



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202332692 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 08 月 16 日

(21) 申請案號：112114559

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 14 日

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

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30) 優先權：2017/12/15 英國

1720975.0

(71) 申請人：比利時商 U C B 生物製藥公司 (比利時) UCB BIOPHARMA SRL (BE)
比利時

(72) 發明人：艾當斯 羅夫 ADAMS, RALPH (GB)；多尼 派翠克 DOWNEY, PATRICK (GB)；貝克 泰倫斯 西瓦德 BAKER, TERENCE SEWARD (GB)；泰森 凱芮 路易斯 TYSON, KERRY LOUISE (GB)；德利赫特費爾德 洛倫佐 DE LICHTERVELDE, LORENZO (BE)；萊特伍 丹尼爾 約翰 LIGHTWOOD, DANIEL JOHN (GB)；麥克米蘭 大衛 詹姆士 MCMILLAN, DAVID JAMES (GB)

(74) 代理人：陳長文；張哲倫；朱淑尹

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：17 共 186 頁

(54) 名稱

抗體

(57) 摘要

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

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

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES

【中文】

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

【英文】

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

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES

【技術領域】

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

【先前技術】

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

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

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

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

【發明內容】

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

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

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3。

【0007】 實施例2：如實施例1之抗體或其抗原結合片段，其結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基

E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131；其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0008】 實施例3：如技術方案1或2中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。

【0009】 實施例4：如實施例1至3中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段能夠結合作為單體及呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白。

【0010】 實施例5：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的結合親和力高於對呈單體形式之 α 突觸核蛋白之結合親和力，其特徵為對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白高至少10倍。

【0011】 實施例6：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的(K_D)為300pM或更小。

【0012】 實施例7：如前述實施例中任一項之抗體或其抗原結合片段，其不結合 β 突觸核蛋白及/或 γ 突觸核蛋白。

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

【0014】 實施例9：如前述實施例中任一項之抗體，其中該抗體係全長抗體。

【0015】 實施例10：如實施例9之抗體，其中該全長抗體係選自IgG1、IgG4或IgG4P。

【0016】 實施例11：如實施例1至8中任一項之其抗原結合片段，其

中該抗原結合片段選自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dAb或V_{HH}。

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

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

b. 包含SEQ ID NO:15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

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

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

b. 包含SEQ ID NO:15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 25之重鏈。

【0019】 實施例14：如技術方案1至11中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 9之CDR-H3；或

b. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 27或35之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 29或37之重鏈。

【0020】 實施例15：如技術方案1至11中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

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

b. 包含SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23或31之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 21之輕鏈及包含SEQ ID NO: 25或33之重鏈。

【0021】 實施例16：如技術方案1至11中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 7之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 9之CDR-H3；或

b. 包含SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 27或35之重

鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 21之輕鏈及包含SEQ ID NO: 29或37之重鏈。

【0022】 實施例17：一種抗體或其抗原結合片段，其：

a. 與如前述技術方案中任一項之抗體或其抗原結合片段競爭結合 α 突觸核蛋白；及/或

b. 交叉阻斷如前述技術方案中任一項之抗體或其抗原結合片段或經其交叉阻斷以結合 α 突觸核蛋白；及/或

c. 與前述技術方案中任一項之抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上相同之抗原決定基；及/或

d. 包含具有與根據SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之序列至少80%一致性或相似性的重鏈可變區；及/或

e. 包含具有與根據SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 19之序列至少80%一致性或相似性的輕鏈可變區。

【0023】 實施例18：一種經分離聚核苷酸，其編碼如實施例1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【0024】 實施例19：如實施例18之經分離聚核苷酸，其中該聚核苷酸編碼：

a. 輕鏈可變區，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 20至少90%一致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 16或20；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 20組成；

b. 重鏈可變區，其中該聚核苷酸：

- i. 與SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 36至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 36；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 36組成；
- c. 輕鏈，其中該聚核苷酸：
- i. 與SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 18或22；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22組成；
- d. 重鏈，其中該聚核苷酸：
- i. 與SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 30或SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 38至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 30或SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 38；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 30或SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 38組成。

【0025】 實施例20：一種選殖或表現載體，其包含一或多種如實施例18或19中任一項之聚核苷酸。

【0026】 實施例21：一種宿主細胞，其包含：

- a. 一或多種如實施例18或19中任一項之聚核苷酸或
- b. 一或多種如實施例20之表現載體。

【0027】 實施例22：一種產生如實施例1至17中任一項之抗體或其

抗原結合片段的方法，其包含在產生該抗體或其抗原結合片段之合適條件下培養如實施例21之宿主細胞及分離該抗體或其抗原結合片段。

【0028】 實施例23：一種醫藥組合物，其包含如實施例1至17中任一項之抗體或其抗原結合片段及一或多種醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。

【0029】 實施例24：如實施例1至17中任一項之抗體或其抗原結合片段或如實施例23之醫藥組合物，其用於療法。

【0030】 實施例25：如實施例1至17中任一項之抗體或其抗原結合片段或如實施例23之醫藥組合物，其用於治療一或多種突觸核蛋白病。

【0031】 實施例26：如實施例25所使用之抗體或其抗原結合片段，其中該突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。

【0032】 實施例27：如實施例26所使用之抗體或其抗原結合片段，其中該突觸核蛋白病係帕金森氏病。

【0033】 實施例28：一種治療患者中之突觸核蛋白病的方法，其包含向該患者投與治療有效量之如實施例1至17中任一項之抗體或其抗原結合片段或如實施例23之醫藥組合物。

【0034】 實施例29：如實施例28之方法，其中該突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症

(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳係帕金森氏病。

【0035】 實施例30：如實施例1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段，其用於診斷 α 突觸核蛋白病，較佳診斷帕金森氏病。

【圖式簡單說明】

【0036】

圖1.(A) α 突觸核蛋白表現之樣品之SDS-PAGE。具有His標籤(1)及在藉由TEV蛋白酶移除His標籤之後(2)的 α 突觸核蛋白，對經TEV蛋白酶處理之人類 α 突觸核蛋白之Superdex 75尺寸排阻層析(3)。蛋白質分子量標記物SeeBluePlus2 (Invitrogen) (M)。(B) 自Expi293上清液純化作為野生型未標記蛋白質之人類 α -突觸核蛋白之SDS-PAGE (4)蛋白質分子量標記物SeeBluePlus2 (Invitrogen) (M)。

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

圖3.ELISA結合分析。兔6470 IgG1與重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維以及人類 α 突觸核蛋白之肽PVDPDNEAYE的ELISA結合。

圖4.(A)西方墨點法，展示兔6470 IgG1與人類 α -突觸核蛋白及人類 β -突觸核蛋白之結合。1.人類 α -突觸核蛋白；2.人類 α -突觸核蛋白(rPeptide)；3.人類 β -突觸核蛋白(rPeptide)；標記物.MagicMark XP。(B) NMR化學位移變化，展示人類 α 突觸核蛋白上所預測之抗原決定基6470。

圖5.抑制6470 IgG與固定 α 突觸核蛋白之結合(對於每一種測試肽，分別地左側條柱對應單體且右側條柱對應原纖維)。

圖6. 6470 Fab與肽123-132複合之示意圖。

圖7.與肽123-132接觸之6470 Fab重鏈之示意圖。肽殘基經直接標記，6470可變重鏈殘基經標記為vH-殘基數目。

圖8.與肽123-132接觸之6470 Fab輕鏈之示意圖。肽殘基經直接標記，6470可變輕鏈殘基經標記為vL-殘基數目。

圖9.輕鏈人類化。6470對應兔可變輕鏈序列。6470gL3對應6470可變輕鏈的人類化移植物，使用IGKV1-16人類生殖系作為受體架構。CDR以粗體/帶下劃線顯示。供體殘基以粗體/斜體顯示且加陰影：Q48及Q72。CDRL1 N33R之突變以粗體/帶下劃線顯示且加陰影。

圖10.重鏈人類化。6470對應兔可變重鏈序列。6470gH23及gH36對應抗體6470可變重鏈之人類化移植物，使用IGHV3-23人類生殖系作為受體架構。CDR以粗體/帶下劃線顯示。供體殘基以粗體/斜體形式顯示且加陰影顯示：V24、Y47、I48、G49、S73、V78及R97。CDRH2及CDRH3之突變S56N及N102H分別以粗體/帶下劃線顯示且加陰影。

圖11.空氣-液體界面處之壓力。在渦旋3小時及24小時後三種預調配物緩衝液中之6470抗體及突變體。

圖12.免疫組織化學。來自(A-E) PD及(F-H)非PD患者之腦切片之免疫反應性。(A-C)在PD患者之顳葉皮質中，6470兔IgG1標記灰質中之神經纖維網及路易體樣結構(白色箭頭)。(D、E) 6470兔IgG1標記PD患者之黑質中之路易體樣特徵(白色箭頭)。(F、G).在非PD顳葉皮質組織中，6470兔IgG1亦標記神經纖維網，但未觀測到路易體樣結構。(H)在非PD個體之黑質中未觀測到路易體樣結構；黑色箭頭指向非特異性標記。比例尺=50 μm 。

圖13.基於細胞之聚集分析(HEK細胞)。本發明之抗體能夠抑制由 α -

突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白，其中 IC_{50} 低於5nM。誤差條表示量測之標準誤差(SEM，N=3，n=9)。在圖例中，各抗體名稱之末端處之FL意謂「全長」。

圖14.基於細胞之聚集分析(原代神經元)。根據本發明之代表性抗體能夠抑制表現內源性含量之 α 突觸核蛋白之小鼠原代神經元上由 α 突觸核蛋白原纖維誘導的 α 突觸核蛋白聚集，其中 IC_{50} 低於4nM。誤差條表示量測之標準誤差(SEM，N=4，n=18)。

圖15.分別用小鼠或人類PFF注射之雄性C57BL/6J野生型小鼠(A)及SNCA-OVX小鼠(B)之不同腦區中的 α 突觸核蛋白病變(箭頭)之免疫-組織化學圖像。

圖16.用小鼠PFF注射之C57BL/6J野生型小鼠之不同腦區(A：大腦皮質；B：紋狀體；C：扁桃體及D：黑質)中之 α 突觸核蛋白病變的定量。

圖17. α 突觸核蛋白抗體之藥物動力學概況：A.野生型小鼠中之6470抗體；B.食蟹獼猴中之6470及比較抗體。

【實施方式】

【0037】 現將參照特定的非限制性態樣及其實施例且參考某些圖及實例描述本發明。

【0038】 除非另外指示，否則技術術語係根據其常見含義使用。若向某些術語傳遞特定含義，則將在使用該等術語之上下文中給定術語之定義。

【0039】 若本發明說明書及申請專利範圍中使用術語「包含」，其不排除其他元件。出於本發明之目的，術語「由.....組成(consisting of)」視為術語「包含(comprising of)」之較佳實施例。

【0040】 當提及單數名詞時，若使用不定冠詞或定冠詞，例如「一(a)」、「一(an)」或「該(the)」，則此包括複數個該名詞，除非具體陳述某物。

【0041】 如本文所用，術語「治療(treatment)」、「治療(treating)」及其類似術語係指獲得所要的藥理學及/或生理學效果。該效果就完全或部分預防疾病或其症狀而言可具預防性，且/或就部分或完全治癒疾病及/或可歸因於該疾病之不良影響而言可具治療性。因此療法涵蓋哺乳動物、尤其人類之疾病的任何療法，且包括：(a)預防可能易患該疾病、但尚未診斷出患有該疾病之個體中出現該疾病；(b)抑制該疾病，亦即阻滯其發展；以及(c)緩解該疾病，亦即促使該疾病消退。

【0042】 「治療有效量」係指抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段在投與哺乳動物或其他個體以治療疾病時足以產生對該疾病之此類治療的量。治療有效量將視抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段、待治療之個體之疾病及其嚴重程度以及年齡、重量等而變化。

【0043】 在本說明書通篇，術語「分離的」意謂視具體情況而定，抗體、抗原結合片段或聚核苷酸存在於不同於其在自然界中所存在於之環境的物理環境中。本發明提供與 α 突觸核蛋白結合之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：

- iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
- v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
- vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3。

【0044】 在SEQ ID NO: 44中，Xaa係天冬醯胺(Asn；N)或精胺酸(Arg；R)。獨立地，在SEQ ID NO: 45中，Xaa係絲胺酸(Ser；S)或天冬醯胺(Asn N)且在SEQ ID NO: 46中，Xaa係天冬醯胺(Asn N)或組胺酸(His；H)。

【0045】 在一個實施例中，SEQ ID NO: 44及46中之Xaa係天冬醯胺且SEQ ID NO: 45中之Xaa係絲胺酸。

【0046】 在一個實施例中，與 α 突觸核蛋白結合之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【0047】 α 突觸核蛋白(或 α syn； α -突觸核蛋白； α -syn或任何其他已知同義詞)係指此蛋白質之一般名稱，且包括但不限於選擇性剪接變異體、突變體及來自其他物種(小鼠、猴等)之 α 突觸核蛋白。除非另外規定，否則在需要或明確提及人類 α 突觸核蛋白時，此類 α 突觸核蛋白包含

SEQ ID NO: 10或Uniprot P37840中給出之序列。

【0048】如本文所用，術語『抗體』大體上係指完整(完全)抗體，亦即包含兩條重鏈及兩條輕鏈的元件。抗體可包含其他結合域，例如根據WO 2007/024715中所揭示的分子DVD-Ig，或WO2011/030107中所述的所謂(FabFv)₂Fc。因此，如本文所使用之抗體包括二價、三價或四價全長抗體。

【0049】抗體之抗原結合片段包括單鏈抗體(亦即全長重鏈及輕鏈)；Fab、經修飾之Fab、Fab'、經修飾之Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、單域抗體(例如V_H或V_L或V_{HH})、scFv、雙價、三價或四價抗體、Bis-scFv、雙功能抗體、三功能抗體(tribodies)、三功能抗體(triabodies)、四功能抗體及以上任一者之抗原決定基-結合片段(參見例如Holliger及Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136；Adair及Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217)。用於產生及製造此等抗體片段之方法為此項技術中所熟知(參見例如Verma等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)。Fab-Fv形式最先在WO2009/040562中揭示且其二硫化物穩定型式Fab-dsFv最先在WO2010/035012中揭示。用於本發明中之其他抗體片段包括國際專利申請案WO2005/003169、WO2005/003170及WO2005/003171中所述的Fab及Fab'片段。多價抗體可以包含多種特異性，例如雙特異性，或可以具單特異性(參見例如WO 92/22583及WO05/113605)。後者之一種此類實例為如WO92/22583中所述之Tri-Fab (或TFM)。

【0050】替代的抗原結合片段包含連接至兩個scFv或dsFv之Fab，各scFv或dsFv結合相同或不同標靶(例如一個scFv或dsFv結合治

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

【0051】 典型Fab'分子包含重鏈及輕鏈對，其中重鏈包含可變區VH、恆定域CH1及天然或經修飾之鉸鏈區且輕鏈包含可變區VL及恆定域CL。根據本發明之Fab'之二聚體產生F(ab')₂，其中例如二聚可經由鉸鏈。

【0052】 根據本發明之抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之抗原決定基結合。

【0053】 在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3，

且結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0054】 在SEQ ID NO: 44中，Xaa係天冬醯胺(Asn；N)或精胺酸(Arg；R)。獨立地，在SEQ ID NO: 45中，Xaa係絲胺酸(Ser；S)或天冬醯胺(Asn N)且在SEQ ID NO: 46中，Xaa係天冬醯胺(Asn N)或組胺酸

(His ; H)。

【0055】 在一個實施例中，SEQ ID NO: 44及46中之Xaa係天冬醯胺且SEQ ID NO: 45中之Xaa係絲胺酸。

【0056】 在一個實施例中，與 α 突觸核蛋白結合之抗體或其抗原結合片段包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3，

且結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0057】 在本發明內，術語「抗原決定基」對於構形及線性抗原決定基而言可互換使用，其中構形抗原決定基由抗原之胺基酸一級序列之中斷部分構成且線性抗原決定基係藉由連續胺基酸所形成之序列形成。

【0058】 抗原決定基可藉由此項技術中已知之任何適合之抗原決定基定位方法結合本發明所提供之抗體中之任一者鑑別。該等方法之實例包括篩檢衍生自全長 α 突觸核蛋白之不同長度的肽以結合於本發明之抗體或其片段及鑑別最小片段，該最小片段可特異性結合於含有抗體識別之抗原

決定基之序列的抗體。 α 突觸核蛋白肽可以合成方式或藉由蛋白分解消化 α 突觸核蛋白產生。結合抗體之肽可藉由例如質譜分析來鑑別。在另一實例中，可用NMR光譜法或X射線結晶學鑑別本發明抗體所結合之抗原決定基。通常，在藉由X射線結晶進行抗原決定基測定時，來自CDR之在4Å內之抗原的胺基酸殘基視為抗原決定基之胺基酸殘基部分。在鑑別後，抗原決定基可用於製備結合本發明之抗體之片段且必要時用作免疫原以獲得結合相同抗原決定基之額外抗體。

【0059】 在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段之抗原決定基係藉由X射線結晶使用包含(參考SEQ ID NO: 10)殘基123至132之 α 突觸核蛋白肽測定。

【0060】 較佳地，根據本發明之抗體或其抗原結合片段防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。

【0061】 在此特定情形內，術語「預防」(及其語法變異)在本文中可與術語「抑制」互換使用且指示根據本發明之抗體對於由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集所具有之效果。該效果就以下而言可為預防性的：完全或部分預防聚集；或完全或部分減少(亦即阻斷)已開始進一步進行之聚集，或完全或部分減少進一步聚集之出現；或完全或部分逆轉已出現之聚集。

【0062】 不希望受理論所束縛，咸信根據本發明之抗體或其抗原結合片段結合於：

- i) 呈單體形式之 α 突觸核蛋白且防止 α 突觸核蛋白形成寡聚物及聚集體；及/或
- ii) 呈寡聚及原纖維形式之 α 突觸核蛋白且防止 α 突觸核蛋白在神經

元之間擴散及/或

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

【0063】 如本文所用關於 α 突觸核蛋白之術語「原纖維」、「原纖維形式」或「呈原纖維形式」意欲指代 α 突觸核蛋白之非單體形式，包括 α 突觸核蛋白寡聚物，其可構成腦結構內及之間的擴散物種。

【0064】 因此，在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3，

防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。較佳地，抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0065】 在SEQ ID NO: 44中，Xaa係天冬醯胺(Asn；N)或精胺酸(Arg；R)。獨立地，在SEQ ID NO: 45中，Xaa係絲胺酸(Ser；S)或天冬醯胺(Asn N)且在SEQ ID NO: 46中，Xaa係天冬醯胺(Asn N)或組胺酸

(His ; H)。

【0066】 在一個實施例中，SEQ ID NO: 44及46中之Xaa係天冬醯胺且SEQ ID NO: 45中之Xaa係絲胺酸。

【0067】 在一個較佳實施例中，與 α 突觸核蛋白結合之抗體或其抗原結合片段包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3，

且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。較佳地，抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0068】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段能夠結合作為單體及呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白。在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白之結合親和力強於對作為單體之 α 突觸核蛋白之結合親和力。其特徵在於對單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)比對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白之解離常數高至少10倍。

【0069】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對

單體 α 突觸核蛋白之解離常數(K_D)小於15nM。在另一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數(K_D)小於10nM。在一個較佳實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白的解離常數(K_D)小於300pM。

【0070】 如本文所使用，術語「 K_D 」係指解離常數，由 K_d 與 K_a 之比率(亦即， K_d/K_a)得到且以莫耳濃度(M)表示。 K_d 及 K_a 分別係指特定抗原-抗體(或其抗原結合片段)相互作用之解離速率及締合速率。抗體之 K_D 值可使用此項技術中充分確立之方法測定。用於測定抗體之 K_D 之方法係藉由使用表面電漿子共振(諸如Biacore®系統，例如本文中之實例中所描述)，使用經分離之天然或重組 α 突觸核蛋白、其合適的融合蛋白/多肽或其原纖維。在一個實例中，親和力係使用如本文中之實例所描述之重組人類 α 突觸核蛋白來量測。對於表面電漿子共振，目標分子係固定於固相上且在沿流槽延伸之移動相中暴露於配位體。若發生配位體結合至固定目標，則局部折射率改變，導致SPR角之變化，其可藉由偵測反射光強度之變化而進行即時監測。可分析SPR信號之變化速率以對於結合反應之締合及解離相產生表觀速率常數。此等值之比給出表觀平衡常數(親和力)(參見例如Wolff等人，*Cancer Res.* 53:2560-65(1993))。

【0071】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對呈原纖維之 α 突觸核蛋白之結合親和力高於對作為單體之 α 突觸核蛋白之結合親和力(亦即較小 K_D)。術語「親和力」係指抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之間的相互作用之強度。

【0072】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對阻斷由呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白誘導之 α 突觸核蛋白聚集具有小於

10nM之 IC_{50} ，較佳地，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對阻斷呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白誘導之 α 突觸核蛋白聚集具有小於5nM之 IC_{50} 。在實例中揭示基於細胞之聚集分析之實例。

【0073】 如本文所用之術語 IC_{50} 係指半最大抑制濃度，其係物質(諸如抗體)在抑制特定生物或生物化學功能，本發明中由 α 突觸核蛋白(較佳呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白)誘導之聚集方面之效果之量度。 IC_{50} 係定量量度，其指示將指定生物過程抑制一半所需之特定物質量。

【0074】 在一個實施例中，在活體外分析中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對由呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白誘導之阻斷 α 突觸核蛋白聚集具有小於10nM之 IC_{50} ，較佳地，根據本發明之抗體或其抗原結合片段對呈原纖維形式之 α 突觸核蛋白誘導之阻斷 α 突觸核蛋白聚集具有小於5nM之 IC_{50} 。

【0075】 根據本發明之抗體或其抗原結合片段不結合 β 突觸核蛋白及/或 γ 突觸核蛋白且對 α 突觸核蛋白具有特異性。

【0076】 如本文所採用之「特異性」意欲指代抗體僅識別對其具有特異性之抗原，或相比於與對其不具有特異性之抗原(γ 及 β 突觸核蛋白)的結合，抗體對對其具有特異性之抗原(例如 α 突觸核蛋白)的結合親和力更高，例如高至少5、6、7、8、9、10倍結合親和力。

【0077】 根據本發明之抗體可使用此項技術中已知之任何適合方法獲得。包括融合蛋白的 α 突觸核蛋白多肽/蛋白質、(以重組方式或天然地)表現多肽之細胞可用以製造特異性識別 α 突觸核蛋白的抗體。多肽可為『成熟』多肽或其生物學活性片段或衍生物。

【0078】 在一個實施例中，多肽(亦即抗原)係人類 α 突觸核蛋白單體

或其片段，較佳如下文實例中所描述。

【0079】 用於免疫宿主之多肽可藉由此項技術中熟知之方法，自包含表現系統之經基因工程改造之宿主細胞製備，或其可自天然生物來源回收。在本申請案中，術語「多肽」包括肽、多肽及蛋白質。除非另外規定，否則此等互換地使用。 α 突觸核蛋白多肽或其片段在一些實例中可係較大蛋白質(諸如融合蛋白，例如與親和標籤或類似者融合之融合蛋白)之部分。

【0080】 在需要對動物進行免疫接種的情況下，可使用熟知且常規的方案，參見例如Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (編)，第4卷，Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986，藉由向動物、較佳非人類動物投與多肽來獲得針對 α 突觸核蛋白多肽產生的抗體。可對許多恆溫動物進行免疫接種，諸如兔、小鼠、大鼠、羊、牛、駱駝或豬。然而，小鼠、兔、豬及大鼠通常最適合。

【0081】 單株抗體可藉由此項技術中已知之任何方法製備，諸如融合瘤技術(Kohler及Milstein, 1975, Nature, 256:495-497)、三源融合瘤(trioma)技術、人類B細胞融合瘤技術(Kozbor等人，1983, Immunology Today, 4:72)及EBV融合瘤技術(Cole等人，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy，第77-96頁，Alan R Liss, Inc., 1985)。

【0082】 用於本發明之抗體亦可使用單淋巴球抗體方法，藉由例如由Babcook, J.等人，1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843-78481；WO92/02551；WO2004/051268及WO2004/106377所描述之方法藉由選殖及表現自經選擇用於產生特異性抗體之單淋巴球產生之免疫球蛋白可變區cDNA來產生。

【0083】 對抗體之篩檢可使用用以量測與 α 突觸核蛋白之結合的分析及/或用以量測在抗體或其片段存在下抑制 α 突觸核蛋白形成原纖維之分析來進行。

【0084】 根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含互補決定區(CDR)，三個來自重鏈且三個來自輕鏈。一般而言，CDR位於一個構架中且一起形成可變區。按照慣例，抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區中之CDR稱為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3且在輕鏈可變區中稱為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3。其在自各鏈之N端至C端之方向上依序編號。

【0085】 CDR係根據Kabat等人設計之系統常規編號。此系統闡述於Kabat等人，1987, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*，美國衛生與人群服務部(US Department of Health and Human Services), NIH, USA (下文稱「Kabat等人(同前文獻)」中。本說明書中使用此編號系統，除非其中另有說明。

【0086】 Kabat殘基名稱不總是直接與胺基酸殘基之線性編號對應。對應於基本可變域結構的縮短或插入結構組分、是否為構架或互補決定區(CDR)，實際線性胺基酸序列含有的胺基酸可比嚴格Kabat編號少或含有其他胺基酸。對於既定抗體，可藉由將抗體序列之同源殘基與「標準」Kabat編號序列比對來確定殘基之正確Kabat編號。

【0087】 根據Kabat編號系統，重鏈可變域之CDR位於殘基31-35 (CDR-H1)、殘基50-65 (CDR-H2)及殘基95-102 (CDR-H3)。然而，根據Chothia (Chothia, C.及Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987))，等效於CDR-H1的環自殘基26延伸至殘基32。因此，除非另外規定，否則如本文所採用之『CDR-H1』旨在指殘基26至35，如Kabat編號系統與

Chothia拓樸環(topological loop)定義之組合所描述。

【0088】 根據Kabat編號系統，輕鏈可變域之CDR位於殘基24-34 (CDR-L1)、殘基50-56 (CDR-L2)及殘基89-97 (CDR-L3)。

【0089】 在一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段包含：輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1、包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1、包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【0090】 可替代地，抗體或抗原結合片段包含：輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 9之CDR-H3。

【0091】 在另一實施例中，抗體或抗原結合片段包含：輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 7之CDR-L1、包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【0092】 在又一實施例中，抗體或抗原結合片段包含：輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 7之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 9之CDR-H3。

【0093】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段可包含培養抗體之動物構架區。舉例而言，若抗體在兔中培養，則其將包含兔抗體之如上文所定義之CDR及構架區，該兔抗體諸如以下抗體：其包含根據SEQ ID NO: 11之輕鏈可變區(其核苷酸序列示於SEQ ID NO: 12中)及根據SEQ ID NO: 13之重鏈可變區(其核苷酸序列示於SEQ ID NO: 14中)。

【0094】 在一個實施例中，抗體可為嵌合、人類化或人類抗體或其片段。

【0095】 嵌合抗體通常係使用重組DNA方法製備。DNA可藉由以人類L及H鏈之編碼序列取代對應的非人類(例如小鼠)H及L恆定區來修飾(Morrison; PNAS 81, 6851 (1984))。

【0096】 人類抗體包含重鏈或輕鏈可變區或全長重鏈或輕鏈，若抗體之可變區或全長鏈獲自使用人生殖系免疫球蛋白基因之系統，則其為特定生殖系序列之「產物」或「來源於」特定生殖系序列。此類系統包括用所關注之抗原使攜帶人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠免疫或用所關注之抗原篩選呈現在噬菌體上之人類免疫球蛋白基因文庫。為人類生殖系免疫球蛋白序列之「產物」或「來源於」人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體或其片段可藉由將人類抗體之胺基酸序列與人類生殖系免疫球蛋白之胺基酸序列進行比較且選擇按序列最接近人類抗體序列(亦即最大一致性%)之人類生殖系免疫球蛋白序列來如此識別。為特定人類生殖系免疫球蛋白序列「之產物」或「來源於」特定人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體可含有與生殖系序列相比因例如天然存在之體細胞突變或有意引入定點突變所致的胺基酸差異。然而，所選人類抗體通常在胺基酸序列上與由

人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少90%一致，且含有當與其他物種之生殖系免疫球蛋白胺基酸序列(例如小鼠生殖系序列)相比時鑑別人類抗體為人類的胺基酸殘基。在某些情況下，人類抗體可在胺基酸序列上與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少60%、70%、80%、90%、或至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。通常，來源於特定人類生殖系序列之人類抗體與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列相比將呈現不超過10個胺基酸差異。在某些情況下，人類抗體可呈現異於由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列之不超過5個，或甚至不超過4、3、2或1個胺基酸差異。

【0097】 人類抗體可藉由熟習此項技術者已知的多種方法生產。人類抗體可藉由融合瘤方法使用人類骨髓瘤或小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株製得(Kozbor, J Immunol; (1984) 133:3001 ; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63頁, Marcel Dekker Inc, 1987)。替代性方法包括使用噬菌體文庫或轉殖基因小鼠，其兩者均利用人類可變區庫(Winter G; (1994) Annu Rev Immunol 12:433-455 , Green LL, (1999) J Immunol Methods 231 :1 1-23)。

【0098】 在本發明之一個較佳實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段經人類化。

【0099】 因此，抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及

b. 重鏈可變區，其包含：

iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；

v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及

vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3，

其中抗體或其抗原結合片段經人類化。較佳地，人類化抗體或其抗原結合片段防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0100】 在SEQ ID NO: 44中，Xaa係天冬醯胺(Asn；N)或精胺酸(Arg；R)。獨立地，在SEQ ID NO: 45中，Xaa係絲胺酸(Ser；S)或天冬醯胺(Asn N)且在SEQ ID NO: 46中，Xaa係天冬醯胺(Asn N)或組胺酸(His；H)。

【0101】 在一個實施例中，人類化抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

a. 輕鏈可變區，其包含：

i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；

ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及

iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及

b. 重鏈可變區，其包含：

iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；

v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及

vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3，

且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中在SEQ ID NO: 44中，Xaa係天冬醯胺(Asn；N)；在SEQ ID NO: 45中，Xaa係絲胺酸(Ser；S)且在SEQ ID NO: 46中，Xaa係天冬醯胺(Asn N)。

【0102】 在一個較佳實施例中，人類化抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3，

且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131。

【0103】 如本文所用，術語「人類化」抗體或其抗原結合片段係指以下抗體或其抗原結合片段：其中重鏈及/或輕鏈含有一或多個來自移植於受體抗體(例如人類抗體)之重鏈及/或輕鏈可變區構架中之供體抗體(例如非人類抗體，諸如小鼠或兔單株抗體)的CDR (視需要包括一或多個經修飾之CDR)。關於綜述，參見Vaughan等人，Nature Biotechnology, 16,

535-539, 1998。在一個實施例中，僅將來自上文所描述之CDR中之任一者的決定特異性的殘基中之一或多個轉移至人類抗體構架而非轉移整個CDR (參見例如，Kashmiri等人，2005, Methods, 36, 25-34)。在一個實施例中，僅將來自上文所描述之CDR中之一或多者的決定特異性的殘基轉移至人類抗體構架。在另一實施例中，僅將來自上文所描述之各CDR的決定特異性的殘基轉移至人類抗體構架。

