



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118922435 A

(43) 申请公布日 2024.11.08

(21) 申请号 202380029746.2

(22) 申请日 2023.03.24

(30) 优先权数据

22164122.8 2022.03.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/057679 2023.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/180546 EN 2023.09.28

(71) 申请人 尤利乌斯·马克西米利安维尔茨堡  
大学

地址 德国维尔茨堡

(72) 发明人 瓦伦汀·布鲁塔尔

乔戈·维施胡森

丹尼拉·布鲁恩纳特

法德赫·阿赫桑

(74) 专利代理机构 北京市竞天公诚律师事务所  
11770

专利代理师 李瑛琦 杨莹跃

(51) Int.Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书4页 说明书24页 附图28页

(54) 发明名称

MHC Ib介导的髓鞘特异性免疫抑制作为针对多发性硬化症和MOG抗体疾病的新型治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及非经典人类主要组织相容性复合体 (MHC) 分子 (也称为MHC Ib类分子) 与髓鞘相关肽抗原组合用于治疗多发性硬化症 (MS)、MOG抗体疾病和MOG抗体阳性视神经脊髓炎的治疗用途。本发明更具体地涉及包含肽抗原与非经典MHC Ib类分子的一个或多个结构域的重组多肽。本发明还涉及生产此类重组多肽的方法、包含此类重组多肽的药物组合物、以及它们用于治疗多发性硬化症 (MS)、MOG抗体疾病和MOG抗体阳性视神经脊髓炎的用途。

1. 一种能够呈递肽抗原的重组多肽,所述重组多肽按N端至C端顺序包含:
  - i) 所述重组多肽呈递的肽抗原,其中所述肽抗原为人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)、或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)的肽;
  - ii) 可选地,接头序列;
  - iii) 可选地,人多肽结构域序列,所述人多肽结构域序列包含人 $\beta$ 2微球蛋白序列,或与SEQ ID NO:5所示的人 $\beta$ 2微球蛋白氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;
  - iv) 可选地,接头序列;
  - v) 可选地,MHC分子的 $\alpha$ 1结构域;
  - vi) 可选地,MHC分子的 $\alpha$ 2结构域;
  - vii) MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域或MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域的衍生物,所述衍生物能够结合ILT2或ILT4;
  - viii) 可选地,蛋白酶切割位点;
  - ix) 可选地,间隔序列;以及
  - x) 可选地,亲和标签。
2. 根据权利要求1所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原的长度为7~11个氨基酸,优选为8~10个氨基酸。
3. 根据权利要求1或2所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原由选自如下组中的氨基酸序列组成,所述组由SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成。
4. 根据权利要求1所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原由选自如下组中的氨基酸序列组成,所述组由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成。
5. 根据前述权利要求中任一项的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原是人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的肽。
6. 根据权利要求1~2和4~5项中任一项所述的重组多肽,其中所述肽抗原由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)所述的 $\alpha$ 2结构域来自人MHC Ia类分子或来自人MHC Ib类分子。
8. 根据权利要求7所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)所述的 $\alpha$ 2结构域来自人MHC Ia类分子。
9. 根据权利要求8所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)所述的 $\alpha$ 2结构域来自人HLA-A2分子。
10. 根据权利要求7所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)的所述 $\alpha$ 2结构域来自人MHC Ib类分子。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域是人HLA-E、人HLA-F或人HLA-G的 $\alpha$ 3结构域。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域是人HLA-G的 $\alpha$ 3结构域。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少80%氨基酸序列同一性,优选地至少90%氨基酸序列同一性。

14. 根据权利要求13所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少92%氨基酸序列同一性。

15. 根据权利要求13所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少94%氨基酸序列同一性。

16. 根据权利要求13所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少96%氨基酸序列同一性。

17. 根据权利要求13所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少98%氨基酸序列同一性。

18. 根据权利要求13所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少99%氨基酸序列同一性。

19. 根据权利要求13所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha 3$ 结构域与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(ii)所述的接头序列和/或根据(iv)所述的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS) $n$ ,其中 $n$ 是等于或大于1的整数。

21. 根据权利要求20所述的重组多肽,其中根据(ii)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS) $n$ ,其中 $n$ 是选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10的整数,并且优选地选自由2、3、4和5组成的组中。

22. 根据权利要求20或21所述的重组多肽,其中根据(iv)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS) $n$ ,其中 $n$ 是选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10的整数,并且优选地选自由2、3、4和5组成的组中。

23. 根据前述权利要求中任一项的重组多肽,其中根据(iii)所述的人多肽结构域的序列与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少95%相同,优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少98%相同,更优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列相同。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽为二聚体或多聚体。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至vii)组成。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽不包含组分viii)至x)。

27. 根据权利要求1~25中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至x)组成。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽, 其还包含N端分泌信号肽序列。
29. 根据权利要求1~27中任一项的重组多肽, 其中所述重组多肽由如下氨基酸序列组成, 所述氨基酸序列以N端至C端顺序由下述(a)和(b)组成:
- (a) 肽抗原, 其选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成的组中; 以及
- (b) SEQ ID NO:16的氨基酸序列。
30. 根据前述权利要求中任一项所述的重组多肽, 其中所述重组多肽是可溶的。
31. 一种核酸, 其编码一种或多种根据前述权利要求中任一项所述的多肽。
32. 根据权利要求31所述的核酸, 其中所述核酸为载体。
33. 一种药物组合物, 包含至少一种根据权利要求31或32所述的核酸。
34. 一种药物组合物或试剂盒, 包含至少一种根据权利要求1~30中任一项所述的重组多肽。
35. 根据权利要求34所述的药物组合物或试剂盒, 其中所述药物组合物或试剂盒包含至少两种不同的根据权利要求1~30中任一项所述的重组多肽, 其中每种不同的多肽包含不同的如权利要求1~6中任一项所定义的肽抗原。
36. 根据权利要求33~35中任一项所述的药物组合物或试剂盒, 用于治疗人类患者的多发性硬化症(MS)、MOG抗体疾病或MOG抗体阳性视神经脊髓炎的用途。
37. 根据权利要求36的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述治疗是多发性硬化症(MS)的治疗。
38. 根据权利要求36的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述治疗是治疗MOG抗体疾病的治疗。
39. 根据权利要求36的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述治疗是MOG抗体阳性视神经脊髓炎的治疗。
40. 根据权利要求36~39中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述治疗是通过免疫疗法进行治疗。
41. 根据权利要求36~40中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述治疗是通过诱导针对人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白的免疫耐受来进行的。
42. 根据权利要求36~41中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述治疗用于降低血浆或脑脊液中抗人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白的自身抗体的水平。
43. 根据权利要求36~42中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述人类患者是在治疗开始前血浆或脑脊液中具有抗髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白自身抗体的患者。
44. 根据权利要求36~43中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒, 其中所述治疗是通过诱导髓鞘特异性调节T细胞进行的。
45. 一种重组宿主细胞, 包含根据权利要求31或32所述的核酸或载体, 并表达根据权利要求1~30中任一项所述的重组多肽。
46. 一种获得包含根据权利要求1~30中任一项所述的多肽的药物组合物的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 在允许从核酸分子表达重组多肽的条件下培养权利要求45的重组

宿主细胞, (b) 回收重组多肽, (c) 纯化重组多肽, 以及 (d) 将重组多肽配制成药物组合物。

## MHC Ib介导的髓鞘特异性免疫抑制作为针对多发性硬化症和MOG抗体疾病的新型治疗方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及非经典人类主要组织相容性复合体 (MHC) 分子 (也称为MHC Ib类分子) 与肽抗原组合用于治疗多发性硬化症 (MS)、MOG抗体疾病和MOG抗体阳性视神经脊髓炎 (neuromyelitis optica) 的治疗用途。本发明更具体地涉及包含肽抗原与非经典MHC Ib类分子的一个或多个结构域的重组多肽。本发明还涉及生产此类重组多肽的方法、包含此类重组多肽的药物组合物、以及它们用于治疗多发性硬化症 (MS)、MOG抗体疾病和MOG抗体阳性视神经脊髓炎的用途。

### 背景技术

[0002] 多发性硬化症 (MS) 和MOG脑脊髓炎 (又称髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白抗体疾病、MOG抗体疾病、MOGAD) 是一种自身免疫性疾病, 其中免疫系统的T细胞攻击中枢神经系统的髓鞘, 导致逐渐累进的神经退行。免疫调节疗法可以有效抑制多发性硬化症 (MS) 特征性的疾病活动复发。对于罕见的MOGAD, 其长期以来被认为是MS的一种亚型, 目前尚无批准的治疗方法, 因此治疗最初包括观察和等待病情进展。在这两种疾病中, 都会发生缓慢累进性的神经退行。一些对MS有效的治疗方法, 例如抗体那他珠单抗 (natalizumab) 或奥瑞珠单抗 (ocrelizumab) 或口服生物可利用的S1P抑制剂芬戈莫德 (fingolimod), 甚至存在持续性且通常无害的JC病毒脑内感染无法再控制的风险, 这种风险导致通常致命的进行性多灶性白质脑病。在此方面, 在这两种疾病中, 免疫调节不足或免疫调节副作用太大的问题仍然没有得到解决, 特别是在进展缓慢方面。常见的生物制剂不能穿过血脑屏障, 因此不能原位 (in situ) 发挥抗炎作用。相反, 调节细胞已被描述其能很好地穿过血脑屏障 (Schneider-Hohendorf等, Eur J Immunol. 2010年12月; 40 (12) : 3581-90)。

[0003] 迄今为止, 至少在早期临床研究中已经对两种策略进行了评估。与过敏中的脱敏策略类似, 已经通过不同的途径施用大量抗原以诱导抗原特异性耐受性。然而, 在自身免疫性疾病中, 这些策略引起了严重的副作用并且在临床上并未取得成功。通过抗原特异性调节T细胞或抗原负载的耐受性树突状细胞的过继转移来诱导耐受性的尝试看起来更有前景。然而, 这些策略极其复杂且昂贵, 需要针对每个患者遵循GMP标准的生产和质量控制流程。因此, 即使小规模临床试验取得了成功, 在可预见的未来, 许多患者是否可以接受过继转移疗法仍是一个很大的疑问。

[0004] 免疫抑制MHC Ib类分子 (例如HLA-G) 对于妊娠期间的耐受性诱导至关重要。它们通过免疫抑制受体, 例如ILT2、ILT4和Kir2DL4, 对各种免疫细胞发挥免疫抑制作用。WO2018/215340涉及用于靶向治疗免疫调节的MHC Ib类分子与肽的组合。

[0005] 总的来说, 仍然需要用于治疗多发性硬化症 (MS) 和MOG抗体疾病的改良药物。同样, 也需要用于治疗MOG抗体阳性视神经脊髓炎 (NMO) 的改良药物。

## 发明内容

[0006] 发明人发现,人类MHC Ib类分子,例如HLA-G,能够诱导针对递呈的肽抗原的抗原特异性耐受性。因此,尽管MHC Ib类分子的结构和序列与诱导抗原肽特异性免疫反应的经典人类MHC Ia类分子相似,但根据本发明,MHC Ib类分子可有利地用于以抗原特异性方式抑制免疫反应。此外,发明人发现,除天然存在的MHC Ib类分子之外的分子,特别是仅包含MHC Ib类分子的至少一个结构域、优选MHC Ib类分子的至少一个 $\alpha 3$ 结构域的多肽,可用于如本发明所述的抑制免疫反应:各种Ia分子的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域可与人类MHC Ib类分子的 $\alpha 3$ 结构域结合,以抑制针对这些抗原呈递的肽的免疫反应。

[0007] 负载有抗原的HLA-G分子可能不稳定。因此,发明人设计了可溶性重组多肽,其包含肽抗原、MHC Ib类分子(例如HLA-G)和 $\beta 2$ -微球蛋白(b2m),并将这三个成分共价连接(例如,通过共价接头)。或者,用其他MHC分子的相应结构域对MHC Ib类分子(例如HLA-G)的抗原结合 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域进行更换,以增强这些重组多肽的灵活性和多功能性(例如,参见图2)。这些替代的重组多肽可以与其他人类HLA分子的抗原结合域设计在一起。之前发现,包含鼠H2-K<sup>b</sup>的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域的构建体可以将卵清蛋白衍生的肽SIINFEKL呈递给OT-1T细胞。(OT-1T细胞表达特异性识别该抗原的转基因T细胞受体)(WO2018/215340)。

[0008] 令人惊讶的是,发明人发现,通过使用本发明的重组多肽,可以抑制针对人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)的免疫反应。因此,根据本发明,可以通过本发明的重组多肽来治疗多发性硬化症(MS)、髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白抗体病(MOG抗体病)和MOG抗体阳性视神经脊髓炎。

[0009] 发明人的实验数据表明,需要合适的肽抗原和MHC Ib类分子(例如HLA-G)的 $\alpha 3$ 结构域的存在才能达到预期的效果。因此,这种方法超越了之前描述的策略,这些策略要么是在没有共刺激的情况下使用抗原肽(导致无反应性而非耐受性T细胞),要么是在抗原非特异性环境中使用MHC Ib类分子。

[0010] 此外,根据本发明,由于与治疗这些疾病的传统药物相比,预计本发明的重组多肽将表现出更好的安全性,而传统药物可能会引起严重的副作用(例如进行性多灶性白质脑病),所以本发明的重组多肽预计在多发性硬化症(MS)、MOG抗体疾病和MOG抗体阳性视神经脊髓炎的免疫治疗中具有高度优势。

[0011] 此外,发明人惊讶地发现,本发明的重组多肽不仅调节T细胞反应,而且还在模型实验中防止MOG特异性自身抗体的形成。由于MOG特异性自身抗体与这些疾病的病理有关,预计这一发现将转化为多发性硬化症(MS)、MOG抗体疾病和MOG抗体阳性视神经脊髓炎患者的临床改善。

[0012] 因此,本发明涉及以下优选的实施方案:

[0013] 1.一种能够呈递肽抗原的重组多肽,所述重组多肽按N端至C端顺序包含:

[0014] i) 被所述重组多肽呈递的肽抗原,其中所述肽抗原为人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)、或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)的肽;

[0015] ii) 可选地,接头序列;

[0016] iii) 可选地,人多肽结构域序列,所述人多肽结构域序列包含人 $\beta 2$ 微球蛋白序列,或与

- [0017] SEQ ID NO:5所示的人 $\beta$ 2微球蛋白氨基酸序列至少90%同一性的氨基酸序列；
- [0018] iv) 可选地,接头序列；
- [0019] v) 可选地,MHC分子的 $\alpha$ 1结构域；
- [0020] vi) 可选地,MHC分子的 $\alpha$ 2结构域；
- [0021] vii)MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域或MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域的衍生物,所述衍生物能够结合ILT2或ILT4；
- [0022] viii) 可选地,蛋白酶酶切位点；
- [0023] ix) 可选地,间隔序列；以及
- [0024] x) 可选地,亲和标签。
- [0025] 2. 根据第1项所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原的长度为7~11个氨基酸,优选为8~10个氨基酸。
- [0026] 3. 根据第1或2项所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原由选自如下组中的氨基酸序列组成,所述组由SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和
- [0027] SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成。
- [0028] 4. 根据第1或2项所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原由选自如下组中的氨基酸序列组成,所述组由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28和
- [0029] SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成。
- [0030] 5. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原是人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的肽。
- [0031] 6. 根据第1~2项和第4~5项中任一项所述的重组多肽,其中所述肽抗原由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。
- [0032] 7. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)所述的 $\alpha$ 2结构域来自人MHC Ia类分子或来自人MHC Ib类分子。
- [0033] 8. 根据第7项所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)所述的 $\alpha$ 2结构域来自人MHC Ia类分子。
- [0034] 9. 根据第8项所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)所述的 $\alpha$ 2结构域来自人HLA-A2分子。
- [0035] 10. 根据第7项所述的重组多肽,其中根据(v)所述的 $\alpha$ 1结构域和根据(vi)的所述 $\alpha$ 2结构域来自人MHC Ib类分子。
- [0036] 11. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域是人HLA-E、人HLA-F或人HLA-G的 $\alpha$ 3结构域。
- [0037] 12. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的MHC Ib类分子的 $\alpha$ 3结构域是人HLA-G的 $\alpha$ 3结构域。
- [0038] 13. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha$ 3结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域具有至少80%氨基酸序列同一性,优选地至少90%氨基酸序列同一性。
- [0039] 14. 根据第13项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha$ 3结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID

NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域具有至少92%氨基酸序列同一性。

[0040] 15. 根据第13项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha$ 3结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域具有至少94%氨基酸序列同一性。

[0041] 16. 根据第13项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha$ 3结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域具有至少96%氨基酸序列同一性。

[0042] 17. 根据第13项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha$ 3结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域具有至少98%氨基酸序列同一性。

[0043] 18. 根据第13项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha$ 3结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域具有至少99%氨基酸序列同一性。

[0044] 19. 根据第13项所述的重组多肽,其中根据(vii)所述的 $\alpha$ 3结构域与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 3结构域相同。

[0045] 20. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中根据(ii)所述的接头序列和/或根据(iv)所述的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS)<sub>n</sub>,其中n是等于或大于1的整数。

[0046] 21. 根据第20项所述的重组多肽,其中根据(ii)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS)<sub>n</sub>,其中n是选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10的整数,并且优选地选自由2、3、4和5组成的组中。

[0047] 22. 根据第20或21项所述的重组多肽,其中根据(iv)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS)<sub>n</sub>,其中n是选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10的整数,并且优选地选自由2、3、4和5组成的组中。

[0048] 23. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中根据(iii)所述的人多肽结构域的序列与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少95%相同,优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少98%相同,更优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列相同。

[0049] 24. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中所述多肽为二聚体或多聚体。

[0050] 25. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至vii)组成。

[0051] 26. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中所述多肽不包含组分viii)至x)。

[0052] 27. 根据第1~25项中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至x)组成。

[0053] 28. 根据前述任一项所述的重组多肽,其还包含N端分泌信号肽序列。

[0054] 29. 根据第1~27项中任一项的重组多肽,其中所述重组多肽由如下氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以N端至C端顺序由下述((a)和(b))组成:

[0055] (a) 肽抗原,其选自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成的组中;以及

[0056] (b) SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

- [0057] 30. 根据前述任一项所述的重组多肽,其中所述重组多肽是可溶的。
- [0058] 31. 一种核酸,其编码一种或多种根据前述任一项所述的多肽。
- [0059] 32. 根据第31项所述的核酸,其中所述核酸为载体。
- [0060] 33. 一种药物组合物,包含至少一种根据第31或32项所述的核酸。
- [0061] 34. 一种药物组合物或试剂盒,包含至少一种根据第1~30项中任一项所述的重组多肽。
- [0062] 35. 根据第34项所述的药物组合物或试剂盒,其中所述药物组合物或试剂盒包含至少两种不同的根据第1~30项中任一项所述的重组多肽,其中每种不同的多肽包含不同的如第1~6项中任一项所定义的肽抗原。
- [0063] 36. 根据第33~35项中任一项所述的药物组合物或试剂盒,用于治疗人类患者的多发性硬化症(MS)、MOG抗体疾病或MOG抗体阳性视神经脊髓炎的用途。
- [0064] 37. 根据第36项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是多发性硬化症(MS)的治疗。
- [0065] 38. 根据第36项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是治疗MOG抗体疾病的治疗。
- [0066] 39. 根据第36项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是MOG抗体阳性视神经脊髓炎的治疗。
- [0067] 40. 根据第36~39项中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是通过免疫疗法进行治疗。
- [0068] 41. 根据第36~40项中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是通过诱导针对人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白的免疫耐受来进行的。
- [0069] 42. 根据第36~41项中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗用于降低血浆或脑脊液中抗人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白的自身抗体的水平。
- [0070] 43. 根据第36~42项中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述人类患者是在治疗开始前血浆或脑脊液中具有抗髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白自身抗体的患者。
- [0071] 44. 根据第36~43项中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是通过诱导髓鞘特异性调节T细胞进行的。
- [0072] 45. 一种重组宿主细胞,包含根据第31或32项所述的核酸或载体,并表达根据第1~30项中任一项所述的重组多肽。
- [0073] 46. 一种获得包含根据第1~30项中任一项所述的多肽的药物组合物的方法,所述方法包括以下步骤:(a)在允许从核酸分子表达重组多肽的条件下培养第45项的重组宿主细胞,
- [0074] (b)回收重组多肽,(c)纯化重组多肽,以及(d)将重组多肽配制成药物组合物。

#### 附图说明

- [0075] 图1:适合于实现治疗性抗原特异性免疫调节的负载肽的可溶性MHC Ib分子的描述。
- [0076] 所呈递的肽抗原以球体虚线表示,HLA-G $\alpha$ -3结构域以浅灰色表示, $\beta$ 2微球蛋白结

构域以深灰色表示。连接抗原肽和 $\beta$ 2微球蛋白分子的可选接头以灰色杆状样式表示,且可选的二硫键捕获以黑色球体表示。此图是使用Pymol生成的,并根据Clements et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005Mar 1; 102(9): 3360-5和Hansen et al., Trends Immunol. 2010Oct; 31(10): 363-9中发表的结构进行了修改。

