

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202492450** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.11.11

(22) Дата подачи заявки
2023.03.24

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(54) **МНС I β -ОПОСРЕДОВАННАЯ ИММУНОСУПРЕССИЯ, СПЕЦИФИЧЕСКАЯ В ОТНОШЕНИИ АНТИГЕНОВ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК, КАК НОВОЕ ЛЕЧЕНИЕ ДИАБЕТА I ТИПА**

(31) 22164163.2

(32) 2022.03.24

(33) EP

(86) PCT/EP2023/057681

(87) WO 2023/180547 2023.09.28

(71) Заявитель:
ЮЛИУС-МАКСИМИЛИАНС-УНИВЕРЗИТЕТ ВЮРЦБУРГ (DE)

(72) Изобретатель:

**Бруттел Валентин, Вишхузен Йорг,
Брюннерт Даниэла, Ахсан Фадхил
(DE)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к терапевтическому применению неклассических молекул главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) (также называемых молекулами МНС класса I β) в комбинации с пептидными антигенами для лечения диабета 1-го типа (T1D). В частности, изобретение относится к рекомбинантным полипептидам, включающим пептидные антигены и один или больше доменов неклассической молекулы МНС класса I β . Изобретение также относится к способам получения таких рекомбинантных полипептидов, включающим их фармацевтическим композициям, а также к их применению для лечения диабета 1-го типа (T1D).

A1

202492450

202492450

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-582146EA/032

МНС Ib-ОПОСРЕДОВАННАЯ ИММУНОСУПРЕССИЯ, СПЕЦИФИЧЕСКАЯ В ОТНОШЕНИИ АНТИГЕНОВ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК, КАК НОВОЕ ЛЕЧЕНИЕ ДИАБЕТА I ТИПА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к терапевтическому применению неклассических человеческих молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) (также называемых молекулами МНС класса Ib) в комбинации с пептидными антигенами для лечения диабета 1-го типа (T1D). Изобретение, в частности, относится к рекомбинантным полипептидам, включающим пептидные антигены и один или больше доменов неклассической молекулы МНС класса Ib. Изобретение также относится к способам получения таких рекомбинантных полипептидов, фармацевтическим композициям, включающим их, а также к их применению для лечения диабета 1-го типа (T1D).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Как и при любых аутоиммунных заболеваниях, чрезмерный иммунный ответ против собственной ткани организма, которая ошибочно распознается как чужеродная и подвергается атаке, приводит к диабету 1 типа (T1D). Решающую роль в данном случае играют Т-клетки, которые с помощью своих рецепторов могут селективно распознавать отдельные структуры-мишени (антигены). В настоящий момент такие заболевания в основном лечат с применением противовоспалительных средств или антител, которые системно подавляют иммунные ответы и, таким образом, ослабляют симптомы или замедляют прогрессирование заболеваний. В то же время, тем не менее, функционирующие Т-клетки также необходимы, в частности, для выживания пациентов с аутоиммунными заболеваниями, поскольку они способны распознавать и бороться с опасными вирусами, бактериями, паразитами и мутантными клетками. Поэтому системную иммуносупрессию можно применять только в узком терапевтическом окне. Таким образом, в случае диабета 1-го типа одним из пробных методов является частичная компенсация развившихся нарушений путем введения инсулина. Однако контроль уровня глюкозы в крови и точной дозы инсулина крайне сложен. Таким образом, существует неудовлетворенная высокая потребность медицины, связанная с тем, что продолжительность жизни пациентов с T1D сокращена на 11-13 лет из-за многочисленных последствий (Livingstone et al, JAMA. 2015 Jan 6; 313(1):37-44).

CD8 Т-клетки, которые атакуют островковые клетки, играют решающую роль при T1D (Tsai S, Shameli A, Santamaria P. CD8+ T cells in type 1 diabetes. Adv Immunol. 2008; 100:79-124).

Впрочем, одним из ключевых диагностических инструментов для T1D является исследование сыворотки на аутоантитела, такие как аутоантитела к цитоплазматическим антигенам островковых клеток (ICA), аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (анти-

GAD), аутоантитела к инсулинома-ассоциированному антигену 2 (IA-2A) или аутоантитела к инсулину (IAA). Таким образом, пациентов с повышенным риском можно выявить до того, как произойдет значимое разрушение островковых клеток. Кроме того, ингибирование как ответов Т-клеток CD8, так и образования аутоантител может значительно улучшить результат лечения заболевания.

WO2018/215340 относится к комбинациям молекул МНС класса Ib и пептидов для адресной терапевтической иммуномодуляции.

В целом сохраняется потребность в улучшенных лекарственных средствах для лечения диабета 1-го типа (T1D).

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения обнаружили, что молекулы МНС класса Ib человека, такие как HLA-G, обладают способностью индуцировать антигенспецифическую толерантность к презентированным пептидным антигенам. Таким образом, несмотря на схожую структуру и последовательность с классическими молекулами МНС класса Ia человека, которые индуцируют специфичные к антигенным пептидам иммунные ответы, молекулы МНС класса Ib могут с преимуществами использоваться согласно изобретению для подавления иммунных ответов антигенспецифическим образом. Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что для подавления иммунных ответов согласно изобретению могут использоваться молекулы, отличающиеся от природных молекул МНС класса Ib, и, в частности, полипептиды, которые включают по меньшей мере только один домен молекулы МНС класса Ib, предпочтительно по меньшей мере домен [альфа]3 молекулы МНС класса Ib: Домены [альфа]1 и [альфа]2 переменных молекул класса Ia можно комбинировать с доменом [альфа]3 молекулы МНС класса Ib человека для подавления иммунных ответов против пептидов, презентуемых этими антигенами. Авторы изобретения также обнаружили, что антиген, который помещен в пептидсвязывающую щель HLA-G, индуцирует селективную толерантность в когнатных Т-клетках. Авторы изобретения наблюдали, в частности, два механизма: индукцию апоптоза в высокоактивированных цитотоксических CD8⁺ Т-клетках и индукцию регуляторных Т-клеток в когнатных интактных Т-клетках. Таким образом, изобретение обеспечивает селективную индукцию толерантности к специфическим антигенам, не приводя к нарушению защитных иммунных ответов против патогенов.

Нагруженные антигенами молекулы HLA-G могут быть нестабильными. По этой причине авторы изобретения сконструировали растворимые рекомбинантные полипептиды, включающие пептидный антиген, молекулу МНС класса Ib, такую как HLA-G, и β 2-микроглобулин (b2m), и соединили эти три компонента ковалентно (например, через ковалентные линкеры). В альтернативе антигенсвязывающие домены α 1 и α 2 молекулы МНС класса Ib, такой как HLA-G, были заменены соответствующими доменами других молекул МНС для повышения гибкости и универсальности этих рекомбинантных полипептидов (см., например, Фигуру 2). Эти альтернативные рекомбинантные полипептиды могут быть сконструированы с антигенсвязывающими

доменами других молекул HLA человека. Ранее было обнаружено, что конструкции, включающие домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ мышиного H2-Kb, могут презентировать пептид SIINFEKL из овальбумина Т-клеткам OT-1 (Т-клетки OT-1 экспрессируют трансгенный Т-клеточный рецептор, который специфично распознает этот антиген) (WO2018/215340).

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что с помощью рекомбинантных полипептидов согласно изобретению можно подавлять иммунные ответы против человеческого проинсулина/человеческого инсулина (INS), человеческой глутаматдекарбоксилазы 65 (GAD65), человеческого амилоидного полипептида островковых клеток (IAPP) и человеческого транспортера цинка 8 (ZNT8). Таким образом, согласно изобретению диабет 1-го типа (T1D) можно лечить с применением рекомбинантных полипептидов изобретения.

Более того, согласно изобретению рекомбинантные полипептиды изобретения не только модулируют Т-клеточные ответы, но и предотвращают образование аутоантител к человеческому проинсулину и человеческому инсулину (INS), человеческой глутаматдекарбоксилазе 65 (GAD65), человеческому островковому амилоидному полипептиду (IAPP) и человеческому транспортеру цинка 8 (ZNT8). Ожидается, что такое преимущество будет способствовать клиническому улучшению у больных диабетом 1-го типа (T1D), поскольку такие аутоантитела, помимо CD8+ Т-клеток, участвуют в патологии диабета 1-го типа (T1D).

Таким образом, изобретение относится к следующим предпочтительным вариантам осуществления:

1. Рекомбинантный полипептид, способный презентировать пептидный антиген, где рекомбинантный полипептид включает, в порядке от N-конца к С-концу:

i) пептидный антиген, презентруемый указанным рекомбинантным полипептидом, где пептидный антиген является пептидом человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8;

ii) необязательно, линкерную последовательность;

iii) необязательно, последовательность домена человеческого полипептида, включающую последовательность человеческого $\beta 2$ -микроглобулина или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности человеческого $\beta 2$ -микроглобулина, представленной в SEQ ID NO:5;

iv) необязательно, линкерную последовательность;

v) необязательно, домен [альфа]1 молекулы МНС;

vi) необязательно, домен [альфа]2 молекулы МНС;

vii) домен [альфа]3 молекулы МНС класса Ib или производное домена [альфа]3 молекулы МНС класса Ib, где указанное производное способно связываться с ILT2 или ILT4;

viii) необязательно, сайт расщепления протеазой;

- ix) необязательно, спейсерную последовательность; и
- x) необязательно, аффинную метку.

2. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 1, где указанный пептидный антиген согласно i) имеет длину от 7 до 11 аминокислот, предпочтительно 8-10 аминокислот.

3. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 1 или 2, где указанный пептидный антиген согласно пункту i) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

4. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где указанный пептидный антиген состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23.

5. Рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого проинсулина или человеческого инсулина и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 25.

6. Рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческой глутаматдекарбоксилазы 65 и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

7. Рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческой глутаматдекарбоксилазы 65 и состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

8. Рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого транспортера цинка 8 и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24.

9. Рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого островкового амилоидного полипептида.

10. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы МНС класса Ia человека или из молекулы МНС класса Ib человека.

11. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 10, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы МНС класса Ia человека.

12. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 11, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы HLA-A2 человека.

13. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 10, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы MHC класса Ib человека.

14. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 13, где указанный домен [альфа]1 согласно пункту (v) и указанный домен [альфа]2 согласно пункту (vi) происходят из молекулы HLA-G человека.

15. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где домен [альфа]3 молекулы MHC класса Ib согласно пункту (vii) представляет собой домен [альфа]3 человеческого HLA-E, человеческого HLA-F или человеческого HLA-G.

16. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где домен [альфа]3 молекулы MHC класса Ib согласно пункту (vii) представляет собой домен [альфа]3 человеческого HLA-G.

17. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичен или обладает по меньшей мере 80% идентичностью аминокислотной последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

18. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 17, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичен или обладает по меньшей мере 92% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

19. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 17, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичен или обладает по меньшей мере 94% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

20. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 17, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичен или обладает по меньшей мере 96% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

21. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 17, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичен или обладает по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

22. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 17, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичен или обладает по меньшей мере 99% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

23. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 17, где домен [альфа]3 согласно (vii) идентичен домену [альфа]3, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

24. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где линкерная последовательность согласно (ii) и/или линкерная последовательность согласно (iv) включает аминокислотную последовательность (GGGGS)_n, где n является целым числом, равным или больше 1.

25. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 24, где линкерная последовательность согласно (ii) включает аминокислотную последовательность (GGGGS)_n, и где n является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и предпочтительно выбрано из группы, состоящей из 2, 3, 4 и 5.

26. Рекомбинантный полипептид согласно пункту 24 или 25, где линкерная последовательность согласно (iv) включает аминокислотную последовательность (GGGGS)_n, и где n является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и предпочтительно выбрано из группы, состоящей из 2, 3, 4 и 5.

27. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где указанная последовательность домена человеческого полипептида согласно (iii) по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 и более предпочтительно идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5.

28. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где указанный полипептид является димерным или мультимерным.

29. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где полипептид включает или состоит из всех компонентов i) - vii).

30. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где полипептид не включает компоненты viii) - x).

31. Рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-29, где полипептид включает или состоит из всех компонентов i) - x).

32. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий N-концевую последовательность сигнального пептида секреции.

33. Рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-31, где рекомбинантный полипептид состоит из аминокислотной последовательности, состоящей из следующих ((a) и (b)) в порядке от N- к C-концу:

(a) пептидный антиген, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 2, и

(b) аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 16.

34. Рекомбинантный полипептид согласно любому из предыдущих пунктов, где

рекомбинантный полипептид является растворимым.

35. Нуклеиновая кислота, кодирующая один или больше полипептидов согласно любому из предыдущих пунктов.

36. Нуклеиновая кислота согласно пункту 35, где нуклеиновая кислота является вектором.

37. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту согласно пунктам 35 или 36.

38. Фармацевтическая композиция или набор, включающие по меньшей мере один рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-34.

39. Фармацевтическая композиция или набор согласно пункту 38, где фармацевтическая композиция или набор включает по меньшей мере два разных рекомбинантных полипептида согласно любому из пунктов 1-34, и где каждый из разных полипептидов включает другой пептидный антиген, как определено в любом из пунктов 3-9.

40. Фармацевтическая композиция или набор согласно пункту 38 или 39, где фармацевтическая композиция или набор включает по меньшей мере следующие ((A)-(C)): (A) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого проинсулина или человеческого инсулина; (B) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческой глутаматдекарбоксилазы 65; (C) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого транспортера цинка 8; и необязательно дополнительно включает (D) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого островкового амилоидного полипептида.

41. Фармацевтическая композиция или набор по любому из пунктов 38-40, где фармацевтическая композиция или набор включает по меньшей мере три разных рекомбинантных полипептида согласно любому из пунктов 1-34, где указанный пептидный антиген первого рекомбинантного полипептида по меньшей мере из трех разных рекомбинантных полипептидов состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где указанный пептидный антиген второго рекомбинантного полипептида по меньшей мере из трех разных рекомбинантных полипептидов состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и где указанный пептидный антиген третьего рекомбинантного полипептида по меньшей мере из трех разных рекомбинантных полипептидов состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

42. Фармацевтическая композиция или набор согласно любому из пунктов 37-41 для применения при лечении диабета 1-го типа у пациента-человека.

43. Фармацевтическая композиция или набор для применения согласно пункту 42, где лечение представляет собой лечение иммунотерапией.

44. Фармацевтическая композиция или набор для применения согласно любому из пунктов 42-43, где лечение осуществляют путем индукции иммунологической

толерантности к человеческому проинсулину и/или человеческому инсулину, человеческой глутаматдекарбоксилазе 65, человеческому островковому амилоидному полипептиду и/или человеческому транспортеру цинка 8.

45. Фармацевтическая композиция или набор для применения согласно любому из пунктов 42-44, где лечение осуществляют путем снижения уровня в плазме аутоантител против инсулина (аутоантител к инсулину IAA) или глутаматдекарбоксилазы (GAD-65), или островкового антигена-2A (IA-2A), или транспортера цинка ZnT8 при оценке с помощью радиоиммунных анализов или электрохемилюминесцентных анализов связывания антигена без радиоактивных меток.

46. Фармацевтическая композиция или набор для применения согласно любому из пунктов 42-45, где пациент-человек является пациентом, который до начала лечения имел в плазме аутоантитела против инсулина (аутоантитела к инсулину IAA) или глутаматдекарбоксилазы (GAD-65), или островкового антигена-2A (IA-2A), или транспортера цинка ZnT8.

47. Рекombинантная клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту или вектор согласно пункту 35 или 36 и экспрессирующая рекомбинантный полипептид согласно любому из пунктов 1-34.

48. Способ получения фармацевтической композиции, включающей полипептид согласно любому из пунктов 1-34, где способ включает этапы: (а) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина согласно пункту 47 в условиях, позволяющих экспрессию рекомбинантного полипептида с молекулы нуклеиновой кислоты, (b) сбора рекомбинантного полипептида, (с) очистки рекомбинантного полипептида и (d) включения рекомбинантного полипептида в фармацевтическую композицию.

Фармацевтические композиции или наборы для применения согласно изобретению также могут применяться при лечении диабета 1-го типа у человека, где лечение представляет собой комбинированное лечение с терапией стволовыми клетками для регенерации ткани поджелудочной железы. Ожидается, что такое комбинированное лечение будет полезным, поскольку рекомбинантные полипептиды согласно изобретению, благодаря своему специфическому иммуносупрессивному эффекту, будут способствовать регенерации ткани поджелудочной железы при терапии стволовыми клетками.

Фармацевтические композиции или наборы для применения согласно изобретению также могут применяться при лечении диабета 1-го типа у человека, где лечение представляет собой комбинированное лечение с терапией стволовыми клетками или лекарственной терапией для регенерации бета-клеток человека для восстановления ткани поджелудочной железы. Лекарственная терапия для регенерации бета-клеток человека при диабете была рассмотрена в обзоре P Wang, E Karakose, L Choleva, K Kumar, RJ DeVita., A Garcia-Ocaña, AF Stewart Andrew. Human Beta Cell Regenerative Drug Therapy for Diabetes: Past Achievements and Future Challenges. *Frontiers in Endocrinology* 12, 2021. DOI=10.3389/fendo.2021.671946.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Изображение нагруженной пептидами растворимой молекулы МНС Ib, подходящей для терапевтической антиген-специфической иммуномодуляции.

Презентированный пептидный антиген показан в виде пунктирных сфер, домены альфа1-3 HLA-G обозначены светло-серым цветом, и домен бета2-микроглобулина обозначен темно-серым цветом. Необязательный линкер, соединяющий антигенный пептид с молекулой бета2-микроглобулина, показан серым в стиле стержневой модели, и необязательная дисульфидная ловушка показана в виде черных сфер. Эта фигура была создана с использованием PyMol и основана на структурах, опубликованных в Clements et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 1; 102(9):3360-5 и Hansen et al., Trends Immunol. 2010 Oct; 31(10):363-9.

Фигура 2: Пример конструкции на основе вектора, кодирующей одноцепочечную молекулу МНС Ib, подходящую для терапевтической пептидспецифической иммуномодуляции.

HLA-G1 и HLA-G5 состоят из 3 [альфа] доменов (показаны черными), нековалентно связанной субъединицы бета-2-микроглобулина (показана темно-серой) и антигенного пептида, презентированного на HLA-G (короткая черная стрелка). HLA-G1 также содержит трансмембранный домен и короткую внутриклеточную цепь (не показана). Как здесь показано, домен [альфа]-3 способен связываться с рецепторами ILT2 (см. Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 July 22; 100(15):8856-8861) и ILT4 (см. Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 31; 103(44):16412-7) на иммунных клетках. Физиологически эти последовательности образуют нековалентно связанный комплекс МНС класса I. Для упрощения очистки молекулы комплекса МНС Ib можно ввести одну или больше белковых меток (таких как SpotTag, тус-метка и/или His(6×)-метка). Их можно ввести таким образом, чтобы обеспечить их последующее необязательное удаление путем расщепления с использованием необязательного сайта расщепления Фактором Ха. Кроме того, антигенный пептид, бета 2-микроглобулин и [альфа] цепь МНС Ib могут быть связаны для повышения стабильности. Карта вектора была создана с использованием программы Snapgene Viewer.

Фигура 3: Суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения индуцируют Treg, секретирующие IL10 у мышей. В этом эксперименте 100 мкг суррогатных молекул, состоящих из вирусного (Gr34) или овальбуминового (Ova) модельного пептидного антигена, мышинных доменов H2-K^b альфа1 и 2, и домена альфа 3 человеческого HLA-G и бета-2-микроглобулина, вводили внутрибрюшинно 12-недельным мышам C57BL/6. Через 14 дней мышей умерщвляли, а спленоциты повторно стимулировали 5 мкг/мл пептида Gr34 или пептида Ova в 48-часовом стандартном анализе ELISpot на мышинный IL-10.

Было обнаружено значимое повышение регуляторных T-клеток, которые секретируют IL-10 только в ответ на повторную стимуляцию пептидом, по отношению к которому была индуцирована толерантность путем инъекции суррогатной молекулы.

(A) схема эксперимента; (B) результаты

Фигура 4: Суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения предотвращают

направляемый CD8⁺ Т-клетками ЕАЕ у мышей.

В этой модели РС на мышях модельный антиген овалбумин (OVA) экспрессируется в олигодендроцитах под контролем промотора основного белка миелина (MBP) (ODC-OVA). Это приводит к презентации пептида OVA257-264 на молекулах H-2K^b МНС на олигодендроцитах. У мышей OT-I Т-клеточный рецептор (OT-I) экспрессируется на собственных CD8⁺ Т-клетках, который распознает именно такую комбинацию пептида и МНС. При переносе CD8⁺ Т-клеток этих мышей 10-дневным мышам ODC-OVA, у них развивается экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), который во многих аспектах напоминает патогенез и симптоматику РС (Na et al., *Brain*, Volume 131, Issue 9, September 2008, Pages 2353-2365). В этом эксперименте 500 мкг суррогатных молекул, состоящих из вирусного (Gp34) или овалбуминового (Ova) модельного пептидного антигена, мышинных доменов H2-K^b альфа1 и 2, и домена альфа 3 человеческого HLA-G и бета-2-микроглобулина, или просто PBS, вводили в один день. ЕАЕ оценивали согласно публикации Bittner et al., *J Vis Exp*. 2014 Apr 15;(86):51275.

Только суррогатные молекулы, индуцирующие толерантность к овалбумину, почти полностью предотвращали симптомы ЕАЕ.

(А) схема эксперимента; (В) результаты

Фигура 5: Некоторые суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения селективно предотвращают ЕАЕ, направляемый CD4⁺ Т-клетками у мышей.

