



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202306966 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：111122598 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 17 日

(51) Int. Cl. : C07K14/00 (2006.01) A61K38/16 (2006.01)
 C12N15/12 (2006.01) C12N15/63 (2006.01)
 C12N15/64 (2006.01)

(30) 優先權：2021/06/18 日本 2021-101745

(71) 申請人：日商住友製藥股份有限公司 (日本) SUMITOMO PHARMA CO., LTD. (JP)
 日本

(72) 發明人：長谷崎拓也 HASEZAKI, TAKUYA (JP)；山田一登 YAMADA, KAZUTO (JP)；松
 本光広 MATSUMOTO, MITSUHIRO (JP)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：5 共 67 頁

(54) 名稱

人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物

(57) 摘要

本發明之目的在於提供一種人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物，該人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽不僅對於 α 突觸核蛋白單體，對於 α 突觸核蛋白寡聚物亦具有較高之抗體誘導性。本發明之多肽包含以下之任一胺基酸序列：(a) 序列編號 1 所表示之胺基酸序列；(b) 序列編號 2 所表示之胺基酸序列；及 (c) 於序列編號 1 或序列編號 2 所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入 1 個、2 個或 3 個胺基酸所得之胺基酸序列。

【發明摘要】

【中文發明名稱】

人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物

【中文】

本發明之目的在於提供一種人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物，該人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽不僅對於 α 突觸核蛋白單體，對於 α 突觸核蛋白寡聚物亦具有較高之抗體誘導性。本發明之多肽包含以下之任一胺基酸序列：(a)序列編號1所表示之胺基酸序列；(b)序列編號2所表示之胺基酸序列；及(c)於序列編號1或序列編號2所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸所得之胺基酸序列。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物。

【先前技術】

【0002】 人類 α 突觸核蛋白(α Syn)係由SNCA基因編碼、包含140個胺基酸、分子量14.5 kDa之蛋白質，於中樞神經系統、尤其是大腦皮質、嗅球、海馬區、齒狀回、紋狀體、視丘、小腦中高度表現。據稱 α 突觸核蛋白會參與突觸囊泡之傳輸、神經傳導物質之釋出之控制等突觸之活動、及多巴胺神經傳導之控制，但其功能尚未完全闡明。另一方面，亦已知 α 突觸核蛋白為各種神經退化性病患者之腦所特有之病理結構物即路易體之主要構成蛋白質。再者，所謂路易體(Lewy body)，係指神經細胞之內部可見之異常之圓形結構物(包涵體)。

【0003】 共核蛋白病(synucleinopathies；亦稱為 α 突觸核蛋白病)係以神經細胞、神經纖維或神經膠細胞中之 α 突觸核蛋白蛋白質之異常之凝集體之累積為特徵之神經退化性疾病，主要可例舉帕金森氏症(PD)、路易體型癡呆症(DLB)、多系統萎縮症(MSA)等(非專利文獻1)。

【0004】 PD之準確之原因尚不明確，但近年來，Braak假說逐漸被接受，即病態之 α 突觸核蛋白隨著疾病之進展而以嗅球或迷走神經為起點向大腦皮質傳遞(非專利文獻2)。

【0005】 著眼於 α 突觸核蛋白之累積，報告有嘗試利用針對 α 突觸核

蛋白之抗體所進行之PD等共核蛋白病之免疫療法。例如，於專利文獻1中揭示有一種醫藥組合物，其包含用以預防或治療路易體疾病之 α 突觸核蛋白、 α 突觸核蛋白之免疫原性片段、針對 α 突觸核蛋白之抗體、或針對 α 突觸核蛋白之免疫原性片段之抗體，且記載稱該免疫原性片段包含130~140個 α 突觸核蛋白之胺基酸，並且具有未達40個胺基酸。進而，亦報告有誘導針對 α 突觸核蛋白之抗體之 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽或模擬表位肽(專利文獻2及3)。

【0006】 另一方面，已知有藉由使載體蛋白連結於抗原而製成偶聯物疫苗，從而提供具有更高之抗體誘導能力之疫苗。作為可用於偶聯物疫苗之載體蛋白，較佳為具有免疫刺激性且抗原性較低者，例如有專利文獻4中所記載之OSK-1肽、KLH等。

先前技術文獻

專利文獻

【0007】 專利文獻1：國際公開2004-041067號

專利文獻2：國際公開2009-103105號

專利文獻3：國際公開2018-232369號

專利文獻4：國際公開2017-164409號

[非專利文獻]

【0008】 非專利文獻1: Maria J Marti et al., "Clinical overview of the synucleinopathies", *Mov Disord.*, Suppl 6: S21-7, 2003

非專利文獻2: Glenda Halliday et al., "Milestones in Parkinson's Disease-Clinical and Pathologic Features", *Mov. Disord.* 26, 1051-1021 (2011)

非專利文獻3: Hodaka Yamakado et al., " α -Synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion", Neuro science Research, Volume 73, Issue 2, 173-177 (2012)

非專利文獻4: Katsuya Araki et al., "A small-angle X-ray scattering study of alpha-synuclein from human red blood cells", Sci Rep. 2016, 6: 30473. doi: 10. 1038/srep30473.

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0009】 藉由先前之抗原決定位或模擬表位，誘導針對 α 突觸核蛋白之單體之抗體，但尚不知曉針對成為共核蛋白病之原因之 α 突觸核蛋白凝集體(α 突觸核蛋白寡聚物)之抗體之誘導。又， α 突觸核蛋白在末梢於包含B細胞、T細胞、NK細胞、單核球、以及血小板及紅血球之血液細胞中以單體之形式表現(非專利文獻4)，因此認為於將針對 α 突觸核蛋白之抗體作為治療藥進行嘗試之情形時，與單體結合之抗體在末梢被捕獲，而不會向腦轉移。因此，認為於將針對 α 突觸核蛋白之抗體作為治療藥進行嘗試之情形時，更理想為使用具有與寡聚物之結合性之抗體。

【0010】 本發明之目的在於提供一種人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物，該人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽不僅對於 α 突觸核蛋白單體，對於 α 突觸核蛋白寡聚物亦具有較高之抗體誘導能力。

[解決問題之技術手段]

【0011】 本發明者等人發現，藉由將包含序列編號1或序列編號2所

表示之胺基酸序列之多肽及該等之模仿體(模擬表位)投予至小鼠而誘導抗 α 突觸核蛋白單體抗體及抗突觸核蛋白寡聚物抗體，從而完成了本發明。

【0012】 即，本發明係關於以下之各發明。

[1]

一種多肽，其包含以下之任一胺基酸序列：

(a)序列編號1所表示之胺基酸序列；

(b)序列編號2所表示之胺基酸序列；及

(c)於序列編號1或序列編號2所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸所得之胺基酸序列。

[2]

如[1]所記載之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號1所表示之胺基酸序列。

[3]

如[1]所記載之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號2所表示之胺基酸序列。

[4]

如[1]所記載之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號4~9、及序列編號22~24之任一者所表示之胺基酸序列。

[5]

如[1]所記載之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號3、序列編號10、序列編號11、及序列編號18~21之任一者所表示之胺基酸序列。

[6]

一種偶聯物，其包含如[1]至[5]中任一項所記載之多肽及載體蛋白。

[7]

如[6]所記載之偶聯物，其中上述載體蛋白為匙孔螺血氰蛋白(KLH)。

[8]

如[6]所記載之偶聯物，其中上述載體蛋白為包含與序列編號13所表示之胺基酸序列相同或實質上相同之胺基酸序列之肽(AJ肽)。

[9]

如[8]所記載之偶聯物，其中上述AJ肽與上述多肽經由 ϵ -胺基己酸及/或肽連接子而連結。

[10]

如[9]所記載之偶聯物，其中上述肽連接子為包含1~6個L-胺基酸或其重複序列之肽連接子。

[11]

如[8]至[10]中任一項所記載之偶聯物，其中上述偶聯物之N末端之胺基酸經乙醯化。

[12]

如[8]至[11]中任一項所記載之偶聯物，其中上述偶聯物之C末端之胺基酸經醯胺化。

[13]

一種醫藥組合物，其含有如[1]至[5]中任一項所記載之多肽或如[6]至[12]中任一項所記載之偶聯物。

[14]

如[13]所記載之醫藥組合物，其進而包含佐劑。

[15]

如[13]或[14]所記載之醫藥組合物，其係用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之疫苗。

[16]

如[15]所記載之醫藥組合物，其中上述神經退化性疾病係與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病。

[17]

如[16]所記載之醫藥組合物，其中上述與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病係帕金森氏症。

[18]

一種核酸，其編碼如[1]至[5]中任一項所記載之多肽或如[8]或[10]所記載之偶聯物。

[19]

一種表現載體，其包含如[18]所記載之核酸。

[20]

一種重組細胞，其係利用如[19]所記載之表現載體將宿主細胞進行轉形而獲得。

[21]

一種抗體，其與如[1]至[5]中任一項所記載之多肽特異性結合。

[22]

一種醫藥組合物，其含有如[18]所記載之核酸、如[19]所記載之表現載體、或如[21]所記載之抗體。

[23]

如[19]所記載之醫藥組合物，其用以預防、改善、或治療神經退化性疾病。

[24]

一種如[1]至[5]中任一項所記載之多肽或如[6]至[12]中任一項所記載之偶聯物之用途，其係用於製造用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之疫苗。

[25]

一種用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之方法，其包括將有效量之如[1]至[5]中任一項所記載之多肽或如[6]至[12]中任一項所記載之偶聯物投予至需要其之對象。

[26]

一種如[18]所記載之核酸、如[19]所記載之表現載體、如[20]所記載之重組細胞、或如[21]所記載之抗體之用途，其係用於製造用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之醫藥組合物。

[27]

一種用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之方法，其包括將有效量之如[18]所記載之核酸、如[19]所記載之表現載體、或如[21]所記載之抗體投予至需要其之對象。

[28]

如[1]至[5]中任一項所記載之多肽、如[6]至[12]中任一項所記載之偶聯物、如[18]所記載之核酸、如[19]所記載之表現載體、或如[21]所記載之抗體，其用於預防、改善、或治療神經退化性疾病。

[發明之效果]

【0013】 根據本發明之多肽，不僅可誘導針對 α 突觸核蛋白單體之中和抗體，而且可誘導針對 α 突觸核蛋白寡聚物之中和抗體。因此，可期待對以帕金森氏症為代表之神經退化性疾病之治療效果。

【圖式簡單說明】

【0014】 圖1A表示實施例5中評價使用SH-SY5Y細胞之凝集型Syn所致之Syn之磷酸化所得之結果。

圖1B表示實施例5中評價藉由AJ-人類 α Syn肽偶聯物於小鼠中所誘導出之抗體之人類 α Syn中和作用所得之結果。

圖2A表示實施例6中利用點漬墨法評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於人類 α Syn過度表現小鼠中抑制人類 α Syn向皮質傳遞之作用所得之結果。

