[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
**C07K 14/755**
C07K 7/08
A61K 38/37
A61K 38/10

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03808701.4

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1646564A

[22] 申请日 2003.4.17 [21] 申请号 03808701.4

[30] 优先权

[32] 2002. 4.18 [33] EP [31] 02008712.8

[32] 2003. 3.24 [33] EP [31] 03006554.4

[86] 国际申请 PCT/EP2003/004063 2003.4.17

[87] 国际公布 WO2003/087161 英 2003.10.23

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.18

[71] 申请人 默克专利有限公司

地址 德国达姆施塔特

[72] 发明人 T·琼斯 M·贝克尔

F·J·卡尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 15 页

[54] 发明名称 修饰的因子Ⅷ

[57] 摘要

本发明涉及对人因子 VIII(FVIII)进行修饰，从而导致当用于体内时与任何未修饰的亲代抗体相比基本无免疫原性或具低的免疫原性的 FV VIII 蛋白质。 本发明也涉及来源于所述未经修饰的蛋白质的 T－细胞表位肽，通过该肽可以构建具有降低的免疫原性的修饰的 FVIII 变体。

ISSN1008-4274

1. 与未修饰的人因子Ⅷ相比包含特异改变的氨基酸残基、在体内使用时基本上无免疫原性或免疫原性较未修饰亲本分子低且具有基本上相同的生物学特异性和活性的经修饰人因子Ⅷ分子，其中所述已改变的氨基酸残基引起一个或多个在亲本未修饰分子中担当Ⅱ型 MHC 结合配体并刺激 T 细胞的 T 细胞表位的减少或消除。

2. 依照权利要求 1 的经修饰因子Ⅷ分子，其中所述改变是在表 1 所描述的亲本分子中存在的一个或多个连续氨基酸残基序列内的一个或多个位置进行的。

3. 依照权利要求 2 的经修饰因子Ⅷ分子，其中所述改变是在表 2 所描述的亲本分子中存在的一个或多个连续氨基酸残基序列内的一个或多个位置进行的。

4. 依照权利要求 1－3 之任一项的经修饰因子Ⅷ分子，其中所述改变是 1－9 个氨基酸残基的替代。

5. 依照权利要求 4 的经修饰因子Ⅷ分子，其中表 1 所描述的序列中的下列位置的一个、多个或所有氨基酸残基已经被替代:

197、198、199、201、202、407、411、412、419、515、517、613、617、636、637、638、639、823、1011、1013、1208、1209、1210、1254、1255、1257、1262、1264、1268、1119、1120、1121、1122、1123。

6. 依照权利要求 3 的经修饰因子Ⅷ分子，其中在表 2 的肽 P10 中进行了下列氨基酸残基替代的一个、多个或所有:

I1208A、I1208T、I1208N;

I1209C;

M1210K、M1210N。

7. 依照权利要求 3 的经修饰因子Ⅷ分子，其中在表 2 的肽 P8 中进行了下列氨基酸残基替代的一个、多个或所有:

M1013K;

I1011A、I1011C、I1011D、I1011E、I1011G、I1011H、I1011K、I1011P、I1011Q、I1011R、I1011S、I1011T。

8. 依照权利要求 3 的经修饰因子Ⅷ分子，其中在表 2 的肽 P7 中进行了下列氨基酸残基替代的一个、多个或所有:

V823A、V823D、V823E、V823G、V823H、V823N、V823P、V823S、V823T。

9. 依照权利要求 1－8 之任一项的经修饰因子Ⅷ分子，其中当作为完整蛋白质在人 T 细胞的经诱导细胞增殖生物学测定中被测试时其展示的刺激指数（SI）小于使用来自相同供体的细胞平行测试的亲本分子且小于 2，其中所述指数为用蛋白质刺激后评价的细胞增殖值除以未接受蛋白质的对照细胞中评价的细胞增殖值，并且其中细胞增殖是通过任何适宜方法测量的。

10. 编码权利要求 1－9 之任一项所定义的因子Ⅷ分子的 DNA 序列。

11. 包含上述权利要求之任一项的经修饰因子Ⅷ分子的药物组合物，其任选还包含药学可接受载体、稀释剂或赋形剂。

12. 由表 1 选择的、由未修饰人因子Ⅷ的一级序列生成且具有潜在Ⅱ型 MHC 结合活性的肽分子，其中所述肽分子在细胞增殖生物学测定中具有大于 1.8 的刺激指数，其中所述指数为用肽刺激后评价的细胞增殖值除以未接受肽的对照细胞中评价的细胞增殖值，并且其中细胞增殖是通过任何适宜方法测量的。

13. 通过氨基酸替代由权利要求 12 的肽分子衍生的经修饰肽分子，其缺少或具有降低的潜在Ⅱ型 MHC 结合活性，表现为刺激指数低于 2，其中所述指数为用肽刺激后评价的细胞增殖值除以未接受肽的对照细胞中评价的细胞增殖值，并且其中细胞增殖是通过任何适宜方法测量的。

14. 编码权利要求 12 或 13 的肽的 DNA 序列。

15. 依照权利要求 13 的肽在制造权利要求 1 所定义的经修饰因子Ⅷ分子中的用途。

16. 依照权利要求 12 的肽在制造用于降低因子Ⅷ在患者体内的免疫原性的疫苗中的用途。

# 修饰的因子Ⅷ

## 发明领域

本发明涉及尤其是向人施用的且特别是用于治疗用途的多肽。该多肽是修饰的多肽，所述修饰导致该多肽当给予人被试者时具有减少的引起免疫反应的倾向。本发明具体地涉及对人因子Ⅷ（FⅧ）进行修饰，从而导致当体内应用时与任何未修饰的对应物相比基本无免疫原性或具低的免疫原性的因子Ⅷ蛋白质。本发明还涉及来源于所述未修饰的蛋白质的T细胞表位肽，通过这些肽可以构建具有降低的免疫原性的FⅧ修饰变体。

## 发明背景

有许多关于治疗性蛋白质的功效受对该治疗性蛋白质有害的免疫反应限制的例子。几种小鼠单克隆抗体已显示出有希望用作许多人类疾病情形的治疗剂，但在某些情况下由于引起显著程度的人抗-鼠抗体（HAMA）反应而失败[Schroff, R. W.等人（1985）*Cancer Res.* 45: 879-885; Shawler, D. L.等人（1985）*J. Immunol.* 135: 1530-1535]。对于单克隆抗体已发展了许多技术来试图减少 HAMA 反应[WO8909622; EP0239400; EP0438310; WO9106667]。这些重组DNA方法通常减少最终抗体构建体中小鼠的遗传信息，同时增加最终构建体中人的遗传信息。但是，在几种情况下，结果所得的“人源化”抗体仍然在患者中引起免疫反应[Issacs, J. D.（1990）*Sem. Immunol.* 2: 449，456; Rebello, P. R.等人（1999）*Transplantation* 68: 1417-1420]。

抗体不是唯一一类作为治疗剂给药而可产生免疫反应的多肽分子。即使人来源的且与人体内存在的蛋白质具有相同氨基酸序列的蛋白质也可诱导人体内免疫反应。显著的例子包括粒细胞巨噬细胞集落刺激因子

[Wadhwa, M.等人（1999）*Clin. Cancer Res.* 5: 1353-1361]和干扰素α2[Russo, D.等人（1996）*Bri. J. Haem.* 94: 300-305; Stein, R.等人（1988）*New Engl. J. Med.* 318: 1409-1413]等的治疗应用。在这些人蛋白质具有免疫原性的情况下，原本在这些个体中起作用的针对这些蛋白质的免疫耐受性，推测将被破坏。

这种将人蛋白质用作替代疗法的情形是不同的，例如用在所说蛋白质天然不足的遗传性疾病的治疗中，诸如血友病、Christmas 病、Gauchers 病之类疾病以及许多其它例子中。在这样的情况中，治疗用的替代蛋白质从开始就可起到免疫学上外源分子的作用，并且当个体能对治疗剂产生免疫应答时，治疗的效力有可能被显著降低。

无论所说的蛋白质治疗剂是否被宿主免疫系统认作外源分子，或现存的对这些分子的耐受性是否被克服，对这些蛋白质的免疫反应性的机制是相同的。诱发免疫应答的关键是在这些蛋白质内存在能通过呈递于Ⅱ型 MHC 分子上而刺激 T 细胞活性的肽，即，所谓的“T 细胞表位”。这样的 T 细胞表位通常被定义为能结合Ⅱ型 MHC 分子的任何氨基酸序列。言外之意，“T 细胞表位”指当结合 MHC 分子时能被 T 细胞受体（TCR）识别并至少在原则上能通过结合 TCR 促进 T 细胞应答而引起这些 T 细胞活化的表位。

Ⅱ型 MHC 分子是一组在辅助 T-细胞的选择和活化中起重要作用的高度多态的蛋白质。人类 DR 类白细胞抗原（HLA-DR）是该组蛋白质的主要同种型，然而同种型 HLA-DQ 和 HLA-DP 也发挥相似的功能。在人类群体中，每个个体携带 2-4 个 DR 等位基因、2 个 DQ 和 2 个 DP 等位基因。对于 DR 同种型来说约存在 70 种不同的同种异型，对于 DQ 是 30 种不同的同种异型，对于 DP 是 47 种不同的同种异型。许多 DR 分子的结构已得到了解析，这些结构显示为具有许多疏水口袋的开放式（open-ended）肽结合沟，这些疏水口袋与肽的疏水残基（口袋残基）啮合[Brown 等人 *Nature*（1993）364: 33; Stern 等人（1994）*Nature* 368: 215]。MHC DR 分子由在 C 末端插入细胞膜的α链和β链组成。每个异二聚体都具有能结合 9

－20 个氨基酸长度的肽的配体结合域，但是结合沟最大能容纳 11 个氨基酸。最近的研究显示 DQ 分子具有同源结构，而且预期 DP 家族蛋白质将非常相似。确立不同Ⅱ型 MHC 分子同种异型的多态性造成了肽结合沟中多种多样的不同肽结合表面，且在群体水平上确保了能够最大的灵活度地识别外源蛋白质及对病原体生物产生免疫反应。

对治疗性蛋白质的免疫反应通过Ⅱ型 MHC 肽呈递途径进行。在此，外源蛋白质被吞入并经加工以与 DR、DQ 或 DP 类的Ⅱ型 MHC 分子结合进行呈递。Ⅱ型 MHC 分子是由专门的抗原呈递细胞（APC），如巨噬细胞和树突细胞等表达的。Ⅱ型 MHC 肽复合物与 T-细胞表面上关连 T-细胞受体的结合，加上某些其他共同受体如 CD4 分子的交互结合可诱导 T-细胞内的活化状态。该活化导致细胞因子的释放，从而进一步活化其他淋巴细胞如 B 细胞以产生抗体，或者活化 T 杀伤细胞而形成完全的细胞免疫反应。

T-细胞表位的鉴定是表位消除的第一步，然而在本领域中几乎没有清楚的案例将鉴定表位和去除表位整合在单个方案中。WO98/52976 和 WO00/34317 讲授了鉴定多肽序列的计算穿线（computational threading approach）方法，该多肽序列具有与人Ⅱ型 MHC DR 同种异型亚型结合的潜力。在这些讲授中，预测的 T-细胞表位通过在目的蛋白质中应用合理的氨基酸替代而去除。然而利用该方案和其他鉴定表位的基于计算的程序[Godkin, A. J.等人（1998）*J. Immunol.* 161: 850-858; Sturniolo, T.等人（1999）*Nat. Biotechnol.* 17: 555-561]，预测能够与Ⅱ型 MHC 分子结合的肽可能并不会在所有情况下，特别是在体内（由于加工途径或其他现象）发挥 T-细胞表位的功能。此外，这些预测 T-细胞表位的计算方法通常不能够预测具有 DP 或 DQ 限制性的表位，尽管这些系统的表位识别通常相互重叠。

除计算技术之外，存在测量合成的肽与Ⅱ型 MHC 分子结合能力的体外方法。一种示例性的方法应用具有限定的 MHC 同种异型的 B-细胞系作为Ⅱ型 MHC 结合表面的来源，且可应用于Ⅱ型 MHC 配体的鉴定中

[Marshall K. W.等人（1994）*J. Immunol.* 152: 4946-4956; O'Sullivan 等人（1990）*J. Immunol.* 145: 1799-1808; Robadey C.等人（1997）*J. Immunol.* 159: 3238-3246]。然而，这种技术不适用于筛选可针对广泛多样的 MHC 同种异型的多重潜在表位，且它们也不能证实结合的肽能否发挥 T-细胞表位的功能。

最近采用重组 MHC 分子与合成的肽的可溶性复合物的技术已得到应用[Kern, F.等人（1998）*Nature Medicine* 4: 975-978; Kwok, W. W.等人（2001）*TRENDS in Immunol.* 22: 583-588]。这些试剂和方法可用于鉴定来自人或实验动物被试者的外周血液样品中是否存在能够结合特定的 MHC-肽复合物的 T-细胞克隆，但这些方法和试剂也不适用于筛选可针对广泛多样的 MHC 同种异型的多重潜在表位。

T-细胞活化的生物学测定法可提供实际的选择方案，通过该方案可读出所检测的肽或整个蛋白质序列引起免疫反应的能力。该类方法的例子包括 Petra 等人的工作，该工作对细菌蛋白质葡萄球菌激酶应用 T-细胞增殖测定，随后用合成的肽刺激 T-细胞系以对表位进行作图[Petra, A. M.等人（2002）*J. Immunol.* 168: 155-161]。类似地，应用合成的破伤风毒素蛋白质的肽进行的 T-细胞增殖测定导致对毒素中免疫优势表位的确定[Reece J. C.等人（1993）*J. Immunol.* 151: 6175-6184]。WO99/53038 公开了所测试蛋白质的 T-细胞表位可用分离的人免疫细胞亚群进行确定的方法，其中细胞分离后，促进其在体外分化并在合成的目的肽存在时进行细胞培养，在培养的 T-细胞中对任何诱导的增殖进行测量。相同技术也由 Stickler 等人[Stickler, M. M.等人（2000）*J. Immunotherapy* 23: 654-660]描述，其中在两种情况下该方法应用于在细菌枯草杆菌蛋白酶中探测 T-细胞表位。这种技术需要仔细地应用细胞分离技术和利用多种细胞因子补充物进行细胞培养以便获得想要的免疫细胞亚群（树突细胞、CD4+和/或 CD8+ T-细胞），且不利于应用多个供体样品的快速通量筛选。

如上所述，由此期望从给定的原则上有治疗价值但最初为免疫原性的肽、多肽或蛋白质中鉴定并去除或至少减少 T-细胞表位。这种治疗上有价

值的分子之一是 FVIII。本发明提供除去了一个或多个 T 细胞表位的修饰形式的人 FVIII。

FVIII是固有的血液凝固途径中的一个凝血因子。FVIII是因子IXa 的辅因子，其在钙离子和磷脂存在的条件下将因子X转变成活化形式Xa。现已对FVIII的分子遗传学有了很好的研究，相当重要的原因是当X-连锁基因中缺乏 FVIII时会导致 A 型血友病。FVIII基因编码两种可选择剪切的转录产物，可产生 A 同种型的大糖蛋白 FVIII和较小的 B 同种型。在天然状态下可鉴别到来源于 A 同种型前体的多种降解或加工形式，且特定的功能活性已被定位于特定的片段。FVIII分子被划分为 6 个结构域：三个 A 结构域（A1、A2、A3），一个富碳水化合物且非必需的中央结构域（B-结构域）和两个 C 结构域（C1、C2）。FVIII的凝血酶和因子Xa 蛋白水解位点在残基 372、740 和 1689 之后。Xa 与活化的蛋白质 C 一道的裂解位点发生在残基 336 之后。

FVIII蛋白质在功能上可定义为能矫正 A 型血友病患者血浆中凝血缺陷的因子。为了治疗 A 型血友病，已生产来自人或猪血浆的纯化形式的 FVIII，最近还通过重组 DNA 技术生产 FVIII。1984 年，人 FVIII基因被至少两个独立的实验小组分离和表达于哺乳动物细胞中[Toole,J.J.等（1984），*Nature*312: 342-347; Gitschier,J.等（1984），*Nature*312: 326-330; Wood,W.I.等（1984），*Nature*312: 330-337; Vehar,G.A.等（1984），*Nature*312: 337-342; WO87/04187;WO88/08035;WO88/03558;US4757006]。从 cDNA 中推知了其氨基酸序列并已开发了治疗用量的 FVIII的重组生产，例如 US4965199 公布了一种用于在哺乳动物宿主细胞中生产 FVIII和纯化人 FVIII的方法。已有关于在 CHO（中国仓鼠卵巢）细胞和 BHKC（幼仓鼠肾细胞）中表达人 FVIII的报道，而最近 FVIII已被修饰成缺失部分或全部的 B 结构域[美国专利申请 4868112]，且这样的分子已在临床试验中显示出了功效[Lusher,J.M.等（2003）*Haemophilia* 9:38-49]。这一分子事实上已获得了应用许可－Refacto 是遗传研究所和 Pharmacia Upjohn 合作在 CHO 细胞中制备的。

尽管可以得到治疗量的 FVIII，仍然继续需要具有增强特性的 FVIII类似

物。期望达到的增强作用包括蛋白质表达和纯化的可选择方案和形式，还有尤其是对蛋白质生物学特性的改进。在用作治疗剂时特别需要增强其体内特性。在这方面，非常期望的是提供减少或缺失在人受试者体内诱发免疫应答的潜力的 FVIII。预期这样的蛋白质会呈现出在人受试者体内循环时间增加且对慢性和复发性疾病尤其有益，诸如 A 型血友病，尤其是在血友病患者可能对外源重组因子VIII敏感且原本产生会限制其治疗效力的抗因子VIII抗体的情况下尤其有益。

其它文献也提供了 FVIII分子和特别是重组修饰 FVIII[US4757006; US5633150; US5668108]，但它们之中无一认识到 T 细胞表位对于该蛋白质免疫原性的重要，也无一考虑到按本发明的方案以特异且受调控的方式直接影响这些特性。

本领域中关于 FVIII修饰的许多例子中包括 US5948407，为了产生对治疗用蛋白质抗原的抑制性 T 细胞全部组分，此文献中公布了用于产生能经粘膜（如口腔）施用该蛋白质的制剂的方案。

其它文献也试图修饰 FVIII以达到提高其在受试血友病患者体内的半衰期的目的，例如 US6037452 描述的聚（环氧烷）因子VIII缀合体。

在 A 型血友病治疗中的一种特殊的并发症是在某些病人中诱发针对所施用 FVIII制品的抑制性抗体。现已提出几种策略来克服血友病患者中对 FVIII的免疫学应答。耐受性诱导治疗是这些方法中的一种，但目前需要在血友病患者的极早期施用很大剂量（且昂贵）的 FVIII制品。此方法只在部分病例中成功获得了耐受性[Colowick,A.B.等（2000）*Blood* 96: 1698-1702]。在预先未接受治疗的受试者中进行的两种不同的重组产物的临床试验报告显示，在 20％左右的病例中有抑制物的产生[Lusher,J.M.等（1993）*N.Engl.J.Med* 328:453-459; Bray,G.L.等（1994）*Blood* 83:2428-2435]。FVIII抑制物是在血浆中中和 FVIII活性的免疫球蛋白抗体。在用 FVIII浓缩品或重组 FVIII治疗的约 25％严重血友病患者和 5-15％轻度至中度患者中所说的抑制物作为同种抗体出现。

对于含有抑制物的病人还采用了因子IX复合物或“凝血酶原复合物”

进行治疗。通常这些药剂是包括如因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ和Ⅹ在内的多种不同因子的混合制品。EP0044343-B1 提供这样一种以已活化的成分（FⅦa）为特征的凝血酶原复合物。类似地，US6358534 描述了包含小部分 FⅧ蛋白和相对较高比例的其它凝血蛋白因子及载体蛋白的免疫耐受性凝血酶原复合物。

US5543145 提供了组合物以抑制 FⅧ抑制物的产生，该组合物包括例如以与 FⅧ混合的 F（ab'）$_2$ 形式的多克隆抗体或单克隆抗体。US4769336 提供了结合并由此封闭 FⅧ抗体抑制物的 FⅧ片段。

其它的策略是利用猪因子Ⅷ替代人 FⅧ，不过这样的治疗是一种暂时的方法，因为猪Ⅷ本身是会产生免疫性的。

其它可选择的方法包括用免疫抑制性药物进行治疗并/或通过体外疗法从循环中除去抑制物，可以理解的是这些方法代表了对目前所出现问题的极端和冒险的解决方案。遗传工程技术的确为治疗用途的 FⅧ分子的修饰和产生提供了相当大的机会。A 型血友病的药用组合物和疗法由文件 US4965199、US5618788 和 US5668108 和外国同族专利提供，应被认为是本领域中可获得的在此题目上进行大规模工作的典型例子。