В этой модели сильный миелинспецифический аутоиммунный ответ инициируют путем введения пептида MOG 35-55 в комбинации с полным адъювантом Фрейнда, который активизирует CD4⁺ Th17 клетки, и коклюшным токсином (PTX), который повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера (методика: Bittner et al., *J Vis Exp*. 2014 Apr 15; (86):51275). В этом случае CD4⁺ клетки, как и антитела, играют решающую роль в развитии ЕАЕ (Tigno-Aranjuez et al., *J Immunol* November 1, 2009, 183 (9) 5654-5661). Кроме того, в первый день вводили 100 мкг/мышь суррогатных молекул, состоящих из вирусного (Gp34) или двух пептидных антигенов Mog (Mog37 или Mog44), мышинных доменов альфа1 и 2 H2-D^b и домена альфа 3 человеческого HLA-G и бета-2-микроглобулина, или просто PBS.

Пептид Mog44, содержащий суррогатную молекулу, значительно уменьшал симптомы ЕАЕ и потерю веса.

(А) схема эксперимента; (В) оценка ЕАЕ; (С) масса тела

Фигура 6: Mog44 суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения предотвращали воспаление и инфильтрацию CD8 Т-клеток в спинной мозг. (А) Толуидин; (В) CD8-DAB

Свежезамороженные 10 мкм срезы окрашивали 1× коммерческим Толуидиновым реагентом для окрашивания в течение 1 ч при комнатной температуре. Сильная инфильтрация иммунных клеток была обнаружена при ЕАЕ, но предотвращена Mog44_Db_G.

Свежезамороженные 10 мкм срезы быстро сушили при комнатной температуре, фиксировали ацетоном, блокировали 5% BSA 10% нормальной козьей сывороткой в PBS, окрашивали 1:100 антителом к CD8, вторичным антителом, связанным с HRP, и раствором DAB (подробные методы: Karikari et al., Brain Behav Immun. 2022 Jan 12; 101:194-210)

Фигура 7: Обнаружение антител к MOG35-55 у мышей Mog-EAE, получавших суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения ("AIM Bio")

Коротко, сыворотку мышей собирали при пункции сердца после умерщвления мышей. 10 мкг/мл Mog35-55 использовали для покрытия планшетов в течение ночи, лунки блокировали 1% BSA и детектировали антитела против Mog35-55 с использованием указанных вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP). На Фигуре 7, продолжении, показано, что общий IgG не снижается при обработке суррогатной молекулой MOG47_Db_G в этих образцах. Набор для анализа IgG человека (гамма-цепь) Easy-Titer™ (Thermo Fisher) использовали для количественного определения общего IgG.

Фигура 8: Список кандидатных рекомбинантных человеческих полипептидов T1D. Правильная укладка белка согласуется с хорошей или, по меньшей мере, приемлемой экспрессией. Показана индукция T-reg в МКПК по меньшей мере 30%, как было обнаружено с помощью ELISpot, и предсказанная с помощью AlphaFold2 укладка.

Рекомбинантные полипептиды, указанные на Фигуре, следующим образом:

название рекомбинантного полипептида	последовательность пептидного антигена	SEQ ID NO:
T1D-01 GAD65_84_G_Spt	KVDVNYAFL	SEQ ID NO: 38
T1D-02 GAD65_323_A2G_Spt	KQKGFVPFL	SEQ ID NO: 39
T1D-03 GAD65_436_G_Spt	SYDTGDKAL	SEQ ID NO: 40
T1D-04 GAD65_507_HLAG_Spt	WYIPPSLRTL	SEQ ID NO: 26
T1D-05 GAD65_536_A2G_Spt	RMMEYGTTM	SEQ ID NO: 27
T1D-06 GAD65_573_A2G_Spt	EWESNGQPE	SEQ ID NO: 23
T1D-07 IAPP_2_A2G_Spt	GILKLQVFL	SEQ ID NO: 41
T1D-08 IAPP_9_A2G_Spt	FLIVLSVAL	SEQ ID NO: 42
T1D-09 IAPP_12_A2G_Spt	VLSVALNHL	SEQ ID NO: 43
T1D-10 IAPP_12_G_Spt	VLSVALNHL	SEQ ID NO: 43
T1D-11 IAPP_81_G_Spt	REPLNYLPL	SEQ ID NO: 44
T1D-12 INS_2_A2G_Spt	ALWMRLLPL	SEQ ID NO: 45
T1D-13 INS_6_A2G_Spt	RLLPLLALL	SEQ ID NO: 46
T1D-14 INS_6_G_Spt	RLLPLLALL	SEQ ID NO: 46
T1D-15 INS_14_A2G_Spt	LALWGPDPA A	SEQ ID NO: 25
T1D-16 INS_15_A2G_Spt	ALWGPDPA A A	SEQ ID NO: 2
T1D-17 INS_33_A2G_Spt	SHLVEALYLV	SEQ ID NO: 47
T1D-18 INS_34_A2G_Spt	HLVEALYLV	SEQ ID NO: 48
T1D-19 INS_76_A2G_Spt	SLQPLALEG	SEQ ID NO: 49
T1D-20 INS_85_A2G_Spt	SLQKRGIVEQ	SEQ ID NO: 50
T1D-21 INS_90_A2G_Spt	GIVEQCCTSI	SEQ ID NO: 51

T1D-22 INS_101_A2G_Spt	SLYQLENYC	SEQ ID NO: 52
T1D-23 ZnT8_107_A2G_Spt	LLIDLTSFL	SEQ ID NO: 53
T1D-24 ZnT8_107_G_Spt	LLIDLTSFL	SEQ ID NO: 53
T1D-25 ZnT8_126_A2G_Spt	KPPSKRLTF	SEQ ID NO: 54
T1D-26 ZnT8_185_A2G_Spt	AVAANIVLTV	SEQ ID NO: 55
T1D-27 ZnT8_245_A2G_Spt	KIADPICTF	SEQ ID NO: 24
T1D-28 ZnT8_245_G_Spt	KIADPICTF	SEQ ID NO: 24
T1D-29 ZnT8_259_G_Spt	VLASTITIL	SEQ ID NO: 56
T1D-30 ZnT8_266_A2G_Spt	ILKDFSILL	SEQ ID NO: 22
T1D-31 ZnT8_291_G_Spt	ILAVDGVLSV	SEQ ID NO: 57

Фигура 9: Повышение CD8 Treg у здоровых доноров крови при воздействии рекомбинантных полипептидов изобретения. На фигуре показано повышение CD8⁺ Treg-клеток при воздействии рекомбинантных полипептидов, содержащих пептидный антиген транспортера цинка 8 ILKDFSILL (A), пептидный антиген инсулина ALWGPDPAАА (B) и пептидный антиген глутаматдекарбоксилазы 65 EWESNGQPE (C) соответственно.

Фигура 10: Очищенные одноцепочечные молекулы МНС Ib представляют собой стабильные мономеры или димеры. После очистки одноцепочечных молекул МНС Ib, показанных на Фигурах 3 и 4, их стабильность исследовали после 1 и 3 циклов замораживания-оттаивания (з/о), хранения в течение 5 дней при комнатной температуре и нагревания до температуры 50°C в течение 30 минут. Для этого проводили: А) окрашивание в геле Кумасси 12% полиакриламидного геля с использованием 2 мкг AIM Bio и В) Вестерн-блоттинг aHLA-G с использованием блота антитела 2A12aHLA-G (1:1000) с использованием 1 мкг белка в невозстановливающих условиях. Обнаружению поддавались как мономеры, так и димеры.

Фигура 11: Одноцепочечные молекулы МНС Ib являются термически стабильными. Для анализа термического сдвига (TSA) 3 мкг соответствующей одноцепочечной молекулы МНС Ib или Мотавизумаба в качестве контрольной молекулы разбавляли PBS и 5× красителем SYPRO Orange (сток 5000×, конечная концентрация: 5×) до объема 25 мкл. Программа постороения кривой плавления была настроена на приборе StepOnePlus с использованием программы StepOnePlus 2.3. Начальная температура составляла 25°C в течение одной минуты с последующим повышением температуры на 1°C в минуту до конечной температуры 95°C в течение 2 минут, при этом производили измерение аутофлуоресценции в условных единицах. Данные экспортировали и строили графики в Prism V7.04. Для определения температуры плавления (T_p) использовали сигмоидальную функцию Больцмана.

Фигура 12: Одноцепочечные молекулы МНС Ib индуцируют Treg дозозависимым образом. Мышам OT-I в/б вводили указанные количества одноцепочечных конструкций альфа1+2 H2_K^b и альфа3 домена HLA-G с человеческим бета-2-микроглобулином и указанным пептидом или растворитель (PBS). Ова является когнатным пептидом для TCR OT-I у этих мышей, Gr34 является нерелевантным, вирусным контрольным пептидом. Через 14 дней мышей умерщвляли и исследовали спленоциты на предмет IL10-

секретирующих клеток в ELISpot на вторичный мышинный IL-10 (200000 клеток на лунку, набор для анализа ELISpot мышинового IL-10 MabTech, добавляли 5 мкг/мл указанного пептида или только PBS, 48 ч). Наблюдали четкую индукцию IL-10-секретирующих клеток, реактивных в отношении пептида Ova, при инъекции 50 и 500 мкг адаптированного для мыши Ova_KbG.

Фигура 13: Одноцепочечные молекулы МНС Ib ингибируют лизис Т-клеток дозозависимым образом. Мышей OT1/BL6 умерщвляли, собирали спленциты и один раз промывали RPMI с 5% FCS. Эритроциты удаляли с использованием 2 мл 1× стерильного буфера для лизиса эритроцитов в течение 3 минут. Клетки культивировали в культуре высокой плотности (10 млн. клеток/мл) в течение 72 часов в среде RPMI с 10% FCS, с ГМ-КСФ 20 нг/мл, IL-2 20 нг/мл и IL-4 10 нг/мл и возрастающими дозами Ova_KbG. Затем клетки соскабливали с планшетов, после чего CD8⁺ клетки очищали с использованием магнитных гранул.

Использовали стерильные 96-луночные белые планшеты. Экспрессирующие люциферазу клетки-мишени Panc02 нагружали 20 мкг/мл пептида Ova (SIINFEKL) в течение 60 минут при 37°C с качанием на 500 об/мин. Добавляли эффекторные CD8⁺ Т-клетки в соотношении 50:1, а также люциферин. Люминесценцию измеряли через 0 ч, 24 ч, 48 ч.

Фигура 14: Одноцепочечные молекулы МНС Ib индуцируют экспрессию IL-10 у мышей EAE-ODC Ova. Цитокины в сыворотке мышей EAE-ODC Ova измеряли с использованием набора Th1/Th2 10plex Flowcytomix (eBioscience) в соответствии с инструкцией производителя. Набор использовали для одновременного обнаружения мышинового гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), интерлейкина-1 альфа (IL-1a), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-10 (IL-10), t интерлейкина-17 (IL-17) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) в одном образце. Смешивали гранулы, покрытые восемью специфическими антителами захвата. Затем в каждую лунку 96-луночных планшетов последовательно добавляли 25 мкл смешанных захваченных гранул, 25 мкл неизвестного образца сыворотки или стандартных разведений и 25 мкл реагента для обнаружения фикоэритрина (ФЭ) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Образцы промывали 1 мл промывочного буфера в течение 5 мин и центрифугировали. Осадок гранул ресуспендировали в 200 мкл буфера после удаления супернатанта. Образцы измеряли на проточном цитофлуориметре Attune™ NxT и анализировали с использованием программного обеспечения Attune Cytometric (Thermo Fisher Scientific).

Фигура 15: Повышение IL-10-секретирующих Т-клеток в ответ на обработку указанной одноцепочечной молекулой МНС Ib (рекомбинантным полипептидом изобретения).

Показано % повышение IL-10-секретирующих Т-клеток в ответ на обработку указанной одноцепочечной молекулой МНС Ib. Черные линии обозначают HLA-A2-

положительного донора, серые - отрицательного донора. Ответ в виде значимого повышения Treg наблюдали как у HLA-A2-положительных, так и у HLA-A2-отрицательных доноров (уровень ответа указан в пояснении к фигуре)

Фигура 16: Анализ теплового сдвига

Для анализа теплового сдвига (TSA) 3 мкг соответствующей одноцепочечной молекулы МНС Ib разводили PBS и 5× красителем SYPRO Orange (5000× стоковый раствор, конечная концентрация: 5×) до объема 25 мкл. Программу кривой плавления настраивали на приборе StepOnePlus с использованием программы StepOnePlus 2.3. Начальная температура составляла 25°C в течение одной минуты с последующим повышением температуры на 1°C в минуту до конечной температуры 95°C в течение 2 минут, при этом измеряли автофлуоресценцию в условных единицах. Данные экспортировали и строили графики в Prism V7.04. Для определения температуры плавления (T_p) использовали сигмоидальную функцию Больцмана. Высокие температуры плавления указывают на хорошую стабильность белка для терапевтического применения.

Фигура 17: Анализ термостабильности

A, C: Вестерн-блоты указанных рекомбинантных полипептидов. B, D: Окрашенные Кумасси гели указанных рекомбинантных полипептидов (с использованием тех же методов).

Данные указывают, что одноцепочечные молекулы МНС Ib T1D (рекомбинантные полипептиды изобретения) можно очищать и хранить, и при этом они устойчивы к циклам замораживания-оттаивания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения и общие методики

Если ниже не определено иное, термины, используемые в настоящем изобретении, следует понимать в соответствии с их общепринятым значением, известным специалисту в данной области. Все публикации, патенты и заявки на патент, цитируемые в настоящем документе, включены посредством отсылки в полном объеме во всех отношениях. Публикации, цитируемые в настоящем документе, могут цитироваться также путем указания полной литературной ссылки в тексте.

Все белки в соответствии с изобретением, включая рекомбинантные полипептиды изобретения, могут быть получены способами, известными в уровне техники. Такие способы включают способы получения рекомбинантных полипептидов. Рекомбинантные полипептиды изобретения могут экспрессироваться в рекомбинантных клетках-хозяевах в соответствии с изобретением. Рекомбинантные клетки-хозяева согласно изобретению предпочтительно представляют собой клетки млекопитающих, такие как клетки CHO и НЕК.

Следует понимать, что рекомбинантные полипептиды изобретения, как подразумевается, необязательно включают последовательность сигнального пептида секреции. Аналогичным образом, рекомбинантные полипептиды изобретения, как подразумевается, также необязательно включают аффинные метки, например, для

облегчения очистки, и необязательные участки расщепления протеазой между меткой и полипептидом, например, для облегчения удаления меток при расщеплении протеазой.

Также следует понимать, что любая ссылка на аминокислотные последовательности, указанные в настоящем документе, подразумевает, что она охватывает не только немодифицированную аминокислотную последовательность, но и типичные посттрансляционные модификации этих аминокислотных последовательностей (например, гликозилирование или дезамидирование аминокислот, вырезание определенных аминокислот или другие посттрансляционные модификации), происходящие в клеточных системах экспрессии, известных в данной области, включая клетки млекопитающих, такие как клетки CHO и HEK.

Аналогичным образом следует понимать, что рекомбинантные полипептиды изобретения подразумевают необязательное включение соответствующих пропептидов.

Также следует понимать, что рекомбинантные полипептиды изобретения могут находиться в своей растворимой или мембраносвязанной форме. При использовании в настоящем документе термин "растворимый" означает, что рекомбинантный полипептид растворяется при следующих стандартных условиях: от 5 мкг/мл до 5 мг/мл в PBS, необязательно с 0,1% человеческой сыворотки или, необязательно, в 50% глицерине. То, что рекомбинантный полипептид является "растворимым" в таких условиях, можно определить с помощью методов, известных в данной области, например, путем измерения мутности рекомбинантного полипептида при указанных выше стандартных условиях. В настоящем документе растворимый означает, что по меньшей мере 95% рекомбинантного полипептида определено как растворимый в таких стандартных условиях. Одноцепочечные молекулы МНС можно хранить, например, в PBS при -80°C (с 0,1% человеческого альбумина в качестве носителя или без него, в зависимости от концентрации белка) или в 50% глицерине при -20°C .

Согласно изобретению, молекулы МНС предпочтительно являются молекулами МНС человека.

Рекомбинантные полипептиды изобретения предпочтительно являются выделенными рекомбинантными полипептидами.

Будет известно, каким способом может быть получен рекомбинантный полипептид, способный связывать и презентировать пептидный антиген согласно изобретению. Например, связывающие пептидный антиген домены, такие как домены [альфа]1 и [альфа]2, хорошо известны, и в эти домены можно вводить модификации. Способность пептидного антигена связываться с полипептидами и молекулами МНС согласно изобретению может быть определена с помощью методов, известных в данной области, включая, без ограничения, такие исследовательские методы, как элюирование пептидов с МНС с последующей масс-спектрометрией и биоинформационным предсказанием *in silico*, и подтверждающими методами, такими как методы связывания мультимеров МНС пептидов и анализы стимуляции.

В соответствии с изобретением рекомбинантные полипептиды, фармацевтические

композиции и наборы согласно изобретению предпочтительно подходят для применения у пациента-человека.

В соответствии с изобретением рекомбинантные полипептиды, фармацевтические композиции и наборы согласно изобретению предпочтительно подходят для применения при лечении диабета 1-го типа у пациента-человека.

В соответствии с изобретением рекомбинантные полипептиды, фармацевтические композиции и наборы согласно изобретению предпочтительно подходят для индукции иммунологической толерантности против человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8, например, у пациента-человека.

Следует понимать, что в соответствии с изобретением рекомбинантные полипептиды, фармацевтические композиции и наборы согласно изобретению являются стабильными.

Следует понимать, что в связи с пептидными антигенами, используемыми в соответствии с изобретением, подразумевается, что любые длины этих пептидных антигенов, указанные в настоящем описании (например, "длиной 7-11 аминокислот"), относятся к длине самих пептидных антигенов. Таким образом, длины пептидных антигенов, указанные в настоящем описании, не включают длину, придаваемую дополнительными аминокислотами, которые не являются частью пептидных антигенов, такими как дополнительные аминокислоты из возможных линкерных последовательностей, и т.д.

В соответствии с настоящим изобретением, при каждом появлении термин "включающий" может быть необязательно заменен термином "состоящий из".

Методы и методики

Как правило, если в настоящем документе не определено иное, методы, используемые в настоящем изобретении (например, методы клонирования или методы, относящиеся к антителам), выполняют в соответствии с процедурами, известными из уровня техники, например, процедурами, описанными в руководствах 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) и Harlow and Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Белок-белковое связывание, например связывание антител со своими соответствующими белками-мишенями, можно оценивать с помощью методов, известных в данной области. Белок-белковое связывание предпочтительно оценивают с помощью измерений методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса.

Например, связывание молекул МНС класса Ib или рекомбинантных полипептидов согласно изобретению со своими рецепторами, включая ILT2 и ILT4, предпочтительно

оценивают с помощью измерений методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса. Более предпочтительно, связывание молекул МНС класса Ib или рекомбинантных полипептидов согласно изобретению со своими рецепторами оценивают при измерении поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. Соответствующие условия для таких измерений поверхностного плазмонного резонанса описаны в Shiroishi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 July 22; 100(15):8856-8861.

Выравнивание последовательностей согласно изобретению выполняется с использованием алгоритма BLAST (см. 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). Соответствующие параметры для выравнивания последовательностей коротких пептидов с использованием алгоритма BLAST, которые подходят для пептидных антигенов согласно изобретению, известны из уровня техники. Большинство программных средств, в которых используется алгоритм BLAST, автоматически настраивают параметры выравнивания последовательностей для короткой вводимой последовательности. В одном из вариантов осуществления используются следующие параметры: максимальные последовательности-мишени 10; размер слова 3; матрица замен BLOSUM 62; величина штрафов за пропуски: присутствие 11, продолжение 1; условная композиционная коррекция матрицы замен. Таким образом, при использовании в отношении последовательностей такие термины, как "идентичность" или "идентичный", предпочтительно относятся к значению идентичности, полученному при использовании алгоритма BLAST.

Получение фармацевтических композиций согласно изобретению

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению изготавливают в соответствии с известными стандартами производства фармацевтических композиций.

Например, фармацевтические композиции изготавливают таким образом, чтобы их можно было хранить и вводить надлежащим образом. Фармацевтические композиции согласно изобретению могут, таким образом, включать фармацевтически приемлемые компоненты, такие как носители, вспомогательные вещества и/или стабилизаторы.

Такие фармацевтически приемлемые компоненты не являются токсичными в количествах, используемых при введении фармацевтической композиции пациенту-человеку. Фармацевтически приемлемые компоненты, добавляемые в фармацевтические композиции, могут зависеть от химической природы активных ингредиентов, присутствующих в композиции, конкретного предполагаемого применения фармацевтических композиций и пути введения.

В целом, фармацевтически приемлемые компоненты, используемые в связи с настоящим изобретением, используются в соответствии со знаниями, доступными в данной области техники, например, из Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA. Фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновые кислоты согласно изобретению (например, РНК), также могут

быть включены в составы в соответствии со знаниями, доступными в данной области, например, с использованием липосомных составов, нацеленных на дендритные клетки.

Пептидные антигены в соответствии с изобретением

Пептидные антигены, которые могут использоваться в соответствии с изобретением, включая пептидные антигены, как определено выше, не имеют особых ограничений, помимо их способности к презентации на молекулах МНС. Следует понимать, что "пептидный антиген, презентуемый указанным рекомбинантным полипептидом", указанный в отношении изобретения, является пептидным антигеном, который презентуется указанным рекомбинантным полипептидом человеческим Т-клеткам в случае, если такие Т-клетки присутствуют.

Пептиды, которые могут презентироваться на молекулах МНС, могут быть созданы, как известно в уровне техники (см., например, Rammensee, Bachmann, Emmerich, Bachor, Stevanović. 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; и Rock, Reits, Neefjes. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends Immunol. 2016 Nov; 37(11):724-737).

