

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-536497

(P2023-536497A)

(43)公表日 令和5年8月25日(2023.8.25)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 4/00 (2006.01)	C 0 7 K 4/00	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全52頁)

(21)出願番号	特願2023-507480(P2023-507480)	(71)出願人	519353651 エイシー イミュン ソシエテ アノニム スイス ツェーハー - 1 0 1 5 ローザン ヌ イーピーエフエル イノベーション パーク ビルディング ビー
(86)(22)出願日	令和3年8月4日(2021.8.4)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(85)翻訳文提出日	令和5年3月28日(2023.3.28)	(74)代理人	100150500 弁理士 森本 靖
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/071778	(74)代理人	100176474 弁理士 秋山 信彦
(87)国際公開番号	WO2022/029181	(72)発明者	ヴィンター , ドリアン オーストリア 1 0 3 0 ウィーン、カール - ファルカス - ガッセ 2 2、アフィリス ・アクチェンゲゼルシャフト内
(87)国際公開日	令和4年2月10日(2022.2.10)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	20189425.0		
(32)優先日	令和2年8月4日(2020.8.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 免疫原性化合物

(57)【要約】

抗原ペプチドは、構造：X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂を含み、-シヌクレインのアミノ酸13-124に由来する。該構造によれば：Pは、プロリンであり；X₁は、L、K、AまたはSであり、ここで、Lは、ロイシン、Kは、リシン、Aは、アラニンおよびSは、セリンであり；X₂は、EまたはSであり、ここで、EおよびSは、前記と同意義であり；X₃は、D、E、K、N、AまたはSであり、ここで、Nは、アスパラギン、Dは、アスパラギン酸であり、D、E、K、AおよびSは、前記と同意義であり；X₄は、M、A、S、LまたはKであり、ここで、Mは、メチオニンであり、A、S、LおよびKは、前記と同意義であり；X₅は、前記と同意義のPまたはAであり；X₆は、V、AまたはSであり、ここで、Vは、バリンであり、AおよびSは、前記と同意義であり；X₇は、前記と同意義のDまたはSであり；X₉は、前記と同意義のDまたはAであり；X₁₀は、N、SまたはAであり、ここで、N、SおよびAは、前記と同意義であり；X₁₁は、E、AまたはSであり、ここで、E、AおよびSは、前記と同意義であり；X₁₂は、存在または不在であり、存在する場合、A、K、V、S、またはGであり、ここで、Gは、グリシンであり、A、K、VおよびSは、前記と同意義である。該構造は、野生型L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A配列と比較して、少なくとも1つの突然変異を含む。ペプチドは、X₁₂の直後のジペプチドY-Eを含まず、ここで、Yは、チロシンであり、Eは、前記と同意義である。ペプチドは、適切な担体に結合され、シヌクレイノパチーの治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造：

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂

[ここで、

Pは、プロリンであり；

X₁は、L、K、AまたはSであり、ここで、Lは、ロイシンであり、Kは、リシンであり、Aは、アラニンであり、Sは、セリンであり；X₂は、EまたはSであり、ここで、Eは、グルタミン酸であり、Sは、前記と同意義であり；X₃は、D、E、K、N、AまたはSであり、ここで、Nは、アスパラギンであり、Dは、アスパラギン酸であり、E、K、AおよびSは、前記と同意義であり；X₄は、M、A、S、LまたはKであり、ここで、Mは、メチオニンであり、A、S、LおよびKは、前記と同意義であり；X₅は、前記と同意義のPまたはAであり；X₆は、V、AまたはSであり、ここで、Vは、バリンであり、AおよびSは、前記と同意義であり；X₇は、前記と同意義のDまたはSであり；X₉は、前記と同意義のDまたはAであり；X₁₀は、N、SまたはAであり、ここで、N、SおよびAは、前記と同意義であり；X₁₁は、E、AまたはSであり、ここで、E、AおよびSは、前記と同意義であり；X₁₂は、存在または不在であり、存在する場合、A、K、V、S、またはGであり、ここで、Gは、グリシンであり、A、K、VおよびSは、前記と同意義であり；ただし、X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂は、L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aではなく、アミノ酸配列：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aと比較して、1～5個のアミノ酸の差異を含み、さらに、ペプチドは、X₁₂の直後に、ジペプチド：Y-Eを含まず、ここで、Yは、チロシンであり、Eは、前記と同意義である]

を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる抗原ペプチド。

【請求項 2】

アミノ酸配列：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aと比較して、1～4個のアミノ酸の差異、好ましくは1～3個のアミノ酸の差異、および最も好ましくは2個のアミノ酸の差を含む、請求項 1 に記載の抗原ペプチド。

【請求項 3】

アミノ酸配列：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aと比較して、X₁、X₃、X₄およびX₁₂から選択される1つまたは複数の位置にアミノ酸の差異を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗原ペプチド。

【請求項 4】

構造：

X_a-X_b-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂

[ここで、

X_aは、存在または不在であり、存在する場合、Gであり、ここで、Gは、グリシンであり；X_bは、Gであり、ここで、Gは、前記と同意義であり；およびX₁-X₁₂は、前記と同意義である]

を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる、前記請求項のいずれかに記載の抗原ペプチド。

【請求項 5】

長さが11～20アミノ酸、好ましくは長さが12～14アミノ酸である、前記請求項のいずれかに記載の抗原ペプチド。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

さらに末端システイン残基、好ましくはN末端システイン残基を含む、前記請求項のいずれかに記載の抗原ペプチド。

【請求項 7】

X₁が、L、S、またはKであり、X₂が、EまたはSであり、X₃が、S、D、E、A、KまたはNであり、X₄が、Mであり、X₁₀が、Nであり、および/またはX₁₂が、A、S、KまたはVであり、好ましくはX₁が、LまたはKであり、X₂が、Eであり、X₃が、S、D、E、KまたはAであり、X₄が、Mであり、X₁₀が、Nであり、および/またはX₁₂が、A、SまたはKであり、特にX₁が、LまたはKであり、X₃が、D、KまたはSであり、X₁₂が、Aである、前記請求項のいずれかに記載の抗原ペプチド。

【請求項 8】

AEDMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNES、SEDMPVDPDNEA、SEKMPVDPDNEA LEEMPVDPDNEA、SESMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNES、LEAMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEK、LEDMPVDPDNEV、LEKMPVDPDNEK、LSDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNES、LENMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEKおよびKEDMPVDPDNEA、好ましくは、SEDMPVDPDNEA、SEKMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEK、LESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNES、KESMPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNES、LEKMPVDPDNEAおよびLESMPVDPDNES、特に、LEKMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEK、KESMPVDPDNEAおよびKEDMPVDPDNEAからなる群から選択される、前記請求項のいずれかに記載の抗原ペプチド。

10

20

【請求項 9】

アミノ酸配列KESMPVDPDNEA、GKESMPVDPDNEA、GGKESMPVDPDNEAまたはCGGKESMPVDPDNEAを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、前記請求項のいずれかに記載の抗原ペプチド。

【請求項 10】

前記請求項のいずれかに記載の抗原ペプチドおよび抗原ペプチドに結合したT細胞エピトープを含む担体を含む免疫原性化合物。

【請求項 11】

T細胞エピトープを含む担体が、リンカーを介して抗原ペプチドに結合される、請求項10に記載の免疫原性化合物。

30

【請求項 12】

T細胞エピトープを含む担体が、抗原ペプチドのN末端で結合される、請求項10または11に記載の免疫原性化合物。

【請求項 13】

担体タンパク質が、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、破傷風トキソイド、易熱性エンテロトキシン(LT)、コレラ毒素(CT)、破傷風トキソイド(TT)、変異毒素、アルブミン結合タンパク質、およびウシ血清アルブミン、好ましくはCRM197からなる群から選択される、請求項12に記載の免疫原性化合物。

【請求項 14】

請求項1～9のいずれか1つに記載の抗原ペプチドまたは請求項10～13のいずれか1つに記載の免疫原性化合物および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤。

40

【請求項 15】

さらにアジュバントを含む、請求項14に記載の医薬製剤。

【請求項 16】

アジュバントが、MF59リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、サイトカイン(たとえば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サポニン(たとえば、QS21)、MDP誘導体、CpGオリゴ、IC31、LPS、MPLA、ポリホスファゼンおよび水酸化アルミニウム、またはそれらの混合物；特にアジュバントとして水酸化アルミニウムを含むものからなる群から選択される、請求項15に記載の医薬製剤。

【請求項 17】

50

抗原ペプチドが、0.1ng~10mg、好ましくは10ng~1mg、特に100ng~100μgの量で含まれる、請求項15または16に記載の医薬製剤。

【請求項18】

製剤が、皮下、皮内、静脈内または筋肉内投与などの非経口投与用に製剤される、請求項14~17のいずれか1つに記載の医薬製剤。

【請求項19】

薬剤として使用するための請求項1~9のいずれか1つに記載の抗原ペプチドまたは請求項10~13のいずれか1つに記載の免疫原性化合物または請求項14~18のいずれか1つに記載の医薬製剤。

【請求項20】

シヌクレイノパチーの治療または予防に使用するための請求項1~9のいずれか1つに記載の抗原ペプチドまたは請求項10~13のいずれか1つに記載の免疫原性化合物または請求項14~18のいずれか1つに記載の医薬製剤。

【請求項21】

シヌクレイノパチーの治療または予防用薬剤の製造のための、請求項1~9のいずれか1つに記載の抗原ペプチドまたは請求項10~13のいずれか1つに記載の免疫原性化合物または請求項14~18のいずれか1つに記載の医薬製剤の使用。

【請求項22】

有効量の請求項1~9のいずれか1つに記載の抗原ペプチドまたは請求項10~13のいずれか1つに記載の免疫原性化合物または請求項14~18のいずれか1つに記載の医薬製剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、シヌクレイノパチーの治療または予防方法。

【請求項23】

シヌクレイノパチーが、原発性シヌクレイノパチーまたは付随する病状である、請求項20または21のいずれか1つに記載の使用あるいは請求項22に記載の方法。

【請求項24】

原発性シヌクレイノパチーが、パーキンソン病(孤発性、 α -シヌクレイン変異を伴う家族性、 α -シヌクレイン以外の変異を伴う家族性、純粋自律神経不全およびレビー小体嚙下障害)、レビー小体病(LBD; レビー小体型認知症(DLB)を含む)(「純粋な」レビー小体型認知症)、パーキンソン病型認知症(PDD)、またはびまん性レビー小体病、多系統萎縮症(シャイ・ドレーガー症候群、線条体黒質変性症およびオリブ橋小脳萎縮症)からなる群から選択される、請求項23に記載の使用または方法。

【請求項25】

付随する病状が、孤発性アルツハイマー病、APP変異を伴う家族性アルツハイマー病、PS-1、PS-2またはその他の変異を伴う家族性アルツハイマー病、家族性英国型認知症、封入体筋炎、外傷性脳損傷、慢性外傷性脳症、ボクサー認知症、タウオパチー(ピック病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、17番染色体に関連するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症およびニーマンピックC1型疾患)、ダウン症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症(孤発性、家族性およびグアムのALS-認知症複合体)、神経軸索ジストロフィー、脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(ハレルフォルデン・シュパッツ症候群)、プリオン病、ゲルストマン・シュトラウスラー・シャインカー病、毛細血管拡張性運動失調症、メージュ症候群、亜急性硬化性全脳炎、ゴーシェ病、クラッペ病、ならびにその他のリソソーム蓄積障害(クフォル・ラケブ症候群およびサンフィリップ症候群を含む)、またはレム(REM)睡眠行動障害からなる群から選択される、請求項23に記載の使用または方法。

【請求項26】

シヌクレイノパチーが、レビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB)、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(NBIAタイプI)からなる群から選択される、請求項20または21のいずれか1つに記載の使用あるいは請求項22に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

ヒト患者が治療される、請求項 21 ~ 26 のいずれか1つに記載の使用または方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫原性化合物、ならびにシヌクレイノパチー、特にパーキンソン病(PD)、レビー小体型認知症(DLB)および多系統萎縮症(MSA)の予防および治療におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

PDは、シヌクレイノパチーであり、2番目に多い神経変性運動疾患である。PDの有病率は、一般集団で100~200/100,000の範囲であり、60歳以上の人口の約1%に影響を及ぼし、年間発生率は約15/100,000である。それは慢性進行性障害であり、運動症候群(運動緩慢、硬直、安静時振戦および姿勢不安定)ならびに通常は運動症候群に先行する非運動症候群(さまざまな自律神経機能障害、感覚異常、および精神医学的異常)の組み合わせによって定義される。この疾患の顕著な特徴は、主に α -シヌクレイン(α Syn)で構成されているレビー小体(LB)と呼ばれる繊維状タンパク質封入体の蓄積を伴う、黒質(SN)におけるドーパミン作動性ニューロンの深刻な喪失である。PD、DLBおよびその他のLB疾患は、さまざまな脳領域および細胞集団で α Synの蓄積と再分布を示す。

【0003】

MSAは、もう1つの非常に重要なシヌクレイノパチーである。MSAは、L-DOPA耐性パーキンソニズム、小脳性運動失調症、および自律神経失調症の症状を特徴とする散発性の神経変性疾患である。患者は、線条体、黒質、小脳、橋、下オリーブおよび脊髄などのさまざまな脳領域に影響を与える多系統神経細胞の喪失に苦しんでいる。MSAは、中枢神経系全体の α Syn陽性のグリア細胞質(GCI)およびまれな神経細胞封入体によって特徴付けられる。これらの封入体は、線条体黒質変性、オリーブ橋小脳萎縮、および髄質と脊髄の自律神経核の関与に関連している。MSAの病因に対するGCIの重要性は一般に認められており、オリゴドンドログリアにおける α Syn過剰発現の影響を分析するトランスジェニックマウスモデルの最近の分析によって明確に示されている。ヒト α Synを過剰発現するtgマウスでは、GCI様の凝集体とMSAの生化学的マーカーの両方が観察された。

【0004】

DLBは、アルツハイマー病(AD)に次いで、西欧社会で2番目に多い神経変性認知症である。臨床的に診断された認知症の4~7%を占めており、同じ数の症例が正しい臨床診断を逃れると予測されている。DLBの診断は、この疾患がADとPDの「中間」を表し、両方のエンティティの重複する特徴を示すため、困難である。「可能性のあるDLB」を診断するために存在しなければならない4つの臨床的コンセンサス基準は、認知と注意の変動、反復性幻覚、レム睡眠行動障害、および自発的なパーキンソン病運動徴候であり、他の基準よりも疾患の後期に発生する。これらは、失神や無反応の一過性エピソード、無関心、不安、うつ病、精神病エピソードおよび神経弛緩薬過敏症など、発生する可能性はあるが発生する必要はないさまざまな追加の臨床基準によってサポートされる。症状は患者間で一様ではない。

【0005】

DLBの病理は、レビー小体(LB)と呼ばれるタンパク質封入体によって特徴付けられ、主にニューロンの機能と構造の喪失に關与する α -シヌクレイン(α Syn)で構成される。しかしながら、DLBでは、LBは皮質全体に拡散して分布していることが見られるが、PDでは主に黒質のドーパミン作動性ニューロンに見られる。DLBのLBは、PDのLBよりも境界がはっきりせず、好酸球性が低く、繊維状性が低い。さらに、DLB患者の脳には、主にAbeta1-42などのカルボキシ末端伸長型のアミロイドペータ(Abeta)を含むアミロイド斑が見られる。皮質アミロイド沈着は、側頭葉下部灌流と海馬萎縮の傾向に関連する。

【0006】

10

20

30

40

50

aSynは、14kDの天然のモノマータンパク質であり、通常はシナプス小胞の膜またはサイトゾルに結合したシナプス前終末に位置する。その天然の機能はよくわかっていないが、シナプス伝達に關与している可能性がある。病因中に、おそらく、特にC末端プロテアーゼ切断などの翻訳後修飾の結果として、aSynの誤った折り畳みと凝集が中枢神経系(CNS)と末梢神経系で発生する(Dufty 2007、Bassil 2016)。

凝集は、オリゴマー、プロトフィブリル、フィブリルなど、LB疾患の病因に關連しているさまざまなaSyn種の生成につながる。aSynの纖維型は、主に神経細胞体に位置するLBで検出される(Kosaka et al., 1990、Dickson et al., 1989)。aSynの凝集体は、アストログリア細胞でも検出されうる(Braak 2007)。

【0007】

フィブリルのみならず、さまざまなオリゴマーaSyn種が病気のヒトの脳で検出された。纖維状aSynとは対照的に、オリゴマー凝集体は、シナプスを損傷する可能性のあるニューロン投射およびシナプス前終末に位置する可能性が最も高いため、オリゴマーaSynは細胞毒性に起因すると考えられている。

【0008】

モノマーaSynは、さまざまなインビトロ条件下で、さまざまな外観、コンフォメーション、細胞毒性および化学的性質を備えたさまざまな種類の凝集体を形成できることが示されている。モノマーのコンフォメーションと一般的な許容条件に応じて、さまざまなタイプの凝集体が発生し、さまざまな構造特性を持つことができる。播種されると、異なるaSyn株(「フィブリル」または「リボン」など)が受容細胞にコンフォメーションを刻み込み、「コンフォメーションテンプレート」と呼ばれるプロセスで同じ株の凝集体を生成する。それらがラットの脳に注入されると、これらのタイプの凝集体は、インビボでの封入体形成および行動および神経毒性の表現型の生成に關してさまざまな特性を示す。異なるタイプのaSyn凝集体は、それらの異なるコンフォメーションのために異なるポリペプチド鎖を露出させると考えられている。これらの異なって露出した表面は、分子内相互作用の異なるセットを可能にする。したがって、特定のaSyn株のコンフォメーションは、播種に対する傾向や特定の細胞型に対する嗜好などの特性を決定する。PDおよびMSA材料から抽出されたaSyn株のさまざまな特性を示す実験データが現れ始めている；PDまたはMSAの患者からの病理学的脳材料の分析は、伝達可能なaSyn凝集体の異なる特性を実証した。

