

Οργανισμός
Βιομηχανικής
Ιδιοκτησίας (ΟΒΙ)



(21) Αριθμός αίτησης:

GR 20170100262

(12)

ΑΙΤΗΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Α)

(41) Ημ/νία Δημοσίευσής: **12.12.2018**

(51) Διεθνής Ταξινόμηση (Int. Cl.):

(11) Αριθμός Χορήγησης:

C07K 14/47 (2017.01)

A61K 38/12 (2017.01)

(22) Ημ/νία Κατάθεσης: **12.06.2017**

A61K 38/17 (2017.01)

A61K 39/00 (2017.01)

(43) Ημ/νία Δημοσίευσης της Αίτησης:
20.03.2019 ΕΔΒΙ 12/2018

(73) Δικαιούχος (οί):

ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΗΝΑ; Σταδίου, Πλατάνι, 26504
ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR.

(71) Αρχικός (οί) Καταθέτης (ες):
ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΗΝΑ; Σταδίου, Πλατάνι, 26504
ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR.

(72) Εφευρέτης (ες):
ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΗΝΑ; , GR.

(54) Τίτλος (Ελληνικά)

ΚΥΚΛΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ "ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΥΕΛΙΝΗ" ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

(54) Τίτλος (Αγγλικά)

CYCLIC MOG PEPTIDE ANALOGUES AND CONJUGATES THEREOF IN THE IMMUNOTHERAPY OF MULTIPLE SCLEROSIS

(57) Περίληψη

Αυτή η εφεύρεση αναφέρεται σε κυκλικά πεπτιδία που περιλαμβάνουν την αλληλουχία αμινοξέων του MOG38-55 αρουραίου, που το αμινοξύ Σερίνη (S) στη θέση 42 υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ συζευγμένο με μαννάνη ή μαννόζη. Η σύζευξη είναι δυνατή μέσω της αλληλουχίας [(Λυσίνη- Γλυκίνη)₅, (Lys-Gly)₅, (KG)₅], που η αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος Λυσίνη στη γέφυρα (KG)₅ σχηματίζει βάση Schiff με τις αλδεϋδικές ομάδες οξειδωμένης μαννάνης ή μαννόζης. Περαιτέρω, αυτή η εφεύρεση περιλαμβάνει κυκλικά πεπτιδία που περιέχουν την αλληλουχία αμινοξέων του ανθρώπινου MOG35-85, που το αμινοξύ Προλίνη (P) στη θέση 42 υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ συζευγμένο με μαννάνη ή μαννόζη. Ομοίως, η σύζευξη διεξάγεται διαμέσου της αλληλουχίας (KG)₅ που αμινομάδα πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος Λυσίνη (Lys) στη γέφυρα (KG)₅ σχηματίζει βάση Schiff με τις ομάδες αλδεϋδης οξειδωμένης μαννάνης ή μαννόζης. Αυτή η εφεύρεση αναφέρεται στη χρήση των παραπάνω κυκλικών πεπτιδίων και μεθόδων για τη ρύθμιση της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΕΑΕ) και της πολλαπλής σκλήρυνσης.

H-Lys¹-Gly²-Lys³-Gly⁴-Lys⁵-Gly⁶-Lys⁷-Gly⁸-Lys⁹-Gly¹⁰-Met¹¹-Glu¹²-
Val¹³-Gly¹⁴-Tyr¹⁵-Arg¹⁶-Pro¹⁷-Pro¹⁸-Phe¹⁹-Ser²⁰-Arg²¹-Val²²-Val²³-
His²⁴-Leu²⁵-Tyr²⁶-Arg²⁷-Asp²⁸-Gly²⁹-Lys³⁰-O

Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-MOG₃₈₋₅₅



Mannan

(Saccharomyces Cerevisiae)

GR 20170100262

ΑΙΤΗΣΗ ΓΙΑ ΠΑΤΕΝΤΑ

**“ΚΥΚΛΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ
“ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΥΕΛΙΝΗ” ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ”**

Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται σε γραμμικά και κυκλικά πεπτιδικά ανάλογα των αντιγόνων MOG μυελίνης και των συζευγμάτων αυτών. Τα πεπτιδικά και συζεύγματα της εφεύρεσης είναι χρήσιμα για την ανοσοθεραπεία της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (MS).

ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

Η Σκλήρυνση κατά Πλάκας είναι μια φλεγμονώδης νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και χαρακτηρίζεται από μια μη ρυθμισμένη απόκριση κυττάρων Τ. Ένας συσχετισμός μεταξύ MHC τάξης II και ασθένειας έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με MS, συγκεκριμένα HLA-DR1, HLA-DR2 και HLA-DR4.

Οι τρέχουσες επιλογές για την θεραπεία της MS περιλαμβάνουν θεραπεία με ιντερφερόνες (ιντερφερόνη βήτα-1α και ιντερφερόνη βήτα-1β) και οξική γλατιραμέρη (συμπολυμερές-1), το οποίο είναι ένα μίγμα συνθετικών πολυπεπτιδίων που αποτελείται από τα κύρια αμινοξέα Glu, Gln, Lys, Arg της MBP. Αυτοί οι ανοσοδιαμορφωτές έχουν εγκριθεί από το FDA για ασθενείς με υποτροπιάζουσα-παροδική σκλήρυνση κατά πλάκας. Οι ιντερφερόνες που χορηγούνται με υποδόρια ή ενδομυϊκή ένεση μειώνουν τη συχνότητα, τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της παροξυσμού, αλλά οι επιπτώσεις τους στην πρόληψη της αναπηρίας μακροπρόθεσμα είναι απογοητευτικές. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι επίσης συχνές και περιλαμβάνουν αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης, πυρετό, μυαλγία και σύνδρομο που μοιάζει με γρίπη. Μέχρι στιγμής τα αναφερθέντα οφέλη από τη χρήση ιντερφερονών και συμπολυμερούς είναι περιορισμένα και συνεπώς υπάρχει ανάγκη για βελτιωμένη θεραπεία. Μια άλλη προσέγγιση υπό κλινική έρευνα για αυτοάνοση καταστολή είναι η χορήγηση από το στόμα αυτοαντιγόνων. Τα στοματικά χορηγούμενα αντιγόνα καταστέλλουν την αυτοανοσία σε ζωικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένης της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (EAE), του

κολλαγόνου και της επαγόμενης από ανοσοενισχυτικό αρθρίτιδας, της ραγοειδίτιδας και του διαβήτη στον μη παχύσαρκο διαβητικό ποντικό. Χαμηλές δόσεις αντιγόνου από το στόμα προκαλούν ρυθμιστικά T-κύτταρα ειδικά για αντιγόνα, τα οποία δρουν απελευθερώνοντας ανασταλτικές κυτοκίνες, όπως μετασχηματιστικό αυξητικό παράγοντα-βήτα, IL-4 και IL-10 στο όργανο στόχο. Έτσι, μπορεί να κατασταλεί η φλεγμονή σε ένα όργανο στόχο με χορήγηση από το στόμα ενός αντιγόνου που προέρχεται από την πλευρά της φλεγμονής, ακόμη και αν δεν είναι ο στόχος της αυτοάνοσης απόκρισης. Οι αρχικές δοκιμές σε ανθρώπους του στοματικά χορηγούμενου αντιγόνου έδειξαν θετικά ευρήματα σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας και ρευματοειδή αρθρίτιδα. Αυτή η πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι επωφελής, επειδή επιτρέπει την από του στόματος χορήγηση σε αντίθεση με προηγούμενες μεθόδους που χρησιμοποιούν ιντερφερόνες και συμπολυμερές-1. Ωστόσο, τα ζητήματα που σχετίζονται με τη φύση του πεπτιδίου και το κόστος της χορηγούμενης ουσίας καθιστούν την μη πεπτιδική μιμητική προσέγγιση, ακόμη και στην παιδική της ηλικία, έναν ελκυστικό στόχο να ακολουθήσει.

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην ανοσοθεραπευτική προσέγγιση για την ανάπτυξη θεραπευτικών εμβολίων για τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας (Multiple Sclerosis, MS), η υπόθεση είναι ότι επίτοποι μυελίνης ή τα ανάλογα τους μπορούν να αναστείλουν ενεργά ή να προλάβουν ασθένεια μέσω της ενεργοποίησης ρυθμιστικών T κυττάρων ειδικών για αντιγόνα ή αντισωμάτων που σχετίζονται με την καταστροφή της θήκης μυελίνης. Η θήκη της μυελίνης αποτελείται από τις πρωτεΐνες: βασική πρωτεΐνη μυελίνης (MBP), πρωτεϊνική λιποπρωτεΐνη (PLP), γλυκοπρωτεΐνη ολιγοδεντροκυττάρων μυελίνης (MOG) και πρωτεΐνη θερμικού σοκ που εμπλέκονται σε MS. Επομένως, οι επίτοποι αυτών των πρωτεϊνών που αποτελούν μυελινική θήκη είναι στόχοι για ανοσοθεραπευτικές τεχνικές. Σε περιοχές φλεγμονής στην MS, έχουν παραχθεί αντισώματα έναντι της δευτερεύουσας πρωτεΐνης MOG. Τα αντισώματα MOG σχετίζονται με σημαντική διαταραχή της μυελίνης, πιθανώς με την επικάλυψη της μυελίνης έτσι ώστε τα μακροφάγα να κατακλύζουν και να καταστρέφουν επικαλυμμένα τμήματα μυελίνης, εμποδίζοντας προσωρινά ή μόνιμα τους παλμούς των νεύρων. Έτσι, είναι γνωστό ότι τα αντισώματα παίζουν ένα ρόλο στην MS και

συνεργάζονται με τα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο στην καταστροφή της μυελίνης. Η παρεμπόδιση των αποτελεσμάτων αυτών των αντισωμάτων MOG με δευτερογενή αντισώματα ή μη πεπτίδια μιμητικά μπορεί να αποτελέσει σημαντική διαδρομή για μελλοντική θεραπεία.

- 5 Μία κατεύθυνση είναι η χρήση κυκλικών πεπτιδικών επίτοπων της μυελίνης στην ανοσοθεραπεία της MS. Πεπτιδικές αλληλουχίες με Λυσίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση πεπτιδίων με Λυσίνη για την πρόσδεση αντιγονικών πεπτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες με Λυσίνη έχουν εφαρμογές ως Φορείς των αντιγόνων στα Δενδριτικά κύτταρα. Η ανάπτυξη κυκλικών μορίων που μιμούνται την ανοσοδιαμορφωτική
- 10 δραστηριότητα γραμμικών επιτόπων μυελίνης διατηρώντας παράλληλα ένα πλεονέκτημα έναντι των γραμμικών πεπτιδίων όσον αφορά τη σταθερότητα και τη δέσμευση με HLA, είναι ένα απαραίτητο βήμα προτού αυτά τα μόρια προταθούν ως φάρμακα. Η χρήση κυκλικών πεπτιδίων αντί των γραμμικών ομολόγων ως θεραπευτικών οντοτήτων έχει πολλά πλεονεκτήματα, περιλαμβανομένης (i)
- 15 σταθερότητας και αντοχής στην ενζυματική αποικοδόμηση, (ii) αυξημένης εκλεκτικότητας υποδοχέα, με αποτέλεσμα βελτιωμένο φαρμακολογικό προφίλ, (iii) καθορισμένη διαμόρφωση επιτρέπουν την ταυτοποίηση ενεργών (iv) σχεδιασμός χρήσιμων προτύπων για την ανάπτυξη ενός μη πεπτιδικού (μιμητικού) φαρμάκου για στοματική χορήγηση, με δυναμική στοματική δραστηριότητα εάν είναι κατάλληλα
- 20 περιορισμένη. Περιγράψαμε προηγουμένως τον ορθολογικό σχεδιασμό και σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων, με βάση ένα συνδυασμό μελετών διαμορφωτικής ανάλυσης και θεωρητικών υπολογισμών που έγιναν στα γραμμικά πεπτίδια επιτόπου MBP χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία 2D NOESY και ROESY NMR (Matsoukas et al, JBC, JMC δημοσιεύσεις) .
- 25 Μια άλλη κατεύθυνση στην ανοσοθεραπεία των αυτοάνοσων ασθενειών είναι η χρήση συστημάτων πεπτιδίων πολλαπλών αντιγόνων (MAP). Παράγωγα λυσίνης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση στερεάς φάσης αλληλουχιών μορίων λυσίνης κατάλληλων για τη συναρμολόγηση αντιγονικών πεπτιδίων. Αυτά τα πεπτίδια έχουν βρει εφαρμογές ως φορείς αντιγόνων στα δενδριτικά κύτταρα και στην παρασκευή
- 30 συνθετικών εμβολίων. Σε έναν πυρήνα λυσίνης μπορούν να συναρμολογηθούν αρκετοί διαφορετικοί επίτοποι πρωτεΐνης ή διαφορετικών πρωτεϊνών για να δημιουργηθεί η απαιτούμενη αντιγονική συνθετική πρωτεΐνη. Μετά τη συναρμολόγηση του πεπτιδίου στον πυρήνα MAP, το πεπτίδιο αποπροστατεύεται και διασπάται από το υπόστρωμα

χρησιμοποιώντας πρότυπες τεχνικές, αποδίδοντας μία εξαιρετικά ανοσογονική μακρομοριακή δομή χωρίς την ανάγκη σύζευξης σε μια πρωτεΐνη-φορέα. Η προσέγγιση MAP έχει αποδειχθεί ότι αποδίδει υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων από ό, τι χρησιμοποιώντας μονομερή πεπτιδικά συζεύγματα. Εναλλακτικά, οι δύο επίτοποι

5 μπορούν να συντεθούν σε εναλλακτικούς κλάδους του κορμού λυσίνης, χρησιμοποιώντας χημεία Boc και Fmoc. Οι επίτοποι T-κυττάρων και B-κυττάρων μπορούν επίσης να συνδυαστούν διαδοχικά μέσα σε μία απλή γραμμική αλληλουχία.

Σχετική με τη στρατηγική πρόκλησης MAP στην ανοσοθεραπεία της MS ή άλλων αυτοάνοσων ασθενειών είναι η χρήση αναλόγων πεπτιδικής πολυ-λυσίνης

10 συζευγμένων με μειωμένη μαννάνη μέσω συνδέτη στην οξειδωμένη ή ανηγμένη μορφή της για εκτροπή αποκρίσεων Th1 προς Th2 που ακολουθούνται από απελευθέρωση κατάλληλων κυτοκινών. Ο στόχος αυτής της προσέγγισης είναι η ανάπτυξη μιας ανοσοθεραπευτικής προσέγγισης για την πρόληψη ή τον έλεγχο της νόσου. Επί του παρόντος, πεπτιδικά αντιγόνα από πρωτεΐνες MBP, PLP και MOG

15 συζευγμένες με μαννάνη υπό την οξειδωμένη ή μειωμένη μορφή της υπόκεινται σε έρευνα. Ένα συζυγές MOG θα δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προσδιορίστηκαν η παραγωγή αντισωμάτων και οι εκκρίσεις έκκρισης κυτοκινών σε αρουραίους Lewis, σε μοντέλα ποντικών και σε T-κύτταρα ανθρώπινου περιφερικού αίματος. Αυτές οι

20 μελέτες περιλαμβάνουν την ανάπτυξη αναλόγων πεπτιδικών αναλόγων κυκλικού ανταγωνιστή που σχεδιάστηκαν πρόσφατα και βασίζονται σε επίτοπο MBP 87-99 και επίτοπο MOG 35-55 που καταστέλλει την ανάπτυξη της κλινικής EAE, της φλεγμονής του ΚΝΣ και της απομυελίνωσης. Η χρήση οξειδωμένου ή μειωμένου μαννάνης για την ανάπτυξη μιας Th1 ή Th2 απόκρισης (και των κατάλληλων κυτοκινών) στα

25 πεπτίδια μυελίνης που εκφράζονται σε MS αποτελεί μια νέα στρατηγική για τη θεραπεία της νόσου.

Η χρήση μαννόζης ως φορέα αντιγόνου αντί για μαννάνη παρέχει διακεκριμένα συζεύγματα γνωστού μοριακού βάρους. Αυτό επιτρέπει ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου στο συζυγές και αποτελεσματικό πειραματικό χειρισμό. Η μαννόζη με ένα μοναδικό

30 μοριακό βάρος είναι ένας προτιμώμενος φορέας αντιγόνου σε σύγκριση με την πολυμαννόζη μαννάνη.

