



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111479826 B

(45) 授权公告日 2024.10.29

(21) 申请号 201880080854.1

(72) 发明人 R·亚当斯 P·道内 T·S·贝克

(22) 申请日 2018.12.13

K·L·泰森 L·德里驰特尔维德
D·J·莱特伍德 D·J·麦克米兰

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111479826 A

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(43) 申请公布日 2020.07.31

专利代理人 傅宇昌

(30) 优先权数据

1720975.0 2017.12.15 GB

(51) Int.CI.

C07K 16/18 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.15

(56) 对比文件

CN 103796679 A, 2014.05.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/084697 2018.12.13

CN 104334184 A, 2015.02.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/115674 EN 2019.06.20

CN 104822389 A, 2015.08.05

CN 106397588 A, 2017.02.15

审查员 季璇馨

(73) 专利权人 UCB生物制药有限责任公司

权利要求书2页 说明书72页

地址 比利时布鲁塞尔

序列表28页 附图18页

(54) 发明名称

抗 α 突触核蛋白抗体

(57) 摘要

本发明涉及结合 α 突触核蛋白的抗体及其片段,其能够结合作为单体和在原纤维中的 α 突触核蛋白并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集。本发明的抗体用于在治疗 α 突触核蛋白病(包括帕金森病)中使用。

1. 结合 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:
 - a. 轻链可变区,其包含:
 - i. 由SEQ ID NO: 1组成的CDR-L1;
 - ii. 由SEQ ID NO: 2组成的CDR-L2;和
 - iii. 由SEQ ID NO: 3组成的CDR-L3;和
 - b. 重链可变区,其包含:
 - i. 由SEQ ID NO: 4组成的CDR-H1;
 - ii. 由SEQ ID NO: 5组成的CDR-H2;和
 - iii. 由SEQ ID NO: 6组成的CDR-H3。
2. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其在包含相关于SEQ ID NO: 10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合。
3. 根据权利要求2的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位进一步包含A124和G132。
4. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集。
5. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段能够结合作为单体和在原纤维中的 α 突触核蛋白。
6. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其对于在原纤维中的 α 突触核蛋白具有相比于单体 α 突触核蛋白而言更高的结合亲和力,其特征为对于单体 α 突触核蛋白的解离常数(K_D)是对于在原纤维中的 α 突触核蛋白的解离常数的至少10倍。
7. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其具有300 pM或更小的对于在原纤维中的 α 突触核蛋白的 K_D 。
8. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其不结合 β 突触核蛋白。
9. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
10. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为全长抗体。
11. 根据权利要求10的抗体或其抗原结合片段,其中所述全长抗体选自IgG1、IgG4或IgG4P。
12. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂或scFv。
13. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:
 - a. 由SEQ ID NO: 15组成的轻链可变区和由SEQ ID NO: 31组成的重链可变区;或者
 - b. 由SEQ ID NO: 17组成的轻链和由SEQ ID NO: 33组成的重链。
14. 根据权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:
 - a. 由SEQ ID NO: 15组成的轻链可变区和由SEQ ID NO: 23组成的重链可变区;或者
 - b. 由SEQ ID NO: 17组成的轻链和由SEQ ID NO: 25组成的重链。
15. 分离的多核苷酸,其编码根据权利要求1至14中任一项的抗体或其抗原结合片段。
16. 根据权利要求15的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码:

- a. 轻链可变区,其中所述多核苷酸:
 - i. 由SEQ ID NO: 16组成;和
 - b. 重链可变区,其中所述多核苷酸:
 - i. 由SEQ ID NO: 32组成;或
 - c. 轻链,其中所述多核苷酸:
 - i. 由SEQ ID NO: 18组成;和
 - d. 重链,其中所述多核苷酸:
 - i. 由SEQ ID NO: 34组成。
17. 克隆或表达载体,其包含一种或多种根据权利要求15或16中任一项的多核苷酸。
18. 宿主细胞,其包含:
- a. 一种或多种根据权利要求15或16中任一项的多核苷酸,或者
 - b. 一种或多种根据权利要求17的表达载体。
19. 用于产生根据权利要求1至14中任一项的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在适合于产生所述抗体或其抗原结合片段的条件下培养根据权利要求18的宿主细胞并且分离所述抗体或其抗原结合片段。
20. 药用组合物,其包含根据权利要求1至14中任一项的抗体或其抗原结合片段和一种或多种在药学上可接受的承载体、赋形剂或稀释剂。
21. 根据权利要求1至14中任一项的抗体或其抗原结合片段或者根据权利要求20的药用组合物在制备用于在治疗一种或多种突触核蛋白病中使用的药物中的用途,其中所述突触核蛋白病选自帕金森病(PD)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVA)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA)和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1)。
22. 根据权利要求21的用途,其中所述突触核蛋白病为帕金森病。
23. 根据权利要求22的用途,其中所述帕金森病为特发性帕金森病或遗传性形式的帕金森病。

抗 α 突触核蛋白抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及抗 α 突触核蛋白抗体以及使用其来治疗突触核蛋白病的方法。特别地，本发明涉及抗人 α 突触核蛋白抗体以及其在治疗帕金森病中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] α 突触核蛋白是以根本不同的形式存在的小的可溶性的长度为140个氨基酸的蛋白质。 α 突触核蛋白主要在突触前神经末梢中被发现，并且虽然不知道其确切功能，但是研究人员认为它在多个神经变性过程中起着中心作用。

[0004] 在过去15年中， α 突触核蛋白已显示出在所有形式的帕金森病的发病机理中起着关键作用。 α 突触核蛋白基因的遗传突变或基因多重化引起家族性早发性帕金森病 (PD)。令人感兴趣的是，在基因座位多重化家族中，致病效应明显地取决于基因剂量。基因双重化引起相对早发形式的PD (~47岁)，其具有正常的疾病过程，而基因三重化与非常早的发病年龄 (~33岁) 和非常快的疾病过程相关联。在所有形式的帕金森病中， α 突触核蛋白是卢伊体 (该疾病的最关键的病理学标志) 的主要成分。

[0005] 在该疾病的过程中卢伊体病理学状况扩大，并且已提出 α 突触核蛋白作为朊病毒样蛋白质起作用，其错误折叠从而形成可以从受影响的神经元散布至未受影响的神经元的毒性寡聚体和聚集体 (Olanow C.W等人, Movement Disorders, 第28卷, 第1期, 2013)。目前存在的疗法不能够终止疾病散布并且仅帮助治疗与运动神经元依赖性活动的逐渐丧失相关联的症状。在2014年，Tran H.T.等人 (Tran H.T.等人, Cell Reports 7, 2054-2065, 2014) 显示，向事先以纹状体内方式注射了 α 突触核蛋白预制原纤维的小鼠腹膜内施用对于经错误折叠的 α 突触核蛋白的单克隆抗体减轻了卢伊体病理学状况，改善了黑质多巴胺能神经元丧失，并且改善了运动损伤。因此，仍然存在对于能够在PD和其他 α 突触核蛋白病中发挥治疗效应的被动免疫疗法的需要。

[0006] 发明简述

[0007] 本发明通过提供根据下面实施方案的抗 α 突触核蛋白抗体解决了上面指出的需要。

[0008] 实施方案1:结合 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含：

[0009] a. 轻链可变区，其包含：

[0010] i. 包含SEQ ID NO:44的CDR-L1；

[0011] ii. 包含SEQ ID NO:2的CDR-L2；和

[0012] iii. 包含SEQ ID NO:3的CDR-L3；和

[0013] b. 重链可变区，其包含：

[0014] i. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1；

[0015] ii. 包含SEQ ID NO:45的CDR-H2；和

[0016] iii. 包含SEQ ID NO:46的CDR-H3。

[0017] 实施方案2:根据实施方案1的抗体或其抗原结合片段，其在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白

相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0018] 实施方案3:根据实施方案1或2中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集。

[0019] 实施方案4:根据实施方案1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段能够结合作为单体和在原纤维中的 α 突触核蛋白。

[0020] 实施方案5:根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其对于在原纤维中的 α 突触核蛋白具有相比于作为单体的 α 突触核蛋白而言更高的结合亲和力,其特征为对于单体 α 突触核蛋白的解离常数(K_D)是对于在原纤维中的 α 突触核蛋白的解离常数的至少10倍。

[0021] 实施方案6:根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其具有300pM或更小的对于在原纤维中的 α 突触核蛋白的 K_D 。

[0022] 实施方案7:根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其不结合 β 突触核蛋白和/或 γ 突触核蛋白。

[0023] 实施方案8:根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0024] 实施方案9:根据前述实施方案中任一项的抗体,其中所述抗体为全长抗体。

[0025] 实施方案10:根据实施方案9的抗体,其中所述全长抗体选自IgG1、IgG4或IgG4P。

[0026] 实施方案11:根据实施方案1至8中任一项的其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dAb或V_{HH}。

[0027] 实施方案12:根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0028] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者

[0029] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区;或者

[0030] c.包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。

[0031] 实施方案13:根据实施方案1至11中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0032] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者

[0033] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23的重链可变区;或者

[0034] c.包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:25的重链。

[0035] 实施方案14:根据实施方案1至11中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0036] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:9的CDR-H3;或者

[0037] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:27或35的重链可变区;或者

- [0038] c. 包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:29或37的重链。
- [0039] 实施方案15:根据实施方案1至11中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:
- [0040] a. 轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者
- [0041] b. 包含SEQ ID NO:19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23或31的重链可变区;或者
- [0042] c. 包含SEQ ID NO:21的轻链和包含SEQ ID NO:25或33的重链。
- [0043] 实施方案16:根据实施方案1至11中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:
- [0044] a. 轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:9的CDR-H3;或者
- [0045] b. 包含SEQ ID NO:19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:27或35的重链可变区;或者
- [0046] c. 包含SEQ ID NO:21的轻链和包含SEQ ID NO:29或37的重链。
- [0047] 实施方案17:抗体或其抗原结合片段,其:
- [0048] a. 与根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段竞争结合 α 突触核蛋白;和/或
- [0049] b. 交叉阻断根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段或者被根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段交叉阻断结合 α 突触核蛋白;和/或
- [0050] c. 在与根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段相同的表位处结合 α 突触核蛋白;和/或
- [0051] d. 包含与按照SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35的序列具有至少80%同一性或相似性的重链可变区;和/或
- [0052] e. 包含与按照SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:19的序列具有至少80%同一性或相似性的轻链可变区。
- [0053] 实施方案18:分离的多核苷酸,其编码根据实施方案1至16中任一项的抗体或其抗原结合片段。
- [0054] 实施方案19:根据实施方案18的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码:
- [0055] a. 轻链可变区,其中所述多核苷酸:
- [0056] i. 与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:20至少90%同一;或者
- [0057] ii. 包含SEQ ID NO:16或20;或者
- [0058] iii. 基本上由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:20组成;
- [0059] b. 重链可变区,其中所述多核苷酸:
- [0060] i. 与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32
- [0061] 或SEQ ID NO:36至少90%同一;或者
- [0062] ii. 包含SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32
- [0063] 或SEQ ID NO:36;或者
- [0064] iii. 基本上由SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:36组

成；

- [0065] c. 轻链, 其中所述多核苷酸:
 - [0066] i. 与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:22至少90%同一; 或者
 - [0067] ii. 包含SEQ ID NO:18或22; 或者
 - [0068] iii. 基本上由SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:22组成;
 - [0069] d. 重链, 其中所述多核苷酸:
 - [0070] i. 与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:34 或SEQ ID NO:38至少90%同一; 或者
 - [0071] ii. 包含SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:34 或SEQ ID NO:38; 或者
 - [0072] iii. 基本上由SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:38组成。
- [0075] 实施方案20: 克隆或表达载体, 其包含一种或多种根据实施方案18或19中任一项的多核苷酸。
- [0076] 实施方案21: 宿主细胞, 其包含:
- [0077] a. 一种或多种根据实施方案18或19中任一项的多核苷酸, 或者
 - [0078] b. 一种或多种根据实施方案20的表达载体。
- [0079] 实施方案22: 用于产生根据实施方案1至17中任一项的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包括在适合于产生所述抗体或其抗原结合片段的条件下培养根据实施方案21的宿主细胞并且分离所述抗体或其抗原结合片段。
- [0080] 实施方案23: 药用组合物, 其包含根据实施方案1至17中任一项的抗体或其抗原结合片段和一种或多种在药学上可接受的承载体、赋形剂或稀释剂。
- [0081] 实施方案24: 根据实施方案1至17中任一项的抗体或其抗原结合片段或者根据实施方案23的药用组合物, 其用于在疗法中使用。
- [0082] 实施方案25: 根据实施方案1至17中任一项的抗体或其抗原结合片段或者根据实施方案23的药用组合物, 其用于在治疗一种或多种突触核蛋白病中使用。
- [0083] 实施方案26: 根据实施方案25的具有所述用途的抗体或其抗原结合片段, 其中所述突触核蛋白病选自帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA) 和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1)。
- [0084] 实施方案27: 根据实施方案26的具有所述用途的抗体或其抗原结合片段, 其中所述突触核蛋白病为帕金森病。
- [0085] 实施方案28: 用于在患者中治疗突触核蛋白病的方法, 其包括向所述患者施用治疗有效量的根据实施方案1至17中任一项的抗体或其抗原结合片段或者根据实施方案23的药用组合物。
- [0086] 实施方案29: 根据实施方案29的方法, 其中所述突触核蛋白病选自帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA) 和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1), 优选地帕金森病。

[0087] 实施方案30:根据实施方案1至16中任一项的抗体或其抗原结合片段,其用于在诊断 α 突触核蛋白病中,优选地在诊断帕金森病中使用。

[0088] 附图简述

[0089] 图1. (A) α 突触核蛋白表达样品的SDS-PAGE。具有His标签(1)和在用TEV蛋白酶去除His标签后(2)的 α 突触核蛋白,对于经TEV蛋白酶处理的人 α 突触核蛋白(3)的Superdex 75大小排阻色谱法。蛋白质分子量标准SeeBluePlus2(Invitrogen) (M)。(B)作为野生型的未加标签的蛋白质从Expi293上清液中纯化出的人 α 突触核蛋白(4)的SDS-PAGE。蛋白质分子量标准SeeBluePlus2(Invitrogen) (M)。

[0090] 图2. (A)没有荧光的单体和在540nm处具有最大荧光的原纤维的通过JC-1测定法的原纤维分析。(B)关于单体人 α 突触核蛋白的无规卷曲谱(波长1646cm⁻¹)和在重组人 α 突触核蛋白原纤维中的间 β -片层形成(波长1625-1630cm⁻¹)的典型例子。

[0091] 图3.ELISA结合测定法。兔6470IgG1与重组人 α 突触核蛋白单体和原纤维以及人 α 突触核蛋白的肽PVDPDNEAYE的ELISA结合。

[0092] 图4. (A)显示了兔6470IgG1与人 α 突触核蛋白和人 β 突触核蛋白的结合的Western印迹。1,人 α 突触核蛋白;2,人 α 突触核蛋白(rPeptide);3,人 β 突触核蛋白(rPeptide);标准,MagicMark XP。(B)显示了所预测的在人 α 突触核蛋白上的6470的表位的NMR化学位移变化。

[0093] 图5.6470IgG与经固定化的 α 突触核蛋白的结合的抑制(对于所测试的肽中的每一种,左边和右边的柱分别表示单体和原纤维)。

[0094] 图6.与肽123-132相复合的6470Fab的示意性图示。

[0095] 图7.6470Fab重链与肽123-132相接触的示意性图示。肽残基直接进行标注,6470可变重链残基用vH-残基编号进行标注。

[0096] 图8.6470Fab轻链与肽123-132相接触的示意性图示。肽残基直接进行标注,6470可变轻链残基用vL-残基编号进行标注。

[0097] 图9.轻链人源化。6470是关于兔可变轻链序列。6470gL3是关于6470可变轻链的人源化移植物,其中使用IGKV1-16人种系作为受者构架。CDR以粗体/下划线显示。供者残基以粗体/斜体显示并且加有阴影:Q48和Q72。在CDRL1 N33R中的突变以粗体/下划线显示并且加有阴影。

[0098] 图10.重链人源化。6470是关于兔可变重链序列。6470gH23和gH36是关于抗体6470可变重链的人源化移植物,其中使用IGHV3-23人种系作为受者构架。CDR以粗体/下划线显示。供者残基以粗体/斜体显示并且加有阴影:V24、Y47、I48、G49、S73、V78和R97。在CDRH2和CDRH3中的突变S56N和N102H分别以粗体/下划线显示并且加有阴影。

[0099] 图11.在空气-液体界面处的应力。在涡旋振荡后3和24小时之时在三种预配制缓冲液中的6470抗体和突变体。

[0100] 图12.免疫组织化学。在来自PD患者(A-E)和非PD患者(F-H)的脑切片中的免疫反应性。(A-C)在PD患者的颞皮质中,抗体6470标记了在灰质中的神经毡和卢伊体样结构(白色箭头)。(D,E)抗体6470标记了在PD患者的黑质中的卢伊体样特征(白色箭头)。(F,G)在非PD颞皮质组织中,6470也标记了神经毡,但没有观察到卢伊体样结构。(H)在非PD个体的黑质中未观察到卢伊体样结构;黑色箭头指向非特异性标记。比例尺=50 μ m。

[0101] 图13. 基于细胞的聚集测定法(HEK细胞)。本发明的抗体能够抑制由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集, 具有低于5nM的IC₅₀。误差棒表示测量的标准误差(SEM, N=3, n=9)。在图例中, 在每个抗体名称的末端处的FL意指“全长”。

[0102] 图14. 基于细胞的聚集测定法(原代神经元)。根据本发明的代表性抗体能够在表达内源水平的 α 突触核蛋白的小鼠原代神经元上抑制由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集, 具有低于4nM的IC₅₀。误差棒表示测量的标准误差(SEM, N=4, n=18)。

[0103] 图15. 在分别注射有小鼠或人PFF的雄性C57B1/6J野生型小鼠(A)和SNCA-OVX小鼠(B)的不同脑区域中 α 突触核蛋白病理学状况(箭头)的免疫组织化学照片。

[0104] 图16. 在注射有小鼠PFF的C57B1/6J野生型小鼠的不同脑区域(A: 大脑皮质; B: 纹状体; C: 杏仁核; 和D: 黑质)中 α 突触核蛋白病理学状况的定量。

[0105] 图17. α 突触核蛋白抗体的药物代谢动力学特性曲线:A. 在野生型小鼠中的6470抗体;B. 在食蟹猴中的6470和比较者抗体。

[0106] 发明详述

[0107] 现在, 将会关于特别的非限制性方面和其实施方案并且参考某些附图和实施例来描述本公开内容。

[0108] 除非另外指明, 技术术语以其通常的意义来进行使用。如果将特别的含义传达给某些术语, 那么将会在使用所述术语的上下文中给出术语的定义。

[0109] 在本说明书和权利要求书中使用术语“包含(包括)”的情况下, 它并不排除其他要素。对于本公开内容的目的, 术语“由……组成”被认为是术语“包含(包括)……”的一个优选的实施方案。

[0110] 在当提及单数名词时使用不定冠词或定冠词例如“a”、“an”或“the”的情况下, 这包括那个名词的复数, 除非另有特别说明。

[0111] 如在本文中所使用的, 术语“治疗”是指获得所希望的药理学和/或生理学效应。所述效应可以是预防性的, 在完全地或部分地防止疾病或其症状方面, 和/或可以是治疗性的, 在部分地或完全地治愈疾病和/或归因于该疾病的不利效应方面。因此, 治疗涵盖在哺乳动物中, 特别是在人中的疾病的任何治疗, 并且包括: (a) 防止该疾病在可能倾向于该疾病但还未被诊断为具有该疾病的受试者中出现; (b) 抑制该疾病, 即使其发展停止; 和(c) 缓解该疾病, 即引起该疾病消退。

[0112] “治疗有效量”是指抗 α 突触核蛋白抗体或其抗原结合片段的这样的量, 其在当施用给哺乳动物或其他受试者以治疗疾病时足以产生对于该疾病的这样的治疗。治疗有效量将会取决于抗 α 突触核蛋白抗体或其抗原结合片段、疾病及其严重度以及待治疗的受试者的年龄、体重等而变化。

[0113] 在整个本说明书中, 术语“分离的”意指, 所述抗体、抗原结合片段或多核苷酸视情况可以存在于不同于在自然界中它可以出现于之中的环境的物理环境中。本发明提供了结合 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体包含:

[0114] a. 轻链可变区, 其包含:

[0115] i. 包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0116] ii. 包含SEQ ID NO:2的CDR-L2; 和

[0117] iii. 包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和

[0118] b. 重链可变区,其包含:

[0119] iv. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0120] v. 包含SEQ ID NO:45的CDR-H2;和

[0121] vi. 包含SEQ ID NO:46的CDR-H3。

[0122] 在SEQ ID NO:44中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或精氨酸(Arg;R)。独立地,在SEQ ID NO:45中,Xaa为丝氨酸(Ser;S)或天冬酰胺(Asn;N);和在SEQ ID NO:46中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或组氨酸(His;H)。

[0123] 在一个实施方案中,在SEQ ID NO:44和46中的Xaa为天冬酰胺并且在SEQ ID NO:45中的Xaa为丝氨酸。

[0124] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

[0125] a. 轻链可变区,其包含:

[0126] i. 包含SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0127] ii. 包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0128] iii. 包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0129] b. 重链可变区,其包含:

[0130] iv. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0131] v. 包含SEQ ID NO:5的CDR-H2;和

[0132] vi. 包含SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0133] α 突触核蛋白(或者 α -syn; α -突触核蛋白; α -syn或任何其他已知的同义词)是指该蛋白质的通用名称,并且包括而不局限于可变剪接变体、突变体和来自其他物种(小鼠、猴等)的 α 突触核蛋白。除非另外说明,当想要或明确提及人 α 突触核蛋白时,这样的 α 突触核蛋白包含在SEQ ID NO:10中或在Uniprot P37840中给出的序列。

[0134] 在本文中所使用的术语“抗体”通常是指完整的(全)抗体,即包含两条重链和两条轻链的要素。所述抗体可以进一步包含另外的结合结构域,例如按照在W0 2007/024715中所公开的分子DVD-Ig,或在W02011/030107中所描述的所谓的(FabFv)₂Fc。因此,在本文中所使用的抗体包括二价、三价或四价全长抗体。

[0135] 抗体的抗原结合片段包括单链抗体(即,全长重链和轻链),Fab,经修饰的Fab,Fab',经修饰的Fab',F(ab')₂,Fv,Fab-Fv,Fab-dsFv,单结构域抗体(例如,V_H或V_L或V_{HH}),scFv,二价、三价或四价抗体,双-scFv,双链抗体,三体抗体,三链抗体,四链抗体,和上面任何一个的表位结合片段(参见例如Holliger和Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法是本领域中熟知的(参见例如Verma等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。Fab-Fv形式首次公开在W02009/040562中,并且其二硫化物稳定化形式,Fab-dsFv,首次公开在W02010/035012中。用于在本发明中使用的其他抗体片段包括在国际专利申请W02005/003169、W02005/003170和W02005/003171中所描述的Fab和Fab'片段。多价抗体可以包含多特异性,例如是双特异性的,或者可以是单特异性的(参加例如W0 92/22583和W005/113605)。后者的一个这样的例子为在W092/22583中所描述的Tri-Fab(或TFM)。

[0136] 备选的抗原结合片段包括与两个scFv或dsscFv相连接的Fab,其中每个scFv或dsscFv结合相同或不同的靶标(例如,一个scFv或dsscFv结合治疗性靶标,而一个scFv或dsscFv通过结合例如白蛋白来增加半寿期)。此类抗体片段描述在国际专利申请公开号W02015/197772中,其通过提及而以其整体并且特别地相对于抗体片段的讨论合并入本文。

[0137] 典型的Fab'分子包含重链和轻链对,其中重链包含可变区VH、恒定结构域CH1和天然或经修饰的铰链区,并且轻链包含可变区VL和恒定结构域CL。根据本公开内容的Fab'的二聚体产生F(ab')₂,其中例如二聚化可以通过铰链。

[0138] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段与 α 突触核蛋白的表位相结合。

[0139] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0140] a.轻链可变区,其包含:

[0141] i.包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0142] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0143] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0144] b.重链可变区,其包含:

[0145] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0146] v.包含SEQ ID NO:45的CDR-H2;和

[0147] vi.包含SEQ ID NO:46的CDR-H3,

[0148] 并且在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0149] 在SEQ ID NO:44中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或精氨酸(Arg;R)。独立地,在SEQ ID NO:45中,Xaa为丝氨酸(Ser;S)或天冬酰胺(Asn;N);和在SEQ ID NO:46中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或组氨酸(His;H)。

[0150] 在一个实施方案中,在SEQ ID NO:44和46中的Xaa为天冬酰胺并且在SEQ ID NO:45中的Xaa为丝氨酸。

[0151] 在一个实施方案中,所述结合 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段包含:

[0152] a.轻链可变区,其包含:

[0153] i.包含SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0154] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0155] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0156] b.重链可变区,其包含:

[0157] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0158] v.包含SEQ ID NO:5的CDR-H2;和

[0159] vi.包含SEQ ID NO:6的CDR-H3,

[0160] 并且在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0161] 在本发明之内,术语“表位”可互换地用于构象和线性表位两者,其中构象表位由抗原的氨基酸一级序列的不连续部分组成,而线性表位由连续氨基酸所形成的序列形成。

[0162] 所述表位可以通过本领域中已知的任何合适的表位作图方法并结合由本发明所提供的抗体中的任何一种来鉴定。此类方法的例子包括就与本发明的抗体或其片段的结合

来筛选源自全长 α 突触核蛋白的具有变化长度的肽，并且鉴定出包含由所述抗体所识别的表位的序列的、可以特异地与所述抗体相结合的最小片段。 α 突触核蛋白肽可以以合成方式或者通过 α 突触核蛋白蛋白质的蛋白水解消化来产生。可以通过例如质谱分析来鉴定结合所述抗体的肽。在另一个例子中，可以使用NMR光谱学或X-射线晶体学来鉴定由本发明的抗体所结合的表位。典型地，当通过X-射线晶体学来进行表位确定时，在自CDR的4Å之内的所述抗原的氨基酸残基被考虑为表位的氨基酸残基部分。一旦经鉴定，所述表位就可以用于制备结合本发明的抗体的片段，并且如果需要，用作免疫原以获得结合相同表位的另外的抗体。

[0163] 在一个实施方案中，通过X-射线晶体学来确定抗体或其抗原结合片段的表位，其中使用包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基123至132的 α 突触核蛋白肽。

[0164] 优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集。

[0165] 在该特殊的上下文中，术语“阻止”(及其语法变化形式)在本文中与术语“抑制”可互换使用，并且指明了相关于由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集而言根据本发明的抗体所具有的效应。所述效应可以是预防性的，在完全地或部分地阻止聚集方面；或者在完全地或部分地减少，即阻断已经开始的聚集进一步进展，或者完全地或部分地减少进一步的聚集出现方面；或者在完全地或部分地逆转已经出现的聚集方面。

[0166] 在不希望被理论所束缚的情况下，认为根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合：

[0167] i) 以单体形式的 α 突触核蛋白，并且阻止 α 突触核蛋白形成寡聚体和聚集体；和/或

[0168] ii) 以寡聚体和原纤维形式的 α 突触核蛋白，并且阻止 α 突触核蛋白在神经元之间散布；和/或

[0169] iii) 以寡聚体和/或原纤维形式的 α 突触核蛋白，并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集，优选地内源 α 突触核蛋白聚集。

[0170] 在本文中关于 α 突触核蛋白所使用的术语“原纤维”、“原纤维形式”或“在原纤维中”意在是指 α 突触核蛋白的非单体形式，包括 α 突触核蛋白寡聚体，其可以构成在脑结构之内和之间的散布性种类。

[0171] 因此，在一个实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含：

[0172] a. 轻链可变区，其包含：

[0173] i. 包含SEQ ID NO:44的CDR-L1；

[0174] ii. 包含SEQ ID NO:2的CDR-L2；和

[0175] iii. 包含SEQ ID NO:3的CDR-L3；和

[0176] b. 重链可变区，其包含：

[0177] iv. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1；

[0178] v. 包含SEQ ID NO:45的CDR-H2；和

[0179] vi. 包含SEQ ID NO:46的CDR-H3，

[0180] 其阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集。优选地，所述抗体或其抗原结合片段在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、

E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0181] 在SEQ ID N0:44中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或精氨酸(Arg;R)。独立地,在SEQ ID N0:45中,Xaa为丝氨酸(Ser;S)或天冬酰胺(Asn;N);和在SEQ ID N0:46中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或组氨酸(His;H)。

[0182] 在一个实施方案中,在SEQ ID N0:44和46中的Xaa为天冬酰胺并且在SEQ ID N0:45中的Xaa为丝氨酸。

[0183] 在一个优选的实施方案中,所述结合 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段包含:

[0184] a.轻链可变区,其包含:

[0185] i.包含SEQ ID N0:1的CDR-L1;

[0186] ii.包含SEQ ID N0:2的CDR-L2;和

[0187] iii.包含SEQ ID N0:3的CDR-L3;和

[0188] b.重链可变区,其包含:

[0189] iv.包含SEQ ID N0:4的CDR-H1;

[0190] v.包含SEQ ID N0:5的CDR-H2;和

[0191] vi.包含SEQ ID N0:6的CDR-H3,

[0192] 并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集。优选地,所述抗体或其抗原结合片段在包含相对于SEQ ID N0:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0193] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段能够结合作为单体和在原纤维中的 α 突触核蛋白。在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段对于在原纤维中的 α 突触核蛋白具有相比于作为单体的 α 突触核蛋白而言更强的结合亲和力。这一点的特征为对于单体 α 突触核蛋白的解离常数(K_D)是对于在原纤维中的 α 突触核蛋白的解离常数的至少10倍。

[0194] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于单体 α 突触核蛋白具有小于15nM的解离常数(K_D)。在另一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于在原纤维中的 α 突触核蛋白具有小于10nM的解离常数(K_D)。在一个优选的实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于在原纤维中的 α 突触核蛋白具有小于300pM的解离常数(K_D)。

[0195] 在本文中所使用的术语“ K_D ”是指从 K_d 与 K_a 之比(即, K_d/K_a)获得的并且以摩尔浓度(M)表示的解离常数。 K_d 和 K_a 分别是指特定抗原-抗体(或其抗原结合片段)相互作用的解离速率和缔合速率。可以通过使用本领域中充分建立的方法来测定关于抗体的 K_D 值。一种用于测定抗体的 K_D 的方法是通过使用表面等离子体共振,例如 **Biacore®** 系统,其例如描述在本文的实施例中,其中使用分离的天然或重组 α 突触核蛋白、其合适的融合蛋白/多肽或者其原纤维。在一个实施例中,通过使用重组人 α 突触核蛋白来测量亲和力,如在本文的实施例中所描述的。对于表面等离子体共振,将靶分子固定在固相上并且暴露于在沿流动池运动的流动相中的配体。如果出现与经固定化的靶标相结合的配体,那么局部折光指数发生变化,从而导致SPR角的变化,其可以通过检测反射光的强度的变化来实时地监测。可以分析SPR信号的变化速率以产生关于结合反应的结合和解离相的表观速率常数。这些值的比率给出表观平衡常数(亲和力)(参见例如,Wolff等人,Cancer Res.53:2560-65(1993))。

[0196] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于在原纤维中的 α 突触核蛋白具有相比于作为单体的 α 突触核蛋白而言更高的结合亲和力(即,更小的 K_D)。术语“亲和力”是指在所述抗体或其抗原结合片段与 α 突触核蛋白之间的相互作用的强度。

[0197] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于阻断由在原纤维中的 α 突触核蛋白所诱导的 α 突触核蛋白聚集具有小于的10nM的 IC_{50} ,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于阻断由在原纤维中的 α 突触核蛋白所诱导的 α 突触核蛋白聚集具有小于的5nM的 IC_{50} 。基于细胞的聚集测定法的例子公开在实施例中。

[0198] 在本文中所使用的术语“ IC_{50} ”是指半最大抑制浓度,其是物质例如抗体在抑制特别的生物学或生物化学功能(在本发明中,由 α 突触核蛋白(优选地在原纤维中的 α 突触核蛋白)所诱导的聚集)中的效能的量度。 IC_{50} 为指明了需要多少特定物质来将给定生物学过程抑制一半的定量量度。

[0199] 在一个实施方案中,在体外测定法中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于阻断由在原纤维中的 α 突触核蛋白所诱导的 α 突触核蛋白聚集具有小于的10nM的 IC_{50} ,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对于阻断由在原纤维中的 α 突触核蛋白所诱导的 α 突触核蛋白聚集具有小于的5nM的 IC_{50} 。

[0200] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段不结合 β 突触核蛋白和/或 γ 突触核蛋白,并且特异于 α 突触核蛋白。

[0201] 在本文中所使用的“特异(的)”意欲是指仅识别它所特异于的抗原的抗体,或者对于它所特异于的抗原(例如, α 突触核蛋白)具有相比于它所非特异于的抗原(γ 和 β 突触核蛋白)而言显著更高的结合亲和力的抗体,例如高至至少5、6、7、8、9、10倍的结合亲和力。

[0202] 根据本发明的抗体可以通过使用本领域中已知的任何合适的方法来获得。 α 突触核蛋白多肽/蛋白质,包括融合蛋白,(重组地或天然地)表达所述多肽的细胞可以用于产生特异地识别 α 突触核蛋白的抗体。所述多肽可以是“成熟的”多肽或者其在生物学上有活性的片段或衍生物。

[0203] 在一个实施方案中,所述多肽(即,抗原)为人 α 突触核蛋白单体或其片段,其优选地如在下面实施例中所描述的那样产生。

[0204] 用于对宿主进行免疫接种的多肽可以通过本领域中熟知的过程从包含表达系统的基因工程宿主细胞中制备,或者它们可以从天然生物学来源中回收。在本申请中,术语“多肽”包括肽、多肽和蛋白质。这些可互换使用,除非另外说明。 α 突触核蛋白多肽或其片段在一些情况下可以为更大的蛋白质(例如融合蛋白,例如与亲和标签等相融合)的一部分。

[0205] 可以获得针对 α 突触核蛋白多肽而产生的抗体,其中对动物进行免疫接种是必需的,这通过将所述多肽施用给动物,优选地非人动物来进行,其中使用熟知的和常规的实验方案,参见例如Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir(编辑),第4卷, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986)。可以对许多温血动物,例如兔、小鼠、大鼠、绵羊、牛、骆驼或猪进行免疫接种。但是,小鼠、兔、猪和大鼠通常是最合适的。

[0206] 可以通过本领域中已知的任何方法,例如杂交瘤技术(Kohler&Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497)、三源杂交瘤技术、人B-细胞杂交瘤技术(Kozbor等人, 1983, Immunology Today, 4: 72)和EBV-杂交瘤技术(Cole等人, Monoclonal Antibodies and

Cancer Therapy, 第77-96页, Alan R Liss, Inc., 1985), 来制备单克隆抗体。

[0207] 用于在本发明中使用的抗体也可以通过使用单淋巴细胞抗体方法来产生,所述方法通过克隆和表达从为了特异性抗体的产生而选择出的单个淋巴细胞中产生的免疫球蛋白可变区cDNA,这通过例如由Babcock, J. 等人, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15) : 7843-78481; WO92/02551; WO2004/051268; 和 WO2004/106377 所描述的方法。

[0208] 对于抗体的筛选可以通过使用用于测量与 α 突触核蛋白的结合的测定法和/或用于测量在抗体或其片段存在下对 α 突触核蛋白形成原纤维的抑制的测定法来进行。

