

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-510786

(P2025-510786A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/74 (2006.01)	C 0 7 K 14/74	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全47頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-556458(P2024-556458)	(71)出願人	510232393
(86)(22)出願日	令和5年3月24日(2023.3.24)		ユリウス - マクシミリアンス - ウニヴェルジテート ヴュルツブルク
(85)翻訳文提出日	令和6年10月9日(2024.10.9)		J U L I U S - M A X I M I L I A N S
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/057684		- U N I V E R S I T A E T W U E R
(87)国際公開番号	WO2023/180549		Z B U R G
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)		ドイツ97070 ヴュルツブルク、ザンダーリング2番
(31)優先権主張番号	22164161.6		S a n d e r r i n g 2 9 7 0 7 0
(32)優先日	令和4年3月24日(2022.3.24)		W u e r z b u r g ( D E )
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	110002572
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)		弁理士法人平木国際特許事務所
	最終頁に続く	(72)発明者	ブルッテル, ヴァレンティン
			ドイツ連邦共和国 97080 ヴュルツブルク, ルイトポルトクヴェレ 10
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 視神経脊髄炎(NMO)の新規治療法としてのMHC Ibを介したアクアポリン4(AQP4)特異的免疫抑制

(57)【要約】

本発明は、視神経脊髄炎(NMO)の治療のための、ペプチド抗原と組み合わせた非古典的ヒト主要組織適合抗原(MHC)分子(MHCクラスIb分子とも称される)の治療的使用に関する。本発明は、より具体的には、ペプチド抗原、および非古典的MHCクラスIb分子の1つもしくは複数のドメインを含む、組換えポリペプチドに関する。本発明はまた、そのような組換えポリペプチドの製造方法、それを含む医薬組成物、ならびに視神経脊髄炎(NMO)を治療するためのその使用に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ペプチド抗原を提示することができる組換えポリペプチドであって、その組換えポリペプチドが、N末端からC末端の順に：

- i) 前記組換えポリペプチドによって提示されるペプチド抗原であって、そのペプチド抗原がヒトアクアポリン4のペプチドである、前記ペプチド抗原；
- ii) 場合により、リンカー配列；
- iii) 場合により、ヒト 2ミクログロブリンの配列を含むヒトポリペプチドドメインの配列、または配列番号5で表されるヒト 2ミクログロブリンのアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列；
- iv) 場合により、リンカー配列；
- v) 場合により、MHC分子の [ ] 1ドメイン；
- vi) 場合により、MHC分子の [ ] 2ドメイン；
- vii) MHCクラスIb分子の [ ] 3ドメイン、または、MHCクラスIb分子の [ ] 3ドメインの誘導体であって、ILT2もしくはILT4に結合可能である前記誘導体；
- viii) 場合により、プロテアーゼ切断部位；
- ix) 場合により、スペーサー配列；および
- x) 場合により、アフィニティタグを含む、前記組換えポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

i) に記載の前記ペプチド抗原が、7~11アミノ酸の長さであり、好ましくは8~10アミノ酸長である、請求項1に記載の組換えポリペプチド。

20

## 【請求項 3】

i) に記載の前記ペプチド抗原が、配列番号2、22、23および24のアミノ酸配列からなる一群から選択されるアミノ酸配列で構成される、請求項1または2に記載の組換えポリペプチド。

## 【請求項 4】

(v) に記載の前記 [ ] 1ドメイン、および(vi) に記載の前記 [ ] 2ドメインが、ヒトMHCクラスIa分子、好ましくはヒトHLA-A2分子、に由来するか、またはヒトMHCクラスIb分子、好ましくはヒトHLA-G分子に由来する、請求項1~3のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

30

## 【請求項 5】

(vii) に記載のMHCクラスIb分子の [ ] 3ドメインが、ヒトHLA-E、ヒトHLA-FまたはヒトHLA-Gの [ ] 3ドメイン、好ましくはヒトHLA-Gの [ ] 3ドメインである、請求項1~4のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

## 【請求項 6】

(vii) に記載の [ ] 3ドメインもしくは誘導体が、配列番号9もしくは配列番号21のアミノ酸配列を有する [ ] 3ドメインと同一であるか、または少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、少なくとも92%のアミノ酸配列同一性、少なくとも94%のアミノ酸配列同一性、少なくとも96%のアミノ酸配列同一性、少なくとも98%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するか、または配列番号9もしくは配列番号21のアミノ酸配列を有する [ ] 3ドメインと同一である、請求項1~5のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

40

## 【請求項 7】

(ii) に記載のリンカー配列、および/または(iv) に記載のリンカー配列が、アミノ酸配列(GGGGS)<sub>n</sub>を含み、nは1または2以上の整数であり、かつnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる一群から選択される整数であり、好ましくは、2、3、4および5からなる一群から選択される、請求項1~6のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

## 【請求項 8】

50

(iii)に記載の前記ヒトポリペプチドドメインの配列が、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であり、好ましくは配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも98%同一であり、より好ましくは配列番号5のアミノ酸配列と同一である、請求項1~7のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【請求項9】

前記ポリペプチドが二量体または多量体である、請求項1~8のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【請求項10】

ポリペプチドが：構成要素(i)~(vii)のすべてを含むか、もしくはそれらすべてからなる；ポリペプチドが、構成要素(viii)~(x)を含まない；または、ポリペプチドが、構成要素(i)~(x)のすべてを含むか、もしくはそれらすべてからなる、請求項1~9のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

【請求項11】

N末端分泌シグナルペプチド配列をさらに含む、請求項1~10のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【請求項12】

組換えポリペプチドが、N末端からC末端の順に、次の(a)および(b)：

(a)配列番号2、22、23および24のアミノ酸配列からなる一群から選択されるペプチド抗原、および

(b)配列番号16のアミノ酸配列

20

からなるアミノ酸配列からなる、請求項1~10のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【請求項13】

組換えポリペプチドが可溶性である、請求項1~12のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【請求項14】

核酸が好ましくはベクターである、請求項1~13のいずれか1つに記載の1つもしくは複数のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項15】

請求項14に記載の少なくとも1つの核酸を含む、医薬組成物またはキット。

30

【請求項16】

請求項1~13のいずれか1つに記載の少なくとも1つの組換えポリペプチドを含む、医薬組成物またはキット。

【請求項17】

医薬組成物またはキットが、請求項1~13のいずれか1つに記載の少なくとも2つの異なる組換えポリペプチドを含み、その異なるポリペプチドの各々が、請求項3に記載の異なるペプチド抗原を含む、請求項16に記載の医薬組成物またはキット。

【請求項18】

ヒト患者における視神経脊髄炎の治療に使用するための、請求項15~17のいずれか1つに記載の医薬組成物またはキット。

40

【請求項19】

治療が免疫療法による治療であり、好ましくは治療がヒトアクアポリン4に対する免疫寛容を誘導することによるものである、請求項18に記載の使用のための医薬組成物またはキット。

【請求項20】

治療が、ヒトアクアポリン4に対する自己抗体の血漿レベルまたは脳脊髄液レベルを低下させるためのものであり、ヒト患者は、治療開始前にヒトアクアポリン4に対する血漿自己抗体または脳脊髄液自己抗体を有する患者である、請求項18~19のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物またはキット。

【請求項21】

50

治療が、ミエリン特異的制御性T細胞の誘導によるものである、請求項18～20のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物またはキット。

【請求項22】

請求項14に記載の核酸またはベクターを含み、請求項1～13のいずれか1つに記載の組換えポリペプチドを発現する、組換え宿主細胞。

【請求項23】

請求項1～13のいずれか1つに記載のポリペプチドを含む医薬組成物を得るための方法であって、その方法が、(a)核酸分子からの組換えポリペプチドの発現を可能にする条件下で、請求項22に記載の組換え宿主細胞を培養するステップ、(b)組換えポリペプチドを回収するステップ、(c)組換えポリペプチドを精製するステップ、および(d)組換えポリペプチドを調剤して医薬組成物とするステップを含む、前記方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、視神経脊髄炎(NMO)の治療のための、ペプチド抗原と組み合わせた非古典的ヒト主要組織適合抗原(MHC)分子(MHCクラスIb分子とも称される)の治療的使用に関する。本発明は、より具体的には、ペプチド抗原、および非古典的MHCクラスIb分子の1つもしくは複数のドメインを含む、組換えポリペプチドに関する。本発明はまた、そのような組換えポリペプチドの製造方法、それを含む医薬組成物、ならびに視神経脊髄炎(NMO)を治療するためのその使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

背景

視神経脊髄炎(NMO)は、中枢神経系(CNS)の脱髄性自己免疫疾患で、罹患率は0.05～0.4/100,000である。NMOは、多発性硬化症と同様の症状を特徴とする。しかしながら、多発性硬化症が再発寛解型の経過を特徴とすることが多いのに対して、NMO患者が寛解を経験することは稀である。さらに、MS患者では有効な治療法がNMOでは無効となることもあり、病気を悪化させることさえありうる。したがって、NMOはMSよりも治療が困難であり、通常、進行がより早い。NMOに対する現在の治療方針は、再発予防または急性の疾病再発の治療に重点を置いている。急性の再発は通常、グルココルチコイドなどの免疫抑制治療薬、または自己反応性抗体を除去するために血漿交換で治療される。さらに最近では、補体系を抑制する治療用抗体(エクリズマブ)または炎症性サイトカインを阻害する治療用抗体(サトラリズマブ)も承認されている。

30

【0003】

しかしながら、自己反応性だけでなく保護的免疫機能も阻害される。これらの機能は、ウイルス、細菌、または腫瘍から患者を護るために不可欠である。したがって、部分的な阻害しか目標としないことが多い。自己免疫疾患は通常、再発後に悪化するため、再発予防に多大な努力が払われる。しかしながら、この自己免疫疾患の全体的な緩慢な進行は、遅らせることはできるが止めることはできない。このジレンマを回避するために、自己反応性免疫細胞によって攻撃される抗原に対する免疫寛容(抗原特異的免疫抑制、ASI)を誘導する試みが、しばらく前から行われてきた。

40

【0004】

少なくとも初期の臨床研究では、これまでに2つの戦略が評価されてきた。アレルギーにおける減感作療法と同様に、抗原特異的寛容を誘導するために、異なる経路で大量の抗原が投与された。しかしながら、自己免疫疾患においては、こうした戦略は重篤な副作用を引き起こし、臨床的には成功していない。抗原特異的制御性T細胞もしくは抗原を担持した寛容原性樹状細胞の養子移入による寛容誘導の試みは、より有望であるように見える。しかしながら、これらの戦略は非常に複雑で高価であり、個々の患者ごとにGMPに準拠した製造工程および品質管理工程が必要である。したがって、小規模な臨床試験が成功

50

したとしても、予見しうる将来において養子移入療法が多くの患者に利用可能になるかどうかは大いに疑問である。

【0005】

WO 2018/215340は、標的治療の免疫調節のためのMHCクラスIb分子およびペプチドの組み合わせに関する。

【0006】

以上を総合すると、視神経脊髄炎（NMO）治療薬の改良が依然として必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

10

【特許文献1】WO 2018/215340

【発明の概要】

【0008】

発明の説明

本発明者らは、HLA-GなどのヒトMHCクラスIb分子が、提示されたペプチド抗原に対する抗原特異的寛容を誘導する能力を有することを見出した。したがって、MHCクラスIb分子は、抗原ペプチド特異的免疫応答を誘導する古典的ヒトMHCクラスIa分子と類似した構造および配列を有するにもかかわらず、抗原特異的な様式で免疫応答を抑制するために、本発明に従って有利に使用することができる。さらに、本発明者らは、本発明による免疫応答の抑制のために、天然に存在するMHCクラスIb分子以外の分子、特に、MHC 20  
クラスIb分子の少なくとも1つのドメイン、好ましくはMHCクラスIb分子の少なくとも [ ] 3ドメインのみを含むポリペプチドを使用することができることを見出した：可変クラスIa分子の [ ] 1および [ ] 2ドメインは、これらの抗原が提示するペプチドに対する免疫応答を抑制するために、ヒトMHCクラスIb分子の [ ] 3ドメインと組み合わせることができる。

20

【0009】

抗原を担持したHLA-G分子は不安定となりうる。そこで、本発明者らは、ペプチド抗原、HLA-GなどのMHCクラスIb分子、および 2ミクログロブリン（b2m）を含む可溶性組換えポリペプチドを設計し、これら3つの構成要素を共有結合で（たとえば、共有結合リンカーを介して）連結した。あるいはまた、HLA-GなどのMHCクラスIb分子の抗原 30  
結合 1および 2ドメインを他のMHC分子のそれぞれのドメインと交換して、これらの組換えポリペプチドの柔軟性および汎用性を高めた（たとえば、図2を参照されたい）。代替りとなりうるこれらの組換えポリペプチドは、他のヒトHLA分子の抗原結合ドメインを考慮に入れて設計することができる。マウスH2-K<sup>b</sup>の 1および 2ドメインを含む構築物は、オボアルブミン由来のペプチドSIINFEKLをOT-1 T細胞に提示できることが以前に見出された（OT-1 T細胞は、この抗原を特異的に認識するトランスジェニックT細胞受容体を発現する）（WO 2018/215340）。

30

【0010】

驚くべきことに、本発明者らは、本発明の組換えポリペプチドを使用することにより、神経炎症性自己抗原に対する免疫応答が抑制され、ヒトアクアポリン4（AQP4）に対する寛容を引き起こす細胞が誘導されうることを見出した。さらに、神経炎症性疾患の確立されたモデルを用いて、本発明者らは、（マウスでの使用に適合させた）これらのポリペプチドのサロゲートを使用して神経炎症性疾患を治療することが可能であることを示した。したがって、本発明によれば、視神経脊髄炎（NMO）は、本発明の組換えポリペプチドによって治療することができる。

40

【0011】

本発明者らの実験データから、望ましい効果を得るためには、適当なペプチド抗原、およびMHCクラスIb分子（たとえばHLA-G）の [ ] 3ドメインの存在が必要であることが示されている。したがって、このアプローチは、共刺激の非存在下で抗原性ペプチドを使用する（寛容原性T細胞ではなく不応答（アナジー）性T細胞をもたらす）か、または

50

抗原非特異的な状態でMHCクラスIb分子を使用する、上記の方法を超えるものである。

【0012】

さらに、本発明によれば、本発明の組換えポリペプチドはT細胞応答を調節するだけでなく、アクアポリン4 (AQP4) 特異的自己抗体の形成も防止する。アクアポリン4 (AQP4) 特異的自己抗体は視神経脊髄炎 (NMO) の病態に関与していることから、この利点が視神経脊髄炎 (NMO) に罹患したヒト患者における臨床的改善につながることを期待される。

【0013】

したがって、本発明は以下の好ましい実施形態に関する：

ペプチド抗原を提示することができる組換えポリペプチドであって、その組換えポリペプチドが、N末端からC末端の順に下記を含む：

i) 前記組換えポリペプチドによって提示されるペプチド抗原であって、そのペプチド抗原がヒトアクアポリン4のペプチドである、前記ペプチド抗原；

ii) 場合により、リンカー配列；

iii) 場合により、ヒト 2ミクログロブリンの配列を含むヒトポリペプチドドメインの配列、または配列番号5で表されるヒト 2ミクログロブリンのアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列；

iv) 場合により、リンカー配列；

v) 場合により、MHC分子の [ ] 1ドメイン；

vi) 場合により、MHC分子の [ ] 2ドメイン；

vii) MHCクラスIb分子の [ ] 3ドメイン、またはMHCクラスIb分子の [ ] 3ドメインの誘導体であって、当該誘導体がILT2もしくはILT4に結合可能である、前記誘導体；

viii) 場合により、プロテアーゼ切断部位；

ix) 場合により、スペーサー配列；および

x) 場合により、アフィニティタグ。

【0014】

1. i) に記載の前記ペプチド抗原が、7~11アミノ酸の長さであり、好ましくは8~10アミノ酸長である、項目1に記載の組換えポリペプチド。

【0015】

2. i) に記載の前記ペプチド抗原が、配列番号2、22、23および24のアミノ酸配列からなる一群から選択されるアミノ酸配列で構成される、項目1または2に記載の組換えポリペプチド。

【0016】

3. 前記ペプチド抗原が、配列番号2または配列番号22のアミノ酸配列からなる、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0017】

4. 前記ペプチド抗原が、配列番号2のアミノ酸配列からなる、項目1~4のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0018】

5. 前記ペプチド抗原が、配列番号23または配列番号24のアミノ酸配列からなる、項目1~3のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0019】

6. (v) に記載の前記 [ ] 1ドメイン、および(vi) に記載の前記 [ ] 2ドメインが、ヒトMHCクラスIa分子由来、またはヒトMHCクラスIb分子由来である、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0020】

7. (v) に記載の前記 [ ] 1ドメイン、および(vi) に記載の前記 [ ] 2ドメインが、ヒトMHCクラスIa分子由来である、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0021】

8. (v) に記載の前記 [ ] 1ドメイン、および(vi) に記載の前記 [ ] 2ドメインが、ヒトH

10

20

30

40

50

LA-A2分子由来である、項目8に記載の組換えポリペプチド。

【0022】

9. (v)に記載の前記[ ]1ドメイン、および(vi)に記載の前記[ ]2ドメインが、ヒトMHCクラスIb分子由来である、項目7に記載の組換えポリペプチド。

【0023】

10. (v)に記載の前記[ ]1ドメイン、および(vi)に記載の前記[ ]2ドメインが、ヒトHLA-G分子由来である、項目10に記載の組換えポリペプチド。

【0024】

11. (vii)に記載のMHCクラスIb分子の[ ]3ドメインが、ヒトHLA-E、ヒトHLA-FまたはヒトHLA-Gの[ ]3ドメインである、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

【0025】

12. (vii)に記載のMHCクラスIb分子の[ ]3ドメインが、ヒトHLA-Gの[ ]3ドメインである、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0026】

13. (vii)に記載の[ ]3ドメインまたは誘導体が、配列番号9または配列番号21のアミノ酸配列を有する[ ]3ドメインと同一であるか、または少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0027】

20

14. (vii)に記載の[ ]3ドメインまたは誘導体が、配列番号9または配列番号21のアミノ酸配列を有する[ ]3ドメインと同一であるか、または少なくとも92%のアミノ酸配列同一性を有する、項目14に記載の組換えポリペプチド。

