(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0044524
(43) 공개일자 2023년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
A61K 39/0007 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7007745
(22) 출원일자(국제) 2021년08월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년03월03일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/071778
(87) 국제공개번호 WO 2022/029181
국제공개일자 2022년02월10일
(30) 우선권주장
20189425.0 2020년08월04일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에이씨 이뮨 에스에이
스위스, 체하-1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프엘 이노베이션 파크
(72) 발명자
윈터, 도리안
오스트리아, 1030 빈, 칼-파르카스-가쎄 22, 아피리스 아게 내.
스태플러, 군터
오스트리아, 1030 빈, 칼-파르카스-가쎄 22, 아피리스 아게 내.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **면역원성 화합물**

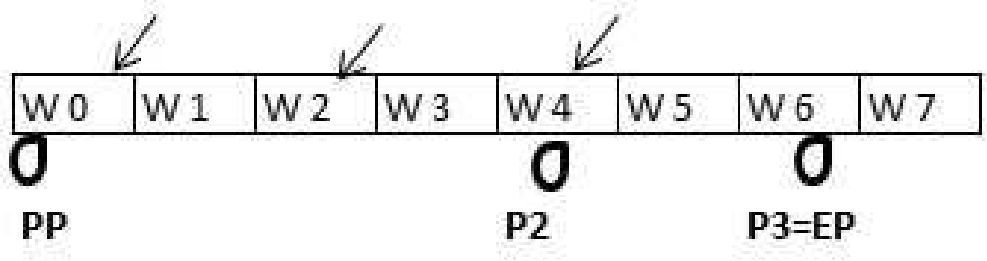
(57) 요 약

항원성 펩티드는 하기 구조를 포함하며:X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}

알파 시누클레인의 아미노산 113 내지 124로부터 유도된다. 이러한 구조에 따르면: P는 프롤린이고; X_1은 L, K, A 또는 S이고, 상기 L은 류신이고, K는 리신이고, A는 알라닌이고 S는 세린이고; X_2는 E 또는 S이고, 상기 E 및

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



S는 상기 정의된 바와 같고; X_3은 D, E, K, N, A 또는 S이고, 상기 N은 아스파라긴이고, D는 아스파르트산이고 D, E, K, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고; X_4는 M, A, S, L 또는 K이고, 상기 M은 메티오닌이고 A, S, L 및 K는 상기 정의된 바와 같고; X_5는 상기 정의된 바와 같은 P 또는 A이고; X_6은 V, A 또는 S이고, 상기 V는 발린이고 A 및 S는 상기 정의된 바와 같고; X_7은 상기 정의된 바와 같은 D 또는 S이고; X_9는 상기 정의된 바와 같은 D 또는 A이고; X_{10}은 N, S 또는 A이고, 상기 N, S 및 A는 상기 정의된 바와 같고; X_{11}은 E, A 또는 S이고, 상기 E, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고; X_{12}는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, A, K, V, S, 또는 G이고 상기 G는 글리신이고 A, K, V 및 S는 상기 정의된 바와 같다. 상기 구조는 야생형 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A 서열에 비해 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 펩티드는 X_{12} 바로 뒤에 디펩티드 Y-E를 포함하지 않으며, 상기 Y는 티로신이고 E는 상기 정의된 바와 같다. 펩티드는 적합한 담체에 접합되고 시누클레인병증을 치료하는데 유용하다.

(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
A61K 2039/555 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)
A61K 2039/6037 (2013.01)

(72) 발명자
갈라보바, 게르가나
오스트리아, 1030 빈, 칼-파르카스-가쎄 22, 아피리스 아게 내.
미헤일로브스카, 에바
오스트리아, 1030 빈, 칼-파르카스-가쎄 22, 아피리스 아게 내.
그루버, 페트라
오스트리아, 1030 빈, 칼-파르카스-가쎄 22, 아피리스 아게 내.
발라즈, 카차
오스트리아, 1030 빈, 칼-파르카스-가쎄 22, 아피리스 아게 내.

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 구조를 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 항원성 펩티드:

X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12},

상기 식에서:

P는 프롤린이고;

X_1은 L, K, A 또는 S이고, 상기 L은 류신이고, K는 리신이고, A는 알라닌이고 S는 세린이고;

X_2는 E 또는 S이고, 상기 E는 글루탐산이고 S는 상기 정의된 바와 같고;

X_3은 D, E, K, N, A 또는 S이고, 상기 N은 아스파라긴이고, D는 아스파르트산이고 E, K, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

X_4는 M, A, S, L 또는 K이고, 상기 M은 메티오닌이고 A, S, L 및 K는 상기 정의된 바와 같고;

X_5는 상기 정의된 바와 같은 P 또는 A이고;

X_6은 V, A 또는 S이고, 상기 V는 발린이고 A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

X_7은 상기 정의된 바와 같은 D 또는 S이고;

X_9는 상기 정의된 바와 같은 D 또는 A이고;

X_{10}은 N, S 또는 A이고, 상기 N, S 및 A는 상기 정의된 바와 같고;

X_{11}은 E, A 또는 S이고, 상기 E, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

X_{12} 는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, A, K, V, S, 또는 G이고 상기 G는 글리신이고 A, K, V 및 S는 상기 정의된 바와 같고,

단 X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}는 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A가 아니고,

이는 아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A와 비교하여 1 내지 5개의 아미노산 차이를 포함하고, 추가로 상기 펩티드는 X_{12} 바로 뒤에 디펩티드 Y-E를 포함하지 않고, 상기 Y는 티로신이고 E는 상기 정의된 바와 같음.

청구항 2

제1항에 있어서,

아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A와 비교하여 1 내지 4개 아미노산 차이, 바람직하게는 1 내지 3개의 아미노산 차이, 보다 바람직하게는 2개의 아미노산 차이를 포함하는, 항원성 펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

X_1, X_3, X_4 및 X_{12}로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A와 비교하여 아미노산 차이를 포함하는, 항원성 펩티드.

청구항 4

전술하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

하기 구조를 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 항원성 펩티드:

X_a-X_b-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12},

상기 식에서:

X_a는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, G이고, 상기 G는 제1항에 정의된 바와 같고;

X_b는 G이고, 상기 G는 상기 정의된 바와 같고;

X_1 내지 X_{12}는 제1항에 정의된 바와 같음.

청구항 5

전술하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

11 내지 20개 아미노산 길이, 바람직하게는 12 내지 14개 아미노산 길이인, 항원성 펩티드.

청구항 6

전술하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

말단 시스테인 잔기, 바람직하게는 N-말단 시스테인 잔기를 추가로 포함하는, 항원성 펩티드.

청구항 7

전술하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

X_1은 L, S, A, 또는 K이고, X_2는 E 또는 S이고, X_3은 S, D, E, A, K 또는 N이고, X_4는 M이고, X_5는 P이고; X_6은 V이고; X_7은 D이고; X_9는 D이고; X_{10}은 N이고/이거나, X_{12}는 A, S, K 또는 V이고, 바람직하게는 X_1은 L 또는 K이고, X_2는 E이고, X_3은 S, D, E, K 또는 A이고, X_4는 M이고, X_{10}은 N이고/이거나, X_{12}는 A, S 또는 K이고, 특히 상기 X_1은 L 또는 K이고, X_3은 D이고, K 또는 S 및 X_{12}는 A인, 항원성 펩티드.

청구항 8

전술하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

AEDMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 및 KEDMPVDPDNEA, 바람직하게는 SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LEKMPVDPDNEA 및 LESMPVDPDNES, 특히 LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항원성 펩티드.

청구항 9

전술하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

아미노산 서열 KESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEA 또는 CGGKESMPVDPDNEA를 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 항원성 펩티드.

청구항 10

전술하는 항 중 어느 한 항의 항원성 펩티드 및 항원성 펩티드에 부착된 T-세포 에피토프를 포함하는 담체를 포함하는, 면역원성 화합물.

청구항 11

제10항에 있어서,

T-세포 에피토프를 포함하는 담체는 링커를 통해 항원성 펩티드에 부착되는, 면역원성 화합물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

T-세포 에피토프를 포함하는 담체는 항원성 펩티드의 N 말단 끝에 부착되는, 면역원성 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서,

담체 단백질은 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin), 파상풍 톡소이드(tetanus toxoid), 열-불안정 엔테로톡신(LT: heat-labile enterotoxin), 콜레라 독소(CT: cholera toxin), 디프테리아 독소(DT: diphtheria toxin) 및 이의 변이체, 특히 CRM197, 파상풍 톡소이드(TT: tetanus toxoid), 돌연변이 독소, 알부민-결합 단백질, 및 소 혈청 알부민, 바람직하게는 CRM197로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역원성 화합물.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항원성 펩티드 또는 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 화합물 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 바람직하게는 백신 조성물 형태인, 약학 제제.

청구항 15

제14항에 있어서,

어주번트를 추가로 포함하는, 약학 제제.

청구항 16

제15항에 있어서,

어주번트는 MF59 알루미늄 포스페이트, 칼슘 포스페이트, 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-12, GM-CSF), 사포닌(예를 들어, QS21), MDP 유도체, CpG 올리고, IC31, LPS, MPLA, 폴리포스파젠, 및 알루미늄 히드록시드, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; 특히 어주번트로서 알루미늄 히드록시드인, 약학 제제.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서,

항원성 펩티드는 0.1 ng 내지 10 mg, 바람직하게는 10 ng 내지 1 mg, 특히 100 ng 내지 100 μg의 양으로 함유되는, 약학 제제.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

제제는 비경구 투여, 예를 들어 피하, 피내, 정맥 내 또는 근육 내 투여용으로 제형화되는, 약학 제제.

청구항 19

약제로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항원성 펩티드, 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 화합물 또는 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 약학 제제.

청구항 20

시누클레인병증의 치료 또는 예방으로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항원성 펩티드, 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 화합물 또는 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 약학 제제.

청구항 21

시누클레인병증의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항원성 펩티

드, 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 화합물 또는 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 약학 제제의 용도.

청구항 22

유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항원성 펩티드, 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 화합물 또는 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 약학 제제를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 시누클레인병증의 치료 또는 예방 방법.

청구항 23

제20항 또는 제21항에 또는 제22항에 있어서,

시누클레인병증은 원발성 시누클레인병증 또는 동반 병리학인, 용도 또는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

원발성 시누클레인병증은 파킨슨병(산발성, 알파-시누클레인 돌연변이가 있는 가족성, 알파-시누클레인 외 돌연변이가 있는 가족성, 순수 자율신경 부전 및 루이 소체 연하곤란), 루이 소체 치매(LBD: Lewy Body dementia; 루이 소체 치매(DLB)("순수" 루이 소체 치매), 파킨슨병 치매(PDD) 포함), 또는 미만성 루이 소체 치매, 다계통 위축증(샤이-드래거 증후군, 선조체 흑질 변성 및 올리브교 소뇌 위축증)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도 또는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서,

동반 병리학은 산발성 알츠하이머병, APP 돌연변이가 있는 가족성 알츠하이머병, PS-1, PS-2 또는 기타 돌연변이가 있는 가족성 알츠하이머병, 가족성 영국 치매(familial British dementia), 봉입체 근육염(inclusion-body myositis), 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury), 만성 외상성 뇌병증(chronic traumatic encephalopathy), 권투선수 치매(dementia pugilistica), 타우병증(tauopathies)(픽병(Pick's disease), 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia), 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 피질기저핵 변성(corticobasal degeneration), 17번 염색체 및 니만-픽 유형 C1 질환과 관련된 파킨슨증이 있는 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 and Niemann-Pick type C1 disease)), 다운 증후군(Down syndrome), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 운동 신경 질환(motor neuron disease), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(괌(Guam)의 산발성, 가족성 및 ALS-치매 복합체), 신경축삭 이영양증(neuroaxonal dystrophy), 뇌 철 축적 유형 1을 동반한 신경변성(neurodegeneration with brain iron accumulation type 1)(할러포르덴-스파츠 증후군(Hallervorden-Spatz syndrome)), 프리온 질환(prion diseases), 게르스트만-슈트로이슬러-샤인커병(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease), 모세혈관 확장성 운동실조(ataxia telangiectasia), 메이그 증후군(Meige's syndrome), 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis), 고셔병(Gaucher disease), 크라베병(Krabbe disease) 및 기타 리소좀 저장 장애(쿠포르-라켑 증후군(Kufor-Rakeb syndrome) 및 산필리포 증후군(Sanfilippo syndrome) 포함), 또는 급속 안구 운동(REM: rapid eye movement) 수면 행동 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도 또는 방법.

청구항 26

제20항 또는 제21항 또는 제22항에 있어서,

시누클레인병증은 루이 소체 장애(LBDs), 특히 파킨슨병(PD), 파킨슨병 치매(PDD) 및 루이 소체 치매(DLB), 및 다계통 위축증(MSA) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도 또는 방법.

청구항 27

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서 인간 대상체가 치료되는, 용도 또는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역원성 화합물 및 시누클레오병증(synucleopathy), 특히 파킨슨병(PD: Parkinson's disease), 루이 소체 치매(DLB: Dementia with Lewy body) 및 다계통 위축증(MSA: Multiple System Atrophy)의 예방 및 치료에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] PD는 시누클레인병증(synucleinopathy)이며 두 번째로 흔한 신경퇴행성 운동 질환이다. PD 유병률은 일반 인구에서 100 내지 200/100,000 사이이며, 60세 초과 인구의 약 1%에 영향을 미치며 연간 발생률은 약 15/100,000이다. 이는 운동성 증후군(운동완서(bradykinesia), 강직(rigidity), 안정 떨림(resting tremor) 및 자세 불안정(postural in안정성))과 통상 운동성 증후군에 선행하는 비-운동성 증후군(다양한 자율신경 기능장애, 감각 이상 및 정신 이상)의 조합으로 정의되는 만성 진행성 장애이다. 이러한 질환의 특징은 주로 알파-시누클레인(aSyn)으로 구성된, 루이 소체(LB: Lewy Body)라고 하는, 필라멘트성 단백질 봉입체의 축적과 함께 흑질(SN: substantia nigra)에서 도파민성 뉴런의 심각한 손실이다. PD, DLB 및 기타 LB 질환은 다양한 뇌 영역 및 세포 집단에서 aSyn의 축적 및 재분배를 나타낸다.

[0003] MSA는 다른 매우 중요한 시누클레인병증이다. MSA는 L-DOPA-저항성 파킨슨증, 소뇌 운동실조(cerebellar ataxia) 및 자율신경실조증(dysautonomia)의 증상을 특징으로 하는 산발성 신경퇴행성 장애이다. 환자들은 선조체, 흑질, 소뇌, 뇌교뿐만 아니라 하올리브(inferior olives) 및 척수를 포함한 다양한 뇌 영역에 영향을 미치는 다중 시스템 뉴런 손실로 고통을 받는다. MSA는 aSyn-양성 아교 세포질(GCI: glial cytoplasmic) 및 중추 신경계 전체에 걸쳐 드문 뉴런 봉입체를 특징으로 한다. 이러한 봉입체는 선조체 흑질 변성(striatonigral degeneration), 올리브교 소뇌 위축증(olivopontocerebellar atrophy), 및 수질 및 척수에서 자율 핵의 침범과 관련이 있다. MSA의 병인에 대한 GCI의 중요성은 일반적으로 희소돌기아교세포(oligodendroglia)에서 aSyn 과발현의 효과를 분석하는 트랜스제닉 마우스 모델의 최근 분석에 의해 인정되고 강조된다. 인간 aSyn을 과발현하는 tg 마우스에서 MSA의 GCI-유사 응집체 및 생화학적 마커 둘 모두가 관찰되었다.

[0004] DLB는 알츠하이머병(AD: Alzheimer's disease) 다음으로 서구 사회에서 두 번째로 흔한 유형의 신경퇴행성 치매이다. 임상적으로 진단된 치매의 4 내지 7%를 차지하며, 정확한 임상 진단을 피할 수 있는 동일한 수의 사례가 있다. DLB의 진단은 질병이 AD와 PD의 "중간"을 나타내고 두 실재물의 중첩되는 특징을 나타내기 때문에 어렵다. 4가지 임상적 합의 기준 중에서, "잠재적 DLB"를 진단하기 위해 2가지가 있어야 하는 것은 인지 및 주의력 변동, 반복적인 시각적 환각, REM 수면 행동 장애 및 자발성 파킨슨병 운동 징후이며, 이들은 다른 기준보다 질환에서 나중에 발생한다. 이는 실신 및 무반응, 무관심, 불안, 우울증, 정신병적 에피소드 및 신경이완제 감수성의 일시적 에피소드 및 기타 여러 가지와 같이 발생할 수 있지만 반드시 발생할 필요는 없는 다양한 추가 임상 기준에 의해 뒷받침될 수 있다. 증상은 환자들 사이에서 균일하지 않다.

[0005] DLB 병리학은 주로 뉴런의 기능 및 구조 손실에 역할을 하는 알파 시누클레인(aSyn)으로 구성된 루이 소체(LB: Lewy Body)라고 하는 단백질성 봉입체를 특징으로 한다. 그러나, DLB에서, LB는 피질 전체에 산재하게 분포되어 있는 것으로 발견되는 반면, PD에서는, 주로 흑질의 도파민성 뉴런에서 발견된다. DLB의 LB는 PD보다 덜 잘 구분되고 호산구성이 적고 섬유질이 더 적다. 또한, DLB 환자의 뇌에서 Abeta1-42와 같은 아밀로이드 베타(Abeta)의 카복시-말단 연장 형태를 주로 함유하는 아밀로이드 플라크가 발견될 수 있다. 피질의 아밀로이드 침착은 낮은 측두엽 관류 및 해마 위축 경향과 관련이 있다.

[0006] aSyn은 일반적으로 시냅스 소포의 막에 결합되거나 세포질에 있는 시냅스전 말단에 위치한 14 kD 천연 단량체 단백질이다. 이의 자연적인 기능은 잘 이해되지 않고 있으며 시냅스 전송에 관여하는 것 같다. 발병기전 동안, aSyn의 잘못된 폴딩 및 응집은 중추 신경계(CNS: central nervous system) 및 말초 신경계에서 발생하며, 이는 아마도 무엇보다도 C-말단 프로테아제 절단을 포함하는 번역 후 변형의 결과일 수 있다(문헌[Dufty 2007], 문헌[Bassil 2016]). 응집은 올리고머, 프로토피브릴 및 피브릴과 같은 LB 질환의 병인과 관련된 다른 aSyn 종의 생성으로 이어진다. 원섬유 형태의 aSyn은 대부분 신경 세포체에 위치한 LB에서 검출된다(문헌[Kosaka et al., 1990], 문헌[Dickson et al, 1989]). aSyn의 응집체는 성상아교세포(astroglial cell)에서도 검출될 수 있다(문헌[Braak 2007]).

[0007] 피브릴뿐만 아니라, 다양한 올리고머 aSyn 종들이 질환에 걸린 인간의 뇌에서 검출되었다. 원섬유성 aSyn과 달

리, 올리고머 응집체는 시냅스를 손상시킬 수 있는 뉴런 투사(neuronal projection) 및 시냅스전 말단에 위치할 가능성이 높으므로, 올리고머 aSyn은 세포의 세포독성에 기인한다.

[0008] 단량체 aSyn은 다양한 시험관 내 조건 하에서 다양한 모양, 형태, 세포독성 및 화학적 특성을 가진 다양한 유형의 응집체를 형성할 수 있는 것으로 나타났다. 단량체의 구조와 미리 허용되는 허용 조건에 따라, 서로 다른 구조적 특성을 가진 서로 다른 유형의 응집체가 개발될 수 있다. 시딩될 때, 별개의 aSyn-변형은 수용 세포에 이들의 형태를 부여하고(예를 들어, "피브릴" 또는 "리본") "형태적 템플릿"이라는 과정에서 동일한 변형의 응집체를 생성한다. 이들이 쥐의 뇌에 주입되는 경우, 이러한 유형의 응집체는 생체 내에서 행동 및 신경독성 표현형의 봉입체 형성 및 생성 측면에서 다양한 특성을 나타낸다.

[0009] 서로 다른 유형의 aSyn 응집체가 이들 고유의 형태로 인해 서로 다른 폴리펩티드 사슬을 노출하는 것으로 추론된다. 이러한 차별적으로 노출된 표면은 다양한 세트의 분자 내 상호작용을 허용한다. 따라서, 주어진 aSyn-변형의 형태는 시딩 경향 또는 특정 세포 유형에 대한 선호도와 같은 특성을 나타낸다. PD 및 MSA 물질에서 추출한 aSyn-변형의 서로 다른 특성을 보여주는 실험 데이터가 나타나기 시작한다; PD 또는 MSA 환자의 병리학 뇌 물질 분석은 전달가능한 aSyn 응집체의 다른 특성을 보여주었다.