Пептидные антигены в целом известны в уровне техники. Как правило, пептидные антигены в соответствии с изобретением способны связываться с белками МНС класса I. Специалисту в данной области будет известно, что для каждой молекулы МНС класса Ib или полипептида, способного презентировать пептиды в соответствии с изобретением, предпочтительно будут использоваться пептидные антигены, которые способны связываться с указанной молекулой МНС класса Ib или рекомбинантным полипептидом. Такие пептидные антигены могут быть выбраны на основе методов, известных в данной области.

Связывание пептидных антигенов с молекулами МНС класса Ib или с полипептидами, способными связывать пептидный антиген в соответствии с изобретением, можно оценивать с помощью методов, известных в уровне техники, например, методов из публикаций:

Rammensee, Bachmann, Emmerich, Bachor, Stevanović. 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; и

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

Такие методы включают экспериментальные методы и методы предсказания связывания пептидного антигена.

Якорные остатки, которые служат для закрепления пептидного антигена на молекуле МНС класса I и обеспечения связывания пептидного антигена с молекулой МНС класса I, известны в уровне техники.

В предпочтительном варианте осуществления, в соответствии со всеми вариантами осуществления изобретения, пептидный антиген, используемый в соответствии с изобретением, содержит любой из якорных или предпочтительных аминокислотных остатков в положениях, предсказанных для молекул МНС класса I.

Такие предсказания предпочтительно можно сделать, как описано в любой из следующих публикаций:

- 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* 2021; 596:583-589.

В изобретении пептидный антиген происходит из человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8.

Нужно понимать, что неякорные аминокислотные остатки пептидного антигена изобретения могут содержать или не содержать консервативных замен, предпочтительно не больше двух консервативных замен, более предпочтительно одну консервативную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью пептидного антигена из человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8.

Пептидные антигены изобретения предпочтительно состоят из природных аминокислот. Впрочем, также могут использоваться неприродные аминокислоты, такие как модифицированные аминокислоты. Например, в одном варианте осуществления пептидный антиген согласно изобретению охватывает пептидомиметик указанной аминокислотной последовательности пептидного антигена человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8.

Способы синтеза пептидных антигенов, включая пептидные антигены в соответствии с изобретением, хорошо известны в уровне техники.

Последовательности

Предпочтительные аминокислотные последовательности, указанные в настоящей заявке, могут быть независимо выбраны из следующих последовательностей. Последовательности представлены в порядке от N-конца к С-концу; и они представлены в однобуквенном аминокислотном коде.

Примерные последовательности, которые являются частью рекомбинантных полипептидов согласно изобретению:

Необязательный лидерный пептид (отсутствует в рекомбинантном полипептиде вследствие процессинга во время клеточной экспрессии): например, MSRSVALAVLALLSLSGLEA (SEQ ID NO: 1)

Пептидный антиген: любой пептид МНС класса I, соответствующий доменам [альфа] 1 и 2 МНС класса I, например, ALWGPDPAAA (SEQ ID NO: 2)

Первый линкер: Например, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3) или GCGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4)

бета-2 микроглобулин, например:

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSF SKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:5, человеческий бета-2 микроглобулин)

Второй линкер, например:

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:6)

Домен [альфа] 1 и 2, полученный из человеческого HLA-G или из любого другого домена [альфа] 1 и 2 МНС класса I, подходящего для презентации выбранного антигенного пептида, Y84 может быть С в варианте DT

например, домен [альфа] 1 и 2, полученный из человеческого HLA-G: например:

GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQ EGPEYWEEETRNTKANAQTDRMNLQTLRG CYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLR GYEQYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEW LHRYLENGKEMLQRA (SEQ ID NO:7)

Или: домен [альфа] 1 и 2 человеческого HLA-A2: например:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQE GPEYWDGETR KVKANSQTHRVDLGT LRG CYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLR GYNQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQT TTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVE WLRRYLENGKETLQRT (SEQ ID NO:8)

домен [альфа]3 человеческого HLA-G (или любой домена [альфа]3 МНС Ib, такой как HLA-F, также взаимодействующий с рецепторами ILT2 и ILT4), например: DPPKTHVTNHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL (SEQ ID NO: 9; последовательность HLA-G [альфа]3).

Следует обратить внимание, что следующие подчеркнутые аминокислоты этой последовательности важны для взаимодействия рецептора ILT2 или ILT4:

DPPKTHVTNHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL

В альтернативе может использоваться более короткая форма домена [альфа]3 человеческого HLA-G, который не содержит необязательную С-концевую

аминокислотную последовательность из интрона 4 (SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL; SEQ ID NO: 20), т.е.:

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEILTWQRDGEDQTQDVELVETRPA
GDGTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW (SEQ ID NO: 21),

Сайт рестрикции Фактора Ха: IEGRTGTKLGP (SEQ ID NO:10)

SpotTag: PDRVRAVSHWSSC (SEQ ID NO: 11)

Мус-метка: EQKLISEEDL (SEQ ID NO:12)

His-метка: НННННН* (SEQ ID NO:13)

Последовательность спейсера: например, NSAVD (SEQ ID NO: 14) или GS

Большинство предпочтительных примерных пептидных антигенов, которые могут быть частью рекомбинантных полипептидов изобретения, являются следующими:

Название	пептидный антиген	SEQ ID NO	Примечания
AIM3_b2mLP_hINS_15_A2G_Spt	ALWGPDPAA	(SEQ ID NO: 2)	предпочтительно используется в рекомбинантных полипептидах, содержащих альфа1 и 2 домены HLA-A2
AIM3_b2mLP_hZnT8_266_A2G_Spt	ILKDFSILL	(SEQ ID NO: 22)	предпочтительно используется в рекомбинантных полипептидах, содержащих альфа1 и 2 домены HLA-A2
AIM3_b2mLP_hGAD65_573_A2G_Spt	EWESNGQPE	(SEQ ID NO: 23)	предпочтительно используется в рекомбинантных полипептидах, содержащих альфа1 и 2 домены HLA-A2
AIM3_b2mLP_hZnT8_245_A2G_Spt	KIADPICTF	(SEQ ID NO: 24)	предпочтительно используется в рекомбинантных полипептидах, содержащих альфа1 и 2 домены HLA-A2

Дополнительные предпочтительные примерные пептидные антигены, которые могут быть частью рекомбинантных полипептидов изобретения, являются следующими:

Название	пептидный антиген	SEQ ID NO	Примечания
AIM3_b2mLP_hINS_14_A2G_Spt	LALWGPDPA	(SEQ ID NO: 25)	предпочтительно используется в рекомбинантных полипептидах, содержащих альфа1 и 2 домены HLA-A2

AIM3_b2mLP_hGAD65_507_HLA G_Spt	WYIPPSLR TL	(SEQ ID NO: 26)	предпочтительно используется в рекомбинантных полипептидах, содержащих альфа1 и 2 домены HLA-G
AIM3_b2mLP_hGAD65_536_A2G_ Spt	RMMEYGT TM	(SEQ ID NO: 27)	предпочтительно используется в рекомбинантных полипептидах, содержащих альфа1 и 2 домены HLA-A2

Пример рекомбинантного полипептида изобретения (с необязательным лидерным пептидом):

MSRSVALAVLALLSLSGLEAALWGPDPAAAGGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQ
VYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYT
EFTPTEKDEYACRVNHVTLTSQPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMR
YFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR
KVKAHSQTHRVDLGLTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQAAYDGK
DYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKE
TLQRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPA
GDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSED
LGSPDRVRAVSHWSSC* (SEQ ID NO: 15; нужно обратить внимание на то, что звездочка
обозначает стоп-кодон),

Следует обратить внимание на то, что последовательность пептидного антигена вышеуказанного полноразмерного рекомбинантного полипептида может быть заменена любой последовательностью пептидного антигена в соответствии с изобретением, т.е. любым пептидным антигеном, презентруемым указанным рекомбинантным полипептидом, где пептидный антиген является пептидом человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8. Таким образом, рекомбинантные полипептиды изобретения могут состоять из последовательности, состоящей из пептидного антигена, который является пептидом человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8 (например, любого из пептидных антигенов SEQ ID NO: 2, 22, 23, 24, 25, 26 и 27), после которой следует последовательность:

GCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL
KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLTSQPKIVKWDRD
MGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFD
SDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVKAHSQTHRVDLGLTLRGCYNQSEAGSHT
VQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQAAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEA
AHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWAL

GFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHE
GLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC* (SEQ ID NO: 16;
нужно обратить внимание на то, что звездочка обозначает стоп-кодон),

Эти рекомбинантные полипептиды изобретения также могут содержать
необязательный лидерный пептид, как представлено выше.

Рецепторы ILT2 (также известный как LILRB1) и ILT4 (также известный как
LILRB2) известны в уровне техники. Предпочтительные последовательности этих
рецепторов в соответствии с изобретением являются следующими:

ILT2:

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQET
QEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLE
LVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHA
RGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLELLVLGVSKKPSLSVQPGP
IVAPEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGG
QYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAGQFYDRVSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGW
M QTFLLTKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLTH
PSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILL
LLLLLLLFLILRHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEE
NLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDT
KDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDV TYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATL
AIH (SEQ ID NO: 17)

ILT4:

MTPIVTVLICLGLSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAEPDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQ
EYRLYREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLV
MTGAYPKPTLSAQSPVVVTSGGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCLNSQPHARG
SSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVV
APGESLTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQ
YRCYGAHNLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTF
LLTKAGAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPV TSAHAGTYRCYGSLNSDPYLLSHPSEPL
ELVVSGPSMGSSPPPTGP ISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLL
LLLLLFLILRHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEEENLY
AAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQDV TYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPEPSIY
ATLAIH (SEQ ID NO: 18)

Последовательности человеческого проинсулина и человеческого инсулина,
человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного
полипептида и человеческого транспортер цинка 8 известны в уровне техники.
Предпочтительные аминокислотные последовательности этих белков являются
следующими:

человеческий проинсулин и человеческий инсулин:

полноразмерный человеческий инсулин (состоящий из сигнального пептида

длиной 24 ак, В-цепи длиной 30 ак, С-пептида длиной 31 ак, А-цепи длиной 21 ак),

референсная последовательность >sp|P01308|INS_HUMAN Insulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=INS PE=1 SV=1
MALWMRLLPLLALLLWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRE
AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

(SEQ ID NO: 19)

проинсулин (после отщепления сигнального пептида)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSL
QPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

(SEQ ID NO: 28)

зрелый инсулин (В-цепь и А-цепь)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (В-цепь) (SEQ ID NO: 29)

LQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN (А-цепь) (SEQ ID NO: 30)

человеческая глутаматдекарбоксилаза 65 (GAD65):

>NP_001127838.1 глутаматдекарбоксилаза 2 [Homo sapiens]

MASPGSGFWSFGSEDGSGDSENPGTARAWCQVAQKFTGGIGNKLCALLYGDAE
KPAESGGSQPPRAAARKAACACDQKPCSCSKVDVNYAFLHATDLLPACDGERPTLAFL
QDVMNILLQYVVKSFDRSTKVIDFHYPNELLQEYNWELADQPQNLEEILMHCQTTLKY
AIKTGHPRYFNQLSTGLDMVGLAADWLTSTANTNMFTYEIAPVFLLEYVTLKKMREII
GWPGGSGDGIFSPGGAISNMYAMMIARFKMFPEVKEKGMAALPRLIAFTSEHSHFSLKK
GAAALGIGTDSVILIKCDERGMIPSDLERRILEAKQKGFVPFLVSATAGTTVYGAFDPL
LAVADICKKYKIWMHVDAAWGGGLLSRKHKWKLSGVERANSVTWNPHKMMGVPL
QCSALLVREEGLMQNCNQMHASYLFQQDKHYDLSYDTGDKALQCGRHVDVFKLWLM
WRAKGTTFEAHVDKCLELAEYLYNIKNREGYEMVFDGKQPQHTNVCFWYIPPSLRTLE
DNEERMSRLSKVAPVIKARMMEYGTMMVSYQPLGDKVNFFRMVISNPAATHQDIDFLIE
EIERLGQDL

(SEQ ID NO: 31; нужно обратить внимание на то, что глутаматдекарбоксилаза 2/GAD2 является синонимом GAD65),

человеческий островковый амилоидный полипептид:

>NP_000406.1 препробелок островкового амилоидного полипептида [Homo sapiens]

MGILKLQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLVHSSNN
FGAILSSTNVGSNTYGKRNAVEVLKREPLNYLPL

(SEQ ID NO: 32)

человеческий транспортер цинка 8:

>NP_776250.2 транспортер цинка 8, изоформа а [Homo sapiens]

MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLESVELQQKPVNKDQCPRERPEELESGGMYHC
HSGSKPTEKGANAYAYAKWKLCSASAICFIFMIAEVVGGHIAGSLAVVTDAAHLLIDLTS
FLLSLFSLWLSSKPPSKRLTFGWHRAEILGALLSILCIWVVVTGVLVYLACERLLYPDYQIQ
ATVMIIIVSSCAVAANIVLTVVLHQRCGLGHNHKEVQANASVRAAFVHALGDLFQSSISVLI

SALIIFYFKPEYKIADPICTFIFSIILVLASTITILKDFSILLMEGVPKSLNYSGVKELILAVDGV
 LSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQVVRREIAKALSKSFTMHSLTIQMESPVD
 QDPDCLFCEDPCD

(SEQ ID NO: 33)

Далее настоящее изобретение проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами:

ПРИМЕРЫ

Пример 1:

Способы получения рекомбинантных полипептидов изобретения

- Клетки Expi-293F (Thermo Fisher), выращенные в среде для экспрессии Expi-293™ (Thermo Fisher): трансфекция 1 мкг ДНК $2,5 \times 10^6$ клеток/мл с использованием набора для трансфекции Expifectamine™ 293 (Thermo Fisher) с использованием Opti-MEM (Thermo Fisher) для образования комплекса ДНК с Expifectamine, через 18-20 ч, добавление усилителя в соответствии с протоколом, сбор супернатанта через 4-6 дней (37°C, 8% CO₂, инкубатор с контролем влажности), орбитальный шейкер 19 мм² 125 об/мин

- Очистка белка с меткой Spot-tag: уравнивание смолы Spot-Car: переносят нужное количества суспензии в соответствующую пробирку, осаждают гранулы с помощью центрифугирования (4°C, 4 мин, 2500 g), удаляют и отбрасывают супернатант, добавляют 10 объемов PBS (холодного) к гранулам, переворачивают пробирку для перемешивания, осаждают гранулы с помощью центрифугирования (4°C, 4 мин, 2500 g), удаляют и отбрасывают супернатант, повторяют 2 раза

- Добавляют требуемый объем гранул к супернатанту, инкубируют в течение ночи при 4°C на орбитальном шейкере, промывают гранулы при многократном центрифугировании (4°C, 4 мин, 2500 g) и удаляют супернатант

- Приготавливают 500 мкМ раствор Spot-пептида в PBS, удаляют супернатант, инкубируют с 1/3 раствора Spot-пептида в течение 5-10 мин

Гранулы осаждают с помощью центрифугирования. Используют центрифужные фильтры Amicon Ultra-4 (отсечение 15 кДа) для концентрирования белка и удаления Spot-пептида с использованием колонок Amicon с отсечением 15 кДа

Центрифужные фильтры Amicon Ultra-4 (15 кДа cutoff) промывают PBS, затем 0,1N NaOH (центрифугирование при 4000 g, 4°C) для удаления остаточных количеств глицерина.

ELISPOT:

1) Культура клеток

А) Выделение МКПК (в ламинарном шкафу)

Для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) проводили центрифугирование в градиенте плотности с лейкоцитами из камеры лейкоредукции и средой для создания градиентной плотности (например, Ficoll или ROTI Sep 1077). Клетки центрифугировали в течение 20 мин при 1200×g без торможения, после чего собирали

межфазное кольцо, которое промывали $1 \times \text{PBS}$ (5 мин, $300 \times g$). МКПК замораживали до последующего использования.

В) Примирование МКПК (в ламинарном шкафу)

МКПК размораживали за 1 день до примирования МКПК (d-1) и выдерживали в течение ночи в 5 мл среды X-VIVO 15, содержащей 5% человеческой сыворотки АВ (IV) группы в лунке 6-луночного планшета при 37°C .

На следующий день (d0) клетки подсчитывали и ресуспендировали в полной среде X-VIVO 15 (5% сыворотки hAB с цитокиновой смесью: 20 нг/мл hIL-2, 20 нг/мл hGM-CSF, 10 нг/мл hIL-4 и 10 нг/мл hTGF-b1) при плотности клеток 3×10^6 клеток/мл.

Для экспериментов 3×10^6 клеток сеяли в соответствующие лунки 12-луночного планшета в конечном объеме 1000 мкл полной среды X-VIVO с цитокиновой смесью и 5 мкг/мл молекулы AIM Bio или соответствующих контролей.

В день 3 добавляли 1 мл полной среды (с цитокинами), в день 6 проводили повторную сенсibilизацию 5 мкг/мл рекомбинантного полипептида изобретения или его суррогата (совместно именуемого молекулой "AIM Bio") (после удаления среды). В дни 7, 10 и 12 добавляли 1 мл полной среды (с цитокинами).

Требуется:

Среда X-VIVO 15+5% человеческой сыворотки АВ

Полная среда X-VIVO 15: среда X-VIVO 15+2% человеческой сыворотки АВ с добавкой цитокиновой смеси: 10 нг/мл TGF-b1, 10 нг/мл IL-4, 20 нг/мл IL-2, 20 нг/мл ГМ-КСФ

6-луночный планшет

12-луночный планшет

2) ELISPOT

Ламинарный шкаф

В день 13 планшеты для ELISPOT покрывали антителом против hIL10 (клон 9D-7, разведение 1:500 в PBS, стерилизованный фильтрованием) и aIL10 (10G8-биотин), и в день 14 сеяли по 200000 клеток/лунка в планшеты ELISPOT в двойной повторности, включая отрицательные контроли (клетки с PBS) и положительный контроль (например, LPS).

Мембрану из ПВДФ активировали 50 мкл/лунка EtOH (35% об/об) в течение 1 мин, затем 5 раз промывали 200 мкл дистиллированной стерильной воды. Планшет покрывали 100 мкл/лунка раствора антител при 4°C в течение ночи. На следующий день несвязавшееся покрывающее антитело удаляли, проводили 5 стадий промывки 200 мкл PBS и добавляли 200 мкл блокирующего буфера (X-VIVO 15 с 5% сыворотки hAB) и инкубировали планшет в течение 30 мин - 2 ч при комнатной температуре.

Приготавливали соответствующий антигенный пептид (например, MOG157) в ДМСО или ДМСО в качестве контроля и добавляли конечное количество 5 мкг пептида/мл до конечного объема 100 мкл/лунка. Сеяли 150000 клеток/лунка в среде X-VIVO 15 с 5% человеческой сыворотки АВ. Блокирующий буфер (среда X VIVO 15+5%

сыворотки hAB) осторожно удаляли и добавляли среду с PBS в качестве отрицательного контроля и стимуляторами (5 мкг/мл общего объема в каждой лунке) в другие лунки и инкубировали при 37°C в течение ночи.

Вне ламинарного шкафа

Приготавливали вторичное антитело: 1 мкг/мл биотинилированного антитела к IL-10 в 0,5% BSA/1× PBS (разведение 1:1000) и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (1:750 в 0,5% BSA/PBS), раствор тетраметилбензидаина фильтровали с использованием фильтра с порами 0,45 мкм и хранили при 4°C до использования.

Супернатант клеток удаляли и 5 раз промывали 100 мкл PBS. Последний оставшийся избыток буфера удаляли при использовании бумажных полотенец. 25 мкл разбавленного HRP-стрептавидина (1:750) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте, после чего проводили 5 стадий промывки с использованием стерильного 1×PBS.

100 мкл отфильтрованного субстрата TMB добавляли в каждую лунку на 15-25 минут до появления синего цвета. Реакцию останавливали, тщательно промывая лунки водопроводной водой.

Пластиковые поддоны планшетов удаляли и промывали дно и боковые стенки планшетов водопроводной водой и высушивали.

Планшеты считывали на анализаторе ImmunoSpot S6 Ultra-V (Cellular Technology Limited), анализировали результаты в Excel и строили графики/проводили статистический анализ в Graphad Prism.

Требуется:

Антитела захвата: антитело против hIL10 (клон: 9D-7, Mabtech #3430-3-250; разведение 1:500), антитело против hIL10, биотинилированное (Mabtech, #3430-6-250)

1× PBS (стерильный)

35% EtOH (об/об)

Блокирующий буфер: X-vivo с 5% сыворотки hAB (стерильный) [блокирование проводили в той же среде, как для культуры клеток]

Буфер для разведения: 0,5% BAS в PBS

Буфер для промывки: 1× PBS

Среда: для Т-клеток, среда X-VIVO 15 (Lonza)

Фильтрующая насадка на шприц: Millex GV

ПВДФ планшет для ELISPOT (#MSIP4510, Millipore)

Субстрат TMB

Пример 2: Суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения индуцируют IL10-секретирующие Treg у мышей

Мышам линии черные 6 дикого типа вводили по 100 мкг рекомбинантных полипептидов (также называемых "AIMBio"), имеющих следующие последовательности:

Ova_KbG

SIINFEKLGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPS

DIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIV
 KWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSLRYFVTAVSRPGLGEPYMEVGYVDD
 TEFVRFSDAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDLRTLGCYNQS
 KGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGCYIALNEDLKTWTAADMAALITKHK
 WEQAGEAERLRAYLEGTCVEWLRRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEATLRC
 WALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRYTCH
 VQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID NO:
 34)

и Gp34_KbG

AVYNFATMGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFH
 PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPK
 IVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSLRYFVTAVSRPGLGEPYMEVGYVD
 DTEFVRFSDAENPRYEPRARWMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDLRTLGCYN
 QSKGGSHTIQVISGCEVGS DGRLLRGYQQYAYDGCYIALNEDLKTWTAADMAALITK
 HKWEQAGEAERLRAYLEGTCVEWLRRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEATL
 RCWALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRYTC
 HVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDL GSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID
 NO: 35),

для индукции толерантности к пептиду OVA или вирусному пептиду Gp34 соответственно. Пептид Gp34 представляет собой хорошо охарактеризованный Т-клеточный эпитоп, полученный из гликопротеина вируса лимфоцитарного хориоменингита (ВЛХ). Хотя этот антиген традиционно назывался Gp33, позднее было обнаружено, что эпитоп, презентируемый на H2-K^b, включает только аминокислоты 34-41 (эпитоп, начинающийся с аминокислоты 33, напротив, презентируется на H2-K^d.) Поэтому эпитоп H2-K^b назвали Gp34, что соответствует самым последним рекомендациям. Тем не менее, в литературе существует неоднозначное использование номенклатуры Gp33 и Gp34. Первые 8 аминокислот SEQ ID NO: 35 соответствуют правильной последовательности (AVYNFATM; SEQ ID NO: 58). Через 2 недели мышей умерщвляли и повторно стимулировали спленоциты либо совпадающим, либо несовпадающим пептидом. Клетки, секретирующие IL-10, определяли количественно с помощью ELIspot. Результаты показаны на Фигуре 3.

