

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：94120197

※ 申請日期：94年6月17日

※ IPC 分類：

A61K 38/00 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

類抗原、醫藥組成物及免疫組成物/mimotope peptide, composition, and immunogenic composition

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

亞佛瑞司研發股份有限公司 / AFFIRIS FORSCHUNGS- und ENTWICKLUNGS GMBH

代表人：(中文/英文) 馬特那 法蘭克 / FRANK MATTNER

住居所或營業所地址：(中文/英文)

奧地利 A-1030 維也納維馬克街 2A 號 / Viehmarktgassee 2A, A-1030 Wien, Austria

國 籍：(中文/英文) 奧地利 / AT

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 馬特那 法蘭克 / MATTNER, FRANK
2. 希密茲 瓦特 / SCHMIDT, WALTER

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 / DE
2. 德國 / DE

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

【奧地利】【2004/07/13】【A 1184/2004】

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種預防及治療阿滋海默症之方法，特別是關於以特定胺基酸片段製備阿滋海默症疫苗之預防及治療阿滋海默症之方法。

【先前技術】

β 型澱粉樣蛋白之胜肽(A β)在阿滋海默症(簡稱為AE或AD)的神經病理學中扮演一個重要的角色(Roher et al., 1993:” β -Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: Implications for the pathology of Alzheimer’s disease [β 型澱粉樣蛋白(1-42)是腦血管澱粉樣蛋白沉積的一個主因：阿滋海默症病理學意義]” PNAS 90:10836)。家族性遺傳的疾病和澱粉樣前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)及早衰基因中的突變有關。基因中與疾病有關的突變導致提高42-氨基酸形式的澱粉樣蛋白胜肽(A β 42)，這是在阿滋海默症的澱粉樣蛋白斑塊〔plaque〕中之主要形式。阿滋海默症的動物模式可以商業購得。PDAPP的基因轉殖鼠可過度表現突變之人類APP(APP之氨基酸序列在位置717用F取代V)，藉此逐漸發展出許多和年齡、大腦有關的阿滋海默症(AE)神經病理學特徵 (Games et al., 1995: ”Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein [基因轉殖鼠之阿滋海默症型神經病理學過度表現 V717F β 型澱粉樣前驅蛋白]:, Nature

373:523)。

一相關疫苗研究係以一個”正常”的疫苗進行研究，並非以類抗原決定部位〔mimotop〕為基礎之疫苗。轉殖基因動物係選擇在產生典型阿滋海默症 AE-的神經病理學症狀(6 週)之前即進行接種聚集 $A\beta 42$ ，或是針對較高齡之動物(11 個月)進行接種聚集 $A\beta 42$ ：年輕動物接種疫苗可防止血中形成斑塊〔plaque〕、神經營養不良及星狀纖維增生的發展。較年長動物的治療明顯降低阿滋海默症 AE 的神經病理學症狀。這個實驗接種方法引發抗 $A\beta 42$ 抗體的研發，該 $A\beta 42$ 的抗體可以突破血腦障壁及攻擊澱粉樣蛋白之斑塊 (Schenk et al., 1999:”Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [β 型澱粉樣蛋白之免疫接種可減弱 PDAPP 轉殖鼠之阿滋海默症的相似病理學症狀。], nature 400:173)。接著，實驗可經由許多機制移除斑塊〔plaque〕，其中包含經由 Fc-受體媒介的吞噬作用 (Bard et al., 2000:”Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease [以抗 β 型澱粉樣蛋白胜肽片段的抗體進行周邊投藥進入中樞神經系統及降低阿滋海默症老鼠模式的病理症狀], Nature Med. 6:916)。這個疫苗也可以延緩記憶喪失 (Janus et al., 2000:” $A\beta$ peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer’s disease [在阿滋海默

症動物模式中進行 A β -胜肽片段的免疫接種可減少行為損傷及形成斑塊], Nature 408:979)。

從 1999 年底起，一項用於阿滋海默症(AD)最有希望的免疫治療方法進入臨床測試階段中。一般咸認為，接種疫苗可造成免疫系統攻擊血中斑塊，並從患疾的人腦血液中清除沉積物，儘管仍需更詳細的釐清其精確機制。

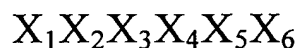
這個臨床實驗是由製藥公司 Elan 及其合作公司 American Home Products 一起進行的(治療疫苗 AN-1792，QS21 作為佐劑 adjuvant)。在 2000 年，成功完成第 I 期的臨床實驗。在 2001 年底，開始第 II 期的臨床實驗，測試對於重度至中度阿滋海默症 AE 患者群組的效果。

然而，該臨床實驗因後續多位患者神經發炎，而中止這個第 II 期的臨床實驗(Editorial 2002, “Insoluble problem?[無解的問題?]”Nature Med. 8:191)。相關症狀包含無菌性的腦膜炎，這導致立刻停止這項世界性的實驗。最壞的情況是，相關的患者已引發自體免疫反應，其係許多免疫治療都會遇到的風險。鑑於澱粉樣前驅蛋白 APP 的無所不在，可以預見自體免疫併發症係因 APP 之蛋白分解產物載有抗原決定部位。最近，研究集中在因聚集 A β 42 而引發的免疫抗體特性(對人及鼠)，研究顯示大部份的抗體辨識 A β 42 胺基酸序列第 4 及 10 個 [A β 4-10] 之間的小範圍片段 [domain]。老鼠抗體可以阻斷 A β 的原纖維生成，及破壞已存在的 A β 纖維 (McLaurin et al., 2002:”Therapeutically effective antibodies against

amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis [抗 β 型澱粉樣蛋白- β 胜肽片段有效的治療抗體是針對 β 型澱粉樣蛋白-末端4-10片段，並可抑制細胞毒素及原纖維生成]”，Nature Med. 8:12630。但是，人類抗體卻對於暴露在細胞表面上的澱粉樣前驅蛋白APP或其不聚集的蛋白水解產物等前驅物質毫無反應(Hock et al.,2002:”Generation of antibodies specific for β -amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease [阿滋海默症患者經由接種疫苗，以產生具 β 型澱粉樣蛋白專一性的抗體]”，Nature Med. 8:1270)。研究觀察到人類及老鼠血清中明顯的差異：相較於人類抗體，老鼠抗體可辨識出A β 的單體、寡聚體及纖維蛋白。顯然，具治療效果的先決條件在於：人類的抗A β 抗體無法辨識A β 的小寡聚體，該A β 小寡聚體是發病時有毒的主要標的(Walsh et al., 2002:”Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo [體內 β 型澱粉樣蛋白自然分泌的寡聚體非常有效地抑制大腦海馬體中的長期增益現象]，Nature 416:535)。因此，有研究使用含 β 型澱粉樣蛋白4-10胺基酸片段(取代聚集的A β 42)的一疫苗做為有潛力的新免疫策略。儘管未知效果，這個策略仍需面對自體免疫的問題，因為患者接種之疫苗直接包含(線性-B細胞)之自體抗原決定部位〔epitope〕。

儘管最近這個阿滋海默症AD免疫策略有令人失望的

發展，但針對 β 型澱粉樣蛋白 A β 的疫苗仍舊是對抗 AE 最熱門的一條路徑。然而，必需要求對阿滋海默症 AE 接種進行立即的改善及提出新策略。特別是，這樣的疫苗必需不會刺激自體反應的 T 細胞及/或 B 細胞。PCT 專利第 EP/04/00162 號揭示類抗原決定部位 [mimotope] 之胜肽係具有一鍵結能力可鍵結一抗體，該抗體專一於天然 A β 42 之 N 端序列 DAEFRH；及該胜肽之五元體具有一鍵結能力可鍵結上述抗體，因而可供製備阿滋海默症 AD 之疫苗。上述應用之類抗原決定部位較佳包含下列胺基酸序列：



其中 X_1 係選自 G 或一個具羥基或帶負電的胺基酸，特別是 E、Y、S 或 D；

X_2 係選自一個疏水性的胺基酸或帶正電的胺基酸，特別是 I、L、V、K、W、R、Y、F 或 A；

X_3 係選自一個帶負電的胺基酸，特別是 D 或 E；

X_4 係選自一個芳香族胺基酸或 L，特別是 Y、F 或 L；

X_5 係選自 H、K、Y、F 或 R，特別是 H、F 或 R；及

X_6 係選自 S、T、N、Q、D、E、R、I、K、Y 或 G，特別是 T、N、D、R、I 或 G；

該類抗原決定部位特別是選自：EIDYHR(SEQ ID NO:1)、ELDYHR(SEQ ID NO:2)、EVDYHR(SEQ ID NO:3)、DIDYHR(SEQ ID NO:4)、DLDYHR(SEQ ID NO:5)、

DVDYHR(SEQ ID NO:6)、DIDYRR(SEQ ID NO:7)、
DLDYRR(SEQ ID NO:8)、DVDYRR(SEQ ID NO:9)、
DKELRI(SEQ ID NO:10)、DWELRI(SEQ ID NO:11)、
YREFRI(SEQ ID NO:12)、YAEFRG(SEQ ID NO:13)、
EAEFRG(SEQ ID NO:14)、DYEFRG(SEQ ID NO:15)、
ELEFRG(SEQ ID NO:16)、DRELRI(SEQ ID NO:17)、
DKELKI(SEQ ID NO:18)、DRELKI(SEQ ID NO:19)、
GREFRN(SEQ ID NO:20)、EYEFRG(SEQ ID NO:21)、
DWEFRDA(SEQ ID NO:22)、SWEFRT(SEQ ID NO:23)、
DKELR(SEQ ID NO:24)或SFEFRG(SEQ ID NO:25)。

再者，左旋 L-或右旋 D-之天然胺基酸可利用左旋 L-或右旋 D-之非天然胺基酸加以取代；例如，可選用正白胺酸 Nle〔Norleucine〕、正纈胺酸 Nva〔Norvaline〕、環己丙胺酸 Cha〔Cyclohexylalanine〕或 alpha 胺基酸等具其他線性或環脂肪族側鏈之胺基酸進行取代原 L、I 及 V；選用芳香族類的胺基酸取代原 W 或 F；選用鹼性的胺基酸如鳥胺酸(Ornithin)或高精胺酸(Homoarginine)取代原 R 及 K。選用具 OH 羥基之脂肪族側鏈及/或芳香族側鏈的胺基酸取代絲胺酸(Serin)及酥胺酸(Threonin)。