[0010] 현재 이용 가능한 치료법은 증상만을 표적으로 하지만, 근본적인 신경퇴행을 수정할 수 있는 치료법은 아직 개발 중이다. 여기서, aSyn의 올리고머 및 신경독성 형태를 주로 표적으로 하여 시누클레인병증의 질환 진행을 방해할 수 있는 aSyn 특이적 능동 면역 요법(SAIT: aSyn Specific Active ImmunoTherapy) 접근법이 제시된다.

[0011] aSyn을 표적으로 하는 이전에 개발된 AFFITOPE®의 PD01 및 PD03을 사용한 백신접종은 aSyn 응집 장애의 다양한 동물 모델에서 효능이 입증되었으며, aSyn 병리를 감소시키고, 신경염증을 보존하며, 행동 결함을 개선한다(문헌[Mandler et al. 2014]; 국제공개 WO 2009/103105 A1호, 국제공개 WO 2011/020133 A1호, 국제공개 WO 2017/076873 A1호). 이러한 펩티드는 인간에서 표적-특이적 항체를 유도할 수 있는 안전하고 내약성이 우수한 백신으로 밝혀졌다.

[0012] 국제공개 WO 2005/108423 A1호에는 aSyn, 베타-시누클레인(bSyn) 또는 감마-시누클레인(GSyn)으로부터 유래된 환경 스트레스 저항성을 부여하는 펩티드가 개시되어 있는데, 이는 - 융합 파트너 단백질과 융합 단백질에 존재할 경우 - 감소된 변성을 제공할 수 있고/있거나 이러한 융합 파트너 단백질에 대한 용해도가 증가할 수 있다. 국제공개 WO 2018/151821 A1호에는 신경퇴행성 질환을 진단, 치료 및 예방하는데 유용한 aSyn에 대한 항체가 개시되어 있다. 이러한 항체는 천연 aSyn 또는 대립형질 변이체 A53T로 면역화하여 생성되며 사전형성된 피브릴("PFF: preformed fibril)에 우선적으로 결합해야 한다. 국제공개 WO 2005/013889 A2호는 LB 질환(LBD)의 치료 또는 예방에 유용하거나 LBD의 치료 또는 예방을 위한 모노클로날 항체를 제공하는데 유용한 천연 aSyn의 단편을 개시하고 있다.

발명의 내용

[0013] 본 발명의 목적은 백신에 기초한 시누클레인병증의 예방 및 치료에 사용하기 위한 약제를 제공하는 것이다. 인간 사용에 적합한 백신접종 펩티드를 제공하는 것이 또 다른 목적이다.

[0014] 또한, 본 발명은 면역원성과 관련하여 개선된 개선된 면역원성 펩티드를 제공할 수 있으며, 이는 말초에서 더 많은 양의 aSyn-특이적 항체를 유도하고 뇌에서 더 많은 양의 aSyn-특이적 항체를 유도한다. 또한, 올리고클로날 항체 반응("연장된 에피토프")으로 인해 유도된 항체의 표적 결합을 증가시키는 것도 바람직하다.

[0015] 따라서, 본 발명은 하기 구조를 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 항원성 펩티드를 제공한다:

[0016] X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12},

[0017] 상기 식에서:

[0018] P는 프롤린이고;

[0019] X_1은 L, K, A 또는 S이고, 상기 L은 류신이고, K는 리신이고, A는 알라닌이고 S는 세린이고;

[0020] X_2는 E 또는 S이고, 상기 E는 글루탐산이고 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0021] X_3은 D, E, K, N, A 또는 S이고, 상기 N은 아스파라긴이고, D는 아스파르트산이고 E, K, A 및 S는 상기 정의된

바와 같고;

[0022] X_4는 M, A, S, L 또는 K이고, 상기 M은 메티오닌이고 A, S, L 및 K는 상기 정의된 바와 같고;

[0023] X_5는 상기 정의된 바와 같은 P 또는 A이고;

[0024] X_6은 V, A 또는 S이고, 상기 V는 발린이고 A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0025] X_7은 상기 정의된 바와 같은 D 또는 S이고;

[0026] X_9는 상기 정의된 바와 같은 D 또는 A이고;

[0027] X_{10}은 N, S 또는 A이고, 상기 N, S 및 A는 상기 정의된 바와 같고;

[0028] X_{11}은 E, A 또는 S이고, 상기 E, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0029] X_{12}는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, A, K, V, S, 또는 G이고 상기 G 는 글리신이고 A, K, V 및 S는 상기 정의된 바와 같고,

[0030] 단 X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}는 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A가 아니고, 이는 아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A와 비교하여 1 내지 5개의 아미노산 차이를 포함하고 상기 펩티드는 X_{12} 바로 뒤에 오는 디펩티드 Y-E를 포함하지 않으며, 상기 Y는 티로신이고 E는 상기 정의된 바와 같다. 따라서, 단일 문자 아미노산 코드가 본원에서 일반적으로 사용된다.

[0031] 항원성 펩티드는 아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A와 비교하여 1 내지 5개의 아미노산 차이(즉 1, 2, 3, 4 또는 5 차이) 또는 1 내지 4개의 아미노산 차이를 포함할 수 있다. 차이는 일반적으로 아미노산 치환이다(X_{12}가 결실될 수 있는 경우를 제외하고, 각 위치에 대해 설정된 옵션에 따름). 아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A(이는 아미노산 113-124의 야생형 알파 시누클레인 서열임)와 1 내지 3개의 아미노산 차이가 바람직하며 보다 바람직하게는 2개의 아미노산 차이가 바람직하다. 이러한 차이는 프롤린인 X_8을 제외하고, 임의의 아미노산 X_1-X_{12}에서 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원성 펩티드는 X_1, X_3, X_4 및 X_{12}로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A와 비교하여 아미노산 차이를 포함한다. 바람직하게는, 항원성 펩티드는 X_1, X_3, X_4 및 X_{12}에서 선택된 위치에서 아미노산 서열 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A와 비교하여 2개의 아미노산 차이를 포함한다.

[0032] 본 발명의 항원성 펩티드는 면역원으로서 사용될 때 aSyn-특이적 항체를 생성하는 능력을 유지한다. 또한, 본 발명의 항원성 펩티드는, 본원의 비교 실험에서 입증된 바와 같이, aSyn-특이적 항체를 생성하는 측면에서 상응하는 야생형 aSyn 펩티드(12-량체 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A 포함, p9524(SEQ ID NO: 4))보다 더 면역원성이다. 이는 또한 p9524보다 면역원성이 낮은 것으로 나타난, aSyn의 C 말단 영역의 다른 aSyn 펩티드보다 더 면역원성이다; 하기 표 1 및 2(예를 들어 p4456 (SEQ ID NO: 1) 및 p4572 (SEQ ID NO: 2))를 참조한다. 이러한 특성은 전형적으로 본원에 상세히 기재된 유형의 접합체 형태의 펩티드(예를 들어, 담체 단백질로서 CRM197에 접합된 펩티드)를 시험함으로써 본원의 교시에 따라 당업자에 의해 시험될 수 있다. 펩티드는 적절한 실험 동물, 특히 마우스에 투여될 수 있고 투여 후 적절한 기간에 샘플(예를 들어, 혈액)이 제거될 수 있다(다시, 특정 세부 사항에 대한 예 참조). aSyn 항체 역가 측정은 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 수행될 수 있다.

[0033] 본 발명의 항원성 펩티드는 전형적으로 X_{12} 이후에 추가의 알파 시누클레인 아미노산 잔기를 포함하지 않는다. 특히 이들은 X_{12} 바로 뒤에 오는 디펩티드 Y-E를 포함하지 않는다. 본원에 기술된 바와 같이, 아미노산 Y_{125} 및 E_{126}을 포함하는 펩티드는 MHCI의 상이한 대립형질 변이체에 높은 친화도로 결합하여 잠재적인 세포독성 T 세포 에피토프(www.syfpeithi.de)인 *인 실리코*(*in silico*) 분석에 의해 예측된다. 그러나, 항원성 펩티드는 제한된 수의 추가 N 말단 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 따라서, 항원성 펩티드는 하기 구조를 포함할 수 있거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나 이로 이루어질 수 있다

[0034] Xa-Xb-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12},

[0035] 상기 식에서:

[0036] Xa는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, G이고, 상기 G는 글리신이고;

[0037] Xb는 G이고, 상기 G는 상기 정의된 바와 같고;

[0038] X_1 내지 X_{12}는 상기 정의된 바와 같다.

[0039] 본 발명의 항원성 펩티드는 따라서 전형적으로 길이가 11 내지 20개 아미노산, 바람직하게는 길이가 12 내지 14개 아미노산(즉, 길이가 12, 13 또는 14개 아미노산)이다. 항원성 펩티드가 길이가 12 또는 14개 아미노산인 것이 특히 바람직하다. 본 발명의 항원성 펩티드는 T-세포 반응이 없을 때 항체 반응을 생성한다. 따라서, 본 발명의 항원성 펩티드 자체는 전형적으로 T-세포 에피토프, 특히 세포독성 T-세포 에피토프를 함유하지 않는다.

[0040] 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 본 발명의 항원성 펩티드는 전형적으로 이들이 담체에 접합된 면역원성 화합물의 형태로 사용된다. 접합 과정을 용이하게 하기 위해, 본 발명의 항원성 펩티드는 접합 부위로서 작용하는 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 전형적으로, 이러한 아미노산은 말단 아미노산이고 바람직하게는 N 말단에 위치한다. 바람직한 실시형태에서, 항원성 펩티드는 말단 시스테인 잔기, 바람직하게는 N-말단 시스테인 잔기를 추가로 포함한다.

[0041] 일부 실시형태에서, X_1은 L, S, 또는 K이고, X_2는 E 또는 S이고, X_3은 S, D, E, A, K 또는 N이고, X_4는 M이고, X_{10}은 N이고/이거나, X_{12}는 A, S, K 또는 V이고, 바람직하게는 상기 X_1은 L 또는 K이고, X_2는 E이고, X_3은 S, D, E, K 또는 A이고, X_4는 M이고, X_{10}은 N이고/이거나, X_{12}는 A, S 또는 K이고, 특히 상기 X_1은 L 또는 K이고, X_3은 D, K 또는 S이고 X_{12}는 A이다. 이러한 실시형태에서, 펩티드의 다른 위치는 바람직하게는 야생형 알파 시누클레인 아미노산이다.

[0042] 일부 실시형태에서, X_1은 A, S 또는 K이다. 일부 실시형태에서, X_2는 S이다. 일부 실시형태에서, X_3은 A, S, E, K 또는 N이다. 일부 실시형태에서, X_4는 A, S, L 또는 K이다. 일부 실시형태에서, X_5는 A이다. 일부 실시형태에서, X_6은 A 또는 S이다. 일부 실시형태에서, X_7은 S이다. 일부 실시형태에서, X_9는 A이다. 일부 실시형태에서, X_{10}은 A 또는 S, 바람직하게는 S이다. 일부 실시형태에서, X_{11}은 A 또는 S이다. 일부 실시형태에서, X_{12}는 S, V, G 또는 K이다. 이러한 실시형태에 따르면, 천연 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A 서열에 비해 항원성 펩티드에 최대 1, 2, 또는 3개의 추가의 돌연변이가 존재하는 것이 바람직하다. 일부 실시형태에서 천연 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A 서열과 비교하여 항원성 펩티드에는 추가 돌연변이가 없다.

[0043] 일부 실시형태에서, 항원성 펩티드는 AEDMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군, 바람직하게는 SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LEKMPVDPDNEA 및 LESMPVDPDNES로 이루어진 군, 특히 LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 항원성 펩티드는 아미노산 서열 KESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEA 또는 CGGKESMPVDPDNEA를 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나 이로 이루어진다.

[0044] 본 발명의 항원성 펩티드는 전형적으로 담체에 접합된 면역원성 화합물의 형태로 사용된다. 담체는 면역원성 펩티드에 대한 면역 반응을 개선하기 위해 T-세포 에피토프의 공급원으로 작용한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 항원성 펩티드 및 항원성 펩티드에 부착된 T-세포 에피토프를 포함하는 담체를 포함하는 면역원성 화합물을 추가로 제공한다. 하기 구조를 갖는 면역원성 화합물이 제공된다:

[0045] 담체-X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12},

[0046] 상기 식에서

[0047] 담체는 X_1에 공유적으로 결합된 폴리펩티드 담체이고; 바람직하게는 담체 분자를 펩티드 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}에 공유적으로 연결하는 링커 모이어티를 포함하고;

[0048] D는 아스파르트산이고, E는 글루탐산이고, P는 프롤린이고, V는 발린이고;

[0049] X_1은 L, K, A 또는 S이고, 상기 L은 류신이고, K는 리신이고, A는 알라닌이고 S는 세린이고;

[0050] X_2는 E 또는 S이고, 상기 E 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0051] X_3은 D, E, K, N, A 또는 S이고, 상기 N은 아스파라긴이고 D, E, K, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0052] X_4는 M, A, S, L 또는 K이고, 상기 M은 메티오닌이고 A, S, L 및 K는 상기 정의된 바와 같고;

[0053] X_{10}은 N, S 또는 A이고, 상기 N, S 및 A는 상기 정의된 바와 같고;

[0054] X_{12} 는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, A, K, V, S, 또는 G이고, 상기 G는 글리신이고 A, K, V 및 S는 상기 정의된 바와 같고,

[0055] 단 X_1-E-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}는 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A가 아니다.

[0056] 본 발명의 화합물은 강력한 항-aSyn 항체 반응("항원성 펩티드")을 유도할 수 있는 펩티드, 즉 유도된 항체가 인간 aSyn과 높은 교차-반응성을 나타내지만, 이러한 펩티드는 천연 서열(L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A)과 다른 서열을 가질 수 있는 펩티드를 함유한다. 천연 서열(즉, 동일한 천연 구조를 표적으로 함)을 사용한 반응보다 우수한 면역 반응이 본 발명에 따른 펩티드로 달성되었고 매우 효과적이고 적합한 항체 반응이 백신접종된 개체에서 유도될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물을 이용한 백신접종에 의해 유도된 항체는 병리학적 인간 뇌 조직에서 응집된 독성 aSyn 종 및 루이 소체에 높은 선택성 및 특이성으로 결합한다.

[0057] aSyn의 비-천연 아미노산 서열을 갖는 면역원성 펩티드가 제공되어 bSyn에 대한 교차-반응성과 관련하여 개선된 aSyn에 대한 특이적 면역 반응을 유도할 수 있다는 것이 이전에 입증되었다(국제공개 WO 2009/103105 A1호, 국제공개 WO 2011/020133 A1호). 비-천연 aSyn 아미노산 서열을 가진 개선된 펩티드가 aSyn에 특이적인 면역 반응을 유도하는 것 외에도, 국제공개 WO 2009/103105 A1호 및 국제공개 WO 2011/020133 A1호에 기술된 펩티드보다 증가된 면역원성을 입증하고 더 높은 교차-반응성을 가진 항체를 유도할 수 있는 개선된 펩티드가 생산될 수 있다는 것이 이제 놀랍게도 입증되었다(하기 실시예 참조).

[0058] 본 발명에 따른 바람직한 면역원성 화합물은 X_1이 L, S, 또는 K이고, X_2가 E 또는 S이고, X_3이 S, D, E, A, K 또는 N이고, X_4가 M이고, X_{10}이 N이고/이거나, X_{12}가 A, S, K 또는 V인, 본 발명의 바람직한 펩티드를 포함한다. 본 발명에 따른 다른 바람직한 면역원성 화합물은 X_1이 L, S 또는 K이고, X_2가 E이고, X_3이 S, D, E, K 또는 A이고, X_4가 M이고, X_{10}이 N이고/이거나, X_{12}가 A, S 또는 K인 바람직한 펩티드를 포함한다. 다른 바람직한 실시형태는 X_1이 L 또는 K이고, X_3이 D, K 또는 S이고 X_{12}가 A인 본 발명에 따른 펩티드이다.

[0059] 바람직한 실시형태에서, T-세포 에피토프를 포함하는 담체는 링커를 통해 항원성 펩티드에 부착된다. 따라서, 링커에 부착된 본 발명의 항원성 펩티드가 또한 제공된다. 당업자가 쉽게 알 수 있는 바와 같이 임의의 적합한 링커가 사용될 수 있다. 링커는 화학적 링커 또는 펩티드(아미노산 기반) 링커일 수 있다. 링커는 적합한 화학 반응을 통해 담체에 대한 항원성 펩티드 항원의 가교결합을 가능하게 하는 반응성 작용기를 함유할 수 있다. 따라서 링커는 2개의 반응기를 포함할 수 있다. 첫 번째는 전형적으로 1차 아민(예를 들어, 라이신 잔기 상의)과의 반응을 통한 것과 같이, 반응성 아미노산 측쇄를 통해 담체(단백질)에 부착된다. 따라서, 전형적으로 아미드 결합이 형성된다. 두 번째는 다시 전형적으로 설프히드릴기(예를 들어, 시스테인 잔기 상의)와 같은 반응성 아미노산 측쇄를 통해 항원성 펩티드에 부착된다. 따라서, 전형적으로 티오에터 결합이 형성된다. 따라서 바람직한 링커는 이종이작용성 링커, 특히 아민-반응기, 예를 들어 N-히드로숙신이미드(NHS: N-히드록시숙신이미드) 에스터, 및 설프히드릴 반응기, 예를 들어 말레이미드를 함유하는 것들이다. 따라서, 링커는 sGMBS(= 설포GMBS) - (말레이미도부티릴옥시)설포 숙신이미드 에스터, GMBS - 말레이미도부티릴옥시 숙신이미드 에스터, 숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도) 프로피오네이트(SBAP) 또는 숙신이미딜 6-(N-말레이미도)-n-헥사노에이트(MHS)를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 링커는 sEMCS (= 설포EMCS) - N-(ε-말레이미도카프로일옥시)설포숙신이미드 에스터, MBS - m-말레이미도벤조일-N-히드로숙신이미드 에스터, sMBS (= 설포MBS) - (m-말레이미도벤조일-N-히드록시)설포 숙신이미드 에스터, 요오도-아세트아미드-(PEG)2-말레이미드(= N-(2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에틸)-3-(2-(2-요오도아세트아미도)에톡시)프로판아미드), 및 요오도-아세트아미드-(PEG)-트리(말레이미드)(= 3,3'-((2-((3-((2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에틸)아미노)-3-옥소프로폭시)메틸)-2-(2-요오도아세트아미도)프로판-1,3-디일)비스(옥시))비스(N-(2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에

틸)프로판아미드))를 포함한다. 링커는 담체(단백질) 내에 함유된 특정 아미노산 잔기 또는 이의 측쇄에 항원성 펩티드를 부착시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 항원성 펩티드는 담체(단백질) 내에 함유된 리신 잔기에(1차 아민기를 통해) 접합된다. 히스티딘 잔기를 통한 접합도 또한 고려된다. 항원성 펩티드는 더 큰 펩티드 분자의 맥락에서 제공될 수 있으며, 그 나머지는 링커를 제공하기 위해 또는 결합을 용이하게 하기 위해 알파 시누클레인 아미노산 서열로부터 유도되지 않음을 유의해야 한다. 예를 들어, 펩티드는 담체(단백질)에 대한 부착을 용이하게 하기 위해, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 스페이서가 있거나 없는 하나 이상의 시스테인 잔기와 같은 추가 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 추가적인 잔기는 전형적으로 항원성 펩티드의 N 및/또는 C 말단, 바람직하게는 항원성 펩티드의 N 말단에서 발견된다. 이와 관련하여, 용어 "필수적으로 이루어진(consists essentially of)"은 본 발명의 항원성 펩티드가 알파 시누클레인 서열(아미노산 111-124 또는 113-124, 본원에 정의된 바와 같이 적어도 하나(및 최대 4개)의 돌연변이가 있음)로부터 유래된 11 내지 20개, 바람직하게는 12 내지 14개의 연속 아미노산을 포함하지만 PEG 또는 아미노산 기반 스페이서와 같은 스페이서가 있거나 없는 담체 단백질에 대한 부착을 용이하게 하기 위해, 추가 시스테인 잔기와 같은 제한된 수의 추가 잔기를 포함할 수 있음을 의미할 수 있다.

