



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109937210 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 15

(21) 申请号 201780070540.9

(22) 申请日 2017.11.14

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109937210 A

(43) 申请公布日 2019.06.25

(30) 优先权数据  
PA201600710 2016.11.15 DK

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.05.15

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2017/079153 2017.11.14

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/091444 EN 2018.05.24

(73) 专利权人 H.隆德贝克有限公司  
地址 丹麦渥尔比

(72) 发明人 P·卡尔伦基  
P·E·G·克里斯特延森  
J·B·斯塔文哈根

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司  
72003  
专利代理师 付文川 吴小瑛

(51) Int.Cl.  
C07K 16/18 (2006.01)  
A61P 25/28 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件  
GB 201512203 D0,2015.08.19  
CN 107709361 A,2018.02.16  
WO 2016061389 A2,2016.04.21  
CN 101052417 A,2007.10.10  
KR 20120090672 A,2012.08.17  
WO 2021055881 A1,2021.03.25  
郅子昱.  $\alpha$ -突触核蛋白在常见神经退行性疾病致病机理研究进展.《中国校外教育》.2014,(第27期),  
Jonas Folke等.Passive Immunization in Alpha-Synuclein Preclinical Animal Models.《Biomolecules》.2022,第12卷(第2期),

审查员 曲肖男

权利要求书3页 说明书81页  
序列表25页 附图36页

(54) 发明名称

用于治疗共核蛋白病的药剂、用途和方法

(57) 摘要

本发明涉及使用单克隆抗  $\alpha$ -突触核蛋白抗体和另外的药物的组合治疗。可以使用这些抗体与本发明的另一种药物一起治疗共核蛋白病,如帕金森氏病(包括帕金森氏病的特发性和遗传性形式)、弥漫性路易体病(DLBD)、阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩。

| 抗体抗体  | 免疫原                                                                                 | 方案                 | 小鼠品系         |  |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------|--|
| GM37  | 全长人 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维<br><br>交替使用<br>1-60 $\alpha$ -突触核蛋白<br>1-119 $\alpha$ -突触核蛋白 | 完全弗氏佐剂<br>和不完全弗氏佐剂 | HC017-Balb/c |  |
| GM285 | 全长人 $\alpha$ -突触核蛋白单体,随后是原纤维或单体                                                     | 完全弗氏佐剂<br>和不完全弗氏佐剂 | HC012-Balb/c |  |

CN 109937210 B

1. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段与选自下组的另外的药物在制备用于治疗受试者中的选自下组的疾病的药物中的用途, 其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段能够与序列如SEQ ID NO:10所示的人 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸112-117 (SEQ ID NO:9 (ILEDMP)) 内的表位特异性结合; 其中所述另外的药物的组由以下组成: 多巴胺、半胱天冬酶抑制剂、钙蛋白酶抑制剂、LRRK2抑制剂、BACE1抑制剂、聚集抑制剂、针对任何形式的A $\beta$ 肽的抗体、炎症抑制剂、LAG-3抗体、伊拉地平、逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的小胶质细胞吞噬活性的减少的分子、尼古丁、咖啡因、葡糖脑苷脂酶调节剂、MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A<sub>2</sub>A拮抗剂; 其中所述疾病的组由以下组成: 特发性和遗传性形式的帕金森氏病、戈谢病、弥漫性路易体病、阿尔茨海默氏病的路易体变体、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩; 其中所述抗原结合片段选自由以下组成的组: Fab片段、Fab' 片段、F(ab')<sub>2</sub>片段和单链Fv; 并且其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含选自下组的重链CDR1-3和轻链CDR1-3, 该组由以下组成:

- a) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的重链CDR1;
  - b) 氨基酸序列如SEQ ID NO:2、33、34或35所示的重链CDR2;
  - c) 氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的重链CDR3;
  - d) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的轻链CDR1;
  - e) 氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的轻链CDR2; 和
  - f) 氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的轻链CDR3,
- 和
- g) 氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示的重链CDR1;
  - h) 氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示的重链CDR2;
  - i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示的重链CDR3;
  - j) 氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示的轻链CDR1;
  - k) 氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示的轻链CDR2; 和
  - l) 氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的轻链CDR3。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

- a) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的重链CDR1;
- b) 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的重链CDR2;
- c) 氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的重链CDR3;
- d) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的轻链CDR1;
- e) 氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的轻链CDR2; 和
- f) 氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的轻链CDR3。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

- a) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的重链CDR1;
- b) 氨基酸序列如SEQ ID NO:33所示的重链CDR2;
- c) 氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的重链CDR3;
- d) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的轻链CDR1;
- e) 氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的轻链CDR2; 和
- f) 氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的轻链CDR3。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

- a) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的重链CDR1;
- b) 氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示的重链CDR2;
- c) 氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的重链CDR3;
- d) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的轻链CDR1;
- e) 氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的轻链CDR2;和
- f) 氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的轻链CDR3。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