【發明內容】

本發明主要目的係提供一種預防及治療阿滋海默症之方法，其係將類抗原決定部位之胜肽〔模擬 DAEFRH〕用於疫苗接種，使得本發明具有提升預防及治療效果之功效。

根據本發明之化合物，其藉由一抗體進行篩選胜肽庫，該抗體專一於 A β 42 之天然 N 端序列 DAEFRH。如此，由該胜肽庫篩選出之胜肽具有或包含下列胺基酸序列：
X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇；

其中 X₁ 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X₂ 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X₃ 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X₄ 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X₅ 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X₆ 係選自缺位或任一胺基酸；

X₇ 係選自缺位或任一胺基酸；及

其中 X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇ 係不包含胺基酸序列 DAEFRH，該化合物具有一鍵結能力可鍵結一抗體，該抗體專一於 A β 42 之天然 N 端胺基酸序列 DAEFRH；及該化合物之五元體具有一鍵結能力可鍵結上述抗體，因而該化合物可供製備阿滋海默症之疫苗。

根據本發，使用一個 A β 42 類抗原決定部位用來做為對抗阿滋海默症 AD 之接種疫苗：類抗原決定部位引發產生抗 A β 42 抗體，然而不是對抗天生的 APP。類抗原決定部位係由一個(單株)抗體及(可商業購得的)胜肽之資料庫取得(如根據 Reineke et al., 2002:” Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences[從一個 5520 隨意產生的序列胜肽庫確認獨特的抗體抗原決定部位及類抗原決定

部位]”，*J. Immunol. Methods* 367:37)。使用一個(單株)抗體，其無法辨識 APP，然而可辨識不同 A β 形式，該 A β 具有天門冬胺酸之胺基端〔N-端〕(這樣抗體的實施例可見於 Johnson-Wood et al., 1997, “Amyloid precursor protein processing and A β 42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease[阿滋海默症(AE)轉殖基因老鼠模式中澱粉樣前驅蛋白處理及 β 型澱粉樣蛋白 A β 42 沉積]” *PNAS* 94:1550)。經證實上述抗體較佳可辨識適用於接種疫苗的類抗原決定部位。雖然相關研究已指出若將單株抗體直接給予 AD 老鼠模式，則在阿滋海默症 AD 老鼠模式中將產生正面效果(Bard et al., 2000; “Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease [以抗 β 型澱粉樣蛋白胜肽片段之抗體進行周邊投藥進入中樞神經系統及降低阿滋海默症老鼠模式的病理症狀]”，*Nature Med.* 6:916)，但仍不建議用這個抗體用來分離 AD 疫苗化合物。

在先前技術方面，所有的努力都集中在自然產生的 A β 胜肽片段。如上所述，因神經發炎的結果停止以 A β 胜肽片段疫苗進行臨床實驗。事實上，T 細胞抗原決定部位預測計劃(MHC-I 型抗原決定部位用的 BIMAS 表位預測軟體，及 MHC-II 型抗原決定部位用的 TEPITOPE 表位預測軟體)在序列內產生大量的(自體)抗原決定部位。這可以說明，若可能由自體免疫反應引發神經發炎結果，這樣的疫

苗可能就不適合作一般使用。

相較於先前技術使用的上述 A β 疫苗，根據本發明的疫苗治療則使用類抗原決定部位，因為類抗原決定部位的單株抗體不會辨識 APP，及類抗原決定部位的序列係從 A β 42 本身序列所衍生，因此預期不致出現自體免疫反應。是以，該類抗原決定部位應可用於進一步的試驗。

本發明用以辨識類抗原決定部位的抗體僅可辨識由 A β 衍生的胺基酸序列〔該衍生序列係在原始抗原決定部位 DAEFRH(SEQ ID NO:26)上另具一個自由 N-端的天門冬胺酸〕，因而該抗體不能辨識天然的 APP。該抗體可選自一單株或多株的抗體之製劑，或其中的各抗體部份片段或其衍生物，唯一的先決條件是抗體分子需能專一辨識 DAEFRH-抗原決定部位，亦即其沒有連結到自然 N 端延長形式的澱粉樣前驅蛋白 APP，也就是，抗體連結到 DAEFRH-抗原決定部位的能力至少為 100 倍，特別是至少 1000 倍，更佳係至少 105 倍高於其連接到 APP 分子的能力。抗體可以是具有與 Johnson-Wood et al.1997 所述的抗體一樣或較高的 DAEFRH 序列鍵結能力之抗體。當然也可以使用較低的鍵結能力之抗體(>10%，>50%或>80%的 Johnson-Wood et al 抗體鍵結能力)，但較佳仍偏好具有較高的鍵結能力之抗體。

本發明的化合物可供連結於實質具 DAEFRH(SEQ ID NO:26)序列專一性的抗體。

本發明使用的化合物包含下列胜肽或由下列胜肽所

組成，其中：

X₁ 係選自 G 或一個具羥基或帶負電的胺基酸，特別是 G、E、Y、S 或 D；

X₂ 係選自一個疏水性的胺基酸或帶正電的胺基酸，特別是 N、I、L、V、K、W、R、Y、F 或 A；

X₃ 係選自一個帶負電的胺基酸，特別是 D 或 E；

X₄ 係選自一個芳香族胺基酸或疏水性的胺基酸，特別是 Y、F 或 L；

X₅ 係選自 H、K、Y、F 或 R，特別是 H、F 或 R；及

X₆ 係選自 P 以外之任一胺基酸，或當 X₇ 存在時，X₆ 係選自 C 以外之任一胺基酸，較佳係選自 S、T、N、Q、D、E、R、I、K、Y 或 G，特別是 T、N、D、R、I 或 G；

其中，可用化學相似物或右旋 D-胺基酸取代 20 個天然胺基酸；例如，可以選用正白胺酸 Nle〔Norleucine〕、正纈胺酸 Nva〔Norvaline〕或環己丙胺酸 Cha〔Cyclohexylalanine〕進行取代原來之白胺酸 L。本發明下述將以實驗模式測試上述置換之可行性。抗體至胜肽的連結也可藉由電腦模式之計算進行立體 3D 空間方面的考量。

該胜肽較佳係選自下列序列：DAEFRWP(SEQ ID NO:27)、DNEFRSP(SEQ ID NO:28)、GSEFRDY(SEQ ID NO:29)、GAEFRFT(SEQ ID NO:30)、SAEFRRTQ(SEQ ID NO:31)、SAEFRAT(SEQ ID NO:32)、SWEFRNP(SEQ ID NO:33)、SWEFRLY(SEQ ID NO:34)、SWELRQA(SEQ ID NO:35)、SVEFRYH(SEQ ID NO:36)、SYEFRHH(SEQ ID

NO:37)、SQEFRTP(SEQ ID NO:38)、SSEFRVS(SEQ ID NO:39)、DWEFRD(SEQ ID NO:40)、DAELRY(SEQ ID NO:41)、DWELRQ(SEQ ID NO:42)、SLEFRF(SEQ ID NO:43)、GPEFRW(SEQ ID NO:44)、GKEFRT(SEQ ID NO:45)、AYEFRH(SEQ ID NO:46)、DKE(Nle)R(SEQ ID NO:47)、DKE(Nva)R(SEQ ID NO:48)或DKE(Cha)R(SEQ ID NO:49)，特別是DAEFRWP(SEQ ID NO:27)、DNEFRSP(SEQ ID NO:28)、SAEFRTQ(SEQ ID NO:31)、SAEFRAT(SEQ ID NO:32)、SWEFRNP(SEQ ID NO:33)、SWEFRLY(SEQ ID NO:34)、SWELRQA(SEQ ID NO:35)、SVEFRYH(SEQ ID NO:36)、SYEFRHH(SEQ ID NO:37)、SQEFRTP(SEQ ID NO:38)、SSEFRVS(SEQ ID NO:39)、DWEFRD(SEQ ID NO:40)、DAELRY(SEQ ID NO:41)、DWELRQ(SEQ ID NO:42)、SLEFRF(SEQ ID NO:43)、GPEFRW(SEQ ID NO:44)或GKEFRT(SEQ ID NO:45)。

本發明使用的化合物(類抗原決定部位)較佳具有5至15個胺基酸的長度。這個化合物可選擇以游離(胜肽)形式存在於疫苗中，或可選擇耦合或複合在其他的分子，例如製藥載體成份、多胜肽結構、脂質結構或碳氫結構等。本發明的類抗原決定部位係具有介於5及15個之間的〔最小〕胺基酸長度，較佳係介於6及12個之間，特別是介於9及11個之間。然而，類抗原決定部位可選擇以(共價及不共價)的方式與不特定的連接子或載體相連結，特別是胜肽連接子或蛋白質載體。此外，胜肽連接子或蛋白質載體可

由助手 T 細胞之抗原決定部位組成，或是含有助手 T 細胞之抗原決定部位。

製藥可用的載體較佳係是孔噉血藍蛋白 KLH、破傷風毒素、白蛋白鍵結蛋白質、牛血清白蛋白、樹枝狀高分子 (dendrimer) (MAP; Biol. Chem. 358:581)，以及在 Singh 等人，Nat. Biotech. 17(1999)，1075-1081(特別是該文件的表 1)，與 O'Hagan 等人，Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003)，727-735(特別是該文件所述的體內免疫潛在化合物及其釋放系統)中所述的輔藥成份，或其混合物。除此之外，該疫苗組合可另含有氫氧化鋁。

本發明之疫苗包含化合物(類抗原決定部位)及製藥可接受的載體，其可選擇以適當的給藥方式，例如靜脈注射 (i.v.)、腹腔內注射 (i.p.)、肌肉注射 (i.m.)、鼻內 (intranasal)、口服 (oral)、皮下注射 (subcutaneous) 等，或置入適當的給藥裝置內 (O'Hagan 等人, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003)，727-735)。疫苗通常含有本發明的化合物之使用劑量介於 0.1ng 至 10mg 之間，較佳係介於 10ng 至 1mg 之間，特別是介於 100ng 至 100 μ g 之間；或者以莫耳濃度計，例如介於 100fMol 至 10 μ Mol 之間，較佳係介於 10pMol 至 1 μ Mol 之間，特別是介於 100pMol 至 100nMol 之間。本發明之疫苗亦可選擇包含傳統的輔助物質，例如緩衝劑、穩定劑等。

