



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119110810 A

(43) 申请公布日 2024.12.10

(21) 申请号 202380029744.3

(22) 申请日 2023.03.24

(30) 优先权数据

22164161.6 2022.03.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/057684 2023.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/180549 EN 2023.09.28

(71) 申请人 尤利乌斯·马克西米利安维尔茨堡
大学

地址 德国维尔茨堡

(72) 发明人 瓦伦汀·布鲁塔尔

乔戈·维施胡森

施瑞娅·玛玛萨·贾亚拉姆

法德赫·阿赫桑

(74) 专利代理机构 北京市竞天公诚律师事务所
11770

专利代理师 李瑛琦 杨莹跃

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/74 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书23页 附图38页

(54) 发明名称

MHC Ib介导的水通道蛋白4 (AQP4) 特异性免疫抑制作为NMO的新型治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及非经典人类主要组织相容性复合体 (MHC) 分子 (也称为MHC Ib类分子) 与肽抗原组合用于治疗视神经脊髓炎 (NMO) 的治疗用途。本发明更具体地涉及包含肽抗原和非经典MHC Ib类分子的一个或多个结构域的重组多肽。本发明还涉及生产此类重组多肽的方法、包含此类重组多肽的药物组合物以及它们用于治疗视神经脊髓炎 (NMO) 的用途。

1. 一种能够呈递肽抗原的重组多肽,所述重组多肽按N端至C端顺序包含:
 - i) 被所述重组多肽呈递的肽抗原,其中所述肽抗原为人水通道蛋白4的肽;
 - ii) 可选地,接头序列;
 - iii) 可选地,人多肽结构域序列,所述人多肽结构域序列包含人 β 2微球蛋白序列,或与SEQ ID NO:5所示的人 β 2微球蛋白氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;
 - iv) 可选地,接头序列;
 - v) 可选地,MHC分子的 α 1结构域;
 - vi) 可选地,MHC分子的 α 2结构域;
 - vii) MHC Ib类分子的 α 3结构域或MHC Ib类分子的 α 3结构域的衍生物,所述衍生物能够结合ILT2或ILT4;
 - viii) 可选地,蛋白酶酶切位点;
 - ix) 可选地,间隔序列;和
 - x) 可选地,亲和标签。
2. 根据权利要求1所述的重组多肽,其中根据i)的所述肽抗原的长度为7至11个氨基酸,优选8-10个氨基酸。
3. 根据权利要求1或2所述的重组多肽,其中根据i)的所述肽抗原由选自如下组中的氨基酸序列组成,所述组由SEQ ID NO:2、22、23和24的氨基酸序列组成。
4. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(v)的所述 α 1结构域和根据(vi)的所述 α 2结构域来自人类MHC Ia类分子,优选人类HLA-A2分子,或来自人类MHC Ib类分子,优选人类HLA-G分子。
5. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)的MHC Ib类分子的 α 3结构域是人类HLA-E、人类HLA-F或人类HLA-G的 α 3结构域,优选人类HLA-G。
6. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 α 3结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 α 3结构域相同或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 α 3结构域具有至少80%氨基酸序列同一性、至少90%氨基酸序列同一性、至少92%氨基酸序列同一性、至少94%氨基酸序列同一性、至少96%氨基酸序列同一性、至少98%氨基酸序列同一性、或至少99%氨基酸序列同一性,或者与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 α 3结构域相同。
7. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(ii)的接头序列和/或根据(iv)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS)_n,其中n是等于或大于1的整数,并且其中n是选自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组中的整数,并且优选选自由2、3、4和5组成的组中。
8. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中根据(iii)的人多肽结构域的所述序列与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少95%相同,优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少98%相同,更优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列相同。
9. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽是二聚体或多聚体。
10. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至vii)组成,其中所述多肽不包含组分viii)至x),或者,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至x)组成。
11. 根据上述权利要求中任一项所述重组多肽,其还包含N端分泌信号肽序列。

12. 根据上述权利要求1-10中任一项所述的重组多肽,其中所述重组多肽由如下氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以N端至C端顺序由下述((a)和(b))组成:

- (a) 肽抗原,其选自由SEQ ID NO:2、22、23和24的氨基酸序列组成的组中,以及
- (b) SEQ ID No:16的氨基酸序列。

13. 根据上述权利要求中任一项所述的重组多肽,其中所述重组多肽是可溶的。

14. 一种核酸,其编码一种或多种根据上述权利要求中任一项所述的多肽,其中所述核酸优选为载体。

15. 一种药物组合物或试剂盒,包含至少一种根据权利要求14所述的核酸。

16. 一种药物组合物或试剂盒,包含至少一种根据权利要求1-13中任一项所述的重组多肽。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物或试剂盒,其中所述药物组合物或试剂盒包含至少两种不同的根据权利要求1-13中任一项所述的重组多肽,并且其中每种不同的多肽包含不同的如权利要求3中定义的肽抗原。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的药物组合物或试剂盒,其用于治疗人类患者的视神经脊髓炎的用途。

19. 根据权利要求18的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是通过免疫疗法进行治疗,并且其中所述治疗优选是通过诱导针对人水通道蛋白4的免疫耐受进行治疗。

20. 根据权利要求18-19中任一项的用于所述用途的治疗的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗用于降低血浆或脑脊液中抗人水通道蛋白4的自身抗体的水平,并且其中所述人类患者是在治疗开始前具有血浆或脑脊液中抗人水通道蛋白4的自身抗体的患者。

21. 根据权利要求18-20中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是通过诱导髓鞘特异性调节性T细胞进行。

22. 一种重组宿主细胞,包含根据权利要求14所述的核酸或载体,并表达根据权利要求1-13中任一项所述的重组多肽。

23. 一种获得包含根据权利要求1-13中任一项所述的多肽的药物组合物的方法,该方法包括以下步骤:(a) 在允许从核酸分子表达重组多肽的条件下培养根据权利要求22所述的重组宿主细胞,(b) 回收重组多肽,(c) 纯化重组多肽,和(d) 将重组多肽配制成药物组合物。

MHC Ib介导的水通道蛋白4(AQP4) 特异性免疫抑制作为NMO的 新型治疗方法

发明领域

[0001] 本发明涉及非经典人类主要组织相容性复合体(MHC)分子(也称为MHC Ib类分子)与肽抗原组合用于治疗视神经脊髓炎(NMO)的治疗用途。本发明更具体地涉及包含肽抗原和非经典MHC Ib类分子的一个或多个结构域的重组多肽。本发明还涉及生产此类重组多肽的方法、包含此类重组多肽的药物组合物以及它们用于治疗视神经脊髓炎(NMO)的用途。

[0002] 背景

[0003] 视神经脊髓炎(NMO)是一种中枢神经系统(CNS)脱髓鞘自身免疫性疾病,发病率介于0.05至0.4/100,000之间。其特征是症状与多发性硬化症(MS)相似。然而,多发性硬化症通常以复发缓解型病程为特征,而NMO患者很少出现缓解。此外,一些对MS患者有益的治疗方法对NMO无效,甚至可能加重病情。因此,NMO比MS更难治疗,并且通常进展更快。目前NMO的治疗策略侧重于复发预防或急性疾病复发的治疗。急性复发通常采用免疫抑制疗法治疗,例如糖皮质激素或血浆置换以去除自身反应性抗体。最近,抑制补体系统(eculizumab)或阻断炎症细胞因子(satralizumab)的治疗性抗体也已获批准。

[0004] 然而,不仅自身反应性免疫功能受到抑制,保护性免疫功能也受到抑制。这些功能对于保护患者免受病毒、细菌或肿瘤的侵害至关重要。因此,通常只能针对部分抑制。由于自身免疫性疾病通常在反复发作后恶化,因此需要付出大量努力来防止复发。然而,这种自身免疫性疾病的总体缓慢进展只能减缓而不能阻止。为了避免这种困境,一段时间以来,人们一直在尝试诱导针对自身反应性免疫细胞攻击的抗原的免疫耐受(抗原特异性免疫抑制,ASI)。

[0005] 到目前为止,至少在早期临床研究中,已经对两种策略进行了评估。与过敏中的脱敏策略类似,已经通过不同的途径施用大量抗原以诱导抗原特异性耐受性。然而,在自身免疫性疾病中,这些策略已引起严重的副作用,并且在临床上并未取得成功。通过抗原特异性调节性T细胞或抗原负载的耐受性树突状细胞的过继转移来诱导耐受性的尝试似乎更有前景。然而,这些策略极其复杂且昂贵,需要为每个患者提供符合GMP的生产和质量控制流程。因此,即使小规模临床试验取得了成功,在可预见的未来,许多患者是否可以接受过继转移疗法,仍是一个很大的疑问。

[0006] W02018/215340涉及MHC Ib类分子与肽的组合,用于靶向性治疗性的免疫调节。

[0007] 总之,仍然需要治疗视神经脊髓炎(NMO)的改良药物。

发明内容

[0008] 本发明人发现,人类MHC Ib类分子,例如HLA-G,具有诱导针对所呈递肽抗原的抗原特异性耐受性的能力。因此,尽管MHC Ib类分子的结构和序列与诱导抗原肽特异性免疫反应的经典人类MHC Ia类分子相似,但根据本发明,MHC Ib类分子可以有利地用于以抗原特异性方式抑制免疫反应。此外,本发明人发现,除天然存在的MHC Ib类分子之外的分子,特别是仅包含MHC Ib类分子的至少一个结构域、优选包含MHC Ib类分子的至少 $\alpha 3$ 结构域的

多肽,可用于如本发明所述的抑制免疫反应:各种Ia类分子的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域可以与人类MHC Ib类分子的 $[\alpha] 3$ 结构域组合,以抑制针对这些抗原所呈递的肽的免疫反应。

[0009] 负载有抗原的HLA-G分子可能不稳定。因此,发明人设计了可溶性重组多肽,其包含肽抗原、MHC Ib类分子(例如HLA-G)和 $\beta 2$ -微球蛋白(b2m),并将这三个成分共价连接(例如,通过共价接头)。或者,用其他MHC分子的相应结构域对MHC Ib类分子(例如HLA-G)的抗原结合 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域进行更换,以增强这些重组多肽的灵活性和多功能性(例如,参见图2)。这些替代的重组多肽可以与其他人类HLA分子的抗原结合结构域设计在一起。先前发现,包含小鼠H2-K^b的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域的构建体可以将卵清蛋白衍生的肽SIINFEKL呈递给OT-1T细胞。(OT-1T细胞表达特异性识别该抗原的转基因T细胞受体)(W02018/215340)。

[0010] 令人惊讶的是,发明人发现,通过使用本发明的重组多肽,可以抑制针对神经炎症自身抗原的免疫反应,并且可以诱导能够诱导针对人水通道蛋白4(AQP4)的耐受性的细胞。此外,利用已建立的神经炎症模型,发明人已证明这些多肽的替代分子(适用于小鼠)可用于治疗神经炎症疾病。因此,根据本发明,可以通过本发明的重组多肽治疗视神经脊髓炎(NMO)。

[0011] 发明人的实验数据表明,需要合适的肽抗原和MHC Ib类分子(例如HLA-G)的 $\alpha 3$ 结构域才能达到预期效果。因此,这种方法超越了之前描述的策略,这些策略要么在没有共刺激的情况下使用抗原肽(导致无反应性T细胞而非耐受性T细胞),要么在抗原非特异性环境中使用MHC Ib类分子。

[0012] 此外,根据本发明,本发明的重组多肽不仅调节T细胞反应,而且还防止水通道蛋白4(AQP4)特异性自身抗体的形成。预计这一优势将转化为对患有视神经脊髓炎(NMO)的人类患者的临床改善,因为水通道蛋白4(AQP4)特异性自身抗体与视神经脊髓炎(NMO)的病理有关。

[0013] 因此,本发明涉及以下的优选实施方案:

[0014] 一种能够呈递肽抗原的重组多肽,所述重组多肽按N端至C端顺序包含:

[0015] i) 被所述重组多肽呈递的肽抗原,其中所述肽抗原为人水通道蛋白4的肽;

[0016] ii) 可选地,接头序列;

[0017] iii) 可选地,人多肽结构域序列,所述人多肽结构域序列包含人 $\beta 2$ 微球蛋白序列,或与SEQ ID NO:5所示的人 $\beta 2$ 微球蛋白氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;

[0018] iv) 可选地,接头序列;

[0019] v) 可选地,MHC分子的 $\alpha 1$ 结构域;

[0020] vi) 可选地,MHC分子的 $\alpha 2$ 结构域;

[0021] vii) MHC Ib类分子的 $\alpha 3$ 结构域或MHC Ib类分子的 $\alpha 3$ 结构域的衍生物,所述衍生物能够结合ILT2或ILT4;

[0022] viii) 可选地,蛋白酶酶切位点;

[0023] ix) 可选地,间隔序列;和

[0024] x) 可选地,亲和标签。

[0025] 1. 根据第1项所述的重组多肽,其中根据i)所述的肽抗原的长度为7至11个氨基酸,优选长度为8至10个氨基酸。

[0026] 2. 根据第1或2项所述的重组多肽,其中根据i)的所述肽抗原由选自如下组中的氨

基酸序列组成,所述组由SEQ ID NO:2、22、23和24的氨基酸序列组成。

[0027] 3.根据上述任一项所述的重组多肽,其中所述肽抗原由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成。

[0028] 4.根据第1-4中任一项所述的重组多肽,其中所述肽抗原由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0029] 5.根据第1-3中任一项所述的重组多肽,其中所述肽抗原由SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成。

[0030] 6.根据上述任一项所述的重组多肽,其中根据(v)的所述 $\alpha 1$ 结构域和根据(vi)的所述 $\alpha 2$ 结构域来自人类MHC Ia类分子或来自人类MHC Ib类分子。

[0031] 7.根据上述任一项所述的重组多肽,其中根据(v)的所述 $\alpha 1$ 结构域和根据(vi)的所述 $\alpha 2$ 结构域来自人类MHC Ia类分子。

[0032] 8.根据第8项所述的重组多肽,其中根据(v)的所述 $\alpha 1$ 结构域和根据(vi)的所述 $\alpha 2$ 结构域来自人类HLA-A2分子。

[0033] 9.根据第7项所述的重组多肽,其中根据(v)的所述 $\alpha 1$ 结构域和根据(vi)的所述 $\alpha 2$ 结构域来自人类MHC Ib类分子。

[0034] 10.根据第10项所述的重组多肽,其中根据(v)的所述 $\alpha 1$ 结构域和根据(vi)的所述 $\alpha 2$ 结构域来自人类HLA-G分子。

[0035] 11.根据上述任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)的MHC Ib类分子的 $\alpha 3$ 结构域是人类HLA-E、人类HLA-F或人类HLA-G的 $\alpha 3$ 结构域。

[0036] 12.根据上述任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)的MHC Ib类分子的 $\alpha 3$ 结构域是人类HLA-G的 $\alpha 3$ 结构域。

[0037] 13.根据上述任一项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少80%氨基酸序列同一性,优选至少90%氨基酸序列同一性。

[0038] 14.根据第14项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID No:9或SEQ ID No:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少92%的氨基酸序列同一性。

[0039] 15.根据第14项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID No:9或SEQ ID No:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少94%的氨基酸序列同一性。

[0040] 16.根据第14项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID No:9或SEQ ID No:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少96%的氨基酸序列同一性。

[0041] 17.根据第14项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID No:9或SEQ ID No:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:21的 $\alpha 3$ 结构域具有至少98%的氨基酸序列同一性。

[0042] 18.根据第14项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 $\alpha 3$ 结构域或衍生物与具有氨基酸序列SEQ ID No:9或SEQ ID No:21的 $\alpha 3$ 结构域相同,或与具有氨基酸序列SEQ ID NO:9或

SEQ ID NO:21的 α 3结构域具有至少99%的氨基酸序列同一性。

[0043] 19.根据第14项所述的重组多肽,其中根据(vii)的 α 3结构域与具有氨基酸序列SEQ ID No:9或SEQ ID No:21的 α 3结构域相同。

[0044] 20.根据上述任一项所述的重组多肽,其中根据(ii)的接头序列和/或根据(iv)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS)_n,其中n是等于或大于1的整数。

[0045] 21.根据第21项所述的重组多肽,其中根据(ii)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS)_n,其中n是选自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组中的整数,并且优选选自由2、3、4和5组成的组中。

[0046] 22.根据第21或22项所述的重组多肽,其中根据(iv)的接头序列包含氨基酸序列(GGGGS)_n,其中n是选自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组中的整数,并且优选选自由2、3、4和5组成的组中。

[0047] 23.根据上述任一项所述的重组多肽,其中根据(iii)的人多肽结构域的序列与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少95%相同,优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少98%相同,更优选与SEQ ID NO:5的氨基酸序列相同。

[0048] 24.根据上述任一项所述的重组多肽,其中所述多肽是二聚体或多聚体。

[0049] 25.根据上述任一项所述的重组多肽,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至vii)组成。

[0050] 26.根据上述任一项所述的重组多肽,其中所述多肽不包含组分viii)至x)。

[0051] 27.根据第1至26项中任一项所述的重组多肽,其中所述多肽包含或由所有的组分i)至x)组成。

[0052] 28.根据上述任一项所述的重组多肽,其还包含N端分泌信号肽序列。

[0053] 29.根据第1-28项中任一项所述的重组多肽,其由如下氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以N端至C端顺序由下述((a)和(b))组成:

[0054] (a) 肽抗原,选自由SEQ ID NO:2、22、23和24的氨基酸序列组成的组中,以及

[0055] (b) SEQ ID No:16的氨基酸序列。

[0056] 30.根据上述任一项所述的重组多肽,其中所述重组多肽是可溶的。

[0057] 31.一种核酸,其编码一种或多种根据上述任一项的多肽。

[0058] 32.根据第32项的核酸,其中所述核酸是载体。

[0059] 33.一种药物组合物或试剂盒,其包含至少一种根据第32或33项的核酸。

[0060] 34.一种药物组合物或试剂盒,其包含至少一种根据第1-31项中任一项所述的重组多肽。

[0061] 35.根据第35项所述的药物组合物或试剂盒,其中所述药物组合物或试剂盒包含至少两种不同的根据第1-31项中任一项所述的重组多肽,其中每种不同的多肽包含不同的如第3至6项中任一项所定义的肽抗原。

[0062] 36.根据第34-36项中任一项的药物组合物或试剂盒,其用于治疗人类患者的视神经脊髓炎的用途。

[0063] 37.根据第37项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是通过免疫疗法进行治疗。

[0064] 38.根据第37-38中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗

是通过诱导针对人水通道蛋白4的免疫耐受。

[0065] 39. 根据第37-39中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗用于降低血浆或脑脊液中针对人水通道蛋白4的自身抗体的水平。

[0066] 40. 根据第37-40中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述人类患者是治疗开始前在血浆或脑脊液中存在针对人水通道蛋白4的自身抗体的患者。

[0067] 41. 根据第37-41中任一项的用于所述用途的药物组合物或试剂盒,其中所述治疗是通过诱导髓鞘特异性调节性T细胞。

[0068] 42. 一种重组宿主细胞,包含如第32或33项所述的核酸或载体,并表达如第1-31项中任一项所述的重组多肽。

[0069] 43. 一种获得包含根据第1-31项中任一项的多肽的药物组合物的方法,该方法包括以下步骤:(a) 在允许从核酸分子表达重组多肽的条件下培养第43项的重组宿主细胞,(b) 回收重组多肽,(c) 纯化重组多肽,和(d) 将重组多肽配制成药物组合物。

[0070] 附图简要说明

[0071] 图1:适合实现治疗性抗原特异性免疫调节的负载肽的可溶性MHC Ib分子的描述。

[0072] 所递呈的肽抗原用虚线球体表示,HLA-G α 1-3结构域以浅灰色表示, β 2微球蛋白白结构域以深灰色表示。连接抗原肽和 β 2微球蛋白分子的可选接头以灰色杆状样式表示,且可选的二硫键捕获以黑色球体表示。该图使用Pymol生成,根据Clements et al., Proc Natl Acad Sci US A. 2005Mar 1;102(9):3360-5和Hansen et al., Trends Immunol. 2010Oct; 31(10):363-9中发表的结构进行了修改。

[0073] 图2:基于载体的构建体示例,该构建体编码适用于治疗性肽特异性免疫调节的单链MHC Ib分子。

[0074] HLA-G1和HLA-G5各由3个 α 结构域(此处用黑色表示)、一个非共价结合的 β 2-微球蛋白亚基(此处用深灰色表示)和HLA-G上呈递的抗原肽(短黑色箭头)组成。HLA-G1还包含跨膜结构域和短胞内链(此处未显示)。如图所示, α 3结构域能够与免疫细胞上的受体ILT2(参见Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003July22;100(15):8856-8861)和ILT4(参见Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006Oct 31;103(44):16412-7)结合。在生理上,这些序列形成非共价连接的MHC1类复合物。为了简化复合MHC Ib分子的纯化,可以引入一个或多个蛋白质标签(例如SpotTag、myc标签和/或His(6x)标签)。以这样的方式引入这些标签,以便后续通过使用可选的Factor Xa裂解位点进行裂解来选择性地去除它们。此外,抗原肽、 β 2-微球蛋白和MHC Ib α 链可以按顺序连接起来,以提高稳定性。载体图使用Snapgene Viewer软件生成。

[0075] 图3:本发明重组多肽的替代分子可在小鼠中诱导分泌IL10的Treg

[0076] 在本实验中,将100 μ g由病毒(Gp34)或卵清蛋白(Ova)模型肽抗原、小鼠H2-K^b α 1和2结构域以及人类HLA-G α 3结构域和 β 2微球蛋白组成的替代分子腹腔注射到12周龄C57BL/6小鼠体内。14天后,处死小鼠,在48小时标准小鼠IL-10ELISpot测定中,用5 μ g/ml Gp34或Ova肽再次刺激脾细胞(Mabtech小鼠IL-10HRPELISpot试剂盒,在RPMI 10% FCS10ng/ml IL2中培养的培养细胞)。

[0077] 仅当通过替代分子注射诱导针对其的耐受性的肽再次刺激时,才会检测到分泌IL-10的调节性T细胞显著增加。(A) 实验设计;(B) 结果

[0078] 图4:本发明重组多肽的替代分子可在小鼠中预防CD8⁺T细胞驱动EAE。

[0079] 在该EAE小鼠模型中,模型抗原卵清蛋白(OVA)在髓鞘碱性蛋白(MBP)启动子(ODC-OVA)的控制下在少突胶质细胞中表达。这导致OVA257-264肽呈递到少突胶质细胞上的H-2Kb MHC分子上。OT-I小鼠在其CD8⁺T细胞上表达T细胞受体(OT-I),该受体可准确识别这种肽-MHC组合。当将这些小鼠的CD8⁺T细胞转移到10日龄的ODC-OVA小鼠中时,这些小鼠会患上实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE),其发病机制和症状在许多方面与MS相似(Na et al., Brain, Volume 131, Issue 9, September 2008, Pages 2353-2365)。在本实验中,同一天注射了500 μ g由病毒(Gp34)或卵清蛋白(Ova)模型肽抗原、小鼠H2-K^b α 1和2结构域以及人类HLA-G α 3结构域和 β 2微球蛋白组成的替代分子,或仅注射PBS。依据Bittner et al., J Vis Exp. 2014 Apr 15; (86):51275进行EAE评分。

[0080] 只有诱导卵清蛋白耐受性的替代分子几乎完全预防了EAE症状。(A) 实验设计; (B) 结果

[0081] 图5:本发明重组多肽的一些替代分子在小鼠中选择性地预防CD4⁺T细胞驱动EAE。

[0082] 在该模型中,通过施用MOG 35-55肽组合完全弗氏佐剂(可激活CD4⁺Th17细胞)和百日咳毒素(可使血脑屏障更具渗透性),可引发强烈的髓鞘特异性自身免疫反应(Protocol: Bittner et al., J Vis Exp. 2014 Apr 15; (86):51275)。在这里,CD4⁺细胞以及抗体在EAE的发展中起着至关重要的作用(Tigno-Aranjuez et al., J Immunol November 1, 2009, 183(9):5654-5661)。此外,第一天给每只小鼠注射100 μ g由病毒(Gp34)或两种Mog肽抗原(Mog37或Mog44)、小鼠H2-D^b α 1和2结构域、以及人类HLA-G α 3结构域和 β 2微球蛋白的替代分子或仅注射PBS。