【0104】 在移植CDR時，關於衍生CDR之供體抗體之類別/類型，可使用任何合適的受體可變區構架序列，包括小鼠、靈長類動物及人類構架區。

【0105】 適當地，根據本發明之人類化抗體具有包含人類受體構架區以及一或多個本文中特定提供之CDR的可變域。因此，在一個實施例中提供結合 α 突觸核蛋白、較佳人類 α 突觸核蛋白之阻斷人類化抗體，其中可變域包含人類受體構架區及非人類供體CDR。

【0106】 可用於本發明之人類構架之實例為KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY及POM (Kabat等人，同前文獻)。舉例而言，KOL及NEWM可用於重鏈，REI可用於輕鏈且EU、LAY及POM可用於重鏈及輕鏈二者。可替代地，可使用人類生殖系序列；此等人類生殖系序列可在<http://www.imgt.org/>處獲得。

【0107】 在根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段中，受體重鏈及輕鏈不必衍生自相同抗體且可視需要包含具有衍生自不同鏈之構架區的複合鏈。

【0108】 根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段之輕鏈的合適構架區衍生自具有SEQ ID NO: 39且其核苷酸序列示於SEQ ID NO: 40中

之人類生殖系IGKV1-16 JK4。

【0109】 根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段之重鏈的合適構架區衍生自具有如SEQ ID NO: 41中所示之序列且其核苷酸序列示於SEQ ID NO: 42中之人類生殖系IGHV3-23 JH4。

【0110】 因此，在一個實施例中，提供人類化抗體或其抗原結合片段，其包含：

- CDR-L1之SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 7中給出之序列；CDR-L2之SEQ ID NO: 2中給出之序列及CDRL3之SEQ ID NO: 3中給出之序列，其中輕鏈構架區衍生自人類生殖系IGKV1-16 JK4；及

- CDR-H1之SEQ ID NO: 4中給出之序列；CDR-H2之SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 8中給出之序列及CDR-H3之SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 9中給出之序列，其中重鏈構架區衍生自人類生殖系IGHV3-23 JH4。

【0111】 在根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段中，構架區可能不具有與受體抗體之序列準確相同之序列。舉例而言，可將異常殘基改變為受體鏈類別或類型中較頻繁存在的殘基。可替代地，可改變在受體構架區中所選擇的殘基以使其對應於在供體抗體中之相同位置出現的殘基(參見Reichmann等人，1998, Nature, 332, 323-324)。此類改變應保持在恢復供體抗體之親和力所必需的最小程度。用於選擇接受體框架區中之可能需要改變的殘基的方案闡述於WO91/09967中。

【0112】 因此，在一個實施例中，構架中之1、2、3、4、5、6、7或8個殘基經替代的胺基酸殘基置換。

【0113】 因此，在一個實施例中，提供一種人類化抗體或其抗原結

合片段，其中至少輕鏈可變域之位置48及72 (參考SEQ ID NO: 15或19)中之每一者處的殘基係供體殘基，參見例如SEQ ID NO: 15、17、19及21中給出之序列。較佳地，輕鏈可變域之殘基48係麩醯胺酸且/或輕鏈可變域之殘基72係麩醯胺酸。

【0114】 更佳地，殘基48及72在根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段之人類化輕鏈可變區中皆為麩醯胺酸。

【0115】 在另一實施例中，提供一種人類化抗體或其抗原結合片段，其中至少重鏈可變域之位置24、47、48、49、73及97 (參考SEQ ID NO: 31或35)或24、47、48、49、78及97 (參考SEQ ID NO: 23及27)中之每一者處的殘基係供體殘基，參見例如SEQ ID NO: 23、25、27、29、31、33、35及37中給出之序列。

【0116】 較佳地，重鏈可變域之殘基24係纈胺酸且/或重鏈可變域之殘基47係酪胺酸且/或重鏈可變域之殘基48係異白胺酸且/或重鏈可變域之殘基49係甘胺酸且/或重鏈可變域之殘基97係精胺酸且/或重鏈可變域之殘基73係絲胺酸且/或重鏈可變域之殘基78係纈胺酸。

【0117】 較佳地，在根據本發明之人類化重鏈可變區中，殘基24係纈胺酸；殘基47係酪胺酸；殘基48係異白胺酸；殘基49係甘胺酸；殘基73係絲胺酸且殘基97係精胺酸。此外，較佳地，在根據本發明之人類化抗體或其抗原結合片段之人類化重鏈可變區中，殘基24係纈胺酸；殘基47係酪胺酸；殘基48係異白胺酸；殘基49係甘胺酸；殘基78係纈胺酸且殘基97係精胺酸。

【0118】 在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：包含SEQ ID NO:15之輕鏈可變區及包含SEQ ID

NO: 31之重鏈可變區。

【0119】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段包含：

- 包含SEQ ID NO:15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23之重鏈可變區；或
- 包含SEQ ID NO:15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 27或35之重鏈可變區；或
- 包含SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23或31之重鏈可變區；或
- 包含SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 27或35之重鏈可變區。

【0120】 在一個實施例中，本發明提供抗體或其抗原結合片段，其包含與本文所揭示之序列80%相似或一致之序列，例如相比於相關序列(例如可變域序列、CDR序列或不包括CDR之可變域序列)之部分或全部85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或一致。在一個實施例中，相關序列係SEQ ID NO: 15。在一個實施例中，相關序列係SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 31。

【0121】 在一個實施例中，本發明提供結合人類 α 突觸核蛋白之抗體或其抗原結合片段，其包含輕鏈，其中輕鏈可變域包含具有與SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 19中給出之序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性或相似性的序列且/或重鏈可變域包含具有與SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35中給出之序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性或相似性的序

列。

【0122】 在一個實施例中，本發明提供結合人類 α 突觸核蛋白之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有與SEQ ID NO: 15中給出之序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或一致的輕鏈可變域但其中抗體或其抗原結合片段具有CDR-L1之SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 7中給出之序列、CDR-L2之SEQ ID NO: 2中給出之序列及CDR-L3之SEQ ID NO: 3中給出之序列。

【0123】 在一個實施例中，本發明提供結合人類 α 突觸核蛋白之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有與SEQ ID NO: 31中給出之序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似或一致的重鏈可變域但其中抗體或其抗原結合片段具有CDR-H1之SEQ ID NO: 4中給出之序列、CDR-H2之SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 8中給出之序列及CDR-H3之SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 9中給出之序列。

【0124】 如本文所用，「一致性」表示在所比對序列之任何特定位置，序列之間的胺基酸殘基一致。如本文所用，「相似性」表示在所比對序列之任何特定位置，序列之間的胺基酸殘基之類型相似。舉例而言，可用白胺酸取代異白胺酸或纈胺酸。通常可以彼此取代的其他胺基酸包括(但不限於)：

- 苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸(具有芳族側鏈之胺基酸)；
- 離胺酸、精胺酸及組胺酸(具有鹼性側鏈之胺基酸)；
- 天冬胺酸及麩胺酸(具有酸性側鏈之胺基酸)；
- 天冬醯胺及麩醯胺(具有醯胺側鏈之胺基酸)；及

- 半胱胺酸及甲硫胺酸(具有含硫側鏈之胺基酸)。

【0125】 一致性及相似性之程度可容易地計算(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 部分1, Griffin, A.M.及Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M.及Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991; 可購自NCBI的BLAST™軟體(Altschul, S.F.等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W.及States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L.等人, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F.等人, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J.及Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656)。

【0126】 在一個實施例中, 根據本發明之抗原結合片段可為但不限於Fab、經修飾之Fab、Fab'、經修飾之Fab'、F(ab')₂、Fv、單域抗體(例如, VH或VL或VHH)、scFv、dsscFv二價抗體、三價抗體或四價抗體、雙scFv、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體以及以上各者中之任一者的抗原決定基-結合片段(參見例如Holliger及Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair及Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217)。用於產生及製造此等抗體片段之方法為此項技術中所熟知(參見例如Verma等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)。用於本發明之其他抗體片段包括WO2005/003169、

WO2005/003170及WO2005/003171中所描述之Fab及Fab'片段。多價抗體可包含多重特異性，例如雙特異性，或可為單特異性(參見例如WO 92/22853、WO05/113605、WO2009/040562及WO2010/035012)。

【0127】 替代的抗原結合片段包含連接至兩個scFv或dsscFv之Fab，各scFv或dsscFv結合相同或不同標靶(例如一個scFv或dsscFv結合治療靶點且一個scFv或dsscFv藉由結合例如白蛋白增加半衰期)。該等抗體片段描述於國際專利申請公開案第WO2015/197772號中，其以全文引用之方式併入本文中且尤其參照抗體片段之討論。

【0128】 在另一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段係 α 突觸核蛋白結合融合蛋白之部分，其包含例如本發明之融合抗原結合片段，例如Fab或Fab'片段，及一或兩種直接地或間接連接至其上之單域抗體(dAb)，例如如WO2009/040562、WO2010035012、WO2011/030107、WO2011/061492及WO2011/086091中所描述，其皆以引用之方式併入本文中。在一個實施例中，融合蛋白包含視情況藉由二硫鍵連接之兩種結構域抗體，例如呈可變重鏈(VH)及可變輕鏈(VL)對。

【0129】 在一個實施例中，融合蛋白之Fab或Fab'要素具有與單域抗體或抗體相同或相似的特異性。在一個實施例中，Fab或Fab'具有與單域抗體不同的特異性，換言之，融合蛋白係多價的。在一個實施例中，根據本發明之多價融合蛋白具有白蛋白結合位點，例如其中的VH/VL對提供白蛋白結合位點。

【0130】 本發明之抗體分子之恆定區結構域若存在則可根據抗體分子之建議功能及尤其係可能需要的效應功能來選擇。舉例而言，恆定區結構域可為人類IgA、IgD、IgE、IgG或IgM結構域。特定言之，當抗體分

子意圖用於治療用途且需要抗體效應功能時，可使用人類IgG恆定區結構域，尤其係IgG1及IgG3同型。可替代地，當抗體分子意欲用於達成治療目的且不需要抗體效應功能時可使用IgG2及IgG4同型。應瞭解亦可使用此等恆定區結構域之序列變異體。舉例而言，可使用如Angal等人(Angal等人，Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108)中所述，位置241之絲胺酸已變成脯胺酸且在本文中稱為IgG4P之IgG4分子。

【0131】 在一個實施例中，抗體係全長抗體，較佳選自IgG1及IgG4或IgG4P。

【0132】 因此，本發明提供全長人類化抗體，其結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3，

其中人類化抗體防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132且其中該抗體係IgG4P同功異型物。

【0133】 在SEQ ID NO: 44中，Xaa係天冬醯胺(Asn；N)或精胺酸(Arg；R)。獨立地，在SEQ ID NO: 45中，Xaa係絲胺酸(Ser；S)或天冬醯胺(Asn N)且在SEQ ID NO: 46中，Xaa係天冬醯胺(Asn N)或組胺酸(His；H)。

【0134】 在一個較佳實施例中，全長人類化抗體，其結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3，

且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132且其中該抗體係IgG4P同功異型物，其中在SEQ ID NO: 44中，Xaa係天冬醯胺(Asn；N)；在SEQ ID NO: 45中，Xaa係絲胺酸(Ser；S)且在SEQ ID NO: 46中，Xaa係天冬醯胺(Asn N)。

【0135】 在一個最佳實施例中，全長人類化抗體，其結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3，

且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且較佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0136】 熟習此項技術者亦瞭解抗體可進行多種轉譯後修飾。此等修飾之類型及程度常常視用於表現抗體的宿主細胞株以及培養條件而定。此類修飾可包括在糖基化、甲硫胺酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬胺酸鹽異構化及天冬醯胺脫醯胺方面之變化。常見修飾為由於羧基胺酶作用而損失羧基端鹼性殘基(諸如離胺酸或精胺酸)(如Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995中所述)。因此，可缺乏抗體重鏈之C端離胺酸。

【0137】 在一個實施例中，抗體之C端胺基酸在轉譯後修飾期間裂解。

【0138】 在一個實施例中，抗體之N端胺基酸在轉譯後修飾期間裂解。

【0139】 在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段包含根據SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 31之重可變區。舉例而言，抗體可為全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 31之重鏈可變區。在另一實施例中，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 17之輕鏈及根據SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 33之重鏈。在又一實施例中，抗原結合片段係Fab'，其包含根據SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 31之重鏈可變區。

【0140】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段包含根據SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區。舉例而言，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區。在另一實施例中，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 17之輕鏈及根據SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 37之重鏈。在又一實施例中，抗原結合片段係Fab'，其包含根據SEQ ID NO: 15之輕可變區及選自SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之重可變區。

【0141】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段包含根據SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區。舉例而言，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區。在另一實施例中，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 21之輕鏈及根據SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 37之重鏈。在又一實施例中，抗原結合片段係Fab'，其包含根據SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO:

27或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區。

【0142】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段包含根據SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 31之重鏈可變區。舉例而言，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 31之重鏈可變區。在另一實施例中，抗體係全長IgG4抗體，其包含根據SEQ ID NO: 21之輕鏈及根據SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 33之重鏈。在又一實施例中，抗原結合片段係Fab'，其包含根據SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區及選自SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 33之重鏈可變區。

【0143】 在一較佳實施例中，抗體結合 α 突觸核蛋白且係全長IgG4抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重鏈可變區。更佳地，抗體防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且甚至更佳地抗體結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0144】 在另一較佳實施例中，抗體結合 α 突觸核蛋白且係全長IgG4抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。更佳地，抗體防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且甚至更佳地抗體結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0145】 此外，本發明亦提供一種抗體或其抗原結合片段，其與根據本發明之抗體或其抗原結合片段競爭結合 α 突觸核蛋白。

【0146】 因此，本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其藉由交叉阻斷本發明之抗體或其抗原結合片段或經本發明之抗體或其抗原結合片段交叉阻斷與根據本發明之抗體或抗原結合片段競爭結合 α 突觸核蛋白；及尤其包含以下之抗體或其抗原結合片段：包含SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區及包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區。

【0147】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段競爭結合與根據本發明之抗體或其抗原結合片段相同之抗原決定基處的 α 突觸核蛋白，且尤其與抗體或其抗原結合片段(其具有包含SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區及包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區)競爭結合 α 突觸核蛋白之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含至少M127、P128、S129、E130及E131，較佳殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131。

【0148】 在一個實施例中，此類抗體或其抗原結合片段與根據本發明之抗體或其片段競爭且具有具有與根據SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 35之序列至少80%一致性或相似性之重鏈可變區；且/或具有具有與根據SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 19之序列至少80%一致性或相似性之輕鏈可變區。

【0149】 競爭抗體可使用此項技術中之任何適合方法鑑別，例如藉由使用競爭ELISA或BIAcore分析，其中交叉阻斷抗體與人類 α 突觸核蛋白之結合防止本發明之抗體之結合或反之亦然。此類競爭分析可使用經分離之天然或重組 α 突觸核蛋白或適合之融合蛋白/多肽。在一個實例中，使

用重組人類 α 突觸核蛋白(SEQ ID NO: 10)來量測競爭。在一個實例中，根據下文中之實例使用N端或C端處標記之重組人類 α 突觸核蛋白(例如具有TEV識別位點之6xHis標籤融合)。在另一實例中，使用重組人類 α 突觸核蛋白原纖維來量測競爭。

【0150】 在一個實施例中，競爭抗體係全人類或人類化的。在一個實施例中，競爭抗體對人類 α 突觸核蛋白之親和力為100pM或更小、較佳50pM或更小。

【0151】 生物分子，諸如抗體或片段，含有酸性及/或鹼性官能基，由此給予分子淨正或負電荷。總體上「觀測到」的電荷之量將視實體之絕對胺基酸序列、3D結構中帶電基團之局部環境及分子之環境條件而定。等電點(pI)係特定分子或其溶劑可進入表面不攜帶淨電荷時的pH。在一個實例中，根據本發明之抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段可經工程改造以具有合適的等電點。此可能產生具有更穩固特性，尤其係適合溶解性及/或穩定性概況及/或改善的純化特徵的抗體及/或片段。

【0152】 因此，在一個態樣中，本發明提供人類化抗體或其抗原結合片段，其結合 α 突觸核蛋白且經工程改造以具有不同於最初鑑別之抗體之等電點的等電點。抗體可能例如藉由替代胺基酸殘基進行改造，諸如用一或多個鹼性胺基酸殘基替代酸性胺基酸殘基。可替代地，可引入鹼性胺基酸殘基或可移除酸性胺基酸殘基。可替代地，若分子具有不可接受地高的pI值，則可視需要引入酸性殘基以降低pI。當調控pI時必須注意保持抗體或片段之所期望的活性係重要的。因此，在一個實施例中，經工程改造之抗體或其抗原結合片段具有與「未經修飾」之抗體或片段相同或基本上相同的活性。

【0153】 可使用諸如**ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html 及http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html之程式預測抗體或片段之等電點。

【0154】 應瞭解，本發明提供之抗體之親和力可使用此項技術中已知之任何適合方法改變。本發明因此亦係關於本發明之抗體分子之變異體，其具有對 α 突觸核蛋白，尤其人類 α 突觸核蛋白之改善親和力。此類變異體可以藉由多種親和力成熟方案獲得，包括使CDR突變(Yang等人，J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、鏈混排(Marks等人，Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、使用大腸桿菌之突變株(Low等人，J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996)、DNA混排(Patten等人，Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、噬菌體展示(Thompson等人，J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996)及有性PCR(Cramer等人，Nature, 391, 288-291, 1998)。Vaughan等人(前述)論述了此等親和力成熟方法。

【0155】 在本發明內，藉由IOTA (WO2014198951)進行親和力成熟。

【0156】 視需要，可使根據本發明之抗體或其抗原結合片段與一或多個效應分子結合。應瞭解，效應分子可包含單一效應分子或如此連接以形成可附接於本發明之抗體或其抗原結合片段之單一部分的兩種或更多種此類分子。在需要獲得連接至效應分子之抗體片段的情況下，此可藉由其中抗體片段直接或經由偶合劑連接至效應分子之標準化學或重組DNA程序來製備。使此類效應分子與抗體結合的技術為此項技術中所熟知的(參見Hellstrom等人，Controlled Drug Delivery，第2版，Robinson等人編，1987，第623-53頁；Thorpe等人，1982, Immunol. Rev., 62:119-58及

Dubowchik等人，1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123)。特定化學程序包括例如WO 93/06231、WO 92/22583、WO 89/00195、WO 89/01476及WO 03/031581中所述之程序。可替代地，在效應分子為蛋白質或多肽之情況下，鍵可使用重組DNA程序，例如如WO 86/01533及EP0392745中所述來實現。

【0157】 如本文所使用之術語效應分子包括例如抗腫瘤劑、藥物、毒素、生物學活性蛋白質(例如酶)、其他抗體或抗體片段、合成的或天然存在之聚合物、核酸及其片段(例如DNA、RNA及其片段)、放射性核素(尤其放射性碘)、放射性同位素、螯合金屬、奈米顆粒及報導基團，諸如螢光化合物或可藉由NMR或ESR光譜法偵測的化合物。

【0158】 效應分子之實例可包括細胞毒素或細胞毒性劑，包括任何對細胞不利(例如殺死)之試劑。實例包括康普瑞汀(combrestatin)、海兔毒素(dolastatin)、埃博黴素(epothilone)、星形孢菌素(staurosporin)、類美登素(maytansinoid)、海綿素(spongistatin)、根瘤菌素(rhizoxin)、軟海綿素(halichondrin)、桿孢菌素(roridin)、海米斯林(hemiasterlin)、紫杉醇(taxol)、細胞遲緩素B (cytochalasin B)、短桿菌素D (gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicin)、小紅莓(doxorubicin)、道諾比星、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D (actinomycin D)、1-去氫罌固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)及其

類似物或同源物。

【0159】 效應分子亦包括(但不限於)抗代謝物(例如甲胺喋呤、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫代鳥嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、達卡巴嗪(decarbazine)、烷基化劑(例如甲氮芥(mechlorethamine)、噻替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法侖(melphalan)、卡莫司汀(carmustine, BSNU)及洛莫司汀(lomustine, CCNU)、環硫磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、鏈佐黴素(streptozotocin)、絲裂黴素C及順式-二氯二胺鉑(II)(DDP)、順鉑(cisplatin)、蔥環黴素(anthracycline)(例如道諾比星(以前為道諾黴素)及小紅莓)、抗生素(例如放線菌素d (以前為放射菌素)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素、安耨黴素(anthramycin, AMC)、卡奇黴素或倍癌黴素(duocarmycin))及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。

【0160】 其他效應分子可包括螯合放射性核素，諸如 ^{111}In 及 ^{90}Y 、 Lu^{177} 、 Bi^{213} 、 Pb^{212} 、 Bi^{213} 及 Po^{210} ；或藥物，諸如(但不限於)烷基磷酸膽鹼、拓樸異構酶I抑制劑、類紫杉醇及蘇拉明(suramin)。

【0161】 其他效應分子包括蛋白質、肽及酶。所關注之酶包括(但不限於)蛋白水解酶、水解酶、裂解酶、異構酶、轉移酶。所關注之蛋白質、多肽及肽包括(但不限於)免疫球蛋白、毒素(諸如相思子毒素、蓖麻毒素A、綠膿桿菌外毒素或白喉毒素)、蛋白質(諸如胰島素、腫瘤壞死因子、 α -干擾素、 β -干擾素、神經生長因子、血小板衍生生長因子或組織纖維蛋白溶酶原活化因子)、血栓性劑或抗血管生成劑(例如血管生長抑素或內皮生長抑素)或生物反應調節劑(諸如淋巴激素、介白素-1 (IL-1)、介白

素-2 (IL-2)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、粒細胞群落刺激因子(G-CSF)、神經生長因子(NGF)或其他生長因子及免疫球蛋白)。

【0162】 其他效應分子可包括可用於例如診斷中之可偵測物質。可偵測物質之實例包括各種酶、輔基、螢光物質、發光物質、生物發光物質、放射性核素、正電子發射金屬(用於正電子發射斷層攝影法)及非放射性順磁性金屬離子。關於適用於診斷學中之可與抗體結合的金屬離子，一般參見美國專利第4,741,900號。適合酶包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適合輔基包括抗生蛋白鏈菌素、抗生物素蛋白及生物素；適合螢光物質包括傘酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯及藻紅素；適合發光物質包括魯米諾(luminol)；適合生物發光物質包括螢光素酶、螢光素及水母素(aequorin)；且適合放射性核素包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 及 ^{99}Tc 。

【0163】 在另一實例中，效應分子可增加抗體在活體內之半衰期，及/或降低抗體之免疫原性及/或增強抗體跨越上皮障壁傳遞至免疫系統。此類型適合效應分子之實例包括聚合物、白蛋白、白蛋白結合蛋白或白蛋白結合化合物，諸如WO05/117984中描述之彼等化合物。

【0164】 在效應分子係聚合物之情況下，其一般可以為合成或天然存在之聚合物，例如視情況經取代之直鏈或分支鏈聚伸烷基、聚伸烯基或聚氧化烯聚合物，或分支或未分支多醣，例如同多醣或雜多醣。

【0165】 可存在於上述合成聚合物上的視情況存在之特定取代基包括一或多個羥基、甲基或甲氧基。

【0166】 合成聚合物之特定實施例包括視情況經取代之直鏈或分支鏈聚(乙二醇)、聚(丙二醇)聚(乙烯醇)或其衍生物，尤其視情況經取代之

聚(乙二醇)，諸如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

【0167】 特定天然存在之聚合物包括乳糖、直鏈澱粉、聚葡萄糖、肝糖或其衍生物。

【0168】 在一個實施例中，聚合物為白蛋白或其片段，諸如人類血清白蛋白或其片段。

【0169】 如本文所使用之「衍生物」意欲包括反應性衍生物，例如巯基選擇性反應性基團，諸如順丁烯二醯亞胺及類似者。反應性基團可直接或經由連接子區段連接於聚合物。應瞭解此類基團之殘基在一些情況下將作為抗體片段與聚合物之間的鍵聯基團形成產物之一部分。

【0170】 聚合物尺寸可根據需要變化，但平均分子量通常在500 Da至50000 Da之範圍內，例如5000 Da至40000 Da，諸如20000 Da至40000 Da。聚合物尺寸可尤其基於產物之意欲用途，例如定位至某些組織，諸如腫瘤或延長循環半衰期之能力而選擇(評述參見Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545)。因此，舉例而言，在產物意欲離開循環且滲透組織，例如用於治療腫瘤之情況下，宜使用例如分子量為大約5000Da之小分子量聚合物。對於產物仍然在循環中之應用，宜使用較高分子量聚合物，例如分子量在20000Da至40000Da範圍內。

【0171】 適合之聚合物包括聚伸烷基聚合物，諸如聚(乙二醇)或，尤其甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物，及尤其分子量在約15000Da至約40000Da範圍內之聚合物。

【0172】 在一個實例中，根據本發明之抗體或抗原結合片段附接於聚(乙二醇) (PEG)部分。在一個特定實施例中，根據本發明之抗原結合片段及PEG分子可經由定位於抗體片段中之任何可用胺基酸側鏈或末端胺基

酸官能基(例如任何游離胺基、亞胺基、巰基、羥基或羧基)附接。此類胺基酸可天然存在於抗體片段中或可使用重組DNA方法經工程改造至片段中(參見例如US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971、WO2008/038024)。在一個實例中,本發明之抗體分子為經修飾之Fab片段,其中該修飾為一或多個胺基酸添加至其重鏈之C端以允許效應分子連接。適當地,附加之胺基酸形成含有一或多個效應分子可附接之半胱胺酸殘基的經修飾之鉸鏈區。可利用多個位點連接兩個或超過兩個PEG分子。

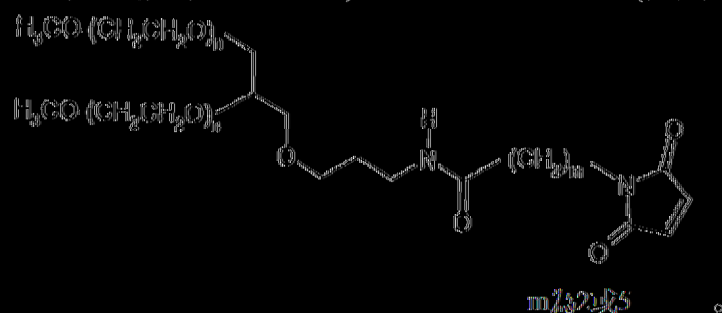
【0173】 PEG分子宜經由位於抗體片段中的至少一個半胱胺酸殘基之巰基共價連接。連接至經修飾之抗體片段的每個聚合物分子可共價連接至位於片段中之半胱胺酸殘基之硫原子。共價鍵一般為二硫鍵或尤其硫-碳鍵。在巰基用作連接點之情況下,可使用適當活化之效應分子,例如巰基選擇性衍生物,諸如順丁烯二醯亞胺及半胱胺酸衍生物。活化聚合物可用作製備如上所述之經聚合物修飾之抗體片段中的起始物質。活化聚合物可為含有巰基反應基之任何聚合物,諸如 α -鹵基羧酸或酯,例如碘乙醯胺、醯亞胺(例如順丁烯二醯亞胺)、乙烯基砜或二硫化物。此類起始物質可市購(例如購自Nektar,前身為Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA)或可使用習知化學程序由市售起始物質製備。特定PEG分子包括20K甲氧基-PEG-胺(可獲自Nektar,以前為Shearwater; Rapp Polymere; 以及SunBio)及M-PEG-SPA(可獲自Nektar,以前為Shearwater)。

【0174】 在一個實施例中,抗體係聚乙二醇化的經修飾Fab片段、Fab'片段或二Fab (diFab),亦即有PEG(聚(乙二醇))共價連接於其上,例如根據揭示於EP0948544或EP1090037中之方法[亦參見

[Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications], 1992, J. Milton Harris (編), Plenum Press, New York, [Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications], 1997, J. Milton Harris及S. Zalipsky (編), American Chemical Society, Washington DC及 [Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences], 1998, M. Aslam及A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]。在一個實例中，PEG連接於銜鏈區中之半胱胺酸。在一個實例中，經PEG修飾之Fab片段具有共價連接於經修飾之銜鏈區中單一巰基的順丁烯二醯亞胺基團。離胺酸殘基可共價連接至順丁烯二醯亞胺基且離胺酸殘基上之胺基中之每一者可連接分子量為大約20,000Da之甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此連接於Fab片段之PEG的總分子量可為大約40,000Da。

[0175] 特定PEG分子包括經N,N'-雙(甲氧基聚(乙二醇) MW 20,000)修飾之離胺酸的2-[3-(N-順丁烯二醯亞胺基)丙醯胺基]乙基醯胺，亦稱為PEG2.MAL40K (可獲自Nektar，以前為Shearwater)。

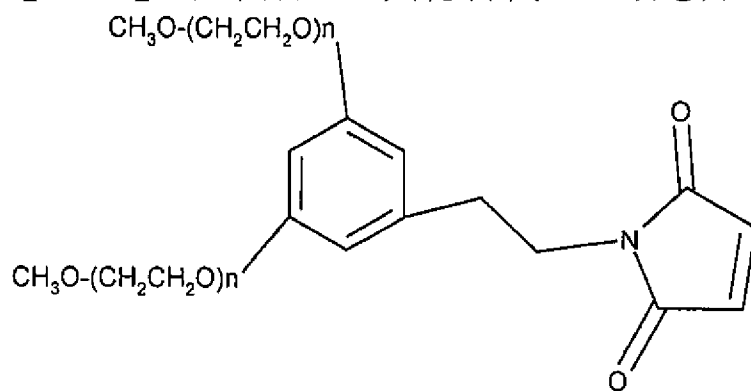
[0176] PEG連接基團之替代來源包括NOF，其供應GL2-400MA3 (其中以下結構中之m為5)及GL2-400MA (其中m為2)，且n大約為450：



[0177] 換言之，各PEG為約20,000Da。

【0178】 因此，在一個實施例中，PEG為2,3-雙(甲基聚氧乙烯-氧基)-1-1-[3-(6-順丁烯二醯亞胺基-1-側氧基己基)胺基]丙基氧基}己烷(2臂分支鏈PEG，-CH₂)₃NHCO(CH₂)₅-MAL，M_w 40,000，稱為SUNBRIGHT GL2-400MA3。

【0179】 以下類型之其他替代PEG效應分子：



可獲自Dr Reddy、NOF

及Jenkem。

【0180】 在一個實施例中，根據本發明之Fab或Fab'與PEG分子結合。

【0181】 在一個實施例中，提供聚乙二醇化(例如具有本文中所述之PEG之)抗體，其經由鏈中之胺基酸226處或大約胺基酸226處(例如重鏈之胺基酸226 (藉由序列編號)，例如SEQ ID NO: 33之胺基酸223)之半胱胺酸胺基酸殘基連接。