[0060] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 면역원성 화합물의 링커 모이어티는 적어도 하나의 시스테인 및/또는 글리신 아미노산 잔기를 포함하고, 바람직하게는 폴리펩티드 담체 모이어티에 대한 화학적 링커와 결합된다. 본 발명의 (예를 들어, 12량체) 펩티드의 N-말단 끝에 아미노산 링커를 제공하는 것은 더 큰 화합물(담체로서)의 커플링 및 (보다 더) 강력한 면역 반응의 유도를 위한 많은 이점을 제공한다; 그러나, 이러한 링커, 특히 아미노산 링커는 본 발명에 필수적인 것은 아니다.

[0061] 바람직한 아미노산 링커는 글리신 및 시스테인(또는 이들의 조합, 예를 들어 CG-, CGG-, CCG-, GC-, GGC-, GCC-, GG-, GGG-, 등)) 및 이소류신, 알라닌, 발린, 류신, 세린, 글루탐산, 아스파르트산, 리신, 아스파라긴, 글루타민, 등이다. 아미노산 링커는 또한 1개 초과의 아미노산 잔기, 예를 들어 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 잔기로 이루어질 수 있다. 안정성/접힘 문제로 인해, 특히 아미노산 링커가 5개 초과의 아미노산 잔기이고 항원성 펩티드가 펩티드 결합을 통해 담체 단백질에 직접 결합하는 경우 펩티드(아미노산 기반) 링커에서 특정 아미노산 잔기를 제외하는 것이 바람직하다. 따라서, 아미노산 링커(또는 X_1로부터 N-말단으로 연장되는 아미노산 서열)가 5개 초과의 아미노산 잔기인 경우, 링커는 X_1에 대한 (링커) 영역 N-말단에, 즉, X_1에 대해 N-말단인 아미노산에서 시작하는 아미노산 링커 분자의 처음 5개 아미노산 내에 프롤린, 아르기닌 또는 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 함유하지 않는 것이 바람직하다.

[0062] 본 발명에서 사용하기에 바람직한 펩티드 링커는 T-세포 에피토프를 형성하지 않는 것들이다. 이는 MHC 리간드 및 펩티드 모티프의 SYFPEITHI 데이터베이스(http://www.syfpeithi.de/)를 참조하는 것과 같은 *인 실리코* 방법을 포함하여, 공지된 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0063] 대안적으로, 또는 아미노산 링커 외에, 담체는 바람직하게는 -폴리펩티드 담체 외에 화학적 연결기(또는 화학적 연결 과정에서 생성된 화학 성분)를 또한 포함한다. 바람직한 연결기는 화학적 링커, 예를 들어 이종이작용성 화합물, 예를 들어 GMBS 또는 설포-GMBS의 도움으로 수득될 수 있다. 당업계에 공지되고 사용되는 모든 화학적 링커, 특히 인간 개인에게 투여되는 생성물을 생산하는데 사용되는 화학적 링커는 본 발명의 펩티드에 대한 담체의 연결을 제공하는데 사용될 수 있다. 특히 바람직한 화학적 링커는 비-펩티드 결합을 통해 본 발명의 항원성 펩티드 및 담체에 결합하는 화학적 링커이다. 이러한 비-펩티드 결합 연결은 면역원성, 안정화 및/또는 제조 특성과 관련하여 특히 유리하다. 바람직하게는, 링커 모이어티는 NHS-폴리(에틸렌 옥시드)(PEO)(예를 들어, NHS-PEO_4-말레이미드에 의해) 또는 생화학 기술에 사용되는 다른 화합물에 의해 형성된다.

[0064] 본 발명에 따른 특히 바람직한 면역원성 화합물은 KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군, 바람직하게는 SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA 및 LESMPVDPDNES로 이루어진 군, 특히 LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군으로부터 선택되는 바람직한 펩티드 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}를 포함한다.

[0065] 담체는 T-세포 에피토프의 공급원으로 작용하므로 전형적으로 다중 T-세포 에피토프를 포함한다. T-세포 에피토프는 바람직하게는 범용(universal) T-세포 에피토프이다. "범용(universal)" T-세포 에피토프는 대부분의 인간 집단에 존재하는 T-세포에 특이적인 에피토프를 의미한다. T-세포를 활성화하는 T-세포 에피토프의 "범용" 능력

은 적어도 두 가지 상보적인 특성의 결과이다: i) 결합 강도를 의미하는, HLA 그루브에 대한 결합 친화성, 및 ii) HLA 분자 발현의 차이와 관련하여, 매우 다양한 인간 집단을 포괄할 수 있는 능력을 의미하는, 난잡한 방식으로 상이한 HLA 일배체형을 결합하는 능력. 범용 T-세포 에피토프는 인간 집단에 존재하는 대부분의 MHC 클래스 II 대립유전자에 결합할 수 있다. 따라서 담체의 T-세포 에피토프는 CD4 T-세포 반응을 자극할 수 있다. 따라서 담체의 T-세포 에피토프는 B-세포에 의한 (항원성 펩티드 특이적) 항체 생산을 향상시키는 헬퍼 T-세포 반응을 자극할 수 있다.

[0066] 바람직한 실시형태에 따르면, 본 발명에 따른 면역원성 화합물은 약학적으로 허용되는 폴리펩티드 담체 분자; 담체 단백질을 포함한다. 담체 단백질은 디프테리아 독소(DT: diphtheria toxin) 및 이의 변이체, 특히 CRM197(교차-반응 물질 197), 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin), 파상풍 톡소이드(tetanus toxoid), 열-불안정 엔테로톡신(LT: heat-labile enterotoxin), 콜레라 독소(CT: cholera toxin), 파상풍 톡소이드(TT: tetanus toxoid), 돌연변이 독소, 알부민-결합 단백질, 소 혈청 알부민, 및 다중 T 세포 에피토프를 함유하는 합성적으로 유도된 융합 펩티드(예를 들어 Tet 또는 PADRE)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 사용될 수 있는 추가 담체 단백질은 슈도모나스 엑소톡신 A(EPA: pseudomonas exotoxin A), 헤모필루스 인플루엔자 단백질 D(HiD: Haemophilus influenzae protein D) 또는 수막구균 외막 단백질 복합체(OMPC: meningococcal outer membrane protein complex)를 포함한다. CRM197이 특히 바람직한 담체 단백질이다.

[0067] 비-폴리펩티드성 담체가 또한 본 발명의 면역원성 화합물에 포함될 수 있다. 예는 폴리(락틱-co-글리콜산) 미세입자(PLG 미세입자), 폴록사머 입자, 바이러스-유사 입자, 및 덴드리머를 포함한다. 추가 담체는 나노입자 또는 리포솜을 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명의 면역원성 화합물 및 항원성 펩티드는 바람직하게는 인간 환자의 치료를 위한 치료 및 예방 방법, 특히 시누클레오병증의 치료 또는 예방에 사용된다. 치료 또는 예방될 바람직한 시누클레오병증은 루이 소체 장애(LBD: Lewy Body Disorder), 특히 파킨슨병(PD: Parkinson's Disease), 파킨슨병 치매(PDD: Parkinson's Disease with Dementia) 및 루이 소체 치매(DLB: Dementia with Lewy Body)뿐만 아니라 다계통 위축증(MSA: Multiple System Atrophy) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I: Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation type I)이다.

[0069] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명에 따른 면역원성 화합물 또는 항원성 펩티드 및 약학적으로 허용되는 부형제(이는 담체로 상호교환적으로 지칭될 수 있음)를 포함하는 약학 제제에 관한 것이다. 용어 "부형제"는 투여를 위한 최종 제형에 존재하는 면역원성 화합물 이외의 임의의 성분을 포함한다. 약학 제제는 바람직하게는 시누클레인병증, 바람직하게는 루이 소체 장애(LBDs), 특히 파킨슨병(PD: Parkinson's Disease), 파킨슨병 치매(PDD) 및 루이 소체 치매(DLB), 및 다계통 위축증(MSA) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 시누클레인병증의 치료 또는 예방에서 백신으로서 사용하기 위한 것이다.

[0070] 본 발명에 따른 약학 제제는 바람직하게는 백신으로서 제형화된다. 약학 제제, 바람직하게는 백신은 어주번트(adjuvant), 바람직하게는 MF59 알루미늄 포스페이트, 칼슘 포스페이트, 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-12, GM-CSF), 사포닌(예를 들어, QS21), MDP 유도체, CpG 올리고, IC31, LPS, 모노포스포릴 지질 A(MPLA-유도체 예를 들어 모노포스포릴 헥사아실 지질 A, 3-디아실(합성)(3D-(6-아실) PHAD®), PHAD®(인산화된 헥사아실 디사카라이드)를 포함하는 용어인 (MPLA))또는 MPL), 폴리포스파젠, 및 알루미늄 히드록시드, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어주번트; 특히 어주번트로서 알루미늄 히드록시드와 함께 제형화될 수 있다. 어주번트의 목적은 대상체에서 면역 반응을 증가시키거나 자극하는 것이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 어주번트는 담체의 일부를 형성한다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 어주번트는 알루미늄 함유 어주번트, 특히 그 중에서도 알루미늄 히드록시드(Alum), 이미다조퀴놀린아민 예를 들어 레지퀴모드(Resiquimod)(R-848) 및/또는 CpG(합성 올리고디옥시뉴클레오티드(ODN: oligodeoxynucleotide) 함유 비메틸화된 CpG 모티프)를 포함한다. 어주번트는 톨-유사 수용체(TLR: Toll-like receptor) 작용제일 수 있다.

[0071] 전형적으로, 본 발명에 따른 약학 제제는, 특히 백신으로서 제형화되는 경우, 본 발명에 따른 면역원성 화합물(또는 본 발명의 펩티드, 선택적으로 대안적인 담체와 결합됨)을 0.1 ng 내지 10 mg, 바람직하게는 10 ng 내지 1 mg, 특히 1 μg 내지 500 μg, 또는, 대안적으로, 예를 들어 100 fmol 내지 10 μmol, 바람직하게는 10 pmol 내지 1 μmol, 특히 1 nmol 내지 500 nmol의 양으로 함유한다. 펩티드의 양은 일부 실시형태에서 100 pmol 내지 100 nmol일 수 있다. 본원에서 양은 조성물의 펩티드 성분을 지칭한다.

[0072] 전형적으로, 약학 제제, 특히 백신은 또한 부형제로서 보조 물질, 예를 들어, 완충액, 안정화제 등을 함유할 수

있으며, 바람직하게는 이러한 보조 물질, 예를 들어, 약학적으로 허용되는 부형제, 예를 들어, 물, 완충액 및/또는 안정화제는 1 내지 99%(중량), 보다 바람직하게는 5 내지 80%(중량), 특히 10 내지 70%(중량)의 양으로 함유된다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 약학 제제는 리포솜, 비로솜(virosome), 이스콤(iscom), 코크리에이트(cochleate), 에멀젼으로서 제형화된다.

[0073] 본 발명의 항원성 펩티드, 면역원성 화합물 및 약학 제제는 임의의 적합한 일정에 따라 투여될 수 있다. 이들은 프라임-부스트 백신접종 전략에 따라 투여될 수 있다. 프라임-부스트 백신접종 전략은 다중 면역화를 포함한다. 이는 백신의 효과를 향상시키는 것을 목표로 한다. 일반적으로, 동일한 백신 조성이 매번 투여된다; 소위 동종 프라임-부스트 백신요법. 약학 제제의 초기 프라이밍 단계를 위한 가능한 투여 요법은 격주에서 최대 4개월 치료; 2 내지 5회, 특히 3 내지 4회, 초기 프라이밍 백신 투여(1 내지 5개월 내)를 포함하며, 그 후 3 내지 12개월 또는 그 후 몇 년 후에 추가 접종 또는 유지 접종을 하는 것이 바람직하다 - 다른 백신에 대해 이미 제안된 다른 요법 외에.

[0074] 절대량으로, 적어도 10 μg, 바람직하게는 적어도 50 μg의 투여량으로 본 발명의 펩티드(항원으로서)의 양을 사용하는 것이 바람직하다. 이와 관련하여 본 발명에서 언급된 "μg 펩티드(항원으로서)"는 용량 내 항원성 펩티드의 양을 지칭하며 백신 접합체(존재하는 경우, 면역원성 화합물)의 담체 또는 링커 부분을 포함하지 않는다는 점에 주목하는 것이 중요하다. 따라서, 항원의 바람직한 양은 적어도 5 nmol, 바람직하게는 적어도 25 nmol이다.

[0075] 바람직하게는, 면역원성 화합물 또는 항원성 펩티드를 포함하는 약학 제제는 비경구 투여용으로 제형화된다. 특정 실시형태에서, 제제는 피하, 피내 또는 근육내 투여용으로 제형화된다. 정맥 내 투여가 또한 이용될 수 있다.

[0076] 본 발명에 대한 백신접종 전략은 바람직하게는 통상적인 백신접종 전략을 따른다. 바람직한 실시형태에서, 국제 공개 WO 2017/076873 A1호에 따른 자가-항원에 대한 백신접종 전략은 즉, 환자에서 1차 면역 반응을 유도한 다음 환자에게 추가 투여 또는 유지 투여를 수행하는 것이다.

[0077] 바람직하게는, 추가/유지 백신접종은 1차 면역 반응이 이미 통과된 시점에, 즉 1차 백신접종으로 유도된 항체 역가(1, 2, 3, 4 또는 1차 면역 반응 유도 과정 내에서 더 많은 백신 투여에 의해 유도됨)가 특정 수준 이상으로 떨어졌거나(예를 들어, 많은 수의 샘플을 시험하는데 적합한 분석의 주어진 임계 수준 이상) 1차 백신접종 과정에서 존재하는 최대 항체 수준의 적어도 30% 미만, 바람직하게는 50% 미만, 특히 80% 미만으로 떨어졌을 때 투여되며, 이는 전체 치료 기간 동안 높은 역가의 항체를 얻기 위한 것이다. 이러한 높은 수준을 유지하려면, 초기(일차) 면역화 후 3 내지 12개월 마다 추가/유지 주사를 투여하는 것이 도움이 될 수 있다.

[0078] 바람직하게는, 추가/유지 투여를 위한 용량 중의 항원의 양은 1차 면역 반응을 위해 투여된 용량에서 사용된 양보다 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 100%, 특히 적어도 200% 더 높다. 특정 실시형태에서, 추가/유지 투여를 위한 용량 중의 항원의 양이 1차 면역 반응을 위해 투여된 용량에서 사용된 양보다 적어도 300%, 바람직하게는 적어도 400%, 보다 바람직하게는 적어도 500%, 특히 적어도 600%인 경우 또한 바람직하다. 그러나, 일부 실시형태에서, 동일한 조성물이 각각의 경우에 투여된다. 따라서, 일부 실시형태에서 투여되는 항원의 양은 각 경우에 동일하다(제조 허용 내에서).

[0079] 추가의 바람직한 실시형태에 따르면, 추가/유지 관리 투여는 일정 시간 후, 예를 들어 1년, 2년, 3년, 5년 또는 10년 후에 반복된다. 바람직하게는, 2차 또는 추가의 추가/유지는 1차 추가/유지 투여와 동일하거나 유사한 방식으로, 즉 1차 백신 접종 용량과 비교하여 증가된 양의 항원으로, 또는 동일한 양의 항원으로 수행된다.

[0080] 본 발명에 따른 투여 경로는 일반적으로 현재의 백신접종과 동일한 경로이다. 따라서, 본 발명에 따른 면역원성 화합물 또는 항원성 펩티드, 또는 약학 제제의 바람직한 투여는 피하, 피내 또는 근육 내 투여와 같은 비경구 투여이다. 그러나, 면역원성 화합물 또는 항원성 펩티드, 또는 본 발명의 약학 제제는 임의의 적절한 투여 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, 이러한 조성물(바람직하게는 백신 조성물)은 국소, 경구, 직장, 비강 또는 비경구(예를 들어, 정맥 내, 피내, 피하 또는 근육 내) 경로에 의해 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 생분해성 중합체와 같은 지속 방출 매트릭스에 혼입될 수 있으며, 중합체는 전달이 필요한 곳 근처에 또는 아주 근접하게 이식된다. 그러나, 바람직한 실시형태에서, 조성물은 근육 내로 또는 피하로 투여된다.

[0081] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 바람직하게는 백신 형태의 면역원성 화합물 또는 항원성 펩티드 또는 약학 제제는 어주번트, 바람직하게는 알루미늄 옥시히드록시드와 함께 투여된다. 이러한 가장 바람직한 실시형

태에 따르면, 본 발명은 유럽 약전 등급(알루미늄-옥시히드록시드, 모노그래프 1664)의 사용, 보다 구체적으로 유럽 연합 준수에 대해 시험된 Brenntag Biosector(2% 알히드로겔(Alhydrogel))에 의해 제조된 제품에 관한 것이다. 알히드로겔은 세 가지 종류가 있다: 알히드로겔 1.3%; 알히드로겔 2% 및 알히드로겔 "85". 알히드로겔 2%는 알루미늄 히드록시드 겔의 국제 표준품으로 선정되었다. 본 발명에 따른 약학 제제는 적합한 완충액, 바람직하게는 등장성 인산염 완충액(1 mM 내지 100 mM), 바람직하게는 ≥ 1.0 mg/ml 알히드로겔(Al_2O_3 당량으로 주어짐; 이러한 측정기준("Al_2O_3 당량"으로서 Al)의 농도로 무균적으로 제형화되며 본 발명을 위해 일반적으로 사용되며; 따라서, 본 출원에서 언급된 모든 용량 및 양은 알루미늄 옥시히드록시드와 관련되는 한 Al_2O_3 당량(알루미늄 옥시히드록시드(알하이드로겔)의), 보다 더 바람직하게는 ≥ 1.5 mg/ml 알히드로겔(Al_2O_3 당량으로 제시)의 농도, 가장 바람직하게는 ≥ 2.0 mg/ml 알히드로겔(Al_2O_3 당량으로 제시)의 농도이다. 알히드로겔에 대한 알루미늄 염의 양은 제조업체가 명시한 강도에 따라 Al_2O_3 당량으로 제공된다(즉, 2% 알히드로겔은 2% Al_2O_3, 즉 20 mg/mL와 동일함). 이러한 농도는 각각의 분자 질량(20 mg/mL Al_2O_3(Mw 101,96)은 10.6 mg/mL 알루미늄(분자량 26,98)에 해당)을 사용하여 각각의 알루미늄 농도로 직접 변환될 수 있다.

[0082] 본 발명의 담체는 선택적으로 링커를 본 발명의 항원성 펩티드(X_1 내지 X_{12} 포함)와 커플링시키기 위한 임의의 적합하고 약학적으로 허용되는 담체 모이어티일 수 있다.

[0083] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 본 발명의 항원성 펩티드(12량체 펩티드일 수 있음)는 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 폴리펩티드 담체, 바람직하게는 CRM197(교차 반응성 물질 197), KLH(키홀 림펫 헤모시아닌), 파상풍 톡소이드, 알부민-결합 단백질, 소 혈청 알부민, 또는 다중 T 세포 에피토프를 함유하는 합성 융합 펩티드와 커플링된다. 추가 담체들 또는 담체 또는 담체 내의 링커 모이어티는 덴드리머(MAP; 문헌[Biol. Chem. 358: 581]), 펩티드 링커(또는 플랭킹 영역) 및 문헌[Singh et al., Nat. Biotech. 17 (1999), 1075-1081](특히 해당 문헌의 표 1에 있는 것들)], 및 문헌[O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735](특히 이에 기술된 내인성 면역-강화 화합물 및 전달 시스템)에 기술된 어주번트 물질, 및 기타 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 이러한 맥락에서 접합 화학(예를 들어, GMBS 및 물론 문헌["Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson]에 기술된 기타의 것들과 같은 이종이작용성 화합물을 통해)은 당업자에게 알려진 반응으로부터 선택될 수 있다.

