(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105722857 A
(43)申请公布日 2016.06.29

(21)申请号 201480061749.5
(22)申请日 2014.11.18
(30)优先权数据
13193892.0 2013.11.21 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.05.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/074840 2014.11.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/075011 EN 2015.05.28
(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 马库斯·布里奇吉
西尔维亚·许贝尔 克拉斯·卡努扎
托马斯·克雷默 奥拉夫·穆迪格尔
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 张国梁 程金山
(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)

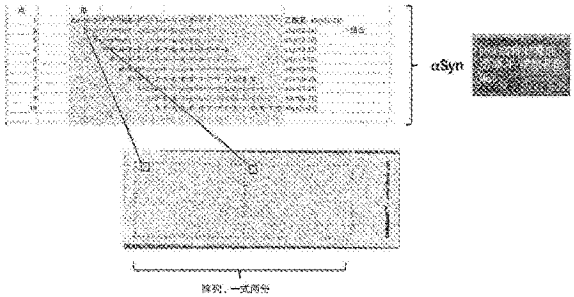
权利要求书2页 说明书86页
序列表23页 附图16页

(54)发明名称

抗-α-突触核蛋白抗体及使用方法

(57)摘要

本发明提供抗-人 α-突触核蛋白的抗体和使用所述抗体的方法。



CN 105722857 A

1.一种特异性结合人α-突触核蛋白的抗体，其中所述人α-突触核蛋白具有游离的N-端甲硫氨酸残基。

2.根据权利要求1所述的抗体，其中所述抗体特异性结合人和小鼠α-突触核蛋白，其中所述人和小鼠α-突触核蛋白具有游离的N-端甲硫氨酸残基。

3.根据权利要求1-2中任一项所述的抗体，其中所述α-突触核蛋白是单体和/或寡聚体α-突触核蛋白。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的抗体，其中所述抗体与在重链中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的抗体，其中所述抗体与包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体结合相同的表位。

6.根据权利要求1-3中任一项所述的抗体，其中所述抗体在重链中包含SEQ ID NO:21，22和17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs。

7.根据权利要求1-3和6中任一项所述的抗体，其中所述抗体通过将包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体人源化而获得。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的抗体，其中所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs，其中，在每个HVR中，0-3个氨基酸残基被改变。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的抗体，其中所述抗体是人源化的抗体，并且重链可变结构域来源于SEQ ID NO:26的重链可变结构域，和轻链可变结构域来源于SEQ ID NO:27的轻链可变结构域。

10.一种抗体，其与在重链中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位。

11.一种抗体，其与在重链中包含SEQ ID NO:21，22和17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs的抗体结合相同的表位。

12.一种抗体，其在重链中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs。

13.一种抗体，其在重链中包含SEQ ID NO:21，22和17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs。

14.一种抗体，其从包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体获得。

15.一种人源化的抗体，其在重链可变结构域中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs，其中，在每个HVR中，0-3个氨基酸残基被改变。

16.一种人源化的抗体，其在重链可变结构域中包含SEQ ID NO:21，22和17的HVRs且在轻链可变结构域中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs，其中，在每个HVR中，0-3个氨基酸残基被改变。

17.一种人源化的抗体，其中重链可变结构域来源于SEQ ID NO:26的重链可变结构域，并且轻链可变结构域来源于SEQ ID NO:27的轻链可变结构域。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的抗体，其中所述抗体缀合到血脑屏障穿梭模块上。

19.根据权利要求18所述的抗体，其中所述血脑屏障穿梭模块是特异性结合LRP1、LRP8、人转铁蛋白受体或人胰岛素样生长因子受体的抗体或抗体片段。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的抗体，其中所述抗体是

a)人亚类IgG1的全长抗体，或

b)人亚类IgG4的全长抗体，或

c)人亚类IgG1的全长抗体，具有突变L234A，L235A和P329G，

d)人亚类IgG4的全长抗体，具有突变S228P，L235E和P329G，

e)人亚类IgG1的全长抗体，在两条重链中均具有突变L234A，L235A和P329G，和在一条重链中具有突变T366W和S354C，并且在各自的另一条重链中具有突变T366S，L368A，Y407V和Y349C，或

f)人亚类IgG4的全长抗体，在两条重链中均具有突变S228P，L235E和P329G，和在一条重链中具有突变T366W和S354C，并且在各自的另一条重链中具有突变T366S，L368A，Y407V和Y349C。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的抗体，其中所述抗体

i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性，和/或

iv)特异性结合具有游离的N-端甲硫氨酸残基的α-突触核蛋白，并且不特异性结合具有修饰的N-端甲硫氨酸残基的α-突触核蛋白。

22.一种药物制剂，其包含权利要求1-21中任一项所述的抗体和药用载体。

23.根据权利要求1-21中任一项所述的抗体，其用作药物。

24.根据权利要求1-21中任一项所述的抗体，其用于治疗突触核蛋白病。

25.根据权利要求1-21中任一项所述的抗体，其用于治疗帕金森病。

26.权利要求1-21中任一项所述的抗体在制备药物中的应用。

27.权利要求26的应用，其中所述药物用于治疗帕金森病。

抗-α-突触核蛋白抗体及使用方法

发明领域

[0001] 本发明涉及抗-人α-突触核蛋白的抗体和使用所述抗体的方法。

[0002] 背景

[0003] 帕金森病(Parkinson's Disease)的特征在于,黑质纹状体系多巴胺(DA)神经元的进行性减少和存在雷维小体(LB)和神经突(LN),其是主要由丝状α-突触核蛋白聚集体构成的蛋白样神经细胞内包涵体。α-突触核蛋白是一种蛋白,其在脑中在控制多巴胺能神经元功能方面起关键作用,并且认为其关键地参与PD病理生理学。事实上,除了α-突触核蛋白是LB的主要蛋白成分的事实之外,遗传研究表明α-突触核蛋白中的某些点突变和增加引起家族形式的PD。大量的证据证明在多巴胺能突触上的α-突触核蛋白病理学是神经元细胞功能障碍发作和PD脑中变性的基础(Bellucci,A.,等,Brain Res.1432(2012)95-113)。

[0004] 雷维小体是α-突触核蛋白沉积,其是帕金森病(PD)的病理体征(Goedert,M.,Nat.Rev.Neurosci 2(2001)492-501)。Braak等报道了与偶发性PD相关的脑病理学的分级(Neurobiology of aging(衰老的神经学)24(2003)197-211)。

[0005] α-突触核蛋白原纤维聚集体是雷维小体和雷维神经突的主要成分。最近的科学工作表明α-突触核蛋白的前原纤维寡聚体可能是帕金森病进展的关键因素(Luk,K.C.,等,Science 338(2012)949-953;Auluck,P.K.,等,Science 295(2002)865-868;Bodner,R.A.,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA103(2006)4246-4251;Bucciantini,M.,等,J.Biol.Chem.279(2004)31374-31382;El-Agnaf,O.M.,等,FASEB J.20(2006)419-425;Kayed,R.,等,Science 300(2003)486-489;Lashuel,H.A.,等,J.Mol.Biol.322(2002)1089-1102;Masliah,E.,等,Science 287(2000)1265-1269.)。

[0006] Chai,Y-J.,等,报道了分泌的寡聚体形式的a-突触核蛋白影响膜运输的多个步骤(FEBS Lett.587(2013)452-459)。由α-突触核蛋白诱导的BV-2细胞的外核体:Chang,C.,等,Neurosci.Lett.548(2013)190-195)报道其是PD神经变性的重要调节剂。Feng,R.L.,等报道α-突触核蛋白调节膜电导中的变化:α-突触核蛋白寡聚体在细胞易损性中的潜在作用(Eur.J.Neurosci.32(2010)10-17)。Lee,H-J.,等报道自体吞噬失败促使α-突触核蛋白的胞吐和细胞内转移(Exp.Mol.Med.45(2013)e22)。Schulz-Schaeffer,W.J.(Acta Neuropathol.120(2010)131-143)报道了α-突触核蛋白聚集在具有雷维小体的痴呆、帕金森病和帕金森病痴呆中的突触病理学。

[0007] 人脑中的大部分α-突触核蛋白是N-端乙酰化的(Kellie,J.F.,等,Sci.Rep.4(2014)5797),并且该N-端乙酰化抑制α-突触核蛋白聚集(Bartels,T.,等,PLoS One 9(2014)e103727)。

[0008] 已经报道了不同的寡聚体形式的重组α-突触核蛋白:A型寡聚体(有细胞毒性的,对Ca^{2+}流入有影响),C型寡聚体(聚集体种子种类(aggregate seeding species)),与脂质混合的原纤维(引起胞内聚集体的聚集),三元脯氨酸(TP)突变体A30P/A56P/A76P(主要形成毒性寡聚体)(例如,参见Danzer,K.M.,等,J.Neurosci.27(2007)9220-9232;Danzer,K.M.,等J.Neurochem.111(2009)192-203;Luk,C.K.,等Proc.Natl.Acad.Sci.USA106

(2009)20051-20056;Desplates,P.,等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106(2009)13010-13015;Karpinar,D.P.,等,EMBO J.28(2009)3256-3268;Lee,H-J.,等,J.Biol.Chem.285(2010)9262-9272;Hansen,C.,等,J.Clin.Invest.121(2011)715-725)。

[0009] Luk,K.C.,等(Science 338(2012)949-953)报道了病理性α-突触核蛋白传递在非转基因小鼠中起始帕金森样神经变性。α-突触核蛋白寡聚体诱导的种子为α-突触核蛋白病理学的扩散提供证据,并且Danzer,K.M.,等(J.Neurochem.111(2009)192-203;Mol.Neurodegen.7(2012)42)报道了α-突触核蛋白寡聚体的胞外体细胞-到-细胞的传递。Braidy等报道了体外原代人胎儿肠神经元中的α-突触核蛋白传递和线粒体毒性(Neurotox.Res.(2013),2013年10月5日在线公布)。Desplats,P.,等报道了包涵体形成和通过α-突触核蛋白的神经元-到-神经元传递的神经元细胞死亡(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106(2009)13010-13015)。Lee等(J.Biol.Chem.285(2010)9262-9272)报道了α-突触核蛋白从神经元直接转运到星形神经胶质引起突触核蛋白病(synucleinopathies)中的炎性反应。Lee,S-J.,等报道了α-突触核蛋白聚集体的细胞-到-细胞的传递(Meth.Mol.Biol.849(2012)347-359;Nat.Rev.Neurol.6(2010)702-706)。α-突触核蛋白病理学通过可能的α-突触核蛋白聚集的传递而进展的可能的最强的证据来自特定PD患者脑的尸体解剖分析,所述患者在11-16年前移植到他们的脑中的胎儿神经元中表现出雷维病变(Li,J-Y.,等,Nat.Med.14(2008)501-503)。

[0010] 聚集的α-突触核蛋白调控体内多巴胺能神经毒性(Periquet,M.,等,J.Neurosci.27(2007)3338-3346)。Pieri,L.,等报道了原纤维α-突触核蛋白和亨廷顿外显子1组装物对细胞有毒(Biophys.J.102(2012)2894-2905)。Van Rooijen等报道了寡聚体α-突触核蛋白的膜渗透:机制探索(PLoS One5(2010)e14292)。

[0011] 最近以来,Wagner等在细胞测定和α-突触核蛋白转基因小鼠模型中证明了小分子Anle138b作用为保护性α-突触核蛋白寡聚体调节剂,其可以用于帕金森病的疾病减轻性治疗(Wagner,J,等,Acta Neuropathol.125(2013)795-813)。Lynch,S.M.,等报道了针对α-突触核蛋白的非淀粉样蛋白成分的scFv内抗体减少胞内聚集和毒性(J.Mol.Biol.377(2008)136-147)。El-Agnaf,O.M.,等(FASEB J.(2004))报道了设计α-突触核蛋白聚集和毒性的抑制剂作为帕金森病和相关病症的新治疗的策略。Emadi,S.,等报道了用人单链抗体片段抑制α-突触核蛋白的聚集和针对寡聚体α-突触核蛋白的人单链抗体片段的分离,所述人单链抗体片段抑制聚集并且防止α-突触核蛋白诱导的毒性(Biochem.43(2004)2871-2878;J.Mol.Biol.368(2007)1132-1144)。Smith等报道了静脉内免疫球蛋白对α-突触核蛋白聚集和神经毒性的作用(Int.Immunopharmacol.14(2012)550-557)。Vekrelis,K.和Stefanis,L.(Expert.Opin.Ther.Targets 16(2012)421-432)报道了靶向胞内和胞外α-突触核蛋白作为帕金森病和其他突触核蛋白病的治疗策略。

[0012] 在各个转基因小鼠中抗体辅助的脑突触核蛋白病的清除以主动免疫形式(Masliah,E.,等,Neuron 46(2005)857-868)和被动免疫形式(Masliah,E.,等,PLoS One 6(2011)e19338)得到证明。Bae,E-J.,等(J.Neurosci.32(2012)13454-13469)报道了胞外α-突触核蛋白被特异性抗体的结合防止细胞-到-细胞的聚集体传递。

[0013] WO 2011/020133报道了使用α-突触核蛋白表位的模拟位来治疗雷维小体病。在WO 2007/011907中报道了α-突触核蛋白抗体和与其相关的方法。Joshi等(MABS 4(2012)686-

693)报道了与高度带电荷的蛋白酶体再导向序列融合增加多种抗-突触核蛋白内抗体的可溶性细胞质表达和功效。Emadi等(J.Mol.Biol.368(2007)1132-1144)报道了分离针对寡聚体α-突触核蛋白的人单链抗体片段,所述人单链抗体片段抑制聚集并且防止α-突触核蛋白诱导的毒性。Emadi等(J.Biol.Chem.284(2009)11048-11058)报道了检测到形态迥异的寡聚体形式的α-突触核蛋白。Zhou等(Mol.Ther.10(2004)1023-1031)报道了人单链Fv内抗体阻断过表达的α-突触核蛋白的异常细胞作用。Nasstrom等(PLoS One 6(2011)e27230)报道了所述针对α-突触核蛋白的抗体减少活细胞中的寡聚化。WO2011/104696报道了前原纤维结合的抗体及其在用于帕金森病、具有雷维小体的痴呆和其他α-突触核蛋白病的治疗和诊断方法中的应用。Barkhordarian等(Prot.Eng.Des.Select.19(2006)497-502)报道了使用原子力显微镜和噬菌体展示技术分离针对特定蛋白形态的重组抗体。Kvam等(PLoS One 4(2009)e5727)报道了活细胞中原纤维聚谷氨酰胺蛋白的构象靶向增加聚集和细胞毒性。

[0014] 概述

[0015] 本发明提供抗-人α-突触核蛋白抗体和使用所述抗体的方法。

[0016] 本文中报道的一个方面是特异性结合人α-突触核蛋白的抗体,其中所述人α-突触核蛋白具有游离的N-端甲硫氨酸残基。

[0017] 术语“游离的N-端甲硫氨酸残基”表示多肽中位于所述多肽的N-端并且除了其与多肽的其余部分缀合的酰胺键之外没有被修饰的甲硫氨酸残基。在一个实施方案中,所述游离的N-端甲硫氨酸残基是未修饰的甲硫氨酸残基。在一个实施方案中,所述游离的N-端甲硫氨酸残基具有游离的氨基。人α-突触核蛋白具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

[0018] 在一个实施方案中,所述抗体特异性结合人和小鼠α-突触核蛋白,其中所述人和小鼠α-突触核蛋白具有游离的N-端甲硫氨酸残基。

[0019] 在一个实施方案中,所述α-突触核蛋白是单体α-突触核蛋白。

[0020] 在一个实施方案中,所述α-突触核蛋白是单体和寡聚体α-突触核蛋白。

[0021] 在一个实施方案中,所述抗体与在重链中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位或重合的表位。

[0022] 在一个实施方案中,所述抗体与在重链中包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs的抗体结合相同的表位或重合的表位。

[0023] 在一个实施方案中,所述抗体与包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体结合相同的表位或重合的表位。

[0024] 在一个实施方案中,所述抗体在重链中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs。

[0025] 在一个实施方案中,所述抗体在重链中包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs。

[0026] 在一个实施方案中,所述抗体通过将包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体人源化而获得。

[0027] 在一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体,并且在重链可变结构域中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs,其中,在每个HVR中,0-3个氨基酸残基被改变。

[0028] 在一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体,并且在重链可变结构域中包含SEQ

ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链可变结构域中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs,其中,在每个HVR中,0-3个氨基酸残基被改变。

[0029] 在一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体,并且重链可变结构域来源于SEQ ID NO:26的重链可变结构域,轻链可变结构域来源于SEQ ID NO:27的轻链可变结构域。

[0030] 本文报道的一个方面是与在重链中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位或重合的表位的抗体。

[0031] 本文报道的一个方面是与包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体结合相同的表位或重合的表位的抗体。

[0032] 本文报道的一个方面是在重链中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体。

[0033] 本文报道的一个方面是在重链中包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs的抗体。

[0034] 本文报道的一个方面是从包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体获得的变体抗体。

[0035] 在一个实施方案中,所述变体抗体是人源化的抗体,其通过将包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体人源化而获得。

[0036] 本文报道的一个方面是在重链可变结构域中包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域中包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的人源化抗体,其中,在每个HVR中,0-3个氨基酸残基被改变。

[0037] 本文报道的一个方面是在重链可变结构域中包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链可变结构域中包含SEQ ID NO:23-25的HVRs的人源化抗体,其中,在每个HVR中,0-3个氨基酸残基被改变。

[0038] 本文报道的一个方面是人源化的抗体,其中重链可变结构域来源于SEQ ID NO:26的重链可变结构域,轻链可变结构域来源于SEQ ID NO:27的轻链可变结构域。

[0039] 在所有前述方面的一个实施方案中,所述抗体缀合到血脑屏障穿梭模块(blood-brain-barrier shuttle module)上。

[0040] 在一个实施方案中,所述血脑屏障穿梭模块是特异性结合LRP1、LRP8、人转铁蛋白受体或人胰岛素样生长因子受体的抗体或抗体片段。

[0041] 在所有前述方面的一个实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。

[0042] 在所有前述方面的一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体或嵌合抗体。

[0043] 在所有前述方面的一个实施方案中,所述抗体是

[0044] a)人亚类IgG1的全长抗体,或

[0045] b)人亚类IgG4的全长抗体,或

[0046] c)人亚类IgG1的全长抗体,具有突变L234A,L235A和P329G,

[0047] d)人亚类IgG4的全长抗体,具有突变S228P,L235E和P329G,

[0048] e)人亚类IgG1的全长抗体,在两条重链中具有突变L234A,L235A和P329G,在一条重链中具有突变T366W和S354C,并且在各自的另一条重链中具有突变T366S,L368A,Y407V和Y349C,或

[0049] f)人亚类IgG4的全长抗体,在两条重链中具有突变S228P,L235E和P329G,在一条

重链中具有突变T366W和S354C，并且在各自的另一条重链中具有突变T366S，L368A，Y407V和Y349C。

[0050] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0051] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区，其中

[0052] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0053] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0054] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0055] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0056] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18，SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0057] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0058] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0059] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区，其中

[0060] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21，SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0061] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0062] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0063] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0064] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23，SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0065] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0066] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0067] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区，其中

[0068] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的非人(兔)可变结构域的人源化形式，

[0069] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0070] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0071] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0072] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的非人(兔)可变结构域的人源化形式，

[0073] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0074] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0075] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0076] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0077] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0078] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0079] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0080] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0081] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0082] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0083] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0084] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0085] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0086] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0087] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0088] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0089] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0090] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0091] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0092] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式,

[0093] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0094] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0095] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0096] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的兔可变结构域的人源化形式,

[0097] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0098] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0099] a)所述抗体包含第一抗体重链,所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0100] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0101] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[0102] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[0103] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[0104] b)所述抗体包含第二抗体重链,所述第二抗体重链在N-至C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区,其中

[0105] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0106] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[0107] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[0108] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C,或者,如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C,则所述恒定区包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[0109] c)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0110] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0111] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0112] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0113] a)所述抗体包含第一抗体重链,所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0114] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0115] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[0116] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[0117] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[0118] b)所述抗体包含第二抗体重链,所述第二抗体重链在N-至C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区,其中

[0119] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0120] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[0121] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[0122] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C,或者,如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C,在所述恒定区包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[0123] c)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0124] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0125] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0126] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0127] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0128] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式，

[0129] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0130] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0131] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0132] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-至C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0133] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式，

[0134] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0135] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0136] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，在所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0137] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0138] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的兔可变结构域的人源化形式，

[0139] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[0140] 在一个实施方案中，特异性结合人转铁蛋白受体的抗体片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域，所述重链可变结构域是SEQ ID NO:56的重链可变结构域的人源化形式，并且所述轻链可变结构域是SEQ ID NO:57的轻链可变结构域的人源化形式。

[0141] 在所有前述方面的一个实施方案中，所述抗体

[0142] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0143] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0144] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性，和/或

[0145] iv)特异性结合具有游离的N-端甲硫氨酸残基的α-突触核蛋白，并且不与具有修饰的N-端甲硫氨酸残基的α-突触核蛋白特异性结合。

[0146] 本文报道的一个方面是特异性结合人α-突触核蛋白的抗体，其中所述抗体

[0147] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0148] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0149] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0150] 在所有方面和实施方案的一个实施方案中，所述人神经元细胞是受四环素控制的、过表达v-myc的人中脑来源的细胞系。在所有方面和实施方案的一个实施方案中，所述

人神经元细胞是Lund人中脑(LUHMES)细胞。

[0151] 在一个实施方案中,所述胱天蛋白酶活性是胱天蛋白酶3和/或胱天蛋白酶7活性。

[0152] 在一个实施方案中,所述抗体用于治疗突触核蛋白病。

[0153] 在一个实施方案中,所述抗体用于治疗帕金森病。

[0154] 在一个实施方案中,所述抗体是效应子功能沉默的。在一个实施方案中,所述抗体没有效应子功能。

[0155] 在一个实施方案中,所述抗体特异性结合由氨基酸序列GKNEEGAPQEG(SEQ ID NO:01)组成的肽。

[0156] 在一个实施方案中,所述抗体具有小于10^{-09}M且大于10^{-07}M的针对单体人α-突触核蛋白的结合亲和力。

[0157] 在一个实施方案中,所述抗体特异性结合单体和寡聚体的人α-突触核蛋白。

[0158] 在一个实施方案中,所述抗体在重链可变结构域包含SEQ ID NO:02-04的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:05-07的HVRs。

[0159] 在一个实施方案中,所述抗体在重链可变结构域包含SEQ ID NO:08,09和04的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:10-12的HVRs。

[0160] 在一个实施方案中,所述抗体包含由SEQ ID NO:13组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:14组成的轻链可变结构域。

[0161] 在一个实施方案中,所述抗体通过将包含由SEQ ID NO:13组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:14组成的轻链可变结构域的抗体人源化而获得。

[0162] 在一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体,并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:02-04的HVRs,且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:05-07的HVRs,其中,在每个HVR中,多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0163] 在一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体,并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:08,09和04的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:10-12的HVRs,其中,在每个HVR中,多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0164] 在一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体,并且重链可变结构域来源于由SEQ ID NO:13组成的重链可变结构域,且轻链可变结构域来源于由SEQ ID NO:14组成的轻链可变结构域。

[0165] 在一个实施方案中,所述抗体与在重链包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0166] 在一个实施方案中,所述抗体与在重链包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:23-25的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0167] 在一个实施方案中,所述抗体包含由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域。

[0168] 在一个实施方案中,所述抗体通过将包含由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域的抗体人源化获得。

[0169] 在一个实施方案中,所述抗体是人源化的抗体,并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:18-20的HVRs,其中,在每个HVR中,多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0170] 在一个实施方案中，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:21，22和17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:23-25的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0171] 在一个实施方案中，所述抗体是人源化的抗体，并且重链可变结构域来源于由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域，轻链可变结构域来源于由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域。

[0172] 在一个实施方案中，所述抗体与在重链中包含SEQ ID NO:28-30的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:31-33的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0173] 在一个实施方案中，所述抗体与在重链中包含SEQ ID NO:28，34和30的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:35-37的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0174] 在一个实施方案中，所述抗体包含由SEQ ID NO:38组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:39组成的轻链可变结构域。

[0175] 在一个实施方案中，所述抗体通过将包含由SEQ ID NO:38组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:39组成的轻链可变结构域的抗体人源化而获得。

[0176] 在一个实施方案中，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:28-30的HVRs，且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:31-33的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0177] 在一个实施方案中，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:28，34和30的HVRs，且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:35-37的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0178] 在一个实施方案中，所述抗体是人源化的抗体，并且重链可变结构域来源于由SEQ ID NO:38组成的重链可变结构域，且轻链可变结构域来源于由SEQ ID NO:39组成的轻链可变结构域。

[0179] 在一个实施方案中，所述抗体特异性结合原纤维人α-突触核蛋白，并且不结合非原纤维人α-突触核蛋白。

[0180] 在一个实施方案中，所述抗体缀合到血脑屏障穿梭模块上。

[0181] 在一个实施方案中，所述血脑屏障穿梭模块是特异性结合LRP1、LRP8、人转铁蛋白受体或人胰岛素样生长因子受体的抗体或抗体片段。

[0182] 在一个实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。

[0183] 在一个实施方案中，所述抗体是人源化的抗体或嵌合抗体。

[0184] 在一个实施方案中，所述抗体是结合人α-突触核蛋白的抗体片段，并且

[0185] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0186] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0187] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0188] 在一个实施方案中，所述抗体是

[0189] a)人亚类IgG1的全长抗体，或

[0190] b)人亚类IgG4的全长抗体，或

[0191] c)人亚类IgG1的全长抗体，具有突变L234A，L235A和P329G，

[0192] d)人亚类IgG4的全长抗体，具有突变S228P，L235E和P329G，

[0193] e)人亚类IgG1的全长抗体，在两条重链中具有突变L234A，L235A和P329G，在一条重链中具有突变T366W和S354C，并且在各自的另一条重链中具有突变T366S，L368A，Y407V和Y349C，或

[0194] f)人亚类IgG4的全长抗体，在两条重链中具有突变S228P，L235E和P329G，在一条重链中具有突变T366W和S354C，并且在各自的另一条重链中具有突变T366S，L368A，Y407V和Y349C。

[0195] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0196] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区，其中

[0197] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:02，SEQ ID NO:03和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0198] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0199] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0200] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0201] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:05，SEQ ID NO:06和SEQ ID NO:07的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0202] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0203] 并且

[0204] c)所述抗体

[0205] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0206] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0207] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0208] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0209] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区，其中

[0210] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:08，SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0211] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0212] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0213] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0214] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0215] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0216] 并且

[0217] c)所述抗体

[0218] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0219] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0220] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0221] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0222] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[0223] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:13的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[0224] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0225] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0226] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0227] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:14的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[0228] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0229] 并且

[0230] c)所述抗体

[0231] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0232] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0233] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0234] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0235] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[0236] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0237] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0238] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0239] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0240] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0241] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0242] 并且

[0243] c)所述抗体

[0244] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0245] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0246] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0247] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0248] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[0249] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0250] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0251] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0252] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0253] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0254] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0255] 并且

[0256] c)所述抗体

[0257] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0258] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0259] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0260] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0261] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[0262] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[0263] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0264] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0265] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0266] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[0267] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0268] 并且

[0269] c)所述抗体

[0270] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0271] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0272] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0273] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0274] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[0275] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0276] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0277] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0278] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0279] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0280] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0281] 并且

[0282] c)所述抗体

[0283] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0284] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0285] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0286] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0287] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[0288] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:30的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0289] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0290] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0291] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0292] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0293] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0294] 并且

[0295] c)所述抗体

[0296] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0297] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0298] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0299] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0300] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[0301] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:38的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[0302] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0303] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0304] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0305] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:39的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[0306] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0307] 并且

[0308] c)所述抗体

[0309] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0310] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0311] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0312] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0313] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0314] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:02，SEQ ID NO:03和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0315] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0316] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0317] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0318] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:05，SEQ ID NO:06和SEQ ID NO:07的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0319] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0320] 并且

[0321] c)所述抗体

[0322] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0323] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0324] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0325] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0326] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0327] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:08，SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0328] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0329] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0330] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0331] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0332] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0333] 并且

[0334] c)所述抗体

[0335] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0336] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0337] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0338] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0339] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0340] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:13的兔可变结构域的人源化形式,

[0341] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0342] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0343] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0344] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:14的兔可变结构域的人源化形式,

[0345] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0346] 并且

[0347] c)所述抗体

[0348] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0349] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0350] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0351] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0352] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0353] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0354] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0355] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0356] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0357] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0358] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0359] 并且

[0360] c)所述抗体

[0361] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0362] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0363] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0364] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0365] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0366] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21，SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0367] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0368] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0369] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0370] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23，SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0371] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0372] 并且

[0373] c)所述抗体

[0374] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0375] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0376] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0377] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0378] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0379] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式，

[0380] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0381] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[0382] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0383] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的兔可变结构域的人源化形式，

[0384] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0385] 并且

[0386] c)所述抗体

[0387] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0388] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0389] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0390] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0391] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0392] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28，SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0393] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[0394] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0395] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0396] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0397] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0398] 并且

[0399] c)所述抗体

[0400] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0401] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0402] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0403] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0404] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0405] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:30的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0406] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0407] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0408] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0409] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[0410] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区,

[0411] 并且

[0412] c)所述抗体

[0413] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[0414] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[0415] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0416] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[0417] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[0418] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:38的兔可变结构域的人源化形式,

[0419] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[0420] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[0421] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[0422] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:39的兔可变结构域的人源化形式,

[0423] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0424] 并且

[0425] c)所述抗体

[0426] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0427] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0428] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0429] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0430] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0431] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:02，SEQ ID NO:03和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0432] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0433] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0434] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0435] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0436] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:02，SEQ ID NO:03和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0437] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0438] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0439] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0440] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0441] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:05，SEQ ID NO:06和SEQ ID NO:07的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0442] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0443] 并且

[0444] d)所述抗体

[0445] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0446] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0447] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0448] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0449] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可

变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0450] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:08，SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0451] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0452] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0453] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0454] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0455] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:08，SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:04的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0456] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0457] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0458] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0459] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0460] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0461] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0462] 并且

[0463] d)所述抗体

[0464] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0465] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0466] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0467] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0468] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0469] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:13的兔可变结构域的人源化形式，

[0470] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0471] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0472] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0473] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0474] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:13的兔可变结构域的人源化形式，

[0475] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0476] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0477] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0478] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0479] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:14的兔可变结构域的人源化形式，

[0480] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0481] 并且

[0482] d)所述抗体

[0483] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0484] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0485] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0486] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0487] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0488] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0489] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0490] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0491] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0492] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0493] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0494] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0495] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0496] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0497] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0498] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18，SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0499] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0500] 并且

[0501] d)所述抗体

[0502] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0503] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0504] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0505] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0506] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0507] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21，SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0508] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0509] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0510] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0511] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0512] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21，SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0513] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0514] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0515] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0516] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0517] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23，SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0518] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0519] 并且

[0520] d)所述抗体

[0521] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0522] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0523] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0524] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0525] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可

变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0526] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式，

[0527] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0528] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0529] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0530] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0531] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式，

[0532] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0533] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0534] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0535] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0536] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的兔可变结构域的人源化形式，

[0537] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0538] 并且

[0539] d)所述抗体

[0540] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0541] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0542] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0543] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0544] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0545] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28，SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0546] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0547] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0548] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0549] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0550] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28，SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0551] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0552] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0553] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0554] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0555] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:31，SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0556] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0557] 并且

[0558] d)所述抗体

[0559] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0560] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0561] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0562] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0563] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0564] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28，SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:30的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0565] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0566] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0567] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0568] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0569] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:28，SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:30的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0570] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0571] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0572] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0573] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0574] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:35，SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[0575] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0576] 并且

[0577] d)所述抗体

[0578] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0579] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0580] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0581] 本文报道的一个方面是抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[0582] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[0583] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:38的兔可变结构域的人源化形式，

[0584] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0585] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0586] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0587] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[0588] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:38的兔可变结构域的人源化形式，

[0589] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[0590] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[0591] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[0592] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[0593] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:39的兔可变结构域的人源化形式，

[0594] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区，

[0595] 并且

[0596] d)所述抗体

[0597] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0598] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0599] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0600] 在一个实施方案中，所述抗体片段包含作为SEQ ID NO:56的重链可变结构域的人源化形式的重链可变结构域和作为SEQ ID NO:57的轻链可变结构域的人源化形式的轻链可变结构域。

[0601] 本文所报道的一个方面是编码本文报道的抗体的分离的核酸。

[0602] 本文所报道的一个方面是包含本文报道的核酸的宿主细胞。

[0603] 本文所报道的一个方面是制备抗体的方法，所述方法包括培养本文报道的宿主细胞以产生所述抗体的步骤。

[0604] 在一个实施方案中，所述方法还包括从细胞或培养基中回收所述抗体的步骤。

[0605] 本文所报道的一个方面是包含本文报道的抗体和药用载体的药物制剂。

[0606] 在一个实施方案中，所述药物制剂还包含另外的治疗剂。

[0607] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗体，其用作药物。

[0608] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗体，其用于治疗突触核蛋白病。

[0609] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗体，其用于治疗帕金森病。

[0610] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗体，其用于抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[0611] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗体，其用于抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递。

[0612] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗体，其用于减少神经元细胞或神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的胱天蛋白酶活性。

