

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290250** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.10

(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.07.07

(54) СПОСОБ

(31) **1909774.0**

(32) **2019.07.08**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2020/051629**

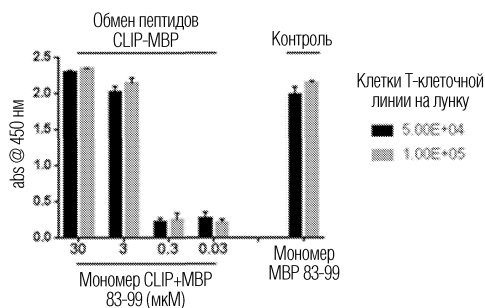
(87) **WO 2021/005357 2021.01.14**

(71) Заявитель:
**ВОРГ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
(ХАНЧЖОУ) КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Янссон Лизелотт, Шергерс Эвелин,
Рэйт Дэвид (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам идентификации толерогенных пептидов. Изобретение также относится к продуктам, используемым в них, и полученным такими способами. Изобретение также относится к применению таких толерогенных пептидов в лечении заболеваний.



A1

202290250

202290250

A1

СПОСОБ**Область техники**

Изобретение относится к способам идентификации толерогенных пептидов. Изобретение также относится к продуктам, используемым в них и полученным такими способами. Изобретение также относится к применению таких толерогенных пептидов в лечении заболеваний.

Уровень техники

При адаптивном иммунном ответе Т-лимфоциты способны распознавать внутренние эпитопы белкового антигена. Антигенпрезентирующие клетки (АРС) захватывают белковые антигены и расщепляют их на короткие пептидные фрагменты. Пептид может связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I или II внутри клетки и переноситься на поверхность клетки. При презентации на клеточной поверхности, будучи в комплексе с молекулой МНС, пептид может распознаваться Т-клеткой (через Т-клеточный рецептор (TCR)), и в этом случае пептид представляет собой Т-клеточный эпитоп.

Т-клеточные эпитопы играют центральную роль в адаптивном иммунном ответе на любой антиген, собственный или чужеродный. Центральная роль Т-клеточных эпитопов при заболеваниях, связанных с гиперчувствительностью (которые включают аллергию, аутоиммунные заболевания и отторжение трансплантата) была продемонстрирована с использованием экспериментальных моделей. Имеется возможность индуцировать иммунологические или аллергические заболевания посредством иммунизации синтетическими пептидами (на основе структуры Т-клеточных эпитопов) в комбинации с адьювантом.

Напротив, было показано, что можно индуцировать иммунологическую толерантность к определенным пептидным эпитопам введением пептидных эпитопов в растворимой форме. Было показано, что введение растворимых пептидных антигенов является эффективным средством подавления заболевания при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (EAE - модель рассеянного склероза (РС)) (Metzler and Wraith (1993) *Int. Immunol.*, 5:1159-1165; Liu and Wraith (1995) *Int. Immunol.*, 7:1255-1263, Anderton and Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.*, 28:1251-1261); и на экспериментальных моделях артрита, диабета и увеопетинита (см. обзор Anderton and Wraith (1998), см. выше). Это также было продемонстрировано в качестве средства лечения текущей болезни при EAE (Anderton and Wraith (1998), см. выше, Streeter et al. (2015) *Neurology, Neuroimmunology, Neuroinflammation*, vol. 2, no. 3, e93).

Применение толерогенных пептидов для лечения или профилактики заболеваний привлекло значительное внимание. Одной из причин этого является то, что было показано, что некоторые толерогенные эпитопы могут снижать Т-клеточные ответы на различные антигены в одной и той же ткани. Это явление, известное как «подавление

иммунного ответа на один эпитоп в результате активации иммунного ответа на другой», означает, что имеется возможность индуцировать толерантность к более чем одному эпитопу (предпочтительно ко всем эпитопам) на данный антиген и к более чем одному антигену при определенном заболевании с использованием конкретного толерогенного пептида (Anderton and Wraith (1998), см. выше, Wraith (2016) *Nature*, 530: 422-423). Это избавит от необходимости идентифицировать все патогенные антигены при конкретном заболевании.

Пептиды также являются подходящим вариантом для терапии за счет их относительно низкой стоимости и того факта, что можно получить аналоги пептидов с измененными иммунологическими свойствами или измененной растворимостью. Таким образом, пептиды можно модифицировать для изменения их взаимодействия либо с МНС, либо с TCR.

Одна возможная проблема, связанная с этим подходом, заключается в том, как было показано, что не все пептиды, которые функционируют в качестве Т-клеточных эпитопов, способны индуцировать толерантность. Пептид основного белка миелина (MBP) 89-101 представляет собой иммунодоминантный антиген после иммунизации, и также является высокоэффективным иммуногеном как с точки зрения праймирования реактивности Т-клеток, так и с точки зрения индукции ЕАЕ. Однако было показано, что этот пептид неэффективен для индукции толерантности при введении в растворе (Anderton and Wraith (1998), см. выше).

Авторы настоящего изобретения ранее показали, что если пептидный эпитоп обладает соответствующими свойствами для презентации незрелыми APC без процессинга антигена, то пептид может индуцировать иммунологическую толерантность. Наблюдение, что некоторые Т-клеточные эпитопы являются толерогенными, а другие неспособны индуцировать толерантность, следовательно, можно объяснить тем фактом, что для некоторых эпитопов требуется дополнительный процессинг, прежде чем они смогут быть презентированы молекулой МНС. Такие эпитопы, требующие дополнительного процессинга, не индуцируют толерантности при введении в растворимой форме, несмотря на их способность вызывать заболевание при введении в комбинации с адъювантом.

Эпитопы, для которых не требуется дополнительный процессинг, способны индуцировать толерантность и были названы авторами изобретения «апитопами» (эпиТОП, не зависящий от процессинга антигена).

Это открытие обеспечивает основанный на правилах способ отбора толерогенных эпитопов Т-клеток, который устраняет необходимость тестирования толерогенной способности пептида *in vivo* и особенно пригоден при разработке стратегий лечения или профилактики заболеваний, для которых отсутствуют доступные животные модели.

Даже для заболеваний, для которых имеются модели на животных, способ отбора должен сделать разработку композиций, индуцирующих толерантность, более простой и безопасной, поскольку он обеспечивает механизм, посредством которого способность

пептида индуцировать толерантность можно тестировать на Т-клетках человека (распознавание антигена в сочетании с с молекулами МНС человека) *in vitro* до его использования *in vivo*.

Однако в настоящее время авторы изобретения разработали усовершенствованный способ отбора и/или идентификации толерогенных пептидов. Данный способ обеспечивает надежный и точный скрининг толерогенных пептидов посредством отбора пептидов, обладающих многочисленными свойствами, ассоциированными с толерогенными пептидами. Кроме того, авторы изобретения разработали более эффективные способы тестирования пептидов на свойства, связанные с толерогенностью, и способы, которые лучше имитируют естественный процесс селекции антигенных пептидов. Следовательно, данные усовершенствованные способы делают общий процесс идентификации толерогенных пептидов более эффективным и более действенным при отборе пептидов, которые будут оказывать толерогенное действие *in vivo*, и толерогенные пептиды могут быть идентифицированы быстрее, чем с помощью способов, ранее известных в данной области.

Сущность изобретения

Изобретение относится к нескольким способам (или стадиям), описанным здесь, которые можно осуществлять в комбинации для достижения эффективного процесса идентификации толерогенных пептидов. Способы или стадии могут включать любое из следующего:

Идентификация Т-клеточных эпитопов - анализ вытеснения CLIP

В одном аспекте изобретение относится к способу идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, где указанный способ включает следующие стадии:

- (i) контактирование комплекса главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII) и ассоциированного с классом II пептида инвариантной цепи (CLIP) (МНСII-CLIP) с пептидом;
- (ii) добавление Т-клеток, специфичных для антигена; и
- (iii) определение активации указанных Т-клеток.

Пептид, который приводит к активации Т-клеток, может содержать Т-клеточный эпитоп.

Пептид CLIP может иметь последовательность PVSKMRMATPLLMQA.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, где указанный способ включает следующие стадии:

- (i) контактирование комплекса главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII) и ассоциированного с классом II пептида инвариантной цепи (CLIP) (МНСII-CLIP) с пептидом;
- (ii) добавление Т-клеток, специфичных к антигену; и
- (iii) определение активации указанных Т-клеток.

Пептид, который приводит к активации Т-клеток, может быть способен

связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению CLIP в способе идентификации толерогенных пептидов.

В одном аспекте активацию Т-клеток можно определить измерением уровня секретированного IL-2 или любым другим подходящим способом. Специалисту в данной области известны подходящие способы определения уровней цитокинов, например, с помощью методов ELISA или других подходящих методов.

Конкурентный анализ *in vitro*

В еще одном аспекте изобретение относится к способу тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, презентированного на APC, где указанный способ включает следующие стадии:

- (i) добавление тестируемого пептида к МНСII;
- (ii) добавление контрольного пептида;
- (ii) добавление Т-клеток, специфичных для контрольного пептида; и
- (iii) определение активации Т-клеток.

В данном анализе контрольным пептидом является известный толерогенный пептид, способный связываться с МНСII. Сначала тестируемый пептид добавляют к МНСII/APC, и затем добавляют контрольный пептид. Если Т-клетки активируются, то контрольный пептид вытеснил тестируемый пептид, и, следовательно, тестируемый пептид имеет более низкую относительную аффинность связывания по сравнению с контрольным пептидом. Другими словами, если специфическая для контрольного пептида активация Т-клеток снижается, то тестируемый пептид связывается с МНСII с аналогичной или более высокой аффинностью и тем самым предотвращает замену контрольным пептидом.

В одном аспекте контрольным пептидом может быть пептид с последовательностью SEQ ID NO:10. Например, когда МНСII представляет собой HLA-DR2.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению пептида, состоящего из последовательности KKGPRCLTRYSSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 10), в способе тестирования аффинности связывания пептида с МНСII.

В одном аспекте контрольным пептидом может быть пептид с последовательностью SEQ ID NO:5. Например, когда МНСII представляет собой HLA-DR3 или HLA-DR4.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению пептида, состоящего из последовательности KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 5), в способе тестирования аффинности связывания пептида с МНСII.

Анализ загрузки МНСII *in vivo*

В одном аспекте пептиды можно модифицировать для повышения растворимости. Модификация пептидов FVIII для повышения их растворимости описана в WO 2014/072958. Модификация пептидов рецептора тиреотропного гормона (TSHR) для

повышения их растворимости описана в WO 2015/019302. Модификация пептидов S-антигена (S-Ag) для повышения их растворимости описана в WO 2018/127830.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу, с помощью которого можно определить, является ли пептид достаточно растворимым, чтобы он мог проходить через жидкую фазу и, в конечном счете, проникать в селезенку при введении. Затем в селезенке пептид может связываться с МНСII на дендритных клетках и презентироваться.

Таким образом, в еще одном аспекте изобретение относится к способу тестирования растворимости пептида *in vivo*, где указанный способ включает следующие стадии:

- (i) получение дендритных клеток от мыши, которой ввели пептид;
- (ii) сокультивирование указанных дендритных клеток с Т-клетками, специфичными для указанного пептида; и
- (iii) определение активации Т-клеток.

В одном аспекте Т-клетки могут представлять собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы.

Толерантность *ex-vivo*

В еще одном аспекте изобретение относится к способу *ex vivo* тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену, где указанный способ включает стадии:

- (i) получение Т-клеток от животного, которому ввели пептид;
- (ii) стимуляцию указанных Т-клеток антигеном; и
- (iii) определение активации Т-клеток.

В одном аспекте активацию Т-клеток можно определить измерением включения BrdU, включения EdU, уровней Ki67, секреции IL-2, секреции IL-17 и/или секреции IFN γ .

Распознавание пептидов клетками пациента

В одном аспекте может быть проведен анализ вытеснения CLIP, описанный здесь, где стадия (ii) включает добавление РВМС, которые были выделены от пациента. Такой анализ можно использовать для подтверждения того, что пептид презентирован клеткам пациента.

Эффективность тестирования на модели заболевания

В одном аспекте изобретение может включать стадию тестирования идентифицированного пептида на подходящей животной модели заболевания, представляющего интерес. Специалисту в данной области известны подходящие модели заболеваний. Например, животная модель, используемая для тестирования пептидов FVIII, описана в WO 2014/072958. Модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ), индуцированная иммунизацией пептидами гликопротеина миелиновых олигодендроцитов (МОГ), описана в WO 2014/111840. Животная модель болезни Грейвса, используемая для тестирования пептидов рецептора тиреотропного гормона (TSHR), описана в WO 2015/019302.

Анализ биомаркеров

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения влияния пептида на секрецию цитокинов, включающему измерение уровней цитокинов в сыворотке крови мыши, которой ввели пептид. Паттерн цитокинов, секретированных в ответ на пептид, демонстрирует, что пептид связывается с МНСII и активирует Т-клетки *in vivo*. Изменение паттерна секреции цитокинов после повторных введений пептида, такое как повышение секреции IL-10, указывает на индукцию толерантности.

В одном аспекте мышь может представлять собой трансгенную мышь HLA-DR.

В одном аспекте изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему следующие стадии:

- (i) проведение анализа вытеснения CLIP в соответствии со способом, описанным здесь; и/или
- (ii) проведение конкурентного анализа *in vitro* в соответствии со способом, описанным здесь; и/или
- (iii) проведение анализа загрузки МНСII *in vivo* в соответствии со способом, описанным здесь; и/или
- (iv) проведение анализа вытеснения CLIP с PBMC пациента в соответствии со способом, описанным здесь; и/или
- (v) проведение анализа толерантности *ex vivo* в соответствии со способом, описанным здесь; и/или
- (vi) тестирование эффективности пептида на модели заболевания; и/или
- (vii) проведение анализа биомаркеров в соответствии со способом, описанным здесь.

В еще одном аспекте изобретение относится к толерогенному пептиду, идентифицированному способом по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей толерогенный пептид, идентифицированный способом по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения и/или профилактики заболевания у субъекта, включающему стадию введения субъекту пептида или композиции по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к толерогенному пептиду или композиции для применения в лечении и/или профилактике заболевания.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению толерогенного пептида или композиции по изобретению в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболевания.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - Анализ вытеснения CLIP

Ответ MBP-специфичной Т-клеточной линии на мономеры HLA-DR2 после пептидного обмена. Биотинилированные мономеры HLA-DR2 (DRB1*1501) со связанным пептидом CLIP присоединяли к покрытым нейтравидином 96-луночным планшетами. Лунки инкубировали с указанной концентрацией MBP 83-99, доминантным эпитопом

MBP, рестриктированным HLA-DR2, в течение 16 ч, и планшеты промывали. Контрольные лунки покрывали мономером DR2, предварительно загруженные пептидом MBP 83-99. Линию Т-клеток, специфическую для MBP, инкубировали с мономерами при 37°C в течение 24 ч и оценивали ответ измерением уровня секретированного IL-2.

Фиг. 2 - Анализ AIPIS

Ответ Т-клеток на пептид, презентируемый фиксированными антигенпрезентирующими клетками (APC), для идентификации апитопов (эпитопов, независимых от процессинга антигена)

А. TSHR-специфическую гибридому сокультивировали со свежeweделенными или фиксированными спленоцитами трансгенных мышей HLA-DR в качестве APC в присутствии указанного белка или пептидов. Секрецию IL-2 реагирующими гибридами измеряли в супернатантах этих культур.

В. CD4+ Т-клетки, выделенные от трансгенных мышей HLA-DR, иммунизированных пептидом D в CFA, сокультивировали со свежeweделенными или фиксированными клетками VAVY, использованными в качестве APC. К этим культурам добавляли белковый или пептидный антиген и в супернатанте измеряли секрецию IFN γ отвечающими CD4+ клетками.

С. Клетки из пептид F-специфичной мышью (HLA-DR трансгенной) Т-клеточной линии (TCL) сокультивировали с клетками VAVY, используемыми в качестве APC. К этим культурам добавляли белковый или пептидный антиген и в супернатанте измеряли секрецию IFN γ отвечающими TCL.

Фиг. 3 - Конкурентный анализ *in vitro*

Ответ Т-клеточных гибридом, специфичных к контрольному пептиду, в конкурентном анализе с тестируемым пептидом. Т-клеточные гибридомы, специфичные к контрольному пептиду, культивировали в присутствии фиксированных HLA-DR-экспрессирующих антигенпрезентирующих клеток (APC). К этим культурам добавляли тестируемый пептид и контрольный пептид на 48 ч при 37°C. Ответ Т-клеточных гибридом оценивали измерением уровня секретированного IL-2. Снижение секреции IL-2 свидетельствует о связывании тестируемого пептида в пользу контрольного пептида.

Фиг. 4 - Анализ загрузки MHCII *in vivo*

Ответ пептид-специфических CD4+ Т-клеток на пептид, загруженный *in vivo* на дендритные клетки. Трансгенным мышам HLA-DR подкожно вводили 100 мкг пептида N (отсутствие связывания HLA-DR) или пептида O (связывание HLA-DR). Через 2 ч после введения отбирали образцы селезенки и выделяли клетки CD11c+ (дендритные клетки). Эти клетки CD11c+ сокультивировали с клетками CD4+, специфичными к пептиду, в течение 72 ч при 37°C. Уровень IFN γ измеряли в супернатантах этих культур для оценки ответа CD4+ Т-клеток на пептид.