用重组方法进行 FⅧ修饰的另外类型的例子参见文件 US5859204、US6376463、US6485563 和 US6180371，它们共同提供了 FⅧ蛋白质及它们的编码基因，其中的定位替代导致了对抑制性抗体反应性的降低。在这些具体的文件中替代被限制在 FⅧ A 结构域的第 484－509 位氨基酸之间。这样的修饰虽然改变了 FⅧ分子的表面布局从而使特定构象表位不再能被病人血清中的特定交叉反应抗体所识别，但是没有涉及驱使 B 细胞产生抗体所需的潜在 T 细胞表位。

其它文献已使用了重组 DNA 方法来提供通过定位氨基酸替代[WO87/07144]或相关分子间的结构域交换来修饰的 FⅧ分子。后一种方法的例子参见 WO90/05530，其中提供了以人因子Ⅴ的 B 结构域替代 FⅧ B 结构域的 FⅧ分子。

还有其它文献提供了包含重组 FⅧ分子的嵌合 FⅧ制品，通过遗传工

程化使其含有人和猪（或其它物种）来源的序列结构域。这样的杂合分子参见 US5744446、US5663060、US5583209、US5364771、US5888974 及其它文献中。

US5171844 提供了遗传工程化的 FVIII分子，该分子可能具有增强的活性和/或降低的免疫原性。后一种特性涉及通过删除缺失分子的某一部分。US4868112 和国外同族专利中所述的较早工作提供了缺失 B 结构域的 FVIII功能性删除突变体。

对 FVIII蛋白质的其它遗传工程修饰致力于蛋白质生产过程的改进，US 6,271,025 提供了具体实例。提供此实例作为本领域可利用的且已知的许多更多相似工作的例示。

发明概述和描述

本发明提供了修饰形式的人因子VIII，此处称作“FVIII”，其中免疫特征通过减少或去除潜在 T-细胞表位的数目而被修饰。

本发明公开了在 FVIII一级序列中鉴定到的序列，该序列由于其 II 型 MHC 结合潜力而是潜在的 T 细胞表位。本公开尤其同样涉及 2332 个氨基酸残基的同种型 A 完整人 FVIII蛋白质以及该蛋白质中缺少 B 域的较小版本。

本发明还公开了在保持最大程度的蛋白质生物学活性的前提下可以通过特定的氨基酸替代、添加或缺失进行改变的本发明分子的一级序列中的特定位点。在只有同时丧失生物学活性才能去掉免疫原性的情况下，可通过在所述蛋白的氨基酸序列中做进一步的改造以恢复所述的活性。

本发明还公开了用于生成这些经修饰分子的方法，首先是用于鉴定为了降低或消除免疫原性位点而需要改变的 T 细胞表位的方法。

本发明提供了预期在体内展示增强特性的经修饰形式的 FVIII蛋白质。本发明公开了在人体内具有免疫原性的 FVIII一级序列的主要区域，并提供了为了消除或降低这些位点的免疫原性效力而对序列进行的修饰。在一个实施方案中，为了提升对完整分子的耐受原性应答(tolerogenic response),

可在药学组合物中提供包含免疫原性区域的合成肽。

在另一个实施方案中，本发明的经修饰 FVIII分子可用于制药学组合物。

概括而言，本发明涉及下面的要点：

● 一种经修饰的分子，其具有 FVIII的生物学活性，且当其在体内应用时基本上无免疫原性或免疫原性低于任何具有相同生物学活性但未经修饰的分子；

● 如上所述的分子，其中，所述的免疫原性丧失是通过从原始的未经修饰的分子中去除一个或多个 T-细胞表位而实现的；

● 如上所述的分子，其中，所述的免疫原性丧失是通过减少能与由所述分子衍生的肽相结合的 MHC 同种异型的数量来实现的；

● 如上所述的分子，其中，去除了一个 T-细胞表位；

● 如上所述的分子，其中，原本存在的 T-细胞表位是 II 型 MHC 的配体，或表现出经 II 型分子呈递作用后有刺激或结合 T-细胞的能力的肽序列；

● 如上所述的分子，其中，所述的肽序列选自如下肽 a-k:

a) = ILLFAVFDEGKSWHS,

b) = SYKSQYLNNGPQRIG,

c) = GPQRIGRKYKKVRFM,

d) = YKWTVTVEDGPTKSD,

e) = ASNIMHSINGYVFDS,

f) = VAYWYILSIGAQTDF,

g) = MSSSPHVLRNRAQSG,

h) = CNIQMEDPTFKENYR,

i) = STLFLVYSNKCQTPL,

j) = ISQFIIMYSLDGKKW,

k) = IARYIRLHPTHYSIRSTLRM;

● 如上所述的分子，其中所述肽序列选自表 1 和/或表 2 中的肽；

● 如上所述的分子，其中，所述的肽序列选自如图 1 所示的肽；

● 如上所述的分子，其中，任何原本存在的 T-细胞表位中的 1-9 个氨基酸残基，优选 1 个氨基酸残基发生了改变；

● 如上所述的分子，其中，所述氨基酸残基的改变是在特定的位置对

原本存在的氨基酸残基进行缺失或用其他的氨基酸残基进行替代、添加;

●如上所述的分子，其中，在需要时常通过替代，添加或缺失特定的氨基酸作进一步改变以恢复所述分子的生物学活性;

●与上文肽序列 a－k 之任一共享超过 90％氨基酸同一性的上文肽分子;

●与上文肽序列 a－k 之任一共享超过 80％氨基酸同一性的上文肽分子;

●与表 1 或图 1 之任一肽序列共享超过 90％氨基酸同一性的上文肽分子;

●与表 1 或图 1 之任一肽序列共享超过 80％氨基酸同一性的上文肽分子;

●能够结合Ⅱ型 MHC 的上述肽序列;

●如上所述的 FⅧ分子，其中在对应于上文肽 a－k 之任一中的任一所示氨基酸的位置进行了一个或多个氨基酸替代;

●如上所述的 FⅧ分子，其中在对应于表 1 或图 1 中任一所示氨基酸的位置进行了一个或多个氨基酸替代;

●包含具有结合Ⅱ型 MHC 的活性的上文任一个肽或修饰的肽的药物组合物;

●编码任何上述和下述经修饰分子的 DNA 序列或分子;

●包含具有 FⅧ生物学活性的经修饰分子的药物组合物;

●上述和/或权利要求中定义的药物组合物，其任选地包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂;

●制造如上引用的任何权利要求中所定义的具有 FⅧ生物学活性的经修饰分子的方法，该方法包括下述步骤: (i) 确定所述多肽或其中一部分的氨基酸序列; (ii)通过任意方法，包括利用体外或硅片(*in silico*)技术或生物学试验确定所述肽与 MHC 分子的结合，由此鉴定所述蛋白的氨基酸序列中潜在的一个或多个 T-细胞表位; (iii)设计新的序列变体，其中，经鉴定的潜在 T-细胞表位内有一个或多个氨基酸经过修饰，由此基本上减弱或去除

了所述 T-细胞表位的活性，这一效果可由体外或计算机技术或生物学试验通过所述肽与 MHC 分子的结合来确定；(iv)通过重组 DNA 技术构建所述序列变体，并检测所述的变体以便鉴定一个或多个具有所需性质的变体；和(v)任选地重复步骤(ii)- (iv)；

●如上所述的方法，其中步骤(iii)是通过在任何原本存在的 T-细胞表位中替代、添加或缺失 1-9 个氨基酸残基来进行的；

●选自图 1 的具有潜在的 II 型 MHC 结合活性且由未经修饰的 FVIII产生的 13 肽 T-细胞表位肽，及其在制造在体内使用时基本上没有免疫原性或免疫原性低于具有相同生物学活性的任何未经修饰的分子的 FVIII中的用途；

●由上述的 13 肽 T-细胞表位肽中的至少 9 个连续的氨基酸残基组成的肽序列，及其在制造在体内使用时基本上没有免疫原性或免疫原性低于任何未经修饰的分子并具有人因子VIII的生物学活性的 FVIII中的用途。

●选自表 1 或图 1 中序列的具有潜在的 II 型 MHC 结合活性且由未经修饰的 FVIII产生的 13 肽 T-细胞表位肽，及其在制造在体内使用时基本上没有免疫原性或免疫原性低于任何未经修饰的分子并具有人因子VIII的生物学活性的 FVIII中的用途；

●由来自表 1 或图 1 中任一序列的 13 肽 T-细胞表位肽中的至少 9 个连续氨基酸残基组成的肽序列，及其在制造在体内使用时基本上没有免疫原性或免疫原性低于任何未经修饰的分子并具有人因子VIII的生物学活性的 FVIII中的用途。

根据对本发明的理解，术语“T-细胞表位”是指具有下述能力的氨基酸序列，即能结合 MCH II、能刺激 T-细胞和/或也能以与 MHC II 形成复合物的形式结合（但不一定可测量地激活）T-细胞。

此处及后附权利要求中所用的术语“肽”是指包含两个或多个氨基酸的化合物。氨基酸之间通过肽键相连(定义见下)。肽的生物生产中涉及 20 种不同的天然氨基酸，任意数量的所述氨基酸可按任意的顺序连接形成肽链或环。用于生物生产肽的天然氨基酸全部具有 L-构型。可应用常规的合

成方法利用 L-氨基酸、D-氨基酸或两种不同构型的氨基酸的各种组合制备合成肽。一些肽仅包含少量的氨基酸单元。例如含有不到 10 个氨基酸单元的短肽有时被称作“寡肽”。其他的包含大量氨基酸残基，例如达 100 个或更多个氨基酸残基的肽称作“多肽”。习惯上将含有 3 个或 3 个以上氨基酸的任何肽链多看作“多肽”，而将“寡肽”视为特定类型的短“多肽”。因而本文所提到的“多肽”也包括“寡肽”。而且，所用到的“肽”包括多肽、寡肽和蛋白。不同的氨基酸排列形式形成不同的多肽或蛋白。因此，可形成的多肽的数量以及不同蛋白的数量实际上是无限的。“α碳(Cα)”是肽链中碳-氢(CH)组分中的碳原子。“侧链”是 Cα 的侧基，其可包含简单的或复杂的基团或部分，且具有与所述肽的大小相比可显著变化的外形大小。

本发明可应用于与此处公开的 FVIII具有基本上相同的一级氨基酸序列的任何 FVIII分子，因此包括利用基因工程手段或其他方法获得的、可以包含多于或少于 2332 个氨基酸残基的 FVIII分子。

对于特别优选的 FVIII分子，分子中缺乏 B 结构域，而且任何剩余结构域中还包含一个或多个氨基酸替代，导致序列中一个或多个 T 细胞表位的消除。缺失了 B 结构域的 1438 个氨基酸残基的治疗性 FVIII分子已经进行了成功的临床试验，正如 Lusher 等人及其中参考文献所述[Lusher,J.M.等（2003）Haemophilia 9:38-49]。本文图 9 描述了这种蛋白质的氨基酸序列。

FVIII蛋白，如从其他哺乳动物来源中鉴定出的相关蛋白与本发明中公开的肽序列之间存在大量共有序列，且与列表中公开的肽序列间存在大量基本上相同的共有序列。因此这样的蛋白序列也落入本发明的保护范围。

本发明设计用于克服实际应用中存在的下述问题，即将可溶性蛋白引入自体生物中可引发免疫应答，产生可与所述可溶性蛋白相结合的宿主抗体。对于许多 A 型血友病患者，针对现有治疗性 FVIII制剂的抗体应答是处理他们疾病的重大问题。在任何个体中，少数 T 细胞表位能够驱动 T 辅助细胞信号传导而导致针对天然 FVIII蛋白质中许许多多由 B 细胞所识别的表面暴露决定簇的持续抗体应答。对来自 A 型血友病患者的编码抑制剂抗体

的基因的分析显示许多这样的抗体经历了亲和力成熟[Jacquemin,M.G.等（1998）Blood 92:496-506; van den Brink,E.N.等（2000）Blood 95:558-563]。亲和力成熟下面的超变现象只发生于应答T细胞辅助的B细胞中，同样早就认识到高比例的 FVIII抑制剂抗体属于 IgG4 亚型[Andersen,B.R.和Terry,W.D.（1968）Nature 217: 174－175]，而且类似地此必需的类型转变反应是T辅助细胞依赖性事件。应答FVIII的抗体是由T细胞驱动的其它证据来自具有FVIII抑制剂的HIV阳性患者中的观察结果，即FVIII抗体应答由于T细胞数目下降而丧失[Bray,G.L.等（1993）Am.J.Hematol. 42: 375－379]。因此，本发明试图通过提供在施用于人体时引发免疫应答的倾向发生改变的FVIII蛋白来解决这一问题。存在这样一种理解，当多数B细胞表位在经修饰的FVIII表面保持完整时，在缺乏持续T细胞辅助时抑制剂滴度将最终降低，而且对于接受这种疗法的新患者而言将开始就不能获得建立。

根据本文所述方法，本发明人发现了FVIII分子中包含关键T细胞表位的区域，这些表位驱动针对该蛋白质的免疫应答。

本发明中形成经修饰的FVIII的一般方法包括下述步骤:

(a) 确定多肽或其中一部分的氨基酸序列;

(b) 通过任意方法，包括利用体外或计算机技术或生物学试验确定所述肽与MHC分子的结合，由此鉴定所述蛋白的氨基酸序列中潜在的一个或多个T-细胞表位;

(c) 设计新的序列变体，其中，经鉴定的潜在T-细胞表位内有一个或多个氨基酸经过修饰，由此基本上减弱或去除了所述T-细胞表位的活性，这一效果可由体外或计算机技术或生物学试验通过所述肽与MHC分子的结合来确定。构建此序列变体以避免由所述的序列变体产生新的潜在T-细胞表位，否则所述的新的潜在T细胞表位又通过此种方式进行修饰以基本上减弱或消除T-细胞表位活性; 和

(d) 根据已知的重组技术通过重组DNA技术构建所述序列变体，并检测所述的变体以便鉴定一个或多个具有所需性质的变体。

对于步骤(b)中对潜在 T-细胞表位的鉴定可依照本领域已公知的方法进行。在 WO 98/59244; WO 98/52976; WO 00/34317; WO02/069232 中公开了适当的方法，可以用于鉴定 FVIII-衍生的肽对 II 型 MHC 分子的结合倾向。在实践中，已经通过联合应用生物学离体人 T 细胞增殖测定法和采用 WO02/06922 中所略述方案的软件工具衍生了本发明的组合物，而且其中所述软件工具是本发明的一个实施方案。

软件在肽－Ⅱ型 MHC 结合相互作用的水平模拟抗原呈递过程，为任何指定肽序列提供了结合评分。这种评分针对群体中现存的许多主要Ⅱ型 MHC 同种异型而确定。由于此方案能够测试任何肽序列，因此能够预测氨基酸替代、添加或缺失在肽与Ⅱ型 MHC 结合沟相互作用的能力方面的后果。因此，可以设计包含减少数目的能够与Ⅱ型 MHC 相互作用从而发挥免疫原性 T 细胞表位功能的肽的新序列组合物。当生物学测定法能够评估任一指定供体样品与最多 4 种 DR 同种异型的结合时，硅片(in silico)方法可以同时用超过 40 种同种异型测试相同肽序列。在实践中，这种方法能够指导与多种 MHC 同种异型相互作用的能力受到损害的新序列变体的设计。

作为这种硅片方法的实例，图 1 提供了在完整人 FVIII序列上进行的分析的结果。图中列出了衍生自 FVIII且经检测具有以显著结合评分结合一种或多种Ⅱ型 MHC 同种异型能力的 13mer 肽序列。从总体上看，针对人 FVIII蛋白质，这组 13mer 肽数据集被认为以高度确定性提供了全部容许的 MHC 型配体。出于诸如对体内完整 FVIII多肽的蛋白水解加工和导致 FVIII肽呈递的其它生理学步骤的需要等原因，显然整个肽库中相对少数的肽将具有最终的生物学适用性。为了进一步鉴定这些生物学相关肽，发明人开发了采用离体人 T 细胞增殖测定法的方法。

这种方法已经被证明是一种特别有效的方法，而且在本文中公开作为本发明的实施方案。该方法可用于测试部分序列，例如缺乏所有或部分 B 结构域的 FVIII蛋白质；该方法可用于序列中的选定区域，例如 FVIII肽子集

诸如图 1 中所列的所有或一些肽；或者该方法可用于测试完整 FVIII序列。在本研究中，该方法包括在方案中测试重叠的 FVIII衍生肽序列以扫描并测试缺乏 B 结构域的 FVIII序列。对合成的肽测试它们在体外人 T 细胞培养物中引发增殖应答的能力。在使用来自健康供体的幼稚人 T 细胞进行这类方法时，本发明人确定了在这种测定法的操作中等于或大于 2.0 的刺激指数是所诱导增殖的有用测量值。刺激指数常规地通过用在有检验的肽时测量到的增殖分数（例如如果应用 $^{3}$H-胸苷掺入则为每分钟的放射性计数）除以在不与检验的肽接触的细胞中测量到的增殖分数而获得。

在这种方法的另一个实施方案中，本发明人提供了使用离体生物学 T 细胞测定法对 FVIII序列扫描以确定 T 细胞表位的存在和定位的方法，其中 T 细胞来源于血友病患者。对于这些患者的一部分而言，FVIII蛋白质在体内构成外来蛋白质和有力抗原。本发明人确定了有可能在体外由这些个体的 PBMC 衍生多克隆和原则上单克隆 T 细胞系，而且这些细胞系可以在 FVIII蛋白质的 T 细胞表位作图中用作有效试剂。

这是按如下实现的：将血友病 PBMC T 细胞在体外进行几轮抗原（FVIII）刺激，随后立即在存在 IL-2 时进行扩增。对于建立多克隆 T 细胞系而言，2－3 轮抗原刺激通常足以生成大量的抗原特异细胞，而且这些细胞可以冷冻保存继而在需要时使用。细胞被用于筛选大量的合成肽。

在本情况中，使用每个库包含 8 种不同肽序列的一系统库分析了合成肽。图 2 图示了肽库方案。在包括将 FVIII与 PBMC 一起孵育 7 天的最初一轮抗原（FVIII）刺激之后，随后在存在自体经照射 PBMC 作为抗原呈递细胞时用抗原再次刺激。这些轮次的抗原选择进行 3－4 天，并以包括用 IL-2 进行刺激的扩增阶段间隔，IL-2 可以每 3 天添加一次，总计大约 9 天。使用 “静息” 的 T 细胞，即大约 4 天未经 IL-2 刺激的 T 细胞进行最后一次的再刺激。

如先前所述，使用最优选的自体抗原呈递细胞用抗原（如合成肽或完整蛋白质）刺激这些细胞大约 4 天，然后测量后继增殖应答（如果有的话）。

组织这些肽库使得每个库包含与后继库重叠的肽。通过这种方式任何一个T细胞表位都出现在2个不同库中，而且将由使用这两个库的处理中检测到诱导的增殖。在对任何指定肽库检测增殖应答后，对肽库解码，使用分离的各个库成员重复此测定法。

在本方案中，特别希望采用来自称为“抑制剂患者”的患者类型的PBMC样品，因为可以预期由来自这些个体的T细胞集合所定义的FVIII蛋白质表位图谱将代表能够在体内环境中呈递的最普遍肽表位。在这方面，来自先前已被证明有免疫应答的患者的PBMC是体内致敏步骤的产物，而且可以预期这具有实践优势，即能够针对任何指定的刺激肽引起强得多的增殖应答。这降低了进行增殖测量的技术难度。

本研究揭示了能够引发显著增殖应答（即SI>2.0）的38种肽序列。这些肽在表1中列出，而且是本发明的一个实施方案。在这组肽中，又鉴定了一个肽子集，经鉴定子集中的肽在2个或更多个供体样品中引发显著增殖应答，而且对于这些应答中的某些而言，应答水平事实上显著高于SI=2.0。这些肽在表2中列出，而且是本发明的另一个实施方案。

