

(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2004-532020

(P2004-532020A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/22	C O 7 K 14/52	4 B O 2 4
C O 7 K 14/52	C O 7 K 14/575	4 C O 8 4
C O 7 K 14/575	C O 7 K 14/76	4 H O 4 5
C O 7 K 14/76	C O 7 K 16/18	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 103 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-577856 (P2002-577856)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成14年3月30日 (2002. 3. 30)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ ト ベシユレンクテル ハフトング
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月26日 (2003. 9. 26)		Merck Patent Gesell schaft mit beschræ nkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/009815		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラーセ 250
(87) 国際公開番号	W02002/079232		Frankfurter Str. 25 0, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany
(87) 国際公開日	平成14年10月10日 (2002. 10. 10)	(74) 代理人	100123788
(31) 優先権主張番号	60/280, 625		弁理士 宮崎 昭夫
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001. 3. 30)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 融合タンパク質の免疫原性の低減

(57) 【要約】

免疫原性が低減された融合タンパク質を製造するための組成物および方法を開示する。本発明の融合タンパク質は、接合部エピトープのMHC分子に結合する能力を減少させることによって、T細胞レセプターと相互作用する能力を低減させるアミノ酸変化を有する接合部分を含む。本発明の方法は、T細胞エピトープを識別し、それがT細胞レセプターと相互作用する能力を低減させるように、融合タンパク質の接合部の1個または複数のアミノ酸をアッセイし、変更し、修飾することを含む。本発明の組成物および方法は、治療上有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i . 融合タンパク質の融合接合部にわたる接合領域内で T - 細胞エピトープ候補を識別すること ; および

ii . T - 細胞エピトープ候補が T 細胞レセプターと相互作用する能力を低減するように、接合領域内の、あるアミノ酸を変更することを含む融合タンパク質の免疫原性を低減する方法。

【請求項 2】

請求項 1 の方法によって產生される融合タンパク質。

【請求項 3】

融合タンパク質の融合接合部にわたる接合領域内で T - 細胞エピトープ候補を変更して、T 細胞エピトープ候補が T 細胞レセプターと相互作用する能力を低減することを含み、

i . T - 細胞エピトープである融合タンパク質の免疫原性を低減する方法

【請求項 4】

請求項 3 の方法によって產生される融合タンパク質。

【請求項 5】

融合タンパク質の融合接合部にわたる接合領域内にグリコシル化部位を導入することを含む、融合タンパク質の免疫原性を低減する方法。

【請求項 6】

融合接合部の 10 個のアミノ酸内にグリコシル化部位を導入することを含む、融合タンパク質の免疫原性を低減する方法。

【請求項 7】

融合接合部の 5 個のアミノ酸内にグリコシル化部位を導入することを含む請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

融合接合部の 2 個のアミノ酸内にグリコシル化部位を導入することを含む請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

i . 置換されたアミノ酸を含む接合領域を融合タンパク質に付与するステップ ; および

ii . 前記融合タンパク質を免疫原性アッセイでアッセイするステップ

を含む融合タンパク質の免疫原性を低減する方法。

【請求項 10】

請求項 5、6、7、8 または 9 の方法によって產生される融合タンパク質。

【請求項 11】

グリコシル化が N - 結合グリコシル化である請求項 5 ~ 8 に記載の方法。

【請求項 12】

グリコシル化が O - 結合グリコシル化である請求項 5 ~ 8 に記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質が Ig 領域を含む請求項 2、4 または 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

タンパク質が血清アルブミン領域を含む請求項 2、4 または 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

タンパク質がサイトカイン活性を含む請求項 2、4 または 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

タンパク質がホルモン活性を含む請求項 2、4 または 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

Ig 領域が、複数の抗体アイソタイプの配列を含む請求項 13 に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

第 1 のタンパク質 ; および

10

20

30

40

50

前記第 1 のタンパク質と融合接合部を介して連結され、融合接合部を取り囲む接合領域のアミノ酸配列が、非自己 T 細胞エピトープを除去するように修飾されている第 2 のタンパク質

を含む免疫原性の低減された融合タンパク質。

【請求項 19】

接合領域が 1 個と 25 個の間のアミノ酸を含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 20】

接合領域が 1 個と 15 個の間のアミノ酸を含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 21】

接合領域が 1 個と 9 個の間のアミノ酸を含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 22】

接合領域が N - 結合グリコシル化部位または O - 結合グリコシル化部位を含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 23】

接合領域がスペーサーまたはリンカーを含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

接合領域が A s n - X - S e r / T h r - G l y アミノ酸配列（ここで X は任意のアミノ酸である）を含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

第 1 のタンパク質が I g 分子またはその断片を含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 26】

前記 I g 分子またはその断片の C - 末端が、前記第 2 のタンパク質の N - 末端に結合している請求項 25 に記載の融合タンパク質。

【請求項 27】

接合領域が、L S L S アミノ酸配列の代わりに A T A T アミノ酸配列を有する I g G 配列を含む請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 28】

前記 I g 分子またはその断片が F c 分子を含む請求項 25 に記載の融合タンパク質。

【請求項 29】

前記 I g 分子またはその断片が 2 種の抗体アイソタイプ由来のアミノ酸配列を含む請求項 25 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 30】

前記 I g 分子またはその断片が I g G 1 および I g G 2 のアミノ酸配列を含む請求項 29 に記載の融合タンパク質。

【請求項 31】

第 2 のタンパク質がサイトカイン活性を有する請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 32】

第 2 のタンパク質がホルモン活性を有する請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 33】

第 1 のタンパク質がアルブミンタンパク質である請求項 18 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 34】

i . 接合領域のペプチド中の、あるアミノ酸（ここで該アミノ酸はロイシン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群から選択される）を識別すること；および

i i . ペプチド中の該アミノ酸を変更して、ペプチドが M H C クラス I I に結合する能力を低減すること

を含む融合タンパク質の免疫原性を低減する方法。

【請求項 35】

請求項 34 の方法によって産生される融合タンパク質。

【請求項 36】

50

i . 第 1 のタンパク質 ;

i i . 前記第 1 のタンパク質と融合接合部を介して連結され、融合接合部を取り囲む接合領域のアミノ酸配列が、非自己 T 細胞エピトープを除去するように修飾されている第 2 のタンパク質 ; および

i i i .

を含む免疫原性の低減された融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 37】

接合領域がリンカーを含む請求項 36 に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

(関連出願)

本願は、2001年3月30日に出願された米国仮出願特許出願シリアル番号60/280,625号(その全開示内容は言及によって本願に組込まれる)に基づく優先権およびその利益を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は概括的に言えば、治療剤として免疫原性が低減されているか免疫原性のない修飾された融合タンパク質を製造および使用するための方法および組成物に関する。より具体的には、本発明は、T-細胞エピトープ候補を識別し、そうしたエピトープを除去するようにアミノ酸配列を修正することにより免疫原性を低減した融合タンパク質に関する。

20

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

多くの治療用タンパク質は正常なヒトタンパク質である。例えば、インターロイキン-2、エリスロポエチンおよび成長ホルモンは、すべて、通常これらのタンパク質を既に内成的なレベルで産生しているヒトに与えるヒトタンパク質である。一般に、これらのタンパク質を治療用に用いる場合、完全に正常なヒトタンパク質に対する免疫反応は稀にしか起こらない。

【0004】

30

最近では、人工的な活性を有する多くの融合タンパク質が治療用タンパク質として有用であることが明らかになってきている。例えば、Enbre1は、TNFレセプターの細胞外ドメインとIgG1Fc領域との融合体である。Enbre1は慢性関節リウマチを治療するために使用され、TNFと反応してTNFの作用を妨げることにより機能すると考えられる。しかし、Enbre1で治療された患者に抗Enbre1抗体が顕著に発生することがわかった。

【0005】

治療上有用な融合タンパク質の別の種類の例は、免疫サイトカイン(immunocytokines; 免疫サイトカイン)である。これらのタンパク質は抗体部分とサイトカイン部分を含み、癌細胞などの疾病状態の細胞をサイトカインの標的とするのに有用である。しかし、これらの融合タンパク質の多くの治療目的での使用は、哺乳動物、特にヒトにおいてその免疫原性により制限される。

40

【0006】

したがって、これらのタンパク質を治療に使用するためには免疫原性の低減された融合タンパク質を生成する必要がある。

【0007】

(発明の要約)

本発明は、治療目的で使用される免疫原性の低減された融合タンパク質を産生するのに有用な方法および組成物を特色とする。例えば、本発明は免疫サイトカイン、免疫フュージン(immunofusins; 免疫融合体)、免疫リガンド(immunoligands; 免疫リガンド)、他

50

の抗体およびFc融合タンパク質、サイトカイン-サイトカイン融合タンパク質および免疫原性の低減されたアルブミン融合タンパク質を特色とする。

【0008】

本発明は、部分的には、融合タンパク質が「非自己」である配列を含んでいる点への着目に関する。例えば、2個のヒトのタンパク質どうしの融合体であっても、融合接合部周辺の領域は、通常、人体に存在しないペプチド配列を含む。例えば、Enbrelなどのタンパク質薬剤は、2個の正常なヒトのタンパク質：TNFレセプターとIgG1に由来する。しかし、TNFレセプターとIgG1との間の接合部分は人体内には通常見出されないペプチド配列である。

【0009】

本発明の好ましい方法は、MHC分子に結合する能力(その結合親和性)を減少させることによって、接合部エピトープ(接合部ペプチド)がT細胞レセプターと相互作用する能力を低減させ、これにより融合タンパク質の免疫原性を低減することを含む。本発明によれば、接合部のエピトープまたはペプチドは好ましくは「非自己」である。一般に、治療用タンパク質を含めタンパク質が免疫原となるのは、部分的には、タンパク質が抗原提示細胞によってエンドサイトーシスされてタンパク質分解を受け、生じたペプチドが主要組織適合複合体(MHC)と呼ばれる分子に結合し、これがペプチドをT細胞に提示するためである。抗原提示細胞(APC)表面の抗原ペプチド-MHC複合体は、T細胞を活性化して増殖、分化させ、サイトカインを放出させる。平行してB細胞の分化および抗体産生が誘導され、これらによる除去によりさらに治療用タンパク質の有効性が制限される。したがって抗原ペプチドは治療用タンパク質に由来する場合一連の望ましくない免疫反応を誘導し得る。治療用タンパク質の有効性は抗体による反応により制限され、多くの場合T細胞およびB細胞応答の誘導は患者における炎症性のアレルギー反応のために有害である。

【0010】

本発明は、(1)免疫グロブリン-標的タンパク質接合領域における1個または複数のT-細胞エピトープ候補を有する新規なアミノ酸配列の識別；および(2)接合部配列に由来しT-細胞エピトープとして機能するペプチドの存在を消失させるか低減させるこれらのアミノ酸配列の修飾を提供する。

【0011】

本発明は、免疫原性の低減に係る組成物および方法として2種類の一般的なクラスを提供する。本発明の1つの実施形態によれば、潜在的な非自己T-細胞エピトープは、融合接合部にわたる配列中に識別される。例えば、潜在的な非自己T-細胞エピトープは、MHCクラスII分子に結合するペプチドのモデル化に基づく計算上の方法によって識別される。次いで、接合領域に由来するペプチドのMHCクラスIIへの結合能力が低減または除去されるように置換を行う。MHCクラスIIに結合するペプチドを識別し修飾するこの過程は、「脱-免疫化」と呼ばれ、生じた修飾されたタンパク質分子は「脱-免疫化された」と表現される。

【0012】

本発明の別の実施形態によれば、融合接合部に1個または複数のグリコシル化部位を導入する。O-結合グリコシル化部位も使用できるが、N-結合グリコシル化部位が好適に使用される。好ましい実施形態によれば、野生型の融合接合部を囲む接合領域中のアミノ酸は、N-末端融合パートナーの最後のアミノ酸をアスパラギンに変異させ、第2の融合パートナーの最初の2個のアミノ酸を、グリシン、これに続いてセリンまたはトレオニンとなるように変異させる。

【0013】

本発明によれば、バクテリア中で、または酵母や昆虫細胞など、哺乳類のグリコシル化パターンを生成しない有機体中でタンパク質が産生される状況では、MHCクラスII結合の除去が好ましい。

【0014】

タンパク質が、哺乳類の細胞系で、または哺乳動物に無害のグリコシル化パターンを創製

10

20

30

40

50

する細胞系で産生される場合は、グリコシル化部位の導入が好ましい。

【0015】

好ましい実施形態では、融合タンパク質の構成成分はサイトカインである。「サイトカイン」という用語は、ここでは、そのサイトカインに対するレセプターを有する細胞の特異的反応を誘導する、天然に存在するまたは遺伝子組換えによるタンパク質、それらのアナログおよびそれらの断片について使用する。好ましくは、サイトカインは細胞によって産生され分泌され得るタンパク質である。好ましくは、サイトカインは、インターロイキン-2 (IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16およびIL-18などのインターロイキン、顆粒細胞マクローファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、G-CSF 10 およびエリスロポエチンなどの造血因子、TNFなどの腫瘍壊死因子(TNF)、リンホトキシンなどのリンホカイン、レプチンなどの代謝プロセスの制御因子、インターフェロン、インターフェロン およびインターフェロンなどのインターフェロン並びにケモカインを含む。好ましくは本発明の抗体-サイトカイン融合タンパク質はサイトカイン特異的生物活性を示す。

【0016】

別の好ましい実施形態では融合タンパク質の構成成分は抗肥満サイトカインである。例えば構成成分はレプチン、CNTFまたはAc rp 30の一部である。

【0017】

さらに別の好ましい実施形態では融合タンパク質の構成成分はホルモンである。例えば、構成成分は、インシュリン、成長ホルモンまたはグルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) 20 による。

【0018】

さらに別の実施形態では融合タンパク質の構成成分は生物活性を有するリガンド結合タンパク質である。好ましい実施形態ではTNFレセプターの細胞外領域が用いられる。

【0019】

一連の実施形態によれば本発明の融合タンパク質は抗体部分のC-末端に非抗体部分のN-末端が融合されたものを含む。別の一連の実施形態によれば本発明の融合タンパク質は抗体部分のN-末端に非抗体部分のC-末端が融合されたものを含む。本発明によれば抗体部分は未処置の免疫グロブリンでもよいし未処置の免疫グロブリンの一部でもよい。免疫グロブリンの一部としては可変領域もしくは定常領域またはその両方を含むことができる。好ましい免疫グロブリンは、Fc領域またはその一部を含む。本発明の好ましい実施形態としては免疫原性が低減されおよび/またはより長い血中半減期を有するように修飾されたIgG1免疫グロブリンアイソタイプまたはその一部を含む。例えばCH3-サイトカイン接合部近傍のアミノ酸残基が修飾されたIgG1が好ましい。場合によってはIgG2またはIgG4アイソタイプ由来の抗体部分が好ましい。

【0020】

イムノサイトカインは腫瘍を標的とする融合タンパク質治療の一例にすぎない。腫瘍特異的抗体への融合によって他の腫瘍有毒分子も腫瘍を標的とすることができる。さらに抗体融合タンパク質はウイルスに感染した細胞など他のタイプの疾病細胞を攻撃することができる。標的化融合タンパク質を造り出す別のアプローチは、Fc-XおよびX-Fc (ここでXはポリペプチドである)技術の使用である。これらの技術は、対象とするポリペプチドが免疫グロブリンのFc部分に連結する場合、標的タンパク質の産生と収集が改善されるという知見を利用する。Fc-X融合タンパク質については、シグナルペプチド(その後免疫グロブリン遺伝子のFc断片が続く)が標的タンパク質のN-末端融合パートナーである。いくつかの例ではX-Fcの向きで融合タンパク質を造り出すことが特に有利である。こうした構成体で、標的タンパク質はN末端融合タンパク質であり、Fc断片がこれに続く。リンパ細胞細胞表面糖タンパク質(LHR)(米国特許第5,428,130号)およびグルカゴン様ペプチド(GLP-1)が示されているように、いくつかのタンパク質については、このアプローチは有用である。

10

20

30

40

50

【0021】

従って、本発明の方法および組成物は免疫原性が低減されたFcXおよびX-Fc融合タンパク質の形態を提供する。本発明によれば、融合タンパク質の免疫原性は当技術分野で知られた方法またはここに開示する方法によってアッセイすることができる。

【0022】

本発明の方法および組成物は、さらに免疫原性の低減されたアルブミン融合タンパク質を提供する。ヒト血清アルブミン(HSA)は、その半減期が著しく長く、生体内に広く分配され、酵素機能や免疫学機能を有しないことから、治療用ペプチド/タンパク質のためにキャリアーとして使用されてきた(Yehら、PNAS 89:1904-1908, 1992)。生体活性ペプチドのHSAへの遺伝的融合は、分泌された治療用HSA誘導体の回復に有用である。しかし、本発明によれば、HSA-CD4などのアルブミン融合タンパク質は、MHCクラスI分子上で提示され得る1個または複数のT-細胞エピトープを一般に含む、新規な接合部を有する。本発明は、アルブミン融合タンパク質の免疫原性の低減された形態、およびアルブミン融合タンパク質の免疫原性を低減する一般的な方法を提供する。本発明によれば、有用なアルブミンタンパク質は、アルブミンの種、対立形質および変異された変異体、並びにそれらの断片を含む。好ましいアルブミンタンパク質は、HSAなどの野生型アルブミンタンパク質の構造と機能的な特性を保持する。

10

【0023】

別の態様では、本発明は、有用な変異を含む正常なまたは変異またはハイブリッド化されたアイソタイプを備えた脱-免疫化抗体融合タンパク質を提供する。これらの変異は、接合部近傍でもよいしまたは接合領域とは別の位置でもよい。

20

【0024】

例えば、本発明は、IgGと非IgG部分との間の接合部に点変異を含む、接合部で修飾された脱-免疫イムノサイトカインを提供する。サイトカイン部分はいかなるサイトカインも含むが、好ましくはIL-2またはIL-12である。1つの実施形態では、アミノ酸変更は、抗体部分のC-末端リジンアラニンまたはロイシンなどの疎水性アミノ酸に変更することを含む。こうした変異を本発明の脱-免疫化修飾と組み合わせることの重要な利点は、変異が、血中半減期の増加と免疫原性の低減とともに作用するという点である。ここに記載する、融合接合部の脱免疫を血中半減期を変える変異と組み合わせる方法は、これらの融合タンパク質の臨床での効能を著しく改善するのに有用である。

30

【0025】

別の態様では、本発明は、異なるIgアイソタイプ(好ましくは、IgG1およびIgG2アイソタイプの両方)に由来するドメインを含むハイブリッド抗体部分と融合接合部での脱-免疫化修飾とを含むイムノサイトカインを提供する。例えば、本発明は、IgG2およびIgG2h(ヒンジ領域をIgG1に修飾したIgG2)ハイブリッドを使用した、脱-免疫化、接合部修飾イムノサイトカインを提供する。好ましい実施形態では、ハイブリッド融合タンパク質は、IgG(1:CH1-H)(2:CH2-CH3)からなる脱-免疫化免疫グロブリン部分とサイトカイン部分からなる。

【0026】

別の態様では、本発明は、免疫原性の低減された融合タンパク質をコードするか、免疫原性の低減された融合タンパク質の発現、産生および分泌を促進する新規な核酸配列を提供する。このような核酸は標準的な組換えDNA技術によって生成される。

40

【0027】

好ましい実施形態において、核酸分子はイムノサイトカイン融合タンパク質をコードする。好ましいイムノサイトカインは、サイトカイン(例えばインターロイキン2)、およびヒト上皮細胞接着分子KSA(EP-CAM)(hUKS)に対する抗体などの腫瘍特異的モノクローナル抗体を含む。

【0028】

別の好ましい実施形態では、核酸分子は様々な配置においてFc融合タンパク質をコードする。核酸分子は、5'から3'の方向に連続的にコードする、(i)シグナル配列、免疫

50

グロブリンFc領域そして標的タンパク質配列、または(ii)シグナル配列、標的タンパク質そして免疫グロブリンFc領域、または(iii)シグナル配列、第1の標的タンパク質、免疫グロブリンFc領域そして第2の標的タンパク質。生じる核酸分子は、これにより、Fc-X、X-FcまたはX-Fc-Y構造(ここで、XとYは標的タンパク質である)をコードする。別の実施形態では、核酸はシグナル配列を有しないFc-X、X-FcまたはX-Fc-Yタンパク質をコードする。

【0029】

別の好ましい実施形態では、本発明の核酸は変異体またはハイブリッドのアイソタイプとのIg融合タンパク質をコードする。特に、核酸は、ハイブリッドのアイソタイプあるいは変更されたヒンジ領域を備えた抗体部分を提供する。例えば、融合タンパク質は、ヒンジ領域に含まれるジスルフィド結合が少なくなるように修飾されたIgG2またはヒンジ領域が別の抗体(好ましくは正常もしくは変異体IgG1ヒンジ領域)に由来するIgG2CH2およびCH3領域からなる。

10

【0030】

好ましくは、本発明の核酸は、作用可能な結合状態で複製可能な発現ベクター中に組み込み、次いでこの発現ベクターは融合タンパク質を産生するのに能力を有する哺乳類宿主細胞に導入する。生じる融合タンパク質は効率的に産生され、哺乳類の宿主細胞から分泌される。続いて分泌された融合タンパク質を哺乳類の宿主細胞を溶解せずに培養培地から回収する。タンパク質製品は必要に応じて慣用の試薬を使用して、活性アッセイおよび/または精製し、かつ/または、融合パートナーから開裂させる。これらはすべて慣用の技術を使用できる。

20

【0031】

したがって、本発明はさらに免疫原性の低減された融合タンパク質を産生する方法を提供する。

【0032】

さらに、本発明の方法および組成物は、免疫原性の低減された融合タンパク質を使用して、治療処置を提供するのに有用である。本発明の全体的な目的は、有効かつ廉価である方法とともに免疫原性の低減されたタンパク質を提供する。本発明の好ましい治療用組成物は治療上有効な量の脱-免疫化融合タンパク質を含む。好ましくは、脱-免疫化された融合タンパク質は、薬学的に許容できる担体とともに投与される。

30

【0033】

これまでに述べてきた、また他の本発明の態様、特徴および利点は、以下に続く詳細な記述、図面および特許請求の範囲からより明白になるであろう。

【0034】

(発明の詳細な説明)

治療用途での使用のために患者に投与される、抗体を含むタンパク質はすべて、レシピエントホストにおいて免疫反応を引き起こす可能性を有する。この免疫反応は、Tリンパ球(T細胞)によって仲介されるが、これは、次いで、Bリンパ細胞(B細胞)を起動して抗体を産生させる。治療剤に対する抗体産生は、治療剤のより多くの迅速な除去に結びつき、アレルギー反応を引き起こすおそれがあるため不利益である。

40

【0035】

本発明は、融合タンパク質の免疫原性を低減する方法を提供する。本発明の1つの方法によれば、潜在的なT-細胞エピトープは、融合タンパク質の融合接合部の接合領域中で識別される。T-細胞エピトープは、コンピュータモデリングによる構造に基づく予測やペプチド合成、特異的MHCクラスII分子への結合試験、または免疫原性アッセイを含む、種々の計算的および非計算的(コンピュータを用いたおよび非コンピュータ的な)方法により識別される。

【0036】

本発明によると、融合接合部は、融合タンパク質において、第1のタンパク質またはペプチドの最後(C-末端)のアミノ酸と、第2のタンパク質またはペプチドの最初(N-末端)

50

のアミノ酸との間の位置として定義される。したがって、融合接合部は、1つのタンパク質の最後のアミノ酸と第2のタンパク質の最初の任意のアミノ酸を含む。1つの実施形態では融合接合部はリンカーを含む。

【0037】

本発明によれば、接合領域は2つのタンパク質間の融合接合部を囲むかその範囲にわたる融合タンパク質の領域である。接合領域は、好ましくは1と約100個の間のアミノ酸、より好ましくは1と約50個の間のアミノ酸、または1と約25個の間のアミノ酸、さらに好ましくは1と約15個の間のアミノ酸、または1と9個の間のアミノ酸を含む。1つの実施形態では、接合領域は2つのタンパク質間の接合ポイントに挿入されたスペーサーまたはリンカーペプチドを含む。本発明によれば、スペーサーまたはリンカーペプチドを含む接合領域も、スペーサーまたはリンカーを含む融合タンパク質に対する患者の反応を最小限にするために脱-免疫化することができる。

10

【0038】

本発明によれば、接合部のT-細胞エピトープは、少なくとも2つの異なる融合パートナータンパク質の各々に由来する少なくとも1つのアミノ酸を含む、MHCクラスIIを結合可能なペプチド配列として定義される。例えば、Paul (Fundamental Immunology、第4版[2000]、p.276、8章、表8)は、MHCクラスII分子に結合することができる10個のアミノ酸のセグメントを例として挙げている。接合部のT-細胞エピトープにおいて、これらの10個のアミノ酸ペプチドは異なる融合パートナーに由来する。本発明によれば、融合接合部にわたる潜在的なすなわち候補となるT-細胞エピトープ(候補となる接合部T-細胞エピトープ)は、好ましくは接合部の一方の側から1~8個のアミノ酸、より好ましくは接合部の一方の側から1~10個または1~11個のアミノ酸を含む。候補エピトープは好ましくは9個、11個または12個のアミノ酸長である。したがって、本発明の接合部T-細胞エピトープは、接合の各側に由来する少なくとも1個のアミノ酸を含むため、好ましい候補T-細胞エピトープは、結合の一方の側に由来する1~8個(または1~10個もしくは11個)のアミノ酸を含んでおり、さらに9~12個のアミノ酸(最も好ましくは9個のアミノ酸)を有するエピトープとなるように、これを補足する数のアミノ酸を接合の他方の側から含む接合部エピトープである。

20

【0039】

本発明によれば、次いで、接合部のT-細胞エピトープ内のアンカー残基を変異させて、MHCクラスII分子への結合を防ぐ。一般に、追加的な潜在的なT-細胞エピトープを導入しないように、かつ各融合パートナーの機能を保存するように注意する。