圖2B表示實施例6中利用點漬墨法評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於人類 α Syn過度表現小鼠中抑制人類 α Syn向嗅球傳遞之作用所得之結果。

圖3A表示實施例6中利用西方墨點法評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於人類 α Syn過度表現小鼠中抑制人類 α Syn向皮質傳遞之作用所得之結果。

圖3B表示實施例6中利用西方墨點法評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於人類 α Syn過度表現小鼠中抑制人類 α Syn向嗅球傳遞之作用所得之結果。

圖4A表示實施例7中評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於食蟹獼猴中之抗 α Syn單體抗體誘導能力所得之結果。

圖4B表示實施例7中評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於食蟹獼猴中之抗 α Syn寡聚物抗體誘導能力所得之結果。

圖5表示實施例8中評價藉由AJ-人類 α Syn肽偶聯物於食蟹獼猴中所誘導出之抗體之人類 α Syn中和作用所得之結果。

【實施方式】

【0015】 [多肽]

人類 α 突觸核蛋白(α Syn)係由SNCA基因(基因庫編號(Genbank No) : 6622, 基因寄存編號(Gene Accession No) : NP_000336.1, 蛋白質寄存編號(Protein Accession No) : P37840)編碼、包含序列編號14所表示之140個胺基酸、分子量14.5 kDa之蛋白質。亦已知 α Syn高度磷酸化並異常凝集而成之凝集體(寡聚物)係路易體之主要構成成分, 又, 共核蛋白病係以 α Syn之異常凝集體之累積為特徵之神經退化性疾病。相對於凝集體(寡聚物), 未凝集之 α Syn被稱作 α Syn之單體。

【0016】 一實施方式之多肽包含以下之任一胺基酸序列:

(a)序列編號1所表示之胺基酸序列;

(b)序列編號2所表示之胺基酸序列; 及

(c)於序列編號1或序列編號2所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸所得之胺基酸序列。

【0017】 包含序列編號1所表示之胺基酸序列(KKDQLGKNE)之多肽係包含序列編號14所表示之人類 α Syn之第96-104個胺基酸(aa)之多肽, 於本說明書中稱為p54。又, 包含序列編號2所表示之胺基酸序列(EAYEMPSEE)之多肽係包含序列編號14所表示之人類 α Syn之第123-131個胺基酸之多肽, 於本說明書中稱為p150。如於實施例中所證明, p54及p150係優異之中和抗體誘導抗原決定位, 不僅可誘導針對 α 突觸核蛋白單體之中和抗體, 亦可誘導針對 α 突觸核蛋白寡聚物之中和抗體。因此, p54及p150可成為用以預防、改善、或治療與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病之疫苗。

【0018】 除p54及p150之2個抗原決定位(抗原決定基)以外, 模仿該

等抗原決定位之結構之多肽(模仿體)即所謂之「模擬表位」亦能夠成為有用之抗原。作為此種模仿體(模擬表位)，可為包含上述(c)所表示之胺基酸序列之多肽。

【0019】 此處，所謂置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸，意指於序列編號1或序列編號2所表示之胺基酸序列中之任意位置置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸，又，意指置換、缺失、附加及/或插入任意胺基酸。

【0020】 所置換、插入或附加之胺基酸可為天然型，亦可為非天然型。作為天然型胺基酸，可例舉：L-丙胺酸、L-天冬醯胺、L-天冬胺酸、L-麩醯胺、L-麩胺酸、甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-白胺酸、L-離胺酸、L-精胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯基丙胺酸、L-脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、L-半胱胺酸等。作為非天然型胺基酸，可例舉上述天然型胺基酸之D體胺基酸、對天然型胺基酸導入各種置換基等而成之天然型胺基酸之衍生物。

【0021】 胺基酸之置換並無特別限定，例如於下述示出具有類似之化學性質且可相互置換之胺基酸之例。同一群中所包含之胺基酸可相互置換(所謂之保守性置換)，但於對抗原決定位之性質之影響較小之位置之胺基酸之情形時，亦可置換為不同群中所包含之胺基酸。

群1：白胺酸(L)、異白胺酸(I)、甘白胺酸、纈胺酸(V)、正纈胺酸、丙胺酸(A)、2-胺基丁酸、甲硫胺酸(M)、鄰甲基絲胺酸、第三丁基甘胺酸、第三丁基丙胺酸、環己基丙胺酸

群2：天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)、異天冬胺酸、異麩胺酸、2-胺基己二酸、2-胺基辛二酸

群3：天冬醯胺(N)、麩醯胺(Q)

群4：離胺酸(K)、精胺酸(R)、鳥胺酸、2,4-二胺基丁酸、2,3-二胺基丙酸

群5：脯胺酸(P)、3-羥基脯胺酸、4-羥基脯胺酸

群6：絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、高絲胺酸

群7：苯基丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)

【0022】 作為序列編號1所表示之胺基酸序列中1個、2個或3個胺基酸置換或插入，可為序列編號14之第96、97、98、99、100、101、102、103、104號之任意位置之1個、2個或3個胺基酸置換或插入，例如可為序列編號14之第97、98、99、102、103、104號之任意位置之1個、2個或3個胺基酸置換。作為序列編號1所表示之胺基酸序列中1個、2個或3個胺基酸缺失，可為序列編號14之第96、97、98、99、100、101、102、103、104號之任意位置之1個、2個或3個胺基酸缺失。作為序列編號1所表示之胺基酸序列中1個、2個或3個胺基酸附加，可為於序列編號1所表示之胺基酸序列之多肽之N末端或C末端之1個、2個或3個胺基酸附加，例如可於序列編號1所表示之胺基酸序列之多肽之N末端附加序列編號14之第95號之胺基酸、第94-95號之2個胺基酸、或第93-95號之3個胺基酸，亦可於序列編號1所表示之胺基酸序列之多肽之C末端附加序列編號14之第105號之胺基酸、第105-106號之2個胺基酸或第105-107號之3個胺基酸，亦可分別附加於序列編號1所表示之胺基酸序列之多肽之N末端及C末端之兩端，例如可使序列編號14之第95號之胺基酸附加於N末端，使第105號之胺基酸及第106號之胺基酸附加於C末端，又，可使序列編號14之第94號之胺基酸及第95號之胺基酸附加於N末端，使第105號之胺基

酸附加於C末端，進而可使序列編號14之第95號之胺基酸附加於N末端，使第105號之胺基酸附加於C末端。可為置換、缺失、附加或插入之任意之組合。

【0023】 作為序列編號2所表示之胺基酸序列中1個、2個或3個胺基酸置換或插入，可為序列編號14之第123、124、125、126、127、128、129、130、131號之任意位置之1個、2個或3個任意之胺基酸置換或插入，例如可為序列編號14之第123、125、131號之任意位置之1個、2個或3個胺基酸向任意胺基酸之置換。作為序列編號2所表示之胺基酸序列中1個、2個或3個胺基酸缺失，可為序列編號14之第123、124、125、126、127、128、129、130、131號之任意位置之1個、2個或3個胺基酸缺失。作為序列編號2所表示之胺基酸序列中1個、2個或3個胺基酸附加，可為於序列編號2所表示之胺基酸序列之多肽之N末端或C末端之1個、2個或3個任意之胺基酸附加，例如可於序列編號2所表示之胺基酸序列之多肽之N末端附加序列編號14之第122號之胺基酸、第121-122號之2個胺基酸、或第120-122號之3個胺基酸，亦可於序列編號2所表示之胺基酸序列之多肽之C末端附加序列編號14之第132號之胺基酸、第132-133號之2個胺基酸、或第132-134號之3個胺基酸，亦可於序列編號2所表示之胺基酸序列之多肽之N末端及C末端之兩端分別附加胺基酸，例如可使序列編號14之第122號之胺基酸附加於N末端，使第132號之胺基酸及第133號之胺基酸附加於C末端，又，可使序列編號14之第121號之胺基酸及第122號之胺基酸附加於N末端，使第132號之胺基酸附加於C末端，進而可使序列編號14之第122號之胺基酸附加於N末端，使第132號之胺基酸附加於C末端。亦可為置換、缺失、附加或插入之任意之組合。

【0024】 作為包含上述(c)所表示之胺基酸序列之多肽之具體例，可例舉包含於序列編號1所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸所得之胺基酸序列即下述之序列編號4~9、及序列編號22~24之任一者所表示之胺基酸序列之多肽，又，可例舉包含於序列編號2所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸所得之胺基酸序列即序列編號3、序列編號10、序列編號11、及序列編號18~21之任一者所表示之胺基酸序列之多肽。即，可例舉以下之 p283、p142、p167、p227、p233、p272、p273、p276、p277、p242、p244、p347、p361、p229、p237、及p298。其中，尤其是p167、p227、p272、p276、p283、p242、p244、p229對於 α 突觸核蛋白寡聚物之中和抗體誘導能力較高而可較佳地使用。

【0025】 p283(序列編號14之123-132aa、E131D)：EAYEMPSEDG(序列編號3)。此處，所謂「序列編號14之123-132aa、E131D」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第123-132號之序列中，將第131號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)。p283之胺基酸序列係將序列編號2所表示之胺基酸序列之第9號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)，且於序列編號2所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第132號之甘胺酸(G)作為第10號之胺基酸所得者。

【0026】 p142(序列編號14之96-104aa、K102A)：KKDQLGANE(序列編號4)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、K102A」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第102號之離胺酸(K)置換為丙胺酸(A)。p142之胺基酸序列係將序列編號1所表示之胺基酸序列之第7號之離胺酸(K)置換為丙胺酸(A)所得

者。

【0027】 p167(序列編號14之96-105aa)：KKDQLGKNEE(序列編號5)。此處，所謂「序列編號14之96-105aa」，係指與序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-105號之序列對應。p167之胺基酸序列係於序列編號1所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第105號之麩胺酸(E)作為第10號之胺基酸所得者。

【0028】 p227(序列編號14之96-104aa、K97R)：KRDQLGKNE(序列編號6)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、K97R」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第97號之離胺酸(K)置換為精胺酸(R)。p227之胺基酸序列係將序列編號1所表示之胺基酸序列之第2號之離胺酸(K)置換為精胺酸(R)所得者。

【0029】 p233(序列編號14之96-104aa、E104D)：KKDQLGKND(序列編號7)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、E104D」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第104號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)。p227之胺基酸序列係將序列編號1所表示之胺基酸序列之第9號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)所得者。

【0030】 p272(序列編號14之96-104aa、D98N、E104D)：KKNQLGKND(序列編號8)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、D98N、E104D」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第98號之天冬胺酸(D)置換為天冬醯胺(N)，且將第104號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)。p272之胺基酸序列係將序列編號1所表示之胺基酸序列之第3號之天冬胺酸(D)置換為天冬醯胺(N)，且將第9號之麩

胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)所得者。

【0031】 p273(序 列 編 號 14 之 96-104aa 、 D98T 、 E104D) : KKTQLGKND(序列編號9)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、D98T、E104D」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第98號之天冬胺酸(D)置換為蘇胺酸(T)，且將第104號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)。p273之胺基酸序列係將序列編號1所表示之胺基酸序列之第3號之天冬胺酸(D)置換為蘇胺酸(T)，且將第9號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)所得者。

【0032】 p276(序 列 編 號 14 之 123-132aa 、 E123D) : DAYEMPSEEG(序列編號10)。此處，所謂「序列編號14之123-132aa、E123D」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第123-132號之序列中，將第123號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)。p276之胺基酸序列係將序列編號2所表示之胺基酸序列之第1號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)，且於序列編號2所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第132號之甘胺酸(G)作為第10號之胺基酸所得者。

【0033】 p277(序 列 編 號 14 之 123-132aa 、 Y125F) : EAFEMPSEEG(序列編號11)。此處，所謂「序列編號14之123-132aa、Y125F」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第123-132號之序列中，將第125號之酪胺酸(Y)置換為苯基丙胺酸(F)。p277之胺基酸序列係將序列編號2所表示之胺基酸序列之第3號之酪胺酸(Y)置換為苯基丙胺酸(F)，且於序列編號2所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第132號之甘胺酸(G)作為第10號之胺基酸所得者。

【0034】 p242(序 列 編 號 14 之 123-132aa 、 E123A) :

AAYEMPSEEG(序列編號18)。此處，所謂「序列編號14之123-132aa、E123A」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第123-132號之序列中，將第123號之麩胺酸(E)置換為丙胺酸(A)。p242之胺基酸序列係將序列編號2所表示之胺基酸序列之第1號之麩胺酸(E)置換為丙胺酸(A)，且於序列編號2所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第132號之甘胺酸(G)作為第10號之胺基酸所得者。

【0035】 p244(序列編號14之123-132aa、Y125A)：EAAEMPSEEG(序列編號19)。此處，所謂「序列編號14之123-132aa、Y125A」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第123-132號之序列中，將第125號之酪胺酸(Y)置換為丙胺酸(A)。p244之胺基酸序列係將序列編號2所表示之胺基酸序列之第3號之酪胺酸(Y)置換為丙胺酸(A)，且於序列編號2所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第132號之甘胺酸(G)作為第10號之胺基酸所得者。

【0036】 p347(序列編號14之123-132aa、E123H、Y125F)：HAFEMPSEEG(序列編號20)。此處，所謂「序列編號14之123-132aa、E123H、Y125F」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第123-132號之序列中，將第123號之麩胺酸(E)置換為組胺酸(H)，將第125號之酪胺酸(Y)置換為苯基丙胺酸(F)。p347之胺基酸序列係將序列編號2所表示之胺基酸序列之第1號之麩胺酸(E)置換為組胺酸(H)，將第3號之酪胺酸(Y)置換為苯基丙胺酸(F)，且於序列編號2所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第132號之甘胺酸(G)作為第10號之胺基酸所得者。

【0037】 p361(序列編號14之123-132aa、E123D、Y125F)：

DAFEMPSEEG(序列編號21)。此處，所謂「序列編號14之123-132aa、E123D、Y125F」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第123-132號之序列中，將第123號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)，且將第125號之酪胺酸(Y)置換為苯基丙胺酸(F)。p361之胺基酸序列係將序列編號2所表示之胺基酸序列之第1號之麩胺酸(E)置換為天冬胺酸(D)，將第3號之酪胺酸(Y)置換為苯基丙胺酸(F)，且於序列編號2所表示之胺基酸序列之C末端附加序列編號14所表示之胺基酸序列之第132號之甘胺酸(G)作為第10號之胺基酸所得者。

【0038】 p229(序列編號14之96-104aa、D98T)：KKTQLGKNE(序列編號22)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、D98T」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第98號之天冬胺酸(D)置換為蘇胺酸(T)。p229之胺基酸序列係將序列編號1所表示之胺基酸序列之第3號之天冬胺酸(D)置換為蘇胺酸(T)所得者。

【0039】 p237(序列編號14之96-104aa、D98N)：KKNQLGKNE(序列編號23)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、D98N」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第98號之天冬胺酸(D)置換為天冬醯胺(N)。p237之胺基酸序列係將序列編號1所表示之胺基酸序列之第3號之天冬胺酸(D)置換為天冬醯胺(N)所得者。

【0040】 p298(序列編號14之96-104aa、Q99E、N103D)：KKDELGKDE(序列編號24)。此處，所謂「序列編號14之96-104aa、Q99E、N103D」，係指於序列編號14所表示之胺基酸序列之第96-104號之序列中，將第99號之麩醯胺(Q)置換為麩胺酸(E)，且將第103號之天冬醯胺(N)置換為天冬胺酸(D)。p298之胺基酸序列係將序列編號1所表示之

胺基酸序列之第4號之麩醯胺(Q)置換為麩胺酸(E)，且將第8號之天冬醯胺(N)置換為天冬胺酸(D)所得者。

【0041】 本實施方式之多肽可藉由基因工程之方法進行製作。製作方法並無特別限定，例如於包含序列編號1或2所表示之胺基酸序列之多肽之情形時，可藉由下述方式獲得：將編碼人類 α 突觸核蛋白(α Syn)之SNCA基因之cDNA(complementary DNA，互補去氧核糖核酸)作為模板而設計引子，藉由PCR(polymerase chain reaction，聚合酶鏈反應)獲得編碼所需多肽之核酸，使該核酸與表現啟動子功能性地連結，視情況編碼載體蛋白之核酸、進而編碼標籤之核酸亦進行連結，並導入至適當之表現載體，從而於宿主細胞中表現。又，於模擬表位之情形時，可藉由將SNCA基因之cDNA作為模板，藉由定點突變導入法導入突變，置換為編碼其他胺基酸殘基之鹼基序列，從而獲取編碼作為模擬表位之多肽之核酸。進而，亦可藉由不使用模板，設計編碼所需之胺基酸序列之核酸，進行人工合成而製作。此處，核酸可為DNA，亦可為RNA。

【0042】 另一方面，本實施方式之多肽係較短之肽，因此亦可依據所需之胺基酸序列，藉由人工合成而進行製作。人工合成之方法只要為公知之方法，則並無特別限定，例如可例舉Fmoc法、Boc法等固相合成法、及液相合成法。

【0043】 又，所製作之多肽亦可視需要進行純化。純化方法並無特別限定，可例舉利用親和層析柱等之純化。

【0044】 [偶聯物]

一實施方式之偶聯物包含上述實施方式之多肽、及載體蛋白。於偶聯物中，多肽與載體蛋白以化學方式連結。由於作為抗原之多肽之分子量

較小，故而於未產生充分之免疫反應之情形時，藉由連結載體蛋白，可增大表觀上之分子量，提高抗體誘導能力。

【0045】 作為載體蛋白，只要為可提高抗原肽之抗原性之載體蛋白，則並無特別限定，可例舉BSA(牛血清白蛋白)、KLH(匙孔螺血氫蛋白)、OVA(卵白蛋白)等一般之載體蛋白。進而，亦可較佳地使用包含與序列編號13(ELKLIFLHRLKRLRKRLKRK)所表示之胺基酸序列相同或實質上相同之胺基酸序列之肽(於本說明書中，稱為「AJ肽」)。由於AJ肽之自身之抗原性較低，故而可減輕來自載體蛋白之抗原性之欠佳之作用。又，儘管AJ肽為較短之肽，但具有較強之佐劑效果(專利文獻4)。

【0046】 此處，所謂與序列編號13所表示之胺基酸序列實質上相同之胺基酸序列，可例舉於序列編號13所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入1~4個胺基酸所得之胺基酸序列，較佳為置換、缺失、附加及/或插入1~3個、更佳為1~2個、進而較佳為1個胺基酸所得之胺基酸序列。或者，所謂實質上相同之胺基酸序列，係與序列編號13所表示之胺基酸序列具有80%以上之同源性之胺基酸序列，較佳為具有85%以上、更佳為90%以上、進而較佳為95%以上之同源性之胺基酸序列。

【0047】 包含與序列編號13所表示之胺基酸序列實質上相同之胺基酸序列之肽較佳為具有與包含序列編號13所表示之胺基酸序列之肽實質上相同性質之活性之肽。具體而言，較佳為包含與包含序列編號13所表示之胺基酸序列之肽實質上相同之胺基酸序列之肽與抗原決定位之偶聯物之抗體誘導能力為與包含序列編號13所表示之胺基酸序列之肽與抗原決定位之偶聯物之抗體誘導能力同等或其以上。關於抗體誘導能力是否為同等或其以上之評價，可藉由下述方式進行評價：使用於相同之抗原決定位同樣地

連結包含序列編號13所表示之胺基酸序列之肽(參照肽)或評價對象之肽所獲得之偶聯物，利用同樣之操作對動物進行免疫，藉由ELISA(enzyme linked immunosorbent assay，酵素結合免疫吸附分析)測定並比較所獲得之免疫血清之抗體效價。若連結有評價對象之肽之偶聯物之抗體效價為連結有參照肽之偶聯物之抗體效價之80%以上、較佳為90%以上、更佳為95%以上，則可評價為評價對象之肽具有與參照肽同等或其以上之抗體誘導能力。再者，抗體效價之測定藉由通常之方法進行即可，例如可例舉實施例中所記載之方法。

【0048】 多肽與載體蛋白可自N末端側，按照多肽、載體蛋白之順序連結，又，亦可按照載體蛋白、多肽之順序連結。進而，載體蛋白可為1種，亦可為2種。於2種之情形時，可自N末端側，按照第1種載體蛋白、多肽、第2種載體蛋白之順序連結。又，以提昇穩定性為目的或以提昇由去除荷電所帶來之細胞滲透性為目的，較佳為偶聯物之N末端之胺基酸經乙醯化，較佳為C末端之胺基酸經醯胺化。

【0049】 多肽與載體蛋白可經由肽連接子或直接地融合，或者亦可經由連接子以化學方式連結，或者亦可經由化學連結中之連接子及肽連接子之兩者而連結。作為肽連接子，並無特別限定，例如可例舉：包含1～50個、較佳為1～20個胺基酸之連接子、或包含15～20個胺基酸之連接子、例如包含1～5個或1～6個天然存在之L-胺基酸或其重複序列之肽連接子。具體而言，可例舉：包含Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS；序列編號15)或其重複序列之連接子、包含Glu-Ala-Ala-Ala-Lys(EAAAK；序列編號16)或其重複序列之連接子、包含Asp-Asp-Ala-Lys-Lys(DDAKK；序列編號17)或其重複序列之連接子、包含Lys-Lys-Lys(KKK)(較佳為

