



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I806940 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：107145231

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 14 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61P25/16 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/15 英國

1720970.1

(71)申請人：比利時商 U C B 生物製藥公司 (比利時) UCB BIOPHARMA SRL (BE)
比利時(72)發明人：多尼 派翠克 DOWNEY, PATRICK (GB)；泰森 凱芮 路易斯 TYSON, KERRY
LOUISE (GB)；柯瑞克 馬可 KRIEK, MARCO (DE)；德利赫特費爾德 洛倫
佐 DE LICHTERVELDE, LORENZO (BE)；萊特伍 丹尼爾 約翰 LIGHTWOOD,
DANIEL JOHN (GB)；麥克米蘭 大衛 詹姆士 MCMILLAN, DAVID JAMES
(GB)；埃利奧特 彼得 ELLIOTT, PETER (GB)；貝克 泰倫斯 西瓦德 BAKER,
TERENCE SEWARD (GB)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 102869680A

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：26 項 圖式數：14 共 135 頁

(54)名稱

抗體

(57)摘要

本發明係關於結合 α 突觸核蛋白之抗體及其片段，其能夠結合作為單體及呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白及預防由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。本發明之抗體係用於治療 α 突觸核蛋白病，包括帕金森氏病(Parkinson's disease)。

The present invention relates to alpha synuclein binding antibodies and fragments thereof capable of binding alpha synuclein as a monomer and in fibrils and preventing alpha synuclein aggregation induced by alpha synuclein fibrils. The antibodies of the present invention are for use in the treatment of alpha synucleinopathies, including Parkinson's disease.



I806940

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES

【中文】

本發明係關於結合 α 突觸核蛋白之抗體及其片段，其能夠結合作為單體及呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白及預防由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。本發明之抗體係用於治療 α 突觸核蛋白病，包括帕金森氏病(Parkinson's disease)。

【英文】

The present invention relates to alpha synuclein binding antibodies and fragments thereof capable of binding alpha synuclein as a monomer and in fibrils and preventing alpha synuclein aggregation induced by alpha synuclein fibrils. The antibodies of the present invention are for use in the treatment of alpha synucleinopathies, including Parkinson's disease.

【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】

抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於抗 α 突觸核蛋白抗體及使用該等抗 α 突觸核蛋白抗體治療突觸核蛋白病之方法。特定言之，本發明係關於抗人類 α 突觸核蛋白抗體及其在治療帕金森氏病中之用途。

【先前技術】

【0002】 α 突觸核蛋白係根本上呈不同形式存在之可溶性小蛋白質，140個胺基酸長。 α 突觸核蛋白主要發現於突觸前神經末梢且儘管其準確功能尚未可知，但研究人員認為其在多個神經退化性過程中起中心作用。

【0003】 過去15年，已證實 α 突觸核蛋白在所有形式之帕金森氏病之發病機制中起重要作用。 α 突觸核蛋白基因之基因突變或基因增殖引起家族性早期發作帕金森氏病(PD)。有趣地，在基因座繁殖家系中，病原作用明顯依賴於基因量。基因複製引起相對早期發作形式之PD (約47歲)，其具有正常病程，而基因三倍化與極早發作年齡(約33歲)及極快速病程相關。在帕金森氏病之所有形式中， α 突觸核蛋白係疾病之關鍵病理標誌-路易體之主要成分。

【0004】 路易體病變在病程期間擴增，且提出 α 突觸核蛋白充當朊病毒樣蛋白，摺疊異常以形成有毒寡聚物及聚集體，其可自受影響神經元

擴散至不受影響的神經元(Olanow C.W等人 Movement Disorders, 第28卷, 第 1期, 2013)。當前存在的療法無法終止疾病擴散且僅輔助治療與運動神經元依賴性活動之進行性損失相關之症狀。在2014年, Tran H.T.等人(Tran H.T.等人, Cell Reports 7, 2054-2065, 2014年6月26日)證實, 向先前紋狀體內注射 α 突觸核蛋白預成型原纖維之小鼠腹膜內投與摺疊異常 α 突觸核蛋白之單株抗體減少路易體病變、改善黑質多巴胺激導性神經元損失及改善運動損傷。因此, 仍需要可在PD及其他突觸核蛋白病中發揮治療效果之被動免疫療法。

【發明內容】

【0005】 本發明藉由提供根據以下實施例之抗 α 突觸核蛋白抗體解決以上確認之需求。

【0006】 實施例1：一種與 α 突觸核蛋白結合之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含選自SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及

b. 重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；選自SEQ ID NO: 5之CDR-H2及選自SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【0007】 實施例2：如實施例1之抗體或其抗原結合片段，其中參考SEQ ID NO: 3位置6處之胺基酸殘基甘胺酸(Gly；G)經丙胺酸(Ala；A)置換。

【0008】 實施例3：如實施例1或2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合參考SEQ ID NO: 8在位置113與129之間的 α 突觸核蛋白之兩個或更多個胺基酸殘基，其中該抗體或其抗原結合片段至

少結合胺基酸殘基D119、N122及Y125。

【0009】 實施例4：如前述技術方案中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。

【0010】 實施例5：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段能夠結合作為單體及呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白。

【0011】 實施例6：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的結合親和力高於對呈單體形式之 α 突觸核蛋白之結合親和力，其特徵為對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白高至少10倍。

【0012】 實施例7：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的(K_D)為60pM或更小。

【0013】 實施例8：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體係嵌合、人類化或人類抗體。

【0014】 實施例9：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體係全長抗體。

【0015】 實施例10：如實施例9之抗體或其抗原結合片段，其中該全長抗體係選自IgG1、IgG4或IgG4P。

【0016】 實施例11：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗原結合片段係選自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dAb或V_{HH}。

【0017】 實施例12：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其片段包含：

- a. 根據SEQ ID NO: 13之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區；或
- b. 根據SEQ ID NO: 17之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區；或
- c. 根據SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區。

【0018】 實施例13：如實施例1至11中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其片段包含：

- a. 根據SEQ ID NO: 14之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；或
- b. 根據SEQ ID NO: 18之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；或
- c. 根據SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈。

【0019】 實施例14：一種經分離聚核苷酸，其編碼如實施例1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【0020】 實施例15：如實施例14之經分離聚核苷酸，其中該聚核苷酸編碼：

- a. 輕鏈可變區，其中該聚核苷酸：
 - i. 與SEQ ID NO: 15、19或23至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 15或19或23；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 15、19或23組成；或
- b. 重鏈可變區，其中該聚核苷酸：
 - iv. 與SEQ ID NO: 27至少90%一致；或
 - v. 包含SEQ ID NO: 27；或
 - vi. 基本上由SEQ ID NO: 27組成；或

- c. 輕鏈，其中該聚核苷酸：
 - vii. 與SEQ ID NO: 16、20或24至少90%一致；或
 - viii. 包含SEQ ID NO: 16、20或24；或
 - ix. 基本上由SEQ ID NO: 16、20或24組成；
- d. 重鏈，其中該聚核苷酸：
 - x. 與SEQ ID NO: 28至少90%一致；或
 - xi. 包含SEQ ID NO: 28；或
 - xii. 基本上由SEQ ID NO: 28組成。

【0021】 實施例16：一種選殖或表現載體，其包含一或多種如實施例14或15中任一項之聚核苷酸。

【0022】 實施例17：一種宿主細胞，其包含：

- a. 一或多種如實施例14或15中任一項之聚核苷酸或
- b. 一或多種如實施例16之表現載體。

【0023】 實施例18：一種用於產生如實施例1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段之方法，其包含在產生該抗體或其抗原結合片段之合適條件下培養如技術方案17之宿主細胞及分離該抗體或其抗原結合片段。

【0024】 實施例19：一種醫藥組合物，其包含如實施例1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段及一或多種醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑，其中該醫藥組合物包含一或多種額外活性成分。

【0025】 實施例20：如實施例1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段或如實施例19之醫藥組合物，其用於療法。

【0026】 實施例21：如實施例1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段或如實施例19之醫藥組合物，其用於治療一或多種突觸核蛋白病。

【0027】 實施例22：如實施例21所使用之抗體或其抗原結合片段，其中該突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(Diffuse Lewy Body Disease；DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(multiple system atrophy；MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。

【0028】 實施例23：如實施例22所使用之抗體或其抗原結合片段，其中該突觸核蛋白病係帕金森氏病。

【0029】 實施例24：一種治療患者中之突觸核蛋白病的方法，其包含向該患者投與治療有效量之如實施例1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段或如實施例19之醫藥組合物。

【0030】 實施例25：如實施例24之方法，其中該突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳係帕金森氏病。

【0031】 實施例26：如實施例1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段或如實施例19之醫藥組合物，其用於診斷突觸核蛋白病，較佳診斷帕金森氏病。

【圖式簡單說明】

【0032】

圖1.(A) α 突觸核蛋白表現之樣品之SDS-PAGE。具有His標籤(1)及在藉由TEV蛋白酶移除His標籤之後(2)的 α 突觸核蛋白，對經TEV蛋白酶

處理之人類 α 突觸核蛋白之Superdex 75尺寸排阻層析(3)。蛋白質分子量標記物SeeBluePlus2 (Invitrogen) (M)。(B)自Expi293上清液純化作為野生型未標記蛋白質之人類 α -突觸核蛋白之SDS-PAGE。(4)蛋白質分子量標記物SeeBluePlus2 (Invitrogen) (M)。

圖2. (A)無螢光之單體及在540 nm下具有最大螢光之原纖維藉由JC-1分析進行的原纖維分析。(B)單體人類 α -突觸核蛋白之無規螺旋光譜(波長 1646 cm^{-1})及重組人類 α 突觸核蛋白原纖維中之間 β 摺疊形成(波長 $1625\text{-}1630\text{cm}^{-1}$)的典型實例。

圖3.ELISA結合分析。(A)小鼠5811 Fab10HIS與重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維以及人類 α 突觸核蛋白之肽PVDPDNEAYE之ELISA結合及(B)小鼠5811 IgG1與重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維之ELISA結合。

圖4.(A)西方墨點法，展示兔5811 IgG1與人類 α -突觸核蛋白及人類 β -突觸核蛋白之結合。1.人類 α -突觸核蛋白；2.人類 α -突觸核蛋白(rPeptide)；3.人類 β -突觸核蛋白(rPeptide)；標記物.MagicMark XP。(B)NMR化學位移變化，展示人類 α 突觸核蛋白上所預測之小鼠5811 Fab之抗原決定基。

圖5.抑制5811 Fab與固定 α 突觸核蛋白之結合(對於每一種測試肽，分別地左側條柱對應單體且右側條柱對應原纖維)。

圖6.用於表徵抗原決定基之丙胺酸掃描之西方墨點法。(A)人類 α -突觸核蛋白之野生型及單一胺基酸突變體(His標記)之4-12% Bis/Tris NuPage分析。軌跡：M. SeeBluePlus2；1. h a-syn V118A；2. h a-syn D119A；3. h a-syn P120A；4. h a-syn D121A；5. h a-syn N122A；6. h

a-syn E123A ; 7. h a-syn A124S ; 8. h a-syn Y125A ; 9. h a-syn E126A ; 10. h a-syn M127A ; 11. h a-syn P128A ; 12及13 h a-syn野生型。PVDF墨點使用(B) 5811 mFab及(C) 5811 mIgG作為初級抗體。軌跡：M. SeeBluePlus2 ; 1. h a-syn V118A ; 2. h a-syn D119A ; 3. h a-syn P120A ; 4. h a-syn D121A ; 5. h a-syn N122A ; 6. h a-syn E123A ; 7. h a-syn A124S ; 8. h a-syn Y125A ; 9. h a-syn E126A ; 10. h a-syn M127A ; 11. h a-syn P128A ; 12 h a-syn wt (His標記) ; 13. MagicMark XP ; 14. h a-syn野生型(未標記)。

圖7.輕鏈人類化。5811對應大鼠可變輕鏈序列。5811gL5、5811gL8及5811gL14對應抗體5811可變輕鏈之人類化移植物，使用IGKV1-39人類生殖系作為受體架構。CDR以粗體/帶下劃線展示。供體殘基以粗體/斜體展示且加陰影：Y71。用以修飾潛在脫醯胺位點之CDR-L3的突變以粗體/帶下劃線及加陰影展示：G94A。

圖8.重鏈人類化。5811對應大鼠可變重鏈序列。5811gH4對應抗體5811可變重鏈之人類化移植物，使用IGHV3 -15人類生殖系作為受體架構。CDR以粗體/帶下劃線展示。供體殘基以粗體/斜體展示且加陰影：A49及A100。

圖9.免疫組織化學。來自(A-E) PD及(F-H)非PD患者之腦切片之免疫反應性。(A-C)在PD患者之顳葉皮質中，抗體5811 mIgG1標記一些細胞之神經纖維網及細胞質；觀測到偶發性路易體樣結構(白色箭頭)。(D、E)抗體5811 mIgG1標記PD患者之黑質中之路易體樣特徵(白色箭頭)。(F、G)在非PD顳葉皮質組織中，抗體5811 mIgG1亦標記神經纖維網，但未觀測到路易體樣結構。(H)在非PD個體之黑質中未觀測到路易體樣結構；黑

色箭頭指向非特異性標記，對應於含神經黑素之神經元及神經元纖維。比例尺=50 μm 。

圖10.基於細胞之聚集分析(HEK細胞)；本發明之抗體能夠抑制由 α -突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，其中 IC_{50} 低於5nM。誤差條表示量測之標準誤差(SEM，N=4，n=12)。

圖11.基於細胞之聚集分析(原代神經元)。根據本發明之抗體能夠抑制表現內源性含量之 α 突觸核蛋白之小鼠原代神經元上由 α 突觸核蛋白原纖維誘導的 α 突觸核蛋白聚集，其中 IC_{50} 低於5 nM。誤差條表示平均值之標準誤差(SEM，N=5，n=17)。

圖12.在注射有小鼠PFF之SNCA-OVX小鼠之不同腦區中， α 突觸核蛋白病變(箭頭)之免疫-組織化學圖像。

圖13.在大腦皮質、紋狀體及黑質中，SNCA-OVX小鼠之不同腦區中之 α 突觸核蛋白病變的量化。

圖14.野生型小鼠中之 α 突觸核蛋白抗體5811之藥物動力學概況。

【實施方式】

【0033】 現將參照特定的非限制性態樣及其實施例且參考某些圖及實例描述本發明。

【0034】 除非另外指示，否則技術術語係根據其常見含義使用。若向某些術語傳遞特定含義，則將在使用該等術語之上下文中給定術語之定義。

【0035】 若本發明說明書及申請專利範圍中使用術語「包含」，其不排除其他元件。出於本發明之目的，術語「由……組成(consisting of)」視為術語「包含(comprising of)」之較佳實施例。

【0036】 當提及單數名詞時，若使用不定冠詞或定冠詞，例如「一(a)」、「一(an)」或「該(the)」，則此包括複數個該名詞，除非具體陳述某物。

【0037】 如本文所用，術語「治療(treatment)」、「治療(treating)」及其類似術語係指獲得所要的藥理學及/或生理學效果。該效果就完全或部分預防疾病或其症狀而言可具預防性，且/或就部分或完全治癒疾病及/或可歸因於該疾病之不良影響而言可具治療性。因此療法涵蓋哺乳動物、尤其人類之疾病的任何療法，且包括：(a)預防可能易患該疾病、但尚未診斷出患有該疾病之個體中出現該疾病；(b)抑制該疾病，亦即阻滯其發展；以及(c)緩解該疾病，亦即促使該疾病消退。

【0038】 「治療有效量」係指抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段在投與哺乳動物或其他個體以治療疾病時足以產生對該疾病之該治療的量。治療有效量將視抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段、待治療之個體之疾病及其嚴重程度以及年齡、重量等而變化。

【0039】 在本說明書通篇，術語「分離的」意謂視具體情況而定，抗體、抗原結合片段或聚核苷酸存在於不同於其在自然界中所存在於之環境的物理環境中。

【0040】 本發明提供與 α 突觸核蛋白結合之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含選自SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及

b. 重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；選自SEQ ID NO: 5之CDR-H2及選自SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【0041】 在一個實施例中，參考SEQ ID NO: 3位置6處之胺基酸殘基甘胺酸(Gly；G)經丙胺酸(Ala；A)置換。

【0042】 α 突觸核蛋白(或 α syn； α -突觸核蛋白； α -syn或任何其他已知同義詞)係指此蛋白質之一般名稱，且包括但不限於選擇性剪接變異體、突變體及來自其他物種(小鼠、猴等)之 α 突觸核蛋白。除非另外規定，否則在需要或明確提及人類 α 突觸核蛋白時，該 α 突觸核蛋白包含SEQ ID NO: 8或Uniprot P37840中給出之序列。

```
MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGV
ATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEE
GAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ ID NO: 8)。
```

【0043】 如本文所用，術語『抗體』大體上係指完整(完全)抗體，亦即包含兩條重鏈及兩條輕鏈的元件。抗體可包含其他結合域，例如根據WO 2007/024715中所揭示的分子DVD-Ig，或WO2011/030107中所述的所謂(FabFv)₂Fc。因此，如本文所使用之抗體包括二價、三價或四價全長抗體。

【0044】 抗體之抗原結合片段包括單鏈抗體(亦即全長重鏈及輕鏈)；Fab、經修飾之Fab、Fab'、經修飾之Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、單域抗體(例如V_H或V_L或V_{HH})、scFv、雙價、三價或四價抗體、Bis-scFv、雙功能抗體、三功能抗體(tribodies)、三功能抗體(triabodies)、四功能抗體及以上任一者之抗原決定基-結合片段(參見例如Holliger及Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136；Adair及Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217)。用於產生及製造此等抗體片段之方法為此項技術中所熟知(參見例如Verma等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)。Fab-Fv形式最先在WO2009/040562中揭示且其二硫化物穩定型式Fab-dsFv最先在

第 11 頁(發明說明書)

WO2010/035012中揭示。用於本發明中之其他抗體片段包括國際專利申請案WO2005/003169、WO2005/003170及WO2005/003171中所述的Fab及Fab'片段。多價抗體可以包含多種特異性，例如雙特異性，或可以具單特異性(參見例如WO 92/22583及WO05/113605)。後者之一種該實例為如WO92/22583中所述之Tri-Fab (或TFM)。

【0045】 替代的抗原結合片段包含連接至兩個scFv或dsscFv之Fab，各scFv或dsscFv結合相同或不同標靶(例如一個scFv或dsscFv結合治療靶點且一個scFv或dsscFv藉由結合例如白蛋白增加半衰期)。該等抗體片段描述於國際專利申請公開案第WO2015/197772號中，其以全文引用之方式併入本文中且尤其參照抗體片段之討論。

【0046】 典型Fab'分子包含重鏈及輕鏈對，其中重鏈包含可變區VH、恆定域CH1及天然或經修飾之鉸鏈區且輕鏈包含可變區VL及恆定域CL。根據本發明之Fab'之二聚體產生F(ab')₂，其中例如二聚可經由鉸鏈。

【0047】 根據本發明之抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之抗原決定基結合。在本發明內，術語「抗原決定基」對於構形及線性抗原決定基而言可互換使用，其中構形抗原決定基由抗原之胺基酸一級序列之中斷部分構成且線性抗原決定基係藉由連續胺基酸所形成之序列形成。

【0048】 抗原決定基可藉由此項技術中已知之任何適合之抗原決定基定位方法結合本發明所提供之抗體中之任一者鑑別。該等方法之實例包括篩檢衍生自全長 α 突觸核蛋白之不同長度的肽以結合於本發明之抗體或其片段及鑑別最小片段，該最小片段可特異性結合於含有抗體識別之抗原決定基之序列的抗體。 α 突觸核蛋白肽可以合成方式或藉由蛋白分解消化 α 突觸核蛋白產生。結合抗體之肽可藉由例如質譜分析來鑑別。在另一實例

中，可用NMR光譜法或X射線結晶學鑑別本發明抗體所結合之抗原決定基。在鑑別後，抗原決定基可用於製備結合本發明之抗體之片段且必要時用作免疫原以獲得結合相同抗原決定基之額外抗體。

【0049】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段結合參考SEQ ID NO: 8在位置113與129之間的 α 突觸核蛋白之兩個或更多個胺基酸殘基。特定言之，抗體或其抗原結合片段至少結合參考SEQ ID NO: 8之胺基酸殘基D119、N122及Y125。

【0050】 較佳地，根據本發明之抗體或其抗原結合片段防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。

【0051】 在此特定情形內，術語「預防」(及其語法變異)在本文中可與術語「抑制」互換使用且指示根據本發明之抗體對於由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集所具有之作用。該效果就以下而言可為預防性的：完全或部分預防聚集；或完全或部分減少(亦即阻斷)已開始進一步進行之聚集，或完全或部分減少進一步聚集之出現；或完全或部分逆轉已出現之聚集。

【0052】 不希望受理論所束縛，咸信根據本發明之抗體或其抗原結合片段與以下 α 突觸核蛋白結合：

i) 呈單體形式之 α 突觸核蛋白結合且防止 α 突觸核蛋白形成寡聚物及聚集體；及/或

ii) 呈寡聚及原纖維形式之 α 突觸核蛋白且防止 α 突觸核蛋白在神經元之間擴散及/或

iii) 呈寡聚及原纖維形式之 α 突觸核蛋白及防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，較佳內源性 α 突觸核蛋白聚集。

【0053】如本文所用關於 α 突觸核蛋白之術語「原纖維」、「原纖維形式」或「呈原纖維形式」意欲指代 α 突觸核蛋白之非單體形式，包括 α 突觸核蛋白寡聚物，其可構成腦結構內及之間的擴散物種。

【0054】在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段能夠結合作為單體及呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白。在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白之結合親和力強於對作為單體之 α 突觸核蛋白之結合親和力。其特徵在於對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白之解離常數高至少10倍。

【0055】在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)小於60pM。在另一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數(K_D)小於30pM。

【0056】如本文所使用，術語「 K_D 」係指解離常數，由 K_d 與 K_a 之比率(亦即， K_d/K_a)得到且以莫耳濃度(M)表示。 K_d 及 K_a 分別係指特定抗原-抗體(或其抗原結合片段)相互作用之解離速率及締合速率。抗體之 K_D 值可使用此項技術中充分確立之方法測定。用於測定抗體之 K_D 之方法係藉由使用表面電漿子共振(諸如Biacore®系統，例如本文中之實例中所描述)，使用經分離之天然或重組 α 突觸核蛋白、其合適的融合蛋白/多肽或其原纖維。在一個實例中，親和力係使用如本文中之實例所描述之重組人類 α 突觸核蛋白來量測。對於表面電漿子共振，目標分子係固定於固相上且在沿流槽延伸之移動相中暴露於配位體。若發生配位體結合至固定目標，則局部折射率改變，導致SPR角之變化，其可藉由偵測反射光強度之變化而進行即時監測。可分析SPR信號之變化速率以對於結合反應之締合

及解離相產生表觀速率常數。此等值之比給出表觀平衡常數(親和力)(參見例如Wolff等人, *Cancer Res.* 53:2560-65(1993))。

【0057】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對呈原纖維之 α 突觸核蛋白之結合親和力高於對作為單體之 α 突觸核蛋白之結合親和力(亦即較小 K_D)。術語「親和力」係指抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之間的相互作用之強度。

【0058】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段阻斷或預防或減少由 α 突觸核蛋白誘導、較佳由呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白誘導之聚集。

【0059】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對阻斷由呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白誘導之聚集具有小於10nM之 IC_{50} ，較佳地，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對阻斷呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白誘導之聚集具有小於5nM之 IC_{50} 。

【0060】 如本文所用之術語 IC_{50} 係指半最大抑制濃度，其係物質(諸如抗體)在抑制特定生物或生物化學功能，本發明中由 α 突觸核蛋白(較佳呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白)誘導之聚集方面之效果之量度。 IC_{50} 係定量量度，其指示將指定生物過程抑制一半所需之特定物質。

【0061】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段不結合 β 突觸核蛋白及/或 γ 突觸核蛋白且對 α 突觸核蛋白具有特異性。

【0062】 如本文所採用之「特異性」意欲指代抗體僅識別對其具有特異性之抗原，或相比於與對其不具有特異性之抗原(γ 及 β 突觸核蛋白)的結合，抗體對對其具有特異性之抗原(例如 α 突觸核蛋白)的結合親和力更高，例如高至少5、6、7、8、9、10倍結合親和力。

【0063】 根據本發明之抗體可使用此項技術中已知之任何適合方法獲得。包括融合蛋白的 α 突觸核蛋白多肽/蛋白質、(以重組方式或天然地)表現多肽之細胞可用以製造特異性識別 α 突觸核蛋白的抗體。多肽可為『成熟』多肽或其生物學活性片段或衍生物。

【0064】 在一個實施例中，多肽(亦即抗原)係人類 α 突觸核蛋白單體或其片段，較佳如下文實例中所描述製備。

【0065】 用於免疫宿主之多肽可藉由此項技術中熟知之方法，自包含表現系統之經基因工程改造之宿主細胞製備，或其可自天然生物來源回收。在本申請案中，術語「多肽」包括肽、多肽及蛋白質。除非另外規定，否則此等互換地使用。 α 突觸核蛋白多肽或其片段在一些實例中可係較大蛋白質(諸如融合蛋白，例如與親和標籤或類似者融合之融合蛋白)之部分。

【0066】 在需要對動物進行免疫接種的情況下，可使用熟知且常規的方案，參見例如Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (編)，第4卷，Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986，藉由向動物、較佳非人類動物投與多肽來獲得針對 α 突觸核蛋白多肽產生的抗體。可對許多恆溫動物進行免疫接種，諸如兔、小鼠、大鼠、羊、牛、駱駝或豬。然而，小鼠、兔、豬及大鼠通常最適合。

【0067】 單株抗體可藉由此項技術中已知之任何方法製備，諸如融合瘤技術(Kohler及Milstein, 1975, Nature, 256:495-497)、三源融合瘤(trioma)技術、人類B細胞融合瘤技術(Kozbor等人, 1983, Immunology Today, 4:72)及EBV融合瘤技術(Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 第77-96頁, Alan R Liss, Inc., 1985)。

【0068】用於本發明之抗體亦可使用單淋巴球抗體方法，藉由例如由 Babcook, J. 等人，1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843-78481；WO92/02551；WO2004/051268及WO2004/106377所描述之方法藉由選殖及表現自經選擇用於產生特異性抗體之單淋巴球產生之免疫球蛋白可變區cDNA來產生。