30

【0040】

本発明によれば、野生型の配列の融合は、融合接合部のN-末端またはC-末端における配列が天然に存在する配列に直接由来する融合である。

【0041】

本発明によれば、脱-免疫化された融合接合部は、野生型配列の接合に対して1個または複数の置換変異が導入された接合部配列である。最も好ましい実施形態では、融合接合部の脱免疫化は、「免疫原性でない」Gly-Serリンカーなどのリンカーの導入を含まず、融合パートナーの空間的關係は脱-免疫化された融合タンパク質において変更されない。本発明によれば、1個または複数のアミノ酸は、接合領域中、融合接合部に対するN-末端、融合接合部に対するC-末端、融合接合部に対するN-末端とC-末端の両方のいずれでも置換または変更することができる。

40

【0042】

本発明によれば、潜在的なT-細胞エピトープは、単離されたペプチドと見なしたとき、MHCクラスII分子または非ヒト種における等価物に結合すると予測される配列である。潜在的なT-細胞エピトープは、抗原提示細胞にタンパク質が取り込まれる効率、完全なタンパク質中の複数部位で分裂してMHCクラスIIに結合可能なペプチドを生成する効率など、抗原処理の他の面を考察することなく定義される。したがって、動物にタンパク質を投与した後、MHCクラスII上に現実に提示されるT-細胞エピトープの集合は

50

、潜在的な T - 細胞エピトープの部分集合である。

【0043】

本発明によれば、T - 細胞エピトープは MHC クラス II 分子と相互作用するタンパク質上のエピトープである。特定の理論に拘束されるものではないが、T - 細胞エピトープはタンパク質または融合タンパク質中のアミノ酸配列であって、T 細胞の成育発展の間に否定的な T 細胞選別過程を経ることなく、したがって MHC クラス II 分子によって提示され、T 細胞レセプターによって認識されると予想される配列であると理解される。本発明の好ましい実施形態では、非自己 T - 細胞エピトープは、融合タンパク質を形成する 2 つのタンパク質の融合接合部において接合領域中に存在する。

【0044】

本発明は、精巧なコンピュータシミュレーションまたはタンパク質三次元構造を必要とせず、融合タンパク質結合中の T - 細胞エピトープの数を低減するか除去する非コンピュータ的方法を提供する。1 つの実施形態では、本発明の方法は、9 個のアミノ酸のコアセグメントが抗原提示の間、T 細胞レセプターとも MHC クラス II 分子ともその両方に相互作用するという事実を利用する。N - 末端の多くのアミノ酸は「アンカー」位置残基と呼ばれ、MHC クラス II 分子内の深いポケットに結合する。MHC クラス II 分子に結合する上で重要なアンカー位置には、典型的には以下のアミノ酸のうちの 1 つが存在する：ロイシン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン。本発明によれば、コアの 9 個のアミノ酸に隣接するさらに 2 ~ 3 個のアミノ酸も MHC 分子との相互作用に影響する。さらに、融合タンパク質の第 1 のタンパク質中の C - 末端の多くのアミノ酸が一般に置換できる。これは特に、N - 末端融合パートナーまたは第 1 のタンパク質が、C - 末端融合パートナーまたは第 2 のタンパク質の C - 末端に融合されたときに活性であるとわかっている場合、有用である。

【0045】

本発明の一般的な方法は、融合タンパク質中の N - 末端融合パートナーの最も C - 末端側 (C-terminal most) の 8 アミノ酸に存在するいかなるロイシン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンを変異させることを含む。1 つの実施形態では、候補となる接合部の T - 細胞エピトープアミノ酸中のこれらの 1 個または複数のアミノ酸を、優先的にトレオニン、アラニンまたはプロリンに変異させる。これは、交換されたアミノ酸の疎水性の性質を幾分か保持する。本発明の別の実施形態では、1 個または複数の前述のアミノ酸が、候補となるすなわち潜在的な接合部 T - 細胞エピトープから除去するか、または適当なアミノ酸類似体に置換する。本発明によれば、潜在的な T - 細胞エピトープを破壊するためアミノ酸を除去する場合、除去部近くのアミノ酸を含む新たな T - 細胞エピトープを生成しないように注意する。

【0046】

本発明によれば、最後の 8 個のアミノ酸に 1 個または複数の疎水性残基の変異を含む N 末端融合パートナーをコードする配列を含む一般化された発現プラスミド構築中間体を構築することが、多くの場合有用である。一般に、このようなプラスミドは、N 末端融合パートナーの C - 末端をコードする DNA 部またはその近傍に、1 個または複数の便利な制限酵素サイトを有する。

【0047】

中間プラスミド構築の目的は、融合タンパク質(ここで、1 個または複数の N - 末端融合パートナーは、8 個の C - 末端アミノ酸において、ロイシン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンの 1 個または複数個を別のアミノ酸とする置換を有する)をコードする発現プラスミドを構築することである。このような最終発現プラスミドの構築は、当業者にはよく知られた他の方法、例えば、PCR 断片または合成核酸の生成後、断片を適当なベクターにライゲートするか、よく知られた PCR 技術によって他の配列に結合させて行ってもよい。

【0048】

特に好ましい実施形態は、Fc - X 融合プラスミド、アルブミン - X 融合プラスミド、s

10

20

30

40

50

c F v - X 融合プラスミドおよび F a b - X 融合プラスミドを含む。F c (ガンマ) - X の場合、I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 分子の F c 領域の C - 末端の近くにロイシン - セリン - ロイシン - セリンセグメントのアミノ酸置換をもたらすようにコード配列中に変異を導入することが有用である(ここでは I g G 1 について図解する)。I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 に由来するヒト F c 領域のアミノ酸配列を配列番号：1、2、3 および 4 にそれぞれ示す。

【0049】

一例として、K S L S L S P G K (配列番号：5) を K S A T A T P G K (配列番号：6) に変更する。この変異は、潜在的な接合部 T - 細胞エピトープを除去し、また、上流のフェニルアラニンまたはチロシンが位置 1 アンカー残基として機能する T - 細胞エピトープを除去するべく設計されている。

10

【0050】

あるいは、候補となる接合部 T - 細胞エピトープを除去する変異を血中半減期を延長する変異と組み合わせることが時として有用である。例えば、K S L S L S P G K (配列番号：5) を K S A T A T P G A (配列番号：7) に変更することによる。

【0051】

他の実施形態は、L S L S セグメント中でのグリシンまたはプロリンなど他のアミノ酸への置換を含む。

【0052】

I g A 融合タンパク質を作製するために使用する発現ベクターの場合には、C - 末端アミノ酸のうちの一つかを除去し、その結果、I g A のオリゴマー化に関する C 末端近くのシステインが除去されるようにすることが有用である。例えば、第 2 のタンパク質に融合される前に、I g A 重鎖配列がプロリン - トレオニン - ヒスチジンで終わるように 15 個のアミノ酸を除去することができる。さらに、I g A F c 領域の C H 3 ドメインの C - 末端近くに以下の変異を導入することが有用である：

20

Q K T I D R L A G K P T H (配列番号：8) を Q K T A D R T A G K P T H (配列番号：9) に変更。

【0053】

I g A - X 融合タンパク質中のさらなる脱 - 免疫化配列は以下のものである。

【0054】

30

【化 1】

QKTPTRTAGKPTH (配列番号：10)

QKTPTRPAGKPTH (配列番号：11)

QKTATRPAGKPTH (配列番号：12)

【0055】

アルブミン - X 融合の場合には、アルブミン - X 発現プラスミドに次の変化を導入してアルブミンの C - 末端タンパク質を以下のように修飾することが有用である：

K K L V A A S Q A A L G L (配列番号：13) を K K L V A A S Q A A T T A (配列番号：14) に変更。

40

【0056】

したがって、本発明は免疫原の低減された融合タンパク質の構築において有用な核酸配列およびタンパク質を提供する。特に、本発明は、最後の 8 個のアミノ酸中の任意のロイシン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンの変異を有するタンパク質を提供する。タンパク質は好ましくは人体中に見出される配列に概ね相当する配列を有するヒトタンパク質である。本発明はこのようなタンパク質をコードする核酸配列も提供する。本発明のこの態様について核酸配列はプラスミド、PCR - 生成断片、または化学合成によって生成された核酸として存在してもよい。

【0057】

50

本発明はまた、1個または複数のN-末端融合パートナーが、8個のC-末端のアミノ酸中、ロイシン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンを別のアミノ酸とする1個または複数の変異を有する融合タンパク質をコードする発現プラスミドを提供する。

【0058】

例えば、Fc領域が上記のように変異されているFc-IL2または全抗体-IL2融合タンパク質をコードするプラスミドが、本発明によって提供される。さらに、WO01/36489に記載されているエリスロポエチンの形態などのエリスロポエチンの正常な形態または変異された形態に上記のように変異されたFc領域を含む融合体が、本発明によって提供される。

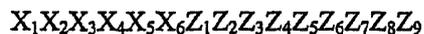
10

【0059】

本発明は、さらにN-結合またはO-結合グリコシル化部位を、融合接合部近傍、好ましくは融合接合部に導入することにより、融合タンパク質結合の免疫原性を低減する方法を提供する。例えば、アスパラギン、セリンまたはトレオニンといったアミノ酸、および第3の残基を以下のように導入する。XがN-末端融合パートナーのアミノ酸を表わす配列であり、ZがC-末端融合パートナーのアミノ酸を表わす配列を考えられたい：

【0060】

【化2】



20

【0061】

この方法によれば、結合ペプチドの接合はグリコシル化部位の導入によって必ずしも阻まれない。しかし、MHCクラスII溝内に結合し、N-末端最端アンカー残基に対してグリコシル化したアスパラギンC-末端を有する任意のペプチドは、T-細胞エピトープとして機能しない。大きなグリコシル化部分の存在は、立体的にMHCクラスII/ペプチド複合体の認識を妨害するであろう。好ましいグリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thr(ここでXは好ましくはGlyであるが、任意のアミノ酸であり得る)を含む。

30

【0062】

さらに、グリシンおよびセリン残基を導入する変異の導入は新しいT-細胞エピトープを生成しない。グリシンもセリンもアンカー残基の役割を果たすことができない。抗原処理において、融合タンパク質は原則としてはグリコシル化したアスパラギンとグリシンの間、またはグリシンとセリンの間で開裂される。いずれの場合も、生じるペプチドはアンカー残基に対し変異体グリシンおよび/またはセリン残基N-末端を有し、したがって変異体グリシンおよび/またはセリン残基は、T細胞レセプターによって認識されない。アンカー残基に対する残基N-末端はTCRによって認識される領域の外部にあるためである。

【0063】

この方法の変形では、融合接合領域は、グリシン、セリン、アラニンなどのアミノ酸残基が先行するセリンまたはトレオニンを既を含む。接合領域が柔軟で各融合パートナーの疎水性コアから変位する場合、好ましくは第2の方法が使用され、その結果、新規なN-結合グリコシル化はいずれの融合パートナーの機能やフォールディングとも干渉しない。

40

【0064】

タンパク質工学の技術における当業者にとって、グリコシル化部位の導入がどのような場合に実現可能かを決めるのは単純明快な問題である。例えば、各融合パートナーの三次元構造、または融合パートナーに近似した同族体が知られていることもある。タンパク質のN-末端またはC-末端に少数のアミノ酸がX線構造解析で解決されなかったり、NM

50

いずれかの側で3個またはそれ以上のアミノ酸が乱される場合、生じる融合タンパク質が正確に折り畳まれ、両方のパートナーが活性になる確信がある。所与の融合タンパク質が機能的であるかどうか決定するには、ある種の定型的実験が必要である。

【0065】

本発明の好ましい実施形態では、融合タンパク質のN-末端およびC-末端パートナーの両方が、ヒトのタンパク質である。このような融合タンパク質中での潜在的なT-細胞エピトープは、C-末端パートナー(第2のタンパク質)の最初の8個のアミノ酸と結合した、N-末端パートナー(第1のタンパク質)の最終の8個のアミノ酸から創製される。これは、第1と第2のタンパク質から創製された一連の8個の9-merハイブリッドを提供する。第1のタンパク質の最後の8個のアミノ酸に脂肪族または芳香族性のいずれかの残基(ロイシン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはチロシン)が含まれる場合、第1の位置(アンカー位置)にMHC分子のポケットを結合するアミノ酸を伴うMHC結合ペプチドを生成する危険が高い。したがって、前述のアミノ酸のうちのいずれかの置換は前述のアミノ酸のうちの1つでないアミノ酸、好ましくはアラニン、プロリンまたはトレオニンで行い、候補T-細胞エピトープを除去することになる。

10

【0066】

例えば、以下の配列：

【0067】

【化3】

HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGS(配列番号：15)

20

【0068】

を含むFc融合タンパク質の場合には、ロイシン残基は2つの潜在的なエピトープを生成する。したがって、配列はLをAに、およびSをTに変更し

【0069】

【化4】

HNHYTQKSATATPGKGGGGSGGGSGGGGS(配列番号：16)

【0070】

として脱-免疫化することができる。これらの変更は、MHC結合ポケット中の第1のアミノ酸としてロイシンを、MHC結合ポケット中の第1のアミノ酸としてチロシンをそれぞれ有するエピトープを除去する。

30

【0071】

これらの置換は、人体においてすべてのFc融合タンパク質を脱-免疫化するため、リンカー配列を伴う場合も伴わない場合も、好ましくは1)融合タンパク質における両方のタンパク質が、ヒトのタンパク質である場合；2)両方のタンパク質の天然配列でのMHC結合ペプチドは無視される場合；および3)本来の配列と同一の9-merも無視される場合に機能する。

【0072】

本発明の方法は、一般にすべての脊椎動物において、好ましくは哺乳動物において、また、最も好ましくはヒトにおいて適用可能である。以下の実施例によって本発明をさらに説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

40

【実施例】

【0073】

実施例1：HuKS-IL2免疫サイトカインの免疫原反応性エピトープの除去
HuKS-IL2は、ヒト化されたV_HおよびV_L領域をヒトのHおよびL鎖定常領域と組み合わせる。H鎖は、前に述べたようにそのカルボキシル末端をヒトIL-2の成熟配列に融合した。このH鎖は1アイソタイプであり、Fcレセプターに高い親和性がある。この高い親和性のためHuKS-IL2は血液循環からすばやく取り除かれた。特定

50

の理論に拘束されるものではないが、h u K S - I L 2 の除去は肝臓(クッパー(Kupffer)細胞)および脾臓(抗原提示細胞)中の F c R 担持細胞を介して生じると推測される。

【 0 0 7 4 】

ある患者が h u K S - I L 2 分子のある部分に対し免疫反応を示すことが以前に確認されている。しかしこれらの抗体によって認識されたエピトープは知られていない。反応的なエピトープを低減するために、h u K S - I L 2 を有する患者の血清の相対的な活性を他の関連するタンパク質と比較した：

- (1) H u 1 4 . 1 8 - I L 2、完全に異なるヒト化された V 領域を備えているが正確に同じ C 領域および I L - 2 との融合接合部を有する分子；
- (2) V H 1、ヒト残基に張り合わせされた(veneered)、表面露出マウス B 細胞エピトープを備えたマウス V 領域に由来する、V_Hおよび V_Lの領域中に T - 細胞エピトープを含まない h u K S - I L 2 の脱 - 免疫形；
- (3) V H 2、ヒト残基に張り合わせされた(veneered)、表面露出マウス B 細胞エピトープを備えたマウス V 領域に由来する、C D R 3 中に 1 個の残存 T - 細胞エピトープを含む h u K S - I L 2 の脱 - 免疫形で、この V_Hは 1 個の T - 細胞エピトープを含む；
- (4) K O L または E U C 1 領域(K S ではなく)のいずれかで構築された 4 2 5 - I L 2 (アロタイプの活性と比較するため)；
- (5) h u K S - m I L 2 -、マウス C 領域およびマウス I L - 2 に融合した h u K S V 領域を備えた分子；
- (6) ヒト F c - I L 2 ；
- (7) ヒト F c のみ；
- (8) ヒト I L - 2 のみ。

10

20

【 0 0 7 5 】

免疫グロブリン融合タンパク質および断片をタンパク質 A セファロースクロマトグラフィーによって精製し、重炭酸ソーダバッファー中 9 6 - ウエルプレートに塗り、次いで、1 % B S A を含有する 1 % ヤギ血清でブロックした。患者血清の稀釈液をインキュベートし、次いで、結合しない物質を P B S - T w e e n で 3 回洗浄して除去した。患者血清から得た結合したヒト抗体を、結合タンパク質に依存する様々な H R P 複合抗体(HRP-conjugated antibodies)で検知した。一般に、ヤギ抗ヒト 鎖 H R P を使用した。プレートに結合されたタンパク質のほとんどがヒト F c およびヒト 鎖からなっていたためである。

30

【 0 0 7 6 】

ある患者血清は、同じ患者からの注入前血清においては検知されなかった h u K S - I L 2 に明瞭な反応を示した。免疫前(preimmune)抗血清はベースライン(基線)となる非免疫対照を確立するために使用した。患者血清で見られた反応は、(1)抗 I L 2 反応、(2)抗 F c (アロタイプック)反応、(3)新規な接合配列に対する反応または(4)K S イディオタイプとの抗イディオタイプ、またはこれらの反応の組合せによるものとすることができる。

【 0 0 7 7 】

患者血清は、組換え I L - 2 や F c 領域(上記 1 および 2)とは顕著には反応しなかった。何人かの患者は K S V 領域に抗イディオタイプ反応を示した。患者血清はすべて、F c - I L 2 とは反応を示した。4 人の患者のうち 3 人は F c - I L 2 と反応を示した。F c - I L 2 に対するが、F c または I L 2 のいずれかに対するものではない反応の存在は、F c と I L 2 の間の結合が患者の抗血清によって認識されたことを示唆している。

40

【 0 0 7 8 】

実施例 2：M H C クラス I I の除去によって免疫原性を低減するための抗体 - サイトカイン融合タンパク質の接合部におけるアミノ酸残基の修飾

ペプチドスレッディング分析により、強い M H C 可能性を有する 2 個の重複するペプチドセグメントが、イムノサイトカインの F c と I L 2 部分の間の接合部に識別された。潜在的な T - 細胞エピトープのペプチドスレッディングおよび識別は、C a r r (W O O 0 / 3 4 3 1 7)に開示されるように実行した。アミノ酸の変更は、既存の潜在的な M H C クラス I I 結合エピトープを除去するが、新たな潜在的な M H C クラス I I エピトープを導

50

入しないように行われた。

【0079】

接合部配列 L S L S P G K - A P (配列番号：17)の A T A T P G A - A P (配列番号：18)への修飾(「L S L S から A T A T へ」)(ここで、ハイフンはイムノサイトカイン h u K S - I L 2 接合部である)は、接合部由来ペプチド配列を、免疫原性にもたらずのに十分に高い親和性をもって任意のヒトの M H C クラス I I に結合できないようにする。

【0080】

実施例3：免疫原性を低減するためのサイトカイン融合タンパク質の接合部におけるアミノ酸残基の修飾

接合部配列 L S L S P G K - A P (配列番号：17)の L N L S P G A - A P (配列番号：19)への修飾(「L S L S から L N L S へ」)(ここで、ハイフンはイムノサイトカイン h u K S - I L 2 接合部である)によっても、接合部由来ペプチド配列はある種のヒトの M H C クラス I I には結合可能である。しかし、K S - I L 2 タンパク質が哺乳類細胞中で発現され分泌される場合、タンパク質は、N X S / T 配列であるため接合部近傍で N - グリコシル化される。

【0081】

生じる接合部由来ペプチドは、接合部由来ペプチドが M H C クラス I I によって T 細胞に提示されたとき、大きなグリコシル化部分が T 細胞レセプターと M H C クラス I I の間の特異的ドッキングを妨げるため、T - 細胞エピトープのように有効ではない。

【0082】

実施例4：脱 - 免疫化された h u K S - I L 2 イムノサイトカインとの比較におけるイムノサイトカイン h u K s - I L 2 への抗原提示細胞の免疫反応性の同定
反応性エピトープの修飾による免疫原性の低減を、L S L S を A T A T に変化させることにより以下のように直接試験する。この配列を模倣する合成ペプチドは、樹状細胞(D C)などの古典的抗原提示細胞の免疫反応を変更する。以下の合成ペプチド：

【0083】

【化5】

KSLSLSPGK-APTS (配列番号：20) および

KSATATPGK-APTS (配列番号：21)

【0084】

(ここで、ハイフンが K S - I L 2 結合である)は、自己 T 細胞への D C - 仲介抗原提示を刺激するために使用される。続いて行うペプチド抗原による挑戦に対する反応においてこれらの T 細胞が示す増殖能力は、そうしたペプチドの免疫原性の基準として有用である。

【0085】

特に、標準の密度勾配技術によりリユーコパック(leukopack)から末梢血単核細胞(P B M C)を分離する。単核細胞を血清を含まない A i m V 培養培地中に再懸濁させ、付着させる。37 で2時間後、付着していない細胞を除去する。付着細胞は、未成熟樹状細胞(D C)を誘導するためにヒト G M - C S F (50 ng/ml)および I L - 4 (20 ng/ml)を含む培地中で7日間培養する。7日後に細胞を収穫し、適当な F I T C ラベルが付けられた M H C クラス I、M H C クラス I I、C D 8 0 および C D 4 0 に対する A b s を用いてフローサイトメトリーを行って発現型を同定し、未熟な D C を確認した。

【0086】

付着していない細胞は、I L 2 および I L 7 とともに培養し、後の機能的な研究で用いる自己由来のエフェクター細胞(T細胞)を得る。機能的な研究では、T細胞を未熟な樹状細胞に加え(比率10：1)、h u K S、脱 - 免疫化 h u K S、ペプチド接合部 1 3 m e r (K S L S L S P G K - A P T S) (配列番号：20)および修飾され、脱 - 免疫化された 1 3 m e r ペプチド(K S A T A T P G K - A P T S) (配列番号：21)とともに共培養する。イムノサイトカインまたは免疫原性ペプチドおよび修飾され、脱 - 免疫化されたペプチドの各々に暴露した後、トリチウムを含むチミジンを組み入れることにより測定した増殖

10

20

30

40

50

指数を比較して、各分子の免疫原性の程度を示す。すなわち、放射性の組込みの増加は、各ペプチドがDC上のMHCクラスII分子に結合してT細胞に提示される能力にほぼ比例する。

【0087】

実施例5：アルブミン融合タンパク質中に見出される免疫原性反応性エピトープの除去および免疫原性を低減するための融合接合部におけるアミノ酸残基の修飾

ヒト血清アルブミン(HSA)は、その著しい半減期の長さのため、生体内で広く分配されるとともに酵素的または免疫学的機能が欠如していることから、治療用のペプチド/タンパク質用の担体として用いられてきた。遺伝子的に操作されたHSA-CD4ハイブリッドは、生体外で可溶性CD4に似た抗ウイルス性を示すと同時にCD4+細胞中へのヒト免疫不全ウイルスの侵入を阻むことが示されている(Yehら、PNAS 89:1904-1908、1992年)。したがって、HSAに生体に影響するペプチドを遺伝的に融合することは、分泌される治療用HSA誘導体を設計および回復に有用である。しかし、すべての融合タンパク質と同様に、HSA-CD4は新規な接合部を有し、これは免疫原になり得るとともに、MHCクラスII分子上で提示され得るT-細胞エピトープを含む。実施例1、2、3および4の方法を使用したHSAとCD4との間の接合部の分析はペプチドを、MHCと結合する可能性を識別する。潜在的に免疫原性の配列は、潜在的なTおよびB細胞エピトープを減少または除去させて免疫原性を低減するために修飾される。同様に、免疫原性を低減するために新規なグリコシル化部位を接合領域に導入することができる。

10

【0088】

【化6】

アルブミン配列

CD4配列

TCFABEGKKLVAAASQAALGL-KKVVVLGKKGDTVELTCTAS (配列番号：

22)

20

【0089】

本発明では、HSA-IFN α 融合タンパク質接合領域が3つの候補T-細胞エピトープ：

【0090】

【化7】

KKLVAAASQAALGL (配列番号：13)

KLVAASQAALGLC (配列番号：23)および

LGLCDLPQTHSLG (配列番号：24)

【0091】

を含むことが想定される。

【0092】

配列番号13と23で描かれるT-細胞エピトープは重複し、LV(太字)をF、I、L、M、V、WおよびY以外の任意のものに変更することにより脱-免疫化することができる。あるいは、ペプチドスレッディングスコアは、LGをTTに変更することにより著しく低減することができる。配列番号：24中のT-細胞エピトープは、2番目のL(太字)をAに変更することにより脱-免疫化することができる。

40

【0093】

さらに、HSA-X融合(ここでXは任意のタンパク質でよい)の場合、融合接合部の脱-免疫化は、アミノ酸配列AALGL(配列番号：25)をTATTA(配列番号：26)に変更することにより実現できる。

【0094】

【化8】

50

CFAEEGKKLVAASQTATTA (配列番号：27)

【0095】

実施例6：X-Fc融合タンパク質および免疫原性を低減するための融合接合部のアミノ酸残基の修飾

いくつかの例では、X-Fcの向きの融合タンパク質を創出するのが有利である。これらの構成体により、標的タンパク質はN-末端融合タンパク質であり、Fc断片が続く。例えば、グルカゴン様ペプチド(GLP-1)は、その活性のために遊離N-末端が必要であり、したがって、GLP-1-Fc融合体が有用である。

【0096】

GLP-1-Fc融合タンパク質は、当技術分野の文献に記載された標準的技術によって構築される。この融合タンパク質は、1重鎖のヒンジと接合したGLP-1のC-末端を有する。CysからSer(残基5)への変異体(これは、IgG1の軽鎖とのジスルフィド結合を形成するCys残基を除去する)を含む1ヒンジ配列(Loら(1998)Protein Engineering 11:495-500)が使用される。非変異Fc配列は、