Пример 3: Суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения селективно предотвращают ЕАЕ, направляемый CD8⁺ Т-клетками, у мышей

Как описано в публикации Na et al, Brain. 2008 Sep; 131(Pt 9):2353-65, адоптивный перенос CD8⁺ OT-I Т-клеток, которые распознают эпитоп овальбумина в контексте H2-K^b, мышам, у которых овальбумин экспрессируется в олигодендроцитах, что приводит к экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту, который воспроизводит многие симптомы рассеянного склероза и поздней стадии нейромиелита зрительного нерва (NMO). В этой модели на животных однократная инъекция 500 мкг суррогатных молекул рекомбинантных полипептидов (также называемых "AIMBio"), которые вызывают

толерантность к эпитопу овальбумина, который является мишенью, почти полностью предотвращала симптомы ЕАЕ, тогда как суррогатная молекула, презентующая контрольный пептид, не приводила к значимым защитным эффектам (Фигура 4). Последовательности молекул суррогатных рекомбинантных полипептидных являлись следующими:

Mog44_DbG

FSRVVHLYRNGGCGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVS
GFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL
QPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSMRYFETA VSRPGLEEPYISVGY
VDNKEFVRFSDAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNLLGC
YNQSAGGSHTLQQMSGCDLGSDWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAADMAA
QITRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDY
EATLRCWALGFYPAEILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQ
RYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ
ID NO: 36)

Mog37_DbG

VGWYRSPFSRGCASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL
SQPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPHSMRYFETA VSRPGLEEPYISVGYV
DNKEFVRFSDAENPRYEPRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNLLGCY
NQSAGGSHTLQQMSGCDLGSDWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAADMAAQI
TRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRTDPPKTHVTHHPVFDYEA
TLRCWALGFYPAEILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRY
TCHVQHEGLPEPLMLRWSKEGDGGIMSVRESRSLSEDLGSPDRVRAVSHWSSC (SEQ ID
NO: 37)

Пример 4: Некоторые суррогаты рекомбинантных полипептидов изобретения селективно предотвращают ЕАЕ, направляемый CD4⁺ Т-клетками, у мышей

В день в/б инъекции 33 мкг или 100 мкг суррогатной молекулы рекомбинантного полипептида изобретения ("AIM Bio"), 100 мкл эмульсии пептида MOG35-55/CFA (полный адъювант Фрейнда; конечная концентрация *Mycobacterium tuberculosis* H37RA и каждого пептида 1 мг/мл) вводили подкожно слева и справа в бок и 250 нг коклюшного токсина (в 200 мкл PBS) внутривентрально. Вторую инъекцию коклюшного токсина делали через 3 дня. В этой модели на животных однократная инъекция суррогатных молекул AIM Bio, которые индуцируют толерантность к эпитопу Mog (Mog44_Kb_G), значительно уменьшала симптомы ЕАЕ, тогда как суррогатная молекула, презентующая контрольный пептид (Grp34) или нефункциональный Mog пептид (Mog37), не приводила к значимому защитному эффекту (Фигура 5). В этой модели Mog44 AIM Bio также предотвращал воспаление и инфильтрацию CD8 Т-клеток в спинной мозг (Фигура 6). Последовательности суррогатных молекул рекомбинантных полипептидов были показаны в Примере 3.

В этой модели Mog44 AIM Bio также полностью предотвращал образование MOG-специфических аутоантител в сыворотке по результатам ИФА (Фигура 7). Это надежный показатель того, что рекомбинантные полипептиды согласно изобретению являются эффективными терапевтическими средствами при НМО, который часто характеризуется ответами антител против человеческого аквапорина 4, и при других аутоиммунных заболеваниях, таких как диабет 1-го типа, патология которого также характеризуется присутствием аутоантител. Таким образом, группа пациентов определяется общим антигеном, связанным с аутоиммунными заболеваниями. Некоторые молекулы МНС также связаны с НМО.

Mog-реактивные антитела в сыворотке мышей, получавших AIM Bio (33 или 100 мкг), обнаруживали с использованием стандартного протокола ИФА с 3 промывками между каждой стадией. Коротко, ИФА планшеты покрывали 10 мкг/мл пептида Mog35-55, блокировали PBS с 1% BSA, после чего добавляли мышинные сыворотки, разведенные 1:25 в PBS с 1% BSA, на 1 час. Для обнаружения использовали HRP-антитела против мышинового IgG или HRP-антитела против мышиной тяжелой и легкой цепи, разведенные 1:5000.

Пример 5: Кандидатные человеческие рекомбинантные полипептиды согласно изобретению для T1D

Рекомбинантные полипептиды изобретения представляют собой недавно разработанные белковые комплексы, полученные на основе ассоциированной с беременностью иммуносупрессивной молекулы МНС HLA-G. Вероятно, что HLA-G позволяет эмбриону влиять на материнскую иммунную систему, чтобы она не реагировала на эмбриональные антигены, но продолжала противодействовать антигенам из патогенов. Рекомбинантные полипептиды изобретения, содержащие переменные пептиды, могла селективно элиминировать пептидспецифические цитотоксические эффекторные Т-клетки, а также индуцировать пептидспецифические регуляторные Т-клетки в пробирке.

Аутоантигены T1D в соответствии с изобретением включают (про-)инсулин (INS), глутаматдекарбоксилазу 65 (GAD65), амилоидный полипептид островковых клеток (IAPP) или транспортер цинка 8 (ZNT8).

На Фигуре 8 показан список кандидатных человеческих рекомбинантных полипептидов T1D.

Результаты, полученные авторами изобретения, показывают, что одноцепочечные белки, содержащие пептидный антиген INS, GAD65, IAPP или ZNT8 и альфа 3 домен HLA-G, могут индуцировать толерогенные Т-клетки у здоровых доноров. Таким образом, CD8 Treg повышались по меньшей мере на 30% у 75% из всех здоровых доноров крови (Фигура 9).

В соответствии с экспериментом *in vivo*, показанным здесь, вероятно, что такие конструкции подавляют опосредованные CD8 Т-клетками и антителами ответы, направленные против антигенов островковых клеток у пациентов.

Пример 6: Дополнительное подтверждение стабильности и эффектов рекомбинантных полипептидов изобретения.

Авторы изобретения также предприняли попытку получить и протестировать рекомбинантные полипептиды, имеющие общую структуру рекомбинантных полипептидов изобретения, но содержащие другие различные пептидные антигены, чтобы получить дополнительное подтверждение концепции того, что рекомбинантные полипептиды изобретения и их суррогаты являются стабильными и эффективными. Как показано на Фигурах 10 и 11 соответственно, протестированные рекомбинантные полипептиды стабильны во время замораживания-оттаивания и хранения и являются термически стабильными. Кроме того, они индуцируют Treg дозозависимым образом (Фигура 12) и ингибируют лизис Т-клеток дозозависимым образом (Фигура 13). Воздействие рекомбинантных полипептидов на профиль цитокинов в сыворотке у мышей EAE-ODC Ova показаны на Фигуре 14. Наблюдается индукция IL-10 и, возможно, IL-4, которые, как известно, являются иммуносупрессивными цитокинами, подавляющими иммунные ответы в условиях воспаления. Для этого требуется альфа3 домен HLA-G и когнатный пептид. IL-2, по-видимому, индуцируется в ответ на презентацию клеткам когнатного пептида, который не зависит от альфа3 домена. IL-2 необходим для активации и выживания Т-клеток.

Кроме того, высокие температуры плавления, показанные на Фигуре 16, подтверждают хорошую белковую стабильность рекомбинантных полипептидов изобретения для терапевтического применения. Кроме того, данные на Фигуре 17 показывают, что T1D одноцепочечные молекулы МНС Ib (рекомбинантные полипептиды изобретения) можно очищать и хранить, и они устойчивы к циклам замораживания-оттаивания.

Пример 7: Как показано на Фигуре 15, наблюдается повышение CD8 Treg-клеток в МКПК здоровых доноров крови под действием рекомбинантного полипептида изобретения.

In vitro индукцию Treg, опосредованную конструкциями, содержащими пептид-HLA-G (AIM Biologicals), проводили следующим образом: МКПК здоровых доноров очищали с помощью центрифугирования в градиенте плотности, проводимого с лейкоцитами из камеры лейкоредукции, при использовании фиколла. Клетки центрифугировали в течение 20 мин при 1200×g без торможения, после чего собирали межфазное кольцо, которое промывали 1× PBS (5 мин, 300×g). МКПК замораживали до последующего использования.

МКПК размораживали за 1 день до примирования МКПК (d-1) и выдерживали в течение ночи в 5 мл среды X-VIVO 15, содержащей 5% человеческой сыворотки АВ, в лунке 6-луночного планшета при 37°C. На следующий день (d0) клетки подсчитывали и ресуспендировали в полной среде X-VIVO 15 (5% сыворотки hAB и цитокиновая смесь: 20 нг/мл hIL-2, 20 нг/мл hGM-CSF, 10 нг/мл hIL-4 и 10 нг/мл hTGF-b1) при плотности клеток 3×10^6 клеток/мл. Для экспериментов 3×10^6 клеток сеяли в соответствующие лунки

12-луночного планшета в конечном объеме 1000 мкл полной среды X-VIVO с цитокиновой смесью и 5 мкг/мл молекулы AIM Bio или соответствующими контролями. В день 3 добавляли 1 мл полной среды (с цитокинами), в день 6 проводили повторную стимуляцию 5 мкг/мл молекулы AIM Bio (после удаления среды). В дни 7, 10 и 12 добавляли 1 мл полной среды (с цитокинами). В день 13 ПВДФ мембрану планшета ELISpot активировали 50 мкл/лунка EtOH (35% об/об) в течение 1 мин, затем 5 раз промывали 200 мкл дистиллированной стерильной воды. Планшет покрывали 100 мкл/лунка антителом против hIL10 (клон 9D-7, разведение 1:500 в PBS, стерилизованное фильтрованием) при 4°C в течение ночи. На следующий день удаляли несвязавшееся покрывающее антитело, проводили 5 стадий промывки 200 мкл PBS и 200 мкл блокирующего буфера (X-VIVO 15 с 5% сыворотки hAB) и инкубировали планшет в течение 30 мин - 2 ч при комнатной температуре. В день 14 сеяли по 200000 клеток в каждую лунку планшетов ELISpot в двойной повторности, включая отрицательный контроль (клетки с PBS) и положительный контроль (например, LPS), на 48 ч. Приготавливали вторичное антитело: 1 мкг/мл биотинилированного антитела против IL-10 в 0,5% BSA/1x PBS (разведение 1:1000) и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (1:750 в 0,5% BSA/PBS), раствор тетраметилбензидина фильтровали с использованием фильтра с порами 0,45 мкм и хранили при температуре 4°C до использования. Супернатант клеток удаляли и 5 раз промывали 100 мкл PBS. Последний оставшийся избыток буфера удаляли бумажными полотенцами. В каждую лунку добавляли по 25 мкл разведенного HRP-стрептавидина (1:750) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте, после чего проводили 5 стадий промывки с использованием стерильного 1xPBS. Добавляли 100 мкл отфильтрованного субстрата ТМВ в каждую лунку в течение 15-25 мин до проявления синего цвета. Реакцию останавливали, тщательно промывая лунки водой. Пластиковые поддоны планшетов удаляли, а дно и боковые стенки планшетов также промывали водопроводной водой и высушивали.

Некоторые рекомбинантные полипептиды изобретения индуцировали в МКПК ~75% от всех здоровых доноров крови по меньшей мере на 30% больше IL-10-секретирующих T-reg.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

Фармацевтические композиции, полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки и продукты для применения в изобретении являются промышленно применимыми. Например, они могут применяться при производстве фармацевтической продукции или в качестве фармацевтической продукции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полипептид, способный презентировать пептидный антиген, где рекомбинантный полипептид включает, в порядке от N-конца к C-концу:

i) пептидный антиген, презентруемый указанным рекомбинантным полипептидом, где пептидный антиген является пептидом человеческого проинсулина или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида или человеческого транспортера цинка 8;

ii) необязательно, линкерную последовательность;

iii) необязательно, последовательность домена человеческого полипептида, включающую последовательность человеческого $\beta 2$ микроглобулина или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности человеческого $\beta 2$ микроглобулина, представленного SEQ ID NO: 5;

iv) необязательно, линкерную последовательность;

v) необязательно, домен [альфа]1 молекулы МНС;

vi) необязательно, домен [альфа]2 молекулы МНС;

vii) домена [альфа]3 молекулы МНС класса Ib или производное домена [альфа]3 молекулы МНС класса Ib, где указанное производное способно связываться с ILT2 или ILT4;

viii) необязательно, сайт расщепления протеазой;

ix) необязательно, спейсерную последовательность; и

x) необязательно, аффинную метку.

2. Рекомбинантный полипептид по п.1, где указанный пептидный антиген согласно i) имеет длину 7-11 аминокислот, предпочтительно длину 8-10 аминокислот.

3. Рекомбинантный полипептид по п.1 или 2, где указанный пептидный антиген согласно i) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

4. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где указанный пептидный антиген состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23.

5. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого проинсулина или человеческого инсулина и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 25.

6. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческой глутаматдекарбоксилазы 65 и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

7. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческой глутаматдекарбоксилазы 65 и состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

8. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого транспортера цинка 8 и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24.

9. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-3, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого островкового амилоидного полипептида.

10. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы МНС класса Ia человека или из молекулы МНС класса Ib человека.

11. Рекомбинантный полипептид по п.10, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы МНС класса Ia человека.

12. Рекомбинантный полипептид по п.11, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы HLA-A2 человека.

13. Рекомбинантный полипептид по п.10, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы МНС класса Ib человека.

14. Рекомбинантный полипептид по п.13, где указанный домен [альфа]1 согласно (v) и указанный домен [альфа]2 согласно (vi) происходят из молекулы HLA-G человека.

15. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где домен [альфа]3 молекулы МНС класса Ib согласно (vii) является доменом [альфа]3 HLA-E человека, HLA-F человека или HLA-G человека.

16. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где домен [альфа]3 молекулы МНС класса Ib согласно (vii) является доменом [альфа]3 HLA-G человека.

17. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичны или обладают по меньшей мере 80% идентичностью аминокислотной последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

18. Рекомбинантный полипептид по п.17, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичны или обладают по меньшей мере 92% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

19. Рекомбинантный полипептид по п.17, где домен [альфа]3 или производное согласно (vii) идентичны или обладают по меньшей мере 94% идентичностью

аминокислотной последовательности с доменом [альфа]₃, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

20. Рекомбинантный полипептид по п.17, где домен [альфа]₃ или производное согласно (vii) идентичны или обладают по меньшей мере 96% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]₃, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

21. Рекомбинантный полипептид по п.17, где домен [альфа]₃ или производное согласно (vii) идентичны или обладают по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]₃, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

22. Рекомбинантный полипептид по п.17, где домен [альфа]₃ или производное согласно (vii) идентичны или обладают по меньшей мере 99% идентичностью аминокислотной последовательности с доменом [альфа]₃, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

23. Рекомбинантный полипептид по п.17, где домен [альфа]₃ согласно (vii) идентичен домену [альфа]₃, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 21.

24. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где линкерная последовательность согласно (ii) и/или линкерная последовательность согласно (iv) включает аминокислотную последовательность (GGGS)_n, где n является целым числом, равным или больше 1.

25. Рекомбинантный полипептид по п.24, где линкерная последовательность согласно (ii) включает аминокислотную последовательность (GGGS)_n, и где n является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и предпочтительно выбрано из группы, состоящей из 2, 3, 4 и 5.

26. Рекомбинантный полипептид по п.24 или 25, где линкерная последовательность согласно (iv) включает аминокислотную последовательность (GGGS)_n, и где n является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и предпочтительно выбрано из группы, состоящей из 2, 3, 4 и 5.

27. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где указанная последовательность домена человеческого полипептида согласно (iii) по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и более предпочтительно идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5.

28. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где указанный полипептид является димерным или мультимерным.

29. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где полипептид включает или состоит из всех компонентов i) - vii),

30. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где полипептид не включает компоненты viii) - x).

31. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-29, где полипептид включает или состоит из всех компонентов i) - х).

32. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., дополнительно включающий N-концевую последовательность сигнального пептида секреции.

33. Рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-31, где рекомбинантный полипептид состоит из аминокислотной последовательности, состоящей из следующих ((a) и (b)) в порядке от N- к C-концу:

(a) пептидный антиген, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 2, и

(b) аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 16.

34. Рекомбинантный полипептид по любому из предыдущих пп., где рекомбинантный полипептид является растворимым.

35. Нуклеиновая кислота, кодирующая один или больше полипептидов по любому из предыдущих пп..

36. Нуклеиновая кислота по п.35, где нуклеиновая кислота является вектором.

37. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по п.35 или 36.

38. Фармацевтическая композиция или набор, включающие по меньшей мере один рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-34.

39. Фармацевтическая композиция или набор по п.38, где фармацевтическая композиция или набор включают по меньшей мере два разных рекомбинантных полипептида по любому из пп.1-34, и где каждый из разных полипептидов включает разные пептидные антигены, как определено в любом из пп.3-9.

40. Фармацевтическая композиция или набор по п.38 или 39, где фармацевтическая композиция или набор включают по меньшей мере следующие ((A)-(C)): (A) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого проинсулина или человеческого инсулина; (B) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческой глутаматдекарбоксилазы 65; (C) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого транспортера цинка 8; и, необязательно, дополнительно включает (D) рекомбинантный полипептид, где указанный пептидный антиген является пептидным антигеном человеческого островкового амилоидного полипептида.

41. Фармацевтическая композиция или набор по любому из пп.38-40, где фармацевтическая композиция или набор включают по меньшей мере три разных рекомбинантных пептида по любому из пп.1-34, где указанный пептидный антиген первого рекомбинантного полипептида по меньшей мере из трех разных рекомбинантных полипептидов состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где указанный пептидный антиген второго рекомбинантного полипептида по меньшей мере

из трех разных рекомбинантных полипептидов состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и где указанный пептидный антиген третьего рекомбинантного полипептида по меньшей мере из трех разных рекомбинантных полипептидов состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

42. Фармацевтическая композиция или набор по любому из пп.37-41 для применения при лечении диабета 1-го типа у пациента-человека.

43. Фармацевтическая композиция или набор для применения по п.42, где лечение является лечением иммунотерапией.

44. Фармацевтическая композиция или набор для применения по любому из пп.42-43, где лечение производят путем индукции иммунологической толерантности против человеческого проинсулина и/или человеческого инсулина, человеческой глутаматдекарбоксилазы 65, человеческого островкового амилоидного полипептида и/или человеческого транспортера цинка 8.

45. Фармацевтическая композиция или набор для применения по любому из пп.42-44, где лечение предназначено для снижения в плазме уровней аутоантител против инсулина (аутоантител к инсулину IAA) или глутаматдекарбоксилазы (GAD-65), или антигена 2A островковых клеток (IA-2A), или транспортера цинка ZnT8, согласно оценке с помощью радиоиммунных анализов или электрохемилюминесцентных анализов связывания антигена без радиоактивных меток.

46. Фармацевтическая композиция или набор для применения по любому из пп.42-45, где пациент-человек является пациентом, который имел в плазме аутоантитела против инсулина (аутоантитела к инсулину IAA) или глутаматдекарбоксилазы (GAD-65), или антигена 2A островковых клеток (IA-2A), или транспортера цинка ZnT8 до начала лечения.