【0028】

15. (vii)に記載の[ ]3ドメインまたは誘導体が、配列番号9または配列番号21のアミノ酸配列を有する[ ]3ドメインと同一であるか、または少なくとも94%のアミノ酸配列同一性を有する、項目14に記載の組換えポリペプチド。

【0029】

16. (vii)に記載の[ ]3ドメインまたは誘導体が、配列番号9または配列番号21のアミノ酸配列を有する[ ]3ドメインと同一であるか、または少なくとも96%のアミノ酸配列同一性を有する、項目14に記載の組換えポリペプチド。

30

【0030】

17. (vii)に記載の[ ]3ドメインまたは誘導体が、配列番号9または配列番号21のアミノ酸配列を有する[ ]3ドメインと同一であるか、または少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有する、項目14に記載の組換えポリペプチド。

【0031】

18. (vii)に記載の[ ]3ドメインまたは誘導体が、配列番号9または配列番号21のアミノ酸配列を有する[ ]3ドメインと同一であるか、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する、項目14に記載の組換えポリペプチド。

【0032】

40

19. (vii)に記載の[ ]3ドメインが、配列番号9または配列番号21のアミノ酸配列を有する[ ]3ドメインと同一である、項目14に記載の組換えポリペプチド。

【0033】

20. (ii)に記載のリンカー配列および/または(iv)に記載のリンカー配列が、アミノ酸配列(GGGGS) $n$ を含み、 $n$ が1以上の整数である、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0034】

21. (ii)に記載のリンカー配列が、アミノ酸配列(GGGGS) $n$ を含み、 $n$ が、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる一群から選択される整数であり、好ましくは、2、3、4および5からなる一群から選択される、項目21に記載の組換えポリペプチド。

50

## 【 0 0 3 5 】

22. (iv)に記載のリンカー配列が、アミノ酸配列(GGGGS) $n$ を含み、 $n$ が、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる一群から選択される整数であり、好ましくは、2、3、4および5からなる一群から選択される、項目21または22に記載の組換えポリペプチド。

## 【 0 0 3 6 】

23. (iii)に記載のヒトポリペプチドドメインの配列が、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であり、好ましくは配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも98%同一であり、より好ましくは配列番号5のアミノ酸配列と同一である、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

## 【 0 0 3 7 】

24. 前記ポリペプチドが二量体または多量体である、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

## 【 0 0 3 8 】

25. 前記ポリペプチドが、構成要素(i)~(vii)のすべてを含むか、またはそれらすべてからなる、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

## 【 0 0 3 9 】

26. 前記ポリペプチドが、構成要素(viii)~(x)を含まない、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

## 【 0 0 4 0 】

27. 前記ポリペプチドが、構成要素(i)~(x)のすべてを含むか、またはそれらすべてからなる、項目1~26のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

20

## 【 0 0 4 1 】

28. N末端分泌シグナルペプチド配列をさらに含む、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

## 【 0 0 4 2 】

29. 組換えポリペプチドが、N末端からC末端の順に、次の((a)および(b))からなるアミノ酸配列で構成される、項目1~28のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド：

(a) 配列番号2、22、23および24のアミノ酸配列からなる一群から選択されるペプチド抗原、および

30

(b) 配列番号16のアミノ酸配列。

## 【 0 0 4 3 】

30. 組換えポリペプチドが可溶性である、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

## 【 0 0 4 4 】

31. 前項のいずれか1つに記載の1つもしくは複数のポリペプチドをコードする核酸。

## 【 0 0 4 5 】

32. 核酸がベクターである、項目32に記載の核酸。

## 【 0 0 4 6 】

33. 項目32または33に記載の少なくとも1つの核酸を含む、医薬組成物またはキット。

40

## 【 0 0 4 7 】

34. 項目1~31のいずれか1つに記載の少なくとも1つの組換えポリペプチドを含む、医薬組成物またはキット。

## 【 0 0 4 8 】

35. 医薬組成物またはキットが、項目1~31のいずれか1つに記載の少なくとも2つの異なる組換えポリペプチドを含み、その異なるポリペプチドの各々が、項目3~6のいずれか1つに記載の異なるペプチド抗原を含む、項目35に記載の医薬組成物またはキット。

## 【 0 0 4 9 】

36. ヒト患者における視神経脊髄炎の治療に使用するための、項目34~36のいずれか

50

1つに記載の医薬組成物またはキット。

【0050】

37. 治療が免疫療法による治療である、項目37に記載の使用のための医薬組成物またはキット。

【0051】

38. 治療がヒトアクアポリン4に対する免疫寛容を誘導することによるものである、項目37～38のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物またはキット。

【0052】

39. 治療が、ヒトアクアポリン4に対する自己抗体の血漿レベルまたは脳脊髄液レベルを低下させるためのものである、項目37～39のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物またはキット。

10

【0053】

40. ヒト患者が、治療開始前にヒトアクアポリン4に対する血漿自己抗体または脳脊髄液自己抗体を有する患者である、項目37～40のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物またはキット。

【0054】

41. 治療が、ミエリン特異的制御性T細胞の誘導によるものである、項目37～41のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物またはキット。

【0055】

42. 項目32または33に記載の核酸またはベクターを含み、項目1～31のいずれか1つに記載の組換えポリペプチドを発現する、組換え宿主細胞。

20

【0056】

43. 項目1～31のいずれか1つに記載のポリペプチドを含む医薬組成物を得るための方法であって、その方法が、(a)核酸分子からの組換えポリペプチドの発現を可能にする条件下で、項目42に記載の組換え宿主細胞を培養するステップ、(b)組換えポリペプチドを回収するステップ、(c)組換えポリペプチドを精製するステップ、および(d)組換えポリペプチドを調剤して医薬組成物とするステップを含む、前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】治療に有効な抗原特異的免疫調節を達成するのに適したペプチド担持可溶性MHC Ib分子の概要図。抗原ペプチドは、点で描かれた球で表され、HLA-G 1-3ドメインは薄い灰色で描かれており、2ミクログロブリンドメインは濃い灰色で示されている。抗原ペプチドと2ミクログロブリン分子とを連結する任意選択的なリンカーはグレーの棒の形で表示され、任意選択的なジスルフィドトラップは黒い球として描かれている。この図はPymolを用いて作成され、Clements et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 1;102(9):3360-5 and Hansen et al., Trends Immunol. 2010 Oct;31(10):363-9で公表された構造をもとに作成されている。

30

【図2】治療に有効なペプチド特異的免疫調節に適した一本鎖MHC Ib分子をコードするベクター構築物の例。HLA-G1およびHLA-G5はそれぞれ、3つの[ ]ドメイン(図では黒色で示す)、非共有結合した2ミクログロブリンサブユニット(図では濃い灰色)、およびHLA-G上に提示された抗原ペプチド(短い黒い矢印)で構成されている。HLA-G1はさらに膜貫通ドメインおよび短い細胞内鎖(図には示していない)を含有する。図に示すように、[ ]3ドメインは、免疫細胞上の受容体ILT2(Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 July 22;100(15):8856-8861を参照されたい)およびILT4(Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 31;103(44):16412-7を参照されたい)に結合することができる。生理学的には、これらの配列は非共有結合によりMHCクラス1複合体を形成している。複合体MHC Ib分子の精製を容易にするために、1つもしくは複数のタンパク質タグ(SpotTag、mycタグおよび/またはHis(6x)タグなど)を導入してもよい。これらは、任意選択的な第Xa因子切断部位を用いた切断により、後から必要に応じて除去できるように導入することができる。さらに、

40

50

抗原ペプチド、 2マイクログロブリンおよびMHC Ib [ ]鎖は、安定性を高めるために連結することができる。ベクターマップはSnapgene Viewer Softwareを用いて作成した。

【図3-1】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートはマウスにおいてIL10分泌Tregを誘導する。この実験では、ウイルス(Gp34)またはオボアルブミン(Ova)モデルペプチド抗原、マウスH2-K<sup>b</sup> 1および2ドメイン、ならびにヒトHLA-G 3ドメインおよび 2マイクログロブリンからなるサロゲート分子100 µgを、12週齢のC57BL/6マウスに腹腔内注射した。14日後、マウスを 殺して、脾細胞を5 µg/mlのGp34またはOvaペプチドで再チャレンジし、48時間後に標準マウスIL-10 ELISpotアッセイ(MabtechマウスIL-10 HRP ELISpotキット、細胞はRPMI 10%FCS 10ng/ml IL2で培養)を行った。サロゲート分子の注射によって寛容が誘導されたペプチドによる再チャレンジについてのみ、IL-10を分泌する制御性T細胞の有意な増加が検出された。(A)実験デザイン；(B)結果

【図3-2】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートはマウスにおいてIL10分泌Tregを誘導する。この実験では、ウイルス(Gp34)またはオボアルブミン(Ova)モデルペプチド抗原、マウスH2-K<sup>b</sup> 1および2ドメイン、ならびにヒトHLA-G 3ドメインおよび 2マイクログロブリンからなるサロゲート分子100 µgを、12週齢のC57BL/6マウスに腹腔内注射した。14日後、マウスを 殺して、脾細胞を5 µg/mlのGp34またはOvaペプチドで再チャレンジし、48時間後に標準マウスIL-10 ELISpotアッセイ(MabtechマウスIL-10 HRP ELISpotキット、細胞はRPMI 10%FCS 10ng/ml IL2で培養)を行った。サロゲート分子の注射によって寛容が誘導されたペプチドによる再チャレンジについてのみ、IL-10を分泌する制御性T細胞の有意な増加が検出された。(A)実験デザイン；(B)結果

【図4-1】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートは、マウスにおいてCD8+ T細胞誘発性EAEを予防する。このEAEマウスモデルにおいて、モデル抗原オボアルブミン(OVA)は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)プロモーターの制御下でオリゴデンドロサイトに発現される(ODC-OVA)。これによって、オリゴデンドロサイト上のH-2K<sup>b</sup> MHC分子上にOVA257-264ペプチドが提示される。OT-Iマウスは、CD8+ T細胞上にT細胞受容体(OT-I)を発現しており、この受容体はまさにこのペプチド-MHCの組み合わせを認識する。前記マウスのCD8+ T細胞を10日齢のODC-OVAマウスに移植すると、これらのマウスは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を発症するが、これは多くの点でMSの病態や症状に類似している(Na et al., Brain, Volume 131, Issue 9, September 2008, Pages 2353-2365)。この実験において、ウイルス(Gp34)またはオボアルブミン(Ova)モデルペプチド抗原、マウスH2-K<sup>b</sup> 1および2ドメイン、ならびにヒトHLA-G 3ドメインおよび 2マイクログロブリンからなるサロゲート分子500 µg、またはPBSのみを同日に注射した。EAEは、Bittner et al., J Vis Exp . 2014 Apr 15;(86):51275にしたがってスコア化した。オボアルブミン寛容を誘導するサロゲート分子のみが、EAEの症状をほぼ完全に予防した。(A)実験デザイン；(B)結果

【図4-2】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートは、マウスにおいてCD8+ T細胞誘発性EAEを予防する。このEAEマウスモデルにおいて、モデル抗原オボアルブミン(OVA)は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)プロモーターの制御下でオリゴデンドロサイトに発現される(ODC-OVA)。これによって、オリゴデンドロサイト上のH-2K<sup>b</sup> MHC分子上にOVA257-264ペプチドが提示される。OT-Iマウスは、CD8+ T細胞上にT細胞受容体(OT-I)を発現しており、この受容体はまさにこのペプチド-MHCの組み合わせを認識する。前記マウスのCD8+ T細胞を10日齢のODC-OVAマウスに移植すると、これらのマウスは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を発症するが、これは多くの点でMSの病態や症状に類似している(Na et al., Brain, Volume 131, Issue 9, September 2008, Pages 2353-2365)。この実験において、ウイルス(Gp34)またはオボアルブミン(Ova)モデルペプチド抗原、マウスH2-K<sup>b</sup> 1および2ドメイン、ならびにヒトHLA-G 3ドメインおよび 2マイクログロブリンからなるサロゲート分子500

μg、またはPBSのみを同日に注射した。EAEは、Bittner et al., J Vis Exp . 2014 Apr 15;(86):51275にしたがってスコア化した。オボアルブミン寛容を誘導するサロゲート分子のみが、EAEの症状をほぼ完全に予防した。(A) 実験デザイン; (B) 結果

【図5-1】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートの一部は、マウスにおいてCD4<sup>+</sup>T細胞誘発性EAEを選択的に予防する。このモデルでは、CD4<sup>+</sup> Th17細胞を活性化する完全フロイントアジュバント、および血液脳関門の透過性を高める百日咳毒素と組み合わせ、MOG 35-55ペプチドを投与することにより、強力なミエリン特異的自己免疫応答が引き起こされる(Protocol: Bittner et al., J Vis Exp . 2014 Apr 15;(86):51275)。EAEの発症には、抗体だけでなくCD4<sup>+</sup>細胞も重要な役割を果たしている(Tigno-Aranjuez et al., J Immunol November 1, 2009, 183 (9) 5654-5661)。さらに、ウイルス抗原(Gp34)もしくは2つのMogペプチド抗原(Mog37またはMog44)、マウスH2-D<sup>b</sup> 1および2ドメイン、ならびにヒトHLA-G 3ドメインおよび2ミクログロブリンからなる、サロゲート分子100 μg/マウス、またはPBSのみを、初日に注射した。Mog44ペプチド含有サロゲート分子は、EAEの症状および体重減少を有意に減少させた。(A) 実験デザイン; (B) EAEスコア; (C) 体重

10

【図5-2】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートの一部は、マウスにおいてCD4<sup>+</sup>T細胞誘発性EAEを選択的に予防する。このモデルでは、CD4<sup>+</sup> Th17細胞を活性化する完全フロイントアジュバント、および血液脳関門の透過性を高める百日咳毒素と組み合わせ、MOG 35-55ペプチドを投与することにより、強力なミエリン特異的自己免疫応答が引き起こされる(Protocol: Bittner et al., J Vis Exp . 2014 Apr 15;(86):51275)。EAEの発症には、抗体だけでなくCD4<sup>+</sup>細胞も重要な役割を果たしている(Tigno-Aranjuez et al., J Immunol November 1, 2009, 183 (9) 5654-5661)。さらに、ウイルス抗原(Gp34)もしくは2つのMogペプチド抗原(Mog37またはMog44)、マウスH2-D<sup>b</sup> 1および2ドメイン、ならびにヒトHLA-G 3ドメインおよび2ミクログロブリンからなる、サロゲート分子100 μg/マウス、またはPBSのみを、初日に注射した。Mog44ペプチド含有サロゲート分子は、EAEの症状および体重減少を有意に減少させた。(A) 実験デザイン; (B) EAEスコア; (C) 体重

20

【図5-3】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートの一部は、マウスにおいてCD4<sup>+</sup>T細胞誘発性EAEを選択的に予防する。このモデルでは、CD4<sup>+</sup> Th17細胞を活性化する完全フロイントアジュバント、および血液脳関門の透過性を高める百日咳毒素と組み合わせ、MOG 35-55ペプチドを投与することにより、強力なミエリン特異的自己免疫応答が引き起こされる(Protocol: Bittner et al., J Vis Exp . 2014 Apr 15;(86):51275)。ここで、EAEの発症には、抗体だけでなくCD4<sup>+</sup>細胞も重要な役割を果たしている(Tigno-Aranjuez et al., J Immunol November 1, 2009, 183 (9) 5654-5661)。さらに、ウイルス抗原(Gp34)もしくは2つのMogペプチド抗原(Mog37またはMog44)、マウスH2-D<sup>b</sup> 1および2ドメイン、ならびにヒトHLA-G 3ドメインおよび2ミクログロブリンからなる、サロゲート分子100 μg/マウス、またはPBSのみを、初日に注射した。Mog44ペプチド含有サロゲート分子は、EAEの症状および体重減少を有意に減少させた。(A) 実験デザイン; (B) EAEスコア; (C) 体重

30

【図6-1】本発明の組換えポリペプチドのMog44サロゲートは、脊髄における炎症およびCD8<sup>+</sup>T細胞浸潤を予防した。10 μmの新鮮凍結切片を市販のトルイジン1x染色試薬により室温で1時間染色した。EAEでは免疫細胞の強い浸潤が検出されたが、Mog44\_Db\_Gによって阻止された。10 μmの新鮮凍結切片を室温で短時間乾燥させ、アセトンで固定して、PBS中5% BSA 10% 正常ヤギ血清でブロックし、1:100抗CD8抗体、HRP結合二次抗体およびDAB溶液で染色した(詳細な方法: Karikari et al., Brain Behav Immun. 2022 Jan 12;101:194-210)。Mog35-55により誘導されたEAEは、脊髄へのCD8<sup>+</sup>細胞の強い浸潤をもたらすが、これはMOG44\_Db\_Gサロゲート分子により阻止された。(A) トルイジン; (B) CD8-DAB

40

【図6-2】本発明の組換えポリペプチドのMog44サロゲートは、脊髄における炎症およびCD8<sup>+</sup>T細胞浸潤を予防した。10 μmの新鮮凍結切片を市販のトルイジン1x染色試

50

薬により室温で1時間染色した。EAEでは免疫細胞の強い浸潤が検出されたが、Mog44\_Db\_Gによって阻止された。10 μmの新鮮凍結切片を室温で短時間乾燥させ、アセトンで固定して、PBS中5%BSA 10%正常ヤギ血清でブロックし、1:100抗CD8抗体、HRP結合二次抗体およびDAB溶液で染色した(詳細な方法: Karikari et al., Brain Behav Immun. 2022 Jan 12;101:194-210)。Mog35-55により誘導されたEAEは、脊髄へのCD8<sup>+</sup>細胞の強い浸潤をもたらすが、これはMOG44\_Db\_Gサロゲート分子により阻止された。(A) トルイジン; (B) CD8-DAB

【図7】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートを投与したMog-EAEマウスにおける抗MOG35-55抗体の検出(「AIM Bio」) マウスを殺した後、マウス血清を心臓から穿刺法で採取した。10 μg/mlのMog35-55を用いて一晚コーティングして、ウェルを1%BSAでブロックし、抗Mog35-55抗体を指定のHRP結合二次抗体により検出した。Mog35-55で誘導されたEAEは、高レベルのMog35-55特異的IgG自己抗体と相関していたが、これは100 μgのMOG44\_Db\_Gサロゲート分子を投与した動物では検出不可であった。

