

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-513720
(P2025-513720A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(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	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	14/74 (2006.01)	C 0 7 K	14/74		4 B 0 6 5
C 0 7 K	7/00 (2006.01)	C 0 7 K	7/00		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
		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2024-556457(P2024-556457)			(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11月19日(2024.11.19)				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/EP2023/057679				- U N I V E R S I T A E T W U E R
(87)国際公開番号	WO2023/180546				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	22164122.8				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			(72)発明者	弁理士法人平木国際特許事務所
	最終頁に続く				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】 多発性硬化症及び抗MOG抗体性疾患のための新規治療法としてのMHC I b 仲介ミエリン特異的免疫抑制

(57)【要約】

本発明は、多発性硬化症（MS）、抗MOG抗体性疾患、及び抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎の治療のための、ミエリン関連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複合体（MHC）分子（MHCクラスI b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、及び非古典的MHCクラスI b分子の1つ若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、ならびに多発性硬化症（MS）、抗MOG抗体性疾患、及び抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎を治療するためのその使用にも関する。

【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ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP1) 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β2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、又は配列番号5で表されるヒトβ2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[α]1ドメイン；

vi) 場合により、MHC分子の[α]2ドメイン；

vii) MHCクラスIb分子の[α]3ドメイン、又はMHCクラスIb分子の[α]3ドメインの誘導体であって、その誘導体がILT2若しくはILT4に結合可能である、前記[α]3ドメイン又は誘導体；

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；及び

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。

【請求項 2】

(i) に記載の前記ペプチド抗原が、7～11アミノ酸長であり、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。

【請求項 3】

(i) に記載の前記ペプチド抗原が、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号32、及び配列番号33のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1又は2に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 4】

(i) に記載の前記ペプチド抗原が、配列番号2、配列番号25、配列番号26、配列番号28、及び配列番号30のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1又は2に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 5】

(i) に記載の前記ペプチド抗原がヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) のペプチドである、請求項1～4のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 6】

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、請求項1～2及び4～5のうちのいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 7】

(v) に記載の前記[α]1ドメイン、及び(vi) に記載の前記[α]2ドメインが、ヒトMHCクラスIa分子に由来するか、又はヒトMHCクラスIb分子に由来する、請求項1～6いずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 8】

(v) に記載の前記[α]1ドメイン、及び(vi) に記載の前記[α]2ドメインが、ヒトMHCクラスIa分子由来である、請求項7に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 9】

(v) に記載の前記[α]1ドメイン、及び(vi) に記載の前記[α]2ドメインが、ヒトHLA-A2分子由来である、請求項8に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 10】

(v) に記載の前記 [α] 1 ドメイン、及び (v i) に記載の前記 [α] 2 ドメインが、ヒト MHC クラス I b 分子由来である、請求項 7 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 1】

(v i i) に記載の MHC クラス I b 分子の [α] 3 ドメインが、ヒト HLA-E、ヒト HLA-F 又はヒト HLA-G の [α] 3 ドメインである、請求項 1-10 のいずれか 1 項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 2】

(v i i) に記載の MHC クラス I b 分子の [α] 3 ドメインが、ヒト HLA-G の [α] 3 ドメインである、請求項 1-11 のいずれか 1 項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 3】

(v i i) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 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、請求項 1-12 のいずれか 1 項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 4】

(v i i) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 92 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 13 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 5】

(v i i) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 94 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 13 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 6】

(v i i) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 96 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 13 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 7】

(v i i) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 13 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 8】

(v i i) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 13 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 1 9】

(v i i) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一である、請求項 13 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 2 0】

(i i) に記載のリンカー配列及び／又は (i v) に記載のリンカー配列が、アミノ酸配列 (G G G G S) n を含み、n は 1 以上の整数である請求項 1-19 のいずれか 1 項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 2 1】

(i i) に記載のリンカー配列が、アミノ酸配列 (G G G G S) n を含み、n は 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 からなる群から選択される整数であり、好ましくは、2、3、4 及び 5 からなる群から選択される、請求項 20 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 2 2】

(i v) に記載のリンカー配列が、アミノ酸配列 (G G G G S) n を含み、n は 1 以上の整数であり、かつ n は、好ましくは 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 から

10

20

30

40

50

なる群から選択される整数であり、好ましくは、2、3、4及び5からなる群から選択される、請求項20若しくは21に記載の組換えポリペプチド。

【請求項23】

(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1-22のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項24】

前記ポリペプチドが二量体又は多量体である、請求項1-23のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項25】

前記ポリペプチドが(i)から(vii)のすべてを含む、又はそれらからなる、請求項1-24のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項26】

前記ポリペプチドが(viii)から(x)を含まない、請求項1-25のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項27】

前記ポリペプチドが(i)から(x)のすべてを含む、又はそれらからなる、請求項1-25のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項28】

N末端分泌シグナルペプチド配列をさらに含む、請求項1-27のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項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)及び(b)):

(a) 配列番号2、配列番号25、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号32、及び配列番号33のアミノ酸配列からなる群から選択されるペプチド抗原、及び

(b) 配列番号16のアミノ酸配列

からなるアミノ酸配列からなる、請求項1-27のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項30】

組換えポリペプチドが可溶性である、請求項1-29のいずれか1項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項31】

請求項1-30のいずれか1項に記載の1つ若しくは複数のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項32】

核酸がベクターである、請求項31に記載の核酸

【請求項33】

請求項31又は32に記載の少なくとも1項の核酸を含む、医薬組成物。

【請求項34】

請求項1-30のいずれか1項に記載の少なくとも1つの組換えポリペプチドを含む、医薬組成物又はキット。

【請求項35】

医薬組成物又はキットが、請求項1-30のいずれか1項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、該異なるポリペプチドの各々が、請求項3-6のいずれか1項で定義される異なるペプチド抗原を含む、請求項34に記載の医薬組成物又はキット。

【請求項36】

ヒト患者における多発性硬化症(MS)、抗MOG抗体性疾患、若しくはMOG抗体陽

10

20

30

40

50

性視神経脊髄炎の治療に使用するための、請求項 33-35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物又はキット。

【請求項 37】

治療が多発性硬化症（MS）の治療である、請求項 36 に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 38】

治療が抗 MOG 抗体性疾患の治療である、請求項 36 に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 39】

治療が MOG 抗体陽性視神経脊髄炎の治療である、請求項 36 に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 40】

治療が免疫療法による治療である、請求項 36-39 のいずれか 1 項に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 41】

治療がヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する免疫耐性を誘導することによるものである、請求項 36-40 のいずれか 1 項に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 42】

治療がヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する血漿中若しくは脳脊髄液中の自己抗体の量を減少させるためのものである、請求項 36-41 のいずれか 1 項に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 43】

ヒト患者が治療開始前にミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する血漿中若しくは脳脊髄液中の抗体を有する患者である、請求項 36-42 のいずれか 1 項に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 44】

治療がミエリン特異的制御性 T 細胞を誘導することによるものである、請求項 36-43 のいずれか 1 項に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

【請求項 45】

請求項 31 若しくは 32 に記載の核酸又はベクターを含み、請求項 1-30 のいずれか 1 項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 46】

請求項 1-30 のいずれか 1 項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、（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 45 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、及び（d）組換えポリペプチドを医薬組成物に製剤化するステップ、を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多発性硬化症（MS）、抗 MOG 抗体性疾患（MOG antibody disease）、及び抗 MOG 抗体陽性視神経脊髄炎の治療のための、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複合体（MHC）分子（MHC クラス IIb 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、及び非古典的 MHC クラス IIb 分子の 1 つ若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、ならびに多発性硬化症（MS）、抗 MOG 抗体性疾患、及び抗 MOG 抗体陽性視神経脊髄炎を治療するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症（MS）及びMOG脳脊髄炎（ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質抗体性疾患、抗MOG抗体性疾患、MOGADとしても知られる）は、免疫系のT細胞が中枢神経系の髄鞘を攻撃し、緩やかに進行する神経変性を引き起こすような自己免疫疾患である。MSの特徴である疾患活性の突発的な再発は、免疫調整性の治療により効果的に抑えられ得る。長い間MSの亜種として考えられてきた珍しいMOGADについては承認された治療法がないため、治療は初期段階では病状の進行を観察し待つことからなる。双方の疾患において進行性の神経変性がゆっくりと生じる。MSに効果的な薬剤の中には、たとえば抗体ナタリズマブ若しくはオクレリズマブ、又は経口的に生体利用可能なS1P阻害剤フィンゴリモドは、持続性かつ通常は無害なJCウイルスの脳内感染が制御不可能となり、しばしば致命的な進行性多巣性白質脳症を引き起こすリスクさえ有している。この点に関して、双方の疾患で、特に進行が遅い場合に、不十分な免疫調整、若しくは過度な副作用を伴う免疫調整のいずれかの問題が未解決のままである。広く使われている生物製剤は血液脳関門を通過できず、従って患部で（in situ）抗炎症効果を有することができない。それに対し、制御細胞は血液脳関門を通過することが記載されている（Schneider-Hohendorf et al., Eur J Immunol, 2010 Dec; 40(12): 3581-90）。

10

【0003】

少なくとも初期の臨床研究では、2つの方法がこれまでに評価されている。アレルギーの減感作療法と類似して、抗原特異的耐性を誘導するために多量の抗原を異なる経路によって投与する方法である。しかしながら、自己免疫疾患においてはこれらの方法が重篤な副作用を引き起こし、臨床的には成功していない。抗原特異的な制御的T細胞、又は抗原をロードした寛容原性樹状細胞の養子免疫移入によって耐性を誘導する方策のほうがより見込みがある。しかしながら、これらの方法は大変煩雑で高価であり、各々の患者に対してGMPに準拠した生産、そして品質管理プロセスが必要とされる。従って、小規模での臨床試験で成功したとしても、養子免疫移入による治療が近々の未来に多数の患者に利用可能となるかには疑問が多い。

20

【0004】

HLA-Gなどの免疫抑制性MHCクラスIb分子は、妊娠中の寛容誘導にとって重要である。それらは、ILT2、ILT4及びKir2DL4などの免疫抑制性受容体を介して様々な免疫細胞に対して免疫抑制効果を発揮する。WO 2018/215340は、MHCクラスIb分子と、標的化された治療的免疫モジュレーションのためのペプチドとの組合せに関するものである。

30

【0005】

総合して、多発性硬化症（MS）及び抗MOG抗体性疾患の治療のために改良された薬品が依然として必要である。類似して、抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎（NMO）の治療に関しても、依然として改良された薬品が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

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。従って、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及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[α]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と見出した：可変クラスIa分子の[α]1及び[α]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[α]3ド

40

50

メインと組み合わせることができる。

【0007】

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I b分子、及びβ2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I b分子の抗原結合α1及びα2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及び汎用性を高めた(たとえば、図2を参照されたい)。代わ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-Kbのα1及びα2ドメインを含む構築物は、オポアルブミン由来のペプチドSIIINF EKLをOT-1 T細胞に提示できることがすでに判明した(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)。

