



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116261464 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 13

(21) 申请号 202180050068.9

(22) 申请日 2021.08.04

(30) 优先权数据

20189425.0 2020.08.04 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/071778 2021.08.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/029181 EN 2022.02.10

(71) 申请人 AC免疫有限公司

地址 瑞士洛桑市

(72) 发明人 多里安·温特 贡特尔·斯塔夫勒

乔治娜·加拉波娃

伊娃·米海洛夫斯卡

彼得拉·格鲁贝尔

卡特娅·巴拉日

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张珊珊 韩晓帆

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书38页

序列表33页 附图10页

(54) 发明名称

免疫原性化合物

(57) 摘要

抗原肽包含结构 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$,并且源自 α 突触核蛋白的氨基酸第113至124位。根据该结构:p是脯氨酸; X_1 是L、K、A或S,其中L是亮氨酸,K是赖氨酸,A是丙氨酸,并且S是丝氨酸; X_2 是E或S,其中E和S如上所限定; X_3 是D、E、K、N、A或S,其中N是天冬酰胺,D是天冬氨酸,并且D、E、K、A和S如上所限定; X_4 是M、A、S、L或K,其中M是甲硫氨酸,并且A、S、L和K如上所限定; X_5 是如上所限定的P或A; X_6 是V、A或S,其中V是缬氨酸,并且A和S如上所限定; X_7 是如上所限定的D或S; X_9 是如上所限定的D或A; X_{10} 是N、S或A,其中N、S和A如上所限定; X_{11} 是E、A或S,其中E、A和S如上所限定; X_{12} 是存在或不存在的,并且如果存在的话,其是A、K、V、S或G,其中G是甘氨酸,并且A、K、V和S如上所限定。与野生型L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A序列相比,该结构包含至少一个突变。该肽不在紧接 X_{12} 之后包含二肽Y-E,其中Y是酪氨酸,并且E如上所限定。所述肽与合适的载

体缀合,并可用于治疗突触核蛋白病。

1. 抗原肽,其包含以下结构、基本上由以下结构组成或由以下结构组成:

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

其中:

p是脯氨酸;

X_1 是L、K、A或S,其中L是亮氨酸,K是赖氨酸,A是丙氨酸,并且S是丝氨酸;

X_2 是E或S,其中E是谷氨酸,并且S如上所限定;

X_3 是D、E、K、N、A或S,其中N是天冬酰胺,D是天冬氨酸,并且E、K、A和S如上所限定;

X_4 是M、A、S、L或K,其中M是甲硫氨酸,并且A、S、L和K如上所限定;

X_5 是如上所限定的P或A;

X_6 是V、A或S,其中V是缬氨酸,并且A和S如上所限定;

X_7 是如上所限定的D或S;

X_9 是如上所限定的D或A;

X_{10} 是N、S或A,其中N、S和A如上所限定;

X_{11} 是E、A或S,其中E、A和S如上所限定;

X_{12} 是存在或不存在的,并且如果存在的话,其是A、K、V、S或G,其中G是甘氨酸,并且A、K、V和S如上所限定,

前提是 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$ 不是L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A,

并且其与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A相比包含1至5个氨基酸差异,并且进一步地,其中所述肽不在紧接 X_{12} 之后包含二肽Y-E,其中Y是酪氨酸,并且E如上所限定。

2. 权利要求1所述的抗原肽,其与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A相比包含1至4个氨基酸差异,优选1至3个氨基酸差异,并最优选2个氨基酸差异。

3. 权利要求1或2所述的抗原肽,其在选自 X_1 、 X_3 、 X_4 和 X_{12} 的一个或更多个位置处与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A相比包含氨基酸差异。

4. 任一前述权利要求所述的抗原肽,其包含以下结构、基本由以下结构组成或由以下结构组成:

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

其中:

X_a 是存在或不存在的,并且如果存在的话,其是G,其中G如权利要求1中所限定;

X_b 是G,其中G如上所限定;以及

X_1 至 X_{12} 如权利要求1中所限定。

5. 任一前述权利要求所述的抗原肽,其长度为11至20个氨基酸,优选长度为12至14个氨基酸。

6. 任一前述权利要求所述的抗原肽,其还包含末端半胱氨酸残基,优选N端半胱氨酸残基。

7. 任一前述权利要求所述的抗原肽,其中 X_1 是L、S、A或K, X_2 是E或S, X_3 是S、D、E、A、K或N, X_4 是M, X_5 是P; X_6 是V; X_7 是D; X_9 是D; X_{10} 是N,和/或者 X_{12} 是A、S、K或V,优选其中 X_1 是L或K, X_2 是E, X_3 是S、D、E、K或A, X_4 是M, X_{10} 是N,和/或者 X_{12} 是A、S或K,特别是其中 X_1 是L或K, X_3 是D、K或S,并且 X_{12} 是A。

8. 任一前述权利要求所述的抗原肽,其选自AEDMPVDPDNEA,KESMPVDPDNEA,

LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 和 KEDMPVDPDNEA, 优选 SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LEKMPVDPDNEA 和 LESMPVDPDNES, 特别是 LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA 和 KEDMPVDPDNEA。

9. 任一前述权利要求所述的抗原肽, 其包含氨基酸序列 KESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEA 或 CGGKESMPVDPDNEA、基本由其组成或由其组成。

10. 免疫原性化合物, 其包含任一前述权利要求所述的抗原肽和包含 T 细胞表位的载体, 所述载体与所述抗原肽连接。

11. 权利要求 10 所述的免疫原性化合物, 其中所述包含 T 细胞表位的载体经由接头与所述抗原肽连接。

12. 权利要求 10 或 11 所述的免疫原性化合物, 其中所述包含 T 细胞表位的载体连接在所述抗原肽的 N 端。

13. 根据权利要求 12 所述的免疫原性化合物, 其中所述载体蛋白选自匙孔血蓝蛋白 (KLH)、破伤风类毒素、不耐热肠毒素 (LT)、霍乱毒素 (CT)、白喉毒素 (DT) 及其变体特别是 CRM197、破伤风类毒素 (TT)、突变体毒素、白蛋白结合蛋白和牛血清白蛋白, 优选 CRM197。

14. 药物制剂, 其包含根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗原肽或根据权利要求 10 至 13 中任一项所述的免疫原性化合物以及可药用赋形剂, 所述药物制剂优选为疫苗组合物的形式。

15. 根据权利要求 14 所述的药物制剂, 其还包含佐剂。

16. 根据权利要求 15 所述的药物制剂, 其中所述佐剂选自 MF59 磷酸铝、磷酸钙、细胞因子 (例如, IL-2、IL-12、GM-CSF)、皂苷 (例如, QS21)、MDP 衍生物、CpG 寡核苷酸、IC31、LPS、MPLA、聚磷腈和氢氧化铝、或其混合物; 特别是使用氢氧化铝作为佐剂。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的药物制剂, 其中所述抗原肽以 0.1 ng 至 10 mg, 优选 10 ng 至 1 mg, 特别是 100 ng 至 100 μ g 的量被包含在内。

18. 根据权利要求 14 至 17 中任一项所述的药物制剂, 其中所述制剂被配制用于肠胃外施用, 例如皮下、皮内、静脉内或肌内施用。

19. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗原肽、根据权利要求 10 至 13 中任一项所述的免疫原性化合物或者根据权利要求 14 至 18 中任一项所述的药物制剂, 其用作药物。

20. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗原肽、根据权利要求 10 至 13 中任一项所述的免疫原性化合物或者根据权利要求 14 至 18 中任一项所述的药物制剂, 其用于治疗或预防突触核蛋白病。

21. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗原肽、根据权利要求 10 至 13 中任一项所述的免疫原性化合物或者根据权利要求 14 至 18 中任一项所述的药物制剂用于制备用于治疗或预防突触核蛋白病的药物的用途。

22. 用于治疗或预防突触核蛋白病的方法, 其包括向有此需要的对象施用有效量的根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗原肽、根据权利要求 10 至 13 中任一项所述的免疫原性化合物或者根据权利要求 14 至 18 中任一项所述的药物制剂。

23. 根据权利要求20或21中任一项所述的用途或者根据权利要求22所述的方法, 其中所述突触核蛋白病为原发性突触核蛋白病或伴随的病理状况。

24. 根据权利要求23所述的用途或方法, 其中所述原发性突触核蛋白病选自帕金森病(散发性、家族性伴 α -突触核蛋白突变、家族性伴除 α -突触核蛋白之外的突变、纯自主衰竭和路易体吞咽困难)、路易体痴呆(LBD; 包括路易体痴呆(DLB) (“纯”路易体痴呆)、帕金森病痴呆(PDD))或弥漫性路易体病、多系统萎缩(夏-德综合征、纹状体黑质变性和橄榄体脑桥小脑萎缩)。

25. 根据权利要求23所述的用途或方法, 其中所述伴随的病理状况选自散发性阿尔茨海默病, 家族性阿尔茨海默病伴APP突变, 家族性阿尔茨海默病伴PS-1、PS-2或其他突变, 家族性英国型痴呆, 包涵体肌炎, 创伤性脑损伤, 慢性创伤性脑病, 拳击性痴呆, tau蛋白病(皮克病、额颞痴呆、进行性核上性麻痹、皮质基底变性、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合征和尼曼-皮克C1型病), 唐氏综合征, 克-雅病, 亨廷顿病, 运动神经元病, 肌萎缩侧索硬化(散发性、家族性和关岛型ALS-痴呆复合征), 神经轴索营养不良, 神经退行性变伴脑铁沉积1型(哈勒沃登-施帕茨综合征), 朊病毒病, 格斯特曼-施特劳斯勒尔-沙因克尔病, 共济失调毛细血管扩张症, 梅热综合征, 亚急性硬化性全脑炎, 戈谢病, 克拉伯病以及其他的溶酶体贮积病症(包括库福-拉克布综合征和圣菲利波综合征)或快速眼动(REM)睡眠行为障碍。

26. 根据权利要求20或21中任一项所述的用途或者根据权利要求22所述的方法, 其中所述突触核蛋白病选自路易体病症(LBD), 特别是帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)和路易体痴呆(DLB), 以及多系统萎缩(MSA)或神经退行性变伴脑铁沉积I型(NBIA I型)。

27. 根据权利要求21至26中任一项所述的用途或方法, 其中人对象受到治疗。

免疫原性化合物

[0001] 本发明涉及免疫原性化合物及其在预防和治疗突触核蛋白病,特别是帕金森病(Parkinson's disease,PD)、路易体痴呆(Dementia with Lewy body,DLB)和多系统萎缩(Multiple System Atrophy,MSA)中的用途。

[0002] PD是突触核蛋白病,并且是第二常见的神经退行性运动疾病。在一般人群中,PD患病率范围在100至200/100,000之间,并且影响大约1%的60岁以上人群,其中年发病率为约15/100,000。PD是慢性进行性病症,其由运动综合征(运动迟缓、强直、静止性震颤和姿势不稳定)和通常先于运动综合征的非运动综合征(多种自主神经功能障碍、感觉异常和精神异常)的组合来限定。该疾病的特征是黑质(substantia nigra,SN)中多巴胺能神经元的严重缺失,并伴有丝状蛋白包涵体(称为路易体(Lewy Body,LB))的积累,该路易体主要由 α -突触核蛋白(α -synuclein,aSyn)构成。PD、DLB和其他LB疾病显示出aSyn在不同脑区和细胞群中的积累和再分布。

[0003] MSA是另一种非常重要的突触核蛋白病。MSA是散发性神经退行性病症,其特征在于具有L-DOPA-抗性帕金森综合征、小脑性共济失调和自主神经障碍(dysautonomia)的症状。患者患有影响多个脑区(包括纹状体、黑质、小脑、脑桥以及下橄榄核和脊髓)的多系统神经元损失。MSA的特征在于aSyn阳性胶质细胞胞质包涵体(glial cytoplasmic inclusion,GCI)和罕见神经元内涵体(其遍布中枢神经系统)。这些包涵体与纹状体黑质变性、橄榄脑桥小脑萎缩以及髓质和脊髓中自主神经核受累有关。GCI对MSA发病机制的重要性得到了普遍认可,并通过最近对分析了aSyn在少突胶质细胞中过表达的作用的转基因小鼠模型的分析得到了强调。在过表达人aSyn的tg小鼠中,观察到GCI样聚集体和MSA的生物化学标志物二者。

[0004] DLB是西方社会中继阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)之后神经退行性痴呆的第二常见类型。DLB占临床诊断痴呆的4%至7%,其中同样数量的病例被预测为逃避正确的临床诊断。DLB的诊断是具有挑战性的,因为该疾病代表了AD和PD的“中间状态”,并显示了两种实体的重叠特征。四个临床共识标准(其中两个必须存在以诊断“可能的DLB”)是认知和注意力的波动、复发性幻视、REM睡眠行为障碍和自发性帕金森运动体征(其在疾病中比其他标准出现更晚)。这些可以由多种另外的临床标准来支持,所述另外的临床标准可以但不必发生,例如晕厥和无反应性的短暂发作、冷漠、焦虑、抑郁、精神病发作和安定药敏感性等。患者中的症状并不一致。

[0005] DLB病理学的特征在于称为路易体(LB)的蛋白质包涵体,主要由在神经元的功能和结构缺失中发挥作用的 α 突触核蛋白(aSyn)构成。然而,在DLB中,发现LB广泛分布于整个皮质,而在PD中,它们主要存在于黑质的多巴胺能神经元中。与PD的LB相比,DLB中的LB界限更不太明确,嗜酸性细胞更少,并且丝状细胞更少。另外,在DLB患者的脑中可以发现淀粉样斑块,其主要包含羧基端伸长形式的淀粉样 β (amyloid beta,Abeta)例如Abeta1-42。皮质淀粉样沉积与下颞叶灌注和海马萎缩趋势相关。

[0006] aSyn是14kD的天然单体蛋白,该天然单体蛋白通常位于突触前末梢,其结合至突触小泡的膜或在胞质溶胶中。它的天然功能仍然知之甚少,并且可能涉及突触传递。在发病

过程期间,aSyn的错误折叠和聚集发生在中枢神经系统(central nervous system,CNS)和外周神经系统中,可能是作为翻译后修饰(包括C端蛋白酶切割等)的后果(Dufty 2007, Bassil 2016)。聚集导致与LB疾病的发病机制相关的不同aSyn物质(例如寡聚体、初原纤维(protofibril)和原纤维)的产生。纤维形式的aSyn主要在位于神经元胞体中的LB中检测到(Kosaka et al.,1990,Dickson et al,1989)。aSyn的聚集体也可以在星形胶质细胞中检测到(Braak 2007)。

[0007] 在患病的人脑中,不仅检测到原纤维,还检测到多种寡聚aSyn物质。与纤维状aSyn相反,寡聚聚集体最可能位于神经元投射和突触前末梢中,在那里它们可损害突触,因此寡聚aSyn被认为具有细胞毒性。

[0008] 已经表明单体aSyn可以在不同的体外条件下形成具有不同外观、构象、细胞毒性和化学性质的不同类型的聚集体。根据单体的构象和主要的许可条件,可以产生不同类型的聚集体,具有不同的结构特征。当接种时,不同的aSyn种(aSyn-strain)将其构象施加(例如“原纤维”或“带状”)至接收细胞上,并在称为“构象模板化”的过程中产生相同种的聚集体。如果将它们注射到大鼠脑中,则这些类型的聚集体在体内的包涵体形成以及行为和神经毒性表型的产生方面显示出不同的性质。

[0009] 据推断,不同类型的aSyn聚集体由于其不同的构象而暴露不同的多肽链。这些暴露程度不同的表面将允许不同组的分子内相互作用。因此,给定aSyn种的构象决定了其性质,例如其播种(seeding)倾向或对某些细胞类型的偏好。证明了从PD和MSA材料中提取的aSyn种的不同性质的实验数据开始出现;对来自患有PD或MSA的患者的病理脑材料的分析表明了可传播的aSyn聚集体的不同性质。

[0010] 目前可用的治疗专门靶向症状,然而,能够修饰潜在神经退行性变的治疗仍在开发中。本文中提出了aSyn特异性主动免疫治疗(Specific Active ImmunoTherapy,SAIT),其主要靶向aSyn的寡聚体和神经毒性形式,并由此可干扰突触核蛋白病的疾病进展。

[0011] 使用PD01和PD03(之前开发的靶向aSyn的**AFFITOPE®**)的疫苗接种已经证明了在aSyn聚集病症的多种动物模型中的效力,其减少了aSyn病理状况,保护了神经炎症,以及改善了行为缺陷(Mandler et al.2014;WO 2009/103105 A1、WO 2011/020133 A1、WO 2017/076873 A1)。这些肽被证明是安全且耐受性良好的疫苗,其能够在人中诱导靶特异性抗体。

[0012] WO 2005/108423 A1公开了赋予环境应激抗性的肽,其源自aSyn、 β -突触核蛋白(beta-synuclein,bSyn)或 γ -突触核蛋白(gamma-synuclein,GSyn),如果其存在于具有融合伴侣蛋白的融合蛋白中,则可为该融合伴侣蛋白提供降低的变性和/或提高的溶解性。WO 2018/151821 A1公开了可用于诊断、治疗和预防神经退行性疾病的aSyn抗体。这些抗体通过用天然aSyn或等位基因变体A53T进行免疫接种来产生,并且应该优先与预先形成原纤维(preformed fibril,“PFF”)结合。WO 2005/013889 A2公开了天然aSyn的片段,其可用于治疗或预防LB疾病(LBD)或用于提供用于治疗或预防LBD的单克隆抗体。

[0013] 本发明的一个目的是基于疫苗提供用于预防和治疗突触核蛋白病的药物。另一个目的是提供适合于人使用的疫苗接种肽。

[0014] 此外,本发明可提供改进的免疫原性肽,其在免疫原性方面得到改进,在外周中诱导更高量的aSyn特异性抗体,并且在脑中诱导更高量的aSyn特异性抗体。此外,也期望提高