【図8】ヒトNMO組換えポリペプチド候補の一覧。図に示したNMO組換えポリペプチド候補のペプチド抗原配列は以下の通りである: 構築物 ペプチド抗原

配列番号 42	hAQP4 42-50_HLAG Myc/Hisタグ	FLAMLIFV
配列番号 31	hAQP4 45-53_HLAG Myc/Hisタグ	MLIFVLLSL
配列番号 32	hAQP4 65-72_HLAG Myc/Hisタグ	PLPVDMLV
配列番号 33	hAQP4 71-79_HLAG Myc/Hisタグ	VLISLCFGL
配列番号 22	hAQP4 126-135_HLAG Myc/Hisタグ	AIIGAGILYL
配列番号 34	hAQP4 127-135_HLAG Myc/Hisタグ	IIGAGILYL
配列番号 32	hAQP4 45-53_A2G Myc/Hisタグ	MLIFVLLSL
配列番号 33	hAQP4 65-72_A2G Myc/Hisタグ	PLPVDMLV
配列番号 22	hAQP4 71-79_A2G Myc/Hisタグ	VLISLCFGL
配列番号 34	hAQP4 126-135_A2G Myc/Hisタグ	AIIGAGILYL
配列番号 23	hAQP4 5_A2G Myc/Hisタグ	IIGAGILYL
配列番号 35	hAQP4 156-164_A2G Myc/Hisタグ	AGHGLLVEL
配列番号 24	hAQP4 238-247_A2G Myc/Hisタグ	IIGAVLAGGL
配列番号 32	hAQP4 45-HLAG SPO Ttag	MLIFVLLSL
配列番号 36	hAQP4 71-79_HLAG SPOTtag	KAVTAEFL
配列番号 22	hAQP4 64-72_HLAG SPOTtag	VLISLCFGL
配列番号 2	hAQP4 71-79_A2G SPOTtag	KPLPVDMLV
配列番号 22	hAQP4 127-A2G SPOTtag	VLISLCFGL
配列番号 23	hAQP4 238-A2G SPOTtag	IIGAVLAGGL
配列番号 24	hAQP4 137-145_HLAG SPOTtag	VTPPSVVGGL

図8はさらに、AQP4ペプチドと抗原提示MHCクラスI 1および2ドメイン(HLAG = HLA-G、A2G = HLA-A2提示ドメイン + HLA-G 3ドメイン)のいずれの組み合わせが、健常な血液ドナーにおいて、製造、品質管理および優先順位付けに関して、有効な(高い)中間的(平均、av)結果をもたらすか、または好ましくない(低い)結果をもたらすかを示す(図9に記載)。

【図9 - 1】KPLPVDMLV抗原を含有する本発明の組換えポリペプチド(「AQP\_64」)による健常血液ドナーのCD8 Tregのアプレギュレーション ペプチド-HLA-G含有構築物(AIM Biologicals)を介したin vitro Treg誘導は、以下のように実施した: 健常ドナーのPBMCは、白血球除去チャンバーから得られた白血球細胞に対して、Ficollを用いて密度勾配遠心法を行うことにより精製した。細胞は1200 x gで20分間、ブレーキをOFFにして遠心し、その後、中間層を回収し、1x PBSで洗浄した(5分間、300 x g)。PBMCは以後使用するまで凍結保存した。PBMCは、PBMCパルス処理の1日前(d-1)に融解し、6ウェルプレートのウェル内で、5mlの5%ヒトAB血清含有X-VIVO 15培地中37 °Cで一晩おいた。翌日(d0)、細胞を計数し、X-VIVO 15完全培地(

5% hAB血清およびサイトカインカクテル：20ng/ml hIL-2、20ng/ml hGM-CSF、10ng/ml hIL-4および10ng/ml hTGF-b1)中に、 $3 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度で再懸濁した。実験のために、最終容量1000  $\mu$ lのX-VIVO完全培地（サイトカインカクテルおよび5  $\mu$ g/mlのAIM Bio分子または各対照を含む）を入れた12ウェルプレートの各ウェルに、 $3 \times 10^6$ 個の細胞を播種した。3日目に1mlの完全培地（サイトカイン含有）を添加し、6日目に5  $\mu$ g/mlのAIM Bio分子を用いて2回目のパルス処理を行った（培地を除去した後）。7日目、10日目、および12日目に、1mlの完全培地（サイトカイン含有）を添加した。13日目に、ELISpotプレートのPVDF膜を50  $\mu$ l/ウェルのEtOH（35% v/v）で1分間活性化した後、200  $\mu$ lの滅菌蒸留水で5回洗浄した。プレートは、4

にて100  $\mu$ l/ウェルの抗hIL10（クローン9D-7、PBS中1:500希釈、無菌濾過）で一晩コーティングした。翌日、未結合のコーティング抗体を除去し、200  $\mu$ l PBSで5回洗浄した後、200  $\mu$ lブロッキングバッファー（X-VIVO 15 5% hAB血清）を加えて、プレートを室温で30分～2時間インキュベートした。14日目に、陰性対照（細胞+PBS）および陽性対照（LPSなど）を含む2連で、ELISpotプレート上に、ウェル当たり200,000個の細胞を播種し、48時間おいた。二次抗体を調製した：1  $\mu$ g/ml aIL-10ビオチン化抗体（0.5% BSA/1x PBS中、1:1000希釈）および西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（0.5% BSA/PBS中、1:750）、テトラメチルベンジジン溶液を0.45  $\mu$ mフィルターで濾過し、使用するまで4 で保存した。細胞上清を除去し、100  $\mu$ l PBSで5回洗浄した。最後の余分なバッファーはペーパータオルで取り除いた。ウェルあたり25  $\mu$ lの希釈HRP-ストレプトアビジン（1:750）を加え、暗下で室温にて1時間インキュベートした後、滅菌1xPBSで5回洗浄した。濾過したTMB基質をウェルあたり100  $\mu$ l加え、青色のスポットが発現するまで15～25分間おいた。ウェルを水で完全に洗浄することによって、反応を停止させた。プレートのプラスチック製アンダードレインを取り外して、プレートの底面および側面も水道水で洗浄し、乾燥させた。AQP4\_64\_G\_Sptは、すべての健常血液ドナーの65%において、IL-10分泌T regを少なくとも30%多く誘導した。

10

20

【図9-2】図9続き：HLA-A2<sup>+</sup>およびHLA-A2<sup>-</sup>ドナーのPBMCにおけるIL10スポットの増加率%（AQP4\_64\_G\_Sptによる処理に対する）。

【図10】図7に示した試料の対照実験によれば、MOG47\_Db\_Gサロゲート分子による処理によって総IgGは減少しない。Easy-Titer（商標名）ヒトIgG（鎖）アッセイキット（Thermo Fisher）を用いて、メーカーの指示に従って総IgGを定量した。本実験は、図7と合わせて、一本鎖MHC Ib分子を用いて選択的抗体応答を抑制しうることを示している。

30

【図11-1】精製一本鎖MHC Ib分子の安定性。一本鎖MHC Ib分子を精製した後、1回および3回の凍結融解サイクル後、室温で5日間保存した後、および30分間50 に加熱した後の安定性を分析した。このために、A) 2  $\mu$ g AIM Bioを用いた12%ポリアクリルアミドゲルのクーマシーゲル染色、およびB) 1  $\mu$ gタンパク質を使用する2A12aHLA-G抗体(1:1000)プロットによるaHLA-Gウェスタンプロットを、非還元条件下で行った。単量体および二量体の両者が検出可能である。

【図11-2】精製一本鎖MHC Ib分子の安定性。一本鎖MHC Ib分子を精製した後、1回および3回の凍結融解サイクル後、室温で5日間保存した後、および30分間50 に加熱した後の安定性を分析した。このために、A) 2  $\mu$ g AIM Bioを用いた12%ポリアクリルアミドゲルのクーマシーゲル染色、およびB) 1  $\mu$ gタンパク質を使用する2A12aHLA-G抗体(1:1000)プロットによるaHLA-Gウェスタンプロットを、非還元条件下で行った。単量体および二量体の両者が検出可能である。

40

【図12】一本鎖MHC Ib分子は熱に安定である。サーマルシフトアッセイ（Thermal Shift Assay）（TSA）のために、3  $\mu$ gの各一本鎖MHC Ib分子、または対照分子としてモタビズマブを、PBSおよび5x SYPRO Orange色素（原液5000x、終濃度：5x）で希釈し、容積25  $\mu$ lとした。StepOnePlus Software 2.3を用いて、StepOnePlus Instrumentで融解曲線プログラムを設定した。開始温度は25 として1分間、その後1

50

分ごとに1 ずつ温度を上昇させ、最終温度95 で2分間として、自己蛍光を任意の単位で測定した。データをエクスポートし、Prism V7.04でグラフを作成した。融解温度 (Tm) の決定にはボルツマンシグモイド関数を用いた。

【図13】一本鎖MHC Ib分子はTregを用量依存的に誘導する。OT-1マウスに、指示された量の一本鎖H2\_K<sup>b</sup> 1+2およびHLA-G 3ドメイン構築物(ヒト 2ミクログロブリンおよび標記ペプチドを有する)、または基剤(PBS)を腹腔内注射した。OvaはこれらのマウスにおいてOT-1 TCRの同種ペプチドであり、Gp34は無関係なウイルス由来の対照ペプチドである。14日後、マウスを 殺し、脾細胞を、リコールマウスIL-10 ELISpotでIL-10分泌細胞について検査した(ウェルあたり200,000細胞、MabTechマウスIL-10 ELISpotキット、5 µg/mlの標記ペプチドまたはPBSのみを添加した、48時間)。Ovaペプチドに反応するIL-10分泌細胞の明確な誘導は、50 µgおよび500 µgのマウス適合Ova\_KbGを注射したときに観察された。

【図14】一本鎖MHC Ib分子はT細胞の溶解を用量依存的に阻害する。OT1/BL6マウスを 殺して脾細胞を回収し、RPMI 5%FCS中で1回洗浄した。2mlの1x滅菌赤血球溶解バッファーを用いて3分間で赤血球を除去した。GMCSF 20ng/ml、IL-2 20ng/ml、およびIL-4 10ng/mlを含有し、Ova\_KbGの用量を増加させた、RPMI 10%FCS培地中で72時間、細胞を高密度培養した(10<sup>7</sup>細胞/ml)。その後、細胞をプレートから掻き出し、CD8+細胞を磁気ビーズで精製した。滅菌96ウェル白色プレートを使用した。ルシフェラーゼ発現Panc02標的細胞に20 µg/mlのOvaペプチド(SIINFEKL)を添加し、37、500rpmで60分間振盪した。ルシフェリンのみならず、CD8+エフェクターT細胞も50:1の割合で添加した。発光は24時間後および48時間後に測定した。

【図15】EAE-ODC Ovaマウスの血清サイトカイン。EAE-ODC Ovaマウスの血清サイトカインは、Th1/Th2 10plex Flowcytomix Kit (eBioscience)を用いてメーカーの指示に従って測定した。このキットは、1つのサンプルで、マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GMCSF)、インターロイキン1 (IL-1a)、インターロイキン2 (IL-2)、インターロイキン4 (IL-4)、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン10 (IL-10)、インターロイキン17 (IL-17)、および腫瘍壊死因子(TNF)を同時に検出するために使用した。このアレイキットは、それぞれのサイトカインに特異的な捕捉抗体でコーティングされた、蛍光強度の異なる8種類の補足ビーズの混合物を提供する。10種類の特異的な捕捉抗体でコーティングされたビーズを混合した。その後、混合した捕捉ビーズ25 µL、未知の血清サンプルもしくは標準希釈液25 µL、およびフィコエリトリン(PE)検出試薬25 µLを、96-V底ウェルプレートの各ウェルに連続して添加し、暗下で室温にて2時間インキュベートした。サンプルを1mLの洗浄バッファーで5分間洗浄し、遠心分離した。上清を除いたのち、ビーズベレットを200 µLバッファーに再懸濁した。サンプルはAttune (商標名) NxTフローサイトメーターで測定し、Attune Cytometric Software (Thermo Fisher Scientific)で解析した。

【図16】もっとも好ましいマウスに適応したAIM Bioの分子構成マップ。対応する典型的なアミノ酸配列は下記のとおりである: MSRSVALAVLALLSLSGLEAVTTVHGN LGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKN GERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDMD GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSLRYFVTAVSRPGLGEPYMEVGYVDDTEFVRF DSDAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDLRTLLGCYNQSKGGS HTIQVISGCEVGS DGRLLRQYQYAYDGCYIALNEDLKTWTAADMAALITKHKWE QAGEAERLRAYLEGTCVEWLRRLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCW ALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVPSGEEQRYTCH VQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (配列番号38)

【図17】精製して安定性をテストしたNMOサロゲート一本鎖MHC Ib分子のクーマシゲル。一本鎖MHC Ib分子を精製した後、1回および3回の凍結融解サイクル後、室温で5日間保存した後、および30分間50 に加熱した後の安定性を分析した。方法は図11

10

20

30

40

50

を参照されたい。

【図18】精製して安定性をテストしたNMOサロゲート一本鎖MHC I b分子のウェスタンブロット(2A12 HLA-G5抗体1:5000)。いずれの実験からも、これらの分子は非常に安定であるが、AQP203\_H2KbGはより多量体化する傾向がより強いことが示された。

【図19】サーマルシフトアッセイ(TSA)。前の図で得られた結果はTSAでも確認されたが、この多量体は低い温度で高い自己蛍光をもたらす。

【図20】EAEスコア。AQP147\_KbGは、投与した2D2マウスにおいてEAEからの完全な予防をもたらした。マウスは、D0、D15およびD30に、処置または対照AIM Biosの注射を受けた。マウスは、表1に示す0-10のEAEスコアリングシステムに基づいて毎日評価した。無処置マウスは実験期間中に重度のEAE症状を発現した。1匹の無処置マウスはD14でスコア6に達し、殺処分した。評価期間中の残りの日数は、そのスコアを6と推定した。gp34\_KbGによる対照処置では、望ましい予防は与えられなかった。(\*p 0.05, \*\*p 0.01, \*\*\*p 0.001)

【図21-1】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経における免疫細胞浸潤。AQP147\_KbG処置は、視神経における免疫細胞の浸潤を抑制した。各処置群から得られたCD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>蛍光シグナルを、パネルA(視神経)およびB(脊髄)に示す。DAPI画像は、各切片に存在する全神経核を示す。CD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の数は、対照マウスおよび無処置マウスの視神経(パネルC)および脊髄(パネルD)において有意に多かった。AQP203\_KbGは対照群および無処置群よりも免疫浸潤を抑制した。データは平均±SEMとして示す。スケールバー25μm。片側t検定。

【図21-2】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経における免疫細胞浸潤。AQP147\_KbG処置は、視神経における免疫細胞の浸潤を抑制した。各処置群から得られたCD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>蛍光シグナルを、パネルA(視神経)およびB(脊髄)に示す。DAPI画像は、各切片に存在する全神経核を示す。CD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の数は、対照マウスおよび無処置マウスの視神経(パネルC)および脊髄(パネルD)において有意に多かった。AQP203\_KbGは対照群および無処置群よりも免疫浸潤を抑制した。データは平均±SEMとして示す。スケールバー25μm。片側t検定。

【図21-3】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経における免疫細胞浸潤。AQP147\_KbG処置は、視神経における免疫細胞の浸潤を抑制した。各処置群から得られたCD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>蛍光シグナルを、パネルA(視神経)およびB(脊髄)に示す。DAPI画像は、各切片に存在する全神経核を示す。CD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の数は、対照マウスおよび無処置マウスの視神経(パネルC)および脊髄(パネルD)において有意に多かった。AQP203\_KbGは対照群および無処置群よりも免疫浸潤を抑制した。データは平均±SEMとして示す。スケールバー25μm。片側t検定。

【図21-4】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経における免疫細胞浸潤。AQP147\_KbG処置は、視神経における免疫細胞の浸潤を抑制した。各処置群から得られたCD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>蛍光シグナルを、パネルA(視神経)およびB(脊髄)に示す。DAPI画像は、各切片に存在する全神経核を示す。CD3<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の数は、対照マウスおよび無処置マウスの視神経(パネルC)および脊髄(パネルD)において有意に多かった。AQP203\_KbGは対照群および無処置群よりも免疫浸潤を抑制した。データは平均±SEMとして示す。スケールバー25μm。片側t検定。

【図22-1】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経、脊髄および網膜における切断型カスパーゼ3の定量。AQP147\_KbGは視神経、脊髄および網膜におけるアポトーシスを完全に阻害する。視神経(パネルA、B)、脊髄(パネルC、D)および網膜(パネルE、F)における切断型カスパーゼ3(アポトーシスマーカー)染色から得られた蛍光シグナルを示す。無処置マウスおよび対照マウスでは、カスパーゼ3のレベルがもっとも高く、したがってアポトーシスのレベルももっとも高かった。データは平均±SEMとして示す。スケールバー25μm。片側t検定

【図22-2】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経、脊髄および網膜における切断

型カスパーゼ3の定量。AQP147\_KbGは視神経、脊髄および網膜におけるアポトーシスを完全に阻害する。視神経（パネルA、B）、脊髄（パネルC、D）および網膜（パネルE、F）における切断型カスパーゼ3（アポトーシスマーカー）染色から得られた蛍光シグナルを示す。無処置マウスおよび対照マウスでは、カスパーゼ3のレベルがもっとも高く、したがってアポトーシスのレベルももっとも高かった。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。スケールバー $25\ \mu\text{m}$ 。片側t検定

【図22-3】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経、脊髄および網膜における切断型カスパーゼ3の定量。AQP147\_KbGは視神経、脊髄および網膜におけるアポトーシスを完全に阻害する。視神経（パネルA、B）、脊髄（パネルC、D）および網膜（パネルE、F）における切断型カスパーゼ3（アポトーシスマーカー）染色から得られた蛍光シグナルを示す。無処置マウスおよび対照マウスでは、カスパーゼ3のレベルがもっとも高く、したがってアポトーシスのレベルももっとも高かった。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。スケールバー $25\ \mu\text{m}$ 。片側t検定

10

【図22-4】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経、脊髄および網膜における切断型カスパーゼ3の定量。AQP147\_KbGは視神経、脊髄および網膜におけるアポトーシスを完全に阻害する。視神経（パネルA、B）、脊髄（パネルC、D）および網膜（パネルE、F）における切断型カスパーゼ3（アポトーシスマーカー）染色から得られた蛍光シグナルを示す。無処置マウスおよび対照マウスでは、カスパーゼ3のレベルがもっとも高く、したがってアポトーシスのレベルももっとも高かった。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。スケールバー $25\ \mu\text{m}$ 。片側t検定