表1:

| 肽序列 | 残基 #* |
|---|---|
| ATRRYYLGAVELSWD | 1 |
| SWDYMQSDLGELPVD | 13 |
| PVDARFPPRVPKSFP | 25 |
| SVVYKKTLFVEFTDH | 43 |

| | |
|---|---|
| VEFTDHLFNIAKPRP | 52 |
| PWMGLLGPTIQAEVY | 67 |
| LKNMASHPVSLHAVG | 88 |
| VSYWKASEGAEYDDQ | 103 |
| PGGSHTYVWQVLKEN | 130 |
| ASDPLCLTYSYLSHV | 148 |
| ILLFAVFDEGKSWHS | 196 |
| SLPGLIGCHRKSVYW | 241 |
| VYWHVIGMGTTPEVH | 253 |
| QASLEISPITFLTAQ | 283 |
| YIAAEEEDWDYAPLV | 385 |
| SYKSQYLNNGPQRIG | 406 |
| GPQRIGRKYKKVRFM | 415 |
| PYNIYPHGITDVRPL | 472 |
| YKWTVTVEDGPTKSD | 511 |
| KESVDQRGNQIMSDK | 556 |
| QIMSDKRNVILFSVF | 565 |
| PAGVQLEDPEFQASN | 598 |
| ASNIMHSINGYVFDS | 610 |
| LQLSVCLHEVAYWYI | 625 |
| VAYWYILSIGAQTDF | 634 |
| GAQTDFLSVFFSGYT | 643 |
| GCHNSDFRNRGMTAL | 691 |
| TGDYYEDSYEDISAY | 712 |
| LLSKNNAIEPRSFSQ | 728 |
| MSSSPHVLRNRAQSG | 817 |
| NEHLGLLGPYIRAEV | 859 |
| AWAYFSDVDLEKDVH | 940 |
| CNIQMEDPTFKENYR | 1009 |
| IGEHLHAGMSTLFLV | 1108 |
| STLFLVYSNKCQTPL | 1117 |
| ISQFIIMYSLDGKKW | 1204 |
| IARYIRLHPTHYSIR | 1251 |
| RLHPTHYSIRSTLRM | 1256 |

***依照 B 结构域缺失的序列进行序列编号（图 9）**

表 2:

能离体刺激来自 2 个或 2 个以上供体样本的人 T 细胞的 FVIII肽序列

| 肽编号 | 残基 #* | 肽序列 | 域 |
|---|---|---|---|
| P1 | 196 | ILLFAVFDEGKSWSH | A1 |
| P2 | 406 | SYKSQYLNNGPQRIG | A2 |
| P3 | 415 | GPQRIGRKYKKVRFM | A2 |
| P4 | 511 | YKWTVTVRDGPTKSD | A2 |
| P5 | 610 | ASNIMHSINGYVFDS | A2 |
| P6 | 634 | VAYWYILSIGAQTDF | A2 |
| P7 | 817 | MSSSPHVLRNRAQSG | A3 |
| P8 | 1009 | CNIQMEDPTFKENYR | A3 |
| P9 | 1117 | STLFLVYSNKCQTPL | A3 |
| P10 | 1204 | ISQFIIMYSLDGKKW | C1 |
| P11 | 1251 | IARYIRLHPTHYSIRSTLRM | C1 |

*依照 B 结构域缺失的序列进行序列编号（图 9）

本文所公开的肽序列是构建其中这些表位的一个或多个遭到破坏的经修饰 FVIII分子所需要的关键信息。在本发明的方案中，通过突变破坏表位从而导致序列不再能够发挥 T 细胞表位的作用。可以用重组 DNA 方法来完成这些靶序列的定向诱变，许多这样的技术在本领域是可以获得的且众所周知的。

当本发明的目的是修饰上文表 1 所列举的至少一个或多个肽的氨基酸序列时，最优选修饰表 2 所示的肽 P1－P11 中的一个或多个序列。此处公布了能够达到双重目的的适宜修饰，所述目的即在作为一种或多种 II 型 MHC 同种型分子的配体的水平上，或者更特别地在能够诱导 T 细胞增殖（尤其是在 T 细胞是体外培养的人 T 细胞的情况）的水平上，降低或消除受试肽序列作为 T 细胞表位的能力。

这样一套优选修饰中的一个例子是破坏肽 P10 所包含的 T 细胞表位，P10 的序列为 ISQFIIMYSLDGKKW。此表位定位于 FVIII的 C1 结构域，而且是能够引发来自血友病患者血液和健康非血友病个体的离体 T 细胞增

殖的表位的一个典型例子。

以该肽序列在Ⅱ型 MHC 配体活性方面的硅片分析结果为指导，将定点诱变方法用于在残基 F1207、I1208、I1209 和 M1210 处产生替代。残基依照缺失了 B 结构域的成熟 FⅧ序列进行编号（图 9）。在 F1207 处的诱变导致了 FⅧ表达的丧失，而且在所采用的检测法中没有可检测的活性。相反，生成了包含 I1208A 或 I1208T 或 I1208N 和/或 I1209C 和/或 M1210K 或 M1210N 替代的活性 FⅧ分子。因此，具有一个或多个上述替代的活性 FⅧ蛋白是本发明方案下的优选组合物。尤其优选的替代是 I1208A、I1209C、M1210K 或 M1210N，这些经过替代修饰的 FⅧ蛋白是本发明另外的实施方案。

同样优选的实施方案还包括在肽 P8 所具有的 T 细胞表位中包含替代的 FⅧ分子，P8 序列为 CNIQMEDPTFKENYR。此表位定位于 FⅧ蛋白质的 A3 结构域。定点诱变方法已应用于此序列，而且为了提供在 Coatest 分析法及硅片(in silico)免疫学参数和体外免疫学检测多方面看都保持了功能活性的分子，已生成了 M1013K、I1011A 或 C 或 D 或 E 或 G 或 H 或 K 或 P 或 Q 或 R 或 S 或 T 的替代。因此包含 M1013K、I1011A 或 C 或 D 或 E 或 G 或 H 或 K 或 P 或 Q 或 R 或 S 或 T 替代的 FⅧ分子是本发明的其它实施方案。

同样优选的实施方案还包括在肽 P7 所具有的 T 细胞表位中包含替代的 FⅧ分子，P7 序列为 MSSSPHVLRNRAQSG。此表位也定位于 FⅧ蛋白质的 A3 结构域。在 V823 位的替代被认为是特别期望的修饰而且也是本发明的一个实施方案。定点诱变方法已应用于此序列，且为了提供在 Coatest 分析法和硅片免疫学参数及体外免疫学检测多方面看都保持了功能活性的分子，已生成了 V823A 或 D 或 E 或 G 或 H 或 N 或 P 或 S 或 T 的替代。因此包含 V823A 或 D 或 E 或 G 或 H 或 N 或 P 或 S 或 T 替代的 FⅧ分子是本发明的其它实施方案。

在血友病患者血样中显示有活性的另一 T 细胞表位肽序列例子是肽 P11，其序列为 IARYIRLHPTHYSIRSTLRM。此表位定位于 FⅧ蛋白的

C1 结构域，而且原来已被鉴定为 FⅧ抑制剂产生的重要驱动剂[Jacquemin,M.等（2003）*Blood* 101:1351-1358]。在位点 Y1254、I1255、L1257、Y1262、I1264、L1268 处的替代被认为是尤其合乎需要的修饰，而且都是本发明的实施方案。

其它类似的优选实施方案有：于肽 P9（STLFLVYSNKCQTPL）所含表位的 L1119、F1120、L1121、V1122 和 Y1123 位点含有替代，以及于肽 P6（VAYWYILSIGAQTDF）所含表位的 Y636、Y638、I637、L638 和 I639 位点含有替代；于肽 P5（ASNIMHSINGYVFDS）所含表位的 I613 和 I617 位点含有替代；于肽 P4（YKWTVTVRDGPTKSD）所含表位的 V515 和 V517 位点含有替代；于肽 P3（GPQRIGRKYKKVRFM）所含表位的 I419 位点含有替代；于肽 P2（SYKSQYLNNGPQRIG）所含表位的 Y407、Y411 和 L412 位点含有替代；于肽 P1（ILLFAVFDEGKSWSH）所含表位的 L197、L198、F199、V201 和 F202 位点含有替代的 FⅧ分子。

从上文可见，依照本发明可生成许多 FⅧ蛋白质变体并检测其期望的免疫和功能特性。用于制备和检测这些 FⅧ变体蛋白质的示例方法参见实施例。所有这些功能性蛋白质都是本发明的实施方案。而且，所进行的修饰均已被证明生成了不能以与亲本或“野生型”（wt）肽序列相同的亲合力结合Ⅱ型 MHC 分子的肽序列，所用的证实方法是 WO02/069232 的预测性硅片Ⅱ型 MHC 结合工具。此外，使用离体人 T 细胞生物学增殖测定法进行了这些例示性变体肽表位的实际测试，证实这些肽支持 T 细胞增殖的能力并由此起到 T 细胞表位的功能如所期望的丧失了。在本案例中这包括用生物学测定法鉴定并由此证实能支持 T 细胞激活的肽序列。有意义的是许多这样的肽能够促进来自血友病患者血液的 T 细胞体外增殖，因而是经过加工的表位的代表而不能被认为是隐蔽的或免疫学无关的决定簇。

尽管有其它的方法，包括可考虑化学合成 FⅧ片段，但变体蛋白质最优选用重组 DNA 技术产生。很容易利用本文所提供的蛋白质序列信息来推断任何优选变体 FⅧ分子或片段的多核苷酸（DNA）。最容易的是利用诸如 DNAstar 软件包（DNAstar Inc.Madison WI，美国）或类似的计算机

软件为工具来完成此推断。任何编码本发明多肽或其重要同源物的这些DNA序列都应被认为是本发明的实施方案。

本发明涉及其中至少一个氨基酸已被替代的FVIII类似物，其中在所选位置的替代导致蛋白质的一个或多个潜在T细胞表位的消除或活性明显降低。在图1所示任一潜在II型MHC配体中或更优选的是表1和2的肽表位序列中，特殊位点处的一个或多个氨基酸替代可能导致产生在作为治疗剂施用于人宿主时其免疫原性潜能有所降低的FVIII分子。

最优选的是提供在亲代分子最具免疫原性的区域进行氨基酸修饰（如替代）而产生的FVIII分子。为了消除T-细胞表位，氨基酸替代优选在肽序列中预期可实现T-细胞表位活性的基本减少或消除的适当位点上进行。在实践中，适当的位点优选等同于可以在II型MHC结合沟所提供的其中一个口袋中结合的氨基酸残基。最优选地是改变肽在所谓的肽P1或P1锚定位置处与裂缝的第一个口袋的结合。在肽的P1锚定残基和II型MHC结合沟的第一个口袋之间的结合相互作用质量被公认为是完整肽的总结合亲和力的主要决定因素。在肽的该位置中的适当替代可为替代为较不易于容纳于口袋中的残基，如替代为更亲水的残基。肽中对应于与MHC结合裂缝其他口袋区域结合的位置的氨基酸残基也可以加以考虑并且属于本发明的范围内。

正如本发明技术人员所清楚的，进行多重复合替代可达到去除不想要的表位的目的。然而，所产生的序列被认为与本文所公布的具体组合物极为同源并因而属于本发明的范围之内。

可以理解的是在给定的潜在T细胞表位中单个氨基酸替代是最优选的消除表位的途径。在单个表位中也可以考虑进行组合替代，例如当单独限定的表位相互重叠时组合替代可能是特别适当的。此外，可以在就II型MHC结合沟而言非“口袋残基”的位置，在肽序列中任何位点处进行氨基酸替代，该氨基酸替代可以是于给定的表位中的单个替代或于单个表位中的组合替代。替代可参照同源结构或由本领域已知的计算机技术产生的结构方法进行，也可以根据本发明分子的已知结构特征进行。所有此类替

代均落入本发明的范围内。

尤其可考虑与所列举肽中的替代相联合在以上限定的肽之外进行氨基酸替代。例如，可考虑进行某种改变来恢复变体分子的结构或生物学活性。这样的补偿性改变和包括从 FVIII多肽中缺失或添加特殊氨基酸残基从而产生具有期望活性的变体的改变与任何已公布肽中的改变相联合均落入本发明的范围内。

就本发明来说，它还涉及已修饰的 FVIII和含此已修饰 FVIII蛋白质或其片段的组合物，且所涉及的组合物应认为是在本发明的范围之内。这方面的相关例子可以是开发肽介导的耐受性诱导策略，其中一个或多个已公布的肽以免疫治疗的目的施用于病人。因此，合成的肽分子，例如一个或多个表 1 中所列举的肽分子，是本发明已考虑过的实施方案。在另一方面，本发明涉及编码已修饰的 FVIII的核酸。在又一方面，本发明涉及用已修饰的 FVIII蛋白质对人进行治疗的方法。在还有一方面，本发明涉及利用含有序列与本文公布序列相同或部分相同的肽或衍生分子的药物制品进行治疗的方法。

现在将用以下实施例对本发明进行描述，但本发明并不局限于这些实施例。前文所述以及下面的实施例涉及以下附图:

图 1 提供了在人因子VIII中具有人Ⅱ型 MHC 分子结合活性的一系列肽序列。肽长为 13 聚体，氨基酸以单字母密码表示。

图 2 描述了筛选肽库的方案。在本研究中肽为 15 聚体，且每个与后续的肽重叠 12 个残基。

图 3 提供的柱形图描述用 FVIII衍生的合成肽处理后体外 T 细胞增殖测定法的结果。在此实施例中，用分离自血友病患者供体的 FVIII T 细胞系来筛选跨 FVIII序列的重叠肽库。箭头指示诱发 T 细胞增殖并随后被解码的肽库。

图 4 提供的柱形图描述用 FVIII衍生的合成肽处理后体外 T 细胞增殖测定法的结果。在此实施例中，使用分离自血友病患者供体的 FVIII特异性 T 细胞系解码诱发 T 细胞增殖的两个肽库。含 T 细胞表位的肽用箭头指示。

图 5 提供的柱形图描述用 FVIII衍生的合成肽处理后得到的体外 T 细胞增殖测定法结果。在此实施例中，用分离自两个供体的细胞来筛选跨越 FVIII序列的肽。1#供体（A）和 2#供体（B）具有相同的 HLA-DR 同种异型（DRB1*03、DRB1*04、DR3 和 DR4*01）。箭头指示含 T 细胞表位的肽。

图 6 提供了显示肽 8（P8）突变体的活性数据和蛋白质表达水平的图：阳性对照是野生型因子VIII。M1013K 描述了含 M1013K 替代的 FVIII分子的表达和活性数据。其它柱子代表了同时含有 M1013K 替代以及 I1011 位变换成所显示氨基酸的改变的 FVIII分子。

图 7 提供了显示肽 7（P7）突变体的活性数据和蛋白质表达水平的图：阳性对照是野生型因子VIII，阴性对照是转染中未加入 DNA。其它的样品是具有所指示氨基酸改变的 V823 突变体。

图 8 提供了示例性 T 细胞测定数据，数据给出在野生型序列肽显示刺激指数>2.0 的条件下具有刺激指数<2.0 的肽突变体。肽序列及 PBMC 供体同种异型数据已制成表格。

图 9 显示了用软件模拟肽与 II 型 MHC 分子结合所获的代表性结果。所示结果针对 18 种不同的 HLA-DR 同种异型，每个直立柱表示对单一同种异型的结合。A 图显示在肽 7 周围针对野生型 FVIII序列检测所得的结合图。肽 7 序列被加深标出。B 图显示对含替代 V823A 的已修饰肽 7 序列进行检测得到的结合图，证实其丢失了针对多种同种异型的高亲和力配体。在每一图中通过标明每个 13 肽 II 型 MHC 配体的第一个残基来描述预期的 MHC 结合。以所示的各配体对各同种异型分子的计算结合分值为基础，用 H、M 或 L 表示结合强度。先前的物理结合研究已显示数值小于 500000 为可忽略的结合相互作用。

图 10 显示了野生型（WT）B 结构域缺失的人 FVIII序列的氨基酸序列及其编号。用单字母密码表示氨基酸。

实施例 1

建立 T 细胞系和克隆的方法

从血友病患者血液中分离外周血单核细胞（PBMC）并低温保存于液氮中。血样的提供得到完全的知情同意并在当地 Addenbrooke's Health Care Trust 的批准下进行加工。通过用 FVIII刺激大量培养中的抗原特异性 T 细胞，随后进行几个循环的 IL-2 诱导的扩增来建立 T 细胞系。最初在 24 孔板中将 PBMC 以 $2x10^6$ 的密度保温（37℃、含 5% $CO_2$ 的潮湿空气中）于 2ml 含 4μg/ml FVVIII （Refacto™）的 AIM V 培养基中。保温 7 天后加入 100U/ml 的 IL-2，继续培养 3 天。10 天的抗原/IL-2 刺激完成后收集 T 母细胞（T blast）并计数。为了保持抗原特异性，用经γ辐射的自体 PBMC 作为抗原呈递细胞对 T 母细胞进行第二轮抗原刺激。这一步的完成方法为：在用 4000 拉德γ射线进行辐射前将 24 孔板中的 $1x10^6$ 个/孔的自体 PBMC 与 4μg/ml FVIII在 0.75ml AIMV（含 5% 的热失活人 AB 血清）中孵育 1 小时。将 0.25ml AIM V 中的自体 T 母细胞以 $4x10^5$ 个细胞/ml 的浓度加入经γ辐射的抗原呈递细胞（预负载 FVIII）中并孵育 3 天。通过用 100U/ml IL-2 刺激细胞 3 天扩增 T 母细胞，然后每隔 3 天向培养物提供新鲜的 IL-2（终浓度 100U/ml）共 9 天。为了保证所有的扩增 T 母细胞都是抗原特异的，进行第三轮抗原刺激，其中 T 母细胞被收集并以 $4x10^5$ 个细胞/ml 的浓度重悬于 AIMV 培养基中。如前文所述通过将 24 孔板中的 $1x10^6$ 个γ辐射的自体 PBMC 与 4μg/ml FVIII在 0.75ml AIMV（含 5% 的热失活人 AB 血清）中孵育 1 小时来产生抗原呈递细胞。将 0.25ml AIM V 中的自体 T 母细胞以 $4x10^5$ 个细胞/ml 的浓度加入经γ辐射的抗原呈递细胞中并孵育 3 天。最终在 10U/ml 的 IL-2 中扩增 3 天，然后收集 T 母细胞并用于筛选肽库。

从大量培养物克隆

在用 FVIII抗原进行第三轮刺激后，收集 T 母细胞并通过系列稀释将其重悬至密度 $4x10^2$-$1x10^4$ 个细胞/ml（2x 培养物终密度）。融化自体 PBMC 并以 $2x10^6$ 个细胞/ml（2x 培养物终密度）的密度重悬于聚丙烯管中。然后将 PBMC 暴露于 4000 拉德γ射线辐射并用作抗原呈递细胞，通过限制稀释选择呈抗原反应性的 T 细胞克隆。将经γ射线辐射的抗原呈递细胞（$1x10^6$ 终浓度）与 T 母细胞（$2x10^2$-$5x10^3$ 终浓度）、1-10μg/ml FVIII抗原

和 100U/ml IL-2 混合。通过在 Terasaki 平板中每孔加入 20μl APC、T 母细胞、FVIII和 IL-2 混合物而建立 T 细胞克隆。用一个 Terasaki 平板上 2-50 个 T 母细胞/孔的稀释度进行有限稀释克隆。

T 细胞克隆的筛选和维持

T 母细胞与 FVIII抗原、IL-2 和经γ射线辐射的自体抗原呈递细胞一起孵育约 14 天。鉴定所含细胞呈现明确生长的孔后，将 T 母细胞转移至含 $1x10^5$ 经γ辐射的同种异体 PBMC、100U/ml IL-2 和 1μg/ml 植物凝集素（PHA）的圆底 96 孔板的单个孔中，终体积为 200μl AIMV（含 1%的热失活人 AB 血清）。在细胞汇合后将 T 细胞克隆传代，最后转移至含 $1x10^6$ 经γ辐射的同种异体 PBMC（饲养细胞）、100U/ml IL-2 和 1μg/ml 植物凝集素（PHA）的 24 孔板的单个孔中，终体积为 2ml AIMV（含 1%的热失活人 AB 血清）。T 细胞克隆的常规维持包括每隔 2－3 周（取决于细胞生长状态）用新鲜的 PHA 和同种异体饲养细胞刺激一次，以及用 100U/ml IL-2 每周刺激 2 次。只有被证实为 FVIII特异性的 T 细胞克隆才被扩增并用于筛选 FVIII肽。

自体 B 细胞的 EBV 转化

通过在 $4x10^6$ 个 PBMC 中加入 3ml 已过滤（0.45μ）的 B95.8 上清并在 37℃保温 1 小时，将来自 PBMC 制品的 B 细胞无限增殖化以产生 B 类淋巴母细胞系（BLCL）。沉淀 PBMC 并重悬于含 5%热失活胎牛血清（FCS）和 1μg/ml 环孢菌素 A 的 2ml RPMI 中。保温 7 天后，用含 5%FCS 和 2μg/ml 环孢菌素 A（达到终浓度为 1μg/ml 环孢菌素 A）的新鲜 RPMI 置换 1ml 培养基。在第 14 和 21 天重复此饲喂方案，此后如需要用含 5%FCS 的 RPMI 进行细胞传代并扩大至组织培养瓶。