[0083] 含有替代分子的Mog44肽显著减轻了EAE症状和体重减轻。

[0084] (A) 实验设计; (B) EAE评分; (C) 体重

[0085] 图6:本发明重组多肽的Mog44替代分子可预防脊髓中的炎症和CD8⁺T细胞浸润。

[0086] 10 μ m新鲜冷冻切片用市售的甲苯胺1 \times 染色试剂在室温下染色1小时。在EAE中检测到大量的免疫细胞浸润,但被Mog44_Db_G阻止。

[0087] 将10 μ m新鲜冷冻切片在室温下短暂干燥,用丙酮固定,用PBS中的5% BSA 10%正常山羊血清封闭,用1:100抗CD8抗体、与HRP和DAB溶液偶联的二抗染色(详细方法: Karikari et al., Brain Behav Immun. 2022 Jan 12; 101:194-210)。Mog35-55诱导的EAE导致CD8⁺细胞大量渗入脊髓,而Mog44_Db_G替代分子可阻止这一过程。

[0088] (A) 甲苯胺; (B) CD8-DAB

[0089] 图7:用本发明重组多肽的替代分子("AIM Bio")处理的Mog-EAE小鼠中抗MOG35-55抗体的检测

[0090] 小鼠被处死后,通过心脏穿刺收集小鼠血清。使用10 μ g/ml Mog35-55过夜包被,用1% BSA封闭孔板,然后使用指示的HRP偶联二抗检测到了抗MOG35-55抗体。

[0091] Mog35-55诱导的EAE与高水平的MOG35-55特异性IgG自身抗体相关,而用100 μ g Mog44_Db_G替代分子处理的动物中检测不到这种抗体。

[0092] 图8:人类NMO重组多肽候选物列表。

[0093] 图中所示的NMO重组多肽候选物的肽抗原序列如下:

[0094]	构建体	肽抗原	SEQ ID NO:
[0095]	hAQP4 42-50_HLAG Myc/His 标签	FLAMLIFVL	SEQ ID No: 31
[0096]	hAQP4 45-53_HLAG Myc/His 标签	MLIFVLLSL	SEQ ID No: 32
[0097]	hAQP4 65-72_HLAG Myc/His 标签	PLPVMVL	SEQ ID No: 33
[0098]	hAQP4 71-79_HLAG Myc/His 标签	VLISLCFGL	SEQ ID NO:22
[0099]	hAQP4 126-135_HLAG Myc/His标签	AIIGAGILYL	SEQ ID No:34
[0100]	hAQP4 127-135_HLAG Myc/His标签	IIGAGILYL	SEQ ID NO:23
[0101]	hAQP4 45-53_A2G Myc/His 标签	MLIFVLLSL	SEQ ID No: 32
[0102]	hAQP4 65-72_A2G Myc/His 标签	PLPVMVL	SEQ ID No: 33
[0103]	hAQP4 71-79_A2G Myc/His 标签	VLISLCFGL	SEQ ID NO:22
[0104]	hAQP4 126-135_A2G Myc/His 标签	AIIGAGILYL	SEQ ID No: 34
[0105]	hAQP4 127-135_A2G Myc/His 标签	IIGAGILYL	SEQ ID NO:23
[0106]	hAQP4 156-164_A2G Myc/His 标签	AGHLLVEL	SEQ ID No: 35
[0107]	hAQP4 238-247_A2G Myc/His 标签	IIGAVLAGGL	SEQ ID NO:24
[0108]	hAQP4 45-HLAG SPOTtag	MLIFVLLSL	SEQ IDNo:32
[0109]	hAQP4 36-43_HLAG SPOTtag	KAVTAEFL	SEQ ID No:36
[0110]	hAQP4 71-79_HLAG SPOTtag	VLISLCFGL	SEQ IDNO:22
[0111]	hAQP4 64-72_HLAG SPOTtag	KPLPVMVL	SEQ IDNO:2
[0112]	hAQP4 71-79_A2G SPOTtag	VLISLCFGL	SEQ IDNO:22
[0113]	hAQP4 127-A2G SPOTtag	IIGAGILYL	SEQ ID NO:23
[0114]	hAQP4 238-A2G SPOTtag	IIGAVLAGGL	SEQ ID NO:24
[0115]	hAQP4 137-145_HLAG SPOTtag	VTPPSVVGGL	SEQ ID No:37

[0116] 图8进一步显示了AQP4肽和抗原呈递MHC I类 α 1和2结构域(HLAG=HLA-G,A2G=HLA-A2呈递结构域+HLA-G α 3结构域)的哪些组合可于生产、质量控制和在健康献血者中的优先级方面产生成功(高)、中级(平均,av.)或不佳(低)的结果(如图9所示)

[0117] 图9:含有KPLPVMVL抗原(“AQP_64”)的本发明重组多肽上调健康献血者体内的CD8 Treg

[0118] 含肽-HLA-G的构建体(AIM Biologicals)介导的体外Treg诱导按如下步骤进行:使用Ficoll对来自白细胞减少室的白细胞进行密度离心,纯化健康供体的PBMC。细胞以 $1200 \times g$ 不间断离心20分钟,然后收集中间相环,用 $1 \times$ PBS清洗(5分钟, $300 \times g$)。PBMC冷冻备用。

[0119] 在PBMC脉冲(d-1)前1天将PBMC解冻,并6孔板孔中在含有5%人AB血清的5ml X-VIVO 15培养基中 37°C 保存过夜。

[0120] 第二天(d0),计数细胞并将其悬浮在X-VIVO 15完全培养基(5%hAB血清和细胞因子混合物:20ng/ml hIL-2,20ng/ml hGM-CSF,10ng/ml hIL-4和10ng/ml hTGF-b1)中,细胞密度为 3×10^6 细胞/ml。实验时,将 3×10^6 个细胞接种到12孔板的相应孔中,终体积为1000 μ l X-VIVO完全培养基,其中含有细胞因子混合物和 $5\mu\text{g/ml}$ AIM Bio分子或相应对照。

[0121] 第3天,加入1ml完全培养基(含细胞因子),第6天,加入 $5\mu\text{g/ml}$ AIM Bio分子进行第二次脉冲(移除培养基后)。第7、10和12天,加入1ml完全培养基(含细胞因子)。

[0122] 第13天,用50 μ l/孔EtOH(35%v/v)活化ELISpot板PVDF膜1分钟,然后用200 μ l蒸馏无菌水清洗5次。将板用100 μ l/孔的抗hIL10(克隆9D-7,在PBS中1:500稀释,无菌过滤)在4 $^{\circ}$ C下过夜包被。第二天,去除未结合的包被抗体,用200 μ l的PBS进行5步清洗,并加入200 μ l封闭缓冲液(X-VIVO 15 5%hAB血清),将板在室温下孵育30分钟-2小时。第14天,在ELISpot板上每孔接种200,000个细胞,一式两份,包括阴性对照(细胞加PBS)和阳性对照(例如LPS),孵育48小时。制备二抗:在0.5% BSA/1 \times PBS中的1 μ g/ml aIL-10-生物素化抗体(1:1000稀释)和辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素(以1:750在0.5% BSA/PBS中稀释),四甲基联苯胺溶液使用0.45 μ m过滤器过滤,并在4 $^{\circ}$ C下储存备用。去除细胞上清液并使用100 μ l的PBS清洗5次。使用纸巾去除最后多余的缓冲液。每孔加入25 μ l稀释的HRP-链霉亲和素(1:750),在室温下黑暗中孵育1小时,然后使用无菌1 \times PBS进行5次清洗。每孔加入100 μ l过滤的TMB底物,反应15-25分钟,直到出现蓝色斑点。用水彻底清洗孔以停止反应。除去板的塑料排水管,并用自来水冲洗板的底部和侧面并使其干燥。

[0123] AQP4_64_G_Spt在65%的健康献血者中诱导的分泌IL-10的Treg至少增加30%。

[0124] 图9续:在HLA-A2⁺和HLA-A2⁻供体(响应于AQP4_64_G_Spt处理)所示的PBMC中的IL10斑点增加百分比。

[0125] 图10:图7中所示样品的对照实验表明,MOG47_Db_G替代分子处理不会降低总IgG。根据制造商的说明,使用Easy-TiterTM人IgG(γ 链)检测试剂盒(Thermo Fisher)对总IgG进行定量分析。该实验与图7结合表明,使用单链MHC Ib分子可以抑制选择性抗体反应。

[0126] 图11:纯化的单链MHC Ib分子的稳定性。纯化单链MHC Ib分子后,在经过1次和3次冻融循环、室温下储存5天以及加热至50 $^{\circ}$ C 30分钟后分析其稳定性。为此,在非还原条件下,A)使用2 μ g AIM Bio在12%聚丙烯酰胺凝胶中进行考马斯凝胶染色,以及B)使用1 μ g蛋白质,应用2A12aHLA-G抗体(1:1000)印迹进行aHLA-G蛋白质印迹(Western Blot)试验。单体和二聚体均可检测到。

[0127] 图12:单链MHC Ib分子具有热稳定性。对于热位移分析(Thermal Shift Assay, TSA),将3 μ g的相应单链MHC Ib分子或Motavizumab作为对照分子用PBS和5 \times SYPRO Orange染料(原液5000 \times ,最终浓度:5 \times)稀释至25 μ l的体积。使用StepOnePlus软件2.3在StepOnePlus仪器上设置溶解曲线程序。起始温度为25 $^{\circ}$ C,持续一分钟,然后以每分钟1 $^{\circ}$ C的速度升温至最终温度95 $^{\circ}$ C,持续2分钟,从而以任意单位测量自发荧光。导出数据并在Prism V7.04中绘制图表。为了确定溶解温度(Tm),使用了Boltzman S形函数。

[0128] 图13:单链MHC Ib分子以剂量依赖性方式诱导Treg。OT-I小鼠腹腔注射指定量的单链H2_K^b α 1+2、HLA-G α 3结构域、人类 β 2微球蛋白和指定肽的构建体,或者载体(PBS)。在这些小鼠中,0va是OT-I TCR的同源肽,Gp34是无关的病毒衍生对照肽。14天后,处死小鼠,并在记忆免疫小鼠IL-10ELISpot中检测脾细胞中的IL10分泌细胞(每孔200,000个细胞, MabTech小鼠IL-10ELISpot试剂盒,添加5 μ g/ml指定肽或仅添加PBS,48小时)。当注射50和500 μ g小鼠适配0va_KbG时,观察到对0va肽有反应性的IL-10分泌细胞的明显诱导。

[0129] 图14:单链MHC Ib分子以剂量依赖性方式抑制T细胞裂解。处死OT1/BL6小鼠,收集脾细胞,在RPMI 5% FCS中清洗一次。用2ml的1 \times 无菌RBC裂解缓冲液去除红细胞3分钟。在含有GMCSF 20ng/ml、IL-220ng/ml和IL-410ng/ml以及剂量递增的0va_KbG的RPMI 10% FCS培养基中,将细胞高密度培养(10mio细胞/ml)72小时。然后从培养皿中刮下细胞,然后

通过磁珠纯化CD8⁺细胞。使用无菌96孔白板。用20 μ g/ml Ova肽(SIINFEKL)负载表达荧光素酶的Panc02靶细胞,在37 $^{\circ}$ C下以500rpm的速度振荡60分钟。以50:1的比例加入CD8⁺效应T细胞,以及荧光素。在24小时和48小时后测量发光。

[0130] 图15:来自EAE-ODC Ova小鼠的血清细胞因子。根据制造商的说明,使用Th1/Th210plex Flowcytomix试剂盒(eBioscience)测量EAE-ODC Ova小鼠血清细胞因子。该试剂盒用于在单个样本中同时检测小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素1 α (IL-1 α)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、 γ 白细胞介素-17(IL-17)和肿瘤坏死因子(TNF)。该阵列试剂盒提供八种具有不同荧光强度的捕获珠混合物,这些珠子已用针对每种细胞因子的特异性捕获抗体包被。将包被有十种特异性捕获抗体的珠子混合在一起。随后,将25 μ L混合捕获珠子、25 μ L未知血清样本或标准品稀释液、25 μ L藻红蛋白(PE)检测试剂依次加入96V底孔板的每个孔中,室温避光孵育2h。用1mL洗涤缓冲液洗涤样品5min,离心。弃去上清后,将珠子沉淀重悬于200 μ L缓冲液中。在AttuneTM NxT流式细胞仪上测定,并采用Attune流式细胞仪软件(Thermo Fisher Scientific)分析样品。

[0131] 图16:最优选的小鼠适应性AIM Bio的分子组成的图。

[0132] 相应的示例性氨基酸序列是:

[0133] MSRSVALAVLALLSLSGLEAVTTVHGNLGCASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAEN

[0134] GKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTEKDEY

[0135] ACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSLRYFVTAVSRPGL

[0136] GEPRYMEVGIVDDTEFVRFDSAEENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFR

[0137] VDLRTLLGCYNQSKGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGC DYIALNEDLKTWT

[0138] AADMAALITKHKWEQAGEAERL RAYLEGTCVEWLR RYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHH

[0139] PVFDYEATLRCWALGFYPAEII LTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWA AVVPS

[0140] GEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEG DGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID No:38)

[0141] 图17:经过纯化的、稳定性测试的NMO替代单链MHC Ib分子的考马斯凝胶。纯化单链MHC Ib分子后,在经过1次和3次冻融循环、室温下储存5天以及加热至50 $^{\circ}$ C温度30分钟后分析其稳定性。方法参见图11。

[0142] 图18:经过纯化和稳定性测试的NMO替代单链MHC Ib分子的蛋白质印迹(2A12HLA-G5抗体1:5000)。两个实验都表明这些分子非常稳定,但AQP203_H2KbG更倾向于多聚化。

[0143] 图19:热位移分析(TSA)。上图得到的结果也在TSA中得到证实,其中多聚体在低温下会产生高自发荧光。

[0144] 图20:EAE评分。AQP147_KbG为接受治疗的2D2小鼠提供了对EAE的完全保护。在D0、D15和D30对小鼠注射了治疗组或对照组AIM Bios。根据表1中所述0-10的EAE评分系统每天对小鼠进行评估。未经治疗的小鼠在实验过程中出现了严重的EAE症状。1只未经治疗的小鼠在D14达到6分并被处死。在评估期间,其得分在剩余几天内被假定为6分。使用gp34_KbG的对照治疗未提供理想的保护>(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)

[0145] 图21:野生型和2D2小鼠视神经中的免疫细胞浸润。AQP147_KbG治疗抑制了视神经中的免疫细胞浸润。子图A(视神经)和子图B(脊髓)显示了从每个治疗组获得的CD3⁺和CD8⁺

荧光信号, DAPI图像描绘了每个切片中存在的总细胞核。对照组和未治疗组小鼠的视神经(子图C)和脊髓(子图D)中的 $CD3^+$ 和 $CD8^+$ T细胞数量明显更高。AQP203_KbG抑制免疫浸润的效果优于对照组和未治疗组。数据表示为平均值 \pm SEM。比例尺 $25\mu\text{m}$ 。单尾T检验。

[0146] 图22:野生型和2D2小鼠的视神经、脊髓和视网膜中裂解的胱天蛋白酶3的定量分析。AQP147_KbG完全抑制视神经、脊髓和视网膜中的细胞凋亡。图中显示了视神经(子图A、B)、脊髓(子图C、D)和视网膜(子图E、F)中裂解的胱天蛋白酶3(细胞凋亡标志物)染色获得的荧光信号。未经治疗和接受对照治疗的小鼠中裂解的胱天蛋白酶3水平最高,因此细胞凋亡水平最高。数据以平均值 \pm SEM表示。比例尺 $25\mu\text{m}$ 。单尾T检验

[0147] 图23:视神经中的 $CD8^+CD122^+$ 和 $CD4^+FoxP3^+$ 调节性T细胞。该图显示,虽然接受AIM治疗的小鼠体内的CD8T细胞更少,但在视神经中存在少量、却明显更多的调节性T细胞(使用单尾T检验)。

[0148] 图24:野生型和2D2小鼠中内层视网膜厚度的量化。AQP147_KbG完全挽救了IRL细胞免于降解。苏木精-伊红染色结果显示,AQP147_KbG的内层视网膜厚度得以保留,而未经治疗和对照治疗的小鼠的IRL较薄。数据表示为平均值 \pm SEM。比例尺 $25\mu\text{m}$ 。双尾T检验。

[0149] 发明详述

[0150] 定义和一般技术

[0151] 除非下文另有定义,否则本发明中使用的术语应按照本领域技术人员所知的通常含义理解。本文引用的所有出版物、专利和专利申请均以引用的方式全文并入本文,适用于所有目的。本文引用的出版物可通过在文中指定完整的文献参考来引用。

[0152] 本发明的所有蛋白质,包括本发明的重组多肽,均可通过本领域已知的方法获得。此类方法包括生产重组多肽的方法。本发明的重组多肽可在本发明的重组宿主细胞中表达。本发明的重组宿主细胞优选为哺乳动物细胞,例如CHO和HEK细胞。

[0153] 应理解,本发明的重组多肽意在可选地包括分泌信号肽序列。类似地,本发明的重组多肽意在也可选地包括亲和和标签,例如为了便于纯化,以及在标签和多肽之间的可选的蛋白酶酶切位点,例如为了便于通过蛋白酶酶切去除标签。

[0154] 还应当理解,本文中提及的任何氨基酸序列不仅意在涵盖未修饰的氨基酸序列,而且还意在涵盖本领域已知的细胞表达系统中发生的对于这些氨基酸序列的典型翻译后修饰(例如,氨基酸的糖基化或脱酰胺、特定氨基酸的剪切或其他翻译后修饰),包括哺乳动物细胞,例如CHO和HEK细胞。

[0155] 同样地,应当理解,本发明的重组多肽旨在可选地包括相应的前肽。

[0156] 还应理解,本发明的重组多肽可以是它们的可溶形式或膜结合的形式。重组多肽在这些条件下是否“可溶”可以通过本领域已知的方法确定,例如通过在上述参考条件下测量重组多肽的浊度。如本文所用的,可溶是指在这些参考条件下至少95%的重组多肽被确定为可溶的。

[0157] 单链MHC分子可以储存在,例如 -80°C , PBS中(根据蛋白质浓度,可以用或不用0.1%人血白蛋白作为载体),或 -20°C , 50%甘油中。

[0158] 根据本发明,MHC分子优选为人类MHC分子。

[0159] 本发明的重组多肽优选是分离的重组多肽。

[0160] 应理解如何制备能够结合并呈递肽抗原的根据本发明的重组多肽。例如,肽抗原

结合域如 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 域是众所周知的,并且可对这些域进行修饰。肽抗原结合本发明多肽和MHC分子的能力可通过本领域已知技术确定,包括但不限于探索性方法如MHC肽洗脱后进行质谱和计算机生物信息学预测,以及确证性方法,如MHC肽多聚体结合方法和刺激试验。

[0161] 根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒优选适用于人类患者。

[0162] 根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒优选适用于治疗人类患者的视神经脊髓炎。

[0163] 根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒优选适用于诱导针对人水通道蛋白4的免疫耐受性,例如,在人类患者中。

[0164] 应当理解,根据本发明,本发明的重组多肽、药物组合物和试剂盒是稳定的。

[0165] 应当理解,对于根据本发明使用的肽抗原,本文中提到的这些肽抗原的任何长度(例如“长度为7至11个氨基酸”)是指肽抗原本身的长度。因此,本文中提到的肽抗原的长度不包括不属于肽抗原的额外氨基酸所赋予的长度,例如来自可能的接头序列的额外氨基酸等。

[0166] 根据本发明,每次出现术语“包含”时可选地用术语“由……组成”替代。

[0167] 方法和技术

[0168] 通常,除非本文另有定义,本发明中所使用的方法(例如克隆方法或与抗体有关的方法)是根据本领域已知的程序进行的,例如Sambrook et al. (“Molecular Cloning: A Laboratory Manual.”, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989), Ausubel et al. (“Current Protocols in Molecular Biology.” Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992), and Harlow and Lane (“Antibodies: A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988), 中描述的步骤,所有这些文献均通过引用并入本文。

[0169] 蛋白质-蛋白质结合,例如抗体与其各自靶蛋白的结合,可通过本领域已知方法评估。蛋白质-蛋白质结合优选通过表面等离子体共振光谱测量来评估。

[0170] 例如,根据本发明的MHC Ib类分子或重组多肽与其受体,包括ILT2和ILT4,的结合,优选通过表面等离子体共振光谱测量来评估。更优选地,根据本发明的MHC Ib类分子或重组多肽与其受体的结合通过在25°C下的表面等离子体共振测量来评估。Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 July 22; 100(15): 8856-8861描述了此类表面等离子体共振测量的适当条件。

[0171] 本发明的序列比对是使用BLAST算法进行的(参见Altschul等人(1990) “Basic local alignment search tool.” Journal of Molecular Biology 215.p.403-410.; Altschul et al.: (1997) GappedBLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.)。适用于使用BLAST算法的短肽的序列比对的合适参数,其适用于根据本发明的肽抗原,是本领域已知的。大多数使用BLAST算法的软件工具自动调整短输入序列的序列比对的参数。在一个实施方案中,使用以下参数: Max target sequences 10; Word size 3; BLOSUM 62 matrix; gap costs: existence 11, extension 1; conditional compositional score matrix adjustment。因此,当与序列一起使用时,诸如“同一性”或“相同的”的术语优选是指使用BLAST算法获得的

同一性值。

[0172] 本发明的药物组合物的制备

[0173] 本发明的药物组合物是按照已知的药物组合物的制备标准来制备的。

[0174] 例如,药物组合物的制备方式应使其易于储存和施用。因此本发明的药物组合物可以包含药学上可接受的组分,例如载体、赋形剂和/或稳定剂。

[0175] 在将药物组合物施用于人类患者时,此类药学上可接受的组分所使用的药量上是无毒的。添加到药物组合物中的药学上可接受的组分可能取决于组合物中存在的活性成分的化学性质、药物组合物的特定预期用途和给药途径。

[0176] 一般而言,与本发明相关的药学上可接受的组分是根据本领域中现有的知识来使用的,例如来自Remington's Pharmaceutical Sciences,Ed.AR Gennaro,20th edition,2000,Williams&Wilkins,PA,USA。包含本发明的核酸(例如,RNA)的药物组合物也可以根据本领域中现有的知识来配制,例如使用靶向树突状细胞的脂质体制剂。

[0177] 根据本发明的肽抗原

[0178] 能够根据本发明进行使用的肽抗原,包括如上文所定义的肽抗原,除了其能在MHC分子上被递呈之外,没有特别的限制。应理解,与本发明相关的“被所述重组多肽呈递的肽抗原”是指所述重组多肽通过与人类T细胞上的T细胞受体结合的方式向人类T细胞(如果存在此类T细胞)呈递的肽抗原。

[0179] 如本领域已知的,可以生产能够在MHC分子上递呈的肽(参见例如Rammensee, Bachmann,Emmerich,Bachor,Stevanović.SYFPEITHI:database for MHC ligands and peptide motifs.Immunogenetics.1999Nov;50(3-4):213-9;Pearson et al.MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome.J Clin Invest.2016Dec 1;126(12):4690-4701;and Rock,Reits,Neefjes.Present Yourself!By MHC Class I and MHC Class II Molecules.Trends Immunol.2016Nov;37(11):724-737)。

[0180] 肽抗原是本领域公知的。通常地,根据本发明的肽抗原能够结合MHC I类蛋白。本领域技术人员会理解,对于根据本发明的能够递呈肽的每个MHC Ib类分子或多肽,将优选地使用能够与所述MHC Ib类分子或重组多肽结合的肽抗原。可以基于本领域已知的方法选择这些肽抗原。

[0181] 可以通过本领域已知的方法进行评估肽抗原与根据本发明的MHC Ib类分子或能够与肽抗原结合的多肽的结合,例如以下的方法:

[0182] Rammensee, Bachmann,Emmerich, Bachor,Stevanović.SYFPEITHI:database for MHC ligands and peptide motifs.Immunogenetics.1999Nov;50(3-4):213-9;

[0183] Pearson et al.MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome.J Clin Invest.2016Dec 1;126(12):4690-4701;和

[0184] Rock,Reits,Neefjes.Present Yourself!By MHC Class I and MHC Class II Molecules.Trends Immunol.2016Nov;37(11):724-737。

[0185] 这些方法包括实验方法和用于预测肽抗原结合的方法。

[0186] 用于将肽抗原锚定在MHC I类分子上并确保肽抗原与MHC I类分子结合的锚定残基是本领域已知的。

[0187] 在根据本发明所有实施方案的优选实施方案中,根据本发明使用的肽抗原在对MHC I类分子预测的位置上包含任意的锚定或优选的氨基酸残基。

[0188] 优选地,此类预测按照以下任一出版物中的描述进行:

[0189] -Rammensee et al,SYFPEITHI:database for MHC ligands and peptide motifs.Immunogenetics(1999)50:213-219

[0190] -Nielsen et al,Protein Sci(2003)12:1007-1017

[0191] -Neefjes et al.Nat Rev Immunol.2011Nov 11;11(12):823-36

[0192] -Diehl et al.Curr Biol.1996Mar 1;6(3):305-14,

[0193] -Lee et al.Immunity.1995Nov;3(5):591-600.

