



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107074938 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580050881.0

(22)申请日 2015.10.15

(30)优先权数据

62/064,867 2014.10.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.03.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/055796 2015.10.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/061389 EN 2016.04.21

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 盖·阿拉隆 蒂尔·莫勒

(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.

G07K 16/18(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 25/16(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书40页

序列表9页 附图14页

(54)发明名称

抗- α -突触核蛋白抗体和使用方法

(57)摘要

本发明涉及抗- α -突触核蛋白(抗- α -突触核蛋白)抗体和使用它们的方法。



1. 一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)和三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3),其中:

- (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;
- (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;
- (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;
- (d) HVR-L1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;
- (e) HVR-L2包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;且
- (f) HVR-L3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

2. 一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和LVR-L3),其中:

- (a) HVR-L1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;
- (b) HVR-L2包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;且
- (c) HVR-L3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

3. 一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3),其中:

- (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;
- (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;且
- (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的分离的抗- α -突触核蛋白抗体,所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的分离的抗- α -突触核蛋白抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区。

6. 根据权利要求1所述的分离的抗- α -突触核蛋白抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区。

7. 一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)和三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3),其中:

- (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;
- (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;
- (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;
- (d) HVR-L1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;
- (e) HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;且
- (f) HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

8. 一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和LVR-L3),其中:

- (a) HVR-L1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;
- (b) HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;且
- (c) HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

9. 一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-

H3), 其中:

- (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;
- (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;且
- (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

10. 根据权利要求7所述的分离的抗- α -突触核蛋白抗体, 所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列, 且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

11. 根据权利要求7所述的分离的抗- α -突触核蛋白抗体, 所述抗体包含含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

12. 根据权利要求7所述的分离的抗- α -突触核蛋白抗体, 所述抗体包含含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区。

13. 根据权利要求1或权利要求7所述的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体。

14. 根据权利要求1或权利要求7所述的抗体, 其中所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

15. 根据权利要求1或权利要求7所述的抗体, 其中所述抗体结合选自由单体 α -突触核蛋白和寡聚体 α -突触核蛋白组成的组的 α -突触核蛋白。

16. 一种分离的核酸, 其编码根据权利要求1或权利要求7所述的抗体。

17. 一种分离的核酸, 其编码根据权利要求4或权利要求10所述的抗体。

18. 一种宿主细胞, 其包含根据权利要求16或权利要求17所述的核酸。

19. 一种生产抗体的方法, 所述方法包括培养根据权利要求18所述的宿主细胞从而生产所述抗体。

20. 一种抗体, 其与根据权利要求1或权利要求4所述的抗体竞争对人 α -突触核蛋白的结合。

21. 一种抗体, 其与根据权利要求1或权利要求4所述的抗体结合相同的人 α -突触核蛋白中的表位。

22. 一种抗体, 其与根据权利要求7或权利要求10所述的抗体竞争对人 α -突触核蛋白的结合。

23. 一种抗体, 其与根据权利要求7或权利要求10所述的抗体结合相同的人 α -突触核蛋白中的表位。

24. 一种分离的结合人 α -突触核蛋白的抗体, 其中所述抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5-43的 α -突触核蛋白的区域或表位。

25. 一种分离的结合人 α -突触核蛋白的抗体, 其中所述抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5-78的 α -突触核蛋白的区域或表位。

26. 一种分离的结合人 α -突触核蛋白的抗体, 其中所述抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基37-51的 α -突触核蛋白的区域或表位。

27. 一种分离的结合人 α -突触核蛋白的抗体, 其中所述抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-118的 α -突触核蛋白的区域或表位。

28. 一种药物制剂, 其包含根据权利要求1或权利要求4所述的抗体和药学上可接受的载体。

29. 一种药物制剂,其包含根据权利要求7或权利要求10所述的抗体和药学上可接受的载体。

30. 根据权利要求1或权利要求7所述的抗体,其用于治疗、预防病症、或延迟病症的发病,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

31. 根据权利要求4或权利要求10所述的抗体,其用于治疗、预防病症、或延迟病症的发病,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

32. 根据权利要求1或权利要求7所述的抗体,其用作药物。

33. 根据权利要求4或权利要求10所述的抗体,其用作药物。

34. 一种用于治疗患有病症的个体的方法,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性,所述方法包括给所述个体施用有效量的根据权利要求1或权利要求7所述的抗体。

35. 一种用于治疗患有病症的个体的方法,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性,所述方法包括给所述个体施用有效量的根据权利要求4或权利要求10所述的抗体。

36. 一种用于治疗、预防病症或延迟病症的发病的方法,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性,所述方法包括给所述个体施用有效量的根据权利要求1或权利要求7所述的抗体。

37. 一种用于治疗、预防病症或延迟病症的发病的方法,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性,所述方法包括给所述个体施用有效量的根据权利要求4或权利要求10所述的抗体。

38. 根据权利要求1或权利要求7所述的抗体,其用在用于治疗、预防病症、或延迟病症的发病的方法中,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

39. 根据权利要求4或权利要求10所述的抗体,其用在用于治疗、预防病症、或延迟病症的发病的方法中,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

40. 根据权利要求1或权利要求7所述的抗体在药物制备中的用途,所述药物用于治疗、

预防病症或延迟病症的发病,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

41.根据权利要求4或权利要求10所述的抗体在药物制备中的用途,所述药物用于治疗、预防病症或延迟病症的发病,所述病症选自由以下组成的组:突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

抗- α -突触核蛋白抗体和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年10月16日提交的临时美国申请号62/064,867的优先权权益,其特此通过引用整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子地提交,且特此通过引用整体并入。所述ASCII拷贝(于2015年9月28日创建)被命名为P32300-WO_SL.txt且具有11,028字节的大小。

技术领域

[0005] 本发明涉及抗- α -突触核蛋白(anti- α -synuclein)(anti- α -synuclein,抗- α -突触核蛋白)抗体和使用它们的方法。

背景技术

[0006] α -突触核蛋白是一种丰富的突触前蛋白。 α -突触核蛋白(α -synuclein)中的点突变以及 α -突触核蛋白基因重复和三体化与帕金森病有关(参见,例如,Polymeropoulos等人(1997)Science 276:2045-2047;Kruger等人(1998)Nat Genet 18:106-108;Zarranz等人(2004)Ann Neurol 55:164-173;Kiely等人(2013)Acta Neuropathol 125:753-769;Proukakis等人(2013)Neurology80:1062-1064;Singleton等人(2003)Science 302:841;和Ibanez等人(2004)Lancet 364:1169-1171)。另外, α -突触核蛋白是被称作雷维小体的细胞内蛋白聚集体的主要组分,所述雷维小体是神经变性疾病例如帕金森病、雷维小体病和多系统萎缩的病理学标志(参见,例如,Spillantini等人(1997)Nature 388:839-840;Wakabayashi等人(1997)Neurosci Lett 239:45-48;Arawaka等人(1998)Neurology 51:887-889;和Gai等人(1998)Lancet352:547-548)。

[0007] 突触核蛋白病包含一类神经变性疾病;该术语被广泛地用于指人神经系统的一系列进行性变性疾病。认为 α -突触核蛋白的错误折叠和细胞内聚集是突触核蛋白病的发病机制中的决定性因素,在其它性质中,所述突触核蛋白病共有异常的 α -突触核蛋白免疫反应性包涵体在神经元和/或大神经胶质细胞中的存在。突触核蛋白病包括帕金森病(Parkinson's disease,PD)、帕金森病痴呆(Parkinson's disease dementia,PDD)、雷维小体病(Lewy body disease,LBD)、伴雷维小体痴呆(dementia with Lewy bodies,DLB)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(juvenile-onset generalized neuroaxonal dystrophy)(Hallervorden-Spatz disease,哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩(multiple system atrophy,MSA)、单纯性自主神经衰竭(pure autonomic failure,PAF)和1型伴脑铁积聚性神经变性(neurodegeneration with brain iron accumulation type-1,NBIA-1)。

[0008] 以前已经描述了针对 α -突触核蛋白的抗体和它们的应用,尤其是在针对各种突触核蛋白病的治疗方案中的应用(参见,例如,国际专利申请公开号:WO 1995/06407、WO 2004/041067、WO 2005/013889、WO 2005/047860、WO 2006/020581、WO 2006/045037、WO

2007/012061、WO 2008/103472、WO 2013/063516、WO 2013/112945、WO 2014/058924、WO 2010/069603、WO 2012/177972、WO 2013/066818、WO 2011/104696、WO 2009/133521、WO 2012/051498、WO 2011/107544、WO 2007/011907;参见,例如,Baba等人(1998)Am J Pathol 152:879-884;Emadi等人(2004)Biochemistry43:2871-2878;Emadi等人(2007)J Mol Biol 368:1132-1144;Masliah等人(2005)Neuron 46:857-868)。但是,仍然需要针对 α -突触核蛋白的另外新抗体,所述抗体尤其用于突触核蛋白病的有效治疗。

发明内容

[0009] 本发明涉及抗- α -突触核蛋白抗体、包含抗- α -突触核蛋白抗体的组合物、和使用它们的方法。

[0010] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)和三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3),其中:

[0011] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

[0012] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0013] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

[0014] (d) HVR-L1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

[0015] (e) HVR-L2包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;且

[0016] (f) HVR-L3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含至少1、2、3、4、5和/或6个高变区(HVR)序列,其中:

[0018] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

[0019] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0020] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;

[0021] (d) HVR-L1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

[0022] (e) HVR-L2包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;且

[0023] (f) HVR-L3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0024] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3),其中:

[0025] (a) HVR-L1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

[0026] (b) HVR-L2包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;且

[0027] (c) HVR-L3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0028] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3),其中:

[0029] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

[0030] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;且

[0031] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0032] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含至少1、2和/或3个轻链高变区(HVR)序列,其中:

[0033] (a) HVR-L1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

- [0034] (b) HVR-L2包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;且
- [0035] (c) HVR-L3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
- [0036] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含至少1、2和/或3个重链高变区(HVR)序列,其中:
- [0037] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;
- [0038] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;且
- [0039] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。
- [0040] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。
- [0041] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0042] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区。
- [0043] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)和三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3),其中:
- [0044] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;
- [0045] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;
- [0046] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;
- [0047] (d) HVR-L1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;
- [0048] (e) HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;且
- [0049] (f) HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
- [0050] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含至少1、2、3、4、5和/或6个高变区(HVR)序列,其中:
- [0051] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;
- [0052] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;
- [0053] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;
- [0054] (d) HVR-L1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;
- [0055] (e) HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;且
- [0056] (f) HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
- [0057] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3),其中:
- [0058] (a) HVR-L1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;
- [0059] (b) HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;且
- [0060] (c) HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
- [0061] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3),其中:
- [0062] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;
- [0063] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;且

[0064] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0065] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含至少1、2和/或3个轻链高变区(HVR)序列,其中:

[0066] (a) HVR-L1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

[0067] (b) HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;且

[0068] (c) HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0069] 在某些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗- α -突触核蛋白抗体,其包含至少1、2和/或3个重链高变区(HVR)序列,其中:

[0070] (a) HVR-H1包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

[0071] (b) HVR-H2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;且

[0072] (c) HVR-H3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0073] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0074] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

[0075] 在某些实施方案中,本发明的分离的抗- α -突触核蛋白抗体包含含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区。

[0076] 本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合 α -突触核蛋白的表位。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5、8-9、15-22、28、39-43和78(在本发明的说明书中,根据SEQ ID NO:1的人 α -突触核蛋白氨基酸序列将氨基酸残基编号)。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5、8-9、15-22、28和39-43。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5-78(MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGAVVTGVTA VA;SEQ ID NO:18)的表位或区域。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5-43(MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAAGKTKEGVLYVGSK;SEQ ID NO:19)的表位或区域。

[0077] 在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基37-51(VLYVGSKTKEGVVHG;SEQ ID NO:20)的表位或区域。

[0078] 在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-105、107、109-111、113-116和118。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-118(GKNEEGAPQEGILEDMPV;SEQ ID NO:21)的表位或区域。

[0079] 在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体竞争性地抑制参比单克隆抗体1F7与人 α -突触核蛋白的结合。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体竞争性地抑制参比单克隆抗体13F3与人 α -突触核蛋白的结合。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体与参比单克隆抗体1F7结合相同的人 α -突触核蛋白上的表位。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体与参比单克隆抗体13F3结合相同的人 α -突触核

蛋白上的表位。

[0080] 在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合人 α -突触核蛋白,其中所述 α -突触核蛋白是单体的或呈单体形式。在其它实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合人 α -突触核蛋白,其中所述 α -突触核蛋白是寡聚体的或呈寡聚体或聚集体形式。

[0081] 本发明还提供了编码本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的分离的核酸。本发明还提供了载体,其包含编码本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的核酸。本发明还提供了宿主细胞,其包含本发明的核酸或载体。载体可以属于任意类型,例如,重组载体诸如表达载体。可以使用多种宿主细胞中的任一种。在一个实施方案中,宿主细胞是原核细胞,例如,大肠杆菌(E.coli)。在另一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如,哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0082] 本发明还提供了一种生产本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的方法。例如,本发明提供了制备抗- α -突触核蛋白抗体(如本文中定义的,其包括全长抗体及其片段)的方法,所述方法包括在合适的宿主细胞中表达编码抗- α -突触核蛋白抗体或其片段的本发明的重组载体,从而生产所述抗体或其片段。在某些实施方案中,所述方法包括培养包含编码本发明的抗- α -突触核蛋白抗体(或其片段)的核酸的宿主细胞,从而表达所述核酸。所述方法可以进一步包括从宿主细胞培养物或宿主细胞培养基回收抗- α -突触核蛋白抗体或其片段。

[0083] 本发明还提供了一种药物制剂,其包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体和药学上可接受的载体。所述药物制剂可以进一步包含另外的治疗剂(例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0084] 本发明还提供了包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。所述组合物可以进一步包含另外的治疗剂(例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0085] 本发明还提供了用于预防突触核蛋白病(synucleinopathy)的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于预防突触核蛋白病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。本发明还提供了用于治疗突触核蛋白病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗突触核蛋白病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。

[0086] 本发明还提供了用于预防帕金森病或延迟帕金森病的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于预防帕金森病或延迟帕金森病的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。本发明还提供了用于治疗帕金森病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗帕金森病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。

[0087] 本发明还提供了用于预防雷维小体病或延迟雷维小体病的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于预防雷维小体病或延迟雷维小体病的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。本发明还提供了用于治疗雷维小体病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗雷维小体病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。

[0088] 本发明还提供了用于预防伴雷维小体痴呆或延迟伴雷维小体痴呆的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于预防伴雷

维小体痴呆或延迟伴雷维小体痴呆的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。本发明还提供了用于治疗伴雷维小体痴呆的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗伴雷维小体痴呆的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。

[0089] 本发明还提供了用于预防多系统萎缩或延迟多系统萎缩的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于预防多系统萎缩或延迟多系统萎缩的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。本发明还提供了用于治疗多系统萎缩的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗多系统萎缩的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。

[0090] 本发明还提供了用于预防单纯性自主神经衰竭或延迟单纯性自主神经衰竭的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于预防单纯性自主神经衰竭或延迟单纯性自主神经衰竭的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。本发明还提供了用于治疗单纯性自主神经衰竭的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗单纯性自主神经衰竭的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。

[0091] 本发明还提供了用于预防帕金森病痴呆或延迟帕金森病痴呆的发病、预防青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)或延迟青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的发病、或预防1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)或延迟1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于预防帕金森病痴呆或延迟帕金森病痴呆的发病、预防青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)或延迟青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的发病、或预防1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)或延迟1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)的发病的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。本发明还提供了用于治疗帕金森病痴呆、治疗青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、或治疗1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗帕金森病痴呆、治疗青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、或治疗1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的药物组合物。

[0092] 包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物也可以用于制备药物。所述药物可以用于治疗、预防以下疾病或用于延迟以下疾病的发病:突触核蛋白病、帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)、伴雷维小体痴呆(DLB)、雷维小体病(LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩(MSA)、单纯性自主神经衰竭(PAF)和1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)。在某些实施方案中,所述药物可以进一步包含另外的治疗剂(例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0093] 本发明还提供了一种用于治疗、预防突触核蛋白病、或延迟突触核蛋白病的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防突触核蛋白病、或延迟突触核蛋白病的发

病。本发明还提供了一种用于治疗、预防帕金森病、或延迟帕金森病的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防帕金森病、或延迟帕金森病的发病。本发明还提供了一种用于治疗、预防帕金森病痴呆、或延迟帕金森病痴呆的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防帕金森病痴呆、或延迟帕金森病痴呆的发病。本发明还提供了一种用于治疗、预防伴雷维小体痴呆、或延迟伴雷维小体痴呆的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防伴雷维小体痴呆、或延迟伴雷维小体痴呆的发病。本发明还提供了一种用于治疗、预防雷维小体病、或延迟雷维小体病的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防雷维小体病、或延迟雷维小体病的发病。本发明还提供了一种用于治疗、预防青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、或延迟青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、或延迟青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的发病。本发明还提供了一种用于治疗、预防多系统萎缩、或延迟多系统萎缩的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防多系统萎缩、或延迟多系统萎缩的发病。本发明还提供了一种用于治疗、预防单纯性自主神经衰竭、或延迟单纯性自主神经衰竭的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防单纯性自主神经衰竭、或延迟单纯性自主神经衰竭的发病。本发明还提供了一种用于治疗、预防1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)、或延迟1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)的发病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效量的包含本发明的抗- α -突触核蛋白抗体的组合物,由此在所述受试者中治疗、预防1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)、或延迟1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)的发病。在某些实施方案中,在以上方法中的任一种中,所述方法还包括给所述受试者施用有效量的另外的治疗剂。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是另一种抗- α -突触核蛋白抗体。