- a) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的重链CDR1;
- b) 氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示的重链CDR2;
- c) 氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的重链CDR3;
- d) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的轻链CDR1;
- e) 氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的轻链CDR2;和
- f) 氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的轻链CDR3。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

- a) 氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示的重链CDR1;
- b) 氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示的重链CDR2;
- c) 氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示的重链CDR3;
- d) 氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示的轻链CDR1;
- e) 氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示的轻链CDR2;和
- f) 氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的轻链CDR3。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述另外的药物选自下组,该组由以下组成:普拉克索、VX-765、ABT-957、PF-06447475、NB-360、神经孔NPT100-18A、NPT200-11、EGCG、巴品珠单抗、茄尼醇单抗、冈特莫单抗、克瑞珠单抗、阿杜单抗、C16H15N04、BMS-986016、GSK2831781、IMP321、ELN484228、NCGC607、美格鲁特、依鲁司他、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述另外的药物选自下组,该组由以下组成:左旋多巴/卡比多巴、普拉克索、普雷卡桑、美格鲁特、依鲁司他、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段能够与包含由SEQ ID NO:8组成的轻链可变结构域和由SEQ ID NO:7、30、31或32组成的重链可变结构域的抗体竞争以结合所述表位。

10. 根据权利要求1所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段能够与序列如SEQ ID NO:10所示的人 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸112-115(SEQ ID NO:19(ILED))内的表位特异性结合。

11. 根据权利要求1、7、8或10任一项所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段能够与包含由SEQ ID NO:26组成的重链可变结构域和由SEQ ID NO:27组成的轻链可变结构域的抗体竞争以结合所述表位。

12. 根据权利要求1所述的用途,其中所述单克隆抗体为完整抗体,该完整抗体选自由

以下组成的组：亚型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗体。

13. 根据权利要求1所述的用途，其中所述单克隆抗体是人抗体、人源化抗体、重组抗体或嵌合抗体。

14. 根据权利要求1所述的用途，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含序列如SEQ ID NO:7所示的重链可变结构域和序列如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域。

15. 根据权利要求1所述的用途，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含序列如SEQ ID NO:30所示的重链可变结构域和序列如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域。

16. 根据权利要求15所述的用途，其中所述单克隆抗体由由序列如SEQ ID NO:30所示的可变结构域和序列如SEQ ID NO:18所示的恒定区组成的重链以及由序列如SEQ ID NO:8所示的可变结构域和序列如SEQ ID NO:17所示的 $\kappa$ 恒定区组成的轻链组成。

17. 根据权利要求1所述的用途，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含序列如SEQ ID NO:31所示的重链可变结构域和序列如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域。

18. 根据权利要求17所述的用途，其中所述单克隆抗体由由序列如SEQ ID NO:31所示的可变结构域和序列如SEQ ID NO:18所示的恒定区组成的重链以及由序列如SEQ ID NO:8所示的可变结构域和序列如SEQ ID NO:17所示的 $\kappa$ 恒定区组成的轻链组成。

19. 根据权利要求1所述的用途，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含序列如SEQ ID NO:32所示的重链可变结构域和序列如SEQ ID NO:8所示的轻链可变结构域。

20. 根据权利要求19所述的用途，其中所述单克隆抗体由由序列如SEQ ID NO:32所示的可变结构域和序列如SEQ ID NO:18所示的恒定区组成的重链以及由序列如SEQ ID NO:8所示的可变结构域和序列如SEQ ID NO:17所示的 $\kappa$ 恒定区组成的轻链组成。

21. 根据权利要求1所述的用途，其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含序列如SEQ ID NO:26所示的重链可变结构域和序列如SEQ ID NO:27所示的轻链可变结构域。

22. 根据权利要求1所述的用途，其中所述治疗是长期的。

23. 根据权利要求22所述的用途，其中所述长期治疗持续至少2周。

24. 根据权利要求1所述的用途，其中所述受试者是人。

25. 根据权利要求1所述的用途，其中所述药物中的所述单克隆抗体或其抗原结合片段和另外的药物分开提供。

## 用于治疗共核蛋白病的药剂、用途和方法

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及与 $\alpha$ -突触核蛋白特异性结合的一类单克隆抗体，用于在组合疗法中使用，还涉及将这些用于治疗共核蛋白病的方法。

[0002] 序列表的引用：

[0003] 本申请包括一个或多个序列表(依照37C.F.R.1.821等等)，其是以计算机可读介质形式披露的(文件名:1069\_ST25.txt,创建于2016年11月15日,并且大小为41kB)，将其通过引用以其全文结合在此。