【0097】

【化9】

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG (配列番号：28)

【0098】

であり、下線部がヒンジ領域で、この後にCH2領域配列の開始点が続く。

【0099】

GLP-1(7-37)と変異体Fc間の融合接合部は次の通りである：

【0100】

【化10】

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLG (配列番号：29)

【0101】

GLP-1(7-37)間と正常Fcの融合接合部は次の通りである：

【0102】

【化11】

SYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG (配列番号：

30)

【0103】

3個の潜在のエピトープがGLP-1-Fc融合接合部におけるペプチドスレッディングにより識別される。

【0104】

【化12】

KEFIAWLVKGRGE (配列番号：31)

EKFIWLVKGRGEP (配列番号：32)

AWLVKGRGEPKSS (配列番号：33)

【0105】

実施例1~3と同様に行ったGLP-1(太字テキスト)とFc(通常テキスト)の間の融合接合部の分析により、MHC結合性を有するペプチドが識別される。ペプチドスレッディング分析によって潜在的なサイトを識別した後、潜在的に免疫原性の配列をアミノ酸置換により修飾し、潜在的なT細胞およびB細胞結合エピトープを低減または除去して免疫原

10

20

30

40

50

性を低減する。

【0106】

配列番号：31、32および33で示される前記の潜在的T-細胞エピトープは単一のアミノ酸置換をなすことにより脱-免疫化される。例えば、配列番号：31で示されるペプチドはリジン(太字で示す)をトレオニンにおよびアルギニン(太字で示す)をトレオニンに変更することにより脱-免疫化される。配列番号：32で示されるペプチドは、イソロイシン(太字で示す)をアラニンまたはプロリンに替えることにより脱-免疫化され、配列番号：33のペプチドは、ロイシンをアラニンまたはプロリンに替えることにより脱-免疫化される。生じる脱-免疫化接合部は次の通りである：

【0107】

【化13】

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFAAWAVIGTG-EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLG

(配列番号：34)

10

【0108】

融合接合部にグリコシル化部位を導入する典型的な方法によれば、次の変更が導入される：

【0109】

【化14】

SYLEGQAAKEFIAWLVKGRN-GSKSSDKTHTCPPCPAPPELLG (配列番号：

35)

20

【0110】

実施例7：Enbrel、TNFR-Fc融合タンパク質の免疫原性反応性エピトープの除去、および免疫原性を低減するための融合接合部のアミノ酸残基の修飾

ENBRELMまたはエタネルセプト(FDAによって承認されたX-Fc融合タンパク質)は、慢性関節リウマチを治療するために使用される腫瘍壊死因子(TNF)阻害剤である。ENBRELMは、ヒトIgG1のFcタンパク質に結合されたTNFレセプターの細胞外のリガンド結合ドメインからなる二量体の融合タンパク質である。TNFR-Fcは、TNFのそのレセプターへの結合を競争的に阻害し、結合したTNFを生物学的に不活性にし、炎症性の活性を顕著に低減させる。GLP-1-Fcについて上述したように、TNFR-Fcは潜在的なT-細胞エピトープを含む新規な接合部を有する。

30

【0111】

TNFRのC-末端部分(太字テキスト)のg1ヒンジN-末端(通常テキストで示しヒンジ領域を、下線を付して表す)への直接融合間の接合部は以下の通りである：

【0112】

【化15】

STSFLLPMGPPPAEGSTGD-EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG (配列番号：

36)

40

【0113】

実施例1~4と同様に行ったTNFRとFc間の融合接合部の分析により、MHC結合性を有するペプチドが識別される。ペプチドスレッディング分析により潜在的なサイトを識別した後、潜在的に免疫原性の配列をアミノ酸置換により修飾し、潜在的なT細胞およびB細胞結合エピトープを低減または除去して免疫原性を低減する。

【0114】

融合接合部にグリコシル化部位を導入する典型的な方法によって以下の変化を導入した：

50

【 0 1 1 5 】

【 化 1 6 】

STSFLLPMGSPPAEGSTGN - GSKSCDKTHTCPPAPPELLG (配列番号 :

3 7)

【 0 1 1 6 】

実施例 8 : F c - I L 1 2 - I L 2 などの F c - X - Y 融合タンパク質の免疫原性反応性エピトープの除去、および免疫原性を低減するための融合接合部のアミノ酸残基の修飾 F c - I L 1 2 - I L 2 などの F c - X - Y の配置の融合タンパク質は、潜在的に免疫原性である多数の新規な融合接合部を有する。例えば、F c - I L 1 2 は、他の F c - X 融合タンパク質またはイムノサイトカイン(実施例 1)に類似した融合接合部を有するが、サイトカイン I L 1 2 の使用のために新規である。融合接合部は免疫原性の結合サイトについて分析され、従って修飾される。第 2 に、融合タンパク質を構成する 2 個の異なるサイトカインとともに、実施例 5 に記載されたそれに匹敵する X - Y 融合接合部がある。ペプチドスレッディング分析が融合接合部の各々について使用される。

10

【 0 1 1 7 】

接合部の分析は、F c の C - 末端(太字テキスト)と I L 1 2 p 3 5 の N - 末端(通常テキスト)との間に

【 0 1 1 8 】

20

【 化 1 7 】

(1) **MHEALHNHYTQKSLSLSPGK - RNLPVATPDPGMFPCLHH SQ** (配列番号 :

3 8)

【 0 1 1 9 】

を、および I L 1 2 p 4 0 の C - 末端(太字テキスト)と I L 2 の N - 末端(通常テキスト)との間に

【 0 1 2 0 】

【 化 1 8 】

(2) **RAQDRYYSSSWSEWASVPCS - APTSSSTKKTQLLEHLLLD** (配列番号 : 3 9)

30

【 0 1 2 1 】

を、ペプチドスレッディングにより M H C 結合性を有するペプチドを識別する。潜在的に免疫原の配列は、潜在的な T - 細胞エピトープを低減させるかまたは除去するために修飾される。

【 0 1 2 2 】

例えば、上記の配列(1)では、次の変更が行われる :

【 0 1 2 3 】

【 化 1 9 】

MHEALHNHYTQKSATATPGK - RNLPVATPDPGMFPCLHHSQ (配列番号 : 4 0)

40

【 0 1 2 4 】

これらの変更は、F c と I L 1 2 の p 3 5 サブユニットの接合部におけるいくつかの T - 細胞エピトープの M H C クラス I I 結合可能性を低減または除去する。

【 0 1 2 5 】

別の例では、上記の配列(2)は I L - 2 内の最初の 2 つの位置にアスパラギンおよびグリシンを導入することで、グリコシル化部位を導入するように修飾される。この戦略は成熟 I L - 2 の位置 3 で天然に存在するトレオニンを使用する。さらに、p 4 0 部分中のジス

50

ルフィド結合の形成を開裂させないことが重要である。したがって、少なくとも1個または2個のアミノ酸によってグリコシル化部位をp40の中のシステインから分離することが有用である。

【0126】

【化20】

RAQDRYYSSSWSEWASVPCS - NGTSSSTKKTQLQLEHLLLD (配列番号:

41)

【0127】

IL12p40 - IL2融合の場合には、上に論じたようなグリコシル化部位の導入が以下の潜在的なT-細胞エピトープを生成する。 10

【0128】

【化21】

SEWASVPCSNGTS (配列番号: 42)

ASVPCSNGTSSST (配列番号: 43)

【0129】

しかし、T-細胞エピトープのグリコシル化は、MHCクラスIIの結合を妨げて低減された免疫原性をもたらす。

【0130】

実施例9: X-Fc-Y融合タンパク質の接合部における免疫原性反応性エピトープの除去、およびMHCクラスII結合を低減するための融合接合部のアミノ酸残基の修飾 20

IL4-Fc-GMCSFなどのX-Fc-Y配置の融合タンパク質は、潜在的なT-細胞エピトープを含む多数の新規な融合接合部を有する。IL4-Fcは、他のX-Fc融合タンパク質(実施例6および7)と類似している接合部であるが、サイトカインIL4の使用のために新規である。例えば、ヒンジ領域を使用するFc、CH2およびヒト1からのCH3領域を用いる形態が使用される。前述のように、pdCshuFc1中の1ヒンジ配列は、IgG1中の軽鎖とのジスルフィド結合を形成するCys残基を除去するCysのSerへの変異(下線)を含んでもよいし(Loら(1998)Protein Engineering 11:495-500)、これにより、分析のための第3の潜在的に免疫原の融合接合部を生成してもよい 30

融合接合部は潜在的なT-細胞エピトープについて分析し、実施例1~4の方法によって修飾した。

【0131】

融合タンパク質を構成する異なるサイトカインGMCSFとともに、イムノサイトカインhuKS-IL2について実施例1に記載したそれに匹敵するFcY融合接合部が存在する。この融合接合部も潜在的なT-細胞エピトープのために分析し、実施例1~4の方法によって修飾した。

【0132】

特に、接合部の分析は、IL4のC-末端(太字テキスト)とFcのN-末端(通常テキスト)との間に 40

【0133】

【化22】

(1) ENFLERLKTIMREKYSKCSS - epkscdkthtccppcapellg (配列番号: 44)

【0134】

を、およびFcのC-末端(太字テキスト)とGMCSFN-末端(通常テキスト)との間に

【0135】

【化23】

(2) MHEALHNHYTQKSLSPGK – parspsstqpwehvnaiqe (配列番号：45)

【0136】

を、ペプチドスレッディングにより、MHC結合性を有するペプチドを識別する。潜在的なT-細胞エピトープは、免疫原性を減少するために潜在的なTエピトープを除去または低減するために修飾される。

【0137】

IL4-Fc融合タンパク質の接合部での候補T-細胞エピトープは以下の通りである：

【0138】

【化24】

EKYSKCSSEPKSC (配列番号：46)

【0139】

ここで、E(太字)をTに変更することでペプチドスレッディングスコアすなわちMHCクラスII結合可能性を著しく低減する。修飾されたIL4-Fc融合の配列は以下の通りである：

【0140】

【化25】

ENFLERLKTIMREKYSKCSS – tpkscdkthtccppcapellg (配列番号：47)

【0141】

Fc-GMCSF融合接合部は、以下に示すように配列LSLSをATA Tに変更することにより脱-免疫化される。

【0142】

【化26】

MHEALHNHYTQKSATATPGK – parspsstqpwehvnaiqe (配列番号：48)

【0143】

実施例10：ハイブリッドアイソタイプにより調製してイムノサイトカインとイムノフュージンの融合接合部におけるT-細胞エピトープを除去するためのアミノ酸残基の修飾抗体またはハイブリッドアイソタイプとの抗体に基づく融合タンパク質を構築し、その結果、異なるアイソタイプの有用な特徴を単一の分子中に組み合わせることは多くの場合有用である。ハイブリッドアイソタイプとの融合タンパク質は免疫原性を低減するために本発明によって修飾してもよい。

【0144】

次の構成成分を備えた抗体融合タンパク質を標準的な組換えDNA技術によって構築する：軽鎖および重鎖、腫瘍特異的抗原を認識するV領域、典型的な軽鎖である軽鎖、およびIgG2由来のCH1、CH2およびCH3ドメインを含む重鎖、並びにIgG1由来ヒンジ領域、さらに上記の融合接合部を含む重鎖のC-末端に融合されたサイトカイン。

【0145】

このタンパク質は、CH1g2とヒンジ-g1との間およびヒンジ-g1とCH2g2との間に新規な接合部を含んでいる。これらの接合部における潜在的なT-細胞エピトープの識別および修飾は、以下のように実行される。IgG2またはIgG2hアイソタイプのいずれかで調製されたイムノサイトカインおよびFc-X融合タンパク質については、これらの修飾は、上記実施例1、2、3および8におけるのと同じである。X-FcIgG2hイムノフュージンについては、FcのN-末端が、IgG1タイプに修飾されたIgG2hタンパク質のヒンジ領域内にあるので、新規な結合も同一である。しかし、IgG2免疫グロブリンに挿入されたIgG1ヒンジは、IgG2CH1とIgG1ヒンジとの間、およびIgG1ヒンジとIgG2CH2との間に2つの新規な接合部を生成するという点で、2個の新規な融合接合部がある。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

【 化 2 7 】

IgG2 CH1 - IgG1 hinge - IgG2 CH2 - IgG2 CH3 - 標的タンパク質

【 0 1 4 7 】

したがって、接合部の分析は、I g G 2 C H 1 の C - 末端(太字テキスト)と I g G 1 ヒンジの N - 末端(通常テキスト)間に

【 0 1 4 8 】

【 化 2 8 】

qytvcnvdhkpsntkvdktv - epkscdkthtccppcp (配列番号 : 4 9)

10

【 0 1 4 9 】

を、および、I g G 1 ヒンジの C - 末端(太字テキスト)と I g G 2 C H 2 F の N - 末端(通常テキスト)の間に、

【 0 1 5 0 】

【 化 2 9 】

epkscdkthtccppcp - appvagpsvflfppkpkdtl (配列番号 : 5 0)

【 0 1 5 1 】

を、ペプチドスレッディングにより、M H C 結合性を有するペプチドを識別するであろう。潜在的な免疫原性配列は、免疫原性を減少するために潜在的な T および B 細胞エピトープを除去または低減するように修飾される。

20

【 0 1 5 2 】

I g G 2 C H 1 - I g G 1 ヒンジ融合接合部での 2 つの潜在的な T - 細胞エピトープは、以下の通りである :

【 0 1 5 3 】

【 化 3 0 】

TKVDKTVPEPKSCD (配列番号 : 5 1) および **KTVEPKSCDKTHT** (配列番号 : 5 2)

30

【 0 1 5 4 】

I g G 2 C H 1 - I g G 1 ヒンジ融合接合部は、V (太字)を A、T または P に変更することにより脱 - 免疫化される。修飾された融合接合部の配列は配列番号 : 5 3

【 0 1 5 5 】

【 化 3 1 】

qytvcnvdhkpsntkadtka - epkscdkthtccppcp (配列番号 : 5 3)

【 0 1 5 6 】

に示される。

【 0 1 5 7 】

前述のように、p d C s - h u F c 1 中の 1 ヒンジ配列は、I g G 1 中の軽鎖とジスルフィド結合を形成する C y s 残基を除去する C y s の S e r への変異(下線)を含んでもよいし(Loら(1998)Protein Engineering 11:495-500)、これにより、分析および修飾のためのさらに 2 個の潜在的に免疫原性の以下の融合接合部を生成してもよい。

40

【 0 1 5 8 】

【 化 3 2 】

(3) qytycndvhkpsntkvdktv - epksSdkthtppcp (配列番号：54)

(4)epksSdkthtppcp - appvagpsvflfppkpkdtl (配列番号：55)

【0159】

実施例11：IgG1とIgG4のハイブリッドアイソタイプFc構成成分を使用するFc-EPO融合タンパク質の生成

Fcエリスロポエチン融合タンパク質を生成するために、次の発現プラスミドを標準的分子生物学技術を使用して構築した。アミノ酸置換His32Gly、Cys33Pro、Trp88CysおよびPro90Alaをもたらす変異を備えた配列をコードするヒトエリスロポエチンの形態を含むXmaI-XhoI DNA断片を、WO01/36489に示されるように、使用した。対応するタンパク質配列は配列番号：56

10

【0160】

【化33】

APRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEGPSLNENITVDPDKVNFYAWKRMEVGGQAVEV
WQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPCEGLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAAS
AAPLRITTTADTRKLFVRVYSNFLRGKCLKLYTGACRTGDR

【0161】

に示される。

20

【0162】

CH3C-末端の領域のアミノ酸置換をもたらす2セットの変異を施したこと以外、このXmaI-XhoI DNA断片を、IgG1からのヒンジ領域およびIgG2からのCH2とCH3領域をコードするプラスミドベクターに挿入した。CH3C-末端とEpoN-末端の接合部の配列を以下の通りである：

【0163】

【化34】

....TQKSATATPGA-APRLI....(配列番号：57)

【0164】

変異の第1のセット(これは、KSLSPG(配列番号：58)のIgG2CH3領域の配列をKSATATPG(配列番号：59)に変更する)は、米国特許出願シリアル番号第60/280,625号に開示されている。Leu-Ser-Leu-Ser(配列番号：58の位置3から位置6)をAla-Thr-Ala-Thr(配列番号：59の位置3から位置6)に置き換える置換の効果は、ヒトFcとヒトエリスロポエチンとの間の結合が非自己ペプチド配列を含むことから発生するかもしれない潜在的なヒト非自己T-細胞エピトープを除去することである。CH3領域のC-末端アミノ酸においてKからAへの単一アミノ酸置換からなる第2のセットは、米国特許出願シリアル番号第09/780,668号に開示されている。

30

【0165】

生じるプラスミドはNS/0細胞に感染させ、当技術分野で知られた操作によってFc-Epo融合タンパク質を発現させ精製した。タンパク質Aへの結合に基づく精製後、IgG2CH3および上記エリスロポエチン置換を含むhuFc2h-huEpoタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーによって同定され、2つの独立した調製物中で97%のモノマーおよび90%のモノマーからなることが見出された。IgG2CH3および上記エリスロポエチン置換を含むhuFc2h-huEpoタンパク質は、細胞ベースのアッセイ(エリスロポエチンタンパク質がTF-1細胞分裂を刺激するという能力を測定する)においてヒトエリスロポエチンと、モル基準で、ほぼ同様な活性を有することが見出された。アッセイはWO01/36489に記述されるようにして行われた。

40

【0166】

50

さらに、I g G 1 (ヒンジ - C H 2 - C H 3)、I g G 2 (ヒンジ - C H 2 - C H 3)または I g G 1 (ヒンジ) - I g G 2 (C H 2 - C H 3)のいずれかからなる F c 領域の C - 末端に非変異ヒトエリスロポエチンを融合したものを同定した。非変異ヒト F c 配列および非変異エリスロポエチン配列を含む発現プラスミドを、上記プラスミドと同様に構築した。N S / 0 細胞を、F c 1 - E p o、F c 2 - E p o および F c 2 h - E p o 発現プラスミドに感染させ、各プラスミドのほぼ等しい数のクローンを選択した後に安定したクローンを分離した。産生性が最良のクローンは、F c 1 - E p o を 5 0 μ g / m l、F c 2 - E p o を 2 0 μ g / m l および F c 2 h - E p o を 1 2 0 μ g / m l 産生した。

【 0 1 6 7 】

以下の例は、本発明で示される融合タンパク質の配列内に免疫原性の配列領域 (T - 細胞エピトープ) の識別するための好ましい方法について詳細に記述する。しかし、既知の他の方法でもこの分子を得ることができる点が指摘されるべきである。

【 0 1 6 8 】

実施例 1 2 : 計算上の方法による T - 細胞エピトープの識別

本発明によれば、融合タンパク質の接合領域のエピトープは、その免疫系との相互作用を調整するためにタンパク質中に変異体を導入する方法を使用して修飾することができる。本発明によれば、本発明によって適用することができる当業者には知られた方法は、先行技術 (W O 9 2 / 1 0 7 5 5 および W O 9 6 / 4 0 7 9 2 (Novo Nordisk)、E P 0 5 1 9 5 9 6 (Merck & Co.)、E P 0 6 9 9 7 5 5 (Centro de Immunologia Molecular)、W O 9 8 / 5 2 9 7 6 および W O 9 8 / 5 9 2 4 4 (Biovation Ltd.) に記載されたもの、さらに関連する方法を含む。

【 0 1 6 9 】

しかし、前記エピトープの識別がここに詳細に記載する以下の新しい方法によって実現され、本発明による融合タンパク質の接合領域に適用されるのであれば、有利な変異体タンパク質を得ることができる。

【 0 1 7 0 】

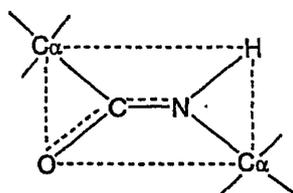
タンパク質、ポリペプチドまたは免疫グロブリンの全体的構造を決定するのに重要な役割を果たす要因は多数存在する。第 1 に、ペプチド結合、アミノ酸を鎖状に互いに連結するその結合は、共有結合である。この結合は平面構造であり実質的に置換アミドである。「アミド」は - C O N H - 基を含む有機化合物の任意の基である。

【 0 1 7 1 】

隣接アミノ酸の C を連結する平面状ペプチド結合は以下に示すように表すことができる：

【 0 1 7 2 】

【 化 3 5 】



【 0 1 7 3 】

O = C および C - N 原子は比較的剛性な平面内にあるので、これらの軸の周りに自由な回転は生じない。このため、破線によって模式的に描いた平面は時として「アミド平面」または「ペプチド平面」と呼ばれ、この平面にはペプチド骨格の酸素 (O)、炭素 (C)、窒素 (N) および水素 (H) 原子が載る。このアミド平面の相対する両隅には C 原子が位置する。ペプチド平面すなわちアミド平面内では、O = C および C - N 原子の周りの回転が実質的にないので、ポリペプチド鎖は C 原子を連結する一連の平面状ペプチド結合を含む。

10

20

30

40

50

【0174】

ポリペプチドまたはタンパク質の全体構造または立体構造を規定する上で重要な役割を果たす第2の要因は、共通なC 連結の周りの各アミド平面の回転角である。「回転角」および「ねじり角」という用語は以下では同義語と見なされる。アミド平面にO、C、NおよびH原子が載ると仮定すると(立体構造によってはこれらの原子のうちいくつかは平面から若干ずれるかもしれないが、これは通常有効な仮定である)、これらの回転角はNとRポリペプチドの骨格の立体構造、つまり隣接残基間に存する構造を定義する。これらの2つの角度は ϕ および ψ として知られている。したがって、1組の角度、 ϕ_i および ψ_i (ここで添字 i はポリペプチド鎖の特定の残基を表す)はポリペプチドの2次構造を有効に規定する。角度 ϕ および ψ を定義するのに使用される慣用規則、すなわち、所与のポリペプチドについてのアミド平面が角度0を形成する参照ポイント、並びに角度 ϕ の定義および角度 ψ の定義は、文献に定義される。例えば、Ramachandran et al. Adv.Prot.Chem.23 : 283-437(1968)、特に285 - 94ページ参照(これらのページは言及によって本願に組み込まれる)。

10

【0175】

本発明の方法は任意のタンパク質に適用することができ、ヒトでは、MHCクラスII分子結合溝の主要なポケット1アンカー位置が、特定のアミノ酸側鎖に対してよく設計された特異性を有するという発見に部分的に基づいている。このポケットの特異性は、MHCクラスII分子のベータ鎖の位置86でのアミノ酸の同一性によって決定される。このサイトはポケット1の底に位置し、このポケットに収容され得る側鎖の大きさを決定する。Marshall, K.W., J.Immunol., 152 : 4946-4956 (1994)。この残基がグリシンである場合、すべての疎水性脂肪族および芳香族アミノ酸(疎水性脂肪族は以下のものである:バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニン、また芳香族は以下のものである:フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン)は、ポケット内に収容され得る(芳香族側鎖が優先される)。このポケット残基がバリンである場合、このアミノ酸側鎖はポケット内部に突出するので、収容できるペプチド側鎖のサイズを制限する(例えば疎水性脂肪族側鎖だけが収容可能である)。したがって、アミノ酸残基配列において、疎水性脂肪族および芳香族側鎖を有するアミノ酸が存在する場合にはいつでも、MHCクラスII制限T細胞エピトープが存在する可能性がある。しかし、側鎖が疎水性脂肪族である場合は、芳香族側鎖の場合と比較して、(全人口において、ポケット1タイプの分布がほぼ均一であると定すれば)T細胞エピトープに関連する可能性はおよそ2倍である。

20

30

【0176】

本発明を具体化する計算方法は、以下のようにT細胞エピトープを含むペプチド領域の可能性を特徴づける：

(1)予め定義した長さのペプチドセグメントの1次配列を走査し、存在する疎水性脂肪族と芳香族側鎖をすべて識別する。(2)疎水性脂肪族側鎖には芳香族側鎖用のそれより大きな値、好ましくは芳香族側鎖に割り当てる値の約2倍を割り当てる(例えば、疎水性脂肪族側鎖に対しては値2を、芳香族側鎖に対しては値1を割り当てる)。(3)ペプチド内の予め定義した一定の長さの各重複するアミノ酸残基セグメント(ウィンドウ)について存在が決定された値を合計し、特定のセグメント(ウィンドウ)に対する値の合計を、セグメント(ウィンドウ)の中間位置で単一のアミノ酸残基、好ましくは、サンプリングされたセグメント(ウィンドウ)の中間点付近の残基に割り当てる。この手続きを、サンプリングされた各重複するアミノ酸残基セグメント(ウィンドウ)について繰り返す。したがって、ペプチドの各アミノ酸残基は、特定のセグメント(ウィンドウ)内に存在するT細胞エピトープの可能性に関係のある値を割り当てられる。(4)上記ステップ3に記載するように計算し割り当てた値は、評価するアミノ酸残基配列全体のアミノ酸座標に対してプロットすることができる。(5)予め定義した値(例えば値1)のスコアを有する配列のすべての部分は、T細胞エピトープを含むと認められ、必要であれば、修飾することができる。

40

【0177】

本発明のこの特定の実施態様は、T細胞エピトープを含むであろうペプチド領域を記述で

50

きる一般的な方法を提供する。これらの領域内のペプチドに対する修飾は、MHCクラスII結合特性を修飾する可能性を有する。

【0178】

本発明の別の実施態様によれば、MHCクラスII対立遺伝子モデルによりペプチドの相互作用を考慮に入れたより精巧な計算方法を使用して、T細胞エピトープをより高精度で予想できる。