本發明可由上述方式分離出合適之五元體，其適用各種 5 個胺基酸片段之胜肽庫，較佳藉由篩選具有上述各

種 X_1 至 X_5 胺基酸片段之胜肽庫，或藉由從一六元體胜肽庫〔如上所述〕中篩選出之陽性對象檢識出合適之五元體。同理，亦可由七元體、八元體、九元體、十元體、...之胜肽庫篩選出能鍵結合本發明抗體之合適序列。藉由檢測上述較長序列〔具五個、六個、七個、八個、九個、...胺基酸長度〕鍵結於本發明抗體之能力，以辨識出該片段之合適抗體鍵結片段。

經證實上述方式可成功提供本發明所需之 $A\beta$ 類抗原決定部位。

上述胜肽係可選擇以個別形式提供在該胜肽庫內，特別是選擇固定在一固定化載體表面上，例如可選擇以 MULTIPINTM 胜肽技術。在該抗體鍵結後，該胜肽庫可作為胜肽混合物，及可分離出抗體：胜肽複合物使用。或者，亦可選擇使該抗體固定化，因而該胜肽庫能以懸浮液或溶液的方式接觸該固定化抗體。

篩選抗體(或胜肽庫之胜肽成份)較佳使用一適當標誌〔marker〕，如此在連結到該胜肽庫的胜肽時，可便於偵測或分離抗體或抗體/胜肽之複合體。熟悉該項技術者可選擇採用適當的標誌系統(例如生物素化、螢光、放射性、磁性標誌、染色標誌、二次抗體標誌)。

由於本發明係明顯排除該自然 $A\beta$ 序列的疫苗接種，因此本發明之胜肽庫必需設計至足以排除自然 $A\beta$ 序列。

另一個本發明分離抗原決定部位的適用技術是選擇如 PCT 專利第 WO03/020750 號所述之噬菌體胜肽庫篩選

技術。

本發明係關於一組成物包含一抗 A β 42 之 N 端抗體鍵結胜肽〔或較佳為一大分子包含上述胜肽，例如該胜肽連結到一載體或傳送分子〕，並選擇做為單一有效成份，較佳係用以做為抗阿滋海默症之疫苗，其包含以該胜肽做為抗原。一適合之抗原包含選自下列族群之至少一胜肽：DAEFRWP(SEQ ID NO:27)、DNEFRSP(SEQ ID NO:28)、GSEFRDY(SEQ ID NO:29)、GAEFRFT(SEQ ID NO:30)、SAEFRTQ(SEQ ID NO:31)、SAEFRAT(SEQ ID NO:32)、SWEFRNP(SEQ ID NO:33)、SWEFRLY(SEQ ID NO:34)、SWELRQA(SEQ ID NO:35)、SVEFRYH(SEQ ID NO:36)、SYEFRHH(SEQ ID NO:37)、SQEFRTP(SEQ ID NO:38)、SSEFRVS(SEQ ID NO:39)、DWEFRD(SEQ ID NO:40)、DAELRY(SEQ ID NO:41)、DWELRQ(SEQ ID NO:42)、SLEFRF(SEQ ID NO:43)、GPEFRW(SEQ ID NO:44)、GKEFRT(SEQ ID NO:45)、AYEFRH(SEQ ID NO:46)、DKE(Nle)R(SEQ ID NO:47)、DKE(Nva)R(SEQ ID NO:48) 或 DKE(Cha)R(SEQ ID NO:49)。上述胜肽係排除在本發明提供之其它適用於製備醫藥組成物〔特別是 AD 疫苗〕的胜肽之外。上述序列完全為人工合成之 A β 類抗原決定部位。該胜肽用於疫苗接種用途時係選擇以共價或非共價方式耦合於其他化合物或結合物，例如佐劑、胜肽或蛋白質載體等，且可選擇以適當方式給藥(O'Hagan 等人, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9)(2003), 727-735)。

【實施方式】

為了讓本發明之上述及其他目的、特徵、優點能更明顯易懂，下文將特舉本發明較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下。

1、產生單株抗體〔mAb〕用以偵測具自由 N 端之 A β 42 衍生胜肽〔N 端具有自由天門冬胺酸〕：

實驗鼠係接種六元體胜肽 DAEFRH〔A β 42 之自然 N 端序列〕，該六元體胜肽連接有蛋白質牛血清白蛋白 BSA〔以便使用半抗原載體效應 hapten-carrier-effect〕，以弗氏完全佐劑 CFA〔初次注射〕及弗氏不完全佐劑 IFA〔加強注射〕進行乳化。具 DAEFRH 胜肽專一性之抗體生成融合瘤〔hybridomas〕係利用酵素連結免疫吸附法 ELISA 方式〔塗覆 DAEFRH 胜肽之 ELISA 試板〕進行檢測。胜肽 SEVKMDAEFRH(SEQ ID NO:50)〔APP 衍生之天然 N 端延長序列，其含有 A β 42 衍生序列 DAEFRH〕用以做為陰性控制組胜肽：由於可辨識該延長胜肽之融合瘤無法區別 A β 42 衍生序列〔N 端具有自由天門冬胺酸〕及 APP 衍生序列〔不具自由天門冬胺酸〕，因此可辨識該延長胜肽之融合瘤將予以排除。

2、架構胜肽庫：

本發明之類抗原決定部位可藉由使用 2000 年 Reinke 等人的方法篩選可鍵結抗體之胜肽庫，該抗體較佳係單株抗體，且專一於 A β 序列〔其 N 端具有天門冬胺酸〕。另一方法係商業使用 MULTIPINTM 胜肽技術。該

MULTIPIN™ 胜肽技術可合成胜肽於一特製聚乙烯針頭上，該針頭固定在一塊體，且相容於一般生物分析用之標準 8x12 孔之微滴定盤。鍵結於針頭之胜肽〔不可分開之胜肽共價鍵結在針頭上〕及液相之胜肽〔可由針頭上脫離之胜肽〕皆由上述方法製備。基於該 MULTIPIN™ 合成系統之 PepSets 技術可同步合成及篩選大量胜肽。

PepSets 技術係由 96 種個別合成胜肽之塊體所組成，其中二個係謹慎選出之控制組序列。可分開之控制組係藉由逆相高效液相層析 HPLC 方法評估純度，並藉由胺基酸分析對其胜肽含量進行定量。陽性及陰性之不可分開控制組係藉由標準 ELISA 技術。

PepSet 之胜肽係可由各種化學修飾取得，該化學修飾包含乙醯化、生物素化、磷酸化及環化等。該液相〔可分開〕胜肽係製成冷凍乾燥的粉末。

液相胜肽之製備可選擇 C 端終結化，其依胜肽使用需求選用酸基及醯基。該可分開之鍵結力係結合在該針頭表面，可選用一 C 端胺基酸之預製醯基衍生物或“Rink”醯基連接子。接著，具酸基或醯基終端官能基之胺基酸可藉由對上述鍵結在針頭之胜肽處理強酸加以釋放。疏水性及分離效率等因子將影響胜肽回收率，因此當胜肽合成在微量的 1mmole 等級時，預期之胜肽產率係為 0.5mmole 至 1mmole〔大約 1mg 之十五元體胜肽〕；或者，在微量的 5mmole 等級時，胜肽產率係為 2.5mmole 至 5mmole。

不可分開的胜肽仍共價鍵結在該針頭，及可藉由使用

ELISA 技術快速篩選有用之胜肽。上述胜肽可用於抗體之抗原決定部位的掃描及結構活性關係〔SAR〕之研究。鍵結抗體或其他蛋白質之移除重新產生該胜肽，使得該胜肽可供重新用於進一步分析。

PepSets 之胜肽係可用於各種應用，其包含：由掃描蛋白質序列辨識具生物益處之主要胜肽、該主要胜肽之極佳化，及其新相似物之研發等。使用在掃描程序之整個策略係經由使用各種合成設計而大幅提高彈性，該合成設計提供一系統方法可完全的定義出主要候選胜肽之特徵。

由系統性胜肽組獲得之複雜結果不只可辨識有用之胜肽，而且亦可指出關鍵序列位置、可置換性及最佳胜肽長度。結果，上述搜尋結果可定義出相關胜肽範圍。左旋 L-胺基酸利用右旋 D-胺基酸及其他稀有胺基酸置換，其係一有效方法可改變胜肽之結構及形態。上述方法亦係一快速路徑可供發現具不同藥理性質之新相似物，例如拮抗物及可提升穩定性之胜肽。

由一已知蛋白質序列開始，所有序列化抗體之抗原決定部位可使用 MULTIPIN 方式定出序列圖譜。亦可使用數種其他可行程序，以定出序列化 B 細胞抗原決定部位之序列圖譜。該可行程序包含：針頭鍵結胜肽、直接塗覆於微滴定盤之液相胜肽，及由微滴定盤預先塗覆親和素 avidin 或鏈黴親和素 streptavidin 攫取生物素化胜肽等。

以本發明之實施例而言，第一實施例之抗體用於篩選胜肽庫，然而任何抗體製劑係專一辨識 DAEFRH 序列(SEQ

ID NO:26), 而非辨識 $A\beta$ 分子之天然 N 端延長序列 (例如 MDAEFRH·KMDAEFRH·SEVKMDAEFRH 或完整之 APP), 例如 Johnson-Wood 等人 [1997] 所述之分子。

四個胜肽庫係架構用於上述目的:

2.1、第 1 胜肽庫:

該六元體胜肽庫包含具有下列序列之胜肽 [序列位置 1 至 6]:

序列位置 1: 所有天然胺基酸, 但不包含 D、K 及 C [17 個可能胺基酸]

序列位置 2: 所有天然胺基酸, 但不包含 A、K 及 C [17 個可能胺基酸]

序列位置 3: 所有天然胺基酸, 但不包含 E、K 及 C [17 個可能胺基酸]

序列位置 4: 所有天然胺基酸, 但不包含 F、K 及 C [17 個可能胺基酸]

序列位置 5: 所有天然胺基酸, 但不包含 R、K 及 C [17 個可能胺基酸]

序列位置 6: 所有天然胺基酸, 但不包含 H、K、C 及 P [16 個可能胺基酸]