20

【図22-5】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経、脊髄および網膜における切断型カスパーゼ3の定量。AQP147\_KbGは視神経、脊髄および網膜におけるアポトーシスを完全に阻害する。視神経（パネルA、B）、脊髄（パネルC、D）および網膜（パネルE、F）における切断型カスパーゼ3（アポトーシスマーカー）染色から得られた蛍光シグナルを示す。無処置マウスおよび対照マウスでは、カスパーゼ3のレベルがもっとも高く、したがってアポトーシスのレベルももっとも高かった。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。スケールバー $25\ \mu\text{m}$ 。片側t検定

【図22-6】野生型マウスおよび2D2マウスの視神経、脊髄および網膜における切断型カスパーゼ3の定量。AQP147\_KbGは視神経、脊髄および網膜におけるアポトーシスを完全に阻害する。視神経（パネルA、B）、脊髄（パネルC、D）および網膜（パネルE、F）における切断型カスパーゼ3（アポトーシスマーカー）染色から得られた蛍光シグナルを示す。無処置マウスおよび対照マウスでは、カスパーゼ3のレベルがもっとも高く、したがってアポトーシスのレベルももっとも高かった。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。スケールバー $25\ \mu\text{m}$ 。片側t検定

30

【図23-1】視神経におけるCD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>制御性T細胞。この図から、AIM処置マウスではCD8<sup>+</sup>T細胞が少ないが、視神経においては制御性T細胞は少ないながらも明らかに多いことがわかる（片側T検定を使用）。

【図23-2】視神経におけるCD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>制御性T細胞。この図から、AIM処置マウスではCD8<sup>+</sup>T細胞が少ないが、視神経においては制御性T細胞は少ないながらも明らかに多いことがわかる（片側T検定を使用）。

40

【図24-1】野生型マウスおよび2D2マウスにおける網膜内層の厚さの定量。AQP147\_KbGはIRL細胞を分解から完全にレスキューする。ヘマトキシリン-エオシン染色の結果によれば、AQP147\_KbGの網膜内層の厚さは保たれていたのに対し、無処置マウスおよび対照マウスのIRLは薄くなっていた。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。スケールバー $25\ \mu\text{m}$ 。両側t検定

【図24-2】野生型マウスおよび2D2マウスにおける網膜内層の厚さの定量。AQP147\_KbGはIRL細胞を分解から完全にレスキューする。ヘマトキシリン-エオシン染色の結果によれば、AQP147\_KbGの網膜内層の厚さは保たれていたのに対し、無処置マウスおよび対照マウスのIRLは薄くなっていた。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。スケールバー $25\ \mu\text{m}$ 。両側t検定

50

## 【0058】

(発明の詳細な説明)

定義および一般的技術

下記に特に定義しない限り、本発明で使用される用語は、当業者に公知の一般的な意味に従って理解されるものとする。本明細書で引用されるすべての刊行物、特許および特許出願は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。本明細書中で言及される刊行物は、本文中で完全な文献参照を指定することによって引用される。

## 【0059】

本発明の組換えポリペプチドを含む、本発明のすべてのタンパク質は、当技術分野で公知の方法によって得ることができる。このような方法には、組換えポリペプチドの作製方法が含まれる。本発明の組換えポリペプチドは、本発明に従って組換え宿主細胞において発現させることができる。本発明の組換え宿主細胞は、好ましくはCHO細胞およびHEK細胞のような哺乳動物細胞である。

10

## 【0060】

本発明の組換えポリペプチドは、場合により分泌シグナルペプチド配列を含むことを意図するものと理解される。同様に、本発明の組換えポリペプチドは、たとえば精製を容易にするために、場合によりアフィニティタグを含み、たとえばプロテアーゼ切断によりタグの除去を容易にするために、タグとポリペプチドとの間に場合によりプロテアーゼ切断部位を含むことも意図している。

20

## 【0061】

また、本明細書で言及されるアミノ酸配列への言及は、修飾されていないアミノ酸配列のみならず、CHO細胞およびHEK細胞などの哺乳動物細胞を含めた、当技術分野で公知の細胞発現系で生じる、これらのアミノ酸配列の典型的な翻訳後修飾（たとえば、アミノ酸のグリコシル化もしくは脱アミド化、特定のアミノ酸のクリッピング、または他の翻訳後修飾）も包含することを意図するものであると理解される。

## 【0062】

同様に、本発明の組換えポリペプチドは、場合によりそれぞれのプロペプチドを含むことを意図するものであることが理解されよう。

## 【0063】

また、本発明の組換えポリペプチドは、可溶性または膜結合型の形態をとることができる。組換えポリペプチドがこれらの条件下で「可溶性」であるかどうかは、当技術分野で公知の方法により、たとえば、上記で指示された標準条件下で組換えポリペプチドの濁度を測定することによって決定することができる。本明細書中で使用される場合、可溶性とは、組換えポリペプチドの少なくとも95%がこれらの標準条件下で可溶性であると判定されることを意味する。

30

## 【0064】

一本鎖MHC分子は、たとえば、-80 のPBS中（担体として0.1%ヒトアルブミンを用いるか用いないかはタンパク質濃度による）、または-20 の50%グリセロール中で保存することができる。

40

## 【0065】

本発明によれば、MHC分子は好ましくはヒトMHC分子である。

## 【0066】

本発明の組換えポリペプチドは、好ましくは単離された組換えポリペプチドである。

## 【0067】

本発明のペプチド抗原を結合して提示することができる組換えポリペプチドをどのようにして調製しうるかは理解されるであろう。たとえば、[ ]1および[ ]2ドメインなどのペプチド抗原結合ドメインはよく知られており、これらのドメインの改変を行うことができる。本発明のポリペプチドおよびMHC分子に結合するペプチド抗原の能力は、当技術分野で公知の技術によって判定することが可能であり、この技術には、MHCペプチド

50

溶出後の質量分析およびin silicoでの生物情報科学的予測のような探索的方法、ならびにMHCペプチド多量体結合法および刺激アッセイのような確認的方法が含まれるがそれらに限定されない。

【0068】

本発明によれば、本発明の組換えポリペプチド、医薬組成物およびキットは、好ましくは、ヒト患者における使用に適している。

【0069】

本発明によれば、本発明の組換えポリペプチド、医薬組成物およびキットは、好ましくは、ヒト患者における視神経脊髄炎の治療への使用に適している。

【0070】

本発明によれば、本発明の組換えポリペプチド、医薬組成物およびキットは、好ましくは、ヒト患者において、たとえばヒトアクアポリン4に対する免疫寛容を誘導するのに適している。

【0071】

本発明によれば、本発明の組換えポリペプチド、医薬組成物およびキットは安定であることが理解される。

【0072】

本発明に従って使用されるペプチド抗原に関連して、本明細書で言及されるこれらのペプチド抗原の任意の長さ（たとえば、「7~11アミノ酸長」）は、ペプチド抗原自体の長さをいうことを意図することが理解される。したがって、本明細書で言及されるペプチド抗原の長さには、可能性のあるリンカー配列などに由来する付加的なアミノ酸のような、そのペプチド抗原の一部ではない付加的アミノ酸によってもたらされる長さは含まれない。

【0073】

本発明にしたがって、「含む (comprising)」という用語の出現はそれぞれ、場合により「からなる (consisting of)」という用語で置き換えてもよい。

【0074】

方法および技術

一般に、本明細書において特に定義されない限り、本発明において使用される方法（たとえば、クローニング法または抗体に関する方法）は、当技術分野で公知の手順、たとえば、Sambrookら（“Molecular Cloning: A Laboratory Manual.”, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989）、Ausubelら（“Current Protocols in Molecular Biology.” Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992）、ならびにHarlowおよびLane（“Antibodies: A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988）に記載の手順に従って実施され、これらはすべて参照により本明細書に組み入れられる。

【0075】

抗体とそれぞれの標的タンパク質との結合のようなタンパク質-タンパク質結合は、当技術分野で公知の方法によって評価することができる。タンパク質-タンパク質結合は、好ましくは表面プラズモン共鳴分光測定で評価される。

【0076】

たとえば、MHCクラスIb分子、または本発明の組換えポリペプチドと、ILT2およびILT4などの、それらの受容体との結合は、好ましくは、表面プラズモン共鳴分光測定によって評価される。より好ましくは、MHCクラスIb分子、または本発明の組換えポリペプチドとそれらの受容体との結合は、25 で、表面プラズモン共鳴測定によって評価される。このような表面プラズモン共鳴測定に適した条件は、Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 July 22;100(15):8856-8861に記載されている。

【0077】

本発明の配列の配列アラインメントは、BLASTアルゴリズムを用いて行われる (Alts

10

20

30

40

50

chul 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を参照されたい)。本発明のペプチド抗原に適した、BLASTアルゴリズムによる短いペプチドの配列アラインメントのための適当なパラメーターは、当技術分野で知られている。BLASTアルゴリズムを使用するほとんどのソフトウェアツールは、短い入力配列の配列アラインメントのためのパラメーターを自動的に調整する。ある実施形態において、以下のパラメーターが使用される：Max target sequences 10 ; Word size 3 ; BLOSUM 62 matrix ; gap costs ; existence 11, extension 1 ; conditional compositional score matrix adjustment。したがって、配列に関連して使用される場合、「同一性」または「同一である」などの用語は、好ましくは、BLASTアルゴリズムを使用して得られた同一性の値を指す。

10

**【 0 0 7 8 】**

本発明の医薬組成物の調製

本発明の医薬組成物は、医薬組成物の調製に関する公知の基準に従って調製される。

**【 0 0 7 9 】**

たとえば、医薬組成物は、適切に保管して投与することができるように調製される。したがって、本発明の医薬組成物は、基剤、賦形剤および/または安定化剤などの製薬上許容される成分を含んでいてもよい。

**【 0 0 8 0 】**

このような製薬上許容される成分は、医薬組成物をヒト患者に投与する際に使用される量では毒性がない。医薬組成物に添加される製薬上許容される成分は、組成物中に存在する活性成分の化学的性質、医薬組成物の個別の使用目的、および投与経路によって決まると考えられる。

20

**【 0 0 8 1 】**

一般に、本発明に関連して使用される製薬上許容される成分は、当技術分野で知られている知見、たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USAからの情報、に従って使用される。本発明の核酸(たとえばRNA)を含む医薬組成物はまた、当技術分野で知られている知見に従って、たとえば、樹状細胞を標的とするリポソーム製剤を用いて、調剤することもできる。

30

**【 0 0 8 2 】**

本発明のペプチド抗原

上記で定義されたペプチド抗原を含めて、本発明に従って使用することができるペプチド抗原は、それらのMHC分子上に提示される能力によって限定される以外は特に限定されない。本発明に関連して言及される「前記組換えポリペプチドによって提示されるペプチド抗原」とは、ヒトT細胞が存在する場合、ヒトT細胞上のT細胞受容体に結合する形で、前記組換えポリペプチドによってヒトT細胞に提示されるペプチド抗原であると理解される。

**【 0 0 8 3 】**

MHC分子上に提示されうるペプチドは、当技術分野で知られているように作製することができる(たとえば、Rammensee, Bachmann, Emmerich, Bachor, Stevanovic. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999 Nov;50(3-4):213-9 ; 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 ; およびRock, Reits, Neefjes. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends Immunol. 2016 Nov;37(11):724-737を参照されたい)。

40

**【 0 0 8 4 】**

ペプチド抗原は当技術分野で広く知られている。概して、本発明のペプチド抗原は、M

50

HCクラスIタンパク質に結合することができる。当業者であれば、本発明のペプチドを提示することができる、それぞれのMHCクラスIb分子またはポリペプチドに対して、好ましくは、前記MHCクラスIb分子または組換えポリペプチドに結合することができるペプチド抗原が使用されることになる。これらのペプチド抗原は、当技術分野で公知の方法に基づいて選択することができる。

【0085】

ペプチド抗原の、MHCクラスIb分子との結合、または本発明のペプチド抗原結合することができるポリペプチドとの結合は、当技術分野で公知の方法、たとえば、以下の方法によって評価することができる：

Rammensee, Bachmann, Emmerich, Bachor, Stevanovic. SYFPEITHI: data base for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999 Nov;50 (3-4):213-9 ;

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 ; および

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

【0086】

このような方法には、実験的方法、およびペプチド抗原結合を予測する方法が含まれる。

【0087】

ペプチド抗原をMHCクラスI分子上に固定して、MHCクラスI分子へのペプチド抗原の結合を確実にする役割を果たすアンカー残基は、当技術分野において公知である。

【0088】

本発明のすべての実施形態に合致した好ましい実施形態において、本発明に従って使用されるペプチド抗原は、MHCクラスI分子のために予測される位置に、アンカー残基または好ましいアミノ酸残基のいずれかを含む。

【0089】

このような予測は、好ましくは、以下の刊行物のいずれか1つに記載のように行うことができる：

- Rammensee et al, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics (1999) 50: 213-219
- Nielsen et al, Protein Sci (2003) 12:1007-1017
- Neefjes et al. Nat Rev Immunol. 2011 Nov 11;11(12):823-36
- Diehl et al. Curr Biol. 1996 Mar 1;6(3):305-14
- Lee et al. Immunity. 1995 Nov;3(5):591-600
- Desai & Kulkarni-Kale, T-cell epitope prediction methods: an overview. Methods Mol Biol. 2014;1184:333-64
- Jumper et al. Highly accurate protein structure prediction with Alpha Fold. Nature 2021;596:583-589。

【0090】

本発明において、ペプチド抗原はヒトアクアポリン4に由来する。

【0091】

本発明のペプチド抗原の非アンカーアミノ酸残基は、ヒトアクアポリン4由来ペプチド抗原の、対応するアミノ酸配列に関して、保存的置換、好ましくは2つ以下の保存的置換、より好ましくは1つの保存的置換を含み得ることもあるが、含んでいないこともあると理解される。

【0092】

本発明のペプチド抗原は、好ましくは天然に存在するアミノ酸で構成される。しかしながら、修飾アミノ酸のように天然に存在しないアミノ酸も使用することができる。たとえ

10

20

30

40

50

ば、ある実施形態において、本発明のペプチド抗原は、ヒトアクアポリン4の指示されたペプチド抗原アミノ酸配列のペプチドミメティックを包含する。

【0093】

本発明のペプチド抗原を含めた、ペプチド抗原の合成のための方法は、当技術分野において周知である。

【0094】

本発明の治療への応用

本発明の組換えポリペプチドは、視神経脊髄炎の治療に使用することができる。

【0095】

治療は、ミエリン特異的制御性T細胞を誘導することによる治療とすることができる。このような制御性T細胞（たとえば、CD8陽性制御性T細胞）は、有髄構造において活性化されるので、同一のミエリン抗原、または別のミエリン抗原を認識する細胞傷害性T細胞に対する標的細胞保護をもたらす。制御性T細胞（たとえばCD8陽性制御性T細胞）は当技術分野で知られており、たとえばIL-10の分泌によって検出することができる。

10

【0096】

CD8陽性制御性T細胞は、CD4CD25制御性T細胞ほど知られていないが、より強力であるとさえ報告されている。たとえば以下を参照されたい：

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 ; および

20

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>.

【0097】

これら（CD8陽性制御性T細胞）は、マウスにおいてCD122およびCD8の発現という特徴を有するが、ヒトでの対応する細胞は、CD8およびCXCR3陽性であることが報告されている。たとえば以下を参照されたい：

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).

30

【0098】

本発明による治療は、ヒトアクアポリン4に対する自己抗体の血漿または脳脊髄液（CSF）レベルを低下させるための治療とすることができる。ヒト患者は、治療開始前にヒトアクアポリン4に対する血漿または脳脊髄液（CSF）自己抗体を有する患者とすることができる。

【0099】

本発明に従って、自己抗体は当技術分野で公知のさまざまな方法によって検出することができる。好ましいアプローチは、自己抗体の標的と疑われる抗原（たとえば、アクアポリン4）をHEK293細胞またはCHO細胞で過剰発現させ、次いでその細胞を血清もしくは脳脊髄液とともに、典型的には室温で1時間インキュベートする、細胞アッセイ（CBA）である。mockトランスフェクトした姉妹細胞が対照となる。細胞に結合した自己抗体は、全ヒトIgG（重鎖および軽鎖）、IgG-Fc（定常鎖）またはIgG1を認識する、異なる蛍光標識抗ヒト特異的二次抗体で検出される。結合は、フローサイトメトリー（CBA-FACS）または顕微鏡による免疫蛍光の評価（CBA-IF）によって数値化され、多くの場合、力価が決定される。酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）もしくはウェスタンブロットのような他のアプローチも可能であるが、多くの場合感度が低い。なぜならば、コンフォメーションに影響される抗体はこれらの方法では検出されないことがあるからである。適当なアプローチは下記に記載されている：

40

Waters, P., Pettingill, P. & Lang, B. Detection methods for neural autoa

50

ntibodies. Handb. Clin. Neurol.133, 147-163 (2016)。

【0100】

Aqp4特異的自己抗体を検出するための方法は下記に記載されている：

Lennon, V. A., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Verkman, A. S. & Hinson, S. R. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. J. Exp. Med.202, 473-477 (2005)。

【0101】

配列

本出願で言及される好ましいアミノ酸配列は、以下の配列から独立して選択することができる。配列はN末端からC末端の順序で表される；加えて、配列は1文字のアミノ酸コードで表される。

【0102】

本発明の組換えポリペプチドの一部である配列の例：

任意選択的なリーダーペプチド（細胞発現時のプロセッシングにより組換えポリペプチドから欠失する）：たとえば、MSRSVALAVLALLSLGLEA（配列番号1）

ペプチド抗原：MHCクラスI [ ] 1及び2ドメインに対応する任意のMHCクラスIペプチド、たとえば、KPLPVDMVL（配列番号2）

第1のリンカー：たとえば、GGGSGGGSGGGGS（配列番号3）またはGCGASGGGSGGGGS（配列番号4）

【0103】

2ミクログロブリン、たとえば：

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSK  
DWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM（配列番号5、ヒト 2  
ミクログロブリン）

第2のリンカー、たとえば：

GGGSGGGSGGGSGGGGS（配列番号6）

【0104】

ヒトHLA-Gまたは選択された抗原性ペプチドを提示するのに適した任意の他のMHCクラスI [ ] 1及び2ドメインのいずれかに由来する [ ] 1及び2ドメイン、Y84はDTバリアントのCまたはAであってもよい