【0179】

特にこの実施態様によるペプチド内に存在するT細胞エピトープの計算上の予想では、すべての公知のMHCクラスII分子の構造に基づく少なくとも42個のMHCクラスII対立遺伝子のモデルの構築が考えられ、T細胞エピトープの計算による識別におけるこれらのモデルの使用、相対的なペプチド骨格アルファ炭素(C α)位置の知られた変わりやすさを考慮に入れるための各モデルのペプチド骨格のライブラリーの構築、ペプチドとMHCクラスII分子との間の相互作用において重要な位置での20個のアミノ酸置換各々のための各モデルを備えた各骨格ドック(dock)のアミノ酸側鎖コンホメーションのライブラリーの構築、および特定のMHCクラスII分子に収容(dock)された特定のペプチドについての最適な骨格および側鎖コンホメーション選択のための、これら骨格および側鎖コンホメーションライブラリーの使用、並びにこの相互作用からの結合スコアの誘導が考えられる。

【0180】

MHCクラスII分子のモデルは相同モデリングによって、ブルックヘブン(Brookhaven)タンパク質データバンク(「PDB」)で見出された多数の同様の構造から誘導できる。これらは、エネルギー最小化のためのCHARMM力場(Molecular Simulations Inc., San Diego, Ca.から入手可能)と共に、シミュレートされたアニーリング機能を組み込んだ半自動的な相同モデリングソフトウェア(Modeller, Sali A. & Blundell T.L., 1993. J. Mol. Biol. 234: 779-815)によって形成できる。別のモデリング方法も同様に利用できる。

【0181】

本願の方法は、MHCクラスII分子の小さな集合について結合溝内の各位置での各アミノ酸選択肢の実験により得た結合データのライブラリーを使用する他の計算方法(Marshall, K.W., et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1(3): 157-162)(1995)や溝内の特定タイプの結合ポケットの結合特性を定義するために実験による同様の結合データを使用し(ここでもまたMHCクラスII分子の比較的小さな部分集合を使用する)次いでこのポケットライブラリーからポケットタイプを「混合およびマッチング」して人為的に別の「仮想的な」MHCクラスII分子を生成するさらに別の計算方法(Sturniolo T., et al., Nat. Biotech., 17(6): 555-561(1999)と著しく異なる。先行技術は両方とも分析が複雑である点および多数のペプチド変異体を合成する必要がある点の不利益を被り、少数のMHCクラスII分子しか実験的に走査できない。したがって、第1の先行技術の方法は少数のMHCクラスII分子の予想しかできない。第2の先行技術の方法は、異なるクラスII対立遺伝子間においては、1個の分子中で類似したアミノ酸で裏打ちされているポケットは同じ結合特性を持つという仮定も前提としており、ポケットライブラリーに含まれるポケットを含むそうしたMHCクラスII分子だけが「仮想的に」生成されるという欠点をさらに有する。本明細書に述べるモデリング手法を使用すれば、任意の数およびタイプのMHCクラスII分子の構造を推定でき、したがって全集団を代表する対立遺伝子を選択できる。さらに、走査されるMHCクラスII分子の数は、複雑な実験によって追加データを生成する必要以上にさらにモデルを生成することにより増加させることができる。

【0182】

骨格ライブラリーの使用により、走査されている様々なペプチドについて、特定のMHCクラスII分子に収容された時のC α 原子位置における変化を考慮に入れることができる。この点もまた、上記の先行技術における計算方法(これらは特定のポケット中でアミノ酸結合を走査するため単純化されたペプチド骨格の使用に依存している)と対照的である

10

20

30

40

50

。これらの単純化された骨格は、「実際の」ペプチドで見つかる骨格構成の代表ではないであろうし、その結果、ペプチド結合の予想が不正確になる。本発明の骨格ライブラリーは、タンパク質データベース内で見出されるMHCクラスII分子に結合するすべてのペプチドの骨格を重ね、結合溝内に位置する11個のアミノ酸各々のC原子間の2乗平均平方根(RMS)偏差を記録することにより生成される。このライブラリーは、より大きな変動の可能性までも考慮に入れるために、少数(現在13個)の適切な利用可能なマウスおよびヒト構造から誘導できる一方、各C^αについてのRMS数値は、50%増加する。その後、各アミノ酸の平均のC^α位置が決定され、その半径がその位置でのRMS偏差プラス50%と等しい球がこの点のまわりに描かれる。この球体は許容されるC^α位置をすべて表す。

10

【0183】

最小のRMS偏差を有するC^α(これは、上記のポケット1中のアミノ酸であり、結合溝中の11個の残基の位置2と等価である)を動かして、球体は3次的にグリッド化され、次いでグリッド内の各頂点はそのアミノ酸のC^αのために可能な位置として使用される。結果として得られるアミド平面は、引き続きアミノ酸へのペプチド結合に対応し、これらのC^αの各々にグラフトされ、次のC^αを位置付けるためにおおよび角を所定の間隔で回転させる。引き続きC^αがC^αに対して「許容される位置の球」内にある場合にはジペプチドの向きが許容され、それが球の外部になる場合には、ジペプチドは拒絶される。その後、先行するC^αのあらゆる組合せから9個の後続C^αがすべて位置付けられるまで、ペプチドがポケット1C^α「種子」から成長するように後続C^α位置の各々についてこのプロセスを繰り返す。次いで、ポケット1の前の単一C^αについてこのプロセスをもう一度繰り返して結合溝内に位置する骨格C^α位置のライブラリーを生成する。

20

【0184】

生成された骨格の数はいくつかの要因に依存する:「許容される位置の球」の大きさ;ポケット1位置の「1次球」のグリッドの精密さ;後続C^αを位置付けるために用いるおおよびの段階的回転角の精密さ。このプロセスを使用すると、大きな骨格ライブラリーを生成できる。骨格ライブラリーが大きい程、MHCクラスII分子の結合溝内の特定のペプチドに対して最もよく適合するものが見つかる可能性は大きくなる。各対立遺伝子について、結合領域のアミノ酸との衝突により、必ずしもすべての骨格がMHCクラスII分子のすべてのモデルに収容されるのには適さないため、その対立遺伝子によって収容される骨格を含むライブラリーの部分集合が生成される。骨格ライブラリーの使用は、MHCクラスII分子モデルと共に、各許容される骨格に収容される各MHCクラスII分子について結合溝の各位置の各アミノ酸の許容される側鎖コンホメーションからなる徹底的なデータベースを作成する。このデータセットは、単純な立体的重なり関数を用いて生成され、ここで、MHCクラスII分子は骨格と結合し、アミノ酸側鎖は所望の位置で骨格上にグラフトされる。各々の側鎖の回転可能な結合を設定した間隔で段階的に回転させ、得られる原子位置は注目する結合に依存する。原子と結合溝の側鎖の原子との相互作用が注目され、位置は次の基準によって許容されるか拒絶される:ここまでに位置付けられたすべての原子の重なり合計は、予め決めた値を超過してはならない。したがって、コンホメーション探索の厳格性は、結合の段階的回転で用いる間隔と全重なりについて予め決めた限界の関数である。特定のポケットが剛性であると知られている場合、この後者の値は小さくなり得るが、ポケット側鎖の位置に比較的柔軟性があると知られている場合は、比較的緩和である。したがって、許容は結合溝ポケット内の柔軟性における変化を模倣するようになすことができる。次いで、MHCクラスII分子の各々に収容された時、このコンホメーション探索を各骨格のすべての位置にあるすべてのアミノ酸について繰り返し、側鎖コンホメーションの徹底的なデータベースを作成する。

30

40

【0185】

適切な数式を用いて、上記骨格/側鎖コンホメーションの大きなデータベースの走査により経験的に導き出さなければならないペプチドリガンドコンホメーションと組み合わせるMHCクラスII分子モデル間の結合エネルギーを評価する。したがって、9~20アミノ酸

50

の範囲で長さが増える(もっとも、長さは各走査に対しては一定にしておく)可能なペプチドに、以下の計算を施すことにより、タンパク質を潜在的なT細胞エピトープについて走査する：MHCクラスII分子をその分子に許容されるペプチド骨格とともに選択し、所望のペプチド配列に対応する側鎖をグラフトする。骨格上の特定の位置での原子の識別および特定の側鎖に関する原子間距離データを、そのアミノ酸の許容される各コンホメーションについて集める(上記データベースから得られる)。これを骨格に沿って各側鎖に対して繰り返し、スコアリング関数を用いてペプチドスコアを導く。その骨格のための最良のスコアを保持し、選択されたモデルについて各許容される骨格に対してこのプロセスを繰り返す。すべての許容される骨格から得られたスコアを比較し、最高のスコアをそのMHCクラスIIモデル中の所望のペプチドについてのペプチドスコアであると見なす。次いで、このプロセスを、走査されているタンパク質に由来するあらゆる可能なペプチドを備えた各モデルについて繰り返し、ペプチド対モデルのスコアを表示する。

10

【0186】

本発明の状況では、結合親和性計算のために提示される各リガンドは、上に議論されるようなペプチドまたはタンパク質から選択されるアミノ酸断片である。したがって、リガンドは、公知の配列のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質から得られ、長さがおおよそ9~20個のアミノ酸である選択されたアミノ酸伸張物である。「アミノ酸」および「残基」という用語は以下においては同義語と見なされる。リガンドは、骨格ライブラリーから得た骨格上にグラフトされて検査されるペプチドの連続アミノ酸の形をしており、ペプチド骨格のC^α原子の座標を介して、MHCクラスII分子モデルライブラリーから得られるMHCクラスII分子の結合溝中に位置し、各側鎖に対して許容されるコンホメーションは許容されるコンホメーションデータベースから選択される。関連する原子同一性および原子間距離もこのデータベースから検索し、ペプチド結合スコアを計算するために使用する。MHCクラスII結合ポケットへの高い結合親和性を備えたりリガンドには、部位指図突然変異生成に対する候補としてフラグが立てられる。フラグが立てられたリガンド(したがって対象タンパク質)でアミノ酸置換を行い、これはその後、結合親和性を予め定義した閾値以下に低減する変更を決定するためにスコアリング関数を使用して再試験する。次いで、これらの変更を対象タンパク質に組み入れ、T細胞エピトープを除去する。

20

【0187】

MHCクラスII分子のペプチドリガンドと結合溝の間は、非共有結合性の相互作用(水素結合、静電的相互作用、疎水性(親油性)相互作用およびファンデアワールス相互作用を含むが、これらに限定されない)を含む。これらは、以下に詳細に述べるペプチドスコアリング関数に含まれている。水素結合は極性または帯電基間で形成され得るもので、2つの他の原子によって共有された水素原子からなる非共有結合であることが理解されるべきである。水素受容体が部分的に負帯電を有する一方で、水素供与体の水素は正電荷を有する。ペプチド/タンパク質相互作用のために、水素結合供与体は、水素と結合した窒素または酸素もしくは窒素に結合した水素のいずれでもよい。水素結合受容体原子は水素と結合していない酸素、水素が全く結合しておらず1個か2個の結合がある窒素、または1つの結合のみある硫黄でもよい。水素を結合した酸素またはイミン窒素(例えばC=NH-)などのある種の原子は、水素受容体とも供与体ともなり得る。水素結合エネルギーは3~7kcal/molの範囲であり、ファンデアワールス結合よりはるかに強いが共有結合よりは弱い。水素結合はまた指向性が強く、供与体原子、水素原子および受容体原子が同一直線上にある場合に最も強い。静電的結合は反対荷電のイオン対間で形成され、相互作用の強さはクーロンの法則による原子間の距離の二乗に反比例する。イオン対間の最適距離は約2.8 Åである。タンパク質/ペプチド相互作用では、静電的結合がアルギニン、ヒスチジンまたはリジンとアスパラギン酸塩またはグルタミン酸塩との間で形成され得る。それらは水素結合と強さがほぼ似ているが、結合の強さはイオン化基のpKaおよび媒体の誘電率に依存するであろう。

30

40

【0188】

親油性(脂肪親和性)相互作用は、タンパク質とペプチドリガンド間に生じる良好な疎水性

50

- 疎水性接触である。通常、これらは結合溝のポケット内に埋没したペプチドの疎水性アミノ酸側鎖間にそれらが溶媒に露出しないように生じる。疎水性残基の溶媒への露出は、周囲の溶分子が互いに水素結合を強いられ、かご状のクラスレート構造を形成するので非常に不利である。結果として生じるエントロピーの減少は非常に不利である。脂肪親和性の強い原子は、極性でもなく水素受容体でもない硫黄や非極性の炭素原子などである。

【0189】

ファンデアワールス結合は3~4離れた原子間で見られる非特異的な結合である。これは水素結合や静電的結合より弱く特異性も低い。原子のまわりの電荷分布は時間とともに変化し、どの瞬間でも、電荷分布は対称ではない。電荷分布におけるこの一時的な非対称性は、近隣の原子にも同様の非対称性を引き起こす。この結果生じる原子間引力は、ファンデアワールス接触距離で最大に達するが、約2~約1に至ると非常に急速に低減する。逆に、原子間の隔たりが接触距離未満になるとともに、原子の外殻電子雲が重なるため、強い斥力が支配的になる。引力は静電的結合や水素結合に比べて比較的弱い(約0.6 Kcal/mol)、斥力は特に、ペプチドリガンドがタンパク質に成功裡に結合するかどうか決する上で非常に重要であろう。

10

【0190】

1つの実施形態では、ベーム(Boehm)スコアリング関数(SCORE1手法)が結合定数を評価するために使用される(Boehm, H.J., J.Comput Aided Mol.Des., 8(3):243-256(1994)、その内容は言及によってその全体が本願に組み入れられる)。別の実施形態では、スコアリング関数(SCORE2手法)が、T細胞エプिटープを含むリガンドの指標として結合親和力を評価するために使用される(Boehm, H.J., J.Comput Aided Mol.Des., 12(4):309-323(1998)、その内容は言及によってその全体が本願に組み入れられる)。しかし、上記の文献に記述されているベームスコアリング関数は、タンパク質へのリガンドの結合親和力を評価するために使用されるが、この場合、リガンドがタンパク質に成功裡に結合することが既に知られており、タンパク質/リガンド複合体はその構造が解明されタンパク質データベース(「PDB」)の中に存在するものである。したがって、スコアリング関数は、陽性であることが知られた結合データを利用して開発されている。陽性および陰性バインダー間の区別を考慮に入れるために、方程式に反発項を加えなければならない。さらに、結合エネルギーのより満足な評価は、上記のベーム関数の領域ベースのエネルギー項を用いるのではなく対同士の方法で脂肪親和性の強い相互作用を計算することで達成される。したがって、好ましい実施形態では、結合エネルギーは修正されたベームスコアリング関数を使用して評価される。修正されたベームスコアリング関数では、タンパク質とリガンド間の結合エネルギー(G_{bind})は、以下のパラメーターを考慮して評価される：リガンド(G_0)の並進エントロピーと回転エントロピーの全面的な喪失による結合エネルギーの低減；少なくとも1個のパートナーが中性である、理想的な水素結合からの寄与(G_{hb})；摂動のないイオン間相互作用(G_{ionic})からの寄与；脂肪親和性リガンド原子と脂肪親和性受容体原子の間の脂肪親和性相互作用(G_{lipo})；リガンド中の内部自由度の凍結による結合エネルギーの喪失、つまり、各C-C結合の周りの回転自由度が低減する(G_{rot})；タンパク質とリガンド間の相互作用エネルギー(E_{vdw})。これらの項を考慮すると方程式1が与えられる：

30

40

$$(G_{bind}) = (G_0) + (G_{hb} \times N_{hb}) + (G_{ionic} \times N_{ionic}) + (G_{lipo} \times N_{lipo}) + (G_{rot} \times N_{rot}) + (E_{vdw})$$

式中、Nは特定の項の相互作用を特徴付ける数であり、1つの実施形態では、 G_0 、 G_{hb} 、 G_{ionic} 、 G_{lipo} および G_{rot} は、それぞれ5.4、-4.7、-4.7、-0.17および1.4の値を与えられる定数である。

【0191】

N_{hb} は方程式2：

$$N_{hb} = n_{bonds} f(R, \dots) \times f(N_{neighb}) \times f_{pcc}$$

によって計算される。

【0192】

50

$f(R, \quad)$ は、理想状態からの水素結合の大きな偏差を説明し、方程式 3 によって計算されるペナルティ関数である：

$$f(R, \quad) = f_1(R) \times f_2(\quad)$$

ここで、 $f_1(R) = 1$ ($R \leq \text{TOL}$ の場合)、

または $= 1 - (R - \text{TOL}) / 0.4$ ($R \leq 0.4 + \text{TOL}$ の場合)、

または $= 0$ ($R > 0.4 + \text{TOL}$ の場合)。

さらに、 $f_2(\quad) = 1$ ($\quad < 30^\circ$ の場合)

または $= 1 - (\quad - 30) / 50$ ($\quad \leq 80^\circ$ の場合)

または $= 0$ ($\quad > 80^\circ$ の場合)。

【0193】

10

TOL は水素結合長さ ($= 0.25$) で許容される偏差、

R は H - O / N 水素結合長さの理想的な値 ($= 1.9$) からの偏差、

\quad は水素結合角度 $\angle_{\text{N/O-H, O/N}}$ の理想的な値 ($= 180^\circ$) からの偏差、

$f(N_{\text{neighb}})$ は、タンパク質表面の凹面と凸面の部分を識別し、したがってタンパク質表面で見られるものではなくポケットで見られる極性相互作用に大きな重みを割り当てる。この関数は下記方程式 4：

$$f(N_{\text{neighb}}) = (N_{\text{neighb}} / N_{\text{neighb},0}) \quad (\text{ここで、} \quad = 0.5)$$

によって計算される。

【0194】

N_{neighb} は任意の所与のタンパク質原子に 5 より接近している非水素タンパク質原子の数であり、

20

$N_{\text{neighb},0} =$ 定数 25 である。

【0195】

f_{pcs} は 1 つの水素結合当たり極性接触表面積を考慮に入れた関数であり、したがって強い水素結合と弱い水素結合を区別し、その値は次の基準によって決定される：

$f_{\text{pcs}} =$ ($A_{\text{polar}} / N_{\text{HB}} < 10^{-2}$ の場合)、

または $f_{\text{pcs}} = 1$ ($A_{\text{polar}} / N_{\text{HB}} > 10^{-2}$ の場合)

A_{polar} はタンパク質リガンド接触表面の大きさであり、

N_{HB} は水素結合の数であり、

\quad は定数 $= 1.2$ である。

30

【0196】

修正されたベームスコアリング関数の実行のためには、イオン相互作用からの寄与、 G_{ionic} を上記水素結合からの寄与と同様の方法で計算する (同じ幾何学依存性が仮定されるため)。

【0197】

N_{lip0} 項は方程式 5 によって計算される：

$$N_{\text{lip0}} = \sum_{\text{IL}} f(r_{\text{IL}})$$

$f(r_{\text{IL}})$ はすべての脂肪親和性リガンド原子について、1 また、すべての脂肪親和性タンパク質原子について L であり、以下の基準により計算される：

$f(r_{\text{IL}}) = 1$ ($r_{\text{IL}} \leq R_1$) $f(r_{\text{IL}}) = (r_{\text{IL}} - R_1) / (R_2 - R_1)$ で $R_2 < r_{\text{IL}} > R_1$ の場合、

40

$f(r_{\text{IL}}) = 0$ ($r_{\text{IL}} \geq R_2$ の場合)。

【0198】

ここで、 R_1 は $r_1^{\text{vdw}} + r_L^{\text{vdw}} + 0.5$ および

$R_2 = R_1 + 3.0$ であり、

r_1^{vdw} は、原子 1 のファンデアワールスの半径であり、

r_L^{vdw} は、原子 L のファンデアワールスの半径である。

【0199】

N_{rot} はアミノ酸側鎖の回転可能な結合の数であり、非環式の $sp^3 - sp^3$ 結合および $sp^3 - sp^2$ 結合の数である。末端 CH_3 または NH_3 の回転は考慮に入れない。

50

【0200】

最後の項 E_{vdw} は方程式 6 によって計算される：

$$E_{vdw} = \frac{1}{2} \left(\frac{r_1^{vdw} + r_2^{vdw}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_1^{vdw} + r_2^{vdw}}{r} \right)^6$$

【0201】

ここで σ_1 と σ_2 は原子同一性に依存する定数であり、
 $r_1^{vdw} + r_2^{vdw}$ はファンデアワールスの原子半径であり、
 r は 1 対の原子間の距離である。

【0202】

方程式 6 に関して、1 つの実施形態では、定数 σ_1 と σ_2 はそれぞれ原子ごとに以下の値を与えられる：C：0.245、N：0.283、O：0.316、S：0.316 (つまり、炭素、窒素、酸素および硫黄のそれぞれの原子について)。方程式 5 および 6 については、ファンデアワールスの半径はそれぞれ原子ごとに以下の値を与えられる：C：1.85、N：1.75、O：1.60、S：2.00。

10

【0203】

タンパク質リガンド相互作用についての現時点での理解の制約内ではあるが、上記の方程式に現われるすべての所定の値および定数がすべて決定されることは理解されるべきである (特に本願で試みられている計算のタイプについて)。したがって、このスコアリング関数がさらに精緻化された場合には、これらの値および定数を変更することが可能で、したがって、リガンドへのタンパク質の結合エネルギーを評価する項において所望の結果を与える適当な数値を使用してもよく、したがって、本発明の範囲内である。

20

【0204】

上記のように、スコアリング関数は、側鎖コンホメーション、原子同一性および原子間の距離のデータベースから抽出されたデータに適用される。本発明を説明する目的のために言えば、このデータベースに含まれる MHC クラス II 分子の数は 42 個のモデルと 4 つの解決された構造である。本発明の計算方法の構築はモジュール化された性質を有するため、新しいモデルを加えペプチド骨格ライブラリーと側鎖コンホメーション関数を用いて走査するだけで、上記のペプチドスコアリング関数によって処理できる追加のデータセットを作成できることは上記の説明から明らかである。これにより、走査された MHC クラス II 分子のレパートリーを容易に増加させることが可能になり、あるいは、データが入手できる場合には構造および関連データを置き換えて、既存の対立遺伝子のより正確なモデルを作成することができる。

30

【0205】

本発明の予想方法は、様々な MHC クラス II 分子に対する有する親和性が実験的に測定された多数のペプチドを含むデータセットにより校正できる。計算値を実験値と比較することによって、すべての実験的に測定した T 細胞エピトープが正確に予想されることがわかれば有益性の一端を決定できる。

【0206】

利用可能ないくつかの精巧な方法論と比較して、上記のスコアリング関数は比較的単純であるが、計算が非常に急速に実行される、ということが理解されるべきである。また、目的が、選択された MHC クラス II タンパク質の結合溝に収容される各ペプチドについて真の結合エネルギーを自身計算するものではないことも理解されるべきである。根本的な目的は、選択されたタンパク質の 1 次構造 (すなわち、アミノ酸配列) に基づいて T 細胞エピトープの位置を予想する助けとして相対的な結合エネルギーデータを得ることである。比較的高い結合エネルギー、すなわち選択された閾値以上の結合エネルギーは、リガンド中の T 細胞エピトープの存在を示唆するだろう。次いで、リガンドに少なくとも 1 回のアミノ酸置換を施し、結合エネルギーを再計算すればよい。計算が迅速性を有するため、ペプチド配列のこれらの操作はコストに見合う利用可能なコンピューターハードウェアにおいてプログラムのユーザインターフェース内で対話形式に実行できる。したがって、コンピューターハードウェアへの大きな投資は要求されない。

40

【0207】

50

同じ目的のために他の利用可能なソフトウェアを使用できるかもしれないことは当業者には明白であろう。特に、タンパク質結合サイト内にリガンドをドッキングさせ得るより精巧なソフトウェアを、エネルギー最小化と共に使用してもよい。ドッキングソフトウェアの例は次の通りである：D O C K (Kuntz et al., J.Mol.Biol., 161: 269-288(1982))、L U D I (Boehm, H.J., J.Comput Aided Mol.Des., 8: 623-632(1994))およびF L E X X (Rarey M., et al., ISMB, 3:300-308(1995))。分子モデリングおよび操作ソフトウェアの例としては：A M B E R (Tripos)およびC H A R m (Molecular Simulations Inc.)。これらの計算方法の使用は、必要な計算を行うために要求される処理時間の長さにより本発明方法の処理能力を厳しく制限するだろう。しかし、本発明の方法によって「陽性なバインダー」であると判明したペプチドについて結合エネルギーのより正確な計算結果を得るために「第2のスクリーン」として、このような方法を使用し得るというのもあり得ることである。洗練された分子の機械的または分子の動的な計算のための処理時間の制限は、これらの計算を行うソフトウェアの設計およびコンピューターハードウェアの現在の技術制限の両者によって決まる。将来的には、より効率的なコードが書かれ、さらにコンピュータープロセッサ速度の持続的な増加によって、より扱いやすい時間枠内でそのような計算を行うことが実現可能になるかもしれない。巨大分子に適用されるエネルギー関数および折り畳まれたタンパク質構造内で起こる様々な相互作用についての考慮に関するさらに詳しい情報は以下に見られる：Brooks, B.R., et al., J.Comput.Chem., 4:187-217(1983)。一般的なタンパク質 - リガンド相互作用に関するさらに詳細な情報は以下に見られる：Dauber-Osguthorpe et al., Proteins4(1):31-47(1988)。その内容の全体は言及によって本願に組み入れられる。有用な背景的事項は、例えば以下に見られる：F a s m a n , G . D . , e d . , P r e d i c t i o n o f P r o t e i n S t r u c t u r e a n d t h e P r i n c i p l e s o f P r o t e i n C o n f o r m a t i o n , P l e n u m P r e s s , N e w Y o r k , I S B N : 0 - 3 0 6 4 3 1 3 - 9。

10

20

30

【0208】

(対応するもの)

本発明は他の具体的なかたちでその精神または基本的な特徴から離れることなく具体化することができる。さらなる具体例として、ここに記載されている発明に限定するというよりは実例として全ての面において、従って考えうる。本発明の範囲内で、従って、先述の明細書によってというよりはさらなる特許請求の範囲によって意図される。さらに、本特許請求の範囲の同等の意味および範囲内に起こる全ての変化は、その中に包括されることを意図している。

【0209】

(参考文献による組み込み)

ここで上記に意図する、全ての特許、特許明細書および化学文献は、すべてこの明細書の中に組み込まれる。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/079232 A2

- (51) International Patent Classification: C07K (81) Designated States (national): AE, AG, AI, 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, LL, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/09815 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 30 March 2002 (30.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/280,625 30 March 2001 (30.03.2001) US
- (71) Applicant: LEXIGEN PHARMACEUTICALS CORP. [US/US], 125 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421 (US).
- (72) Inventor: GILLIES, Stephen, D., 159 Sunset Road, Carlisle, MA 01741 (US).
- (74) Agent: WALLER, Patrick, R., H., Testa, Hurwitz & Thibault, LLP, High Street Tower, 125 High Street, Boston, MA 02110 (US).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/079232 A2

(54) Title: REDUCING THE IMMUNOGENICITY OF FUSION PROTEINS

(57) Abstract: Disclosed are compositions and methods for producing fusion proteins with reduced immunogenicity. Fusion proteins of the invention include a junction region having an amino acid change that reduces the ability of a junctional epitope to bind to MHC Class II, thereby reducing its interaction with a T-cell receptor. Methods of the invention involve analyzing, changing, or modifying one or more amino acids in the junction region of a fusion protein in order to identify a T-cell epitope and reduce its ability to interact with a T-cell receptor. Compositions and methods of the invention are useful in therapy.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

REDUCING THE IMMUNOGENICITY OF FUSION PROTEINS

5

Related Applications

[0001] This application claims priority to and the benefit of U.S. provisional patent application serial number 60/280,625, filed March 30, 2001, the entire disclosure of which is incorporated herein by reference.

