

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03818969.0

C07K 14/505

C12N 15/12

A61K 38/18

G01N 33/68

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1675242A

[22] 申请日 2003.8.7 [21] 申请号 03818969.0

[30] 优先权

[32] 2002.8.9 [33] EP [31] 02017914.9

[86] 国际申请 PCT/EP2003/008725 2003.8.7

[87] 国际公布 WO2004/018515 英 2004.3.4

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.6

[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 M·贝克 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 4 页 说明书 26 页 附图 4 页

[54] 发明名称 促红细胞生成素中的 T-细胞表位

[57] 摘要

本发明涉及人 EPO 中 T-细胞表位的鉴定和来自 EPO 的 T-细胞表位肽,通过这类肽可以构建出免疫原性降低的新的修饰的 EPO 变体。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 具有人促红细胞生成素 (EPO) 生物活性的修饰分子, 当用于体内时其基本上不具有免疫原性或比任何具有相同生物活性的未修饰分子具有更低的免疫原性, 其中 (i) 所述免疫原性的丧失是通过除去一个或多个来自原未修饰分子的 T-细胞表位而实现的, 并且所述 T-细胞表位是 II 型 MHC 配体或表现出能够通过 II 型上呈递而刺激或结合 T-细胞的肽序列,

(ii) 所述修饰分子当以整个蛋白质的形式于人 T-细胞生物增殖试验中测试时, 表现出小于亲本未修饰分子的刺激指数 (SI) 并且该刺激指数小于 2.0, 并且

(iii) 所述被除去的 T-细胞表位定位在原来未修饰 EPO 分子的连续残基链上, 所述链选自:

(a) RVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP,

(b) RGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL,

(c) RTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRT,

2. 根据权利要求 1 的修饰的 EPO 分子, 其中所述被除去的 T-细胞表位定位于链 (a)、(b) 和 (c) 的下述子链上:

(a1) AKEAENITTGCAEHCSLNENI

(a2) RGQALLVNSSQPWEPLQLHVD;

(a3) TFRKLFVYSNFLRGKCLKLYT。

3. 根据权利要求 1 的修饰的 EPO 分子, 其中所述被除去的 T-细胞表位定位于表 1 描述的残基链上。

4. 权利要求 1-3 中任一项的修饰的 EPO 分子, 其中所述被除去的 T-细胞表位定位在任一所述链的 13 到 15 个连续残基上。

5. 权利要求 1-4 中任一项的修饰的 EPO 分子, 其中通过对所述链中一个或多个氨基酸残基的替代, 已除去 T-细胞表位。

6. 具有人促红细胞生成素 (EPO) 生物活性的修饰分子, 当用于体内

时其基本上不具有免疫原性或比任何具有相同生物活性的未修饰分子具有更低的免疫原性，其中 (i) 所述免疫原性的丧失是通过除去一个或多个来自原未修饰分子的 T-细胞表位而实现的，并且所述 T-细胞表位是 II 型 MHC 配体或表现出能够通过 II 型上呈递而刺激或结合 T-细胞的肽序列，且

(ii) 所述修饰分子具有氨基酸序列：

APPR LICDSRV LERYLL EAKEAENX¹TTGCAEHCSX²NENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQAV
 EVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPX³EPX⁴QX⁵HX⁶DKAVSGLRSLTLLLRALGAQKEAIS
 PPDAASAAPLRTITADTFRKX⁷X⁸RX⁹X¹⁰SNX¹¹X¹²RGKX¹³KLYTGEACRTGDR

其中

X¹ = A、G、P；

X² = A、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T；

X³ = T、A 和 G；

X⁴ = A、P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T；

X⁵ = A、P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T；

X⁶ = A、P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T；

X⁷ = T；

X⁸ = A、P 和 G；

X⁹ = T；

X¹⁰ = P、A 和 G；

X¹¹ = A、P 和 G；

X¹² = S、A、D、E、G、H、K、N、P、Q、R 和 T；

X¹³ = A、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T；

并且同时排除 X¹=I、X²=L、X³=W、X⁴=L、X⁵=L、X⁶=V、X⁷=I、X⁸=F、X⁹=V、X¹⁰=Y、X¹¹=F、X¹²=L 和 X¹³=L。

7. 权利要求 6 的修饰的 EPO 分子，其中

X¹ = A、X² = A、X³ = T、X⁴ = A、X⁵ = A、X⁶ = A、X⁷ = T、X⁸ = A、X⁹ = T；X¹⁰ = P、X¹¹ = A、X¹² = S 且 X¹³ = A。

8. 权利要求 5 或 6 的修饰的 EPO 分子, 其中, 当作为整个蛋白质于 T-细胞生物增殖试验中测试时该分子表现出小于亲本未修饰分子的刺激指数 (SI) 并且该刺激指数小于 2.0。

9. 编码权利要求 1-8 中任一项的修饰的 EPO 蛋白质的 DNA 分子。

10. 药物组合物, 其包含权利要求 1-8 中任一项的 EPO 分子以及药物可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

11. 作为具有人促红细胞生成素 (EPO) 生物活性的分子的一部分的肽序列, 其包含一个或多个 T-细胞表位, 其中所述 T 细胞表位是 II 型 MHC 配体或表现出能够通过 II 型上呈递而刺激或结合 T-细胞的序列片段; 此肽选自:

(a) RVLERYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENITVP,

(b) RGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL,

(c) RTITADTFRKLFVRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRT。

12. 根据权利要求 11 的肽序列, 其中该序列是链 (a)、(b) 和 (c) 的子链, 并选自:

(a1) AKEAENITTTGCAEHCSLNENI

(a2) RGQALLVNSSQPWEPLQLHVD;

(a3) TFRKLFVRVYSNFLRGKCLKLYT。

13. 根据权利要求 11 的肽序列, 其中该序列选自表 1。

14. 根据权利要求 11-13 中任一项的肽序列, 其包含来自任一所述链的 13 到 15 个连续的氨基酸残基。

15. 权利要求 11-14 中任一项的肽序列, 当于人 T-细胞生物增殖试验中测试时其表现出高于 2.0 的刺激指数 (SI)。

16. 权利要求 15 的修饰的肽序列, 其中所述修饰通过一个或多个氨基酸残基的替代, 导致作为 II 型 MHC 配体的潜在 T-细胞表位消除, 当于人 T-细胞生物增殖试验中测试时, 该肽表现出低于 2.0, 优选地 1.8 的刺激指数 (SI)。

17. 根据权利要求 16 的肽在制备权利要求 1 所定义的修饰的人 EPO 分

子中的用途。

18. 编码权利要求 11-16 中任一项的肽序列的 DNA 分子。

19. 通过定位人 EPO 中的 T-细胞表位来构建人 EPO 的 T-细胞表位图的方法，此方法包括步骤：

(i) 使用合成肽免疫原和来自无关联供体样品的 PBMC 制品进行体外抗原刺激，其中所述 PBMC 制品含有生理比例的 T 细胞和抗原呈递细胞，

(ii) 应用模拟肽配体与一种或多种 MHC 同种异型结合的计算方案来分析步骤 (i) 中鉴定的表位区，从而鉴定表位区中的 II 型 MHC 配体；

(iii) 应用模拟肽配体与一种或多种 MHC 同种异型结合的计算方案来鉴定包含于表位区中的 MHC 配体的序列类似物，其中该序列类似物不再结合 II 型 MHC，或以降低的亲合力与更少数量的 MHC 同种异型结合；以及可选地

(iv) 使用幼稚 T-细胞活化试验和完全覆盖或总体覆盖 EPO 分子中鉴定的表位区的合成肽，在幼稚 T-细胞活化试验中与亲本人 EPO 序列平行地测试该序列类似物。

20. 权利要求 19 的方法，其中当在至少两个独立的供体样品中观察到 2.0 或大于 2.0 的刺激指数 (SI) 时，即发现特定的 T-细胞表位的位置。

促红细胞生成素中的 T-细胞表位

发明领域

本发明涉及免疫学领域。本发明鉴定在人促红细胞生成素 (EPO) 中能够引起免疫反应的决定簇。具体来说, 本发明涉及人 EPO 中 T-细胞表位的鉴定。此外本发明还涉及来自 EPO 的 T-细胞表位肽, 通过这类肽可以构建出具有降低的免疫原性的修饰的 EPO 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 [WO89/09622; EP0239400; EP0438310; WO91/06667]。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 α 2 [Russo, D. 等人 (1996) *Bri. J. Haem.* **94**: 300-305; Stein, R. 等人 (1988)

New Engl. J. Med. **318**: 1409-1413]的治疗性应用。在这些人类蛋白质具有免疫原性的情况下，推测本应在这些受体中针对这些蛋白质发挥作用的免疫耐受遭到了破坏。