【0182】 在一個實施例中，本發明提供一種Fab'PEG分子，其包含一或多種PEG聚合物，例如1或2種聚合物，諸如40kDa聚合物或聚合物。

【0183】 根據本發明之Fab'-PEG分子可尤其有利，因為其具有與Fc片段無關之半衰期。在一個實施例中，提供結合於諸如PEG分子、澱粉分子或白蛋白分子之聚合物之Fab'。在一個實施例中，提供結合於諸如PEG分子、澱粉分子或白蛋白分子之聚合物之scFv。在一個實施例中，根據本

發明之Fab或Fab'與人類血清白蛋白結合。在一個實施例中，抗體或片段結合於澱粉分子，例如以增加半衰期。澱粉結合於蛋白質之方法如US 8,017,739中所述，以引用的方式併入本文中。

【0184】 本發明亦提供一種經分離聚核苷酸，其編碼根據本發明之抗體或其抗原結合片段。根據本發明之經分離聚核苷酸可包含合成DNA，其例如藉由化學處理、cDNA、基因組DNA或其任何組合製備。

【0185】 分子生物學之標準技術可用於製備編碼本發明之抗體或其抗原結合片段之DNA序列。所需DNA序列可使用寡核苷酸合成技術完全或部分合成。適當時可使用定點突變誘發及聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction；PCR)技術。

【0186】 在一個實施例中，根據本發明之經分離聚核苷酸編碼：

a. 輕鏈可變區，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 20至少90%一致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 16或20；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 20組成；

b. 重鏈可變區，其中該聚核苷酸：

i. 與SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 36至少90%一致；或

ii. 包含SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 36；或

iii. 基本上由SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 36組成；

c. 輕鏈，其中該聚核苷酸：

- i. 與SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22至少90%一致；或
- ii. 包含SEQ ID NO: 18或22；或
- iii. 基本上由SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 22組成；
- d. 重鏈，其中該聚核苷酸：
 - i. 與SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 30或SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 38至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 30或SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 38；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 30或SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 38組成；
- e. 輕鏈可變區，其中該聚核苷酸：
 - i. 與SEQ ID NO: 12至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 12；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 12組成；
- f. 重鏈可變區，其中該聚核苷酸：
 - i. 與SEQ ID NO: 14至少90%一致；或
 - ii. 包含SEQ ID NO: 14；或
 - iii. 基本上由SEQ ID NO: 14組成。

【0187】 在一個實施例中，本發明提供一種經分離聚核苷酸，其編碼本發明之抗體Fab'片段或IgG1或IgG4抗體的重鏈，包含SEQ ID NO: 24、28、32或36中給出之序列。亦提供一種經分離聚核苷酸，其編碼本發明之抗體Fab'片段或IgG1或IgG4抗體之輕鏈，包含SEQ ID NO: 16或20中給出之序列。

【0188】 在另一實施例中，本發明提供一種經分離聚核苷酸，其編碼本發明之IgG4(P)抗體之重鏈及輕鏈，其中編碼重鏈之聚核苷酸包含SEQ ID NO: 26、30、34或38中給出之序列且編碼輕鏈之聚核苷酸包含SEQ ID NO: 18或22中給出之序列。

【0189】 本發明亦提供選殖或表現載體，其包含一或多種本文中所述之聚核苷酸。在一個實例中，根據本發明之選殖或表現載體包含一或多種經分離之聚核苷酸，該經分離之聚核苷酸包含選自SEQ ID NO: 16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36或38之序列。

【0190】 可構築載體之一般方法、轉染方法及培養方法為熟習此項技術者所熟知。就此而言，參考「Current Protocols in Molecular Biology」，1999, F. M. Ausubel (編), Wiley Interscience, New York及由Cold Spring Harbor Publishing出版的Maniatis Manual。

【0191】 亦提供一種宿主細胞，其包含根據本發明之一或多種經分離聚核苷酸序列或包含編碼本發明之抗體之一或多種經分離聚核苷酸序列的一或多種選殖或表現載體。任何適合之宿主細胞/載體系統均可用於表現編碼本發明之抗體或其抗原結合片段之聚核苷酸序列。可使用細菌，例如大腸桿菌及其他微生物系統，或亦可使用真核(例如哺乳動物的)宿主細胞表現系統。適合哺乳動物宿主細胞包括CHO、骨髓瘤或融合瘤細胞。

【0192】 用於本發明之中國倉鼠卵巢(CHO細胞)的適合類型可包括CHO及CHO-K1細胞，包括dhfr- CHO細胞，諸如可用於DHFR可選標記物之CHO-DG44細胞及CHO-DXB11細胞或可用於麩醯胺酸合成酶可選標記物之CHOK1-SV細胞。用於表現抗體之其他細胞類型包括淋巴球性細胞株，例如NSO骨髓瘤細胞及SP2細胞、COS細胞。宿主細胞可用根據本

發明之經分離聚核苷酸序列或表現載體穩定轉型或轉染。

【0193】 在一個實施例中，根據本發明之宿主細胞係用表現載體穩定轉染之CHO-DG44細胞，該表現載體包含本發明之經分離聚核苷酸序列，較佳包含根據SEQ ID NO: 18及26或SEQ ID NO: 18及34或SEQ ID NO: 18及30 SEQ ID NO: 18及38之經分離聚核苷酸序列。

【0194】 本發明亦提供一種用於產生根據本發明之抗體或其抗原結合片段的方法，其包含在適用於產生根據本發明之抗體或其抗原結合片段之條件下培養根據本發明之宿主細胞，及分離該抗體或其抗原結合片段。

【0195】 抗體或其抗原結合片段可僅包含重鏈或輕鏈多肽，在此情況下僅需使用重鏈或輕鏈多肽編碼序列轉染宿主細胞。為了產生包含重鏈及輕鏈兩者之抗體或其抗原結合片段，細胞株可用兩種載體轉染，第一載體編碼輕鏈多肽且第二載體編碼重鏈多肽。可替代地，可使用單一載體，載體包括編碼輕鏈及重鏈多肽之序列。

【0196】 因此，提供一種用於培養宿主細胞且表現抗體或其片段、分離該抗體或其片段且視情況將其純化以得到分離之抗體或片段的方法。在一個實施例中，該方法進一步包含將效應分子結合於分離之抗體或片段，例如結合於尤其如本文所述之PEG聚合物的步驟。

【0197】 因此，在一個實施例中，提供經純化之抗 α 突觸核蛋白抗體或其片段，例如人類化抗體或其片段，尤其根據本發明之抗體或其片段，基本上自內毒素及/或宿主細胞蛋白質或DNA純化，尤其不含或基本上不含內毒素及/或宿主細胞蛋白質或DNA。

【0198】 基本上不含內毒素一般意指每毫克抗體產物內毒素含量為1 EU或更低，諸如每毫克產物0.5或0.1 EU。

【0199】基本上不含宿主細胞蛋白質或DNA一般意指每毫克抗體產物宿主細胞蛋白質及/或DNA含量為400 μg 或更低，諸如100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 或更低，尤其適當時20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

【0200】因為本發明之抗體適用於治療、診斷及/或防治病理病狀，諸如 α 突觸核蛋白病，所以本發明亦提供一種醫藥或診斷組合物，其包含根據本發明之抗體或其抗原結合片段以及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑中之一或多者。

【0201】較佳地，醫藥或診斷組合物包含人類化抗體，該人類化抗體結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3。

【0202】更佳地，醫藥或診斷組合物包含人類化抗體，該人類化抗體結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及

- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【0203】 在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段係單一活性成分。在另一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段係與一或多種額外活性成分組合。可替代地，醫藥組合物包含根據本發明之抗體或其抗原結合片段，其係單一活性成分且其可與其他試劑、藥物或激素組合(例如同時、依序或分開)單獨地向患者投與。

【0204】 在另一實施例中，醫藥組合物包含抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 15或19之輕鏈可變區且包含SEQ ID NO: 23、27、31或35、例如SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 31之重鏈可變區。

【0205】 較佳地，本發明提供醫藥組合物，其包含抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及SEQ ID NO: 31之重鏈可變區。

【0206】 根據本發明之醫藥組合物宜可適當地向患者投與以鑑別所需之治療有效量。如本文所用，術語「治療有效量」係指治療、改善或預防靶向疾病或病狀或展現可偵測之治療或預防效果所需要的治療劑之量。關於任何抗體，治療有效量可最初在細胞培養分析中或在動物模型中，通常在啮齒動物、兔、狗、豬或靈長類中估算。動物模型亦可用於確定投與之適當濃度範圍及途徑。該等資訊可隨後用於確定適用於投與人類之劑量及途徑。

【0207】 人類個體之精確治療有效量將視疾病狀態之嚴重程度、個體之整體健康、個體之年齡、體重及性別、飲食、投藥之時間及頻率、藥物組合、反應敏感性及對療法之耐受性/反應而定。此量可以藉由常規實驗確定且在臨床醫師之判斷內。一般而言，治療有效量將為0.01 mg/kg至500 mg/kg，例如0.1 mg/kg至200 mg/kg，諸如100 mg/Kg。醫藥組合物宜呈每劑含有預定量之本發明之活性劑的單位劑型呈現。

【0208】 治療組合物中醫藥學上可接受之載劑可另外含有液體，諸如水、生理食鹽水、丙三醇及乙醇。另外，諸如濕潤劑或乳化劑或pH緩衝物質之輔助物質可存在於此類組合物中。此等載劑使得醫藥組合物能夠調配成錠劑、丸劑、糖衣藥丸、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液及懸浮液，以便患者攝入。

【0209】 適合之投藥形式包括適用於非經腸投藥之形式，例如藉由注射或輸注，例如藉由快速注射或連續輸注、靜脈內、可吸入或皮下形式。在產品用於注射或輸注的情況下，其可採用於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液的形式且其可含有調配試劑，諸如懸浮劑、防腐劑、穩定劑及/或分散劑。可替代地，根據本發明之抗體或其抗原結合片段可呈無水形式，以在與合適的無菌液體一起使用之前復原。亦可製備適合於在注射前溶解或懸浮於液體媒劑中之固體形式。

【0210】 一旦調配，本發明之組合物可直接投與個體。因此，本文提供根據本發明之抗體或其抗原結合片段用於製造藥劑之用途。

【0211】 待治療之個體可為動物。較佳地，根據本發明之醫藥組合物經調適用於向人類個體投與。

【0212】 因此，在另一態樣中，本發明提供用於療法之抗體或其抗

原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3。

【0213】 較佳地，抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0214】 在一較佳實施例中，用於療法之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係以下抗體或其抗原結合片段：其結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 1之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：

- iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
- v. 包含SEQ ID NO: 5之CDR-H2及
- vi. 包含SEQ ID NO: 6之CDR-H3。

【0215】 較佳地，抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0216】 特定言之，在療法中之用途包含用於治療一或多種 α 突觸核蛋白病。

【0217】 在又另一態樣中，本發明提供治療患者中之一或多種突觸核蛋白病之方法，其包含向該患者投與治療有效量之根據本發明之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

- a. 輕鏈可變區，其包含：
 - i. 包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及
 - iii. 包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及
- b. 重鏈可變區，其包含：
 - iv. 包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；
 - v. 包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及
 - vi. 包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3。

【0218】 較佳地，抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸

核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0219】 在一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係用於治療一或多種 α 突觸核蛋白病，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

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

b. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【0220】 較佳地，此抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0221】 在另一較佳實施例中，本發明提供治療患者中之一或多種 α 突觸核蛋白病之方法，其包含向該患者投與治療有效量之根據本發明之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

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

b. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【0222】 較佳地，抗體或其抗原結合片段經人類化且防止由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集，且更佳地結合 α 突觸核蛋白上之抗原決定基，該抗原決定基參考SEQ ID NO: 10包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131，其中該抗原決定基視情況包含A124及G132。

【0223】 可替代地，抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係用於療法或用於治療一或多種 α 突觸核蛋白病且係包含以下之抗體或其抗原結合片段：

a. 輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 7之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 9之CDR-H3；或

b. 包含SEQ ID NO: 15或19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕鏈及包含SEQ ID NO:

25或SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 37之重鏈。

【0224】 在本發明之另一實施例中，治療患者中之一或多種 α 突觸核蛋白病之方法包含向該患者投與治療有效量之根據本發明之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

a. 輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 7之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 9之CDR-H3；或

b. 包含SEQ ID NO: 15或19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕鏈及包含SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 37之重鏈。

【0225】 根據本發明之 α 突觸核蛋白病包含但不限於帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。較佳地， α 突觸核蛋白病係帕金森氏病(PD)。

【0226】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係用於治療帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森

氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳帕金森氏病(PD)，且係包含以下之抗體或其抗原結合片段：

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

b. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【0227】 在另一實施例中，抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物係用於治療帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳帕金森氏病(PD)，且係包含以下之抗體或其抗原結合片段：

a. 輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 7之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 9之CDR-H3；或

b. 包含SEQ ID NO: 15或19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕鏈及包含SEQ ID NO:

25或SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 37之重鏈。

【0228】 在另一實施例中，提供一種治療患者中之帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳帕金森氏病(PD)的方法，其包含向該患者投與治療有效量之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

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

b. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【0229】 在另一實施例中，治療患者中之帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳帕金森氏病(PD)的方法包含向該患者投與治療有效量之抗體或其抗原結合片段或包含該抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a. 輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 7之

CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 8之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 9之CDR-H3；或

b. 包含SEQ ID NO: 15或19之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 35之重鏈可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 21之輕鏈及包含SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 37之重鏈。

【0230】 可替代地，本發明亦提供抗體或其抗原結合片段用於製造供治療 α 突觸核蛋白病之藥劑用之用途，其中該 α 突觸核蛋白病較佳係帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，較佳帕金森氏病(PD)，更佳帕金森氏病(PD)，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

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

b. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【0231】 此外，本發明之部分係抗 α 突觸核蛋白抗體或抗原結合片

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

【0232】 診斷較佳可針對生物樣品進行。「生物樣品」涵蓋來自個體之多種樣品類型且可用於診斷或監測分析。該定義涵蓋腦脊髓液，諸如血漿及血清之血液，及生物來源之其他液體樣品，諸如尿液及唾液，固體組織樣品，諸如活檢試樣或自其及其子代衍生之組織培養物或細胞。定義亦包括在獲取之後已以任何方式操控的樣品，諸如藉由試劑處理、增溶，或富集某些組分，諸如聚核苷酸。

【0233】 診斷測試較佳可針對不與人類或動物身體接觸的生物樣品進行。此類診斷測試亦稱為活體外測試。活體外診斷測試可依賴於偵測已獲自個體之生物樣品中之 α 突觸核蛋白的活體外方法，其包含以下步驟：
i)使生物樣品與如本文所述之抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段接觸；及ii)偵測抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之結合。藉由比較偵測到之 α 突觸核蛋白含量或 α 突觸核蛋白之特異性轉譯後修飾形式之存在與適合對照，可鑑別一或多種 α 突觸核蛋白病。此類偵測方法因此可用於判定個體是否患有 α 突觸核蛋白病，或處於罹患 α 突觸核蛋白病風險下，其包括確定 α 突觸核蛋白病之階段(嚴重程度)。

【0234】 因此，本發明提供用於診斷 α 突觸核蛋白病、較佳診斷帕金森氏病之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

a. 輕鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 44之CDR-L1；包含SEQ ID NO: 2之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 3之CDR-L3；及重鏈可變區，其包含：包含SEQ ID NO: 4之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 45之CDR-H2及包含SEQ ID NO: 46之CDR-H3。

【0235】較佳地，抗體或其抗原結合片段用於診斷 α 突觸核蛋白病，較佳診斷帕金森氏病，其中該抗體或其抗原結合片段結合 α 突觸核蛋白且包含：

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

b. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重可變區；或

c. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【0236】本發明中所包括之序列展示於表1中：

表1

名稱	SEQ ID NO:	序列
CDR-L1	1	QASQSVYKNNYLA
CDR-L2	2	GASTLAS
CDR-L3	3	AGYKGGGRNDGFA
CDR-H1	4	GIDLSSHDMY
CDR-H2	5	AIYASGSTYYASWAKG
CDR-H3	6	IHYGNSGGL
CDR-L1 N33R	7	QASQSVYKNRYLA
CDR-H2 S56N	8	AIYASGNTYYASWAKG

CDR-H3 N102H	9	IHYGHSGL
人類 α 突觸 核蛋白 P37840	10	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEG VVHGVATVAEKKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVK KDQLGKNEEGAPQEGILEMDPVPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA
兔VL	11	AIVMTQTPSSKSVAVGDTVINCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGQPPKQLI YGASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYCAGYKGGRRND GFAFGGGTEVVVK
兔VL核苷 酸	12	Gccatcgtgatgaccagactccatctccaagtctgctgctgtgggagacacagtcaccatcaattgccaggcca gtcagagtggtataagaacaactacttagcctggttcaacagaaaccaggcagcctccaacaactgatctatg gtcgtccactctggcatctggggtcccacgcggttcaaaaggcagtgatctgggacagatcactctaccatc agcgtatggtgtgacgatgctgccactactactgtgcaggatataaagggtgctgtaataatggtttgcttcg cggaggaccagggtggtggtcaaa
兔VH	13	QSVEESGRLVTPGTPPLTLTCTVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKGLEIYIGAIY ASGSTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKMSTLTEDTATYFCARIHYGNSG GLWGQGLTIVSS
兔VH核苷 酸	14	Cagtcggtggaggagtcgggggtcgcctggtcacgcctgggacaccctgacactcacctgcacagtctctg aatcgacctagtagccacgacatgtattgggtccgacagcctcagggaaggggctggaatacattggagccatt tatgctagtgtacatactacgcgagctgggcgaaaggccgattcaccatctcaagacctgaccacgggtg atctgaaaatgaccagctgacaaccgaggacacggccactatttctgtccagaattcattatgtaataatggtg ggttggggccaaggcaccctgtcaccgtctcgagt
6470 gL3 VL	15	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGKAPKQLI YGASTLASGVPSRFSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRRNDGF AFGGGKVEIK
6470 gL3 VL核苷酸	16	Gacattcagatgaccagtcacctcactgtccgcgagcgtgggcgacagagtgaccattacgtgccaagcca gccagtcggtgataagaacaactacctggcctggttccagcaaaagcccgggaaaggcgaacaacagctatct acgggtgatccactctgcctcgggagtgccgagccgcttctcgggatctgggtccggaactcagttaccctgact atctcgtccctgcaaccgaggatttcgccactactactgcgccgctataaggaggagcgaacgacggcttcg ctttggtggaggccaaggtcgaatacaag
6470 gL3 輕鏈	17	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGKAPKQLI YGASTLASGVPSRFSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRRNDGF AFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSPPVTKSFNRGEC
6470 gL3 輕鏈 核苷酸	18	Gacattcagatgaccagtcacctcactgtccgcgagcgtgggcgacagagtgaccattacgtgccaagcca gccagtcggtgataagaacaactacctggcctggttccagcaaaagcccgggaaaggcgaacaacagctatct acgggtgatccactctgcctcgggagtgccgagccgcttctcgggatctgggtccggaactcagttaccctgact atctcgtccctgcaaccgaggatttcgccactactactgcgccgctataaggaggagcgaacgacggcttcg ctttggtggaggccaaggtcgaatacaagcgtacgggtggcgcctccctcgtttcatttcccacctccgac gagcagctgaagtccggaccgctccgctgtgctgctgaacaacttaccctccgaggccaaggtgcag tgaaggtggacaacccctgcagtcggcaactcccaggaatccgaccagcagactccaaggacagcac ctactccctgtctccacctgacctgtccaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgctcgaagtgacc caccaggcctgtccagccccgtaccaagtcctcaaccggggcgagtc
6470 gL3 VL N33R	19	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGKAPKQLI YGASTLASGVPSRFSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRRNDGF AFGGGKVEIK
6470 gL3 VL N33R核 苷酸	20	Gacattcagatgaccagtcacctcactgtccgcgagcgtgggcgacagagtgaccattacgtgccaagcca gccagtcggtgataagaaccgtacctggcctggttccagcaaaagcccgggaaaggcgaacaacagctatct cgtgcatccactctgcctcgggagtgccgagccgcttctcgggatctgggtccggaactcagttaccctgact tctcgtccctgcaaccgaggatttcgccactactactgcgccgctataaggaggagcgaacgacggcttcg

		ttttggtggaggcaccagggtcgaatcaag
6470 gL3 輕鏈N33R	21	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSVYKNRYLAWFQQKPGKAPKQLI YGASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRRNDGF AFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
6470 gL3 輕鏈N33R 核苷酸	22	Gacattcagatgaccagtcacctcactgtccgcgagcgtgggcgacagagtaccattactgccaagcca gccagtcctgtacaagaacctgacctggcctgggtccagcaaaagcccgggaagggcggcaaacagcttatcta cggcgcacacctcgcctcgggagtgccgagccgctctcgggatcgggtccggaactcagttaccctgacta tctcgtccctgcaacccgaggattcggcacctactactgcgccggctataaggaggacggaacgacggctcgc ttttggtggaggcaccagggtcgaatcaagcgtacgggtggcctcctccctggttcatctcccacctccgacg agcagctgaagtcggcaccgctcctgctgtgctgctgaacaactctacccccgcgagggcaaggtgcagt ggaaggtggacaacgccctgcagtcggcaactccaggaatccgtaccagcaggactccaaggacagcac clactccctgtcctccacctgacctgtccaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgcgaagtgacc caccaggcctgtccagccccgtgaccaagtcctcaaccggggcgagtg
6470 gH23 VH	23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKLEYIG AIYASGSTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGNSSGLWGQGLTLTVSS
6470 gH23 VH核苷酸	24	Gaggttcagctgctggagtctggaggcggcctgtccagcctggaggagcctgcgtctcttctgtcagtaagcg gcatcgacctgtccagccagacatgtattgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctggaatacatcgccgcat ttatgctagtggtagcacatactacgcgagctgggcgaaaggccgttcaccatctcccgtgacaactctaaaaaca cctgtacctgcagatgaactctcgtcgtcgggaagacactcgggttactattgcgcgctattcattatgtaaatg ggtgggtgtgggtcagggtactctggtaccgtcgcg
6470 gH23 重鏈	25	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKLEYIG AIYASGSTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGNSSGLWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKQPREPQVYITLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDG SFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLKG
6470 gH23 重鏈核苷酸	26	gaggttcagctgctggagtctggaggcggcctgtccagcctggaggagcctgcgtctcttctgtcagtaagcg gcatcgacctgtccagccagacatgtattgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctggaatacatcgccgcat ttatgctagtggtagcacatactacgcgagctgggcgaaaggccgttcaccatctcccgtgacaactctaaaaaca cctgtacctgcagatgaactctcgtcgtcgggaagacactcgggttactattgcgcgctattcattatgtaaatg ggtgggtgtgggtcagggtactctggtaccgtcgcgctctcacaaggccctcctggtcctctgccc cctgctcccggcaccctccgactctaccgcccgtctgggtgctgcaaggactactccccgagcccgtgac agtgtcctggaactctgcccctgacctccggcgtgcacacctccctgcccgtcagtcagtcctccgacctgact ccctgtcctccgtcgtaccgtgcccctcctcagcctgggcaccaagacactacactgtaacgtggaccacaagcc clccaacccaaggtggacaagcgggtggaacttaagtagggcctcctccccccccctgcccctgcccctgaattt ctggcggacctccgtgtctctgtcccccacaagccaagacacctgatgatctcccgacccccgaagtga cctgctgtgtgtggacgtgcccaggaagatcccagggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtga caatgccaagaccaagccagaggaagacagttcaactccacctaccgggtggtgctcgtgacctgctgca ccaggactggctgaacggcaagagtacaagtcaaggtgtccaacaaggcctgcctccagcatcgaagaaga ccatctccaagccaagggccaagcccgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtcgtcaagggtcttaccctccgacattgcccgtggaatgggagtcacaag gccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcagcggctccttctctgactctcggct gacctggacaagtcgggtggcaggaaggaacgtctctcctgctccgtgatgcagagccctgcacaacca ctacaccagaagtcctgacctgacctggcaag
6470 gH23 VH S56N N102H	27	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKLEYIG AIYASGNTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGHSSGLWGQGLTLTVSS
6470 gH23 VH S56N	28	Gaggttcagctgctggagtctggaggcggcctgtccagcctggaggagcctgcgtctcttctgtcagtaagcg gcatcgacctgtccagccagacatgtattgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctggaatacatcgccgcat ttatgctagtggtaatacactacgcgagctgggcgaaaggccgttcaccatctcccgtgacaactctaaaaaac

N102H 核苷酸		cgtgtacctgcagatgaactctctcgtgcggaagacactcgggttactattgcgcgcgtattcattatgtcacagt ggtgggttggtgggtcagggtactctggtaccgtctcgagc
6470 gH23 重鏈S56N N102H	29	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKLEYIG AIYASGNTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGHSGGLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLTP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLKG
6470 gH23 重鏈S56N N102H 核苷酸	30	gaggttcagctgctggagtctggaggcggcgttgcaccctggaggagcctgcgtctcttctgtcagtaagcg gcatcgacctgtccagccacgacatgtattgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctggaatacatcgcccat ttatgctagtggtaacatactacgcgagctgggcgaaaggccgttaccatctcccgtgacaactcaaaaacac cgtgtacctgcagatgaactctctcgtgcggaagacactcgggttactattgcgcgcgtattcattatgtcacagt ggtgggttggtgggtcagggtactctggtaccgtctcagcgtctctacaaaggccctccgtgttccctctggcc cctgtctcccgtccacctccgagctaccgccgtctgggtgctggtcaaggactacttccccgagcccgtgac agtgctcctggaactctggcggcctgacctccggcgtgcacacctccctgcccgtgctgagtcctccggcctgact ccctgtcctccgtcgtgaccgtgccctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaactgtgaccacaagcc ctccaacccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggcctccctgccccctgcccctgcccctgaattt ctggcggaccttccgttctctgttcccccaagccaaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtga cctgcgtgggtggtgacgtgtcccaggaagatcccagggtcagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtga caatgccaagaccaagcccaagaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgctgctgacctgctgca ccagactggctgaacggcaagagtagaaggtcaaggtgtccaacaaggcctgcccctccagcatcgaaaaga ccatctcaagccaagggcagccccgcgagccccagggtgtacacctgccccctagccaggaaagatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctgtcaaggccttaccctccgacattgccgtggaatggaggtcaacg gccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcagcggctccttctctgactctcggct gacctggacaagtcccgggtggcaggaaggaacgtcttctcctgctccgtgatgcagagggcctgcacaacca ctacaccagaagtcctgtccctgacctgggcaag
6470 gH36 VH	31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKLEYIG AIYASGSTYYASWAKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGNSSGGLWGQGLTVTVSS
6470 gH36 VH核苷酸	32	Gaggttcagctgctggagtctggaggcggcgttgcaccctggaggagcctgcgtctcttctgtcagtaagcg gcatcgacctgtccagccacgacatgtattgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctggaatacatcgcccat ttatgctagtggtagcacatactacgcgagctgggcgaaaggccgttaccatctcccgtgactccagcaaaaaca ccctgtacctgcagatgaactctctcgtgcggaagacactcgggttactattgcgcgcgtattcattatgtaaatgt ggtgggttggtgggtcagggtactctggtaccgtctcagcgtctctacaaaggccctccgtgttccctctggcc cctgtctcccgtccacctccgagctaccgccgtctgggtgctggtcaaggactacttccccgagcccgtgac agtgctcctggaactctggcggcctgacctccggcgtgcacacctccctgcccgtgctgagtcctccggcctgact ccctgtcctccgtcgtgaccgtgccctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaactgtgaccacaagcc ctccaacccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggcctccctgccccctgcccctgcccctgaattt ctggcggaccttccgttctctgttcccccaagccaaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtga cctgcgtgggtggagctgtcccaggaagatcccagggtcagttcaattggtacgtggcggcgtggaagtga caatgccaagaccaagcccaagaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgctgctgacctgctgca
6470 gH36 重鏈	33	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKLEYIG AIYASGSTYYASWAKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGNSSGGLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLTP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLKG
6470 gH36 重鏈核苷酸	34	gaggttcagctgctggagtctggaggcggcgttgcaccctggaggagcctgcgtctcttctgtcagtaagcg gcatcgacctgtccagccacgacatgtattgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctggaatacatcgcccat ttatgctagtggtagcacatactacgcgagctgggcgaaaggccgttaccatctcccgtgactccagcaaaaaca ccctgtacctgcagatgaactctctcgtgcggaagacactcgggttactattgcgcgcgtattcattatgtaaatgt ggtgggttggtgggtcagggtactctggtaccgtctcagcgtctctacaaaggccctccgtgttccctctggcc cctgtctcccgtccacctccgagctaccgccgtctgggtgctggtcaaggactacttccccgagcccgtgac agtgctcctggaactctggcggcctgacctccggcgtgcacacctccctgcccgtgctgagtcctccggcctgact ccctgtcctccgtcgtgaccgtgccctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaactgtgaccacaagcc ctccaacccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggcctccctgccccctgcccctgcccctgaattt ctggcggaccttccgttctctgttcccccaagccaaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtga cctgcgtgggtggagctgtcccaggaagatcccagggtcagttcaattggtacgtggcggcgtggaagtga caatgccaagaccaagcccaagaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgctgctgacctgctgca

		ccaggactggctgaacggcaagagtagacaagtgaaggtgccacaaggcctgcctccagcatc gaaaga ccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctgtcaagggcttaccctccgacattgccgtggaatggagtgccaacg gccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgagcctcttctctgactctcggct gaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggaacgtctctctctgctccgtgatgcacgagccctgcacaacca ctacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
6470 gH36 VH S56N N102H	35	EVQLLESGGGLVQP GGSRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKGLEYIG AIYASGNTYYASWAKGRFTISR DSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGHSGGLWGQGLTVTVSS
6470 gH36 VH S56N N102H核苷 酸	36	Gaggttcagctgctggagtctggagcgggctgtccagcctggaggagcctgcgtctctgtgcagtaagcg gcatcgacctgtccagccacgacatgtattgggtacgtcagccaccgggtaaaggctggaatacatcgcgccat ttatgctagtggtaatacactacgcgagctgggcgaaaggccgttcaccatctcccgtactccagcaaaaaca ccctgtacctgcagatgaactctctgctgctggaagacactgcggttactattgcgcgctattcattatgtcacag tgggggttggggcaggtactctggttaccgtctcgagc
6470 gH36 重鏈S56N N102H	37	EVQLLESGGGLVQP GGSRLSCAVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKGLEYIG AIYASGNTYYASWAKGRFTISR DSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIH YGHSGGLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPPKD TLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY TLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
6470 gH36 重鏈S56N N102H核苷 酸	38	gaggttcagctgctggagtctggagcgggctgtccagcctggaggagcctgcgtctctgtgcagtaagcg gcatcgacctgtccagccacgacatgtattgggtacgtcagccaccgggtaaaggctggaatacatcgcgccat ttatgctagtggtaatacactacgcgagctgggcgaaaggccgttcaccatctcccgtactccagcaaaaaca ccctgtacctgcagatgaactctctgctgctggaagacactgcggttactattgcgcgctattcattatgtcacag tgggggttggggcaggtactctggttaccgtctcgagcctctacaaggccccctcctgttccctctggc cccttgcctccgggtccacctccgagctaccgctctgggctgctgtgcaaggactactccccgagcccgtga cagtgctcctggaactctggcgcctgacctccggcgtgcacacctccctgccgtgctgcagctccggcctgtac tccttgcctccgtcgtgacctggcctcctccagcctgggccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagc cctcaacaccaaggtgacaagcgggtggaatctaagtacggcctccctgccccctgccccctgccccctgaatt ctggcgggaccttccgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctccggacccccgaagtga cctgcgtggtggtgacgtgtcccaggaagatcccaggtccaattggtacgtgacggcgtggaagtgc aatgccaagaccaagcccaagaggaacagttcaactccacctaccgggtggtgctgctgacctgctgca ccagactggctgaacggcaagagtagacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgcctccagcatc gaaaga ccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctgtcaagggcttaccctccgacattgccgtggaatggagtgccaacg gccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgagcctcttctctgactctcggct gaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggaacgtctctctctgctccgtgatgcacgagccctgcacaacca ctacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag
人類 IGKV1-16 JK4受體架 構	39	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTK VEIK
人類 IGKV1-16 JK4受體架 構核苷 酸	40	Gacatccagatgaccagctcctcactctgctgcatctgtaggagacagatccatcactgtcggcgag tcaggcattagcaattatttagcctggttcagcagaaaccagggaagccccctaaagcctgatctatgctgcatcc agtttgaagatgggtcccataaggttcagcggcagtgatctggacagattcactctaccatcagcagcct gcagcctgaagatttgaacttactgccaacagataatagtaccctctcacttccggcggaggaccagggtg gagatcaaa
人類 IGHV3-23 JH4受體架	41	EVQLLESGGGLVQP GGSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKY FDYWGQGLTVTVSS