【0009】

現在利用可能な治療法は症状のみを対象としているが、根底にある神経変性を修正することができる治療法はまだ開発中である。ここでは、aSynのオリゴマー型および神経毒性型を主に標的とするaSyn特異的能動免疫療法(SAIT)アプローチが提示されているため、シヌクレイノパチーの疾患進行を妨げる可能性がある。

【0010】

以前に開発されたaSynを標的とするAFFITOPE(登録商標)であるPD01およびPD03によるワクチン接種は、aSyn凝集障害のさまざまな動物モデルにおいて有効性が証明されており、aSyn病理の軽減、神経炎症の保存、および行動障害の改善が見られる(Mandler et al., 2014；WO 2009/103105 A1、WO 2011/020133 A1、WO 2017/076873 A1)。これらのペプチドは、ヒトにおいて標的的特異的抗体を誘導することができる、安全で忍容性の高いワクチンであることが判明した。

【0011】

WO 2005/108423 A1は、特にaSyn、 β -シヌクレイン(bSyn)、または α -シヌクレイン(GSyn)に由来する環境ストレス耐性を与えるペプチドを開示している；これは、融合パートナータンパク質をもつ融合タンパク質に存在する場合、変性の減少および/またはこの融合パートナータンパク質の溶解度の増加をもたらす可能性がある。WO 2018/151821 A1は、神経変性疾患の診断、治療および予防に有用なaSynに対する抗体を開示している。これらの抗体は、天然のaSynまたは対立遺伝子変異体A53Tで免疫化することによって作成され、事前に形成された纖維(PFF)に優先的に結合するはずである。

10

20

30

40

50

WO 2005/013889 A2は、LB疾患(LBD)の治療または予防のために、またはLBDの治療または予防のためのモノクローナル抗体を提供するために有用な天然のaSynの断片を開示している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、ワクチンに基づいてシヌクレイノパチーを予防および治療するための薬剤を提供することである。ヒトへの使用に適したワクチン接種ペプチドを提供することがさらなる目的である。

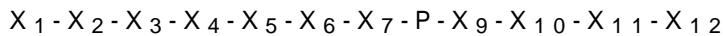
【課題を解決するための手段】

【0013】

さらに、本発明は、免疫原性に関して改善され、末梢においてより多量のaSyn特異的抗体を誘導し、脳においてより多量のaSyn特異的抗体を誘導する、改善された免疫原性ペプチドを提供し得る。さらに、オリゴクローナル抗体応答(延長エピトープ(prolonged epitope))により、誘導された抗体の標的結合を増加させることも望ましい。

【0014】

したがって、本発明は、構造：



を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる抗原ペプチドを提供する。

ここで、

Pは、プロリンであり；

X₁は、L、K、AまたはSであり、ここで、Lは、ロイシンであり、Kは、リシンであり、Aは、アラニンであり、Sは、セリンであり；

X₂は、EまたはSであり、ここで、Eは、グルタミン酸であり、Sは、前記と同意義であり；

X₃は、D、E、K、N、AまたはSであり、ここで、Nは、アスパラギンであり、Dは、アスパラギン酸であり、E、K、AおよびSは、前記と同意義であり；

X₄は、M、A、S、LまたはKであり、ここで、Mは、メチオニンであり、A、S、LおよびKは、前記と同意義であり；

X₅は、前記と同意義のPまたはAであり；

X₆は、V、AまたはSであり、ここで、Vは、バリンであり、AおよびSは、前記と同意義であり；

X₇は、前記と同意義のDまたはSであり；

X₉は、前記と同意義のDまたはAであり；

X₁₀は、N、SまたはAであり、ここで、N、SおよびAは、前記と同意義であり；

X₁₁は、E、AまたはSであり、ここで、E、AおよびSは、前記と同意義であり；

X₁₂は、存在または不在であり、存在する場合、A、K、V、S、またはGであり、ここで、Gは、グリシンであり、A、K、VおよびSは、前記と同意義であり；

ただし、X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂は、L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aではなく、アミノ酸配列：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aと比較して、1~5個のアミノ酸の差異を含み、ペプチドは、X₁₂の直後に、ジペプチド：Y-Eを含まず、ここで、Yは、チロシンであり、Eは、前記と同意義である。したがって、本明細書では一般に、1文字アミノ酸コードが使用される。

【0015】

抗原ペプチドは、アミノ酸配列：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aと比較して、1~5個のアミノ酸の差異(すなわち、1、2、3、4または5個の差異)、または1~4個のアミノ酸の差異を含み得る。差異は、一般的にアミノ酸の置換である(各位置に設定された選択肢により、X₁₂が削除される場合がある)。アミノ酸配列：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A(野生型 -シヌクレイン配列のアミノ酸113~124である)と1~3個のアミノ酸の差異、最も好ましくは2個のアミノ酸の差異があることが好ましい。これらの差異は、プロリン

10

20

30

40

50

であるX₈を除いて、アミノ酸X₁-X₁₂のいずれかから選択することができる。いくつかの実施形態では、抗原ペプチドは、アミノ酸配列：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aと比較して、X₁、X₃、X₄およびX₁₂から選択される1つまたは複数の位置にアミノ酸の差異を含む。好ましくは抗原ペプチドは、アミノ酸配列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aと比較して、X₁、X₃、X₄およびX₁₂から選択された位置に2つのアミノ酸の差異を含む。

【0016】

本発明の抗原ペプチドは、免疫原として使用された場合、aSyn特異的抗体を生成する能力を保持している。さらに、本発明の抗原ペプチドは、比較実験で示されるように、aSyn特異的抗体の生成に関して、対応する野生型aSynペプチド(12量体：L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A、p9524(配列番号4)を含む)よりも免疫原性が高い。これらはまた、p9524よりも免疫原性が低いことが示されている、aSynのC末端領域からの他のaSynペプチドよりも免疫原性が高い；以下の表1および2を参照(たとえば、p4456(配列番号:1)およびp4572(配列番号:2))。これらの特性は、本明細書の教示に従って、典型的には、本明細書に詳細に記載されたタイプのコンジュゲートの形態(たとえば、タンパク質担体としてのCRM197にコンジュゲートされたペプチド)でペプチドを試験することによって、当業者によって試験され得る。ペプチドは、適切な実験動物、特にマウスに投与され、投与後の適切な期間にサンプル(血液など)が採取される(具体的な詳細については実施例を参照)。aSyn抗体力価の決定は、本明細書に記載されているように、たとえば、ELISAによって行うことができる。

10

【0017】

本発明の抗原ペプチドは、典型的には、X₁₂の後にさらなる -シヌクレインアミノ酸残基を含まない。特にそれらは、X₁₂の直後のジペプチドY-Eを含まない。本明細書に記載されるように、アミノ酸Y₁₂₅およびE₁₂₆を含むペプチドは、コンピューターによる分析により、MHCIの異なる対立遺伝子変異体に高い親和性で結合し、したがって潜在的な細胞傷害性T細胞エピトープであると予測される(www.syfpeithi.de)。しかしながら、抗原ペプチドは、限られた数のさらなるN末端アミノ酸残基を含み得る。したがって、抗原ペプチドは、構造：

20

Xa-Xb-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂

を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。

ここで、

30

Xaは、存在または不在であり、存在する場合、Gであり、ここで、Gは、グリシンであり；

Xbは、Gであり、ここで、Gは、前記と同意義であり；および

X₁-X₁₂は、前記と同意義である。

【0018】

したがって、本発明の抗原ペプチドは、典型的には、長さが11~20アミノ酸、好ましくは長さが12~14アミノ酸(すなわち、長さが12、13または14アミノ酸)である。抗原ペプチドは、長さが12または14アミノ酸であることが特に好ましい。本発明の抗原ペプチドは、T細胞応答の不在下で抗体応答を引き起こす。したがって、本発明の抗原ペプチド自体は、典型的には、T細胞エピトープ、特に細胞傷害性T細胞エピトープを含まない。

40

【0019】

本明細書にさらに記載されるように、本発明の抗原ペプチドは、典型的には、担体にコンジュゲートされた免疫原性化合物の形態で使用される。結合プロセスを促進するために、本発明の抗原ペプチドは、結合部位として作用するアミノ酸をさらに含んでもよい。典型的には、このアミノ酸は、末端アミノ酸であり、好ましくはN末端に位置する。好ましい実施形態では、抗原ペプチドは、末端システイン残基、好ましくはN末端システイン残基をさらに含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、X₁は、L、S、またはKであり、X₂は、EまたはSであり、X₃は、S、D、E、A、KまたはNであり、X₄は、Mであり、X₁₀は、Nであり、および/ま

50

、Gは、グリシンであり、A、K、VおよびSは、前記と同意義であり；

ただし、X₁-E-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂は、L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aではない。

【0024】

本発明の化合物は、強力な抗aSyn抗体応答を誘導することができるペプチド(抗原ペプチド)を含み、誘導された抗体はヒトaSynと高い交差反応性を示すが、これらのペプチドは天然の配列(L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A)とは異なる配列を有する。天然の配列による応答よりも優れた免疫反応(すなわち、同じ天然構造を標的とする)が、本発明によるペプチドで達成され、非常に効果的で適切な抗体応答が、ワクチン接種された個体において誘導され得る。本発明による化合物でのワクチン接種により誘導された抗体は、高い選択性および特異性で病理学的ヒト脳組織中の凝集した毒性aSyn種およびレビー小体に結合する。

10

【0025】

aSynの非天然アミノ酸配列を有する免疫原性ペプチドが、bSynに対する交差反応性に関して改善されたaSynに対する特異的免疫反応を誘導するために提供されることが以前に実証された(WO 2009/103105 A1、WO 2011/020133 A1)。驚くべきことに、aSynに特異的な免疫反応を誘導することに加えて、免疫原性の増加を示し、WO 2009/103105 A1およびWO 2011/020133 A1に記載のペプチドよりも高い交差反応性を有する抗体を誘導することができる、非天然aSynアミノ酸配列を有する改良されたペプチドが生成されることが実証された(以下の実施例を参照)。

20

【0026】

本発明による好ましい免疫原性化合物は、本発明の好ましいペプチドを含み、ここで、X₁は、L、S、またはKであり、X₂は、EまたはSであり、X₃は、S、D、E、A、KまたはNであり、X₄は、Mであり、X₁₀は、Nであり、および/またはX₁₂は、A、S、KまたはVである。本発明による他の好ましい免疫原性化合物は、好ましいペプチドを含み、ここで、X₁はL、SまたはKであり、X₂はEであり、X₃はS、D、E、KまたはAであり、X₄はMであり、X₁₀はNであり、および/またはX₁₂はA、SまたはKである。別の好ましい実施形態は、本発明によるペプチドであり、ここで、X₁は、LまたはKであり、X₃は、D、KまたはSであり、X₁₂は、Aである。

【0027】

好ましい実施形態において、T細胞エピトープを含む担体は、リンカーを介して抗原ペプチドに結合される。したがって、リンカーに結合した本発明の抗原ペプチドも提供される。当業者には容易に理解されるように、任意の適切なリンカーを使用することができる。リンカーは、化学リンカーまたはペプチド(アミノ酸ベース)リンカーであり得る。リンカーは、適切な化学反応を介して抗原ペプチド抗原の担体への架橋を可能にする反応性官能基を含み得る。したがって、リンカーは、2つの反応基を含み得る。最初のものは、典型的には、反応性アミノ酸側鎖を介して、第一級アミン(リシン残基上など)との反応などにより、担体(タンパク質)に結合する。したがって、典型的には、アミド結合が形成される。2つ目は、再び典型的には、反応性アミノ酸側鎖を介して、スルフヒドリル基(システイン残基上など)を介して抗原ペプチドに結合する。したがって、典型的には、チオエーテル結合が形成される。したがって、好ましいリンカーは、ヘテロ二官能性リンカーであり、特にN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルなどのアミン反応基、およびマレイミドなどのスルフヒドリル反応基を含む。したがって、リンカーは、sGMBS(=スルホGMBS)-(マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル、GMBS-マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル、3-(プロモアセトアミド)プロピオン酸スクシンイミジル(SBAP)または6-(N-マレイミド)-n-ヘキサン酸スクシンイミジル(MHS)を含み得る。使用され得る他のリンカーとして、sEMCS(=スルホEMCS)-N-(マレイミドカプロイルオキシ)スルホスクシンイミドエステル、MBS-m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、sMBS(=スルホMBS)-(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシ)スルホスクシンイミドエステル、ヨード-アセトアミド-(PEG)2-マレ

30

40

50

イミド(=N-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)-3-(2-(2-ヨードアセトアミド)エトキシ)プロパンアミド)、およびヨード-アセトアミド-(PEG)-トリ(マレイミド)(=3,3'-((2-((3-((2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-2-(2-ヨードアセトアミド)プロパン-1,3-ジイル)ビス(オキシ))ビス(N-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)プロパンアミド))が挙げられる。リンカーは、担体(タンパク質)内に含まれる特定のアミノ酸残基またはその側鎖に抗原ペプチドを結合させることができる。このように、いくつかの実施形態では、担体(タンパク質)内に含まれるリシン残基に(一級アミン基を介して)抗原ペプチドを結合させる。ヒスチジン残基を介した結合も考えられる。抗原ペプチドは、リンカーを提供するため、または結合を容易にするために、 α -シヌクレインの10 アミノ酸配列に由来しない、残りのより大きなペプチド分子との関連で提供され得ることに留意すべきである。たとえば、ペプチドは、担体(タンパク質)への結合を容易にするために、ポリエングリコール(PEG)などのスペーサーを含むか、または含まない1つまたは複数のシステイン残基などの追加の残基を含むことができる。これらの追加の残基は、典型的には、抗原ペプチドのNおよび/またはC末端、好ましくは抗原ペプチドのN末端に見出される。この文脈において、「本質的にからなる」という用語は、本発明の抗原ペプチドが α -シヌクレイン配列に由来する11~20個、好ましくは12~14個の連続したアミノ酸(アミノ酸111-124または113-124、本明細書で定義される少なくとも1つ(および最大4つ)の変異を受ける)を含むが、PEGまたはアミノ酸ベースのスペーサーなどのスペーサーの有無にかかわらず、担体タンパク質への結合を容易にするための追加のシステイン残基などの限られた数の追加の残基を含むことができることを意味し得る。20

【0028】

本発明の好ましい実施形態によれば、免疫原性化合物のリンカー部分は、好ましくはポリペプチド担体部分に化学的リンカーで結合した、少なくとも1つのシステインおよび/またはグリシンアミノ酸残基を含む。本発明の(たとえば、12量体の)ペプチドのN末端にアミノ酸リンカーを提供することは、より大きな化合物を(担体として)カップリングするため、および強力な(より)免疫反応を誘導するために、多くの利点を提供する；しかしながら、そのようなリンカー、特にアミノ酸リンカーは、本発明にとって必須ではない。

【0029】

好ましいアミノ酸リンカーは、グリシンおよびシステイン(またはCG-、CGG-、CCG-、GC-、GGC-、GCC-、GG-、GGG-などのそれらの組み合わせ)ならびにイソロイシン、アラニン、バリン、ロイシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシン、アスパラギン、グルタミンなどである。アミノ酸リンカーはまた、2、3、4、または5アミノ酸残基など、1を超えるアミノ酸残基からなってもよい。特にアミノ酸リンカーが5アミノ酸残基よりも長い場合、および抗原ペプチドがペプチド結合を介して担体タンパク質に直接結合している場合は、安定性/折り畳み問題により、ペプチド(アミノ酸ベース)リンカー内の特定のアミノ酸残基を除外することが優先される。したがって、アミノ酸リンカー(または X_1 からN末端に伸びるアミノ酸配列)が5アミノ酸残基よりも長い場合、リンカーが、プロリン、アルギニン、またはヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸を(リンカーの)領域の X_1 に対するN末端内、すなわち、 X_1 に対してN末端であるアミノ酸から40 出発するアミノ酸リンカー分子の最初の5アミノ酸内に含まないことが好ましい。

【0030】

本発明における使用に好ましいペプチドリンカーは、T細胞エピトープを形成しないものである。これは、MHC リガンドおよびペプチドモチーフのSYFPEITHIデータベース(<http://www.syfpeithi.de/>)を参考にするなど、コンピューターによる方法を含む既知の方法を使用して評価することができる。

【0031】

あるいは、またはアミノ酸リンカーに加えて、担体は、好ましくはポリペプチド担体に加えて、化学結連結基(または化学連結プロセスから生じる化学成分)も含む。好ましい連結基は、ヘテロ二官能性化合物、たとえば、GMBSまたはスルホ-GMBSなどの化学リン50

カーを用いて得ることができる。当技術分野で知られ、使用されているすべての化学リンカー、特にヒト個体に投与される製品を製造するために使用されるものは、本発明のペプチドへの担体の結合を提供するために使用され得る。特に好ましい化学リンカーは、非ペプチド結合を介して本発明の抗原ペプチドおよび担体に結合する化学リンカーである。そのような非ペプチド結合連結は、その免疫原性、安定化および/または製造特性に関して特に有利である。好ましくはリンカー部分は、NHS-ポリ(エチレンオキシド)(PEO)(たとえば、NHS-PEO₄-マレイミド)または生化学技術で使用される他の化合物によって形成される。