[0194] -Desai&Kulkarni-Kale,T-cell epitope prediction methods:an overview.Methods Mol Biol.2014;1184:333-64.

[0195] -Jumper et al.Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.Nature2021;596:583-589

[0196] 本发明中,所述肽抗原来自人水通道蛋白4。

[0197] 应理解,相对于来自人水通道蛋白4的肽抗原的相应氨基酸序列,本发明的肽抗原的非锚定氨基酸残基可以含有或不含有保守取代,优选不超过两个保守取代,更优选为一个保守取代。

[0198] 本发明的肽抗原优选由天然氨基酸组成。然而,也可以使用非天然氨基酸,例如修饰的氨基酸。例如,在一个实施方案中,本发明的肽抗原包括人水通道蛋白4的所示肽抗原氨基酸序列的拟肽(peptidomimetic)。

[0199] 肽抗原,包括根据本发明的肽抗原,的合成方法是本领域所熟知的。

[0200] 本发明的治疗应用

[0201] 本发明的重组多肽可以用于治疗视神经脊髓炎。

[0202] 治疗可以是通过诱导髓鞘特异性调节性T细胞进行的治疗。由于此类调节性T细胞(例如CD8阳性调节性T细胞)在髓鞘结构中被激活,它们赋予靶细胞保护,以抵御识别相同或另一种髓鞘抗原的细胞毒性T细胞。调节性T细胞(例如CD8阳性调节性T细胞)是本领域已知的,并且可通过其分泌IL-10来检测。

[0203] 尽管CD8阳性调节性T细胞并不像CD4CD25调节性T细胞那样广为人知,但它们甚至被认为更强效。参见,例如:

[0204] 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;和

[0205] 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

[0206] 虽然这些细胞的特征是在小鼠中表达CD122和CD8,但在人类中相应的细胞则被描述为CD8和CXCR3阳性。参见,例如:

[0207] Shi Z,Okuno Y,Rifa'i M,Endharti AT,Akane K,Isobe K,et al.Human CD8+CXCR3+Tcells have the same function as murine CD8+CD122+Treg.Eur J Immunol

(2009)39:2106-2119.doi:10.1002/eji.200939314)。

[0208] 根据本发明的治疗可以是降低血浆或脑脊液 (CSF) 中抗人水通道蛋白4的自身抗体水平的治疗。人类患者可以是在治疗开始前具有血浆或脑脊液 (CSF) 中抗人水通道蛋白4的自身抗体的患者。

[0209] 根据本发明,自身抗体可通过本领域已知的各种方法检测。优选方法是基于细胞的测定 (CBA),其中自身抗体的可疑靶抗原 (例如,水通道蛋白4) 在HEK293或CHO细胞中过表达,然后将所述细胞与血清或脑脊液一起孵育,通常在室温下孵育1小时。模拟转染的姊妹细胞用作对照。使用不同的荧光标记的抗人特异性二抗检测与细胞结合的自身抗体,这些二抗识别总人IgG (重链和轻链)、IgG-Fc (恒定链) 或IgG1。通过流式细胞术 (CBA-FACS) 或通过显微镜评估免疫荧光 (CBA-IF) 进行视觉评分来对结合进行量化,通常进行滴定。也可以使用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 或蛋白质印迹法等其他方法,但通常灵敏度较低,因为这些方法可能无法检测到构象敏感抗体。合适的方法已描述于:

[0210] Waters,P.,Pettingill,P.&Lang,B.Detection methods for neural autoantibodies.Handb.Clin.Neurol.133,147-163(2016)。

[0211] 检测AQP4特异性自身抗体的方法描述于:

[0212] 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-4water channel.J.Exp.Med.202,473-477(2005)。

[0213] 序列

[0214] 本申请中提及的优选氨基酸序列可独立地选自下列序列。这些序列以N末端至C末端的顺序表示;并以单字母氨基酸代码表示。

[0215] 示例性序列,其是本发明重组多肽的一部分:

[0216] 可选的前导肽 (由于细胞表达过程中的加工而从重组多肽中缺失): 例如MSRSVALAVLALLSLSGLEA (SEQ ID No:1)

[0217] 肽抗原:任何与MHC I类 α 1&2结构域相对应的MHC I类肽,例如KPLPVDML (SEQ ID No:2)

[0218] 第一接头:例如GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID No:3) 或GCGASGGGGSGGGGS (SEQ ID No:4)

[0219] β 2微球蛋白,例如:

[0220] IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSK DWSFYLLYY TEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM (SEQ ID NO:5,人类 β 2微球蛋白)

[0221] 第二接头,例如:

[0222] GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID No:6)

[0223] α 1和2结构域,源自人类HLA-G或任何其他适合呈递选定抗原肽的MHC I类 α 1&2结构域,DT变体中Y84可以为C,或者,Y84可以为A

[0224] 例如,源自人类HLA-G的 α 1&2结构域:例如

[0225] GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFRFIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNTK AHAQTDRMNLQTLRGCYNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGDYLDLALNEDLRSWTAADTAAQISK RKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLRQA (SEQ ID No:7)

[0226] 或者:人类HLA-A2 α 1&2结构域:例如

[0227] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKKV
AHSQTHRVDLGLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK
HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRT (SEQ ID No:8)

[0228] 人类HLA-G α 3结构域(或任何MHC I β α 3结构域,如HLA-F,其也与ILT2和ILT4受体相互作用),例如:

[0229] DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA $\overline{\text{AVVVP}}$
SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL (SEQ ID No:9;HLA-G α 3序列)。

[0230] 注意,该序列中以下带下划线的氨基酸与ILT2或ILT4受体相互作用相关:

[0231] DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA $\overline{\text{AVVVP}}$
GEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL

[0232] 此外,可以使用较短形式的人类HLA-G α 3结构域,其缺少来自内含子4的可选C端氨基酸序列(SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL;SEQ ID No:20),即:

[0233] DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA $\overline{\text{AVVVP}}$
SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW (SEQ ID No:21),

[0234] Xa因子限制位点:IEGRTGTKLGP (SEQ ID No:10)

[0235] SpotTag:PDRVRAVSHWSSC (SEQ ID No:11)

[0236] Myc标签:EQKLISEEDL (SEQ ID No:12)

[0237] His标签:HHHHHH* (SEQ ID No:13)

[0238] 间隔序列:例如NSAVD (SEQ ID No:14)或GS

[0239] 可作为本发明重组多肽的一部分的其它(替代)示例性肽抗原如下:

[0240] VLISLCFGL (SEQ ID NO:22),优选用于含有HLA-G α 1和2结构域的重组多肽;

[0241] IIGAGILYL (SEQ ID NO:23),优选用于含有HLA-A2 α 1和2结构域的重组多肽;

[0242] IIGAGILYL (SEQ ID NO:24),优选用于含有HLA-A2 α 1和2结构域的重组多肽;

[0243] 本发明重组多肽的实施例(具有可选的前导肽):

[0244] MSRSVALAVLALLSLSGLEAKPLPVDMLVCGGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN
CYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMG
GGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFSAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGP
EYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGCYNQSEASSHTLQWMI GCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDY LALNEDLRSW
TAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEM LQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFY
PAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA $\overline{\text{AVVVP}}$ SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSV
RESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC* (SEQ ID NO:15;注意,星号表示终止密码子)

[0245] 注意,上述全长重组多肽的肽抗原(此处:KPLPVDML)序列可由根据本发明的任何肽抗原序列替换,即由所述重组多肽所呈递的任何肽抗原替换,其中所述肽抗原是人水通道蛋白4的肽。也就是说,本发明的重组多肽可以由以下序列组成,所述序列的组成是,肽抗原,其是人水通道蛋白4的肽(例如,SEQ ID No:2、22、23和24的肽抗原中的任一种),随后是如下序列:

[0246] GCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN CYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSD
LSFSKDW SFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMGGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFSA

AVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGCYN
 QSEASSHTLQWMI GCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEG
 TCVEWLHRYLENGKEMLRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEII LTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGD
 GTFQKWA AVVVPSGEEQR YTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEG DGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC*(SEQ
 ID NO:16;注意,星号表示终止密码子)

[0247] 本发明的这些重组多肽也可以含有如上列举的可选的前导肽。

[0248] 受体ILT2(也称为LILRB1)和ILT4(也称为LILRB2)是本领域已知的。根据本发明,这些受体的优选序列如下:

[0249] ILT2:

[0250] MTPILTVL ICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKTAL
 WITRIPQELVKKGQFP IPSITWEHAGRYRCYYS DTAGRSESSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVNVSGGNVILQ
 CDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVL
 GVSKKPSLSVQPGPIVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDG ERDFLQLAGAQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYR
 CYGAHNLSSEWSAPSDPLDIL IAGQFYDRVSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMTFLLTKEGAADDPWRLRST
 YQSQKYQAEFPMGPVTSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGTSTSGPEDQPLTPTG
 SDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLFLILRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPA
 ADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPAV TYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD
 TEAAASEAPQDV TYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH(SEQ ID NO:17)

[0251] ILT4:

[0252] MTPIVTVL ICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAEPDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSAS
 WITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQC
 ESQVAFGGF ILCKEGEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPG
 VSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRC
 YGAHNLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAGAADAPLRLRSIH
 EYPKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGLNSDPYLLSHPSEPLELVVSGPSMGSSPPPTGP ISTPAGPEDQPLTPTG
 SDPQSGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLLLLLLFLILRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPA
 ADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQDV TYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPSIYATLAIH
 (SEQ ID No:18)

[0253] 人水通道蛋白4的序列是本领域已知的。人水通道蛋白4的优选氨基酸序列如下:

[0254] >sp|P55087-2|AQP4_HUMAN Isoform 1of Aquaporin-4S=Homo sapiens OX=9606GN=AQP4

[0255] MVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMLVLSLFCGLSIA

[0256] TMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVV

[0257] GGLGVTMVHGNLTAGHLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSIALAI GFSVAIGHL

[0258] FAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYVWGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRF

[0259] KEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGVVHVIDVDRGEEKKGDQSGEVLSS

[0260] V

[0261] (SEQ ID NO:19)

[0262] >sp|P55087|AQP4_HUMAN Aquaporin-4Isoform 2OS=Homo sapiens OX=9606GN

=AQP4 PE=1SV=2

[0263] MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLG-STINWG

[0264] GTEKPLPVDMLVLSLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFYIA

[0265] AQCLGAIIGAGILYLVTTPPSVVGGLGVTMVHGNTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDS

[0266] KRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYVWGP IIG

[0267] AVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSAAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGVVH

[0268] VIDVDRGEEKKGDQSGEVLSSV

[0269] (SEQ ID NO:29)

[0270] >NP_001304313.1aquaporin-4isoform M1x[Homo sapiens]

[0271] MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVD

M

[0272] VLISLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTTP

S

[0273] VVGGLGVTMVHGNTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTG

A

[0274] SMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYVWGP IIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSAAAQQTKGSYME

V

[0275] EDNRSQVETDDLILKPGVVHV IDVDRGEEKKGDQSGEVLSSVXLEDRTESRQDSLELSSDFLPPIKET

D

[0276] LL

[0277] (SEQ ID No:30;其中X可以是色氨酸、半胱氨酸、精氨酸或丝氨酸或终止密码子)通过下列非限制性实施例进一步说明本发明:

实施例

[0278] 实施例1:

[0279] 生产本发明的重组多肽的方法

[0280] Expi-293F细胞(Thermo Fisher),在Expi-293TM表达培养基(Thermo Fisher)中生长:使用ExpifectamineTM293转染试剂盒(Thermo Fisher),用Opti-MEM(Thermo Fisher)将DNA与Expifectamine复合,将1 μ g DNA转染到 2.5×10^6 个细胞/ml中,18-20小时后,根据方案添加增强剂,4-6天后收获上清液(37 $^{\circ}$ C、8% CO₂、加湿培养箱),在19mm²轨道摇床上以125rpm摇动培养。

[0281] -Spot-tag蛋白质纯化:Spot-Cap树脂的平衡处理:将所需量的浆液转移到适当的管中,通过离心(4 $^{\circ}$ C,4分钟,2500g)沉淀珠子,移除并丢弃上清液,向珠子中加入10倍床体积的PBS(冷),颠倒混合,通过离心(4 $^{\circ}$ C,4分钟,2500g)沉淀珠子,移除并丢弃上清液,重复2次。

[0282] -将所需体积的珠子添加到上清液中,在旋转器上4 $^{\circ}$ C孵育,通过反复离心(4 $^{\circ}$ C,4分钟,2500g)清洗珠子,并去除上清液。

[0283] -在PBS中制备500 μ M Spot肽溶液,除去上清液,与1/3rd Spot肽溶液孵育5-10分钟。

[0284] 通过离心沉淀珠子。使用Amicon Ultra-4离心过滤器(15kDa截止值)进行蛋白质浓缩,并使用15kDa Amicon截止柱去除Spot肽。

[0285] 用PBS冲洗Amicon Ultra-4离心过滤器(15kDa截止值),然后用0.1N NaOH(在4000g、4°C下离心)冲洗,以去除痕量甘油。

[0286] ELISPOT法:

[0287] 1) 细胞培养

[0288] A) PBMC分离(在层流罩下)

[0289] 为了分离外周血单核细胞(PBMC),使用来自白细胞减量室和密度梯度介质(例如Ficoll或ROTI Sep 1077)的白细胞进行密度离心。细胞以 $1200 \times g$ 不间断离心20分钟,然后收集间期环,用 $1 \times$ PBS(5分钟, $300 \times g$)清洗。PBMC冷冻直至进一步使用。

[0290] B) PBMC脉冲(在层流罩下)

[0291] 在PBMC脉冲(d-1)前1天将PBMC解冻,并在6孔板孔中,在含有5%人AB血清的5ml X-VIVO 15培养基中 37°C 保存过夜。

[0292] 第二天(d0)计数细胞并将其悬浮在X-VIVO 15完全培养基(5%hAB血清和细胞因子混合物:20ng/ml hIL-2,20ng/ml hGM-CSF,10ng/ml hIL-4和10ng/ml hTGF- β 1)中,细胞密度为 3×10^6 个细胞/ml。

[0293] 实验中,将 3×10^6 个细胞接种于12孔板的相应孔中,终体积为 $1000 \mu\text{l}$ X-VIVO完全培养基,其中含有细胞因子混合物和

[0294] $5 \mu\text{g/ml}$ AIM Bio分子或相应的对照。

[0295] 第3天,加入1ml完全培养基(含细胞因子),第6天,用 $5 \mu\text{g/ml}$ 的本发明重组多肽或其替代分子(统称为“AIM Bio”分子)进行第二次脉冲(去除培养基后)。第7、10和12天,加入1ml完全培养基(含细胞因子)。

[0296] 必需的:

[0297] X-VIVO 15培养基+5%人AB血清

[0298] X-VIVO 15完全培养基:X-VIVO 15培养基+2%人AB血清,补充细胞因子混合物:10ng/ml TGF- β 1,10ng/ml IL-4,20ng/ml IL-2,20ng/ml GM-CSF

[0299] 2) ELISPOT

[0300] 层流罩

[0301] 在第13天,使用抗hIL10(克隆9D-7,在PBS中1:500稀释,无菌过滤)和aIL10(10G8-生物素)包被ELISpot板,并在第14天,在ELISpot板上每孔接种200,000个细胞,一式两份,包括阴性对照(细胞加PBS)和阳性对照(例如,LPS)。

[0302] 用 $50 \mu\text{l}$ /孔EtOH(35%v/v)活化PFD膜1分钟,然后用 $200 \mu\text{l}$ 蒸馏无菌水清洗5次。将板用 $100 \mu\text{l}$ /孔抗体溶液在 4°C 下包被过夜。第二天,去除未结合的包被抗体,用 $200 \mu\text{l}$ PBS进行5步清洗,并加入 $200 \mu\text{l}$ 封闭缓冲液(X-VIVO 15 5%hAB血清),将板在室温下孵育30分钟-2小时。

[0303] 制备含有相应抗原肽的DMSO或DMSO作为对照,加入的肽最终量为 $5 \mu\text{g}$ 肽/ml,终体积为 $100 \mu\text{l}$ /孔。在含有5%人AB血清的X-VIVO 15培养基中每孔接种150,000个细胞。小心地除去封闭缓冲液(X VIVO 15培养基+5%hAB血清),将含有PBS的培养基作为阴性对照,并将刺激物(每孔总体积为 $5 \mu\text{g/ml}$)添加到其他孔中,并在 37°C 下孵育过夜。

- [0304] 层流罩外
- [0305] 制备二抗:在0.5%BSA/1×PBS(1:1000稀释)中的1μg/ml aIL-10-生物素化抗体和辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素(0.5%BSA/PBS中1:750),四甲基联苯胺溶液使用0.45μm过滤器过滤,并在4℃下储存备用。
- [0306] 去除细胞上清液,用100μlPBS清洗5次。最后用纸巾擦去多余的缓冲液。
- [0307] 每孔加入25μl稀释的HRP-链霉亲和素(1:750),室温下避光孵育1小时,然后用无菌1×PBS进行5步洗涤。
- [0308] 每孔加入100μl过滤后的TMB底物,反应15-25分钟,直至出现蓝色斑点。用自来水彻底冲洗孔以终止反应。
- [0309] 除去板的塑料排水管并用自来水冲洗板的底部和侧面并使其干燥。
- [0310] 使用ImmunoSpot S6 Ultra-V分析仪(Cellular Technology Limited)读取板子的数据,在Excel中进行分析,然后在Graphad Prism中绘制图表/统计数据。
- [0311] 必需的:
- [0312] 捕获抗体:抗hIL10(克隆:9D-7,Mabtech#3430-3-250;1:500稀释),抗hIL10-生物素化(Mabtech,#3430-6-250)
- [0313] 1×PBS(无菌)
- [0314] 35%乙醇(v/v)
- [0315] 封闭缓冲液:X-vivo 5%hAB血清(无菌)[在与细胞培养相同的培养基中进行封闭]
- [0316] 稀释缓冲液:PBS中的0.5% BAS
- [0317] 洗涤缓冲液:1×PBS
- [0318] 培养基:对于T细胞,X-VIVO 15培养基(Lonza)
- [0319] 过滤注射器:Millex GV
- [0320] ELISPOT PVDF板(#MSIP4510,Millipore)
- [0321] TMB底物
- [0322] 实施例2:本发明重组多肽的替代分子在小鼠中诱导分泌IL10的Treg
- [0323] 给野生型黑色6只小鼠注射100μg重组多肽(也称为“AIMBio”),其具有如下序列,
Ova_KbG
- [0324] SIINFEKLGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGER
IEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGP
HSLRYFVTAVSRPGLGEPYMEVGYVDDTEFVRFDSDAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDL
RTLLGCYNQSKGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGCYIALNEDLKTWTAADMAALITKHKEQAGEAE
RLRAYLEGTCVEWLRRLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVEL
VETRPAGDGTFFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGIMS VRESRSLSEDLGSPDRVRAVSH
WSSC(SEQ ID NO:25),
- [0325] 和
- [0326] Gp34_KbG
- [0327] AVYNFATMCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGER
IEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGP

HSLRYFVTAVSRPGLGEPYMEVGYVDDTEFVRFSDAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDL
 RTLLGCYNQSKGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGCYIALNEDLKTWTAADMAALITKHKWEQAGEAE
 RLRAYLEGTCEVWLRRLKNGNATLLRTPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVEL
 VETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDG GIMSVRESRSLSEDL
 GSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID NO:26) ,

[0328] 用于分别诱导针对OVA肽或病毒Gp34肽的耐受性。Gp34肽是一种特征明确的T细胞表位,源自淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)糖蛋白。虽然这种抗原传统上被称为Gp33,但后来发现H2-K^b上呈递的表位仅包含氨基酸34-41。(相反,H2-K^d呈递的表位从氨基酸33开始)。因此,我们将H2-K^b表位称为Gp34,这符合最新的建议。然而,文献中对Gp33和Gp34命名法的使用仍然是不清晰的。SEQ ID NO:26的前8个氨基酸显示正确序列。2周后,处死小鼠,并用匹配或不匹配的肽重新刺激脾细胞。采用ELIspot法对IL-10分泌细胞进行定量分析,结果如图3所示。

[0329] 实施例3:本发明重组多肽的替代分子在小鼠中选择性地预防CD8⁺T细胞驱动的EAE

[0330] 如(Na et al,Brain.2008Sep;131(Pt 9):2353-65.)所述,将可在H2-K^b背景下识别卵清蛋白表位的CD8⁺OT-IT细胞过继转移到其少突胶质细胞中表达卵清蛋白的小鼠中,导致实验性自身免疫性脑脊髓炎,其重现了许多MS和晚期NMO的症状。在该动物模型中,单次注射500μg诱导针对靶向卵清蛋白表位的耐受性的重组多肽替代分子(也称为“AIMBio”)几乎完全预防了EAE症状,而呈递对照肽的替代分子没有显著的保护作用(图4)。重组多肽替代分子的序列列于实施例2中。

[0331] 实施例4:本发明的一些重组多肽的替代分子在小鼠中选择性地预防CD4⁺T细胞驱动的EAE

[0332] 在腹腔注射33μg或100μg本发明重组多肽替代分子(“AIM Bio”)的当天,分别在左侧和右侧皮下注射100μl MOG35-55肽/CFA(完全弗氏佐剂;结核分枝杆菌H37RA和肽的最终浓度均为1mg/ml)乳剂,并在腹腔内注射250ng百日咳毒素(在200μl PBS中)。3天后进行第二次百日咳毒素注射。在该动物模型中,单次注射诱导针对Mog表位耐受性的AIM Bio替代分子(Mog44_Kb_G)可显著减轻EAE症状,而呈递对照肽(Gp34)或非功能性Mog肽(Mog37)的替代分子则无显著的保护作用(图5)。在该模型中,Mog44 AIM Bio还预防了脊髓中的炎症和CD8T细胞浸润(图6)。重组多肽替代分子的序列列于实施例2中或如下所示:

[0333] Mog44_DbG

[0334] FSRVVHLYRNGGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNG
 ERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
 PHSMRYFETAVSRPGLLEPRYISVGYVDNKEFVRFSDAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQE QWFRVSL
 RNLLGCYNQSAGGSHTLQQMSGCDLGS DWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAADMAAQITRRKWEQSGAAEH
 YKAYLEGECEVWLRRLKNGNATLLRTPPKTHVTHHPVFDYEATLRCW

[0335] ALGF

[0336] YPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSK
 EGDG GIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID No:27)

[0337] Mog37_DbG

- [0338] VGWYRSPFSRGCASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPS
 [0339] DIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVK
 [0340] WDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGPHSMRYFETA VSRPGLEEPYISVGYVDNKEF
 [0341] VRFDSAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNLG
 [0342] CYNQSAGGSHTLQQMSGCDLGSWRLLRGLYLFAYEGRDYIALNEDLKTWTAADMAA
 [0343] QITRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYE
 [0344] ATLRCWALGFYPAEIIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRY
 [0345] TCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDDGIMSRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID No:28)

[0346] 在该模型中, Mog44 AIM Bio还完全阻止了血清中MOG特异性自身抗体的形成, 如通过ELISA测试(图7; 另见图10的确认)。这有力地表明本发明的重组多肽是NMO的有效治疗方法, NMO通常以针对人水通道蛋白4的抗体反应为特征。因此, 患者群体由常见的自身免疫相关抗原所定义。某些MHC分子也与NMO相关。

[0347] 通过标准ELISA方案检测经AIM Bio (33或100 μ g) 处理的小鼠血清中的Mog反应性抗体, 每个步骤之间进行3次清洗。简而言之, ELISA 板用10 μ g/ml的MOG35-55肽包被, 用PBS1% BSA封闭, 然后加入在PBS1% BSA中按1:25稀释的小鼠血清, 持续1小时。使用按1:5000稀释的抗小鼠IgG-HRP或抗小鼠重链和轻链-HRP抗体进行检测。