[0084] 또한, 본 발명에 따른 면역원성 화합물 또는 항원성 펩티드를 포함하는 백신 조성물은 어주번트, 바람직하게는 낮은 가용성 알루미늄 조성물, 특히 알루미늄 히드록시드와 함께 제형화될 수 있다. 물론, 또한 어주번트 예를 들어 MF59 알루미늄 포스페이트, 칼슘 포스페이트, 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-12, GM-CSF), 사포닌(예를 들어, QS21), MDP 유도체, CpG 올리고, IC31, LPS, MPLA(MPL을 포함함), 폴리포스파젠, 에멀젼(예를 들어, 프로인트(Freund's), SAF), 리포솜, 비로솜, 이스콤, 코크리에이트, PLG 미세입자, 폴록사머 입자, 바이러스-유사 입자, 열-불안정 엔테로톡신(LT), 콜레라 독소(CT), 디프테리아 독소(DT), 파상풍 톡소이드(TT), 돌연변이 독소(예를 들어, LTK63 및 LTR72), 미세입자, 리포솜 및/또는 중합된 리포솜이 사용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드는 바람직하게는 NHS-폴리(에틸렌 옥시드)(PEO)(예를 들어 NHS-PEO_4-말레이미드)인 링커를 통해 담체 또는 어주번트에 결합된다. 대안은 위에 설명되어 있다.

[0086] 담체는 바람직하게는 톡소이드 단백질을 포함한다. 톡소이드 단백질은 천연 발생 톡소이드 단백질 또는 약학 조성물에 사용되는 이의 재조합 변이체일 수 있다. 독소는 예를 들어 포름알데히드, 글루타르알데히드, UDP-디알데히드, 과산화물, 산소로 처리하거나 돌연변이(예를 들어, 재조합 방법 사용)에 의해 비활성화될 수 있다. 독성이 감소된 돌연변이 디프테리아 독소가 또한 재조합 방법을 사용하여 생산될 수 있다.

[0087] DT는 디프테리아 독소-교차 반응 물질(DT-CRM: diphtheria toxin cross-reacting material) 또는 디프테리아 톡소이드이다. DT-CRM은 예를 들어 돌연변이에 의해 또는 화학적 변형에 의해 더 이상 충분한 ADP-리보실을 보유하지 않는 돌연변이 디프테리아 독소를 지칭한다. DT-CRM의 비-제한적 예는 DT-CRM30, DT-CRM45, DT-CRM176, DT-CRM197 및 DT-CRM228을 포함한다. 디프테리아 톡소이드는 포름알데히드-비활성화된 디프테리아 독소이다. DT는 상업적으로 이용 가능하거나 재조합 DNA 기술과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0088] CRM197은 야생형 디프테리아 독소의 면역학적 특성을 유지하는 디프테리아 독소의 비-독성 변이체(즉, 톡소이드)이다. CRM197은 글루탐산에서 글리신으로의 단일 아미노산 치환을 일으키는 구조 유전자의 단일 염기에서 야생형 디프테리아 독소와 상이하다. CRM197은 전형적으로 카사미노산 및 효모 추출물-기반 배지에서 성장

한 코리네박테리움 디프테리아 균주 C7(P197)의 배양물에서 단리된다. CRM197은 한외 여과, 황산 암모늄 침전 및 이온-교환 크로마토그래피를 통해 정제될 수 있다. 대안적으로, CRM197은 재조합적으로 제조될 수 있다. CRM197은 Hibtiter™, Menveo®, 또는 Prevnar®와 같은 당접합 백신 설계에 사용되었다.

[0089] 파상풍 톡소이드는 클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani)에 의해 유발되는 파상풍(또는 락조)에 대한 대규모 면역화를 위해 전 세계적으로 준비되고 사용된다. 파상풍 톡소이드는 또한 단독으로 또는 디프테리아 및/또는 백일해 백신과 함께 사용된다. 부모 단백질인 파상풍 독소는 일반적으로 클로스트리디움 테타니의 배양물에서 수득된다. 파상풍 독소는 약 150 kDa의 단백질이며 황화물 결합으로 연결된 두 개의 하위 단위(약 100 kDa 및 약 50 kDa)로 구성된다. 독소는 전형적으로 포름알데히드로 해독되며 황산암모늄 침전 또는 크로마토그래피 기술과 같은 공지된 방법을 사용하여 배양 여액으로부터 정제될 수 있다. 파상풍 독소는 또한 재조합 유전적 수단에 의해 비활성화될 수 있다. 파상풍 톡소이드는 또한 폐렴구균 접합 백신을 비롯한 다른 백신에서 담체 단백질로 사용되었다. 또한 혼합 담체, 예를 들어 CRM197과 조합된 폐렴구균 접합 백신, 파상풍 톡소이드 담체와 조합된 혈청형 3, 디프테리아 톡소이드에 접합된 혈청형 3이 사용될 수 있다.

[0090] 본 발명의 펩티드는 천연 인간 aSyn 서열의 변이체, 즉 AFFITOPE® 또는 VARIOTOPE®이다(원래 천연 aSyn 서열과 비교하여 서열 변이를 함유하지만, 유사한(동일하거나 개선된) 면역 특성을 나타내는, 즉 천연 aSyn 서열로 수득된 면역 반응보다 유사하거나 더 높은 면역 반응을 유도할 수 있는 펩티드임). 동시에, AFFITOPES®는 세포독성 또는 헬퍼 T 세포 반응을 유도하지 않도록 설계되었으며, 전자는 면역화 펩티드의 선형 서열 단편을 포함하는 $CD8^+$ T 세포가 도달할 수 있는 임의의 조직에 대한 세포독성 공격을 피하고, 후자는 백신과 독립적으로 표적-유래 펩티드에 대한 반응을 피하여 영구적으로 재생되고 제어되지 않는 면역 반응의 생성을 방지한다. 이러한 AFFITOPE® 또는 VARIOTOPE® 기술은 (i) 자가-단백질에 대한 내성 파괴, (ii) 천연 표적 단백질 에피토프와 교차-반응하는 백신의 펩티드 모이어티에 대한 높은 역가 항체 반응 생성, (iii) 및 자가면역 반응을 유도하지 않는 것을 목표로 설계되었다.

[0091] 따라서 본 발명의 과정에서 펩티드의 길이는 바람직하게는 12 aa(X_1 내지 X_{12})로 제한되었다. 본 발명의 항원성 펩티드는 전형적으로 길이가 11 내지 20개 아미노산, 바람직하게는 12 내지 14개 아미노산 길이이다. 항원성 펩티드는 길이가 12개 또는 14개 아미노산인 것이 특히 바람직하다. 이들은 전형적으로 천연 알파 시누클레인 서열에 비해 1 내지 4개, 바람직하게는 2 또는 3개의 아미노산 돌연변이를 함유한다. 그러나, 특히 펩티드의 N 말단에서 알파 시누클레인 서열에 기초하지 않은(또는 동일하지 않은) 아미노산 확장이 허용될 수 있음에 유의한다. 이러한 추가 아미노산은 예를 들어 링커의 일부를 형성할 수 있다. 펩티드를 담체와 같은 다른 분자 모이어티에 공유적으로 연결하는 링커(아미노산, 또는 펩티드, 링커 포함)가 존재할 수 있다. 링커는 추가 아미노산, 바람직하게는 글리신과 같은 비하전 측쇄를 갖는 아미노산을 포함할 수 있다. 링커는 펩티드의 면역원성 특성이 현저하게 악화되지 않는 한 면역원성 펩티드의 모든 위치에 부착될 수 있다. 예를 들어, 링커는 N-말단 또는 C-말단 aa(X_1 또는 X_{12})를 통해 연결될 수 있다; 또한 펩티드 내부 연결이 가능할 수 있다. 그러나, 본 발명의 펩티드가 면역원성 조성물로서 적용되는 경우, 펩티드(X_1)의 N-말단을 통해 담체에 본 펩티드를 연결하는 것이 바람직하다. 본 발명의 펩티드가 분취(preparative) 모이어티(예를 들어, 항체 정제 과정에서) 또는 진단 프로브(예를 들어, 인간 표본에서 항체를 검출하기 위해)와 같은 다른 목적을 위해 사용되는 경우, 링커 및 담체는 본 발명의 펩티드를 표면, 즉, 고체 표면에 연결하는 것을 비롯하여, 더 다양할 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 또한 다양한 검정 및 키트, 특히 면역학적 검정 및 키트에서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩티드가 다른 펩티드 또는 폴리펩티드의 일부일 수 있는 것이 특히 바람직하며, 예를 들어 이들은 면역학적 분석에서 리포터로서 사용되는 효소와 융합되거나 접합될 수 있다. 이러한 리포터 효소에는 예를 들어 형광 모이어티, 예를 들어 녹색 형광 단백질(GFP: green fluorescent protein), 포스파타제, 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 또는 옥시다제/리덕타제, 예를 들어 고추냉이 퍼옥시다아제를 포함한다.

[0092] 특정 실시형태에서, 본 발명은 하기 구조를 갖는 항원성 펩티드에 관한 것이다:

[0093] X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12},

[0094] 상기 식에서

[0095] D는 아스파르트산이고, E는 글루탐산이고, P는 프롤린이고, V는 발린이고;

[0096] X_1은 L, K, A 또는 S이고, 상기 L은 류신이고, K는 리신이고, A는 알라닌이고 S는 세린이고;

[0097] X_2는 E 또는 S이고, 상기 E 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0098] X_3은 D, E, K, N, A 또는 S이고, 상기 N은 아스파라긴이고 D, E, K, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0099] X_4는 M, A, S, L 또는 K이고, 상기 M은 메티오닌이고 A, S, L 및 K는 상기 정의된 바와 같고;

[0100] X_{10}은 N, S 또는 A이고, 상기 N, S 및 A는 상기 정의된 바와 같고;

[0101] X_{12}는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, A, K, V, S, 또는 G이고 상기 G는 글리신이고 A, K, V 및 S는 상기 정의된 바와 같고,

[0102] 단 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}는 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A가 아니다.

[0103] 의심스러운 경우, "구조를 갖는"이라는 용어는 주어진 아미노산 잔기로 "이루어지는(consisting of)(구조)"로 이해되어야 한다(즉, 추가 아미노산 잔기, 예를 들어 항원성 펩티드의 C-말단에서 제외). 펩티드 또는 그 측쇄의 자유 C-말단(또는 N-말단) 끝의 아미드화, 에스터화, 포르밀화, 아세틸화, 기타 화학적 치환 등과 같은 사소한 변형은 배제되지 않지만 이러한 변형이 존재하지 않는 것이 바람직하다. 이러한 사소한 변형은 본원에서 사용되는 "본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"이라는 용어의 범위 내에 있다. 본 발명에 따른 이러한 11량체 또는 12량체 펩티드("(본 발명의)(항원성) 펩티드"; "X_1 내지 X_{12}"; 등)는 특히 약학 조성물에서, 바람직하게는 약학적으로 허용되는 담체와 조합하여 시누클레인 병증을 예방 및/또는 치료하기 위해 의도된 용도에 적합한 조성물로 제공될 수 있다. 이러한 약학 조성물은 이를 필요로 하는 환자에 예방 및/또는 치료 효과를 달성하기에 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[0104] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 펩티드는 AEDMPVDPDNEA, LEAMPVDPDNEA, LEDAPVDPDNEA, LEDMAVDPDNEA, LEDMPADPDNEA, LEDMPVDPANEA, LEDMPVDPDNAA, SEDMPVDPDNEA, LSDMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LEDSPVDPDNEA, LEDMPSDPDNEA, LEDMPVSPDNEA, LEDMPVDPDSEA, LEDMPVDPDNSA, LEDMPVDPDNES, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, LEDKPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEV, LEDMPVDPDNEG, LEDMPVDPDNEK, LESMPVDPDNES, SESMPVDPDNEA, LESSPVDPDNEA,, SEDMPVDPDNES, LEDSPVDPDNES, SEDSPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, SEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK, 바람직하게는, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, LEKMPVDPDNES, SEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0105] 바람직하게는, 본 발명에 따른 펩티드는 KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 및 KEDMPVDPDNEA, 바람직하게는 SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA 및 LESMPVDPDNES, 특히 LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0106] 다른 양태에 따르면, 본 발명은 또한 하기 구조를 갖는 아미노산 링커가 있는 항원성 펩티드에 관한 것이다:

[0107] 링커-X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12},

[0108] 상기 식에서 X_1, X_2, X_3, X_4, X_{10}, 및 X_{12}는 상기 정의된 바와 같고, 상기 아미노산 링커는 1 내지 5개 아미노산 잔기를 포함한다.

[0109] 바람직한 실시형태에 따르면, 본 발명에 따른 아미노산 링커가 있는 펩티드는 링커를 포함하며, 상기 링커의 아미노산 잔기는 글리신, 시스테인, 이소류신, 알라닌, 발린, 류신, 세린, 글루탐산, 아스파르트산, 리신, 아스파라긴, 글루타민 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 링커는 C-, G-, CG-, CGG-, CCG-, GC-, GGC-, GCC-, GG-, 및 GGG-의 군으로부터 선택되고; 특히 상기 아미노산 링커가 있는 펩티드는 GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCKESMPVDPDNEA, CCCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, CKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEA GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNES, CSEDMPVDPDNEA, CLEEMPVDPDNEA, CSESMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNES, CLEAMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNEK, CLEDMPVDPDNEV, CGGKESMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEK, CLSDMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEA,

CKEDMPVDPDNEA, CLENMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEK, 및 CGGKEDMPVDPDNEA, 특히 GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCK-ESMPVDPDNEA, CCCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, 및 CKESMPVDPDNEA의 군으로부터 선택된다.

[0110] 바람직하게는, 본 발명의 모든 관련 양태에 따르면

[0111] (a) X_{12}가 존재하며 X_{12}에 대한 C-말단에 추가 아미노산 잔기가 존재하지 않거나;

[0112] (b) X_{12}는 존재하지 않으며 X_{11}에 대한 C-말단에 추가 아미노산 잔기가 존재하지 않는다.

[0113] 이러한 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 본 발명의 항원성 펩티드는 C-말단 끝에서 추가 확장을 갖지 않는다(예를 들어, 화합물 또는 펩티드를 안정화시킬 수 있는 사소한 변형(예를 들어, 아미드화 등)이 존재할 수 있는 경우를 제외하고). 어떤 경우에도, (예를 들어 국제공개특허 WO 2005/108423 A1호에 개시된 융합 단백질과 대조적으로) aSyn의 천연 아미노산 서열을 나타내는 아미노산 확장, 즉 특히 MHCI의 상이한 대립형질 변이체에 높은 친화도로 결합할 수 있으므로 잠재적인 세포독성 T 세포 에피토프가 될 수 있는, Tyr_{125} 및 Glu_{126}은 C-말단에 존재하지 않아야 한다. 따라서, Y 아미노산 잔기 또는 YE 디펩티드 사슬은 펩티드의 C-말단 끝에 존재하지 않아야 하며, 상기 Y는 티로신이고 E는 상기 정의된 바와 같다.

[0114] 본 발명의 펩티드 및 화합물은 단리된 펩티드로서 또는 다른 폴리펩티드의 일부로서 당업계에 잘 알려진 화학적 합성 방법에 의해 합성적으로 생성될 수 있다. 대안적으로, 펩티드 및 화합물은 본 발명의 펩티드를 생산하는 미생물에서 생산될 수 있으며, 이는 단리되고 필요하다면 추가로 정제된다. 펩티드 및 화합물은 미생물 예를 들어 박테리아, 효모 또는 진균에서, 진핵 세포 예를 들어 포유류 또는 곤충 세포에서, 또는 재조합 바이러스 벡터 예를 들어 아데노바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스바이러스, 셈리키 숲 바이러스, 배큘로바이러스, 박테리오파지, 신드비스 바이러스 또는 센다이 바이러스에서 생산될 수 있다. 펩티드 및 화합물을 생산하기에 적합한 박테리아는 대장균(E.coli), B. 서브틸리스(B.subtilis) 또는 펩티드 예를 들어 펩티드 미모토프를 발현할 수 있는 임의의 다른 박테리아를 포함한다. 펩티드 및 화합물을 발현하기에 적합한 효모 유형은 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae), 스키조사카로마이세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 칸디다(Candida), 피키아 패스토리스(Pichia pastoris) 또는 펩티드를 발현할 수 있는 임의의 다른 효모를 포함한다. 상응하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 또한 재조합적으로 생산된 펩티드 및 화합물을 단리 및 정제하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있으며 예를 들어 겔 여과, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 등을 포함한다.

[0115] 펩티드 및 화합물의 단리를 용이하게 하기 위해, 12량체 펩티드가 친화성 크로마토그래피에 의한 단리를 가능하게 하는 이종 폴리펩티드에 번역적으로 융합(공유 결합)된 융합 폴리펩티드가 제조될 수 있다. 전형적인 이종 폴리펩티드는 His-Tag(예를 들어 His_6; 6개의 히스티딘 잔기), GST-Tag(글루타티온-S-트랜스퍼라제) 등이다. 융합 폴리펩티드는 펩티드 및 화합물의 정제를 촉진할 뿐만 아니라 정제 중 분해를 방지할 수도 있다. 정제 후 이종 폴리펩티드를 제거하는 것이 바람직하다면, 융합 폴리펩티드는 예를 들어 펩티드 미모토프와 이종 폴리펩티드 사이의 접합부에 절단 부위를 포함할 수 있다. 절단 부위는 부위에서 아미노산 서열에 특이적인 효소(예를 들어 프로테아제)로 절단되는 아미노산 서열로 구성된다.

[0116] 본 발명의 항원성 펩티드, 본 발명의 면역원성 화합물 또는 본 발명의 약학 제제는 치료 용도(즉, 약제로서)이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 본 발명의 항원성 펩티드, 본 발명의 면역원성 화합물 또는 본 발명의 약학 제제가 시누클레인병증의 치료 또는 예방을 위해 사용되는 것을 제공한다. 본 발명은 또한 시누클레인병증의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한 약제의 제조를 위한, 본 발명의 항원성 펩티드, 본 발명의 면역원성 화합물 또는 본 발명의 약학 제제의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 항원성 펩티드, 본 발명의 면역원성 화합물 또는 본 발명의 약학 제제를 이를 필요로하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 시누클레인병증의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 이러한 모든 양태에 따른 특정 실시형태에서, 시누클레인병증은 루이 소체 장애(LBD), 특히 파킨슨병(PD: Parkinson's Disease), 파킨슨병 치매(PDD) 및 루이 소체 치매(DLB), 및 다계통 위축증(MSA) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 양태에 따른 일부 실시형태에서, 용어 시누클레인병증(또는 알파-시누클레인병증)은 a-시누클레인 응집체가 검출되고 원발성 시누클레인병증 및 수반되는 병리를 포함하는 질환을 설명하는 데 사용된다. 원발성 시누클레인병증은 파킨슨병(산발성, 알파-시누클레인 돌연변이가 있는 가족성, 알파-시누클레인 이외의 돌연변이가 있는 가족성, 순수 자율신경 부전 및 루이 소체 연하곤란), 루이 소체 치매(LBD; 루이 소체 치매(DLB)("순수" 루이 소

체 치매), 파킨슨병 치매(PDD) 포함), 또는 미만성 루이 소체 질환, 다계통 위축증(샤이-드래거 증후군, 선조체 흑질 변성 및 올리브교 소뇌 위축증)을 포함한다. 또한 a-syn 병변은 하기 질환에서 수반되는 병리로서 검출될 수 있다: 산발성 알츠하이머병, APP 돌연변이가 있는 가족성 알츠하이머병, PS-1, PS-2 또는 기타 돌연변이가 있는 가족성 알츠하이머병, 가족성 영국 치매(familial British dementia), 봉입체 근육염(inclusion-body myositis), 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury), 만성 외상성 뇌병증(chronic traumatic encephalopathy), 권투선수 치매(dementia pugilistica), 타우병증(tauopathies)(픽병(Pick's disease), 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia), 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 피질기저핵 변성(corticobasal degeneration), 17번 염색체 및 니만-픽 유형 C1 질환과 관련된 파킨슨증이 있는 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 and Niemann-Pick type C1 disease)), 다운 증후군(Down syndrome), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 운동 신경 질환(motor neuron disease), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(괌(Guam)의 산발성, 가족성 및 ALS-치매 복합체), 신경축삭 이영양증(neuroaxonal dystrophy), 뇌철 축적 유형 1을 동반한 신경변성(neurodegeneration with brain iron accumulation type 1)(할러포르덴-스파츠 증후군(Hallervorden-Spatz syndrome)), 프리온 질환(prion diseases), 게르스트만-슈트로이슬러-샤인커병(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease), 모세혈관 확장성 운동실조(ataxia telangiectasia), 메이그 증후군(Meige's syndrome), 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis), 고셔병(Gaucher disease), 크라베병(Krabbe disease) 및 기타 리소좀 저장 장애(쿠포르-라켑 증후군(Kufor-Rakeb syndrome) 및 산필리포 증후군(Sanfilippo syndrome) 포함), 또는 급속 안구 운동(REM: rapid eye movement) 수면 행동 장애.