【0069】對抗體之篩檢可使用用以量測與 α 突觸核蛋白之結合的分析及/或用以量測在抗體或其片段存在下抑制 α 突觸核蛋白形成原纖維之分析來進行。

【0070】根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含互補決定區(CDR)，三個來自重鏈且三個來自輕鏈。一般而言，CDR位於一個構架中且一起形成可變區。按照慣例，抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區中之CDR稱為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3且在輕鏈可變區中稱為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3。其在自各鏈之N端至C端之方向上依序編號。

【0071】CDR係根據Kabat等人設計之系統常規編號。此系統闡述於Kabat等人，1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest，美國衛生與人群服務部(US Department of Health and Human Services), NIH, USA (下文稱「Kabat等人(同前文獻)」中。本說明書中使用此編號系統，除非其中另有說明。

【0072】Kabat殘基名稱不總是直接與胺基酸殘基之線性編號對應。對應於基本可變域結構的縮短或插入結構組分、係否為構架或互補決定區(CDR)，實際線性胺基酸序列含有的胺基酸可比嚴格Kabat編號少或含有其他胺基酸。對於既定抗體，可藉由將抗體序列之同源殘基與「標準」Kabat編號序列比對來確定殘基之正確Kabat編號。

【0073】 根據 Kabat 編號系統，重鏈可變域之 CDR 位於殘基 31-35 (CDR-H1)、殘基 50-65 (CDR-H2) 及殘基 95-102 (CDR-H3)。然而，根據 Chothia (Chothia, C. 及 Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987))，等效於 CDR-H1 的環自殘基 26 延伸至殘基 32。因此，除非另外規定，否則如本文所採用之『CDR-H1』旨在指殘基 26 至 35，如 Kabat 編號系統與 Chothia 拓樸環(topological loop) 定義之組合所描述。

【0074】 根據 Kabat 編號系統，輕鏈可變域之 CDR 位於殘基 24-34 (CDR-L1)、殘基 50-56 (CDR-L2) 及殘基 89-97 (CDR-L3)。

【0075】 在一個實施例中，抗體可為嵌合、人類化或人類抗體或其片段。

【0076】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段可包含培養抗體之動物構架區。舉例而言，若抗體在大鼠中培養，則其將包含大鼠抗體之如本文所定義及主張之 CDR 及構架區，該大鼠抗體諸如包含根據 SEQ ID NO: 9 之輕鏈可變區(其核苷酸序列示於 SEQ ID NO: 11 中)及根據 SEQ ID NO: 10 之重鏈可變區(其核苷酸序列示於 SEQ ID NO: 12 中)之抗體或其抗原結合片段。

【0077】 嵌合抗體通常係使用重組 DNA 方法製備。DNA 可藉由以人類 L 及 H 鏈之編碼序列取代對應的非人類(例如小鼠)H 及 L 恆定區來修飾 (Morrison; PNAS 81, 6851 (1984))。

【0078】 人類抗體包含重鏈或輕鏈可變區或全長重鏈或輕鏈，若抗體之可變區或全長鏈獲自使用人生殖系免疫球蛋白基因之系統，則其為特定生殖系序列之「產物」或「來源於」特定生殖系序列。此類系統包括用所關注之抗原使攜帶人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠免疫或用所關注

之抗原篩選呈現在噬菌體上之人類免疫球蛋白基因文庫。為人類生殖系免疫球蛋白序列之「產物」或「來源於」人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體或其片段可藉由將人類抗體之胺基酸序列與人類生殖系免疫球蛋白之胺基酸序列進行比較且選擇按序列最接近人類抗體序列(亦即最大一致性%)之人類生殖系免疫球蛋白序列來如此識別。為特定人類生殖系免疫球蛋白序列「之產物」或「來源於」特定人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體可含有與生殖系序列相比因例如天然存在之體細胞突變或有意引入定點突變所致的胺基酸差異。然而，所選人類抗體通常在胺基酸序列上與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少90%一致，且含有當與其他物種之生殖系免疫球蛋白胺基酸序列(例如小鼠生殖系序列)相比時鑑別人類抗體為人類的胺基酸殘基。在某些情況下，人類抗體可在胺基酸序列上與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少60%、70%、80%、90%、或至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。通常，來源於特定人類生殖系序列之人類抗體與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列相比將呈現不超過10個胺基酸差異。在某些情況下，人類抗體可呈現異於由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列之不超過5個，或甚至不超過4、3、2或1個胺基酸差異。

【0079】 人類抗體可藉由熟習此項技術者已知的多種方法生產。人類抗體可藉由融合瘤方法使用人類骨髓瘤或小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株製得(Kozbor, J Immunol; (1984) 133:3001 ; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63頁, Marcel Dekker Inc, 1987)。替代性方法包括使用噬菌體文庫或轉殖基因小鼠，其兩者均利用人類可變區庫(Winter G; (1994) Annu Rev Immunol 12:433-

455, Green LL, (1999) *J Immunol Methods* 231:1 1-23)。

【0080】 在本發明之一個較佳實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段經人類化。

【0081】 如本文所用，術語『人類化抗體分子』係指以下抗體分子：其中重鏈及/或輕鏈含有一或多個來自移植於受體抗體(例如人類抗體)之重鏈及/或輕鏈可變區架構中之供體抗體(例如非人類抗體，諸如小鼠或兔單株抗體)的CDR (視需要包括一或多個經修飾之CDR)。關於綜述，參見Vaughan等人，*Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998。在一個實施例中，僅將來自上文所描述之CDR中之任一者的決定特異性的殘基中之一或多個轉移至人類抗體構架而非轉移整個CDR (參見例如，Kashmiri等人，2005, *Methods*, 36, 25-34)。在一個實施例中，僅將來自上文所描述之CDR中之一或多者的決定特異性的殘基轉移至人類抗體構架。在另一實施例中，僅將來自上文所描述之各CDR的決定特異性的殘基轉移至人類抗體構架。

【0082】 在移植CDR時，關於衍生CDR之供體抗體之類別/類型，可使用任何合適的受體可變區構架序列，包括小鼠、靈長類動物及人類構架區。

【0083】 適當地，根據本發明之人類化抗體具有包含人類受體構架區以及一或多個本文中特定提供之CDR的可變域。因此，在一個實施例中提供結合 α 突觸核蛋白、較佳人類 α 突觸核蛋白之阻斷人類化抗體，其中可變域包含人類受體構架區及非人類供體CDR。

【0084】 可用於本發明之人類構架之實例為KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY及POM (Kabat等人，同前文獻)。舉例而言，KOL

及NEWM可用於重鏈，REI可用於輕鏈且EU、LAY及POM可用於重鏈及輕鏈二者。可替代地，可使用人類生殖系序列；此等人類生殖系序列可在<http://www.imgt.org/>處獲得。

【0085】 在根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段中，受體重鏈及輕鏈不必衍生自相同抗體且可視需要包含具有衍生自不同鏈之構架區的複合鏈。

【0086】 本發明之人類化抗體之輕鏈的適合構架區來源於人類生殖系IGKV1-39，其具有SEQ ID NO: 29且其核苷酸序列示於SEQ ID NO: 31中。

【0087】 因此，在一個實施例中，提供人類化抗體或其抗原結合片段，其包含CDR-L1之SEQ ID NO: 1中給出之序列、CDR-L2之SEQ ID NO: 2中給出之序列及CDRL3之SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7中給出之序列，其中輕鏈構架區來源於人類生殖系IGKV1-39。

【0088】 根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段之重鏈的適合構架區來源於人類生殖系IGHV3-15，其具有如SEQ ID NO: 30中所示之序列且其核苷酸序列示於SEQ ID NO: 32中。

【0089】 在一個實施例中，提供人類化抗體或其抗原結合片段，其包含CDR-H1之SEQ ID NO: 4中給出之序列、CDR-H2之SEQ ID NO: 5中給出之序列及CDR-H3之SEQ ID NO: 6中給出之序列，其中重鏈構架區來源於人類生殖系IGHV3-15。

【0090】 在另一實施例中，提供一種人類化抗體或其抗原結合片段，其包含：

輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1中給出之序列之CDR-L1、

根據SEQ ID NO: 2中給出之序列之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7中給出之序列之CDR-L3，其中輕鏈構架區來源於人類生殖系IGKV1-39及

重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4中給出之序列之CDR-H1、根據SEQ ID NO: 5中給出之序列之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6中給出之序列之CDR-H3，其中重鏈構架區來源於人類生殖系IGHV3-15。

【0091】 在根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段中，構架區可能不具有與受體抗體之彼等相同的序列。舉例而言，可將異常殘基改變為受體鏈類別或類型中較頻繁存在的殘基。替代地，可改變在受體構架區中所選擇的殘基以使其對應於在供體抗體中之相同位置出現的殘基(參見Reichmann等人，1998, *Nature*, 332, 323-324)。此類改變應保持在恢復供體抗體之親和力所必需的最小程度。用於選擇接受體框架區中之可能需要改變的殘基的的方案闡述於WO91/09967中。

【0092】 因此，在一個實施例中，構架中之1、2、3、4、5、6、7或8個殘基經替代的胺基酸殘基置換。

【0093】 因此，在一個實施例中，提供一種人類化抗體或其抗原結合片段，其中輕鏈可變域之位置71處之殘基(Phe (F) 71) (參考SEQ ID NO: 17或18)係供體殘基(Tyr (Y) 71)，參見例如SEQ ID NO: 13及14中給出之序列。

【0094】 在另一實施例中，提供一種人類化抗體或其抗原結合片段，其中重鏈可變域之參考SEQ ID NO: 30之位置49及100 (Gly (G) 49及Thr (T) 100)中的每一者處之殘基係供體殘基(Ala 49及Ala 100)，參見例如SEQ ID NO: 25及26中給出之序列。

【0095】 在一個實施例中，本發明提供抗體或其抗原結合片段，其包含：

1. 根據SEQ ID NO: 13之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區；或
2. 根據SEQ ID NO: 17之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區；或
3. 根據SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區。

【0096】 在一個實施例中，本發明提供抗體或其抗原結合片段，其包含與本文所揭示之序列80%相似或一致之序列，例如相比於相關序列(例如可變域序列、CDR序列或不包括CDR之可變域序列)之部分或全部85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或一致。在一個實施例中，相關序列係SEQ ID NO: 25。在一個實施例中，相關序列係SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21。

【0097】 在一個實施例中，本發明提供結合人類 α 突觸核蛋白之抗體或其抗原結合片段，其包含輕鏈，其中輕鏈可變域包含具有與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21中給出之序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性或相似性的序列且/或其中重鏈可變域包含具有與SEQ ID NO: 25中給出之序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性或相似性的序列。

【0098】 在一個實施例中，本發明提供結合人類 α 突觸核蛋白之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有與SEQ ID NO:

13、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21中給出之序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或一致之輕鏈可變域但其中該抗體或其抗原結合片段具有CDR-L1之SEQ ID NO: 1中給出之序列、CDR-L2之SEQ ID NO: 2中給出之序列及CDR-L3之SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7中給出之序列。

【0099】 在一個實施例中，本發明提供結合人類 α 突觸核蛋白之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有與SEQ ID NO: 25中給出之序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或一致之重鏈可變域但其中該抗體或其抗原結合片段具有CDR-H1之SEQ ID NO: 4中給出之序列、CDR-H2之SEQ ID NO: 5中給出之序列及CDR-H3之SEQ ID NO: 6中給出之序列。

【0100】 如本文所用，「一致性」表示在所比對序列之任何特定位置，序列之間的胺基酸殘基一致。如本文所用，「相似性」表示在所比對序列之任何特定位置，序列之間的胺基酸殘基之類型相似。舉例而言，可用白胺酸取代異白胺酸或纈胺酸。通常可以彼此取代的其他胺基酸包括(但不限於)：

- 苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸(具有芳族側鏈之胺基酸)；
- 離胺酸、精胺酸及組胺酸(具有鹼性側鏈之胺基酸)；
- 天冬胺酸及麩胺酸(具有酸性側鏈之胺基酸)；
- 天冬醯胺及麩醯胺酸(具有醯胺側鏈之胺基酸)；及
- 半胱胺酸及甲硫胺酸(具有含硫側鏈之胺基酸)。一致性及相似性之

程度可容易地計算(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M.編，Oxford University Press, New York, 1988；Biocomputing. Informatics

and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, 部分1, Griffin, A.M. 及 Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及 Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991 ; 可購自NCBI的BLAST™軟體(Altschul, S.F.等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410 ; Gish, W. 及 States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272 ; Madden, T.L.等人, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141 ; Altschul, S.F.等人, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 ; Zhang, J. 及Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656)。

【0101】 在一個實施例中，抗原結合片段可為但不限於Fab、經修飾之Fab、Fab'、經修飾之Fab'、F(ab')₂、Fv、單域抗體(例如，VH或VL或VHH)、scFv、二價抗體、三價抗體或四價抗體、雙scFv、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體以及以上各者中之任一者的抗原決定基-結合片段(參見例如Holliger及Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136 ; Adair及Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217)。用於產生及製造此等抗體片段之方法為此項技術中所熟知(參見例如Verma等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)。用於本發明之其他抗體片段包括WO2005/003169、WO2005/003170及WO2005/003171中所描述之Fab及Fab'片段。多價抗體可包含多重特異性，例如雙特異性，或可為單特異性(參見例如WO 92/22853、WO05/113605、WO2009/040562及WO2010/035012)。

【0102】 替代的抗原結合片段包含連接至兩個scFv或dsscFv之

Fab，各scFv或dsscFv結合相同或不同標靶(例如一個scFv或dsscFv結合治療靶點且一個scFv或dsscFv藉由結合例如白蛋白增加半衰期)。該等抗體片段描述於國際專利申請公開案第WO2015/197772號中，其以全文引用之方式併入本文中且尤其參照抗體片段之討論。

【0103】 本發明之抗體分子之恆定區結構域若存在則可根據抗體分子之建議功能及尤其係可能需要的效應功能來選擇。舉例而言，恆定區結構域可為人類IgA、IgD、IgE、IgG或IgM結構域。特定言之，當抗體分子意圖用於治療用途且需要抗體效應功能時，可使用人類IgG恆定區結構域，尤其係IgG1及IgG3同型。可替代地，當抗體分子意欲用於達成治療目的且不需要抗體效應功能時可使用IgG2及IgG4同型。應瞭解亦可使用此等恆定區結構域之序列變異體。舉例而言，可使用如Angal等人，*Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108中所述，其中位置241之絲胺酸已改變成脯胺酸的IgG4分子。熟習此項技術者亦瞭解抗體可進行多種轉譯後修飾。此等修飾之類型及程度常常視用於表現抗體的宿主細胞株以及培養條件而定。此類修飾可包括糖基化變化、甲硫胺酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬胺酸鹽異構化及天冬醯胺去醯胺 常見修飾為由於羧基肽酶作用而損失羧基端鹼性殘基(諸如離胺酸或精胺酸)(如Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995中所述)。因此，可缺乏抗體重鏈之C端離胺酸。

【0104】 在一個實施例中，抗體之C端胺基酸在轉譯後修飾期間裂解。

【0105】 在一個實施例中，抗體之N端胺基酸在轉譯後修飾期間裂解。

【0106】 在另一實施例中，本發明之抗體可包含具有全長重鏈及輕鏈之完全抗體或其抗原結合片段。舉例而言，全長抗體係選自IgG1、IgG4或IgG4P。

【0107】 在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段包含：

1. 根據SEQ ID NO: 14之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；或
2. 根據SEQ ID NO: 18之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；或
3. 根據SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈。

【0108】 在一個實施例中，根據本發明之抗體作為 α 突觸核蛋白結合抗體融合蛋白提供，該融合蛋白包含免疫球蛋白部分，例如Fab或Fab'片段及直接或間接連接於其之一種或兩種單域抗體(dAb)，例如如WO2009/040562、WO2010035012、WO2011/030107、WO2011/061492及WO2011/086091 (均以引用的方式併入本文中)中所述。

【0109】 在一個實施例中，融合蛋白包含視情況藉由二硫鍵連接之兩種結構域抗體，例如呈可變重鏈(VH)及可變輕鏈(VL)對。

【0110】 在一個實施例中，融合蛋白之Fab或Fab'要素具有與單域抗體或抗體相同或相似的特異性。在一個實施例中，Fab或Fab'具有與單域抗體不同的特異性，換言之，融合蛋白係多價的。在一個實施例中，根據本發明之多價融合蛋白具有白蛋白結合位點，例如其中的VH/VL對提供白蛋白結合位點。

【0111】 在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段包含根據SEQ ID NO: 13或17或21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區。舉例而言，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 13或17或21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區。在另一實例中，抗體係全長IgG4

抗體，其包含根據SEQ ID NO: 14、18或22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈。在又一實例中，抗原結合片段係Fab'，其包含根據SEQ ID NO: 13、17或21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區。

【0112】 在一個較佳實施例中，用於療法之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係包含以下之抗體或其抗原結合片段：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125。

【0113】 甚至更佳地，抗體或其抗原結合片段不與 β -突觸核蛋白交叉反應且結合 α 突觸核蛋白，對單體 α 突觸核蛋白時解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數高至少10倍。

【0114】 生物分子，諸如抗體或片段，含有酸性及/或鹼性官能基，由此給予分子淨正或負電荷。總體上「觀測到」的電荷之量將視實體之絕對胺基酸序列、3D結構中帶電基團之局部環境及分子之環境條件而定。等電點(pI)係特定分子或其溶劑可進入表面不攜帶淨電荷時的pH。在一個

實例中，根據本發明之抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段可經工程改造以具有合適的等電點。此可能產生具有更穩固特性，尤其係適合溶解性及/或穩定性概況及/或改善的純化特徵的抗體及/或片段。

【0115】 因此，在一個態樣中，本發明提供人類化抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段，其經工程改造以具有不同於最初鑑別之抗體之等電點的等電點。抗體可能例如藉由置換胺基酸殘基進行改造，諸如用一或多個鹼性胺基酸殘基置換酸性胺基酸殘基。可替代地，可引入鹼性胺基酸殘基或可移除酸性胺基酸殘基。可替代地，若分子具有不可接受地高的pI值，則可視需要引入酸性殘基以降低pI。當調控pI時必須注意保持抗體或片段之所期望的活性係重要的。因此，在一個實施例中，經工程改造之抗體或其抗原結合片段具有與「未經修飾」之抗體或片段相同或基本上相同的活性。

【0116】 可使用諸如 **ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html 及 http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html 之程式預測抗體或片段之等電點。

【0117】 應瞭解，本發明提供之抗體之親和力可使用此項技術中已知之任何適合方法改變。本發明因此亦係關於本發明之抗體分子之變異體，其具有對 α 突觸核蛋白，尤其人類 α 突觸核蛋白之改善親和力。此類變異體可以藉由多種親和力成熟方案獲得，包括使CDR突變(Yang等人, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、鏈混排(Marks等人, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、使用大腸桿菌之突變株(Low等人, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996)、DNA混排(Patten等人, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、噬菌體呈現(Thompson等人, J. Mol. Biol., 256, 77-88,

1996)及有性PCR(Cramer等人, Nature, 391, 288-291, 1998)。Vaughan等人(前述)論述了此等親和力成熟方法。

【0118】 視需要，根據本發明之抗體或其抗原結合片段可與一或多種效應分子結合。應瞭解，效應分子可包含單一效應分子或如此連接以形成可附著至本發明之抗體或其抗原結合片段之單一部分的兩種或更多種該等分子。在需要獲得連接至效應分子之抗體片段的情況下，此可藉由其中抗體片段直接或經由偶合劑連接至效應分子之標準化學或重組DNA程序來製備。使該等效應分子與抗體結合的技術為此項技術中所熟知的(參見Hellstrom等人，Controlled Drug Delivery，第2版，Robinson等人編，1987，第623-53頁；Thorpe等人，1982, Immunol. Rev., 62:119-58及Dubowchik等人，1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123)。特定化學程序包括例如WO 93/06231、WO 92/22583、WO 89/00195、WO 89/01476及WO 03/031581中所述之程序。可替代地，在效應分子為蛋白質或多肽之情況下，鍵可使用重組DNA程序，例如如WO 86/01533及EP0392745中所述來實現。

【0119】 如本文所使用之術語效應分子包括例如抗腫瘤劑、藥物、毒素、生物學活性蛋白質(例如酶)、其他抗體或抗體片段、合成的或天然存在之聚合物、核酸及其片段(例如DNA、RNA及其片段)、放射性核素(尤其放射性碘)、放射性同位素、螯合金屬、奈米顆粒及報導基團，諸如螢光化合物或可藉由NMR或ESR光譜法偵測的化合物。

【0120】 效應分子之實例可包括細胞毒素或細胞毒性劑，包括任何對細胞不利(例如殺死)之試劑。實例包括康普瑞汀(combrestatin)、海兔毒素(dolastatin)、埃博黴素(epothilone)、星形孢菌素(staurosporin)、類

美登素(maytansinoid)、海綿素(spongistatin)、根瘤菌素(rhizoxin)、軟海綿素(halichondrin)、桿孢菌素(roridin)、海米斯林(hemiasterlin)、紫杉醇(taxol)、細胞遲緩素B (cytochalasin B)、短桿菌素D (gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicin)、小紅莓(doxorubicin)、道諾比星、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D (actinomycin D)、1-去氫罌固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)及其類似物或同源物。

【0121】 效應分子亦包括(但不限於)抗代謝物(例如甲胺喋呤、6-巯基嘌呤(6-mercaptapurine)、6-硫代鳥嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、達卡巴嗪(decarbazine)、烷基化劑(例如甲氫芥(mechlorethamine)、噻替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法侖(melphalan)、卡莫司汀(carmustine, BSNU)及洛莫司汀(lomustine, CCNU)、環硫磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、鏈佐黴素(streptozotocin)、絲裂黴素C及順式-二氯二胺鉑(II)(DDP)、順鉑(cisplatin))、蒽環黴素(anthracycline)(例如道諾比星(以前為道諾黴素)及小紅莓)、抗生素(例如放線菌素d (以前為放射菌素)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素、安醯黴素(anthramycin, AMC)、卡奇黴素或倍癌黴素(duocarmycin))及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。

【0122】 其他效應分子可包括螯合放射性核素，諸如¹¹¹In及⁹⁰Y、Lu¹⁷⁷、鉍²¹³、鐳²⁵²、銻¹⁹²及鎢¹⁸⁸/銻¹⁸⁸；或藥物，諸如(但不限於)烷基磷酸膽鹼、拓樸異構酶I抑制劑、類紫杉醇及蘇拉明(suramin)。

【0123】 其他效應分子包括蛋白質、肽及酶。所關注之酶包括(但不限於)蛋白水解酶、水解酶、裂解酶、異構酶、轉移酶。所關注之蛋白質、多肽及肽包括(但不限於)免疫球蛋白、毒素(諸如相思子毒素、蓖麻毒素A、綠膿桿菌外毒素或白喉毒素)、蛋白質(諸如胰島素、腫瘤壞死因子、 α -干擾素、 β -干擾素、神經生長因子、血小板衍生生長因子或組織纖維蛋白溶酶原活化因子)、血栓性劑或抗血管生成劑(例如血管生長抑素或內皮生長抑素)或生物反應調節劑(諸如淋巴激素、介白素-1 (IL-1)、介白素-2 (IL-2)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、粒細胞群落刺激因子(G-CSF)、神經生長因子(NGF)或其他生長因子及免疫球蛋白)。

【0124】 其他效應分子可包括可用於例如診斷中之可偵測物質、可偵測物質之實例包括各種酶、輔基、螢光物質、發光物質、生物發光物質、放射性核素、正電子發射金屬(用於正電子發射斷層攝影法)及非放射性順磁性金屬離子。關於適用於診斷學中之可與抗體結合的金屬離子，一般參見美國專利第4,741,900號。適合酶包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適合輔基包括抗生蛋白鏈菌素、抗生物素蛋白及生物素；適合螢光物質包括傘酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯及藻紅素；適合發光物質包括魯米諾(luminol)；適合生物發光物質包括螢光素酶、螢光素及水母素(aequorin)；且適合放射性核素包括¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In及⁹⁹Tc。

【0125】 在另一實例中，效應分子可增加抗體在活體內之半衰期，及

/或降低抗體之免疫原性及/或增強抗體跨越上皮障壁傳遞至免疫系統。此類型適合效應分子之實例包括聚合物、白蛋白、白蛋白結合蛋白或白蛋白結合化合物，諸如WO05/117984中描述之彼等化合物。

【0126】 在效應分子係聚合物之情況下，其一般可以為合成或天然存在之聚合物，例如視情況經取代之直鏈或分支鏈聚伸烷基、聚伸烯基或聚氧化烯聚合物，或分支或未分支多醣，例如同多醣或雜多醣。

【0127】 可存在於上述合成聚合物上的視情況存在之特定取代基包括一或多個羥基、甲基或甲氧基。

【0128】 合成聚合物之特定實施例包括視情況經取代之直鏈或分支鏈聚(乙二醇)、聚(丙二醇)聚(乙烯醇)或其衍生物，尤其視情況經取代之聚(乙二醇)，諸如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

【0129】 特定天然存在之聚合物包括乳糖、直鏈澱粉、聚葡萄糖、肝糖或其衍生物。

【0130】 在一個實施例中，聚合物為白蛋白或其片段，諸如人類血清白蛋白或其片段。

【0131】 如本文所使用之「衍生物」意欲包括反應性衍生物，例如巯基選擇性反應性基團，諸如順丁烯二醯亞胺及類似者。反應性基團可直接或經由連接子區段連接於聚合物。應瞭解此類基團之殘基在一些情況下將作為抗體片段與聚合物之間的鍵聯基團形成產物之一部分。

【0132】 聚合物尺寸可根據需要變化，但平均分子量通常在500 Da至50000 Da之範圍內，例如5000 Da至40000 Da，諸如20000 Da至40000 Da。聚合物尺寸可尤其基於產物之意欲用途，例如定位至某些組織，諸如腫瘤或延長循環半衰期之能力而選擇(評述參見Chapman, 2002,

Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545)。因此，舉例而言，在產物意欲離開循環且滲透組織，例如用於治療腫瘤之情況下，宜使用例如分子量為大約5000Da之小分子量聚合物。對於產物仍然在循環中之應用，宜使用較高分子量聚合物，例如分子量在20000Da至40000Da範圍內。