Field of the Invention

10 [0002] The present invention relates generally to methods and compositions for making and using modified fusion proteins with reduced or no immunogenicity as therapeutic agents. More specifically, the invention relates to fusion proteins, made less immunogenic by identifying candidate T-cell epitopes and modifying the amino acid sequence to eliminate such epitopes.

15

Background of the Invention

[0003] Many therapeutic proteins are normal human proteins. For example, interleukin-2, erythropoietin, and growth hormone are all human proteins that are given to humans who already usually make endogenous levels of these proteins. In general, immune responses against completely normal human proteins are rare when
20 these proteins are used as therapeutics.

[0004] Recently it has become apparent that many fusion proteins with artificial activities are useful as therapeutic proteins. For example, Enbrel is a fusion of the extracellular domain of a TNF receptor with an IgG1 Fc region. Enbrel is used to treat rheumatoid arthritis, and is thought to function by titrating TNF and preventing
25 TNF action. However, a significant incidence of anti-Enbrel antibodies have been noted in patients treated with Enbrel.

[0005] Another example of a therapeutically useful class of fusion proteins is the immunocytokines. These proteins include an antibody moiety and a cytokine moiety, and are useful for targeting cytokines to diseased cells, such as cancer cells.

30 However, the therapeutic use of many of these fusion proteins is curtailed due to their immunogenicity in mammals, especially humans.

[0006] Therefore, there is a need to generate fusion proteins with reduced immunogenicity in order to use these proteins in therapy.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Summary of the Invention

- [0007] The present invention features methods and compositions useful for producing fusion proteins with reduced immunogenicity for use in therapy. For example, the invention features immunocytokines, immunofusins, immunoligands, other antibody and Fc fusion proteins, cytokine-cytokine fusion proteins, and albumin fusion proteins with decreased immunogenicity.
- [0008] The invention relates in part to the insight that fusion proteins contain sequences that are "non-self." For example, even in a fusion between two human proteins, the region surrounding the fusion junction comprises a peptide sequence that is not normally present in the human body. For example, a protein drug such as Enbrel is derived from two normal human proteins: TNF receptor and IgG1. However, the junction between TNF receptor and IgG1 is a peptide sequence that is not normally found in the human body.
- [0009] Preferred methods of the invention involve reducing the immunogenicity of a fusion protein by reducing the ability of a junctional epitope (junctional peptide) to interact with a T-cell receptor by reducing its ability to bind (its binding affinity) to MHC molecules. According to the invention, the junctional epitope or peptide is preferably "non-self." In general, proteins, including therapeutic proteins, are immunogenic, in part because proteins are endocytosed by antigen-presenting cells and proteolyzed, and the resulting peptides bind to molecules called major histocompatibility complex (MHC) that present the peptides to T cells. The antigenic peptide – MHC complex on the surface of an antigen presenting cell (APC) activates T-cells to proliferate, differentiate and release cytokines. In parallel, B-cell differentiation and antibody production is induced which may further limit the therapeutic protein's effectiveness due to clearance. Thus, the antigenic peptide, if derived from a therapeutic protein, is capable of inducing a series of undesired immune responses. The therapeutic protein's effectiveness is limited due to titration by antibodies, and the induction of T-cell and B-cell responses is often deleterious due to inflammatory and allergic reactions in the patient.
- [0010] The invention provides (1) the identification of novel amino acid sequences in the region of the immunoglobulin – target protein junction with one or more candidate T-cell epitopes; and (2) the modification of these amino acid sequences to reduce or eliminate the presence of peptides, derived from the junction sequence, that function as T-cell epitopes.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

- [0011] The invention provides two general classes of compositions and methods relating to the reduction of immunogenicity. According to one embodiment of the invention, potential non-self T-cell epitopes are identified in sequences that span a fusion junction. For example, potential non-self T-cell epitopes are identified by computational methods based on modeling peptide binding to MHC Class II molecules. Substitutions are then made such that the ability of peptides deriving from the junction region to bind to MHC Class II is reduced or eliminated. This process of identifying and modifying peptides which bind to MHC Class II is termed "de-immunization" and the resultant modified protein molecules are termed "de-immunized."
- [0012] According to another embodiment of the invention, one or more glycosylation sites is introduced at a fusion junction. An N-linked glycosylation site is preferably used, although an O-linked glycosylation site may also be used. According to a preferred embodiment, amino acids in a junction region surrounding a fusion junction of wild-type sequence are mutated such that the last amino acid of the N-terminal fusion partner is mutated to an asparagine, and the first two amino acids of the second fusion partner are mutated to a glycine followed by a serine or a threonine.
- [0013] According to the invention, removal of MHC Class II binding is preferred in situations where a protein is to be produced in bacteria or in an organism that does not generate a mammalian glycosylation pattern, such as yeast or insect cells.
- [0014] The introduction of glycosylation sites may be preferred when the protein is to be produced in a mammalian cell line or in a cell line that creates a glycosylation pattern that is innocuous to mammals.
- [0015] In a preferred embodiment, a component of the fusion protein is a cytokine. The term "cytokine" is used herein to describe naturally occurring or recombinant proteins, analogs thereof, and fragments thereof that elicit a specific response in a cell that has a receptor for that cytokine. Preferably, cytokines are proteins that may be produced and excreted by a cell. Preferably, cytokines include interleukins such as interleukin-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16 and IL-18, hematopoietic factors such as granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), G-CSF and erythropoietin, tumor necrosis factors (TNF) such as TNF α , lymphokines such as lymphotoxin, regulators of metabolic processes such as leptin, and interferons such as interferon α , interferon β , and

WO 02/079232

PCT/US02/09815

interferon γ and chemokines. Preferably, the antibody-cytokine fusion protein of the present invention displays a cytokine specific biological activity.

[0016] In another preferred embodiment, a component of the fusion protein is an anti-obesity cytokine. For example, a component is leptin, CNTF, or a portion of Acrp30.

5 [0017] In an alternative preferred embodiment, a component of the fusion protein is a hormone. For example, a component may be insulin, growth hormone, or glucagon-like peptide 1 (GLP-1).

[0018] In yet another alternative embodiment, a component of the fusion protein is a ligand-binding protein with biological activity. In a preferred embodiment, an
10 extracellular domain of TNF receptor is used.

[0019] According to one series of embodiments, a fusion protein of the invention comprises the N-terminus of a non-antibody moiety fused to the C-terminus of an antibody moiety. According to another series of embodiments, a fusion protein of the invention comprises the C-terminus of a non-antibody moiety fused to the N-terminus
15 of an antibody moiety. According to the invention, an antibody moiety can be an intact immunoglobulin or a portion of an intact immunoglobulin. A portion of an immunoglobulin can include a variable region or a constant region or both. Preferred immunoglobulins include Fc regions or portions thereof. A preferred embodiment of the invention includes an IgG1 immunoglobulin isotype, or a portion thereof,
20 modified to be less immunogenic and/or to have a longer serum half-life. For example, an IgG1 with modification of amino acid residues near the CH3 - cytokine junction is preferred. For certain applications, antibody moieties from IgG2 or IgG4 isotypes are preferred.

[0020] Immunocytokines are only one example of a tumor-targeted fusion protein
25 therapy. Other tumor-toxic molecules can also be targeted to tumors by fusion to tumor-specific antibodies. In addition, antibody fusion proteins can attack other types of diseased cells, such as virus-infected cells. Another approach to engineering targeted fusion proteins has been use of Fc-X and X-Fc technology where X is a polypeptide. These technologies utilize the knowledge that production and collection
30 of a target protein is improved if the polypeptide of interest is linked to the Fc portion of an immunoglobulin. For Fc-X fusion proteins, a signal peptide, followed by the Fc fragment of an immunoglobulin gene is the N-terminal fusion partner to the target protein. In some instances it is specifically advantageous to engineer a fusion protein

WO 02/079232

PCT/US02/09815

in the X-Fc orientation. With these constructs the target protein is the N-terminal fusion protein and the Fc fragment follows. For some proteins this approach is useful, as has been shown with lymphocyte cell surface glycoprotein (LHR) (US patent 5,428,130), and glucagon-like peptide (GLP-1).

5 [0021] Accordingly, methods and compositions of the invention provide forms of Fc-X and X-Fc fusion proteins with reduced-immunogenicity. According to the invention, the immunogenicity of a fusion protein can be assayed according to a method known in the art or disclosed herein.

[0022] Methods and compositions of the invention also provide albumin fusion
10 proteins with reduced immunogenicity. Human serum albumin (HSA), due to its remarkably long half-life, its wide in vivo distribution and its lack of enzymatic or immunological functions, has been used as a carrier for therapeutic peptides/proteins (Yeh et al, PNAS 89:1904-1908, 1992). A genetic fusion of a bioactive peptide to HSA is useful for recovery of a secreted therapeutic HSA derivative. However,
15 according to the invention, albumin fusion proteins such as HSA-CD4 have a novel junction which generally contains one or more T-cell epitopes capable of being presented on MHC class II molecules. The invention provides less immunogenic forms of albumin fusion proteins, and general methods for reducing the immunogenicity of albumin fusion proteins. According to the invention, useful
20 albumin proteins include species, allelic, and mutant variants of albumin, including fragments thereof. Preferred albumin proteins retain the structural and functional properties of a wild-type albumin protein such as HSA.

[0023] In another aspect, the invention provides de-immunized antibody fusion
25 proteins with normal, mutant, or hybrid isotypes that comprise useful mutations. These mutations may be near the junction or at positions distinct from the region of the junction.

[0024] For example, the invention provides a de-immunized immunocytokine,
modified at the junction, with a point mutation at the junction between the IgG and non-IgG moieties. The cytokine moiety includes any cytokine but preferably IL-2 or
30 IL-12. In one embodiment, the amino acid changes involve changing the C-terminal lysine of the antibody moiety to a hydrophobic amino acid such as alanine or leucine. A key advantage of combining such mutations with a de-immunizing modification of the invention is that the mutations act together to increase serum half-life and to decrease immunogenicity. The methods described herein for combining de-

WO 02/079232

PCT/US02/09815

immunization of a fusion junction with a serum-half-life altering mutation are useful to improve significantly the clinical efficacy of these fusion proteins.

[0025] In another aspect, the invention provides immunocytokines comprising a hybrid antibody moiety that includes domains from different Ig isotypes, preferably from both IgG1 and IgG2 isotypes, and a de-immunizing modification at the fusion junction. For example, the invention provides a de-immunized, junction-modified immunocytokine using an IgG2 and an IgG2h hybrid (IgG2 modified in the hinge region to IgG1). In a preferred embodiment, the hybrid fusion protein consists of a de-immunized immunoglobulin moiety composed of an IgG (γ 1:CH1-H)(γ 2: CH2-CH3) and a cytokine moiety.

[0026] In another aspect, the invention provides novel nucleic acid sequences that encode fusion proteins with reduced immunogenicity or facilitate the expression, production, and secretion of fusion proteins with reduced immunogenicity. Such nucleic acids are generated according to standard recombinant DNA techniques.

[0027] In a preferred embodiment, a nucleic acid molecule encodes an immunocytokine fusion protein. A preferred immunocytokine includes a cytokine, for example, Interleukin 2, and a tumor specific monoclonal antibody such as an antibody to human epithelial cell adhesion molecule KSA (EP-CAM)(huKS).

[0028] In another preferred embodiment, nucleic acid molecules encode Fc fusion proteins in various configurations. The nucleic acid molecule encodes serially in a 5' to 3' direction, (i) a signal sequence, an immunoglobulin Fc region and a target protein sequence or (ii) a signal sequence, a target protein, and an immunoglobulin Fc region, or (iii) a signal sequence, a first target protein, an immunoglobulin Fc region, and a second target protein. The resulting nucleic acid molecule thereby encodes an Fc-X, X-Fc, or X-Fc-Y structure where X and Y are a target protein. In an alternative embodiment, a nucleic acid encodes an Fc-X, X-Fc, or X-Fc-Y protein without a signal sequence.

[0029] In another preferred embodiment, a nucleic acid of the invention encodes an Ig fusion protein with mutant or hybrid isotypes. Specifically, the nucleic acid provides antibody moieties with hybrid isotypes, or alternatively with altered hinge regions. For example, the fusion protein consists of an IgG2, modified to contain fewer disulfide bonds in the hinge region, or an IgG2 CH2 and CH3 region in which the

WO 02/079232

PCT/US02/09815

hinge region derives from another antibody, preferably a normal or mutant IgG1 hinge region.

[0030] A nucleic acid of the invention is preferably incorporated in operative association into a replicable expression vector which is then introduced into a mammalian host cell competent to produce the fusion protein. The resultant fusion protein is produced efficiently and secreted from the mammalian host cell. The secreted fusion protein is subsequently collected from the culture media without lysing the mammalian host cell. The protein product is assayed for activity and/or purified using common reagents as desired, and/or cleaved from the fusion partner, all using conventional techniques.

[0031] Thus, the invention also provides methods for producing fusion proteins with reduced immunogenicity.

[0032] Methods and compositions of the invention are also useful to provide therapeutic treatment using a fusion protein that has been rendered less immunogenic.

15 An overall object of the invention is to provide processes that are both efficient and inexpensive as well as proteins that are less immunogenic. Preferred therapeutic compositions of the invention include a therapeutically effective amount of de-immunized fusion protein. Preferably, the de-immunized fusion protein is administered along with a pharmaceutically acceptable carrier.

20 [0033] The foregoing and other aspects, features and advantages of the present invention will be made more apparent from the detailed description, drawings, and claims that follow.

Detailed Description of the Invention

[0034] All proteins, including antibodies, that are administered to a patient for therapeutic use have the potential to induce an immune response in the recipient host. This immune response is mediated by T-lymphocytes (T-cells) which then trigger B-lymphocytes (B-cells) to make antibodies. Antibody production against the therapeutic agent is detrimental since it leads to more rapid elimination of the therapeutic agent and may induce an allergic response.

30 [0035] The present invention provides methods of reducing the immunogenicity of fusion proteins. According to one method of this invention, potential T-cell epitopes are identified in the junction region of a fusion junction in a fusion protein. T-cell epitopes are identified by a variety of computer and non-computer methods, including prediction based on structure-based computer modeling or by synthesis of peptides

WO 02/079232

PCT/US02/09815

and testing for binding to specific MHC Class II molecules or in an immunogenicity assay.

5 [0036] According to the invention, a fusion junction is defined as the position between the last (C-terminal) amino acid of a first protein or peptide and the first (N-terminal) amino acid of a second protein or peptide in a fusion protein. Accordingly, a fusion junction includes any amino acids between the last amino acid of one protein and the first amino acid of a second protein. In one embodiment, the fusion junction includes a linker.

10 [0037] According to the invention, a junction region is the region of a fusion protein surrounding or spanning the fusion junction between two proteins. A junction region preferably includes between 1 and about 100 amino acids, more preferably between 1 and about 50 amino acids, or between 1 and about 25 amino acids, and even more preferably between 1 and about 15 amino acids, or between 1 and 9 amino acids. In one embodiment, a junction region comprises a spacer or linker peptide inserted at the
15 junction point between the two proteins. According to the invention, a junction region including a spacer or linker peptide can also be de-immunized to minimize the response of a patient to a fusion protein including the spacer or linker.

[0038] According to the invention, a junctional T-cell epitope is defined as a peptide sequence capable of binding an MHC Class II containing at least one amino acid
20 derived from each of at least two different fusion partner proteins. For example, Paul (*Fundamental Immunology*, Chapter 8, Table 8, p. 276 [2000] 4th ed.) illustrates segments of 10 amino acids that can bind to an MHC Class II molecule. In a junctional T-cell epitope, these 10 amino acid peptides are derived from different fusion partners. According to the invention a potential or candidate T-cell epitope
25 that spans a fusion junction (a candidate junctional T-cell epitope) preferably includes 1 to 8 amino acids from either side of the junction, and more preferably 1 to 10 or 1 to 11 amino acids from either side of the junction. Candidate epitopes are preferably 9, 11, or 12 amino acids long. Accordingly, since a junctional T-cell epitope of the invention includes at least one amino acid from each side of the junction, preferred
30 candidate T-cell epitopes are junctional epitopes that include 1-8 (or 1-10, or 11) amino acids from one side of the junction and also include a complementary number of amino acids from the other side of the junction to result in an epitope having 9-12 amino acids, and most preferably 9 amino acids.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0039] According to the invention, anchor residues within a junctional T-cell epitope are then mutated to prevent binding to an MHC Class II molecule. In general, care is taken to not introduce additional potential T-cell epitopes, and to preserve the function of each fusion partner.

5 [0040] According to the invention, a fusion of wild-type sequences is a fusion in which the sequences at the N-terminal and C-terminal sides of the fusion junction are derived directly from naturally occurring sequences.

[0041] According to the invention, a de-immunized fusion junction is a junction sequence in which one or more substitution mutations have been introduced relative
10 to a junction of wild-type sequences. In a most preferred embodiment, deimmunization of a fusion junction does not involve introduction of a linker, such as a 'non-immunogenic' Gly-Ser linker, and the spatial relationship between the fusion partners is not altered in a de-immunized fusion protein. According to the invention, one or more amino acids can be substituted or changed in the junction region either
15 N-terminally to the fusion junction, C-terminally to the fusion junction, or both N-terminally and C-terminally to the fusion junction.

[0042] According to the invention, a potential T-cell epitope is a sequence that, when considered as an isolated peptide, is predicted to bind to an MHC Class II molecule or an equivalent in a non-human species. A potential T-cell epitope is defined without
20 consideration of other aspects of antigen processing, such as the efficiency of protein uptake into antigen-presenting cells, the efficiency of cleavage at sites in an intact protein to yield a peptide that can bind to MHC Class II, and so on. Thus, the set of T-cell epitopes that are actually presented on MHC Class II after administration of a protein to an animal is a subset of the potential T-cell epitopes.

25 [0043] According to the invention, a T-cell epitope is an epitope on a protein that interacts with an MHC class II molecule. Without wishing to be bound by theory, it is understood that a T-cell epitope is an amino acid sequence in a protein or a fusion protein, that failed to undergo the negative T-cell selection process during T-cell development and therefore will be expected to be presented by an MHC Class II
30 molecule and recognized by a T-cell receptor. In a preferred embodiment of the invention, the non-self T-cell epitopes are present in the junction region at the fusion junction of two proteins that form a fusion protein.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0044] The invention provides non-computer methods for reducing or eliminating the number of T-cell epitopes in a fusion protein junction without requiring elaborate computer simulations or protein three-dimensional structures. In one embodiment, a method of the invention takes advantage of the fact that a core segment of nine amino acids interacts with both the MHC class II molecule as well as the T-cell receptor during antigen presentation. The N-terminal most amino acid is called an "anchor" position residue that binds to a deep pocket within the MHC class II molecule. One of the following amino acids is typically present at the anchor position which is important for binding to an MHC class II molecule: Leucine, Valine, Isoleucine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan. According to the invention, an additional 2 to 3 amino acids adjacent to the core 9 amino acids also affect the interaction with MHC molecules. In addition, the C-terminal most amino acid in the first protein of the fusion protein can generally be substituted. This is useful especially when the N-terminal fusion partner or first protein is known to be active when fused to the C-terminal fusion partner or second protein at the C-terminus of the first protein.

[0045] A general method of the invention includes mutating any Leucines, Valines, Isoleucines, Methionines, Phenylalanines, Tyrosines or Tryptophans that occur in the C-terminal most eight amino acids of an N-terminal fusion partner in a fusion protein. In one embodiment, one or more of these amino acids in a candidate junctional T-cell epitope amino acids is preferentially mutated to a Threonine, an Alanine or a Proline. This retains some of the hydrophobic nature of the amino acid that is replaced. In further embodiments of the invention, one more more of the above-mentioned amino acids is deleted from a candidate or potential junctional T-cell epitope, or replaced with an appropriate amino acid analog. According to the invention, if an amino acid is deleted to destroy a potential T-cell epitope, care is taken not to generate a new T-cell epitope that includes amino acids near the deletion.

[0046] According to the invention, it is often useful to construct a generalized expression plasmid construction intermediate comprising the coding sequence for an N-terminal fusion partner containing a mutation of one or more hydrophobic residues in the last eight amino acids. Generally, such a plasmid has one or more convenient restriction enzyme sites at or near the DNA encoding the C-terminus of the N-terminal fusion partner.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

- [0047] The purpose of a plasmid construction intermediate is to construct expression plasmids encoding a fusion protein in which one or more N-terminal fusion partners has one or more substitutions of a Leucine, Valine, Isoleucine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine, or Tryptophan to another amino acid in the eight C-terminal amino acids. The construction of such final expression plasmids may be accomplished by a variety of other methods well known in the art, such as generation of PCR fragments or synthetic nucleic acids, followed by ligation of the fragment into an appropriated vector or attachment with other sequences through well-known PCR techniques.
- 10 [0048] Specific preferred embodiments include Fc-X fusion plasmids, albumin-X fusion plasmids, scFv-X fusion plasmids, and Fab-X fusion plasmids. In the Fc(gamma)-X case, it is useful to introduce mutations into the coding sequence to bring about amino acid substitutions of the Leucine-Serine-Leucine-Serine segment near C-terminus the Fc region of an IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 molecule, as
- 15 diagrammed here for IgG1: Amino acid sequences of human Fc regions derived from IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 are depicted in SEQ ID NOs: 1, 2, 3 and 4 respectively. [0049] In one example, KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5) is changed to KSATATPGK (SEQ ID NO: 6). This mutation is designed to eliminate potential junctional T-cell epitopes and also remove a T-cell epitope in which the upstream Phenylalanine or
- 20 Tyrosine serves as a position 1 anchor residue. [0050] Alternatively, it is sometimes useful to combine mutations that remove candidate junctional T-cell epitopes with a mutation that extends the serum half-life. For example, by changing KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5) to KSATATPGA (SEQ ID NO: 7).
- 25 [0051] Other embodiments include substitutions in the LSLS segment to other amino acids such as Glycine or Proline. [0052] In the case of expression vectors used for making IgA fusion proteins, it is useful to delete some of the C-terminal amino acids, so that the cysteine near the C-terminus that is involved in oligomerization of IgA is deleted. For example, fifteen
- 30 amino acids can be deleted, such that the IgA heavy chain sequence ends with Proline-Threonine-Histidine before being fused to a second protein. In addition, it is useful to introduce the following changes near the C-terminus of CH3 domain of the IgA Fc region:
QKTIDRLAGKPTH (SEQ ID NO: 8) changed to QKTADRDTAGKPTH (SEQ ID NO: 9)

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0053] Additional de-immunized sequences in an IgA-X fusion protein are,
QKTPTRTAGKPTH (SEQ ID NO: 10)
QKTPTRPAGKPTH (SEQ ID NO: 11)
QKTATRPAGKPTH (SEQ ID NO: 12).

5

[0054] In the case of an albumin-X fusion, it is useful to introduce the following changes in an albumin-X expression plasmid such that the C-terminus of albumin is modified as follows:
KKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 13) changed to KKLVAASQAATTA (SEQ ID NO:
10 14).

[0055] Thus, the invention provides nucleic acid sequences and proteins that are useful in construction of less immunogenic fusion proteins. Specifically, the invention provides proteins with mutations of any Leucines, Valines, Isoleucines,
15 Methionines, Phenylalanines, Tyrosines, or Tryptophans in the last eight amino acids. The proteins are preferably human proteins with sequences that generally correspond to sequences found in the human body. The invention also provides nucleic acid sequences encoding such proteins. The nucleic acid sequences for this aspect of the invention may exist as plasmids, PCR-generated fragments, or nucleic acids produced
20 by chemical synthesis.

[0056] The invention also provides expression plasmids encoding a fusion protein in which one or more N-terminal fusion partners has one or more mutations of a Leucine, Valine, Isoleucine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine, or Tryptophan to another amino acid in the eight C-terminal amino acids.

25 [0057] For example, plasmids encoding an Fc-IL2 or whole-antibody-IL2 fusion protein in which the Fc region is mutated as described above are provided by the invention. In addition, fusions comprising an Fc region mutated as described above to normal or mutated forms of erythropoietin, such as the forms of erythropoietin described in WO01/36489, are provided by the invention.