[0094] 在另一个方面,本发明提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其用在用于治疗、预防病症、或延迟病症的发病的方法中,所述病症选自突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

[0095] 在另一个方面,本发明提供了抗- α -突触核蛋白抗体在药物制备中的用途,所述药物用于治疗、预防病症或延迟病症的发病,所述病症选自突触核蛋白病、帕金森病、帕金森病痴呆、伴雷维小体痴呆、雷维小体病、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩、单纯性自主神经衰竭和1型伴脑铁积聚性神经变性。

[0096] 在另一个方面,本发明提供了本发明的核酸在药物制备中的用途。所述药物可以用于治疗、预防以下疾病或用于延迟以下疾病的发病:突触核蛋白病、帕金森病(PD)、帕金

森病痴呆 (PDD)、伴雷维小体痴呆 (DLB)、雷维小体病 (LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良 (哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩 (MSA)、单纯性自主神经衰竭 (PAF) 和1型伴脑铁积聚性神经变性 (NBIA-1)。在某些实施方案中,所述药物可以进一步包含另外的治疗剂 (例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0097] 在另一个方面,本发明提供了本发明的表达载体在药物制备中的用途。所述药物可以用于治疗、预防以下疾病或用于延迟以下疾病的发病:突触核蛋白病、帕金森病 (PD)、帕金森病痴呆 (PDD)、伴雷维小体痴呆 (DLB)、雷维小体病 (LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良 (哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩 (MSA)、单纯性自主神经衰竭 (PAF) 和1型伴脑铁积聚性神经变性 (NBIA-1)。在某些实施方案中,所述药物可以进一步包含另外的治疗剂 (例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0098] 在另一个方面,本发明提供了本发明的宿主细胞在药物制备中的用途。所述药物可以用于治疗、预防以下疾病或用于延迟以下疾病的发病:突触核蛋白病、帕金森病 (PD)、帕金森病痴呆 (PDD)、伴雷维小体痴呆 (DLB)、雷维小体病 (LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良 (哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩 (MSA)、单纯性自主神经衰竭 (PAF) 和1型伴脑铁积聚性神经变性 (NBIA-1)。在某些实施方案中,所述药物可以进一步包含另外的治疗剂 (例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0099] 在另一个方面,本发明提供了本发明的制成品在药物制备中的用途。所述药物可以用于治疗、预防以下疾病或用于延迟以下疾病的发病:突触核蛋白病、帕金森病 (PD)、帕金森病痴呆 (PDD)、伴雷维小体痴呆 (DLB)、雷维小体病 (LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良 (哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩 (MSA)、单纯性自主神经衰竭 (PAF) 和1型伴脑铁积聚性神经变性 (NBIA-1)。在某些实施方案中,所述药物可以进一步包含另外的治疗剂 (例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0100] 在另一个方面,本发明提供了本发明的试剂盒在药物制备中的用途。所述药物可以用于治疗、预防以下疾病或用于延迟以下疾病的发病:突触核蛋白病、帕金森病 (PD)、帕金森病痴呆 (PDD)、伴雷维小体痴呆 (DLB)、雷维小体病 (LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良 (哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩 (MSA)、单纯性自主神经衰竭 (PAF) 和1型伴脑铁积聚性神经变性 (NBIA-1)。在某些实施方案中,所述药物可以进一步包含另外的治疗剂 (例如,不同的抗- α -突触核蛋白抗体)。

[0101] 在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体是单克隆抗体。在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体是小鼠抗体。在其它实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在特定实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0102] 在某些实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合单体 α -突触核蛋白蛋白。在其它实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合 α -突触核蛋白的寡聚体 (例如,寡聚体形式)。在其它实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合聚集的 α -突触核蛋白。在其它实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合 α -突触核蛋白的单体和寡聚体形式。

[0103] 在某些实施方案中,本发明提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其用于检测 α -突触核蛋白、用于检测 α -突触核蛋白的单体、和/或用于检测 α -突触核蛋白的寡聚体。在某些实

施方案中,本发明提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其用于检测 α -突触核蛋白纤丝(例如, α -突触核蛋白的纤丝形式)或 α -突触核蛋白的聚集形式。在其它实施方案中,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体用于检测与疾病或病症有关的 α -突触核蛋白蛋白,所述疾病或病症包括、例如,突触核蛋白病、帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)、雷维小体病(LBD)、伴雷维小体痴呆(DLB)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩(MSA)、单纯性自主神经衰竭(PAF)和1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)。所述检测可以是体外的、体内的或原位的。

[0104] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于诊断受试者中的突触核蛋白病性的(synucleinopathic)疾病或病症的方法,所述方法包括:使用本发明的抗- α -突触核蛋白抗体或其片段评估要诊断的受试者中的 α -突触核蛋白的水平、定位、构象或其组合,并将受试者中的 α -突触核蛋白的水平、定位、构象或它们的组合与从一个或多个对照受试者衍生出的一个或多个参比标准进行对比,其中所述受试者中的 α -突触核蛋白的水平、定位、构象或它们的组合与所述参比标准之间的差异或相似性指示所述受试者是否具有突触核蛋白病性的疾病或病症。

附图说明

[0105] 图1阐述了人 α -突触核蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0106] 图2A和2B分别阐述了抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7的轻链可变区(SEQ ID NO:2)和重链可变区(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。

[0107] 图3A和3B分别阐述了抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3的轻链可变区(SEQ ID NO:4)和重链可变区(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列。

[0108] 图4阐述了抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7和抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3的重链和轻链高变区的氨基酸序列。

[0109] 图5显示了在Superdex 75 10/300GL柱上分离的重组人 α -突触核蛋白寡聚体的凝胶过滤色谱图。

[0110] 图6A和6B分别显示了重组人 α -突触核蛋白单体制品和 α -突触核蛋白寡聚体制品的SDS-PAGE分析。

[0111] 图7阐述的数据显示了对重组人 α -突触核蛋白的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7和抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3的结合曲线。

[0112] 图8阐述的数据显示了对重组人 α -突触核蛋白的三种不同形式的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3和抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7的结合特征。

[0113] 图9A和9B阐述的数据分别显示了与单独的重组人 α -突触核蛋白且以1:0.5的摩尔比结合的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3Fab的NMR谱。

[0114] 图10A和10B阐述的数据分别显示了与单独的重组人 α -突触核蛋白或重组人 α -突触核蛋白和人 α -突触核蛋白的合成肽(人 α -突触核蛋白的氨基酸残基105-123)的组合结合的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3Fab的NMR谱。

[0115] 图11A和11B阐述的数据分别显示了与单独的重组人 α -突触核蛋白且以1:0.5的摩尔比结合的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7Fab的NMR谱。

[0116] 图12A和12B在人 α -突触核蛋白蛋白的示意图内分别显示了抗- α -突触核蛋白单克

隆抗体13F3和抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7的结合表位。

具体实施方式

[0117] I. 定义

[0118] 为了本文的目的“受体人框架”是包含如下文定义的源自人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域 (VL) 框架或重链可变结构域 (VH) 框架的氨基酸序列的框架。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同氨基酸序列,或它可以含有氨基酸序列变化。在某些实施方案中,氨基酸变化的数量为10或更少、9或更少、8或更少、7或更少、6或更少、5或更少、4或更少、3或更少或2或更少。在某些实施方案中,VL受体人框架与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上相同。

[0119] “亲和力”表示分子(例如,抗体)的单个结合位点和它的结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则本文中使用的“结合亲和力”表示反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数 (K_d) 表示。通过本领域已知的常见方法(包括本文描述的那些),可以测量亲和力。在下面描述了用于测量结合亲和力的具体举例性和示例性实施方案。

[0120] “亲和力成熟的”抗体表示,与不具有这种改变的亲本抗体相比,在一个或多个高变区 (HVR) 中具有一个或多个改变的抗体,这种改变导致抗体对抗原的亲和力的改善。

[0121] 术语“抗- α -突触核蛋白抗体”和“结合 α -突触核蛋白的抗体”表示这样的抗体:其能够以足够的亲和力结合 α -突触核蛋白,使得所述抗体可用作靶向 α -突触核蛋白的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中,如例如通过放射免疫测定 (RIA) 所测得的,抗- α -突触核蛋白抗体与无关的、非- α -突触核蛋白蛋白的结合的程度小于所述抗体与 α -突触核蛋白的结合的约10%。在某些实施方案中,结合 α -突触核蛋白的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更低,例如, 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如, 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在某些实施方案中,抗- α -突触核蛋白抗体结合在来自不同物种的 α -突触核蛋白之间保守的 α -突触核蛋白的表位。

[0122] 本文中的术语“抗体”以最宽的含义使用,并且包括各种抗体结构,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,只要它们表现出期望的抗原结合活性。

[0123] “抗体片段”表示除了完整抗体以外的分子,所述分子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。抗体片段的例子包括但不限于:Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双体;直链抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和由多个抗体片段形成的多特异性抗体。

[0124] 与参比抗体“结合相同表位的抗体”表示在竞争测定中使参比抗体与它的抗原的结合阻断50%或更多的抗体,且相反,所述参比抗体在竞争测定中使所述抗体与它的抗原的结合阻断50%或更多。在本文中提供了一个示例性的竞争测定。

[0125] 术语“嵌合的”抗体表示这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,同时重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种。

[0126] 抗体的“类型”表示其重链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为亚类(同种型),例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0127] 本文中使用的术语“细胞毒性剂”表示,抑制或阻止细胞功能和/或造成细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括、但不限于:放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、⁹⁰Y、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如,甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其它嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段诸如溶核酶;抗生素;毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;和下面公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0128] “效应子功能”表示可归因于抗体的Fc区的那些生物活性,其随抗体同种型改变。抗体效应子功能的例子包括:C1q结合和补体依赖性的细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性的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-细胞活化。

[0129] 试剂(例如,药物制剂)的“有效量”表示在必要的剂量和持续必要的时间段,有效地实现期望的治疗或预防结果的量。

[0130] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C-端区域,该区域含有恒定区的至少一部分。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或从Pro230延伸至重链的羧基端。但是,Fc区的C-端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非在本文中另外指出,在Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0131] “框架”或“FR”表示除了高变区(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序列通常出现在VH(或VL)中的以下序列中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0132] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“完整的抗体”在本文中互换地用于表示这样的抗体:其具有与天然抗体结构基本上类似的结构或具有含有如本文中定义的Fc区的重链。

[0133] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”、和“宿主细胞培养”互换使用,且表示其中已经引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。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由其来源的后代(不考虑传代数)。后代在核酸内容物方面可以与亲本细胞不完全相同,但是可以含有突变。针对最初转化的细胞筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变体后代被包括在本文中。

[0134] “人抗体”是这样的抗体:其氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体或源自利用人抗体组库或其它人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。该人抗体的定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0135] “人共有框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架。通常,从可变结构域序列的亚组选择人免疫球蛋白VL或VH序列。通常,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,

NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,所述亚组是如在Kabat等人(出处同上)中的亚组KI。在一个实施方案中,对于VH,所述亚组是如在Kabat等人(出处同上)中的亚组III。

[0136] “人源化的”抗体表示包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个和通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含源自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”表示已经经历人源化的抗体。

[0137] 本文中使用的术语“高变区”或“HVR”表示抗体可变结构域的在序列上高变(“互补性决定区”或“CDR”)和/或形成在结构上确定的环(“高变环”)和/或含有与抗原接触残基(“抗原接触点”)的每个区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL(L1、L2、L3)中。本文中示例性的HVR包括:

[0138] (a) 在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处存在的高变环(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

[0139] (b) 在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处存在的CDR(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

[0140] (c) 在氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处存在的抗原接触点(MacCallum等人, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996));和

[0141] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,其包括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)。

[0142] 在一个实施方案中,本发明的代表性的抗- α -突触核蛋白抗体的HVR氨基酸残基包含在图4中鉴别出的那些。

[0143] 除非另有说明,可变结构域中的HVR残基和其它残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等人(出处同上)编号。

[0144] “免疫缀合物”是与一个或多个异源分子(包括、但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

[0145] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括、但不限于,驯养动物(例如牛、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,和啮齿类动物(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。

[0146] “分离的”抗体是已经与它的天然环境的组分分离的抗体。在某些实施方案中,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。关于评价抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman等人, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)。

[0147] “分离的”核酸表示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含有核酸分子的细胞中包含的核酸分子,但是所述核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置。

[0148] “分离的编码抗- α -突触核蛋白抗体的核酸”表示编码抗体重链和轻链(或其片段)

的一个或多个核酸分子,包括在单个载体或分开的载体中的这样的核酸分子、以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置的这样的核酸分子。

[0149] 本文中使用的术语“单克隆抗体”表示得自基本上同源的抗体的群体的抗体,即,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位,除了可能的变体抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制品的生产过程中产生)以外,这样的变体通常以微量存在。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品不同,单克隆抗体制品的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因而,修饰语“单克隆”指示所述抗体得自基本上同源的抗体群体的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法生产所述抗体。例如,要根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,所述技术包括、但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法、和使用包含人免疫球蛋白基因座的全部或部分的转基因动物的方法,本文描述了这样的方法和其它示例性的制备单克隆抗体的方法。

[0150] “裸抗体”表示没有与异源部分(例如,细胞毒性的部分)或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0151] “天然抗体”表示具有不同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,由二硫键合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N-端至C-端,每个重链具有可变区(VH),也称为可变重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-端至C-端,每个轻链具有可变区(VL),也称为可变轻结构域或轻链可变结构域,接着是恒定轻(CL)结构域。抗体的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列归入两种类型(称为kappa(K)和lambda(λ))中的一种。

[0152] 术语“包装说明书”用于表示治疗性产品的商业包装中通常包括的指令,其含有关于这样的治疗性产品的使用的适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌和/或告诫的信息。

[0153] 相对于参考多肽序列而言的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为,比对所述序列,如果必要的话引入间隙以实现最大序列同一性百分比,且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术中的多种方式实现,例如,使用公众可得到的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括实现在要对比的序列的全长上的最大对齐所需的任何算法。但是,为了本文的目的,使用序列对比计算机程序ALIGN-2产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列对比计算机程序由Genentech, Inc. 创造,并且源代码已经在美国版权局, Washington D.C., 20559与用户文档一起提交,其在美国版权登记号TXU510087下登记。ALIGN-2程序可以从Genentech, Inc., South San Francisco, California公开获得,或可以从源代码编译。应该编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列对比参数由ALIGN-2程序设定并且不改变。

[0154] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列对比的情况下,如下计算给定氨基酸序列A相对、与、或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其可以可替换地叙述为相对、与、或针对给定氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A):

[0155] $100 \times \text{分数} X/Y$

[0156] 其中X是通过序列比对程序ALIGN-2(在该程序的A和B的比对中)评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的

长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A相对B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对A的%氨基酸序列同一性。除非另外特别说明,本文使用的所有%氨基酸序列同一性值如在紧邻的上一段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0157] 术语“药物制剂”表示这样的制品:其呈使得包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且所述制剂不含有对所述制剂要施用的受试者有不可接受的毒性的额外组分。

[0158] “药学上可接受的载体”表示药物制剂中除了活性成分之外的成分,其对受试者无毒。药学上可接受的载体包括、但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0159] 除非另外指出,否则本文中使用的术语“ α -突触核蛋白”表示来自任何脊椎动物来源的任何天然 α -突触核蛋白,包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如人类)和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语包括“全长”、未加工的 α -突触核蛋白以及从在细胞内或细胞外加工产生的 α -突触核蛋白的任何形式,包括 α -突触核蛋白的磷酸化形式。该术语也包括 α -突触核蛋白的天然存在的变体,例如,剪接变体或等位基因变体。一种示例性的人 α -突触核蛋白的氨基酸序列显示在图1 (SEQ ID NO:1)中。

[0160] 本文中使用的“治疗(treatment)”(和其语法变体诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)表示试图改变治疗的个体的天然进程的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学进程中执行。期望的治疗效果包括、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病理学后果,防止转移,降低疾病进展的速度,改善或减轻疾病状态,以及减轻或改善的预后。在某些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展(例如,延迟疾病的发病)或减缓疾病的进展。

[0161] 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四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见,例如,Kindt等人, *Kuby Immunology*,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原-结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的VH或VL结构域分离,以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见,例如,Portolano等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993);Clarkson等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

[0162] 本文中使用的术语“载体”表示能够扩增与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及整合进它已经引入其中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地连接的核酸的表达。这样的载体在本文被称为“表达载体”。