最近关于这一问题的显著的例子出现在使用重组人促红细胞生成素（EPO）进行的治疗上。因为能在体内促进红细胞形成，因此 EPO 是一重要的糖蛋白生长因子。此蛋白质被用于治疗透析的贫血病人和其它存在贫血问题的病人。已经证明这一蛋白质在控制贫血症方面对于大多数病人而言是安全有效的。然而，Prabhakar 和 Muhlfelder [Prabhakar, S. & Muhlfelder, T. Clin. Nephrol. **47**: 331-335]在 1997 年描述了一例在高效价抗-EPO 抗体存在时纯红细胞再生障碍的例子。随后报道了多例与抗重组 EPO 抗体形成有关的纯红细胞再生障碍例子。已得出结论，诱导的抗体与内源蛋白质交叉反应导致红细胞的分化被完全阻断（见 Indiveri F. & Murdaca, G 的综述; Rev. Clin. Exp. Hematol. (2002) Suppl. 1: 7-11）。病人只有通过频繁的输血来维持生命，虽然停止治疗后抗体水平有所下降，但约有一半的病人仍然需要输血。

维持对治疗蛋白质（如 EPO）的抗体反应需要刺激 T-辅助细胞增殖和活化。刺激 T-细胞需要在 T-细胞和抗原呈递细胞（APC）之间建立 T-细胞“突触”（synapse）。突触的核心是与 APC 表面上的 II 型 MHC 肽复合物结合的 T-细胞上的 T-细胞受体（TCR）。所述肽来自对抗原性蛋白质的胞内加工。能够通过 II 型 MHC 分子上呈递而刺激 T-细胞活性的来自蛋白质抗原的肽序列被命名为“T-细胞表位”。这种 T-细胞表位通常定义为具有与 II 型 MHC 分子结合的能力的任何氨基酸残基序列。“T-细胞表位”隐含地指如下表位，该表位当与 MHC 分子结合时可由 T 细胞受体（TCR）识别，且至少在原则上可通过与 TCR 啮合导致这些 T-细胞活化以促进 T-细胞反应。可以理解的是，对于许多蛋白质而言，少量的 T-辅助细胞表位能够引起 T-辅助的信号传递，从而导致针对治疗蛋白质表面的决定簇（这可能是一个非常巨大的决定簇集合）的持续、高亲和力的、类别转换的抗体反应。

T-细胞表位的鉴定被认识到是表位消除的第一步，并且十分期望鉴定治疗性蛋白（如 EPO）中的 T-细胞表位。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 同种异型亚群结合的潜力。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。

同样的，测量合成的肽与 II 型 MHC 分子结合能力的体外方法，例如应用具有限定的 MHC 同种异型的 B-细胞系作为 II 型 MHC 结合表面的来源的方法[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] 可以被应用于 II 型 MHC 配体的鉴定。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。

对于读出所检测的肽/蛋白质序列引起免疫反应的能力而言，T-细胞活化的生物学测定法仍是最佳的实践选择方案。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，导致了对毒素中免疫优势表位区域的确定[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）。

在这些方法的一个变通方案中，Hiemstra 等人[Hiemstra, H. S. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci USA **94**: 10313-10318]描述了一种鉴定能够刺激已知 T-细胞的表位肽的方法，这一方法对于检测（自身）抗原未知的自身反应性 T-细胞克隆是有用的。

上述的例子和在 T-细胞体外激活事件的测量（通常是通过测量诱导的增殖反应）问题上涉及技术改变的其它生物分析法大量存在。然而，没有一个方法为检测存在于人源蛋白质中的生物相关表位提供了统一方案，也没有一个方法容易被用于检测对多种 MHC 同种异型群体有意义的表位。本发明提供了一种鉴定人 EPO 中 T-细胞表位肽的方案，并提供了 EPO 类似物，其中所述 T-细胞表位肽与人 II 型 MHC 分子相互作用的能力遭到破坏。

本发明人之前已在 WO 02/062843 中描述了人 EPO 序列中潜在的 II 型 MHC 配体。与本发明不同，公开于 WO 02/062843 的潜在 II 型 MHC 配体数据集仅仅是通过计算方式获得的，它非常大并且代表了全部的潜在 MHC 配体。由于种种原因（如对全长 EPO 蛋白质的蛋白酶水解加工的需要以及其它导致体内呈递 EPO 肽的生理步骤），很清楚在整个肽库中只有一个小的子集最终具有生物相关性，而本发明即是考虑以 EPO T-细胞表位

图的形式来解决本领域的这一缺点。

如先前所述,重组 EPO 被有效的用于治疗慢性肾衰竭导致的贫血。EPO 是参与红系祖细胞成熟为红细胞的糖蛋白激素。天然发生的 EPO 在胎儿期由肝脏产生,而成年由肾产生。此激素进入血液循环,刺激骨髓中红细胞的产生。由于肾衰竭时来自肾的 EPO 产生减少,贫血几乎注定是肾衰竭的结果。先前已对使用重组 DNA 技术生产 EPO 有所描述[Jacobs 等人 Nature, 313: 806-810; Lin, F. -K. 等人(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 7580-7585], 并且根据如描述于 Kirin-Amgen PCT Publication WO 85/02610 的方法和其它例子可以制备出治疗所需的量。

成熟的人 EPO 氨基酸序列含有 166 个氨基酸残基,以单字母密码描述包含以下序列:

```

APPRLICDSRVLEARYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQ
GLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPL
RTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLGKLYTGACRTGDR

```

重组人 EPO (表达于哺乳动物细胞)含有 3 条 N-连接的和 1 条 O-连接的寡糖链,每条链含有末端唾液酸残基。O-连接的寡糖链对于避免 EPO 被肝脏脱唾液酸糖蛋白结合蛋白质从循环中迅速清除是重要的。已开展了若干应用蛋白质的突变修饰来理解分子的结构和功能的研究。例如 Yamaguchi [Yamaguchi, K. 等人(1991) J. Biol. Chem. 266: 20434-20439]、Delorme [Delorme, E. 等人(1992) Biochemistry 31 : 9871-9876] 和 Bill [Bill, R. 等人(1995) Biochim. Biophys. Acta. 1261 : 35-43] 的研究通过替代 N24、N38、N83 和 S126 而关注于蛋白质的 N-连接和 O-连接糖基化位点。这一工作已经表明 EPO 活力需要某些 N-连接糖基化,特别是 N-连接的糖增加 EPO 的表观分子量并延长它的循环半衰期。在 Bill 等人的研究中,用半胱氨酸替代 N24、N38 和 N83 导致功能活力的大大降低。

半胱氨酸替代也被公开于 WO99/03887,其目的是提供添加半胱氨酸的 EPO 变体,以及利用它们通过与半胱氨酸反应的 PEGs 和其它与半胱氨酸反应的部分制备缀合物。此申请教导在 EPO 中某些氨基酸对于生物活力是

非必需的，它们可以被突变成半胱氨酸残基而不改变正常的二硫键模式和分子的整体构象。WO 99/03887 中设想的替代例子包括

S126C, N24C, I25C, T26C, N38C, I39C, T40C, N83C, S84C, A1C, P2C, P3C, R4C, D8C, S9C, T27C, G28C, A30C, E31C, H32C, S34C, N36C, D43C, T44C, K45C, N47C, A50C, K52C, E55C, G57C, Q58C, G77C, Q78C, A79C, Q86C, W88C, E89C, T107C, R110C, A111C, G113C, A114C, Q115C, K116C, E117C, A118C, S120C, P121C, P122C, D123C, A124C, A125C, A127C, A128C, T132C, K154C, T157C, G158C, E159C, A160C, T163C, G164C, D165C, R166C 和 S85C.

本发明公开了 EPO 类似物，其特征在于在上文鉴定的用于掺入游离半胱氨酸的一个或多个位置中进行替代。然而，本发明具体讲授的不是上述计划的替代，也根本不关注适合用 PEG 部分衍生的游离半胱氨酸残基的掺入。

US 专利 4,703, 008 提供天然发生的 EPO 变体和存在于哺乳动物 EPO 蛋白质中的氨基酸替代。

EP0357804 提供包含替代 M54 的 EPO 组合物。优选的替代是 M54L，另一优选的实施方案为在 N38 的替代。M54L 替代被认为会降低 EPO 组合物的氧化敏感性，并将生物合成过程中正亮氨酸的错误掺入降低到最小。

其他人也提供了修饰的 EPO 分子，例子包括 US 5,856, 298 和 US 5,955, 422，但是可以理解的是这些方法和其它例子针对的是如何改善 EPO 的商业生产以及如何影响作为重组分子的蛋白质的糖基化状况。

这些教导都没有认识到 T 细胞表位对蛋白质免疫原性的重要性，也没有设想根据本发明的方案以具体和可控的方式直接影响该性质。

在线性蛋白质序列中 T-细胞表位的出处或位置在这里被称为“表位图”。本发明的一个目的是提供人 EPO 的表位图。

本发明进一步的目的是提供 EPO 类似物，其中先已作图的 T-细胞表位作为 II 型 MHC 配体的功能和/或与 II 型 MHC 分子联合激活 T-细胞的功能受到了损害。提供在诱导人对象的免疫系统方面具有降低的或缺失的潜力的 EPO 是非常需要的。因此本发明的一个特定目的是提供修饰的 EPO 蛋白质，其中通过减少潜在的 T-细胞表位的数量来修饰蛋白质的免疫特