30 [0058] The invention also provides a method for reducing immunogenicity of a fusion protein junction by introducing an N-linked or O-linked glycosylation site near, or preferably, at a fusion junction. For example, the amino acids Asparagine, Serine or Threonine, and a third residue are introduced as follows. Consider a sequence in

WO 02/079232

PCT/US02/09815

which X's represent amino acids of an N-terminal fusion partner, and Z's represent amino acids of a C-terminal fusion partner.

$$X_1X_2X_3X_4X_5X_6Z_1Z_2Z_3Z_4Z_5Z_6Z_7Z_8Z_9$$

$$X_1X_2X_3X_4X_5N\text{GS}Z_3Z_4Z_5Z_6Z_7Z_8Z_9$$

- 5 [0059] According to this method, binding of a junction peptide is not necessarily blocked by introduction of the glycosylation site. However, any peptide that is bound in the MHC Class II groove and has the glycosylated asparagine C-terminal to the N-terminal-most anchor residue will not function as a T-cell epitope. The presence of the large glycosylation moiety will sterically hinder recognition of the MHC Class
- 10 II/peptide complex. A preferred glycosylation site includes the sequence Asn-X-Ser or Asn-X-Thr wherein X is preferably Gly, but can be any amino acid.
- [0060] Furthermore, the introduction of mutations introducing Glycine and Serine residues does not create new T-cell epitopes. Neither Glycine nor Serine can act as an anchor residue. During antigen processing, a fusion protein, in principle, is cleaved
- 15 between the glycosylated Asparagine and the Glycine or between the Glycine and the Serine. In either case, the resulting peptides have the mutant Glycine and/or Serine residues N-terminal to an anchor residue, and thus the mutant Glycine and/or Serine residues are not recognized by a T cell receptor, since residues N-terminal to an anchor residue are outside the region recognized by the TCR.
- 20 [0061] In a variation of this method, a fusion junction region already contains a Serine or Threonine preceded by an amino acid residues such as Glycine, Serine, Alanine, etc. The second method is preferably used when a junction region is flexible and displaced from the hydrophobic core of each fusion partner, so that the novel N-linked glycosylation does not interfere with the folding or function of either fusion
- 25 partner.
- [0062] It is a straightforward matter for those skilled in the art of protein engineering to determine when introduction of a glycosylation site is feasible. For example, the three-dimensional structure of each fusion partner, or close homologs of the fusion partners, may be known. It is often the case that a few amino acids at the N-terminus
- 30 or C-terminus of a protein are not resolved in an X-ray structure, or exhibit many possible conformations in an NMR structure. In cases where three or more amino acids are disordered on either side of a glycosylation site, there is some confidence that the resulting fusion protein will fold correctly and both partners will be active.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Some routine experimentation is necessary to determine whether a given fusion protein construct will be functional.

[0063] In preferred embodiments of the invention, both the N-terminal and the C-terminal partner of the fusion protein are human proteins. Potential T-cell epitopes in such fusion proteins are created from the final 8 amino acids of the N-terminal partner (first protein) combined with the first 8 amino acids of the C-terminal partner (second protein). This provides a series of 8 hybrid 9-mers created from the first and second proteins. Any aliphatic or aromatic residue (Leucine, Valine, Isoleucine, Methionine, Phenylalanine, Tryptophan or Tyrosine) in the last 8 amino acids of the first protein presents a high risk of creating an MHC binding peptide with the amino acid in the first position (anchor position) that binds the pocket of the MHC molecule.

Therefore, substitution of any of the above-mentioned amino acids, with an amino acid that is not one of the above-mentioned amino acids, and preferably with Alanine, Proline, or Threonine, will remove a candidate T-cell epitope.

[0064] For example, in the case of an Fc fusion protein containing the sequence:

HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 15),

the leucine residues create two potential epitopes. Therefore, the sequence can be de-immunized as;

HNHYTQKSATATPGKGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16),

by changing L to A and S to T. These changes remove epitopes with Leucine as the first amino acid in the MHC binding pocket and Tyrosine as the first amino acid in the MHC binding pocket, respectively.

[0065] These substitutions for deimmunization work in humans for all Fc fusion proteins, both with and without linker sequences, preferably when 1) both proteins in the fusion protein are human proteins; 2) the MHC binding peptides in the natural sequences of both proteins are ignored; and 3) the 9-mers identical to the original sequences are also ignored.

[0066] Methods of the invention are generally applicable in all vertebrate organisms, preferably in mammals and most preferably in humans. The invention is illustrated further by the following non-limiting examples.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Examples**Example 1: Deduction of immunogenic reactive epitopes of huKS-IL2 immunocytokine.**

- 5 [0067] HuKS-IL2 consists of humanized V_H and V_L regions combined with human H and L chain constant regions. The H chain was fused at its carboxyl terminus to the mature sequence of human IL-2 as described previously. This H chain is of the γ 1 isotype and has high affinity for Fc receptors. Because of this high affinity HuKS-IL2 was cleared quickly from the circulation. Without wishing to be bound by theory, the clearance of HuKS-IL2 presumably occurs via FcR-bearing cells in the liver (Kupffer cells) and spleen (antigen presenting cells).
- 10 [0068] It was previously established that certain patients had made immune responses to some portion of the huKS-IL2 molecule, however, the epitopes recognized by these antibodies are not known. To deduce the reactive epitopes, relative reactivities of patient sera with huKS-IL2 were compared to other related proteins:
- 15 (1) Hu14.18-IL2, a molecule with completely different humanized V regions but exactly the same C regions and fusion junction with IL-2;
- (2) VH1, a de-immunized form of huKS-IL2 with no T-cell epitopes in the VH and VL regions, derived from mouse V regions with surface-exposed mouse B-cell epitopes veneered to human residues.
- 20 (3) VH2, a de-immunized form of huKS-IL2 with one remaining T-cell epitope in CDR3, derived from mouse V regions with surface-exposed mouse B-cell epitopes veneered to human residues, in which the VH contains one T-cell epitope.
- (4) 425-IL2 constructed with either KOL or EU Cy1 regions (rather than KS) (to compare allotypic reactivity);
- 25 (5) huKS-mIL2 – a molecule with the huKS V regions fused to mouse C regions and mouse IL-2;
- (6) human Fc-IL2;
- (7) human Fc only;
- (8) human IL-2 only.
- 30 [0069] Immunoglobulin fusion proteins and fragments were purified by protein A Sepharose chromatography and were coated on 96-well plates in bicarbonate buffer and then blocked with 1% goat serum containing 1% BSA. Dilutions of patient sera were incubated and then unbound material was removed by three washes with PBS-

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Tween. Bound human antibodies from the patient sera were detected with various HRP-conjugated antibodies depending on the bound protein. Generally, goat anti-human λ chain HRP conjugate was used because most of the plate-bound proteins consisted of human Fc and human κ chains.

- 5 [0070] Certain patient sera showed a clear reactivity to huKS-IL2 that was not detectable in pre-injection sera from the same patients. Preimmune antisera was used to establish a baseline non-immunized control. Reactivity seen in patient sera can be attributed to (1) anti-IL2 reactivity, (2) anti Fc (allotypic) reactivity, (3) reactivity to the novel junction sequence or (4) anti-idiotypic reactivity with the KS idiotype, or a
- 10 combination of reactivities.
- [0071] No patient serum reacted significantly with recombinant IL-2 or to the Fc region (1 and 2 above). Some patients showed anti-idiotypic reactivity to the KS V regions. All patient sera showed reactivity with Fc-IL2. Three of four patients showed reactivity to Fc-IL2. The presence of reactivity against Fc-IL2 but not against
- 15 either Fc or IL2 suggests that the junction between Fc and IL2 was recognized by the patients' anti-sera.

Example 2: Modification of amino acid residues at the junction of an antibody-cytokine fusion protein to reduce immunogenicity by elimination of MHC Class II binding motifs

- 20 [0072] Peptide threading analysis identified two overlapping peptide segments with strong MHC binding potential at the junction between the Fc and IL2 portion of the immunocytokine. The peptide threading and identification of potential T-cell epitopes was performed as disclosed in Carr (WO00/34317). Amino acid changes
- 25 were introduced such that the existing potential MHC Class II binding epitopes were eliminated, but new potential MHC Class II epitopes were not introduced.
- [0073] Modification of a junction sequence LSLSPGK-AP (SEQ ID NO: 17) to ATATPGA-AP (SEQ ID NO: 18) ("LSLS to ATAT"), where the hyphen is the immunocytokine huKS-IL2 junction, made junction-derived peptide sequences
- 30 incapable of binding to any human MHC Class II with an affinity high enough to result in immunogenicity.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Example 3: Modification of amino acid residues at the junction of immunocytokine fusion proteins to reduce immunogenicity

[0074] Modification of a junction sequence LSLSPGK-AP (SEQ ID NO: 17) to LNLSPGA-AP (SEQ ID NO: 19) ("LSLS to LNLS"), where the hyphen is the immunocytokine huKS-IL2 junction, results in junction-derived peptide sequences that are still capable of binding to certain MHC Class II molecules. However, when the KS-IL2 protein is expressed in mammalian cells and secreted, the protein is N-glycosylated near the junction because of the NXS/T sequence.

[0075] The resulting junction-derived peptides are not effective as T-cell epitopes, because when the junction-derived peptides are presented to T cells by MHC Class II, the large N-glycosylation moiety prevents specific docking between a T cell-receptor and MHC Class II.

Example 4: Characterization of the immune reactivity of antigen presenting cells to immunocytokine huKS-IL2 in comparison to a de-immunized huKS-IL2 immunocytokine.

[0076] Reduction of immunogenicity due to modification of the reactive epitope by mutating LSLS to ATAT is directly tested as follows. Synthetic peptides mimicking this sequence alter the immune response of a classic antigen presenting cell such as a dendritic cell (DC). The following synthetic peptides

KSLSLSPGK-APTS (SEQ ID NO: 20) and

KSATATPGK-APTS (SEQ ID NO: 21),

where the hyphen is the KS-IL2 junction, are used to stimulate DC-mediated antigen presentation to autologous T cells. The ability of those T cells to proliferate in response to a subsequent challenge with the peptide antigen serves as a measure of immunogenicity of that peptide.

[0077] Specifically, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated from leukopacks by standard density gradient techniques. Mononuclear cells are resuspended in serum-free Aim V culture media and allowed to adhere. After 2 h at 37 °C nonadherent cells are removed. Adherent cells are cultured for 7 days in media containing human GM-CSF (50 ng/ml) and IL-4 (20ng/ml) to derive immature dendritic cells (DC). After 7 days, the cells are harvested and phenotypically

WO 02/079232

PCT/US02/09815

characterized by flow cytometry with appropriate FITC-labeled Abs for MHC class I, MHC class II, CD80 and CD40 to confirm the immature DC phenotype.

5 [0078] Non-adherent cells are cultured with IL2 and IL7 to obtain autologous effector cells (T-cells) to be used in subsequent functional studies. For functional studies, T-cells are added to immature dendritic cells (10:1 ratio) and co-cultured with huKS, de-immunized huKS, peptide junction 13 mer (KSLSLSPGK-APTS) (SEQ ID NO: 20) and the modified, de-immunized 13 mer peptide (KSAATPGK-APTS) (SEQ ID NO: 21). Comparison of the proliferation index, as measured by tritiated thymidine incorporation after exposure to each of the immunocytokines or immunogenic and
10 modified de-immunized peptides demonstrates the degree of immunogenicity of each molecule. Namely, an increase in radioactive incorporation is roughly proportional to the ability of each peptide to be bind to a class II MHC molecule on DC and be presented to T cells.

15 Example 5: Deduction of immunogenic reactive epitopes found in albumin fusion proteins and modification of amino acid residues at a fusion junction to reduce immunogenicity.

[0079] Human serum albumin (HSA), due to its remarkably long half-life, its wide *in vivo* distribution and its lack of enzymatic or immunological functions, has been used
20 as a carrier for therapeutic peptides/proteins. A genetically engineered HSA-CD4 hybrid has been shown to block the entry of the human immunodeficiency virus into CD4+ cells while exhibiting antiviral *in vitro* properties similar to those of soluble CD4 (Yeh et al, PNAS 89:1904-1908, 1992). Thus, the genetic fusion of bioactive peptides to HSA is useful for designing and recovering secreted therapeutic HSA derivatives. However, as with all fusion proteins, HSA-CD4 has a novel junction
25 which can be immunogenic and contains T-cell epitopes capable of being presented on MHC class II molecules. Analysis of the junction between HSA and CD4 using the methods of Examples 1, 2, 3, and 4 identifies peptides with MHC binding potential. The potentially immunogenic sequences are modified to decrease or
30 eliminate potential T and B-cell epitopes in order to reduce immunogenicity. Similarly, a novel glycosylation site can be introduced into the junction region in order to reduce immunogenicity.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Albumin sequence

CD4 sequence

TCFAEEGKKLVAAASQAALGL – KKVVVLGKKGDTVELTCTAS (SEQ ID NO: 22).

- 5 [0080] It is contemplated by the invention that the HSA-IFNalpha fusion protein junction region contains three candidate T-cell epitopes, KKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 13); KLVAASQAALGLC (SEQ ID NO: 23); and LGLCDLPQTHSLG (SEQ ID NO: 24).
- 10 [0081] The T-cell epitopes depicted in SEQ ID NOS: 13 and 23 overlap and can be de-immunized by changing LV (in bold) to anything except F, I, L, M, V, W and Y. Alternatively, the peptide threading score can be reduced significantly by changing LG to TT. The T-cell epitope in SEQ ID NO: 24 can be de-immunized by changing the second L (in bold) to an A.
- 15 [0082] Furthermore, it is contemplated that in the case of an HSA-X fusion, wherein X can be any protein, deimmunization of the fusion junction is achieved by changing the amino acid sequence AALGL(SEQ ID NO: 25) to TATTA (SEQ ID NO: 26). CFAEBGKKLVAAASQTATTA (SEQ ID NO: 27).
- 20 **Example 6: X-Fc fusion proteins and modification of amino acid residues at a fusion junction to reduce immunogenicity.**
- [0083] In some instances it is specifically advantageous to engineer a fusion protein in the X-Fc orientation. With these constructs, a target protein is a N-terminal fusion protein and a Fc fragment follows. For example, the glucagon-like peptide (GLP-1) requires a free N-terminus for its activity, so a GLP-1-Fc fusion is useful.
- 25 [0084] A GLP-1-Fc fusion protein is constructed according to standard techniques described in the art. This fusion protein has the C-terminus of GLP-1 joined to the hinge of the γ 1 heavy chain. The γ 1 hinge sequence containing a Cys to Ser mutation (residue 5) which eliminates the Cys residue that forms a disulphide bond with the
- 30 light chain in IgG1 (Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495-500) is used. The non-mutant Fc sequence is BPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG (SEQ ID NO: 28)

WO 02/079232

PCT/US02/09815

with the hinge region being underlined, followed by the start of the CH2 domain sequence.

[0085] The fusion junction between GLP-1 (7-37) and mutant Fc is:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG –

5 EPKSSDKTHTCPPAPPELLG (SEQ ID NO: 29).

[0086] The fusion junction between GLP-1 (7-37) and normal Fc is:

SYLEGQAAKEFIAWLKGRG – EPKSCDKTHTCPPAPPELLG (SEQ ID NO: 30)

[0087] Three potential epitopes are identified by peptide threading at the GLP-1-Fc fusion junction.

KEFIAWLKGRGE (SEQ ID NO: 31)

E~~F~~IAWLKGRGEP (SEQ ID NO: 32)

AWLKGRGEPKSS (SEQ ID NO: 33).

15 [0088] Analysis of fusion junctions between GLP-1 (bold text) and Fc (plain text), performed as in Examples 1-3, identifies peptides with MHC binding potential. After identification of potential sites by peptide threading analysis, the potentially immunogenic sequences are modified by amino acid substitution to reduce or eliminate potential T and B-cell binding epitopes and decrease immunogenicity.

20 [0089] The above-mentioned potential T-cell epitopes depicted in SEQ ID NOs: 31, 32 and 33 are de-immunized by making single amino acid substitutions. For example, peptide shown in SEQ ID NO: 31 is de-immunized by changing the Lysine (shown in bold) to a Threonine and the Arginine (shown in bold) to a Threonine. The peptide shown in SEQ ID NO: 32 is de-immunized by replacing the Isoleucine (shown in

25 bold) with an Alanine or a Proline and the peptide in SEQ ID NO: 33 is de-immunized by replacing the Leucine with an Alanine or a Proline. The resulting de-immunized junction is:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFAAWA**V**VTGTG – EPKSSDKTHTCPPAPPELLG

30 (SEQ ID NO: 34).

[0090] According to an exemplary method for introducing a glycosylation site at a fusion junction the following changes are introduced:

WO 02/079232

PCT/US02/09815

SYLEGQAAKEFIAWLVKGRN – GSKSSDKTHTCPPAPELLG (SEQ ID NO: 35).

- Example 7: Deduction of immunogenic reactive epitopes of Enbrel, a TNFR-Fc fusion protein and modification of amino acid residues at a fusion junction to reduce immunogenicity.**
- [0091] ENBREL or etanercept, a X-Fc fusion protein approved by the FDA, is a tumor necrosis factor (TNF) inhibitor used to treat rheumatoid arthritis. ENBREL is a dimeric fusion protein consisting of an extracellular-ligand-binding domain of TNF receptor linked to an Fc protein of human IgG1. TNFR-Fc competitively inhibits binding of TNF to its receptor and renders the bound TNF biologically inactive, resulting in significant reduction in inflammatory activity. As described above for GLP-1 – Fc, TNFR-Fc has a novel junction which contains potential T-cell epitopes.
- [0092] The junction between a direct fusion of a C-terminus portion of TNF-R (**bold text**) to the N-terminus of the g1 hinge (plain text with the underline region representing the hinge region) is **STSFLLPMGSPPAEGSTGD** – EPKSCDKTHTCPPAPELLG (SEQ ID NO: 36)
- [0093] Analysis of a junction between TNF-R and Fc, performed as in Examples 1-4, identifies peptides with MHC binding potential. After identification of potential sites by peptide threading analysis, the potentially immunogenic sequences are modified by amino acid substitution to reduce or eliminate potential T and B-cell binding epitopes and decrease immunogenicity.
- [0094] According to an exemplary method for introducing a glycosylation site at a fusion junction the following changes are introduced:
STSFLLPMGSPPAEGSTGN - GSKSCDKTHTCPPAPELLG (SEQ ID NO: 37).
- Example 8: Deduction of immunogenic reactive epitopes for Fc-X-Y fusion proteins such as Fc-IL12-IL2 and modification of amino acid residues at the fusion junction to reduce immunogenicity.**
- [0095] Fusion proteins of a Fc-X-Y orientation such as Fc-IL12-IL2 have multiple novel fusion junctions which are potentially immunogenic. For instance, Fc-IL12 has

WO 02/079232

PCT/US02/09815

a fusion junction similar to other Fc-X fusion proteins or immunocytokines (Example 1) but is novel due to the usage of the cytokine IL12. The fusion junction is analyzed for immunogenic binding sites and modified accordingly. Secondly, there is an X-Y fusion junction comparable to that described in Example 5, with two different cytokines constituting a fusion protein. Peptide thread analysis is used for each of the fusion junctions.

[0096] Analysis of the junctions:

(1) **MHEALHNHYTQKSLSLSPGK** - RNLPVATPDPGMFPCLLHH SQ (SEQ ID NO: 38)

10

between the C-terminus of Fc (bold text) and the N-terminus of IL12p35 (plain text), and

(2) **RAQDRYYSSSWSEWASVPCS** - APTSSSTKKTQLQLEHLLLD (SEQ ID NO: 39)

15

between the C-terminus of IL12p40 (bold text) and the N-terminus of IL2 (plain text) by peptide threading identifies peptides with MHC binding potential. The potentially immunogenic sequences are modified to decrease or eliminate potential T-cell epitopes.

20

[0097] For example, in sequence (1) above, the following changes are made:

MHEALHNHYTQKS**ATAT****PGK** - RNLPVATPDPGMFPCLLHHSQ (SEQ ID NO: 40).

25 [0098] These changes reduce or eliminate MHC Class II-binding potential of several T-cell epitopes at a junction of Fc and the p35 subunit of IL12.

[0099] In another example, sequence (2) above is modified to introduce a glycosylation site by introducing an Asparagine and Glycine at the first two positions within IL-2. This strategy uses the naturally occurring Threonine at position 3 of mature IL-2. In addition, it is important to not disrupt the formation of a disulfide bond in the p40 moiety, so it is useful to separate the glycosylation site by at least one or two amino acids from the Cysteine in p40.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

RAQDRYSSSWSEWASVPCS - NGTSSSTKKTQLQLEHLLD (SEQ ID NO: 41).

[0100] In the case of the IL12p40-IL2 fusion, introduction of a glycosylation site as discussed above creates the following potential T-cell epitopes.

SEWASVPCSNGT (SEQ ID NO: 42)

ASVPCSNGTSSST (SEQ ID NO: 43)

[0101] However, glycosylation of the T-cell epitope prevents MHC Class II binding thus resulting in reduced immunogenicity.

Example 9: Deduction of immunogenic reactive epitopes in junction of an X-Fc-Y fusion protein and modification of amino acid residues at a fusion junction to reduce MHC Class II binding.

[0102] Fusion proteins of the X-Fc-Y configuration, such as IL4-Fc-GMCSF, have multiple novel fusion junctions that contain potential T-cell epitopes. The IL4-Fc is a junction analogous to other X-Fc fusion proteins (Examples 6 and 7) but is novel due to the use of the cytokine IL4. For example, a form of Fc using a hinge region, CH2, and CH3 domain from human γ 1 is used. As stated above, a γ 1 hinge sequence in pdCs-huFc γ 1 may contain a Cys to Ser mutation (underlined) that eliminates the Cys residue that forms a disulphide bond with a light chain in IgG1 (Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495-500), thereby creating a third potentially immunogenic fusion junction for analysis. The fusion junction is analyzed for potential T-cell epitopes and modified according to the methods of Examples 1-4.

[0103] There is an Fc-Y fusion junction comparable to that described in Example 1 for the immunocytokine huKS-IL2, with a different cytokine GMCSF constituting a fusion protein. This fusion junction is also analyzed for potential T-cell epitopes and modified according to the methods of Examples 1-4.

Specifically, analysis of the junctions

(1) **ENFLERLKTIMREKYSKCSS** – epkscdktkhtcppepapellg (SEQ ID NO: 44)

between the C-terminus of IL4 (bold text) and the N-terminus of Fc (plain text), and

(2) **MHEALHNHYTQKSLSLSPGK** – parspstqpwhehvnaie (SEQ ID NO: 45)

WO 02/079232

PCT/US02/09815

between the C-terminus of Fc (bold text) and the N-terminus of GMCSF (plain text) by peptide threading identifies peptides with MHC binding potential. The potential T-cell epitopes are modified to decrease or eliminate potential T epitopes in order to reduce immunogenicity.

[0104] A candidate T-cell epitope at the junction of IL4-Fc fusion protein is, EKYSKCSSEPKSC (SEQ ID NO: 46),

where changing E (in bold) to T reduces the peptide threading score or the MHC Class II binding potential significantly. The sequence of the modified IL4-Fc fusion is as follows:

ENFLERLKT**IMRE**KYSKCSS – tpkscdkthtppcpapellg (SEQ ID NO: 47).

[0105] The Fc-GMCSF fusion junction is de-immunized by changing the sequence LSLS to ATAT as shown below.

MHEALHNHYT**QKSATAT**PGK – parspsptqpwhvnaiqe (SEQ ID NO: 48).

Example 10: Modification of amino acid residues at a fusion junction of immunocytokines and immunofusins prepared with a hybrid isotype to remove T-cell epitopes.

[0106] It is often useful to construct an antibody or antibody-based fusion protein with a hybrid isotype, so that useful features of different isotypes may be combined into a single molecule. Fusion proteins with hybrid isotypes may be modified according to the invention to reduce immunogenicity.

[0107] An antibody fusion protein with the following components is constructed by standard recombinant DNA techniques: a light chain and a heavy chain, the V regions recognizing a tumor-specific antigen, the light chain being a typical light chain, and the heavy chain comprising CH1, CH2, and CH3 domains from IgG2 and a hinge region from IgG1, with a cytokine fused to the C-terminus of the heavy chain involving a fusion junction as described above.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0108] This protein contains novel junctions between CH1g2 and hinge-g1, and hinge-g1 and CH2g2. The identification and modification of potential T-cell epitopes in these junctions is performed as follows. For immunocytokines and Fc-X fusion proteins prepared with either an IgG2 or an IgG2h isotype, these modifications are identical to those set forth in Examples 1, 2, 3, and 8 above. For X-Fc IgG2h immunofusions, the novel junction is also identical since the N-terminus of the Fc is located within the hinge region of the IgG2h protein which has been modified to an IgG1 type. However, there are two novel fusion junctions in that the IgG1 hinge inserted into a IgG2 immunoglobulin creates two novel junctions between the IgG2 CH1 and IgG1 hinge and the IgG1 hinge and the IgG2 CH2.

IgG2 CH1 – IgG1 hinge – IgG2 CH2 – IgG2 CH3 – target protein .

[0109] Thus, analysis of the junctions

qtytenvdhkpsntkvdktv – epkscdkthtppcp (SEQ ID NO: 49)

between the C-terminus of IgG2 CH1 (bold text) and the N-terminus of the IgG1 hinge (plain text), and

epkscdkthtppcp – appvagpsvflfppkpkdtl (SEQ ID NO: 50)

between the C-terminus of the IgG1 hinge (bold text) and the N-terminus of IgG2 CH2 F (plain text) by peptide threading should identify peptides with MHC binding potential. The potentially immunogenic sequences are modified to decrease or eliminate potential T and B-cell epitopes in order to reduce immunogenicity.

[0110] Two potential T-cell epitopes in the IgG2CH1-IgG1 hinge fusion junction are,

TKVDKTVEPKSCD (SEQ ID NO: 51) and KTVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 52).