[0209] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含互补性决定区 (CDR), 其中三个来自重链, 和三个来自轻链。通常, CDR在构架中并且一起形成可变区。依照惯例, 在抗体或其抗原结合片段的重链可变区中的CDR被称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 并且在轻链可变区中的CDR被称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在每条链的从N-末端至C-末端的方向上将它们顺次编号。

[0210] CDR常规地按照由Kabat等人所设想出的系统来进行编号。该系统阐述在Kabat等人, 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (此后, “Kabat等人(同上)”) 中。在本说明书中使用该编号系统,除非另外指明。

[0211] Kabat残基命名并不总是与氨基酸残基的线性编号直接相符。实际的线性氨基酸序列可以包含比在严格的Kabat编号中更少或额外的氨基酸, 其相当于基本可变结构域结构的结构组分(无论是构架区, 还是互补性决定区 (CDR))的缩短或插入。对于给定的抗体, 可以通过将在抗体序列中的具有同源性的残基与“标准的”经Kabat编号的序列进行比对来确定残基的正确的Kabat编号。

[0212] 按照Kabat编号系统, 重链可变结构域的CDR位于残基31-35 (CDR-H1)、残基50-65 (CDR-H2) 和残基95-102 (CDR-H3) 处。但是, 按照Chothia (Chothia, C. 和 Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), 等价于CDR-H1的环从残基26延伸至残基32。因此, 除非另外指明, 在本文中所使用的“CDR-H1”意欲是指残基26至35, 如由Kabat编号系统和Chothia的拓扑学环定义的组合所描述的。

[0213] 按照Kabat编号系统, 轻链可变结构域的CDR位于残基24-34 (CDR-L1)、残基50-56 (CDR-L2) 和残基89-97 (CDR-L3) 处。

[0214] 在一个优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和重链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0215] 备选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和重链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:9的CDR-H3。

[0216] 在另一个实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和重链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0217] 在另外一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:9的CDR-H3。

[0218] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含在其中产生了所述抗体的动物的构架区。例如,如果在兔中产生所述抗体,那么它将会包含上面所定义的CDR和兔抗体的构架区,例如包含按照SEQ ID NO:11(其核苷酸序列显示在SEQ ID NO:12中)的轻链可变区和按照SEQ ID NO:13(其核苷酸序列显示在SEQ ID NO:14中)的重链可变区的抗体。

[0219] 在一个实施方案中,所述抗体可以是嵌合的、人源化的或人的抗体或其片段。

[0220] 嵌合抗体典型地通过使用重组DNA方法来产生。可以通过用关于人L和H链的编码序列替换相应的非人(例如,鼠类)H和L恒定区来修饰DNA(Morrison; PNAS 81, 6851 (1984))。

[0221] 人抗体包含作为特定种系序列“的产物”或“源自”特定种系序列的重链或轻链可变区或者全长重链或轻链,如果抗体的可变区或全长链是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统中获得的。此类系统包括用目的抗原对携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行免疫接种,或者用目的抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。可以通过下述方式如此地来鉴定作为人种系免疫球蛋白序列“的产物”或“源自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体或其片段:将人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较,并且选择与人抗体的序列在序列上最接近的(即,最大的%同一性)人种系免疫球蛋白序列。作为特定人种系免疫球蛋白序列“的产物”或“源自”特定人种系免疫球蛋白序列的人抗体相比于种系序列而言可以包含氨基酸差异,这归因于例如天然发生的体细胞突变或位点定向突变的故意引入。但是,典型地,所选择的人抗体与由人种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列在氨基酸序列上至少90%同一,并且包含这样的氨基酸残基,所述氨基酸残基将该人抗体鉴定为是人的,当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠类种系序列)进行比较时。在某些情况下,人抗体可以与由种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列在氨基酸序列上至少60%、70%、80%、90%或至少95%,或甚至至少96%、97%、98%或99%同一。典型地,源自特定人种系序列的人抗体将会展示出与由人种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列的不超过10个氨基酸的差异。在某些情况下,人抗体可以展示出与由种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列的不超过5个,或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸的差异。

[0222] 可以通过本领域技术人员已知的许多方法来产生人抗体。可以通过杂交瘤方法来制备人抗体,其中使用人骨髓瘤或小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(Kozbor, J Immunol, (1984) 133:3001; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63, Marcel Dekker Inc, 1987)。备选的方法包括使用噬菌体文库或转基因小鼠,两者都利用人可变区储存库(Winter G, (1994) Annu Rev Immunol 12:433-455; Green LL, (1999) J Immunol Methods 231:11-23)。

[0223] 在本发明的一个优选的实施方案中,根据本公开内容的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0224] 因此,所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0225] a.轻链可变区,其包含:

[0226] i.包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0227] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0228] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0229] b.重链可变区,其包含:

[0230] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0231] v.包含SEQ ID NO:45的CDR-H2;和

[0232] vi.包含SEQ ID NO:46的CDR-H3,

[0233] 其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。优选地,所述人源化抗体或其抗原结合片段阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更优选地,在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0234] 在SEQ ID NO:44中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或精氨酸(Arg;R)。独立地,在SEQ ID NO:45中,Xaa为丝氨酸(Ser;S)或天冬酰胺(Asn;N);和在SEQ ID NO:46中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或组氨酸(His;H)。

[0235] 在一个实施方案中,所述人源化抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0236] a.轻链可变区,其包含:

[0237] i.包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0238] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0239] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0240] b.重链可变区,其包含:

[0241] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0242] v.包含SEQ ID NO:45的CDR-H2;和

[0243] vi.包含SEQ ID NO:46的CDR-H3,

[0244] 并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,并且在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中在SEQ ID NO:44中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N),在SEQ ID NO:45中,Xaa为丝氨酸(Ser;S),和在SEQ ID NO:46中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)。

[0245] 在一个优选的实施方案中,所述人源化抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0246] a.轻链可变区,其包含:

[0247] i.包含SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0248] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0249] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0250] b.重链可变区,其包含:

[0251] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0252] v.包含SEQ ID NO:5的CDR-H2;和

[0253] vi. 包含SEQ ID NO:6的CDR-H3,

[0254] 并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,并且在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合。

[0255] 如在本文中所使用的,术语“人源化(的)”抗体或其抗原结合片段是指这样的抗体或其抗原结合片段,其中重链和/或轻链包含一个或多个移植到受者抗体(例如,人抗体)的重链和/或轻链可变区构架中的来自供者抗体(例如,非人抗体例如鼠类或兔单克隆抗体)的CDR(包括,如果希望,一个或多个经修饰的CDR)。关于综述,参见Vaughan等人,Nature Biotechnology,16,535-539,1998。在一个实施方案中,不是转移整个CDR,而是仅将来自任一个在本文上面所描述的CDR的决定特异性的残基中的一个或多个转移至人抗体构架(参见例如,Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。在一个实施方案中,仅将来自一个或多个在本文上面所描述的CDR的决定特异性的残基转移至人抗体构架。在另一个实施方案中,仅将来自每一个在本文上面所描述的CDR的决定特异性的残基转移至人抗体构架。

[0256] 当移植CDR时,可以使用任何合适的受者可变区构架序列,其中注意所述CDR所源自的供者抗体的类别/类型,包括小鼠、灵长类动物和人构架区。

[0257] 合适地,根据本发明的人源化抗体具有这样的可变结构域,其包含人受者构架区以及一个或多个在本文中特别提供的CDR。因此,在一个实施方案中提供了结合 α 突触核蛋白,优选地人 α 突触核蛋白的阻断性人源化抗体,其中所述可变结构域包含人受者构架区和非人供者CDR。

[0258] 可以在本发明中使用的人构架的例子为KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY和POM(Kabat等人,同上)。例如,KOL和NEWM可以用于重链,REI可以用于轻链,和EU、LAY和POM可以用于重链和轻链两者。备选地,可以使用人种系序列;这些在<http://www.imgt.org/>处是可得的。

[0259] 在根据本发明的人源化抗体或其抗原结合片段中,受者重链和轻链不是必然需要源自相同的抗体,并且可以,如果希望,包含具有源自不同链的构架区的复合链。

[0260] 对于根据本发明的人源化抗体或其抗原结合片段的轻链的合适的构架区源自人种系IGKV1-16 JK4,其具有SEQ ID NO:39并且其核苷酸序列显示在SEQ ID NO:40中。

[0261] 对于根据本发明的人源化抗体或其抗原结合片段的重链的合适的构架区源自人种系IGHV3-23 JH4,其具有显示在SEQ ID NO:41中的序列并且其核苷酸序列显示在SEQ ID NO:42中。

[0262] 因此,在一个实施方案中,提供了人源化抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0263] -关于CDR-L1的在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7中给出的序列,关于CDR-L2的在SEQ ID NO:2中给出的序列,和关于CDR-L3的在SEQ ID NO:3中给出的序列,其中轻链构架区源自人种系IGKV1-16 JK4;和

[0264] -关于CDR-H1的在SEQ ID NO:4中给出的序列,关于CDR-H2的在SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:8中给出的序列,和关于CDR-H3的在SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9中给出的序列,其中重链构架区源自人种系IGHV3-23 JH4。

[0265] 在根据本发明的人源化抗体或其抗原结合片段中,所述构架区可以不具有与受者抗体的那些完全相同的序列。例如,可以将不寻常的残基变成对于那种受者链类别或类型

来说更经常出现的残基。备选地,可以改变在受者构架区中的所选择的残基,从而使得它们相应于在供者抗体中在相同位置处所找到的残基(参见Reichmann等人,1998,Nature,332,323-324)。应当将此类变化保持在对于恢复供者抗体的亲和力来说所需要的最小程度。用于选择可能需要进行改变的在受者构架区中的残基的实验方案阐述在W091/09967中。

[0266] 因此,在一个实施方案中,在构架中的1、2、3、4、5、6、7或8个残基被备选的氨基酸残基替代。

[0267] 因此,在一个实施方案中,提供了人源化抗体或其抗原结合片段,其中至少在轻链可变结构域的位置48和72(相关于SEQ ID NO:15或19)中的每一个处的残基为供者残基,参见例如在SEQ ID NO:15、17、19和21中给出的序列。优选地,轻链可变结构域的残基48为谷氨酰胺,和/或轻链可变结构域的残基72为谷氨酰胺。

[0268] 更优选地,在根据本发明的人源化抗体或其抗原结合片段的人源化轻链可变区中,残基48和72都为谷氨酰胺。

[0269] 在另一个实施方案中,提供了人源化抗体或其抗原结合片段,其中至少在重链可变结构域的位置24、47、48、49、73和97(相关于SEQ ID NO:31或35)或者24、47、48、49、78和97(相关于SEQ ID NO:23和27)中的每一个处的残基为供者残基,参见例如在SEQ ID NO:23、25、27、29、31、33、35和37中给出的序列。

[0270] 优选地,重链可变结构域的残基24为缬氨酸,和/或重链可变结构域的残基47为酪氨酸,和/或重链可变结构域的残基48为异亮氨酸,和/或重链可变结构域的残基49为甘氨酸,和/或重链可变结构域的残基97为精氨酸,和/或重链可变结构域的残基73为丝氨酸,和/或重链可变结构域的残基78为缬氨酸。

[0271] 优选地,在根据本发明的人源化重链可变区中,残基24为缬氨酸,残基47为酪氨酸,残基48为异亮氨酸,残基49为甘氨酸,残基73为丝氨酸,和残基97为精氨酸。此外,优选地,在根据本发明的人源化抗体或其抗原结合片段的人源化重链可变区中,残基24为缬氨酸,残基47为酪氨酸,残基48为异亮氨酸,残基49为甘氨酸,残基78为缬氨酸,和残基97为精氨酸。

[0272] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白,并且包含:包含SEQ ID NO:15的轻链可变区,和包含SEQ ID NO:31的重链可变区。

[0273] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0274] -包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23的重链可变区;或者

[0275] -包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:27或35的重链可变区;或者

[0276] -包含SEQ ID NO:19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23或31的重链可变区;或者

[0277] -包含SEQ ID NO:19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:27或35的重链可变区。

[0278] 在一个实施方案中,本发明提供了这样的抗体或其抗原结合片段,其包含与在本文中所公开的序列80%相似或同一的序列,例如在相关序列(例如,可变结构域序列、CDR序列或排除了CDR的可变结构域序列)的部分或全部上85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一个实施方案中,所述相关序列为SEQ ID NO:15。在一个实施方案中,所述相关序列为SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:31。

[0279] 在一个实施方案中,本发明提供了结合人 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链,其中所述轻链的可变结构域包含与在SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:19中给出的

序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列,和/或所述重链的可变结构域包含与在SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35中给出的序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或相似性的序列。

[0280] 在一个实施方案中,本发明提供了结合人 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有与在SEQ ID NO:15中给出的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或同一的轻链可变结构域,但是其中所述抗体或其抗原结合片段具有关于CDR-L1的在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7中给出的序列,关于CDR-L2的在SEQ ID NO:2中给出的序列,和关于CDR-L3的在SEQ ID NO:3中给出的序列。

[0281] 在一个实施方案中,本发明提供了结合人 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有与在SEQ ID NO:31中给出的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或同一的重链可变结构域,但是其中所述抗体或其抗原结合片段具有关于CDR-H1的在SEQ ID NO:4中给出的序列,关于CDR-H2的在SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:8中给出的序列,和关于CDR-H3的在SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9中给出的序列。

[0282] 在本文中所使用的“同一性”表明,在所比对的序列中的任何特定位置处,氨基酸残基在所述序列之间是相同的。在本文中所使用的“相似性”表明,在所比对的序列中的任何特定位置处,氨基酸残基在所述序列之间具有相似的类型。例如,可以将亮氨酸置换成异亮氨酸或缬氨酸。其他经常可以被置换成另一种氨基酸的氨基酸包括但不限于:

- [0283] -苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸(具有芳族侧链的氨基酸);
- [0284] -赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);
- [0285] -天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);
- [0286] -天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);和
- [0287] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0288] 可以容易地计算同一性和相似性的程度(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G., 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., 编辑, M Stockton Press, New York, 1991; 从NCBI可得的BLASTTM软件(Altschul, S.F. 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D. J. 1993, Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L. 等人, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F. 等人, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T. L. 1997, Genome Res. 7:649-656)。

[0289] 在一个实施方案中,根据本发明的抗原结合片段可以为但不限于:Fab,经修饰的Fab, Fab',经修饰的Fab', F(ab')₂, Fv,单结构域抗体(例如,V_H或V_L或V_{HH}), scFv, dsscFv, 二价、三价或四价抗体,双-scFv, 双链抗体,三链抗体,四链抗体,和上面任何一个的表位结合片段(参见例如Holliger和Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126-1136; Adair 和

Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法是本领域中熟知的(参见例如Verma等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)。用于在本发明中使用的其他抗体片段包括在W02005/003169、W02005/003170和W02005/003171中所描述的Fab和Fab' 片段。多价抗体可以包含多特异性, 例如是双特异性的, 或者可以是单特异性的(参见例如W0 92/22853、W005/113605、W02009/040562和W02010/035012)。

[0290] 备选的抗原结合片段包括与两个scFv或dsscFv相连接的Fab, 其中每个scFv或dsscFv结合相同或不同的靶标(例如, 一个scFv或dsscFv结合治疗性靶标, 而一个scFv或dsscFv通过结合例如白蛋白来增加半寿期)。此类抗体片段描述在国际专利申请公开号W02015/197772中, 其通过提及而以其整体并且特别地相对于抗体片段的讨论合并入本文。

[0291] 在另一个实施方案中, 根据本发明的抗体或其抗原结合片段是结合 α 突触核蛋白的融合蛋白的一部分, 所述融合蛋白例如包含所融合的本发明的抗原结合片段, 例如作为Fab或Fab' 片段, 以及一个或两个直接或间接与其相连接的单结构域抗体(dAb), 例如在W02009/040562、W02010035012、W02011/030107、W02011/061492和W02011/086091中所描述的, 所有这些文献均通过提及而合并入本文。在一个实施方案中, 所述融合蛋白包含两个结构域抗体, 例如作为可变重链(VH)和可变轻链(VL)配对, 其任选地通过二硫键相连接。

[0292] 在一个实施方案中, 所述融合蛋白的Fab或Fab' 要素具有与所述单结构域抗体相同或相似的特异性。在一个实施方案中, 所述Fab或Fab' 具有与所述单结构域抗体不同的特异性, 即所述融合蛋白是多价的。在一个实施方案中, 根据本发明的多价融合蛋白具有白蛋白结合位点, 例如VH/VL对在那里提供了白蛋白结合位点。

[0293] 本发明的抗体分子的恒定区结构域, 如果存在, 可以通过注意该抗体分子的所计划的功能, 特别是可能需要的效应子功能来进行选择。例如, 所述恒定区结构域可以是人IgA、IgD、IgE、IgG或IgM结构域。特别地, 可以使用人IgG恒定区结构域, 尤其是IgG1和IgG3同种型的, 当该抗体分子打算用于治疗性用途并且需要抗体效应子功能时。备选地, 可以使用IgG2和IgG4同种型, 当该抗体分子打算用于治疗性目的并且不需要抗体效应子功能时。将会意识到的是, 也可以使用这些恒定区结构域的序列变体。例如, 可以使用其中在位置241处的丝氨酸已被变成脯氨酸的IgG4分子, 如在Angal等人(Angal等人, Molecular Immunology, 1993, 30(1), 105-108)中所描述的并且在本文中被称为IgG4P。

[0294] 在一个实施方案中, 所述抗体为全长抗体, 其优选地选自IgG1和IgG4或IgG4P。

[0295] 因此, 本发明提供了全长人源化抗体, 其结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0296] a. 轻链可变区, 其包含:

[0297] i. 包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0298] ii. 包含SEQ ID NO:2的CDR-L2; 和

[0299] iii. 包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和

[0300] b. 重链可变区, 其包含:

[0301] iv. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0302] v. 包含SEQ ID NO:45的CDR-H2; 和

[0303] vi. 包含SEQ ID NO:46的CDR-H3,

[0304] 其中所述人源化抗体阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集, 和优

选地在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132,并且其中所述抗体为IgG4P同工型。

[0305] 在SEQ ID NO:44中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或精氨酸(Arg;R)。独立地,在SEQ ID NO:45中,Xaa为丝氨酸(Ser;S)或天冬酰胺(Asn;N);和在SEQ ID NO:46中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)或组氨酸(His;H)。

[0306] 在一个优选的实施方案中,所述全长人源化抗体结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0307] a.轻链可变区,其包含:

[0308] i.包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0309] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0310] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0311] b.重链可变区,其包含:

[0312] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0313] v.包含SEQ ID NO:45的CDR-H2;和

[0314] vi.包含SEQ ID NO:46的CDR-H3,

[0315] 并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和优选地在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132,并且其中所述抗体为IgG4P同工型,其中在SEQ ID NO:44中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N),在SEQ ID NO:45中,Xaa为丝氨酸(Ser;S),和在SEQ ID NO:46中,Xaa为天冬酰胺(Asn;N)。

[0316] 在一个最优选的实施方案中,所述全长人源化抗体结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0317] a.轻链可变区,其包含:

[0318] i.包含SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0319] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0320] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0321] b.重链可变区,其包含:

[0322] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0323] v.包含SEQ ID NO:5的CDR-H2;和

[0324] vi.包含SEQ ID NO:6的CDR-H3,

[0325] 并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和优选地在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0326] 本领域技术人员还将会理解,抗体可以经历各种各样的翻译后修饰。这些修饰的类型和程度经常取决于用于表达所述抗体的宿主细胞系以及培养条件。此类修饰可以包括在糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬氨酸脱酰胺中的变化。一种常见的修饰是羧基末端碱性残基(例如赖氨酸或精氨酸)的丢失,其归因于羧肽酶的作用(如在Harris, RJ. Journal of Chromatography 705: 129-134, 1995中所描述的)。因此,抗体重链的C-末端赖氨酸可以不存在。

[0327] 在一个实施方案中,在翻译后修饰期间,C-末端氨基酸被从抗体中切除。

[0328] 在一个实施方案中,在翻译后修饰期间,N-末端氨基酸被从抗体中切除。

[0329] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含按照SEQ ID NO:15的轻链可变区和选自SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:31的重链可变区。例如,所述抗体可以为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:15的轻链可变区和选自SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:31的重链可变区。在另一个实施方案中,所述抗体为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:17的轻链和按照SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:33的重链。在另外一个实施方案中,所述抗原结合片段为Fab',其包含按照SEQ ID NO:15的轻链可变区和选自SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:31的重链可变区。

[0330] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含按照SEQ ID NO:15的轻链可变区和选自SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35的重链可变区。例如,所述抗体为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:15的轻链可变区和选自SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35的重链可变区。在另一个实施方案中,所述抗体为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:17的轻链和按照SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:37的重链。在另外一个实施方案中,所述抗原结合片段为Fab',其包含按照SEQ ID NO:15的轻链可变区和选自SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35的重链可变区。

[0331] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含按照SEQ ID NO:19的轻链可变区和选自SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35的重链可变区。例如,所述抗体为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:19的轻链可变区和选自SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35的重链可变区。在另一个实施方案中,所述抗体为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:21的轻链和按照SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:37的重链。在另外一个实施方案中,所述抗原结合片段为Fab',其包含按照SEQ ID NO:19的轻链可变区和选自SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:35的重链可变区。

[0332] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含按照SEQ ID NO:19的轻链可变区和选自SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:31的重链可变区。例如,所述抗体为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:19的轻链可变区和选自SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:31的重链可变区。在另一个实施方案中,所述抗体为全长IgG4抗体,其包含按照SEQ ID NO:21的轻链和按照SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:33的重链。在另外一个实施方案中,所述抗原结合片段为Fab',其包含按照SEQ ID NO:21的轻链可变区和选自SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:33的重链可变区。

[0333] 在一个优选的实施方案中,所述抗体结合 α 突触核蛋白并且为全长IgG4抗体,其包含:包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区。更优选地,所述抗体阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更加优选地,所述抗体在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0334] 在另一个优选的实施方案中,所述抗体结合 α 突触核蛋白并且为全长IgG4抗体,其包含:包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。更优选地,所述抗体阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更加优选地,所述抗体在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0335] 进一步地,本发明还提供了与根据本发明的抗体或其抗原结合片段竞争结合 α 突触核蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0336] 因此,本发明提供了这样的抗体或其抗原结合片段,其通过交叉阻断本发明的抗体或其抗原结合片段或者被本发明的抗体或其抗原结合片段交叉阻断而与根据本发明的抗体或其抗原结合片段竞争结合 α 突触核蛋白;和特别地,这样的抗体或其抗原结合片段,其包含:包含SEQ ID N0:23、SEQ ID N0:31、SEQ ID N0:27或SEQ ID N0:35的重链可变区,和包含SEQ ID N0:15或SEQ ID N0:19的轻链可变区。

[0337] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在与根据本发明的抗体或其抗原结合片段相同的表位处竞争结合 α 突触核蛋白,并且特别地,与具有包含SEQ ID N0:23、SEQ ID N0:31、SEQ ID N0:27或SEQ ID N0:35的重链可变区和包含SEQ ID N0:15或SEQ ID N0:19的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段竞争在包含关于SEQ ID N0:10而言的至少残基M127、P128、S129、E130和E131(优选地,残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131)的表位处结合 α 突触核蛋白。

[0338] 在一个实施方案中,这样的抗体或其抗原结合片段与根据本发明的抗体或其片段竞争,并且具有与按照SEQ ID N0:23、SEQ ID N0:31、SEQ ID N0:27或SEQ ID N0:35的序列具有至少80%同一性或相似性的重链可变区;和/或具有与按照SEQ ID N0:15或SEQ ID N0:19的序列具有至少80%同一性或相似性的轻链可变区。

[0339] 可以通过使用本领域中的任何合适的方法来鉴定竞争性抗体,例如通过使用竞争ELISA或BIAcore测定法,其中交叉阻断性抗体与人 α 突触核蛋白的结合阻止本发明的抗体的结合,反之亦然。此类竞争测定法可以使用分离的天然或重组 α 突触核蛋白或者合适的融合蛋白/多肽。在一个例子中,通过使用重组人 α 突触核蛋白(SEQ ID N0:10)来测量竞争。在一个例子中,按照在本文中的实施例,使用在N-末端或C-末端处加有标签(例如具有TEV识别位点的6xHis标签融合物)的重组人 α 突触核蛋白来测量竞争。在另一个例子中,通过使用重组人 α 突触核蛋白原纤维来测量竞争。

[0340] 在一个实施方案中,所述竞争性抗体是完全人的或人源化的。在一个实施方案中,所述竞争性抗体具有100pM或更小,优选地50pM或更小的对于人 α 突触核蛋白的亲和力。

[0341] 生物分子,例如抗体或片段,包含酸性和/或碱性官能团,由此给予该分子以正或负的净电荷。总的“所观察到的”电荷的量将会取决于该实体的绝对氨基酸序列、在3D结构中荷电基团的局部环境和该分子的环境条件。等电点(pI)是特定分子或其溶剂可达表面不携带净电荷时所处的pH。在一个例子中,根据本发明的抗 α 突触核蛋白抗体或其抗原结合片段可以进行改造以具有适当的等电点。这可以导致具有更稳固的特性,特别是合适的可溶性和/或稳定性特性和/或经改善的纯化特征的抗体和/或片段。

[0342] 因此,在一个方面,本发明提供了人源化抗体或其抗原结合片段,其结合 α 突触核蛋白并且进行改造以具有不同于最初所鉴定的抗体的等电点。例如,可以通过替换氨基酸残基,例如用一个或多个碱性氨基酸残基替换酸性氨基酸残基来改造所述抗体。备选地,可以引入碱性氨基酸残基或者可以去除酸性氨基酸残基。备选地,如果该分子具有不可接受地高的pI值,那么可以引入酸性残基以降低pI,当需要时。重要的是,当操纵pI时,必须小心保持所述抗体或片段的所希望的活性。因此,在一个实施方案中,经改造的抗体或其抗原结合片段具有与“未修饰的”抗体或片段相同或基本上相同的活性。

[0343] 程序例如**ExPASY http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, 和http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html可以用于预测所述抗体或片段的等电点。

[0344] 将会意识到的是,可以通过使用本领域中已知的任何合适的方法来改变由本发明所提供的抗体的亲和力。因此,本发明还涉及本发明的抗体分子的变体,其具有经改善的对于 α 突触核蛋白,特别是人 α 突触核蛋白的亲和力。此类变体可以通过许多亲和力成熟实验方案来获得,包括使CDR突变(Yang等人,J.Mol.Biol.,254,392-403,1995)、链改组(Marks等人,Bio/Technology,10,779-783,1992)、使用大肠杆菌(E.coli)的增变菌株(Low等人,J.Mol.Biol.,250,359-368,1996)、DNA混编(Patten等人,Curr.Opin.Biotechnol.,8,724-733,1997)、噬菌体展示(Thompson等人,J.Mol.Biol.,256,77-88,1996)和有性PCR(Crameri等人,Nature,391,288-291,1998)。Vaughan等人(同上)讨论了这些亲和力成熟方法。

[0345] 在本发明之内,通过IOTA来进行亲和力成熟(WO2014198951)。

[0346] 如果希望,可以将根据本发明的抗体或其抗原结合片段与一个或多个效应分子相缀合。将会意识到的是,所述效应分子可以包含单个效应分子或者两个或更多个如此连接以便形成可以附着至本发明的抗体或其抗原结合片段的单一部分的此类分子。在希望获得与效应分子相连接的抗体片段的情况下,这可以通过标准的化学或重组DNA程序来制备,其中将所述抗体片段直接地或者通过偶联试剂连接至效应分子。用于将此类效应分子缀合至抗体的技术是本领域中熟知的(参见Hellstrom等人,Controlled Drug Delivery,第2版,Robinson等人,编辑,1987,第623-53页;Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.,62:119-58;和Dubowchik等人,1999,Pharmacology and Therapeutics,83,67-123)。特别的化学程序包括,例如在WO 93/06231、WO 92/22583、WO 89/00195、WO 89/01476和WO 03/031581中所描述的那些。备选地,在所述效应分子为蛋白质或多肽的情况下,所述连接可以通过使用重组DNA程序来实现,例如如在WO 86/01533和EP0392745中所描述的。

[0347] 在本文中所使用的术语“效应分子”包括例如抗肿瘤试剂,药物,毒素,在生物学上有活性的蛋白质,例如酶、其他抗体或抗体片段,合成的或天然出现的聚合物,核酸及其片段,例如DNA、RNA及其片段,放射性核素,特别是放射性碘化物,放射性同位素,经螯合的金属,纳米颗粒,和报道基团,例如荧光化合物或者可以通过NMR或ESR光谱学来检测的化合物。

[0348] 效应分子的例子可以包括细胞毒素或细胞毒性试剂,其包括任何对于细胞有害(例如,杀死细胞)的试剂。例子包括康普瑞汀、多拉司他汀、埃坡霉素、星形孢菌素、美登素类化合物、海绵抑制素、利索新、软海绵素、杆孢菌素、哈米特林、紫杉醇、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春花新碱、长春花碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素,以及其类似物或同系物。

[0349] 效应分子还包括,但不限于,抗代谢物(例如,氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺)、烷基化试剂(例如,氮芥、thioepa、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺合铂(II)(DDP)(顺铂))、蒽环类(例如,柔红霉素(以前,道诺霉素)和

多柔比星)、抗生素(例如,更生霉素(以前,放线菌素)、博来霉素、光神霉素、氨曲霉素(AMC)、加利车霉素或倍癌霉素)和抗有丝分裂试剂(例如,长春花新碱和长春花碱)。

[0350] 其他效应分子可以包括经螯合的放射性核素例如¹¹¹In和⁹⁰Y、Lu¹⁷⁷、铼¹⁸⁸、锎²⁵²、铼¹⁹²和钨¹⁸⁸/铼¹⁸⁸;或者药物,例如但不限于,烷基磷酸胆碱、拓扑异构酶I抑制剂、紫杉烷类和苏拉明。

[0351] 其他效应分子包括蛋白质、肽和酶。目的酶包括,但不限于,蛋白质水解酶、水解酶、裂合酶、异构酶、转移酶。目的蛋白质、多肽和肽包括,但不限于,免疫球蛋白,毒素,例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素,蛋白质,例如胰岛素、肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子或组织纤溶酶原激活物,血栓试剂或抗血管发生试剂,例如制管张素或内皮抑制素,或者生物学应答调节物,例如淋巴因子、白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、神经生长因子(NGF)或其他生长因子和免疫球蛋白。

[0352] 其他效应分子可以包括例如在诊断中有用的可检测的物质。可检测的物质的例子包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性核素、发射正电子的金属(用于在正电子发射断层成像术中使用)和非放射性顺磁金属离子。关于可以与用于作诊断剂的抗体相缀合的金属离子,通常参见美国专利号4,741,900。合适的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基包括链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白和生物素;合适的荧光材料包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯和藻红蛋白;合适的发光材料包括鲁米诺;合适的生物发光材料包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;和合适的放射性核素包括¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In和⁹⁹Tc。

[0353] 在另一个例子中,所述效应分子可以增加所述抗体的体内半寿期,和/或降低所述抗体的免疫原性,和/或增强抗体穿越上皮屏障向免疫系统的递送。合适的该类型的效应分子的例子包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物,例如在W005/117984中所描述的那些。

[0354] 在所述效应分子为聚合物的情况下,它通常可以为合成的或天然出现的聚合物,例如任选地经取代的直链或支化链的聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧亚烷基聚合物,或者支化或非支化的多糖,例如同多糖或杂多糖。

[0355] 可以在上面提及的合成聚合物中存在的特别的任选的取代基包括一个或多个羟基、甲基或甲氧基基团。

[0356] 合成聚合物的特别的例子包括任选地经取代的直链或支化链的聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇或其衍生物,尤其是任选地经取代的聚乙二醇例如甲氧基聚乙二醇或其衍生物。

[0357] 特别的天然出现的聚合物包括乳糖、直链淀粉、右旋糖酐、糖原或其衍生物。

[0358] 在一个实施方案中,所述聚合物为白蛋白或其片段,例如人血清白蛋白或其片段。

[0359] 在本文中所使用的“衍生物”意欲包括反应性衍生物,例如硫羟基选择性的反应性基团例如马来酰亚胺等。所述反应性基团可以直接地或通过连接体区段连接至所述聚合物。将会意识到的是,此类基团的残基在一些情况下将会作为在抗体片段和聚合物之间的连接基团而成为产物的一部分。

[0360] 聚合物的大小可以按所希望的进行变动,但通常将会在500Da至50000Da,例如

5000至40000Da,例如20000至40000Da的平均分子量范围内。特别地,可以基于所想要的产物的用途,例如定位至某些组织例如肿瘤的能力或延长循环半寿期的能力,来选择聚合物大小(关于综述,可参见Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545)。因此,例如,在产物意欲离开循环并穿透组织(例如用于在治疗肿瘤中使用)的情况下,可能有利的是使用小分子量聚合物(例如,具有大约5000Da的分子量)。对于其中产物保留在循环中的应用,可能有利的是使用较高分子量聚合物(例如,具有在20000Da至40000Da的范围内的分子量)。

[0361] 合适的聚合物包括聚亚烷基聚合物,例如聚乙二醇,或尤其是甲氧基聚乙二醇或其衍生物,其尤其具有在大约15000Da至大约40000Da的范围内的分子量。

[0362] 在一个例子中,将根据本发明的抗体或其抗原结合片段附着至聚乙二醇(PEG)部分。在一个特别的实施方案中,根据本发明的抗原结合片段和PEG分子可以通过任何位于所述抗体片段中的可得的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如,任何游离的氨基、亚氨基、硫羟基、羟基或羧基基团)来进行附着。此类氨基酸可以天然地出现在所述抗体片段中,或者可以通过使用重组DNA方法而改造入所述片段中(参见例如US 5,219,996;US 5,667,425;W098/25971;W02008/038024)。在一个例子中,本发明的抗体分子为经修饰的Fab片段,其中所述修饰为向其重链的C-末端添加一个或多个氨基酸以允许附着效应分子。合适地,所述另外的氨基酸形成经修饰的铰链区,其包含一个或多个半胱氨酸残基,所述效应分子可以附加至所述半胱氨酸残基。可以使用多个位点来附着两个或更多个PEG分子。

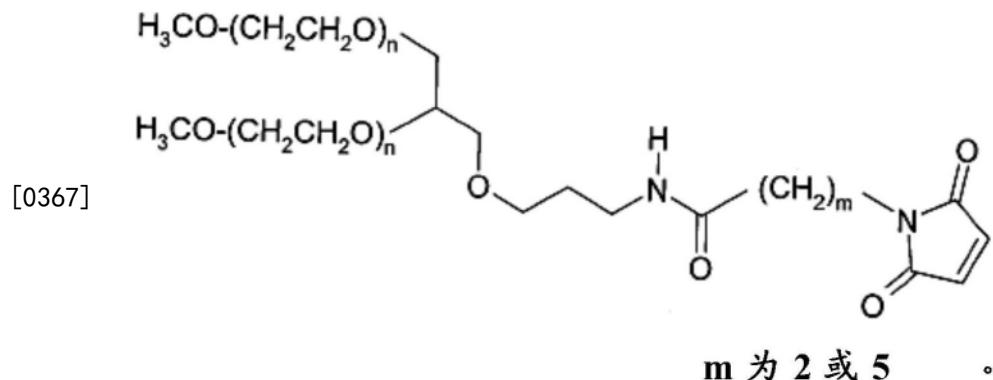
[0363] 合适地,通过至少一个位于所述抗体片段中的半胱氨酸残基的硫羟基基团来共价连接PEG分子。附着至经修饰的抗体片段的每个聚合物分子可以共价连接至位于所述片段中的半胱氨酸残基的硫原子。所述共价连接通常将会是二硫键,或特别地硫-碳键。在使用硫羟基基团作为经适当地活化的效应分子的附着点的情况下,可以使用例如硫羟基选择性衍生物例如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。在上面所描述的经聚合物修饰的抗体片段的制备中,可以使用经活化的聚合物作为起始材料。所述经活化的聚合物可以为任何包含硫羟基反应性基团(例如,α-卤代羧酸或酯,例如碘乙酰胺,二酰亚胺,例如马来酰亚胺,乙烯基砜,或二硫化物)的聚合物。此类起始材料可以商购获得(例如从Nektar(以前,Shearwater Polymers Inc.),Huntsville,AL,USA),或者可以通过使用常规化学程序从商购可得的起始材料来制备。特别的PEG分子包括20K甲氧基-PEG-胺(可获得自Nektar(以前,Shearwater);Rapp Polymere;和SunBio)和M-PEG-SPA(可获得自Nektar(以前,Shearwater))。