性。

总而言之，本发明涉及以下要点：

- 在幼稚 T-细胞试验中使用一组合成肽来对人 EPO 的免疫原性区域作图；
- 使用从 20 个或更多健康供体中分离的 PBMC 和筛选方法构建 EPO 蛋白质的 T-细胞表位图，该筛选方法涉及的步骤包括：

- i) 使用两个或两个以上肽浓度的合成肽免疫原，使用含有生理比例的 T-细胞和抗原呈递细胞的 PBMC 制品进行培养期多达 7 天的体外抗原刺激；并且 ii) 通过任何适当的方式测量诱导的增殖指数。

- 来自 EPO 的肽序列，其在幼稚 T-细胞试验中能够引起大于 1.8 以及优选大于 2.0 的刺激指数；

- 来自 EPO 的肽序列，其在幼稚 T-细胞试验中具有大于 1.8 以及优选大于 2.0 的刺激指数，其中该肽被最小程度的修饰并测试于幼稚 T-细胞试验，发现具有小于 2.0 的刺激指数；

- 来自 EPO 的肽序列，其与野生型蛋白质序列具有 100% 的氨基酸一致性，并在幼稚 T-细胞试验中能够引起大于或等于 1.8 以及优选大于 2.0 的刺激指数；

- 上文所述的 EPO 肽序列，经修饰后具有与野生型蛋白质序列低于 100% 的氨基酸一致性、当在 T-细胞试验中测试时引起小于 2.0 的刺激指数；

- 含有修饰的肽序列的 EPO 分子，当单独测试于 T-细胞试验时引起低于 2.0 的刺激指数；

- 含有修饰的 EPO 分子，当测试于 T-细胞试验时引起相对于未修饰的蛋白质分子有所降低的刺激指数；

- EPO 分子，已使用 T-细胞试验对其免疫原性区域进行作图，之后进行修饰，以致在重新测试于 T-细胞试验时修饰的蛋白质比亲本（未修饰的）分子引起更小的刺激指数，最优选的低于 2.0 或甚至低于 1.8。

- 具有 EPO 生物活性的修饰分子，当用于体内时其基本上不具有免疫原性或比任何具有相同生物活力的非修饰分子具有更低的免疫原性；

· 上文所述的分子，其中改变是在此处定义为表位区域的连续残基链的一个或多个残基上进行的，所述连续残基链包括下述序列之一：

(a) RVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP,

(b) RGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL, 或

(c) RTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRT

· 上文所述的分子，其中改变是在这里被定义为 R1 表位区并包含如下序列的连续残基链的一个或多个残基上进行的：
AKEAENITTGCAEHCSLNENI;

· 上文所述的分子，其中改变是在这里被定义为 R2 表位区并包含如下序列的连续残基链的一个或多个残基上进行的：
RGQALLVNSSQPWEPLQLHVD;

· 上文所述的分子，其中改变是在这里被定义为 R3 表位区并包含如下序列的连续残基链的一个或多个残基上进行的：
TFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYT;

- 包含来自 R1-R3 序列之任一的 13-15 个连续残基的肽分子；
- 包含来自此处表 1 中任何序列的 13-15 个连续残基的肽分子；
- 与来自 R1-R3 表位区的任何肽序列有超过 80% 的氨基酸一致性的上述肽分子；
- 与来自此处表 1 中所示肽序列的任何肽序列有超过 80% 的氨基酸一致性的上述肽分子；
- 能够结合 II 型 MHC 的上述肽序列；
- 包含具 II 型 MHC 结合活性的上述任何肽或修饰的肽的药物组合物；
- 编码在上文和下文中限定的任何一个特定的修饰分子的 DNA 序列或分子；
- 包含具有 EPO 生物活力的修饰分子的药物组合物；
- 如上文和/或在权利要求中限定的药物组合物，其任选地还包含药物可接受的载体、稀释剂或赋形剂；
- 一种制备具有 EPO 生物学活性的修饰分子的方法，该方法包括下面的步

骤：(i) 确定多肽或其部分的氨基酸序列；(ii) 通过任何方法鉴定蛋白质氨基酸序列中的一个或多个潜在 T-细胞表位，该方法包括用体外或 *in silico* 技术或生物学测定法确定肽与 MHC 分子的结合；(iii) 设计新的序列变体，该变体在鉴定的潜在 T-细胞表位中具有修饰的一个或多个氨基酸，从而如由体外或 *in silico* 技术或生物学测定法通过肽与 MHC 分子的结合所确定的，基本减少或消除这些 T-细胞表位的活性；(iv) 用重组 DNA 技术构建这种序列变体并检验该变体以鉴定一个或多个具有期望性质的变体；和 (v) 可选择地重复步骤 (ii) - (iv)；

· 上文所述的方法，其中步骤 (iii) 是通过在任何一个最初存在的 T-细胞表位中替代、添加或缺失 1-9 个氨基酸残基而实施的；

· 上文所述的方法，其中改变是参照同源蛋白质序列和/或 *in silico* 建模 (*modelling*) 技术而进行的；

· 由上述 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备当用于体内时基本上不具有免疫原性或比任何具有相同生物活力的未修饰分子具有更低的免疫原性的 EPO 中的应用；

· 用于作图定位 EPO 中 T-细胞表位的协同方法，其使用幼稚 T-细胞活化试验和模拟肽配体与一种或多种 MHC 同种异型结合的计算方案；

· 定位 EPO 中 T-细胞表位的方法，包括以下步骤：

i) 使用幼稚 T-细胞活化试验和总体覆盖目的蛋白质序列的合成肽以鉴定能够激活 T-细胞的表位区；

ii) 使用计算方案模拟肽配体与一种或多种 MHC 同种异型的结合以分析步骤 (i) 中鉴定的表位区，从而鉴定表位区中的 II 型 MHC 配体；

iii) 使用计算方案模拟肽配体与一种或多种 MHC 同种异型的结合以鉴定包含于表位区中的 MHC 配体的序列类似物，其中该序列类似物不再结合 II 型 MHC，或者以降低的亲合力与更少数量的 MHC 同种异型结合；

iv) 使用幼稚 T-细胞活化试验和完全覆盖或总体覆盖目的蛋白质中鉴定的表位区的合成肽，并在幼稚 T-细胞活化试验中与野生型 (亲本) 序列平行测试序列类似物。

- 根据上述方案的方法，其中使用 WO 02/069232 讲授的计算方法进行步骤 (ii) 和 (iii)；
- 根据上述方案的方法，其中步骤 (iv) 任选地进行；
- 根据上述方案的方法，使用来自约 20 个或更多个无关联供体的 PBMC 细胞进行幼稚 T-细胞活化试验；
- 根据上述方案的方法，其中，当在两个或两个以上的独立供体样品中观察到约 2.0 的刺激指数值时即发现了 T-细胞表位的位置；
- 根据上述方案的方法，其中，当在两个或两个以上的独立供体样品中观察到约 2.0 的刺激指数值时即发现了 T-细胞表位的位置，并且使用计算系统可以在相同的序列位置鉴定出一个或多个 II 型 MHC 配体；
- 根据上述方案的方法，其中计算系统以 WO 02/069232 中讲授的方法为基础；
- EPO 分子，已使用 T-细胞试验对其免疫原性区进行作图，之后进行修饰，以致在重新于 T-细胞试验中测试时修饰的蛋白质比亲本（未修饰的）分子引起更小的刺激指数，最优的低于 2.0，优选低于 1.8。
- 具有如此处图 4 所描述的结构 EPO 分子。

发明详述

根据本发明的第一个实施方案，提供人 EPO 的 T-细胞表位图。EPO 的 T-细胞表位图可以被用于设计 EPO 类似物，其中使用特定的残基在特定的位置进行氨基酸替代，以使蛋白质的一个或多个潜在 T-细胞表位的活性基本上降低或消除。本发明提供在亲本分子最具免疫原性的区域进行适当替代的例子，这些替代被认为是本发明的实施方案。

共有的申请 WO 02/062843 已在之前给出了包含所有可能 II 型 MHC 配体的 EPO 衍生肽数据集，并提示了能够损害每个肽行使 II 型 MHC 配体功能的能力的氨基酸替代。WO 02/062843 公布于 2002 年 8 月 15 日，在此整体引入作为参考。WO 02/062843 申请使用 *in silico* 技术来确定 II 型 MHC 配体，但由于蛋白酶水解加工的需要以及其它导致体内免疫原性肽

呈递的生理步骤等原因，很清楚在整个肽库中将只有一个相对小的子集最终具有生物相关性。本发明人已经确立，离体人 T-细胞活化试验可以被用于鉴定 EPO 蛋白质序列中能够支持 T-细胞活化并由此与该蛋白质的免疫原性最具生物相关性的区域。此处公开的人 EPO 表位图来自此方法的应用，公开的方法因此也是本发明的一个实施方案。