構		
人類 IGHV3-23 JH4受體架 構核苷酸	42	Gaggtgcagctgtggagctctggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctctgtgcagcctctg gattcaccttttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggtccaggaaggggctggagtgggtctcagctatt agtggtagtggtagcacatactacgcagactccgtgaaggccgggtcacatctccagagacaattccaaga acacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggcgtatattactgtgcgaatactttgactact ggggccaaggaaccctggtcaccgtctcctca
兔Fc人類 68-140 a-syn	43	GAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDM PVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPPEAVEKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVF IFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLR EQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQP LEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKT TPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISR SPGK
CDR-L1 X33	44	QASQSVYKNXYLA (X = N或R)
CDR-H2 X56	45	AIYASGXTYASWAKG (X = S或N)
CDR-H3 X102	46	IHYGXSGGL (X = N或H)
6470兔輕鏈	47	AIVMTQTSSKSVAVGDTVINCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGQPPKQLI YGASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVVCDAAATYYCAGYKGGRRND GFAFGGGTEVVVKRTPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTV TWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYNHKEYTCKV TQGTTSVVQSFNRGDC
6470兔重鏈	48	QSVESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKGLEYIGAIY ASGSTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKMSTLTEDTATYFCARIHYGNSG GLWGQGLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPV TVTWNSTLTNGVVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATN TKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWL RGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSL TCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTS EWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
6470兔 Fab重鏈	49	QSVESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSHDMYWVRQAPGKGLEYIGAIY ASGSTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKMSTLTEDTATYFCARIHYGNSG GLWGQGLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPV TVTWNSTLTNGVVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATN TKVDKTVAPSTCSKPHHHHHHHHHH

【0237】 現將參照附圖中示出的實施例，藉助於實例進一步描述本發明。

【0238】

實例

實例1：人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維之表現

編碼人類 α -突觸核蛋白之基因係使用標準分子生物學技術以合成方式產生且次選殖於載體pMH 10His TEV (含有CMV啟動子)中，以產生經工程改造以製備具有N端10His-TEV標籤之 α 突觸核蛋白的載體。所得載體係使用Expi293TM表現系統(Invitrogen)根據製造商之方案轉染於Expi293F細胞中。 α 突觸核蛋白在培養基中積累，使用固定化金屬離子親和性層析法HisTrap excel管柱(GE Healthcare)自該培養基回收 α 突觸核蛋白。管柱係用25 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, pH 8.0洗滌，且蛋白質在相同緩衝液中之500 mM咪唑之分級梯度溶離。使用TEV蛋白酶移除10His標籤。樣品隨後經濃縮且去鹽，之後將裂解之蛋白質重新塗覆於HisTrap excel管柱且收集溢流道中之裂解之 α 突觸核蛋白。 α 突觸核蛋白進一步藉由凝膠過濾在HiLoad 26/600 Superdex 75 column (GE Healthcare)上純化，且內毒素藉由Proteus NoEndo濾筒(Generon)上之通路移除。純化之 α 突觸核蛋白藉由SEC MALS證實為單體(圖1A)。

【0239】 亦在Expi293F細胞中表現野生型(不標記之)人類 α -突觸核蛋白。使用HiTrap Q管柱(GE Healthcare)經由陰離子交換自培養基回收蛋白質。管柱係用20mM TrisHCl pH 8.0洗滌，且蛋白質使用400 mM之氯化鈉梯度溶離。溶離份經濃縮且藉由經過HiPrep 26/10管柱(GE Healthcare)去鹽且用20 mM TrisHCl pH 8.0溶離。蛋白質係使用MonoQ 10/100GL管柱進一步純化，在20mM TrisHCl pH 8.0中用400 mM之氯化鈉梯度溶離，之後在HiLoad 26/600 Superdex 75管柱(GE Healthcare)上凝膠過濾，其中溶離在PBS pH 7.4中(圖1B)。

【0240】 使用此野生型(非標記之) α -突觸核蛋白單體製備 α -突觸核蛋白原纖維，其藉由在1200 rpm, 37°C下於Vortemp56振盪培養箱

(Labnet)中連續攪動純化重組 α -突觸核蛋白單體(於PBS pH7.4中之9-10mg/mL) 10天來獲得。原纖維形成藉由JC-1分析(Lee等人, Biochem. J. 2009, 418, 311-323), 及溶液之C傅立葉變換紅外光譜分析來評定。原纖維溶液中之未併入單體係藉由超速離心及穿過100KDa截止值膜之藉由, 之後凝膠電泳來評定。在進一步研究中僅使用具有JC-1反應 >15 、較低量之可溶性單體($<5\%$)及主要吸收在1625與1630 cm^{-1} 之間的FTIR光譜之原纖維(圖2)。所製備之原纖維在 -80°C 下儲存。

【0241】

實例2：免疫接種及抗體分離

進行使用各種物種及免疫原之大量免疫接種策略。抗體6470(包含親本抗體及其各種變異體)來源於雌性紐西蘭白兔($>2\text{kg}$), 該兔已接受兔Fc融合蛋白之皮下免疫接種, 該兔Fc融合蛋白包含與兔Fc融合之人類 α -突觸核蛋白殘基68-140 (SEQ ID NO: 43)。

【0242】 使用Expi293TM表現系統(Invitrogen)根據製造商之方案在Expi293F細胞中表現用於免疫接種之 α -突觸核蛋白(68-140)兔Fc融合蛋白。使用MabSelectSure管柱(GE Healthcare)藉由親和層析自上清液純化蛋白質。管柱係使用50mM甘胺酸/甘胺酸鈉pH 8.8緩衝液平衡, 且用相同緩衝液中之0.1M檸檬酸pH 2.0之梯度溶離。蛋白質溶離份係用2M Tris HCl pH8.5中和, 經濃縮且進一步藉由凝膠過濾在HiLoad 26/600 Superdex 200 column (GE Healthcare)中純化, 在PBS pH 7.4中平衡及溶離。兔接受初次免疫接種, 該免疫接種包含在等體積之完全弗氏佐劑(CFA)中乳化之500 μg 融合蛋白。使用不完全弗氏佐劑(IFA), 以21天時間間隔給予兔2次加打注射, 免疫後第14天自耳放血。在用脾、骨髓及周

邊血液單核細胞之單細胞懸浮液最後加打之後第14天發生終止，該脾、骨髓及周邊血液單核細胞之單細胞懸浮液在 -80°C 下於胎牛血清(FCS)中之10%二甲亞砜(DMSO)中製備及冷凍。

【0243】

***B*細胞培養物**

B細胞培養物係使用類似於Tickle等人，2015. J Biomol Screen: 20 (4), 492-497所描述之方法的方法製備。簡言之，來自經免疫接種之動物的淋巴結或脾細胞來源之B細胞係在5% CO_2 之氛圍中在 37°C 下於帶有條形碼之96孔組織培養物板中以大約2000-5000個細胞/孔之密度培養七天，該培養板具有補充有以下各者之200微升/孔RPMI 1640介質(Gibco BRL)：10% FCS (Sigma Aldrich)、2% HEPES (Sigma Aldrich)、1%L-麩醯胺酸(Gibco BRL)、1%青黴素/鏈黴素溶液(Gibco BRL)、0.1% β -巰基乙醇(Gibco BRL)、1%活化之人類PBMC上清液(BSS) 及X射線輻射之突變EL4小鼠胸腺瘤細胞(5×10^4 個/孔)。使用來自經免疫接種之所有動物的B細胞建立培養物，且取樣總計大約 1.7×10^9 個B細胞。

【0244】 根據本發明之抗體6470(包含親本抗體及其各種變異體)係由活化之淋巴結來源之B細胞產生，該等B細胞係以大約5000個細胞/孔之密度培養。除了脾細胞以外，還將淋巴結用於抗體發現以得到B細胞之替代源，從中得到樣品且鑑別新穎抗體。自來源於淋巴結但不來源於脾之B細胞鑑別具有相關序列之抗體。自經免疫接種人類 α 突觸核蛋白C端蛋白質之免取樣大約 9.6×10^7 個細胞。

【0245】

初次篩檢

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

【0246】

二次篩選

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

結構且保存原纖維在預塗佈有抗生蛋白鏈菌素之ELISA板上的有效塗佈。

【0247】藉由在PBS中組合生物素標記之重組 α 突觸核蛋白單體(如上文所述)與50倍過量之未標記之重組 α 突觸核蛋白，如本文所述產生生物素標記之 α 突觸核蛋白總原纖維。藉由JC1分析(Lee等人，Biochem. J. 2009, 418, 311-323)證實原纖維形成。

【0248】將PBS中之生物素標記之單體或生物素標記之原纖維捕獲於塗佈碳酸鹽($\text{dH}_2\text{O} + 0.16\% \text{Na}_2\text{CO}_3 + 0.3\% \text{NaHCO}_3$)之緩衝液中之塗佈有抗生蛋白鏈菌素的384孔Maxisorp培養板上。培養板用1% w/v PEG/PBS阻斷且接著與10微升/孔之B細胞培養物上清液(用阻斷緩衝液1:1稀釋)一起培育。向培養板中添加二次HRP結合山羊抗兔IgG Fc抗體(Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch)，隨後利用TMB受質(3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，得自EMD Millipore；10微升/孔)目測結合。使用BioTek Synergy 2微定量盤式讀取器，在630 nM量測光密度。初次結合分析鑑別640個成功結果且在ELISA篩選之後，彼等成功結果中之491個展示與單體及原纖維重組人類 α 突觸核蛋白兩者結合。

【0249】選擇展現對重組原纖維之最強ELISA結合信號的B細胞上清液以藉由表面電漿子共振進一步分析從而鑑別具有對重組人類 α 突觸核蛋白單體、重組人類 α 突觸核蛋白原纖維及重組小鼠 α 突觸核蛋白原纖維之最佳解離速率的彼等。測試80種不同B細胞之上清液，九個孔提供對重組人類原纖維 $<1 \times 10^{-5}$ 之解離速率(kd)。在此等中，七種提供對重組小鼠原纖維小於 1×10^{-5} 之解離速率(kd)且兩種提供對重組人類單體小於 1×10^{-5} 之解離速率(kd)。選擇所有九種上清液以用於可變區恢復。

【0250】

可變區恢復

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

【0251】 使用重鏈及輕鏈可變區特異性引子，藉由逆轉錄(RT)-PCR自單細胞中回收抗體可變區基因。利用併入3'及5'末端處之限制位點的嵌套式2° PCR進行兩輪PCR，使得可變區選殖於兔IgG (VH)或兔 κ (VL)哺乳動物表現載體中。來自5種不同上清液之抗 α 突觸核蛋白抗體基因成功選殖於表現載體中。使用ExpiFectamine 293 (Invitrogen)將重鏈及輕鏈構築體共轉染至Expi-293細胞中且在125 ml錐形瓶(Erlenmeyer flask)中以30 ml體積表現重組抗體。5-7天表現之後，收集上清液且使用親和層析純化。

【0252】

瞬時上清液之ELISA篩選

隨後使經純化之抗體進一步藉由ELISA篩選。將生物素標記之重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維捕獲於塗佈碳酸鹽(dH₂O + 0.16%Na₂CO₃

+ 0.3% NaHCO₃)之緩衝液中之塗佈有抗生蛋白鏈菌素的384孔Maxisorp培養板(ThermoScientific/Nunc)上。獨立的培養板亦塗佈有對應於根據SEQ ID NO: 10 (肽PVDPDNEAYE)之人類 α 突觸核蛋白之殘基117至126的生物素標記肽以檢查是否短暫結合於此或分子上之不同區域。板用1% w/v PEG/PBS阻斷且接著與純化之短暫上清液之若干稀釋液一起培育。向培養板中添加二次HRP結合山羊抗兔IgG Fc抗體(Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch)，隨後利用TMB受質 (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，得自EMD Millipore；10微升/孔)目測結合。使用BioTek Synergy 2微定量盤式讀取器，在630 nM量測光密度。6470之資料顯示於圖3中。如可見，6470展示與單體及原纖維重組人類 α 突觸核蛋白兩者之結合，但不展示與117-126肽之結合。

【0253】隨後在如稍後實例7中所描述之基於細胞的聚集分析中測試抗體(IgG)。接著藉由表面電漿子共振測定在細胞分析中展現活性之所有抗體之結合動力學。測試作為IgG及Fab之抗體以分別測定親合力(二價結合)及親和力(單價結合)。

【0254】

實例3：抗體表徵

表面等離子共振動力學

藉由使用表面電漿子共振技術在Biacore T200儀器上測定相互作用動力學。使用胺-偶合化學在CM5薄片之三個不同流量槽上各自固定三種不同配位體，該等配位體包括如本文所述製備之重組全長人類 α 突觸核蛋白單體、經純化之重組人類 α 突觸核蛋白原纖維，及經純化之重組小鼠 α 突觸核蛋白原纖維。三種配位體係在10 mM NaAc，pH 3.5中製備，且固定

於獨立的流量槽表面上以在10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率下達到以下固定水準：分別地對於 α 突觸核蛋白單體約30反應單位(RU)、對於人類 α 突觸核蛋白原纖維約40 RU，及對於小鼠 α 突觸核蛋白原纖維約300 RU。緩衝液HBS-EP+ (GE healthcare Bio-Sciences AB)用作操作緩衝液以進行配位體固定及動力學分析。隨後量測單株6470兔IgG1 (包含SEQ ID NO: 47及48)及單株6470兔Fab (包含SEQ ID NO: 47及49)與三種配位體之結合。在100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率下，在3個流量槽上以800 nM至0.195 nM之7種不同濃度注射單株IgG或Fab抗體，接觸時間為3分鐘且解離時間為30分鐘。藉由在10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 下一次持續90 s注射50 mM，且在10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 下再一次持續60 s注射50 mM HCl來重新產生表面。使用Biacore T200評估軟體(版本3.0)，使用二價分析物模型(假設對於IgG型式無塊材貢獻(RI=0)及全局Rmax)以及1:1模型(具有可撓性塊材貢獻(局部RI)與全局Rmax)分析資料。

【0255】 IgG及Fab與固定標靶之結合的動力學值展示於表2中。IgG型式展示，比較對人類 α 突觸核蛋白單體之親和力，對人類 α 突觸核蛋白原纖維有明顯的選擇性親和力，解離常數KD對於人類原纖維低超過10倍。

表2

樣品	人類單體			人類原纖維			小鼠原纖維		
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)
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

【0256】

與 β 突觸核蛋白之結合

使用rPeptide β 突觸核蛋白藉由西方墨點法測試針對人類 α 突觸核蛋白培養之抗體與人類 β 突觸核蛋白之結合。在4-12% Bis/Tris凝膠上進行一微克之突觸核蛋白且印跡於PVDF膜上。將膜在具有3% BSA及0.1% Tween20之PBS中封端。將6470兔IgG1抗體添加至經封端之墨點且在室溫下培育1小時，用PBS、0.1% Tween20洗滌且與二次抗體-HRP結合物(抗兔H+L HRP結合物，Bethyl，A120-101P)一起培育1小時。使墨點在具有0.1% Tween20、PBS及水之PBS中充分洗滌。在添加ECL西方墨點法基質(Pierce)之後量測化學發光。如圖4(A)第3道中所示，6470兔IgG1不與人類 β -突觸核蛋白結合。

【0257】

抗原決定基定位

NMR

將人類 α -突觸核蛋白選殖於pET28a表現載體中，使得表現無任何標籤之蛋白質。將構築體轉移至大腸桿菌(*E.coli*) BL21 (DE3)細胞(Stratagene)中，且在氧化氘(D₂O)存在及缺失下在具有C¹³標記之DL-葡萄糖及N¹⁵標記之硫酸銨之定義培養基中生長細胞。在OD_{600nm} = 1下用300 mM IPTG誘導表現且在30°C下將培養物培育4小時。使細胞粒化且藉由在100 ml溶解緩衝液(20 mM Tris/HCl pH8.0，25單位核酸酶(Merck Millipore)、完整EDTA游離蛋白酶抑制劑混合物(2錠劑，Roche)及10 mg溶菌酶(Sigma))中進行三次冷凍-融化循環來溶解。藉由在18 000 rpm下離心來澄清溶解產物，且使澄清之溶解產物穿過0.22 μ m過濾器(Stericup，Millipore)。將無菌溶解產物裝載於用20 mM Tris/HCl pH 8.0，5CV平衡之MonoQ 10/100GL (GE Healthcare)上且在相同緩衝液中

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

【0258】使兔6470 Fab (包含SEQ ID No.: 11之VL及SEQ ID No.: 13之VH，且亦包含SEQ ID NO: 47及49)在CHO SXE中表現為經His標記之實體且藉由His標籤親和層析自上清液純化，使該蛋白質與來自上清液之HisTrap Excel (GE Healthcare)且用PBS中之250 mM咪唑溶離。將溶離池裝載於HiTrap GammaBind Plus Sepharose (GE Healthcare)上，管柱用PBS洗滌且蛋白質用0.1M甘胺酸-HCl pH 2.6溶離，且用0.75 M磷酸鈉 pH 9將pH值調節至pH 6。在HiPrep 26/10去鹽管柱上將溶離之Fab-His蛋白質緩衝液互換於NMR緩衝液(25 mM磷酸鈉pH 6.4，100 mM NaCl)中。Fab-His蛋白質溶離份經濃縮且添加蛋白酶抑制劑AEBSF (10 μ M最終濃度)及疊氮化鈉(0.02%最終濃度)，之後在Millex GV 0.22 μ m過濾器上進行過濾器滅菌。對於結晶學，經濃縮之6470 Fab-His藉由製備型尺寸排阻層析在HiLoad 26/600 Superdex 75 (GE Healthcare)管柱平衡上純化且用25 mM磷酸鈉pH 6.4，100 mM NaCl溶離。在>99%純度下在UPLC-SEC上測試最終池之純度。使最終池穿過Millex GV 0.22mm過濾器以進行滅菌。

α -突觸核蛋白之主鏈分配

NMR樣品通常體積為350 μl ，在5 mm Shigemi試管中蛋白質濃度為360 μM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標記或430 μM $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標記之人類 α -突觸核蛋白。緩衝條件為100 mM NaCl、25 mM磷酸鈉pH 6.4、10 μM AEBSF、0.02% NaN_3 。所有實驗均在20°C、在裝配有低溫冷卻探針的600 MHz Bruker AVIII或800 MHz Bruker AVII光譜儀上記錄。蛋白質中殘基之主鏈NMR信號之間的順序連接 $\text{H}_\text{N}(i)\text{-N}(i)\text{-N}(i\pm 1)$ 係使用3D (H)N(CA)NNH實驗(Weisemann等人，1993 3D Triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and ^{15}N resonances in ^{15}N - and ^{13}C -labelled proteins. J. Biomol. NMR 3)進行，該實驗係在 ^{15}N 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別用28、28及10 ppm之譜寬及117 (F1)、117 (F2)及140 (F3) ms之擷取時間記錄，每個增量8次掃描及1.5 s弛豫延遲。非均一取樣係在10% (40000個超複合物點中的4000個)的取樣密度下使用，得到2.75天之總擷取時間。使用TROSY-HNCA (Grzesiek及Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440；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)及TROSY-HNCACB (Wittekind及Mueller, 1993 HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. J. Magn. Reson. Ser. B 101, 201-205；Salzmann等人，1999. TROSY-type Triple Resonance Experiments for Sequential NMR Assignment of Large Proteins. J. Am. Chem. Soc. 121, 844-848)實驗證實依序連接且鑑別殘基

類型。TROSY-HNCA實驗係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用23、28、10 ppm之譜寬及12.1 (F1)、21.7 (F2)及100 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量8次掃描，1.5秒弛豫延遲，1天總擷取時間)，而TROSY-HNCACB係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用56、28及10 ppm之譜寬及8.2 (F1)、21.7 (F2)及100 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量8次掃描，1.5秒弛豫延遲，1.7天總擷取時間)。主鏈羰基分配獲自TROSY-HNCO光譜(Grzesiek及Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J. Magn. Reson.* 96, 432-440; Salzman等人，1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 13585-90)，該TROSY-HNCO光譜在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用10、29、10 ppm之譜寬及80 (F1)、21.7 (F2) 及150 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量8次掃描及1.5 s弛豫延遲)。非均一取樣係在15% (8050個超複合物點中的1208個)的取樣密度下使用，得到19小時之總擷取時間。NMR光譜係使用NMRPipe (Delaglio等人，1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-93)處理，其中使用線性預測將氮氣之有效擷取時間延長高達1倍。使用Harvard迭代軟閾值法(Hyberts等人，2012)重構非均一取樣資料，資料經重構為下一傅里葉數目，將間接擷取時間提高高達60%。使用Sparky (Goddard及Kneller, D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco)進行資料分析，從而得到133個殘基(對應於99%殘基(不包括脯胺酸殘基及N端甲硫胺酸))之醯胺質子及氮共振的賦值。

【0259】 使用含有10%莫耳過量之未經標記之6470 Fab的150 μM 經

$^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標記之人類 α 突觸核蛋白的樣品進行6470 Fab之結合位點之定位。在相同緩衝液中製備樣品，如上文針對 α 突觸核蛋白之主鏈分配所述。 ^1H 、 ^{15}N 及 ^{13}C 化學位移變化係藉由比較在 α 突觸核蛋白/Fab複合物上記錄之TROSY-HNCO (Grzesiek及Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J. Magn. Reson.* 96, 432-440; Salzman等人, 1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 13585-90)光譜與在游離 α 突觸核蛋白上記錄之等效對照光譜來測定。游離 α 突觸核蛋白之對照TROSY-HNCO實驗係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用10、28及10 ppm之譜寬及80 (F1)、22 (F2)及150 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量16次掃描, 1.5 s弛豫延遲)。非均一取樣係在25% (8050個超複合物點中的2013個)的取樣密度下使用, 得到2.7天之總擷取時間。 α 突觸核蛋白/Fab複合物之TROSY-HNCO實驗係在 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^1H 維度中分別利用10、28及10 ppm之譜寬及80 (F1)、21.7 (F2)及80 (F3) ms之擷取時間記錄(每個增量32次掃描, 1.5 s弛豫延遲)。非均一取樣係在25% (4477個超複合物點中的1119個)的取樣密度下使用, 得到2.8天之總擷取時間。NMR光譜係使用NMRPipe (Delaglio等人, 1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-93)處理, NUS資料之重構使用mddnmr進行。非均一取樣光譜之分析利用多維分解。Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 59, 第271-292頁)。氮氣維度之有效擷取時間在資料重構期間增加高達1倍。

【0260】 化學位移變化係使用最小位移方法(Williamson等人,)

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

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

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

[(0261)] 為鑑別 α 突觸核蛋白上之Fab結合位點(抗原決定基), 使用組合之最小位移相對於蛋白質序列之直方圖揭示含有擾動顯著之信號之 α 突觸核蛋白的區域。若個別胺基酸之組合化學位移變化大小超過所有胺基酸之組合化學位移變化平均值之臨限值加一個相對於該平均值之標準差, 則選擇此等殘基作為Fab結合位點中的可能接觸殘基以便進一步評價。

[(0262)] 顯著擾動殘基鑑別為最小位移至少大於所計算所有位移之平均值加一個標準差的殘基。應用四種不同臨限值鑑別Fab所結合的殘基。涉及結合位點的殘基依據遞增的嚴格度如下評分: 最小位移超過所計算所有位移之平均值加一個標準差的殘基(>0.018925); 最小位移超過所計算所有位移之平均值加兩個標準差的殘基(>0.032049); 最小位移超過

所計算所有位移之平均值加三個標準差的殘基(>0.045174)；最小位移超過所計算所有位移之平均值加四個標準差的殘基(>0.058299)。在此分析中，脯胺酸殘基由於其不含醯胺質子而未能鑑別。

【0263】 6470 Fab之抗原決定基因此依據遞增的嚴格度定義如下：所計算所有位移之平均值加一個標準偏差：D121、N122、E123、A124、Y125、E126、M127、S129、E130、Y133、Q134、D135及Y136；所計算所有位移之平均值加兩個標準偏差：E123、A124、Y125、E126、M127、S129、E130、D135及Y136；所計算所有位移之平均值加三個標準偏差：Y125、M127、S129及D135；所計算所有位移之平均值加四個標準偏差：M127、S129及D135。

【0264】 如圖4B中所示，藉由NMR研究發現親本抗體6470結合至少以下殘基(平均值+3 SD)：Y125、M127、S129及D135且另外亦結合人類 α -突觸核蛋白(SEQ ID NO: 10)之所有以下殘基(平均值+1 SD)：D121、N122、E123、A124、E126、E130、Y133、Q134及Y136。

【0265】

肽映射

與6470結合之抗原決定基之進一步表徵係藉由使用表示人類 α 突觸核蛋白之C端區且覆蓋人類 α 突觸核蛋白之C端區之短(通常為9聚體或10聚體)肽進行。此等用於競爭性表面電漿子共振分析以確定任一者是否能夠抑制抗體與固定在Biacore薄片上之單體 α 突觸核蛋白或預成型 α 突觸核蛋白原纖維之結合。隨後選擇展示最大抑制水準之肽以進行利用抗體之共同結晶研究以便證實準確的抗原決定基。

【0266】 肽係由Peptide Protein Research Ltd., Bishop's Waltham,

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

表3

肽ID	序列
AS104-113	EEGAPQEGIL
AS109-118	QEGILEDMPV
AS111-120	GILEDMPVDP
AS113-122	LEDMPVDPDN
AS115-124	DMPVDPDNEA
AS117-126	PVDPDNEAYE
AS119-128	DPDNEAYEMP
AS121-130	DNEAYEMPSE
AS123-132	EAYEMPSEEG
AS125-134	YEMPSEEGYQ
AS127-136	MPSEEGYQDY

【0267】 使用Biacore 3000儀器(GE Healthcare)將重組人類 α 突觸核蛋白單體及預成型 α 突觸核蛋白原纖維固定在CM5薄片上。在藉由以10 μ l/min之流動速率注射100 μ l 50 mM N-羥基丁二醯亞胺與200 mM 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺之新鮮1:1 (v/v)混合物來活化羧甲基聚葡萄糖表面之後，HBS-EP (GE Healthcare)作為操作緩衝液，藉由注射在10 mM乙酸鹽pH 5.0中為5 μ M之100 μ l單體及原纖維經過單獨的流量槽上來達成偶合。參考流量槽以相同方式活化且隨後所有流量槽表面均以1 M乙醇胺HCl pH 8.5之50 μ l脈衝去活化。

【0268】 肽溶液以100 μM 在操作緩衝液中製備且肽空白對照製備為在操作緩衝液中1/100 DMSO之稀釋液。在操作緩衝液中以50.5 nM製備6470兔Fab (包含SEQ ID NO: 47及49)之溶液，之後與2 μl 空白對照或稀釋肽一起預培育198 μl 以得到50 nM Fab與1 μM 肽或對照之最終混合物。藉由以10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射30 μl 混合物且在注射結束前5秒記錄報導點來記錄各樣品之感測器圖譜。藉由注射兩次10 μl 40 mM HCl及一次5 mM NaOH在每次循環結束時重新產生薄片。使對照循環與肽循環交替。

【0269】 各種肽之抑制程度經計算為相比於相鄰對照循環之平均值之百分比變化，在報導點時所量測之回應單元之百分比變化。

【0270】 各種 α 突觸核蛋白肽之抑制水準顯示於圖5中。僅針對三種肽觀測到6470 Fab與 α 突觸核蛋白單體或原纖維之顯著抑制：AS121-130、AS123-132及AS125-134，其中針對AS123-132觀測到最高抑制水準，對抗體與單體及原纖維之結合分別為37%及54%。針對肽AS125-134獲得略微較低之抑制水準，分別為34%及52%，表明抗原決定基之主要組分包含殘基125至132。肽AS121-130分別在20%及27%之較低水準下抑制，表明全部三種肽共有之殘基：125至130對抗原決定基貢獻最多。

【0271】 因為6470抗體之抗原決定基似乎至少包含序列YEMPSEEG，所以在利用6470 Fab之共同結晶研究中研究AS123-132肽。

X射線結晶

為製備複合物，使大約10 mg/ml之1 ml純化之6470兔Fab與Fab中之 α -突觸核蛋白肽123-132 (EAYEMPSEEG)混合：1:2之肽莫耳比且在室溫下培育1小時。適用於晶體生長之條件藉由沉滴式蒸氣擴散方法，使用可

商購的結晶篩(Qiagen)鑑別。為產生繞射質量晶體，使用懸滴式蒸氣擴散方法。

【0272】對於6470 Fab-肽123-132複合物，使1 μ l蛋白溶液與1 μ l儲存溶液混合，該儲存溶液含有1.6 M硫酸銨及0.1 M Hepes緩衝液pH 7.5。在簡單穿過含有1.6 M硫酸銨、0.1 M Hepes緩衝液pH 7.5及20%甘油之低溫保護劑溶液之後，收集晶體且在液氮中速凍。在簡單穿過含有0.2 M硫酸銨及35% (v/v)聚乙二醇8000之低溫保護劑溶液之後，收集晶體且在液氮中速凍。

【0273】在Diamond Synchrotron, Didcot, Oxfordshire, UK處之光束線i04-1上自6470 Fab-肽123-132之單晶收集2.9 Å之繞射資料且使用Mosflm、Aimless及Truncate處理。使用自產Fab之座標作為檢索模型，藉由與Phaser分子置換解析複合物之結構。

【0274】使用CNS (Brunger等人，(2007) Nature Protocols 2, 2728-2733)及COOT (Emsley等人，(2004) Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60, 2126-2132)進行優化及模型建構週期，直至兩種模型彙聚所有優化統計資料。使用Molprobit43驗證模型幾何。利用Pymol44產生分子可視化。藉由考慮Fab/肽接觸表面上4Å距離內的原子，產生下文描述之抗原決定基資訊。資料收集及優化統計資料展示於表4A及表4B中。