【0032】

本発明による特に好ましい免疫原性化合物は、KESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、SESMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEA、LEAMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEK、LEDMPVDPDNEV、LEKMPVDPDNEK、LSDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LENMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEKおよびKEDMPVDPDNEA、好ましくは、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEAおよびLESMPVDPDNEA、特に、LEKMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEAおよびKEDMPVDPDNEAからなる群から選択される好ましいペプチドX₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂を含む。

【0033】

担体は、T細胞エピトープの供給源として機能し、したがって、典型的には、複数のT細胞エピトープを含む。T細胞エピトープは、好ましくはユニバーサル細胞エピトープである。「ユニバーサル」細胞エピトープとは、ヒト集団の大部分に存在するT細胞に特異的なエピトープを意味する。T細胞を活性化するT細胞エピトープの「ユニバーサルな」能力は、少なくとも2つの相補的な特性の結果である：i)結合の強さを意味する、HLA溝への結合の親和性、およびii)HLA分子の発現の違いに関して、非常に多様なヒト集団をカバーする能力を意味する、異なるHLAハプロタイプを無差別に結合する能力。ユニバーサルT細胞エピトープは、ヒト集団に存在するMHCクラスII対立遺伝子の大部分に結合することができる。したがって、担体のT細胞エピトープは、CD4 T細胞応答を刺激することができる可能性がある。したがって、担体のT細胞エピトープは、B細胞による(抗原ペプチド特異的な)抗体産生を増強するヘルパーT細胞応答を刺激することができる可能性がある。

【0034】

好ましい実施形態によれば、本発明による免疫原性化合物は、薬学的に許容されるポリペプチド担体分子、担体タンパク質を含む。担体タンパク質は、ジフテリア毒素(DT)およびその変異体、特にCRM197(交差反応物質197)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、破傷風トキソイド、易熱性エンテロトキシン(LT)、コレラ毒素(CT)、破傷風トキソイド(TT)、変異毒素、アルブミン結合タンパク質、ウシ血清アルブミン、および複数のT細胞エピトープを含む合成由来の融合ペプチド(たとえば、TetまたはPADRE)からなる群から選択され得る。使用することができるさらなる担体タンパク質には、シュードモナス外毒素A(EPA)、インフルエンザ菌タンパク質D(HiD)または髄膜炎菌外膜タンパク質コンジュゲート(OMPC)が含まれる。CRM197は特に好ましい担体タンパク質である。

【0035】

非ポリペプチド担体もまた、本発明の免疫原性化合物に含まれ得る。例としては、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)微粒子(PLG微粒子)、ポロキサマー粒子、ウイルス様粒子、およびデンドリマーなどが挙げられる。さらなる担体は、ナノ粒子またはリポソームを含み得る。

【0036】

本発明の免疫原性化合物および抗原ペプチドは、好ましくはヒト患者を治療するための治療および予防方法、特にシヌクレイノパチーの治療または予防において使用される。の

10

20

30

40

50

治療または予防に好ましいシヌクレイノパチーは、レビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB)、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(NBIAタイプI)である。

【0037】

本発明の別の態様によれば、本発明は、本発明による免疫原性化合物または抗原ペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤(互換的に担体と呼ばれることがある)を含む医薬製剤に関する。「賦形剤」という用語は、投与のための最終製剤中に存在する免疫原性化合物以外の任意の成分を包含する。医薬製剤は、シヌクレイノパチー、好ましくはレビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB)、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(NBIAタイプI)からなる群から選択されるシヌクレイノパチーの治療または予防におけるワクチンとして使用するためのものであることが好ましい。

10

【0038】

本発明による医薬製剤は、好ましくはワクチンとして製剤される。医薬製剤、好ましくはワクチンは、アジュバント、好ましくはMF59リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、サイトカイン(たとえば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サポニン(たとえば、QS21)、MDP誘導体、CpGオリゴ、IC31、LPS、モノホスホリルヘキサアシルリピドA、3-デアシル(合成)(3D-(6-アシル)PHAD(登録商標))、PHAD(登録商標)(リン酸化ヘキサアシル二糖)またはMPL)、などのMPLA誘導体を含むモノホスホリル脂質A((MPLA)、ポリホスファゼンおよび水酸化アルミニウム、またはそれらの混合物；特にアジュバントとして水酸化アルミニウムを含むものからなる群から選択されるアジュバントと共に製剤され得る。アジュバントの目的は、対象の免疫反応を増加または刺激することである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアジュバントは、担体の一部を形成する。本発明に従って使用することができる他のアジュバントには、アルミニウム含有アジュバント、特に水酸化アルミニウム(Alum)、とりわけレシキモド(R-848)などのイミダゾキノリンアミンおよび/またはCpG(メチル化されていないCpGモチーフを含む合成オリゴデオキシヌクレオチド(ODN))が含まれる。アジュバントは、Toll様受容体(TLR)アゴニストであり得る。

20

【0039】

典型的には、本発明による医薬製剤は、特にワクチンとして製剤される場合、本発明による免疫原性化合物(または任意に別の担体に結合された本発明のペプチド)を0.1ng~10mg、好ましくは10ng~1mg、特に1μg~500μg、または、代替として、たとえば、100fmol~10μmol、好ましくは10pmol~1μmol、特に1nmol~500nmolの量で含有する。いくつかの実施形態では、ペプチドの量は、100pmol~100nmolであり得る。本明細書において、量は、組成物のペプチド成分を示す。

30

【0040】

通常は、医薬製剤、特にワクチンは、賦形剤として、たとえば、緩衝剤、安定剤などの補助物質を含む場合がある。好ましくは、そのような補助物質、たとえば、水、緩衝剤および/または安定剤などの薬学的に許容される賦形剤は、1~99%(重量)、より好ましくは5~80%(重量)、特に10~70%(重量)の量で含まれる。好ましくは、本発明による医薬製剤は、リポソーム、ウイルス様体、イソコム、ココリエート、エマルジョンとして製剤される。

40

【0041】

本発明の抗原ペプチド、免疫原性化合物および医薬製剤は、任意の適切なスケジュールに従って投与され得る。それらは、プライムブーストワクチン接種戦略に従って投与される場合がある。プライムブーストワクチン接種戦略には、複数回の予防接種が含まれる。それらは、ワクチンの効果を高めることを目的とする。一般に、毎回同じワクチン組成物が投与される；いわゆる相同プライムブーストワクチン接種計画である。医薬製剤の初期プライミング段階のための可能な投与計画には、他のワクチンについて

50

すでに提案されている他の体制に加えて、2週間ごとから最大4か月；2～5回、特に3～4回の治療が含まれ、最初のプライミングワクチン投与(1～5か月で)、その後、3～12か月後、または数年後のブースターまたは維持ワクチン接種が望ましい

【0042】

絶対量では、少なくとも10 μ g、好ましくは少なくとも50 μ gの量の本発明の(抗原としての)ペプチドを使用することが好ましい。これに関連して、本発明で言及される「(抗原としての)ペプチド μ g」は、用量中の抗原ペプチドの量を意味し、ワクチンコンジュゲート(免疫原性化合物、存在する場合)の担体またはリンカー部分を含まないことに注意することが重要である。したがって、抗原の好ましい量は、少なくとも5nmol、好ましくは少なくとも25nmolである。

10

【0043】

好ましくは、免疫原性化合物または抗原ペプチドを含む医薬製剤は、非経口投与用に製剤される。特定の実施形態では、製剤は、皮下、皮内または筋肉内投与用に製剤される。静脈内投与を使用することもできる。

【0044】

本発明のワクチン接種戦略は、通常のワクチン接種戦略に従うことが好ましい。好ましい実施形態では、WO 2017/076873 A1による自己抗原のワクチン接種戦略、すなわち、患者において一次免疫反応を誘導し、その後、患者にブースターまたは維持投与を行う。

【0045】

好ましくは、ブースター/維持ワクチン接種は、全治療期間にわたって高い力価の抗体を得るために、一次免疫反応がすでに終了した時点で、すなわち、一次ワクチン接種で誘導された(一次免疫反応誘導の過程で、1回、2回、3回、4回、またはそれ以上のワクチン投与によって誘導された)抗体力価が特定のレベルを超えて(たとえば、多数のサンプルを試験するのに適したアッセイの所定の閾値レベルを超えて)低下した場合、または一次ワクチン接種の過程で存在する最大抗体レベルの少なくとも30%未満、好ましくは50%未満、特に80%未満になった場合に、投与される。このような高レベルを維持するために、初回(一次)免疫後、3～12か月ごとにブースター/維持注射を投与すると有益な場合がある。

20

【0046】

好ましくは、ブースター/維持投与のための用量における抗原の量は、少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも100%、特に少なくとも200%であり、一次免疫反応のための投与のための用量で使用される量よりも多い。特定の実施形態では、ブースター/維持投与のための用量における抗原の量は、少なくとも300%、好ましくは少なくとも400%、より好ましくは少なくとも500%、特に少なくとも600%であり、一次免疫反応のための投与のための用量で使用される量よりも多い。しかしながら、いくつかの実施形態では、毎回同じ組成物が投与される。したがって、いくつかの実施形態では、投与される抗原の量は、毎回同じである(製造公差内)。

30

【0047】

さらに好ましい実施形態によれば、ブースター/維持投与は、しばらくして、たとえば、1年、2年、3年、5年または10年後に繰り返される。好ましくは、2回目以降のブースター/維持は、1回目のブースター/維持投与と同じまたは同様の方法で、すなわち、初回接種より抗原量を増やすか、または同量の抗原を使用して、実施される。

40

【0048】

本発明による投与経路は、通常、現在のワクチン接種と同じ経路である。したがって、本発明による免疫原性化合物または抗原ペプチド、または医薬製剤の好ましい投与は、皮下、皮内または筋肉内などの非経口投与である。しかしながら、本発明の免疫原性化合物または抗原ペプチド、または医薬製剤は、任意の適切な投与経路によって対象に投与され得る。当業者が認識するように、そのような組成物(好ましくはワクチン組成物)は、局所、経口、直腸、経鼻または非経口(静脈内、皮内、皮下、または筋肉内など)経路によって

50

投与され得る。さらに、該組成物は、生分解性ポリマーなどの徐放性マトリックスに組み込むことができ、ポリマーは、送達が望まれる場所の近く、または極めて近くに移植される。しかしながら、好ましい実施形態では、組成物は、筋肉内または皮下に投与される。

【0049】

本発明の好ましい実施形態によれば、免疫原性化合物または抗原ペプチド、または医薬製剤は、好ましくはワクチンの形態で、アジュバント、好ましくはオキシ水酸化アルミニウムと共に投与される。この最も好ましい実施形態によれば、本発明は、欧州薬局方グレード(オキシ水酸化アルミニウム、モノグラフ1664)の使用に関し、より具体的には、EPコンプライアンスに対して試験されたBrenntag Biosectorによって製造された製品(2%アルヒドロゲル)に関する。アルヒドロゲルには、アルヒドロゲル1.3%、アルヒドロゲル2%、アルヒドロゲル"85"の3種類が利用可能である。アルヒドロゲル2%は、水酸化アルミニウムゲルの国際標準製剤として選ばれた。本発明による医薬製剤は、適切な緩衝液、好ましくは等張リン酸緩衝液(1mM~100mM)に、好ましくは1.0mg/ml以上の濃度のアルヒドロゲル(Al_2O_3 等価物として与えられる)中に無菌的に製剤される；この測定基準(Al_2O_3 等価物としてのAl)は、本発明に一般的に使用される；したがって、本出願で言及されるすべての用量および量は、オキシ水酸化アルミニウムに関する限り、(オキシ水酸化アルミニウム(アルヒドロゲル)の)等価物を意味し、さらにより好ましくは、1.5mg/ml以上の濃度のアルヒドロゲル(Al_2O_3 等価物として与えられる)、より好ましくは2.0mg/ml以上のアルヒドロゲル(Al_2O_3 等価物として与えられる)の濃度である。アルヒドロゲルのアルミニウム塩の量は、製造元が指定した強度に合わせて Al_2O_3 等価物として与えられる(すなわち、2%アルヒドロゲルは2% Al_2O_3 、すなわち、20mg/mLに相当する)。この濃度は、それぞれの分子量(20mg/mL Al_2O_3 (Mw 101,96)は10.6mg/mLアルミニウム(分子量26,98)に対応する)を使用して、それぞれのアルミニウム濃度に直接変換することができる。

【0050】

本発明の担体は、任意にリンカーを本発明の抗原ペプチド(X_1 から X_{12} を含む)と結合させるためのリンカーを有する、任意の適切で薬学的に許容される担体部分であってもよい。

【0051】

本発明の好ましい実施形態によれば、本発明の抗原ペプチド(12量体ペプチドであってもよい)は、少なくとも1つの薬学的に許容されるポリペプチド担体、好ましくはCRM197(交差反応性物質197)、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)(KLH)、破傷風トキソイド、アルブミン結合タンパク質、ウシ血清アルブミン、または複数のT細胞エпитープを含む合成由来の融合ペプチドに結合される。さらなる担体、または担体内の担体もしくはリンカー部分には、デンドリマー(MAP; Biol. Chem. 358: 581)、ペプチドリリンカー(またはフランキング領域)、ならびにSingh et al., Nat. Biotech. 17(1999)、1075-1081(特に、その文書の表1に記載のもの)、およびO'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9)(2003)、727-735(特に、それに記載されている内因性免疫増強化合物および送達システム)およびその他に記載されているアジュバント物質またはそれらの混合物が含まれる。この文脈における共役化学(たとえば、GMBSなどのヘテロ二官能性化合物、および当然のことながら「Bioconjugate Techniques」、Greg T. Hermansonに記載されている他のものによる)は、当業者に知られている反応から選択することができる。

【0052】

さらに、本発明による免疫原性化合物または抗原ペプチドを含むワクチン組成物は、アジュバント、好ましくは低溶解性アルミニウム組成物、特に水酸化アルミニウムと共に製剤され得る。当然のことながら、MF59、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、サイトカイン(たとえば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サポニン(たとえば、QS21)、MDP誘導体、CpGオリゴ、IC31、LPS、MPLA(MPLを含む)、ポリホスファゼン、エマルジョン(たとえば、フロイント、SAF)、リポソーム、ウィロソーム、イスコム、コクリエート

、PLG微粒子、ポロキサマー粒子、ウイルス様粒子、易熱性エンテロトキシン(LT)、コレラ毒素(CT)、ジフテリア毒素(DT)、破傷風トキソイド(TT)、変異毒素(たとえば、LT K63、LTR72)、微粒子、リポソームおよび/または重合リポソームなどのアジュバントも使用され得る。

【0053】

本発明のペプチドまたはポリペプチドは、好ましくは、NHS-ポリ(エチレンオキシド)(PEO)(たとえば、NHS-PEO₄-マレイミド)であるリンカーを介して担体またはアジュバントに結合される。代替物は上述の通りである。

【0054】

担体は、好ましくは、トキソイドタンパク質を含む。トキソイドタンパク質は、天然に存在するトキソイドタンパク質または医薬組成物で使用されるその組換え変異体であり得る。毒素は、たとえば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、UDP-ジアルデヒド、過酸化物質、酸素による処理、または突然変異(たとえば、組換え法を使用)によって不活化することができる。毒性が低下した変異ジフテリア毒素は、組換え法を使用して生成することもできる。

【0055】

DTは、ジフテリア毒素交差反応物質(DT-CRM)またはジフテリアトキソイドである。DT-CRMは、たとえば、突然変異または化学修飾によって、もはや十分なADP-リボシルを持たない突然変異ジフテリア毒素を示す。DT-CRMの非限定的な例には、DT-CRM30、DT-CRM45、DT-CRM176、DT-CRM197およびDT-CRM228が含まれる。ジフテリアトキソイドは、ホルムアルデヒド不活化ジフテリア毒素である。DTは、市販されているか、または組換えDNA技術などの当技術分野で知られている方法によって調製することができる。

【0056】

CRM197は、野生型ジフテリア毒素の免疫学的特性を保持する、ジフテリア毒素の非毒性変異体(すなわち、トキソイド)である。CRM197は、グルタミン酸からグリシンへの1つのアミノ酸置換を生じさせる構造遺伝子の1つの塩基において野生型ジフテリア毒素とは異なる。CRM197は通常、カザミノ酸と酵母エキスベースの培地で増殖させたコリネバクテリウム・ジフテリア株 C7(P1 97)の培養物から単離される。CRM197は、限外ろ過、硫酸アンモニウム沈殿、およびイオン交換クロマトグラフィーによって精製することができる。あるいは、CRM197を組換えにより調製することができる。CRM197は、Hibtiter™、Menveo(登録商標)、またはPrevnar(登録商標)などの複合糖質ワクチンの設計に使用されている。

【0057】

破傷風トキソイドは、破傷風菌(*Clostridium tetani*)による破傷風(または開口障害)に対する大規模な予防接種用に製造され、世界中で使用されている。破傷風トキソイドは、単独でも、ジフテリアおよび/または百日咳ワクチンと組み合わせても使用される。親タンパク質である破傷風毒素は、通常、破傷風菌の培養で得られる。破傷風毒素は、約150kDaのタンパク質であり、スルフィド結合で結合した2つのサブユニット(約100kDaと約50kDa)で構成される。毒素は、典型的には、ホルムアルデヒドで解毒され、硫酸アンモニウム沈殿、またはクロマトグラフィー技術などの既知の方法を使用して培養液から精製することができる。破傷風毒素はまた、組換え遺伝子手段によって不活性化され得る。破傷風トキソイドは、肺炎球菌結合型ワクチンを含む他のワクチンの担体タンパク質としても使用されている。混合担体もまた使用することができ、たとえば、CRM197と組み合わせた肺炎球菌結合型ワクチン、破傷風トキソイド担体と結合組み合わせた血清型3、ジフテリアトキソイドに結合した血清型3である。