Фиг. 5 - Анализ толерантности *ex vivo*

Ответ на белковый антиген в лимфатических узлах (А) и селезенке (В) мышей, обработанных пептидом и не обработанных пептидом. Трансгенным мышам HLA-DR по

схеме с эскалацией дозы вводили подкожно (0, 1; 1; 10 и 3×100 мкг через день) толерогенный (пептид Q) или нетолерогенный (пептид P) пептид или вводили контроль (PBS). После этого мышей иммунизировали пептидным антигеном в CFA и через 10 суток отбирали образцы лимфатических узлов и селезенки. Клетки лимфатических узлов и селезенки культивировали *in vitro* в течение 3 суток при 37°C в присутствии белкового антигена (SAg) или положительного контроля (PPD). Ответ клеток на белковый антиген оценивали измерением уровней IFN γ в супернатантах культур. * $p < 0,05$

Фиг. 6 - Анализ биомаркеров

Трансгенных мышей HLA-DR иммунизировали пептидом B в CFA. На сутки 21 после иммунизации подкожно вводили 100 мкг пептида C. Через 2 ч после инъекции собирали кровь и определяли уровни цитокинов в сыворотке с помощью электрохемилюминесцентного анализа (MSD). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Фиг. 7 - Способ идентификации толерогенных пептидов

Схема, иллюстрирующая способ идентификации толерогенных пептидов. Цифры в скобках обозначают, где может быть использован каждый анализ, описанный здесь: (1) анализ вытеснения CLIP, (2) конкурентный анализ, (3) анализ загрузки МНСII, (4) анализ толерантности *ex vivo*, (5) анализ биомаркеров.

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к способам отбора или идентификации толерогенных пептидов.

В рамках настоящего изобретения, термин «толерогенный» означает пептид, способный индуцировать толерантность. «Толерогенные пептиды» представляют собой пептиды, которые, вероятно, будут эффективны в лечении заболеваний, связанных с гиперчувствительностью, таких как аутоиммунные заболевания. Толерогенность можно тестировать на животных моделях и в клинических испытаниях.

Определенные свойства ассоциированы с толерогенностью. Например, толерогенный пептид может обладать одним или более из следующих свойств:

- Пептид содержит Т-клеточный эпитоп
- Пептид может связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу
- Пептид имеет относительно высокую аффинность к МНСII
- Пептид является достаточно растворимым, чтобы его можно было вводить, и он мог циркулировать *in vivo*, для обеспечения связывания с МНСII на APC *in vivo*
- Пептид индуцирует толерантность в анализах *ex vivo*.

Свойства, подобные перечисленным выше, могут указывать на то, что пептид может быть толерогенным, или они могут быть важными или даже необходимыми для того, чтобы пептид мог рассматриваться в качестве толерогенного.

Способы по изобретению включают тестирование пептидов на свойства, ассоциированные с толерогенностью. Таким образом, толерогенные пептиды могут быть идентифицированы до того, как они будут тестированы на животных моделях и в клинических испытаниях у людей.

С использованием способов по изобретению идентифицируют толерогенные пептиды посредством тестирования, анализа или оценки того, обладает ли данный пептид несколькими свойствами, которые являются показательными, важными или необходимыми для того, чтобы пептид был толерогенным, например, два или более из вышеперечисленных свойств, например, три или более, например, четыре или более, например, все пять свойств, перечисленных выше.

Способы по изобретению для идентификации толерогенных пептидов можно рассматривать в качестве процесса скрининга. Пептиды тестируют на специфическое свойство, ассоциированное с толерогенными пептидами. Пептиды, не обладающие тестируемым свойством, отбрасываются, в то время как пептиды, обладающие тестируемым свойством, остаются. Затем оставленные пептиды тестируют на другое свойство, связанное с толерогенными пептидами, и процесс повторяют, каждый раз тестируя оставленные пептиды на другое свойство и оставляя пептиды, обладающие этим свойством. Таким образом, большой набор потенциально толерогенных пептидов может быть сужен до меньшего числа толерогенных пептидов, которые, скорее всего, будут терапевтически эффективными.

Таким образом, способы по изобретению обеспечивают надежные и точные средства для идентификации толерогенных пептидов. Способы по изобретению могут уменьшить количество «ложноположительных результатов» (т. е. пептидов, отобранных для дальнейших испытаний, таких как испытания на животных моделях или клинические испытания, но которые в конечном итоге окажутся терапевтически неэффективными), идентифицированных по сравнению со способами, ранее использованными для идентификации толерогенных пептидов, тем самым экономя время, деньги и другие ресурсы.

Таким образом, один аспект изобретения относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему:

- идентификацию пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или
- тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, и/или
- тестирование аффинности связывания пептида с МНСII и/или
- тестирование растворимости пептида *in vivo* и/или
- тестирование способности пептида индуцировать толерантность к антигену, и/или
- тестирование влияния пептида на секрецию цитокинов *in vivo*.

Такие способы можно осуществить в соответствии с изобретением, как здесь описано. В дополнительных аспектах изобретение относится к усовершенствованным способам тестирования, анализа или оценки пептида на свойство или свойства, ассоциированные с толерогенными пептидами.

Один такой аспект изобретения относится к способам идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, которые являются более эффективными, чем способы предшествующего уровня. Данные способы относятся здесь к «анализу вытеснения

CLIP».

Еще один такой аспект изобретения относится к способам тестирования аффинности связывания пептида с МНСП, которые являются более физиологически релевантными, чем способы предшествующего уровня. Данные способы относятся здесь к «конкурентному анализу».

Другой такой аспект изобретения относится к способам тестирования растворимости пептида *in vivo*, которые дают результаты, более терапевтически значимые, чем способы *in vitro* предшествующего уровня. Данные способы относятся здесь к «анализу загрузки МНСП».

Еще один такой аспект изобретения относится к способам тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену. Данные способы относятся здесь к «анализу толерантности *ex vivo*».

Еще один такой аспект изобретения относится к способам определения влияния пептида на секрецию цитокинов. Данные способы относятся здесь к «анализу биомаркеров».

Данные усовершенствованные способы тестирования свойств пептидов могут быть использованы как часть вышеуказанного способа идентификации толерогенных пептидов. Другими словами, способ по изобретению для идентификации толерогенных пептидов может включать один или несколько способов по изобретению для тестирования пептидов на свойства, ассоциированные с толерогенными пептидами.

В некоторых вариантах осуществления способ идентификации толерогенных пептидов включает:

способ по изобретению идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или

способ по изобретению тестирования способности пептида связываться с МНСП, не подвергаясь процессингу, и/или

способ по изобретению тестирования аффинности связывания пептида с МНСП, и/или

способ по изобретению тестирования растворимости пептида *in vivo*, и/или

способ по изобретению для тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену и/или

способ по изобретению для тестирования действия пептида на секрецию цитокинов *in vivo*.

Пептиды

Термин «пептид» используется в обычном смысле для обозначения ряда остатков, обычно L-аминокислот, соединенных друг с другом, как правило, пептидными связями между α -аминогруппами и карбоксильными группами смежных аминокислот. Термин включает модифицированные пептиды и синтетические аналоги пептидов.

Пептид по настоящему изобретению может быть получен химическими способами (Peptide Chemistry, A Practical Chemistry. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin).

Например, пептиды могут быть синтезированы твердофазными методами (Roberge J.Y. et al. (1995) *Science*, 269: 202-204), с дальнейшим отщеплением от смолы и очисткой препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (например, Creighton (1983) *Proteins Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman and Co, New York NY). Автоматизированный синтез может быть осуществлен, например, с использованием пептидного синтезатора ABI 431 A (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя.

Альтернативно пептид может быть получен рекомбинантными способами или расщеплением более длинного полипептида, после чего может следовать модификация одного или обоих концов. Состав пептида можно подтвердить аминокислотным анализом или секвенированием (например, методом деградации по Эдману).

Для практических целей существуют различные другие характеристики, которые может проявлять пептид. Например, важно, чтобы пептид был достаточно стабилен *in vivo* для того, чтобы быть терапевтически пригодным. Период полураспада пептида *in vivo* может составлять, по меньшей мере, 10 мин (например, в свободной форме), 15 мин, 30 мин, 4 ч или 24 ч.

Пептид также может демонстрировать высокую биодоступность *in vivo*. Пептид может сохранять конформацию *in vivo*, которая позволяет ему без затруднения связываться с молекулой МНС на поверхности клетки.

Идентичность последовательности можно оценить любым удобным способом. Однако для определения степени идентичности последовательностей между последовательностями являются пригодными компьютерные программы, с помощью которых выполняют множественное выравнивание последовательностей, например, Clustal W. (Thompson et al., (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680). Также для этой цели пригодны программы, которые сравнивают и выравнивают пары последовательностей, такие как ALIGN (Myers et al., (1988) *CABIOS*, 4: 1-17), FASTA (Pearson et al., (1988) *PNAS*, 85:2444-2448; Pearson (1990)), *Methods Enzymol.*, 183: 63-98) и гэпированная программа BLAST (Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402). Кроме того, сервер Dali в Европейском институте биоинформатики предлагает выравнивание белковых последовательностей на основе структуры (Holm (1993) *J. Mol. Biol.*, 233: 123-38; Holm (1995) *Trends Biochem. Sci.*, 20: 478-478). 480; Holm (1998) *Nucleic Acid Res.*, 26: 316-9).

Множественные выравнивания последовательностей и расчеты процентной идентичности можно провести с использованием стандартных параметров BLAST (с использованием последовательностей из всех доступных организмов, матрица Blosum 62, стоимость гэпа: наличие 11, удлинение 1).

В качестве альтернативы можно использовать следующую программу и параметры: программа: Align Plus 4, версия 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite). Сравнение ДНК: глобальное сравнение, стандартная линейная оценочная матрица, штраф за несоответствие=2, штраф за открытый гэп=4, штраф за удлинение гэпа=1.

Сравнение аминокислот: глобальное сравнение, оценочная матрица BLOSUM 62.

Таким образом, в объем изобретения включены варианты указанных или определенных последовательностей при условии, что вариант сохраняет функциональную активность исходного пептида, т.е. варианты являются функционально эквивалентными, другими словами, они имеют или проявляют активность исходного пептида, как здесь определено. Такие варианты могут включать аминокислотные замены, добавления или делеции (включая усечения на одном или обоих концах) исходной последовательности, например из одной или более, например, от 1 до 14 аминокислот.

Также включаются функционально эквивалентные производные, в которых одна или более аминокислот являются химически дериватизированными, т.е. замещенными химической группой.

Пептиды по изобретению можно формулировать в композицию в виде нейтральной или солевой формы. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные свободными аминогруппами пептида) и которые образуются с неорганическими кислотами, например, такими как соляная или фосфорная кислоты, или органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, винная и малеиновая кислота. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и органических оснований, таких как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин и прокаин.

Антигены

В рамках настоящего изобретения, термин «антиген» относится к веществу, которое индуцирует иммунный ответ. Неадекватный иммунный ответ на антиген приводит к развитию заболевания. Например, сверхактивный иммунный ответ на антиген может привести к заболеваниям, связанным с гиперчувствительностью, таким как аллергия. При аутоиммунных заболеваниях иммунный ответ развивается против веществ, входящих в состав организма, которые поэтому называются «аутоантигенами».

С помощью способов по настоящему изобретению идентифицируют пептиды, которые способны индуцировать толерантность к антигенам (т.е. снижать иммунный ответ на антигены). Таким образом, данные толерогенные пептиды могут быть пригодными в лечении заболеваний, ассоциированных с неадекватным иммунным ответом на антигены. Каждое такое заболевание ассоциировано с нетолерантностью определенных антигенов, которые для каждого заболевания разные. Например, известно, что аутоиммунное заболевание, рассеянный склероз (MS), связано с нетолерантностью миелин-связывающего белка (MBP), тогда как болезнь Грейвса связана с нетолерантностью рецептора тиреотропного гормона (TSHR).

Таким образом, для лечения каждого заболевания требуется идентификация пептидов, которые могут индуцировать толерантность к конкретным антигенам, индуцирующим неадекватный иммунный ответ в этиологии этого конкретного заболевания.

Следовательно, способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации пептидов, индуцирующих толерантность к любому белковому антигену. В некоторых вариантах осуществления антиген может представлять собой МВР, фактор VIII (FVIII), гликопротеин миелиновых олигодендроцитов (MOG), миелиновый протеолипидный белок (PLP), TSHR, сердечный миозин или S-антиген. Толерогенные пептиды, полученные из этих антигенов, использовали для демонстрации эффективности способов по изобретению (см. фиг. 1-6).

«Антигенпрезентирующие клетки» (APC) представляют собой клетки, которые представляют антигены на своей поверхности для распознавания клетками иммунной системы. APC включают дендритные клетки, макрофаги и В-клетки. В некоторых вариантах осуществления APC, используемые в способах по изобретению, были выделены от животного («первичные APC»). В некоторых вариантах осуществления APC происходят из линий APC (т.е. иммортализованных APC).

Т-клетки

В рамках настоящего изобретения, термин «Т-клетка» относится к клетке, экспрессирующей Т-клеточный рецептор, которая способна отвечать на пептид, связывающийся с Т-клеточным рецептором, посредством пролиферации и/или секреции цитокинов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой CD4⁺ клетки.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой первичные Т-клетки (Т-клетки, выделенные у субъекта).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой Т-клеточные клоны. Т-клеточные клоны представляют собой Т-клетки с одинаковой антигенной специфичностью, которые образуются в результате стимуляции пролиферации выделенных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой линию Т-клеток. Линии Т-клеток представляют собой Т-клетки, которые были иммортализованы, например, трансформацией вирусом, таким как вирус Эпштейна-Барр (EBV).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой Т-клеточные гибридомы. Т-клеточная гибридома представляет собой слияние первичной Т-клетки с иммортализованной клеткой с образованием иммортализованной клетки, которая может активироваться сигнальным путем Т-клеточного рецептора.

В рамках настоящего изобретения, термин «активация Т-клетки» относится к ответу Т-клетки на связывание ее Т-клеточного рецептора пептидом. Такой ответ обычно включает пролиферацию Т-клеток и/или повышенную секрецию цитокинов и/или экспрессию маркеров активации. Активацию Т-клеток, таким образом, можно измерить, оценить или анализировать посредством оценки пролиферации Т-клеток и/или измерения уровней цитокинов и/или определением экспрессии маркеров активации.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно оценить измерением пролиферации Т-клеток. Методы оценки пролиферации Т-клеток известны в

данной области и включают измерение включения ^3H -тимидина, 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU) или 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) в реплицирующуюся ДНК пролиферирующих клеток.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно оценить посредством измерения уровней цитокинов. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно оценить посредством измерения уровней интерлейкина-2 (IL-2). В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно оценить путем измерения уровней гамма-интерферона (IFN γ).

Т-клетки могут быть описаны здесь как специфичные к определенным эпитопам, пептидам или антигенам, или могут быть описаны как «пептид-специфические» или «антигенспецифические». Эти термины означают, что Т-клетка активируется (т.е. пролиферирует и/или повышает продукцию цитокинов и/или увеличивает экспрессию маркеров активации) в ответ на определенное вещество. Т-клетка может нести Т-клеточный рецептор, который связывается с определенным веществом или частью определенного вещества как часть активации Т-клетки. Например, «пептид-специфическая Т-клетка» может представлять собой Т-клетку, несущую Т-клеточный рецептор, способный связываться с конкретным пептидом, связанным с МНСII на APC. Т-клетка, специфичная к конкретному антигену, может нести Т-клеточный рецептор, способный связываться с пептидом, полученным из этого антигена в результате процессинга антигена, и презентируемым в комплексе с МНСII на APC.

Апитопы

При адаптивном иммунном ответе Т-лимфоциты способны распознавать эпитопы белкового антигена. Антигенпрезентирующие клетки (APC) захватывают белковые антигены и расщепляют их на короткие пептидные фрагменты. Пептид может связываться с главным комплексом гистосовместимости (МНС) внутри клетки и переноситься на клеточную поверхность. При презентации на клеточной поверхности в сочетании с молекулой МНС пептид может распознаваться Т-клеткой через Т-клеточный рецептор (TCR), и в этом случае пептид представляет собой Т-клеточный эпитоп.

Таким образом, эпитоп представляет собой пептид, полученный из антигена, который способен связываться с пептид-связывающей бороздкой молекулы МНС и распознаваться Т-клеткой.

Авторы настоящего изобретения ранее определили, что существует связь между способностью пептида связываться с молекулой МНС и презентироваться Т-клетке без дополнительного процессинга, и способностью пептида индуцировать толерантность *in vivo* (WO 02/16410). Если пептид является слишком длинным, чтобы связаться с пептид-связывающей бороздкой молекулы МНС без дополнительного процессинга (например, разрезания), или связывается в неподходящей конформации, то он не будет толерогенным *in vivo*. С другой стороны, если пептид имеет подходящий размер и конформацию для непосредственного связывания с пептид-связывающей бороздкой молекулы МНС в правильной форме для презентации Т-клетке, то можно предположить, что этот пептид

будет пригоден для индукции толерантности.

Таким образом, можно исследовать толерогенную способность пептида, исследуя, насколько он может связываться с молекулой МНС и презентоваться Т-клетке без дополнительного процессинга антигена *in vitro*.

Эпитопы, для которых не требуется дополнительный процессинг, способны индуцировать толерантность и были названы авторами изобретения апитопами (эпиТОПы, не зависящие от процессинга антигена).