表4A

結構	VR6470 Fab-肽123-132
空間群	P 3 ₁ 2 1
晶胞大小	
α, b, c (Å)	111.78, 111.78, 71.93
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 120.00

分辨率(Å)	30.00 - 2.90 (3.08- 2.90)
$R_{\text{融合}}$	0.07 (0.36)
$I / \sigma I$	17.0 (5.1)
完整性(%)	99.9 (100)
冗餘	9.8(10.2)

表4B

優化	VR6470 Fab-肽123-132
分辨率(Å)	30.00 - 2.90
反射數目	11762
R_{work}/R_{free}	0.2587/0.3192
原子數目	
蛋白質	3259
水	0
配位體	30
B 因數	
肽	81.8
Fab	67.4
R.m.s.偏差	
鍵長(Å)	0.005
鍵角度(°)	1.125

【0275】 括弧中之值係指高解析度殼。 $R_{sym} = \sum(I - \langle I \rangle) / \sum(I)$ ，其中 I 係觀測到之積分強度， $\langle I \rangle$ 係獲自多個量測結果之平均積分強度，且求和係針對所有觀測到之反射。 $R_{work} = \sum||F_{obs}| - k|F_{calc}|| / \sum|F_{obs}|$ ，其中 F_{obs} 及 F_{calc} 分別係觀測到及計算之結構因數。使用隨機選擇且忽略優化計算之5%反射資料， R_{free} 經計算為 R_{work} 。

【0276】 重鏈及輕鏈殘基與肽之間的主要接觸展示於表5中。

表5

鏈	殘基 (SEQ ID NO: 13)	原子	鏈	肽胺基酸	肽靶原子	距離(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
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
鏈	殘基 (SEQ ID NO: 11)	原子	鏈	胺基酸	靶原子	距離(埃)
L	34(TYR)	OH [O]	A	123(GLU)	CD [C]	3.63
			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
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

【0277】 總之，抗原決定基包含殘基E123、Y125、E126、M127、P128、S129、E130及E131。圖6展示6470 Fab與肽123-132之複合且圖7及8分別展示肽123-132與6470 Fab重鏈及輕鏈之間的觸點。

實例4：抗體人類化及親和力成熟

藉由將來自兔V區的CDR移植至人類生殖系抗體V區構架上以使兔抗體6470人類化。為了恢復抗體活性，來自兔V區域之許多構架殘基亦保留於人類化序列中。使用Adair等人(1991) (WO91/09967)概述之方案選擇此等殘基。兔抗體(供體)V區序列與人類生殖系(受體)V區序列的比對以及所設計的人類化序列顯示於圖9及圖10中。除了使用Chothia/Kabat組合定義的CDR-H1 (參見Adair等人，WO91/09967)之外，自供體序列移植至受體序列的CDR如由Kabat等人(Kabat等人，1987)所定義。

【0278】 藉由DNA 2.0 Inc.之自動化合成方法，設計且構築編碼多個變異體重鏈及輕鏈V區序列的基因。藉由寡核苷酸引導之突變誘發(在一些情況下包括CDR內之突變)修飾VH及VK基因產生重鏈及輕鏈V區之其他變異體。為了短暫表現於哺乳動物細胞中，將人類化輕鏈V區基因選殖

入UCB輕鏈表現載體pMhCK中，該表現載體含有編碼人類 κ 鏈恆定區的DNA (Km3異型)。將人類化重鏈V區基因選殖入UCB人類 γ -4重鏈表現載體pMh γ 4PFL中，該表現載體含有編碼具有鉸鏈穩定化突變S241P之人類 γ -4重鏈恆定區的DNA (Angal等人，Mol. Immunol. 1993, 30(1):105-8)。亦類似地製備包含兔V區(SEQ ID NO: 11及13)及人類恆定區之嵌合6470且用作比較抗體。將所得重鏈及輕鏈載體共同轉染於Expi293™懸浮液細胞中提供呈人類IgG4P之人類化重組抗體之表現。

【0279】選擇人類V區IGKV1-16與JK4 J區 (IMGT, <http://www.imgt.org/>)作為抗體6470輕鏈CDR的受體。移植物gL3中之輕鏈構架殘基皆來自人類生殖系基因，殘基48及72 (參考SEQ ID NO: 15)除外，其中分別保留供體殘基麩醯胺酸(Q48)及麩醯胺酸(Q72)。保留殘基Q48及Q72對於人類化抗體(圖9及表6)結合人類 α 突觸核蛋白原纖維之完整效能而言係必需的。

表6

抗體變異體	輕鏈	重鏈	人類原纖維親和力(KD)
	供體殘基	供體殘基	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

【0280】選擇人類V區 IGHV3-23 與JH4 J區(IMG T, <http://www.imgt.org/>)作為抗體6470之重鏈CDR的受體。與多種兔抗體共同的係，抗體6470之VH基因比所選人類受體短。在與人類受體序列對準時，抗體6470之VH區之構架1缺乏保留在人類化抗體中之N端殘基(圖10)。6470兔VH區中之構架3亦缺乏位於β片股D與E之間之環中的兩個殘基(75及76)：在人類化移植物中，間隙填充有來自所選人類受體序列的相應殘基(離胺酸75，K75；天冬醯胺76，N76) (圖10)。移植物gH23及gH36中之重鏈構架殘基皆來自人類生殖系基因，來自包含殘基24、47、48、49、73、78及97 (參考SEQ ID NO: 23及31)之群之一或多個殘基除外，其中分別保留供體殘基纈胺酸(V24)、酪胺酸(Y47)、異白胺酸(I48)、甘胺酸(G49)、絲胺酸(S73)、纈胺酸(V78)及精胺酸(R97)。保留殘基V24、Y47、I48、G49及R97對於人類化抗體結合人類α突觸核蛋白原纖維之完整效能而言係必需的。

【0281】另外，將人類化VH基因選殖於UCB人類Fab-HIS表現載體pMhFab10HIS中，該表現載體含有編碼具有十個組胺酸殘基之C端標籤之人類γ-1 CH1-鉸鏈域的DNA：組胺酸標籤藉由親和層析促進表現Fab之純化。將所得重鏈及輕鏈載體共同轉染於Expi293™懸浮液細胞中提供呈Fab-HIS型式之人類化重組抗體之表現。

【0282】根據WO2014198951中所描述之IOTA方法進行親和力成

熟。使藉由X射線結晶測定之複合物中之6470兔Fab與 α 突觸核蛋白肽EAYEMPSEEG (123-132)之間的界面進行分析以鑑別可能改善6470兔Fab對 α 突觸核蛋白之親和力之突變。IOTA係用於測定蛋白質界面或結合位點處之指定接觸原子類型之機率的統計勢工具。

【0283】 為了評估此等突變對抗體結合人類 α 突觸核蛋白單體或原纖維之效能的影響，首先在6470兔Fab中研究突變(表7A)。如實例3中所描述，在Biacore T200儀器上藉由使用表面電漿子共振技術測定相互作用動力學。CDRL1中之殘基33 (參考SEQ ID NO: 11)由天冬醯胺(N)突變成精胺酸(R)或離胺酸(K)：殘基33突變為精胺酸導致對 α 突觸核蛋白之親和力提高(表7A)。CDRH2中之殘基55由絲胺酸(S)突變成天冬醯胺(N)，且CDRH3中之殘基99由天冬醯胺(N)突變成離胺酸(K)，或麩醯胺酸(Q)或組胺酸(H)或色胺酸(W) (參考SEQ ID NO: 13)，殘基55突變為天冬醯胺且殘基99突變為組胺酸導致對 α 突觸核蛋白之親和力提高(表7A)。CDRH3中天冬醯胺(N99H)之突變亦移除潛在脫醯胺位點。

表7A

突變	鏈	單體			原纖維		
		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
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

【0284】最後，亦在先前產生之全長人類化抗體中測試新鑑別之突變(表6)且測試其對人類原纖維之選擇性(表7B)。如實例3中所描述，在Biacore T200儀器上藉由使用表面電漿子共振技術測定相互作用動力學。如表7B中所示，輕鏈中之位置33 (參考SEQ ID NO: 19)及重鏈中之56及102 (參考SEQ ID NO: 27及35)處的突變導致對人類原纖維之親和力提高，此對需要穿過血腦屏障以結合其標靶之抗體而言係有利的特徵。當全身性投與抗體時，可能損失大量所投與之抗體，此係因為抗體穿過複雜生理屏障的系統有限。

表7B

人類化抗體	人類單體			人類原纖維		
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)
VR6470 gL3 ; gH23	1.20E+06	0.02416	20.15	8.55E+05	1.42E-04	0.166
VR6470 gL3 ; gH36	1.15E+06	0.01742	15.10	1.07E+06	3.17E-04	0.298
VR6470 gL3 ; gH23-S56N-N102H	9.66E+05	0.00445	4.62	1.04E+06	7.08E-05	0.068
VR6470 gL3 ; gH36-S56N-N102H	1.19E+06	0.00488	4.10	1.25E+06	7.44E-05	0.059
VR6470 gL3-N33R ; gH23-S56N-N102H	3.48E+06	0.00594	1.71	2.07E+06	1.16E-04	0.056
VR6470 gL3-N33R ; gH36-S56N-N102H	4.97E+06	0.00648	1.31	2.39E+06	1.26E-04	0.053

【0285】使變異體人類化抗體鏈及其組合表現且評估其效力(相對於親本抗體)、其生物物理學特性及用於下游處理的適合性。

實例5：人類化抗體之表徵

針對六種人類化6470 IgG4P抗體進行生物物理學表徵(表8，表1中之序列)。

表8

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

【0286】 基於熱穩定性(T_m)、實驗pI、疏水性、溶解度(PEG沈澱分析)及在空氣/液體界面處之聚集穩定性篩選所有抗體以確定突變尤其對於親和力、穩定性及可發展性而言是否具有任何影響。

【0287】 篩選製程亦因抗體具有以下各者包括評估化學穩定性(脫醯胺、天冬胺酸異構化傾向)：

1. 僅對gL3gH23及gL3gH36而言重鏈CDR3中之Asn(102)S基元(脫醯胺)；
2. 對於所有抗體輕鏈CDR3中之Asn(98)Asp(99)基元(脫醯胺)；
3. 對於除N33突變體之外之全部，輕鏈CDR1中之Asn(32)Asn(33)基元(脫醯胺)；
4. 對於所有抗體，輕鏈CDR3中之Asp(99)G基元(Asp異構化)

【0288】 在此等位點的化學不穩定性可導致產物異質性及免疫原性。

熱穩定性(T_m)量測

使用Thermofluor分析來測定解鏈溫度(T_m)或去摺疊中點時的溫度。

在此方法中，使用螢光染料SYPRO®橙，根據對隨著溫度升高而暴露之疏水區域的結合來監測蛋白質去摺疊過程。

【0289】反應混合物含有5 μ l 30x SYPRO®橙色染料 (Invitrogen™)，用PBS自5000X儲備溶液及45 μ l 0.12 mg/ml樣品(於PBS中，pH 7.4)稀釋。將10 μ l混合物一式四份分配於384 PCR光學孔板中且在7900HT快速即時PCR系統(Applied Biosystems™)上運作。PCR系統加熱裝置設定於20°C至99°C，升高速率為1.1°C/min。電荷耦合裝置監測孔中的螢光變化。對強度增加作圖，且利用斜率拐點計算T_m，如下文所述。

【0290】對所有抗體均觀測到兩次去摺疊轉變。第一次可歸因於CH₂結構域之T_m。第二次根據文獻(Garber E, Demarest SJ. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 13;355(3):751-7)可歸因於Fab去摺疊域及CH₃結構域之T_m之平均值。表9概括結果。

表9

描述符	Fab域T _m	SD	CH ₂ 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

【0291】IgG4分子之熱穩定性在正常預期範圍內(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.)。

實驗pI

6470抗體之實驗pI係使用全毛細管成像cIEF iCE3™系統 (ProteinSimple)獲得。

【0292】 藉由混合以下來製備樣品：30 µl樣品(來自HPLC級水中之1 mg/ml儲備液)、35 µl 1%甲基纖維素溶液(Protein Simple)、4µl pH 3-10兩性電解質(Pharmalyte)、0.5 µl 4.65合成pI標記物及0.5µl 9.77合成pI標記物(ProteinSimple)、12.5 µl 8M 脲溶液(Sigma-Aldrich®)。使用HPLC級水將最終體積補足至100 µL。將混合物簡單渦旋以確保完全混合且在分析前以10,000 rpm離心3分鐘以移除氣泡。將樣品在1.5 kV下聚焦1 min，隨後在3 kV下5 min，且使用ProteinSimple軟體獲取毛細管之A280影像。所得電泳圖首先使用iCE3軟體分析且給pI值賦值(pI標誌物之間的線性關係)。經校準的電泳圖隨後使用Empower®軟體(Waters)整合。

【0293】 所有6470抗體之實驗pI均在8.4-9.2範圍內。分子之間的帶電荷物種之比值存在微小差異，然而，此對於IgG4P分子並非出乎意料的。所有pI均較高且因此將有助於抗體之製造製程。

【0294】

疏水相互作用層析(HIC)

疏水相互作用層析(HIC)按提高之疏水性的順序分離分子。分子在高濃度極性鹽存在下結合於疏水性固定相且隨著鹽濃度降低而解吸附於移動相中。較長之滯留時間等效於較高疏水性。

【0295】 以1.6 M硫酸銨及PBS (pH 7.4)按1:2稀釋2 mg/mL樣品。將5µg (5µL)樣品注射於與具有螢光偵測器之Agilent 1200二元HPLC串聯連接的Dionex ProPac™ HIC-10管柱(100 mm × 4.6 mm)上。藉由內源螢

光(激發及發射波長分別為280 nm及340 nm)監測分離。

【0296】 使用緩衝液A (0.8 M硫酸銨，100 mM磷酸鹽pH 7.4)及緩衝液B (100 mM磷酸鹽pH 7.4)，如下使用梯度溶離分析樣品：(i)在0% B下保持2分鐘，(ii) 0至100% B之線性梯度持續30分鐘(0.8毫升/分鐘) (iii) 管柱用100% B洗滌2分鐘且在0% B中重新平衡10分鐘，之後進行下一次樣品注射。將管柱溫度維持在20°C下。

【0297】 亦按相同運作順序分析展現低疏水性及高之標準物以及對照以使滯留時間標準化(表11)。使用以下等式針對低疏水性及高疏水性標準物使樣品之滯留時間(RT)標準化：

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

表10

抗體(主峰)	滯留時間(min)	標準化的滯留時間(min)
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

【0298】 所有6470抗體及突變體均展示類似的標準化滯留時間及類似的低疏水性。市售治療劑抗體傾向於展現低疏水性(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.)。低疏水性在製造期間有助於穩定性(亦即減少聚集)。

【0299】

使用聚乙二醇(PEG)沈澱分析進行溶解度量測。

使用聚乙二醇(PEG)沈澱分析分析膠體穩定性。藉由提高PEG之濃度(w/v)且量測在溶液中剩餘之蛋白質量，使用PEG以數量上可定義之方式降低蛋白質溶解度。此分析用以在不使用習知濃度方法下模仿高濃度溶解度之效果。在PBS pH 7.4中之7-18% PEG-3350、50 mM醋酸鈉/125 mM氯化鈉pH 5.0 (乙酸鹽pH 5)及20 mM L-組胺酸、140 mM NaCl，pH 6.0存在下研究6470抗體之PEG誘導的沈澱。視需要使用滲析緩衝液互換樣品且將濃度調節至2 mg/mL。為了將非平衡沈澱降至最少，樣品製劑由混合的2×蛋白質及2×PEG溶液以1:1體積比組成。在混合之後，將樣品在37°C下培育30分鐘以重新溶解非平衡聚集體。在20°C下隔夜培育之後，使樣品離心60 min (4000 g)。將上清液之等分試樣轉移至一半體積的96孔光學培養板且使用板讀取器BMG Labtech FLUOstar® Omega LVIS A280來量測280 nm下之吸光度。相對於PEG%及計算中點(LogEC50) (藉由非線性曲線擬合產生)繪製濃度資料，獲得不同斜率作為樣品之相對膠體溶解度之量測。在此分析中，較高LogEC50等效於較高膠體穩定性。

【0300】 結果(未圖示)表明隨著緩衝液pH值升高，所有6470抗體之膠體穩定性均降低。另外，獲得以下趨勢：自最高至較低可溶性gL3gH23及gL3gH36 > gL3gH23-S56N-N102H及gL3gH36-S56N-N102H > gL3-N33RgH23-S56N-N102H及gL3-N33RgH36-S56N-N102H。

【0301】 因此，為親和力成熟引入之突變降低抗體分子之膠體穩定性。在gL3gH23與gL3gH36移植物之間未觀測到差異。

【0302】

空氣-液體界面處之壓力影響(聚集分析)

蛋白質在暴露於空氣-液體界面時傾向於伸展，其中向疏水環境(空

氣)呈現疏水性表面且向親水環境(水)呈現親水性表面。攪拌蛋白質溶液實現可驅動聚集之較大空氣-液體界面。此分析用以模仿分子將在製造(例如超過濾)期間將經受之應力且提供嚴格條件以便試圖區分不同的抗體分子。

【0303】 使用Eppendorf恆溫混勻儀Comfort™藉由渦旋對PBS pH 7.4、50 mM醋酸鈉/125 mM氯化鈉pH 5.0 (醋酸鹽pH 5)及20mM L-組胺酸、140mM NaCl，pH6.0中之樣品加壓。選擇緩衝液作為通用調配前緩衝液。在渦旋之前，使用合適的吸光度係數(1.35 Abs 280 nm，1 mg/mL，1 cm路徑長度)將濃度調節至1 mg/mL且使用Varian Cary® 50-Bio分光光度計獲得280 nm、340 nm及595 nm下之吸光度以建立零時間讀數。將各樣品次等分於1.5 mL圓錐形Eppendorf®型封端試管(4×250 μL)中且經受嚴格條件以便藉由在1400 rpm下在25°C下渦旋直至24小時測試穩固性。使用Varian Cary™ 50-Bio分光光度計，藉由在595 nm下渦旋3小時及24小時後量測樣品來監測時間依賴性聚集(濁度)。針對各樣品相對於時間繪製平均吸光度值。

【0304】 結果示於圖11中。在三種緩衝液中之任一者中，在24小時時6470抗體之間不存在差異，然而，在渦旋3小時之後，辨別出聚集傾向之較小差異，呈現出緩衝液依賴性。

【0305】

脫醯胺/Asp異構化應力研究

使用6470抗體gL3gH23及gL3gH36建立應力研究以確定四種鑑別之可能序列可靠性之脫醯胺/Asp異構化傾向：重鏈CDR3中之Asn(102)S (脫醯胺基元)；輕鏈CDR3中之Asn(98)Asp(99)(脫醯胺基元)；輕鏈CDR1中

之Asn(32)Asn(33)(脫醯胺基元)及輕鏈CDR3中之Asp(99)G (Asp異構化基元)。脫醯胺及Asp異構化之傾向/速率因其依賴於一級序列及3D結構以及溶液特性而無法預測(R C Stephenson及S Clarke (1989)；K. Diepold等人(2012)；Jasmin F. Sydow等人(2014)；N.E. Robinson等人(2004))。

【0306】 亦獲得基礎脫醯胺水準(非加壓樣品)-低水準指示低敏感性但水準可因不同製造批次/條件而變化。

【0307】 兩種6470抗體經緩衝液互換於緩衝液中，該等緩衝液(i)已知促進Asn(N)殘基之脫醯胺(Tris pH 8/37°C)及(ii)已知促進Asp異構化(醋酸鹽，pH 5/37°C)。將每種緩衝液中之樣品之最終濃度調節至約6.5 mg/mL且隨後分成兩種等分試樣，其中一種儲存於4°C下且另一種儲存於37°C下直至4週。立即(T0)及在第2週及第4週移除等分試樣且儲存於-20°C下。

【0308】 2週樣品經解凍且藉由胰蛋白酶消化/質譜(MS)分析以如下進行化學修飾分析。加壓蛋白質之樣品經TCEP還原且經含有0.1% w/v Rapigest洗滌劑之Tris-HCL緩衝液pH 8.0中之氯乙酸烷基化。添加胰蛋白酶(1:25 w/w)且在室溫下使樣品消化隔夜。藉由添加甲酸直至1% v/v停止蛋白分解且將樣品稀釋至0.5 mg/ml，之後離心以移除沈澱的Rapigest™。所得肽經分離且在與Thermo Fusion™質譜儀接合之Waters BEH C18管柱上分析，該質譜儀執行利用碰撞誘導解離(collision induced dissociation；CID)斷裂之陽性離子、資料依賴性軌道阱-軌道阱方法。使用Thermo Xcalibur™及Pepfinder software™分析LC-MS資料。

【0309】 亦進行尺寸排阻HPLC及SDS PAGE以監測聚集/降解。

【0310】 肽映射/質譜分析之結果顯示，全部三種CDR位點中之基

礎Asn脫醯胺含量<1.5%且對於重鏈CDR3中之Asn(102)S位點，在pH 8.0及37°C下2週之後，脫醯胺最大限度地提高高達約6%。

【0311】 在pH 5.0及37°C下2週之後，輕鏈CDR3中之Asp(99)修飾(丁二醯亞胺形成)為約25%。

【0312】 評定化學修飾(重鏈CDR3上之Asn(102)處的脫醯胺及輕鏈CDR3上之Asp(99)處的丁二醯亞胺中間產物的形成)對重組全長人類 α 突觸核蛋白單體及經純化重組人類 α 突觸核蛋白原纖維之親和力/親合力的影響。將完全脫醯胺之產物(Asn(102)Asp)及加壓材料(pH5/2週/37°C)用於研究。

【0313】

實例6：免疫組織化學

藉由Asterand Bioscience (Royston, United Kingdoms)進行免疫組織化學。在自動加熱及冷卻下，使用Dako PT Link及EnVision FLEX靶修復溶液(pH 6)在97°C下使冷凍切片(10 μ m)首先進行抗原修復程序，持續20 min。所有後續培育步驟均在室溫下進行。冷凍切片經風乾30分鐘，在1 \times PBS中製備之4%多聚甲醛中固定10分鐘，在Dako EnVision™ FLEX洗滌緩衝液(Dako)中洗滌且隨後裝載於Dako自動染色儀Plus中。藉由使切片與Dako過氧化酶阻斷劑(Dako)一起培育5分鐘來阻斷內源性過氧化酶活性。隨後用1 \times PBS將切片洗滌兩次，之後與Dako CSA II蛋白質阻斷劑(Dako)一起培育10分鐘。藉由噴氣移除蛋白質阻斷溶液且使切片與在Dako抗體稀釋劑(Dako)中稀釋(0.05 μ g/ml)之6470兔IgG1 (包含SEQ ID NO: 47及48)一起培育30分鐘。在培育之後，切片用1 \times PBS洗滌兩次，隨後與抗兔Dako Flex聚合物-HRP基質(Dako)一起培育20分鐘，洗滌兩次且

隨後與二胺基聯苯胺基質(Dako)一起培育10分鐘。藉由以蒸餾水沖洗載片停止顯色反應。在色素形成之後，自Dako自動染色儀Plus移出切片且用蘇木精對其人工對比染色，在遞增之乙醇系列中脫水，在三種變化之二甲苯中澄清且滑動加上蓋玻片處於DPX封固劑(Sigma-Aldrich)下。使用Aperio ScanScope AT Turbo系統(Leica Biosystems)獲得染色切片之數位影像。針對來源於五種不同pS129- α -突觸核蛋白-陽性及三種不同pS129- α -突觸核蛋白-陰性供體(1個切片/供體)之腦切片測試6470兔IgG1。6470兔IgG1標記PD患者之顳葉皮質及黑質中之神經纖維網及路易體樣特徵(圖12A-E)。在非PD腦組織中，6470兔IgG1標記顳葉皮質中之神經纖維網，但在皮質或黑質中未觀測到路易體樣結構(圖12F-H)。此等觀測結果表明，6470兔IgG1與來自PD及非PD患者之腦組織之神經纖維網中的正常 α -突觸核蛋白結合，但其僅與存在於PD患者中之路易體中的病理 α -突觸核蛋白結合。

【0314】

實例7：基於細胞之聚集分析

在自由式293表現培養基(Invitrogen™)中以 0.7×10^6 個細胞/毫升製備HEK自由式293F細胞(懸浮液細胞)且培養至 300×10^6 個細胞/毫升。根據製造商說明書進行轉染且簡單地將併入 α -突觸核蛋白基因之600 μ g pcDNA3.1(+)混入20 ml OptiMEM培養基中，同時將293Fectin稀釋於OptiMEM培養基(Invitrogen™)中且在室溫下培育5分鐘。添加經稀釋之DNA且在室溫下培育20分鐘，之後逐滴添加於細胞上(每個燒瓶20 ml)。在37°C，125 rpm，8% CO₂下將細胞培育24小時。立即使用細胞或以5百萬個細胞/毫升之濃度將細胞冷凍於FBS + 10% DMSO中。

【0315】 若細胞先前已經冷凍，則將冷凍小瓶解凍且將細胞再懸浮於自由式293培養基中，在500 g下離心5分鐘，排出上清液且將糰粒以 2×10^6 個細胞/毫升再懸浮於包含Pen/鏈黴素(Invitrogen™)之自由式293培養基(Life Technologies™)中。在384孔板(Grainer™)中，添加20 μ l細胞懸浮液(總計大約40,000個細胞/孔)。向各孔添加150 nM之人類 α -突觸核蛋白原纖維(如本文實例1中所述製備)，之後添加(各種濃度)待測試之PBS中之抗體(6470 gL3gH23；6470 gL3gH36；6470 gL3N33gH23 S56N N102；6470 gL3N33gH36 S56N N102；6470 gL3gH23 S56N N102；6470 gL3gH36 S56N N102；全部作為IgG4P，表1中之序列)。在細胞培養培養箱中，在37°C，5% CO₂，95%濕度下將培養板培育2天。

【0316】 在第二天結束時，自所有孔抽吸培養基且洗滌板，剩餘20微升/孔。向各孔添加約50 μ l之PBS且在500 g下將培養板離心5分鐘。用板洗滌器自所有孔抽吸上清液，在各孔中剩餘20 μ l之培養基。添加維爾烯(Lonza™) (50微升/孔)且在500 g下將培養板離心5分鐘，抽吸上清液，每孔僅剩餘20 μ l培養基。各孔補充有於PBS中之20 μ l 8%甲醛(16%水溶液，Life Technologies™)+ 2% Triton X-100 (VWR™)。使培養板在室溫下培育15分鐘且其後添加由HBSS (不含鈣-鎂之VWR™) + 2% FBS + 2mM EDTA (Life Technologies™)組成之50 μ l FACS緩衝液。使培養板在2000 g下離心1分鐘且抽吸上清液，在各孔中僅剩下20 μ l培養基。各孔進一步補充有含有按1:300稀釋之抗pSer129 α -突觸核蛋白抗體(AbCam™)之20 μ l FACS緩衝液。使培養板在室溫下培育1小時且隨後各孔補充有50 μ l FACS緩衝液，之後再次在2000 g下離心1分鐘。移出上清液，之後各孔補充有1:500稀釋之Alexafluor647-結合抗兔-二次抗體(Life

Technologies™)及DAPI (Life Technologies™)。使培養板在黑暗中在室溫下培育1小時，且隨後添加50 μ l FACS緩衝液且在2000 g下將培養板離心1分鐘。在洗滌後，添加更多的FACS緩衝液且備好培養板以置放於流式細胞儀(BD FACS Canto II)中進行讀數。

【0317】 使用FlowJo軟體分析FACS資料。首先，使用正向及側面散射閘化活的單細胞。其次，閘化DAPI+事件且將其數目用作活的有核單細胞之數目量測。最後，閘化磷絲胺酸 129- α -突觸核蛋白-陽性(pSer129+)細胞。pSer129+細胞相對於所有DAPI+細胞之百分比用作聚集之量測。相對於僅用原纖維處理且無抗體之孔使資料標準化，且表示為百分比。

【0318】 將結果概括於圖13中，該等結果顯示所測試抗體抑制表現 α 突觸核蛋白之細胞上由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之聚集的能力。此等資料證實，本發明之抗體能夠阻斷由 α -突觸核蛋白原纖維誘導之聚集，其中IC₅₀低於5nM。

【0319】 誤差條表示量測之標準誤差(SEM，N=3，n=9)。

實例8：原代神經元聚集分析

在剝離緩衝液(不含鈣及鎂，含0.6% D-(+)-葡萄糖，20 mM HEPES之HBSS)中自E17小鼠胚胎剝離Hippocampi。隨後移出剝離緩衝液且經解離溶液(不含鈣及鎂，含0.6% D-(+)-葡萄糖、20 mM HEPES、40U/m木瓜蛋白酶、1mg/ml DNase、1mM L-半胱氨酸、0.5mM EDTA之HBSS)置換。在37°C下培育30分鐘後，移出解離緩衝液且用平板培養基(Neurobasal™培養基，2% B27補充物，1mM GlutaMAX，2.5% FBS，50單位/毫升青黴素-鏈黴素)將hippocampi洗滌3次。用1 ml移液管濕磨組

織凝集塊以獲得單細胞懸浮液。在平板培養基中將細胞稀釋至合適濃度。將約15000個細胞接種於塗佈PDL之384孔板之各孔中。隨後將細胞保持在細胞培養培養箱中，處於37°C，5% CO₂，95%濕度下。

【0320】 次日，用不含FBS (Neurobasal™培養基，2% B27補充劑，1 mM GlutaMAX，50個單位/毫升青黴素-鏈黴素)之平板培養基置換80%之培養基。在平板接種七天之後，移出培養基，各孔中剩餘20 µl。向各孔添加100 nM人類α-突觸核蛋白原纖維(如本文實例1中所述製備)，之後添加(各種濃度)待測試之PBS中之抗體6470gL3gH36 hIgG4P(即，包含SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 33之圖14中之VR6470)。在細胞培養培養箱中，在37°C，5% CO₂，95%濕度下將培養板培育額外7天。在平板接種十四天之後，自所有孔抽吸培養基，每孔剩餘20 µl。各孔用80 µl Dulbecco磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)洗滌。移出DPBS，且在每孔40 µl之固定緩衝液(含4%多聚甲醛之DPBS)中培育細胞，持續15分鐘。隨後移出固定緩衝液且另外用80 µl DPBS洗滌細胞。移出DPBS且每孔經40 µl滲透緩衝液(含0.1% Triton X-100之DPBS)置換。在10分鐘之後，移出滲透緩衝液，且在每孔40 µl之阻斷緩衝液(含1% BSA及0.1% Triton X-100之PBS)中將細胞培育1小時。隨後移出阻斷緩衝液且用40微升/孔之一次抗體溶液(含0.3%兔抗磷絲胺酸129α-突觸核蛋白抗體(AbCam™ ab51253)之阻斷緩衝液)置換。使抗體溶液在細胞上培育1 h，之後洗滌三次(每次90 µl，PBS)。在最後一次洗滌之後，移出PBS且用40 µl之二次抗體溶液(含0.2% AlexaFluor488結合抗β-III-微管蛋白抗體之PBS中的0.1% AlexaFluor647結合抗兔抗體)置換。使二次抗體溶液在細胞上培育1 h，隨後移出且用40 µl之包含0.3% CellMask Blue™之PBS置換。在培育5分