根据此方法，测试合成的肽在体外培养的人 T-细胞中引起增殖反应的能力。T-细胞存在于外周血单个核细胞 (PBMC) 层中，PBMC 易于通过已知方法从全血样品中获得。此外，PBMC 制品含有生理比例的 T-细胞和抗原呈递细胞，因此是进行体外替代免疫反应的良好材料来源。本发明人已确立在此测定试验的操作中，紧靠 2.0 或大于 2.0 的刺激指数是对所诱导的增殖作用的有用量度。刺激指数 (SI) 常规地通过用在有测试的肽时测量到的增殖分数 (例如如果应用 ^3H -胸苷掺入则为每分钟的放射性计数) 除以在不与测试的肽接触的细胞中测量到的增殖分值而获得。虽然实际上 0.8-1.2 范围的 SI 值都是不值得注意的，但没有引起反应的肽被给定为 SI = 1.0。可以在这类试验的操作中加入多个技术程序以确保记录值的可信度。通常，所有的测定至少平次 3 次进行并且可以计算平均值。当计算出的 SI \geq 2.0 时，可以对 3 次平行试验的各值进行检查，以查明是否存在偏远数据(outlying data)。测试的肽以至少两个不同的浓度与细胞接触，而这些浓度通常至少跨越两倍浓度差异。这样一种浓度范围对试验的动力学维度提供了补偿 (off-set)，对于进行单一时间点的测定 (例如在正 7 天) 特别重要。在一些试验中可以进行多个时程测定，但是无论如何也需要使用至少以两个不同浓度提供的肽免疫原来作出确定。

相似的，在每一测定平板中可以包括预计多数 PBMC 供体样品会与之反应的对照肽。虽然可以使用许多其它例子，流感血凝素肽 307-309 (序列为 PKYVKQNTLKLA) 和衣原体 HSP 60 肽 (序列 KVVDQIKKISKPVQH) 仍是特别适宜的对照肽。试验也优选使用预计所有的 PBMC 样品会对其表现出显著高于 2.0 的 SI 的有效全蛋白质抗原，如匙孔槭血蓝蛋白 (hemocyanin from Keyhole Limpet)。

特别需要提供人 EPO 表位图, 其中该图与多种潜在 MHC 同种异型具有相关性。图谱需要具有足够的代表性, 以允许设计或选择修饰的蛋白质, 对于可能被施予该修饰的蛋白质的病人的大多数而言, 其引起 T-细胞驱动的免疫反应的能力被消除或至少减弱了。因此在筛选过程中, 从具有足够免疫多样性的供体库收集来源于幼稚供体的 PBMC 衍生 T-细胞, 从而提供具有人类群体中现有全部 II 型 MHC (HLA-DR) 中的至少 90% 以上的样品。检测针对给定合成肽的幼稚 T-细胞反应时, 肽实际上与来自多个供体的 PBMC 制品分开接触, 为了实用的目的, 供体的数量 (或“供体库”大小) 不能少于 20 个无关联的个体, 并且可以根据 II 型 MHC 单元型对供体库中的所有样品进行预选择。

本发明上下文中的术语“幼稚供体”的意思是来自没有接受过任何治疗性 EPO 或外源性 EPO 的个体的 T 细胞。

本发明此处公开了一种使用免疫幼稚 T-细胞对 T-细胞表位作图的方法。T-细胞来自多个不同健康供体的外周血样品, 对于供体而言目的蛋白质可能是内源分子, 但是该供体没有接受过任何外来 (如治疗施用的) 的目的蛋白质。使用体外培养的 PBMC, 按照本领域通常的程序进行试验, 包括将 PBMC 与代表目的蛋白质的合成肽种类相接触, 适当时期的孵育之后测量肽诱导的 T 细胞活化 (如细胞增殖)。可以通过任何合适的方式进行测量, 例如可以通过掺入 ^3H -胸苷来进行, 由此使用实验室工具能够容易的测量细胞材料中积累的 ^3H 。检测每一个 PBMC 样品和合成肽的组合引起的细胞增殖程度, 与未用肽处理的 PBMC 样品中所观测到的结果相对比。也可以参照用具有预期增殖效果的肽 (一种或多种) 处理后所见到的增殖反应。在这一点上, 使用已知具有广泛 MHC 限制的肽, 特别是对 DP 或 DQ 同种型具有 MHC 限制的肽表位被认为特别有利。

为了便于装配人 EPO 表位图, 产生了一套合成肽。每一肽具有 15 个氨基酸残基的长度并且与系列中的下一个肽重叠 12 个氨基酸残基; 即系列中每一个后续的肽递增地向分析中添加另 3 个氨基酸。通过这种方式, 任何给定的毗邻的两肽能对 18 个氨基酸的连续序列作图。对于 EPO 而言,

能够扫描完整的成熟蛋白质需要总共 51 个肽。实施例 1 中提供了一种使用幼稚 T-细胞试验定义 EPO 的 T-细胞图的特别有效的方法。

本研究公开了 16 个能够引起显著增殖反应的肽序列。这些肽被列于表 1 并且是本发明的一个实施方案。在这一套肽中，鉴定了进一步的肽子集，这一子集中的每个肽都能够在 2 个或更多的独立供体样品中引起显著的增殖反应。这些肽被列于表 2 并且是本发明进一步的实施方案。

表 1:

能够刺激离体人 T 细胞的 EPO 肽序列

| 肽 ID # | 残基 # | 肽序列 |
|--------|------|------------------|
| P4 | 10 | RVLERYLLEAKEAEN |
| P7 | 19 | AKEAENITTGCAEHC |
| P8 | 22 | AENITTGCAEHCSLN |
| P9 | 25 | ITTGCAEHCSLNENI |
| P10 | 28 | GCAEHCSLNENITVP |
| P16 | 46 | VNIFYAWKRMEVGGQA |
| P26 | 76 | RGQALLVNSSQPWEP |
| P27 | 79 | ALLVNSSQPWEPLQL |
| P28 | 82 | VNSSQPWEPLQLHVD |
| P32 | 94 | HVDKAVSGLRSLTTL |
| P41 | 122 | PDAASAAPLRTITAD |
| P44 | 131 | RTITADTFRKLFRVY |
| P46 | 137 | TFRKLFRVYSNFLRG |
| P47 | 140 | KLFRVYSNFLRGKLK |
| P48 | 143 | RVYSNFLRGKCLKLYT |
| P50 | 149 | LRGKCLKLYTGEACRT |

表 2:

能够刺激来自两个或更多个供体样品的离体人 T 细胞的 EPO 肽序列

| 肽 ID # | 残基 # | 肽序列 | 表位区 |
|--------|------|-----------------|-----|
| P7 | 19 | AKEAENITTGCAEHC | R1 |
| P8 | 22 | AENITTGCAEHCSLN | |
| P9 | 25 | ITTGCAEHCSLNENI | |
| P26 | 76 | RGQALLVNSSQPWEP | R2 |
| P46 | 137 | TFRKLFVYSNFLRG | R3 |
| P47 | 140 | KLFRVYSNFLRGKLK | |
| P50 | 149 | LRGKLKLYTGEACRT | |

鉴定于表 1 的每一个肽被提示能结合 II 型 MHC 并以足够的亲和力与至少一个关联 TCR 结合以引起在试验系统中可以检测到的增殖爆发。对于表 2 中的肽而言，使用来自两个或 3 个无关联 PBMC 样品的 PBMC 已经达到这些严格的标准。这些肽被认为包括分子的主要表位区并在 EPO 序列中簇集到这里命名为 R1、R2 和 R3 表位区的 3 个区域。

R1 表位区由肽 P7、P8 和 P9 所覆盖，包含序列 AKEAENITTGCAEHCSLNENI。R2 表位区由肽 P26 所覆盖，包含序列 RGQALLVNSSQPWEP。值得注意的是对 R2 表位而言，后续的肽 P27 和 P28 也各与一个 PBMC 供体样品具有反应性。对于 P27 肽，该供体也与 P26 肽反应，可能是由位于 R2 中的单一共同核心序列负责这一刺激。由于每一连续的肽在序列中所处的相位，因此可能同一九聚体核心序列被两个或 3 个相邻的肽所共享（即共有）。确切的相位取决于与 N 端的接近度，以及肽的长度和每一次连续序列递增所涉及的“新”残基数目。对于 R2 表位而言，表位区域的 C 末端边界被设定为包括肽 P27 和 P28 所覆盖的序列，相当重要的原因是该区域在其 C-末端区被证实含有有意义的 II 型 MHC 配体（见后面和图 2）。因此，R2 表位区由序列 RGQALLVNSSQPWEPLQLHVD 限定。

R3 表位区由肽 P46 和 P47 覆盖，并向 EPO 序列的 C-末端延伸。R3

表位的 C 末端边界由 EPO 蛋白质的天然末端限定, 值得注意的是, 肽 P50 也与两个供体样品具有反应性, 这些供体与和肽 P46 和 P47 反应的供体相同。R3 表位的核心被认为包含序列 TFRKLFVYSNFLRGKLIK, 但是另一 II 型 MHC 配体, 已知反应性肽包含重叠的 P50 肽序列 LRGKLIKLYTGEACRT, 这就得出整个 R3 序列包含 TFRKLFVYSNFLRGKLIKLYT。