Пептиды, которые связываются с молекулами МНС класса II, обычно имеют длину от 8 до 20 аминокислот, чаще от 10 до 17 аминокислот и могут быть длиннее (например, включать до 40 аминокислот). Эти пептиды имеют вытянутую конформацию вдоль пептид-связывающей бороздки МНС II, которая (в отличие от пептид-связывающей бороздки МНС класса I) открыта с обоих концов. Пептид удерживается на месте в основном за счет контактов атомов основной цепи с консервативными остатками, которые располагаются в пептид-связывающей бороздке.

Толерантность

Эпитопы Т-клеток играют центральную роль в адаптивном иммунном ответе на любой антиген, собственный или чужеродный. Центральная роль Т-клеточных эпитопов при заболеваниях, связанных с гиперчувствительностью (аутоиммунных) (включая аллергию и отторжение трансплантата) была продемонстрирована с использованием экспериментальных моделей. Можно индуцировать аутоиммунные или аллергические заболевания введением синтетических пептидов (на основе структуры Т-клеточных эпитопов) в сочетании с адъювантом.

Напротив, было показано, что можно индуцировать иммуногенную толерантность к определенным антигенам введением пептидных эпитопов в растворимой форме. Было показано, что введение растворимого пептида является эффективным средством подавления заболевания при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЕАЕ - модель рассеянного склероза (РС)) (Metzler and Wraith (1993) *Int. Immunol.*, 5:1159-1165; Liu and Wraith (1995) *Int. Immunol.*, 7:1255-1263, Anderton and Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.*, 28:1251-1261, de Souza (2018) *Neuro. Ther.*, 7:103-128); и на экспериментальных моделях артрита, диабета и увеоретинита (см. обзор Anderton and Wraith (1998), как указано выше). Это также было продемонстрировано как средство лечения текущей болезни при ЕАЕ (Anderton and Wraith (1998), см. выше).

Толерантность представляет собой отсутствие ответа на антиген. Толерантность к собственным антигенам является важной характеристикой иммунной системы. При утрате толерантности к собственным антигенам может развиваться аутоиммунное заболевание. Адаптивная иммунная система должна поддерживать способность отвечать на огромное разнообразие инфекционных агентов, избегая при этом аутоиммунной атаки на собственные антигены, находящиеся в собственных тканях. Это в значительной степени контролируется отрицательной селекцией высокоаффинных Т-лимфоцитов в тимусе (центральная толерантность). Однако не все аутоантигены экспрессируются в тимусе,

поэтому гибель аутореактивных тимоцитов остается неполной. Таким образом, существуют также механизмы, с помощью которых зрелые аутореактивные Т-лимфоциты в периферических тканях могут приобретать толерантность (периферическая толерантность). Обзор механизмов центральной и периферической толерантности представлен в Anderton et al. (1999) *Immunological Reviews*, 169:123-137. См. также Wraith (2016) *Nature*, 530:422-423.

Толерантность может быть результатом или характеризоваться индукцией анергии, по меньшей мере, в части CD4⁺ Т-клеток. Для активации Т-клетки, пептид должен связаться с «компетентной» APC, способной доставлять Т-клеткам два сигнала. Первый сигнал (сигнал 1) доставляется комплексом МНС-пептид на клеточной поверхности APC и принимается Т-клеткой через TCR. Второй сигнал (сигнал 2) доставляется костимулирующими молекулами на поверхности APC, такими как CD80 и CD86, и принимается CD28 на поверхности Т-клетки. Полагается, что когда Т-клетка получает сигнал 1 в отсутствие сигнала 2, то она не активируется и фактически становится анергичной. Анергические Т-клетки невосприимчивы к последующей антигенной стимуляции и могут быть способны подавлять другие иммунные реакции. Полагается, что анергические Т-клетки участвуют в опосредовании толерантности Т-клеток.

Пептиды, для которых требуется процессинг, прежде чем они могут быть презентированы в комплексе с молекулами МНС, не вызывают толерантности, поскольку они должны процессироваться зрелыми антигенпрезентирующими клетками. Зрелые антигенпрезентирующие клетки (такие как макрофаги, В-клетки и дендритные клетки) способны к процессингу антигена, а также к доставке сигналов 1 и 2 к Т-клеткам, что приводит к активации Т-клеток. С другой стороны, апитопы могут напрямую связываться с МНС класса II на незрелых APC. Таким образом, они будут презентированы Т-клеткам без костимуляции, что приведет к анергии и толерантности Т-клеток.

Конечно, апитопы также способны связываться с молекулами МНС на клеточной поверхности зрелых APC. Однако иммунная система содержит большее количество незрелых, чем зрелых APC (было высказано предположение, что активировано менее 10% дендритных клеток, Summers et al. (2001) *Am. J. Pathol.*, 159: 285-295). Таким образом, стандартной позицией для апитопа будет анергия/толерантность, а не активация.

Было показано, что при индукции толерантности снижается способность антигенспецифических CD4⁺ Т-клеток к пролиферации. Кроме того, продукция IL-2, IFN γ и IL-4 этими клетками подавляется, но продукция IL-10 увеличивается. Было показано, что нейтрализация IL-10 у мышей в состоянии индуцированной пептидом толерантности полностью восстанавливает восприимчивость к развитию заболевания. Было высказано предположение, что популяция регуляторных клеток сохраняется в толерантном состоянии, продуцируя IL-10 и опосредуя иммунную регуляцию (Burkhart et al. (1999) *Int. Immunol.*, 11: 1625-1634).

Таким образом, индукцию толерантности можно контролировать с помощью различных показателей, включая:

(a) пониженную восприимчивость к заболеванию, для которого пептид является эпитопом-мишенью *in vivo*;

(b) индукцию анергии в CD4⁺ Т-клетках (которую можно обнаружить при последующем заражении антигеном *in vitro*);

(c) изменения в популяции CD4⁺ Т-клеток, включая

(i) снижение пролиферации;

(ii) снижение продукции, например, IL-2, IFN γ и IL-4; и

(iii) повышение продукции IL-10.

В рамках настоящего изобретения, термин «толерогенный» означает способный индуцировать толерантность.

Способы по изобретению направлены на идентификацию толерогенных пептидов. В частности, способы по изобретению можно использовать для идентификации пептидов, которые являются хорошими кандидатами для дальнейшего тестирования на моделях животных и в клинических испытаниях; способы по изобретению дают четкое указание на то, что пептиды, вероятно, будут терапевтически эффективными. Таким образом, термин «толерогенные пептиды» может относиться к пептидам, которые являются кандидатами для дальнейшего тестирования на животных моделях и в клинических испытаниях и, вероятно, будет эффективными в лечении аутоиммунных заболеваний.

Идентификация пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы

В данной области известен ряд способов идентификации Т-клеточных эпитопов в определенном антигене.

Естественно процессированные эпитопы можно идентифицировать с помощью масс-спектрофотометрического анализа пептидов, элюированных с антиген-нагруженных APC. Это такие APC, которые либо были стимулированы к захвату антигена, либо были вынуждены продуцировать белок внутриклеточно в результате трансформации соответствующим геном. Обычно APC инкубируют с белком в растворе или соответственно направленным на клеточную поверхность APC. После инкубации при 37°C клетки лизируют в детергенте и белок класса II очищают, например, аффинной хроматографией. Обработка очищенного МНС подходящей химической средой (например, в кислых условиях) приводит к элюированию пептидов из МНС. Данный пул пептидов отделяют и сравнивают профиль с пептидом из контрольной APC, обработанной аналогично. Пики, уникальные для клеток, экспрессирующих белок клеток/фидерных клеток, анализируют (например, с помощью масс-спектрометрии) и идентифицируют пептидные фрагменты. Данная процедура обычно дает информацию о диапазоне пептидов (обычно находящихся во «вложенном множестве»), полученных из определенного антигена в результате процессинга антигена.

Другим способом идентификации эпитопов является скрининг синтетической библиотеки пептидов, которые перекрываются и охватывают длину антигена в анализе *in vitro*. Например, можно использовать пептиды длиной 15 аминокислот, и которые перекрываются на 5 или 10 аминокислот. Пептиды тестируют в системе презентации

антигена, которая включает антигенпрезентирующие клетки и Т-клетки. Например, система презентации антигена может представлять собой препарат мышинных спленоцитов, препарат клеток человека, происходящих из миндалин или PBMC. Альтернативно, антигенпрезентирующая система может содержать конкретную линию/клон Т-клеток и/или конкретный тип антигенпрезентирующих клеток.

Активацию Т-клеток можно определить по пролиферации Т-клеток (например, с использованием включения ^3H -тимидина) или продукции цитокинов. Активацию CD4+ Т-клеток TH1-типа можно детектировать, например, по продукции IFN γ , которую, в свою очередь, можно детектировать стандартными методами, такими как анализ ELISPOT.

Результаты исследований с перекрывающимися пептидами обычно указывают на область антигена, в которой находится эпитоп. Затем можно идентифицировать минимальный эпитоп для конкретной Т-клетки оценкой ответа на усеченные пептиды. Например, если получен ответ на пептид, содержащий остатки 1-15 в перекрывающейся библиотеке, то ряды пептидов, усеченных с обоих концов (т.е. 1-14, 1-13, 1-12 и т. д. и 2-15, 3-15, 4-15 и т.д.) можно использовать для идентификации минимального эпитопа.

Авторы настоящего изобретения разработали более быстрый способ идентификации пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы. Данный метод относится здесь к анализу вытеснения CLIP.

Анализ вытеснения CLIP

Главные комплексы гистосовместимости (МНС) представляют собой мультисубъединичные белковые комплексы клеточной поверхности, которые связывают антигены и экспонируют их на поверхности антигенпрезентирующих клеток для распознавания Т-клетками. МНС делятся на три группы: МНС класса I, класса II и класса III. МНС класса II (МНСII) обычно экспрессируется на поверхности макрофагов, дендритных клеток и В-клеток.

Ассоциированный с классом II пептид инвариантной цепи (CLIP) представляет собой пептид, способный связываться с пептид-связывающей бороздкой МНСII, что способствует образованию и транспорту МНСII в антигенпрезентирующих клетках.

CLIP синтезируется в виде фрагмента полипептида, называемого инвариантной цепью, ассоциированной с антигенами HLA-DR (сокращенно «инвариантная цепь»). В эндоплазматическом ретикулуле (ER) сегмент инвариантной цепи связывается с пептид-связывающей бороздкой вновь синтезированных комплексов МНСII, которые еще не полностью собраны. Таким образом, инвариантная цепь блокирует связывание пептидов, находящихся в ER, с пептид-связывающей бороздкой МНСII. Кроме того, сигнал в N-концевом цитоплазматическом хвосте инвариантной цепи облегчает экспорт комплекса инвариантная цепь-МНСII из ER в эндосомальный компартмент в большей степени, чем на клеточную поверхность. В эндосомальном компартменте катепсин S расщепляет инвариантную цепь, оставляя фрагмент (аминокислоты 86-100), называемый CLIP, связанным в пептид-связывающей бороздке комплекса МНСII. Остальная часть инвариантной цепи подвергается деградации.

В эндосомах экзогенные белки (т. е. потенциальные антигены) разворачиваются и расщепляются различными протеазами (т. е. подвергаются «процессингу антигена»). Для презентации антигена селектируются пептиды из деградированных экзогенных белков, которые способны вытеснять CLIP из МНСII.

Авторы изобретения разработали способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, на основе концепции антигенных пептидов, способных вытеснять CLIP из пептид-связывающей бороздки МНСII. Если пептид может вытеснить CLIP, связанный с МНСII, и активировать Т-клетки, то вероятно, этот пептид будет содержать Т-клеточный эпитоп.

В частности, анализ вытеснения CLIP можно использовать для идентификации Т-клеточных эпитопов в антигене. Лунки, содержащие мономеры МНСII-CLIP, инкубируют с рядом пептидов, покрывающих области антигена, которые, как предполагается, связываются с МНСII (т.е. области, которые, как предполагается, содержат Т-клеточный эпитоп). Будут презентироваться пептиды, способные связываться с МНСII без процессинга антигена и обладающие достаточной аффинностью для вытеснения CLIP. Т-клетки, специфичные к антигену, используются для скрининга презентации пептидов.

Таким образом, анализ вытеснения CLIP имитирует и воспроизводит естественный процесс связывания пептидов, происходящих из антигена, с МНСII. Следовательно, пептиды, отобранные с использованием анализа вытеснения CLIP, имитируют естественно процессированные Т-клеточные эпитопы и, следовательно, вовлекают соответствующие клетки для индукции толерантности.

Анализ вытеснения CLIP также обеспечивает высокопроизводительный метод идентификации Т-клеточных эпитопов, поскольку одновременно можно тестировать множество различных пептидов с выполнением очень небольших манипуляций. Например, в 96-луночной планшете с лунками, покрытыми МНСII-CLIP, можно тестировать 48 дубликатов проб посредством простого добавления пептида, и затем Т-клеток в каждую лунку.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, включающему добавление пептида к МНСII, имеющему ассоциированный с классом II пептид инвариантной цепи (CLIP) (МНСII-CLIP), добавление Т-клеток, специфичных для антигена, и определение активации Т-клеток.

Если тестируемый пептид содержит Т-клеточный эпитоп, то пептид может связываться с МНСII и вытеснять CLIP. Т-клетки, специфичные к антигену, затем связываются с пептидом через свои Т-клеточные рецепторы и активируются. Следовательно, активация Т-клеток указывает на то, что тестируемый пептид содержит Т-клеточный эпитоп.

В некоторых вариантах осуществления анализ включает:

(i) отбор Т-клеток, отвечающих на интактный антиген (т.е. отвечающих на естественно процессированные эпитопы антигена);

(ii) получение комплексов МНСII-CLIP и присоединение их к лункам планшета для культивирования тканей;

(iii) инкубирование лунок с рядом пептидов, охватывающих прогнозируемую область связывания МНСII; и

(iv) добавление Т-клеток и определение активации Т-клеток.

Кроме того, если пептид может вытеснять CLIP, связанный с МНСII, и активировать Т-клетки, то этот пептид способен связываться с МНСII без необходимости подвергаться процессингу. Будут презентироваться только те пептиды, которые способны связываться без процессинга антигена и с достаточной аффинностью для вытеснения CLIP, тем самым обеспечивая высокопроизводительный скрининг апитопов.

Таким образом, в еще одном аспекте изобретение относится к способу тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, включающему добавление пептида к МНСII-CLIP, добавление Т-клеток, специфичных для антигена, и определение активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления пептид происходит из антигена (т.е. пептид имеет ту же аминокислотную последовательность, что и участок антигена). В некоторых вариантах осуществления пептид получен из области антигена, которая, как предполагается, связывается с МНСII. В некоторых вариантах осуществления пептид получен из области антигена, которая, как предполагается, содержит Т-клеточный эпитоп.

В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой один из множества пептидов, предназначенных для покрытия области в антигене, предположительно содержащей Т-клеточный эпитоп или предположительно связывающейся с МНСII. Прогнозы могли быть выполнены *in silico*.

В некоторых вариантах осуществления способ проводят несколько раз параллельно, в каждом случае с использованием разных пептидов, таких как разные пептиды из множества пептидов, предназначенных для покрытия области в антигене, которая, как предполагается, содержит Т-клеточный эпитоп или, как предполагается, связывается с МНСII. Следовательно, пептиды, содержащие Т-клеточный эпитоп и способные связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу антигена, отбирают из множества пептидов.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные клоны. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные гибридомы. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки происходят из линии Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки происходят из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенных у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления МНСII может представлять собой антиген лейкоцитов человека - DR изотипа 2 (HLA-DR2). В некоторых вариантах осуществления МНСII может представлять собой антиген лейкоцитов человека - DR изотипа 3 (HLA-DR3).

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции цитокинов. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IL-2. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IFN γ . В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением как секреции IL-2, так и секреции IFN γ .

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения ^3H -тимидина. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения BrdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения EdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением уровней Ki67.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой как секреции цитокинов, так и пролиферации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления CLIP содержит последовательность PVSKMRMATPLLMQA.

В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro*.

Компоненты МНСII могут быть получены в виде рекомбинантных белков. В частности, альфа- и бета-цепи МНСII могут быть экспрессированы в бактериях, таких как *E. coli*, затем подвергнуты фолдингу и собраны в комплекс МНСII с мечеными пептидами. В данной области техники известны способы экспрессии рекомбинантных белков, очистки таких белков и сборки белков в комплекс. Day et al. (2003) *J. Clin. Investig.*, 112: 831-842 описывают способ экспрессии МНСII-CLIP.

Комплекс МНСII-CLIP можно собрать, и затем присоединить к культуральному планшету, такому как лунки культурального планшета.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления МНСII-CLIP присоединяют к культуральному планшету. Комплекс МНСII-CLIP может быть биотинилирован для обеспечения его присоединения к культуральному планшету, посредством покрытия планшета нейтравидином перед добавлением комплекса биотин-МНСII-CLIP. В некоторых вариантах осуществления МНСII-CLIP содержит биотин. В некоторых вариантах осуществления МНСII-CLIP присоединяют к культуральному планшету с помощью биотина-нейтравидина.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению CLIP в способе по изобретению для идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, или для тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу. В некоторых вариантах осуществления CLIP содержит последовательность PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO: 1).

Анализ вытеснения CLIP позволяет идентифицировать пептиды, содержащие Т-клеточные эпитопы, и тестировать способность пептидов связываться с МНСII, не

подвергаясь процессингу. Как здесь описано, свойства включения Т-клеточного эпитопа и способности представлять собой МНСII без процессинга связаны с толерогенными пептидами. Таким образом, анализ вытеснения CLIP можно использовать в способе идентификации толерогенных пептидов.