[0613] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗体在制备药物中的用途。

[0614] 在一个实施方案中，所述药物用于治疗帕金森病。

[0615] 在一个实施方案中，所述药物用于抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[0616] 在一个实施方案中，所述药物用于抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递。

[0617] 在一个实施方案中，所述药物用于减少人神经元细胞或神经胶质细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0618] 本文所报道的一个方面是治疗患有帕金森病的个体的方法，所述方法包括给所述个体施用有效量的本文报道的抗体。

[0619] 本文所报道的一个方面是抑制个体中人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性的方法，所述方法包括给所述个体施用有效量的本文报道的抗体，以抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[0620] 本文所报道的一个方面是抑制个体中寡聚体人α-突触核蛋白在神经元与神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递的方法，所述方法包括给所述个体施用有效量的本文报道的抗体，以抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[0621] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗-人α-突触核蛋白抗体在抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性中的应用。

[0622] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗-人α-突触核蛋白抗体在抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递中的应用。

[0623] 本文所报道的一个方面是本文报道的抗-人α-突触核蛋白抗体在减少神经元细胞或神经胶质细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性中的应用。

[0624] 本文报道的抗体可以用于治疗帕金森病。不受该理论限制，所述抗体抑制毒性寡聚体α-突触核蛋白的扩散，或抑制神经元或神经胶质细胞对毒性寡聚体α-突触核蛋白的摄入，或减轻神经炎症。

[0625] 使用本文报道的抗体,可以影响突触核蛋白病和神经病变进展的抑制/减轻。

[0626] 本文报道的抗体可以用于防止发展帕金森病或者甚至用于终止帕金森病的进展。

[0627] 在一个实施方案中,本文报道的抗体:i)与α-突触核蛋白转基因小鼠和帕金森病患者的脑切片上的α-突触核蛋白结合;和/或标记LUHMES细胞中的α-突触核蛋白。

[0628] 本文报道的抗体可以用于治疗突触核蛋白病。一些突触核蛋白病是具有1型脑部铁积聚的神经变性(neurodegeneration with brain iron accumulation type 1,NBIA1),单纯性自主神经衰竭(pure autonomic failure),唐氏综合征(Down's syndrome),关岛复合症(complex of Guam),和一些雷维小体病症,诸如弥漫性雷维小体病(diffuse Lewy body disease,DLBD),阿尔茨海默病的雷维小体变异(the Lewy body variant of Alzheimer's disease,LBVAD),某些形式的戈谢病(Gaucher's Disease)和帕金森病痴呆(Parkinson's Disease dementia,PDD)。

[0629] 本文所报道的一个方面是与人α-突触核蛋白中SEQ ID NO:01的氨基酸序列特异性结合的抗体。

[0630] 本文所报道的一个方面是与包含SEQ ID NO:13的重链可变结构域和SEQ ID NO:14的轻链可变结构域的抗体结合相同的表位的抗体。

[0631] 本文所报道的一个方面是与包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体结合相同的表位的抗体。

[0632] 本文所报道的一个方面是与包含SEQ ID NO:38的重链可变结构域和SEQ ID NO:39的轻链可变结构域的抗体结合相同的表位的抗体。

[0633] 附图简述

[0634] 图1:抗-α-突触核蛋白-抗体0017的浓度依赖性的结合特异性;泳道:1)原纤维α-突触核蛋白制备物,2)三-脯氨酸突变的α-突触核蛋白寡聚体,3)A型α-突触核蛋白寡聚体,4)C型α-突触核蛋白寡聚体。

[0635] 图2:抗-α-突触核蛋白-抗体0018的浓度依赖性的结合特异性;泳道:1)原纤维α-突触核蛋白制备物,2)三-脯氨酸突变的α-突触核蛋白寡聚体,3)A型α-突触核蛋白寡聚体,4)C型α-突触核蛋白寡聚体。

[0636] 图3:抗-α-突触核蛋白-抗体0081的浓度依赖性的结合特异性;泳道:1)原纤维α-突触核蛋白制备物,2)三-脯氨酸突变的α-突触核蛋白寡聚体,3)A型α-突触核蛋白寡聚体,4)C型α-突触核蛋白寡聚体。

[0637] 图4:α-突触核蛋白[A30P]-转基因小鼠脑干中的α-突触核蛋白染色;新鲜冷冻的10μm矢状脑切片;40x放大率;所有的图像在相同的照明条件下获得;箭头表示雷维神经突样包涵体。

[0638] 图5:帕金森病患者(A)、具有帕金森病同病(comorbidity)的阿尔茨海默病患者(B)和进行性核上麻痹(progressive supranuclear palsy(PSP,tau病变(tauopathy)))(C)的人脑皮质中的抗体0017和0018染色;箭:雷维小体样包涵体;箭头:雷维神经突样包涵体。

[0639] 图6:在15月龄的α-突触核蛋白突变体A30P转基因小鼠中急性外周注射特异性的mAbs(2x60mg/kg抗体或PBS,持续5天)后,标记α-突触核蛋白突变体A30P转基因小鼠中的脑α-突触核蛋白病;将新鲜冷冻的20μm矢状脑切片用抗-鼠IgG1-抗体-AF555缀合物或用各自

的抗-α-突触核蛋白抗体和抗-鼠IgG1-抗体-AF555缀合物染色;脑干区40x放大率;所有图在可比照明下;箭:雷维小体样包涵体;箭头:雷维神经突样包涵体。

[0640] 图7:来自SHSY5Y细胞的重组α-突触核蛋白的条件培养基对LUHMES细胞的细胞毒性;(A)抗体0017;(B)抗体0018;(C)抗体12F4(参比)。

[0641] 图8:用来自表达重组α-突触核蛋白的SHSY5Y细胞的条件培养基处理LUHMES细胞;使用a)对照培养基=用于LUHMES细胞的分化培养基和b)条件培养基=从表达重组α-突触核蛋白的SHSY5Y细胞6天后收集的LUHMES分化培养基对刚涂布的LUHMES细胞处理3天。

[0642] 图9:抗体0017和0018能够免疫消耗来自胞外介质的α-突触核蛋白寡聚体,由此这些抗体减少α-突触核蛋白寡聚体的毒性。

[0643] 图10:按照实施例11确定的解链转变原始数据(空心圆,40℃-最高值)和相对应的拟合(实线)。

[0644] 图11:当急性外周注射抗-α突触核蛋白-抗体-血脑屏障穿梭模块缀合物后,标记α-突触核蛋白突变体A30P转基因小鼠中的脑α-突触核蛋白病理学、脉管系统和实质。

[0645] 图12:帕金森病患者脑切片的免疫组织化学分析的低温切片的共聚焦显微镜分析(所有图像设置相同):(A)抗体0017,(B)抗体0018,(C)12F4参比抗体。

[0646] 图13:抗体0018的CelluSpots™表位绘图。

[0647] 图14:单体(N-端游离的(1)和N-端His-标记的(2))与二聚体(3)α-突触核蛋白与抗体0018的结合。显示的结果是5种浓度的滴定。

[0648] 1:单体,游离N-端,4.2mg/mL,从未解冻;

[0649] 2:单体,His-标记的N-端,4.8mg/mL;

[0650] 3:二聚体,游离N-端,1.6mg/mL。

[0651] 发明实施方案的详述

[0652] I.定义

[0653] “接受体人构架”用于本文的目的是包含来源于如下文定义的人免疫球蛋白构架或人共有构架的轻链可变结构域(VL)构架或重链可变结构域(VH)构架的氨基酸序列的构架。“来源于”人免疫球蛋白构架或人共有构架的接受体人构架可以包括其相同的氨基酸序列,或其可以包含氨基酸序列改变。在一些实施方案中,氨基酸改变的数目是10个以下、9个以下、8个以下、7个以下、6个以下、5个以下、4个以下、3个以下或2个以下。在一些实施方案中,VL接受体人构架在序列上与VL人免疫球蛋白构架序列或人共有构架序列相同。

[0654] “亲和力”指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,在用于本文时,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可用解离常数(Kd)来表示。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量,包括本文中所描述的那些方法。在下文中描述了用于测量结合亲和力的具体的举例说明性和示例性的实施方案。

[0655] “亲和力成熟的”抗体是指与不具有所述改变的亲本抗体相比在一个或多个高变区(HVRs)具有一个或多个改变的抗体,所述改变导致抗体对抗原的亲和力提高。

[0656] 术语“抗-人α-突触核蛋白抗体”和“与人α-突触核蛋白结合的抗体”是指能够以足够的亲和力结合人α-突触核蛋白的抗体,所述亲和力足以使所述抗体有效用作靶向人α-突

触核蛋白的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中，抗-人α-突触核蛋白抗体与不相关的、非-人α-突触核蛋白的蛋白结合的程度比例如通过放射免疫测定法(RIA)测量的所述抗体与人α-突触核蛋白的结合小约10％。

[0657] 术语“抗体”在本文中以最广泛的意思使用，并且涵盖多种抗体结构，包括但不限于，单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们表现出所需要的抗原结合活性。

[0658] “抗体片段”是指完整抗体之外的分子，其包含完整抗体的一部分，所述部分结合所述完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于，Fv，Fab，Fab′，Fab'-SH，F(ab′)$_2$；双抗体；线性抗体；单链抗体分子(例如scFv)；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0659] 与参比抗体“结合相同表位的抗体”是指具有与所述参比抗体在所述抗原上的相同的残基的结合相互作用的抗体。结合相互作用可以使用表面等离子体共振和突变的抗原或抗体-抗原复合物的X-线结构分析确定。

[0660] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体，其中重链和/或轻链的一部分是来源于特定的来源或物种，而重链和/或轻链的其余部分是来源于不同的来源或物种。

[0661] 抗体的“种类”是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五种主要的抗体类型：IgA，IgD，IgE，IgG和IgM，并且这些中的一些可以进一步分成亚类(同种型)，例如，IgG$_1$，IgG$_2$，IgG$_3$，IgG$_4$，IgA$_1$和IgA$_2$。与不同种类的免疫球蛋白相对应的重链恒定结构域分别称为α，δ，ε，γ 和μ。

[0662] “效应子功能”是指归因于抗体的Fc区的那些生物学活性，其随抗体种类而不同。抗体效应子功能的实例包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如，B细胞受体)的下调；和B细胞激活。

[0663] 药剂，例如药物制剂的“有效量”是指以需要的剂量和时间期间有效获得需要的治疗或预防结果的量。

[0664] 术语“Fc区”在本文中用来定义包含至少部分的恒定区的免疫球蛋白重链的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中，人IgG重链Fc-区从Cys226或Pro230延伸到重链的羧基端。然而，Fc区的C端赖氨酸(Lys447)，以及有时C端的赖氨酸-甘氨酸二肽(Gly446Lys447)，可以存在或可以不存在。除非本文另外指明，Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是按照EU编号系统，也称为EU索引，如Kabat，E.A.等，Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的序列)，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD(1991)，NIH Publication 91-3242中所述。

[0665] “构架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成：FR1，FR2，FR3和FR4。因此，HVR和FR序列通常以下述顺序出现在VH(或VL)中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0666] 术语“全长抗体”、“完整的抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用，用来表示具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有包含本文定义的Fc区的重链的抗体。

[0667] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且是指其中已引入外源核酸的细胞，包括所述细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其

包括原代转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代数。后代的核酸内容物可以与母本细胞不完全一致，而是可以包含突变。本文包括具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的变体后代。

[0668] “人共有构架”是代表人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选择中最普遍存在的氨基酸残基的构架。通常，人免疫球蛋白VL或VH序列的选择是来自可变结构域序列亚组。通常，所述序列的亚组是Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的序列),第5版,Bethesda MD(1991),NIH Publication 91-3242,第1-3卷中的亚组。在一个实施方案中，对于VL，所述亚组是亚组κI，如Kabat等(同前所述)。在一个实施方案中，对于VH，所述亚组是亚组III，如Kabat等(同前所述)。

[0669] “人源化的”抗体是指包含来源于非人HVRs的氨基酸残基和来源于人FRs的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中，人源化的抗体包含基本上全部的至少一个、且典型地两个可变结构域，其中全部或基本上全部的HVRs(例如,CDRs)对应于非人抗体的那些，并且全部或基本上全部的FRs对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如,非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

[0670] 术语“高变区”或“HVR”当在本文中使用时，是指抗体可变结构域的每个区域，其序列是高可变的(“互补决定性区”或“CDRs”)并且形成结构上限定的环(“高变环”)，和/或包含抗原接触残基(“抗原接触”)。通常，抗体包含六个HVRs;三个在VH(H1,H2,H3)中，三个在VL(L1,L2,L3)中。

[0671] 本文的HVRs包括：

[0672] (a)存在于氨基酸残基26-32(L1),50-52(L2),91-96(L3),26-32(H1),53-55(H2),和96-101(H3)的高变环(Chothia,C.和Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.196(1987)901-917);

[0673] (b)存在于氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2),89-97(L3),31-35b(H1),50-65(H2),和95-102(H3)的CDRs(Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白序列),第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991),NIH Publication 91-3242);

[0674] (c)存在于氨基酸残基27c-36(L1),46-55(L2),89-96(L3),30-35b(H1),47-58(H2),和93-101(H3)的抗原接触(MacCallum等J.Mol.Biol.262:732-745(1996));和

[0675] (d)(a),(b),和/或(c)的组合，包括HVR氨基酸残基46-56(L2),47-56(L2),48-56(L2),49-56(L2),26-35(H1),26-35b(H1),49-65(H2),93-102(H3),和94-102(H3)。

[0676] 除非另外说明，可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等人(同前所述)编号。

[0677] “免疫缀合物”是与一种或多种异源分子(诸如血脑屏障穿梭模块)缀合的抗体。

[0678] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括，但不限于，饲养的动物(例如，母牛，绵羊，猫，狗，和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物，诸如猴)，兔，和啮齿动物(例如，小鼠和大鼠)。在某些实施方案中，所述个体或受试者是人。

[0679] “分离的”抗体是已经与它的天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中，将抗体纯化至大于95％或99％纯度，所述纯度通过例如电泳(例如，SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如，离子交换或反相HPLC)来确定。关于用于评估抗体纯度的

方法的综述，参见，例如，Flatman，S.等，J.Chromatogr.B 848(2007)79-87。

[0680] “分离的”核酸是已经与它的天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括通常包含核酸分子的细胞中所包含的核酸分子，但是所述核酸分子存在于染色体外，或者在与天然染色体位置不同的染色体位置上。

[0681] “编码抗-人α-突触核蛋白抗体的分离的核酸”是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一种或多种核酸分子，包括在单一载体或独立的载体中的此类核酸分子，和存在于宿主细胞中的一个或多个位置的此类核酸分子。

[0682] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体，即，除了例如包含天然存在的突变或在产生单克隆抗体制备物的过程中出现的可能的变体(此类变体通常以少量存在)之外，构成群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相比，单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此，修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来产生抗体。例如，根据本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术制备，包括，但不限于，杂交瘤法，重组DNA法，噬菌体展示法和使用包含全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，本文记述了所述方法和其他示例性的用于制备单克隆抗体的方法。

[0683] “天然抗体”是指具有不同的结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白，由两个相同的轻链和两个相同的重链构成，它们是通过二硫键键合的。从N-到C-端，每条重链具有可变区(VH)，也称为可变重链结构域或重链可变结构域，接着是三个恒定结构域(CH1，CH2和CH3)。类似地，从N-到C-端，每条轻链具有可变区(VL)，也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域，接着是恒定轻链(CL)结构域。基于其恒定结构域的氨基酸序列，抗体的轻链可以分配为称为kappa(κ)和lambda(λ)的两种类型中的一种。

[0684] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的使用说明，其包含关于适应证、用途、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和/或关于所述治疗产品的用途的警告的信息。

[0685] 关于参比多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”，定义为在进行序列比对并在必要时导入空隙以获取最大百分比序列同一性，且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后，候选序列中的氨基酸残基与所述参比多肽序列中的氨基酸残基相同的百分数。可使用本领域技术内的多种方法实现测定氨基酸序列同一性百分比目的的比对，例如，使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定用于比对序列的适宜参数，包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。然而，为此目的，%氨基酸序列同一性值使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生。ALIGN-2序列比较计算机程序的作者是Genentech，Inc.，该源代码已经随用户文档提交至美国版权局(Washington D.C.，20559)，其美国版权注册登记号为TXU510087。公众可通过Genentech，Inc.(South San Francisco，加利福尼亚)得到ALIGN-2程序，或者可以从源代码进行编译。ALIGN-2程序应当为在UNIX操作系统中使用，包括在数字UNIX V4.0D上使用而进行编译。ALIGN-2程序设定了所有序列比较参数并且不变。

[0686] 在应用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况中，给定氨基酸序列A相对于(to)、与

(with)、或针对(against)给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(或者这样说:给定氨基酸序列A具有或含有相对于、与或针对给定氨基酸序列B的特定%氨基酸序列同一性)如下计算:

[0687] X/Y比值乘以100,

[0688] 其中X是用序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,且其中Y是B中的氨基酸残基总数。应该理解,当氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等时,A相对于B的氨基酸序列同一性%将不等于B相对于A的氨基酸序列同一性%。除非另外指明,本文所用的所有%氨基酸序列同一性值如前面一段所述使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0689] 术语"药物制剂"指这样的制剂,其以允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

[0690] "药用载体"是指药物制剂中除活性成分以外的成分,其对受试者是无毒的。药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0691] 术语"人α-突触核蛋白"用在本文中是指天然的人α-突触核蛋白(UniProt P37840)。该术语包括"全长"未加工的人α-突触核蛋白以及由在细胞中加工产生的任意形式的人α-突触核蛋白。该术语还包括天然存在的人α-突触核蛋白变体,例如,突变体,剪接变体或等位基因变体。人α-突触核蛋白的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:40中。

[0692] 本文中使用的"治疗(treatment)"(及其语法变体,如"treat"或"treating")指试图改变所治疗的个体的天然过程的临床干预,其可以为了预防或在临床病理的过程中实施。治疗的期望效果包括、但不限于,防止疾病的发生或复发、缓解征状、减少疾病的任何直接或间接的病理后果、防止转移、降低疾病进展的速度、改善或缓和疾病状态、及缓解或改善的预后。在一些实施方案中,用本发明的抗体来延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。

[0693] 术语"可变区"或"可变结构域"指抗体重链或轻链的参与所述抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有类似的结构,其中每个结构域包含4个框架(FRs)区,和3个高变区(HVRs)。(参见,例如,Kindt,T.J.等Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(2007),第91页)。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原-结合特异性。此外,通过使用得自结合抗原的抗体的VH或VL结构域分别筛选互补VL或VH结构域的文库,可以分离出结合特定抗原的抗体。参见,例如,Portolano,S.等,J.Immunol.150(1993)880-887;Clackson,T.等,Nature 352(1991)624-628)。

[0694] 术语"载体"用在本文中是指能够使与其连接的另一种核酸繁殖的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体和掺和到其所引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作性连接的核酸的表达。此类载体在本文中称作"表达载体"。

[0695] II.组合物和方法

[0696] 在一个方面中,本发明部分基于本文报道的抗体可以用于减少/消除脑神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的毒性的发现。在某些方面中,提供结合人α-突触核蛋白的抗体。例如,本发明的抗体用于突触核蛋白病和神经病的诊断或治疗,特别是帕金森病和具有帕金森病同病的阿尔茨海默病的诊断或治疗。

[0697] A.示例性的抗-人α-突触核蛋白抗体

[0698] 本文报道的抗体通过使用仔细的免疫方法和具有特定结合特性的抗体的目的性

选择而获得。

[0699] 首先，将兔用多种组件和重组α-突触核蛋白的聚集体的混合物免疫。通过ELISA表征分离的B细胞克隆，并且选择最好的结合剂。在下一步骤中，通过使用肽阵列方法的表位绘图，和通过确定其针对单体和寡聚体重组α-突触核蛋白的选择性(例如，使用蛋白质印迹)，来表征所述抗体。此外，确定抗体与重组α-突触核蛋白和人神经元细胞中的生理性α-突触核蛋白以及人α-突触核蛋白的转基因小鼠和帕金森病患者脑切片中的病理性α-突触核蛋白的结合。基于之前列出的数据，选择候选者，并且确定外周注射后与病理性α-突触核蛋白的急性体内结合。然后选择最有效的结合剂。使用所选择的最有效的结合剂，将确定Thy1-(A30P)aSYN转基因小鼠中的α-突触核蛋白的清除和/或α-突触核蛋白病理学进展的终止。

[0700] 一种优选的抗体是抗体0017。该抗体具有宽泛的α-突触核蛋白特异性结合模式，即，该抗体结合单体和聚集的(寡聚体)人α-突触核蛋白。在图1中，显示了抗体0017针对单体和多种聚集形式的人α-突触核蛋白的浓度依赖性的结合。抗体0017是嵌合抗体，具有通过之前列出的方法选择的兔抗体233的可变结构域和鼠恒定区。

[0701] 另一种优选的抗体是抗体0018。该抗体具有α-突触核蛋白聚集依赖性结合模式，即，该抗体结合单体、二聚体和寡聚体人α-突触核蛋白，其中，如果N-端甲硫氨酸残基被修饰(例如，通过乙酰化或生物素酰化修饰)或不存在时，则与单体人和小鼠α-突触核蛋白的结合减少。在图2中，显示了抗体0018针对不同聚集形式的人α-突触核蛋白的浓度依赖性的结合。在0.5μg/ml抗体浓度以下，寡聚体结合特征变得明显。抗体0018是嵌合抗体，具有通过之前列出的方法选择的兔抗体064的可变结构域和鼠恒定区。

[0702] 当使用N-端修饰的肽来确定抗体0018在人α-突触核蛋白上的结合位点时，没有检测到结合。因此，用重合的、固定的肽片段(长度:15个氨基酸，变化:1个氨基酸)(对应于α-突触核蛋白(1-140)、β-突触核蛋白(60-134)、γ-突触核蛋白(60-127)和N-乙酰化的α-突触核蛋白肽(1-15)的序列)的文库，并且使用基于ELISA的检测方法(参见实施例14和图13)，进行抗体0018的表位分析。

[0703] 已经发现，抗体0018结合所述肽阵列上呈递的短的(长度为15个氨基酸)单体α-突触核蛋白肽。抗体0018识别在α-突触核蛋白的最N-端的表位。N-端氨基酸甲硫氨酸(M,MET)是结合必需的，当去除(或封闭)其时，完全消除了抗体0018的结合。此外，当N-端甲硫氨酸氨基酸残基通过N-乙酰化加帽时，不能观察到结合。这得到表面等离子体共振分析的证实(参见图14)。

[0704] 另一种优选的抗体是抗体0081。抗-α突触核蛋白-抗体0081表现出抗体0018显示的剂量依赖性的反应性模式，其对于印迹上所有形式的α突触核蛋白具有相等的免疫反应性减少(图3)。

[0705] 在图4中，显示了α-突触核蛋白突变体A30P转基因小鼠矢状脑切片中抗体0017和0018与参比抗体12F4的不同的染色行为。

[0706] 在图5中，显示了在帕金森病患者(A)、具有帕金森病同病的阿尔茨海默病患者(B)和进行性核上麻痹(C)的人脑皮质中的抗体0017和0018的不同染色行为。使用抗体0017导致了弥散性的实质和雷维小体和雷维神经突染色。抗体0018表现出较弱的实质染色和主要的雷维小体和雷维神经突染色。因此，抗体0017和0018对于帕金森病患者脑切片中的α-突

触核蛋白聚集体表现出不同的染色模式。

[0707] 在图6中，显示了当急性外周注射特异性mAbs后，在α-突触核蛋白突变体A30P转基因小鼠中的脑α-突触核蛋白病的标记。对15月龄的α-突触核蛋白突变体A30P转基因小鼠使用抗-α突触核蛋白抗体(2x60mg/kg，持续5天)或PBS。将新鲜冷冻的20μm矢状脑切片用抗-鼠IgG1-抗体-AF555缀合物或用各自的抗-α-突触核蛋白抗体和抗-鼠IgG1-抗体-AF555缀合物染色。

[0708] 从图7可以看出，抗体0017和0018能够免疫消耗来自胞外介质的α-突触核蛋白寡聚体，并且由此，这些抗体减少α-突触核蛋白寡聚体的毒性。

[0709] 在一个方面中，本发明提供结合人α-突触核蛋白的分离的抗体。在某些实施法案中，所述抗-人α-突触核蛋白抗体：

[0710] ●结合具有SEQ ID NO:01的氨基酸序列的肽，并且结合单体而不结合原纤维α-突触核蛋白，或者

[0711] ●与具有一对SEQ ID NO:26与27或SEQ ID NO:38与39的可变结构域的抗体结合相同的表位，并且结合原纤维α-突触核蛋白而不结合单体α-突触核蛋白，

[0712] ●抑制神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的毒性，

[0713] ●抑制α-突触核蛋白聚集的细胞-到-细胞的传递，

[0714] ●减少α-突触核蛋白诱导的胱天蛋白酶活性(例如，在LUHMES细胞中)。

[0715] 在一个方面中，本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体，其包含至少一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个选自下述的HVRs：(a)包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-L3。

[0716] 在一个方面中，本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体，其包含至少一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个选自下述的HVRs：(a)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L3。

[0717] 在一个方面中，本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体，其包含至少一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个选自下述的HVRs：(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。

[0718] 在一个方面中，本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体，其包含至少一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个选自下述的HVRs：(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L3。

[0719] 在一个方面中，本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体，其包含至少一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个选自下述的HVRs：(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列

的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-L3。

[0720] 在一个方面中,本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其包含至少一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个选自下述的HVRs:(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[0721] 在一个方面中,本发明提供包含选自下述的至少一种、至少两种或全部三种VH HVR序列的抗体:

[0722] i)(a)包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3;或

[0723] ii)(a)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0724] iii)(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0725] iv)(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0726] v)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0727] vi)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3。

[0728] 在一个实施方案中,所述抗体包含:

[0729] i)(a)包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3;或

[0730] ii)(a)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0731] iii)(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0732] iv)(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0733] v)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0734] vi)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3。

[0735] 在另一个实施方案中,所述抗体还包含选自下述的至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列:

[0736] i)(a)包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0737] ii)(a)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0738] iii)(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0739] iv)(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0740] v)(a)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0741] vi)(a)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[0742] 在另一个实施方案中,所述抗体包含:

[0743] i)(a)包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0744] ii)(a)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0745] iii)(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0746] iv)(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0747] v)(a)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0748] vi)(a)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[0749] 在一个方面中,本发明提供包含下述的抗体:

[0750] i)(a)包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0751] ii)(a)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0752] iii)(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0753] iv)(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID

NO:25的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0754] v)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0755] vi)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[0756] 在任意的上述实施方案中,所述抗-α突触核蛋白抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗-人α-突触核蛋白抗体包含任意上述实施方案中的HVRs,并且还包含接受体人构架,例如,人免疫球蛋白构架或人共有构架。

[0757] 在另一个实施方案中,相对于参比序列,VH或VL包含置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含所述序列的抗-人α-突触核蛋白抗体保留与人α-突触核蛋白结合的能力。

[0758] 在特定的实施方案中,在每个HVR序列中,共有1-3个氨基酸被置换、插入和/或缺失,如本文前文所述。

[0759] 在另一个方面中,本发明提供与本文提供的抗-人α-突触核蛋白抗体结合相同的表位的抗体。

[0760] 例如,在特定实施方案中,提供与抗-人α-突触核蛋白抗体结合相同的表位的抗体,所述抗-人α-突触核蛋白抗体包含:

[0761] a)SEQ ID NO:13的VH序列和SEQ ID NO:14的VL序列,或

[0762] b)SEQ ID NO:26的VH序列和SEQ ID NO:27的VL序列,或

[0763] c)SEQ ID NO:38的VH序列和SEQ ID NO:39的VL序列。

[0764] 在特定的实施方案中,提供抗体,所述抗体结合由SEQ ID NO:40的氨基酸101-111组成的人α-突触核蛋白片段内的表位。

[0765] 在特定的实施方案中,提供抗体,所述抗体结合由SEQ ID NO:40的氨基酸1-15组成的人α-突触核蛋白片段内的游离的N-端表位(游离的N-端甲硫氨酸残基)。

[0766] 在一个实施方案中,提供抗体,所述抗体结合具有游离的N-端甲硫氨酸残基的人α-突触核蛋白,并且结合人α-突触核蛋白的残基1-15和188-195内的构象表位。

[0767] 在本发明的另一个方面中,任意前述实施方案所述的抗-人α-突触核蛋白抗体是单克隆抗体,包括嵌合的、人源化的和人抗体。在一个实施方案中,抗-人α-突触核蛋白抗体是抗体片段,例如,Fv,Fab,Fab',scFv,双抗体,或$F(ab')_2$片段。在另一个实施方案中,所述抗体是全长抗体,例如,完整的IgG1或IgG 4抗体或本文定义的其他抗体种类或同种型。

[0768] 在另一个方面中,任意前述实施方案所述的抗-人α-突触核蛋白抗体可以结合下文1-7节中所述的任意特征(单个的或组合的特征):

[0769] 1.抗体亲和力

[0770] 在特定的实施方案中,本文提供的抗体具有≤100nM,≤10nM,≤1nM,或1nM-100nM(例如,10^{-7}M以下,例如,10^{-7}M-10^{-9}M)的解离常数(Kd)。

[0771] 在一个实施方案中,Kd通过放射标记的抗原结合测定(RIA)测量。在一个实施方案

中，RIA使用目的抗体的Fab版本及其抗原进行。例如，通过在存在滴定系列的未标记的抗原的条件下，用最低浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡Fab，然后用抗-Fab抗体-包被的平板捕获结合的抗原(例如，参见，Chen，Y.等，J.Mol.Biol.293(1999)865-881)，来测量FABs针对抗原的溶液结合亲和力。为了确定测定的条件，将MICROTITER®多孔平板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜，然后用在PBS中的2%(w/v)牛血清白蛋白在室温(约23℃)封闭2-5小时。在无吸附性的平板(Nunc#269620)中，将100pM或26pM[^{125}I]-抗原与目的Fab的系列稀释液混合(例如，与抗-VEGF抗体Fab-12的评估一致，在Presta，L.G.等，Cancer Res.57(1997)4593-4599中)。然后，将目的Fab培育过夜；然而，培育可以进行更长的时间(例如，约65小时)，以确保达到平衡。然后，将混合物转移到捕获平板中在室温温育(例如，一小时)。然后去除溶液，并且将平板用在PBS中的0.1%聚山梨酯20(吐温-20®)洗涤八次。当平板已经晾干时，加入150μl/孔的闪烁液(MICROSCINT-20™；Packard)，并且将平板在TOPCOUNT™γ计数仪(Packard)上计数十分钟。选择给出小于或等于最大结合的20%的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0772] 按照另一个实施方案，Kd使用BIACORE®表面等离子体共振测定测量。例如，使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(BIAcore，Inc.，Piscataway，NJ)的测定在25℃进行，所述测定使用～10个反应单位(RU)的固定的抗原CM5芯片。在一个实施方案中，按照供应商的使用说明，用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5，BIACORE，Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠，pH 4.8稀释至5μg/ml(～0.2μM)，然后以5μl/分钟的流速注入，以获得约10个反应单位(RU)的偶联蛋白。在抗原注入后，注入1M乙醇胺，以封闭未反应的基团。对于动力学测量，在25℃以约25μl/min的流速注入在具有0.05%聚山梨酯20(吐温-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中的Fab两倍连续稀释液(0.78nM-500nM)。使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE®评价软件版本3.2)，通过同时拟合缔合和解离感应图(sensorgrams)，计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)计算为k_{off}/k_{on}的比率(例如，参见Chen，Y.等，J.Mol.Biol.293(1999)865-881)。如果通过上述的表面等离子体共振测定测量的缔合速率(on-rate)超过$10^6 M^{-1}s^{-1}$，那么该缔合速率(on-rate)可以通过使用荧光猝灭技术来确定，所述技术在存在分光计(诸如stop-flow equipped spectrophotometer(Aviv Instruments)或具有搅拌比色杯的8000-系列的SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic))中测量的增加浓度的抗原的条件下，在25℃测量在PBS，pH 7.2中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发＝295nm；发射＝340nm，16nm带通)的增加或减少。

[0773] 2.抗体片段

[0774] 在特定的实施方案中，本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括，但不限于，Fab，Fab'，Fab'-SH，F(ab')$_2$，Fv，和scFv片段，和下文所述的其他片段。关于某些抗体片段的综述，参见Hudson，P.J.等，Nat.Med.9(2003)129-134。关于scFv片段的综述，例如，参见Plueckthun，A.，在：The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(单克隆抗体的药理学)中，Vol.113，Rosenburg和Moore(编)，Springer-Verlag，New York(1994)，第269-315页；还参见WO 93/16185；US 5,571,894和US 5,587,458。对于包含补救受体结合表位残基

并且具有增加的体内半衰期的Fab和$F(ab')_2$片段的讨论，参见US 5,869,046。

[0775] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段，其可以是二价的或双特异性的。例如，参见EP 0 404 097;WO 1993/01161;Hudson,P.J.等,Nat.Med.9(2003)129-134;和Holliger,P.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90(1993)6444-6448。Hudson,P.J.等,Nat.Med.9(20039 129-134)中也记述了三抗体和四抗体。

[0776] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或抗体的全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在特定的实施方案中，单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;例如，参见US 6,248,516)。

[0777] 抗体片段可以通过多种记述制备，包括，但不限于，完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如，大肠杆菌或噬菌体)产生，如本文所述。