【0058】

本発明のペプチドは、天然のヒトaSyn配列の変異体、すなわち、AFFITOPE(登録商標)またはVARIOTOPE(登録商標)である(元のネイティブaSyn配列と比較して配列変異を含むペプチドであるが、同様の(同じまたは改善された)免疫特性を示す、すなわち、ネ

10

20

30

40

50

イティブaSyn配列で得られる免疫反応と同等またはそれ以上の免疫反応を誘導することができるペプチドである)。同時に、AFFITOPE(登録商標)は、細胞傷害性応答、またはヘルパーT細胞応答を誘導しないように設計されており、第1は、免疫化ペプチドの直鎖状配列フラグメントを有するCD8⁺T細胞が到達可能な組織に対する細胞毒性攻撃を最初に回避し、後者は、ワクチンとは無関係に標的由来ペプチドへの応答を回避して、永久に更新され制御されない免疫反応を生成することを回避する。このAFFITOPE(登録商標)またはVARIOTOPE(登録商標)技術は、(i)自己タンパク質に対する耐性を壊す、(ii)天然の標的タンパク質エピトープと交差反応するワクチンのペプチド部分に対して高力価の抗体応答を生成すること、および(iii)自己免疫反応を誘導しないことを目的として設計されている。

10

【0059】

したがって、本発明の過程において、ペプチドの長さは、好ましくは12aa(X_1 から X_{12})に制限されている。本発明の抗原ペプチドは、典型的には11~20アミノ酸の長さ、好ましくは12~14アミノ酸の長さである。抗原ペプチドは、12または14アミノ酸の長さであることが特に好ましい。これらは、典型的には、天然のアルファシヌクレイン配列と比較して、1~4個、好ましくは2個または3個のアミノ酸変異を含む。しかしながら、アルファシヌクレイン配列に基づかない(または同一でない)アミノ酸の伸長は、特にペプチドのN末端で許容される場合があることに留意されたい。そのような追加のアミノ酸は、たとえば、リンカーの一部を形成し得る。ペプチドを担体などの他の分子部分に共有結合するリンカー(アミノ酸、またはペプチド、リンカーなど)が存在する場合がある。リンカーは、追加のアミノ酸、好ましくはグリシンなどの非荷電側鎖を有するアミノ酸を含んでもよい。リンカーは、ペプチドの免疫原性が著しく悪化しない限り、免疫原性ペプチドのすべての位置に結合することができる。たとえば、リンカーは、N末端またはC末端aa(X_1 または X_{12})を介して結合することができ、ペプチド内で結合することも可能である。しかしながら、本発明のペプチドが免疫原性組成物として適用される場合、本発明のペプチドをペプチド(X_1)のN末端を介して担体に連結することが好ましい。本発明のペプチドが、調製用部分(たとえば、抗体精製の過程における)または診断用プローブ(たとえば、ヒト検体中の抗体を検出するための)などの他の目的に使用される場合、リンカーおよび担体は、本発明のペプチドを表面、すなわち、固体表面に結合することを含めて、より多様であり得る。

20

30

【0060】

したがって、本発明のペプチドはまた、さまざまなアッセイおよびキット、特に免疫学的アッセイおよびキットで使用することができる。したがって、本発明のペプチドは、別のペプチドまたはポリペプチドの一部であることが特に好ましく、たとえば、それらは、免疫学的アッセイにおいてレポーターとして使用される酵素と融合または結合することができる。そのようなレポーター酵素には、たとえば、緑色蛍光タンパク質(GFP)などの蛍光部分、アルカリホスファターゼなどのホスファターゼ、またはホースラディッシュペルオキシダーゼなどのオキシダーゼ/レダクターゼが含まれる。

【0061】

特定の実施形態では、本発明は、構造：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12}

を有する抗原ペプチドに関し、

ここで、

Dは、アスパラギン酸であり、Eは、グルタミン酸であり、Pは、プロリンであり、Vは、バリンであり；

X_1 は、L、K、AまたはSであり、ここで、Lは、ロイシンであり、Kは、リシンであり、Aは、アラニンであり、Sは、セリンであり；

X_2 は、EまたはSであり、ここで、EおよびSは、前記と同意義であり；

X_3 は、D、E、K、N、AまたはSであり、ここで、Nは、アスパラギン酸であり、D、E、K、AおよびSは、前記と同意義であり；

40

50

X₄は、M、A、S、LまたはKであり、ここで、Mは、メチオニンであり、A、S、LおよびKは、前記と同意義であり；

X₁₀は、N、SまたはAであり、ここで、N、SおよびAは、前記と同意義であり；

X₁₂は、存在または不在であり、存在する場合、A、K、V、S、またはGであり、ここで、Gは、グリシンであり、A、K、VおよびSは、前記と同意義であり；

ただし、X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂は、L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aではない。

【0062】

疑問がある場合、「構造を有する」という用語は、与えられたアミノ酸残基(すなわち、抗原ペプチドのC末端などのさらなるアミノ酸残基を除く)「からなる」と理解されるべきである。ペプチドまたはその側鎖の遊離C末端(またはN末端)のアミド化、エステル化、ホルミル化、アセチル化、その他の化学置換などのマイナーな修飾は排除されないが、そのような修飾が存在しないことが好ましい。このような若干の修飾は、本明細書で使用される「本質的にからなる」という用語の範囲内にある。本発明によるこれらの11量体または12量体のペプチド((本発明の)(抗原)ペプチド；X₁からX₁₂など)は、シヌクレイノパシーの予防および/または治療のための意図された使用に適した組成物で、特に、好ましくは薬学的に許容される担体と組み合わせた医薬組成物で、提供することができる。そのような医薬組成物は、予防および/または治療効果を達成するのに有効な量で、それを必要とする患者に投与することができる。

10

【0063】

1つの実施形態では、本発明によるペプチドは、AEDMPVDPDNEA、LEAMPVDPDNEA、LEDAPVDPDNEA、LEDMAVDPDNEA、LEDMPADPDNEA、LEDMPVDPANE A、LEDMPVDPDNAA、SEDMPVDPDNEA、LSDMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、LEDSPVDPDNEA、LEDMPSPDPDNEA、LEDMPVSPDNEA、LEDMPVDPDSEA、LEDMPVDPDNSA、LEDMPVDPDNES、LEEMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEA、LENMPVDPDNEA、LEDKPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEV、LEDMPVDPDNEG、LEDMPVDPDNEK、LESMPVDPDNES、SESMPVDPDNEA、LESSPVDPDNEA、SEDM PVDPDNES、LEDSPVDPDNES、SEDSPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LEKMPV DPDNES、SEKMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEK、KESMPVDPDNEA、KESMPV DPDNEK、好ましくは、KEDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEA、LESMPVDPDNES、LEKMPVDPDNES、SEKMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEK、KESMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEKからなる群から選択される。

20

30

【0064】

好ましくは、本発明によるペプチドは、KESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNES、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、SESMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNES、LEAMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEK、LEDMPVDPDNEV、LEKMPVDPDNEK、LSDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LENMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEKおよびKEDMPVDPDNEA、好ましくは、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEAおよびLESMPVDPDNES、特に、LEKMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEAおよびKEDMPVDPDNEAからなる群から選択される。

40

【0065】

もう1つの態様によれば、本発明はまた、構造：

リンカー-X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂

を有する、アミノ酸リンカーをもつ抗原ペプチドに関し、

ここで、X₁、X₂、X₃、X₄、X₁₀、およびX₁₂は、前記と同意義であり、ここで、アミノ酸リンカーは、1~5個のアミノ酸残基を含む。

【0066】

好ましい実施形態によれば、本発明によるアミノ酸リンカーを有するペプチドは、リンカーを含み、ここで、リンカー中のアミノ酸残基は、グリシン、システイン、イソロイシ

50

ークロマトグラフィーによる単離を可能にする異種ポリペプチドに翻訳的に融合(共有結合)された融合ポリペプチドを作製することができる。代表的な異種ポリペプチドは、His-Tag(たとえば、His₆; 6ヒスチジン残基)、GST-Tag(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)などである。融合ポリペプチドは、ペプチドおよび化合物の精製を促進するだけでなく、精製中の分解を防ぐこともできる。精製後に異種ポリペプチドを除去することが望ましい場合、融合ポリペプチドは、たとえば、ペプチドミモトープと異種ポリペプチドの間の結合部に、切断部位を含むことができる。切断部位は、その部位のアミノ酸配列に特異的な酵素(たとえば、プロテアーゼ)で切断されるアミノ酸配列からなる。

【0071】

本発明の抗原ペプチド、本発明の免疫原性化合物、または本発明の医薬製剤は、治療に使用するためのものである(すなわち、薬剤として)。より具体的には、本発明は、シヌクレイノパチーの治療または予防に使用するための本発明の抗原ペプチド、本発明の免疫原性化合物、または本発明の医薬製剤を提供する。本発明はまた、本発明の抗原ペプチド、本発明の免疫原性化合物、または本発明の医薬製剤の、シヌクレイノパチーの治療または予防のための薬剤の製造のための使用を提供する。本発明はまた、本発明の抗原ペプチド、本発明の免疫原性化合物、または本発明の医薬製剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、シヌクレイノパチーの治療または予防方法を提供する。これらの態様のすべてによる特定の実施形態では、シヌクレイノパチーは、レビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB) 20、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(NBIAタイプI)からなる群から選択される。これらの態様によるいくつかの実施形態では、シヌクレイノパチー(または -シヌクレイノパチー)という用語は、 -シヌクレイン凝集体が検出され、原発性シヌクレイノパチーおよび付随する病状を含む疾患を説明するために使用される。原発性シヌクレイノパチーには、パーキンソン病(孤発性、 -シヌクレイン変異を伴う家族性、 -シヌクレイン以外の変異を伴う家族性、純粋自律神経不全およびレビー小体嚙下障害)、レビー小体病(LBD; レビー小体型認知症(DLB)を含む)(「純粋な」レビー小体型認知症)、パーキンソン病型認知症(PDD)、またはびまん性レビー小体病、多系統萎縮症(シャイ・ドレーガー症候群、線条体黒質変性症およびオリブ橋小脳萎縮症)が含まれる。さらに、a-syn病変は、次の疾患における付随する病状として検出することができる：孤発性アルツハイマー病、APP変異を伴う家族性アルツハイマー病、PS-1、PS-2 30またはその他の変異を伴う家族性アルツハイマー病、家族性英国型認知症、封入体筋炎、外傷性脳損傷、慢性外傷性脳症、ボクサー認知症、タウオパチー(ピック病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、17番染色体に関連するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症およびニーマンピックC1型疾患)、ダウン症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症(孤発性、家族性およびグアムのALS-認知症複合体)、神経軸索ジストロフィー、脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(ハレルフォルデン・シュバツツ症候群)、プリオン病、ゲルストマン・シュトラウスラー・シャインカー病、毛細血管拡張性運動失調症、メージュ症候群、亜急性硬化性全脳炎、ゴーシェ病、クラッペ病、ならびにその他のリソソーム蓄積障害(クフォル・ラケブ症候群およびサンフィリップ症候群を含む)、またはレム(REM)睡眠行動障害 40。

【0072】

これらすべての態様によれば、治療される対象は哺乳類対象であり、好ましくはヒトである。本発明の抗原ペプチド、本発明の免疫原性化合物または本発明の医薬製剤は、シヌクレイノパチーを治療または予防するのに有効な量で投与される。予防は、本発明のワクチン組成物を使用することが好ましい。予防には、疾患の発症および/または重症度を(投与しない場合と比較して)遅らせること、および疾患を完全に予防することが含まれる。治療には、疾患の1つまたは複数の症状を改善すること、疾患の進行を予防または遅延させること(投与しない場合と比較して)、および疾患の完全な治療が含まれる。適切な投与量および投与経路は本明細書に記載されており、バリエーションは臨床医によって経 50

験的に決定され得る。

【0073】

本発明は、以下の番号付きの項によってさらに定義され得る：

1. 構造：

担体-X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂を有する免疫原性化合物であって、ここで、担体は、X₁に共有結合したポリペプチド担体であり、好ましくは担体分子をペプチド：X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂

に共有結合するリンカー部分を含み；

Dは、アスパラギン酸であり、Eは、グルタミン酸であり、Pは、プロリンであり、Vは、バリンであり；

X₁は、L、K、AまたはSであり、ここで、Lは、ロイシンであり、Kは、リシンであり、Aは、アラニンであり、Sは、セリンであり；

X₂は、EまたはSであり、ここで、EおよびSは、前記と同意義であり；

X₃は、D、E、K、N、AまたはSであり、ここで、Nは、アスパラギン酸であり、D、E、K、AおよびSは、前記と同意義であり；

X₄は、M、A、S、LまたはKであり、ここで、Mは、メチオニンであり、A、S、LおよびKは、前記と同意義であり；

X₁₀は、N、SまたはAであり、ここで、N、SおよびAは、前記と同意義であり；

X₁₂は、存在または不在であり、存在する場合、A、K、V、SまたはGであり、ここで、Gは、グリシンであり、A、K、VおよびSは、前記と同意義であり；

ただし、X₁-E-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂は、L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aではない；免疫原性化合物。

【0074】

2. X₁が、L、SまたはKであり、X₂が、EまたはSであり、X₃が、S、D、E、A、KまたはNであり、X₄が、Mであり、X₁₀が、N、および/またはX₁₂が、A、S、KまたはVであり、好ましくはX₁が、LまたはKであり、X₂が、Eであり、X₃が、S、D、E、KまたはAであり、X₄が、Mであり、X₁₀が、Nであり、および/またはX₁₂が、A、SまたはKであり、特にX₁が、LまたはKであり、X₃が、D、KまたはSであり、X₁₂が、Aである、項1に記載の免疫原性化合物。

【0075】

3. リンカー部分が、好ましくはポリペプチド担体部分に化学的リンカーで結合した、少なくとも1つのシステインおよび/またはグリシンアミノ酸残基を含み、特にリンカー部分が、NHS-ポリ(エチレンオキシド)(PEO)によって(たとえば、NHS-PEO₄-マレイミドによって)形成される、項1または2に記載の免疫原性化合物。

【0076】

4. ペプチド：X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂が、KESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNES、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、SESMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNES、LEAMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEK、LEDMPVDPDNEV、LEKMPVDPDNEK、LSDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEA、LENMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEKおよびKEDMPVDPDNEA、好ましくは、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEAおよびLESMPVDPDNES、特に、LEKMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEAおよびKEDMPVDPDNEAからなる群から選択される、項1～3のいずれか1つに記載の免疫原性化合物。

【0077】

5. ペプチド：X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂が、KESMPVDPDNEAである、項1～4のいずれか1つに記載の免疫原性化合物。

【0078】

6. ポリペプチド担体部分が、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、破傷風トキソイド、易熱性エンテロトキシン(LT)、コレラ毒素(CT)、破傷風トキソイド(TT)、ジフ

10

20

30

40

50

テリア毒素(DT)およびその変異体、特にCRM197、破傷風トキソイド(TT)、変異毒素、アルブミン結合タンパク質、およびウシ血清アルブミンからなる群から選択される薬学的に許容される担体分子であるか、またはそれを含む、項1~5のいずれか1つに記載の免疫原性化合物。

【0079】

7. シヌクレイノパチーの治療または予防における使用のため、好ましくはレビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB)、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(NBIAタイプI)からなる群から選択されるシヌクレイノパチーの治療または予防における使用のための項1~6のいずれか1つに記載の免疫原性化合物。

10

【0080】

8. 好ましくは、シヌクレイノパチー、好ましくはレビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB)、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(NBIAタイプI)からなる群から選択されるシヌクレイノパチーの治療または予防におけるワクチンとしての使用のための、項1~7のいずれか1つに記載の化合物および薬学的に許容される担体を含む医薬製剤。

【0081】

9. 医薬製剤が、アジュバントと共に、好ましくはMF59リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、サイトカイン(たとえば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サポニン(たとえば、QS21)、MDP誘導体、CpGオリゴ、IC31、LPS、MPL、ポリホスファゼン、および水酸化アルミニウム、またはそれらの混合物からなる群から選択されるアジュバントと共に；特にアジュバントとして水酸化アルミニウムと共に、ワクチンとして製剤される、項8に記載の医薬製剤。

20

【0082】

10. 項1~10のいずれか1つに記載の化合物が、0.1ng~10mg、好ましくは10ng~1mg、特に100ng~100μgの量で含まれる、項8または9に記載の医薬製剤。

【0083】

11. 医薬製剤が、皮下、皮内または筋肉内投与用に製剤される；および/または医薬製剤が、リポソーム、ウイルス、イソコム、ココリエート、またはエマルジョンとして製剤される、項8~10のいずれか1つに記載の医薬製剤。

30

【0084】

12. 構造：

$X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ を有する抗原ペプチドであって、ここで、Dは、アスパラギン酸であり、Eは、グルタミン酸であり、Pは、プロリンであり、Vは、バリンであり；(C-)は、存在するか、または不在であるシステインであり； X_1 は、L、K、AまたはSであり、ここで、Lは、ロイシンであり、Kは、リシンであり、Aは、アラニンであり、Sは、セリンであり；