Следовательно, в еще одном аспекте изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему добавление пептида к МНСII, имеющему связанный CLIP, добавление Т-клеток, специфичных к антигену, и определение активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления анализ вытеснения CLIP можно комбинировать с одним или более другими способами, описанными здесь, для тестирования пептидов на свойства, связанные с толерогенностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему добавление пептида к МНСII-CLIP, добавление Т-клеток, специфичных к антигену, и определение активации Т-клеток, где способ дополнительно включает способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, и/или способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, и/или способ *ex vivo* тестирования растворимости пептида *in vivo*, и/или способ *ex vivo* тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену, и/или способ определения влияния пептида на секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления анализ вытеснения CLIP используется для идентификации Т-клеточных эпитопов человека. Т-клетки, используемые в анализе, могут представлять собой Т-клетки субъекта, страдающего заболеванием, связанным с гиперчувствительностью, таким как аутоиммунное заболевание. Таким образом, Т-клетки будут специфичны к антигену, к которому субъект имеет гиперчувствительность. Пептиды, оцениваемые с помощью анализа, могут быть сконструированы таким образом, чтобы охватывать области антигена, к которым субъект проявляет гиперчувствительность.

В некоторых вариантах осуществления анализ вытеснения CLIP используют параллельно с идентификацией Т-клеточных эпитопов у трансгенных мышей HLA-DR.

Системы презентации, независимые от процессинга антигена (APIPS)

При идентификации толерогенных пептидов после идентификации эпитопа следующим стадией является исследование того, ведет ли он себя также как апитоп (т.е. способен ли он связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу).

Апитоп должен быть презентируем Т-клеткам без необходимости процессинга антигена. После идентификации пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы, апитопы могут быть идентифицированы с использованием системы без процессинга.

Пептиды можно тестировать на способность связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению, описанного здесь. Альтернативно или дополнительно способность связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, можно тестировать с использованием системы презентации,

независимой от процессинга антигена (APIPS).

Примеры APIPS включают:

- а) фиксированные APC (с или без антител к CD28);
- б) липидные мембраны, содержащие молекулы МНС класса I или II (с или без антител к CD28); и
- с) очищенный природный или рекомбинантный МНС в форме, связанной с планшетом (с или без антител к CD28).

Известно использование фиксированных APC для оценки ответов Т-клеток, например, в исследованиях по идентификации минимального эпитопа в полипептиде посредством оценки ответа на усеченные пептиды (Fairchild et al. (1996) *Int. Immunol.*, 8:1035-1043)). APC можно фиксировать, например, с использованием формальдегида (обычно параформальдегида) или глутарового альдегида.

Липидные мембраны (которые могут представлять собой плоские мембраны или липосомы) можно приготовить с использованием искусственных липидов, или они могут представлять собой плазматические мембраны/микросомальные фракции из APC.

При использовании, APIPS можно вносить в лунки планшета для культивирования тканей. Затем добавляют пептидные антигены, и связывание пептида с участком МНС APIPS определяют добавлением выбранных Т-клеток, таких как первичные Т-клетки, Т-клеточные гибридомы, линии Т-клеток или Т-клеточные клоны. Активацию Т-клеток можно определить любым из способов, известных в данной области, например, по включению ³H-тимидина или секреции цитокинов.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, посредством обработки APIPS пептидом, добавления Т-клеток, специфичных к пептиду, к APIPS и определения активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления APIPS содержит фиксированные APC. В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой первичные APC, такие как спленоциты. В некоторых вариантах осуществления APC происходят из линии APC, такой как клетки MGAR или клетки VAVY.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, добавленные к APIPS, представляют собой первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные клоны. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные гибридомы. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки происходят из линии Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления МНСII может представлять собой антиген лейкоцитов человека - DR изотипа 2 (HLA-DR2). В некоторых вариантах осуществления МНСII может представлять собой антиген лейкоцитов человека - DR изотипа 3 (HLA-DR3).

В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой спленоциты, и Т-клетки представляют собой Т-клеточные гибридомы. В некоторых вариантах

осуществления APC происходят из линии APC, и Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции цитокинов. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IL-2. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IFN γ . В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой как секреции IL-2, так и секреции IFN γ .

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения BrdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения EdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением уровней Ki67.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой как секреции цитокинов, так и пролиферации Т-клеток.

В способах по изобретению для идентификации толерогенного пептида анализ APIPS можно использовать вместо или в дополнение к анализу вытеснения CLIP, описанному здесь, для тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу. Использование как анализа вытеснения CLIP, так и анализа APIPS обеспечивает особенно надежную идентификацию пептидов, способных связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему анализ вытеснения CLIP, описанный здесь, и анализ APIPS, как здесь описано. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему добавление пептида к МНСII-CLIP, добавление Т-клеток, специфичных к пептиду, и определение активации Т-клеток, и затем обработку APIPS пептидом, добавление Т-клеток, специфичных к пептиду, к APIPS и определение активации Т-клеток.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления анализ APIPS можно комбинировать с одним или более другими способами, описанными здесь, для тестирования пептидов на свойства, связанные с толерогенностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, включающему обработку APIPS пептидом, добавление Т-клеток, специфичных к пептиду, к APIPS и определение активации Т-клеток, где способ дополнительно включает способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, и/или способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, и/или способ тестирования

растворимости пептида *in vivo*, и/или способ *ex vivo* тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену, и/или способ определения влияния пептида на секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления анализ APIPS проводят после анализа вытеснения CLIP.

Тестирование аффинности - конкурентный анализ *in vitro*

Для того, чтобы быть толерогенным, пептид должен иметь относительно высокую аффинность к МНСII. Аффинность связывания молекул можно определить с использованием способов, известных в данной области. Однако авторы настоящего изобретения разработали функциональный «конкурентный анализ» для анализа связывания пептида с МНСII, адаптированный к требованиям для идентификации толерогенных пептидов.

В конкурентном анализе изобретения тестируемый пептид и контрольный пептид конкурируют за связывание с МНСII. Тестируемый пептид, который превосходит контрольный пептид в связывании с МНСII, имеет относительно высокую аффинность к МНСII, таким образом, вероятно, является толерогенным пептидом.

Таким образом, в еще одном аспекте изобретение относится к способу тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, включающему добавление тестируемого пептида и контрольного пептида к МНСII, добавление Т-клеток, специфичных для контрольного пептида, и определение активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления МНСII находится на антигенпрезентирующих клетках (APC). В некоторых вариантах осуществления APC являются фиксированными. В некоторых вариантах осуществления APC являются «свежевыделенными», т.е. не фиксированными. В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой первичные APC. В некоторых вариантах осуществления APC происходят из линии APC. В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой клетки MGAR. В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой клетки VAVY. В некоторых вариантах осуществления APC представляют собой клетки BM14.

В некоторых вариантах осуществления МНСII представляет собой HLA-DR2. В некоторых вариантах осуществления контрольный пептид состоит из последовательности KKGPRCLTRYYSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 10). Данная последовательность контрольного пептида специфична для HLA-DR2.

В некоторых вариантах осуществления МНСII представляет собой HLA-DR3. В некоторых вариантах осуществления МНСII представляет собой HLA-DR4. В некоторых воплощениях МНСII контрольный пептид состоит из последовательности KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 5). Данная последовательность контрольного пептида специфична для HLA-DR3 и HLA-DR4.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные

клоны. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные гибридомы. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки происходят из линии Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции цитокинов. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IL-2. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IFN γ . В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой как секреции IL-2, так и секреции IFN γ .

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения ^3H -тимидина. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения BrdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения EdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением уровней Ki67.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой как секреции цитокинов, так и пролиферации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления тестируемый пептид добавляют к МНСII до добавления контрольного пептида. В некоторых вариантах осуществления тестируемый пептид инкубируют с МНСII в течение примерно от 15 до 45 мин перед добавлением контрольного пептида.

В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro*.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению контрольного пептида, состоящего из последовательности KKGPRCLTRYYSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 10), в способе по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению контрольного пептида, состоящего из последовательности KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 5), в способе по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления конкурентный анализ по изобретению можно комбинировать с одним или более другими способами, описанными здесь, для тестирования пептидов на свойства, связанные с толерогенностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему конкурентный анализ изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему добавление тестируемого пептида и контрольного пептида к МНСII, добавление Т-клеток, специфичных для контрольного пептида, и определение активации Т-клеток, где способ дополнительно включает способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, и/или способ тестирования

растворимости пептида *in vivo*, и/или способ *ex vivo* для тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену и/или способ определения влияния пептида на секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления конкурентный анализ по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как содержащий Т-клеточный эпитоп, например, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению. В некоторых вариантах осуществления конкурентный анализ по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как способный связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, например, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению или анализа APIPS. В некоторых вариантах осуществления пептид тестируют сначала с помощью анализа вытеснения CLIP по изобретению, затем с помощью анализа APIPS, затем с помощью конкурентного анализа по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления конкурентный анализ по изобретению комбинируют с анализом APIPS. Другими словами, анализ APIPS и конкурентный анализ проводят одновременно.

Тестирование растворимости - анализ загрузки МНСII

Дендритные клетки представляют собой тип антигенпрезентирующих клеток, которые экспрессируют МНСII, находящийся в лимфоидных органах (лимфатических узлах и селезенке). Пептиды, которые могут связываться с МНСII на дендритных клетках селезенки *in vivo*, не подвергаясь процессингу антигена, могут индуцировать толерантность. Однако для попадания в дендритные клетки лимфоидных органов пептиды должны быть достаточно растворимыми, чтобы проходить через жидкую фазу. Степень, в которой пептиды способны связываться с МНСII на дендритных клетках селезенки, можно назвать «загрузкой МНСII».

Авторы настоящего изобретения установили прямую корреляцию между способностью пептида связываться с МНСII на дендритных клетках *in vivo* и его способностью индуцировать толерантность. Следовательно, при идентификации толерогенных пептидов, потенциально пригодных для лечения заболеваний, полезно знать, могут ли пептиды связываться с МНСII на дендритных клетках *in vivo*. Авторы изобретения разработали анализ для тестирования пептидов на это свойство, относящийся здесь к анализу загрузки МНСII.

Таким образом, в еще одном аспекте изобретение относится к способу тестирования растворимости пептида *in vivo*, включающему сокультивирование дендритных клеток мыши, которой ввели пептид, с Т-клетками, специфичными для пептида, и определение активации Т-клеток, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы.

Термин «дендритные клетки» может относиться к CD11c⁺ клеткам. Такие клетки можно выделить с использованием способов, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные

клоны. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клеточные гибридомы.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции цитокинов. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IL-2. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением секреции IFN γ . В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой как секреции IL-2, так и секреции IFN γ .

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения ^3H -тимидина. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения BrdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением включения EdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить измерением уровней Ki67.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток можно определить оценкой как секреции цитокинов, так и пролиферации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления мышь представляет собой трансгенную по HLA-DR2 (HLA-DR2tg) или трансгенную по HLA-DR3 (HLA-DR3tg) мышь.

В некоторых вариантах осуществления мыши ввели примерно 100 мкг пептида. В некоторых вариантах осуществления введение мышам провели подкожно.

В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки отбирают из селезенки мыши.

В некоторых вариантах осуществления анализ загрузки МНСII по изобретению можно комбинировать с одним или более другими способами, описанными здесь, для тестирования пептидов на свойства, связанные с толерогенностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему анализ загрузки МНСII по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему сокультивирование дендритных клеток мыши, которой ввели пептид, с Т-клетками, специфичными для пептида, и определение активации Т-клеток, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы, где способ дополнительно включает способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, и/или способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, и/или способ *ex vivo* тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену, и/или способ определения влияния пептида на секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления анализ загрузки МНСII по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как содержащий Т-клеточный эпитоп,

например, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению. В некоторых вариантах осуществления анализ вытеснения МНСII по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как способный связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, например, с помощью анализа вытеснения CLIP по изобретению или анализа AIPIS. В некоторых вариантах осуществления анализ загрузки МНСII по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как обладающий высокой аффинностью к МНСII, с использованием конкурентного анализа по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления пептид тестируют сначала с помощью анализа вытеснения CLIP по изобретению, затем с помощью анализа AIPIS, затем с помощью конкурентного анализа по изобретению и затем с помощью анализа загрузки МНСII по изобретению.

Тестирование толерогенности - анализ толерантности *ex vivo*

В еще одном аспекте изобретение относится к способу *ex vivo* тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену, включающему получение Т-клеток от животного, которому ввели пептид, стимуляцию Т-клеток антигеном и определение активации Т-клеток измерением включения BrdU, включения EdU, уровней Ki67, оценкой секреции IL-2 и/или секреции IFN γ . Данный способ относится здесь к «анализу толерантности *ex vivo*».

BrdU (5-бром-2'-дезоксинуридин) и EdU (5-этинил-2'-дезоксинуридин) являются синтетическими нуклеозидными аналогами тимидина. BrdU или EdU, включенные во вновь синтезированную ДНК реплицирующихся клеток, можно детектировать с использованием антител, специфичных к BrdU или EdU, и, таким образом, использовать в качестве маркеров пролиферирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток определяют измерением включения BrdU. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток определяют измерением включения EdU.

Ki-67 представляет собой ядерный белок, участвующий в транскрипции рибосомной РНК. Ki-67 присутствует в клетке во время клеточного цикла, но отсутствует в неделящихся клетках. Таким образом, Ki-67 можно использовать в качестве маркера пролиферирующих клеток. Окрашивание антителом против Ki-67 можно использовать для оценки клеточной пролиферации. В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток определяют измерением уровней Ki67.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток определяют оценкой секреции IL-2.

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток определяют дополнительной оценкой секреции IFN γ .

В некоторых вариантах осуществления животное иммунизировали антигеном. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизируют антигеном примерно через 10-20 суток после первого введения пептида животному. В некоторых вариантах осуществления животное иммунизируют антигеном примерно через 15 суток после первой инъекции пептида животному. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки

стимулируют антигеном примерно через 10 суток после иммунизации животного антигеном. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки стимулируют антигеном в течение примерно 48-96 ч. В некоторых воплощениях Т-клетки стимулируют антигеном в течение примерно 72 ч. В некоторых вариантах осуществления пептид вводили с использованием схемы с эскалацией дозы.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой мышь. В некоторых вариантах осуществления мышь представляет собой мышь HLA-DR2tg или HLA-DR3tg. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки находятся в образце клеток лимфатических узлов и спленоцитов.

В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки находятся в образце мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

В некоторых вариантах осуществления анализ толерантности *ex vivo* по изобретению можно комбинировать с одним или более другими способами, описанными здесь, для тестирования пептидов на свойства, связанные с толерогенностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему анализ толерантности *ex vivo* по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему получение Т-клеток от животного, которому ввели пептид, стимуляцию Т-клеток антигеном и определение активации Т-клеток измерением включения BrdU, включения EdU, уровней Ki67 и/или оценкой секреции IL-2, где способ дополнительно включает способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, и/или способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, и/или способ тестирования растворимости пептида *in vivo*, и/или способ определения влияния пептида на секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления анализ толерантности *ex vivo* по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как содержащий Т-клеточный эпитоп, например, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению. В некоторых вариантах осуществления анализ толерантности *ex vivo* по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как способный связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, например, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению или анализа AIPIS. В некоторых вариантах осуществления анализ толерантности *ex vivo* по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как обладающий высокой аффинностью к МНСII с использованием конкурентного анализа по изобретению. В некоторых вариантах осуществления анализ толерантности *ex vivo* по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как обладающий хорошей растворимостью *in vivo* с использованием анализа загрузки МНСII по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления пептид тестируют сначала с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению, затем с использованием

анализа APIPS, затем с использованием конкурентного анализа по изобретению, затем с использованием анализа загрузки МНСII по изобретению и затем с использованием анализа толерантности *ex vivo* по изобретению.

Анализ биомаркеров

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения влияния пептида на секрецию цитокинов, включающему измерение уровней цитокинов в сыворотке мыши, которой ввели пептид.

Паттерн цитокинов, секретированных в ответ на пептид, демонстрирует, что пептид связывается с МНСII и активирует Т-клетки *in vivo*. Изменение паттерна секреции цитокинов после повторных введений пептида, такое как повышение секреции IL-10, указывает на индукцию толерантности.

В некоторых вариантах осуществления мышь иммунизируют пептидом примерно за 15-25 суток до введения пептида.

В некоторых вариантах осуществления мышь иммунизируют пептидом примерно за 21 сутки до введения пептида.

В некоторых вариантах осуществления мыши вводят примерно 100 мкг пептида.

В некоторых вариантах осуществления мышь представляет собой мышь HLA-DRtg.

В некоторых вариантах осуществления уровни цитокинов измеряют с помощью электрохемилюминесценции.

В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни IL-2.

В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни интерлейкина-6 (IL-6).

В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни интерлейкина-10 (IL-10).

В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни интерлейкина-12/интерлейкина-23p40 (IL-12/IL-23p40).

В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни интерлейкина-17 (IL-17).

В некоторых вариантах осуществления измеряют уровни IFN γ .