【0133】 適合之聚合物包括聚伸烷基聚合物，諸如聚(乙二醇)或尤其甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物，且尤其分子量在約15000Da至約40000Da範圍內。

【0134】 在一個實例中，用於本發明之抗體連接於聚(乙二醇)(PEG)部分。在一個特定實例中，抗體為抗體片段且PEG分子可經由位於抗體片段中的任何可用的胺基酸側鏈或末端胺基酸官能基，例如任何游離胺基、亞胺基、巰基、羥基或羧基連接。此類胺基酸可天然存在於抗體片段中或可使用重組DNA方法經工程改造至片段中(參見例如US 5,219,996；US 5,667,425；WO98/25971、WO2008/038024)。在一個實例中，本發明之抗體分子為經修飾之Fab片段，其中該修飾為一或多個胺基酸添加至其重鏈之C端以允許效應分子連接。適當地，附加之胺基酸形成含有一或多個效應分子可連接之半胱胺酸殘基的經修飾之鉸鏈區。可利用多個位點連接兩個或超過兩個PEG分子。

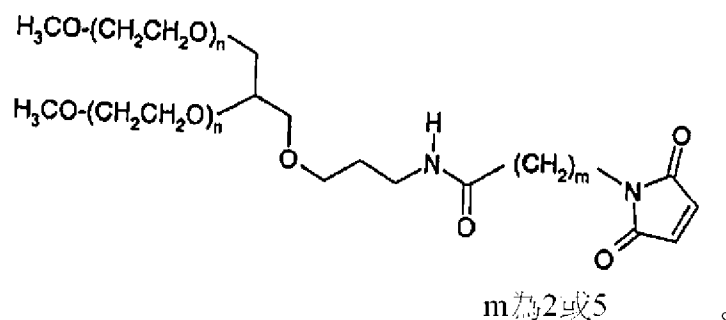
【0135】 PEG分子宜經由位於抗體片段中的至少一個半胱胺酸殘基之巰基共價連接。連接至經修飾之抗體片段的每個聚合物分子可共價連接至位於片段中之半胱胺酸殘基之硫原子。共價鍵一般為二硫鍵或尤其硫-碳鍵。在巰基用作連接點之情況下，可使用適當活化之效應分子，例如巰基選擇性衍生物，諸如順丁烯二醯亞胺及半胱胺酸衍生物。活化聚合物可用作製備如上所述之經聚合物修飾之抗體片段中的起始物質。活化聚合物

可為含有巰基反應基之任何聚合物，諸如 α -鹵基羧酸或酯，例如碘乙醯胺、醯亞胺(例如順丁烯二醯亞胺)、乙烯基磺或二硫化物。此類起始物質可市購(例如購自Nektar，前身為Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA)或可使用習知化學程序由市售起始物質製備。特定PEG分子包括20K 甲氧基-PEG-胺(可獲自Nektar，以前為Shearwater；Rapp Polymere；以及SunBio)及M-PEG-SPA(可獲自Nektar，以前為Shearwater)。

【0136】在一個實施例中，抗體係聚乙二醇化的經修飾Fab片段、Fab'片段或二Fab (diFab)，亦即有PEG (聚(乙二醇))共價連接於其上，例如根據揭示於EP0948544 或 EP1090037 中之方法 [亦參見「Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications」, 1992, J. Milton Harris (編), Plenum Press, New York, 「Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications」, 1997, J. Milton Harris 及 S. Zalipsky (編), American Chemical Society, Washington DC及「Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences」, 1998, M. Aslam及A. Dent, Grove Publishers, New York；Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]。在一個實例中，PEG連接於鉸鏈區中之半胱胺酸。在一個實例中，經PEG修飾之Fab片段具有共價連接於經修飾之鉸鏈區中單一巰基的順丁烯二醯亞胺基團。離胺酸殘基可共價連接至順丁烯二醯亞胺基且離胺酸殘基上之胺基中之每一者可連接分子量大約為20,000Da之甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此連接於Fab片段之PEG的總分子量可為大約40,000Da。

【0137】 特定PEG分子包括經N,N'-雙(甲氧基聚(乙二醇) MW 20,000)修飾之離胺酸的2-[3-(N-順丁烯二醯亞胺基)丙醯胺基]乙基醯胺，亦稱為PEG2MAL40K (可獲自Nektar，以前為Shearwater)。

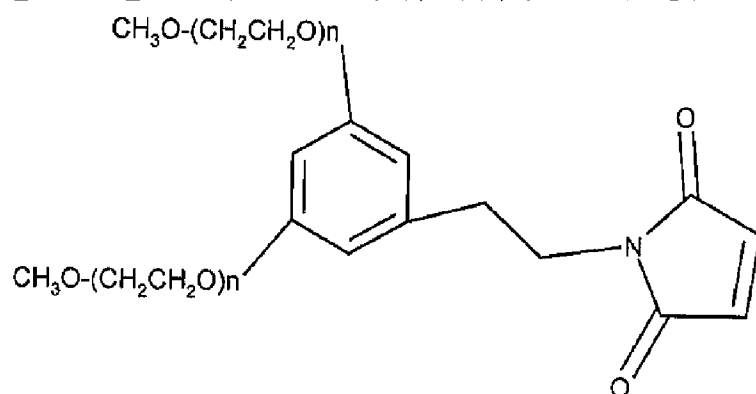
【0138】 PEG連接基團之替代來源包括NOF，其供應GL2-400MA3 (其中以下結構中之m為5)及GL2-400MA (其中m為2)且n大約為450：



【0139】 換言之，各PEG為約20,000Da。

【0140】 因此，在一個實施例中，PEG為2,3-雙(甲基聚氧乙烯-氧基)-1-{[3-(6-順丁烯二醯亞胺基-1-側氧基己基)胺基]丙氧基}己烷(2臂分支鏈PEG，-CH₂)₃NHCO(CH₂)₅-MAL，M_w 40,000，稱為SUNBRIGHT GL2-400MA3。

【0141】 以下類型之其他替代PEG效應分子：



可獲自Dr Reddy、NOF及Jenkem。

【0142】 在一個實施例中，根據本發明之Fab或Fab'與PEG分子結合。

【0143】 在一個實施例中，提供經聚乙二醇化之抗體(例如具有本文中所述之PEG)，其經由鏈中在胺基酸226處或大約胺基酸226處之半胱胺酸胺基酸殘基(例如重鏈之胺基酸226 (藉由依序編號)，例如SEQ ID NO: 26之胺基酸224)連接。

【0144】 在一個實施例中，本發明提供一種Fab'PEG分子，其包含一或多種PEG聚合物，例如1或2種聚合物，諸如40kDa聚合物或聚合物。

【0145】 根據本發明之Fab'-PEG分子可尤其有利，因為其具有與Fc片段無關之半衰期。在一個實施例中，提供結合於諸如PEG分子、澱粉分子或白蛋白分子之聚合物之Fab'。在一個實施例中，提供結合於諸如PEG分子、澱粉分子或白蛋白分子之聚合物之scFv。在一個實施例中，根據本發明之Fab或Fab'與人類血清白蛋白結合。在一個實施例中，抗體或片段結合於澱粉分子，例如以增加半衰期。澱粉結合於蛋白質之方法如US 8,017,739中所述，以引用的方式併入本文中。

【0146】 本發明亦提供一種經分離聚核苷酸，其編碼根據本發明之抗體或其抗原結合片段。根據本發明之經分離聚核苷酸可包含合成DNA，其例如藉由化學處理、cDNA、基因組DNA或其任何組合製備。

【0147】 分子生物學之標準技術可用於製備編碼本發明之抗體或其抗原結合片段之DNA序列。所需DNA序列可使用寡核苷酸合成技術完全或部分合成。適當時可使用定點突變誘發及聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction ; PCR)技術。

【0148】 在一個實施例中，根據本發明之經分離聚核苷酸編碼：

- a. 輕鏈可變區，其中該聚核苷酸：
 - i. 與SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 23至少90%一

致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 23；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 23組

成；

b. 重鏈可變區，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 27至少90%一致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 27；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 27組成；

c. 輕鏈，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 24至少90%一

致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 24；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 24組

成；

d. 重鏈，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 28至少90%一致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 28；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 28組成。

【0149】 本發明亦提供選殖或表現載體，其包含一或多種本文中所述之聚核苷酸。在一個實例中，根據本發明之選殖或表現載體包含一或多種經分離之聚核苷酸，該經分離之聚核苷酸包含選自SEQ ID NO: 15、16、19、20、23、24、27或28之序列。

【0150】 可構築載體之一般方法、轉染方法及培養方法為熟習此項

技術者所熟知。就此而言，參考「Current Protocols in Molecular Biology」，1999, F. M. Ausubel (編), Wiley Interscience, New York及由 Cold Spring Harbor Publishing出版的Maniatis Manual。

【0151】亦提供一種宿主細胞，其包含根據本發明之一或多種經分離聚核苷酸序列或包含編碼本發明之抗體之一或多種經分離聚核苷酸序列的一或多種選殖或表現載體。任何適合之宿主細胞/載體系統均可用於表現編碼本發明之抗體或其抗原結合片段之聚核苷酸序列。可使用細菌，例如大腸桿菌及其他微生物系統，或亦可使用真核(例如哺乳動物的)宿主細胞表現系統。適合哺乳動物宿主細胞包括CHO、骨髓瘤或融合瘤細胞。

【0152】用於本發明之中國倉鼠卵巢(CHO細胞)的適合類型可包括CHO及CHO-K1細胞，包括dhfr- CHO細胞，諸如可用於DHFR可選標記物之CHO-DG44細胞及CHO-DXB11細胞或可用於麩醯胺酸合成酶可選標記物之CHOK1-SV細胞。用於表現抗體之其他細胞類型包括淋巴球形細胞株，例如NSO骨髓瘤細胞及SP2細胞、COS細胞。宿主細胞可用根據本發明之經分離聚核苷酸序列或表現載體穩定轉型或轉染。

【0153】在一個實施例中，根據本發明之宿主細胞係用表現載體穩定轉染之CHO-DG44細胞，該表現載體包含本發明之經分離聚核苷酸序列，較佳包含根據SEQ ID NO: 15及27或SEQ ID NO: 19及27或SEQ ID NO: 23及27或SEQ ID NO: 16及28或SEQ ID NO: 20及28或SEQ ID NO: 24及28之經分離聚核苷酸序列。

【0154】本發明亦提供一種用於產生根據本發明之抗體或其抗原結合片段的方法，其包含在適用於產生根據本發明之抗體或其抗原結合片段之條件下培養根據本發明之宿主細胞，及分離該抗體或其抗原結合片段。

【0155】 抗體或其抗原結合片段可僅包含重鏈或輕鏈多肽，在此情況下僅需使用重鏈或輕鏈多肽編碼序列轉染宿主細胞。為了產生包含重鏈及輕鏈兩者之抗體或其抗原結合片段，細胞株可用兩種載體轉染，第一載體編碼輕鏈多肽且第二載體編碼重鏈多肽。可替代地，可使用單一載體，載體包括編碼輕鏈及重鏈多肽之序列。

【0156】 因此，提供一種用於培養宿主細胞且表現抗體或其片段、分離該抗體或其片段且視情況將其純化以得到經分離的抗體或片段的方法。在一個實施例中，該方法進一步包含將效應分子結合於分離之抗體或片段，例如結合於尤其如本文所述之PEG聚合物的步驟。

【0157】 因此，在一個實施例中，提供經純化之抗 α 突觸核蛋白抗體或其片段，例如人類化抗體或其片段，尤其根據本發明之抗體或其片段，基本上自內毒素及/或宿主細胞蛋白質或DNA純化，尤其不含或基本上不含內毒素及/或宿主細胞蛋白質或DNA。

【0158】 基本上不含內毒素一般意指每毫克抗體產物內毒素含量為1 EU或更低，諸如每毫克產物0.5或0.1 EU。

【0159】 基本上不含宿主細胞蛋白質或DNA一般意指每毫克抗體產物宿主細胞蛋白質及/或DNA含量為400 μg 或更低，諸如100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 或更低，尤其適當時20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

【0160】 因為本發明之抗體適用於治療、診斷及/或防治病理病狀，諸如 α 突觸核蛋白病，所以本發明亦提供一種醫藥或診斷組合物，其包含根據本發明之抗體或其抗原結合片段以及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑中之一或多者。在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段係單一活性成分。在另一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結

合片段係與一或多種額外活性成分組合。可替代地，醫藥組合物包含根據本發明之抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段係單一活性成分且其可與其他試劑、藥物或激素組合(例如同時、依序或分開)單獨向患者投與。

【0161】 在另一實施例中，醫藥組合物包含抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 13或17或21之輕鏈可變區且包含SEQ ID NO: 25，例如SEQ ID NO: 13及SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 21及SEQ ID NO: 25之重鏈可變區。

【0162】 根據本發明之醫藥組合物宜可適當地向患者投與以鑑別所需之治療有效量。如本文所用，術語「治療有效量」係指治療、改善或預防靶向疾病或病狀或展現可偵測之治療或預防效果所需要的治療劑之量。關於任何抗體，治療有效量可最初在細胞培養分析中或在動物模型中，通常在啮齒動物、兔、狗、豬或靈長類中估算。動物模型亦可用於確定投與之適當濃度範圍及途徑。該等資訊可隨後用於確定適用於投與人類之劑量及途徑。

【0163】 人類個體之精確治療有效量將視疾病狀態之嚴重程度、個體之整體健康、個體之年齡、體重及性別、飲食、投藥之時間及頻率、藥物組合、反應敏感性及對療法之耐受性/反應而定。此量可以藉由常規實驗確定且在臨床醫師之判斷內。一般而言，治療有效量將為0.01 mg/kg至500 mg/kg，例如0.1 mg/kg至200 mg/kg，諸如100 mg/Kg。醫藥組合物宜呈每劑含有預定量之本發明之活性劑的單位劑型呈現。

【0164】 治療組合物中醫藥學上可接受之載劑可另外含有液體，諸

如水、生理食鹽水、甘油及乙醇。另外，諸如濕潤劑或乳化劑或pH緩衝物質之輔助物質可存在於該等組合物中。此等載劑使得醫藥組合物能夠調配成錠劑、丸劑、糖衣藥丸、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液及懸浮液，以便患者攝入。

【0165】 適合之投藥形式包括適用於非經腸投藥之形式，例如藉由注射或輸注，例如藉由快速注射或連續輸液、靜脈內、可吸入或皮下形式。在產品用於注射或輸注的情況下，其可採用於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液的形式且其可含有調配試劑，諸如懸浮劑、防腐劑、穩定劑及/或分散劑。可替代地，根據本發明之抗體或其抗原結合片段可呈無水形式，以在與合適的無菌液體一起使用之前復原。亦可製備適合於在注射前溶解或懸浮於液體媒劑中之固體形式。

【0166】 一旦調配，本發明之組合物可直接投與個體。因此，本文提供根據本發明之抗體或其抗原結合片段用於製造藥劑之用途。

【0167】 待治療之個體可為動物。較佳地，根據本發明之醫藥組合物經調適用於向人類個體投與。

【0168】 因此，在另一態樣中，本發明提供抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物以用於療法，且尤其用於治療一或多種 α 突觸核蛋白病。在又另一態樣中，本發明提供治療患者中之一或多種突觸核蛋白病的方法，其包含向該患者投與治療有效量之根據本發明之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物。

【0169】 在一個實施例中，用於療法之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係包含以下之抗體或其抗原結合

片段：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中該抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125且其中該抗體或其抗原結合片段係用於療法。較佳地，抗體或其抗原結合片段不與 β -突觸核蛋白交叉反應且結合 α 突觸核蛋白，對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數高至少10倍。

【0170】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係用於治療一或多種突觸核蛋白病，係抗體或其抗原結合片段，其包含：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中該抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125。較佳地，抗體或其抗原結合片段不與 β -突觸核蛋白交叉反應且結合 α 突觸核蛋白，對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數高至少10倍。

【0171】 在另一實施例中，提供一種治療患者中之一或多種突觸核蛋白病的方法，其包含向該患者投與治療有效量之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中該抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維

誘導之 α 突觸核蛋白聚集，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125。較佳地，抗體或其抗原結合片段不與 β -突觸核蛋白交叉反應且結合 α 突觸核蛋白，對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數高至少10倍。

【0172】 根據本發明之 α 突觸核蛋白病包含但不限於帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。較佳地， α 突觸核蛋白病係帕金森氏病(PD)。

【0173】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係用於治療帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳帕金森氏病(PD)，係包含以下之抗體或其抗原結合片段：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及

根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中該抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，其中視情況該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125且其中該抗體或其抗原結合片段係用於療法。較佳地，抗體或其抗原結合片段不與 β -突觸核蛋白交叉反應且結合 α 突觸核蛋白，對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數高至少10倍。

【0174】 在另一實施例中，提供一種治療患者中之帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳帕金森氏病(PD)的方法，其包含向該患者投與治療有效量之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中該抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，其中視情況該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125且其中該抗體或其抗原結合片段係用於療法。較佳地，抗體或其抗原結合片段不與 β -突觸核蛋白交叉反應且結合 α 突觸核蛋白，對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數高至少10倍。

【0175】 可替代地，本發明亦提供抗體或其抗原結合片段用於製造供治療 α 突觸核蛋白病之藥劑用之用途，其中該 α 突觸核蛋白病較佳係帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，更佳帕金森氏病(PD)，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中該抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維

誘導之 α 突觸核蛋白聚集，其中視情況該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125且其中該抗體或其抗原結合片段係用於療法。較佳地，抗體或其抗原結合片段不與 β -突觸核蛋白交叉反應且結合 α 突觸核蛋白，對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數高至少10倍。

【0176】 此外，本發明之部分係抗 α 突觸核蛋白抗體或抗原結合片段用作診斷活性劑或用於診斷分析之用途，例如用於診斷 α 突觸核蛋白病，諸如帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。

【0177】 診斷較佳可針對生物樣品進行。「生物樣品」涵蓋來自個體之多種樣品類型且可用於診斷或監測分析。該定義涵蓋腦脊髓液，諸如血漿及血清之血液，及生物來源之其他液體樣品，諸如尿液及唾液，固體組織樣品，諸如活檢試樣或自其及其子代衍生之組織培養物或細胞。定義亦包括在獲取之後已以任何方式操控的樣品，諸如藉由試劑處理、增溶，或富集某些組分，諸如聚核苷酸。

【0178】 診斷測試較佳可針對不與人類或動物身體接觸的生物樣品進行。此類診斷測試亦稱為活體外測試。活體外診斷測試可依賴於偵測已獲自個體之生物樣品中之 α 突觸核蛋白的活體外方法，其包含以下步驟：
i)使生物樣品與如本文所述之抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段接觸；及
ii)偵測抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之結

合。藉由比較偵測到之 α 突觸核蛋白含量或 α 突觸核蛋白之特異性轉譯後修飾形式之存在與適合對照，可鑑別一或多種 α 突觸核蛋白病。此類偵測方法因此可用於判定個體是否患有 α 突觸核蛋白病，或處於罹患 α 突觸核蛋白病風險下，其包括確定 α 突觸核蛋白病之階段(嚴重程度)。

【0179】 因此，本發明提供用於診斷 α 突觸核蛋白病、較佳診斷或帕金森氏病(PD)之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；根據SEQ ID NO: 5之CDR-H2及根據SEQ ID NO: 6之CDR-H3；或

b. 根據SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕可變區及選自SEQ ID NO: 25之重可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；

其中，視情況該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基包含至少參考SEQ ID NO: 8之殘基D119、N122及Y125。

【0180】 本發明中所包括之序列展示於表1中：

表1

名稱	SEQ ID NO:	序列
CDR-L1	1	KASQNINKNLD
CDR-L2	2	YANNLQT
CDR-L3	3	YQYKNGWT
CDR-H1	4	GFTFNNAAMY

CDR-H2	5	RIIRTKPNNYATSYADSVKG
CDR-H3	6	DYSRGDR
CDR-L3變異體1	7	YQYKNAWT
人類 α 突觸核蛋白 P37840	8	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATV AEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQE GILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA
大鼠VL 5811	9	NIQMTQSPFVLSASVGDRTVLSCKASQNINKNLDWYQQKHGEAPKLLMYANNLQ TGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDVATYYCYQYKNGWTFGGGTKLELK
大鼠VH 5811	10	EMQLVESGGGLVQPKESLKI SCAASGFTFNNAAMYWVRQAPGKGLEWVARIIRTKP NNYATSYADSVKGRFTISRDDSKSMVYLQMDNLKSEDTAMYYCTADYSRGDRWGQ GVMVTVSS
大鼠VL核苷酸	11	aacatccagatgaccagctctcctccagctcctgtctgcatctgtgggagacagag tcactctcagctgcaaagcaagtcagaaacattaataagaacttagactggatca gcaaagcatggagaagctccaaaactcctgatgtattatgcaaacaatttaca acgggcatcccatcaaggttcagtgccagtggtctggaacagattacagctca ccatcagcagcctgcagcctgaagatggtgccacatattactgctatcagtataa gaatgggtggacggttcgggtggaggcaccgaagctggaactgaaa
大鼠VH 核苷酸	12	Gaaatgcagctggtggagtctggtggaggattggtgcagcctaaggagtcattga aatctcatgtgcagcctctggattcaccttcaataatgctgccatgtactgggt ccgccaggctccaggaaaggtctggaatgggtctgcataagaactaaacct aataattatgcaacatcttatgctgattcagtgaaaggcagattcacatctcca gagatgattcaaaaagcatggtctacctacaaatggataactgaaaagtgagga cacagccatgtattactgtacagcagattactccagaggtgacaggtggggccaa ggagtcatggtcacagctctcgagc
5811 gL5 V-區	13	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNINKNLDWYQQKPKAPKLLIYYANNLQ TGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCYQYKNGWTFGQGTKVEIK
5811 gL5 輕鏈	14	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNINKNLDWYQQKPKAPKLLIYYANNLQ TGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCYQYKNGWTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5811 gL5 V-區 核苷酸	15	Gacatccagatgaccagagcccagactcctgtccgcatcagtgggggatcgcg tgactattacgtgcaaagcctcgcaaacatcaacaagaacctcgactggatca gcagaagccaggaaagggcgctaaagctgctgatctactacgccaacaatctccag accggcgtgccctcgcggttctccggatctgggtccgggtactgattacacctga ccattagctcccttcaaccggaggacttcgccacctattactgctaccagtataa gaacggctggacttttggacaaggcaccgaaggtcgaaatcaag
5811 gL5 輕鏈 核苷酸	16	Gacatccagatgaccagagcccagactcctgtccgcatcagtgggggatcgcg tgactattacgtgcaaagcctcgcaaacatcaacaagaacctcgactggatca gcagaagccaggaaagggcgctaaagctgctgatctactacgccaacaatctccag accggcgtgccctcgcggttctccggatctgggtccgggtactgattacacctga ccattagctcccttcaaccggaggacttcgccacctattactgctaccagtataa gaacggctggacttttggacaaggcaccgaaggtcgaaatcaagcgtacgggtggcc gctccctccgtgttcatcttcccacctccgacgagcagctgaaagtcgggcaccg cctccgtcgtgtgctgcaacaacttctacccccgagggcagaaggtgcagtg gaaggtggacaacgccctgcagtcgggcaactcccaggaatccgtcaccgagcag gactccaaggacagcacctactcctgtcctccacctgacctgtccaaggccg actacgagaagcaaaaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggcctgtccag ccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtg
5811 gL8 V-區	17	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNINKNLDWYQQKPKAPKLLIYYANNLQ TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCYQYKNGWTFGQGTKVEIK
5811 gL8	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNINKNLDWYQQKPKAPKLLIYYANNLQ

輕鏈		TGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCYQYKNGWTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5811 gL8 V-區 核苷酸	19	Gacatccagatgaccagagcccagagctccctgtccgcatcagtggggggatcgcg tgactattacgtgcaaagcctcgcagaacatcaacaagaacctcgactggatca gcagaagccaggaaaggcgctaagctgctgatctactacgccaacaatctccag accggcgctgccctcgcggttctccggatctgggtccggactgatttcacctga ccattagctcccttcaaccggaggacttcgccacctattactgctaccagtataa gaacggctggacttttgacaaggcaccaaggtcgaaatcaag
5811 gL8 輕鏈 核苷酸	20	Gacatccagatgaccagagcccagagctccctgtccgcatcagtggggggatcgcg tgactattacgtgcaaagcctcgcagaacatcaacaagaacctcgactggatca gcagaagccaggaaaggcgctaagctgctgatctactacgccaacaatctccag accggcgctgccctcgcggttctccggatctgggtccggactgatttcacctga ccattagctcccttcaaccggaggacttcgccacctattactgctaccagtataa gaacggctggacttttgacaaggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtggtcatcttcccacctccgacgagcagctgaagtcgggaccg cctccgtcggtgctgctgaacaacttctacccccgagggccaaggtgcagt gaaggtggacaacgcctgcagtcgggcaactcccaggaatccgtcaccgagcag gactccaaggacagcacctactccctgtcctccacctgacctgtccaagggcg actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggacctgtccag ccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc
5811 gL14 V-區	21	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIKNDLWYQQKPKAPKLLIYYANNLQ TGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCYQYKNAWTFGQGTKVEIK
5811 gL14 輕鏈	22	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIKNDLWYQQKPKAPKLLIYYANNLQ TGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCYQYKNAWTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5811 gL14 V-區 核苷酸	23	Gacatccagatgaccagagcccagagctccctgtccgcatcagtggggggatcgcg tgactattacgtgcaaagcctcgcagaacatcaacaagaacctcgactggatca gcagaagccaggaaaggcgctaagctgctgatctactacgccaacaatctccag accggcgctgccctcgcggttctccggatctgggtccggactgatttcacctga ccattagctcccttcaaccggaggacttcgccacctattactgctaccagtataa gaacgcttggacttttgacaaggcaccaaggtcgaaatcaag
5811 gL14 輕鏈 核苷酸	24	Gacatccagatgaccagagcccagagctccctgtccgcatcagtggggggatcgcg tgactattacgtgcaaagcctcgcagaacatcaacaagaacctcgactggatca gcagaagccaggaaaggcgctaagctgctgatctactacgccaacaatctccag accggcgctgccctcgcggttctccggatctgggtccggactgatttcacctga ccattagctcccttcaaccggaggacttcgccacctattactgctaccagtataa gaacgcttggacttttgacaaggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtggtcatcttcccacctccgacgagcagctgaagtcgggaccg cctccgtcggtgctgctgaacaacttctacccccgagggccaaggtgcagt gaaggtggacaacgcctgcagtcgggcaactcccaggaatccgtcaccgagcag gactccaaggacagcacctactccctgtcctccacctgacctgtccaagggcg actacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggacctgtccag ccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc
5811 gH4 V-區	25	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFNNAAMYWVRQAPGKGLEWVARIITKP NNYATSYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTADYSRGDRWGQ GTMVTVSS
5811 gH4 重鏈	26	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFNNAAMYWVRQAPGKGLEWVARIITKP NNYATSYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTADYSRGDRWGQ GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLGK
5811 gH4	27	Gaagtgcagcttgtggagagcggaggtggactcgtgaagcctggcgatctctgc