[0163] II. 组合物和方法

[0164] 在一个方面,本发明部分地基于抗- α -突触核蛋白抗体、及其用途。在某些实施方案中,提供了结合人 α -突触核蛋白的抗体。本发明的抗体可用于例如诊断、治疗和/或预防突触核蛋白病、帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)、伴雷维小体痴呆(DLB)、雷维小体病(LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩(MSA)、单纯性自主神经衰竭(PAF)和1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)。

[0165] A. 示例性的抗- α -突触核蛋白抗体

[0166] 在一个方面,本发明提供了分离的结合 α -突触核蛋白的抗体。在某些实施方案中,

本发明的抗- α -突触核蛋白抗体结合单体 α -突触核蛋白;结合寡聚体 α -突触核蛋白;结合聚集的 α -突触核蛋白;结合在人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5-78内的表位;结合在人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5-43内的表位;结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5、8-9、15-22、28、39-43和78;结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5、8-9、15-22、28和39-43;结合在人 α -突触核蛋白的氨基酸残基37-51内的表位;结合在人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-118内的表位;结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-105、107、109-111、113-116和118。

[0167] 在一个方面,本发明提供了一种包含至少1、2、3、4、5或6个HVR的抗- α -突触核蛋白抗体,所述HVR选自(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0168] 在一个方面,本发明提供了一种包含至少1、2、3、4、5或6个HVR的抗- α -突触核蛋白抗体,所述HVR选自(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0169] 在一个方面,本发明提供了一种包含至少一个、至少两个、或所有三个VH HVR序列的抗- α -突触核蛋白抗体,所述VH HVR序列选自(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗体包含(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0170] 在另一个方面,本发明提供了一种包含至少一个、至少两个、或所有三个VL HVR序列的抗- α -突触核蛋白抗体,所述VL HVR序列选自(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗体包含(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0171] 在一个方面,本发明提供了一种包含至少一个、至少两个、或所有三个VH HVR序列的抗- α -突触核蛋白抗体,所述VH HVR序列选自(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗体包含(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0172] 在另一个方面,本发明提供了一种包含至少一个、至少两个、或所有三个VL HVR序列的抗- α -突触核蛋白抗体,所述VL HVR序列选自(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗体包含(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID

NO:14的氨基酸序列。

[0173] 在另一个方面,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体包含(a)包含至少一个、至少两个、或所有三个VH HVR序列的VH结构域,所述VH HVR序列选自(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:11的氨基酸序列;和(b)包含至少一个、至少两个、或所有三个VL HVR序列的VL结构域,所述VL HVR序列选自(i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0174] 在另一个方面,本发明的抗- α -突触核蛋白抗体包含(a)包含至少一个、至少两个、或所有三个VH HVR序列的VH结构域,所述VH HVR序列选自(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:17的氨基酸序列;和(b)包含至少一个、至少两个、或所有三个VL HVR序列的VL结构域,所述VL HVR序列选自(i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0175] 在另一个方面,提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗- α -突触核蛋白抗体保留结合 α -突触核蛋白的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:3中置换、插入和/或缺失共1-10个氨基酸。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即,在FR中)。任选地,所述抗- α -突触核蛋白抗体包含在SEQ ID NO:3中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,所述VH包含1、2或3个HVR,所述HVR选自:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0176] 在另一个方面,提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗- α -突触核蛋白抗体保留结合 α -突触核蛋白的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:2中置换、插入和/或缺失共1-10个氨基酸。在某些实施方案中,所述置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即,在FR中)。任选地,所述抗- α -突触核蛋白抗体包含在SEQ ID NO:2中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,所述VL包含1、2或3个HVR,所述HVR选自(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0177] 在另一个方面,提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其中所述抗体包含如在上面提供的实施方案中的任一个中的VH、和如在上面提供的实施方案中的任一个中的VL。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:2中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0178] 在另一个方面,提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗- α -突触核蛋白抗体保留结合 α -突触核蛋白的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:5中置换、插入和/或缺失共1-10个氨基酸。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即,在FR中)。任选地,所述抗- α -突触核蛋白抗体包含在SEQ ID NO:5中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,所述VH包含1、2或3个HVR,所述HVR选自:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,和(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0179] 在另一个方面,提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗- α -突触核蛋白抗体保留结合 α -突触核蛋白的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:4中置换、插入和/或缺失共1-10个氨基酸。在某些实施方案中,所述置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即,在FR中)。任选地,所述抗- α -突触核蛋白抗体包含在SEQ ID NO:4中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,所述VL包含1、2或3个HVR,所述HVR选自(a) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(b) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0180] 在另一个方面,提供了一种抗- α -突触核蛋白抗体,其中所述抗体包含如在上面提供的实施方案中的任一个中的VH、和如在上面提供的实施方案中的任一个中的VL。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0181] 在另一个方面,本发明提供了一种抗体,其与本文提供的抗- α -突触核蛋白抗体结合相同的人 α -突触核蛋白中的表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含SEQ ID NO:3的VH序列和SEQ ID NO:2的VL序列的抗- α -突触核蛋白抗体结合相同的表位。在其它实施方案中,提供了一种抗体,其与包含SEQ ID NO:3的VH序列和SEQ ID NO:2的VL序列的抗- α -突触核蛋白抗体竞争对人 α -突触核蛋白的结合。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基5-43的片段或区域内的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基5-78的片段或区域内的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基37-51的片段或区域内的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的5、8-9、15-22、28和39-43氨基酸残基。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5、8-9、15-22、28、39-43和78。

[0182] 在某些实施方案中,本发明提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ

ID NO:18的氨基酸序列的区域。在其它实施方案中,本发明提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的区域。在其它实施方案中,本发明提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的区域。

[0183] 在其它实施方案中,提供了一种抗体,其与包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:4的VL序列的抗- α -突触核蛋白抗体结合人 α -突触核蛋白中的相同的表位。在其它实施方案中,提供了一种抗体,其与包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:4的VL序列的抗- α -突触核蛋白抗体竞争对人 α -突触核蛋白的结合。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基104-118的片段或区域内的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-105、107、109-111、113-116、118。在某些实施方案中,本发明提供了一种抗体,其结合人 α -突触核蛋白的包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的区域。

[0184] 在本发明的另一个方面,根据以上实施方案中的任一个的抗- α -突触核蛋白抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗- α -突触核蛋白抗体是抗体片段,例如,Fv、Fab、Fab'、scFv、双体或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IgG2a抗体或如本文中定义的其它抗体类型或同种型。

[0185] 在另一个方面,根据以上实施方案中的任一个的抗- α -突触核蛋白抗体可以单独地或组合地包含如在下面部分1-7中所述的任意特征:

[0186] 1. 抗体亲和力

[0187] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如,从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0188] 在一个实施方案中,通过放射性地标记的抗原结合测定(RIA)来测量Kd。在一个实施方案中,用目标抗体的Fab形式和它的抗原执行RIA。例如,如下测量Fab对抗原的溶液结合亲和力:在有未标记的抗原的滴定系列存在下使Fab与最低浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡,然后用抗-Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立测定的条件,将MICROTITER[®]多孔平板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,并随后用在PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白在室温(大约23 $^{\circ}\text{C}$)封闭2-5小时。在非吸附平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与目标Fab的系列稀释物混合(例如,与抗-VEGF抗体Fab-12的评估一致,见Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997))。然后将目标Fab温育过夜;但是,所述温育可以持续较长时段(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获平板用于在室温温育(例如,1小时)。然后将溶液除去,并将平板用0.1%聚山梨酯20(TWEEN-20[®]) 在PBS中的溶液洗涤8次。当平板已经干燥时,加入150 μl /孔的闪烁剂(MICROSCINT-20[™];Packard),并将平板在TOPCOUNT[™] γ 计数器(Packard)上计数10分钟。选择给出小于或等于最大结合的20%的每种Fab的浓度用在竞争性结合测定中。

[0189] 根据另一个实施方案,使用BIACORE[®]表面等离子体共振测定来测量Kd。例如,使用BIACORE[®]-2000或BIACORE[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)的测定在

25℃用固定化的抗原CM5芯片以约10个应答单位(RU)进行。在一个实施方案中,根据供应商的说明书,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)活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用10mM醋酸钠(pH 4.8)稀释至5μg/ml(约0.2μM),随后以5μl/分钟的流速注射以实现偶联的蛋白的大约10个应答单位(RU)。注射抗原以后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,将在具有0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20™)表面活性剂(PBST)的PBS(PBST)中的Fab的两倍系列稀释物(0.78nM至500nM)在25℃以大约25μL/min的流速注射。使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIAcore®评价软件3.2版),通过同时拟合结合和解离传感图(sensorgram),计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_d)计算为比率 k_{off}/k_{on} 。参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定确定结合速率超过 $10^6 M^{-1}s^{-1}$,那么可以使用荧光淬灭技术确定结合速率,所述荧光淬灭技术在有递增抗原浓度存在下在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,所述抗原浓度在光谱仪(诸如配备止流阀(stop-flow)的分光光度计(AvivInstruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中测量。

[0190] 2. 抗体片段

[0191] 在某些实施方案中,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片段以及下面描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthün,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994);也参见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含结合补救受体的表位残基且具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0192] 双体是具有两个抗原结合位点(其可以是二价或双特异性的)的抗体片段。参见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三体和四体也描述在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中。

[0193] 单结构域抗体是这样的抗体片段:其包含抗体的重链可变结构域的全部或部分或者轻链可变结构域的全部或部分。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见,例如,美国专利号6,248,516 B1)。

[0194] 可以通过多种技术制备抗体片段,所述技术包括、但不限于,如本文中所述的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)的生产。

[0195] 3. 嵌合抗体和人源化抗体

[0196] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述在,例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中。在一个实施例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,从小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物诸如猴衍生出的可变区)和人恒定区。在另一个实施例中,嵌合抗体是“类别转换的”抗体,其中所述类或亚类已经从亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0197] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对于

人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含这样的—个或多个可变结构域:其中HVR例如CDR(或其部分)源自非人抗体并且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地也包含人恒定区的至少一部分。在某些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基替换为来自非人抗体(例如,从其衍生出HVR残基的抗体)的相应残基,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0198] 人源化抗体和制造它们的方法综述在,例如,Almagro和Fransson, *Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008),且进一步描述在,例如,Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988);Queen等人, *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*86:10029-10033 (1989);美国专利号5,821,337,7,527,791,6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人, *Methods*36:25-34 (2005) (描述了特异性决定区(SDR)移植);Padlan, *Mol.Immunol.*28:489-498 (1991) (描述了“表面重建”);Dall'Acqua等人, *Methods*36:43-60 (2005) (描述了“FR改组”);和Osborn等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 和Klimka等人, *Br.J.Cancer*,83:252-260 (2000) (描述了用于FR改组的“指导选择”方案)。

[0199] 可以用于人源化的人框架区包括、但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见,例如,Sims等人, *J.Immunol.*151:2296 (1993));从轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生出的框架区(参见,例如,Carter等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,89:4285 (1992);和Presta等人, *J.Immunol.*,151:2623 (1993));人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson, *Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008));和从筛选FR文库来源的框架区(参见,例如,Baca等人, *J.Biol.Chem.*272:10678-10684 (1997) 和Rosok等人, *J.Biol.Chem.*271:22611-22618 (1996))。

[0200] 4.人抗体

[0201] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术生产人抗体。人抗体通常描述在van Dijk和van de Winkel, *Curr.Opin.Pharmacol.*5:368-74 (2001) 和Lonberg, *Curr.Opin.Immunol.*20:450-459 (2008)。

[0202] 可以通过将免疫原施用给转基因动物来制备人抗体,所述转基因动物已经经过修饰以响应于抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座或其在染色体外存在或随机整合进动物的染色体中。在这样的转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经被灭活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg, *Nat.Biotech.*23:1117-1125 (2005)。也参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HUMAB®技术的美国专利号5,770,429;描述K-MOUSE®技术的美国专利号7,041,870;和描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自从这类动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0203] 还可以通过基于杂交瘤的方法制备人抗体。已经描述了用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见,例如,Kozbor, *J.Immunol.*,133:3001 (1984);Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*,第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987);和Boerner等人, *J.Immunol.*,147:86 (1991))。在Li等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,103:3557-3562 (2006) 中也描述了通过人B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体。另外的方法包括例如在以下文献中描述的那些方法:美国

专利号7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系生产单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)。在Vollmers和Brandlein, Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中也描述了人杂交瘤技术(Trioma技术)。

[0204] 通过分离选自人-来源的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列,也可以产生人抗体。这样的可变结构域序列随后可以与期望的人恒定结构域组合。下文描述了用于从抗体文库选择人抗体的技术。

[0205] 5. 文库来源的抗体

[0206] 通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体,可以分离本发明的抗体。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库并对这类文库筛选拥有期望的结合特征的抗体的多种方法。这类方法综述在,例如,Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人,ed.,Human Press,Totowa,NJ,2001),且进一步描述在,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo,编,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0207] 在某些噬菌体展示法中,VH和VL基因的组库分别通过聚合酶链式反应(PCR)克隆并且在噬菌体文库中随机地重组,其随后可以针对抗原结合噬菌体进行筛选,如在Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所述。噬菌体通常展示抗体片段,作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段。来自免疫过的来源的文库会提供针对免疫原的高亲和力抗体,无需构建杂交瘤。可替换地,可以(例如,从人)克隆原初库以在没有任何免疫接种的情况下提供针对广泛类型的非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源,如Griffiths等人,EMBOJ,12:725-734(1993)所述。最后,通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段并使用含有随机序列以编码高度可变的CDR3区并实现体外重排的PCR引物,也可以合成地产生原初文库,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0208] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被认为是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0209] 6. 多特异性抗体

[0210] 在某些实施方案中,本文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种不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,所述结合特异性之一是针对 α -突触核蛋白,且另一种是针对任意其它抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合 α -突触核蛋白的2个不同表位。双特异性抗体也可以用于将细胞毒性剂定位至表达 α -突触核蛋白的细胞。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段。

[0211] 用于制备多特异性抗体的技术包括、但不限于重组共表达具有不同特异性的两个

免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983)),WO 93/08829,和Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991)),和“凸起-进入-孔洞”工程改造(参见,例如,美国专利号5,731,168)。也可以通过以下方式制备多特异性抗体:工程改造静电操纵效应用于制备抗体Fc-异源二聚体分子(WO 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段(参见,例如,美国专利号4,676,980,和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体(参见,例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用“双体”技术以制备双特异性抗体片段(参见,例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));和使用单链Fv(sFv)二聚体(参见,例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及制备三特异性抗体,如在例如Tutt等人.J.Immunol.147:60(1991)中所述。

[0212] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的经工程改造的抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”(参见,例如,US 2006/0025576A1)。

[0213] 本文中的抗体或片段也包括“双重作用FAb”或“DAF”,其包含结合 α -突触核蛋白以及另一种不同抗原的抗原结合位点(参见,例如US 2008/0069820)。

[0214] 7. 抗体变体

[0215] 在某些实施方案中,预见到本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能合乎需要的是,改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成,可以制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如,从抗体的氨基酸序列删除残基和/或将残基插入所述氨基酸序列中和/或置换所述氨基酸序列内的残基。可以制备缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体,前提条件是,所述最终构建体具有期望的特征,例如,抗原结合。

[0216] a) 置换、插入和缺失变体

[0217] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目标位点包括HVR和FR。在表1中在“优选置换”的标题下显示了保守置换。在表1中在“示例性置换”的标题下提供了更实质性变化,并且参考氨基酸侧链类别在下面进一步描述。可以将氨基酸置换引入目标抗体中并且针对期望的活性(例如,保留的/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的ADCC或CDC)来筛选产物。

[0218] 表1

[0219]

原始残基	示例性置换	优选置换
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

[0220]

原始残基	示例性置换	优选置换
Ser (S)	Thr	Thr
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

[0221] 氨基酸可以根据共同的侧链特性分组：

[0222] (1) 疏水的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0223] (2) 中性亲水的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0224] (3) 酸性的: Asp、Glu;

[0225] (4) 碱性的: His、Lys、Arg;

[0226] (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0227] (6) 芳族的: Trp、Tyr、Phe。