Το μοντέλο EAE χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση του θεραπευτικού δυναμικού των πεπτιδίων. Τα πεπτίδια μπορούν να δράσουν ως ανταγωνιστές στον ίδιο

υποδοχέα με τον εγκεφαλιτογόνο επίτοπο ή μπορούν να δεσμευτούν σε διαφορετικούς υποδοχείς που προκαλούν την ενεργοποίηση των κυττάρων Th2 ή Treg τα οποία, με τη σειρά τους, καταστέλλουν την ενεργοποίηση κυττάρων Th1 από τον εγκεφαλογενικό επίτοπο. Οι προηγούμενες μελέτες μας σε μοντέλα EAE που χρησιμοποιούν

5 διαφορετικά τροποποιημένα παράγωγα επιτόπων Μυελίνης (APL μυελίνης) έδειξαν ότι τα ανταγωνιστικά αποτελέσματα των πεπτιδίων οφειλόταν στην επίδρασή τους σε διαφορετικούς πληθυσμούς T-κυττάρων με αντίθετες λειτουργίες, αυξάνοντας την πιθανότητα ότι ο μηχανισμός αναστολής από APLs διαμεσολαβείται μέσω ενεργοποίησης Ειδικών για το αντιγόνο ρυθμιστικών T-κυττάρων. Λόγω των κλινικών

10 ομοιοτήτων της EAE με την MS, αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη παθολογικών μηχανισμών καθώς και νέων πειραματικών θεραπειών για τη νόσο. Η EAE επάγεται σε ευαίσθητα ζώα χρησιμοποιώντας γραμμικά πεπτίδια (αντιγόνα) πρωτεϊνών μυελίνης του ΚΝΣ. Αυτά τα πεπτίδια φέρουν διαφορετικές αντιγονικές ιδιότητες σε κάθε είδος ζώου και η ασθένεια προσδιορίζεται από τις

15 ιδιότητες του απλότυπου MHC τάξης II του ζώου. Οποιαδήποτε τροποποίηση στο αντιγονικό πεπτίδιο και οποιαδήποτε προκαλούμενη απόκλιση από ένα σφιχτό σύμπλοκο MHC κατηγορίας II-πεπτιδίου-TCR μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ενεργοποίηση T-κυττάρων, ανεργία T κυττάρων ή / και διαφορετικά προφίλ κυτοκινών. Βάσει αυτής της ιδέας, έγιναν αρκετές προσπάθειες να τροποποιηθούν οι

20 συγγένειες των τριμερούς συνθετικού συμπλόκου και να καταστούν τα αυτοαντιδραστικά T-κύτταρα σε MS και EAE ανενεργά, τροποποιημένα ή εξαλειμμένα.

Στην παρούσα εφεύρεση χρησιμοποιήσαμε μάλλον διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση για την βελτίωση της EAE σε ποντίκια C57BL / 6. Συντιθέσαμε το

25 ανοσογόνο και εγκεφαλοτογόνο πεπτίδιο MOG35-55 (1-MOG35-55) και τροποποιήσαμε τη 3D διαμόρφωση του ώστε να γίνει κυκλική (c-MOG35-55). Με αυτό τον τρόπο διατηρήσαμε τον ίδιο αντιγονικό γραμμικό επίτοπο του MOG35-55 αλλά αλλάξαμε το στερεοδιάταξη του μορίου έτσι ώστε να μειώσουμε τη συγγένεια και την εγγύτητα του TCR με το MHC στο τριμερές σύμπλεγμα. Αυτή είναι η πρώτη

30 φορά, σύμφωνα με τις γνώσεις μας, ότι αναφέρεται μια τέτοια χημική διαμόρφωση του γραμμικού MOG35-55. Περαιτέρω, εξετάσαμε την πιθανή εγκεφαλονογένεια αυτού του νέου συντιθέμενου κυκλικού πεπτιδίου c-MOG35-55 στους ποντικούς C57BL / 6 και χρησιμοποιήσαμε το πεπτίδιο ως προληπτική αγωγή στο αντίστοιχο μοντέλο 1-MOG35-55 της EAE. Στην επαγόμενη EAE μελετήθηκαν τόσο η κλινική πορεία όσο

και η παθολογία. Ο τρόπος σύνδεσης μέσω υπολογιστικών μεθόδων του c-MOG35-55 σε H2-IAb ήταν παρόμοιος με τον I-MOG35-55, αλλά τα αμινοξέα που έδειχναν προς το TCR άλλαζαν. Επιπλέον, οι μελέτες σύνδεσης και η μοριακή μοντελοποίηση του c-MOG35-55 σε ανθρώπινο MHC κατηγορίας II, HLA-DR2 έδωσαν γνώση και

5 συνάφεια του c-MOG35-55 για περαιτέρω μελέτες που χρησιμοποίησαν ανθρώπινα κύτταρα και το συνολικό δυναμικό μεταφράσεώς του.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ

Το γραμμικό MOG 35-55 συζευγμένο με μαννάνιο μέσω συνδέτη (KG) 5 έχει

10 αποδειχθεί ότι προκαλεί μακροχρόνια ανοχή T κυττάρου με ειδικό πεπτίδιο και μειώνει τη φλεγμονή του ΚΝΣ και τα νευρολογικά συμπτώματα σε μοντέλα EAE σε πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) -προ-κλινικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για MS, με προφυλακτικά και θεραπευτικά πρωτόκολλα και δείχνει

15 καλό προφίλ ασφάλειας στις μελέτες τοξικολογίας Το γραμμικό συζυγές MOG35-55 επάγει επίσης μειωμένες αποκρίσεις πολλαπλασιασμού T κυττάρων σε σύγκριση με μη συζευγμένο ανθρώπινο MOG35-55, σε αίμα απομονωμένο από MS Ασθενείς που χρησιμοποιούν δοκιμασία διέγερσης ex vivo λεμφοκυττάρων. Για αυτούς τους λόγους,

20 το γραμμικό συζυγές MOG35-55 αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη, νέα θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία μιας χρόνιας μη μεταδοτικής νευρολογικής νόσου, MS, σχεδιασμένη να στοχεύει επιλεκτικά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση ασθένειας χωρίς να επηρεάζεται το υπόλοιπο ανοσοποιητικό σύστημα [Apostolopoulos, 1995, Tseveleki et al, 2016].

Το κυκλικό MOG35-55 είναι ένα σταθερότερο μόριο σε σύγκριση με το αντίστοιχο γραμμικό του. Τα in vitro και in vivo πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα

25 εφεύρεση έδειξαν ότι αυτό το κυκλικό ανάλογο είναι ένα δυνητικά υποψήφιο φάρμακο στην ανοσοθεραπεία της MS [Matsoukas, Apostolopoulos et al., που πρόκειται να υποβληθεί].

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

30 *Σύνοψη της μεθόδου EAE*

Η ΕΑΕ επάγεται σε ευαίσθητους ποντικούς χρησιμοποιώντας γραμμικά πεπτίδια πρωτεϊνών μυελίνης του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ειδικά μοτίβα πεπτιδίων εντός της αύλακας σύνδεσης πεπτιδίου του συμπλέγματος πεπτιδίου ΜΗΟ καθορίζουν τη συγγένεια του πεπτιδίου σε κάθε ζώο και την επακόλουθη αναγνώριση και ενεργοποίηση του υποδοχέα Τ-κυττάρου. Ο τροποποιημένος εμβολιασμός πεπτιδικού προσδέματος είναι μια νέα προσέγγιση που βασίζεται σε μια προσπάθεια να προκληθεί ανοχή κυττάρων Τ ή να μεταβληθεί το προφίλ κυτοκίνης από προ-φλεγμονώδη έως αντιφλεγμονώδη. Στην παρούσα μελέτη συνθέσαμε το πεπτίδιο MOG35-55 και τροποποιήσαμε την τρισδιάστατη διαμόρφωσή του για να την καταστήσουμε κυκλική (c-MOG35-55). Η ΕΑΕ προκλήθηκε σε ποντίκια C57BL / 6 και η παθολογία μελετήθηκε σε οξεία και χρόνια φάση της νόσου. Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι το πεπτίδιο c-MOG35-55 φέρει ήπια εγκεφαλογαينوγένεια, προκαλώντας μια ήπια οξεία φάση χωρίς χρόνια αξονιοπάθεια. Η χορήγηση του πεπτιδίου σε αναλογία 1: 1 κατά την επαγωγή της νόσου βελτιώνει σημαντικά την κλινική ασθένεια και την υποκείμενη παθολογία. Η απομυελίνωση και η αξονόπαυση μειώνονται σημαντικά στις οξείες και χρόνιες φάσεις παρουσία c-MOG35-55. Διεξήχθησαν μελέτες σύνδεσης και δομής προκειμένου να κατανοηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αλλήλων MHC τάξης II ποντικού και ανθρώπου (H2-IAb και HLA-DR2). Τα δεδομένα δείχνουν για πρώτη φορά την ευεργετική επίδραση του πεπτιδίου c-MOG35-55 στις υποκείμενες παθολογικές διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την κλινική πορεία της ΕΑΕ. Έτσι, δικαιολογούνται περαιτέρω μελέτες για να προσδιοριστεί εάν το c-MOG35-55 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανοσορρύθμιση της ανθρώπινης MS όπου η αυτοανοσία του 1-MOG35-55 παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση της νόσου.

25 *Εισαγωγή στην εφεύρεση*

Η πολλαπλή Σκλήρυνση (MS) ορίζεται ως μια χρόνια απομυελινωτική ασθένεια του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπου τα ανοσοκύτταρα (μακροφάγα, Τ helper (h) 1, Th2, Th17, CD8 + Τ κύτταρα, Β κύτταρα) μεταναστεύουν στο σημείο της βλάβης (η έλυτρο μυελίνης) και επάγουν φλεγμονή, απομυελίνωση και αποικοδόμηση νευρώνων.¹ Η αναγνώριση πεπτιδίων αυτο- μυελίνης από CD4 + Τ κύτταρα που παρουσιάζονται από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) κατηγορίας II είναι μία από τις διαδικασίες που εμπλέκονται στην παθογένεση της Σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΚΥΡΙΑ). Τα αυτοενεργά αντιδραστικά CD4 + Τ κύτταρα σε αυτοαντιγόνο,

κατάλοιπα 83-99 βασικής πρωτεΐνης μυελίνης (MBP) 83-99 (MBP83-99) σε σύμπλεγμα με HLA-DR2 (DRA, DRB1 * 1501) σε ανθρώπους σχετίζονται με ευαισθησία σε MS.²⁻⁴ Ως συνέπεια, αυτοδραστικών CD4 + T κύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες Th1 όπως, IL-1, IL-6, IPN-γ και TNF-α, οι οποίες επάγουν μία φλεγμονώδη

5 απόκριση.⁵ Άλλα συστατικά της μυελίνης που είναι σημαντικά στην μυελίνωση των νευρών και είναι στόχοι για Αυτοάνοση προσβολή, γλυκοπρωτεΐνη ολιγοδενδροκυττάρων μυελίνης (MOG) και πρωτεΐνη πρωτεολιπιδίου (PLP). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι αντισώματα αντι-MOG εμπλέκονται στην παθογένεση της MS.⁶ Επιπλέον, παρατηρήθηκαν υψηλές συχνότητες πρόδρομων

10 κυττάρων T έναντι MOG, ειδικότερα σε επίτοπους MOG, MOG1-22, MOG34-56 και MOG64-96 που υποστηρίζουν έναν πρωταρχικό ρόλο των αυτοάνοσων T κυττάρων CD4 + να MOG στην ανάπτυξη της νόσου. Αν και υψηλά επίπεδα T-λεμφοκυττάρων εναντίον MOG σημειώνονται, επίσης, και σε υγιή άτομα.⁷⁻⁹ Ειδικότερα, τα T κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με θετικό MS HLA-DR2 αντέδρασαν σε πεπτίδια

15 MOG με έκκριση υψηλών IPN-γ, αλλά όχι από T κύτταρα από υγιή άτομα, υποδηλώνοντας έναν ρόλο των HLA-DR2 στην ασθένεια.¹⁰ Στην πραγματικότητα, HLA-DR2 + και HLA-DR4 + (DRB1 * 0401) αστροκύτταρα και μικρογλοία αποτελεσματικά παρούσα επίτοποι MOG σε CD4 + T κύτταρα επάγουν τις μικτές απαντήσεις Th1 κυτοκίνης / Th2, ενώ παρουσίαση MOG επίτοπο από δενδριτικά

20 κύτταρα επάγουν κυρίως Th1κυτοκίνες.¹¹ Κατά συνέπεια, σε HLA-DR2 διαγονιδιακά ποντίκια MOG35-55 ποντικού σημειώθηκε να είναι ισχυρά ανοσογόνα και επάγεται πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE), ενώ τα ανθρώπινα MOG35-55 (διαφέρει κατά ένα αμινοξύ από P⁴² αντί του S⁴²) ήταν ανοσογόνα αλλά όχι εγκεφαλιτογόνα. Αυτά τα ευρήματα προετοίμασαν το δρόμο για τη μελέτη του

25 πεπτιδίου MOG³⁵⁻⁵⁵ ως δυνητικού παθογόνου προσδιοριστικού παράγοντα σε ανθρώπους με MS.¹²

Η EAE είναι ένα πειραματικό μοντέλο απομυελίνωσης, φλεγμονωδών διεργασιών και νευροπάθειας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) ευαίσθητων ζώων, χρησιμοποιώντας την ενεργοποίηση διαφόρων αντιγόνων του ΚΝΣ όπως οι πρωτεΐνες

30 MBP, PLP και MOG ή τα πεπτίδια τους.^{13,14} Λόγω των ομοιομορφιών της EAE με MS, το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη παθολογικών μηχανισμών καθώς και νέων πειραματικών θεραπειών για τη νόσο. Η EAE επάγεται σε ευαίσθητα ζώα χρησιμοποιώντας γραμμικά πεπτίδια (αντιγόνα) πρωτεϊνών μυελίνης του ΚΝΣ. Αυτά τα πεπτίδια φέρουν διαφορετικές αντιγονικές ιδιότητες σε κάθε είδος ζώου και η

ασθένεια προσδιορίζεται από τις ιδιότητες του απλότυπου MHC τάξης II του ζώου. Στην πραγματικότητα, η έγχυση C57BL / 6 ποντικών με το γραμμικό πεπτίδιο MOG35-55 (1-MOG35-55) εναιωρημένο σε πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (CFA) ακολουθούμενο από ενέσεις 2 τοξινών του κοκκύτη, αναπτύσσει μια κλασική

5 αυτοπεριοριζόμενη μονοφασική EAE με ανερχόμενη άμορφη. Η παράλυση μέσα σε 2 εβδομάδες μετά την ένεση και οι ποντικοί παρακολουθούνται συνήθως έως και 50 ημέρες, ανάλογα με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της EAE.¹⁵ Η αλληλεπίδραση μεταξύ του πεπτιδίου MHC κατηγορίας II και του υποδοχέα T κυττάρων (TCR) που σχηματίζει ένα τριμερές σύμπλεγμα είναι το κλειδί για Πρόκληση νόσου. Οποιαδήποτε

10 τροποποίηση του αντιγονικού πεπτιδίου και οποιαδήποτε προκαλούμενη απόκλιση από ένα σφιχτό σύμπλοκο MHC κατηγορίας II-πεπτιδίου-TCR μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ενεργοποίηση T-κυττάρων, ανεργία T κυττάρων ή / και διαφορετικά προφίλ κυτοκινών¹⁶⁻¹⁸. Με βάση αυτή την έννοια, υπήρξαν αρκετές προσπάθειες να μεταβληθούν οι συγγενικές σχέσεις τριμερούς συνθέσεως και να καταστούν τα

15 αυτοαντιδραστικά T-κύτταρα σε MS και EAE ανενεργά, τροποποιημένα ή εξαλειμμένα. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιήσει είτε εμβολιασμό με T-κύτταρα, εμβολιασμό με πεπτίδιο υποδοχέα T-κυττάρου, εμβολιασμό με DNA ή τροποποιημένο εμβόλιο πεπτιδικού προσδέματος (APL).¹⁸⁻²⁶

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μάλλον διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση

20 για την βελτίωση της EAE σε ποντίκια C57BL/ 6. Συντιθέσαμε το ανοσογόνο και εγκεφαλοτογόνο πεπτίδιο MOG35-55 (1-MOG35-55) και τροποποιήσαμε τη 3D διαμόρφωση του ώστε να γίνει κυκλική (c-MOG35-55). Με αυτό τον τρόπο διατηρήσαμε τον ίδιο αντιγονικό γραμμικό επίτοπο του MOG35-55 αλλά αλλάξαμε το στεροταξύ του μορίου έτσι ώστε να μειώσουμε τη συγγένεια και την εγγύτητα του

25 TCR με το MHC στο τριμερές σύμπλεγμα. Αυτή είναι η πρώτη φορά, σύμφωνα με τις γνώσεις μας, ότι αναφέρεται μια τέτοια χημική διαμόρφωση του γραμμικού MOG35-55. Περαιτέρω, εξετάσαμε την πιθανή εγκεφαλονογένεια αυτού του νέου συντιθέμενου πεπτιδίου c-MOG35-55 στους ποντικούς C57BL / 6 και χρησιμοποιήσαμε το πεπτίδιο ως προληπτική αγωγή στο αντίστοιχο μοντέλο 1-MOG35-55 της EAE. Στην

30 επαγόμενη EAE μελετήθηκαν τόσο η κλινική πορεία όσο και η παθολογία. Ο τρόπος σύνδεσης μέσω υπολογιστικών μεθόδων του c-MOG35-55 σε H2-IAb ήταν παρόμοιος με τον 1-MOG35-55, αλλά τα αμινοξέα που έδειχναν προς το TCR άλλαξαν. Επιπλέον, οι μελέτες σύνδεσης και η μοριακή μοντελοποίηση του c-MOG35-55 σε ανθρώπινο MHC κατηγορίας II, HLA-DR2 έδωσαν γνώση και συνάφεια του c-MOG35-55 για

περαιτέρω μελέτες που χρησιμοποίησαν ανθρώπινα κύτταρα και το συνολικό δυναμικό μεταφράσεώς του.