[0364] 在一个实施方案中,所述抗体为经修饰的Fab片段、Fab'片段或diFab,其是经PEG化的,即具有与之共价附着的PEG(聚乙二醇),例如根据在EP 0948544或EP1090037中所公开的方法[也可参见"Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris(编辑), Plenum Press, New York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris和S. Zalipsky(编辑), American Chemical Society, Washington DC;和"Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam和A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]。在一个例子中,将PEG附着至在铰链区中的半胱氨酸。在一个

例子中,经PEG修饰的Fab片段具有与在经修饰的铰链区中的单个硫羟基基团共价连接的马来酰亚胺基团。可以将赖氨酸残基共价连接至该马来酰亚胺基团,并且向在该赖氨酸残基上的胺基团中的每一个,可以附着具有大约20,000Da的分子量的甲氧基聚乙二醇聚合物。因此,附着至Fab片段的PEG的总分子量可以为大约40,000Da。

[0365] 特别的PEG分子包括经N,N'-二(甲氧基聚乙二醇, MW 20,000)修饰的赖氨酸的2-[3-(N-马来酰亚胺基)丙酰胺基]乙基酰胺,其也称为PEG2MAL40K(可获得自Nektar(以前, Shearwater))。

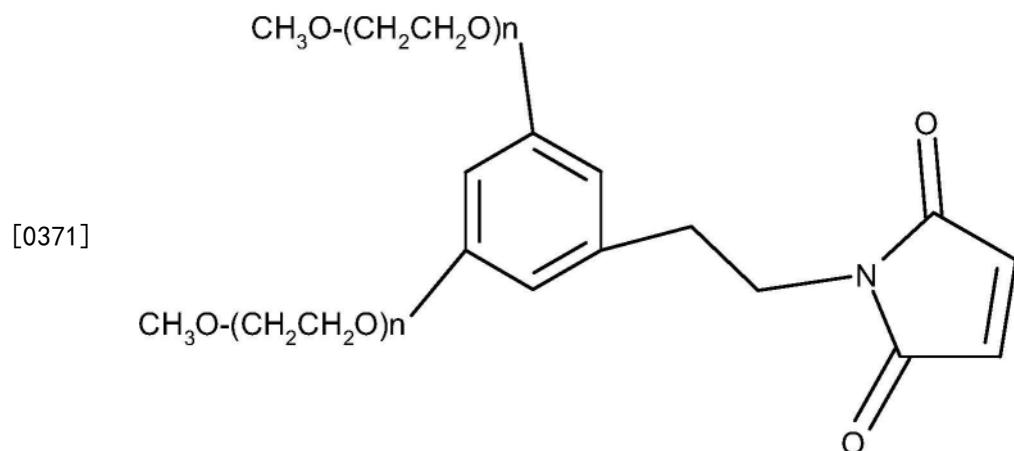
[0366] PEG连接体的备选来源包括NOF,其提供GL2-400MA3(其中在下面的结构中m低于5)和GL2-400MA(其中m为2并且n为大约450):



[0368] 也就是说,每个PEG为大约20,000Da。

[0369] 因此,在一个实施方案中,所述PEG为2,3-二(甲基聚氧乙烯-氧基)-1-{[3-(6-马来酰亚胺基-1-氧己基)氨基]丙氧基}己烷(2臂化PEG,-CH₂)₃NHCO(CH₂)₅-MAL, Mw 40,000,被称为SUNBRIGHT GL2-400MA3。

[0370] 下面类型的进一步的备选的PEG效应分子:



[0372] 是从Dr Reddy、NOF和Jenkem可得的。

[0373] 在一个实施方案中,将根据本发明的Fab或Fab'与PEG分子相缀合。

[0374] 在一个实施方案中,提供了经PEG化(例如,用在本文中所描述的PEG)的抗体,其中通过在链中在氨基酸226处或在大约氨基酸226处的半胱氨酸氨基酸残基,例如重链的氨基酸226(以顺次编号),例如SEQ ID NO:33的氨基酸223,来进行附着。

[0375] 在一个实施方案中,本公开内容提供了包含一个或多个PEG聚合物(例如,1或2个聚合物,例如40kDa聚合物)的Fab' PEG分子。

[0376] 根据本公开内容的Fab' -PEG分子可以是特别有利的,因为它们具有不依赖于Fc片段的半寿期。在一个实施方案中,提供了与聚合物例如PEG分子、淀粉分子或白蛋白分子相缀合的Fab'。在一个实施方案中,提供了与聚合物例如PEG分子、淀粉分子或白蛋白分子相缀合的scFv。在一个实施方案中,将根据本公开内容的Fab或Fab'与人血清白蛋白相缀合。在一个实施方案中,将所述抗体或片段与淀粉分子相缀合,例如以增加半寿期。用于将淀粉与蛋白质相缀合的方法描述在US 8,017,739(其通过提及而合并入本文)中。

[0377] 本发明还提供了分离的多核苷酸,其编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段。根据本发明的分离的多核苷酸可以包含合成的DNA(其例如通过化学处理来产生)、cDNA、基因组DNA或其任何组合。

[0378] 标准的分子生物学技术可以用于制备编码本发明的抗体或其抗原结合片段的DNA序列。所希望的DNA序列可以通过使用寡核苷酸合成技术完全地或部分地来进行合成。视情况,可以使用位点定向诱变和聚合酶链式反应(PCR)技术。

[0379] 在一个实施方案中,根据本发明的分离的多核苷酸编码:

[0380] a.轻链可变区,其中所述多核苷酸:

[0381] i.与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:20至少90%同一;或者

[0382] ii.包含SEQ ID NO:16或20;或者

[0383] iii.基本上由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:20组成;

[0384] b.重链可变区,其中所述多核苷酸:

[0385] i.与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32

[0386] 或SEQ ID NO:36至少90%同一;或者

[0387] ii.包含SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32

[0388] 或SEQ ID NO:36;或者

[0389] iii.基本上由SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:36组成;

[0390] c.轻链,其中所述多核苷酸:

[0391] i.与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:22至少90%同一;或者

[0392] ii.包含SEQ ID NO:18或22;或者

[0393] iii.基本上由SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:22组成;

[0394] d.重链,其中所述多核苷酸:

[0395] i.与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:34

[0396] 或SEQ ID NO:38至少90%同一;或者

[0397] ii.包含SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:34

[0398] 或SEQ ID NO:38;或者

[0399] iii.基本上由SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:38组成;

[0400] e.轻链可变区,其中所述多核苷酸:

[0401] i.与SEQ ID NO:12至少90%同一;或者

[0402] ii.包含SEQ ID NO:12;或者

[0403] iii.基本上由SEQ ID NO:12组成;

[0404] f. 重链可变区, 其中所述多核苷酸:

[0405] i. 与SEQ ID NO:14至少90%同一; 或者

[0406] ii. 包含SEQ ID NO:14; 或者

[0407] iii. 基本上由SEQ ID NO:14组成。

[0408] 在一个实施方案中, 本发明提供了分离的多核苷酸, 其编码本发明的抗体Fab' 片段或者IgG1或IgG4抗体的重链, 所述重链包含在SEQ ID NO:24、28、32或36中给出的序列。还提供了分离的多核苷酸, 其编码本发明的抗体Fab' 片段或者IgG1或IgG4抗体的轻链, 所述轻链包含在SEQ ID NO:16或20中给出的序列。

[0409] 在另一个实施方案中, 本发明提供了分离的多核苷酸, 其编码本发明的IgG4 (P) 抗体的重链和轻链, 其中编码重链的多核苷酸包含在SEQ ID NO:26、30、34或38中给出的序列和编码轻链的多核苷酸包含在SEQ ID NO:18或22中给出的序列。

[0410] 本发明还提供了克隆或表达载体, 其包含一种或多种在本文中所描述的多核苷酸。在一个例子中, 根据本发明的克隆或表达载体包含一种或多种分离的多核苷酸, 其包含选自SEQ ID NO:16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36或38的序列。

[0411] 通过其可以构建出所述载体的一般方法、转染方法和培养方法是本领域技术人员熟知的。在该方面, 参考“Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F.M. Ausubel (编辑), Wiley Interscience, New York; 和由Cold Spring Harbor Publishing制作的Maniatis Manual。

[0412] 还提供了宿主细胞, 其包含一种或多种根据本发明的分离的多核苷酸, 或者一种或多种包含一种或多种编码本发明的抗体的分离的多核苷酸序列的克隆或表达载体。任何合适的宿主细胞/载体系统可以用于编码本发明的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列的表达。可以使用细菌(例如大肠杆菌)和其他微生物系统, 或者也可以使用真核生物(例如哺乳动物)宿主细胞表达系统。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0413] 用于在本发明中使用的中国仓鼠卵巢(CHO细胞)的合适类型可以包括CHO和CHO-K1细胞, 包括dhfr-CHO细胞, 例如CHO-DG44细胞和CHO-DXB11细胞, 其可以与DHFR选择性标记一起进行使用, 或者CHOK1-SV细胞, 其可以与谷氨酰胺合成酶选择性标记一起进行使用。在表达抗体中有用的其他细胞类型包括淋巴细胞细胞系, 例如NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞、COS细胞。可以用根据本发明的分离的多核苷酸序列或表达载体稳定地转化或转染宿主细胞。

[0414] 在一个实施方案中, 根据本发明的宿主细胞为用包含本发明的分离的多核苷酸序列(优选地, 包含按照SEQ ID NO:18和26或者SEQ ID NO:18和34或者SEQ ID NO:18和30或者SEQ ID NO:18和38的分离的多核苷酸序列)的表达载体稳定地转染的CHO-DG44细胞。

[0415] 本发明还提供了用于产生根据本发明的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包括在适合于产生根据本发明的抗体或其抗原结合片段的条件下培养根据本发明的宿主细胞, 并且分离所述抗体或其抗原结合片段。

[0416] 所述抗体或其抗原结合片段可以仅包含重链或轻链多肽, 在这种情况下, 仅需要使用重链或轻链多肽编码序列来转染宿主细胞。为了产生包含重链和轻链两者的抗体或其抗原结合片段, 可以用两种载体(编码轻链多肽的第一载体和编码重链多肽的第二载体)来转染细胞系。备选地, 可以使用单个载体, 该载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0417] 因此,提供了用于培养宿主细胞和表达抗体或其片段、分离后者并且任选地纯化其以提供分离的抗体或片段的方法。在一个实施方案中,所述方法进一步包括将效应分子与分离的抗体或片段相缀合的步骤,例如与PEG聚合物(特别是如在本文中所描述的)相缀合。

[0418] 因此,在一个实施方案中,提供了经纯化的抗 α 突触核蛋白抗体或其片段,例如人源化抗体或其片段,特别地根据本发明的抗体或其片段,其以基本上经纯化的形式,特别地没有或基本上没有内毒素和/或宿主细胞蛋白质或DNA。

[0419] 通常,“基本上没有内毒素”意欲是指1EU/mg抗体产品或更少的内毒素含量,例如0.5或0.1EU/mg产品。

[0420] 通常,“基本上没有宿主细胞蛋白质或DNA”意欲是指400 μ g/mg抗体产品或更少的宿主细胞蛋白质和/或DNA含量,例如100 μ g/mg或更少,特别是20 μ g/mg,视情况而定。

[0421] 由于本发明的抗体在治疗、诊断和/或预防病理学状况例如 α 突触核蛋白病中是有用的,因此本发明还提供了药用或诊断组合物,其包含根据本发明的抗体或其抗原结合片段,以及与之相组合的一种或多种在药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0422] 优选地,所述药用或诊断组合物包含人源化抗体,其结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0423] a.轻链可变区,其包含:

[0424] i.包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0425] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0426] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0427] b.重链可变区,其包含:

[0428] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0429] v.包含SEQ ID NO:45的CDR-H2;和

[0430] vi.包含SEQ ID NO:46的CDR-H3。

[0431] 更优选地,所述药用或诊断组合物包含人源化抗体,其结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0432] a.轻链可变区,其包含:

[0433] i.包含SEQ ID NO:1的CDR-L1;

[0434] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0435] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0436] b.重链可变区,其包含:

[0437] iv.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1;

[0438] v.包含SEQ ID NO:5的CDR-H2;和

[0439] vi.包含SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0440] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是唯一的活性成分。在另一个实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段与一种或多种另外的活性成分相组合。备选地,所述药用组合物包含作为唯一的活性成分的根据本发明的抗体或其抗原结合片段,并且它可以与其他试剂、药物或激素相组合地(例如,同时地、顺次地或分开地)独立地施用给患者。

[0441] 在另一个实施方案中,所述药用组合物包含抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ

ID NO:15或19的轻链可变区并且包含SEQ ID NO:23、27、31或35的重链可变区,例如SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:23或者SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:31。

[0442] 优选地,本发明提供了包含抗体或其抗原结合片段的药用组合物,所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和SEQ ID NO:31的重链可变区。

[0443] 合适地,可以将根据本发明的药用组合物施用给患者以鉴定所要求的治疗有效量。在本文中所使用的术语“治疗有效量”是指对于治疗、改善或预防所靶向的疾病或状况来说或者对于展示出可检测的治疗或预防效果来说所需要的治疗剂的量。对于任何抗体,可以最初在细胞培养测定法中或者在动物模型中(通常在啮齿类动物、兔、狗、猪或灵长类动物中)估计治疗有效量。动物模型还可以用于确定合适的浓度范围和施用途径。然后,这样的信息可以用于确定对于在人中施用来说有用的剂量和途径。

[0444] 对于人受试者的精确的治疗有效量将会取决于疾病状态的严重度,受试者的总体健康状态,受试者的年龄、体重和性别,饮食,施用的时间和频次,药物组合,反应敏感性,和对于疗法的耐受性/应答。该量可以通过常规实验来确定,并且在临床医生的判断之内。通常,治疗有效量将会为0.01mg/kg至500mg/kg,例如0.1mg/kg至200mg/kg,例如100mg/Kg。药用组合物可以方便地以单位剂量形式来呈现,所述单位剂量形式包含预定量的本发明的活性试剂/剂。

[0445] 在治疗性组合物中的在药学上可接受的承载体可以额外地包含液体例如水、盐水、甘油和乙醇。另外,辅助物质,例如润湿剂或乳化剂或pH缓冲物质,可以存在于这样的组合物中。此类承载体使得所述药用组合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸剂、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆液和悬浮液,以用于被患者摄取。

[0446] 用于施用的合适形式包括适合于肠胃外施用(例如,通过注射或输注,例如通过推注或连续输注)的形式,以静脉内、可吸入或皮下形式。在产品是用于注射或输注的情况下,它可以采取在油性或水性载料中的悬浮液、溶液或乳状液的形式,并且它可以包含配制试剂,例如助悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。备选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以以干的形式,其用于在使用前用合适的无菌液体进行重构。也可以制备适合于在注射前溶解或悬浮在液体载料中的固体形式。

[0447] 一旦进行了配制,就可以将本发明的组合物直接施用给受试者。因此,本文中提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段用于制备药物的用途。

[0448] 待治疗的受试者可以为动物。优选地,使根据本发明的药用组合物适合于施用给人受试者。

[0449] 因此,在另一个方面,本发明提供了用于在疗法中使用的抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0450] a.轻链可变区,其包含:

[0451] i.包含SEQ ID NO:44的CDR-L1;

[0452] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2;和

[0453] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和

[0454] b.重链可变区,其包含:

- [0455] iv. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1；
- [0456] v. 包含SEQ ID NO:45的CDR-H2；和
- [0457] vi. 包含SEQ ID NO:46的CDR-H3。

[0458] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段是人源化的并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更优选地在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0459] 在一个优选的实施方案中,所述用于在疗法中使用的抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物为这样的抗体或其抗原结合片段,其结合 α 突触核蛋白并且包含:

- [0460] a. 轻链可变区,其包含:
 - [0461] i. 包含SEQ ID NO:1的CDR-L1；
 - [0462] ii. 包含SEQ ID NO:2的CDR-L2；和
 - [0463] iii. 包含SEQ ID NO:3的CDR-L3；和
- [0464] b. 重链可变区,其包含:
 - [0465] iv. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1；
 - [0466] v. 包含SEQ ID NO:5的CDR-H2；和
 - [0467] vi. 包含SEQ ID NO:6的CDR-H3。

[0468] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段是人源化的并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更优选地在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0469] 特别地,所述在疗法中使用包括在治疗一种或多种 α 突触核蛋白病中的使用。

[0470] 在另外一个方面,本发明提供了用于在患者中治疗一种或多种突触核蛋白病的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

- [0471] a. 轻链可变区,其包含:
 - [0472] i. 包含SEQ ID NO:44的CDR-L1；
 - [0473] ii. 包含SEQ ID NO:2的CDR-L2；和
 - [0474] iii. 包含SEQ ID NO:3的CDR-L3；和
- [0475] b. 重链可变区,其包含:
 - [0476] iv. 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1；
 - [0477] v. 包含SEQ ID NO:45的CDR-H2；和
 - [0478] vi. 包含SEQ ID NO:46的CDR-H3。

[0479] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段是人源化的并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更优选地在包含相关于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0480] 在一个优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物用于在治疗一种或多种 α 突触核蛋白病中使用,其中所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0481] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者

[0482] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区;或者

[0483] c.包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。

[0484] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段是人源化的并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更优选地在包含相对于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0485] 在另一个优选的实施方案中,本发明提供了用于在患者中治疗一种或多种 α 突触核蛋白病的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0486] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者

[0487] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区;或者

[0488] c.包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。

[0489] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段是人源化的并且阻止由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集,和更优选地在包含相对于SEQ ID NO:10而言的残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131的表位处与 α 突触核蛋白相结合,其中所述表位任选地包含A124和G132。

[0490] 备选地,所述抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物用于在疗法中使用或者用于在治疗一种或多种 α 突触核蛋白病中使用,并且为这样的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0491] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9的CDR-H3;或者

[0492] b.包含SEQ ID NO:15或19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35的重链可变区;或者

[0493] c.包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:21的轻链和包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37的重链。

[0494] 在本发明的另一个实施方案中,所述用于在患者中治疗一种或多种 α 突触核蛋白病的方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触

核蛋白并且包含：

[0495] a. 轻链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和重链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9的CDR-H3; 或者

[0496] b. 包含SEQ ID NO:15或19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35的重链可变区; 或者

[0497] c. 包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:21的轻链和包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37的重链。

[0498] 根据本发明的 α 突触核蛋白病包括但不限于: 帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA)和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1)。优选地, 所述 α 突触核蛋白病为帕金森病(PD)。

[0499] 在另一个实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物用于在治疗帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA)和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1) (优选地, 帕金森病(PD)) 中使用, 并且为这样的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

[0500] a. 轻链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和重链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3; 或者

[0501] b. 包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区; 或者

[0502] c. 包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。

[0503] 在另一个实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物用于在治疗帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA)和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1) (优选地, 帕金森病(PD)) 中使用, 并且为这样的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

[0504] a. 轻链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3; 和重链可变区, 其包含: 包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9的CDR-H3; 或者

[0505] b. 包含SEQ ID NO:15或19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35的重链可变区; 或者

[0506] c. 包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:21的轻链和包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37的重链。

[0507] 在另一个实施方案中, 提供了用于在患者中治疗帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA)和1型脑铁蓄积性神经变

性(NBIA-1) (优选地,帕金森病(PD)) 的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0508] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者

[0509] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区;或者

[0510] c.包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。

[0511] 在另一个实施方案中,所述用于在患者中治疗帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA) 和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1) (优选地,帕金森病(PD)) 的方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的药用组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0512] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:8的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9的CDR-H3;或者

[0513] b.包含SEQ ID NO:15或19的轻链可变区和包含SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35的重链可变区;或者

[0514] c.包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:21的轻链和包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37的重链。

[0515] 备选地,本发明还提供了抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗 α 突触核蛋白病的药物中的用途,其中所述 α 突触核蛋白病优选地为帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA) 和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1),更优选地帕金森病(PD),其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0516] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者

[0517] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区;或者

[0518] c.包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。

[0519] 所述抗 α 突触核蛋白抗体或其抗原结合片段用于作为在诊断上有活性的试剂或者在诊断测定法中使用的用途也是本发明的一部分,例如用于诊断 α 突触核蛋白病例如帕金森病(PD) (包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVAD)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA) 和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1)。

[0520] 优选地,所述诊断可以在生物学样品上进行。“生物学样品”包括从个体获得的各种各样的样品类型,并且可以在诊断或监测测定法中使用。所述定义包括脑脊液,血液例如

血浆和血清,和其他具有生物学来源的液体样品例如尿和唾液,固体组织样品例如活组织检查样本或者源自其的组织培养物或细胞和其后代。所述定义还包括这样的样品,其已经在其取得后以任何方式进行了操作,例如通过用试剂进行处理、增溶或对于某些成分(例如多核苷酸)进行富集。

[0521] 优选地,诊断测试可以在不与人或动物身体相接触的生物学样品上进行。此类诊断测试也被称为体外测试。体外诊断测试可以依靠用于在已经从个体获得的生物学样品中检测 α 突触核蛋白的体外方法,其包括下列步骤:i)使所述生物学样品与在本文中所描述的抗 α 突触核蛋白抗体或其抗原结合片段相接触;和ii)检测所述抗 α 突触核蛋白抗体或其抗原结合片段与 α 突触核蛋白的结合。通过将检测出的 α 突触核蛋白水平或者 α 突触核蛋白的特定的翻译后修饰形式的存在与合适的对照进行比较,可以鉴定出一种或多种 α 突触核蛋白病。因此,这样的检测方法可以用于确定受试者是否具有 α 突触核蛋白病或者处于发展出 α 突触核蛋白病的风险中,包括确定 α 突触核蛋白病的阶段(严重度)。

[0522] 因此,本发明提供了用于在诊断 α 突触核蛋白病中,优选地在诊断帕金森病中使用的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0523] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:44的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:45的CDR-H2和包含SEQ ID NO:46的CDR-H3。

[0524] 优选地,本发明提供了用于在诊断 α 突触核蛋白病中,优选地在诊断帕金森病中使用的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合 α 突触核蛋白并且包含:

[0525] a.轻链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:1的CDR-L1、包含SEQ ID NO:2的CDR-L2和包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;和重链可变区,其包含:包含SEQ ID NO:4的CDR-H1、包含SEQ ID NO:5的CDR-H2和包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;或者

[0526] b.包含SEQ ID NO:15的轻链可变区和包含SEQ ID NO:31的重链可变区;或者

[0527] c.包含SEQ ID NO:17的轻链和包含SEQ ID NO:33的重链。

[0528] 在本发明中所包括的序列显示在表1中:

[0529] 表1

[0536]	6470 gH36 VH S56N N102H	35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMDYWVRQA PGKGLEYIGAIYASGNTYYASWAKGRFTISRDSSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARIHYGHSGGLWGQGTLVTVSS
	6470 gH36 VH S56N N102H 核 昔酸	36	Gaggttcagtcgtggagtctggaggcgggcttgcacgcgtggaggggacgtgcgtctct cttgtgeagtaageggcategacactgtccageacgacatgtattgggtacgtcaggcacc ggtaaaggctggaatacatcggeccatttatgtctatgttaatacatactacgag ggcggaaaggccgttaccatctccgtgactccageaaaaacaccctgtacactgcag gaactctctcggtcggaagacactgcggttactattgcgcgegtattcattatggtacag tggtggttgcgggtactctggtaacgtctcgagc
	6470 gH36 重链 S56N N102H	37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMDYWVRQA PGKGLEYIGAIYASGNTYYASWAKGRFTISRDSSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARIHYGHSGGLWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTKTYTCNV HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPGCPAPEGFLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0538]	人 IGHV3-23 JH4 受者 构架核苷 酸	42	Gagggtgeagctgtggagctggggaggttggacagctggggggccctgagacttcctgtgeagectctggattcaccttageagctatgcacatgagctgggtccggccaggttca gggaaggggctggagtgggttcagctatttagtggtagtggtagcacaactacgca actcegtgaaggggcgggttccacatctccagagacaattcaagaacaacgctgttatctgca aatgaacagectgagagccgaggacaeggegtatattactgtgegaaatactttgactactggggcaaggaaacctggtccacgcttcetca
	兔 Fc 人 68-140 a-syn	43	GAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAATGFVKKDQLGKNEEG APQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEAVEKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVV STLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTIKARGQPL EPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNG KAEDNYKTTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFCTCS VMHEALHNHYTQKSISRSPGK
	CDR-L1 X33	44	QASQSVYKNXYLA (X = N 或 R)
	CDR-H2 X56	45	AIYASGXYYASWAKG (X = S 或 N)
	CDR-H3 X102	46	IHYGXSGGL (X = N 或 H)
	6470 兔轻 链	47	AIVMTQTPSSKSVAVGDTVTINCQASQSVYKNNYLAWFQQ KPGQPPKQLIYGASTLASGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDVV CDDAATYYCAGYKGGRNDGFAFGGGTEVVVKRTPVAPTV LIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT TGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYNSHKEYTCKVT QGTTSVVQSFNRGDC
[0539]	6470 兔重 链	48	QSVEESGGRLVTPGTPLTCTVSGIDLSSHDMDYWVRQAP GKGLEYIGAIYASGSTYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKMTS LTTEDTATYFCARIHYGNSSGLWGQGTLTVSSGQPKAPS VFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVWNSGTLTN GVRTFPSVRQSSGLYSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTK VDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRV STLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTIKARGQPLEPKVY TMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNG KAEDNYKTTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFCTCS VMHEALHNHYTQKSISRSPGK
	6470 兔 Fab 重链	49	QSVEESGGRLVTPGTPLTCTVSGIDLSSHDMDYWVRQAP GKGLEYIGAIYASGSTYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKMTS LTTEDTATYFCARIHYGNSSGLWGQGTLTVSSGQPKAPS VFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVWNSGTLTN GVRTFPSVRQSSGLYSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTK VDKTVAPSTCSKPHHHHHHHHH

[0540] 现在,将通过实施例并参考在附图中所图解说明的实施方案来进一步描述本发明。

实施例

[0541] 实施例1:人 α 突触核蛋白单体和原纤维的表达

[0542] 合成产生编码人 α 突触核蛋白的基因,并且使用标准分子生物学技术亚克隆到载体pMH 10His TEV(包含CMV启动子)中,以创建经改造从而产生具有N-末端10His-TEV标签的 α 突触核蛋白的载体。依照制造商的实验方案,通过使用Expi293TM Expression System (Invitrogen),将所得的载体转染到Expi293F细胞中。通过使用固定化金属离子亲和色谱法HisTrap excel柱(GE Healthcare)来纯化积累在培养基(从其中回收它)中的 α 突触核蛋白蛋白质。用25mM TrisHCl,300mM NaCl, pH 8.0洗涤柱子,并且用在相同缓冲液中的500mM咪唑的阶梯式梯度来洗脱出蛋白质。使用TEV蛋白酶来去除10His标签。然后,将样品浓缩并脱盐,之后将经切割的蛋白质再施加至HisTrap excel柱并且收集在流出物中的经切割的 α 突触核蛋白。通过在HiLoad 26/600Superdex 75柱(GE Healthcare)上的凝胶过滤来进一步纯化 α 突触核蛋白,并且经由通过Proteus NoEndo盒(Generon)来去除内毒素。用SEC MALS确证了经纯化的 α 突触核蛋白是单体的(图1A)。

[0543] 也在Expi293F细胞中表达了野生型(未加标签的)人 α 突触核蛋白。使用HiTrap Q柱(GE Healthcare)经由阴离子交换从培养基中回收蛋白质。用20mM TrisHCl pH 8.0洗涤柱子,并且使用至400mM的氯化钠梯度来洗脱出蛋白质。经由通过HiPrep 26/10柱(GE Healthcare)来使级分浓缩和脱盐,并且用20mM TrisHCl pH 8.0进行洗脱。通过使用MonoQ 10/100GL柱来进一步纯化蛋白质,用在20mM TrisHCl pH 8.0中的至400mM的氯化钠梯度进行洗脱,随后为在HiLoad 26/600Superdex 75柱(GE Healthcare)上的凝胶过滤,在PBS pH 7.4中进行洗脱(图1B)。

[0544] 将该野生型(未加标签的) α 突触核蛋白单体用于制备 α 突触核蛋白原纤维,其通过在1200rpm,37°C下在Vortemp56摇动培养箱(Labnet)中连续搅动经纯化的重组 α 突触核蛋白单体(9-10mg/mL,在PBS pH 7.4中)10天来获得。通过JC-1测定法(Lee等人, Biochem. J. 2009, 418, 311-323)和溶液的C傅里叶变换红外光谱学来评估原纤维形成。经由超离心和经由通过100KDa截止膜和随后的凝胶电泳来评估在原纤维溶液中的未掺入的单体。在进一步的研究中仅使用具有>15的JC-1应答、低量的可溶性单体(<5%)和其主要吸收在1625和1630cm⁻¹之间的FTIR谱的原纤维(图2)。将所制备的原纤维储存于-80°C。

[0545] 实施例2:免疫接种和抗体分离

[0546] 施行使用各种物种和免疫原的许多免疫接种策略。抗体6470源自雌性新西兰白兔(>2kg),其已经接受了用兔Fc融合蛋白(其包含与兔Fc相融合的人 α 突触核蛋白残基68-140)(SEQ ID NO:43)进行的皮下免疫接种。

[0547] 依照制造商的实验方案,通过使用Expi293™ Expression System(Invitrogen),在Expi293F细胞中表达用于免疫接种的 α 突触核蛋白(68-140)兔Fc融合蛋白。使用MabSelectSure柱(GE Healthcare)通过亲和色谱法从上清液中纯化出蛋白质。将柱子用50mM甘氨酸/甘氨酸钠(pH 8.8)缓冲液进行平衡,并且用在相同缓冲液中的0.1M柠檬酸pH 2.0的梯度进行洗脱。将蛋白质级分用2M Tris HCl pH 8.5中和,浓缩,并且在HiLoad 26/

600Superdex 200柱(GE Healthcare) (在PBS pH 7.4中进行平衡和洗脱) 上通过凝胶过滤法进一步进行纯化。兔子接受包含500 μ g的在等体积的完全弗氏佐剂(CFA)中进行乳化的融合蛋白的初次免疫接种。以21天间隔,通过使用不完全弗氏佐剂(IFA),给予兔子2次加强注射,其中在免疫接种后14天从耳朵取血。在最后一次加强后14天,免疫接种结束,其中制备脾、骨髓和外周血单核细胞的单细胞悬浮液并且在-80°C下在处于胎牛血清(FCS)中的10%二甲亚砜(DMSO)之中进行冷冻。

[0548] B细胞培养物

[0549] 通过使用与由Tickle等人,2015.J Biomol Screen:20(4),492-497所描述的相似的方法来制备B细胞培养物。简而言之,在37°C下在5%CO₂的气氛中,在具有200 μ l/孔的RPMI 1640培养基(补充有10%FCS(Sigma Aldrich)、2%HEPES(Sigma Aldrich)、1%L-谷氨酰胺(Gibco BRL)、1%青霉素/链霉素溶液(Gibco BRL)、0.1% β -巯基乙醇(Gibco BRL)、1%经激活的人PBMC上清液(BSS)和经X-射线辐射的突变型EL4鼠类胸腺瘤细胞(5×10^4 /孔)) (Gibco BRL)的带条形码的96-孔组织培养平板中以大约2000-5000个细胞/孔的密度培养来自经免疫接种的动物的淋巴结或脾细胞来源B细胞七天。使用来自所有经免疫接种的动物的B细胞来建立培养物,并且取样总共大约 1.7×10^9 个B细胞。

[0550] 6470,根据本发明的抗体,产生自以大约5000个细胞/孔的密度进行培养的经激活的淋巴结来源B细胞。除了脾细胞外,还使用淋巴结用于抗体发现,从而给我们提供备选的B细胞来源,从其取样并鉴定新型抗体。从源自淋巴结而不是脾的B细胞中鉴定出了具有相关序列的抗体。从用人 α 突触核蛋白C-末端蛋白质进行免疫接种的兔子中取样大约 9.6×10^7 个细胞。

[0551] 初次筛选

[0552] 使用包被有经生物素化的重组人 α 突触核蛋白全长单体作为靶抗原来源的SuperavidinTM珠粒(Bangs Laboratories),通过使用基于均匀荧光的结合测定法来测定在B细胞培养物上清液中人 α 突触核蛋白特异性抗体的存在。通过使用3-倍摩尔过量的生物素来使在本文中所描述的重组人 α 突触核蛋白生物素化。为了避免位于 α 突触核蛋白分子内的所有七个赖氨酸残基的完全修饰,使用低摩尔过量的生物素。在40°C下将 α 突触核蛋白单体与生物素一起温育,并且次日通过使用ZebaTM旋转脱盐柱来去除游离的生物素。筛选牵涉使用Agilent Bravo液体处理机将10 μ l的上清液从带条形码的96-孔组织培养平板中转移到带条形码的384-孔黑壁测定法平板中,后者包含固定在Superavidin珠粒上的经生物素化的重组人 α 突触核蛋白单体(10 μ l/孔)。用山羊抗兔IgG Fc γ -特异性Alexafluor647缀合物(Jackson)来揭示结合。将平板在TTP Labtech Mirrorball上进行读取以便鉴定包含 α 突触核蛋白特异性IgG的孔。

[0553] 二次筛选

[0554] 在初次筛选后,通过使用Beckman Coulter BiomekNXP命中拾取(hit-picking)机器人来将阳性上清液合并在96-孔带条形码的主平板上,并且将在细胞培养平板中的B细胞冷冻在-80°C下。然后,通过使用经生物素化的重组人 α 突触核蛋白单体或经生物素化的重组人 α 突触核蛋白原纤维在链霉抗生物素蛋白捕获ELISA测定法中对主平板进行筛选。进行该筛选是为了鉴定给出与单体的和原纤维的重组人 α 突触核蛋白两者的结合的孔,并且排除任何显示出与SuperavidinTM珠粒的脱靶结合的假阳性孔。鉴于原纤维的不可溶性质,不

赞成用在溶液中的蛋白质来进行使用的常规ELISA包被实验方案。决定采用最小生物素化实验方案以保存原纤维结构和促进原纤维在用链霉抗生物素蛋白预包被的ELISA平板上的有效包被。

[0555] 如上面所描述的,通过在PBS中将经生物素化的重组 α 突触核蛋白单体与50-倍过量的未标记的重组 α 突触核蛋白相组合,产生经生物素化的 α 突触核蛋白总原纤维。通过JC1测定法(Lee等人,Biochem.J.2009,418,311-323)来确证原纤维形成。

[0556] 将在PBS中的经生物素化的单体或经生物素化的原纤维捕获在包被有在碳酸盐包被缓冲液($\text{dH}_2\text{O}+0.16\% \text{Na}_2\text{CO}_3+0.3\% \text{NaHCO}_3$)中的链霉抗生物素蛋白的384-孔Maxisorp平板上。将平板用1% w/v PEG/PBS进行封闭,然后与10 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 的B细胞培养物上清液(用封闭缓冲液进行1:1稀释)一起温育。向平板添加缀合有HRP的山羊抗兔IgG Fc二抗(Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch),随后用TMB底物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺,来自EMD Millipore;10 $\mu\text{l}/\text{孔}$)来使结合可视化。使用BioTek Synergy2微量培养板阅读器在630nM下测量光密度。初次结合测定法鉴定出了640个命中,并且在ELISA筛选后,这些中的491个命中显示出结合单体的和原纤维的重组人 α 突触核蛋白两者。