[0228] 非保守置换需要将这些分类之一的成员交换为另一个分类的成员。

[0229] 一类置换变体涉及置换亲本抗体(例如, 人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常, 选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体在某些生物学特性上具有修饰(例如, 改善)(例如, 增加的亲和力、降低的免疫原性), 和/或具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。一种示例性的置换变体是亲和力成熟的抗体, 所述抗体可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文描述的那些)方便地产生。简而言之, 将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示和针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0230] 可以在HVR中做出改变(例如, 置换), 例如, 以改善抗体亲和力。这类改变可以在HVR“热点”(即, 在体细胞成熟过程中以高频率经历突变的密码子所编码的残基(参见, 例如, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), 和/或接触抗原的残基中做出, 并对得到的变体VH或VL试验结合亲和力。通过构建次级文库并从中重新选择而实现的亲和力成熟已经描述在, 例如, Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人, 编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施方案中, 通过多种方法(例如, 易出错的PCR、链改组或寡核苷酸-指导的诱变)的任一种, 将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。随后建立次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR-指导的方案, 其中将几个HVR残基(例如, 一次4-6个残基)随机化。可以特别地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。特别地经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0231] 在某些实施方案中, 置换、插入或缺失可以出现在一个或多个HVR内部, 只要这类改变不实质上降低抗体的结合抗原的能力。例如, 可以在HVR中做出不实质上降低结合亲和力的保守改变(例如, 如本文中提供的保守置换)。这类改变可以例如在HVR的抗原接触残基的外部。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中, 每个HVR未改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0232] 一种用于鉴定可以被靶向以便诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”, 如Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在这种方法中, 鉴定一个残基或靶残基组(例如, 带电荷残基诸如arg、asp、his、lys和glu), 并且用中性的或带负电荷的氨基酸(例如, 丙氨酸或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始置换显示出功能敏感性的氨基酸位置处引入其它置换。可替换地或额外地, 可以使用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以靶向或消除这类接触残基和邻近残基作为置换候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0233] 氨基酸序列插入包括长度在从1个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合体, 以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例

子包括具有N-端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N-或C-端与酶(例如针对ADEPT的酶)或增加所述抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0234] b) 糖基化变体

[0235] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以增加或减少抗体被糖基化的程度。通过改变氨基酸序列从而建立或移除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现对抗体添加或删除糖基化位点。

[0236] 在抗体包含Fc区的情况下,可以改变与之连接的碳水化合物。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分枝的双天线寡糖,所述寡糖通常借助N-键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人.TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双天线寡糖结构的“茎部”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可以修饰本发明的抗体中的寡糖以便建立具有某些改善的特性的抗体变体。

[0237] 在一个实施方案中,提供具有碳水化合物结构的抗体变体,所述碳水化合物结构缺少与Fc区(直接地或间接地)连接的岩藻糖。例如,这类抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%、或20%至40%。通过以下方式确定岩藻糖的量:相对于如通过MALDI-TOF质谱法(例如,如WO 2008/077546中所述)所测量的与Asn297连接的全部糖结构(例如复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和,计算糖链内在Asn297处的岩藻糖的平均量。Asn297表示位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);但是,由于抗体中的微小序列变异,Asn297也可以位于位置297的上游或下游±3个氨基酸附近,即,在位置294和300之间。这样的岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US 2003/0157108 (Presta,L.);US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖基化的”或“岩藻糖-缺陷型”抗体变体相关的出版物的例子包括: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;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人.J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人.Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够生产去岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括在蛋白岩藻糖基化方面有缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等人.Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,特别在实施例11),和敲除的细胞系,诸如 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等人.Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0238] 还可以为抗体变体提供双分的寡糖,例如,其中与抗体的Fc区连接的双天线寡糖由GlcNAc对分。这样的抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或改善的ADCC功能。这样的抗体变体的例子例如描述在WO2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)。还提供了具有与Fc区连接的、在寡糖中的至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。这样的抗体变体例如描述在WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)。

[0239] c) Fc区变体

[0240] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此产生Fc区变体。该Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),所述人Fc区序列包含在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如,置换)。

[0241] 在某些实施方案中,本发明预见到具有一些但并非全部效应子功能的抗体变体,这使所述抗体变体成为下述应用的合乎需要的候选物:其中抗体的体内半衰期是重要的,而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以实施体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以实施Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述在美国专利号5,500,362(参见,例如,Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可替换地,可以采用非放射性测定方法(参见,例如,用于流式细胞计量术的ACTI™非放射性的细胞毒性测定(Cell Technology,Inc.Mountain View,CA;和CytoTox96®非放射性的细胞毒性测定(Promega, Madison,WI)。用于这样的测定的有效效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可替换地或额外地,可以在体内评估目标分子的ADCC活性,例如,在动物模型中,诸如在Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA95:652-656(1998)公开的动物模型中。也可以实施C1q结合测定以证实抗体不能结合C1q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等人,J.Immunol.Methods202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域已知的方法执行FcRn结合和体内清除率/半衰期确定(参见,例如,Petkova,S.B.等人,Int'l Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0242] 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(美国专利号6,737,056)。这样的Fc突变体包括具有在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处的置换的Fc突变体,包括将残基265和297置换成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0243] 描述了具有改善的或减少的与FcR的结合的某些抗体变体(参见,例如,美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0244] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸置换(例如,在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的置换)的Fc区。

[0245] 在某些实施方案中,在Fc区中做出导致改变的(即,改善的或减少的)C1q结合和/或补体依赖性的细胞毒性(CDC)的改变,例如,如在美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0246] 在US2005/0014934A1(Hinton等人.)中描述了具有增加的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体,所述新生儿Fc受体负责母亲IgG向胎儿的转移(Guyer等人,

J. Immunol. 117:587 (1976) 和 Kim 等人, J. Immunol. 24:249 (1994))。那些抗体包含其中具有一个或多个置换的 Fc 区, 所述置换改善 Fc 区与 FcRn 的结合。这样的 Fc 变体包括在一个或多个 Fc 区残基: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434 处具有置换的那些, 例如, Fc 区残基 434 的置换 (美国专利号 7, 371, 826)。

[0247] 关于 Fc 区变体的其它例子, 也参见 Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利号 5,648,260; 美国专利号 5,624,821; 和 WO 94/29351。

[0248] d) 半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0249] 在某些实施方案中, 可能合乎需要的是, 建立半胱氨酸工程改造的抗体, 例如, “硫代 MAb”, 其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中, 置换的残基出现在抗体的可到达位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基, 由此使反应性巯基位于抗体的可到达位点处并且可以用于将抗体缀合至其它部分 (诸如药物部分或接头-药物部分) 以产生免疫缀合物, 如本文中进一步所述。在某些实施方案中, 可以用半胱氨酸置换以下残基中的任何一个或多个: 轻链的 V205 (Kabat 编号); 重链的 A118 (EU 编号); 和重链 Fc 区的 S400 (EU 编号)。可以如例如美国专利号 7,521,541 中所述产生半胱氨酸工程改造的抗体。

[0250] e) 抗体衍生物

[0251] 在某些实施方案中, 可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域已知的且容易得到的额外非蛋白性部分。适合用于衍生化抗体的部分包括、但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括、但不限于聚乙二醇 (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-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、亚乙基/马来酸酐共聚物、聚氨基酸 (同聚物或无规共聚物) 和葡聚糖或聚 (n-乙烯基吡咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇同聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇 (例如, 丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。由于它在水中的稳定性, 聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点。所述聚合物可以具有任何分子量, 并可以是分枝或不分枝的。与抗体连接的聚合物的数目可以变动, 并且如果连接超过一个聚合物, 它们可以是相同或不同的分子。一般而言, 用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑事项确定: 包括、但不限于待改善的抗体的特定特性或功能, 抗体衍生物是否将用在确定条件下的疗法中等。

[0252] 在另一个实施方案中, 提供了抗体和非蛋白性部分的缀合物, 所述非蛋白性部分可以通过暴露于辐射而选择性地加热。在一个实施方案中, 非蛋白性部分是碳纳米管 (Kam 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005))。辐射可以具有任何波长, 并包括、但不限于这样的波长: 其不伤害普通细胞, 但是其将非蛋白性部分加热至杀伤在抗体-非蛋白性部分附近的细胞的温度。

[0253] B. 重组方法和组合物

[0254] 使用重组方法和组合物, 例如, 如在美国专利号 4,816,567 中所述, 可以生产抗体。在一个实施方案中, 提供了分离的核酸, 其编码本文描述的抗- α -突触核蛋白抗体。所述核酸可以编码包含所述抗体的 VL 的氨基酸序列和/或包含所述抗体的 VH 的氨基酸序列 (例如, 所述抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中, 提供了一种或多种包含所述核酸的载体 (例如, 表达载体)。在另一个实施方案中, 提供了包含所述核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中, 宿主细胞包含以下载体 (例如, 已经用以下载体转化): (1) 包含特定核

酸的载体,所述核酸编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和包含所述抗体的VH的氨基酸序列,或(2)第一载体和第二载体,所述第一载体包含特定核酸,所述核酸编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列,所述第二载体包含特定核酸,所述核酸编码包含所述抗体的VH的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞,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,提供了制备抗- α -突触核蛋白抗体的方法,其中所述方法包括在适合表达所述抗体的条件下培养如上所述的包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,和任选地,从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0255] 为了重组生产抗- α -突触核蛋白抗体,将编码抗体的核酸(例如,如上所述)分离,并将其插入到一种或多种载体中用以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规方法容易地对这样的核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0256] 适用于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文中所述的原核和真核细胞。例如,抗体可以在细菌中制备,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见,例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(也参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后,抗体可以分离自可溶级分中的细菌细胞糊,并且可以被进一步纯化。

[0257] 除了原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已经被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而导致具有部分地或完全地人糖基化模式的抗体的生产。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0258] 适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞的生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴别出众多可以与昆虫细胞结合使用的杆状病毒菌株,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0259] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见,例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0260] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适合悬浮培养的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,其描述在例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利细胞(TM4细胞,其描述在例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中);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);水牛鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,其描述在例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中;MRC 5细胞;和FS4细胞。其它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等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适合用于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0261] C. 测定

[0262] 通过本领域已知的各种测定, 可以针对它们的物理/化学性能和/或生物活性鉴别、筛选或表征本文中提供的抗- α -突触核蛋白抗体。

[0263] 1. 结合测定和其它测定

[0264] 在一个方面, 针对它的抗原结合活性来试验本发明的抗体, 例如, 通过已知方法诸如ELISA、蛋白质印迹、NMR、Biacore等。

[0265] 在另一个方面, 可以使用竞争测定来鉴别与抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7竞争或与抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3竞争对人 α -突触核蛋白的结合的抗体。在某些实施方案中, 这样的竞争抗体结合被抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7结合的或被抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3结合的相同表位(例如, 直链或构象表位)。用于将表位映射至抗体结合对象的详细示例性方法提供在Morris(1996) "Epitope Mapping Protocols," Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)。

[0266] 在一种示例性的竞争测定中, 将固定化的 α -突触核蛋白在溶液中温育, 所述溶液包含结合人 α -突触核蛋白的第一种标记的抗体(例如, 抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7或抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3)和正在试验它与第一抗体竞争对人 α -突触核蛋白的结合的能力的第二种未标记的抗体。所述第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照, 将固定化的人 α -突触核蛋白在包含第一种标记的抗体、但是不包含第二种未标记的抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与 α -突触核蛋白结合的条件下温育以后, 将多余的未结合的抗体除去, 并测量与固定化的 α -突触核蛋白结合的标记的量。如果试验样品中与固定化的 α -突触核蛋白结合的标记的量相对于对照样品大幅下降, 那么指示, 第二抗体与第一抗体竞争对 α -突触核蛋白的结合。参见Harlow和Lane(1988) Antibodies: A Laboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0267] 2. 活性测定

[0268] 在一个方面, 提供了用于鉴别具有生物活性的其抗- α -突触核蛋白抗体的测定。生物活性可以包括, 例如, 抑制或减少 α -突触核蛋白寡聚体形成, 抑制或减少 α -突触核蛋白聚集, 抑制、减少或预防 α -突触核蛋白-相关的毒性。还提供了具有这样的体内和/或体外生物活性的抗体。

[0269] 在某些实施方案中, 针对这样的生物活性来试验本发明的抗体。

[0270] D. 免疫缀合物

[0271] 本发明还提供了免疫缀合物, 其包含与一个或多个细胞毒性剂诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如, 蛋白毒素、细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素缀合的本文中的抗- α -突触核蛋白抗体。例如, 公开的主题的抗体或抗原结合部分可以在功能上连接(例如, 通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其它方式)至一个或多个其它结合分子, 诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物。

[0272] 在一个实施方案中, 免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC), 其中将抗体与一个或多个药物缀合, 所述药物包括、但不限于美坦辛类(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1); 耳他汀诸如单甲基耳他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588和7,498,298); 多拉司他汀; 卡奇霉素或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,

773,001和5,877,296;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素诸如道诺霉素或多柔比星(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷诸如多西他赛、紫杉醇、拉罗他赛、替司他赛和奥他赛;单端孢霉烯;和CC1065。

[0273] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,所述酶活性毒素或其片段包括、但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(得自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒蛋白A链、 α -帚曲毒蛋白、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*momordicacharantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、白树毒素、丝林霉素、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素。

[0274] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文中所述的抗体。多种放射性同位素可用于生产放射性缀合物。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。当将放射性缀合物用于检测时,它可以包括用于闪烁法研究的放射性原子,例如 ^{99m}Tc 或 ^{112}In ,或用于核磁共振(NMR)成像(也被称作磁共振成像,mri)的自旋标记,诸如碘-123(再次出现)、碘-131、镱-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0275] 可以用多种双官能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒性剂的缀合物,如3-(2-吡啶二硫基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚胺酯的双官能衍生物(诸如二亚胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(诸如如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(诸如戊二醛)、二-叠氮基化合物(诸如二(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、二-重氮基衍生物(诸如二-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以按照Vitetta等人,Science238:1098(1987)中所述制备蓖麻蛋白免疫毒素。碳-14-标记的3-甲基二亚乙基三胺五乙酸1-异硫氰酰基苄酯(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。接头可以是促进在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可以使用酸敏感接头、肽酶敏感接头、光敏感接头、二甲基接头或含有二硫化物的接头(Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0276] 本文的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于用包括、但不限于如下的市售交联剂(例如来自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL.,U.S.A)制备的这类缀合物:BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙基磺基)苯甲酸酯)。

[0277] E.用于诊断和检测的方法和组合物

[0278] 在某些实施方案中,本文提供的任何抗- α -突触核蛋白抗体可用于检测 α -突触核蛋白在生物样品中的存在。本文中使用的术语“检测”包括定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包括细胞或组织,诸如脑组织,或包括生物流体,诸如血清、血浆、脑脊液等。

[0279] 在一个实施方案中,提供了用在诊断或检测方法中的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,提供了检测 α -突触核蛋白在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括:在允许抗- α -突触核蛋白抗体与 α -突触核蛋白结合的条件下使生物样品与如本文中所述的抗- α -突触核蛋白抗体接触,和检测在抗- α -突触核蛋白抗体和 α -突触核蛋白之间是否形成复合物。这样的方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,使用抗- α -突触核蛋白抗体来选择对于使用抗- α -突触核蛋白抗体的疗法而言合格的受试者,例如在 α -突触核蛋白是用于患者选择的生物标志物的情况下。

[0280] 使用本发明的抗体可以诊断的示例性病症包括,例如,突触核蛋白病、帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)、伴雷维小体痴呆(DLB)、雷维小体病(LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩(MSA)、单纯性自主神经衰竭(PAF)和1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)。

[0281] 在某些实施方案中,提供了标记的抗- α -突触核蛋白抗体。标记包括、但不限于直接检测的标记或部分(诸如荧光标记、生色标记、电子密度标记、化学发光标记和放射性标记),以及例如通过酶促反应或分子相互作用间接检测的部分(诸如酶或配体)。示例性的标记包括、但不限于:放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 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、丹磺酰、伞形酮、萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号4,737,456)),萤光素,2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HR),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶(例如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡糖-6-磷酸脱氢酶),杂环氧化酶(诸如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶)、与利用过氧化氢来氧化染料前体的酶(诸如HRP,乳过氧化物酶,或微氧化酶)偶联,生物素/抗生物素蛋白,自旋标记,噬菌体标记,稳定自由基等。

[0282] F. 药物制剂

[0283] 通过将具有期望纯度的这类抗体与一种或多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编(1980))混合,可以以低压冻干制剂或水溶液的形式制备如本文中所述的抗- α -突触核蛋白抗体的药物制剂。药学上可接受的载体在采用的剂量和浓度对接受者而言通常是无毒的,且包括、但不限于:缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸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(小于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖类、二糖类和其它碳水化合物类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖类诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的抗衡离子诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子型表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。示例性的药学上可接受的载体在本文中还包括间质(interstitial)药物分散剂,诸如可溶性的中性活性的透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性的PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(

HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。包括rHuPH20在内的某些示例性sHASEGP和使用方法描述在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0284] 示例性的低压冻干的抗体制剂描述在美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括在美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后者制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0285] 本文中的制剂还可以含有超过一种正在治疗的特定适应症所需的活性成分,优选地具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。例如,可能合乎需要的是,进一步提供不同的抗- α -突触核蛋白抗体。这样的活性成分适当地以对于预期目的而言有效的量联合存在。

[0286] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(分别例如,羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或大乳剂中。这样的技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A.编(1980)。

[0287] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成形制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。

[0288] 要用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以容易地实现无菌度,例如,通过穿过无菌过滤膜过滤。

[0289] G. 治疗方法和组合物

[0290] 本文提供的任何抗- α -突触核蛋白抗体可以用在治疗方法中。

[0291] 在一个方面,提供了用作药物的抗- α -突触核蛋白抗体。在其它方面,提供了用于治疗、预防以下疾病或延迟以下疾病的发病的抗- α -突触核蛋白抗体:突触核蛋白病、帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)、伴雷维小体痴呆(DLB)、Lew body disease (LBD)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩(MSA)、单纯性自主神经衰竭(PAF)和1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)。