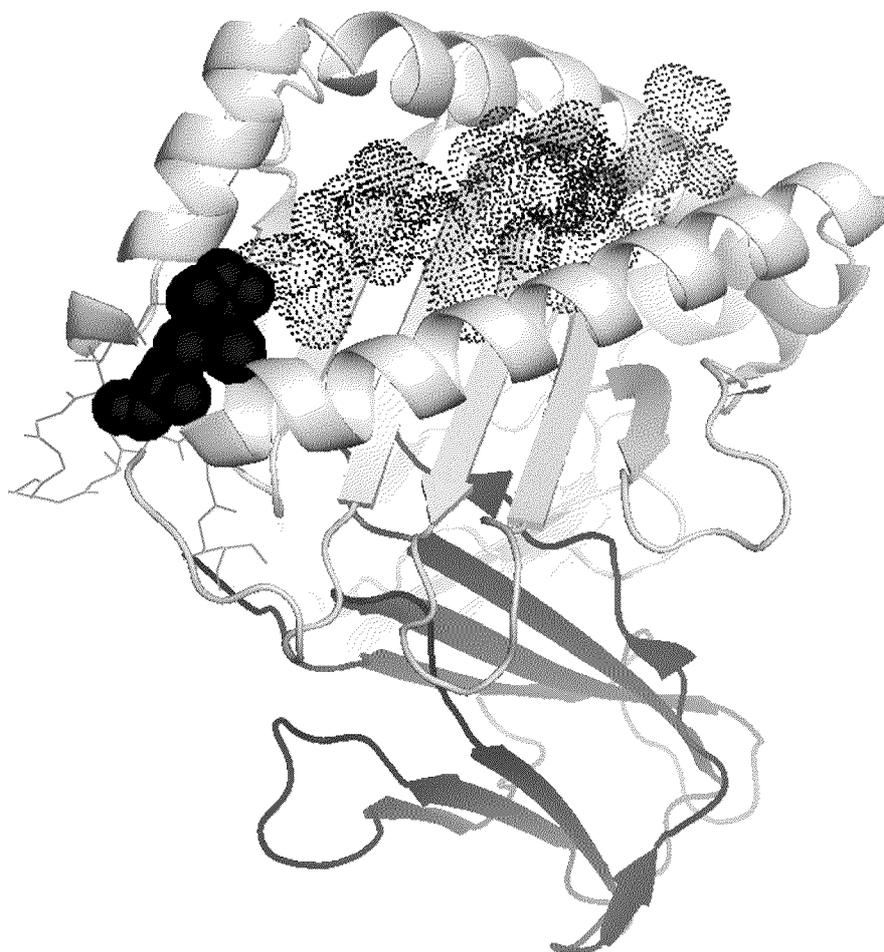
47. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту или вектор по п.35 или 36 и экспрессирующая рекомбинантный полипептид по любому из пп.1-34.

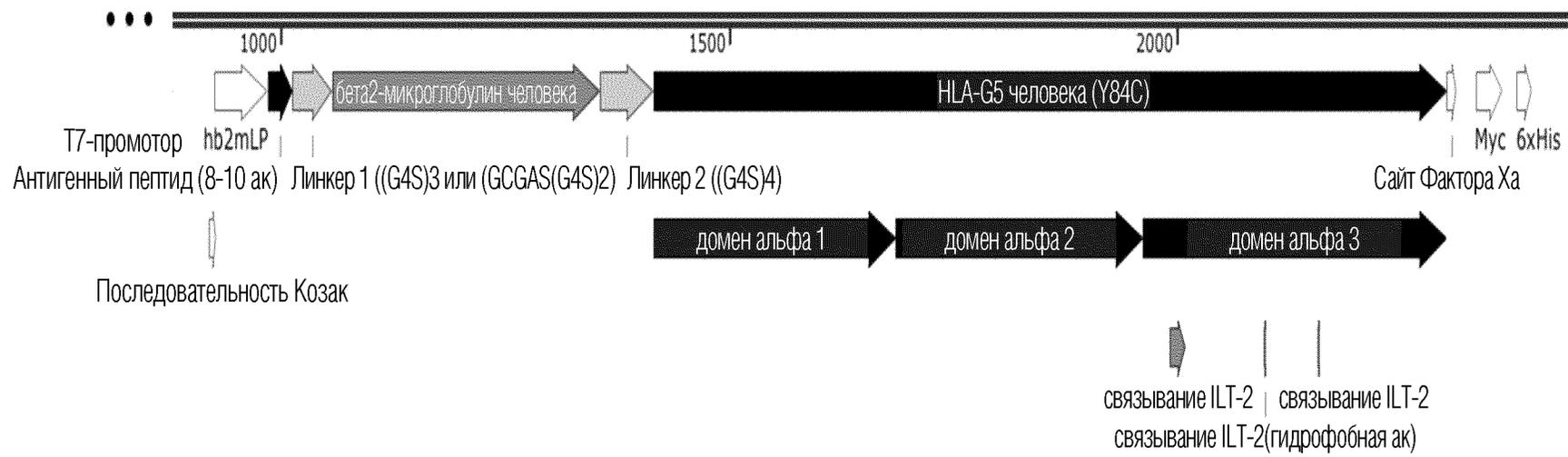
48. Способ получения фармацевтической композиции, включающей полипептид по любому из пп.1-34, где способ включает стадии: (a) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина по п.47 при условиях, обеспечивающих экспрессию рекомбинантного полипептида с молекулы нуклеиновой кислоты, (b) сбор рекомбинантного полипептида, (c) очистку рекомбинантного полипептида и (d) включение рекомбинантного полипептида в фармацевтическую композицию.

По доверенности

1/28

ФИГ. 1

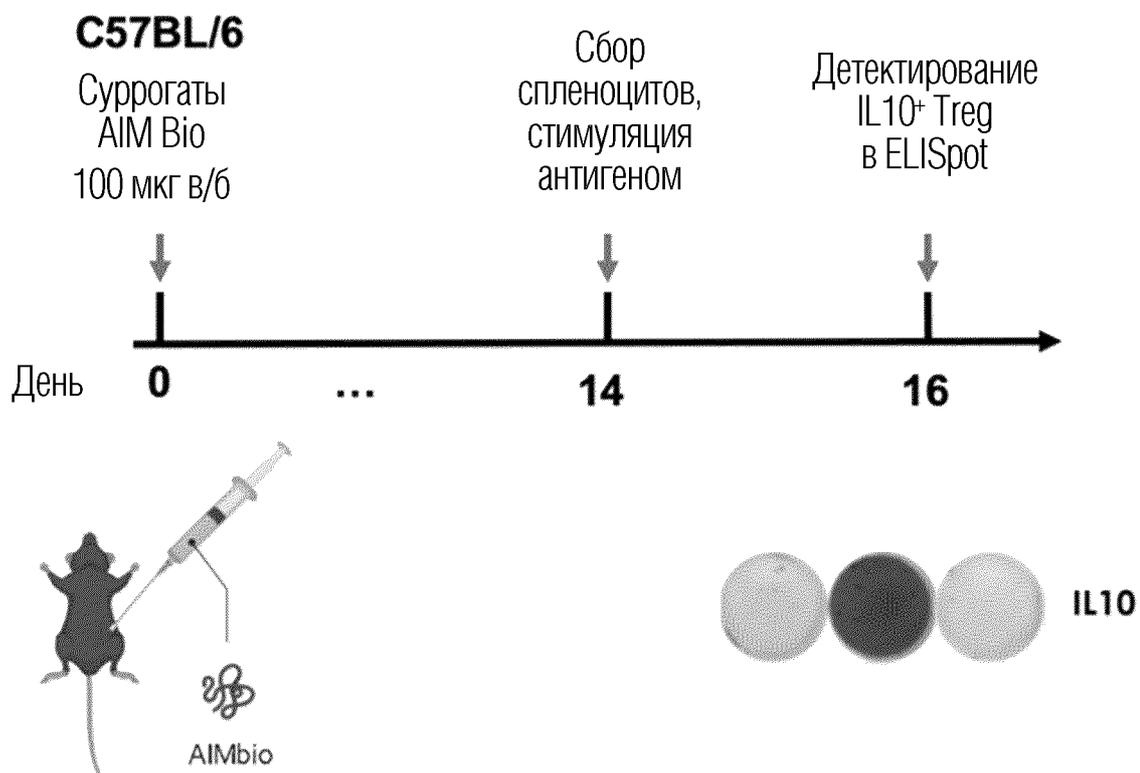




ФИГ. 2

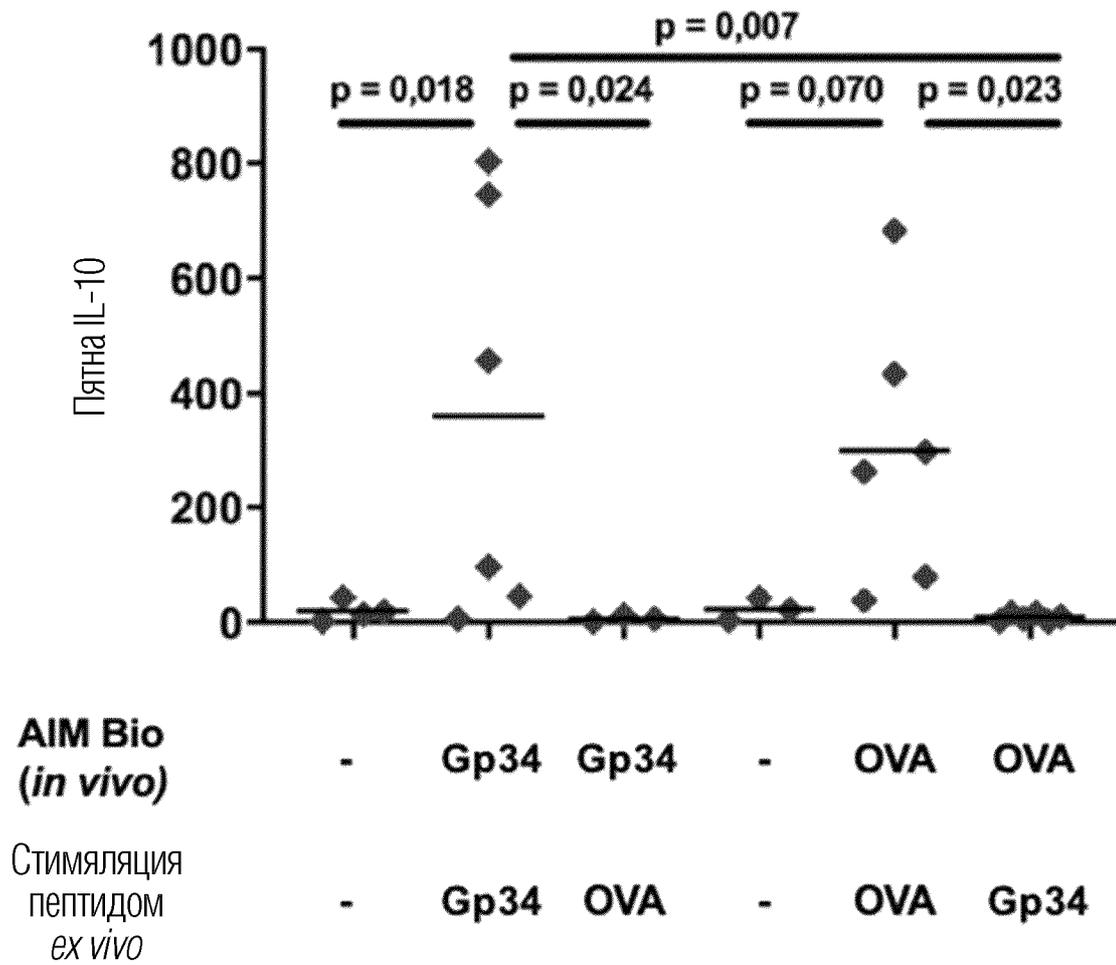
ФИГ. 3

A

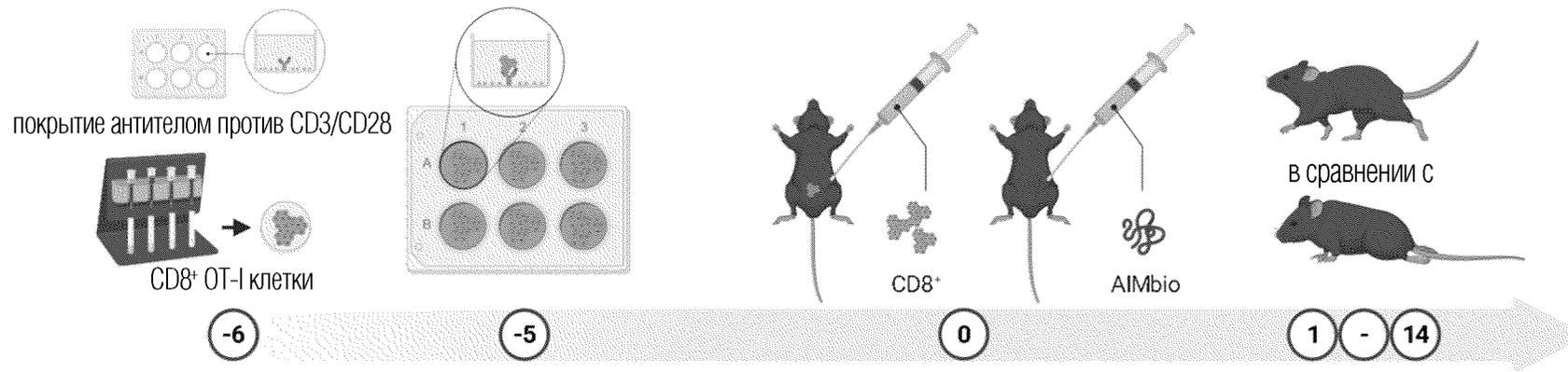


ФИГ. 3 (продолжение)

В



A



Сортинг CD8⁺ и выдерживание в покое в течение ночи при 37°C
Покрывание стерильного планшета антителом против CD3/CD28 при 4°C

Перенос CD8⁺ OT-I клеток для размножения в планшеты, покрытые антителом против CD3/GP28, в полной среде RPMI с 2MЭ

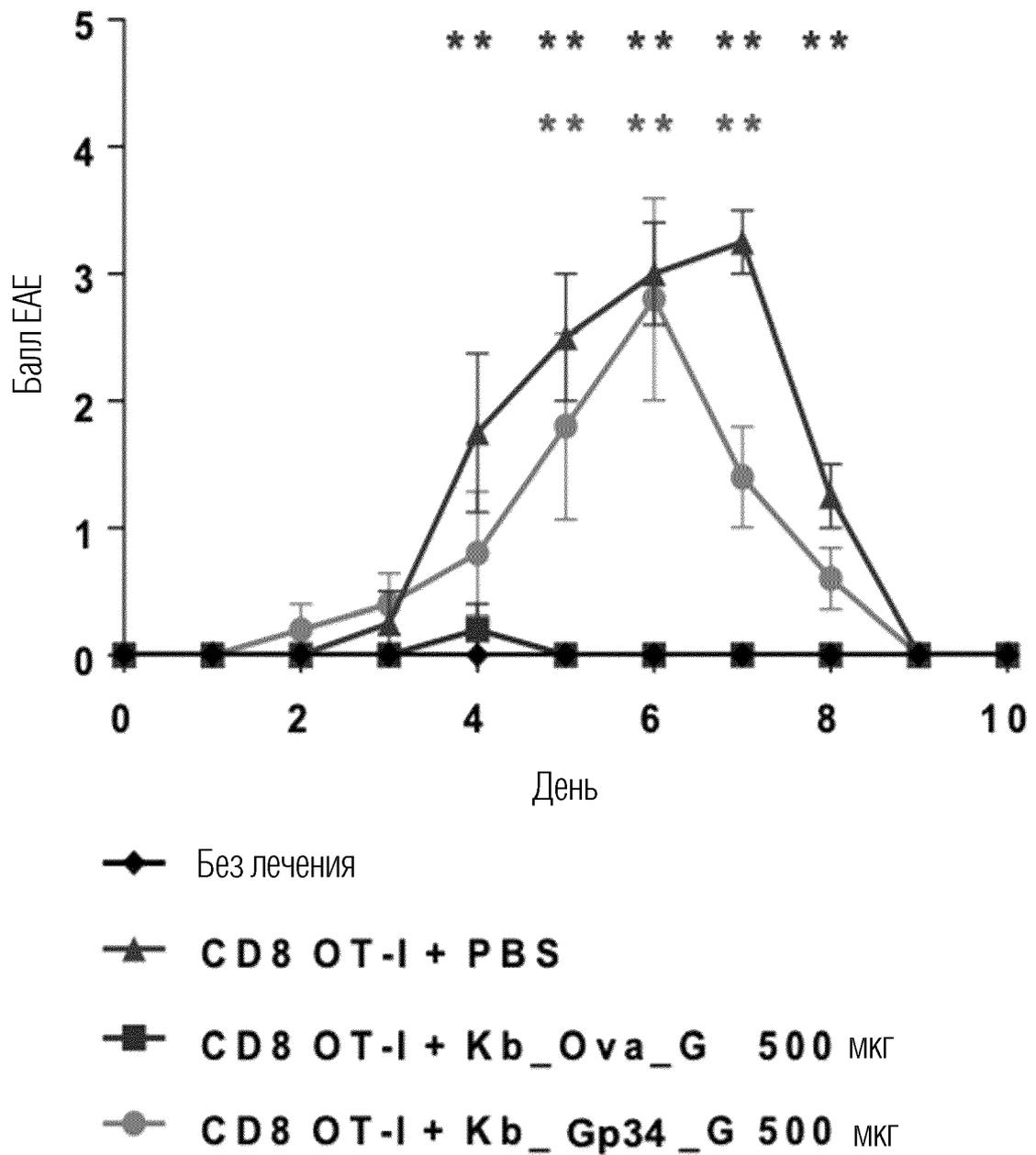
Маркирование уха и взвешивание
Подсчет жизнеспособных клеток и доведение концентрации CD8⁺ OT1 клеток в 100-200 мкл
В/б введение CD8⁺ OT1 клеток и AIMBio или контролей

Оценка EAE
Взвешивание

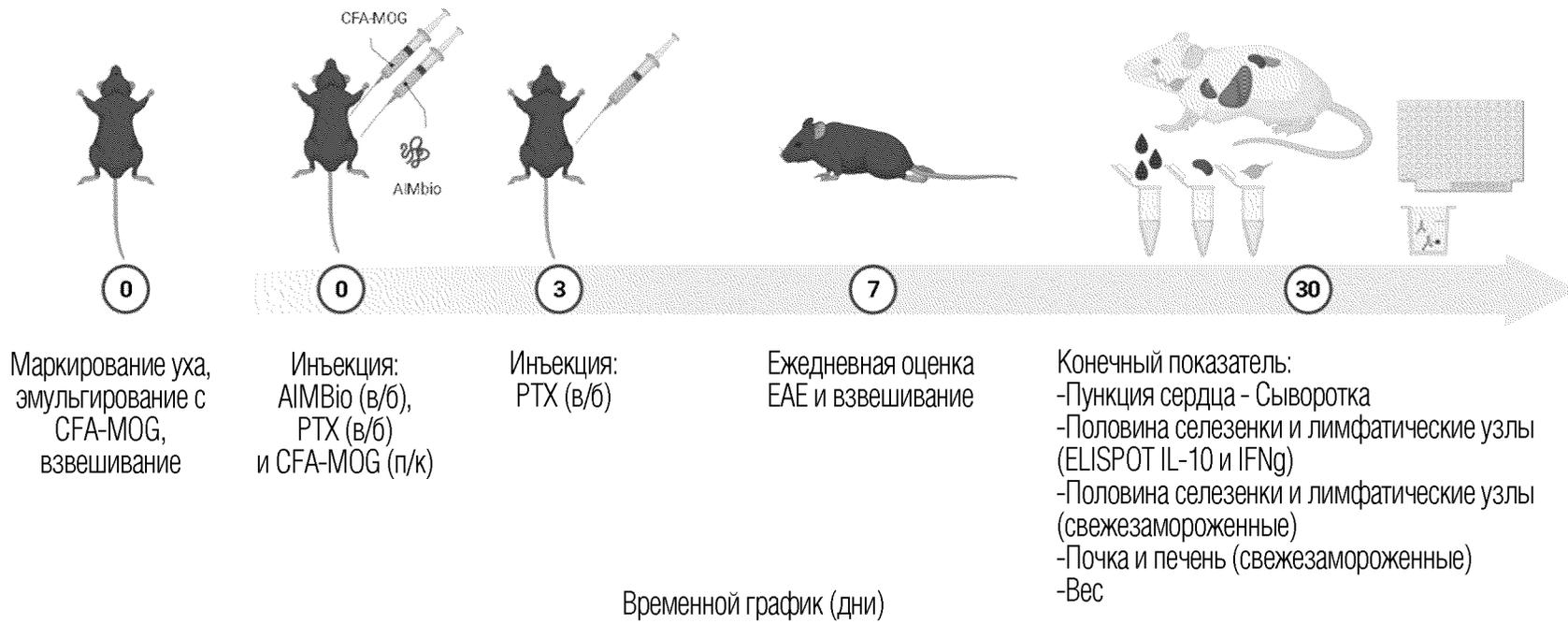
ФИГ. 4

ФИГ. 4 (продолжение)