В некоторых вариантах осуществления анализ биомаркеров по изобретению можно комбинировать с одним или более другими способами, описанными здесь, для тестирования пептидов на свойства, связанные с толерогенностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему анализ биомаркеров по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему определение влияния пептида на секрецию цитокинов, включающему измерение уровней цитокинов в сыворотке мыши, которой ввели пептид, где способ дополнительно включает способ идентификации пептида, включающего Т-клеточный эпитоп, и/или способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, и/или способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, и/или способ тестирования растворимости пептида *in vivo* и/или способ тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену.

В некоторых вариантах осуществления анализ биомаркеров по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как содержащий Т-клеточный эпитоп, например, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению. В некоторых вариантах осуществления анализ биомаркеров по настоящему изобретению проводят на пептиде, который идентифицирован как способный связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, например, с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению или анализа APIPS. В некоторых вариантах осуществления анализ биомаркеров по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как обладающий высокой аффинностью к МНСII с использованием конкурентного анализа по изобретению. В некоторых вариантах осуществления анализ биомаркеров по изобретению проводят на пептиде, идентифицированном как обладающий хорошей растворимостью *in vivo* с использованием анализа загрузки МНСII по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления пептид сначала тестируют с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению, затем с использованием анализа APIPS, затем с использованием конкурентного анализа по изобретению, затем с использованием анализа загрузки МНСII по изобретению, затем с использованием анализа толерантности *ex vivo* по изобретению, и затем с использованием анализа биомаркеров по изобретению.

Способы идентификации толерогенных пептидов

В еще одном аспекте изобретение относится к способу отбора или идентификации толерогенного пептида, включающему любой из способов по изобретению.

Способы по изобретению, описанные здесь, можно использовать самостоятельно или в комбинации с некоторыми или всеми другими способами по изобретению в способе идентификации толерогенных пептидов.

Изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему:

идентификацию пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, с использованием способа по изобретению, и/или

тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, с использованием способа по изобретению, и/или

тестирование аффинности связывания пептида с МНСII с использованием способа по изобретению и/или

тестирование растворимости пептида *in vivo* с использованием способа по изобретению и/или

тестирование способности пептида индуцировать толерантность к антигену с использованием способа по изобретению и/или

определение влияния пептида на секрецию цитокинов с использованием способа по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему:

идентификацию пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, с использованием анализа вытеснения CLIP в соответствии с изобретением, и/или

тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, с использованием анализа вытеснения CLIP в соответствии с изобретением, и/или

тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, с использованием анализа APIPS в соответствии с изобретением, и/или

тестирование аффинности связывания пептида с МНСII с использованием конкурентного анализа в соответствии с изобретением, и/или

тестирование растворимости пептида *in vivo* с использованием анализа загрузки МНСII в соответствии с изобретением, и/или

тестирование способности пептида индуцировать толерантность к антигену с использованием анализа толерантности *ex vivo* по изобретению, и/или

определение влияния пептида на секрецию цитокинов с использованием анализа биомаркеров в соответствии с изобретением.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему:

способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, и/или тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, включающий добавление пептида к МНСII-CLIP, добавление Т-клеток, специфичных к антигену, и определение активации Т-клеток, и/или

способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, включающий обработку системы презентации антигена, независимой от процессинга (APIPS) пептидом, добавление Т-клеток, специфичных для пептида, к APIPS, и определение активации Т-клеток, и/или

способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, включающий добавление тестируемого пептида и контрольного пептида к МНСII, добавление Т-клеток, специфичных для контрольного пептида, и определение активации Т-клеток, и/или

способ *in vivo* тестирования растворимости пептида, включающий сокультивирование дендритных клеток мыши, которой ввели пептид, с Т-клетками, специфичными для пептида, и определение активации Т-клеток, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы, и/или

способ *ex vivo* тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену, включающий получение Т-клеток от животного, которому ввели пептид, стимуляцию Т-клеток антигеном и определение активации Т-клеток посредством измерения включения BrdU, включения EdU, уровней Ki67, секреции IL-2 и/или секреции IFN γ , и/или

способ определения влияния пептида на секрецию цитокинов, включающий измерение уровней цитокинов в сыворотке мыши, которой ввели пептид.

В некоторых вариантах осуществления способ идентификации толерогенных пептидов включает один способ, выбранный из следующего: анализ вытеснения CLIP, анализ APIPS, конкурентный анализ, анализ загрузки МНСII, анализ толерантности *ex vivo*, анализ биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способ включает два анализа, выбранных из них. В некоторых вариантах осуществления способ включает три анализа, выбранных из них. В некоторых вариантах осуществления способ включает четыре анализа, выбранных из них. В некоторых вариантах осуществления способ включает пять анализов, выбранных из них. В некоторых вариантах осуществления способ включает все шесть перечисленных анализов.

В некоторых вариантах осуществления данный пептид можно тестировать первым способом, выбранным из способов, описанных здесь, затем тестировать вторым способом, выбранным из способов, описанных здесь, затем тестировать третьим способом, выбранным из способов, описанных здесь, затем тестировать четвертым способом, выбранным из способов, описанных здесь, затем тестировать пятым способом, выбранным из способов, описанных здесь, затем тестировать шестым способом, выбранным из способов, описанных здесь.

Схематичный обзор того, как способы по изобретению могут вписываться в общий способ идентификации толерогенных пептидов, представлен на фиг. 7. Т-клеточные эпитопы могут быть прогнозированы *in silico* и идентифицированы на HLA-трансгенных мышцах и/или культурах первичных моноклеарных клеток крови человека. Из этих идентифицированных эпитопов апитопы могут быть отобраны с использованием анализа вытеснения CLIP по изобретению и/или анализа APIPS. Аффинность связывания апитопов с МНСII можно тестировать с использованием конкурентного анализа по изобретению. После того, как апитопы были отобраны таким образом, их можно дополнительно модифицировать для улучшения их физических свойств, например, растворимости, и тестировать на способность связываться с МНС класса II с использованием анализа загрузки МНСII по изобретению. Те пептиды, которые проявляют способность связываться с МНСII на дендритных клетках, можно дополнительно тестировать на их способность индуцировать толерантность на модели толерантности *ex vivo* и на модели заболевания, если это необходимо. Такие лекарственные препараты-кандидаты также можно тестировать в анализе биомаркеров по изобретению. Таким образом, устанавливается рабочий процесс для идентификации потенциальных терапевтических пептидов для лечения аутоиммунных заболеваний.

Способы по изобретению не ограничиваются конкретными комбинациями или определенным порядком. Предпочтительно сначала проводят анализ вытеснения CLIP. В предпочтительном варианте осуществления способы по изобретению осуществляют в следующем порядке: анализ вытеснения CLIP, анализ APIPS, конкурентный анализ, анализ загрузки МНСII, анализ толерантности *ex vivo*, анализ биомаркеров.

Изобретение относится к способу идентификации толерогенного пептида, включающему:

идентификацию пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп,
тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу,

тестирование аффинности связывания пептида с МНСII,

тестирование растворимости пептида *in vivo*, и

тестирование способности пептида индуцировать толерантность к антигену.

Пептиды, отобранные способами по изобретению, и их композиции

В еще одном аспекте изобретение относится к толерогенному пептиду, идентифицированному способом по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей толерогенный пептид, идентифицированный способом по изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит более одного толерогенного пептида, идентифицированного способом по изобретению, например, два или более таких пептида, например, три или более таких пептида. Пептиды могут происходить из одного и того же или разных антигенов-мишеней.

Композиция может находиться в форме набора, в котором некоторые или каждый из эпитопов предоставлены по отдельности для одновременного, раздельного или последовательного введения.

Альтернативно (или дополнительно), если композицию (или любую ее часть) следует вводить несколькими дозами, то каждая доза может быть упакована отдельно.

Композиция может содержать терапевтически или профилактически эффективное количество одного или каждого пептида и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Кроме того, в композициях по настоящему изобретению пептид или каждый пептид может быть смешан с любым подходящим связующим агентом(и), смазывающим агентом(и), суспендирующим агентом(и), покрывающим агентом(и) или солюбилизующим агентом(и).

Способы лечения

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения и/или профилактики заболевания у субъекта, включающему стадию введения субъекту толерогенного пептида, идентифицированного способом по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения и/или профилактики заболевания у субъекта, включающему стадию введения субъекту композиции, содержащей толерогенный пептид, идентифицированный способом по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления способ включает следующие стадии:

- (i) идентификацию антигена, ассоциированного с заболеванием,
- (ii) идентификацию толерогенного пептида для антигена; и
- (iii) введение толерогенного пептида субъекту.

В еще одном аспекте изобретение относится к толерогенному пептиду,

идентифицированному способ по изобретению, для применения в лечении и/или профилактике заболевания.

В еще одном аспекте изобретение обеспечивает композицию, содержащую толерогенный пептид, идентифицированный способом по изобретению, для применения в лечении и/или профилактике заболевания.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению толерогенного пептида, идентифицированного способом по изобретению, в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболевания.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению композиции, содержащей толерогенный пептид, идентифицированный способом по изобретению, в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболевания.

Заболевания

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевание, связанное с гиперчувствительностью. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой аллергию. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой отторжение трансплантата.

Апитоп для МНС класса II, вероятно, будет особенно пригоден при заболеваниях, которые опосредованы ответами CD4⁺ Т-клеток. Например, заболевания, которые развиваются или сохраняются в результате неадекватного или чрезмерного ответа CD4⁺Т-клеток.

Такой пептид, вероятно, будет особенно пригоден в лечении заболеваний, ассоциированных с гиперчувствительностью. Реакции гиперчувствительности включают:

- (i) аллергию, возникающую в результате неадекватной реакции на безвредные чужеродные вещества;
- (ii) аутоиммунные заболевания, возникающие в результате ответов на собственные тканевые антигены; и
- (iii) отторжение трансплантата в результате реакции на трансплантат.

Примеры аллергии включают, не ограничиваясь этим: сенную лихорадку, экзогенную астму, аллергию на укусы и укусы насекомых, пищевую и лекарственную аллергию, аллергический ринит, бронхиальную астму, хронический бронхит, анафилактический синдром, крапивницу, ангионевротический отек, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, узловатую эритему, мультиформную эритему, синдром Стивенса-Джонсона, риноконъюнктивит, конъюнктивит, кожный некротизирующий васкулит, воспалительные заболевания легких и буллезные заболевания кожи.

Примеры аутоиммунных заболеваний включают, не ограничиваясь этим: ревматоидный артрит (RA), тяжелую миастению (MG), рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), аутоиммунный тиреоидит (тиреоидит Хашимото), болезнь Грейвса, воспалительные заболевания кишечника, аутоиммунный увеоретинит,

полимиозит и некоторые виды сахарного диабета, системный васкулит, полимиозит-дерматомиозит, системный склероз (склеродермия), синдром Шегрена, анкилозирующий спондилит и связанные спондилоартропатии, ревматизм, гиперчувствительный пневмонит, аллергический бронхолегочный аспергиллез, пневмокониоз, вызванный частицами неорганической пыли, саркоидоз аутоиммунную гемолитическую анемию, нарушения тромбоцитов, вызванные иммунологическими расстройствами, криопатии, такие как криофибриногенемия и аутоиммунные полиэндокринопатии.

В клинической медицине часто пересекаются различные ткани, включая почки, печень, сердце, легкие, кожу, роговицу и костный мозг. Для всех трансплантатов, за исключением роговицы и некоторых трансплантатов костного мозга, в настоящее время обычно требуется длительная иммуносупрессия.

Введение

В некоторых вариантах осуществления пептид или композицию вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления пептид или композицию вводят внутрикожно.

В некоторых вариантах осуществления пептид вводят мукозальным путем.

В некоторых вариантах осуществления пептид вводят интраназально.

В некоторых воплощениях пептид вводят в растворимой форме без адъюванта.

Результаты исследований показали, что пептид при введении в растворимой форме внутрибрюшинно (в/б), внутривенно (в/в), интраназально или перорально может индуцировать толерантность Т-клеток (Anderton and Wraith (1998), см. выше; Liu and Wraith (1995), см. выше; Metzler and Wraith (1999) *Immunology*, 97:257-263).

Результаты исследований на мышах показали, что продолжительность введения пептида, необходимая для индукции толерантности, зависит от уровня предшественников Т-клеток у реципиента (Burkhart et al. (1999), см. выше). Во многих экспериментальных исследованиях было показано, что для индукции толерантности требуются повторные дозы пептида (Burkhart et al (1999), см. выше). Таким образом, точная доза и количество доз пептида зависят от субъекта, однако в предпочтительном варианте осуществления вводят множество доз.

Если множество пептидов вводят одновременно, то они могут находиться в форме «коктейля», подходящего для введения в виде одной или более доз. В качестве альтернативы может быть предпочтительнее вводить несколько доз, но варьировать относительные концентрации пептидов между дозами.

В некоторых вариантах осуществления пептид или композицию вводят многократными дозами. В предпочтительном варианте осуществления можно следовать протоколу «с эскалацией дозы», когда пациенту вводят множество доз в возрастающих концентрациях. Такой подход использовался, например, для пептидов фосфолипазы A2 в иммунотерапевтических применениях против аллергии на пчелиный яд (Müller et al. (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101:747-754 и Akdis et al. (1998) *J. Clin. Invest.*, 102:98-106).

Примеры

Материалы и методы

Материалы и способы, использованные в следующих примерах, описаны здесь.

Мыши

DR3tg мышей выращивали в условиях, свободных от специфических патогенов, в питомнике Charles River, Великобритания, или в Innoser, Нидерланды или Бельгия. Линия DR3tg мышей была первоначально создана Strauss et al. (Strauss et al., Immunogenetics, 1994). Вкратце, используемые геномные конструкции представляли собой NdeI фрагмент размером 6 т.п.н. геномного клона HLA-DRA в pUC 13 и ClaI/SalI фрагмент размером 24 т.п.н. в cos 4.1, космиде (pTCF), содержащей ген В DRB1*0301. Раствор, содержащий 1-2 мкг/мл каждой конструкции, использовали для совместной инъекции в оплодотворенные яйцеклетки от F1 доноров (C57BL/6 × DBA/2), скрещенных с самцами C57BL/6. Затем потомство было выведено на фоновом генотипе C57BL/6 с нокаутом IA-бета (мышь AB0), где у мыши отсутствует экспрессия молекулы МНС класса II. Такие DR3tg мыши экспрессируют молекулу HLA-DRB1*0301, но не экспрессируют молекулу мышинового МНС-II. Мышей поддерживали обратным скрещиванием с C57BL/6 и с B10.Q. Трансгенных мышей идентифицировали анализом саузерн-блоттингом хвостовой ДНК, расщепленной с помощью EcoRI, и зондировали BamHI фрагментом размером 1,35 т.п.н. кДНК DRA и BamHI фрагментом размером 1,25 т.п.о. кДНК DRB1*0301.

DR3tg мышей выращивали в условиях, свободных от специфических патогенов, в питомнике Charles River, Великобритания, или в Innoser, Нидерланды или Бельгия. Трансгенные мыши HLA-DR2 (DR2tg) первоначально были получены из Lars Fugger (Madsen et al., Nature Genetics, 1999). Вкратце, кДНК цепи DR α и DR β (DRA*0101 и DRB1*1501) экспрессировали с использованием экспрессионного вектора pDOI-5, который содержит мышинный промотор МНСII. Конструкции инъецировали в оплодотворенные яйцеклетки от скрещиваний (DBA/2xC57BL/6)F1. Мышей подвергали обратному скрещиванию с фоновым генотипом C57BL/6 с нокаутом IA-бета (мышь AB0), у которых отсутствует экспрессия мышиной молекулы МНС класса II. DR2tg мыши экспрессируют молекулу HLA-DRB1*1501, но не экспрессируют молекулу мышинового МНС.

Линия DR4tg мышей была первоначально создана Lars Fugger et al. (Fugger et al., PNAS USA, 1994). Делеция эндогенного МНС класса II была достигнута скрещиванием мышей с нокаутом IA-b (B6; 129S2-H2dIAb1-Ea/J).

Исследования на животных были одобрены «Комитетом по этике экспериментов на животных» (ECD) Университета Хасселта и проводились с соблюдением самых высоких стандартов ухода в помещении, свободном от патогенов.

Белки и пептиды

Все отдельные пептиды были синтезированы компанией Severn Biotech (Kidderminster, Великобритания) и хранились в маточном растворе с концентрацией 20 мг/мл в ДМСО (Sigma-Aldrich) или с концентрацией 4 мг/мл в забуференном фосфатом

физиологическом растворе (PBS) при -80°C . Пептиды были синтезированы с N-концевым свободным амином и C-концевым амидом. Человеческий SAg (S-аррестин) получали в клетках HEK293F (QBiologicals, Eurofins Amatsigroup, Ghent, Бельгия). TSHR, рекомбинантный внеклеточный домен человеческого TSHR (TSHRECD, AA19-417) был получен в экспрессионной системе личинок *Trichoplusia ni* с использованием технологии Chesapeake PERL PERLXpress (Savage, MD, US).

Последовательности пептидов представлены в таблице 1 ниже.