诱导的抗体的靶结合,其归因于寡克隆抗体应答(“延长的表位”)。

[0015] 因此,本发明提供了抗原肽,其包含以下结构、基本上由以下结构组成或由以下结构组成:

[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] 其中:

[0018] p是脯氨酸;

[0019] X_1 是L、K、A或S,其中L是亮氨酸,K是赖氨酸,A是丙氨酸,并且S是丝氨酸;

[0020] X_2 是E或S,其中E是谷氨酸,并且S如上所限定;

[0021] X_3 是D、E、K、N、A或S,其中N是天冬酰胺,D是天冬氨酸,并且E、K、A和S如上所限定;

[0022] X_4 是M、A、S、L或K,其中M是甲硫氨酸,并且A、S、L和K如上所限定;

[0023] X_5 是如上所限定的P或A;

[0024] X_6 是V、A或S,其中V是缬氨酸,并且A和S如上所限定;

[0025] X_7 是如上所限定的D或S;

[0026] X_9 是如上所限定的D或A;

[0027] X_{10} 是N、S或A,其中N、S和A如上所限定;

[0028] X_{11} 是E、A或S,其中E、A和S如上所限定;

[0029] X_{12} 是存在或不存在的,并且如果存在的话,其是A、K、V、S或G,其中G是甘氨酸,并且A、K、V和S如上所限定,

[0030] 前提是 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-P-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$ 不是L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A,并且其与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A相比包含1至5个氨基酸差异,并且其中该肽不在紧接 X_{12} 之后包含二肽Y-E,其中Y是酪氨酸,并且E如上所限定。因此,本文中通常使用单字母氨基酸代码。

[0031] 与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A相比,抗原肽可包含1至5个氨基酸差异(即1、2、3、4或5个差异)或1至4个氨基酸差异。这些差异通常是氨基酸替换(根据针对每个位置列出的选项,除了 X_{12} 可被删除之外)。优选的是,与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A(其为野生型 α 突触核蛋白序列的氨基酸第113至124位)有1至3个氨基酸差异,并且最优选2个氨基酸差异。这些差异可以选自氨基酸 X_1 至 X_{12} 中的任一者,除X8(其是脯氨酸)以外。在一些实施方案中,与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A相比,抗原肽在选自 X_1 、 X_3 、 X_4 和 X_{12} 中的一个或多个位置处包含氨基酸差异。优选地,所述抗原肽在选自 X_1 、 X_3 、 X_4 和 X_{12} 的位置处与氨基酸序列L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A相比包含两个氨基酸差异。

[0032] 当用作免疫原时,本发明的抗原肽保留了其产生aSyn特异性抗体的能力。此外,就产生aSyn特异性抗体而言,本发明的抗原肽比相应的野生型aSyn肽(包含12聚体L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A, p9524 (SEQ ID NO:4))更具免疫原性,如本文中的比较实验中所表明的。它们也比来自aSyn的C端区域的其他aSyn肽更具有免疫原性,所述来自aSyn的C端区域的其他aSyn肽显示出比p9524更低的免疫原性;参见下表1和表2(例如p4456 (SEQ ID NO:1)和p4572 (SEQ ID NO:2))。这些性质可以由本领域技术人员根据本文中的教导通常通过测试本文中详细描述的类型缀合物形式的肽(例如与作为载体蛋白的CRM197缀合的肽)来测试。可以将肽施用于合适的实验动物,特别是小鼠,并在施用后的合适时间取出样品(例如血液)(具体细节再次参见实施例)。如本文所述,aSyn抗体滴度测定可以通过例如ELISA

进行。

[0033] 本发明的抗原肽通常在 X_{12} 之后不包含另外的 α 突触核蛋白氨基酸残基。特别是，它们不在紧接 X_{12} 之后包含二肽Y-E。如本文所述，包含氨基酸 Y_{125} 和 E_{126} 的肽通过计算机分析被预测以高亲和力与MHC I的不同等位基因变体结合，并因此是潜在的细胞毒性T细胞表位(www.syfpeithi.de)。然而，该抗原肽可包含有限数量的另外的N端氨基酸残基。因此，抗原肽可包含以下结构、基本上由以下结构组成或由以下结构组成：

[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] 其中：

[0036] Xa 是存在或不存在的，并且如果存在的话，其是G，其中G是甘氨酸；

[0037] Xb 是G，其中G如上所限定；并且

[0038] X_1 至 X_{12} 如上所限定。

[0039] 因此，本发明的抗原肽通常长度为11至20个氨基酸，优选长度为12至14个氨基酸(即长度为12、13或14个氨基酸)。特别优选的是，抗原肽的长度为12或14个氨基酸。本发明的抗原肽在不存在T细胞应答的情况下产生抗体应答。因此，本发明的抗原肽本身通常不含T细胞表位，特别是细胞毒性T细胞表位。

[0040] 如本文进一步所述的，本发明的抗原肽通常以免疫原性化合物(在其中它们与载体缀合)的形式使用。为了促进缀合过程，本发明的抗原肽还可包含充当为缀合位点的氨基酸。通常来说，该氨基酸是末端氨基酸，并且优选位于N端。在一些优选的实施方案中，抗原肽还包含末端半胱氨酸残基，优选N端半胱氨酸残基。

[0041] 在一些实施方案中， X_1 是L、S或K， X_2 是E或S， X_3 是S、D、E、A、K或N， X_4 是M， X_{10} 是N，和/或者 X_{12} 是A、S、K或V，优选其中 X_1 是L或K， X_2 是E， X_3 是S、D、E、K或A， X_4 是M， X_{10} 是N，和/或者 X_{12} 是A、S或K，特别是其中 X_1 是L或K， X_3 是D、K或S，并且 X_{12} 是A。在那些实施方案中，肽中的其他位置优选为野生型 α 突触核蛋白氨基酸。

[0042] 在一些实施方案中， X_1 是A、S或K。在一些实施方案中， X_2 是S。在一些实施方案中， X_3 是A、S、E、K或N。在一些实施方案中， X_4 是A、S、L或K。在一些实施方案中， X_5 是A。在一些实施方案中， X_6 是A或S。在一些实施方案中， X_7 是S。在一些实施方案中， X_9 是A。在一些实施方案中， X_{10} 是A或S，优选S。在一些实施方案中， X_{11} 是A或S。在一些实施方案中， X_{12} 是S、V、G或K。根据这些实施方案，优选的是，与天然L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A序列相比，在抗原肽中存在最多一个、两个或三个另外的突变。在一些实施方案中，与天然L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A序列相比，在抗原肽中没有另外的突变。

[0043] 在一些实施方案中，所述抗原肽选自AEDMPVDPDNEA，KESMPVDPDNEA，LESMPVDPDNEA，LESMPVDPDNES，SEDMPVDPDNEA，SEKMPVDPDNEA，LEEMPVDPDNEA，SESMPVDPDNEA，LEDMPVDPDNES，LEAMPVDPDNEA，LEDMPVDPDNEK，LED-MPVDPDNEV，LEKMPVDPDNEK，LSDMPVDPDNEA，LEKMPVDPDNEA，LEKMPVDPDNES，LENMPVDPDNEA，KESMPVDPDNEK和KEDMPVDPDNEA，

[0044] 优选SEDMPVDPDNEA，SEKMPVDPDNEA，LEEMPVDPDNEA，LEKMPVDPDNEK，LESMPVDPDNEA，LESMPVDPDNES，KESMPVDPDNEA，KEDMPVDPDNEA，LEKMPVDPDNES，LEKMPVDPDNEA和LESMPVDPDNES，特别是LEKMPVDPDNEA，KESMPVDPDNEK，KESMPVDPDNEA和KEDMPVDPDNEA。在一些优选的实施方案中，抗原肽包含氨基酸序列KESMPVDPDNEA，GKESMPVDPDNEA，

GGKESMPVDPDNEA或CGGKESMPVDPDNEA、基本上由其组成或由其组成。

[0045] 本发明的抗原肽通常以免疫原性化合物(在其中它们与载体缀合)的形式使用。载体充当T细胞表位的来源,以提高对免疫原性肽的免疫应答。因此,本发明还提供了免疫原性化合物,其包含本发明的抗原肽和包含T细胞表位的载体,所述载体与抗原肽连接。提供了具有以下结构的免疫原性化合物:

[0046] 载体- $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$,

[0047] 其中

[0048] 载体是与 X_1 共价偶联的多肽载体;优选包含将载体分子共价连接至肽 $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ 的接头部分;

[0049] D是天冬氨酸,E是谷氨酸,P是脯氨酸,并且V是缬氨酸;

[0050] X_1 是L、K、A或S,其中L是亮氨酸,K是赖氨酸,A是丙氨酸,并且S是丝氨酸;

[0051] X_2 是E或S,其中E和S如上所限定;

[0052] X_3 是D、E、K、N、A或S,其中N是天冬酰胺,并且D、E、K、A和S如上所限定;

[0053] X_4 是M、A、S、L或K,其中M是甲硫氨酸,并且A、S、L和K如上所限定;

[0054] X_{10} 是N、S或A,其中N、S和A如上所限定;

[0055] X_{12} 是存在或不存在的,并且如果存在的话,其是A、K、V、S或G,其中G是甘氨酸,并且A、K、V和S如上所限定,前提是 $X_1-E-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ 不是L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A。

[0056] 本发明的化合物包含能够引发强烈的抗aSyn抗体应答的肽(“抗原肽”),即诱导的抗体显示出与人aSyn的高交叉反应性,尽管这些肽具有不同于天然序列(L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A)的序列。用根据本发明的肽实现了优于在天然序列(即靶向相同的天然结构)的情况下的应答的免疫应答,并且可以在经免疫接种的个体中诱导高度有效和合适的抗体应答。通过用根据本发明的化合物进行疫苗接种所诱导的抗体以高选择性和特异性与病理人脑组织中聚集的毒性aSyn物质和路易体结合。

[0057] 先前已表明,可提供具有aSyn的非天然氨基酸序列的免疫原性肽,以引发针对aSyn的特异性免疫应答,其关于与bSyn的交叉反应性得到改善(WO 2009/103105 A1,WO 2011/020133 A1)。现已出乎意料地表明,可以产生具有非天然aSyn氨基酸序列的经改进的肽,其除了引发对aSyn具有特异性的免疫应答之外,还显示出提高的免疫原性,并且能够引发具有比WO 2009/103105 A1和WO 2011/020133 A1中所述的肽更高交叉反应性的抗体(参见以下实施例)。

[0058] 根据本发明的优选免疫原性化合物包含本发明的优选肽,其中 X_1 是L、S或K, X_2 是E或S, X_3 是S、D、E、A、K或N, X_4 是M, X_{10} 是N,和/或者 X_{12} 是A、S、K或V。根据本发明的另一些优选免疫原性化合物包含优选的肽,其中 X_1 是L、S或K, X_2 是E, X_3 是S、D、E、K或A, X_4 是M, X_{10} 是N,和/或者 X_{12} 是A、S或K。另一个优选的实施方案是根据本发明的肽,其中 X_1 是L或K, X_3 是D、K或S,并且 X_{12} 是A。

[0059] 在一些优选的实施方案中,包含T细胞表位的载体经由接头与抗原肽连接。因此,还提供了与接头连接的本发明的抗原肽。如本领域技术人员容易理解的,可以使用任何合适的接头。接头可以是化学接头或肽(基于氨基酸的)接头。接头可含有反应性官能团,以使抗原肽抗原能够通过合适的化学反应与载体交联。因此,接头可包含两种反应性基团。第一

种通常经由活性氨基酸侧链(例如通过与伯胺(例如在赖氨酸残基上)反应)与载体(蛋白质)连接。因此,通常形成酰胺键。第二种通常再次经由反应性氨基酸侧链(例如利用巯基(例如在半胱氨酸残基上))而与抗原肽连接。因此,通常形成硫醚键。因此,优选的接头是异双官能接头,特别是含有胺反应性基团例如N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯和巯基反应性基团例如马来酰亚胺的接头。因此,接头可包含sGMBS(=磺基GMBS)-(马来酰亚胺丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯、GMBS-马来酰亚胺丁酰氧基琥珀酰亚胺酯、琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰胺基)丙酸酯(succinimidyl3-(bromoacetamido)propionate,SBAP)或琥珀酰亚胺基-6-(N-马来酰亚胺基)-n-己酸酯(MHS)。可以使用的其他接头包括sEMCS(=磺基EMCS)-N-(ε-马来酰亚胺基己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯、MBS-m-马来酰亚胺基苯甲酰基N-羟基琥珀酰亚胺酯、sMBS(=磺基MBS)-(m-马来酰亚胺基苯甲酰基N-羟基)磺基琥珀酰亚胺酯、碘-乙酰胺-(PEG)2-马来酰亚胺(=N-(2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-3-(2-(2-碘乙酰胺基)乙氧基)丙酰胺)和碘-乙酰胺-(PEG)-三(马来酰亚胺)(=3,3'-((2-((3-((2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-2-(2-碘乙酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))(N-(2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)丙酰胺))。接头可以将抗原肽附接至包含在载体(蛋白质)内的特定氨基酸残基或其侧链上。因此,在一些实施方案中,抗原肽与包含在载体(蛋白质)中的赖氨酸残基(经由伯胺基团)缀合。还设想经由组氨酸残基的缀合。应注意的是,抗原肽可以在更大的肽分子的背景下提供,其剩余部分不是源自α突触核蛋白氨基酸序列,以提供接头或促进键联。例如,肽可以包含另外的残基,例如具有或不具有间隔基(例如聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG))的一个或更多个半胱氨酸残基,以促进与载体(蛋白质)的连接。那些另外的残基通常存在于抗原肽的N和/或C端,优选在抗原肽的N端。在这种情况下,术语“基本上由……组成”可意指本发明的抗原肽包含源自α突触核蛋白序列的11至20个,优选12至14个连续氨基酸(氨基酸第111至124位或第113至124位,其经受如本文所限定的至少一个(并且最多四个)突变),但可以包含有限数量的另外的残基,例如另外的半胱氨酸残基,以促进在具有或不具有间隔基(例如PEG或基于氨基酸的间隔基)的情况下与载体蛋白连接。

[0060] 根据本发明的一个优选实施方案,免疫原性化合物的接头部分包含至少一个半胱氨酸和/或甘氨酸氨基酸残基,优选通过化学接头与多肽载体部分偶联。在本发明的(例如12聚体)肽的N端处提供氨基酸接头为较大化合物(作为载体)的偶联和引发(更)强免疫应答提供了许多益处;然而,这样的接头,特别是氨基酸接头对于本发明不是强制性的。

[0061] 优选的氨基酸接头是甘氨酸和半胱氨酸(或其组合,例如CG-、CGG-、CCG-、GC-、GGC-、GCC-、GG-、GGG-等)以及异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺等。氨基酸接头也可以由多于1个氨基酸残基,例如2、3、4或5个氨基酸残基组成。由于稳定性/折叠问题,优先排除肽(基于氨基酸的)接头中的某些氨基酸残基,特别是如果氨基酸接头长于5个氨基酸残基,以及如果抗原肽经由肽键直接与载体蛋白偶联。因此,如果氨基酸接头(或从X₁的N端延伸的氨基酸序列)长于5个氨基酸残基,则优选的是接头在X₁的N端(接头)区域中,即在从X₁的N端氨基酸开始的氨基酸接头分子的前5个氨基酸中,不包含选自脯氨酸、精氨酸或组氨酸的氨基酸。

[0062] 用于本发明的优选肽接头是不形成T细胞表位的那些肽接头。这可以使用已知的方法,包括计算机方法,例如通过查阅MHC配体和肽基序的SYFPEITHI数据库(<http://>

www.syfpeithi.de/)进行评估。

[0063] 作为氨基酸接头的替代或补充,载体(除了多肽载体之外)优选包含化学连接基团(或者由化学连接过程产生的化学组分)。优选的连接基团可以借助化学接头,例如异双官能化合物,例如GMBS或磺基GMBS来获得。本领域已知和使用的化学接头,特别是那些用于产生施用于人个体的产物的接头,可用于提供载体与本发明肽的键联。特别优选的化学接头是经由非肽键与本发明的抗原肽和与载体偶联的化学接头。这种非肽键连接在其免疫原性、稳定性和/或制造性质方面特别有利。优选地,接头部分由NHS-聚(环氧乙烷)(PEO)(例如由NHS-PEO₄-马来酰亚胺)或生物化学技术中使用的其他化合物形成。

[0064] 根据本发明的特别优选的免疫原性化合物包含优选的肽X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂,其选自KESMPVDPDNEA,LESMPVDPDNEA,LESMPVDPDNES,SEDMPVDPDNEA,LEEMPVDPDNEA,SESMPVDPDNEA,LEDMPVDPDNES,LEAMPVDPDNEA,LED-MPVDPDNEK,LEDMPVDPDNEV,LEKMPVDPDNEK,LSDMPVDPDNEA,LEKMPVDPDNEA,KEDMPVDPDNEA,LENMPVDPDNEA,KESMPVDPDNEK和KED-MPVDPDNEA,优选SEDMPVDPDNEA,LEEMPVDPDNEA,LESMPVDPDNEA,KESMPVDPDNEA,KEDMPVDPDNEA,LEKMPVDPDNEA和LESMPVDPDNES,特别是LEKMPVDPDNEA,KESMPVDPDNEA和KEDMPVDPDNEA。

[0065] 载体充当T细胞表位的来源,并因此通常包含多个T细胞表位。T细胞表位优选是通用T细胞表位。“通用”T细胞表位意指对大多数人群中存在的T细胞具有特异性的表位。T细胞表位活化T细胞的“通用”能力是至少两种互补性质的结果:i)与HLA沟(groove)结合的亲和力,其意味着结合的强度,以及ii)其以混杂方式结合不同HLA单倍型的能力,其意味着关于HLA分子表达的差异,覆盖非常多样的人群的能力。通用T细胞表位可与人群中存在的大多数MHC II类等位基因结合。因此,载体的T细胞表位能够刺激CD4T细胞应答。因此,载体的T细胞表位能够刺激增强通过B细胞产生(抗原肽特异性)抗体的辅助T细胞应答。