[0077] 图2: 基于载体的构建体示例, 该构建体编码适合于治疗性肽特异性免疫调节的单链MHC Ib分子。

[0078] HLA-G1和HLA-G5分别由3个 $\alpha$ 结构域(这里用黑色表示)、1个非共价结合的 $\beta$ 2微球蛋白亚基(这里用深灰色表示)和HLA-G上递呈的抗原肽(短黑箭头)组成。HLA-G1还包含跨膜结构域和短胞内链(这里未显示)。如图所示, $\alpha$ -3结构域能够在免疫细胞上与受体ILT2(参见Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003July 22; 100(15): 8856-8861)和受体ILT4(参见Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006Oct 31; 103(44): 16412-7)结合。在生理上, 这些序列形成非共价连接MHC 1类复合体。为了简化复合MHC Ib分子的纯化, 可以引入一个或多个蛋白质标签(例如SpotTag、myc标签和/或His(6x)标签)。以这样的方式引入这些标签, 以便使得它们稍后能够通过使用可选的因子Xa或弗林蛋白酶切割位点的切割而被可选地去除。此外, 抗原肽、 $\beta$ 2-微球蛋白和MHC Ib $\alpha$ 链可以按顺序连接, 以提高稳定性。载体图谱使用Snapgene Viewer软件生成。

[0079] 图3: 本发明的重组多肽的替代分子在小鼠中诱导分泌IL10的Treg。

[0080] 在本实验中, 将100 $\mu$ g由病毒(Gp34)或卵清蛋白(Ova)模型肽抗原、小鼠H2-K<sup>b</sup> $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2结构域以及人HLA-G $\alpha$ 3结构域和 $\beta$ -2-微球蛋白组成的替代分子腹腔(i.p.)注射到12周龄的C57BL/6小鼠体内。14天后, 处死小鼠, 在48h标准小鼠IL-10ELISpot测定(Mabtech小鼠IL-10HRP ELISpot试剂盒)中, 用5 $\mu$ g/ml Gp34或Ova肽再次刺激(re-challenge)通过Ficoll梯度分离的脾细胞(A)。

[0081] 仅当通过替代分子注射诱导针对其的耐受性的肽再次刺激时, 才会检测到分泌IL-10的调节性T细胞显著增加。

[0082] 图4: 本发明的重组多肽的替代分子可在小鼠中预防CD8+T细胞引起的EAE。

[0083] 在该MS小鼠模型中, 模型抗原卵清蛋白(OVA)在髓鞘碱性蛋白(MBP)启动子(ODC-OVA)的控制下于少突胶质细胞中表达。这导致OVA257-264肽呈递在少突胶质细胞上的H-2Kb MHC分子上。OT-I小鼠在其CD8+T细胞上表达T细胞受体(OT-I), 该受体可以准确识别这种肽-MHC组合。当这些小鼠的CD8+T细胞被转移到10日龄的ODC-OVA小鼠中时, 这些小鼠就会发生实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE), 其发病机制和症状在许多方面与MS相似(Na et al., Brain, Volume 131, Issue 9, September 2008, Pages 2353-2365)。在本实验中, 同一天注射500 $\mu$ g由病毒(Gp34)或卵清蛋白(Ova)模型肽抗原、小鼠H2-K<sup>b</sup> $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2结构域以及人HLA-G $\alpha$ 3结构域和 $\beta$ -2-微球蛋白组成的替代分子或仅注射PBS。按照Bittner et al., J Vis Exp. 2014Apr 15; (86): 51275进行EAE评分。

[0084] 只有诱导卵清蛋白耐受的替代分子才能几乎完全预防EAE症状。

[0085] (A) 实验设计; (B) 结果。

[0086] 图5: 本发明的重组多肽的替代分子可以产生有效的旁观者免疫抑制。

[0087] 本实验测试了Mog44肽替代分子是否可以诱导能够抑制细胞毒性T细胞的保护性T细胞, 所述细胞毒性T细胞针对的是相同细胞所呈递的另一种肽。将图4中描述的该分子按

照250 $\mu\text{g}$ /只小鼠与OT-I细胞一起注射到ODC-OVA小鼠中,如图4所示。

[0088] 使用这种较低剂量的替代分子,虽然不能完全预防EAE症状,但通过使用诱导针对直接靶向的CD8表位(Ova\_KbG)或对在相同细胞(Mog44\_DbG)上表达的另一个表位(Mog44)产生耐受性的这两个分子,EAE症状均得到了显著的减轻。

[0089] (A)EAE评分;(B):体重。

[0090] 图6:本发明的一些重组多肽的替代分子可选择性地预防小鼠中CD4<sup>+</sup>T细胞引起的EAE。

[0091] (A)实验设计:在此模型中,通过施用MOG 35-55肽组合完全弗氏佐剂(可激活CD4<sup>+</sup>Th17细胞)和百日咳毒素(可使血脑屏障更具渗透性),引发强烈的髓鞘特异性自身免疫反应(Protocol:Bittner et al.,J Vis Exp.2014Apr 15;(86):51275)。在这里,CD4<sup>+</sup>细胞以及抗体在EAE的发展中起着至关重要的作用(Tigno-Aranjuez et al.,J Immunol November 1,2009,183(9)5654-5661)。此外,第一天给每只小鼠注射100 $\mu\text{g}$ 由病毒(Gp34)或两种Mog肽抗原(Mog37或Mog44)、鼠H2-D<sup>b</sup> $\alpha$ 1和 $\alpha$ 2结构域、以及人HLA-G $\alpha$ 3结构域和 $\beta$ -2-微球蛋白组成的替代分子或仅注射PBS。

[0092] 含有替代分子的Mog44肽显著缓解了EAE症状(B)和体重减轻(C)。

[0093] 图7:本发明的重组多肽的Mog44替代分子可预防脊髓中的炎症和CD8<sup>+</sup>T细胞浸润。(A)甲苯胺;(B)CD8-DAB。

[0094] 将10 $\mu\text{m}$ 新鲜冷冻切片在室温下用市售甲苯胺1 $\times$ 染色试剂染色1h。在EAE中检测到了大量的免疫细胞浸润,但被Mog44\_Db\_G阻止。

[0095] 将10 $\mu\text{m}$ 新鲜冰冻切片在室温下短暂干燥,用丙酮固定,用PBS中的5%BSA、10%正常山羊血清封闭,用1:100抗CD8抗体、与HRP和DAB溶液偶联的二抗染色(详细方法:Karikari et al.,Brain Behav Immun.2022Jan 12;101:194-210)。Mog35-55诱导的EAE导致CD8<sup>+</sup>细胞大量浸润至脊髓,而MOG44\_Db\_G替代分子可阻止这一过程。

[0096] (A)甲苯胺;(B)CD8-DAB。

[0097] 图8:用本发明的重组多肽替代分子处理的Mog-EAE小鼠中抗MOG35-55抗体的检测(“AIM Bio”)。

[0098] 小鼠被处死后,通过心脏穿刺收集小鼠血清,并在PBS中按1:50稀释。使用PBS中的10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Mog35-55进行过夜包被,然后使用1%BSA封闭孔2h,再加入稀释血清,静置1h。使用指示的二抗HRP偶联抗体(PBS中稀释1:5000)检测抗Mog35-55抗体。Mog35-55诱导的EAE与高水平的Mog35-55特异性IgG自身抗体相关,在用100 $\mu\text{g}$  MOG44\_Db\_G替代分子处理的动物中检测不到这种抗体。

[0099] 图9:人MS和MOGAD重组多肽候选物列表。

[0100] 髓鞘(MAG、MBP、MOG、PLP)肽和MHC I类呈递分子如下:

[0101]

重组多肽	肽抗原序列	SEQ ID NO:
MAG160_A2G_His	MVPDNCPEL	25
MAG160_G_His	MVPDNCPEL	25
MAG237_G_Spt	KYPPVIVEM	34
MOG104_A2G_Spt	AIGEGKVTL	26
MOG104_A2G_Spt	AIGEGKVTL	26
MBP29_G_Spt	FLPRHRDTG	35
MBP75_G_Spt	RSQPGLCNM	27
MBP169_G_Spt	KGVDAQGTL	36
MBP244_A2G_Spt	SLSRFSWGA	28

	MOG38_G_Spt	RHPIRALVG	31
	MOG42_G_Spt	RALVGDEVEL	32
	MOG44_G_Spt	FSRVVHLYRNG	37
	MOG70_G_Spt	RPPFSRVVHL	38
	MOG102_G_Spt	KDAIGEGKVTL	29
	MOG104_A2G_Spt	AIGEGKVTL	26
	MOG157_A2G_Spt	VLLAVLPVL	2
	MOG157_G_Spt	VLLAVLPVL	2
[0102]	MOG163_G_Spt	VSPGVLVLL	39
	MOG185_G_His	KLRAEIENL	40
	MOG203_A2G_His	RVPCWKITL	41
	MOG203_G_His	RVPCWKITL	41
	PLP3_A2G_His	LLLECCARCL	33
	PLP3_G_His	LLLECCARCL	33
	PLP80_A2G_His	FLYGALLLA	42
	PLP105_G_Spt	KTTICGKGL	43
	PLP127_G_His	RGQHQAHS�	44
	PLP151_G_spt	KFVGITYAL	45

[0103] 进一步显示髓鞘肽和抗原呈递MHC I类 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域(HLAG=HLA-G, A2G=HLA-A2呈递结构域+HLA-G $\alpha 3$ 结构域)的哪些组合在表达/制备、健康献血者中的基于ELISpot的优先级排序(如图10所示)或AlphaFold2预测等方面可产生良好的结果。His表示6-组氨酸标签, Spt表示Spot-Tag。

[0104] 图10:本发明的含有VLLAVLPVL抗原(“Mog157\_A2G”)的重组多肽上调健康献血者体内的CD8 Treg。

[0105] AIM Biologicals介导的体外Treg诱导如下:

[0106] 使用Ficoll对来自白细胞减毒室的白细胞进行密度离心纯化,从而纯化来自健康捐赠者的PBMC。将细胞以1200×g的速度不间断离心20min,然后收集中间相环,用1×PBS清洗(5min, 300×g)。将PBMC冷冻直至进一步使用。

[0107] 在PBMC脉冲刺激(pulse)(d-1)前1天将PBMC解冻,并在6孔板孔中在含有5%人AB血清的5ml X-VIVO 15培养基中37°C保存过夜。

[0108] 第二天(d0),对细胞进行计数并将其悬浮在X-VIVO 15完全培养基(5%hAB血清和细胞因子混合物:20ng/ml hIL-2、20ng/ml hGM-CSF、10ng/ml hIL-4和10ng/ml hTGF-b1)

中,细胞密度为 $3 \times 10^6$ 细胞/ml。实验中,将 $3 \times 10^6$ 个细胞接种于12孔板的相应孔中,其中X-VIVO完全培养基的最终体积为1000 $\mu$ l,培养基中含有细胞因子混合物、以及5 $\mu$ g/ml AIM Bio分子或相应的对照。

[0109] 第3天,添加1ml完全培养基(含有细胞因子),第6天,用5 $\mu$ g/ml AIM Bio分子进行第二次脉冲刺激(去除培养基后)。在第7、10和12天,添加1ml完全培养基(含有细胞因子)。

[0110] 第13天,用50 $\mu$ l/孔EtOH(35% v/v)活化ELISPOT板PVDF膜1min,然后用200 $\mu$ l蒸馏无菌水清洗5次。将板用100 $\mu$ l/孔抗hIL10(克隆9D-7,在PBS中1:500稀释,无菌过滤)在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。第二天,去除未结合的包被抗体,用200 $\mu$ l PBS进行5次清洗步骤,并添加200 $\mu$ l封闭缓冲液(X-VIVO 15 5% hAB血清),并将板在室温下孵育30min-2h。

[0111] 第14天,将200,000个细胞接种于ELISPOT板的每个孔中,一式两份,包括阴性对照(细胞加PBS)和阳性对照(例如LPS)。

[0112] 二抗制备:在0.5% BSA/1 $\times$ PBS中的1 $\mu$ g/ml aIL-10-生物素化抗体(1:1000稀释)和辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素(0.5% BSA/PBS,1:750稀释),四甲基联苯胺溶液使用0.45 $\mu$ m过滤器过滤,并在4 $^{\circ}$ C下保存直至使用。

[0113] 去除细胞上清液并用100 $\mu$ l PBS清洗5次。最后用纸清除多余的缓冲液。

[0114] 每孔加入25 $\mu$ l稀释的HRP-链霉亲和素(1:750),室温下避光孵育1h,然后用无菌1 $\times$ PBS清洗5次。

[0115] 每孔加入100 $\mu$ l过滤的TMB底物,静置15-25min,直至出现蓝色斑点。用自来水彻底冲洗孔以停止反应。

[0116] 除去板的塑料排水管并用自来水冲洗板的底部和侧面并晾干。

[0117] MOG157\_A2G\_Spt在75%的健康献血者中诱导分泌IL-10的Treg至少增加30%。

[0118] 图11:图8的对照实验表明,总IgG不会因MOG47\_Db\_G替代分子处理而减少。根据制造商的说明,使用Easy-Titer<sup>TM</sup>人IgG( $\gamma$ 链)检测试剂盒(Thermo Fisher)对总IgG进行定量分析。该实验与图8相结合表明,可以使用单链MHC Ib分子抑制选择性抗体反应。

[0119] 图12:纯化的单链MHC Ib分子的稳定性。纯化单链MHC Ib分子后,在1次和3次冻融循环、室温下储存5天以及加热至50 $^{\circ}$ C30min后分析其稳定性。为此,在非还原条件下,A)使用2 $\mu$ g AIM Bio对12%聚丙烯酰胺凝胶进行考马斯亮蓝染色,B)使用2A12aHLA-G抗体(1:1000)和1 $\mu$ g蛋白质进行aHLA-G蛋白质印迹法。单体和二聚体均可检测到。

[0120] 图13:单链MHC Ib分子具有热稳定性。对于热位移分析(TSA),将3 $\mu$ g相应的单链MHC Ib分子或Motavizumab作为对照分子用PBS和5 $\times$ SYPRO Orange染料(原液5000 $\times$ ,最终浓度:5 $\times$ )稀释至25 $\mu$ l的体积。使用StepOnePlus软件2.3在StepOnePlus仪器上设置了熔化曲线程序。起始温度为25 $^{\circ}$ C,持续1min,然后以每分钟1 $^{\circ}$ C的速率升温至最终温度95 $^{\circ}$ C,持续2min,从而以任意单位测量自发荧光。数据已导出并在Prism V7.04中绘制图表。为了测定溶解温度(Tm),使用了Boltzman S形函数。

[0121] 图14:单链MHC Ib分子以剂量依赖性方式诱导Treg。OT-I小鼠腹腔注射指定量的单链H2\_K<sup>b</sup> $\alpha$ 1+2、HLA-G $\alpha$ 3结构域人 $\beta$ -2-微球蛋白和指定肽的构建体,或者载体(PBS)。在这些小鼠中,0va是OT-I TCR的同源肽,Gp34是无关的病毒衍生对照肽。14天后,处死小鼠,并在记忆(recall)小鼠IL-10ELISpot中测试脾细胞中的IL10分泌细胞(每孔200,000个细胞,MabTech小鼠IL-10ELISpot试剂盒,添加5 $\mu$ g/ml指定的肽或仅添加PBS,48h)。当注射50 $\mu$ g和

500 $\mu$ g小鼠适配Ova\_KbG时,观察到对Ova肽有反应性的IL-10分泌细胞的明显诱导。

[0122] 图15:单链MHC Ib分子以剂量依赖性方式抑制T细胞裂解。10mio OT-1/ml,在单链MHC Ib分子存在下培养3天,37 $^{\circ}$ C,125rpm摇动,OT-1:Panc02比例为50:1。

[0123] 方法:

[0124] 脾细胞分离和治疗。

[0125] 处死OT1/BL6小鼠,收集脾细胞并在RPMI 5%FCS中清洗一次。用2ml 1 $\times$ 无菌RBC裂解缓冲液处理3min,去除红细胞。在含GMCSF 20ng/ml、IL-2 20ng/ml和IL-4 10ng/ml,和剂量递增的Ova\_KbG的RPMI 10% FCS的培养基中,将细胞高密度培养(10mio细胞/ml)72h。然后将细胞从培养皿中刮下来,然后通过磁珠纯化CD8 $^{+}$ 细胞。

[0126] 荧光素酶检测(48h)

[0127] 使用无菌96孔白色板。用20 $\mu$ g/ml Ova肽(SIINFEKL)负载Panc02 fluc+靶细胞,在37 $^{\circ}$ C温度下以500rpm的速度摇动,持续60min。将效应CD8 $^{+}$ T细胞与Panc02靶细胞(5000个靶细胞)以50:1的比例混合,添加荧光素。测量0h、24h、48h时的发光。

[0128] 图16:EAE-ODC Ova小鼠的血清细胞因子。根据制造商的说明,使用Th1/Th2 10plex Flowcytomix Kit(eBioscience)测量EAE-ODC Ova小鼠的血清细胞因子。该试剂盒用于在单个样本中同时检测小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GMCSF)、白细胞介素1 $\alpha$ (IL-1a)、白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、白细胞介素17(IL-17)、肿瘤坏死因子(TNF)。该阵列试剂盒提供了十种具有不同荧光强度的捕获珠子的混合物,这些珠子上已包被针对每种细胞因子的特异性捕获抗体。将包被有十种特异性捕获抗体的珠子混合在一起。随后,将25 $\mu$ L混合的捕获珠子、25 $\mu$ L未知血清样本或标准稀释液、25 $\mu$ L藻红蛋白(PE)检测试剂依次加入96-V底孔板的每个孔中,室温下避光孵育2h。用1mL清洗缓冲液清洗样品5min,然后离心。弃去上清液,将珠粒重新悬浮于200 $\mu$ L缓冲液中。使用Attune<sup>TM</sup> NxT流式细胞仪测量样品,并采用Attune流式细胞仪软件(Thermo Fisher Scientific)分析样品。

[0129] 图17:MOG诱导的EAE模型脊髓的免疫荧光分析。

[0130] A、B:MOG诱导的EAE脊髓中的Caspase 3浸润。A:图像;B:定量。

[0131] C、D:MOG诱导的EAE脊髓白质损伤。C:图像;D:定量。

[0132] E、F:MOG诱导的EAE脊髓中的CD3浸润。E:图像;F:定量。

[0133] 图18:MOG157\_A2G处理后IL10斑点增加。

[0134] 发明详述

[0135] 定义与一般技术

[0136] 除非下文另有说明,本发明中使用的术语应按照本领域技术人员所知道的通常含义来理解。本文引用的所有出版物、专利和专利申请均以引用的方式全部并入本文。可以通过在文中指定完整的文献参考来引用本文中提及的出版物。

[0137] 本发明的所有蛋白质,包括本发明的重组多肽,均可通过本领域已知的方法获得。这些方法包括生产重组多肽的方法。可以根据本发明在重组宿主细胞中表达本发明的重组多肽。本发明的重组宿主细胞优选为哺乳动物细胞,例如CHO和HEK细胞。

[0138] 应当理解,本发明的重组多肽旨在可选地包括分泌信号肽序列。类似地,本发明的重组多肽还旨在可选地包含亲和标签,例如以便于纯化,以及标签与多肽之间的可选的蛋

白酶酶切位点,例如为了便于通过蛋白酶酶切去除标签。

[0139] 还应当理解,本文中提及的任何氨基酸序列不仅旨在涵盖未修饰的氨基酸序列,而且还旨在涵盖本领域已知的细胞表达系统中发生的这些氨基酸序列的典型翻译后修饰(例如,氨基酸的糖基化或脱酰胺、特定氨基酸的剪切或其他翻译后修饰),包括哺乳动物细胞,例如CHO和HEK细胞。

[0140] 同样地,应当理解,本发明的重组多肽旨在可选地包括相应的前肽。

[0141] 还应当理解,本发明的重组多肽可以是其可溶形式或其膜结合形式。重组多肽在这些条件下是否“可溶”可以通过本领域已知的方法确定,例如通过在上述参考条件下测量重组多肽的浊度。如本文所用,可溶是指在这些参考条件下至少95%的重组多肽被确定是可溶的。

[0142] 单链MHC分子可以储存在,例如,-80°C,PBS中(根据蛋白质浓度,可以用或不用0.1%人血白蛋白作为载体),或-20°C,50%甘油中。

[0143] 根据本发明,MHC分子优选为人MHC分子。

[0144] 本发明的重组多肽优选是分离的重组多肽。

[0145] 应理解,如何制备根据本发明能够结合和递呈肽抗原的重组多肽。例如,肽抗原结合结构域,如 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域是众所周知的,并且可以对这些结构域进行修饰。肽抗原与根据本发明的多肽和MHC分子结合的能力可以通过本领域已知的技术来确定,包括但不限于探索性的方法,例如MHC肽洗脱、然后进行质谱分析和计算机生物信息预测,以及确证性的方法,例如MHC肽多聚体结合法和刺激试验。

[0146] 根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒优选适用于人类患者。

[0147] 根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒优选适用于治疗人类患者的多发性硬化症(MS)、MOG抗体疾病或MOG抗体阳性视神经脊髓炎。

[0148] 根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒优选适用于诱导针对人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)、或人髓鞘蛋白脂蛋白(PLP1)的免疫耐受性,例如,在人类患者中。

[0149] 应当理解,根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒是稳定的。

[0150] 可以理解的是,对于本发明中使用的肽抗原,本文所指的这些肽抗原的任何长度(例如“7至11个氨基酸的长度”)均指肽抗原本身的长度。因此,本文所指的肽抗原的长度不包括不属于肽抗原的额外氨基酸(所赋予的长度,例如来自可能的接头序列中的额外氨基酸等)。