Таблица 1

Пептид	Последовательность	SEQ ID No.	Антиген
CLIP	PVSKMRMATPLMQA	1	N/A
MBP83-99	ENPVVHFFKNIVTPRTP	2	MBP
Пептид А	ISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHI	3	TSHR
Пептид В	IYVSIDVTLQQLESH	4	TSHR
Пептид С	KKKYVSIDVTLQQLEKKK	5	TSHR
Пептид D	VIGLTFRRDLYFSRVQVYPPVG	6	S-Ag
Пептид E	TFRRDLYFSRVQ	7	S-Ag
Пептид F	MAASGKTSKSEPNHVIFKKISRDKSVTIYLGNRDYI DHVSQV	8	S-Ag
Пептид G	FKKISRDKSVTIY	9	S-Ag
Пептид H	KKGPRCLTRYYSFVNMEGKK	10	FVIII
Пептид J	NPILLWQPIPVHTVPLSEDQ	11	PAP*
Пептид K	LTLPLANNRERRGIALDGKIKHEDTNLASSTIIKE G	12	S-Ag
Пептид L	GLKMFPDLTKVYSTD	13	TSHR
Пептид M	KKEIFKKISRDKSVTIYLEKK	14	S-Ag
Пептид N	GILVSYQIKVK	15	S-Ag
Пептид O	KKKGILVSYQIKVKKKK	16	S-Ag
Пептид P	KKIFKKISRDKSVTIYLKK	17	S-Ag
Пептид Q	KKKIFKKISRDKSVTIYLKKK	18	S-Ag

*Пептид J представляет собой известный HLA-DR2-связывающий пептид из простатической кислой фосфатазы (PAP), описанный Klyushnenkova et al., Prostate, 2007;67(10):1019-28.)

Последовательность TSHR (SEQ ID No. 19) - запись P16473 в базе данных UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>):

MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQT
 LKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDP
 DALKELPLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLT
 LKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVT
 ALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRGILESL
 MCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHYVFFE
 EQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTCGDSMDVCTPKSDEFNPCEDIMGYKFL
 RIVVWFVSLALLGNVFLVLLILTSHYKLVNPRFLMCNLAFADFCMGMYLLLIASVDLY
 THSEYYNHAIDWQTGPGCNTAGFFTTFASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLR
 HACAIMVGGWVCCFLLALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIVFVLTLNIVAFVI
 VCCCYVKIYITVRNPQYNPGDKDTKIAKRMAVLIFTDFICMAPISFYALSAILNKPLITVS
 NSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLSKFGICKRQAQAYRGQRVPPKNSTD
 IQVQKVTHDMRQGLHNMEDVYELIENSHLTPKKQGQISEEYMQTVL

Последовательность S-Ag (SEQ ID No. 20) - запись P10523 в базе данных UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>):

MAASGKTSKSEPNHVIFKKISRDKSVTIYLGNRDYIDHVSQVQPVVDGVVLVDPDL
 VKGKKVYVTLTCAFRYGQEDIDVIGLTFRRDLYFSRVQVYPPVGAASTPTKLQESLLKK
 LGSNTYPFLLTFPDYLPCSVMLQPAPQDSGKSCGVDFEVKAFATDSTDAEEDKIPKKSSV
 RLLIRKVQHAPLEMGPQPRAEAAWQFFMSDKPLHLAVSLNKEIYFHGEPIPVTVTVTNN
 TEKTVKKIKAFVEQVANVVLVYSSDYVVKPVAMEEAQEKVPPNSTLTKTLTLLPLLANN
 RERRGIALDGKIKHEDTNLASSTIIEGIDRTVLGILVSYQIKVKLTVSGFLGELTSSEVAT
 EVPFRLMHPQPEDPAKESYQDANLVFEEFARHNLKDAGEAEEGKRDKNDVDE

Получение линии Т-клеток (TCL)

HLA-DRtg мышей иммунизировали подкожно в основание хвоста 50 мкг пептида, эмульгированного в CFA (пептид/CFA). Через десять суток после иммунизации отбирали образцы дренирующих лимфатических узлов (LN) и селезенки. Выделяли клетки LN и спленоциты, и CD4⁺ Т-клетки выделяли отрицательной селекцией с использованием набора Magnisort Mouse CD4 Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве антигенпрезентирующих клеток (APC) использовали облученные (3000 рад) спленоциты. 5×10^6 APC + $2,5 \times 10^6$ CD4⁺ Т-клеток культивировали в среде X-vivo 15 (с добавлением 2 mM L-глутамина, 50 Е/мл пенициллина и 50 Е/мл стрептомицина; Lonza) в 6-луночных планшетах в присутствии 0,1; 1; 2,5 или 5 мкг/мл пептида. На сутки 4 добавляли 20 Е/мл rIL-2 (R&D Systems, Abingdon, Великобритания). На сутки 7 подсчитывали клетки TCL и культивировали со свежими APC, пептидами и IL-2, все в тех же концентрациях, указанных выше. На сутки 10 добавляли 20 Е/мл rIL-2. На сутки 14 использовали культуры TCL как таковые или отбирали клетки CD4⁺.

Пример 1 - Анализ вытеснения CLIP

Тестировали способность известного толерогенного пептида MBP 83-99 вытеснять CLIP из МНСII. MBP 83-99 представляет собой доминантный HLA-DR2-

рестриктированный эпитоп MBP, имеющий последовательность ENPVVHFFKNIVTPRTP (SEQ ID NO: 2).

МНСII (HLA-DR2) со связанным CLIP (МНСII-CLIP) присоединяли к лункам 96-луночного планшета с использованием нейтравидина и биотина. В частности, 96-луночные планшеты покрывали 15 мкг/мл нейтравидина в PBS в течение ночи при 4°C. Планшеты дважды промывали буфером для промывания (0,1% BSA/PBS) и блокировали 1% BSA в PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты дважды промывали буфером для промывания и добавляли 0,125 мкг/мл биотин-МНСII-CLIP в PBS для 2-ч инкубации при комнатной температуре во влажной атмосфере. Планшеты промывали 4 раза буфером для промывания, оставляя лунки покрытыми МНСII-CLIP. Лунки с положительным контролем покрывали МНСII со связанным MBP 83-99 (вместо CLIP).

Лунки, содержащие МНСII-CLIP, инкубировали с различными концентрациями MBP 83-99 в течение 16 ч, затем промывали.

В лунки вносили Т-клеточную линию, специфичную для MBP, и инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Активацию Т-клеток оценивали посредством измерения секретированного IL-2. Результаты представлены на фиг. 1. Когда MBP 83-99 в концентрации 30 мкМ или 3 мкМ добавляют к МНСII-CLIP («мономер CLIP»), то Т-клетки активируются, что указывает на то, что в этих концентрациях MBP 83-99 может вытеснять CLIP из МНСII.

Пример 2 - анализ APIPS

Анализ APIPS проводили с использованием трех комбинаций различных типов APC и Т-клеток.

Используемые типы APC представляли собой либо первичные спленоциты HLA-DRtg мышей, либо клеточную линию APC.

Используемые типы Т-клеток представляли собой Т-клеточные гибридомы, линии Т-клеток или первичные Т-клетки.

Для каждой комбинации 5×10^4 Т-клеток культивировали с пептидом (10 или 25 мкг/мл) и APC (5×10^4 спленоцитов или $2,5 \times 10^4$ клеток клеточной линии).

Для каждой комбинации использовали фиксированные и нефиксированные («свежевыделенные») APC. Для фиксации APC клетки инкубировали с 0,5% параформальдегидом (Merck, Darmstadt, Германия) (pH 7) при комнатной температуре в течение 2 мин (если APC представляли собой первичные спленоциты) или 5 мин (если APC представляли собой клеточные линии). Реакцию фиксации останавливали добавлением 0,4 М глицина (Sigma-Aldrich) и промыванием клеток в RPMI-10%FCS.

Для каждой комбинации определяли ответ Т-клеток на человеческий S-Ag или TSHR (10 или 25 мкг/мл) для идентификации криптических эпитопов.

Активацию Т-клеток оценивали посредством измерения уровней цитокинов с помощью ELISA (R&D Systems, Abingdon, Великобритания).

А. Анализ APIPS с использованием APC, спленоцитов, с Т-клеточными гибридами

Гибридомные клоны антигенспецифических Т-клеток инкубировали в течение 48 ч с известными толерогенными пептидами TSHR и спленоцитами мышей HLA-DRtg (APC).

Активацию Т-клеточной гибридомы оценивали измерением продукции IL-2. Результаты представлены на фиг. 2А. Данные показывают, что Т-клеточные гибридомы активируются в ответ на пептиды, презентированные APC, спленоцитами. Таким образом, Т-клеточные гибридомы и спленоциты представляют собой эффективную комбинацию Т-клеток и APC для применения в анализах APIPS.

В. Анализ APIPS с использованием клеточной линии APC с Т-клеточными линиями

Линии Т-клеток инкубировали в течение 24 ч с известными толерогенными пептидами S-Ag и линиями клеток APC. Используемые клеточные линии APC представляли собой клетки VAVY (экспрессирующие HLA-DR3) или клетки MGAR (экспрессирующие HLA-DR2).

Активацию Т-клеток оценивали измерением продукции IFN γ . Результаты представлены на фиг. 2В. Данные показывают, что линии Т-клеток активируются в ответ на пептиды, презентированные линиями клеток APC. Таким образом, линии Т-клеток и линии клеток APC представляют собой эффективную комбинацию Т-клетка-APC для применения в анализах APIPS.

С. Анализ APIPS с использованием клеточной линии APC с первичными Т-клетками

Первичные Т-клетки инкубировали в течение 24 ч с известными толерогенными пептидами S-Ag и линиями клеток APC. Используемые клеточные линии APC представляли собой клетки VAVY (экспрессирующие HLA-DR3) или клетки MGAR (экспрессирующие HLA-DR2).

Для получения первичных пептид-специфических первичных Т-клеток мышей HLA-DRtg иммунизировали подкожно в основание хвоста 50 мкг пептида, эмульгированного в CFA (пептид/CFA). Через десять суток после иммунизации отбирали образцы дренирующих лимфатических узлов (LN) и селезенки. Выделяли клетки LN и спленоциты, и CD4⁺ Т-клетки выделяли отрицательной селекцией с использованием набора Magnisort Mouse CD4 Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя.

Активацию Т-клеток оценивали посредством измерения продукции IFN γ . Результаты представлены на фиг. 2С. Данные показывают, что первичные Т-клетки активируются в ответ на пептиды, презентированные клеточными линиями APC. Таким образом, первичные Т-клетки и клеточные линии APC представляют собой эффективную комбинацию Т-клетка-APC для применения в анализах APIPS.

Пример 3 - Конкурентный анализ

Конкурентный анализ *in vitro* для оценки аффинности связывания тестируемого пептида с МНСII проводили с использованием тестируемых пептидов, о которых известно, что они обладают высокой аффинностью к МНСII (пептиды J и L) и низкой аффинностью к МНСII (пептиды K и M).

Гибридомные клоны Т-клеток, специфичных для контрольного пептида,

инкубировали с фиксированными APC и тестируемым пептидом. Во время инкубации тестируемый пептид связывается с МНСII на APC.

В частности, гибридные клоны Т-клеток (5×10^5 клеток) сокультивировали с 5×10^5 фиксированных APC в течение 0,5 ч в 96-луночном плоскодонном планшете в присутствии 50 мкг/мл, 10 мкг/мл и 1 мкг/мл тестируемого пептида в среде RPMI-1640 (с добавлением 15% FBS, 2 mM L-глутамина, 1 mM пирувата натрия, 50 Е/мл пенициллина и 50 Е/мл стрептомицина; Lonza). Для фиксации APC, клетки инкубировали с 0,5% параформальдегидом (Merck, Darmstadt, Германия) (pH 7) в течение 5 мин при комнатной температуре (КТ). Реакцию фиксации останавливали добавлением 0,4 М глицина (Sigma-Aldrich) и промыванием клеток в среде с добавлением RPMI-1640.

Используемые APC представляли собой клетки MGAR (экспрессирующие HLA-DR2) и клетки VAVY (экспрессирующие HLA-DR3).

После 0,5-ч инкубации с тестируемым пептидом к культурам добавляли контрольный пептид в диапазоне концентраций от 0,0125 мкг/мл до 0,2 мкг/мл.

Через 48 ч ответ Т-клеточных гибридом оценивали измерением секретированного IL-2. Результаты приведены на фиг. 3. В частности, на фиг. 3А и 3В приведены данные для HLA-DR2-экспрессирующих APC (клетки MGAR), и на фиг. 3С и 3D показаны данные для HLA-DR3-экспрессирующих APC (клетки VAVY) соответственно.

Пептид Н (см. оси х на фиг. 3А и 3В) представляет собой контрольный пептид для связывания HLA-DR2 и имеет последовательность KKGPRCLTRYYSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 10).

Пептид С (см. оси х на фиг. 3С и 3D) представляет собой контрольный пептид для связывания HLA-DR3 и имеет последовательность KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID NO: 5).

Конкурентный анализ *in vitro* четко показывает, насколько пептид может связываться с МНСII.

В частности, когда тестируемый пептид не добавляется, то уровни активации Т-клеток повышаются с увеличением концентрации контрольного пептида (см. линию 0 мкг/мл на фиг. 3А-3D). Контрольный пептид может связываться с МНСII без конкуренции и тем самым активировать Т-клетки в зависимости от его концентрации.

При достаточном количестве тестируемого пептида, который может связываться с МНСII, увеличение концентрации контрольного пептида мало влияет на активацию Т-клеток (см. линии 50 и 10 мкг/мл на фиг. 3А и 3С). Тестируемый пептид превосходит контрольный пептид в отношении связывания МНСII, поэтому Т-клетки активируются меньше.

Напротив, если тестируемый пептид не может связываться с МНСII, то повышение концентрации контрольного пептида увеличивает активацию Т-клеток в той же степени, как если бы тестируемый пептид отсутствовал (см. линии 50, 10 и 1 мкг/мл на фиг. 3В и 3D, которые показывают отсутствие разницы с линией 0 мкг/мл). Тестируемый пептид не конкурирует с контрольным пептидом за связывание МНСII, поэтому контрольный

пептид может активировать Т-клетки в зависимости от его концентрации.

Пример 4 - Анализ загрузки МНСII *in vivo*

Анализ загрузки МНСII *in vivo* для оценки растворимости пептидов тестировали с использованием пептида, о котором известно, что он плохо растворяется (пептид О), и пептида, о котором известно, что он обладает хорошей растворимостью (пептид N). Исследуемые пептиды вводили мышам и оценивали степень, в которой пептиды связывались с МНСII на дендритных клетках.

В частности, HLA-DRtg мышам вводили 100 мкг пептида в 100 мкл PBS подкожно в бок. Контрольным животным вводили подкожно 100 мкл PBS. Через 2 ч отбирали образцы селезенки и готовили суспензии отдельных клеток. Клетки CD11c⁺ (дендритные клетки селезенки) подвергали положительной селекции с использованием микрогранул CD11c в соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Была достигнута средняя чистота >92%.

1×10^5 клеток CD11c⁺ сокультивировали с 1×10^5 клеток CD4⁺ (первичные Т-клетки) в 96-луночных круглодонных планшетах в среде X-vivo 15 (с добавлением 2 mM L-глутамин, 50 Е/мл пенициллина и 50 Е/мл стрептомицина; Lonza). Клетки CD4⁺ выделяли от HLA-DRtg мышей, которых подкожно иммунизировали в основание хвоста 50 мкг пептида, эмульгированного в CFA (пептид/CFA). Через десять суток после иммунизации отбирали образцы дренирующих лимфатических узлов (LN) и селезенки. Выделяли клетки LN и спленоциты, и CD4⁺ Т-клетки выделяли отрицательной селекцией с использованием набора Magnisort Mouse CD4 Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя.

Через 72 ч собирали супернатант сокультур CD11c⁺-CD4⁺. Активацию CD4⁺ Т-клеток анализировали с помощью IFN γ ELISA (R&D Systems, Abingdon, Великобритания). В параллельном эксперименте оценивали ответы CD4⁺ Т-клеток на пептид, добавленный *in vitro*, чтобы убедиться, что Т-клетки распознают пептиды, презентированные клетками CD11c⁺.

Результаты анализа *in vivo* представлены на фиг. 4. Нерастворимый пептид (пептид N) не вызывал активацию Т-клеток, в то время как растворимый пептид (пептид О) индуцировал активацию, указывая на то, что анализ может идентифицировать пептиды с подходящей растворимостью.

Пример 5 - Анализ толерантности *ex vivo*

HLA-DRtg мышам вводили подкожно в бок 0,1 мкг, 1 мкг и 10 мкг пептида на сутки -15, -13 и -11 соответственно, и затем 3 инъекции по 100 мкг пептида на сутки -8, -6 и -4 (схема с эскалацией дозы). На сутки 0 мышей иммунизировали подкожно в основание хвоста 50 мкг антигена (исходный пептид), эмульгированного в CFA (пептид/CFA).

Через десять суток после иммунизации отбирали образцы дренирующих лимфатических узлов (LN) и селезенки. Выделяли клетки LN и спленоциты и культивировали в среде X-vivo 15 (с добавлением 2 mM L-глутамин, 50 Е/мл пенициллина и 50 Е/мл стрептомицина; Lonza) в 96-луночных плоскодонных планшетах.

Для исследования антиген-индуцированной пролиферации клеток, $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку культивировали (200 мкл/лунку) в течение 72 ч с различными концентрациями антигена (0-25 мкг/мл) или с 12,5 мкг/мл очищенного производного белка (PPD; контроль праймирования; Государственный институт сывороток, Копенгаген, Дания). Через 72 ч супернатант собирали и хранили при -80°C до дальнейшего анализа.