[0066] 根据一个优选的实施方案,根据本发明的免疫原性化合物包含可药用多肽载体分子,即载体蛋白。载体蛋白可选自白喉毒素(diphtheria toxin,DT)及其变体特别是CRM197(交叉反应物质197)、匙孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin,KLH)、破伤风类毒素、不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin,LT)、霍乱毒素(cholera toxin,CT)、破伤风类毒素(tetanus toxoid,TT)、突变体毒素、白蛋白结合蛋白、牛血清白蛋白和含有多个T细胞表位(例如Tet或PADRE)的合成来源的融合肽。可以使用的其他载体蛋白包括假单胞菌外毒素A(pseudomonas exotoxin A,EPA)、流感嗜血杆菌蛋白D(Haemophilus influenzae protein D,HiD)或脑膜炎球菌外膜蛋白复合物(meningococcal outer membrane protein complex,OMPC)。CRM197是特别优选的载体蛋白。

[0067] 非多肽载体也可以包含在本发明的免疫原性化合物中。实例包括聚(乳酸-共-乙醇酸)微粒(PLG微粒)、泊洛沙姆颗粒、病毒样颗粒和树枝状聚合物。其他载体可包含纳米粒或脂质体。

[0068] 本发明的免疫原性化合物和抗原肽优选用于治疗人患者的治疗性和预防性方法,特别是用于治疗或预防突触核蛋白病。待治疗或预防的优选突触核蛋白病是路易体病症(LBD),特别是帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)和路易体痴呆(DLB),以及多系统萎缩(MSA)或神经退行性变伴脑铁沉积I型(Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation type I,NBIA I型)。

[0069] 根据本发明的另一个方面,本发明涉及药物制剂,其包含根据本发明的免疫原性化合物或抗原肽以及可药用赋形剂(其可互换地称为载体)。术语“赋形剂”涵盖除了用于施用的最终制剂中存在的免疫原性化合物之外的任何组分。所述药物制剂优选用作治疗或预防突触核蛋白病的疫苗,突触核蛋白病优选选自路易体病症(LBD),特别是帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)和路易体痴呆(DLB),以及多系统萎缩(MSA)或神经退行性变伴脑铁沉积I型(NBIA I型)。

[0070] 根据本发明的药物制剂优选被配制为疫苗。药物制剂,优选疫苗,可以与佐剂,优选与选自以下的佐剂一起配制:MF59磷酸铝、磷酸钙、细胞因子(例如,IL-2、IL-12、GM-CSF)、皂苷(例如,QS21)、MDP衍生物、CpG寡聚体、IC31、LPS、单磷酸脂质A((monophosphoryl lipid A,MPLA),该术语涵盖MPLA-衍生物,例如单磷酸六酰基脂质A、3-脱酰基(合成)(3D-(6-酰基)PHAD[®]、PHAD[®](磷酸化六酰基二糖)或MPL)、聚磷腈和氢氧化铝,或其混合物;特别是使用氢氧化铝作为佐剂。佐剂的目的是在对象中提高或刺激免疫应答。在一些实施方案中,至少一种佐剂形成载体的一部分。根据本发明可以使用的其他佐剂包括含铝佐剂,特别是氢氧化铝(明矾)、咪唑并喹啉胺例如瑞喹莫德(R-848)和/或CpG(含有未甲基化CpG基序的合成寡聚脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide,ODN))等。佐剂可以是Toll样受体(Toll-like receptor,TLR)激动剂。

[0071] 通常来说,根据本发明的药物制剂,特别是如果被配制为疫苗,含有根据本发明的免疫原性化合物(或本发明的肽,任选地与替代载体偶联),其量为0.1ng至10mg,优选10ng至1mg,特别是1μg至500μg,或者,作为替代地,例如100fmol至10μmol,优选10pmol至1μmol,特别是1nmol至500nmol。在一些实施方案中,肽的量可以是100pmol至100nmol。本文中的量是指组合物中的肽组分。

[0072] 通常来说,药物制剂,特别是疫苗,也可以含有辅助物质作为赋形剂,例如缓冲剂、稳定剂等。优选地,这种辅助物质,例如可药用赋形剂,例如水、缓冲剂和/或稳定剂以1%至99%(重量),更优选5%至80%(重量),特别是10%至70%(重量)的量被包含在内。优选地,根据本发明的药物制剂被配制成脂质体、病毒体、iscom、脂质卷(cochleate)、乳剂。

[0073] 本发明的抗原肽、免疫原性化合物和药物制剂可以根据任何合适的方案施用。它们可根据初免-加强疫苗接种策略来施用。初免-加强免疫接种策略涉及多次免疫接种。他们旨在提高疫苗的有效性。通常来说,每次施用相同的疫苗组合物,即所谓的同源初免加强免疫接种方案。药物制剂初始引发阶段的可能施用方案包括两周至四个月的治疗;除了已经为其他疫苗建议的其他方案之外,优选2至5次,特别是3至4次初始引发疫苗施用(在1至5个月内),随后是此后3至12个月或甚至此后数年进行加强或维持疫苗接种。

[0074] 在绝对量上,优选以至少10μg,优选至少50μg的剂量使用本发明的肽(作为抗原)的量。在这方面,重要的是要注意,本发明中涉及的“μg肽(作为抗原)”是指剂量中抗原肽的量,并不包括疫苗缀合物(如果存在的话,免疫原性化合物)的载体或接头部分。因此,抗原的优选量为至少5nmol,优选至少25nmol。

[0075] 优选地,包含免疫原性化合物或抗原肽的药物制剂被配制用于肠胃外施用。在一些具体实施方案中,制剂被配制用于皮下、皮内或肌内施用。也可以采用静脉内施用。

[0076] 本发明的疫苗接种策略优选遵循通常的疫苗接种策略。在一个优选的实施方案中,根据WO 2017/076873 A1的自身抗原的疫苗接种策略,即在患者中引发初次免疫应答,

并随后对患者进行加强或维持施用。

[0077] 优选地,加强/维持疫苗接种在以下的时间点施用:当初次免疫应答已经过去时,即当通过初次疫苗接种引发的(在初次免疫应答引发过程中通过一次、两次、三次、四次或更多次疫苗施用引发的)抗体滴度已经下降超过一定水平(例如,超过适合于测试大量样品的测定的给定阈值水平)或已经至少低于初次疫苗接种过程中存在的最大抗体水平的30%,优选低于50%,特别是低于80%,以在整个治疗期间获得高滴度的抗体。为了保持如此高的水平,在初始(初次)免疫接种之后每3至12个月施用加强/维持注射可以是有益的。

[0078] 优选地,用于加强/维持施用的剂量中抗原的量比用于初次免疫应答的施用剂量中使用的量高至少20%,优选至少50%,更优选至少100%,特别是至少200%。在某些实施方案中,如果用于加强/维持施用的剂量中抗原的量比用于初次免疫应答的施用剂量中使用的量高至少300%,优选至少400%,更优选至少500%,特别是至少600%,则也是优选的。然而,在一些实施方案中,在每次施用相同的组合物。因此,在一些实施方案中,在每次施用的抗原量是相同的(在制造公差范围内)。

[0079] 根据另外的优选的实施方案,在一段时间,例如一、两、三、五或十年之后,重复加强/维持施用。优选地,第二次或另外的加强/维持以与第一次加强/维持施用相同或相似的方式进行,即与初次疫苗接种的剂量相比使用提高量的抗原,或者使用相同量的抗原。

[0080] 根据本发明的施用途径通常与当前疫苗接种的途径相同。因此,根据本发明,免疫原性化合物或抗原肽或药物制剂的优选施用是肠胃外的,例如皮下、皮内或肌肉内施用。然而,本发明的免疫原性化合物或抗原肽或药物制剂可以通过任何合适的施用途径施用于对象。如技术人员将意识到的,这样的组合物(优选疫苗组合物)可以通过表面、经口、经直肠、经鼻或肠胃外(例如静脉内、皮内、皮下或肌肉内)途径施用。此外,可以将组合物并入到缓释基质例如生物可降解的聚合物中,将所述聚合物植入期望递送的部位附近或紧邻该部位植入。然而,在一些优选的实施方案中,组合物是肌肉内或皮下施用的。

[0081] 根据本发明的一个优选实施方案,免疫原性化合物或抗原肽或药物制剂,优选以疫苗的形式,与佐剂,优选羟基氧化铝(aluminium oxyhydroxide)一起施用。根据这个最优选的实施方案,本发明涉及欧洲药典级(羟基氧化铝,专论1664)的使用,更具体地,涉及由Brenntag Biosector制造的产品(2%Alhydrogel),其经过EP合规性测试。Alhydrogel有三个种类是可用的:Alhydrogel 1.3%、Alhydrogel 2%和Alhydrogel“85”。Alhydrogel 2%被选为氢氧化铝凝胶的国际标准制剂(International Standard Preparation)。将根据本发明的药物制剂无菌配制成合适的缓冲剂,优选等张磷酸盐缓冲剂(1mM至100mM),优选浓度 $\geq 1.0\text{mg/ml}$ Alhydrogel(作为 Al_2O_3 当量给出;该度量(Al作为“ Al_2O_3 当量”)通常用于本发明;因此,在本申请中提及的所有剂量和量,只要它们涉及羟基氧化铝,都是指 Al_2O_3 当量(羟基氧化铝(Alhydrogel)的当量),甚至更优选浓度为 $\geq 1.5\text{mg/ml}$ Alhydrogel(作为 Al_2O_3 当量给出),最优选浓度为 $\geq 2.0\text{mg/ml}$ Alhydrogel(作为 Al_2O_3 当量给出)。Alhydrogel的铝盐量作为 Al_2O_3 当量给出,其与制造商所述的强度(即2%Alhydrogel等于2% Al_2O_3 ,即20mg/mL)一致。该浓度通过使用相应的分子质量(20mg/mL Al_2O_3 (Mw101.96)可直接转换成相应的铝浓度,对应于10.6mg/mL铝(分子质量26.98))。

[0082] 本发明的载体可以是任何合适的和可药用载体部分,任选地带有接头,以使接头与本发明的抗原肽(包含 X_1 至 X_{12})偶联。

[0083] 根据本发明的一个优选实施方案,本发明的抗原肽(其可以是12聚体肽)与至少一种可药用多肽载体偶联,该至少一种可药用多肽载体优选CRM197(交叉反应性物质197)、KLH(匙孔血蓝蛋白)、破伤风类毒素、白蛋白结合蛋白、牛血清白蛋白或含有多个T细胞表位的合成融合肽。其他载体或载体内的载体或接头部分包含树枝状聚合物(MAP; Biol.Chem.358:581),肽接头(或侧翼区)以及在Singh et al.,Nat.Biotech.17(1999), 1075-1081(特别是该文献的表1中的那些),以及O'Hagan et al.,Nature Reviews,Drug Discovery 2(9)(2003), 727-735(特别是其中描述的内源性免疫增强化合物和递送系统)中描述的佐剂物质等、或其混合物。在这种情况下,缀合化学(例如经由异双功能化合物,例如GMBS,当然还有在“Bioconjugate Techniques”,Greg T.Hermanson中描述的其他化合物)可以选自技术人员已知的反应。

[0084] 此外,包含根据本发明的免疫原性化合物或抗原肽的疫苗组合物可以与佐剂一起配制,优选低可溶性铝组合物,特别是氢氧化铝。当然,还可使用佐剂如MF59磷酸铝、磷酸钙、细胞因子(例如,IL-2、IL-12、GM-CSF)、皂苷(例如,QS21)、MDP衍生物、CpG寡聚体、IC31、LPS、MPLA(其包括MPL)、聚磷腈、乳剂(例如,弗氏(Freund's)、SAF)、脂质体、病毒体、iscom、脂质卷、PLG微粒、泊洛沙姆颗粒、病毒样颗粒、不耐热肠毒素(LT)、霍乱毒素(CT)、白喉毒素(DT)、破伤风类毒素(TT)、突变体毒素(例如LTK63和LTR72)、微粒、脂质体和/或聚合脂质体。

[0085] 本发明的肽或多肽优选经由接头与载体或佐剂结合,接头是NHS-聚(环氧乙烷)(PEO)(例如NHS-PEO₄-马来酰亚胺)。替代物如上所述。

[0086] 载体优选包含类毒素蛋白。类毒素蛋白可以是用于药物组合物的天然存在的毒素蛋白或其重组变体。毒素可以例如,通过用甲醛、戊二醛、UDP-二醛、过氧化物、氧进行的处理或通过突变(例如,使用重组方法)进行灭活。毒性降低的突变体白喉毒素还可以使用重组方法产生。

[0087] DT是白喉毒素交叉反应物质(diphtheria toxin cross-reacting material,DT-CRM)或白喉类毒素。DT-CRM是指突变体白喉毒素,例如通过突变或通过化学修饰,使其不再具有足够的ADP-核糖基。DT-CRM的非限制性实例包括DT-CRM30、DT-CRM45、DT-CRM176、DT-CRM197和DT-CRM228。白喉类毒素是甲醛灭活的白喉毒素。DT可商购获得,或可通过本领域已知的方法(例如重组DNA技术)来制备。

[0088] CRM197是白喉毒素的无毒变体(即类毒素),其保留了野生型白喉毒素的免疫学性质。CRM197在结构基因的单个碱基处不同于野生型白喉毒素,其产生从谷氨酸至甘氨酸的单个氨基酸替换。CRM197通常是从生长在基于酪蛋白氨基酸和酵母提取物的培养基上的白喉棒状杆菌菌株C7(P197)的培养物中分离的。CRM197可以通过超滤、硫酸铵沉淀和离子交换色谱纯化。或者,CRM197可以重组制备。CRM197已用于设计糖缀合物疫苗,例如Hibbiter™、Menveo®或Pprevnar®。

[0089] 破伤风类毒素在全世界被制备并用于针对由破伤风梭菌引起的破伤风(tetanus)(或口噤(lockjaw))的大规模免疫接种。破伤风类毒素还可单独使用,以及与白喉和/或百日咳疫苗组合使用二者。母体蛋白破伤风毒素通常在破伤风梭菌培养物中获得。破伤风毒素是大约150kDa的蛋白质,并由两个亚基(大约100kDa和大约50kDa)通过硫化物键连接组成。该毒素通常用甲醛解毒,并且可以使用已知方法,例如硫酸铵沉淀或色谱技术从培养滤

液中纯化。破伤风毒素还可以通过重组遗传手段来灭活。破伤风类毒素也被用作其他疫苗(包括肺炎球菌结合疫苗)的载体蛋白。也可以使用混合载体,例如与CRM197组合的肺炎球菌结合疫苗,与破伤风类毒素载体组合的血清型3,与白喉类毒素缀合的血清型3。

[0090] 本发明的肽是天然人aSyn序列的变体,即**AFFITOPE[®]**或**VARIOTOPE[®]**(是这样的肽,其与原始天然aSyn序列相比含有序列变异,但显示出相似(相同或改善)免疫特征,即能够引发与用天然aSyn序列获得的免疫应答相似或更高的免疫应答)。同时,**AFFITOPES[®]**被设计成不引发细胞毒性或辅助性T细胞应答,首先避免针对由携带免疫肽线性序列片段的CD8⁺T细胞可到达的任何组织的细胞毒性攻击,其次避免对独立于疫苗的靶来源肽的响应并由此产生永久更新和不受控制的免疫应答。设计该**AFFITOPE[®]**或**VARIOTOPE[®]**技术的目的是(i)打破针对自身蛋白的耐受性,(ii)产生对与天然靶蛋白表位交叉反应的疫苗的肽部分的高滴度抗体应答,(iii)并且不诱导自身免疫应答。

[0091] 在本发明的过程中,肽的长度因此被限制,优选为12aa (X₁至X₁₂)。本发明的抗原肽通常长度为11至20个氨基酸,优选长度为12至14个氨基酸。特别优选的是抗原肽的长度为12或14个氨基酸。与天然α突触核蛋白序列相比,它们通常含有1至4个,优选2或3个氨基酸突变。然而,值得注意的是,可以允许不基于(或相同于)α突触核蛋白序列的氨基酸延伸,特别是在肽的N端。这样的另外的氨基酸可形成例如接头的一部分。可以存在接头(包括氨基酸或肽接头),其将肽与其他分子部分,例如载体共价连接。接头可包含另外的氨基酸,优选具有不带电荷侧链的氨基酸,例如甘氨酸。接头可以附接至免疫原性肽的所有位置,只要该肽的免疫原性特性不显著恶化即可。例如,接头可以经由N端或C端aa (X₁或X₁₂)连接;同样肽内的连接也可以是可能的。然而,如果本发明的肽作为免疫原性组合物施加,优选经由本发明的肽的N端(X₁)将肽与载体连接。如果本发明的肽用于其他目的,例如制备部分(例如在抗体纯化过程中)或诊断探针(例如检测人样本中的抗体),则接头和载体可以更多样,包括将本发明的肽连接至表面,即固体表面。

[0092] 因此,本发明的肽也可用于多种测定和试剂盒,特别是免疫学测定和试剂盒。因此,特别优选的是,本发明的肽可以是另一种肽或多肽的一部分,例如,它们可以与在免疫测定中用作报道分子的酶融合或缀合。这种报道分子酶包括例如荧光部分,例如绿色荧光蛋白(GFP);磷酸酶,例如碱性磷酸酶;或氧化酶/还原酶,例如辣根过氧化物酶。

[0093] 在某些实施方案中,本发明涉及具有以下结构的抗原肽:

[0094] X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂,

[0095] 其中

[0096] D是天冬氨酸,E是谷氨酸,P是脯氨酸,并且V是缬氨酸;

[0097] X₁是L、K、A或S,其中L是亮氨酸,K是赖氨酸,A是丙氨酸,并且S是丝氨酸;