鐘之後，用80 μ l PBS將孔洗滌3次，隨後每孔填充有50 μ l PBS，之後用透明塑膠薄膜密封培養板。

【0321】 在Arrayscan板成像器中使培養板成像(ThermoFisher Scientific™)。使用來自同一製造商之HCS Scan™軟體分析影像。使用 β -III-微管蛋白信號監測神經元密度。不包括展示損壞之神經元細胞層的(一或多個)稀疏場，其由 β -III-微管蛋白信號之表面的顯著減少反應。最後，使用每個場pSer129 α 突觸核蛋白信號之表面量化病理 α -突觸核蛋白聚集。

【0322】 咸信 α 突觸核蛋白之S129處的磷酸化在控制 α 突觸核蛋白正常功能、以及調節其聚集、LB形成及神經毒性中起重要作用。在正常條件下，僅一小部分之 α 突觸核蛋白在大腦中之S129處構成性磷酸化(Fujiwara H等人 (2002) Nat Cell Biol, 4, 160-164)，而已在患有突觸核蛋白病之患者之大腦中觀測到pS129之顯著積聚(Kahle PJ等人 (2000) Ann N Y Acad Sci, 920, 33-41)；Okochi M等人 (2000) J Biol Chem, 275, 390-397)；Anderson JP等人 (2006) J Biol Chem, 281, 29739-29752)。

【0323】 相對於僅用原纖維處理且無抗體之孔使資料標準化，且表示為百分比。如圖14中所示，6470gL3gH36 (稱為VR6470)抑制表現內源性含量之 α 突觸核蛋白之小鼠上的由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之 α 突觸核蛋白聚集。誤差條表示平均值之標準誤差(SEM，N=4，n=18)。此等資料證實6470gL3gH36能夠阻斷小鼠原代神經元上由 α 突觸核蛋白原纖維誘導之聚集，其中IC₅₀低於4 nM。

實例9：活體內VR6470功效之評估

在野生型雄性小鼠C57BL/6J (Janvier, France)及表現人類 α 突觸核蛋白之 α -突觸核蛋白基因剔除小鼠之轉殖基因模型(其後稱為SNCA-OVX ; Charles River, France)中測試抗體6470gL3gH36 IgG4P (在此實例中命名為VR6470且包含SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 33)。

【0324】用VR6470及小鼠預成型原纖維(PFF) (如本文實例1中所述製備)注射C57BL/6J及SNCA-OVX小鼠。亦與結合最後九個C端殘基處之 α 突觸核蛋白之比較抗 α 突觸核蛋白抗體(比較C-端Ab)一起注射陰性對照抗體(101.4)及媒劑。此類比較抗體(其具有與根據本發明之抗體不同的CDR)展示相當的與本發明之抗體之結合特徵。比較抗體對 α 突觸核蛋白之親和力比本發明之抗體更高且具有類似的生物物理特性。根據實例8 (表11)，在防止於基於HEK細胞之分析上的 α 突觸核蛋白聚集方面亦同等有效。

表11

抗體	單體			原纖維			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	小於5
比較C端Ab	4.76E+05	1.03E-02	21.64	1.08E+06	2.20E-05	0.02	小於5

【0325】在室溫下在搖動器上，使抗體與PFF一起預培育30分鐘，之後直接投與至動物之大腦中。以1 μ g PFF/10 μ g抗體之比率在PBS中製備抗體/PFF混合物。pH 7.4下之PBS用作媒劑溶液。在組合腦內投藥24小時之前進行一次注射。

【0326】隨後以30 mg/kg之劑量向小鼠腹膜內投與抗體。在第一次注射之後第7天給予第二次腹膜內注射，且隨後執行相同方案(以30 mg/kg之劑量每週一次腹膜內注射，投藥體積為10 ml/kg)，對於野生型雄性小

鼠C57BL/6J持續4週，總計4次注射且對於SNCA-OVX小鼠持續11週，總計12次注射。對於兩個實驗，將小鼠隨機分配給藥物治療組且使實驗對治療盲目。

【0327】 根據《歐洲指令2010/63/EU》及比利時法律之指導原則進行動物實驗。來自UCB Biopharma SPRL (LA1220040及LA2220363)之動物實驗的道德委員會批准了實驗方案(ASYN-IC-PARKINSON-MO)。在手術時，小鼠重量在25與30 g之間且為17週齡。小鼠圈養於籠子(每個籠子4隻小鼠，Macrolon 2型)中。使其保持12:12輕/暗循環，輕循環在06:00h開始。溫度維持在20-21°C下且濕度大約為40%。在分配至實驗組之前，所有動物能夠自由獲取標準的顆粒飼料及水。在手術之前及之後提供額外的營養及福利。由動物護理人員每日監測動物健康。儘力將患病降至最低。在麻醉下進行處死。

【0328】 使用腹膜內注射之50 mg/kg之氯胺酮(Nimatek, Eurovet Animal Health B.V.)及0.5 mg/kg之美托定咪啉(medetomidine) (Domitor, Orion Corporation)的混合物在全身麻醉下進行手術。另外，給予2.5 mg/kg阿替美唑(atipamezole) (Antisedan, Orion Corporation)以支持喚醒。重組之純化PFF經解凍且在室溫下音波處理(Qsonica 500 - 20 kHz；65%功率，30脈衝，1s開，1s關，持續一分鐘)。隨後在腦注射之前，使PFF與抗體預混合30分鐘且在室溫下搖晃30分鐘。以0.2 μ l/min之速率輸注溶液(2 μ l)且在緩慢縮回之前將針頭靜置原地，持續額外的2.5分鐘。在右側紋狀體中在以下座標處進行單側注射：AP= +0.20 mm，ML= -2.00 mm，DV= -3.20 mm。

【0329】 在麻醉之後，以6 ml/min之流動速率經由左心室經心灌注

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

【0330】 在神經科學協會(TN, USA)進行腦剖切。首先，用20%甘油及2%二甲亞砷處理大腦隔夜以防止凍結-人工產物，且使用MultiBrain®技術嵌入於明膠基質中。在固化之後，藉由浸沒於用碾碎乾冰冷卻至-70°C之異戊烷中快速冷凍阻斷物，且安放在AO860滑動式切片機之凍結段上。在冠狀平面中40 μm處將MultiBrain®塊切片。將所有切片依序收集於24個容器/塊中，該等容器填充有抗原保存溶液(49% PBS pH 7.0，50%乙二醇，1%聚乙烯吡咯啶酮)。立即將未染色之切片儲存於-20°C下。

【0331】 自由浮動的切片係藉由免疫化學以pSer129 α突觸核蛋白抗體(小鼠抗α突觸核蛋白(pSer129)生物素-(Wako - 010-26481))染色，以1:30,000稀釋。來自阻斷血清之所有培育溶液繼續使用含Triton X-100之Tris緩衝鹽水(TBS)作為媒劑；所有溶液均用TBS沖洗。內源性過氧化酶活性係藉由0.9%過氧化氫處理阻斷且非特異性結合係利用1.26%全正常血清阻斷。在沖洗之後，在室溫下用一次抗體將切片染色隔夜。媒劑溶液含有0.3% Triton X-100以滲透。在沖洗之後，使切片與抗生物素蛋白-生物素-HRP複合物(Vectastain Elite ABC套組, Vector Laboratories, Burlingame, CA)在室溫下一起培育一小時。在沖洗之後，切片用二胺基

聯苯胺四鹽酸鹽(DAB)及0.0015%過氧化氫處理以產生可見反應產物，安放在膠凝化(塗膠)玻璃載片上，經風乾，用硫堇輕微染色，在醇中脫水，在二甲苯中澄清，且以Permount滑動封蓋。

【0332】 對浮動腦切片進行p62/SQSTM1 (已知p62在人類中之路易體中共同聚集)之螢光免疫組織化學及Amytracker (一般用於蛋白質聚集體)染色。VR6470顯示降低用Amytracker染色之聚集之蛋白質數目且與pS129共同定位。此表明VR6470抗體不僅減少二氧磷基-突觸核蛋白且亦減少突觸核蛋白聚集體(資料未展示)。

【0333】 使用每個場pSer129 α 突觸核蛋白信號之pSer129 α 突觸核蛋白信號的定量來量化紋狀體、皮質、底外側扁桃體及黑質之同側側面中的病理 α 突觸核蛋白聚集。對所關注區(ROI)人工劃定界限且用VisioPharm 6軟體(VisioPharm)進行不同腦區中之pSer129 α 突觸核蛋白信號的自動定量。為量化pSer129 α 突觸核蛋白信號，使用線性貝氏演算法(Bayesian algorithm)，其提供信號區(以 μm^2 為單位之標記區域)之值。標記區域反映覆蓋不同腦區之pSer129 α 突觸核蛋白病變之量。所有定量均盲目進行直至統計分析結束。

【0334】 針對標記區域%進行資料分析(亦即以 μm^2 為單位之pSer129信號區域與以 μm^2 為單位之所關注之區域之間的比率)。對頭端-尾端安置之多個腦切片重複評定標記區域% (紋狀體：來自前囟+1.1至-0.94之13-14個切片；皮質：來自+1.1至-0.94之13-14個切片；底外側扁桃體：-0.58與-2.06之間的6-10個切片；黑質：來自-2.54至-3.88之6-8個切片)，且針對每個測試個體分別計算AUC。

【0335】 考慮單向ANOVA用於統計分析。變方分析之後為在不進

行任何大量調節下平均值之間的多個成對比較。(**對應 $p < 0.01$ 且*對應 $p < 0.05$)。資料經對數變換以滿足常態及等變異性準則。圖式表示未轉化資料之幾何平均數。

【0336】 如圖15A及圖15B中所示，在向雄性C57BL/6J野生型小鼠投與小鼠PFF一個月之後(圖15A)及在向雄性SNCA-OVX小鼠投與人類PFF三個月之後(圖15B)，在包括紋狀體、大腦皮質、扁桃體及黑質之四個不同的同側腦區中，VR6470 (對應於6470gL3gH36 IgG4P)與三個對照組相比明顯減少 α 突觸核蛋白病變(亦即pSer129 α 突觸核蛋白信號)。

【0337】 圖16分別展示C57BI/6J野生型小鼠之同側皮質、紋狀體、扁桃體及黑質中之Ser129 (標記區域%之AUC)處磷酸化的 α 突觸核蛋白之定量。陰性對照抗體及比較C端抗體與媒劑處理組相比未減少 α 突觸核蛋白病變。相比之下，與用小鼠PFF注射之C57BL/6J小鼠之三個對照組相比，VR6470顯著減少皮質、紋狀體、扁桃體及黑質中之病變(亦即pSer129 α 突觸核蛋白信號)水準($p < 0.01$)。在C57BI/6J野生型小鼠中進行測試時，用VR6470處理之組展示在四個不同結構及彼等之中，遠離注射部位之三個區(皮質、黑質及扁桃體)中pSer129 α 突觸核蛋白之顯著降低之水準。

【0338】 在用人類PFF注射之SNCA OVX小鼠中，與接受媒劑、陰性對照抗體(101.4)及比較C端抗體相比，VR6470顯著降低皮質及紋狀體中之病變水準。在SNCA-OVX小鼠中，在至少兩個不同腦結構(皮質及紋狀體)以及遠離注射部位的至少一個(大腦皮質)中，VR6470展示顯著降低之pSer129水準。

【0339】 此等結果證實，包含本發明之結構特徵之抗體(諸如

6470gL3gH36 IgG4P)能夠在活體內防止在Ser129處磷酸化之 α 突觸核蛋白的出現。

【0340】此外，結果表明，並非所有結合C端區中之a-syn的抗體均在活體內有效。以極高親和力與 α 突觸核蛋白之C端結合且在基於細胞之分析中防止 α 突觸核蛋白聚集的比較抗體未能防止活體內Ser129磷酸化。

【0341】因此，本發明之抗體可用於治療 α 突觸核蛋白病，例如在其特徵為Ser129磷酸化之增加時，包括帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。

實例10：小鼠中抗體6470之藥物動力學

以2 mg/kg之單次劑量用抗體6470gL3gH36 IgG4P (包含SEQ ID NO: 17及33；在圖17中且下文中僅稱為6470)靜脈內注射雄性C57/BL6小鼠(每種藥物n=3)。

【0342】自尾部靜脈取得血液樣品(距離注射0.083、1、4、8、24、72、120、168及336小時)且使其在室溫下結塊。在離心之後分離血清，隨後使血清冷凍直至分析。藉由LC-MS/MS進行6470之定量。來自研究之血清樣品經解凍且針對使用以不同濃度摻入對照小鼠血清中之6470或比較抗體製備之校準線定量。在將樣品注射於LC-MS/MS系統上之前，血清經變性、還原且分別使用乙腈(VWR, UK)、TCEP-Tris(2-羧乙基)膦鹽酸鹽(Sigma, UK)及碘乙醯胺(Sigma, UK)烷基化。經烷基化之樣品隨後在100 mM碳酸氫二銨緩衝液(Sigma, UK)中重構且在37°C下使用胰蛋白酶(Promega, UK)消化隔夜。藉由向樣品添加甲酸停止消化以降

低pH值且隨後使用Waters HLB SPE板去鹽。使用真空蒸發器蒸發所得溶離劑。在將樣品完全乾燥之後，用含有0.1%甲酸之95/5:水/乙腈重構樣品且注射於LC-MS/MS系統上。藉由耦接至AB Sciex QTrap 6500三重四極質譜儀之Schimadzu prominence HPLC系統進行LC-MS/MS分析。藉由自動取樣器將消化樣品注射於逆相高效液相層析管柱(Phenomenex Aeris C18肽管柱100×2.1mm，2.6 μm)上，該管柱維持在50°C下。將0.1%甲酸中之5-70%乙腈的線性梯度施用6分鐘且隨後以0.6 ml/min之流動速率歷經0.8分鐘逐漸升至0.1%甲酸中之95%乙腈。設定質譜儀以進行多個反應監測分析，從而以50毫秒/轉變之停留時間偵測6470或5811之肽之多個轉變。使用Analyst 1.6軟體版本進行資料分析。

【0343】 此等資料顯示，基於所量測之低清除值，6470在小鼠中具有極好的藥物動力學特性(表12及圖17A)。此等呈現出優於針對給藥於小鼠之人類IgG藥物所引用的典型範圍(3-16 ml/day/kg；Deng等人2011 mabs 3:1 61-66)。

【0344】 亦在食蟹獼猴中研究6470之藥物動力學特性且與先前技術抗體比較。以2或3 mg/kg之抗體6470gL3gH36 IgG4P (6470)及另一比較抗 α 突觸核蛋白抗體(胺基酸118-126內之結合 α 突觸核蛋白之抗 α 突觸核蛋白IgG1抗體；WO2013/063516)之單次劑量靜脈內注射雄性食蟹獼猴(每種藥物n=3或n=6)。

【0345】 在多個時間點(距離注射0.083、1、3、6、24、48、96、168、240、336、504、576、672小時)取得血液樣品且使其在室溫下結塊。在離心之後分離血清，隨後使血清冷凍直至分析。樣品經解凍且使用LC/ESI MS/MS分析。對於6470，使用本文中在此實例中先前所述之方

法，藉由在獼猴血清中建立標準曲線來進行定量。對於比較抗體，將馬肌血球素用作內標物且藉由使信號與內標物信號比較來進行定量。為進行製備，使樣品與內標物混合。樣品隨後經變性、烷基化且因此進行隔夜酶促消化(胰蛋白酶)。在消化之後，樣品經稀釋且使所有分析物之標誌性肽進行LC-MS/MS分析。樣品僅製備一次且注射兩次(每種方法各一次)。

【0346】 使用非房室分析，使用Pharsight Phoenix 6分析濃度-時間概況以推導各種個體動物之清除率及半衰期藥物動力學參數。報導各分子之平均值及標準偏差參數。

【0347】 如圖17B及表12中所示，6470亦在展現低清除率之食蟹獼猴中展現極佳的藥物動力學特性。如在小鼠中，其藥物動力學行為呈現出優於針對給藥於食蟹獼猴之人類IgG藥物所引用的典型範圍(5-12 ml/天/kg；Deng等人 2011 mabs 3:1 61-66)。

【0348】 針對比較抗體所觀測到之獼猴中的快速清除與公開之人類資料(JAMA Neurology 2018, 75, 10:1206-14)一致。相比於展現較弱的非典型藥物動力學特徵及參數之比較抗體，6470在暴露及清除率兩個方面優於比較抗體。

表12

抗體	清除率(SD) ml/天/kg	
	小鼠	獼猴
6470	3.1 (0.7)	4.7 (0.8)
比較劑		23.4 (9.8)

【序列表】

<110> 比利時商UCB生物製藥公司(UCB BIOPHARMA SRL)

<120> 抗體

<130> PF0130-WO

<150> GB1720975.0

<151> 2017-12-15

<160> 49

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 1

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 2

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 3

Ala Gly Tyr Lys Gly Gly Arg Asn Asp Gly Phe Ala

1 5 10

<210> 4

<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 4

Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp Met Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 5

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 6

Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu
1 5

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR-L1 N33R

<400> 7

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H2 S56N

<400> 8

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 N102H

<400> 9

Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu
 1 5

<210> 10

<211> 140

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 11

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

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Gln
35 40 45

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

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

Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly
85 90 95

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 12
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 家兔

<400> 12
 gccatcgtga tgaccagac tccatcttc aagtctgtcg ctgtgggaga cacagtcacc 60
 atcaattgcc aggccagtca gagtgtttat aagaacaact acttagcctg gtttcaacag 120
 aaaccagggc agcctcccaa acaactgata tatggtgcgt ccaactctggc atctggggtc 180
 ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcgatgtg 240
 gtgtgtgacg atgctgccac ttactactgt gcaggatata aagggtgctg taatgatggt 300
 tttgctttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaa 336

<210> 13
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 13

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp
 20 25 30

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

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

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

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His
 85 90 95

Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 14

<211> 342

<212> DNA

<213> 家兔

<400> 14

cagtcggtgg aggagtcgg gggtcgctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc cacgacatgt attgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaaatcat tggagccatt tatgctagtg gtagcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaag acctcgacca cggtaggatct gaaaatgacc 240

agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaattcatta tggtaatagt 300

ggtgggttgt gggccaagg cacctggtc accgtctcga gt 342

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gL3 VL

<400> 15

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

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
 35 40 45

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

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

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

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 6470 gL3 VL核苷酸

<400> 16
gacattcaga tgaccagtc cccttcatca ctgtccgcga gcgtgggcga cagagtgacc 60
attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaacaact acctggcctg gttccagcaa 120
aagcccggga aggcgcaaaa acagcttata tacggtgcat ccaactctcgc ctcgggagtg 180
ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg 240
caaccgagg atttcgccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300
ttcgcttttg gtggaggcac caaggtcgaa atcaag 336

<210> 17
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 6470 gL3輕鏈

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly
 85 90 95
 Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 18
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gL3輕鏈核苷酸

<400> 18
 gacattcaga tgaccagtc ccttcatca ctgtccgca gcgtgggca cagagtgacc 60
 attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaacaact acctggcctg gttccagcaa 120
 aagcccggga aggcgcaaaa acagcttata tacggtgcat cactctcgc ctcgggagtg 180
 ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctctccctg 240
 caaccgagg atttcgccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300
 ttcgcttttg gtggaggcac caaggtcgaa atcaagcgta cggtagccgc tccctccgtg 360
 ttcattcttc caccctccga cgagcagctg aagtccgca ccgcctccgt cgtgtgctg 420
 ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggaaa cgcctgcag 480
 tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540
 tctccacc tgaccctgtc caagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagtctt tcaaccgggg cgagtgc 657

<210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gL3 VL N33R

<400> 19

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

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

Arg Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
 35 40 45

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

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

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

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gL3 VL N33R核苷酸

<400> 20

gacattcaga tgaccagtc cccttcatca ctgtccgcga gcgtgggcga cagagtgacc 60

attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaaccgtt acctggcctg gttccagcaa 120

aagcccggga aggcgcaaaa acagcttata tacggtgcat ccaactctcgc ctcgggagtg 180

ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg 240

caaccgagg atttcgccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300

ttcgcttttg gtggaggcac caaggtcgaa atcaag 336

<210> 21

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gL3輕鏈N33R

<400> 21

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

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

Arg Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gln
 35 40 45

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

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

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

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 22

<211> 657

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gL3輕鏈N33R核苷酸

<400> 22

gacattcaga tgaccagtc ccttcatca ctgtccgcga gcgtgggcga cagagtgacc 60

attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaaccgtt acctggcctg gttccagcaa 120

aagcccggga aggcgcaaaa acagcttata tacggtgcat ccaactctcgc ctcgggagtg 180

ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg 240

caaccgagg atttcgccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300

ttcgcttttg gtggaggcac caaggtcgaa atcaagcgta cggtagccgc tccctccgtg 360

ttcattcttc caccctccga cgagcagctg aagtccgca ccgcctccgt cgtgtgcctg 420

ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgcctgcag 480

tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540

tctccacc tgaccctgtc caagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600

gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagtctt tcaaccgggg cgagtgc 657

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gH23 VH

<400> 23

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6479gH23 VH核苷酸

<400> 24

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgcg 180
 agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300
 ggtaatagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctgggta ccgtctcgag c 351

<210> 25
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH23重鏈

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

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

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

325

330

335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 26

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470gH23重鏈核苷酸

<400> 26

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgctctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgcg 180

agctgggcga aagccggtt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300

ggtaaatagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggfta ccgtctcgag cgcttctaca 360
 aagggccctt ccgtgttccc tctggccctt tctctcccgt ccacctccga gtctaccgcc 420
 gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgagcccc tgacagtgtc ctggaactct 480
 ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540
 tcctgtctct ccgtctgtac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
 aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660
 cctccctgcc cccctgtccc tgcctctgaa tttctgggcy gaccttccgt gttcctgttc 720
 ccccaaaagc ccaaggacac cctgatgata tcccggacc ccgaagtgc ctgctgggtg 780
 gtggacgtgt cccaggaaga tcccagggtc cagttcaatt ggtactgga cggcgtggaa 840
 gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca actccacctc ccgggtgggtg 900
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtaca gtgcaagggtg 960
 tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020
 cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tcctgacct gtctgggtcaa gggcttctac cctctcgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
 ttcttctgt actctcggct gaccgtggac aagtccccgt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 tcctgtctcg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320
 agcctgggca ag 1332

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gH23 VH S56N N102H

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gH23 VH S56N N102H核苷酸

<400> 28

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtgtaatac atactacgcg 180

agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300

ggtcacagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag c 351

<210> 29
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH23重鏈S56N N102H

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

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

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355

360

365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 30

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gH23重鏈S56N N102H核苷酸

<400> 30

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgctctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggaatac atactacgcg 180

agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300

ggtcacagtg gtgggtgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca 360

aagggccct ccgtgttccc tctggccct tctccccgt ccacctccga gtctaccgcc 420

gctctgggct gcctgttcaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct 480

ggcgcctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540

tcctgtctt cctgtctgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
 aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gttgacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660
 cctccctgcc cccctgccc tggccctgaa tttctgggcy gaccttccgt gttcctgttc 720
 cccccaaagc ccaaggacac cctgatgac tcccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg 780
 gtggacctgt cccaggaaga tcccagggtc cagttcaatt ggtacctgga cggcgtggaa 840
 gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca actccacctc ccgggtggtg 900
 tccgtgctga cctgtctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg 960
 tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020
 cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tcctgacct gtctgtgcaa gggcttctac cctccgaca ttgccgtgga atgggagtec 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
 ttcttctgt actctcggct gaccgtggac aagtcccgtt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 tctgtctcc tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320
 agcctgggca ag 1332

<210> 31
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH36 VH

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH36 VH核苷酸

<400> 32
 gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
 tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgcg 180
 agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300
 ggtaaatagtg gtgggttggt gggtcagggt actctgggta ccgtctcgag c 351

<210> 33
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH36重鏈

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

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

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385

390

395

400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 34

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gH36重鏈核苷酸

<400> 34

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg ctgtccagc ctggaggag cctgctctc 60
 tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggtagcac ataactacgcg 180
 agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300
 ggtaatagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca 360
 aagggccctt ccgtgttccc tctggccctt tctccccgt ccacctccga gtctaccgcc 420
 gctctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct 480
 ggcgcctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540
 tcctgtctt ccgtcgtgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
 aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660
 cctccctgcc cccctgccc tgccctgaa tttctgggcg gacctccgt gttcctgttc 720
 ccccaaaagc ccaaggacac cctgatgate tcccggacc ccaagtac ctgctgggtg 780
 gtggacgtgt cccaggaaga tcccagggtc cagtccaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840

gtgcacaatg ccaagaccaa gccagagag gaacagtica actccaccta ccgggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg 960
 tccaacaagg gcctgcctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020
 cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tcctgacct gtctggtcaa gggcttctac cctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
 ttcttctgt actctcggct gaccgtggac aagtcccgtt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 tcctgtccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca ccagaagtc cctgtccctg 1320
 agcctgggca ag 1332

<210> 35
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH36 VH S56N N102H

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH36 VH S56N N102H核苷酸

<400> 36
 gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
 tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggaatac ataactacgcg 180
 agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300
 ggtcacagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggtta ccgtctcgag c 351

<210> 37
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6470 gH36重鏈S56N N102H

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

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

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 38

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470 gH36重鏈S56N N102H核苷酸

<400> 38

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg ctgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120
ccgggtaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggtaatac ataactacgcg 180
agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240
cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg tattcattat 300
ggtcacagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggita ccgtctcgag cgcttctaca 360
aagggccctt ccgtgttccc tctggccctt tctccccgtt ccacctccga gtctaccgcc 420
gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct 480
ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgcccgtc tgcagtcctc cggcctgtac 540
tcctgtctct ccgtcgtgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660
cctccctgcc cccctgccc tgccttgaa tttctgggcg gacctccgt gttcctgttc 720
ccccaaagc ccaaggacac cctgatgac tcccggacc ccgaagtgac ctgcgtgggtg 780
gtggacgtgt cccaggaaga tcccaggctc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
gtgcacaatg ccaagaccaa gccagagag gaacagtica actccacctc ccgggtgggtg 900
tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg 960
tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagacctct ccaaggccaa gggccagccc 1020
cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccagggtg 1080

tcctgacct gtctggtaaa gggcttctac cctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
 ttcttctgt actctcggct gaccgtggac aagtcccgtt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 tcctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca ccagaagtc cctgtccctg 1320
 agcctgggca ag 1332

<210> 39
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類IGKV1-16 JK4受體架構

<400> 39

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 40
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類IGKV1-16 JK4受體架構核苷酸

<400> 40
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 41
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類IGHV3-23 JH4受體架構

<400> 41

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 42

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類IGHV3-23 JH4受體架構核苷酸

<400> 42

gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatacttt 300

gactactggg gccaaaggaac cctggtcacc gtctcctca 339

<210> 43

<211> 306

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 兔Fc-人類68-140 a-syn

<400> 43

Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu

1 5 10 15

Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys Lys Asp Gln
 20 25 30

Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp
 35 40 45

Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu
 50 55 60

Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
 65 70 75 80

Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 85 90 95

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 100 105 110

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp
 115 120 125

Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg
 130 135 140

Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg
 145 150 155 160

Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys
 165 170 175

Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 180 185 190

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr
 195 200 205

Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu
 210 215 220

Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp
 225 230 235 240

Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val
 245 250 255

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro
 260 265 270

Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His
 275 280 285

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro
 290 295 300

Gly Lys
 305

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-L1 X33

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa係Asn (N)或Arg (R)

<400> 44

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Xaa Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H2 X56

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa係Ser (S)或Asn (N)

<400> 45

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Xaa Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 X102

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa係Asn (N)或His (H)

<400> 46

Ile His Tyr Gly Xaa Ser Gly Gly Leu
 1 5

<210> 47

<211> 216

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 47

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

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Gln
 35 40 45

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

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

Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly
 85 90 95

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

Arg Thr Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp
 115 120 125

Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr
 130 135 140

Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr
 145 150 155 160

Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr
 165 170 175

Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser
 180 185 190

His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val
 195 200 205

Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 210 215

<210> 48

<211> 437
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 48

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp
 20 25 30

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

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

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

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His
 85 90 95

Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
 115 120 125

Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu
 145 150 155 160

Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

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

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 195 200 205

Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu
 210 215 220

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 225 230 235 240

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 245 250 255

Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu
 260 265 270

Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser
 275 280 285

Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu
 290 295 300

Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 305 310 315 320

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro
 325 330 335

Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser
 340 345 350

Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser
 355 360 365

Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr
 370 375 380

Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
385 390 395 400

Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser
405 410 415

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser
420 425 430

Arg Ser Pro Gly Lys
435

<210> 49

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6470兔Fab-His重鏈

<400> 49

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp
20 25 30

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

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His
85 90 95

Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
115 120 125

Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu
145 150 155 160

Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

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

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro His His His His His His His
210 215 220

His His His
225

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合 α 突觸核蛋白(alpha synuclein)之抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備診斷 α 突觸核蛋白病之分析的診斷活性劑，該 α 突觸核蛋白病選自帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

- i. 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含CDR-L1，該CDR-L1包含SEQ ID NO: 1、CDR-L2，該CDR-L2包含SEQ ID NO: 2、及CDR-L3，該CDR-L3包含SEQ ID NO: 3之，以及重鏈可變區，該重鏈可變區包含CDR-H1，該CDR-H1包含SEQ ID NO: 4、CDR-H2，該CDR-H2包含SEQ ID NO: 5、及CDR-H3，該CDR-H3包含SEQ ID NO: 6之；
- ii. 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO:15及重鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 31；或
- iii. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【請求項2】