Η ανάπτυξη κυκλικών μορίων που μιμούνται την ανοσοδιαμορφωτική δραστικότητα των γραμμικών επιτόπων μυελίνης διατηρώντας παράλληλα ένα πλεονέκτημα έναντι των τακτικών πεπτιδίων όσον αφορά τη σταθερότητα και τη δέσμευση με HLA, είναι ένα απαραίτητο βήμα προτού αυτά τα μόρια προταθούν ως φάρμακα. Η χρήση κυκλικών πεπτιδίων αντί των γραμμικών ομολόγων ως θεραπευτικών οντοτήτων έχει πολλά πλεονεκτήματα, περιλαμβανομένης (i) σταθερότητας και αντοχής στην ενζυματική αποικοδόμηση, (ii) αυξημένης εκλεκτικότητας υποδοχέα, με αποτέλεσμα βελτιωμένο φαρμακολογικό προφίλ, (iii) καθορισμένη διαμόρφωση επιτρέπουν την ταυτοποίηση ενεργών (iv) σχεδιασμός χρήσιμων προτύπων για την ανάπτυξη ενός μη πεπτιδικού (μιμητικού) φαρμάκου για στοματική χορήγηση, με δυνητική στοματική δραστικότητα εάν είναι κατάλληλα περιορισμένη. Περιγράψαμε προηγουμένως τον ορθολογικό σχεδιασμό και σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων, με βάση ένα συνδυασμό μελετών διαμορφωτικής ανάλυσης και θεωρητικών υπολογισμών που έγιναν στα γραμμικά πεπτίδια επιτόπου MBP χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία 2D NOESY και ROESY NMR (Ref.17,19,20,21, 29,31,33,36,52,53).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το c-MOG35-55 είναι ελαφρώς ανοσογόνο και βελτιώνει την 1-MOG35-55 (μάρτυρα) EAE.

Για να δοκιμαστούν οι *in vivo* ανοσογόνες δράσεις του c-MOG35-55 σε EAE σε ποντίκια, οι μύες εγχύθηκαν μόνο με πεπτίδιο c-MOG35-55 (ανοσογονικότητα) και σε γαλάκτωμα 1: 1 με το πεπτίδιο c-MOG35-55 (Προληπτική θεραπεία).

Ήταν σαφές ότι το c-MOG35-55 βελτιώνει τόσο τη χρόνια όσο και την οξεία φάση της EAE (Εικόνα 1). Στα χρόνια πειράματα, τα ποντίκια ανέπτυξαν μέτρια EAE με αργή και σχετικά καθυστερημένη έναρξη της νόσου (η κλινική πορεία της χρόνιας EAE παρουσιάζεται στο Σχήμα 1Α). Κανένα ζώο δεν πέθανε από την EAE σε οποιαδήποτε ομάδα. Το συνολικό φορτίο της νόσου, όπως ορίζεται από τις μέσες περιοχές κάτω από την καμπύλη (mAUC, σχήμα 1Β), για κάθε ομάδα ήταν σημαντικά χαμηλότερο στην ομάδα Β (mAUC = 39,63 ± 7,12) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου mAUC = 68,72 ± 11,07, $p = 0,036$). Η μέση κλινική βαθμολογία ήταν στατιστικά σημαντικά

διαφορετική στις ημέρες 21-28, 30-34 και 46 ($p < 0,05$). Το μέγιστο φορτίο της νόσου (όπως ορίζεται από το Μέσο Μέγιστο Κλινικό Αποτέλεσμα, MMS) ήταν σημαντικά χαμηλότερο στην ομάδα που υποβλήθηκε σε αγωγή σε σύγκριση με τους μάρτυρες (έλεγχος MMS = $3,3 \pm 0,42$ και ομάδα B MMS = $2,13 \pm 0,34$, $p = 0,043$, Εικόνα 1C).

- 5 Και οι δύο ομάδες είχαν μια παρόμοια ημέρα εμφάνισης της νόσου (dDO), που ορίστηκε ως η πρώτη ημέρα με κλινική βαθμολογία "1" (έλεγχος = $17,90 \pm 3,17$ και ομάδα B = $21,90 \pm 3,32$, Ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier, log rank $p = 0,358$, Σχ. 1D).

- 10 Τα πειράματα της οξείας φάσης της EAE αναπαράγουν τα κύρια οξέα κλινικά ευρήματα χρόνιων πειραμάτων, σημαντικά κάτω από πιο σοβαρή, πιο επιθετική και γρηγορότερη ασθένεια (Εικ. 1E). Εξ ορισμού, όλα τα ποντίκια θανατώθηκαν 5 ημέρες μετά το πρώτο κλινικό τους σημάδι της EAE (δηλαδή την 16η ημέρα, οξεία φάση). Κανένα ζώο δεν πέθανε σε καμία ομάδα, μέχρι την ημέρα της θυσίας. Το βάρος της νόσου για την οξεία φάση (mAUC, Σχήμα 1F) ήταν χαμηλότερο για την ομάδα B
- 15 (αντιμετωπίστηκε) σε σύγκριση με το μάρτυρα (ομάδα B mAUC = 7.62 ± 2.09 , ομάδα ελέγχου mAUC = 18.56 ± 1.46 , $p = 0.01$). Οι επεξεργασμένοι ποντικοί είχαν χαμηλότερες μέσες κλινικές βαθμολογίες από την 11η ημέρα και μετά ($p < 0,05$ για την ημέρα 11, $p < 0,01$ για τις ημέρες 14-16). Το μέγιστο φορτίο ασθένειας (MMS) δεν υπολογίστηκε για αυτό το πείραμα, επειδή τα ποντίκια δεν παρακολούθηθηκαν αρκετά
- 20 μακρά ώστε να φθάσουν στις μέγιστες βαθμολογίες τους. Και πάλι, και οι δύο ομάδες είχαν σχεδόν παρόμοια ημέρα εμφάνισης νόσου (μέσος όρος dDO για έλεγχο = $11,67 \pm 0,49$ και ομάδα B = $13,67 \pm 0,84$, Ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier, log rank $p = 0,073$, Σχήμα 1G).

- 25 Η ένεση με το c-MOG35-55 μόνο έδειξε ένα ήπιο εγκεφαλιτιδογόνο δυναμικό για το πεπτίδιο, που δεν διατηρείται μακροπρόθεσμα. Ποντίκια που εγχύθηκαν με πεπτίδιο c-MOG35-55 μόνο ανέπτυξαν μια ήπια ασθένεια, με μία ήπια οξεία φάση και ελάχιστα υπολειπόμενα χρόνια ελλείμματα, σε σύγκριση με μία σοβαρή χρόνια EAE ζώων ελέγχου ($p < 0,01$ για ημέρες 14 και εξής, Σχ. 1 H). Το συνολικό φορτίο της νόσου από c-MOG35-55 ήταν ελάχιστο στα πλείστα ποντίκια (c-MOG35-55 mAUC = $29,45 \pm$
- 30 $14,87$, ομάδα ελέγχου mAUC = $109,29 \pm 17,83$, $p = 0,002$, Σχήμα 11). Παρότι τα ποντίκια εμφάνισαν κάποια συμπτώματα ήπιας έως μέτριας ασθένειας, αυτά δεν διατηρήθηκαν μακροπρόθεσμα, γεγονός που υποδηλώνει μακροχρόνια συμπτωματολογία της νόσου (c-MOG35-55 MMS = $1,5 \pm 0,48$, ομάδα ελέγχου MMS

= $3,30 \pm 0,47$, $p = 0,033$, Μακροπρόθεσμη ανίχνευση της νόσου με ελάχιστα ή καθόλου υπολειμματικά ελλείμματα. Η έναρξη της νόσου ήταν στατιστικά παρόμοια και στις δύο ομάδες (c-MOG35-55 και l-MOG35-55, δοκιμή log-rank ανάλυσης επιβίωσης Kaplan-Meier $p = 0,0629$), παρά το γεγονός ότι οι ποντικοί c-MOG35-55
 5 είχαν τάση καθυστέρησης (Σχ. 1K).

Από κοινού, τα κλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ένεση με c-MOG35-55 έχει πολύ χαμηλό εγκεφαλιτιδογόνο δυναμικό. Ωστόσο, η προσθήκη c-MOG35-55 στο γαλάκτωμα ανοσοποίησης του EAE (l-MOG35-55) βελτιώνει το συνολικό βάρος της νόσου και τα μέγιστα κλινικά ελλείμματα, υποδεικνύοντας ένα προληπτικό ή
 10 ανοσοποιητικό αποτέλεσμα για το πεπτίδιο c-MOG35-55.

Το σχήμα 1 περιγράφει κλινικές παραμέτρους πορείας και έκβασης της EAE με ή χωρίς c-MOG35-55. Τα διαγράμματα (A-D) δείχνουν τη μακροπρόθεσμη (χρόνια) κλινική πορεία και τις παραμέτρους των ζώων που έχουν ανοσοποιηθεί με το πεπτίδιο c-MOG35-55 (+ cMOG): (A) τη μακροπρόθεσμη παρακολούθηση της νόσου,) Το
 15 συνολικό βάρος της νόσου (mAUC), (C) τα μέγιστα ελλείμματα ασθένειας (MMS) και (D) Ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier για την έναρξη της νόσου (% ζώων χωρίς ασθένεια). Τα πάνελ (EG) παρουσιάζουν την αντίστοιχη βραχυπρόθεσμη (οξεία) κλινική πορεία και τις παραμέτρους των ζώων που είναι ταυτόχρονα ανοσοποιημένα με το πεπτίδιο c-MOG35-55 (+ cMOG): (E) βραχυχρόνια παρακολούθηση, (F) Η
 20 ασθένεια και (Z) ανάλυση επιβίωσης για την εμφάνιση της νόσου. Τα πάνελ (GJ) παρουσιάζουν τη μακροπρόθεσμη κλινική πορεία και τις παραμέτρους των ζώων που ανοσοποιήθηκαν μόνο με το πεπτίδιο c-MOG35-55 (cMOG) σε σύγκριση με τους μάρτυρες (ανοσοποιημένο με το l-MOG35-55): (G) (H) το συνολικό βάρος της νόσου, (I) τα μέγιστα ελλείμματα νόσου και (I) ανάλυση επιβίωσης για την εμφάνιση της
 25 νόσου. Οι ομάδες ελέγχου σε όλα τα πειράματα EAE ανοσοποιούνται με το πεπτίδιο l-MOG35-55. * Δηλώνει $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Τα δεδομένα των κλιμακωτών βαθμολογιών EAE (A, E, Z) εμφανίζονται ως μέση $\pm$ τυπική απόκλιση (SD). Οι οριζόντιες γραμμές στα τελεία dot δείχνουν μέσα.

30 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η συν-ανοσοποίηση με c-MOG35-55 μειώνει τις φλεγμονώδεις διεργασίες της EAE

Μελέτη φλεγμονωδών διεργασιών σε οξεία και χρόνια φάση της EAE έδειξε ότι το c-MOG35-55 βελτίωσε τις φλεγμονώδεις διεργασίες της EAE. Ειδικότερα, κατά την οξεία φάση, ο c-MOG35-55 μείωσε τον ολικό αριθμό των κυττάρων διήθησης ανά mm² (ομάδα ελέγχου $260,51 \pm 19,30$, ομάδα B $172,23 \pm 18,91$, $p = 0,001$, σχήμα 2) και το μέγεθος φλεγμονώδους εστίας Κύτταρα ανά διήθηση: ομάδα ελέγχου $55,75 \pm 3,90$, ομάδα B $37,61 \pm 3,25$, $p < 0,001$). Ως αποτέλεσμα, το χρονικό υπολειμματικό φλεγμονώδες φορτίο (αριθμός κυττάρων διηθήσεως ανά mm²: ομάδα ελέγχου $28,14 \pm 4,67$, ομάδα B $14,36 \pm 3,13$, $p = 0,015$, σχήμα 3) και μέγεθος φλεγμονώδους εστίας (ομάδα ελέγχου $15,76 \pm 2,34$, ομάδα B $7,54 \pm 1,27$, $p = 0,002$) βελτιώθηκαν επίσης από το c-MOG35-55.

Λαμβανόμενα μαζί, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το c-MOG35-55 βελτιώνει τις οξείες φλεγμονώδεις διεργασίες εντός των σπονδυλικών κλώνων των ποντικών, το οποίο αντανakλάται σε ένα μειωμένο φλεγμονώδες φορτίο μακροπρόθεσμα.

Το σχήμα 2 περιγράφει (A) απομυελινωτικές, (B) φλεγμονώδεις και (C, D) αξονοπαθητικές διαδικασίες ελέγχου και + cMOG ομάδες κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της EAE του νωτιαίου μυελού. Τα γραφήματα C και D δείχνουν την αξονική βλάβη (AI) και την απώλεια (AL) ως ημιποσοτική κατανομή βαρύτητας (κλίμακες 0 έως ++++ στη δεξιά πλευρά των γραφημάτων). Οι φωτογραφίες E και ΣΤ δείχνουν αντιπροσωπευτικές διαμήκεις τομές νωτιαίου μυελού (κάτω από το στόχο 10x) ενός ελέγχου και + συν-ανοσοποιημένο ζώο + cMOG που χρωματίζεται με LFB (μπλε: άθικτη μυελίνη, κόκκινος: κυτταρικοί πυρήνες · βέλη σημείο σε θέσεις φλεγμονώδους εστίας ή / και απομυελίνωση). Σημειώστε την πιο έντονη φλεγμονή και απομυελίνωση των ποντικών ελέγχου. Οι φωτογραφίες G-H δείχνουν αντιπροσωπευτικά τμήματα διαμήκους νωτιαίου μυελού (κάτω από 10x αντικειμενικό στόχο) μάρτυρα και + συν-ανοσοποιημένο ζώο με cMOG χρώση με Bielschowsky και αιματοξυλίνη (BLS + Hem) για νευροπάθεια και φλεγμονή (μπλε: κυτταρικά σώματα, σκούρο καφέ: άξονες). Τα ένθετα παρουσιάζουν μεγεθύνσεις ενός κομμένου αξόνου σε ένα ζώο ελέγχου (σφαιροειδές / ωοειδές, ένθετο του G) ή άθικτα άξονια δίπλα σε φλεγμονώδη κύτταρα σε συν-ανοσοποιημένο ζώο + cMOG (ένθετο H). *** υποδηλώνει $p < 0,001$. Τα δεδομένα εμφανίζονται ως μέσο $\pm$ τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

Η συν-ανοσοποίηση με c-MOG35-55 μειώνει την αξονοπάθεια και την απομυελίνωση της EAE

Η μελέτη της αξονικής παθολογίας αποκάλυψε ένα σημαντικό αποτέλεσμα της θεραπείας c-MOG35-55 στον τραυματισμό και στην απώλεια του νευρικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης, η συν-ανοσοποίηση με c-MOG35-55 οδήγησε σε μειωμένη νευραξική βλάβη (AI) και απώλεια αξονικών (AL) σε σύγκριση με τον έλεγχο (chi-square τεστ Pearson, $p < 0,001$, Εικόνα 2C-D, G-H). Κατά τη διάρκεια της χρόνιας φάσης, η απώλεια νευραξόνων ήταν μικρότερη στους ποντικούς που συν-ανοσοποιήθηκαν με c-MOG35-55, σε σύγκριση με τον έλεγχο (chi-square δοκιμή Pearson, $p = 0,001$, σχήμα 3D, GH), αντικατοπτρίζοντας μια μακροχρόνια αξονική προστασία από C-MOG35-55 πεπτίδιο. Ενεργός νευραξονικός τραυματισμός κατά τη διάρκεια της χρόνιας φάσης (παρουσία δυστροφικών ή κομμένων αξόνων, που απεικονίζονται ως μορφολογία "μαργαριτάρια-χορδές" και "ωοειδή / σφαιροειδή", ένθετα στο σχήμα 3C, GH) βελτιώθηκε επίσης σε ποντίκια συν-ανοσοποιημένα με c-MOG35-55 σε σύγκριση με τους μάρτυρες, αν και αυτό δεν ήταν οριακά στατιστικά διαφορετικό (δοκιμή chi-square Pearson, $p = 0,071$).

Μελέτες απομυελίνωσης (σε τμήματα χρωματισμένα με LFB) έδειξαν ότι η συν-ανοσοποίηση με c-MOG35-55 μείωσε την περιοχή απομυελινοποίησης κατά την οξεία φάση, σε σύγκριση με μάρτυρες (ομάδα ελέγχου = $20,73 \pm 1,34$ και ομάδα B = $7,99 \pm 0,83$, $p < 0,001$, Σχήμα 2A, EF). Η ίδια ωφέλιμη δράση του c-MOG35-55 παρατηρήθηκε επίσης κατά τη διάρκεια της χρόνιας φάσης της νόσου (ομάδα ελέγχου = $14,92 \pm 0,92$ και ομάδα B = $6,77 \pm 0,67$, $p < 0,001$) (Σχήμα 3A, E-P).

Συνολικά, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το c-MOG35-55 μειώνει σημαντικά τις απομυελινωτικές και αξονοπαθητικές διαδικασίες της EAE κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου, με αποτέλεσμα την καλύτερη ανατομική ακεραιότητα των οδών λευκής ουσίας του νωτιαίου μυελού. Είναι σημαντικό ότι η ευεργετική αυτή επίδραση διατηρείται μέχρι τη χρόνια φάση της νόσου και αντανακλάται σε καλύτερες νευρολογικές βαθμολογίες για την ομάδα που υποβλήθηκε σε θεραπεία.