[0348] 实施例5: 本发明的用于NMO的人类重组多肽候选物

[0349] 本发明的重组多肽是新开发的蛋白质复合物, 源自妊娠相关免疫抑制MHC分子HLA-G。HLA-G可能使胚胎能够影响母体免疫系统, 使其耐受胚胎抗原, 但进一步拮抗病原体抗原。含有各种肽的本发明重组多肽能够在试管中选择性消除肽特异性细胞毒性效应T细胞以及诱导肽特异性调节性T细胞。

[0350] 图8显示了人类MS&MOGAD重组多肽候选物的列表。

[0351] 发明人的研究表明, 含有AQP4肽抗原和HLA-G α 3结构域的单链蛋白可在健康献血者中诱导耐受性T细胞。因此, 65%的健康献血者中的CD8Treg上调至少30% (图9)。

[0352] 实施例6: 本发明的重组多肽的稳定性和效果的进一步概念验证。

[0353] 此外, 发明人着手获得并测试具有本发明重组多肽的一般结构但含有各种不同肽抗原的重组多肽, 以便获得进一步的概念验证, 即本发明的重组多肽及其替代分子是稳定和有效的。如图11和12分别所示, 测试的重组多肽在冻融和储存期间是稳定的, 并且是热稳定的。此外, 它们以剂量依赖性方式诱导Treg (图13) 并以剂量依赖性方式抑制T细胞裂解 (图14)。图15显示了重组多肽对EAE-ODC Ova小鼠血清细胞因子谱的影响。诱导了IL-10, 也可能诱导了IL-4, 两者都是已知的免疫抑制细胞因子, 在炎症环境中下调免疫反应。这需要HLA-G α 3结构域加上同源肽。IL-2的诱导似乎是向细胞呈现与 α 3结构域无关的同源肽时所引起的。IL-2是T细胞活化和存活所必需的。

[0354] 实施例7: 包含小鼠水通道蛋白抗原肽的重组肽在2D2 TCR转基因小鼠中的治疗效果。

[0355] 材料和方法

[0356] 实验模型

[0357] 2D2 TCR转基因小鼠被分成4个组。每个组至少由5只动物组成。WT (C57BL/6) 同窝小鼠属于第5组。实验期从2D2小鼠自发出现视神经炎时开始。疾病发作由视觉异常或血清

中抗MOG IgG水平升高来确定。在疾病发作的第二天,给小鼠注射(iv)如下处理中的一种:小鼠适应性单链MHC Ib分子AQP147_KbG(抗原肽:VTTVHGNL;SEQ ID No:39)/AQP203_KbG(抗原肽:FAINYTGASM;SEQ ID No:40),或对照AIM Bio Gp34_KbG。对照小鼠仅接受PBS。剂量设定为250 μ l,5mg/kg体重。对照或处理注射通过静脉注射给药(D0)。未处理的小鼠接受PBS。在第15和30天重复注射。每天称量小鼠并监测EAE症状(表1)。在研究期结束前处死EAE评分达到6分的小鼠。所有动物在第42天用CO₂处死。收获视神经、眼睛、脊髓、脑、血清和淋巴结并在-20 $^{\circ}$ C下冷冻保存。收集心脏血液并处理以进行血清分析。

[0358] EAE按照10分制评分系统进行评分(Bittner et al.,Journal of visualized experiments:JoVE, (86),51275)

[0359] 免疫组织化学

[0360] 切割20 μ m厚的眼睛连续切片,并用苏木精和伊红染色。简而言之,将冷冻切片在室温下干燥10分钟,并在苏木精染色溶液中染色10分钟。将组织切片在流水下冲洗10分钟,并在伊红染色溶液中染色30秒。然后依次将切片在70%、96%和100%乙醇中脱水30秒。随后,将切片与二甲苯孵育10分钟,并用Vitro Cloud封片。

[0361] 免疫荧光

[0362] 连续切割10 μ m厚的视神经纵向切片,用于免疫组织化学分析。用PBS中的4% PFA固定组织切片10分钟;然后用1 \times PBS中含有5% BSA、0.2% Triton-X100和5% NGS的缓冲液在室温下封闭2小时。用单一一种或适当组合的一抗在含有1% BSA、1% NGS和0.2% Triton-X100的染色缓冲液中将组织在4 $^{\circ}$ C下染色过夜。一抗为:i)大鼠抗小鼠CD3(1:200,Invitrogen);ii)大鼠抗小鼠CD8(1:200,Biorad);iii)兔抗裂解胱天蛋白酶3(1:400,Cell signaling)。用PBS清洗切片三次,并在室温下用相应的荧光标记二抗避光染色1小时:i)抗兔Cy3(1:300,Dianova);ii)抗大鼠AF488(1:300,Invitrogen)。用PBS清洗切片,并用DAPI(1:500,Sigma-Aldrich)在室温下避光染色DNA10分钟。最后清洗切片,并用aquapolymount(Polysciences)封片。使用蔡司AxioCam在20倍或40倍放大倍数下获得光学切片。

[0363] 免疫染色的量化

[0364] 使用ImageJ-Fiji Version 1.53t对免疫荧光图像进行量化。对每只动物,分析3-4个切片。将图像分成单独的通道并转换为8位图像。裂解的caspase-3染色的8位图像阈值设置为5MFI,DAPI染色的阈值设置为100。裂解的caspase-3覆盖的面积/DAPI覆盖的面积表示切片中裂解的caspase-3的百分比。

[0365] 质量控制和稳定性

[0366] 纯化单链MHC Ib分子后,在经过1次和3次冻融循环、室温下储存5天以及加热至50 $^{\circ}$ C 30分钟后分析其稳定性。为此,进行了A)使用2 μ g单链MHC-Ib分子在12%聚丙烯酰胺凝胶中进行考马斯凝胶染色,和B)在非还原条件下,使用2A12aHLA-G抗体(1:1000)、使用1 μ g蛋白质的 α HLA-G蛋白质印迹(Western Blot)试验。单体和二聚体均可检出。

[0367] 结果

[0368] 质量控制和稳定性

[0369] 质量控制和稳定性测试表明,两种NMO替代单链MHC Ib分子都非常稳定(图17-19)。然而,AQP203_H2KbG_spt似乎多聚化程度更高,这可以解释为什么它在某些检测中效果较差。

[0370] 治疗效果

[0371] 值得注意的是,用AQP147_KbG治疗可完全保护接受治疗的小鼠免受EAE的侵袭(图20),抑制视神经中的免疫细胞浸润(图21),并完全抑制视神经、脊髓和视网膜中的细胞凋亡(图22)。此外,虽然接受AIM治疗的小鼠体内CD8T细胞较少,但视神经中的调节性T细胞虽少,却明显增加(图23)。此外,AQP147_KbG完全防止了IRL(视网膜内层)细胞的退化(图24)。

[0372] 这些数据证实了本发明的重组多肽及其替代分子具有治疗效果。因此,根据本发明,本发明的重组多肽可用于治疗人类患者的视神经脊髓炎。

[0373] 工业实用性

[0374] 本发明所用的药物组合物、多肽、核酸、细胞和产品具有工业应用价值,例如,可用于制造药品或作为药品使用。

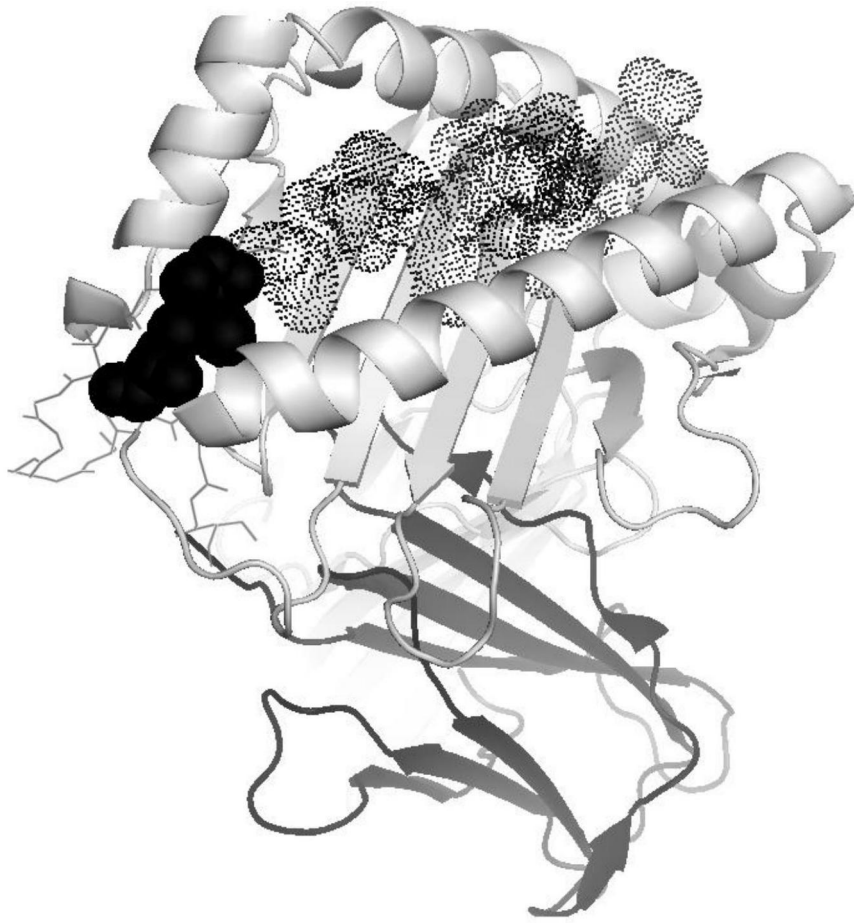


图1

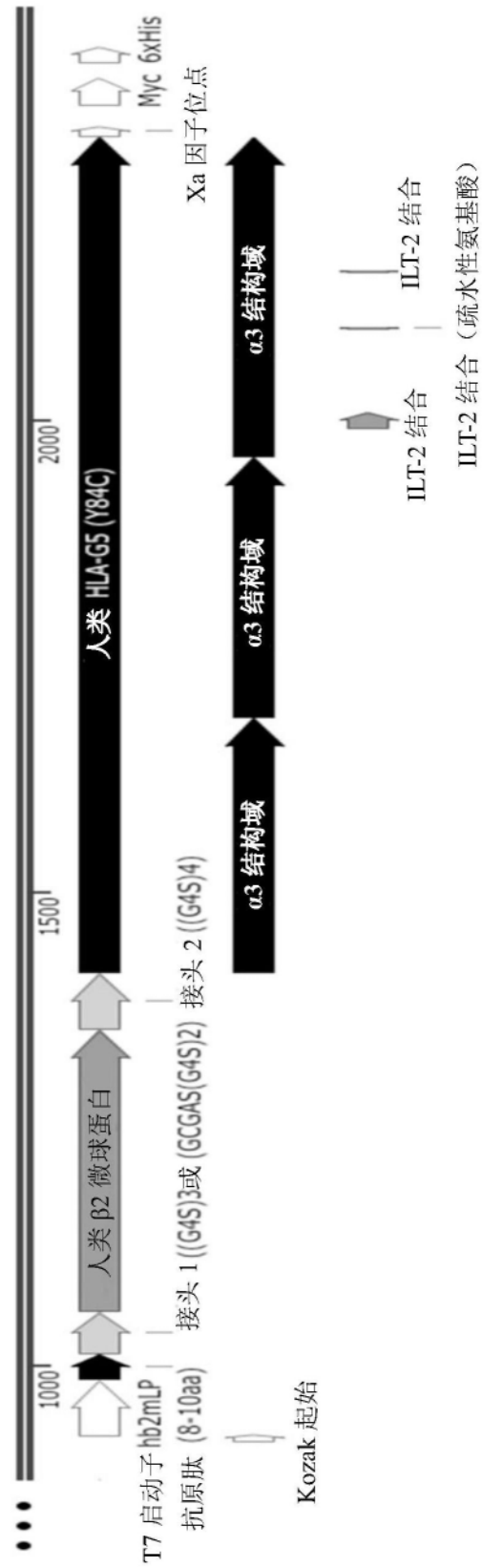


图2

A

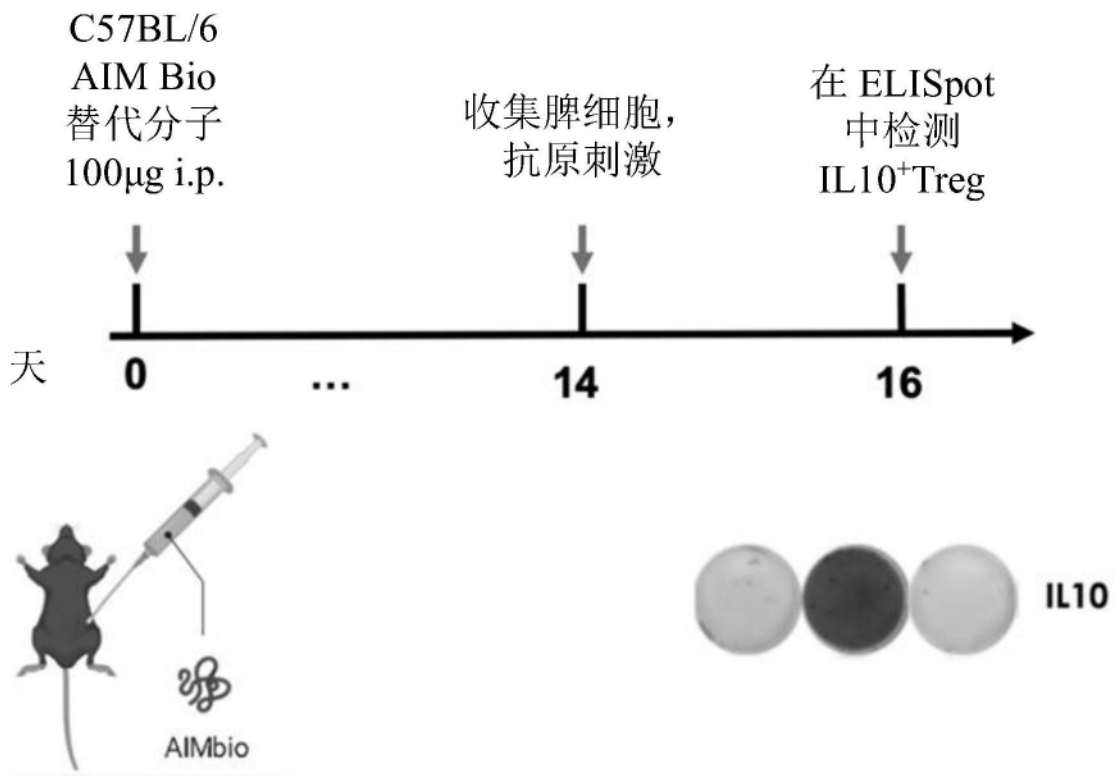
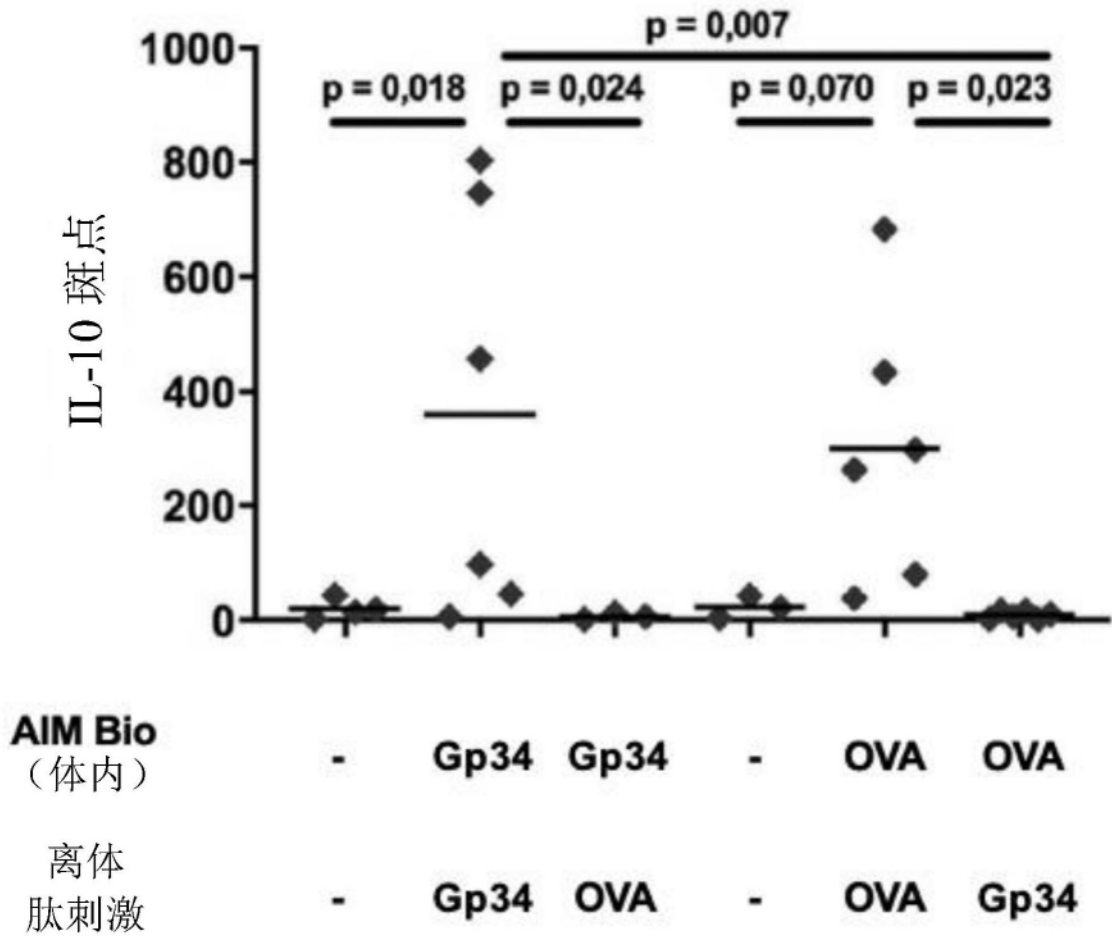


图3

B



横线表示平均值

图3,续

A

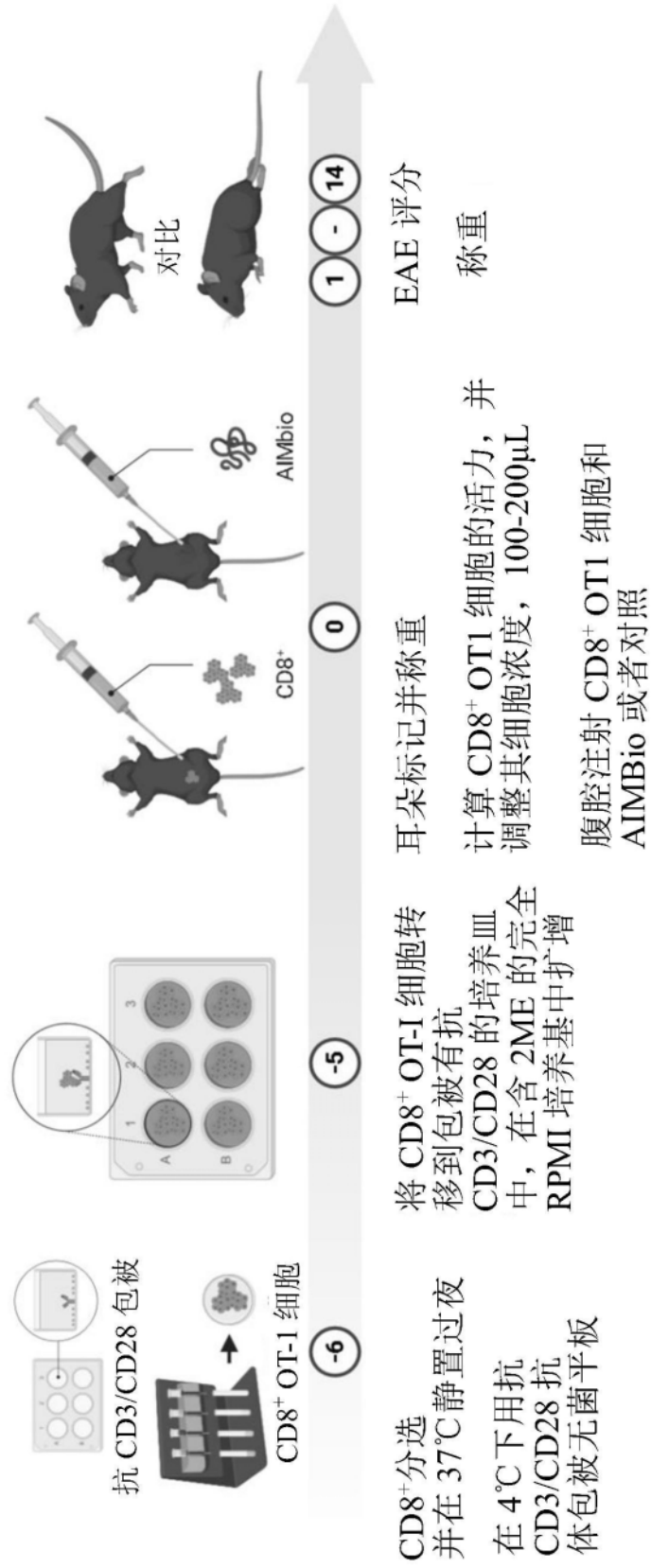
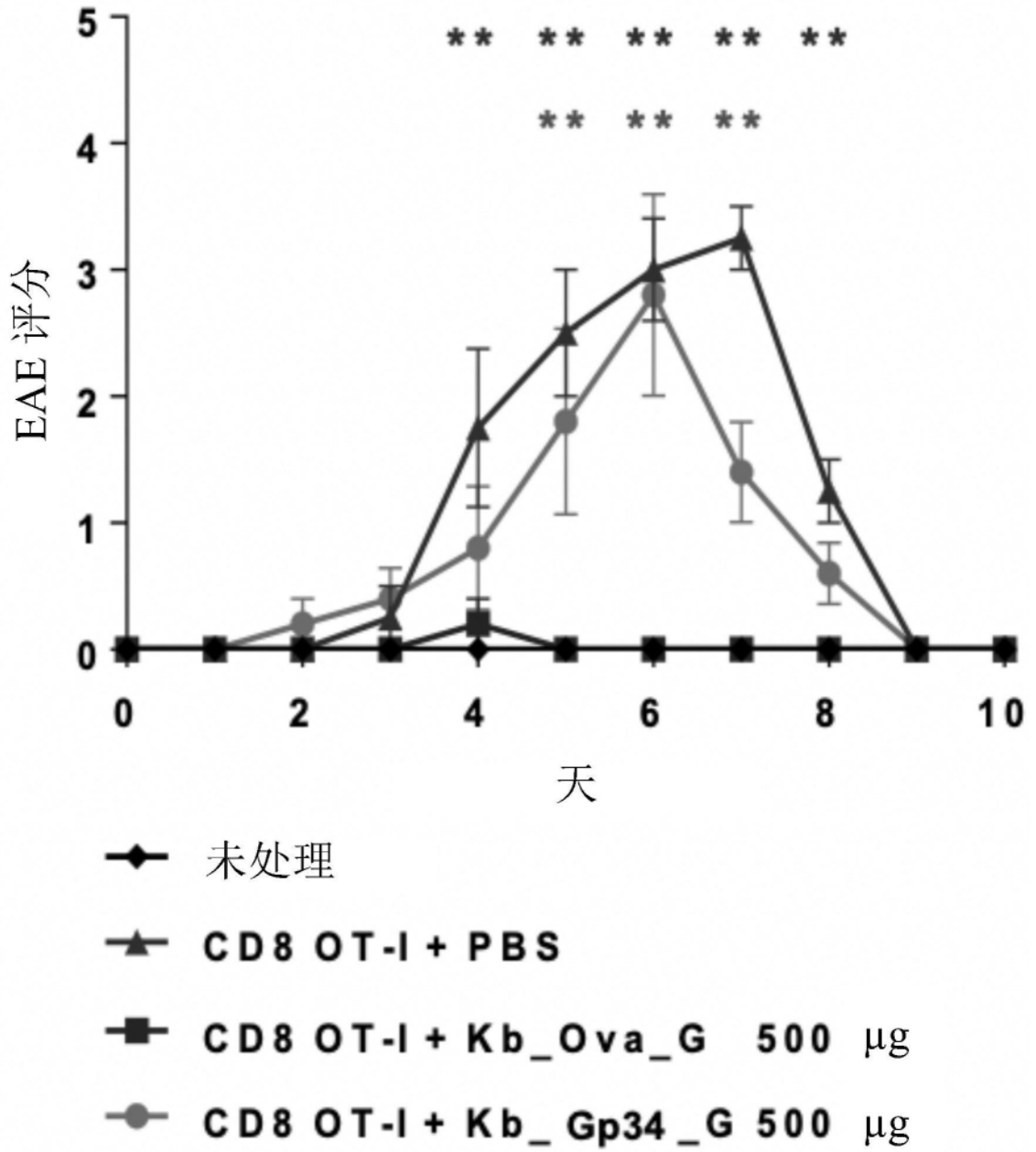