X_2 は、EまたはSであり、ここで、EおよびSは、前記と同意義であり；

X_3 は、D、E、K、N、AまたはSであり、ここで、Nは、アスパラギンであり、D、E、K、AおよびSは、前記と同意義であり；

40

X_4 は、M、A、S、LまたはKであり、ここで、Mは、メチオニンであり、A、S、LおよびKは、前記と同意義であり；

X_{10} は、N、SまたはAであり、ここで、N、SおよびAは、前記と同意義であり；

X_{12} は、存在または不在であり、存在する場合、A、K、V、SまたはGであり、ここで、Gは、グリシンであり、A、K、VおよびSは、前記と同意義であり；

ただし、 $X_1-E-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ は、L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-Aではない；

抗原ペプチド。

【0085】

50

13. KESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、SEEMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEA、LEAMPVDPDNEA、LEDMPVDPDNEK、LEDMPVDPDNEV、LEKMPVDPDNEK、LSDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEA、LENMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEKおよびKEDMPVDPDNEA、好ましくは、SEDMPVDPDNEA、LEEMPVDPDNEA、LESMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEA、KEDMPVDPDNEA、LEKMPVDPDNEAおよびLESMPVDPDNEA、特に、LEKMPVDPDNEA、KESMPVDPDNEAおよびKEDMPVDPDNEAからなる群から選択される、項12に記載のペプチド。

【0086】

14. 構造：

リンカー-X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂

を有する、アミノ酸リンカーをもつ抗原ペプチドであって、

ここで、X₁、X₂、X₃、X₄、X₁₀、およびX₁₂は、項13と同意義であり、ここで、アミノ酸リンカーは、1~5個のアミノ酸残基を含む、抗原ペプチド。

【0087】

15. リンカー中のアミノ酸残基が、グリシン、システイン、イソロイシン、アラニン、バリン、ロイシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシン、アスパラギン、グルタミンおよびそれらの組み合わせからなる群から選択され、好ましくは、ここで、リンカーが、C-、G-、CG-、CGG-、CCG-、GC-、GGC-、GCC-、GG-、およびGGG-からなる群から選択され；特に、アミノ酸リンカーを有するペプチドが、以下の群：GGKESMPVDPDNEA、GKESMPVDPDNEA、GGGKESMPVDPDNEA、CGGKESMPVDPDNEA、GCGKESMPVDPDNEA、GGCKESMPVDPDNEA、CCGKESMPVDPDNEA、CGCKESMPVDPDNEA、CCCKESMPVDPDNEA、CKESMPVDPDNEA、CGKESMPVDPDNEA、GCKESMPVDPDNEA、CKESMPVDPDNEA、GGKESMPVDPDNEK、GGKEDMPVDPDNEA、GGKESMPVDPDNEK、CLEMPVDPDNEA、CLEMPVDPDNEA、CSEDMPVDPDNEA、CLEEMPVDPDNEA、CSEEMPVDPDNEA、CLEDMPVDPDNEA、CLEAMPVDPDNEA、CLEDMPVDPDNEK、CLEDMPVDPDNEV、CGGKESMPVDPDNEA、CLEKMPVDPDNEK、CLSDMPVDPDNEA、CLEKMPVDPDNEA、CKEDMPVDPDNEA、CLENMPVDPDNEA、CGGKESMPVDPDNEK、およびCGGKEDMPVDPDNEA、特に、GGKESMPVDPDNEA、GKESMPVDPDNEA、GGGKESMPVDPDNEA、CGGKESMPVDPDNEA、GCGKESMPVDPDNEA、GGCKESMPVDPDNEA、CCGKESMPVDPDNEA、CGCKESMPVDPDNEA、CCCKESMPVDPDNEA、CKESMPVDPDNEA、CGKESMPVDPDNEA、GCKESMPVDPDNEA、およびCKESMPVDPDNEAから選択される、項14に記載のアミノ酸リンカーをもつ抗原ペプチド。

【0088】

16. リンカー部分またはアミノ酸リンカーが、プロリン、アルギニン、またはヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸を含まない、項1~7のいずれか1つに記載の免疫原性化合物、あるいは項14または15に記載のアミノ酸リンカーをもつペプチド。

【0089】

17. Yアミノ酸残基またはYEジペプチド鎖が、ペプチドのC末端に存在せず、ここで、Yが、チロシンであり、Eが、前記と同意義であり；好ましくは、

(a) X₁₂が存在し、さらなるアミノ酸残基はX₁₂のC末端に存在しない；または

(b) X₁₂が存在せず、さらなるアミノ酸残基はX₁₁のC末端には存在しない；

項16に記載の免疫原性化合物またはアミノ酸リンカーをもつペプチド。

【0090】

18. シヌクレイノパチーの治療または予防のための、好ましくはレビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB)、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプI(NBIAタイプI)からなる群から選択されるシヌクレイノパチーの治療または予防用薬剤の製造のための、項1~7、16および17のいずれか1つに記載の免疫原性化合物、または項1

10

20

30

40

50

2または13に記載の抗原ペプチド、または項14～17に記載のアミノ酸リンカーをもつペプチドの使用。

【0091】

19. シヌクレイノパチーの治療または予防、好ましくはレビー小体病(LBD)、特にパーキンソン病(PD)、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)およびレビー小体型認知症(DLB)、ならびに多系統萎縮症(MSA)または脳の鉄沈着を伴う神経変性タイプ1(NBIAタイプ1)からなる群から選択されるシヌクレイノパチーの治療または予防方法であって、有効量の項1～7、16および17のいずれか1つに記載の免疫原性化合物、または項12または13に記載の抗原ペプチド、または項14～17に記載のアミノ酸リンカーをもつペプチドが、そのような治療または予防を必要とするヒト個体に投与される、方法。

10

【0092】

本明細書で使用される略語：

aa アミノ酸

ab 抗体

aSyn -シヌクレイン

BSA ウシ血清アルブミン

bSyn -シヌクレイン

CNS 中枢神経系

DLB レビー小体型認知症

DHA ドコサヘキサエン酸(精製)

20

EC₅₀ 半数効果濃度

ELISA 酵素結合免疫吸着検査法

Fc フローセル

FELASA 実験動物学会連合

h 時間

HBS HEPES緩衝食塩水

HNE 4-ヒドロキシ-2-ノネナール

HPLC 高圧液体クロマトグラフィー

IC₅₀ 半数阻害濃度

IHC 免疫組織化学

30

IQR 四分位範囲

IR 免疫反応

kDa キロダルトン

KLH キーホールリンペットヘモシアニン

LB レビー小体

mAb モノクローナル抗体

MSA 多系統萎縮症

OD 光学密度

OD_{max/2} 半値光学密度

PD パーキンソン病

40

RT 室温

RU 反応単位

SAIT 特異的能動免疫療法

s.c. 皮下

SEM 標準誤差

SN 黒質

SPR 表面プラズモン共鳴

vs 対

wt 野生型

【0093】

50

本発明は、以下の実施例および図面によってさらに説明されるが、それらに限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】実験の図式的時間経過。注入は矢印で、採血は液滴形で表す。PP：処置前血漿、EP：最終血漿。Pn：血漿n。Wn：実験の第n週。

【図2】p4456とp4572によるか、または対応する長さの異なる天然のaSynエピトープによって誘導されたaSyn交差反応抗体の比較。(A)すべての個々のマウスの最終血漿から誘導されたaSynタンパク質に対する抗体濃度が示される。棒は、SEMを伴う平均値を表す。極端な異常値(IQR×3を超える)は、「グラフ(B)天然のaSyn配列のアミノ酸配列に沿った注入されたペプチドの相対位置」から削除されている。p9524は、AFFITOPE(登録商標)のさらなる開発の足場として使用され、灰色で強調表示されている。

【図3】単一アラニン(A)またはセリン(B)交換を有するaSyn配列 aa₁₁₃₋₁₂₄を有するペプチド(ペプチド-担体タンパク質コンジュゲートとして送達された)の免疫原性。100%として設定された、p9524のワクチン接種によって誘導された抗aSyn抗体の濃度に関連して、個々の免疫化マウスに由来する最終血漿中の抗aSyn抗体のグループ中央値濃度が決定され、設定された。注入されたペプチドの配列を表3および表4に示す。

【図4】1位または3位(A)および4位または12位(B)での単一アミノ酸交換を有するaSyn配列 aa₁₁₃₋₁₂₄を有するペプチド(ペプチド-担体タンパク質コンジュゲートとして送達された)の免疫原性。100%として設定された、p9524のワクチン接種によって誘導された抗aSyn抗体の濃度に関連して、個々の免疫化マウスに由来する最終血漿中の抗aSyn抗体のグループ中央値濃度が決定され、設定された。注入されたペプチドの配列を表7および表8に示す。

【図5】ダブルセリンおよびその他のアミノ酸交換を有するaSyn配列 aa₁₁₃₋₁₂₄を有するペプチドの免疫原性。100%として設定された、p9524のワクチン接種によって誘導された抗aSyn抗体の濃度に関連して、個々の免疫化マウスに由来する最終血漿中の抗aSyn抗体のグループ中央値濃度が決定され、設定された。注入されたペプチドの配列を表11に示す。

【図6】aSyn配列 aa₁₁₃₋₁₂₄およびN末端延長配列によって誘導されたaSynに対する免疫原性。100%として設定された、p10074のワクチン接種によって誘導された抗aSyn抗体の濃度に関連して、個々の免疫化マウスに由来する最終血漿中の抗aSyn抗体のグループ中央値濃度が決定され、設定された。注入されたペプチドの配列を表13に示す。

【図7】aSyn配列 aa₁₁₃₋₁₂₄、N末端延長配列によって、およびaSyn配列₁₁₅₋₁₂₁ p4456によって誘導されたaSynに対する免疫原性。100%として設定された、p4456のワクチン接種によって誘導された抗aSyn抗体の濃度に関連して、個々の免疫化マウスに由来する最終血漿中の抗aSyn抗体のグループ中央値濃度が決定され、設定された。注入されたペプチドの配列を表13に示す。

【図8】Syn標的配列p10033およびp10118ならびにそのC末端トランケート配列の免疫原性。(A)100%として設定された、p10033のワクチン接種によって誘導された抗aSyn抗体の濃度に関連して、個々の免疫化マウスに由来する最終血漿中の抗aSyn抗体のグループ中央値濃度が決定され、設定された。(B)100%として設定された、p10118のワクチン接種によって誘導された抗aSyn抗体の濃度に関連して、個々の免疫化マウスに由来する最終血漿中の抗aSyn抗体のグループ中央値濃度が決定され、設定された。注入されたペプチドの配列を表16に示す。

【図9】AFFITOPE(登録商標)候補-誘導抗体による死後ヒトDLB脳のIHC染色。各パネルで使用される抗体は、それぞれのパネルの最上部に示されるペプチドによって誘導される。下線を引いた文字は、天然の配列とは異なるアミノ酸を示す。サイズバーは、メインの写真では50 μM、右下隅の小さなボックスでは10 μMを示し、単一のレビー小体(LB)に焦点を当てる。

【図10】オリゴマータイプで毒性のあるaSyn種対モノマータイプとの優先的な結合(B

10

20

30

40

50

iaCoreデータ)。AFFITOPE(登録商標)候補-誘導抗体およびモノクローナル抗体LB509および28A7のオリゴマー(赤の曲線)またはモノマーaSyn(緑の曲線)種への安定結合のセンソグラム。青い線はネガティブコントロール(HBS緩衝液のみに結合を表す。X軸：実行時間(秒)、y軸：相対的結合反応単位。

【図11】AFFITOPE(登録商標)候補-特異的抗体のaSynモノマー、オリゴマー、および線維への結合の濃度依存的阻害を示す競合ELISA。AFFITOPE(登録商標)候補-免疫化マウスからの精製抗体を、増加する量の異なるaSyn種と共にプレインキュベートし、次に、プレートに結合したaSynオリゴマーへの結合を試験した。モノマーaSynによる結合の阻害は赤い曲線で、繊維状aSynによる阻害は青い曲線で、オリゴマーによる阻害は緑の曲線で示される。X軸：aSyn種濃度の十進対数(ng/ml)、y軸：各aSyn種および濃度で測定されたOD405値。

10

【実施例】

【0095】

Syn-AFFITOPE(登録商標)の同定

さまざまなaSyn凝集体の潜在的な毒性を考えると、シヌクレイノパチーの治療アプローチには、細胞内および細胞外のaSynのレベルまたは蓄積を減少させることが含まれる可能性がある。オリゴマーaSynは細胞間空間に分泌される傾向があり、1つの影響を受けたニューロンまたはオリゴデンドロサイトから隣接するニューロンまたは(たとえば、MSAの場合)神経膠細胞にプリオンのように移動することができるという事実(Lee et al., 2008, Lashuel et al., 2013, Bengoa-Vergniory et al., 2017, Bernis et al., 2015)は、aSyn伝達を長期的に標的とする、AFFIRIS特異的活性免疫療法(specific active immunotherapy)(SAIT)などの治療アプローチへの道を開く。AFFITOPE(登録商標)PD01およびPD03[aSynの明確な領域を模倣する短い合成ペプチド]は、PDにおいて[PD01A(NCT01568099; Volc et al., 2020)およびPD03A(NCT02267434)]、および多系統萎縮症(MSA)患者において[PD01およびPD03](NCT02270489)の臨床第I相試験でSAIT用の化合物として試験されている。これらの薬剤は耐容性が高く、オリゴマーaSynを優先するaSyn特異的抗体を誘導することが示された。

20

【0096】

本発明の過程で、PD01およびPD03でそれぞれ見られるよりも高い力価およびaSynタンパク質に対する交差反応性を誘導する第2世代のaSynを標的とするAFFITOPE(登録商標)が開発された。さらに、選択の焦点は、誘導された抗体が凝集した毒性のあるaSyn種(オリゴマーaSyn)とモノマーaSynタンパク質を区別する能力にもあった。このように、AFFITOPE(登録商標)によって誘導された抗体が、末梢で過剰に存在するモノマーaSyn種に結合する程度は小さいと考えられているが、CNSおよび末梢で、毒性のあるオリゴマーおよび少量しか存在しないaSyn種への結合が起こるのが好ましい。

30

【0097】

非常に潜在的なAFFITOPE(登録商標)を同定するために、aSynエピトープaa₁₁₃₋₁₂₄がターゲットにされた。高い免疫原性、aSyn天然エピトープに対する高い交差反応性、およびオリゴマーおよび線維性毒性aSyn種に対する高い選択性を備えた誘導抗体の結合(オリゴマー結合>線維性結合)など、明確に定義された選択基準が適用された。

40

【0098】

選択戦略は、いくつかのステップで構成された：(i)免疫原性が高く適切なエピトープを同定するための、aSyn標的タンパク質のC末端内でのエピトープ発見、(ii)免疫原性および交差反応性を高めるために交換可能な天然の標的配列に沿った位置を検出するためのアラニンスキャン、(iii)免疫原性と交差反応性を高めるために交換されうる天然の標的配列に沿った位置を検出するためのセリンスキャン、(iv)天然の標的配列に沿った二重セリン交換、(v)aSynに対する免疫原性および交差反応性を改善することができるAlaまたはSer以外のアミノ酸交換、および(vi)2つの選択されたAFFITOPE(登録商標)配列からのC末端の1つのアミノ酸の除去。

【0099】

50

すべてのインビボ実験の免疫化スケジュール

本明細書に記載されているBALB/cを用いたすべての実験では、マウスにAFFITOPE(登録商標)または天然のaSynエピトープ配列(1回の注射で正味ペプチド 10 μg)を隔週間隔で3回注射した(図1)。

【0100】

aSyn標的タンパク質のC末端内のエピトープ発見(aSyn-28インビボ実験)

aSynタンパク質のC末端領域に沿った免疫原性の高い配列のエピトープスクリーニングが行われている。この目的のために、7~13アミノ酸の間で変化する異なる長さのアミノ酸ストレッチが、wt BALB/cマウスの免疫原性研究に使用された(表1、図1)。並行して、AFFiRiS p4456とp4572によって以前に選択されたAFFITOPE(登録商標)が比較のために含まれた。3回目の免疫の2週間後にすべての個々の動物から血漿を採取し、続いて注射したペプチドおよびaSynタンパク質に対する力価ならびにaSyn反応抗体の濃度を決定するためにELISAによって分析した。aSyn aa₁₁₃₋₁₂₄配列に対応するペプチドp9524は、最高量のaSyn特異的抗体を誘導した(図2、表2)。これらの発見に基づいて、この配列は、さらなるAFFITOPE(登録商標)候補選択のための天然の標的配列として選択された。高い抗aSyn力価も誘導する他の2つのペプチドp9964およびp9556は、さらなる開発から除外された。ペプチドp9964はアミノ酸Y₁₂₅とE₁₂₆を含み、p9964由来のペプチド断片はコンピューターによる分析により、MHC Iの異なる対立遺伝子バリエーションに高い親和性で結合し、潜在的な細胞傷害性T細胞エピトープであると予測される(www.syfpeithi.de)。ペプチドp9556は、病理学に関連する可能性のあるカルパイン切断部位aSynL₁₁₃/E₁₁₄をカバーしていないため、さらなる開発には選択されなかった。表2は、AFFITOPE(登録商標)誘導マウス血漿で見出だされるaSynに対する力価をまとめたものである。

10

20

【0101】

表1：実験aSyn-28の設定。医薬品、医薬品のペプチドの配列と対応する配列番号を表に示す。

【表1】

配列番号	グループ	医薬品	配列	追加情報
1	1	p4456-CRM197 水酸化アルミニウム	C-DQPVLDP	aSyn115-121 (M → Q, D → L)
2	2	p4572-CRM197 水酸化アルミニウム	C-YDRPVQPDR	aSyn114-122 (E → Y, M → R, D → Q, N → R)
3	3	p9964-CRM197- 水酸化アルミニウム	C-EDMPVDPDNEAYE	aSyn114-126
4	4	p9524-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEA	aSyn113-124
5	5	p9556-CRM197 水酸化アルミニウム	C-DMPVDPDNEA	aSyn115-124
6	6	p9557-CRM197 水酸化アルミニウム	C-EDMPVDPDNE	aSyn114-123
7	7	p9663-CRM197 水酸化アルミニウム	C-VDPDNEAYE	aSyn118-126