【0008】

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用いてヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質(MAG)、又はヒトミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP1)に対する免疫反応を抑制できることを見出した。従って、本発明によると、多発性硬化症(MS)、抗MOG抗体性疾患、及び抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎を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。

【0009】

本発明者らの実験のデータは、適当なペプチド抗原、及びMHCクラスI b分子(たとえばHLA-G)の[α]3ドメインの存在が、所望の効果をを得るために必要であることを示す。従って、このアプローチは、共刺激することなく抗原ペプチドを使用する(免疫寛容原性ではなく不応答(アナジー)性T細胞をもたらす)か、又は抗原非選択的な状態でMHCクラスI b分子を使用する、従来の方法を超えるものである。

【0010】

さらに、本発明によると、進行性多巣性白質脳症などの深刻な副作用を伴い得るこれらの疾患に対する従来薬と比較すると、改善された安全プロファイルを示すことが期待されるため、本発明の組換えポリペプチドは多発性硬化症(MS)、抗MOG抗体性疾患、及び抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎の免疫療法において非常に有効であることが期待される。

【0011】

加えて、驚くべきことに、本発明者らはモデル実験から本発明のポリペプチドがT細胞応答を調整するだけでなくMOG特異的自己抗体の形成を防ぐことを見出した。MOG特異的自己抗体がこれらの病状に関与することから、この知見が多発性硬化症(MS)、抗MOG抗体性疾患、及び抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎を有する患者の臨床的な改善につながることを期待される。

【課題を解決するための手段】

【0012】

従って、本発明は以下の好ましい実施形態に関する：

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ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質(MAG)、又はヒトミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP1)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β2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、又は配列番号5で表されるヒトβ2ミクログロブリンのアミノ酸配列に対し

10

20

30

40

50

て少なくとも90%同一であるアミノ酸配列；

i v) 場合により、リンカー配列；

v) 場合により、MHC分子の[α]1ドメイン；

v i) 場合により、MHC分子の[α]2ドメイン；

v i i) MHCクラスI b分子の[α]3ドメイン、又はMHCクラスI b分子の[α]3ドメインの誘導体であって、当該誘導体がILT2若しくはILT4に結合可能である、前記[α]3ドメイン又は誘導体；

v i i i) 場合により、プロテアーゼ切断部位；

i x) 場合により、スペーサー配列；及び

x) 場合により、アフィニティタグ。

10

2. i) に記載の前記ペプチド抗原が、7～11アミノ酸長であり、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。

3. i) に記載の前記ペプチド抗原が配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号32、及び配列番号33のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、項目1又は2に記載の組換えポリペプチド。

4. i) に記載の前記ペプチド抗原が、配列番号2、配列番号25、配列番号26、配列番号28及び配列番号30のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、項目1又は2に記載の組換えポリペプチド。

5. i) に記載の前記ペプチド抗原が、ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)のペプチドである、前項のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

20

【0013】

6. 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1～2、及び4～5のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

7. (v) に記載の前記[α]1ドメイン、及び(v i) に記載の前記[α]2ドメインが、ヒトMHCクラスI a分子由来、又はヒトMHCクラスI b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。

8. (v) に記載の前記[α]1ドメイン、及び(v i) に記載の前記[α]2ドメインが、ヒトMHCクラスI b分子由来である、項目7に記載の組換えポリペプチド。

9. (v) に記載の前記[α]1ドメイン、及び(v i) に記載の前記[α]2ドメインが、ヒトHLA-A2分子由来である、項目8に記載の組換えポリペプチド。

30

10. (v) に記載の前記[α]1ドメイン、及び(v i) に記載の前記[α]2ドメインが、MHCクラスI b分子由来である、項目7に記載の組換えポリペプチド。

【0014】

11. (v i i) に記載のMHCクラスI b分子の[α]3ドメインが、ヒトHLA-E、ヒトHLA-F又はヒトHLA-Gの[α]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。

12. (v i i) に記載のMHCクラスI b分子の[α]3ドメインが、ヒトHLA-Gの[α]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。

13. (v i i) に記載の[α]3ドメイン又は誘導体が、配列番号9又は配列番号21のアミノ酸配列を有する[α]3ドメインと同一であるか、又は少なくとも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。

40

14. (v i i) に記載の[α]3ドメイン又は誘導体が、配列番号9又は配列番号2のアミノ酸配列を有する[α]3ドメインと同一であるか、又は少なくとも92%のアミノ酸配列同一性を有する、項目13に記載の組換えポリペプチド。

15. (v i i) に記載の[α]3ドメイン又は誘導体が、配列番号9又は配列番号21のアミノ酸配列を有する[α]3ドメインと同一であるか、又は少なくとも94%のアミノ酸配列同一性を有する、項目13に記載の組換えポリペプチド。

【0015】

16. (v i i) に記載の[α]3ドメイン又は誘導体が、配列番号9又は配列番号

50

2 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 96 % のアミノ酸配列同一性を有する、項目 13 に記載の組換えポリペプチド。

17. (vii) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 又は配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性を有する、項目 13 に記載の組換えポリペプチド。

18. (vii) に記載の [α] 3 ドメイン又は誘導体が、配列番号 9 又は配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一であるか、又は少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有する、項目 13 に記載の組換えポリペプチド。

19. (vii) に記載の [α] 3 ドメインが、配列番号 9 又は配列番号 21 のアミノ酸配列を有する [α] 3 ドメインと同一である、項目 13 に記載の組換えポリペプチド。

20. (ii) に記載のリンカー配列及び／又は (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。

【0016】

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 及び 10 からなる群から選択される整数であり、好ましくは、2、3、4 及び 5 からなる群から選択される、項目 20 に記載の組換えポリペプチド。

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 及び 10 からなる群から選択される整数であり、好ましくは、2、3、4 及び 5 からなる群から選択される、項目 20 又は 21 に記載の組換えポリペプチド。

23. (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、前項のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

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

25. 前記ポリペプチドが、構成要素 i) ~ vii) のすべてを含むか、又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。

【0017】

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。

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

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。

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) 及び (b)) からなるアミノ酸配列からなる、項目 1 ~ 27 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、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 32、及び配列番号 33 のアミノ酸配列からなる群から選択されるペプチド抗原、及び

(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列。

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。

【0018】

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

10

20

30

40

50

32. 核酸がベクターである、項目31に記載の核酸。

33. 項目31又は32に記載の少なくとも1つの核酸を含む、医薬組成物。

34. 項目1～30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、医薬組成物又はキット。

35. 医薬組成物又はキットが、項目1～30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つに定義される異なるペプチド抗原を含む、項目34に記載の医薬組成物又はキット。

【0019】

36. ヒト患者における多発性硬化症(MS)、抗MOG抗体性疾患、若しくは抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎の治療に使用するための、項目33～35のいずれか1つに記載の医薬組成物又はキット。

37. 治療が多発性硬化症(MS)の治療である、項目36に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

38. 治療が抗MOG抗体性疾患の治療である、項目36に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

39. 治療が抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎の治療である、項目36に記載の使用のための医薬組成物又はキット。

40. 治療が免疫療法による治療である、項目36～39のいずれか1つに記載の医薬組成物又はキット。

【0020】

41. 治療がミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質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36～40のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物又はキット。

42. 治療がヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する自己抗体の血漿又は脳脊髄液レベルを低下させるためのものである、項目36～41のいずれか1つに記載の医薬品組成物又はキット。

43. ヒト患者が治療の開始前にミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する血漿又は脳脊髄液自己抗体を有する患者である、項目36～42のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物又はキット。

44. 治療がミエリン特異的な制御性T細胞を誘導することによるものである、項目36～43のいずれか1つに記載の使用のための医薬組成物又はキット。

45. 項目31又は32に記載の核酸又はベクターを含み、項目1～30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。

46. 項目1～30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45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、及び(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】

【0021】

【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MHCIb分子の概要図。提示されるペプチド抗原は、点で描かれた球で表され、HLA- α 1-3ドメインは薄い灰色で描かれており、 β 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 β 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

10

20

30

40

50

されている。

【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 I b分子をコードするベクター構築物の例。HLA-G1及びHLA-G5はそれぞれ、3つの[α]ドメイン（図では黒色で示す）、非共有結合したβ2ミクログロブリンサブユニット（図では濃い灰色）、及び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及び短い細胞内鎖（図には示していない）を含有する。図に示すように、[α]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）及び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 I b分子の精製を容易にするために、1つ若しくは複数のタンパク質タグ（Spotタグ、mycタグ及び／又は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因子又はFurin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、抗原ペプチド、β2ミクログロブリン及びMHC I b [α]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を用いて作製する。

【図3A】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Tre gを誘導する。この実験では、ウイルス（Gp34）又はオボアルブミン（Ova）モデルペプチド抗原、マウスH2-Kb-[α]1及び2ドメイン、並びにヒトHLA-G [α]3ドメイン及びβ2ミクログロブリンからなるサロゲート分子100μgを、12週齢のC57BL/6マウスに腹腔内投与した。14日後、マウスを殺して、Ficol lで単離した脾細胞に48時間の標準マウスIL10 ELISpotアッセイ（MabtechマウスIL-10 HRP ELISpotキット）で5μg/mlのGp34又はOvaペプチドを再チャレンジした（A）。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対してのみ、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（B）。

【図3B】図3Aの続き。

【図4A】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MS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-2Kb 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）又はオボアルブミン（Ova）モデルペプチド抗原、マウス由来H2-Kb-[α]1及び2ドメイン、並びにヒトHLA-G [α]3ドメイン及びβ2ミクログロブリンからなるサロゲート分子500μg、又はPBSのみを同日に注射した。EAEは、Bittner et al., J Vis Exp. 2014 Apr 15; (86): 51275に従ってスコア化した。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4B】図4Aの続き。

【図5A】本発明の組換えポリペプチドのサロゲートは効果的なバイスタンダー免疫抑制につながり得る。この実験では、Mog44ペプチドサロゲート分子が、同じ細胞に提示

されている別のペプチドを標的とする細胞傷害性T細胞を阻害し得る防御T細胞を誘導し得るか否かを試験した。図4に記載されるようにマウス当たり250 μ gのこの分子をOT-I細胞と共にODC-OVAマウスに図4に示されている通り注射した。このような少量のサロゲート分子では、EAE症状が完全には防げなかったが、直接対象となるCD8エピトープ(Ova__KbG)に対しての、若しくは同一の細胞(Mog44__DbG)の別のエピトープ(Mog44)に対しての寛容を誘導する分子の双方で有意に減少した。(A)EAEスコア；(B)体重。

【図5B】図5Aの続き。

【図6A】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+T細胞誘発性EAEを選択的に予防する。(A)実験デザイン：このモデルでは、CD4+Th17細胞を活性化する完全フロイントアジュバント、及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て、MOG35-55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)。ここでは、EAEの発症には、抗体だけでなくCD4+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)若しくは2つのMogペプチド抗原(Mog37又はMog44)、マウスH2-Db α 1及び2ドメイン、ならびにヒトHLA-G α 3ドメイン及び β 2ミクログロブリンからなる、サロゲート分子100 μ g/マウス、又はPBSのみが初日に注射された。Mog44ペプチド含有サロゲート分子は、EAEの症状(B)及び体重減少(C)を有意に減少させた。