图4

B



示出了平均值和标准偏差，P 值： * < 0.05, ** < 0.01

图4, 续

A

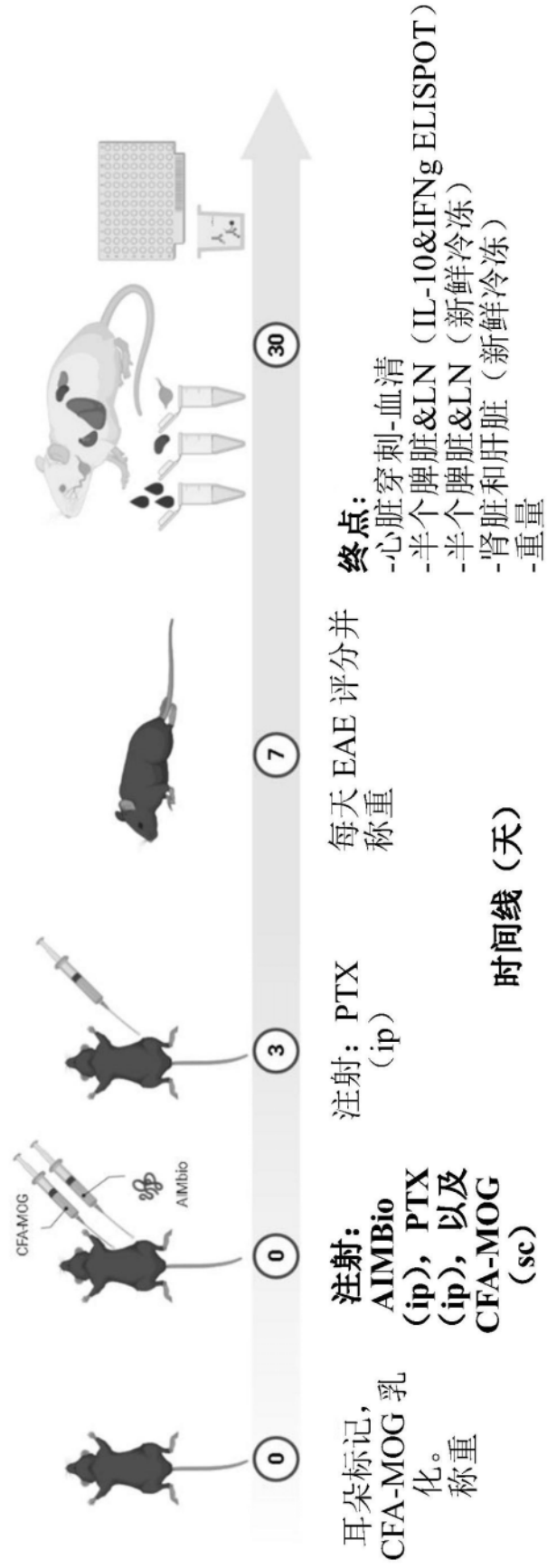
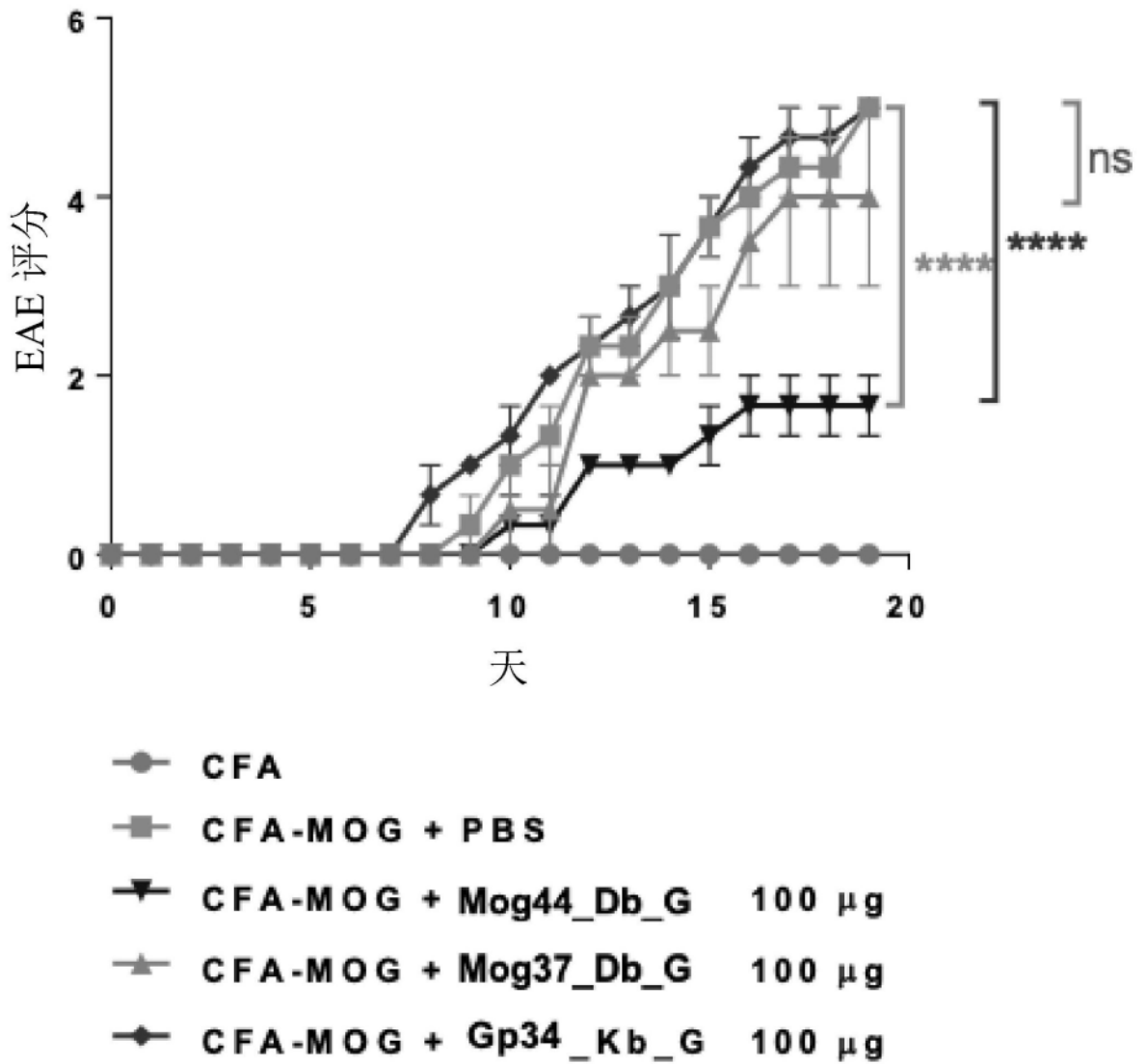


图5

B



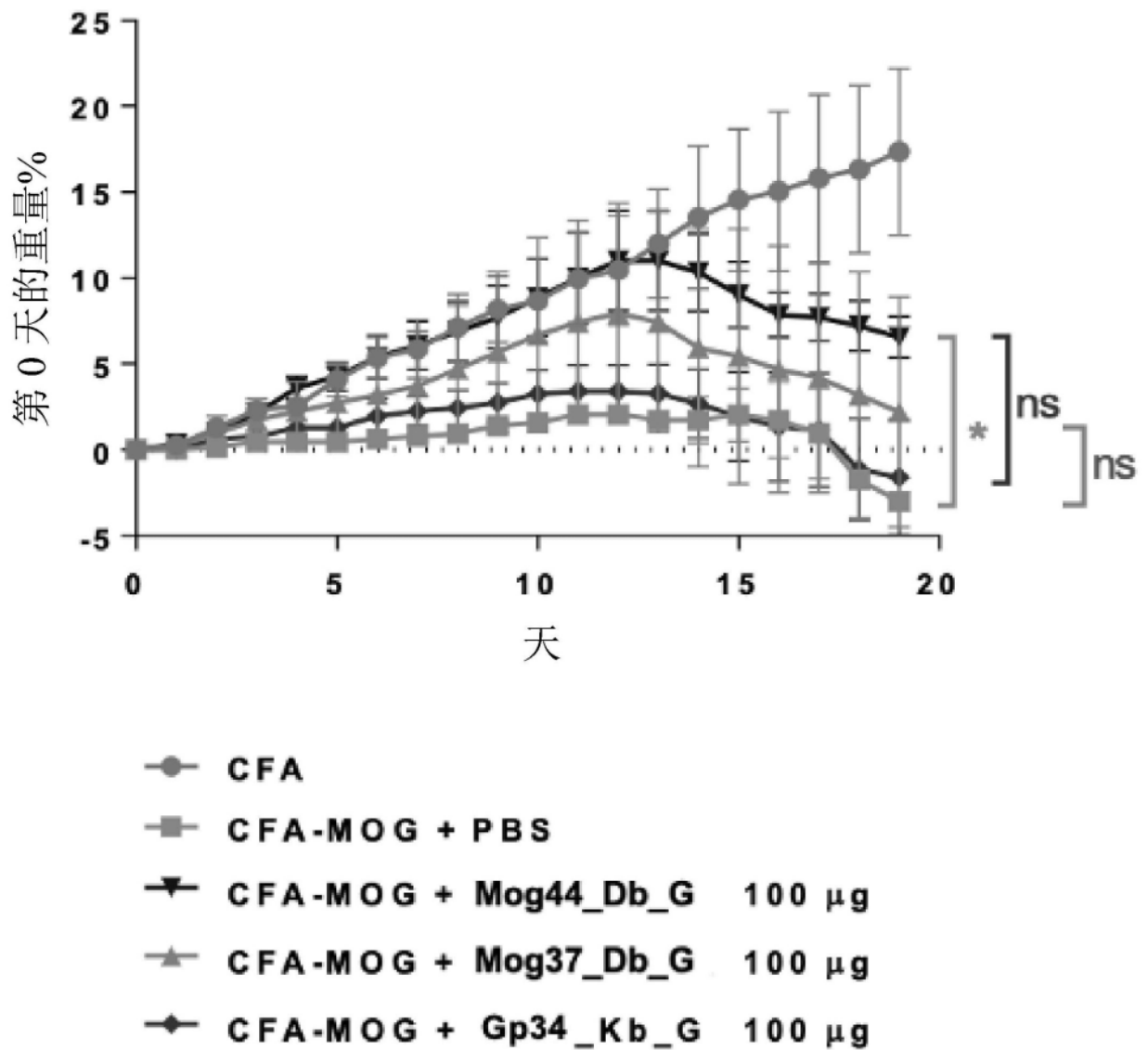
示出了平均值和标准偏差。

P 值: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001

图5,续

C

%重量-CFA-MOG - B6 中



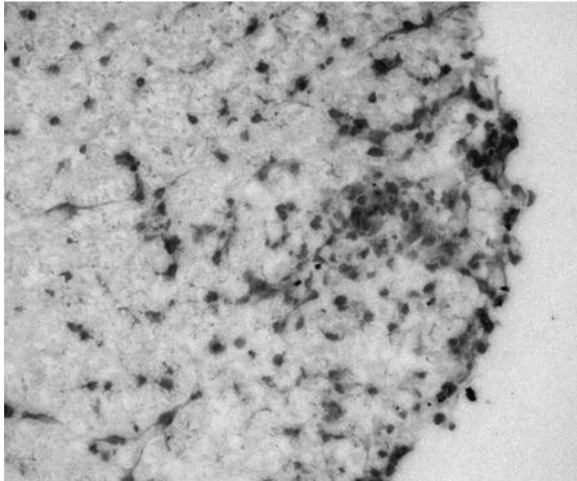
示出了平均值和标准偏差。P 值：* < 0.05

图5,续

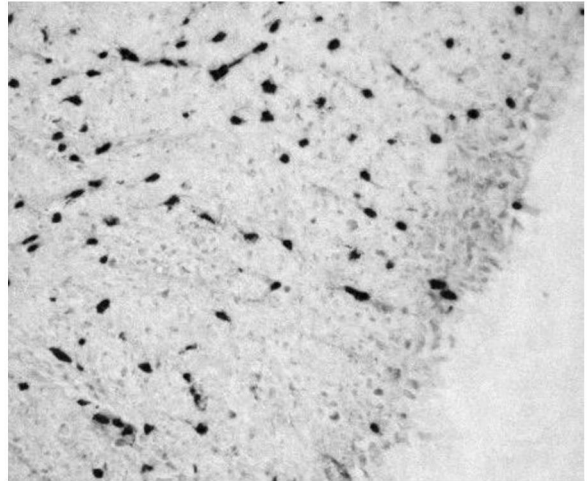
A

脊髓（甲苯胺）

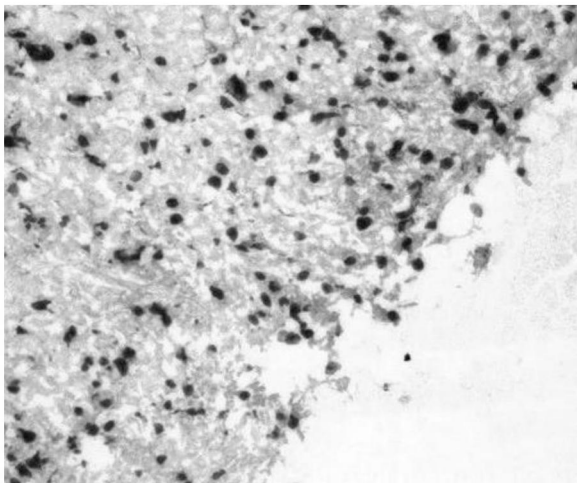
EAE + PBS



EAE + MOG44_Db_G



EAE + MOG37_Db_G



CFA 对照

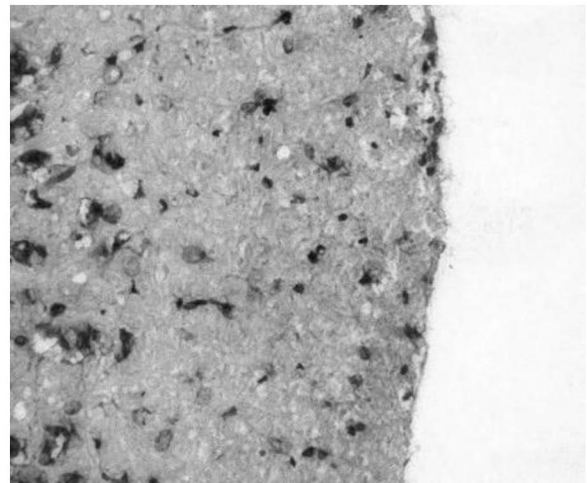


图6

B

脊髓 (CD8-DAB)

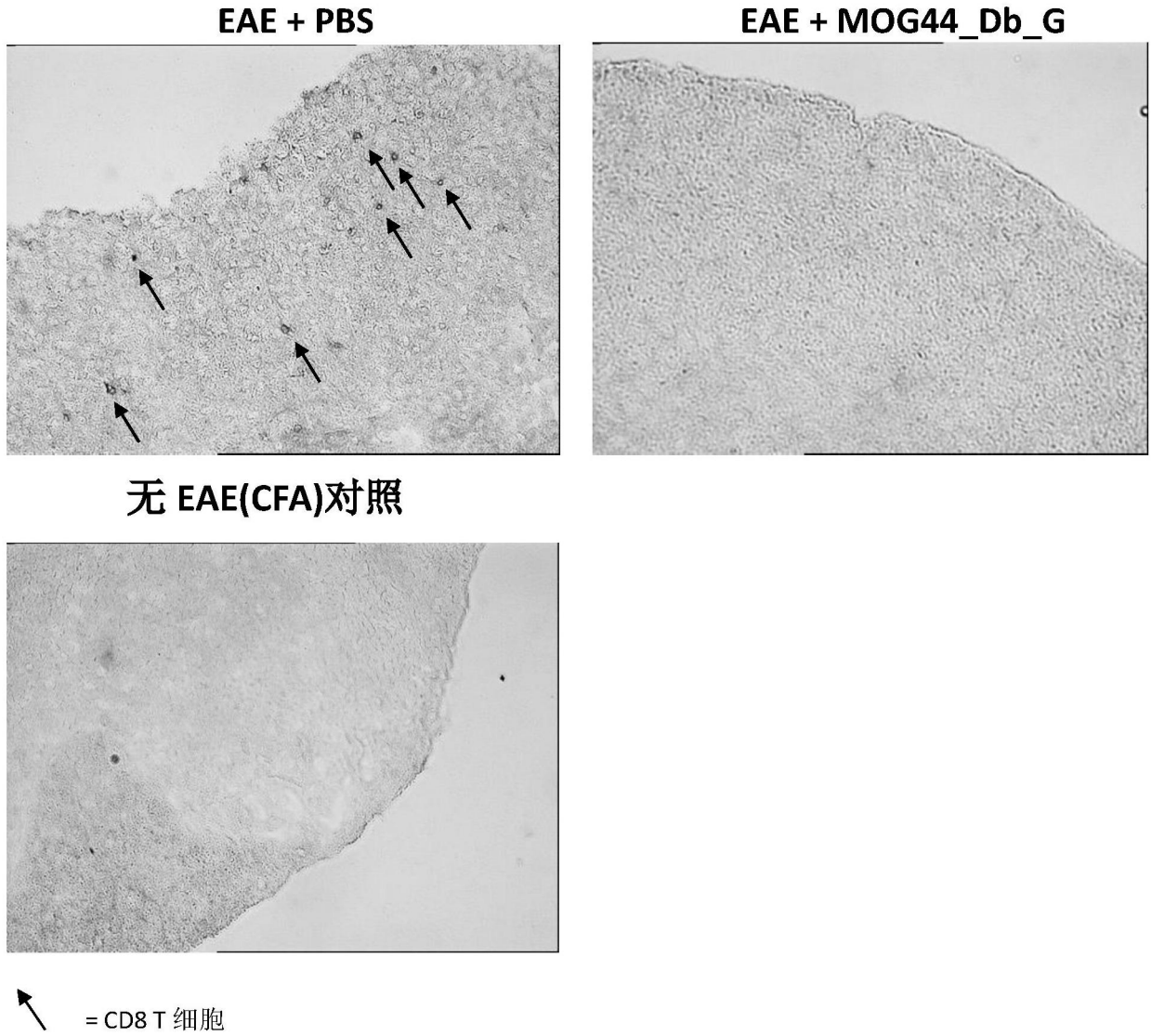
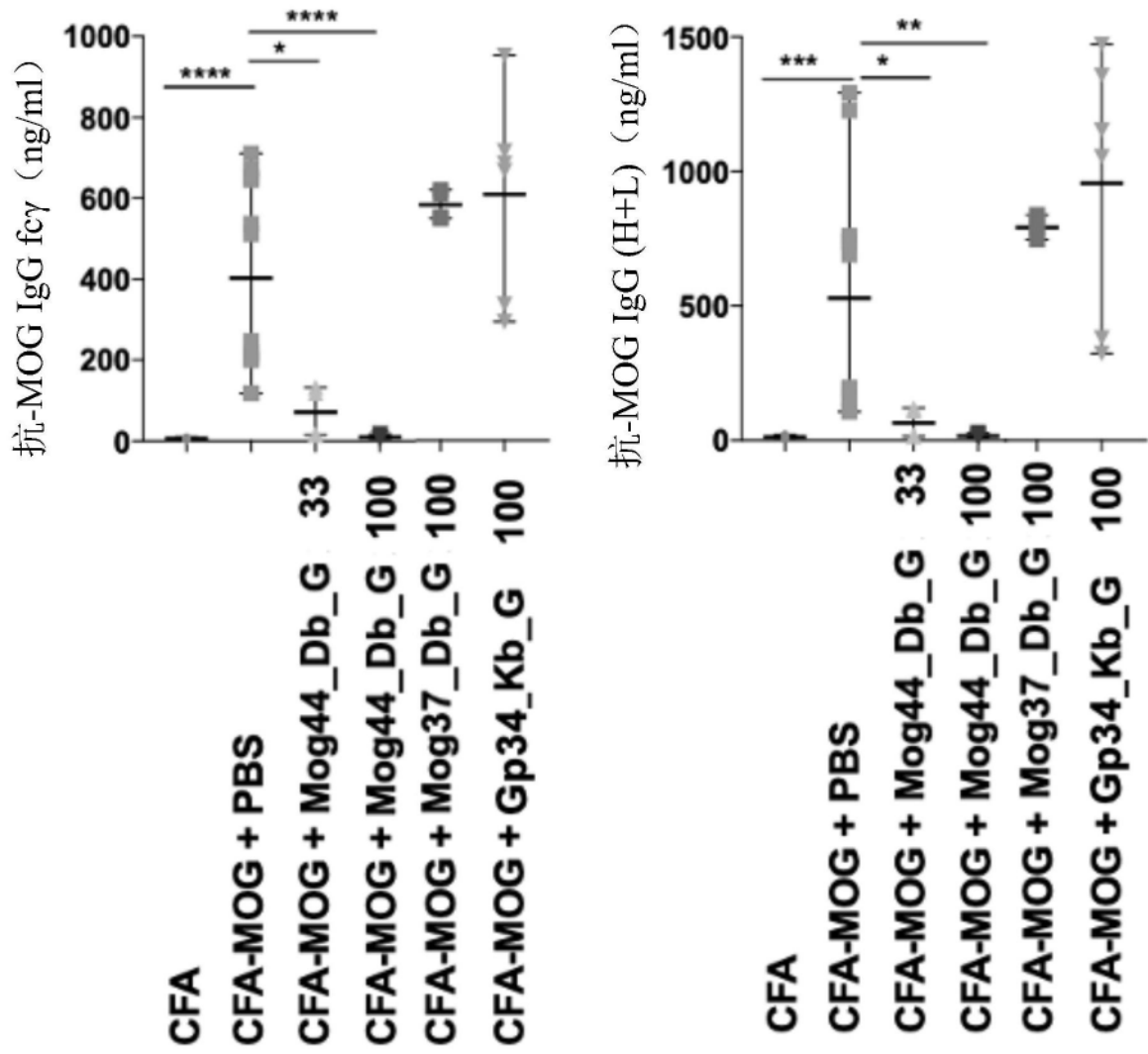


图6,续



P 值: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001

图7

#	设计		制备			质量控制		优先级	
	构建体	肽序列	SN 中的 收率	纯化	高收 率	考马 斯染 色	蛋白质 印迹法	Elispot 中的 低密度健 康 PBMC 测试	统计学 上有显著 性差异的 结果
1	hAQP4 42-50_HLAG Myc/His Tag	FLAMLIFVL	低	高	低	NA	NA	NA	NA
2	hAQP4 45-53_HLAG Myc/His Tag	MLIFVLLSL	平均	低	NA	NA	NA	NA	NA
3	hAQP4 65-72_HLAG Myc/His Tag	PLPVDMVL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	hAQP4 71-79_HLAG Myc/His Tag	VLISLCFGL	高	低	NA	NA	NA	NA	NA
5	hAQP4 126-135_ HLAG Myc/His Tag	AIIGAGILYL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	hAQP4 127-135_ HLAG Myc/His Tag	IIGAGILYL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	hAQP4 45-53_A2G Myc/His Tag	MLIFVLLSL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	hAQP4 65-72_A2G Myc/His Tag	PLPVDMVL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	hAQP4 71-79_A2G Myc/His Tag	VLISLCFGL	平均	低	NA	NA	NA	NA	NA
10	hAQP4 126- 135_A2G Myc/His Tag	AIIGAGILYL	平均	高	低	NA	NA	NA	NA
11	hAQP4 127- 135_A2G Myc/His Tag	IIGAGILYL	平均	高	低	NA	NA	NA	NA
12	hAQP4 156- 164_A2G Myc/His Tag	AGHGLLVEL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	hAQP4 238- 247_A2G Myc/His Tag	IIGAVLAGGL	高	高	高	NA	NA	NA	NA
14	hAQP4 45-HLAG SPOTtag	MLIFVLLSL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	hAQP4 36-43_HLAG SPOTtag	KAVTAEFL	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	hAQP4 71-79_HLAG SPOTtag	VLISLCFGL	高	高	低	低	高	NA	NA
17	hAQP4 64-72_HLAG SPOTtag	KPLPVDMVL	高	高	高	平均	高	高	高
18	hAQP4 71-79_A2G SPOTtag	VLISLCFGL	平均	高	低	高	NA	高	平均
19	hAQP4 127-A2G SPOTtag	IIGAGILYL	平均	高	低	高	NA	高	平均
20	hAQP4 238-A2G SPOTtag	IIGAVLAGGL	高	高	高	高	NA	高	平均
21	hAQP4 137-145G SPOTtag	VTTPSVVGG L	低	NA	NA	NA	NA	NA	NA