[0778] 3.嵌合的和人源化的抗体

[0779] 在特定的实施方案中，本文提供的抗体是嵌合抗体。例如，US 4,816,567中;和Morrison,S.L.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81(1984)6851-6855)中记述了某些嵌合抗体。在一个实例中，嵌合抗体包含非人可变区(例如，来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长动物，诸如猴的可变区)和人恒定区。在另一个实例中，嵌合抗体是“种类变换的”抗体，其中种类或亚类已经由母本抗体的种类或亚类产生了改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0780] 在特定的实施方案中，嵌合抗体是人源化的抗体。典型地，将非人抗体人源化，以减少针对人的免疫原性，同时保留母本非人抗体的特异性和亲和性。通常，人源化的抗体包含一个或多个这样的可变结构域，其中，HVRs，例如，CDRs，(或其部分)来源于非人抗体，并且FRs(或其部分)来源于人抗体序列。人源化的抗体任选地还至少包含一部分的人恒定区。在一些实施方案中，人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如，HVR残基所来源的抗体)的相应残基置换，例如，以恢复或改善抗体特异性或亲和性。

[0781] 例如，人源化的抗体和制备其的方法总结在Almagro,J.C.和Fransson,J.,Front.Biosci.13(2008)1619-1633中，并且，例如，在Riechmann,I.等,Nature 332(1988)323-329;Queen,C.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86(1989)10029-10033;US 5,821,337,US 7,527,791,US 6,982,321,和US 7,087,409;Kashmiri,S.V.等,Methods 36(2005)25-34(描述特异性决定区(SDR)移接);Padlan,E.A.,Mol.Immunol.28(1991)489-498(描述“表面重修(resurfacing)”);Dall'Acqua,W.F.等,Methods36(2005)43-60(描述“FR移动”);和Osbourn,J.等,Methods 36(2005)61-68和Klimka,A.等,Br.J.Cancer 83(2000)252-260(描述关于FR移动的“导向选择”法)中进一步描述。

[0782] 可以用于人源化的人构架区包括，但不限于：使用“最佳适配”法选择的构架区(例如，参见Sims,M.J.等,J.Immunol.151(1993)2296-2308);来源于特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体共有序列的构架区(例如，参见Carter,P.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89(1992)4285-4289;和Presta,L.G.等,J.Immunol.151(1993)2623-2632);人成熟的(体突变的)构架区或人种系构架区(例如，参见Almagro,J.C.和Fransson,J.,Front.Biosci.13(2008)1619-1633);和来源于筛选FR文库的构架区(例如，参见Baca,M.等,J.Biol.Chem.272(1997)10678-10684和Rosok,M.J.等,J.Biol.Chem.271(1996922611-22618)。

[0783] 4.人抗体

[0784] 在特定的实施方案中，本文提供的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的多种技术产生。人抗体通常记述在van Dijk，M.A.和van de Winkel，J.G.，Curr.Opin.Pharmacol.5(2001)368-374以及Lonberg，N.，Curr.Opin.Immunol.20(2008)450-459中。

[0785] 人抗体可以通过将免疫原施用给转基因动物而制备，所述转基因动物已被改良，从而相应抗原性攻击而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。所述动物典型地包含全部或部分的人免疫球蛋白基因座，其替代了内源性免疫球蛋白基因座，或者其存在于染色体外或者随机整合到动物的染色体中。在这样的转基因动物中，内源性的免疫球蛋白基因座通常被灭活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述，参见Lonberg，N.，Nat.Biotech.23(2005)1117-1125。例如，还参见US 6,075,181和US 6,150,584，其描述了XENOMOUSE™技术；US 5,770,429，其描述了HuMAb®技术；US 7,041,870，其描述了K-M MOUSE®技术，和US2007/0061900，其描述了VelociMouse®技术。来自由所述动物产生的完整抗体的人可变区可以被进一步修饰，例如，与不同的人恒定区组合。

[0786] 人抗体还可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经记述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系。(例如，参见Kozbor，D.，J.Immunol.133(1984)3001-3005；Brodeur，B.R.等，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications(单克隆抗体制备技术和应用)，Marcel Dekker，Inc.，New York(1987)，第51-63页；和Boerner，P.等，J.Immunol.147(1991)86-95)。通过人B细胞杂交瘤产生的人抗体也记述在Li，J.等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103(2006)3557-3562中。另外的方法包括，例如，记述在US 7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni，J.，Xiandai Mianyixue 26(2006)265-268(描述了人-人杂交瘤)中的那些方法。人杂交瘤技术(三源杂交瘤技术)也记述在Vollmers，H.P.和Brandlein，S.，Histology and Histopathology(组织学和组织病理学)20(2005)927-937以及Vollmers，H.P.和Brandlein，S.，Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology(实验和临床药理学中的方法和发现)27(2005)185-191中。

[0787] 人抗体也可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列而产生。然后，可以将所述可变结构域序列与需要的人恒定结构域组合。下文描述了用于从抗体文库中选择人抗体的技术。

[0788] 5.文库来源的抗体

[0789] 本发明的抗体可以通过筛选组合文库中具有一种或多种需要的活性的抗体而分离。例如，本领域已知有多重方法用于产生噬菌体展示文库并且筛选所述文库寻找具有需要的结合特征的抗体。例如，所述方法总结在Hoogenboom，H.R.等，Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)178(2001)1-37中，并且，例如，进一步记述在McCafferty，J.等，Nature348(1990)552-554；Clackson，T.等，Nature 352(1991)624-628；Marks，J.D.等，J.Mol.Biol.222(1992)581-597；Marks，J.D.和Bradbury，A.，Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)248(2003)161-175；Sidhu，S.S.等，J.Mol.Biol.338(2004)299-310；Lee，C.V.等，J.Mol.Biol.340(2004)1073-1093；Fellouse，F.A.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(2004)12467-12472；和Lee，C.V.等，J.Immunol.Methods 284(2004)119-132中。

[0790] 在某些噬菌体展示方法中，通过聚合酶链式反应(PCR)分别克隆(PCR)基因的全体成员，并且随机重组在噬菌体文库中，然后可以如在Winter,G.等,Ann.Rev.Immunol.12(1994)433-455中所述筛选该噬菌体文库寻找结合抗原的噬菌体。噬菌体典型地展示抗体片段，作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体，而不需要构建杂交瘤。备选地，可以克隆天然的全体成员(例如，来自于人)，以提供针对宽泛范围的非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源，无需任何的免疫，如Griffiths,A.D.等,EMBO J.12(1993)725-734所述。最后，还可以通过从干细胞克隆非重排的V基因区段，并且使用包含随机序列的PCR引物来编码高变CDR3区并且实现体外重排，而合成制备天然的文库，如Hoogenboom,H.R.和Winter,G.,J.Mol.Biol.227(1992)381-388所述。记述人抗体噬菌体文库的专利公布包括，例如:US 5,750,373,和US 2005/0079574,US 2005/0119455,US 2005/0266000,US 2007/0117126,US 2007/0160598,US 2007/0237764,US 2007/0292936,和US 2009/0002360。

[0791] 认为由人抗体文库分离的抗体或抗体片段是本文的人抗体或人抗体片段。

[0792] 6.多特异性抗体

[0793] 在特定实施方案中，本发明提供的抗体是多特异性抗体，例如，双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在特定实施方案中，一种结合特异性是针对人α-突触核蛋白的并且另一种结合特异性是针对任意其他抗原的。在特定实施方案中，双特异性抗体可以结合人α-突触核蛋白的两个不同表位。双特异性抗体还可以用来将细胞毒性试剂定位到表达人α-突触核蛋白的细胞。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。

[0794] 用于制备多特异性抗体的技术包括，但不限于，具有不同特异性的两种免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见Milstein,C.和Cuello,A.C.,Nature 305(1983)537-540,WO 93/08829,和Traunecker,A.等,EMBO J.10(1991)3655-3659)，和“凸起-在-孔洞中”改造(参见，例如,US 5,731,168)。多特异性抗体还可以这样制备:通过改造静电操作作用(engineering electrostatic steering effects)用于制备抗体Fc-异型二聚体分子(WO 2009/089004);交联两种以上的抗体或片段(参见，例如,US 4,676,980,和Brennan,M.等,Science 229(1985)81-83);使用亮氨酸拉链以产生双特异性抗体(参见，例如，Kostelny,S.A.等,J.Immunol.148(1992)1547-1553);使用“双抗体”技术制备双特异性抗体片段(参见，例如,Holliger,P.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(1993)6444-6448);和使用单链Fv(sFv)二聚体(参见，例如,Gruber,M等,J.Immunol.152(1994)5368-5374);和制备三特异性抗体，如例如在Tutt,A.等,J.Immunol.147(1991)60-69中所述。

[0795] 具有三个以上功能抗原结合位点的改造的抗体，包括“章鱼(Octopus)抗体”也包括在本文中(参见，例如,US 2006/0025576)。

[0796] 本发明的抗体或片段还包括“双重作用Fab(Dual Acting FAb)”或“DAF”，其包含结合人α-突触核蛋白以及另一个不同抗原(例如参见,US 2008/0069820)的抗原结合位点。

[0797] 本发明的抗体或片段还包括WO 2009/080251,WO 2009/080252,WO 2009/080253,WO 2009/080254,WO 2010/112193,WO 2010/115589,WO 2010/136172,WO 2010/145792,和WO 2010/145793中所述的多特异性抗体。

[0798] 7.抗体变体

[0799] 在特定实施方案中，考虑本发明提供的抗体的氨基酸序列变体。例如，可以理想地提高抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码所述抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成制备。所述修饰包括，例如，从所述抗体的氨基酸序列中缺失和/或插入和/或置换残基。可以进行缺失、插入和置换的任意组合，以获得最终构建体，条件是最终构建体具有所需要的特征，例如，抗原结合。

[0800] a)置换、插入和缺失变体

[0801] 在特定实施方案中，提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目的位点包括HVRs和FRs。保守置换显示在表1中，其标题为“优选的置换”。更实质性的变化提供在表1中，其标题为“示例性的置换”，并且参照氨基酸侧链种类在下文中进一步描述。氨基酸置换可以引入到目的抗体中，并且筛选产物的理想活性，例如，保留的/提高的抗原结合，减少的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0802] 表1

原始残基	示例性的置换	保守置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp， Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

[0803]

[0804]

原始残基	示例性的置换	保守置换
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0805] 按照常规侧链特性可以将氨基酸分成下述组：

[0806] (1)疏水的：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；

[0807] (2)中性亲水的：Met，Ala，Val，Leu，Ile；

[0808] (3)酸性的：Asp，Glu；

[0809] (4)碱性的：His，Lys，Arg；

[0810] (5)影响链方向的残基：Gly，Pro；

[0811] (6)芳香的：Trp，Tyr，Phe。

[0812] 非保守置换将限定为这些种类中的一种的成员与另一种类交换。

[0813] 一种类型的置换变体包括置换亲本抗体(例如，人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常，所得到的选择用于进一步研究的一个或多个变体将相对于母本抗体具有某些生物学特性的改进(例如，提高)(例如，增加的亲和力，减少的免疫原性)和/或将具有基本上保留的母本抗体的某些生物学特性。这种类型的示例性的置换变体是亲和力成熟抗体，其可以便利地产生，例如，使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术，如本文所述的那些。简言之，将一个或多个HVR残基突变，并且将变异抗体展示在噬菌体上并且筛选特定的生物学活性(例如，结合亲和力)。

[0814] 例如，可以在HVRs中进行变化(例如，置换)，以提高抗体亲和力。所述变化可以在HVR“热点”和/或接触抗原的残基上进行，所述“热点”即由在体细胞成熟过程中高频率发生突变的密码子所编码的残基(参见，例如，Chowdhury，P.S.，Methods Mol.Biol.207(2008)179-196)，对所得到的变异VH或VL检测结合亲和力。通过构建和由二级文库重新选择的亲和力成熟已经记述在例如Hoogenboom，H.R.等，Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)178(2002)1-37中。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法中的任一种(例如，易错PCR，链改组，或寡核苷酸-定向诱变)将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后产生二级文库。然后，筛选该文库以鉴定具有所需要的亲和力的任意抗体变体。另一种引入多样性的方法包括HVR-定向方法，其中一些HVR残基(例如，一次4-6个残基)被随机化。可以特异性鉴定参与抗原结合的HVR残基，例如，使用丙氨酸扫描诱变或建模来鉴定。通常特别靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0815] 在特定实施方案中，置换、插入或缺失可以发生在一个或多个HVRs中，只要所述变化基本上不减少抗体与抗原结合的能力。例如，可以在HVRs中进行基本上不减少结合亲和力的保守变化(例如，如本文提供的保守置换)。例如，所述变化可以在HVRs中接触抗原的残基之外。在上文提供的变异VH和VL序列的特定实施方案中，每个HVR是未变化的、或包含不多于一个、两个或三个氨基酸置换。

[0816] 用于鉴定可以被靶向用于诱变的抗体的残基或区域的有效方法称为“丙氨酸扫描

诱变”，如Cunningham，B.C.和Wells，J.A.，Science 244(1989)1081-1085所述。在这种方法中，鉴定一个残基或一组靶残基(例如，带电荷残基，如arg，asp，his，lys和glu)并且用中性或带负电荷的氨基酸(例如，丙氨酸或聚丙氨酸)替换，以确定是否影响抗体与抗原的相互作用。其他置换可以在表现出针对初始置换的功能敏感性的氨基酸位置引入。备选地，或另外地，抗原-抗体复合物的晶体结构鉴定抗体与抗原之间的接触点。所述接触残基和邻近的残基可以被靶向或消除，作为置换的候选。可以筛选变体来确定它们是否包含所需要的特性。

[0817] 氨基酸序列插入包括长度范围在一个残基到包含一百以上残基的多肽的氨基-端和/或羧基-端融合，以及单个氨基酸残基或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括在抗体的N-端或C-端融合酶(例如，用于ADEPT)或融合增加抗体的血清半衰期的多肽。

[0818] b)糖基化变体

[0819] 在特定实施方案中，改变本发明提供的抗体以增加或减少所述抗体被糖基化的程度。向抗体添加或删除糖基化位点可以便利地通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而实现。

[0820] 在抗体包含Fc区的情形中，可以改变连接在其上的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体典型地包含分支的、双触角(biantennary)寡糖，其通常通过N-连接连接到Fc区的CH2结构域的Asn297上(参见，例如，Wright，A.和Morrison，S.L.，TIBTECH 15(1997)26-32)。所述寡糖可以包括多种碳水化合物，例如，甘露糖，N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)，半乳糖和唾液酸，以及与双触角寡糖结构的“茎干”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中，可以进行对本发明的抗体中的寡糖的修饰，从而产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0821] 在一个实施方案中，提供具有缺少连接(直接或间接地)到Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。例如，在所述抗体中，岩藻糖的量可以为1％至80％，1％至65％，5％至65％或20％至40％。岩藻糖的量通过相对于如通过MALDI-TOF质谱测量的连接到Asn 297上的所有糖结构(例如，复合型、杂合型和高甘露糖结构)的总和计算在Asn297的糖链内的岩藻糖的平均量而确定，例如，如在WO 2008/077546中所述。Asn297是指在Fc区中位于大约位置297(Fc区残基的Eu编号)的天冬酰胺残基；然而，由于抗体内较小的序列变化，Asn297还可以位于位置297的上游或下游大约±3个氨基酸处，即，在位置294和300之间。所述岩藻糖化的变体可以具有提高的ADCC功能。参见，例如，US 2003/0157108；US 2004/0093621。关于“去岩藻糖化”或“岩藻糖-不足”的抗体变体的公布的实例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；WO 2002/031140；Okazaki，A.等，J.Mol.Biol.336(2004)1239-1249；Yamane-Ohnuki，N.等，Biotech.Bioeng.87(2004)614-622。能够产生去岩藻糖化的抗体的细胞系的实例包括缺失蛋白岩藻糖化的Lec13CHO细胞(Ripka，J.等，Arch.Biochem.Biophys.249(1986)533-545；US2003/0157108；和WO 2004/056312，尤其是在实施例11中)，和敲除的细胞系，如α-1，6-岩藻糖基转移酶基因，FUT8，敲除的CHO细胞(参见，例如，Yamane-Ohnuki，N.等，Biotech.Bioeng.87(2004)614-622；Kanda，Y.等，Biotechnol.Bioeng.94(2006)680-688；

和WO 2003/085107)。

[0822] 进一步提供具有平分型寡糖的抗体变体,例如,其中连接到所述抗体的Fc区上的双触角寡糖被GlcNAc平分。所述抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或提高的ADCC功能。所述抗体变体的实例记述在例如WO 2003/011878;US 6,602,684;和US 2005/0123546中。还提供在连接到Fc区的寡糖中具有至少一种半乳糖残基的抗体变体。所述抗体变体可以具有提高的CDC功能。所述抗体变体记述在例如WO 1997/30087;WO1998/58964;和WO 1999/22764中。

[0823] c)Fc区变体

[0824] 在特定实施方案中,可以将一种或多种氨基酸修饰引入到本发明提供的抗体所包含的Fc区中,由此产生Fc区变体。所述Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置含有氨基酸修饰(例如,置换)的人Fc区序列(例如,人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4Fc区)。

[0825] 在特定实施方案中,本发明考虑具有一些而不是全部效应子功能的抗体变体,这使得其成为用于这样的应用的理想候选物,在所述应用中,抗体的体内半衰期是重要的而某些效应子功能(如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定来验证CDC和/或ADCC活性的减少/消除。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定来确保所述抗体缺少FcγR结合(因此可能缺少ADCC活性),而保留FcRn结合能力。调控ADCC的原代细胞,NK细胞,仅表达Fc(RIII,而单核细胞表达Fc RI,Fc RII和Fc RIII。FcR在造血细胞上的表达总结在Ravetch,J.V.和Kinet,J.P.,Annu.Rev.Immunol.9(1991)457-492中第464页的表3中。评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例记述在US 5,500,362(例如,参见Hellstrom,I.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83(1986)7059-7063;和Hellstrom,I.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82(1985)1499-1502);US 5,821,337(参见Bruggemann,M.等,J.Exp.Med.166(1987)1351-1361)中。备选地,可以使用非放射性测定法(参见,例如,关于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA;和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI)。对所述测定有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地,或另外地,可以在体内评估目的分子的ADCC活性,例如,在动物模型如Clynes,R.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA95(1998)652-656中公开的那些中。还可以进行C1q结合测定来验证抗体不能结合C1q并且因此缺少CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见,例如,Gazzano-Santoro,H.等,J.Immunol.Methods 202(1996)163-171;Cragg,M.S.等,Blood 101(2003)1045-1052;以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103(2004)2738-2743)。还可以使用本领域已知的方法(参见,例如,Petkova,S.B.等,Int.Immunol.18(2006):1759-1769)进行FcRn结合和体内清除/半衰期确定。

[0826] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238,265,269,270,297,327和329中的一个或多个的置换的那些(US 6,737,056)。所述Fc突变体包括具有在氨基酸位置265,269,270,297和327的两个或更多个处的置换的Fc突变体,包括所谓的"DANA"Fc突变体,其残基265和297置换为丙氨酸(US 7,332,581)。

[0827] 记述了具有提高的或减小的与FcRs的结合的某些Fc变体。(参见,例如,US 6,737,056;WO 2004/056312,和Shields,R.L.等,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。

[0828] 在特定实施方案中，抗体变体包含具有一个或多个提高ADCC的氨基酸置换的Fc区，例如，具有在Fc区的位置298，333，和/或334(残基的EU编号)的置换。

[0829] 在一些实施方案中，在Fc区中进行改变，所述改变导致改变的(即，提高的或减小的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)，例如，如在US 6,194,551，WO 99/51642，和Idusogie，E.E.等，J.Immunol.164(2000)4178-4184中所述。

[0830] US 2005/0014934描述了具有增加的半衰期和提高的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体，其负责将母体IgGs转运到胎儿(Guyer，R.L.等，J.Immunol.117(1976)587-593，和Kim，J.K.等，J.Immunol.24(1994)2429-2434)。那些抗体包含在其中具有一个或多个提高Fc区与FcRn的结合的置换的Fc区。所述Fc变体包括具有在下述Fc区残基中的一个或多个处的置换的那些：238，256，265，272，286，303，305，307，311，312，317，340，356，360，362，376，378，380，382，413，424或434，例如，Fc区残基434的置换(US 7,371,826)。

[0831] 还参见A.R.和Winter，G，Nature 322(1988)738-740；US 5,648,260；US 5,624,821；以及关于其他Fc区变体的实例的WO 94/29351。

[0832] d)半胱氨酸改造的抗体变体

[0833] 在特定实施方案中，可以理想地产生半胱氨酸改造的抗体，例如，“硫代MAbs(thioMAbs)”，其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中，所置换的残基存在于抗体的可接近的位点。通过用半胱氨酸置换这些残基，由此反应性硫醇基团位于抗体的可接近位点，并且可以用于将所述抗体缀合到其它结构部分上，如药物结构部分或接头-药物结构部分，从而产生免疫缀合物，如本文进一步所述。在特定实施方案中，下述残基中的任一种或多种可以用半胱氨酸置换：轻链的V205(Kabat编号)；重链的A118(EU编号)；和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸改造的抗体可以如例如美US 7,521,541中所述产生。

[0834] e)抗体衍生物

[0835] 在特定实施方案中，本发明提供的抗体可以进一步修饰以包含本领域已知的且容易获得的另外的非蛋白质样结构部分。适于抗体衍生的结构部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括聚乙二醇(PEG)，乙二醇/丙二醇的共聚物，羧甲基纤维素，葡聚糖，聚乙烯醇，聚乙烯吡咯烷酮，聚-1，3-二氧戊环，聚-1，3，6-三噁烷，乙烯/马来酸酐共聚物，聚氨基酸(均聚合物或随机的共聚物)，和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯酮)聚乙二醇，丙二醇均聚物，聚氧化丙烯/环氧乙烷共聚物(prolypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers)，聚氧乙基化多元醇(例如，甘油)，聚乙烯醇，以及它们的混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性可以具有制备中的优点。聚合物可以是任意分子量的，并且可以是分支的或不分支的。连接到抗体上的聚合物的数目可以不同，并且如果连接多于一个聚合物，则它们可以是相同的或不同的分子。通常，用于衍生的聚合物的数目和/或类型可以基于下述考虑确定，所述考虑包括但不限于，抗体要改善的特定特性或功能，抗体衍生物是否将用于限定条件下的治疗等等。

[0836] 在另一个实施方案中，提供抗体和非蛋白质样结构部分的缀合物，所述非蛋白质样结构部分可以通过暴露于射线而被选择性加热。在一个实施方案中，所述非蛋白质样结构部分是碳纳米管(Kam，N.W.等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102(2005)11600-11605)。射线可以是任意波长的，并且包括但不限于，不损伤普通细胞的波长，但是其将所述非蛋白质样

结构部分加热至将邻近所述抗体-非蛋白质样结构部分的细胞杀死的温度。

[0837] f)具有血脑屏障穿梭模块的融合体

[0838] 单克隆抗体对于治疗神经或中枢神经系统(CNS)疾病具有巨大的治疗潜力,但是其进入脑的行程受到血脑屏障(BBB)的限制。过去的研究已经表明,在血流中循环的IgG有非常少的百分量(约0.1%)穿过BBB进入CNS(Felgenhauer,K.,Klin.Wschr.52(1974)1158-1164),其中抗体的CNS浓度可能不足以允许稳健的作用。

[0839] 在特定实施方案中,本发明提供的抗体可以被进一步修饰,以包含一个或多个本领域已知的且容易获得的血脑屏障穿梭模块。

[0840] 所述一个或多个血脑屏障穿梭模块可以融合在轻链或重链的任一端。在一个优选的实施方案中,所述血脑屏障穿梭模块融合在重链的C端。

[0841] 重链的C端可以是以氨基酸残基PGK结束的完整的C端。重链的C端可以是截短的C端,其中一个或两个C端氨基酸残基被去除。在一个优选的实施方案中,重链的C端是以PG结束的截短的C端。

[0842] 一个或多个血脑屏障穿梭模块可以直接或通过肽接头融合到各个抗体链。在一个优选的实施方案中,接头肽具有氨基酸序列GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:41)。

[0843] 所述血脑屏障穿梭模块可以是抗体scFv片段。在一个实施方案中,所述血脑屏障穿梭模块是scFv,其在N-到C-端顺序上包含轻链可变结构域-轻链恒定结构域-接头肽-重链可变结构域-重链恒定结构域1。

[0844] 在一个优选的实施方案中,所述血脑屏障穿梭模块是具有$(G4S)_6$接头肽的抗-转铁蛋白受体-抗体8D3的scFv片段或其人源化的变体。

[0845] 术语其人源化的变体表示这样的分子,其通过将鼠8D3抗体的CDRs移接到人构架上而获得,在构架区(FRs)和/或高变区(HVRs)的每一个中彼此独立地任选的引入1-3个突变。

[0846] 在一个方面中,本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽,其包含抗-人α-突触核蛋白抗体、两个肽接头和两个结合血脑屏障受体的共价结合实体,其中所述接头将抗-人α-突触核蛋白抗体偶联到与血脑屏障受体结合的单价结合实体上。

[0847] 在一个方面中,本发明提供一种抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽,其包含抗-人α-突触核蛋白抗体、一个肽接头和一个结合血脑屏障受体的单价结合实体,其中所述接头将抗-人α-突触核蛋白抗体偶联到与血脑屏障受体结合的单价结合实体上。

[0848] 在一个实施方案中,与血脑屏障受体结合的单价结合实体选自由蛋白、多肽和肽组成的组。

[0849] 在一个实施方案中,与血脑屏障受体结合的单价结合实体包含选自由下述组成的组的分子:血脑屏障受体配体,scFv,Fv,scFab,VHH,在一个优选的实施方案中,选自scFv或scFab。

[0850] 在一个实施方案中,所述血脑屏障受体选自由下述组成的组:转铁蛋白受体,胰岛素受体,胰岛素样生长因子受体,低密度脂蛋白受体相关的蛋白8,低密度脂蛋白受体相关的蛋白1和肝素结合表皮生长因子样生长因子。在一个优选的实施方案中,所述血脑屏障受体是转铁蛋白受体。

[0851] 在一个实施方案中,与血脑屏障受体结合的单价结合实体包含一个scFab或一个

导向转铁蛋白受体的scFv，更具体地是识别转铁蛋白受体中的表位(包含在SEQ ID NO:52，53和54的氨基酸序列中)的scFab或scFv。

[0852] 在一个实施方案中，与血脑屏障受体结合的单价结合实体通过接头偶联到抗-人α-突触核蛋白抗体的重链的C端。

[0853] 在一个实施方案中，所述肽结构是具有至少15个氨基酸的长度、更优选具有18-25个氨基酸的长度的氨基酸序列。

[0854] 在一个实施方案中，所述抗-人α-突触核蛋白抗体是全长抗体，在一个优选的实施方案中，是全长IgG。术语全长抗体表示由两条抗体轻链多肽和两条抗体重链多肽组成的抗体，其中，在两条抗体重链多肽中，C端赖氨酸残基(K)可以存在或不存在。

[0855] 在一个优选的实施方案中，抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽包含作为脑效应子实体的全长IgG抗-人α-突触核蛋白抗体、序列为GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:41)的接头和一个作为单价结合实体的scFab(其与作为血脑受体的人转铁蛋白受体结合)，其中scFab通过接头偶联到全长抗-人α-突触核蛋白抗体的一条重链(Fc部分)的C端，并且，其中scFab识别人转铁蛋白受体包含在SEQ ID NO:52，53和54的氨基酸序列中的表位。

[0856] 在一个优选的实施方案中，抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽包含作为脑效应子实体的全长IgG抗-人α-突触核蛋白抗体、序列为GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:41)的接头和一个作为单价结合实体的scFv(其与作为血脑受体的人转铁蛋白受体结合)，其中scFab通过接头偶联到全长抗-人α-突触核蛋白抗体的一条重链(Fc部分)的C端，并且，其中scFab识别人转铁蛋白受体包含在SEQ ID NO:52，53和54的氨基酸序列中的表位。

[0857] 在一个实施方案中，抗-人α-突触核蛋白抗体的第一重链包含第一二聚体化模块，并且所述抗体的第二重链包含第二二聚体化模块，它们允许这两条重链的异源二聚体化。

[0858] 在一个实施方案中，抗-人α-突触核蛋白抗体的第一重链的第一二聚体化模块是凸起重链，并且抗-人α-突触核蛋白抗体的第二重链的二聚体化模块是孔洞重链(按照凸起-进入-孔洞策略)。

[0859] 本文报道的抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽可以用作药物，特别地，其可以用于治疗神经病症，诸如，例如，帕金森病。

[0860] 本文报道的抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽可以用于将抗-人α-突触核蛋白抗体(脑效应子实体)转运穿过血脑屏障。

[0861] 在一个实施方案中，在其Fc区的C末端偶联到作为单价结合实体的scFab(其结合人转铁蛋白受体)上的抗-人α-突触核蛋白抗体的重链在N-到C-端方向上具有下述结构：

[0862] ●IgG重链，

[0863] ●肽接头，其将IgG重链Fc区的C末端偶联到scFab VL结构域的N末端，在一个优选的实施方案中，所述肽接头具有氨基酸序列GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:41)，

[0864] ●scFab的可变轻链结构域(VL)和C-κ轻链结构域，

[0865] ●肽接头，其将scFab C-κ轻链结构域的C末端偶联到scFab VH结构域的N末端，在一个优选的实施方案中，所述肽结构具有氨基酸序列$(G_4S)_6GG$(SEQ ID NO:55)，

[0866] ●scFab抗体的可变重链结构域(VH)和IgG CH1重链结构域。

[0867] 在一个实施方案中，在其Fc区的C末端偶联到作为单价结合实体的scFv(其结合人转铁蛋白受体)上的抗-人α-突触核蛋白抗体的重链在N-到C-端方向上具有下述结构：

[0868] ●IgG重链，

[0869] ●肽接头，其将IgG重链Fc部分的C末端偶联到scFv抗体片段VL结构域的N末端，在一个优选的实施方案中，所述肽接头具有氨基酸序列GGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO：41)，

[0870] ●可变轻链结构域(VL)，

[0871] ●肽接头，其将可变轻链结构域的C末端偶联到scFv VH结构域的N末端，在一个优选的实施方案中，所述肽结构具有氨基酸序列$(G_4S)_6GG$(SEQ ID NO:55)，

[0872] ●scFv抗体片段的可变重链结构域(VH)。

[0873] 在第二方面中，本发明提供将脑效应子实体转运穿过血脑屏障的融合多肽，其包含CH2-CH3Ig实体、肽接头和一个导向血脑屏障受体的scFab或scFv，其中所述scFab或scFv通过肽接头偶联到CH2-CH3Ig实体的C末端。

[0874] 在一个实施方案中，血脑屏障穿梭模块/导向血脑屏障受体的scFab或scFv来源于人源化的抗-转铁蛋白受体抗体8D3(例如，参见Boado,R.J.,等,Biotechnol.Bioeng.102(2009)1251-1258)。鼠重链可变结构域具有下述氨基酸序列：

[0875]

EVQLVESGGG LVQPGNSLTL SCVASGFTFS NYGMHWIRQA PKKGLEWIAM IYYDSSKMNY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LEMNSLRSED TAMYYCAVPT SHYVVDVWGQ GVSVTVSS

[0876] (SEQ ID NO:56)。

[0877] 鼠轻链可变结构域(变体1)具有下述氨基酸序列：

[0878]

DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP GKSPQLLIYG ATSLADGVPS RFSGSRSGTQ FSLKISRVQV EDIGIYYCLQ AYNTPWTFGG GTKLELK

[0879] (SEQ ID NO:57)，并且

[0880] 鼠轻链可变结构域(变体2)具有下述氨基酸序列：

[0881]

DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP GKSPQLLIYG ATSLADGVPS RFSGSRSGTQ FSLKISRVQV EDIGIYYCLQ AYNTPWTFGG GTKVEIK

[0882] (SEQ ID NO:58)。

[0883] 一个血脑屏障穿梭模块

[0884] 在一个方面中，所述抗-人α突触核蛋白抗体融合多肽恰好包含一个血脑屏障穿梭模块，其中所述血脑屏障穿梭模块包含鼠抗-人转铁蛋白受体抗体8D3的人源化的可变结构域，由此包含鼠抗-人转铁蛋白受体抗体8D3的人源化的可变结构域的血脑屏障穿梭模块转运抗-人α-突触核蛋白抗体穿过血脑屏障。抗-人转铁蛋白受体抗体8D3的可变结构域具有SEQ ID NO:56和57的氨基酸序列。

[0885] 一个或两个血脑屏障穿梭模块

[0886] 在一个方面中，所述抗-人α突触核蛋白抗体融合多肽包含一个或两个血脑屏障穿

梭模块，其中所述血脑屏障穿梭模块，来源于以低亲和力结合血脑屏障受体(BBB-R)的抗体，由此所述来源于以低亲和力结合血脑屏障受体的抗体的血脑屏障穿梭模块转运抗-人α-突触核蛋白抗体穿过血脑屏障。

[0887] 在另一个方面中，BBB-R选自由下述组成的组：转铁蛋白受体(TfR)，胰岛素受体，胰岛素样生长因子受体(IGF受体)，低密度脂蛋白受体相关的蛋白8(LRP8)，低密度脂蛋白受体相关的蛋白1(LRP1)，和肝素结合表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)。在另一个这样的方面中，BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中，BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中，BBB-R是TfR，并且所述抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中，BBB-R是TfR，并且所述抗体不抑制TfR与转铁蛋白的结合。