V-區 核苷酸		gcctgtcctgcgccgctcgggggttacctttaacaatgccgcaatgtattgggt cagacaggccccgggaaaggggttgaatgggtggctaggattcggactaagccc aacaactacgcgacctcctacgccgatagcgtgaagggcagattcaccatctccc gggacgactcaaagaacacgctgtacctccaaaatgaactccctgaaaaccgagga caccgccgtgtactactgcaccgcggaactactcccggggcgatcgctggggacag gggactatgggtcactgtctcgagt
5811 gH4 重鏈 核苷酸	28	gaagtgcagcttgtggagagcggaggtggactcgtgaagcctggcggatctctgc gcctgtcctgcgccgctcgggggttacctttaacaatgccgcaatgtattgggt cagacaggccccgggaaaggggttgaatgggtggctaggattcggactaagccc aacaactacgcgacctcctacgccgatagcgtgaagggcagattcaccatctccc gggacgactcaaagaacacgctgtacctccaaaatgaactccctgaaaaccgagga caccgccgtgtactactgcaccgcggaactactcccggggcgatcgctggggacag gggactatgggtcactgtctcgagtgcctccaccaagggcccctccgtgtccctc tggccccttgtcccgggtccacctccgagctaccgcccgtctgggctgcctgggt caaggactactccccgagcccgtgacagtgctcctggaactctggcctgacc tccggcgtgcacacctccctgcccgtgctgcaagtccctccggcctgtactccctgt cctccgtcgtgaccgtgccctcctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaa cgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtac ggccctccctgccccccctgccctgccctgaatttctgggaggaccttccgtgt tctgttcccccaaaagcccaaggacacctgatgatctccggacccccgaagt gacctcgtgggtggacgtgtccaggaagatcccagggtccagttcaattgg tacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagt tcaactccacctaccgggtgggtgctccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggct gaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaagggcctgccctccagcatc gaaaagaccatctccaaggccaagggccaagccccgagccccaggtgtacacc tgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggt caagggttctaccctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagccc gagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcagggctccttcttcc tgtactctcggtgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctc ctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtcc ctgagcctgggcaag
人類IGKV1- 39 JK1受體 架構	29	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWFQGGTKVEIK
人類IGHV3- 15 JH3受體 架構	30	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKT DGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDAFDVWGQGT MVTVSS
人類IGKV1- 39 JK1受體 架構 核苷酸	31	gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagag tcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctattttaaattggatca gcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaa agtgggtcccacaaaggttcagtgccagtgatctgggacagatttcaactctca ccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagtta cagtaacccttgagcgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
人類IGHV3- 15 JH3受體 架構 核苷酸	32	Gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtaaagcctggggggtccctta gactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtaacgcctggatgagctgggt ccgccaggctccagggaaagggctggagtgggttgccgtattaaaagcaaaact gatggtgggacaacagactacgtgcaaccgtgaaaggcagattcaccatctcaa gagatgattcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgagga cacagccgtgtattactgtaccacagatgcttttgatgtctggggccaagggaca atggtcaccgtctcttca
兔Fc人類68- 140 a-syn	33	GAVVTGVTAVAQKTFEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEMPVDPDN EAYEMPSEEGYQDYEPPEAVEKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTL PIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSR SVSLTCMINGFYPSDI SVEWEKNGKAEDNYKTPAVLSDSGSYFLYKLSVPTSE WQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSI SRSPGK
5811兔-小鼠	34	NIQMTQSPFVLSASVGDRTLSCKASQININKNLWDYQQKHGEAPKLLMYANNLQ

嵌合輕鏈		TGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDVATYYCYQYKNGWTFGGGKLELKRDTDA APTVSIFPPPSSEQLTSSGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLSWTDQ DSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC
5811大鼠-小鼠嵌合重鏈	35	EMQLVESGGGLVQPKESLKI SCAASGFTFNNAAMYWVRQAPGKGLEWVARI RTKP NNYATSYADSVKGRFTISRDDSKSMVYLQMDNLKSEDTAMYICTADYSRGDRWGQ GVMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTKVDKIKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTGVVVDISKDDPEVQFSWFVD DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKT ISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN YKNTQFIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSP GK
5811大鼠-小鼠嵌合Fab-HIS重鏈	36	EMQLVESGGGLVQPKESLKI SCAASGFTFNNAAMYWVRQAPGKGLEWVARI RTKP NNYATSYADSVKGRFTISRDDSKSMVYLQMDNLKSEDTAMYICTADYSRGDRWGQ GVMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTKVDKIKIVPRDC HHHHHHHHHH

【0181】 現將參照附圖中示出的實施例，藉助於實例進一步描述本發明。

【0182】

實例

實例1：人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維之表現

編碼人類 α -突觸核蛋白之基因係使用標準分子生物學技術以合成方式產生且次選殖於載體pMH 10His TEV (含有CMV啟動子)中，以產生經工程改造以製備具有N端10His-TEV標籤之 α 突觸核蛋白的載體。所得載體係使用Expi293™表現系統(Invitrogen)根據製造商之方案轉染於Expi293F細胞中。 α 突觸核蛋白在培養基中積累，使用固定化金屬離子親和性層析法HisTrap excel管柱(GE Healthcare)自該培養基回收 α 突觸核蛋白。管柱係用25 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, pH 8.0洗滌，且蛋白質在相同緩衝液中用500 mM咪唑之分級梯度溶離。使用TEV蛋白酶移除10His標籤。樣品隨後經濃縮且去鹽，之後將裂解之蛋白質重新塗覆於HisTrap excel管柱且收集溢流道中之裂解之 α 突觸核蛋白。 α 突觸核蛋白進一步藉由凝膠過濾在HiLoad 26/600 Superdex 75 column (GE Healthcare)上純化，且內毒素藉由Proteus NoEndo濾筒(Generon)上之通

路移除。純化之 α 突觸核蛋白藉由SEC MALS證實為單體(圖1A)。

【0183】 亦在Expi293F細胞中表現野生型(未標記之)人類 α 突觸核蛋白。使用HiTrap Q管柱(GE Healthcare)經由陰離子交換自培養基回收蛋白質。管柱係用20mM TrisHCl pH 8.0洗滌，且蛋白質使用氯化鈉梯度溶離400mM。溶離份經濃縮且藉由經過HiPrep 26/10管柱(GE Healthcare)去鹽且用20 mM TrisHCl pH 8.0溶離。蛋白質係使用MonoQ 10/100GL管柱進一步純化，在20mM TrisHCl pH 8.0中用氯化鈉梯度溶離至400mM，之後在HiLoad 26/600 Superdex 75管柱(GE Healthcare)上凝膠過濾，其中溶離在PBS pH 7.4中(圖1B)。

【0184】 用於製備 α -突觸核蛋白原纖維之此未標記之野生型 α 突觸核蛋白單體係藉由在Vortemp56振盪培養箱(Labnet)中，在1200 rpm，37 °C下將純化之單體(PBS pH7.4中為9-10 mg/mL)連續攪動10天來獲得。原纖維形成藉由溶液之JC-1分析(Lee等人, Biochem. J. 2009, 418, 311-323)，及C傅立葉變換紅外光譜分析來評定。原纖維溶液中之未併入單體係藉由超速離心及穿過100KDa截止值膜之藉由，之後凝膠電泳來評定。在進一步研究中僅使用具有JC-1反應>15、較低量之可溶性單體(<5%)及主要吸收在1625與1630 cm^{-1} 之間的FTIR光譜之原纖維(圖2)。所製備之原纖維在-80°C下儲存。

【0185】

實例2：免疫接種及抗體分離

進行使用各種物種及免疫原之大量免疫接種策略。抗體5811來源於雌性史泊格多利大白鼠(>180g)，其已接受50 μg 之如上文所述表現(SEQ ID NO: 8)之未標記的野生型 α 突觸核蛋白單體之皮下免疫接種。

【0186】 使用不完全弗氏佐劑(IFA)，以21天時間間隔給予大鼠3次加打注射，免疫後第14天自尾部靜脈放血。在最終加打之後第14天發生終止，在-80°C下在10% DMSO/FCS中製備及冷凍脾、淋巴結、骨髓及周邊血液單核細胞之單細胞懸浮液。

【0187】

***B*細胞培養物**

B細胞培養物係使用類似於Tickle等人, 2015. J Biomol Screen: 20 (4), 492-497所描述之方法的方法製備。簡言之，來自經免疫接種之動物的淋巴結或脾細胞來源之B細胞係在5% CO₂之氛圍中在37°C下於帶有條形碼之96孔組織培養物板中以大約2000-5000個細胞/孔之密度培養七天，該培養板具有補充有以下各者之200微升/孔RPMI 1640培養基(Gibco BRL)：10% FCS (Sigma Aldrich)、2% HEPES (Sigma Aldrich)、1% L-麩醯胺酸(Gibco BRL)、1%青黴素/鏈黴素溶液(Gibco BRL)、0.1% β-巰基乙醇(Gibco BRL)、1%活化之人類PBMC上清液(BSS) 及X射線輻射之突變EL4小鼠胸腺瘤細胞(5x10⁴個/孔)。使用來自經免疫接種之所有動物的B細胞建立培養物，且取樣總計大約1.7×10⁹個B細胞。

【0188】 根據本發明之抗體5811係由活化之淋巴結來源之B細胞產生，該等B細胞係以大約2000個細胞/孔之密度培養。除了脾細胞以外，還將淋巴結用於抗體發現以得到B細胞之替代源，從中得到樣品且鑑別新穎抗體。自經免疫接種全長單體人類α突觸核蛋白之大鼠取樣大約3.3×10⁸個細胞。

【0189】

初次篩選

使用塗佈有作為標靶抗原源之生物素標記之重組人類 α 突觸核蛋白全長單體的Superavidin™珠粒(Bangs Laboratories)，使用基於螢光之均質結合分析確定B細胞培養上清液中之人類 α 突觸核蛋白特異性抗體之存在。如本文所述之重組人類 α 突觸核蛋白係使用3倍莫耳過量之生物素生物素標記。按順序使用低莫耳過量之生物素以避免存在於 α 突觸核蛋白分子內之全部七個離胺酸殘基完全修飾。在40°C下使 α 突觸核蛋白單體與生物素一起培育隔夜且第二天使用Zeba™旋轉去鹽管柱移除游離生物素。篩選涉及將10 ml上清液自帶條碼之96孔組織培養物轉移於帶條碼之384孔黑壁分析板中，該分析板含有使用Agilent Bravo液體處理器固定在Superavidin珠粒(10微升/孔)上之生物素標記之重組人類 α 突觸核蛋白單體。結合經由山羊抗大鼠IgG Fc γ 片段特異性Alexafluor647結合物(Jackson)展現。在TTP Labtech Mirrorball上對培養板讀數以便鑑別含有 α 突觸核蛋白特異性IgG之孔。

【0190】

二次篩選

在初次篩選之後，使用Beckman Coulter BiomekNXP 到達揀選機器人將陽性上清液固結在96孔帶條形碼之主培養板上且細胞培養板中之B細胞在-80°C下冷凍。隨後使用生物素標記之重組人類 α 突觸核蛋白單體或生物素標記之重組人類 α 突觸核蛋白原纖維在抗生蛋白鏈菌素捕獲ELISA分析中篩選主培養板。進行此以鑑別提供與單體及原纖維重組人類 α 突觸核蛋白兩者之結合的孔，且排除展示與Superavidin™珠粒之脫靶結合的任何假陽性孔。鑒於原纖維之不溶性質，與溶液中之蛋白質一起使用之習知ELISA塗佈方案不受歡迎。決定採用最小生物素標記方案以保存原纖維結

構且保存原纖維在預塗佈有抗生蛋白鏈菌素之ELISA板上的有效塗佈。

【0191】藉由在PBS中組合生物素標記之重組 α 突觸核蛋白單體(如上文所述)與50倍過量之未標記之重組 α 突觸核蛋白，如本文所述產生生物素標記之 α 突觸核蛋白總原纖維。藉由JC1分析(Lee等人, *Biochem. J.* 2009, 418, 311-323)證實原纖維形成。

【0192】將PBS中之生物素標記之單體或生物素標記之原纖維捕獲於塗佈碳酸鹽($\text{dH}_2\text{O} + 0.16\% \text{Na}_2\text{CO}_3 + 0.3\% \text{NaHCO}_3$)之緩衝液中之塗佈有抗生蛋白鏈菌素的384孔Maxisorp培養板上。培養板用1% w/v PEG/PBS阻斷且接著與10微升/孔之B細胞培養物上清液(用阻斷緩衝液1:1稀釋)一起培育。向培養板中添加二次HRP結合山羊抗大鼠IgG Fc γ 片段特异性HRP結合物(Jackson)，隨後利用TMB受質(3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，得自EMD Millipore；10微升/孔)目測結合。使用BioTek Synergy 2微量盤式讀取器，在630 nM量測光密度。初次結合分析鑑別83個成功結果且在ELISA篩選之後，彼等成功結果中之29個展示與單體及原纖維重組人類 α 突觸核蛋白兩者結合。

【0193】選擇展現對重組原纖維之最強ELISA結合信號的B細胞上清液以藉由表面電漿子共振進一步分析從而鑑別具有對重組人類 α 突觸核蛋白單體、重組人類 α 突觸核蛋白原纖維及重組小鼠 α 突觸核蛋白原纖維之最佳解離速率的彼等。測試26種不同B細胞之上清液，19個孔提供對重組人類原纖維 $<1 \times 10^{-5}$ 之解離速率(kd)。在此等中，6個孔提供對重組小鼠 α 突觸核蛋白單體小於 1×10^{-5} 之解離速率(kd)。選擇所有19種上清液以用於可變區恢復。

【0194】

可變區恢復

為允許來自一系列所關注上清液之抗體可變區基因的恢復，必須進行解迴旋步驟以實現在含有B細胞之異質群體之指定孔中的抗原特異性B細胞之鑑別。此係使用螢光焦點方法(Clargo等人, 2014. MAbs: 6(1), 143-159)實現。簡言之，使陽性孔中之分泌免疫球蛋白之B細胞與塗佈有生物素標記之重組人類 α 突觸核蛋白原纖維(使用如上文所述之1:50混合物產生)及山羊抗大鼠IgG Fc γ 片段特異性FITC結合物(Jackson)之1:1200最終稀釋液的抗生蛋白鏈菌素珠粒(New England Biolabs)混合。在37°C靜態培育1小時之後，由於在該B細胞周圍存在螢光光環而可鑑別出抗原特異性B細胞。接著利用Eppendorf微操作器挑選多個使用Olympus顯微鏡所鑑別的此等個別B細胞純系且沈積至PCR管中。

【0195】 使用重鏈及輕鏈可變區特異性引子，藉由逆轉錄(RT)-PCR自單細胞中回收抗體可變區基因。利用併入3'及5'末端處之限制位點的嵌套式2° PCR進行兩輪PCR，使得可變區選殖於小鼠IgG Fc γ 1或Fab-10HIS (VH)或小鼠 κ (VL)哺乳動物表現載體中。來自9種不同上清液之抗 α 突觸核蛋白抗體基因成功選殖於表現載體中。使用ExpiFectamine 293 (Invitrogen)將重鏈及輕鏈構築體共轉染於Expi-293細胞中且以30 ml體積在125ml錐形瓶中表現大鼠-小鼠嵌合重組抗體5811 mFab或5811 mIgG1 (包含大鼠5811可變區及小鼠恆定區(根據IgG之SEQ ID NO: 34及35及Fab之SEQ ID NO: 34及36))。5-7天表現之後，收集上清液且使用親和層析純化。

【0196】

瞬時上清液之ELISA篩選

隨後藉由ELISA使經純化之大鼠-小鼠嵌合抗體經受進一步篩選。將

生物素標記之重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維捕獲於塗佈碳酸鹽(dH₂O + 0.16%Na₂CO₃ + 0.3% NaHCO₃)之緩衝液中之塗佈有抗生蛋白鏈菌素的384孔Maxisorp培養板(ThermoScientific/Nunc)上。獨立的培養板亦塗佈有對應於根據SEQ ID NO: 8 (肽PVDPDNEAYE)之人類 α 突觸核蛋白之殘基117至126的生物素標記肽以檢查是否短暫結合於此或分子上之不同區域。培養板用1% w/v PEG/PBS阻斷且接著與純化之短暫上清液之若干稀釋液一起培育。向培養板中添加二次HRP結合山羊抗小鼠IgG Fc抗體(Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch)，隨後利用TMB受質(3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，得自EMD Millipore；10微升/孔)目測結合。使用BioTek Synergy 2微定量盤式讀取器，在630 nM量測光密度。呈IgG Fcy1 (包含SEQ ID NOs: 34及35)形式及呈Fab (包含SEQ ID NO: 34及36)形式之抗體5811之資料展示於圖3A及3B中。如可見，5811抗體展示與單體及原纖維重組人類 α 突觸核蛋白兩者之結合，且亦展示與PVDPDNEAYE肽之結合。

【0197】 進行進一步表徵以測定該等抗體之活性、親和力及親合力、抗原決定基結合及生物物理學特性。除非明確提及使用人類化型式，否則使用大鼠-小鼠嵌合抗體(5811 mFab或5811 mIgG1)進行實驗。

【0198】

實例3：抗體表徵

表面等離子共振動力學

藉由使用表面電漿子共振技術在Biacore T200儀器上測定相互作用動力學。使用胺-偶合化學在CM5晶片表面之三個不同流量槽上各自固定三種不同配位體，該等配位體包括如本文所述製備之重組全長人類 α 突觸

核蛋白單體、經純化之重組人類 α 突觸核蛋白原纖維，及經純化之重組小鼠 α 突觸核蛋白原纖維。三種配位體係在10 mM NaAc, pH 3.5中製備，且固定於獨立的流量槽表面上以在10 μ l/min之流動速率下達到以下固定水準：分別地對於 α 突觸核蛋白單體約30反應單位(RU)、對於人類 α 突觸核蛋白原纖維約40 RU，及對於小鼠 α 突觸核蛋白原纖維約300 RU。緩衝液HBS-EP+ (GE healthcare Bio-Sciences AB)用作操作緩衝液以進行配位體固定及動力學分析。隨後量測抗 α 突觸核蛋白單株5811 mIgG1抗體及單株5811 mFab抗體對三種配位體之結合。在100 μ l/min之流動速率下，在3個流量槽上以800 nM至0.195 nM之7種不同濃度注射單株mIgG1或mFab抗體，接觸時間為3分鐘且解離時間為30分鐘。藉由在10 μ l/min下持續90 s一次注射50 mM HCl，且在10 μ l/min下持續60 s再次注射50 mM HCl來重新產生表面。使用Biacore T200評估軟體(版本3.0)，使用二價分析物模型(假設對於mIgG1型式無塊材貢獻(RI=0)及全局Rmax)及1:1模型(具有可撓性塊材貢獻(局部RI)與全局Rmax)分析資料。

【0199】 mIgG1及mFab與固定標靶之結合的動力學值展示於表2中。mIgG1型式展示，比較對人類 α 突觸核蛋白單體之親和力，對人類 α 突觸核蛋白原纖維有表觀選擇性親和力，解離常數KD對於人類原纖維低超過10倍。

表2

樣品	人類單體			人類原纖維			小鼠原纖維		
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)
5811 mFab	1.26E+06	3.69E-04	0.29	1.04E+06	6.28E-04	0.60	3.12E+04	1.34E-03	42.92
5811 mIgG1	4.21E+05	2.25E-04	0.53	1.05E+06	2.87E-05	0.03	6.94E+05	8.27E-02	119.07

【0200】

與 β 突觸核蛋白之結合

使用rPeptide β 突觸核蛋白藉由西方墨點法測試針對人類 α 突觸核蛋白培養之抗體與人類 β 突觸核蛋白之結合。在4-12% Bis/Tris凝膠上進行1微克之突觸核蛋白且印跡於PVDF膜上。將膜在具有3% BSA及0.1% Tween20之PBS中封端。將抗體5811 mIgG1添加至經阻斷之墨點且在室溫下培育1小時，用PBS、0.1% Tween20洗滌且與二次抗體-HRP結合物(抗兔H+L HRP結合物，Bethyl，A120-101P)一起培育1小時。將墨點在具有0.1% Tween20、PBS及水之PBS中充分洗滌。在添加ECL西方墨點法基質(Pierce)之後量測化學發光。如圖4(A)第3軌跡中所示，抗體5811 mIgG1不與人類 β -突觸核蛋白結合。

【0201】

抗原決定基定位**NMR**

將人類 α -突觸核蛋白選殖於pET28a表現載體中，使得表現無任何標籤之蛋白質。將構築體轉移至大腸桿菌(*E.coli*) BL21 (DE3)細胞(Stratagene)中，且在氧化氘(D₂O)存在及缺失下在具有C¹³標記之DL-葡萄糖及N¹⁵標記之硫酸銨之定義培養基中生長細胞。在OD_{600nm} = 1下用300 mM IPTG誘導表現且在30°C下將培養物培育4小時。使細胞粒化且藉由在100 ml溶解緩衝液(20 mM Tris/HCl pH 8.0，25單位核酸酶(Merck Millipore)、完整EDTA游離蛋白酶抑制劑混合物(2錠劑，Roche)及10 mg溶菌酶(Sigma))中進行三次冷凍-融化循環來溶解。藉由在18 000 rpm下離心來澄清溶解產物，且使澄清之溶解產物穿過0.22 μ m過濾器

(Stericup, Millipore)。將無菌溶解產物裝載於用20 mM Tris/HCl pH 8.0, 5CV平衡之MonoQ 10/100GL (GE Healthcare)上且在相同緩衝液中用500 mM NaCl之梯度溶離蛋白質。在MonoQ 10/100GL管柱上重複最純溶離份之進一步純化, 之後在20 mM Tris/HCl pH 8.0中進行5倍稀釋。最純溶離份經彙集, 用10kDa MWCO離心濃縮器(Centriprep, Millipore)濃縮, 藉由尺寸排阻在HiLoad 26/600 Superdex 75管柱(GE Healthcare)上純化, 且在25 mM磷酸鈉緩衝液, 100 mM NaCl (pH 6.4)中溶離。來自Superdex 75管柱之溶離份經彙集且添加疊氮化鈉(0.02%最終濃度)及AEBSF (10 μ M最終濃度)。最終蛋白質濃度為大約5 mg/ml。

【0202】 使大鼠-小鼠5811 Fab抗體在CHO SXE中表現為經His標記之實體且藉由His標籤親和層析自上清液純化, 使該蛋白質與來自上清液之HisTrap Excel (GE Healthcare)結合且用PBS中之250 mM咪唑溶離。將溶離庫裝載於HiTrap GammaBind Plus Sepharose (GE Healthcare)上, 管柱用PBS洗滌且蛋白質用0.1M甘胺酸-HCl pH 2.6溶離, 且用0.75 M磷酸鈉pH 9將pH值調節至pH 6。在HiPrep 26/10去鹽管柱上將溶離之Fab-His蛋白質緩衝液互換於NMR緩衝液(25 mM磷酸鈉pH 6.4, 100 mM NaCl)中。Fab-His蛋白質溶離份經濃縮且添加蛋白酶抑制劑AEBSF (10 μ M最終濃度)及疊氮化鈉(0.02%最終濃度), 之後在Millex GV 0.22 μ m過濾器上進行過濾器滅菌。

【0203】 使用抗體之Fab片段, 使用異核核磁共振(NMR)光譜分析測定具有SEQ ID NO.: 9之VL及SEQ ID NO.: 10之VH的抗體5811之抗原決定基結合。

【0204】

α -突觸核蛋白之主鏈分配

NMR樣品通常體積為350 μ l，在5 mm Shigemi試管中蛋白質濃度為360 μ M $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標記或430 μ M $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標記之人類 α -突觸核蛋白。緩衝條件為100 mM NaCl、25 mM磷酸鈉pH 6.4、10 μ M AEBSF、0.02% NaN_3 。所有實驗均在20 $^\circ\text{C}$ 、在裝配有低溫冷卻探針的600 MHz Bruker AVIII或800 MHz Bruker AVII光譜儀上記錄。蛋白質中殘基之主鏈NMR信號之間的順序連接 $\text{H}_\text{N}(\text{i})-\text{N}(\text{i})-\text{N}(\text{i}\pm 1)$ 係使用3D (H)N(CA)NNH實驗(Weisemann等人, 1993 3D Triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and ^{15}N resonances in ^{15}N - and ^{13}C -labelled proteins. J. Biomol. NMR 3)進行，該實驗分別記錄28、28及10 ppm之光譜寬度及在 ^{15}N 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中117 (F1)、117 (F2)及140 (F3) ms之收集時間，每增量8次掃描及1.5 s弛豫延遲。非均一取樣係在10% (40000個超複合物點中的4000個)的取樣密度下使用，得到2.75天之總擷取時間。使用TROSY-HNCA (Grzesiek及Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440 ; Salzman 等人, 1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 13585-90)及TROSY-HNCACB (Wittekind 及 Mueller, 1993 HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. J. Magn. Reson. Ser. B 101, 201-205 ; Salzman 等人, 1999. TROSY-type Triple Resonance Experiments for Sequential NMR Assignment of Large