### 背景技术：

[0004] 共核蛋白病(synucleinopathy)，也称为路易体疾病(LBD)，其特征用显微镜可见为路易体(LB)和/或路易神经突(其中蛋白 $\alpha$ -突触核蛋白是主要组分)的细胞内蛋白聚集体的沉积(Jellinger, Mov Disord. [运动障碍] 2012年1月; 27(1): 8-30; McKeith等人, Neurology [神经病学] (1996) 47: 1113-24)。共核蛋白病包括帕金森氏病(PD) (包括帕金森氏病的特发性和遗传性形式) 和弥漫性路易体(DLB) 病(也称为路易体痴呆(DLB)，阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)，组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病(CAPD)，纯自主神经衰竭(PAF) 和多系统萎缩(MSA; 例如橄榄体脑桥小脑萎缩, 纹状体黑质变性和希一德二氏综合征))。共核蛋白病经常具有多巴胺能黑质纹状体系统的变性, 造成帕金森氏病中的核心运动缺陷(僵硬、运动过慢、静止性震颤)，但是在与非运动功能障碍(如痴呆和自主神经系统缺陷) 关联的中枢、外周和自主神经系统和脑区以及其他器官中还存在路易体和营养不良路易神经突的广泛出现。在帕金森氏病和其他共核蛋白病中, 若干非运动体征和症状被认为先于运动症状。例如此类早期体征包括快速眼动期睡眠行为障碍(RBD) 和嗅觉的丧失以及便秘(Mahowald等人, Neurology [神经病学] (2010) 75: 488-489)。在老年人群中, 共核蛋白病仍旧是运动障碍和认知恶化的普通原因(Galasko等人, Arch. Neurol. [神经病学档案] (1994) 51: 888-95)。

[0005]  $\alpha$ -突触核蛋白是蛋白家族的成员, 包括 $\beta$ -和 $\gamma$ -突触核蛋白和突触素(synoretin)。 $\alpha$ -突触核蛋白表达在与突触关联的正常状态下, 并且被认为在调节突触泡释放中起作用, 并且由此影响神经通信、可塑性、学习和记忆。

[0006] 若干研究已经暗示, 在PD发病机理中,  $\alpha$ -突触核蛋白具有中心作用。在病理性病症中, 该蛋白质可以聚集以形成细胞内不溶性原纤维。例如, 突触核蛋白在LB中累积(Spillantini等人, Nature [自然] (1997) 388: 839-40; Takeda等人, J. Pathol. [病理学杂志] (1998) 152: 367-72; Wakabayashi等人, Neurosci. Lett. [神经科学快报] (1997) 239: 45-8)。在 $\alpha$ -突触核蛋白基因的突变以及该基因的二倍和三倍重复与帕金森氏病罕见的家族形式共分离(Kruger等人, Nature Gen. [自然遗传学] (1998) 18: 106-8; Polymeropoulos等人, Science [科学] (1997) 276: 2045-7)。一个重要的发现一直认为 $\alpha$ -突触核蛋白可分泌到细胞外液并且存在于血浆和脑脊液(CSF)中。若干研究, 例如Pacheco等人(2015) 和其他人的研究(Pacheco等人, J Neurochem [神经化学杂志] 2015年3月; 132(6): 731-4; Conway等人,

Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊](2000) 97:571-576;Volles等人, J.Biochem.[生物化学杂志]42:7871-7878,2003)已经表明,细胞外突触核蛋白在大脑中起着致病作用。他们已证明细胞外 $\alpha$ -突触核蛋白寡聚体拥有对脑神经元质膜的神经毒性。基于突触核蛋白分泌数据的另一个有趣的假设是 $\alpha$ -突触核蛋白的朊病毒样传播构成帕金森氏病和其他共核蛋白病进展的基础(Lee等人,2014,Nat Rev Neurol.[自然评论神经病学]2014年2月;10(2):92-8;Hansen和Li,2012,Trends Mol Med[分子医学发展趋势],2012年5月;18(5):248-55)。这些发现产生了可以通过免疫疗法靶向细胞外突触核蛋白的期望(Vekrellis等人,2011,Lancet Neurol[柳叶刀神经学]2011年11月;10(11):1015-25)。

[0007] 天然存在的 $\alpha$ -突触核蛋白自身抗体已经显示存在于PD患者和健康对照中(Smith等人,2012,PLoS One.[公共科学图书馆期刊]2012;7(12):e52285;Maetzler等人,2014,PLoS One.[公共科学图书馆期刊]2014年2月21日;9(2):e88604;Papachroni等人,2007,J Neurochem.[神经化学杂志]2007年5月;101(3):749-56;以及Woulfe等人,2002,Neurology[神经病学]2002年5月14日;58(9):1435-6),已经报道了相比健康对照有时在PD患者中增加水平的 $\alpha$ -突触核蛋白自身抗体(Gruden等人,2011,J Neuroimmunol.[神经免疫学杂志]2011年4月;233(1-2):221-7,Gruden等人,2012,Neuroimmunomodulation[神经免疫调节]2012;19(6):334-42;以及Yanamandra,2011,PLoS One.[公共科学图书馆期刊]2011年4月25日;6(4):e18513)或在PD患者中降低的 $\alpha$ -突触核蛋白自身抗体(Besong-Agbo等人,2013,Neurology[神经病学]2013年1月8日;80(2):169-75)。在发现自身抗体后很早就表明了循环的抗 $\alpha$ -突触核蛋白自身抗体可作为关于 $\alpha$ -突触核蛋白聚集的保护作用的可能性(Woulfe等人,2002,Neurology[神经病学]2002年5月14日;58(9):1435-6)。