В



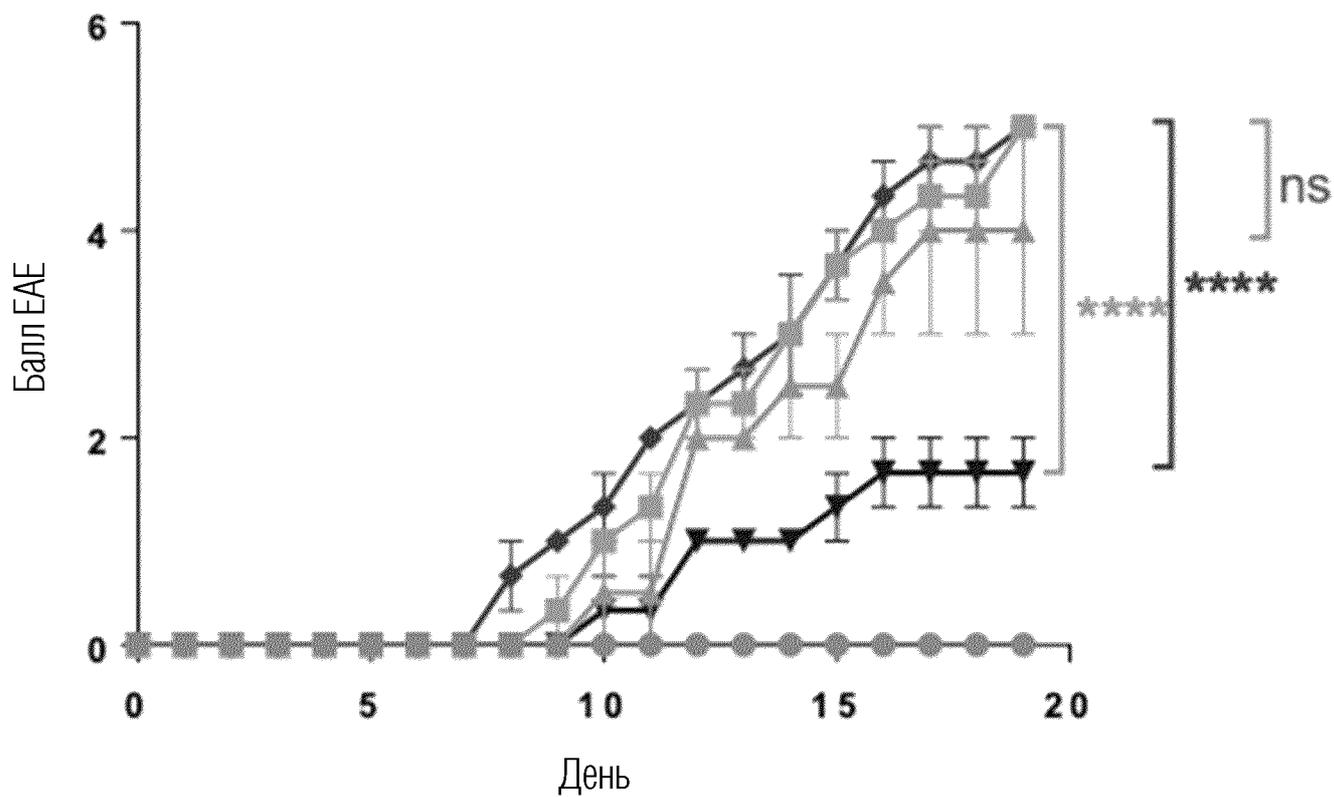
A



ФИГ. 5

ФИГ. 5 (продолжение)

В

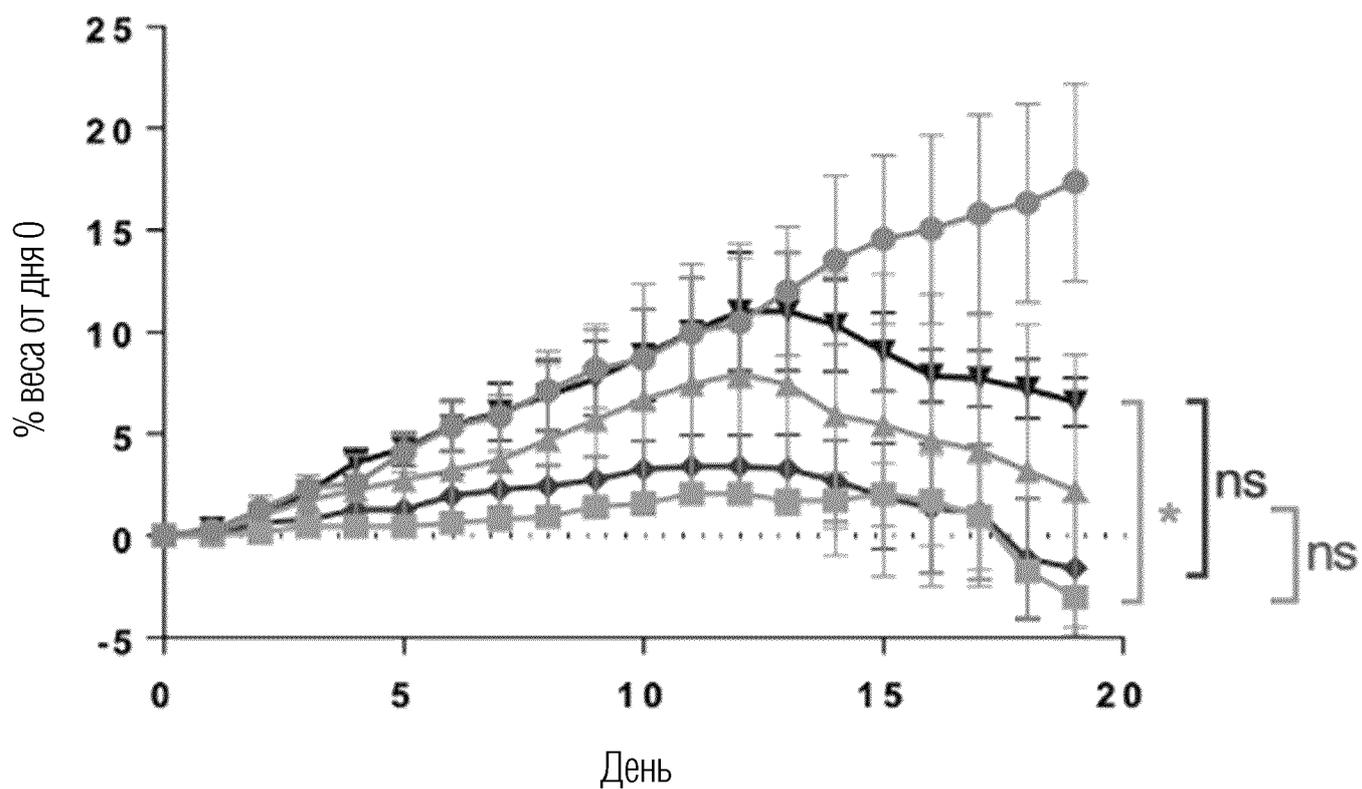


- CFA
- CFA-MOG + PBS
- ▼ CFA-MOG + Mog44_Db_G 100 мкг
- ▲ CFA-MOG + Mog37_Db_G 100 мкг
- ◆ CFA-MOG + Gp34_Kb_G 100 мкг

ФИГ. 5 (продолжение)

С

% веса - CFA-MOG в B6



- CFA
- CFA-MOG + PBS
- ▼ CFA-MOG + Mog44_Db_G 100 МКГ
- ★ CFA-MOG + Mog37_Db_G 100 МКГ
- ◆ CFA-MOG + Gp34_Kb_G 100 МКГ

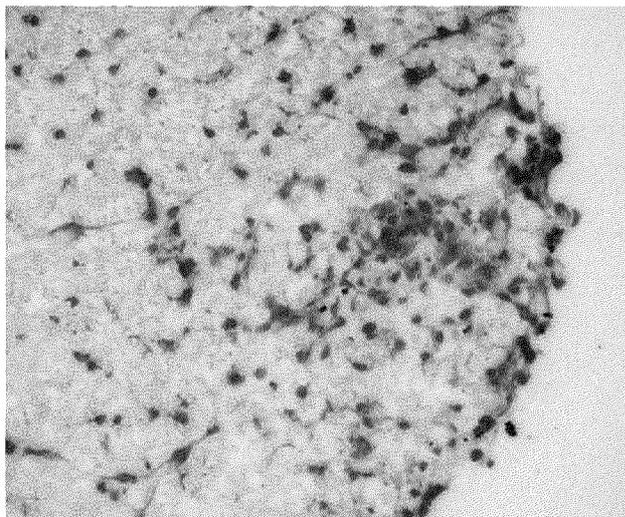
10/28

ФИГ. 6

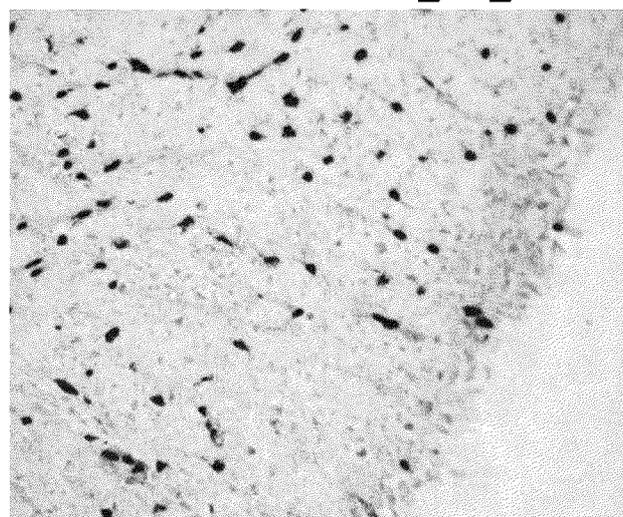
A

Спинной мозг (Толуидин)

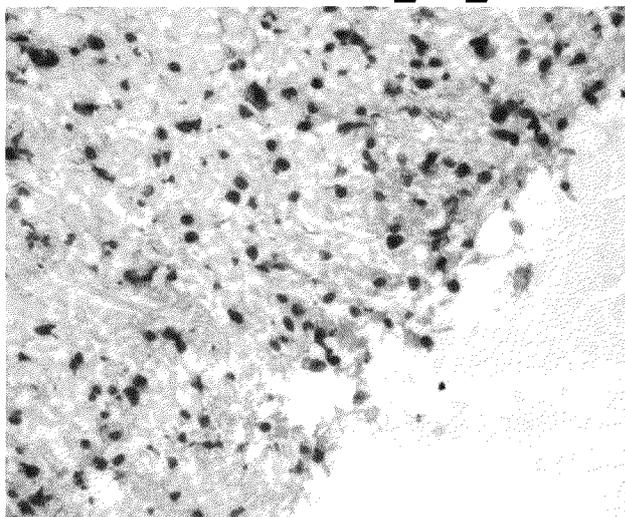
EAE + PBS



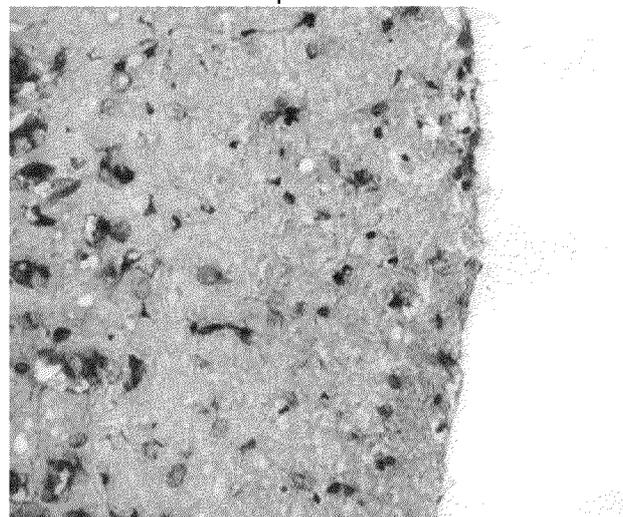
EAE + MOG44_Db_G



EAE + MOG37_Db_G



Контроль CFA

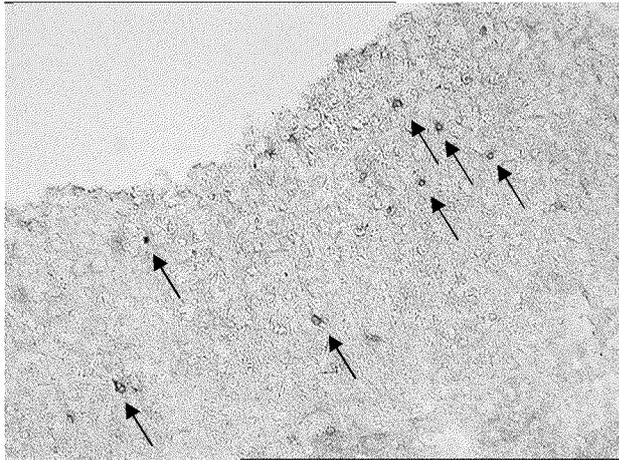


ФИГ. 6 (продолжение)

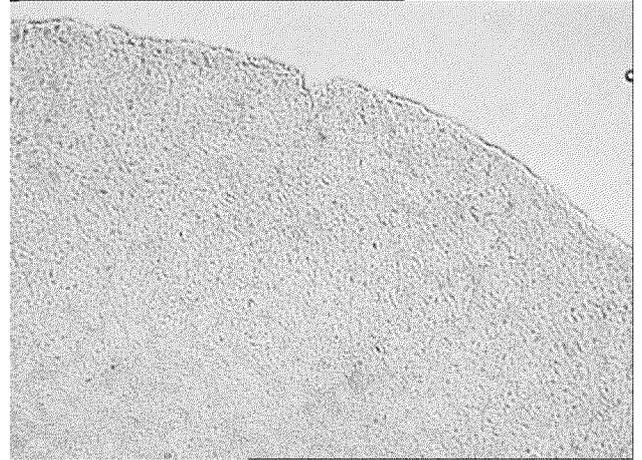
B

Спинной мозг (CD8-DAB)

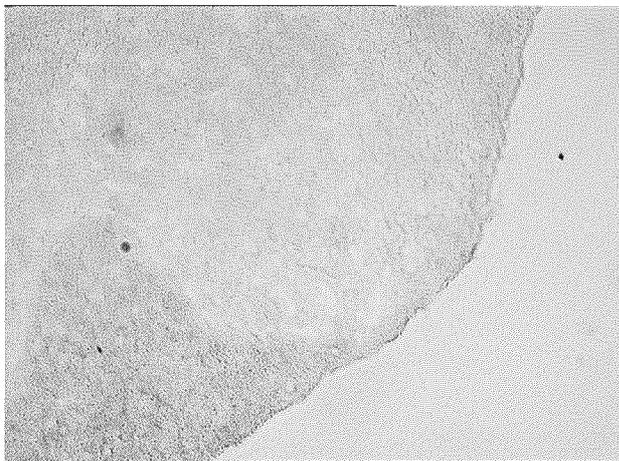
EAE + PBS



EAE + MOG44_Db_G

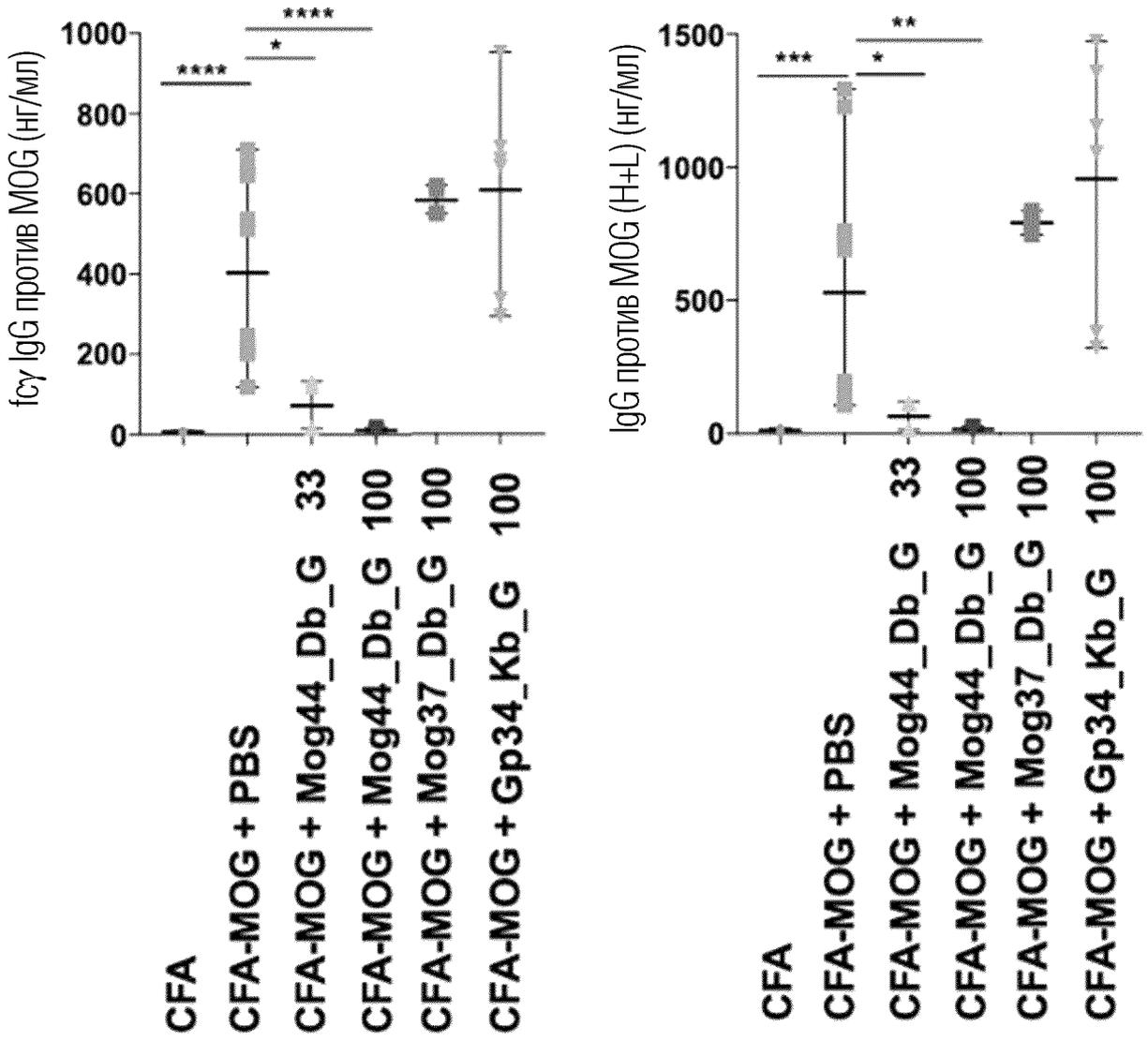


Контроль без EAE (CFA)

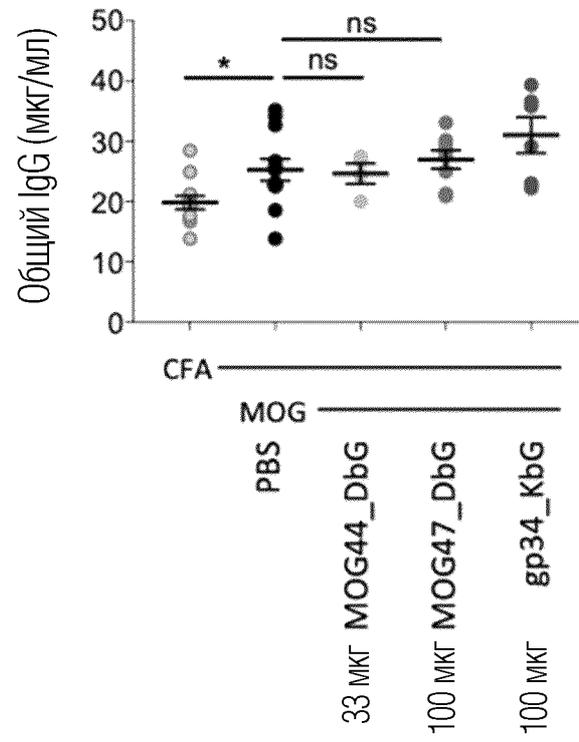


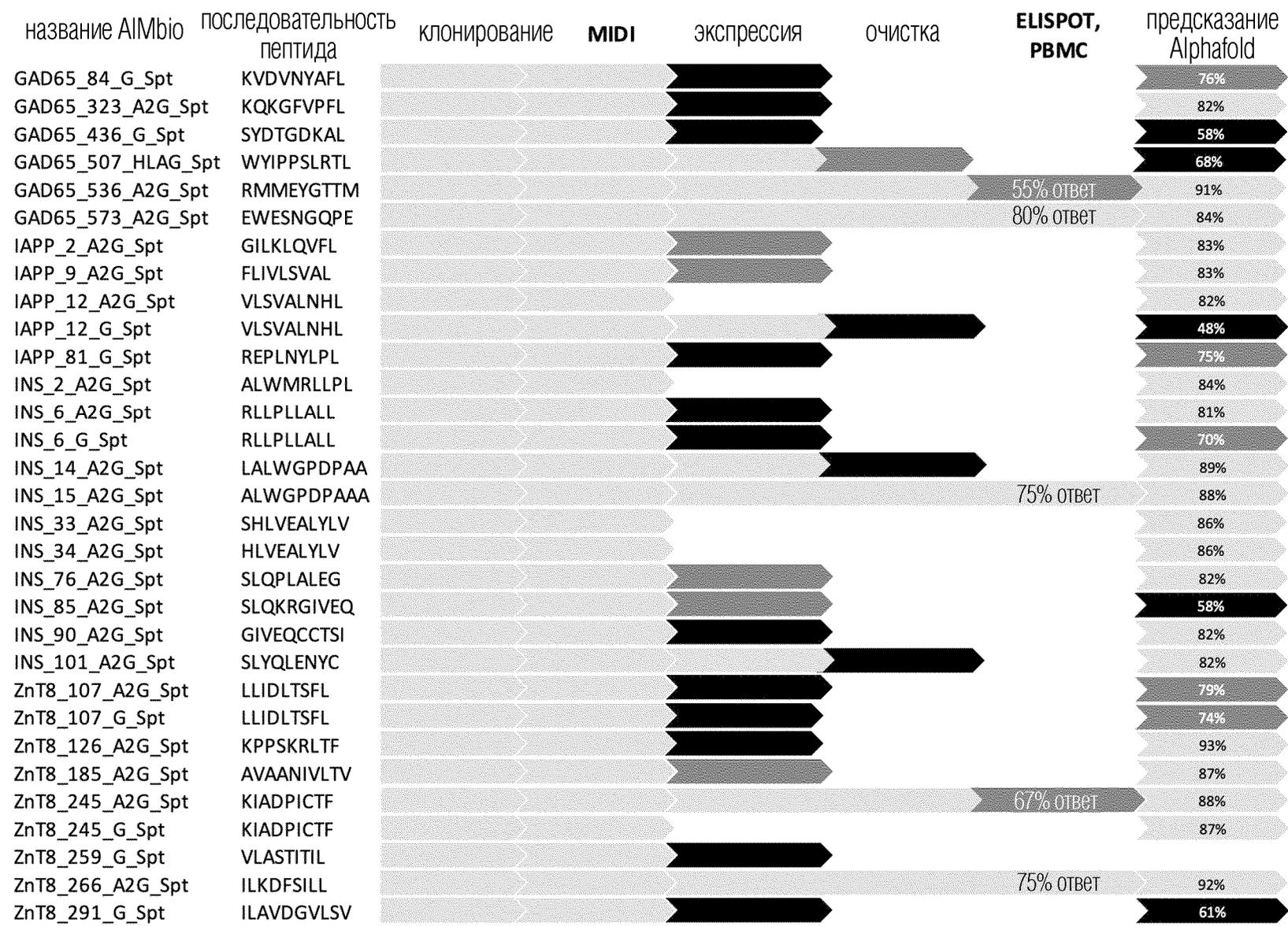
↖ = CD8 T-клетка

ФИГ. 7



ФИГ. 7 (продолжение)