【図6B】図6Aの続き。

【図6C】図6Bの続き。

【図7A】本発明の組換えポリペプチドのMog44サロゲートは、脊髄における炎症及びCD8+T細胞浸潤を予防した。(A)トルイジン；(B)CD8-DAB。10 μ m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 μ m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、PBS中5%BSA 10%正常ヤギ血清でブロックし、1:100抗CD8抗体、HRP結合二次抗体及び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+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7B】図7Aの続き。

【図8】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、マウス血清を心臓穿刺により採取し、PBS中に1:50で希釈した。PBS中10 μ g/mlのMog35-55を用いて一晚コーティングして、次いで希釈された血清を1時間加える前にウェルを1%BSAで2時間ブロックした。抗Mog35-55抗体は、指定のHRP結合二次抗体(PBS中1:5000希釈)を使用して検出した。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 μ gのMOG44__Db__Gサロゲート分子を投与した動物では検出不可能であった。

【図9】ヒトMS及びMOGAD組換えポリペプチド候補の一覧。ミエリン(MAG、MBP、MOG、PLP)ペプチド、及びMHCクラスI提示分子は以下の通りである。さらに、ミエリンペプチドと抗原提示MHCクラスI α 1及び2ドメイン(HLAG=HLA-G、A2G=HLA-A2提示ドメイン+HLA-G α 3ドメイン)の組み合わせが、健常な血液ドナーにおいて、発現/製造、ELISpotに基づく優先順位付け、若し

くは **A l p h a F o l d 2** の予測に関して良好な結果をもたらすことが示される（図 1 0 に記載）。**H i s** は 6 ヒスチジンタグを示す。**S p t** はスポットタグを示す。

【 0 0 2 2 】

組み換えポリペプチド	ペプチド抗原配列	配列番号
MAG160_A2G_His	MVPDNCPEL	25
MAG160_G_His	MVPDNCPEL	25
MAG237_G_Spt	KYPPVIVEM	34
MOG104_A2G_Spt	AIGEGKVTI	26
MOG104_A2G_Spt	AIGEGKVTI	26
MBP29_G_Spt	FLPRHRDTG	35
MBP75_G_Spt	RSQPGLCNM	27
MBP169_G_Spt	KGVDAQGTL	36
MBP244_A2G_Spt	SLSRFSWGA	28
MOG38_G_Spt	RHPIRALVG	31
MOG42_G_Spt	RALVGDEVEL	32
MOG44_G_Spt	FSRVVHLYRNG	37
MOG70_G_Spt	RPPFSRVVHL	38
MOG102_G_Spt	KDAIGEGKVTI	29
MOG104_A2G_Spt	AIGEGKVTI	26
MOG157_A2G_Spt	VLLAVLPVL	2
MOG157_G_Spt	VLLAVLPVL	2
MOG163_G_Spt	VSPGVLVLL	39
MOG185_G_His	KLRAEIENL	40
MOG203_A2G_His	RVPCWKITL	41
MOG203_G_His	RVPCWKITL	41
PLP3_A2G_His	LLLECCARCL	33
PLP3_G_His	LLLECCARCL	33
PLP80_A2G_His	FLYGALLLA	42
PLP105_G_Spt	KTICGKGL	43
PLP127_G_His	RGQHQAHSI	44
PLP151_G_spt	KFVGITYAL	45

10

20

30

40

50

【図 1 0】 **V L L A V L P V L** 抗原を含有する本発明の組換えポリペプチド（「**M o g 1 5 7 _ A 2 G**」）による健常血液ドナーの **C D 8 T r e g** のアップレギュレーション。**A I M B i o l o g i c a l s** によって仲介された **i n v i t r o T r e g** 誘導は、以下のように実施された：健常ドナーの **P B M C** 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、**F i c o l l** 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 **1 2 0 0 x g** で 2 0 分間、ブレーキなしで遠心し、その後、中間層を回収し、1

x 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された。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、5%ヒトAB血清含有X-VIVO 15培地5ml中37℃で一晩保持された。翌日（d0）、細胞を計数し、X-VIVO 15完全培地（5%hAB血清及びサイトカインカクテル：20 ng/ml hIL-2、20 ng/ml hGM-CSF、10 ng/ml hIL-4及び10 ng/ml hTGF- β 1）中に、 3×10^6 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 μ lのX-VIVO完全培地（サイトカインカクテル及び5 μ g/mlのAIM Bio分子又は各対照を含む）を入れた12ウェルプレートの各ウェルに、 3×10^6 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 μ 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、及び12日目に、1mlの完全培地（サイトカイン含有）が添加された。13日目に、ELISPOTプレートのPVDF膜を50 μ l/ウェルのEtOH（35% v/v）で1分間活性化した後、200 μ lの滅菌蒸留水で5回洗浄した。プレートは、4℃にて100 μ 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 μ l PBSで5回の洗浄ステップを行った後、200 μ 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）及び陽性対照（LPSなど）を含む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。二次抗体を用意した。：0.5%BSA/1xPBS（1:1000希釈）中の1 μ g/ml aIL-10 ビオチン化抗体、及び西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビジン（0.5%BSA/PBS中に1:750希釈）、テトラメチルベンジジン溶液は0.45 μ mのフィルターを用いて濾過し、使用まで4度で保管した。細胞上清を除去し、100 μ lのPBSで5回洗浄した。最後余剰なバッファーをペーパータオルで除去した。25 μ lの希釈HRP-ストレプトアビジン（1:750）を各ウェルに加え、室温、暗所で1時間インキュベートし、続いて滅菌した1xPBSで5回洗浄した。100 μ lの濾過したTMB基質を、各々のウェルに15～25分間、青いスポットがみられるまで添加した。反応はウェルを水道水で丁寧に洗浄することにより停止させた。プレートのプラスチックのアンダーレインを取り出し、プレートの底面と側面を水道水で洗浄し、乾燥した。MOG157__A2G__Sptは、すべての健常血液ドナーの75%において、IL-10分泌Tregを少なくとも30%多く誘導した。

【図11】図8のコントロール実験であり、MOG47__Db__Gサロゲート分子処理によって総IgGが減少しないことを示す。製造者の使用説明書に従い、Easy-Titer（商標）ヒトIgG（ γ 鎖）アッセイキット（Thermo Fisher）を用いて総IgGを定量した。この実験は、図8と合わせて、選択的抗体応答が一本鎖MHC I b分子によって抑制され得ることを示す。

【図12A】精製一本鎖MHC I b分子の安定性。一本鎖MHC I b分子を精製した後、1回及び3回の凍結融解サイクル後、室温で5日間保存した後、及び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 μ 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、及びB) 1 μ gタンパク質を用いた2A12 aHLA-G抗体（1:1000）プロットを使用するaHLA-Gウェスタンプロットを、非還元条件下で行った。単量体及び二量体の両者が検出可能である。

【図12B】図12Aの続き。

【図13】一本鎖MHC I b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 μ gの各一本鎖MHC I b分子、又は対照分子としてモタビズマブを、PBS及び5x SYPRO Orange色素（原液5000x、終濃度：5x）で希釈し、体積25 μ lとした。StepOne Plus Software 2.3を用いて、StepOne Plus 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

10

20

30

40

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(T_m)の決定にはボルツマンシグモイド関数を用いた。

【図14】一本鎖MHC Ib分子はTregを用量依存的に誘導する。OT-Iマウスに、指示された量の一本鎖H2-K^bα1+2及びHLA-Gα3ドメイン構築物(ヒトβ2ミクログロブリン及び標記ペプチドを有する)、又は基剤(PBS)を腹腔内注射した。OvaはこれらのマウスにおいてOT-I 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、5μg/mlの標記ペプチド又は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、50μg及び500μgのマウス適合Ova-K^bGを注射したときに観察された。

【図15】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。3日間一本鎖MHC Ib分子の存在下で10⁶ OT-1/ml、2時間、37℃、125 rpmで振盪、OT-1:Panc02比は50:1。方法:脾細胞の単離と処理 OT-1/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を用いて3分間で赤血球を除去した。GMCSF 20ng/ml、IL-2 20ng/ml、及びIL-4 10ng/mlを含有し、Ova-K^bG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(10⁷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。ルシフェラーゼアッセイ(48時間) 滅菌96ウェル白色プレートを使用した。20μg/mlのOvaペプチド(SIINFEEKL)をPanc02 fluc+標的細胞にロードし、37℃、500 rpmで60分間振盪した。CD8+エフェクターT細胞とPanc02標的細胞(5000標的細胞)を50:1の割合で混合し、ルシフェリンを添加した。発光は0時間後、24時間後、48時間後に測定した。

【図16】EAE-ODC Ovaマウス由来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 Flow cytometry 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1α(IL-1α)、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)、及び腫瘍壊死因子α(TNFα)を同時に検出するために使用した。このアレイキットは各々のサイトカインに特異的な捕捉抗体でコートされていて、各々異なる蛍光強度を持った十の捕捉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25μL、未知の血清サンプル若しくは標準希釈液25μL、及びフィコエリトリン(PE)検出試薬25μL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の洗浄バッファで5分間洗浄し、遠心分離した。上清を除いたのち、ビーズペレットを200μLバッファに再懸濁した。サンプルはAttune(商標)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17A】MOG誘導EAEモデルの脊髄の免疫蛍光解析を示す。A、B:MOG誘導EAE脊髄におけるカスパーゼ3の侵入、A:画像、B:定量。C、D:脊髄中のMOG誘導EAE白質における病変、C:画像、D:定量。E、F:MOG誘導EAE脊髄におけるCD3の侵入、E:画像、F:定量。

【図17B】図17Aの続き。

【図17C】図17Bの続き。

【図 1 7 D】図 1 7 C の続き。

【図 1 7 E】図 1 7 D の続き。

【図 1 7 F】図 1 7 E の続き。

【図 1 8】M O G 1 5 7 A 2 G 処理後の I L 1 0 スポットの増加。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 3】

定義及び一般的技術

下記に別段に定義されない限り、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、特許及び特許出願は、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り引用される。

10

【0 0 2 4】

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 C H O 細胞及び H E K 細胞のような哺乳動物細胞である。

【0 0 2 5】

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であることが理解されよう。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

【0 0 2 6】

また、本明細書で言及されるアミノ酸配列への任意の言及は、修飾されていないアミノ酸配列のみならず、C H O 細胞及び H E K 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若しくは脱アミド化、特定のアミノ酸のクリッピング、又は他の翻訳後修飾）も包含することを意図するものであることも理解される。

30

【0 0 2 7】

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。

【0 0 2 8】

また本発明の組換えポリペプチドは、可溶性又は膜結合型の形態をとり得ることも理解されよう。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 9 5 % 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。