第 1 胜肽庫係六元胜肽之混合物。理論上, 所有可能胜肽包含 17 個不同胺基酸 [如下所述]。該混合物不包含任何離胺酸 [K] 及半胱胺酸 [C] 之殘基。

再者, 該混合物之序列位置 1 不包含天門冬胺酸 [D]; 序列位置 2 不包含丙胺酸 [A]; 序列位置 3 不包含

麩胺酸〔E〕；序列位置4不包含苯丙胺酸〔F〕；序列位置5不包含精胺酸〔R〕；序列位置6不包含組胺酸〔H〕。

上述合成反應係使用 Applied Biosystem 431A-Synthesizer 及 FastMoc 程序，其合成等級為 0.25mmole。

上述合成反應的起始係使用所有胺基酸各為 1mmole〔胺基及側鏈保護〕。接著，產生一混合物〔精胺酸 Asn、麩胺醯胺 Gln、甘胺酸 Gly、異白胺酸 Ile、白胺酸 Leu、甲硫胺酸 Met、脯胺酸 Pro、絲胺酸 Ser、酥胺酸 Thr、色胺酸 Trp、酪胺酸 Tyr、纈胺酸 Val〕。陽性專一胜肽係添加下列胺基酸：

丙胺酸 Ala、麩胺酸 Glu、苯丙胺酸 Phe、精胺酸 Arg、組胺酸 His〔陽性/混合物1〕；

丙胺酸 Ala、麩胺酸 Glu、苯丙胺酸 Phe、精胺酸 Arg、組胺酸 His〔陽性/混合物2〕；

天門冬胺酸 Asp、丙胺酸 Ala、苯丙胺酸 Phe、精胺酸 Arg、組胺酸 His〔陽性/混合物3〕；

天門冬胺酸 Asp、丙胺酸 Ala、麩胺酸 Glu、精胺酸 Arg、組胺酸 His〔陽性/混合物4〕；

天門冬胺酸 Asp、丙胺酸 Ala、麩胺酸 Glu、苯丙胺酸 Phe、組胺酸 His〔陽性/混合物5〕；

天門冬胺酸 Asp、丙胺酸 Ala、麩胺酸 Glu、苯丙胺酸 Phe、精胺酸 Arg〔陽性/混合物6，不包含脯胺酸 Pro〕。

混合物 6 用以裝載在樹脂上〔2-氯-三苯甲基氯樹脂 (2-chloro-tritylchloride)、1.49mmole/g、Alexis Germany 公司製〕：

1mmole 之胺基酸混合物 6

611mg 之樹脂〔=0.91mmole 反應官能基〕

15ml 之二氯甲烷

5.5 當量=5mmole 二異丙基乙胺〔871 μ l〕

該混合物係置入一燒瓶中震盪 1 小時。接著，加入 1ml 甲醇，該混合物係再震盪 10 分鐘。該樹脂係經由一濾片萃取，並以二甲基甲醯胺、二氯甲烷、異丙醇、甲醇及乙醚〔各 30ml〕清洗二次。接著，在一高真空下隔夜乾燥，其乾重為 737mg。

5.66mg 之量係以 1ml 的 20% 哌啶〔piperidine，溶於二甲基甲醯胺 DMF〕處理 30 分鐘，以定義該樹脂之密度。接著，該混合物係離心處理。該自由 Fmoc 保護基係在上清液中進行光度測量〔301nm、消光係數=7800M(e-1)〕。因此，該樹脂之密度係 0.49mmole/g。

所有下列步驟係在合成機中進行，其使用其他混合物〔置於 5 個不同之匣具中〕。使用 515mg 的樹脂〔等於 0.25mmole：胺基酸混合物係使用 4 倍之過量〕該自由 Fmoc 保護基係由該合成物之末端分開。在利用乙醇清洗及隔夜乾燥後，藉由使用三氟醋酸 TFA/水〔體積比 95:5〕將該胜肽由該樹脂分出。該 TFA 溶液係於冷凍離心乾燥機 Speed Vac 中濃縮至 1/5 的體積比，及在二乙基醚中沈澱及

清洗，並冷凍乾燥。

該胜肽六元體 EIDYHR(SEQ ID NO:1)、ELDYHR(SEQ ID NO:2)及 EVDYHR(SEQ ID NO:3)係類抗原決定部位之實施例，其可藉由上述第一實施例之單株抗體偵測到。

2.2、第 2 胜肽庫：

該六元體胜肽庫包含具有下列序列之胜肽〔序列位置 1 至 6〕：

序列位置 1：固定皆為 D

序列位置 2：所有天然胺基酸，但不包含 A、K 及 C
〔17 個可能胺基酸〕

序列位置 3：所有天然胺基酸，但不包含 E、K 及 C
〔17 個可能胺基酸〕

序列位置 4：所有天然胺基酸，但不包含 F、K 及 C
〔17 個可能胺基酸〕

序列位置 5：所有天然胺基酸，但不包含 R、K 及 C
〔17 個可能胺基酸〕

序列位置 6：所有天然胺基酸，但不包含 H、K、C 及 P
〔16 個可能胺基酸〕

第 2 胜肽庫係根據上述第 1 胜肽庫之方法〔2.1 節〕進行架構。

該胜肽六元體 DIDYHR(SEQ ID NO:4)、DLDYHR(SEQ ID NO:5)及 DVDYHR(SEQ ID NO:6)係類抗原決定部位之實施例，其可藉由上述第一實施例之單株抗體偵測到。

2.3、第3胜肽庫：

第3胜肽庫係使用於一額外方法，以定義類抗原決定部位序列。該胜肽庫包含原始序列，並可偵測更相關於原始抗原決定部位的類抗原決定部位。

該六元體胜肽庫包含具有下列序列之胜肽〔序列位置1至6〕：

序列位置1：所有天然胺基酸，但不包含K及C〔18個可能胺基酸〕

序列位置2：所有天然胺基酸，但不包含K及C〔18個可能胺基酸〕

序列位置3：所有天然胺基酸，但不包含K及C〔18個可能胺基酸〕

序列位置4：所有天然胺基酸，但不包含K及C〔18個可能胺基酸〕

序列位置5：所有天然胺基酸，但不包含K及C〔18個可能胺基酸〕

序列位置6：所有天然胺基酸，但不包含K、C及P〔17個可能胺基酸〕

第3胜肽庫亦根據上述第1胜肽庫之方法〔2.1節〕進行架構。

該胜肽六元體 DIDYRR(SEQ ID NO:7)、DLDYRR(SEQ ID NO:8)及 DVDYRR(SEQ ID NO:9)係類抗原決定部位之實施例，其亦可藉由上述第一實施例之單株抗體偵測到〔位置1之D及位置5之R係相同於原始抗原

決定部位)。

2.4、第4胜肽庫：

第4胜肽庫係由 $5 \times 18 = 90$ 個胜肽所組成，其係來自 Mimotopes Ltd.公司〔Paris, France；參照製造商之導引手冊〕，及根據 A β 42 之自然 N 端序列 DAEFRH 而設計。

序列位置 1：固定皆為 D

序列位置 2：所有天然胺基酸，但不包含 K 及 C〔18 個可能胺基酸〕

序列位置 3：所有天然胺基酸，但不包含 K 及 C〔18 個可能胺基酸〕

序列位置 4：所有天然胺基酸，但不包含 K 及 C〔18 個可能胺基酸〕

序列位置 5：所有天然胺基酸，但不包含 K 及 C〔18 個可能胺基酸〕

序列位置 6：所有天然胺基酸，但不包含 K 及 C〔18 個可能胺基酸〕

該第4胜肽庫之個別胜肽係如第1圖所示，胜肽第1、24、48、56及80號具有 A β 42 之原始 N 端序列。所有其他胜肽係為候選胜肽，其可進一步測試與一 DAEFRH 鍵結抗體之鍵結能力。

2.5、胜肽庫之酵素連結免疫吸附法 ELISA 分析：

如上所述，第1、2及3胜肽庫係由 Applied Biosystem 431A 胜肽合成機及典型 Fmoc 化學程序。上述商業取得之第4胜肽庫係根據製造商之說明製造〔如上所述及如

www.mimotopes.com 所述〕。上述 90 個胜肽係由 C 端連結至一針頭。

各胜肽庫之 ELISA 分析係以下列標準程序進行：

胜肽庫溶解於 100% 二甲基亞砷 DMSO 溶液中〔最終濃度 10mg/ml〕；

胜肽溶液進一步稀釋於磷酸緩衝鹽水 PBS 中；

胜肽混合物塗覆於 ELISA 試盤〔Nunc Maxisorp, Germany〕至隔夜〔4°C〕，開始時加入 500 μ g/孔，並滴定至 100ng/孔；

該試盤以 PBS/Tween20 液〔體積比：0.1%〕清洗 3 次；

該試盤以 PBS/牛血清白蛋白 BSA 液進行阻斷〔室溫下進行 2 小時〕；

該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次；

該試盤以生物素化之 DAEFRH 專一性單株抗體〔mAb〕〔10 μ g/ml in PBS〕在室溫下培養 4 小時；

該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次；

該試盤以鏈黴親和素-辣根過氧化物酶〔streptavidin-horseradish-peroxidase；SA-HRP〕在室溫下培養 30 分鐘；

該試盤以 PBS/Tween 液清洗 5 次；

該試盤以顯色液 ABTS+雙氧水〔重量/體積比：0.1%〕培養 10 至 45 分鐘；及該反應係以檸檬酸中止，並接著進行光度量計〔波長 405nm〕。

3、藉由抑制分析辨識類抗原決定部位：

3.1、額外胜肽庫：

除了上述 4 個胜肽庫之外〔2.1 節至 2.4 節〕，一第 5 胜肽庫係用以定義類抗原決定部位序列。該六元體胜肽庫係由 EMC microcollections〔Tübingen Germany〕商業購得，並包含 114 種不同六元胜肽混合物，各混合物之 1 胺基酸位置係選自所有胺基酸，但不包含半胱胺酸 C〔19 個可能胺基酸〕，其餘 5 個位置係可具有變化性：