[0557] 选择显示出最强的对于重组原纤维的ELISA结合信号的B细胞上清液用于通过表面等离子体共振的进一步分析,以鉴定在重组人 α 突触核蛋白单体、重组人 α 突触核蛋白原纤维和重组小鼠 α 突触核蛋白原纤维上具有最佳解离速率的那些。测试了来自80种不同B细胞的上清液,九个孔在重组人原纤维上给出了 $<1 \times 10^{-5}$ 的解离速率(kd)。在这些之中,七个在重组小鼠原纤维上给出了小于 1×10^{-5} 的解离速率(kd),和两个在重组人单体上给出了小于 1×10^{-5} 的解离速率(kd)。就可变区回收,对所有九个上清液进行选择。

[0558] 可变区回收

[0559] 为了允许从目的上清液的选择中回收抗体可变区基因,不得不进行去卷积(deconvolution)步骤以使得能够在包含异质B细胞群体的给定孔中鉴定出抗原特异性B细胞。这通过使用荧光焦点方法(Clargo等人,2014.MAbs:6(1),143-159)来实现。简而言之,将来自阳性孔的分泌免疫球蛋白的B细胞与包被有经生物素化的重组人 α 突触核蛋白原纤维(其通过使用1:50混合物来产生,如上面所描述的)的链霉抗生物素蛋白珠粒(New England Biolabs)和1:1200最终稀释度的山羊抗兔Fc γ 片段特异性FITC缀合物(Jackson)相混合。在37°C下静止温育1小时后,由于在那个B细胞周围的荧光晕轮的存在可以鉴定出抗原特异性B细胞。然后,用Eppendorf显微操作器挑选通过使用Olympus显微镜鉴定出的许多这些独个B细胞克隆,并且存放入PCR管中。

[0560] 使用重链和轻链可变区特异性引物,通过逆转录(RT)-PCR从单个细胞中回收抗体可变区基因。用巢式2°PCR进行两轮PCR,其中在3'和5'末端处掺入限制性位点,从而允许将可变区克隆到兔IgG(VH)或兔 κ (VL)哺乳动物表达载体中。成功地将来自5个不同上清液的抗 α 突触核蛋白抗体基因克隆到表达载体中。使用ExpiFectamine 293(Invitrogen)将重链和轻链构建体共转染到Expi-293细胞中,并且在125ml Erlenmeyer瓶中以30ml的体积表达出重组抗体。在5-7天表达后,收获上清液并使用亲和色谱法进行纯化。

[0561] 瞬时上清液的ELISA筛选

[0562] 然后,使经纯化的抗体经历通过ELISA的进一步筛选。将经生物素化的重组人 α 突触核蛋白单体和原纤维捕获在包被有在碳酸盐包被缓冲液($\text{dH}_2\text{O}+0.16\% \text{Na}_2\text{CO}_3+0.3\%$

NaHCO₃) 中的链霉抗生素蛋白的384-孔Maxisorp平板 (ThermoScientific/Nunc) 上。还将分开的平板用经生物素化的相应于按照SEQ ID NO:10的人 α 突触核蛋白的残基117至126的肽 (肽PVDPDNEAYE) 进行包被,以检查是否瞬时上清液与在该分子上的这个区域或不同区域相结合。用1%w/v PEG/PBS封闭平板,然后与几个稀释度的经纯化的瞬时上清液一起温育。向平板添加缀合有HRP的山羊抗兔IgG Fc二抗 (Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch),随后用TMB底物 (3,3',5,5'-四甲基联苯胺,来自EMD Millipore;10 μ l/孔) 来使结合可视化。使用BioTek Synergy 2微量培养平板阅读器在630nM下测量光密度。关于6470的数据显示在图3中。如可以看出的,6470显示出与单体的和原纤维的重组人 α 突触核蛋白两者的结合,但没有显示出与117-126肽的结合。

[0563] 然后,在基于细胞的聚集测定法中测试抗体 (IgG),如稍后在实施例7中所描述的。随后通过表面等离子体共振来测定在细胞测定法中显示出活性的所有抗体的结合动力学。所述抗体以IgG和Fab来进行测试,以分别测定抗体亲抗原性 (二价结合) 和亲和力 (单价结合)。

[0564] 实施例3:抗体表征

[0565] Biacore动力学

[0566] 在Biacore T200仪器上通过使用表面等离子体共振技术来测定相互作用动力学。通过使用胺偶联化学将三种不同的配体 (包括重组全长人 α 突触核蛋白单体、经纯化的重组人 α 突触核蛋白原纤维和经纯化的重组小鼠 α 突触核蛋白原纤维,如在本文中所描述的那样制备的) 各自固定在CM5芯片表面的三个不同的流动池上。在10mM NaAc, pH 3.5中制备所述三种配体,并且以10 μ l/分钟的流速固定到分开的流动池表面上,以分别达到下列的固定化水平:对于 α 突触核蛋白单体,大约30响应单位 (RU);对于人 α 突触核蛋白原纤维,大约40RU;而对于小鼠 α 突触核蛋白原纤维,大约300RU。使用缓冲液HBS-EP+ (GE healthcare Bio-Sciences AB) 作为用于配体固定化和动力学测定法两者的运行缓冲液。然后,测量单克隆6470兔IgG1 (包含SEQ ID NO:47和48) 和单克隆6470兔Fab (包含SEQ ID NO:47和49) 与所述三种配体的结合。以100 μ l/分钟的流速,以800nM至0.195nM的7种不同的浓度将单克隆IgG或Fab抗体注射在3个流动池上,其中采用3分钟的接触时间和30分钟的解离时间。通过在10 μ l/分钟下历时90秒的50mM HC1的一次注射和在10 μ l/分钟下历时60秒的50mM HC1的另一次注射来使表面再生。通过使用Biacore T200评价软件 (3.0版) 采用二价分析物模型来分析数据,其中假定对于IgG形式没有大批量贡献 (RI=0) 和总体Rmax,和1:1模型具有灵活的大批量贡献 (局部RI) 和总体Rmax。

[0567] 关于IgG和Fab两者与经固定化的靶标的结合的动力学值显示在表2中。IgG形式显示出针对人 α 突触核蛋白原纤维的明显选择性的亲和力,相比于对于人 α 突触核蛋白单体的亲和力而言,因为关于人原纤维的解离常数KD以超过10倍的程度更低。

[0568] 表2

样品	人单体			人原纤维			小鼠原纤维		
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)
6470 兔 Fab	1.80E+06	2.67E-02	14.79	1.83E+06	2.25E-02	12.35	1.38E+06	2.43E-02	17.65
6470 兔 IgG1	4.75E+06	1.42E-02	2.98	1.76E+06	4.78E-04	0.27	8.89E+05	3.07E-04	0.34

[0570] 与β突触核蛋白的结合

[0571] 使用rPeptideβ突触核蛋白通过Western印迹来测试针对人α突触核蛋白引起的抗体与人β突触核蛋白的结合。将一微克的突触核蛋白在4-12% Bis/Tris凝胶上走电泳,并且印迹到PVDF膜上。将所述膜在具有3% BSA和0.1% Tween20的PBS中进行封闭。向经封闭的印迹添加6470兔IgG1抗体并在室温下温育1小时,用PBS, 0.1% Tween20进行洗涤,并且与二抗-HRP缀合物(抗兔H+L HRP缀合物,Bethyl, A120-101P)一起温育1小时。在具有0.1% Tween20的PBS、PBS和水中充分地洗涤印迹。在添加ECL Western印迹底物(Pierce)后测量化学发光。如在图4(A)泳道3中所显示的,6470兔IgG1不与人β-突触核蛋白相结合。

[0572] 表位作图

[0573] NMR

[0574] 将人α-突触核蛋白克隆到pET28a表达载体中,从而使得不带任何标签地表达所述蛋白质。将构建体转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞 (Stratagene) 中,并且使细胞在具有经C¹³标记的DL-葡萄糖和经N¹⁵标记的硫酸铵的成分确定的培养基中在氧化氘(D₂O)存在或不存在下进行生长。在OD600nm=1时用300mM IPTG诱导表达,并且将培养物在30℃下温育4小时。使细胞形成粒状沉淀,并且通过在100ml裂解缓冲液(20mM Tris/HCl pH 8.0、25单位的benzonase (Merck Millipore)、完全的无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(2片, Roche) 和10mg溶菌酶(Sigma))中的三个冷冻-解冻循环来进行裂解。通过以18000rpm进行离心来使裂解物澄清,并且使变清的裂解物通过0.22μm过滤器(Stericup, Millipore)。将无菌的裂解物加载到用20mM Tris/HCl pH 8.0, 5CV进行平衡的MonoQ 10/100GL (GE Healthcare) 上,并且用在相同缓冲液中的至500mM NaCl的梯度洗脱出蛋白质。在20mM Tris/HCl pH 8.0中进行5倍稀释后,在MonoQ10/100GL柱上重复对最纯的级分的进一步纯化。汇集最纯的级分,用10kDa MWCO离心浓缩器(Centriprep, Millipore)进行浓缩,在HiLoad 26/600Superdex 75柱(GE Healthcare)上通过大小排阻进行纯化,并且在25mM磷酸钠缓冲液,100mM NaCl (pH 6.4) 中进行洗脱。汇集来自Superdex 75柱的级分,并且添加叠氮化钠(0.02%的最终浓度)和AEBSF(10μM的最终浓度)。最终蛋白质浓度为大约5mg/ml。

[0575] 在CHO SXE中作为加有His标签的实体来表达兔6470Fab(其包含SEQ ID N0:11的VL和SEQ ID N0:13的VH,和还包含SEQ ID N0:47和49),并且通过His标签亲和色谱法从上清液中纯化,其中使蛋白质从上清液中结合至HiTrap Excel (GE Healthcare) 并且用在PBS中的250mM咪唑来洗脱它。将洗脱汇集物加载到HiTrap GammaBind Plus Sepharose (GE Healthcare) 上,用PBS洗涤柱子并且用0.1M甘氨酸-HCl pH 2.6来洗脱蛋白质,并且用0.75M磷酸钠(pH 9)将pH调节至pH 6。在HiPrep 26/10脱盐柱上,将洗脱出的Fab-His蛋白质进行缓冲液交换以交换到NMR缓冲液(25mM磷酸钠pH 6.4, 100mM NaCl)中。在经过Millex

GV 0.22 μ m过滤器进行过滤灭菌之前,浓缩Fab-His蛋白质分级并且添加蛋白酶抑制剂AEBSF(10 μ M的最终浓度)和叠氮化钠(0.02%的最终浓度)。对于晶体学,通过在用25mM磷酸钠pH 6.4,100mM NaCl进行平衡和洗脱的HiLoad 26/600Superdex 75(GE Healthcare)柱上的制备型大小排阻色谱法来纯化经浓缩的6470Fab-His。在UPLC-SEC上测试最终汇集物的纯度在>99%纯度。使最终汇集物通过Millex GV 0.22mm过滤器进行灭菌。

[0576] α -突触核蛋白的主链分配

[0577] 典型地,NMR样品为在5mm Shigemi管中的具有360 μ M经¹³C/¹⁵N标记的或430 μ M经²H/¹³C/¹⁵N标记的人 α -突触核蛋白的蛋白质浓度的350 μ l体积。缓冲液条件为100mM NaCl,25mM磷酸钠pH6.4,10 μ M AEBSF,0.02%NaN₃。在20℃下在600MHz Bruker AVIII或800MHz Bruker AVII分光计(其安装有经低温冷却的探针)上记录所有实验。通过使用3D(H)N(CA)NNH实验(Weisemann等人,19933D Triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and 15N resonances in 15N-and 13C-labelled proteins.J.Biomol.NMR 3)来进行在蛋白质中的残基的主链NMR信号之间的顺次连接,H_N(i)-N(i)-N(i±1),分别在¹⁵N、¹⁵N和¹H维度中以28、28和10ppm的光谱宽度和117(F1)、117(F2)和140(F3)ms的采集时间来进行记录,其中采用8次扫描/增量和1.5s弛豫延迟。采用非均匀采样,其中具有10%的采样密度(40000个超复杂点中的4000个),从而给出2.75天的总采集时间。通过使用TROSY-HNCA(Grzesiek和Bax,1992Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31kDa protein.J.Magn.Reson.96,432-440;Salzmann等人,1998.TROSY in triple-resonance experiments:new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.95,13585-90)和TROSY-HNCACB(Wittekind和Mueller,1993HNCACB,a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha-and Beta-Carbon Resonances in Proteins.J.Magn.Reson.Ser.B 101,201-205;Salzmann等人,1999.TROSY-type Triple Resonance Experiments for Sequential NMR Assignment of Large Proteins.J.Am.Chem.Soc.121,844-848)实验来确证顺次连接并且鉴定残基类型。分别在¹³C、¹⁵N和¹H维度中以23、28、10ppm的光谱宽度和12.1(F1)、21.7(F2)和100(F3)ms的采集时间(8次扫描/增量,1.5s弛豫延迟,1天的总采集时间)来记录TROSY-HNCA实验,而分别在¹³C、¹⁵N和¹H维度中以56、28、10ppm的光谱宽度和8.2(F1)、21.7(F2)和100(F3)ms的采集时间(8次扫描/增量,1.5s弛豫延迟,1.7天的总采集时间)来记录TROSY-HNCACB。从分别在¹³C、¹⁵N和¹H维度中以10、29、10ppm的光谱宽度和80(F1)、21.7(F2)和150(F3)ms的采集时间(8次扫描/增量和1.5s弛豫延迟)记录的TROSY-HNCA光谱(Grzesiek和Bax,1992Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31kDa protein.J.Magn.Reson.96,432-440;Salzmann等人,1998.TROSY in triple-resonance experiments:new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.95,13585-90)来获得主链羰基分配。采用非均匀采样,其中具有15%(8050个超复杂点中的1208个)的采样密度,从而给出19小时的总采集时间。通过使用NMRPipe(Delaglio等人,1995NMRPipe:a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.J.Biomol.NMR 6,277-93)来处理NMR光谱,其中使用线性预测来将氮的有效采集时间延伸多至1倍。通过使用Harvard迭代软阈值化方法(Hyberts等

人,2012)来重构非均匀采样的数据,其中将数据重构至下一个傅立叶数,从而将间接采集时间增加多至60%。通过使用Sparky (Goddard和Kneller,D.G.SPARKY 3.In.,University of California, San Francisco)来进行数据分析,其导致133个残基(相当于99%的残基(不包括脯氨酸残基和N-末端甲硫氨酸))的酰胺质子和氮共振的分配。

[0578] 6470Fab的结合位点的作图通过使用经²H/¹³C/¹⁵N标记的人 α 突触核蛋白的150 μ M样品(其包含10%摩尔过量的未标记的6470Fab)来进行。在与在上面对于 α 突触核蛋白的主链分配所描述的相同的缓冲液中制备样品。通过将在 α 突触核蛋白/Fab复合物上记录的TROSY-HNCO (Grzesiek和Bax,1992Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31kDa protein.J.Magn.Reson.96,432-440;Salzmann等人,1998.TROSY in triple-resonance experiments:new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.95,13585-90)光谱与对于游离的 α 突触核蛋白所记录的等价对照光谱进行比较,测定了¹H、¹⁵N和¹³C化学位移变化。分别在¹³C、¹⁵N和¹H维度中以10、28和10ppm的光谱宽度和80(F1)、22(F2)和150(F3)ms的采集时间(16次扫描/增量,1.5s弛豫延迟)来记录游离 α 突触核蛋白的对照TROSY-HNCO实验。采用非均匀采样,其中具有25%(8050个超复杂点中的2013个)的采样密度,从而给出2.7天的总采集时间。分别在¹³C、¹⁵N和¹H维度中以10、28和10ppm的光谱宽度和80(F1)、21.7(F2)和80(F3)ms的采集时间(32次扫描/增量,1.5s弛豫延迟)来记录 α 突触核蛋白/Fab复合物的TROSY-HNCO实验。采用非均匀采样,其中具有25%(4477个超复杂点中的1119个)的采样密度,从而给出2.8天的总采集时间。通过使用NMRPipe (Delaglio等人,1995NMRPipe:a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.J.Biomol.NMR 6,277-93)来处理NMR光谱,其中使用mddnmr (Analysis of non-uniformly sampled spectra with Multi-Dimensional Decomposition.Prog.Nucl.Magn.Reson.Spectrosc.,59,p 271-292)来进行NUS数据的重构。在数据重构期间氮维度的有效采集时间增加多至1倍。

[0579] 通过使用最小位移方法(Williamson等人,1997Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation.Biochemistry 36,13882-9)来分析化学位移变化,基本上如以前所描述的那样(Vererka等人,2008Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor:compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR.Oncogene 27,585-95),除了对用于计算组合式化学位移变化($\Delta\delta$)的等式进行修改以包括羰基化学位移,这导致下述等式:

$$[0580] \Delta\delta = \frac{\sqrt{(\Delta\delta_{\text{HN}})^2 + (\Delta\delta_{\text{N}\alpha\text{N}})^2 + (\Delta\delta_{\text{C}\alpha\text{C}})^2}}{3}$$

[0581] 其中 $\Delta\delta_{\text{HN}}$ 、 $\Delta\delta_{\text{N}}$ 和 $\Delta\delta_{\text{C}}$ 分别是¹H、¹⁵N和¹³C化学位移的差异。 αN 和 αC 分别相当于0.2和0.35的比例因子,其用于解释酰胺质子、氮和羰基化学位移的化学位移范围的差异。

[0582] 为了鉴定在 α 突触核蛋白上的Fab结合位点(表位),使用组合式最小位移对蛋白质序列的直方图来揭示包含显著地受干扰的信号的 α 突触核蛋白的区域。如果对于独个氨基酸的组合式化学位移变化的大小超过了对于所有氨基酸的组合式化学位移变化的平均值

加上一个离该平均值的标准偏差的阈值,那么就选择这些残基作为在Fab结合位点中的可能的接触残基用于进一步评价。

[0583] 将显著地受干扰的残基鉴定为其最小位移至少大于所有计算出的位移的平均值加上一个标准偏差的那些。应用四个不同的阈值来鉴定被Fab所结合的残基。以渐增的严紧性将在结合位点中所牵涉的残基评分为:其最小位移超过所有计算出的位移的平均值加上一个标准偏差(为>0.018925)的那些;其最小位移超过所有计算出的位移的平均值加上两个标准偏差(为>0.032049)的那些;其最小位移超过所有计算出的位移的平均值加上三个标准偏差(为>0.045174)的那些;其最小位移超过所有计算出的位移的平均值加上四个标准偏差(为>0.058299)的那些。在该分析中,无法鉴定脯氨酸残基,因为它们不包含酰胺质子。

[0584] 因此,以增加的严紧性将关于6470Fab的表位定义为:所有计算出的位移的平均值加上一个标准偏差:D121、N122、E123、A124、Y125、E126、M127、S129、E130、Y133、Q134、D135和Y136;所有计算出的位移的平均值加上两个标准偏差:E123、A124、Y125、E126、M127、S129、E130、D135和Y136;所有计算出的位移的平均值加上三个标准偏差:Y125、M127、S129和D135;所有计算出的位移的平均值加上四个标准偏差:M127、S129和D135。

[0585] 如在图4B中所显示的,通过NMR研究发现抗体6470结合人 α -突触核蛋白(SEQ ID NO:10)的至少下列残基(平均值+3SD):Y125、M127、S129和D135,并且另外还结合所有下列残基(平均值+1SD):D121、N122、E123、A124、E126、E130、Y133、Q134和Y136。

[0586] 肽作图

[0587] 被6470所结合的表位的进一步表征通过使用代表并且覆盖人 α 突触核蛋白的C-末端区域的短(典型地9-聚体或10-聚体)肽来进行。在竞争性表面等离子体共振测定法中使用这些肽来测试是否任何一个能够抑制所述抗体与固定在Biacore芯片上的单体 α 突触核蛋白或预先形成的 α 突触核蛋白原纤维的结合。然后,选择显示出最大抑制水平的肽用于与所述抗体的共结晶研究,以便确认准确的表位。

[0588] 肽由Peptide Protein Research Ltd., Bishop's Waltham, U.K.提供,并且按照Atherton和Sheppard的方法(参见Atherton, E., Sheppard, R.C. (1989). Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press)通过Fmoc固相肽化学来合成。分别用乙酰基和酰胺基团给N和C肽末端加帽,除了在代表 α -突触核蛋白的N-末端和C-末端(其中氨基和羧基基团分别保持游离)的肽的情况下。以10mM在DMSO中制备肽储备溶液。肽的全部列表显示在表3中。

[0589] 表3

肽 ID	序列
AS104-113	EEGAPQEGIL
AS109-118	QEGILEDMPV
AS111-120	GILEDMPVDP
AS113-122	LEDMPVDPDN
AS115-124	DMPVDPDNEA

[0590]

[0591]

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

[0592] 通过使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)来将重组人 α 突触核蛋白单体和预先形成的 α 突触核蛋白原纤维固定在CM5芯片上。在通过以10 μ l/分钟HBS-EP(GE Healthcare) (作为运行缓冲液)的流速注射100 μ l的50mM N-羟基琥珀酰亚胺和200mM 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺的新鲜的1:1(v/v)混合物来活化羧甲基右旋糖酐后,通过在分开的流动池上以在10mM乙酸盐pH 5.0中的5 μ M注射100 μ l的单体和原纤维来实现偶联。以相同的方式活化参考流动池,然后用50 μ l脉冲的1M盐酸乙醇胺(pH 8.5)来使所有流动池表面去活化。

[0593] 在运行缓冲液中以100 μ M制备肽溶液,并且将肽空白对照制备为在运行缓冲液中的1:100稀释度的DMSO。在运行缓冲液中以50.5nM制备6470兔Fab(包含SEQ ID NO:47和49)的溶液,之后将198 μ l与2 μ l的空白对照或经稀释的肽一起预温育以产生50nM Fab和1 μ M肽的最终混合物或者对照。对于每个样品通过下述方式来记录传感图:以10 μ l/分钟注射30 μ l的所述混合物,并且在注射结束之前记录报告点5秒钟。在每个循环结束时,通过40mM HCl的2次10 μ l注射和5mM NaOH的一次注射来使芯片再生。使对照循环与肽循环交替。

[0594] 将每种肽的抑制程度计算为相比于邻近对照循环的平均值而言在报告点测量的响应单位的百分比变化。

[0595] 每种 α 突触核蛋白肽的抑制水平显示在图5中。仅对于三种肽观察到6470Fab对于 α 突触核蛋白单体或原纤维的显著抑制:AS121-130、AS123-132和AS125-134,其中对于AS123-132观察到最高的抑制水平,其中关于所述抗体与单体和原纤维的结合分别为37%和54%。对于肽AS125-134获得稍低的抑制水平,分别为34%和52%,这表明表位的主要组分包含残基125至132。肽AS121-130以分别20%和27%的较低水平进行抑制,这暗示对于所有三种肽来说共同的残基125至130对表位贡献最多。

[0596] 由于6470抗体的表位看起来至少包含序列YEMPSEEG,因此在与6470Fab的共结晶研究中调查了AS123-132肽。

[0597] X-射线晶体学

[0598] 为了制备复合物,将1mL的大约10mg/mL的经纯化的6470兔Fab与 α -突触核蛋白肽123-132(EAYEMPSEEG)以1:2的Fab:肽摩尔比相混合,并且在室温下温育1小时。使用商购可得的结晶筛(Qiagen),通过坐滴蒸汽扩散法(sitting drop vapor diffusion method)来鉴定适合于晶体生长的条件。为了产生衍射质量的晶体,使用悬滴蒸汽扩散法(hanging drop vapor diffusion method)。

[0599] 对于6470Fab-肽123-132复合物,将1 μ l的蛋白质溶液与1 μ l的储库溶液(其包含1.6M硫酸铵和0.1M Hepes缓冲液pH 7.5)相混合。收获晶体,并且在短暂通过包含1.6M硫酸

铵、0.1M Hepes缓冲液pH 7.5和20%甘油的冷冻保护溶液后在液氮中进行快速冷冻。收获晶体，并且在短暂通过包含0.2M硫酸铵和35% (v/v) 聚乙二醇8000的冷冻保护溶液后在液氮中进行快速冷冻。

[0600] 至 **2.9 Å** 的衍射数据在Diamond Synchrotron, Didcot, Oxfordshire, UK在光束线i04-1上从6470Fab-肽123-132的单个晶体收集，并且通过使用Mosflm, Aimless和Truncate来进行处理。使用内部Fab的坐标作为搜索模型，通过用Phaser进行分子替代来解析复合物的结构。

[0601] 通过使用CNS (Brunger等人, (2007) Nature Protocols 2, 2728-2733) 和COOT (Emsley等人, (2004) Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60, 2126-2132) 来进行细化和模型建立的循环，直至对于这两个模型所有细化统计都收敛。通过使用Molprobity43来验证模型几何学。用Pymol44产生分子可视化。通过考虑在Fab/肽接触表面的**4Å**距离之内的原子，得出了下面所描述的表位信息。数据收集和细化统计显示在表4A和表4B中。

[0602] 表4A

结构	VR6470 Fab-肽 123-132
间隔基团	P 3₁ 2 1
晶胞尺寸	
<i>a, b, c</i> (Å)	111.78, 111.78, 71.93
<i>α, β, γ</i> (°)	90.00, 90.00, 120.00
分辨率 (Å)	30.00 - 2.90 (3.08-2.90)
<i>R</i> 合并	0.07 (0.36)
<i>I</i> / <i>σI</i>	17.0 (5.1)
完整度 (%)	99.9 (100)
冗余度	9.8 (10.2)

[0604] 表4B

[0605]	细化	VR6470 Fab-肽 123-132
	分辨率 (Å)	30.00 - 2.90
	反射数	11762
	$R_{\text{工作}} / R_{\text{自由}}$	0.2587/0.3192
	原子数	
	蛋白质	3259
	水	0
	配体	30
	B-因子	
	肽	81.8
	Fab	67.4
	R.m.s.偏差	
	键长 (Å)	0.005
	键角 (°)	1.125

[0606] 括号中的值是指高分辨率壳。 $R_{\text{sym}} = \Sigma |(I - \langle I \rangle)| / \Sigma (I)$, 其中 I 为所观察到的累积强度, $\langle I \rangle$ 为从多次测量中获得的平均累积强度, 并且总和涉及所有所观察到的反射。 $R_{\text{工作}} = \Sigma |||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||| / \Sigma |F_{\text{obs}}|$, 其中 F_{obs} 和 F_{calc} 分别为观察到的和计算出的结构因子。将 $R_{\text{自由}}$ 计算为 $R_{\text{工作}}$, 这通过使用随机选择的并且从细化计算中省略的反射数据的 5% 来进行。

[0607] 重链和轻链残基与肽之间的主要接触显示在表5中。

[0608] 表5

[0609]

链	残基 (SEQ ID NO: 13)	原子	链	肽氨基酸	肽靶原子	距离 (Å)
H	96 (HIS)	NE2 [N]	A	125 (TYR)	CD1 [C]	3.93
H	96 (HIS)	CD2 [C]	A	125 (TYR)	CD1 [C]	3.93
			A	125 (TYR)	CE1 [C]	3.69
H	99 (ASN)	CB [C]	A	125 (TYR)	CD2 [C]	3.34
H	99 (ASN)	N [N]	A	125 (TYR)	CD2 [C]	3.57
H	99 (ASN)	CB [C]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.85
H	96 (HIS)	CA [C]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.85
H	96 (HIS)	CB [C]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.93
H	97 (TYR)	N [N]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.81
H	99 (ASN)	CA [C]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.99
H	98 (GLY)	N [N]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.42
H	98 (GLY)	CA [C]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.91
H	98 (GLY)	C [C]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	4
H	99 (ASN)	N [N]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.12
H	96 (HIS)	CA [C]	A	125 (TYR)	CZ [C]	3.5
H	96 (HIS)	CB [C]	A	125 (TYR)	CZ [C]	3.96
H	96 (HIS)	C [C]	A	125 (TYR)	CZ [C]	3.79
H	97 (TYR)	N [N]	A	125 (TYR)	CZ [C]	3.32
H	98 (GLY)	N [N]	A	125 (TYR)	CZ [C]	3.72
H	96 (HIS)	CA [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.19
H	97 (TYR)	N [N]	A	125 (TYR)	OH [O]	2.32
H	97 (TYR)	C [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.64

[0610]

H	98 (GLY)	N [N]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.1
H	97 (TYR)	CG [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.51
H	97 (TYR)	CE1 [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.86
H	97 (TYR)	CA [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.19
H	97 (TYR)	CB [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.38
H	97 (TYR)	CD1 [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	2.84
H	32 (ASP)	OD1 [O]	A	126 (GLU)	CA [C]	3.34
			A	126 (GLU)	CB [C]	3.78
H	52 (ALA)	CB [C]	A	126 (GLU)	CG [C]	3.92
H	32 (ASP)	OD1 [O]	A	126 (GLU)	CG [C]	3.16
			A	126 (GLU)	CD [C]	3.47
H	52 (ALA)	N [N]	A	126 (GLU)	OE2 [O]	3.82
H	52 (ALA)	CB [C]	A	126 (GLU)	OE2 [O]	3.92
H	32 (ASP)	OD1 [O]	A	126 (GLU)	OE2 [O]	2.99
H	51 (TYR)	CB [C]	A	126 (GLU)	OE2 [O]	3.93
H	32 (ASP)	CG [C]	A	126 (GLU)	OE2 [O]	3.89
H	51 (TYR)	CD2 [C]	A	126 (GLU)	OE2 [O]	3.7
H	32 (ASP)	OD1 [O]	A	126 (GLU)	C [C]	3.2
H	32 (ASP)	CG [C]	A	126 (GLU)	C [C]	3.72
H	32 (ASP)	OD2 [O]	A	126 (GLU)	C [C]	3.79
H	32 (ASP)	OD1 [O]	A	126 (GLU)	O [O]	2.4
H	32 (ASP)	CG [C]	A	126 (GLU)	O [O]	2.8
H	32 (ASP)	OD2 [O]	A	126 (GLU)	O [O]	2.73
H	51 (TYR)	CD2 [C]	A	126 (GLU)	O [O]	3.87
H	51 (TYR)	CE2 [C]	A	126 (GLU)	O [O]	3.96
			A	127 (MET)	CB [C]	3.99
			A	127 (MET)	C [C]	3.85
H	51 (TYR)	CD2 [C]	A	127 (MET)	O [O]	3.1
H	51 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	O [O]	3.03
H	57 (TYR)	OH [O]	A	129 (SER)	CB [C]	3.05
H	57 (TYR)	CZ [C]	A	129 (SER)	CB [C]	3.96
H	57 (TYR)	OH [O]	A	129 (SER)	OG [O]	2.78
H	57 (TYR)	CE2 [C]	A	129 (SER)	OG [O]	3.79
H	57 (TYR)	CZ [C]	A	129 (SER)	OG [O]	3.7
链	残基 (SEQ ID NO: 11)	原子	链	肽氨基酸	肽靶原子	距离 (Å)
L	34 (TYR)	OH [O]	A	123 (GLU)	CD [C]	3.63

[0611]

			A	123 (GLU)	OE1 [O]	3.46
L	34 (TYR)	CE1 [C]	A	123 (GLU)	OE2 [O]	3.68
L	34 (TYR)	CZ [C]	A	123 (GLU)	OE2 [O]	3.74
L	34 (TYR)	OH [O]	A	123 (GLU)	OE2 [O]	3.01
			A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.89
L	34 (TYR)	CE2 [C]	A	125 (TYR)	CE2 [C]	3.85
			A	125 (TYR)	CZ [C]	3.59
L	34 (TYR)	CD2 [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.66
L	34 (TYR)	CE2 [C]	A	125 (TYR)	OH [O]	3.39
L	93 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CB [C]	3.75
L	93 (TYR)	CZ [C]	A	127 (MET)	CB [C]	3.62
L	93 (TYR)	OH [O]	A	127 (MET)	CB [C]	3.05
L	93 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CG [C]	3.4
L	93 (TYR)	CZ [C]	A	127 (MET)	CG [C]	3.69
L	93 (TYR)	OH [O]	A	127 (MET)	CG [C]	3.67
L	34 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CG [C]	3.95
L	34 (TYR)	CZ [C]	A	127 (MET)	SD [S]	3.49
L	34 (TYR)	OH [O]	A	127 (MET)	SD [S]	3.16
L	34 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	SD [S]	3.05
L	34 (TYR)	CZ [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.72
L	34 (TYR)	OH [O]	A	127 (MET)	CE [C]	3.75
L	93 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.22
L	30 (TYR)	CG [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.79
L	30 (TYR)	CD2 [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.35
L	30 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.33
L	34 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.33
L	30 (TYR)	CZ [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.75
L	30 (TYR)	OH [O]	A	128 (PRO)	CD [C]	3.86
			A	128 (PRO)	CG [C]	3.43
L	30 (TYR)	CZ [C]	A	128 (PRO)	CG [C]	3.98
L	93 (TYR)	OH [O]	A	128 (PRO)	O [O]	3.45
L	96 (GLY)	N [N]	A	128 (PRO)	O [O]	3.41
L	96 (GLY)	CA [C]	A	129 (SER)	CA [C]	3.88
L	96 (GLY)	O [O]	A	129 (SER)	CA [C]	3.4
L	96 (GLY)	N [N]	A	129 (SER)	CA [C]	3.99
L	96 (GLY)	O [O]	A	129 (SER)	CB [C]	3.56
			A	129 (SER)	C [C]	3.52
L	96 (GLY)	CA [C]	A	130 (GLU)	N [N]	3.99

[0612]	L	96 (GLY)	C [C]	A	130 (GLU)	N [N]	3.6
	L	96 (GLY)	O [O]	A	130 (GLU)	N [N]	2.73
	L	96 (GLY)	N [N]	A	130 (GLU)	N [N]	3.78
	L	96 (GLY)	O [O]	A	130 (GLU)	CA [C]	3.71
				A	130 (GLU)	CB [C]	3.81
	L	97 (ARG)	CD [C]	A	130 (GLU)	CB [C]	3.78
				A	130 (GLU)	CG [C]	3.93
				A	130 (GLU)	CD [C]	3.72
	L	97 (ARG)	CG [C]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	3.85
	L	94 (LYS)	CG [C]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	3.77
	L	97 (ARG)	CD [C]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	2.77
	L	97 (ARG)	NE [N]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	3.75
	L	94 (LYS)	CG [C]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.69
	L	94 (LYS)	O [O]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.63
	L	94 (LYS)	CD [C]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.77
	L	94 (LYS)	CE [C]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.26
	L	97 (ARG)	NE [N]	A	131 (GLU)	C [C]	3.94
	L	97 (ARG)	CD [C]	A	131 (GLU)	O [O]	3.75
	L	97 (ARG)	NE [N]	A	131 (GLU)	O [O]	2.94
	L	97 (ARG)	CZ [C]	A	131 (GLU)	O [O]	3.79
	L	97 (ARG)	NH2 [N]	A	131 (GLU)	O [O]	2.79

[0613] 总之,所述表位包含残基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130和E131。图6显示了与肽123-132相复合的6470Fab,以及图7和8分别显示了在肽123-132与6470Fab重链和轻链之间的接触。