40

【0 0 2 9】

一本鎖 M H C 分子は、たとえば、- 8 0 ° C の P B S 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）、又は 2 0 ° C の 5 0 % グリセロール中で保存することができる。

【0 0 3 0】

本発明によれば、M H C 分子は好ましくはヒト M H C 分子である。

【0 0 3 1】

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。

【0 0 3 2】

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

50

にして調製しうるかは理解されるであろう。たとえば、 $[\alpha]1$ 及び $[\alpha]2$ 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及び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ペプチド溶出後の質量分析及び*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及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。

【0033】

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

10

【0034】

本発明によれば、本発明の組換えポリペプチド、医薬組成物及びキットは、好ましくは、ヒト患者における多発性硬化症(MS)、抗MOG抗体性疾患、そして抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎の治療における使用に適している。

【0035】

本発明によれば、本発明の組換えポリペプチド、医薬組成物及びキットは、好ましくは、たとえばヒト患者において、ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質(MAG)、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP1)に対する免疫耐性を誘導するのに適している。

20

【0036】

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

【0037】

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よう。従って、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なアミノ酸によってもたらされる長さは含まれない。

30

【0038】

本発明に従って、「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。

【0039】

方法及び技術

一般に、本明細書において別段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、クローニング法又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及び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。

40

【0040】

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

50

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。

【0041】

たとえば、MHCクラスⅡ分子、又は本発明の組換えポリペプチドと、ILT2及び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Ⅱ分子、又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。

10

【0042】

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(Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology 215. p. 403-410.; Altschul et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402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を自動的に調整する。一実施形態において、以下のパラメータが使用される: Max target sequences 10; Word size 3; BLOSUM 62 matrix; gap costs; existence 11, extension 1; conditional compositional score matrix adjustment。従って、配列に関連して使用される場合、「同一性」又は「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。

20

【0043】

本発明の医薬組成物の調製

30

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。

【0044】

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。従って、本発明の医薬組成物は、基剤、賦形剤及び／又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。

【0045】

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、及び投与経路によって決まり得る。

40

【0046】

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、当技術分野で得られている知見、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、当技術分野で得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。

【0047】

本発明のペプチド抗原

50

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。

【0048】

MHC分子上に提示され得るペプチドは、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; 及び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）。

【0049】

ペプチド抗原は当技術分野で広く知られている。一般的に、本発明のペプチド抗原は、MHC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分子又はポリペプチドに対して、好ましくは、前記MHCクラスIb分子又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を理解するであろう。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。

【0050】

ペプチド抗原の、MHCクラスIb分子との結合、又は本発明に従って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: 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; 及び
- Rock、Reits、Neefjes. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends Immunol. 2016 Nov; 37 (11): 724-737。

【0051】

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

【0052】

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。

【0053】

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、アンカー残基又は好ましいアミノ酸残基のいずれかを含む。

【0054】

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 AlphaFold. Nature 596, 583-589 (2021)。

10

20

【0055】

本発明において、ペプチド抗原はヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質(MAG)、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP1)に由来する。

【0056】

本発明のペプチド抗原の非アンカーアミノ酸残基は、ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質(MAG)、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP1)由来の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んでいてもよく、含んでいなくてもよいことが理解される。

30

【0057】

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からなる。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可能である。たとえば、一実施形態において、本発明のペプチド抗原は、ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質(MAG)、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP1)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。

【0058】

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。

40

【0059】

本発明の治療への応用

本発明の組換えポリペプチドは、多発性硬化症、抗MOG抗体性疾患、抗MOG抗体陽性視神経脊髄炎の治療に使用することができる。

【0060】

治療は、ミエリン特異的Treg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Treg(たとえば、CD8陽性Treg)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、又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。Treg(たとえばCD8陽性Treg)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。

50

【0061】

CD8陽性Tregは、CD4CD25Treg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; 及び

Niederlova, V., Tsyklauri, O., Chadimova, T. and Stepanek, O. (2021), CD8⁺Tregs revisited: A heterogeneous population with different phenotypes and properties. Eur. J. Immunol., 51:512–530. <https://doi.org/10.1002/eji.202048614>。

10

【0062】

これら(CD8陽性Treg)は、マウスにおいてCD122及び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及び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)。

20

【0063】

本発明による治療は、ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する自己抗体の血漿又は脳脊髄液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、治療開始前にミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する血漿又は脳脊髄液自己抗体を有する患者とすることができる。

【0064】

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、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質)をHEK293細胞又はCHO細胞で過剰発現させ、次いでその細胞を血清若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、細胞ベースアッセイ(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(重鎖及び軽鎖)、IgG-Fc(定常鎖)又は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)又は顕微鏡による免疫蛍光の視覚的な評価(CBA-IF)によって定量化され、多くの場合、滴定される。MOG抗体を検出する大多数の確立した細胞ベースのアッセイにおいて、218アミノ酸のMOGのA1アイソフォームが用いられるが、その代替手法である細胞外免疫グロブリンと膜貫通ドメインのみを有するMOGの切断型も試験された。酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)若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：

30

40

Waters, P., Pettingill, P. & Lang, B. Detection methods for neural autoantibodies. Handb. Clin. Neurol. 133, 147–163 (2016)。

【0065】

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)抗体についての詳細な総説は下記に記載されている：

50

Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. Nat Rev Neurol. 2019 Feb; 15 (2) : 89 - 102. doi: 10.1038/s41582-018-0112-x. PMID : 30559466.

【0066】

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。

【0067】

本発明の組換えポリペプチドの一部である配列の例：

任意のリーダーペプチド（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、MSRSVALAVLALLSLSGLEA（配列番号1）

ペプチド抗原：MHCクラスI [α] 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、VLLAVLPVL（配列番号2）（最も好ましい）

第1のリンカー：たとえば、GGGGSGGGGSGGGGS（配列番号3）又はGCGASGGGGSGGGGS（配列番号4）

【0068】

β2ミクログロブリン、たとえば：

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTPE
KDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM

（配列番号5、ヒトβ2ミクログロブリン）

第2のリンカー、たとえば：

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS（配列番号6）

【0069】

ヒトHLA-G、又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 [α] 1及び2ドメインのいずれかに由来する [α] 1及び2ドメイン、Y84はDTバリエーションにおいてCであってもよい

たとえばヒトHLA-G由来の [α] 1及び2ドメイン：たとえば

GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAH
AQTDRLNLQTLRGYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAA
QISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRA

（配列番号7）

又は：ヒトHLA-A2 [α] 1及び2ドメイン：たとえば

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAH
SQTHRVDLGLRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYALKEDLRSWTAADMAA
QTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRT

（配列番号8）

【0070】

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

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFFQKWAAVVPSGE
EQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL

(配列番号 9 ; H L A - G [α] 3 の配列)。

【 0 0 7 1 】

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 I L T 2 若しくは I L T 4 受容体相互作用に関連していることである：

DPPKTHVTHHPPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFFQKWAAVVPSGE
EQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL

10

【 0 0 7 2 】

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 (S K E G D G G I M S V R E S R S L S E D L ; 配列番号 2 0) を欠いた、短縮型のヒト H L A - G [α] 3 ドメインを使用してもよい、すなわち：

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFFQKWAAVVPSGE
EQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW

20

(配列番号 2 1) 、

【 0 0 7 3 】

第 X a 因子制限部位： I E G R T G T K L G P (配列番号 1 0)

S p o t T a g : P D R V R A V S H W S S C (配列番号 1 1)

M y c タグ： E Q K L I S E E D L (配列番号 1 2)

H i s タグ： H H H H H H * (配列番号 1 3)

スペーサー配列：たとえば N S A V D (配列番号 1 4) 又は G S。

【 0 0 7 4 】

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

30

【 0 0 7 5 】

40

50

【表 1】

[表1] 更なる好ましいペプチド抗原

ペプチド 抗原の由来	ペプチド配列	配列番号	備考
MAG	MVPDNCPEL	25	好ましくはヒトHLA-A2 [α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチドに用いられる
MOG	AIGEGKVTL	26	好ましくはヒトHLA-A2 [α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる
MBP	RSQPGLCNM	27	好ましくはヒトHLA-G由来の[α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる
MBP	SLSRFSWGA	28	好ましくはヒトHLA-A2 [α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる
MOG	KDAIGEGKVTL	29	好ましくはヒトHLA-G由来の[α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる
MOG	AIGEGKVTL	30	好ましくはヒトHLA-A2 [α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる
MOG	RHPIRALVG		好ましくはヒトHLA-G由来の[α]1及び2

10

20

30

		31	ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる
MOG	RALVGDEVEL	32	好ましくはヒトHLA-G由来の[α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる
PLP	LLLECCARCL	33	好ましくはヒトHLA-G由来の[α]1及び2ドメインを含む組換えポリペプチド構築物に用いられる

40

【0076】

本発明の組換えポリペプチドの例（任意のリーダーペプチドを含む）：

50

MSRSVALAVLALLSLSGLEAVLLAVLPVLGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVS
 GFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLFSKDWFSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPQKIVKWDRDMGG
 GSGGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAP
 WVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGCYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYD
 GKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRCCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLRADPPKTHVT
 HHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWAAVVPSGEEQRYTCHV
 QHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC*

10

(配列番号 15 ; アスタリスクは終止コドンの位置を表すことに留意されたい)。

【0077】

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：VLLAVLPVL）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ることであって、このペプチド抗原はヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）、ヒトミエリン塩基性タンパク質（MBP）、ヒトミエリン関連糖タンパク質（MAG）、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質（PLP1）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、ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）、ヒトミエリン塩基性タンパク質（MBP）、ヒトミエリン関連糖タンパク質（MAG）、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質（PLP1）のペプチドであるペプチド抗原（たとえば、配列番号 2、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 32、及び配列番号 33 のペプチド抗原のいずれか 1 つ）のペプチドであるペプチド抗原からなる配列と、それに続く以下の配列で構成され得る：

20

GCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLFS
 KDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPQKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRY
 FSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMN
 LQTLRGCYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRCCE
 ANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRD

30

GEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRS
 LSEDLGSPDRVRAVSHWSSC*

(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)。

これらの本発明の組換えポリペプチドは上記の例に示される選択的リーダーペプチドを含み得る。

40

【0078】

受容体 ILT2（LILRB1としても知られる）及び ILT4（LILRB2としても知られる）は、当技術分野で公知である。これらの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：

50

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRL
 YREKKTALWITRIPQELVKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVWTG
 AYIKPTLSAQSPVWNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRA
 IFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPEE
 TLTLQCGSDAGYNRFVLYKDERDFLQLAGAQPPAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGA
 HNLSSSEWSAPSDPLDILIAGQFYDRVLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFLLTKE
 GAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPVTSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVS
 GPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRLGVVIGILVAVLLLLLLLLLLF
 LILRHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQ
 PEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD
 TEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

10

(配列番号 17)

【0079】

ILT4:

MTPIVTVLICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAEPDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRL
 YREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGA
 YPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCLNSQPHARGSSRAI
 FSVGPVSPNRRWVSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGES
 LTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAH
 NLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAG
 AADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLELVSG
 PSMGSSPPPTGPSTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRLGVVIGILVAVLLLLLLLLLLF
 LILRHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQ
 PEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPISYATLAIH

20

30

(配列番号 18)

【0080】

ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP1) の配列は、当技術分野で公知である。ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG)、ヒトミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ヒトミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、若しくはヒトミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP1) の好ましいアミノ酸配列は、以下の通りである:

40

【0081】

ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG):

>NP_996532.2 myelin-oligodendrocyte glycoprotein isoform alpha1 precursor [Homo sapiens]

50

MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPGKNATGMEVGWYR
PPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRFSDGGFTCFRDHSYQEEAAM
ELKVEDPFYWVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLIFLCLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFRLRVPCWKIT
LFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF

(配列番号 19)

【0082】

ヒトミエリン塩基性タンパク質 (MBP) :

10

> NP_001020252.1 myelin basic protein isoform 1 [Homo sapiens]

MASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKVPWLKPGRSPL
PSHARSQPGLCNMYKDSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSR
FSWGAEGQRPFGYGGRASDYKSAHKGFGVDAQGTLSKIFKLGGDRSGSPMARR

(配列番号 22)

【0083】

ヒトミエリン関連糖タンパク質 (MAG) :

20

> NP_002352.1 myelin-associated glycoprotein isoform a precursor [Homo sapiens]

MIFLTALPLFWIMISASRGGHWGAWMPSSISAFEGTCVSIPCRFDFPDELRAVVHGVWYFNSPYPKNYP
PVVFKSRTQVVHESFQGRSRLGDLGLRNCTLLLSNVSPELGGKYFRGDLGGYNQYTFSEHSVLDIVNT
PNIVVPPEVVAGTEVEVSCMVPDNCPELRPELSWLGHGELGEPVGLGRLREDEGTWVQVSLHFVPTREA
NGHRLGCQASFPNTTLQFEGYASMDVKYPPVIVEMNSSVEAIEGSHVSLCGADSNPPPLLTWMRDGTVL
REAVAESLLEEEVTPAEDGVYACLAENAYGQDNRTVGLSVMYAPWKPTVNGTMVAVEGETVSILCSTQ
SNPDPILTIFKEKQILSTVIYESELQLELPAVSPEDDGEYWCVAENQYQQRATAFNLSVEFAPVLLLESH
CAAARDTVQCLCVVKSNPESVAFELPSRNVTVNESEREFVYSERSGLVLTSILTLRGQAQAPPRVICTA
RNLYGAKSLELPFQGAHRLMWAKIGPVGAVFAFALIAIVCYITQTRRKKNVTESPSFSAGDNPPVLFSS
DFRISGAPEKYESERRLGSERRLLGLRGEPELDLSYSHSDLGKRPTKDSYTLTEELAEYAEIRVK

30

(配列番号 23)

【0084】

ヒトミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP1) :

40

> NP_000524.3 myelin proteolipid protein isoform 1 [Homo sapiens]

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLINVIHAFQY
VIYGTASFFFLYGALLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLELVCH

CLGKWLGHDPKFKVGITYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTCSIAFPSKTSASIGSLCADARMYGVL
PWNAFPGKVCGSNLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAAATLVSLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTKF

50

(配列番号 24)

【0085】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに示される：

(実施例)

【実施例 1】

【0086】

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 μ g DNAを 2.5×10^6 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。

【0087】

Spot-Tagタンパク質の精製：Spot-Cap樹脂の平衡化：望ましいスラリー量を適当なチューブに移す、遠心分離(4 $^{\circ}$ C、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 $^{\circ}$ C、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。

【0088】

必要体積のビーズを上清に添加する、ローテーターで4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートする、遠心分離(4 $^{\circ}$ C、4分、2500g)を繰り返してビーズを洗浄する、上清を除去する。

【0089】

PBS中500 μ 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。

【0090】

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(15kDaカットオフ)を使用して、15kDaAmiconカットオフカラムによりタンパク質の濃縮及びSpotペプチドの除去を行う。

【0091】

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

【0092】

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及び密度勾配媒体(たとえばFicoll、又は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、ブレーキをかけず遠心分離し、その後、層の間の輪(interphase ring)を回収して1xPBS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。

【0093】

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 $^{\circ}$ Cで一晩おいた。

【0094】

翌日 (d 0)、細胞を計数し、X-VIVO 15 完全培地 (5% hAB 血清及びサイトカインカクテル: 20 ng/ml hIL-2、20 ng/ml hGM-CSF、10 ng/ml hIL-4 及び 10 ng/ml hTGF- β 1) 中に、 3×10^6 細胞/ml の細胞密度で再懸濁した。

【0095】

実験のために、最終体積 1000 μ l の X-VIVO 完全培地 (サイトカインカクテル及び 5 μ g/ml の AIM Bio 分子又は各対照を含む) を入れた 12 ウェルプレートの各ウェルに、 3×10^6 個の細胞を播種した。

【0096】

3 日目に 1 ml の完全培地 (サイトカイン含有) を添加し、6 日目に、5 μ g/ml の本発明の組換えポリペプチド又はその代用 (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 日目及び 12 日目に、1 ml の完全培地 (サイトカイン含有) を添加した。

【0097】

実験材料:

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含有): 10 ng/ml TGF- β 1、10 ng/ml IL-4、20 ng/ml IL-2、20 ng/ml GM-CSF

6 及び 12 ウェルプレート。

【0098】

2) ELISPOT

13 日目に、抗 hIL10 (クローン 9D-7、PBS 中 1:500 希釈、無菌濾過) 及び 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) 及び陽性対照 (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。

【0099】

PFD 膜を 50 μ l/ウェルの EtOH (35% v/v) で 1 分間活性化した後、200 μ l の滅菌蒸留水で 5 回洗浄した。プレートは、100 μ l/ウェルの抗体溶液で 4°C にて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 μ l PBS で 5 回の洗浄ステップを行った後、200 μ 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。

【0100】

DMSO 中のそれぞれの抗原ペプチド (たとえば MOG157)、又は対照としての DMSO を調製し、最終量の 5 μ g ペプチド/ml を添加して、最終体積 100 μ 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、及び刺激物質 (ウェルごとに総量 5 μ g/ml) を他のウェルに加え、37°C で一晩インキュベートした。

【0101】

層流フード外

二次抗体を調製した: 0.5% BSA/1x PBS 中 1 μ g/ml aIL-10 ビオチン化抗体 (1:1000 希釈) 及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)、テトラメチルベンジジン溶液を 0.45 μ m フィルターを用いて濾過し、使用するまで 4°C で保存した。

【0102】

細胞上清を除去し、100 μ 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。

10

20

30

40

50

10

20

30

40

G p 3 4 K b G

AVYNFATMGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKV
 EHSDFSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
 GPHSLRYFVTAVSRPGLGEPRYMEVGYVDDTEFVRFDSDAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKG
 NEQSFRVDLRTLLGCYNQSKGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGC DYIALNEDLKTWTAADMAAL
 ITKHKEWQAGEAERLRAYLEGTCVEWLRRLKNGNATLLRTPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEII
 LTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AWWVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIM
 SVRESRSLSEDL GSPDRVRAVSHWSSC

10

(配列番号47)の配列を有する100 μ gの組換えポリペプチド(「AIMBio」とも称される)を注射した。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。このエピトープは従来Gp33と命名されていたが、H2-Kb上に提示されるエピトープは、後にアミノ酸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-Kd上に提示される。)従って、本発明者らは、H2-Kb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、文献においてGp33及びGp34の命名法が曖昧に使用されている。配列番号47の最初の8アミノ酸が個々のペプチド配列を示す。2週間後、マウスを殺し、脾細胞を適合ペ
 プチド又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。

【実施例3】

【0109】

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-Kbにおいてオボアルブミンエピトープを認識するCD8+OT-I T細胞を養子移入すると、多くのMS症状及びMOGAD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 μ g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は実施例2に示す通りである。

30

【0110】

同じモデルにおいて、本発明者らは更に、対象の組織や細胞にも提示されている抗原ペプチドを用いることによって効果的なバイスタンダー免疫抑制を引き起こし得ることを示すことができた。ここでは、マウス当たり250 μ gの組換えポリペプチドサロゲート分子(「AIMBio」とも称される)が注射された(図5)。組換えポリペプチドサロゲート分子の配列は以下の通りであった。

40

【0111】

Mo g 4 4 _ D b G

FSRVVHLYRNGGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERI
EKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGPHSMRYFETAVSRPGLEEPYISVG YVDNKEFVRFDSDAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKA
KGQEQWFRVSLRNLLGCYNQSAGGSHTLQQMSGCDLGSDWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAAD
MAAQITRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGF
YPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA A V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L M L R W S K E G D
GGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC

10

(配列番号 48)

【0112】

M o g 3 7 _ _ D b G

VGWYRSPFSRGCASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERI
EKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGPHSMRYFETAVSRPGLEEPYISVG YVDNKEFVRFDSDAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKA
KGQEQWFRVSLRNLLGCYNQSAGGSHTLQQMSGCDLGSDWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAAD
MAAQITRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGF
YPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA A V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L M L R W S K E G D
GGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC

20

(配列番号 49)

【実施例 4】

【0113】

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 C D 4 + T 細胞誘発性 E A E を選択的に予防する

30

0 日目に、33 μ g 又は 100 μ g の本発明の組換えポリペプチドのサロゲート分子 (「A I M B i o」) を腹腔内注射し、そして 100 μ l の M O G 3 5 - 5 5 ペプチド / C F A (完全フロイントアジュバント; 終濃度結核菌 H 3 7 R A 及びペプチド各 1 m g / m l) エマルジョンをそれぞれ左及び右の脇腹に皮下注射し、250 n g 百日咳毒素 (200 μ l P B S 中) を腹腔内注射した。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、M o g エピトープ (M o g 4 4 _ _ D b G) に対する寛容を誘導する A I M B i o サロゲート分子の単回注射は、E A E の症状を有意に軽減したが、対照ペプチド (G p 3 4) 又は非機能性 M o g ペプチド (M o g 3 7) 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 6)。このモデルでは、M o g 4 4 A I M B i o も脊髄における炎症及び C D 8 T 細胞の浸潤を予防した (図 7)。組換えポリペ

40

【0114】

このモデルにおいて、M o g 4 4 A I M B i o は、E L I S A で検証されたように、血清中の M O G 特異的自己抗体の形成も完全に阻止した (図 8 及び 11)。これは、本発明の組換えポリペプチドが、多くの場合 M O G に対する抗体応答を特徴とする M S 及び M O G A D の有効な治療薬となることを強く示すものである。従って、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。

【0115】

A I M B i o (33 又は 100 μ g) 投与マウスの血清中の M o g 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 E L I S A プロトコルで検出された。簡単に

50

述べると、ELISAプレートは、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のMog 35-55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又は抗マウス重鎖及び軽鎖HRP抗体を使用した。