Proteins. J. Am. Chem. Soc. 121, 844-848)實驗證實依序連接且鑑別殘基類型。TROSY-HNCA實驗係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用23、28、10 ppm之譜寬及12.1 (F1)、21.7 (F2)及100 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量8次掃描，1.5秒弛豫延遲，1天總擷取時間)，而TROSY-HNCACB係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用56、28及10 ppm之譜寬及8.2 (F1)、21.7 (F2)及100 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量8次掃描，1.5秒弛豫延遲，1.7天總擷取時間)。主鏈羰基賦值獲自TROSY-HNCO光譜(Grzesiek及Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440；Salzmann等人, 1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 13585-90)，該TROSY-HNCO光譜在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用10、29、10 ppm之譜寬及80 (F1)、21.7 (F2) 及150 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量8次掃描及1.5 s弛豫延遲)。非均一取樣係在15% (8050個超複合物點中的1208個)的取樣密度下使用，得到19小時之總擷取時間。NMR光譜係使用NMRPipe (Delaglio等人, 1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR 6, 277-93)處理，其中使用線性預測將氮氣之有效擷取時間延長高達1倍。使用Harvard迭代軟閾值法(Hyberts等人, 2012 Application of iterative soft thresholding for fast reconstruction of NMR data non-uniformly sampled with multidimensional Poisson Gap scheduling. J Biomol NMR 52, 315-27)重構非均一取樣資料，資料經重構為下一傅里葉數目，將間接擷取時間提高高達60%。使用Sparky (Goddard及Kneller, D. G. SPARKY 3. In.,

University of California, San Francisco)進行資料分析，從而得到133個殘基(對應於99%殘基(不包括脯胺酸殘基及N端甲硫胺酸))之醯胺質子及氮共振的賦值。 α 突觸核蛋白唯一未賦值之另一殘基係位置2處之天冬胺酸。

【0205】

定位抗體5811Fab片段之結合位點

使用含有10%莫耳過量之未經標記之5811 Fab的150 μ M經 $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標記之人類 α 突觸核蛋白的樣品進行5811之結合位點之定位。在相同緩衝液中製備樣品，如上文針對 α -突觸核蛋白之主鏈分配所述。 ^1H 、 ^{15}N 及 ^{13}C 化學位移變化係藉由比較在 α 突觸核蛋白/Fab複合物上記錄之TROSY-HNCO (Grzesiek及Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440; Salzman等人, 1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 13585-90)光譜與在游離 α 突觸核蛋白上記錄之等效物對照光譜來測定。游離 α 突觸核蛋白之對照TROSY-HNCO實驗係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用10、28及10 ppm之譜寬及80 (F1)、21.7 (F2)及150 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量16次掃描，1.4 s弛豫延遲)。非均一取樣(NUS)係在25% (8050個超複合物點中的2013個)的取樣密度下使用，得到2.5天之總擷取時間。 α -突觸核蛋白/Fab複合物之TROSY-HNCO實驗係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用10、28及10 ppm之譜寬及80 (F1)、21.7 (F2)及80 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量32次掃描，1.5 s弛豫延遲)。非均一取樣係在25% (4477個超複合物點中的1119個)的取樣

密度下使用，得到2.8天之總擷取時間。NMR光譜係使用NMRPipe (Delaglio等人, 1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-93)處理，NUS資料之重構使用mddnmr (Orekhov及Jaravine, 2011. Analysis of non-uniformly sampled spectra with Multi-Dimensional Decomposition. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 59, 第271-292頁)進行。氮氣維度之有效擷取時間在資料重構期間增加高達1倍。

【0206】化學位移變化係使用最小位移方法(Williamson等人, 1997 Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry* 36, 13882-9)，基本上如先前所描述 (Veverka等人, 2008 Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* 27, 585-95)分析，例外之處在於對用於計算組合之化學位移變化($\Delta\delta$)之方程式進行修改以包括羰基化學位移，從而得到以下等式：

$$\Delta\delta = \frac{\sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_{N\alpha N})^2 + (\Delta\delta_{C\alpha C})^2}}{3}$$

其中 $\Delta\delta_{HN}$ 、 $\Delta\delta_N$ 及 $\Delta\delta_C$ 分別為 ^1H 、 ^{15}N 及 ^{13}C 化學位移的差異。 αN 及 αC 分別對應於比例因數0.2及0.35，其用於考慮醯胺質子、氮及羰基化學位移在化學位移範圍內的差異。

【0207】為鑑別 α 突觸核蛋白上之Fab結合位點(抗原決定基)，使用組合之最小位移相對於蛋白質序列之直方圖揭示含有擾動顯著之信號之 α

突觸核蛋白的區域。若個別胺基酸之組合化學位移變化大小超過所有胺基酸之組合化學位移變化平均值之臨限值加一個相對於該平均值之標準差，則選擇此等殘基作為Fab結合位點中的可能接觸殘基以便進一步評價。

【0208】 顯著擾動殘基鑑別為最小位移至少大於所計算所有位移之平均值加一個標準差的殘基。應用四種不同臨限值鑑別Fab所結合的殘基。涉及結合位點的殘基依據遞增的嚴格度如下評分：最小位移超過所計算所有位移之平均值加一個標準差的殘基(>0.025574)；最小位移超過所計算所有位移之平均值加兩個標準差的殘基(>0.042552)；最小位移超過所計算所有位移之平均值加三個標準差的殘基(>0.059530)；最小位移超過所計算所有位移之平均值加四個標準差的殘基(>0.076508)。在此分析中，脯胺酸殘基由於其不含醯胺質子而未能鑑別。

【0209】 5811 Fab之 α 突觸核蛋白抗原決定基因此依據遞增的嚴格度定義如下：所計算所有位移之平均值加一個標準偏差：E114、D115、V118、D119、D121、N122、E123、A124、Y125、E126、M127、S129、Q134、D135及Y136；所計算所有位移之平均值加兩個標準偏差：V118、D119、D121、N122、Y125、M127、D135及Y136；所計算所有位移之平均值加三個標準偏差：V118、D119、D121、N122、M127、D135及Y136；相對於所計算所有位移之平均值加四個標準偏差無殘基位移。

【0210】 使用用於NCBI參考序列NP_000336.1之胺基酸編號，發現5811 Fab結合至少以下 α 突觸核蛋白殘基(平均值+ 3 SD) V118、D119、D121、N122、Y125、M127、D135及Y136。抗體亦可結合所有以下殘基(平均值+ 1 SD) E114、D115、V118、D119、D121、N122、E123、

A124、Y125、E126、M127、S129、Q134、D135及Y136。

【0211】如圖4B中所示，在與5811 mFab結合時，dCN人類 α 突觸核蛋白之NMR化學位移變化。5811 mFab之預測抗原決定基表現為在人類 α -突觸核蛋白(SEQ ID NO: 8)之胺基酸114及136內包含殘基。

【0212】

肽圖譜

與抗體5811 mFab結合之抗原決定基之進一步表徵係藉由使用表示人類 α 突觸核蛋白之C端區且覆蓋人類 α 突觸核蛋白之C端區之短(通常為9聚體或10聚體)肽進行。此等用於競爭性表面電漿子共振分析以確定任一者是否能夠抑制抗體與固定在Biacore晶片上之單體 α 突觸核蛋白或預成型 α 突觸核蛋白原纖維之結合。隨後選擇展示最大抑制水準之肽以進行與抗體之共同結晶研究以便證實準確的抗原決定基。

【0213】肽係由Peptide Protein Research Ltd., Bishop's Waltham, U.K.供應且藉由Fmoc固相肽化學根據Atherton及Sheppard之方法合成。(參考文獻：Atherton, E.; Sheppard, R.C. (1989). Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press)。N及C肽端分別以乙醯基及醯胺基封端，不同之處在於就表示 α -突觸核蛋白之N端及C端之肽而言，其中胺基及羧基分別保持游離。以10 mM在DMSO中製備肽儲備溶液。肽之完整清單示於表3中。

表3

肽ID	序列
AS104-113	EEGAPQEGIL
AS109-118	QEGILEDMPV
AS111-120	GILEDMPVDP
AS113-122	LEDMPVDPDN

AS115-124	DMPVDPDNEA
AS117-126	PVDPDNEAYE
AS119-128	DPDNEAYEMP
AS121-130	DNEAYEMPSE
AS123-132	EAYEMPSEEG
AS125-134	YEMPSEEGYQ
AS127-136	MPSEEGYQDY

【0214】 使用Biacore 3000儀器(GE Healthcare)將重組人類 α 突觸核蛋白單體及預成型 α 突觸核蛋白原纖維固定在CM5晶片上。在藉由以10 μ l/min之流動速率注射100 μ l 50 mM N-羥基丁二醯亞胺與200 mM 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺之新鮮1:1 (v/v)混合物來活化羧甲基聚葡萄糖表面之後，HBS-EP (GE Healthcare)作為操作緩衝液，藉由注射在10 mM乙酸鹽pH 5.0中為5 μ M之100 μ l單體及原纖維經過單獨的流量槽上來達成偶合。參考流量槽以相同方式活化且隨後所有流量槽表面均以1 M乙醇胺HCl pH 8.5之50 μ l脈衝去活化。

【0215】 肽溶液以100 μ M在操作緩衝液中製備且肽空白對照製備為在操作緩衝液中1/100 DMSO之稀釋液。在操作緩衝液中以50.5 nM製備5811 mFab之溶液，之後與2 μ l空白對照或稀釋肽一起預培育198 μ l以得到50 nM Fab與1 μ M肽或對照之最終混合物。藉由以10 μ l/min注射30 μ l混合物且在注射結束前5秒記錄報導點來記錄各樣品之感測器圖譜。藉由注射兩次10 μ l 40 mM HCl及一次5 mM NaOH在每次循環結束時重新產生晶片。使對照循環與肽循環交替。

【0216】 各種肽之抑制程度經計算為相比於相鄰對照循環之平均值之百分比變化，在報導點時所量測之回應單元之百分比變化。

【0217】 各種 α 突觸核蛋白肽之抑制水準顯示於圖5中。僅針對以下各者觀測到5811 mFab與 α 突觸核蛋白單體或原纖維之顯著抑制：AS113-

122、AS115-124、AS117-126及AS119-128，其中對任一形式之 α -突觸核蛋白之抑制水準極其類似。對肽AS117-126觀測到最強抑制水準，對於與單體及原纖維之結合分別為81%及90%。以上四種肽中之共有殘基係119至122，其因此包含抗原決定基之部分。因為對肽AS113-122及AS119-128而言抑制水準降至僅2至5%，所以殘基115至118及123至124亦必須包含抗原決定基之部分。

【0218】 此研究之結果表明抗體5811之抗原決定基包含殘基115至124 (DMPVDPDNEA)。

【0219】

丙胺酸掃描

根據製造商說明在Expi293系統(Thermo Fisher Scientific)中製備及表現人類 α 突觸核蛋白(His標記)之單一胺基酸突變體。丙胺酸殘基置放在位置118至128處，例外之處在於殘基124，其已經係丙胺酸且改變為絲胺酸(表4)。自上清液純化得到突變蛋白質，該上清液在離心(4200 rpm，2小時)之後繼之以無菌過濾(Stericup，Millipore)獲得。將上清液裝載於用25 mM磷酸鈉及500 mM NaCl預平衡及洗滌之HisTrap Excel管柱(GE Healthcare)上。在相同緩衝液中用咪唑之梯度溶離結合蛋白質直至500 mM。含所關注蛋白質之溶離份係藉由NuPage凝膠電泳鑑別，經彙集，使用Centriprep 10 kDa MWCO (Millipore)濃縮且在PD-10管柱上緩衝液互換於PBS中。使用Ultracel 3KDa MWCO離心旋轉濃縮器(Millipore)濃縮蛋白質溶離份。使濃縮物穿過0.22 μ m滅菌過濾器(Millex GV, Millipore)且儲存於-20°C下。以與野生型人類 α 突觸核蛋白類似之量表現所有突變體(圖6A)。

表4

突變 α -突觸核蛋白
V118A
D119A
P120A
D121A
N122A
E123A
A124S
Y125A
E126A
M127A
P128A

【0220】 在4-12% Bis/Tris NuPage凝膠上，使用1 μ g/蛋白質/軌跡分析人類 α 突觸核蛋白之突變體且印跡於PVDF膜(iBlot mini stack, Thermo Fisher Scientific)上。墨點在阻斷緩衝液(磷酸鹽緩衝鹽水PBS中之3%牛血清白蛋白，0.1% Tween20)中經阻斷且與抗體5811 mFab或抗體5811 mIgG1一起培育。在室溫下培育1小時之後，用PBS中之0.1% Tween洗滌墨點。將墨點與二次偵測抗體抗小鼠IgG Fc HRP結合物(AB5879, Abcam)在阻斷緩衝液中培育1小時，洗滌且在添加ECL西方墨點法基質(Pierce)之後偵測化療-發光。

【0221】 如圖6B及6C中所示，抗體5811 mFab及5811 mIgG1未識別對應於人類 α 突觸核蛋白D119A、N122A及Y125A之3種突變體。此分析表明，人類 α -突觸核蛋白中之此等胺基酸對於抗體5811 mFab及5811 mIgG1與人類 α 突觸核蛋白之結合而言係必須的。

【0222】

實例4：抗體人類化

藉由將來自大鼠V區的CDR移植至人類生殖系抗體V區構架上以使大鼠抗體5811人類化。為了恢復抗體活性，來自大鼠V區之許多構架殘基亦保留於人類化序列中。使用Adair等人(WO91/09967)概述之方案選擇此等殘基。大鼠抗體(供體)V區序列與人類生殖系(受體) V區序列的比對以及所設計的人類化序列顯示於圖7及圖8中。自供體移植至受體序列之CDR如Kabat (Kabat等人, 1987)所定義，但其中使用組合之Chothia/Kabat定義之CDR-H1除外(參見Adair等人, 1991 Humanized antibodies. WO91/09967)。

【0223】 藉由DNA 2.0 Inc.之自動化合成方法，設計且構築編碼多個變異體重鏈及輕鏈V區序列的基因。藉由寡核苷酸引導之突變誘發(在一些情況下包括CDR內之突變)修飾VH及VK基因產生重鏈及輕鏈V區之其他變異體。為了短暫表現於哺乳動物細胞中，將人類化輕鏈V區基因選殖入UCB輕鏈表現載體pMhCK中，該表現載體含有編碼人類κ鏈恆定區的DNA (Km3異型)。將人類化重鏈V區基因選殖入UCB人類γ-4重鏈表現載體pMhγ4PFL中，該表現載體含有編碼具有鉸鏈穩定化突變S241P之人類γ-4重鏈恆定區的DNA (Angal等人, Mol. Immunol. 1993, 30(1):105-8)。亦類似地製備嵌合大鼠-人類5811抗體(包含SEQ ID NO: 9及10)。將所得重鏈及輕鏈載體共同轉染於Expi293™懸浮液細胞中係使用ExpiFectamine™ 293轉染劑(A14525, ThermoFisher Scientific)實現，且提供人類化重組抗體在人類IgG4P或Fab-HIS型式中之表現。

【0224】 選擇人類V區IGKV1-39與JK1 J區(IMG T, <http://www.imgt.org/>)作為抗體5811輕鏈CDR的受體。移植物gL5、gL8及gL14中之輕鏈構架殘基皆來自人類生殖系基因，其中保留供體殘基酪

胺酸(Y71)之殘基71 (參考SEQ ID NO: 13)除外。移植物gL14之CDRL3中之殘基94由甘胺酸(G)突變成丙胺酸(A)殘基，因此修飾潛在的天冬醯胺脫醯胺位點。

【0225】 選擇人類V區IGHV3-15與JH3J區(IMG T，<http://www.imgt.org/>)作為抗體5811之重鏈CDR的受體。移植物gH4中之重鏈構架殘基皆來自人類生殖系基因，其中分別保留供體殘基丙胺酸(A49)及丙胺酸(A100)之殘基49及100(參考SEQ ID NO: 25)除外。

【0226】 使變異體人類化抗體鏈及其組合表現且評估其效力(相對於親本抗體)、其生物物理學特性及用於下游處理的適合性。

【0227】 如表5中所示，所有移植物均保留與親本大鼠-人類抗體對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白之親和力相同或相似的親和力。

表5

抗體5811 變異體	輕鏈 供體殘基	重鏈 供體殘基	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	親和力(KD) pM
嵌合大鼠-人類5811	-	-	1.56E+06	2.42E-05	15.6
5811gL5gH4	Y71	A49, A94	2.74E+06	4.10E-05	15.0
5811gL8gH4	-	A49, A94	3.26E+06	5.17E-05	15.9
5811gL14gH4	A100	A49, A94	1.10E+06	2.04E-05	18.5

【0228】

實例5：免疫組織化學

藉由Asterand Bioscience (Royston, United Kingdoms)進行免疫組織化學。在自動加熱及冷卻下，使用Dako PT Link及EnVision FLEX靶修復溶液(pH 6)在97°C下使冷凍切片(10 μ m)首先進行抗原修復程序，持續20 min。所有後續培育步驟均在室溫下進行。冷凍切片經風乾30分鐘，在於1×PBS中製備之4%多聚甲醛中固定10分鐘，在Dako EnVision™ FLEX

洗滌緩衝液(Dako)中洗滌且隨後裝載於Dako自動染色儀Plus中。藉由使切片與Dako過氧化酶阻斷劑(Dako)一起培育5分鐘來阻斷內源性過氧化酶活性。隨後用1×PBS將切片洗滌兩次，之後與Dako CSA II蛋白質阻斷劑(Dako)一起培育10分鐘。藉由噴氣移除蛋白質阻斷溶液且使切片與在Dako抗體稀釋劑(Dako)中稀釋(0.05 µg/ml)之5811大鼠-小鼠IgG1抗體(包含SEQ ID NO: 34及35)一起培育30分鐘。在培育之後，切片用1×PBS洗滌兩次，隨後與抗小鼠Dako Flex聚合物-HRP基質(Dako)一起培育20分鐘，洗滌兩次且隨後與二胺基聯苯胺基質(Dako)一起培育10分鐘。藉由以蒸餾水沖洗載片停止顯色反應。在色素形成之後，自Dako自動染色儀Plus移出切片且用蘇木精對其人工對比染色，在遞增之乙醇系列中脫水，在三種變化之二甲苯中澄清且滑動加上蓋玻片處於DPX封固劑(Sigma-Aldrich)下。使用Aperio ScanScope AT Turbo系統(Leica Biosystems)獲得染色切片之數位影像。在來源於五種不同pS129- α 突觸核蛋白-陽性及三種不同pS129- α 突觸核蛋白-陰性供體之腦切片(1個切片/供體)上測試抗體5811 mIgG1。抗體5811 mIgG1標記PD患者之顳葉皮質及黑質中之神經纖維網及偶發性路易體樣特徵(圖9A-E)。在非PD腦組織中，抗體5811 mIgG1標記顳葉皮質中之神經纖維網，但在皮質或黑質中未觀測到路易體樣結構(圖9F-H)。此等觀測結果表明，抗體5811 mIgG1與來自PD及非PD患者之腦組織之神經纖維網中的正常 α -突觸核蛋白結合，但其僅與存在於PD患者中之路易體中的病理 α -突觸核蛋白結合。

【0229】

實例6：人類化抗體之表徵

測試三種Ab5811人類化IgG4P抗體(5811gL5gH4；5811gL8gH4)

5811gL14gH4；表1中之序列)以評定其生物化學及生物物理學特徵，包括熱穩定性(T_m)、實驗pI、疏水性、溶解度(PEG沈澱分析)、空氣/液體界面處之聚集穩定性及相對於Asn93對CDR-L3 (5811gL14gH4具有N(93)A基元且5811gL8gH4及gL5gH4兩者具有N(93)G基元)之脫醯胺傾向的化學穩定性。

【0230】

熱穩定性(T_m)量測

使用Thermofluor分析來測定熔融溫度(T_m)或去摺疊中點時的溫度。在此方法中，使用螢光染料SYPRO橙，根據對隨著溫度升高而暴露之疏水區域的結合來監測蛋白質去摺疊過程。

【0231】 反應混合物含有5 μ l 30x SYPRO®橙色染料(Invitrogen™)，用PBS自5000X儲備溶液及45 μ l 0.12 mg/ml樣品(於PBS中，pH 7.4)稀釋。將約10 μ l混合物一式四份分配於384 PCR光學孔板中且在7900HT快速即時PCR系統(Applied Biosystems™)上運作。PCR系統加熱裝置設定於20°C至99°C，升高速率為1.1°C/min。電荷耦合裝置監測孔中的螢光變化。對強度增加作圖，且利用斜率拐點計算 T_m ，如下文所述。在PBS pH 7.4及50mM醋酸鈉/125mM氯化鈉pH 5.0 (係常見預調配緩衝液)中獲得各種抗體分子之 T_m 。

【0232】 全部三種人類化抗體之熱穩定性示於表6中。在PBS pH 7.4中觀測到一次轉變且此歸因於CH₂及Fab結構域去摺疊。在50 mM醋酸鈉/125 mM氯化鈉pH 5.0中，觀測到兩次轉變。較低的 T_m 歸因於CH₂去摺疊域且第二次轉變歸因於Fab結構域。根據此分析，抗體5811gL8gH4及5811gL5gH4具有與抗體5811gL14gH4相當的熱穩定性，熱穩定性僅略

小。

表6

	抗體	平均 T_m (1)°C	標準誤差	平均 T_m (2)°C	標準誤差
PBS pH 7.4	5811gL14gH4	65.3	0	MD	ND
	5811gL8gH4	67.6	0	MD	ND
	5811gL5gH4	67.6	0	ND	ND
醋酸鹽pH 5	5811gL14gH4	56.3	0.1	66.2	0
	5811gL8gH4	56.3	0	69	0
	5811gL5gH4	56.4	0	69.1	0.1

【0233】

實驗pI

使用全毛細管成像 cIEF iCE3™ 系統 (Protein Simple) 獲得 5811gL14gH4、5811gL8gH4 及 5811gL5gH4 之實驗 pI。藉由混合以下來製備樣品：30 μ l 樣品(來自 HPLC 級水中之 1 mg/ml 儲備液)、35 μ l 1% 甲基纖維素溶液 (Protein Simple)、4 μ l pH 3-10 兩性電解質 (Pharmalyte)、0.5 μ l 4.65 合成 pI 標記物及 0.5 μ l 9.77 合成 pI 標記物 (Protein Simple)、12.5 μ l 8M 脲溶液 (Sigma-Aldrich®)。使用 HPLC 級水將最終體積補足至 100 μ L。將混合物簡單渦旋以確保完全混合且在分析前以 10,000 rpm 離心 3 分鐘以移除氣泡。將樣品在 1.5 kV 下聚焦 1 min，隨後在 3 kV 下 5 min，且使用 Protein Simple 軟體獲取毛細管之 A280 影像。所得電泳圖首先使用 iCE3 軟體分析且給 pI 值賦值 (pI 標誌物之間的線性關係)。經校準的電泳圖隨後使用 Empower® 軟體 (Waters) 整合。

【0234】 所有分子之實驗 pI 皆在 8.80-9.23 範圍內，其中主要物種處於 9.09。對於 IgG4P 分子典型的酸性/鹼性物質分佈不存在差異。實驗 pI 較高且因此有助於抗體之製造製程。

【0235】

疏水相互作用層析(HIC)

經由疏水相互作用層析(HIC)評定人類化抗體5811gL14gH4、5811gL8gH4及5811gL5gH4之疏水性行為。在HIC中，抗體在高濃度極性鹽存在下結合於疏水性固定相且隨著鹽濃度降低而解吸附於移動相中。較長之滯留時間等效於較高疏水性。

【0236】 以1.6 M硫酸銨及PBS (pH 7.4)按1:2稀釋2 mg/mL抗體樣品。將5 μ g (10 μ L)樣品注射於與具有螢光偵測器之Agilent 1200二元HPLC串聯連接的Dionex ProPac™ HIC-10管柱(100 mm \times 4.6 mm)上。藉由內源螢光(激發及發射波長分別為280 nm及340 nm)監測分離。

【0237】 使用緩衝液A (0.8 M硫酸銨，100 mM磷酸鹽pH 7.4)及緩衝液B (100 mM磷酸鹽pH 7.4)，如下使用梯度溶離分析樣品：(i)在0% B下保持2分鐘，(ii) 0至100% B之線性梯度持續30分鐘(0.8毫升/分鐘) (iii)管柱用100% B洗滌2分鐘且在0% B中重新平衡10分鐘，之後進行下一次樣品注射。將管柱溫度維持在20°C下。亦按相同運作順序分析展現低疏水性及高之標準物以及對照以使滯留時間標準化。使用以下等式針對低疏水性及高疏水性標準物使樣品之滯留時間(RT)標準化：

$$[(\text{樣品(RT)} - \text{低標準(RT)}) / (\text{高標準(RT)} - \text{低標準(RT)})] \times 100$$

【0238】 全部三種抗體5811gL14gH4、5811gL8gH4及5811gL5gH4展示類似的標準化滯留時間及類似的低疏水性，亦即，自管柱之溶離少於5分鐘(參見表7)。低疏水性在製造期間有助於穩定性(亦即減少聚集)。

表7

抗體(主要峰)	滯留時間(min)	標準化滯留時間(min)
5811gL14gH4	4.7	2.9
5811gL8gH4	4.7	2.9
5811gL5gH4	4.6	2.0

【0239】

使用聚乙二醇(PEG)沈澱分析進行溶解度量測.