此处公开的肽序列是构建一个或多个表位被破坏的修饰的 EPO 分子所需的关键信息。根据本发明的方案, 通过突变破坏表位, 导致序列不再具有作为 T-细胞表位的功能。可以使用重组 DNA 方法来完成对目的序列的定向诱变, 许多这类技术可在本领域获得, 并且是本领域所熟知的。

当本发明目的是对至少一个或多个上述表 1 中列出的肽进行氨基酸序列修饰时, 最优选的是修饰表 2 中的一个或多个肽的序列。此处公开了适宜的修饰, 它们可以降低或消除所述肽序列在作为一种或多种 II 型 MHC 同种异型的配体水平上行使 T-细胞表位功能的能力。一套这种合适的修饰被提供于图 4。

根据第二个实施方案, 对蛋白质合适的修饰可能包括对特定残基或残基组合的氨基酸替代。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 结合沟所提供的的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“P1”或“P1 锚”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体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成较不易于容纳于口袋中的残基, 如替代为更亲水的残基。肽中位于与 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。

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。可以参考同源结构或使用本领域已知的 *in silico* 技术产生的结构方法进行替代并且可基于分子已知的结构特征进行。在这一点上，存在于 Protein Data Bank 中的 EPO 晶体结构模型特别有用 [PDB ID : 1CN4; Syed, R. 等人(1998) *Nature* 395 :511-516]。可以考虑通过改变来恢复变体分子的结构或生物活力。此种补偿性的改变和变化也可包括向多肽缺失或加入特定的氨基酸残基。

从蛋白质分子中除去表位的一种别有效的手段是协同使用如这里所概括的幼稚 T-细胞活化试验和根据描述于共有申请 WO 02/069232 的方案发展的 *in silico* 工具，WO 02/069232 也在此被整体引入作为参考。

软件在肽与 II 型 MHC 结合相互反应的水平模拟抗原呈递过程，以便为任何给定的肽序列提供结合分值。这类结合分值是针对群体中现有的许多主要的 II 型 MHC 同种异型确定的。因为这一方案可以测定任何肽序列，所以可以预测氨基酸替代、增加或缺失后对于肽与 II 型 MHC 结合沟反应的能力的影响。因此可以设计含有数目减少的能与 II 型 MHC 反应（由此作为免疫原性 T-细胞表位）的肽的新序列组合物。当使用任何一个给定供体样品的生物试验能够最多评估与四种 DR 同种异型的结合时，在 *in silico* 方法中能够同时使用超过 40 种的同种异型测试同样的肽序列。实际上这一方法能够指导设计出与多种 MHC 同种异型反应的能力受损的新序列变体。

T-细胞试验能够在分子中限定出 R1-R3 这 3 个免疫原性区域，根据 WO 02/069232 的方案软件系统能够鉴定每一表位中预测的 II 型 MHC 配体。此外，此系统还能够鉴定表位中导致肽序列与系统中基本上所有 II 型 MHC 同种异型的结合亲和力均显著丧失的氨基酸替代。

通过破坏 R1 表位区提供了这样一套修饰的一个例子。I25A 和 L35A 的替代组导致 R1 表位中主要的 II 型 MHC 配体受损。

相似的，对于被鉴定的位于 R2 表位区的 II 型 MHC 配体而言，V82A、Q88W、L91G、L93P 和 V95A 替代是示例性的可行改变。

对于 R3 表位区，鉴定了一系列重叠的 MHC 配体。合适的替代系列包括以下一个或多个改变：L141T, F142A, V144T, Y145P, F148A, L149S 和/或 L153A。在以上所有例子中，基于给定的肽与 II 型 MHC 结合沟结合的能力以及根据对 EPO 晶体结构模型检测的结构考虑[PDB ID :1CN4 ; Syed, R.等人(1998) *Nature* 395 : 511-516]可以识别其它的突变组。

上述每一个替代都是本发明方法的示例和本发明方案下的优选组合物。就如本领域技术人员将会清楚的，可以获得许多可选的替代组来实现除去不需要的表位的目的。然而，应认识到产生的序列与这里公开的具体组合物紧密同源并因此属于本发明的范围。因为 C 末端精氨酸在翻译后被去除的缘故，EPO 的成熟蛋白质形式可能含有 165 或 166 个氨基酸。D165 是 165 个氨基酸形式的 C 末端，R166 是 166 个氨基酸形式的 C 末端氨基酸。这里描述的 EPO 类似物可以包含 EPO 的 165 或 166 个氨基酸形式。

使用 *in silico* 工具鉴定 II 型 MHC 配体和设计缺少 II 型 MHC 配体的序列类似物并协同地进行表位作图和再次检测（任选地使用生物学基础的 T-细胞活化试验），这一组合方法是本发明特别有效的方法和最优的实施方法。根据这一实施方案的一般方法包括以下步骤：

- i) 使用幼稚 T-细胞活化试验和总体覆盖目的蛋白质序列的合成肽以鉴定能够激活 T-细胞的表位区；
- ii) 使用计算方案模拟肽配体与一种或多种 MHC 同种异型的结合以分析步骤 (i) 中鉴定的表位区，从而鉴定表位区中的 II 型 MHC 配体；
- iii) 使用计算方案模拟肽配体与一种或多种 MHC 同种异型的结合以鉴定包含于表位区中的 MHC 配体的序列类似物，其中该序列类似物不再结合 II 型 MHC，或者以降低的亲合力与更少数量的 MHC 同种异型结合，以及任选地；
- iv) 使用幼稚 T-细胞活化试验和完全覆盖或总体覆盖目的蛋白质中鉴定的表位区的合成肽，在幼稚 T-细胞活化试验中与野生型（亲本）序列平行测

试序列类似物。

术语“T-细胞表位”根据本发明的理解指能够结合 II 型 MHC、能够刺激 T-细胞和/或也能够以和 II 型 MHC 复合的形式结合 T-细胞（但不一定可测量地活化 T 细胞）的氨基酸序列。

如在此处和在所附权利要求中所用的，术语“肽”是包括两个或多个氨基酸的化合物。氨基酸是通过肽键（在下文中定义）连接在一起的。有 20 种不同的天然存在的氨基酸参与肽的生物学生产，且可以将任何数目的氨基酸以任何顺序连接而形成肽链或环。在肽的生物学生产中应用的天然存在的氨基酸均具有 L-构型。合成的肽可采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氨基酸的各种组合来制备。一些肽仅含有少数的氨基酸单位。短肽，如少于 10 个氨基酸单位的肽有时称为“寡肽”。其他肽含有大数目的氨基酸残基，如多达 100 个或更多，并称为“多肽”。按惯例，“多肽”可认为是含有 3 个或更多个氨基酸的肽链，而“寡肽”通常认为是特殊类型的“短”多肽。因而，如在此处所用的，可以理解的是只要提及到“多肽”也包括寡肽。进一步地，只要提及“肽”即包括多肽、寡肽和蛋白质。氨基酸的每一种不同排列形成了不同的多肽或蛋白质。可形成的多肽的数目及由此不同蛋白质的数目实际上是无限的。

可以通过若干方法中的任何一种制备本发明 EPO 分子，但是最优的是使用常规重组方法。使用这里提供的蛋白质序列和信息来推导编码任何优选蛋白质序列的多核苷酸（DNA）是相对容易的程序。例如可以使用如 DNSstar 软件包[DNASTAR Inc, Madison, WI, USA]或相似的计算机软件工具来实现这一点。任何具有编码本发明优选多肽或其显著同源物能力的这类 DNA 序列都应该被认为是本发明的实施方案。

作为一般的方案，可以使用基因合成来制备编码任何 EPO 蛋白质序列的基因并克隆进合适的表达载体。接着将表达载体引入宿主细胞，选择细胞并培养。从培养基中纯化优选的分子并配制成用于治疗施用的制剂。可替代的是，可以例如按照 cDNA 克隆策略，使用从合适的肝或肾组织或人细胞系中制备的 RNA，获得野生型 EPO 基因序列。该野生型基因可以用

作诱变和构建优选的变体序列的模板。在这一点上，虽然可以容易的应用其它方法和系统，但是使用 Higuchi 等人描述的“重叠延伸 PCR”策略 [Higuchi 等人(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:7351]特别方便。然后通过传统的方式在选择的宿主细胞系统中表达改变的编码 DNA，并从宿主细胞系统中回收目的 EPO 并纯化。本领域熟知合适的宿主细胞、纯化和试验方案，包括 WO 85/02610、WO 86/03520、WO 99/03887、EP0357804 中提供的任何方案或其它例子。

通过重组 DNA 技术可以完成对 EPO 分子的组建，这可以包括将 EPO 分子与其它蛋白质结构域（如抗体恒定区）融合。纯化和操作重组蛋白质（包括融合蛋白质）的方法是本领域熟知的。在文献中有对必要技术的充分解释，如“*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”，第二版(Sambrook 等人, 1989); “*Oligonucleotide Synthesis*” (M. J. Gait 编辑, 1984); “*Animal Cell Culture*” (R.1. Freshney 编辑, 1987); “*Methods in Enzymology*” (Academic Press, Inc.); “*Handbook of Experimental Immunology*” (D. M. Weir & C. C.Blackwell 编辑); “*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*” (J. M. Miller & M. P. Calos 编辑, 1987); “*Current Protocols in Molecular Biology*” (F. M. Ausubel 等人编辑, 1987); “*PCR : The Polymerase Chain Reaction*”, (Mullis 等人编辑, 1994); “*Current Protocols in Immunology*” (J. E. Coligan 等人编辑, 1991).