Το σχήμα 3 περιγράφει (A) απομυελινωτικές, (B) φλεγμονώδεις και (C, D) αξονοπαθητικές διαδικασίες ελέγχου και + cMOG ομάδες κατά τη διάρκεια της χρόνιας φάσης της EAE, στα νωτιαίου μυελού. Τα γραφικά C και D δείχνουν τα αποτελέσματα της αξονικής βλάβης (AI) και της απώλειας (AL) ως ημιποσοτική κατανομή της σοβαρότητας. Οι φωτογραφίες E και F δείχνουν αντιπροσωπευτικές διαμήκεις τομές νωτιαίου μυελού (κάτω από το στόχο 10x) μάρτυρα και συν-

ανοσοποιημένο ζώο + cMOG, χρωματισμένο με LFB (μπλε: άθικτη μυελίνη, κόκκινο: κυτταρικοί πυρήνες, βέλη με σημεία φλεγμονώδεις εστίες και / ή Απομυελίνωση). Σημειώστε την υπολειμματική φλεγμονή και την προφανή απομυελίνωση των ποντικών ελέγχου με την παρουσία κενотоπισμού και των συντριμμίων μυελίνης (μπλε χρώση μέσα σε κενοτόπια ή κύτταρα, εισαγωγή στο ε). Οι φωτογραφίες G-H δείχνουν αντιπροσωπευτικές διαμήκεις τομές νωτιαίου μυελού (κάτω από 10x αντικειμενικό στόχο) ποντικών ελέγχου (G) και + cMOG συν-ανοσοποιημένων (H) χρωματισμένων με BLS + Hem για νευροπάθεια και φλεγμονή (μπλε: κυτταρικά σώματα, σκούρα καφέ: άξονες). Τα ένθετα παρουσιάζουν μεγεθύνσεις μιας περιοχής με σοβαρή απώλεια νευραξόνων και συνεχή τραυματισμό σε ένα ζώο ελέγχου (σχεδόν πλήρης απουσία σκούρων καφέ αξόνων με ταυτόχρονη παρουσία σφαιροειδών, ένθετο του G) ή ήπιου νευραξονικού τραυματισμού με ανέπαφα νευραξόνια σε ζώο συν-ανοσοποιημένο με cMOG (Ένθετο του H). * Δηλώνει $p < 0,05$, * $p < 0,001$. Τα δεδομένα εμφανίζονται ως μέσο $\pm$ τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

Ο τρόπος σύνδεσης των πεπτιδίων 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 σε σύμπλεγμα με μυϊκό MHC κατηγορίας II (H2-IAβ)

Ένας αριθμός μελετών έχει αναγνωρίσει τον τρόπο σύνδεσης του 1-MOG35-55 με ποντικίσιο MHC τάξης II, H2-IAb^{27, 28}. Σημειώθηκε ότι τα αμινοξέα στο πεπτίδιο MOG38-51 ήταν σημαντικά για σύνδεση με H2-IAβ. Τα αμινοξέα R41, F44, R46 και V47 αποτελούν την κύρια επαφή υποδοχέα T κυττάρου, δεδομένου ότι οι υποκαταστάσεις του αμινοξέος Αλανίνη (Ala) καταργούν τις αποκρίσεις των κυττάρων T χωρίς να επηρεάζουν την συγγένεια σύνδεσης του πεπτιδίου με το H2-IAβ · τα 27 G38 και W39 δρουν ως υπολείμματα πρόσδεσης υποδοχέα T κυττάρου. Επιπροσθέτως, το αμινοξύ Τυροσίνη στη θέση 40 αναγνωρίστηκε ότι είναι σημαντικό για την αγκύρωση του πεπτιδίου στο H2-IAβ, το οποίο καταλαμβάνει το θύμο P1 των κοινώς ταυτοποιημένων θυλάκων των συμπλοκών MHC, 27 καθώς η αντικατάσταση με Ala σε αυτό το υπόλειμμα μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης του πεπτιδίου με H2-IAβ έως 50%. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις πληροφορίες για σκοπούς επικύρωσης, η αλληλουχία 1-MOG35-55 εξετάστηκε για την τοποθέτησή της στο H2-IAb χρησιμοποιώντας τον εξυπηρετητή IEDB, ο οποίος χρησιμοποιεί αρκετούς αλγόριθμους για την αναγνώριση της τοποθέτησης των αντισωμάτων μέσα στα αλληλόμορφα MHC (βλέπε υλικά και μεθόδους). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια

προβλεπόμενη υψηλότερη συγγένεια της αλληλουχίας YRPPFSRVV (MOG40-48) από το πεπτίδιο CLIP91-99 που χρησιμοποιήθηκε για λόγους σύγκρισης καθώς έχει συν-κρυσταλλωθεί με H2-IAβ (Πίνακας 1). Αυτό το αποτέλεσμα, που είναι σύμφωνο με τα προαναφερθέντα πειραματικά αποτελέσματα, που δείχνει ότι οι θύλακες P1-P9
 5 είναι πιο πιθανό να καταληφθούν από την ειδική αλληλουχία MOG40-48, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των μοντέλων των 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 με H2-IAb.

Τα 3-D πολύπλοκα μοντέλα του 1-MOG35-55-H2-IAb και του c-MOG35-55-H2-IAb κατασκευάστηκαν διαδοχικά με αντικατάσταση αμινοξέων μέσω μοντέλων ομολογίας,
 10 προκειμένου να αποκτήσουν καλύτερη κατανόηση των στοιχείων της αγκύρωσης. Η κατοχή των θυλάκων P1-P9 και των αντίστοιχων αλληλουχιών MOG40-48 παρουσιάζεται στο Σχ. 4. Οι θύλακες P1-P9 καταλαμβάνονται από τα υπολείμματα Y40PPPPPPK48 αντίστοιχα και στα δύο πεπτίδια, 1-MOG35-55 και c-MOG35-55. Στην περίπτωση του 1-MOG35-55 (Σχήμα 4α) το Y40 καταλαμβάνει P1,
 15 σχηματίζοντας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υδροξυλομάδας και της E86β. Το P4 καταλαμβάνεται από P43 που κάνει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με F11α, V78α και δεσμό υδρογόνου με N62α. Το S45 αλληλεπιδρά με το N69α σε P6 και το V48 βρίσκεται σε ένα υδρόφοβο περιβάλλον του P9 που αλληλεπιδρά με V72α και W61β. Στην περίπτωση του c-MOG (Εικόνα 4b), η κυκλοποίηση δεν φαίνεται να
 20 παρεμβαίνει στην κατακράτηση των θυλάκων P1, P4, P6 και P9 παρόμοια με την πείνα μας που αναφέρεται σε κυκλικά APL μικρότερου μήκους.²⁹ Η τοπολογία των αντίστοιχων MOG40-48 Τα υπολείμματα στους θύλακες P1, P4, P6 και P9 είναι τα ίδια όπως το κυκλικό πεπτίδιο μήκους 20 και έχει επαρκές μήκος ραχοκοκαλιάς για να προσδεθεί στην τάξη II MHC. Τα υπολείμματα N53GK55-M35EV37 δείχνουν προς
 25 τη θέση αλληλεπίδρασης TCR.

Με βάση τα κλινικά και νευροπαθολογικά δεδομένα (περίπου 50% καλύτερα κλινικά και ιστολογικά αποτελέσματα), μπορούμε να υποθέσουμε ότι το c-MOG35-55 (όταν τα ζώα συν-ανοσοποιούνται με 1: 1 κυκλικό γραμμικό γαλάκτωμα) ανταγωνίζεται το γραμμικό πεπτίδιο για Επαγωγή ανοσοαποκρίσεων. Υποθέτουμε ότι ένας πεπτιδικός
 30 εξειδικευμένος ανταγωνισμός (c-MOG35-55 κατά 1-MOG35-55) είναι πιθανόν υπεύθυνος για τα ευεργετικά αποτελέσματα του c-MOG35-55 δεδομένου ότι το c-MOG35-55 παρέχει μια παρόμοια συνάφεια συνάφειας συγγένειας και συγγένεια με 1-MOG35-55 σε H2-IAb (Πίνακας 1). Επιπλέον, καθώς το c-MOG35-55 δεσμεύεται

εντός της αύλακας σύνδεσης H2-IAβ, τα κατάλοιπα επαφής TCR είναι διαφορετικά από εκείνα του 1-MOG35-55, επομένως θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανταγωνισμό T κυττάρων. Τα δεδομένα της συν-ανοσοποίησης με c-MOG35-55 έχουν αντιγραφεί σε 2 πειραματικά σύνολα (οξεία και χρόνια). Αυτό αυξάνει την εγκυρότητα των δεδομένων, ως προϋπόθεση σύμφωνα με τα κριτήρια ARRIVE.30

Πίνακας 1

10	Peptide	Residue positioning	SMM-align predicted IC ₅₀ (nM)	NN-align predicted IC ₅₀ (nM)	% Rank
		123456789			
15	MOG₄₀₋₄₈ (linear, cyclic)	YRPPFSRVV	72	15.50	0.28
	MBP₈₇₋₉₅	YRPPFSRVV	236	79.40	1.78
20	CLIP₉₁₋₉₉ (control)	MRMATPLLM	2113	281	10.90

25 Ο πίνακας 1 απεικονίζει τα υψηλότερα ταξινομημένα πεπτίδια χρησιμοποιώντας τη συναινετική προσέγγιση για την πρόβλεψη της συγγένειας σύνδεσης πεπτιδίων με το αλληλόμορφο H2-IAb στη βάση δεδομένων ελεύθερου επιτόπου και τον πόρο πρόβλεψης (IEDB). Τα πεπτίδια ταξινομούνται (ποσοστό κατάταξης) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο συναίνεσης. NN-ευθυγράμμιση, ένας αλγόριθμος
30 ευθυγράμμισης βασισμένος σε τεχνητό νευρικό δίκτυο για πρόβλεψη δέσμευσης πεπτιδίων MHC τάξης II. SMM-ευθυγράμμιση, μέθοδος ευθυγράμμισης μήτρας σταθεροποίησης για πρόβλεψη συγγένειας σύνδεσης MHC τάξης II.

Στο σχήμα 4 απεικονίζονται κορδέλες και επιφανειακές αναπαραστάσεις των (Α) 1-MOG35-55 (σε κίτρινο) και (Β) c-MOG35-55 (σε πορτοκαλί) πεπτίδια συνδεδεμένα με
35 το μοντέλο H2-IAb. Οι αλυσίδες α και β εμφανίζονται σε χρώματα σιταριού και κυανίου αντίστοιχα. Η αρίθμηση των πεπτιδίων εμφανίζεται με έντονα γράμματα.

ΟΙ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ 1-MOG35-55 ΚΑΙ c-MOG35-55 ΣΕ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ HLA-DR2 (DRB1 * 1501)

Τόσο το I-MOG35-55 όσο και το c-MOG35-55 δεσμεύονται με HLA-DR2

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ικανότητα δέσμευσης των πεπτιδίων 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 με HLA- που είχε δημοσιευθεί προηγουμένως¹⁷, 31-36 MBP83-99-AMCA-σημασμένο πεπτίδιο και καθαρισμένα με ανοσοσυγγένεια προϊόντα απομόνωσης HLA-DR2 από μετασχηματισμένο ανθρώπινο EBv DRB1 * 1501 B κυτταρικές σειρές. Καθώς οι ανταγωνιστές 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιήθηκε MBP83-99 ως θετικός έλεγχος. Το γραμμικό MOG35-55 δεσμεύθηκε με υψηλή συγγένεια παρόμοια με εκείνη του πεπτιδίου ελέγχου MBP83-99 και του πεπτιδίου c-MOG35-55 που συνδέθηκε με μειωμένη ικανότητα δέσμευσης με HLA-DR2 αλλά ακόμη με σημαντική συγγένεια (Σχήμα 5)

DR2 *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν δοκιμασίες ανταγωνισμού με βάση μια μέθοδο διήθησης πηκτής όπως δημοσιεύθηκε προηγουμένως¹⁷, 31-36 MBP83-99-AMCA-επισημασμένο πεπτίδιο και απομονωθέντα HLA-DR2 προϊόντα απομόνωσης καθαρισμένα με ανοσοσυγγένεια από ανθρώπινες κυτταρικές γραμμές DRB1 * 1501 B μετασχηματισμένες με EBv. Καθώς οι ανταγωνιστές 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιήθηκε MBP83-99 ως θετικός έλεγχος. Το γραμμικό MOG35-55 δεσμεύθηκε με υψηλή συγγένεια παρόμοια με εκείνη του πεπτιδίου ελέγχου MBP83-99 και του πεπτιδίου c-MOG35-55 που συνδέθηκε με μειωμένη ικανότητα δέσμευσης με HLA-DR2 αλλά ακόμη με σημαντική συγγένεια (Σχήμα 5).

Το σχήμα 5 περιγράφει τη σύνδεση των πεπτιδίων 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 με HLA-DR2. Η ανταγωνιστική δέσμευση σε 10-πλάσια, 20-πλάσια και 50-πλάσια περίσσεια πεπτιδίου. Ο ανταγωνισμός% εμφανίζεται στον άξονα γ και τα πεπτίδια επισημαίνονται στον άξονα χ. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα δίδονται ως μέσο ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

Προκειμένου να εκτιμηθούν τα δεδομένα της δέσμευσης πεπτιδίου 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 με HLA-DR2, εξετάστηκε η αλληλουχία MOG35-55 για την τοποθέτησή της στο HLA-DR2 χρησιμοποιώντας τον εξυπηρετητή IEDB, σε σύγκριση με την αλληλουχία MBP83-98 (Πίνακας 2). Από την πρόβλεψη συνάφειας πεπτιδίων, η βέλτιστη προβλεπόμενη αλληλουχία σύνδεσης για 1-MOG35-55 είναι

F44SRVVHLYR52. Αυτό που ήταν αξιοσημείωτο να βρεθεί είναι ότι η προκύπτουσα αλληλουχία MOG35-55 στο κυκλικό πεπτιδίο περιέχει μία πολύ ομόλογη αλληλουχία προς την MBP83-99 λόγω της κυκλικής φύσης που παράγεται από τα συντηγμένα άκρα. Συγκεκριμένα, η υψηλότερη βαθμολογημένη ακολουθία cMOG, MOG [(48-55) - (35)] (παρένθεση υποδηλώνουν τα τμήματα της γραμμικής αλληλουχίας στο πλαίσιο ενός κυκλικού πεπτιδίου) V48HLYRNGK55-M35, είναι ομόλογη προς το MBP87-95 P1-P9 (V, H, N αντίστοιχα) και οι θύλακες P3, P4 και P5 έχουν παρόμοια αντίστοιχα υπολείμματα (F / L, F / Y και R / K αντίστοιχα). Η αλληλουχία MOG [(48-55) - (35)] είχε προβλεφθεί ότι έχει παρόμοια συγγένεια με το MBP87-95 και σημαντικά υψηλότερη από αυτή του MOG44-52 και στους τρεις αλγορίθμους που χρησιμοποιήθηκαν.

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων πρόβλεψης δέσμευσης, δημιουργήθηκαν μοντέλα των πεπτιδίων σε σύμπλοκο με HLA-DR2 χρησιμοποιώντας μοντέλο ομολογίας. Σύκο. Το Σχήμα 6 απεικονίζει το κρυσταλλικό σύμπλοκο του HLA-DR2 με MBP83-98 και τα μοντέλα σύμπλοκα με I-MOG35-55 και c-MOG35-55. Το HLA-DR2 έχει έναν πολύ υδρόφοβο θύλακα P1 που σχηματίζεται από F24a, F32a, V85β και V86β, στον οποίο είναι τοποθετημένο V87 του MBP83-98 (Σχήμα 6a). Το F90 του MBP83-98 βρίσκεται στο θύλακα P4, που αποτελείται από R13β, F26β, Q70β και Y78β, το N92 αλληλεπιδρά με E11a και το R13β στο P6 και το T95 είναι τοποθετημένο μεταξύ I71a και D57β. Στην περίπτωση του I-MOG, οι F44 και V47 καταλαμβάνουν τους υδρόφοβους θύλακες P1 και P4 αντίστοιχα (Σχήμα 6b). H49 είναι τοποθετημένη σε P6 και R52 είναι θαμμένη βαθιά στο P9, πιθανώς σχηματίζοντας μια ισχυρή γέφυρα άλατος με την πλευρική αλυσίδα D57β. Για την c-MOG35-55, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αλληλουχία MOG [(48-55) - (35)] που εμφανίζεται μετά την κυκλοποίηση είναι πολύ ομόλογη με την MBP87-95 (Πίνακας 2) και επομένως αναμένεται να έχει πολύ παρόμοια αλληλεπίδραση (Σχήμα 6γ). Πράγματι, το σύμπλοκο μοντέλου έδειξε την ίδια ακριβώς τοπολογία για τα κατάλοιπα V48, H49 και Y51 σε σύγκριση με τους MBP87-95 V87, H88 και F90 που καταλαμβάνουν τους θύλακες P1, P2 και P4 αντίστοιχα. Το R52 στο P5 χάνει την εκτεταμένη διαμόρφωση της πλευρικής αλυσίδας που δείχνει προς TCR, λόγω της στερικής επικάλυψης κυκλοποίησης με την σπονδυλική στήλη c-MOG35-55. Τέλος, το M35 καταλαμβάνει το P9, αλληλεπιδρώντας κυρίως με το I72. Τα δεδομένα διαμόρφωσης δέσμευσης επιβεβαιώνουν ότι παρόλο που το c-MOG35-55 είναι ασθενέστερο συνδετικό υλικό στο γραμμικό του αντίστοιχο, το I-MOG35-55 (λόγω

των αποτελεσμάτων κυκλοποίησης) εξακολουθεί να έχει σημαντική συγγένεια με το HLA-DR2 (Εικόνα 5).