ϵ KKK)或其重複序列之連接子、包含Lys-Lys-Lys-Lys(KKKK；序列編號25)(較佳為 ϵ KKKK)或其重複序列之連接子、包含Pro-Pro-Asp-Pro-Asp-Pro(PPDPDP；序列編號26)或其重複序列之連接子。該等胺基酸可為天然L-胺基酸，亦可為D-胺基酸。又，化學連結中之連接子亦無特別限定，例如可例舉： ϵ -胺基己酸、 β -胺基丙胺酸、 γ -胺基酪酸、7-胺基庚酸、12-胺基月桂酸、麩胺酸、對胺基苯甲酸等。AJ肽與上述多肽可經由 ϵ -胺基己酸而連結，又，KLH與上述多肽可經由半胱胺酸等肽連接子而連結。AJ肽與上述多肽可經由 ϵ -胺基己酸及/或肽連接子而連結。

【0050】 作為偶聯物之具體例，可例舉：表1所示之AJ-p54、AJ-p150、AJ-p283、AJ-p54-KLH、KLH-AJ-p54、KLH-p54、p54-KLH、AJ-p142、AJ-p167、AJ-p227、AJ-p233、AJ-p272、AJ-p273、AJ-p276、AJ-p277、表5所示之AJ-p242、AJ-p244、AJ-p347、AJ-p361、AJ-p229、AJ-p237、AJ-p298。其中，尤其是AJ-p54、AJ-p150、AJ-p167、AJ-p227、AJ-p272、AJ-p276、AJ-p283、AJ-p242、AJ-p244、AJ-p229對於 α 突觸核蛋白寡聚物之中和抗體誘導能力較高而可較佳地使用。

【0051】 偶聯物可藉由對於業者而言已知之方法進行製作。於偶聯物為融合蛋白之情形時，可藉由下述方式獲得作為融合蛋白之偶聯物：以上述方式藉由PCR法製作編碼多肽與載體蛋白視情況經由肽連接子功能性連結而成之融合蛋白之核酸，使該核酸與表現啟動子功能性地連結，並導入至適當之表現載體，從而於宿主細胞中表現。又，於融合蛋白具有較短之胺基酸序列之情形時，亦可藉由公知之肽合成方法(例如固相合成法)利用人工合成進行製作。

【0052】於經由化學連接子連結之偶聯物之情形時，可藉由分別製作肽及載體蛋白後，使其連結而進行製作。例如可藉由下述方式獲得：分別製作作為抗原決定位之多肽及載體蛋白，附加保護基後，經由化學連接子(例如 ϵ -胺基己酸)連結，進行縮合及脫保護。作為保護基，可例舉tBOC(第三丁氧基羰基)、FMOC(苄基-甲氧基-羰基)等。作為縮合劑，例如可使用DCC(N,N'-二環己基碳二醯亞胺)、EDC((N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳二醯亞胺)等碳二醯亞胺系化合物、CDI(1,1'-羰基二咪唑)等咪唑系化合物、BOP(六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基三(二甲基胺基)磷)等磷鹽系化合物、HBTU(六氟磷酸O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-脲鎗)、HCTU(六氟磷酸O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-脲鎗)等脲鎗鹽系化合物等。

【0053】 [抗體]

一實施方式提供一種與作為人類 α 突觸核蛋白(α Syn)之抗原決定位(包含模擬表位)之多肽特異性結合之抗體。本實施方式之抗體用於預防、改善、或治療神經退化性疾病。

【0054】此處，神經退化性疾病可為與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病。 α 突觸核蛋白之累積尤其指 α 突觸核蛋白之凝集體(亦稱為「凝集型 α 突觸核蛋白」或「 α 突觸核蛋白寡聚物」)向神經細胞、神經纖維或神經膠細胞之累積，作為與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病，可例舉：帕金森氏症(PD)、路易體型癡呆症(DLB)、多系統萎縮症(MSA)、單純自律神經失調(PAF)、伴有腦內鐵累積之神經退化症(NBIA)等共核蛋白病，尤其可例舉帕金森氏症。因此，本實施方式之抗體較佳為不僅可與 α Syn單體特異性結合，亦可與凝集型 α 突觸核蛋白特異性結合。

【0055】 抗體可藉由公知之方法，利用上述多肽或上述偶聯物或者下述之醫藥組合物(疫苗)對哺乳類動物進行免疫，藉此自免疫血清中獲取。再者，免疫時，投予量或投予間隔度可如下述之[醫藥組合物]中所記載。作為哺乳類動物，可例舉：人類、中國倉鼠、小鼠、大鼠、兔、狗、豬、猴、山羊、馬等哺乳類動物。因此，抗體可為來自該等哺乳類動物之抗體，尤佳為人類抗體(人類型抗體)。又，亦可為嵌合抗體、人類化抗體。嵌合抗體例如可包含來自某動物種之可變區、及來自其他動物種之恆定區。例如，嵌合抗體可為具有來自小鼠單株抗體之可變區、及來自人類抗體之恆定區之抗體(人類化抗體)。

【0056】 抗體可為單株抗體，亦可為多株抗體，但較佳為單株抗體。又，抗體可為全長之抗體(天然抗體)，亦可為抗原結合片段。作為天然抗體，可選自由IgG、IgM、IgA、IgD、及IgE所組成之群。作為抗原結合片段，可例舉：(i)Fab片段，其係包含V_L、V_H、C_L、及C_{H1}域之一價片段；(ii)F(ab')₂片段，其係包含藉由鉸鏈區中二硫鍵橋接而連結之2個Fab片段之二價片段；(iii)包含V_H及C_{H1}域之Fd片段；(iv)包含1條臂之抗體之V_L及V_H之Fv片段；或(v)包含V_H域之dAb片段。

【0057】 本實施方式之抗體係以用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之有效量投予。投予對象可為人類等哺乳類動物，尤佳為人類。投予量及投予間隔係依賴於對象中之抗體之半衰期而變動。作為投予量，例如為0.0001 mg/kg～100 mg/kg體重即可，例如亦可為0.01 mg/kg～10 mg/kg體重、或者0.1～10 mg/kg。投予間隔並無特別限定，可為2週1次、1個月1次、3～6個月1次、1年1次、或2～5年1次。投予間隔可為不定期之投予間隔，即如監測對象之血漿中之抗α突觸核蛋白抗體之濃度，

於低於某閾值(例如1~1000 µg/ml之血漿抗體濃度)之情形時進行投予。又，可為1種抗體，亦可將具有不同之結合特異性之2種以上之單株抗體同時或交替投予。投予路徑並無特別限定，可例舉：經口、非經口、局部、靜脈內、皮下、動脈內、顱內、蛛網膜下、腹腔內、鼻內、肌內等路徑。

【0058】 [核酸、表現載體、重組細胞]

一實施方式提供一種編碼上述多肽或作為融合蛋白之偶聯物之核酸。本實施方式之核酸用於預防、改善、或治療神經退化性疾病。此處，神經退化性疾病如上所述。

【0059】 本實施方式之核酸係編碼上述多肽或作為融合蛋白之偶聯物之核酸，可為DNA亦可為RNA。核酸可以上述方式藉由PCR來製作，又，亦可人工合成。

【0060】 一實施方式之表現載體包含編碼上述多肽或作為融合蛋白之偶聯物之核酸。該表現載體只要為可於宿主細胞中自主複製之載體及/或可組入至宿主細胞之染色體之載體，且可轉錄、表現上述核酸之載體，則並無特別限定。於使用細菌等原核生物作為宿主細胞之情形時，表現載體較佳為除上述核酸以外，進而包含啟動子、核糖體結合序列、及轉錄終止序列，進而亦可包含控制啟動子之基因。此種載體可為公知之載體，業者可根據宿主細胞選擇適當之載體。

【0061】 作為表現載體，可使用反轉錄病毒系統、腺病毒載體、腺相關病毒載體、來自包含牛痘病毒及禽痘病毒之痘病毒科之病毒載體、來自α病毒屬之病毒載體、委內瑞拉馬腦炎病毒、棒狀病毒等。

【0062】 可將編碼多肽或作為融合蛋白之偶聯物之核酸、或者包含該核酸之表現載體封入至脂質體中。亦可使編碼多肽或作為融合蛋白之偶

聯物之核酸、或者包含該核酸之表現載體吸附於粒子狀載體(例如聚甲基丙烯酸甲酯聚合物)或與其結合。

【0063】 亦可向對象投予用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之有效量之編碼多肽或作為融合蛋白之偶聯物之核酸、包含該核酸之表現載體、封入有該核酸或表現載體之脂質體、或者擔載有該核酸或表現載體之粒子狀載體。投予路徑並無特別限定，可例舉：經口、非經口、局部、靜脈內、皮下、動脈內、顱內、蛛網膜下、腹腔內、鼻內、肌內等路徑。作為投予量，例如以編碼多肽或作為融合蛋白之偶聯物之核酸之量進行換算，為0.0001 mg~100 mg即可，例如亦可為0.001 mg~10 mg。投予間隔並無特別限定，可為2週1次、1個月1次、3~6個月1次、1年1次、或2~5年1次。於對象中，藉由核酸之表現，於體內產生抗原決定位，誘導出與抗原決定位特異性結合之抗體。因此，投予間隔亦可為不定期之投予間隔，即如監測對象之血漿中之抗 α 突觸核蛋白抗體之濃度，於低於某閾值(例如1~1000 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿抗體濃度)之情形時進行投予。

【0064】 一實施方式之重組細胞係利用上述表現載體將宿主細胞進行轉形而獲得之重組細胞。於重組細胞中，上述核酸或表現載體可組入至基因組，亦可以可自主複製之質體之形式存在，上述核酸以可轉錄之狀態包含於其中。宿主細胞可為原核生物、酵母、動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞等任一種，但較佳可為原核生物或酵母菌株。例如可例舉：大腸桿菌(*Escherichia coli*)等原核生物、釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)等酵母菌株。可使用本實施方式之重組細胞，製造上述多肽或作為融合蛋白之偶聯物。

【0065】 [醫藥組合物]

一實施方式之醫藥組合物係含有上述實施方式之多肽或上述實施方式之偶聯物之醫藥組合物。本醫藥組合物可為用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之醫藥組合物，尤佳為疫苗。

【0066】 本實施方式之醫藥組合物之劑型例如可為液狀、粉末狀(冷凍乾燥粉末、乾燥粉末)、膠囊狀、錠劑、冷凍狀態。

【0067】 本實施方式之醫藥組合物亦可包含作為醫藥可容許之載體。作為上述載體，可為通常用於製造疫苗之載體，具體而言，可例舉：鹽水、緩衝鹽水、葡萄糖、水、甘油、等張水性緩衝液及其等之組合。疫苗亦可進而適宜調配乳化劑、保存劑(例如硫柳汞)、等張劑、pH值調整劑、去活化劑(例如福馬林)等。