[0151] 根据本发明,每次出现术语“包含”时都可选地用“由……组成”代替。

[0152] 方法和技术

[0153] 通常,除非本文另有说明,在本发明中使用的方法(例如克隆法或与抗体有关的方法)根据本领域已知的步骤进行,例如在Sambrook et al. (“:A Laboratory Manual.”, 2Nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989), Ausubel et al. (“Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992), 和Harlow and Lane (“Antibodies: A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988)中描述的步骤,其均以引用的方式并入本文。

[0154] 蛋白质-蛋白质结合,例如抗体与其各自的靶蛋白的结合,可以通过本领域已知的方法来评估。蛋白质-蛋白质结合优先通过表面等离子体共振光谱测量来评估。

[0155] 例如,根据本发明的MHC b类分子或重组多肽与其受体,包括ILT2和ILT4的结合,优选地通过表面等离子体共振光谱测量来评估。更优选地,根据本发明的MHC Ib类分子或重组多肽与其受体的结合通过25°C下的表面等离子体共振测量来评估。Shiroishi等描述了这种表面等离子体共振测量的适当条件(Shiroishi et al.,Proc Natl Acad Sci U S A.2003July22;100(15):8856-8861.)。

[0156] 根据本发明的序列比对是使用BLAST算法进行的(参见Altschul et al.(1990)“Basic local alignment search tool.”Journal of Molecular Biology 215.p.403-410.;Altschul et al.:(1997)Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs.Nucleic Acids Res.25:3389-3402.)。适用于使用BLAST算法的短肽的序列比对的合适参数,其适用于根据本发明的肽抗原,是本领域已知的。大多数的使用BLAST算法的软件工具自动调整短输入序列的序列比对的参数。在一个实施方案中,使用以下参数:Max target sequences 10;Word size 3;BLOSUM 62matrix;gap costs:existence 11,extension 1;conditional compositional score matrix adjustment。因此,当与序列一起使用时,例如“同一性”或“相同的”的术语优选地指代使用BLAST算法得出的同一性值。

[0157] 本发明的药物组合物的制备

[0158] 本发明的药物组合物是根据已知的药物组合物的制备标准制备。

[0159] 例如,药物组合物制备方式应能够使其易于储存和施用。因此,本发明的药物组合物可以包含药学上可接受的组分,例如载体、赋形剂和/或稳定剂。

[0160] 在将药物组合物施用于人类患者时,这些药学上可接受的组分在使用的药量上是无毒的。添加到药物组合物中的药学上可接受的组分可取决于组合物中存在的活性成分的化学性质,药物组合物的特定用途和给药途径。

[0161] 通常地,与本发明相关的药学上可接受的组分是根据本领域现有的知识使用的,例如参见Remington's Pharmaceutical Sciences,Ed.AR Gennaro,20th edition,2000,Williams&Wilkins,PA,USA。还可以根据本领域的现有知识来配制包含本发明的核酸(例如,RNA)的药物组合物,例如使用靶向树突状细胞的脂质体制剂。

[0162] 根据本发明的肽抗原

[0163] 能够根据本发明进行使用的肽抗原,包括如上文所定义的肽抗原,除了其能在MHC分子上被递呈之外,没有特别的限制。应当理解,本发明中所称的“所述重组多肽呈递的肽抗原”是指所述重组多肽以与人类T细胞上的T细胞受体结合的方式向人类T细胞(如果存在此类T细胞)呈递的肽抗原。

[0164] 如本领域已知的,可以生产能够在MHC分子上递呈的肽(参见例如,Rammensee, Bachmann,Emmerich,Bachor, **Stevanović**.SYFPEITHI:database for MHCligands and peptide motifs.Immunogenetics.1999Nov;50(3-4):213-9;Pearson et al.MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome.J Clin Invest.2016Dec 1;126(12):4690-4701;以及Rock,Reits,Neefjes.Present Yourself!By MHC Class I and MHC Class II Molecules.Trends Immunol.2016Nov;37

(11)::724-737)。

[0165] 肽抗原是本领域公知的。通常地,根据本发明的肽抗原能够结合MHC I类蛋白。本领域技术人员会理解,对于根据本发明能够递呈肽的每个MHC Ib类分子或多肽,将优选地使用能够与所述MHC Ib类分子或重组多肽结合的肽抗原。可以基于本领域已知的方法选择这些肽抗原。

[0166] 可以通过本领域已知的方法进行评估肽抗原与根据本发明的MHC Ib类分子或能够与肽抗原结合的多肽的结合,例如以下的方法:

[0167] Rammensee, Bachmann, Emmerich, Bachor, Stevanović. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999 Nov; 50(3-4): 213-9;

[0168] Pearson et al. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. J Clin Invest. 2016 Dec 1; 126(12): 4690-4701; 和

[0169] Rock, Reits, Neefjes. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends Immunol. 2016 Nov; 37(11): 724-737.

[0170] 这些方法包括实验方法和用于预测肽抗原结合的方法。

[0171] 用于将肽抗原锚定在MHC I类分子上并确保肽抗原与MHC I类分子结合的锚定残基是本领域已知的。

[0172] 在根据本发明所有实施方案的优选实施方案中,根据本发明使用的肽抗原在对MHC I类分子预测的位置上包含任意的锚定的或优选的氨基酸残基。

[0173] 优选地,此类预测按照以下任一出版物中的描述进行:

[0174] -Rammensee et al, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics (1999) 50: 213-219

[0175] -Nielsen et al, Protein Sci (2003) 12: 1007-1017

[0176] -Neefjes et al. Nat Rev Immunol. 2011 Nov 11; 11(12): 823-36

[0177] -Diehl et al. Curr Biol. 1996 Mar 1; 6(3): 305-14,

[0178] -Lee et al. Immunity. 1995 Nov; 3(5): 591-600.

[0179] -Desai & Kulkarni-Kale, T-cell epitope prediction methods: an overview. Methods Mol Biol. 2014; 1184: 333-64.

[0180] -Jumper et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 2021; 596: 583-589

[0181] 本发明中,所述肽抗原来自人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)、或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)。

[0182] 应当理解,本发明的肽抗原的非锚定氨基酸残基相对于人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)的肽抗原的相应氨基酸序列可以含有或不含有保守取代,优选不超过两个保守取代,更优选一个保守取代。

[0183] 本发明的肽抗原优选地由天然存在的氨基酸组成。但是,也可以使用非天然存在的氨基酸,例如经修饰的氨基酸。例如,在一个实施方案中,本发明的肽抗原包括人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)的指定肽抗原氨基酸序列的拟肽(peptidomimetic)。

[0184] 肽抗原,包括根据本发明的肽抗原,的合成方法是本领域所熟知的。

[0185] 本发明的治疗应用

[0186] 本发明的重组多肽可用于治疗多发性硬化症、MOG抗体病及MOG抗体阳性视神经脊髓炎。

[0187] 该治疗可以是通过诱导髓鞘特异性调节T细胞进行的治疗。由于此类调节T细胞(例如CD8阳性调节T细胞)在髓鞘结构中被激活时,它们会赋予靶细胞保护,以抵御识别相同或另一种髓鞘抗原的细胞毒性T细胞。调节T细胞(例如CD8阳性调节T细胞)是本领域已知的并且可以例如通过其分泌IL-10来检测。

[0188] 尽管CD8阳性调节T细胞并不像CD4CD25调节T细胞那样出名,但它们甚至被认为更强效。参见,例如:

[0189] Junfeng Liu,Dacan Chen,Golay D.Nie and Zhenhua Dai CD8+CD122+T-Cells: A Newly Emerging Regulator with Central Memory Cell Phenotypes.Front.Immunol.doi:10.3389/fimmu.2015.00494;以及,Niederlova,V.,Tsyklauri,O.,Chadimova,T.and Stepanek,O.(2021),CD8<sup>+</sup>Tregs revisited:A heterogeneous population with different phenotypes and properties.Eur.J.Immunol.,51:512-530.https://doi.org/10.1002/eji.202048614

[0190] 虽然这些细胞的特征是在小鼠中表达CD122和CD8,但在人类中相应的细胞被描述为CD8和CXCR3阳性。参见,例如:

[0191] Shi Z,Okuno Y,Rifa'i M,Endharti AT,Akane K,Isobe K,et al.Human CD8+CXCR3+T cells have the same function as murine CD8+CD122+Treg.Eur J Immunol (2009)39:2106-2119.doi:10.1002/eji.200939314)。

[0192] 该治疗可以是降低血浆或脑脊液中抗人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白的自身抗体水平的治疗。人类患者可以是在治疗开始之前血浆或脑脊液具有针对髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白的自身抗体的患者。

[0193] 根据本发明,可以通过本领域已知的各种方法检测自身抗体。优选方法是基于细胞的测定(CBA),其中自身抗体的疑似靶抗原(例如髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白)在HEK293或CHO细胞中过表达,然后将所述细胞与血清或脑脊液一起孵育,通常在室温下孵育1h。模拟转染的姊妹细胞作为对照。利用不同的荧光标记的抗人特异性二抗来检测与细胞结合的自身抗体,这些二抗可识别总人IgG(重链和轻链)、IgG-Fc(恒定链)或IgG1。可以通过流式细胞术(CBA-FACS)或免疫荧光显微镜评估(CBA-IF)的视觉评分来对结合进行量化,通常采用滴定法。在大多数已建立的基于细胞的MOG抗体检测方法中,使用的是218个氨基酸的MOG的a1异构体,尽管也有一种替代方案,其中测试了仅含有细胞外免疫球蛋白和跨膜结构域的截短版MOG。也可以采用酶联免疫吸附试验(ELISA)或蛋白质印迹法等其他方法,但通常灵敏度较低,因为这些方法可能无法检测到构象敏感抗体。Waters,P.,Pettingill,P.&Lang,B.Detection methods for neuroautoantibodies.Handb.Clin.Neurol.133,147-163(2016)中描述了合适的方法。

[0194] 有关髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)抗体的详细概述,可参见Reindl M,Waters P.Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease.Nat Rev Neurol.2019Feb;15(2):89-102.doi:10.1038/s41582-018-0112-x.PMID:30559466。

[0195] 序列

[0196] 本申请中提及的优选的氨基酸序列可独立地选自以下序列。这些序列以N端至C端的顺序表示;并且以单字母的氨基酸代码表示。

[0197] 示例性序列,作为本发明的重组多肽的一部分:

[0198] 可选的前导肽(由于在细胞表达过程中的加工而从重组多肽中缺失):例如MSRSVALAVLALLSLSGLEA(SEQ ID NO:1)

[0199] 肽抗原:任意与MHC I类 $\alpha$ 1&2结构域相对应的MHC I类肽,例如,VLLAVLPVL(SEQ ID NO:2)(最优选)

[0200] 第一接头:例如GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:3)或GCGASGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:4)

[0201]  $\beta$ 2微球蛋白,例如:

[0202] IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKD WSFYLLYY TEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM(SEQ ID NO:5,人 $\beta$ 2微球蛋白)

[0203] 第二接头,例如:

[0204] GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:6)

[0205]  $\alpha$ 1&2结构域,来自人HLA-G或其他适合于递呈所选抗原肽的MHC I类 $\alpha$ 1&2结构域,在DT变体中Y84可以是C

[0206] 例如,来自人HLA-G的 $\alpha$ 1&2结构域:例如:

[0207] GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNTK AHAQTDRMNLQTLRGCYNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISK RKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRA(SEQ ID NO:7)

[0208] 或者:人HLA-A2 $\alpha$ 1&2结构域:例如:

[0209] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKKV AHSQTHRVDLGT LRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDY IALKEDLRSWTAADMAAQTTK HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRT(SEQ ID NO:8)

[0210] 人HLA-G $\alpha$ 3结构域(或任意MHC Ib类 $\alpha$ 3结构域,例如HLA-F,其也与ILT2和ILT4受体相互作用),例如:

[0211] DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWAAVVV PSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL(SEQ ID NO:9;HLA-G $\alpha$ 3的序列)。

[0212] 注意:该序列的以下加下划线的氨基酸与ILT2或ILT4受体的相互作用有关:

[0213] DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWAAVVV PSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL

[0214] 此外,可以使用较短形式的人HLA-G $\alpha$ 3结构域,其缺少来自内含子4的可选C端氨基酸序列(SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL;SEQ ID NO:20),即:

[0215] DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWAAVVV PSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW(SEQ ID NO:21),

[0216] Xa因子限制位点:IEGRTGTKLGP(SEQ ID NO:10)

[0217] SpotTag:PDRVRAVSHWSSC(SEQ ID NO:11)

[0218] Myc标签:EQKLISEEDL(SEQ ID NO:12)

[0219] His标签:HHHHHH\*(SEQ ID NO:13)

[0220] 间隔序列:例如NSAVD(SEQ ID NO:14)或GS

[0221] 可作为本发明重组多肽的一部分的其它(替代)示例性肽抗原如下:

[0222] 表1:进一步优选的肽抗原

肽抗原是 以下肽:	肽序列	SEQ ID NO:	备注
MAG	MVPDNCPEL	25	优选用于含有人 HLA-A2 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽
MOG	AIGEGKVTL	26	优选用于含有人 HLA-A2 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体
MBP	RSQPGLCNM	27	优选用于含有源自人 HLA-G 的 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体
MBP	SLSRFSWGA	28	优选用于含有人 HLA-A2 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体
MOG	KDAIGEGKVTL	29	优选用于含有源自人 HLA-G 的 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体
MOG	AIGEGKVTL	30	优选用于含有人 HLA-A2 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体
MOG	RHPIRALVG	31	优选用于含有源自人 HLA-G 的 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体
MOG	RALVGDEVEL	32	优选用于含有源自人 HLA-G 的 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体
PLP	LLLECCARCL	33	优选用于含有源自人 HLA-G 的 $\alpha$ 1&2 结构域的重组多肽构建体

[0224] 本发明的重组多肽的示例(具有可选的前导肽):

[0225] MSRSVALAVLALLSLSGLEAVLLAVLPVLGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN  
 CYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLLYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWRDMG  
 GGGSGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGP  
 EYWEEETRNKAHAQTDRMNLQTLRGYNQSEASSHTLQWMI GCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDY LALNEDLR SW  
 TAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFY  
 PAEII LTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDG GIMSV  
 RESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC\*(SEQ ID NO:15;注意,星号表示终止密码子)

[0226] 注意,上述全长重组多肽的肽抗原序列(此处:VLLAVLPVL)可以由本发明的任意肽抗原序列替换,即由所述重组多肽呈递的任意肽抗原替换,其中肽抗原是人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)、或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)的肽。也即是,本发明的重组多肽可以由以下序列组成,所述序列的组成是,肽抗原,其是人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白(MAG)或人髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP1)的肽(例如,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32、以及SEQ ID NO:33的肽抗原中的任一者),随后是以下序列GCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSFYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFDS DSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYCNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLR GYE QYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGIMS VRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC\*(SEQ ID NO:16;注意,星号表示终止密码子)

[0227] 本发明的这些重组多肽还可以含有如上例举的可选的前导肽。

[0228] 受体ILT2(也称为LILRB1)和ILT4(也称为LILRB2)是本领域已知的。根据本发明这些受体的优选序列如下:

[0229] ILT2:

[0230] MTPILTVL ICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFP IPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPSPVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGGERDFLQLAGAQPPAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLDIL IAGQFYDRVLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFLLTKEGAADDPWRLRSTYQSKYQAEFPMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSG LGRHLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLFLILRHRRQKGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPAV TYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDV TYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH(SEQ ID NO:17)

[0231] ILT4:

[0232] MTPIVTVL ICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAEPDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGF ILCKEGEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAGAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPV TSAHAGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLELVVSGPSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSG LGRHLGVVIGILVAVVLLLLLLLLLFLILRHRRQKGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQDV TYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEP SIYATLAIH(SEQ ID NO:18)

[0233] 人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、人髓鞘碱性蛋白(MBP)、人髓鞘相关糖蛋白

(MAG) 或人髓鞘蛋白脂质蛋白 (PLP1) 的序列是本领域已知的。人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)、人髓鞘碱性蛋白 (MBP)、人髓鞘相关糖蛋白 (MAG)、或人髓鞘蛋白脂质蛋白 (PLP1) 的优选氨基酸序列如下:

[0234] 人髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白 (MOG):

[0235] >NP\_996532.2myelin-oligodendrocyte glycoprotein isoform alpha precursor[Homo sapiens]

[0236] MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPICALVGDEVELPCRISPGKNATGMEVGWY RPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRFSDGEGFTCFFRDHSYQEEAAMELKVED PFYVWSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLIFLCLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFFVIVPVLGPLVA LIICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF

[0237] (SEQ ID NO:19)

[0238] 人髓鞘碱性蛋白 (MBP):

[0239] >NP\_001020252.1myelin basic protein isoform 1[Homo sapiens]

[0240] MASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKVPWLKPGRSP LPSHARSQPGLCNMYKDSHHPARTAHYGSPLQKSHGRTQDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAE GQRPGFGYGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLSKIFKLGGDRSRSGSPMARR

[0241] (SEQ ID NO:22)

[0242] 人髓鞘相关糖蛋白 (MAG):

[0243] >NP\_002352.1myelin-associated glycoprotein isoform a precursor[Homo sapiens]

[0244] MIFLTALPLFWIMISASRGGHWGAWMPSSISAFEGTCVSI PCRFD PDEL RPAVVHGVVWFNSPYPKNY PPVVFKSRTQVVHESFQGRSRLGLDLGRNCTLLLSNV SPELGGKYYFRGDLGGYNQYTFSEHSVLDIVNTPNIVVP PEVVAGTEVEVSCMVPDNCPELRPELSWLGHGELGEPAVLGRLEDEGTWVQVSLHVFPTREANGHRLGCQASFPN TTLQFEGYASMDVKYPPVIVEMNSSVEAIEGSHVSLCGADSNPPPLLTWMRDGTVLREAVAESLLELEEVTPAED GUYACLAENAYGQDNRTVGLSVMYAPWKPTVNGTMVAVEGETVSILCSTQSNPDILTIFKEKQILSTVIYESELQL ELPAVSPEDDGEYWCVAENYQGRATAFNLSVEFAPVLLLESHCAAARDTVQCLCVVKSNDPEPSVAFELPSRNVTVN ESEREFVYSERSGLVLTSLILTRGQAQAPPRVICTARNLYGAKSLELFPQGAHRLMWAKIGPVGAVVAFAILIAIVC YITQTRRKNVTESPSFSAGDNPPVLFSSDFRISGAPEKYESERRLLGSRLLGLRGPEPELDLSYSHSDLGKRPTK DSYTLTEELAEYAEIRVK

[0245] (SEQ ID NO:23)

[0246] 人髓鞘蛋白脂质蛋白 (PLP1):

[0247] >NP\_000524.3myelin proteolipid protein isoform 1[Homo sapiens]

[0248] MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLINVIHAFQ YVIYGTASFFFLYGALLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSRLRVCHCLGKWL GHPDKFVGIYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTCQSIAFPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVCGSN LLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAATLVSLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTFK

[0249] (SEQ ID NO:24)

[0250] 通过以下非限制性实施例进一步说明本发明。

## 实施例

[0251] 实施例1:

[0252] 生产本发明的重组多肽的方法

[0253] -在Expi-293™表达培养基(Thermo Fisher)中生长Expi-293F细胞(Thermo Fisher):使用Expifectamine™293转染试剂盒(Thermo Fisher),使用Opti-MEM(Thermo Fisher)将DNA与Expifectamine复合,将1μg DNA转染到2.5x10<sup>6</sup>细胞/ml中,18-20h后,根据方案添加增强剂,4-6天后收获上清液(37°C、8% CO<sub>2</sub>加湿培养箱),19mm<sup>2</sup>轨道摇床上以125rpm振荡培养。

[0254] -Spot-tag蛋白质纯化:Spot-Cap树脂平衡:将所需浆液量转移到适当的管中,通过离心(4°C,4min,2500g)沉淀珠子,移除并丢弃上清液,向珠子中加入10倍床体积PBS(预冷的),倒置混合,通过离心(4°C,4min,2500g)沉淀珠子,移除并丢弃上清液,重复2次。

[0255] -将所需体积的珠子添加到上清液中,在旋转器上4°C孵育,通过反复离心(4°C,4min,2500g)清洗珠子,然后去除上清液。

[0256] -在PBS中制备500μM Spot-肽溶液,除去上清液,与1/3rd Spot-肽溶液孵育5-10min。

[0257] 通过离心沉淀珠子。使用Amicon Ultra-4离心过滤器(15kDa截止值)进行蛋白质浓缩,并使用15kDa Amicon截止值柱去除Spot-肽。

[0258] 用PBS冲洗Amicon Ultra-4离心过滤器(15kDa截止值),然后用0.1N NaOH(在4000g、4°C下离心)冲洗,以去除痕量甘油。

[0259] ELISPOT:

[0260] 1) 细胞培养

[0261] A) PBMC分离(在层流罩下)

[0262] 为了分离外周血单核细胞(PBMC),使用来自白细胞减毒室和密度梯度培养基(例如Ficoll或ROTI Sep 1077)的白细胞进行密度离心。将细胞以1200×g的速度不间断离心20min,然后收集中间相环,用1×PBS清洗(5min,300×g)。将PBMC冷冻直至进一步使用。

[0263] B) PBMC脉冲刺激(在层流罩下)