图8

AQP4_64_G_Spt

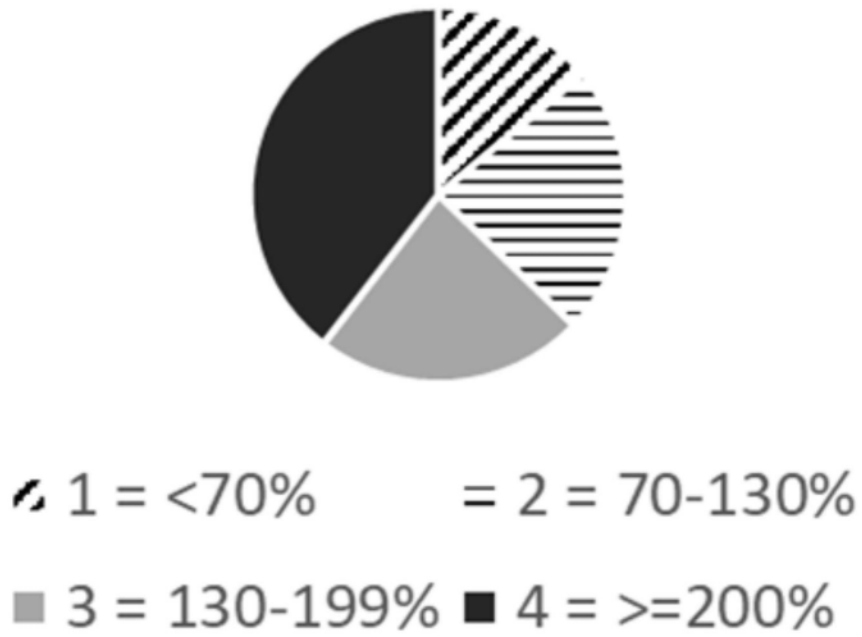


图9

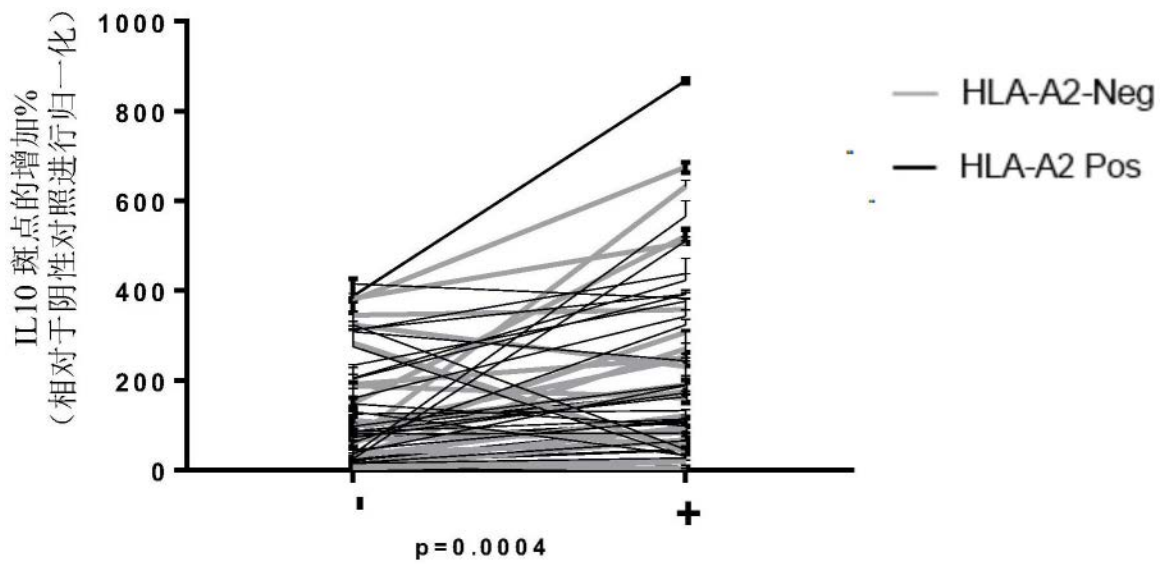
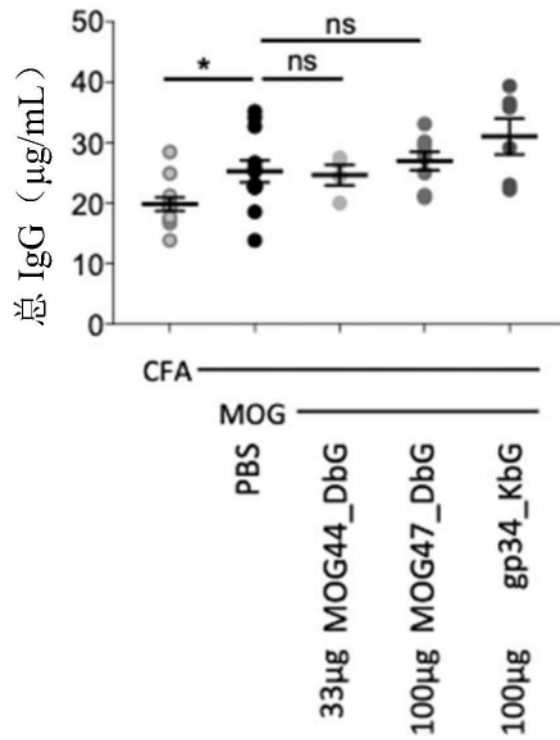


图9,续



示出了平均值和标准偏差。

P 值: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001

图10

纯化后的单链 MHC Ib 分子的稳定性

A

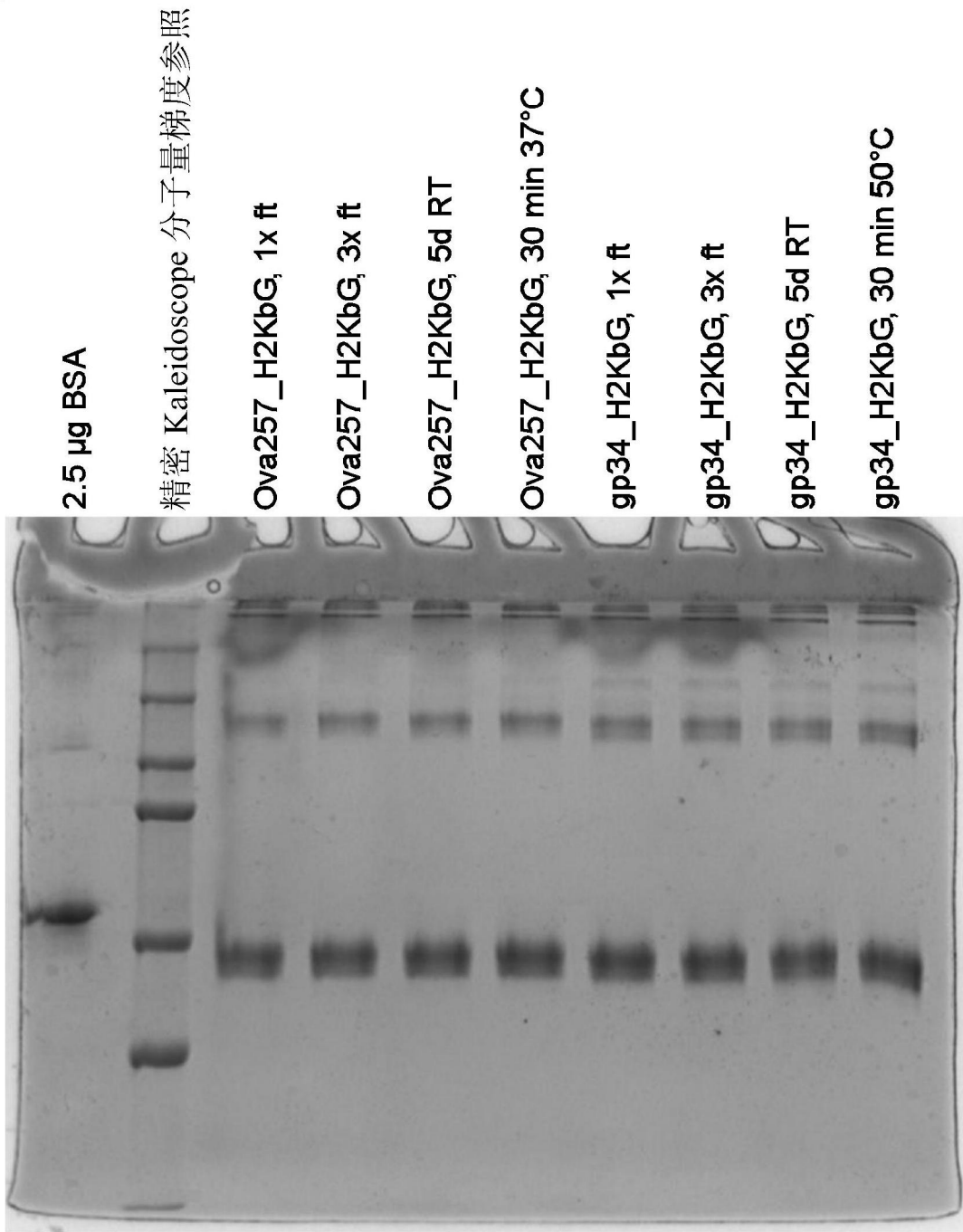


图11

B

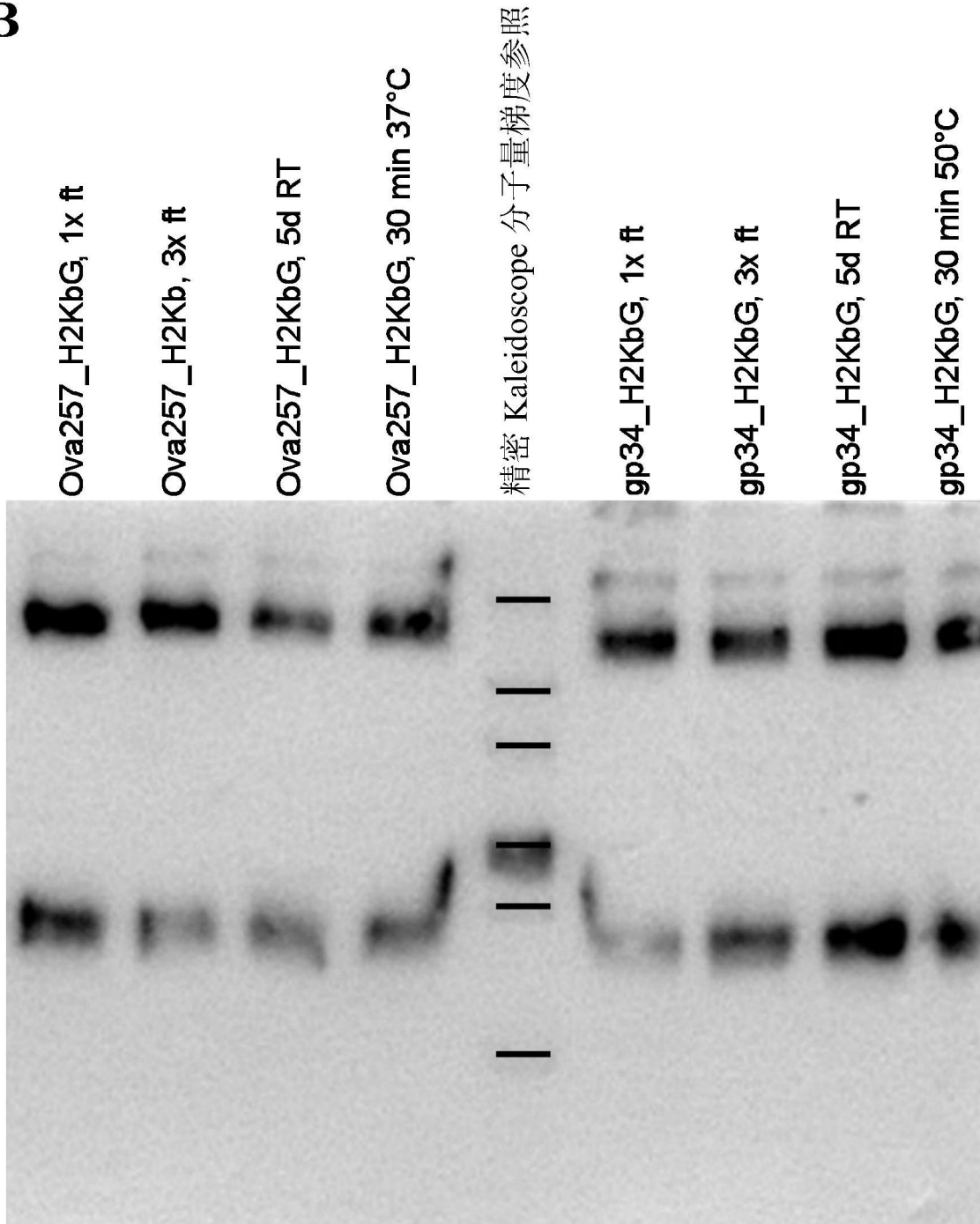


图11,续

单链 MHC Ib 分子是热稳定的

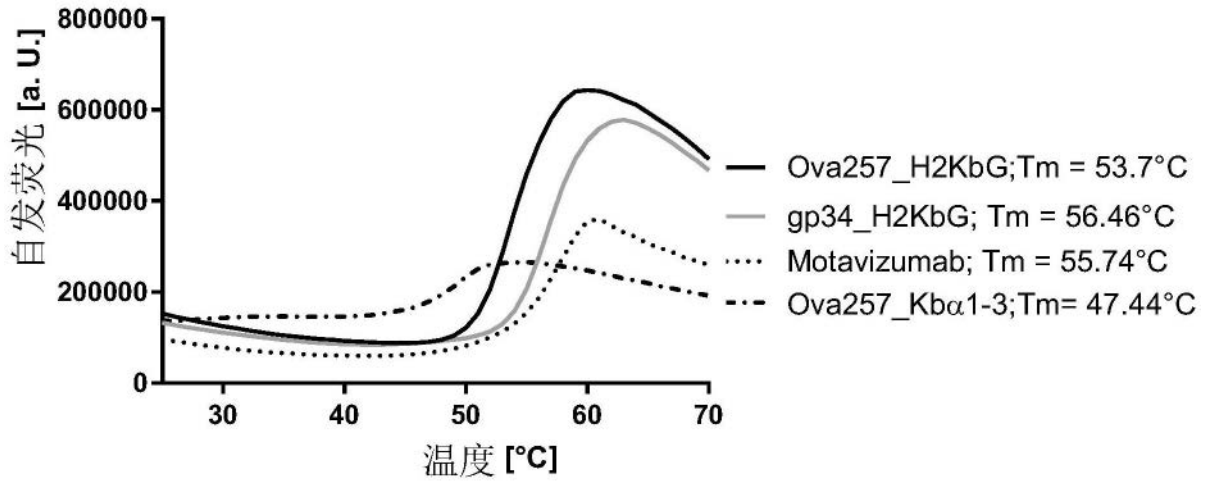
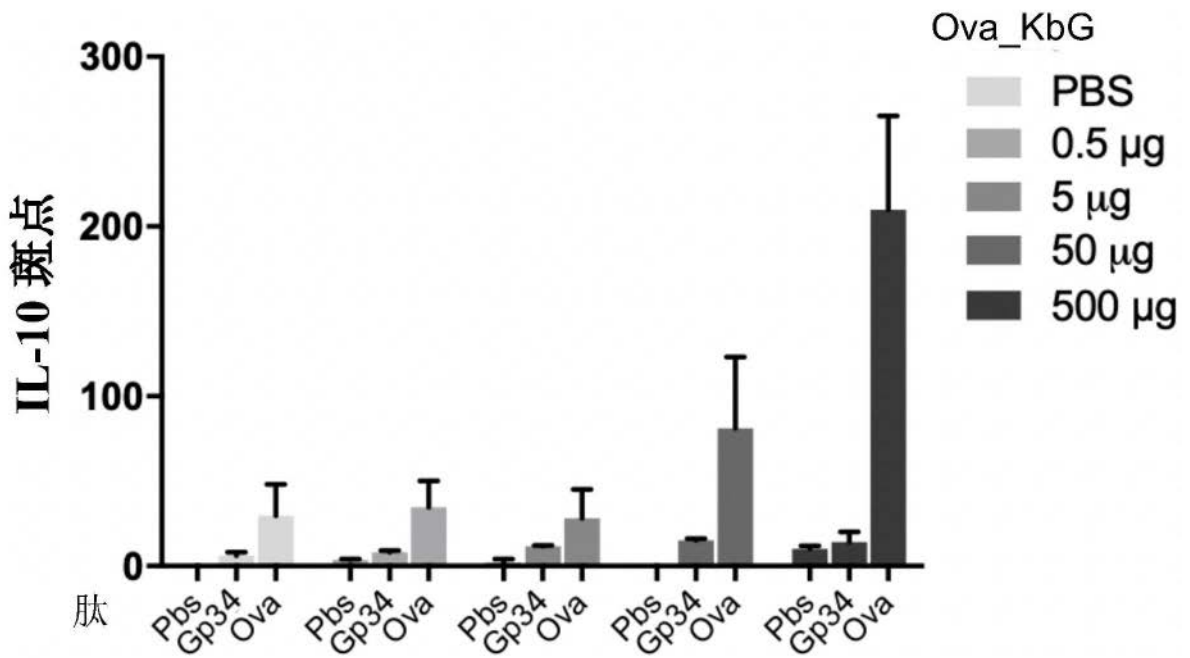