用 T 细胞系/克隆筛选 FVIII肽

合成长度为 15 个残基且通过增加 12 个氨基酸而与先前的肽重叠的肽（Pepscan，荷兰）。为了保存，最初将肽以 10mM 的浓度溶于 100%的二甲亚砜（DMSO）。建立肽库以便同时针对 FVIII特异性 T 细胞系筛选大量肽。组织肽库以便每个库都与随后的库包含重叠肽，通过使用此方法，与

两种肽重叠的T细胞表位将诱导两个不同库的增殖。通常每个库由8种肽组成，以1或5μM的浓度测试每种肽。肽库策略如图2所述。

自体PBMC（对于T细胞系来说）或EBV转化的BLCL（对于T细胞克隆来说）被用作抗原呈递细胞，将$1x10^5$个PBMC或BLCL悬浮于50μL AIMV培养基中并随后加入96孔圆底板的各个孔中。对于每个库来说分别以两个浓度（1或5μM）将肽库加入三个平行孔中。在暴露于4000拉德γ射线辐射之前将抗原呈递细胞和肽库于37℃孵育1小时。当用作T细胞克隆的抗原呈递细胞（代替已γ辐射的自体PBMC）时，BLCL在37℃用1μg/ml丝裂霉素C预处理1小时，随后在AIMV中洗4次。然后将抗原特异性T细胞系或T细胞克隆以$5x10^4$个细胞/孔的浓度加入并培养3天。第三天在每个孔中加入1μCi[$^3$H]-胸腺嘧啶核苷至少脉冲8小时。在滤垫上收获平板后用Wallac小平板β计数器测定cpm/孔。图3显示了用T细胞系产生的表位图谱，其中T母细胞被用于鉴定含T细胞表位的肽库，随后将这些库解码以鉴别含T细胞表位的单个肽。

用来自健康供体的PBMC绘制幼稚T细胞表位图谱

用来自40名健康HLA-DR类型供体的血液分离PBMC，将此PBMC用于在两个浓度（1和5μM）筛选各FVIII肽。由于来自每个供体的PBMC数目不足以筛选所有的FVIII肽，供体被分成两组，其中前20个供体用于筛选跨越前半段分子的肽，第二组供体用于筛选剩余的肽。为了覆盖呈现于世界人群中的多种同种异型，按所表达的II型MHC同种异型来选择供体。检测MHC同种异型。

用购买到的试剂体系（Dynal，Wirral，英国）来检测所有PBMC样品的组织类型。按供应商推荐的方案用标准的辅助试剂及琼脂糖电泳体系来进行检测。

PBMC包含生理性数量的幼稚T细胞和抗原呈递细胞。这些细胞以$2x10^5$个细胞/孔（96孔平底板）的密度用于筛选三份平行200μL培养物中1μM和5μM的肽。将细胞与肽在37℃保温6天，然后在每个孔中加入1μCi[$^3$H]-胸腺嘧啶核苷至少脉冲8小时。收获培养物于滤垫上后用

Wallac 小平板β计数器测定 cpm/孔。图 5 显示了用两组供体分别筛选分子两半部分所产生的FVIII表位图谱。

实施例 2

克隆和表达因子VIII的方法

mRNA 提取和 cDNA 合成:

从医院病理学系获取人的肝组织。将样品切成方块并分成 50mg 的等分试样，保存于液氮中。将一份 50mg 试样匀浆并直接用 PolyA Tract System1000 试剂盒（Promega）按制造商说明书提取 mRNA，得到约 10μg mRNA。用 ImProm-Ⅱ逆转录系统（Promega）以寡（dT）$_{15}$为引物按制造商的说明书将 1μg 等分试样的 mRNA 在 20μL 反应体系中进行逆转录。然后在 70℃加热 15 分钟灭活逆转录酶。

因子VIII序列的聚合酶链式反应扩增

由于待克隆的是 B 结构域缺失的因子VIII变体，所以此 cDNA 以两半段的方式扩增。用以下引物扩增 5'端的 mRNA:

SEQ ID NO. 1 GCATCGCGCGCTAGCAATAAGTCATGCAAATAGAG

SEQ ID NO. 2 GAAGCTCCTAGGTTCAATGGCATTGTTTTTACTCA

SEQ ID NO.1 包含为方便克隆的两个限制性酶切位点加上因子VIII mRNA 序列 ATG 起始密码子（粗体）周围的 24 个核苷酸。SEQ ID NO.2 与因子VIII mRNA 的第 2420－2454 位核苷酸互补并在第 2445 和 2448 位(粗体）包含两个改变的核苷酸，这样就引入了一个新的限制性酶切位点同时使蛋白质序列未受影响。

用以下引物对扩增因子VIII基因的 3'端:

SEQ ID NO.3:

TGAGTCTTAAGCTAGCTAGATACCTAGGAGCTTCTCCCAAAACCCACCAGTCTTGAAACGCC

SEQ ID NO. 4:

TACGTCTCGAGTCAGTAGAGGTCCTGTGCCTCGCA

SEQ ID NO.3 包含限制性酶切位点 NheI 以便克隆，并包含与第 5140－5164 位核苷酸融合的因子VIII mRNA 的第 2442－2457 位核苷酸。此引物因此建立了重链和轻链之间的联结，在此几乎整个 B 结构域缺失。此引物

还含有在第 2445 和 2448 位点（粗体显示）处的核苷酸改变，这样就建立了也能在 SEQ ID NO.2 中找到的新限制性酶切位点。SEQ ID NO.4 包含因子Ⅷ编码序列的最后 24 个核苷酸加上一个方便克隆的限制性酶切位点。

用 Expand HiFi 聚合酶(Roche)及供应的含 $MgCl_2$ 的缓冲液进行 PCR 反应，终体积 50μL。反应体系是 1x 缓冲液中含 dNTP 各 200μM、引物各 50pmol（或者是 seq ID No.1 加 No.2，或者是 seq ID No.3 加 No.4）、2.5 个单位的 RNaseH 和 5μL 逆转录酶的反应混合物。为了提高 PCR 反应的效率将反应在 37℃保温 30 分钟使 RNA/cDNA 杂交体中的 RNA 被 RNaseH 所降解。然后将反应在 94℃加热 2 分钟预变性，随后的循环使用以下的温度和时间：94℃30 秒，55℃30 秒，72℃2.5 分钟。在第一个退火步骤期间加入推荐量的聚合酶，反应进行 20 个循环。在第 20 个延伸步骤后的退火步骤中加入第二等份聚合酶并再进行 20 个循环的反应。然后将反应在 72℃保温 10 分钟以保证所有的链完全聚合。

因子Ⅷ基因的克隆和组装

用 1％的琼脂糖凝胶分离 PCR 反应产物的一半，切下相应于因子Ⅷ cDNA 5'端的 2286bp 带和相应于 3'端的 2015bp 带并通过 Qiagen 凝胶提取试剂盒将这两条带从琼脂糖中纯化出来。然后按制造商的说明将 PCR 产物连入 PCR 产物克隆载体（pGEM-T Easy Vector System，Promega）。按供应商所推荐的用 0.1cm 间距的电击杯将连接反应液各 1μL 电穿孔转化入 20μL 电感受态大肠杆菌菌株 XL1-Blue（Stratagene）中。还按供应商所推荐的方法重悬细胞并使其复苏。将 10μL 和 100μL 等份的电穿孔细胞铺于含 100μg/ml 氨苄青霉素、80μg/ml Xgal 和 0.5mM IPTG 的 LB 琼脂板上并在 37℃培养过夜。

挑选白色菌落并分散于 20μL 水中。用供应的缓冲液和 Taq 聚合酶（Roche）以 20μL 的反应体积通过 PCR 分析来自各重悬菌落的样品。反应体系为在 1x 缓冲液中包含 dNTP 各 200μM、标准 M13 正向和反向引物（本文的 SEQ ID Nos5 和 6）各 50pmol 和 1μL 的重悬菌落。然后将反应在 94℃加热 2 分钟预变性，随后的 20 个循环使用以下的温度和时间：

94℃30 秒，60℃30 秒，72℃2 分钟。然后将反应在 72℃保温 10 分钟以保证所有的链完全聚合。

取各反应样品 5μL 于 1％的琼脂糖凝胶上分离。含有约 2300bp 大小条带的样品被认为对于因子Ⅷ 5'半侧的插入片段来说是阳性的，而含有约 2150bp 条带的样品被认为对于因子Ⅷ 3'半侧的插入片段来说是阳性的。对于各插入片段，将 8 个菌落分别接种于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 5ml 2YT 肉汤液体培养基中并在 37℃振荡培养过夜。用 Qiagen 小量提取试剂盒从 1.5ml 各培养物中制备质粒并将质粒送到合同测序机构进行序列测定，所用引物如下：

5'半侧的克隆

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID No. 5 | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC | (M13 正向 ) |
| SEQ ID No. 6 | AGCGGATAACAATTTCACACAGGA | (M13 反向 ) |
| SEQ ID No. 7 | ATGATCAGACCAGTCAAAGG | ( 因子 VIII mRNA nt573-592) |
| SEQ ID No. 8 | CAGGAAATCAGTCTATTGGC | ( 因子 VIII mRNA nt975-994) |
| SEQ ID No. 9 | TGGGTACATTACATTGCTGC | ( 因子 VIII mRNA nt1372-1391) |
| SEQ ID No. 10 | ACAGTGACTGTAGAAGATGG | ( 因子 VIII mRNA nt1768-1787) |
| SEQ ID No. 11 | GTCTTCTTCTCTGGATATACC | ( 因子 VIII mRNA nt2179-2199) |

3'半侧的克隆

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID No. 5 | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC | (M13 正向 ) |
| SEQ ID No. 6 | AGCGGATAACAATTTCACACAGGA | (M13 反向 ) |
| SEQ ID No. 12 | GAGTAGCTCCCCACATGTTC | ( 因子 VIII mRNA nt5370-5361) |
| SEQ ID No. 13 | GTGCACTCAGGCCTGATTGG | ( 因子 VIII mRNA nt5786-5767) |
| SEQ ID No. 14 | AGGTGTTTTTGAGACAGTGG | ( 因子 VIII mRNA nt6187-6168) |
| SEQ ID No. 15 | GAGGAAATTCCACTGGAACC | ( 因子 VIII mRNA nt6594-6575) |
| SEQ ID No. 16 | AATCTCTGCTTACCAGCATG | ( 因子 VIII mRNA nt6993-6974) |

已发现质粒 pCF85 编码因子Ⅷ基因 5'半侧的正确氨基酸序列。质粒 pCF83 则被发现编码因子Ⅷ基因 3'半侧的正确氨基酸序列。

用 Bst98I 和 XhoI 消化 pCF83 并通过琼脂糖凝胶电泳纯化所得到的含因子Ⅷ基因 3'半侧的 2.0Kbp 片段，用标准技术将其克隆入同样酶切和纯化的 pLitmus（NEB）中。如上所述通过 PCR 鉴别阳性菌落并选择一个克隆－pCLF83 进行培养和 DNA 制备。

用 BssHII 消化 pCF85 并在 dNTP 各 100μM 存在的条件下用 T4 DNA 聚合酶将末端补平。然后将反应在 70℃加热 10 分钟并随之以 AvrII 消化。通过琼脂糖凝胶电泳纯化酶切释放的 2.3kbp 片段，将其克隆入已用 Bst98I 消化并如上补平及用 AvrII 消化并进行凝胶纯化的 pCLF83 中。如上所述用引物 Seq ID No.11 和 Seq ID No.17（ATCAGTAAATTCCTGGAAAAC[因子Ⅷ mRNA 第 5448-5428 位核苷酸]）通过 PCR 筛选鉴别阳性菌落。这对引物扩增了跨越因子Ⅷ基因两半间连接区的片段，因此只有在克隆成功的情况下才能得到约 570bp 的产物。选择阳性菌落并命名为 pCLF8。培养此菌落，然后进行 DNA 制备和测序。用引物 Seq ID No.6 和 Seq ID No.5 证实了连接序列的正确。此 5'和 3'两半之间的连接也用引物 Seq ID No.17 得到了证实。

因子Ⅷ的表达和活性分析

用已修饰的载体 pCI 变体（Promega，Southampton，英国）表达此 FⅧ蛋白。未修饰的 pCI 载体长 4.0kbp，含用于哺乳动物表达的 CMV 增强子/启动子和 SV40 晚期聚腺苷酸化信号，还包含细菌繁殖所必需的序列。该载体还含有噬菌体 F1 的起点，用限制性酶 BamHI 和 EcoO109I 消化此质粒去除该起点。如上所述用 T4 DNA 聚合酶将消化产物补平，然后通过 1%的琼脂糖凝胶分离。从凝胶中纯化 3.2kbp 的载体片段，自连接并如上所述转化入细菌菌株 XL1-blue 中。如上所述挑选菌落、培养过夜并小量制备质粒。用酶切位点出现于 F1 起点序列内的限制性酶 NgoMIV 消化已纯化的质粒样品并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。挑选抗性质粒并称之为 pCIΔ。

用限制性酶 NheI 和 XhoI 消化 pCIΔ并通过琼脂糖凝胶电泳纯化载体片段。用同样的酶消化 pCLF8 并通过琼脂糖凝胶电泳纯化含有因子Ⅷ基因的 4.4kbp 片段，用标准技术将其克隆入酶切的 pCIΔ中。用如上所述引物 Seq ID No.11 和 Seq ID No.17 通过 PCR 分析鉴别阳性菌落。

选择一阳性菌落，命名为 pCIF8，将其接种入含 100μg/ml 氨苄青霉素的 50ml 2YT 肉汤培养基中 37℃剧烈振荡培养过夜。用 Qiagen 小量制备

试剂盒制备高纯度的质粒 DNA。质粒 DNA 用分光光度法定量，稀释至 0.2 μg/μL 并通过 0.2μm 孔径、1.5cm 直径的滤器（Nalgene）进行无菌过滤。

HEK293 细胞（ATCC CRL-1573）连续培养维持于 75cm$^2$ 组织培养瓶的 DMEM 中，此 DMEM 中含有 Glutamax-I、丙酮酸钠和 4500mg/ml 葡萄糖（Invitrogen 目录号 31966-021），补充有 10％的热灭活胎牛血清（Perbio 目录号 CH30160.03）。细胞生长于 37℃/5%$CO_2$ 中并每 48 小时 1/5 稀释进行传代培养。HEK293 细胞只微弱粘附于组织培养塑料制品上，通过洗涤培养瓶表面就使其脱离。

用 Lipofectamine2000（Invitrogen）按制造商所述在聚 L-赖氨酸包被的 24 孔组织培养皿（Beckton Dickinson）中转染 HEK293 细胞。用磷酸缓冲盐水（PBS）洗涤 75cm 组织培养瓶中几乎汇合的细胞，并用胰蛋白酶/EDTA 溶液使其从组织培养瓶上分离下来。加入等体积的生长培养基灭活胰蛋白酶。用血球计数器进行细胞计数并将细胞悬浮液以 1200rpm 离心 5 分钟。去除上清，以 4x10$^5$ 个细胞/ml 的密度将细胞沉淀重悬于生长培养基中。在 24 孔组织培养皿的每孔中分配 0.5ml 细胞悬浮液并在 37℃/5% $CO_2$ 中培养过夜。转染前去除各孔中的培养基并置换成新鲜的 0.5ml 培养基。将 0.8μg 质粒 pCIF8 和阴性对照质粒 pCIΔ分别在 Optimem（Invitrogen 目录号 51985-026）中稀释至 50μL。对于每次转染，将 2μL Lipofectamine2000 稀释至 50μL，室温放置 5 分钟后与已稀释的质粒混合，随后再室温放置 20 分钟。进行三份平行的转染，然后在 24 孔板的每个孔中分别滴加 100μL 质粒/脂质混合物。然后将平板在 37℃/5% $CO_2$ 中保温。在 24 小时、48 小时和 72 小时三个时间点从各转染样品中取出 10μL 的等分试样。将来自三个平行样品的等分试样合并得到每个样品的总体积为 30μL，在进行活性分析前冻存于－80℃。

按制造商的说明书用 Coatest F8:C/4 试剂盒（Chromogenix）以微量滴定的形式检测上清液中的因子Ⅷ活性。在冰上融化上清液样品，1/20 和 1/100 稀释于检测缓冲液中并以双份平行样品进行检测。标准品是已对照因子Ⅷ活性的国际标准（Chromogenix）定量的冻干血浆样品。按制造商说

明书将一小瓶血浆重溶于 1ml 水中。对于血浆中因子Ⅷ活性水平参考所附数据表，然后将血浆通过添加检测缓冲液进行 100％稀释（1IU/ml）。然后按制造商提供的微量滴定检测方案中所述的步骤稀释标准品。24 小时后发现来自 pCIF8 所转染细胞的上清中含 0.16 IU/ml 活性，在 48 小时时增加到了 0.74IU/ml，然后在 72 小时时又回落到 0.5IU/ml。在用对照质粒转染的细胞上清中未观察到活性。因此因子Ⅷ以足够测定突变体活性的量成功表达。

肽 P10 中氨基酸的诱变（表 2）

肽 10 包含的 4 个疏水残基具有作为与Ⅱ型 MHC 分子相互作用的主要锚定位点的潜能：F1207、I1208、I1209 及 M1210（按 B 结构域缺失的成熟序列编号）。因此这四个残基被选为突变的目标残基，以突变成不可能作为主要锚定位点的那些残基。F1207 改变成：A、H、K、N、Q 和 R；I1208 改变成：A、T、D、N；I1209 改变成：A、C、D、N、P；M1210 改变成：A、K、N 和 Q。用本领域众所周知的已建立的方法通过交迭 PCR 进行诱变。肽 10 位于因子Ⅷ核苷酸序列中被 PspOMI 和 SphI 限制性位点所限定范围的片段内。合成用于扩增这些片段的 PCR 引物（下文的 Seq ID No.18 和 Seq ID No.19），它们相应于紧邻此区域外侧的序列。对于 F1207 的诱变，合成的内部引物如下所述：

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID No.18: | GGACACATTAGAGATTTTCA | (基因 nt.3463-3482) |
| SEQ ID No.19: | CAGTAATCTGTGCATCTGAT | (基因 nt.3949-3930) |
| SEQ ID No.20: | CTGAGAGATGTAGAGGCT | (基因 nt.3675-3658) |
| SEQ ID No.21: | AGCCTCTACATCTCTCAGgccATCATCATGT | (F1207A) |
| SEQ ID No.22: | AGCCTCTACATCTCTCAGcacATCATCATGT | (F1207H) |
| SEQ ID No.23: | AGCCTCTACATCTCTCAGaagATCATCATGT | (F1207K) |
| SEQ ID No.24: | AGCCTCTACATCTCTCAGaacATCATCATGT | (F1207N) |
| SEQ ID No.25: | AGCCTCTACATCTCTCAGcagATCATCATGT | (F1207Q) |
| SEQ ID No.26: | AGCCTCTACATCTCTCAGcgcATCATCATGT | (F1207R) |

用 Expand HiFi 聚合酶(Roche)及供应的含 $MgCl_2$ 的缓冲液进行 PCR 反应，终体积 50μL。5'片段的反应体系是 1x 缓冲液中含 dNTP 各 200μM、引物各 50pmol（Seq ID No.18 加 No.20）、100ng pCIF8 和 2.5 个单位

的 Expand 聚合酶。建立 6 个 3'片段反应，体系为 1x 缓冲液中含 dNTP 各 200μM、引物各 50pmol（Seq ID No.19 加 Seq ID No.21、22、23、24、25 或 26）、100ng pCIF8 和 2.5 个单位的 Expand 聚合酶。然后将反应在 94℃加热 2 分钟预变性，随后的循环使用以下的温度和时间：94℃30 秒，50℃30 秒，72℃30 秒。反应进行 20 个循环，然后在 72℃保温 10 分钟以保证所有的链完全聚合。