【0068】 為了提高疫苗之免疫原性，亦可進而包含佐劑。作為佐劑，例如可例舉：鋁佐劑或包含角鯊烯之水中油型乳濁佐劑(AS03、MF59等)、CpG及3-O-去醯基化-4'-單磷醯脂質A(MPL)等類鐸受體(Toll-like receptor)之配體、皂苷系佐劑、聚 γ -麩胺酸等聚合物系佐劑、聚葡萄糖胺糖及菊糖等多糖類，具體而言，可例舉氫氧化鋁(明礬)、CFA(Complete Freund's adjuvant，弗氏完全佐劑)(DIFCO)等。

【0069】 本實施方式之醫藥組合物可藉由除上述多肽或上述偶聯物以外，視需要與載體、佐劑等混合而進行製造。佐劑亦可為於使用時混合者。

【0070】 本實施方式之醫藥組合物之投予對象係哺乳類動物，尤其是人類。本實施方式之醫藥組合物之投予路徑例如可為經皮投予、舌下投予、點眼投予、皮內投予、肌內投予、經口投予、經腸投予、經鼻投予、靜脈內投予、皮下投予、腹腔內投予、從口入肺之吸入投予。

【0071】 本實施方式之醫藥組合物之投予方法例如可為藉由注射器、經皮貼片、顯微操作用針、可移植之緩釋性器件、附顯微操作用針之注射器、無針裝置、噴霧進行投予之方法。

【0072】 本實施方式之醫藥組合物係用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之醫藥組合物，此處，神經退化性疾病可為與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病。 α 突觸核蛋白之累積尤其指 α 突觸核蛋白之凝集體(亦稱為「凝集型 α 突觸核蛋白」或「 α 突觸核蛋白寡聚物」)向神經細胞、神經纖維或神經膠細胞之累積，作為與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病，可例舉：帕金森氏症(PD)、路易體型癡呆症(DLB)、多系統萎縮症(MSA)、單純自律神經失調(PAF)、伴有腦內鐵累積之神經退化症(NBIA)等共核蛋白病，尤其可例舉帕金森氏症。作為其他神經退化性疾病，起因於 τ 蛋白及 β 澱粉樣蛋白(A β)之腦內沈積之阿茲海默症(AD)、及起因於TDP-43蛋白質之凝集體之腦內沈積之肌萎縮性側索硬化症(ALS)由於 α 突觸核蛋白與該等蛋白質之凝集相關，故而亦被認為係與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病。

【0073】 本實施方式之醫藥組合物較佳為包含有效量之上述多肽或上述偶聯物，以上述多肽之量進行換算，包含0.0001 mg~1000 mg、較佳為0.001 mg~1000 mg、進而較佳為0.1 mg~100 mg之量之多肽。

【0074】 藉由向對象投予本實施方式之醫藥組合物，於對象中誘導抗人類 α 突觸核蛋白抗體，該抗體不僅與人類 α 突觸核蛋白單體特異性結合，亦與人類 α 突觸核蛋白寡聚物特異性結合。藉此，可預防、改善、或治療起因於 α 突觸核蛋白之凝集體之神經退化性疾病。

【0075】 本實施方式之醫藥組合物之投予次數及投予間隔並無特別

限定，可為單次投予，亦可隔開數天至數個月之間隔而投予複數次。本實施方式之醫藥組合物之1次之投予量可根據投予對象、投予方法等而適宜調整，為0.0001 mg~1000 mg、較佳為0.001 mg~1000 mg、進而較佳為0.1 mg~100 mg。本實施方式之醫藥組合物之有效性可藉由檢測投予對象中之血清中之抗人類 α 突觸核蛋白抗體而進行評價。

【0076】 另一實施方式之醫藥組合物係含有上述實施方式之核酸或表現載體之醫藥組合物。本實施方式之醫藥組合物可為用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之醫藥組合物，尤佳為疫苗。上述核酸或上述表現載體可為封入有上述核酸或表現載體之脂質體、或者擔載有上述核酸或表現載體之粒子狀載體之形態，其有效量(投予量)、投予路徑、投予間隔如上述[核酸、表現載體、重組細胞]中所記載。本實施方式之醫藥組合物之劑型例如可為液狀、粉末狀(冷凍乾燥粉末、乾燥粉末)、膠囊狀、錠劑、冷凍狀態。本實施方式之醫藥組合物亦可包含作為醫藥可容許之載體。

【0077】 又一實施方式之醫藥組合物係含有上述實施方式之抗體之醫藥組合物。本實施方式之醫藥組合物係用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之醫藥組合物，投予量、投予路徑及投予間隔等如上述[抗體]中所記載。本實施方式之醫藥組合物之劑型例如可為液狀、粉末狀(冷凍乾燥粉末、乾燥粉末)、膠囊狀、錠劑、冷凍狀態。本實施方式之醫藥組合物亦可包含作為醫藥可容許之載體。

【0078】 [用途、方法]

本發明之一實施方式提供一種上述實施方式之多肽或上述實施方式之偶聯物之用途，其係用於製造用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之疫苗。

【0079】本發明之一實施方式提供一種用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之方法，其包括將有效量之上述實施方式之多肽或上述實施方式之偶聯物投予至需要其之對象(例如神經退化性疾病之患者或需要預防神經退化性疾病之對象)。

【0080】本發明之一實施方式提供一種上述實施方式之核酸、上述實施方式之表現載體、上述實施方式之重組細胞、或上述實施方式之抗體之用途，其係用於製造用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之醫藥組合物。

【0081】本發明之一實施方式提供一種用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之方法，其包括將有效量之上述實施方式之核酸、上述實施方式之表現載體、或上述實施方式之抗體投予至需要其之對象(例如神經退化性疾病之患者或需要預防神經退化性疾病之對象)。

【0082】本發明之一實施方式提供一種上述實施方式之多肽、上述實施方式之偶聯物、上述實施方式之核酸、上述實施方式之表現載體、或上述實施方式之抗體，其用於預防、改善、或治療神經退化性疾病。

【0083】以下舉出實施例詳細地說明本發明，但本發明完全不受限於該等實施例。

[實施例]

【0084】實施例1 各種人類 α Syn之抗原決定位肽及偶聯物之製作
藉由RB Merrifield等人所報告之固相合成法(J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 14, 2149-2154)，合成以下之各種人類 α Syn之抗原決定位肽(包含模擬表位)、AJ肽。具體而言，依據文獻「Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce (1984)」、「Fmoc solid synthesis: a practical approach,

Oxford University Press (2000)」及「第5版 實驗化學講座16 有機化合物之合成IV、日本化學會編、2005年」等中所記載之方法，使用全自動固相合成機，利用Fmoc法合成保護肽樹脂。於所獲得之保護肽樹脂中加入三氟乙酸(TFA)及清除劑(硫代苯甲醚、乙二硫醇、苯酚、三異丙基矽烷、水等之混合物)，自樹脂中切出並進行脫保護，獲得粗肽。針對該粗肽，使用逆相HPLC(high performance liquid chromatography，高效液相層析)管柱(ODS)，利用0.1%TFA-H₂O/CH₃CN之系統進行梯度溶出，進行純化。收集包含目標物之組分並進行冷凍乾燥，獲得目標之肽。所合成之肽之胺基酸序列係使用胺基酸定序儀G1000A(Hewlett Packard)、PPSQ-23A(島津製作所)或ProcisLC(ABI公司)進行確認，使所獲得之肽之N末端乙酰化。

p54(序列編號14之96-104aa)：KKDQLGKNE(序列編號1)

p150(序列編號14之123-131aa)：EAYEMPSEE(序列編號2)

p283(序列編號14之123-132aa、E131D)：EAYEMPSEDG(序列編號3)

p142(序列編號14之96-104aa、K102A)：KKDQLGANE(序列編號4)

p167(序列編號14之96-105aa)：KKDQLGKNEE(序列編號5)

p227(序列編號14之96-104aa、K97R)：KRDQLGKNE(序列編號6)

p233(序列編號14之96-104aa、E104D)：KKDQLGKND(序列編號7)

p272(序列編號14之96-104aa、D98N、E104D)：KKNQLGKND(序列編號8)

p273(序列編號14之96-104aa、D98T、E104D)：KKTQLGKND(序列編號9)

p276(序列編號14之123-132aa、E123D)：DAYEMPSEEG(序列編號
10)

p277(序列編號14之123-132aa、Y125F)：EAFEMPSEEG(序列編號
11)

DMPVDPDN(序列編號14之115-122aa)：DMPVDPDN(序列編號12)

AJ肽：ELKLIFLHRLKRLRKRLKRRK(序列編號13)

【0085】 繼而，製作下述表1所示之各種偶聯物。AJ-人類 α Syn肽偶聯物係使AJ肽(序列編號13)與上述合成之各種人類 α Syn之抗原決定位肽，附加保護基後，經由連接子之 ϵ -胺基己酸(ϵ -Acp)連結，進行縮合及脫保護，藉此製作表1所示之各種AJ-人類 α Syn肽偶聯物。進而，於連結有KLH(Sigma-Aldrich)之偶聯物之情形時，使作為連接子之半胱胺酸與KLH蛋白質之表面所存在之離胺酸殘基進行共價結合，藉此連結於人類 α Syn肽或AJ-人類 α Syn肽偶聯物，製作KLH-人類 α Syn肽偶聯物或KLH修飾型AJ-人類 α Syn肽偶聯物。

[表1]

偶聯物	胺基酸序列
AJ-p64	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKIQIGKNEE
AJ-p150	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXQIAYIIMPSIEE
AJ-p263	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXQIAYIIMPSIDG
KLII-AJ-p64	KLII-C-EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKIQIGKNEE
AJ-p64-KLII	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKIQIGKNEE-C-KLII
KLII-p64	KLII-C-KKIQIGKNEE
p64-KLII	KKIQIGKNEE-C-KLII
AJ-p142	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKIQIGANIEE
AJ-p167	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKIQIGKNEEE
AJ-p227	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKRIQIGKNEE
AJ-p233	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKIQIGKND
AJ-p272	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKNIQIGKND
AJ-p273	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXKKIQIGKND
AJ-p276	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXQIAYIIMPSIEEG
AJ-p277	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXQIAYIIMPSIEEG
KLII-DMPVDPDND	KLII-C-DMPVDPDND
AJ-DMPVDPDND	EEKIDFTHRIKRIEKRIKIKXQDMPVDPDND

X : e-Acp、C : 半胱胺酸、KLII : 匙孔螺血凝蛋白

[(0086)] 實施例2：AJ肽-人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力之研究(1)

使用實施例1中所製作之各種AJ肽-人類 α Syn肽偶聯物，評價於小鼠中對人類 α Syn之抗體誘導能力。將生理鹽水中之各種AJ-人類 α Syn肽偶聯物(250 μ g/隻)或KLII-DMPVDPDND(25 μ g/隻)以氣氧化鋁(明礬)(InvivoGen、50 μ g/隻)為佐劑，對balb/c小鼠(雌、6週齡、CLEA Japan)間隔2週肌內投予2次，從而進行免疫。作為陰性對照，投予2次等量之包含氣氧化鋁之生理鹽水(100 μ L/隻)。於自第2次投予起2週後回收血清，藉由ELISA評價針對人類 α Syn之抗體效價。