混合物 01 至 06〔任一位置固定為丙胺酸 A，其餘五個位置任意變化 X〕：

混合物 01：AXXXXX

混合物 02：XAXXXX

混合物 03：XXAXXX

混合物 04：XXXAXX

混合物 05：XXXXAX

混合物 06：XXXXXA

混合物 07 至 12〔任一位置固定為精胺酸 R，其餘五個位置任意變化 X〕：

混合物 07：RXXXXX

混合物 08：XRXXXX

混合物 09：XXRXXX

混合物 10：XXXRXX

混合物 11：XXXXRX

混合物 12：XXXXXR

因此，混合物 13 至 114 係使用所有胺基酸進行設計，但不包含 C。

3.2、抑制分析：

請參照第 2 及 3 圖所示，其揭示上述 5 種胜肽庫之類抗原決定部位胜肽之抑制分析結果。該類抗原決定部位胜肽係與原始抗原決定部位競爭，以決定何者可受單株抗體所辨識。必要時，原始抗原決定部位及類抗原決定部位胜肽額外於 C 端包含半胱胺酸 C，以供耦合一蛋白質載體。

使用下列胜肽：

胜肽 1737 DAEFRH(SEQ ID NO:26)；

胜肽 3001 DKELRI(SEQ ID NO:10)；

胜肽 3002 DWELRI(SEQ ID NO:11)；

胜肽 3003 YREFFI；

胜肽 3004 YREFRI(SEQ ID NO:12)；

胜肽 3005 YAEFRG(SEQ ID NO:13)；

胜肽 3006 EAEFRG(SEQ ID NO:14)；

胜肽 3007 DYEFRG(SEQ ID NO:15)；

胜肽 3008 ELEFRG(SEQ ID NO:16)；

胜肽 3009 SFEFRG(SEQ ID NO:25)；

胜肽 3010 DISFRG；

胜肽 3011 DIGWRG。

程序：

ELISA 試盤〔Nunc Maxisorp〕塗覆原始抗原決定部位胜肽 DAEFRH(SEQ ID NO:26)〔C 端延長結合半胱胺酸

C 及耦合有 BSA)，濃度為 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 胜肽-BSA [$100 \mu\text{g/}$ 孔、12 小時， 4°C]。在以 0.1% 之 PBS/BSA 液 [$200 \mu\text{l/}$ 孔、12 小時， 4°C] 進行阻斷後，該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次。接著，分別添加 $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.005 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.0005 \mu\text{g/ml}$ 之生物素化單株抗體 [1 : 2000 ; $50 \mu\text{l/}$ 孔] 及胜肽 [$50 \mu\text{l/}$ 孔] 在 37°C 下反應 20 分鐘。該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次，接著以辣根過氧化物酶 HRP 標示之鏈黴親和素 SA [$100 \mu\text{l/}$ 孔，30 分鐘，室溫] 進行培養。該試盤以 PBS/Tween 液清洗 5 次，接著以顯色液 ABTS+雙氧水 [重量/體積比 : 0.1%] 培養 10 至 45 分鐘；及該反應係以檸檬酸中止，並接著進行光度量計 [波長 405nm]。

如預期般及參照第 2 圖所示，胜肽 1737 之 DAEFRH (SEQ ID NO:26) 可與上述耦合 BSA 且鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭，因此抑制受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 3003 無法抑制單株抗體鍵結原始抗原決定部位。相反的，胜肽 3001、3002、3004、3005、3006 及 3007 [不同程度的] 阻斷單株抗體對抗原決定部位的辨識率。然而，胜肽 3004 係唯一需高濃度 [$50 \mu\text{g/ml}$] 才能發揮抑制效果者，而胜肽 3001、3006 及 3007 係具強效抑制性 [IC_{50} 小於 $0.5 \mu\text{g/ml}$]。胜肽 3002 及 3005 係具中效抑制性 [IC_{50} 大於 $0.5 \mu\text{g/ml}$]。

如預期般及參照第 3 圖所示，在一額外獨立進行之實驗中，胜肽 1737 之 DAEFRH 可成功的與上述耦合 BSA 且

鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 3010 及 3011 在其濃度測試中並不具抑制效果。然而，胜肽 3008 及 3009 係具〔相對〕弱效抑制性〔 IC_{50} 小於 $5 \mu g/ml$ 〕。

下列表一概要揭示各胜肽庫包含之類抗原決定部位之抑制能力。

表一、類抗原決定部位之抑制能力：

胜肽編號	序列	抑制效果
胜肽 3001	DKELRI	強效
胜肽 3002	DWELRI	中效
胜肽 3003	YREFFI	無效
胜肽 3004	YREFRI	弱效
胜肽 3005	YAEFRG	中效
胜肽 3006	EAEFRG	強效
胜肽 3007	DYEFRG	強效
胜肽 3008	ELEFRG	弱效
胜肽 3009	SFEFRG	弱效
胜肽 3010	DISFRG	無效
胜肽 3011	DIGWRG	無效

4、本發明篩選之額外類抗原決定部位的抑制分析：

請參照第 4 及 5 圖所示，其揭示上述 5 種胜肽庫之類抗原決定部位胜肽之抑制分析結果。該類抗原決定部位胜肽係與原始抗原決定部位競爭，以決定何者可受單株抗體所辨識。必要時，原始抗原決定部位及類抗原決定部位胜

肽額外於 C 端包含半胱胺酸 C〔位置 7〕，以供耦合一蛋白質載體。

使用下列胜肽：

胜肽 1737 DAEFRH(SEQ ID NO:26) (原始抗原決定部位+ C)；

胜肽 1234 KKELRI(SEQ ID NO:52)；

胜肽 1235 DRELRI(SEQ ID NO:17)；

胜肽 1236 DKELKI(SEQ ID NO:18)；

胜肽 1237 DRELKI(SEQ ID NO:19)；

胜肽 1238 DKELR(SEQ ID NO:24)；

胜肽 1239 EYEFRG(SEQ ID NO:21)；

胜肽 1241 DWEFRDA(SEQ ID NO:22)；

胜肽 4002 SWEFRT(SEQ ID NO:23)；

胜肽 4003 GREFRN(SEQ ID NO:20)；

胜肽 4004 WHWSWR(SEQ ID NO:50)。

程序：

ELISA 試盤〔Nunc Maxisorp〕塗覆原始抗原決定部位胜肽 DAEFRH〔C 端延長結合半胱胺酸 C 及耦合有 BSA〕，濃度為 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 胜肽-BSA〔 $100 \mu\text{g/孔}$ 、12 小時， 4°C 〕。在以 0.1% 之 PBS/BSA 液〔 $200 \mu\text{l/孔}$ 、12 小時， 4°C 〕進行阻斷後，該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次。接著，分別添加不同濃度之生物素化單株抗體〔1：2000； $50 \mu\text{l/孔}$ 〕及胜肽〔 $50 \mu\text{l/孔}$ 〕在 37°C 下反應 20 分鐘。該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次，接著以辣根過氧化物酶 HRP

標示之鏈黴親和素 SA [100 μ l/孔，30 分鐘，室溫] 進行培養。該試盤以 PBS/Tween 液清洗 5 次，接著以顯色液 ABTS+雙氧水 [重量/體積比：0.1%] 培養 10 至 45 分鐘；及該反應係以檸檬酸中止，並接著進行光度量計 [波長 405nm]。

如預期般及參照第 4 圖所示，胜肽 1737 之 DAEFRH 可與上述耦合 BSA 且鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭，因此抑制受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 4004 無法抑制單株抗體鍵結原始抗原決定部位。相反的，胜肽 4002、4003 [不同程度的] 阻斷單株抗體對抗原決定部位的辨識率。然而，胜肽 4003 係唯一需高濃度 [10 μ g/ml] 才能發揮抑制效果者，而胜肽 4002 係具強效抑制性 [IC₅₀ 小於 0.4 μ g/ml]。

如預期般及參照第 5 圖所示，在一額外獨立進行之實驗中，胜肽 1737 之 DAEFRH 可成功的與上述耦合 BSA 且鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 1234 在其濃度測試中很難具有抑制效果。然而，胜肽 1235、1236、1237、1238、1239 及 1241 [不同程度的] 阻斷單株抗體對抗原決定部位的辨識率。胜肽 1235、1238 及 1241 係具強效抑制性 [IC₅₀ 小於 0.5 μ g/ml]，然而胜肽 1236 及 1237 係具 [相對] 弱效抑制性 [IC₅₀ 大於 5 μ g/ml]，而胜肽 1239 係具中效抑制性 [IC₅₀ 大於 0.5 μ g/ml]。

下列表二概要揭示各胜肽庫包含之類抗原決定部位

之抑制能力。

表二、類抗原決定部位之抑制能力：

胜肽編號	序列	抑制效果
胜肽 1234	KKELRI	無效
胜肽 1235	DRELRI	強效
胜肽 1236	DKELKI	弱效
胜肽 1237	DRELKI	弱效
胜肽 1238	DKELR	強效
胜肽 1239	EYEFRG	中效
胜肽 1241	DWEFRDA	強效
胜肽 4002	SWEFRT	強效
胜肽 4003	GREFRN	弱效
胜肽 4004	WHWSWR	無效

第 4 及 5 圖之結果顯示除了各種胜肽六元體之外，胜肽五元體〔如胜肽 1238 之 DKELR〕及胜肽七元體〔如胜肽 1241 之 DWEFRDA〕亦可使用在一類抗原決定部位基礎之阿滋海默症疫苗內做為抗原決定部位。

5、用於篩選之另一獨立新實驗：

胜肽庫：

該類抗原決定部位較佳具有 5 至 15 個胺基酸之長度。二種不同胜肽庫係用於 ELISA 分析，以定義類抗原決定部位序列。

第 1 胜肽庫：

該六元體胜肽庫包含具下列序列〔序列位置 1 至 6〕

之胜肽群：

序列位置 1：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 2：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 3：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 4：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 5：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 6：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕。

第 2 胜肽庫：

該七元體胜肽庫包含具下列序列〔序列位置 1 至 7〕之胜肽群：

序列位置 1：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 2：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 3：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 4：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 5：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 6：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕；

序列位置 7：所有天然胺基酸，但不包含 C〔19 個可能胺基酸〕。

抑制分析：

請參照第 6、7 及 8 圖所示，其揭示上述 2 種胜肽庫之類抗原決定部位胜肽之抑制分析結果。該類抗原決定部位胜肽係與原始抗原決定部位競爭，以決定何者可受單株抗體所辨識。必要時，原始抗原決定部位及類抗原決定部位胜肽額外於 C 端包含半胱胺酸 C〔分別於位置 7 或 8〕，以供耦合一蛋白質載體。