在 1％琼脂糖凝胶上分离各 PCR 的一半反应产物，将 226bp 的 5'片段和 292bp 的 6 个不同的 3'片段从凝胶上切下来并用 Qiagen 凝胶提取试剂盒进行纯化。然后如下将 5'片段与各个 3'片段连接：如上所述用 Expand HiFi 聚合酶进一步进行 6 个 PCR 反应，以已洗脱的 5'片段 2μL 和 6 个已洗脱的 3'片段各 2μL 作为模板，引物是 Seq ID No.18 和 Seq ID No.19。将这些反应液各一半在 1％的琼脂糖凝胶上进行分离并如上所述纯化 6 个 486bp 大小的片段。用限制性酶 PspOMI 和 SphI 在 37℃消化各 PCR 产物过夜，总反应体积为 50μL。同样在 37℃消化 4μg 质粒 pCIF8 2 小时，并将质粒和 PCR 片段消化产物的一半进行 1%琼脂糖凝胶电泳。从凝胶中切下 7.2kbp 的载体带和 391bp 的 PCR 片段并如上所述进行纯化，纯化产物分别溶于水中，终体积为 30μL。在标准 10μL 连接反应体系中用 T4 DNA 连接酶和所供应的缓冲液（Invitrogen）将 1μL 载体与 6 种片段各 3μL 连接。反应液在室温放置 4 小时。按供应商所推荐的用 0.1cm 间距的电击杯将连接反应液各 1μL 电穿孔转化入 20μL 电感受态大肠杆菌菌株 XL1-Blue（Stratagene）中。还按供应商所推荐的方法重悬细胞并使其复苏。将 10μL 和 100μL 等份的电穿孔细胞铺于含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上并在 37℃培养过夜。

从各连接产物所铺的板上挑选 4 个菌落并在含 100μg/ml 氨苄青霉素的 5ml 2YT 液体培养基中 37℃剧烈振荡培养过夜。用 Qiagen Mini-Prep 试剂盒从各 1.5ml 培养物中制备质粒 DNA。用引物 Seq ID No.18 对各质粒样品进行 DNA 测序。从 4 个一组中挑选序列正确的一个质粒保存以备通过转染进行活性和表达水平的分析。

在此相同的一般步骤后对 I1208、I1209 和 M1210 进行突变。用于各氨基酸的引物如下：

I1208:

SEQ ID No.18: GGACACATTAGAGATTTTCA (基因 nt.3463-3482)
SEQ ID No.19: CAGTAATCTGTGCATCTGAT (基因 nt.3949-3930)
SEQ ID No.20: CTGAGAGATGTAGAGGCT (基因 nt.3675-3658)
SEQ ID No.27: AGCCTCTACATCTCTCAGTTT**gcc**ATCATGT (I1208A)
SEQ ID No.28: AGCCTCTACATCTCTCAGTTT**acc**ATCATGT (I1208T)
SEQ ID No.29: AGCCTCTACATCTCTCAGTTT**gac**ATCATGT (I1208D)
SEQ ID No.30: AGCCTCTACATCTCTCAGTTT**aac**ATCATGT (I1208N)

I1209:

SEQ ID No.18: GGACACATTAGAGATTTTCA (基因 nt.3463-3482)
SEQ ID No.19: CAGTAATCTGTGCATCTGAT (基因 nt.3949-3930)
SEQ ID No.20: CTGAGAGATGTAGAGGCT (基因 nt.3675-3658)
SEQ ID No.31: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATC**gcc**ATGTATA (I1209A)
SEQ ID No.32: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATC**tgc**ATGTATA (I1209C)
SEQ ID No.33: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATC**gac**ATGTATA (I1209D)
SEQ ID No.34: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATC**aac**ATGTATA (I1209N)
SEQ ID No.35: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATC**ccc**ATGTATA (I1209P)

M1210:

SEQ ID No.18: GGACACATTAGAGATTTTCA (基因 nt.3463-3482)
SEQ ID No.19: CAGTAATCTGTGCATCTGAT (基因 nt.3949-3930)
SEQ ID No.20: CTGAGAGATGTAGAGGCT (基因 nt.3675-3658)
SEQ ID No.36: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATC**gcc**TATAGTC (M1210A)
SEQ ID No.37: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATC**aag**TATAGTC (M1210K)
SEQ ID No.38: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATC**aac**TATAGTC (M1210N)
SEQ ID No.39: AGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATC**cag**TATAGTC (M1210Q)

如上所述，在 24 孔聚-L-赖氨酸平板中将已通过序列分析证实的各突变克隆一式两份转染入 HEK293 细胞中。转染在 37℃/5% $CO_2$ 中进行 48 小时。合并各转染的平行试样上清并如上所述检测因子Ⅷ的活性。还用配对的抗因子Ⅷ抗体 ELISA 试剂盒（Affinity Biologicals）检测上清中的因子Ⅷ表达水平。修改此检测法使其有效地对组织培养上清物质进行定量，步骤如下：将捕捉抗体以 1/100 稀释于 pH9.6 的碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液中，按 100μl/孔加入 Dynex Immulon4 96 孔 ELISA 平板中。此平板在 4℃放

置过夜。用洗涤缓冲液（含 0.1%Tween20 的 Tris 缓冲盐水[TBS: 25mM Tris，137mM NaCl，3mM KCl，在 25℃pH7.4]）将孔洗 4 次，100μl/次，将双份 100μl 等分试样的平行稀释标准品和组织培养上清加入各个孔中。标准品是已对照因子Ⅷ活性的国际标准（Chromogenix）定量的冻干血浆样品。按制造商说明书将一小瓶血浆重溶于 1ml 水中。参考所附数据表显示的血浆中因子Ⅷ活性水平，然后添加样品稀释缓冲液（含 1% w/v 的牛血清白蛋白）进行 100％稀释（1IU/ml）。然后用样品稀释缓冲液将其 1/4 稀释得到 100%的 ELISA 标准。然后再用样品稀释缓冲液对其进行进一步的稀释得到代表 75%、50%、25%和 5%的标准。用样品稀释缓冲液 1/4 稀释组织培养上清。平板在室温放置 2 小时后用洗涤缓冲液漂洗 4 次，100μl/孔。在每个孔中加入 100μl 已缀合辣根过氧化物酶的抗体并室温放置 1 小时。如前文所述漂洗平板，然后在每个孔中加入 100μl 底物（现配的 TMB/过氧化物溶液: Sigma 目录号 T0440）。将平板室温放置 15 分钟后加入终止液（2M 硫酸）。在 Anthos HTII 平板阅读器上用 450nm 波长的滤片对平板进行读数。

活性值及表达水平的比较显示了所有对 F1207 的改变都导致了无表达从而无活性。I1208 突变成 A 产生与未修饰的因子Ⅷ相似的表达和活性，而突变成 T 和 N 则导致 25％和 50％的活性损失。对于 I1209 来说，只有突变成 C 才使突变体的表达和活性与未修饰的因子Ⅷ相似。所有对于 M1210 的改变都导致了具明显活性的蛋白质表达，其中具 K 和 N 的蛋白与未修饰的因子Ⅷ无差别。因此， I1208A、I1209C、M1210K 和 M1210N 是用于去除肽 10 内 T 细胞表位的有用突变。

肽 8 中氨基酸的诱变（表 2）

肽 8 包含两个有可能作为结合Ⅱ型 MHC 分子的主要锚定位点的氨基酸: I1011 和 M1013（按 B 结构域缺失的成熟序列进行编号）。因此这两个残基也是突变的靶残基，突变成除了可能是主要锚定位点的残基之外的残基。与其它物种（狗、小鼠和大鼠）的因子Ⅷ序列比较的结果显示，在狗的因子Ⅷ中，M1013 是 K。K 也被证实对于肽 10 的 M1210 诱变来说它

是最好的置换残基。因此只将 M1013 突变成 K，并与在 I1011 处不可能形成主要锚定位点的所有氨基酸（即 A、C、D、E、K、N、P、Q、R、S、T）相结合。

用本领域技术人员众所周知的已建立的方法通过交迭 PCR 进行诱变。肽 8 位于因子Ⅷ核苷酸序列中被 PflM1 和 PspOMI 限制性位点所限定范围的片段内。合成用于扩增此片段的 PCR 引物（下文的 Seq ID No.40 和 Seq ID No.41），它们相应于紧邻此区域外侧的序列。对于 M1013K 和 I1011X 的诱变，合成的内部引物如下所述：

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID No.40: | ATGAGACCAAAAGCTGGT | (基因 nt.3026-3043) |
| SEQ ID No.41: | AGGCATTGATTGATCCG | (基因 nt.3559-3543) |
| SEQ ID No.42: | ATTGCAGGGAGCCCTGCAGT | (基因 nt.3087-3068) |
| SEQ ID No.43: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGaagGAAGA | (M1013K) |
| SEQ ID No.44: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATgccCAGaagGAAGA | (I1011A, M1013K) |
| SEQ ID No.45: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATtgcCAGaagGAAGA | (I1011C, M1013K) |
| SEQ ID No.46: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATgacCAGaagGAAGA | (I1011D, M1013K) |
| SEQ ID No.47: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATgagCAGaagGAAGA | (I1011E, M1013K) |
| SEQ ID No.48: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATggcCAGaagGAAGA | (I1011G, M1013K) |
| SEQ ID No.49: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcacCAGaagGAAGA | (I1011H, M1013K) |
| SEQ ID No.50: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATaagCAGaagGAAGA | (I1011K, M1013K) |
| SEQ ID No.51: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATaacCAGaagGAAGA | (I1011N, M1013K) |
| SEQ ID No.52: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcccCAGaagGAAGA | (I1011P, M1013K) |
| SEQ ID No.53: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcagCAGaagGAAGA | (I1011Q, M1013K) |
| SEQ ID No.54: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATcgcCAGaagGAAGA | (I1011R, M1013K) |
| SEQ ID No.55: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATagcCAGaagGAAGA | (I1011S, M1013K) |
| SEQ ID No.56: | ACTGCAGGGCTCCCTGCAATaccCAGaagGAAGA | (I1011T, M1013K) |

用与上述肽 10 诱变相同的常规步骤进行诱变，不同处在于 5'片段长度为 62bp 及 3'片段长为 492bp。此连接片段长为 534bp，用 PspOMI 和 PflMI 消化后克隆入同样酶切消化的 pCIF8。

对于各个突变来说选择一个序列正确的克隆并如上所述分析它们的活性和表达水平，但不同之处在于转染以三份平行形式进行，且各上清单独分析以便评估表达/活性中的变化。

对以上突变体的表达水平和活性的比较结果显示单独的 M1013K 突变

与未修饰的因子Ⅷ非常相似。此外，含 M1013K 加上 I1011A、E、P、S 或 T 的联合突变体也与未修饰的因子Ⅷ无差别。因此这些突变可用于去除与肽 8 相关的 T 细胞表位。

肽 P7 中氨基酸的诱变（表 2）

肽 7 包含一个有可能作为结合Ⅱ型 MHC 分子的主要锚定位点的氨基酸：V823（按 B 结构域缺失的成熟序列进行编号）。因此这个残基也是突变的靶残基，突变为不可能是主要锚定位点的残基（即 A、C、D、E、K、N、P、Q、R、S、T）。

如前文所述用已建立的方法通过交迭 PCR 进行诱变。肽 7 位于因子Ⅷ核苷酸序列中被 AvrII 和 PflM1 限制酶位点所限定范围的 766bp 片段内。合成用于此片段扩增的 PCR 引物(下文的 Seq ID No.57 和 Seq ID No.58)，它们相应于紧邻此区域外侧的序列。对于 V823X 的诱变，合成的内部引物如下所述：

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID No.57: | CGAGGACAGTTATGAAG | (基因 nt.2214-2230) |
| SEQ ID No.58: | AGTGGGATCTTCCATCTG | (基因 nt.3108-3091) |
| SEQ ID No.59: | ATGTGGGGAGCTACTCATCCC | (基因 nt.2523-2503) |
| SEQ ID No.60: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**gcc**CTAAGAAACAG | (V823A) |
| SEQ ID No.61: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**tgc**CTAAGAAACAG | (V823C) |
| SEQ ID No.62: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**gac**CTAAGAAACAG | (V823D) |
| SEQ ID No.63: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**gag**CTAAGAAACAG | (V823E) |
| SEQ ID No.64: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**ggg**CTAAGAAACAG | (V823G) |
| SEQ ID No.65: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**cac**CTAAGAAACAG | (V823H) |
| SEQ ID No.66: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**aag**CTAAGAAACAG | (V823K) |
| SEQ ID No.67: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**aac**CTAAGAAACAG | (V823N) |
| SEQ ID No.68: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**ccc**CTAAGAAACAG | (V823P) |
| SEQ ID No.69: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**cag**CTAAGAAACAG | (V823Q) |
| SEQ ID No.70: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**cgc**CTAAGAAACAG | (V823R) |
| SEQ ID No.71: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**agc**CTAAGAAACAG | (V823S) |
| SEQ ID No.72: | GGGATGAGTAGCTCCCCACAT**acc**CTAAGAAACAG | (V823T) |

用与肽 10 诱变相同的常规步骤（见上文）进行诱变，不同处在于 5' 片段长度为 310bp 及 3'片段长为 606bp。此连接片段长为 894bp，用 AvrII 和 PflMI 消化后克隆入同样酶切消化的 pCIF8。

对于各个突变来说选择一个序列正确的克隆并如上所述分析它们的活

性和表达水平，转染以双份平行形式进行并在检测前合并上清。

对以上突变体的表达水平和活性比较的结果显示多种改变都基本上未影响表达水平和活性。这些数据见图 7。V823 改变成 A、D、E、G、H、N、P、S 或 T 所产生的突变体具有至少与野生型因子Ⅷ相同的表达和活性。因此这些突变可用于去除与肽 7 相关的 T 细胞表位。

实施例 3

合成含有突变的 FⅧ来源肽并用离体试验检测它们所保持的促进 T 细胞增殖的能力。所说的肽是 15 聚体的序列，且是为检测 I1011A 或 I1011T 与 M1013K 联合替代而设计的。用原先显示对野生型肽序列有响应的 4 个 PBMC 供体样品测试所说的肽。在所有的案例中所检测的突变肽都不能以 SI>2.0 刺激增殖。包括供体同种异型详情和肽序列在内的此试验结果如图 8 所示。

在 96 孔平底板中以 $2x10^6$ 个 PBMC/孔的密度用蛋白质和肽抗原刺激 PBMC。在加入 $^3H$-胸苷前将 PBMC 在 37℃孵育 7 天。产生了具有所述替代的肽，并相对于分离自原先已显示对 FⅧ P8 肽序列有响应的 4 个健康供体的 PBMC，对各个肽进行分别筛选。在各供体试验中使用了来自流感血凝素的对照肽和有效的非回忆型抗原匙孔血蓝蛋白（KLH）。

将肽溶于 DMSO 中至终浓度 10mM，然后将这些贮液以 1/500 稀释于 AIM V 培养基中（终浓度 20μM）。将肽加入平底 96 孔板中，于 100μl 中达终浓度 2μM 和 20μM。用台盼蓝染料排除法估计已融化的 PBMC 的存活力，然后以 $2x10^6$ 个细胞/ml 的密度重悬细胞，分别将 100μl（$2x10^5$ 个 PBMC/孔）转移入含有肽的各个孔中。对于每一种肽浓度检测三份平行孔培养物。平板在潮湿的 5%$CO_2$ 空气中 37℃孵育 7 天。在收获至滤垫上之前用 1μCi $^3H$-Thy/孔脉冲细胞 18-21 个小时。用 Wallac 小平板β顶平板计数器（Perkin Elmer）测定 CPM 值。结果表示为刺激指数，通过用测试肽的 CPM 值除以未处理孔中的 CPM 值而计算得到。刺激指数大于 2 被认为是阳性增殖。

# 图1

| | | | |
|---|---|---|---|
| TRRYYLGAVELSW, | RRYYLGAVELSWD, | RYYLGAVELSWDY, | YYLGAVELSWDYM, |
| GAVELSWDYMQSD, | VELSWDYMQSDLG, | LSWDYMQSDLGEL, | WDYMQSDLGELPV, |
| DYMQSDLGELPVD, | SDLGELPVDARFP, | GELPVDARFPPRV, | LPVDARFPPRVPK, |
| ARFPPRVPKSFPF, | PRVPKSFPFNTSV, | PKSFPFNTSVVYK, | KSFPFNTSVVYKK, |
| FPFNTSVVYKKTL, | TSVVYKKTLFVEF, | SVVYKKTLFVEFT, | VVYKKTLFVEFTD, |
| KTLFVEFTDHLFN, | TLFVEFTDHLFNI, | LFVEFTDHLFNIA, | VEFTDHLFNIAKP, |
| EFTDHLFNIAKPR, | DHLFNIAKPRPPW, | HLFNIAKPRPPWM, | FNIAKPRPPWMGL, |
| PPWMGLLGPTIQA, | PWMGLLGPTIQAE, | MGLLGPTIQAEVY, | GLLGPTIQAEVYD, |
| LLGPTIQAEVYDT, | PTIQAEVYDTVVI, | AEVYDTVVITLKN, | EVYDTVVITLKNM, |
| VYDTVVITLKNMA, | DTVVITLKNMASH, | TVVITLKNMASHP, | VVITLKNMASHPV, |
| ITLKNMASHPVSL, | TLKNMASHPVSLH, | KNMASHPVSLHAV, | SHPVSLHAVGVSY, |
| HPVSLHAVGVSYW, | PVSLHAVGVSYWK, | VSLHAVGVSYWKA, | HAVGVSYWKASEG, |
| VGVSYWKASEGAE, | VSYWKASEGAEYD, | SYWKASEGAEYDD, | EGAEYDDQTSQRE, |
| AEYDDQTSQREKE, | QREKEDDKVFPGG, | DKVFPGGSHTYVW, | KVFPGGSHTYVWQ, |
| GSHTYVWQVLKEN, | HTYVWQVLKENGP, | TYVWQVLKENGPM, | YVWQVLKENGPMA, |
| WQVLKENGPMASD, | QVLKENGPMASDP, | KENGPMASDPLCL, | GPMASDPLCLTYS, |
| DPLCLTYSYLSHV, | LCLTYSYLSHVDL, | LTYSYLSHVDLVK, | YSYLSHVDLVKDL, |
| SYLSHVDLVKDLN, | SHVDLVKDLNSGL, | VDLVKDLNSGLIG, | DLVKDLNSGLIGA, |
| KDLNSGLIGALLV, | DLNSGLIGALLVC, | LNSGLIGALLVCR, | SGLIGALLVCREG, |
| GLIGALLVCREGS, | IGALLVCREGSLA, | GALLVCREGSLAK, | ALLVCREGSLAKE, |
| LLVCREGSLAKEK, | GSLAKEKTQTLHK, | QTLHKFILLFAVF, | TLHKFILLFAVFD, |
| HKFILLFAVFDEG, | KFILLFAVFDEGK, | FILLFAVFDEGKS, | ILLFAVFDEGKSW, |
| LLFAVFDEGKSWH, | FAVFDEGKSWHSE, | AVFDEGKSWHSET, | KSWHSETKNSLMQ, |
| NSLMQDRDAASAR, | SLMQDRDAASARA, | MQDRDAASARAWP, | RAWPKMHTVNGYV, |
| PKMHTVNGYVNRS, | HTVNGYVNRSLPG, | NGYVNRSLPGLIG, | GYVNRSLPGLIGC, |
| RSLPGLIGCHRKS, | PGLIGCHRKSVYW, | GLIGCHRKSVYWH, | KSVYWHVIGMGTT, |
| SVYWHVIGMGTTP, | VYWHVIGMGTTPE, | WHVIGMGTTPEVH, | HVIGMGTTPEVHS, |
| IGMGTTPEVHSIF, | GTTPEVHSIFLEG, | PEVHSIFLEGHTF, | HSIFLEGHTFLVR, |
| SIFLEGHTFLVRN, | IFLEGHTFLVRNH, | GHTFLVRNHRQAS, | HTFLVRNHRQASL, |
| TFLVRNHRQASLE, | FLVRNHRQASLEI, | VRNHRQASLEISP, | RQASLEISPITFL, |
| QASLEISPITFLT, | ASLEISPITFLTA, | LEISPITFLTAQT, | ISPITFLTAQTLL, |
| SPITFLTAQTLLM, | ITFLTAQTLLMDL, | TFLTAQTLLMDLG, | QTLLMDLGQFLLF, |
| TLLMDLGQFLLFC, | LLMDLGQFLLFCH, | MDLGQFLLFCHIS, | DLGQFLLFCHISS, |
| GQFLLFCHISSHQ, | QFLLFCHISSHQH, | FLLFCHISSHQHD, | LLFCHISSHQHDG, |
| CHISSHQHDGMEA, | SSHQHDGMEAYVK, | DGMEAYVKVDSCP, | EAYVKVDSCPEEP, |
| AYVKVDSCPEEPQ, | VKVDSCPEEPQLR, | DSCPEEPQLRMKN, | PQLRMKNNEEAED, |
| LRMKNNEEAEDYD, | NEEAEDYDDDLTD, | EDYDDDLTDSEMD, | DDDLTDSEMDVVR, |
| DDLTDSEMDVVRF, | SEMDVVRFDDDNS, | MDVVRFDDDNSPS, | DVVRFDDDNSPSF, |
| VVRFDDDNSPSFI, | VRFDDDNSPSFIQ, | DNSPSFIQIRSVA, | PSFIQIRSVAKKH, |
| SFIQIRSVAKKHP, | IQIRSVAKKHPKT, | RSVAKKHPKTWVH, | KTWVHYIAAEEED, |
| TWVHYIAAEEEDW, | VHYIAAEEEDWDY, | HYIAAEEEDWDYA, | EDWDYAPLVLAPD, |
| WDYAPLVLAPDDR, | APLVLAPDDRSYK, | PLVLAPDDRSYKS, | LVLAPDDRSYKSQ, |
| VLAPDDRSYKSQY, | RSYKSQYLNNGPQ, | YKSQYLNNGPQRI, | SQYLNNGPQRIGR, |
| QYLNNGPQRIGRK, | NGPQRIGRKYKKV, | QRIGRKYKKVRFM, | RKYKKVRFMAYTD, |
| KKVRFMAYTDETF, | KVRFMAYTDETFK, | VRFMAYTDETFKT, | RFMAYTDETFKTR, |
| FMAYTDETFKTRE, | MAYTDETFKTREA, | YTDETFKTREAIQ, | ETFKTREAIQHES, |
| FKTREAIQHESGI, | TREAIQHESGILG, | EAIQHESGILGPL, | QHESGILGPLLYG, |
| SGILGPLLYGEVG, | GILGPLLYGEVGD, | GPLLYGEVGDTLL, | PLLYGEVGDTLLI, |
| LLYGEVGDTLLII, | GEVGDTLLIIFKN, | DTLLIIFKNQASR, | TLLIIFKNQASRP, |
| LLIIFKNQASRPY, | LIIFKNQASRPYN, | IIFKNQASRPYNI, | SRPYNIYPHGITD, |
| RPYNIYPHGITDV, | YNIYPHGITDVRP, | NIYPHGITDVRPL, | PHGITDVRPLYSR, |
| HGITDVRPLYSRR, | TDVRPLYSRRLPK, | RPLYSRRLPKGVK, | PLYSRRLPKGVKH, |
| RRLPKGVKHLKDF, | KGVKHLKDFPILP, | KHLKDFPILPGEI, | LKDFPILPGEIFK, |
| KDFPILPGEIFKY, | FPILPGEIFKYKW, | PILPGEIFKYKWT, | GEIFKYKWTVTVE, |
| EIFKYKWTVTVED, | FKYKWTVTVEDGP, | YKWTVTVEDGPTK, | WTVTVEDGPTKSD, |
| VTVEDGPTKSDPR, | GPTKSDPRCLTRY, | SDPRCLTRYYSSF, | RCLTRYYSSFVNM, |