[0292] 在某些实施方案中,提供了用在治疗方法中的抗- α -突触核蛋白抗体。在某些实施方案中,本发明提供了用在治疗具有突触核蛋白病、帕金森病(PD)、帕金森病痴呆(PDD)、雷维小体病(LBD)、伴雷维小体痴呆(DLB)、青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、多系统萎缩(MSA)、单纯性自主神经衰竭(PAF)或1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)的个体的方法中的抗- 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抗- α -突触核蛋白抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括给所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如本文中所述的。在其它实施方案中,本发明提供了用在预防或减少 α -突触核蛋白的聚集和/或寡聚化中的抗- α -突触核蛋白抗体。在某些实施方案中,本发明提供了用在预防或减少个体中的 α -突触核蛋白的聚集和/或寡聚化的方法中的抗- 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抗- α -突触核蛋白抗体以预防或减少 α -突触核蛋白的聚集和/或寡聚化。根据以上实施方案中的任一个的“个体”优选地是人。

[0293] 在另一个方面,本发明提供了抗- α -突触核蛋白抗体在药物的生产或制备中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗、预防突触核蛋白病或延迟突触核蛋白病的发病。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗、预防帕金森病或延迟帕金森病的发病。在另

一个实施方案中,所述药物用于治疗、预防雷维小体病或延迟雷维小体病的发病。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗、预防伴雷维小体痴呆或延迟伴雷维小体痴呆的发病。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗、预防青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)或延迟青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的发病。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗、预防多系统萎缩(MSA)或延迟多系统萎缩(MSA)的发病。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗、预防单纯性自主神经衰竭(PAF)或延迟单纯性自主神经衰竭(PAF)的发病。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗或预防1型伴脑铁积聚性神经变性(NBIA-1)。

[0294] 在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防突触核蛋白病、或延迟突触核蛋白病的发病的方法中,所述方法包括给具有突触核蛋白病的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防帕金森病、或延迟帕金森病的发病的方法中,所述方法包括给具有帕金森病的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防帕金森病痴呆、或延迟帕金森病痴呆的发病的方法中,所述方法包括给具有帕金森病痴呆的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、或延迟青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的发病的方法中,所述方法包括给具有青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防雷维小体病、或延迟雷维小体病的发病的方法中,所述方法包括给具有雷维小体病的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防伴雷维小体痴呆、或延迟伴雷维小体痴呆的发病的方法中,所述方法包括给具有伴雷维小体痴呆的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防多系统萎缩、或延迟多系统萎缩的发病的方法中,所述方法包括给具有多系统萎缩的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防单纯性自主神经衰竭、或延迟单纯性自主神经衰竭的发病的方法中,所述方法包括给具有单纯性自主神经衰竭的个体施用有效量的药物。在另一个实施方案中,所述药物用于用在治疗、预防1型伴脑铁积聚性神经变性、或延迟1型伴脑铁积聚性神经变性的发病的方法中,所述方法包括给具有1型伴脑铁积聚性神经变性的个体施用有效量的药物。在某些实施方案中,以上方法中的任一种还包括给所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如本文中所述的。

[0295] 在某些方面,所述药物是用于降低 α -突触核蛋白蛋白(例如,降低 α -突触核蛋白单体、降低 α -突触核蛋白寡聚体、降低 α -突触核蛋白多聚体、降低 α -突触核蛋白纤丝、降低 α -突触核蛋白聚集体)的水平。在另一个实施方案中,所述药物用于用在降低个体中 α -突触核蛋白蛋白(例如,降低 α -突触核蛋白单体、降低 α -突触核蛋白寡聚体、降低 α -突触核蛋白多聚体、降低 α -突触核蛋白纤丝、降低 α -突触核蛋白聚集体)的水平的方法中,所述方法包括给所述个体施用有效量的药物以降低 α -突触核蛋白蛋白(例如,降低 α -突触核蛋白单体、降低 α -突触核蛋白寡聚体、降低 α -突触核蛋白多聚体、降低 α -突触核蛋白纤丝、降低 α -突触核蛋白聚集体)的水平。根据以上实施方案中的任一个的“个体”可以是人。

[0296] 在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防突触核蛋白病、或延迟突触核蛋白病的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有突触核蛋白病的个体施用有

效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防帕金森病、或延迟帕金森病的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有帕金森病的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防雷维小体病、或延迟雷维小体病的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有雷维小体病的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防伴雷维小体痴呆、或延迟伴雷维小体痴呆的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有伴雷维小体痴呆的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防多系统萎缩、或延迟多系统萎缩的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有多系统萎缩的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防帕金森病痴呆、或延迟帕金森病痴呆的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有帕金森病痴呆的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)、或延迟青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有青少年发病的全身性神经轴性营养不良(哈勒沃登-施帕茨病)的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防单纯性自主神经衰竭、或延迟单纯性自主神经衰竭的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有单纯性自主神经衰竭的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗、预防1型伴脑铁积聚性神经变性、或延迟1型伴脑铁积聚性神经变性的发病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给具有1型伴脑铁积聚性神经变性的个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体。在某些实施方案中,以上方法中的任一种还包括给所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如本文中所述的。根据以上实施方案中的任一个的“个体”可以是人。

[0297] 在另一个方面,本发明提供了一种用于降低个体中的 α -突触核蛋白蛋白(例如,降低 α -突触核蛋白单体、降低 α -突触核蛋白寡聚体、降低 α -突触核蛋白多聚体、降低 α -突触核蛋白纤丝、降低 α -突触核蛋白聚集体)的水平的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给所述个体施用有效量的抗- α -突触核蛋白抗体以降低 α -突触核蛋白单体、以降低 α -突触核蛋白寡聚体、以降低 α -突触核蛋白多聚体、以降低 α -突触核蛋白纤丝或以降低 α -突触核蛋白聚集体。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0298] 在另一个方面,本发明提供了包含本文提供的任何抗- α -突触核蛋白抗体的药物制剂,例如,用在任何以上治疗方法中。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗- α -突触核蛋白抗体和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗- α -突触核蛋白抗体和至少一种另外的治疗剂,例如,如本文中所述的。

[0299] 本发明的抗体可以单独地或与其它药剂联合地用在治疗中。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂一起共同施用。在某些实施方案中,另外的治疗剂是不同的抗- α -突触核蛋白抗体。

[0300] 上面指出的这样的联合治疗包括组合施用(其中将两种或更多种治疗剂包括在相同制剂或单独制剂中)和分开施用,在后一种情况下,本发明的抗体的施用可以发生在另外的治疗剂或试剂的施用之前、同时和/或之后。在一个实施方案中,抗- α -突触核蛋白抗体的

施用和另外的治疗剂的施用发生在彼此的约1个月内,或在约1、2或3个周内,或在约1、2、3、4、5或6天内。

[0301] 本发明的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任意合适的方式施用,包括胃肠外、肺内和鼻内施用,并且,如果需要局部治疗,病灶内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。定量给药可以通过任意适当的途径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分地取决于施用是否是短暂的或长期的。各种定量给药计划包括但不限于在不同时间点单次或多次施用,推注施用,并且在本文中预见到脉冲输注。

[0302] 以与良好医学实践一致的方式,配制、定量给药和施用本发明的抗体。在该背景下考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的起因、药剂的递送位点、施用方法、施用调度和医学从业人员已知的其它因素。抗体不需要、但任选地与一种或多种当前用于预防或治疗讨论的病症的药剂一起使用。这样的其它药剂的有效量取决于存在于所述制剂中的抗体的量,病症或治疗的类型,和上文讨论的其它因素。这些通常以相同剂量并且以本文所述的施用途径使用,或以本文所述的剂量的约1至99%、或以经验上/临床上确定为合适的任意剂量和任意途径使用。

[0303] 为了预防、治疗疾病或延迟疾病的发病,本发明的抗体(当单独地或与一种或多种其它另外的治疗剂联合使用时)将取决于要治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体是否为了预防或治疗目的、以前的治疗、患者的临床史和对抗体的应答、以及主治医师的判断。适当地一次性地或在一系列治疗中将抗体施用给患者。取决于疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如,0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体可以是用于施用给患者的最初候选剂量,例如,不论通过一次或多次单独施用,还是通过连续输注。一个典型的日剂量可能是在约1 μ g/kg至100mg/kg或更多的范围内,取决于上面提及的因素。对于在几天或更长时间内的重复施用,取决于病症,所述治疗通常持续至发生疾病症状的期望抑制。抗体的一种示例性剂量是在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因而,可以将一剂或多剂约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或它们的任意组合)施用给患者。可以间歇地(例如,每周或每3周)施用这样的剂量(例如,使得患者接受约2至约20、或例如约6剂抗体)。可以施用最初的较高负荷剂量,继之以一个或多个较低剂量。但是,其它剂量方案可能是有用的。通过常规技术和测定容易地监测该治疗的进展。

[0304] 应当理解,使用本发明的免疫缀合物替代抗- α -突触核蛋白抗体或者在抗- α -突触核蛋白抗体之外还使用本发明的免疫缀合物,可以实现以上制剂或治疗方法中的任一种。

[0305] H. 制成品

[0306] 在发明的另一方面,提供了制成品,其含有用于治疗、预防和/或诊断上文所述的病症的材料。所述制成品包含容器和贴在容器上或与容器结合的标签或包装说明书。适当的容器包括,例如,瓶子、管形瓶、注射器、静脉内溶液袋等。容器可以由多种材料制成,例如玻璃或塑料。所述容器容纳单独的组合物或与另一种可有效地治疗、预防和/或诊断病症的组合物组合的组合物,且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的瓶子)。组合物内的至少一种活性剂是本发明的抗体。所述标签或包装说明书指示,所述组合物用于治疗选择的病症。此外,制成品可以包含(a)具有包含在其中的组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)具有包含在其中的组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一种细胞毒性治疗剂或其它的治疗剂。本发明

的该实施方案中的制成品还可以包含包装说明书,所述包装说明书指示所述组合物可以用于治疗特定病症。可替换地,或另外,制品可以进一步包含第二(或第三)容器,所述容器包含药学上可接受的缓冲液,诸如抑制细菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。制品可以进一步包含从商业和用户观点看合乎需要的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0307] 应当理解,以上制成品中的任一种可以包括本发明的免疫缀合物以替代抗- α -突触核蛋白抗体或者与抗- α -突触核蛋白抗体组合。

[0308] III. 实施例

[0309] 下面是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于上文提供的一般描述,可以实施多种其它的实施方案。

[0310] 实施例1. 重组人 α -突触核蛋白的生产

[0311] 在用pST239/ α -突触核蛋白质粒转染的大肠杆菌细菌细胞58F3中表达重组人 α -突触核蛋白,所述质粒含有编码人 α -突触核蛋白的核酸。将来自1L摇瓶培养物的大肠杆菌糊(15-20g沉淀物)溶解在10体积(w/v)的含有7M盐酸胍的20mM Tris-HCl (pH 8.0)中。将细胞裂解物离心,并将得到的上清液加载到在含有6M盐酸胍的20mM Tris-HCl (pH 8.6)中平衡过的20-ml Qiagen Ni-NTA金属螯合物柱上。将柱用含有50mM咪唑(Ultrol级;Calbiochem)的另外缓冲液洗涤。将蛋白用含有250mM咪唑的缓冲液洗脱。透析以后,根据生产商(Qiagen)的说明书将N-端Unizyme-多his标签切掉。随后将去标签的蛋白透析进6M盐酸胍(pH 6.0)中。

[0312] 为了制备重组人 α -突触核蛋白单体,将 α -突触核蛋白蛋白透析进PBS (8mM Na_2HPO_4 , 137mM NaCl, 2mM KH_2PO_4 , 2.7mM KCl, pH 7.4)中,并然后穿过0.2 μm 过滤器(Millipore)过滤。为了制备重组人 α -突触核蛋白可溶性的寡聚体,将透析的单体重组人 α -突触核蛋白蛋白进一步浓缩至50 μM ,并与二十二碳六烯酸(DHA, Sigma)一起在1:50摩尔比(α -突触核蛋白:DHA)在37 $^\circ\text{C}$ 、500RPM使用恒温混合器(Eppendorf)温育2小时。随后将整个混合物在用20mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl预平衡的Superdex 75 10/300GL (GE)柱上纯化。基于SDS-PAGE凝胶分析,随后合并含有寡聚体的级分。将纯化的 α -突触核蛋白单体和 α -突触核蛋白寡聚体分别用作抗原来制备抗体。

[0313] 图5显示了如上所述在Superdex 75 10/300柱上分离的重组人 α -突触核蛋白寡聚体的凝胶过滤色谱图。图6A和图6B显示了在用考马斯蓝染色的20%Tris-slycine凝胶上对 α -突触核蛋白单体(图6A)和 α -突触核蛋白寡聚体(图6B)的SDS-PAGE分析。如上所述制备 α -突触核蛋白寡聚体,并在Superdex 75 10/300GL柱上分离。随后将与泳道7-9(寡聚体形式)对应的柱级分合并,并用于如本文中所述的抗体制备。

[0314] 实施例2: 小鼠单克隆抗- α -突触核蛋白抗体的开发和表征

[0315] 通过腹膜内和/或脚垫注射2-10 μg 每种人 α -突触核蛋白单体或寡聚体蛋白(如上所述制备),将 α -突触核蛋白敲除的小鼠(JAX003692, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)每周免疫2次,共8-13次注射。在融合前3天,通过腹膜内和/或脚垫注射用2-10 μg 人 α -突触核蛋白单体或寡聚体蛋白进行融合前强化。通过电融合(Cyto Pulse CEEF-50设备, BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA)使来自免疫的小鼠(它们的血清都通过ELISA证实结合直接包被的人和小鼠 α -突触核蛋白单体蛋白)的脾细胞和/或淋巴细胞与X63-Ag8.653或

P3X63-Ag8U.1小鼠骨髓瘤细胞(美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA)融合。用Cytofusion Medium C(BTX HarvardApparatus 47-0001)洗涤2次以后,将分离的淋巴细胞和骨髓瘤细胞以1:1比率混合,并然后以1000万个细胞/ml再悬浮于Cytofusion Medium C中;根据生产商的指导执行电融合。在7%CO₂培养箱中在37℃在ClonaCell-HY Medium C(Stemcell Technologies目录号03803)中培养融合的细胞过夜。

[0316] 次日,将融合的细胞离心,并然后悬浮于10ml含有抗-小鼠IgG-FITC(Jackson Immunoresearch,West Grove,PA)的ClonaCell-HY Medium C中,并然后与90ml含有HAT组分的基于甲基纤维素的ClonaCell-HY Medium D(Stemcell Technologies目录号03804)轻轻混合。将细胞铺板在OmniTray平板(Thermo Fisher Scientific,Rochester,NY)中,并在7%CO₂培养箱中在37℃培养。温育10天以后,选择荧光菌落并使用Clonepix FL(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)转移进含有200μL/孔ClonaCell-HY Medium E(Stemcell Technologies目录号03805)的96-孔平板(Becton Dickinson,目录号353075)中。

[0317] 针对与直接包被的人α-突触核蛋白寡聚体和/或人和小鼠α-突触核蛋白、β-突触核蛋白和γ-突触核蛋白单体蛋白(通过ELISA)、与过表达α-突触核蛋白、β-突触核蛋白或γ-突触核蛋白的FFPE或PFA-固定的293细胞(通过IHC)和与小鼠脑裂解物(通过蛋白质印迹)的结合,筛选来自细胞的上清液。将阳性克隆使用FACSAria II(Becton Dickinson, Franklin Lakes,NJ)进行亚克隆,并然后扩增用于在生物反应器(Integra Biosciences, Chur,瑞士)中大规模生产。使用RNeasy试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)从阳性杂交瘤细胞系提取RNA,并制备cDNA和扩增用于序列确定。将重链和轻链的可变区基因插入pRK质粒载体(Genentech)中用于表达,并将来自独特克隆的有关抗体重链和轻链在293细胞中重组地表达。然后通过如前面描述的蛋白A亲和色谱法纯化上清液(参见Hongo等人,Hybridoma19:303,2000)。将2个小鼠单克隆抗体鉴别和进一步表征,命名为抗-α-突触核蛋白单克隆抗体1F7(mIgG2a)和抗-α-突触核蛋白单克隆抗体13F3(mIgG2a)。

[0318] 实施例3:鼠抗-α-突触核蛋白单克隆抗体对人α-突触核蛋白的单价亲和力

[0319] 使用表面等离子体共振在Biacore T200仪器中评估抗-α-突触核蛋白抗体13F3和1F7对人α-突触核蛋白的单价亲和力。这些实验利用抗体捕获形式,其中如下将试验抗体固定化:使试验抗体结合用鼠IgG捕获试剂预包被的芯片,并随后允许在溶液中结合α-突触核蛋白蛋白。

[0320] 根据生产商的说明书使用GE鼠IgG捕获试剂盒制备鼠IgG捕获芯片。简而言之,将Series S CM5传感器芯片用EDC/NHS的混合物活化,然后暴露于捕获抗体在10mM醋酸钠(pH 5.0)缓冲液中的溶液。用乙醇胺封闭剩余的共价连接位点。