[0111] The IgG2CH1-IgG1 hinge fusion junction is de-immunized by changing the V (in

WO 02/079232

PCT/US02/09815

bold) to an A, a T or a P. The sequence of the modified fusion junction is depicted in SEQ ID NO: 53.

qytyenvdhkpsntk~~adkta~~ – epks~~g~~dkthtppcp (SEQ ID NO: 53).

[0112] As stated above, the γ 1 hinge sequence in pdCs-huFc γ 1 may contain a Cys to Ser mutation (underlined) that eliminates the Cys residue that forms a disulphide bond with the light chain in IgG1 (Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495-500), thereby creating two additional potentially immunogenic fusion junctions for analysis and modification:

(3) **qytyenvdhkpsntk~~v~~dktv** – epks~~S~~dkthtppcp (SEQ ID NO: 54)

(4) **epks~~S~~dkthtppcp** – appvagsvflfppkpkdtl (SEQ ID NO: 55).

Example 11: Generation of Fc-EPO fusion protein using hybrid isotype Fc components of IgG1 and IgG4.

[0113] To generate an Fc-erythropoietin fusion protein, the following expression plasmid was constructed using standard molecular biology techniques. An XmaI-XhoI DNA fragment containing a form of the human erythropoietin coding sequence with mutations resulting in the amino acid substitutions His32Gly, Cys33Pro, Trp88Cys, and Pro90Ala, as disclosed in WO01/36489, was used. The corresponding protein sequence is shown in SEQ ID NO: 56.

```
APPRICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEGPFLNENITVPDITKVNFYAWKRMEVGGQAVEV
WQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPCBGLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAAS
AAPLRTTTADTRKLFVYSNFLRGKLLKLYTGACRTGDR
```

[0114] This XmaI-XhoI DNA fragment was inserted into a plasmid vector that encodes a hinge region from IgG1 and a CH2 and CH3 region from IgG2, except that there were two sets of mutations that resulted in amino acid substitutions in the region of the CH3 C-terminus, such that the sequence at the junction of the CH3 C-terminus and the Epo N-terminus is as follows:

WO 02/079232

PCT/US02/09815

... TQKSATATPGA-APPRLI ... (SEQ ID NO: 57)

[0115] The first set of mutations, which change the sequence KSLSLSPG (SEQ ID NO: 58) of the IgG2 CH3 region to KSATATPG (SEQ ID NO: 59), is disclosed in U.S. Patent Application Serial No. 60/280,625. The effect of the substitution of Leu-Ser-Leu-Ser (position 3 to position 6 of SEQ ID NO: 58) with Ala-Thr-Ala-Thr (position 3 to position 6 of SEQ ID NO: 59) is to remove potential human non-self T-cell epitopes that may arise because the junction between human Fc and human erythropoietin contains non-self peptide sequences. The second set consisting of the single amino acid substitution K to A at the C-terminal amino acid of the CH3 region, is disclosed in U.S. Patent Application Serial No. 09/780,668.

[0116] The resulting plasmid was transfected into NS/0 cells and the Fc-Epo fusion protein was expressed and purified according to the procedures known in the art. After purification based on binding to protein A, the huFc γ 2h-huEpo protein containing the IgG2 CH3 and erythropoietin substitutions described above was characterized by size exclusion chromatography and found to consist of 97% monomer and 90% monomer in two independent preparations. The huFc γ 2h-huEpo protein containing the IgG2 CH3 and erythropoietin substitutions described above was found to be about as active, on a molar basis, as human erythropoietin in a cell-based assay that measured the ability of an erythropoietin protein to stimulate TF-1 cell division. The assay was performed as described in WO01/36489.

[0117] In addition, fusions of non-mutant human erythropoietin to the C-terminus of an Fc region consisting of either IgG1(hinge-CH2-CH3), IgG2(hinge-CH2-CH3), or IgG1(hinge)-IgG2(CH2-CH3) were characterized. Expression plasmids comprising non-mutant human Fc sequences and non-mutant erythropoietin sequences were constructed analogously to the plasmid described above. NS/0 cells were transfected with the Fc γ 1-Epo, Fc γ 2-Epo, and Fc γ 2h-Epo expression plasmids, and stable clones were isolated after screening an approximately equal number of clones for each plasmid. The best-producing clones yielded 50 μ g/ml for Fc γ 1-Epo, 20 μ g/ml for Fc γ 2-Epo, and 120 μ g/ml for Fc γ 2h-Epo.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0118] The following example describes in detail a preferred method for identification of immunogenic sequence regions (T-cell epitopes) within the sequences of the fusion proteins as disclosed in this invention. However, it should be pointed out, that said molecules can be obtained by other known methods.

Example 12. Identification of T-cell epitopes by computational methods

[0119] According to the invention, epitopes in a junction region of a fusion protein can be modified using methods for introducing mutations into proteins to modulate their interaction with the immune system. According to the invention, known methods in the art that can be adapted according to the invention include those described in the prior art (WO 92/10755 and WO 96/40792 (Novo Nordisk), EP 0519 596 (Merck & Co.), EP 0699 755(Centro de Immunologia Molecular), WO 98/52976 and WO 98/59244 (Biovation Ltd.) or related methods.

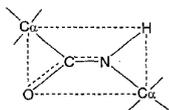
[0120] Advantageous mutant proteins, however, can be obtained if the identification of said epitopes is realized by the following new method which is described herewith in detail and applied to the junction region of fusion proteins according to the invention.

[0121] There are a number of factors that play important roles in determining the total structure of a protein, polypeptide or immunoglobulin. First, the peptide bond, i.e., that bond which joins the amino acids in the chain together, is a covalent bond. This bond is planar in structure, essentially a substituted amide. An "amide" is any of a group of organic compounds containing the grouping -CONH-.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0122] The planar peptide bond linking $C\alpha$ of adjacent amino acids may be represented as depicted below:



[0123] Because the O=C and the C-N atoms lie in a relatively rigid plane, free rotation does not occur about these axes. Hence, a plane schematically depicted by the interrupted line is sometimes referred to as an "amide" or "peptide plane" plane wherein lie the oxygen (O), carbon (C), nitrogen (N), and hydrogen (H) atoms of the peptide backbone. At opposite corners of this amide plane are located the $C\alpha$ atoms. Since there is substantially no rotation about the O=C and C-N atoms in the peptide or amide plane, a polypeptide chain thus comprises a series of planar peptide linkages joining the $C\alpha$ atoms.

[0124] A second factor that plays an important role in defining the total structure or conformation of a polypeptide or protein is the angle of rotation of each amide plane about the common $C\alpha$ linkage. The terms "angle of rotation" and "torsion angle" are hereinafter regarded as equivalent terms. Assuming that the O, C, N, and H atoms remain in the amide plane (which is usually a valid assumption, although there may be some slight deviations from planarity of these atoms for some conformations), these angles of rotation define the N and R polypeptide's backbone conformation, i.e., the structure as it exists between adjacent residues. These two angles are known as ϕ and ψ . A set of the angles ϕ_i, ψ_i , where the subscript i represents a particular residue of a polypeptide chain, thus effectively defines the polypeptide secondary structure. The conventions used in defining the ϕ, ψ angles, i.e., the reference points at which the amide planes form a zero degree angle, and the definition of which angle is ϕ , and which angle is ψ , for a given

polypeptide, are defined in the literature. See, e.g., Ramachandran et al. *Adv. Prot. Chem.* 23:283-437 (1968), at pages 285-94, which pages are incorporated herein by reference.

[0125] The present method can be applied to any protein, and is based in part upon the discovery that in humans the primary Pocket 1 anchor position of MHC Class II molecule binding grooves has a well designed specificity for particular amino acid side chains. The specificity of this pocket is determined by the identity of the amino acid at position 86 of the beta chain of the MHC Class II molecule. This site is located at the bottom of Pocket 1 and determines the size of the side chain that can be accommodated by this pocket. Marshall, K.W., *J. Immunol.*, 152:4946-4956 (1994). If this residue is a glycine, then all hydrophobic aliphatic and aromatic amino acids (hydrophobic aliphatics being: valine, leucine, isoleucine, methionine and aromatics being: phenylalanine, tyrosine and tryptophan) can be accommodated in the pocket, a preference being for the aromatic side chains. If this pocket residue is a valine, then the side chain of this amino acid protrudes into the pocket and restricts the size of peptide side chains that can be accommodated such that only hydrophobic aliphatic side chains can be accommodated. Therefore, in an amino acid residue sequence, wherever an amino acid with a hydrophobic aliphatic or aromatic side chain is found, there is the potential for a MHC Class II restricted T-cell epitope to be present. If the side-chain is hydrophobic aliphatic, however, it is approximately twice as likely to be associated with a T-cell epitope than an aromatic side chain (assuming an approximately even distribution of Pocket 1 types throughout the global population).

[0126] A computational method embodying the present invention profiles the likelihood of peptide regions to contain T-cell epitopes as follows: (1) The primary sequence of a peptide segment of predetermined length is scanned, and all hydrophobic aliphatic and aromatic side chains present are identified. (2) The hydrophobic aliphatic side chains are assigned a value greater than that for the aromatic side chains; preferably about twice the value assigned to the aromatic side chains, e.g., a value of 2 for a hydrophobic aliphatic side chain and a value of 1 for an aromatic side chain. (3) The values determined to be present are summed for each overlapping amino acid residue segment (window) of predetermined uniform length within the peptide, and the total value for a particular

WO 02/079232

PCT/US02/09815

segment (window) is assigned to a single amino acid residue at an intermediate position of the segment (window), preferably to a residue at about the midpoint of the sampled segment (window). This procedure is repeated for each sampled overlapping amino acid residue segment (window). Thus, each amino acid residue of the peptide is assigned a value that relates to the likelihood of a T-cell epitope being present in that particular segment (window). (4) The values calculated and assigned as described in Step 3, above, can be plotted against the amino acid coordinates of the entire amino acid residue sequence being assessed. (5) All portions of the sequence which have a score of a predetermined value, e.g., a value of 1, are deemed likely to contain a T-cell epitope and can be modified, if desired.

[0127] This particular aspect of the present invention provides a general method by which the regions of peptides likely to contain T-cell epitopes can be described. Modifications to the peptide in these regions have the potential to modify the MHC Class II binding characteristics.

[0128] According to another aspect of the present invention, T-cell epitopes can be predicted with greater accuracy by the use of a more sophisticated computational method which takes into account the interactions of peptides with models of MHC Class II alleles.

[0129] The computational prediction of T-cell epitopes present within a peptide according to this particular aspect contemplates the construction of models of at least 42 MHC Class II alleles based upon the structures of all known MHC Class II molecules and a method for the use of these models in the computational identification of T-cell epitopes, the construction of libraries of peptide backbones for each model in order to allow for the known variability in relative peptide backbone alpha carbon ($C\alpha$) positions, the construction of libraries of amino-acid side chain conformations for each backbone dock with each model for each of the 20 amino-acid alternatives at positions critical for the interaction between peptide and MHC Class II molecule, and the use of these libraries of backbones and side-chain conformations in conjunction with a scoring function to select the optimum backbone and side-chain conformation for a particular peptide docked

WO 02/079232

PCT/US02/09815

with a particular MHC Class II molecule and the derivation of a binding score from this interaction.

[0130] Models of MHC Class II molecules can be derived via homology modeling from a number of similar structures found in the Brookhaven Protein Data Bank ("PDB"). These may be made by the use of semi-automatic homology modeling software (Modeller, Sali A. & Blundell TL., 1993. *J. Mol Biol* 234:779-815) which incorporates a simulated annealing function, in conjunction with the CHARMM force-field for energy minimization (available from Molecular Simulations Inc., San Diego, Ca.). Alternative modeling methods can be utilized as well.

[0131] The present method differs significantly from other computational methods which use libraries of experimentally derived binding data of each amino-acid alternative at each position in the binding groove for a small set of MHC Class II molecules (Marshall, K.W., et al., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids*, 1(3):157-162 (1995) or yet other computational methods which use similar experimental binding data in order to define the binding characteristics of particular types of binding pockets within the groove, again using a relatively small subset of MHC Class II molecules, and then 'mixing and matching' pocket types from this pocket library to artificially create further 'virtual' MHC Class II molecules (Sturmiolo T., et al., *Nat. Biotech*, 17(6): 555-561 (1999)). Both prior methods suffer the major disadvantage that, due to the complexity of the assays and the need to synthesize large numbers of peptide variants, only a small number of MHC Class II molecules can be experimentally scanned. Therefore the first prior method can only make predictions for a small number of MHC Class II molecules. The second prior method also makes the assumption that a pocket lined with similar amino-acids in one molecule will have the same binding characteristics when in the context of a different Class II allele and suffers further disadvantages in that only those MHC Class II molecules can be 'virtually' created which contain pockets contained within the pocket library. Using the modeling approach described herein, the structure of any number and type of MHC Class II molecules can be deduced, therefore alleles can be specifically selected to be representative of the global population. In addition, the number of MHC

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Class II molecules scanned can be increased by making further models further than having to generate additional data via complex experimentation.

[0132] The use of a backbone library allows for variation in the positions of the C α atoms of the various peptides being scanned when docked with particular MHC Class II molecules. This is again in contrast to the alternative prior computational methods described above which rely on the use of simplified peptide backbones for scanning amino-acid binding in particular pockets. These simplified backbones are not likely to be representative of backbone conformations found in 'real' peptides leading to inaccuracies in prediction of peptide binding. The present backbone library is created by superposing the backbones of all peptides bound to MHC Class II molecules found within the Protein Data Bank and noting the root mean square (RMS) deviation between the C α atoms of each of the eleven amino-acids located within the binding groove. While this library can be derived from a small number of suitable available mouse and human structures (currently 13), in order to allow for the possibility of even greater variability, the RMS figure for each C α position is increased by 50%. The average C α position of each amino-acid is then determined and a sphere drawn around this point whose radius equals the RMS deviation at that position plus 50%. This sphere represents all allowed C α positions.

[0133] Working from the C α with the least RMS deviation (that of the amino-acid in Pocket 1 as mentioned above, equivalent to Position 2 of the 11 residues in the binding groove), the sphere is three-dimensionally gridded, and each vertex within the grid is then used as a possible location for a C α of that amino-acid. The subsequent amide plane, corresponding to the peptide bond to the subsequent amino-acid is grafted onto each of these C α s and the ϕ and ψ angles are rotated step-wise at set intervals in order to position the subsequent C α . If the subsequent C α falls within the 'sphere of allowed positions' for this C α then the orientation of the dipeptide is accepted, whereas if it falls outside the sphere then the dipeptide is rejected. This process is then repeated for each of the subsequent C α positions, such that the peptide grows from the Pocket 1 C α 'seed', until all nine subsequent C α s have been positioned from all possible permutations of the

preceding C α s. The process is then repeated once more for the single C α preceding pocket 1 to create a library of backbone C α positions located within the binding groove.

[0134] The number of backbones generated is dependent upon several factors: The size of the 'spheres of allowed positions'; the fineness of the gridding of the 'primary sphere' at the Pocket 1 position; the fineness of the step-wise rotation of the ϕ and ψ angles used to position subsequent C α s. Using this process, a large library of backbones can be created. The larger the backbone library, the more likely it will be that the optimum fit will be found for a particular peptide within the binding groove of an MHC Class II molecule. Inasmuch as all backbones will not be suitable for docking with all the models of MHC Class II molecules due to clashes with amino-acids of the binding domains, for each allele a subset of the library is created comprising backbones which can be accommodated by that allele. The use of the backbone library, in conjunction with the models of MHC Class II molecules creates an exhaustive database consisting of allowed side chain conformations for each amino-acid in each position of the binding groove for each MHC Class II molecule docked with each allowed backbone. This data set is generated using a simple steric overlap function where a MHC Class II molecule is docked with a backbone and an amino-acid side chain is grafted onto the backbone at the desired position. Each of the rotatable bonds of the side chain is rotated step-wise at set intervals and the resultant positions of the atoms dependent upon that bond noted. The interaction of the atom with atoms of side-chains of the binding groove is noted and positions are either accepted or rejected according to the following criteria: The sum total of the overlap of all atoms so far positioned must not exceed a pre-determined value. Thus the stringency of the conformational search is a function of the interval used in the step-wise rotation of the bond and the pre-determined limit for the total overlap. This latter value can be small if it is known that a particular pocket is rigid, however the stringency can be relaxed if the positions of pocket side-chains are known to be relatively flexible. Thus allowances can be made to imitate variations in flexibility within pockets of the binding groove. This conformational search is then repeated for every amino-acid at every position of each backbone when docked with each of the MHC Class II molecules to create the exhaustive database of side-chain conformations.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0135] A suitable mathematical expression is used to estimate the energy of binding between models of MHC Class II molecules in conjunction with peptide ligand conformations which have to be empirically derived by scanning the large database of backbone/side-chain conformations described above. Thus a protein is scanned for potential T-cell epitopes by subjecting each possible peptide of length varying between 9 and 20 amino-acids (although the length is kept constant for each scan) to the following computations: An MHC Class II molecule is selected together with a peptide backbone allowed for that molecule and the side-chains corresponding to the desired peptide sequence are grafted on. Atom identity and interatomic distance data relating to a particular side-chain at a particular position on the backbone are collected for each allowed conformation of that amino-acid (obtained from the database described above). This is repeated for each side-chain along the backbone and peptide scores derived using a scoring function. The best score for that backbone is retained and the process repeated for each allowed backbone for the selected model. The scores from all allowed backbones are compared and the highest score is deemed to be the peptide score for the desired peptide in that MHC Class II model. This process is then repeated for each model with every possible peptide derived from the protein being scanned, and the scores for peptides versus models are displayed.

[0136] In the context of the present invention, each ligand presented for the binding affinity calculation is an amino-acid segment selected from a peptide or protein as discussed above. Thus, the ligand is a selected stretch of amino acids about 9 to 20 amino acids in length derived from a peptide, polypeptide or protein of known sequence. The terms "amino acids" and "residues" are hereinafter regarded as equivalent terms. The ligand, in the form of the consecutive amino acids of the peptide to be examined grafted onto a backbone from the backbone library, is positioned in the binding cleft of an MHC Class II molecule from the MHC Class II molecule model library via the coordinates of the C α atoms of the peptide backbone and an allowed conformation for each side-chain is selected from the database of allowed conformations. The relevant atom identities and interatomic distances are also retrieved from this database and used to calculate the peptide binding score. Ligands with a high binding affinity for the MHC Class II binding

WO 02/079232

PCT/US02/09815

pocket are flagged as candidates for site-directed mutagenesis. Amino-acid substitutions are made in the flagged ligand (and hence in the protein of interest) which is then retested using the scoring function in order to determine changes which reduce the binding affinity below a predetermined threshold value. These changes can then be incorporated into the protein of interest to remove T-cell epitopes.

[0137] Binding between the peptide ligand and the binding groove of MHC Class II molecules involves non-covalent interactions including, but not limited to: hydrogen bonds, electrostatic interactions, hydrophobic (lipophilic) interactions and Van der Waal's interactions. These are included in the peptide scoring function as described in detail below. It should be understood that a hydrogen bond is a non-covalent bond which can be formed between polar or charged groups and consists of a hydrogen atom shared by two other atoms. The hydrogen of the hydrogen donor has a positive charge where the hydrogen acceptor has a partial negative charge. For the purposes of peptide/protein interactions, hydrogen bond donors may be either nitrogens with hydrogen attached or hydrogens attached to oxygen or nitrogen. Hydrogen bond acceptor atoms may be oxygens not attached to hydrogen, nitrogens with no hydrogens attached and one or two connections, or sulphurs with only one connection. Certain atoms, such as oxygens attached to hydrogens or imine nitrogens (e.g. C=NH) may be both hydrogen acceptors or donors. Hydrogen bond energies range from 3 to 7 Kcal/mol and are much stronger than Van der Waal's bonds, but weaker than covalent bonds. Hydrogen bonds are also highly directional and are at their strongest when the donor atom, hydrogen atom and acceptor atom are co-linear. Electrostatic bonds are formed between oppositely charged ion pairs and the strength of the interaction is inversely proportional to the square of the distance between the atoms according to Coulomb's law. The optimal distance between ion pairs is about 2.8Å. In protein/peptide interactions, electrostatic bonds may be formed between arginine, histidine or lysine and aspartate or glutamate. The strength of the bond will depend upon the pKa of the ionizing group and the dielectric constant of the medium although they are approximately similar in strength to hydrogen bonds.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

[0138] Lipophilic interactions are favorable hydrophobic-hydrophobic contacts that occur between the protein and peptide ligand. Usually, these will occur between hydrophobic amino acid side chains of the peptide buried within the pockets of the binding groove such that they are not exposed to solvent. Exposure of the hydrophobic residues to solvent is highly unfavorable since the surrounding solvent molecules are forced to hydrogen bond with each other forming cage-like clathrate structures. The resultant decrease in entropy is highly unfavorable. Lipophilic atoms may be sulphurs which are neither polar nor hydrogen acceptors and carbon atoms which are not polar.

[0139] Van der Waal's bonds are non-specific forces found between atoms which are 3-4Å apart. They are weaker and less specific than hydrogen and electrostatic bonds. The distribution of electronic charge around an atom changes with time and, at any instant, the charge distribution is not symmetric. This transient asymmetry in electronic charge induces a similar asymmetry in neighboring atoms. The resultant attractive forces between atoms reaches a maximum at the Van der Waal's contact distance but diminishes very rapidly at about 1Å to about 2Å. Conversely, as atoms become separated by less than the contact distance, increasingly strong repulsive forces become dominant as the outer electron clouds of the atoms overlap. Although the attractive forces are relatively weak compared to electrostatic and hydrogen bonds (about 0.6 Kcal/mol), the repulsive forces in particular may be very important in determining whether a peptide ligand may bind successfully to a protein.

[0140] In one embodiment, the Böhm scoring function (SCORE1 approach) is used to estimate the binding constant. (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8(3):243-256 (1994) which is hereby incorporated in its entirety). In another embodiment, the scoring function (SCORE2 approach) is used to estimate the binding affinities as an indicator of a ligand containing a T-cell epitope (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 12(4):309-323 (1998) which is hereby incorporated in its entirety). However, the Böhm scoring functions as described in the above references are used to estimate the binding affinity of a ligand to a protein where it is already known that the ligand successfully binds to the protein and the protein/ligand complex has had its structure solved, the solved structure being present in the Protein Data Bank ("PDB"). Therefore, the scoring function has

WO 02/079232

PCT/US02/09815

been developed with the benefit of known positive binding data. In order to allow for discrimination between positive and negative binders, a repulsion term must be added to the equation. In addition, a more satisfactory estimate of binding energy is achieved by computing the lipophilic interactions in a pairwise manner rather than using the area based energy term of the above Böhm functions. Therefore, in a preferred embodiment, the binding energy is estimated using a modified Böhm scoring function. In the modified Böhm scoring function, the binding energy between protein and ligand (ΔG_{bind}) is estimated considering the following parameters: The reduction of binding energy due to the overall loss of translational and rotational entropy of the ligand (ΔG_0); contributions from ideal hydrogen bonds (ΔG_{hb}) where at least one partner is neutral; contributions from unperturbed ionic interactions (ΔG_{ionic}); lipophilic interactions between lipophilic ligand atoms and lipophilic acceptor atoms (ΔG_{lipo}); the loss of binding energy due to the freezing of internal degrees of freedom in the ligand, i.e., the freedom of rotation about each C-C bond is reduced (ΔG_{rot}); the energy of the interaction between the protein and ligand (E_{vdw}). Consideration of these terms gives equation 1:

$$(\Delta G_{bind}) = (\Delta G_0) + (\Delta G_{hb} \times N_{hb}) + (\Delta G_{ionic} \times N_{ionic}) + (\Delta G_{lipo} \times N_{lipo}) + (\Delta G_{rot} \times N_{rot}) + (E_{vdw})$$

Where N is the number of qualifying interactions for a specific term and, in one embodiment, ΔG_0 , ΔG_{hb} , ΔG_{ionic} , ΔG_{lipo} and ΔG_{rot} are constants which are given the values: 5.4, -4.7, -4.7, -0.17, and 1.4, respectively.

The term N_{hb} is calculated according to equation 2:

$$N_{hb} = \sum_{\text{h-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \times f(N_{neighb}) \times f_{pcu}$$

$f(\Delta R, \Delta \alpha)$ is a penalty function which accounts for large deviations of hydrogen bonds from ideality and is calculated according to equation 3:

$$f(\Delta R, \Delta \alpha) = f1(\Delta R) \times f2(\Delta \alpha)$$

$$\begin{aligned} \text{Where: } f1(\Delta R) &= 1 \text{ if } \Delta R \leq \text{TOL} \\ &\text{or } = 1 - (\Delta R - \text{TOL}) / 0.4 \text{ if } \Delta R > \text{TOL} \\ &\text{or } = 0 \text{ if } \Delta R > 0.4 + \text{TOL} \end{aligned}$$

WO 02/079232

PCT/US02/09815

And: $f_2(\Delta\alpha) = 1$ if $\Delta\alpha < 30^\circ$
 or $= 1 - (\Delta\alpha - 30)/50$ if $\Delta\alpha <= 80^\circ$
 or $= 0$ if $\Delta\alpha > 80^\circ$

TOL is the tolerated deviation in hydrogen bond length = 0.25 Å

ΔR is the deviation of the H-O/N hydrogen bond length from the ideal value = 1.9 Å

Δα is the deviation of the hydrogen bond angle $\angle_{\text{N/O-H...O/N}}$ from its idealized value of 180°

$f(N_{\text{neighbb}})$ distinguishes between concave and convex parts of a protein surface and therefore assigns greater weight to polar interactions found in pockets rather than those found at the protein surface. This function is calculated according to [equation 4](#) below:

$f(N_{\text{neighbb}}) = (N_{\text{neighbb}}/N_{\text{neighbb},0})^\alpha$ where $\alpha = 0.5$

N_{neighbb} is the number of non-hydrogen protein atoms that are closer than 5 Å to any given protein atom.