# 图1（续）

TRYYSSFVNMERD, RYYSSFVNMERDL, SSFVNMERDLASG, SFVNMERDLASGL,
VNMERDLASGLIG, NMERDLASGLIGP, RDLASGLIGPLLI, DLASGLIGPLLIC,
LASGLIGPLLICY, SGLIGPLLICYKE, GLIGPLLICYKES, GPLLICYKESVDQ,
PLLICYKESVDQR, LLICYKESVDQRG, ICYKESVDQRGNQ, CYKESVDQRGNQI,
KESVDQRGNQIMS, ESVDQRGNQIMSD, NQIMSDKRNVILF, QIMSDKRNVILFS,
RNVILFSVFDENR, NVILFSVFDENRS, VILFSVFDENRSW, ILFSVFDENRSWY,
LFSVFDENRSWYL, FSVFDENRSWYLT, SVFDENRSWYLTE, RSWYLTENIQRFL,
SWYLTENIQRFLP, WYLTENIQRFLPN, ENIQRFLPNPAGV, QRFLPNPAGVQLE,
RFLPNPAGVQLED, AGVQLEDPEFQAS, GVQLEDPEFQASN, VQLEDPEFQASNI,
QLEDPEFQASNIM, PEFQASNIMHSIN, SNIMHSINGYVFD, NIMHSINGYVFDS,
HSINGYVFDSLQL, INGYVFDSLQLSV, NGYVFDSLQLSVC, GYVFDSLQLSVCL,
YVFDSLQLSVCLH, VFDSLQLSVCLHE, DSLQLSVCLHEVA, LQLSVCLHEVAYW,
LSVCLHEVAYWYI, VCLHEVAYWYILS, HEVAYWYILSIGA, VAYWYILSIGAQT,
AYWYILSIGAQTD, YWYILSIGAQTDF, WYILSIGAQTDFL, YILSIGAQTDFLS,
ILSIGAQTDFLSV, LSIGAQTDFLSVF, IGAQTDFLSVFFS, TDFLSVFFSGYTF,
DFLSVFFSGYTFK, LSVFFSGYTFKHK, SVFFSGYTFKHKM, VFFSGYTFKHKMV,
FSGYTFKHKMVYE, SGYTFKHKMVYED, YTFKHKMVYEDTL, HKMVYEDTLTLFP,
KMVYEDTLTLFPF, MVYEDTLTLFPFS, DTLTLFPFSGETV, LTLFPFSGETVFM,
TLFPFSGETVFMS, FPFSGETVFMSME, SGETVFMSMENPG, ETVFMSMENPGLW,
TVFMSMENPGLWI, VFMSMENPGLWIL, MSMENPGLWILGC, PGLWILGCHNSDF,
GLWILGCHNSDFR, LWILGCHNSDFRN, WILGCHNSDFRNR, GCHNSDFRNRGMT,
CHNSDFRNRGMTA, SDFRNRGMTALLK, RGMTALLKVSSCD, TALLKVSSCDKNT,
ALLKVSSCDKNTG, LKVSSCDKNTGDY, GDYYEDSYEDISA, DYYEDSYEDISAY,
EDSYEDISAYLLS, DSYEDISAYLLSK, EDISAYLLSKNNA, DISAYLLSKNNAI,
ISAYLLSKNNAIE, SAYLLSKNNAIEP, AYLLSKNNAIEPR, YLLSKNNAIEPRS,
SKNNAIEPRSFSQ, NAIEPRSFSQNSR, RSFSQNSRHPSTR, KQFNATTIPENDI,
TTIPENDIEKTDP, NDIEKTDPWFAHR, TDPWFAHRTPMPK, DPWFAHRTPMPKI,
PWFAHRTPMPKIQ, TPMPKIQNVSSSD, PKIQNVSSSDLLM, QNVSSSDLLMLLR,
NVSSSDLLMLLRQ, SDLLMLLRQSPTP, DLLMLLRQSPTPH, LLMLLRQSPTPHG,
LMLLRQSPTPHGL, MLLRQSPTPHGLS, HGLSLSDLQEAKY, GLSLSDLQEAKYE,
LSLSDLQEAKYET, SDLQEAKYETFSD, AKYETFSDDPSPG, ETFSDDPSPGAID,
PSPGAIDSNNSLS, SPGAIDSNNSLSE, GAIDSNNSLSEMT, NSLSEMTHFRPQL,
SEMTHFRPQLHHS, THFRPQLHHSGDM, PQLHHSGDMVFTP, HSGDMVFTPESGL,
GDMVFTPESGLQL, DMVFTPESGLQLR, MVFTPESGLQLRL, SGLQLRLNEKLGT,
LQLRLNEKLGTTA, LRLNEKLGTTAAT, RLNEKLGTTAATE, EKLGTTAATELKK,
KLGTTAATELKKL, TAATELKKLDFKV, TELKKLDFKVSST, ELKKLDFKVSSTS,
KKLDFKVSSTSNN, KLDFKVSSTSNNL, LDFKVSSTSNNLI, FKVSSTSNNLIST,
TSNNLISTIPSDN, NNLISTIPSDNLA, NLISTIPSDNLAA, STIPSDNLAAGTD,
SDNLAAGTDNTSS, DNLAAGTDNTSSL, LAAGTDNTSSLGP, DNTSSLGPPSMPV,
SSLGPPSMPVHYD, PSMPVHYDSQLDT, MPVHYDSQLDTTL, PVHYDSQLDTTLF,
VHYDSQLDTTLFG, HYDSQLDTTLFGK, SQLDTTLFGKKSS, TTLFGKKSSPLTE,
TLFGKKSSPLTES, SPLTESGGPLSLS, GPLSLSEENNDSK, LSLSEENNDSKLL,
SEENNDSKLLESG, NDSKLLESGLMNS, SKLLESGLMNSQE, KLLESGLMNSQES,
SGLMNSQESSWGK, GLMNSQESSWGKN, LMNSQESSWGKNV, SSWGKNVSSTESG,
SWGKNVSSTESGR, KNVSSTESGRLFK, GRLFKGKRAHGPA, RLFKGKRAHGPAL,
FKGKRAHGPALLT, AHGPALLTKDNAL, HGPALLTKDNALF, PALLTKDNALFKV,
ALLTKDNALFKVS, DNALFKVSISLLK, NALFKVSISLLKT, ALFKVSISLLKTN,
FKVSISLLKTNKT, KVSISLLKTNKTS, VSISLLKTNKTSN, SISLLKTNKTSNN,
ISLLKTNKTSNNS, SLLKTNKTSNNSA, LLKTNKTSNNSAT, KTSNNSATNRKTH,
NRKTHIDGPSLLI, THIDGPSLLIENS, DGPSLLIENSPSV, GPSLLIENSPSVW,
PSLLIENSPSVWQ, SLLIENSPSVWQN, LLIENSPSVWQNI, IENSPSVWQNILE,
PSVWQNILESDTE, SVWQNILESDTEF, QNILESDTEFKKV, NILESDTEFKKVT,
DTEFKKVTPLIHD, TEFKKVTPLIHDR, FKKVTPLIHDRML, KKVTPLIHDRMLM,
VTPLIHDRMLMDK, TPLIHDRMLMDKN, PLIHDRMLMDKNA, IHDRMLMDKNATA,
HDRMLMDKNATAL, DRMLMDKNATALR, RMLMDKNATALRL, MLMDKNATALRLN,
DKNATALRLNHMS, NATALRLNHMSNK, TALRLNHMSNKTT, LRLNHMSNKTTSS,
NHMSNKTTSSKNM, KNATALRLNHMSN, ALRLNHMSNKTTS, SKNMEMVQQKKEG,
KNMEMVQQKKEGP, MEMVQQKKEGPIP, EMVQQKKEGPIPP, EGPIPPDAQNPDM,
GPIPPDAQNPDMS, PDAQNPDMSFFKM, NPDMSFFKMLFLP, PDMSFFKMLFLPE,
MSFFKMLFLPESA, SFFKMLFLPESAR, FFKMLFLPESARW, FKMLFLPESARWI,
KMLFLPESARWIQ, MLFLPESARWIQR, LFLPESARWIQRT, SARWIQRTHGKNS,
ARWIQRTHGKNSL, RWIQRTHGKNSLN, IQRTHGKNSLNSG, NSLNSGQGPSPKQ,
PKQLVSLGPEKSV, KQLVSLGPEKSVE, QLVSLGPEKSVEG, LVSLGPEKSVEGQ,
VSLGPEKSVEGQN, LGPEKSVEGQNFL, GPEKSVEGQNFLS, KSVEGQNFLSEKN,

# 图1（续）

| | | | |
|---|---|---|---|
| SVEGQNFLSEKNK, | GQNFLSEKNKVVV, | QNFLSEKNKVVVG, | NFLSEKNKVVVGK, |
| NKVVVGKGEFTKD, | KVVVGKGEFTKDV, | VVVGKGEFTKDVG, | KGEFTKDVGLKEM, |
| GEFTKDVGLKEMV, | KDVGLKEMVFPSS, | VGLKEMVFPSSRN, | GLKEMVFPSSRNL, |
| LKEMVFPSSRNLF, | KEMVFPSSRNLFL, | EMVFPSSRNLFLT, | MVFPSSRNLFLTN, |
| SSRNLFLTNLDNL, | SRNLFLTNLDNLH, | RNLFLTNLDNLHE, | NLFLTNLDNLHEN, |
| LFLTNLDNLHENN, | LTNLDNLHENNTH, | TNLDNLHENNTHN, | NLDNLHENNTHNQ, |
| LDNLHENNTHNQE, | DNLHENNTHNQEK, | EKKIQEEIEKKET, | KKIQEEIEKKETL, |
| QEEIEKKETLIQE, | EEIEKKETLIQEN, | IEKKETLIQENVV, | KKETLIQENVVLP, |
| ETLIQENVVLPQI, | TLIQENVVLPQIH, | IQENVVLPQIHTV, | ENVVLPQIHTVTG, |
| NVVLPQIHTVTGT, | VVLPQIHTVTGTK, | LPQIHTVTGTKNF, | PQIHTVTGTKNFM, |
| IHTVTGTKNFMKN, | HTVTGTKNFMKNL, | KNFMKNLFLLSTR, | NFMKNLFLLSTRQ, |
| FMKNLFLLSTRQN, | MKNLFLLSTRQNV, | KNLFLLSTRQNVE, | NLFLLSTRQNVEG, |
| LFLLSTRQNVEGS, | FLLSTRQNVEGSY, | RQNVEGSYDGAYA, | QNVEGSYDGAYAP, |
| EGSYDGAYAPVLQ, | GSYDGAYAPVLQD, | DGAYAPVLQDFRS, | GAYAPVLQDFRSL, |
| YAPVLQDFRSLND, | APVLQDFRSLNDS, | PVLQDFRSLNDST, | LQDFRSLNDSTNR, |
| QDFRSLNDSTNRT, | DFRSLNDSTNRTK, | FRSLNDSTNRTKK, | RSLNDSTNRTKKH, |
| AHFSKKGEEENLE, | EENLEGLGNQTKQ, | ENLEGLGNQTKQI, | LEGLGNQTKQIVE, |
| EGLGNQTKQIVEK, | LGNQTKQIVEKYA, | KQIVEKYACTTRI, | QIVEKYACTTRIS, |
| EKYACTTRISPNT, | TTRISPNTSQQNF, | TRISPNTSQQNFV, | NTSQQNFVTQRSK, |
| TSQQNFVTQRSKR, | QQNFVTQRSKRAL, | QNFVTQRSKRALK, | NFVTQRSKRALKQ, |
| QRSKRALKQFRLP, | RALKQFRLPLEET, | KQFRLPLEETELE, | QFRLPLEETELEK, |
| FRLPLEETELEKR, | LPLEETELEKRII, | PLEETELEKRIIV, | LEETELEKRIIVD, |
| TELEKRIIVDDTS, | EKRIIVDDTSTQW, | KRIIVDDTSTQWS, | RIIVDDTSTQWSK, |
| IIVDDTSTQWSKN, | VDDTSTQWSKNMK, | TQWSKNMKHLTPS, | SKNMKHLTPSTLT, |
| KNMKHLTPSTLTQ, | KHLTPSTLTQIDY, | PSTLTQIDYNEKE, | STLTQIDYNEKEK, |
| LTQIDYNEKEKGA, | TQIDYNEKEKGAI, | QIDYNEKEKGAIT, | IDYNEKEKGAITQ, |
| EKEKGAITQSPLS, | GAITQSPLSDCLT, | SPLSDCLTRSHSI, | SDCLTRSHSIPQA, |
| DCLTRSHSIPQAN, | SHSIPQANRSPLP, | HSIPQANRSPLPI, | RSPLPIAKVSSFP, |
| SPLPIAKVSSFPS, | PLPIAKVSSFPSI, | LPIAKVSSFPSIR, | IAKVSSFPSIRPI, |
| AKVSSFPSIRPIY, | VSSFPSIRPIYLT, | SSFPSIRPIYLTR, | FPSIRPIYLTRVL, |
| PSIRPIYLTRVLF, | SIRPIYLTRVLFQ, | RPIYLTRVLFQDN, | PIYLTRVLFQDNS, |
| IYLTRVLFQDNSS, | LTRVLFQDNSSHL, | TRVLFQDNSSHLP, | RVLFQDNSSHLPA, |
| VLFQDNSSHLPAA, | QDNSSHLPAASYR, | NSSHLPAASYRKK, | SSHLPAASYRKKD, |
| SHLPAASYRKKDS, | AASYRKKDSGVQE, | ASYRKKDSGVQES, | KKDSGVQESSHFL, |
| KDSGVQESSHFLQ, | DSGVQESSHFLQG, | SGVQESSHFLQGA, | VQESSHFLQGAKK, |
| SHFLQGAKKNNLS, | HFLQGAKKNNLSL, | NNLSLAILTLEMT, | NLSLAILTLEMTG, |
| LSLAILTLEMTGD, | LAILTLEMTGDQR, | AILTLEMTGDQRE, | LTLEMTGDQREVG, |
| TLEMTGDQREVGS, | LEMTGDQREVGSL, | TGDQREVGSLGTS, | QREVGSLGTSATN, |
| REVGSLGTSATNS, | VGSLGTSATNSVT, | GSLGTSATNSVTY, | KNNLSLAILTLEM, |
| NSVTYKKVENTVL, | SVTYKKVENTVLP, | VTYKKVENTVLPK, | KKVENTVLPKPDL, |
| NTVLPKPDLPKTS, | PDLPKTSGKVELL, | SGKVELLPKVHIY, | GKVELLPKVHIYQ, |
| VELLPKVHIYQKD, | ELLPKVHIYQKDL, | LPKVHIYQKDLFP, | PKVHIYQKDLFPT, |
| VHIYQKDLFPTET, | HIYQKDLFPTETS, | KDLFPTETSNGSP, | DLFPTETSNGSPG, |
| PGHLDLVEGSLLQ, | GHLDLVEGSLLQG, | LDLVEGSLLQGTE, | DLVEGSLLQGTEG, |
| VEGSLLQGTEGAI, | EGSLLQGTEGAIK, | GSLLQGTEGAIKW, | SLLQGTEGAIKWN, |
| GAIKWNEANRPGK, | AIKWNEANRPGKV, | IKWNEANRPGKVP, | RPGKVPFLRVATE, |
| GKVPFLRVATESS, | KVPFLRVATESSA, | VPFLRVATESSAK, | PFLRVATESSAKT, |
| FLRVATESSAKTP, | LRVATESSAKTPS, | VATESSAKTPSKL, | SKLLDPLAWDNHY, |
| KLLDPLAWDNHYG, | LLDPLAWDNHYGT, | LDPLAWDNHYGTQ, | DPLAWDNHYGTQI, |
| PLAWDNHYGTQIP, | LAWDNHYGTQIPK, | DNHYGTQIPKEEW, | NHYGTQIPKEEWK, |
| GTQIPKEEWKSQE, | TQIPKEEWKSQEK, | KEEWKSQEKSPEK, | EEWKSQEKSPEKT, |
| KSQEKSPEKTAFK, | SQEKSPEKTAFKK, | KTAFKKKDTILSL, | QEKSPEKTAFKKK, |
| KSPEKTAFKKKDT, | SPEKTAFKKKDTI, | KTAFKKKDTILSL, | TAFKKKDTILSLN, |
| AFKKKDTILSLNA, | DTILSLNACESNH, | TILSLNACESNHA, | ILSLNACESNHAI, |
| LSLNACESNHAIA, | HAIAAINEGQNKP, | AIAAINEGQNKPE, | IAAINEGQNKPEI, |
| AAINEGQNKPEIE, | GQNKPEIEVTWAK, | QNKPEIEVTWAKQ, | GQNKPEIEVTWAK, |
| QNKPEIEVTWAKQ, | PEIEVTWAKQGRT, | EIEVTWAKQGRTE, | IEVTWAKQGRTER, |
| EVTWAKQGRTERL, | VTWAKQGRTERLC, | TERLCSQNPPVLK, | ERLCSQNPPVLKR, |
| NPPVLKRHQREIT, | PPVLKRHQREITR, | PVLKRHQREITRT, | LKRHQREITRTTL, |
| KRHQREITRTTLQ, | REITRTTLQSDQE, | TTLQSDQEEIDYD, | QEEIDYDDTISVE, |
| EEIDYDDTISVEM, | EIDYDDTISVEMK, | IDYDDTISVEMKK, | DTISVEMKKEDFD, |
| TISVEMKKEDFDI, | ISVEMKKEDFDIY, | SVEMKKEDFDIYD, | VEMKKEDFDIYDE, |
| EDFDIYDEDENQS, | DFDIYDEDENQSP, | FDIYDEDENQSPR, | DIYDEDENQSPRS, |