使用聚乙二醇 (PEG) 沈澱分析分析人類化抗體 5811gL14gH4、5811gL8gH4 及 5811gL5gH4 之膠體穩定性。藉由提高 PEG 之濃度(w/v)且量測在溶液中剩餘之蛋白質量，使用 PEG 以數量上可定義之方式降低蛋白質溶解度。此分析用以在不使用習知濃度方法下模仿高濃度溶解度之效果。

【0240】 在 PBS pH 7.4 及 50mM 醋酸鈉/125mM 氯化鈉 pH 5.0 中之 7–18% PEG-3350 存在下研究人類化抗體 5811gL14gH4、5811gL8gH4 及 5811gL5gH4 之 PEG 誘導之沈澱。使用滲析緩衝液互換抗體樣品且將濃度調節至 2 mg/mL。為了將非平衡沈澱降至最少，樣品製劑由混合的 2×蛋白質及 2×PEG 溶液以 1:1 體積比組成。在混合之後，將樣品在 37°C 下培育 30 分鐘以重新溶解非平衡聚集體。在 20°C 下隔夜培育之後，使樣品離心 60 min (4000 g)。將上清液之等分試樣轉移至一半體積的 96 孔光學培養板且使用板讀取器 BMG Labtech FLUOstar® Omega LVIS A280 來量測 280 nm 下之吸光度。相對於 PEG% 及計算中點(LogEC50) (藉由非線性回歸曲線擬合產生) 繪製濃度資料，獲得不同斜率作為樣品之相對膠體溶解度之量測。在此分析中，較高 LogEC50 等效於較高膠體穩定性。

【0241】 如表 8 中所示，觀測到三種不同抗體之膠體穩定性無差異。如藉由較大 logEC50 值所展示，在醋酸鹽 pH 5 緩衝液中觀測到較大膠體穩定性。

表8

	50mM NaOAc/125mMNaCl pH 5			PBS pH 7.4		
最佳擬合值	5811gL14gH4	5811gL8gH4	5811gL5gH4	5811gL14gH4	5811gL8gH4	5811gL5gH4
LogEC50	15.1	14.9	15.3	11.9	11.7	11.9
希爾斜率	-0.91	-0.77	-0.66	-0.84	-0.62	-0.69
R ² 標準偏差	0.987	0.989	0.965	0.994	0.985	0.99
S形劑量-反應(不同斜率)						

【0242】

空氣-液體界面處之壓力影響(聚集分析)

此分析用以模仿在製造(例如超過濾)期間抗體將經受之應力。諸如抗體之蛋白質傾向於在暴露於空氣-液體界面時展開，其中向疏水性環境(空氣)呈現疏水性表面且向親水性環境(水)呈現親水性表面。攪拌蛋白質溶液實現可驅動聚集之較大空氣-液體界面。

【0243】 使用Eppendorf恆溫混勻儀Comfort™藉由渦旋對PBS pH 7.4及50 mM醋酸鈉/125 mM氯化鈉pH 5.0中之抗體5811gL14gH4、5811gL8gH4及5811gL5gH4之樣品加壓。在渦旋之前，使用合適的吸光度係數(1.41 Ab 280 nm，1 mg/mL，1 cm路徑長度)將濃度調節至1 mg/mL且使用Varian Cary® 50-Bio分光光度計獲得280 nm、340 nm及595 nm下之吸光度以建立零時間讀數。將各樣品等分於1.5 mL圓錐形Eppendorf®型帶帽試管(4×250 μL)中且經受嚴格條件以便藉由在1400 rpm下在25°C下渦旋直至24小時測試穩固性。使用Varian Cary™ 50-Bio分光光度計，藉由在595 nm下渦旋24小時後量測樣品來監測時間依賴性聚集(濁度)。針對各樣品相對於時間繪製平均吸光度值。

【0244】 抗體分子5811gL5gH4相比於5811gL14gH4及5811gL8gH4展現較大的聚集穩定性。所有抗體在PBS pH 7.4中均展示較大的聚集穩定性。

【0245】

化學穩定性-脫醯胺應力研究

全部三種抗體進行加速應力研究：5811gL5gH4、5811gL8gH4及5811gL14gH4用以測定一個鑑別的潛在位點之脫醯胺傾向：CDR3之輕鏈中之Asn(93)，其中5811gL14gH4具有Asn(93)Ala基元且5811gL8gH4及gL5gH4兩者具有Asn(93)Gly基元。

【0246】三種抗體經受已知促進Asn(N)殘基之脫醯胺的條件(50 mM Tris/125 mM氯化鈉pH 8.0/37°C)。另外，亦在作為對照條件之50 mM醋酸鈉/125 mM氯化鈉pH 5.0中製備樣品以評定加壓之前的基礎脫醯胺。將每種緩衝液中之樣品之最終濃度調節至約5 mg/mL且隨後分成兩種等分試樣，其中一種儲存於4°C下且另一種儲存於37°C下直至5週。立即(T0)及在第2週及第5週移除等分試樣且儲存於-20°C下。

【0247】針對非加壓樣品(50 mM醋酸鈉/125 mM氯化鈉pH 5/4°C)量測殘基Asn (93)處之基礎脫醯胺且使用2週/pH 8/37°C加壓樣品藉由產生含有所關注序列之胰蛋白酶肽獲得Asn (93)之脫醯胺傾向。簡言之，使用DTT還原80 µg之各種且在37°C下用鹽酸胍變性。樣品隨後在室溫下用碘乙醯胺烷基化，之後緩衝液交換於7.5 mM Tris/1.5 mM CaCl₂ pH 7.9 (Zeba™ 7 kDa MWCO旋轉柱，Thermo Fisher)中且在37°C下與胰蛋白酶(1:23 w/w)一起培育大約3小時。藉由添加三氟乙酸至0.1% v/v停止蛋白分解且將樣品儲存於-20°C下。在解凍後，樣品經離心以移除沈澱。

【0248】所得肽經分離且在與Thermo Fusion™質譜儀接合之Waters BEH C18管柱上分析，該質譜儀執行利用碰撞誘導解離(collision induced dissociation；CID)斷裂之陽性離子、資料依賴性軌道阱-軌道阱

方法。使用 Thermo Xcalibur™ 及 Pepfinder™ 軟體分析 LC-MS 及 MS² 資料。分析所關注的肽(LC N93-K102)以評定化學修飾之百分比。

【0249】 肽圖譜質譜分析顯示，相比於 5811gL8gH4 及 5811gL5gH4，5811gL14gH4 之基礎 Asn(93) 脫醯胺含量較低。意料到分子之間的差異，因為已證實儘管脫醯胺傾向之預測較為困難，但 Gly(G) 殘基之前的 Asn(N) 殘基展示比更大 Ala (A) 殘基之前的彼等 Asn(N) 殘基更大的脫醯胺傾向 (Robinson, N. E. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, 4367-4372)。

【0250】 對於全部三種抗體，在 Asn(93) 處觀測到低脫醯胺速率，亦即，每週 1.2%-1.4%。5811gL5gH4 及 5811gL8gH4 之輕鏈 N93-K102 肽之質量差異包括 a-17 Da 修飾 (可能中間產物丁二醯亞胺物種) 及 +1 Da (在 Asn(93) 處之完全脫醯胺之產物)，而未觀測到 5811gL14gH4 之丁二醯亞胺 (表9)。

表9

百分比(%)	脫醯胺 Asn(93)		丁二醯亞胺形成		脫醯胺與丁二醯亞胺 每週總化學修飾增加
	基礎	2 週	基礎	2週	
5811gL14gH4	1.2	4.1	未見	未見	1.4
5811gL8gH4	4.4	7.1	4.6	4.3	1.2
5811gL5gH4	5.6	8.6	4.8	4.3	1.3

【0251】 對於所有抗體而言，總體脫醯胺速率較低，但針對 5811gL5gH4 及 5811gL8gH4 觀測到更多的異質性。

【0252】

實例7：基於細胞之聚集分析

在自由式293表現培養基(Invitrogen™)中以 0.7×10^6 個細胞/毫升製備 HEK 自由式293F細胞(懸浮液細胞)且培養至 300×10^6 個細胞/毫升。根據製

造商說明書進行轉染且簡單地將併入 α -突觸核蛋白基因之600 μg pcDNA3.1(+)混入20 ml OptiMEM培養基中，同時將293Fectin稀釋於OptiMEM培養基(Invitrogen™)中且在室溫下培育5分鐘。添加經稀釋之DNA且在室溫下培育20分鐘，之後逐滴添加於細胞上(每個燒瓶20 ml)。在37°C，125 rpm，8% CO₂下將細胞培育24小時。立即使用細胞或以5百萬個細胞/毫升之濃度將細胞冷凍於FBS + 10% DMSO中。

【0253】若細胞先前已經冷凍，則將冷凍小瓶解凍且將細胞再懸浮於自由式293培養基中，在500 g下離心5分鐘，排出上清液且將糰粒以 2×10^6 個細胞/毫升再懸浮於自由式293培養基(Life Technologies™) + Pen/鏈黴素(Invitrogen™)中。在384孔板(Grainer™)中，添加20 μl 細胞懸浮液(總計大約40,000個細胞/孔)。向各孔添加150nM之人類 α -突觸核蛋白原纖維(如本文中實例1中所述製備)，之後為待測試PBS中之抗體5811gL5gH4 IgG4P、5811 gL8gH4 IgG4P及5811 gL14gH4 IgG4P (表1中之序列) (各種濃度)。在細胞培養培養箱中，在37°C，5% CO₂，95%濕度下將培養板培育2天。

【0254】在第二天結束時，自所有孔抽吸培養基且洗滌板，剩餘20微升/孔。向各孔添加約50 μl 之PBS且在500 g下將培養板離心5分鐘。用板洗滌器自所有孔抽吸上清液，在各孔中剩餘20 μl 之培養基。添加維爾烯(Lonza™) (50微升/孔)且在500 g下將培養板離心5分鐘，抽吸上清液，每孔僅剩餘20 μl 培養基。各孔補充有於PBS中之20 μl 8%甲醛(16%水溶液，Life Technologies™)+ 2% Triton X-100 (VWR™)。使培養板在室溫下培育15分鐘且其後添加由HBSS (不含鈣-鎂之VWR™) + 2% FBS + 2mM EDTA (Life Technologies™)組成之50 μl FACS緩衝液。使培養板

在2000 g下離心1分鐘且抽吸上清液，在各孔中僅剩下20 μ l培養基。各孔進一步補充有含有按1:300稀釋之抗pSer129 α -突觸核蛋白抗體(AbCam™)之20 μ l FACS緩衝液。使培養板在室溫下培育1小時且隨後各孔補充有50 μ l FACS緩衝液，之後再次在2000 g下離心1分鐘。移出上清液，之後各孔補充有1:500稀釋之Alexafluor647-結合抗兔-二次抗體(Life Technologies™)及DAPI (Life Technologies™)。使培養板在黑暗中在室溫下培育1小時，且隨後添加50 μ l FACS緩衝液且在2000 g下將培養板離心1分鐘。在洗滌後，添加更多的FACS緩衝液且備好培養板以置放於流式細胞儀(BD FACS Canto II)中進行讀數。

【0255】 使用FlowJo軟體分析FACS資料。首先，使用正向及側面散射閘化活的單細胞。其次，閘化DAPI+事件且將其數目用作活的有核單細胞之數目量測。最後，閘化磷絲胺酸129- α -突觸核蛋白-陽性(pSer129+)細胞。pSer129+細胞相對於所有DAPI+細胞之百分比用作聚集之量測。相對於僅用原纖維處理且無抗體之孔使資料標準化，且表示為百分比。將結果概括於圖10中，該等結果顯示所測試抗體抑制表現 α 突觸核蛋白之細胞上由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之聚集的能力。此等資料證實根據本發明之抗體能夠阻斷由 α -突觸核蛋白原纖維誘導之聚集，IC₅₀大約為或低於5nM。

【0256】

實例8：原代神經元聚集分析

在剝離緩衝液(不含鈣及鎂，含0.6% D-(+)-葡萄糖，20 mM HEPES之HBSS)中自E17小鼠胚胎剝離Hippocampi。隨後移出剝離緩衝液且經解離溶液(不含鈣及鎂，含0.6% D-(+)-葡萄糖、20 mM HEPES、40U/m木瓜

蛋白酶、1mg/ml DNase、1mM L-半胱氨酸、0.5mM EDTA之HBSS)置換。在37°C下培育30分鐘後，移出解離緩衝液且用平板培養基(Neurobasal™培養基，2% B27補充物，1mM GlutaMAX，2.5% FBS，50單位/毫升青黴素-鏈黴素)將hippocampi洗滌3次。用1 ml移液管濕磨組織凝集塊以獲得單細胞懸浮液。在平板培養基中將細胞稀釋至合適濃度。將約15000個細胞接種於塗佈PDL之384孔板之各孔中。隨後將細胞保持在細胞培養培養箱中，處於37°C，5% CO₂，95%濕度下。

【0257】 次日，用不含FBS (Neurobasal™培養基，2% B27補充劑，1 mM GlutaMAX，50個單位/毫升青黴素-鏈黴素)之平板培養基置換80%之培養基。在平板接種七天之後，移出培養基，各孔中剩餘20 µl。向各孔添加100nM之人類α-突觸核蛋白原纖維(如本文中實例1中所述製備)，之後為待測試PBS中之抗體5811gL5gH4 IgG4P、5811 gL8gH4 IgG4P及5811 gL14gH4 IgG4P (表1中之序列) (各種濃度)。在細胞培養培養箱中，在37°C，5% CO₂，95%濕度下將培養板培育額外7天。在平板接種十四天之後，自所有孔抽吸培養基，每孔剩餘20 µl。各孔用80 µl Dulbecco磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)洗滌。移出DPBS，且在每孔40 µl之固定緩衝液(含4%多聚甲醛之DPBS)中培育細胞，持續15分鐘。隨後移出固定緩衝液且另外用80 µl DPBS洗滌細胞。移出DPBS且每孔經40 µl滲透緩衝液(含0.1% Triton X-100之DPBS)置換。在10分鐘之後，移出滲透緩衝液，且在每孔40 µl之阻斷緩衝液(含1% BSA及0.1% Triton X-100之PBS)中將細胞培育1小時。隨後移出阻斷緩衝液且用40微升/孔之一次抗體溶液(含0.3%兔抗磷絲胺酸129α-突觸核蛋白抗體(AbCam™ ab51253)之阻斷緩衝液)置換。使抗體溶液在細胞上培育1 h，之後洗滌三次(每次90 µl，

PBS)。在最後一次洗滌之後，移出PBS且用40 μ l之二次抗體溶液(含0.2% AlexaFluor488結合抗 β -III-微管蛋白抗體之PBS中的0.1% AlexaFluor647結合抗兔抗體)置換。使二次抗體溶液在細胞上培育1 h，隨後移出且用40 μ l之包含0.3% CellMask Blue™之PBS置換。在培育5分鐘之後，用80 μ l PBS將孔洗滌3次，隨後每孔填充有50 μ l PBS，之後用透明塑膠薄膜密封培養板。

【0258】 在 Arrayscan 板成像器中使培養板成像 (ThermoFisher Scientific™)。使用來自同一製造商之 HCS Scan™ 軟體分析影像。使用 β -III-微管蛋白信號監測神經元密度。不包括展示損壞之神經元細胞層的(一或多個)稀疏場，其由 β -III-微管蛋白信號之表面的顯著減少反應。最後，使用每個場 pSer129 α 突觸核蛋白信號之表面量化病理 α -突觸核蛋白聚集。

【0259】 咸信 α 突觸核蛋白之S129處的磷酸化在控制 α 突觸核蛋白正常功能、以及調節其聚集、LB形成及神經毒性中起重要作用。在正常條件下，僅一小部分之 α 突觸核蛋白在大腦中之S129處構成性磷酸化 (Fujiwara H等人 (2002) Nat Cell Biol, 4, 160-164)，而已在患有突觸核蛋白病之患者之大腦中觀測到pS129之顯著積聚 (Kahle PJ等人 (2000) Ann N Y Acad Sci, 920, 33-41)；Okochi M等人 (2000) J Biol Chem, 275, 390-397)；Anderson JP等人 (2006) J Biol Chem, 281, 29739-29752)。

【0260】 相對於僅用原纖維處理且無抗體之孔使資料標準化，且表示為百分比。如圖11中所示，全部三種抗體抑制表現內源性含量之 α 突觸核蛋白之小鼠上的由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。此等資

料證實 5811gL5gH4 IgG4P、5811 gL8gH4 IgG4P 及 5811 gL14gH4 IgG4P 抗體能夠阻斷小鼠原代神經元上由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之聚集， IC_{50} 低於5nM。

【0261】

實例9：活體內VR5811功效之評估

在表現人類 α 突觸核蛋白之 α -突觸核蛋白基因剔除小鼠之轉殖基因模型(其後命名為 SNCA-OVX；Charles River, France)中測試抗體 5811gL5gH4 IgG4P (包含SEQ ID NO: 14及SEQ ID NO: 26且下文簡稱為 VR5811)。

【0262】用VR5811及小鼠預成型原纖維(PFF) (如本文實例1中所述製備)注射SNCA-OVX小鼠。亦與結合最後九個C端殘基處之 α 突觸核蛋白之比較抗 α 突觸核蛋白抗體(比較C-端Ab)一起注射陰性對照抗體及媒劑。此類比較抗體(其具有與根據本發明之抗體不同的CDR)展示相當的與本發明之抗體之結合特徵。比較C端Ab抗體對 α 突觸核蛋白之親和力與本發明之抗體類似且具有類似的生物物理特性。其在基於細胞之分析上亦有效防止 α 突觸核蛋白聚集(表10)。

表10

抗體	人類原纖維			IC_{50} (nM)
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	
VR5811	2.74E+06	4.10E-05	0.015	小於5
比較C-term Ab	1.08E+06	2.20E-05	0.02	小於5

【0263】在室溫下在搖動器上，使抗體與PFF一起預培育30分鐘，之後直接投與至動物之大腦中。以1 μ g PFF/10 μ g抗體之比率在PBS中製備抗體/PFF混合物。pH 7.4下之PBS用作媒劑溶液。在組合腦內投藥24小時之前注射抗體。

【0264】 隨後以30 mg/kg之劑量向小鼠腹膜內投與抗體。針對SNCA-OVX小鼠，在第一次後第7天給予第二次腹膜內注射，且隨後用相同方案(以30 mg/kg之劑量一次腹膜內注射/週，投藥體積為10 ml/kg)實行，持續11週，總計12次注射。將小鼠隨機分配給藥物治療組且實驗對治療盲目。

【0265】 根據《歐洲指令2010/63/EU》及比利時法律之指導原則進行動物實驗。來自UCB Biopharma SPRL (LA1220040及LA2220363)之動物實驗的道德委員會批准了實驗方案(ASYN-IC-PARKINSON-MO)。在手術時，小鼠重量在25與30 g之間且為17週齡。小鼠圈養於籠子(每個籠子4隻小鼠，Macrolon 2型)中。使其保持12:12輕/暗循環，輕循環在06:00h開始。溫度維持在20-21°C下且濕度大約為40%。在分配至實驗組之前，所有動物能夠自由獲取標準的顆粒飼料及水。在手術之前及之後提供額外的營養及福利(Enviro-dri, Phama Serv)。由動物護理人員每日監測動物健康。儘力將患病降至最低。在麻醉下進行處死。

【0266】 使用腹膜內注射之50 mg/kg之氯胺酮(Nimatek, Eurovet Animal Health B.V.)及0.5 mg/kg之美托定咪啉(medetomidine) (Domitor, Orion Corporation)的混合物在全身麻醉下進行手術。另外，給予2.5 mg/kg阿替美唑(atipamezole) (Antisedan, Orion Corporation)以支持喚醒。重組之純化PFF經解凍且在室溫下音波處理(Qsonica 500 - 20 kHz；65%功率，30脈衝，1s開，1s關，持續一分鐘)。隨後在腦注射之前，使PFF與抗體預混合30分鐘且在室溫下搖晃30分鐘。以0.2 μ l/min之速率輸注溶液(2 μ l)且在緩慢縮回之前將針頭靜置原地，持續額外的2.5分鐘。在右側紋狀體中在以下座標處進行單側注射：AP= +0.20 mm，ML= -2.00

mm，DV= -3.20 mm。

【0267】 在麻醉之後，以6 ml/min之流動速率經由左心室經心灌注含有10 U/ml肝素之冰冷的0.9% PBS來灌注小鼠，持續9分鐘。切斷右心房作為流出路徑。接著，以6 ml/min之流動速率用PBS中之冰冷的4%多聚甲醛灌注動物，持續15分鐘。在4°C下(第0天)，將大腦隔夜後固定在含有4%多聚甲醛之PBS中。第二天上午(+1天)，捨棄4%多聚甲醛且在冷PBS中洗滌大腦且培育隔夜。次日(+2天)，在PBS中洗滌大腦，持續最少1小時且轉移至含有15%蔗糖之PBS且儲存於4°C下直至運送。

【0268】 在神經科學協會(TN, USA)進行腦剖切。首先，用20%甘油及2%二甲亞砷處理大腦隔夜以防止凍結-人工產物，且使用MultiBrain®技術嵌入於明膠基質中。在固化之後，藉由浸沒於用碾碎乾冰冷卻至-70°C之異戊烷中快速冷凍阻斷物，且安放在AO860滑動式切片機之凍結段上。在冠狀平面中40 μm處將MultiBrain®塊切片。將所有切片依序收集於24個容器/塊中，該等容器填充有抗原保存溶液(49% PBS pH 7.0，50%乙二醇，1%聚乙烯吡咯啉酮)。立即將未染色之切片儲存於-20°C下。

【0269】 自由浮動的切片係藉由免疫化學以pSer129 α突觸核蛋白抗體(小鼠抗α突觸核蛋白(pSer129)生物素-(Wako - 010-26481))染色，以1:30,000稀釋。來自阻斷血清之所有培育溶液繼續使用含Triton X-100之Tris緩衝鹽水(TBS)作為媒劑；所有溶液均用TBS沖洗。內源性過氧化酶活性係藉由0.9%過氧化氫處理阻斷且非特異性結合係利用1.26%全正常血清阻斷。在沖洗之後，在室溫下用一次抗體將切片染色隔夜。媒劑溶液含有0.3% Triton X-100以滲透。在沖洗之後，使切片與抗生物素蛋白-生物

素-HRP複合物(Vectastain Elite ABC套組, Vector Laboratories, Burlingame, CA)在室溫下一起培育一小時。在沖洗之後，切片用二胺基聯苯胺四鹽酸鹽(DAB)及0.0015%過氧化氫處理以產生可見反應產物，安放在膠凝化(塗膠)玻璃載片上，經風乾，用硫堇輕微染色，在醇中脫水，在二甲苯中澄清，且以Permount滑動封蓋。

【0270】 使用每個場pSer129 α 突觸核蛋白信號之pSer129 α 突觸核蛋白信號的定量來量化紋狀體、皮質、底外側扁桃體及黑質之同側側面中的病理 α -突觸核蛋白聚集。對所關注區(ROI)人工劃定界限且用VisioPharm 6軟體(VisioPharm)進行不同腦區中之pSer129 α 突觸核蛋白信號的自動定量。為量化pSer129 α 突觸核蛋白信號，使用線性貝氏演算法(Bayesian algorithm)，其提供信號區(以 μm^2 為單位之標記區域)之值。標記區域反映覆蓋不同腦區之pSer129 α 突觸核蛋白病變之量。以盲目方式進行所有定量直至統計分析結束。

【0271】 針對標記區域%進行資料分析(亦即以 μm^2 為單位之pSer129信號區域與以 μm^2 為單位之所關注之區域之間的比率)。對頭端-尾端安置之多個腦切片重複評定標記區域%(紋狀體：來自前囟+1.1至-0.94之13-14個切片；皮質：來自+1.1至-0.94之13-14個切片；底外側扁桃體：-0.58與-2.06之間的6-10個切片；黑質：來自-2.54至-3.88之6-8個切片)，且針對每個測試個體分別計算AUC。

【0272】 考慮單向ANOVA用於統計分析。變方分析之後為在不進行任何大量調節下平均值之間的多個成對比較。(**對應 $p<0.01$ 且*對應 $p<0.05$)。資料經對數變換以滿足常態及等變異性準則。圖式表示未轉化資料之幾何平均數。

【0273】 如圖12中所示，在向SNCA-OVX小鼠投與PFF 3個月之後，VR5811抗體明顯減少包括紋狀體、大腦皮質、扁桃體及黑質之不同腦區中的 α 突觸核蛋白病變(亦即pSer129 α 突觸核蛋白信號)。

【0274】 陰性對照抗體及比較C端抗體顯示與利用人類PFF注射之經媒劑處理之小鼠相比，在減少 α 突觸核蛋白病變(pSer129 α 突觸核蛋白信號)方面無影響。

【0275】 圖13展示在SNCA-OVX小鼠中分析之大腦區中之每一者中的Ser129處磷酸化之 α 突觸核蛋白之量化。結果證實與三個對照組(亦即媒劑、101.4及比較C端Ab)相比，VR5811顯著($p < 0.05$)降低包括紋狀體、大腦皮質及黑質之同側側面之不同腦區中的 α 突觸核蛋白病變。

【0276】 因此，在SNCA-OVX小鼠中測試時，用5811處理之組展示在三種不同結構中顯著降低之pSer129 α -突觸核蛋白水準且在彼等結構中，兩個遠離注射部位(大腦皮質及黑質)。

【0277】 此證實包含本發明之結構特徵之抗體能夠防止在活體內出現在Ser129處磷酸化之 α 突觸核蛋白。此外，結果顯示並非全部結合C端區中之a-syn之抗體均在活體內有效：在基於細胞之分析中以高親和力結合a-syn之C端且有效防止a-syn聚集之比較抗體未能在活體內防止Ser129磷酸化。

【0278】 因此，根據本發明之抗體可用於治療特徵為Ser129磷酸化增加之 α 突觸核蛋白病，包括帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。

【0279】

實例10：小鼠中抗體5811之藥物動力學

利用抗體5811gL14gH4 IgG4P (5811)以2 mg/kg之單次劑量靜脈內注射雄性C57/B16小鼠(每種藥物n=3)。

【0280】自尾部靜脈取得血液樣品(距離注射0.083、1、4、8、24、72、120、168及336小時)且使其在室溫下結塊。在離心之後分離血清，隨後使血清冷凍直至分析。藉由LC-MS/MS進行5811抗體之量化。研究中之血清樣品經解凍且針對使用以不同濃度摻入對照小鼠血清中之5811抗體製備之校準株定量。在將樣品注射於LC-MS/MS系統上之前，血清經變性、還原且分別使用乙腈(VWR, UK)、TCEP-Tris(2-羧乙基)膦鹽酸鹽(Sigma, UK)及碘乙醯胺(Sigma, UK)烷基化。經烷基化之樣品隨後在100 mM碳酸氫二銨緩衝液(Sigma, UK)中重構且在37°C下使用胰蛋白酶(Promega, UK)消化隔夜。藉由向樣品添加甲酸停止消化以降低pH值且隨後使用Waters HLB SPE板去鹽。使用真空蒸發器蒸發所得溶離劑。在將樣品完全乾燥之後，用含有0.1%甲酸之95/5:水/乙腈重構樣品且注射於LC-MS/MS系統上。藉由耦接至AB Sciex QTrap 6500三重四極質譜儀之Schimadzu prominence HPLC系統進行LC-MS/MS分析。藉由自動取樣器將消化樣品注射於逆相高效液相層析管柱(Phenomenex Aeris C18肽管柱100×2.1mm, 2.6 μm)上，該管柱維持在50°C下。將0.1%甲酸中之5-70%乙腈的線性梯度施用6分鐘且隨後以0.6 ml/min之流動速率歷經0.8分鐘逐漸升至0.1%甲酸中之95%乙腈。設定質譜儀以進行多個反應監測分析，從而以50毫秒/轉變之停留時間偵測5811之肽之多個轉變。使用Analyst 1.6軟體版本進行資料分析。