Πίνακας 2

Peptide	Residue positioning	SMM-align predicted IC ₅₀ (nM)	NN-align predicted IC ₅₀ (nM)	Sturniolo score	% Rank
	123456789				
MBP ₈₇₋₉₈ (control)	VHFFKNIVT	22	12.60	6	0.10
MOG _[(48-55)-(35)] (cyclic)	VHLYRNGKM	135	27.40	5.08	1.93
MOG ₄₄₋₅₂ (linear)	FSRVVHLYR	528	57.90	2.80	5.94

Ο πίνακας 2 απεικονίζει τα πεπτίδια υψηλότερης ταξινόμησης χρησιμοποιώντας τη συναινετική προσέγγιση για την πρόβλεψη της συγγένειας σύνδεσης πεπτιδίων με το αλληλότιπο HLA-DR2 (DRB1 * 1501) στη βάση δεδομένων ελεύθερου επιτόπου και τον πόρο πρόβλεψης (IEDB). Οι αλληλουχίες σε αγκύλες υποδηλώνουν την κυκλική φύση του πεπτιδίου. Τα πεπτίδια ταξινομούνται (ποσοστό κατάταξης) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο συναίνεσης. NN-ευθυγράμμιση, ένας αλγόριθμος ευθυγράμμισης βασισμένος σε τεχνητό νευρικό δίκτυο για πρόβλεψη δέσμευσης πεπτιδίων MHC τάξης II. SMM-ευθυγράμμιση, μέθοδος ευθυγράμμισης μήτρας σταθεροποίησης για πρόβλεψη συγγένειας πρόσδεσης τάξης II MHC. Το Sturniolo score, ένα λογισμικό πρόβλεψης που ανιχνεύει τις πεπτιδικές βάσεις δεδομένων HLA τάξης II που είναι ειδικές για τα ιστούς και τη διάσπαση, χρησιμοποιώντας μαρκαρίσματα DNA και εικονικές μήτρες HLA τάξης II.

Στο σχήμα 6 απεικονίζονται κορδέλες και επιφανειακές αναπαραστάσεις της (Α) MBP83-99 (σε μπλε) - HLA-DR2 κρυσταλλική δομή 37 και σύμπλοκα μοντέλων (Β) 1-MOG35-55 (σε κίτρινο) και (C) c-MOG35-55 (Σε πορτοκαλί) πεπτίδια συνδεδεμένα με HLA-DR2. Οι αλυσίδες α και β εμφανίζονται σε πράσινο και γκρι χρώματα αντίστοιχα. Η αρίθμηση των πεπτιδίων εμφανίζεται με έντονα γράμματα.

ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ

Είναι σαφές ότι η συγχορήγηση ενός πεπτιδίου c-MOG35-55 σε αναλογία 1: 1 με το αντίστοιχο πεπτίδιο 1-MOG35-55 κατά τη διάρκεια της επαγωγής της EAE παρέχει

5 ένα ευεργετικό προληπτικό αποτέλεσμα στην κλινική πορεία μιας αυτοάνοσης φλεγμονώδους νόσου όπως Ως EAE. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μείωση της κλινικής σοβαρότητας της οξείας φάσης καθώς και με τη μείωση του συνολικού βάρους της νόσου. Αυτές οι κλινικές επιδράσεις αντανακλώνται σε βελτιωμένες φλεγμονώδεις, αξονοπαθητικές και απομυελινωτικές διεργασίες στο ΚΝΣ των ζώων που

10 υποβλήθηκαν σε αγωγή. Το όφελος στις φλεγμονώδεις διεργασίες διατηρείται κατά τη διάρκεια τόσο της οξείας όσο και της χρόνιας φάσης της EAE. Το ίδιο είναι επίσης εμφανές για τις διεργασίες απομυελίνωσης. Η ακονοπάθεια επίσης μειώνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου και αυτό οδηγεί σε σημαντική διατήρηση της λευκής ουσίας κατά τη διάρκεια της χρόνιας φάσης της

15 EAE. Είναι σημαντικό ότι η συντηρητική μυελίνωση και η αξονική ακεραιότητα των οδών του νωτιαίου μυελού σε ζώα συν-ανοσοποιημένα με πεπτίδιο c-MOG35-55 αντανακλώνται σε σημαντικά βελτιωμένα χρόνια νευρολογικά ελλείμματα σε αυτά τα ζώα, σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Προκειμένου να κατανοηθεί ο τρόπος σύνδεσης των c-MOG35-55 και 1-MOG35-55 πεπτιδίων, διεξήχθησαν μελέτες μοντελοποίησης

20 σε σύμπλοκο με την κρυσταλλική δομή του H2-IAβ και σημειώθηκε ότι ο c-MOG35-55 παρείχε δέσμευση σε H2- IAb. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ευεργετική επίδραση του πεπτιδίου c-MOG35-55 στις υποκείμενες παθολογικές διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την κλινική πορεία της EAE. Επιπλέον, καταδείξαμε ότι το c-MOG35-55 δεσμεύεται σε ανθρώπινο MHC τάξης II, HLA-DR2 με χαμηλότερη αλλά

25 συγκρίσιμη συγγένεια με το γραμμικό του αντίστοιχο (1-MOG35-55) και για τον έλεγχο του αγωνιστικού πεπτιδίου MBP83-99. Ήταν ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το c-MOG35-55 δεσμεύεται με HLA-DR2 με παρόμοια διαμόρφωση με εκείνη του MBP83-99. Αν και τα αμινοξέα επαφής TCR είναι κάπως διαφορετικά και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανταγωνισμό TCR. Έτσι, αυτό το νέο πεπτίδιο (c-

30 MOG35-55) θα μπορούσε ενδεχομένως να συζευχθεί με έναν κατάλληλο φορέα (δηλαδή με μαννάνη, στοχεύοντας κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο) ώστε να προκύψει μια νέα ανοσοδιαμορφωτική θεραπεία ανθρώπινης MS όπου η αυτοανοσία του 1-MOG35-55 παίζει ρόλο Στην παθογένεια της νόσου. Πράγματι, έχουμε δείξει ότι

η σύζευξη με μαννάν σε I-MOO35-55 προστατεύει ποντικούς έναντι EAE και συσχετίστηκε με μειωμένο πολλαπλασιασμό T κυττάρων ειδικού αντιγόνου και επαγόμενη ανεκτικότητα T κυττάρων · 26 επιπλέον η σύζευξη με μαννάνη είναι ικανή να εκτρέψει τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε MBP83-99 Αλλοιωμένους πεπτιδικούς
5 συνδέτες (19-21, 23-25).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

Σύνθεση πεπτιδίων στερεάς φάσης κυκλικού-MOG35-55

Γραμμικά προστατευμένο MOG35-55 (αρουραίου, ποντικού) (H₂N-Met35-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Ser42-Pro-Phe-Ser-Arg- Val -Val-His-Leu-Tyr-Arg- -Gly-Lys55-OH) συντέθηκε σε ρητίνη χλωριούχου 2-χλωροτριτυλοχλωριδίου (CTLR-Cl) χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία Fmoc / tBu (Σχήμα 1). Όλα τα αμινοξέα αγοράστηκαν από την CBL (Πάτρα, Ελλάδα). Η σύνθεση πεπτιδίων ήταν σε κλίμακα 0,5 mmol μέχρι το τελικό προστατευμένο ανάλογο. Η χρήση της ρητίνης 2-χλωροτριτυλίου υπό ήπιες συνθήκες (DCM / TFE, 7/3) για τη διάσπαση του δεσμού
10 πεπτιδίου-ρητίνης, επέτρεψε την απελευθέρωση υψηλής απόδοσης και καθαρότητας του προστατευμένου πεπτιδίου από τη ρητίνη. Η απόδοση των πλήρως
15 προστατευμένων πεπτιδικών ρητινών ήταν > 90%.

Η κυκλοποίηση γραμμικά προστατευμένου MOG35-55 επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τετραφθοροβορικό Ο-βενζοτρίαζολ-1-υλ-N, N, N', N'-τετραμεθυλουρόνιο (TBTU) και
20 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτρίαζόλη, 2,4,6 κολιιδίνη σε DMF Που επιτρέπει γρήγορες αντιδράσεις και προϊόντα κυκλοποίησης υψηλής απόδοσης (Σχήμα 2).

Η αντίδραση κυκλοποίησης παρακολουθήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία νινυδρίνης και το μίγμα της αντίδρασης αναλύθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, σύστημα διαλύτη nbutanol / οξικό οξύ / νερό (4/1/1) και αναλυτική HPLC
25 σε υλικό συσκευασίας C4 Nucleosil RP 5 μm. Το προστατευμένο κυκλικό ανάλογο στη συνέχεια απελευθερώνεται από προστατευμένες ομάδες πλευρικής αλυσού με 90% τριφθοροοξικό οξύ (TFA) σε διάλυμα DCM που περιέχει 5% διθειοθρεϊτόλη / νερό / ανισόλη ως σαρωτές. Ο καθαρισμός του τελικού αναλόγου κυκλικού πεπτιδίου επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός συστήματος χρωματογραφίας HPLC Waters Delta Prep
30 εφοδιασμένο με ελεγκτή Prep LC και ανιχνευτή συστοιχίας Photodiode Waters 2996. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης Nucleosil RP-18 με υλικό συσκευασίας 7 μm με βαθμιδωτή γραμμική βαθμίδωση ακετονιτρίλιου σε 0.1%

CF₃CO₂H με ρυθμό ροής 8 ml / min. Κυκλικό ανάλογο, 5 mg ανά δείγμα, εγχύθηκε για τις συλλογές των κλασμάτων σύμφωνα με τα δεδομένα χρωματογραφήματος. Η έκλουση του αναλόγου πεπτιδίου ανιχνεύθηκε από απορρόφηση στα 254 nm και 230 nm ταυτόχρονα. Τα κλάσματα που περιείχαν το απαιτούμενο πεπτίδιο συγκεντρώθηκαν μετά την απομάκρυνση του CH₃CN σε έναν περιστροφικό εξατμιστήρα στους 40 ° C και λυοφιλοποιήθηκαν. Το τελικό κυκλικό πεπτίδιο ήταν > 98% καθαρό όπως αναλύθηκε με αναλυτική RP-HPLC και ESI-MS (Σχήμα 7).

Το Σχέδιο 1 απεικονίζει τη σχηματική αναπαράσταση της χημικής σύνθεσης του πεπτιδίου c-MOG35-55

- 10 Το Σχήμα 7 περιγράφει (Α) Αναλυτική RP-HPLC καθαρισμένου (καθαρότητα > 98%) c-MOG35-55 πεπτιδίου. Στήλη: Συσκευασία Xbridge C18, 150 mm x 4.6 mm, 3.5 μm (Μέρος / N = 186003034). RT: 9.49 λεπτά Συνθήκες: βαθμίδα 5% (B) -100% (B), σε 30 λεπτά, ρυθμός ροής 1 κ.εκ. / λεπτό. [Εκλουστικοί παράγοντες (α): διάλυμα TFA σε H₂O 0,1% (v / v), (β): διάλυμα TFA σε AcN 0,1% (v / v)]. (B) ESI + MS του πεπτιδίου c-MOG35-55. M + 2H + / 2: 1282.83, M + 3H + / 3: 855.23. M + 4H + / 4: 642.23].

Μεταχείριση των ζώων

- Τα θηλυκά ποντίκια χωρίς C57BL / 6 αγοράστηκαν από το Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur της Αθήνας και στεγάστηκαν στη ζωοτεχνική μονάδα του Β' Νευρολογικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΗΕΡΑ, Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου σύμφωνα με τις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας. Τα ποντίκια τρέφονταν με κανονική δίαιτα και έδωσαν νερό χωρίς αντιβιοτικά.

ΕΑΕ επαγωγή και αξιολόγηση της κλινικής νόσου

- Η MOG ΕΑΕ προκλήθηκε ως εξής. Εν συντομία, θηλυκοί ποντικοί ηλικίας C57BL / 6 ηλικίας 10 εβδομάδων, διαιρέθηκαν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα πεπτίδια. Οι ομάδες ελέγχου σε όλα τα πειράματα εγχύθηκαν με 300 μg γραμμικού πεπτιδίου MOG35-55 (που συντέθηκε από την ομάδα του Καθ. Ματσούκα). Τα ποντίκια επίσης ανοσοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα μίγμα 1: 1 του γραμμικού πεπτιδίου MOG35-55 και του κυκλικού MOG35-55 (c-MOG35-55) ή c-MOG35-55 μόνο του. Όλες οι ομάδες εγχύθηκαν υποδορίως στην αριστερή παραοσφυϊκή περιοχή γαλακτωμάτων που αποτελούνται από το ειδικό μίγμα πεπτιδίων

αραιωμένο σε 100 μ l φιλτραρισμένο με φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS) και γαλακτωματοποιήθηκε με 100 μ l πλήρους ανοσοενισχυτικού Freund (CFA) με 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, σε ένα συνολικό εγχυμένο όγκο 200 μ l (ημέρα 0). Επιπρόσθετα, την ημέρα επαγωγής (ημέρα 0), όλες οι ομάδες έλαβαν επίσης ενδοπεριτοναϊκά 400 ng τοξίνης κοκκύτη (Sigma) αραιωμένα σε 0,5 ml διηθημένου PBS. Την ημέρα 2, εγχύθηκαν άλλα 200 ng τοξίνης κοκκύτη. Μία δεύτερη ένεση των γαλακτωματοποιημένων πεπτιδίων, παρέλαβε επίσης 7 ημέρες αργότερα στην δεξιά παρα-οσφυϊκή περιοχή. Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες πειραματικές διαδικασίες: (i) χρόνιες EAE, οι ποντικοί θυσιάστηκαν την ημέρα 46 μετά την πρόκληση ασθένειας, (ii) οξεία EAE, οι ποντικοί θυσιάστηκαν την ημέρα 17 μετά την πρόκληση ασθένειας, και (iii) η σύγκριση μεταξύ των ανοσογόνων ιδιοτήτων του c-MOG35-55 έναντι του γραμμικού MOG35-55. Όλα τα ποντίκια εξετάστηκαν καθημερινά και αξιολογήθηκαν για αλλαγές σωματικού βάρους και κλινικά συμπτώματα ασθένειας. Τα πρώτα κλινικά σημεία εμφανίζονται την ημέρα 12-16 μετά την ανοσοποίηση, ανάλογα με την εξέλιξη της νόσου των EAE. Η κλινική κατάσταση των ποντικών βαθμολογήθηκε ως εξής: 0, χωρίς κλινική ασθένεια. 1) αδυναμία κινητικότητας ουράς 2) παράλυση ουράς 3) αδυναμία πίσω άκρου επαρκή για να μειώσει την αποκατάσταση. 4) παραπληγία. 5) μερική παράλυση ή παραπληγία του πρόσθιου άκρου. 6) θάνατος από την EAE.

20 Ιστοπαθολογία

Σε οξεία (ημέρα 17) και χρόνια (ημέρα 46) φάση της EAE, τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε διακαρδική διάχυση με 4% παραφορμαλδεϋδη σε PBS (pH 7.2, παγωμένο). Οι εγκεφαλοι και τα νωτιαία κορδόνια απομακρύνθηκαν, τοποθετήθηκαν στο ίδιο σταθεροποιητικό για περίπου 20 ώρες, υποβλήθηκαν σε διαδικασία ρουτίνας για την ενσωμάτωση σε παραφίνη και διαχωρίστηκαν στα 6 μ m. Οι τομές από ποντίκια οξείας και χρόνιας φάσης της νόσου, στη συνέχεια, κηλιδώθηκαν χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες μεθόδους: (i) τροποποιημένη μέθοδο βαφής εμποτισμού με άργυρο Bielschowsky silver (BLS) σε συνδυασμό με αιματοξυλίνη (Hem) (BLS + Hem), για την ταυτόχρονη αξιολόγηση (ii) χρώση Luxol fast blue (LFB), βαμμένη αντιθέτως με τον πυρηνικό κόκκινο κόκκινο για την ανίχνευση περιοχών απομυελινοποίησης εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος των ποντικών, χρησιμοποιώντας ιστοπαθολογικά πρωτόκολλα ρουτίνας.

- Η παθολογική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο φωτός (Olympus AxioPlan-2) από δύο τυφλούς ερευνητές και λήφθηκαν φωτογραφίες χρησιμοποιώντας κάμερα CCD (Nikon). Πέντε τυχαία επιλεγμένες διαμήκεις τομές ανά ιστό (εγκεφάλου και σπονδυλικής στήλης) αξιολογήθηκαν ως εξής: για κάθε ζώο, κάθε τμήμα
- 5 αξιολογήθηκε σε οπτικά πεδία 20x ή 40x (ανάλογα με το αντικείμενο της μελέτης) έτσι ώστε να καλύπτει ολόκληρη την περιοχή του τμήματος. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ανά mm² ιστού, κατά περίπτωση. Τα νωτιαία σχοινιά είχαν την πλειοψηφία των βλαβών (σε σύγκριση με τους εγκεφάλους), επομένως οι παθολογικές μελέτες επικεντρώθηκαν στα τμήματα του νωτιαίου μυελού των ζώων.
- 10 Ανάλογα με την εκτιμώμενη παράμετρο χρησιμοποιήσαμε τις ακόλουθες κλίμακες όπως περιγράψαμε προηγουμένως.^{39,42} Αξονική βλάβη (AI), αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη κλίμακα: 0 = όχι AI, 1+ = διασκορπισμένοι δυστροφικοί τραυματισμένοι άξονες χωρίς σφαιροειδές ή ωοειδές, 2+ = Ήπια AI με την παρουσία τουλάχιστον ενός σφαιροειδούς ή ωοθυλακίου, 3+ = μέτριας AI, 4+ =
- 15 σοβαρής AI, Οι γενικώς τραυματισμένοι νευραξόνες ορίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως σφαιροειδή και ωοειδή (που αντιπροσωπεύουν αξονότμηση) και διασταλμένα (δυστροφικά) νευραξόνια τα οποία αντιπροσωπεύουν τραυματισμένους νευράξονες που δεν έχουν ακόμη κοπεί. Η αξονική απώλεια (AL) αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη κλίμακα: 0 = κανονική αξονική πυκνότητα, 1+ = 25% AL, 2+ = ήπια
- 20 AL (26-50%), 3+ = μέτρια έως σοβαρή (51-75%) AL, 4+ = σοβαρό AL (> 75%). Διάφοροι βαθμοί μειωμένης πυκνότητας των νευραξόνων αποδόθηκαν σε απώλεια αξονικών κυττάρων και αξιολογήθηκαν αναλόγως. Οι διηθήσεις ιστού εκτιμήθηκαν με στόχο 20x και τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ο αριθμός των κυττάρων διήθησης ανά mm² και ο αριθμός των κυττάρων διείσδυσης ανά διήθηση. Η απομυελίνωση της
- 25 λευκής ύλης αξιολογήθηκε σε 40x οπτικά πεδία: χρησιμοποιώντας ένα προμετωπικό πλέγμα, μετρήσαμε την περιοχή απομυελίνωσης και τη συνολική επιφάνεια λευκής ύλης σε κάθε οπτικό πεδίο και στη συνέχεια υπολογίσαμε το% της απομυελίνωσης.