30

40

【0102】

表2：aSyn-28、力価、誘導された抗体濃度、および交差反応性を含む主要な結果。すべてのパラメータは1匹のマウスで評価され、値は中央値を示す。免疫したマウスの血漿中の抗aSyn抗体の濃度は、mAb LB509で生成された参照曲線から外挿された。

【表 2】

配列番号	グループ	注入されたペプチドに対する力価	aSyn に対する力価	aSyn に対する抗体濃度 [µg/ml]
1	1	98101	22951	97.0
2	2	114544	12449	49.5
3	3	62282	88308	375.1
4	4	90418	91136	420.9
5	5	78491	90089	376.9
6	6	33753	29295	117.5
7	7	93592	30084	129.7

10

【0103】

aSyn₁₁₃₋₁₂₄ エピトープに沿ったアラニンスキャン(aSyn-30)およびセリン-スキャン(aSyn-31)

20

次のステップとして、天然のaSyn₁₁₃₋₁₂₄配列の各アミノ酸位置を、免疫原性を維持または増強するための置換可能な位置を同定するために、アラニンまたはセリンのいずれかによって交換した(表3および4)。BALB/cマウスにそれぞれAFFITOPE(登録商標)を3回注射し、3回目で最後の注射の2週間後に、個々のマウスの血漿を採取し、AFFITOP E(登録商標)誘導性力価とaSyn抗体濃度を決定するためにELISAで分析した。アラニンスキャンにより、aSyn_{113-124aa}(p9524)配列に沿った1位のLeu(p9988)と3位のAsp(p9990)は必須ではなく、逆に、それらをAlaに交換するとaSynへの交差反応性が高くなることが明らかになった(図3A)。セリンスキャン、すなわち、aSyn₁₁₃₋₁₂₄配列に沿った天然に存在する各アミノ酸のセリンとの交換(図3B)は、1位(p9999)、2位(p10000)、3位(p10001)、および12位(p10010)でのセリンへのアミノ酸交換によ

30

【0104】

表3：実験aSyn-30の設定。異なる治療グループ、用途におけるそれぞれの医薬品、医薬品のペプチドの配列、および対応する配列番号を表に示す。

40

50

【表 3】

配列番号	グループ	医薬品	配列
4	1	p9524-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEA
8	2	p9988-CRM197 水酸化アルミニウム	C-AEDMPVDPDNEA
9	3	p9989-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LADMPVDPDNEA
10	4	p9990-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEAMPVDPDNEA
11	5	p9991-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDAPVDPDNEA
12	6	p9992-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMAVDPDNEA
13	7	p9993-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPADPDNEA
14	8	p9994-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVAPDNEA
15	9	p9995-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDADNEA
16	10	p9996-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPANEA
17	11	p9997-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDAEA
18	12	p9998-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEA

10

【0105】

表4：実験aSyn-31の設定。異なる治療グループ、用途におけるそれぞれの医薬品、医薬品のペプチドの配列、および対応する配列番号を表に示す。

20

【表 4】

配列番号	グループ	医薬品	配列
4	1	p9524-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEA
19	2	p9999-CRM197 水酸化アルミニウム	C-SEDMPVDPDNEA
20	3	p10000-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LSDMPVDPDNEA
21	4	p10001-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LESMPVDPDNEA
22	5	p10002-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDSPVDPDNEA
23	6	p10003-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMSVDPDNEA
24	7	p10004-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPSPDNEA
25	8	p10005-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVSPDNEA
26	9	p10006-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVSDNEA
27	10	p10007-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVSPSNEA
28	11	p10008-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDSEA
29	12	p10009-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNSA
30	13	p10010-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNES

30

40

【0106】

表5：aSyn-30、主な結果。aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値は、p9524で得られた中央値に対する中央値を表す。

50

【表 5】

配列番号	グループ	p9524 に対する力価 (%)
4	1	100.0
8	2	391.8
9	3	56.2
10	4	581.0
11	5	170.0
12	6	215.5
13	7	117.0
14	8	63.9
15	9	50.1
16	10	127.7
17	11	90.4
18	12	114.4

10

20

【0107】

表6：aSyn-31、主な結果。aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値は、p9524で得られた中央値に対する中央値を表す。

【表 6】

配列番号	グループ	p9524 に対する力価 (%)
4	1	100.0
19	2	699.1
20	3	300.5
21	4	1161.7
22	5	105.0
23	6	19.5
24	7	183.9
25	8	115.2
26	9	21.2
27	10	49.7
28	11	124.6
29	12	107.3
30	13	251.3

30

40

【0108】

50

aSyn aa₁₁₃₋₁₂₄ エピトープ配列に沿った1位、3位、4位、および12位のアミノ酸交換 (インビボ実験aSyn-32およびaSyn-33)

1位のLeu、3位のAsp、4位のMet、12位のAlaを天然のaSyn₁₁₃₋₁₂₄配列のAlaおよび/またはSerに交換すると、高いaSyn特異的抗体濃度が誘導されるため(図3)、これらの位置は、AFFITOPES(登録商標)の設計につながる修飾の有望な候補である。次のステップとして、これらの位置を、免疫原性およびaSyn交差反応性に関して好ましい交換またはあまり好ましくない交換を定義するために、異なる特性を有するアミノ酸(たとえば、異なる電荷を有するアミノ酸または異なる極性を有するアミノ酸)によって交換した(表7および8)。比較のために、天然のaSyn₁₁₃₋₁₂₄(p9524)を注射したグループを含めた。免疫化マウスの血漿をELISAで分析し、aSynに対する天然の配列で誘発された力価と比較した抗体力価を測定した(図4A、B)。1位と3位の両方でLysに交換すると、より多量のaSyn特異的抗体(p10029とp10033)が誘導されたが、Trpに交換すると、aSyn特異的抗体(p10026とp10031)産生が劇的に減少した(図4A)。さらに、3位でのAspからGluへの交換により、天然のaSyn配列と比較して、aSynに対する交差反応性が高くなった(図4A)。4位のMetと12位のAlaは、実験aSyn-33の1位と3位について示したように、実験aSyn-33(表8)と同様の戦略で交換された。ここでも、12位でのLysまたはValへの交換(p10045またはp10042)は、より高い抗aSyn抗体力価をもたらしたが、4位または12位でのTrpへの交換は、aSynに対する交差反応性を低下させた(図4B)。表9および10は、免疫化マウスの血漿中に存在するaSynに対するWT配列によって誘導された力価に対する誘導力価をまとめたものである。

10

20

【0109】

表7：実験aSyn-32の設定。異なる治療グループ、用途におけるそれぞれの医薬品、医薬品のペプチドの配列、および対応する配列番号を表に示す。

【表7】

配列番号	グループ	医薬品	配列
4	1	p9524-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEA
31	2	p10026-CRM197 水酸化アルミニウム	C-WEDMPVDPDNEA
32	3	p10027-CRM197 水酸化アルミニウム	C-IEDMPVDPDNEA
33	4	p10028-CRM197 水酸化アルミニウム	C-NEDMPVDPDNEA
34	5	p10029-CRM197 水酸化アルミニウム	C-KEDMPVDPDNEA
35	6	p10030-CRM197 水酸化アルミニウム	C-DEDMPVDPDNEA
36	7	p10031-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEWMPVDPDNEA
37	8	p10032-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEEMPVDPDNEA
38	9	p10033-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEKMPVDPDNEA
39	10	p10034-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LELMPVDPDNEA
40	11	p10035-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LENMPVDPDNEA

30

40

【0110】

表8：実験aSyn-33の設定。異なる治療グループ、用途におけるそれぞれの医薬品、医薬品のペプチドの配列、および対応する配列番号を表に示す。

【表 8】

配列番号	グループ	医薬品	配列
4	1	p9524-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEA
41	2	p10036-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDWPVDPDNEA
42	3	p10037-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDLPVDPDNEA
43	4	p10038-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDNPVDPDNEA
44	5	p10039-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDDPVDPDNEA
45	6	p10040-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDKPVDPDNEA
46	7	p10041-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEW
47	8	p10042-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEV
48	9	p10043-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEG
49	10	p10044-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEB
50	11	p10045-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEK

10

【0111】

表9：aSyn-32、主な結果。aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値はp9524で得られた中央値に対する中央値を表す。

20

【表 9】

配列番号	グループ	p9524 に対する力価 (%)
4	1	100.0
31	2	41.9
32	3	57.7
33	4	42.5
34	5	128.9
35	6	33.1
36	7	30.9
37	8	338.4
38	9	137.2
39	10	41.4
40	11	128.2

30

40

【0112】

表10：aSyn-33、主な結果。aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値は、p9524で得られた中央値に対する中央値を表す。

50

【表 1 0】

配列番号	グループ	p9524 に対する力価 (%)
4	1	100.0
41	2	13.6
42	3	84.6
43	4	41.5
44	5	15.2
45	6	160.8
46	7	22.2
47	8	225.5
48	9	129.5
49	10	42.2
50	11	270.8

10

【0 1 1 3】

aSyn_{aa113-124} エピトープ配列に沿った二重セリン交換(インピボ実験aSyn-37)

20

aSyn₁₁₃₋₁₂₄天然配列に沿ってセリン交換を追加したVARIOTOPES(登録商標)(p9524)を設計し、wtBALB/cマウスで免疫原性を試験した(表11、図5)。3回目で最後の注射の2週間後に、個々のマウスの血漿を採取し、AFFITOPE(登録商標)誘導力価とaSyn抗体濃度を決定するためにELISAで分析した。天然のaSyn配列は、直接比較の目的で注射された(グループ1)。3位と12位(p10074)、および1位と3位(p10075)での二重Ser交換は、天然の標的配列と比較して、aSyn特異的抗体の力価をさらに高めることができた(図5)。1位と4位、および4位と12位での二重セリン交換は、aSynに対する免疫原性を増加させなかった(図5)。表12は、免疫化マウスの血漿中に存在するaSynに対するWT配列によって誘導された力価に対する誘導された力価をまとめたものである。

【0 1 1 4】

30

表11：実験aSyn-37の設定。異なる治療グループ、用途におけるそれぞれの医薬品、医薬品のペプチドの配列、および対応する配列番号を表に示す。

【表 1 1】

配列番号	グループ	医薬品	配列
4	1	p9524-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDMPVDPDNEA
51	2	p10074-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LESMPVDPDNES
52	3	p10075-CRM197 水酸化アルミニウム	C-SESMPVDPDNEA
53	4	p10076-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LESSPVDPDNEA
54	5	p10077-CRM197 水酸化アルミニウム	C-SEDMPVDPDNES
55	6	p10078-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEDSPVDPDNES
56	7	p10079-CRM197 水酸化アルミニウム	C-SEDSPVDPDNEA

40

【0 1 1 5】

表12：aSyn-37、主な結果。aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値は、p9524で得られた中央値に対する中央値を表す。

50

【表 1 2】

配列番号	グループ	p9524 に対する力価 (%)
4	1	100.0
51	2	622.3
52	3	397.0
53	4	145.9
54	5	188.8
55	6	110.5
56	7	101.3

10

【0 1 1 6】

aSyn aa₁₁₃₋₁₂₄ エピトープ配列に沿った1位、3位、および12位でのSerおよびLysとのアミノ酸交換(インビボ実験aSyn-44)

天然のaSyn₁₁₃₋₁₂₄配列の1位、3位、および12位でのSerおよびLysへの交換は、高濃度の抗aSyn抗体を誘導するのに有利であることが示されている(図3B、4および5)。本明細書に提示された免疫原性研究では、aSyn₁₁₃₋₁₂₄エピトープに沿ったセリンおよびリシン交換の組み合わせが、wtBALB/cマウスで試験された(aSyn-44実験、表13)。また、リンカーアミノ酸は別のペプチドに付加されている。並行して、以前に選択されたAFFITOPE(登録商標)の候補p4456が直接比較のためにこの実験に包含された。3回目で最後の注射の2週間後に、個々のマウスの血漿を採取し、AFFITOPE(登録商標)誘導力価とaSyn抗体濃度を決定するためにELISAで分析した。グループ2~7で試験されたAFFITOPE(登録商標)候補は、図5に示されている非常に成功したAFFITOPE(登録商標)p10074と比較して、より高い力価の抗aSyn抗体を誘導することができた(図6)。特に、AFFITOPE(登録商標)p10118は、aSynに対して最高の力価を誘導することが明らかになった。表14は、免疫化マウスの血漿中に存在するaSynに対するp10074によって誘導された力価に対する誘導力価をまとめたものである。

20

【0 1 1 7】

新たに選択されたAFFITOPE(登録商標)配列(グループ2~7)の免疫原性をAFFiRiSで以前に選択されたペプチドp4456と直接比較するために、これらのAFFITOPE(登録商標)候補によって誘導される抗aSyn抗体のグループ中央値濃度は、p4456によって誘発されるグループ中央値抗aSyn抗体濃度に関連して設定された(図7)。試験したすべての新しいAFFITOPE(登録商標)候補は、p4456と比較して有意に高いaSyn 特異的力価を誘導した(図7)。表15は、免疫化マウスの血漿中に存在するaSynに対するAFFITOPE(登録商標)配列p4456によって誘導された力価に対する誘導力価をまとめたものである。

30

【0 1 1 8】

表13：実験aSyn-44の設定。異なる治療グループ、用途におけるそれぞれの医薬品、医薬品のペプチドの配列、および対応する配列番号を表に示す。

40

50

【表 1 3】

配列番号	グループ	医薬品	配列
51	1	p10074-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LESMPVDPDNES
57	2	p10114-CRM197 水酸化アルミニウム	CGG-KEDMPVDPDNEA
58	3	p10115-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEKMPVDPDNES
59	4	p10116-CRM197 水酸化アルミニウム	C-SEKMPVDPDNEA
60	5	p10117-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEKMPVDPDNEK
61	6	p10118-CRM197 水酸化アルミニウム	CGG-KESMPVDPDNEA
62	7	p10119-CRM197 水酸化アルミニウム	CGG-KESMPVDPDNEK
1	8	p4456-CRM197 水酸化アルミニウム	C-DQPVLDP

10

【0 1 1 9】

表14：aSyn-44、主な結果。aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値は、100%に設定されたp10074中央値に対する中央値を表す。

【表 1 4】

配列番号	グループ	p10074 に対する力価 (%)
51	1	100.0
57	2	160.1
58	3	141.6
59	4	143.4
60	5	258.2
61	6	295.1
62	7	205.5

20

30

【0 1 2 0】

表15：aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値は、100%に設定されたp10074中央値に対する中央値を表す。

【表 1 5】

配列番号	グループ	p4456 に対する力価 (%)
1	8	100.0
57	2	432.5
58	3	382.5
59	4	387.3
60	5	697.5
61	6	797.1
62	7	555.2

40

【0 1 2 1】

選択した2つのAFFITOPE(登録商標)配列p10033およびp10118の12位のAlaを除去することによるC末端切断

AFFITOPE(登録商標)配列p10033および特にp10118は、高濃度の抗aSyn抗体を誘

50

導することが示されている(それぞれ図4Aおよび図6)。本明細書に示される免疫原性研究では、C末端切断が、設計されたペプチドの免疫原性およびaSyn交差反応性に影響を与えるかどうかを試験するために、位置X12のC末端AlaがAFFITOPE(登録商標)配列p10033およびp10118から除去された。wtBALB/cマウスは、p10033、p10118、p10166、またはp10167のいずれかで独立した実験で免疫化された。表16は、ペプチド配列を示す。3回目の注射の2週間後に、各マウスの血漿を採取し、AFFITOPE(登録商標)誘導力価とaSyn抗体反応性を決定するためにELISAで分析した。試験された切断されたAFFITOPE(登録商標)候補は、X12位にAlaを組み込んだAFFITOPE(登録商標)配列を使用して生成されたものよりも低いが、p4456を使用して取得されたものよりも高い抗aSyn抗体の力価を誘導することができた(図8)。表17は、免疫マウスの血漿中に存在するaSynに対するAFFITOPE(登録商標)配列p10033(A)またはAFFITOPE(登録商標)配列p10118(B)のいずれかによって誘導される力価に対する誘導力価をまとめたものである。

10

【0122】

表16：異なる治療グループ、用途におけるそれぞれの医薬品、医薬品のペプチドの配列、および対応する配列番号を表に示す。

【表16】

配列番号	医薬品	配列
38	p10033-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEKMPVDPDNEA
63	p10166-CRM197 水酸化アルミニウム	C-LEKMPVDPDNE
61	p10118-CRM197 水酸化アルミニウム	CGG-KESMPVDPDNEA
64	p10167-CRM197 水酸化アルミニウム	CGG-KESMPVDPDNE

20

【0123】

表17：aSynに対する力価は1匹のマウスで評価され、値は、p10033またはp10118のいずれかで得られた中央値に対する中央値を表す。

【表17】

配列番号	p10033 または p10118 に対する力価 (%)
38	100.0
63	58.8
61	100.0
64	76.2

30

【0124】

選択したAFFITOPE(登録商標)によって誘導される抗体の迎撃

AFFITOPE(登録商標)候補によって誘導された抗体がインサイチュで凝集したaSynを検出できるかどうかを調べるために、AFFITOPE(登録商標)候補でワクチン接種されたwtBALB/cマウスの血清を、PD/DLB患者の死体解剖由来のヒト脳組織の脳切片でIHC染色によって試験した。レビー小体は、PD/DLB疾患患者の脳における病理学的特徴であり、主にaSynの病原性の凝集型が豊富である(Spillantini et al., 1997)。