【0281】 此等資料顯示，基於所量測之低清除值，抗體5811在小鼠中具有極好的藥物動力學特性(表11及圖14)。此等呈現出優於針對給藥於小鼠之人類IgG藥物所引用的典型範圍(3-16 ml/天/kg；Deng等人2011 mabs 3:1 61-66)。

表11

抗體	清除率(SD) ml/天/kg
	小鼠
5811	3.1 (1.0)

【序列表】

<110> 比利時商UCB生物製藥公司

<120> 抗體

<130> PF0129-WO

<150> GB1720970.1

<151> 2017-12-15

<160> 36

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 1

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn Leu Asp
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 2

Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 3

Tyr Gln Tyr Lys Asn Gly Trp Thr
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Ala Ala Met Tyr
1 5 10

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 5

Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 6

Asp Tyr Ser Arg Gly Asp Arg
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR-L3變異體I

<400> 7

Tyr Gln Tyr Lys Asn Ala Trp Thr
1 5

<210> 8
<211> 140
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠

<400> 9

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Val Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Met
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Lys Asn Gly Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠

<400> 10

Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Ala
 20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Lys Asn Gly Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5811 gL5輕鏈

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Lys Asn Gly Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 15
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL5 V-區核苷酸

<400> 15
 gacatccaga tgaccagag cccagagctcc ctgtccgcat cagtgaggga tgcgctgact 60
 attacgtgca aagcctcgca gaacatcaac aagaacctcg actggatatca gcagaagcca 120
 ggaaaggcgc ctaagctgct gatctactac gccacaate tccagaccgg cgtgccctcg 180
 cggttctccg gatctgggtc cggtaactgat tacacctga ccattagctc cttcaaccg 240
 gaggacttcg ccacctatta ctgctaccag tacaagaacg gctggacttt tggacaaggc 300
 accaaggctc aaatcaag 318

<210> 16
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL5輕鏈核苷酸

<400> 16
 gacatccaga tgaccagag cccagagctcc ctgtccgcat cagtgaggga tgcgctgact 60
 attacgtgca aagcctcgca gaacatcaac aagaacctcg actggatatca gcagaagcca 120
 ggaaaggcgc ctaagctgct gatctactac gccacaate tccagaccgg cgtgccctcg 180
 cggttctccg gatctgggtc cggtaactgat tacacctga ccattagctc cttcaaccg 240

gaggacttcg ccacctatta ctgctaccag tacaagaacg gctggacttt tggacaaggc 300
 accaaggctg aaatcaagcg tacgggtggcc gctccctccg tgttcatttt cccaccctcc 360
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtcgtgtgcc tgcigaacaa ctctaccccc 420
 cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggiggac aacgcctcgc agtccggcaa ctcccaggaa 480
 tccgtcaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgcctccac cctgaccctg 540
 tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctcgc aagtgaccca ccagggccctg 600
 tccagccccg tgaccaagtc ctcaaccgg ggcgagtg 639

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL8 V-區

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Lys Asn Gly Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL8輕鏈

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn
 20 25 30
 Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Lys Asn Gly Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Glu Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 19
 <211> 3:8
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 V-區核苷酸

<400> 19
 gacatccaga tgaccagag cccgagctcc ctgtccgcat cagtggggga tgcgtgact 60
 attactgca aagcctcgca gaacatcaac aagaacctcg actggtatca gcagaagcca 120
 ggaaaggcgc ctaagctgct gatctactac gccacaate tccagaccgg cgtgccctcg 180

cggttctccg gatcigggtc cggctactgat ttcacctga ccattagctc cttcaaccg 240
 gaggacttcg ccacclatta cigtaccag tacaagaacg gctggacttt tggacaaggc 300
 accaaggctc aaalcaag 318

<210> 20
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL8輕鏈核苷酸

<400> 20
 gacatccaga tgaccagag cccgagctcc cigtccgcat cagtggggga tcgctgact 60
 attacgtgca aagcctcgca gaacatcaac aagaacctcg actggtatca gcagaagcca 120
 ggaaaggcgc ctaagctgct gatctactac gccaacaatc tccagaccgg cgtgccctcg 180
 cggttctccg gatcigggtc cggctactgat ttcacctga ccattagctc cttcaaccg 240
 gaggacttcg ccacclatta cigtaccag tacaagaacg gctggacttt tggacaaggc 300
 accaaggctc aaatcaagcg tacggggccc gctccctccg tgttcattcti cccacctcc 360
 gacgagcagc tgaagtcagg caccgctcc gtcgtgtgcc tgcigaaca cttctacccc 420
 cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcccctgc agtccggcaa ctcccaggaa 480
 tccgtcaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgcctccac cctgacctg 540
 tccaaggccg actacgagaa gcacaaggig tacgctgcg aaglgacca ccagggcctg 600
 tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgc 639

<210> 21
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL14 V-區

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 23
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL14 V-區核苷酸

<400> 23
 gacatccaga tgacctagag cccgagctcc ctgtccgcat cagtggggga tgcggtgact 60
 attacgtgca aagcctcgca gaacatcaac aagaacctcg actggtatca gcagaagcca 120
 ggaaggcgc ctaagctgct gatctactac gccaaccaatc tccagaccgg cgtgccctcg 180
 cggttctccg gatctgggtc cggctactgat ttcaacctga ccattagctc cttcaaccg 240
 gaggacttcg ccacctatta ctgctaccag tacaagaacg ctggacttt tggacaaggc 300
 accaaggtcg aaatcaag 318

<210> 24
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811 gL14輕鏈核苷酸

<400> 24
 gacatccaga tgacctagag cccgagctcc ctgtccgcat cagtggggga tgcggtgact 60
 attacgtgca aagcctcgca gaacatcaac aagaacctcg actggtatca gcagaagcca 120
 ggaaggcgc ctaagctgct gatctactac gccaaccaatc tccagaccgg cgtgccctcg 180
 cggttctccg gatctgggtc cggctactgat ttcaacctga ccattagctc cttcaaccg 240
 gaggacttcg ccacctatta ctgctaccag tacaagaacg ctggacttt tggacaaggc 300
 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gctccctccg tgitcatctt cccacctcc 360
 gacgagcagc tgaagtcggg caccgcctcc gtctgtgtcc tctgaacaa ctctacccc 420
 cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccttgc agtccggcaa ctcccaggaa 480
 tccgtaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgcctccac ctgacctg 540
 tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctcgg aagtgaccca ccagggcctg 600
 tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtcg 639

<210> 25
 <211> 118
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5811 gH4 V-區

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Ala
20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Asp Tyr Ser Arg Gly Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5811 gH4重鏈

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Ala
20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Trp Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ala Asp Tyr Ser Arg Gly Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Trp Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

gactacacccc ggggcgatcg cgggggacag gggactatgg tcaactgtctc gagtgcctcc 360
 accaaggggcc cctccgigt t cctcttggcc ccttgcctcc ggtccacetc egagttctacc 420
 gccgctctgg gctgcctgg t caaggactac tccccgagc ccgtgacagt gtccctggaac 480
 tctggcgccc tgacctccgg cglgcacacc tccccgccc tgcctgagtc ctccggccctg 540
 tactccctgt cctccgctgt gaccgtgccc tccccagcc tgggcaccaa gacctacacc 600
 tgltaactgg accacaagcc ctccaacacc aagggtggaca agcgggtgga atctaagtac 660
 ggccccccc gccccccctg ccttgcctcc gaatttctgg gcggacctc cgtgttctctg 720
 tccccccaa agccccagga caccctgatg atctcccgga cccccgaagt gacctgcctg 780
 glggltggagc tgtcccagga agalcccag gttccagttca attggtactg ggacggcctg 840
 gaagtgcaca atgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 900
 gigtccctgc tgacctgct gcaccaggac tggctgaacc gcaaagagta caagtgcaag 960
 gtgtccaaca agggcctgcc ctccagctc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020
 ccccgcgagc cccaggigta caccctgccc cctagccagg aagagatgac caagaaccag 1080
 gltctcciga cctgtctggt caaggcttc tccccctccg acattgccgt ggaatgggag 1140
 tccaacggcc agcccagaaa caactacaag accaccccc c'tgtgctgga cagcgacggc 1200
 tcc'tct'cc tgtactctcg gcigaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtc 1260
 tctctctgt cctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtccctgtcc 1320
 ctgagcctgg gcaag 1335

<210> 29
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 30
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 31

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatctaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctccl galctatgct gcalccagll tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccalcagcag tctgcaacct 240
gaagatcttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccttggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 32
<211> 348
<212> DNA

<213> 智人
 <400> 32
 gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacittcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggcctggagt ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
 gactacgctg caccctgtaa aggcagatc accatctcaa gagatgatt aaaaaacag 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
 gatgcttttg atgtctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca 348

<210> 33
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 兔Fc人類68-140 a-syn

<400> 33
 Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys Lys Asp Gln
 20 25 30
 Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp
 35 40 45
 Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu
 50 55 60
 Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
 65 70 75 80
 Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 85 90 95
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 100 105 110
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp
 115 120 125
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg
 130 135 140
 Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg
 145 150 155 160
 Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys

165 170 175
 Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 180 185 190
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr
 195 200 205
 Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu
 210 215 220
 Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp
 225 230 235 240
 Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val
 245 250 255
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro
 260 265 270
 Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His
 275 280 285
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro
 290 295 300

Gly Lys
 305

<210> 34
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811大鼠-小鼠嵌合輕鏈

<400> 34

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Val Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Asn
 20 25 30
 Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Met
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Asn Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Lys Asn Gly Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro
 100 105 110
 Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 130 135 140
 Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 35
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811大鼠-小鼠嵌合重鏈

<400> 35

Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Trp Phe Asn Asn Ala
 20 25 30
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ala Asp Tyr Ser Arg Gly Asp Arg Trp Gly Gln Gly Val
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190
 Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220
 Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 245 250 255
 Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 260 265 270
 Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 290 295 300
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 305 310 315 320
 Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335
 Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
 340 345 350

Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380

Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
 385 390 395 400

Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 405 410 415

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 420 425 430

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 36
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5811大鼠-小鼠嵌合Fab-His重鏈

<400> 36

Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Ala
 20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Asp Tyr Ser Arg Gly Asp Arg Trp Gly Gln Gly Val
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
180 185 190

Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys His His His His
210 215 220

His His His His His His
225 230

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種與 α 突觸核蛋白結合之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含選自SEQ ID NO: 1之CDR-L1；根據SEQ ID NO: 2之CDR-L2及根據SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及

b. 重鏈可變區，其包含根據SEQ ID NO: 4之CDR-H1；選自SEQ ID NO: 5之CDR-H2及選自SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【請求項2】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中參考SEQ ID NO: 3位置6處之胺基酸殘基甘胺酸(Gly；G)經丙胺酸(Ala；A)置換。

【請求項3】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合參照到SEQ ID NO: 8之胺基酸殘基D119、N122及Y125。

【請求項4】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。

【請求項5】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段能夠結合作為單體及呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白。

【請求項6】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其對呈原纖維形式

之 α 突觸核蛋白的結合親和力高於對作為單體之 α 突觸核蛋白之結合親和力，其中對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白高至少10倍。

【請求項7】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的(K_D)為60pM或更小。

【請求項8】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體係嵌合、人類化或人類抗體。

【請求項9】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體係全長抗體。

【請求項10】

如請求項9之抗體或其抗原結合片段，其中該全長抗體係選自IgG1、IgG4或IgG4P。

【請求項11】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗原結合片段係選自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dAb或V_{HH}。

【請求項12】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其片段包含：

a. 根據SEQ ID NO: 13之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區；或

b. 根據SEQ ID NO: 17之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區；或

c. 根據SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25之重鏈可變區。

【請求項13】

如請求項1或請求項2之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其片段包含：

a. 根據SEQ ID NO: 14之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；或

b. 根據SEQ ID NO: 18之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈；或

c. 根據SEQ ID NO: 22之輕鏈及根據SEQ ID NO: 26之重鏈。

【請求項14】

一種經分離聚核苷酸，其編碼如請求項1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【請求項15】

如請求項14之經分離聚核苷酸，其中該聚核苷酸編碼：

a. 輕鏈可變區，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 15、19或23至少90%一致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 15或19或23；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 15、19或23組成；或

b. 重鏈可變區，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 27至少90%一致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 27；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 27組成；或

- c. 輕鏈，其中該聚核苷酸：
 - i. 與SEQ ID NO: 16、20或24至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 16、20或24；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 16、20或24組成；
- d. 重鏈，其中該聚核苷酸：
 - i. 與SEQ ID NO: 28至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 28；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 28組成。

【請求項16】

一種選殖或表現載體，其包含一或多種如請求項14或15中任一項之聚核苷酸。

【請求項17】

一種宿主細胞，其包含：

- a. 一或多種如請求項14或15中任一項之聚核苷酸或
- b. 一或多種如請求項16之表現載體。

【請求項18】

一種產生如請求項1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段的方法，其包含在產生該抗體或其抗原結合片段之合適條件下培養如請求項17之宿主細胞及分離該抗體或其抗原結合片段。

【請求項19】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。

【請求項20】

如請求項19之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含一種額外活性成分。

【請求項21】

一種如請求項1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項19或20之醫藥組合物之用途，其係用於製備用於療法之藥劑。

【請求項22】

一種如請求項1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項19或20之醫藥組合物之用途，其係用於製備治療一或多種突觸核蛋白病之藥劑。

【請求項23】

如請求項22之用途，其中該突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(Diffuse Lewy Body Disease ; DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(multiple system atrophy ; MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。

【請求項24】

如請求項23之用途，其中該突觸核蛋白病係帕金森氏病。

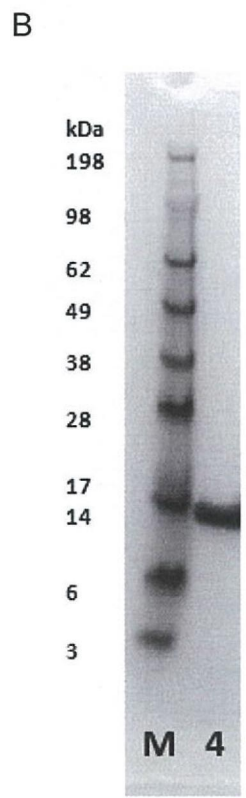
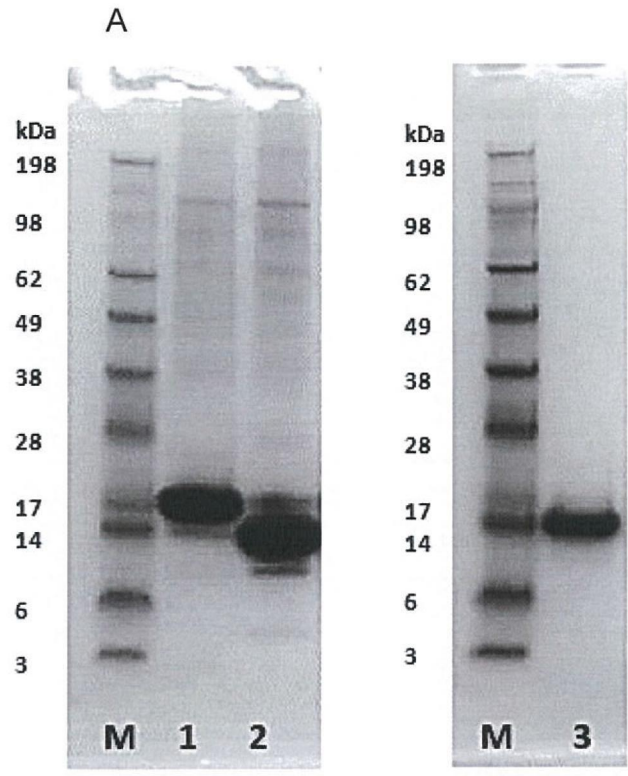
【請求項25】

一種診斷突觸核蛋白病之活體外方法，其包含使生物樣品與如請求項1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項19或20之醫藥組合物接觸。

【請求項26】

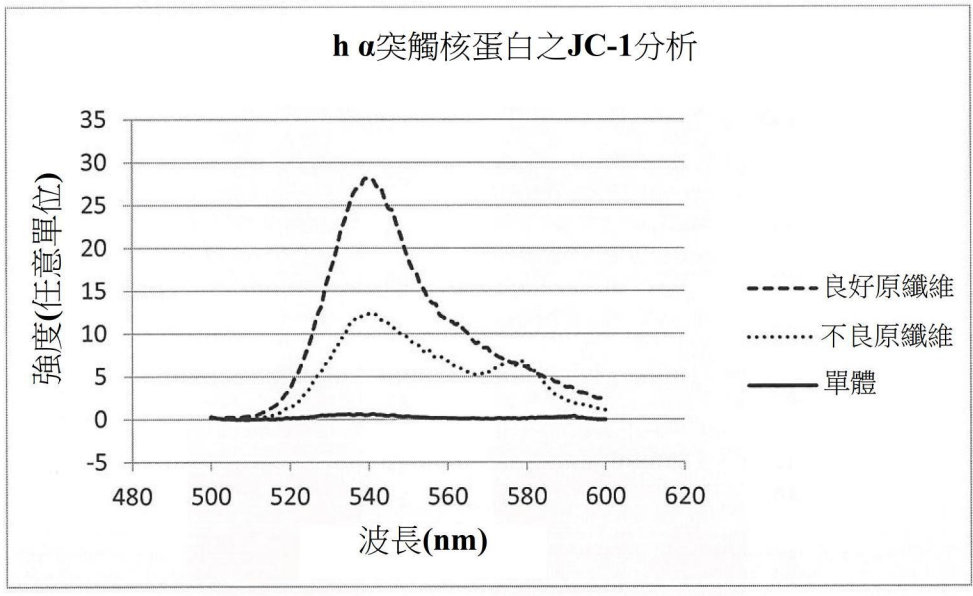
如請求項25之活體外方法，其中該突觸核蛋白病係帕金森氏病。

【發明圖式】



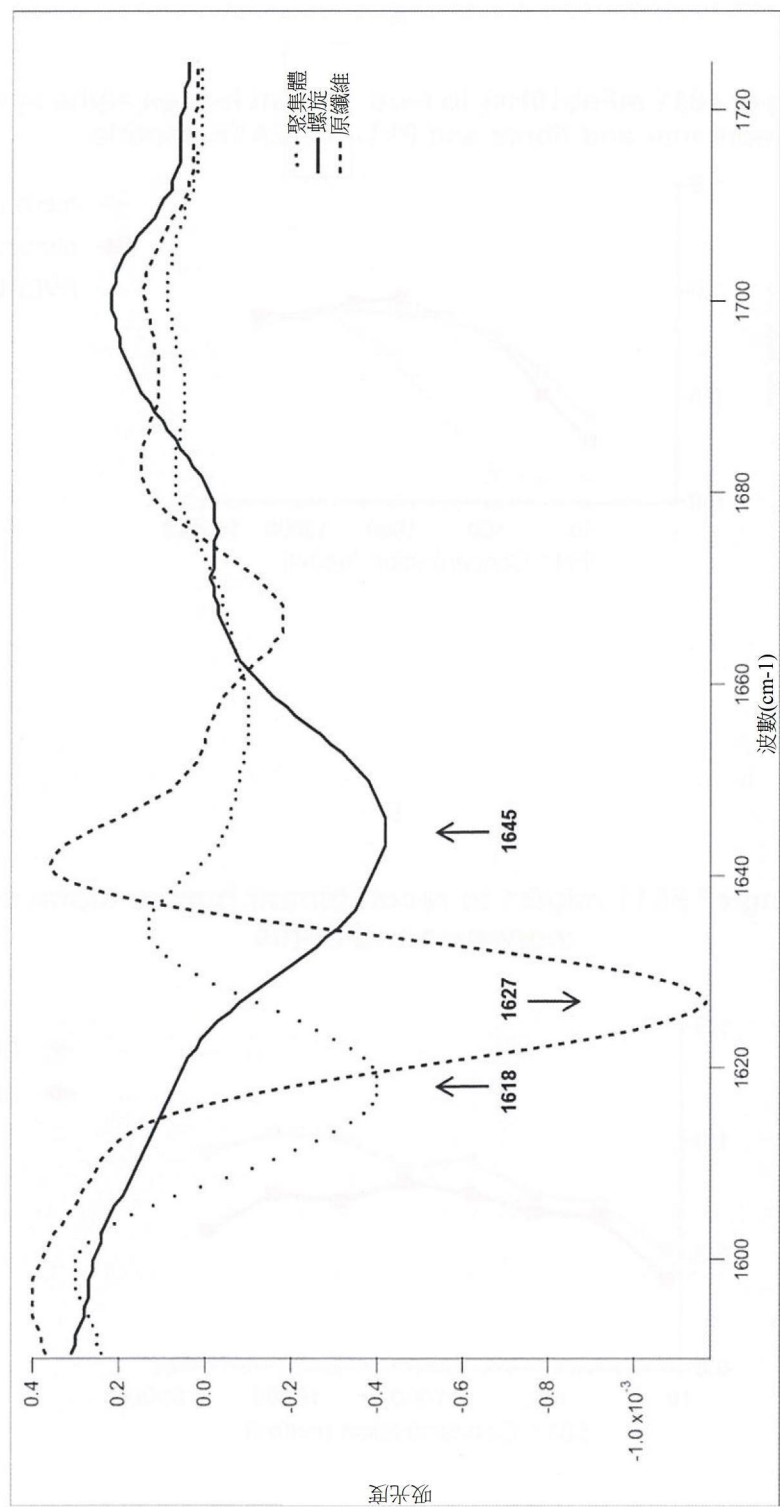
【圖1】

A



【圖2】

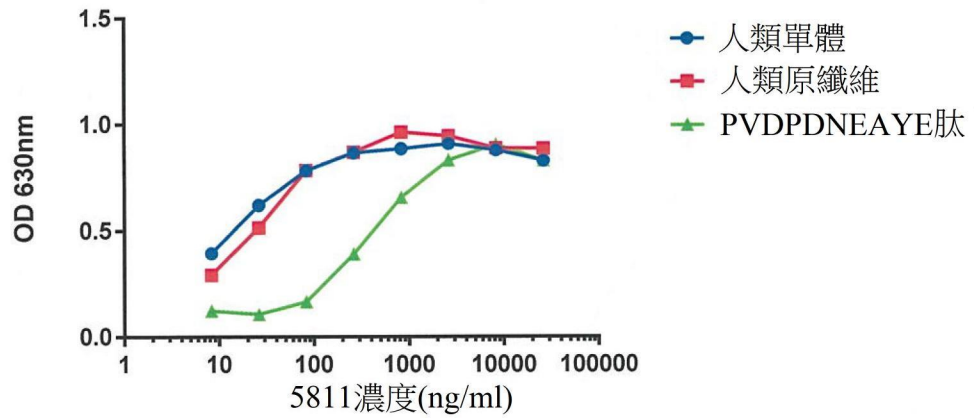
B



【圖2】(續)

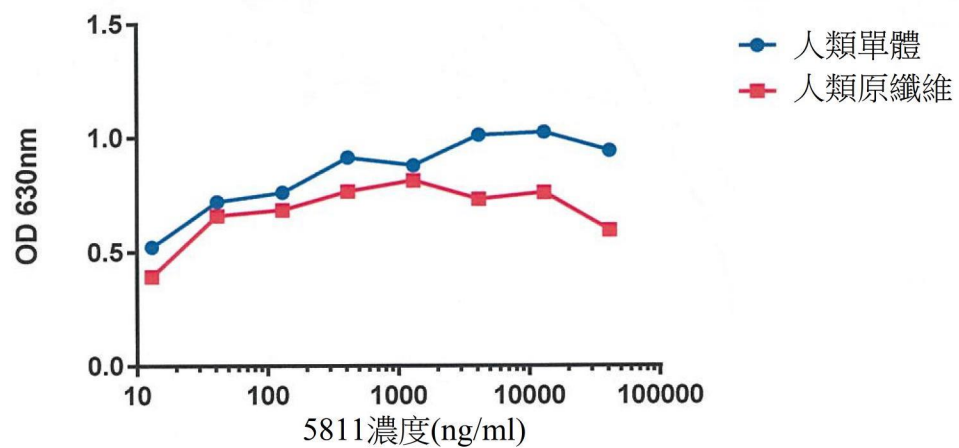
A

5811 mFab10HIS與重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維
以及PVDPDNEAYE肽之ELISA結合