$N_{\text{neighbb},0}$ is a constant = 25

f_{pcs} is a function which allows for the polar contact surface area per hydrogen bond and therefore distinguishes between strong and weak hydrogen bonds and its value is determined according to the following criteria:

$f_{\text{pcs}} = \beta$ when $A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} < 10 \text{ \AA}^2$

or $f_{\text{pcs}} = 1$ when $A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} > 10 \text{ \AA}^2$

A_{polar} is the size of the polar protein-ligand contact surface

N_{HB} is the number of hydrogen bonds

β is a constant whose value = 1.2

For the implementation of the modified Böhm scoring function, the contributions from ionic interactions, ΔG_{ionic} , are computed in a similar fashion to those from hydrogen bonds described above since the same geometry dependency is assumed.

The term N_{ippo} is calculated according to [equation 5](#) below:

$N_{\text{ippo}} = \sum_l f(r_{1l})$

$f(r_{1l})$ is calculated for all lipophilic ligand atoms, l, and all lipophilic protein atoms, L, according to the following criteria:

WO 02/079232

PCT/US02/09815

$f(r_{1L}) = 1$ when $r_{1L} \leq R1$ $f(r_{1L}) = (r_{1L} - R1) / (R2 - R1)$ when $R2 < r_{1L} < R1$

$f(r_{1L}) = 0$ when $r_{1L} \geq R2$

Where: $R1 = r_1^{vdw} + r_L^{vdw} + 0.5$

and $R2 = R1 + 3.0$

and r_1^{vdw} is the Van der Waal's radius of atom 1

and r_L^{vdw} is the Van der Waal's radius of atom L

The term N_{rot} is the number of rotatable bonds of the amino acid side chain and is taken to be the number of acyclic $sp^3 - sp^3$ and $sp^3 - sp^2$ bonds. Rotations of terminal $-CH_3$ or $-NH_3$ are not taken into account.

The final term, E_{vdw} , is calculated according to [equation 6](#) below:

$E_{vdw} = \epsilon_1 \epsilon_2 ((r_1^{vdw} + r_2^{vdw})^{1.2} / r^{1.2} - (r_1^{vdw} + r_2^{vdw})^6 / r^6)$, where:

ϵ_1 and ϵ_2 are constants dependent upon atom identity

$r_1^{vdw} + r_2^{vdw}$ are the Van der Waal's atomic radii

r is the distance between a pair of atoms.

[0141] With regard to Equation 6, in one embodiment, the constants ϵ_1 and ϵ_2 are given the atom values: C: 0.245, N: 0.283, O: 0.316, S: 0.316, respectively (i.e. for atoms of Carbon, Nitrogen, Oxygen and Sulphur, respectively). With regards to equations 5 and 6, the Van der Waal's radii are given the atom values C: 1.85, N: 1.75, O: 1.60, S: 2.00Å.

[0142] It should be understood that all predetermined values and constants given in the equations above are determined within the constraints of current understandings of protein ligand interactions with particular regard to the type of computation being undertaken herein. Therefore, it is possible that, as this scoring function is refined further, these values and constants may change hence any suitable numerical value which gives the desired results in terms of estimating the binding energy of a protein to a ligand may be used and hence fall within the scope of the present invention.

[0143] As described above, the scoring function is applied to data extracted from the database of side-chain conformations, atom identities, and interatomic distances. For the purposes of the present description, the number of MHC Class II molecules included in this database is 42 models plus four solved structures. It should be apparent from the

WO 02/079232

PCT/US02/09815

above descriptions that the modular nature of the construction of the computational method of the present invention means that new models can simply be added and scanned with the peptide backbone library and side-chain conformational search function to create additional data sets which can be processed by the peptide scoring function as described above. This allows for the repertoire of scanned MHC Class II molecules to easily be increased, or structures and associated data to be replaced if data are available to create more accurate models of the existing alleles.

[0144] The present prediction method can be calibrated against a data set comprising a large number of peptides whose affinity for various MHC Class II molecules has previously been experimentally determined. By comparison of calculated versus experimental data, a cut of value can be determined above which it is known that all experimentally determined T-cell epitopes are correctly predicted.

[0145] It should be understood that, although the above scoring function is relatively simple compared to some sophisticated methodologies that are available, the calculations are performed extremely rapidly. It should also be understood that the objective is not to calculate the true binding energy *per se* for each peptide docked in the binding groove of a selected MHC Class II protein. The underlying objective is to obtain comparative binding energy data as an aid to predicting the location of T-cell epitopes based on the primary structure (i.e. amino acid sequence) of a selected protein. A relatively high binding energy or a binding energy above a selected threshold value would suggest the presence of a T-cell epitope in the ligand. The ligand may then be subjected to at least one round of amino-acid substitution and the binding energy recalculated. Due to the rapid nature of the calculations, these manipulations of the peptide sequence can be performed interactively within the program's user interface on cost-effectively available computer hardware. Major investment in computer hardware is thus not required.

[0146] It would be apparent to one skilled in the art that other available software could be used for the same purposes. In particular, more sophisticated software which is capable of docking ligands into protein binding-sites may be used in conjunction with energy minimization. Examples of docking software are: DOCK (Kuntz *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 161:269-288 (1982)), LUDI (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8:623-632 (1994))

WO 02/079232

PCT/US02/09815

and FLEXX (Rarey M., et al., ISMB, 3:300-308 (1995)). Examples of molecular modeling and manipulation software include: AMBER (Tripos) and CHARMM (Molecular Simulations Inc.). The use of these computational methods would severely limit the throughput of the method of this invention due to the lengths of processing time required to make the necessary calculations. However, it is feasible that such methods could be used as a 'secondary screen' to obtain more accurate calculations of binding energy for peptides which are found to be 'positive binders' via the method of the present invention. The limitation of processing time for sophisticated molecular mechanic or molecular dynamic calculations is one which is defined both by the design of the software which makes these calculations and the current technology limitations of computer hardware. It may be anticipated that, in the future, with the writing of more efficient code and the continuing increases in speed of computer processors, it may become feasible to make such calculations within a more manageable time-frame. Further information on energy functions applied to macromolecules and consideration of the various interactions that take place within a folded protein structure can be found in: Brooks, B.R., et al., *J. Comput. Chem.*, 4:187-217 (1983) and further information concerning general protein-ligand interactions can be found in: Dauber-Osguthorpe et al., *Proteins*4(1):31-47(1988), which are incorporated herein by reference in their entirety. Useful background information can also be found, for example, in Fasman, G.D., ed., *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Plenum Press, New York, ISBN: 0-306 4313-9.

Equivalents

[0147] The invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential characteristics thereof. The foregoing embodiments are therefore to be considered in all respects illustrative rather than limiting on the invention described herein. Scope of the invention is thus indicated by the appended claims rather than by the foregoing description, and all changes which come within the meaning and range of equivalency of the claims are intended to be embraced therein.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Incorporation by Reference

[0148] All patents, patent applications, and scientific publications mentioned herein above are incorporated by reference into this application in their entirety.

CLAIMS

What is claimed is:

- 1 1. A method for reducing the immunogenicity of a fusion protein, the method
2 comprising:
 - 3 i. identifying a candidate T-cell epitope within a junction region spanning a
4 fusion junction of a fusion protein; and,
 - 5 ii. changing an amino acid within the junction region to reduce the ability of the
6 candidate T-cell epitope to interact with a T cell receptor.
- 1 2. A fusion protein produced by the method of claim 1.
- 1 3. A method for reducing the immunogenicity of a fusion protein, the method
2 comprising changing a candidate T-cell epitope within a junction region spanning
3 a fusion junction of a fusion protein to reduce the ability of the candidate T-cell
4 epitope to interact with a T cell receptor:
 - 5 i. T-cell epitope
- 1 4. A fusion protein produced by the method of claim 3.
- 1 5. A method for reducing the immunogenicity of a fusion protein, the method
2 comprising introducing a glycosylation site within the junction region spanning
3 the
4 fusion junction.
- 1 6. A method for reducing the immunogenicity of a fusion protein, the method
2 comprising introducing a glycosylation site within 10 amino acids of the fusion
3 junction.
- 1 7. A method of claim 5, the method comprising introducing a glycosylation site
2 within 5 amino acids of the fusion junction.
- 1 8. A method of claim 5, the method comprising introducing a glycosylation site
2 within 2 amino acids of the fusion junction.
- 1 9. A method for reducing the immunogenicity of a fusion protein, the method
2 comprising the steps of:

WO 02/079232

PCT/US02/09815

- 3 i. providing a fusion protein with a junction region comprising a substituted
4 amino acid; and
5 ii. assaying said fusion protein in an immunogenicity assay.
- 1 10. A fusion protein produced by the method of claim 5, 6, 7, 8, or 9.
- 1 11. A method of claim 5-8, wherein the glycosylation is an N-linked glycosylation.
- 1 12. A method of claim 5-8, wherein the glycosylation is an O-linked glycosylation.
- 1 13. A fusion protein of claim 2, 4, or 9, wherein the protein comprises an Ig
2 region.
- 1 14. A fusion protein of claim 2, 4, or 9, wherein the protein comprises a serum
2 albumin region.
- 1 15. A fusion protein of claim 2, 4, or 9, wherein the protein comprises a cytokine
2 activity.
- 1 16. A fusion protein of claim 2, 4, or 9, wherein the protein comprises a hormone
2 activity.
- 1 17. A fusion protein of claim 13, wherein the Ig region, the Ig region comprises
2 sequences of more than one antibody isotype.
- 1 18. A fusion protein with reduced immunogenicity comprising
2 a first protein; and
3 a second protein linked to said first protein via a fusion junction,
4 wherein the amino acid sequence of a junction region surrounding the fusion
5 junction is modified to remove a non-self T-cell epitope.
- 1 19. The fusion protein of claim 18, wherein the junction region comprises between
2 1 and 25 amino acids.
- 1 20. The fusion protein of claim 18, wherein the junction region comprises between
2 1 and 15 amino acids.
- 1 21. The fusion protein of claim 18, wherein the junction region comprises between
2 1 and 9 amino acids.
- 1 22. The fusion protein of claim 18, wherein the junction region comprises an N-
2 linked or an O-linked glycosylation site.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

- 1 23. The fusion protein of claim 18, wherein the junction region comprises a spacer
2 or linker.
- 1 24. The fusion protein of claim 18, wherein the junction region comprises an Asn-
2 X-Ser/Thr-Gly-amino acid sequence, wherein X is any amino acid.
- 1 25. The fusion protein of claim 18, wherein the first protein comprises an Ig
2 molecule or a fragment thereof.
- 1 26. The fusion protein of claim 25, wherein the C-terminus of said Ig molecule or
2 fragment thereof is linked to the N-terminus of said second protein.
- 1 27. The fusion protein of claim 18, wherein the junction region comprises an IgG
2 sequence having an ATAT amino acid sequence instead of an LSLS amino acid
3 sequence.
- 1 28. The fusion protein of claim 25, wherein the Ig molecule or fragment thereof
2 comprises an Fc molecule.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

- 3 29. The fusion protein of claim 25, wherein the Ig molecule or fragment thereof
4 comprises amino acid sequences from two antibody isotypes.
- 1 30. The fusion protein of claim 29, wherein the Ig molecule or fragment thereof
2 comprises IgG1 and IgG2 amino acid sequences.
- 1 31. The fusion protein of claim 18, wherein the second protein has cytokine
2 activity.
- 1 32. The fusion protein of claim 18, wherein the second protein has hormone
2 activity.
- 1 33. The fusion protein of claim 18, wherein the first protein is an albumin protein.
- 1 34. A method of reducing the immunogenicity of a fusion protein, the method
2 comprising:
3 i. identifying an amino acid in a peptide in a junction region, wherein the
4 amino acid is selected from the group consisting of a leucine, a valine, an isoleucine, a
5 methionine, a phenylalanine, a tryptophan and a tyrosine; and
6 ii. changing the amino acid in the peptide, such that the ability of the
7 peptide to bind to MHC Class II is reduced.
- 1 35. A fusion protein produced by the method of claim 34.
- 1 36. A nucleic acid encoding a fusion protein with reduced immunogenicity, the
2 fusion
3 protein comprising:
4 i. a first protein;
5 ii. a second protein linked to the first protein via a fusion junction,
6 wherein the amino acid sequence of a junction region spanning the
7 fusion junction is modified to remove a non-self T-cell epitope.
1 iii.
- 2 37. A nucleic acid of claim 36, wherein the junction region comprises a linker.

WO 02/079232

PCT/US02/09815

SEQUENCE LISTING

<110> Lexigen Pharmaceuticals Corp.
 <120> Reducing the Immunogenicity of Fusion Proteins
 <130> LEX-017PCT
 <150> US 60/280,625
 <151> 2001-03-30
 <160> 59
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> human Ig gamma heavy chain C region
 <400> 1
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

WO 02/079232

PCT/US02/09815

```

180              185              190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195              200              205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210              215              220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225              230              235              240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245              250              255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260              265              270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275              280              285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290              295              300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305              310              315              320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325              330

<210> 2
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> human Ig gamma-2 chain C region

<400> 2
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1              5              10              15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20              25              30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35              40              45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50              55              60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65              70              75              80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85              90              95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100             105             110

```

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325
 <210> 3
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> human Ig3 constant region
 <400> 3
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 165 170 175
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
 180 185 190
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Trp Glu
 195 200 205
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 210 215 220
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 225 230 235 240
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 245 250 255
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 260 265 270
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 275 280 285
 Pro Ser Asp Ile Ala Met Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
 290 295 300
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 305 310 315 320
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 325 330 335
 Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 340 345 350
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

WO 02/079232

PCT/US02/09815

355 360
 <210> 4
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Ig gamma-4 chain C region

 <400> 4
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> potential T cell epitope

<400> 5

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> mutated potential T cell epitope

<400> 6

Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> mutated potential T cell epitope

<400> 7

Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala
 1 5

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<223> sequence near the C-terminus of CH3 domain of the IgA Fc region

<400> 8

Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His
 1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> mutated sequence near the C-terminus of CH3 domain of the IgA Fc region

<400> 9

Gln Lys Thr Ala Asp Arg Thr Ala Gly Lys Pro Thr His
 1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> deimmunized sequence in an IgA-X fusion

<400> 10

Gln Lys Thr Pro Thr Arg Thr Ala Gly Lys Pro Thr His
 1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> deimmunized sequence in an IgA-X fusion

<400> 11

Gln Lys Thr Pro Thr Arg Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
 1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> deimmunized sequence in an IgA-X fusion

<400> 12

Gln Lys Thr Ala Thr Arg Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
 1 5 10

<210> 13

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> potential T cell epitope in the HSA-IFNalpha junction

<400> 13
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 1 5 10

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> modified C-terminus of albumin

<400> 14
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Thr Thr Ala
 1 5 10

<210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence in an Fc fusion protein

<400> 15
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
 1 5 10 15
 /
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> modified sequence in an Fc fusion protein

<400> 16
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Lys Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<220>
 <223> junction sequence
 <400> 17
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Pro
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> modified junction sequence
 <400> 18
 Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro
 1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> modified junction sequence
 <400> 19
 Leu Asn Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro
 1 5
 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic peptide containing a reactive epitope
 <400> 20
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Pro Thr Ser
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> modified synthetic peptide containing a reactive epitope
 <400> 21
 Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Lys Ala Pro Thr Ser
 1 5 10

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<210> 22
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> albumin-CD4 junction sequence

 <400> 22
 Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val
 20 25 30
 Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser
 35

 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> potential T cell epitope in HSA-IFNalpha fusion

 <400> 23
 Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Cys
 1 5 10

 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> potential T cell epitope in HSA-IFNalpha fusion

 <400> 24
 Leu Gly Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly
 1 5 10

 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> C-terminus albumin sequence

 <400> 25
 Ala Ala Leu Gly Leu
 1 5

 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> mutated C-terminus albumin sequence
 <400> 26
 Thr Ala Thr Thr Ala
 1 5
 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> modified albumin junction region
 <400> 27
 Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Thr Ala
 1 5 10 15
 Thr Thr Ala
 <210> 28
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> non-mutant Fc sequence
 <400> 28
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly
 20
 <210> 29
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> GLP-1-mutant Fc fusion junction
 <400> 29
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 35 40 45

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Glu Leu Leu Gly
50

<210> 30
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> GLP-1-normal Fc fusion junction

<400> 30

Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
35 40

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> potential T cell epitope at the GLP-1-Fc fusion

<400> 31

Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu
1 5 10

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> potential T cell epitope at the GLP-1-Fc fusion junction

<400> 32

Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu Pro
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> potential T cell epitope in GLP-1-Fc fusion junction

<400> 33

Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu Pro Lys Ser Ser
1 5 10

WO 02/079232

PCT/US02/09815

```

<210> 34
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> deimmunized GLP-1Fc fusion junction

<400> 34
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1          5          10          15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ala Ala Trp Ala Val Thr Gly Thr Gly Glu
          20          25          30
Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          35          40          45
Glu Leu Leu Gly
          50

<210> 35
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> GLP-1-Fc fusion junction with a glycosylation site

<400> 35
Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val
1          5          10          15
Lys Gly Arg Asn Gly Ser Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
          20          25          30
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
          35          40

<210> 36
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> TNF-R-gamma-1 fusion junction

<400> 36
Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly
1          5          10          15
Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
          20          25          30
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
          35          40

<210> 37

```

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> TNF-R-Fc fusion junction

 <400> 37

 Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly
 1 5 10 15

 Ser Thr Gly Asn Gly Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30

 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 35 40

 <210> 38
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Fc-IL12p35 fusion junction

 <400> 38

 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 1 5 10 15

 Ser Pro Gly Lys Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met
 20 25 30

 Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln
 35 40

 <210> 39
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> IL-12p40-IL2 fusion junction

 <400> 39

 Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser
 1 5 10 15

 Val Pro Cys Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30

 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
 35 40

 <210> 40
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<220>

<223> modified Fc-IL12p35 fusion junction

<400> 40

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala
 1 5 10 15

Thr Pro Gly Lys Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met
 20 25 30

Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln
 35 40

<210> 41

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> modified IL12p40-IL2 fusion junction

<400> 41

Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser
 1 5 10 15

Val Pro Cys Ser Asn Gly Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
 35 40

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> potential T cell epitope in IL12p40-IL fusion

<400> 42

Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Asn Gly Thr Ser
 1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> potential T cell epitope in IL12p40-IL2 fusion junction

<400> 43

Ala Ser Val Pro Cys Ser Asn Gly Thr Ser Ser Ser Thr
 1 5 10

<210> 44

<211> 41

WO 02/079232

PCT/US02/09815

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> IL4-Fc fusion junction

 <400> 44
 Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser
 1 5 10 15
 Lys Cys Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 35 40

 <210> 45
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Fc-GMCSF fusion junction

 <400> 45
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Gly Lys Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp
 20 25 30
 Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu
 35 40

 <210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> potential T-cell epitope at IL4-Fc fusion junction

 <400> 46
 Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5 10

 <210> 47
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> modified IL4-Fc fusion

 <400> 47
 Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser
 1 5 10 15

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Lys Cys Ser Ser Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 35 40
 <210> 48
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> deimmunized Fc-GMCSF fusion junction
 <400> 48
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 Thr Pro Gly Lys Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp
 20 25 30
 Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu
 35 40
 <210> 49
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> IgG2CH1-IgG1hinge fusion junction
 <400> 49
 Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 1 5 10 15
 Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30
 Pro Cys Pro
 35
 <210> 50
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> IgG1hinge-IgG2CH2 fusion junction
 <400> 50
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30

WO 02/079232 PCT/US02/09815

Asp Thr Leu
35

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> potential T cell epitope in the IgG2CH1-IgG1 hinge fusion junctio

<400> 51

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
1 5 10

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> potential T cell epitope in the IgG2CH1-IgG1 hinge fusion junctio

<400> 52

Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
1 5 10

<210> 53
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> modified IgG2CH1-IgG1hinge fusion junction

<400> 53

Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Ala
1 5 10 15

Asp Lys Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro
35

<210> 54
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> modified IgG2CH1-IgG1hinge fusion junction

<400> 54

Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

WO 02/079232

PCT/US02/09815

```

1 .           5           10           15
Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
   20           25           30

Pro Cys Pro
   35

<210> 55
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> modified IgG1hinge-IgG2CH2 fusion junction

<400> 55

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1           5           10           15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
   20           25           30

Asp Thr Leu
   35

<210> 56
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> mutant EPO sequence

<400> 56

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1           5           10           15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu Gly
   20           25           30

Pro Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
   35           40           45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
   50           55           60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
   65           70           75           80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Cys Glu Gly Leu Gln Leu His Val Asp
   85           90           95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
  100           105           110

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
  115           120           125

```

WO 02/079232

PCT/US02/09815

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> CH3-EPO fusion junction

<400> 57

Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro Pro Arg Leu
 1 5 10 15

Ile

<210> 58
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> IgG2 CH3 sequence

<400> 58

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5

<210> 59
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> modified IgG2CH3 sequence

<400> 59

Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly
 1 5

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/079232 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 1/00, 14/00, 16/00, 17/00, A61K 38/24, 45/00, 47/00, 38/27, G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US02/09815
- (22) International Filing Date: 30 March 2002 (30.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/280,625 30 March 2001 (30.03.2001) US
- (71) Applicant: LEXIGEN PHARMACEUTICALS CORP. [US/US]; 125 Hartwell Avenue, Lexington, MA 02421 (US).
- (72) Inventor: GILLIES, Stephen, D.; 159 Sunset Road, Carlisle, MA 01741 (US).
- (74) Agent: WALLER, Patrick, R., H.; Testa, Hurwitz & Thibault, LLP High Street Tower, 125 High Street, Boston, MA 02110 (US).
- (81) Designated States (national): 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, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 12 December 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/079232 A3

(54) Title: REDUCING THE IMMUNOGENICITY OF FUSION PROTEINS

(57) Abstract: Disclosed are compositions and methods for producing fusion proteins with reduced immunogenicity. Fusion proteins of the invention include a junction region having an amino acid change that reduces the ability of a junctional epitope to bind to MHC Class II, thereby reducing its interaction with a T-cell receptor. Methods of the invention involve analyzing, changing, or modifying one or more amino acids in the junction region of a fusion protein in order to identify a T-cell epitope and reduce its ability to interact with a T-cell receptor. Compositions and methods of the invention are useful in therapy.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09815		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C07K 1/00, 14/00, 15/00, 17/00; A61K 38/24, 45/00, 47/00, 38/27; G01N 33/53 US CL : 530/350, 363, 399; 435/7.1; 424/278.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 363, 399; 435/7.1; 424/278.1				
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 practicable, search terms used) WEST, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	REISFELD et al. Immunocytokines: a new approach to immunotherapy of melanoma. Melanoma Res. 1997, Vol. 7, Suppl. 2, pages S99-S106, see entire document.	1-28		
Y	LODE et al. Amplification of T Cell Mediated Immune Responses by Antibody-Cytokine Fusion Proteins. Immunol. Invest. 2000, Vol. 29, No. 2, pages 117-120, see entire document.	1-28		
Y	WO 89/059244 A1 (ECLAGEN LIMITED) 30 December 1998, see entire document.	1-28		
Y	WO 99/003887 A1 (BOLDER BIOTECHNOLOGY, INC.) 28 January 1999, see entire document.	1-28		
Y	WO 99/002709 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER) 21 January 1999, see entire document.	1-28		
Y	WO 00/034317 A2 (BIOVATION LIMITED) 15 June 2000, see entire document.	1-28		
<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 border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (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%;"> *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 *A* 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 *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (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 *A* 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 *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (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 *A* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 24 July 2002 (24.07.2002)		Date of mailing of the international search report		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-2120		Authorized officer G. R. Ewoldt Telephone No. 703-308-0196		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テマコード(参考)
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	A 6 1 K 37/24	
// A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	

(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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 ジリーズ、 スティーヴン ディー .

アメリカ合衆国 0 1 7 4 1 マサチューセッツ州 カーライル サンセット ロード 1 5 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA07 HA06

4C084 AA06 BA34 BA41 DA01 DB01 NA06 NA07 ZB022 ZC032

4H045 AA10 BA41 CA40 DA86 EA20 FA74

专利名称(译)	降低融合蛋白的免疫原性		
公开(公告)号	JP2004532020A	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2002577856	申请日	2002-03-30
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	ジリーズスティーヴンディー		
发明人	ジリーズ、 スティーヴン ディー.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K38/22 A61K38/24 A61K38/27 A61K45/00 A61K47/00 C07K1/00 C07K14/00 C07K14/505 C07K14/52 C07K14/54 C07K14/55 C07K14/575 C07K14/705 C07K14/725 C07K14/76 C07K16/00 C07K16/18 C07K17/00 C07K19/00 C12N15/62 G01N33/53		
CPC分类号	A61P3/04 A61P3/10 A61P35/00 C07K14/505 C07K14/5434 C07K14/55 C07K14/70578 C07K16/30 C07K2319/00 C07K2319/02 C07K2319/30 C07K2319/33 C07K2319/40 C07K2319/75 C12N15/62 Y10S424/809 Y10S530/868 C07K1/1077		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/52 C07K14/575 C07K14/76 C07K16/18 C07K19/00 A61K37/24 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA07 4B024/HA06 4C084/AA06 4C084/BA34 4C084/BA41 4C084/DA01 4C084/DB01 4C084/NA06 4C084/NA07 4C084/ZB022 4C084/ZC032 4H045/AA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
优先权	60/280625 2001-03-30 US		
其他公开文献	JP4638129B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于产生免疫原性降低的融合蛋白的组合物和方法。本发明的融合蛋白包含具有氨基酸变化的连接部分，其降低连接表位与MHC分子结合的能力，从而降低与T细胞受体相互作用的能力。本发明的方法在融合蛋白的连接处测定，修饰和修饰一个或多个氨基酸，以鉴定T细胞表位并降低它们与T细胞受体相互作用的能力。包括。本发明的组合物和方法在治疗上是有用的。