[0614] 实施例4:抗体人源化和亲和力成熟

[0615] 通过将来自兔V-区的CDR移植到人种系抗体V-区构架上来使兔抗体6470人源化。为了恢复抗体的活性,还将许多来自兔V-区的构架残基保留在人源化序列中。这些残基通过使用由Adair等人(1991)(W091/09967)所概述的实验方案来进行选择。兔抗体(供者)V-区序列与人种系(受者)V-区序列的比对显示在图9和10中,与所设计的人源化序列一起。从供者移植至受者序列的CDR是如由Kabat所定义的(Kabat等人,1987),除了CDR-H1,其中使用了组合的Chothia/Kabat定义(参见Adair等人,W091/09967)。

[0616] 由DNA2.0 Inc.通过自动化合成方法来设计和构建编码许多变体重链和轻链V-区序列的基因。重链和轻链V-区的进一步变体通过下述方式来创建:通过寡核苷酸指导的诱变来修饰VH和VK基因,包括在一些情况下,在CDR内的突变。对于在哺乳动物细胞中的瞬时表达,将人源化轻链V-区基因克隆到UCB轻链表达载体pMhCK中,其包含编码人κ链恒定区(Km3同种异型)的DNA。将人源化重链V-区基因克隆到UCB人γ-4重链表达载体pMhγ4PFL中,其包含编码具有铰链稳定化突变S241P(Angal等人,Mol Immunol.1993,30(1):105-8)的人γ-4重链恒定区的DNA。还类似地制备了包含兔V-区(SEQ ID NO:11和13)和人恒定区的嵌合6470并且用作比较者抗体。将所得的重链和轻链载体共转染到Expi293TM悬浮细胞中,给出以人IgG4P的人源化重组抗体的表达。

[0617] 选择人V-区IGKV1-16加上JK4 J-区(IMGT,<http://www.imgt.org/>)作为对于抗体

6470轻链CDR的受者。在移植物gL3中的轻链构架残基都来自人种系基因,除了残基48和72(相关于SEQ ID NO:15而言),其中分别保留了供者残基谷氨酰胺(Q48)和谷氨酰胺(Q72)。残基Q48和Q72的保留对于该人源化抗体结合人 α 突触核蛋白原纤维的完全效力来说是必需的(图9和表6)。

[0618] 表6

抗体变体	轻链	重链	人原纤维亲和力 (KD)
	供者残基	供者残基	pM
嵌合 6470	-	-	99
6470gL3gH23	Q48, Q72	V24, Y47, I48, G49, V78, R97	148
6470gL3gH36	Q48, Q72	V24, Y47, I48, G49, S73, R97	166
6470gL6gH23	Q72	V24, Y47, I48, G49, V78, R97	547
6470gL6gH36	Q72	V24, Y47, I48, G49, S73, R97	377
6470gL8gH23	Q48	V24, Y47, I48, G49, V78, R97	246
6470gL8gH36	Q48	V24, Y47, I48, G49, S73, R97	198
6470gL3gH25	Q48, Q72	V24, I48, G49, K71, S73, V78, R97	76000
6470gL3gH26	Q48, Q72	V24, Y47, G49, K71, S73, V78, R97	300
6470gL3gH27	Q48, Q72	V24, Y47, I48, K71, S73, V78, R97	22300
6470gL3gH35	Q48, Q72	V24, Y47, I48, G49, K71, S73, V78	5282
6470gL3gH46	Q48, Q72	Y47, I48, G49, V78, R97	316
6470gL3gH50	Q48, Q72	Y47, I48, G49, S73, R97	580

[0619] [0620] 选择人V-区IGHV3-23加上JH4 J-区 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) 作为对于抗体6470的重链CDR的受者。与许多兔抗体共同地,抗体6470的VH基因比所选择的人受者短。当与人受者序列进行比对时,抗体6470的VH区的构架1缺少N-末端残基,其被保留在人源化抗体中了(图10)。6470兔VH区的构架3也缺少两个残基(75和76),其在 β 片层链D和E之间的环中:在人源化移植物中,该缺口用来自所选择的人受者序列的相应的残基(赖氨酸75,K75;天冬酰胺76,N76)来填补(图10)。在移植物gH23和gH36中的重链构架残基都来自人种系基因,除了来自包括残基24、47、48、49、73、78和97(相关于SEQ ID NO:23和31而言)的组的一个或多个残基,其中分别保留了供者残基缬氨酸(V24)、酪氨酸(Y47)、异亮氨酸(I48)、甘氨酸(G49)、丝氨酸(S73)、缬氨酸(V78)和精氨酸(R97)。残基V24、Y47、I48、G49和R97的保留对于该人源化抗体结合人 α 突触核蛋白原纤维的完全效力来说是必需的。

[0621] 另外,将人源化VH基因克隆到UCB人Fab-HIS表达载体pMhFab10HIS中,其包含编码具有C-末端标签(十个组氨酸残基)的人 γ -1CH1铰链结构域的DNA。组氨酸标签有助于通过亲和色谱法来纯化表达出的Fab。将所得的重链和轻链载体共转染到Expi293TM悬浮细胞中,给出以Fab-HIS形式的人源化重组抗体的表达。

[0622] 按照在W02014198951中所描述的IOTA方法来进行亲和力成熟。使通过X-射线晶体学测定的在复合物中的6470兔Fab与 α 突触核蛋白肽EAYEMPSEEG(123-132)之间的界面经历分析以鉴定能够潜在地改善6470兔Fab对于 α 突触核蛋白蛋白质的亲和力的突变。IOTA是用于测定在蛋白质界面或结合位点处的给定接触原子类型的概率的统计学潜在工具。

[0623] 为了评价这些突变对于抗体结合人 α 突触核蛋白单体或原纤维的效力的影响,首

先在6470兔Fab中研究了所述突变(表7A)。如在实施例3中所描述的,在Biacore T200仪器上通过使用表面等离子体共振技术来测定相互作用动力学。将在CDRL1中的残基33(相当于SEQ ID NO:11而言)从天冬酰胺(N)突变为精氨酸(R)或赖氨酸(K):残基33突变为精氨酸导致增加的对于 α 突触核蛋白的亲和力(表7A)。将在CDRH2中的残基55从丝氨酸(S)突变为天冬酰胺(N),和将在CDRH3中的残基99从天冬酰胺(N)突变为赖氨酸(K)或谷氨酰胺(Q)或组氨酸(H)或色氨酸(W)(相当于SEQ ID NO:13而言),残基55突变为天冬酰胺和残基99突变为组氨酸导致增加的对于 α 突触核蛋白的亲和力(表7A)。在CDRH3中的天冬酰胺的突变(N99H)也去除了潜在的脱酰胺位点。

[0624] 表7A

突变	链	单体			原纤维			
		ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	
6470 兔 Fab	-	7.23E+06	1.24E-01	17.2	4.58E+06	4.76E-02	10.3	
Y30W	L	2.99E+06	1.51E-01	50.4	4.75E+06	8.95E-02	18.8	
N33R	L	1.92E+07	7.99E-02	7.9	9.98E+06	2.89E-02	2.9	
N33K	L	2.84E+06	4.33E-02	15.2	6.93E+06	4.98E-02	7.1	
[0625]	H31R	H	2.65E+05	4.40E-01	1658.4	5.98E+06	3.73E-01	62.3
	H31K	H	6.17E+06	9.38E-01	151.9	9.06E+06	4.23E-01	46.7
	H31Q	H	8.00E+06	1.85E-01	23.1	7.83E+06	9.72E-02	12.4
	S53N	H	4.56E+04	5.17E-02	1132.6	5.75E+06	2.86E-01	49.6
	S55N	H	1.39E+07	1.91E-02	1.9	9.20E+06	1.30E-02	1.4
	N99R	H	1.22E+07	1.70E-01	16.9	1.89E+07	1.54E-01	15.3
	N99K	H	7.89E+06	1.89E-01	23.9	1.58E+07	2.07E-01	20.7
	N99Q	H	3.75E+05	4.93E-01	1314.1	1.03E+07	4.25E-01	42.4
	N99H	H	1.33E+07	7.45E-03	0.7	6.20E+06	4.01E-03	0.4
	N99W	H	9.22E+06	5.66E-01	61.3	5.27E+06	1.34E-01	25.3

[0626] 最后,还在先前产生的全长人源化抗体中测试了新鉴定的突变(表6),并且测试了其对于人原纤维的选择性(表7B)。如在实施例3中所描述的,在Biacore T200仪器上通过使用表面等离子体共振技术来测定相互作用动力学。如在表7B中所显示的,在轻链中的位置33处(相当于SEQ ID NO:19而言)和在重链中的位置56和102处(相当于SEQ ID NO:27和35而言)的突变导致增加的对于人原纤维的亲和力,这对于需要穿过血脑屏障以结合其靶标的抗体来说是有利的特征。当全身施用抗体时,大量的所施用的抗体可能会丢失,因为抗体具有有限的系统去穿过复杂的生理学屏障。

[0627] 表7B

人源化抗体	人单体			人原纤维		
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)
[0628]	VR6470 gL3; gH23	1.20E+06	0.02416	20.15	8.55E+05	1.42E-04
	VR6470 gL3; gH36	1.15E+06	0.01742	15.10	1.07E+06	3.17E-04
	VR6470 gL3; gH23-S56N-N102H	9.66E+05	0.00445	4.62	1.04E+06	7.08E-05
	VR6470 gL3; gH36-S56N-N102H	1.19E+06	0.00488	4.10	1.25E+06	7.44E-05
	VR6470 gL3-N33R; gH23-S56N-N102H	3.48E+06	0.00594	1.71	2.07E+06	1.16E-04
	VR6470 gL3-N33R; gH36-S56N-N102H	4.97E+06	0.00648	1.31	2.39E+06	1.26E-04

[0629] 表达变体人源化抗体链及其组合,并且就其相对于亲本抗体而言的效力、其生物物理学特性和对于下游加工的适合性进行评估。

[0630] 实施例5:人源化抗体的表征

[0631] 在六个人源化的6470IgG4P抗体上进行生物物理学表征(表8,表1中的序列)。

[0632] 表8

描述符
gL3gH23
gL3gH36
gL3-N33RgH23-S56N-N102H
gL3-N33RgH36-S56N-N102H
gL3gH23-S56N-N102H
gL3gH36-S56N-N102H

[0634] 基于热稳定性(T_m)、实验性pI、疏水性、可溶性(PEG沉淀测定法)和在空气/液体界面处的聚集稳定性来筛选所有抗体,以确定所述突变是否具有任何影响,特别是关于亲和力、稳定性和可开发性。

[0635] 筛选过程还包括评估化学稳定性(脱酰胺、天冬氨酸异构化倾向),因为所述抗体具有:

1. 在重链CDR3中的Asn(102)S基元(脱酰胺),仅对于gL3gH23和gL3gH36;
2. 在轻链CDR3中的Asn(98)Asp(99)基元(脱酰胺),对于所有抗体;
3. 在轻链CDR1中的Asn(32)Asn(33)基元(脱酰胺),对于所有,除了N33突变体;
4. 在轻链CDR3中的Asp(99)G基元(Asp异构化),对于所有抗体。

[0640] 在这些位点处的化学不稳定性可以导致产物异质性和免疫原性。

[0641] 热稳定性(T_m)测量

[0642] 通过使用Thermofluor测定法来测定解链温度(T_m)或在解折叠中点处的温度。在该方法中,将荧光染料SYPRO®橙用于通过与随温度增加而变得暴露的疏水区域相结合来监测蛋白质解折叠过程。

[0643] 反应混合物包含5 μ l的从5000X储备溶液用PBS稀释的30x **SYPRO®** 橙染料 (Invitrogen™) 和45 μ l的0.12mg/ml的样品 (在PBS pH 7.4中)。将大约10 μ l的混合物以一式四份分发到384PCR光学孔平板中,并且在7900HT快速实时PCR系统 (Applied Biosystems™) 上运行。将PCR系统加热装置设置在20°C至99°C,具有1.1°C/分钟的增加速率。电荷耦合器件监测在孔中的荧光变化。将强度增加进行绘图,并且使用斜率的拐点来计算T_m,如下面所描述的。

[0644] 对于所有抗体观察到两个解折叠过渡。第一个可以归因于CH₂结构域的T_m。根据文献 (Garber E, Demarest SJ. Biochem Biophys Res Commun. 2007年4月13日, 355 (3) :751-7), 第二个可以归因于Fab解折叠结构域和CH₃结构域的T_m的平均值。表9概括了结果。

[0645] 表9

描述符	Fab 结构域 T _m	SD	CH ₂ 结构域 T _m	SD
gL3gH23	73.1	0.6	64.8	0.2
gL3gH36	73.5	0.3	64.7	0.0
gL3gH23-S56N-N102H	72.8	0.2	64.8	0.3
gL3gH36-S56N-N102H	73.4	0.2	65.1	0.3
gL3-N33R-gH23-S56N-N102H	73.9	0.5	65.2	0.1
gL3-N33R-gH36-S56N-N102H	73.3	0.2	64.7	0.3

[0647] 对于IgG4分子,热稳定性在正常的所预期的范围之内 (Heads等人, "Relative stabilities of IgG1 and IgG4 Fab domains: influence of the light-heavy interchain disulfide bond architecture". Protein Sci. 2012年9月, 21 (9) :1315-22)。

[0648] 实验性pI

[0649] 通过使用全毛细管成像cIEF iCE3™系统 (ProteinSimple) 来获得6470抗体的实验性pI。

[0650] 通过混合下列组分来制备样品:30 μ L样品 (来自在HPLC级水中的1mg/ml储备液)、35 μ L的1%甲基纤维素溶液 (Protein Simple)、4 μ L pH 3-10两性电解质 (Pharmalyte)、0.5 μ L 4.65和0.5 μ L 9.77合成pI标准物 (ProteinSimple)、12.5 μ L的8M尿素溶液 (Sigma-Aldrich®)。使用HPLC级水来补足最终体积至100 μ L。在分析之前,将混合物短暂涡旋震荡以确保完全的混合并且以10,000rpm离心3分钟以去除气泡。将样品在1.5kV下聚焦1分钟,随后为在3kV下5分钟,并且通过使用ProteinSimple软件来获取毛细管的A280图像。将所得的电泳图首先通过使用iCE3软件来进行分析,并且分配pI值 (pI标准物之间的线性关系)。然后,通过使用**Empower®** 软件 (Waters) 对经校准的电泳图进行积分。

[0651] 对于所有6470抗体的实验性pI都在8.4-9.2的范围内。在分子之间在荷电种类的比例方面存在轻微的差异,但是这对于IgG4P分子来说不是出人意料的。所有pI都是高的,因此将会帮助抗体的制备过程。

[0652] 疏水相互作用色谱法 (HIC)

[0653] 疏水相互作用色谱法 (HIC) 以渐增的疏水性的顺序分开分子。分子在高浓度的极

性盐存在下与疏水固定相相结合,并且随着盐浓度降低而解吸附入流动相中。较长的保留时间等同于较大的疏水性。

[0654] 用1.6M硫酸铵和PBS (pH 7.4) 对2mg/mL的样品进行1:2稀释。将5 μ g (5 μ L) 的样品注射到与具有荧光检测器的Agilent 1200二元HPLC串联连接的Dionex ProPacTM HIC-10柱 (100mm x 4.6mm) 上。通过固有荧光(激发和发射波长分别为280nm和340nm) 来监测所述分开。

[0655] 使用缓冲液A (0.8M硫酸铵, 100mM磷酸盐, pH7.4) 和缓冲液B (100mM磷酸盐, pH7.4), 通过使用梯度洗脱如下来分析样品: (i) 在0% B下保持2分钟, (ii) 在30分钟中0至100% B的线性梯度 (0.8mL/分钟), (iii) 在下一次样品注射之前, 用100% B洗涤柱子2分钟并且在0% B中再平衡10分钟。将柱温保持在20°C。

[0656] 还以相同的运行顺序分析了展示出低和高疏水性的标准物加上对照, 以允许保留时间的标准化(表11)。通过使用下述等式, 针对低和高疏水性标准物使样品的保留时间(RT)标准化:

[0657] [(样品(RT) - 低标准物(RT) / 高标准物(RT) - 低标准物(RT)] x 100

[0658] 表10

抗体(主峰)	保留时间(分钟)	经标准化的保留时间(分钟)
gL3gH23	9	3.8
gL3gH36	8.8	3.1
gL3gH23-S56N-N102H	8.9	3.5
gL3gH36-S56N-N102H	8.8	3.1
gL3-N33RgH23-S56N-N102H	8.8	3.1
gL3-N33RgH36-S56N-N102H	8.8	3.1

[0659] [0660] 所有6470抗体和突变体都显示出相似的经标准化的保留时间和相似的低疏水性。商购可得的治疗性抗体倾向于展示出低疏水性(Jain等人, “Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape” Proc Natl Acad Sci U S A. 2017年1月31日, 114(5):944-949)。低疏水性在制备期间帮助稳定性(即, 减少聚集)。

[0661] 使用聚乙二醇(PEG)沉淀测定法的可溶性测量

[0662] 通过使用聚乙二醇(PEG)沉淀测定法来分析胶体稳定性。PEG用于以在数量上可确定的方式降低蛋白质可溶性, 这通过增加PEG浓度(w/v)和测量留在溶液中的蛋白质的量来进行。该测定法用于模拟高浓度可溶性的效应, 而不使用常规浓度方法。在PBS pH 7.4, 50mM乙酸钠/125mM氯化钠pH 5.0(乙酸盐pH 5), 和20mM L-组氨酸, 140mM NaCl, pH6.0中, 在7-18% PEG-3350存在下调查了6470抗体的由PEG诱导的沉淀。在需要的情况下通过使用透析来使样品进行缓冲液交换, 并且将浓度调节至2mg/mL。为了使非平衡沉淀最小化, 样品制备由以1:1体积比混合2×蛋白质和2×PEG溶液组成。在混合后, 将样品在37°C下温育30分钟以再溶解非平衡聚集体。在20°C下过夜温育后, 将样品离心60分钟(4000g)。将上清液的等分试样转移至半容积96-孔光学平板, 并且通过使用平板阅读器BMG Labtech

FLUOstar[®]Omega LVIS A280来测量在280nm处的吸光度。将浓度数据对PEG %进行作图,并且获得计算出的中点(LogEC50) (其通过非线性曲线拟合来产生,可变斜率)作为样品的相对胶体可溶性的量度。在该测定法中,较高的LogEC50等同于较大的胶体稳定性。

[0663] 结果(未显示)表明,对于所有6470抗体,随着缓冲液pH增加,胶体稳定性降低。另外,获得下述趋势,从最可溶至较不可溶:gL3gH23和gL3gH36>gL3gH23-S56N-N102H和gL3gH36-S56N-N102H>gL3-N33RgH23-S56N-N102H和gL3-N33RgH36-S56N-N102H。

[0664] 因此,为了亲和力成熟而引入的突变降低了抗体分子的胶体稳定性。在gL3gH23和gL3gH36移植植物之间未观察到差异。

[0665] 在空气-液体界面处的应力的效应(聚集测定法)

[0666] 当暴露于空气-液体界面时,蛋白质倾向于解折叠,其中疏水表面被呈现给疏水环境(空气)和亲水表面被呈现给亲水环境(水)。蛋白质溶液的搅动实现大的空气-液体界面,其可以驱动聚集。该测定法用于模拟在制备(例如,超滤)期间分子将会经历的应力,并且提供严格条件以便试图区别不同的抗体分子。

[0667] 通过使用Eppendorf Thermomixer ComfortTM进行涡旋振荡来给在PBS pH 7.4, 50mM乙酸钠/125mM氯化钠pH 5.0(乙酸盐pH 5), 和20mM L-组氨酸, 140mM NaCl, pH6.0中的样品施加应力。选择所述缓冲液作为共同的预配制缓冲液。在涡旋振荡之前,通过使用合适的消光系数(1.35Abs 280nm, 1mg/mL, 1cm光程长度)来将浓度调节至1mg/mL, 并且通过使用Varian Cary[®] 50-Bio分光光度计来获得在280nm、340nm和595nm处的吸光度以建立零时间读数。将每个样品亚等分入1.5mL圆锥形 **Eppendorf[®]**-型带盖管(4x 250 μ L)中,并且使其经历严格条件以便通过在25°C下以1400rpm涡旋振荡直至24小时来测试稳固性。通过在涡旋振荡后3小时和24小时使用Varian CaryTM 50-Bio分光光度计在595nm处测量样品来监测时间依赖性聚集(浊度)。对于每个样品,将平均吸光度值对时间进行作图。

[0668] 结果图解说明在图11中。在所述三种缓冲液的任何一个中在24小时之时的6470抗体之间不存在差异,但是,在涡旋振荡后3小时之后在聚集倾向方面辨别出小的差异,这看起来是缓冲液依赖性的。

[0669] 脱酰胺/Asp异构化应力研究

[0670] 使用6470抗体gL3gH23和gL3gH36来设立了应力研究以测定四个经鉴定的潜在序列不利因素的脱酰胺/Asp-异构化倾向:在重链CDR3中的Asn(102) S(脱酰胺基元);在轻链CDR3中的Asn(98) Asp(99) (脱酰胺基元);在轻链CDR1中的Asn(32) Asn(33) (脱酰胺基元);和在轻链CDR3中的Asp(99) G(Asp异构化基元)。无法预测脱酰胺和Asp-异构化的倾向/比率,因为它取决于一级序列和3D结构以及溶液特性(R C Stephenson和S Clarke (1989); K. Diepold等人, (2012); Jasmin F. Sydow等人, (2014); N.E. Robinson等人, (2004))。

[0671] 还获得了基础脱酰胺水平(未加应力的样品)一低水平表明低的易感性,但是水平可以由于不同的制备批次/条件而变化。

[0672] 将两种6470抗体进行缓冲液交换以交换到下述缓冲液中: (i) 已知有利于Asn(N)残基的脱酰胺的缓冲液(Tris pH 8/37°C); 和(ii) 已知有利于Asp异构化的缓冲液(乙酸盐, pH 5/37°C)。将在每种缓冲液中样品的最终浓度调节至~6.5mg/mL, 然后分为两个等分试样, 其中一个贮存于4°C和一个贮存于37°C直至4周。立即(T0)和在贮存于-20°C 2周和4

周时移出等分试样。

[0673] 将2-周样品解冻,并且如下通过用于化学修饰分析的胰蛋白酶消化/质谱法 (MS)来进行分析。用TCEP还原施加了应力的蛋白质的样品,并且用在包含0.1% w/v Rapigest去污剂的Tris-HCL缓冲液pH8.0中的氯乙酸进行烷基化。添加胰蛋白酶(1:25w/w)并且在室温下消化样品过夜。通过添加甲酸至1% v/v来终止蛋白质水解并且将样品稀释至0.5mg/ml,之后进行离心以去除沉淀出的RapigestTM。在与Thermo FusionTM质谱仪相互连接的Waters BEH C18柱上将所得的肽分开并进行分析,其中运行+ve-离子、数据依赖性orbitrap-具有碰撞诱导解离 (CID) 片段化的orbitrap方法。通过使用Thermo XcaliburTM和PepfinderTM软件来分析LC-MS数据。

[0674] 还进行了大小排阻HPLC和SDS PAGE以监测聚集/降解。

[0675] 肽作图/质谱法的结果显示,在所有三个CDR位点中的基础Asn脱酰胺水平都<1.5%,并且对于在重链CDR3中的Asn (102) S位点,在pH 8.0和37°C下2周后,脱酰胺最大地增加达~6%。

[0676] 在pH 5.0和37°C下2周后,在轻链CDR3中的Asp (99) 修饰(琥珀酰亚胺形成)为~25%。

[0677] 对于重组全长人 α 突触核蛋白单体和经纯化的重组人 α 突触核蛋白原纤维,评估了化学修饰(在重链CDR3上Asn (102) 处的脱酰胺和在轻链CDR3上Asp (99) 处的琥珀酰亚胺中间物的形成)对于亲和力/抗体亲抗原性的影响。在该研究中使用完全脱酰胺的产物(Asn (102) Asp)和施加了应力的材料(pH5/2周/37°C)。

[0678] 实施例6:免疫组织化学

[0679] 免疫组织化学由Asterand Bioscience (Royston, United Kingdoms) 来进行。首先使冷冻切片(10 μ m)经历抗原取回程序,其中使用Dako PT Link和EnVision FLEX Target Retrieval Solutions (pH 6),在97°C下20分钟,具有自动加热和冷却。所有随后的温育步骤都在室温下进行。将冷冻切片风干30分钟,在4%的在1X PBS中制备的低聚甲醛中固定10分钟,在Dako EnVisionTM FLEX洗涤缓冲液(Dako)中进行洗涤,和然后加载到Dako Autostainer Plus中。通过将切片与Dako过氧化物酶封闭液(Dako)一起温育5分钟来封闭内源过氧化物酶活性。然后,在与Dako CSA II蛋白质封闭液(Dako)一起温育10分钟之前,用1X PBS洗涤切片两次。通过空气喷射来去除蛋白质封闭溶液,并且将切片与在Dako抗体稀释剂(Dako)中稀释的6470兔IgG1(包含SEQ ID NO:47和48)(0.05 μ g/ml)一起温育30分钟。在温育后,用1X PBS洗涤切片两次,然后与抗兔Dako Flex聚合物-HRP底物(Dako)一起温育20分钟,洗涤两次,然后与二氨基联苯胺底物(Dako)一起温育10分钟。通过用蒸馏水漂洗载玻片来终止生色反应。在生色后,将切片从Dako Autostainer Plus中移出并且用苏木精进行手工复染,在递增的一系列乙醇中进行脱水,在三次二甲苯变化中变透明,并且在DPX封固剂(Sigma-Aldrich)下盖上盖玻片。通过使用Aperio ScanScope AT Turbo系统(Leica Biosystems)来获得经染色的切片的数字图像。在源自五位不同的pS129- α -突触核蛋白阳性供者和三位不同的pS129- α -突触核蛋白阴性供者的脑切片上测试了抗体6470(1个切片/供者)。抗体6470标记了在PD患者的颞皮质和黑质中的神经毡和卢伊体样特征(图12A-E)。在非PD脑组织中,抗体6470标记了在颞皮质中的神经毡,但在皮质或黑质中未观察到卢伊体样结构(图12F-H)。这些观察结果暗示,抗体6470与在来自PD和非PD患者的脑组织

的神经毡中的正常 α -突触核蛋白相结合,而它仅与在PD患者中的卢伊体之中存在的病理学 α -突触核蛋白相结合。

[0680] 实施例7:基于细胞的聚集测定法

[0681] 在Freestyle 293表达培养基(InvitrogenTM)中以 0.7×10^6 个细胞/ml制备HEK Freestyle 293F细胞(悬浮细胞)并且培养至 300×10^6 个细胞/ml。按照制造商的说明书进行转染;简而言之,在20ml OptiMEM中混合600 μ g的掺入了 α -突触核蛋白基因的pcDNA3.1 (+),而在OptiMEM培养基(InvitrogenTM)中稀释293Fectin并且在室温下温育5分钟。添加经稀释的DNA,并且在逐滴添加到细胞上(20ml/瓶)之前在室温下温育20分钟。将细胞在37℃、125rpm、8%CO₂下温育24小时。立即使用细胞,或者在FBS+10%DMSO中以 5×10^6 个细胞/ml的浓度冷冻细胞。

[0682] 如果先前已经冷冻了细胞,那么解冻冷冻瓶,并且将细胞重悬浮在Freestyle 293 培养基中,以500g离心5分钟,弃去上清液并将粒状沉淀以 2×10^6 个细胞/ml重悬浮在包含 Pen/Strep(InvitrogenTM)的Freestyle 293培养基(Life TechnologiesTM)中。在384-孔平板(GrainerTM)中,添加20 μ l的细胞悬浮液(至总共大约40,000个细胞/孔)。向每个孔添加150nM的人 α -突触核蛋白原纤维(如在本文中在实施例1中所描述的那样进行制备),随后为待检测的在PBS中的抗体(6470gL3gH23;6470gL3gH36;6470gL3N33gH23 S56N N102;6470gL3N33gH36 S56N N102;6470gL3gH23 S56N N102;6470gL3gH36 S56N N102;所有都以全长IgG4P,在表1中的序列)(以各种浓度)。将平板在细胞培养培养箱中在37℃、5%CO₂、95%湿度下温育2天。

[0683] 在第二天结束时,从所有孔中吸出培养基,并且洗涤平板,留下20 μ l/孔。向每个孔添加大约50 μ l的PBS,并且将平板以500g离心5分钟。用平板洗涤器从所有孔中吸出上清液,每个孔中留下20 μ l的培养基。添加Versene(LonzaTM)(50 μ l/孔),并且将平板以500g离心5分钟,吸出上清液,仅留下20 μ l的培养基/孔。给每个孔补充以20 μ l的8%甲醛(在水中的16%溶液,Life TechnologiesTM)+在PBS中的2%Triton X-100(VWRTM)。将平板在室温下温育15分钟,和此后添加50 μ l的由HBSS(无钙镁的VWRTM)+2%FBS+2mM EDTA(Life TechnologiesTM)组成的FACS缓冲液。将平板以2000g离心1分钟,并且吸出上清液,每个孔中仅留下20 μ l的培养基。给每个孔进一步补充以20 μ l的具有经1:300稀释的抗-pSer129 α -突触核蛋白抗体(AbCamTM)的FACS缓冲液。将平板在室温下温育1小时,然后在以2000g再次离心1分钟之前,给每个孔补充以50 μ l的FACS缓冲液。在给每个孔补充以经1:500稀释的缀合有Alexafluor647的抗兔二抗(Life TechnologiesTM)和DAPI(Life TechnologiesTM)之前,去除上清液。将平板在室温下在黑暗中温育一小时,然后添加50 μ l的FACS缓冲液并且将平板以2000g离心1分钟。在洗涤后,添加更多的FACS缓冲液,并且平板准备好被放置在流式细胞仪(BD FACS Canto II)中用于进行读数。

[0684] 使用FlowJo软件来分析FACS数据。首先,使用前向和侧向散射来对活的单个细胞设门。其次,对DAPI+事件设门,并且使用其数目作为活的具核的单个细胞的数目的量度。最后,对磷酸丝氨酸129- α -突触核蛋白阳性(pSer129+)细胞设门。将相对于所有DAPI+细胞而言的pSer129+细胞的百分比用作聚集的量度。将数据相对于用仅原纤维和没有抗体进行处理的孔而言进行标准化,并且表示为百分比。

[0685] 结果概括在图13中,其显示了所测试的抗体在表达 α 突触核蛋白的细胞上抑制由 α

突触核蛋白原纤维所诱导的聚集的能力。这些数据确认了,本发明的抗体能够阻断由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的聚集,具有低于5nM的IC₅₀。

[0686] 误差棒表示测量的标准误差 (SEM, N=3, n=9)。

[0687] 实施例8:原代神经元聚集测定法

[0688] 在解剖缓冲液(无钙和镁的HBSS, 0.6% D- (+) -葡萄糖, 20mM Hepes)中解剖来自E17小鼠胚胎的海马。然后,去除解剖缓冲液,并且用解离溶液(无钙和镁的HBSS, 0.6% D- (+) -葡萄糖, 20mM HEPES, 40U/ml木瓜蛋白酶, 1mg/ml DNA酶, 1mM L-半胱氨酸, 0.5mM EDTA)替代。在37°C下进行30分钟温育后,去除解离缓冲液并且用铺板培养基(NeurobasalTM培养基, 2% B27补充物, 1mM GlutaMAX, 2.5% FBS, 50单位/ml青霉素-链霉素)洗涤海马3次。用1ml吸移管研磨组织团块以获得单细胞悬浮液。将细胞在铺板培养基中稀释至合适的浓度。将大约15000个细胞铺板在经PDL包被的384-孔平板的每个孔中。然后,在细胞培养培养箱中,在37°C、5% CO₂、95% 湿度下保持细胞。

[0689] 次日,用没有FBS的铺板培养基[NeurobasalTM培养基, 2% B27补充物, 1mM GlutaMAX, 50单位/ml青霉素-链霉素]替代所述培养基的80%。在铺板后七天,去除培养基,每个孔中留下20 μ l。向每个孔添加100nM的人 α 突触核蛋白原纤维(如在本文中在实施例1中所描述的那样进行制备),随后为待测试的在PBS中的抗体6470(6470gL3gH36 hIgG4P;在图14中的VR6470,其包含SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:33) (以各种浓度)。将平板在细胞培养培养箱中在37°C、5% CO₂、95% 湿度下温育另外7天。在铺板后十四天,从所有孔中吸出培养基,留下20 μ l/孔。用80 μ l的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)洗涤每个孔。去除DPBS,在40 μ l的固定缓冲液(具有4% 低聚甲醛的DPBS)/孔中温育细胞15分钟。然后,去除固定缓冲液并且用80 μ l的DPBS再次洗涤细胞。去除DPBS,并且用40 μ l的渗透缓冲液(具有0.1% Triton X-100的DPBS)/孔替代。10分钟后,去除渗透缓冲液,并且在40 μ l的封闭缓冲液(具有1% BSA和0.1% Triton X-100的PBS)/孔中温育细胞1小时。然后,去除封闭缓冲液,并且用40 μ l/孔的一抗溶液(具有0.3% 兔抗磷酸丝氨酸129 α -突触核蛋白抗体(AbCamTM ab51253)的封闭缓冲液)替代。将抗体溶液在细胞上温育1小时,随后为三次洗涤(每次90 μ l, PBS)。在最后一次洗涤后,去除PBS并且用40 μ l的二抗溶液(在具有0.2% 缀合有AlexaFluor488的抗- β -III-微管蛋白抗体的PBS中的0.1% 缀合有AlexaFluor647的抗兔抗体)替代。将二抗溶液在细胞上温育1小时,然后去除并且用40 μ l的包含0.3% CellMask BlueTM的PBS替代。在5分钟的温育后,用80 μ l的PBS洗涤孔3次,然后用50 μ l的PBS/孔填充,之后用透明塑料薄膜密封平板。

[0690] 在Arrayscan平板成像仪(ThermoFisher ScientificTM)中使平板成像。使用来自相同制造商的HCS ScanTM软件来分析图像。使用 β -III-微管蛋白信号来监测神经元密度。排除稀疏的视野或者显示出受损害的神经元细胞层(其通过 β -III-微管蛋白信号的面积的显著降低而反映出来)的视野。最后,将pSer129 α 突触核蛋白信号的面积/视野用于定量病理学 α 突触核蛋白聚集。

[0691] 认为在 α 突触核蛋白的S129处的磷酸化在 α 突触核蛋白正常功能的控制以及其聚集、LB形成和神经毒性的调节中起着重要作用。在正常条件下,在脑中仅小部分的 α 突触核蛋白组成性地在S129处被磷酸化(Fujiwara H等人, (2002) Nat Cell Biol, 4, 160-164),而在罹患 α 突触核蛋白病的患者的脑中观察到pS129的引人注目的积累(Kahle PJ等人, (2000) Ann N Y Acad Sci, 920, 33-41); Okochi M, 等人, (2000) J Biol Chem, 275, 390-

397) ;Anderson JP,等人, (2006) *J Biol Chem*, 281, 29739-29752)。

[0692] 将数据相对于用仅原纤维和没有抗体进行处理的孔而言进行标准化,并且表示为百分比。如在图14中所显示的,6470gL3gH36(标示为VR6470)在表达内源水平的 α 突触核蛋白的小鼠原代神经元上抑制由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的 α 突触核蛋白聚集。误差棒表平均值的标准误差(SEM, N=4, n=18)。这些数据确认了,6470gL3gH36能够在小鼠原代神经元上阻断由 α 突触核蛋白原纤维所诱导的聚集,具有低于4nM的IC₅₀。

[0693] 实施例9:体内VR6470功效的评估

[0694] 在野生型雄性小鼠C57B1/6J (Janvier, France) 中以及在表达人 α 突触核蛋白的 α 突触核蛋白敲除小鼠的转基因模型(此后称为SNCA-OVX; Charles River, France) 中测试抗体6470gL3gH36 IgG4P(在本实施例中命名为VR6470,并且包含SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:33)。