[0008] 在转基因小鼠中过量表达 $\alpha$ -突触核蛋白模拟路易体疾病的一些致病方面。在过去数十年就已经产生了若干过量表达 $\alpha$ -突触核蛋白的不同转基因系的小鼠(描述于综述:Koehler等人,2014,PLoS One.[公共科学图书馆期刊]2013年5月31日;8(5):e64649;Fleming和Chesselet,2006,Behav Pharmacol.[行为药理学]2006年9月;17(5-6):383-91;Springer和Kahle,2006,Curr Neurol Neurosci Rep.[当前神经病学和神经科学报告]2006年9月;6(5):432-6)。具有Thy-1和PDGF- $\beta$ 启动子的小鼠系发展了运动障碍和认知缺陷,并已被用于证明在体内针对 $\alpha$ -突触核蛋白的抗体的神经保护作用。然而,没有转基因系具有强的多巴胺能神经元变性,并且通常运动表型是由运动神经元内的表达驱动,这些运动神经元在帕金森氏病中通常不会变性。因此,潜在的疾病修饰改治疗的积极成果是否通过对多巴胺能神经元或其他中枢神经系统神经元的影响来介导尚不清楚。

[0009] 一个在转基因小鼠模型中的强大发现是人 $\alpha$ -突触核蛋白的长期过量表达损害突触功能。使用体外和体内两个系统的研究显示在海马体中野生型(wt)人 $\alpha$ -突触核蛋白的过量表达损害突触传递(Nemani等人,2010,Neuron[神经元]2010年1月14日;65(1):66-79;Paumier等人,2013,PLoS One.[公共科学图书馆期刊]2013年8月1日;8(8):e70274)。这已显示在海马体的CA1区域中,在该区域中两个研究都发现减少的基础突触传递。这后面的机制假设为 $\alpha$ -突触核蛋白细胞内的积累导致功能障碍的突触释放。然而,最近关于 $\alpha$ -突触核蛋白分泌到突触中的细胞外间隙和 $\alpha$ -突触核蛋白寡聚物对突触功能的毒性作用的发现打开了细胞外 $\alpha$ -突触核蛋白在突触功能障碍中发挥作用的可能性,并因此打开了治疗抗体以援救缺陷的能力。

[0010] 使用病毒载体来过量表达 $\alpha$ -突触核蛋白代表在啮齿动物中模拟PD的一种重要的方式,因为这一方法产生黑质纹状体神经元的相对快速进步的变性,这是在小鼠或大鼠中通过遗传突变没有被重现的特性(Kirik和Bjorklund,2003,Trends Neurosci.[神经科学发展趋势]2003年7月;26(7):386-92)。此外,病毒基因递送揭示了野生型 $\alpha$ -突触核蛋白诱导黑质纹状体病理的能力(Kirik等人,2002,J Neurosci.[神经科学杂志]2002年4月1日;22(7):2780-91),这一发现与具有 $\alpha$ -突触核蛋白二倍和三倍重复的以家族形式的PD的证据一致(Lee和Trojanowski,2006,Neuron[神经元]2006年10月5日;52(1):33-8)。在一个研究中已经显示针对 $\alpha$ -突触核蛋白N-末端的山羊抗体池使帕金森氏病的基于AAV- $\alpha$ -突触核蛋白的大鼠模型免受多巴胺能细胞死亡并改善行为缺陷(Shahaduzzaman等人,2015,PLoS One.[公共科学图书馆期刊]2015年2月6日;10(2):e0116841)。

[0011] 最近已经显示 $\alpha$ -突触核蛋白病理的朊病毒样传播发展了 $\alpha$ -突触核蛋白病理并且也发展了多巴胺能细胞死亡(Luk等人,2012,Science[科学]2012年11月16日;338(6109):949-53)。这一模型已经被用来显示 $\alpha$ -突触核蛋白抗体可以改善该病理(Tran等人,2014,Cell Rep[细胞报告]2014年6月26日;7(6):2054-65)。在这个模型中,抗体治疗能够减少磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白在若干脑区域(包括黑质中的多巴胺能神经元)积累并减少运动缺陷的发展。