【0125】

AFFITOPE(登録商標)候補処置マウスの血漿は、対照の抗aSyn mAb 28A7と同様に、大脳皮質の脳切片にレビー小体を検出した(図9)。特異性は、AFFITOPE(登録商標)候

40

50

補の対応するペプチド部分による血清の事前吸収後の染色の欠如によって確認された(データは示さず)。

【0126】

aSynオリゴマー(毒性)対モノマーaSyn種への優先的結合

次に、異なるAFFITOPE(登録商標)によって誘導された抗体を、SPRベースの方法論を使用して、モノマー種よりもオリゴマーaSyn(低分子量、aSynの可溶性凝集体、主にダイマーおよびトリマー)への選択的結合について試験した(図10)。等量のAFFITOPE(登録商標)候補誘導抗体またはモノクローナル抗体は、最初に抗マウス捕捉抗体でコーティングされたチップに固定化された。続いて、モノマーおよびオリゴマーaSyn種が連続して適用され、aSynモノマーおよびオリゴマーaSyn種への異なる結合(RUとして定義)が評価された。対照として、LB509(Biolegend、サンディエゴ、カリフォルニア)と28A7(AFFiRiS AG)の2つのモノクローナル抗体を使用した。チップ表面へのLB509の固定化は、モノマーaSynとオリゴマーaSynを区別せず、両方のaSyn種に同等なRUをもたらした。ペプチドp4456に対して惹起された2番目の対照抗体28A7は、モノマーaSyn種とオリゴマーaSyn種を区別した。AFFITOPE(登録商標)候補誘導抗体は、aSynのモノマー形態と比較して、aSynのオリゴマー凝集体に対して高い選択性を示した(図10)。

10

【0127】

SPR(BiaCore)解析に加えて、AFFITOPE(登録商標)誘導抗体は、阻害ELISAにより、aSynのモノマー種よりもaSyn線維への優先的な結合について試験されている。これらのアッセイでは、一定量のアフィニティー精製されたAFFITOPE(登録商標)誘導抗体を、滴定量のモノマーおよび線維状aSynとプレインキュベートし、aSyn線維でコーティングされたELISAプレートに移した(詳細については、M&Mを参照されたい)。図11に、代表的な2つのAFFITOPE(登録商標)候補(p10033とp10118)の結果を示す。aSynオリゴマーとそれに続くaSyn線維では非常に良好な競合が見られたが、aSynのモノマー型との競合はごくわずかであった(図11)。

20

【0128】

aSynのオリゴマー型および凝集型に優先的に結合することが知られている mAb28A7を対照として使用した(図11C)。

【0129】

全体として、AFFITOPE(登録商標)候補特異的抗体の結合データは、モノマー型とは対照的に、細胞死につながる関連する毒性種であると考えられているaSynの毒性オリゴマー凝集体に対するAFFITOPE(登録商標)候補誘導抗体の高い選択性の明確な証拠を提供する。

30

【0130】

材料および方法

マウス

BALB/cマウスはJanvier Elevages(Le Genest-Sainte-Isle、F)から購入した。

【0131】

動物は、飼育者、供給者、および使用者としての活動を許可するためのIMPの申請書に記載されている標準的な条件下で飼育および保管された。それぞれの許可は、2013年5月13日に関係当局によって通知GZ:223633/2013/4 で付与された。

40

【0132】

簡単に言うと、マウスは、5匹のマウスごとにTECNIPLAST Sealsafe NextIVC Blue Line - ケージ(ミラノ、イタリア)中で飼育した。ケージには、入れ子の形の強化物と、隠れたり遊んだりするための小さなプラスチック製の家が装備された。実験開始時のマウスの週齢は6~8週であった。標準食と酸性水を自由に摂取させ、12時間の明暗サイクルで飼育した。

【0133】

すべての動物実験は、オーストリアおよびヨーロッパの法律に従って行われ、ウィーン

50

市行政局、市当局58(Vienna City Administration、municipal department 58)の許可を得ている。

【0134】

ペプチドおよびタンパク質

免疫化に使用したペプチドは、EMC microcollections(テュービンゲン、ドイツ)から購入した。CRM197はPfenex(サンディエゴ、カリフォルニア)から購入した。

【0135】

免疫原性製品の製造

記載されている実験で使用されたすべての免疫原性AFFITOPE(登録商標) ースの製品は、キャリアタンパク質CRM197への合成AFFITOPE(登録商標)ペプチドのコンジュゲートである。コンジュゲーションは、CRM197のリシン残基の側鎖アミノ基と、ペプチドのアミノ(N)末端システインの遊離チオール基を使用する指令された手順である。CRM197の活性化のために、CRM197水溶液を10mMリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に調整し、二官能性リンカーである4-マレイミド酪酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(GMBS)とともに穏やかに振とうする。その後、透析または限外ろ過により、未反応のGMBSを除去する。次に、得られた活性化CRM197溶液は、リン酸緩衝液(pH 6.7)に溶解したAFFITOPE(登録商標)ペプチドとともにインキュベートされる。ペプチド内のシステインの遊離チオール基がマレイミド基と反応して、最終的なAFFITOPE(登録商標)-CRM197生成物を形成する。

【0136】

免疫原の適用

ワクチンを周囲温度に戻し、ボルテックスし、G30ゲージのインスリン20シリンジ(Omnican(C)50、B.Braun Melsungen AG、メルズンゲン、ドイツ)を使用して、マウスの脇腹に皮下(s.c.)(200 µl)適用する。免疫化は、隔週間隔で3回繰り返す。

【0137】

サンプル採取

各注射の2週間後に採血した。血漿を採取し、分析まで-20 で保存した。動物の採血と 殺は、FELASA承認の手順を使用して行われた。

【0138】

モノクローナル抗体

この研究では、2つのモノクローナル抗体を対照として使用した：LB509(Biolegend、カリフォルニア、US)および28A7。LB509は市販の精製抗aSyn、115-121抗体である。マウス mAb 28A7(IgG1)は、aSyn₁₁₅₋₁₂₁エピトープを模倣するAFFITOPE(登録商標)PD01に対して、マウスB細胞ハイブリドーマ(Mandler et al.、2014)を使用して社内で生成された。

【0139】

サンプル採取

各注射の約2週間後、少なくとも次の注射の1日前に採血した。血漿を採取し、分析まで-20 で保存した。動物の採血と 殺は、FELASA承認の手順を使用して行われた。

【0140】

ELISAによる力価決定

免疫化ペプチドに対する力価および組換えヒトaSynタンパク質に対する力価を分析した。免疫化マウスの血漿中のAFFIOTPE(登録商標)誘導抗体の存在をELISAで決定した。96ウェルプレート(Nunc-Maxisorp)は、組換えヒトaSyn(1 µg/ml)または注射されたペプチド(BSA結合体；1 µM)のいずれかでコーティングされた。力価は、PRISM(登録商標)5.04(GraphPad Inc、サンディエゴ、カリフォルニア)を用いて非線形回帰分析(4パラメータロジスティックフィット関数)によりEC₅₀値として計算した。

【0141】

免疫組織化学(IHC)

aSyn陽性封入体(レビー小体)の認識は、DLB患者(DLB 患者、症例番号：X5631、U

10

20

30

40

50

CSDの神経科学科、ラホヤ、カリフォルニア)の前頭皮質生検からの死後脳切片で行われた。

【0142】

AFFITOPE(登録商標)免疫化マウスの血漿を使用して、DLB患者の前頭皮質脳生検の切片を染色した。組織調製(再水和、脱パラフィン、抗原回復、およびブロッキング)の後、希釈したマウス血漿とともに切片を室温で2時間、または4で一晩インキュベートした。切片を未希釈のDako EnVision HRP標識ポリマー(Agilent、サンタクララ、カリフォルニア)とともにRTで1時間インキュベートした。各IHC染色について、ヘマトキシリンで対比染色を行い、このステップの後、スライドを脱水し、エンテラン(Sigma-Aldrich)に封入した。Panoramic(Mirax)Scanner150(Carl Zeiss MicroImaging GmbH)を使用して、スライドを明視野モードでスキャンした。

10

【0143】

表面プラズモン共鳴(Biacore)分析

すべての実験は、Biacore T200 Control Software 2.0.1を使用して、Biacore T200 (GE Healthcare、シカゴ、イリノイ)で実行された。CM5チップは、メーカーの指示に従って、チップのフローセル(Fc)1およびFc2において、アミン結合により、市販のマウス抗体キャプチャーキット(GE-Healthcare)からの抗体で固定化された。Fc1は参照フローセルとして機能した。両方のFcに対する抗マウス抗体の固定化レベルは同等であり、Fc1とFc2について約11000RUになった。

【0144】

同等のレベルの捕捉抗体を達成するために、各特異的抗体の注入時間を実際の実行前に試験し、それに応じて注入時間を調整した。これにより、各サイクルでFc1に捕捉された非特異的抗体を含む、試験したすべての抗体の捕捉レベルが同等になった。

20

【0145】

1サイクルの実験設定は次のとおりである：

1. 参照Fc1での非特異的抗体の捕捉
2. Fc2でのaSyn特異的抗体の捕捉
3. サンプル(オリゴマーaSyn、モノマーaSyn、バッファーのみ)をFc1とFc2に注入
4. 低pHでのFc1とFc2の再生；抗マウス抗体のみがチップ上に残る
5. 次のサイクルに備えたチップ表面

30

【0146】

オリゴマーおよびモノマーaSynの調製：aSynオリゴマー(SynAging、ヴァンドウーヴル＝レ＝ナンシー、フランス)を解凍し、注射直前にHBSで5 µg/mlに希釈した。真正な(bona fide)モノマーaSyn(rPeptide)から高分子量画分を除去するために、aSynを新たに溶解し、HBSで5 µg/mlに希釈し、50kDa カットオフカラム(Amicon Ultra 0.5ml)を使用して14,000 x g で10分間カットオフ遠心分離した。対照として、2つのaSyn特異的抗体、LB509(BioLegend、サンディエゴ、カリフォルニア)および28A7(AFFiRiS AG)を使用した。

【0147】

免疫血漿からのAFFITOPE(登録商標)特異的抗体のアフィニティー精製

ヨードアセチル磁気ビーズ(FG-106、Bioclone Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア)をそれぞれのペプチド(HPLC精製済み)と室温で1時間カップリングさせ、残っている過剰な遊離部位をシステインでさらに1時間ブロックした。ブロッキング反応後、AFFITOPE(登録商標)結合ビーズを、対応するAFFITOPE(登録商標)候補で免疫したマウスの血漿150 µlと共にインキュベートした(室温で2時間)。次に、AFFITOPE(登録商標)特異的抗体をElution Buffer(Thermo Scientific)で溶出した。その後、溶離液を超遠心分離(Millipore)チューブ(30kDa)で150 µlの体積(入力容量に等しい)に濃縮した。

40

【0148】

競合ELISA

100 ~ 0.05 µg/mlの範囲の濃度(これは、モノマーaSynに関連して69 ~ 0.034 µM

50

の範囲に相当する)での異なるaSyn種、モノマー(rPeptide)、およびフィブリルを含む凝集形態(Proteos Inc)、またはオリゴマー(Crossbeta Biosciences)の滴定量を、AFFITOPE(登録商標)候補免疫マウスの末端血漿から事前に精製された抗体、および対照の抗aSyn抗体28A7と共にプレインキュベートした。追加されたaSyn種は、プレートコーティングされたaSyn線維(Proteos Inc)への結合に対して競合する。IC₅₀値は、ELISAシグナルの半分をクエンチするのに必要なモノマー、オリゴマー、または線維性aSynの濃度として計算された。IC₅₀値はPRISM(登録商標)5.04(GraphPad Inc、サンディエゴ、カリフォルニア)を用いて非線形回帰分析(4パラメータロジスティックフィット関数)によって計算された。

【 0 1 4 9 】

10

表18：試験されたAFFITOPE(登録商標)およびオリジナル配列ペプチド

20

30

40

50

【表 18】

配列番号	内部ペプチド名	ペプチド配列	追加情報
1	p4456	C-DQPVLPD	aSyn115-121 (M116→ Q, D119→ L)
2	p4572	C-VDRPVQPDR	aSyn114-122 (E114→ Y, M116→ R, D119→ Q, N122→ R)
3	p9964	C-EDMPVDPDNEAYE	aSyn114-126
4	p9524	C-LEDMPVDPDNEA	aSyn113-124
5	p9556~	C-DMPVDPDNEA	aSyn115-124
6	p9557	C-EDMPVDPDNE	aSyn114-123
7	p9663	C-VDPDNEAYE	aSyn118-126
8	p9988	C-AEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → A)
9	p9989	C-LADMPVDPDNEA	aSyn113-124 (E114 → A)
10	p9990	C-LEAMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → A)
11	p9991	C-LEDAPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→ A)
12	p9992	C-LEDMAVDPDNEA	aSyn113-124 (P117 → A)
13	p9993	C-LEDMPADPDNEA	aSyn113-124 (V118 → A)
14	p9994	C-LEDMPVAPDNEA	aSyn113-124 (D119 → A)
15	p9995	C-LEDMPVDADNEA	aSyn113-124 (P120 → A)
16	p9996	C-LEDMPVDPANEA	aSyn113-124 (D121→ A)
17	p9997	C-LEDMPVDPDAEA	aSyn113-124 (N122→ A)
18	p9998	C-LEDMPVDPDNAA	aSyn113-124 (E123 → A)
19	p9999	C-SEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → S)
20	p10000	C-LSMPVDPDNEA	aSyn113-124 (E114 → S)
21	p10001	C-LESMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → S)
22	p10002	C-LEDSPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→ S)
23	p10003	C-LEDMSVDPDNEA	aSyn113-124 (P117 → S)
24	p10004	C-LEDMPSPDNEA	aSyn113-124 (V118 → S)
25	p10005	C-LEDMPVSPDNEA	aSyn113-124 (D119 → S)
26	p10006	C-LEDMPVSDNEA	aSyn113-124 (P120 → S)
27	p10007	C-LEDMPVDPDSNEA	aSyn113-124 (D121→ S)
28	p10008	C-LEDMPVDPDSEA	aSyn113-124 (N122→ S)
29	p10009	C-LEDMPVDPDNSA	aSyn113-124 (E123 → S)
30	p10010	C-LEDMPVDPDNES	aSyn113-124 (A124 → S)
31	p10026	C-WEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → W)
32	p10027	C-IEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → I)
33	p10028	C-NEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → N)

10

20

30

40

50

【表 19】

34	p10029	C-KEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → K)
35	p10030	C-DEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → D)
36	p10031	C-LEWMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → W)
37	p10032	C-LEEMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → E)
38	p10033	C-LEKMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → K)
39	p10034	C-LELMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → L)
40	p10035	C-LENMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → N)
41	p10036	C-LEDWMPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116 → W)
42	p10037	C-LEDLMPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116 → L)
43	p10038	C-LEDNMPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116 → N)
44	p10039	C-LEDDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116 → D)
45	p10040	C-LEDKMPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116 → K)
46	p10041	C-LEDMPVDPDNEW	aSyn113-124 (A124 → W)
47	p10042	C-LEDMPVDPDNEV	aSyn113-124 (A124 → V)
48	p10043	C-LEDMPVDPDNEG	aSyn113-124 (A124 → G)
49	p10044	C-LEDMPVDPDNEE	aSyn113-124 (A124 → D)
50	p10045	C-LEDMPVDPDNEK	aSyn113-124 (A124 → K)
51	p10074	C-LESMPVDPDNES	aSyn113-124 (D115 → S, A124 → S)
52	p10075	C-SESMVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → S, D115 → S)
53	p10076	C-LESSPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → S, M116 → S)
54	p10077	C-SEDMVDPDNES	aSyn113-124 (L113 → S, A124 → S)
55	p10078	C-LEDSPVDPDNES	aSyn113-124 (M116 → S, A124 → S)
56	p10079	C-SEDSPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → S, M116 → S)
57	p10114	CGG-KEDMPVDPDNEA	aSyn111-124 (I112 → G, D115 → K)
58	p10115	C-LEKMPVDPDNES	aSyn113-124 (D115 → K, A124 → S)
59	p10116	C-SEKMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → S, D115 → K)
60	p10117	C-LEKMPVDPDNEK	aSyn113-124 (D115 → K, A124 → K)
61	p10118	CGG-KESMPVDPDNEA	aSyn111-124 (I112 → G, D115 → K, P117 → S)
62	p10119	CGG-KESMPVDPDNEK	aSyn111-124 (I112 → G, D115 → K, P117 → S, A124 → K)
63	p10166	C-LEKMPVDPDNE	aSyn113-123 (D115 → K)
64	p10167	CGG-KESMPVDPDNE	aSyn111-123 (I112 → G, D115 → K, P117 → S)

10

20

30

40

【0150】

参考文献

- Dufty et al., Am J Pathol. 2007 May;170(5):1725-38. [PubMed: 17456777]
 Bassil et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 23; 113(34): 9593-8 .
 doi: 10.1073/pnas.1609291113 [PubMed: 27482103]
 Kosaka, J Neurol. 1990; 237:197-204. [PubMed: 2196340]
 Dickson et al., Acta Neuropathol. 1989; 78:572-584. [PubMed: 2683563]
 Braak et al., Acta Neuropathol. 2007; 114:231-241. [PubMed: 17576580]
 Lee et al., Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40:1835-1849. [Pub-Med: 18