就本发明涉及修饰的 EPO 而言，含有这类修饰的 EPO 蛋白质或修饰的 EPO 蛋白质的片段的组合物以及相关组合物也应该被认为属于本发明的范围。在这一方面一个相关的例子可能是开发肽介导的耐受诱导策略，其中为了免疫治疗的目的，一个或多个公开的肽被施用于病人。因此，合成的肽分子（如列于表 1 的一个或多个肽，或更优选地包含上述表位区 R1-R3 中任何一个的全部或部分及在表 2 中描述的序列）被认为是本发明的实施方案。

在另一方面，本发明涉及编码修饰的 EPO 实体的核酸。本发明进一步的方面涉及将修饰的 EPO 蛋白质用于人的治疗处理的方法。在这一方面，

修饰的 EPO 可以作为重组融合蛋白质生产。

本发明将通过以下实验性的实施例来举例说明。实施例参照以下附图：

图 1 是对被鉴定位于 R1 表位区的 II 型 MHC 配体的描述。使用实施例 2 的 *in silico* 系统鉴定配体。在此图中，18 种人 DR 同种异型的结合情况以柱型图展示。检测的配体是 13 聚体，每一个 13 聚体的第一位残基通过带色块标识。每个肽与 18 种同种异型中每一种的结合反应强度（高、中或低）根据展示的图解指示。

图 2 是对被鉴定位于 R2 表位区的 II 型 MHC 配体的描述。使用实施例 2 的 *in silico* 系统鉴定配体。在此图中，18 种人 DR 同种异型的结合情况以柱型图展示。检测的配体是 13 聚体，每一个 13 聚体的第一位残基通过带色块标识。每个肽与 18 种同种异型中每一种的结合反应强度（高、中或低）根据展示的图解指示。

图 3 是对被鉴定位于 R3 表位区的 II 型 MHC 配体的描述。使用实施例 2 的 *in silico* 系统鉴定配体。在此图中，18 种人 DR 同种异型的结合情况以柱型图展示。检测的配体是 13 聚体，每一个 13 聚体的第一位残基通过带色块标识。每个肽与 18 种同种异型中每一种的结合反应强度（高、中或低）根据展示的图解指示。

图 4 描述一种最优选的 EPO 结构，其中通过在 R1、R2 和 R3 表位区内的替代而消除了 II 型 MHC 配体。

实施例 1

MHC、肽和 T-细胞受体 (TCR) 之间的相互作用为 T-细胞识别的抗原特异性提供了结构基础。T-细胞增殖试验检验肽与 MHC 的结合和 TCR 对 MHC/肽复合物的识别。本实施例的体外 T-细胞增殖测定法涉及对外周血单个核细胞 (PBMC) 的刺激，该外周血单个核细胞含有抗原呈递细胞 (APC) 和 T-细胞。刺激是在体外用合成的肽抗原进行的，且在一些实验中是用完整的蛋白质抗原进行的。刺激的 T-细胞增殖是用 ^3H -胸苷 (^3H -Thy) 测量的，其中掺入的 ^3H -Thy 通过对洗涤后的固定细胞进行闪烁计数来估计。

来自贮存少于 12 小时的人血液的白细胞层从国家血液服务部门 (National Blood Service) (Addenbrooks Hospital, Cambridge, 英国) 获得。Ficoll-paque 从 Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, 英国) 获得。无血清 AIM V 培养基从 Gibco-BRL (Paisley, 英国) 获得, 该培养基用于原代人淋巴细胞的培养并含有 L-谷氨酰胺、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentomycin 和 0.1% 的人血清清蛋白。合成的肽从 Pepscan(荷兰)和 Babraham Technix (Cambridge, 英国) 获得。红细胞和白细胞是通过对白细胞层的轻轻离心而从血浆和血小板中分离的。移走并丢弃上层相 (含有血浆和血小板)。使红细胞和白细胞在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中进行 1:1 的稀释, 然后铺在 15 ml ficoll-paque (Amersham Pharmacia, Amersham 英国) 上。根据制造商建议的条件进行离心, 并从血清+PBS/ ficoll paque 界面收获 PBMC。使 PBMC 与 PBS 混合 (1: 1) 并通过离心收集。移走并丢弃上清液, 且将 PBMC 沉淀重悬于 50 ml PBS 中。再次通过离心使细胞沉淀, 并丢弃 PBS 上清液。将细胞用 50 ml AIM V 培养基重悬, 并在此时进行细胞计数并用锥虫蓝染料排除法进行生存力的估计。再次通过离心收集细胞并丢弃上清液。将细胞重悬并以每 ml 3×10^7 的密度进行低温贮存。贮存培养基是 90% (v/v) 热失活的 AB 人血清 (Sigma, Poole, 英国) 和 10% (v/v) DMSO (Sigma, Poole, 英国)。将细胞转移到有调控的冷冻容器 (Sigma) 中并于 -70°C 放置过夜, 之后转移至液氮中长期保存。当需要使用时, 将细胞在转移到 10 ml 预热的 AIM V 培养基中之前于 37°C 水浴中快速解冻。

PBMC 以每孔 2×10^5 个 PBMC 的密度在 96 孔的平底平板上用蛋白质和肽抗原刺激。在用 ^3H -Thy (Amersham-Pharmacia, Amersham 英国) 进行脉冲之前, 使 PBMC 于 37°C 温育 7 日。对于本研究, 制备了相继重叠 12 个氨基酸的合成肽 (15 聚体), 它们跨越 EPO 的整个序列。肽标识号 (ID#) 和序列显示于表 3。

每一个肽都单独地针对从 20 个幼稚供体中分离的 PBMC 进行筛选。在每一个供体测定试验中都应用先前已证明具有免疫原性的两个对照肽和有效的非回忆性抗原 KLH。

在这一研究中使用的对照抗原是 Flu 血凝素 307-319 (序列: PKYVKQNTLKLAT); 衣原体 HSP 60 肽(序列: KVDQIKKISKPVQH) 和匙孔血蓝蛋白。

表 3 EPO 肽

| 肽 ID # | EPO; 15mer 肽序列 | 残基 # |
|--------|-----------------|------|
| P1 | APPRLICDSRVLERY | 1 |
| P2 | RLICDSRVLERYLLE | 4 |
| P3 | CDSRVLERYLLEAKE | 7 |
| P4 | RVLERYLLEAKEAEN | 10 |
| P5 | ERYLLEAKEAENITT | 13 |
| P6 | LLEAKEAENITTGCA | 16 |
| P7 | AKEAENITTGCAEHC | 19 |
| P8 | AENITTGCAEHCSLN | 22 |
| P9 | ITTGCAEHCSLNENI | 25 |
| P10 | GCAEHCSLNENITVP | 28 |
| P11 | EHCSLNENITVPDTK | 31 |
| P12 | SLNENITVPDTKVNF | 34 |
| P13 | ENITVPDTKVNFYAW | 37 |
| P14 | TVPDTKVNFYAWKRM | 40 |
| P15 | DTKVNFYAWKRMEVG | 43 |
| P16 | VNFYAWKRMEVGQQA | 46 |
| P17 | YAWKRMEVGQQAVEV | 49 |
| P18 | KRMEVGQQAVEVWQG | 52 |
| P19 | EVGQQAVEVWQGLAL | 55 |
| P20 | QQAVEVWQGLALLSE | 58 |
| P21 | VEVWQGLALLSEAVL | 61 |
| P22 | WQGLALLSEAVLRGQ | 64 |
| P23 | LALLSEAVLRGQALL | 67 |
| P24 | LSEAVLRGQALLVNS | 70 |
| P25 | AVLRGQALLVNSSQP | 73 |
| P26 | RGQALLVNSSQPWEP | 76 |
| P27 | ALLVNSSQPWEPLQL | 79 |
| P28 | VNSSQPWEPLQLHVD | 82 |
| P29 | SQPWEPLQLHVDKAV | 85 |
| P30 | WEPLQLHVDKAVSGL | 88 |
| P31 | LQLHVDKAVSGLRSL | 91 |
| P32 | HVDKAVSGLRSLTTL | 94 |
| P33 | KAVSGLRSLTTLRA | 97 |
| P34 | SGLRSLTTLRALGA | 100 |
| P35 | RSLTTLRALGAQKE | 103 |
| P36 | TTLRALGAQKEAIS | 106 |
| P37 | LRALGAQKEAISPPD | 109 |
| P38 | LGAQKEAISPPDAAS | 112 |
| P39 | QKEAISPPDAASAAP | 115 |
| P40 | AISPPDAASAAPLRT | 118 |
| P41 | PDAASAAPLRTITAD | 122 |
| P42 | ASAAPLRTITADTFR | 125 |
| P43 | APLRTITADTFRKLF | 128 |
| P44 | RTITADTFRKLFVY | 131 |
| P45 | TADTFRKLFVYSNF | 134 |
| P46 | FRKLFVYSNFLRG | 137 |
| P47 | KLFRVYSNFLRGKLK | 140 |
| P48 | RVYSNFLRGKLYT | 143 |
| P49 | SNFLRGKLYTGEA | 146 |
| P50 | LRGKLYTGEACRT | 149 |
| P51 | KLKLYTGEACRTGDR | 152 |