[0098] X₂是E或S,其中E和S如上所限定;

[0099] X₃是D、E、K、N、A或S,其中N是天冬酰胺,并且D、E、K、A和S如上所限定;

[0100] X₄是M、A、S、L或K,其中M是甲硫氨酸,并且A、S、L和K如上所限定;

[0101] X₁₀是N、S或A,其中N、S和A如上所限定;

[0102] X₁₂是存在或不存在的,并且如果存在的话,其是A、K、V、S或G,其中G是甘氨酸,并且A、K、V和S如上所限定,前提是X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂不是L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-

E-A。

[0103] 在有疑问的情况下,术语“具有该结构”应理解为“由(该结构)给c出的氨基酸残基组成”(即不包括另外的氨基酸残基,例如在抗原肽的C端处)。不排除肽的游离C端(或N端)末端或其侧链的较小的修饰,较小的修饰(例如酰胺化、酯化、甲酰化、乙酰化、其他化学取代等),但优选不存在这样的修饰。这样的较小的修饰在本文使用的术语“基本上由……组成”的范围内。根据本发明的这些11聚体或12聚体肽(“(本发明的)(抗原)肽”;“X₁至X₁₂”等)可以在适合于旨在用于预防和/或治疗突触核蛋白病的预期用途的组合物中,特别是在优选与可药用载体组合的药物组合物中提供。这样的药物组合物可以以有效量施用于有此需要的患者,以实现预防和/或治疗作用。

[0104] 在一个实施方案中,根据本发明的肽选自AEDMPVDPDNEA、LEAMPVDPDNEA, LEDAPVDPDNEA, LELMAV DPDNEA, LEDMPADPDNEA, LEDMPVDPANEA, LEDMPVDPDNAA, SEDMPVDPDNEA, LSDMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LEDSPVDPDNEA, LEDMPSPDPDNEA, LEDMPVSPDNEA, LEDMPVDPDSEA, LEDMPVDPDNSA, LEDMPVDPDNES, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, LEDKPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEV, LEDMPVDPDNEG, LEDMPVDPDNEK, LESMPVDPDNES, SESMPVDPDNEA, LESSPVDPDNEA, , SEDMPVDPDNES, LEDSPVDPDNES, SEDSPVDPDNEA, KED-MPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, SEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK, 优选KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, LEKMPVDPDNES, SEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK。

[0105] 优选地,根据本发明的肽选自KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LED-MPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK和KEDMPVDPDNEA, 优选SED-MPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KED-MPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA和LESMPVDPDNES, 特别是LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA和KEDMPVDPDNEA。

[0106] 根据另一个方面,本发明还涉及具有以下结构的具有氨基酸接头的抗原肽:

[0107] 接头-X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂,

[0108] 其中X₁、X₂、X₃、X₄、X₁₀和X₁₂如上所限定,并且其中氨基酸接头包含1至5个氨基酸残基。

[0109] 根据一个优选的实施方案,根据本发明的具有氨基酸接头的肽包含接头,其中接头中的氨基酸残基选自甘氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、及其组合,优选其中接头选自C-、G-、CG-、CGG-、CCG-、GC-、GGC-、GCC-、GG-和GGG-;特别是其中具有氨基酸接头的肽选自GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCK-ESMPVDPDNEA, CCCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, CKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEAGGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNES, CSMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNES, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNEK, CLESMPVDPDNEV, CGGKESMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEK, CLSDMPVDPDNEA,

CLEKMPVDPDNEA, CKEDMPVDPDNEA, CLENMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEK, 和CGGKEDMPVDPDNEA, 特别是GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCK-ESMPVDPDNEA, CCCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, 和CKESMPVDPDNEA。

[0110] 优选地,根据本发明的所有相关方面

[0111] (a) X_{12} 是存在的,并且在 X_{12} 的C端不存在另外的氨基酸残基;或者

[0112] (b) X_{12} 是不存在的,并且在 X_{11} 的C端不存在另外的氨基酸残基。

[0113] 根据这些特别优选的实施方案,本发明的抗原肽在C末端处没有另外的延伸(除了可存在较小的修饰之外,例如可稳定化合物或肽的较小的修饰(例如酰胺化等))。在任何情况下,C端都不应该存在代表aSyn的天然氨基酸序列(即具体地Tyr₁₂₅和Glu₁₂₆,其可以高亲和力与MHC I的不同等位基因变体结合,并因此可以是潜在的细胞毒性T细胞表位)的氨基酸延伸(与例如W0 2005/108423 A1中所公开的融合蛋白相反)。因此,在肽的C末端处不应存在Y氨基酸残基或YE二肽链,其中Y是酪氨酸,并且E如上所限定。

[0114] 本发明的肽和化合物可以通过本领域公知的化学合成方法,作为分离的肽或者作为另一种多肽的一部分来合成产生。或者,肽和化合物可以在产生本发明肽的微生物中产生,然后分离,并且如果期望的话,进一步纯化。肽和化合物可以在微生物例如细菌、酵母或真菌中,在真核细胞例如哺乳动物或昆虫细胞中,或在重组病毒载体例如腺病毒、痘病毒、疱疹病毒、塞姆利基森林病毒、杆状病毒、噬菌体、辛德比斯病毒或仙台病毒中产生。用于产生肽和化合物的合适细菌包括大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)或任何其他能够表达肽例如肽模拟表位的细菌。用于表达肽和化合物的合适的酵母类型包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、假丝酵母(*Candida*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或任何其他能够表达肽的酵母。相应的方法是本领域公知的。用于分离和纯化重组产生的肽和化合物的方法也是本领域公知的,并包括例如凝胶过滤、亲和色谱、离子交换色谱等。

[0115] 为了促进肽和化合物的分离,可以制备融合多肽,其中12聚体肽翻译地融合(共价连接)至异源多肽,使得能够通过亲和色谱进行分离。典型的异源多肽是His标签(例如His₆;6组氨酸残基)、GST标签(谷胱甘肽-S-转移酶)等。融合多肽不仅有助于肽和化合物的纯化,而且可以防止纯化期间的降解。如果期望在纯化之后去除异源多肽,则融合多肽可以包含切割位点,例如在肽模拟表位(peptide mimotope)和异源多肽之间的连接处。切割位点由氨基酸序列组成,该氨基酸序列用对该位点的氨基酸序列具有特异性的酶(例如蛋白酶)切割。

[0116] 本发明的抗原肽、本发明的免疫原性化合物或本发明的药物制剂用于治疗(即作为药物)。更具体地,本发明提供了用于治疗或预防突触核蛋白病的本发明的抗原肽、本发明的免疫原性化合物或本发明的药物制剂。本发明还提供了本发明的抗原肽、本发明的免疫原性化合物或本发明的药物制剂用于制备用于治疗或预防突触核蛋白病的药物的用途。本发明还提供了用于治疗或预防突触核蛋白病的方法,该方法包括将本发明的抗原肽、本发明的免疫原性化合物或本发明的药物制剂施用于有此需要的对象。在根据所有这些方面的具体实施方案中,突触核蛋白病选自路易体病症(LBD),特别是帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)和路易体痴呆(DLB),以及多系统萎缩(MSA)或神经退行性变伴脑铁沉积I型

(NBIA I型)。在根据这些方面的一些实施方案中,术语突触核蛋白病(或 α -突触核蛋白病)用于描述其中检测到 α -突触核蛋白聚集体的疾病,并且其包含原发性突触核蛋白病和伴随的病理状况。原发性突触核蛋白病包括帕金森病(散发性、家族性伴 α -突触核蛋白突变、家族性伴除 α -突触核蛋白之外的突变、纯自主衰竭和路易体吞咽困难)、路易体痴呆(LBD;包括路易体痴呆(DLB) (“纯”路易体痴呆)、帕金森病痴呆(PDD))或弥漫性路易体病、多系统萎缩(夏-德综合征、纹状体黑质变性和橄榄体脑桥小脑萎缩)。此外, α -syn损伤可被检测为以下疾病的伴随病理状况:散发性阿尔茨海默病,家族性阿尔茨海默病伴APP突变,家族性阿尔茨海默病伴PS-1、PS-2或其他突变,家族性英国型痴呆(familial British dementia),包涵体肌炎,创伤性脑损伤,慢性创伤性脑病,拳击性痴呆,tau蛋白病(皮克病(Pick's disease)、额颞痴呆、进行性核上性麻痹、皮质基底变性、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合征和尼曼-皮克C1型病),唐氏综合征,克-雅病(Creutzfeldt-Jakob disease),亨廷顿病(Huntington's disease),运动神经元病,肌萎缩侧索硬化(散发性、家族性和关岛型ALS-痴呆复合征),神经轴索营养不良,神经退行性变伴脑铁沉积1型(哈勒沃登-施帕茨综合征(Hallervorden-Spatz syndrome)),朊病毒病,格斯特曼-施特劳斯勒-沙因克尔病,共济失调毛细血管扩张症,梅热综合征(Meige's syndrome),亚急性硬化性全脑炎,戈谢病,克拉伯病以及其他的溶酶体贮积病症(包括库福-拉克布综合征和圣菲利波综合征)或快速眼动(rapid eye movement, REM)睡眠行为障碍。

[0117] 根据所有这些方面,被治疗的对象是哺乳动物对象,优选人。本发明的抗原肽、本发明的免疫原性化合物或本发明的药物制剂以有效治疗或预防突触核蛋白病的量施用。优选使用本发明的疫苗组合物进行预防。预防涵盖延迟疾病的发作和/或严重性(与未施用的情况相比)以及完全预防疾病。治疗涵盖改善疾病的一种或更多种症状、预防或延迟疾病进展(与未施用的情况相比)以及完全治疗疾病。本文描述了合适的剂量和施用途径,并且临床医师可以根据经验确定变化。

[0118] 本发明可以由以下编号的条款进一步限定:

[0119] 1. 具有以下结构的免疫原性化合物:

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

[0121] 其中

[0122] 载体是与 X_1 共价偶联的多肽载体;优选包含将载体分子共价连接至肽 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} 的接头部分;

[0123] D是天冬氨酸,E是谷氨酸,P是脯氨酸,并且V是缬氨酸;

[0124] X_1 是L、K、A或S,其中L是亮氨酸,K是赖氨酸,A是丙氨酸,并且S是丝氨酸;

[0125] X_2 是E或S,其中E和S如上所限定;

[0126] X_3 是D、E、K、N、A或S,其中N是天冬酰胺,并且D、E、K、A和S如上所限定;

[0127] X_4 是M、A、S、L或K,其中M是甲硫氨酸,并且A、S、L和K如上所限定;

[0128] X_{10} 是N、S或A,其中N、S和A如上所限定;

[0129] X_{12} 是存在或不存在的,并且如果存在的话,其是A、K、V、S或G,其中G是甘氨酸,并且A、K、V和S如上所限定,

[0130] 前提是 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} 不是L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A。

[0131] 2. 根据条款1所述的免疫原性化合物,其中 X_1 是L、S或K, X_2 是E或S, X_3 是S、D、E、A、K

或N, X_4 是M, X_{10} 是N, 和/或者 X_{12} 是A、S、K或V, 优选其中 X_1 是L或K, X_2 是E, X_3 是S、D、E、K或A, X_4 是M, X_{10} 是N, 和/或者 X_{12} 是A、S或K, 特别是其中 X_1 是L或K, X_3 是D、K或S, 并且 X_{12} 是A。

[0132] 3. 根据条款1或2所述的免疫原性化合物, 其中接头部分包含至少一个半胱氨酸和/或甘氨酸氨基酸残基, 优选通过化学接头与多肽载体部分偶联, 特别是其中接头部分由NHS-聚(环氧乙烷)(PEO)(例如由NHS-PEO₄-马来酰亚胺)形成。

[0133] 4. 根据条款1至3中任一项所述的免疫原性化合物, 其中所述肽 $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ 选自

[0134] KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK和KEDMPVDPDNEA, 优选SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA和LESMPVDPDNES, 特别是LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA和KEDMPVDPDNEA。

[0135] 5. 根据条款1至4中任一项所述的免疫原性化合物, 其中所述肽 $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ 是KESMPVDPDNEA。

[0136] 6. 条款1至5中任一项所述的免疫原性化合物, 其中所述多肽载体部分是或包含选自以下的可药用载体分子: 匙孔血蓝蛋白(KLH)、破伤风类毒素、不耐热肠毒素(LT)、霍乱毒素(CT)、白喉毒素(DT)及其变体特别是CRM197、破伤风类毒素(TT)、突变体毒素、白蛋白结合蛋白和牛血清白蛋白。

[0137] 7. 根据条款1至6中任一项所述的免疫原性化合物, 其用于治疗或预防突触核蛋白病, 优选用于治疗或预防选自以下的突触核蛋白病: 路易体病症(LBD), 特别是帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)和路易体痴呆(DLB), 以及多系统萎缩(MSA)或神经退行性变伴脑铁沉积I型(NBIA I型)。

[0138] 8. 药物制剂, 其包含根据条款1至7中任一项所述的化合物以及可药用载体, 所述药物制剂优选用作治疗或预防突触核蛋白病的疫苗, 所述突触核蛋白病优选选自以下的突触核蛋白病: 路易体病症(LBD), 特别是帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)和路易体痴呆(DLB), 以及多系统萎缩(MSA)或神经退行性变伴脑铁沉积I型(NBIA I型)。

[0139] 9. 根据条款8所述的药物制剂, 其中所述制剂被配制具有佐剂, 优选具有选自以下的佐剂的疫苗: MF59磷酸铝、磷酸钙、细胞因子(例如, IL-2、IL-12、GM-CSF)、皂苷(例如, QS21)、MDP衍生物、CpG寡聚体、IC31、LPS、MPL、聚磷腈和氢氧化铝、或其混合物; 特别是使用氢氧化铝作为助剂。

[0140] 10. 根据条款8或9所述的药物制剂, 其中根据条款1至10中任一项所述的化合物以0.1ng至10mg, 优选10ng至1mg, 特别是100ng至100μg的量被包含在内。

[0141] 11. 根据条款8至10中任一项所述的药物制剂, 其中所述制剂被配制用于皮下、皮内或肌肉施用; 和/或者其中制剂被配制成脂质体、病毒体、iscom、脂质卷或乳剂。

[0142] 12. 具有以下结构的抗原肽:

[0143] $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$,

[0144] 其中

[0145] D是天冬氨酸, E是谷氨酸, P是脯氨酸, 并且V是缬氨酸; (C-)是存在或不存在的半

胱氨酸；

[0146] X_1 是L、K、A或S，其中L是亮氨酸，K是赖氨酸，A是丙氨酸，并且S是丝氨酸；

[0147] X_2 是E或S，其中E和S如上所限定；

[0148] X_3 是D、E、K、N、A或S，其中N是天冬酰胺，并且D、E、K、A和S如上所限定；

[0149] X_4 是M、A、S、L或K，其中M是甲硫氨酸，并且A、S、L和K如上所限定；

[0150] X_{10} 是N、S或A，其中N、S和A如上所限定；

[0151] X_{12} 是存在或不存在的，并且如果存在的话，其是A、K、V、S或G，其中G是甘氨酸，并且A、K、V和S如上所限定，前提是 $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ 不是L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A。

[0152] 13. 根据条款12所述的肽，其选自

[0153] KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LED-MPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK 和 KEDMPVDPDNEA,

[0154] 优选SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA和LESMPVDPDNES, 特别是LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA和KEDMPVDPDNEA。

[0155] 14. 具有以下结构的具有氨基酸接头的肽：

[0156] 接头- $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$,

[0157] 其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_{10} 和 X_{12} 如条款13中所限定，并且其中氨基酸接头包含1至5个氨基酸残基。

[0158] 15. 根据条款14所述的具有氨基酸接头的肽，其中接头中的氨基酸残基选自甘氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、及其组合，优选其中接头选自C-、G-、CG-、CGG-、CCG-、GC-、GGC-、GCC-、GG-和GGG-；特别是其中具有氨基酸接头的肽选自GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCK-ESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, CKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEAGGKESMPVDPDNEK, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNES, CSEDMPVDPDNEA, CLEEMPVDPDNEA, CSESMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNES, CLEAMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNEK, CLEDMPVDPDNEV, CGGKESMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEK, CLSDMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEA, CKEDMPVDPDNEA, CLENMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEK, 和CGGKEDMPVDPDNEA, 特别是GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCK-ESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, 和CKESMPVDPDNEA。

[0159] 16. 根据条款1至7中任一项所述的免疫原性化合物或者根据条款14或15所述的具有氨基酸接头的肽，其中所述接头部分或氨基酸接头不包含选自脯氨酸、精氨酸或组氨酸的氨基酸。

[0160] 17. 根据条款16所述的免疫原性化合物或具有氨基酸接头的肽，其中在所述肽的C端处不存在Y氨基酸残基或YE二肽链，其中Y是酪氨酸，并且E如上所限定；优选地，其中

[0161] (a) X_{12} 是存在的, 并且其中在 X_{12} 的 C 端不存在另外的氨基酸残基; 或者

[0162] (b) X_{12} 是不存在的, 并且其中在 X_{11} 的 C 端不存在另外的氨基酸残基。

[0163] 18. 根据条款 1 至 7、16 和 17 中任一项所述的免疫原性化合物或者根据条款 12 或 13 所述的抗原肽或者根据条款 14 至 17 所述的具有氨基酸接头的肽用于制备用于治疗或预防突触核蛋白病的药物的用途, 优选用于治疗或预防选自以下的突触核蛋白病: 路易体病症 (LBD), 特别是帕金森病 (PD)、帕金森病痴呆 (PDD) 和路易体痴呆 (DLB), 以及多系统萎缩 (MSA) 或神经退行性变伴脑铁沉积 I 型 (NBIA I 型)。