[0321] 为了评估结合,使用1μg/ml的在运行缓冲液(1x HBSP;10mM HEPES,pH 7.4,150mM NaCl,0.05%吐温20)中的溶液以10μl/min的流速捕获抗-α-突触核蛋白单克隆抗体13F3和抗-α-突触核蛋白单克隆抗体1F7。在6种不同浓度(跨从单数位纳摩尔至大于1μM的浓度的3倍稀释系列)和1种重复浓度,以30μl/min的流速,监测人α-突触核蛋白在溶液中的结合。用在运行缓冲液(1xHBSP)中稀释的样品在25℃执行测定;通过在10μl/min注射10mM甘氨酸(pH 1.7)180秒,使表面再生。将稳态分析应用于得到的数据。这两种抗体各自对重组人α-突触核蛋白的亲和力(K_D)显示在下面表2中。

[0322] 表2

[0323]

抗体	K _D (实验A)	K _D (实验B)
1F7	130nM	160nM
13F3	410nM, 490nM	460nM

[0324] 如在上面表2中所示,单价亲和力(如通过上述的平衡常数所测量的)对于单克隆抗体13F3而言是 4.5×10^{-7} M和 4.7×10^{-7} M,且对于单克隆抗体1F7而言是 1.3×10^{-7} M和 1.8×10^{-7} M。图7显示了在上述实验中得到的结合曲线的图解表示(抗体1F7为顶图,抗体13F3为2个下图,抗体浓度在x-轴上, α -突触核蛋白在y-轴上)。

[0325] 实施例4:不同形式的 α -突触核蛋白的识别

[0326] 使用Biacore芯片研究了单克隆抗体13F3和单克隆抗体1F7与不同形式的人 α -突触核蛋白的结合,在所述Biacore芯片上通过生物素-中和亲和素相互作用固定化了生物素化的人 α -突触核蛋白。为了避免由潜在亲和力作用引起的并发症,以Fab形式研究了单克隆抗体13F3和1F7。用固定化的木瓜蛋白酶(Thermo Scientific)使用蛋白水解性消化从mIgG2a生产每种抗 α -突触核蛋白抗体的Fab,并随后使用本领域中的标准方法纯化Fab片段。

[0327] 使用GE胺偶联试剂盒将中和亲和素(Thermo Scientific, Product#31000)共价地偶联至Series S CM5Biacore芯片(GE)。简而言之,将每个流动池依次用EDC/NHS活化,暴露于在10mM醋酸钠(pH 5)中的10 μ g/ml中和亲和素保持5分钟,并用乙醇胺封闭表面。这导致大约2200-2600应答单位(RU)中和亲和素在四个流动池(包括参比池FC1)中的每一个上的固定化。随后,根据需要如下固定化生物素化的 α -突触核蛋白:在运行缓冲液(1xHBSP)中稀释至0.5-2 μ g/ml,并以30 μ l/min流动跨过有关的流动池,同时小心地监测应答。

[0328] 平行地评估重组人 α -突触核蛋白的三种形式。将通过遗传上连接的Avi-标签生物素化的重组人单体 α -突触核蛋白固定化在流动池2上(估计28个RU固定化)。将重组人寡聚体的、avi-标签生物素化的 α -突触核蛋白固定化在流动池3上(估计22个RU固定化)。将在用NHS-PEG4-生物素化学生物素化之前寡聚化的非-avi-标记的重组人 α -突触核蛋白固定化在流动池4上(估计15个RU固定化)。

[0329] 然后使生物素化的重组人 α -突触核蛋白的三种形式所包被的芯片结合一定浓度范围的单克隆抗体1F7和13F3 Fab片段(从2 μ M的最高浓度开始在3倍稀释系列以后的6种浓度;重复浓度667nM评估2次)。使用30 μ l/min的流速以及各自300秒的结合阶段和解离阶段评估结合。在Fab片段注射之间,通过10mM甘氨酸(pH 1.7)在10 μ l/min的60秒注射使表面再生。每个浓度系列跟踪2次。

[0330] 这些分析的结果显示在图8中。对于与固定化在流动池2上的生物素化的单体重组人 α -突触核蛋白(“天然” α -突触核蛋白酶促地生物素化的单体 α -突触核蛋白)的结合,单克隆抗体13F3Fab表现出快速动力学。当允许单克隆抗体13F3结合在流动池3(酶促地生物素化的寡聚体 α -突触核蛋白)或流动池4(化学生物素化的 α -突触核蛋白,其寡聚化且通过胺偶联而化学生物素化)上的生物素化的寡聚体重组人 α -突触核蛋白时,观察到表现出慢得多的解离的结合组分;另外,也观察到快速解离组分。用抗体1F7没有观察到这样的结合特征。

[0331] 通过Biacore分析得到的这些结果表明,单克隆抗体13F3Fab表现出与生物素化的

α -突触核蛋白寡聚体的多模态结合。单克隆抗体13F3表现出与单体和寡聚体 α -突触核蛋白的定性上不同的结合特征。由于预见到抗体Fab片段与 α -突触核蛋白的相互作用是单价的,这些结果提示,增强的与寡聚体 α -突触核蛋白的结合不是亲合力介导的,并且与该抗体对寡聚体-特异性的表位的识别相一致(除了 α -突触核蛋白上的单体表位以外)。

[0332] 实施例5.通过NMR光谱法鉴别抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3和抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7的结合表位

[0333] 如下使用NMR鉴别抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3和抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7的结合表位。通过将 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的重组人 α -突触核蛋白在PBS (pH 7.0) 中的溶液(在1mg/ml (71 μM) 的浓度购自Giotto Biotech (Sesto Fiorentino (FI), 意大利)) 以180 μl 体积加入3mm NMR试管中,制备NMR样品。通过将18mg/ml (120 μM) 的抗体13F3和17.8mg/ml (118 μM) 抗体1F7在PBS (pH 7.2) 中的溶液以9 μl 等分试样加入NMR样品中,实现 α -突触核蛋白的抗体结合形式的复合物形成。以递增的Fab浓度记录2D HSQC-TROSY波谱,并在CCPN中监测质子-酰胺交叉峰强度(参见Vranken等人(2005) *Proteins* 59:687-696)。在Bruker 600MHz波谱仪上使用5mm TXI冷冻-探针在校准的300K记录所有波谱。用于数据分析的最终摩尔比为1:0.5 α -突触核蛋白:Fab。使用Topspin 3.1 (Bruker Karlsruhe, 德国) 处理所有数据,并使用CCPN显影和分析。在与71 μM 的浓度对应的1mg/ml,在PBS (pH 7.2) 缓冲液中测量 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 标记的 α -突触核蛋白的样品。使用呈送的NMR数据(来自BMRB,具有登录号6968) 分配波谱。使用来自3D TROSY-HNCO的三重共振信息证实公开的分配并除去信号重叠的模糊。在CCPN中评价信号强度。基于记录的数据的信噪比,在CCPN中外推信号误差。

[0334] 关于抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3Fab的结合的NMR结果如下。单独的和具有1:0.5的摩尔比的重组人 α -突触核蛋白的波谱分别显示在图9A和9B中。将结合表位鉴别为在复合光谱中具有信号强度的陡峭下降的氨基酸残基信号。将氨基酸残基归类为属于抗体的结合表位(通过2D异核单量子相干-横向迟缓优化的光谱学检查(2D Heteronuclear Single Quantum Coherence-Transversal Relaxation Optimized Spectroscopy) (2D HSQC-TROSY) 的光谱的信号下降)(参见Pervushin等人(1997) *PNAS* 94:12366-12371.)。将超过50的信号强度减弱的因子用作截止值。对于抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3Fab,人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-105、107、109-111、113-116和118满足该判据。这些结果表明,单克隆抗体13F3结合人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-105、107、109-111、113-116和118,从而指示单克隆抗体13F3的结合表位包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-118,且更具体地包含人 α -突触核蛋白的氨基酸残基104-105、107、109-111、113-116和118(参见下面表3)。

[0335] 除了信号减弱以外,在用结合人 α -突触核蛋白的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3Fab观察的情况下,对于氨基酸残基98-103、119-122和124-125观察到化学位移扰动。这些化学位移扰动归因于Fab结合的间接作用。对于组氨酸50也观察到化学位移扰动的影响;这些归因于第二效应诸如轻微的pH变化。来自甘氨酸106的信号是重叠的;脯氨酸残基108和117不具有HSQC标记。应当指出,残基异亮氨酸112没有受到强烈影响,具有1.79的信号减弱。

[0336] 通过添加合成肽进一步证实了上述抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3Fab的结合表位,所述合成肽具有与人 α -突触核蛋白中的氨基酸残基105-123对应的氨基酸序列

EGAPQEGILEDMPVDPDNE (SEQ ID NO:22)。在NMR实验(如上所述)中该(未标记的)肽向Fab- α -突触核蛋白复合物样品中的添加导致表位信号的重新出现(对比图10A和10B)。

[0337] 关于抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7Fab的结合的NMR结果如下。通过向NMR样品中添加Fab 1F7,与上面关于抗- α -突触核蛋白抗体13F3所述的制备类似地实现 α -突触核蛋白的这种抗体结合形式的制备。在递增的Fab浓度记录2D HSQC-TROSY波谱,并监测质子-酰胺交叉峰强度。单独的和具有1:0.5的摩尔比的 α -突触核蛋白的波谱分别显示在图11A和11B中。将显示信号衰变的氨基酸残基(人 α -突触核蛋白的氨基酸残基5、8-9、15-22、28、39-43和78)归类为单克隆抗体1F7的结合表位(参见下面表3)。

[0338] 表3

Fab	表位	氨基酸残基
	(人 α -突触核蛋白氨基酸残基编号)	(人 α -突触核蛋白氨基酸残基编号)
13F3	104-118	104-105, 107, 109-111, 113-116, 118
1F7	5-43 (5-78)	5, 8-9, 15-22, 28, 39-43, 78

[0340] 将这些氨基酸残基映射至Ulmer等人报道的 α -突触核蛋白的溶液结构,并在呈送编号1XQ8下呈送至Protein Data Bank(参见Bernstein等人(1977)J Mol Biol 112:535)。向 α -突触核蛋白的溶液结构映射的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体13F3Fab的表位显示在图12A中。向 α -突触核蛋白的溶液结构映射的抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7Fab的表位显示在图12B中。

[0341] 实施例6.通过肽映射鉴别抗- α -突触核蛋白单克隆抗体1F7的结合表位

[0342] 使用跨人 α -突触核蛋白长度的一系列15-聚体肽,发现抗- α -突触核蛋白抗体1F7结合与人 α -突触核蛋白的氨基酸残基37-51对应的肽。(VLYVGSKTKEGVVHG;SEQ ID NO:20)

[0343] 尽管为了清楚理解的目的已经通过具体说明和实施例对前述发明进行了比较详细的描述,但是所述描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容明确地通过引用以它们的整体并入。