# 图1（续）

YDEDENQSPRSFQ, PRSFQKKTRHYFI, RSFQKKTRHYFIA, TRHYFIAAVERLW,
RHYFIAAVERLWD, HYFIAAVERLWDY, YFIAAVERLWDYG, IAAVERLWDYGMS,
AAVERLWDYGMSS, ERLWDYGMSSSPH, RLWDYGMSSSPHV, LWDYGMSSSPHVL,
WDYGMSSSPHVLR, YGMSSSPHVLRNR, MSSSPHVLRNRAQ, SSSPHVLRNRAQS,
PHVLRNRAQSGSV, HVLRNRAQSGSVP, RAQSGSVPQFKKV, QSGSVPQFKKVVF,
GSVPQFKKVVFQE, VPQFKKVVFQEFT, PQFKKVVFQEFTD, FKKVVFQEFTDGS,
KKVVFQEFTDGSF, KVVFQEFTDGSFT, VVFQEFTDGSFTQ, VFQEFTDGSFTQP,
QEFTDGSFTQPLY, GSFTQPLYRGELN, QPLYRGELNEHLG, PLYRGELNEHLGL,
GELNEHLGLLGPY, LNEHLGLLGPYIR, NEHLGLLGPYIRA, EHLGLLGPYIRAE,
LGLLGPYIRAEVE, GLLGPYIRAEVED, LGPYIRAEVEDNI, GPYIRAEVEDNIM,
PYIRAEVEDNIMV, YIRAEVEDNIMVT, RAEVEDNIMVTFR, AEVEDNIMVTFRN,
EDNIMVTFRNQAS, DNIMVTFRNQASR, NIMVTFRNQASRP, IMVTFRNQASRPY,
MVTFRNQASRPYS, VTFRNQASRPYSF, ASRPYSFYSSLIS, SRPYSFYSSLISY,
RPYSFYSSLISYE, YSFYSSLISYEED, SFYSSLISYEEDQ, YSSLISYEEDQRQ,
SSLISYEEDQRQG, SLISYEEDQRQGA, LISYEEDQRQGAE, ISYEEDQRQGAEP,
KNFVKPNETKTYF, NFVKPNETKTYFW, KTYFWKVQHHMAP, TYFWKVQHHMAPT,
YFWKVQHHMAPTK, WKVQHHMAPTKDE, HHMAPTKDEFDCK, TKDEFDCKAWAYF,
DEFDCKAWAYFSD, KAWAYFSDVDLEK, WAYFSDVDLEKDV, AYFSDVDLEKDVH,
SDVDLEKDVHSGL, DVDLEKDVHSGLI, VDLEKDVHSGLIG, LEKDVHSGLIGPL,
KDVHSGLIGPLLV, DVHSGLIGPLLVC, VHSGLIGPLLVCH, SGLIGPLLVCHTN,
GLIGPLLVCHTNT, IGPLLVCHTNTLN, GPLLVCHTNTLNP, PLLVCHTNTLNPA,
LLVCHTNTLNPAH, NTLNPAHGRQVTV, AHGRQVTVQEFAL, RQVTVQEFALFFT,
VTVQEFALFFTIF, TVQEFALFFTIFD, QEFALFFTIFDET, FALFFTIFDETKS,
ALFFTIFDETKSW, LFFTIFDETKSWY, FTIFDETKSWYFT, TIFDETKSWYFTE,
KSWYFTENMERNC, SWYFTENMERNCR, WYFTENMERNCRA, FTENMERNCRAPC,
ENMERNCRAPCNI, PCNIQMEDPTFKE, CNIQMEDPTFKEN, IQMEDPTFKENYR,
PTFKENYRFHAIN, ENYRFHAINGYIM, NYRFHAINGYIMD, YRFHAINGYIMDT,
HAINGYIMDTLPG, AINGYIMDTLPGL, NGYIMDTLPGLVM, GYIMDTLPGLVMA,
YIMDTLPGLVMAQ, DTLPGLVMAQDQR, TLPGLVMAQDQRI, PGLVMAQDQRIRW,
GLVMAQDQRIRWY, LVMAQDQRIRWYL, MAQDQRIRWYLLS, QRIRWYLLSMGSN,
IRWYLLSMGSNEN, RWYLLSMGSNENI, WYLLSMGSNENIH, YLLSMGSNENIHS,
LSMGSNENIHSIH, GSNENIHSIHFSG, ENIHSIHFSGHVF, HSIHFSGHVFTVR,
IHFSGHVFTVRKK, HFSGHVFTVRKKE, GHVFTVRKKEEYK, HVFTVRKKEEYKM,
FTVRKKEEYKMAL, VRKKEEYKMALYN, KEEYKMALYNLYP, EEYKMALYNLYPG,
YKMALYNLYPGVF, MALYNLYPGVFET, ALYNLYPGVFETV, YNLYPGVFETVEM,
NLYPGVFETVEML, PGVFETVEMLPSK, GVFETVEMLPSKA, FETVEMLPSKAGI,
ETVEMLPSKAGIW, VEMLPSKAGIWRV, EMLPSKAGIWRVE, MLPSKAGIWRVEC,
AGIWRVECLIGEH, GIWRVECLIGEHL, WRVECLIGEHLHA, ECLIGEHLHAGMS,
CLIGEHLHAGMST, EHLHAGMSTLFLV, HLHAGMSTLFLVY, AGMSTLFLVYSNK,
STLFLVYSNKCQT, TLFLVYSNKCQTP, LFLVYSNKCQTPL, FLVYSNKCQTPLG,
LVYSNKCQTPLGM, YSNKCQTPLGMAS, QTPLGMASGHIRD, TPLGMASGHIRDF,
LGMASGHIRDFQI, SGHIRDFQITASG, GHIRDFQITASGQ, IRDFQITASGQYG,
RDFQITASGQYGQ, FQITASGQYGQWA, EHLHAGMSTLFLV, HLHAGMSTLFLVY,
AGMSTLFLVYSNK, STLFLVYSNKCQT, TLFLVYSNKCQTP, LFLVYSNKCQTPL,
FLVYSNKCQTPLG, LVYSNKCQTPLGM, YSNKCQTPLGMAS, QTPLGMASGHIRD,
TPLGMASGHIRDF, LGMASGHIRDFQI, SGHIRDFQITASG, GHIRDFQITASGQ,
IRDFQITASGQYG, RDFQITASGQYGQ, FQITASGQYGQWA, TASGQYGQWAPKL,
SGQYGQWAPKLAR, GQYGQWAPKLARL, GQWAPKLARLHYS, QWAPKLARLHYSG,
PKLARLHYSGSIN, ARLHYSGSINAWS, LHYSGSINAWSTK, GSINAWSTKEPFS,
NAWSTKEPFSWIK, EPFSWIKVDLLAP, FSWIKVDLLAPMI, SWIKVDLLAPMII,
WIKVDLLAPMIIH, IKVDLLAPMIIHG, VDLLAPMIIHGIK, DLLAPMIIHGIKT,
LLAPMIIHGIKTQ, APMIIHGIKTQGA, PMIIHGIKTQGAR, MIIHGIKTQGARQ,
HGIKTQGARQKFS, GIKTQGARQKFSS, IKTQGARQKFSSL, GARQKFSSLYISQ,
QKFSSLYISQFII, FSSLYISQFIIMY, SSLYISQFIIMYS, SLYISQFIIMYSL,
LYISQFIIMYSLD, YISQFIIMYSLDG, SQFIIMYSLDGKK, QFIIMYSLDGKKW,
FIIMYSLDGKKWQ, IIMYSLDGKKWQT, IMYSLDGKKWQTY, YSLDGKKWQTYRG,
KKWQTYRGNSTGT, QTYRGNSTGTLMV, GTLMVFFGNVDSS, TLMVFFGNVDSSG,
LMVFFGNVDSSGI, MVFFGNVDSSGIK, VFFGNVDSSGIKH, FFGNVDSSGIKHN,
GNVDSSGIKHNIF, VDSSGIKHNIFNP, SGIKHNIFNPPII, GIKHNIFNPPIIA,
IKHNIFNPPIIAR, KHNIFNPPIIARY, HNIFNPPIIARYI, NIFNPPIIARYIR,
NPPIIARYIRLHP, PPIIARYIRLHPT, PIIARYIRLHPTH, ARYIRLHPTHYSI,
RYIRLHPTHYSIR, IRLHPTHYSIRST, THYSIRSTLRMEL, YSIRSTLRMELMG,
STLRMELMGCDLN, TLRMELMGCDLNS, LRMELMGCDLNSC, MELMGCDLNSCSM,
ELMGCDLNSCSMP, LMGCDLNSCSMPL, CDLNSCSMPLGME, CSMPLGMESKAIS,

# 图1（续）

SMPLGMESKAISD, MPLGMESKAISDA, LGMESKAISDAQI, GMESKAISDAQIT,
SKAISDAQITASS, KAISDAQITASSY, AISDAQITASSYF, DAQITASSYFTNM,
AQITASSYFTNMF, TASSYFTNMFATW, SSYFTNMFATWSP, SYFTNMFATWSPS,
TNMFATWSPSKAR, NMFATWSPSKARL, FATWSPSKARLHL, ATWSPSKARLHLQ,
PSKARLHLQGRSN, ARLHLQGRSNAWR, LHLQGRSNAWRPQ, QGRSNAWRPQVNN,
NAWRPQVNNPKEW, PQVNNPKEWLQVD, NNPKEWLQVDFQK, KEWLQVDFQKTMK,
EWLQVDFQKTMKV, LQVDFQKTMKVTG, VDFQKTMKVTGVT, KTMKVTGVTTQGV,
MKVTGVTTQGVKS, TGVTTQGVKSLLT, VTTQGVKSLLTSM, QGVKSLLTSMYVK,
GVKSLLTSMYVKE, KSLLTSMYVKEFL, SLLTSMYVKEFLI, LTSMYVKEFLISS,
TSMYVKEFLISSS, SMYVKEFLISSSQ, MYVKEFLISSSQD, YVKEFLISSSQDG,
KEFLISSSQDGHQ, EFLISSSQDGHQW, FLISSSQDGHQWT, ISSSQDGHQWTLF,
SQDGHQWTLFFQN, GHQWTLFFQNGKV, HQWTLFFQNGKVK, WTLFFQNGKVKVF,
TLFFQNGKVKVFQ, LFFQNGKVKVFQG, NGKVKVFQGNQDS, GKVKVFQGNQDSF,
VKVFQGNQDSFTP, KVFQGNQDSFTPV, DSFTPVVNSLDPP, TPVVNSLDPPLLT,
PVVNSLDPPLLTR, NSLDPPLLTRYLR, SLDPPLLTRYLRI, PPLLTRYLRIHPQ,
PLLTRYLRIHPQS, TRYLRIHPQSWVH, RYLRIHPQSWVHQ, LRIHPQSWVHQIA,
HPQSWVHQIALRM, QSWVHQIALRMEV, SWVHQIALRMEVL, WVHQIALRMEVLG,
HQIALRMEVLGCE, IALRMEVLGCEAQ, LRMEVLGCEAQDL,

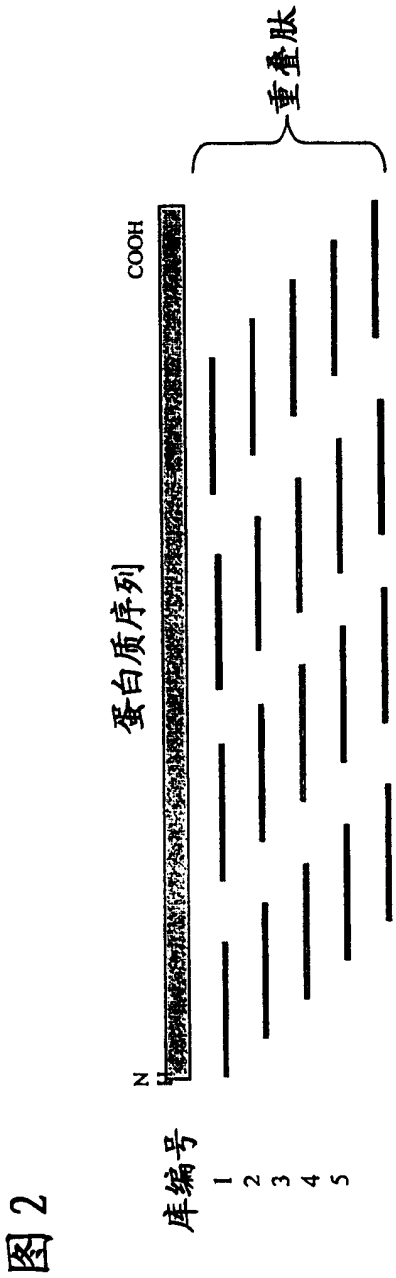
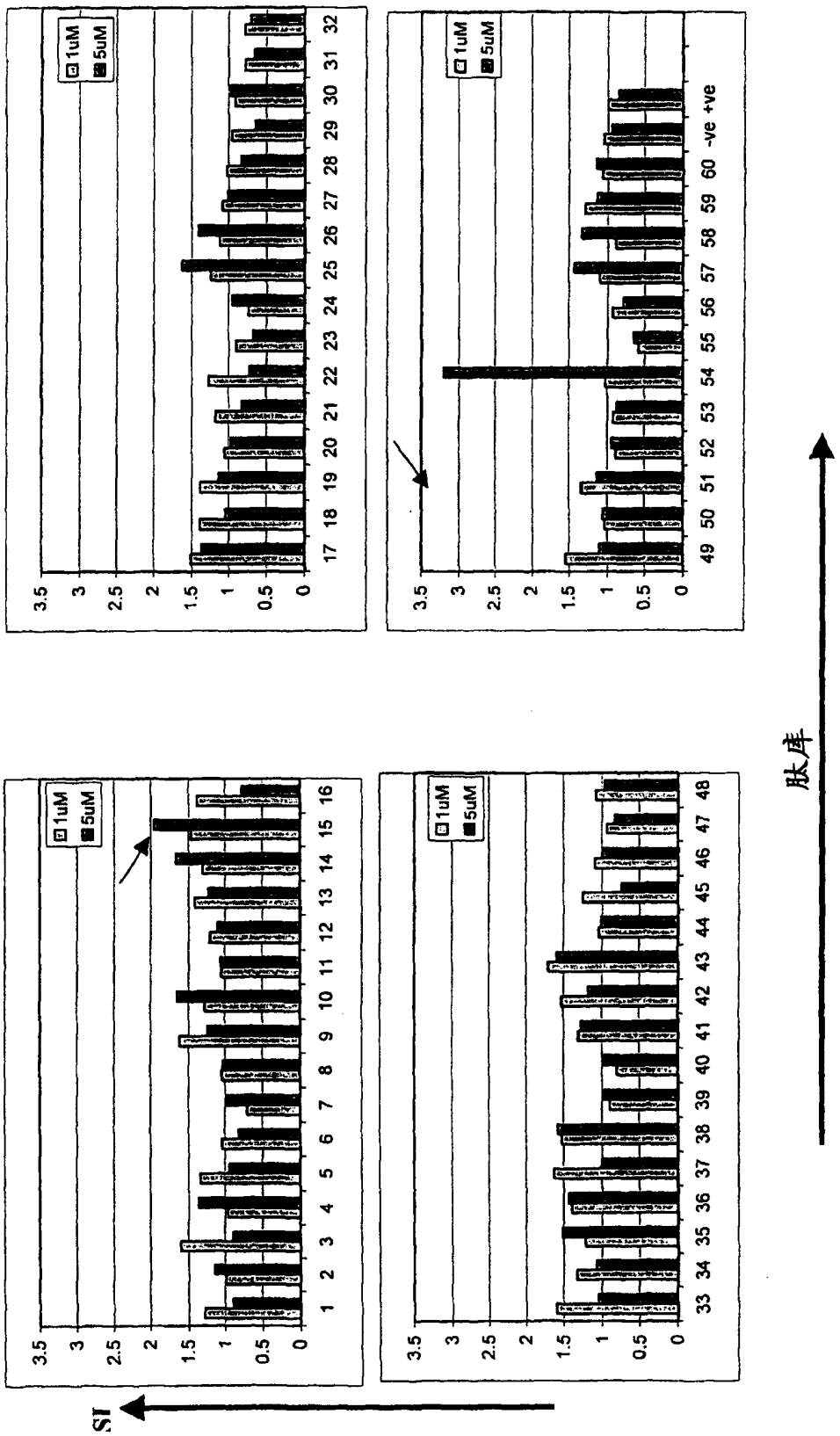



图 2

图 3



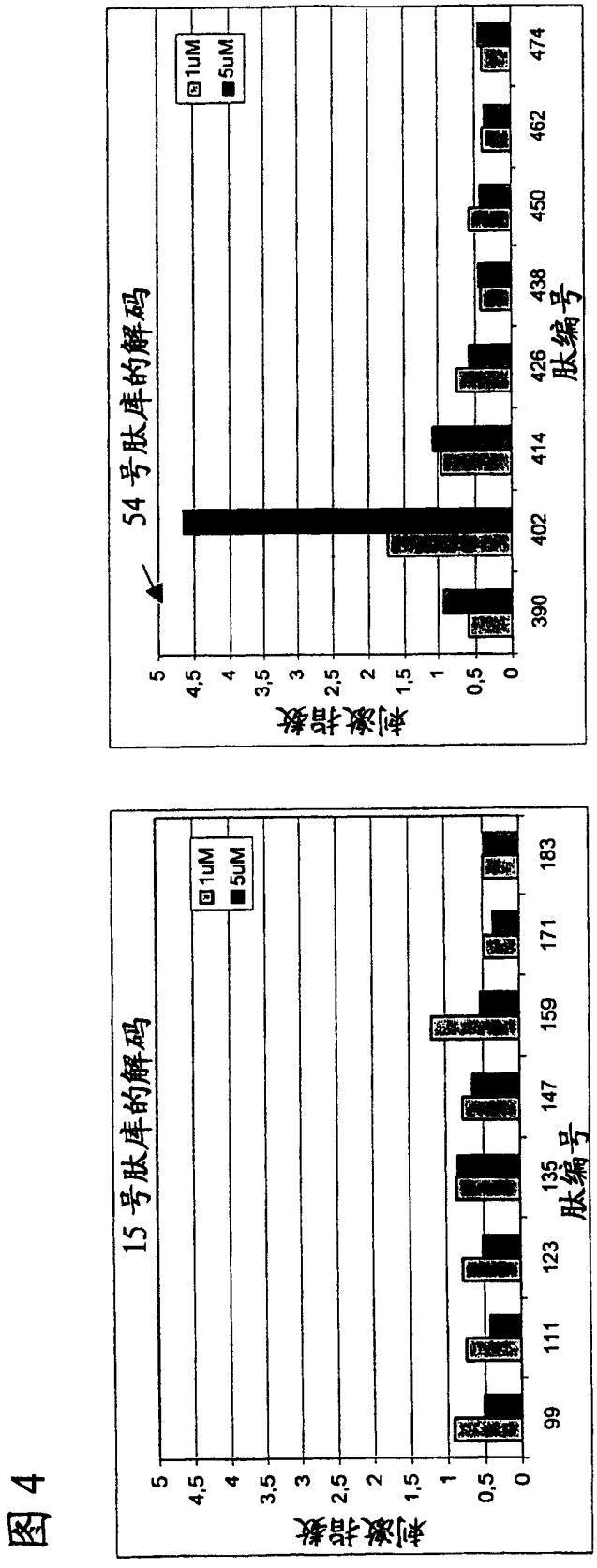
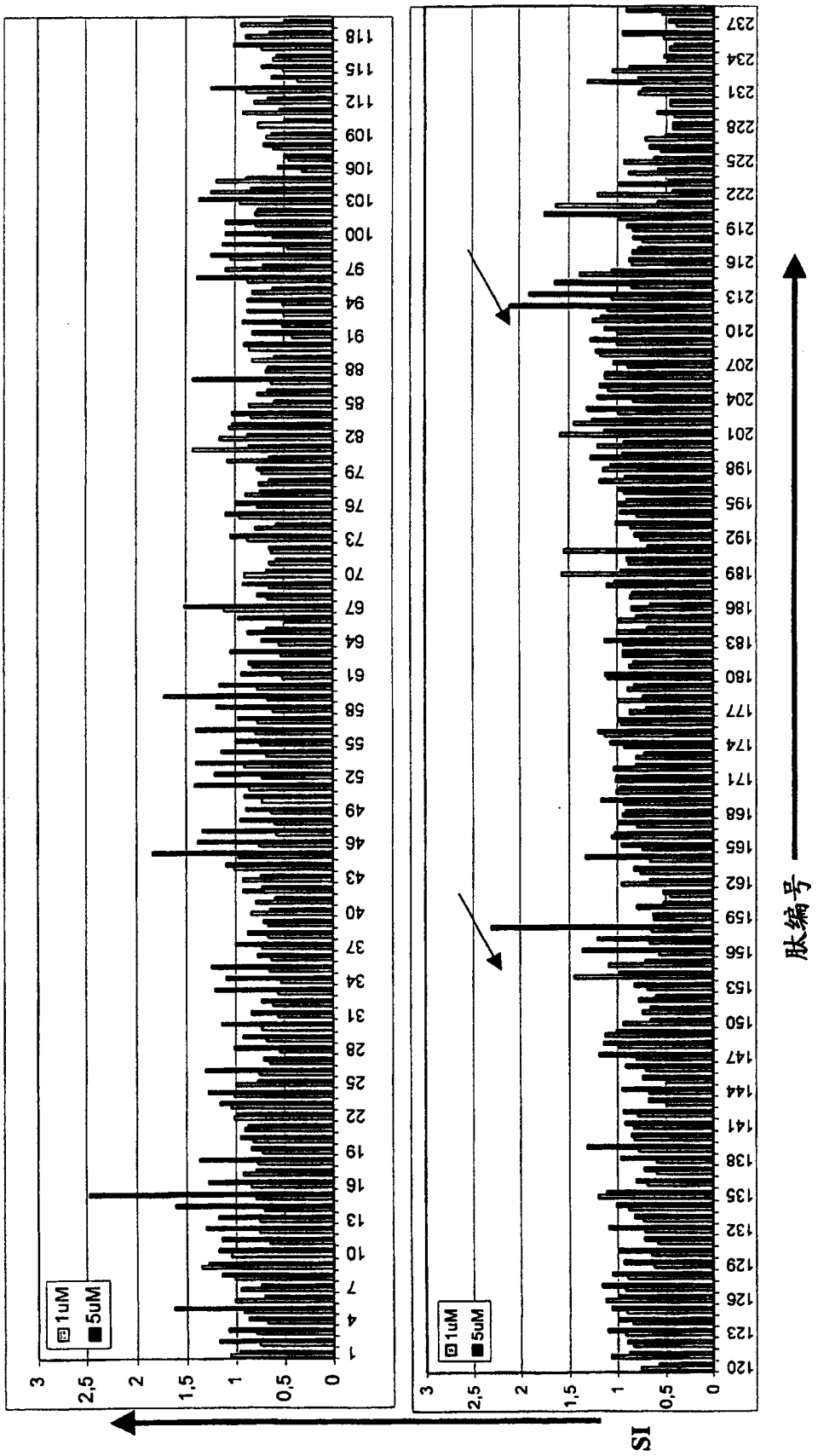