[0264] 在PBMC脉冲刺激前1天(d-1)将PBMC解冻,于6孔板的孔中在含有5%人AB血清的5ml X-VIVO 15培养基中37°C保存过夜。

[0265] 第二天(d0),对细胞进行计数并将其悬浮在X-VIVO 15完全培养基(5%hAB血清和细胞因子混合物:20ng/ml hIL-2、20ng/ml hGM-CSF、10ng/ml hIL-4和10ng/ml hTGF-b1)中,细胞密度为3x10<sup>6</sup>细胞/ml。

[0266] 实验中,将3×10<sup>6</sup>个细胞接种于12孔板的相应孔中,其中X-VIVO完全培养基的最终体积为1000μl,培养基中含有细胞因子混合物、以及5μg/ml AIM Bio分子或相应的对照。

[0267] 第3天,加入1ml完全培养基(含有细胞因子),第6天,用5μg/ml本发明的重组多肽或其替代物(统称为“AIM Bio”分子)进行第二次脉冲刺激(除去培养基后)。在第7、10和12天,添加1ml完全培养基(含有细胞因子)。

[0268] 材料:

[0269] X-VIVO 15培养基+5%人AB血清

[0270] X-VIVO 15完全培养基:X-VIVO 15培养基+2%人AB血清,补充细胞因子混合物:

10ng/ml TGF- $\beta$ 1、10ng/ml IL-4、20ng/ml IL-2、20ng/ml GM-CSF

[0271] 6孔板和12孔板

[0272] 2) ELISPOT

[0273] 在第13天,使用抗IL10 (克隆9D-7,在PBS中1:500稀释,无菌过滤)和aIL10 (10G8-生物素)包被ELISPOT板,并在第14天,在ELISPOT板上每孔接种200,000个细胞,一式两份,包括阴性对照(细胞加PBS)和阳性对照(例如LPS)。

[0274] 用50 $\mu$ l/孔EtOH (35% v/v)活化PVDF膜1min,然后用200 $\mu$ l蒸馏无菌水清洗5次。将板用100 $\mu$ l/孔抗体溶液包被,在4 $^{\circ}$ C下过夜。第二天,去除未结合的包被抗体,用200 $\mu$ l PBS进行5次清洗步骤,并添加200 $\mu$ l封闭缓冲液(X-VIVO 15 5% hAB血清),并将板在室温下孵育30min-2h。

[0275] 制备含有相应的抗原肽的DMSO (例如MOG157)或以DMSO为对照,并将最终量为5 $\mu$ g肽/ml添加到100 $\mu$ l/孔的最终体积中。在含有5%人AB血清的X-VIVO 15培养基中每孔接种150,000个细胞。小心去除封闭缓冲液(X-VIVO 15培养基+5% hAB血清),并将含有PBS的培养基作为阴性对照,并将刺激物(每孔总体积5 $\mu$ g/ml)添加到其他孔中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。

[0276] 层流罩外

[0277] 二抗制备:在0.5% BSA/1 $\times$  PBS 1 $\mu$ g/ml aIL-10-生物素化抗体(1:1000稀释)和辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素(0.5% BSA/PBS, 1:750稀释),四甲基联苯胺溶液使用0.45 $\mu$ m过滤器过滤,并在4 $^{\circ}$ C下保存直至使用。

[0278] 去除细胞上清液并用100 $\mu$ l PBS清洗5次。最后用纸清除多余的缓冲液。

[0279] 每孔加入25 $\mu$ l稀释的HRP-链霉亲和素(1:750),室温下避光孵育1h,然后用无菌1 $\times$  PBS清洗5次。

[0280] 每孔加入100 $\mu$ l过滤的TMB底物,静置15-25min,直至出现蓝色斑点。用自来水彻底冲洗孔以停止反应。

[0281] 除去板的塑料排水管并用自来水冲洗板的底部和侧面并晾干。

[0282] 使用ImmunoSpot S6 Ultra-V分析仪(Cellular Technology Limited)读取板的数据,在Excel中进行分析,然后在Graphad Prism中绘制图表/统计数据。

[0283] 必需的:捕获抗体:抗hIL10 (克隆:9D-7, Mabtech#3430-3-250; 1:500稀释)、抗hIL10生物素化 (Mabtech, #3430-6-250)、1 $\times$  PBS (无菌)、35% EtOH (v/v); 封闭缓冲液:X-vivo 5% hAB血清 (无菌) [封闭在与细胞培养相同的培养基中进行]; 稀释缓冲液:PBS中的0.5% BAS; 清洗缓冲液:1 $\times$  PBS; 培养基:用于T细胞,X-VIVO 15培养基 (Lonza); 过滤注射器:Millex GV, ELISPOT PVDF板 (#MSIP4510, Millipore), TMB底物

[0284] 实施例2:本发明的重组多肽的替代分子在小鼠中诱导分泌IL10的Treg。

[0285] 给野生型黑色6只小鼠注射100 $\mu$ g重组多肽(也称为“AIMBio”),其具有如下序列,

[0286] Ova\_KbG

[0287] SIINFEKLGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGER  
IEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGP  
HSLRYFVTVASRPGLGEPYMEVGYVDDTEFVRFDSDAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDL  
RTLLGCYNQSKGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGC DYIALNEDLKTWTAADMAALITKHKWEQAGEAE

RLRAYLEGTCVEWLRRLKNGNATLLRTPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEI ILTWQRDGEDQTQDVEL  
VETRPAGDGTFFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSH  
WSSC (SEQ ID NO:46)

[0288] 和

[0289] Gp34\_KbG

[0290] AVYNFATMGCASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGER  
IEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGP  
HSLRYFVTAVSRPGLGEP RYMEVG YVDDTEFVRFDS DAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDL  
RTLLGCYNQSKGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGC DYIALNEDLKTWTAADMAALITKHKEQAGEAE  
RLRAYLEGTCVEWLRRLKNGNATLLRTPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEI ILTWQRDGEDQTQDVEL  
VETRPAGDGTFFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSH  
WSSC (SEQ ID NO:47)。

[0291] 分别诱导对OVA肽或病毒Gp34肽的耐受性。Gp34是一种已明确特征的T细胞表位，源自淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 糖蛋白的。虽然该表位传统上被命名为Gp33，但后来发现H2-K<sup>b</sup>上呈递的表位仅包含氨基酸34-41。(相反，呈递在H2-K<sup>d</sup>上的表位从氨基酸33开始) 因此，我们将H2-K<sup>b</sup>表位称为Gp34，这符合最新的建议。然而，文献中Gp33和Gp34命名的使用仍不清晰。SEQ ID NO:47的前8个氨基酸显示相应的肽序列。两周后，处死小鼠，并用匹配或不匹配的肽再次刺激脾细胞。通过ELIspot对IL-10分泌细胞进行定量。结果如图3所示。

[0292] 实施例3:本发明的重组多肽的替代分子在小鼠中预防CD8<sup>+</sup>T细胞驱动EAE。

[0293] 如(Na et al, Brain. 2008 Sep; 131 (Pt 9): 2353-65.) 所述, 将可在H2-K<sup>b</sup>背景下识别卵清蛋白表位的CD8<sup>+</sup>OT-I T细胞过继转移到在少突胶质细胞中表达卵清蛋白的小鼠中, 会导致实验性自身免疫性脑脊髓炎, 这种脑脊髓炎会重现许多MS和MOGAD症状。在该动物模型中, 单次注射500μg可诱导针对目标卵清蛋白表位耐受性的重组多肽替代分子(也称为“AIMBio”)几乎完全预防了EAE症状, 而呈递对照肽的替代分子没有显著的保护作用(图4)。重组多肽替代分子的序列如实施例2所示。

[0294] 在同一模型中, 发明人进一步证明, 使用目标组织或细胞中呈递的抗原肽可产生有效的旁观者免疫抑制。在此, 每只小鼠注射了250μg重组多肽替代分子(也称为“AIMBio”) (图5)。重组多肽替代分子的序列如下:

[0295] Mog44\_DbG

[0296] FSRVVHLYRNGGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHP

[0297] SDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVK

[0298] WDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSMRYFETAVSRPGLLEPRYISVG YVDNKEFV

[0299] RFDS DAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNLLGCYNQ SAGGSH

[0300] TLQQMSGCDLGS DWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAADMAAQITRRKWEQSGA

[0301] AEHYKAYLEGECEVWLHRYL KNGNATLLRTPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAE

[0302] I ILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLR

[0303] WSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID NO:48)

[0304] Mog37\_DbG

[0305] VGWYRSPFSRGCASGGGGSGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSPDIE  
[0306] VDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDR  
[0307] DMGGGGSGGGSGGGSGGGSGPHSMRYFETAVSRPGLLEPRYISVGYVDNKEFVRFDS  
[0308] DAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNLGVCYNQSAGGSHTLQQ  
[0309] MSGCDLGSWRLLRGLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAADMAAQITRRKWEQSGAAEHY  
[0310] KAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTW  
[0311] QRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSK  
[0312] EGDGIMSRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID NO:49)。

[0313] 实施例4: 本发明的一些重组多肽的替代物在小鼠中选择性地预防CD4<sup>+</sup>T细胞驱动的EAE。

[0314] 在第0天, 腹腔注射33 $\mu$ g或100 $\mu$ g本发明替代分子的重组多肽(“AIM Bio”), 左侧和右侧侧腹皮下注射100 $\mu$ l MOG35-55肽/CFA(完全弗氏佐剂; 结核分枝杆菌H37RA和肽的最终浓度各为1mg/ml) 乳剂, 并在腹膜内注射250ng百日咳毒素(在200 $\mu$ l PBS中)。3天后进行了第二次百日咳毒素注射。在该动物模型中, 单次注射诱导对Mog表位(Mog44\_DbG)耐受性的AIM Bio替代分子可显著减轻EAE症状, 而呈递对照肽(Gp34)或非功能性Mog肽(Mog37)的替代分子则没有显著的保护作用(图6)。在该模型中, Mog44 AIM Bio还能预防脊髓中的炎症和CD8<sup>+</sup>T细胞浸润(图7)。重组多肽替代分子的序列如实施例3所示。

[0315] 在该模型中, 经ELISA检测, Mog44 AIM Bio还完全阻止了血清中MOG特异性自身抗体的形成(图8和图11)。这有力地表明, 本发明的重组多肽是MS和MOGAD的有效治疗剂, 这两项疾病通常以针对MOG的抗体反应为特征。因此, 患者群体是由常见的自身免疫相关抗原定义的。

[0316] 通过标准ELISA方案检测AIM Bio(33或100 $\mu$ g)治疗小鼠血清中的Mog反应性抗体, 每个步骤之间进行3次清洗。简而言之, 将ELISA板用10 $\mu$ g/ml Mog35-55肽包被, 用PBS 1% BSA封闭, 然后加入在PBS 1% BSA中1:25稀释的小鼠血清, 静置1h。使用1:5000稀释的抗小鼠IgG-HRP或抗小鼠重链和轻链-HRP抗体进行检测。

[0317] 实施例5: 本发明的用于MS和MOGAD的人重组多肽候选物。

[0318] 本发明的重组多肽是新开发的蛋白质复合物, 源自妊娠相关免疫抑制MHC分子HLA-G。HLA-G可能使胚胎能够影响母体免疫系统, 使其耐受胚胎抗原, 但进一步拮抗病原体抗原。本发明的含有各种肽的重组多肽能够在试管中选择性消除肽特异性细胞毒性效应T细胞以及诱导肽特异性调节T细胞。

[0319] 图9示出了人MS和MOGAD重组多肽候选物的列表。

[0320] 发明人的研究表明, 含有髓鞘肽抗原和HLA-G $\alpha$ 3结构域的单链蛋白质可以在健康供体中诱导耐受性T细胞。因此, 含有VLLAVLPVL抗原(也称为“Mog157\_A2G”; 参见图10)的本发明的重组多肽在75%的健康献血者中使CD8<sup>+</sup>Treg上调至少30%。

[0321] 实施例6: 本发明的重组多肽的稳定性和效果的进一步概念验证。

[0322] 此外, 发明人着手获得并测试具有本发明重组多肽的一般结构但含有各种不同肽抗原的重组多肽, 以便获得进一步的概念验证, 证明本发明的重组多肽及其替代分子是稳定和有效的。如图12和图13分别所示, 所测试的重组多肽在冻融和储存过程中保持稳定, 且具有热稳定性。此外, 它们以剂量依赖性方式诱导Treg(图14)并以剂量依赖性方式抑制T细

胞裂解(图15)。重组多肽对EAE-ODC Ova小鼠血清细胞因子谱的影响,如图16所示。诱导了IL-10,有可能诱导了IL-4,二者都是已知的免疫抑制细胞因子,可在炎症环境中下调免疫反应。这需要HLA-G $\alpha$ 3结构域加上同源肽。IL-2的诱导似乎是在向细胞呈递与 $\alpha$ 3结构域无关的同源肽时引起的。IL-2是T细胞激活和存活所必需的。

[0323] 实施例7:本发明的MOG耐受诱导重组多肽可防止脊髓细胞凋亡(裂解的caspase 3)、CD3<sup>+</sup>免疫细胞浸润和髓鞘损伤。小鼠模型如图6所示。

[0324] MOG诱导的EAE模型的脊髓免疫荧光分析。

[0325] 材料:

[0326] 一抗

[0327]  $\alpha$ -CD3i克隆CD3-12(1:100);大鼠单克隆(大鼠抗人,与小鼠有交叉反应,Bio-rad); $\alpha$ -MBP(1:300,兔单克隆,MBL); $\alpha$ -裂解的caspase3(1:400,兔单克隆,Cell Signaling)

[0328] DAPI(1:500,Sigma#D8417)

[0329] 二抗

[0330]  $\alpha$ -兔-Cy3(红色,1:300,Dianova#111-165-144); $\alpha$ -大鼠-AF488(绿色,1:300,Invitrogen)或 $\alpha$ -兔-Cy3(红色,1:300,Dianova#112-165-167)

[0331] 步骤

[0332] 将冷冻切片在室温下加热5min,用Pap-Pen标记染色区域,在丙酮中固定,在-20℃下放置10min。

[0333] 清洗:1×PBS清洗3次

[0334] 封闭1h:1×PBS中5% BSA+0.2% Triton-X100+5% NGS

[0335] 一抗:1% BSA+1%NGS+0.2% Triton-X100;4℃,过夜

[0336] 清洗:1×PBS清洗3次

[0337] 二抗:1% BSA+1%NGS+0.2% Triton-X100;RT,1h

[0338] 清洗:1×PBS清洗3次

[0339] DAPI:在1×PBS中1:300,10min,RT

[0340] 清洗:1×PBS清洗2次

[0341] 使用Aquapolymount封片

[0342] 详细结果:

[0343] 图17的A、B:在MOG诱导的EAE脊髓中,Caspase3激活(细胞凋亡)能够被阻止。A:图像;B:定量。

[0344] 图17的C、D:MOG诱导的EAE脊髓白质损伤能够被阻断。C:图像;D:定量。

[0345] 图17的E、F:MOG诱导的EAE中CD3浸润脊髓能够被阻止的。E:图像;F:定量。

[0346] 实施例8:MOG157\_A2G治疗后IL10斑点增加。

[0347] 图18显示用MOG157\_A2G处理后IL10斑点增加,这表明已经诱导了耐受性Treg。这是图10的另一种描述。

[0348] 产业适用性

[0349] 本发明所用的药物组合物、多肽、核酸、细胞和产品具有产业应用价值。例如,它们可以用于制造药品或用作药品。

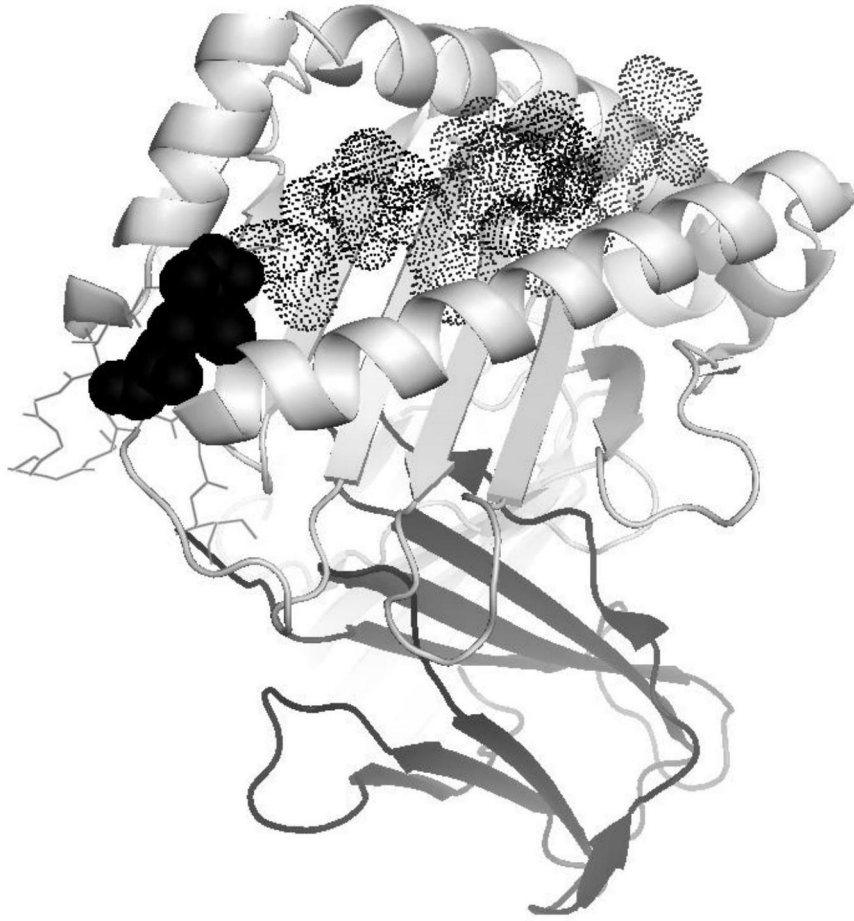


图1

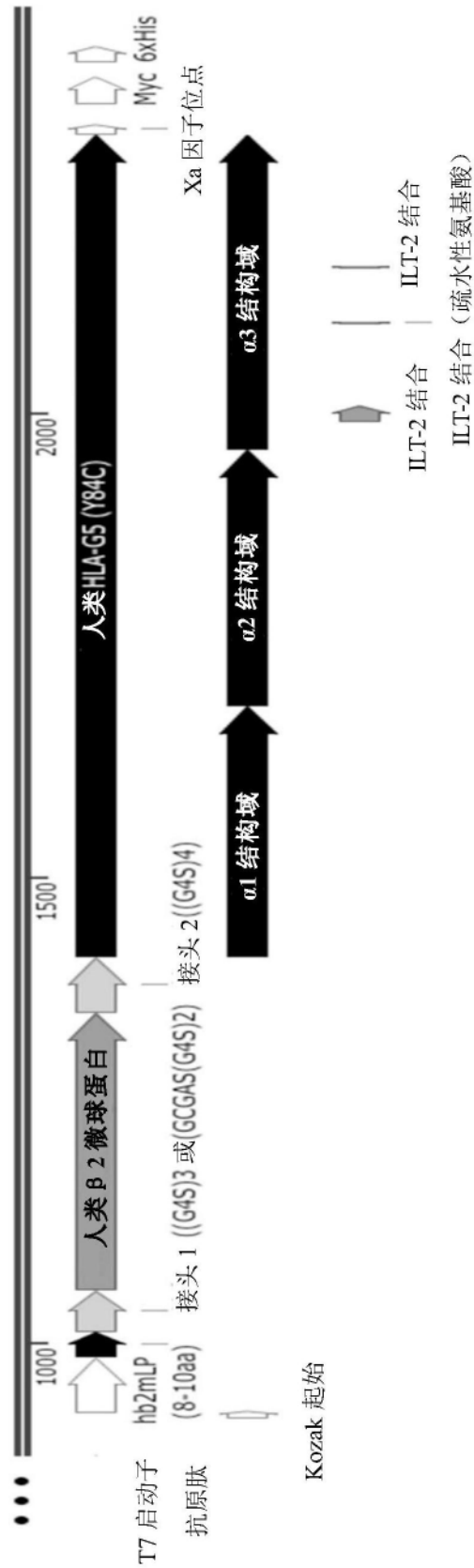


图2

**A**

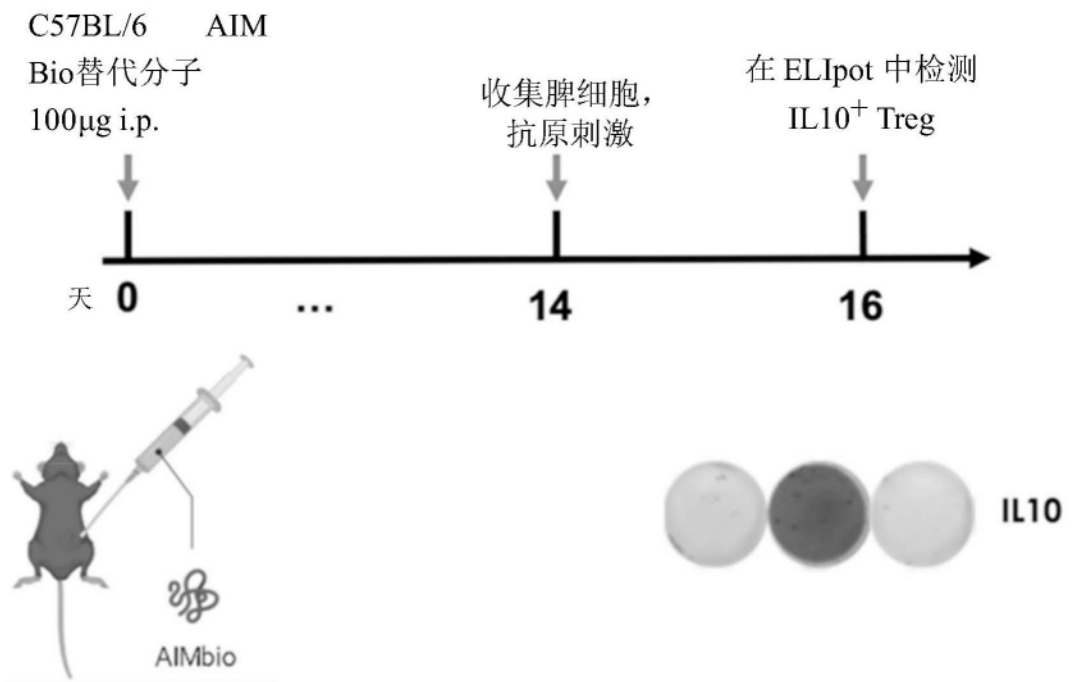


图3

B

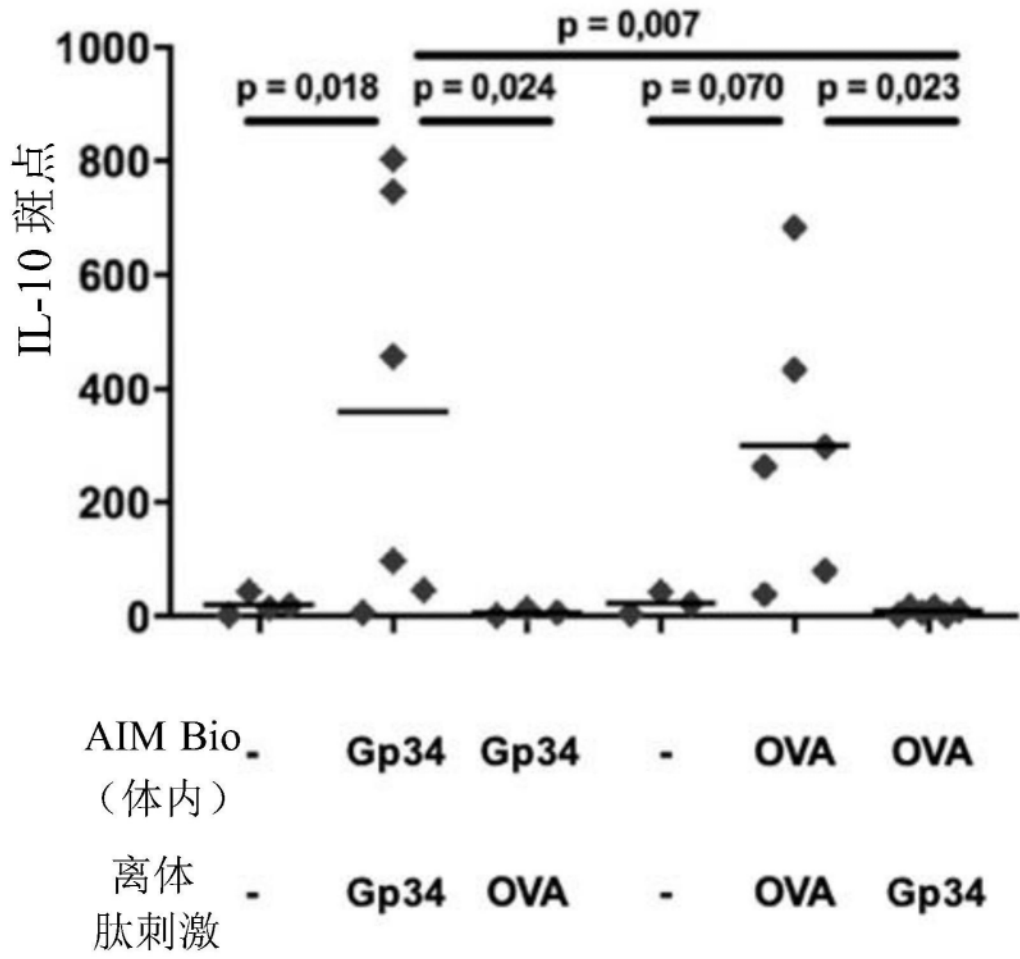


图3,续

A

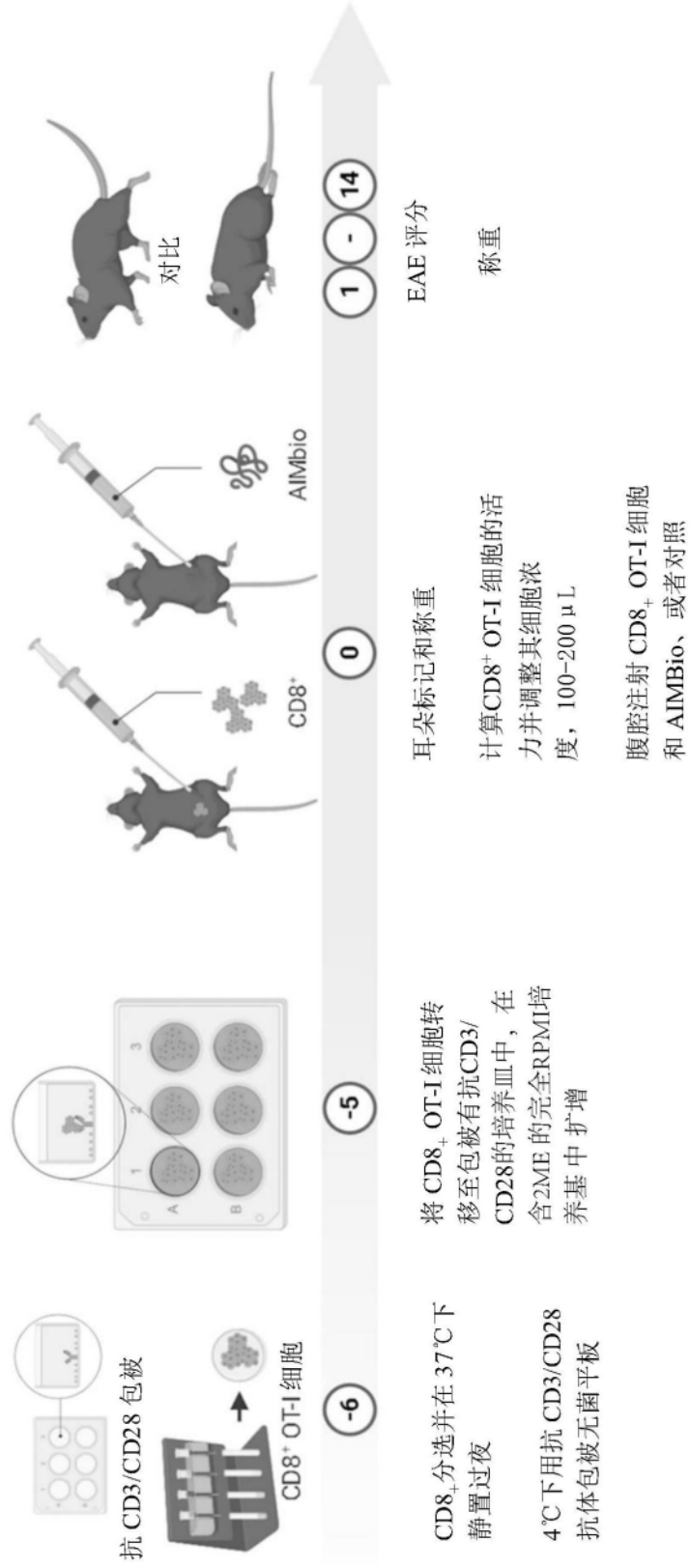


图4

**B**

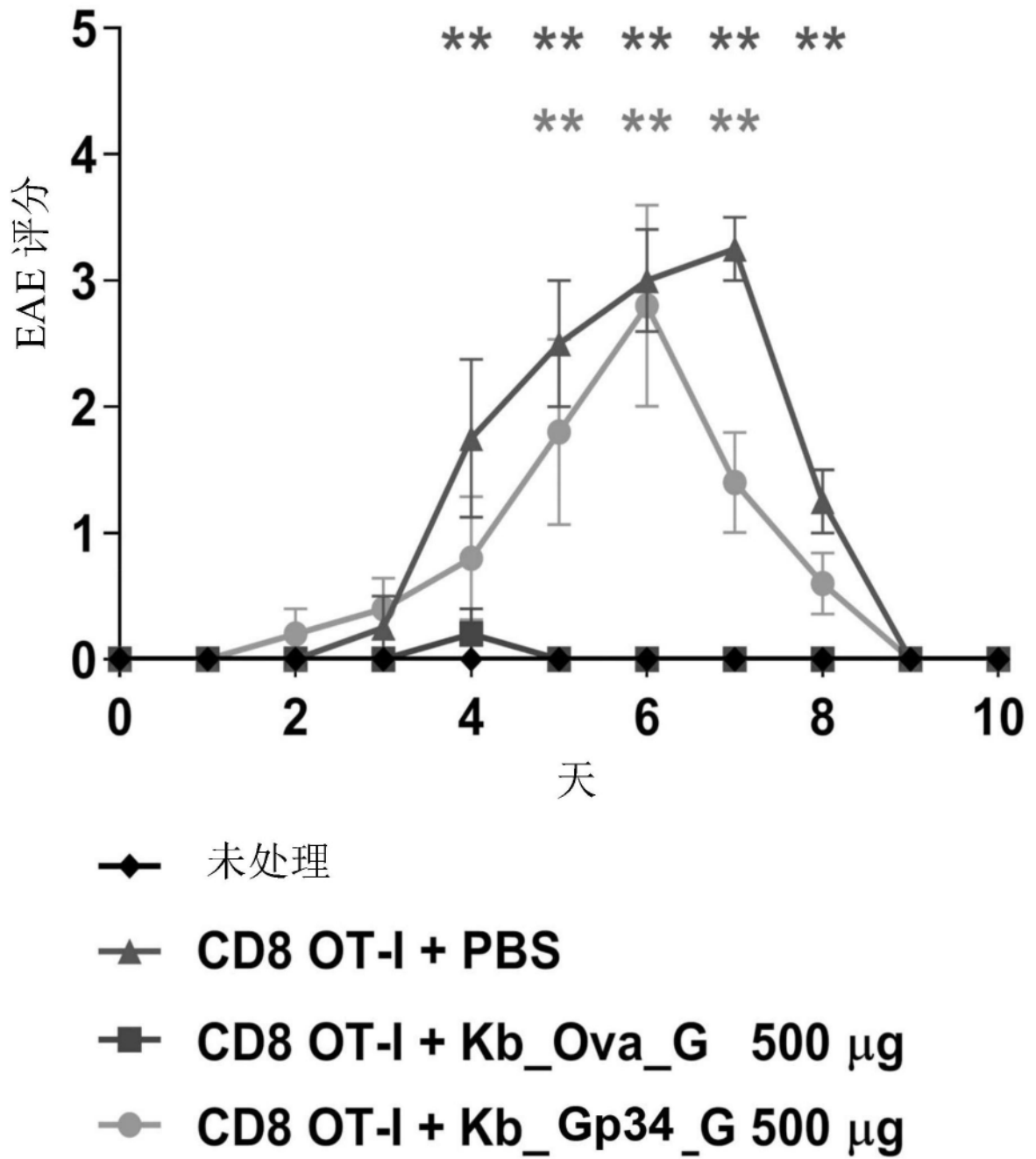


图4,续

A