Концентрации $\text{IFN}\gamma$ в супернатантах определяли анализом цитокинов на основе ELISA (R&D Systems, Abingdon, Великобритания) и измеряли активацию клеток. Результаты представлены на фиг. 5.

Пример 6 - Анализ биомаркеров

Для определения влияния введения толерогенного пептида на секрецию цитокинов *in vivo*, мышей HLA-DRtg иммунизировали подкожно в основание хвоста 50 мкг пептида С (последовательность KKKYVSIDVTLLQQLKKK, SEQ ID NO: 5), эмульгированного в CFA (пептид/CFA).

Через 21 сутки после иммунизации мышам вводили 100 мкг пептида или носителя.

Через 2 ч после введения у этих мышей отбирали кровь и определяли уровни цитокинов в сыворотке с помощью электрохемилюминесцентного анализа (анализ U-plex; Meso Scale Diagnostics (MSD)) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты анализа представлены на фиг. 6.

Изобретение также относится к следующим аспектам, определенным в следующих нумерованных пунктах:

1. Способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, где указанный способ включает стадии:

(i) контактирование комплекса главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII) и ассоциированного с классом II пептида инвариантной цепи (CLIP) (МНСII-CLIP) с пептидом,

(ii) добавление Т-клеток, специфичных к антигену; и

(iii) определение активации указанных Т-клеток.

2. Способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, где указанный способ включает стадии:

(i) контактирование комплекса главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII) и ассоциированного с классом II пептида инвариантной цепи (CLIP) (МНСII-CLIP) с пептидом;

(ii) добавление Т-клеток, специфичных к антигену; и

(iii) определение активации указанных Т-клеток.

3. Способ по пп.1 или 2, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы или происходят из линии Т-клеток.

4. Способ по п.3, где Т-клетки происходят из линии Т-клеток.

5. Способ по п.3, где Т-клетки происходят из мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), выделенных у субъекта.

6. Способ по любому из пп.1-5, где МНСII представляет собой антиген лейкоцитов

человека - DR(HLA-DR) изотипа 2 (HLA-DR2), HLA-DR3 или HLA-DR4.

7. Способ по п.6, где МНСII представляет собой HLA-DR2.

8. Способ по любому из пп.1-7, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции цитокинов и/или пролиферации Т-клеток.

9. Способ по п.8, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции интерлейкина-2 (IL-2) и/или секреции гамма-интерферона (IFN γ).

10. Способ по п.9, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IL-2.

11. Способ по любому из пп.8-10, где активацию Т-клеток определяют измерением включения ^3H -тимидина, включения BrdU, включения EdU или уровней Ki67.

12. Способ по любому из пп.1-11, где CLIP содержит последовательность PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO: 1).

13. Способ по любому из пп.1-12, где способ представляет собой способ *in vitro*.

14. Способ по п.13, где МНСII-CLIP присоединяют к культуральному планшету.

15. Способ по любому из пп.1-14, где МНСII-CLIP содержит биотин.

16. Способ по п.15, где МНСII-CLIP присоединяют к культуральному планшету с помощью биотина-нейтравидина.

17. Применение CLIP в способе по любому из пп.1-16.

18. Применение по п.17, где CLIP содержит последовательность PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO: 1).

19. Способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, где указанный способ включает стадии:

(i) добавление тестируемого пептида к МНСII,

(ii) добавление контрольного пептида,

(iii) добавление Т-клеток, специфичных для контрольного пептида; и

(iii) определение активации Т-клеток.

20. Способ по п.19, где МНСII находится на антигенпрезентирующих клетках (APC).

21. Способ по п.20, где APC являются фиксированными.

22. Способ по п.20, где APC являются свежевыделенными.

23. Способ по любому из пп.19-22, где APC представляют собой первичные APC или происходят из линии APC.

24. Способ по п.23, где APC представляют собой клетки MGAR.

25. Способ по п.23, где APC представляют собой клетки VAVY.

26. Способ по п.23, где APC представляют собой клетки BM14.

27. Способ по любому из пп.19-26, где МНСII представляет собой HLA-DR2, HLA-DR3 или HLA-DR4.

28. Способ по п.27, где МНСII представляет собой HLA-DR2.

29. Способ по п.28, где контрольный пептид состоит из последовательности KKGPRCLTRYYSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 10).

30. Способ по п.27, где МНСII представляет собой HLA-DR3 или HLA-DR4.

31. Способ по п.30, где контрольный пептид состоит из последовательности KKKYVSIDVTLLQQLKKK (SEQ ID NO: 5).

32. Способ по любому из пп.19-31, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы или происходят из линии Т-клеток.

33. Способ по п.32, где Т-клетки представляют собой Т-клеточные гибридомы.

34. Способ по любому из пп.19-33, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции цитокинов и/или пролиферации Т-клеток.

35. Способ по п.34, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IL-2 и/или секреции IFN γ .

36. Способ по п.35, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IL-2.

37. Способ по любому из пп.33-36, где активацию Т-клеток определяют измерением включения ^3H -тимидина, включения BrdU, включения EdU или уровней Ki67.

38. Способ по любому из пп.19-37, где тестируемый пептид добавляют к МНСII перед контрольным пептидом.

39. Способ по п.38, где тестируемый пептид инкубируют с МНСII в течение примерно 15-45 мин перед добавлением контрольного пептида.

40. Способ по любому из пп.19-39, где способ представляет собой способ *in vitro*.

41. Применение пептида, состоящего из последовательности KKGPRCLTRYYSFVNMEGKK (SEQ ID NO: 10), в способе по любому из пп.19-40.

42. Применение пептида, состоящего из последовательности KKKYVSIDVTLLQQLKKK (SEQ ID NO: 5), в способе по любому из пп.19-40.

43. Способ тестирования растворимости пептида *in vivo*, включающий стадии:

(i) получение дендритных клеток от мыши, которой ввели пептид;

(ii) сокультивирование указанных дендритных клеток с Т-клетками, специфичными для указанного пептида; и

(iii) определение активации указанных Т-клеток.

44. Способ по п.43, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы.

45. Способ по п.44, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки.

46. Способ по любому из пп.43-44, где мышь представляет собой трансгенную по HLA-DR2 (HLA-DR2tg) или трансгенную по HLA-DR3 (HLA-DR3tg) мышь.

47. Способ по любому из пп.43-46, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции цитокинов и/или пролиферации Т-клеток.

48. Способ по п.47, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IL-2 и/или секреции IFN γ .

49. Способ по п.48, активацию Т-клеток определяют измерением секреции IL-2.

50. Способ по п.48, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IFN γ .

51. Способ по любому из пп. 47-50, где активацию Т-клеток определяют

измерением включения ^3H -тимидина, включения BrdU, включения EdU или уровня Ki67.

52. Способ по любому из пп.43-51, где мыши ввели примерно 100 мкг пептида.

53. Способ по любому из пп.43-52, где введение мыши проводили подкожно.

54. Способ по любому из пп.43-54, где дендритные клетки отбирают из селезенки мыши.

55. Способ *ex vivo* тестирования способности пептида индуцировать толерантность к антигену, где указанный способ включает стадии:

(i) получение Т-клеток от животного, которому ввели пептид;

(ii) стимуляцию указанных Т-клеток антигеном; и

(iii) определение активации указанных Т-клеток.

56. Способ по п.55, где активацию Т-клеток определяют измерением включения BrdU, включения EdU, уровней Ki67, секреции IL-2 и/или секреции $\text{IFN}\gamma$.

57. Способ по п.56, активацию Т-клеток определяют измерением уровней Ki67.

58. Способ по п.56, активацию Т-клеток определяют измерением секреции $\text{IFN}\gamma$.

59. Способ по любому из пп.55-58, где животное иммунизировали антигеном.

60. Способ по п.59, где животное иммунизируют антигеном примерно через 10-20 суток после первого введения животному пептида.

61. Способ по п.60, где животное иммунизируют антигеном примерно через 15 суток после первого введения животному пептида.

62. Способ по любому из пп.59-61, где Т-клетки стимулируют антигеном примерно через 10 суток после иммунизации животного антигеном.

63. Способ по любому из пп.55-62, где Т-клетки стимулируют антигеном в течение примерно 48-96 ч.

64. Способ по п.63, где Т-клетки стимулируют антигеном в течение примерно 72 ч.

65. Способ по любому из пп.55-64, где пептид ввели с использованием схемы с эскалацией дозы.

66. Способ по любому из пп.55-65, где животным является мышь.

67. Способ по п.66, где мышь представляет собой мышь HLA-DR2tg, HLA-DR3tg или HLA-DR4tg.

68. Способ по пп.66 или 67, где Т-клетки находятся в образце клеток лимфатических узлов и спленоцитов.

69. Способ по любому из пп.55-68, где животным является человек.

70. Способ по п.69, где Т-клетки находятся в образце мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

71. Способ определения влияния пептида на секрецию цитокинов, включающий измерение уровней цитокинов в сыворотке мыши, которой ввели пептид.

72. Способ по п.71, где мышь иммунизируют пептидом примерно за 15-25 суток до введения пептида.

73. Способ по п.72, где мышь иммунизируют пептидом примерно за 21 сутки до введения пептида.

74. Способ по любому из пп.71-73, где мыши вводят примерно 100 мкг пептида.
75. Способ по любому из пп.71-74, где мышь представляет собой мышь HLA-DRtg.
76. Способ по любому из пп.71-75, где уровни цитокинов измеряют с использованием электрохемилюминесценции.
77. Способ по любому из пп.71-76, где измеряют уровни IL-2.
78. Способ по любому из пп.71-77, где измеряют уровни интерлейкина-6 (IL-6).
79. Способ по любому из пп.71-78, где измеряют уровни интерлейкина-10 (IL-10).
80. Способ по любому из пп.71-79, где измеряют уровни интерлейкина-12/интерлейкина-23p40 (IL-12/IL-23p40).
81. Способ по любому из пп.71-80, где измеряют уровни интерлейкина-17 (IL-17).
82. Способ по любому из пп.71-81, где измеряют уровни IFN γ .
83. Способ идентификации толерогенного пептида, включающий стадии:
 - (i) проведение анализа вытеснения CLIP в соответствии с любым из пп.1-16, и/или
 - (ii) проведение конкурентного анализа *in vitro* в соответствии с любым из пп.19-40, и/или
 - (iii) проведение анализа загрузки МНСII в соответствии с любым из пп.43-54, и/или
 - (iv) проведение анализа вытеснения CLIP с PBMC пациента в соответствии с любым из пп.55-70, и/или
 - (v) тестирование эффективности пептида на модели заболевания; и/или
 - (vi) проведение анализа биомаркеров в соответствии с любым из пп.71-82.
84. Способ по п.83, дополнительно включающий тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, включающий:
 - обработку системы презентации, независимой от процессинга антигена (APIPS), пептидом,
 - добавление Т-клеток, специфичных для пептида, к APIPS, и
 - определение активации Т-клеток.
85. Способ по п.84, где APIPS включает:
 - (i) фиксированные APC
 - (ii) липидные мембраны, содержащие МНСII; или
 - (iii) МНСII, связанный с планшетом.
86. Способ по п.85, где APC представляют собой первичные APC или происходят из линии APC.
87. Способ по п.86, где первичные APC представляют собой спленоциты.
88. Способ по п.86, где APC представляют собой клетки MGAR.
89. Способ по п.86, где APC представляют собой клетки VAVY.
90. Способ по любому из пп.84-89, где Т-клетки, добавленные к APIPS, представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы или происходят из линии Т-клеток.
91. Способ по п.90, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки.
92. Способ по любому из пп.84-91, где активацию Т-клеток определяют

измерением секреции цитокинов и/или пролиферации Т-клеток.

93. Способ по п.92, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IL-2 и/или секреции IFN γ .

94. Способ по п.93, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IFN γ .

95. Способ по любому из пп.92-94, где активацию Т-клеток определяют измерением включения ³H-тимидина, включения BrdU, включения EdU или уровней Ki67.

96. Способ идентификации толерогенного пептида, включающий:
идентификацию пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп,
тестирование способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу,
тестирование аффинности связывания пептида с МНСII,
тестирование растворимости пептида *in vivo*, и
тестирование способности пептида индуцировать толерантность к антигену.

97. Толерогенный пептид, идентифицированный способом по любому из предшествующих пунктов.

98. Композиция, содержащая толерогенный пептид по п.97.

99. Способ лечения и/или профилактики заболевания у субъекта, включающий стадию введения субъекту пептида по п.97 или композиции по п.98.

100. Способ по п.99, включающий следующие стадии:

- (i) идентификацию антигена, ассоциированного с заболеванием,
- (ii) идентификацию толерогенного пептида для антигена; и
- (iii) введение толерогенного пептида субъекту.

101. Способ по пп.99 или 100, где пептид или композицию вводят многократными дозами.

102. Способ по любому из пп.99-101, где пептид или композицию вводят подкожно.

103. Способ по любому из пп.99-101, где пептид или композицию вводят внутривенно.

104. Толерогенный пептид по п.97 или композиция по п.98 для применения в лечении и/или профилактике заболевания.

105. Применение толерогенного пептида по п.97 или композиции по п.98 в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации пептида, содержащего Т-клеточный эпитоп, где указанный способ включает следующие стадии:

(i) контактирование комплекса главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII) и ассоциированного с классом II пептида инвариантной цепи (CLIP) (МНСII-CLIP) с пептидом,

(ii) добавление Т-клеток, специфичных к антигену; и

(iii) определение активации указанных Т-клеток.

2. Способ тестирования способности пептида связываться с МНСII, не подвергаясь процессингу, где указанный способ включает стадии:

(i) контактирование комплекса главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII) и ассоциированного с классом II пептида инвариантной цепи (CLIP) (МНСII-CLIP) с пептидом;

(ii) добавление Т-клеток, специфичных к антигену; и

(iii) определение активации указанных Т-клеток.

3. Способ по пп.1 или 2, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, Т-клеточные клоны или Т-клеточные гибридомы или происходят из линии Т-клеток.

4. Способ по п.3, где Т-клетки происходят из линии Т-клеток.

5. Способ по п.3, где Т-клетки происходят из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенных у субъекта.

6. Способ по любому из пп.1-5, где МНСII представляет собой антиген лейкоцитов человека - DR(HLA-DR) изотипа 2 (HLA-DR2), HLA-DR3 или HLA-DR4.

7. Способ по п.6, где МНСII представляет собой HLA-DR2.

8. Способ по любому из пп.1-7, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции цитокинов и/или пролиферации Т-клеток.

9. Способ по п.8, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции интерлейкина-2 (IL-2) и/или секреции гамма-интерферона (IFN γ).

10. Способ по п.9, где активацию Т-клеток определяют измерением секреции IL-2.

11. Способ по любому из пп.8-10, где активацию Т-клеток определяют измерением включения ³H-тимидина, включения BrdU, включения EdU или уровней Ki67.

12. Способ по любому из пп.1-11, где CLIP содержит последовательность PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO: 1).

13. Способ по любому из пп.1-12, где способ представляет собой способ *in vitro*.

14. Способ по п.13, где МНСII-CLIP присоединяют к культуральному планшету.

15. Способ по любому из пп.1-14, где МНСII-CLIP содержит биотин.

16. Способ по п.15, где МНСII-CLIP присоединяют к культуральному планшету с помощью биотина-нейтравидина.

17. Применение CLIP в способе по любому из пп.1-16.

18. Применение по п.17, где CLIP содержит последовательность PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO: 1).

19. Способ тестирования аффинности связывания пептида с МНСII, где указанный способ включает стадии:

- (i) добавление тестируемого пептида к МНСII,
- (ii) добавление контрольного пептида,
- (iii) добавление Т-клеток, специфичных для контрольного пептида; и
- (iii) определение активации Т-клеток.

20. Способ по п.19, где МНСII находится на антигенпрезентирующих клетках (APC).

21. Способ по п.20, где APC являются фиксированными.

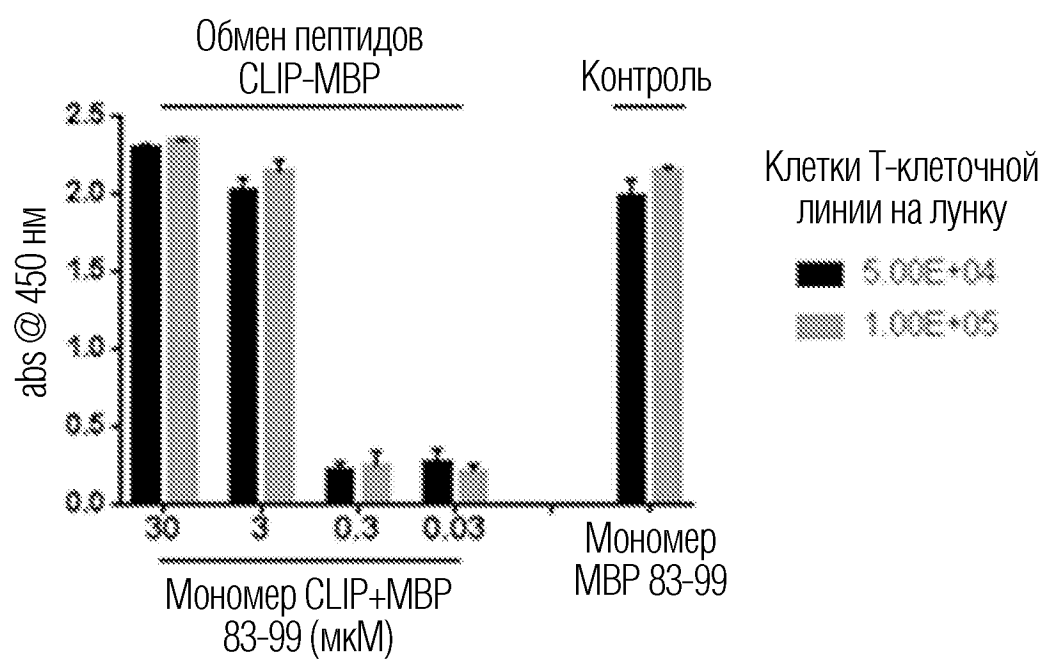
22. Способ по п.20, где APC являются свежевыделенными.