[0012] 除了突变, $\alpha$ -突触核蛋白基因的可变剪接和该蛋白质的翻译后修饰,如磷酸化作用、泛素化、硝化、和截短可以产生 $\alpha$ -突触核蛋白的蛋白形式,该蛋白形式具有形成 $\alpha$ -突触核蛋白的聚集的和/或有毒的形式的增加的能力(Beyer和Ariza,Mol Neurobiol[分子神经生物学]2013年4月;47(2):509-24)。然而, $\alpha$ -突触核蛋白的精确的病理学的种类仍然未知。已经将各种从寡聚体至原纤维范围的错误折叠的/聚集的/分泌的种类和不同翻译后修饰与毒性关联,但哪一个最重要还没有达成一致(是否真的甚至只有单一的毒性种类)。

[0013] 整体上,具有相似的形态学和神经学改变的 $\alpha$ -突触核蛋白在人、小鼠、和苍蝇等不同动物模型中的积累表明这种分子在路易体疾病的发病机制中具有中心作用。

[0014] 已经显示若干不同的 $\alpha$ -突触核蛋白抗体在临床前动物模型中具有治疗效果。已经显示靶向涉及 $\alpha$ -突触核蛋白残基91-99的表位的抗体和靶向涉及 $\alpha$ -突触核蛋白残基118-126的表位的抗体两者都对转基因小鼠的运动和认知缺陷有影响(Games等人,2014,J Neurosci.[神经科学杂志]2014年7月9日;34(28):9441-54)。这些抗体中最先进的是基于小鼠单克隆抗体9E4的人源化抗体,该人源化抗体靶向涉及 $\alpha$ -突触核蛋白残基118-126的表位并且现在处于I期临床试验。靶向涉及 $\alpha$ -突触核蛋白残基120-140的表位的C-末端抗体274(Bae等人,2012,J Neurosci.[神经科学杂志]2012年9月26日;32(39):13454-69)也显示在临床前模型中对从细胞至细胞的病理传播有影响。除了这些,靶向构象的种类如 $\alpha$ -突触核蛋白的寡聚体和原纤维的抗体已经显示可以至少减少这些推测有毒的 $\alpha$ -突触核蛋白种类的水平(Lindström等人,2014,Neurobiol Dis[疾病神经生物学]2014年9月;69:134-43以及Spencer等人,2014,Mol Ther[分子治疗]2014年10月;22(10):1753-67)。在体内降低 $\alpha$ -突触核蛋白寡聚体水平的这些构象抗体,如mab47,也显示靶向 $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸121-125的C-末端表位(US20120308572)。其他构象的、原纤维和寡聚体特异性抗体也靶向C-末端序列(Vaikath等人,Neurobiol Dis[疾病神经生物学]2015;79:81-99)。

[0015] 因为 $\alpha$ -突触核蛋白的毒性形式是未知的,理想地治疗性抗体应当可以结合大多数

通过可变剪接或翻译后修饰(如截短)形成的 $\alpha$ -突触核蛋白种类以及寡聚体和原纤维形式的 $\alpha$ -突触核蛋白种类。如以上所讨论,已经检测到使用目前的抗体(已经在临床前模型中作为疗法进行测试)的一个问题是它们中的许多靶向C-末端的表位,在 $\alpha$ -突触核蛋白的主要截短形式的一些中未发现这些C-末端的表位。例如对于结合9E4是重要的氨基酸是天冬酰胺122和酪氨酸125(根据专利US20140127131中陈述的丙氨酸扫描),并且这意味着这个抗体不能结合在氨基酸119和122处截短的 $\alpha$ -突触核蛋白,这些 $\alpha$ -突触核蛋白是帕金森脑组织中的一些主要截短的种类(Kellie等人,Sci Rep[科学报告]2014;4:5797)。抗体274和抗体mab47是相同的情况(US 8,632,776)。并且,氨基末端抗体可能不能结合缺乏 $\alpha$ -突触核蛋白的第一氨基酸的主要截短的种类中的一些,如截短至氨基酸5-140的 $\alpha$ -突触核蛋白。对于9E4抗体,一个建议的作用机制是在细胞外间隙预防氨基酸119-122处的截短,因为抗体将结合至与蛋白酶切割 $\alpha$ -突触核蛋白相同的区域(Games等人,2014,J Neurosci.[神经科学杂志]2014年7月9日;34(28):9441-54)。也可以在抗体的该位点的近邻区域发现相似的作用机制,并且因此预期这个区域周围的许多抗体将具有这个活性。