图12

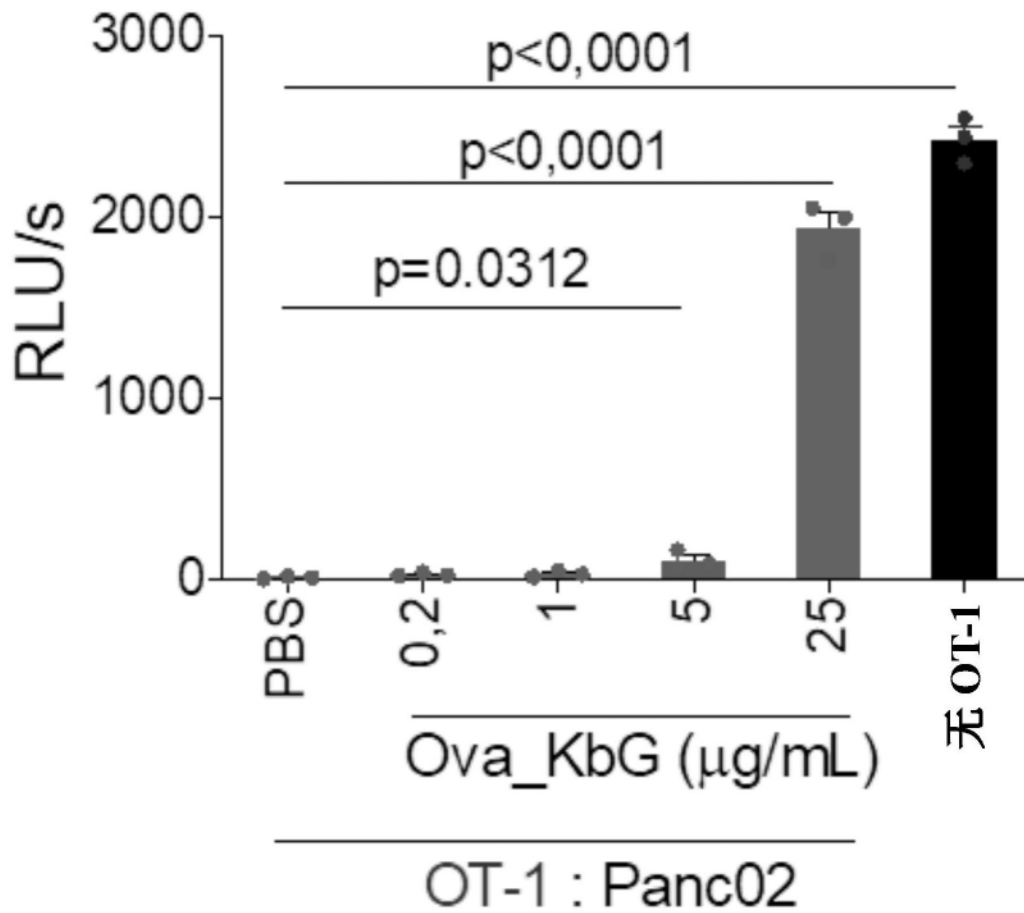
单链 MHC Ib 分子以剂量依赖性方式诱导 Treg



示出了平均值和标准偏差。

图13

单链 MHC Ib 分子以剂量依赖性方式抑制 T 细胞裂解



示出了平均值和标准偏差。

图14

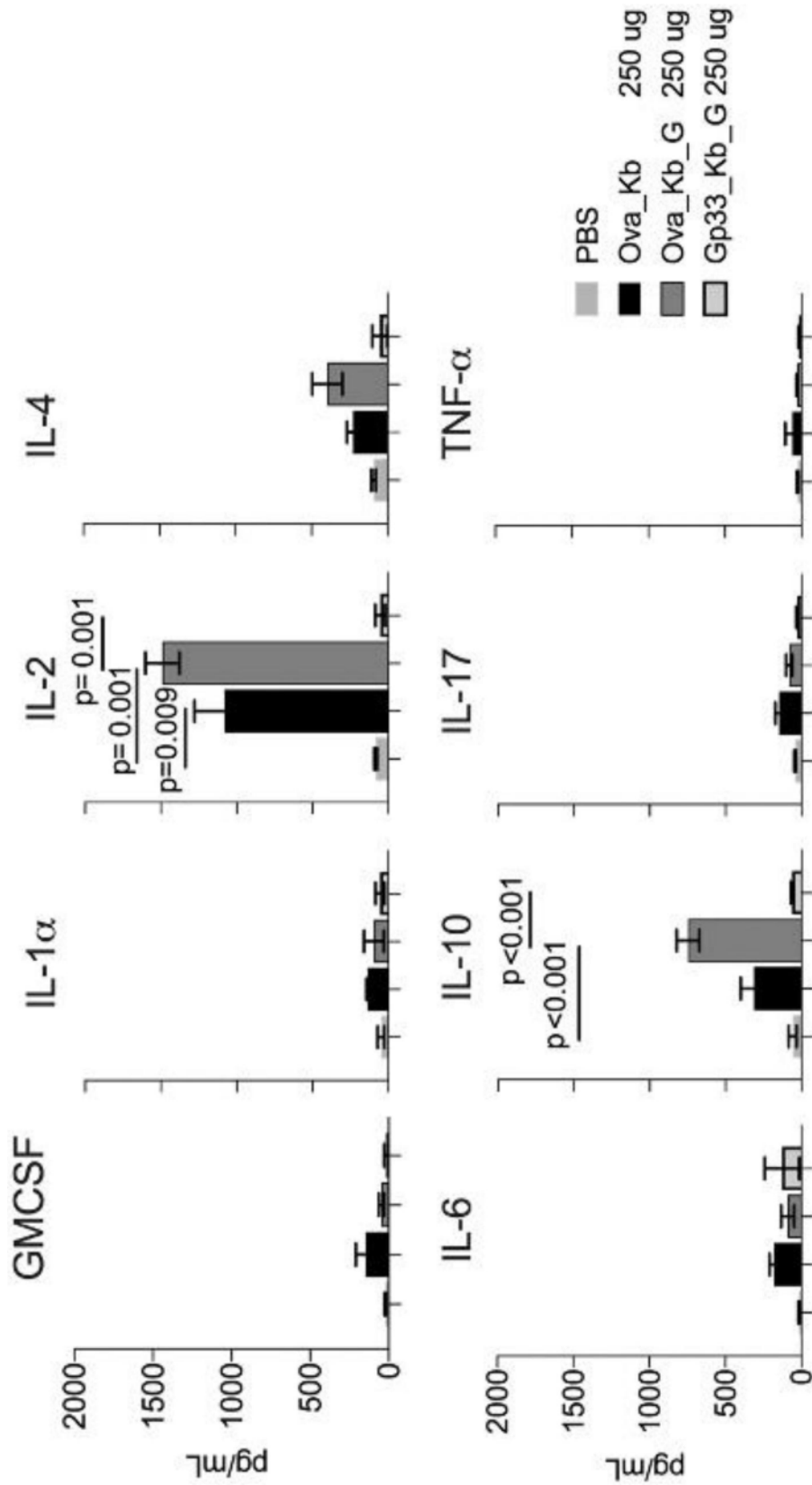


图15

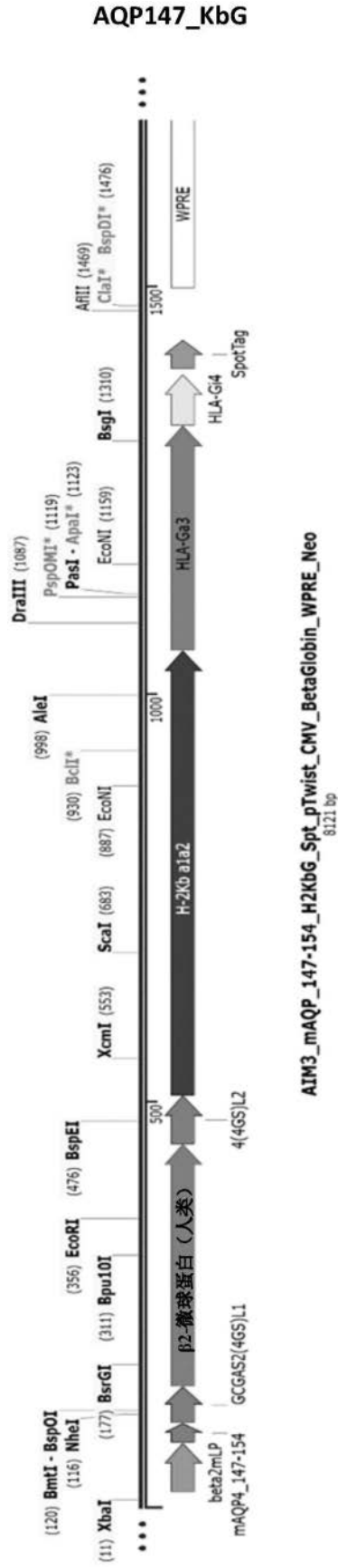


图16

经纯化的
AQP203_H2KbG-Spot

经纯化的
AQP147_H2KbG-Spot

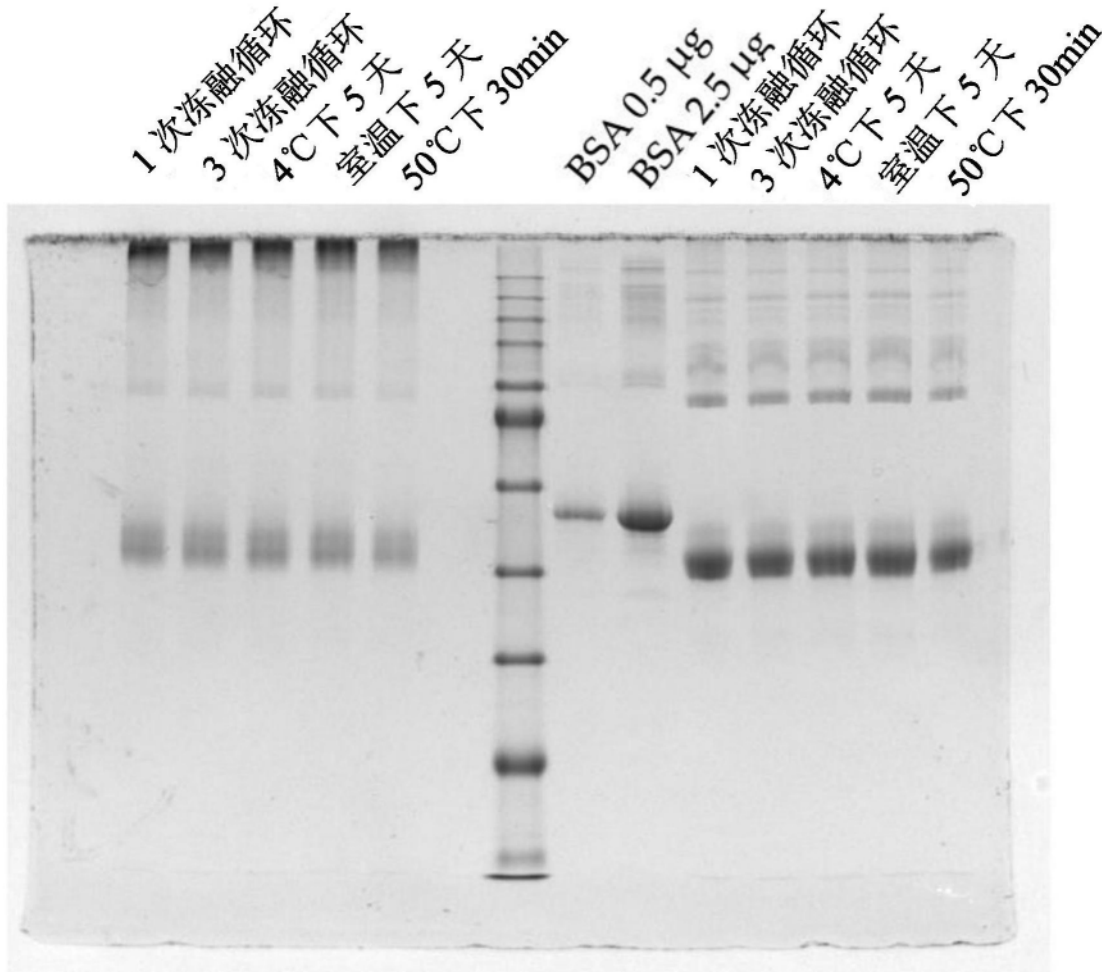


图17

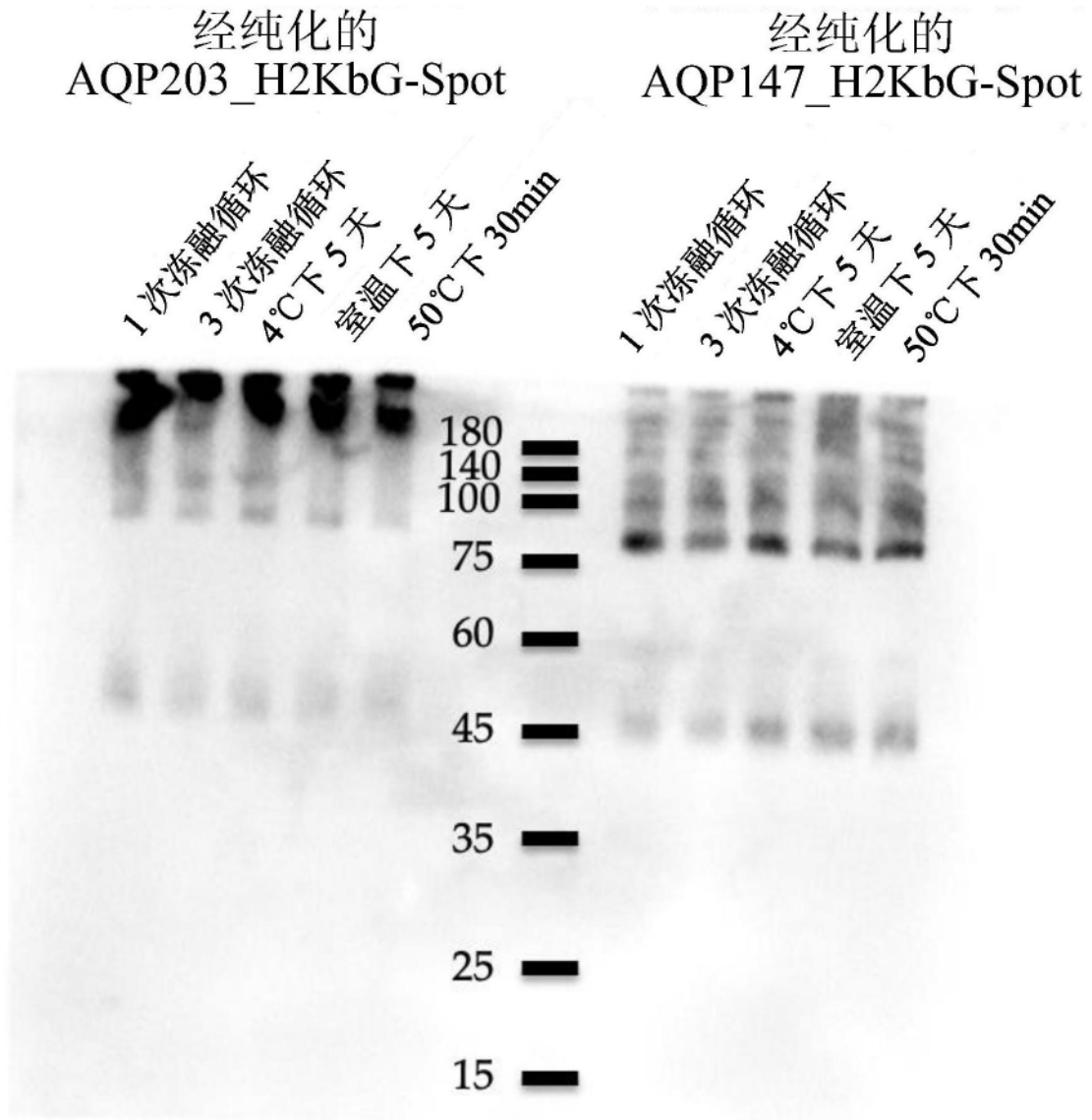


图18

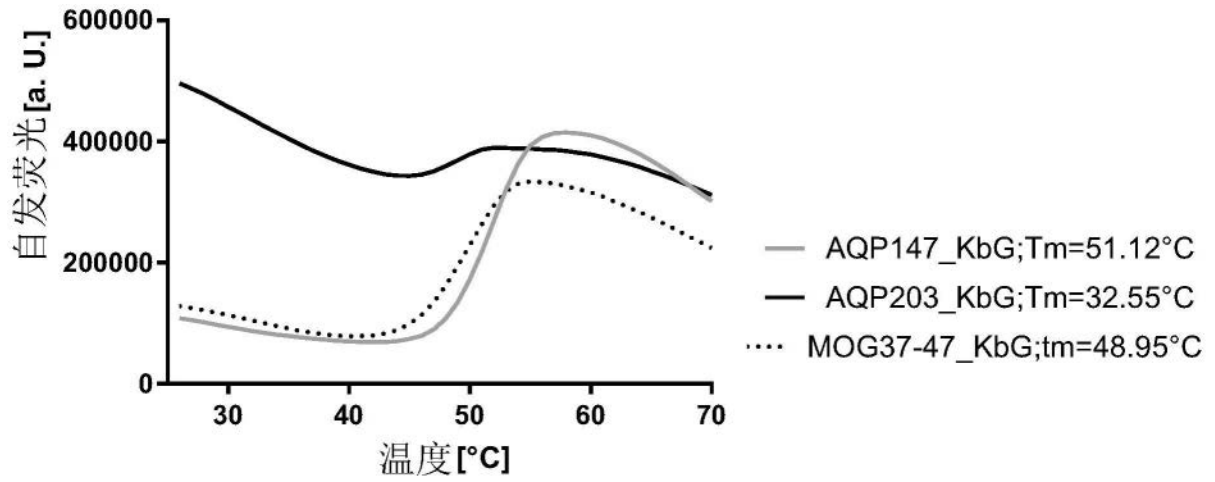
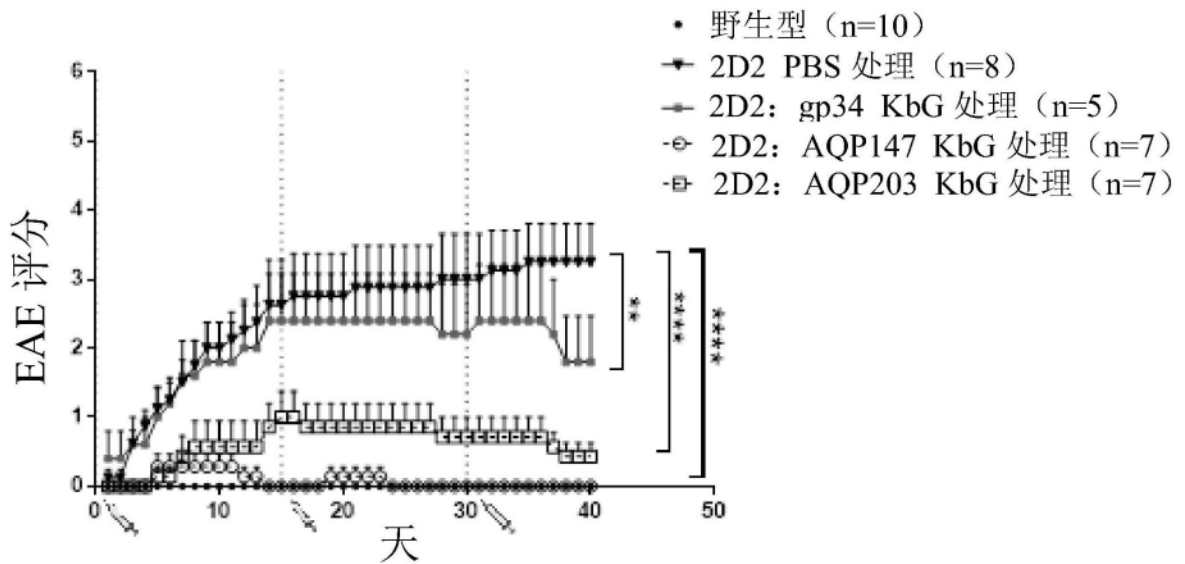