Στατιστική ανάλυση

- 30 Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων του ποντικίου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS 23.0. Για κλινικά κλινικά και ιστοπαθολογικά δεδομένα, η κανονικότητα της κατανομής δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας δοκιμές Shapiro-Wilk. Για 2 συγκρίσεις ομάδων εφαρμόσαμε είτε t-test Student (παραμετρικά

δεδομένα) είτε Mann-Whitney U test (μη παραμετρικά δεδομένα). Για ονομαστικά ή
σειριακά δεδομένα και συγκρίσεις μεταξύ 2 ομάδων χρησιμοποιήσαμε ακριβείς
δοκιμές Pearson chi-square ή Fisher, όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Ανάλυση επιβίωσης
Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την κλινική πορεία της ΕΑΕ, με την «έναρξη της
5 νόσου» ως το τελικό σημείο της ανάλυσης (η ημέρα εμφάνισης της νόσου, dDO,
ορίστηκε ως η πρώτη ημέρα με κλινική βαθμολογία «1»). Η μέση μέγιστη βαθμολογία
(MMS) υπολογίστηκε για κάθε ομάδα χρησιμοποιώντας τις μέγιστες βαθμολογίες από
κάθε ζώο κάθε ομάδας. Το βάρος της νόσου εκφράστηκε ως η περιοχή κάτω από την
καμπύλη (AUC), η οποία υπολογίστηκε για κάθε ποντίκι χρησιμοποιώντας τον τύπο:
10 43 Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ SEM, εκτός αν ορίζεται διαφορετικά.

Ανταγωνιστική πρόσδεση γραμμικού και κυκλικού MOG35-55 σε αλληλόμορφο HLA-DR2

Η σύνδεση των αναλόγων 1-MOG35-55 και c-MOG35-55 με HLA-DR2 διεξήχθη
15 όπως αποδείχθηκε προηγουμένως.^{34, 35} Εν συντομία, χρησιμοποιήθηκαν
μετασχηματισμένες με EBv ομόζυγες ανθρώπινες Β κυτταρικές γραμμές HTO-Λαν
(DRB1 * 1501, DRB5 * 0101) Για την απομόνωση του μορίου MHC τάξης II. Τα
σφαιρίδια κυττάρων HTC-Lan λυθήθηκαν από nonidet P-40 και HLA-DR2 που
απομονώθηκαν από ομογενοποιημένα με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας
20 το μονοκλωνικό αντίσωμα L243. Η καθαρότητα του παρασκευάσματος ελέγχθηκε με
SDS-PAGE, HPSEC και κηλίδωση Western (δεν φαίνεται). Διεξήχθησαν δοκιμασίες
δέσμευσης ανταγωνισμού όσον αφορά γραμμικά MOG35-55 και c-MOG35-55 με τη
χρησιμοποίηση επισημασμένου με φθορίζοντα AMCA αλληλόμορφου μορίου MBP83-
99 για την αλυσίδα HLA-DR2b. Διαλυτοποιημένο HLA-DR2 (0.66 mM) επώαστηκε
25 για 48 ώρες στους 37 ° C με επισημασμένο με MBP83-99- (AMCA) πεπτίδιο
διαλυμένο σε 150 mM φωσφορικό νάτριο, pH 6.0, που περιείχε 15% ακετονιτρίλιο,
0.1% Zwittergent-12 (Calbiochem) . Διεξήχθησαν προσδιορισμοί ανταγωνισμού σε
διάλυμα 1 μ M πεπτιδίου AMCA. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν σε στήλη διήθησης
πηκτής υψηλής απόδοσης Pharmacia Superdex 75 HR 5/20. Η στήλη λειτουργεί με
30 ρυθμό ροής 0,3 ml / λεπτό χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα HPSEC, pH 6,0.
Το μέσο έκλουσης διήλθε μέσω φασματόμετρου φθορισμού Shimadzu (350/450 nm)
και ανιχνευτή υπερύθρου Merck (214 nm) σε σειρά. Τα σήματα φθορισμού και

υπεριώδους ακτινοβολίας που εκλύονται με τα διμερή HLA-DR καταγράφηκαν από ένα μοντέλο O 2500 ολοκλήρωσης (Merck-Hitachi).

Σύζευξη πεπτιδίων μυελίνης με μαννάνη ή μαννόζη

- 5 Η σύζευξη των πεπτιδίων μυελίνης στη μαννάνη πολυσακχαρίτη ζυμομύκητα τους κατευθύνει απευθείας σε δενδριτικά κύτταρα μέσω του υποδοχέα μαννόζης και είναι μια ισχυρή προσέγγιση για τη ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων. Οι καθηγητές Ian McKenzie και Vasso Apostolopoulos ανέπτυξαν για πρώτη φορά αυτή την προσέγγιση στο Austin Research Institute, Βικτώρια, Αυστραλία. Έδειξαν ότι το καρκινικό
- 10 αντιγόνο MUC1 που συνδέονται με οξειδωμένη μαννάνη επαγόμενη την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών CD8 T λεμφοκυττάρων κατά του «ξένου» αντιγόνο MUC 1 σε ποντικούς και να τους προστατεύονται έναντι πρόκλησης με κύτταρα όγκου MUC1 (Αποστολόπουλος et al., 1995). Αυτή η προσέγγιση έχει μεταφραστεί με επιτυχία μέσα
- 15 φάσης I για την πιλοτική μελέτες φάσης III σε ένα εμβόλιο όγκου για χρήση σε πρώιμο καρκίνο του μαστού (Αποστολόπουλος et al., 2006, Βασίλαρο et al., 2013). Αργότερα έδειξαν ότι «αυτο» πεπτίδια που συνδέονται με την οξειδωμένη μαννάνη επάγεται την
- 20 εναλλακτική ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών CD4 T λεμφοκύτταρα όταν τα αλλοιωμένα πεπτίδια μυελίνης (APL) χρησιμοποιείται (Κατσαρά et al., 2008, Κατσαρά et al., 2009), ή έλλειψη ανταποκρίσεως όταν τα φυσικά Χρησιμοποιούνται πεπτίδια
- 25 μυελίνης (Tseveleki et al., 2015). Τα πεπτίδια φυσικό μυελίνης που συνδέονται με οξειδωμένο μαννάνη επαγόμενη πεπτιδίου-ειδική ανοχή T κυττάρου και προστασία έναντι νευροφλεγμονής σε 4 διαφορετικά μοντέλα των MS (MOG35-55-EAE σε C57BL / 6 και εξανθρωπισμένα ποντίκια DR2, PLP139-151-EAE σε ποντικούς SJL, MBP74 -87-EAE σε αρουραίους Lewis), χρησιμοποιώντας προφυλακτικά ή
- 30 θεραπευτικά πρωτόκολλα (Tseveleki et al., 2015). Συνεπώς, τα οξειδωμένα πεπτίδια συζευγμένα με μαννάνη όπως το MOG35-55 αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενα αντιδραστήρια για την αποκατάσταση της ανοχής των περιφερειακών κυττάρων T σε αυτοανοσία και για τη θεραπεία της MS. Το κυκλικό MOG35-55 είναι ανώτερο από το γραμμικό MOG35-55 ως αποτέλεσμα της κυκλικής δομής του, γεγονός που το καθιστά
- 30 πιο ανθεκτικό στα πρωτεολυτικά ένζυμα και είναι συγκεκριμένο στις δράσεις του.

Το Σχήμα 8 περιγράφει την αλληλουχία του πεπτιδίου MOG 35-55 και τη σύζευξη του με μαννάνη.

REFERENCES

1. Steinman, L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996, 85, 299-302.
2. Krogsgaard, M.; Wucherpfennig, K. W.; Cannella, B.; Hansen, B. E.; Svejgaard, A.; Pyrdol, J.; Ditzel, H.; Raine, C.; Engberg, J.; Fugger, L. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* 2000, 191, 1395-412.
3. Martin, R.; McFarland, H. F.; McFarlin, D. E. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992, 10, 153-87.
4. Ota, K.; Matsui, M.; Milford, E. L.; Mackin, G. A.; Weiner, H. L.; Hafler, D. A. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990, 346, 183-7.
5. Steinman, L.; Waisman, A.; Altmann, D. Major T-cell responses in multiple sclerosis. *Mol Med Today* 1995, 1, 79-83.
6. Berger, T.; Rubner, P.; Schautzer, F.; Egg, R.; Ulmer, H.; Mayringer, I.; Dilitz, E.; Deisenhammer, F.; Reindl, M. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003, 349, 139-45.
7. Diaz-Villoslada, P.; Shih, A.; Shao, L.; Genain, C. P.; Hauser, S. L. Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen. *J Neuroimmunol* 1999, 99, 36-43.
8. Kerlero de Rosbo, N.; Hoffman, M.; Mendel, I.; Yust, I.; Kaye, J.; Bakimer, R.; Flechter, S.; Abramsky, O.; Milo, R.; Karni, A.; Ben-Nun, A. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol* 1997, 27, 3059-69.
9. Sun, J.; Link, H.; Olsson, T.; Xiao, B. G.; Andersson, G.; Ekre, H. P.; Linington, C.; Diener, P. T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Immunol* 1991, 146, 1490-5.

10. Wallstrom, E.; Khademi, M.; Andersson, M.; Weissert, R.; Linington, C.; Olsson, T. Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 1998, 28, 3329-35.
11. Kort, J. J.; Kawamura, K.; Fugger, L.; Weissert, R.; Forsthuber, T. G. Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice. *J Neuroimmunol* 2006, 173, 23-34.
12. Rich, C.; Link, J. M.; Zamora, A.; Jacobsen, H.; Meza-Romero, R.; Offner, H.; Jones, R.; Burrows, G. G.; Fugger, L.; Vandenbark, A. A. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 peptide induces severe chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR2-transgenic mice. *Eur J Immunol* 2004, 34, 1251-61.
13. Grigoriadis, N.; Ben-Hur, T.; Karussis, D.; Milonas, I. Axonal damage in multiple sclerosis: a complex issue in a complex disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2004, 106, 211-7.
14. Grigoriadis, N.; Grigoriadis, S.; Polyzoidou, E.; Milonas, I.; Karussis, D. Neuroinflammation in multiple sclerosis: evidence for autoimmune dysregulation, not simple autoimmune reaction. *Clin Neurol Neurosurg* 2006, 108, 241-4.
15. Bittner, S.; Afzali, A. M.; Wiendl, H.; Meuth, S. G. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* 2014.
16. Degano, M.; Garcia, K. C.; Apostolopoulos, V.; Rudolph, M. G.; Teyton, L.; Wilson, I. A. A functional hot spot for antigen recognition in a superagonist TCR/MHC complex. *Immunity* 2000, 12, 251-61.
17. Deraos, G.; Chatzantoni, K.; Matsoukas, M. T.; Tselios, T.; Deraos, S.; Katsara, M.; Papathanasopoulos, P.; Vynios, D.; Apostolopoulos, V.; Mouzaki, A.; Matsoukas, J. Citrullination of linear and cyclic altered peptide ligands from myelin basic protein (MBP(87-99)) epitope elicits a Th1 polarized response by T cells isolated from multiple sclerosis patients: implications in triggering disease. *J Med Chem* 2008, 51, 7834-42.
18. Katsara, M.; Minigo, G.; Plebanski, M.; Apostolopoulos, V. The good, the bad

- and the ugly: how altered peptide ligands modulate immunity. *Expert Opin Biol Ther* 2008, 8,1873-84.
19. Katsara, M.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Design of novel cyclic altered peptide ligands of myelin basic protein MBP83-99 that modulate immune responses in SJL/J mice. *J Med Chem* 2008, 51, 3971-8.
 20. Katsara, M.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, M. T.; Friligou, I.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Design and synthesis of a cyclic double mutant peptide (cyclo(87-99)[A91,A96]MBP87-99) induces altered responses in mice after conjugation to mannan: implications in the immunotherapy of multiple sclerosis. *J Med Chem* 2009, 52, 214-8.
 21. Katsara, M.; Deraos, S.; Tselios, T. V.; Pietersz, G.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Immune responses of linear and cyclic PLP139-151 mutant peptides in SJL/J mice: peptides in their free state versus mannan conjugation. *Immunotherapy* 2014, 6, 709-24.
 22. Katsara, M.; Matsoukas, J.; Deraos, G.; Apostolopoulos, V. Towards immunotherapeutic drugs and vaccines against multiple sclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008, 40, 636-42.
 23. Katsara, M.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. A double mutation of MBP(83-99) peptide induces IL-4 responses and antagonizes IFN-gamma responses. *J Neuroimmunol* 2008, 200, 77-89.
 24. Katsara, M.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Mannosylation of mutated MBP83-99 peptides diverts immune responses from Th1 to Th2. *Mol Immunol* 2008, 45, 3661-70.
 25. Katsara, M.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Tselios, T.; Deraos, G.; Lourbopoulos, A.; Grigoriadis, N.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Altered peptide ligands of myelin basic protein (MBP87-99) conjugated to reduced mannan modulate immune responses in mice. *Immunology* 2009, 128, 521-33.
 26. Tseveleki, V.; Tselios, T.; Kanistras, I.; Koutsoni, O.; Karamita, M.; Vamvakas, S. S.; Apostolopoulos, V.; Dotsika, E.; Matsoukas, J.; Lassmann, H.; Probert, L. Mannan- conjugated myelin peptides prime non-pathogenic Th1 and Th17 cells and ameliorate experimental autoimmune

- encephalomyelitis. *Exp Neurol* 2015, 267, 254-67.
27. Petersen, T. R.; Bettelli, E.; Sidney, J.; Sette, A.; Kuchroo, V.; Bäckström, B. T. Characterization of MHC-and TCR-binding residues of the myelin oligodendrocyte glycoprotein 38–51 peptide. *European journal of immunology* 2004, 34, 165-173.
 28. Ben-Nun, A.; de Rosbo, N. K.; Kaushansky, N.; Eisenstein, M.; Cohen, L.; Kaye, J. F.; Mendel, I. Anatomy of T cell autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): Prime role of MOG44F in selection and control of MOG-reactive T cells in H-2b mice. *European journal of immunology* 2006, 36, 478-493.
 29. Apostolopoulos, V.; Deraos, G.; Matsoukas, M.-T.; Day, S.; Stojanovska, L.; Tselios, T.; Androutsou, M.-E.; Matsoukas, J. Cyclic citrullinated MBP 87–99 peptide stimulates T cell responses: Implications in triggering disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25, 528-538.
 30. Kilkenny, C.; Browne, W. J.; Cuthill, I. C.; Emerson, M.; Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010, 8, e1000412.
 31. Deraos, G.; Rodi, M.; Kalbacher, H.; Chatzantoni, K.; Karagiannis, F.; Synodinos, L.; Plotas, P.; Papalois, A.; Dimisianos, N.; Papathanasopoulos, P.; Gatos, D.; Tselios, T.; Apostolopoulos, V.; Mouzaki, A.; Matsoukas, J. Properties of myelin altered peptide ligand cyclo(87-99)(Ala91,Ala96)MBP87-99 render it a promising drug lead for immunotherapy of multiple sclerosis. *Eur J Med Chem* 2015, 101, 13-23.
 32. Halder, T. M.; Bluggel, M.; Heinzl, S.; Pawelec, G.; Meyer, H. E.; Kalbacher, H. Defensins are dominant HLA-DR-associated self-peptides from CD34(-) peripheral blood mononuclear cells of different tumor patients (plasmacytoma, chronic myeloid leukemia). *Blood* 2000, 95, 2890-6.
 33. Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V.; Kalbacher, H.; Papini, A. M.; Tselios, T.; Chatzantoni, K.; Biagioli, T.; Lolli, F.; Deraos, S.; Papathanassopoulos, P.; Troganis, A.; Mantzourani, E.; Mavromoustakos, T.; Mouzaki, A. Design and synthesis of a novel potent myelin basic protein epitope 87-99 cyclic analogue: enhanced stability and biological properties of mimics render them a potentially new class of immunomodulators. *J Med Chem* 2005, 48, 1470-80.