【実施例5】

【0116】

MS及びMOGAD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Tregを誘導することができた。

10

【0117】

図9は、ヒトMS&MOGAD組換えポリペプチド候補のリストを示す。

【0118】

本発明者らの知見によれば、髓鞘ペプチド抗原及びHLA-G α 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。従って、VLLAVLPVL抗原（「Mog 157__A2G」とも呼ばれる；図10を参照）を含む本発明の組換えポリペプチドによって、すべての健常血液ドナーの75%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。

20

【実施例6】

【0119】

本発明の組換えポリペプチドの安定性及び効果に関するさらなる原理の証明

さらに、本発明者らは、本発明の組換えポリペプチド及びその代用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12及び図13にそれぞれ示すように、検証した組換えポリペプチドは凍結融解及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14）、用量依存的にT細胞溶解を阻害する（図15）。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16に示す。IL-10、及び場合によっては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 α 3ドメイン及び同族ペプチドが必要である。IL-2は、 α 3ドメインとは無関係に、同族ペプチドの細胞への提示に応じて誘導されると考えられる。IL-2はT細胞の活性化及び生存に必要である。

30

【実施例7】

【0120】

MOG耐性を誘導する本発明の組換えポリペプチドがアポトーシス（切断カスパーゼ3）、CD3+免疫細胞の浸潤、及び脊髄におけるミエリン病変を防ぐ。マウスモデルは図6に記載されている。

40

MOGによって誘導されたEAEモデルの脊髄の免疫蛍光解析

材料：

一次抗体

α CD3 iクローンCD3-12（1:100）；ラットモノクローナル（ラット抗ヒト、マウスとも交差反応する、Bio-rad）

α MBP（1:300、ウサギモノクローナル、MBL）

α 切断カスパーゼ3（1:400、ウサギモノクローナル、Cell Signaling）

50

DAPI (1 : 500、Sigma #D8417)

二次抗体

α -ウサギCy3 (赤色、1 : 300、Dianova #111-165-144)、
 α -ラットAF488 (緑色、1 : 300、Invitrogen)、又は α -ウサギCy3 (赤色、1 : 300、Dianova #112-165-167)

【0121】

プロトコル

冷凍切片を室温で5分温め、染色する部分をPaperpenで印をつけた後、アセトンで10分、マイナス20℃で固定する。

1 x PBSで3回洗浄する

1 x PBS中5% BSA + 0.2% Triton-X100 + 1% NGSで1時間ブロッキングする

一次抗体：1% BSA + 1% NGS + 0.2% Triton-X100、4℃で一晩

洗浄：1 x PBSで3回

二次抗体：1% BSA + 1% NGS + 0.2% Triton-X100、室温で1時間

洗浄：1 x PBSで3回

DAPI：1 x PBS中1 : 300、10分、室温

洗浄：1 x PBSで2回

Aquapolymountでマウントする。

【0122】

詳細な結果

図17A、B：カスパーゼ3活性化（アポトーシス）はMOG誘導されたEAE脊髄において抑制され得る。A：画像、B：定量。

図17C、D：脊髄のMOG誘導されたEAE白質における病変を防ぐことができる。

C：画像、D：定量。

図17E、F：MOG誘導されたEAEにおいて脊髄へのCD3の侵入を防ぐことができる。E：画像、F：定量。

【実施例8】

【0123】

MOG157_A2Gでの処理後のIL10スポットの増加

図18は、寛容原性Tregが誘導されたことを示すMOG157_A2Gでの処理後のIL10スポットの増加を示す。これは図10の代替的な図示である。

【0124】

産業上の利用可能性

本発明で使用する医薬組成物、ポリペプチド、核酸、細胞、及び製品は、産業上利用可能である。たとえば、それらは、医薬品の製造に、又は医薬品として、使用することができる。