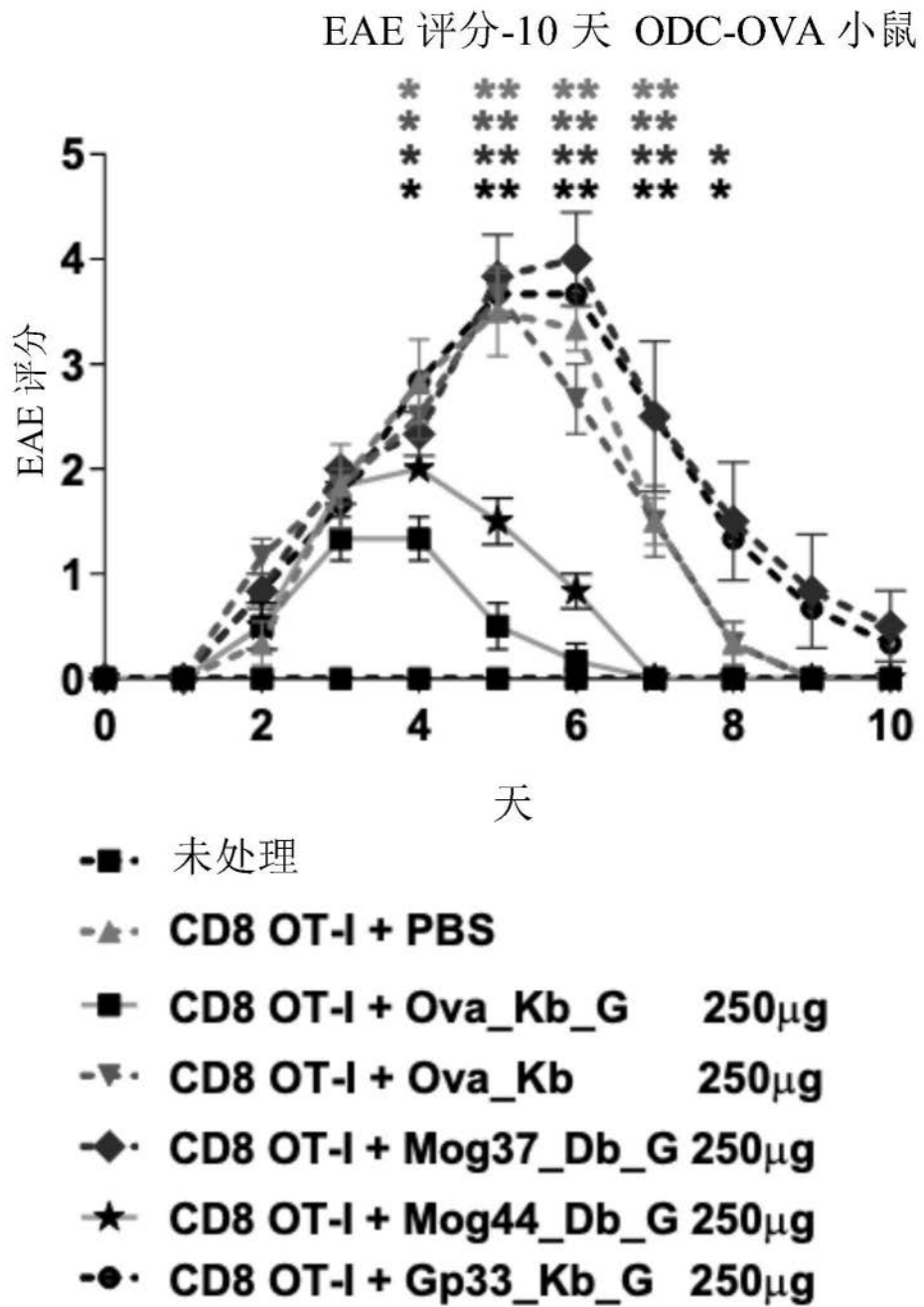


图5

**B**

%体重-10 天 ODC-OVA 小鼠

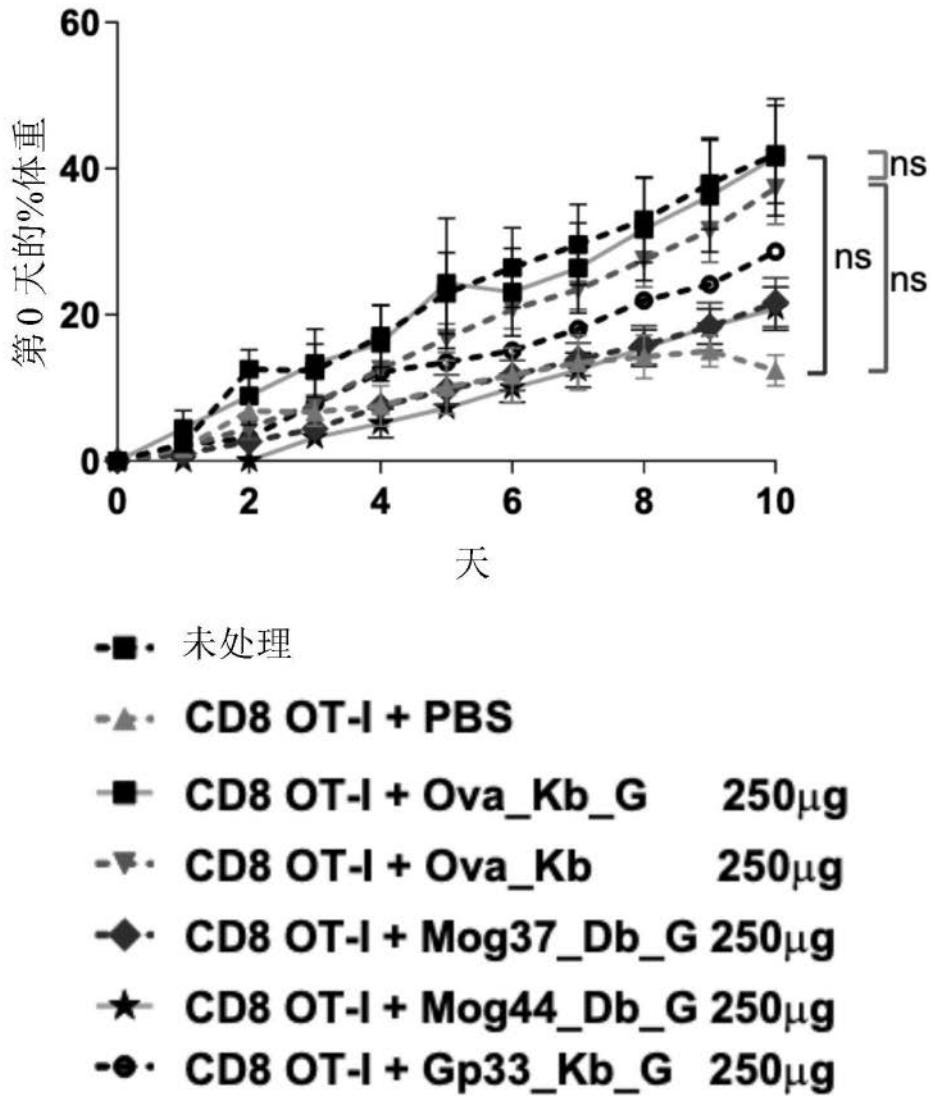


图5,续

A

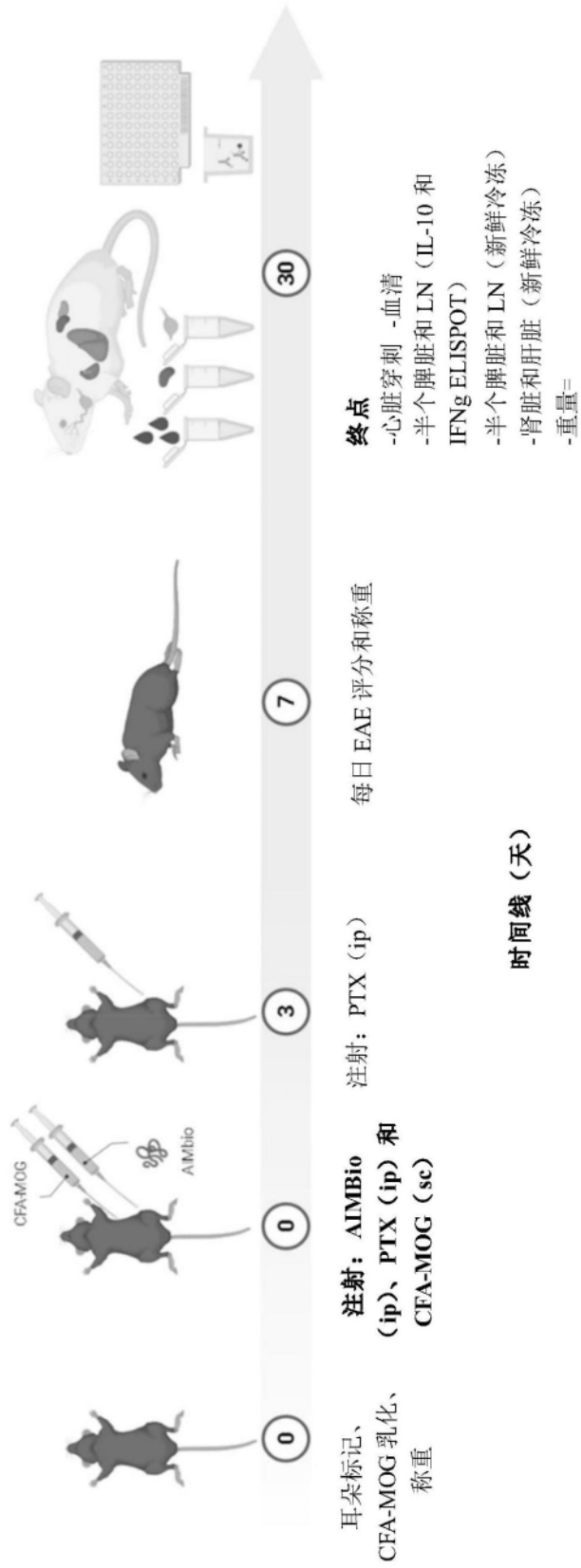


图6

**B**

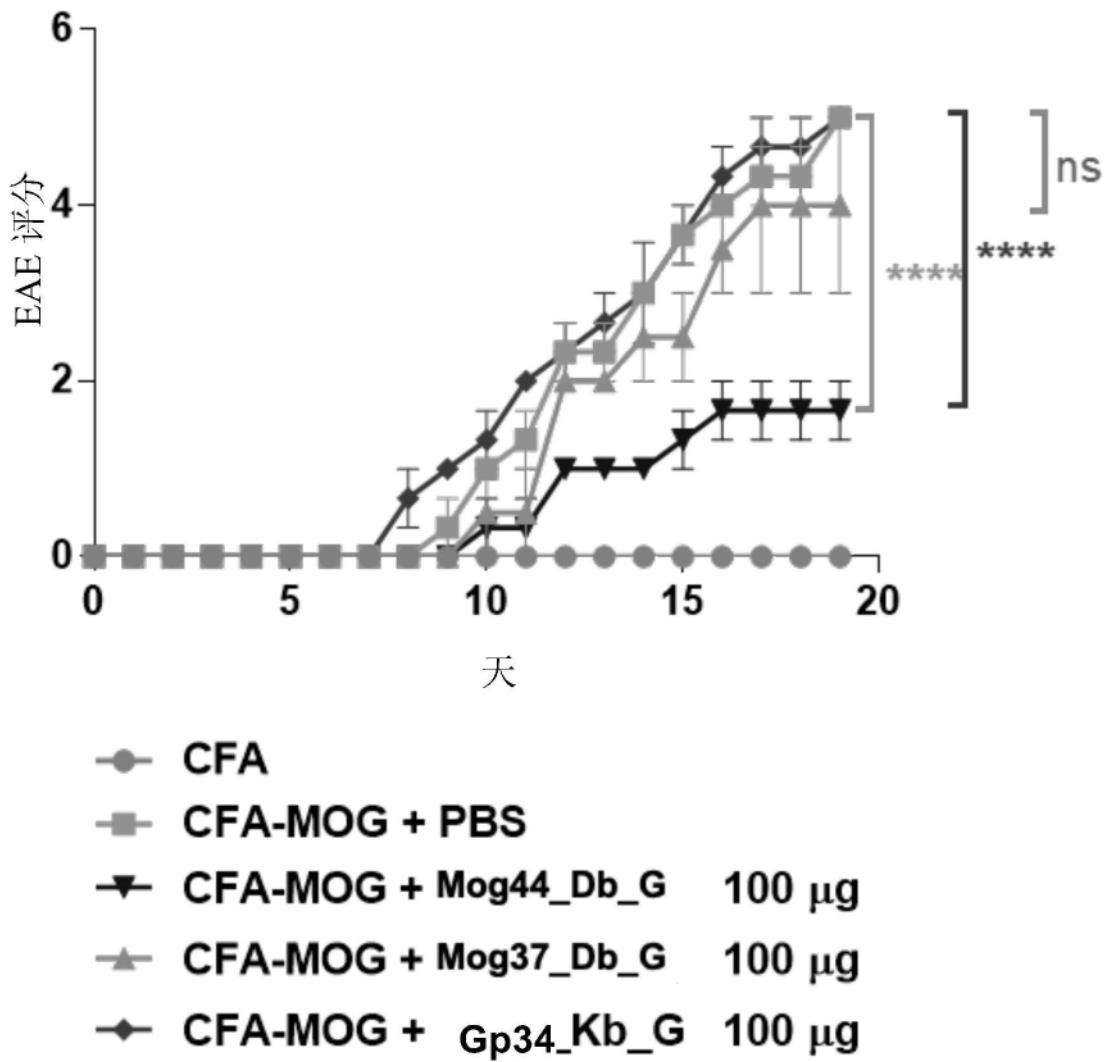


图6,续

C

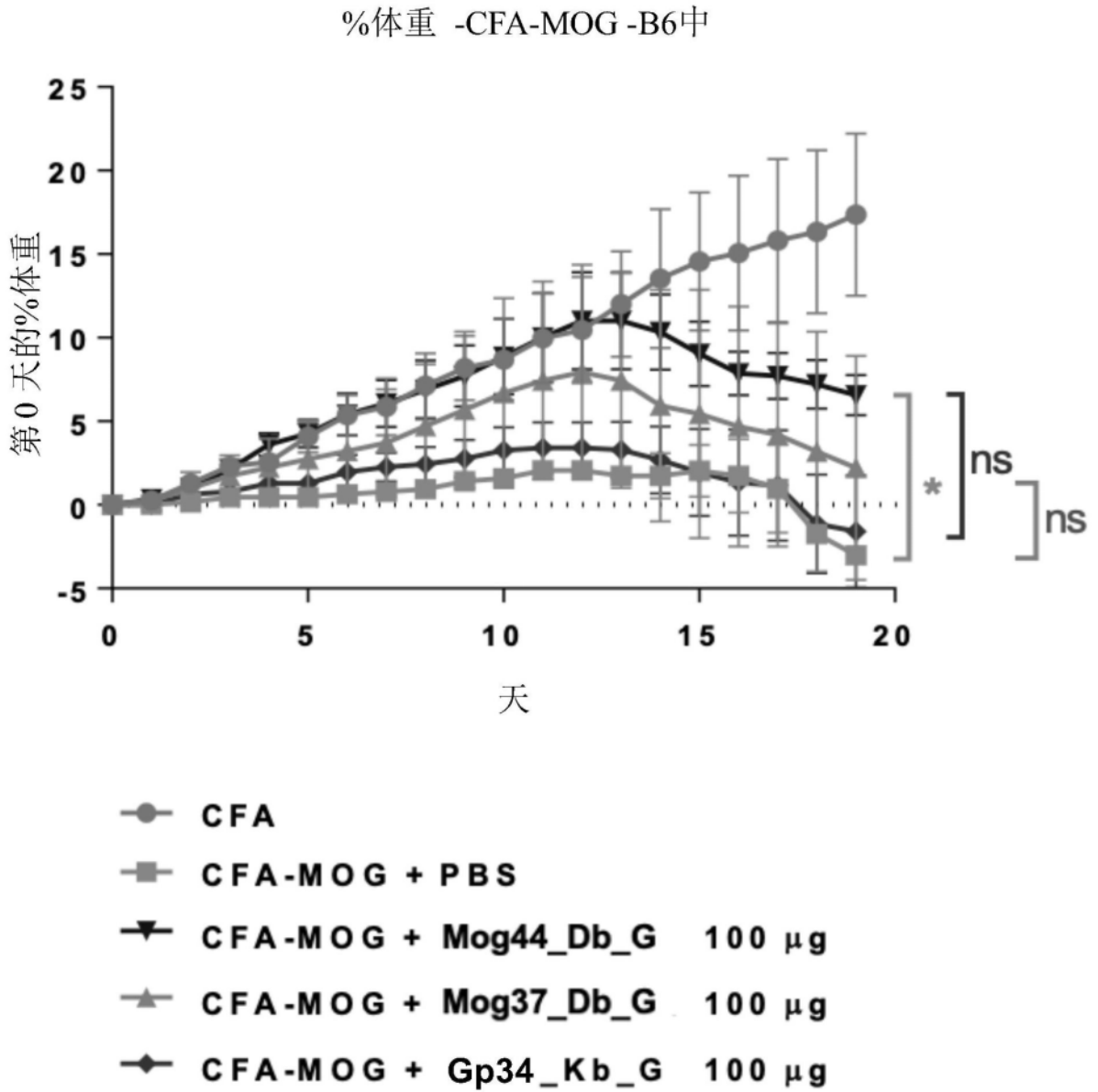
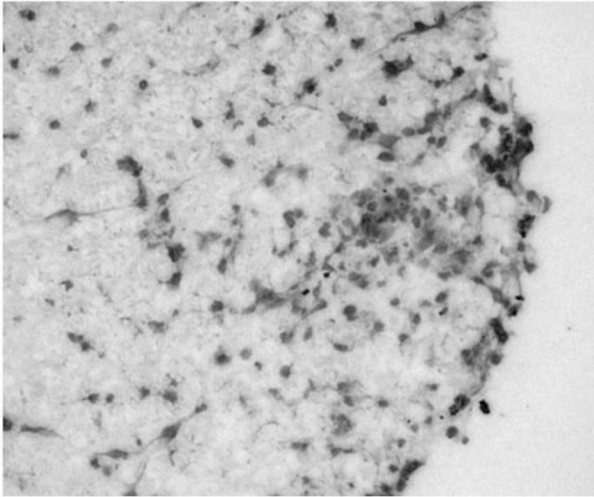


图6,续

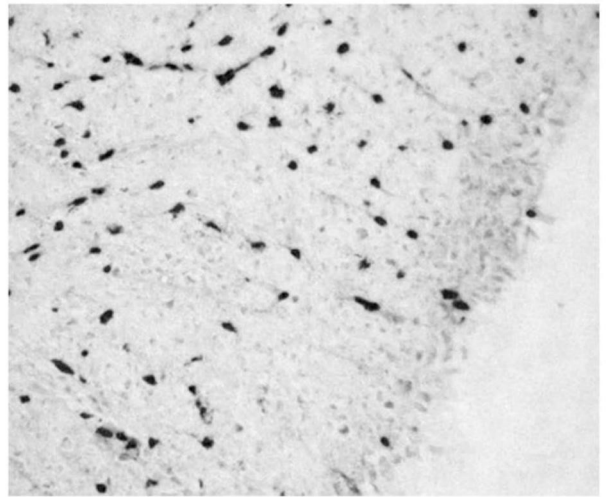
**A**

脊髓（甲苯胺）

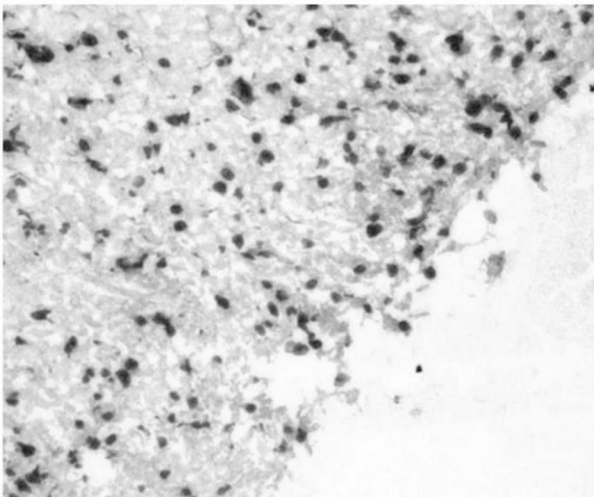
**EAE + PBS**



**EAE + MOG44\_Db\_G**



**EAE + MOG37\_Db\_G**



**CFA 对照**

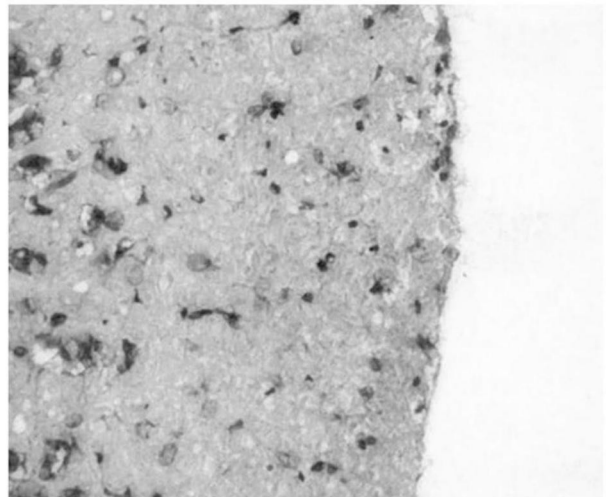


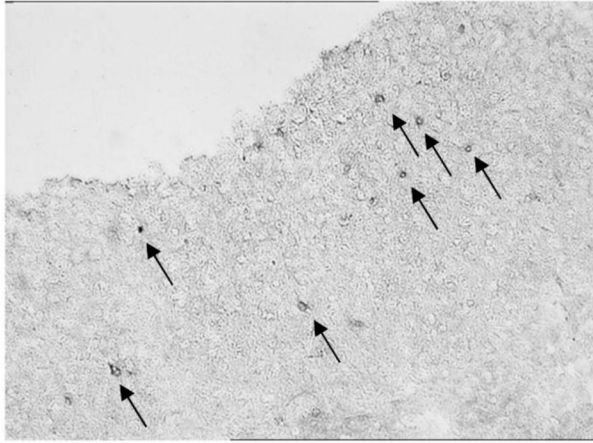
图7

**B**

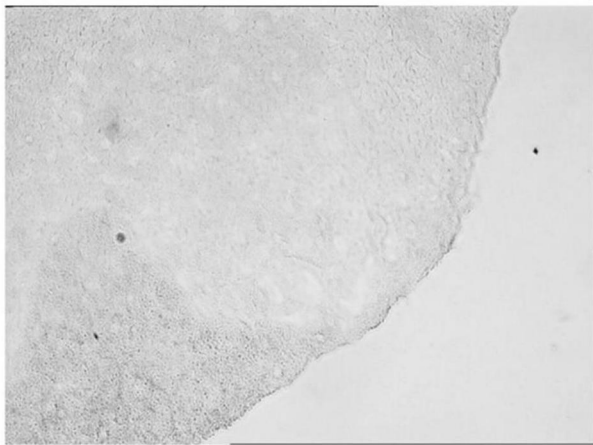
脊髓 (CD8-DAB)