たとえばヒトHLA-G由来の [ ] 1及び2ドメイン：たとえば

GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEG  
PEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGQYNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLR  
GYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEW  
LHRYLENGKEMLRQA（配列番号7）

または：ヒトHLA-A2 [ ] 1及び2ドメイン：たとえば

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGP  
EYWDGETRKVKAKHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRG  
YHQYAYDGKDYLALNKEDLRSWTAAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEW  
LRRYLENGKETLQRT（配列番号8）

【0105】

ヒトHLA-G [ ] 3ドメイン（または任意のMHC Ib [ ] 3ドメイン、HLA-Fなど、これはILT2およびILT4受容体とも相互作用する）、たとえば：

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGD  
GTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSED  
L（配列番号9；HLA-G [ ] 3の配列）。

【0106】

ここで留意すべきは、この配列の以下の下線を付したアミノ酸がILT2もしくはILT4受容体相互作用に関連していることである：

10

20

30

40

50

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWAAVVPSGE  
EQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL

## 【0107】

あるいはまた、イントロン4由来の任意選択的なC末端アミノ酸配列（SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL；配列番号20）を欠いた、短縮型のヒトHLA-G[ ]3ドメインを使用してもよい、すなわち：

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGD  
GTQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW（配列番号21）、

10

第Xa因子制限部位：IEGRTGTKLGP（配列番号10）

SpotTag：PDRVRAVSHWSSC（配列番号11）

Mycタグ：EQKLISEEDL（配列番号12）

Hisタグ：HHHHHH\*（配列番号13）

スペーサー配列：たとえばNSAVD（配列番号14）またはGS

## 【0108】

本発明の組換えポリペプチドの一部となりうるさらに他の（代わりとなる）ペプチド抗原の例は以下のとおりである：

VLISLCFGL（配列番号22）、好ましくはHLA-G 1および2ドメイン含有組換えポリペプチドに含まれる

20

IIGAGILYL（配列番号23）、好ましくはHLA-A2 1および2ドメイン含有組換えポリペプチドに含まれる

IIGAVLAGGL（配列番号24）、好ましくはHLA-A2 1および2ドメイン含有組換えポリペプチドに含まれる

## 【0109】

本発明の組換えポリペプチドの例（場合によりリーダーペプチドを含有する）：

MSRSVALAVLALLSLSGLEAKPLPVDMLGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRH  
PAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFT  
PTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYF  
SAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEET  
RNTKAHAQTDRMNLQTLRGCYNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYD  
GKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENG  
KEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELV  
ETRPAGDGTQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVR  
ESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC\*（配列番号15；アスタリスクは終止コドンを表すことに留意されたい）

30

## 【0110】

ここで留意すべきは、上記の全長組換えポリペプチドのペプチド抗原の配列（ここでは：KPLPVDML）を、本発明の任意のペプチド抗原配列、すなわち、前記組換えポリペプチドによって提示される任意のペプチド抗原で置き換えることができ、ここで該ペプチド抗原はヒトアクアポリン4のペプチドである。すなわち、本発明の組換えポリペプチドは、ヒトアクアポリン4のペプチドであるペプチド抗原（たとえば、配列番号2、22、23、および24のペプチド抗原のいずれか1つ）からなる配列と、それに続く以下の配列で構成されうる：

40

GCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRH  
PAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFT  
PTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYF  
SAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEET  
RNTKAHAQTDRMNLQTLRGCYNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYD  
GKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENG  
KEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRC

50

WALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTTFQKWAAVVVPSGEEQRYTC  
HVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC\* (配列  
番号16 ; アスタリスクは終止コドンを表すことに留意されたい)

【0111】

本発明のこれらの組換えポリペプチドはまた、上記に例示したように、場合によりリー  
ダーペプチドを含有することができる。

【0112】

受容体ILT2 (LILRB1としても知られる) およびILT4 (LILRB2としても知られる)  
は、当技術分野で公知である。本発明の受容体の好ましい配列は、以下のとおりである：  
ILT2 :

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPPSVITQGSPVTLRCQGGQETQE  
YRL YREKKTALWITRIPQELVKKGQFPISITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPL  
ELVVTG AYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQ  
PHARGSSRA IFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLELLVVGVSCKPS  
LSVQPGPIVAPEE TLTLCQGS DAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQAGLSQANFT  
LGPVRSYGGQYRCYGA HNLSSSEWSAPSDPLDILIAGQFYDRVSLSVQPGPTVASGE  
NVTLLCQSQGWMTFLLTKE GAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPVTSAHAGT  
YRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVS GPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDP  
QSG LGRHLGVVIGILVAVILL LLLLLLLLLL LILRHRRQGKHW TSTQRKADFQHPAGAV  
GPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQ PEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYA  
EVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD TEAAASEAPQDVTYAQLHS  
LTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (配列番号17)

10

20

【0113】

ILT4 :

MTPIVTVLICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAEPPSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEY  
RL YREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVL  
VMTGA YPKPTLSAQSPVVTS GGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCLNSQP  
HARGSSRAI FSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLELLVPGVSKKPSLS  
VQPGPVVAPGES LTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLG  
PVSRSYGGQYRCYGAH NLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVT  
LLCQSWRQFHTFLLTKAG AADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYG  
SLNSDPYLLSHPSEPLELVVSG PSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGL  
GRHLGVVIGILVAVV LLLLLLLLLL LILRHRRQGKHW TSTQRKADFQHPAGAVGPE  
PTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQ PEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLH  
SLTLRRKATEPPPSQEREPPEPSIYATLAIH (配列番号18)

30

【0114】

ヒトアクアポリン4の配列は当技術分野で知られている。ヒトアクアポリン4の好まし  
いアミノ酸配列は以下のとおりである：

sp | P55087-2 | AQP4\_HUMAN Isoform 1 of Aquaporin-4 OS=Homo sapien  
s OX=9606 GN=AQP4

40

MVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMLISLCFG  
LSIA  
TMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPS  
VV  
GGLGVTMVHGNLTAGHG LLEVELIITFQLVFTIFASCD SKRTDVTGSIALAIGFSVAIG  
HL  
FAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEF  
KRRF  
KEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGVVHVIDVDRGEEKKGDQSGE  
VLSS

50

V

(配列番号19)

【0115】

sp | P55087 | AQP4\_HUMAN Aquaporin-4 Isoform 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AQP4 PE=1 SV=2

MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGST  
INWG

GTEKPLPVDMVLISLCFGLSIATMVQCFCGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFY  
IA

AQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASC  
DS 10

KRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVG  
PIIG

AVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPG  
VVH

VIDVDRGEEKKKGKDQSGEVLSSV

(配列番号29)

【0116】

NP\_001304313.1 aquaporin-4 isoform M1x [Homo sapiens]

MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGST  
INWGGTEKPLPVDM 20

VLISLCFGLSIATMVQCFCGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIG  
AGILYLVTPPS

VVGGLGVTMVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSIALAIGFSVA  
IGHLFAINYTGA

SMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAF  
SKAAQQTKGSYMEV

EDNRSQVETDDLILKPGVVHVIDVDRGEEKKKGKDQSGEVLSSVXLEDRTESRQDSLE  
LSSDFLPPIKETD

LL

30

(配列番号30;配列中Xは、トリプトファン、システイン、アルギニンもしくはセリン、または終止コドンとすることができる)

【0117】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに説明される：

(実施例)

【実施例】

【0118】

本発明の組換えポリペプチドを作製する方法

Expi-293F細胞(Thermo Fisher)、Expi-293(商標名)発現培地(Thermo Fisher)で培養:ExpifectamineとのDNA複合体形成のためにOpti-MEM(Thermo Fisher)を使用し、Expifectamine(商標名)293トランスフェクションキット(Thermo Fisher)を用いて1 $\mu$ g DNAを $2.5 \times 10^6$ 細胞/mlにトランスフェクション、18-20時間後、プロトコルに従ってエンハンサーを添加、4-6日後に上清を回収(37 $^{\circ}$ C、8%CO $_2$ 、加湿インキュベーター)、19mm $^2$ オービタルシェーカー 125 rpm 40

Spot-Tagタンパク質の精製:Spot-Cap樹脂の平衡化:望ましい量のスラリーを適当なチューブに移す、遠心分離(4分、2500g)でビーズを沈降させる、上清を除去して捨てる、10ベッド容積のPBS(冷却)をビーズに添加する、反転させて混合する、遠心分離(4分、2500g)でビーズを沈降させる、上清を除去して捨てる、2回繰り返す。

必要量のビーズを上清に添加する、ローターで4時間に一晚インキュベートする、

50

遠心分離（4分、4分、2500g）を繰り返してビーズを洗浄する、上清を除去する。

PBS中500  $\mu$ M Spotペプチド溶液を調製する、上清を除去する、1/3量のSpotペプチド溶液とともに5-10分間インキュベートする。

【0119】

遠心分離によりビーズを沈降させる。Amicon Ultra-4 遠心式フィルター（15 kDa カットオフ）を使用して、15 kDa Amiconカットオフカラムによりタンパク質の濃縮およびSpotペプチドの除去を行う。

【0120】

Amicon Ultra-4遠心式フィルター（15 kDaカットオフ）をPBSで、続いて0.1N NaOHですすぎ（4000 g、4分 で遠心）、微量のグリセリンを除去する。

10

【0121】

ELISPOT:

1) 細胞培養

A) PBMC単離（層流フード下）

末梢血単核球（PBMC）を単離するために、白血球除去チャンバーから得た白血球および密度勾配媒体（たとえばFicoll、またはROTI Sep 1077）を用いて密度勾配遠心分離を行った。細胞を1200xgで20分間、ブレーキをOFFにして遠心し、その後の層の間の輪を回収して1x PBSで洗浄した（5分間、300xg）。PBMCはさらなる使用まで凍結保存した。

【0122】

20

B) PBMCパルス処理（層流フード下）

PBMCは、PBMCパルス処理の1日前（d-1）に融解し、6ウェルプレートのウェル内で、5mlの5%ヒトAB血清含有X-VIVO 15培地中37°Cで一晩おいた。

【0123】

翌日（d0）、細胞を計数し、X-VIVO 15完全培地（5% hAB血清およびサイトカインカクテル：20ng/ml hIL-2、20ng/ml hGM-CSF、10ng/ml hIL-4および10ng/ml hTGF- $\beta$ 1）中に、 $3 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度で再懸濁した。

【0124】

実験のために、最終容量1000  $\mu$ lのX-VIVO完全培地（サイトカインカクテルおよび5  $\mu$ g/mlのAIM Bio分子または各コントロールを含む）を入れた12ウェルプレートの各ウェルに、 $3 \times 10^6$ 個の細胞を播種した。

30

【0125】

3日目に1mlの完全培地（サイトカイン含有）を添加し、6日目に5  $\mu$ g/mlの本発明の組換えポリペプチドまたはそのサロゲート（総称して「AIM Bio」分子と称する）を用いて2回目のパルス処理を行った（培地を除去した後）。7日目、10日目および12日目に、1mlの完全培地（サイトカイン含有）を添加した。

必要とされるのは以下のものである：

X-VIVO 15培地 + 5%ヒトAB血清

X-VIVO 15完全培地：X-VIVO 15培地 + 2%ヒトAB血清（サイトカインカクテル添加されたもの）：10 ng/ml TGF- $\beta$ 1、10 ng/ml IL-4、20 ng/ml IL-2、20 ng/ml GM-CSF

40

【0126】

2) ELISPOT

層流フード

13日目に、抗hIL10（クローン9D-7、PBS中1:500希釈、無菌濾過）およびaIL10（10G8-ビオチン）を用いてELISPOTプレートをコーティングし、14日目に、陰性対照（細胞 + PBS）および陽性対照（たとえばLPS）を含めて、ELISPOTプレート上にウェル当たり200,000個の細胞を2連で播種した。

【0127】

PFDF膜を50  $\mu$ l/ウェルのEtOH（35% v/v）で1分間活性化した後、200  $\mu$ lの滅菌

50

蒸留水で5回洗浄した。プレートは、100  $\mu$ l/ウェルの抗体溶液で4 にて一晚コーティングした。翌日、未結合のコーティング抗体を除去し、200  $\mu$ l PBSで5回の洗浄ステップを行った後、200  $\mu$ lブロッキングバッファー（X-VIVO 15 5% hAB血清）を加えて、プレートを室温で30分～2時間インキュベートした。

【0128】

DMSO中のそれぞれの抗原ペプチド、または対照としてのDMSOを調製し、最終量の5  $\mu$ gペプチド/mlを添加して、最終容量100  $\mu$ l/ウェルとした。5%ヒトAB血清を含有するX-VIVO 15培地に、1ウェルあたり150,000個の細胞を播種した。ブロッキングバッファー（X-VIVO 15培地+5%ヒトAB血清）を注意深く除去し、陰性対照としてPBSを含有する培地、および刺激物質（ウェルごとに総量5  $\mu$ g/ml）を他のウェルに加え、37

10

【0129】

層流フード外

二次抗体を調製した：0.5%BSA/1x PBS中1  $\mu$ g/ml aIL-10ビオチン化抗体（1:1000希釈）および西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート化ストレプトアビジン（0.5%BSA/PBS中1:750）、テトラメチルペンジジン溶液を0.45  $\mu$ mフィルターを用いて濾過し、使用するまで4 で保存した。

【0130】

細胞上清を除去し、100  $\mu$ l PBSを用いて5回洗浄した。最後の余分なバッファーはペーパータオルで取り除いた。

20

【0131】

ウェルあたり25  $\mu$ lの希釈HRP-ストレプトアビジン（1:750）を加え、暗下で室温にて1時間インキュベートした後、滅菌1xPBSを用いて5回洗浄ステップを行った。

【0132】

濾過したTMB基質をウェルあたり100  $\mu$ l加え、青色のスポットが発現するまで15～25分間おいた。ウェルを水道水で完全に洗浄することによって、反応を停止させた。

【0133】

プレートのプラスチック製アンダートレインを取り外し、プレートの底面および側面を水道水で洗浄して乾燥させた。

【0134】

プレートはImmunoSpot S6 Ultra-V Analyzer（Cellular Technology Limited）を用いて読み取り、Excelで分析し、グラフ/統計はGraphad Prismで行った。

30

必要とされるのは以下のものである：

捕捉抗体：抗hIL10（クローン：9D-7、Mabtech #3430-3-250；1:500希釈）、

抗hIL10ビオチン化（Mabtech #3430-6-250）

1x PBS（滅菌）

35%EtOH（v/v）

ブロッキングバッファー：X-vivo 5%hAB血清（滅菌）[細胞培養と同じ培地中でブロッキングを行った]

希釈バッファー：PBS中0.5%BAS

40

洗浄バッファー：1x PBS

培地：T細胞用、X-VIVO 15培地（Lonza）

フィルターシリンジ：Millex GV

ELISPOT PVDFプレート（#MSIP4510、Millipore）

TMB基質

【実施例】

【0135】

本発明の組換えポリペプチドのサロゲートは、マウスにおいてIL10分泌Tregを誘導するOVAペプチドまたはウイルスGp34ペプチドに対する免疫寛容を誘導するために、野生型black 6マウスに、それぞれ、以下の配列を有する100  $\mu$ gの組換えポリペプチド（

50

「AIMBio」とも称される)を注射した、

Ova\_KbG

SIINF EKLGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDI  
EVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKI  
VKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSLRYFVTAVSRPGLGEP RYMEVGYV  
DDTEFVRFDS DAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDLRTL LGC  
YNQSKGG SHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGC DYIALNEDLKTWTAADMAA  
LITKHKWEQAGEAERLRAYLEGTCVEWLRRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFD  
YEATLRCWALGFYPAEII LTWQRDGEDQTQDVELVETRPA GDGTFQKWA AVVVPSG  
EEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWS  
SC (配列番号25)、

10

および

Gp34\_KbG

AVYNFATMGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSD  
IEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKI  
VKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSLRYFVTAVSRPGLGEP RYMEVGYV  
DDTEFVRFDS DAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDLRTL LGC  
YNQSKGG SHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGC DYIALNEDLKTWTAADMAA  
LITKHKWEQAGEAERLRAYLEGTCVEWLRRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFD  
YEATLRCWALGFYPAEII LTWQRDGEDQTQDVELVETRPA GDGTFQKWA AVVVPSG  
EEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL GSPDRVRAVSHW  
SSC (配列番号26)。

20

Gp34ペプチドは、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)糖タンパク質由来の、十分に特徴の明らかなT細胞エピトープである。この抗原は従来Gp33と命名されていたが、後にH2-K<sup>b</sup>上に提示されるエピトープは、アミノ酸34-41のみを含むことが判明した。(これに対して、アミノ酸33から始まるエピトープはH2-K<sup>d</sup>上に提示される。)したがって、本発明者らは、H2-K<sup>b</sup>エピトープをGp34と呼んでいるが、これは最新の勧告に沿ったものである。それでもなお、文献におけるGp33およびGp34の命名法の使用は曖昧である。配列番号26の最初の8アミノ酸が正しい配列を示す。2週間後、マウスを殺し、脾細胞を適合ペプチドまたは不適合ペプチドで再チャレンジした。IL-10分泌細胞をELIspotで定量した。結果を図3に示す。

30

【実施例】

【0136】

本発明の組換えポリペプチドのサロゲートは、マウスにおいてCD8<sup>+</sup> T細胞誘発性EAEを選択的に予防する

(Na et al, Brain. 2008 Sep;131(Pt 9):2353-65.)に記載されているように、オリゴデンドロサイトにオボアルブミンを発現するマウスに、H2-K<sup>b</sup>においてオボアルブミンエピトープを認識するCD8<sup>+</sup> OT-I T細胞を養子移入すると、多くのMS症状および末期のNMO症状を再現する実験的自己免疫性脳脊髄炎が引き起こされる。この動物モデルでは、標的とするオボアルブミンエピトープに対する寛容を誘導する組換えポリペプチドサロゲート分子(「AIMBio」とも称される)を500 μg単回注射すると、EAE症状はほぼ完全に予防されたが、対照ペプチドを提示するサロゲート分子は有意な予防効果を示さなかった(図4)。組換えポリペプチドサロゲート分子の配列を実施例2に示す。

40

【実施例】

【0137】

本発明の組換えポリペプチドのサロゲートの一部は、マウスにおいてCD4<sup>+</sup> T細胞誘発性EAEを選択的に予防する

33 μgまたは100 μgの本発明の組換えポリペプチドのサロゲート分子(「AIM Bio」)を腹腔内注射した日に、100 μlのMOG35-55ペプチド/CFA(完全フロイントアジュバント;終濃度結核菌H37RAおよびペプチド各1mg/ml)エマルジョンをそれぞれ