приоритет:



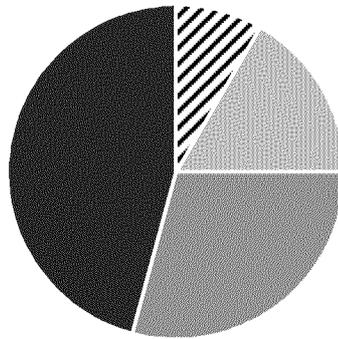
(% ОТВЕТОВ)

ФИГ. 8

ФИГ. 9

A)

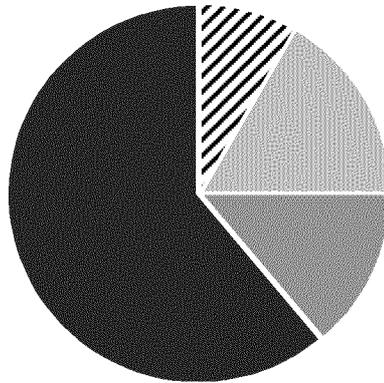
F3 ZnT8_266_A2G_Spt



1 = <70% 2 = 70-130%
3 = 130-199% 4 = >=200%

B)

C3 INS15-A2G_Spt

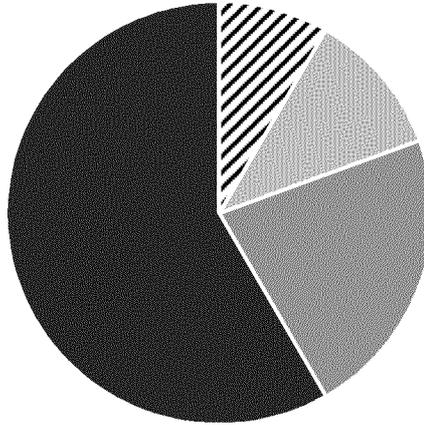


1 = <70% 2 = 70-130%
3 = 130-199% 4 = >=200%

ФИГ. 9 (продолжение)

с)

E1 GAD65_573_A2G_Spt

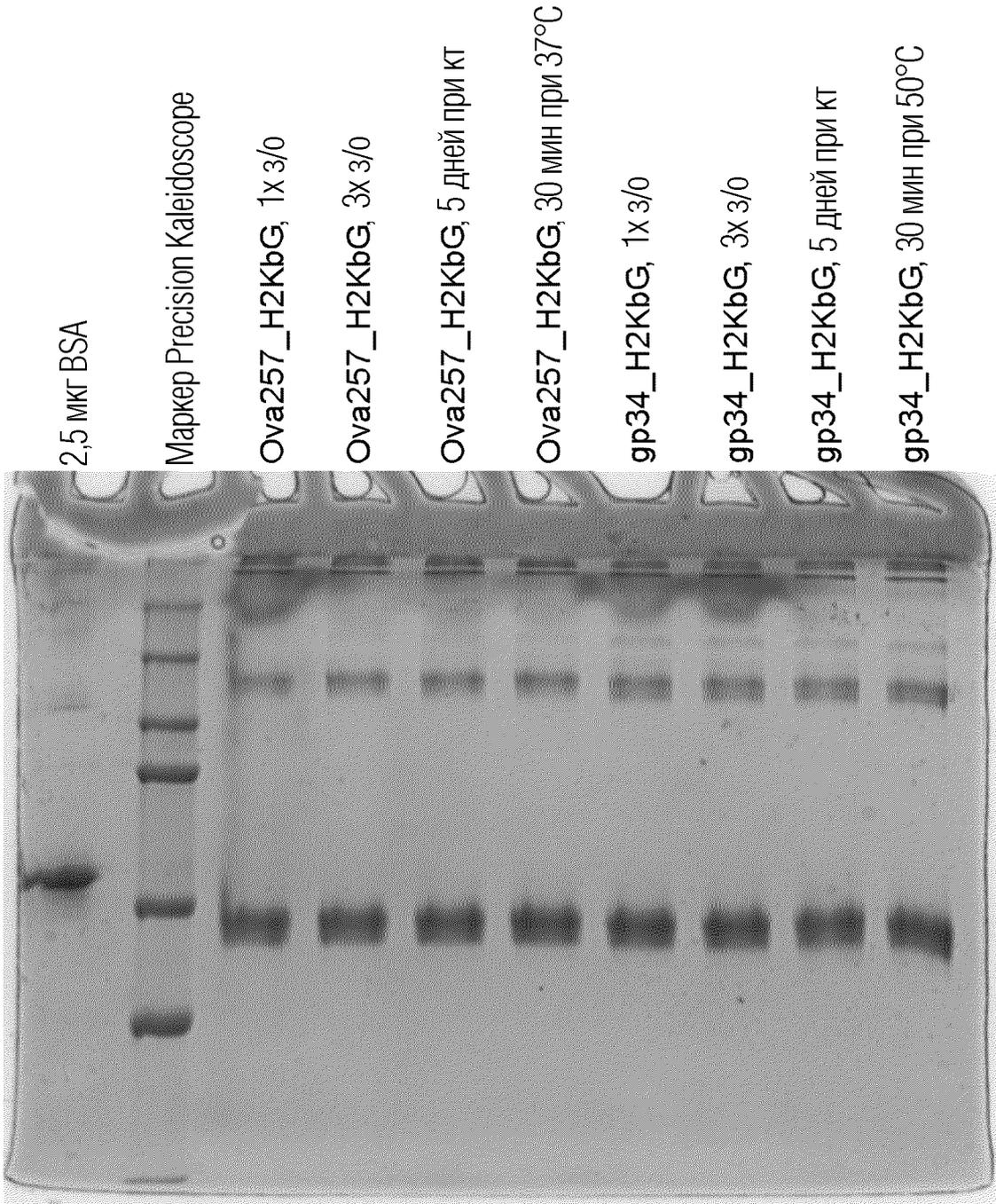


1 = <70% 2 = 70-130%
3 = 130-199% 4 = >=200%

ФИГ. 10

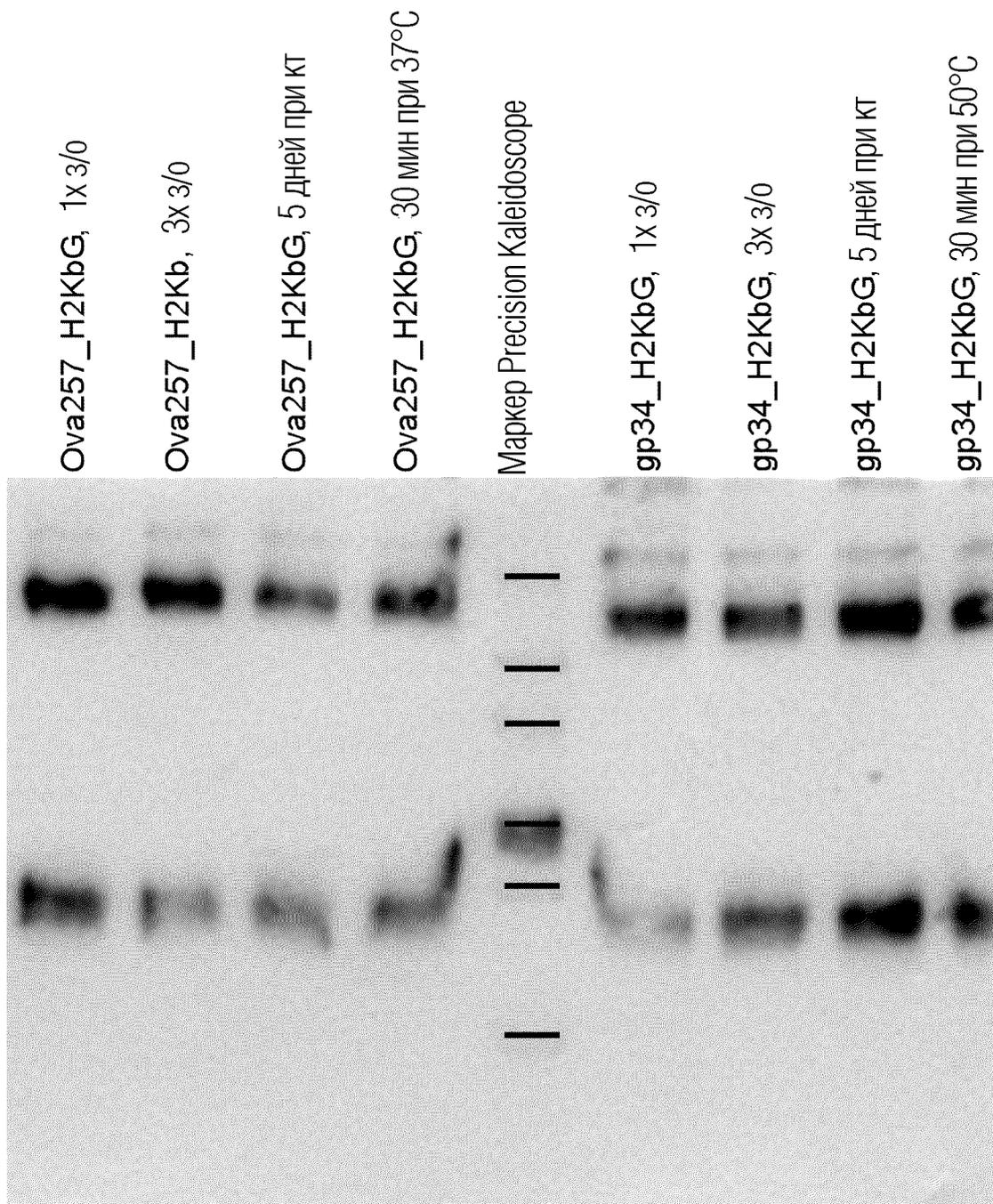
Стабильность очищенных одноцепочечных молекул МНС Ib

A



ФИГ. 10 (продолжение)

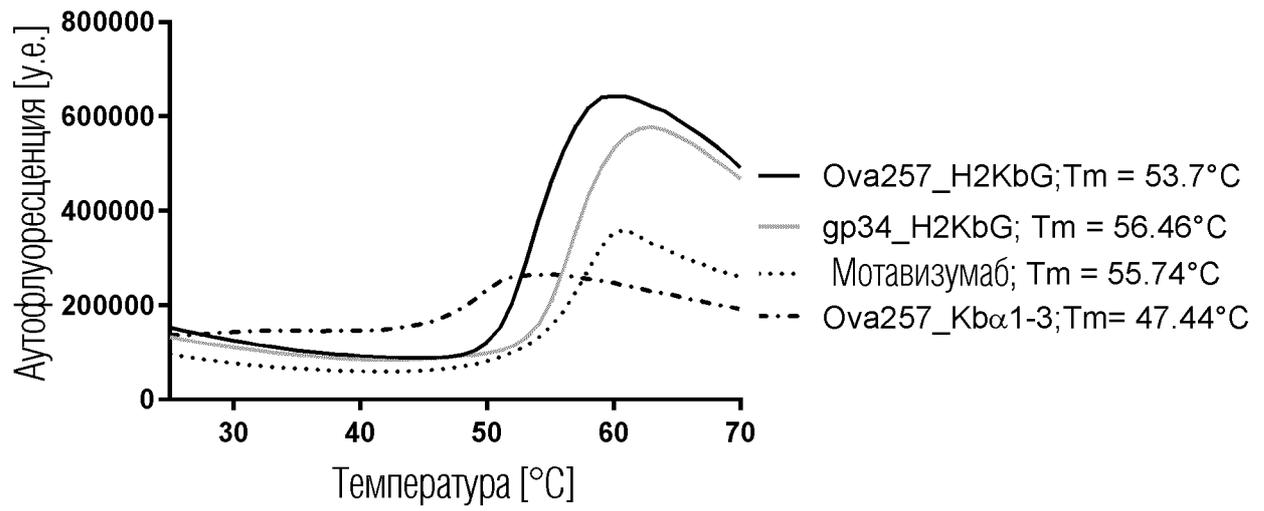
В)



19/28

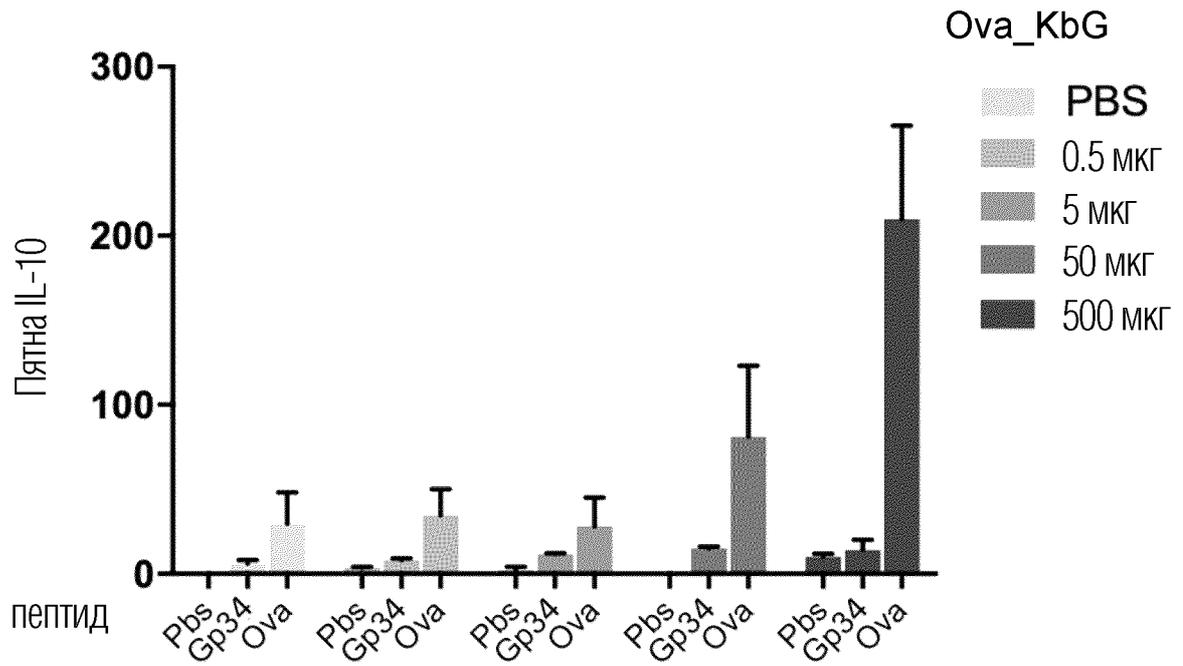
ФИГ. 11

одноцепочечные молекулы МНС Ib термически стабильны



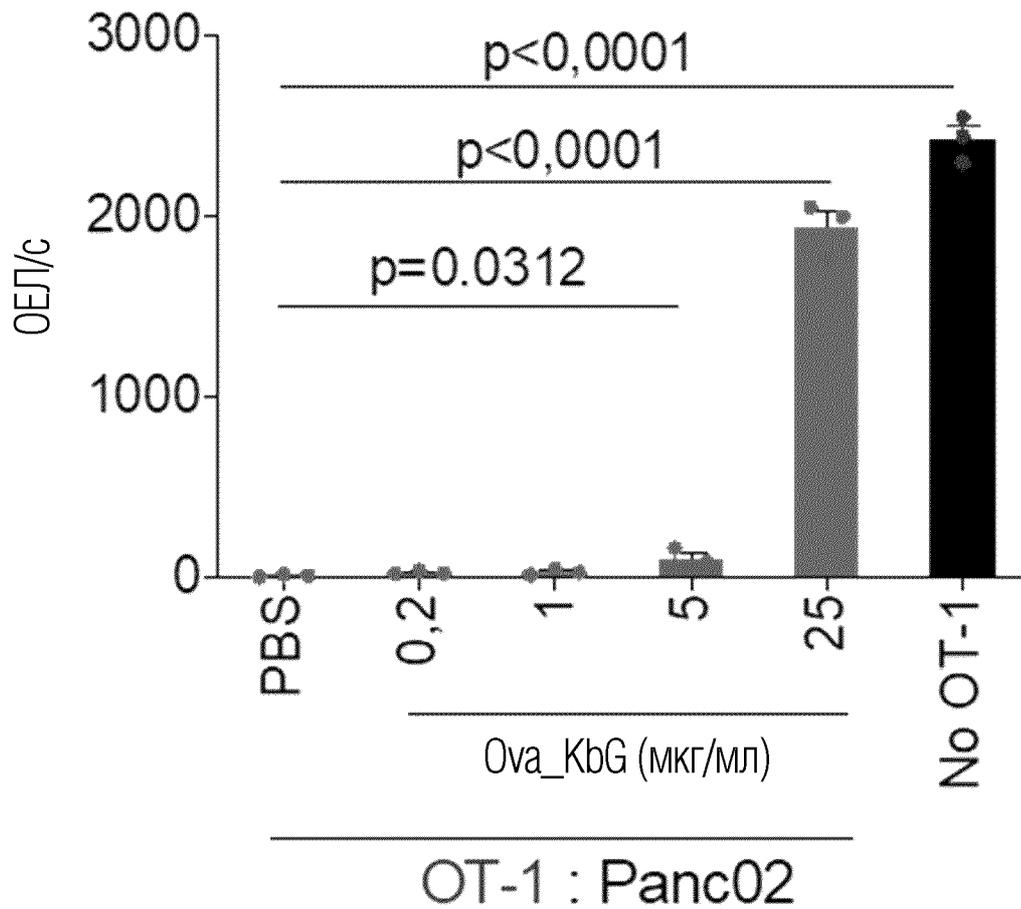
ФИГ. 12

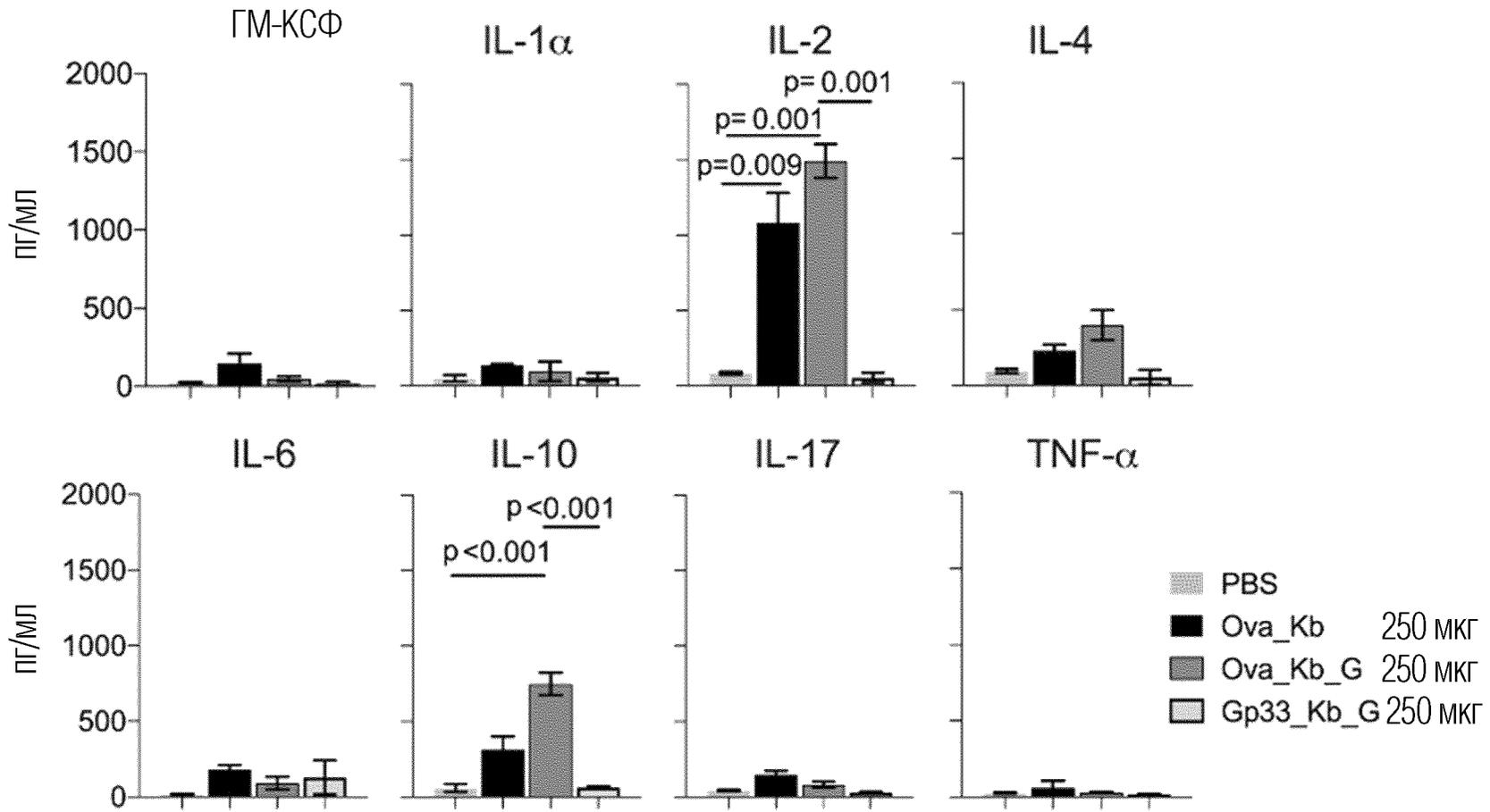
одноцепочечные молекулы MHC Ib индуцируют Treg дозозависимым образом