[0888] 在另一个方面中，所述抗体不削弱BBB-R与其天然配体的一种或多种的结合。在另一个这样的方面中，所述抗体以这样的方式特异性结合人转铁蛋白受体(hTfR)，以使其不抑制hTfR与人转铁蛋白的结合。

[0889] 在另一个方面中，抗-BBB-R抗体具有约1nM至约100μM的针对BBB-R的IC_{50}。在另一个这样的方面中，IC_{50}为约5nM至约100μM。在另一个这样的方面中，IC_{50}为约50nM至约100μM。在另一个这样的方面中，IC_{50}为约100nM至约100μM。在另一个方面中，抗体具有约5nM至约10μM的针对BBB-R的亲和力。在另一个这样的方面中，当与抗-人α-突触核蛋白抗体偶联时，抗体具有约30nM至约1μM的针对BBB-R的亲和力。在另一个这样的方面中，当与抗-人α-突触核蛋白抗体偶联时，抗体具有约50nM至约1μM的针对BBB-R的亲和力。在一个方面中，使用scatchard分析测量抗-BBB-R抗体或抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽针对BBB-R的亲和力。在另一个方面中，使用BIACORE分析测量抗-BBB-R抗体或抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽针对BBB-R的亲和力。在另一个方面中，使用竞争性ELISA测量抗-BBB-R抗体或抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽针对BBB-R的亲和力。

[0890] 包含血脑屏障穿梭的抗体融合多肽的用途

[0891] 在另一个实施方案中，本文提供增加CNS对抗-人α突触核蛋白抗体的暴露的方法，其中所述抗-人α突触核蛋白抗体偶联到以低亲和力结合BBB-R的抗体或抗体片段上，由此增加CNS对所述抗-人α突触核蛋白抗体的暴露。在另一个方面中，相对于CNS对与不具有针对BBB-R的低亲和力的典型抗体偶联的抗-人α突触核蛋白抗体的暴露，测量CNS对抗-人α突触核蛋白抗体的暴露的增加。在另一个方面中，以相对于施用后血清中发现的量，在CNS中发现的抗-人α突触核蛋白抗体的量的比率，测量CNS对抗-人α突触核蛋白抗体的暴露的增加。在另一个这样的方面中，CNS暴露的增加导致大于0.1％的比率。在另一个方面中，相对于在不存在偶联的抗-BBB-R抗体的条件下，CNS对抗-人α突触核蛋白抗体的暴露，测量CNS对抗-人α突触核蛋白抗体的暴露的增加。在另一个方面中，通过成像测量CNS对抗-人α突触核蛋白抗体的暴露的增加。在另一个方面中，通过间接读取，诸如一种或多种生理症状的减轻，来测量CNS对抗-人α突触核蛋白抗体的暴露的增加。

[0892] 增加施用给受试者的抗-人α突触核蛋白抗体在CNS中的保留的方法，其中所述抗-人α突触核蛋白抗体偶联到以低亲和力结合BBB-R的抗体或抗体片段上，以使所述抗-人α突触核蛋白抗体在CNS中的保留增加。

[0893] 在另一个实施方案中，本发明提供最优化抗-人α突触核蛋白抗体的药物代谢动力学和/或药效学以在受试者的CNS中有效的方法，其中所述抗-人α突触核蛋白抗体偶联到以

低亲和力结合BBB-R的抗体或抗体片段上，由此选择所述抗体或抗体片段，以使在偶联到抗-人α突触核蛋白抗体上之后，其针对BBB-R的亲和力导致一定量的与所述抗-人α突触核蛋白抗体缀合的抗体或抗体片段转运穿过BBB，这最优化了抗-人α突触核蛋白抗体在CNS中的药物代谢动力学和/或药效学。

[0894] 在另一个实施方案中，本发明提供治疗哺乳动物中的神经病症的方法，包括用结合BBB-R并且偶联到抗-人α突触核蛋白抗体上的抗体或抗体片段治疗所述哺乳动物，其中已经选择所述抗体，以具有针对BBB-R的低亲和力，并且由此改善所述抗体和偶联的抗-人α突触核蛋白抗体的CNS摄入。在一个实施方案中，所述治疗导致病症症状的减少或消除。在另一个方面中，所述治疗导致神经病症的改善。

[0895] 在所有前述方面的一个实施方案中，所述抗-BBB-R抗体具有约1nM至约100μM的针对BBB-R的IC_{50}。在另一个这样的实施方案中，IC_{50}为约5nM至约100μM。在另一个这样的实施方案中，IC_{50}为约50nM至约100μM。在另一个这样的实施方案中，IC_{50}为约100nM至约100μM。在另一个实施方案中，所述抗体具有约5nM至约10μM的针对BBB-R的亲和力。在另一个实施方案中，当偶联到抗-人α-突触核蛋白抗体上时，抗体具有约30nM至约1μM的针对BBB-R的亲和力。在另一个实施方案中，当偶联到抗-人α-突触核蛋白抗体上时，抗体具有约50nM至约1μM的针对BBB-R的亲和力。在一个实施方案中，使用scatchard分析测量抗-BBB-R抗体或抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽针对BBB-R的亲和力。在另一个实施方案中，使用BIACORE分析测量抗-BBB-R抗体或抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽针对BBB-R的亲和力。另一个实施方案中，使用竞争性ELISA测量抗-BBB-R抗体或抗-人α-突触核蛋白抗体融合多肽针对BBB-R的亲和力。

[0896] 在另一个实施方案中，所述抗-人α突触核蛋白抗体融合多肽被标记。在另一个实施方案中，所述抗-BBB-R抗体或片段不削弱BBB-R与其天然配体中的一种或多种的结合。在另一个实施方案中，所述抗-BBB-R抗体以这样的方式特异性结合hTfR，以使其不抑制hTfR与人转铁蛋白的结合。在另一个实施方案中，所述抗-人α突触核蛋白抗体融合多肽施用给哺乳动物。在另一个实施方案中，所述哺乳动物是人。在另一个实施方案中，所述哺乳动物具有神经病症。在另一个实施方案中，所述神经病症选自由下述组成的组：阿尔茨海默病(AD)，卒中(stroke)，痴呆(dementia)，肌营养不良(muscular dystrophy，MD)，多发性硬化(multiple sclerosis，MS)，肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis，ALS)，囊性纤维化(cystic fibrosis)，安吉尔曼综合征(Angelman's syndrome)，利德尔综合征(Liddle syndrome)，帕金森病，皮克病(Pick's disease)，佩吉特病(Paget's disease)，癌症和外伤性脑损伤(traumatic brain injury)。

[0897] B.重组方法和组合物

[0898] 抗体可以使用本领域公知的重组方法和组合物产生，例如，如US 4,816,567所述。在一个实施方案中，提供编码本文所述的抗-人α-突触核蛋白抗体的分离的核酸。所述核酸可以编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列(例如，抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中，提供包含所述核酸的一种或多种载体(例如，表达载体)。在另一个实施方案中，提供包含所述核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中，宿主细胞包含(例如，已经转化下述)：(1)包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的载体，或(2)包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载

体和包含编码包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中，所述宿主细胞是真核的，例如，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如，Y0，NS0，Sp20细胞)。在一个实施方案中，提供制备抗-人α-突触核蛋白抗体的方法，其中所述方法包括在适于表达所述抗体的条件下，培养如上文提供的包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞，并且任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

[0899] 对于抗-人α-突触核蛋白抗体的重组生产，分离例如如上文所述的编码抗体的核酸并且将其插入到一种或多种载体中，用于进一步的克隆和/或在宿主细胞中的表达。所述核酸可以容易地用常规方法分离并测序(例如，通过使用能够特异性结合编码所述抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0900] 用于克隆或表达编码抗体的载体的适当的宿主细胞包括本文所述的原核细胞或真核细胞。例如，抗体可以在细菌中产生，特别是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达，参见，例如，US 5,648,237，US 5,789,199，和US 5,840,523。(还参见Charlton，K.A.，在：Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)中，卷248，Lo，B.K.C.(编)，Humana Press，Totowa，NJ(2003)，第245-254页，其描述抗体片段在大肠杆菌(E.coli.)中的表达)。表达后，可以从细菌细胞糊状物中分离在可溶级分中的抗体，并可以进一步纯化。

[0901] 除了原核生物，真核微生物，如丝状真菌或酵母也是编码抗体的载体的适当的克隆或表达宿主，包括其糖基化途径已被“人源化”的真菌和酵母菌株，导致以部分或完全人糖基化模式生产抗体。参见Gerngross，T.U.，Nat.Biotech.22(2004)1409-1414；和Li，H.等，Nat.Biotech.24(2006)210-215。

[0902] 用于表达糖基化的抗体的适当的宿主细胞还来源于多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了多种可以与昆虫细胞联合应用、特别是用于转染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞的杆状病毒毒株。

[0903] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见，例如，US 5,959,177，US 6,040,498，US 6,420,548，US 7,125,978，和US 6,417,429(描述用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0904] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如，适合悬浮生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。其他有用的哺乳动物宿主细胞的实例是转化了SV40(COS-7)的猴肾CV1株系；人胚肾株系(293或293细胞，如在例如Graham，F.L.等，J.Gen Virol.36(1977)59-74中所述)；幼仓鼠肾细胞(BHK)；小鼠支持细胞(TM4细胞，如在例如Mather，J.P.，Biol.Reprod.23(1980)243-252中所述)；猴肾细胞(CV1)；非洲绿猴肾细胞(VERO-76)；人宫颈癌细胞(HELA)；犬肾细胞(MDCK；布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A)；人肺细胞(W138)；人肝细胞(Hep G2)；小鼠乳房瘤(MMT 060562)；TRI细胞，如例如在Mather，J.P.等，Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68中所述；MRC 5细胞；和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包括DHFR-CHO细胞(Urlaub，G.等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980)4216-4220)；和骨髓瘤细胞系，如Y0，NS0和Sp2/0。对于适于抗体生产的特定哺乳动物宿主细胞系的综述，参见，例如，Yazaki，P.和Wu，A.M.，Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)，卷248，Lo，B.K.C.(编)，Humana Press，Totowa，NJ(2004)，第255-268页。

[0905] C.测定

[0906] 可以通过本领域已知的多种测定法鉴定、筛选或表征本发明提供的抗-人α-突触核蛋白抗体的物理/化学特性和/或生物学活性。

[0907] 1.结合测定和其他测定

[0908] 在一个方面中，检测本发明的抗体针对其抗原的结合活性，例如，通过已知的方法，诸如ELISA，αLISA，Western印迹，抗体或反相阵列等。

[0909] 在示例性的ELISA或αLISA测定中，溶液(细胞上清液，细胞或组织裂解物，体液等)中的α-突触核蛋白被捕获抗体结合，所述捕获抗体特异性结合α-突触核蛋白上的第一表位或处于特定构象的α-突触核蛋白个偶联到检测实体上的检测抗体，所述检测抗体特异性结合α-突触核蛋白的第二表位或构象。读数是基于检测实体(化学发光，荧光，能量转移诱导的发光等)。在一些情形中，在相同的测定中，可以使用与捕获抗体和检测抗体相同的抗体，以检测α-突触核蛋白的聚集形式(例如，参见Tokuda，T.等，Neurology 75(2010)1766-1772)。

[0910] 在抗体阵列的情形中，将抗体点样到玻璃或硝基纤维素芯片上。将载玻片封闭，并用包含α-突触核蛋白的溶液温育，洗涤，以去除未结合的抗体，并且用荧光标记的相对应的二级抗体检测结合的抗体。通过荧光载玻片扫描仪测量荧光信号。类似地，对于反相阵列，将重组的α-突触核蛋白、细胞上清液、细胞或组织裂解物、体液等点样到玻璃或硝基纤维素芯片上。将载玻片封闭，并且将单个的阵列用针对α-突触核蛋白上的特异性表位的抗体温育。洗去未结合的抗体，并且用荧光标记的相对应的二级抗体检测结合的抗体。通过荧光载玻片扫描仪测量荧光信号(Dernick，G，等，J.Lipid Res.52(2011)2323-2331)。

[0911] 在Western印迹的实例中，在SDS PAGE或非变性凝胶条件下，通过分子量分离来源于细胞上清液、细胞或组织裂解物、体液等的聚集的重组α-突触核蛋白或α-突触核蛋白，并且印迹到硝基纤维素或PVDF膜上。封闭后，将膜用特异性针对α-突触核蛋白的氨基酸序列或构象的抗体温育。然后，洗涤膜，以去除未结合的抗体。通过偶联到用于化学发光或荧光或其他检测方式的检测实体偶联的相对应的二级抗体检测结合的抗体。特异性针对α-突触核蛋白的氨基酸序列的抗体将结合各种聚集形式的并且因此各种分子量的α-突触核蛋白，只要聚集没有掩蔽表位即可。另一方面，构象特异性的抗体将仅检测聚集形式的α-突触核蛋白，这仅显示特定分子量的条带(例如，参见Towbin，H.，等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA76(1979)4350-4353；Burnette，W.N.，Anal.Biochem.112(1981)195-203)。

[0912] 在另一个方面中，可以使用竞争性测定来鉴定与抗体0017、抗体0018或抗体0081竞争性结合人α-突触核蛋白的抗体。在特定实施方案中，所述竞争性抗体与本文报道的抗体(如抗体0017，抗体0018和抗体0081)结合相同的表位(例如，线性或构象表位)。关于绘制抗体结合的表位的详细的示例性的方法提供在Morris，G.E.(编)，Epitope Mapping Protocols(表位绘图方法)，在：Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)中，卷66，Humana Press，Totowa，NJ(1996)中。

[0913] 在一种示例性的竞争测定法中，将固定的人α-突触核蛋白在包含第一标记的抗体和第二未标记的抗体的溶液中温育，所述第一标记的抗体结合人α-突触核蛋白(例如，抗体0017，抗体0018或抗体0081)，并且所述第二未标记的抗体被检测其与所述第一抗体竞争与人α-突触核蛋白结合的能力。作为对照，将固定的人α-突触核蛋白在包含第一标记的抗体但不包含第二未标记的抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与人α-突触核蛋白结合的条件

下温育后，去除过量的未结合的抗体，并且测量与固定的人α-突触核蛋白缔合的标记的量。如果相对于对照样品，测试样品中与固定的人α-突触核蛋白缔合的标记的量大量减少，那么这表示所述第二抗体与所述第一抗体竞争与人α-突触核蛋白的结合(例如，参见Harlow，E.和Lane，D.，Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:实验室手册)，第14章，Cold Spring Harbor Laboratory(冷泉港实验室)，Cold Spring Harbor(冷泉港)，NY(1988))。

[0914] 2.活性测定

[0915] 在一个方面中，提供用于鉴定具有生物学活性的抗-人α-突触核蛋白抗体的测定法。生物学活性可以包括，例如，α-突触核蛋白诱导的细胞毒性的防止/减少/抑制，和/或寡聚体的人α-突触核蛋白的细胞-到-细胞传递的防止/减少/抑制，和/或人神经元细胞中α-突触核蛋白诱导的胱天蛋白酶活性的减少。还提供在体内和/或体外具有所述生物学活性的抗体。

[0916] 在特定实施方案中，在体外检测本发明的抗体的所述生物学活性。

[0917] 可以通过加入包含所选的α-突触核蛋白的条件培养基来评估保护性生物学活性，所述α-突触核蛋白引起接受体神经元细胞上的细胞死亡。该毒性可以通过加入本文所述的保护性的抗体而被逆转。在之前已经确定所选的α-突触核蛋白的毒性性质(Emmanouilidou，E.，等，J.Neurosci.，30(2010)6838-6851)。

[0918] D.用于诊断和检测的方法和组合物

[0919] 在特定实施方案中，本发明提供的任一种抗-人α-突触核蛋白抗体有效用于检测生物样品中人α-突触核蛋白抗体的存在。术语“检测”用在本文中包括定量或定性检测。在特定实施方案中，生物样品包括细胞或组织，如脑组织。

[0920] 在一个实施方案中，提供用于诊断或检测方法的抗-人α-突触核蛋白抗体。在另一个方面中，提供检测生物样品中人α-突触核蛋白的存在的方法。在特定实施方案中，所述方法包括:在允许抗-人α-突触核蛋白抗体与人α-突触核蛋白结合的条件下，使生物样品与本文所述的抗-人α-突触核蛋白抗体接触，并且检测是否形成抗-人α-突触核蛋白抗体与人α-突触核蛋白之间的复合物。所述方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，抗-人α-突触核蛋白抗体用于选择适合使用抗-人α-突触核蛋白抗体的疗法的受试者，例如，其中人α-突触核蛋白是用于选择患者的生物标记。

[0921] 可以使用本发明的抗体诊断的示例性的病症包括具有1型脑部铁积聚的神经变性(NBIA1)，单纯性自主神经衰竭，唐氏综合征，关岛复合症(complex of Guam)，和一些雷维小体病症，诸如弥漫性雷维小体病(DLBD)，阿尔茨海默病的雷维小体变异(LBVAD)，某些形式的戈谢病，和帕金森病痴呆(PDD)。

[0922] 在特定实施方案中，提供标记的抗-人α-突触核蛋白抗体。标记包括，但不限于，直接检测的标记或结构部分(诸如荧光的、发色的、高电子密度的、化学发光的和放射性的标记)，以及间接检测的结构部分，如酶或配体，例如，通过酶反应或分子相互作用间接测。示例性的标记包括，但不限于，同位素^{32}P，^{14}C，^{125}I，^{3}H，和^{131}I，荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，丹酰，伞形酮，荧光素酶(luceriferases)，例如，萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(US 4,737,456)，荧光素，2,3-二氢酞嗪二酮，辣根过氧化物酶(HRP)，碱性磷酸酶，β-半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶菌酶，糖氧化酶，例如，葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，其偶联这样的酶，所

述酶利用过氧化氢来氧化染料前体，如HRP，乳过氧化物酶，或微过氧化物酶，生物素/抗生物素蛋白，自旋标记，噬菌体标记，稳定的自由基等。

[0923] E.药物制剂

[0924] 本发明所述的抗-人α-突触核蛋白抗体的药物制剂可以通过将所述具有所需要的纯度的抗体与一种或多种任选的药用载体混合而制备(Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药科学)，第16版，Osol，A.(编)(1980))，采用冻干制剂或水溶液的形式。药用载体以所用的剂量和浓度对接受者通常是无毒的，并且包括，但不限于：缓冲剂，如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(如十八基二甲基苄基氯化铵；六甲氯铵(hexamethonium chloride)；苯扎氯铵(benzalkonium chloride)；苄索氯铵(benzethonium chloride)；苯酚，丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间-甲酚)；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，如血清白蛋白，明胶，或免疫球蛋白；亲水性聚合物如聚(乙烯吡咯烷酮)；氨基酸如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，组氨酸，精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖，和其他糖类，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如EDTA；糖，如蔗糖，甘露醇，海藻糖或山梨糖醇；形成盐的抗衡离子，如钠；金属复合物(例如，Zn-蛋白复合物)；和/或非离子表面活性剂，如聚乙二醇(PEG)。本发明示例性的药用载体还包括肠药物分散剂，如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP)，例如，人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白，诸如rhuPH20(HYLENEX®，Baxter International，Inc.)。某些示例性的sHASEGPs和使用方法，包括rhuPH20，记述在US 2005/0260186和US 2006/0104968中。在一个方面中，sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(glycosaminoglycanases)如软骨素酶组合。

[0925] 示例性的冻干抗体制剂记述在US 6,267,958中。水性抗体制剂包括US 6,171,586和WO2006/044908中记述的那些，后述制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0926] 当被治疗的具体适应证需要时，本发明的制剂还可以包含多于一种活性成分，优选包含具有没有彼此不利的影响的互补活性的那些活性成分。例如，可以理想地进一步提供[[列出可以与抗-人α-突触核蛋白抗体组合的药物]]。此类活性成分适当地以对期待的目的有效的量以组合形式存在。

[0927] 活性成分可以被包封在微胶囊中，例如，在胶质药物递送系统(例如，脂质体，白蛋白微球体，微乳液，纳米颗粒和纳米胶囊)中，或在粗乳液中，所述微胶囊例通过凝聚技术或通过界面聚合制备，例如，分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这样的技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药科学)，第16版，Osol，A.(编)(1980)中。

[0928] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质，所述基质采用成形物品的形式，例如，薄膜或微胶囊。

[0929] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以容易地获得无菌性，例如，通过经由无菌过滤膜过滤获得。

[0930] F.治疗方法和组合物

[0931] 本发明提供的任一种抗-人α-突触核蛋白抗体可以用在治疗方法中。

[0932] 在一个方面中，提供用作药物的抗-人α-突触核蛋白抗体。在其他方面中，提供用于治疗帕金森病的抗-人α-突触核蛋白抗体。在特定实施方案中，提供用于治疗方法中的

抗-人α-突触核蛋白抗体。在特定实施方案中，本发明提供用在治疗患有帕金森病的个体的方法中的抗-人α-突触核蛋白抗体，所述方法包括给所述个体施用有效量的所述抗-人α-突触核蛋白抗体。在一个这样的实施方案中，所述方法还包括给个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂，例如，如下所述。在其他实施方案中，本发明提供抗-人α-突触核蛋白抗体，其用于抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，或抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，或减少α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。在特定实施方案中，本发明提供抗-人α-突触核蛋白抗体，其用在抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性、或抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递、或减少个体中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性的方法中，所述方法包括向所述个体施用有效量的抗-人α-突触核蛋白抗体，以抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，或抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，或减少α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。上述任一个实施方案所述的“个体”优选是人。

[0933] 在另一个方面中，本发明提供抗-人α-突触核蛋白抗体在制造或制备药物中的应用。在一个实施方案中，所述药物用于治疗帕金森病。在另一个实施方案中，所述药物用在治疗帕金森病的方法中，所述方法包括给患有帕金森病的个体施用有效量的所述药物。在一个这样的实施方案中，所述方法还包括给个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂，例如，如下所述。在另一个实施方案中，所述药物用于抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，或用于抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，或用于减少α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。在另一个实施方案中，所述药物用在抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性、或抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递、或减少个体中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性的方法中，所述方法包括向所述给体施用有效量的所述药物，以抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，或抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，或减少α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。上述任一个实施方案所述的“个体”可以是人。

[0934] 在另一个方面中，本发明提供用于治疗帕金森病的方法。在一个实施方案中，所述方法包括给患有所述帕金森病的个体施用有效量的抗-人α-突触核蛋白抗体。在一个这样的实施方案中，所述方法还包括给个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂，例如，如下所述。上述任一个实施方案所述的“个体”可以是人。

[0935] 在另一个方面中，本发明提供用于抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性、或抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递、或减少个体中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性的方法。在一个实施方案中，所述方法包括向所述个体施用有效量的抗-人α-突触核蛋白抗体，以抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，或抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，或减少α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。在一个实施方案中，“个体”是人。

[0936] 在另一个方面中，本发明提供包含本文提供的任一种抗-人α-突触核蛋白抗体的药物制剂，例如，用在任一种上述治疗方法中。在一个实施方案中，药物制剂包含本文提供

的任一种抗-人α-突触核蛋白抗体和药用载体。在另一个实施方案中，药物制剂包含本文提供的任一种抗-人α-突触核蛋白抗体和至少一种另外的治疗剂，例如，如下所述。

[0937] 本发明的抗体可以单独或与其他药剂组合用在治疗中。例如，本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂共同施用。

[0938] 上述组合疗法包括组合的施用(其中两种以上治疗剂包含在同一种或分开的制剂中)，和分开的施用，在该情形中，本发明的抗体的施用可以在施用一种或多种另外的治疗剂之前、同时、和/或之后发生。在一个实施方案中，抗-人α-突触核蛋白抗体的施用和一个或多个另外的治疗剂的施用彼此在约一个月内发生，或在约一个、两个或三个周内发生，或在约一天、两天、三天、四天、五天或六天内发生。

[0939] 本发明的抗体(和任意另外的治疗剂)可以通过任何适当的方式施用，包括肠胃外、肺内和鼻内，并且，如果需要局部治疗，可以在损伤内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。给药可以通过任何适当的途径，例如，通过注射，如静脉内或皮下注射，这部分取决于所述施用是短期的还是长期的。本发明考虑多种给药时间方案，包括但不限于，在多个时间点的单次或多次施用、推注施用、和脉冲输注。

[0940] 本发明的抗体将以与良好的医学实践一致的方式配制、给药和施用。在这种情形中考虑的因素包括被治疗的具体病症，被治疗的具体的哺乳动物，个体患者的临床状况，病症的病因，递送药剂的部位，施用方法，施用时间表，和医学执业者已知的其他因素。抗体不需要但是任选地与一种或多种目前用来预防或治疗所讨论病症的药剂一起配制。所述其他药剂的有效量取决于所述制剂中存在的抗体的量，病症或治疗的类型，和上文讨论的其他因素。这些通常以相同的剂量和用如本文所述的施用途径使用，或本文所述的剂量的约1至99％，或以凭经验/临床确定是适当的任意剂量和任意途径使用。

[0941] 对于疾病的预防和治疗，本发明的抗体的适当的剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于要治疗的疾病的类型，抗体的类型，疾病的严重性和病程，是否为预防或治疗目的施用所述抗体，先前的疗法，患者的临床病史和对所述抗体的反应，以及主治医师的判断力。所述抗体适当地一次或在一系列治疗中施用给患者。取决于疾病的类型和严重性，约1μg/kg至15mg/kg(例如，0.5mg/kg-10mg/kg)的抗体可以作为施用给患者的初始候选剂量，不管是例如通过一次或多次分开的施用还是通过连续输注施用。一种典型地每日剂量可能在约1μg/kg至100mg/kg以上范围内，这取决于上文提及的因素。对于在数天或更久时间内的重复施用，取决于病症，治疗通常将持续到出现理想的疾病症状抑制。一种示例性的抗体剂量将在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此，可以给患者施用约0.5mg/kg，2.0mg/kg，4.0mg/kg或10mg/kg的一种或多种剂量(或它们的任意组合)。所述剂量可以间断性施用，例如，每周或每三周(例如，以使患者接受约两次至约二十次或例如约六次剂量的抗体)。可以使用较高的初始负载剂量，然后施用一种或多种较低的剂量。然而，可以使用其他的剂量方案。这种疗法的进展容易通过常规技术和测定法进行监测。

[0942] 应该理解，上述制剂或治疗方法中的任一种可以使用本发明的免疫缀合物替代抗-人α-突触核蛋白抗体或在使用抗-人α-突触核蛋白抗体之外另外进行。

[0943] III.制品

[0944] 在本发明的另一个方面中，提供制品，其包含可用于治疗、预防和/或诊断上述病

症的物质。所述制品包括容器和在所述容器上或相连的标签或包装插页。适当的容器包括，例如，瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由各种材料如玻璃或塑料制成。容器容纳单独的或与有效用于治疗、预防和/或诊断病症的另一种组合物组合的组合物，并且可以具有无菌入口(例如，所述容器可以是具有由皮下注射针穿透的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。所述组合物中的至少一种活性药剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示所述组合物用于治疗选择的病症。此外，所述制品可以包括：(a)其中包含组合物的第一容器，其中所述组合物包含本发明的抗体；和(b)其中包含组合物的第二容器，其中所述组合物包含另一种细胞毒性剂或其他治疗剂。在本发明这一实施方案中的制品可以进一步包括指示所述组合物可以用于治疗具体病症的包装插页。备选地，或另外地，所述制品可以进步一包括包含药用缓冲剂的第二(或第三)容器，如抑菌的注射用水(BWFI)，磷酸缓冲盐水，林格溶液和葡萄糖溶液。其可以进一步包括在商业和使用者立场上是合乎需要的其他材料，包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0945] 应该理解，上述任一种制品可以包括替代抗-人α-突触核蛋白抗体本发明的免疫缀合物或包括除使用抗-人α-突触核蛋白抗体之外的另外的本发明的免疫缀合物。

[0946] IV.具体的实施方案

[0947] 1.特异性结合人α-突触核蛋白的抗体，其中所述抗体

[0948] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0949] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0950] iii)减少LUHMES细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0951] 2.根据第1项所述的抗体，其特征在于，所述胱天蛋白酶活性是胱天蛋白酶3和/或胱天蛋白酶7活性。

[0952] 3.根据第1-2项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体用于治疗突触核蛋白病。

[0953] 4.根据第3项所述的抗体，其特征在于，所述抗体用于治疗帕金森病。

[0954] 5.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体特异性结合由氨基酸序列GKNEEGAPQEG(SEQ ID NO:01)组成的肽。

[0955] 6.根据第1-5项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体具有小于10E-09M且大于10E-07M的针对单体人α-突触核蛋白的结合亲和力。

[0956] 7.根据第1-6项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体特异性结合单体和寡聚体人α-突触核蛋白，并且不结合原纤维人α-突触核蛋白。

[0957] 8.根据第1-7项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体在重链可变结构域包含SEQ ID NO:02-04的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:05-07的HVRs。

[0958] 9.根据第1-7项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体在重链可变结构域包含SEQ ID NO:08,09和04的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:10-12的HVRs。

[0959] 10.根据第8-9项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体包含由SEQ ID NO:13组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:14组成的轻链可变结构域。

[0960] 11.根据第1-10项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体通过将包含由SEQ ID NO:13组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:14组成的轻链可变结构域的抗体人源化

而获得。

[0961] 12.根据第1-7项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:02-04的HVRs，且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:05-07的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0962] 13.根据第1-7项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:08，09和04的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:10-12的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0963] 14.根据第1-7和12-13项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且重链可变结构域是由SEQ ID NO:13组成的重链可变结构域的人源化形式(来源于由SEQ ID NO:13组成的重链可变结构域)，且轻链可变结构域是由SEQ ID NO:14组成的轻链可变结构域的人源化形式(来源于由SEQ ID NO:14组成的轻链可变结构域)。

[0964] 15.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体与在重链包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0965] 16.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体与在重链包含SEQ ID NO:21，22和17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:23-25的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0966] 17.根据第15和16项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体包含由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域。

[0967] 18.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体通过将包含由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域的抗体人源化获得。

[0968] 19.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:18-20的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0969] 20.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:21，22和17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:23-25的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0970] 21.根据第1-4和19-20项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且重链可变结构域是由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域的人源化形式(来源于由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域)，轻链可变结构域是由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域的人源化形式(来源于由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域)。

[0971] 22.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体与在重链中包含SEQ ID NO:28-30的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:31-33的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0972] 23.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体与在重链中包含SEQ ID NO:28，34和30的HVRs且在轻链中包含SEQ ID NO:35-37的HVRs的抗体结合相同的表位。

[0973] 24.根据第22-23项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体包含由SEQ ID NO:38组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:39组成的轻链可变结构域。

[0974] 25.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体通过将包含由SEQ ID NO:38组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:39组成的轻链可变结构域的抗体人源化而获得。

[0975] 26.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:28-30的HVRs，且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:31-33的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0976] 27.根据第1-4项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:28,34和30的HVRs，且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:35-37的HVRs，其中，在每个HVR中，多至3个氨基酸残基可以被改变。

[0977] 28.根据第1-4和26-27项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体，并且重链可变结构域是由SEQ ID NO:38组成的重链可变结构域的人源化形式(来源于由SEQ ID NO:38组成的重链可变结构域)，且轻链可变结构域是由SEQ ID NO:39组成的轻链可变结构域的人源化形式(来源于由SEQ ID NO:39组成的轻链可变结构域)。

[0978] 29.根据第1-4和15-28项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体特异性结合原纤维人α-突触核蛋白，并且不结合非原纤维人α-突触核蛋白。

[0979] 30.根据第1-29项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体缀合到血脑屏障穿梭模块上。

[0980] 31.根据第30项所述的抗体，其特征在于，所述血脑屏障穿梭模块是特异性结合LRP1、LRP8、人转铁蛋白受体或人胰岛素样生长因子受体的抗体或抗体片段。

[0981] 32.根据第1-31项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

[0982] 33.根据第1-32项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是人源化的抗体或嵌合抗体。

[0983] 34.根据第1-33项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是结合人α-突触核蛋白的抗体片段，并且

[0984] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性，和/或

[0985] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递，和/或

[0986] iii)减少LUHMES细胞中α突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[0987] 35.根据第1-34项中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是

[0988] a)人亚类IgG1的全长抗体，或

[0989] b)人亚类IgG4的全长抗体，或

[0990] c)人亚类IgG1的全长抗体，具有突变L234A,L235A和P329G，

[0991] d)人亚类IgG4的全长抗体，具有突变S228P,L235E和P329G，

[0992] e)人亚类IgG1的全长抗体，在两条重链中具有突变L234A,L235A和P329G，在一条重链中具有突变T366W和S354C，并且在各自的另一条重链中具有突变T366S,L368A,Y407V和Y349C，或

[0993] f)人亚类IgG4的全长抗体，在两条重链中具有突变S228P和P329G，在一条重链中具有突变T366W和S354C，并且在各自的另一条重链中具有突变T366S,L368A,Y407V和Y349C。