50

れ左および右の脇腹に皮下注射し、250ng百日咳毒素(200 $\mu$ l PBS中)を腹腔内に注射した。2回目の百日咳毒素注射は3日後に行った。この動物モデルにおいて、Mogエpitep( Mog44\_Kb\_G )に対する寛容を誘導するAIM Bioサロゲート分子の単回注射は、EAEの症状を有意に軽減したが、対照ペプチド(Gp34)または非機能性Mogペプチド(Mog37)を提示するサロゲート分子は有意な予防効果を示さなかった(図5)。このモデルでは、Mog44 AIM Bioも脊髄における炎症およびCD8 T細胞の浸潤を予防した(図6)。組換えポリペプチドサロゲート分子の配列を実施例2または下記に記載した:

**【0138】**

Mog44\_DbG

FSRVVHLYRNGGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHP  
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLTSQ  
PKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSMRYFETAVSRPGLEEPYISVG  
YVDNKEFVRFDSDAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNL  
LGCYNQSAGGSHTLQQMSGCDLGSWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAAD  
MAAQITRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHH  
PVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFFQKWAHAVV  
VPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVS  
HWSSC(配列番号27)

10

**【0139】**

Mog37\_DbG

VGWYRSPFSRGCASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHP  
SDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLTSQP  
KIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSMRYFETAVSRPGLEEPYISVGY  
VDNKEFVRFDSDAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNL  
LGCYNQSAGGSHTLQQMSGCDLGSWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAAD  
MAAQITRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHH  
PVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFFQKWAHAVV  
VPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVS  
HWSSC(配列番号28)

20

30

**【0140】**

このモデルにおいて、Mog44 AIM Bioは、ELISAで検証されたように、血清中のM OG特異的自己抗体の形成も完全に阻止した(図7; 図10による確認も参照されたい)。これは、本発明の組換えポリペプチドが、多くの場合ヒトアクアポリン4に対する抗体応答を特徴とするNMOの有効な治療薬となることを強く示すものである。このように、患者集団は共通の自己免疫関連抗原によって規定される。ある種のMHC分子はNMOにも関連している。

**【0141】**

AIM Bio(33または100 $\mu$ g)投与マウスの血清中のMog反応性抗体は、各ステップの間に3回の洗浄を行う、標準的なELISAプロトコルで検出された。簡単に述べると、ELISAプレートは、10 $\mu$ g/mlのMog35-55ペプチドでコーティングし、PBS 1%BSAでブロックした後、PBS 1%BSAで1:25に希釈したマウス血清を1時間、添加した状態とした。検出には、1:5000に希釈した抗マウスIgG-HRPまたは抗マウス重鎖および軽鎖HRP抗体を使用した。

40

**【実施例】**

**【0142】**

NMOのための本発明のヒト組換えポリペプチド候補

本発明の組換えポリペプチドは、妊娠関連免疫抑制MHC分子HLA-Gに由来する、新たに開発されたタンパク質複合体である。HLA-Gは、胚が母体の免疫系に影響を与えて、胚性の抗原は許容するが、病原体由来の抗原にはよりいっそう拮抗することを可能にする

50

と考えられる。可変ペプチドを含有する本発明の組換えポリペプチドは、試験管内でペプチド特異的細胞傷害性エフェクターT細胞を選択的に排除し、ペプチド特異的制御性T細胞を誘導することができた。

【0143】

図8は、ヒトMS&MOGAD組換えポリペプチド候補のリストを示す。

【0144】

本発明者らの発見によれば、AQP4ペプチド抗原およびHLA-G 3ドメインを含有する一本鎖タンパク質は、健常ドナーにおいて免疫寛容誘発T細胞を誘導することができる。したがって、すべての健常血液ドナーの65%において、CD8 Tregが少なくとも30%アップレギュレートされた(図9)。

【実施例】

【0145】

本発明の組換えポリペプチドの安定性および効果に関するさらなる原理の証明

上記に加えて、本発明者らは、本発明の組換えポリペプチドおよびそのサロゲートが安定で有効であるという原理の証明をさらに得るために、本発明の組換えポリペプチドの一般構造を有するが、さまざまな異なるペプチド抗原を含有する組換えポリペプチドを入手し、検証することに着手した。図11および図12にそれぞれ示すように、検討した組換えポリペプチドは凍結融解および保存中に安定であり、熱に安定である。さらに、これらの組換えポリペプチドは、用量依存的にTregを誘導し(図13)、用量依存的にT細胞溶解を阻害する(図14)。EAE-ODC Ovaマウスにおける血清サイトカインプロファイルに対する組換えポリペプチドの効果を図15に示す。IL-10、および場合によってはIL-4の誘導が見られるが、これらはいずれも炎症性の環境において免疫応答をダウンレギュレートする免疫抑制性サイトカインであることが知られている。これにはHLA-G 3ドメインおよび同族ペプチドが必要である。IL-2は、3ドメインとはかかわりなく、同族ペプチドの細胞への提示に応じて誘導されると思われる。IL-2はT細胞の活性化および生存に必要である。

【実施例】

【0146】

2D2 TCRトランスジェニックマウスにおけるマウスアクアポリン抗原ペプチドを含む組換えペプチドの治療効果

材料および方法

実験モデル

2D2 TCRトランスジェニックマウスを4つのコホートに分けた。各コホートは少なくとも5匹の動物で構成された。同腹仔にマッチングされたWT(C57BL/6)マウスは第5コホートとした。実験期間は、2D2マウスが自然発生的に視神経炎を発症した時点から開始した。疾患発症は、眼の異常または血清中の抗MOG IgGレベルの上昇によって判定した。疾患発症の翌日、マウスに、治療マウスに適合した一本鎖MHC Ib分子AQP147\_KbG(抗原ペプチド: VTTVHGNL; 配列番号39)/AQP203\_KbG(抗原ペプチド: FAI NYTGASM; 配列番号40)、または対照のAIM Bio Gp34\_KbGのいずれかを静脈注射した。対照マウスはPBSのみの投与を受けた。投与量は250 µl中5mg/kg体重とした。対照注射または治療注射を静脈内投与した(D0)。無処置マウスにはPBSを投与した。注射はD15およびD30に繰り返した。マウスの体重を毎日測定し、EAEの症状をモニターした(表1)。EAEスコアが6に達したマウスは試験期間終了前に殺した。すべての動物はD42にCO<sub>2</sub>により殺した。視神経、眼球、脊髄、脳、血清、およびリンパ節を採取し、-20 で凍結保存した。心臓の血液を採取し、血清分析用に処理した。

【0147】

EAEは、10点採点法に従って点数化した(Bittner et al., Journal of visualized experiments: JoVE, (86), 51275)。

【0148】

免疫組織化学検査

眼球の厚さ20  $\mu\text{m}$ の連続切片を切り出し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。簡単に述べると、凍結切片を室温で10分間乾燥させて、ヘマトキシリン染色液中で10分間染色した。組織切片を流水で10分間洗浄し、エオシン染色液中で30秒間染色した。その後、切片を70%、96%、および100%エタノール中で30秒間ずつ順次脱水した。この

【0149】

#### 免疫蛍光法

視神経の厚さ10  $\mu\text{m}$ の縦連続切片を免疫組織化学検査用に切り出した。組織切片をPBS中4%PFAで10分間固定した；続いて1X PBS中5%BSA、0.2%Triton-X100、および5%NGSを含有するバッファーを用いて室温で2時間ブロッキングした。組織は、1%BSA、1%NGS、および0.2%Triton-X100を含有する染色バッファー中で、単一の一次抗体、または適当な組み合わせの一時抗体により4で一晚染色した。一次抗体は以下の通りである：i) ラット抗マウスCD3 (1:200、Invitrogen)；ii) ラット抗マウスCD8 (1:200、Biorad)；iii) ウサギ抗切断型カスパーゼ3 (1:400、Cell signaling)。切片をPBSで3回洗浄し、対応する蛍光標識二次抗体：i) 抗ウサギ-Cy3 (1:300、Dianova)；ii) 抗ラット-AF488 (1:300、Invitrogen)により、暗下で室温にて1時間染色した。切片をPBSで洗浄し、DNAをDAPI (1:500、Sigma-Aldrich)により暗下で室温にて10分間染色した。最後に切片を洗浄し、Aqua-poly/Mount (Polysciences)でマウントした。光学切片は、Zeiss AxioCamを使用して20倍または40倍の倍率で得られた。

【0150】

#### 免疫染色の定量化

免疫蛍光画像は、ImageJ-Fiji Version 1.53tを用いて数値化した。それぞれの動物について3-4枚の切片を分析した。画像は個々のチャンネルに分割され、8ビット画像に変換された。切断型カスパーゼ3染色の8ビット画像の閾値は、5MFIに設定し、DAPI染色からは100とした。切断型カスパーゼ3で覆われた面積/DAPIで覆われた面積は、切片中の切断型カスパーゼ3の割合を示す。

【0151】

#### 品質管理および安定性

一本鎖MHC Ib分子を精製した後に、1回および3回の凍結融解サイクル後、室温で5日間保存した後、ならびに30分間50に加熱した後の安定性を分析した。このために、A) 2  $\mu\text{g}$ の一本鎖MHC-Ib分子を用いた12%ポリアクリルアミドゲルのクーマシーゲル染色、およびB) 1  $\mu\text{g}$ のタンパク質を用いた2A12aHLA-G抗体(1:1000)プロットによるHLA-Gウェスタンプロットを、非還元条件下で行った。単量体および二量体がいずれも検出可能である。

【0152】

#### 結果

##### 品質管理および安定性

品質管理および安定性の試験から、NMOサロゲート一本鎖MHC Ib分子はいずれも非常に安定であることが示された(図17-19)。しかしながら、AQP203\_H2KbG\_sptは、より多量化するようであり、このことが一部のアッセイで効果が低い理由を説明している可能性がある。

【0153】

#### 治療効果

驚くべきことに、AQP147\_KbGの処置は、処置を受けたマウスにおいて、EAEからの完全な保護をもたらした(図20)、視神経における免疫細胞の浸潤を抑制し(図21)、視神経、脊髄、および網膜におけるアポトーシスを完全に阻害した(図22)。さらに、AIMを投与したマウスにおいてCD8 T細胞は少なかったが、視神経には制御性T細胞が、少ないながらも明らかに多く認められた(図23)。それに加えて、AQP147\_KbGは、IRL(網膜内層)細胞を分解から完全にレスキューした(図24)。

10

20

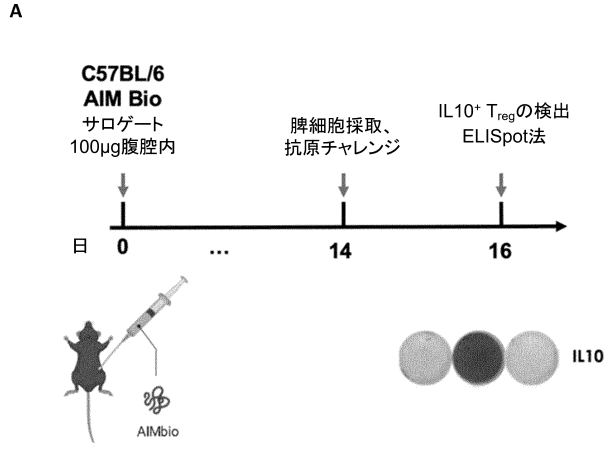
30

40

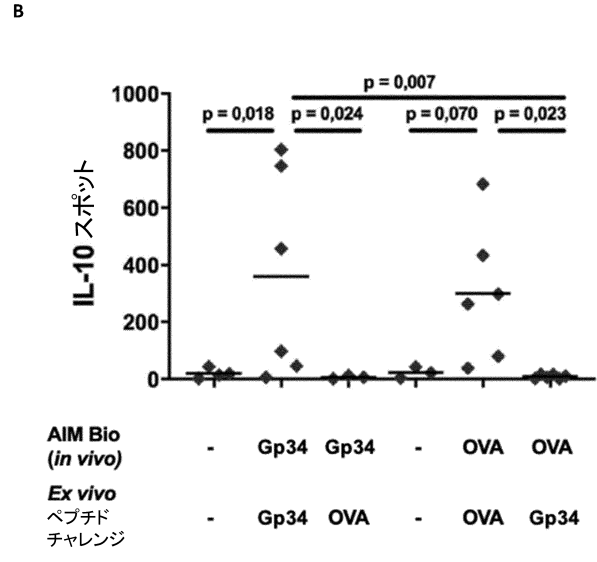
50



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

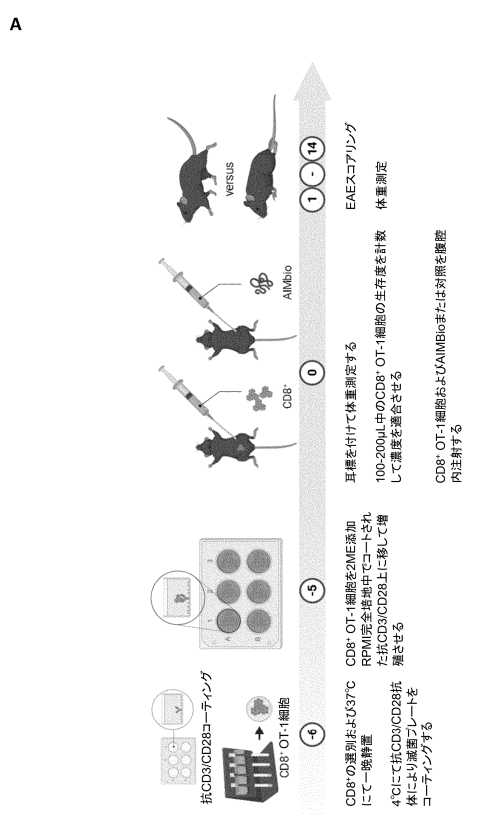


10

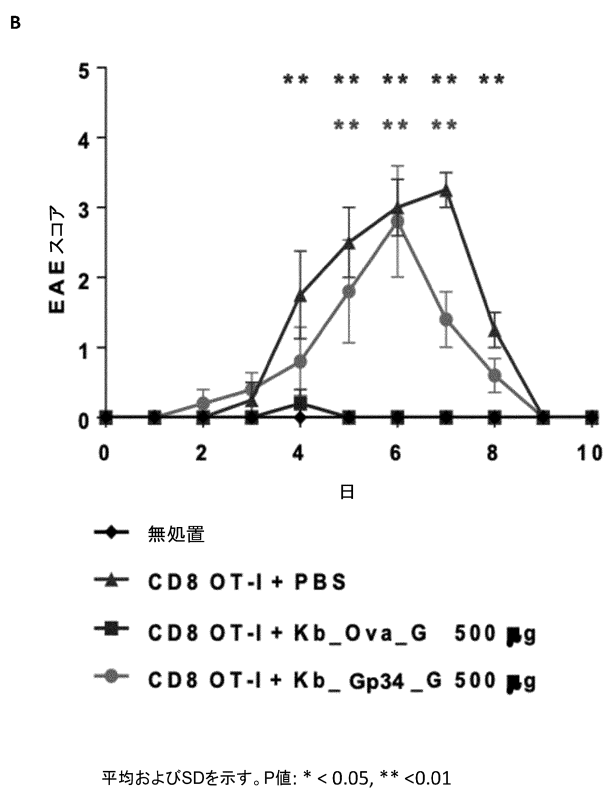
20

平均をバーで示す

【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】

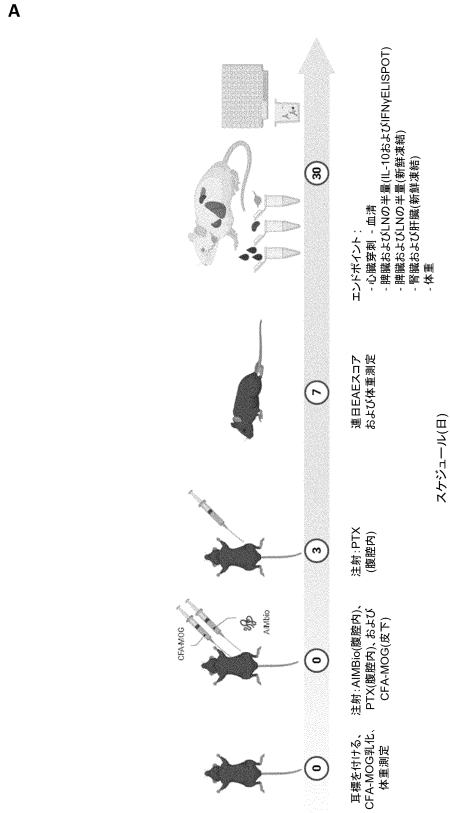


30

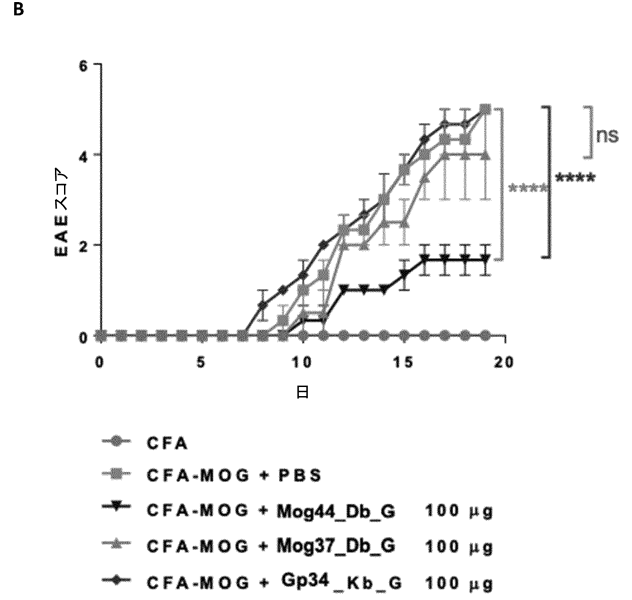
40

50

【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】

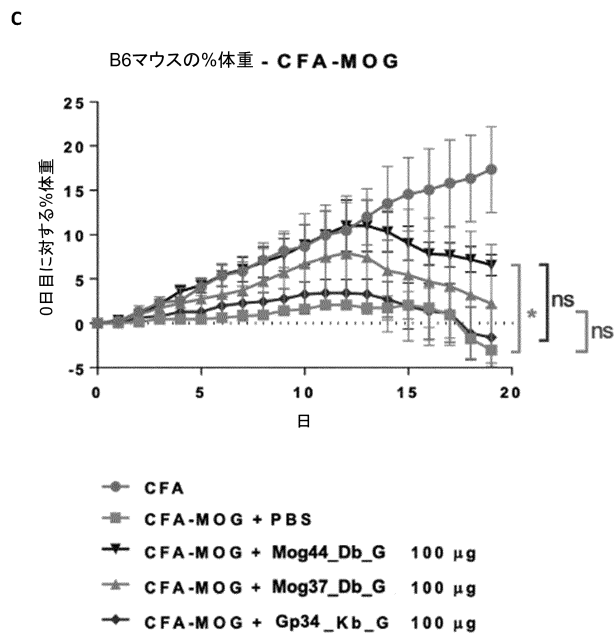


10

20

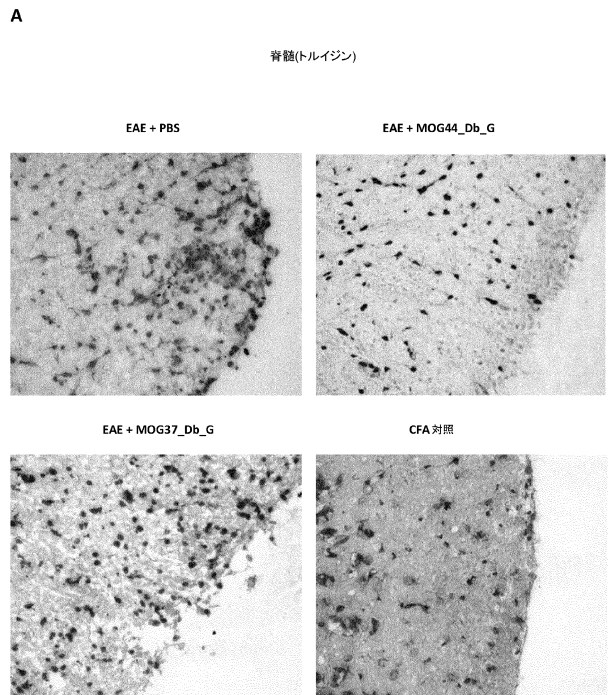
平均およびSDを示す。  
P値: \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001, \*\*\*\* < 0.0001