使用下列胜肽：

胜肽	胺基酸序列	原始抗原決定部位	效果
胜肽 1737	DAEFRH	原始抗原決定部位	
胜肽 4011	DAEFRWP	七元體	強效
胜肽 4012	DNEFRSP	七元體	強效
胜肽 4013	GSEFRDY	七元體	中效
胜肽 4014	GAEFRFT	七元體	中效
胜肽 4015	SAEFRTQ	七元體	強效
胜肽 4016	SAEFRAT	七元體	強效
胜肽 4017	SWEFRNP	七元體	強效
胜肽 4018	SWEFRLY	七元體	強效
胜肽 4019	SWFRNP	六元體	無效

胜肽 4020	SWELRQA	七元體	強效
胜肽 4021	SVEFRYH	七元體	強效
胜肽 4022	SYEFRHH	七元體	強效
胜肽 4023	SQEFRTP	七元體	強效
胜肽 4024	SSEFRVS	七元體	強效
胜肽 4025	DWEFRD	六元體	強效
胜肽 4031	DAELRY	六元體	強效
胜肽 4032	DWELRQ	六元體	強效
胜肽 4033	SLEFRF	六元體	強效
胜肽 4034	GPEFRW	六元體	強效
胜肽 4035	GKEFRT	六元體	強效
胜肽 4036	AYEFRH	六元體	中效
胜肽 4037	VPTSALA	七元體	無效
胜肽 4038	ATYAYWN	七元體	無效

再者，下列胜肽五元體〔具有非天然胺基酸〕亦用於抑制分析：

胜肽 4061	DKE(tBuGly)R	五元體	無效
胜肽 4062	DKE(Nle)R	五元體	中效
胜肽 4063	DKE(Nva)R	五元體	中效
胜肽 4064	DKE(Cha)R	五元體	中效

程序：

ELISA 試盤〔Nunc Maxisorp〕塗覆原始抗原決定部位胜肽 DAEFRH〔C端延長結合半胱胺酸 C 及耦合有 BSA〕，濃度為 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 胜肽-BSA〔 $100 \mu\text{g/孔}$ 、12 小時，4

°C〕。在以 0.1%之 PBS/BSA 液〔200 μ l/孔、12 小時，4 °C〕進行阻斷後，該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次。接著，分別添加 50 μ g/ml、5 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.005 μ g/ml、0.0005 μ g/ml 之生物素化單株抗體〔1:2000；50 μ l/孔〕及胜肽〔50 μ l/孔〕在 37°C 下反應 20 分鐘。該試盤以 PBS/Tween 液清洗 3 次，接著以辣根過氧化物酶 HRP 標示之鏈黴親和素 SA〔100 μ l/孔，30 分鐘，室溫〕進行培養。該試盤以 PBS/Tween 液清洗 5 次，接著以顯色液 ABTS+雙氧水〔重量/體積比：0.1%〕培養 10 至 45 分鐘；及該反應係以檸檬酸中止，並接著進行光度量計〔波長 405nm〕。

如預期般及參照第 6 圖〔胜肽 4011 至 4018〕所示，胜肽 1737 之 DAEFRH 可與上述耦合 BSA 且鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭，因此抑制受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 4012 之 DNEFRSP、胜肽 4013 之 GSEFRDY 及胜肽 4014 之 GAEFRFT 能溫和的抑制單株抗體鍵結原始抗原決定部位。相反的，胜肽 4011 之 DAEFRWP、胜肽 4015 之 SAEFRAT、胜肽 4016 之 SAEFRAT、胜肽 4017 之 SWEFRNP 及胜肽 4018 之 SWEFRLY〔不同程度的〕強力阻斷單株抗體對抗原決定部位的辨識率。

如預期般及參照第 7 圖〔胜肽 4019 至 4025〕所示，在一額外獨立進行之實驗中，胜肽 1737 之 DAEFRH 可成功的與上述耦合 BSA 且鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 4019 之

SWFRNP 在其濃度測試中並不具抑制效果。然而，胜肽 4020 之 SWELRQA 及胜肽 4021 之 SVEFRYH、胜肽 4022 之 SYEFRHH、胜肽 4023 之 SQEFRTP、胜肽 4024 之 SSERFVS 及胜肽 4025 之 DWEFRD〔不同程度的〕阻斷單株抗體對抗原決定部位的辨識率。胜肽 4021、4022、4023、4024 及 4025 係具強效抑制性〔 IC_{50} 小於 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 〕，然而胜肽 4020 係具中效抑制性〔 IC_{50} 大於 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 〕。

如預期般及參照第 8 圖〔胜肽 4031 至 4038〕所示，在一第 3 次獨立進行之實驗中，胜肽 1737 之 DAEFRH 可成功的與上述耦合 BSA 且鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 4037 之 VPTSALA(SEQ ID NO:53) 及胜肽 4038 之 ATYAYWN(SEQ ID NO:54)在其濃度測試中並不具抑制效果。然而，胜肽 4031 之 DAELRY、胜肽 4032 之 DWELRQ、胜肽 4033 之 SLEFRF、胜肽 4034 之 GPEFRW、胜肽 4035 之 GKEFRT、胜肽 4036 之 AYEFRH〔不同程度的〕阻斷單株抗體對抗原決定部位的辨識率。胜肽 4031、4032、4033、4034 及 4035 係具相對強效抑制性〔 IC_{50} 小於 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 〕，然而胜肽 4036 係具〔相對〕弱效抑制性〔 IC_{50} 大於 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 〕。

6、上述定義之胜肽五元體之抑制分析：〔具非天然胺基酸者〕

經證實胜肽五元體〔如胜肽 1238 之 DKELR〕可使用在一類抗原決定部位基礎之阿滋海默症疫苗內做為抗原決

定部位〔參照 PCT 專利第 EP/04/00162 號〕。原始五元體之抗原決定部位的胺基酸係利用非天然胺基酸加以置換，例如；原本之白胺酸 L 可選用 t-丁基甘胺酸〔tBuGly〕、正白胺酸 Nle〔Norleucine〕、正纈胺酸 Nva〔Norvaline〕、環己丙胺酸 Cha〔Cyclohexylalanine〕等非天然胺基酸加以置換。

如預期般及參照第 9 圖〔胜肽 4061 至 4064 之 DKELR 變化型〕所示，在一第 4 次獨立進行之實驗中，胜肽 1737 之 DAEFRH 可成功的與上述耦合 BSA 且鍵結在試盤上之胜肽 DAEFRH 競爭受單株抗體辨識之辨識率。再者，經證實胜肽 4061 之 DKE(tBuGly)R 在其濃度測試中並不具抑制效果。然而，胜肽 4062 之 DKE(Nle)R、胜肽 4063 之 DKE(Nva)R 及胜肽 4064 之 DKE(Cha)R〔不同程度的〕阻斷單株抗體對抗原決定部位的辨識率。胜肽 4062、4063 及 4064 係具〔相對〕弱效抑制性〔 IC_{50} 大於 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 〕。

雖然本發明已利用前述較佳實施例詳細揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與修改，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1A、1B 及 1C 圖：本發明之篩選過程使用之胜肽庫 4 之個別胜肽之示意圖表。

第 2 圖：本發明之 DAEFRH 類抗原決定部位之抑制分析曲線圖。

第 3 圖：本發明之另一 DAEFRH 類抗原決定部位之抑制分析曲線圖。

第 4 及 5 圖：本發明之類抗原決定部位胜肽之抑制分析結果之曲線圖。

第 6、7、8 及 9 圖：本發明之類抗原決定部位胜肽 4011-4018、4019-4025、4031-4038 及 4061-4064 之抑制分析結果之曲線圖。

【主要元件符號說明】

無

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 馬特那 法蘭克

希密茲 瓦特

<120> 類抗原在製備用以預防及治療阿滋海默症之化合物的用途

● <130> PF-1307-S

<140> PCT/EP2005/053225

<141> 2005-07-06

<150> AT 1184/2004

<151> 2004-07-13

● <160> 54

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 3

Glu Val Asp Tyr His Arg

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 4

<223> Mimotope

<400> 6

Asp Val Asp Tyr His Arg

1 5

● <210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

● <400> 7

Asp Ile Asp Tyr Arg Arg

1 5

<210> 8

<211> 6

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 10

Asp Lys Glu Leu Arg Ile

1

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 11

Asp Trp Glu Leu Arg Ile

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 12

Tyr Arg Glu Phe Arg Ile

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mimotope

<400> 15

Asp Tyr Glu Phe Arg Gly

1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mimotope

<400> 16

Glu Leu Glu Phe Arg Gly

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 17

Asp Arg Glu Leu Arg Ile

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 20

Gly Arg Glu Phe Arg Asn

1

5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mimotope

<400> 21

Glu Tyr Glu Phe Arg Gly

1

5

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 27

Asp Ala Glu Phe Arg Trp Pro

1

5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 28

Asp Asn Glu Phe Arg Ser Pro

1

5

Gly Ala Glu Phe Arg Phe Thr

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 31

Ser Ala Glu Phe Arg Thr Gln

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 32

Ser Ala Glu Phe Arg Ala Thr

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 33

Ser Trp Glu Phe Arg Asn Pro

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 34

Ser Trp Glu Phe Arg Leu Tyr

1

5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 35

Ser Trp Glu Leu Arg Gln Ala

1 5

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> peptide

<400> 36

Ser Val Glu Phe Arg Tyr His

1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> peptide

<400> 37

Ser Tyr Glu Phe Arg His His

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 38

Ser Gln Glu Phe Arg Thr Pro

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 39

Ser Ser Glu Phe Arg Val Ser

1

5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 40

Asp Trp Glu Phe Arg Asp

1

5

Asp Trp Glu Leu Arg Gln

1 5

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 43

Ser Leu Glu Phe Arg Phe

1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 44

Gly Pro Glu Phe Arg Trp

1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<400> 45

Gly Lys Glu Phe Arg Thr

1 5

<210> 46

<222> (4)..(4)

<400> 47

Asp Lys Glu Xaa Arg

1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<220>

<221> Nva

<222> (4)..(4)

<400> 48

Asp Lys Glu Xaa Arg

1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> peptide

<220>
<221> Cha
<222> (4)..(4)

<400> 49

Asp Lys Glu Xaa Arg

1 5

<210> 50
<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His

1

5

10

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> mimotope

<400> 51

Trp His Trp Ser Trp Arg

1

5

<210> 52

1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> peptide

<400> 54

Ala Thr Tyr Ala Tyr Trp Asn
1 5

五、中文發明摘要：

一種預防及治療阿滋海默症之方法，其包含使用一化合物，該化合物具有下列胺基酸序列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ ；

其中 X_1 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_2 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_3 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_4 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_5 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_6 係選自缺位或任一胺基酸；

X_7 係選自缺位或任一胺基酸；及

其中 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 係不包含胺基酸序列 DAEFRH，該化合物具有一鍵結能力可鍵結一抗體，該抗體專一於 AB42 之天然 N 端胺基酸序列 DAEFRH；及該化合物之五元體具有一鍵結能力可鍵結上述抗體，因而該化合物可供製備阿滋海默症之疫苗。

六、英文發明摘要：

The invention relates to the use of a compound comprising the following amino acid sequence:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$,

wherein X_1 is an amino acid, except of C,

X_2 is an amino acid, except of C,

X_3 is an amino acid, except of C,

X_4 is an amino acid, except of C,

X_5 is an amino acid, except of C,

X_6 is not present or any amino acid,

X_7 is not present or any amino acid,

and wherein $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ is not DAEFRH, said compound having a binding capacity to an antibody being specific for the natural N-terminal A β 42 sequence DAEFRH, and 5-mers thereof having a binding capacity to said antibody being specific for the natural N-terminal A β 42 sequence DAEFRH, for the preparation of a vaccine for Alzheimer's disease.