[0994] 36.一种分离的核酸，其编码第1-35项中任一项所述的抗体。

[0995] 37.包含第36项的核酸的宿主细胞。

[0996] 38.一种制备抗体的方法，所述方法包括培养第37项的宿主细胞以产生所述抗体

的步骤。

[0997] 39.根据第38项所述的方法，其特征在于，所述方法还包括从细胞或细胞培养基回收所述抗体的步骤。

[0998] 40.一种药物制剂，其包含第1-35项中任一项所述的抗体和药用载体。

[0999] 41.根据第40项所述的药物制剂，其特征在于，其还包含另外的治疗剂。

[1000] 42.根据第1-35项中任一项所述的抗体，其用作药物。

[1001] 43.根据第1-35项中任一项所述的抗体，其用于治疗突触核蛋白病。

[1002] 44.根据第1-35项中任一项所述的抗体，其用于治疗帕金森病

[1003] 45.根据第1-35项中任一项所述的抗体，其用于抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[1004] 46.根据第1-35项中任一项所述的抗体，其用于抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递。

[1005] 47.根据第1-35项中任一项所述的抗体，其用于减少神经元细胞或神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的胱天蛋白酶活性。

[1006] 48.第1-35项中任一项所述的抗体在制备药物中的用途。

[1007] 49.第48项的用途，其中所述药物用于治疗帕金森病。

[1008] 50.第48项的用途，其中所述药物用于抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[1009] 51.第48项的用途，其中所述药物用于抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递。

[1010] 52.第48项的用途，其中所述药物用于减少人神经元细胞或神经胶质细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性。

[1011] 53.一种治疗患有帕金森病的个体的方法，所述方法包括给所述个体施用有效量的第1-35项中任一项所述的抗体。

[1012] 54.一种抑制个体中人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性的方法，所述方法包括给所述个体施用有效量的第1-35项中任一项所述的抗体，以抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[1013] 55.一种抑制个体中寡聚体人α-突触核蛋白在神经元与神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递的方法，所述方法包括给所述个体施用有效量的第1-35项中任一项所述的抗体，以抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性。

[1014] 56.第1-35项中任一项所述的抗-人α突触核蛋白抗体在抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性中的应用。

[1015] 57.第1-35项中任一项所述的抗-人α突触核蛋白抗体在抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递中的应用。

[1016] 58.第1-35项中任一项所述的抗-人α突触核蛋白抗体在减少神经元细胞或神经胶质细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性中的应用。

[1017] 59.一种抗体，所述抗体特异性结合人α-突触核蛋白，并且包含选自下述的至少一个、至少两个或全部三个VH HVR序列：

[1018] i)(a)包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:03的氨基酸

序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3;或

[1019] ii)(a)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1020] iii)(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1021] iv)(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1022] v)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1023] vi)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3。

[1024] 60.一种抗体,所述抗体特异性结合人α-突触核蛋白,并且包含下述作为VH HVR序列:

[1025] i)(a)包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3;或

[1026] ii)(a)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1027] iii)(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1028] iv)(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1029] v)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3,或

[1030] vi)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3。

[1031] 61.根据第59-60中任一项所述的抗体,其特征在于,其还包含选自下述的至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列:

[1032] i)(a)包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-L3;或

[1033] ii)(a)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L3,或

[1034] iii)(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3,或

[1035] iv)(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L3,或

[1036] v)(a)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-L3,或

[1037] vi)(a)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[1038] 62.根据第60项所述的抗体，其特征在于，所述抗体还包含下述作为VL HVR序列：

[1039] i)(a)包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的HVR-L2；和(c)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-L3；或

[1040] ii)(a)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L2；和(c)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1041] iii)(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2；和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1042] iv)(a)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2；和(c)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1043] v)(a)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L2；和(c)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1044] vi)(a)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2；和(c)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[1045] 63.一种抗体，其特异性结合人α-突触核蛋白，并且包含下述作为HVR序列：

[1046] i)(a)包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1047] ii)(a)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:09的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1048] iii)(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1049] iv)(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1050] v)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-L3，或

[1051] vi)(a)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[1052] 64.特异性结合人α-突触核蛋白的抗体，其中所述人α-突触核蛋白具有游离的N-

端甲硫氨酸残基。

[1053] 65.根据第64项所述的抗体，其中所述抗体特异性结合人和小鼠α-突触核蛋白，其中所述人和小鼠α-突触核蛋白具有游离的N-端甲硫氨酸残基。

[1054] 66.根据第64-65项中任一项所述的抗体，其中所述α-突触核蛋白是单体α-突触核蛋白。

[1055] 67.根据第64-65项中任一项所述的抗体，其中所述α-突触核蛋白是寡聚体α-突触核蛋白。

[1056] 68.根据第64-67项中任一项所述的抗体，其中所述α-突触核蛋白是单体的和寡聚体的α-突触核蛋白。

[1057] 69.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体与在重链包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位。

[1058] 70.根据第64-69项中任一项所述的抗体，其中所述抗体与在重链包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:23-25的HVRs的抗体结合相同的表位。

[1059] 71.根据第64-70项中任一项所述的抗体，其中所述抗体与包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体结合相同的表位。

[1060] 72.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体在重链包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:18-20的HVRs。

[1061] 73.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体在重链包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:23-25的HVRs。

[1062] 74.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体通过将包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体人源化获得。

[1063] 75.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:18-20的HVRs，其中，在每个HVR中，0-3个氨基酸残基被改变。

[1064] 76.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体是人源化的抗体，并且在重链可变结构域包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:23-25的HVRs，其中，在每个HVR中，0-3个氨基酸残基被改变。

[1065] 77.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体是人源化的抗体，并且重链可变结构域来源于SEQ ID NO:26的重链可变结构域，且轻链可变结构域来源于SEQ ID NO:27的轻链可变结构域。

[1066] 78.一种抗体，所述抗体与在重链包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链包含SEQ ID NO:18-20的HVRs的抗体结合相同的表位。

[1067] 79.一种抗体，其在重链包含SEQ ID NO:15-17的HVRs，且在轻链包含SEQ ID NO:18-20的HVRs。

[1068] 80.一种抗体，其在重链包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs，且在轻链包含SEQ ID NO:23-25的HVRs。

[1069] 81.一种(变体)抗体，所述抗体由包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体获得。

[1070] 82.根据第64-68项中任一项所述的抗体，其中所述抗体是人源化的抗体，其通过

将包含SEQ ID NO:26的重链可变结构域和SEQ ID NO:27的轻链可变结构域的抗体人源化获得。

[1071] 83.一种(人源化的)抗体,其在重链可变结构域包含SEQ ID NO:15-17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:18-20的HVRs,其中在每个HVR中,0-3个氨基酸残基被改变。

[1072] 84.一种(人源化的)抗体,其在重链可变结构域包含SEQ ID NO:21,22和17的HVRs且在轻链可变结构域包含SEQ ID NO:23-25的HVRs,其中在每个HVR中,0-3个氨基酸残基被改变。

[1073] 85.一种(人源化的)抗体,其中重链可变结构域来源于SEQ ID NO:26的重链可变结构域,并且轻链可变结构域来源于SEQ ID NO:27的轻链可变结构域。

[1074] 86.根据第64-85项中任一项所述的抗体,其中所述抗体缀合到血脑屏障穿梭模块上。

[1075] 87.根据第86项所述的抗体,其中所述血脑屏障穿梭模块是特异性结合LRP1、LRP8、人转铁蛋白受体或人胰岛素样生长因子受体的抗体或抗体片段。

[1076] 88.根据第64-87项中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

[1077] 89.根据第64-88项中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化的抗体或嵌合抗体。

[1078] 90.根据第64-89项中任一项所述的抗体,其中所述抗体是

[1079] a)人亚类IgG1的全长抗体,或

[1080] b)人亚类IgG4的全长抗体,或

[1081] c)人亚类IgG1的全长抗体,具有突变L234A,L235A和P329G,

[1082] d)人亚类IgG4的全长抗体,具有突变S228P,L235E和P329G,

[1083] e)人亚类IgG1的全长抗体,在两条重链中具有突变L234A,L235A和P329G,在一条重链中具有突变T366W和S354C,并且在各自的另一条重链中具有突变T366S,L368A,Y407V和Y349C,或

[1084] f)人亚类IgG4的全长抗体,在两条重链中具有突变S228P,L235E和P329G,在一条重链中具有突变T366W和S354C,并且在各自的另一条重链中具有突变T366S,L368A,Y407V和Y349C。

[1085] 91.一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[1086] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[1087] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1088] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[1089] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[1090] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[1091] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1092] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1093] 92.一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[1094] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[1095] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1096] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[1097] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[1098] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[1099] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1100] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1101] 93.一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[1102] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链包含一个重链可变结构域和一个重链恒定区,其中

[1103] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[1104] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[1105] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[1106] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[1107] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的非人(兔)可变结构域的人源化形式,

[1108] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1109] 94.一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[1110] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[1111] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1112] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,并且

[1113] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,

[1114] b)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[1115] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1116] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1117] 95.一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[1118] a)所述抗体包含两条抗体重链,每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[1119] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其

中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[1120] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[1121] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[1122] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[1123] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23，SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[1124] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1125] 96.一种抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[1126] a)所述抗体包含两条抗体重链，每条重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[1127] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式，

[1128] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，并且

[1129] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，

[1130] b)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[1131] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的兔可变结构域的人源化形式，

[1132] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1133] 97.一种抗-人α-突触核蛋白抗体，其特征在于：

[1134] a)所述抗体包含第一抗体重链，所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段，其与人转铁蛋白受体特异性结合，其中

[1135] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[1136] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[1137] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[1138] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[1139] b)所述抗体包含第二抗体重链，所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区，其中

[1140] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的HVRs，其中在每个HVR中，不依赖于彼此，0，1，2或3个氨基酸残基被改变，

[1141] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区，其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在，

[1142] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A，L235A和P329G，并且

[1143] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C，或者，如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C，则所述恒定区包含氨基酸变化T366S，L368A，Y407V和Y349C，

[1144] c)所述抗体包含两条抗体轻链，每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域，其中

[1145] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1146] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1147] 98.一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[1148] a)所述抗体包含第一抗体重链,所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[1149] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1150] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[1151] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[1152] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[1153] b)所述抗体包含第二抗体重链,所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区,其中

[1154] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:17的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1155] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[1156] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[1157] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C,或者,如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C,则所述恒定区包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[1158] c)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[1159] i)所述可变结构域包含SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的HVRs,其中在每个HVR中,不依赖于彼此,0,1,2或3个氨基酸残基被改变,

[1160] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1161] 99.一种抗-人α-突触核蛋白抗体,其特征在于:

[1162] a)所述抗体包含第一抗体重链,所述第一抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域、重链恒定区、肽接头和scFab或scFv抗体片段,其与人转铁蛋白受体特异性结合,其中

[1163] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式,

[1164] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[1165] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[1166] iv)所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C或氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[1167] b)所述抗体包含第二抗体重链,所述第二抗体重链在N-到C-端方向上包含重链可变结构域和重链恒定区,其中

[1168] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:26的兔可变结构域的人源化形式,

[1169] ii)所述恒定区是人IgG1恒定区,其中C-端赖氨酸残基可以存在或不存在,

[1170] iii)所述恒定区包含氨基酸变化L234A,L235A和P329G,并且

[1171] iv)如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,则所述恒定区包含氨基酸变化T366W和S354C,或者,如果第一抗体重链包含氨基酸变化T366W和S354C,则所述恒定区包含氨基酸变化T366S,L368A,Y407V和Y349C,

[1172] c)所述抗体包含两条抗体轻链,每条轻链包含一个轻链可变结构域和一个轻链恒定结构域,其中

[1173] i)所述可变结构域是SEQ ID NO:27的兔可变结构域的人源化形式,

[1174] ii)所述恒定区是人κ轻链恒定区或人λ轻链恒定区。

[1175] 100.根据第94-99项中任一项所述的抗体,其中所述特异性结合人转铁蛋白受体的抗体片段包含的重链可变结构域是SEQ ID NO:56的重链可变结构域的人源化形式,包含的轻链可变结构域是SEQ ID NO:57的轻链可变结构域的人源化形式。

[1176] 101.根据第64-100项中任一项所述的抗体,其中所述抗体

[1177] i)抑制人神经元和神经胶质细胞中α-突触核蛋白诱导的细胞毒性,和/或

[1178] ii)抑制寡聚体人α-突触核蛋白在神经元和神经胶质细胞之间的细胞-到-细胞的传递,和/或

[1179] iii)减少人神经元细胞中α-突触核蛋白-诱导的胱天蛋白酶活性,和/或

[1180] iv)特异性结合具有游离的N-端甲硫氨酸残基的α-突触核蛋白,并且不特异性结合具有修饰的N-端甲硫氨酸残基的α-突触核蛋白。

[1181] V.实施例

[1182] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应该理解,给定上文提供的总述,可以实施多种其他实施方案。

[1183] 方法和材料

[1184] 重组DNA技术

[1185] 如在Sambrook,J.等,Molecular cloning:A laboratory manual(分子克隆:实验室手册);Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989中所述,使用标准方法来操作DNA。按照供应商的使用说明使用分子生物学试剂。

[1186] 基因和寡核苷酸合成

[1187] 在Geneart GmbH(Regensburg,德国)通过化学合成制备需要的基因区段。将合成的基因片段克隆到大肠杆菌(E.coli)质粒汇总用于增殖/扩增。通过DNA测序验证亚克隆的基因片段的DNA序列。备选地,通过退火化学合成的寡核苷酸或通过PCR组装短的合成的DNA片段。由metabion GmbH(Planegg-Martinsried,德国)制备各种寡核苷酸。

[1188] 试剂

[1189] 如果没有另外阐明,则按照供应商使用流程所提供的使用所有的商购化学剂、抗体和试剂盒。

[1190] 细胞克隆

[1191] 抗体0017=ASYN-233HC_110-IV=aSyn.S019.006A08

[1192] 抗体0018=ASYN-064HC_110-II=aSyn.S003.006A11

[1193] 抗体0081=ASYN-235HC_110-IV=aSyn.S019.005A08

[1194] 抗体0070＝抗体0017+血脑屏障穿梭模块

[1195] 抗体0076＝抗体0018+血脑屏障穿梭模块

[1196] 实施例1

[1197] 抗原的制备

[1198] 材料

[1199] 蛋白:-冻干的人野生型α-突触核蛋白(100μg,200μg,或500μg等分试样);

[1200] -人突变体TPα-突触核蛋白(8.2mg/ml,在50mM HEPES/100mM NaCl中透析)

[1201] 缓冲液和溶液(室温保存,并且避免直接的阳光暴露):

[1202] -PB储液(5x):250mM磷酸缓冲液,pH 7.0(0.22μm过滤的)

[1203] -EtOH储液:无水乙醇分析用等级(pro analysis grade)(EMSURE)(Merck;Cat.No.1.00989.1000)

[1204] -HPLC级别的水(LiChrosolv,Merck)

[1205] -50mM HEPES/100mM NaCl,pH 7.4(0.22μm过滤的)

[1206] -TBS(50mM Tris/100mM NaCl)pH 7.0(0.22μm过滤的)

[1207] -BioPORTER蛋白递送试剂(Genlantis,Cat.No.BP502424)

[1208] A1-寡聚物的制备

[1209] 关于参考文献,参见Danzer,K.M.,等,J.Neurosci.27(2007)9220-9232,和Danzer,K.M.,等,J.Neurochem.111(2009)192-203。

[1210] 将冻干的α-突触核蛋白溶解在HPLC水中,以获得约70μMα-突触核蛋白的溶液(100μl/100μg蛋白)。将溶液在水浴超声仪中用管浮动装置超声30秒。然后,加入500μl HPLC级别的水,200μl 250mM PB pH 7.0,200μl分析用等级的无水乙醇。将混合物以全速振荡10秒。然后,产生在50mM PB pH 7.0/20％乙醇中的100μg/mlα-突触核蛋白溶液。关于参比样品,在不存在α-突触核蛋白的条件下,混合相同的缓冲液。将溶液在室温在章动器上摇动4小时。摇动后,将溶液在干冰上冷冻,以立即冻干。冻干在室温以恒定旋转(例如,在Speedvac中)进行过夜。将冻干物重悬在0.5ml具有10％乙醇的50mM PB pH 7.0中。在具有开放的盖子的通风橱(Eppendorf Thermomixer 5436,速度5)中,将乙醇在20-21℃蒸发24小时。然后,将盖子关闭,并且继续在室温摇动6天。将A1-寡聚物用Vivaspin 500(30kD截留值)浓缩至1mg/ml,并且汇总用于免疫。对于长期的存储,将寡聚物保存在-80℃。通过SDS-PAGE和EM进行正确的寡聚物形成的质量控制。

[1211] C1-寡聚物的制备

[1212] 关于参考文献,参见Danzer,K.M.,等,J.Neurosci.27(2007)9220-9232,和Danzer,K.M.,等,J.Neurochem.111(2009)192-203。

[1213] 将冻干的α-突触核蛋白溶解在HPLC级别的水中,以获得浓度约为70μM的溶液(100μl/100μg蛋白)。将溶液在水浴超声仪中用管浮动装置超声30秒。然后,加入500μl HPLC级别的水,200μl 250mM PB pH 7.0,200μl分析用等级的无水乙醇。将混合物以全速振荡10秒。然后,产生在50mM PB pH 7.0/20％乙醇中的100μg/mlα-突触核蛋白溶液。关于对照样品,在不存在α-突触核蛋白的条件下,混合相同的缓冲液。将溶液在室温在章动器上摇动16小时(例如,过夜)。将C1-寡聚物用Vivaspin500(30kD截留值)浓缩至1mg/ml,并且汇总用于免疫。对于长期的存储,将寡聚物保存在-80℃。通过SDS-PAGE和EM进行正确的寡聚物形成

的质量控制。

[1214] TP突变体α-突触核蛋白寡聚物的制备

[1215] 改编自Karpinar,D.P.,等,EMBO J.28(2009)3256-3268。

[1216] 将100μl在50mM HEPES/100mM NaCl pH 7.4中的8.2mg/ml(约590mM)TPα-突触核蛋白等分试样在37℃用2x 5mm微磁性搅拌子搅拌(200rpm)6天。通过SDS-PAGE和EM进行正确的寡聚物形成的质量控制。

[1217] α-突触核蛋白原纤维形成和与BioPORTER混合

[1218] 改编自Luk,K.C.,等,Biochem.46(2007)12522-12526,和Luk,K.C.,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106(2009)20051-20056。

[1219] 将冻干的和抽真空的α-突触核蛋白等分试样(从-80℃)取出到室温(RT)10-15分钟,不打开抽真空的袋子。同时,将轨道管式混合器预热至37℃。然后,将包含管的袋子打开,并且,如果需要,清除管外侧的水滴。将100μg冻干的α-突触核蛋白溶解在100μl TBS pH 7中。将管放到轨道管式混合器中,并且在37℃/1000rpm温育96小时。然后,将管在室温全速(20,000g)离心10分钟。去除90μl上清。将沉淀物用90μl新鲜的TBS重悬(假设浓度约为1mg/ml)。通过SDS-PAGE和EM进行正确的原纤维形成的质量控制。关于长期存储,将样品保存在-80℃。

[1220] 在免疫前立即将100μl 1mg/ml充分悬浮的原纤维加入到20μl BioPORTER试剂干燥薄膜上,通过通过振荡和水浴超声彻底混合。在用于免疫前,将溶液在室温温育10分钟。

[1221] 实施例2

[1222] 兔的免疫

[1223] 将三只新西兰白兔用α-突触核蛋白C1寡聚物、α-突触核蛋白原纤维和α-突触核蛋白TP突变体寡聚物(第一次免疫,每种成分400μg;连续的免疫每种成分200μg;制备参见实施例1)的混合物免疫。动物通过在第0天皮内使用接受用完全弗氏佐剂乳化的免疫原,并且在第7,14,35,63和91天通过交替的肌内和皮下使用接受免疫原。在第21,41,69和97天采集血液(估测的总血液体积的10%)。制备血清,其用于通过ELISA进行滴度确定(见下文)。分离外周单核细胞,将其用作B细胞克隆过程中的抗原特异性的B细胞的来源(实施例3和4)。

[1224] 确定血清滴度

[1225] 对于免疫原混合物中的每种成分分别确定滴度。将α-突触核蛋白C1寡聚物,α-突触核蛋白原纤维,或α-突触核蛋白TP突变体寡聚物以在PBS(磷酸缓冲的盐溶液)中0.6μg/ml、100μl/孔固定在96-孔NUNC Maxisorb平板上,然后:用在PBS中的2%CroteinC 200μl/孔封闭平板;使用在PBS中0.5%CroteinC中的抗血清连续稀释液,一式两份,100μl/孔;用在PBS中0.5%CroteinC中1:16,000稀释的HRP-缀合的(辣根过氧化物酶-缀合的)驴抗-兔IgG抗体(Jackson Immunoresearch)100μl/孔检测。对于所有步骤,将平板在37℃温育一小时。在所有步骤之间,将平板用在PBS中的0.05%吐温20洗涤三次。通过加入可溶性BM Blue POD底物(Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国)100μl/孔显现信号,并且通过加入1M HCl,100μl/孔终止。在450nm读取吸光度,针对690nm的吸光度作为参比。滴度定义为导致一半最大信号的抗血清的稀释。

[1226] 实施例3

[1227] 分离产生抗-人α-突触核蛋白抗体的B细胞

[1228] 分离兔外周血单核细胞(PBMC)

[1229] 使用三只兔子(如实施例2所述)作为血液来源。在使用lympholyte哺乳动物(Cedarlane Laboratories,Burlington,Ontario,加拿大)按照供应商的详细说明进行密度离心之前,将含有EDTA的全血用1x PBS(磷酸缓冲的盐水;PAA,Pasching,奥地利)稀释两倍。PBMCs用1x PBS洗涤两次。

[1230] EL-4B5培养基

[1231] RPMI 1640(Pan Biotech,Aidenbach,德国),补充有10%FCS(Hyclone,Logan,UT,USA),2mM谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素溶液(PAA,Pasching,奥地利),2mM丙酮酸钠,10mM HEPES(PAN Biotech,Aidenbach,德国)和0.05mMβ-巯基乙醇(Gibco,Paisley,苏格兰)。

[1232] 消耗巨噬细胞/单核细胞

[1233] 使用无菌的6孔平板(细胞培养级别)通过非特异性粘附消耗巨噬细胞和单核细胞。每孔最多装4ml培养基和多至$6x10^6$个来自免疫的兔的PBMCs,并且允许在培养箱中在37℃结合1小时。将上清中的细胞(外周血淋巴细胞(PBLs))用于抗原淘选步骤。

[1234] 包被平板

[1235] 在4℃,将无菌的细胞培养6孔平板用在碳酸缓冲液(0.1M碳酸氢钠,34mM碳酸氢二钠(disodium hydrogen carbonate),pH 9.55)中的两种不同的人α-突触核蛋白寡聚物的混合物(1μg/ml C1寡聚物和1μg/ml TP突变体寡聚物)包被过夜。在使用之前,将平板在无菌PBS中洗涤三次。

[1236] 在人α-突触核蛋白寡聚物上富集B细胞

[1237] 将用人α-突触核蛋白寡聚物包被的6孔组织培养板接种多至$6x10^6$个PBLs/4ml培养基,并且允许在培养箱中在37℃结合1小时。在α-突触核蛋白寡聚物上的富集步骤后,通过用1x PBS仔细洗涤孔1-2次而去除未粘附的细胞。通过在培养箱中在37℃用胰蛋白酶处理10分钟,使余下的粘性细胞解离。用EL-4B5培养基终止胰蛋白酶化。将细胞保存在冰上,直到免疫荧光染色时。

[1238] 免疫荧光染色和流式细胞术

[1239] 使用抗-IgG抗体FITC缀合物(AbD Serotec,Düsseldorf,德国)进行单一细胞分选。对于表面染色,用在PBS中的抗-IgG抗体FITC缀合物温育来自消耗和富集步骤的细胞,并且在4℃在暗处温育45分钟。染色后,将PBMCs用冰冷的PBS洗涤两次。最后,将PBMCs重悬在冰冷的PBS中,并且立即进行FACS分析。在FACS分析之前,加入浓度为5μg/ml的碘化丙啶(BD Pharmingen,San Diego,CA,USA),以区分死细胞和活细胞。

[1240] 使用装配了计算机和FACSDiva软件的Becton Dickinson FACSAria(BD Biosciences,USA)进行单个细胞分选。

[1241] B细胞培育

[1242] 通过与Zubler等(J.Exp.Med.160(1984)1170-1183)所述相似的方法制备兔B-细胞的培育物。简言之,将单个分选的兔B-细胞在具有200μl/孔包含Pansorbin细胞(1:100000)(Calbiochem(Merck),Darmstadt,德国)、5%兔胸腺细胞上清(charge 20100908,内部制备)和γ-辐照的鼠EL-4-B5胸腺瘤细胞(2.5×10^4/孔)的EL-4 B5培养基的96孔平板中在37℃、5%CO_2温育7天。取出B细胞培育的上清用于筛选。平行地,将剩余细胞的mRNA立即保存在100μl RLT缓冲液(Qiagen,Hilden,德国)中,并且将裂解物冷冻在-80℃。

[1243] 实施例4

[1244] 确定编码抗体可变结构域的核酸

[1245] PCR扩增V结构域和测序

[1246] 使用NucleoSpin 8/96RNA试剂盒(Macherey&Nagel;Cat-No.740709.4,740698)按照供应商的流程制备总RNA。所有的步骤在epMotion5075液体操作系统(Eppendorf)上进行。将RNA用60μl不含RNA酶的水稀释。使用6μl RNA用Superscript III第一链合成超级混合物(Invitrogen;Cat-No.18080-400)和寡dT-引物按照供应商的使用说明通过反转录酶反应产生cDNA。使用4μl cDNA扩增免疫球蛋白重链和轻链可变区(VH和VL),使用AccuPrime超级混合物(Invitrogen;Cat-No.12344-040),以50μl的终体积,用针对重链的引物rbHCfinal.up(AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGC TGCGCTGGCTTC;SEQ ID NO:42)和rbHCfinal.do(CCATTGGTG AGGGTGCCCGAG;SEQ ID NO:43)和针对轻链的引物rbLCfinal.up(AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC;SEQ ID NO:44)和rbLCfinal.do(CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC;SEQ ID NO:45)扩增。PCR条件如下:94℃热启动5分钟;35个循环:94℃ 20秒,70℃20秒,68℃ 45秒,和最后在68℃延伸7分钟。

[1247] 将50μl PCR溶液中的八微升上样到48E-Gel 2%(Invitrogen;Cat-No.G8008-02)上。使用NucleoSpin Extract II试剂盒(Macherey&Nagel;Cat-No.740609250)按照供应商的流程纯化阳性PCR反应,并且稀释在50μl洗脱缓冲液中。使用针对重链的rbHCfinal.up和rbHCfinal.do和针对轻链的rbLCfinal.up和rbLCfinal.do,在两个方向上对12μl纯化的PCR产物直接测序。

[1248] 实施例5

[1249] 兔抗-人α-突触核蛋白抗体的人源化

[1250] 可以按照标准技术,如CDR移接,将兔抗-人α-突触核蛋白抗体人源化。

[1251] 实施例6

[1252] 产生重组表达载体

[1253] a)使用小鼠IgG1恒定区产生用于表达免疫球蛋白重链的载体

[1254] 通过融合编码各自的抗-α-突触核蛋白-特异性抗体VH结构域的DNA片段与编码小鼠IgG1恒定区的序列元件而组装编码小鼠IgG1的融合基因,所述融合基因包含小鼠IgG1恒定区(CH1,铰链,CH2,CH3)和来源于兔的抗-α突触核蛋白-抗体VH结构域。

[1255] 小鼠IgG1恒定区具有下述氨基酸序列:

[1256]

AKTTPPSVYP LAPGSAAQTN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGSLSSGV
HTFPAVLQSD LYTLSSSVTV PSSTWPSETV TCNVAHPASS TKVDKKIVPR
DCGCKPCICT VPEVSSVFIF PPKPKDVLTI TLTPKVTCVV VDISKDDPEV
QFSWFVDDVE VHTAQTQPRE EQFNSTFRSV SELPIMHQDW LNGKEFKCRV
NSAAFPAPIE KTISKTKGRP KAPQVYTIPP PKEQMAKDKV SLTCMITDFF
PEDITVEWQW NGQPAENYKN TQPIMDTDGS YFVYSKLNVQ KSNWEAGNTF
TCSVLHEGLH NHHTEKSLSH SPGK

[1257] (SEQ ID NO:46)。

[1258] 所述表达载体还包含允许该质粒在大肠杆菌中复制的来自载体pUC18的复制起点

和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。

[1259] 抗体重链的转录单位在5'至3'方向上包含下述功能性元件：

[1260] -来自人巨细胞病毒的即时早期增强子和启动子(P-CMV)，包含内含子A，

[1261] -人重链免疫球蛋白5'-不翻译区(5'UTR)，

[1262] -鼠免疫球蛋白重链信号序列，

[1263] -重链可变(VH)结构域编码核酸，

[1264] -小鼠IgG1恒定区编码核酸，和

[1265] -牛生长激素多聚腺苷酸序列(BGH pA)。

[1266] b)使用小鼠Ig-κ恒定区产生用于表达免疫球蛋白轻链的载体

[1267] 通过融合编码各自的抗-α-突触核蛋白-特异性抗体VL(κ)结构域的DNA片段与编码小鼠Ig-κ恒定区的序列元件而组装编码小鼠κ轻链的融合基因，所述融合基因包含小鼠Ig-κ恒定区(CL-κ)和来源于兔的抗-α突触核蛋白-抗体VL(κ)结构域。

[1268] 小鼠Ig-κ恒定区具有下述氨基酸序列：

[1269]

RADAAPTVSI FPPSSEQLTS GGASVVCFLN NFYPKDINVK WKIDGSERQN GVLNSWTDQD SKDSTYSMSS TLTLTKDEYE RHNSYTCEAT HKTSTSPIVK SFNRNEC

[1270] (SEQ ID NO:47)。

[1271] 所述表达载体还包含允许该质粒在大肠杆菌中复制的来自载体pUC18的复制起点和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。

[1272] 抗体κ轻链的转录单位在5'至3'方向上包含下述功能性元件：

[1273] -来自人巨细胞病毒的即时早期增强子和启动子(P-CMV)，包含内含子A，

[1274] -人重链免疫球蛋白5'-不翻译区(5'UTR)，

[1275] -鼠免疫球蛋白重链信号序列，

[1276] -轻链可变(VL)结构域编码核酸，

[1277] -小鼠Ig-κ恒定区编码核酸，和

[1278] -牛生长激素多聚腺苷酸序列(BGH pA)。

[1279] c)使用小鼠Ig-λ恒定区产生用于表达免疫球蛋白轻链的载体

[1280] 通过融合编码各自的抗-α-突触核蛋白-特异性抗体VL(λ)结构域的DNA片段与编码小鼠Ig-λ恒定区的序列元件而组装编码小鼠λ轻链的融合基因，所述融合基因包含小鼠Ig-λ恒定区(CL-λ)和来源于兔的抗-α突触核蛋白-抗体VL(λ)结构域。

[1281] 小鼠Ig-λ恒定区具有下述氨基酸序列：

[1282]

GQPKSSPSVT LFPPSSEELE TNKATLVCTI TDFYPGVVTV DWKVDGTPVT QGMETTQPSK QSNNKYMASS YLTLTARAWE RHSSYSCQVT HEGHTVEKSL SRADCS

[1283] (SEQ ID NO:48)。

[1284] 所述表达载体还包含允许该质粒在大肠杆菌中复制的来自载体pUC18的复制起点和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。

[1285] 抗体λ轻链的转录单位在5'至3'方向上包含下述功能性元件：

[1286] -来自人巨细胞病毒的即时早期增强子和启动子(P-CMV)，包含内含子A，

[1287] -人重链免疫球蛋白5'-不翻译区(5'UTR)，

[1288] -鼠免疫球蛋白重链信号序列，

[1289] -可变轻链(VL)结构域编码核酸，

[1290] -小鼠Ig-λ恒定区编码核酸，和

[1291] -牛生长激素多聚腺苷酸序列(BGH pA)。

[1292] d)产生用于表达与血脑屏障穿梭模块缀合的免疫球蛋白链的载体

[1293] 在编码IgG重链构建体的表达载体的情形中，分子的IgG部分处在基因组构造中，即，在信号肽中、在VH与CH1结构域之间、在CH1结构域与铰链区之间、在铰链区与CH2结构域之间、和在CH2与CH3结构域之间存在内含子。向其(C-端/在3'端)融合编码脑穿梭模块的cDNA元件。为了产生每个完整的抗体分子仅携带一个脑穿梭模块的抗体分子，使用“凸起-进入-孔洞”技术。

[1294] 孔洞-重链包含下述突变：T366W。

[1295] 凸起重链包含下述突变：T366S/L368A/Y407V。

[1296] 任选地，可以在孔洞-重链的残基354与凸起-重链的残基349之间引入人工二硫键。另外需要的突变是在孔洞-重链中的S354C和在凸起重链中的Y349C。

[1297] 在编码Ig轻链构建体的表达载体的情形中，该分子的Ig-κ或Ig-λ部分处于基因组构造中，即，在信号肽中和在VL与CL结构域之间存在内含子。

[1298] 除了包含待表达的需要的基因的表达单位/表达盒之外，基本/标准的哺乳动物报道质粒还包含：

[1299] i)使用具有“孔洞”突变的人IgG1恒定区产生用于表达包含穿梭模块的免疫球蛋白重链的载体

[1300] 通过融合编码各自的抗-α-突触核蛋白-特异性抗体VH结构域的DNA片段与编码包含“孔洞”突变的人IgG1恒定区的序列元件而组装编码人IgG1的融合基因，所述融合基因包含人IgG1恒定区(CH1，铰链，CH2，CH3)和来源于兔的抗-α突触核蛋白-抗体VH结构域。该构建体处于基因组构造中，即，在信号肽中、在VH与CH1结构域之间、在CH1结构域与铰链区之间、在铰链区与CH2结构域之间、和在CH2与CH3结构域之间存在内含子。