[0695] 给C57B1/6J和SNCA-OVX小鼠注射6470gL3gH36 IgG4P和鼠类的预形成的原纤维(PFF) (如在本文中在实施例1中所描述的那样进行制备)。还注射了阴性对照抗体(101.4)和载料,与在最后九个C-末端残基处结合 α 突触核蛋白的比较者抗 α 突触核蛋白抗体(比较者C-term Ab)一起。这样的比较者抗体(其具有与根据本发明的抗体不同的CDR)显示出与本发明的抗体相当的结合特征。比较者抗体具有比本发明的抗体更高的对于 α 突触核蛋白的亲和力和相似的生物物理学特性。它在根据实施例8的基于HEK细胞的测定法上在阻止 α 突触核蛋白聚集方面也是同等有效的(表11)。

[0696] 表11

抗体	单体			原纤维			IC ₅₀ (nM)
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	
VR6470	1.15E+06	0.01742	15.10	1.07E+06	3.17E-04	0.298	小于 5
比较者 C-term Ab	4.76E+05	1.03E-02	21.64	1.08E+06	2.20E-05	0.02	小于 5

[0698] 在直接施用到动物的脑中之前,在室温下在摇床上将抗体与PFF一起预温育30分钟。以1 μ g PFF/10 μ g抗体的比例在PBS中制备抗体/PFF混合物。使用处于pH 7.4的PBS作为载料溶液。在组合式大脑内施用之前24小时,进行一次注射。

[0699] 然后,以30mg/kg的剂量向小鼠以腹膜内方式施用抗体。在第一次之后7天给予第二次腹膜内注射,然后以相同的用药制度(对于10ml/kg的施用体积,以30mg/kg的剂量,一次腹膜内注射/周)继续,对于野生型雄性小鼠C57B1/6J进行4周总共4次注射,和对于SNCA-OVX小鼠进行11周总共12次注射。对于这两个实验,将小鼠随机分配至药物治疗组,并且实验者对于治疗是不知情的。

[0700] 根据欧洲指令2010/63/EU和比利时法规的指导准则来进行动物实验。UCB Biopharma SPRL的动物实验伦理委员会(LA1220040和LA2220363)批准了实验方案(ASYN-IC-PARKINSON-MO)。在外科手术之时,小鼠重量在25和30g之间并且为17周龄。将小鼠安置在笼中(4只小鼠/笼,Macrolon 2型)。将它们保持在12:12光/暗循环,其中在06:00照亮。温度保持在20-21°C,并且湿度为大约40%。在分配至实验组之前,所有动物可自由获取标准的粒状食物和水。在外科手术之前和之后,提供额外的营养强化和福利(Enviro-dri, PharmaServ)。由动物护理人员每日监测动物健康。尽一切努力来使受苦最小化。在麻醉下

进行处死。

[0701] 通过使用以腹膜内方式注射的50mg/kg氯胺酮(Nimatek, Eurovet Animal Health B.V.)和0.5mg/kg美托咪定(Domitor, Orion Corporation)的混合物,在全身麻醉下施行外科手术。另外,给予2.5mg/kg阿替美唑(Antisedan, Orion Corporation)以支持唤醒。将重组的经纯化的PFF解冻,并且在室温下进行超声处理(Qsonica 500-20kHz; 65% 功率, 30个脉冲, 1秒开, 1秒关, 1分钟)。然后,将PFF与抗体预混合30分钟,并且在脑注射之前在室温下摇动30分钟。以0.2 μ l/分钟的速率输注所述溶液(2 μ l),并且将针头留在原位另外2.5分钟,之后将其缓慢撤回。以下面的坐标在右纹状体中单侧地进行注射: AP=+0.20mm, ML=-2.00mm, DV=-3.20mm。

[0702] 在麻醉后,通过经由左心室以6ml/分钟的流速用包含10U/ml肝素的冰冷的0.9% PBS进行经心脏输注9分钟来对小鼠进行输注。切开右心房作为流出路径。随后,以6ml/分钟的流速用冰冷的在PBS中的4%低聚甲醛对动物输注15分钟。将脑在4°C下在包含4%低聚甲醛的PBS中后固定过夜(第0天)。次日上午(第+1天),弃去4%低聚甲醛,并且将脑在冷的PBS中进行洗涤并温育过夜。次日(第+2天),将脑在PBS中洗涤最少1小时,并且转移至包含15%蔗糖的PBS中并贮存于4°C直至运输。

[0703] 在Neuroscience Associates (TN, USA) 进行脑切片操作。首先,将脑用20%甘油和2%二甲亚砜处理过夜以防止冷冻伤,并且通过使用**MultiBrain®**技术来包埋到明胶基质中。在固化后,将块状物通过浸没在具有碎干冰的冷却至-70°C的异戊烷中来快速冷冻,并且安放在A0860滑动切片机的冷冻台上。以40 μ m在冠状平面中对**MultiBrain®**块状物进行切片。将所有切片顺次收集到24个容器/块状物中,所述容器填充有抗原保存溶液(49% PBS pH 7.0, 50% 乙二醇, 1% 聚乙烯吡咯烷酮)。将未染色的切片立即贮存于-20°C。

[0704] 用以1:30,000进行稀释的pSer129 α 突触核蛋白抗体(小鼠抗 α 突触核蛋白(pSer129)生物素-(Wako-010-26481))通过免疫组织化学对自由浮动切片进行染色。所有温育溶液从阻断性血清开始向前都使用具有Triton X-100的Tris缓冲盐水(TBS)作为载料;所有漂洗都用TBS。通过0.9%过氧化氢处理来封闭内源过氧化物酶活性,和用1.26%正常全血清来封闭非特异性结合。在漂洗后,在室温下用一抗将切片染色过夜。载料溶液包含0.3% Triton X-100用于渗透。在漂洗后,将切片与抗生物素蛋白-生物素-HRP复合物(Vectastain Elite ABC试剂盒, Vector Laboratories, Burlingame, CA)一起在室温下温育一小时。在漂洗后,将切片用二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)和0.0015%过氧化氢进行处理以产生可见的反应产物,安放在涂有明胶的(上有胶层的)载玻片上,风干,用硫堇轻微染色,在醇中进行脱水,在二甲苯中变透明,并且用Permount盖上盖玻片。

[0705] 在浮动脑切片上进行关于p62/SQSTM1(已知p62在人中在卢伊体中共聚集)的荧光免疫组织化学和Amytracker(通常,用于蛋白质聚集体)染色。VR6470显示出降低用Amytracker染色的聚集蛋白质的数目并且与pS129共定位。这表明,VR6470抗体不仅减少磷酸突触核蛋白,而且减少突触核蛋白聚集体(数据未显示)。

[0706] 将每个视野pSer129 α 突触核蛋白信号的pSer129 α 突触核蛋白信号的定量用于定量在纹状体、皮质、基底外侧杏仁核和黑质的同侧中的病理学 α 突触核蛋白聚集。手工描绘出目的区域(ROI),并且用VisioPharm 6软件(VisioPharm)进行在不同脑区域中的pSer129 α 突触核蛋白信号的自动定量。为了定量pSer129 α 突触核蛋白信号,使用线性贝叶斯算法,

其提供信号面积的值(以 μm^2 的标记物面积)。标记物面积反映了覆盖不同脑区域的pSer129 α 突触核蛋白病理学状况的量。所有定量都以不知情的方式进行直至统计学分析结束。

[0707] 在%标记物面积(即,在以 μm^2 的pSer129信号面积与以 μm^2 的目的区域面积之间的比例)上进行数据分析。对于多个以首尾方式定位的脑切片(纹状体:13-14个切片,从前囟点+1.1至-0.94;皮质:13-14个切片,从+1.1至-0.94;基底外侧杏仁核:6-10个切片,在-0.58至-2.06之间;黑质:6-8个切片,从-2.54至-3.88)来重复评估%标记物面积,并且对于每一位所测试的受试者分开地计算AUC。

[0708] 对于统计学分析,考虑单因素ANOVA。在ANOVA随后为平均值之中的多重成对比较,没有任何多重性调整(具有**,对于 $p<0.01$;和*,对于 $p<0.05$)。将数据进行对数转换,以满足正态性和同方差性标准。所述图显示了未转换的数据的几何平均值。

[0709] 如在图15A和图15B中所显示的,在向雄性C57B1/6J野生型小鼠施用鼠类PFF后一个月(图15A)和在向雄性SNCA-OVX小鼠施用人PFF后三个月(图15B),在四个不同的同侧脑区域(包括纹状体、大脑皮质、杏仁核和黑质)中,相比于三个对照组而言,6470抗体(相当于6470gL3gH36 IgG4P)显著地减少 α 突触核蛋白病理学状况(即,pSer129 α 突触核蛋白信号)。

[0710] 图16显示了分别在C57B1/6J野生型小鼠的同侧皮质、纹状体、杏仁核和黑质中的在Ser129处磷酸化的 α 突触核蛋白的定量(%标记物面积的AUC)。相比于载料处理组而言,阴性对照抗体和比较者C-末端抗体不减少 α 突触核蛋白病理学状况。相反地,相比于用鼠类PFF进行注射的C57B1/6J小鼠的三个对照组而言,6470抗体显著地减少在皮质、纹状体、杏仁核和黑质中的病理学状况(即,pSer129 α 突触核蛋白信号)的水平($p<0.01$)。当在C57B1/6J野生型小鼠中进行测试时,用6470进行处理的组在四种不同结构(在那些之中,三个离注射位点的远端区域(皮质、黑质和杏仁核))中显示出显著降低的pSer129 α 突触核蛋白的水平。

[0711] 在用人PFF进行注射的SNCA OVX小鼠中,相比于接收了载料、阴性对照抗体(101.4)和比较者C-末端抗体的小鼠而言,6470抗体显著地减少了在皮质和纹状体中的病理学状况的水平。在SNCA-OVX小鼠中,6470在至少两个不同的脑结构(皮质和纹状体)中显示出显著降低的pSer129的水平,其中至少一个(大脑皮质)远离注射位点。

[0712] 这些结果确认了,包含本发明的结构特征的抗体,例如6470gL3gH36 IgG4P,能够在体内阻止在Ser129处磷酸化的 α 突触核蛋白的出现。

[0713] 此外,结果证明,不是所有的在C-末端区域中结合 α -syn的抗体在体内都是有效的。比较者抗体(其以高亲和力恰好结合 α 突触核蛋白的C-末端,并且其在基于细胞的测定法中在阻止 α 突触核蛋白聚集方面是有效的)未能在体内阻止Ser129磷酸化。

[0714] 因此,可以将本发明的抗体用于治疗 α 突触核蛋白病,例如当以Ser129磷酸化的增加为特征时,包括帕金森病(PD)(包括特发性和遗传性形式的帕金森病)、卢伊体痴呆(DLB)、弥漫性卢伊体病(DLBD)、阿尔茨海默病的卢伊体变型(LBVA)、复合性阿尔茨海默病和帕金森病、多系统萎缩(MSA)和1型脑铁蓄积性神经变性(NBIA-1)。

[0715] 实施例10:在小鼠中抗体6470的药物代谢动力学

[0716] 用抗体6470gL3gH36 IgG4P(包含SEQ ID NO:17和33;在图17中并且此后简称为6470)以2mg/kg的单剂量以静脉内方式对雄性C57/B16小鼠($n=3$ /药物)进行注射。

[0717] 从尾静脉中获取血液样品(从注射开始0.083、1、4、8、24、72、120、168和336小时)

并且允许其在室温下凝结。在离心后分离出血清,其然后进行冷冻直至分析。通过LC-MS/MS来进行6470的定量。将来自该研究的血清样品解冻,并且针对通过使用以不同浓度掺入到对照小鼠血清中的6470或比较者抗体而制备的校准线进行定量。在将样品注射到LC-MS/MS系统上之前,分别使用乙腈(VWR, UK)、TCEP-Tris(2-羧乙基)膦盐酸盐(Sigma, UK)和碘乙酰胺(Sigma, UK)来使血清变性、还原和烷基化。然后,将经烷基化的样品在100mM碳酸氢铵缓冲液(Sigma, UK)中进行重构,并且使用胰蛋白酶(Promega, UK)在37°C下进行过夜消化。通过向样品添加甲酸以降低pH来终止消化,和然后使用Waters HLB SPE板来进行脱盐。将所得的洗脱液通过使用真空蒸发器来进行蒸发。在使样品完全干燥后,将它们用包含0.1%甲酸的95/5的水/乙腈进行重构并且注射到LC-MS/MS系统上。通过与AB Sciex QTrap 6500三重四级质谱仪相联接的Schimadzu prominence HPLC系统来进行LC-MS/MS分析。通过自动取样器将经消化的样品注射到保持于50°C的反向高效液相色谱柱(Phenomenex Aeris C18肽柱100X2.1mm, 2.6μm)上。施加在0.1%甲酸中的5-70%乙腈的线性梯度6分钟,然后经过0.8分钟斜线上升至在0.1%甲酸中的95%乙腈,以0.6ml/分钟的流速。对质谱仪进行设置以运行多重反应监测分析,以便检测6470或5811的肽的多重转变,以50毫秒的采样时间/转变。通过使用Analyst 1.6软件版本来进行数据分析。

[0718] 这些数据证明,抗体6470在小鼠中具有非常好的药物代谢动力学特性(表12和图17A),基于所测量到的低的清除值。这些看起来优于对于给小鼠服用的人IgG药物所引用的典型范围(3-16ml/天/kg; Deng等人, 2011mabs 3:1 61-66)。

[0719] 还在食蟹猴中调查了抗体6470的药物代谢动力学特性,并且与现有技术抗体进行了比较。以2或3mg/kg的抗体6470gL3gH36 IgG4P(6470)和另一个比较者抗α突触核蛋白抗体(在氨基酸118-126之内结合α突触核蛋白的抗α突触核蛋白IgG1抗体; WO2013/063516)的单剂量,以静脉内方式对雄性食蟹猴(n=3或n=6/药物)进行注射。

[0720] 在多个时间点(从注射开始0.083、1、3、6、24、48、96、168、240、336、504、576、672小时)获取血液样品并且允许其在室温下凝结。在离心后分离出血清,其然后进行冷冻直至分析。将样品解冻,并且通过使用LC/ESI MS/MS来进行分析。对于6470,使用在该实施例中前面在本文中所描述的方法,其中通过建立在食蟹猴血清中的标准曲线来进行定量。对于比较者抗体,使用马肌红蛋白作为内部标准物,并且通过将信号与内部标准物信号进行比较来进行定量。对于制备,将样品与内部标准物相混合。然后,使样品变性、烷基化并因此经历过夜酶促消化(胰蛋白酶)。在消化后,稀释样品,并且使关于所有分析物的特征肽经历LC-MS/MS分析。仅制备样品一次并且注射两次(对于每一种方法一次)。

[0721] 通过使用非房室分析(non-compartmental analysis),使用Pharsight Phoenix 6来分析浓度-时间特性曲线,以对于每个个体动物得出清除和半寿期药物代谢动力学参数。对于每种分子记录平均值和标准偏差参数。

[0722] 如在图17B中和在表12中所显示的,抗体6470还在食蟹猴中展示出优异的药物代谢动力学特性,其中展示出低的清除。如在小鼠中那样,其药物代谢动力学行为看起来优于对于给食蟹猴服用的人IgG药物所引用的典型范围(5-12ml/天/kg; Deng等人, 2011mabs 3:161-66)。

[0723] 对于比较者抗体所观察到的在食蟹猴中的快速清除与所发表的人数据(JAMA Neurology 2018, 75, 10:1206-14)相一致。相比于展示出差的、非典型的药物代谢动力学特

征和参数的比较者抗体而言,抗体6470在暴露和清除这两个方面都优于比较者抗体。

[0724] 表12

抗体	清除 (SD) ml/天/kg	
	小鼠	食蟹猴
6470	3.1 (0.7)	4.7 (0.8)
比较者		23.4 (9.8)

[0725]

- [0001] 序列表
[0002] <110> UCB Biopharma Sprl
[0003] <120> 抗α突触核蛋白抗体
[0004] <130> PF0130-W0
[0005] <150> GB1720975.0
[0006] <151> 2017-12-15
[0007] <160> 49
[0008] <170> PatentIn version 3.5
[0009] <210> 1
[0010] <211> 13
[0011] <212> PRT
[0012] <213> 穴兔 (Oryctolagus cuniculus)
[0013] <400> 1
[0014] Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ala
[0015] 1 5 10
[0016] <210> 2
[0017] <211> 7
[0018] <212> PRT
[0019] <213> 穴兔
[0020] <400> 2
[0021] Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
[0022] 1 5
[0023] <210> 3
[0024] <211> 12
[0025] <212> PRT
[0026] <213> 穴兔
[0027] <400> 3
[0028] Ala Gly Tyr Lys Gly Gly Arg Asn Asp Gly Phe Ala
[0029] 1 5 10
[0030] <210> 4
[0031] <211> 10
[0032] <212> PRT
[0033] <213> 穴兔
[0034] <400> 4
[0035] Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp Met Tyr
[0036] 1 5 10
[0037] <210> 5
[0038] <211> 16
[0039] <212> PRT
[0040] <213> 穴兔
[0041] <400> 5

[0042]	Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly			
[0043]	1	5	10	15
[0044]	<210> 6			
[0045]	<211> 9			
[0046]	<212> PRT			
[0047]	<213> 穴兔			
[0048]	<400> 6			
[0049]	Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu			
[0050]	1	5		
[0051]	<210> 7			
[0052]	<211> 13			
[0053]	<212> PRT			
[0054]	<213> 人工序列			
[0055]	<220>			
[0056]	<223> CDR-L1 N33R			
[0057]	<400> 7			
[0058]	Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Arg Tyr Leu Ala			
[0059]	1	5	10	
[0060]	<210> 8			
[0061]	<211> 16			
[0062]	<212> PRT			
[0063]	<213> 人工序列			
[0064]	<220>			
[0065]	<223> CDR-H2 S56N			
[0066]	<400> 8			
[0067]	Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly			
[0068]	1	5	10	15
[0069]	<210> 9			
[0070]	<211> 9			
[0071]	<212> PRT			
[0072]	<213> 人工序列			
[0073]	<220>			
[0074]	<223> CDR-H3 N102H			
[0075]	<400> 9			
[0076]	Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu			
[0077]	1	5		
[0078]	<210> 10			
[0079]	<211> 140			
[0080]	<212> PRT			
[0081]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0082]	<400> 10			
[0083]	Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val			

[0084]	1	5	10	15
[0085]	Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys			
[0086]		20	25	30
[0087]	Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val			
[0088]		35	40	45
[0089]	Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr			
[0090]		50	55	60
[0091]	Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys			
[0092]		65	70	75
[0093]	Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys			
[0094]		85	90	95
[0095]	Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile			
[0096]		100	105	110
[0097]	Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro			
[0098]		115	120	125
[0099]	Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala			
[0100]		130	135	140
[0101]	<210> 11			
[0102]	<211> 112			
[0103]	<212> PRT			
[0104]	<213> 穴兔			
[0105]	<400> 11			
[0106]	Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Ala Val Gly			
[0107]		1	5	10
[0108]				15
[0109]	Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn			
[0110]		20	25	30
[0111]	Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Gln			
[0112]		35	40	45
[0113]	Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe			
[0114]		50	55	60
[0115]	Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val			
[0116]		65	70	75
[0117]	Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly			
[0118]		85	90	95
[0119]	Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys			
[0120]		100	105	110
[0121]	<210> 12			
[0122]	<211> 336			
[0123]	<212> DNA			
[0124]	<213> 穴兔			
[0125]	<400> 12			
	gccatcgta tgacccagac tccatcttcc aagtctgtcg ctgtggaga cacagtcacc	60		

- [0126] atcaattgcc aggccagtca gagtgtttat aagaacaact acttagcctg gtttcaacag 120
 [0127] aaaccaggc agcctccaa acaactgatc tatggtcgtt ccactctggc atctgggtc 180
 [0128] ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctaccat cagcgatgtg 240
 [0129] gtgtgtgacg atgctgccac ttactactgt gcaggatata aaggtggtcg taatgatgg 300
 [0130] ttgccttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaa 336
 [0131] <210> 13
 [0132] <211> 114
 [0133] <212> PRT
 [0134] <213> 穴兔
 [0135] <400> 13
 [0136] Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 [0137] 1 5 10 15
 [0138] Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp
 [0139] 20 25 30
 [0140] Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 [0141] 35 40 45
 [0142] Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 [0143] 50 55 60
 [0144] Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
 [0145] 65 70 75 80
 [0146] Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His
 [0147] 85 90 95
 [0148] Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 [0149] 100 105 110
 [0150] Ser Ser
 [0151] <210> 14
 [0152] <211> 342
 [0153] <212> DNA
 [0154] <213> 穴兔
 [0155] <400> 14
 [0156] cagtcgggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60
 [0157] tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc cacgacatgt attgggtccg ccaggctcca 120
 [0158] gggaaaggc tggaatacat tggagccatt tatgcttagt gtagcacata ctacgcgagc 180
 [0159] tggcgaaag gccgattcac catctccaag acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc 240
 [0160] agtctgacaa ccgaggacac ggcacccat ttctgtgcca gaattcatta tggtaatagt 300
 [0161] ggtgggttgtt gggccaaagg caccctggtc accgtctcga gt 342
 [0162] <210> 15
 [0163] <211> 112
 [0164] <212> PRT
 [0165] <213> 人工序列
 [0166] <220>
 [0167] <223> 6470 gL3 VL

- [0168] <400> 15
- [0169] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [0170] 1 5 10 15
- [0171] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn
- [0172] 20 25 30
- [0173] Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
- [0174] 35 40 45
- [0175] Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
- [0176] 50 55 60
- [0177] Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
- [0178] 65 70 75 80
- [0179] Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly
- [0180] 85 90 95
- [0181] Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
- [0182] 100 105 110
- [0183] <210> 16
- [0184] <211> 336
- [0185] <212> DNA
- [0186] <213> 人工序列
- [0187] <220>
- [0188] <223> 6470 gL3 VL 核酸
- [0189] <400> 16
- [0190] gacattcaga tgacccagtc cccttcatca ctgtccgcga gcgtggcga cagagtgacc 60
- [0191] attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaacaact acctggcctg gttccagcaa 120
- [0192] aagcccgga aggcgcacaaa acagcttac tacggtgcac ccactctgc ctcggagtg 180
- [0193] ccgagccgct tctcggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg 240
- [0194] caacccgagg attcgcac acactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300
- [0195] ttcgcttttgcgtggaggcac caaggtcgaa atcaag 336
- [0196] <210> 17
- [0197] <211> 219
- [0198] <212> PRT
- [0199] <213> 人工序列
- [0200] <220>
- [0201] <223> 6470 gL3 轻链
- [0202] <400> 17
- [0203] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [0204] 1 5 10 15
- [0205] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn
- [0206] 20 25 30
- [0207] Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
- [0208] 35 40 45
- [0209] Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

[0210]	50	55	60														
[0211]	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
[0212]	65		70		75		80										
[0213]	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gly	Gly	
[0214]			85			90				95							
[0215]	Arg	Asn	Asp	Gly	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[0216]			100			105				110							
[0217]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
[0218]			115			120				125							
[0219]	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
[0220]			130			135				140							
[0221]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
[0222]	145		150			155				160							
[0223]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
[0224]			165			170				175							
[0225]	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
[0226]			180			185				190							
[0227]	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
[0228]			195			200				205							
[0229]	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
[0230]			210			215											
[0231]	<210>	18															
[0232]	<211>	657															
[0233]	<212>	DNA															
[0234]	<213>	人工序列															
[0235]	<220>																
[0236]	<223>	6470 gL3 轻链核酸															
[0237]	<400>	18															
[0238]	gacattcaga	tgacccagtc	ccttcatca	ctgtccgcga	gcgtggcga	cagagtgacc	60										
[0239]	attacgtgcc	aagccagcca	gtccgtgtac	aagaacaact	acctggcctg	gttccagcaa	120										
[0240]	aagccccggga	aggcgccaaa	acagcttatac	tacggtgcat	ccactctcgc	ctcgggagtg	180										
[0241]	ccgagccgct	tctcgggatc	tgggtccgga	actcagttca	ccctgactat	ctcgccctg	240										
[0242]	caacccgagg	atttcgcccc	ctactactgc	gccggctata	agggaggacg	gaacgacggc	300										
[0243]	ttcgctttg	gtggaggcac	caaggtcgaa	atcaagcgta	cggtgccgc	tccctccgt	360										
[0244]	ttcatcttcc	caccctccga	cgagcagctg	aagtccggca	ccgcctccgt	cgtgtccctg	420										
[0245]	ctgaacaact	tctacccccc	cgaggccaag	gtgcagtgaa	aggtggacaa	cgcctgcag	480										
[0246]	tccggcaact	cccaggaatc	cgtcaccgag	caggactcca	aggacagcac	ctactccctg	540										
[0247]	tcctccaccc	tgaccctgtc	caaggccgac	tacgagaagc	acaaggtgt	cgcctgcgaa	600										
[0248]	gtgacccacc	agggcctgtc	cagccccgtg	accaagtcc	tcaaccgggg	cgagtgc	657										
[0249]	<210>	19															
[0250]	<211>	112															
[0251]	<212>	PRT															

- [0252] <213> 人工序列
- [0253] <220>
- [0254] <223> 6470 gL3 VL N33R
- [0255] <400> 19
- [0256] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [0257] 1 5 10 15
- [0258] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn
- [0259] 20 25 30
- [0260] Arg Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
- [0261] 35 40 45
- [0262] Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
- [0263] 50 55 60
- [0264] Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
- [0265] 65 70 75 80
- [0266] Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly
- [0267] 85 90 95
- [0268] Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
- [0269] 100 105 110
- [0270] <210> 20
- [0271] <211> 336
- [0272] <212> DNA
- [0273] <213> 人工序列
- [0274] <220>
- [0275] <223> 6470 gL3 VL N33R 核酸
- [0276] <400> 20
- [0277] gacattcaga tgacccagtc cccttcatca ctgtccgcga gcgtggcga cagagtgacc 60
- [0278] attacgtgcc aagccagcca gtcgtgtac aagaaccgtt acctggcctg gttccagcaa 120
- [0279] aagcccgaga aggcgcacaaa acagcttatac tacggtgcat ccactctcgc ctcggagtg 180
- [0280] ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg 240
- [0281] caacccgagg atttcgcac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300
- [0282] ttcgctttg gtggaggcac caaggtcgaa atcaag 336
- [0283] <210> 21
- [0284] <211> 219
- [0285] <212> PRT
- [0286] <213> 人工序列
- [0287] <220>
- [0288] <223> 6470 gL3 轻链 N33R
- [0289] <400> 21
- [0290] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [0291] 1 5 10 15
- [0292] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn
- [0293] 20 25 30

[0294] Arg Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
 [0295] 35 40 45
 [0296] Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 [0297] 50 55 60
 [0298] Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 [0299] 65 70 75 80
 [0300] Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly
 [0301] 85 90 95
 [0302] Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0303] 100 105 110
 [0304] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 [0305] 115 120 125
 [0306] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [0307] 130 135 140
 [0308] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 [0309] 145 150 155 160
 [0310] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 [0311] 165 170 175
 [0312] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 [0313] 180 185 190
 [0314] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 [0315] 195 200 205
 [0316] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0317] 210 215
 [0318] <210> 22
 [0319] <211> 657
 [0320] <212> DNA
 [0321] <213> 人工序列
 [0322] <220>
 [0323] <223> 6470 gL3 轻链 N33R 核酸
 [0324] <400> 22
 [0325] gacattcaga tgacccagtc cccttcatca ctgtccgcga gcgtggcga cagagtgacc 60
 [0326] attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaaccgtt acctggcctg gttccagcaa 120
 [0327] aagcccgaaaa aggcgcacaaa acagcttatac tacggtgcat ccactctcgc ctcggagatg 180
 [0328] ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg 240
 [0329] caacccgagg atttcgcccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300
 [0330] ttgcgttttgc gtggaggcac caaggtcgaa atcaagcgta cggtgccgc tccctccgt 360
 [0331] ttcatcttcc caccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt cgtgtgcctg 420
 [0332] ctgaacaact tctaccccccgc cgaggccaag gtgcagtggaa aggtggacaa cgcctgcag 480
 [0333] tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540
 [0334] tcctccaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600
 [0335] gtgacccacc accaagtctt tcaaccgggg cgagtgc 657

- [0336] <210> 23
[0337] <211> 117
[0338] <212> PRT
[0339] <213> 人工序列
[0340] <220>
[0341] <223> 6470 gH23 VH
[0342] <400> 23
[0343] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0344] 1 5 10 15
[0345] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
[0346] 20 25 30
[0347] Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[0348] 35 40 45
[0349] Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
[0350] 50 55 60
[0351] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
[0352] 65 70 75 80
[0353] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0354] 85 90 95
[0355] Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[0356] 100 105 110
[0357] Val Thr Val Ser Ser
[0358] 115
[0359] <210> 24
[0360] <211> 351
[0361] <212> DNA
[0362] <213> 人工序列
[0363] <220>
[0364] <223> 6479gH23 VH 核酸
[0365] <400> 24
[0366] gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggt cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
[0367] tcttgtcag taagcggcat cgacactgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
[0368] ccgggttaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgcg 180
[0369] agctggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
[0370] cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgctg tattcattat 300
[0371] ggtaatagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag c 351
[0372] <210> 25
[0373] <211> 444
[0374] <212> PRT
[0375] <213> 人工序列
[0376] <220>
[0377] <223> 6470 gH23 重链

[0378]	<400> 25		
[0379]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0380]	1	5	10 15
[0381]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His		
[0382]	20	25	30
[0383]	Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile		
[0384]	35	40	45
[0385]	Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys		
[0386]	50	55	60
[0387]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu		
[0388]	65	70	75 80
[0389]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0390]	85	90	95
[0391]	Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[0392]	100	105	110
[0393]	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
[0394]	115	120	125
[0395]	Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
[0396]	130	135	140
[0397]	Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
[0398]	145	150	155 160
[0399]	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
[0400]	165	170	175
[0401]	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
[0402]	180	185	190
[0403]	Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn		
[0404]	195	200	205
[0405]	Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
[0406]	210	215	220
[0407]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
[0408]	225	230	235 240
[0409]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[0410]	245	250	255
[0411]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
[0412]	260	265	270
[0413]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[0414]	275	280	285
[0415]	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[0416]	290	295	300
[0417]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
[0418]	305	310	315 320
[0419]	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		

[0420]	325	330	335
[0421]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
[0422]	340	345	350
[0423]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
[0424]	355	360	365
[0425]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
[0426]	370	375	380
[0427]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
[0428]	385	390	395
[0429]	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
[0430]	405	410	415
[0431]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
[0432]	420	425	430
[0433]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0434]	435	440	
[0435]	<210> 26		
[0436]	<211> 1332		
[0437]	<212> DNA		
[0438]	<213> 人工序列		
[0439]	<220>		
[0440]	<223> 6470gH23 重链核酸		
[0441]	<400> 26		
[0442]	gagggtcagc tgctggagtc tggaggcgaa cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60		
[0443]	tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120		
[0444]	ccgggtaaag gtctgaaata catcgccgcattttatgcta gtggtagcac atactacgcg 180		
[0445]	agctggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaaacac cgtgtacctg 240		
[0446]	cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcg tattcattat 300		
[0447]	ggtaatagtg gtgggttggc gggcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca 360		
[0448]	aaggccccct ccgtgttccc tctggccct tgctcccggt ccaccccgaa gtctaccgccc 420		
[0449]	gctctggcgt gcctggtaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaaactct 480		
[0450]	ggcccccgtga cctccggcgt gcacacccctc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540		
[0451]	tccctgtcct ccgtcgtgac cgtccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600		
[0452]	aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaaatc taagtacggc 660		
[0453]	cctccctgcc cccccctgccc tgccctgaa tttctggcgt gacccctcggt gttcctgttc 720		
[0454]	ccccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc tcccggaccc ccgaagtgtac ctgcgtgggt 780		
[0455]	gtggacgtgt cccaggaaga tcccgagggtc cagttcaatt ggtacgtggc cggcgtggaa 840		
[0456]	gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagtgtca actccaccta ccgggtgggt 900		
[0457]	tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg 960		
[0458]	tccaacaagg gcctgccctc cagcatgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020		
[0459]	cgcgagccccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080		
[0460]	tccctgaccc gtctggtaa gggcttctac ccctccgaca ttgcgtggc atgggagttcc 1140		
[0461]	aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200		

- [0462] ttcttcctgt actctcggt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtctc 1260
- [0463] tcctgctccg tgatgcacga gccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320
- [0464] agcctggca ag 1332
- [0465] <210> 27
- [0466] <211> 117
- [0467] <212> PRT
- [0468] <213> 人工序列
- [0469] <220>
- [0470] <223> 6470 gH23 VH S56N N102H
- [0471] <400> 27
- [0472] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0473] 1 5 10 15
- [0474] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
- [0475] 20 25 30
- [0476] Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
- [0477] 35 40 45
- [0478] Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
- [0479] 50 55 60
- [0480] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
- [0481] 65 70 75 80
- [0482] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
- [0483] 85 90 95
- [0484] Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
- [0485] 100 105 110
- [0486] Val Thr Val Ser Ser
- [0487] 115
- [0488] <210> 28
- [0489] <211> 351
- [0490] <212> DNA
- [0491] <213> 人工序列
- [0492] <220>
- [0493] <223> 6470 gH23 VH S56N N102H 核酸
- [0494] <400> 28
- [0495] gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
- [0496] tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
- [0497] ccgggtaaag gtctggaata catcgccgc atttatgcta gtggtaatac atactacgca 180
- [0498] agctggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
- [0499] cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggttact attgcgcgcg tattcattat 300
- [0500] ggtcacagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag c 351
- [0501] <210> 29
- [0502] <211> 444
- [0503] <212> PRT

[0504]	<213> 人工序列																
[0505]	<220>																
[0506]	<223> 6470 gH23 重链 S56N N102H																
[0507]	<400> 29																
[0508]	Glu	Val	Gln														
	Leu	Leu	Glu														
	Gly	Gly	Gly														
	Leu	Val	Gln														
[0509]	1	5	10	15													
[0510]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Ser	His	
[0511]	20		25		30												
[0512]	Asp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	
[0513]	35		40		45												
[0514]	Gly	Ala	Ile	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	
[0515]	50		55		60												
[0516]	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	
[0517]	65		70		75		80										
[0518]	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
[0519]	85		90		95												
[0520]	Arg	Ile	His	Tyr	Gly	His	Ser	Gly	Gly	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
[0521]	100		105		110												
[0522]	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
[0523]	115		120		125												
[0524]	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
[0525]	130		135		140												
[0526]	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
[0527]	145		150		155		160										
[0528]	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
[0529]	165		170		175												
[0530]	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
[0531]	180		185		190												
[0532]	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
[0533]	195		200		205												
[0534]	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	
[0535]	210		215		220												
[0536]	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
[0537]	225		230		235		240										
[0538]	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
[0539]	245		250		255												
[0540]	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	
[0541]	260		265		270												
[0542]	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
[0543]	275		280		285												
[0544]	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
[0545]	290		295		300												