【 図 5 - 3 】



平均およびSDを示す。P値: \* < 0.05

【 図 6 - 1 】

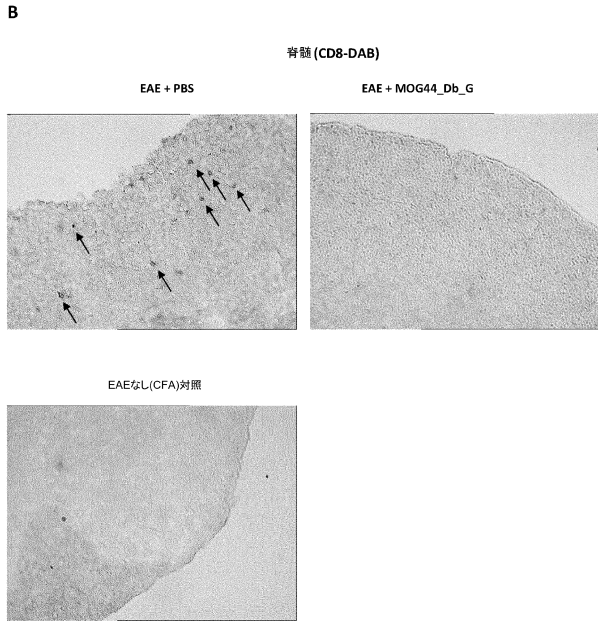


30

40

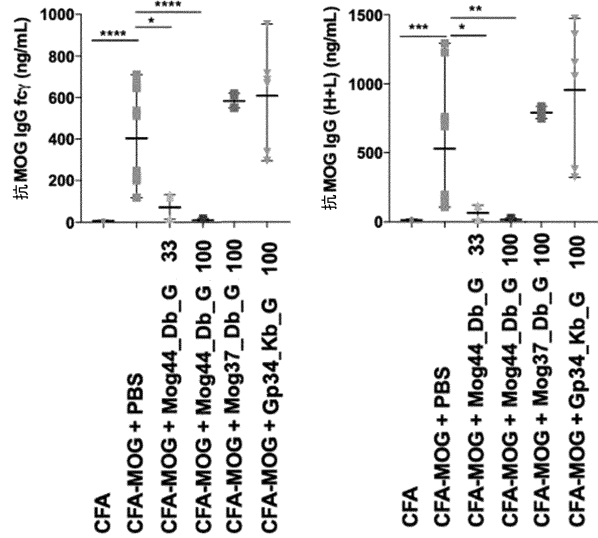
50

【 図 6 - 2 】



▲ = CD8 T 細胞

【 図 7 】



P値: \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001, \*\*\*\* < 0.0001

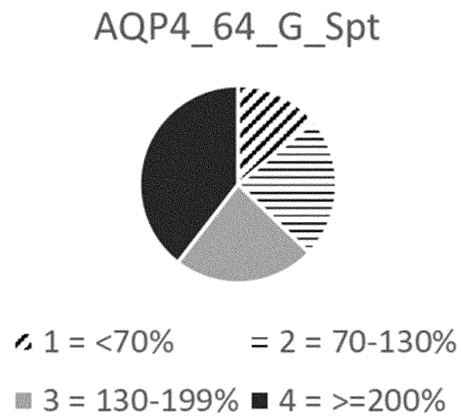
10

20

【 図 8 】

#	デザイン		製造			品質管理		優先順位付け	
	構築物	ペプチド配列	SNでの 収率	精製	高 収率	ケーマ 染色	ウェスタン プロット	Elispotでの 低密度健常 PBMC検査	統計的に 有意な結果
1	hAQP4 42-50_HLAG Myo/His Tag	FLAMLIFVL	low	high	low	NA	NA	NA	NA
2	hAQP4 45-53_HLAG Myo/His Tag	MLIFVLLSL	av.	low	NA	NA	NA	NA	NA
3	hAQP4 65-72_HLAG Myo/His Tag	PLPVDMLV	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	hAQP4 71-79_HLAG Myo/His Tag	VLISLCFGL	high	low	NA	NA	NA	NA	NA
5	hAQP4 126-135_HLAG Myo/His Tag	AIIGAGILYL	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	hAQP4 127-135_HLAG Myo/His Tag	IIGAGILYL	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	hAQP4 45-53_A2G Myo/His Tag	MLIFVLLSL	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	hAQP4 65-72_A2G Myo/His Tag	PLPVDMLV	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	hAQP4 71-79_A2G Myo/His Tag	VLISLCFGL	av.	low	NA	NA	NA	NA	NA
10	hAQP4 126-135_A2G Myo/His Tag	AIIGAGILYL	av.	high	low	NA	NA	NA	NA
11	hAQP4 127-135_A2G Myo/His Tag	IIGAGILYL	av.	high	low	NA	NA	NA	NA
12	hAQP4 156-164_A2G Myo/His Tag	AGHGLLVEL	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	hAQP4 238-247_A2G Myo/His Tag	IIGAVLAGGL	high	high	high	NA	NA	NA	NA
14	hAQP4 45-HLAG SPOTtag	MLIFVLLSL	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	hAQP4 36-43_HLAG SPOTtag	KAVTAEFL	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	hAQP4 71-79_HLAG SPOTtag	VLISLCFGL	high	high	low	low	high	NA	NA
17	<b>hAQP4 64-72_HLAG SPOTtag</b>	<b>KPLPVDMLV</b>	<b>high</b>	<b>high</b>	<b>high</b>	<b>av.</b>	<b>high</b>	<b>high</b>	<b>high</b>
18	hAQP4 71-79_A2G SPOTtag	VLISLCFGL	av.	high	low	High	NA	high	av.
19	hAQP4 127-A2G SPOTtag	IIGAGILYL	av.	high	low	high	NA	high	av.
20	hAQP4 238-A2G SPOTtag	IIGAVLAGGL	high	high	high	high	NA	high	av.
21	hAQP4 137-145G SPOTtag	VTPPSVWGG L	low	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【 図 9 - 1 】

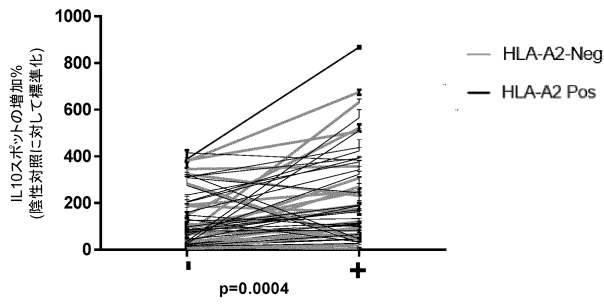


30

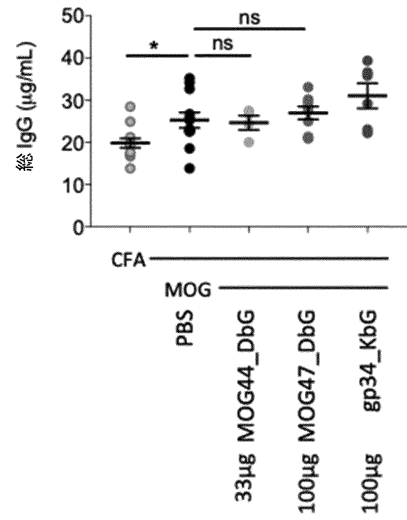
40

50

【 図 9 - 2 】



【 図 1 0 】



平均およびSDを示す。

P値: \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001, \*\*\*\* < 0.0001

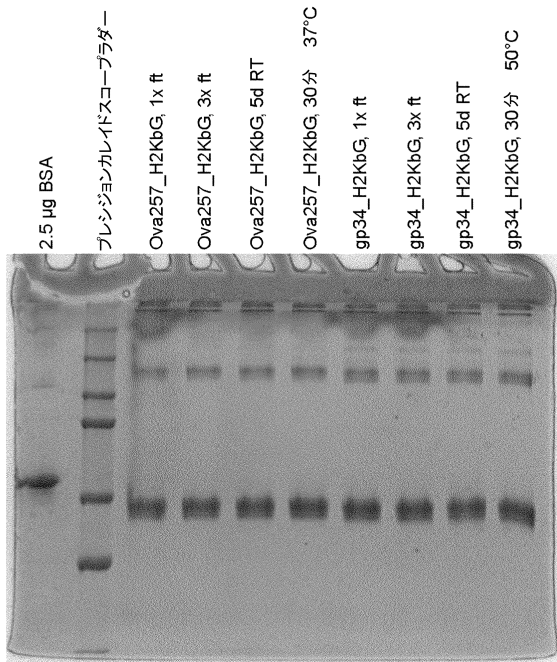
10

20

【 図 1 1 - 1 】

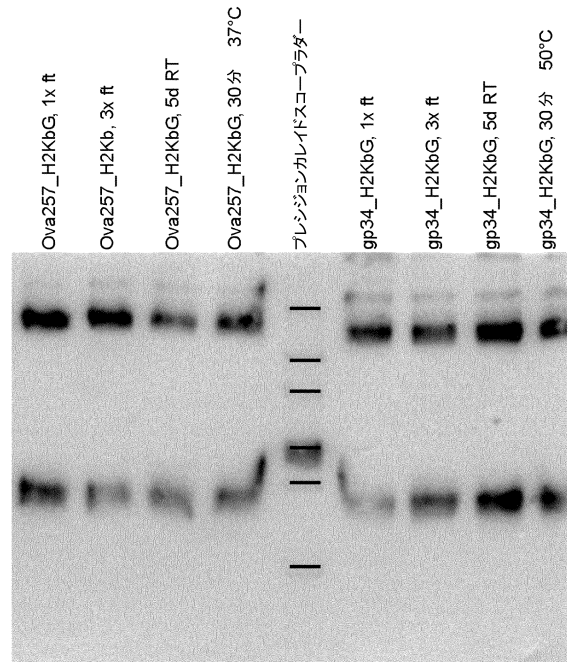
精製一本鎖MHC lb分子の安定性

A



【 図 1 1 - 2 】

B



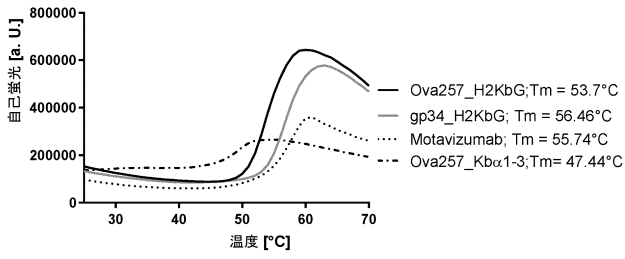
30

40

50

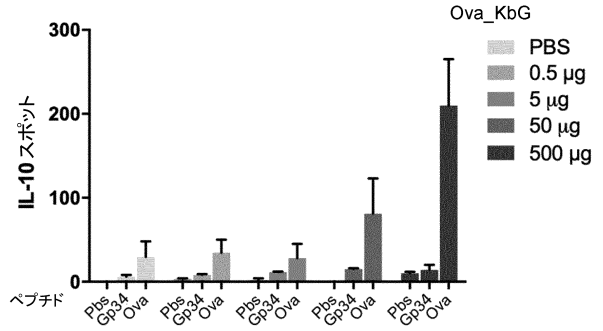
【 図 1 2 】

一本鎖MHC Ib分子は熱に安定である



【 図 1 3 】

一本鎖MHC Ib分子は用量依存的にTregを誘導する

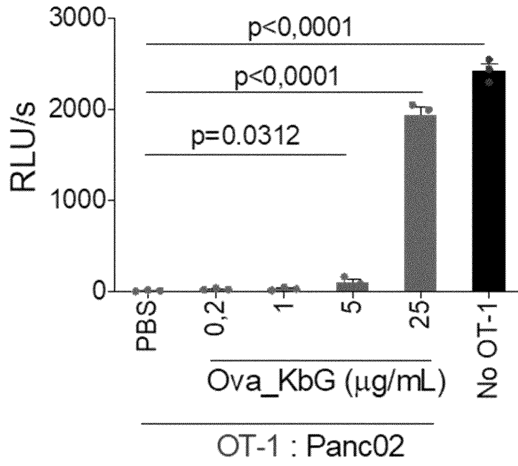


平均およびSDを示す。

10

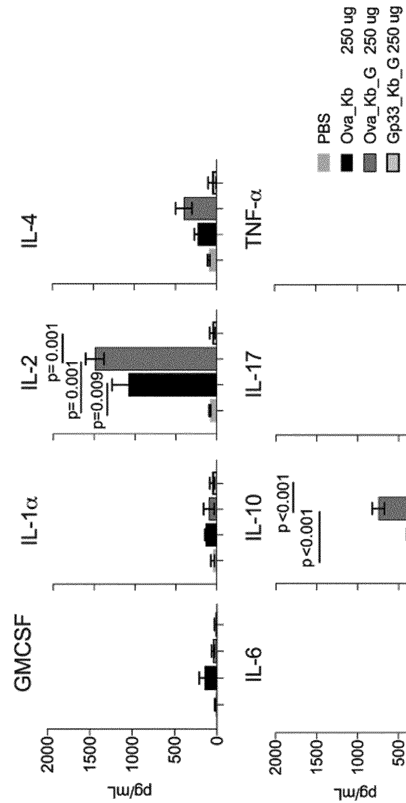
【 図 1 4 】

一本鎖MHC Ib分子は用量依存的にT細胞溶解を阻害する



平均およびSDを示す。

【 図 1 5 】



20

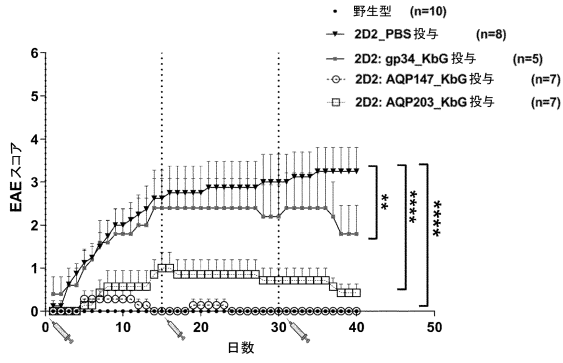
30

40

50



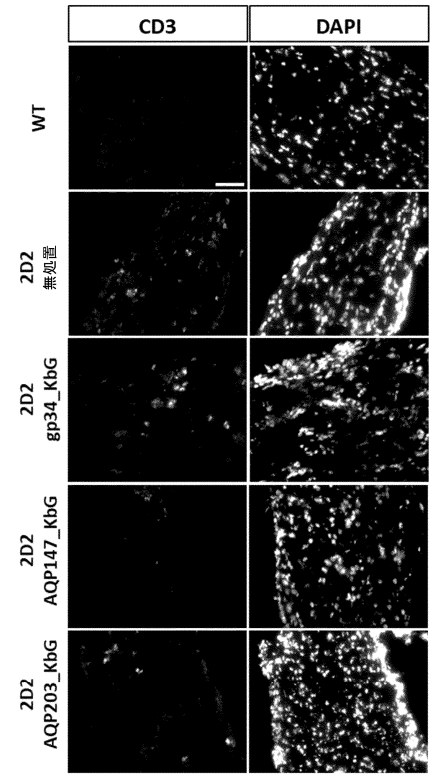
【 図 2 0 】



平均およびSDを示す。  
 P値: \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001, \*\*\*\* < 0.0001