[0164] 19. 用于治疗或预防突触核蛋白病的方法, 优选用于治疗或预防选自以下的突触核蛋白病: 路易体病症 (LBD), 特别是帕金森病 (PD)、帕金森病痴呆 (PDD) 和路易体痴呆 (DLB), 以及多系统萎缩 (MSA) 或神经退行性变伴脑铁沉积 I 型 (NBIA I 型), 其中有效量的根据条款 1 至 7、16 和 17 中任一项所述的免疫原性化合物或者根据条款 12 或 13 所述的抗原肽或者根据条款 14 至 17 所述的具有氨基酸接头的肽被施用于需要这样的治疗或预防的人个体。

[0165] 本文中使用的缩写:

[0166] aa 氨基酸

[0167] ab 抗体

[0168] aSyn α 突触核蛋白

[0169] BSA 牛血清白蛋白

[0170] bSyn β 突触核蛋白

[0171] CNS 中枢神经系统

[0172] DLB 路易体痴呆

[0173] DHA 二十二碳六烯酸 (经纯化的)

[0174] EC_{50} 半数最大有效浓度

[0175] ELISA 酶联免疫吸附测定

[0176] Fc 流动池

[0177] FELASA 实验动物科学协会联合会 (Federation for laboratory animal science associations)

[0178] h 小时

[0179] HBS HEPES 缓冲盐水

[0180] HNE 4-羟基-2-壬烯醛

[0181] HPLC 高效液相色谱

[0182] HRP 辣根过氧化物酶

[0183] IC_{50} 半数最大抑制浓度

[0184] IHC 免疫组织化学

[0185] IQR 四分位距

[0186] IR 免疫应答

[0187] kDa 千道尔顿

[0188] KLH 匙孔血蓝蛋白

[0189] LB 路易体

[0190] mAb 单克隆抗体

[0191] MSA 多系统萎缩

[0192] OD 光密度

[0193] $OD_{max/2}$ 半数最大光密度

[0194] PD 帕金森病

[0195] RT 室温

[0196] RU 响应单位

[0197] SAIT 特异性主动免疫治疗

[0198] s.c. 皮下

[0199] SEM 平均值的标准误差

[0200] SN 黑质

[0201] SPR 表面等离子体共振

[0202] vs 相对于

[0203] wt 野生型

[0204] 本发明通过以下实施例和附图进一步描述,但不限于此。

[0205] 图1:实验的时间过程示意图。注射通过箭头表示,并且血液取样通过滴(drop)表示。PP:前血浆,EP:终血浆。Pn:血浆n。Wn:实验第n周。

[0206] 图2:由p4456和p4572或由不同长度的相应天然aSyn表位诱导的aSyn交叉反应抗体的比较。(A)示出了来自所有个体小鼠的终血浆的针对aSyn蛋白的经诱导抗体浓度。柱代表用SEM表示的平均值。已经从图中去除了极端异常值(超过3倍IQR), (B)注射的肽沿着天然aSyn序列的氨基酸序列的相对位置。p9524用作**AFFITOPE**[®]进一步开发的支架,并以灰色突出显示。

[0207] 图3:具有其中单个丙氨酸(A)或丝氨酸(B)交换的aSyn序列aa第113至124位的肽(作为肽-载体蛋白缀合物递送)的免疫原性。确定源自个体经免疫接种小鼠的终血浆中抗aSyn抗体的组中值浓度,并相对于通过用p9524疫苗接种引发的抗aSyn抗体的浓度进行设定,后者被设定为100%。注射肽的序列在表3和4中示出。

[0208] 图4:具有在第1或3(A)和4或12(B)位处具有单个氨基酸交换的aSyn序列aa第113至124位的肽(作为肽-载体蛋白缀合物递送)的免疫原性。确定源自个体经免疫接种小鼠的终血浆中抗aSyn抗体的组中值浓度,并相对于通过用p9524疫苗接种引发的抗aSyn抗体的浓度进行设定,后者被设定为100%。注射肽的序列在表7和8中示出。

[0209] 图5:由具有双丝氨酸和其他氨基酸交换的aSyn序列aa_{113至124}诱导的对aSyn的免疫原性。确定源自个体经免疫接种小鼠的终血浆中抗aSyn抗体的组中值浓度,并相对于通过用p9524疫苗接种引发的抗aSyn抗体的浓度进行设定,后者被设定为100%。注射肽的序列在表11中示出。

[0210] 图6:由aSyn序列aa_{113至124}和N端延长序列诱导的对aSyn的免疫原性。确定源自个体经免疫接种小鼠的终血浆中抗aSyn抗体的组中值浓度,并相对于通过用p10074疫苗接种引发的抗aSyn抗体的浓度进行设定,后者被设定为100%。注射肽的序列在表13中示出。

[0211] 图7:由aSyn序列aa_{113至124}、N端延长序列和由aSyn序列aa_{115至121}p4456诱导的对aSyn的免疫原性。确定源自个体经免疫接种小鼠的终血浆中抗aSyn抗体的组中值浓度,并相对于通过用p4456疫苗接种引发的抗aSyn抗体的浓度进行设定,后者被设定为100%。注射肽

的序列在表13中示出。

[0212] 图8:aSyn靶标序列p10033和p10118及其C端截短序列的免疫原性。(A) 确定源自个体经免疫接种小鼠的终血浆中抗aSyn抗体的组中值免疫原性,并相对于通过用p10033疫苗接种引发的抗aSyn抗体的浓度进行设定,后者被设定为100%。(B) 确定源自个体经免疫接种小鼠的终血浆中抗aSyn抗体的组中值免疫原性,并相对于通过用p10118疫苗接种引发的抗aSyn抗体的浓度进行设定,后者被设定为100%。注射肽的序列在表16中示出。

[0213] 图9:通过**AFFITOPE**[®]候选物诱导的抗体对死后人DLB脑的IHC染色。每组中使用的抗体由各自组顶部所示的肽来诱导。带下划线字母指示与天然序列不同的氨基酸。尺寸条在主图片中指示50μM,并在聚焦于单个路易体(LB)的右下角的较小方框中指示10μM。

[0214] 图10:与单体形式相比,优先与寡聚的和毒性aSyn物质结合(BiaCore数据)。**AFFITOPE**[®]候选物诱导的抗体和单克隆抗体LB509和28A7与寡聚的(红色曲线)或单体aSyn(绿色曲线)物质的稳定性结合的传感图。蓝线代表阴性对照(仅与HBS缓冲剂结合)。x轴:运行时间(秒),y轴:相对结合响应单位。

[0215] 图11:示出**AFFITOPE**[®]候选物特异性抗体与aSyn单体、寡聚体和纤丝(filament)结合的浓度依赖性抑制的竞争ELISA。将经纯化的来自经**AFFITOPE**[®]候选物免疫接种小鼠的抗体用提高量的不同aSyn物质预孵育,并随后测试与平板结合aSyn寡聚体的结合。以红色曲线示出了单体aSyn对结合的抑制,以蓝色曲线示出了通过纤维状aSyn的抑制,并且以绿色曲线示出了通过寡聚体的抑制。x轴:aSyn物质浓度的十进制对数(ng/ml),y轴:用每种aSyn物质和浓度测量的OD 405值。

实施例

[0216] aSyn-**AFFITOPE**[®]的鉴定

[0217] 鉴于多种aSyn聚集体的潜在毒性,用于突触核蛋白病的治疗方法可涉及降低胞内和胞外aSyn的水平或积累。寡聚aSyn易于分泌到细胞间隙中,并能够以类似朊病毒的方式从一个受影响的神经元或(例如,在MSA的情况下)少突胶质细胞移动至邻近的神经元或神经胶质细胞(Lee et al.,2008;Lashuel et al.,2013;Bengoa-Vergniory et al.,2017;Bernis et al.,2015)的事实为以长期方式靶向aSyn传输的治疗性方法(例如**AFFIRIS**特异性主动免疫治疗(specific active immunotherapy,SAIT))开辟了途径。**AFFITOPE**[®]PD01和PD03-模拟aSyn限定区域的短合成肽-已在PD的临床I期试验中(PD01A(NCT01568099;Volc et al.,2020)和PD03A(NCT02267434))以及在多系统萎缩(MSA)患者中(PD01和PD03)(NCT02270489)作为用于SAIT的化合物进行了测试。这些药剂显示出良好的耐受性,并引发对寡聚aSyn具有偏好性的aSyn特异性抗体。

[0218] 在本发明的过程中,开发了第二代aSyn靶向**AFFITOPE**[®],其分别诱导了比PD01和PD03所观察到的更高的针对aSyn蛋白的滴度和交叉反应性。此外,选择的重点还在于诱导的抗体区分聚集的和毒性aSyn物质(寡聚aSyn)和单体aSyn蛋白的能力。因此,**AFFITOPE**[®]诱导的抗体与外周中过度呈现的单体aSyn物质的结合应该是较小程度的结合,然而,与CNS和外周中毒性寡聚的和未充分呈现的aSyn物质的结合将优选发生。

[0219] 为了鉴定高度潜在的**AFFITOPE**[®],靶向aSyn表位aa_{113至124}。应用了明确限定的

选择标准,例如高免疫原性、对aSyn天然表位的高交叉反应性,以及对寡聚的和纤维状毒性aSyn物质具有高选择性的经诱导抗体的结合(寡聚体结合>原纤维结合)。

[0220] 选择策略由数个步骤组成:(i)在aSyn靶蛋白的C端内寻找表位,以鉴定高免疫原性和合适的表位,(ii)丙氨酸扫描,以沿着天然靶序列检测可以被交换以增强免疫原性和交叉反应性的位置,(iii)丝氨酸扫描,以沿着天然靶序列检测可以被交换以增强免疫原性和交叉反应性的位置,(iv)沿着天然靶序列的双丝氨酸交换,(v)除Ala或Ser以外的氨基酸交换,其能够提高对aSyn的免疫原性和交叉反应性,以及(vi)从两个选择的AFFITOPE®序列中去除C端处的一个氨基酸。

[0221] 所有体内实验的免疫接种方案

[0222] 在本文中所述的用BALB/c进行的所有实验中,小鼠以每两周一次的间隔接受3次用AFFITOPE®或天然aSyn表位序列的注射(每次注射10μg净肽)(图1)。

[0223] 在aSyn靶蛋白的C端内发现表位(aSyn-28体内实验)

[0224] 已经对沿着aSyn蛋白C端区域的高免疫原性序列进行了表位筛选。为此目的,在wt BALB/c小鼠中,将7至13个氨基酸内变化的不同长度的氨基酸区段用于免疫原性研究(表1,图1)。平行地,包括先前通过AFFiRiS p4456和p4572选择的AFFITOPE®用于比较。在第三次免疫接种之后两周收集来自所有个体动物的血浆,并随后通过ELISA进行分析,以确定针对注射的肽和aSyn蛋白的滴度以及aSyn反应抗体的浓度。与aSyn aa_{113至124}序列相对应的肽p9524诱导了最高量的aSyn特异性抗体(图2,表2)。基于这些发现,选择该序列作为天然靶序列用于进一步AFFITOPE®候选物的选择。另外两种也引发高抗aSyn滴度的肽p9964和p9556被排除在进一步开发之外。肽p9964包含氨基酸Y₁₂₅和E₁₂₆,并且通过计算机分析预测源自p9964的肽片段以高亲和力与MHC I的不同等位基因变体结合,并因此是潜在的细胞毒性T细胞表位(www.syfpeithi.de)。没有选择肽p9556进行进一步开发,因为它不覆盖潜在的病理学相关的钙蛋白酶切割位点aSyn L₁₁₃/E₁₁₄。表2总结了在AFFITOPE®诱导的小鼠血浆中发现的针对aSyn的滴度。

[0225] 表1:aSyn-28的实验设置。该表示出了药物产品、药物产品中肽的序列以及相应的序列ID号。

[0226]

序 列 ID	组	药物产品	序列	另外的信息
1	1	p4456-CRM197 氢氧化铝	C-DQPVLPD	aSyn 第 115 至 121 位 (M → Q, D → L)
2	2	p4572-CRM197 氢氧化铝	C-YDRPVQPD R	aSyn 第 114 至 122 位 (E → Y, M → R, D → Q, N → R)
3	3	p9964-CRM197- 氢氧化铝	C-EDMPVDPD NEAYE	aSyn 第 114 至 126 位
4	4	p9524-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDP DNEA	aSyn 第 113 至 124 位
5	5	p9556-CRM197 氢氧化铝	C-DMPVDPDN EA	aSyn 第 115 至 124 位
6	6	p9557-CRM197 氢氧化铝	C-EDMPVDPD NE	aSyn 第 114 至 123 位
7	7	p9663-CRM197 氢氧化铝	C-VDPDNEAY E	aSyn 第 118 至 126 位

[0227] 表1

[0228] 表2: aSyn-28, 包括滴度、诱导抗体浓度和交叉反应性在内的关键结果。所有参数均在单一小鼠中进行评价, 并且数值是指中位数。从用mAb LB509产生的参考曲线推断经免疫接种小鼠血浆中抗aSyn抗体的浓度。

[0229]

序 列 ID	组	针对注射肽 的滴度	针 对 aSyn 的滴度	针对 aSyn 的 Ab 浓度[$\mu\text{g/ml}$]
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

[0230] 表2

[0231] 沿着aSyn第113至124位表位的丙氨酸扫描(aSyn-30)和丝氨酸扫描(aSyn-31)

[0232] 作为下一个步骤,天然aSyn第113至124位序列的每个氨基酸位置被丙氨酸或丝氨酸置换以确定可取代的位置,以保持或增强免疫原性(表3和4)。用相应的**AFFITOPE[®]**注射BALB/c小鼠三次,并在第三次也是最后一次注射之后两周,收集每只个体小鼠的血浆并通过ELISA分析,以确定**AFFITOPE[®]**诱导的滴度和aSyn抗体浓度。丙氨酸扫描显示,沿着aSyn第113至124位aa (p9524)序列的第1位处的Leu (p9988) 和第3位处的Asp (p9990) 不是必需的,并且相对的,它们与Ala的交换导致与aSyn的更高的交叉反应性(图3A)。丝氨酸扫描,即沿着aSyn第113至124位序列的每个天然存在的氨基酸与丝氨酸的交换(图3B)通过第1 (p9999)、2 (p10000)、3 (p10001) 和12 (p10010) 位处与Ser的氨基酸交换揭示了与对aSyn的更高的交叉反应性。表5和6总结了相对于通过WT序列诱导的针对经免疫接种小鼠血浆中存在的aSyn的滴度的诱导滴度。

[0233] 表3:实验aSyn-30的设置。该表示出了不同的处理组、使用的相应药物产品、药物产品中肽的序列以及相应的序列ID号。

[0234]

序列 ID	组	药物产品	序列
4	1	p9524-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEA
8	2	p9988-CRM197 氢氧化铝	C-AEDMPVDPDNEA
9	3	p9989-CRM197 氢氧化铝	C-LADMPVDPDNEA
10	4	p9990-CRM197 氢氧化铝	C-LEAMPVDPDNEA
11	5	p9991-CRM197 氢氧化铝	C-LEDAPVDPDNEA
12	6	p9992-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMAVDPDNEA
13	7	p9993-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPADPDNEA
14	8	p9994-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVAPDNEA
15	9	p9995-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDADNEA
16	10	p9996-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPANEA
17	11	p9997-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDAEA
18	12	p9998-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNAA

[0235] 表3

[0236] 表4: 实验aSyn-31的设置。该表示出了不同的处理组、使用的相应药物产品、药物产品中肽的序列和相应的序列ID号。

[0237]

序列 ID	组	药物产品	序列
4	1	p9524-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEA
19	2	p9999-CRM197 氢氧化铝	C-SEDMPVDPDNEA
20	3	p10000-CRM197 氢氧化铝	C-LSDMPVDPDNEA
21	4	p10001-CRM197 氢氧化铝	C-LESMPVDPDNEA
22	5	p10002-CRM197 氢氧化铝	C-LEDSPVDPDNEA
23	6	p10003-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMSVDPDNEA
24	7	p10004-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPSPDPDNEA

[0238]

25	8	p10005-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVSPDNEA
26	9	p10006-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDSDNA
27	10	p10007-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPSNEA
28	11	p10008-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDSEA
29	12	p10009-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNSA
30	13	p10010-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNES

[0239] 表4

[0240] 表5:aSyn-30,关键结果。在单一小鼠中评价的对aSyn的滴度,并且数值代表相对于用p9524获得的中位数的中位数。

[0241]

序 列 ID	组	相对于 p9524 的滴度 (%)
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

[0242]

17	11	90.4
18	12	114.4

[0243] 表5

[0244] 表6:aSyn-31,关键结果。在单一小鼠中评价对aSyn的滴度,并且值代表相对于用p9524获得的中位数的中位数。

[0245]

序 列 ID	组	相对于 p9524 的滴度 (%)
4	1	100.0
19	2	699.1
20	3	300.5
21	4	1161.7
22	5	105.0
23	6	19.5
24	7	183.9
25	8	115.2
26	9	21.2
27	10	49.7
28	11	124.6
29	12	107.3
30	13	251.3

[0246] 表6

[0247] 沿着aSyn aa第113至124位表位序列的第1、3、4和12位上的氨基酸交换(体内实验aSyn-32和aSyn-33)

[0248] 由于将天然aSyn_{113至124}序列的第1位处的Leu、第3位处的Asp、第4位处的Met和第12处的Ala交换成Ala和/或Ser诱导了高的aSyn特异性抗体浓度(图3),因此这些位置是导致设计AFFITOPES®的用于修饰的有希望的候选位置。作为下一个步骤,这些位置被具有