54 号肽库的解码
1uM
5uM
刺激指数
肽编号
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
4
4,5
5
390
402
414
426
438
450
462
474
15 号肽库的解码
1uM
5uM
刺激指数
肽编号
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
4
4,5
5
99
111
123
135
147
159
171
183

图 4

图 5A



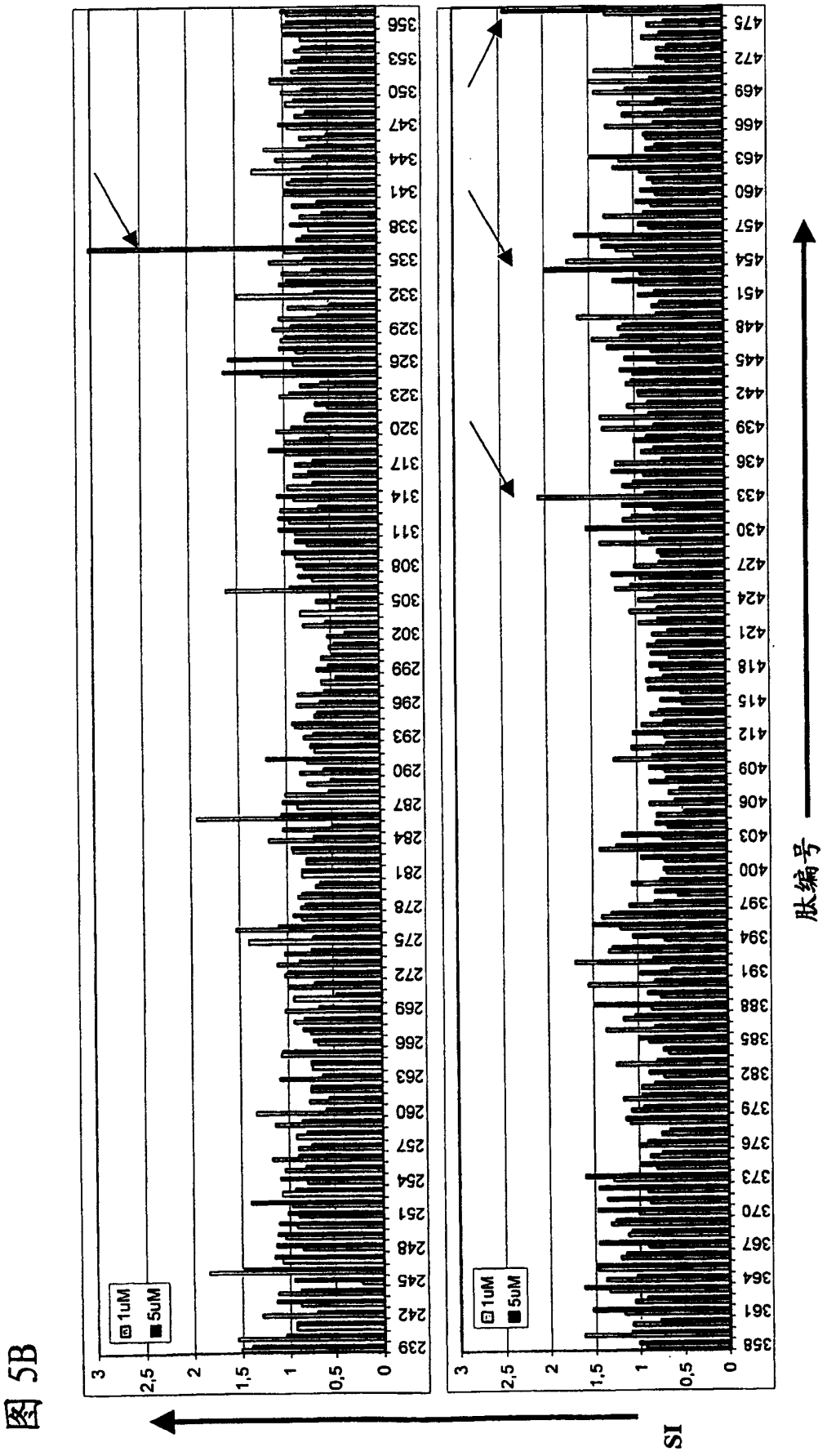



图 5B

图 6

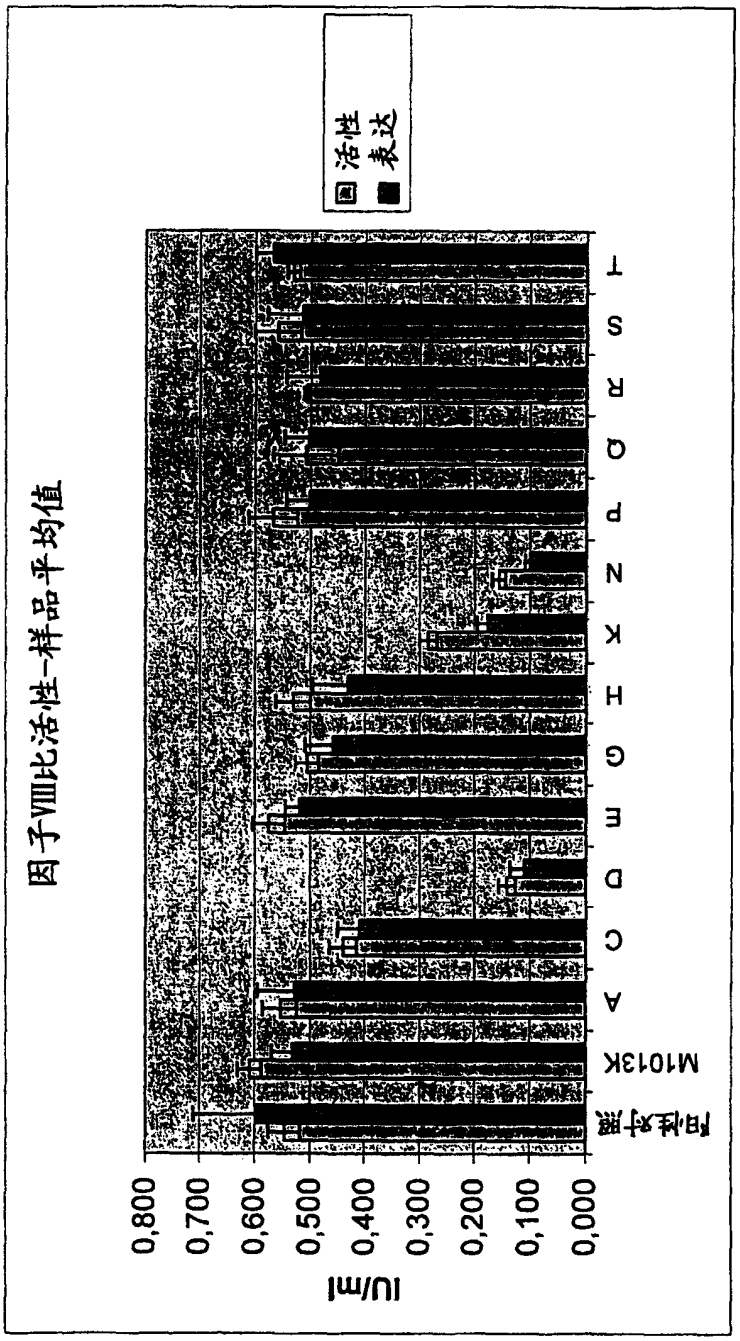

因子VIII比活性-样品平均值
IU/ml
0,800
0,700
0,600
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
0,000
阳性对照
M1013K
A
C
D
E
G
H
K
N
P
Q
R
S
T
活性
表达

图 7

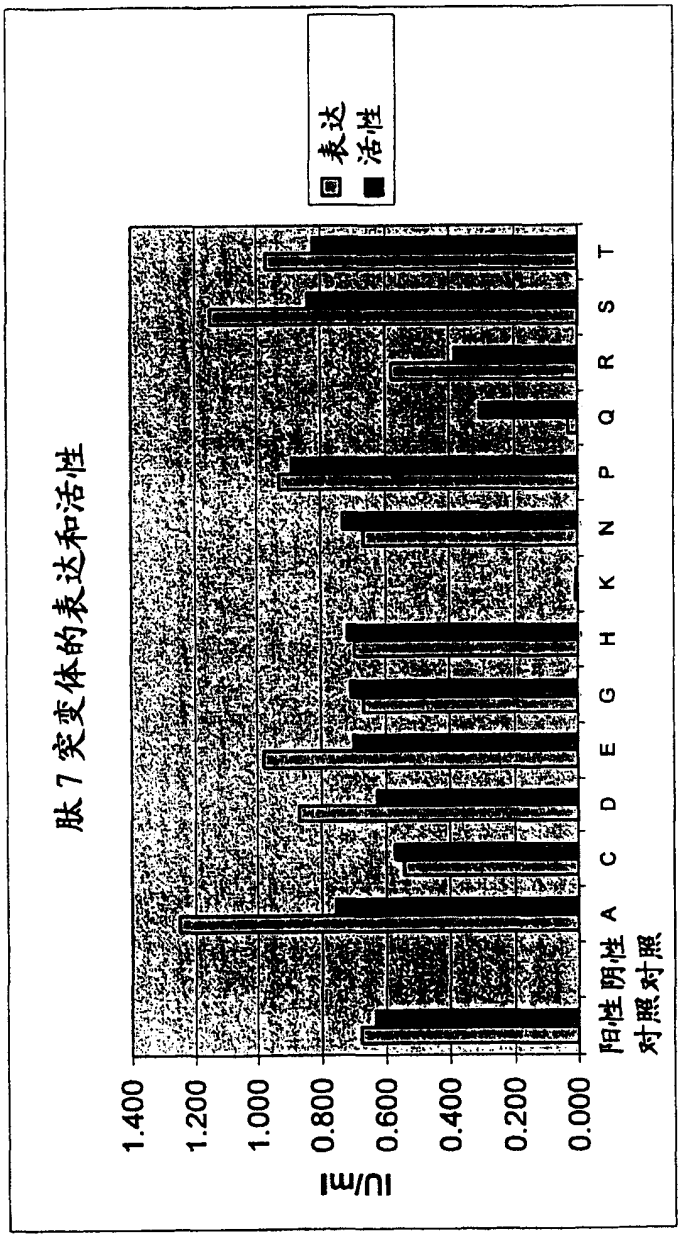
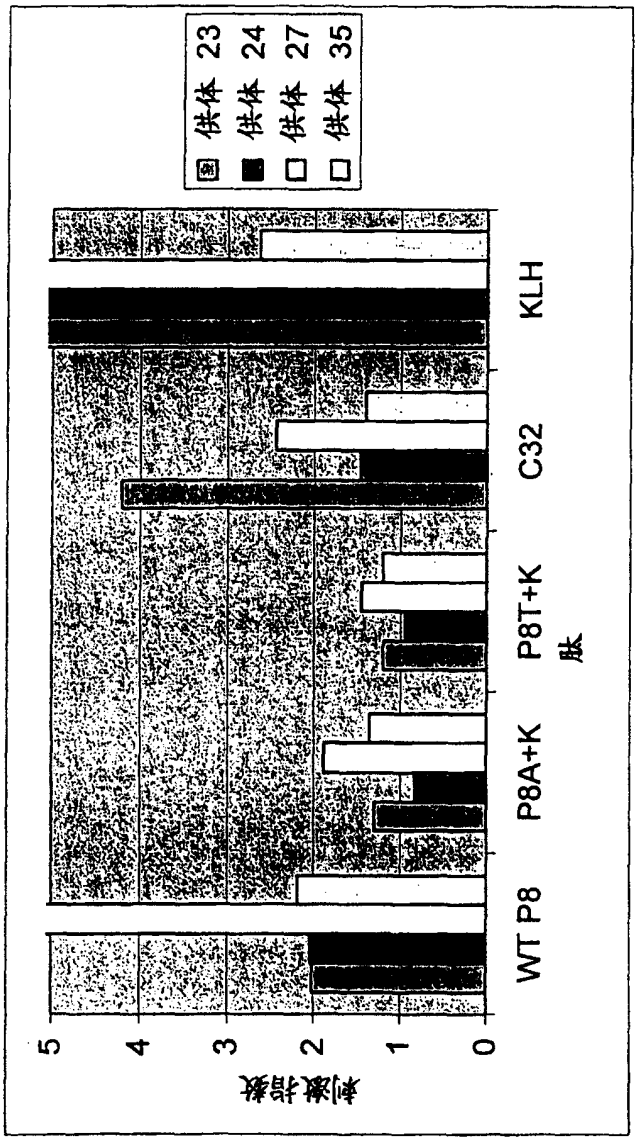

肽7突变体的表达和活性
表达
活性
IU/ml
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
阳性 阴性 A C D E G H K N P Q R S T
对照 对照

图 8

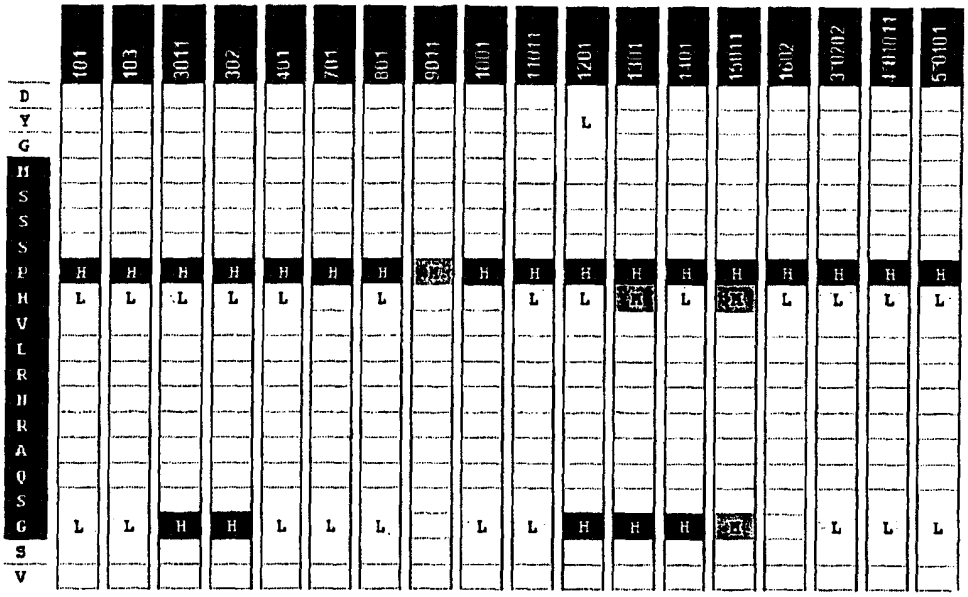



| 肽 | 序列 | 来源 |
|---|---|---|
| WTP8 | CNIQMEDPTFKENYR | FVIII免疫原性肽 P8; 残基 1009-1023 |
| P8K+A | CNAQKEDPTFKENYR | 具 $I_{1011}A + M_{1013}K$ 替代的肽 P8 |
| P8K+T | CNTQKEDPTFKENYR | 具 $I_{1011}T + M_{1013}K$ 替代的肽 P8 |
| C32 | PKYVKQNTLKLAT | 对照肽; 流感血凝素残基 307-319 |
| KLH | 全蛋白 | 对照肽; 匙孔血蓝蛋白 |

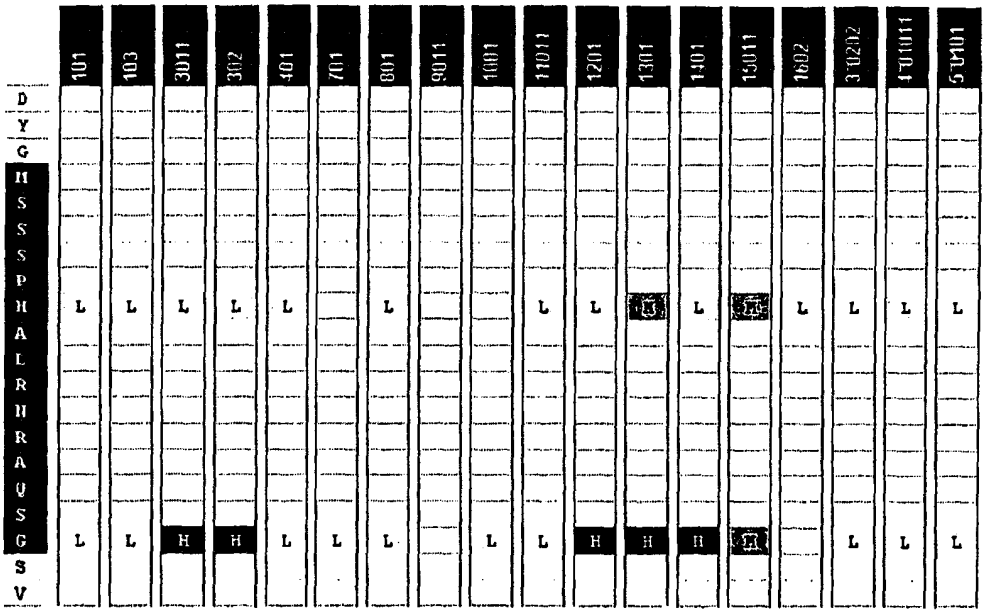
| 供体编号 | MHC 同种异型 |
|---|---|
| 23 | DRB1*04, DRB1*13, DRB3, DRB4*01 |
| 24 | DRB1*03, DRB1*04, DRB3, DRB4*01 |
| 27 | DRB1*03, DRB1*15, DRB3, DRB5 |
| 35 | DRB1*04, DRB1*08, DRB4*01 |

# 图9

A) 野生型因子 VIII（肽 7）




B) 因子 VIII $V_{823}A$




H 高亲和力 MHC配体，分值> 1,000,000

中等亲和力 MHC 配体，分值750,001 - 1,000,000

| L | 低亲和力 MHC配体，分值500,000 - 750,000

图10

```
1                         25                         50                         75
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPT
                         100                        125                        150
IQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
                         175                        200                        225
PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA
                         250                        275                        300
RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
                         325                        350                        375
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVA
                         400                        425                        450
KKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
                         475                        500                        525
PLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSD
                         550                        575                        600
PRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
                         625                        650                        675
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSG
                         700                        725                        750
ETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLK
                         775                        800                        825
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR
                         850                        875                        900
NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE
                         925                        950                        975
DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGR
                        1000                       1025                       1050
QVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
                        1075                       1100                       1125
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSN
                        1150                       1175                       1200
KCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
                        1225                       1250                       1275
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGC
                        1300                       1325                       1350
DLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT
                        1375                       1400                       1425
TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIAL
       1438
RMEVLGCEAQDLY
```