[(0087)] ELISA係利用以下之方法來實施。將人類 α Syn(Sigma)以0.2 μ g/孔塗佈於96孔板。利用PBST(包含0.05% Tween之磷酸鹽緩衝鹽水

(Phosphate Buffered Saline))洗淨1次後，利用3%脫脂乳(wako)進行封閉。利用PBST洗淨3次後，添加經稀釋之血清，於室溫下反應1小時。進而，利用PBST洗淨3次後，添加山羊抗小鼠IgG-HRP(horseradish peroxidase，辣根過氧化物酶)(abcam)並於室溫下反應1小時。利用PBST洗淨3次後，加入SureBlue TMB微孔過氧化物酶底物(Microwell Peroxidase Substrate)(KPL)並於室溫下一面遮光一面反應10分鐘。添加等量之TMB停止溶液(Stop Solution)(KPL)使反應停止，測定450 nm之吸光度。針對凝集型人類 α Syn之ELISA係於上述方法中以15 ng/孔塗佈凝集型人類 α Syn(Stress Marq)代替人類 α Syn來實施。

【0088】將結果示於表2。根據表2，確認到藉由投予各種AJ-人類 α Syn肽偶聯物，而於小鼠血清中誘導出針對人類 α Syn之抗體。又，關於專利文獻2中所記載之KLH-DMPVDPDN，亦確認到針對人類 α Syn之抗體之誘導。又，對於凝集型人類 α Syn，確認到AJ-p167、AJ-p227、AJ-p272及AJ-p283具有特別強之抗體誘導能力，但利用KLH-DMPVDPDN之抗體誘導能力非常弱。

[表2]

表2.人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn之抗體誘導能力

抗原	針對人類 α Syn之抗體效價 (N=4-6、平均 \pm 標準偏差)	針對凝集型人類 α Syn之抗體效價 (N=4-6、平均 \pm 標準偏差)
生理鹽水	8 \pm 0	16 \pm 0
AJ-p54	4096 \pm 2896	768 \pm 862
AJ-p142	4693 \pm 6431	576 \pm 732
AJ-p150	2176 \pm 1471	576 \pm 322
AJ-p167	2389 \pm 1399	1664 \pm 1409
AJ-p227	4267 \pm 3200	3072 \pm 2748
AJ-p233	1323 \pm 1505	555 \pm 377
AJ-p272	4096 \pm 2896	1536 \pm 1724
AJ-p273	3328 \pm 3278	704 \pm 896
AJ-p276	1792 \pm 512	896 \pm 256
AJ-p277	1920 \pm 1585	576 \pm 322
AJ-p283	2304 \pm 1289	1152 \pm 644
KLH-DMPVDPDN	5461 \pm 2365	208 \pm 205

【0089】 實施例3：AJ-人類 α Syn肽偶聯物及KLH修飾型AJ-人類 α Syn肽偶聯物之抗體誘導能力之研究

使用實施例1中所製作之KLH-人類 α Syn肽偶聯物(KLH-p54及p54-KLH)、進而KLH-AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54-KLH、KLH-AJ-p54)，與實施例2同樣地評價該等偶聯物於小鼠中對人類 α Syn之抗體誘導能力。作為比較，使用AJ-p54。

【0090】 將結果示於表3。根據表3，確認到於使用AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54)及KLH修飾型AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54-KLH、KLH-AJ-p54)之任一種疫苗之情形時，均同程度地誘導出針對人類 α Syn之抗體。關於KLH修飾型AJ-人類 α Syn肽偶聯物，於KLH連結於N末端之情形及連結於C末端之情形時抗體效價均未見差異。又，於僅連結有KLH且未連結有AJ肽(KLH-p54、p54-KLH)之情形時，誘導出針對人類 α Syn之抗體，於KLH連結於N末端之情形及連結於C末端之情形時抗體效價均未見差異。

[表3]

表3.AJ-人類 α Syn肽偶聯物及KLH修飾型AJ-人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn之抗體誘導能力

名稱	抗體效價 (N=4-6、平均 \pm 標準偏差)
生理鹽水	8 \pm 0
AJ-p54	1434 \pm 1510
AJ-p54-KLH	1621 \pm 681
KLH-AJ-p54	1707 \pm 1240
KLH-p54	4096 \pm 2243
p54-KLH	3072 \pm 2748

【0091】 實施例4：AJ-人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力之研究(2)

評價實施例1中所製作之AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54、AJ-p54-KLH、AJ-DMPVDPDN)於小鼠中對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力。利用生理鹽水、AJ-人類 α Syn肽偶聯物(250 μ g/隻)，將明礬(InvivoGen、50 μ g/隻)作為佐劑，對balb/c小鼠(雌、6週齡、CLEA Japan)間隔2週肌內投予2次。又，KLH-DMPVDPDN(25 μ g/隻)係將明礬(InvivoGen、50 μ g/隻)作為佐劑而進行投予。於自第2次投予起2週後回收血清，藉由ELISA評價抗體效價。ELISA係利用實施例2中所記載之方法進行。

【0092】將結果示於表4。根據表4，確認到於小鼠中AJ-p54及AJ-p54-KLH誘導出針對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體。然而，KLH-DMPVDPDN誘導出針對人類 α Syn之抗體，但未誘導出針對凝集型人類 α Syn之抗體。又，AJ-DMPVDPDN對於針對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體之任一者均顯示非常弱之抗體誘導作用。

[表4]

表4. AJ-人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力

名稱	針對人類 α Syn之抗體效價 (平均 \pm 標準偏差)	針對凝集型人類 α Syn之抗體效價 (平均 \pm 標準偏差)
生理鹽水	8 \pm 0	16 \pm 0
AJ-p54	1434 \pm 1510	768 \pm 296
AJ-p54-KLH	1621 \pm 681	640 \pm 314
KLH-DMPVDPDN	1792 \pm 1536	36 \pm 20
AJ-DMPVDPDN	168 \pm 122	358 \pm 140

【0093】實施例5：藉由AJ-人類 α Syn肽偶聯物於小鼠中所誘導出之抗體之人類 α Syn中和作用之研究

評價實施例1中所製作之AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54)於小鼠中所誘導出之抗體之凝集型人類 α Syn之中和作用。利用生理鹽水、AJ-人類 α Syn肽偶聯物(250 μ g/隻)，將CFA(DIFCO)作為佐劑，對C57BL/6小鼠

(雄、6週齡、CLEA Japan)間隔2週肌內投予4次。又，KLH-DMPVDPDN(25 µg/隻)係將明礬(InvivoGen、50 µg/隻)作為佐劑而進行投予。於自第4次投予起2週後回收血清。藉由蛋白G HP SpinTrap(Cytiva)回收血清中所含之抗體後，利用以下所述之方法評價人類αSyn及凝集型人類αSyn之中和作用。

【0094】 作為人類αSyn或凝集型人類αSyn之中和作用，評價對SH-SY5Y細胞(ATCC)之人類αSyn之磷酸化所產生之影響。將SH-SY5Y細胞以 2×10^4 cells/孔接種至96孔板，於37°C、5%CO₂之條件下進行培養。第二天，添加不同濃度(5、10、20、25 µg/mL)之人類αSyn(wako)或凝集型人類αSyn(Stress Marq)，進而培養3天。利用4%多聚甲醛-磷酸緩衝液(wako)將細胞固定後，藉由螢光標記抗磷酸化αSyn抗體(Cell Signaling)將磷酸化人類αSyn染色。藉由使用陣列掃描(Array Scan)(Thermo)之圖像解析評價磷酸化人類αSyn之量。

【0095】 將結果示於圖1A(N=3、平均±標準誤差)。於添加有凝集型人類αSyn之SH-SY5Y細胞中觀察到人類αSyn之磷酸化，但於添加有人類αSyn之SH-SY5Y細胞中未確認到人類αSyn之磷酸化。

【0096】 因此，研究添加有凝集型人類αSyn之SH-SY5Y細胞中之人類αSyn之磷酸化抑制。將凝集型人類αSyn與上述所獲得之疫苗誘導抗體(100 µg/mL)或陽性對照抗體混合，於室溫下振盪1小時。作為陽性對照之抗體，使用抗-α-突觸核蛋白絲抗體(Anti-Alpha-synuclein filament antibody)(abcam、純系 MJFR-14-6-4-2、10 µg/mL)(稱為MJFR)。將混合所得者添加至SH-SY5Y細胞，於37°C、5%CO₂條件下培養1天，與上述同樣地測定磷酸化人類αSyn之量。

【0097】 將其結果示於圖1B(N=3、平均±標準誤差)。圖1B中，磷酸化人類 α Syn之量係將添加有同型對照之情形設為100來表示。於添加有AJ-p54及KLH-DMPVDPDN所誘導出之抗體之SH-SY5Y細胞中，人類 α Syn之磷酸化得到抑制。於本研究中所使用之凝集型人類 α Syn中存在一部分單體，認為與凝集型處於平衡關係。因此，來自對單體之抗體誘導作用較強之KLH-DMPVDPDN之抗體亦有抑制磷酸化之可能性。根據以上之結果，可明確該等疫苗所誘導出之抗體具有凝集型人類 α Syn之中和作用。

【0098】 實施例6：人類 α Syn過度表現小鼠中之人類 α Syn傳遞抑制作用

調查AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54、AJ-p150)所誘導出之抗體對帕金森氏症模型小鼠之腦內之人類 α Syn之量所產生之影響。利用生理鹽水、AJ-人類 α Syn肽偶聯物(250 μ g/隻)，將CFA(DIFCO)作為佐劑，對人類 α Syn過度表現小鼠(16週齡)間隔2週肌內投予4次。又，KLH-DMPVDPDN(25 μ g/隻)係將明礬(InvivoGen、50 μ g/隻)作為佐劑而進行投予。人類 α Syn過度表現小鼠係使用依據非專利文獻4中所記載方法所製作者。於自第4次投予起2週後回收皮質及嗅球。藉由點漬墨法評價皮質及嗅球中之可溶性組分之人類 α Syn之量。

【0099】 樣品調整及點漬墨法係利用以下之方法來實施。將小鼠皮質及嗅球分別放入至陶瓷珠粒套組管CK14(M&S Instruments)，添加經冰浴冷卻之1% TritonX-100、10 mM Tris(三羥甲基胺基甲烷)-HCl(pH值7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid，乙二胺四乙酸)、蛋白酶磷酸酶抑制劑混合物(Protease and Phosphatase