如請求項1之用途，其中該診斷係對生物樣品進行。

【請求項3】

如請求項2之用途，其中該生物樣品包含腦脊髓液、諸如血漿及血清之血液、以及固體組織樣品，諸如活檢試樣或自其及其子代衍生之組織培

養物或細胞。

【請求項4】

如請求項2之用途，其中該生物樣品在獲取之後已以任何方式操控，諸如藉由試劑處理、增溶、或富集諸如聚核苷酸之某些組分。

【請求項5】

一種偵測已獲自個體之生物樣品中之 α 突觸核蛋白之活體外診斷方法，其包含以下步驟：

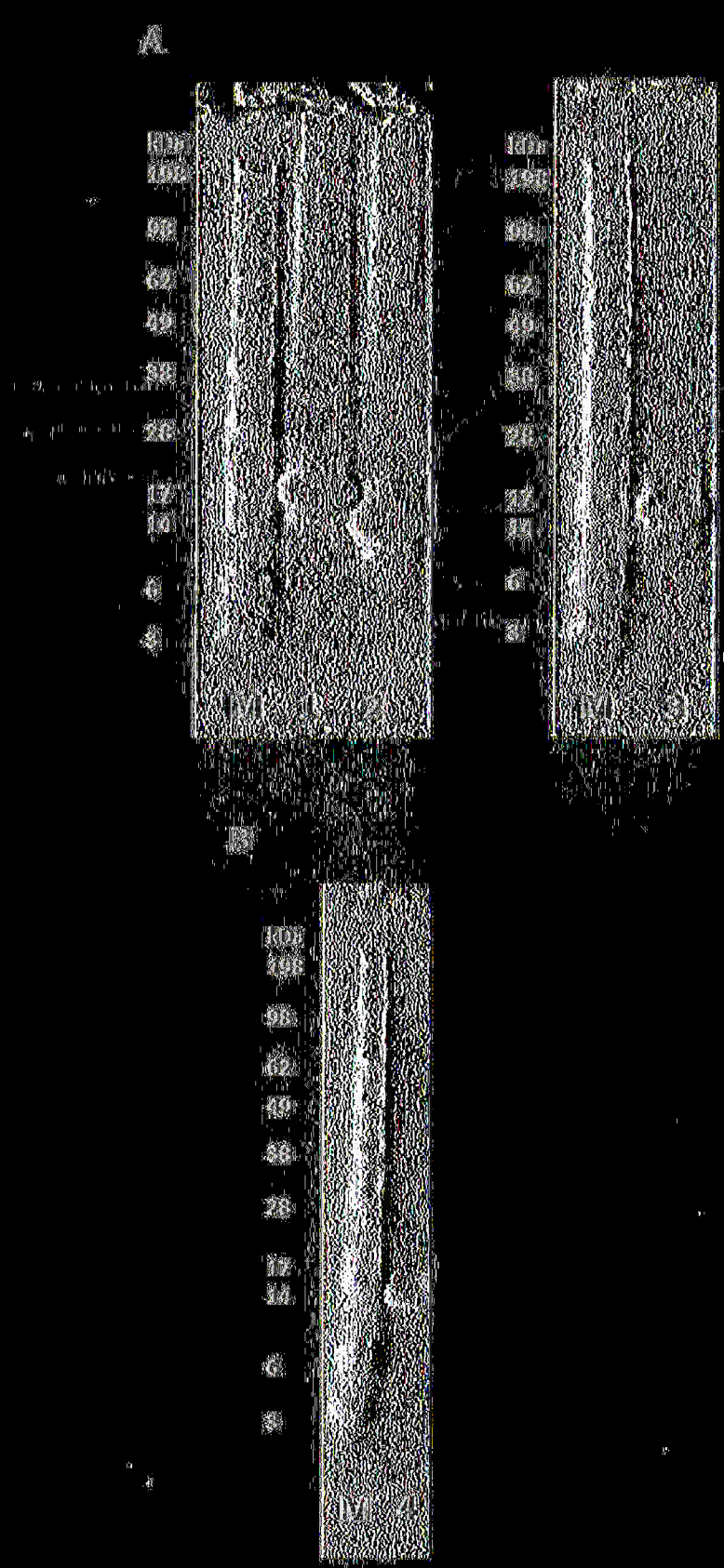
- i) 使該生物樣品與抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段接觸；
- ii) 偵測該抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之結合；
- iii) 與適合對照比較偵測到之 α 突觸核蛋白含量或 α 突觸核蛋白之特異性轉譯後修飾形式之存在；以及
- iv) 視情況鑑別一或多種 α 突觸核蛋白病，其包含判定 α 突觸核蛋白病之階段（嚴重程度）；其中該抗體或其抗原結合片段包含：
 - i. 包含含有SEQ ID NO: 1之CDR-L1、含有SEQ ID NO: 2之CDR-L2及含有SEQ ID NO: 3之CDR-L3之輕鏈可變區，以及包含含有SEQ ID NO: 4之CDR-H1、含有SEQ ID NO: 5之CDR-H2及含有SEQ ID NO: 6之CDR-H3之重鏈可變區；
 - ii. 包含SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 31之重鏈可變區；或
 - iii. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【請求項6】

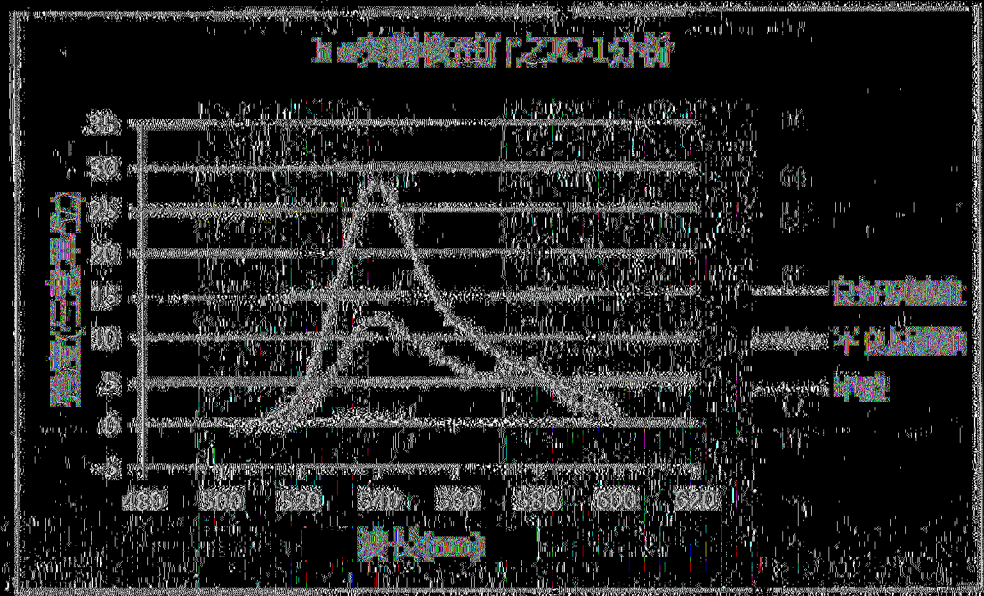
如請求項5之活體外診斷方法，其中該 α 突觸核蛋白病選自帕金森氏

病(PD) (包括帕金森氏病之特發及遺傳形式)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，其中該 α 突觸核蛋白病較佳為帕金森氏病。

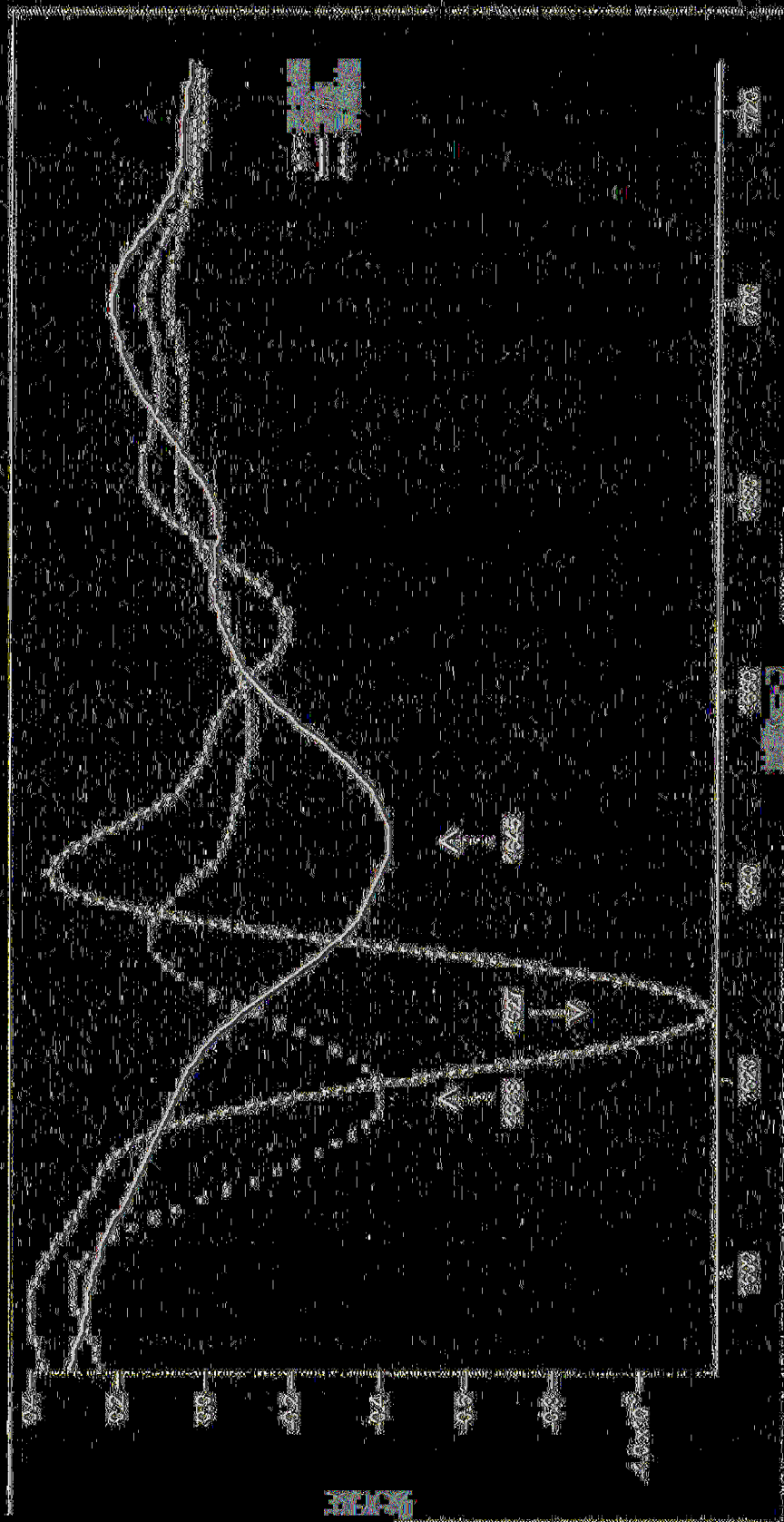
(發明圖式)



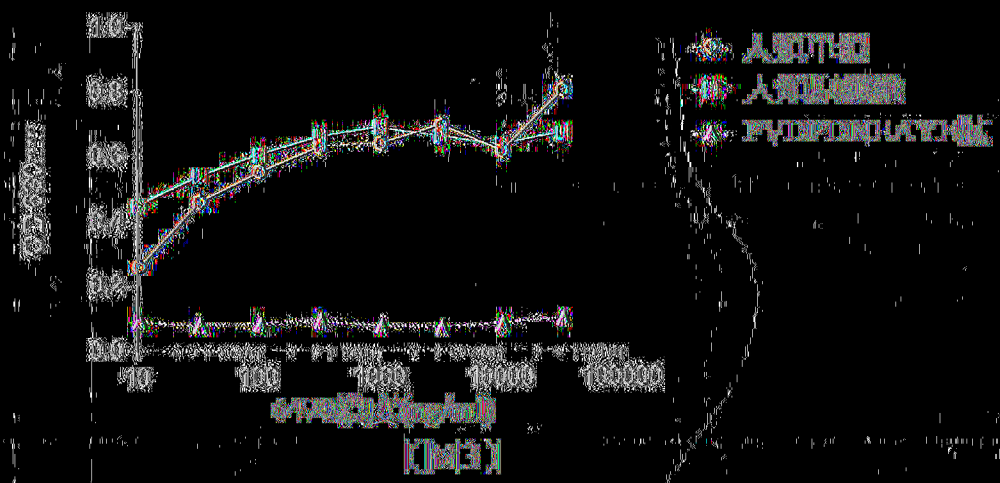
(圖1)

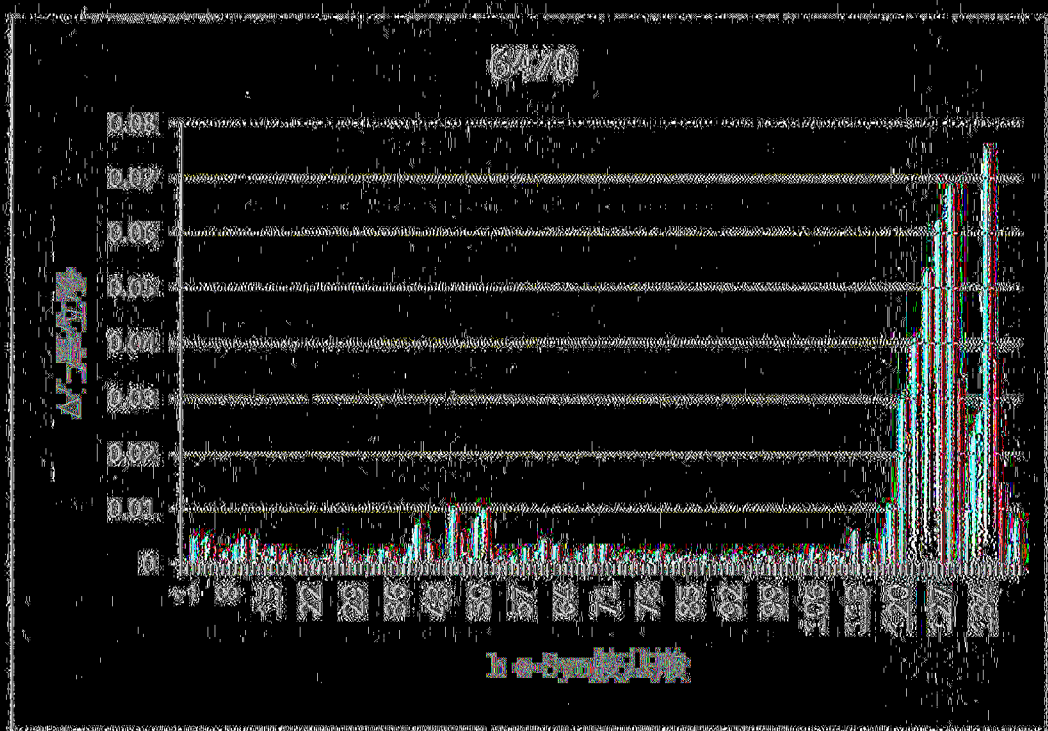
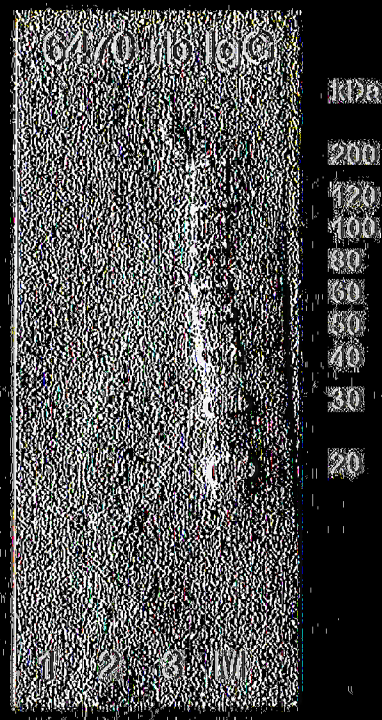


(F-12)



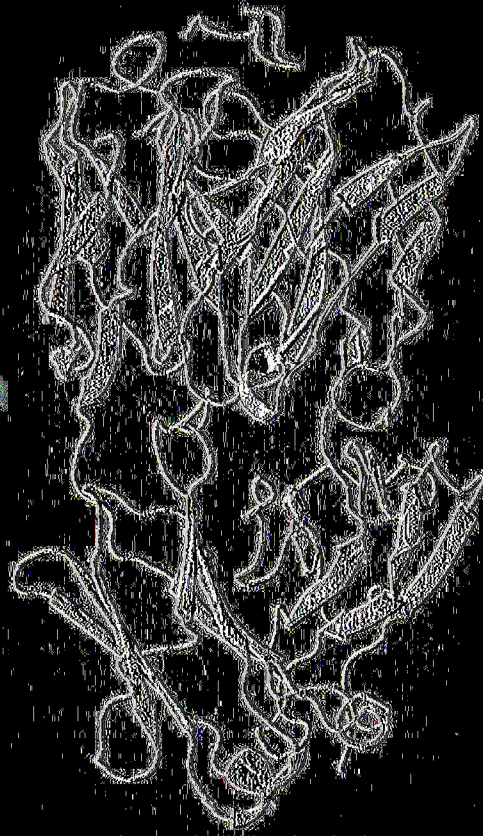
6470 RbIgG1 與重組人類 α 突觸核蛋白單體及原纖維以及 PVD(PDNEAY) 狀之 ELISA 結合



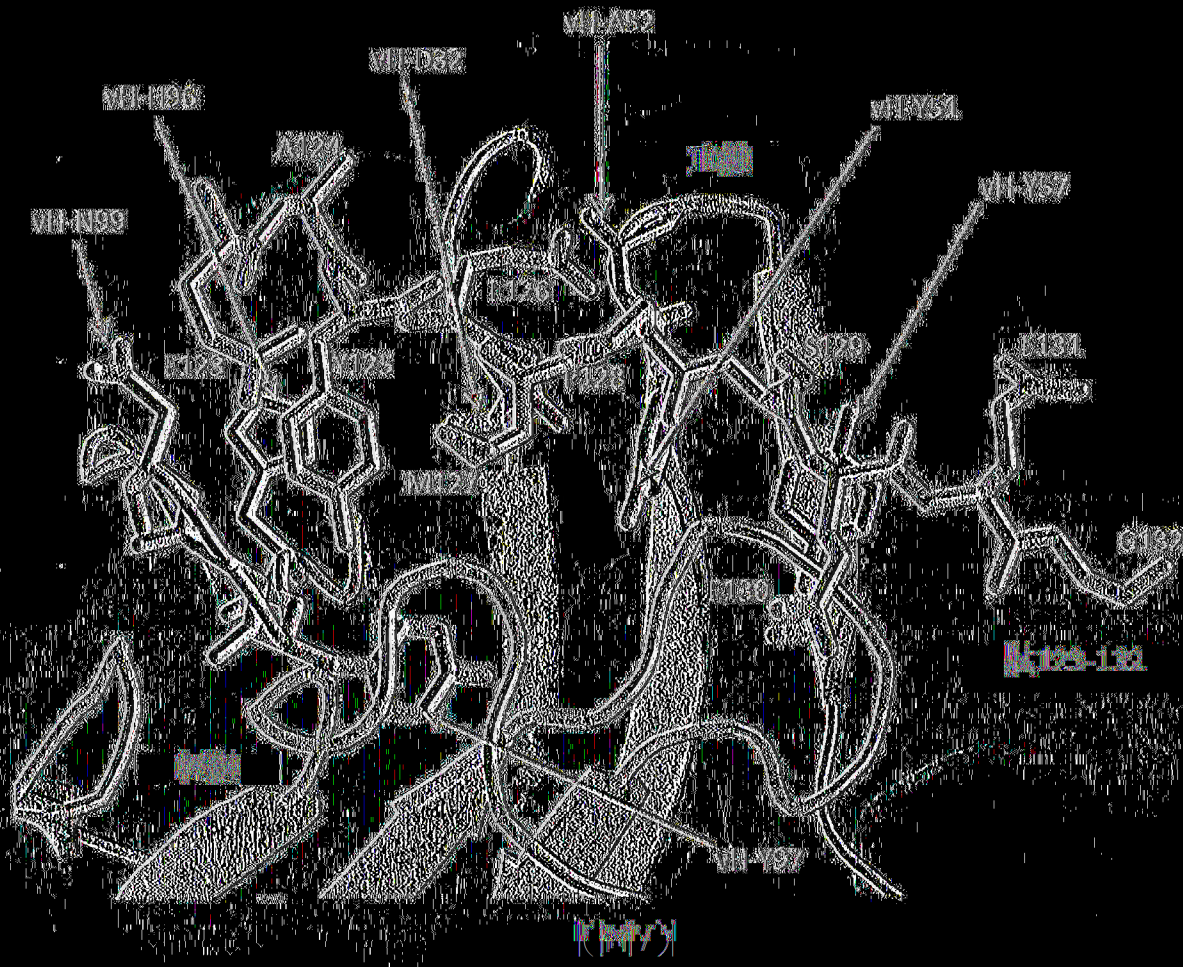


(14)

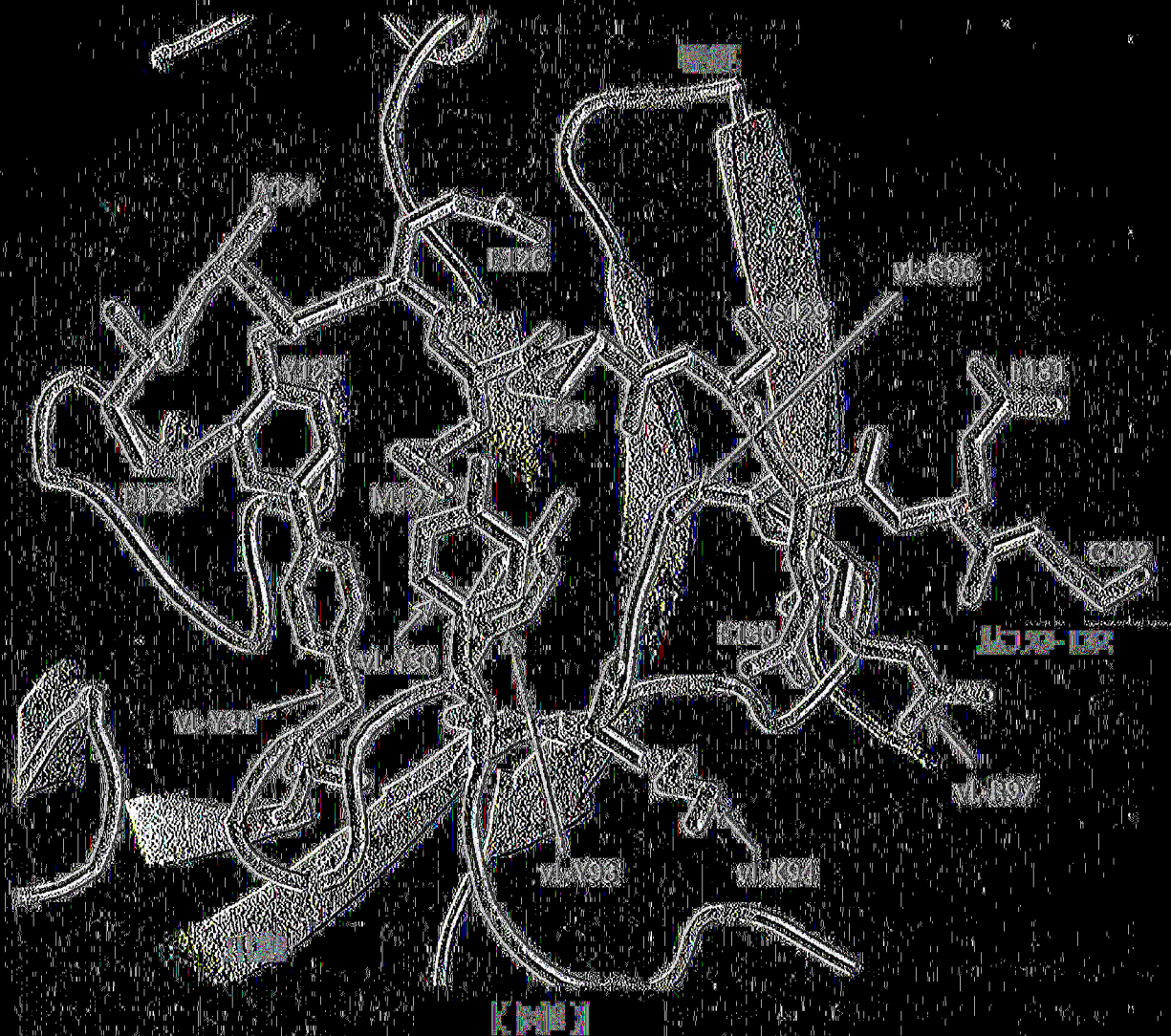
64/01A123-132



(16)



(續前頁)



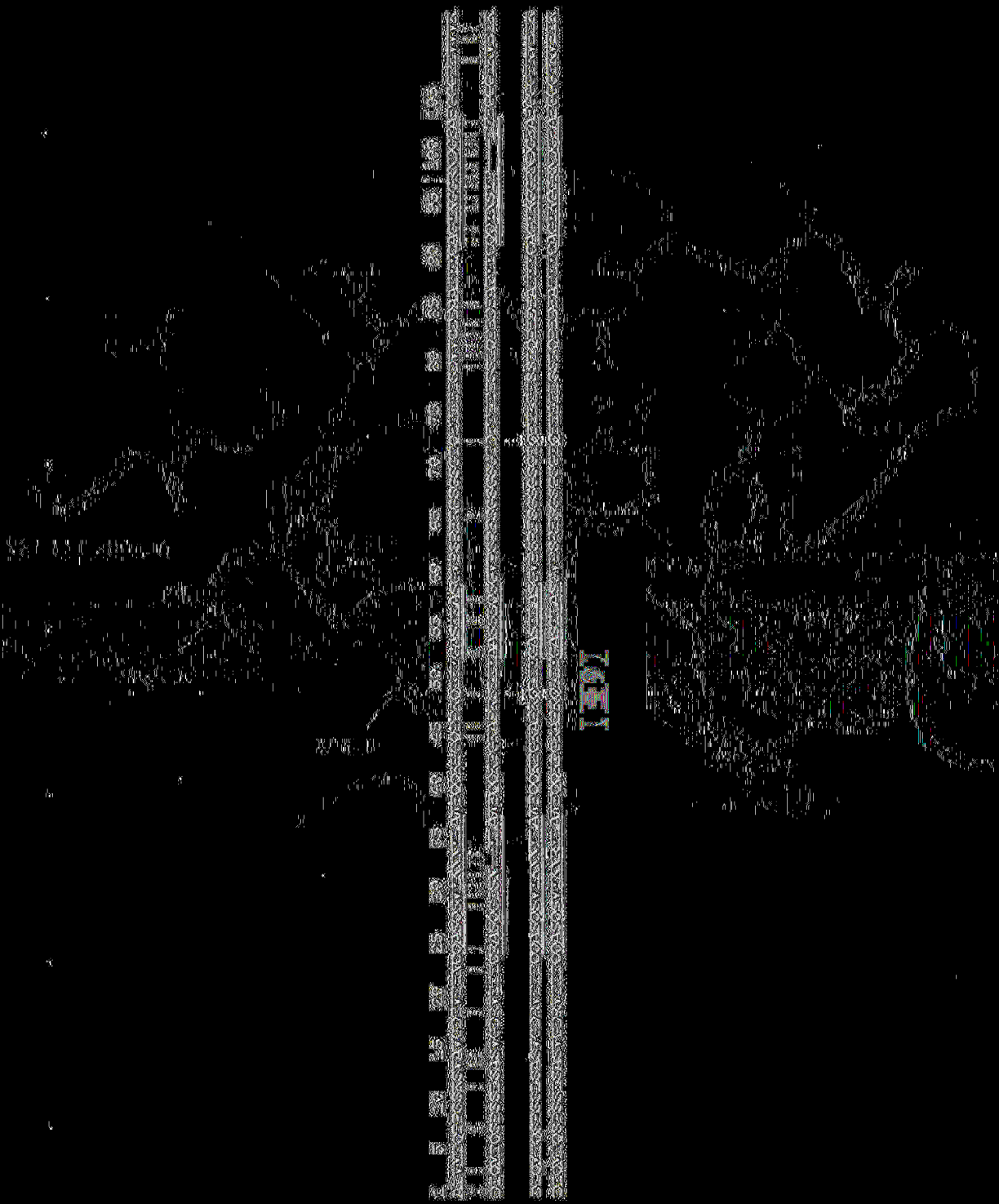
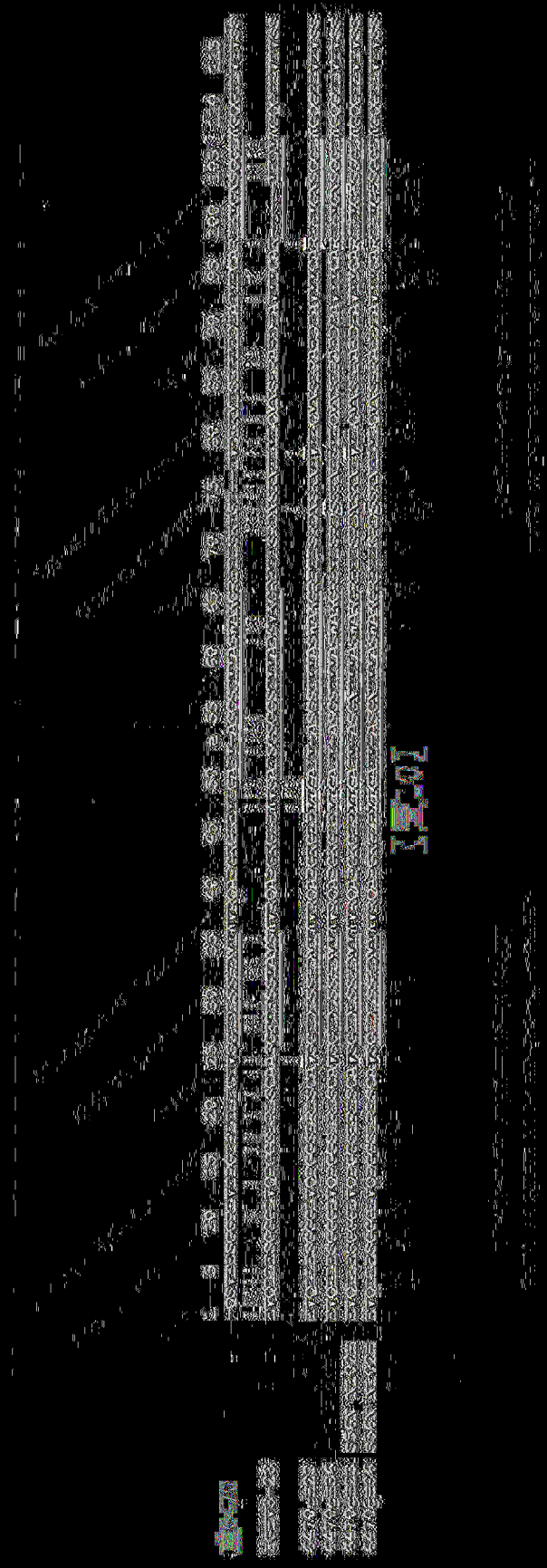
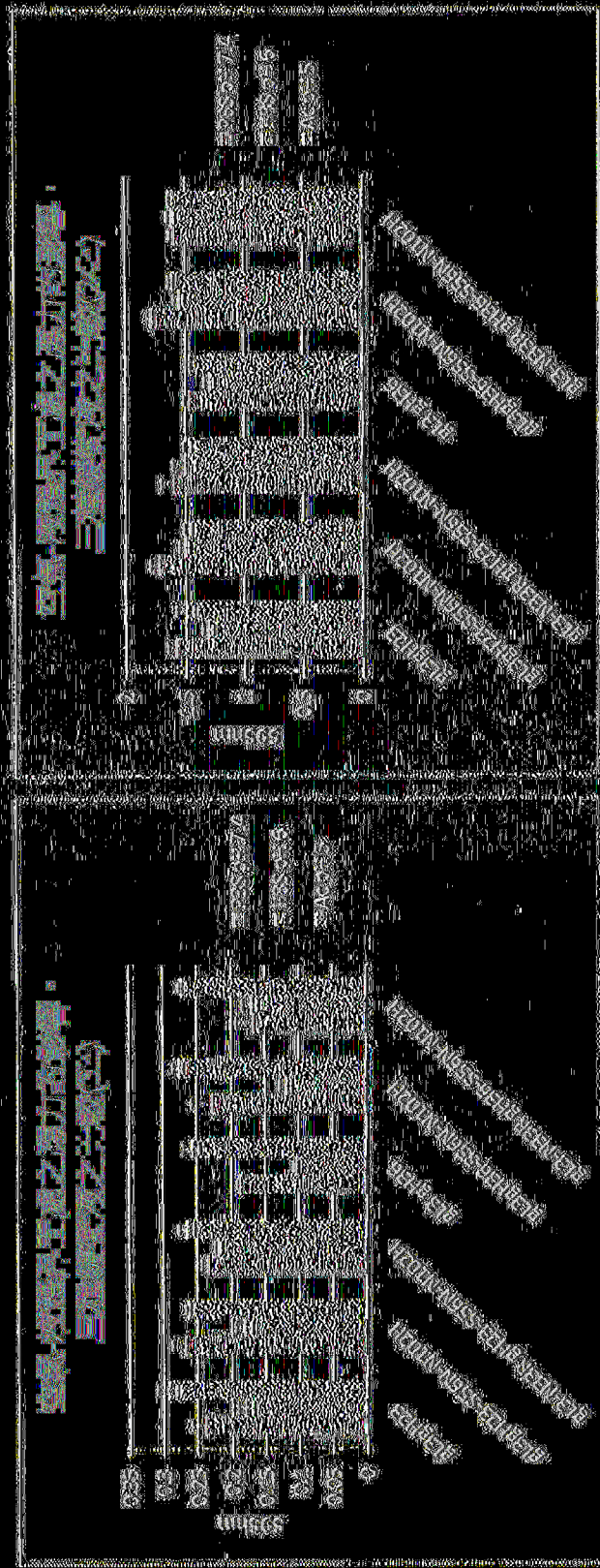