50

291704]

Bengoia-Vergniory et al., Acta Neuropathol . 2017;134(6):819-838 . doi: 10.1007/s00401-017-1755-1 . [PubMed: 28803412]

Bernis et al., Acta Neuropathol Commun . 2015 Nov 26;3:75 . doi: 10.1186/s40478-015-0254-7 . [PubMed: 26612754]

Mandler et al., Acta Neuropathol . 2014;127(6):861-79 . doi: 10.1007/s00401-014-1256-4 . [PubMed: 24525765]

Spillantini et al., Nature . 1997 Aug 28;388(6645):839-40.(PubMed: 9278044]

Lashuel, et al., Nat . Rev . Neurosci . 14, 38-48 . doi: 10.1038/nrn3406

Volc, et al., Lancet Neurol . 19, 591-600 . doi: 10.1016/S1474-4422(20)30136-8

【 図 面 】

【 図 1 】

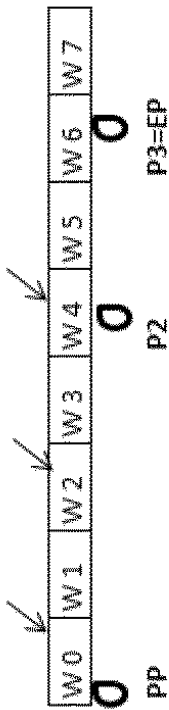


Fig. 1

【 図 2 】

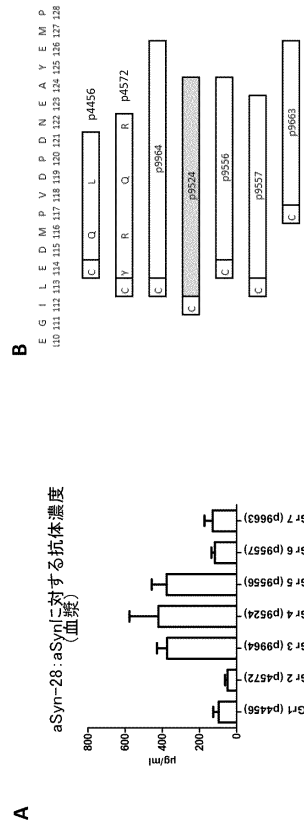


Fig. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

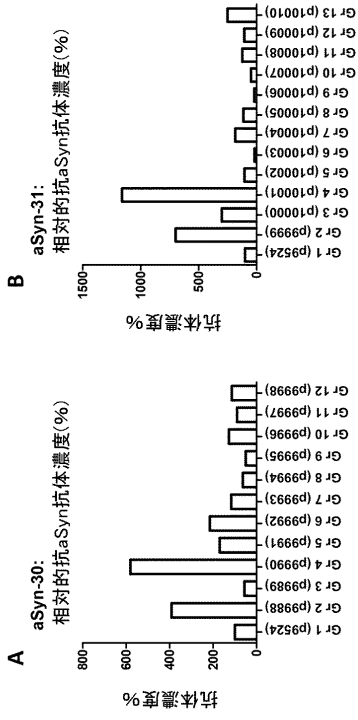


Fig. 3

【 図 4 】

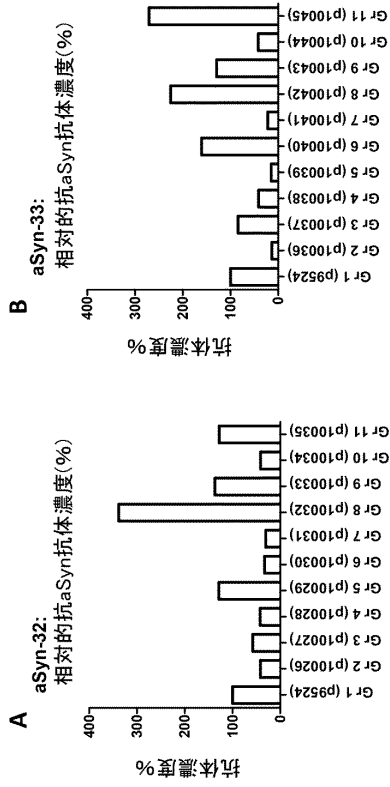


Fig. 4

【 図 5 】

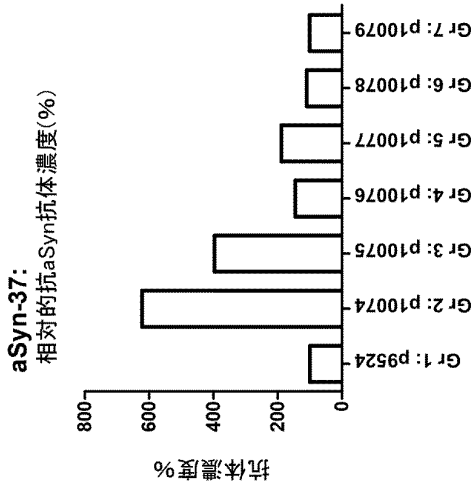


Fig. 5

【 図 9 】

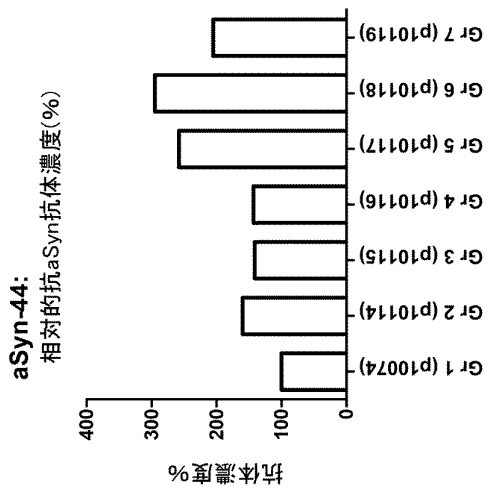


Fig. 6

10

20

30

40

50

【 図 7 】

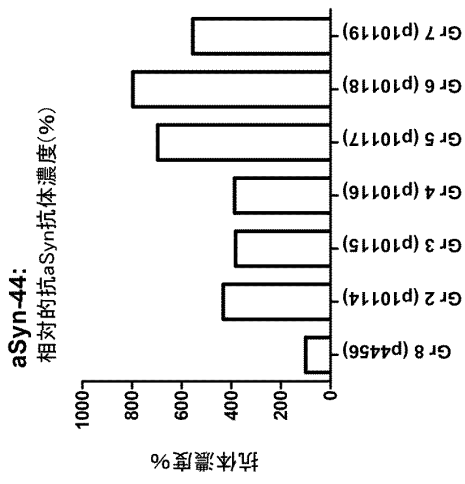


Fig. 7

【 図 8 】

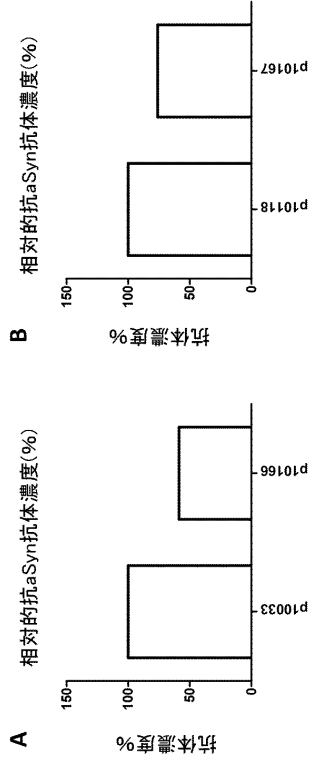


Fig. 8

【 図 9 】

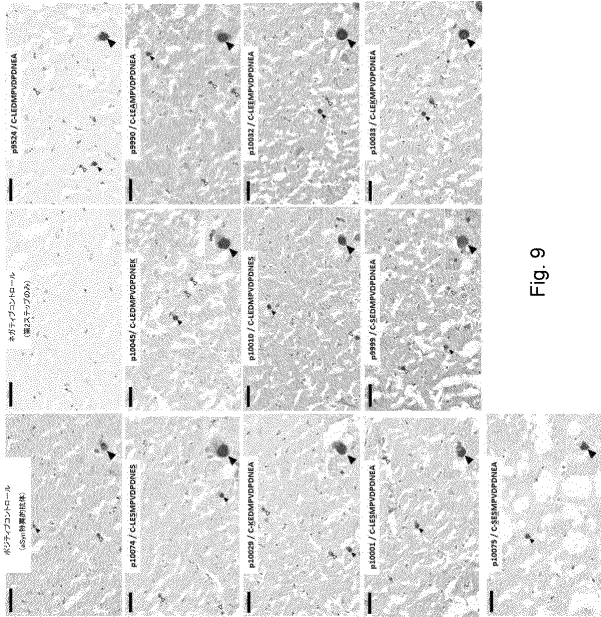
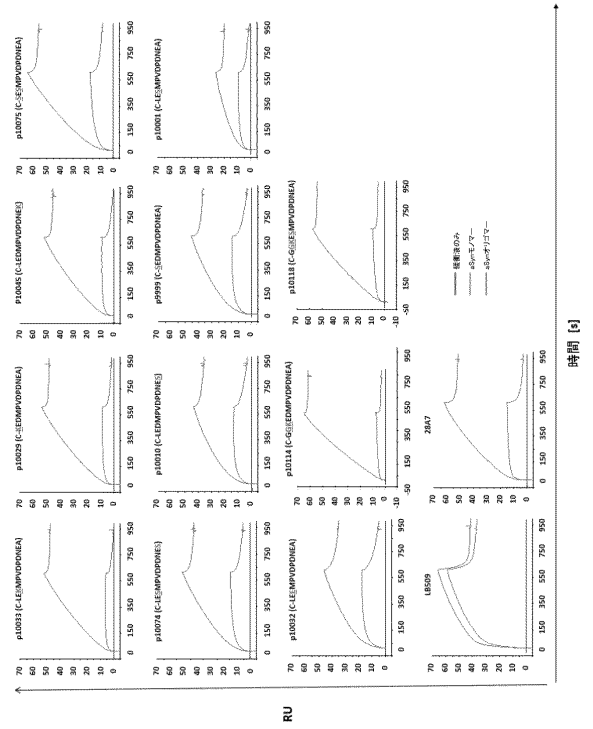


Fig. 9

【 図 10 】



時間 [s]

Fig. 10

【 図 1 1 】

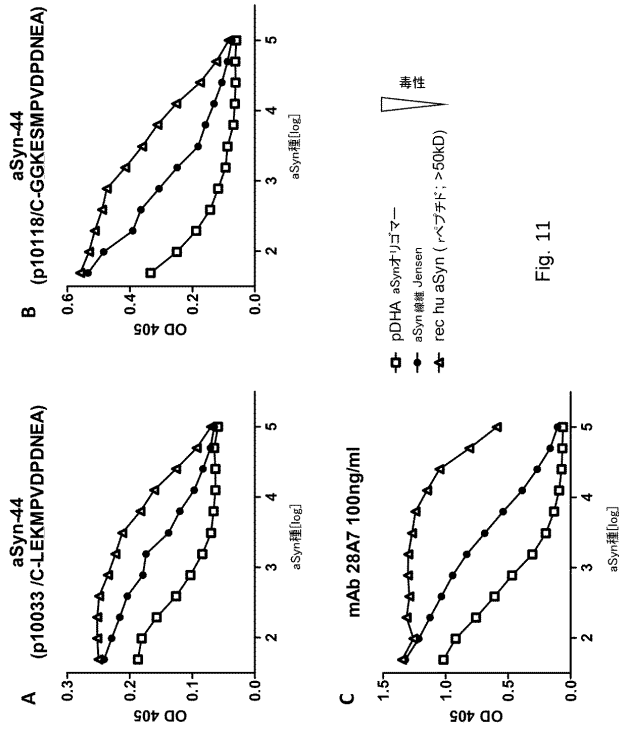


Fig. 11

10

20

【 配列表 】

2023536497000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

International application No. PCT/EP2021/071778
--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:	
a.	<input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.	10
b.	<input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.	
c.	<input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	
2.	<input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	20
3.	Additional comments:	
		30
		40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2021/071778
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K38/04 A61K39/00 A61P25/28		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/108423 A1 (ATGEN CO LTD [KR]; KIM JONG SUN [KR]) 17 November 2005 (2005-11-17) Figure 10, SEQ ID NO:6 and 83 -----	1-27
X	WO 2018/151821 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 23 August 2018 (2018-08-23) Example 2; SEQ ID NO 139 -----	1-27
X	WO 2018/232369 A1 (UNITED NEUROSCIENCE; UBI US HOLDINGS LLC [US]) 20 December 2018 (2018-12-20) Table 1-9, Examples and claims -----	1-27
X,P	WO 2021/055881 A1 (DENALI THERAPEUTICS INC [US]) 25 March 2021 (2021-03-25) SEQ ID NO:72, etc; pages 148-149, Examples and claims -----	1-27
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 7 December 2021	Date of mailing of the international search report 04/01/2022	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gómez Ortiz, Mariola	

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

page 1 of 2

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/071778

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2005/013889 A2 (ELAN PHARM INC [US]; CHILCOTE TAMIE J [US] ET AL.) 17 February 2005 (2005-02-17) Examples and claims</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>WO 2017/076873 A1 (AFFIRIS AG [AT]) 11 May 2017 (2017-05-11) Examples and claims</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>MARKUS MANDLER ET AL: "Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials", ACTA NEUROPATHOLOGICA, vol. 127, no. 6, 14 February 2014 (2014-02-14), pages 861-879, XP055203363, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/s00401-014-1256-4 the whole document</p> <p>-----</p>	1-27

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/071778

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005108423 A1	17-11-2005	US 2005203010 A1 WO 2005108423 A1	15-09-2005 17-11-2005
WO 2018151821 A1	23-08-2018	AU 2018222743 A1 BR 112019016374 A2 CA 3051839 A1 CN 110506057 A EA 201991720 A1 EP 3583124 A1 JP 2020513791 A KR 20190117622 A SG 10201913011W A SG 11201906947S A US 2020231661 A1 US 2021221878 A1 WO 2018151821 A1	22-08-2019 07-04-2020 23-08-2018 26-11-2019 20-01-2020 25-12-2019 21-05-2020 16-10-2019 30-03-2020 27-08-2019 23-07-2020 22-07-2021 23-08-2018
WO 2018232369 A1	20-12-2018	AU 2018283510 A1 BR 112019026707 A2 CA 3067231 A1 EP 3638298 A1 JP 2021508672 A KR 20200054938 A RU 2020101121 A SG 11201912195T A US 2021138049 A1 WO 2018232369 A1	16-01-2020 30-06-2020 20-12-2018 22-04-2020 11-03-2021 20-05-2020 16-07-2021 30-01-2020 13-05-2021 20-12-2018
WO 2021055881 A1	25-03-2021	NONE	
WO 2005013889 A2	17-02-2005	CA 2526900 A1 CY 1119133 T1 CY 1119556 T1 DK 1633189 T3 DK 2361928 T3 EP 1633189 A2 EP 2361928 A1 ES 2632216 T3 ES 2640669 T3 HU E034320 T2 HU E035044 T2 JP 4820291 B2 JP 5766923 B2 JP 2007525464 A JP 2011033633 A PL 1633189 T3 PL 2361928 T3 PT 1633189 T PT 2361928 T SI 1633189 T1 US 2005198694 A1 WO 2005013889 A2	17-02-2005 14-02-2018 07-03-2018 21-08-2017 03-07-2017 15-03-2006 31-08-2011 11-09-2017 03-11-2017 28-02-2018 02-05-2018 24-11-2011 19-08-2015 06-09-2007 17-02-2011 29-12-2017 29-09-2017 04-10-2017 21-07-2017 29-12-2017 08-09-2005 17-02-2005
WO 2017076873 A1	11-05-2017	AU 2016348610 A1 BR 112018008697 A2 CA 3003943 A1 CN 108472344 A EP 3370761 A1	10-05-2018 30-10-2018 11-05-2017 31-08-2018 12-09-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/071778

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2018532782 A	08-11-2018
		KR 20180079406 A	10-07-2018
		RU 2018120009 A	04-12-2019
		US 2019091306 A1	28-03-2019
		WO 2017076873 A1	11-05-2017

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

(72)発明者 シュタッフラー, ギュンター
オーストリア 1 0 3 0 ウィーン、カール - ファルカス - ガッセ 2 2、アフィリス・アクチェンゲゼ
ルシャフト内

(72)発明者 ガラボワ, ゲルガナ
オーストリア 1 0 3 0 ウィーン、カール - ファルカス - ガッセ 2 2、アフィリス・アクチェンゲゼ
ルシャフト内

(72)発明者 ミハイロヴスカ, エヴァ
オーストリア 1 0 3 0 ウィーン、カール - ファルカス - ガッセ 2 2、アフィリス・アクチェンゲゼ
ルシャフト内

(72)発明者 グルーバー, ペトラ
オーストリア 1 0 3 0 ウィーン、カール - ファルカス - ガッセ 2 2、アフィリス・アクチェンゲゼ
ルシャフト内

(72)発明者 バラージュ, カッチャ
オーストリア 1 0 3 0 ウィーン、カール - ファルカス - ガッセ 2 2、アフィリス・アクチェンゲゼ
ルシャフト内

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA18 BA23 BA42 CA59 MA17 MA66
NA14 ZA151 ZB052 ZB092
4C085 AA02 AA38 BB11 CC32 DD86 EE01 FF01 FF02 FF13 GG02
GG03 GG04 GG05
4H045 AA10 AA20 AA30 BA40 DA86 EA20 EA31