Inhibitor Cocktail)(Thermo)。利用微粉碎機(Micro Smash) MS-100R(TOMY)於30秒、5,500rpm之條件下進行均質化。進而，利用BIORUPTOR(BM Equipment)進行超音波處理。於冰浴冷卻下靜置30分鐘後，以18,900×g、4°C進行20分鐘離心分離。回收上清液作為可溶性組分。使用BCA蛋白質分析套組(Protein Assay Kit)(Thermo)定量蛋白質濃度。

【0100】 於點漬墨法(Dot Blot)裝置(Bio-Dot、Bio-Rad)設置膜片並以0.5 μg/孔添加皮質及嗅球之可溶性組分，於室溫下靜置1小時後，進行抽吸過濾。添加Blocking One (Nacalai Tesque)並於室溫下靜置1小時後，進行抽吸過濾，藉此加以封閉。利用PBS進行洗淨後，添加抗- α -突觸核蛋白絲抗體(abcam、純系 MJFR-14-6-4-2)並於室溫下靜置2小時後，進行抽吸過濾。利用PBST進行洗淨後，添加羊抗兔IgG、HRP標記抗體(Cell Signaling)並於室溫下靜置1小時後，進行抽吸過濾。利用PBST進行洗淨後，使用Chemi-Lumi One Super(Nacalai Tesque)檢測化學發光。

【0101】 將結果示於圖2A(皮質)及圖2B(嗅球)(圖2A及圖2B中，於Welch's t-檢驗中，###：相對於WT， $p < 0.005$ ；於Dunnett's檢驗中，*：相對於媒劑， $p < 0.05$ ，**：相對於媒劑， $p < 0.01$ ，***：相對於媒劑， $p < 0.005$ ；媒劑：無抗原)。於皮質中，藉由投予AJ-p150而人類 α Syn之量顯著減少。進而，於嗅球中，藉由投予AJ-p54、AJ-p150、KLH-DMPVDPDN而人類 α Syn之量顯著減少。根據以上之結果，可明確AJ-人類 α Syn肽偶聯物於人類 α Syn過度表現小鼠中顯示人類 α Syn傳遞抑制作用。

【0102】 進而，利用西方墨點法解析皮質及嗅球之可溶性組分。具

體而言，針對皮質及嗅球之可溶性組分10 μg ，使用15-20%聚丙烯醯胺凝膠（富士膠片和光純藥）及 Tris/Tricine（三（羥甲基）甲基甘胺酸）/SDS（Sodium Dodecyl Sulfate，十二烷基硫酸鈉）緩衝液（Bio-Rad），實施 SDS-PAGE（Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis，十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳）。於Trans-Blot Turbo 微型0.2 μm PVDF（polyvinylidene fluoride，聚偏二氟乙烯）轉印包（Transfer Packs）（Bio-Rad）之膜片上放置凝膠，使用墨點裝置Trans-Blot Turbo（Bio-Rad），將蛋白質轉印至膜片。將膜片移至預先添加有4%多聚甲醛-磷酸緩衝液（富士膠片和光純藥）之容器中並於室溫下振盪30分鐘。將膜片於PBS中振盪5分鐘並洗淨3次後，添加Blocking One（Nacalai Tesque），於室溫下振盪30分鐘，藉此實施封閉。將利用經PBST稀釋10倍之Blocking One對1次抗體 α -突觸核蛋白單株抗體（alpha Synuclein Monoclonal Antibody）（純系：Syn211、Thermo）稀釋10,000倍所得之溶液加至膜片，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下振盪一晚。將膜片於PBST中振盪5分鐘並洗淨3次後，添加使用經PBST稀釋10倍之Blocking One稀釋20,000倍所得之2次抗體山羊抗小鼠IgG（H+L）交叉吸附二次抗體（Cross-Adsorbed Secondary Antibody），HRP（Thermo）溶液並於室溫下振盪1小時。將膜片於PBST中振盪5分鐘並洗淨3次後，使用Chemi-Lumi One Super（Nacalai Tesque）檢測化學發光。

【0103】 將結果示於圖3A（皮質）及圖3B（嗅球）（圖3A及圖3B中，於Welch's t-檢驗中，###：相對於WT， $p < 0.005$ ；於Dunnett's檢驗中，*：相對於媒劑， $p < 0.05$ ，***：相對於媒劑， $p < 0.005$ ；媒劑：無抗原）。於皮質中，藉由投予AJ-p150而人類 αSyn 之量顯著減少。進而，

於嗅球中，藉由投予AJ-p54、AJ-p150而人類 α Syn之量顯著減少，但藉由投予KLH-DMPVDPDN而未見人類 α Syn之量之顯著減少。

【0104】 實施例7：食蟹獼猴中之對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力之研究

評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於食蟹獼猴中對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力。利用AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54、AJ-p150、AJ-p283、AJ-p142、AJ-p273)2000 μ g/隻)及KLH-DMPVDPDN(75 μ g/隻)，將明礬(InvivoGen、200 μ g/隻)作為佐劑，對食蟹獼猴(雄、年齡3~7年、新日本科學)間隔2週肌內投予3次。於投予前及自初次投予起4、6、8、10週後分別採血，回收血清。ELISA係利用以下之方法來實施。

【0105】 將人類 α Syn(Sigma)或凝集型人類 α Syn(Stress Marq)分別以0.2 μ g/孔及15 ng/孔塗佈於96孔板。利用PBST洗淨1次後，利用3%脫脂乳(wako)加以封閉。利用PBST洗淨3次後，添加經稀釋之血清並於室溫下反應1小時。進而，利用PBST洗淨3次後，添加羊抗猴IgG-HRP (Bio-RAD)並於室溫下反應1小時反應。利用PBST洗淨3次後，加入SureBlue™ TMB微孔過氧化物酶底物(Microwell Peroxidase Substrate)(KPL)並於室溫下一面遮光一面反應10分鐘。添加等量之TMB停止溶液(Stop Solution)(KPL)使反應停止，測定450 nm之吸光度。

【0106】 將針對人類 α Syn之抗體效價示於圖4A，將針對凝集型人類 α Syn之抗體效價示於圖4B(N=3、平均 \pm 標準誤差)。任一種疫苗均誘導出針對人類 α Syn之抗體。關於針對凝集型人類 α Syn之抗體，KLH-DMPVDPDN及AJ-p273未誘導出，但其以外之疫苗均誘導出。

【0107】 實施例8：食蟹獼猴中所誘導出之抗體之人類 α Syn中和作

用之研究

評價AJ-人類 α Syn肽偶聯物於食蟹獼猴中所誘導出之抗體對凝集型人類 α Syn之中和作用。利用AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p54、AJ-p150、2000 μ g/隻)及KLH-DMPVDPDN(75 μ g/隻)，將明礬(InvivoGen、200 μ g/隻)作為佐劑，對食蟹獼猴(雄、年齡3~7年、新日本科學)間隔2週肌內投予3次。於自第3次投予起2週後回收血清。藉由蛋白G HP SpinTrap(Cytiva)回收血清中所含之抗體後，利用實施例5中所記載之方法評價凝集型人類 α Syn之中和作用。作為陽性對照之抗體，使用抗- α -突觸核蛋白絲抗體(Anti-Alpha-synuclein filament antibody)(abcam、純系MJFR-14-6-4-2、10 μ g/mL)(稱為MJFR)。

【0108】 將其結果示於圖5。圖5中，將添加有同型對照之IgG(100 μ g/mL)之情形時之磷酸化 α Syn之量設為100來表示。藉由任一種疫苗所誘導出之抗體均抑制了SH-SY5Y細胞中之人類 α Syn之磷酸化。根據以上情況，可明確該等疫苗所誘導出之抗體具有凝集型人類 α Syn之中和作用。

【0109】 實施例9：AJ-人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力之研究(3)

利用實施例1中所記載之方法，合成以下之肽，繼而，利用實施例1中所記載之方法製作下述表5所示之各種人類 α Syn肽偶聯物。

p150(序列編號14之123-131aa)：EAYEMPSEE(序列編號2)

p242(序列編號14之123-132aa、E123A)：AAYEMPSEEG(序列編號18)

p244(序列編號14之123-132aa、Y125A)：EAAEMPSEEG(序列編號19)

p347(序列編號14之123-132aa、E123E、Y125E) :
EIAFEIMPSEIEG(序列編號20)

p361(序列編號14之123-132aa、E123D、Y125E) :
DAIFEIMPSEIEG(序列編號21)

p54(序列編號14之96-104aa) : KKDQLGKNE(序列編號1)

p229(序列編號14之96-104aa、D98T) : KKIQQLGKNE(序列編號22)

p237(序列編號14之96-104aa、D98N) : KKNQLGKNE(序列編號23)

p298(序列編號14之96-104aa、Q99E、N103D) : KKDIELGKDE(序
列編號24)

[表5]

偶聯物	胺基酸序列
AJ-p150	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXIAFEIMPSEIE
AJ-p242	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXAAFEIMPSEIEG
AJ-p244	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXAAIMPSEIEG
AJ-p347	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXIAFEIMPSEIEG
AJ-p361	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXDAFEIMPSEIEG
AJ-p54	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXKKDQIGKNE
AJ-p229	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXKKIQIGKNE
AJ-p237	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXKKNQIGKNE
AJ-p298	EIKIIEFHRIKRIKIKIKIKKXKDEIGKDE

X: E、Acp

〔0110〕 針對所製作之各種人類 α Syn肽偶聯物，利用實施例2中所記載之方法，利用小鼠免疫血清之針對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體效價評價小鼠中之對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力。將其結果示於表6。表6中，AJ-p242、AJ-p244、AJ-p347、或AJ-p361之抗體效價係將作為對照之AJ-p150之抗體效價設為1(對數)來表示。又，AJ-p229、AJ-p237、AJ-p298之抗體效價係將作為對照之AJ-p54之抗體效價

設為1(對數)來表示。

[表6]

表6.人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力

名稱	針對人類 α Syn之抗體效價	針對凝集型人類 α Syn之抗體效價
AJ-p150	1	1
AJ-p242	1.06	1.12
AJ-p244	1.06	1.10
AJ-p347	0.97	0.97
AJ-p361	0.92	0.95
AJ-p54	1	1
AJ-p229	0.92	1.02
AJ-p237	0.91	0.95
AJ-p298	0.82	0.93

N=4

【0111】 根據表6，可明確所製作之各種AJ-人類 α Syn肽偶聯物(AJ-p242、AJ-p244、AJ-p347、AJ-p361、AJ-p229、AJ-p237、及AJ-p298)顯示與對照之AJ-人類 α Syn肽偶聯物之抗體效價同程度之抗體效價。

【0112】 實施例10：將連接子改型後之AJ-人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力之研究

針對AJ-p54及AJ-p150，將連接子部分進行改型，製作下述表7所示之將各種連接子改型後之AJ-人類 α Syn肽偶聯物。

[表7]