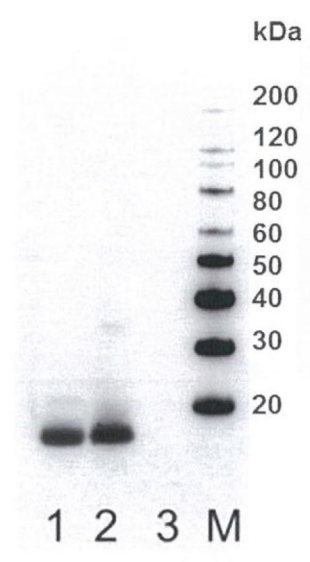
B

5811 mIgG1與重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維之ELISA結合

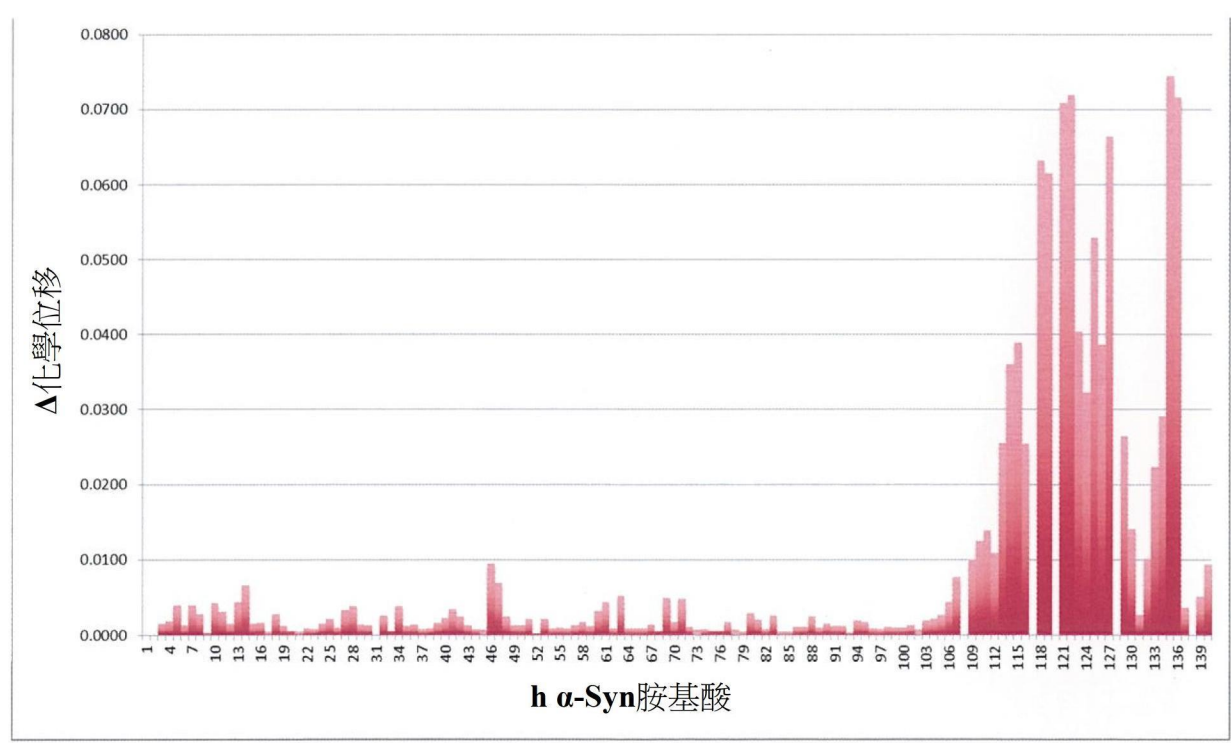


【圖3】

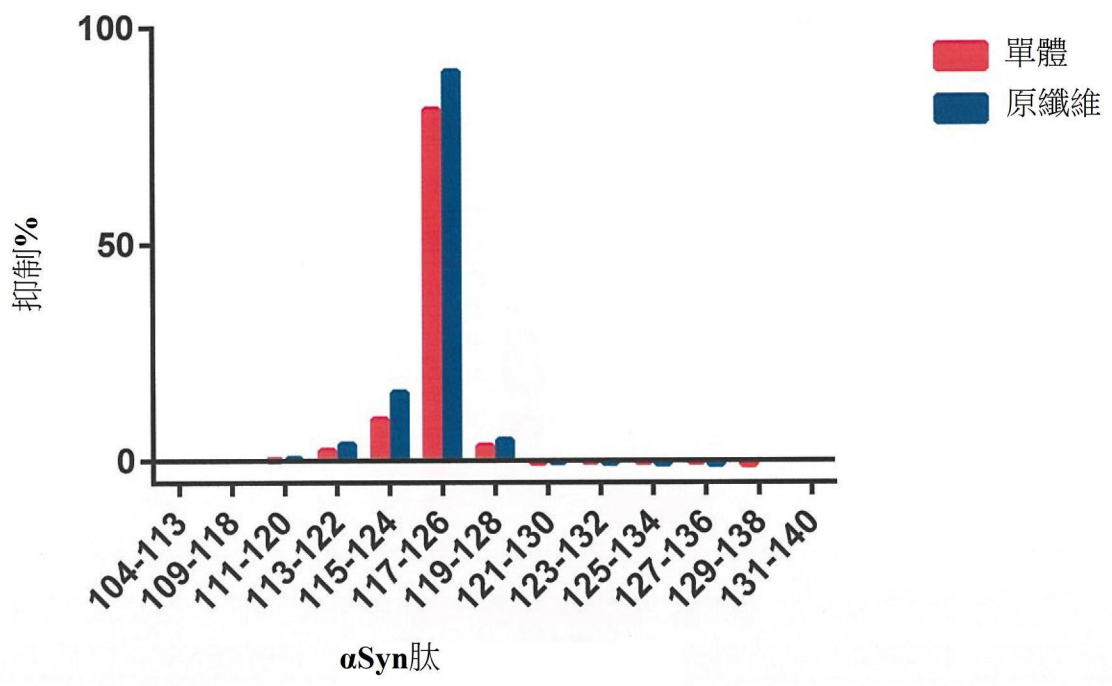
A



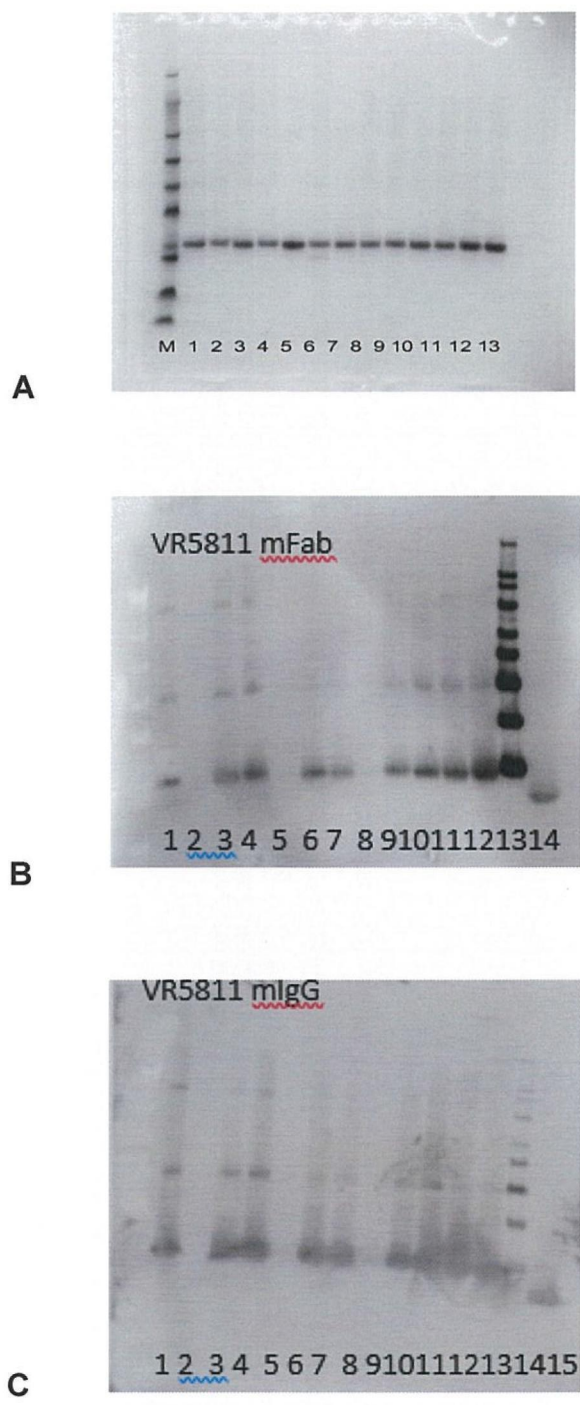
B



【圖4】



【圖5】

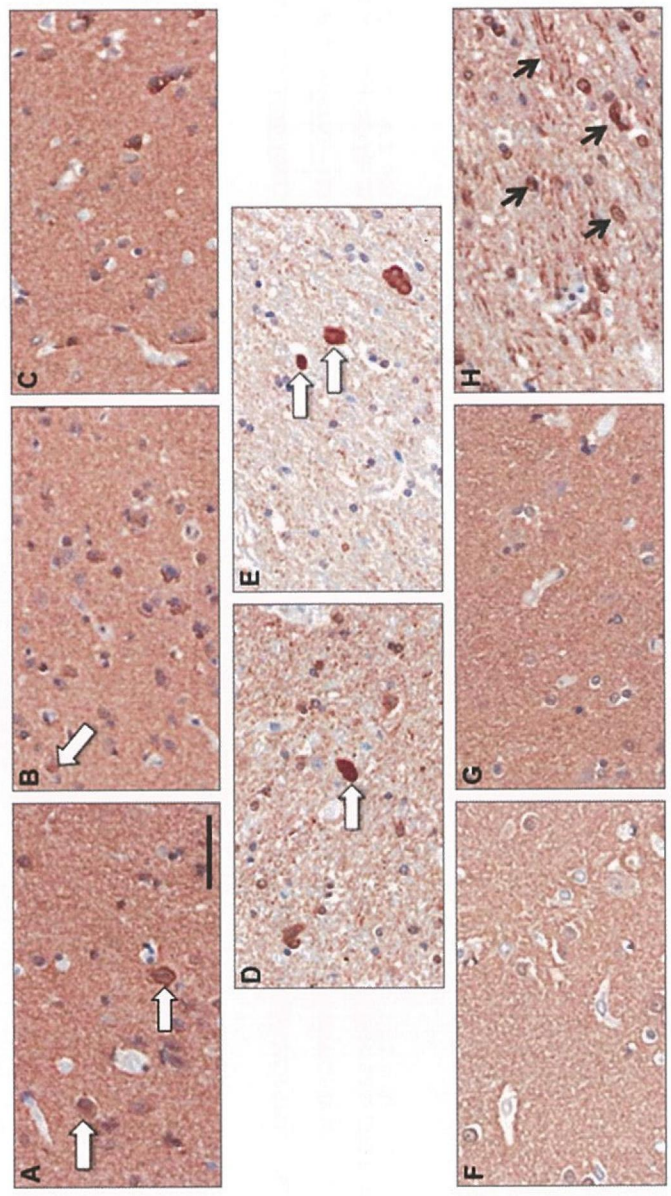


【圖6】

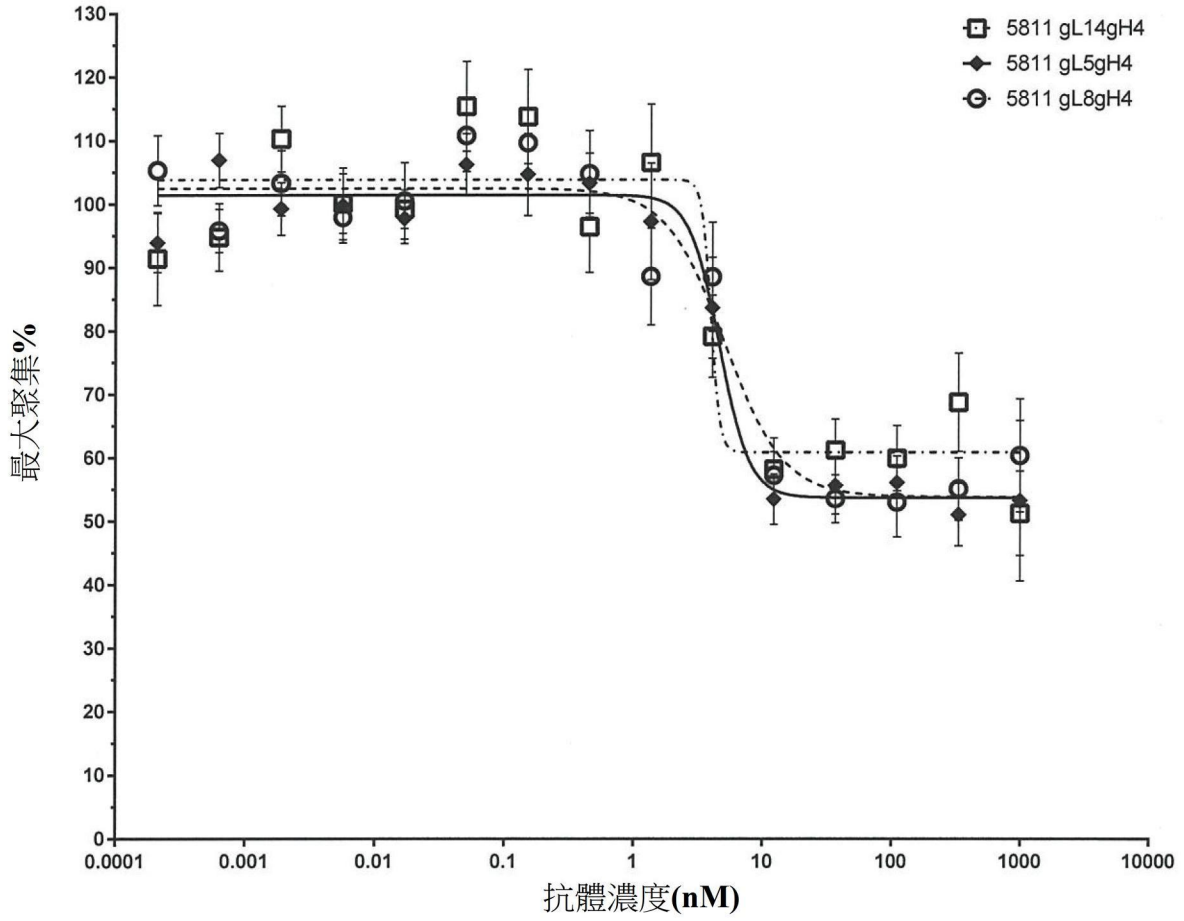
1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105
	NIQMTQSPFVLSASVGD	RVTLISCKASONINKNLDWYQKHGEAPKLLMYANNLOTGIPSRFSGSGGIDYTLTISSLOPEDVAIYYCYOYKNG-WTFGGGKLEIK																			
	DIQMTQSPFSSLSASVGD	RVTLITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLOSQVPSRFSRSGSGGIDFTLTISSLOPEDFAIYYQOOSYSTPWFQQGTKEIK																			
	DIQMTQSPFSSLSASVGD	RVTLITCKASONINKNLDWYQKPGKAPKLLIYYANNLOTGVPFRSFGSGSGGIDYTLTISSLOPEDFAIYYCYOYKNG-WTFGGGKVEIK																			
	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTLITCKASONINKNLDWYQKPGKAPKLLIYYANNLOTGVPFRSFGSGSGGIDFTLTISSLOPEDFAIYYCYOYKNA-WTFGGGKVEIK																			

串經 5811
 IGV1-39
 5811g15
 5811g16
 5811g14

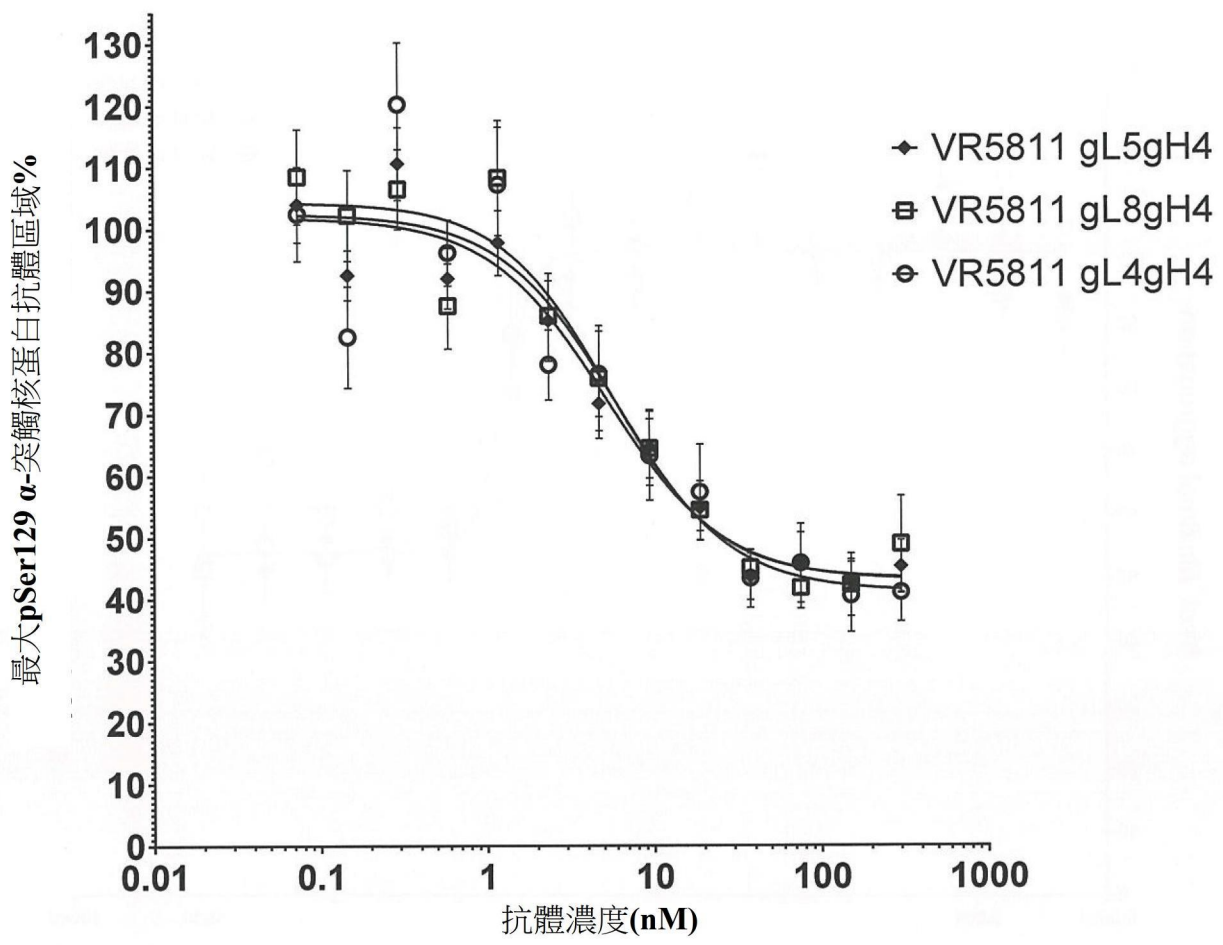
【圖7】



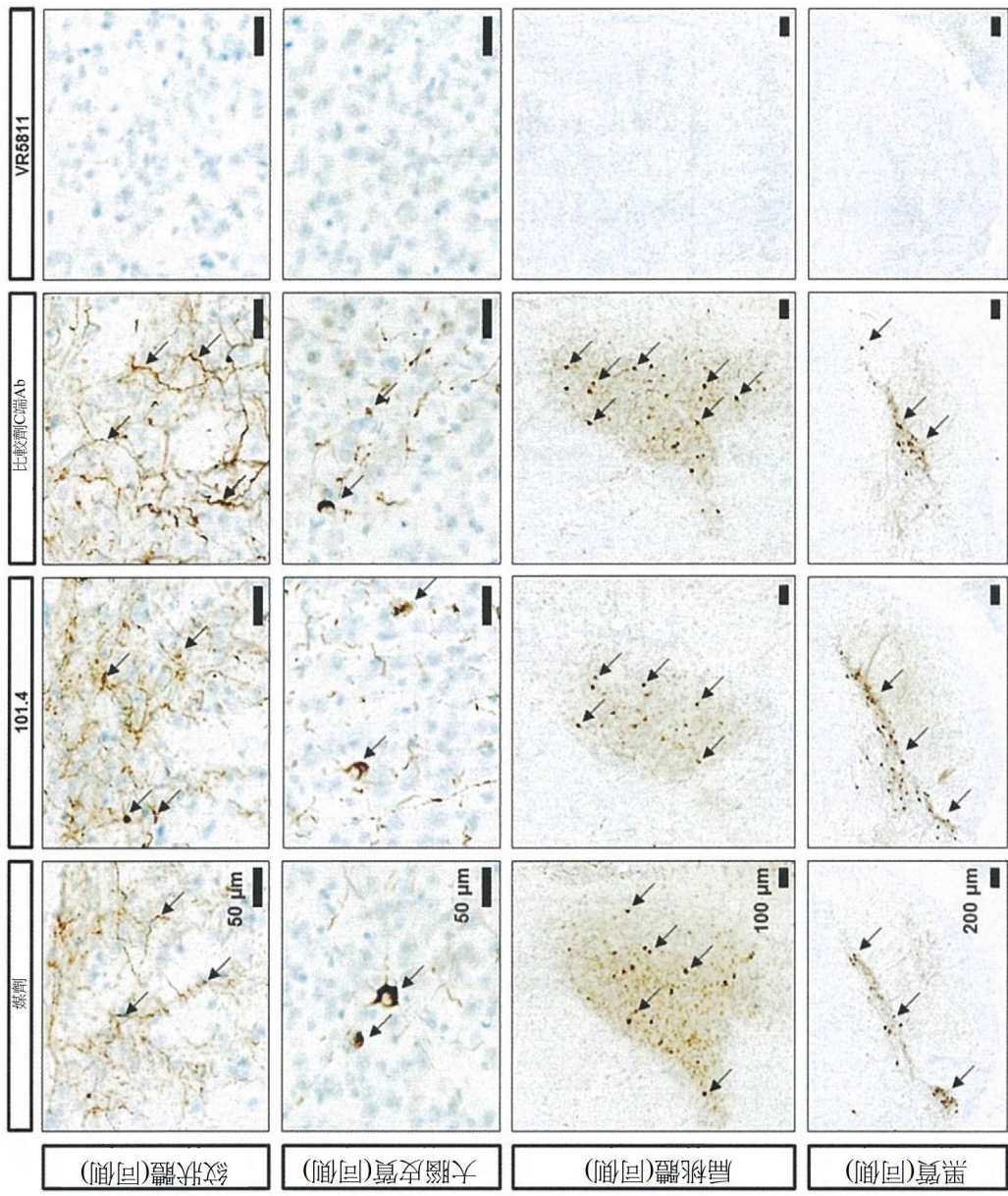
【圖9】



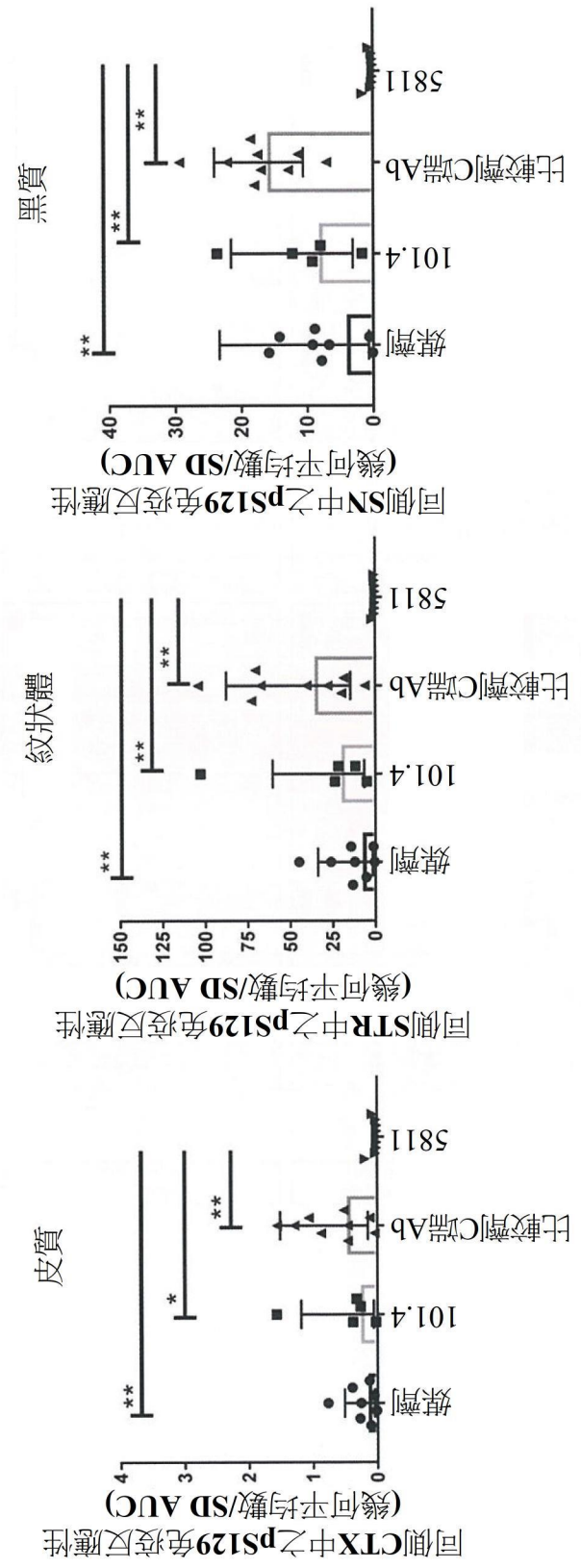
【圖10】



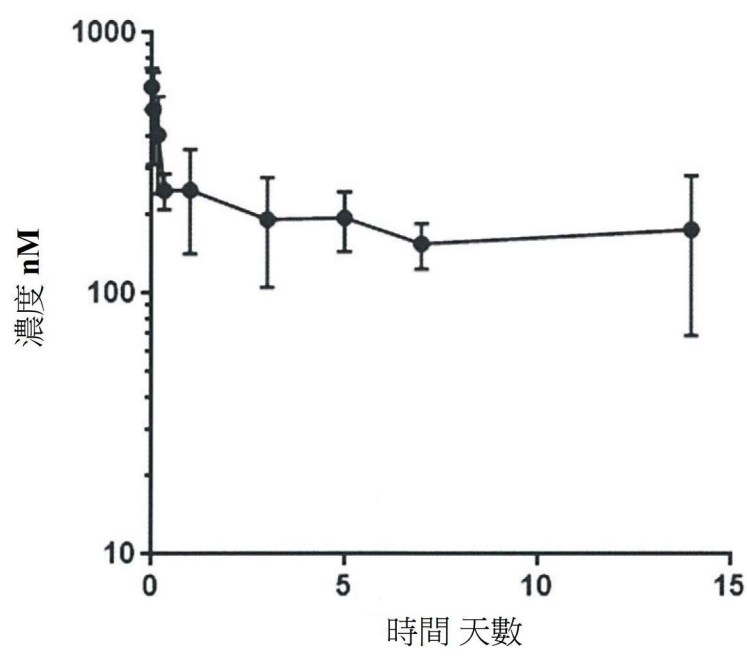
【圖11】



【圖12】



【圖13】



【圖14】