10

20

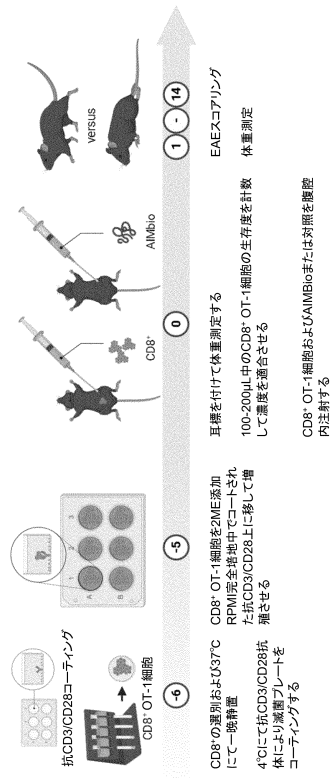
30

40

50

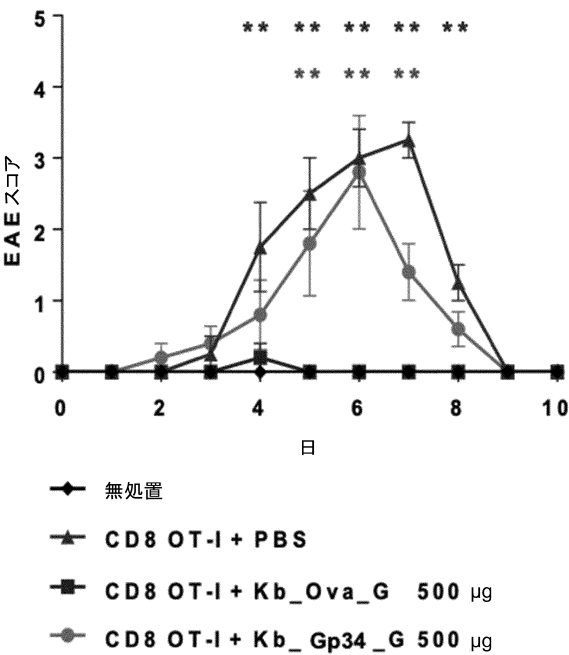
【図 4 A】

A



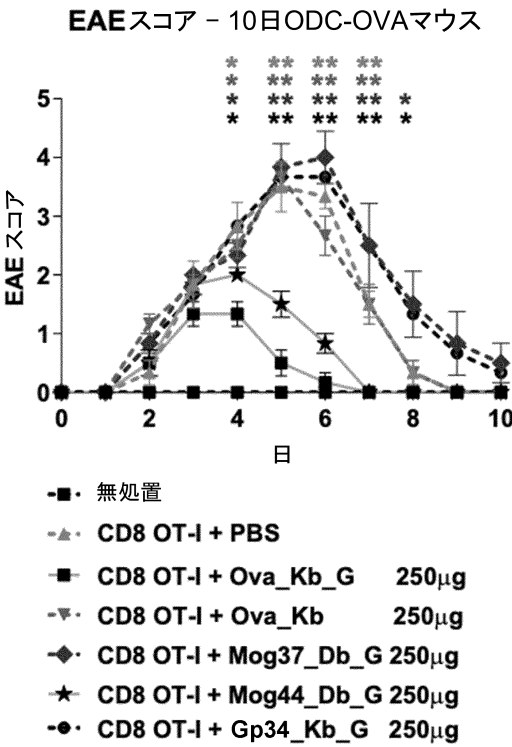
【図 4 B】

B



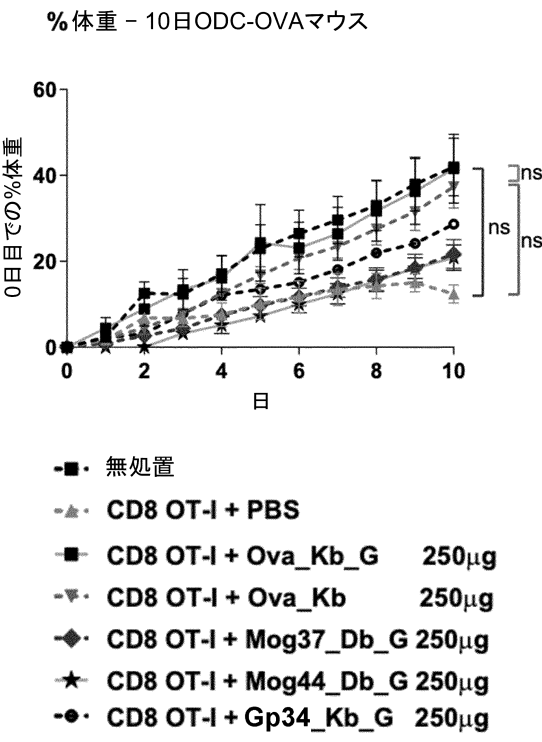
【図 5 A】

A



【図 5 B】

B



10

20

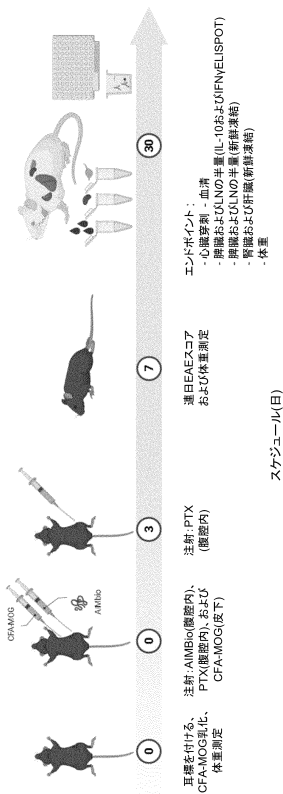
30

40

50

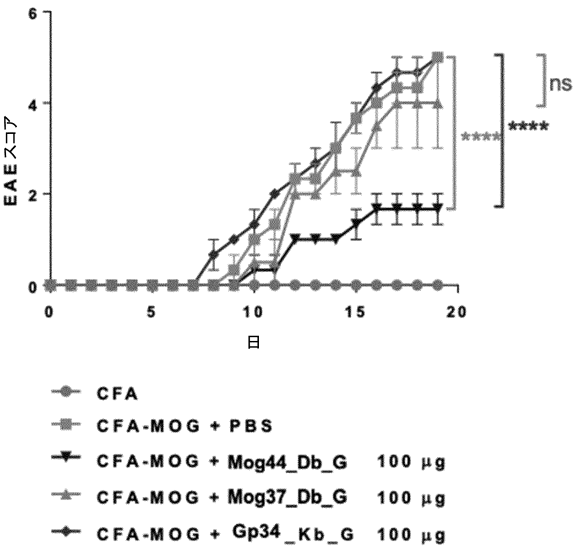
【図 6 A】

A



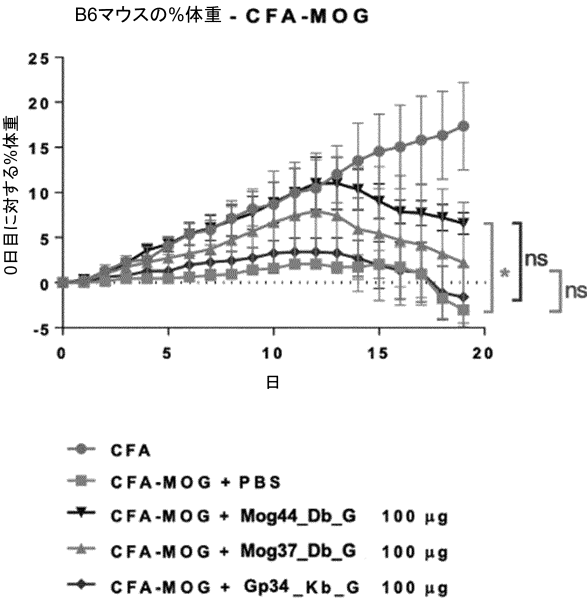
【図 6 B】

B



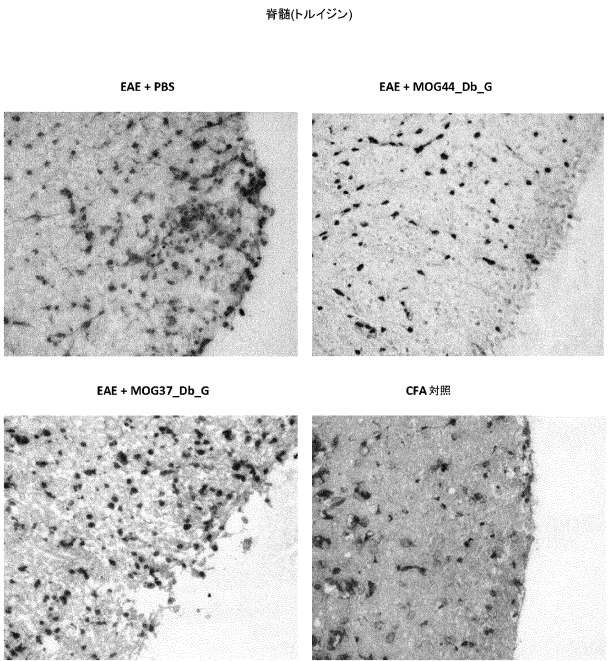
【図 6 C】

C



【図 7 A】

A



10

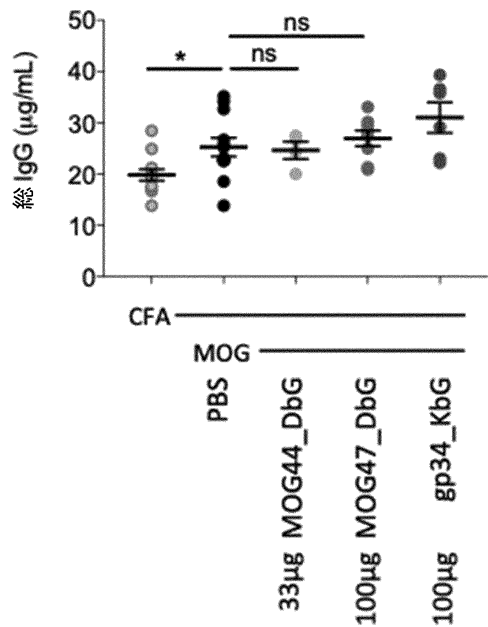
20

30

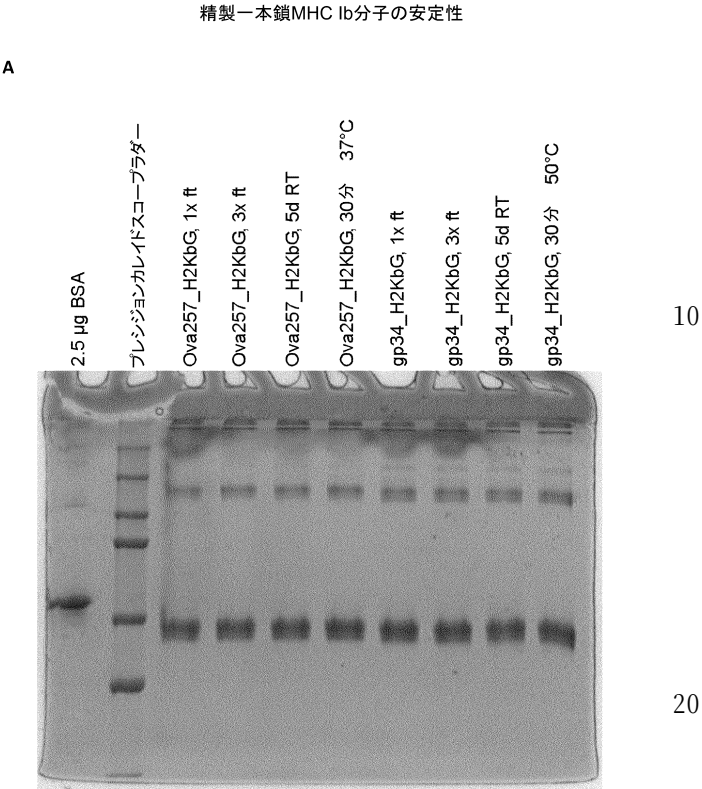
40

50

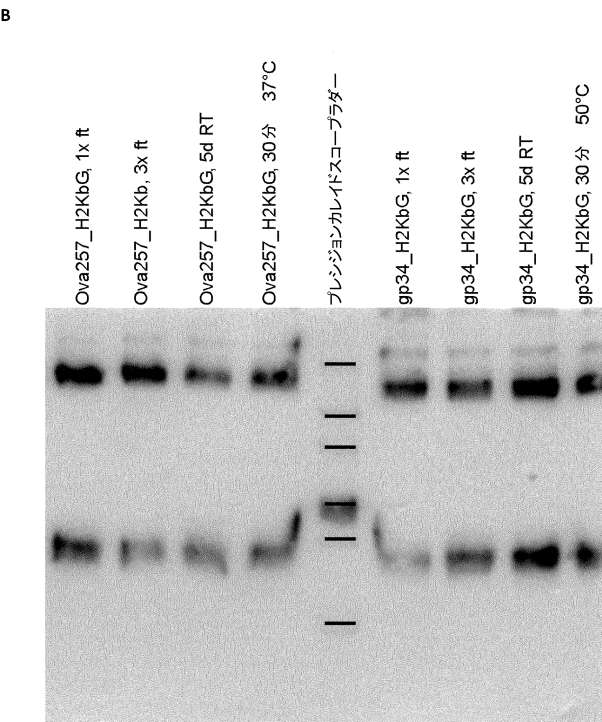
【図 1 1】



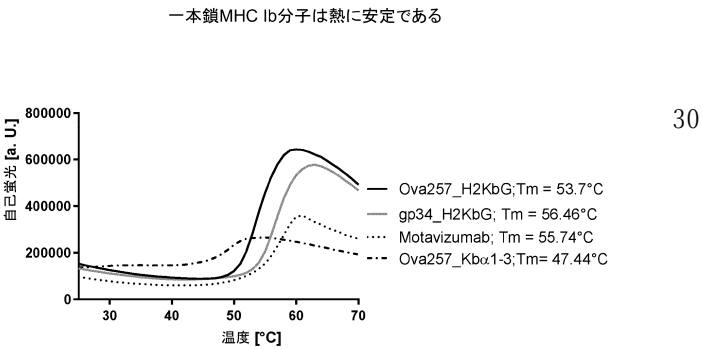
【図 1 2 A】



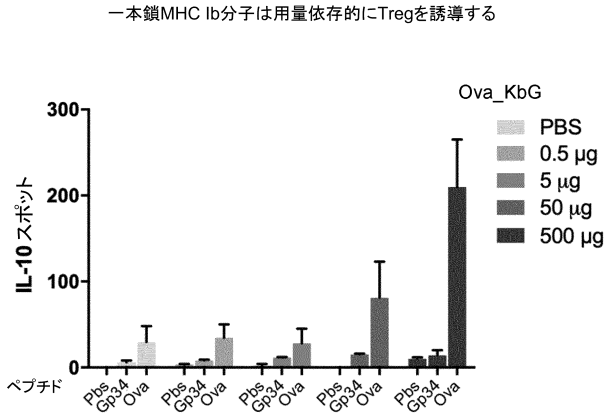
【図 1 2 B】



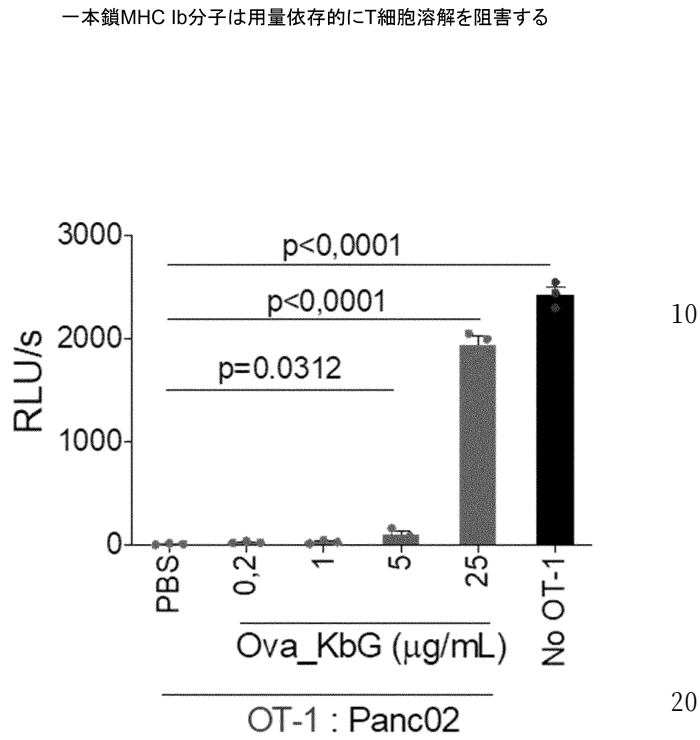
【図 1 3】



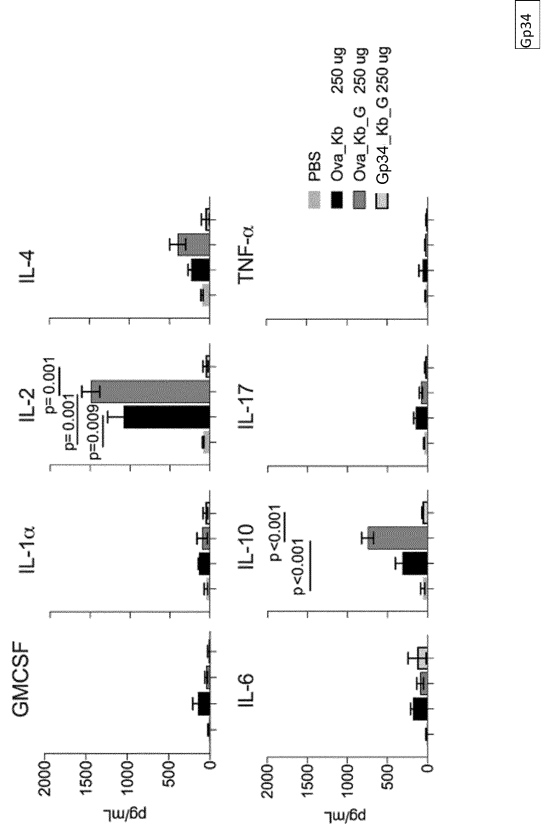
【図 1 4】



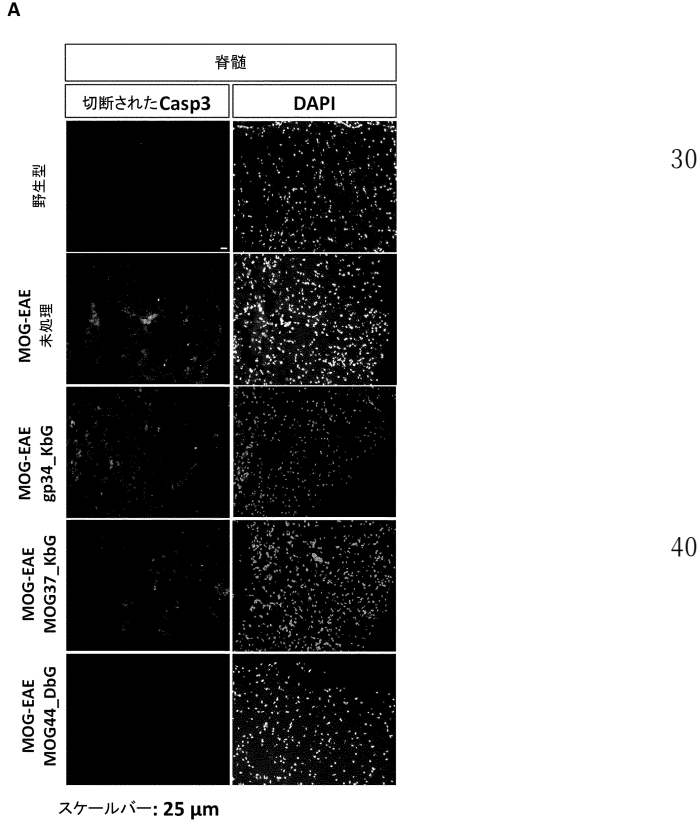
【図 1 5】



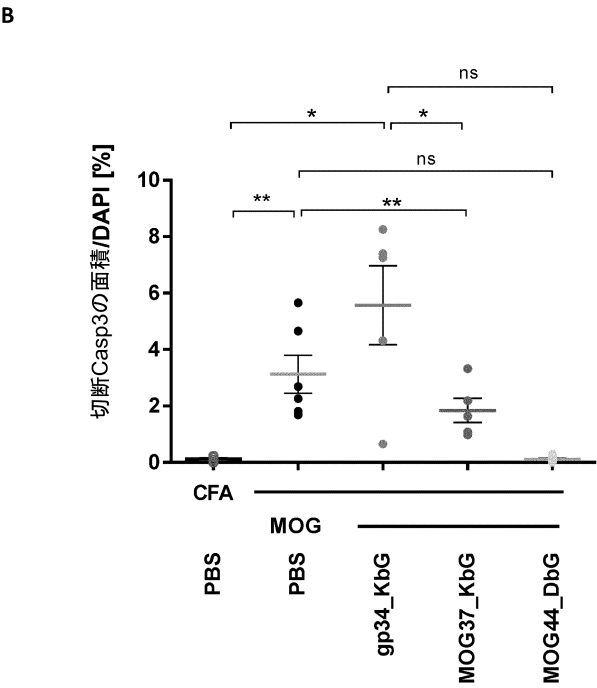
【図 1 6】



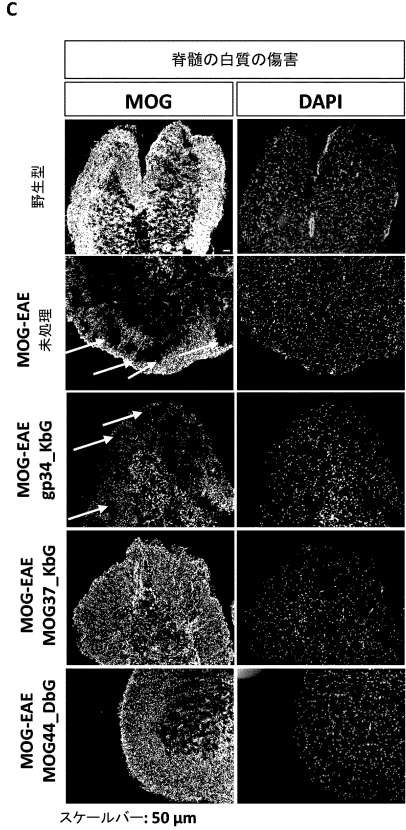
【図 1 7 A】



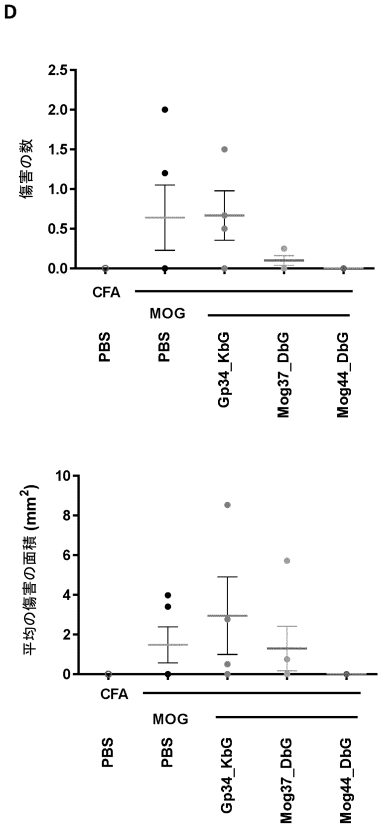
【図 1 7 B】



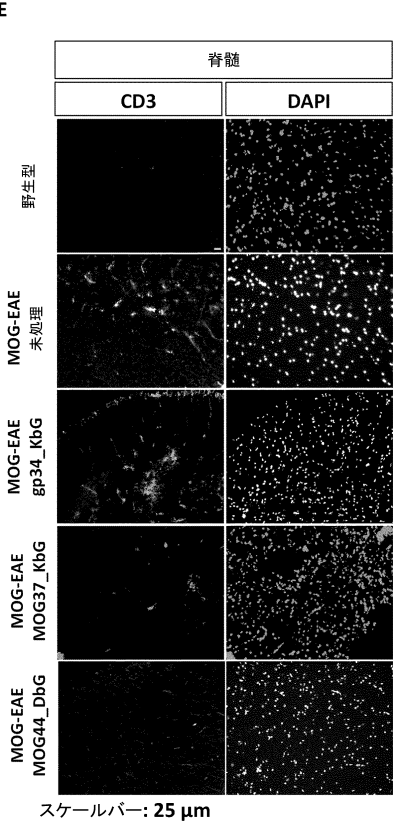
【図 1 7 C】



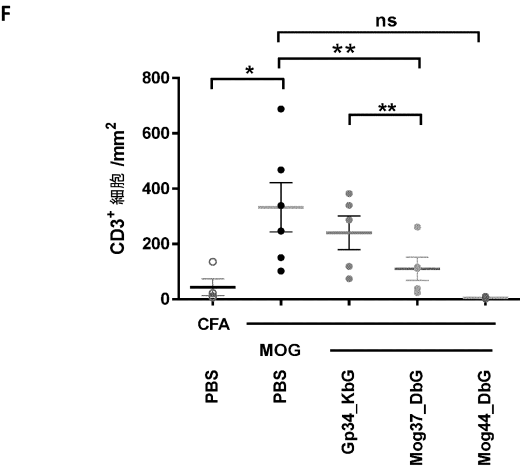
【図 1 7 D】



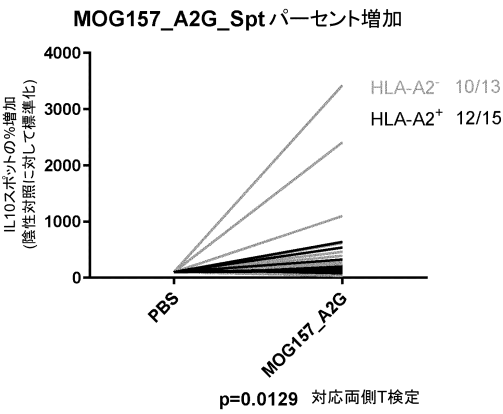
【図 1 7 E】



【図 1 7 F】



【図 1 8】



10

【配列表】

2025513720000001.xml

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2023/057679

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:

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/435 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/215340 A1 (BRUTTEL VALENTIN [DE]; UNIV WUERZBURG J MAXIMILIANS [DE]) 29 November 2018 (2018-11-29) the whole document in particular, claims 22 and 44 -----	1-46
Y	US 2020/138928 A1 (CHEN SWEY-SHEN [US]) 7 May 2020 (2020-05-07) the whole document in particular, paragraphs [0033], [0048], [0056] to [0057], [0097], and [0110] ----- -/--	1-46

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 2023

Date of mailing of the international search report

07/07/2023

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

Strobel, Andreas

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057679