[0016] 有一些证据支持截短的 $\alpha$ -突触核蛋白种类在动物模型中的毒性作用。已经显示在酪氨酸羟化酶启动子下表达截短的 $\alpha$ -突触核蛋白导致黑质纹状体病理,这在转基因的 $\alpha$ -突触核蛋白模型中不常见(Tofaris等人,2006,J Neurosci.[神经科学杂志]2006年4月12日;26(15):3942-50;Wakamatsu等人,2006,Neurobiol Aging[衰老神经生物学]2008年4月;29(4):574-85)。例如,具有A53T突变的人 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸1-130的表达造成在黑质致密部的多巴胺能神经元的胚胎性丢失,然而全长蛋白的表达没有(Wakamatsu等人,2006,Neurobiol Aging[衰老神经生物学]2008年4月;29(4):574-85)。在钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II $\alpha$ (CamKII- $\alpha$ )启动子下表达120个氨基酸的 $\alpha$ -突触核蛋白分子与 $\alpha$ -突触核蛋白聚集和在包括巴恩斯(Barnes)迷宫和新物体识别的皮质-海马体记忆测试中渐进的缺陷有关(Hall等人,2015,Exp Neurol[实验神经病学]2015年2月;264:8-13)。此外,在大鼠AAV模型中共表达C-末端截短的 $\alpha$ -突触核蛋白增强全长 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的病理(Ulusoy等人,2010,Eur J Neurosci.[欧洲神经科学杂志]2010年8月;32(3):409-22)。

[0017] 在本发明中,已产生的抗体(如“GM37”和“GM285”,描述于实例中)可以与毒性 $\alpha$ -突触核蛋白片段1-119/122结合并中和 $\alpha$ -突触核蛋白的这个截短形式。本发明的抗体(如GM37和GM285)能够与 $\alpha$ -突触核蛋白的其他寡聚体形式结合并以减少疾病传播的方式由其他CNS固有细胞改变其摄取。此外,本发明的抗体(如GM37和285)被出人意料地发现在与人脑不同的 $\alpha$ -突触核蛋白的种类结合方面要优于现有技术的抗体如9E4,并且在清除细胞外 $\alpha$ -突触核蛋白和使由异常 $\alpha$ -突触核蛋白在体内的存在诱导的损害突触传递正常化方面具有出人意料的优异效果。为了进一步说明它们的治疗能力,本发明的抗体(如GM37和285)能够预防在帕金森氏病大鼠模型中与运动表现相关的疾病的出现。最后,抗体GM37和GM285能够抑制通过在初级小鼠神经元中细胞外添加的重组病理 $\alpha$ -突触核蛋白种子诱导的聚集体的播种和内源性 $\alpha$ -突触核蛋白的磷酸化作用。抗体如GM37和285也可抑制使用帕金森氏病小鼠模型在体内将 $\alpha$ -突触核蛋白病理播种至多巴胺能神经元,进一步支持这些抗体在预防细胞至细胞传播的病理方面的治疗能力。总之,这些数据强烈支持使用这些抗体(GM37和GM285)作为新的治疗药剂,这些药剂能够通过抑制帕金森氏病的病理在神经元帕金森氏病患者之间的传播的机制来改变疾病。

[0018] 在本发明的另外的方面提供了该GM37抗体的3个氨基酸变体。所有这些变体具有与亲本抗体(GM37)相似的功能资料解析,但具有可制造性方面改善的特性。变体降低GM37抗体的结合结构域内发生的翻译后修饰的风险,并提供生产该抗体方面的一些改善。这是有利的,因为抗体的大规模临床或商业制造是复杂和昂贵的,并且特别是对于免疫球蛋白和蛋白质在制药药物方面提供同质的产品是关键。