[0117] 이러한 모든 양태에 따르면, 치료되는 대상체는 포유류 대상체, 바람직하게는 인간이다. 본 발명의 항원성 펩티드, 본 발명의 면역원성 화합물 또는 본 발명의 약학 제제는 시누클레인병증을 치료 또는 예방하기에 유효한 양으로 투여된다. 예방은 본 발명의 백신 조성물을 사용하는 것이 바람직하다. 예방은 질환의 완전한 예방뿐만 아니라 질환의 발병 및/또는 중증도(투여가 없는 상황과 비교하여)를 지연시키는 것을 포함한다. 치료는 질환의 완전한 치료뿐만 아니라 질환의 하나 이상의 증상을 개선하고 질환 진행을 예방하거나 지연시키는 것(투여하지 않는 상황과 비교하여)을 포함한다. 적합한 투여량 및 투여 경로가 본원에 기술되어 있으며, 변형은 임상의에 의해 경험적으로 결정될 수 있다.

[0118] 본 발명은 하기 숫자가 매겨진 항에 의해 추가로 정의될 수 있다:

[0119] 1. 하기 구조를 갖는 면역원성 화합물로서,

[0120] 담체-X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12},

[0121] 상기 식에서

[0122] 담체는 X_1에 공유적으로 결합된 폴리펩티드 담체이고; 바람직하게는 담체 분자를 펩티드 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}에 공유적으로 연결하는 링커 모이어티를 포함하고;

[0123] D는 아스파르트산이고, E는 글루탐산이고, P는 프롤린이고, V는 발린이고;

[0124] X_1은 L, K, A 또는 S이고, 상기 L은 류신이고, K는 리신이고, A는 알라닌이고 S는 세린이고;

[0125] X_2는 E 또는 S이고, 상기 E 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0126] X_3은 D, E, K, N, A 또는 S이고, 상기 N은 아스파라긴이고 D, E, K, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0127] X_4는 M, A, S, L 또는 K이고, 상기 M은 메티오닌이고 A, S, L 및 K는 상기 정의된 바와 같고;

[0128] X_{10}은 N, S 또는 A이고, 상기 N, S 및 A는 상기 정의된 바와 같고;

[0129] X_{12}는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, A, K, V, S, 또는 G이고, 상기 G는 글리신이고 A, K, V 및 S는 상기 정의된 바와 같고,

[0130] 단 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}가 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A가 아닌, 면역원성 화합물.

[0131] 2. 1항에 있어서,

[0132] X_1은 L, S, 또는 K이고, X_2는 E 또는 S이고, X_3은 S, D, E, A, K 또는 N이고, X_4는 M이고, X_{10}은 N이고/이거나, X_{12}는 A, S, K 또는 V이고, 바람직하게는 상기 X_1은 L 또는 K이고, X_2는 E이고, X_3은 S, D, E, K 또는 A이고, X_4는 M이고, X_{10}은 N이고/이거나, X_{12}는 A, S 또는 K이고, 특히 상기 X_1은 L 또는 K이고, X_3은 D, K 또는 S이고 X_{12}는 A인, 면역원성 화합물.

[0133] 3. 1항 또는 2항에 있어서,

[0134] 링커 모이어티가 바람직하게는 화학적 링커로 폴리펩티드 담체 모이어티에 결합된 적어도 하나의 시스테인 및/또는 글리신 아미노산 잔기를 포함하고, 특히 상기 링커 모이어티가 NHS-폴리(에틸렌 옥시드)(PEO)에 의해(예를 들어 NHS-PEO_4-말레이미드에 의해) 형성되는, 면역원성 화합물.

[0135] 4. 1항 내지 3항 중 어느 한 항에 있어서,

[0136] 펩티드 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}가 KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 및 KEDMPVDPDNEA, 바람직하게는 SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA 및 LESMPVDPDNES, 특히 LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역원성 화합물.

[0137] 5. 1항 내지 4항 중 어느 한 항에 있어서,

[0138] 펩티드 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}가 KESMPVDPDNEA인, 면역원성 화합물.

[0139] 6. 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 담체 모이어티가 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 파상풍 톡소이드, 열-불안정 엔테로톡신(LT), 콜레라 독소(CT), 디프테리아 독소(DT) 및 이의 변이체, 특히 CRM 197, 파상풍 톡소이드(TT), 돌연변이 독소, 알부민-결합 단백질, 및 소 혈청 알부민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적으로 허용되는 담체 분자이거나 이를 포함하는, 면역원성 화합물.

[0140] 7. 1항 내지 6항 중 어느 한 항에 있어서,

[0141] 시누클레오병증의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한, 바람직하게는 루이 소체 장애(LBD), 특히 파킨슨병(PD), 파킨슨병 치매(PDD) 및 루이 소체 치매(DLB), 및 다계통 위축증(MSA) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 시누클레인병증의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한, 면역원성 화합물.

[0142] 8. 시누클레인병증, 바람직하게는 루이 소체 장애(LBD), 특히 파킨슨병(PD), 파킨슨병 치매(PDD) 및 루이 소체 치매(DLB), 및 다계통 위축증(MSA) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 시누클레인병증의 치료 또는 예방에서 백신으로서 사용하기 위한, 1항 내지 7항 중 어느 한 항에 따른 화합물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약학 제제.

[0143] 9. 8항에 있어서,

[0144] 제제가 어주번트와 함께, 바람직하게는 MF59 알루미늄 포스페이트, 칼슘 포스페이트, 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-12, GM-CSF), 사포닌 (예를 들어, QS21), MDP 유도체, CpG 올리고, IC31, LPS, MPL, 폴리포스파젠, 및 알루미늄 히드록시드, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어주번트와 함께; 특히 어주번트로서 알루미늄 히드록시드와 함께 백신으로서 제형화되는, 약학 제제.

[0145] 10. 8항 또는 9항에 있어서,

[0146] 1항 내지 10항 중 어느 한 항에 따른 화합물이 0.1 ng 내지 10 mg, 바람직하게는 10 ng 내지 1 mg, 특히 100 ng 내지 100 μg의 양으로 함유되는, 약학 제제.

[0147] 11. 8항 내지 10항 중 어느 한 항에 있어서,

[0148] 제제가 피하, 피내 또는 근육 내 투여용으로 제형화되고/되거나; 제제가 리포솜, 비로솜, 이스콤, 코크리에이트, 또는 에멀젼으로서 제형화되는, 약학 제제.

[0149] 12. 하기 구조를 갖는 항원성 펩티드로서,

[0150] X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12},

[0151] 상기 식에서

[0152] D는 아스파르트산이고, E는 글루탐산이고, P는 프롤린이고, V는 발린이고; (C-)는 존재하거나 존재하지 않는 시스테인이고;

[0153] X_1은 L, K, A 또는 S이고, 상기 L은 류신이고, K는 리신이고, A는 알라닌이고 S는 세린이고;

[0154] X_2는 E 또는 S이고, 상기 E 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0155] X_3은 D, E, K, N, A 또는 S이고, 상기 N은 아스파라긴이고 D, E, K, A 및 S는 상기 정의된 바와 같고;

[0156] X_4는 M, A, S, L 또는 K이고, 상기 M은 메티오닌이고 A, S, L 및 K는 상기 정의된 바와 같고;

[0157] X_{10}은 N, S 또는 A이고, 상기 N, S 및 A는 상기 정의된 바와 같고;

[0158] X_{12}는 존재하거나 존재하지 않고, 존재하는 경우, A, K, V, S, 또는 G이고 상기 G는 글리신이고 A, K, V 및 S는 상기 정의된 바와 같고,

[0159] 단 X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}는 L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A가 아닌, 항원성 펩티드.

[0160] 13. 12항에 있어서,

[0161] KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 및 KEDMPVDPDNEA, 바람직하게는 SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA 및 LESMPVDPDNES, 특히 LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA 및 KEDMPVDPDNEA로 이루어진 군으로부터 선택되는, 펩티드.

[0162] 14. 하기 구조를 갖는 아미노산 링커가 있는 펩티드로서,

[0163] 링커-X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12},

[0164] 상기 X_1, X_2, X_3, X_4, X_1, 및 X_{12}는 13항에 정의된 바와 같고, 상기 아미노산 링커는 1 내지 5개 아미노산 잔기를 포함하는, 아미노산 링커가 있는 펩티드.

[0165] 15. 14항에 있어서,

[0166] 링커의 아미노산 잔기가 글리신, 시스테인, 이소류신, 알라닌, 발린, 류신, 세린, 글루탐산, 아스파르트산, 리신, 아스파라긴, 글루타민 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 링커가 C-, G-, CG-, CGG-, CCG-, GC-, GGC-, GCC-, GG-, 및 GGG-의 군으로부터 선택되고; 특히 아미노산 링커가 있는 펩티드가 GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCKESMPVDPDNEA, CCCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, CKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEA GGKESMPVDPDNEK, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNES, CSEDMPVDPDNEA, CLEEMPVDPDNEA, CSESMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNES, CLEAMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNEK, CLEDMPVDPDNEV, CGGKESMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEK, CLSDMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEA, CKEDMPVDPDNEA, CLENMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEK, 및 CGGKEDMPVDPDNEA, 특히 GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCKESMPVDPDNEA, CCCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, 및 CKESMPVDPDNEA의 군으로부터 선택되는, 아미노산 링커가 있는 펩티드.

[0167] 16. 1항 내지 7항 중 어느 한 항에 있어서 또는 14항 또는 15항에 있어서,

[0168] 링커 모이어티 또는 아미노산 링커가 프롤린, 아르기닌, 또는 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 함유하지 않는, 면역원성 화합물 또는 아미노산 링커가 있는 펩티드.

[0169] 17. 16항에 있어서,

[0170] 펩티드의 C-말단 끝에 Y 아미노산 잔기 또는 YE 디펩티드 사슬이 존재하지 않고, 상기 Y는 티로신이고 E는 상기 정의된 바와 같고; 바람직하게는

[0171] (a) X_{12}가 존재하며 X_{12}에 대한 C-말단에 추가 아미노산 잔기가 존재하지 않거나;

[0172] (b) X_{12}는 존재하지 않으며 X_{11}에 대한 C-말단에 추가 아미노산 잔기가 존재하지 않는, 면역원성 화합물 또는 아미노산 링커가 있는 펩티드.

[0173] 18. 시누클레오병증의 치료 또는 예방용, 바람직하게는 루이 소체 장애(LBDs), 특히 파킨슨병(PD), 파킨슨병 치매(PDD) 및 루이 소체 치매(DLB), 및 다계통 위축증(MSA) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 시누클레인병증의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한, 1항 내지 7항, 16항 및 17항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 화합물 또는 12항 또는 13항에 따른 항원성 펩티드 또는 14항 내지 17항 중 어느 한 항에 따른 아미노산 링커가 있는 펩티드의 용도.

[0174] 19. 시누클레오병증의 치료 또는 예방, 바람직하게는 루이 소체 장애(LBD), 특히 파킨슨병(PD), 파킨슨병 치매(PDD) 및 루이 소체 치매(DLB), 및 다계통 위축증(MSA) 또는 뇌 철 축적 유형 I을 동반한 신경변성(NBIA 유형 I)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 시누클레인병증의 치료 또는 예방 방법으로서, 유효량의 1항 내지 7항, 16항 및 17항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 화합물 또는 12항 또는 13항에 따른 항원성 펩티드 또는 14항 내지 17항 중 어느 한 항에 따른 아미노산 링커가 있는 펩티드가 이러한 치료 또는 예방을 필요로 하는 인간 개인에 투여되는, 방법.

[0175] 본원에서 사용되는 약어:

[0176] aa 아미노산(Amino acid)

[0177] ab 항체(Antibody)

[0178] aSyn 알파 시누클레인(Alpha synuclein)

[0179] BSA 소 혈청 알부민(Bovine serum albumin)

[0180] bSyn 베타 시누클레인(Beta synuclein)

[0181] CNS 중추신경계(Central nervous system)

[0182] DLB 루이 소체 치매(Dementia with Lewy bodies)

[0183] DHA 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic acid)(정제됨)

[0184] EC_{50}절반-최대 유효 농도(Half-maximal effective concentration)

[0185] ELISA 효소-연결 면역흡착 분석(Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0186] Fc 플로우 셀(Flow cell)

[0187] FELASA 실험실 동물 과학 협회 연합회(Federation for laboratory animal science associations)

[0188] h 시간(Hour)(s)

[0189] HBS HEPES 완충 식염수(HEPES buffer saline)

[0190] HNE 4-히드록시-2-노네날(4-hydroxy-2-nonenal)

[0191] HPLC 고압 액체 크로마토그래피(High pressure liquid chromatography)

[0192] HRP 고추냉이 과산화효소(Horseradish peroxidase)

[0193] IC_{50}절반-최대 억제 농도(Half-maximal inhibitory concentration)

[0194] IHC 면역조직화학(Immunohistochemistry)

[0195] IQR 사분위 범위(Interquartile range)

[0196] IR 면역 반응(Immune response)

[0197] kDa 킬로달톤(Kilodalton)

[0198] KLH 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole limpet haemocyanin)

[0199] LB 루이 소체(Lewy body)/ 루이 소체(Lewy bodies)

[0200] mAb 모노클로날 항체(Monoclonal antibody)

[0201] MSA 다계통 위축증(Multiple system atrophy)

[0202] OD 광학 밀도(Optical density)

[0203] $OD_{max/2}$절반-최대 광학 밀도(Half-maximal optical density)

[0204] PD 파킨슨병(Parkinson's disease)

[0205] RT 실온(Room temperature)

[0206] RU 반응 단위(response units)

[0207] SAIT 특정 활성 면역요법(Specific active immunotherapy)

[0208] s.c. 피하(Subcutaneous)

[0209] SEM 평균의 표준 편차(Standard error of the mean)

[0210] SN 흑질(Substantia nigra)

[0211] SPR 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance)

[0212] vs 대(Versus)

[0213] wt 야생형(Wild type)

[0214] 본 발명은 하기 실시예 및 도면에 의해 추가로 기술되지만, 이에 제한되지는 않는다.

도면의 간단한 설명

[0215] 도 1: 실험의 개략적인 시간-경과. 주사는 화살표로 표시되고 채혈은 방울로 표시된다. PP: 예비(pre)-혈장, EP: 말단(end)-플라즈마. Pn: 혈장 n. Wn: 실험 n주차.

도 2: p4456 및 p4572 또는 서로 다른 길이의 해당 천연 aSyn 에피토프에 의해 유도된 aSyn 교차-반응 항체의 비교. (a) 모든 개별 마우스의 말단-혈장으로부터의 aSyn 단백질에 대한 유도된 항체 농도가 제시된다. 열은 SEM의 평균값을 나타낸다. 극한 이상치(IQR의 3배 이상)가 그래프에서 제거되었다 (b) 천연 aSyn 서열의 아미노산 서열을 따라 주입된 펩티드의 상대적 위치. p9524는 AFFITOPE®의 추가 개발을 위한 스캐폴드로 사용되었으며 회색으로 강조 표시되어 있다.

도 3: 단일 알라닌(a) 또는 세린(b) 교환을 갖는 aSyn 서열 aa113 내지 124를 갖는 펩티드(펩티드-담체 단백질 접합체로 전달됨)의 면역원성. 개별 면역화된 마우스로부터 유도된 말단-혈장 내 항-aSyn 항체의 군 중앙값 농도를 결정하고 100%로 설정한, p9524를 사용한 백신접종에 의해 유발된 항-aSyn 항체의 농도와 관련하여 설정하였다. 주입된 펩티드의 서열이 표 3 및 4에 제시되어 있다.

도 4: 위치 1 또는 3(a) 및 4 또는 12(b)에서 단일 아미노산 교환을 갖는 aSyn 서열 aa113 내지 124를 갖는 펩티드(펩티드-담체 단백질 접합체로 전달됨)의 면역원성. 개별 면역화된 마우스로부터 유도된 말단-혈장 내의 항-aSyn 항체의 군 중앙값 농도를 결정하고 100%로 설정한, p9524를 사용한 백신접종에 의해 유도된 항-aSyn 항체의 농도와 관련하여 설정하였다. 주입된 펩티드의 서열이 표 7 및 8에 제시되어 있다.

도 5: 이중 세린 및 기타 아미노산 교환을 갖는 aSyn 서열 $aa_{113-124}$에 의해 유도된 aSyn에 대한 면역원성. 개별 면역화된 마우스로부터 유래된 말단-혈장 내 항-aSyn 항체의 군 중앙값 농도를 결정하고 100%로 설정한, p9524를 사용한 백신접종에 의해 유도된 항-aSyn 항체의 농도와 관련하여 설정하였다. 주입된 펩티드의 서열이 표 11에 제시되어 있다.

도 6: aSyn 서열 $aa_{113-124}$ 및 N-말단 연장된 서열에 의해 유도된 aSyn에 대한 면역원성. 개별 면역화된 마우스로부터 유래된 말단-혈장 내 항-aSyn 항체의 군 중앙값 농도를 결정하고 100%로 설정한, p10074를 사용한 백신접종에 의해 유도된 항-aSyn 항체의 농도와 관련하여 설정하였다. 주입된 펩티드의 서열이 표 13에 제시되어 있다.

도 7: aSyn 서열 $aa_{113-124}$, N-말단 연장된 서열, 및 aSyn 서열 $aa_{115-121}$ p4456에 의해 유도된 aSyn에 대한 면역원성. 개별 면역화된 마우스로부터 유래된 말단-혈장 내 항-aSyn 항체의 군 중앙값 농도를 결정하고 100%로 설정한, p4456을 사용한 백신접종에 의해 유도된 항-aSyn 항체의 농도와 관련하여 설정하였다. 주입된 펩티드의 서열이 표 13에 제시되어 있다.

도 8: aSyn 표적화 서열 p10033 및 p10118 및 이들의 C-말단 절단 서열의 면역원성. (a) 개별 면역화된 마우스로부터 유도된 말단-혈장 내 항-aSyn 항체의 군 중앙값 면역원성을 결정하고 100%로 설정한, p10033을 사용한 백신접종에 의해 유도된 항-aSyn 항체의 농도와 관련하여 설정하였다. (b) 개별 면역화된 마우스로부터 유래된 말단-혈장 내 항-aSyn 항체의 군 중앙값 면역원성을 결정하고 100%로 설정한, p10118을 사용한 백신접종에 의해 유도된 항-aSyn 항체의 농도와 관련하여 설정하였다. 주입된 펩티드의 서열이 표 16에 제시되어 있다.

도 9: AFFITOPE® 후보-유도된 항체에 의한 *사후* 인간 DLB 뇌의 IHC 염색. 각 패널에 사용된 항체는 각 패널 상단에 표시된 펩티드에 의해 유도된다. 밑줄 친 문자는 천연 서열과 다른 아미노산을 나타낸다. 크기 막대는 기본 사진에서 50 μM을 나타내고 단일 루이 소체(LB)에 초점을 맞춘 오른쪽 하단 모서리의 작은 상자에서 10 μM을 나타낸다.

도 10: 올리고머 및 독성 aSyn 종 대 단량체 형태에 대한 우선적 결합(BiaCore 데이터). 올리고머(적색 곡선) 또는 단량체 aSyn(녹색 곡선) 종에 대한 AFFITOPE® 후보-유도된 항체 및 모노클로날 항체 LB509 및 28A7의 안정성 결합의 센소그램. 파란색 선은 음성 대조군(HBS 완충액에만 결합)을 나타낸다. X축: 러닝타임(초), y축: 상대 결합 반응 단위.