[0546] Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 [0547] 305 310 315 320
 [0548] Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 [0549] 325 330 335
 [0550] Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 [0551] 340 345 350
 [0552] Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 [0553] 355 360 365
 [0554] Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 [0555] 370 375 380
 [0556] Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 [0557] 385 390 395 400
 [0558] Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 [0559] 405 410 415
 [0560] Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 [0561] 420 425 430
 [0562] Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 [0563] 435 440
 [0564] <210> 30
 [0565] <211> 1332
 [0566] <212> DNA
 [0567] <213> 人工序列
 [0568] <220>
 [0569] <223> 6470 gH23 重链 S56N N102H 核酸
 [0570] <400> 30
 [0571] gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
 [0572] tcttgcgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgcaca tgtattgggt acgtcaggca 120
 [0573] ccgggtaaag gtctggaaata catggcgcc atttatgcta gtggtaatac atactacgcg 180
 [0574] agctggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
 [0575] cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggttact attgcgcgcg tattcattat 300
 [0576] ggtcacagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca 360
 [0577] aaggccccct ccgtgttccc tctggccct tgctcccggt ccaccccgta gtctaccgccc 420
 [0578] gctctggct gcctggtaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaaactct 480
 [0579] ggcgcctgta cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcaagtctc cggcctgtac 540
 [0580] tccctgtcct ccgtcgtgac cgtccctcc tccagcctgg gcacccaagac ctacaccgt 600
 [0581] aacgtggacc acaaggccctc caacaccaag gtggacaagc gggtgaaatc taagtacggc 660
 [0582] ccccccgtcc cccccgtccc tgccccgtaa tttctggcg gacccctggt gttcctgttc 720
 [0583] cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc tcccgacccc ccgaagtgc acgtcggtg 780
 [0584] gtggacgtgt cccaggaaga tcccgaggc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
 [0585] gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca actccaccta ccgggtgggt 900
 [0586] tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggt 960
 [0587] tccaacaagg gcctgcctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020

- [0588] cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
[0589] tccctgacct gtctggtcaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgga atgggagatcc 1140
[0590] aacggccage ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
[0591] ttcttcctgt actctcggt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
[0592] tcctgctccg tgatgcacga gcccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320
[0593] agcctggca ag 1332
[0594] <210> 31
[0595] <211> 117
[0596] <212> PRT
[0597] <213> 人工序列
[0598] <220>
[0599] <223> 6470 gH36 VH
[0600] <400> 31
[0601] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0602] 1 5 10 15
[0603] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
[0604] 20 25 30
[0605] Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[0606] 35 40 45
[0607] Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
[0608] 50 55 60
[0609] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
[0610] 65 70 75 80
[0611] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0612] 85 90 95
[0613] Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[0614] 100 105 110
[0615] Val Thr Val Ser Ser
[0616] 115
[0617] <210> 32
[0618] <211> 351
[0619] <212> DNA
[0620] <213> 人工序列
[0621] <220>
[0622] <223> 6470 gH36 VH 核酸
[0623] <400> 32
[0624] gagttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
[0625] tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
[0626] ccgggtaaag gtctggaata catcgccgcatttatgcta gtggtagcac atactacg 180
[0627] agctggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgactcca gaaaaaacac cctgtacactg 240
[0628] cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcg 300
[0629] ggtaatatgt gtgggttgggt acgtcgttta cctgtccgag c 351

[0630]	<210> 33			
[0631]	<211> 444			
[0632]	<212> PRT			
[0633]	<213> 人工序列			
[0634]	<220>			
[0635]	<223> 6470 gH36 重链			
[0636]	<400> 33			
[0637]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0638]	1	5	10	15
[0639]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His			
[0640]	20	25	30	
[0641]	Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile			
[0642]	35	40	45	
[0643]	Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys			
[0644]	50	55	60	
[0645]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
[0646]	65	70	75	80
[0647]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[0648]	85	90	95	
[0649]	Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
[0650]	100	105	110	
[0651]	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
[0652]	115	120	125	
[0653]	Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
[0654]	130	135	140	
[0655]	Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
[0656]	145	150	155	160
[0657]	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
[0658]	165	170	175	
[0659]	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
[0660]	180	185	190	
[0661]	Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn			
[0662]	195	200	205	
[0663]	Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro			
[0664]	210	215	220	
[0665]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
[0666]	225	230	235	240
[0667]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
[0668]	245	250	255	
[0669]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe			
[0670]	260	265	270	
[0671]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			

[0672]	275	280	285
[0673]	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[0674]	290	295	300
[0675]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
[0676]	305	310	315
[0677]	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
[0678]	325	330	335
[0679]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
[0680]	340	345	350
[0681]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
[0682]	355	360	365
[0683]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
[0684]	370	375	380
[0685]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
[0686]	385	390	395
[0687]	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
[0688]	405	410	415
[0689]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
[0690]	420	425	430
[0691]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0692]	435	440	
[0693]	<210> 34		
[0694]	<211> 1332		
[0695]	<212> DNA		
[0696]	<213> 人工序列		
[0697]	<220>		
[0698]	<223> 6470 gH36 重链核酸		
[0699]	<400> 34		
[0700]	gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60		
[0701]	tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120		
[0702]	ccgggtaaag gtctggaata catcgccgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgca 180		
[0703]	agctggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240		
[0704]	cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300		
[0705]	ggtaatagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca 360		
[0706]	aaggggccct ccgtgttccc tctggccct tgcctcccggt ccaccccgta gtctaccggc 420		
[0707]	gctctggct gcctggtaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaaactct 480		
[0708]	ggcgccctga cctccggcgt gcacacccctc cctgcccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540		
[0709]	tccctgtcct ccgtcgtgac cgtccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600		
[0710]	aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtgaaatc taagtacggc 660		
[0711]	cctccctgcc cccccctgccc tgccctgaa tttctggcg gaccttcgt gttcctgttc 720		
[0712]	cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc tcccgacacc ccgaagtgac ctgcgtggc 780		
[0713]	gtggacgtgt cccaggaaga tcccgaggc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840		

[0714] gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca actccaccta ccgggtgggt 900
 [0715] tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg 960
 [0716] tccaacaagg gcctgccctc cagcatgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020
 [0717] cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 [0718] tcctgacccgt gtctggtcaa gggttctac ccctccgaca ttgcgtgga atgggagtcc 1140
 [0719] aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccgt tgctggacag cgacggctcc 1200
 [0720] ttcttcctgt actctcggt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 [0721] tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320
 [0722] agcctggca ag 1332
 [0723] <210> 35
 [0724] <211> 117
 [0725] <212> PRT
 [0726] <213> 人工序列
 [0727] <220>
 [0728] <223> 6470 gH36 VH S56N N102H
 [0729] <400> 35
 [0730] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0731] 1 5 10 15
 [0732] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 [0733] 20 25 30
 [0734] Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 [0735] 35 40 45
 [0736] Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 [0737] 50 55 60
 [0738] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 [0739] 65 70 75 80
 [0740] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0741] 85 90 95
 [0742] Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 [0743] 100 105 110
 [0744] Val Thr Val Ser Ser
 [0745] 115
 [0746] <210> 36
 [0747] <211> 351
 [0748] <212> DNA
 [0749] <213> 人工序列
 [0750] <220>
 [0751] <223> 6470 gH36 VH S56N N102H 核酸
 [0752] <400> 36
 [0753] gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
 [0754] tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
 [0755] ccgggtaaag gtctggataa catcgccgcattttatgcta gtggtaatac atactacgca 180

[0756] agctggcgaaaggccgtt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240
 [0757] cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggttact attgcgcgcg tattcattat 300
 [0758] ggtcacagtgtgggttgggt actctggta ccgtctcgag c 351
 [0759] <210> 37
 [0760] <211> 444
 [0761] <212> PRT
 [0762] <213> 人工序列
 [0763] <220>
 [0764] <223> 6470 gH36 重链 S56N N102H
 [0765] <400> 37
 [0766] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0767] 1 5 10 15
 [0768] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 [0769] 20 25 30
 [0770] Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 [0771] 35 40 45
 [0772] Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 [0773] 50 55 60
 [0774] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 [0775] 65 70 75 80
 [0776] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0777] 85 90 95
 [0778] Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 [0779] 100 105 110
 [0780] Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 [0781] 115 120 125
 [0782] Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 [0783] 130 135 140
 [0784] Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 [0785] 145 150 155 160
 [0786] Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 [0787] 165 170 175
 [0788] Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 [0789] 180 185 190
 [0790] Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 [0791] 195 200 205
 [0792] Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 [0793] 210 215 220
 [0794] Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 [0795] 225 230 235 240
 [0796] Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 [0797] 245 250 255

[0798] Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 [0799] 260 265 270
 [0800] Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 [0801] 275 280 285
 [0802] Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 [0803] 290 295 300
 [0804] Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 [0805] 305 310 315 320
 [0806] Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 [0807] 325 330 335
 [0808] Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 [0809] 340 345 350
 [0810] Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 [0811] 355 360 365
 [0812] Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 [0813] 370 375 380
 [0814] Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 [0815] 385 390 395 400
 [0816] Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 [0817] 405 410 415
 [0818] Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 [0819] 420 425 430
 [0820] Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 [0821] 435 440
 [0822] <210> 38
 [0823] <211> 1332
 [0824] <212> DNA
 [0825] <213> 人工序列
 [0826] <220>
 [0827] <223> 6470 gH36 重链 S56N N102H 核酸
 [0828] <400> 38
 [0829] gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
 [0830] tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
 [0831] ccgggtaaag gtctggaata catcgccgccc atttatgcta gtggtaatac atactacgctg 180
 [0832] agctggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240
 [0833] cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgctg tattcattat 300
 [0834] ggtcacagtg gtgggttggc gggtcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca 360
 [0835] aaggccccct ccgtgttccc tctggccct tgctcccggt ccacctccga gtctaccgcc 420
 [0836] gctctggcgt gcctggtaa ggactacttc cccgagcccc tgacagtgtc ctggaaactct 480
 [0837] ggcgcctga cctccggcgt gcacacccctc cctgcgtgc tgcaagtgcctc cggcctgtac 540
 [0838] tccctgtcct ccgtcggtac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
 [0839] aacgtggacc acaaggccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaaatc taagtacggc 660

- [0840] cctccctgcc cccccctgcc tgcccctgaa tttctggcg gaccttcgt gttcctgttc 720
 [0841] ccccccaaagg ccaaggacac cctgatgatc tcccggaccc cagaatgtac ctgcgtggtg 780
 [0842] gtggacgtgt cccaggaaga tcccggagtc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
 [0843] gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca actccaccta ccgggtggtg 900
 [0844] tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg 960
 [0845] tccaacaagg gcctgcctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020
 [0846] cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccagggtg 1080
 [0847] tccctgacct gtctggtcaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140
 [0848] aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
 [0849] ttcttcctgt actctcggt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 [0850] tcctgctccg tcatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320
 [0851] agectggca ag 1332
 [0852] <210> 39
 [0853] <211> 107
 [0854] <212> PRT
 [0855] <213> 人工序列
 [0856] <220>
 [0857] <223> 人IGKV1-16 JK4受者构架
 [0858] <400> 39
 [0859] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0860] 1 5 10 15
 [0861] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 [0862] 20 25 30
 [0863] Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 [0864] 35 40 45
 [0865] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0866] 50 55 60
 [0867] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0868] 65 70 75 80
 [0869] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 [0870] 85 90 95
 [0871] Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0872] 100 105
 [0873] <210> 40
 [0874] <211> 321
 [0875] <212> DNA
 [0876] <213> 人工序列
 [0877] <220>
 [0878] <223> 人IGKV1-16 JK4受者构架核酸
 [0879] <400> 40
 [0880] gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 [0881] atcacttgc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctggttca gcagaaaccca 120

- [0882] gggaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
- [0883] agttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
- [0884] gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctctcac ttcggcggg 300
- [0885] gggaccaagg tggagatcaa a 321
- [0886] <210> 41
- [0887] <211> 113
- [0888] <212> PRT
- [0889] <213> 人工序列
- [0890] <220>
- [0891] <223> 人IGHV3-23 JH4受者构架
- [0892] <400> 41
- [0893] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0894] 1 5 10 15
- [0895] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
- [0896] 20 25 30
- [0897] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [0898] 35 40 45
- [0899] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
- [0900] 50 55 60
- [0901] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
- [0902] 65 70 75 80
- [0903] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0904] 85 90 95
- [0905] Ala Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
- [0906] 100 105 110
- [0907] Ser
- [0908] <210> 42
- [0909] <211> 339
- [0910] <212> DNA
- [0911] <213> 人工序列
- [0912] <220>
- [0913] <223> 人IGHV3-23 JH4受者构架核酸
- [0914] <400> 42
- [0915] gaggtgcagc tggggggggc ttgggtacagc ctggggggc cctgagactc 60
- [0916] tcctgtcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccggccaggct 120
- [0917] ccagggaagg ggctggatg ggtctcagct attagtgta gtgggtggtag cacatactac 180
- [0918] gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
- [0919] ctgcaaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatacttt 300
- [0920] gactactggg gccaaaggaaac cctggtcacc gtctcctca 339
- [0921] <210> 43
- [0922] <211> 306
- [0923] <212> PRT

[0924]	<213> 人工序列															
[0925]	<220>															
[0926]	<223> 兔Fc - 人68-140 a-syn															
[0927]	<400> 43															
[0928]	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Lys	Thr	Val	Glu
[0929]	1		5				10						15			
[0930]	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Phe	Val	Lys	Lys	Asp	Gln
[0931]			20				25						30			
[0932]	Leu	Gly	Lys	Asn	Glu	Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Gly	Ile	Leu	Glu	Asp
[0933]			35				40						45			
[0934]	Met	Pro	Val	Asp	Pro	Asp	Asn	Glu	Ala	Tyr	Glu	Met	Pro	Ser	Glu	Glu
[0935]			50				55						60			
[0936]	Gly	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Glu	Pro	Glu	Ala	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro
[0937]			65				70						75			80
[0938]	Ser	Thr	Cys	Ser	Lys	Pro	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
[0939]							85						90			95
[0940]	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
[0941]							100						105			110
[0942]	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Asp
[0943]							115						120			125
[0944]	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Thr	Trp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Glu	Gln	Val	Arg
[0945]							130						135			140
[0946]	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	Leu	Arg	Glu	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg
[0947]							145						150			160
[0948]	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Lys
[0949]							165						170			175
[0950]	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	His	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
[0951]							180						185			190
[0952]	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Glu	Pro	Lys	Val	Tyr
[0953]							195						200			205
[0954]	Thr	Met	Gly	Pro	Pro	Arg	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu
[0955]							210						215			220
[0956]	Thr	Cys	Met	Ile	Asn	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp
[0957]							225						230			240
[0958]	Glu	Lys	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu	Asp	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Ala	Val
[0959]							245						250			255
[0960]	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Pro
[0961]							260						265			270
[0962]	Thr	Ser	Glu	Trp	Gln	Arg	Gly	Asp	Val	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Met	His
[0963]							275						280			285
[0964]	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro
[0965]							290						295			300

- [0966] Gly Lys
[0967] 305
[0968] <210> 44
[0969] <211> 13
[0970] <212> PRT
[0971] <213> 人工序列
[0972] <220>
[0973] <223> CDR-L1 X33
[0974] <220>
[0975] <221> MISC_FEATURE
[0976] <222> (10) .. (10)
[0977] <223> Xaa为Asn (N) 或Arg (R)
[0978] <400> 44
[0979] Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Xaa Tyr Leu Ala
[0980] 1 5 10
[0981] <210> 45
[0982] <211> 16
[0983] <212> PRT
[0984] <213> 人工序列
[0985] <220>
[0986] <223> CDR-H2 X56
[0987] <220>
[0988] <221> MISC_FEATURE
[0989] <222> (7) .. (7)
[0990] <223> Xaa为Ser (S) 或Asn (N)
[0991] <400> 45
[0992] Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Xaa Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
[0993] 1 5 10 15
[0994] <210> 46
[0995] <211> 9
[0996] <212> PRT
[0997] <213> 人工序列
[0998] <220>
[0999] <223> CDR-H3 X102
[1000] <220>
[1001] <221> MISC_FEATURE
[1002] <222> (5) .. (5)
[1003] <223> Xaa为Asn (N) 或His (H)
[1004] <400> 46
[1005] Ile His Tyr Gly Xaa Ser Gly Gly Leu
[1006] 1 5
[1007] <210> 47

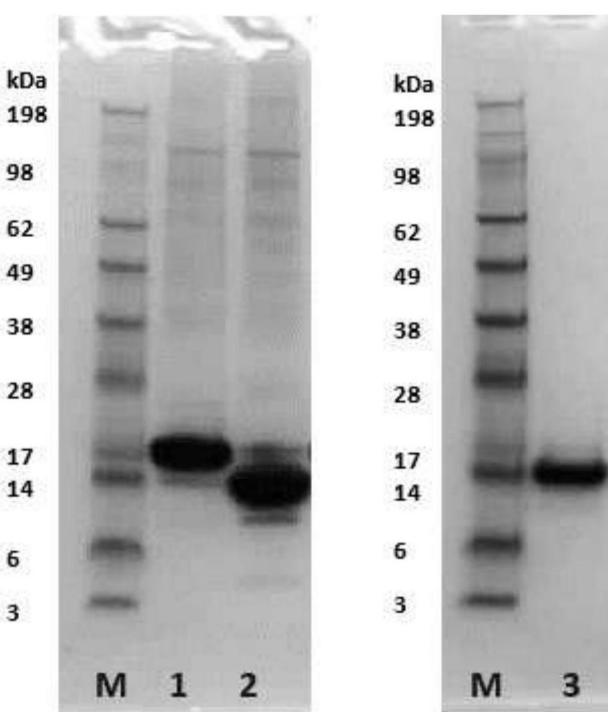
[1008]	<211> 216															
[1009]	<212> PRT															
[1010]	<213> 穴兔															
[1011]	<400> 47															
[1012]	Ala	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Val	Ala	Val	Gly
[1013]	1		5					10							15	
[1014]	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Lys	Asn
[1015]			20					25							30	
[1016]	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Gln
[1017]		35						40							45	
[1018]	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
[1019]		50				55						60				
[1020]	Lys	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asp	Val
[1021]		65				70					75				80	
[1022]	Val	Cys	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gly	Gly
[1023]			85					90							95	
[1024]	Arg	Asn	Asp	Gly	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys
[1025]			100					105							110	
[1026]	Arg	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Thr	Val	Leu	Ile	Phe	Pro	Pro	Ala	Ala	Asp
[1027]			115					120							125	
[1028]	Gln	Val	Ala	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Val	Cys	Val	Ala	Asn	Lys	Tyr
[1029]		130				135						140				
[1030]	Phe	Pro	Asp	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Glu	Val	Asp	Gly	Thr	Thr	Gln	Thr
[1031]		145				150					155				160	
[1032]	Thr	Gly	Ile	Glu	Asn	Ser	Lys	Thr	Pro	Gln	Asn	Ser	Ala	Asp	Cys	Thr
[1033]			165					170							175	
[1034]	Tyr	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ser	Thr	Gln	Tyr	Asn	Ser
[1035]			180					185							190	
[1036]	His	Lys	Glu	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Thr	Gln	Gly	Thr	Thr	Ser	Val	Val
[1037]			195					200							205	
[1038]	Gln	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Asp	Cys								
[1039]		210				215										
[1040]	<210> 48															
[1041]	<211> 437															
[1042]	<212> PRT															
[1043]	<213> 穴兔															
[1044]	<400> 48															
[1045]	Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro
[1046]	1		5					10							15	
[1047]	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Ser	His	Asp
[1048]			20					25							30	
[1049]	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Gly

[1050]	35	40	45
[1051]	Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly		
[1052]	50	55	60
[1053]	Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr		
[1054]	65	70	75
[1055]	Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His		
[1056]	85	90	95
[1057]	Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[1058]	100	105	110
[1059]	Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys		
[1060]	115	120	125
[1061]	Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys		
[1062]	130	135	140
[1063]	Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu		
[1064]	145	150	155
[1065]	Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu		
[1066]	165	170	175
[1067]	Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val		
[1068]	180	185	190
[1069]	Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr		
[1070]	195	200	205
[1071]	Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu		
[1072]	210	215	220
[1073]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[1074]	225	230	235
[1075]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[1076]	245	250	255
[1077]	Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu		
[1078]	260	265	270
[1079]	Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser		
[1080]	275	280	285
[1081]	Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu		
[1082]	290	295	300
[1083]	Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[1084]	305	310	315
[1085]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro		
[1086]	325	330	335
[1087]	Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser		
[1088]	340	345	350
[1089]	Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser		
[1090]	355	360	365
[1091]	Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr		

[1092]	370	375	380
[1093]	Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[1094]	385	390	395 400
[1095]	Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser		
[1096]	405	410	415
[1097]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser		
[1098]	420	425	430
[1099]	Arg Ser Pro Gly Lys		
[1100]	435		
[1101]	<210> 49		
[1102]	<211> 227		
[1103]	<212> PRT		
[1104]	<213> 人工序列		
[1105]	<220>		
[1106]	<223> 6470 兔 Fab-His 重链		
[1107]	<400> 49		
[1108]	Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro		
[1109]	1 5 10 15		
[1110]	Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp		
[1111]	20 25 30		
[1112]	Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly		
[1113]	35 40 45		
[1114]	Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly		
[1115]	50 55 60		
[1116]	Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr		
[1117]	65 70 75 80		
[1118]	Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His		
[1119]	85 90 95		
[1120]	Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[1121]	100 105 110		
[1122]	Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys		
[1123]	115 120 125		
[1124]	Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys		
[1125]	130 135 140		
[1126]	Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu		
[1127]	145 150 155 160		
[1128]	Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu		
[1129]	165 170 175		
[1130]	Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val		
[1131]	180 185 190		
[1132]	Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr		
[1133]	195 200 205		

[1134] Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro His His His His His His His
[1135] 210 215 220
[1136] His His His
[1137] 225

A



B

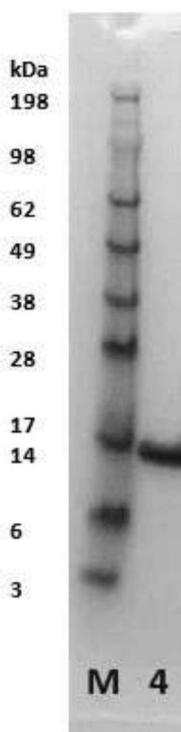


图1

A

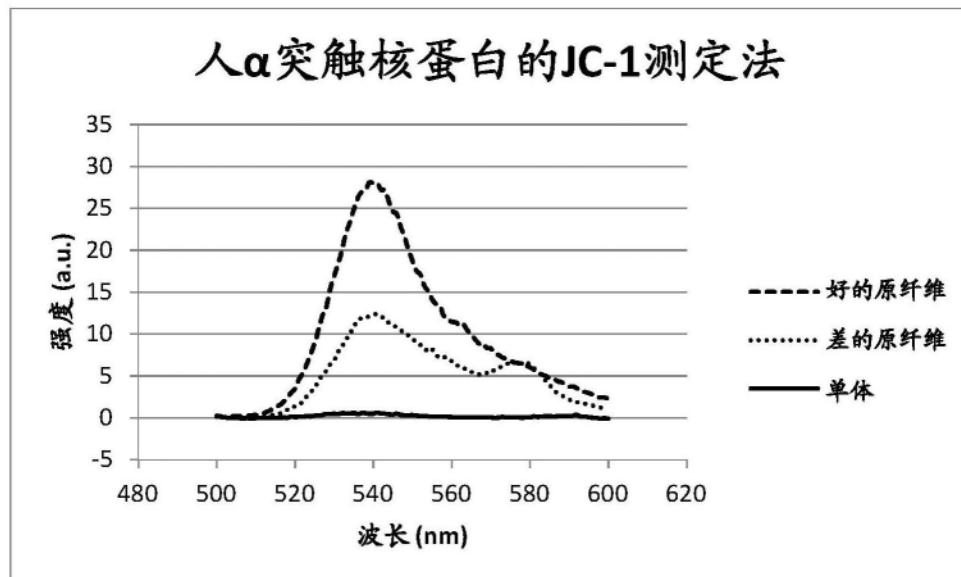


图2

B

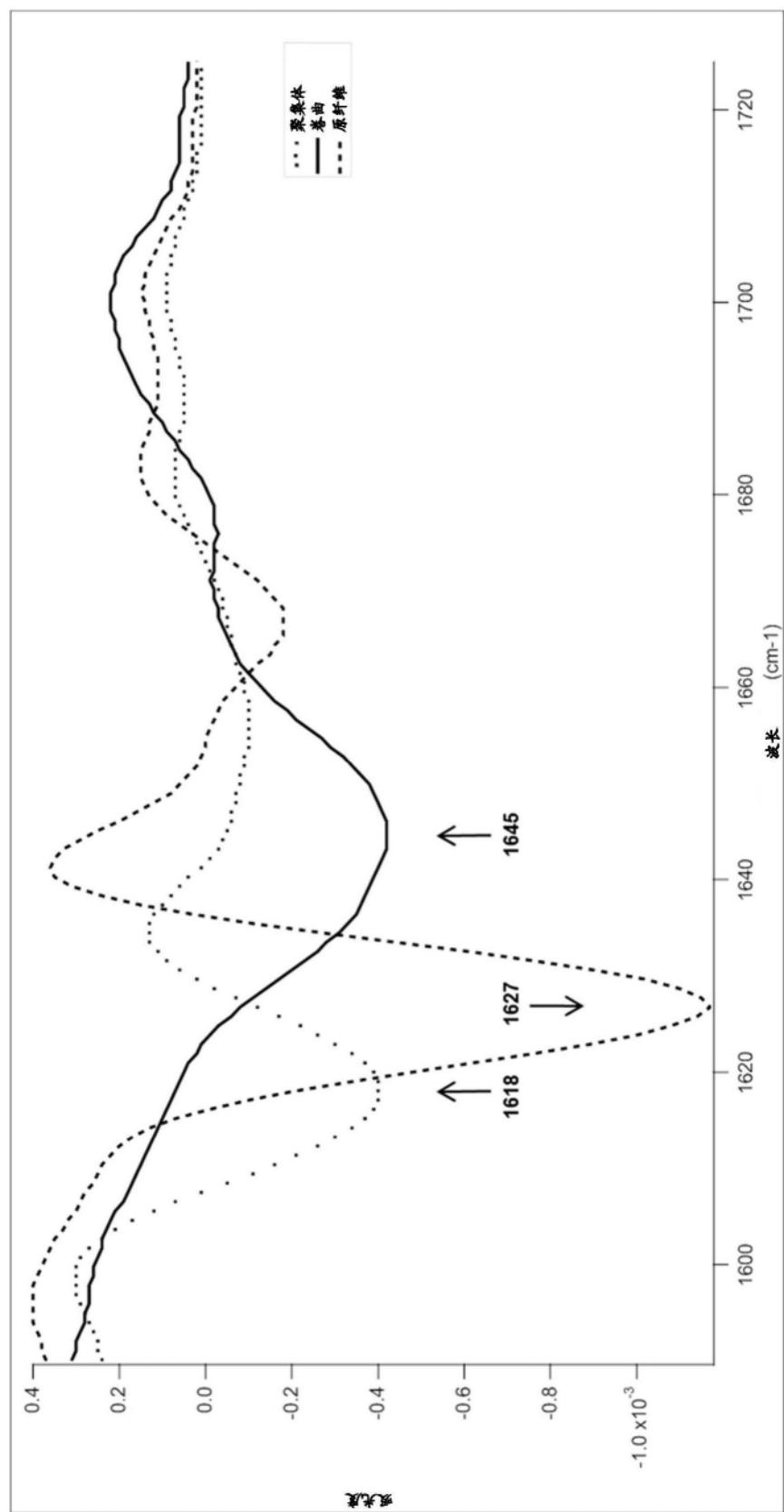


图2(续)

6470 RblgG1 与重组人 α 突触核蛋白单体和原纤维
以及 PVDPDNEAYE 肽的 ELISA 结合

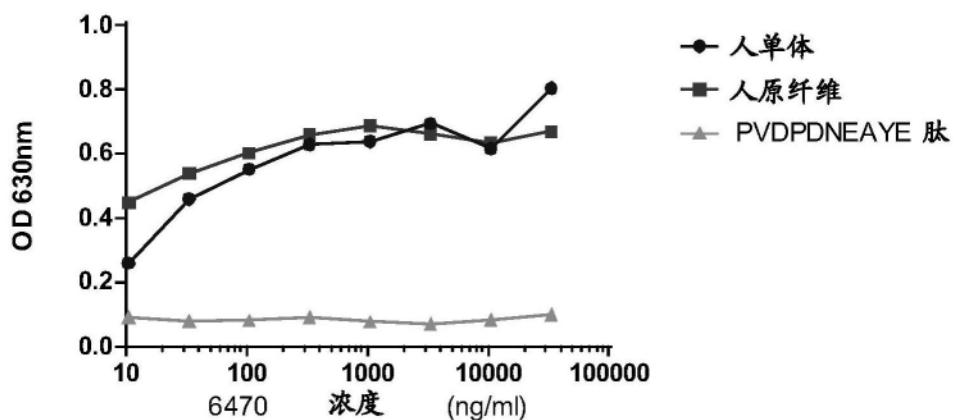
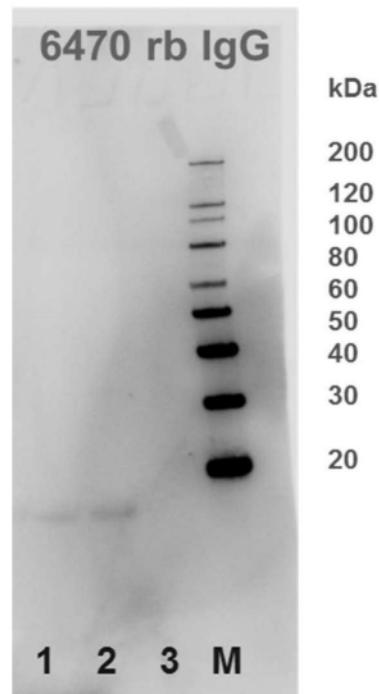