[0019] 本发明的抗体GM285、GM37及其变体可以与如在此披露的另外的药剂组合使用,以改善治疗的功效、安全性和依从性。

[0020] 组合治疗可以与以下药物一起:对症药物(如多巴胺(普拉克索)(Loiodice等人, Psychopharmacology[精神药理学](Berl) 2016年9月10日;Luo HT等人, F. Exp Ther Med. [实验与治疗医学] 2016年9月;12(3):1373-1376))或是与以下的组合:疾病调节化合物(如半胱天冬酶(caspase)抑制剂(例如前药VX-765;普雷卡桑(Pralnacasan))(Bassil F等人, Proc Natl Acad Sci U S A. [美国国家科学院院刊] 2016年8月23日;113(34):9593-8; Wang等人, Proc Natl Acad Sci U S A. [美国国家科学院院刊] 2016年8月23日;113(34):9587-92)或钙蛋白酶抑制剂(例如Calpeptin(来自艾伯维公司(AbbVie)的ABT-957))(Czapski等人, FEBS Lett. [FEBS快报] 2013年9月17日;587(18):3135-41), LRRK2抑制剂(例如PF-06447475(Daher等人, J Biol Chem. [生物化学杂志] 2015年8月7日;290(32):19433-44), BACE1抑制剂(例如NB-360)(Spencer等人, J Neurosci. [神经科学杂志] 2016年7月27日;36(30):7971-84;Schelle等人, Alzheimers Dement. [阿尔茨海默氏病与痴呆] 2016年10月14日, pii), 聚集抑制剂(例如神经孔NPT100-18A(NPT200-11)(Wrasidlo等人, E. Brain. [E. Brain杂志] 2016年9月27日, pii:aww238);EGCG(Xu等人, Neurochem Res. [神经化学研究杂志] 2016年10月;41(10):2788-2796);识别任何形式的AB的抗体(例如巴品珠单抗(Bapineuzumab)、茄尼醇单抗(Solanezumab)、冈特莫单抗(Gantenerumab)、克瑞珠单抗(Crenezumab)、阿杜单抗(Aducanumab)(Guerrero-Muñoz等人, Neurobiol Dis. [疾病神经生物学] 2014年11月;71:14-23;Kabiraj等人, ACS Chem Neurosci. [美国化学会化学神经科学] 2016年10月3日;Hepp等人, J Neuropathol Exp Neurol. [神经病理学与实验神经学杂志] 2016年10月;75(10):936-945;Walker等人, Acta Neuropathol. [神经病理学学报] 2015年5月;129(5):729-48;炎症抑制剂(例如C16H15N04(C29))(Kim等人, Exp Neurobiol. [实验神经学] 2016年6月;25(3):113-9;Kim等人, J Neuroinflammation. [神经炎症杂志] 2015年12月18日;12:236;He等人, Eur J Neurosci. [欧洲神经科学杂志] 2016年1月;43(1):41-52;Regloid等人, Prog Neurobiol. [神经生物学进展] 2015年11月2日, pii:S0301-0082(15)00128-8.);LAG-3抗体(例如BMS-986016、GSK2831781或IMP321)(Mao等人, Science. [科学] 2016年9月30日;353(6307);逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的小胶质细胞吞噬活性的减少的小分子-靶向 $\alpha$ -突触核蛋白的药物样苯基磺酰胺化合物(ELN484228)(Tóth等人, PLoS One. [公共科学图书馆期刊] 2014年2月14日;9(2):e87133. 勘误于:PLoS One. [公共科学图书馆期刊] 2014;9(5);Gardai等人, PLoS One. [公共科学图书馆期刊] 2013年8月23日;8(8);伊拉地平(Surmeier等人, Biochem Biophys Res Commun. [生物化学与生物物理学研究通讯] 2016年8月30日, pii:S0006-291X(16)31432-2;Emanuele等人, EBioMedicine. [E生物医学] 2016年5月;7:191-204;Di Scala等人, Sci Rep. [科学报告] 2016年6月29日);尼古丁或咖啡因(Tavassoly等人, Eur J Med Chem. [欧洲药物化学杂志]

2014年12月17日;88:42-54;Derkinderen等人,Mov Disord.[运动障碍]2014年7月;29(8):976-9);葡糖脑苷脂酶(GCase)调节剂(例如NCGC607(一种葡萄糖脑苷脂酶的小分子非抑制伴侣);美格鲁特(Miglustat)(一种GlcCer合酶抑制剂)和依鲁司他(Eliglustat)(Cerdelga)(底物还原疗法)(Mazzulli等人,J Neurosci.[神经科学杂志]2016年7月20日;36(29):7693-706;Yap等人,J Biol Chem.[生物化学杂志]2011年8月12日;286(32):28080-8;Yap等人,Mol Genet Metab.[分子遗传学与代谢]2013年1月;108(1):56-64;或可商购的药物像MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A2A拮抗剂(像例如雷沙吉兰(Azilect)、司来吉兰(Eldepryl)、Zelapar、普拉克索(Pramipexole)、罗匹尼罗(Ropinerole)、溴麦角环肽(Bromocriptine)、Comtess、答是美(Tasmar)和伊曲茶碱(Istradefylline))。

#### 发明内容:

[0021] 本发明涉及使用单克隆抗体及其抗原结合片段(这些单克隆抗体及其抗原结合片段能够与 $\alpha$ -突触核蛋白中氨基酸112-117(SEQ ID NO:9(ILEDMP))内的表位特异性结合)和另外的药物的组合治疗。被本发明的抗体或其抗体结合片段(如示例性抗体“GM37”或“GM285”)结合的表位在此被称为“112-117表位”。本发明的抗体与该112-117表位内的表位特异性结合,并且可以(根据一个实施例)与抗体GM37或GM285竞争以结合氨基酸112-117内的表位。例如,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以与由SEQ ID NO:7的可变结构域组成的重链和由SEQ ID NO:8的可变结构域组成的轻链竞争以结合人 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸112-117内的表位。这种竞争结合抑制可以使用本技术领域熟知的测定和方法确定,例如使用未标记结合测定如表面等离子体共振(SPR)。例如,使人 $\alpha$ -突触核蛋白固定在表面上并在与待测的抗体或结合片段孵育前使用或不使用参考抗体“GM37”孵育。可替代地,可以使用成对映射方法,其中参考抗体“GM37”被固定到表面,人 $\alpha$ -突触核蛋白抗原结合于固定的抗体,并且然后测试第二抗体同时与人 $\alpha$ -突触核蛋白的结合能力(参见“BIAcore®测定手册”,通用电气医疗集团生命科学部(GE Healthcare Life Sciences),29-0194-00AA 05/2012;将其披露通过引用结合在此)。