**EAE + PBS**

**EAE + MOG44\_Db\_G**



无EAE (CFA) 对照



↑  
=CD8 T 细胞

图7, 续

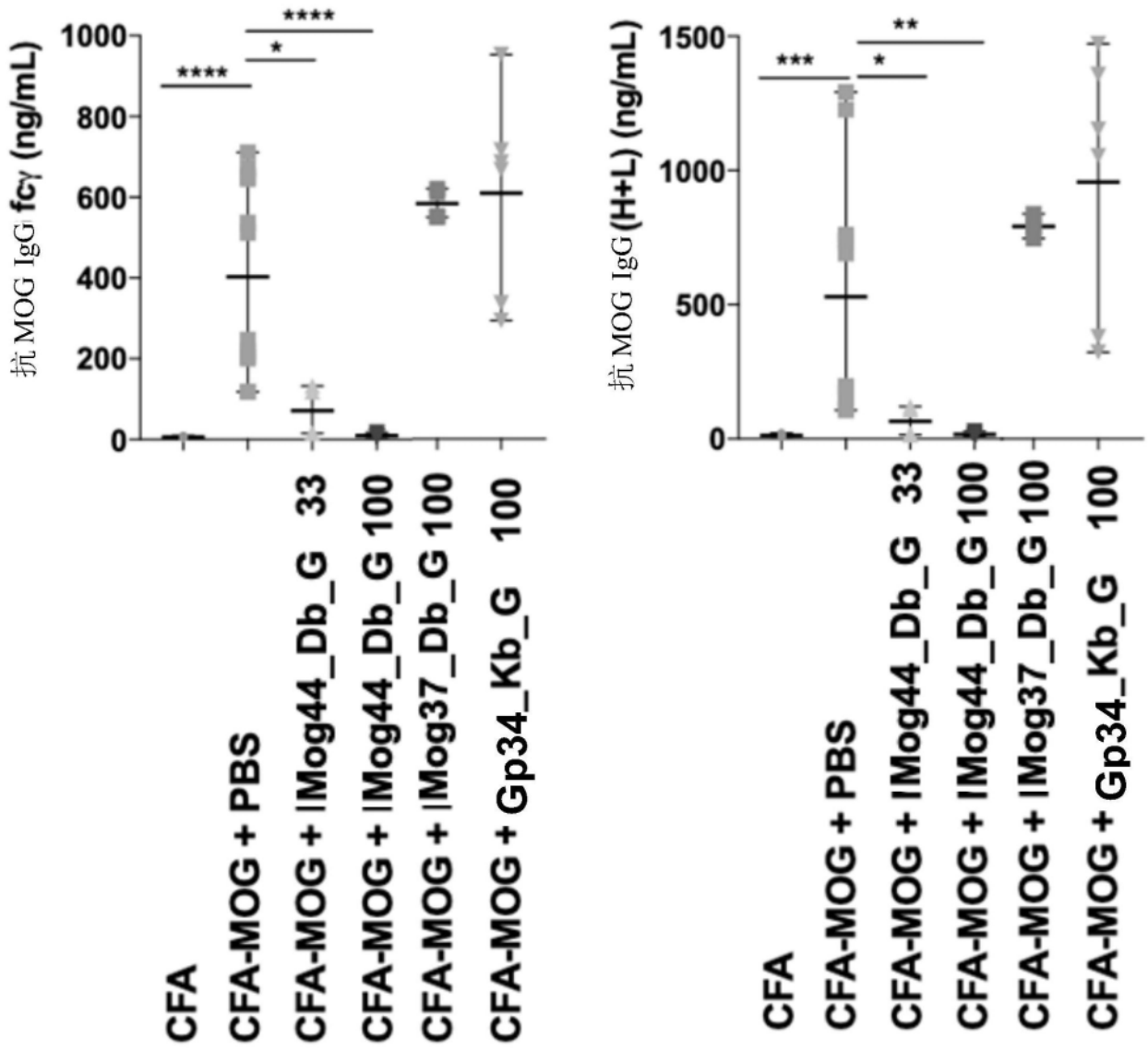


图8

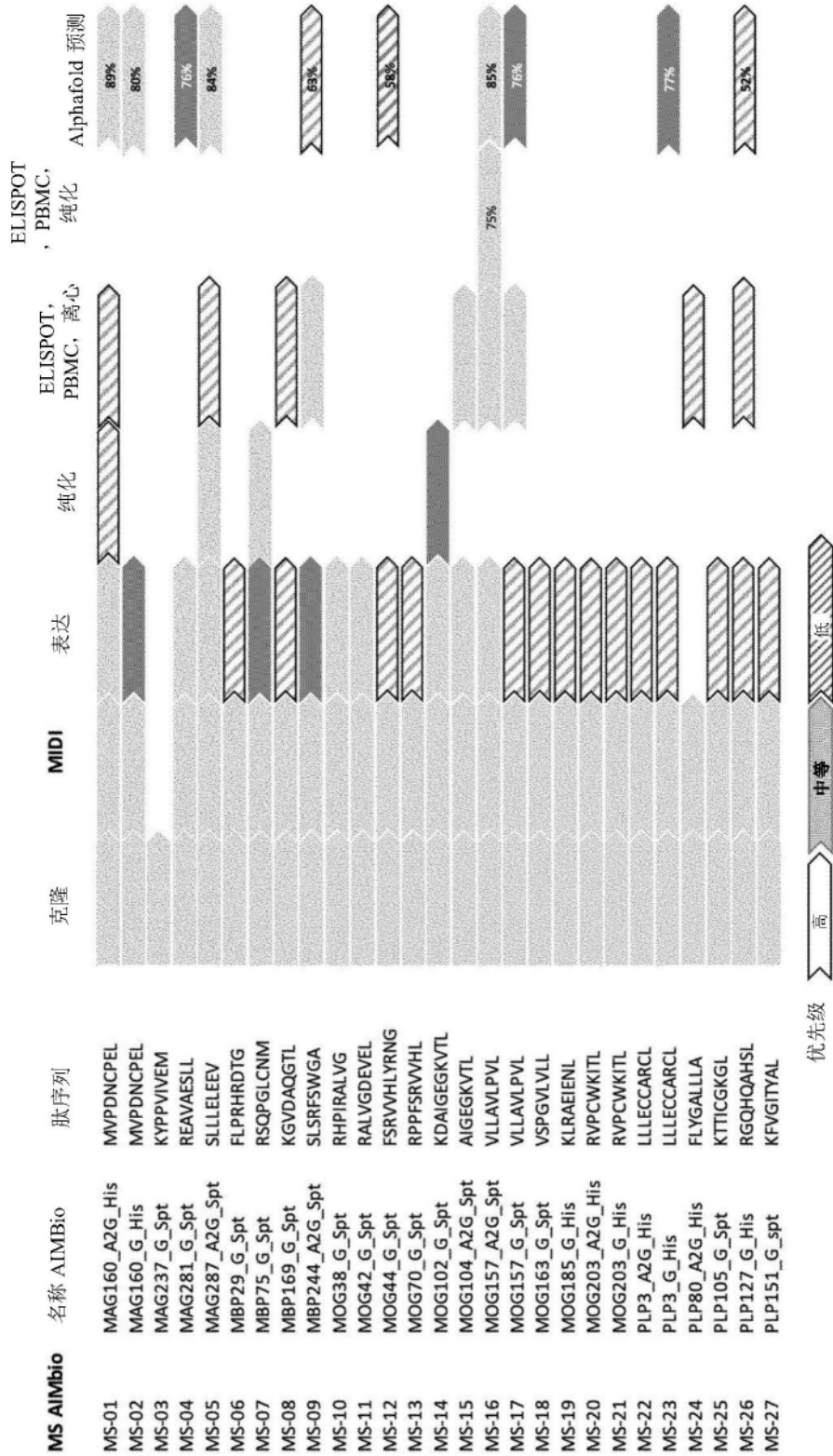


图9

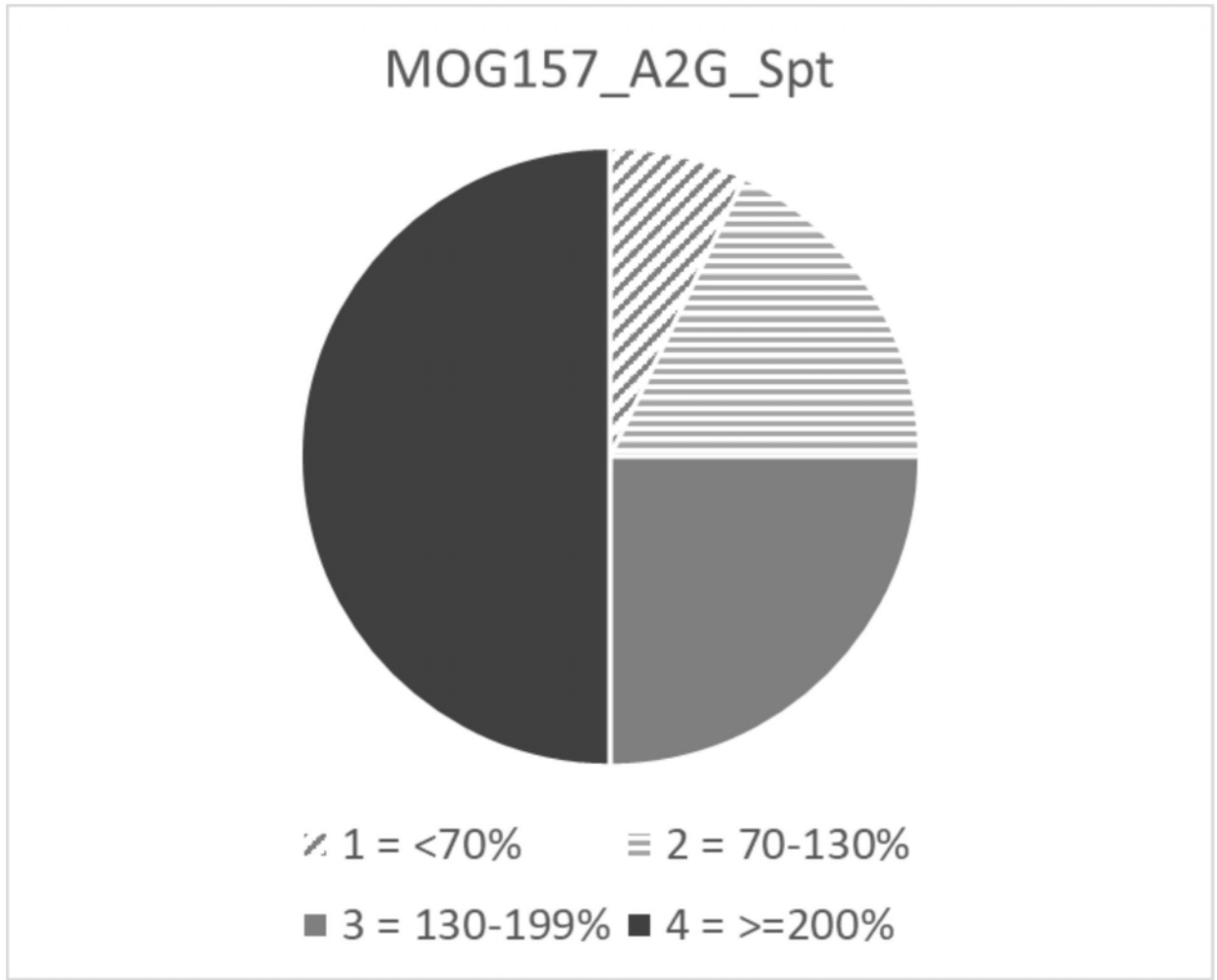


图10

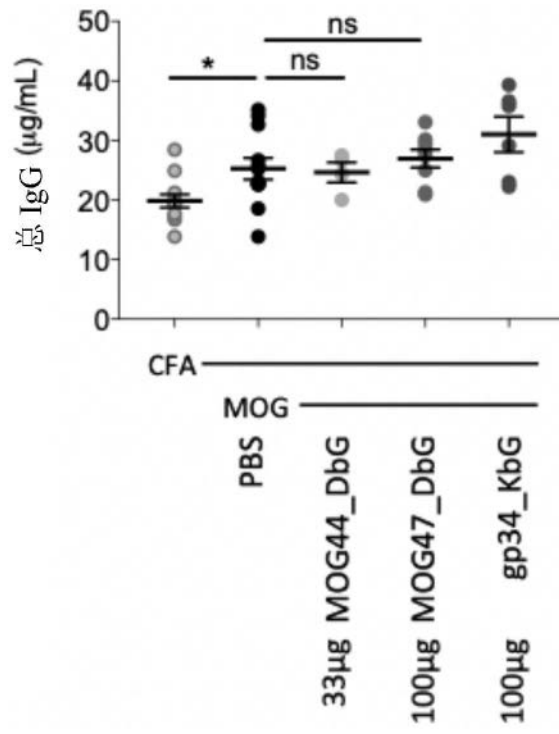


图11

A

纯化后的单链MHC Ib 分子的稳定性

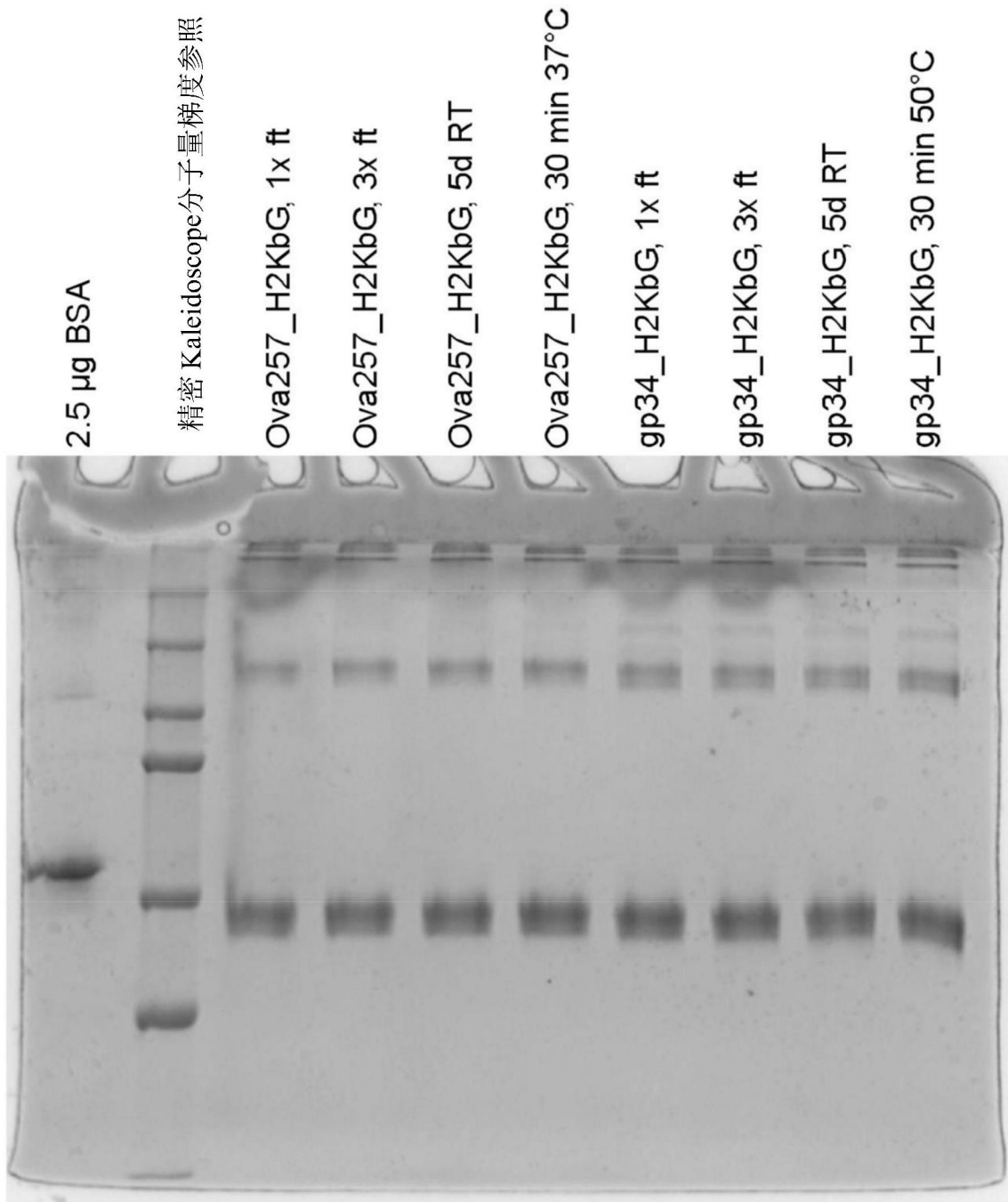


图12

B

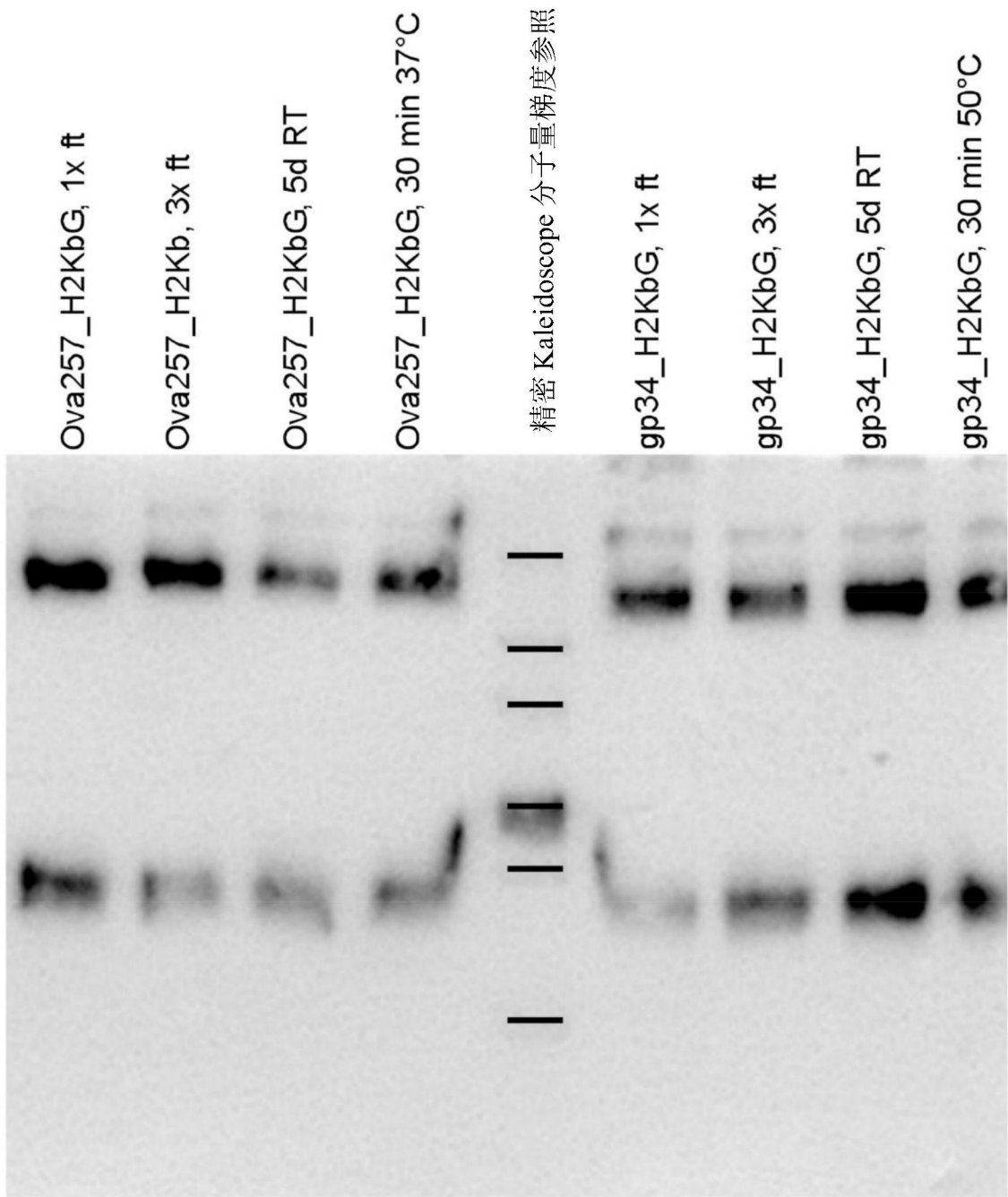


图12,续

单链MHC Ib分子是热稳定的

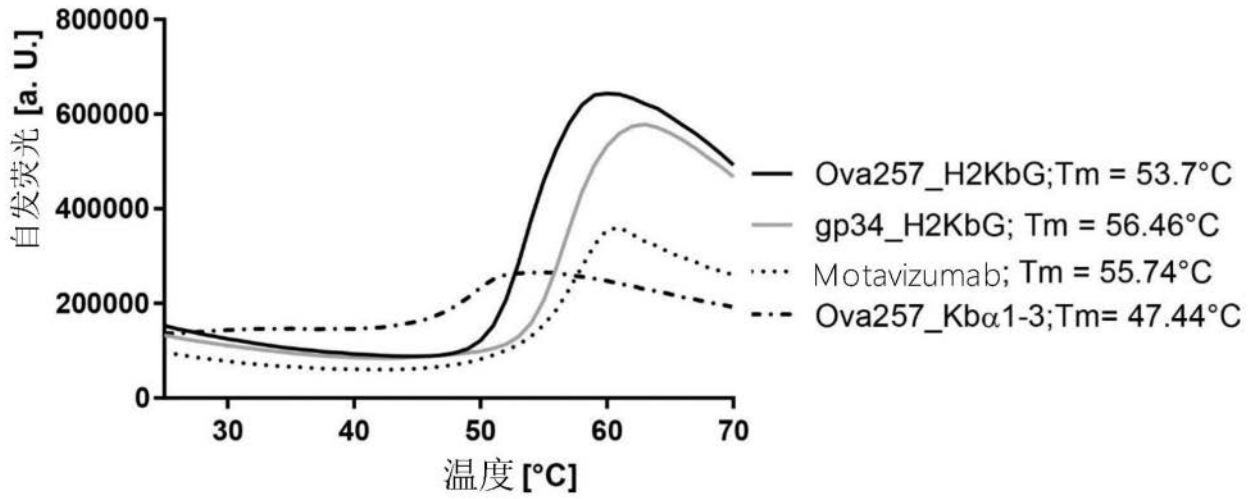


图13

单链MHC Ib分子以剂量依赖性方式诱导Treg

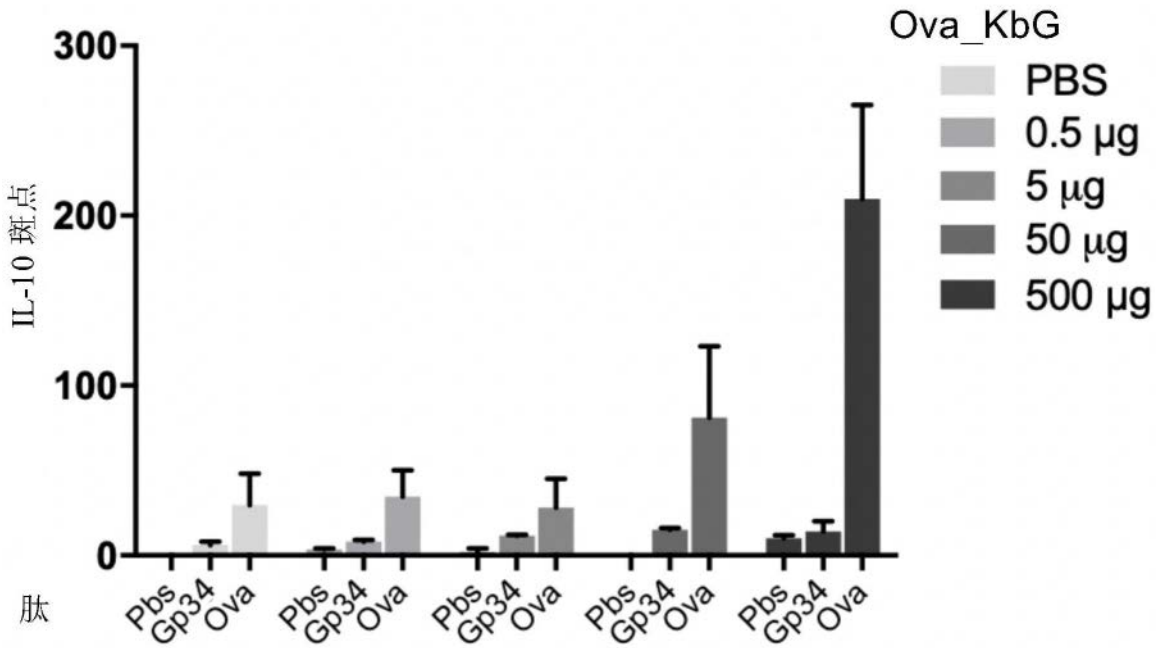


图14

单链 MHC Ib 分子以剂量依赖性方式抑制 T 细胞裂解

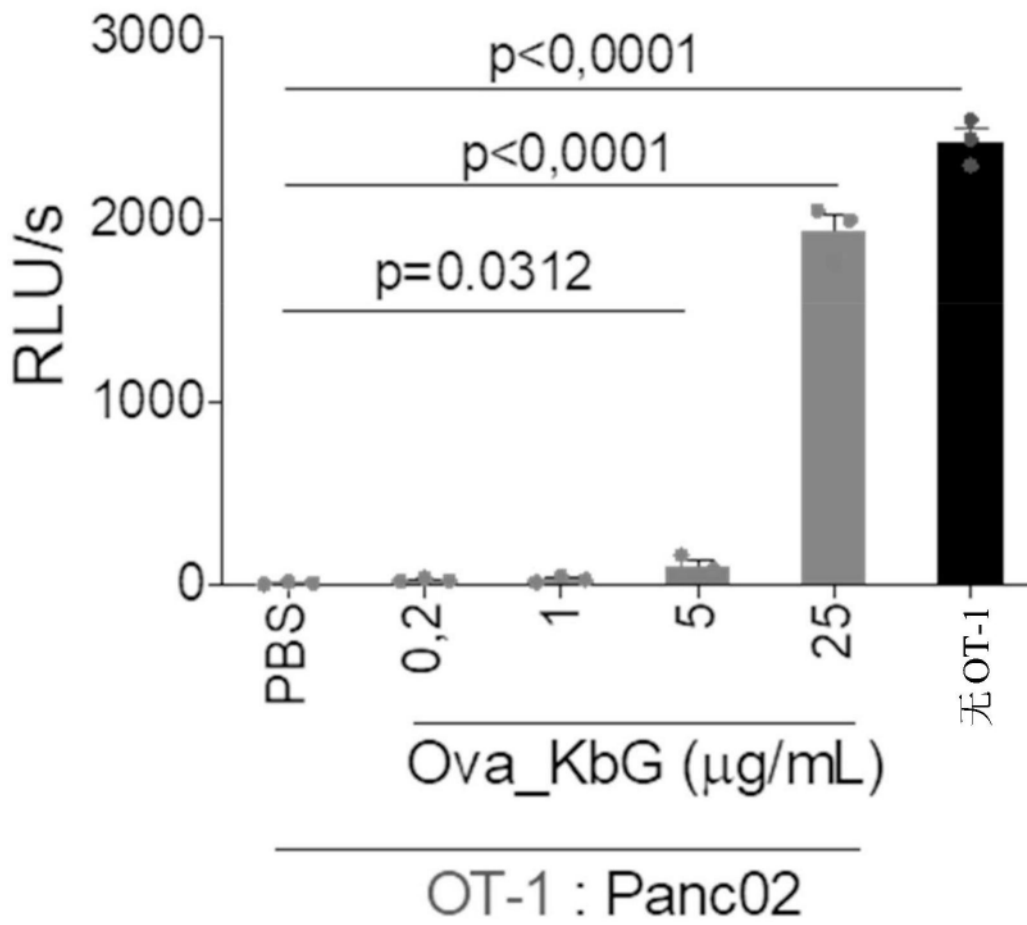
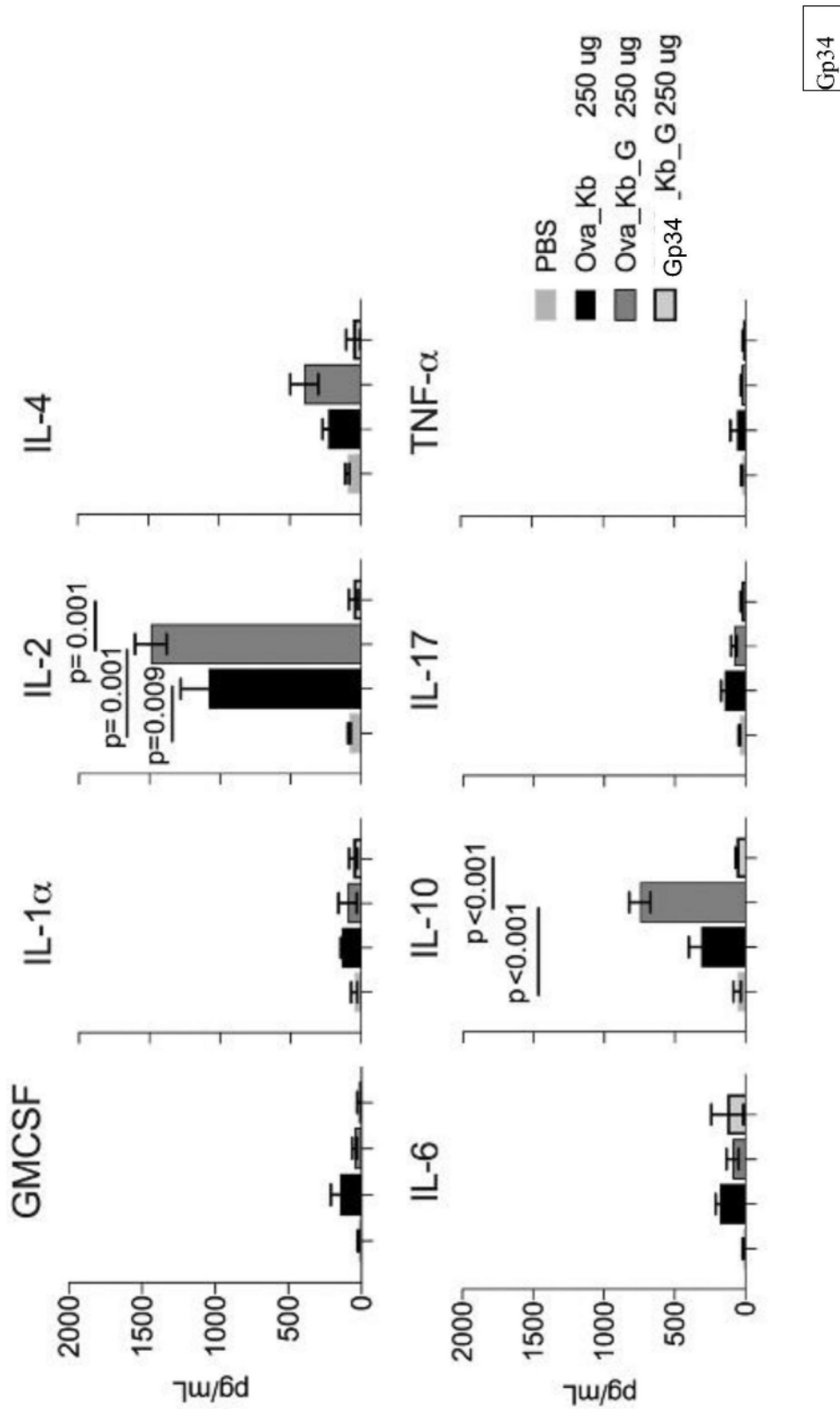