도 11: aSyn 단량체, 올리고머 및 필라멘트에 대한 AFFITOPE® 후보-특이적 항체 결합의 농도-의존적 억제를 보여주는 경쟁 ELISA. AFFITOPE® 후보-면역화 마우스의 정제된 항체를 다양한 aSyn-종의 양을 증가시키면서 사전 배양한 다음 플레이트에 결합된 aSyn-올리고머에 대한 결합을 시험하였다. 단량체 aSyn에 의한 결합 억제는 빨간색 곡선으로, 원섬유 aSyn에 의한 억제는 파란색 곡선으로, 올리고머에 의한 억제는 녹색 곡선으로 표시된다. X축: aSyn-종 농도(ng/ml)의 십진법 대수, y축: 각 aSyn 종 및 농도로 측정한 OD 405 값.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0216] **실시예**

[0217] **aSyn-AFFITOPE®의 식별**

[0218] 다양한 aSyn 응집체의 잠재적인 독성을 감안할 때, 시누클레인병증에 대한 치료적 접근법은 세포 내 및 세포 외 aSyn의 수준 또는 축적을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 올리고머 aSyn은 세포 간(intercellular) 공간으로 분비되는 경향이 있고 프리온-유사 방식으로 하나의 영향을 받는 뉴런 또는(예를 들어, MSA의 경우) 희소돌기신경교(oligodendrocyte)에서 인접한 뉴런 또는 신경아교 세포로 이동할 수 있다는 사실(문헌[Lee et al., 2008], 문헌[Lashuel et al., 2013], 문헌[Bengoa-Vergniory et al., 2017], 문헌[Bernis et al., 2015])은 장기적인 방식으로 aSyn-전달을 목표로 하는, AFFIRIS 특정 능동 면역 요법(SAIT: specific active immunotherapy)과 같은 치료적 접근법을 위한 길을 열어준다. AFFITOPE®의 PD01 및 PD03 - aSyn의 정의된 영역을 모방하는 짧은 합성 펩티드-은 PD - PD01A(NCT01568099; 문헌[Volc et al., 2020]) 및 PD03A(NCT02267434)-및 다계통 위축증(MSA) 환자(PD01 및 PD03)(NCT02270489)의 임상 1상 시험에서 SAIT에 대한 화합물로서 시험되었다. 제제는 올리고머 aSyn을 선호하는 aSyn-특이적 항체를 잘 견디고 유도하는 것으로 나타났다.

[0219] 본 발명의 과정에서 aSyn-표적화 AFFITOPE®의 2세대가 개발되었으며, 이는 각각 PD01 및 PD03에서 보이는 것보다 더 높은 역가 및 aSyn 단백질에 대한 교차 반응성을 유도하였다. 또한, 선택의 초점은 응집된 독성 aSyn 종(올리고머 aSyn)과 단량체 aSyn 단백질을 구별하는 유도된 항체의 능력에도 있었다. 따라서, AFFITOPE®-유도된 항체가 주변부에서 과도하게 대표되는 단량체 aSyn 종에 대한 결합은 미미한 정도인 것으로 가정되지만, CNS 및

주변부에서 독성 올리고머 및 과소하게 대표되는 aSyn 종에 대한 결합은 발생하는 것이 바람직하다.

[0220] 가능성이 높은 AFFITOPE®를 식별하기 위해 aSyn 에피토프 $aa_{113-124}$를 표적으로 삼았다. 높은 면역원성, aSyn 천연 에피토프에 대한 높은 교차-반응성, 올리고머 및 원섬유 독성 aSyn 종에 대한 높은 선택성을 가진 유도된 항체의 결합(올리고머 결합 > 피브릴 결합)과 같은 잘 정의된 선택 기준을 적용하였다.

[0221] 선택 전략을 여러 단계로 구성하였다. (i) 면역원성이 높고 적합한 에피토프를 식별하기 위해 aSyn 표적 단백질의 C-말단 내에서 에피토프 찾기, (ii) 면역원성 및 교차-반응성을 강화하기 위해 교환될 수 있는 천연 표적 서열을 따라 위치를 검출하기 위한 알라닌 스캔, (iii) 면역원성 및 교차-반응성을 강화하기 위해 교환될 수 있는 천연 표적 서열을 따라 위치를 검출하기 위한 세린 스캔, (iv) 천연 표적 서열을 따라 이중 세린 교환, (v) aSyn에 대한 면역원성 및 교차 반응성을 개선할 수 있는 Ala 또는 Ser 아미노산 교환 이외의 것, 및 (vi) 2개의 선택된 AFFITOPE® 서열로부터 C-말단에서 하나의 아미노산을 제거.

[0222] ***생체 내* 실험의 면역화 일정**

[0223] BALB/c에 대해 본원에서 설명된 모든 실험에서, 마우스에 격주 간격으로 AFFITOPE® 또는 천연 aSyn 에피토프 서열(주사 당 순 펩티드 10 μg)을 3회 주사하였다(도 1).

[0224] **aSyn 표적 단백질의 C-말단 내 에피토프 찾기(aSyn-28 *생체 내* 실험)**

[0225] aSyn 단백질의 C-말단 영역을 따라 고도로 면역원성인 서열에 대한 에피토프 스크리닝을 수행하였다. 이 목적을 위해, wt BALB/c 마우스에서 면역원성 연구를 위해 7 내지 13개 아미노산의 다양한 긴 아미노산 스트레치를 사용하였다(표 1, 도 1). 동시에, AFFiRiS p4456 및 p4572에 의해 이전에 선택한 AFFITOPE®를 비교를 위해 포함시켰다. 모든 개별 동물의 혈장을 3차 면역화 2주 후에 수집한 후 주입된 펩티드 및 aSyn 단백질에 대한 역가와 aSyn 반응 항체의 농도를 결정하기 위해 ELISA로 분석하였다. aSyn $aa_{113-124}$ 서열에 상응하는 펩티드 p9524는 가장 많은 양의 aSyn-특이적 항체를 유도하였다(도 2, 표 2). 이러한 결과를 기반으로 이러한 서열을 추가 AFFITOPE® 후보 선택을 위한 천연 표적 서열로서 선택하였다. 또한 높은 항-aSyn 역가를 유도하는 2개의 다른 펩티드 p9964 및 p9556을 추가 개발에서 제외시켰다. 펩티드 p9964는 아미노산 Y_{125} 및 E_{126}을 포함하며 p9964로부터 유래된 펩티드 단편은 MHCI의 상이한 대립형질 변이체에 높은 친화도로 결합하여 잠재적인 세포독성 T 세포 에피토프가 될 것으로 *인 실리코* 분석에 의해 예측된다(www.syfpeithi.de). 펩티드 p9556은 잠재적으로 병리학-관련 칼페인(calpain) 절단 부위 aSyn L_{113}/E_{114}를 포함하지 않기 때문에 추가 개발을 위해 선택하지 않았다.

표 2는 AFFITOPE® 유도 마우스 혈장에서 발견된 aSyn에 대한 역가를 요약한 것이다.

[0226] [표 1]

[0227] aSyn-28 실험 설정. 표는 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

[0228]

Seq ID	군	약물 제품	서열	추가 정보
1	1	p4456-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-DQFVLPD	aSyn115-121 (M→Q, D→L)
2	2	p4572-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-YDRPVQPDR	aSyn114-122 (E→Y, M→R, D→Q, N→R)
3	3	p9964-CRM197- 알루미늄 히드록시드	C-EDMPVDPDNEAYE	aSyn114-126
4	4	p9524-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEA	aSyn113-124
5	5	p9556-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-DMPVDPDNEA	aSyn115-124
6	6	p9557-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-EDMPVDPDNE	aSyn114-123
7	7	p9663-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-VDPDNEAYE	aSyn118-126

[0229] 표 1

[0230] [표 2]

[0231] aSyn-28, 역가, 유도된 항체 농도 및 교차-반응 퓰ㅎ프성을 포함한 주요 결과. 모든 매개변수를 단일 마우스에서 평가하였으며 값은 중앙값을 나타낸다. 면역화된 마우스의 혈장 내 항-aSyn 항체의 농도를 mAb LB509로 생성된 참조 곡선으로부터 외삽하였다.

Seq ID	군	주입된 펩티드에 대한 역가	aSyn에 대한 역가	aSyn에 대한 Ab 농도 [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

[0232]

[0233] 표 2

[0234] **aSyn113-124 에피토프(aSyn-30)에 따른 알라닌-스캔 및 세린 스캔(aSyn-31)**

[0235] 다음 단계로서, 천연 $aSyn_{113-124}$ 서열의 각 아미노산 위치를 알라닌 또는 세린으로 교환하여 면역원성을 유지하거나 강화시키기 위해 대체가능한 위치를 식별하였다(표 3 및 4). BALB/c 마우스에게 각각의 AFFITOPE®를 3회 주입하고 세 번째이자 마지막 주사 2주 후, 각 개별 마우스의 혈장을 수집하고 ELISA로 분석하여 AFFITOPE®-유도된 역가 및 aSyn 항체 농도를 결정하였다. 알라닌 스캔은 aSyn 113-124aa(p9524) 서열을 따라 위치 1(p9988)의 Leu 및 위치 3(p9990)의 Asp가 필수적이지 않은 반면, Ala로의 교환은 aSyn에 대한 더 높은 교차-반응성으로 이어진다는 것을 밝혔다(도 3a). 세린 스캔, 즉 aSyn 113-124 서열을 따라 각각의 천연 발생 아미노산과 세린의 교환(도 3b)은 위치 1(p9999), 2(p10000), 3(p10001), 및 12(p10010)에서 Ser로의 아미노산 교환에 의해 aSyn에 대한 더 높은 교차-반응성을 밝혔다. 표 5 및 6은 면역화된 마우스의 혈장에 존재하는 aSyn에 대한 WT 서열에 의해 유도된 역가에 대한 유도된 역가를 요약한다.

[0236] [표 3]

[0237] aSyn-30 실험 설정. 표는 상이한 치료군, 사용 중인 각각의 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열, 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

Seq ID	군	약물 제품	서열
4	1	p9524-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEA
8	2	p9988-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-AEDMPVDPDNEA
9	3	p9989-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LADMPVDPDNEA
10	4	p9990-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEAMPVDPDNEA
11	5	p9991-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDAPVDPDNEA
12	6	p9992-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMAVDPDNEA
13	7	p9993-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPADPDNEA
14	8	p9994-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVAPDNEA
15	9	p9995-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDADNEA
16	10	p9996-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPANEA
17	11	p9997-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDAEA
18	12	p9998-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNAA

[0238]

[0239] 표 3

[0240] [표 4]

[0241] aSyn-31의 실험 설정. 표는 상이한 처리군, 사용 중인 각각의 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

Seq ID	군	약물 제품	서열
4	1	p9524-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEA
19	2	p9999-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-SEDMPVDPDNEA
20	3	p10000-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LSDMPVDPDNEA
21	4	p10001-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LESMPVDPDNEA
22	5	p10002-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDSPVDPDNEA
23	6	p10003-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMSVDPDNEA
24	7	p10004-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPSDPDNEA
25	8	p10005-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVSPDNEA
26	9	p10006-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDSDNEA
27	10	p10007-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPSNEA
28	11	p10008-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDSEA
29	12	p10009-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNSA
30	13	p10010-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNES

[0242]

[0243] 표 4

[0244] [표 5]

[0245] aSyn-30, 주요 결과. 단일 마우스에서 평가된 aSyn에 대한 역가 및 값은 p9524로 얻은 중앙값에 대한 중앙값을 나타낸다.

[0246]

Seq ID	군	p9524에 대한 역가(%)
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

[0247] 표 5

[0248] [표 6]

[0249] aSyn-31, 주요 결과. aSyn에 대한 역가를 단일 마우스에서 평가하였고 값은 p9524로 얻은 중앙값에 대한 중앙값을 나타낸다.

[0250]

ID	군	p9524에 대한 역가(%)
	1	100.0
	2	699.1
	3	300.5
	4	1161.7
	5	105.0
	6	19.5
	7	183.9
	8	115.2
	9	21.2
	10	49.7
	11	124.6
	12	107.3
	13	251.3

[0251] 표 6

[0252] **aSyn aa113-124 에피토프 서열을 따라 위치 1, 3, 4 및 12에서 아미노산 교환(*생체 내* 실험 aSyn-32 및 aSyn-33)**

[0253] 위치 1의 Leu, 3의 Asp, 4의 Met 및 12의 Ala를 천연 $aSyn_{113-124}$ 서열의 Ala 및/또는 Ser로 교환하면 높은 aSyn 특이적 항체 농도가 유도되기 때문에(도 3), 이러한 위치는 AFFITOPES®의 설계로 이어지는 변형을 위한 유망한 후보이다. 다음 단계로서 이러한 위치는 면역원성과 aSyn 교차-반응성과 관련하여 우호적이거나 덜 우호적인 교환을 정의하기 위해 상이한 특성을 가진 아미노산(예를 들어, 상이하게 하전된 아미노산 또는 상이한 극성을 가진 아미노산)에 의해 교환하였다(표 7 및 8). 비교를 위해, 천연 $aSyn_{113-124}$(p9524)를 주입한 군을 포함시켰다. 면역화된 마우스의 혈장을 ELISA로 분석하고 aSyn에 대한 천연 서열로 유도된 역가에 대한 항체 역가를 결정하였다(도 4a, b). 위치 1과 3 모두에서 Lys로의 교환은 더 많은 양의 aSyn-특이적 Ab(p10029 및 p10033)를 유도하는 반면, Trp로의 교환은 aSyn 특이적 항체 생산(p10026 및 p10031)을 극적으로 감소시켰다(도 4a). 또한, 위치 3에서 Asp에서 Glu로의 교환은 천연 aSyn 서열과 비교하여 aSyn에 대한 더 높은 교차-반응성을 야기하였다(도 4a). 위치 4에서의 Met 및 위치 12에서의 Ala는 실험 aSyn-32에서 위치 1 및 3에 대해 나타낸 바와 같이 실험 aSyn-33(표 8)에서 유사한 전략으로 교환하였다. 여기서 다시, 위치 12(p10045 또는 p10042)에서 Lys 또는 Val로의 교환은 더 높은 항-aSyn 항체 역가를 초래한 반면, 위치 4 또는 12에서 Trp로의 교환은 aSyn에 대한 교차-반응성을 감소시켰다(도 4b). 표 9 및 10은 면역화된 마우스의 혈장에 존재하는 aSyn에 대한 WT 서열에 의해 유도된 역가에 대한 유도된 역가를 요약한다.

[0254] [표 7]

[0255] 표 7: 실험 aSyn-32 설정. 표는 상이한 치료군, 사용 중인 각각의 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

[0256]

Seq ID	군	약물 제품	서열
4	1	p9524-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEA
31	2	p10026-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-WEDMPVDPDNEA
32	3	p10027-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-IEDMPVDPDNEA
33	4	p10028-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-NEDMPVDPDNEA
34	5	p10029-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-KEDMPVDPDNEA
35	6	p10030-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-DEDMPVDPDNEA
36	7	p10031-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEWMPVDPDNEA
37	8	p10032-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEEMPVDPDNEA
38	9	p10033-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEKMPVDPDNEA
39	10	p10034-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LELMPVDPDNEA
40	11	p10035-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LENMPVDPDNEA

[0257] 표 7

[0258] [표 8]

[0259] 실험 aSyn-33 설정. 표는 상이한 치료군, 사용 중인 각각의 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

[0260]

Seq ID	군	약물 제품	서열
4	1	p9524-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEA
41	2	p10036-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDWPVDPDNEA
42	3	p10037-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDLPVDPDNEA
43	4	p10038-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDNPVDPDNEA
44	5	p10039-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDDPVDPDNEA
45	6	p10040-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDKPVDPDNEA
46	7	p10041-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEW
47	8	p10042-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEV
48	9	p10043-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEG
49	10	p10044-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNED
50	11	p10045-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEK

[0261] 표 8

[0262] [표 9]

[0263] aSyn-32, 주요 결과. aSyn에 대한 역가를 단일 마우스에서 평가하였고 값은 p9524로 얻은 중앙값에 대한 중앙값을 나타낸다.

[0264]

Seq ID	군	p9524에 대한 역가(%)
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

[0265] 표 9

[0266] [표 10]

[0267] aSyn-33, 주요 결과. aSyn에 대한 역가를 단일 마우스에서 평가하였고 값은 p9524로 얻은 중앙값에 대한 중앙값을 나타낸다.

[0268]

Seq ID	군	p9524에 대한 역가(%)
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

[0269] 표 10

[0270] **aSyn aa113-124 에피토프 서열에 따른 이중 세린-교환(*생체 내* 실험 aSyn-37)**

[0271] $aSyn_{113-124}$ 천연 서열(p9524)을 따라 추가적인 세린 교환이 있는 VARIOTOPES®를 설계하고 wt BALB/c 마우스에서 면역원성에 대해 시험하였다(표 11, 도 5). 세 번째이자 마지막 주사 2주 후, AFFITOPE®-유도된 역가 및 aSyn 항체 농도를 결정하기 위해 각 개별 마우스의 혈장을 수집하고 ELISA로 분석하였다. 천연 aSyn 서열을 직접 비교 목적으로 주입하였다(군 1). 위치 3과 12(p10074) 및 위치 1과 3(p10075)에서의 이중 Ser 교환은 천연 표적 서열과 비교할 때 aSyn-특이적 항체의 역가를 추가로 향상시킬 수 있었다(도 5). 위치 1 및 4 및 위치 4 및 12에서의 이중 세린 교환은 aSyn에 대한 면역원성을 증가시키지 않았다(도 5). 표 12는 면역화된 마우스의 혈장에 존재하는 aSyn에 대한 WT 서열에 의해 유도된 역가에 대한 유도된 역가를 요약한 것이다.

[0272] [표 11]

[0273] 실험 aSyn-37의 설정. 표는 상이한 치료군, 사용 중인 각각의 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

[0274]

Seq ID	군	약물 제품	서열
4	1	p9524-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDMPVDPDNEA
51	2	p10074-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LESMPVDPDNES
52	3	p10075-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-SESMPVDPDNEA
53	4	p10076-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LESSPVDPDNEA
54	5	p10077-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-SEDMPVDPDNES
55	6	p10078-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEDSPVDPDNES
56	7	p10079-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-SEDSPVDPDNEA

[0275] 표 11

[0276] [표 12]

[0277] aSyn-37, 주요 결과. aSyn에 대한 역가를 단일 마우스에서 평가하였고 값은 p9524로 얻은 중앙값에 대한 중앙값을 나타낸다.

[0278]

Seq ID	군	p9524에 대한 역가(%)
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

[0279] 표 12

[0280] **aSyn aa113-124 에피토프 서열을 따라 위치 1, 3 및 12에서 Ser 및 Lys와 아미노산 교환(*생체 내* 실험 aSyn-44)**

[0281] 천연 $aSyn_{113-124}$ 서열의 위치 1, 3 및 12에서 Ser 및 Lys로의 교환은 높은 항-aSyn 항체 농도를 유도하는데 유리한 것으로 나타났다(도 3b, 4 및 5). 본원에 제시된 면역원성 연구에서 $aSyn_{113-124}$ 에피토프를 따른 세린 및 리신 교환의 조합을 wt BALB/c 마우스에서 시험하였다(aSyn-44 실험, 표 13). 또한, 링커 아미노산을 상이한 펩티드에 추가하였다. 동시에, 이전에 선택된 AFFITOPE® 후보 p4456을 직접 비교를 위해 이 실험에 포함시켰다. 각각의 개별 마우스의 세 번째이자 마지막 주사 2주 후 혈장을 수집하고 ELISA로 분석하여 AFFITOPE®-유도된 역가 및 aSyn 항체 농도를 결정하였다. 군 2 내지 7에서 시험한 AFFITOPE® 후보는 도 5(도 6)에 제시된 매우 성공적인 AFFITOPE® p10074와 비교할 때 항-aSyn 항체의 더 높은 역가를 유도할 수 있었다. 특히, AFFITOPE® p10118은 aSyn에 대해 가장 높은 역가를 유도하는 것으로 나타났다. 표 14는 면역화된 마우스의 혈장에 존재하는 aSyn에 대한 p10074에 의해 유도된 역가에 대한 유도된 역가를 요약한 것이다.

[0282] 새로 선택된 AFFITOPE® 서열(군 2 내지 7)의 면역원성을 AFFiRiS에서 이전에 선택된 펩티드 p4456과 직접 비교하기 위해, 이러한 AFFITOPE® 후보에 의해 유도된 항-aSyn 항체의 군 중간값 농도를 p4456에 의해 유도된 군 중앙값 항-aSyn 항체 농도로 관련하여 설정하였다(도 7). 시험한 모든 새로운 AFFITOPE® 후보는 p4456에 비해 상

당히 더 높은 aSyn 특정 역가를 유도하였다(도 7). 표 15는 면역화된 마우스의 혈장에 존재하는 aSyn에 대한 AFFITOPE® 서열 p4456에 의해 유도된 역가에 대한 유도된 역가를 요약한 것이다.