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WISCHHUSEN JORG ET AL: "alpha-synuclein peptides presented on chimeric MHC class Ib molecules prevent loss of substantia nigra neurons in an animal model for Parkinson's disease", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 208, no. 1, 15 March 2022 (2022-03-15), XP055965217, Retrieved from the Internet: URL:https://www.jimmunol.org/content/208/1_Supplement/60.16> the whole document -----	1-46
A	TAJFIROUZ DEENA A. ET AL: "Clinical Characteristics and Treatment of MOG-IgG-Associated Optic Neuritis", CURRENT NEUROLOGY AND NEUROSCIENCE REPORTS, vol. 19, no. 12, 26 November 2019 (2019-11-26), XP93057252, New York ISSN: 1528-4042, DOI: 10.1007/s11910-019-1014-z Retrieved from the Internet: URL:http://link.springer.com/article/10.1007/s11910-019-1014-z/fulltext.html> the whole document -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/057679

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018215340	A1	29-11-2018	AU 2018274545 A1	05-12-2019
			CA 3063959 A1	29-11-2018
			CN 110945019 A	31-03-2020
			EP 3630809 A1	08-04-2020
			JP 2020521000 A	16-07-2020
			JP 2023052647 A	11-04-2023
			KR 20200021475 A	28-02-2020
			US 2020157175 A1	21-05-2020
			WO 2018215340 A1	29-11-2018

US 2020138928	A1	07-05-2020	NONE	

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 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
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 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	C
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	

,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. T R I T O N

- (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 ブリュンネルト, ダニエラ
ドイツ連邦共和国 9 7 0 7 8 ヴュルツブルク, ヴェルスバッハーシュトラッセ 2 6 3
- (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 シュトラッセ 3 0
- F ターム (参考) 4B064 AG20 AG31 CA10 CA19 CC24 CE09 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 BC01 BD14
CA24 CA44
4C084 AA02 AA03 BA02 NA14 ZA01
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA86 EA20 EA21 FA74
GA20