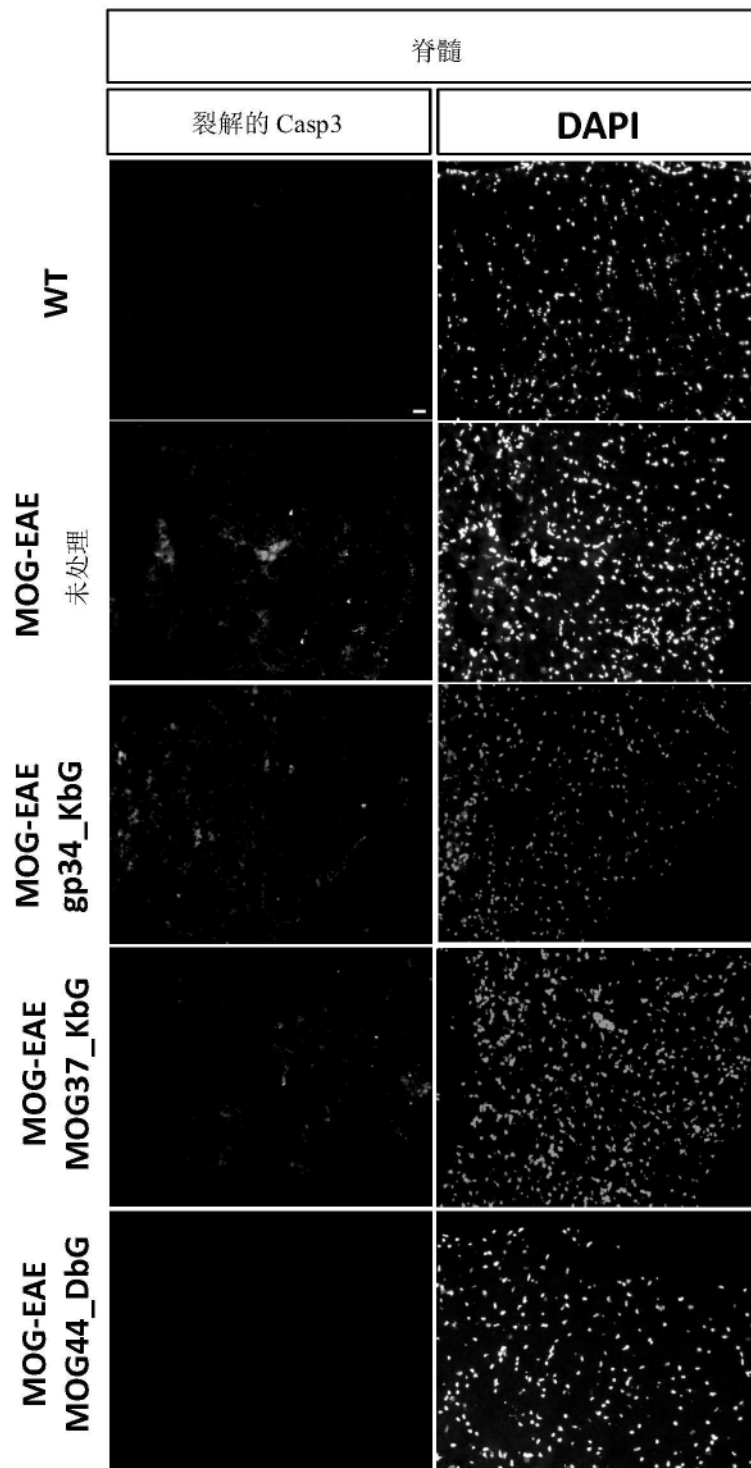
图15



Gp34

图16

A



比例尺: 25  $\mu$ m

图17

**B**

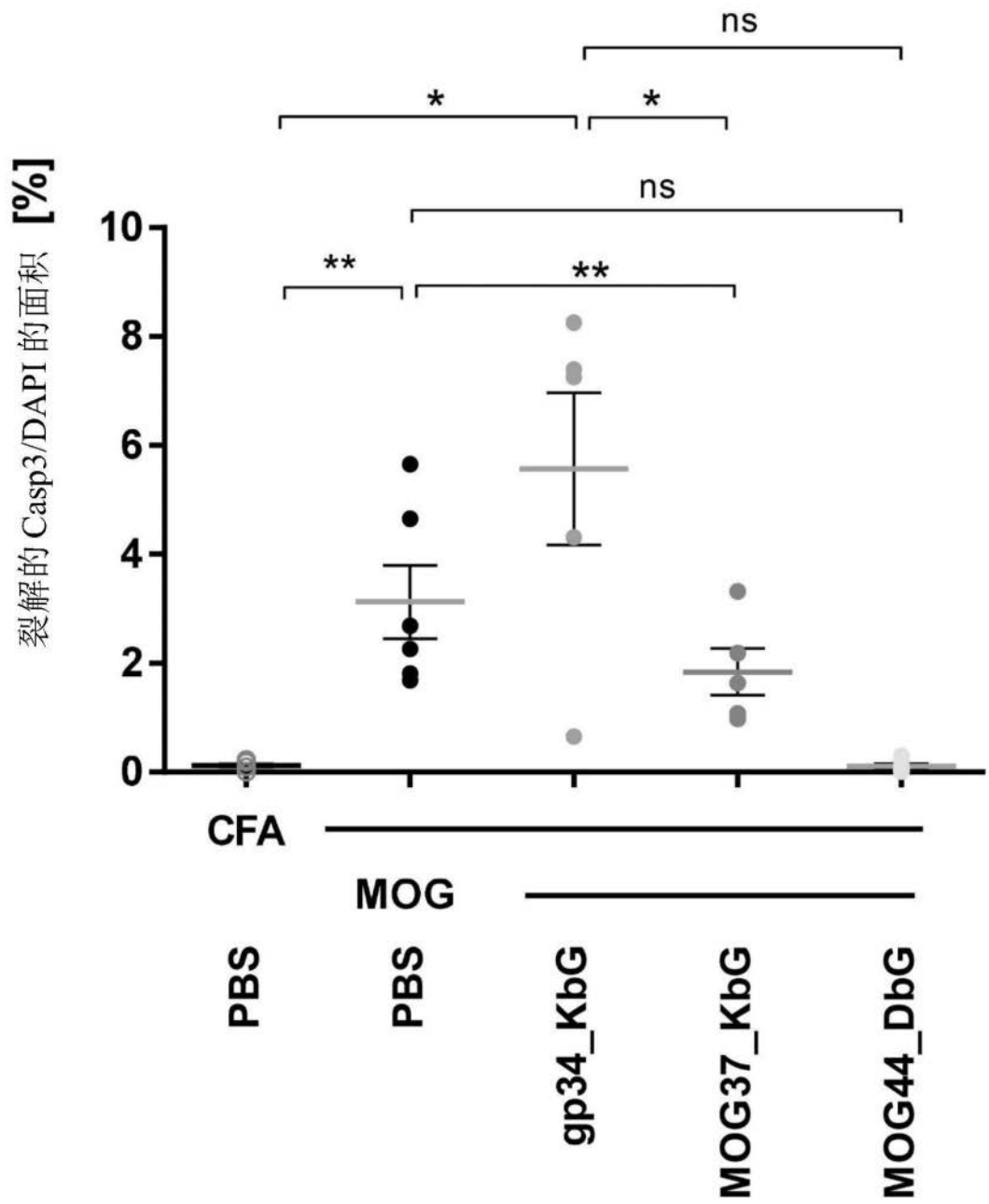
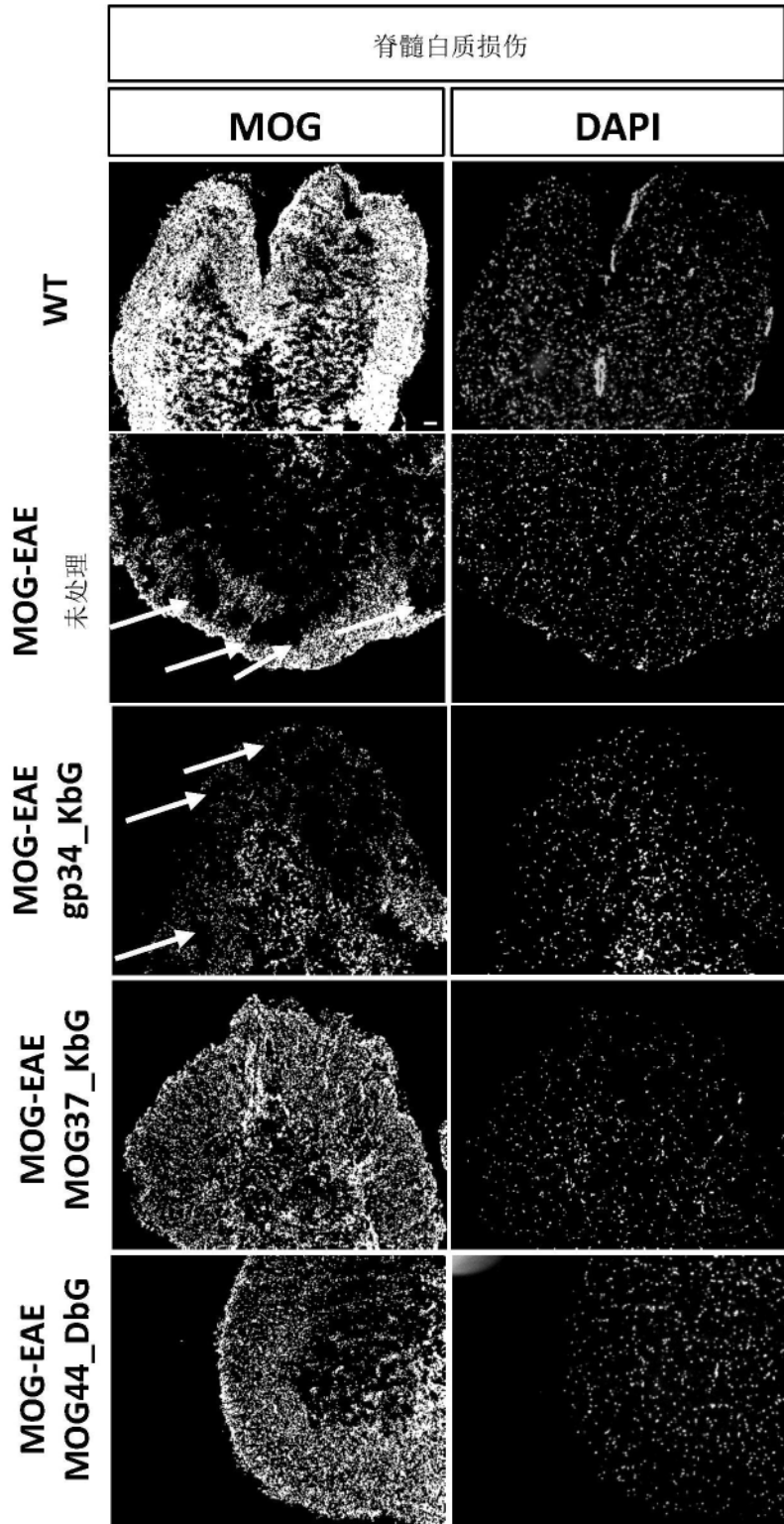


图17, 续

C



比例尺 : 50  $\mu$ m

图17,续

D

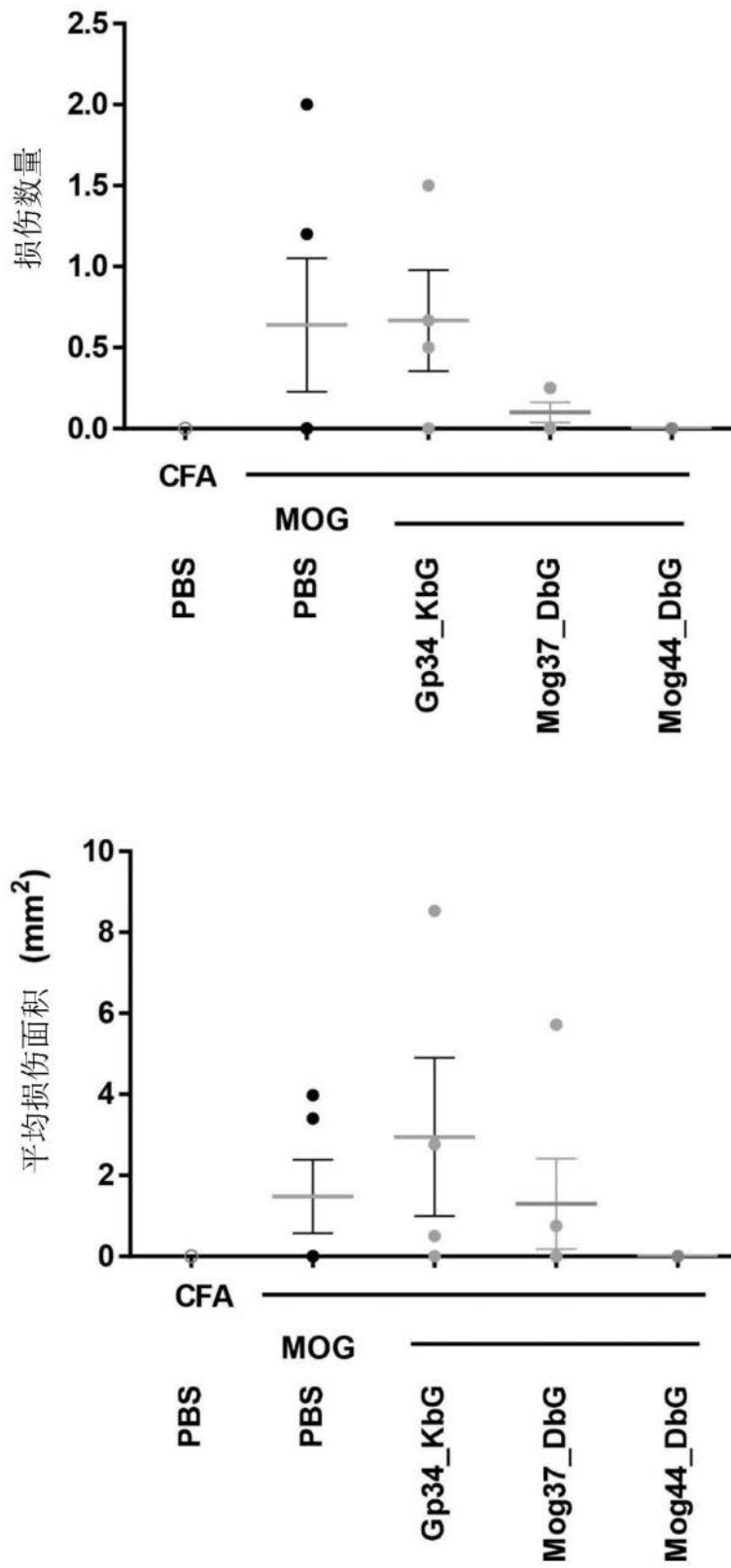
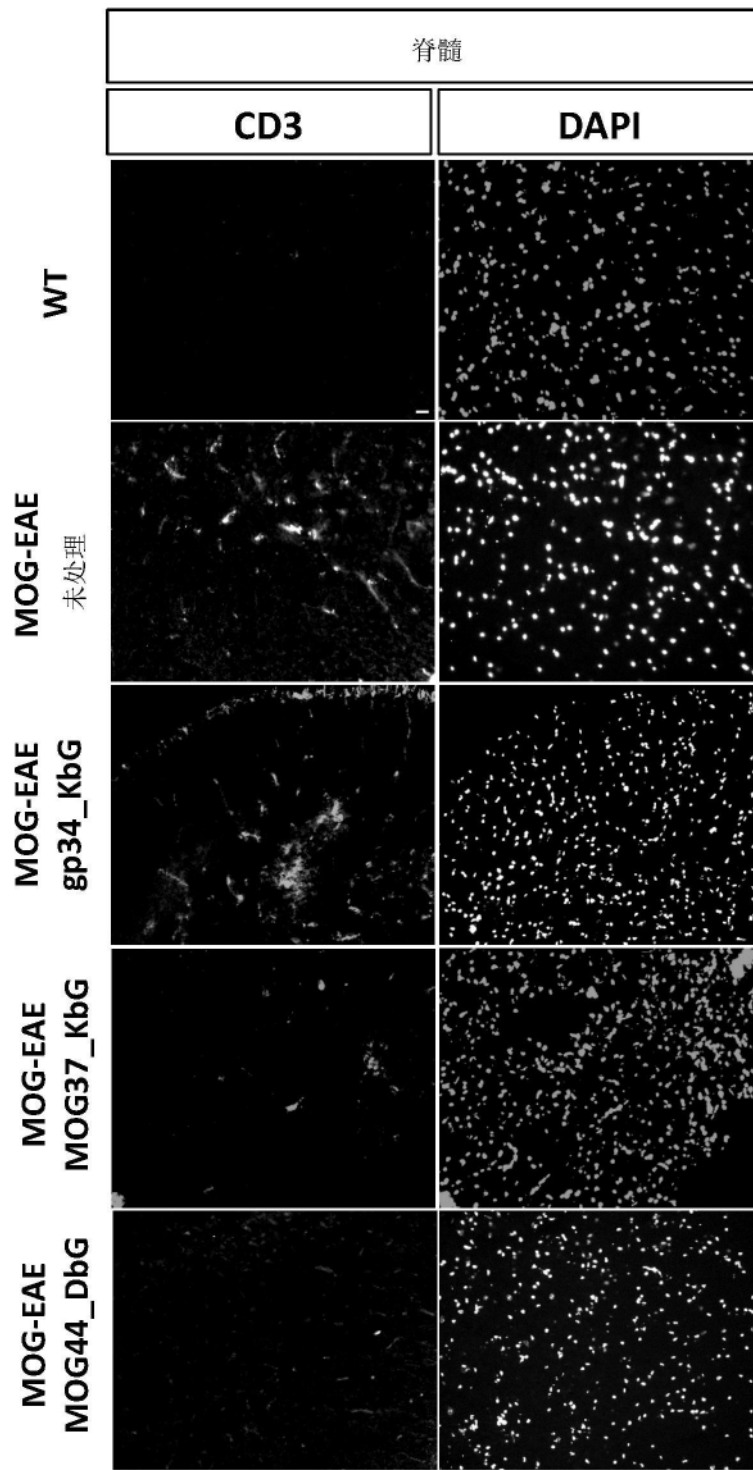


图17, 续

**E**



比例尺 : 25  $\mu$ m

图17,续