不同性质的氨基酸(例如,带不同电荷的氨基酸或具有不同极性的氨基酸)交换,以限定关于免疫原性和aSyn交叉反应性的有利或不太有利的交换(表7和8)。为了比较,包括了注射了天然aSyn_{113至124}(p9524)的组。通过ELISA分析经免疫接种小鼠的血浆,并测定相对于用抗aSyn的天然序列引发的滴度的抗体滴度(图4A,B)。在第1位和第3位二者处交换为Lys导致了诱导更高量的aSyn特异性Ab(p10029和p10033),而替换为Trp显著降低了aSyn特异性抗体产生(p10026和p10031)(图4A)。另外,与天然aSyn序列相比,在第3位处Asp至Glu的交换导致与aSyn的更高的交叉反应性(图4A)。在实验aSyn-33(表8)中,在第4位处的Met和第12位处的Ala用如实验aSyn-32中第1位和第3位所示相似的策略交换。在此同样地,在第12位处交换为Lys或Val(p10045或p10042)导致更高的抗aSyn抗体滴度,而在第4位或第12位处交换为Trp降低了与aSyn的交叉反应性(图4B)。表9和10总结了相对于通过WT序列诱导的针对经免疫接种小鼠血浆中存在的aSyn的滴度的诱导滴度。

[0249] 表7:实验aSyn-32的设置。该表示出了不同的处理组、使用的相应药物产品、药物产品中肽的序列和相应的序列ID号。

	序 列 ID	组	药物产品	序列
[0250]	4	1	p9524-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEA
	31	2	p10026-CRM197 氢氧化铝	C-WEDMPVDPDNEA
	32	3	p10027-CRM197 氢氧化铝	C-IEDMPVDPDNEA
	33	4	p10028-CRM197 氢氧化铝	C-NEDMPVDPDNEA
	34	5	p10029-CRM197 氢氧化铝	C-KEDMPVDPDNEA
	35	6	p10030-CRM197 氢氧化铝	C-DEDMPVDPDNEA
[0251]	36	7	p10031-CRM197 氢氧化铝	C-LEWMPVDPDNEA
	37	8	p10032-CRM197 氢氧化铝	C-LEEMPVDPDNEA
	38	9	p10033-CRM197 氢氧化铝	C-LEKMPVDPDNEA
	39	10	p10034-CRM197 氢氧化铝	C-LELMPVDPDNEA
	40	11	p10035-CRM197 氢氧化铝	C-LENMPVDPDNEA

[0252] 表7

[0253] 表8:实验aSyn-33的设置。该表示出了不同的处理组、使用的相应药物产品、药物产品中肽的序列和相应的序列ID号。

[0254]

序列 ID	组	药物产品	序列
4	1	p9524-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEA
41	2	p10036-CRM197 氢氧化铝	C-LEDWPVDPDNEA
42	3	p10037-CRM197 氢氧化铝	C-LEDLPVDPDNEA
43	4	p10038-CRM197 氢氧化铝	C-LEDNPVDPDNEA
44	5	p10039-CRM197 氢氧化铝	C-LEDDPVDPDNEA
45	6	p10040-CRM197 氢氧化铝	C-LEDKPVDPDNEA
46	7	p10041-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEW
47	8	p10042-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEV
48	9	p10043-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEG
49	10	p10044-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNED
50	11	p10045-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEK

[0255] 表8

[0256] 表9:aSyn-32,关键结果。在单一小鼠中评价对aSyn的滴度,并且值代表相对于用p9524获得的中位数的中位数。

[0257]

序列 ID	组	相对于 p9524 的滴度 (%)
4	1	100.0
31	2	41.9

[0258]

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

[0259] 表9

[0260] 表10:aSyn-33,关键结果。在单一小鼠中评价对aSyn的滴度,并且值代表相对于用p9524获得的中位数的中位数。

[0261]

序列ID	组	相对于p9524的滴度(%)
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

[0262] 表10

[0263] 沿aSyn aa第113至124位表位序列的双重丝氨酸交换(体内实验aSyn-37)

[0264] 设计了沿着aSyn_{113至124}天然序列(p9524)具有另外丝氨酸交换的变体,并在wt BALB/c小鼠中测试了它们的免疫原性(表11,图5)。在第三次并且是最后一次注射之后两周,收集每只个体小鼠的血浆并通过ELISA进行分析,以确定**AFFITOPE®**诱导的滴度和aSyn抗体浓度。注射天然aSyn序列用于直接比较目的(组1)。当与天然靶序列相比时,第3位和第12位处(p10074)以及第1位和第3位处(p10075)的双Ser交换能够进一步增强aSyn特异性抗体的滴度(图5)。第1位和第4位处以及第4位和第12位处的双丝氨酸交换没有提高对aSyn的免疫原性(图5)。表12总结了相对于通过WT序列诱导的针对经免疫接种小鼠血浆中

存在的aSyn的滴度的诱导滴度。

[0265] 表11:实验aSyn-37的设置。该表示出了不同的处理组、使用的相应药物产品、药物产品中肽的序列和相应的序列ID号。

[0266]

序列 ID	组	药物产品	序列
4	1	p9524-CRM197 氢氧化铝	C-LEDMPVDPDNEA
51	2	p10074-CRM197 氢氧化铝	C-LESMPVDPDNES
52	3	p10075-CRM197 氢氧化铝	C-SESMPVDPDNEA
53	4	p10076-CRM197 氢氧化铝	C-LESSPVDPDNEA
54	5	p10077-CRM197 氢氧化铝	C-SEDMPVDPDNES
55	6	p10078-CRM197 氢氧化铝	C-LEDSPVDPDNES
56	7	p10079-CRM197 氢氧化铝	C-SEDSPVDPDNEA

[0267] 表11

[0268] 表12:aSyn-37,关键结果。在单一小鼠中评价对aSyn的滴度,并且值代表相对于用p9524获得的中位数的中位数。

[0269]

序列 ID	组	相对于 p9524 的滴度 (%)
4	1	100.0
51	2	622.3
52	3	397.0

[0270]

53	4	145.9
54	5	188.8
55	6	110.5
56	7	101.3

[0271] 表12

[0272] 在沿着aSyn aa第113至124位表位序列的第1、3和12位上与Ser和Lys的氨基酸交

换(体内实验aSyn-44)

[0273] 天然aSyn_{113至124}序列的第1、3和12位上针对Ser和Lys的交换已表明有利于诱导高抗aSyn抗体浓度(图3B, 4和5)。在本文提出的免疫原性研究中,在wt BALB/c小鼠中测试了沿着aSyn_{113至124}表位的丝氨酸和赖氨酸交换的组合(aSyn-44实验,表13)。另外,还将接头氨基酸添加至不同的肽。平行地,先前选择的**AFFITOPE**[®]候选物p4456被包括在该实验中用于直接比较。在第三次并且是最后一次注射之后两周,收集每只个体小鼠的血浆并通过ELISA进行分析,以确定**AFFITOPE**[®]诱导的滴度和aSyn抗体浓度。当与图5(图6)中所示的高度成功的**AFFITOPE**[®]p10074相比时,在组2至7中测试的**AFFITOPE**[®]候选物能够诱导更高滴度的抗aSyn抗体。特别地,**AFFITOPE**[®]p10118显示诱导针对aSyn的最高滴度。表14总结了相对于通过p10074诱导的针对经免疫接种小鼠血浆中存在的aSyn的滴度的诱导滴度。

[0274] 为了直接比较新选择的**AFFITOPE**[®]序列(组2至7)与先前在AFFiRiS选择的肽p4456的免疫原性,相对于通过p4456引发的组中值抗aSyn抗体浓度,设置由这些**AFFITOPE**[®]候选物诱导的抗aSyn抗体的组中值浓度(图7)。与p4456相比,测试的所有新**AFFITOPE**[®]候选物均诱导了显著更高的aSyn特异性滴度(图7)。表15总结了相对于由**AFFITOPE**[®]序列p4456诱导的针对经免疫接种小鼠血浆中存在的aSyn的滴度的诱导滴度。

[0275] 表13:实验aSyn-44的设置。该表示出了不同的处理组、使用的相应药物产品、药物产品中肽的序列和相应的序列ID号。

[0276]	序列ID	组	药物产品	序列
	51	1	p10074-CRM197 氢氧化铝	C-LESMPVDPDNES
	57	2	p10114-CRM197 氢氧化铝	CGG-KEDMPVDPDNEA
	58	3	p10115-CRM197 氢氧化铝	C-LEKMPVDPDNES
	59	4	p10116-CRM197 氢氧化铝	C-SEKMPVDPDNEA
	60	5	p10117-CRM197 氢氧化铝	C-LEKMPVDPDNEK
	61	6	p10118-CRM197 氢氧化铝	CGG-KESMPVDPDNEA
	62	7	p10119-CRM197 氢氧化铝	CGG-KESMPVDPDNEK
	1	8	p4456-CRM197 氢氧化铝	C-DQPVLDP

[0278] 表13

[0279] 表14:aSyn-44,关键结果。在单一小鼠中评价对aSyn的滴度,并且值代表相对于用p10074获得的中位数(设定为100%)的中位数。

[0280]	序列ID	组	相对于p10074的滴度(%)
	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

[0281] 表14

[0282] 表25:在单一小鼠中评价对aSyn的滴度,并且值代表相对于用p4456获得的组中位数(设定为100%)的组中位数。

序列 ID	组	相对于 p4456 的滴度 (%)
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

[0285] 表15

[0286] 通过去除第12位处的Ala对两个选择的**AFFITOPE**[®]序列p10033和p10118进行的C端截短

[0287] **AFFITOPE**[®]序列p10033,以及特别是p10118已经显示出诱导高的抗aSyn抗体浓度(分别见图4A和图6)。在本文中提出的免疫原性研究中,从**AFFITOPE**[®]序列p10033和p10118中去除了第X12位处的C端Ala,以测试C端截短是否对设计的肽的免疫原性和aSyn交叉反应性具有影响。wt BALB/c小鼠在独立实验中用p10033、p10118、p10166或p10167进行免疫接种。表16列出了肽序列。

[0288] 在第三次注射之后两周,收集每只个体小鼠的血浆并通过ELISA进行分析,以确定**AFFITOPE**[®]诱导的滴度和aSyn抗体反应性。测试的截短的**AFFITOPE**[®]候选物能够诱导抗aSyn抗体的滴度,尽管其低于使用在第X12位处并入Ala的**AFFITOPE**[®]序列产生的

滴度(图8),但仍高于使用p4456获得的滴度。

[0289] 表17总结了相对于由**AFFITOPE**[®]序列p10033(A)或由**AFFITOPE**[®]序列p10118(B)诱导的针对经免疫接种小鼠血浆中存在的aSyn的滴度的诱导滴度。

[0290] 表16:该表示出了不同的处理组、使用的相应药物产品、药物产品中肽的序列和相应的序列ID号。

[0291]	序 列 ID	药物产品	序列
	38	p10033-CRM197 氢氧化铝	C-LEKMPVDPDNEA
[0292]	63	p10166-CRM197 氢氧化铝	C-LEKMPVDPDNE
	61	p10118-CRM197 氢氧化铝	CGG-KESMPVDPDNEA
	64	p10167-CRM197 氢氧化铝	CGG-KESMPVDPDNE

[0293] 表16

[0294] 表17:在单一小鼠中评价对aSyn的滴度,并且值代表相对于用p10033或p10118获得的中位数的中位数。

[0295]	序列ID	相对于p10033或p10118的滴度(%)
	38	100.0
	63	58.8
	61	100.0
	64	76.2

[0296] 表17

[0297] 由选择的**AFFITOPE**[®]诱导的抗体的靶标结合

[0298] 为了研究由**AFFITOPE**[®]候选物诱导的抗体是否能够原位检测聚集的aSyn,通过在PD/DLB疾病患者死后来源的人脑组织的脑切片上进行IHC染色来测试**AFFITOPE**[®]候选物疫苗接种的wt BALB/c小鼠的血清。路易体是患PD/DLB疾病的患者脑中的病理学标志,并且主要富含致病的聚集形式的aSyn(Spillantini et al.,1997)。

[0299] 来自经**AFFITOPE**[®]候选物处理的小鼠的血浆在皮质的脑切片上检测到类似于对照抗aSyn mAb 28A7的路易体(图9)。特异性通过在预吸收血清之后用**AFFITOPE**[®]候选物的相应肽部分没有染色来确定(数据未显示)。

[0300] 相对于单体aSyn物质而与aSyn寡聚(毒性)物质的优先结合

[0301] 接下来,使用基于SPR的方法,测试由不同**AFFITOPE**[®]诱导的Ab相对于单体物质而与寡聚aSyn(低MW、可溶性aSyn聚集体,主要是二聚体和三聚体)的选择性结合(图10)。首先将等量的**AFFITOPE**[®]候选物诱导的抗体或单克隆抗体固定在抗小鼠捕获抗体包被

的芯片上。随后连续施加单体和寡聚aSyn物质,并评估aSyn单体和寡聚aSyn物质的差异结合(限定为RU)。作为对照,使用两种单克隆抗体:LB509(Biolegend, San Diego, CA)和28A7(AFFiRiS AG)。将LB509固定至芯片表面,其不区分单体和寡聚aSyn,导致两种aSyn物质的相当的RU。针对肽p4456产生的第二对照抗体28A7确实区分单体和寡聚aSyn物质。与单体形式的aSyn相比,**AFFITOPE**[®]候选物诱导的抗体显示出对aSyn寡聚聚集体的高选择性(图10)。

[0302] 除了SPR(BiaCore)分析之外,通过抑制ELISA测试了**AFFITOPE**[®]诱导的Ab相对于aSyn单体物质而与aSyn纤维的优先结合。在这些测定中,恒定量的亲和纯化的**AFFITOPE**[®]诱导的抗体用滴定量的单体和丝状aSyn预孵育,并随后转移至用aSyn纤维包被的ELISA平板上(详情见M&M)。在图11中,示出了两个代表性的**AFFITOPE**[®]候选物(p10033和p10118)的结果。在aSyn寡聚体和随后的aSyn纤维的情况下观察到非常好的竞争,而在单体形式的aSyn的情况下的竞争仅具有较小程度(图11)。

[0303] 已知优选结合aSyn的寡聚和聚集形式的mAb 28A7用作对照(图11C)。

[0304] 总之,**AFFITOPE**[®]候选物特异性抗体的结合数据提供了**AFFITOPE**[®]候选物诱导的抗体对aSyn的毒性寡聚聚集体的高选择性的明确证据,aSyn的毒性寡聚聚集体被认为是导致细胞死亡的相关毒性物质,与单体形式相反。

[0305] 材料和方法

[0306] 小鼠

[0307] BALB/c小鼠购自Janvier Elevages(Le Genest-Sainte-Isle,F)。

[0308] 动物在IMP的申请中描述的标准条件下被圈养和饲养,以许可其作为饲养者、供应商和使用者的活动。由相关部门于2013年5月13日以通知GZ:223633/2013/4授予了相应的许可。

[0309] 简言之,将小鼠饲养在TECNIPLAST Sealsafe NextIVC蓝线笼(Milano,IT)中,共5只小鼠。笼子配备有丰富形式的筑巢材料和用于躲藏/玩耍目的的小塑料屋。在实验开始时小鼠的年龄为6至8周。给它们任意提供标准饮食和酸化水,并保持在12小时的光/暗周期下。

[0310] 所有的动物实验都是根据奥地利和欧洲的法律进行的,并得到了维也纳城市管理市政部门58授予的许可。

[0311] 肽和蛋白质

[0312] 用于免疫接种的肽购自EMC microcollections(Tübingen,Germany)。

[0313] CRM197购自Pfenex(San Diego,CA)。

[0314] 免疫原性产物的制备

[0315] 在所述实验中使用的基于免疫原性**AFFITOPE**[®]的产物是合成**AFFITOPE**[®]与载体蛋白CRM197的缀合物。缀合是使用CRM197中赖氨酸残基的侧链氨基和肽中氨基(N)端半胱氨酸的游离巯基的定向过程。为了活化CRM197,将水性CRM197溶液调节至10mM磷酸盐缓冲盐水(PBS),并随后与双功能接头4-马来酰亚胺基丁酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(GMBS)一起轻轻摇动。随后,通过透析或超滤去除过量的未反应的GMBS。获得的经活化CRM197溶液随后与溶解在磷酸盐缓冲剂(pH 6.7)中的**AFFITOPE**[®]肽一起孵育。肽中

半胱氨酸的游离巯基与马来酰亚胺基反应,形成最终的**AFFITOPE®**-CRM197产物。

[0316] 免疫原的应用

[0317] 将疫苗置于环境温度,涡旋并使用带有G30-gauge的胰岛素20注射器(**Omnican®50**,B.Braun Melsungen AG,Melsungen,Germany)在小鼠的胁部皮下(s.c.)施加(200μl)。免疫接种以两周间隔重复三次。

[0318] 样品收集

[0319] 每次注射之后两周采集血液。收集血浆并储存在-20℃直至分析。使用FELASA批准的程序进行动物的血液收集和处死。

[0320] 单克隆抗体

[0321] 在该研究中,两种单克隆Ab用作对照:LB509(Biolegend,CA,US)和28A7.LB509是市售的纯化抗aSyn₁₁₅₋₁₂₁ Ab。小鼠mAb 28A7(IgG1)是用小鼠B细胞杂交瘤(Mandler et al.,2014)针对模拟aSyn_{115至121}表位的**AFFITOPE®**PD01在内部产生的。

[0322] 样品收集

[0323] 在每次注射之后大约两周,至少在下一次注射之前一天采集血液。收集血浆并储存在-20℃下直至分析。使用FELASA批准的程序进行动物的血液收集和处死。

[0324] 通过ELISA的滴度确定

[0325] 分析了针对免疫肽和针对重组人aSyn蛋白的滴度。通过ELISA确定经免疫接种小鼠血浆中**AFFIOTPE®**诱导的抗体的存在。96孔板(Nunc-Maxisorp)用重组人aSyn(1μg/ml)或注射的肽(BSA-缀合物;1μM)包被。用**PRISM®**5.04(GraphPad Inc,San Diego,CA)通过非线性回归分析(四参数逻辑拟合函数)将滴度以EC₅₀值计算。

[0326] 免疫组织化学(Immunohistochemistry,IHC)

[0327] 对来自DLB患者(DLB患者,病例No.X5631,加州大学圣地亚哥分校神经科学系(Department of Neuroscience at UCSD),La Jolla,CA)额叶皮质活检的死后脑切片进行了aSyn阳性包涵体(路易体)的识别。