23. Способ по любому из пп.19-22, где APC представляют собой первичные APC или происходят из линии APC.

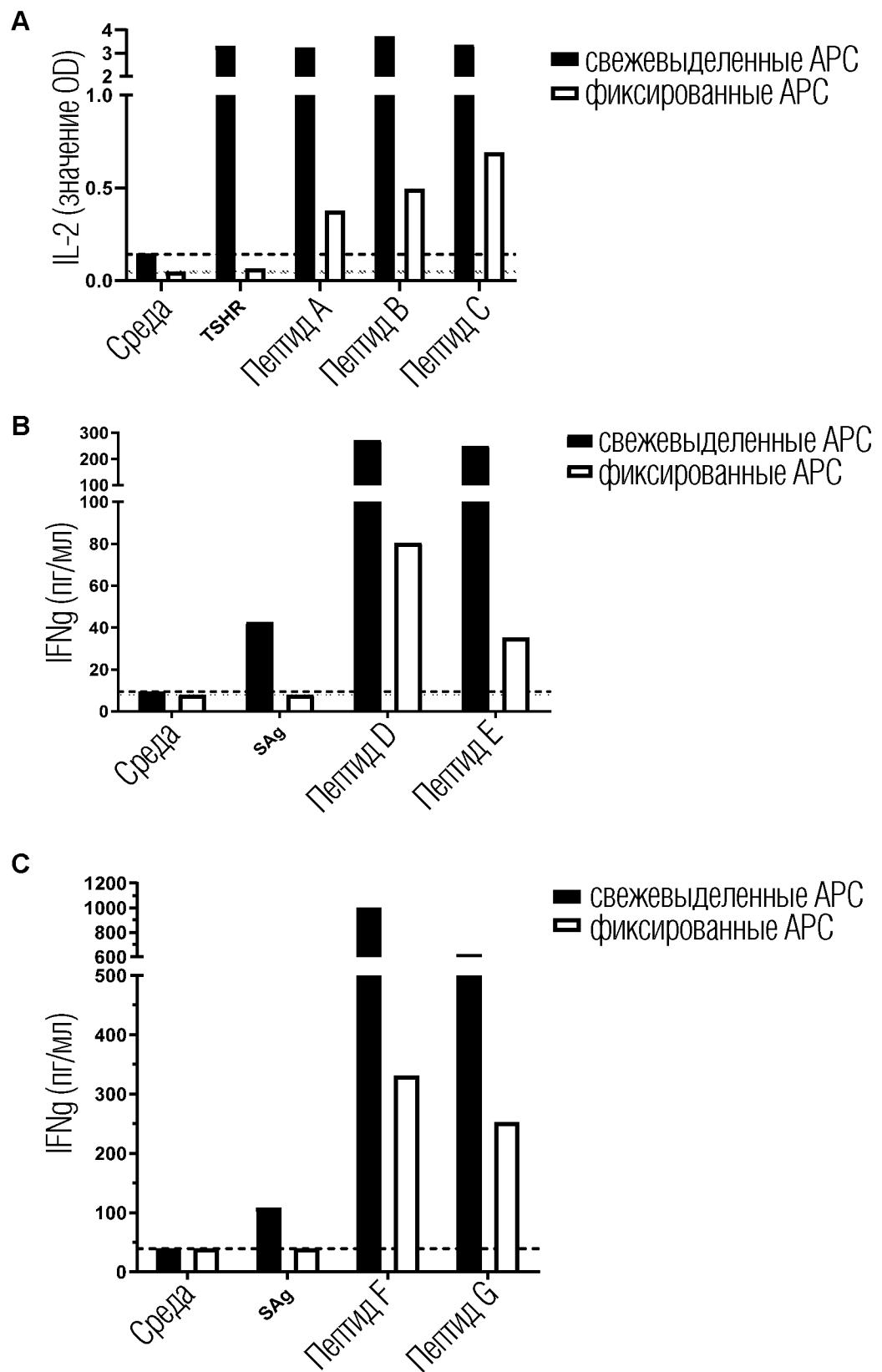
24. Способ по п.23, где APC представляют собой клетки MGAR.

25. Способ по п.23, где APC представляют собой клетки VAVY.

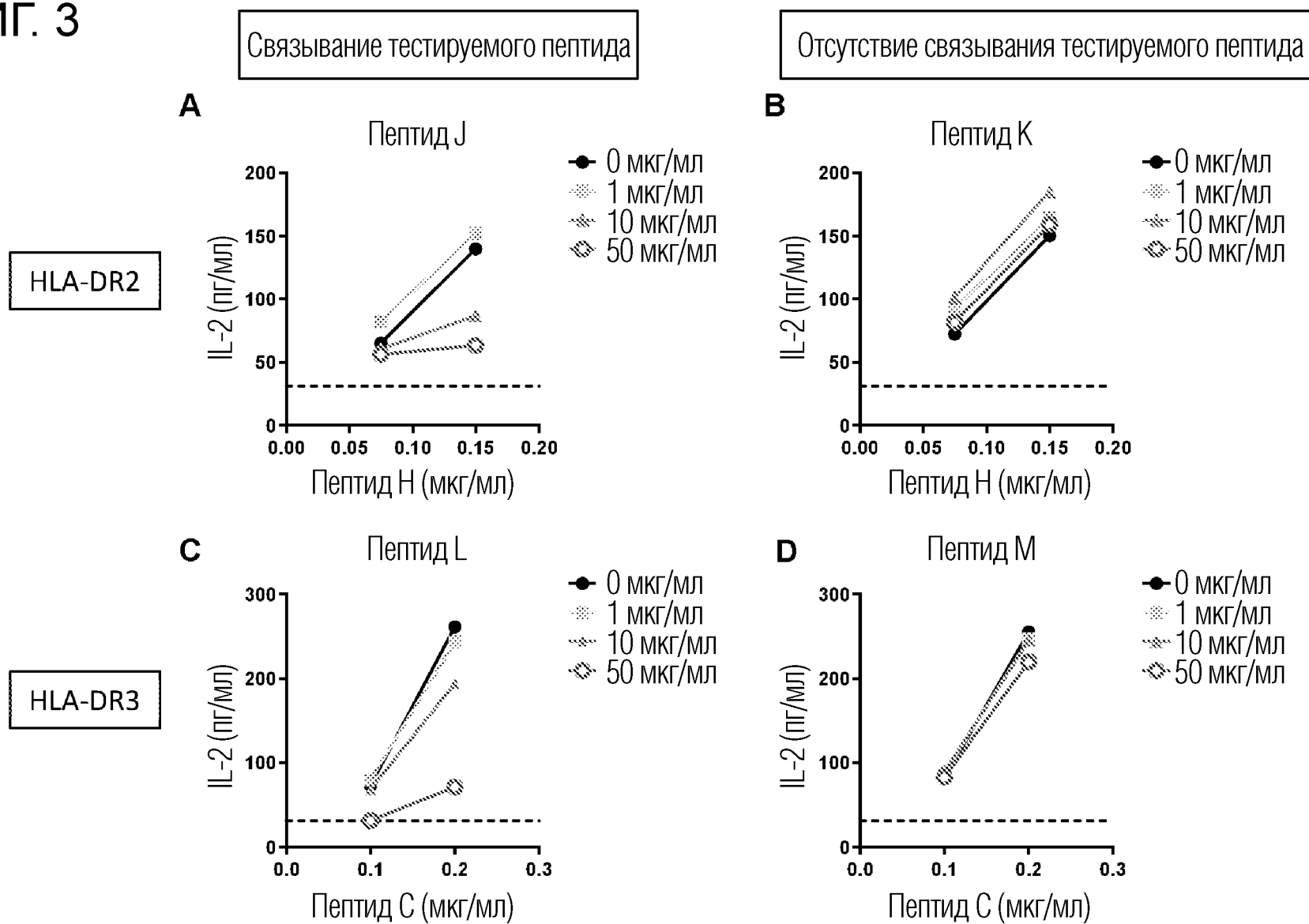
ФИГ. 1



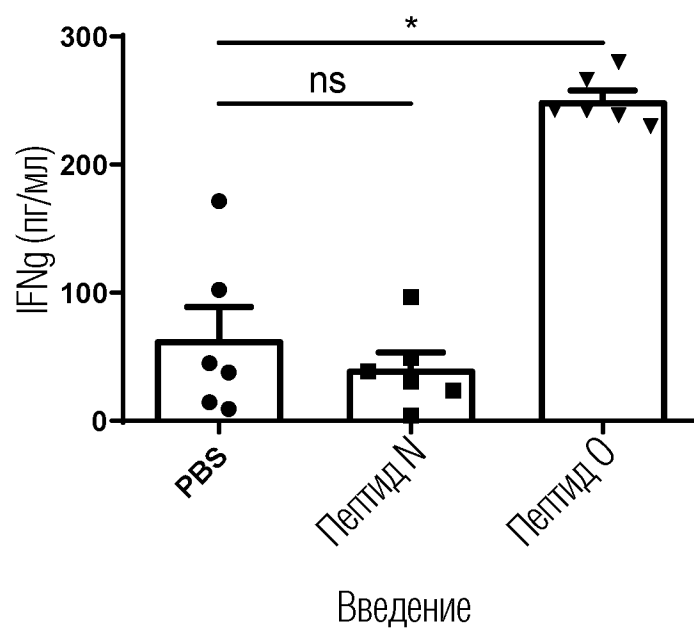
ФИГ. 2



ФИГ. 3

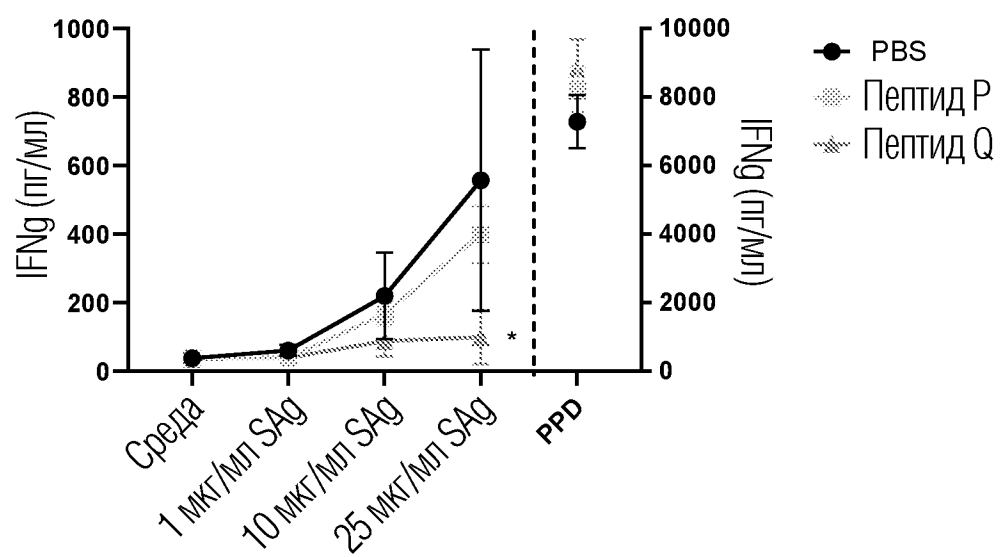


ФИГ. 4

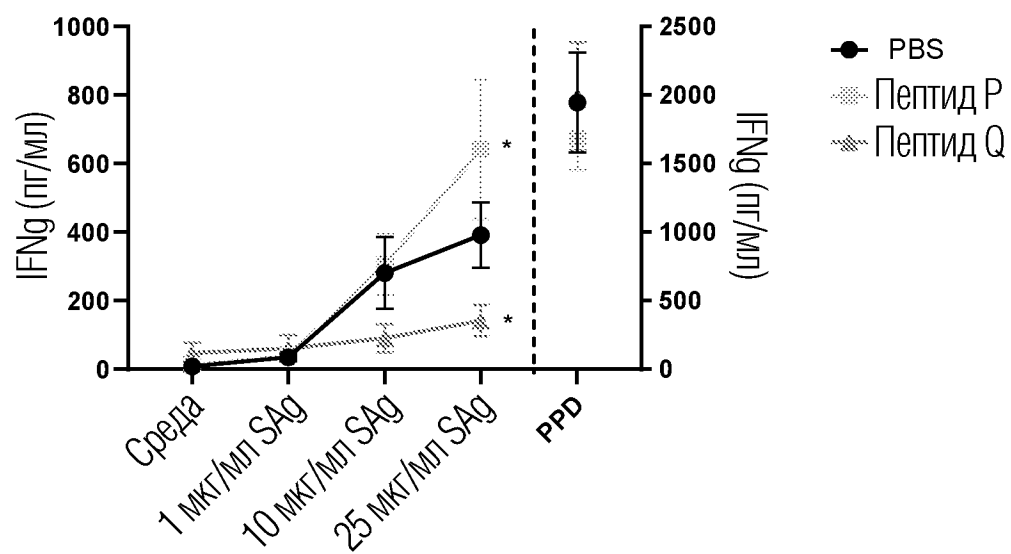


ФИГ. 5

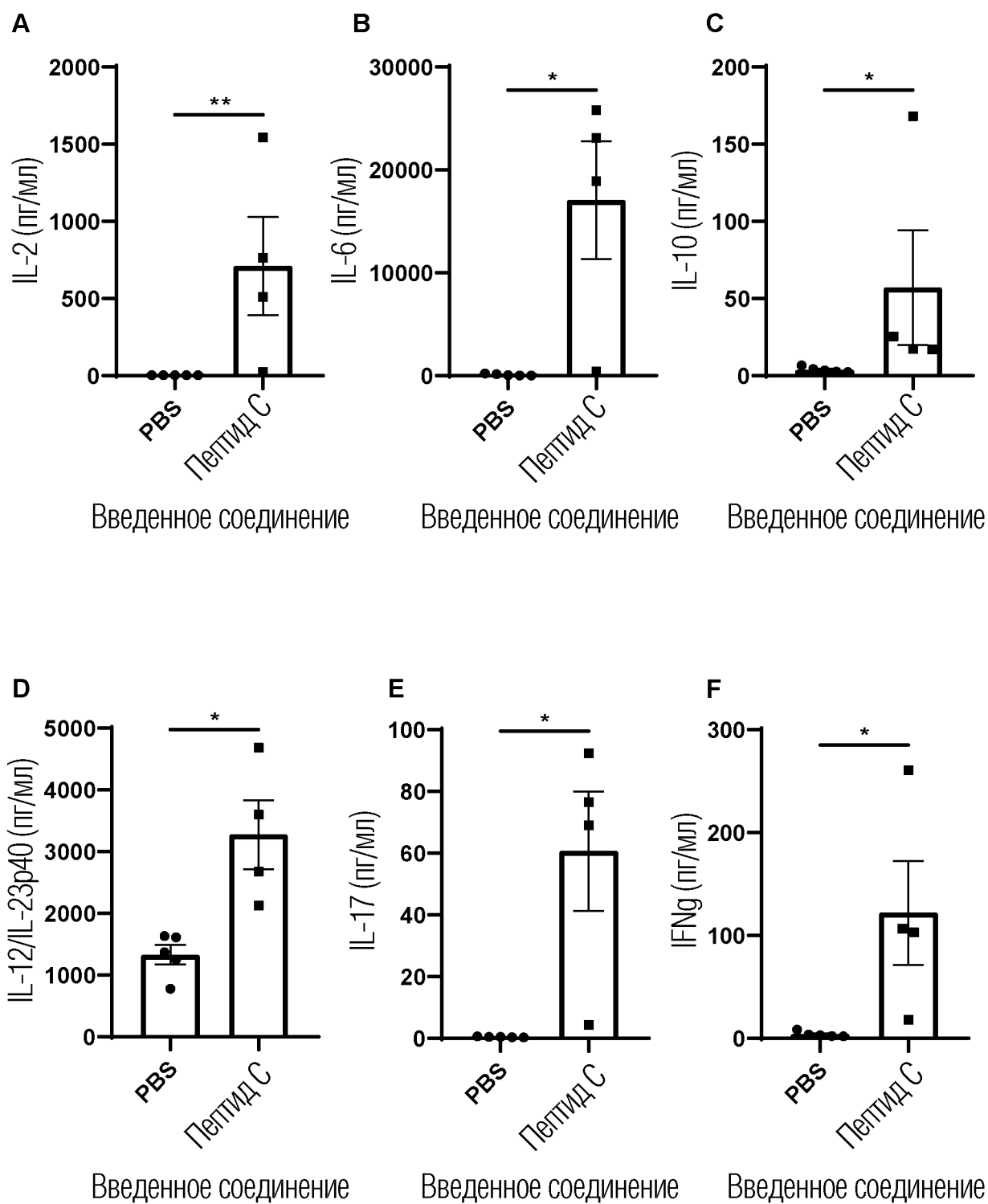
А



В



ФИГ. 6



ФИГ. 7