图19



示出了平均值和标准偏差。

P 值: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001

图20

A

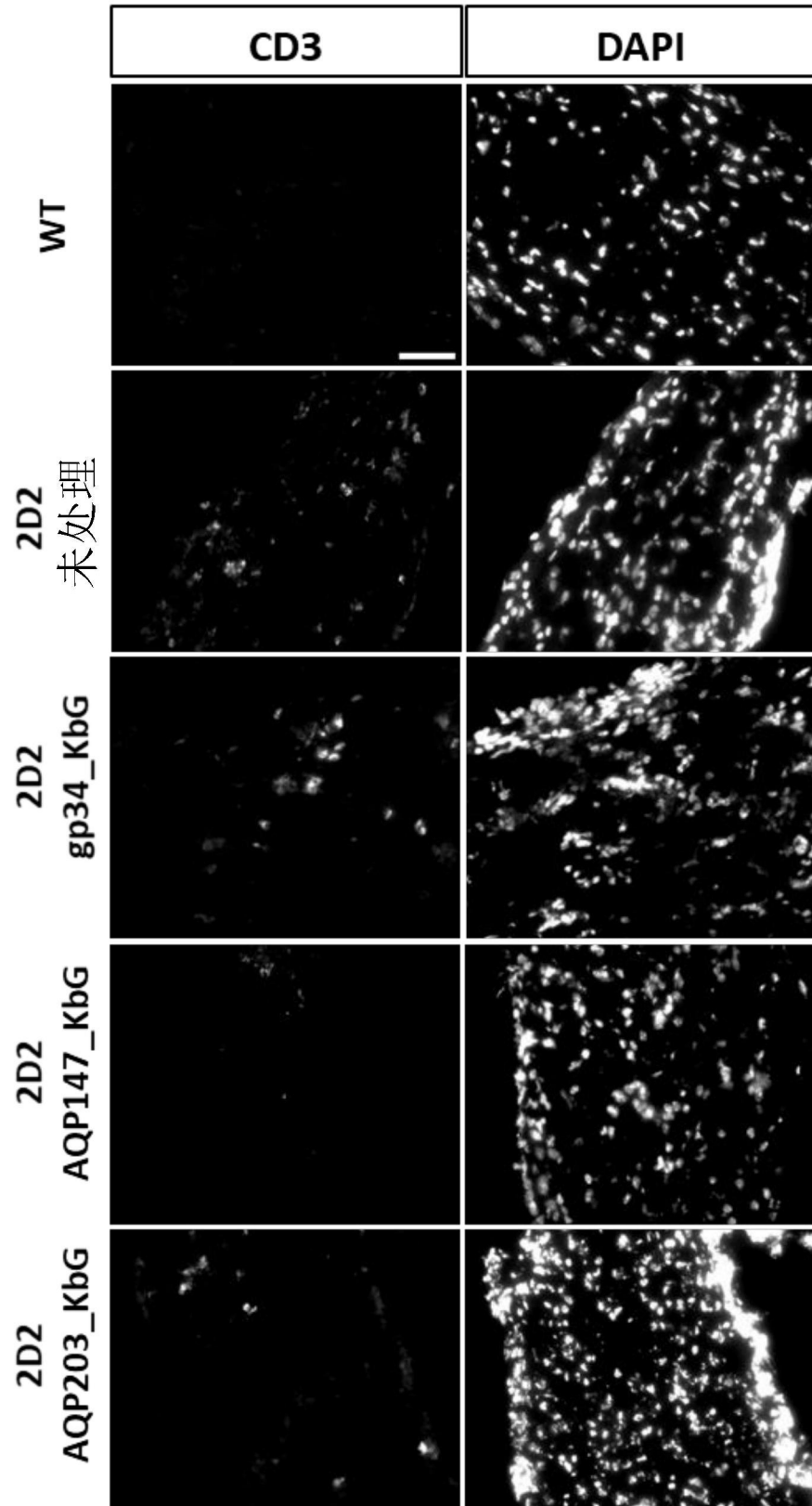


图21

B

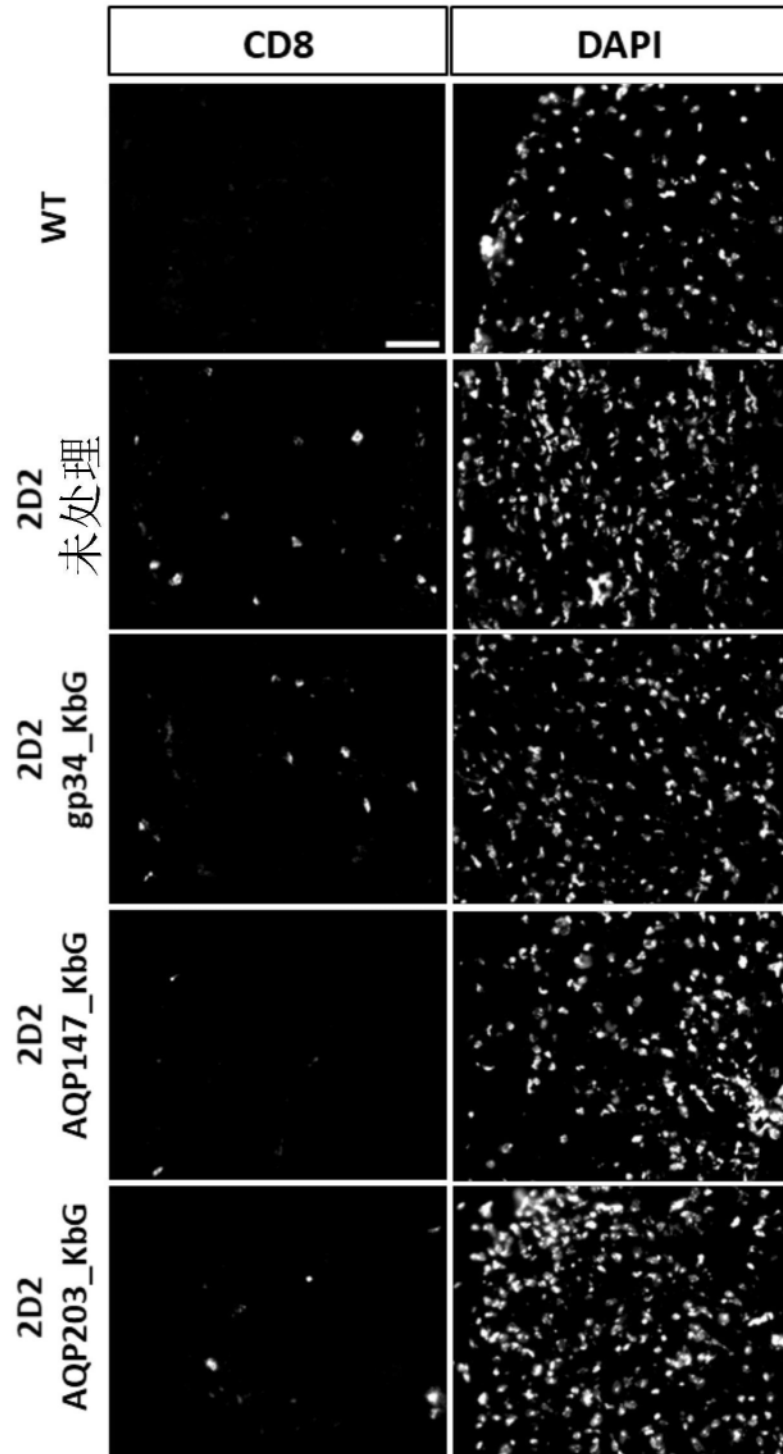


图21,续

D

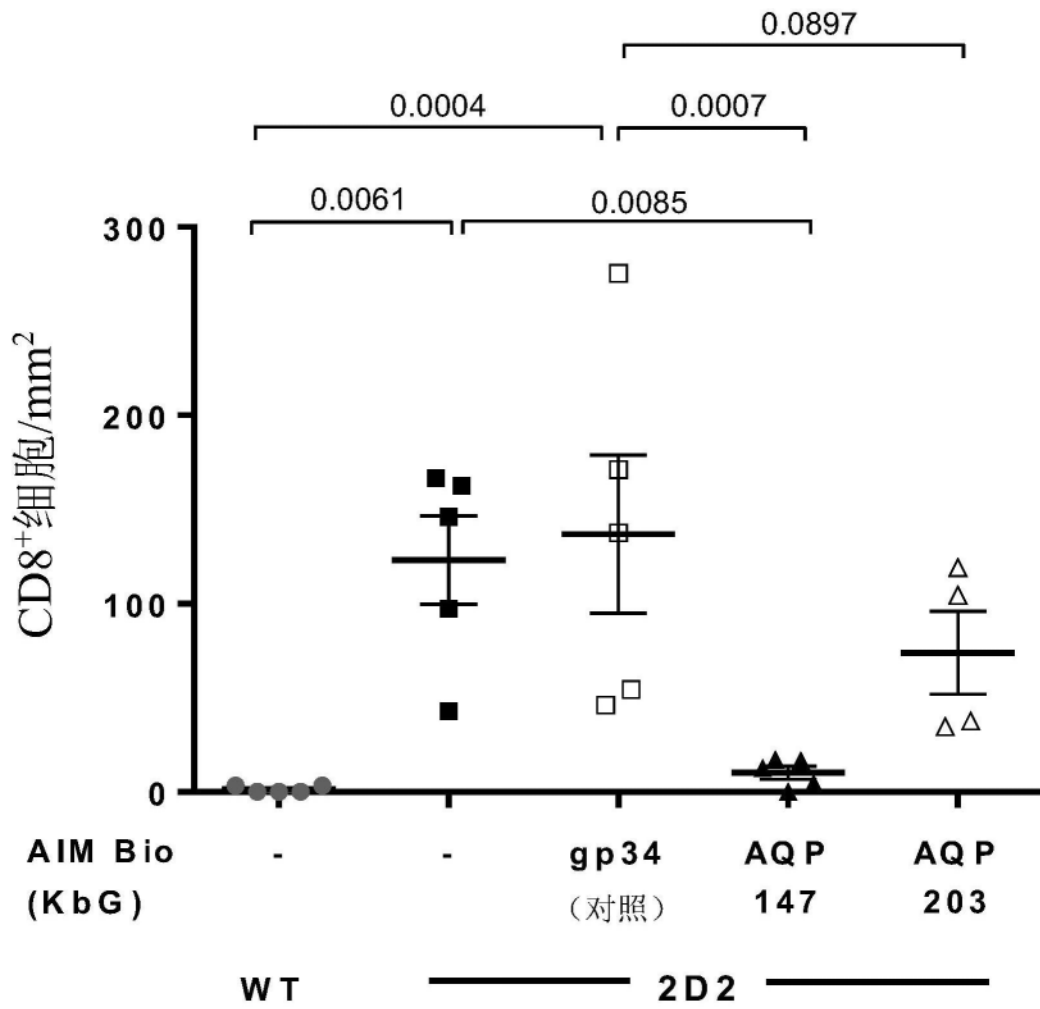


图21, 续

A

视神经

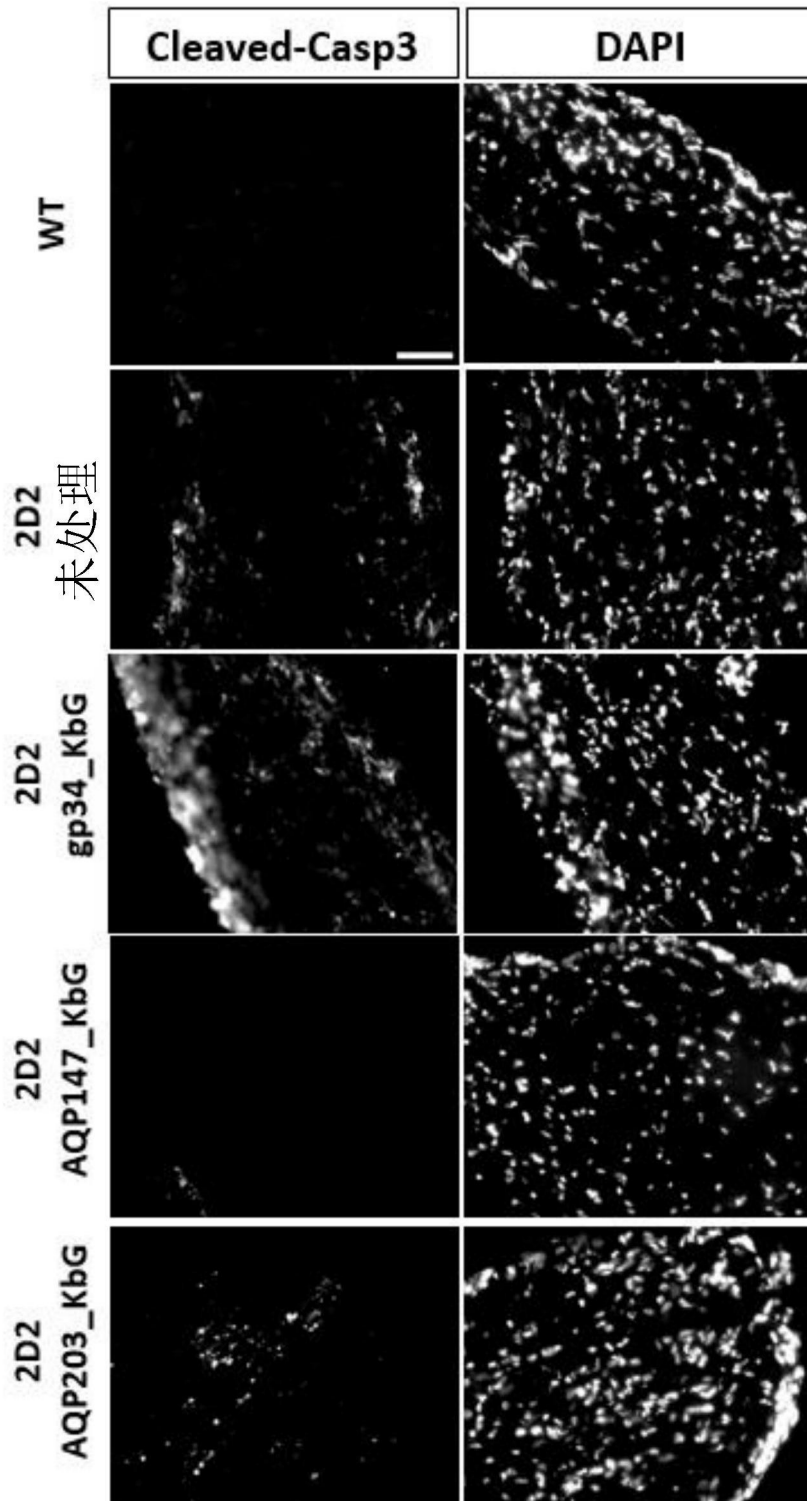


图22

C

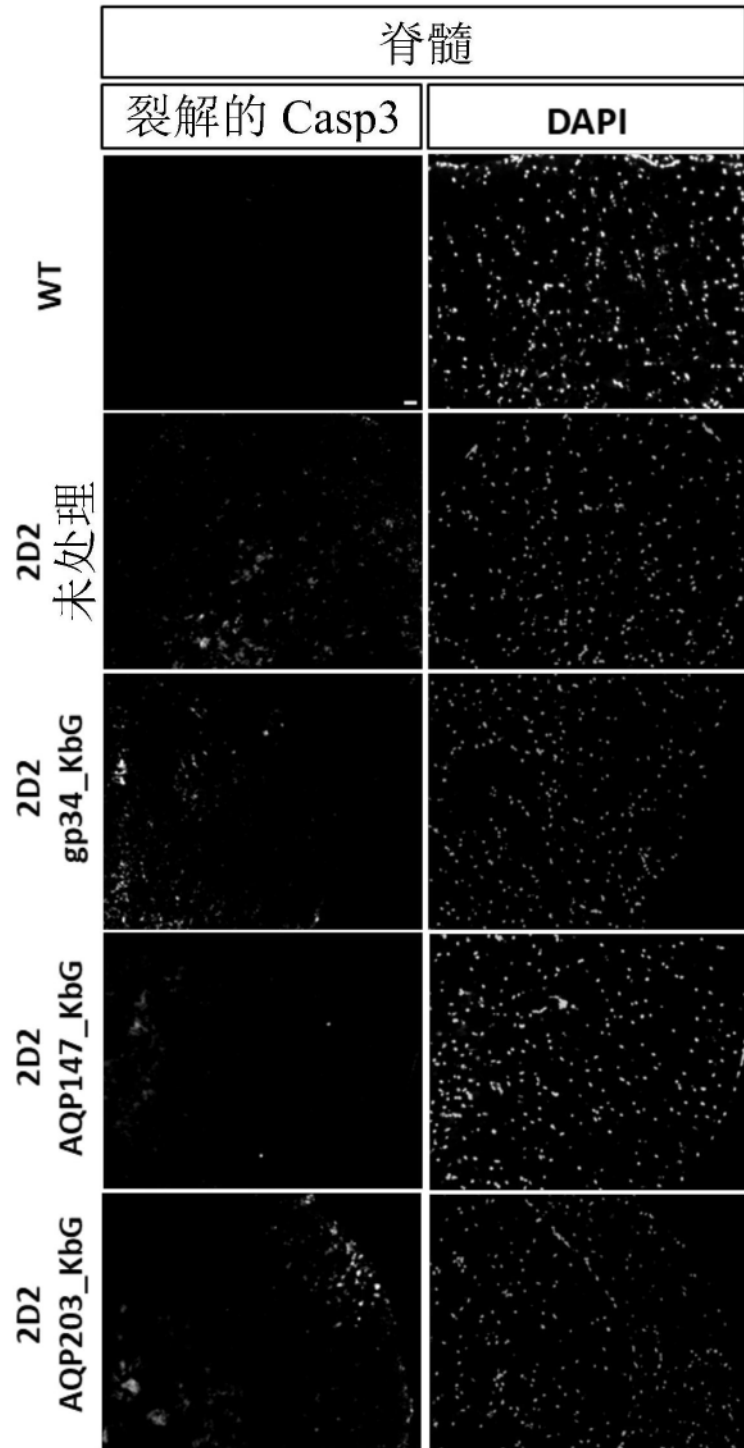


图22,续

D

脊髓

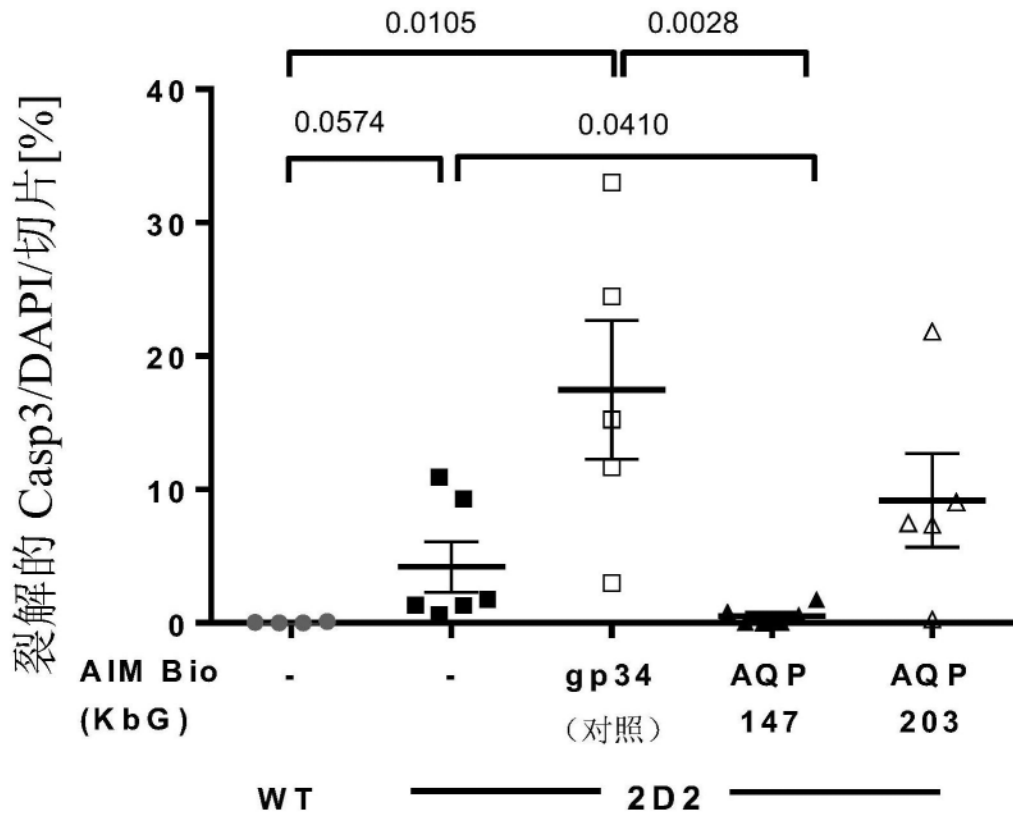


图22,续

E

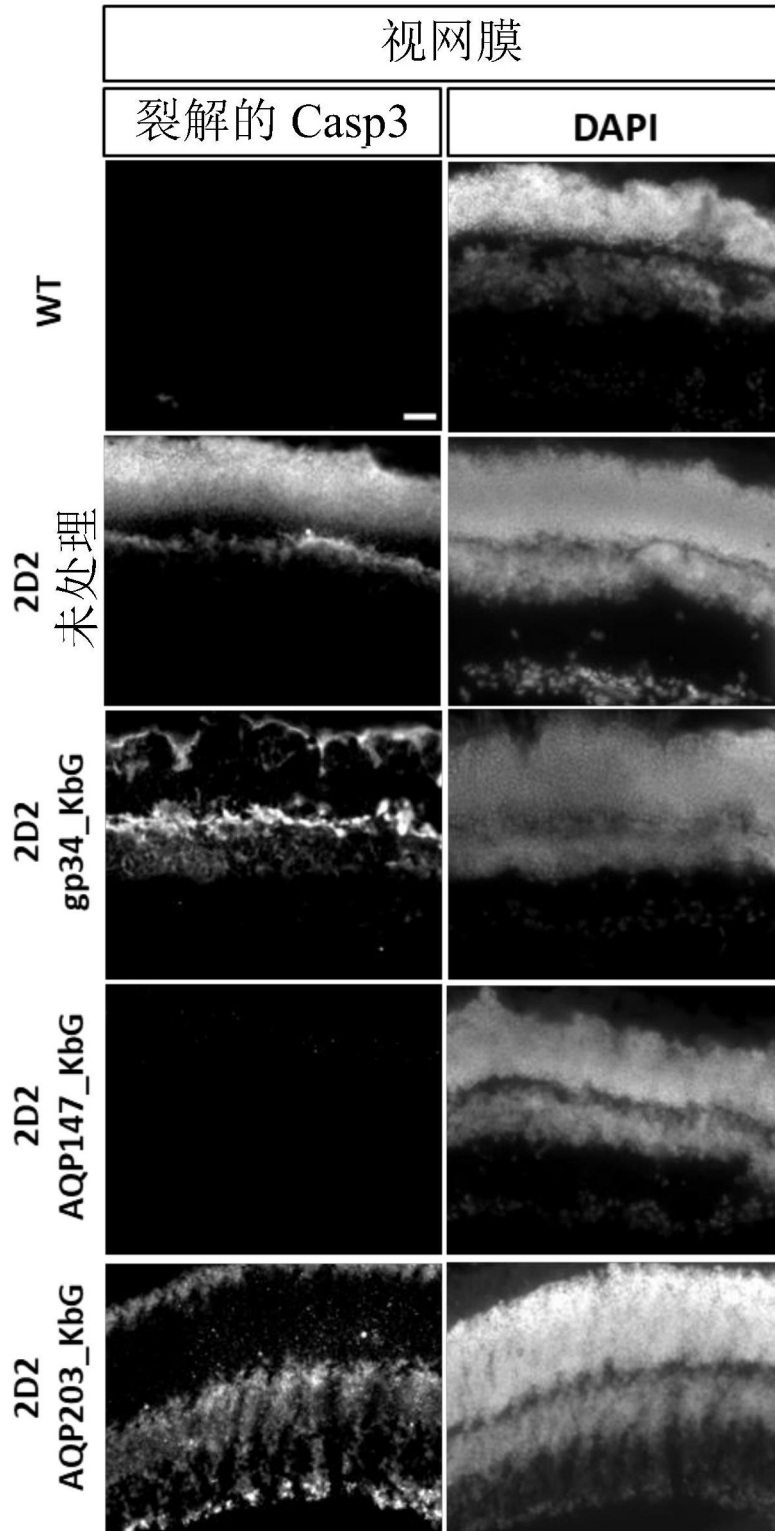


图22,续

F

视网膜

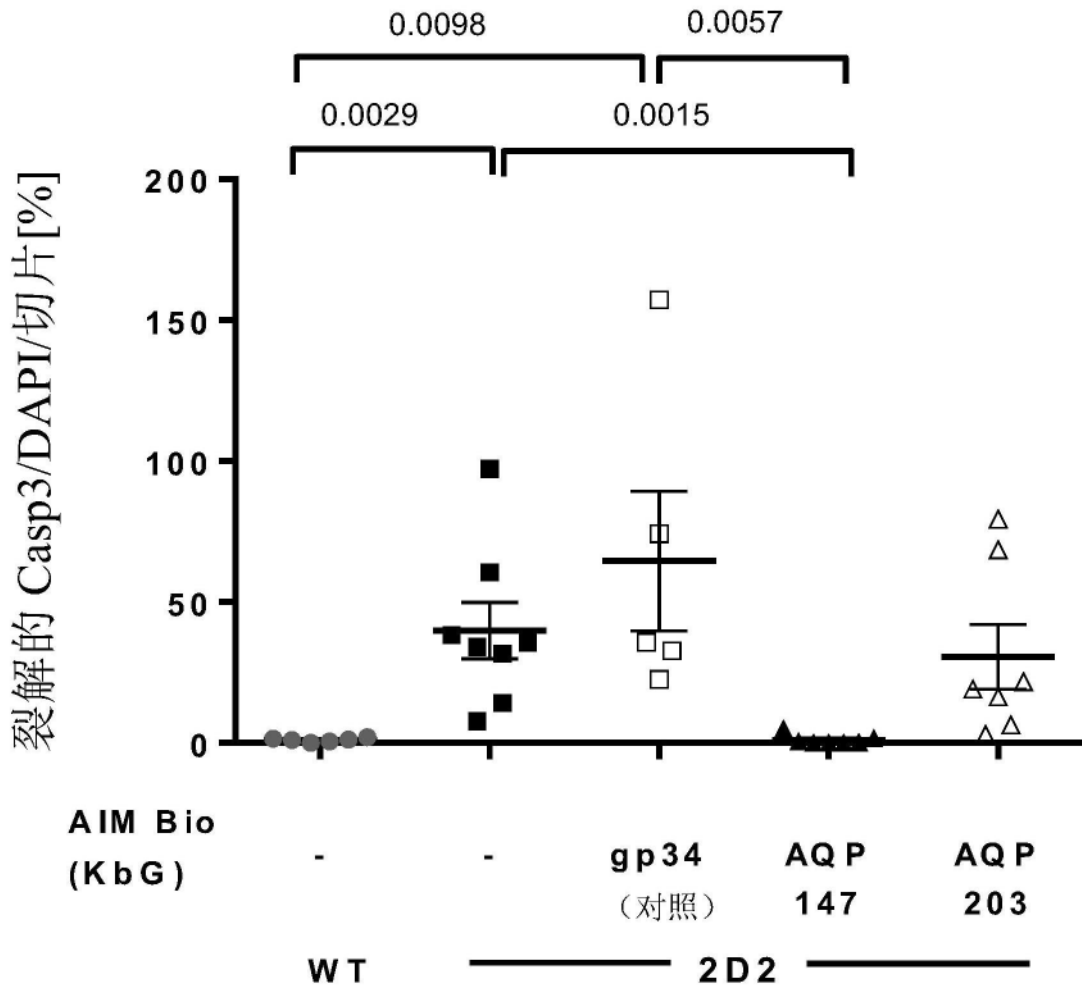


图22, 续

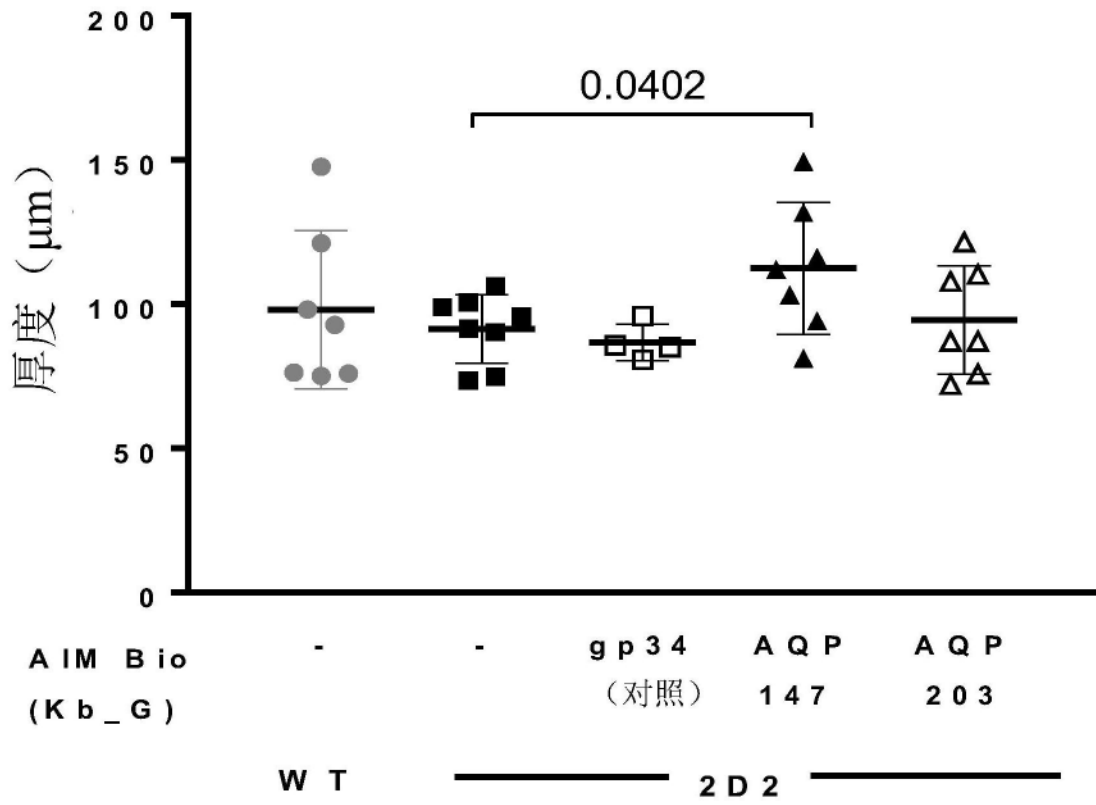


图24

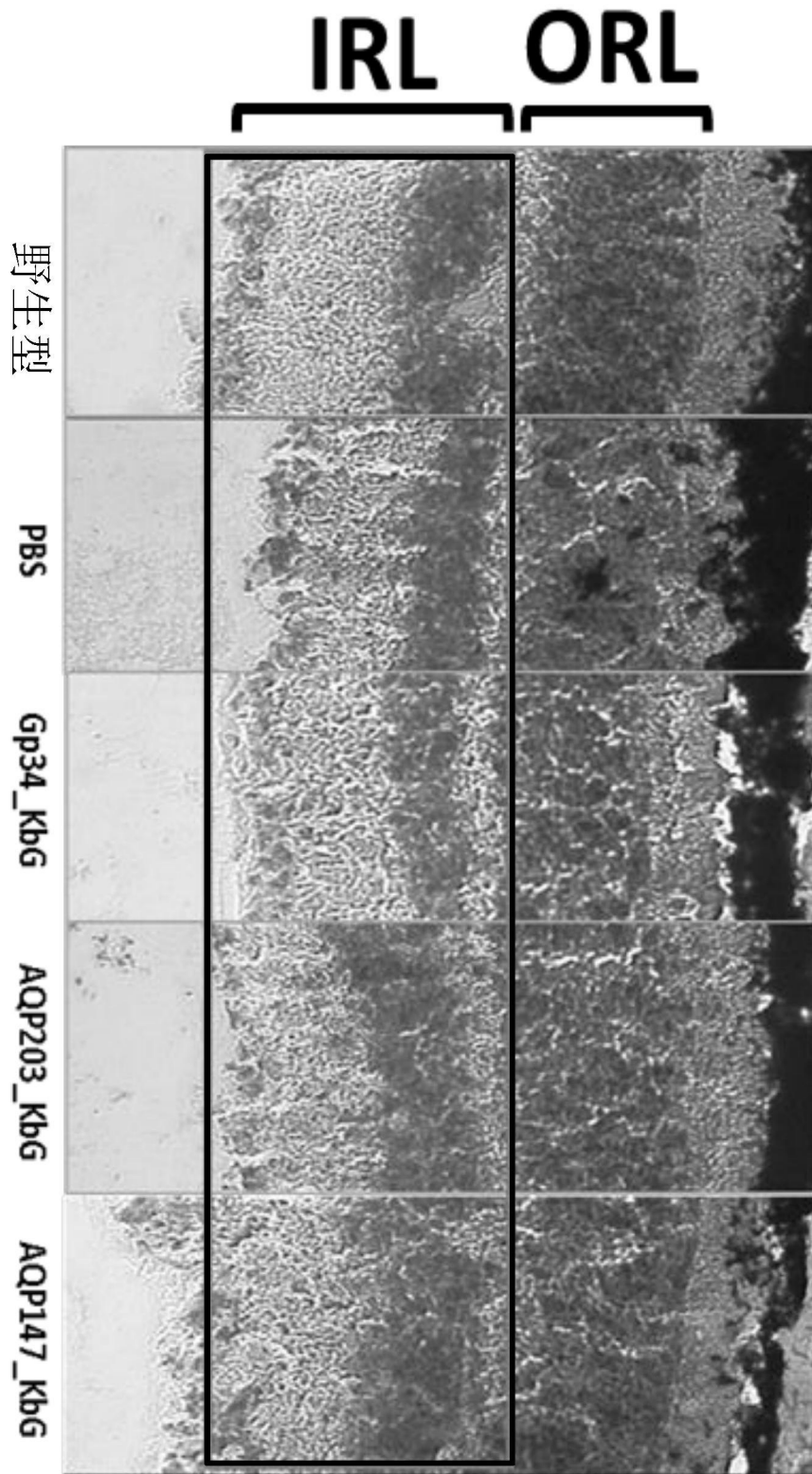


图24,续