圖 6470



10211



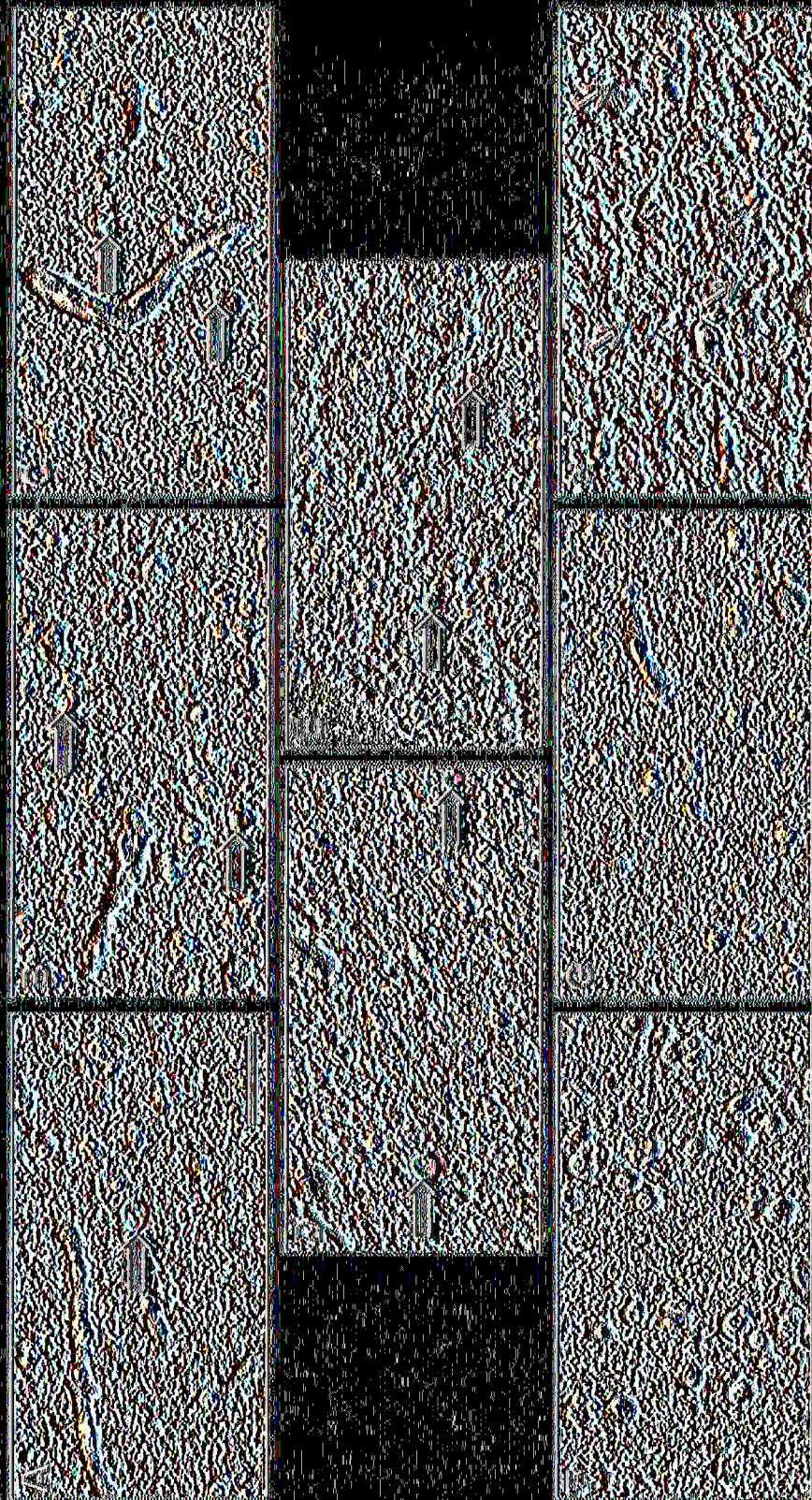
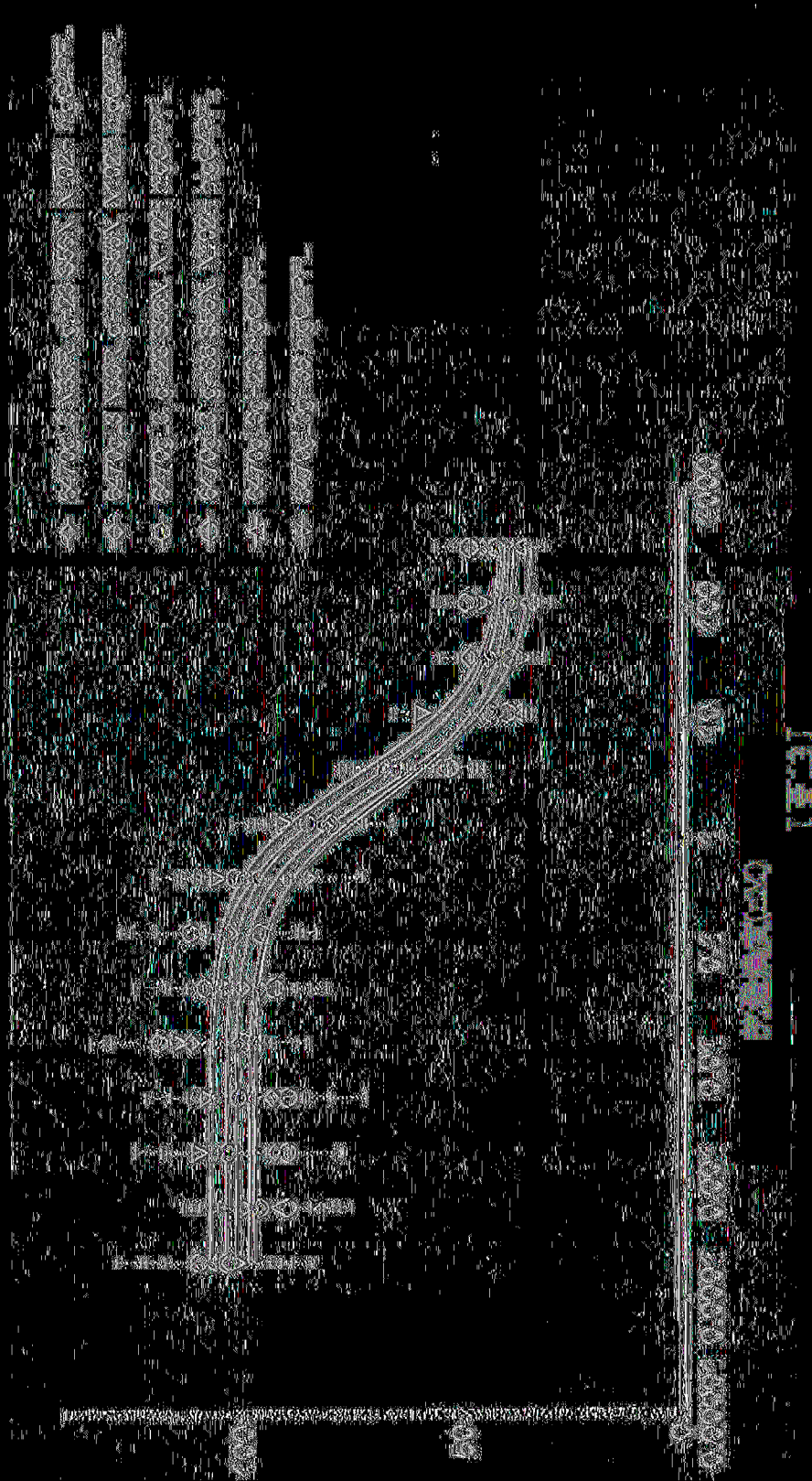
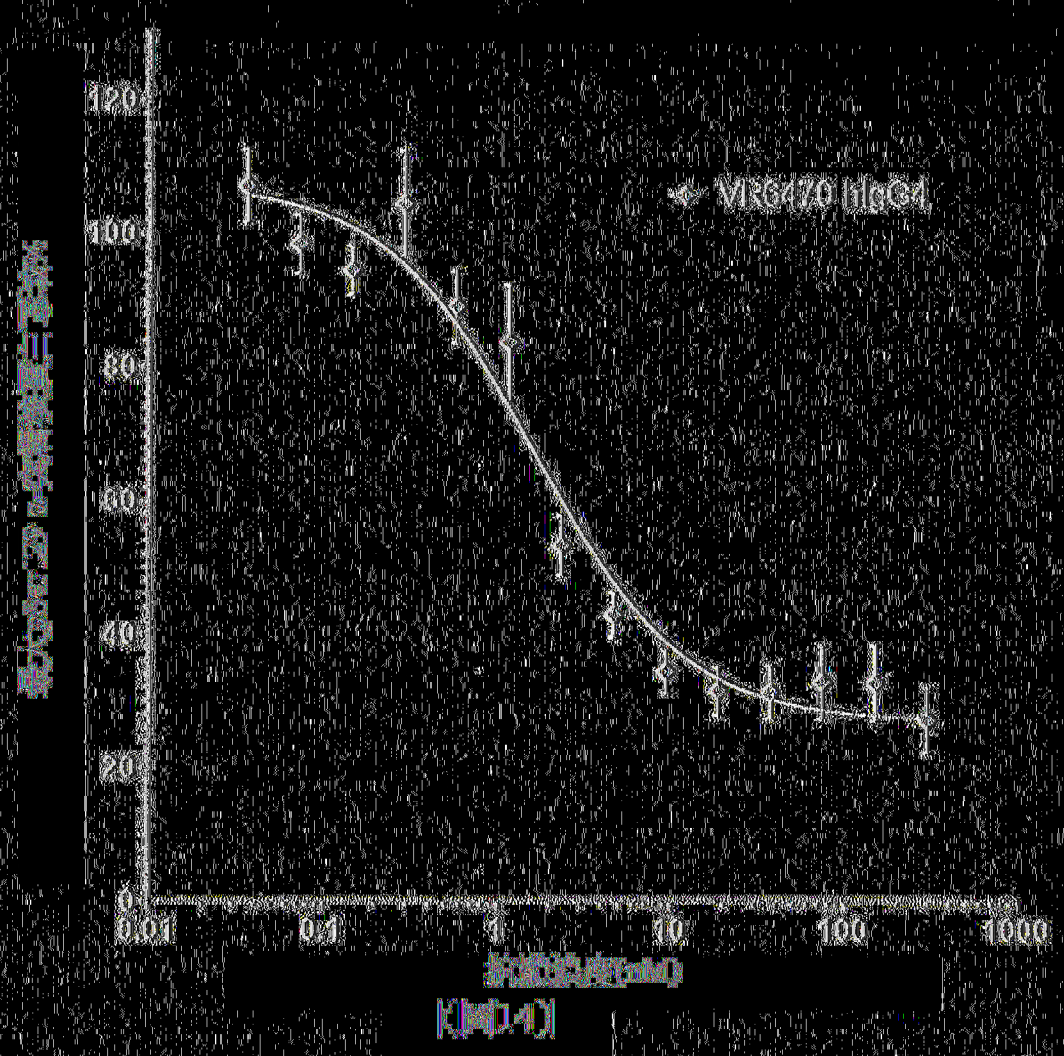
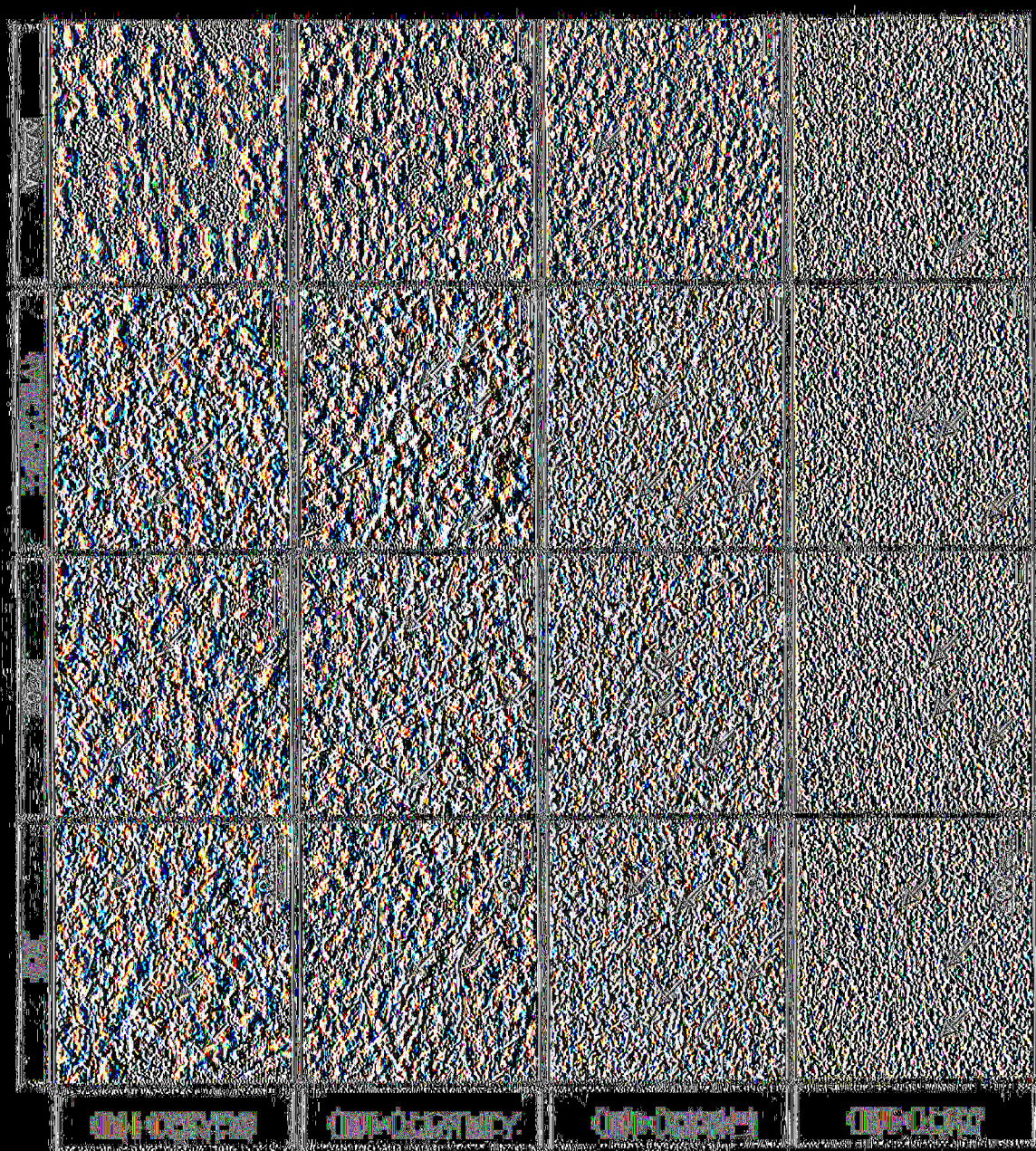


圖 1

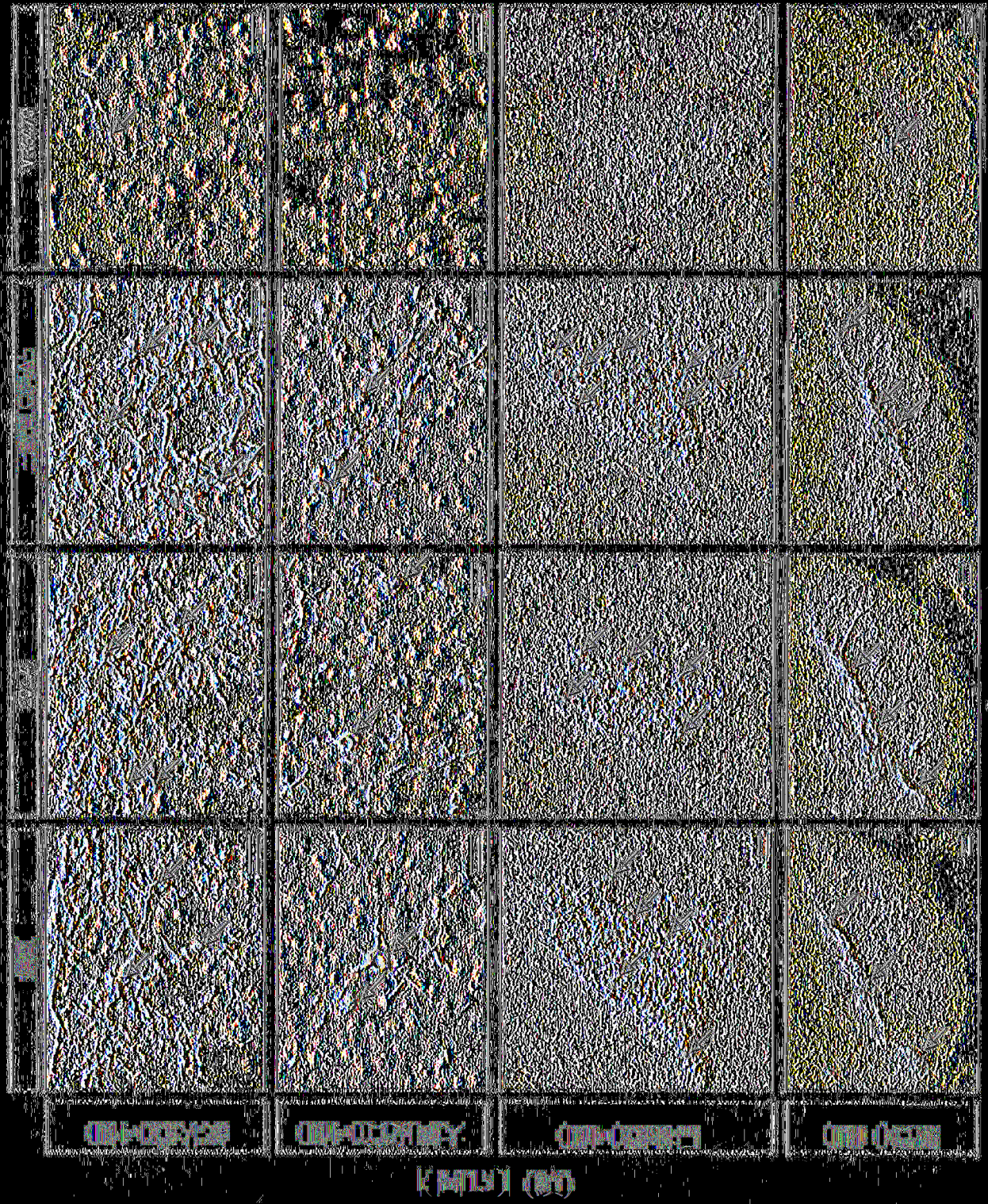


最人眾集%





(圖15)



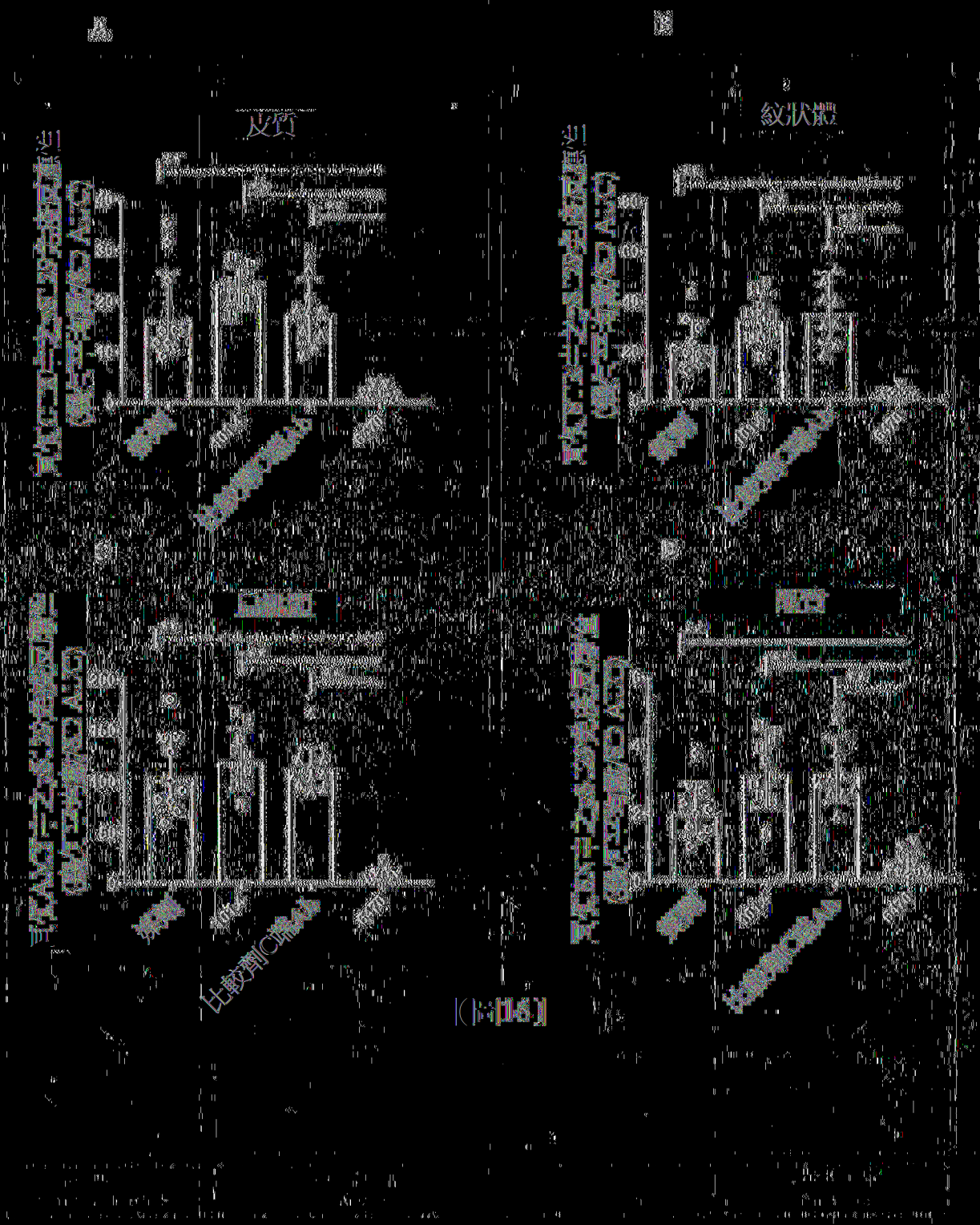


圖 8

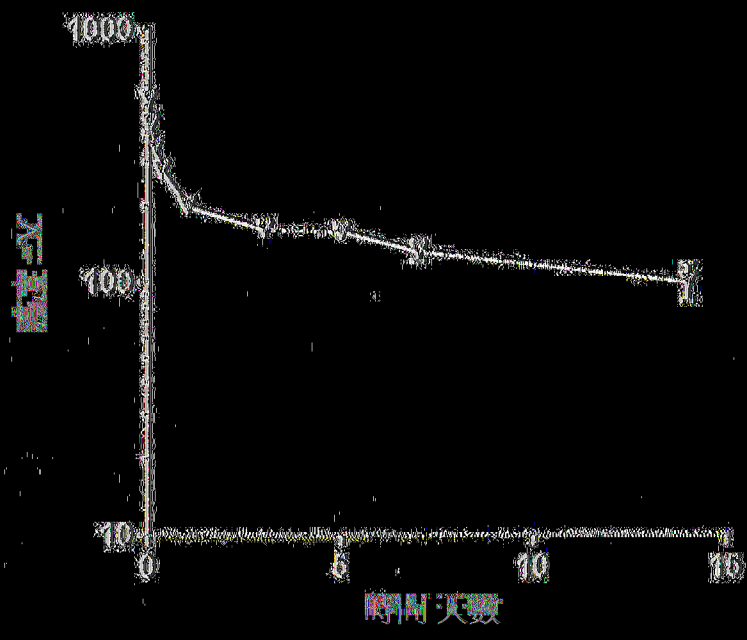
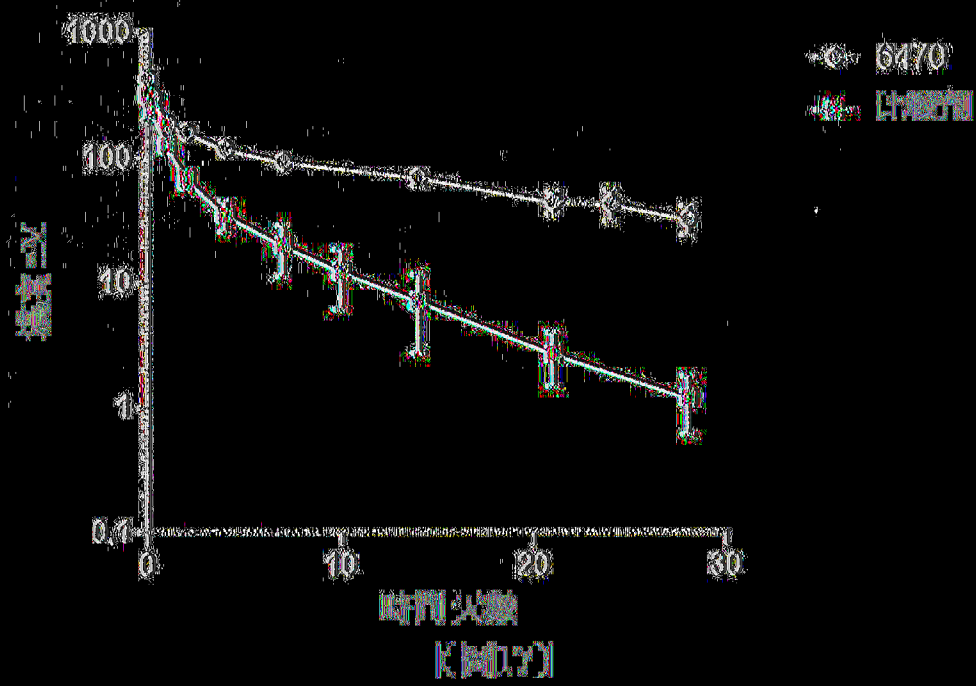


圖 9



【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合 α 突觸核蛋白(alpha synuclein)之抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備診斷 α 突觸核蛋白病之分析的診斷活性劑，該 α 突觸核蛋白病選自帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：

CDR-L1，該CDR-L1包含SEQ ID NO: 1；

CDR-L2，該CDR-L2包含SEQ ID NO: 2；及

CDR-L3，該CDR-L3包含SEQ ID NO: 3；以及

重鏈可變區，該重鏈可變區包含：

CDR-H1，該CDR-H1包含SEQ ID NO: 4；

CDR-H2，該CDR-H2包含SEQ ID NO: 5；及

CDR-H3，該CDR-H3包含SEQ ID NO: 6；

ii. 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO:15；及

重鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 31；或

iii. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【請求項2】

如請求項1之用途，其中該帕金森氏病係帕金森氏病之特發或遺傳形式。

【請求項3】

如請求項1之用途，其中該診斷係對生物樣品進行。

【請求項4】

如請求項3之用途，其中該生物樣品包含腦脊髓液樣品、血液樣品、固體組織樣品或前述之組合。

【請求項5】

如請求項4之用途，其中該血液樣品係血漿或血清，且該固體組織樣品係活檢試樣、組織培養物或自其及其子代衍生之細胞。

【請求項6】

如請求項3之用途，其中該生物樣品在獲取之後進行試劑處理、增溶、聚核苷酸之富集或前述之組合。

【請求項7】

一種偵測已獲自個體之生物樣品中之 α 突觸核蛋白之活體外診斷方法，其包含以下步驟：

- i) 使該生物樣品與抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段接觸；
- ii) 偵測該抗 α 突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段與 α 突觸核蛋白之結合；以及
- iii) 與適合對照比較偵測到之 α 突觸核蛋白含量或 α 突觸核蛋白之特異性轉譯後修飾形式之存在；其中該抗體或其抗原結合片段包含：
 - i. 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：
 - CDR-L1，該CDR-L1包含SEQ ID NO: 1；
 - CDR-L2，該CDR-L2包含SEQ ID NO: 2；及
 - CDR-L3，該CDR-L3包含SEQ ID NO: 3；以及
 - 重鏈可變區，該重鏈可變區包含：

CDR-H1，該CDR-H1包含SEQ ID NO: 4；

CDR-H2，該CDR-H2包含SEQ ID NO: 5；及

CDR-H3，該CDR-H3包含SEQ ID NO: 6；

或

ii. 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO:15；及

重鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 31；

或

iii. 包含SEQ ID NO: 17之輕鏈及包含SEQ ID NO: 33之重鏈。

【請求項8】

如請求項7之活體外診斷方法，其中該 α 突觸核蛋白病選自帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)、泛發性路易體疾病(DLBD)、阿茲海默氏病之路易體變異型(LBVAD)、合併型阿茲海默氏病及帕金森氏病、多發性系統萎縮症(MSA)及具有1型腦鐵積聚之神經退化(NBIA-1)。

【請求項9】

如請求項8之活體外診斷方法，其中該 α 突觸核蛋白病係帕金森氏病。

【請求項10】

如請求項8之活體外診斷方法，其中該帕金森氏病係帕金森氏病之特發或遺傳形式。

【請求項11】

如請求項7之活體外診斷方法，其進一步包含鑑別一或多種 α 突觸核蛋白病，其包含判定 α 突觸核蛋白病之階段（嚴重程度）。