[1301] 人IgG1恒定区具有下述氨基酸序列：

[1302]

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[1303] (SEQ ID NO:49)。

[1304] 人Ig1孔洞恒定区具有下述氨基酸序列：

[1305]

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLWC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[1306] (SEQ ID NO:50)。

[1307] 所述表达载体还包含允许该质粒在大肠杆菌中复制的来自载体pUC18的复制起点和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。

[1308] 孔洞-抗体重链的转录单位在5'至3'方向上包含下述功能性元件：

[1309] -来自人巨细胞病毒的即时早期增强子和启动子(P-CMV)，

[1310] -人重链免疫球蛋白5'-不翻译区(5'UTR)，

[1311] -鼠免疫球蛋白重链信号序列，

[1312] -重链可变(VH)结构域编码核酸，

[1313] -具有"孔洞"突变的人IgG1恒定区的编码核酸，

[1314] -任选地，编码GS-接头的核酸，其与编码血脑屏障穿梭模块的核酸融合，和

[1315] -牛生长激素多聚腺苷酸序列(BGH pA)。

[1316] ii)使用具有"凸起"突变的人IgG1恒定区产生用于表达包含穿梭模块的免疫球蛋白重链的载体

[1317] 通过融合编码各自的抗-α-突触核蛋白-特异性抗体VH结构域的DNA片段与编码包含"凸起"突变的人IgG1恒定区的序列元件而组装编码人IgG1的融合基因，所述融合基因包含人IgG1恒定区(CH1，铰链，CH2，CH3)和来源于兔的抗-α突触核蛋白-抗体VH结构域。该构建体处于基因组构造中，即，在信号肽中、在VH与CH1结构域之间、在CH1结构域与铰链区之间、在铰链区与CH2结构域之间、和在CH2与CH3结构域之间存在内含子。

[1318] 人Ig1凸起恒定区具有下述氨基酸序列：

[1319]

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLSC
AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[1320] (SEQ ID NO:51)。

[1321] 所述表达载体还包含允许该质粒在大肠杆菌中复制的来自载体pUC18的复制起点

和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。

[1322] 凸起-抗体重链的转录单位在5'至3'方向上包含下述功能性元件：

[1323] -来自人巨细胞病毒的即时早期增强子和启动子(P-CMV)，

[1324] -人重链免疫球蛋白5'-不翻译区(5'UTR)，

[1325] -鼠免疫球蛋白重链信号序列，

[1326] -重链可变(VH)结构域编码核酸，

[1327] -具有"凸起"突变的人IgG1恒定区的编码核酸，

[1328] -任选地，编码GS-接头的核酸，其与编码血脑屏障穿梭模块的核酸融合，和

[1329] -牛生长激素多聚腺苷酸序列(BGH pA)。

[1330] iii)使用人Ig-κ恒定区产生用于表达免疫球蛋白κ轻链的载体

[1331] 通过融合编码各自的抗-α-突触核蛋白-特异性抗体VL(κ)结构域的DNA片段与编码人Ig-κ恒定区的序列元件而组装编码人κ轻链的融合基因，所述融合基因包含人Ig-κ恒定区(CL-κ)和来源于兔的抗-α突触核蛋白-抗体VL(κ)结构域。该构建体处于基因组构造中，即，在信号肽中和在VL(κ)与CL-κ结构域之间存在内含子。

[1332] 所述表达载体还包含允许该质粒在大肠杆菌中复制的来自载体pUC18的复制起点和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。

[1333] 抗体κ轻链的转录单位在5'至3'方向上包含下述功能性元件：

[1334] -来自人巨细胞病毒的即时早期增强子和启动子(P-CMV)

[1335] -人重链免疫球蛋白5'-不翻译区(5'UTR)，

[1336] -鼠免疫球蛋白重链信号序列，

[1337] -轻链可变(VL)结构域编码核酸，

[1338] -人IgGκ恒定区，

[1339] -任选地，编码GS-接头的核酸，其与编码血脑屏障穿梭模块的核酸融合，和

[1340] -牛生长激素多聚腺苷酸序列(BGH pA)。

[1341] iv)使用人Ig-λ恒定区产生用于表达免疫球蛋白λ轻链的载体

[1342] 通过融合编码各自的抗-α-突触核蛋白-特异性抗体VL(λ)结构域的DNA片段与编码人Ig-λ恒定区的序列元件而组装编码人Ig-λ轻链的融合基因，所述融合基因包含人Ig-λ恒定区(CL-λ)和来源于兔的抗-α突触核蛋白-抗体VL(λ)结构域。该构建体处于基因组构造中，即，在信号肽中和在VL(λ)与CL-λ结构域之间存在内含子。

[1343] 所述表达载体还包含允许该质粒在大肠杆菌中复制的来自载体pUC18的复制起点和在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因。

[1344] 抗体λ轻链的转录单位在5'至3'方向上包含下述功能性元件：

[1345] -来自人巨细胞病毒的即时早期增强子和启动子(P-CMV)

[1346] -人重链免疫球蛋白5'-不翻译区(5'UTR)，

[1347] -鼠免疫球蛋白重链信号序列，

[1348] -轻链可变(VL)结构域编码核酸，

[1349] -人IgGλ恒定区，

[1350] -任选地，编码GS-接头的核酸，其与编码血脑屏障穿梭模块的核酸融合，和

[1351] -牛生长激素多聚腺苷酸序列(BGH pA)。

[1352] 实施例7

[1353] 抗-人α-突触核蛋白抗体的重组产生

[1354] 抗体在培养在F17培养基(Invitrogen Corp.)中的瞬时转染的HEK293细胞(人胚肾细胞系293-来源的)中产生。为了转染实施例6所述的各种载体,使用"不含293"的转染试剂(Novagen)。抗体和抗体-血脑屏障穿梭-融合体由单个表达质粒表达。转染按照供应商的使用说明指示进行。转染后三至七天收集包含重组抗体的细胞培养物上清。上清保存在降低的温度(例如,-80℃),直到进行纯化时。

[1355] 关于在例如HEK293细胞中重组表达人免疫球蛋白的通用信息提供在Meissner,P.等,Biotechnol.Bioeng.75(2001)197-203中。

[1356] 实施例8

[1357] 重组抗-人α-突触核蛋白抗体的纯化

[1358] 将包含抗体的培养物上清过滤,并且通过两个层析步骤纯化。

[1359] 将所述抗体使用用PBS(1mM KH_2PO_4,10mM Na_2HPO_4,137mM NaCl,2.7mM KCl),pH 7.4平衡的HiTrap MabSelectSuRe(GE Healthcare)通过亲和层析捕获。通过用平衡缓冲液洗涤而去除未结合的蛋白,并且用25mM柠檬缓冲液,pH 3.1回收抗体,洗脱后立即用1M Tris-碱,pH 9.0将其调整为pH 6.0。

[1360] 使用在Superdex 200™(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤。大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液,0.14M NaCl,pH 6.0中进行。将包含抗体的溶液用装配有Biomax-SK膜(Millipore,Billerica,MA,USA)的Ultrafree-CL离心滤器浓缩,并且保存在-80℃。

[1361] 表:每升培养物上清的平均产量

[1362]

抗体	每升培养物上清的平均产量
0017	10mg
0018	9.2mg
0070	6.1mg
0076	7.3mg
0081	15mg
12F4-穿梭	14.3mg

[1363] 实施例9

[1364] 使用表面等离子体共振表征结合特异性

[1365] 在所有所述的方法中使用BIAcore 2000,3000或T200仪器(GE Healthcare,BIAcore,Uppsala,瑞典)。所有的固定步骤和结合测定都在25℃进行。分别以5或30μl min^{-1}进行固定和结合测定(如果没有专门提及的话)。

[1366] a)表征单体α-突触核蛋白与固定的单克隆抗体的结合

[1367] 缓冲液:固定缓冲液:

[1368] 10mM Hepes,150mM NaCl,0.05%聚山梨酯20(P20),pH 7.5

[1369] 捕获和结合缓冲液:

[1370] 10mM Hepes,pH 7.5,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%P20

[1371] 纯化的单体α-突触核蛋白-6His与捕获抗体上的固定的单克隆抗体的结合测定

[1372] i)固定山羊抗-小鼠免疫球蛋白IgG(捕获抗体)

[1373] 山羊抗-小鼠免疫球蛋白IgG(小鼠抗体捕获试剂盒;Cat-No.BR-1008-38;GE Healthcare,Uppsala,瑞典)的固定在包含10m M Hepes,150m M NaCl,0.05%P20,pH 7.5的缓冲液中进行。在第一步中,通过使传感器表面与0.2M N-乙基-N-二甲基氨基聚碳二亚胺(EDC)和0.05M N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的融合接合处七分钟,而将CM5传感器芯片表面的羧基基团转化成反应性琥珀酰亚胺酯。活化后,使传感器表面与在10mM醋酸钠缓冲液(pH 5.0)中的30μg/ml的山羊抗-小鼠IgG接触3分钟。IgG固定值约3000RUs(反应单位)的水平。最后,用乙醇胺(1M,pH8.5,7min.)淬灭表面上过量的活化的羧基基团。

[1374] ii)抗-α突触核蛋白抗体的捕获

[1375] 单克隆抗-α突触核蛋白抗体(在运行缓冲液中的100nM溶液)捕获在固定的IgG抗体上,直到达到200-250RUs的捕获的抗体量。传感器芯片的一个通道使用固定的山羊抗-小鼠抗体作为参比通道。

[1376] iii)单体α-突触核蛋白与N-端六组氨酸标签的结合实验

[1377] 在含有10mM Hepes,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%P20,pH7.5的缓冲液中进行结合实验。在捕获的单克隆抗-α突触核蛋白-抗体表面上将纯化的单体α-突触核蛋白-6His滴定至334nM(5个点,稀释因子为2)。每次纯化的单体α-突触核蛋白-6His滴定后,用10mM甘氨酸-HCl溶液(pH 1.7)的短脉冲将α-突触核蛋白与单克隆抗-α突触核蛋白-抗体的复合物从芯片上去除。然后将新的单克隆抗-α突触核蛋白抗体捕获在芯片表面上。

[1378] b)与通过His-标签固定在NTA(次氮基三乙酸)上的单体α-突触核蛋白结合的单克隆抗-α突触核蛋白-抗体的表征

[1379] 缓冲液:固定缓冲液:

[1380] 10mM Hepes,150mM NaCl,0.05%P20,pH 7.5

[1381] 结合缓冲液:

[1382] 10mM Hepes,pH 7.5,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%P20

[1383] i)将纯化的单体α-突触核蛋白固定在NTA传感器表面上

[1384] 在包含10mM Hepes,150mM NaCl,0.05%P20,pH 7.5的运行缓冲液中进行单体α-突触核蛋白-6His(N-端)在NTA(次氮基三乙酸)传感器表面上的固定。向将NTA传感器表面用0.35M EDTA以5μl/min的流速洗涤三次,每次1分钟。然后,通过将芯片表面与在运行缓冲液中的500μM $NiCl_2$接触1分钟而将传感器表面负载Ni^{2+}-离子,并且另外用0.2M EDC和0.05M NHS溶液活化7分钟。此外,将在运行缓冲液中的6His标记的α-突触核蛋白(<0.1μg/ml)与传感器表面接触,以获得低密度表面(多至5RUs),该表面允许进一步检测单克隆抗-α突触核蛋白-抗体与α-突触核蛋白的单价结合。最后,将剩余的活性酯基团用1M Tris,pH7.5灭活5分钟。将没有固定的α-突触核蛋白的流动通道用作参比通道。

[1385] ii)使用具有固定的α-突触核蛋白的单克隆抗体的结合测定

[1386] 结合测定在包含10mM Hepes,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%P20,pH 7.5的缓冲液中进行。以100nM的浓度分析单克隆抗-α突触核蛋白-抗体的Yes/No结合反应,或者在运行缓冲液中以多至100nM的浓度滴定(单次注射5个浓度,稀释因子为2),以评估针对单体α-突触核蛋白的结合动力学和亲和力。监测每一浓度的每种抗-α突触核蛋白-抗体的结合曲线

后，用两次100m磷酸(2x 1min.)的短脉冲洗去结合的抗体而再生α-突触核蛋白表面，并且允许检测另一种抗体结合。

[1387] c)表征与固定在L1传感器上DOPC:DOPS脂质体上的单体α-突触核蛋白结合的单克隆抗-α突触核蛋白-抗体

[1388] 缓冲液:固定和结合缓冲液：

[1389] 50mM Hepes,150mM NaCl,pH 7.5

[1390] i)制备DOPC:DOPS脂质体

[1391] 在真空罩下，在玻璃烧瓶中用氩气流挥发25mg/ml(7:3(w/w))在氯仿中的脂质DOPC:DOPS(1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱:1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸)的混合物，以获得在烧瓶壁上的脂质薄膜。将脂质薄膜在Hepes缓冲液(50mM Hepes，150mM NaCl,pH 7.5)中水合，以获得5mM缓冲脂质溶液。用Mini-Extruder(Avanti Polar Lipids,Alabaster,USA)通过将脂质溶液经过100nm挤出器-滤器15次而挤出脂质溶液。从而获得脂质体溶液。脂质体的质量和尺寸通过动态光散射证实。

[1392] ii)将纯化的单体α-突触核蛋白固定在DOPC:DOPS脂质体上

[1393] 将α-突触核蛋白-6His(N-端标签)固定在DOPC:DOPS脂质体上在包含50mM Hepes，150mM NaCl,pH 7.5的缓冲液中进行。先用20mM Chaps溶液将L1传感器表面的所有流动通道洗涤1分钟，以获得稳定的基线。将通过挤出获得的DOPC:DOPS脂质体在运行缓冲液中稀释5倍，并且负载到所有流动通道的传感器表面上，以获得约3000RUs的固定水平。下一步骤中，用0.1mg/ml的BSA(牛血清白蛋白)溶液封闭所有的流动通道，以减少传感器表面上/与传感器表面非特异性结合的α-突触核蛋白。将α-突触核蛋白在运行缓冲液中稀释至5.0μg/ml的浓度，并且在所选的流动通道上以低密度(＜30RUs)固定在脂质体上，这允许检测与α-突触核蛋白的单价抗体结合。使用具有固定的脂质体而没有α-突触核蛋白的流动通道作为参比通道。

[1394] iii)单克隆抗体与DOPC:DOPS脂质体上固定的α-突触核蛋白的结合测定在结合测定中，每种抗体以100nM的单一浓度分析Yes/No结合反应，或者以多至100nM的浓度(5个点，稀释因子为2)在活性或参比通道上在运行缓冲液中滴定，以评估针对α-突触核蛋白的结合动力学和亲和力。监测抗体结合后，用20mM Chaps使传感器表面再生1分钟，并且用运行缓冲液平衡，以用于下一次脂质体固定。

[1395] d)表征与α-突触核蛋白预形成的-原纤维(PFF)结合的单克隆抗-α突触核蛋白-抗体

[1396] 缓冲液:固定缓冲液：

[1397] 10mM Hepes,150mM NaCl,0.05％P20,pH 7.5

[1398] 结合缓冲液：

[1399] 10mM Hepes,pH 7.5,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05％P20

[1400] i)将α-突触核蛋白预形成的-原纤维固定在NTA传感器表面上

[1401] 在NTA传感器上，在包含10mM Hepes,150mM NaCl,0.05％P20,pH 7.5的运行缓冲液中进行α-突触核蛋白PFF(以1:10的比率包含N-末端6His-标签标记的α-突触核蛋白和未标记的α-突触核蛋白)的His-标签固定。先用0.35M EDTA溶液以5μl/min的流速洗涤NTA传感器表面1分钟。然后，通过使表面与运行缓冲液中的500μM $NiCl_2$溶液接触1分钟，而将传

感器表面负载Ni^{2+}-离子，并且另外用0.2M EDC和0.05M NHS溶液活化7分钟。使稀释在运行缓冲液中的α-突触核蛋白PFF溶液与传感器表面接触，以在传感器表面上获得不同的原纤维密度(约20RUs，约200Rus和约2000RUs)。用1M Tris，pH 7.5进行活性酯其余游离基团的灭活5分钟。使用没有固定α-突触核蛋白原纤维的一个流动通道作为参比通道。

[1402] ii)单克隆抗体与固定的PFF的结合测定

[1403] 在所有四个通道上平行进行的浓度多至100nM(5个点，稀释因子为2)的滴定实验中监测每种抗-α-突触核蛋白-抗体的结合。监测每种抗体的结合曲线后，用100mM磷酸的短脉冲(2x 1min.)洗掉结合的抗体而使α-突触核蛋白PFF表面再生。

[1404] 结果：

[1405] 下表显示用上文所述的SPR确定的不同的本文报道的α-突触核蛋白-抗体以及与血脑屏障穿梭模块的融合物和某些参比抗体的结合。

[1406] 表：抗-α-突触核蛋白抗体与不同α-突触核蛋白形式的结合。

[1407]

抗体	与单体α-突触核蛋白的结合		与脂质体中α-突触核蛋白的结合	与α-突触核蛋白预形成的原纤维的结合
	固定的抗体	固定的突触核蛋白		
0017	是	是	是	是
0018	否	否	否	是
0070	未检测的	是	未检测的	是
0076	未检测的	否	未检测的	是
0081	未检测的	否	未检测的	是
sc211(参比)	是	是	是	是
12F4 (参比)	否	否	否	是
12F4- 穿 梭 (参比)	未检测的	是	未检测的	是
4B12(参比)	是	是	是	是
syn1 (参比)	是	是	是	是

[1408] -抗体0070是抗体0017与抗-转铁蛋白受体-抗体8D3的scFv的血脑屏障穿梭融合物；

[1409] -抗体0076是抗体0018与抗-转铁蛋白受体-抗体8D3的scFv的血脑屏障穿梭融合物。

[1410] 实施例10

[1411] 免疫组织化学分析和细胞毒性测定

[1412] PD脑切片的免疫组织化学分析

[1413] 将人帕金森病患者脑的低温切片(10μm)用5.0μg/ml抗体0017、抗体0018或抗体0057(鼠Fc)的一级IgG染色，并用5.0μg/ml兔抗-α-突触核蛋白抗体(Cell Signaling；Cat.No.2628S)复染。

[1414] 作为二级抗体，使用Alexa Fluor 488缀合的山羊抗-小鼠IgG抗体(H+L)(Invitrogen,Cat.No.A11001)和Alexa Fluor 594缀合的山羊抗-兔IgG抗体(H+L)(高度交叉吸附的,Invitrogen,Cat.No.A11037)。

[1415] 样本在LEICA共聚焦显微镜(SP5x)上用63x透镜1.2NA，1.6x放大镜，Pinhole@1.0AU成像。

[1416] Alexa 488@497nm(10％WLL)激发；发射@505-571nm(98％HyD)。

[1417] Alexa 594@590nm(8％WLL)激发；发射@596-680nm(92％HyD)。图像是5次线平均的平均。

[1418] 结果见图12。

[1419] 用于治疗性抗体对α突触核蛋白介导的毒性的保护的人神经元细胞(LUHMES)功能性细胞模型

[1420] 如下文详细所述，将LUHMES细胞在384孔平板中分化5天。接种后24小时，将来自在LUHMES分化培养基中生长的SHSY5Y细胞的条件细胞培养物上清以1:1稀释加入到平板中，以诱导外染色体介导的α-突触核蛋白毒性。对照培养接受LUHMES分化培养基。以10μg/ml的终浓度加入要检测的抗体连同条件SHSY5Y培养基。再过4天后，通过CellTiterGlo测定(Promega,Cat.No.REF G7571)确定细胞存活力。存活力值表示为CPS计数。

[1421] 细胞培养方法

[1422] 包被，培养基和添加剂：

[1423] -聚-L-鸟氨酸：Sigma-Aldrich,Cat.No.P-3655-100mg

[1424] -纤连蛋白(溶液)：Sigma-Aldrich,Cat.No.F-1141-5mg

[1425] -高级DMEM/F-12：Gibco/Invitrogen,Cat.No.12634-010

[1426] -N-2：Gibco/Invitrogen,Cat.No.17502048或PAA F005-004

[1427] -L-谷氨酰胺：Sigma-Aldrich,Cat.No.G7513

[1428] -FGF：R&D Systems,Cat.No.4114-TC(1mg)

[1429] -GDNF：R&D Systems,Cat.No.212-GD(50μg)

[1430] -四环素：Sigma-Aldrich,Cat.No.T-7660

[1431] -cAMP：Sigma-Aldrich,Cat.No.D0627

[1432] LUHMES培养和分化：

[1433] 包被(所有的平板和烧瓶都必须是Nunclon)：

[1434]

包被	5ml	7ml	10ml	14ml	20ml
Milli Q H_2O	4.75ml	6.65ml	9.5ml	13.3ml	19ml
PLO(1mg/ml)	250μl	350μl	500μl	700μl	1000μl
纤连蛋白(1mg/ml)	5μl	7μl	10μl	14μl	20l

[1435] 在平板和烧瓶中装满包被溶液(T75烧瓶：7ml；T175烧瓶：14ml；96-孔平板：50μl/

孔，24-孔平板：250μl/孔，12孔平板：500μl/孔，6孔平板：1ml/孔）。将平板和烧瓶在37℃温育至少3小时（或过夜）。温育后，将包被溶液吸出。烧瓶用Milli Q水洗涤两次。使用前，将平板和烧瓶在层流工作台上晾干。

[1436] 增殖培养基：

[1437]

增殖培养基	10ml	20ml	30ml	40ml	50ml
高级DMEM/F12	9.8ml	19.6ml	29.4ml	39.2ml	49ml
L-Gln(200mM)	100μl	200μl	300μl	400μl	500μl
N2(100x)	100μl	200μl	300μl	400μl	500μl
FGF(160μg/ml)	2.5μl	5μl	7.5μl	10μl	12.5μl

[1438] 分化培养基：

[1439]

分化培养基	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
高级 DMEM/F12	9.7 ml	19.4 ml	29.1 ml	38.8 ml	48.5 ml
L-Gln (200 mM)	100 μl	200 μl	300 μl	400 μl	500 μl
N2 (100x)	100 μl	200 μl	300 μl	400 μl	500 μl

[1440]

cAMP (100 mM)	100 μl	200 μl	300 μl	400 μl	500 μl
四环素(1 mg/ml)	10 μl	20 μl	30 μl	40 μl	50 μl
GDNF (20 μg/ml)	1 μl	2 μl	3 μl	4 μl	5 μl

[1441] 传代培养：

[1442] 当其达到80％汇合时，将在75cm^{2}烧瓶中增殖培养基中培育的细胞分开。首先，将细胞用10ml PBS洗涤两次。然后，加入4ml ATV-胰蛋白酶（之前混合2ml 2x ATV-胰蛋白酶储液与2ml PBS）。将细胞在37℃温育3分钟。当细胞解离后，加入21ml不含添加剂的高级DMEM/F12培养基。将细胞混悬液在50ml Falcon管中以300x g离心5分钟。去除上清，并且将细胞重悬在5ml不含添加剂的高级DMEM/F12培养基中。在Neubauer-室中计数细胞。

[1443] 为了传代培养，将细胞在2、3或4天后分开。如果目的是两天，则将2*10^{6}个细胞（1:5分开）接种到75cm^{2}烧瓶中。对于3天的培养，1*10^{6}个细胞（1:10分开）足够，并且对于四天的培养，500,000个细胞（1:20分开）足够。将细胞接种在包含10ml增殖培养基的75cm^{2}烧瓶中。

[1444] 预分化：

[1445] LUHMES细胞的预分化发生在175cm^{2}烧瓶中。因此，将6*10^{6}个细胞接种在20ml增殖培养基中。24小时贴壁和增殖后，更换培养基。将增殖培养基更换为分化培养基。再过48小时后，完成预分化。

[1446] 将细胞接种在多孔平板中。因此，吸出培养基。用10ml PBS洗涤细胞两次。然后，加入8ml ATV-胰蛋白酶（之前混合4ml 2x ATV-胰蛋白酶储液与4ml PBS）。将细胞在37℃温育3-5分钟。加入42ml不含添加剂的高级DMEM/F12。将细胞混悬液在50ml Falcon管中以300x g离心5分钟。去除上清，并且将细胞重悬在10ml分化培养基中。在Neubauer-室中计数细胞。

[1447] 分化：

[1448] 进一步的分化在包被的细胞培养板中进行。

[1449]

细胞培养板	6 孔	12 孔	24 孔	48 孔	96 孔
生长面积[cm^2]	9.6	3.5	1.9	1.1	0.33
培养基体积	2 ml	1 ml	500 µl	300 µl	100 µl
每孔细胞数 [*1000]	1000	500	200-250	100-150	30-50

[1450] 细胞用分化培养基稀释，并且适当体积的分化培养基接种到细胞培养板中。再过72小时后，完成分化。结果参见图7和9。

[1451] 实施例11

[1452] 热稳定性

[1453] 使用Sypro Orange作为报道荧光团，通过热转移测定确定单克隆抗-α-突触核蛋白抗体(2µM)的变性点(解链温度，T_m)。

[1454] 将解链转换用Boltzmann S形方程拟合，并且半最大信号幅度的拐点定义为解链温度T_m，此时一半的抗体变性(图10)。确定T_m-值在60℃与75℃之间。

[1455] 表：所选的抗-α-突触核蛋白抗体的解链温度(T_m)

[1456]

	T_m [°C]		
mAb	His-缓冲液	DPBS	TBS
0017	69.7	73.6	73.0
0018	69.2	71.9	71.8
0057	63.9	66.6	65.7

[1457] 实施例12

[1458] 表位绘图

[1459] 在由JPT Peptide Technologies(JPT肽技术)提供的定制的PepStar™肽微阵列上进行表位绘图。肽序列具有15个氨基酸残基的长度，并且设计其覆盖人α-突触核蛋白的完整序列(UniProt登记号：P37840)。邻近的肽具有11个氨基酸的重叠序列。另外的肽包含具有已知的疾病相关的α-突触核蛋白突变的位点(A30P，A53T，E57K)的序列和评估针对啮齿动物α-突触核蛋白的交叉反应性的序列。此外，点样12种肽/蛋白，其作为一级和二级抗体的反应性和特异性的对照。蛋白如下：牛血清白蛋白，人IgG，兔IgG，小鼠IgG，人tau蛋白，人α-突触核蛋白，人β-突触核蛋白，人γ-突触核蛋白，人IgM，小鼠IgM，磷酸-酪氨酸肽，人α-三脯氨酸突变的-突触核蛋白(A30P，A56P，A76P)。

[1460] 按照供应商的使用说明进行表位绘图。

[1461] 表：根据肽绘图，选择的抗-α-突触核蛋白-抗体的数据。

[1462]

抗体	表位
0017	aa97-111: KDQL**GKNEEGAPQEG** aa101-15: **GKNEEGAPQEG**ILED 线性表位，没有预测的物种和同种型交叉反应性
0018	没有检测到的肽，检测 TP 突触核蛋白
12F4 (参比抗体)	没有检测到的肽，检测 TP 突触核蛋白
syn211 (参比抗体)	aa113-127: LEDM**PVDPDNEAYEM** aa117-:131 **PVDPDNEAYEM**PSEE 检测 TP 突触核蛋白

[1463] 实施例13

[1464] 通过抗-α突触核蛋白抗体-血脑屏障穿梭模块缀合物灵敏体内标记α-突触核蛋白病理学

[1465] 研究设计

[1466] 将三组15月龄的Thy1-(A30P)α-突触核蛋白转基因小鼠(Kahle小鼠;n＝3只/组)和野生型对照(n＝1只/组)注射三种不同的抗-α突触核蛋白-抗体-血脑屏障穿梭模块缀合物：

[1467] -抗体0070-＞抗体0017-scFab8D3缀合物

[1468] -抗体0076-＞抗体0018-scFab8D3缀合物

[1469] -参比-＞12F4-scFab8D3缀合物

[1470] 包括一只转基因小鼠和一只野生型小鼠作为未注射的对照。研究共包括14只小鼠。

[1471] 脑组织中结合的mAb-脑穿梭物的染色/检测

[1472] 在20μm低温脑切片(每只小鼠4个;丙酮固定,用NGS封闭)上用AF555-标记的抗-huIgG-抗体检测脑中的靶标占据。进行共染色:血管(抗-足萼蛋白,AF647);DAPI。

[1473] 结果

[1474] 脑干的实质:从大的神经炎/α-突触核蛋白积聚的结构到与突触染色相似的弥散性斑点染色的变化。

[1475] 神经炎病理学(＝该小鼠模型中的主要病理学特征)局限在脑干,并且在小鼠与小鼠之间高度可变。

[1476] 完整的脑以及在非转基因小鼠中:主要是斑点染色,与突触染色相似。

[1477] 见图11。

[1478] 实施例14

[1479] CelluSpots™合成和表位绘图

[1480] 使用Intavis CelluSpots™技术制备用于抗体0018的肽分析的肽阵列。在该方法中,用自动合成仪(Intavis MultiPep RS)在修饰的纤维素盘上合成肽,合成后所述纤维素盘溶解。然后,将保持与大分子纤维素共价连接的单个肽的溶液点样到包被的显微镜载玻片上。在384孔合成板的氨基修饰的纤维素盘上,使用9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)化学逐步进行CelluSpots™合成。在每个偶联循环中,用在DMF中的DIC/HOBt溶液活化相对应的氨基酸。在偶联步骤之间,用乙酸酐、二异丙基乙基胺和1-羟基苯并三唑的混合物封端未反应的(即,游离的)氨基基团。合成结束时,将纤维素盘转移到96孔平板中,并且用三氟乙酸(TFA)、二氯甲烷、三异丙基硅烷(TIS)和水的混合物处理,用于侧链去保护。去除切割溶液后,将纤维素结合的肽用TFA、TFMSA(三氟乙烷磺酸)、TIS和水的混合物溶解,用二异丙醚沉淀,并重悬在DMSO中。然后,用Intavis载玻片点样机器人将这些肽溶液点样到Intavis CelluSpots™载玻片上。

[1481] 对于表位分析,将制备的载玻片用乙醇洗涤,然后用TBS(TRIS-缓冲的盐溶液;50mM Tris,137mM NaCl,2.7mM KCl,pH 8)洗涤,然后在4℃,用5mL 10x Western封闭试剂(Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,Germany),2.5g在TBS中的蔗糖,0.1%吐温-20进行封闭步骤16小时。用TBS-T(TBS+0.1%吐温-20)洗涤后,将载玻片用在包含0.1%吐温-20的TBS中的抗体0018溶液(1μg/mL)在室温温育2小时。洗涤后,温育载玻片,以用缀合到辣根过氧化物酶(HRP)上的抗-小鼠或抗-兔二级抗体(在TBS-T中1:20000)检测,然后用DAB(3,3′-二氨基联苯胺)底物/过氧化物缓冲液(Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国)温育。定量ELISA-阳性的点,并且通过分配相应的肽序列而鉴定抗体结合表位。

[1482] 尽管出于清楚理解的目的已经通过举例说明和实例的方式在某些细节上描述了前述发明,但是所述描述和实例不应该解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完全清楚地结合在本文中。

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司

<120> 抗-α-突触核蛋白抗体及使用方法

<130> Case P31869

<150> EP13193892.0
<151> 2013-11-21

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人α-突触核蛋白片段

<400> 1

Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly
1 5 10

[0001]

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1

<400> 2

Tyr Ala Met Ile
1

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2

<400> 3

Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3

<400> 4

Arg Asp Gly Thr Asp Lys Thr Phe Asn Ile
1 5 10

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL1

<400> 5

Asn Val Tyr Gly Asp Asn
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL2

<400> 6

Glu Ala Ser Lys Leu Ala
1 5

[0002]

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 7

Gly Glu Phe Leu Cys Thr Thr Ser Asp Cys
1 5 10

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1

<400> 8

Ser Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 9
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2

<400> 9

Val Ile Tyr Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL1

<400> 10

Gln Ala Ser Gln Asn Val Tyr Gly Asp Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL2

[0003]

<400> 11

Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 12

Gln Gly Glu Phe Leu Cys Thr Thr Ser Asp Cys Phe Thr
1 5 10

<210> 13
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变结构域

<400> 13

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

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

Val Ile Tyr Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp
85 90 95

Gly Thr Asp Lys Thr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Leu
115

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
[0004] <213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域

<400> 14

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

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Tyr Gly Asp Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
50 55 60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Glu Phe Leu Cys Thr
85 90 95

Thr Ser Asp Cys Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gly Val Val Val Arg

100 105 110

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1

<400> 15

Arg Tyr Ala
1

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2

<400> 16

Asn Ser Ser Gly Ala
1 5

[0005]

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3

<400> 17

Trp Thr Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Gln Gly Phe Asn Ile
1 5 10

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL1

<400> 18

Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asp Leu Ala
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL2

<400> 19

Arg Ala Ser Lys Leu Ala
1 5

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 20

Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Met Gly Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1

<400> 21

[0006] Arg Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2

<400> 22

Val Ile Asn Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

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

<220>
<223> CDRL1

<400> 23

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 24

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL2

<400> 24

Arg Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 25

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Met Gly Ala
1 5 10

<210> 26
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007]