将肽在 DMSO 中溶解至 10 mM 的终浓度，然后将这些贮存液在 AIM V 培养基中 1/500 稀释（终浓度 20 μ M）。将肽添加到平底 96 孔板上以得到 100 μ l 中 2 和 20 μ M 的终浓度。解冻的 PBMC 的生存力通过锥虫蓝染料排除法进行估计，然后将细胞以 2×10^6 个细胞/ml 的密度进行重悬，并将 100 μ l (2×10^5 个 PBMC/孔) 转移到含有肽的每一个孔中。在每一个肽浓度重复对三个孔的细胞培养物进行测定。将平板在 5% CO₂ 的潮湿空气中于 37°C 温育 7 日。在滤器垫上收获细胞之前用每孔 1 μ Ci 的 ³H-Thy 对细胞脉冲 18-21 小时。CPM 值用 Wallac 小平板 β 顶部平板计数器 (Wallac microplate beta top plate counter) (Perkin Elmer) 测定。结果表示为刺激指数 (SI)，其中刺激指数 (SI) 通过用在有测试的肽时测量到的增殖分数 (例如每分钟的放射计数) 除以在不与测试的肽接触的细胞中测量到的分数而获得。

使用 T-细胞增殖试验对 EPO 序列中的 T 细胞表位作图，导致鉴定出 R1、R2 和 R3 这 3 个免疫原性区。能在至少一个 PBMC 供体样品中刺激显著反应的肽被列于表 1。能在两个或更多个 PBMC 供体样品中刺激显著反应的肽被列于表 2。反应性供体对 EPO 肽的同种异型限制被示于表 4。

表 4

| 肽 ID # | 肽序列 | 反应性同种异型 |
|--------|-----------------|--|
| P4 | RVLERYLLEAKEAEN | DRB1*11, DRB1*0103, DRB3 |
| P7 | AKEAENITTGCAEHC | DRB1*04, DRB1*07, DRB4*01 DRB1*01, DRB1*08 DRB1*10, DRB1*13, DRB3 |
| P8 | AENITTGCAEHCSLN | DRB1*01, DRB1*08 DRB1*10, DRB1*13, DRB3 DRB1*11, DRB1*15, DRB3, DRB5 |
| P9 | ITTGCAEHCSLNENI | DRB1*01, DRB1*08 DRB1*10, DRB1*13, DRB3 |

| | | |
|-----|------------------|--|
| P10 | GCAEHCSLNENITVP | DRB1*01, DRB1*08 |
| P16 | VNFYAWKRMEVGGQA | DRB1*11, DRB1*0103, DRB3 |
| P26 | RGQALLVNSSQPWEP | DRB1*10, DRB1*13, DRB3 DRB1*11, DRB1*15, DRB3, DRB5 |
| P27 | ALLVNSSQPWEPLQL | DRB1*11, DRB1*15, DRB3, DRB5 |
| P28 | VNSSQPWEPLQLHVD | DRB1*10, DRB1*13, DRB3 |
| P32 | HVDKAVSGLRSLTTL | DRB1*04, DRB1*07, DRB4*01 |
| P41 | PDAASAAPLRTITAD | DRB1*15, DRB1*0103, DRB5 |
| P44 | RTITADTFRKLFVY | DRB1*11, DRB1*0103, DRB3 |
| P46 | TFRKLFVYSNFLRG | DRB1*13, DRB1*14 or DRB1*14 only, DRB3 DRB1*11, DRB1*0103, DRB3 |
| P47 | KLFRVYSNFLRGKLGK | DRB1*13, DRB1*14 or DRB1*14 only, DRB3 DRB1*11, DRB1*0103, DRB3 |
| P48 | RVYSNFLRGKLGKLYT | DRB1*11, DRB1*0103, DRB3 |
| P50 | LRGKLGKLYTGEACRT | DRB1*13, DRB1*14 or DRB1*14 only, DRB3 DRB1*11, DRB1*0103, DRB3 |

实施例 2

设计具有改善的免疫原性性质的修饰的 EPO 序列：

共有申请 WO 02/069232 的方法被用于分析 R1、R2 和 R3 表位区。此系统能够预测包含于生物学方法检测的表位区中的具体 MHC 配体并对给定的 II 型 MHC 配体与特定的 MHC 同种异型反应的能力提供“分值”。

可以使用如在附图 1-3 中针对 R1-R3 表位区中的每一个所提供的同种异型限制展示图来描述 MHC 配体的同种异型限制模式。

此分析被拓展到对 R1-R3 表位中每一个的内部序列修饰进行考虑。测试序列变体继续与 II 型 MHC 结合的能力和它们保留的结合分值。确定了多个氨基酸替代，这些替代消除了与测试的大多数 MHC 同种异型的 II 型 MHC 结合。进一步测试所鉴定的特定替代容纳于 EPO 分子结构模型 [PDB ID :1CN4 ; Syed, R.等人(1998) Nature 395: 511-516] 中的能力。针对野生型序列的选定残基上设计的突变，检测空间抵触 (steric clashes)、氢键形成、疏水作用和结构中的一般适应性。导致空间抵触的替代被摒弃。

对于侧链采纳与原来的残基相似的构型（旋转异构体）时被容纳的替代，被认为是可以接受的。如果不止一个替代符合这些标准，则与相邻侧链或骨架原子潜在形成氢键、和/或形成有利的疏水接触或其它联系的残基是优选的。使用 Swiss Prot Deep View v3.7 [Guex, N.和 Peitsch, M. C. (1997) *Electrophoresis* **18**:2714-2723] 互动完成了上述操作。此方法针对 R1-R3 的每一个表位区产生了一组优选的替代。将这些替代组汇集起来产生描述于图 4 的结构。所有的替代均被证实导致位于 R1-R3 表位区中的 II 型 MHC 配体的去除。

含有根据上述方案的最优选替代组的 EPO 结构被描述于下文和图 4。

```
APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENX1TTGCAEHCSX2NENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQ
QAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPX3EPX4QX5HX6DKAVSGLRSLTLLLRALGAQ
KEAISPDAASAAPLRTITADTFRKX7X8RX9X10SNX11X12RGKX13KLYTGEACRTGDR
```

其中

$X^1 = A$, 但也可考虑 G 或 P;

$X^2 = A$, 但也可考虑 D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^3 = T$, 但也可考虑 A 和 G;

$X^4 = A$, 但也可考虑 P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^5 = A$, 但也可考虑 P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^6 = A$, 但也可考虑 P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^7 = T$;

$X^8 = A$, 但也可考虑 P 和 G;

$X^9 = T$;

$X^{10} = P$, 但也可考虑 A 和 G;

$X^{11} = A$, 但也可考虑 P 和 G;

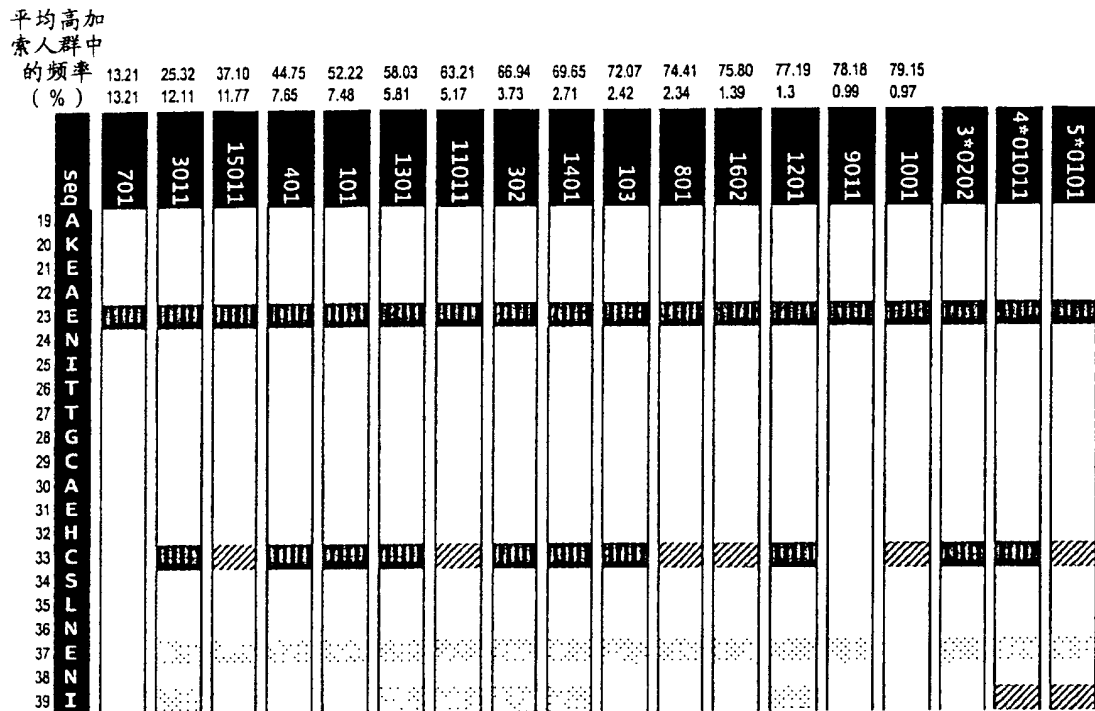
$X^{12} = S$, 但也可考虑 A、D、E、G、H、K、N、P、Q、R 和 T;