十、申請專利範圍：

100年6月29日修正本

公告本

- 1、一種經分離或純化之類抗原(mimotope peptide)，由 6 至 15 個胺基酸所組成，且其包含一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自由：DAEFRWP(SEQ ID NO:27)、DNEFRSP(SEQ ID NO:28)、GSEFRDY(SEQ ID NO:29)、GAEFRFT(SEQ ID NO:30)、SAEFRTQ(SEQ ID NO:31)、SAEFRAT(SEQ ID NO:32)、SWEFRNP(SEQ ID NO:33)、SWEFRLY(SEQ ID NO:34)、SWELRQA(SEQ ID NO:35)、SVEFRYH(SEQ ID NO:36)、SYEFRHH(SEQ ID NO:37)、SQEFRTP(SEQ ID NO:38)、SSEFRVS(SEQ ID NO:39)、DWEFRD(SEQ ID NO:40)、DAELRY(SEQ ID NO:41)、DWELRQ(SEQ ID NO:42)、SLEFRF(SEQ ID NO:43)、GPEFRW(SEQ ID NO:44)及 GKEFRT(SEQ ID NO:45)所組成之群組。
- 2、一種醫藥組成物，包含：
一經純化或分離之類抗原(mimotope peptide)，該類抗原(mimotope peptide)如申請專利範圍第 1 項所述之；以及
一製藥學上可接受之載體。
- 3、依申請專利範圍第 2 項所述之醫藥組成物，其中，該醫藥組成物更包含氫氧化鋁。
- 4、依申請專利範圍第 2 項所述之醫藥組成物，其中，該純化或分離之類抗原的劑量介於 0.1 奈克(ng)至 10 毫克(mg)。
- 5、依申請專利範圍第 2 項所述之醫藥組成物，其中，該純

化或分離之類抗原的劑量介於10奈克(ng)至1毫克(mg)

- 6、依申請專利範圍第2項所述之醫藥組成物，其中，該純化或分離之類抗原的劑量介於100奈克(ng)至100微克(μg)。
- 7、一種免疫組成物，其包含：
至少一個如申請專利範圍第1項所示之類抗原(mimotope peptide)；以及
一製藥學上可接受之載體。
- 8、一種免疫組成物，包含：
如申請專利範圍第1項所述之類抗原(mimotope peptide)，其中，該胜肽係非共價地結合於一載體。
- 9、一種免疫組成物，包含：
如申請專利範圍第1項所述之類抗原(mimotope peptide)，其中，該胜肽係共價地結合於一載體。
- 10、依申請專利範圍第1項所述之類抗原(mimotope peptide)，其胜肽序列為 DNEFRSP(SEQ ID NO:28)。
- 11、依申請專利範圍第1項所述之類抗原(mimotope peptide)，其胜肽序列為 SVEFRYH(SEQ ID NO:36)。
- 12、依申請專利範圍第1項所述之類抗原(mimotope peptide)，其胜肽序列為 DAEFRWP(SEQ ID NO:27)、DWEFRD(SEQ ID NO:40)、DAELRY(SEQ ID NO:41)或 DWELRQ(SEQ ID NO:42)。
- 13、依申請專利範圍第1項所述之類抗原(mimotope peptide)

，其胜肽序列為 SAEFRTQ(SEQ ID NO:31)、
SAEFRAT(SEQ ID NO:32)、SWEFRNP(SEQ ID NO:33)
、SWEFRLY(SEQ ID NO:34)、SWELRQA(SEQ ID
NO:35)、SYEFRHH(SEQ ID NO:37)、SQEFRTP(SEQ ID
NO:38)、SSEFRVS(SEQ ID NO:39)或 SLEFRF(SEQ ID
NO:43)。

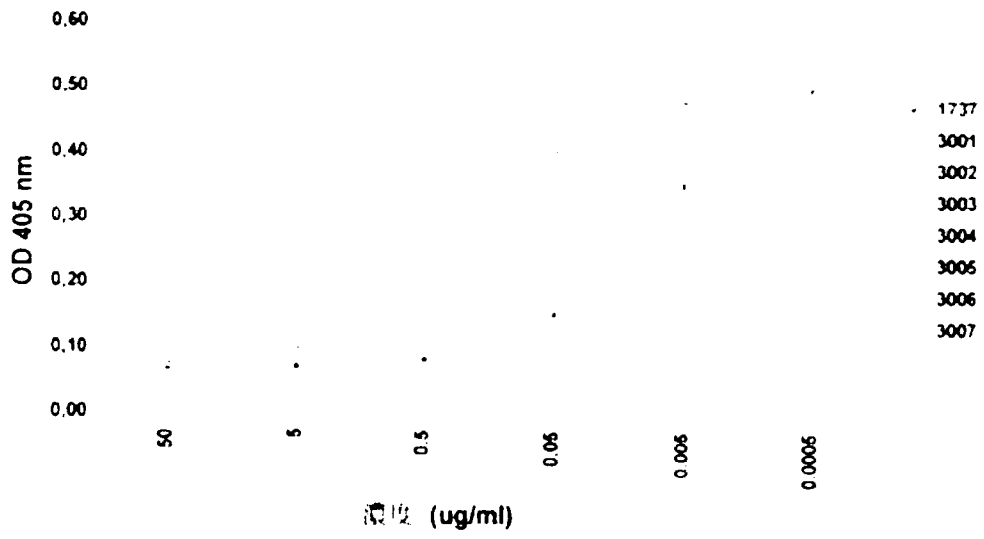
14、依申請專利範圍第 1 項所述之類抗原(mimotope peptide)

，其胜肽序列為 GPEFRW(SEQ ID NO:44) 或
GKEFRT(SEQ ID NO:45)。

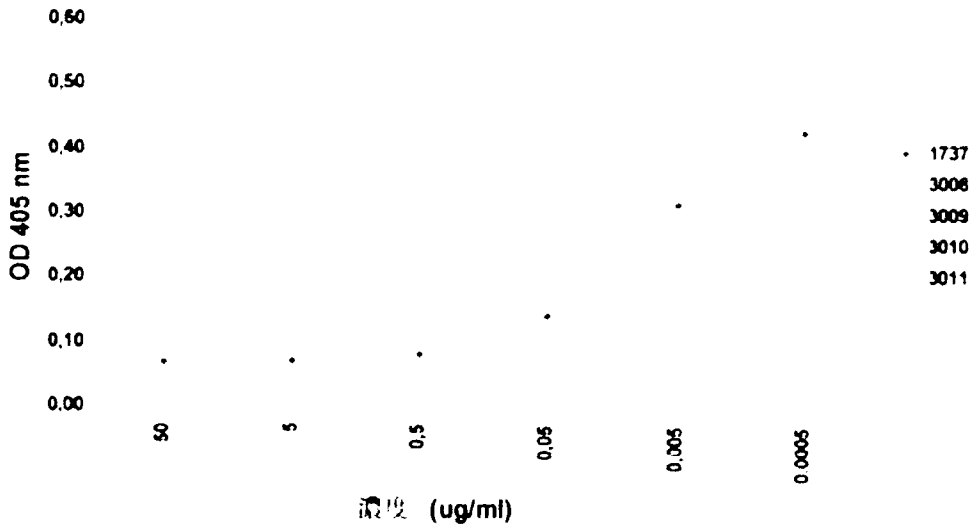
十一、圖式：

1	alanine	ala	A	丙胺酸
2	arginine	arg	R	精胺酸
3	asparagine	asn	N	天門冬醯胺
4	aspartic acid	asp	D	天門冬胺酸
5	cysteine	cys	C	半胱胺酸
6	glutamine	gln	Q	麩胺醯胺
7	glutamic acid	glu	E	麩胺酸
8	glycine	gly	G	甘胺酸
9	histidine	his	H	組胺酸
10	isoleucine	ile	I	異白胺酸
11	leucine	leu	L	白胺酸
12	lysine	lys	K	離胺酸
13	methionine	met	M	甲硫胺酸
14	phenylalanine	phe	F	苯丙胺酸
15	proline	pro	P	脯胺酸
16	serine	ser	S	絲胺酸
17	threonine	thr	T	蘇胺酸
18	tryptophan	trp	W	色胺酸
19	tyrosine	tyr	Y	酪胺酸
20	valine	val	V	纈胺酸