<220>
<223> 重链可变结构域

<400> 26

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala
20 25 30

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

Val Ile Asn Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Glu Thr Ser Thr Thr Val Glu Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Thr
85 90 95

Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Gln Gly Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
115

<210> 27
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域

<400> 27

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln
65 70 75 80

[0008]

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp
85 90 95

Ala Asp Met Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1

<400> 28

Arg Asp Thr Met Ile
1 5

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2

<400> 29

Ser Ile Tyr Thr Asp Ser Gly Asn Thr Trp
1 5 10

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3

<400> 30

Asn Phe Ser Val
1

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL1

<400> 31

Val Tyr Asn Ser Asp Arg
1 5

[0009]

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL2

<400> 32

Val Ser Lys Leu Ala
1 5

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 33

Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser Ser Ala Glu Cys
1 5 10

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2

<400> 34

Ser Ile Tyr Thr Asp Ser Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL1

<400> 35

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Ser Asp Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010]

<220>
<223> CDRL2

<400> 36

Asp Val Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 37

Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser Ser Ala Glu Cys Asn Val
1 5 10

<210> 38
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变结构域

<400> 38

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asp Thr
20 25 30

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

Ser Ile Tyr Thr Asp Ser Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys
50 55 60

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

Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95

Asn Phe Ser Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
100 105 110

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
[0011] <213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域

<400> 39

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

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Met Arg Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Val Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser
85 90 95

Ser Ala Glu Cys Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 40
<211> 140
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 40

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

[0012] 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> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头肽

<400> 41

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 42
<211> 37

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> rbHCfinal.up

<400> 42
aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc 37

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> rbHCfinal.do

<400> 43
ccattggtga gggtgcccga g 21

<210> 44
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> rbLCfinal.up

<400> 44
[0013] aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc 34

<210> 45
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> rbLCfinal.do

<400> 45
cagagtrctg ctgaggttgt aggtac 26

<210> 46
<211> 324
<212> PRT
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 46

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
100 105 110

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

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

[0014] Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His

305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 47
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 47

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
[0015] 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 48
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 48

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro
35 40 45

Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu
65 70 75 80

Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val
85 90 95

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
100 105

<210> 49
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

[0016]

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

```
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
```

[0017]

```
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 50
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人Ig1孔洞恒定区

<400> 50

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
```

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0018] 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 51
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人Ig1凸起恒定区

<400> 51

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

[0019] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Glu Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

[0020]

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人转铁蛋白受体片段

<400> 52

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

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人转铁蛋白受体片段

<400> 53

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

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人转铁蛋白受体片段

<400> 54

Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 55
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

<210> 56
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

[0021] <400> 56

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 57

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

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

[0022] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID NO: 57的L104V和L106I变体

<400> 58

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

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

[0023]

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

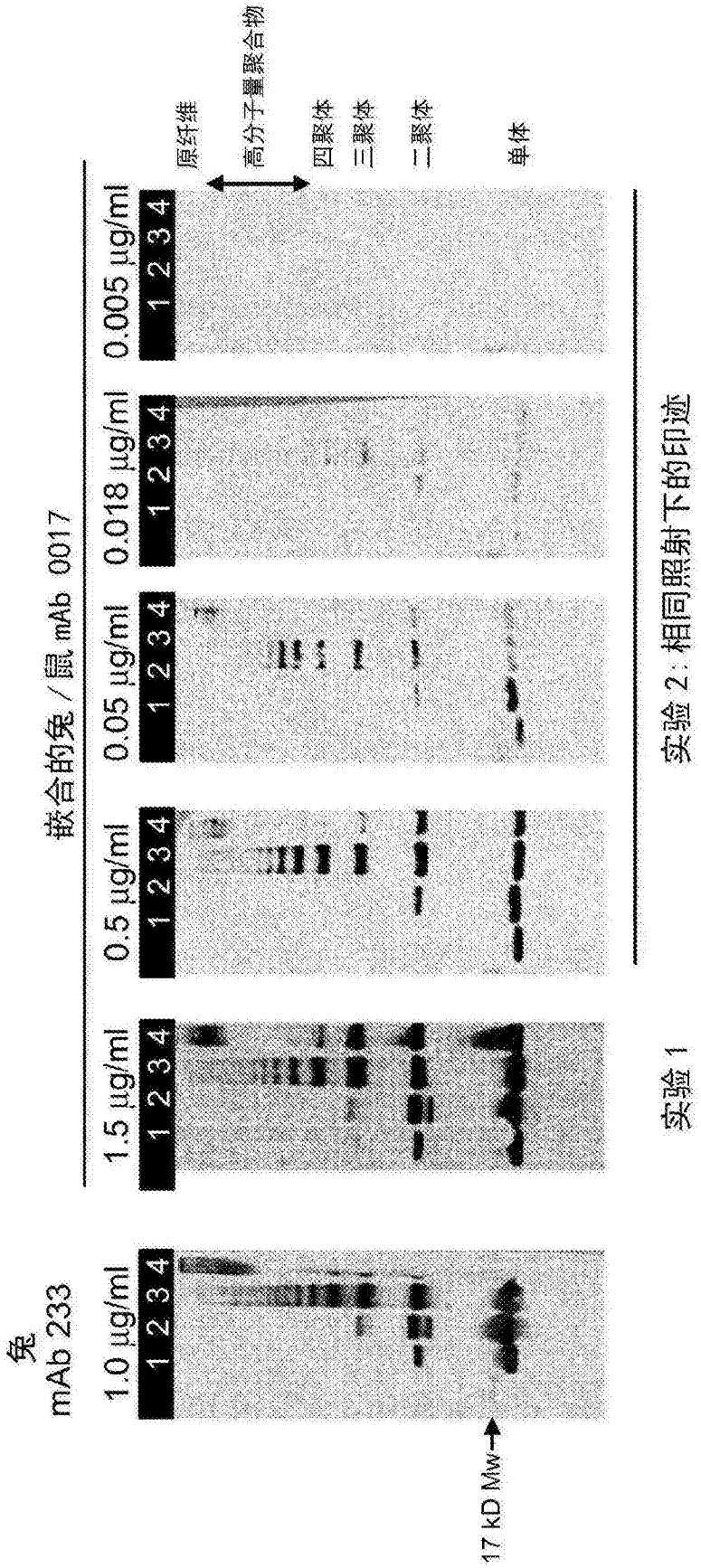

兔
mAb 233
1.0 µg/ml
1 2 3 4
嵌合的兔 / 鼠 mAb 0017
1.5 µg/ml
0.5 µg/ml
0.05 µg/ml
0.018 µg/ml
0.005 µg/ml
原纤维
高分子量聚合物
四聚体
三聚体
二聚体
单体
17 kD Mw
实验 1
实验 2：相同照射下的印迹

图1

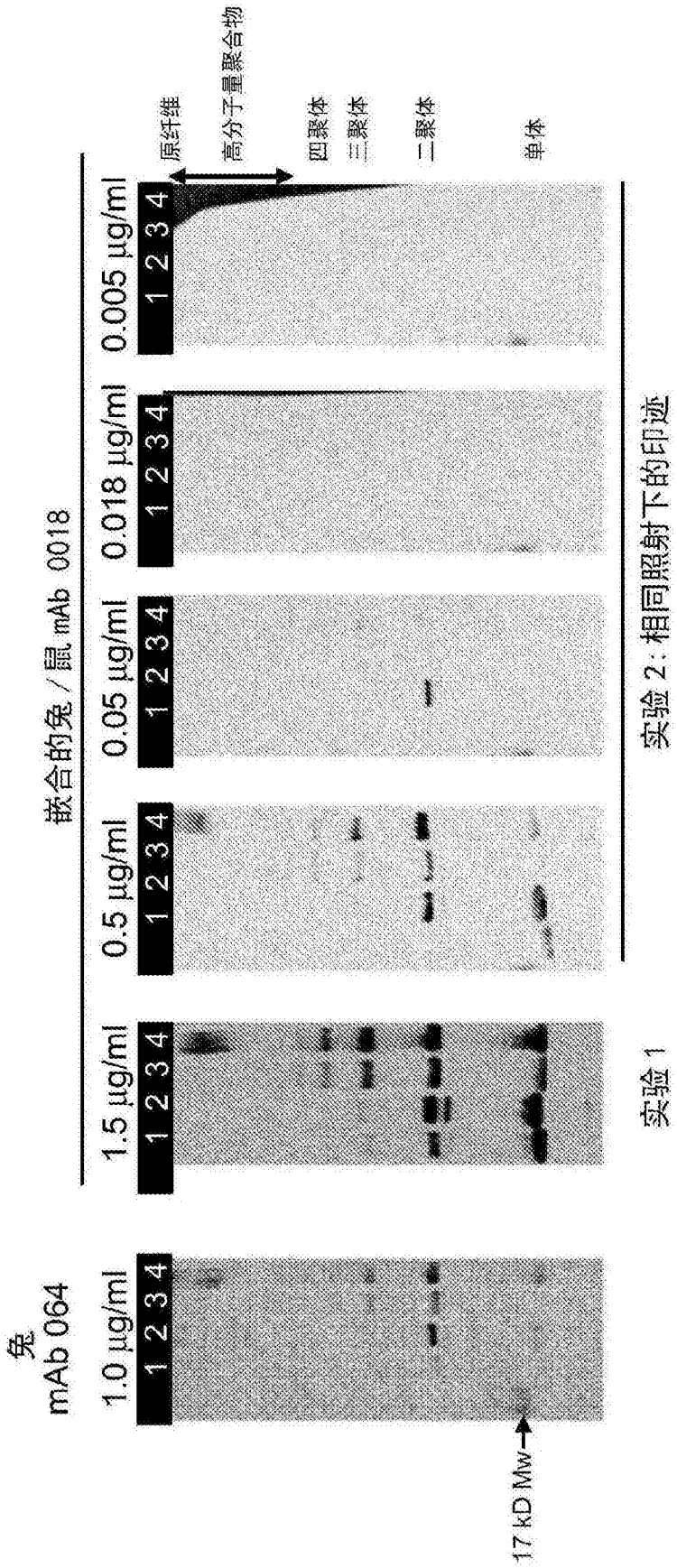

兔
mAb 064
1.0 µg/ml
1 2 3 4
1.5 µg/ml
1 2 3 4
0.5 µg/ml
1 2 3 4
0.05 µg/ml
1 2 3 4
0.018 µg/ml
1 2 3 4
0.005 µg/ml
1 2 3 4
嵌合的兔 / 鼠 mAb 0018
原纤维
高分子量聚合物
四聚体
三聚体
二聚体
单体
17 kD Mw
实验 1
实验 2：相同照射下的印迹

图2

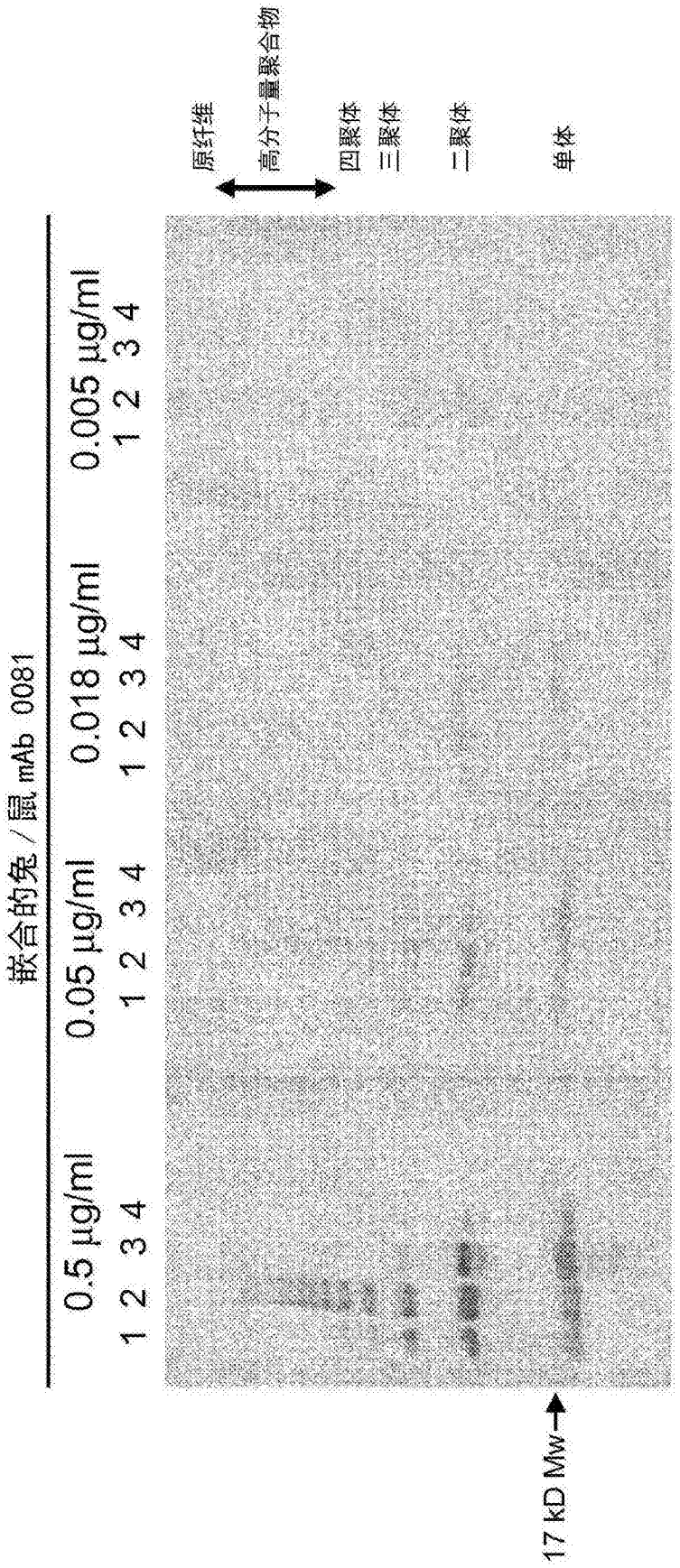

原纤维
高分子量聚合物
四聚体
三聚体
二聚体
单体
嵌合的兔 / 鼠 mAb 0081
0.5 µg/ml
1 2 3 4
0.05 µg/ml
1 2 3 4
0.018 µg/ml
1 2 3 4
0.005 µg/ml
1 2 3 4
17 kD Mw

图3

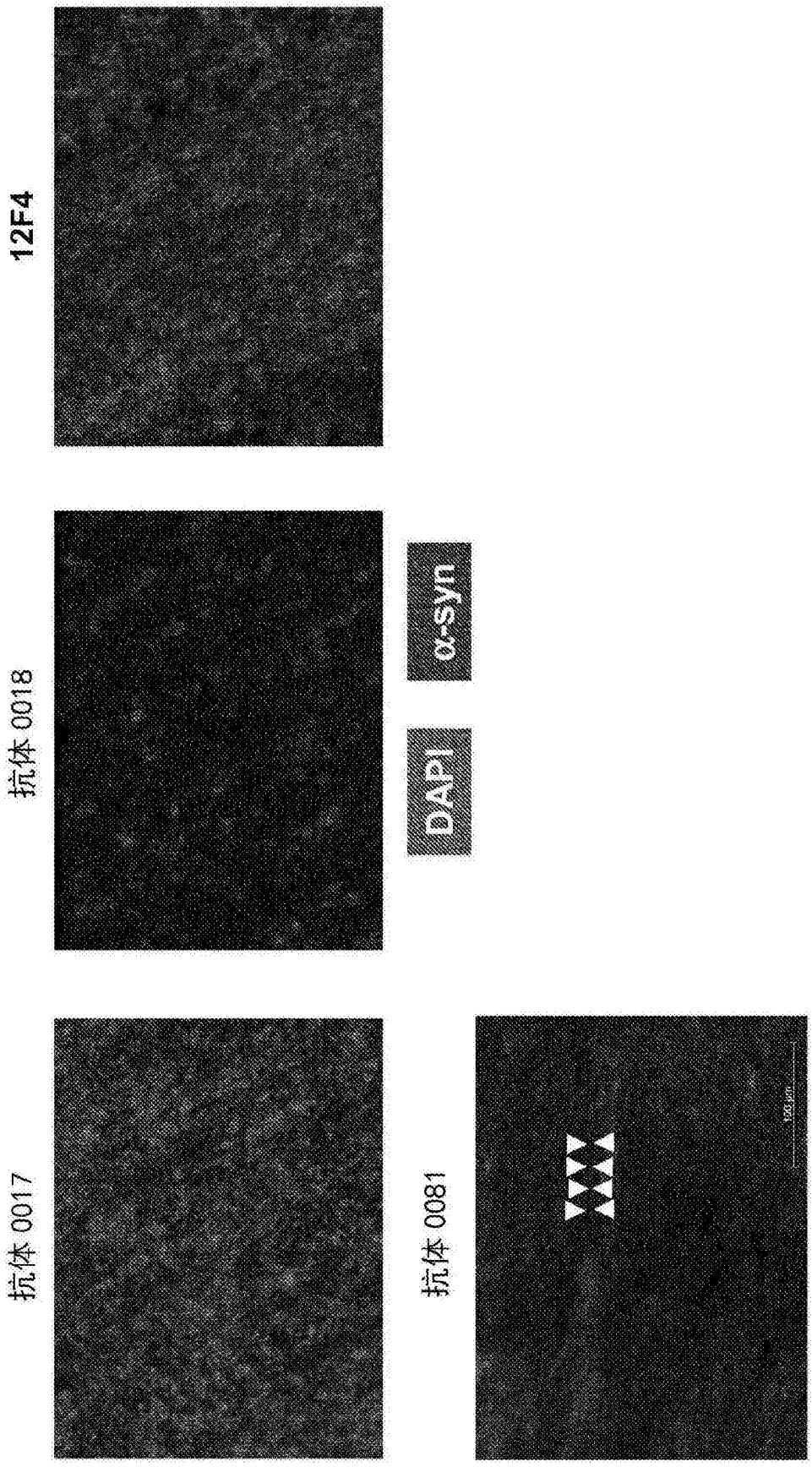


图4

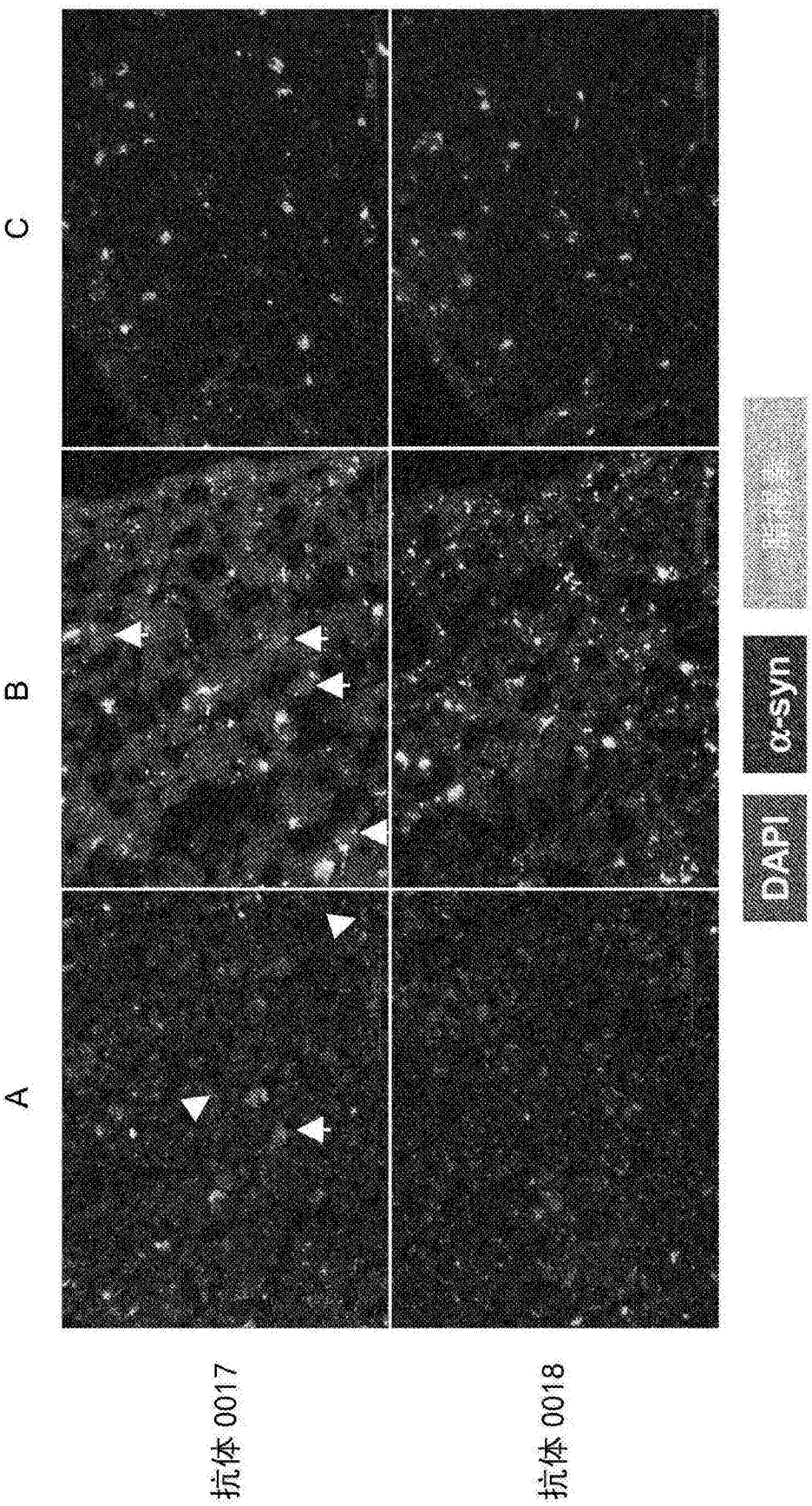


图5

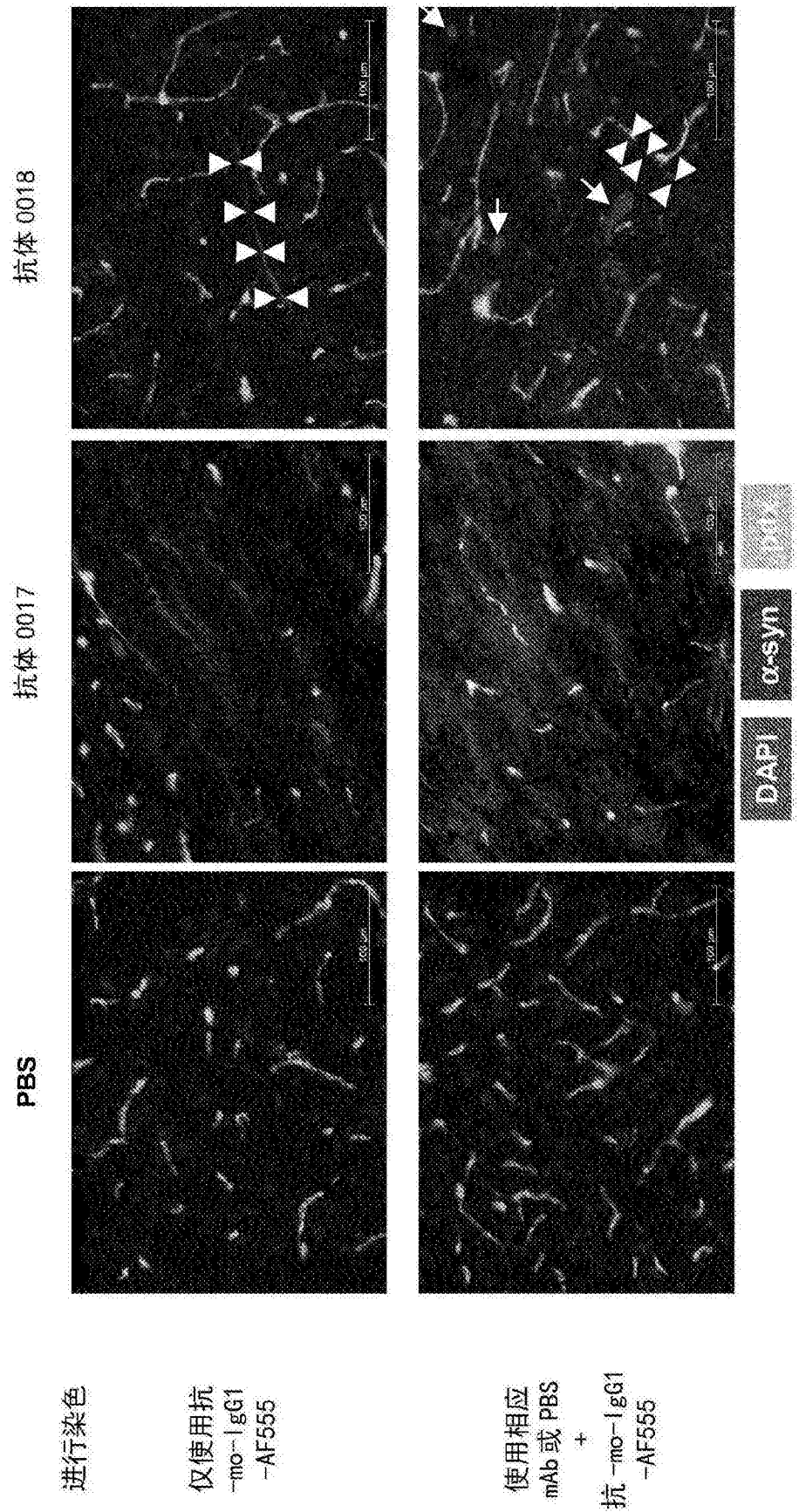

PBS
抗体 0017
抗体 0018
DAPI
α-Syn
DAPI
进行染色
仅使用抗
-mo-IgG1
-AF555
使用相应
mAb 或 PBS
+
抗 -mo-IgG1
-AF555

图6

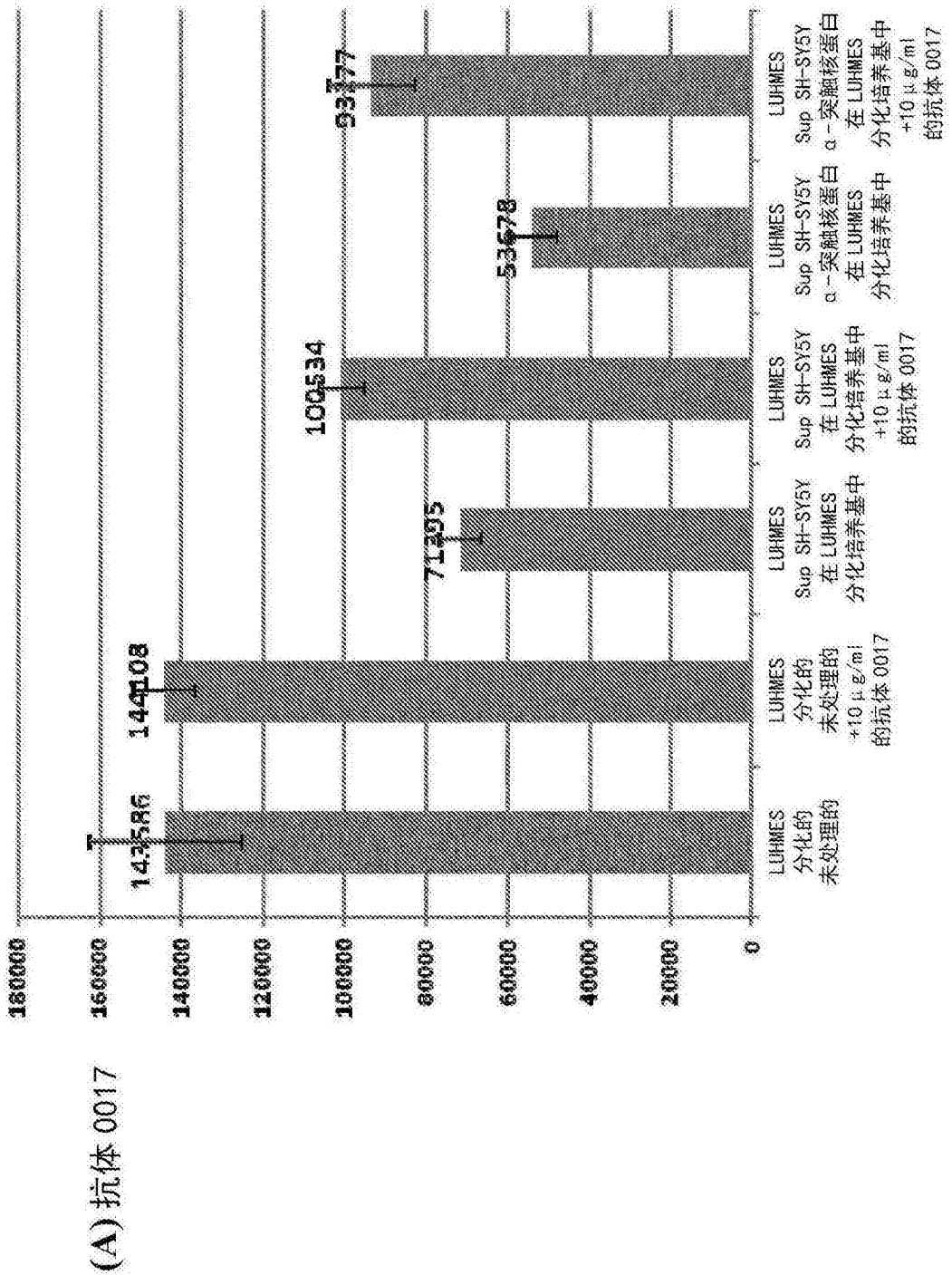
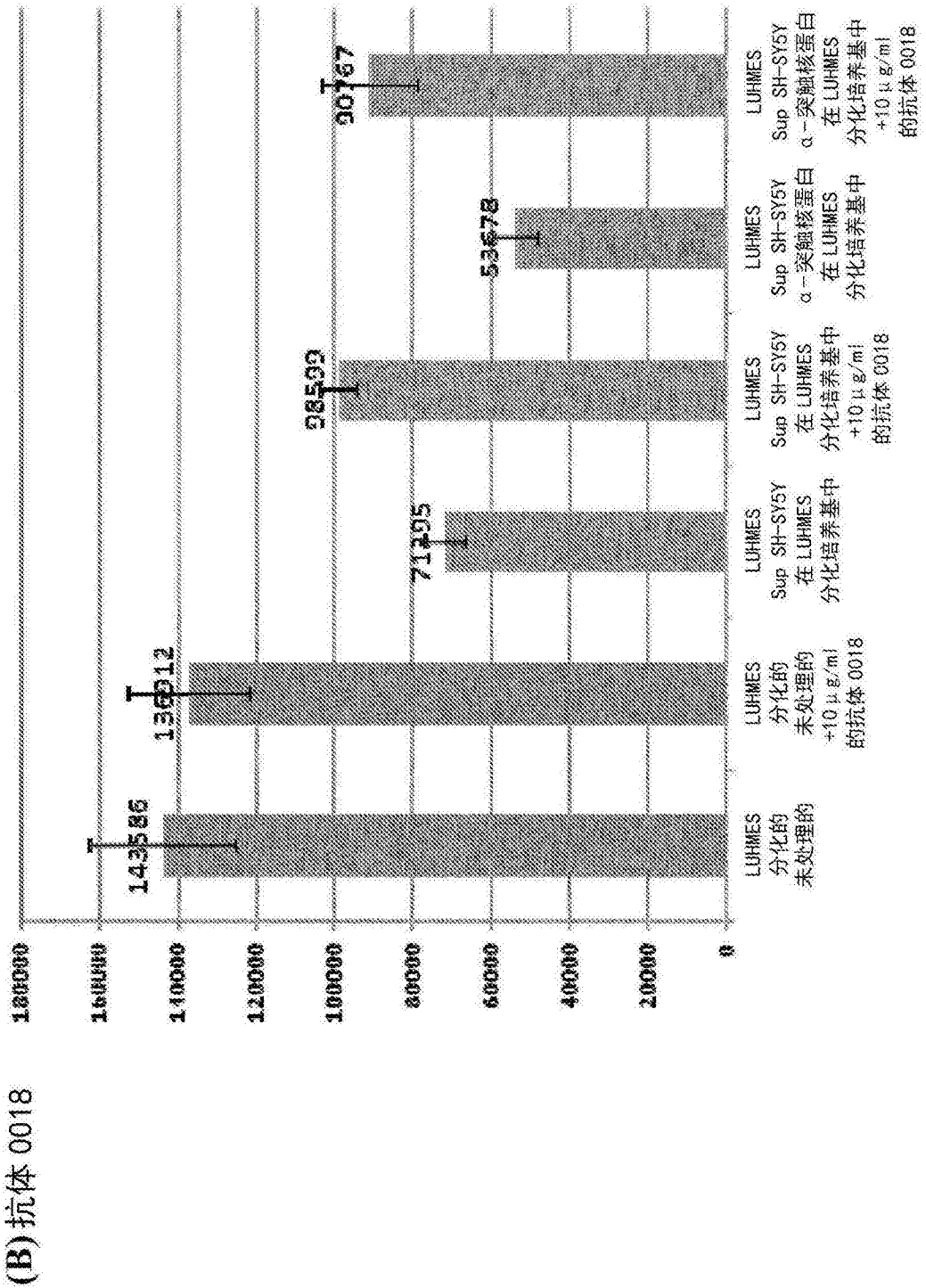
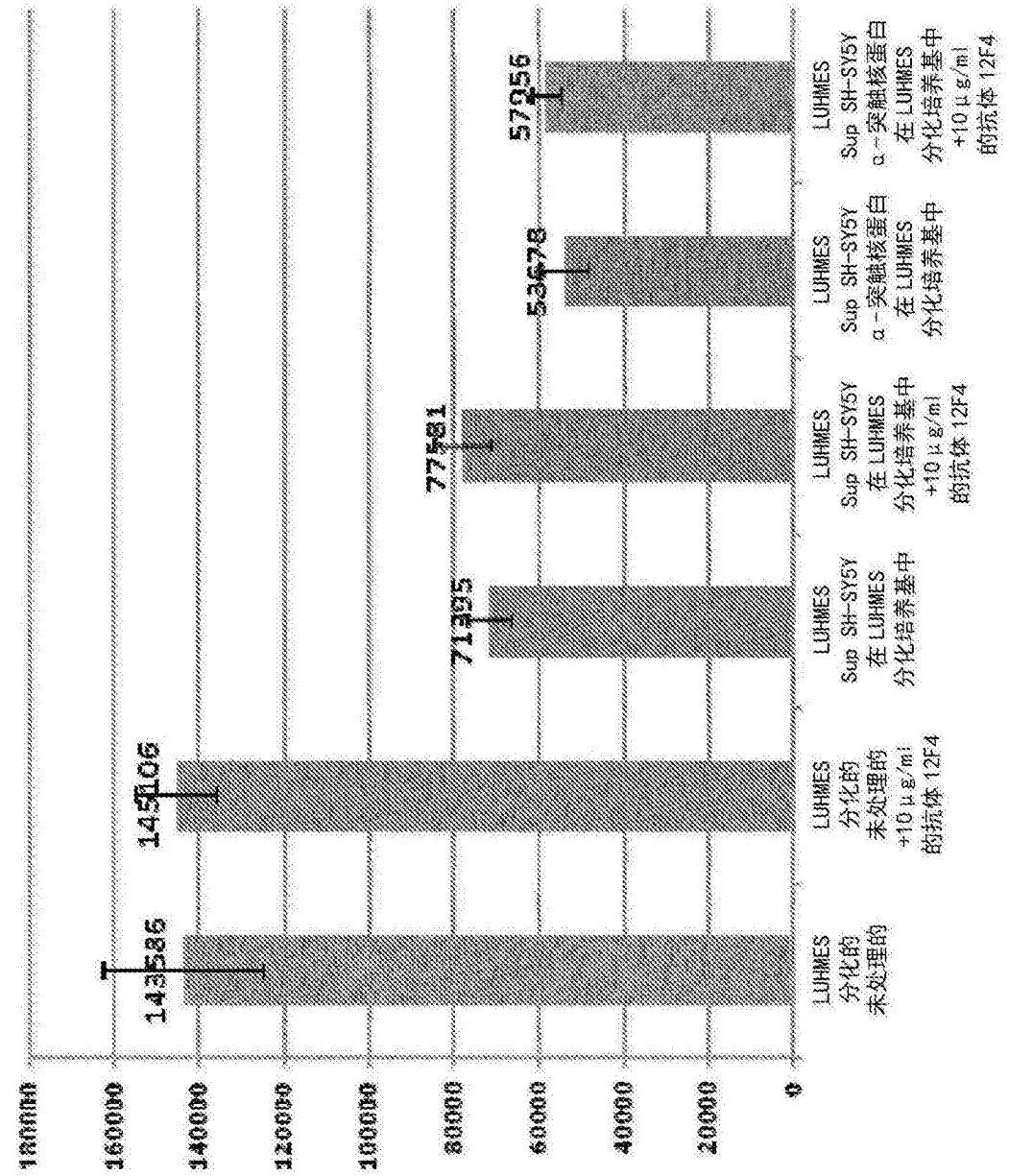
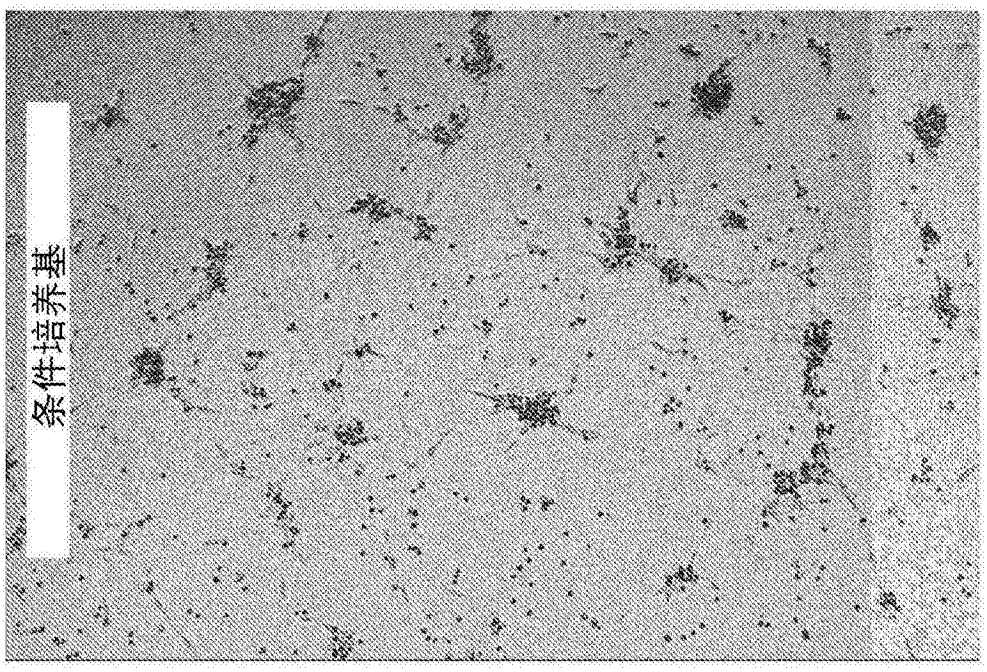