$X^{13} = A$, 但也可考虑 D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

并且同时排除 $X^1 = I$ 、 $X^2 = L$ 、 $X^3 = W$ 、 $X^4 = L$ 、 $X^5 = L$ 、 $X^6 = V$ 、 $X^7 = I$ 、 $X^8 = F$ 、 $X^9 = V$ 、 $X^{10} = Y$ 、 $X^{11} = F$ 、 $X^{12} = L$ 和 $X^{13} = L$ 。

作为优选的实施方案，根据本发明提供修饰的 EPO 分子，其中

$X^1 = A$ 、 $X^2 = A$ 、 $X^3 = T$ 、 $X^4 = A$ 、 $X^5 = A$ 、 $X^6 = A$ 、 $X^7 = T$ 、 $X^8 = A$ 、 $X^9 = T$ ； $X^{10} = P$ 、 $X^{11} = A$ 、 $X^{12} = S$ 和 $X^{13} = A$ 。



图注

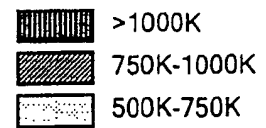
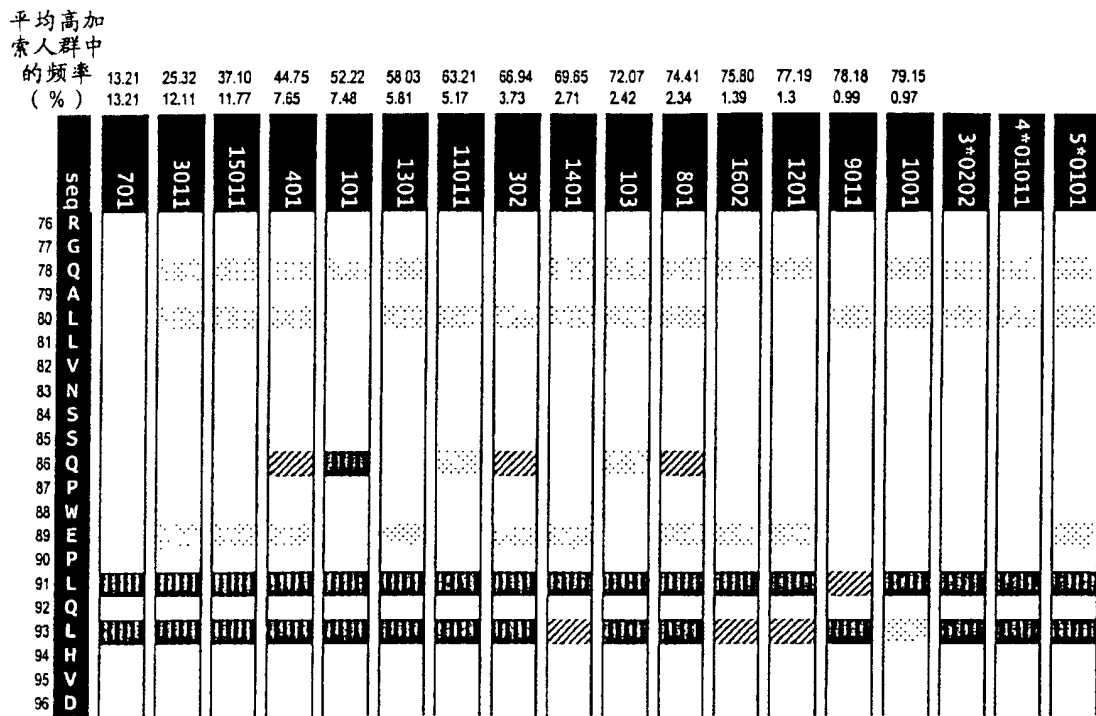


图 1



图注

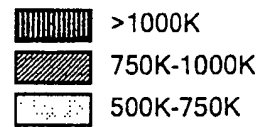
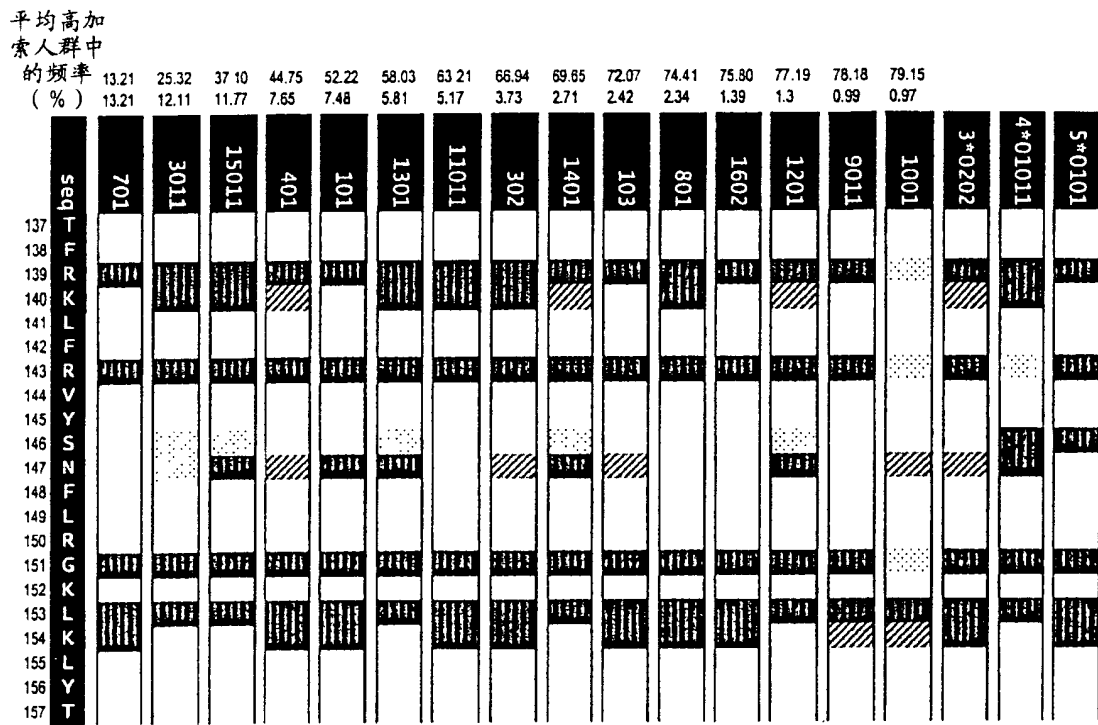


图 2



图注

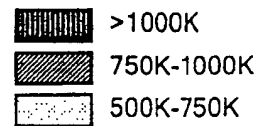


图 3

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAEN¹TTGCAEHCS²NENI
 TVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQAL
 LVNSSQP³EP⁴Q⁵H⁶DKAVSGLRSLTLLRALGAQKEA
 ISPPDAASAAPLRTITADTFRK⁷X⁸R⁹X¹⁰SN¹¹X¹²RGKX
¹³KLYTGEACRTGDR

其中

$X^1 = A$, 但也可考虑 G 或 P;

$X^2 = A$, 但也可考虑 D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^3 = T$, 但也可考虑 A 和 G;

$X^4 = A$, 但也可考虑 P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^5 = A$, 但也可考虑 P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^6 = A$, 但也可考虑 P、D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

$X^7 = T$;

$X^8 = A$, 但也可考虑 P 和 G;

$X^9 = T$;

$X^{10} = P$, 但也可考虑 A 和 G;

$X^{11} = A$, 但也可考虑 P 和 G;

$X^{12} = S$, 但也可考虑 A、D、E、G、H、K、N、P、Q、R 和 T;

$X^{13} = A$, 但也可考虑 D、E、G、H、K、N、P、Q、R、S 和 T;

并且同时排除 $X^1 = I$ 、 $X^2 = L$ 、 $X^3 = W$ 、 $X^4 = L$ 、 $X^5 = L$ 、 $X^6 = V$ 、 $X^7 = I$ 、 $X^8 = F$ 、 $X^9 = V$ 、 $X^{10} = Y$ 、 $X^{11} = F$ 、 $X^{12} = L$ 和 $X^{13} = L$ 。

图 4