序列表

<110> 健泰科生物技术公司等

<120> 抗- α -突触核蛋白抗体和使用方法

<130> P32300-W0

<140>

<141>

<150> 62/064,867

<151> 2014-10-16

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```
Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1           5           10          15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
          20          25          30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
          35          40          45
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
          50          55          60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65          70          75          80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
          85          90          95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
          100         105         110
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
          115         120         125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
          130         135         140
```

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 2

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Ile	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser
			20					25						30	
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Val
			85					90						95	
Thr	His	Phe	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 3

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

Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 4

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Thr Trp Val Lys Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

〈221〉 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 8

Trp Gln Val Thr His Phe Pro His Thr

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 9

Asp Tyr Tyr Met Asp

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 10

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 11

Phe Asp Tyr

1

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 12

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 13

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 14

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1

5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 15

Ser Tyr Trp Ile Thr

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 16

Asp Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 17

Ala Gln Thr Thr Phe Ala Tyr

1 5

<210> 18

<211> 78

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

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
65 70 75

<210> 19

<211> 43

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

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
35 40

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val Val His Gly
1 5 10 15

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp Met
1 5 10 15

Pro Val

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 22

Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Gly	Ile	Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Val	Asp	Pro
1				5					10					15	
Asp	Asn	Glu													

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTEGVLYV
GSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQK
TVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPOEGILEDMPVDP
DNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ ID NO: 1)

图1

1F7 轻链可变区

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR
LIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQVTHFPHT
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:2)

图2A

1F7 重链可变区

EVQLQQSGAELVIZPGASVKLSCTASGFNIKDYMDWVKQRTAQGLEWIA
RIDPEDGETKYAPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCRVFD
YWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:3)

图2B

13F3 轻链可变区

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTF
GGGTRLEIK (SEQ ID NO:4)

图3A

13F3 重链可变区

QVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKKRPGQGLEWIG
DISPGSGSTHYNEKFKSKATLTVDTSSTAYIQLFSLTSEDSAVYYCAIAQT
TFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:5)

图3B

	单克隆抗体 1F7	单克隆抗体 13F3
HVR-L1	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:6)	RSSQSIVHENGNTYLE (SEQ ID NO:12)
HVR-L2	LVSKLDS (SEQ ID NO:7)	KVSNRFS (SEQ ID NO:13)
HVR-L3	WQVTHFPHT (SEQ ID NO:8)	FQGSHPVPT (SEQ ID NO:14)
HVR-H1	DYYMD (SEQ ID NO:9)	SYWIT (SEQ ID NO:15)
HVR-H2	RIDPEDGETKYAPKFQG (SEQ ID NO:10)	DISPGSGSTHYNEKFKS (SEQ ID NO:16)
HVR-H3	FDY (SEQ ID NO:11)	AQTTFAY (SEQ ID NO:17)

图4

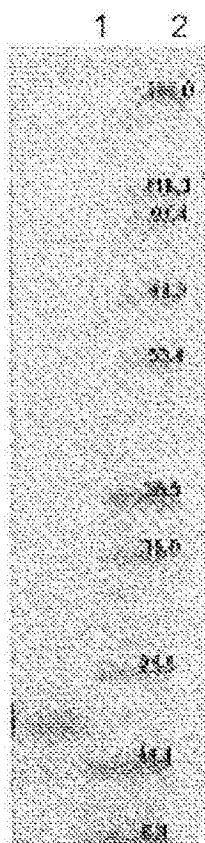


图6A

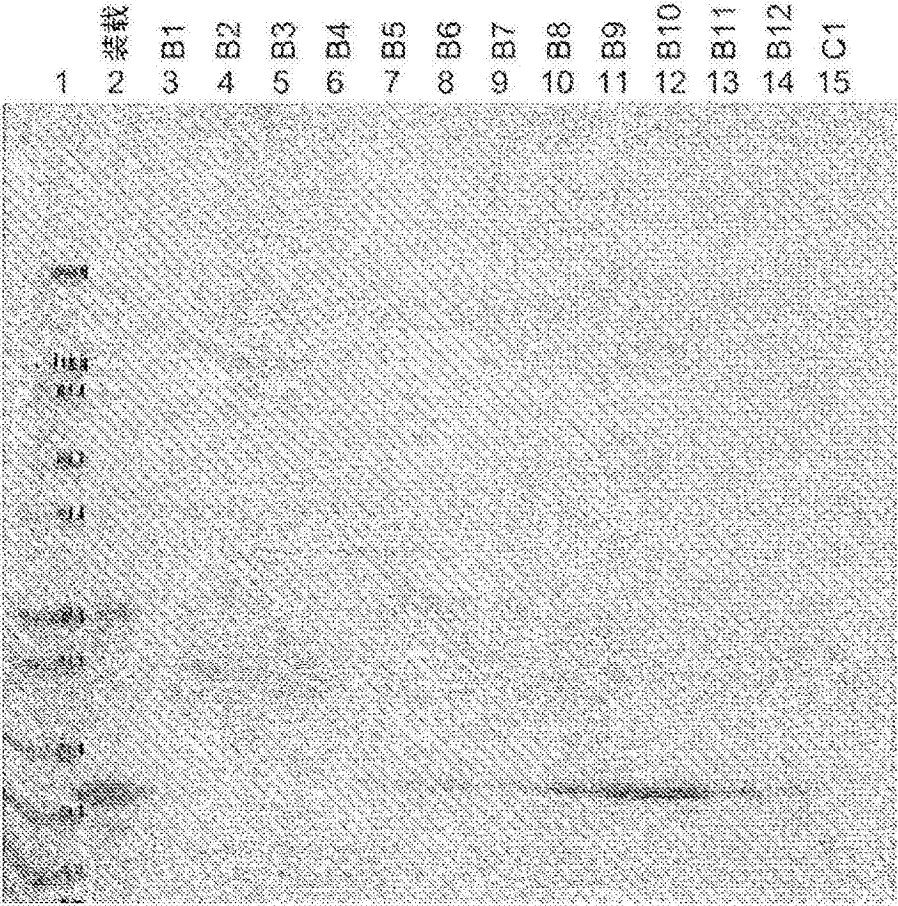


图6B

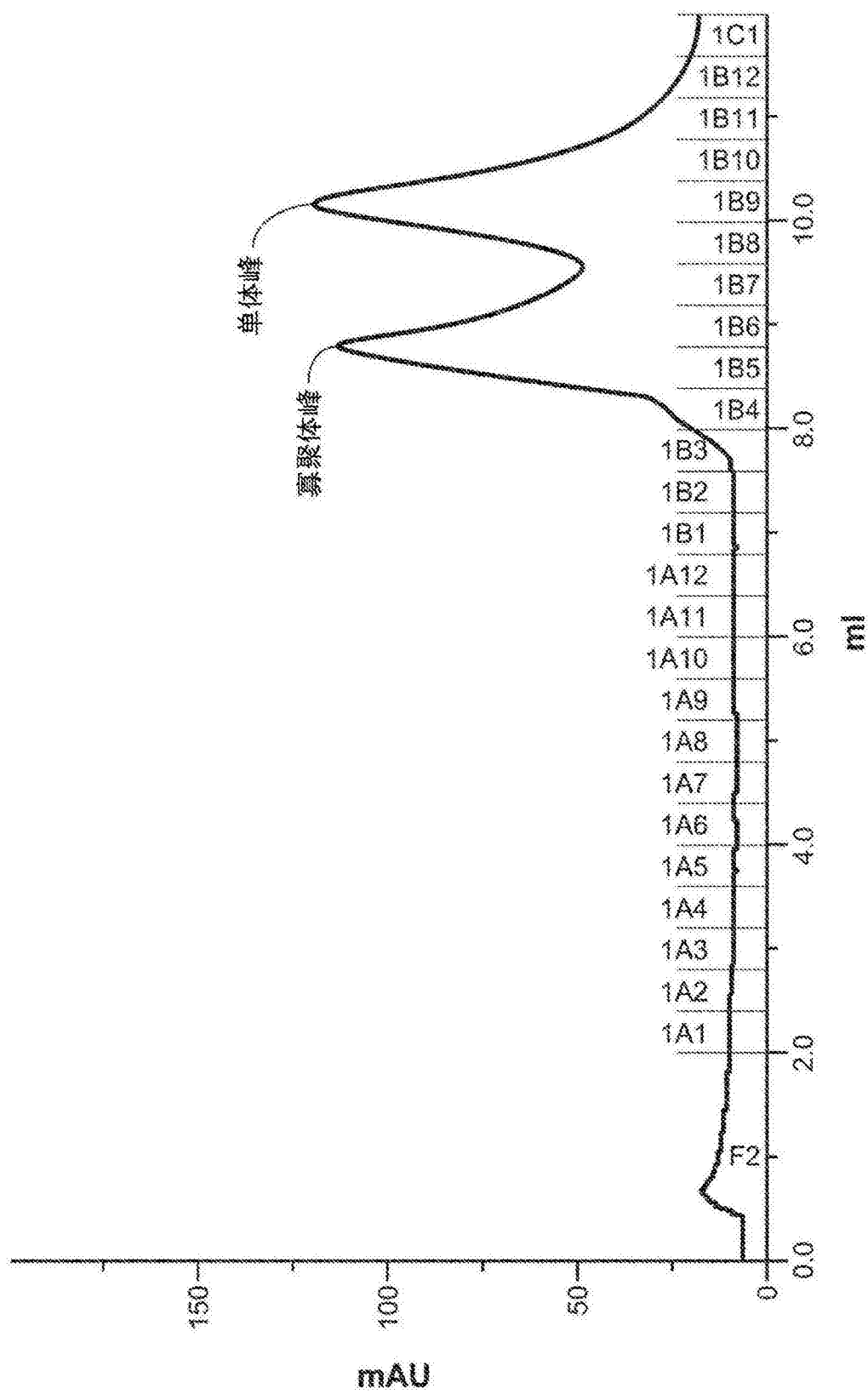


图5

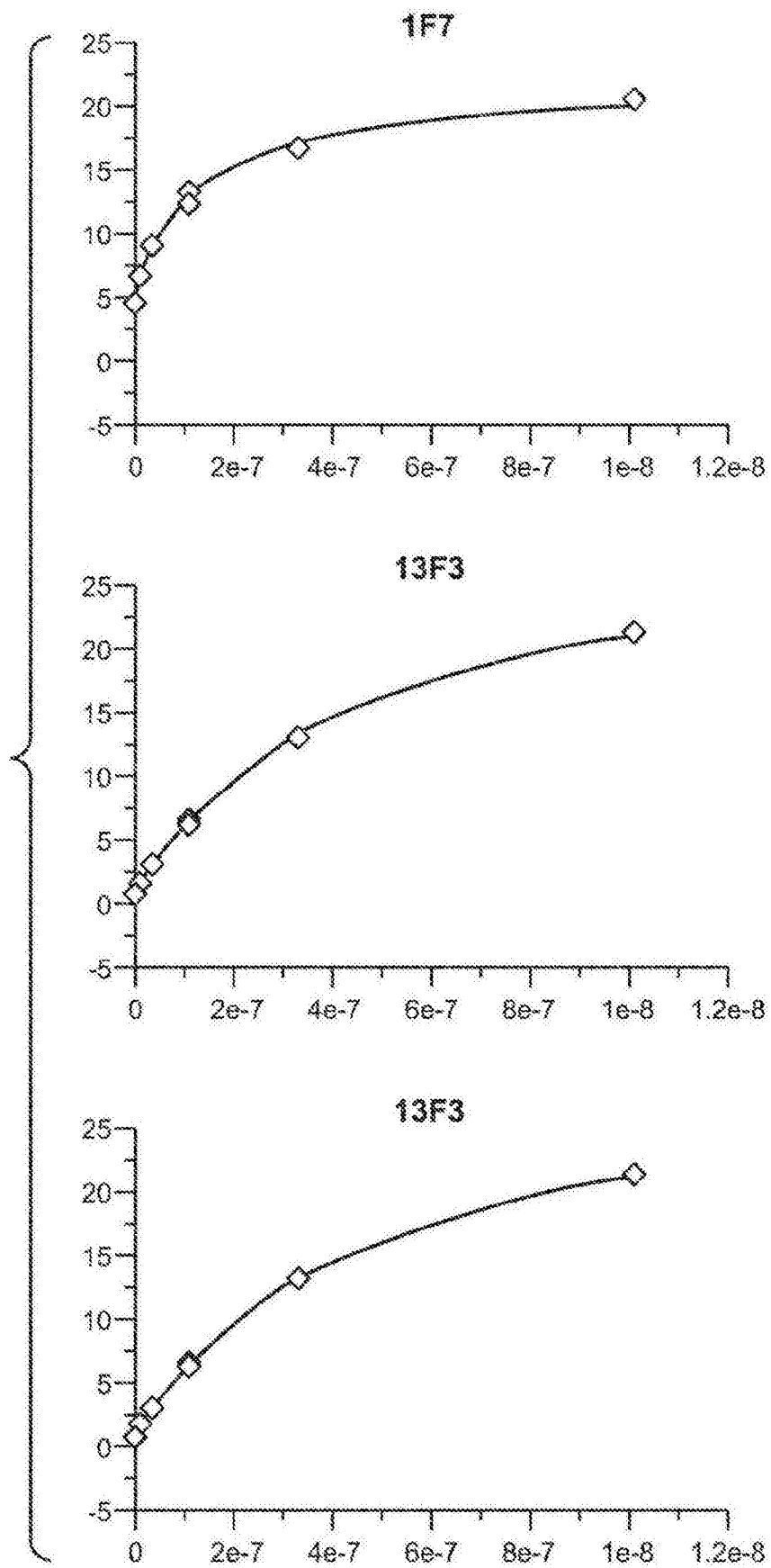
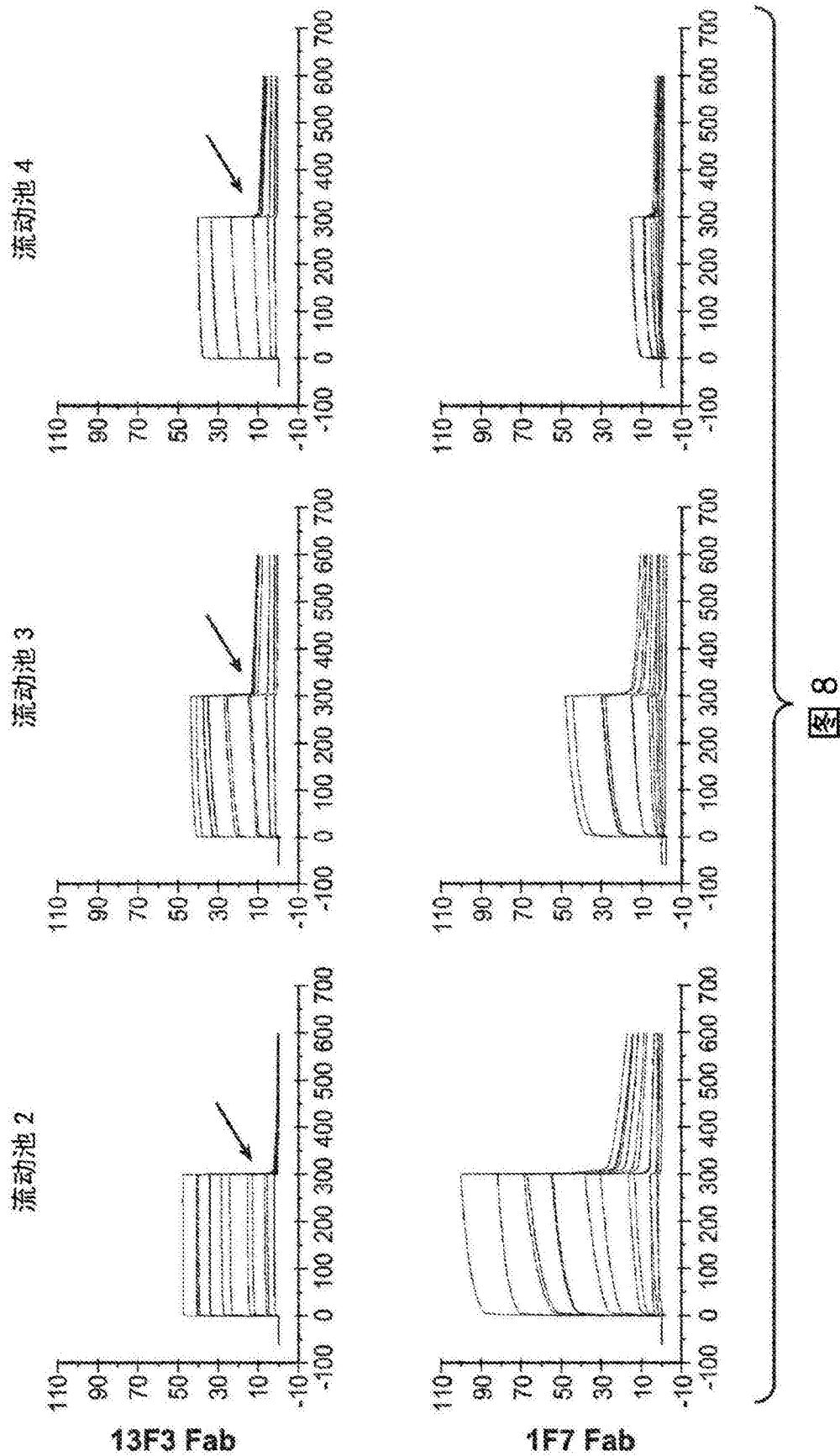


图7



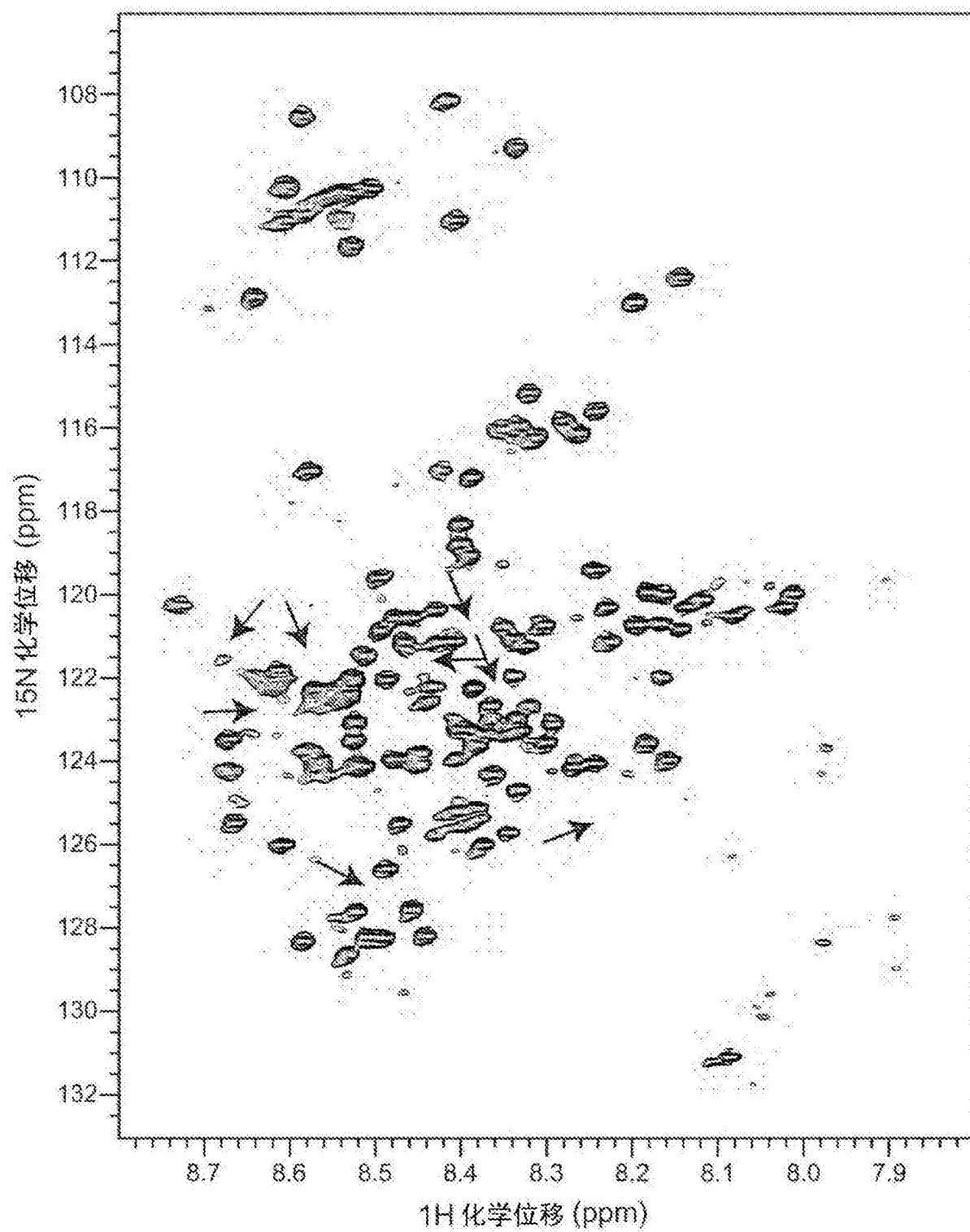


图9B

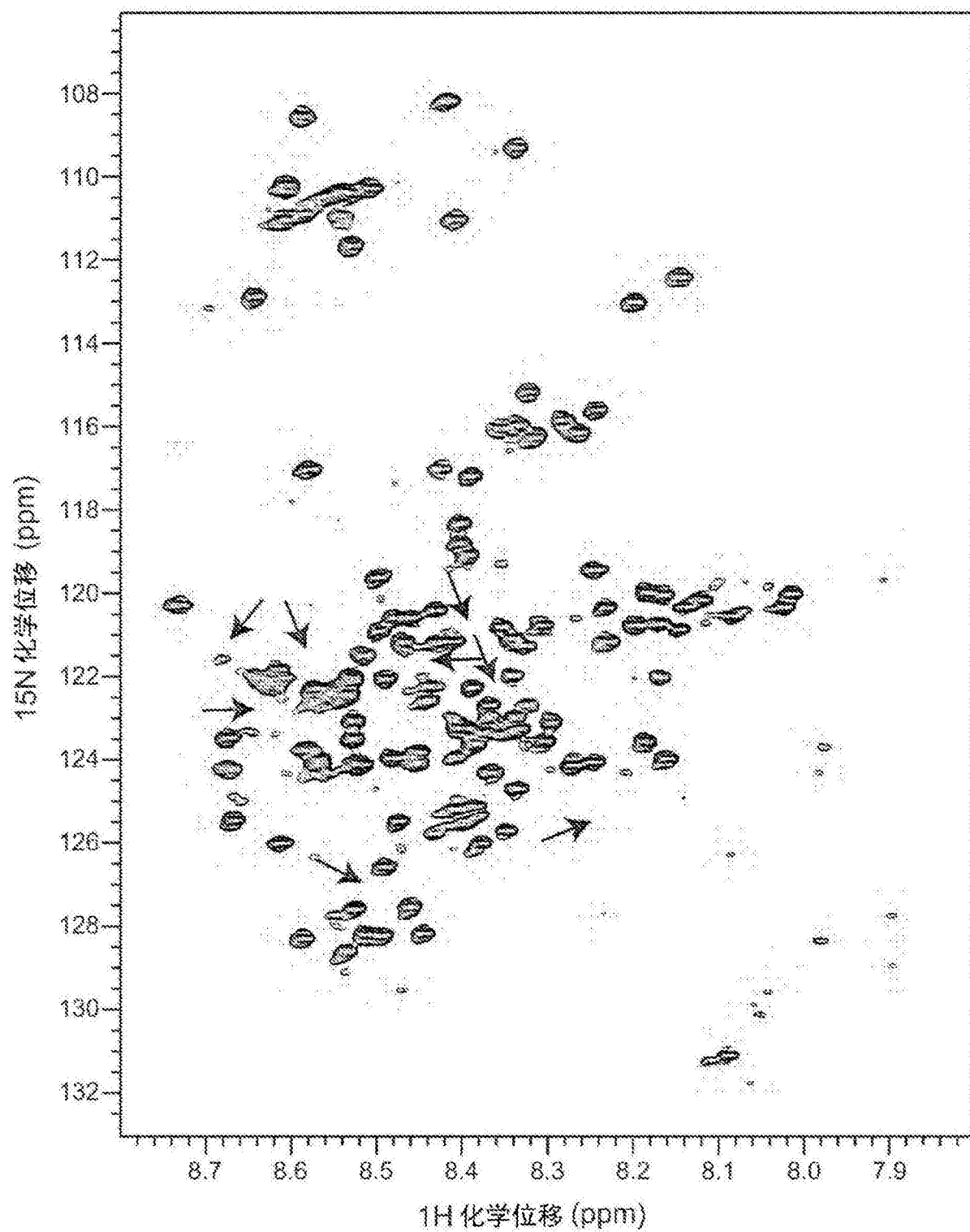


图10A

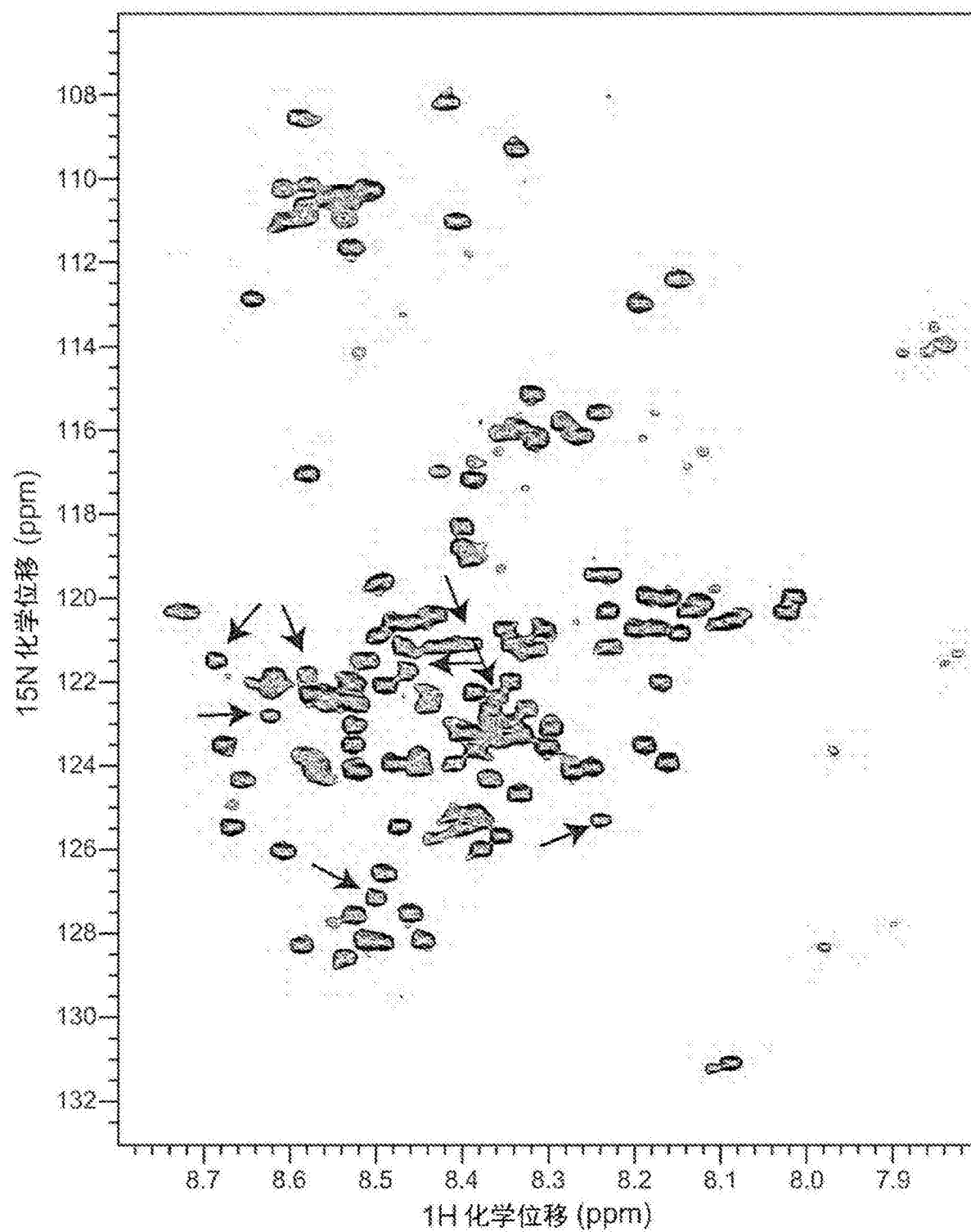


图10B

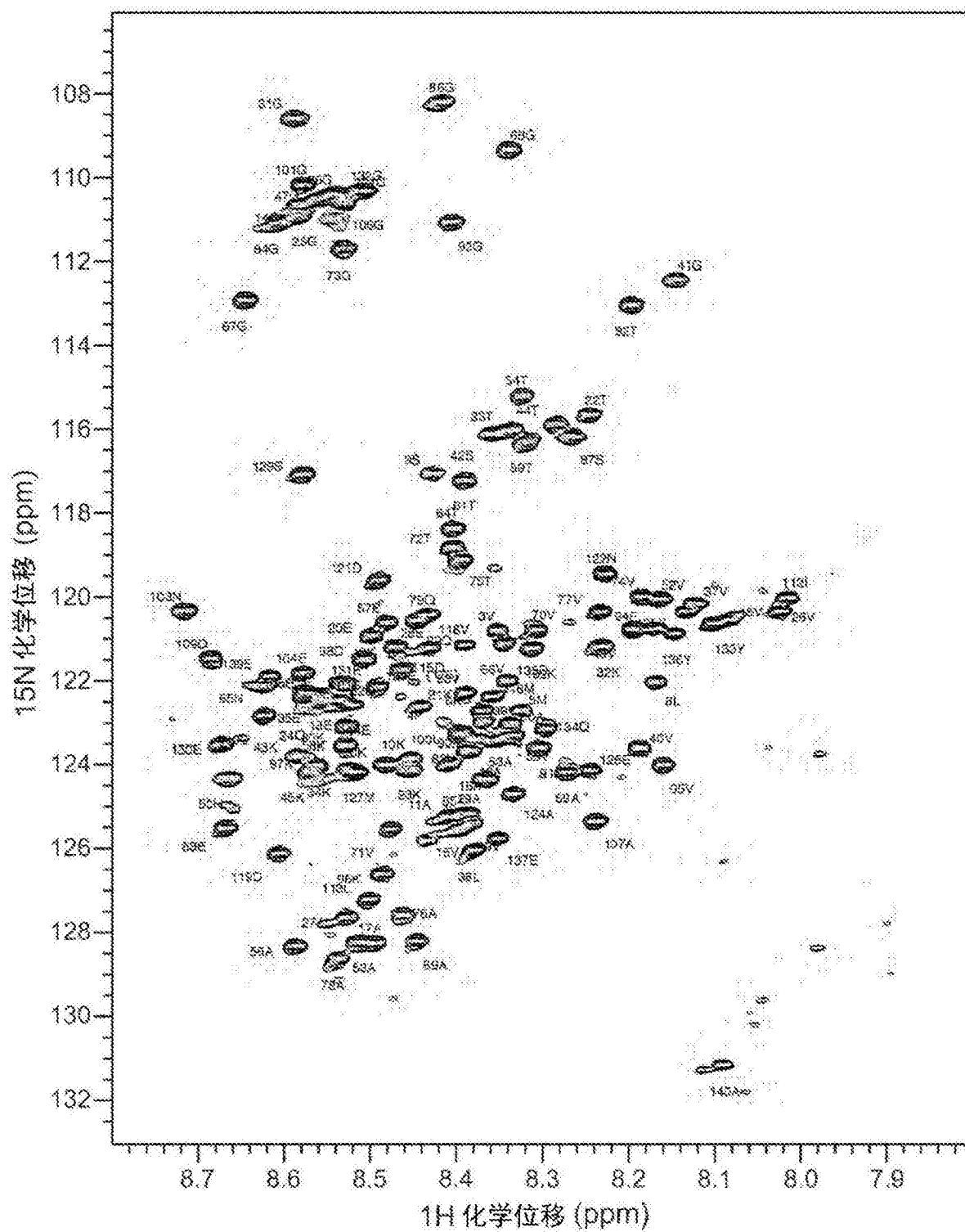


图11A

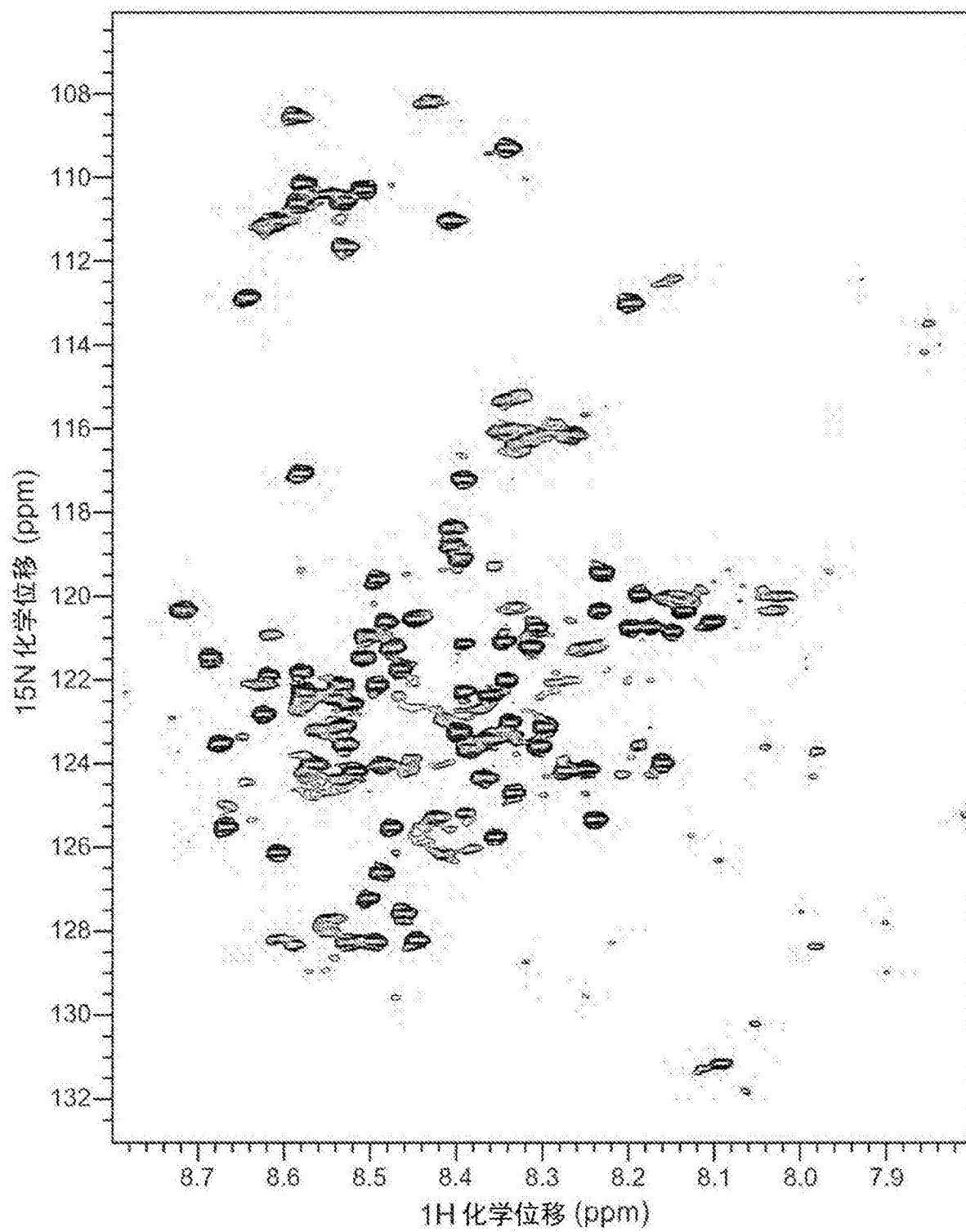


图11B

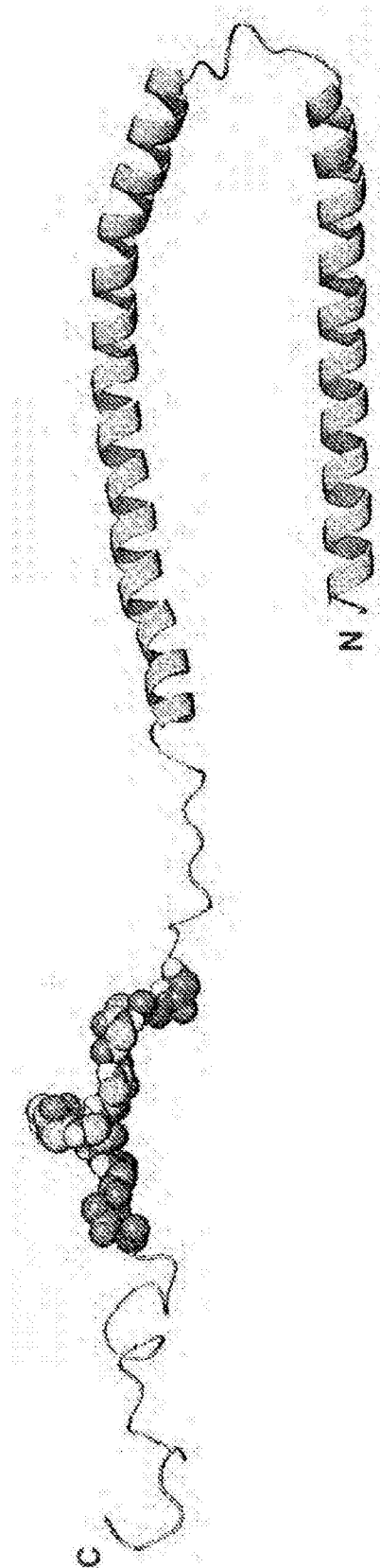


图12A

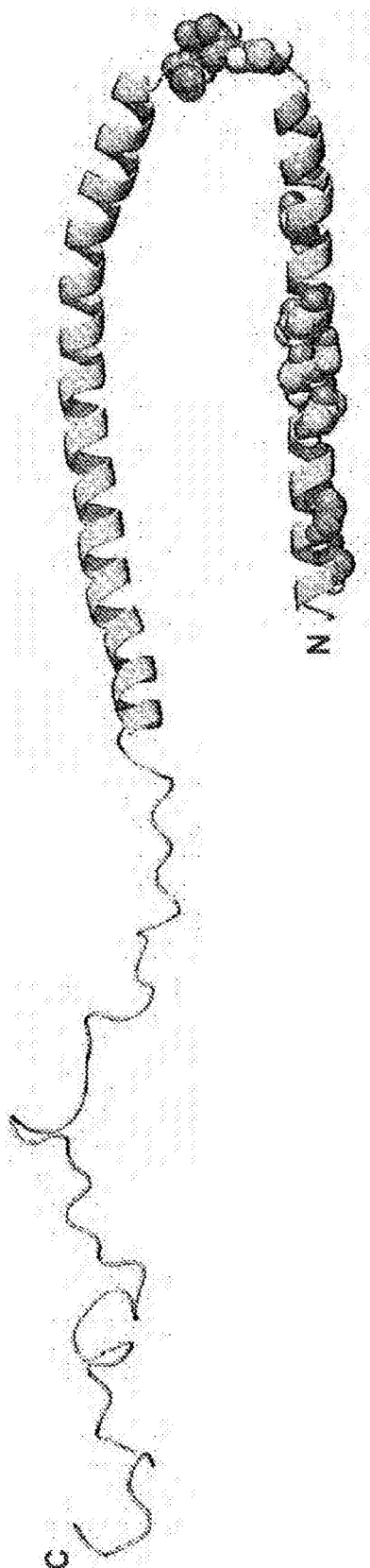


图12B