34. Max, H.; Halder, T.; Kalbus, M.; Gnau, V.; Jung, G.; Kalbacher, H. A 16mer peptide of the human autoantigen calreticulin is a most prominent HLA-DR4Dw4-associated self-peptide. *Human immunology* 1994, 41, 39-45.
35. Max, H.; Halder, T.; Kropshofer, H.; Kalbus, M.; Müller, C. A.; Kalbacher, H. Characterization of peptides bound to extracellular and intracellular HLA-DR1 molecules. *Human immunology* 1993, 38, 193-200.
36. Tselios, T.; Apostolopoulos, V.; Daliani, I.; Deraos, S.; Grdadolnik, S.; Mavromoustakos, T.; Melachrinou, M.; Thymianou, S.; Probert, L.; Mouzaki, A.; Matsoukas, J. Antagonistic effects of human cyclic MBP(87-99) altered peptide ligands in experimental allergic encephalomyelitis and human T-cell proliferation. *J Med Chem* 2002, 45, 275-83.
37. Smith, K. J.; Pyrdol, J.; Gauthier, L.; Wiley, D. C.; Wucherpfennig, K. W. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA* 0101, DRB1* 1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *The Journal of experimental medicine* 1998, 188, 1511-1520.
38. Hahn, M.; Nicholson, M. J.; Pyrdol, J.; Wucherpfennig, K. W. Unconventional topology of self peptide-major histocompatibility complex binding by a human autoimmune T cell receptor. *Nature immunology* 2005, 6, 490-496.
39. Lourbopoulos, A.; Grigoriadis, N.; Lagoudaki, R.; Touloumi, O.; Polyzoidou, E.; Mavromatis, I.; Tascos, N.; Breuer, A.; Ovadia, H.; Karussis, D.; Shohami, E.; Mechoulam, R.; Simeonidou, C. Administration of 2-arachidonoylglycerol ameliorates both acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2011, 1390, 126-41.
40. Theotokis, P.; Touloumi, O.; Lagoudaki, R.; Nousiopoulou, E.; Kesidou, E.; Siafis, S.; Tselios, T.; Lourbopoulos, A.; Karacostas, D.; Grigoriadis, N.; Simeonidou, C. Nogo receptor complex expression dynamics in the inflammatory foci of central nervous system experimental autoimmune demyelination. *J Neuroinflammation* 2016, 13, 265.
41. Lourbopoulos, A.; Grigoriadis, S.; Symeonidou, C.; Deretzi, G.; Taskos, N.; Shohami, E.; Grigoriadis, N. Modified Bielschowsky silver impregnation combined with Hematoxylin or Cresyl Violet counterstaining as a potential tool for the simultaneous study of inflammation and axonal injury in the central nervous system. *Aristotle University Med J* 2007, 34, 31-39.

42. Gur-Wahnon, D.; Mizrachi, T.; Maaravi-Pinto, F. Y.; Lourdopoulos, A.; Grigoriadis, N.; Higazi, A. A.; Brenner, T. The plasminogen activator system: involvement in central nervous system inflammation and a potential site for therapeutic intervention. *J Neuroinflammation* 2013, 10, 124.
43. Fleming, K. K.; Bovaird, J. A.; Mosier, M. C.; Emerson, M. R.; LeVine, S. M.; Marquis, J. G. Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005, 170, 71-84.
44. Nielsen, M.; Lundegaard, C.; Lund, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC bioinformatics* 2007, 8, 1.
45. Nielsen, M.; Lund, O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC bioinformatics* 2009, 10, 1.
46. Sturniolo, T.; Bono, E.; Ding, J.; Raddrizzani, L.; Tuereci, O.; Sahin, U.; Braxenthaler, M.; Gallazzi, F.; Protti, M. P.; Sinigaglia, F. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nature biotechnology* 1999, 17, 555-561.
47. Wang, P.; Sidney, J.; Kim, Y.; Sette, A.; Lund, O.; Nielsen, M.; Peters, B. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC bioinformatics* 2010, 11, 1.
48. Webb, B.; Sali, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics* 2014, 5.6. 1-5.6. 32.
49. Zhu, Y.; Rudensky, A. Y.; Corper, A. L.; Teyton, L.; Wilson, I. A. Crystal structure of MHC class II IA b in complex with a human CLIP peptide: prediction of an IA b peptide-binding motif. *Journal of molecular biology* 2003, 326, 1157-1174.
50. Shen, M. y.; Sali, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science* 2006, 15, 2507-2524.
51. Accelrys. *Discovery Studio Modeling Environment*, 3.5; Accelrys: San Diego, CA, 2012.
52. Tselios T., Probert L, Daliani I, Matsoukas E., Troganis A., Gerothanassis I., Mavromoustakos T, Moore G. Matsoukas J. Design and Synthesis of a

Potent Cyclic Analogue of the Myelin Basic Protein Epitope MBP72-85: Importance of the Ala81 Carboxyl Group and of a Cyclic Conformation for Induction of Experimental Allergic Encephalomyelitis (E.A.E.). *Journal of Medicinal Chemistry* 1999, 42, 170-1177.

53. Matsoukas J., Apostolopoulos V., Kalbacher H., Papini A.M., Tselios T., Chantzantoni K., Biagioli T., Lolli F., Deraos S., Papathanassopoulos P., Mavromoustakos T., Probert L., Mouzaki A. Enhanced Stability and Biological Properties of Myelin Basic Protein Epitope 87-99 cyclic mimics render them a potentially new class of Immunomodulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 10, 48 (5) 1470-80,

OTHER REFERENCES

Apostolopoulos V, Pietersz GA, Loveland BE, Sandrin MS, McKenzie IF (1995) Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:10128-10132.

Apostolopoulos V, Pietersz GA, Tsibanis A, Tsikkinis A, Drakaki H, Loveland BE, Piddlesden SJ, Plebanski M, Pouniotis DS, Alexis MN, McKenzie IF, Vassilaros S (2006) Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]. *Breast cancer research : BCR* 8:R27.

Avloniti M, Evangelidou M, Kanistras I, Anagnostouli M, Tseveleki V, Lampros F, Tselios T, Jensen LT, Kilindireas C, Matsoukas J, Lassmann H, Probert L. (2017) Mannan-conjugated myelin peptides induce T cell anergy in humanized DR2 mice and reduce T cell responses in multiple sclerosis. Submitted for publication March 2017.

Kappos L, Comi G, Panitch H, Oger J, Antel J, Conlon P, Steinman L (2000) Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nature medicine* 6:1176-1182.

- Katsara M, Yuriev E, Ramsland PA, Deraos G, Tselios T, Matsoukas J, Apostolopoulos V (2008) Mannosylation of mutated MBP83-99 peptides diverts immune responses from Th1 to Th2. *Molecular immunology* 45:3661-3670.
- Katsara M., Deraos G., Tselios T., Matsoukas J.M., Apostolopoulos V.(2008) Design of novel cyclic altered peptide ligands of myelin basic protein MBP83-99 modulate immune responses in SJL/J mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (13), 3971-8.
- Katsara M., Yuriev E., Ramsland P.R., Deraos G., Tselios T., Matsoukas J., Apostolopoulos V.,(2008) A double mutation of MBP83-99 peptide induces IL-4 responses and antagonizes IFN- γ responses. *Journal of Neuroimmunology*, 200, 77-89.
- Rodi M, Dimisianos N, de Lastic AL, Sakellaraki P, Deraos G, Matsoukas J, Papathanasopoulos P, Mouzaki A (2016) Regulatory Cell Populations in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) Patients: Effect of Disease Activity and Treatment Regimens. *Int J Mol Sci. (Advances in Multiple Sclerosis)*, 25; 17(9).
- Tselios, L Probert, I. Daliani, E. Matsoukas, A. Troganis, I. Gerothanassis, T. Mavromoustakos, G. Moore and J. Matsoukas (1999) Design and Synthesis of a Potent Cyclic Analogue of the Myelin Basic Protein Epitope MBP72-85: Importance of the Ala81 Carboxyl Group and of a Cyclic Conformation for Induction of Experimental Allergic Encephalomyelitis (E.A.E.). *T. Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 170-1177.
- T. Tselios, V. Apostolopoulos, I. Daliani, S. Deraos, S. Grdadolnik, T. Mavromoustakos, M. Melachrinou, S. Thymianou, L. Probert, A. Mouzaki, J. Matsoukas(2002) Antagonistic Effects of Human Cyclic MBP87-99 Altered Peptide Ligands in Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) and Human T-Cell Proliferation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 275-283.
- Tseveleki V, Tselios T, Kanistras I, Koutsoni O, Karamita M, Vamvakas SS, Apostolopoulos V, Dotsika E, Matsoukas J, Lassmann H, Probert L (2015) Mannan-

conjugated myelin peptides prime non-pathogenic Th1 and Th17 cells and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental neurology* 267:254-267.

Turley DM, Miller SD (2010) Prospects for antigen-specific tolerance based therapies for the treatment of multiple sclerosis. *Results and problems in cell differentiation* 51:217-235.

Vassilaros S, Tsibanis A, Tsikkinis A, Pietersz GA, McKenzie IF, Apostolopoulos V (2013) Up to 15-year clinical follow-up of a pilot Phase III immunotherapy study in stage II breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1. *Immunotherapy* 5:1177-1182.

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

1. Ένα πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του MOG 35-55 αρουραίου όπου το S στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ, συζευγμένο με μαννάνη ή μαννόζη.

H-MEVGWYRS42PFSRVVHLYRNGK-OH

2. Ένα κυκλικό πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του MOG 35-55 αρουραίου όπου το S στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ.

[MEVGWYRS⁴²PFSRVVHLYRNGK]

3. Ένα κυκλικό πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του MOG 35-55 αρουραίου και τη γέφυρα (KG) 5 όπου το S στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ.

[KGKGKGKGKGMEVGWYRS⁴²PFSRVVHLYRNGK]

4. Ένα κυκλικό πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του MOG 35-55 αρουραίου και τη γέφυρα (KG) 5 όπου το S στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ, συζευγμένο με μαννάνη ή μαννόζη.

[KGKGKGKGKGMEVGWYRS⁴²PFSRVVHLYRNGK]

5. Ένα πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του ανθρώπινου MOG 35-55 όπου το P στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ συζευγμένο με μαννάνη ή μαννόζη.

H-MEVGWYRP42PFSRVVHLYRNGK-OH

6. Ένα κυκλικό πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του ανθρώπινου MOG 35-55 όπου το P στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ.

[MEVGWYP⁴²PFSRVVHLYRNGK-]

7. Ένα κυκλικό πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του ανθρώπινου MOG 35-55 και τη γέφυρα (KG) 5 όπου το P στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ.

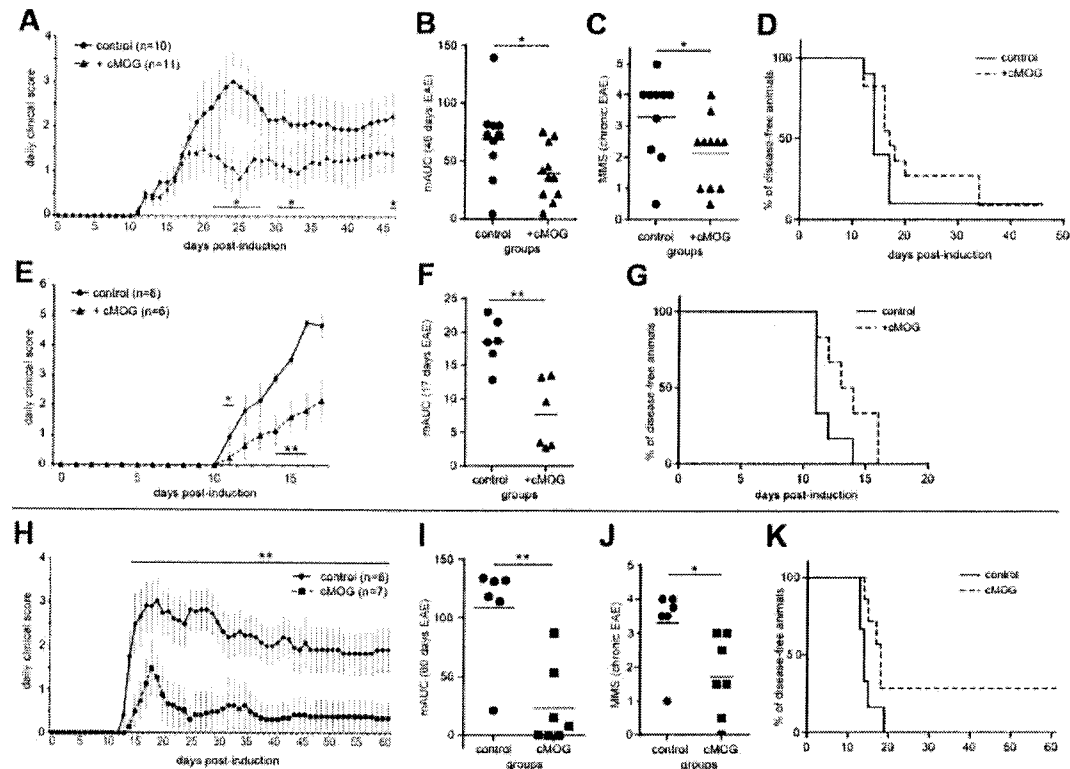
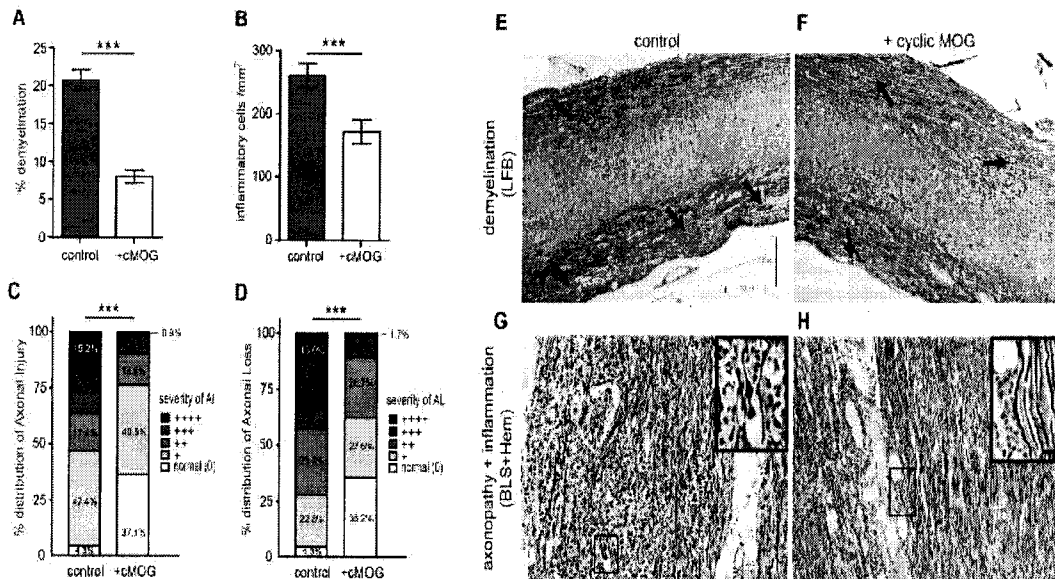
[KGKGKGKGKGMEVGWYRP⁴²PFSRVVHLYRNGK]

8. Κυκλικό πεπτίδιο που περιλαμβάνει την αλληλουχία αμινοξέων του ανθρώπινου MOG 35-55 και τη γέφυρα (KG) 5 όπου το P στη θέση 42 της αλληλουχίας υποκαθίσταται από ένα φυσικό ή μη φυσικό αμινοξύ, συζευγμένο με μαννάνη ή μαννόζη.

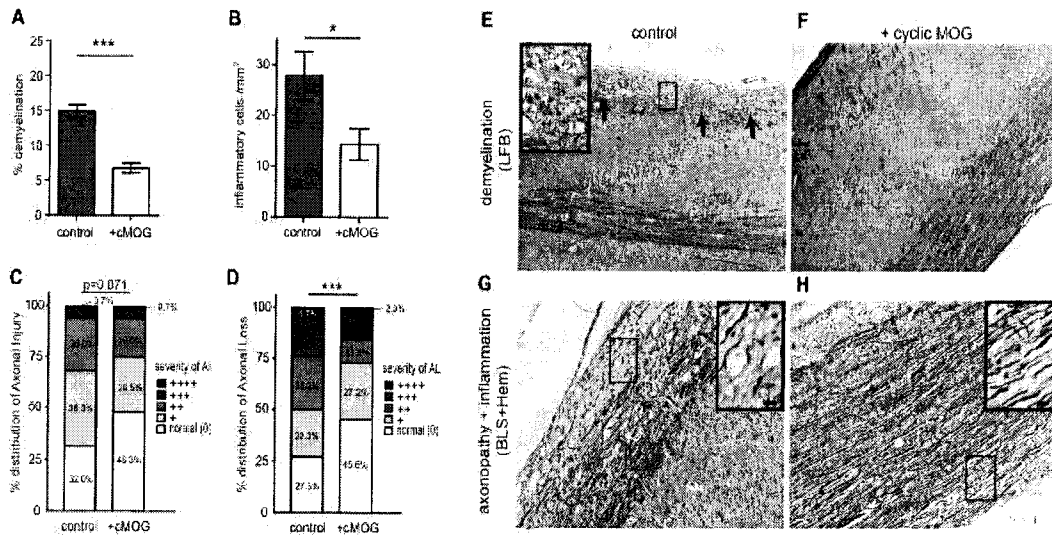
[KGKGKGKGKGMEVGWYRP⁴²PFSRVVHLYRNGK]

9. Μέθοδος σύνθεσης κυκλικών αναλόγων και συζευγμάτων αυτών όπως στις αξιώσεις 1-8 και μέθοδο ανοσοποίησης ενός ατόμου και θεραπευτική αγωγή ανοσολογικής διαταραχής, όπου η εν λόγω μέθοδος περιλαμβάνει τη χορήγηση σε ένα υποκείμενο ενός πεπτιδίου ή συζυγούς σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις αξιώσεις 1 έως 8.