[0328] 来自经**AFFITOPE®**免疫接种小鼠的血浆用于对来自DLB患者的额叶皮质脑活检切片进行染色。在组织制备(再水化、脱蜡、抗原修复和封闭)之后,切片用稀释的小鼠血浆在室温下孵育2小时或在4℃下孵育过夜。切片用未稀释的Dako EnVision HRP标记的聚合物(Agilent,Santa Clara,CA)在室温下孵育1小时。对于每次IHC染色,用苏木精进行复染,并在此步骤之后,将载片脱水并在Entellan(Sigma-Aldrich)中固定。使用全景(Mirax)扫描仪150(Carl Zeiss MicroImaging GmbH)以明场模式扫描载片。

[0329] 表面等离子体共振(Biacore)分析

[0330] 所有实验均使用Biacore T200控制软件2.0.1在Biacore T200(GE Healthcare,Chicago,IL)上运行。根据制造商的说明,通过在芯片的流动池(Fc)1和Fc2上进行胺偶联,使CM5芯片固定有来自市售小鼠抗体捕获试剂盒(GE-Healthcare)的抗体。Fc1用作参考流动池。两种Fc的抗小鼠抗体的固定化水平相当并导致Fc1和Fc2的固定化水平为约11000RU。

[0331] 为了达到经捕获抗体的可比水平,在实际运行之前测试了每种特异性抗体的注射时间,并相应地调整了注射时间。这使得每个周期中所有测试抗体(包括在Fc1上捕获的非特异性抗体)的捕获水平相当。

[0332] 一个周期的实验设置如下:

[0333] 1. 在参考Fc1上捕获非特异性抗体

[0334] 2. 在Fc2上捕获aSyn特异性抗体

[0335] 3. 在Fc1和Fc2上注射样品(寡聚aSyn、单体aSyn、仅缓冲剂)

[0336] 4. 低pH条件下Fc1和Fc2的再生;仅抗小鼠抗体留在芯片上

[0337] 5. 芯片表面为下一个周期做好准备

[0338] 寡聚aSyn和单体aSyn的制备:aSyn寡聚体(SynAging, **Vandœuvre-lès-Nancy**, FR) HBS解冻并稀释至5μg/ml (在注射之前不久进行)。为了从真正的单体aSyn(r肽)中去除高分子量级分,使aSyn新鲜溶解,在HBS中稀释至5μg/ml,并使用50kDa截留柱(Amicon Ultra 0.5ml)以14.000×g截留离心10分钟。作为对照,使用两种aSyn特异性抗体,LB509(BioLegend, San Diego, CA)和28A7(AFFiRiS AG)。

[0339] 从免疫血浆中亲和纯化**AFFITOPE**[®]特异性抗体

[0340] 碘乙酰基磁珠(FG-106, Bioclone Inc., San Diego, CA)在室温下与相应的肽(HPLC纯化的)偶联1小时,并且剩余的过量游离位点用半胱氨酸封闭另外1小时。在封闭反应之后,将偶联**AFFITOPE**[®]的珠与用相应的**AFFITOPE**[®]候选物免疫接种的小鼠的150μl血浆一起孵育(在室温下2小时)。然后用洗脱缓冲剂(Thermo Scientific)洗脱**AFFITOPE**[®]特异性Ab。然后通过超离心(Millipore)管(30kDa)将洗脱液浓缩至150μl的体积(等于输入体积)。

[0341] 竞争ELISA

[0342] 将浓度范围为100至0.05μg/ml (这对应于与单体aSyn相关的69至0.034μM的范围)的滴定量的不同aSyn物质、单体(r肽)和聚集形式(包括原纤维(Proteos Inc)或寡聚体(Crossbeta Bicosciences))与先前从经**AFFITOPE**[®]候选物免疫接种小鼠的终血浆中纯化的抗体以及对照抗aSyn抗体28A7一起预孵育。添加的aSyn物质竞争与平板包被的aSyn原纤维(Proteos Inc)的结合。IC₅₀值以淬灭一半ELISA信号所需的单体aSyn、寡聚aSyn或原纤维aSyn的浓度计算。用**PRISM**[®]5.04(GraphPad Inc, San Diego, CA)通过非线性回归分析(四参数逻辑拟合函数)计算IC₅₀值。

[0343] 表18:测试的原始序列肽和**AFFITOPE**[®]

[0344]

序列ID号	内部肽名称	肽序列	另外的信息
1	p4456	C-DQFVLPD	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)

[0345]

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-SEDMFVDPDNEA	aSyn113-124 (L113 → S)
20	p10000	C-LSDMFVDPDNEA	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-LEDMPVSDNEA	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)
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-LEDDFVDPDNEA	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)

[0346]

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)

[0347] 表18

[0348] 参考文献

[0349] Dufty et al., Am J Pathol. 2007 May; 170(5):1725-38. [PubMed:17456777]

[0350] Bassil et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 23; 113(34):9593-8. doi: 10.1073/pnas.1609291113 [PubMed:27482103]

[0351] Kosaka, J Neurol. 1990; 237:197-204. [PubMed:2196340]

[0352] Dickson et al., Acta Neuropathol. 1989; 78:572-584. [PubMed:2683563]

[0353] Braak et al., Acta Neuropathol. 2007; 114:231-241. [PubMed:17576580]

[0354] Lee et al., Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40:1835-1849. [PubMed:18291704]

[0355] Bengoa-Vergniory et al., Acta Neuropathol. 2017; 134(6):819-838. doi: 10.1007/s00401-017-1755-1. [PubMed:28803412]

[0356] Bernis et al., Acta Neuropathol Commun. 2015 Nov 26; 3:75. doi:10.1186/s40478-015-0254-7. [PubMed:26612754]

[0357] Mandler et al., Acta Neuropathol. 2014; 127(6):861-79. doi:10.1007/s00401-014-1256-4. [PubMed:24525765]

[0358] Spillantini et al., Nature. 1997 Aug 28; 388(6645):839-40. (PubMed:9278044)

[0359] Lashuel, et al., Nat. Rev. Neurosci. 14, 38-48. doi:10.1038/nrn3406

[0360] Volc, et al., Lancet Neurol. 19, 591-600. doi:10.1016/S1474-4422(20)30136-

8

序列表

<110> Affiris AG
<120> 免疫原性化合物
<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 1
Cys Asp Gln Pro Val Leu Pro Asp
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0001]

<220>
<223> 肽

<400> 2
Cys Tyr Asp Arg Pro Val Gln Pro Asp Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 5
Cys Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 6
Cys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 肽

<400> 7
Cys Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu
1 5 10

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

[0003]

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 17

Cys	Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Val	Asp	Pro	Asp	Ala	Glu	Ala
1				5					10			

[0004]

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 22
Cys Leu Glu Asp Ser Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0005] <210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

[0007] <220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

[0008]

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 43

Cys Leu Glu Asp Asn Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0009]

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

[0010]

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

[0011] <220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

[0012] <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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽; XXXXPVDPDXEX不是LEDMPVDPDNEA

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> 可以是 L, K, A或S

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> 可以是 E或S

<220>

<221> 变体

<222> 3

<223> 可以是 D, E, K, N, A或S

[0013]

<220>

<221> 变体

<222> 4

<223> 可以是 M, A, S, L或K

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> 可以是 N, S或A

<220>

<221> 变体

<222> 12

<223> 可以是存在或不存在的, 并且如果存在的话, 其可以是 A, K, V, S或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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 64

Lys	Glu	Ser	Met	Pro	Val	Asp	Pro	Asp	Asn	Glu	Ala
1				5					10		

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 65
Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 66
Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser
1 5 10

<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 67
Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0014]

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 68
Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 69
Ser Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 70

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser
1 5 10

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 71

Leu Glu Ala Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 72

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys
1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

[0015]

<220>

<223> 肽

<400> 73

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Val
1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 74

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys
1 5 10

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 75

Leu Ser Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 76
Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 77
Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0016]

<220>
<223> 肽

<400> 78
Leu Glu Asn Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 79
Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys
1 5 10

<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 80
Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 81
Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 82
Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0017] <220>
<223> 肽

<400> 83
Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 84
Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 85
Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 86
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 86

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 87

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser
1 5 10

<210> 88

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

[0018]

<400> 88

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 89

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 90

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 91

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 92

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 93

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0019]

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 94

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser
1 5 10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 95

Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 96

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 96
Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 97
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 97
Ser Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 98
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser
1 5 10

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0020]

<220>
<223> 肽

<400> 99
Leu Glu Ala Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 100
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys
1 5 10

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 101
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Val
1 5 10

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 102
Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys
1 5 10

<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 103
Leu Ser Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0021] <220>
<223> 肽

<400> 104
Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 105
Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 106
Leu Glu Asn Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 107
<211> 12

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 107
Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Lys
1 5 10

<210> 108
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 108
Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 109
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

[0022] <400> 109
Ser Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 110
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 110
Leu Glu Glu Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 111
Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 112

Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 113

Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 114

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 114

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0023]

<210> 115

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 115

Leu Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ser
1 5 10

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 116

Leu Glu Lys Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 117
Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 118
Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

<210> 119
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 119
Gly Gly Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0024] <210> 120
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列			
<220>			
<223> 肽			
<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> 人工序列			
<220>			
<223> 肽			
<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> 人工序列			
[0025]			
<220>			
<223> 肽			
<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> 人工序列			
<220>			
<223> 肽			
<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> 人工序列			
<220>			
<223> 肽			
<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

[0026]

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 135

Gly Gly Lys Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0027]

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 140
Cys Ser Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

[0028] <210> 141
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

[0029]

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

[0030] <220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>
<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

[0031]

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 161

Cys	Cys	Cys	Lys	Glu	Ser	Met	Pro	Val	Asp	Pro	Asp	Asn	Glu	Ala
1				5					10				15	

[0032]

<210> 162

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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> 人工序列

<220>

<223> 肽

<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
[0033] <213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 165
Cys Lys Glu Ser Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala
1 5 10

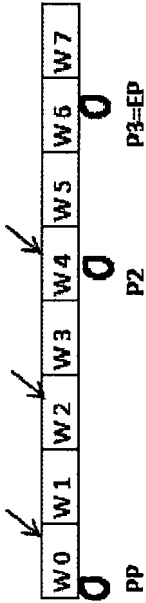


图1



图2

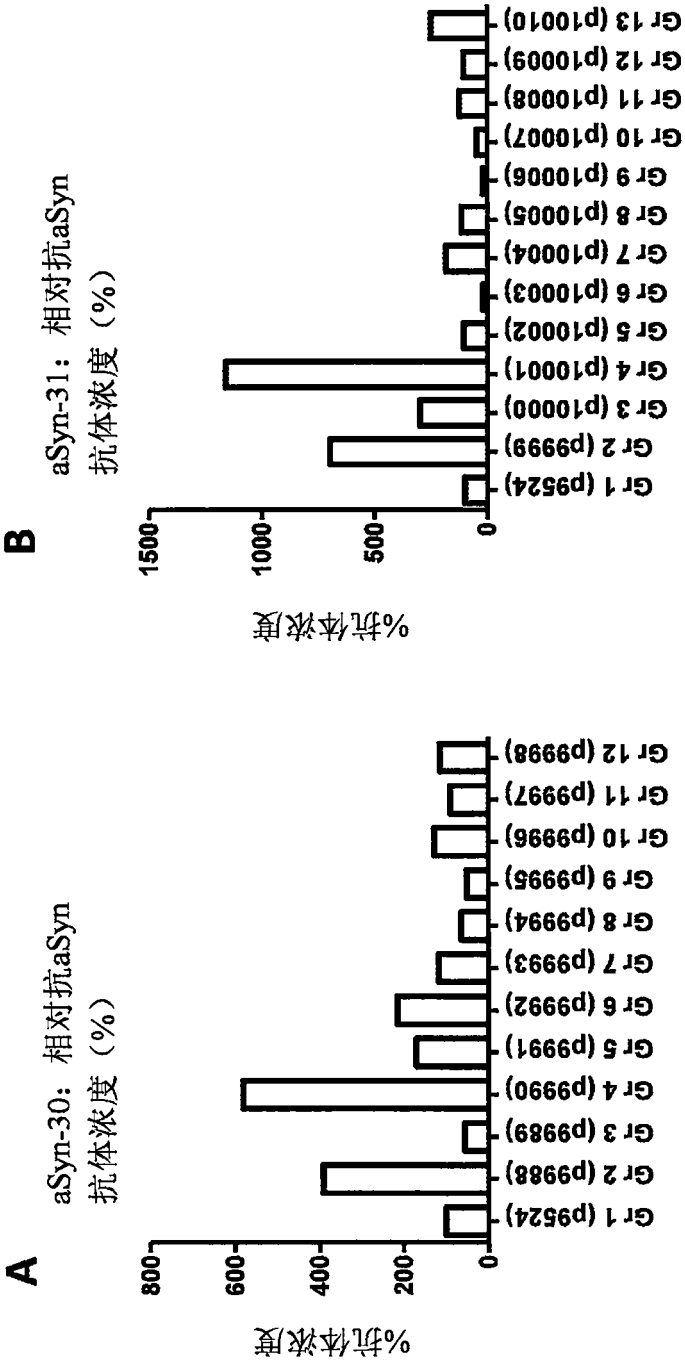


图3

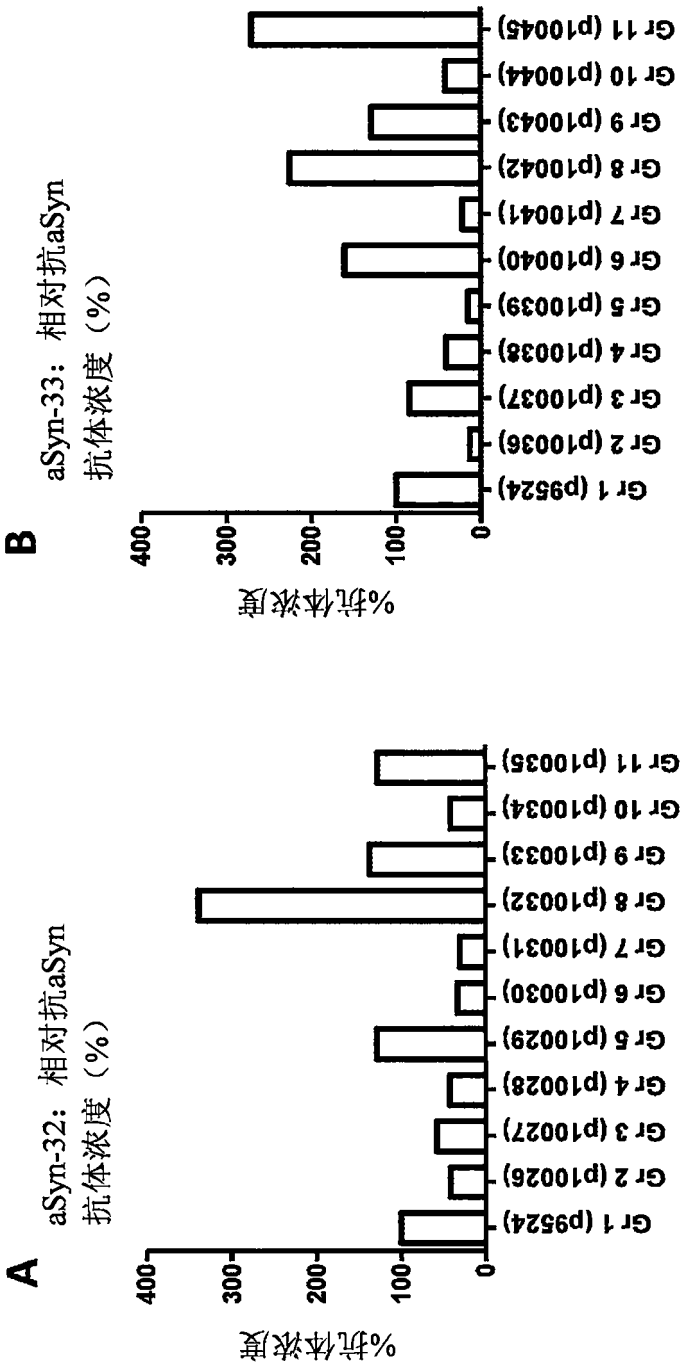
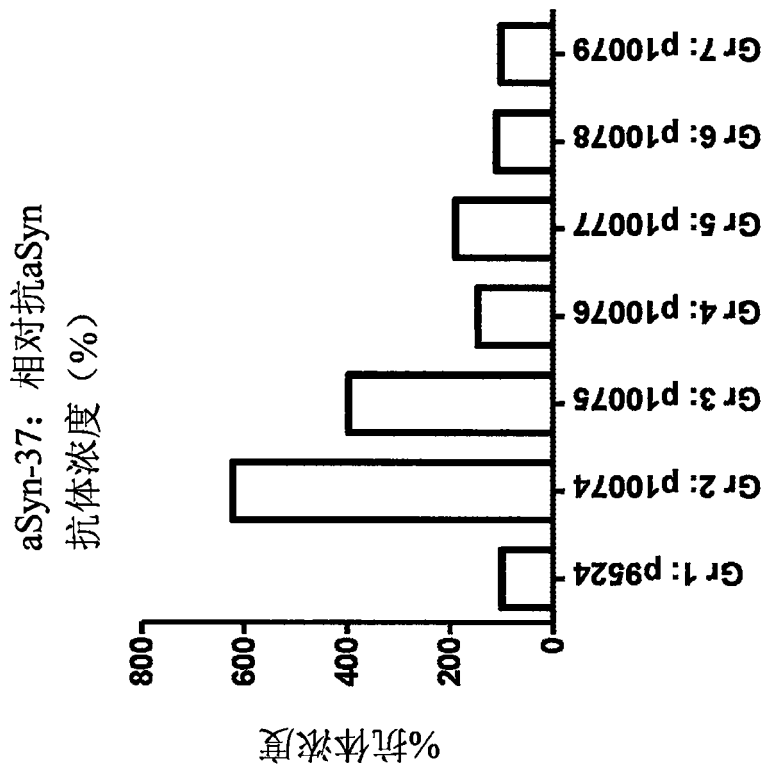
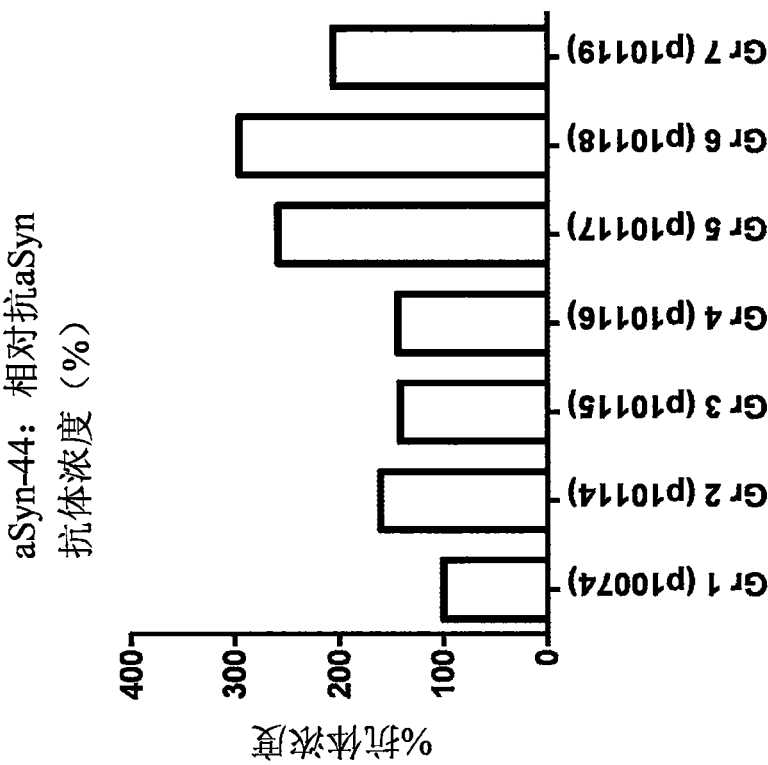