[0283] [표 13]

[0284] 실험 aSyn-44의 설정. 표는 상이한 치료군, 사용 중인 각각의 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

[0285]

Seq ID	군	약물 제품	서열
51	1	p10074-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LESMPVDPDNES
57	2	p10114-CRM197 알루미늄 히드록시드	CGG-KEDMPVDPDNEA
58	3	p10115-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEKMPVDPDNES
59	4	p10116-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-SEKMPVDPDNEA
60	5	p10117-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEKMPVDPDNEK
61	6	p10118-CRM197 알루미늄 히드록시드	CGG-KESMPVDPDNEA
62	7	p10119-CRM197 알루미늄 히드록시드	CGG-KESMPVDPDNEK
1	8	p4456-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-DQPVLPD

[0286] 표 13

[0287] [표 14]

[0288] aSyn-44, 주요 결과. aSyn에 대한 역가를 단일 마우스에서 평가하였고 값은 100%로 설정한 p10074로 얻은 중앙값에 대한 중앙값을 나타낸다.

[0289]

Seq ID	군	p10074에 대한 역가(%)
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

[0290] 표 14

[0291] [표 15]

[0292] aSyn에 대한 역가를 단일 마우스에서 평가하였고 값은 100%로 설정한 p4456으로 얻은 군 중앙값에 대한 군 중앙값을 나타낸다.

[0293]

Seq ID	군	p4456에 대한 역가(%)
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

[0294] 표 15

[0295] **위치 12에서 Ala를 제거하여 두 개의 선택된 AFFITOPE® 서열 p10033 및 p10118의 C-말단 절단**

[0296] AFFITOPE® 서열 p10033 및 특히 p10118은 높은 항-aSyn 항체 농도를 유도하는 것으로 나타났다(각각 도 4a 및 도 6). 본원에 제시된 면역원성 연구에서 위치 X12의 C-말단 Ala를 AFFITOPE® 서열 p10033 및 p10118로부터 제거하여 C-말단 절단이 설계된 펩티드의 면역원성 및 aSyn 교차-반응성에 영향을 미치는지 여부를 시험하였다. p10033, p10118, p10166 또는 p10167로 독립적인 실험에서 면역화된 wt BALB/c 마우스. 표 16은 펩티드 서열을 열거한다.

[0297] 세 번째 주사 2주 후에 각 개별 마우스의 혈장을 수집하고 ELISA로 분석하여 AFFITOPE®-유도된 역가 및 aSyn 항체 반응성을 결정하였다. 시험한 절단된 AFFITOPE® 후보는 위치 X12에 Ala를 포함하는 AFFITOPE® 서열을 사용하여 생성된 것보다 낮지만(도 8), p4456을 사용하여 얻은 것보다 여전히 더 높은 항-aSyn 항체의 역가를 유도할 수 있었다.

[0298] 표 17은 면역화된 마우스의 혈장에 존재하는 aSyn에 대한 AFFITOPE® 서열 p10033(a) 또는 AFFITOPE® 서열

p10118(b)에 의해 유도된 역가에 대한 유도된 역가를 요약한 것이다.

[0299] [표 16]

[0300] 표는 상이한 치료군, 사용 중인 각각의 약물 제품, 약물 제품 내 펩티드의 서열 및 상응하는 서열 ID 번호를 보여준다.

[0301]

Seq ID	약물 제품	서열
38	p10033-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEKMPVDPDNEA
63	p10166-CRM197 알루미늄 히드록시드	C-LEKMPVDPDNE
61	p10118-CRM197 알루미늄 히드록시드	CGG-KESMPVDPDNEA
64	p10167-CRM197 알루미늄 히드록시드	CGG-KESMPVDPDNE

[0302] 표 16

[0303] [표 17]

[0304] aSyn에 대한 역가를 단일 마우스에서 평가하였고 값은 p10033 또는 p10118로 얻은 중앙값에 대한 중앙값을 나타낸다.

[0305]

Seq ID	p10033 또는 p10118에 대한 역가(%)
38	100,0
63	58,8
61	100,0
64	76,2

[0306] 표 17

[0307] **선택된 AFFITOPE®에 의해 유도된 항체의 표적 결합**

[0308] AFFITOPE® 후보에 의해 유도된 항체가 *제자리에서* 응집된 aSyn을 검출할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, AFFITOPE® 후보-백신접종된 wt BALB/c 마우스의 혈청을 PD/DLB-질환 환자의 *사후*에 유도된 인간 뇌 조직의 뇌 절편에서 IHC 염색으로 시험하였다. 루이 소체는 PD/DLB-질환 환자의 뇌에서 병리학적 특징이며 주로 병원성 응집체 형태의 aSyn이 풍부하다(문헌[Spillantini et al., 1997]).

[0309] AFFITOPE® 후보-처리된 마우스의 혈장은 대조군 항-aSyn mAb 28A7과 유사한 피질의 뇌 섹션에서 루이 소체를 검출하였다(도 9). 특이성은 AFFITOPE® 후보의 상응하는 펩티드 모이어티로 혈청을 사전 흡수한 후 염색이 없음으로 확인하였다(데이터는 표시되지 않음).

[0310] **aSyn 올리고머(독성) 대 단량체 aSyn 종에 대한 우선적 결합**

[0311] 다음으로, 상이한 AFFITOPE®에 의해 유도된 Ab를 SPR-기반 방법론을 사용하여 단량체 종에 비해 올리고머 aSyn(낮은 MW, aSyn의 가용성 응집체, 주로 이량체 및 삼량체)에 대한 선택적인 결합에 대해 시험하였다(도 10). 동일한 양의 AFFITOPE® 후보-유도된 항체 또는 모노클로날 항체를 먼저 항-마우스 포획 항체 코팅된 칩에 고정하였다. 이어서 단량체 및 올리고머 aSyn 종을 연속적으로 적용하고, aSyn 단량체 및 올리고머 aSyn 종에 대한 차등 결합(RU로 정의)을 평가하였다. 대조군으로서, LB509(Biolegend, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재) 및 28A7(AFFiRiS AG)의 두 가지 모노클로날 항체를 사용하였다. 단량체와 올리고머 aSyn을 구별하지 않는 칩 표면에 대한 LB509의 고정화는 두 aSyn 종 모두에 대해 유사한 RU를 생성하였다. 펩티드 p4456에 대해 생성된 두 번째 대조군 항체인 28A7은 단량체와 올리고머 aSyn 종을 구별하였다. AFFITOPE® 후보-유도된 항체는 aSyn의 단량체 형태와 비교하여 aSyn의 올리고머 응집체에 대해 높은 선택성을 나타냈다(도 10).

[0312] SPR(BiaCore) 분석 외에도, AFFITOPE®-유도된 Ab는 억제 ELISA에 의해 aSyn의 단량체 종보다 aSyn 필라멘트에 대한 우선적인 결합에 대해 시험하였다. 이러한 분석에서, 친화성-정제된 AFFITOPE®-유도된 항체의 일정량을 적정량의 단량체 및 섬유성 aSyn과 사전 배양한 다음 aSyn 필라멘트로 코팅된 ELISA 플레이트로 옮겼다(자세한 내용은 M&M 참조). 도 11에는 두 가지 대표적인 AFFITOPE® 후보(p10033 및 p10118)의 결과가 도시되어 있다.

aSyn 올리고머에 이어 aSyn 필라멘트로 매우 우수한 경쟁이 관찰된 반면, 단량체 형태의 aSyn과의 경쟁은 단지 미미한 정도였다(도 11).

[0313] 바람직하게는 aSyn의 올리고머 및 응집체 형태에 결합하는 것으로 알려진 mAb 28A7을 대조군으로서 사용하였다(도 11c).

[0314] 전체적으로, AFFITOPE® 후보-특이적 항체에 대한 결합 데이터는 aSyn의 독성의 올리고머 응집체에 대한 AFFITOPE® 후보-유도된 항체의 높은 선택성에 대한 명확한 증거를 제공하며, 이는 단량체 형태와 달리 세포 사멸을 유발하는 관련 독성 종으로 간주된다.

[0315] **재료 및 방법**

[0316] **마우스**

[0317] BALB/c 마우스를 Janvier Elevages(Le Genest-Sainte-Isle, F)로부터 구입하였다.

[0318] 사육자, 공급업체 및 사용자로서의 활동을 허가하기 위해 IMP의 적용에 설명된 표준 조건 하에서 동물을 수용하고 보관하였다. 관련 권한은 2013년 5월 13일 GZ:223633/2013/4 통지와 함께 관련 당국에 의해 부여되었다.

[0319] 간단히 말해, 마우스를 TECNIPLAST Sealsafe NextIVC Blue Line - Cages(이탈리아 밀라노 소재)에 5마리 씩 수용하였다. 케이지에는 숨기/놀이 목적을 위한 둥지 재료와 작은 플라스틱 하우스 형태의 보강 장치가 장착되었다. 실험 시작 시 마우스는 6주령 내지 8주령이었다. 이들에게 표준 식이와 산성화된 물을 *자유롭게* 제공하고 12시간 명/암 주기로 유지시켰다.

[0320] 모든 동물 실험을 오스트리아 및 유럽법에 따라 수행하였으며 58번 지방자치단체인 비엔나 시 행정국의 허가를 받았다.

[0321] **펩티드 및 단백질**

[0322] 면역화에 사용한 펩티드를 EMC 마이크로컬렉션(독일 튀빙겐 소재)에서 구입하였다.

[0323] CRM197을 Pfenex(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에서 구입하였다.

[0324] **면역원성 생성물의 제조**

[0325] 설명된 실험에 사용된 모든 면역원성 AFFITOPE®-기반 생성물은 담체 단백질 CRM197에 대한 합성 AFFITOPE® 펩티드의 접합체이다. 접합은 CRM197의 리신 잔기의 측쇄 아미노기와 펩티드의 아미노(N)-말단 시스테인의 유리 티올기를 사용하는 지시된 절차이다. CRM197의 활성화를 위해, CRM197 수용액을 10 mM 인산완충식염수(PBS)로 조정한 다음 이기능성 링커 4-말레이미도부티르산 N-히드록시숙신이미드 에스터(GMBS)와 함께 부드럽게 진탕한다. 이어서, 미반응 GMBS의 과잉을 투석 또는 한외여과에 의해 제거한다. 수득한 활성화된 CRM197 용액을 이후 인산염 완충액(pH 6.7)에 용해된 AFFITOPE® 펩티드와 함께 인큐베이션한다. 펩티드 내 시스테인의 유리 티올기는 최종 AFFITOPE®-CRM197 생성물을 형성하는 말레이미도기와 반응한다.

[0326] **면역원의 적용**

[0327] 백신을 상온으로 가져오고, 와류시키고, G30-게이지(Omnican©50, B.Braun Melsungen AG, 독일 멜중엔 소재)가 있는 인슐린 20 주사기로 마우스의 측부에 피하(s.c.)로 도포한다(200 µl). 면역화는 격주 간격으로 3회 반복한다.

[0328] **샘플 수집**

[0329] 각 주입 후 2주 동안 혈액을 채취하였다. 혈장을 수집하여 분석할 때까지 -20℃에서 보관하였다. 동물의 혈액 수집 및 희생을 FELASA-승인된 절차를 사용하여 수행하였다.

[0330] **모노클로날 항체**

[0331] 본 연구에서, LB509(Biolegend, 미국 캘리포니아주 소재) 및 28A7의 두 가지 모노클로날 항체를 대조군으로서 사용하였다. LB509는 상업적으로 이용 가능한 정제된 항-aSyn, 115-121 Ab이다. 마우스 mAb 28A7(IgG1)은 $aSyn_{115-121}$ 에피토프를 모방하는 AFFITOPE® PD01에 대한 마우스 B 세포 하이브리도마(문헌[Mandler et al.,

2014])로 사내에서 생성하였다.

[0332] **샘플 수집**

[0333] 각 주사 후 약 2주, 다음 주사의 적어도 하루 전에 혈액을 채취하였다. 혈장을 수집하여 분석할 때까지 -20℃에서 보관하였다. 동물의 혈액 수집 및 희생을 FELASA-승인된 절차를 사용하여 수행하였다.

[0334] **ELISA에 의한 역가 결정**

[0335] 면역화 펩티드 및 재조합 인간 aSyn 단백질에 대한 역가를 분석하였다. 면역화된 마우스의 혈장에서 AFFIOTPE®-유도된 항체의 존재를 ELISA에 의해 결정하였다. 96-웰 플레이트(Nunc-Maxisorp)를 재조합 인간 aSyn(1 μg/ml) 또는 주입된 펩티드(BSA-접합체; 1 μM)로 코팅하였다. 비-선형 회귀 분석(4-매개변수 로지스틱 적합 함수)에 의해 PRISM® 5.04(GraphPad Inc, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 사용하여 역가를 EC_{50}-값으로 계산하였다.

[0336] **면역조직화학(IHC: Immunohistochemistry)**

[0337] aSyn 양성 봉입체(루이 소체)의 인식을 DLB 환자(DLB 환자, 사례 번호 X5631, 미국 캘리포니아주 라 호야 소재 UCSD의 신경과학과(Department of Neuroscience))의 전두엽 피질 생검에서 *사후* 뇌 절편에서 수행하였다.

[0338] AFFITOPE®-면역화된 마우스의 혈장을 사용하여 DLB 환자의 전두엽 피질 뇌 생검 절편을 염색하였다. 조직 준비(재수화, 탈파라핀화, 항원 재검색 및 차단) 후, 절편을 희석된 마우스 혈장과 함께 실온에서 2시간 동안 또는 4℃에서 밤새 인큐베이션 하였다. 절편을 희석되지 않은 Dako EnVision HRP 표지된 중합체(Agilent, 미국 캘리포니아주 산타클라라 소재)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 각각의 IHC 염색에 대해, 헤마톡실린으로 대조염색을 하고, 이 단계 후에, 슬라이드를 탈수하여 Entellan(Sigma-Aldrich)에 장착하였다. Panoramic(Mirax) Scanner 150(Carl Zeiss MicroImaging GmbH)을 사용하여 명시야 모드에서 슬라이드를 스캔하였다.

[0339] **표면 플라즈몬 공명(Biacore) 분석**

[0340] 모든 실험은 Biacore T200 Control Software 2.0.1을 사용하여 Biacore T200(GE Healthcare, 미국 일리노이주 시카고 소재)에서 실행하였다. CM5 칩을 제조업체의 지침에 따라 상업적으로 이용 가능한 마우스 항체 포획 키트(GE-Healthcare)의 항체로 칩의 플로우-셀(Fc) 1 및 Fc2에 아민 커플링하여 고정화하였다. Fc1은 참조 플로우 셀 역할을 하였다. 두 Fc 모두에 대한 항-마우스 항체의 고정화 수준은 비슷했고 Fc1 및 Fc2에 대해 대략 11000 RU가 되었다.

[0341] 포획된 항체의 비슷한 수준에 도달하기 위해, 실제 실행 전에 각 특정 항체에 대한 주입 시간을 시험하였고 그에 따라 주입 시간을 조정하였다. 이는 각 주기에서 Fc1에 포획된 비특이적 항체를 포함하여 모든 시험한 항체에 대해 유사한 포획 수준을 초래하였다.

[0342] 한 주기에 대한 실험 설정은 하기와 같다:

[0343] 1. 참조 Fc1에 대한 비특이적 항체 포획

[0344] 2. Fc2에 대한 aSyn-특이적 항체 포획

[0345] 3. Fc1 및 Fc2에 대한 샘플(올리고머 aSyn, 단량체 aSyn, 완충액만) 주입

[0346] 4. 낮은 pH에서 Fc1 및 Fc2의 재생; 항-마우스 항체만 칩에 남음

[0347] 5. 다음 사이클을 위한 칩 표면 준비

[0348] 올리고머 및 단량체 aSyn의 제조: aSyn 올리고머(SynAging, 프랑스 방되브르-르-낭시 소재)를 해동하고 주입 직전에 HBS에서 5 μg/ml로 희석하였다. 진실(*bona fide*) 단량체 aSyn(rPeptide)에서 고분자량 분획을 제거하기 위해, aSyn을 새로 용해하고, HBS에 5 μg/ml로 희석한 다음, 50 kDa 컷-오프 컬럼(Amicon Ultra 0,5 ml)을 사용하여 14.000 x g에서 10분 동안 컷-오프 원심분리하였다. 대조군으로서, 2개의 aSyn-특이적 항체, LB509(BioLegend, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재) 및 28A7(AFFiRiS AG)을 사용하였다.

[0349] **면역 혈장에서 AFFITOPE® 특이적 항체의 친화성 정제**

[0350] 요오도아세틸 자기 비드(FG-106, Bioclone Inc., 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 실온에서 1시간 동안 각각의 펩티드(HPLC 정제됨)와 결합시키고 나머지 과량의 유리 부위를 추가 시간 동안 시스테인으로 차단하였다. 차단 반응 후, AFFITOPE®-커플링된 비드를 상응하는 AFFITOPE® 후보로 면역화된 마우스의 혈장 150 μl와 함께 인큐베이션하였다(실온에서 2시간 동안). 그런 다음 AFFITOPE®-특이적 Ab를 용출 완충액(Thermo Scientific)으로 용출하였다. 그 후 용출액을 초원심분리(Millipore) 튜브(30 kDa)로 150 μl(입력 부피와 동일)의 부피로 농축하였다.

[0351] **경쟁 ELISA**

[0352] 다양한 aSyn 종, 단량체(rPeptide), 피브릴(Proteos Inc), 또는 올리고머(Crossbeta Bicosciences)를 포함한 응집된 형태의 적정된 양을 100 내지 0.05 μg/ml 범위의 농도(이는 단량체 aSyn과 관련하여 69 내지 0.034 μM의 범위에 해당)로 AFFITOPE® 후보-면역화된 마우스의 말단-혈장으로부터 이전에 정제된 항체, 및 대조군 항-aSyn 항체 28A7과 사전 인큐베이션 하였다. 추가된 aSyn 종은 플레이트-코팅된 aSyn 피브릴(Proteos Inc)에 결합하기 위해 경쟁한다. IC_{50} 값을 ELISA 신호의 절반을 켄칭시키는데 필요한 단량체, 올리고머 또는 피브릴 aSyn의 농도로 계산하였다. IC_{50} 값을 PRISM® 5.04(GraphPad Inc, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 사용하여 비-선형 회귀 분석(4개 매개변수 로지스틱 적합 함수)으로 계산하였다.