第 1A 圖

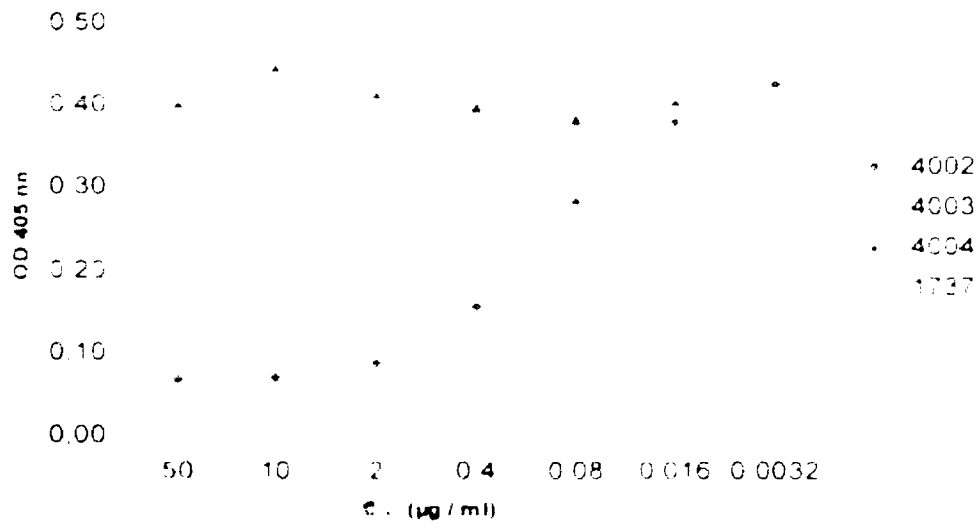


第 2 圖

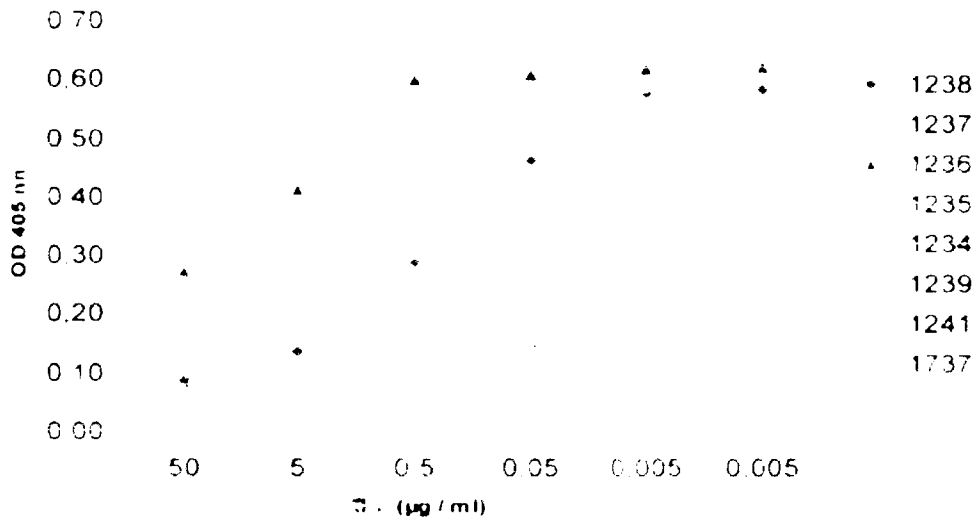


第 3 圖

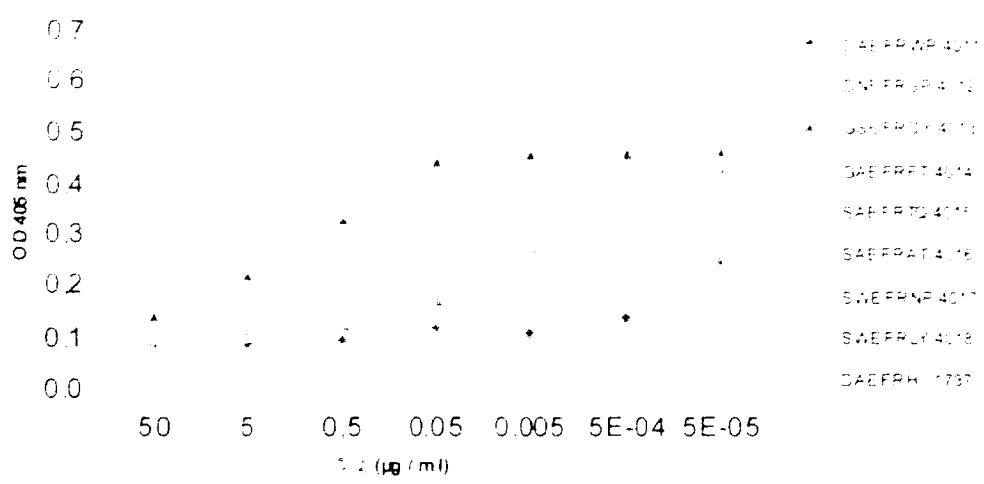




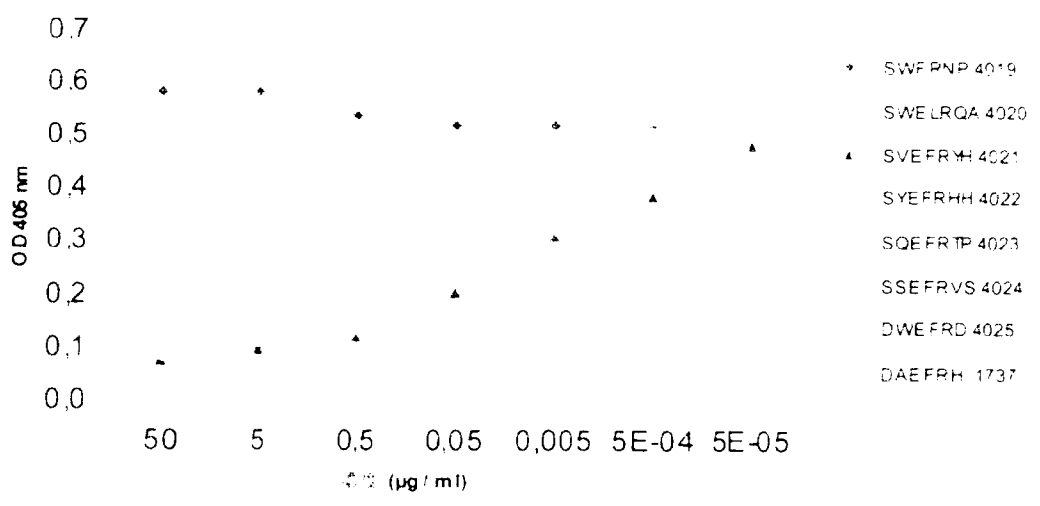
第 4 圖



第 5 圖

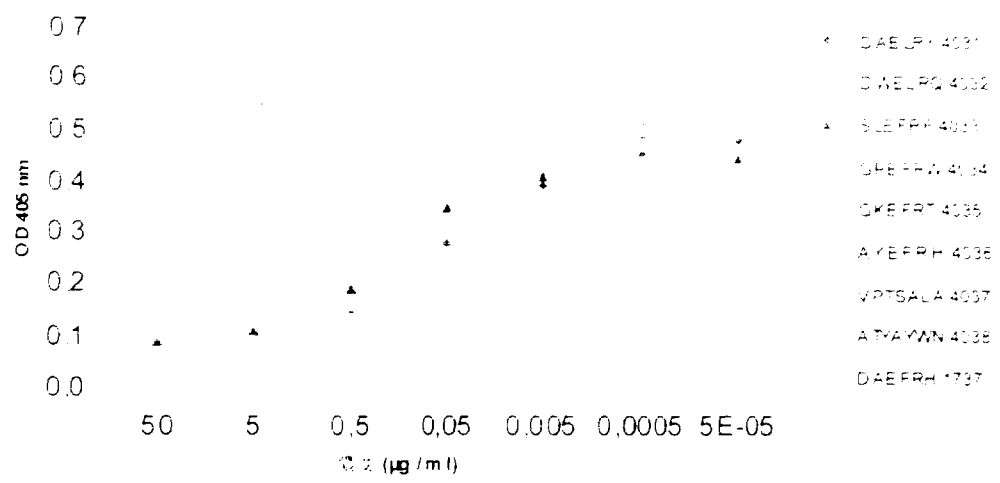


第 6 圖

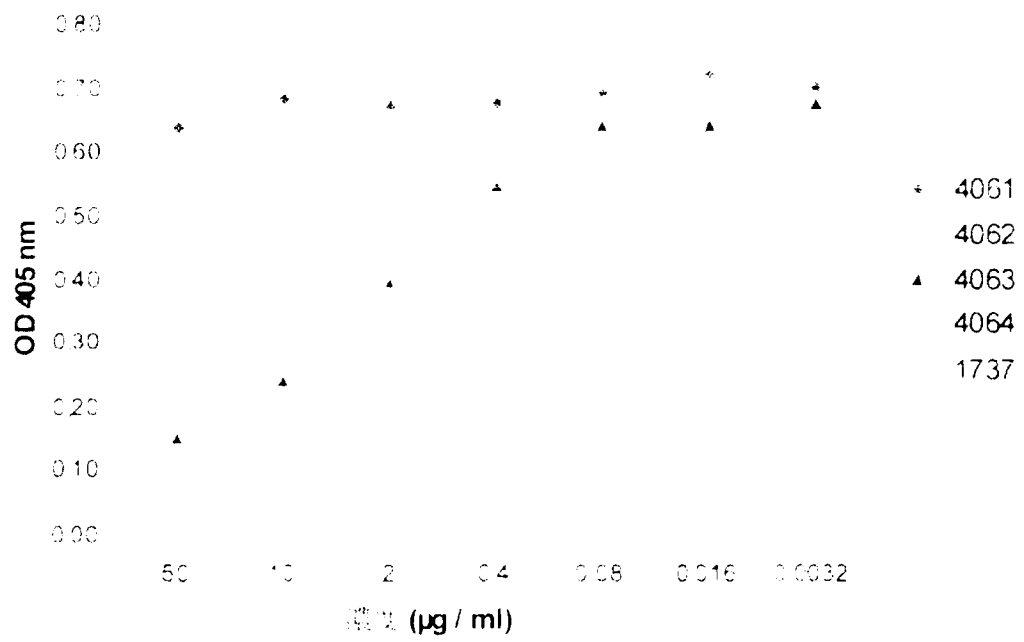


第 7 圖





第 8 圖



第 9 圖



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

胺基酸序列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ ；

其中 X_1 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_2 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_3 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_4 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_5 係選自一胺基酸，但不包含半胱胺酸 C；

X_6 係選自缺位或任一胺基酸；

X_7 係選自缺位或任一胺基酸；及

其中 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 不包含胺基酸序列 DAEFRH。