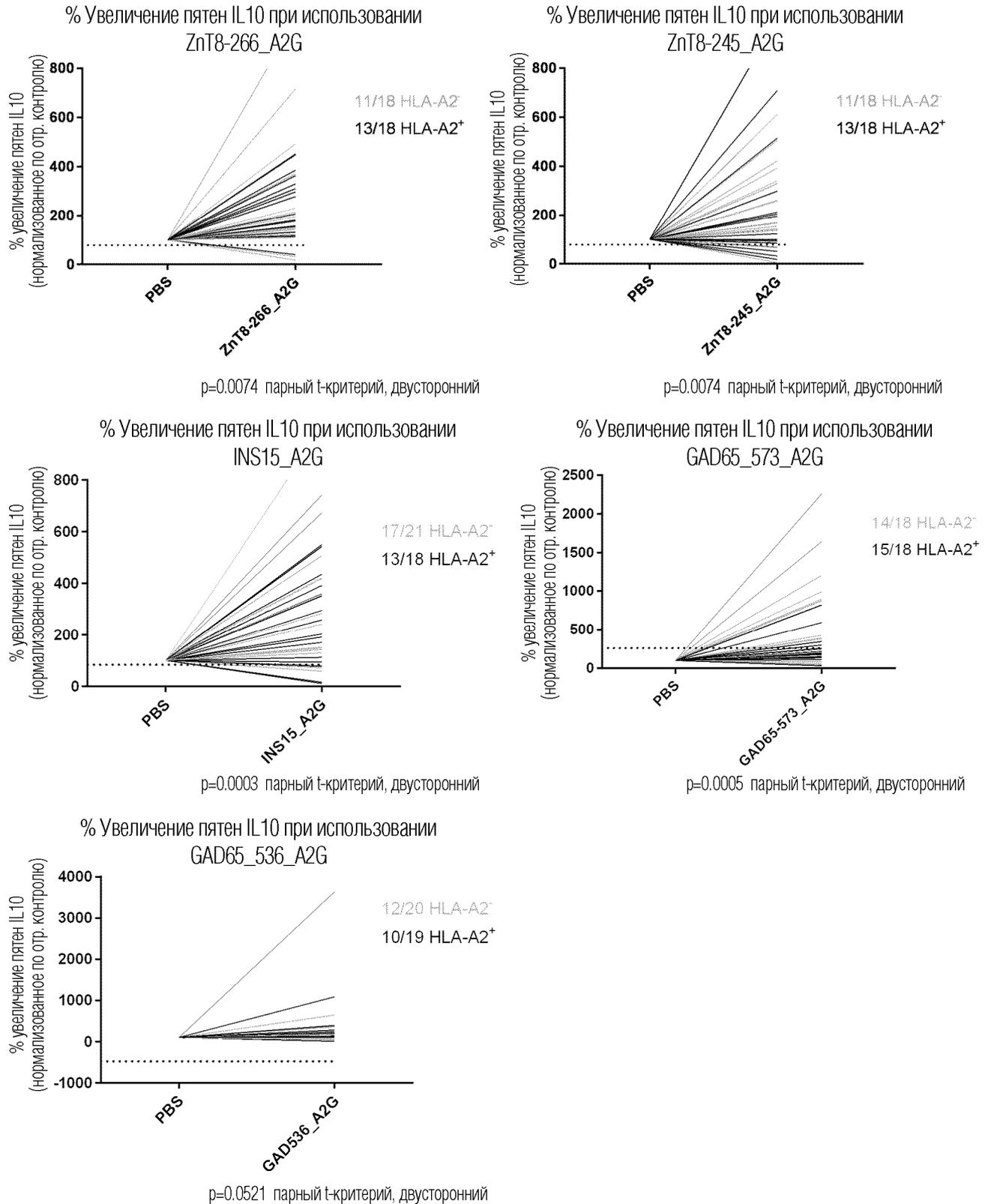
ФИГ. 13

Одноцепочечные молекулы МНС Ib ингибируют лизис Т-клеток дозозависимым образом



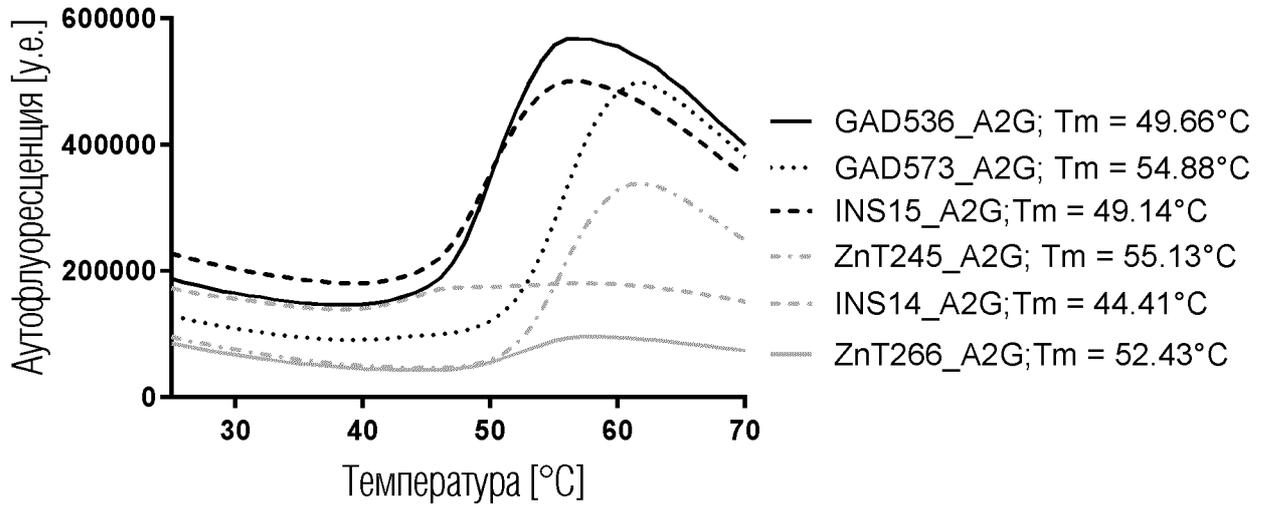


ФИГ. 15



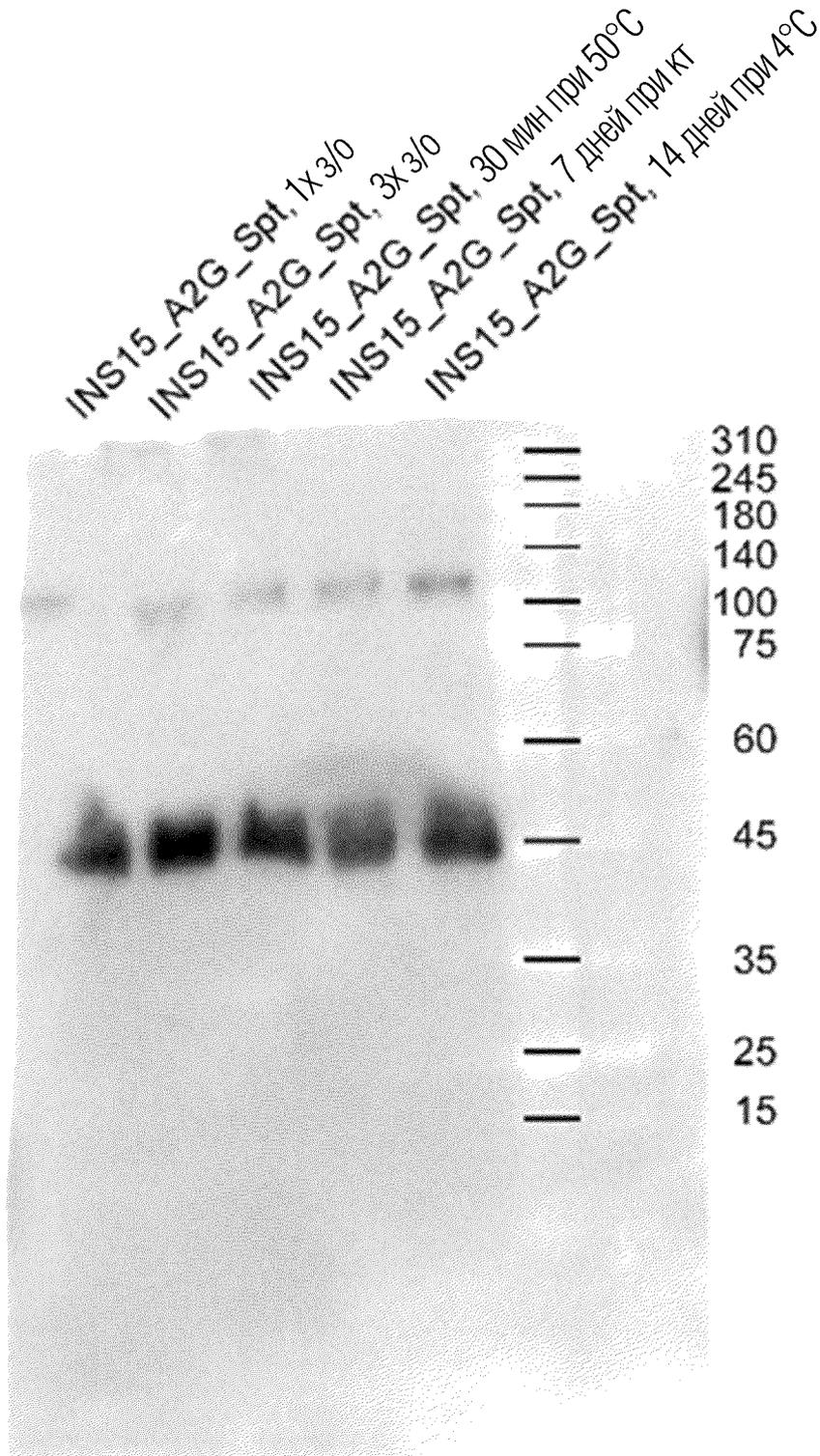
ФИГ. 16

Анализ теплового сдвига для диабета 1-го типа



ФИГ. 17

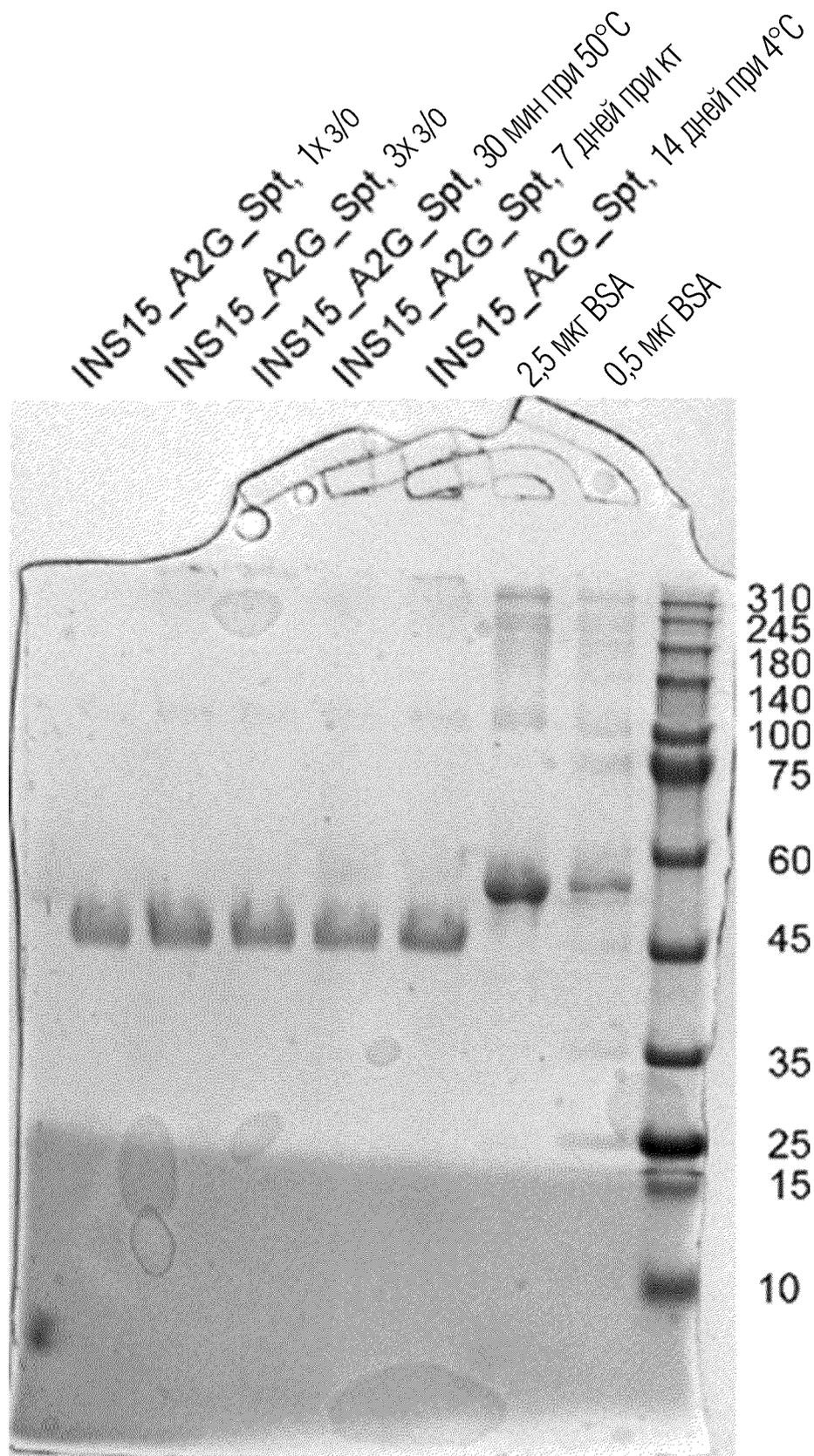
A



2A12 α HLA-G, MA1-10358, Thermo, 1:1000 ON
 α mIgG, 7076, CST, 1:5000, 1 h

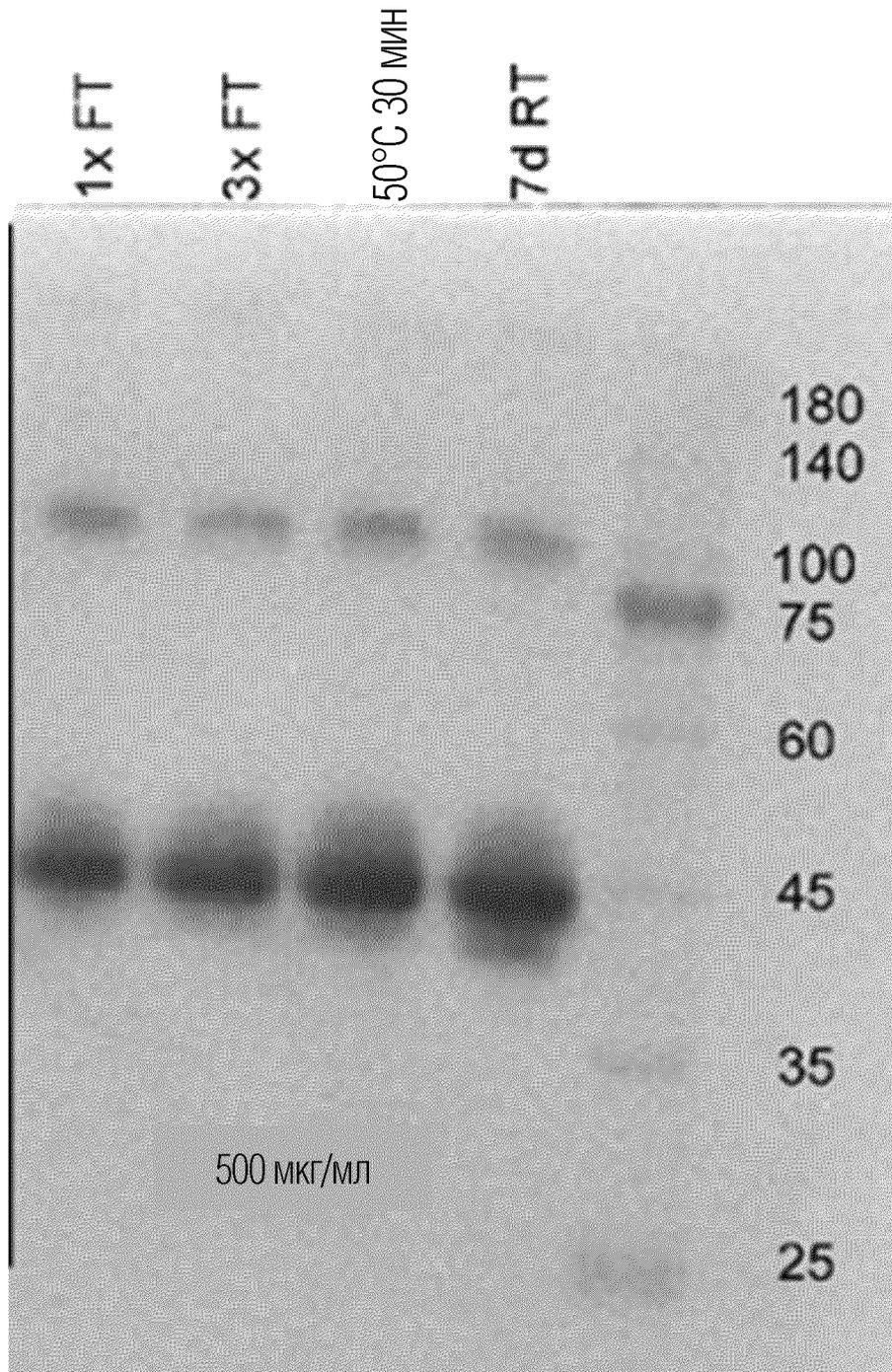
ФИГ. 17 (продолжение)

В



ФИГ. 17 (продолжение)

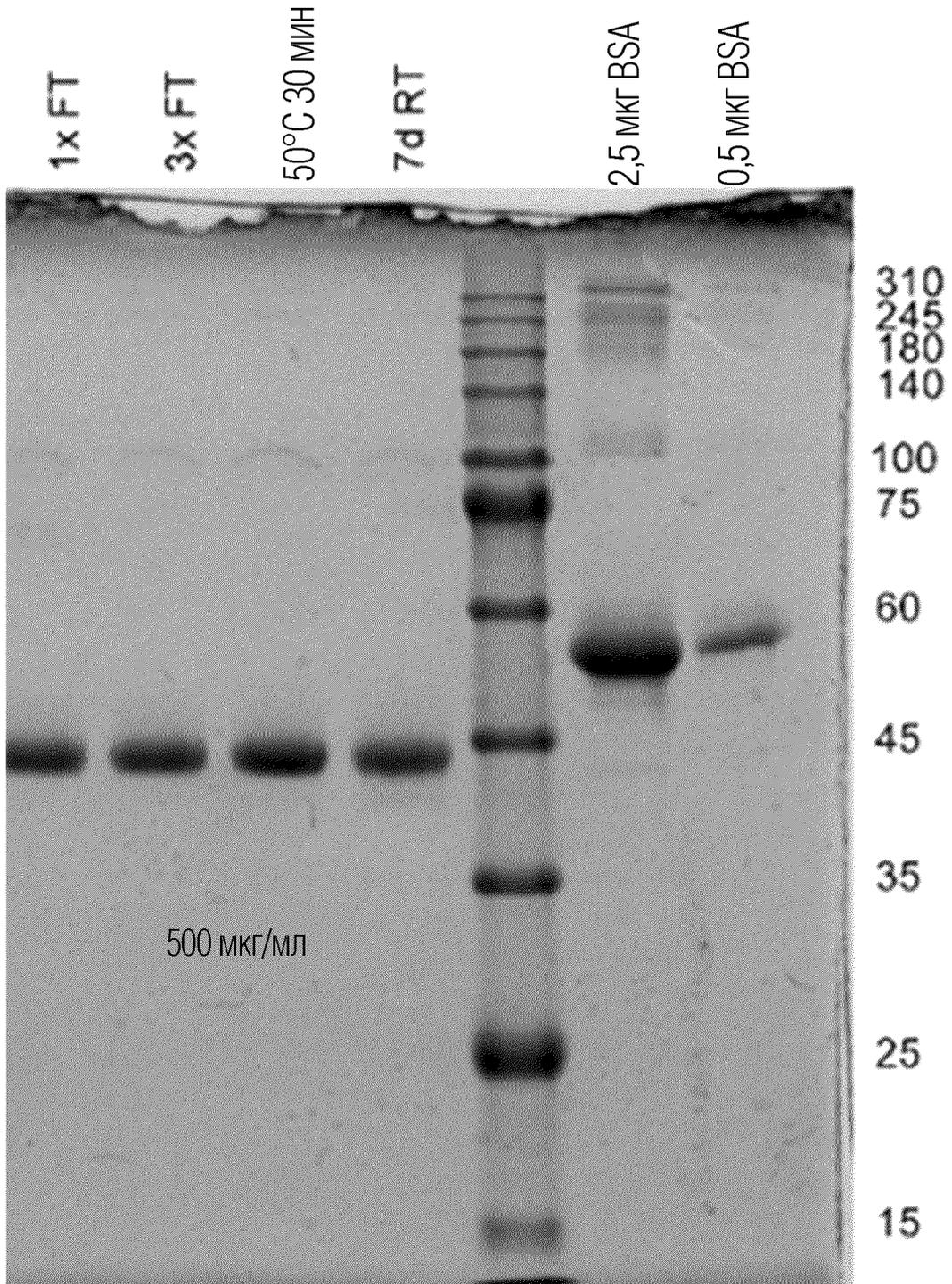
с



GAD65_A2G

ФИГ. 17 (продолжение)

D



GAD65_A2G