表7.將連接子改型後之AJ-人類 α Syn肽偶聯物

名稱	胺基酸序列
AJ-G p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKGKKIDQIGKNI
AJ-εK p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKεKIKIDQIGKNI
AJ-αK p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKαKIKIDQIGKNI
AJ-εKKK p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKεKKKIDQIGKNI
AJ-εKKKK p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKεKKKKIDQIGKNI
AJ-GGGGS p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKGGGSSKIDQIGKNI
AJ-EAAAK p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKEAAAKKIDQIGKNI
AJ-DDAKK p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKDDAKKKIDQIGKNI
AJ-PPDPD ⁺ p54	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKPPDPDPKIDQIGKNI
AJ-G p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKGIAYIMPSIE
AJ-εK p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKεKIAYIMPSIE
AJ-αK p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKαKIAYIMPSIE
AJ-εKKK p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKεKKKIAYIMPSIE
AJ-εKKKK p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKεKKKKIAYIMPSIE
AJ-GGGGS p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKGGGSIAYIMPSIE
AJ-EAAAK p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKEAAAKIAYIMPSIE
AJ-DDAKK p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKDDAKKIAYIMPSIE
AJ-PPDPD ⁺ p150	EIKIIEFHRIKRIEKRIKIKPPDPDPAYIMPSIE

εK：表示於離胺酸之ε位結合有AJ肽；

αK：表示於離胺酸之α位結合有AJ肽。

〔0113〕 針對將各種連接子改型後之AJ-人類αSyn肽偶聯物，利用小鼠免疫血清之針對人類αSyn及凝集型人類αSyn之抗體效價評價小鼠中之對人類αSyn及凝集型人類αSyn之抗體誘導能力。將其結果示於表8。表8中，將包括p54在內之各種連接子改型後之AJ-人類αSyn肽偶聯物之抗體效價係將作為對照之AJ-p54之抗體效價設為1(對數)來表示。又，將包括p150在內之各種連接子改型後之AJ-人類αSyn肽偶聯物之抗體效價係將作為對照之AJ-p150之抗體效價設為1(對數)來表示。

[表8]

表8.將連接子改型後之AJ-人類 α Syn肽偶聯物對人類 α Syn及凝集型人類 α Syn之抗體誘導能力

名稱	針對人類 α Syn之抗體效價	針對凝集型人類 α Syn之抗體效價
AJ-p54	1	1
AJ-G-p54	0.89	0.96
AJ- ϵ K-p54	0.70	0.81
AJ- α K-p54	0.99	0.92
AJ- ϵ KKK-p54	0.74	0.88
AJ- ϵ KKKK-p54	0.77	0.90
AJ-GGGGS-p54	1.05	1.02
AJ-EAAAK-p54	0.96	0.96
AJ-DDAKK-p54	1.03	0.98
AJ-PPDPDP-p54	0.89	0.88
AJ-p150	1	1
AJ-G-p150	0.96	0.95
AJ- ϵ K-p150	0.82	0.86
AJ- α K-p150	0.95	1.05
AJ- ϵ KKK-p150	0.79	0.90
AJ- ϵ KKKK-p150	0.97	1.00
AJ-GGGGS-p150	1.19	1.25
AJ-EAAAK-p150	1.14	1.16
AJ-DDAKK-p150	1.14	1.30
AJ-PPDPDP-p150	1.33	1.37

【0114】根據表8，確認到將各種連接子改型後之AJ-人類 α Syn肽偶聯物顯示與將 ϵ -Acp作為連接子之偶聯物即AJ-p54或AJ-p150同程度之抗體效價。根據以上之結果，可明確即便將連接子部分進行改型，該等AJ-人類 α Syn肽偶聯物亦會誘導抗體。

【序列表】

<110> 日商住友製藥股份有限公司(Sumitomo Pharma Co., Ltd.)

<120> 人類 α 突觸核蛋白之抗原決定位肽及包含該肽之醫藥組合物

<130> FP22-0475-00

<150> JP2021-101745

<151> 2021-06-18

<160> 26

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p54

<400> 1

Lys Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p150

<400> 2

Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p283

<400> 3

Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Asp Gly
1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p142

<400> 4

Lys Lys Asp Gln Leu Gly Ala Asn Glu
1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p167

<400> 5

Lys Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu
1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p227

<400> 6

Lys Arg Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p233

<400> 7

Lys Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Asp
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p272

<400> 8

Lys Lys Asn Gln Leu Gly Lys Asn Asp
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p273

<400> 9

Lys Lys Thr Gln Leu Gly Lys Asn Asp
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p276

<400> 10

Asp Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly
 1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p277

<400> 11

Glu Ala Phe Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly
 1 5 10

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DMPVDPDN

<400> 12

Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn
 1 5

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AJ肽

<400> 13

Glu Leu Lys Leu Ile Phe Leu His Arg Leu Lys Arg Leu Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Leu Lys Arg Lys
 20

<210> 14
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
 20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
 100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135 140

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 16

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 17

Asp Asp Ala Lys Lys

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p242

<400> 18

Ala Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly

1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p244

<400> 19

Glu Ala Ala Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p347

<400> 20

His Ala Phe Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p361

<400> 21

Asp Ala Phe Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> p229

<400> 22

Lys Lys Thr Gln Leu Gly Lys Asn Glu
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p237

<400> 23

Lys Lys Asn Gln Leu Gly Lys Asn Glu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p298

<400> 24

Lys Lys Asp Glu Leu Gly Lys Asp Glu
1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 25

Lys Lys Lys Lys
1

<210> 26

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 26

Pro Pro Asp Pro Asp Pro

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種多肽，其包含以下之任一胺基酸序列：

(a)序列編號1所表示之胺基酸序列；

(b)序列編號2所表示之胺基酸序列；及

(c)於序列編號1或序列編號2所表示之胺基酸序列中置換、缺失、附加及/或插入1個、2個或3個胺基酸所得之胺基酸序列。

【請求項2】

如請求項1之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號1所表示之胺基酸序列。

【請求項3】

如請求項1之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號2所表示之胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項1之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號4~9、及序列編號22~24之任一者所表示之胺基酸序列。

【請求項5】

如請求項1之多肽，其中上述胺基酸序列為序列編號3、序列編號10、序列編號11、及序列編號18~21之任一者所表示之胺基酸序列。

【請求項6】

一種偶聯物，其包含如請求項1至5中任一項之多肽及載體蛋白。

【請求項7】

如請求項6之偶聯物，其中上述載體蛋白為匙孔螺血氫蛋白(KLH)。

【請求項8】

如請求項6之偶聯物，其中上述載體蛋白為包含與序列編號13所表示之胺基酸序列相同或實質上相同之胺基酸序列之肽(AJ肽)。

【請求項9】

如請求項8之偶聯物，其中上述AJ肽與上述多肽經由 ϵ -胺基己酸及/或肽連接子而連結。

【請求項10】

如請求項9之偶聯物，其中上述肽連接子為包含1~6個L-胺基酸或其重複序列之肽連接子。

【請求項11】

如請求項8至10中任一項之偶聯物，其中上述偶聯物之N末端之胺基酸經乙醯化。

【請求項12】

如請求項8至11中任一項之偶聯物，其中上述偶聯物之C末端之胺基酸經醯胺化。

【請求項13】

一種醫藥組合物，其含有如請求項1至5中任一項之多肽或如請求項6至12中任一項之偶聯物。

【請求項14】

如請求項13之醫藥組合物，其進而包含佐劑。

【請求項15】

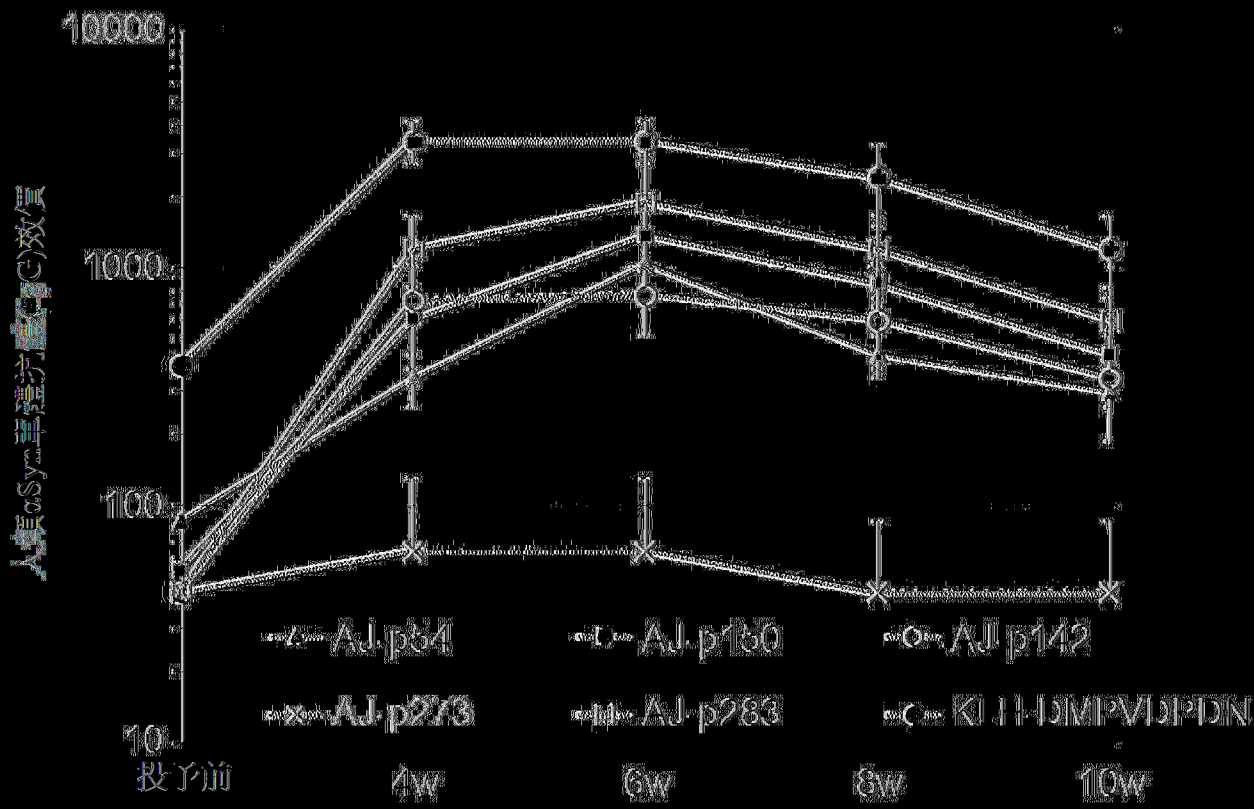
如請求項13或14之醫藥組合物，其係用以預防、改善、或治療神經退化性疾病之疫苗。

【請求項16】

如請求項15之醫藥組合物，其中上述神經退化性疾病係與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病。

【請求項17】

如請求項16之醫藥組合物，其中上述與 α 突觸核蛋白之累積相關之疾病係帕金森氏症。



(Fig. 1A)