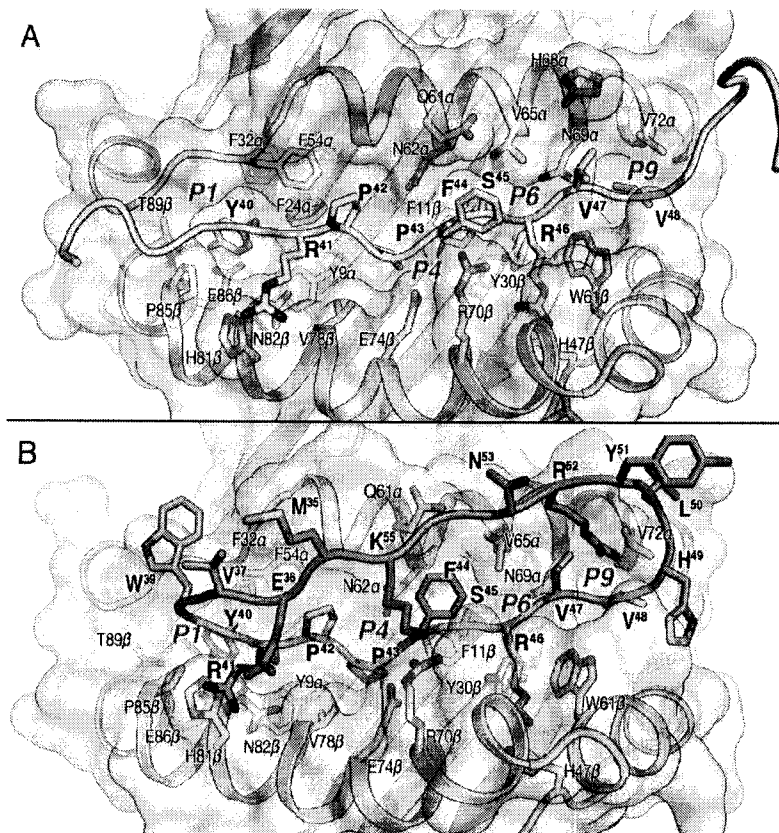
10. Χρήση ενός πεπτιδίου ή συζεύγματος και των μεθόδων σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις αξιώσεις 1 έως 9, σε μια δοκιμασία για διαλεύκανση παραγόντων ικανών να ρυθμίζουν την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) ή να ρυθμίζουν τη σκλήρυνση κατά πλάκας.

Σχήμα 1**Σχήμα 2**

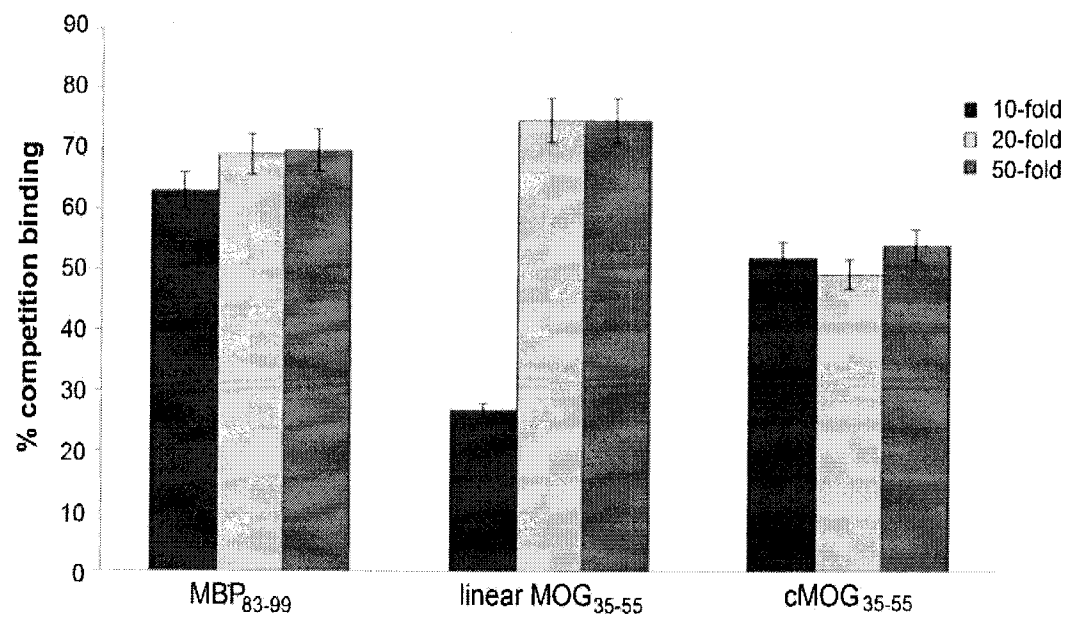
Σχήμα 3



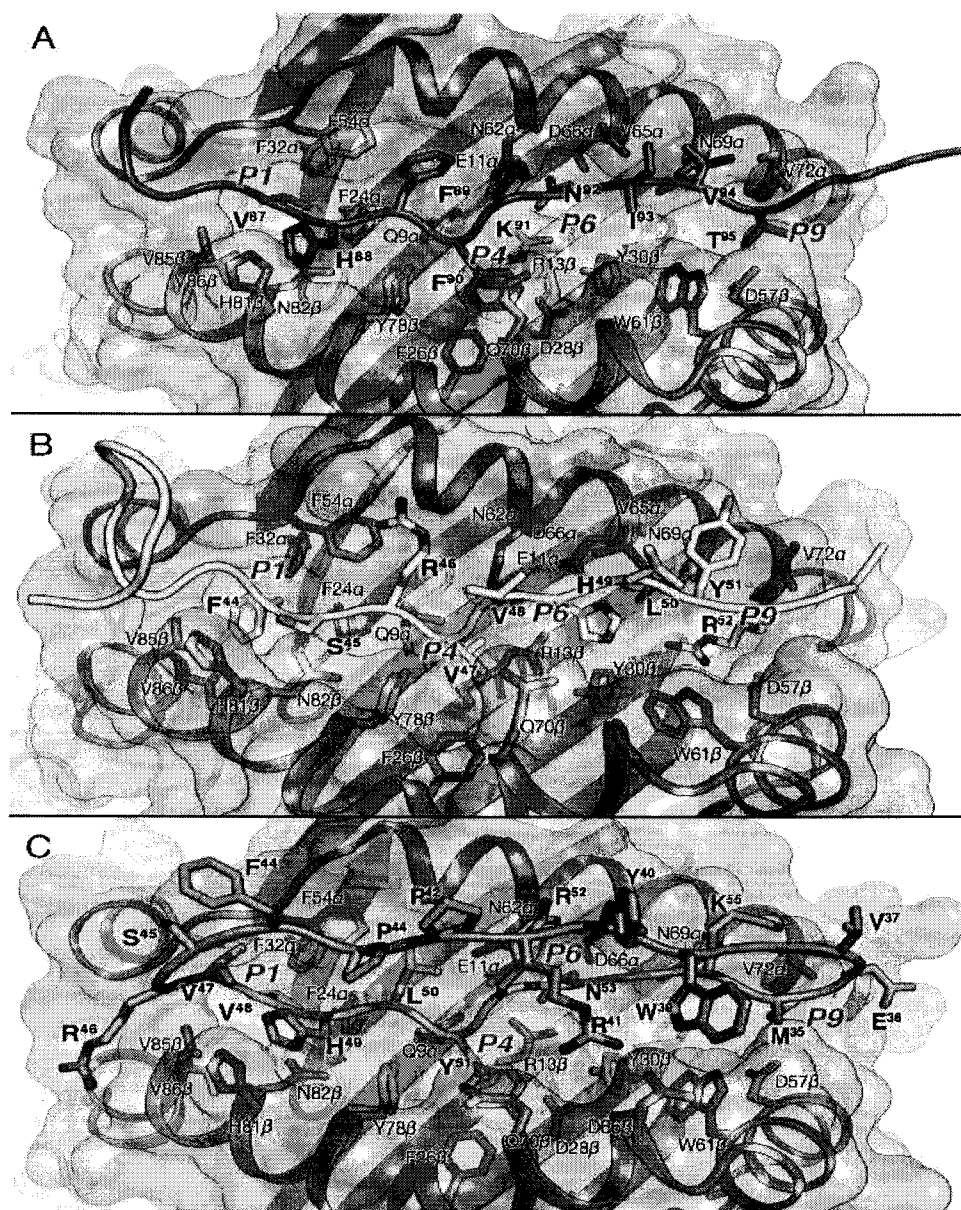
Σχήμα 4



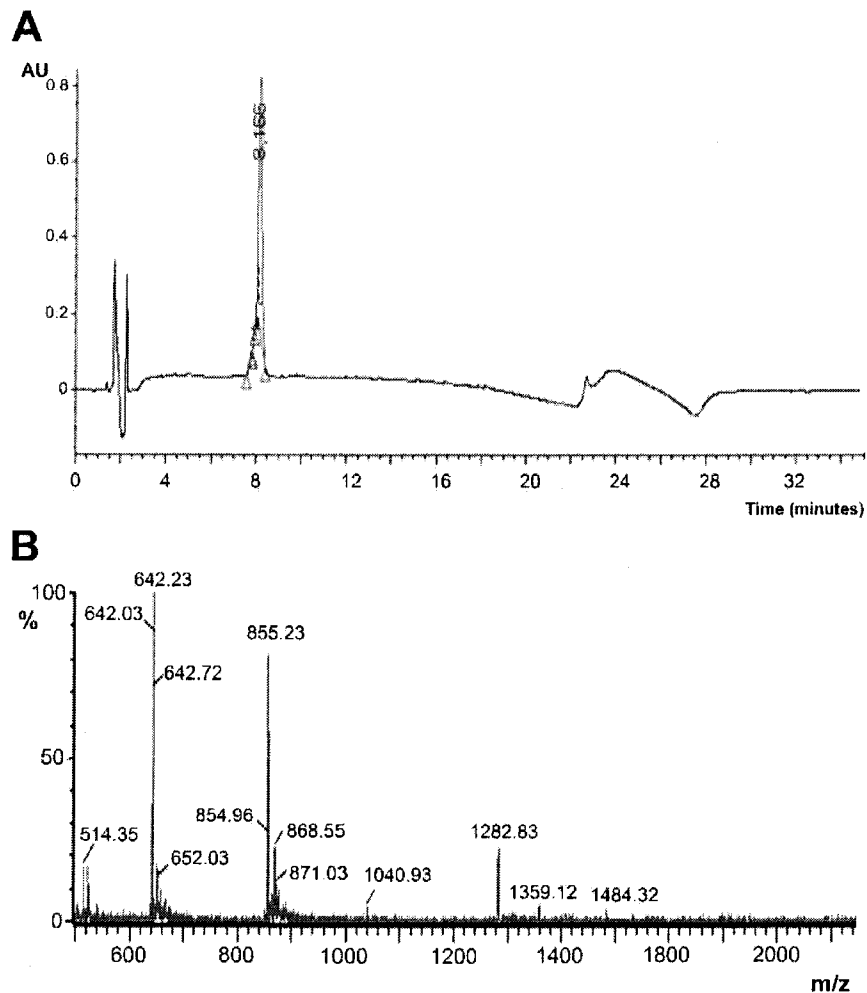
Σχήμα 5



Σχήμα 6

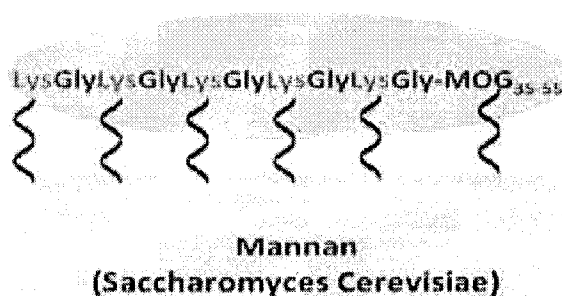


Σχήμα 7

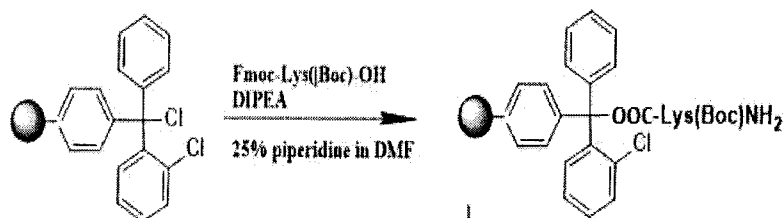


Σχήμα 8

H-Lys¹- Gly²- Lys³- Gly⁴- Lys⁵- Gly⁶- Lys⁷- Gly⁸- Lys⁹- Gly¹⁰- Met¹¹- Glu¹²- Val¹³- Gly¹⁴- Trp¹⁵- Tyr¹⁶- Arg¹⁷- Pro¹⁸- Pro¹⁹- Phe²⁰- Ser²¹- Arg²²- Val²³- Val²⁴- His²⁵- Leu²⁶- Tyr²⁷- Arg²⁸- Asn²⁹- Gly³⁰- Lys³¹- O



Σχέδιο 1



1. HOBt/DIC in DMF 20x fold
2. Piperidine 25% in DMF

Fmoc-Gly-OH
 Fmoc-Asn(Trt)-OH
 Fmoc-Arg(Pbf)-OH
 Fmoc-Tyr(tBu)-OH
 Fmoc-Leu-OH
 Fmoc-His(Trt)-OH
 Fmoc-Val-OH
 Fmoc-Val-OH
 Fmoc-Arg(Pbf)-OH
 Fmoc-Ser(tBu)-OH
 Fmoc-Phe-OH
 Fmoc-Ser(tBu)-OH
 Fmoc-Pro-OH
 Fmoc-Arg(Pbf)-OH
 Fmoc-Tyr(tBu)-OH
 Fmoc-Trp(Boc)-OH
 Fmoc-Gly-OH
 Fmoc-Val-OH
 Fmoc-Glu(tBu)-OH
 Fmoc-Met-OH

Met-Glu(tBu)-Val-Gly-Trp(Boc)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Ser(tBu)-Pro-Phe-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Val-Val-His(Trt)-Leu-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-O

1. HFIP/TFE in DMF
7/3
2. Head to tail cyclization
TBTU/HOAt/Collidine in DMF
Cprot. peptide = 10^{-5} M

3. Final Deprotection
TFA/DCM/Anisole/DTT/H₂O
90/5/2/2/1

Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Ser-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ
(Ο.Β.Ι.)

ΕΚΘΕΣΗ ΕΡΕΥΝΑΣ

Αριθμός αίτησης
20170100262

ΕΓΓΡΑΦΑ ΘΕΩΡΟΥΜΕΝΑ ΩΣ ΣΧΕΤΙΚΑ			
Κατηγορία	Σχετικό έγγραφο με επισήμανση, όπου χρειάζεται, των σχετικών παραγράφων	Σχετικό με αξίωση	Διεθν. Ταξινόμηση Int. Cl. 01/01/2017(AL)
X	AU2014200921 A1 / VIANEX S A 27/3/2014 *σελίδα 5 - σελίδα 7, σχέδια 1-12* *σελίδα 19 - σελίδα 22* *σελίδα 30 - σελίδα 40*	1-10	C07K 14/47 A61K 38/12 A61K 38/17 A61K 39/00
X	WO2009/093143 A2 / ELDRUG S A, MATSOUKAS JOHN, TSELIOS THEODORE, APOSTOLOP 30/7/2009 *σελίδα 3, παράγραφος 2, σχέδια 1-9* *σελίδα 5 -σελίδα 8* *σελίδα 14 - σελίδα 18* *σελίδα 38 - σελίδα 40*	1,9,10	
X	XP085114634 / LOURBOPOULOS ATHANASIOS ET AL 7/6/2017 "Cyclic MOG35-55 ameliorates clinical and neuropathological features of experimental autoimmune encephalomyelitis", BIOORGANIC 7 MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, τόμος 25, No 15, σελίδες 4163-4174, ISSN: 0968-0696, DOI:10.1016/J.BMC.2017.06.005, *ολόκληρο το έγγραφο*	5,6,9,10	
A	XP055431427 / THEODORE TSELIOS ET AL 4/11/2014 "Rational Design and Synthesis of Altered Peptide Ligands based on Human Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 Epitope: Inhibition of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice", MOLECULES, τόμος 19, No 11, σελίδες 17968-17984, DOI: 10.3390/molecules191117968, *σελίδα 17969 - σελίδα 17971* *σελίδα 17975 - σελίδα 17976*	2-4,6-8	Τεχνικά πεδία που ερευνήθηκαν C07 A61K G01N

Ημερομηνία περάτωσης της έρευνας : 15/12/2017

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΗΛΟΥΜΕΝΩΝ ΕΓΓΡΑΦΩΝ

X: ιδιαίτερα σχετικό αν ληφθεί μεμονωμένα
Y: ιδιαίτερα σχετικό αν συνδυαστεί με άλλο έγγραφο της ίδιας κατηγορίας
A: τεχνολογικό υπόβαθρο
O: μη έγγραφη αποκάλυψη
P: ενδιάμεσο έγγραφο

T: βασική θεωρία ή αρχή στην οποία βασίζεται η εφεύρεση
E: προγενέστερο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, το οποίο δημοσιεύτηκε την ημερομηνία κατάθεσης ή μετά από αυτήν
D: έγγραφο αναφερόμενο στην αίτηση
I: έγγραφο αναφερόμενο για άλλους λόγους
.....
B: μέλος της ίδιας οικογένειας ευρεσιτεχνιών, αντίστοιχο έγγραφο