(A) 抗体 0017
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
143586
144108
71205
100534
53678
93777
LUHMES 分化的未处理的
LUHMES 分化的未处理的 +10 μg/ml 的抗体 0017
Sup SH-SY5Y 在 LUHMES 分化培养基中
Sup SH-SY5Y 在 LUHMES 分化培养基中 +10 μg/ml 的抗体 0017
Sup SH-SY5Y α-突触核蛋白在 LUHMES 分化培养基中
Sup SH-SY5Y α-突触核蛋白在 LUHMES 分化培养基中 +10 μg/ml 的抗体 0017

图7


(B) 抗体 0018
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
143586
130312
98532
71295
53678
90767
LUHMES 分化的未处理的
LUHMES 分化的未处理的 +10 μg/ml 的抗体 0018
Sup SH-SY5Y 在 LUHMES 分化培养基中
Sup SH-SY5Y 在 LUHMES 分化培养基中 +10 μg/ml 的抗体 0018
Sup SH-SY5Y α-突触核蛋白在 LUHMES 分化培养基中
Sup SH-SY5Y α-突触核蛋白在 LUHMES 分化培养基中 +10 μg/ml 的抗体 0018


(C) 抗体 12F4
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
143586
145106
71395
77581
53678
57956
LUHMES 分化的未处理的
LUHMES 分化的未处理的 +10 μg/ml 的抗体 12F4
Sup SH-SY5Y 在 LUHMES 分化培养基中
Sup SH-SY5Y 在 LUHMES 分化培养基中 +10 μg/ml 的抗体 12F4
Sup SH-SY5Y α-突触核蛋白在 LUHMES 分化培养基中
Sup SH-SY5Y α-突触核蛋白在 LUHMES 分化培养基中 +10 μg/ml 的抗体 12F4



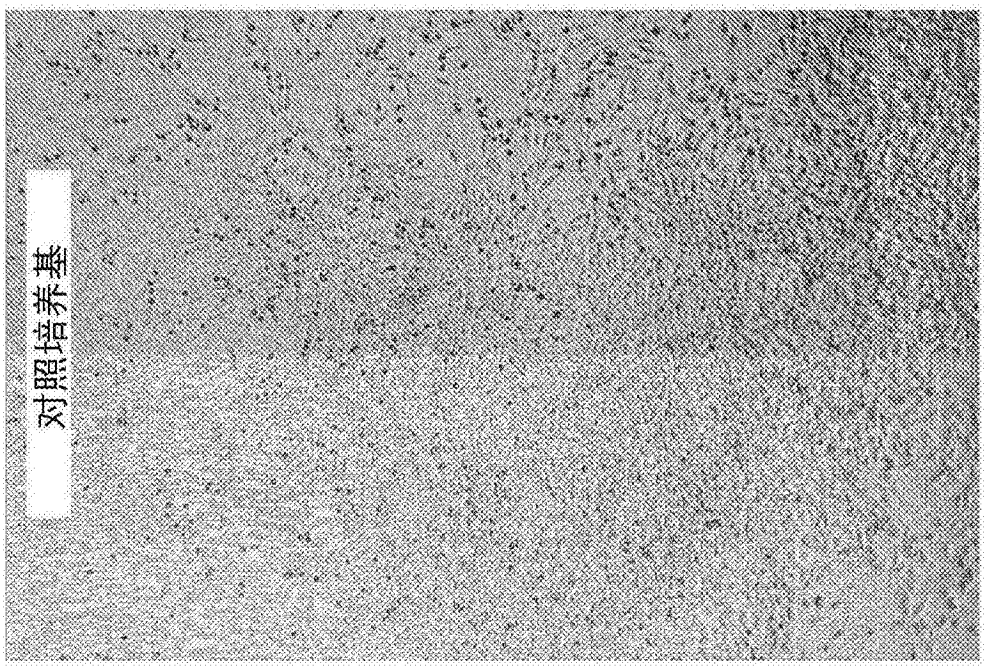


图8

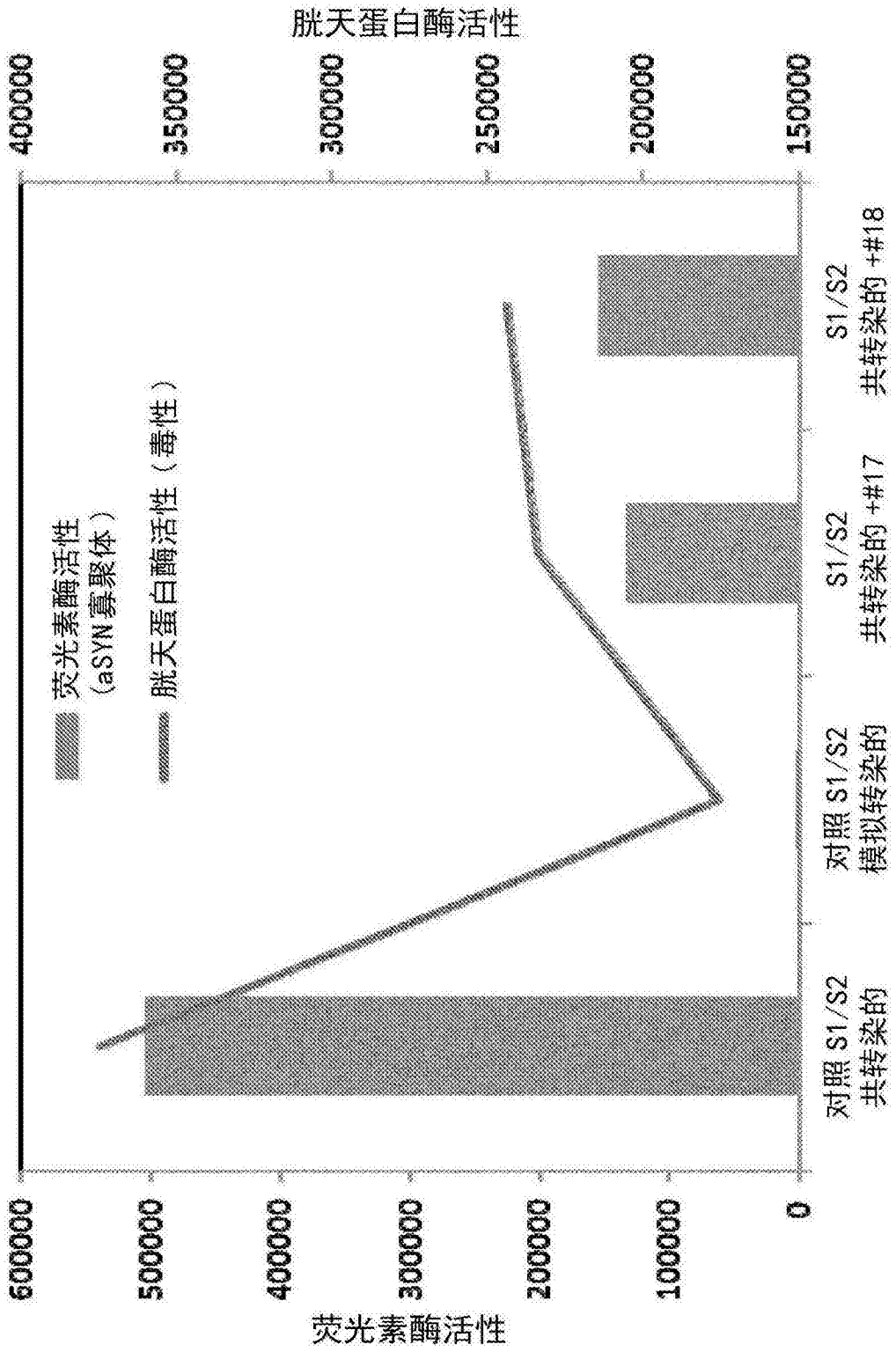

胱天蛋白酶活性
400000
350000
300000
250000
200000
150000
荧光素酶活性（aSYN寡聚体）
胱天蛋白酶活性（毒性）
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
荧光素酶活性
对照 S1/S2 共转染的
对照 S1/S2 模拟转染的
S1/S2 共转染的 +#17
S1/S2 共转染的 +#18

图9

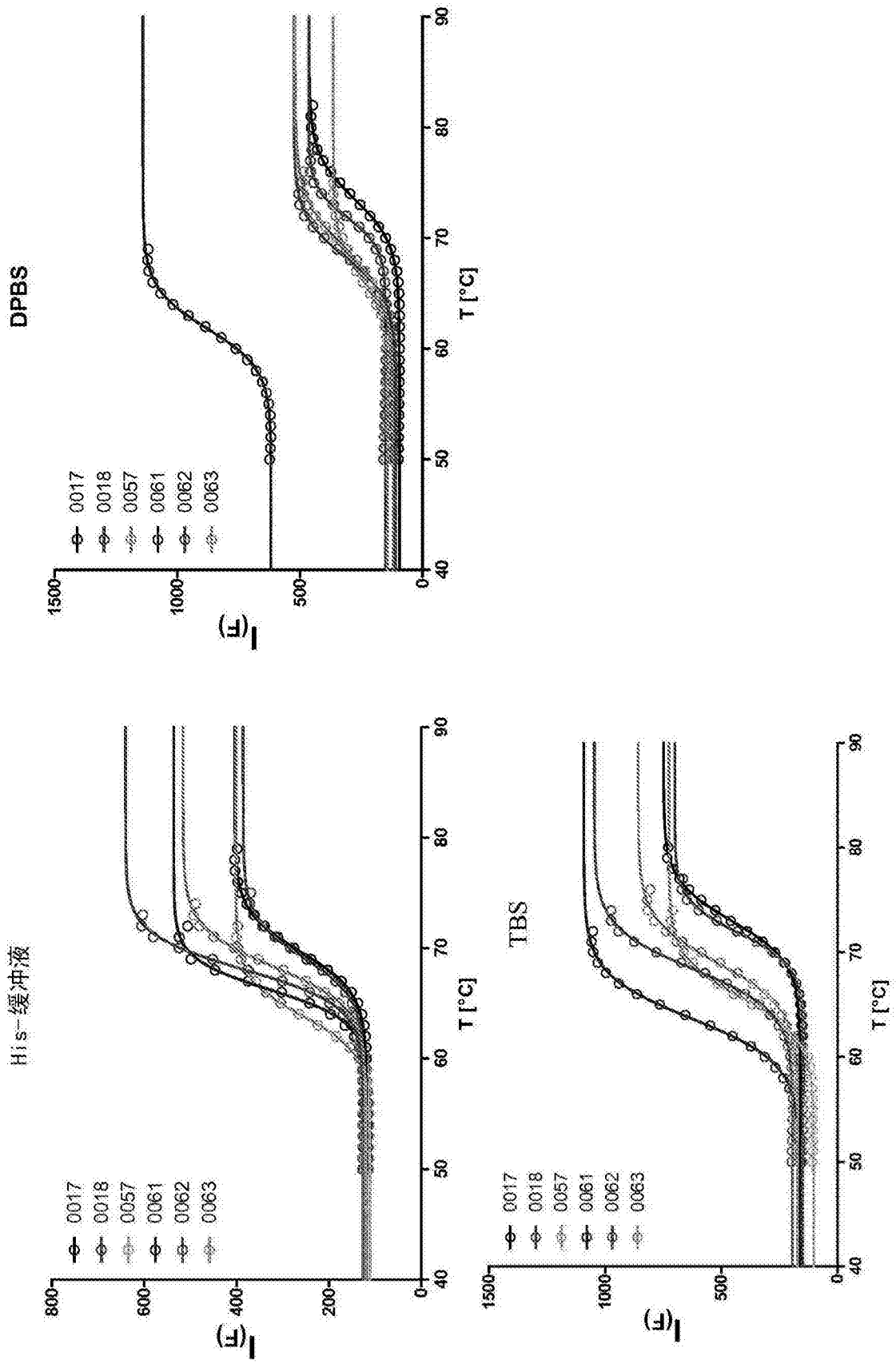


图10

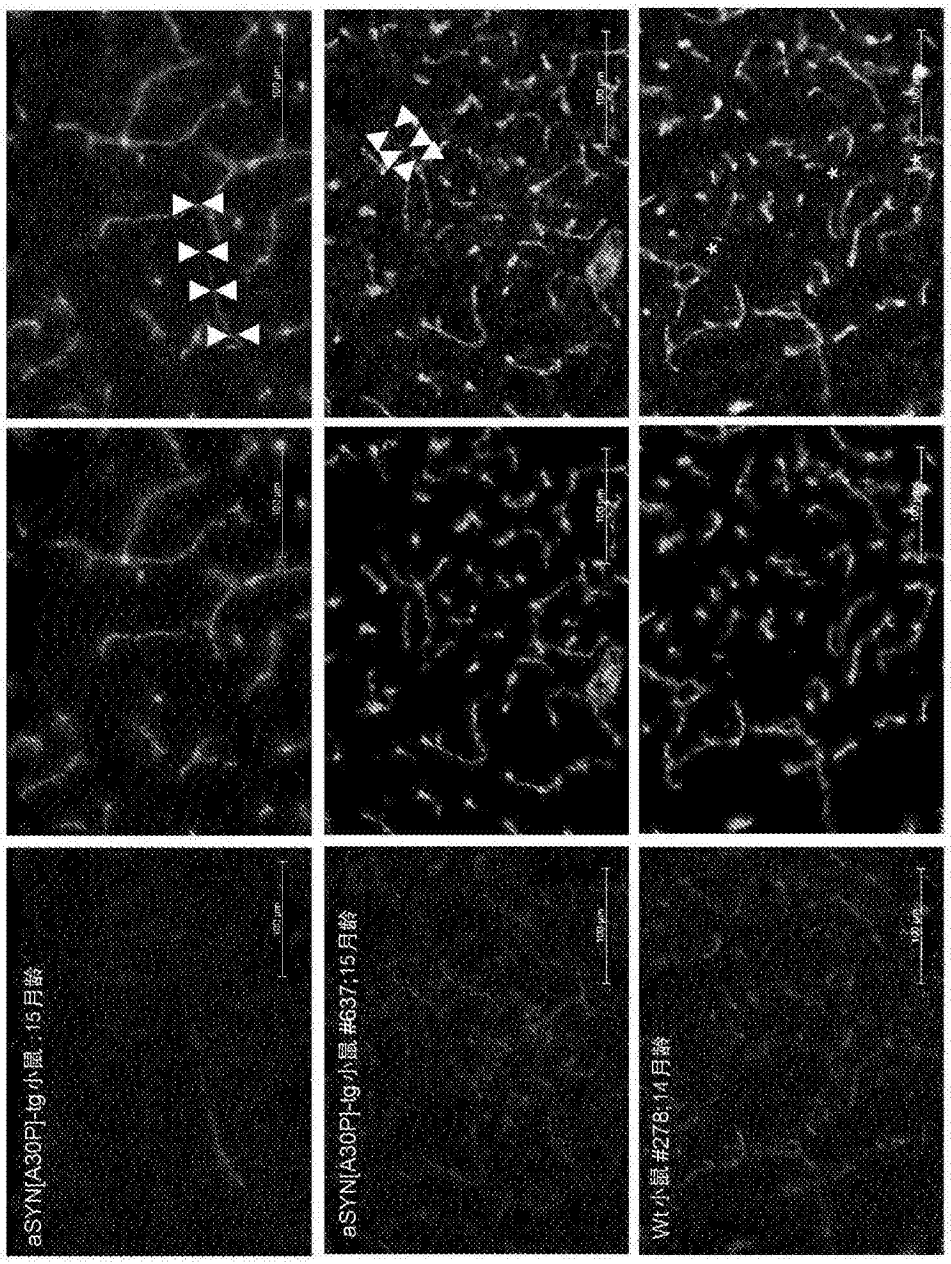

aSYN[A30P]-tg 小鼠，15月龄
aSYN[A30P]-tg 小鼠 #637;15月龄
Wt小鼠 #278;14月龄
抗体 0018
2x60 mg/kg i.p.
5天后分离的脑
抗体 0018-
穿梭模块缀合物
13.5 mg/kg i.p.
2天后分离的脑
抗体 0018-
穿梭模块缀合物
13.5 mg/kg i.p.
2天后分离的脑
DAPI
α-Syn
* 脂褐素

图11

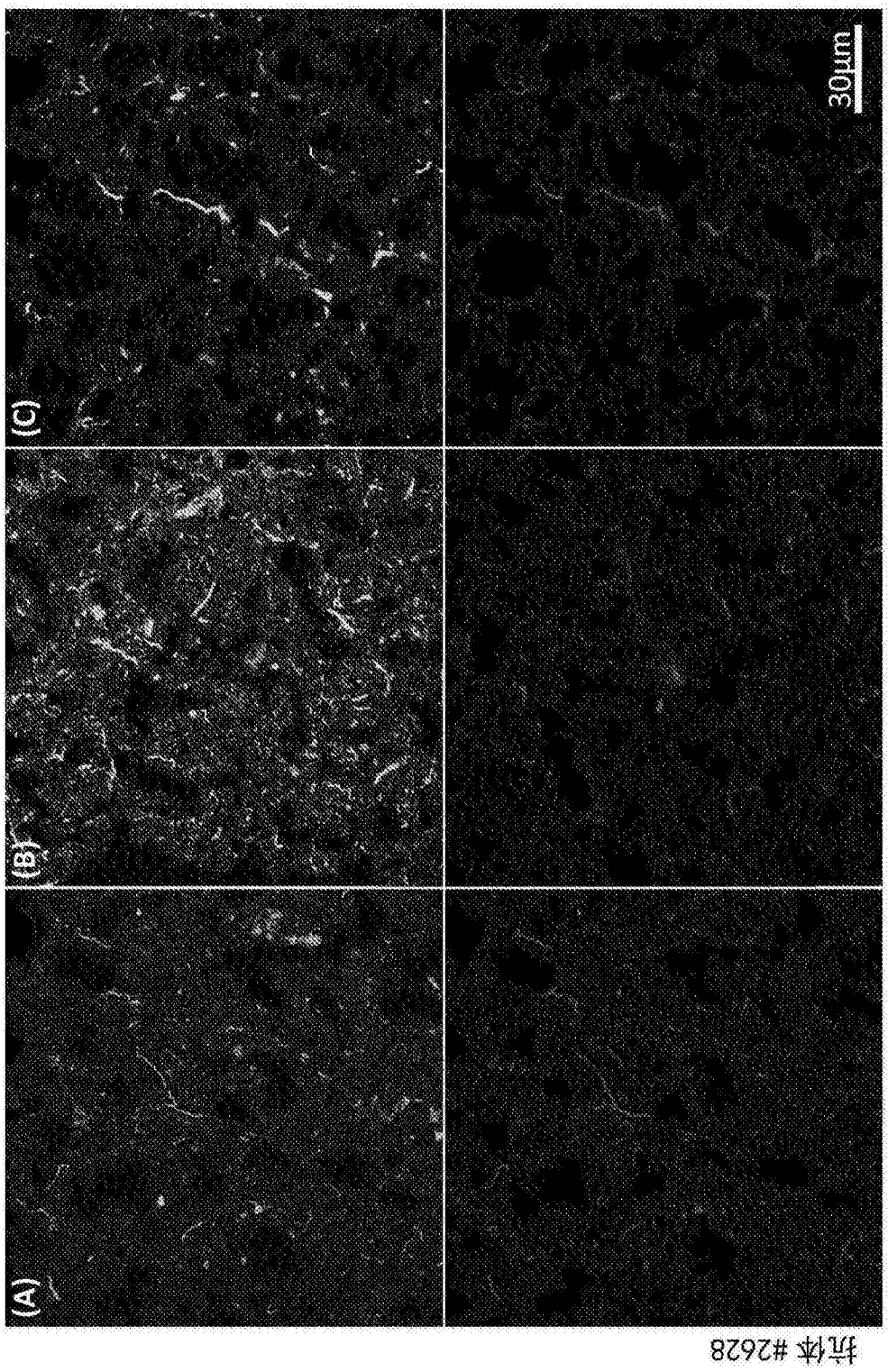


图12

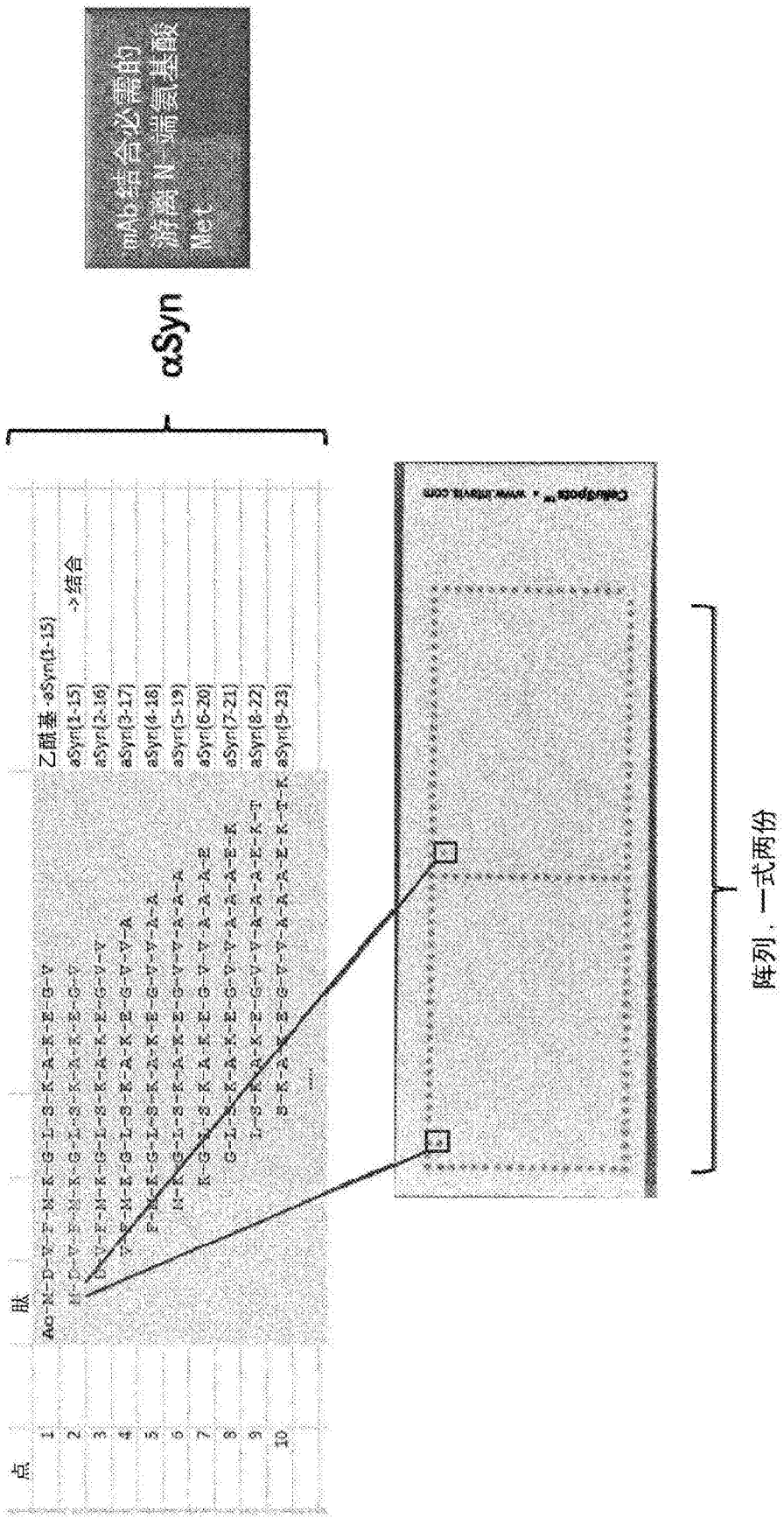


图13

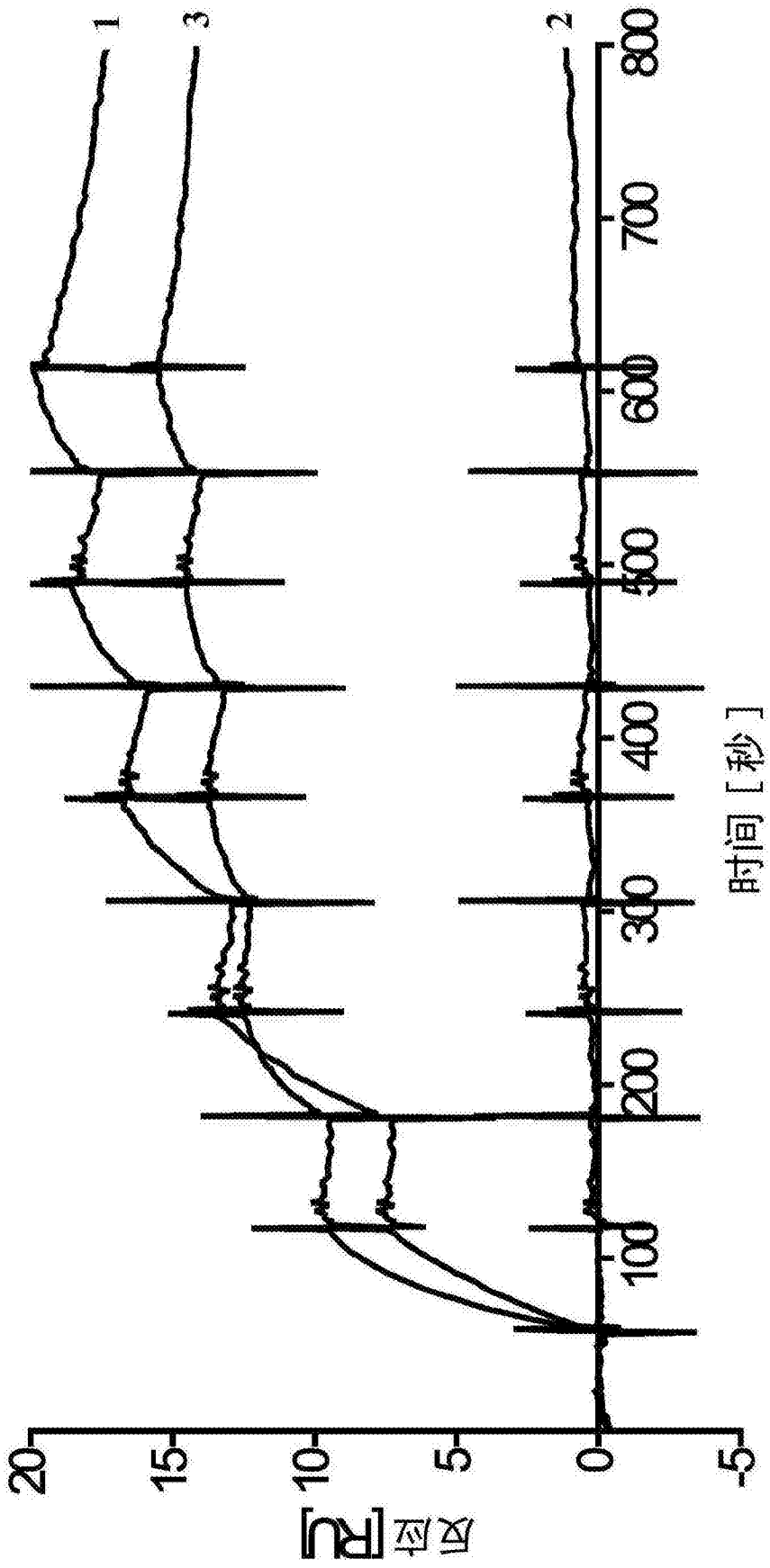


图14