【 図 2 1 - 1 】

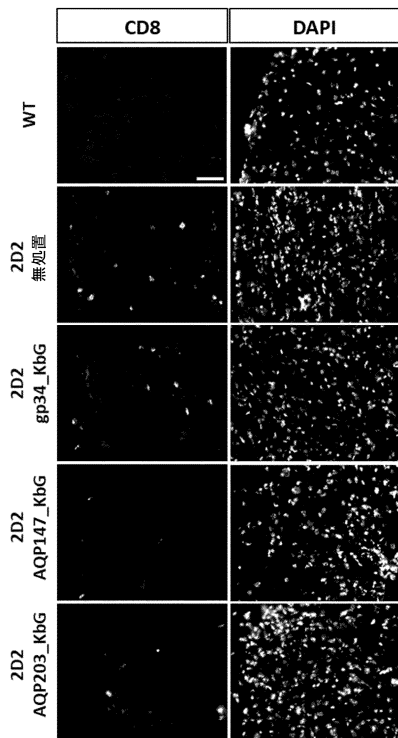
A



10  
20

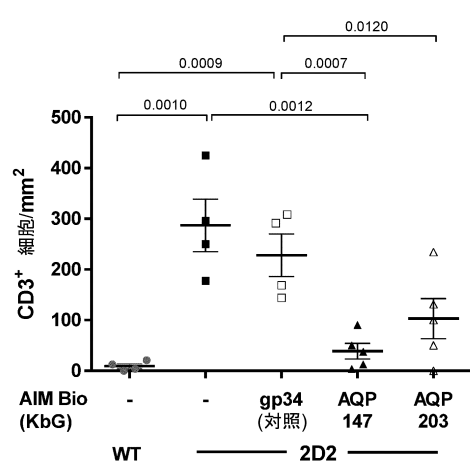
【 図 2 1 - 2 】

B



【 図 2 1 - 3 】

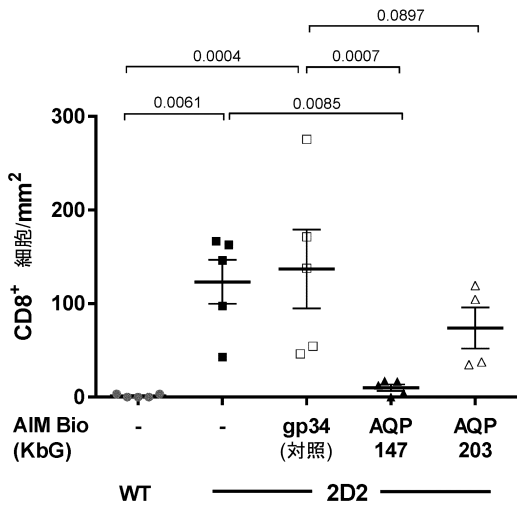
C



30  
40

【 図 2 1 - 4 】

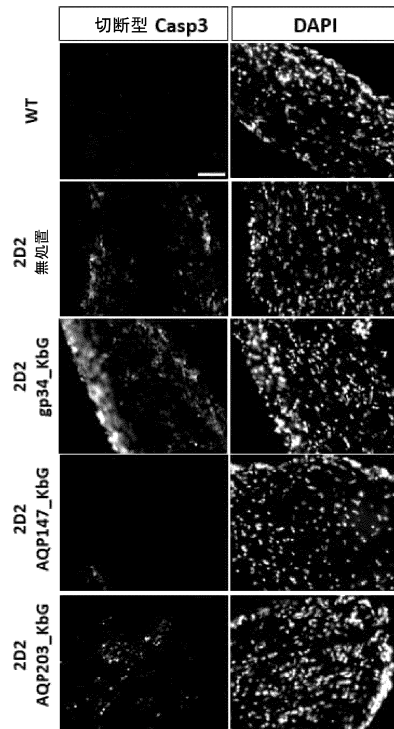
D



【 図 2 2 - 1 】

A

視神経



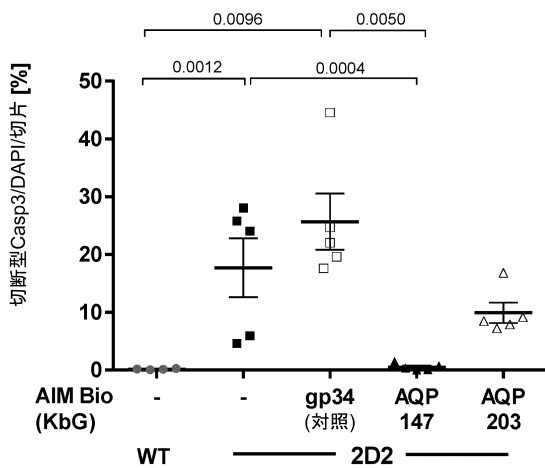
10

20

【 図 2 2 - 2 】

B

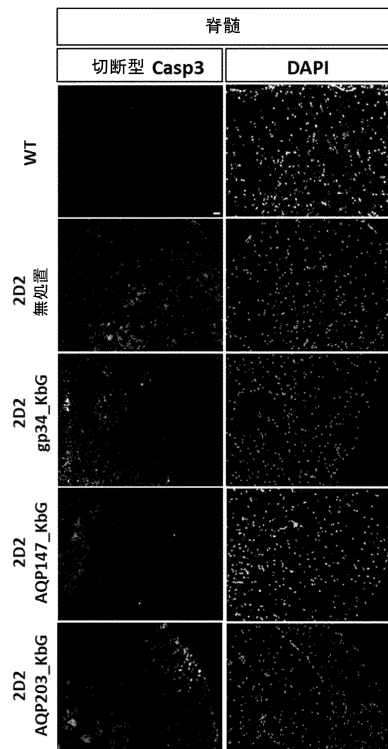
視神経



【 図 2 2 - 3 】

C

脊髓

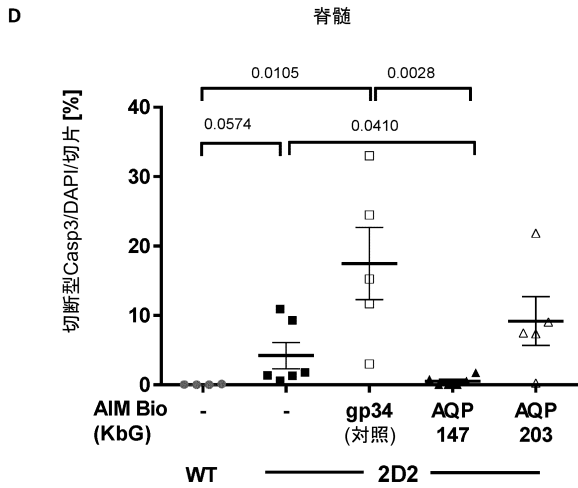


30

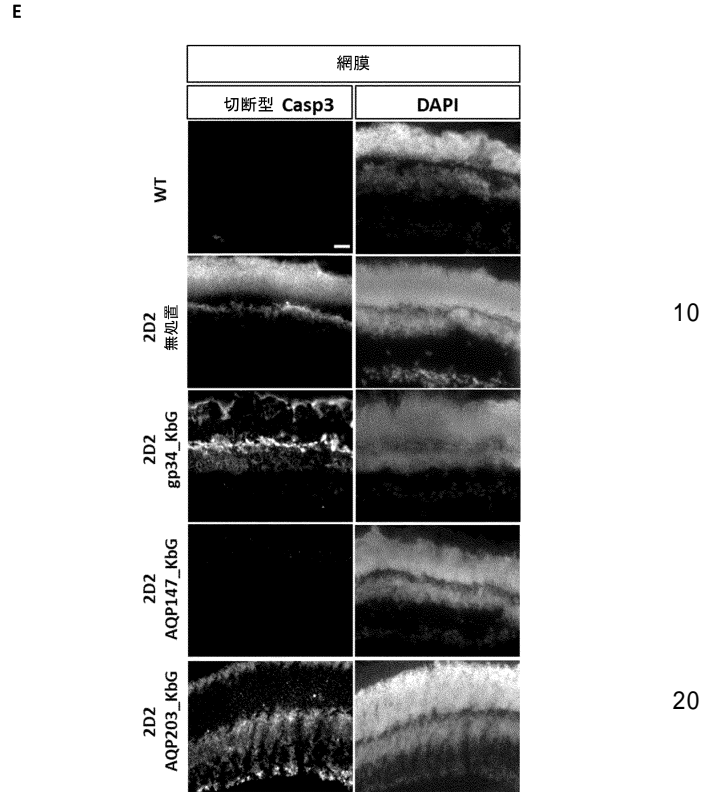
40

50

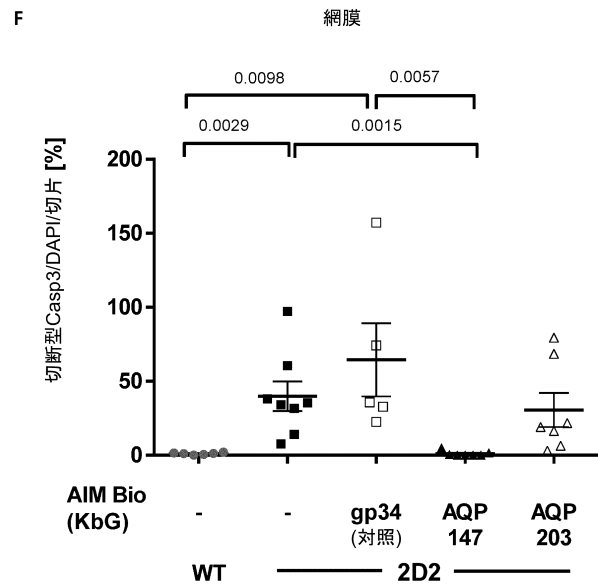
【 図 2 2 - 4 】



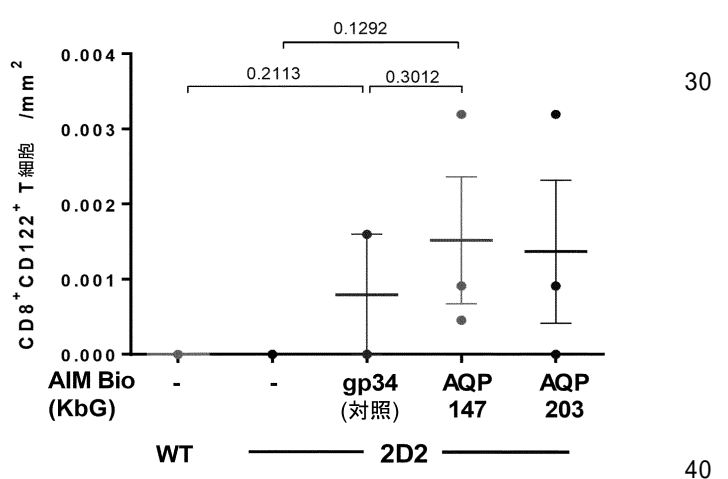
【 図 2 2 - 5 】



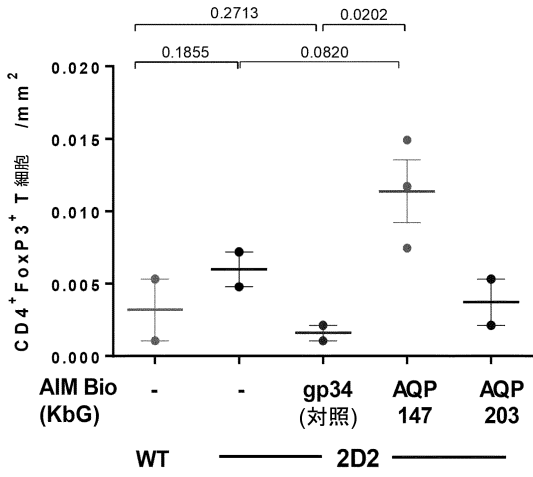
【 図 2 2 - 6 】



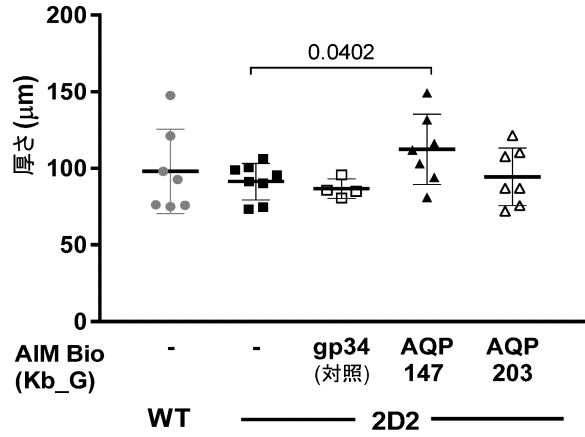
【 図 2 3 - 1 】



【 図 2 3 - 2 】

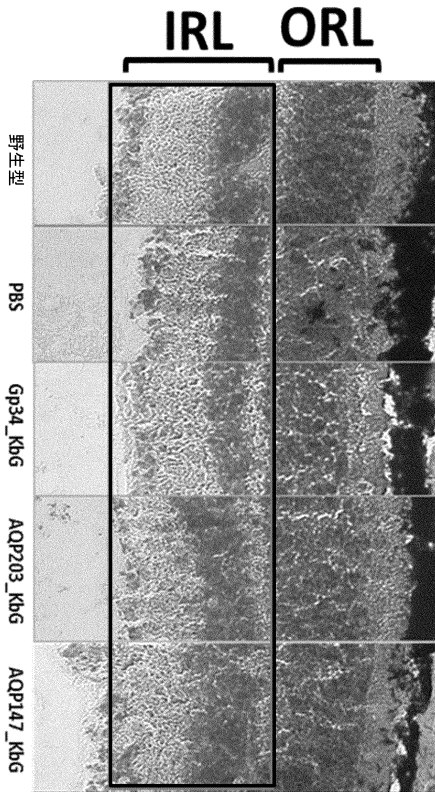


【 図 2 4 - 1 】



10

【 図 2 4 - 2 】



20

30

40

【 配列表 】

2025510786000001.xml

50

【 国際調査報告 】

International application No.

PCT/EP2023/057684

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
    - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- 2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No <b>PCT/EP2023/057684</b>
--

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	<b>A61P35/00</b>	<b>C07K14/705</b>
		<b>C07K14/74</b>
		<b>A61P25/00</b>
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
<b>A61P C07K</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>EPO-Internal, CHEM ABS Data</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<b>Y</b>	<b>WO 2018/215340 A1 (BRUTTEL VALENTIN [DE]; UNIV WUERZBURG J MAXIMILIANS [DE])</b> <b>29 November 2018 (2018-11-29)</b> <b>cited in the application</b> <b>abstract</b> <b>claims 1-3, 13, 22-25, 35-44, 63, 64; sequences 11, 6</b>	<b>1, 2,</b> <b>4-11,</b> <b>13-23</b>
<b>Y</b>	<b>WO 2018/185564 A2 (UTI LP [CA])</b> <b>11 October 2018 (2018-10-11)</b>	<b>1, 2,</b> <b>4-11,</b> <b>13-23</b>
<b>A</b>	<b>abstract</b> <b>page 65, paragraph 1</b> <b>page 76, paragraph 2; claims 1, 7, 11; table 1; sequences 119, 120</b>	<b>3, 12</b>
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
<b>6 July 2023</b>	<b>17/07/2023</b>	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  <b>Gurdjian, Didier</b>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2023/057684
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ZUBIZARRETA IRATI ET AL: "Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 116, no. 17, 23 April 2019 (2019-04-23), pages 8463-8470, XP093058248, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1820039116 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6486735/pdf/pnas.201820039.pdf&gt; abstract page 8464, right-hand column, paragraph 3; figures 1-3</p> <p>-----</p>	<p>1, 2, 4-11, 13-23</p>
Y	<p>WO 2021/184017 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 16 September 2021 (2021-09-16)</p> <p>abstract; claims 1,36-52</p> <p>-----</p>	<p>1, 2, 4-11, 13-23</p>
A	<p>US 2014/199333 A1 (ZAMVIL SCOTT S [US] ET AL) 17 July 2014 (2014-07-17) claims 1-22; sequence 25</p> <p>-----</p>	<p>3, 12</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

**PCT/EP2023/057684**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>WO 2018215340 A1</b>	<b>29-11-2018</b>	<b>AU 2018274545 A1</b>	<b>05-12-2019</b>
		<b>CA 3063959 A1</b>	<b>29-11-2018</b>
		<b>CN 110945019 A</b>	<b>31-03-2020</b>
		<b>EP 3630809 A1</b>	<b>08-04-2020</b>
		<b>JP 2020521000 A</b>	<b>16-07-2020</b>
		<b>JP 2023052647 A</b>	<b>11-04-2023</b>
		<b>KR 20200021475 A</b>	<b>28-02-2020</b>
		<b>US 2020157175 A1</b>	<b>21-05-2020</b>
		<b>WO 2018215340 A1</b>	<b>29-11-2018</b>
		<b>WO 2018185564 A2</b>	<b>11-10-2018</b>
<b>BR 112019021022 A2</b>	<b>09-06-2020</b>		
<b>CA 3059016 A1</b>	<b>11-10-2018</b>		
<b>CN 110945120 A</b>	<b>31-03-2020</b>		
<b>CO 2019011018 A2</b>	<b>21-10-2019</b>		
<b>EP 3607058 A2</b>	<b>12-02-2020</b>		
<b>IL 269846 A</b>	<b>28-11-2019</b>		
<b>JP 2020516594 A</b>	<b>11-06-2020</b>		
<b>KR 20200004807 A</b>	<b>14-01-2020</b>		
<b>RU 2019135533 A</b>	<b>07-05-2021</b>		
<b>SG 11201909290T A</b>	<b>28-11-2019</b>		
<b>US 2020057048 A1</b>	<b>20-02-2020</b>		
<b>WO 2018185564 A2</b>	<b>11-10-2018</b>		
<b>WO 2021184017 A1</b>	<b>16-09-2021</b>		
		<b>US 2023114434 A1</b>	<b>13-04-2023</b>
		<b>WO 2021184017 A1</b>	<b>16-09-2021</b>
<b>US 2014199333 A1</b>	<b>17-07-2014</b>	<b>US 2014199333 A1</b>	<b>17-07-2014</b>
		<b>US 2016075748 A1</b>	<b>17-03-2016</b>

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 1/14 (2006.01)	C 0 7 K 1/14	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/08 (2019.01)	A 6 1 K 38/08	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. TRITON

- (72)発明者 ヴィシュフーゼン, イェルク  
ドイツ連邦共和国 9 7 0 8 2 ヴュルツブルク, ロイトフレサーヴェーク 1 4 エー
- (72)発明者 ジャヤラム, シュリヤ ママタ  
ドイツ連邦共和国 9 7 0 8 0 ヴュルツブルク, ヴェルスバッハーシュトラッセ 1 0 7
- (72)発明者 アーサン, ファディル  
ドイツ連邦共和国 1 0 5 5 5 ベルリン, エルバースフェルダール シュトラッセ 3 0

F ターム (参考) 4B064 AG01 BH09 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01  
DA13  
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y  
AB01 AC14 BA02 BD15 CA44 CA46  
4C076 CC01 CC04 CC07 CC10 EE41 EE59 FF34  
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA17 BA18 BA41 CA53 DC50  
NA14 ZA011 ZA331 ZB081 ZB091 ZB111 ZB211  
4C085 AA03 CC21 DD62 EE01  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 EA20 EA50 FA74 GA15