[0353] [표 18]

[0354] AFFITOPE® 및 시험된 본래 서열 펩티드

[0355]

서열 ID 번호	내부 펩티드 명칭	펩티드 서열	추가 정보
1	p4456	C-DQPVLPD	aSyn115-121 (M116→ Q, D119→ L)
2	p4572	C-YDRPVQPDR	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-LSDMPVDPDNEA	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-LEDMPSDPDNEA	aSyn113-124 (V118 → S)
25	p10005	C-LEDMPVSPDNEA	aSyn113-124 (D119 → S)
26	p10006	C-LEDMPVDSDNEA	aSyn113-124 (P120 → S)
27	p10007	C-LEDMPVDPSNEA	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)
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)

[0356]

39	p10034	C-LELMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → L)
40	p10035	C-LENMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → N)
41	p10036	C-LEDWPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→ W)
42	p10037	C-LEDLPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→ L)
43	p10038	C-LEDNPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→ N)
44	p10039	C-LEDDPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→ D)
45	p10040	C-LEDKPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→ K)
46	p10041	C-LEDMPVDPDNEW	aSyn113-124 (A124 → W)
47	p10042	C-LEDMPVDPDNEV	aSyn113-124 (A124 → V)

[0357]

48	p10043	C-LEDMPVDPDNEG	aSyn113-124 (A124 → G)
49	p10044	C-LEDMPVDPDNED	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-SESMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → S, D115 → S)
53	p10076	C-LESSPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115 → S, M116 → S)
54	p10077	C-SEDMPVDPDNES	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)

[0358]

[0359] 표 18

[0360] **참고문헌**

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. [PubMed: 18291704]
Bengoa-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]

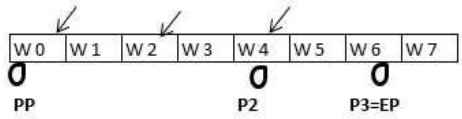
[0361]

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

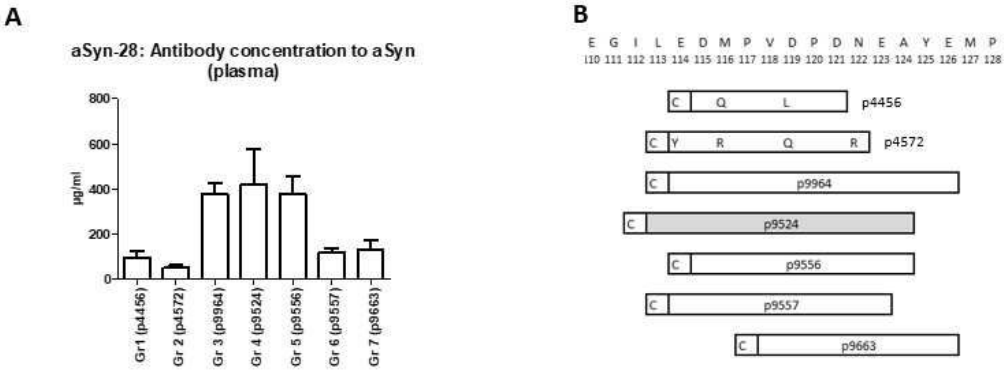
[0362]

도면

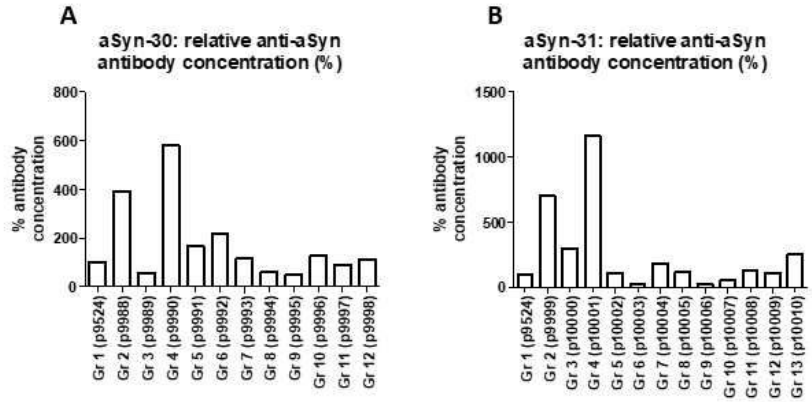
도면1



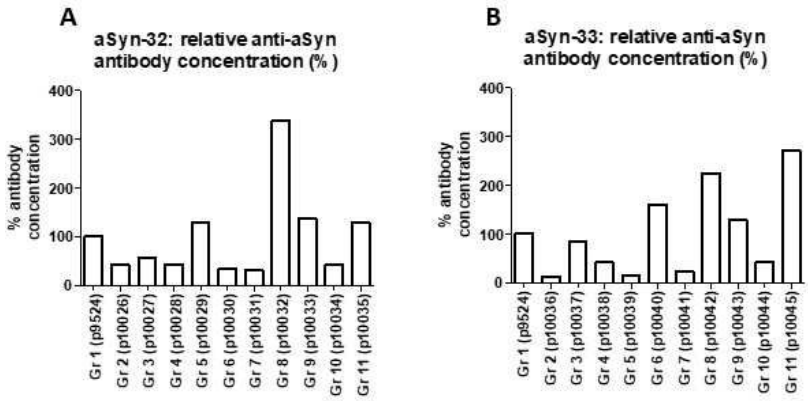
도면2



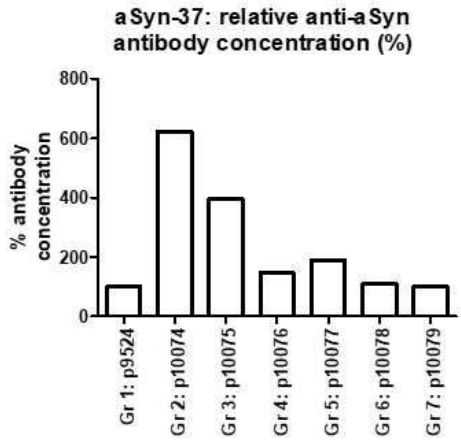
도면3



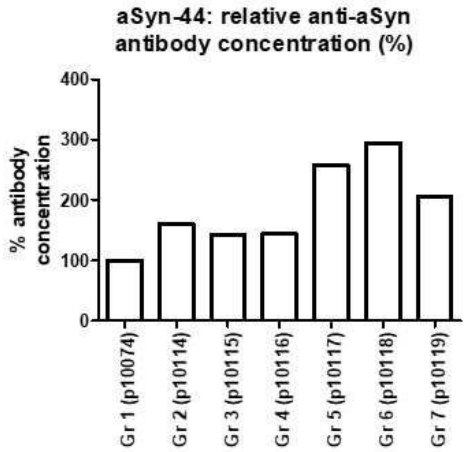
도면4


A
aSyn-32: relative anti-aSyn antibody concentration (%)
% antibody concentration
400
300
200
100
0
Gr 1 (p9524)
Gr 2 (p10026)
Gr 3 (p10027)
Gr 4 (p10028)
Gr 5 (p10029)
Gr 6 (p10030)
Gr 7 (p10031)
Gr 8 (p10032)
Gr 9 (p10033)
Gr 10 (p10034)
Gr 11 (p10035)
B
aSyn-33: relative anti-aSyn antibody concentration (%)
% antibody concentration
400
300
200
100
0
Gr 1 (p9524)
Gr 2 (p10036)
Gr 3 (p10037)
Gr 4 (p10038)
Gr 5 (p10039)
Gr 6 (p10040)
Gr 7 (p10041)
Gr 8 (p10042)
Gr 9 (p10043)
Gr 10 (p10044)
Gr 11 (p10045)

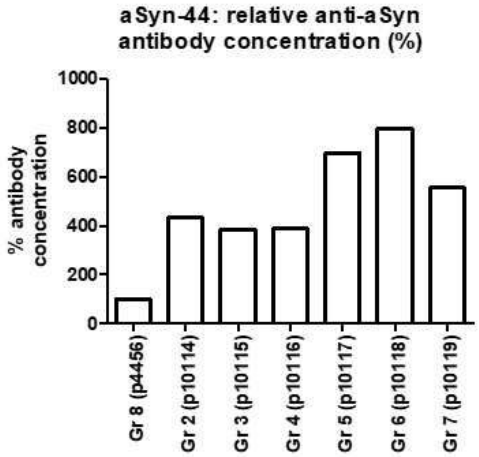
도면5


aSyn-37: relative anti-aSyn antibody concentration (%)
% antibody concentration
800
600
400
200
0
Gr 1: p9524
Gr 2: p10074
Gr 3: p10075
Gr 4: p10076
Gr 5: p10077
Gr 6: p10078
Gr 7: p10079

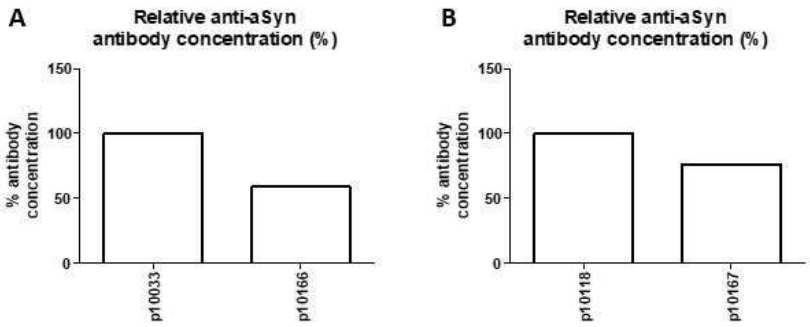
도면6


aSyn-44: relative anti-aSyn antibody concentration (%)
% antibody concentration
400
300
200
100
0
Gr 1 (p10074)
Gr 2 (p10114)
Gr 3 (p10115)
Gr 4 (p10116)
Gr 5 (p10117)
Gr 6 (p10118)
Gr 7 (p10119)

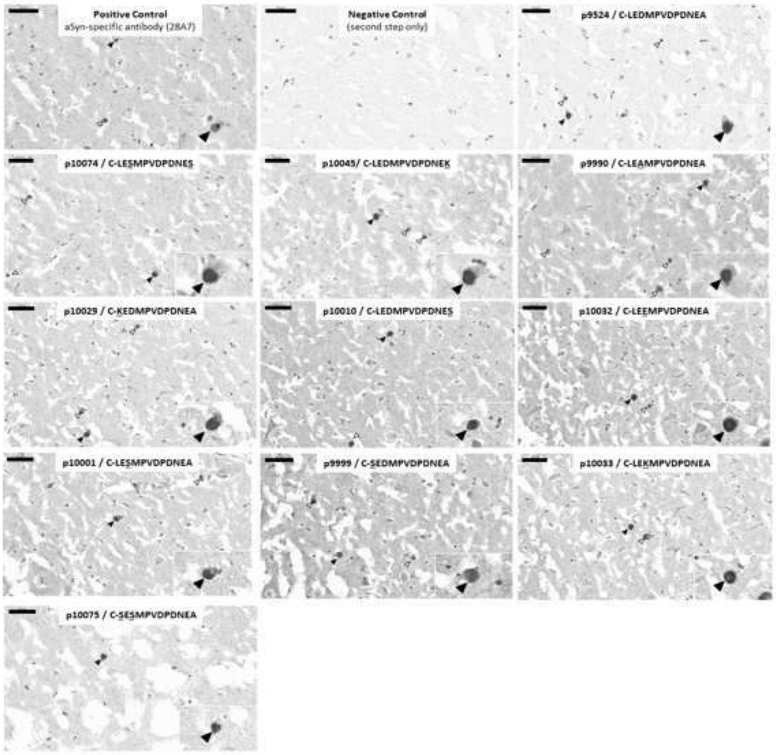
도면7


aSyn-44: relative anti-aSyn antibody concentration (%)
% antibody concentration
1000
800
600
400
200
0
Gr 8 (p4456)
Gr 2 (p10114)
Gr 3 (p10115)
Gr 4 (p10116)
Gr 5 (p10117)
Gr 6 (p10118)
Gr 7 (p10119)

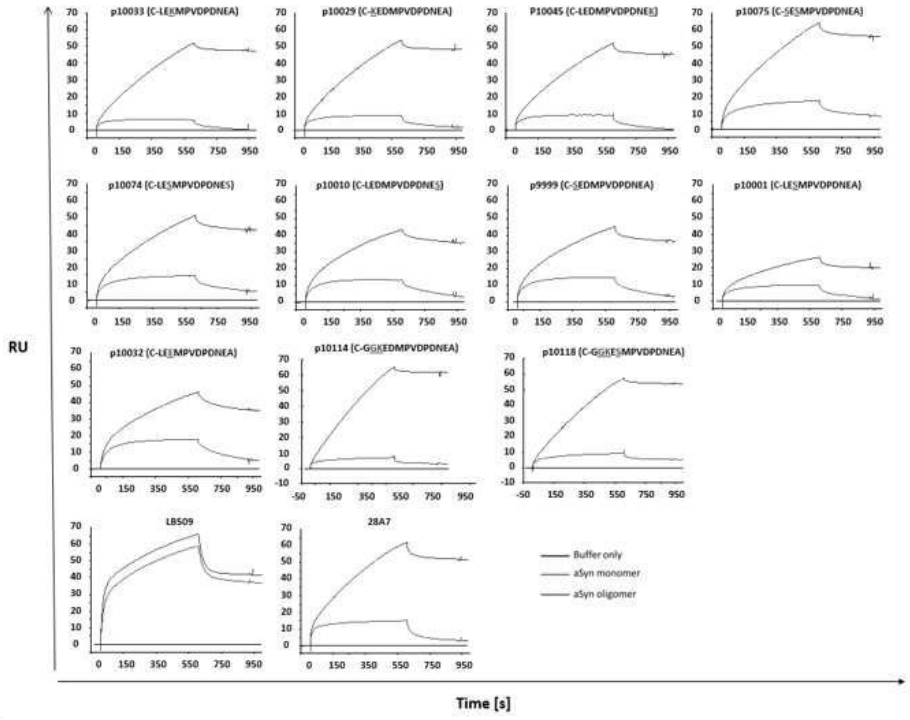
도면8


A
Relative anti-aSyn antibody concentration (%)
% antibody concentration
150
100
50
0
p10033
p10166
B
Relative anti-aSyn antibody concentration (%)
% antibody concentration
150
100
50
0
p10118
p10167

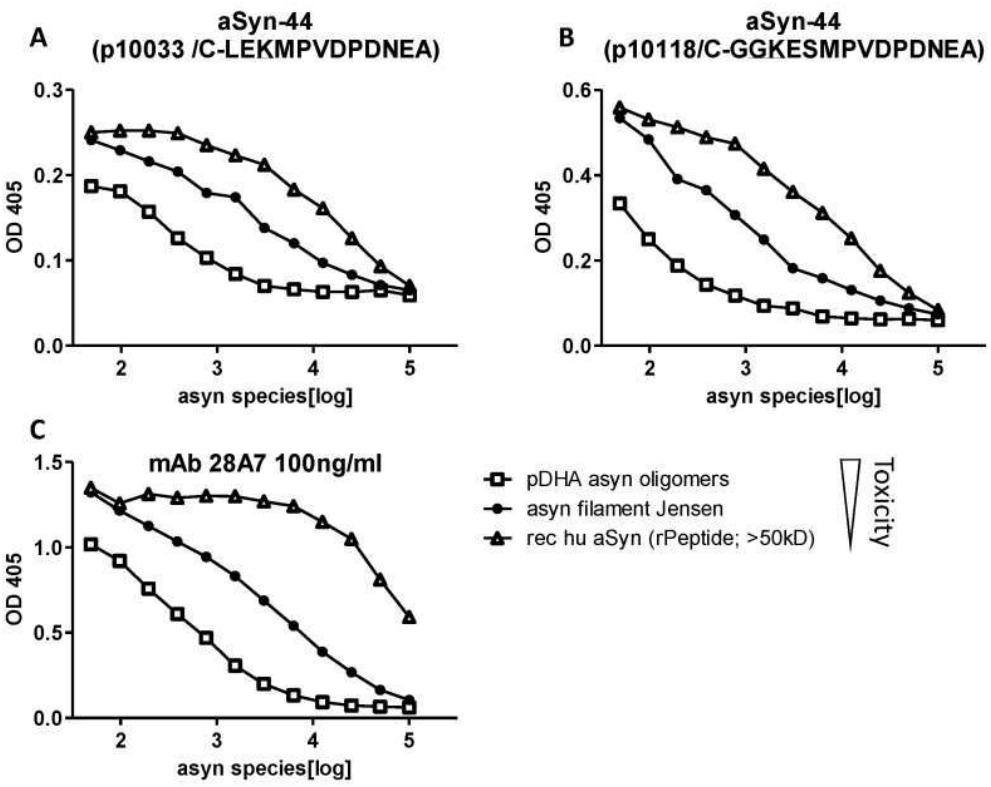
도면9


Positive Control
aSyn-specific antibody (28A7)
Negative Control
(second step only)
p9524 / C-LEDMPVDPDNEA
p10074 / C-LESMPVDPDNES
p10045/ C-LEDMPVDPDNEK
p9990 / C-LEAMPVDPDNEA
p10029 / C-KEDMPVDPDNEA
p10010 / C-LEDMPVDPDNES
p10032 / C-LEEMPVDPDNEA
p10001 / C-LESMPVDPDNEA
p9999 / C-SEDMPVDPDNEA
p10033 / C-LEKMPVDPDNEA
p10075 / C-SESMPVDPDNEA

도면10


p10033 (C-LEKMPVDPDNEA)
p10029 (C-KEDMPVDPDNEA)
P10045 (C-LEDMPVDPDNEK)
p10075 (C-SESMPVDPDNEA)
p10074 (C-LESMPVDPDNES)
p10010 (C-LEDMPVDPDNES)
p9999 (C-SEDMPVDPDNEA)
p10001 (C-LESMPVDPDNEA)
p10032 (C-LEEMPVDPDNEA)
p10114 (C-GGKEDMPVDPDNEA)
p10118 (C-GGKESMPVDPDNEA)
LBS09
28A7
Buffer only
aSyn monomer
aSyn oligomer
RU
Time [s]

도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Affiris AG

<120> Immunogenic compound

<130> R78619

<140> EP20189425

<141> 2020-08-04

<150> EP20189425.0

<151> 2020-08-04

<160> 165

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 1

Cys Asp Gln Pro Val Leu Pro Asp

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 2

Cys Tyr Asp Arg Pro Val Gln Pro Asp Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 3

Cys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu

1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 4

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 5

Cys Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 6

Cys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 7

Cys Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu

1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 8

Cys Ala Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 9

Cys Leu Ala Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 10

Cys Leu Glu Ala Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 11

Cys Leu Glu Asp Ala Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 12

Cys Leu Glu Asp Met Ala Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 13

Cys Leu Glu Asp Met Pro Ala Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 14

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Ala Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 15

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Ala Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 16

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Ala Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 17

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Ala Glu Ala

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 18

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Ala Ala

1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 19

Cys Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 20

Cys Leu Ser Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 21

Cys Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 22

Cys Leu Glu Asp Ser Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 23

Cys Leu Glu Asp Met Ser Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 24

Cys Leu Glu Asp Met Pro Ser Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 25

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Ser Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 26

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Ser Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 27

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Ser Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 28

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Ser Glu Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 29

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Ser Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 30

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 31

Cys Trp Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 32

Cys Ile Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 33

Cys Asn Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 34

Cys Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 35

Cys Asp Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 36

Cys Leu Glu Trp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 37

Cys Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 38

Cys Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 39

Cys Leu Glu Leu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 40

Cys Leu Glu Asn Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 41

Cys Leu Glu Asp Trp Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 42

Cys Leu Glu Asp Leu Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 43

Cys Leu Glu Asp Asn Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 44

Cys Leu Glu Asp Asp Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 45

Cys Leu Glu Asp Lys Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 46

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Trp

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 47

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Val

1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 48

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Gly

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 49

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Asp

1 5 10

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 50

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 51

Cys Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 52

Cys Ser Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 53

Cys Leu Glu Ser Ser Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 54

Cys Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 55

Cys Leu Glu Asp Ser Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 56

Cys Ser Glu Asp Ser Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 57

Cys Gly Gly Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 58

Cys Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 59

Cys Ser Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 60

Cys Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 61

Cys Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 62

Cys Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10 15

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide; XXXXPVDPDXEX is not LEDMPVDPDNEA

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> can be L, K, A or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> can be E or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> can be D, E, K, N, A or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> can be M, A, S, L or K

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> can be N, S or A

<220>

<221> VARIANT

<222> 12

<223> can be present or not, and if present, can be A, K, V, S or G

<400> 63

Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Val Asp Pro Asp Xaa Glu Xaa

1 5 10

<210> 64

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 64

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 65

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 66

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 67

Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 68

Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> peptide

<400> 69

Ser Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 70

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 71

Leu Glu Ala Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 72

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 73

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Val

1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 74

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 75

Leu Ser Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 76

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> peptide

<400> 77

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 78

Leu Glu Asn Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 79

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 80

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 81

Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 82

Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 83

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 84

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> peptide

<400> 85

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 86

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 87

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 88

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 88

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 89

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 90

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 91

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 92

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> peptide

<400> 93

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 94

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 95

Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 96

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 96

Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 97

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 97

Ser Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 98

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 99

Leu Glu Ala Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 100

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 100

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 101

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 101

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Val

1 5 10

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 102

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 103

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 103

Leu Ser Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 104

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 105

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 106

Leu Glu Asn Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 107

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 108

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 109

Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 110

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 110

Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 111

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 111

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 112

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 112

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 113

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 114

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 114

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 115

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 115

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 116

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 117

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 118

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 118

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 119

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 119

Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 120

Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 121

Gly Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 122

Cys Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 123

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 123

Gly Cys Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 124

Gly Gly Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 125

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 125

Cys Cys Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 126

Cys Gly Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 127

Cys Cys Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 128

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 128

Cys Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 129

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 129

Cys Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 130

Gly Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 131

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 131

Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 132

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 132

Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 133

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 133

Gly Gly Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 134

<211> 14

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 134

Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 135

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 135

Gly Gly Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 136

Cys Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 137

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 137

Cys Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 138

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 138

Cys Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 139

<211> 13

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 139

Cys Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 140

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 140

Cys Ser Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 141

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 141

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser

1 5 10

<210> 142

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 142

Cys Leu Glu Ala Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 143

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 143

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 144

Cys Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Val

1 5 10

<210> 145

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 145

Cys Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 146

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 146

Cys Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10

<210> 147

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 147

Cys Leu Ser Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 148

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 148

Cys Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 149

<211> 13

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 149

Cys Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 150

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 150

Cys Leu Glu Asn Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 151

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 151

Cys Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys

1 5 10 15

<210> 152

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 152

Cys Gly Gly Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 153

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 153

Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 154

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 154

Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 155

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 155

Gly Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400

> 156

Cys Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 157

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 157

Gly Cys Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 158

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 158

Gly Gly Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 159

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 159

Cys Cys Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 160

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 160

Cys Gly Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 161

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 161

Cys Cys Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10 15

<210> 162

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 162

Cys Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 163

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 163

Cys Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 164

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 164

Gly Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10

<210> 165

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 165

Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala

1 5 10