图3

A



B

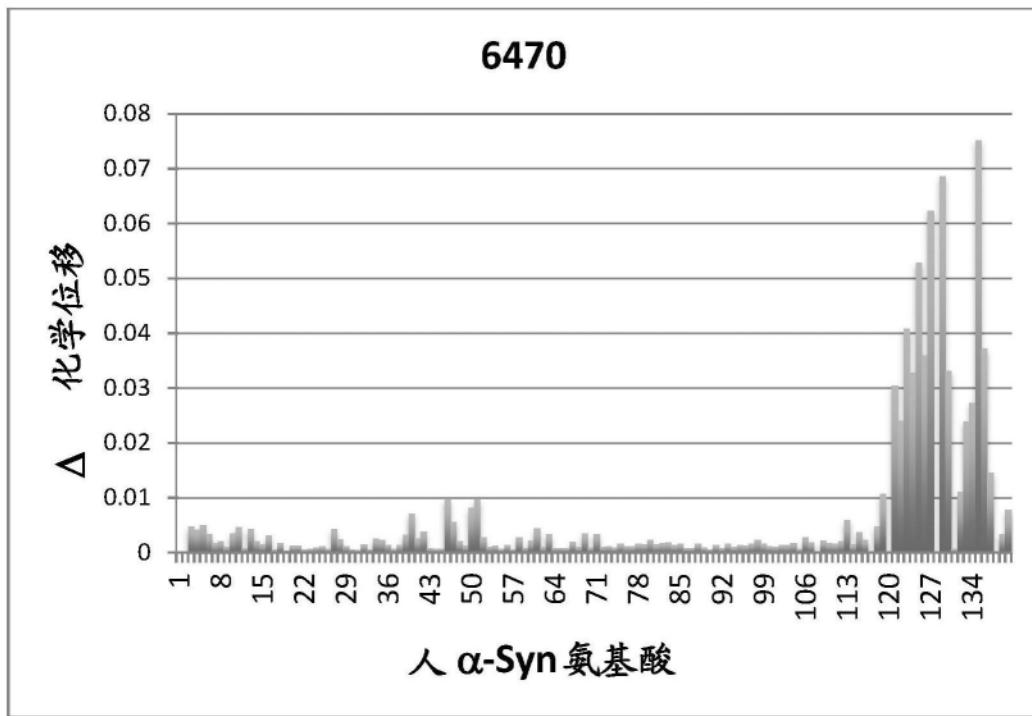


图4

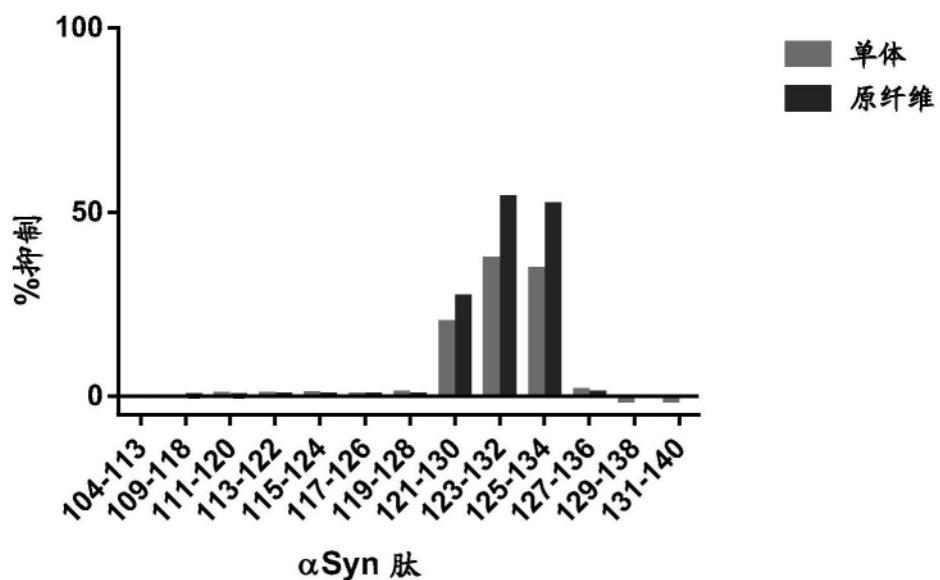


图5

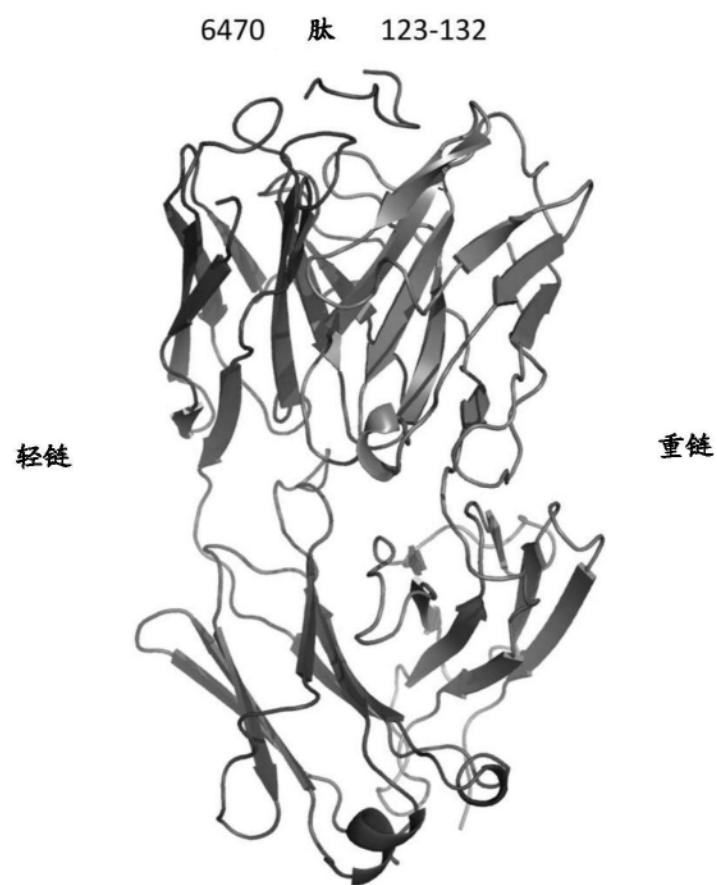


图6

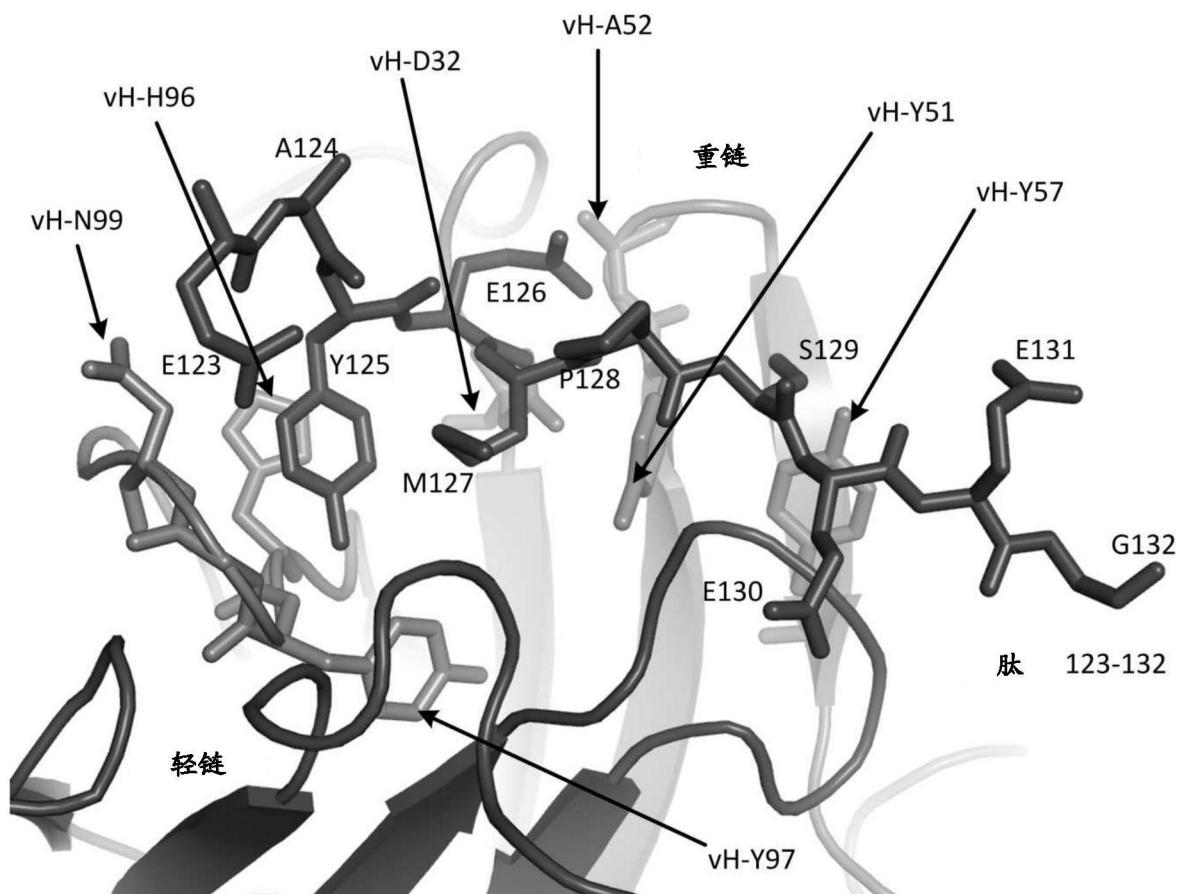


图7

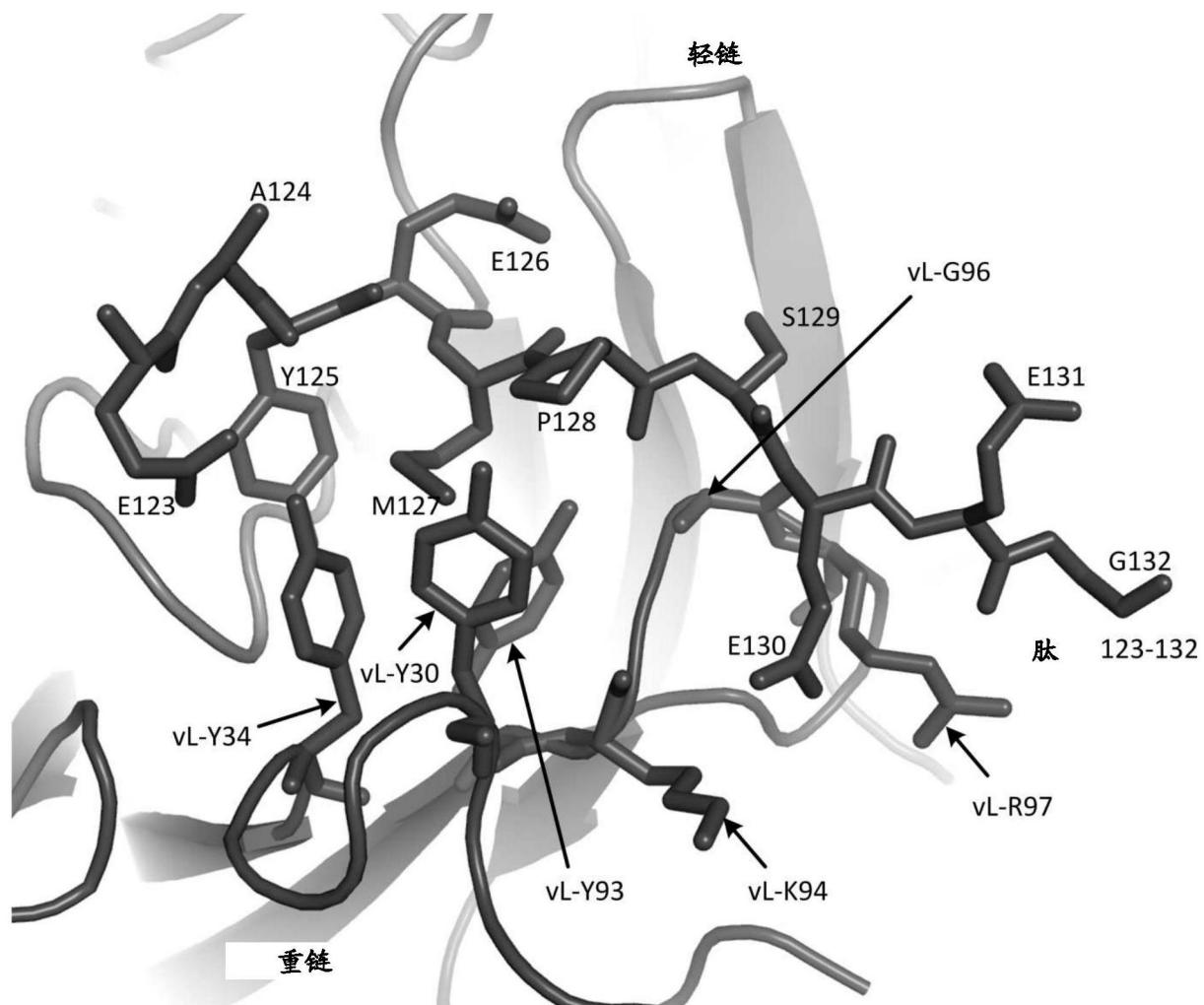


图8

图9

重链	6470
	IGHV3-23

图10

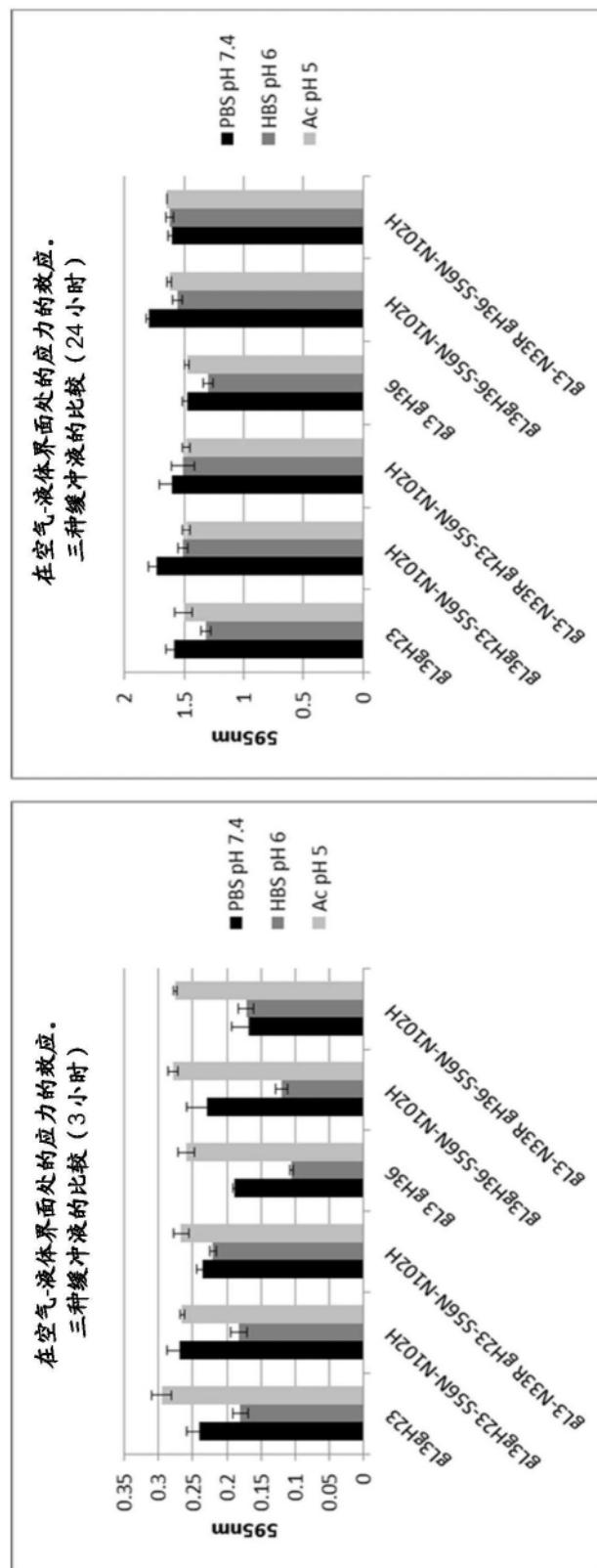


图11

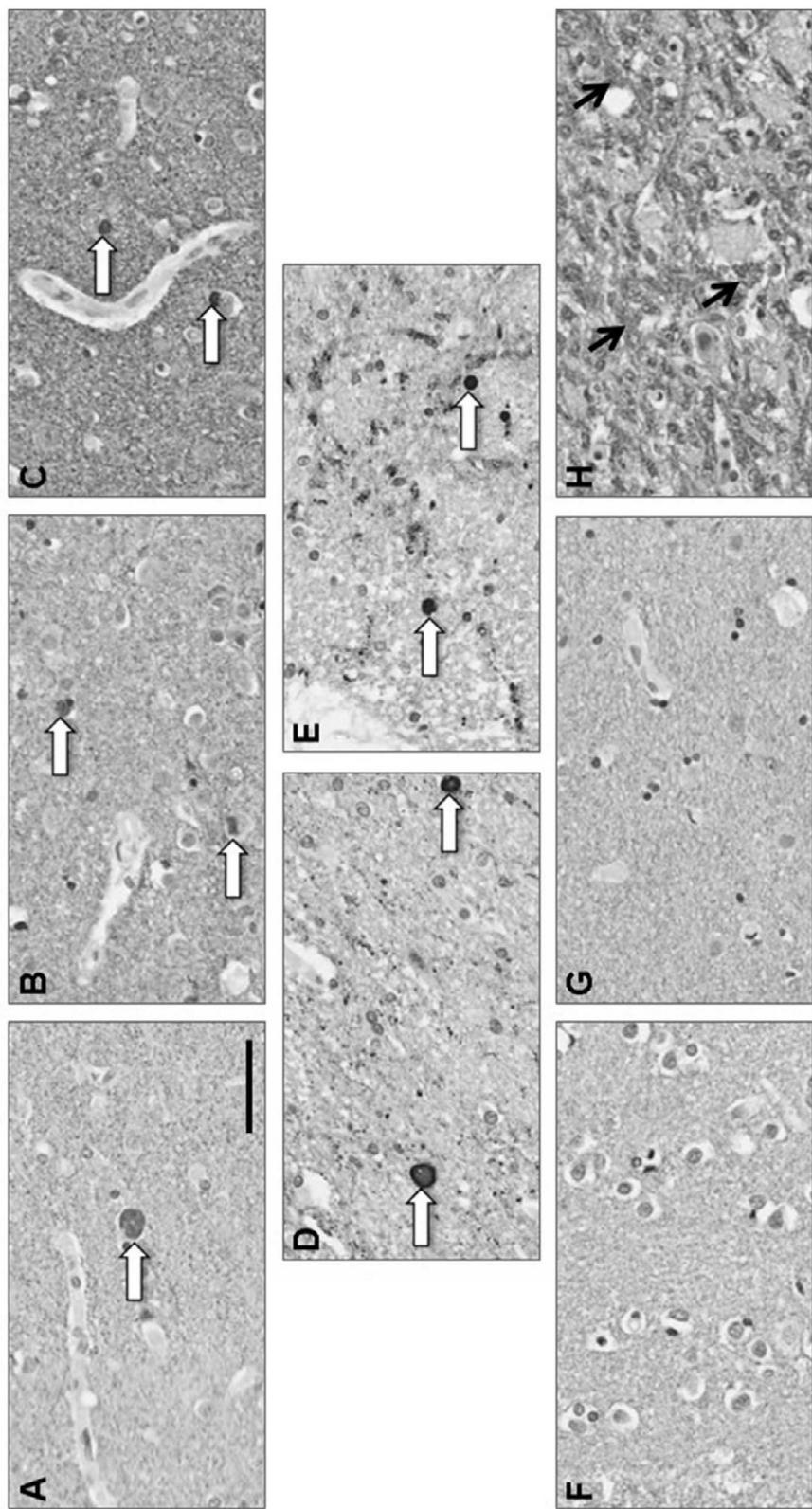


图12

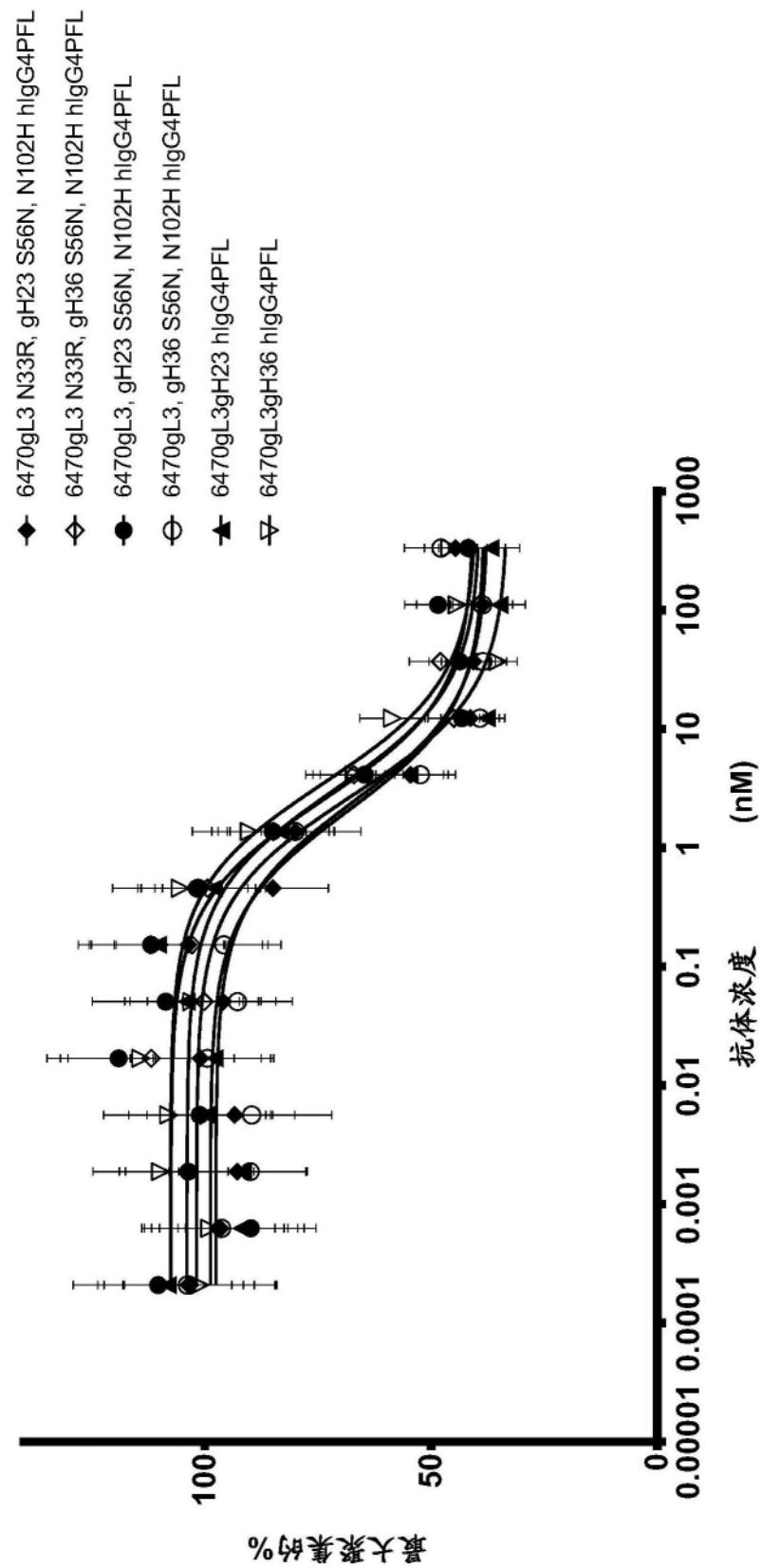


图13

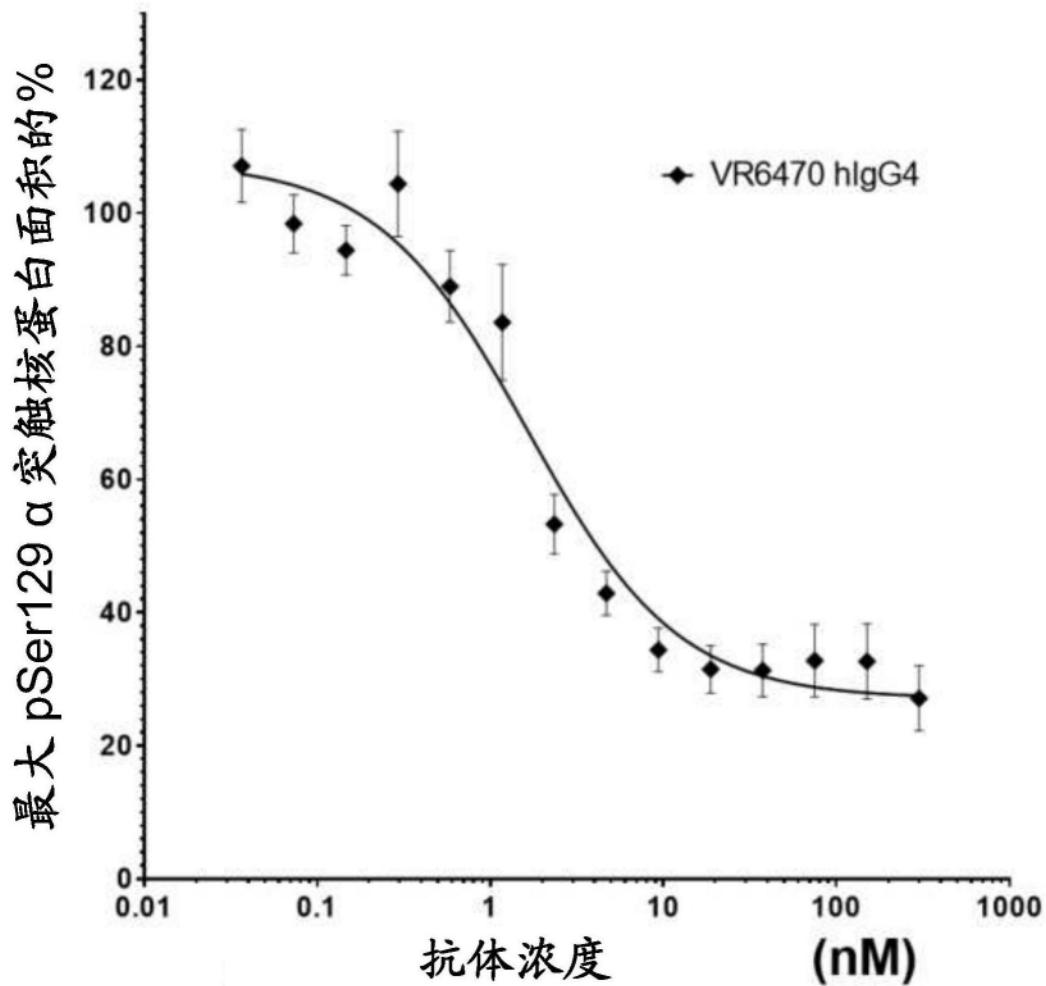


图14

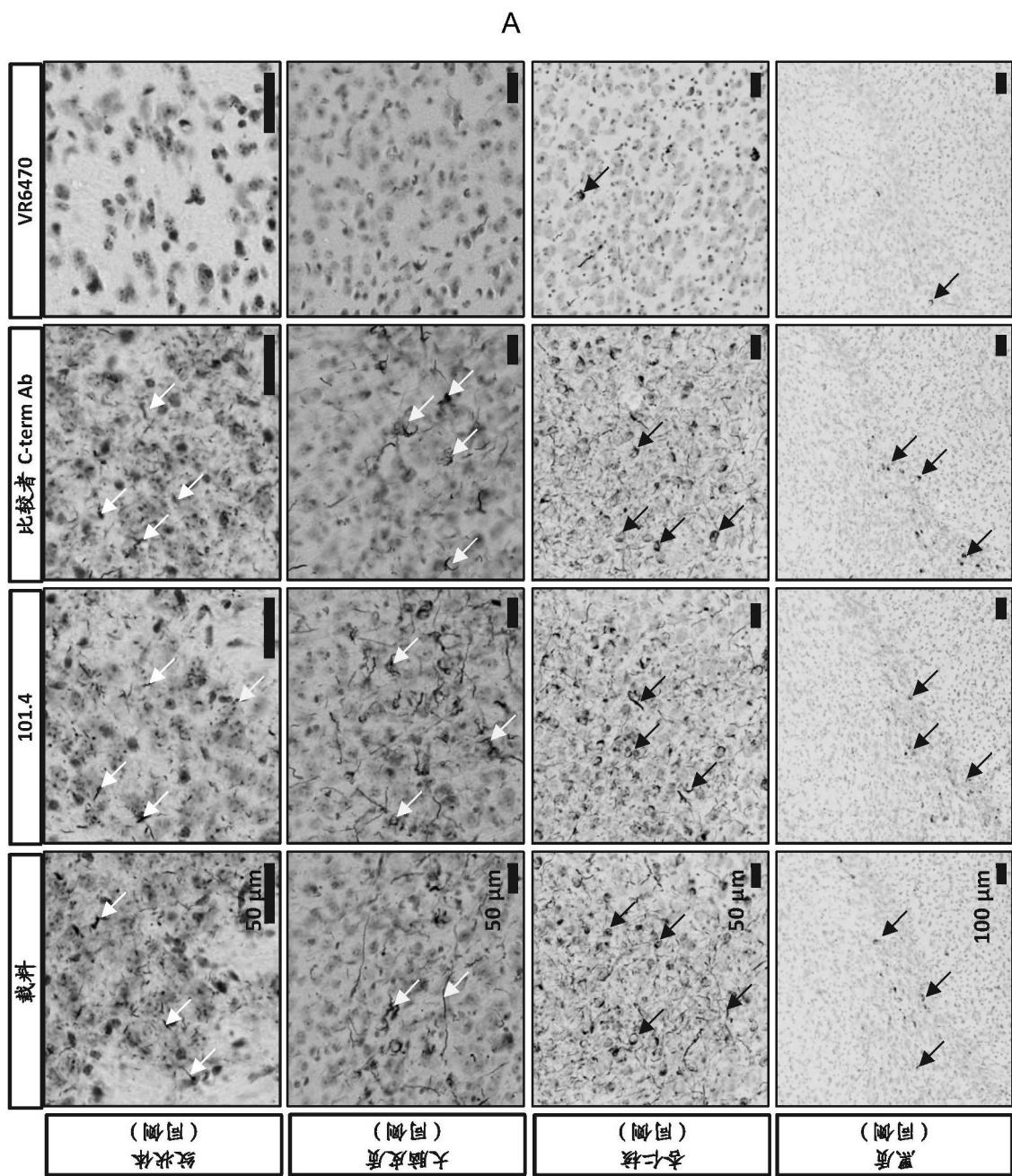


图15

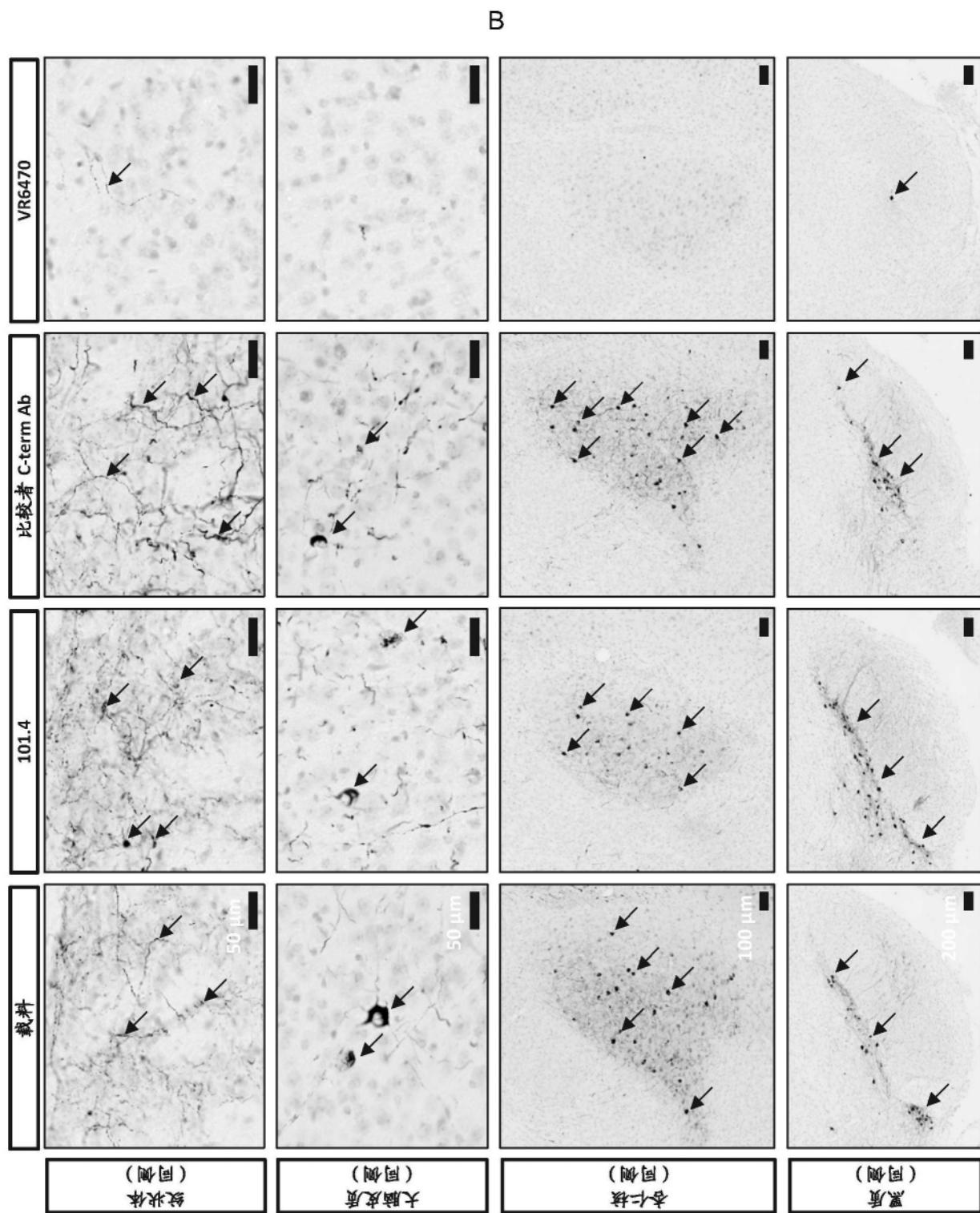


图15(续)

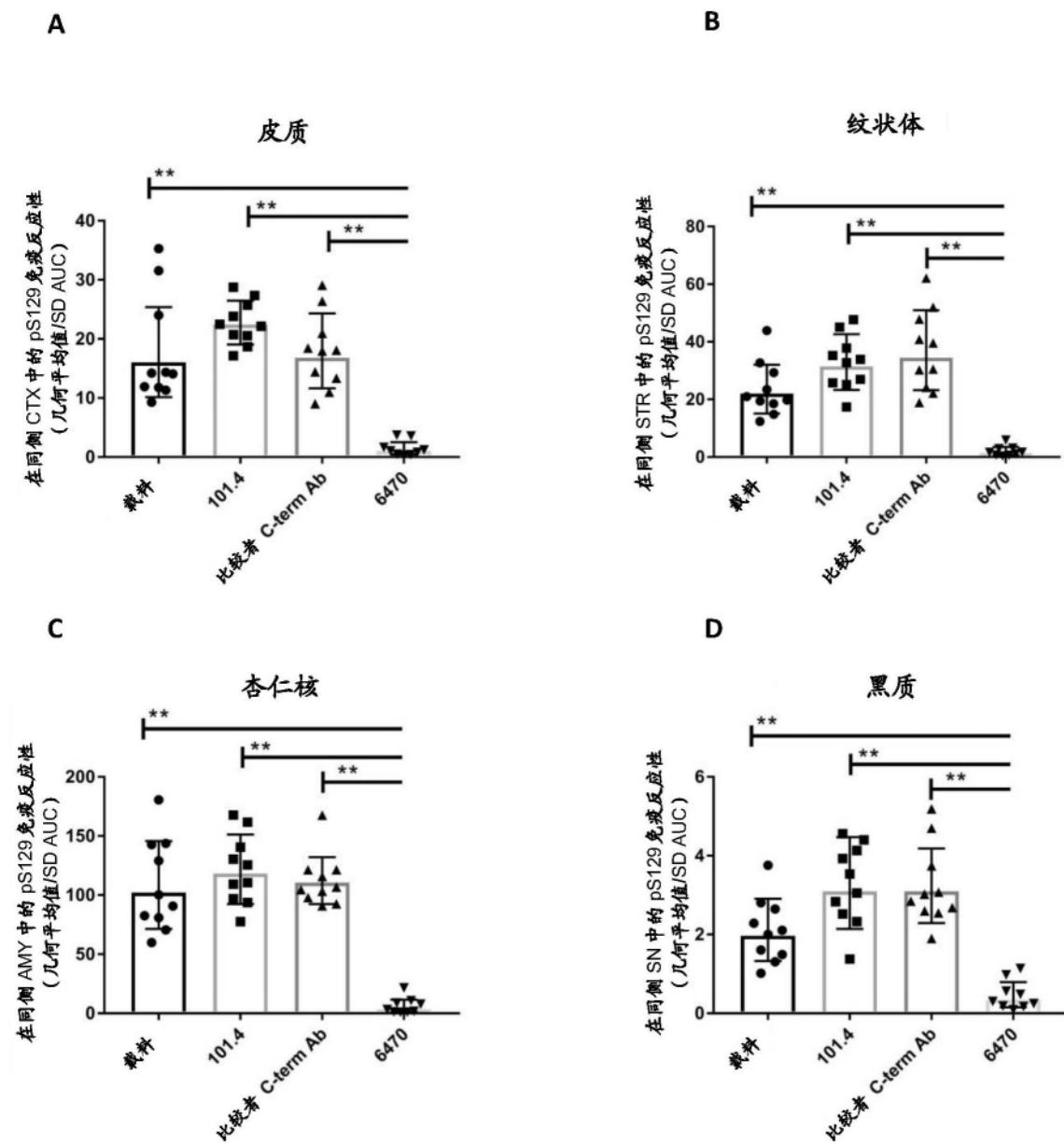


图16

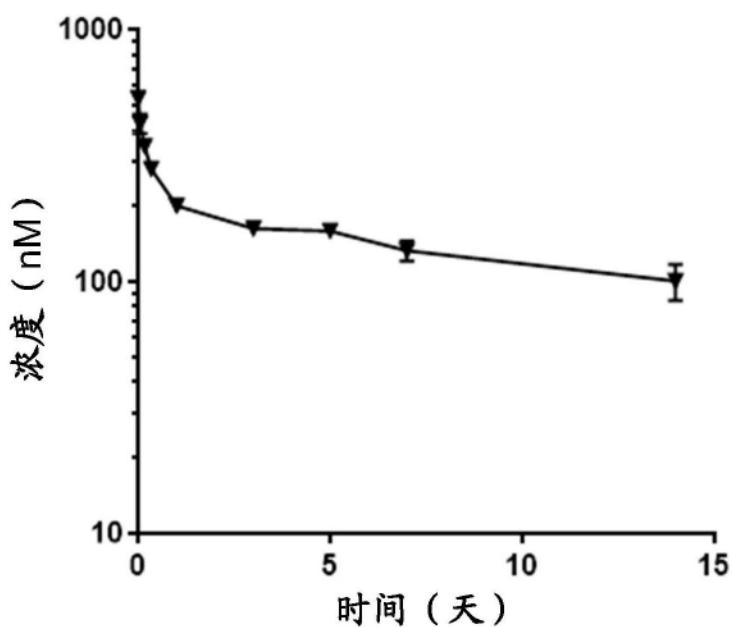
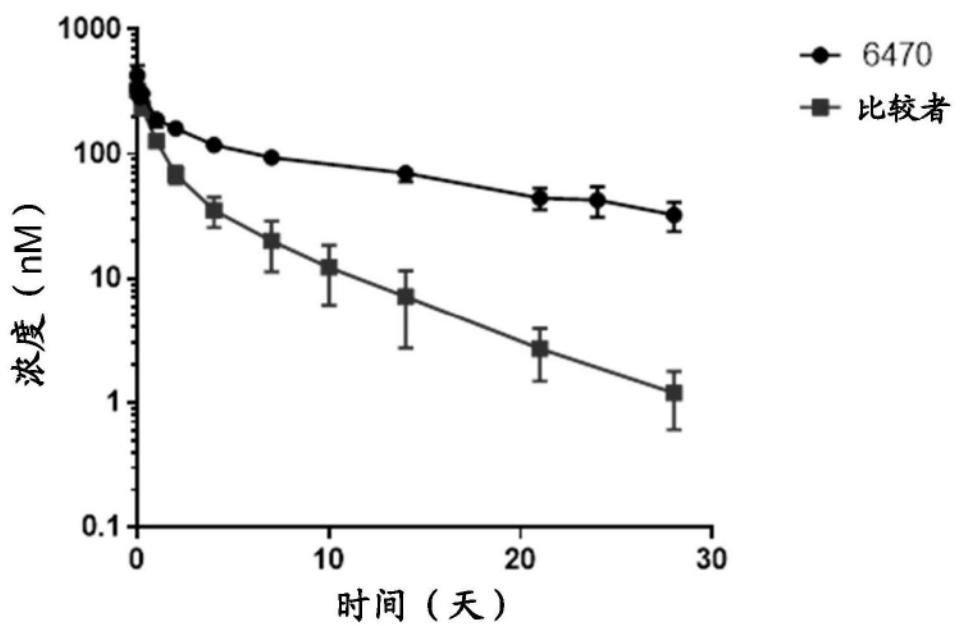
A**B**

图17