图4



5图



9图

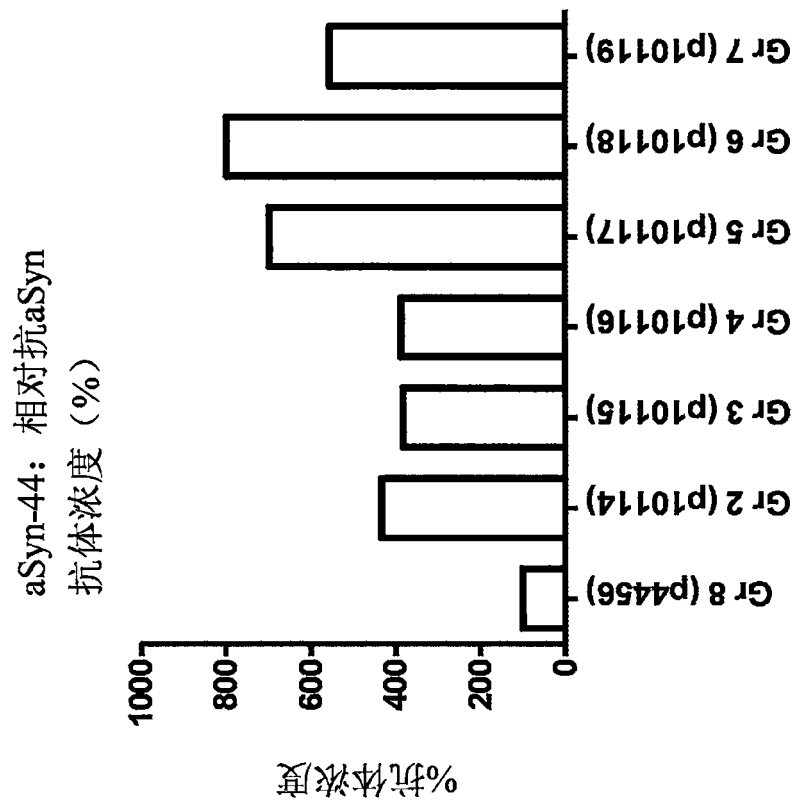


图7

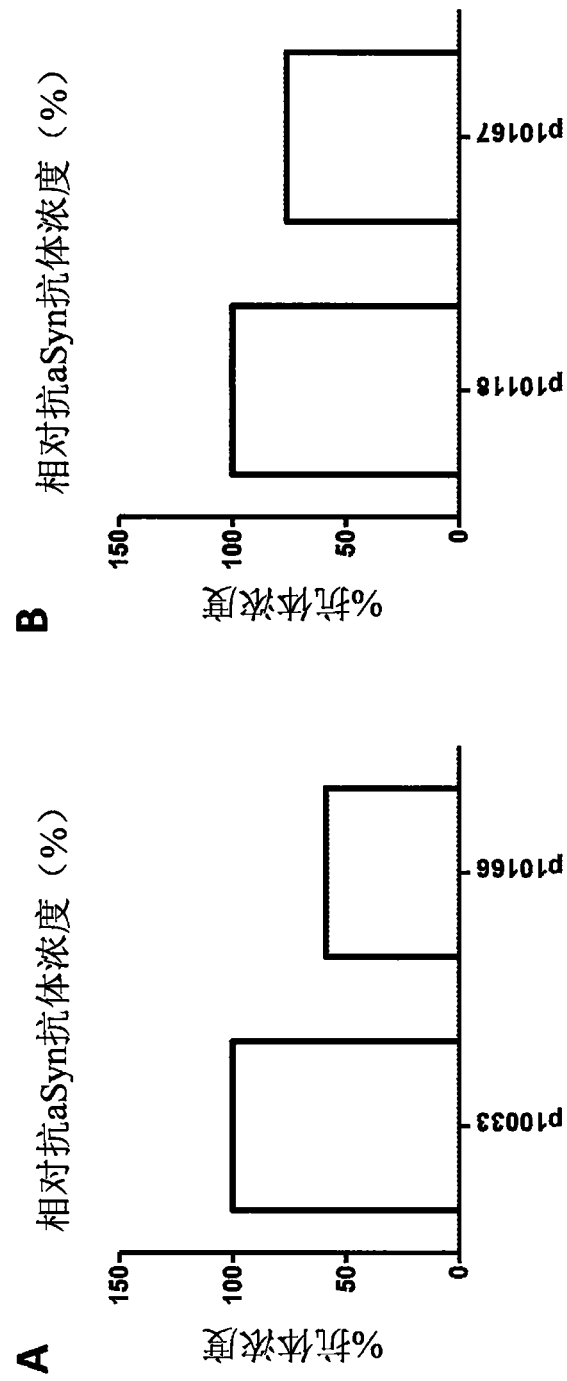


图8

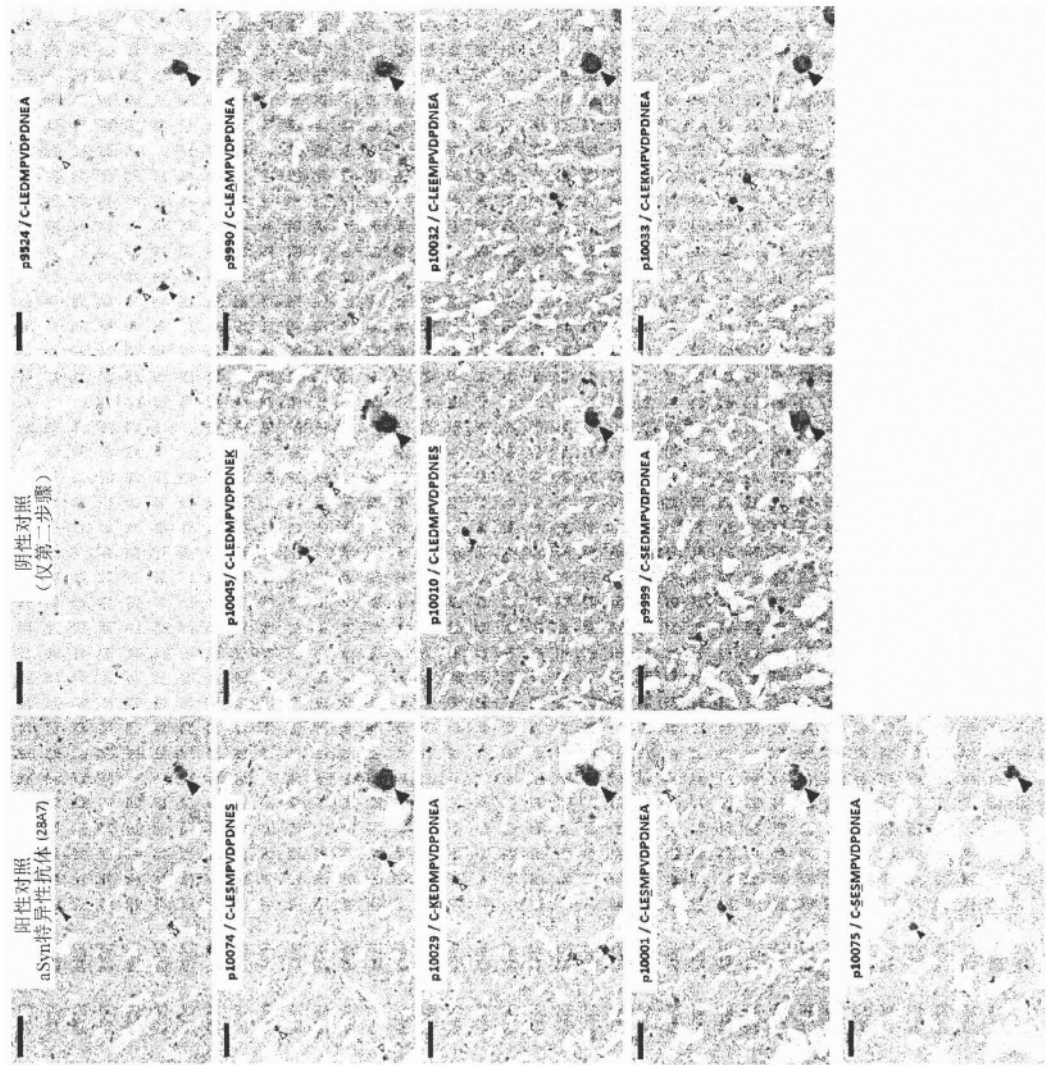


图9

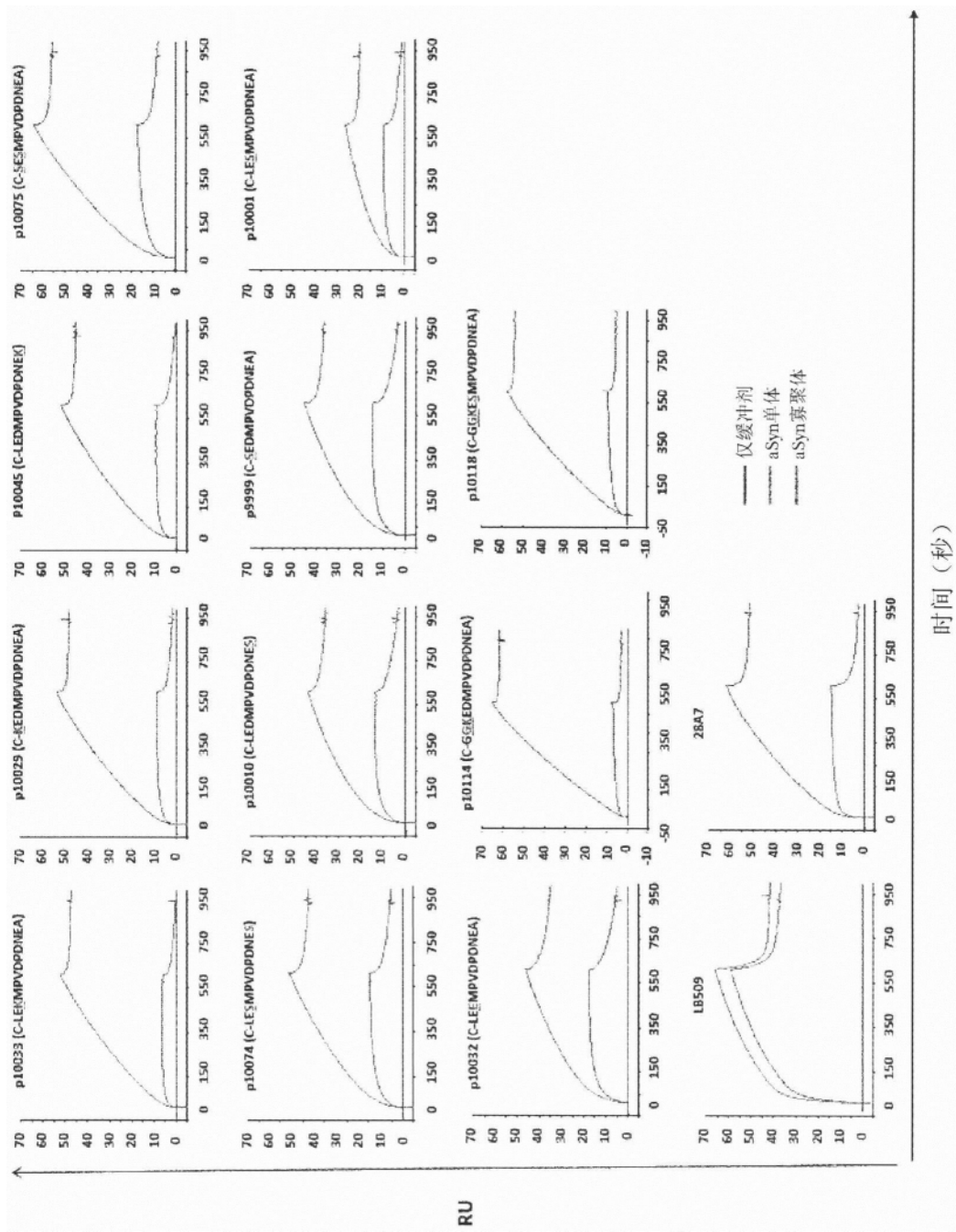


图10

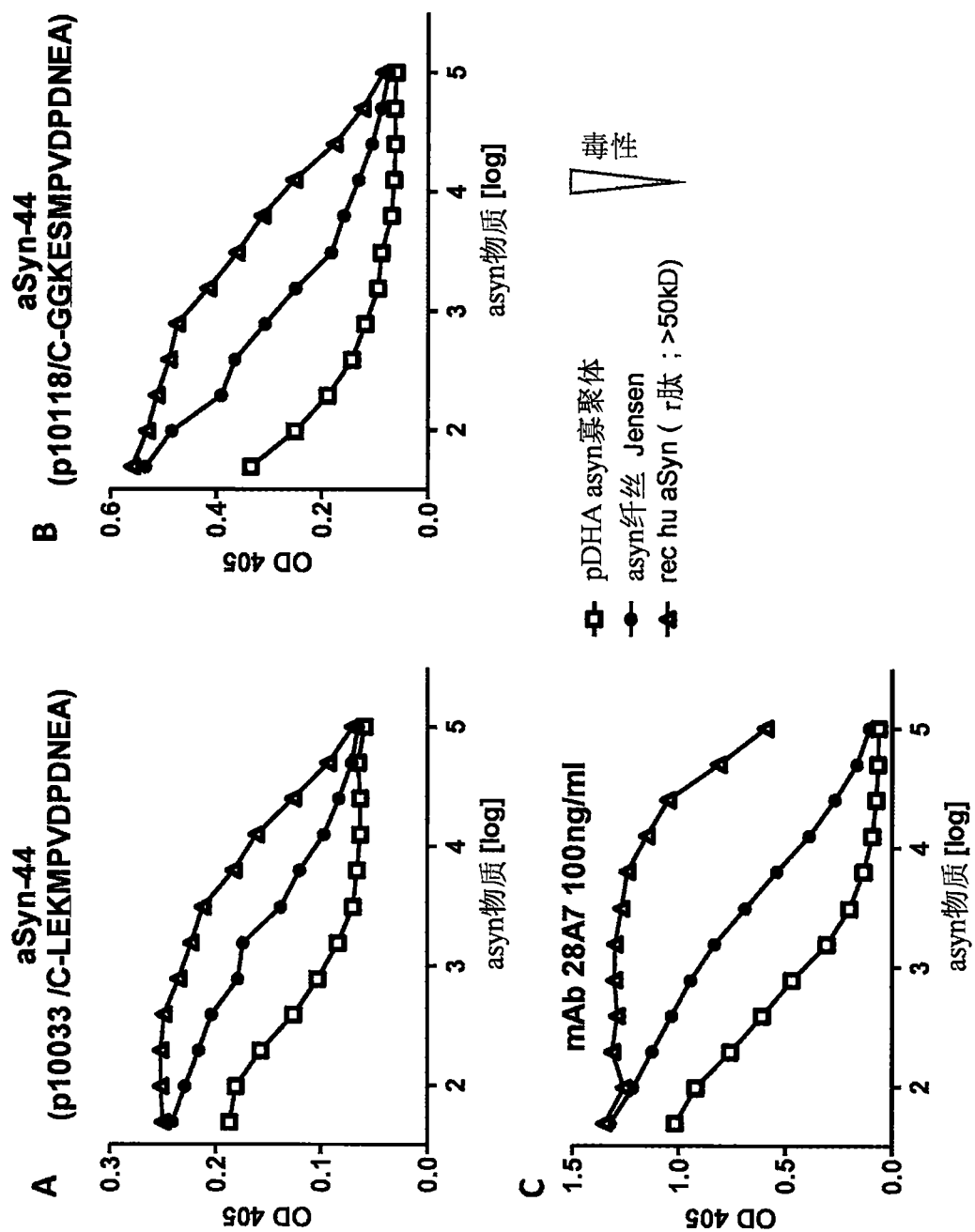


图11