[0022] 更特别地,GM285抗体结合 $\alpha$ -突触核蛋白的残基112-117内的表位,该表位包括 $\alpha$ -突触核蛋白的残基112-115(ILED;SEQ ID NO:19)。

[0023] 在一个实施例中,本发明涉及用单克隆抗体GM37,其变体(例如,GM37变体1、GM37变体2和GM37变体3),或GM285的组合治疗。

[0024] 特别地,本发明提供用单克隆抗体GM37、其变体(例如,GM37变体1、GM37变体2和GM37变体3)或GM285的组合治疗,并且涵盖具有足够数量(例如1、2、或3)的轻链CDR和足够数量(例如1、2、或3)的重链CDR以形成能够与人突触核蛋白特异性结合的结合位点的此类抗体及其衍生物。优选地,如下面所定义,此类抗体将拥有三个轻链CDR和三个重链CDR。这个区域中氨基酸残基的编号是根据IMGT®, 国际免疫遗传学信息系统® (the international ImmunoGeneTics information system®) 或Kabat,E.A.,Wu,T.T.,Perry,H.M.,Gottesmann,K.S.和Foeller,C.(1991).Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学目的蛋白质序列],第5版,NIH出版号91-3242U.S.Department of Health and Human Services[美国健康与人服务部];Chothia,C.和Lesk,A.M.(1987).Canonical

structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins.[免疫球蛋白超变结构域的典型结构]J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196,901-917。

[0025] 在一个实施例中,该单克隆抗体或其抗原结合片段具有突触核蛋白抗原结合片段,该突触核蛋白抗原结合片段包括以下或由以下组成:

[0026] (a)具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链CDR1;和/或

[0027] (b)具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR2;和/或

[0028] (c)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链CDR3;和/或

[0029] (d)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链CDR1;和/或

[0030] (e)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链CDR2;和/或

[0031] (f)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR3;

[0032] 该突触核蛋白抗原结合片段能够与人 $\alpha$ -突触核蛋白特异性结合。

[0033] 在另一个实施例中,该单克隆抗体或其抗原结合片段拥有突触核蛋白抗原结合片段,该突触核蛋白抗原结合片段包括以下或由以下组成:

[0034] (a)具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链CDR1;

[0035] (b)具有SEQ ID NO:33、34或35的氨基酸序列的重链CDR2;

[0036] (c)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链CDR3;

[0037] (d)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链CDR1;

[0038] (e)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链CDR2;和

[0039] (f)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR3;

[0040] 该突触核蛋白抗原结合片段能够与人 $\alpha$ -突触核蛋白特异性结合。

[0041] 在又一个实施例中,该单克隆抗体或其抗原结合片段拥有突触核蛋白抗原结合片段,该突触核蛋白抗原结合片段包括以下或由以下组成:

[0042] (a)具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链CDR1;和/或

[0043] (b)具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链CDR2;和/或

[0044] (c)具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链CDR3;和/或

[0045] (d)具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链CDR1;和/或

[0046] (e)具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链CDR2;和/或

[0047] (f)具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0048] 该突触核蛋白抗原结合片段能够与人 $\alpha$ -突触核蛋白特异性结合。

[0049] 本发明的抗体及其抗原结合片段可以与选自下组的另外的药物组合用于治疗共核蛋白病(如帕金森氏病(PD),包括帕金森氏病的特发性和遗传性形式)、弥漫性路易体病(DLBD)、阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、戈谢病(GD)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病(CAPD)、纯自主神经衰竭和多系统萎缩)的方法中的组合治疗,该组包括:多巴胺、半胱天冬酶抑制剂、钙蛋白酶抑制剂、LRRK2抑制剂、BACE1抑制剂、聚集抑制剂、针对任何形式的淀粉样蛋白- $\beta$ 的抗体、炎症抑制剂、LAG-3抗体、伊拉地平、逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的小胶质细胞吞噬活性的减少的分子、尼古丁、咖啡因、葡萄糖脑苷脂酶调节剂、MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A2A拮抗剂。

[0050] 在一个实施例中,该药物可以选自下组,该组包括:普拉克索、VX-765(普雷卡桑)、ABT-957、PF-06447475、NB-360、神经孔NPT100-18A、NPT200-11、EGCG、巴品珠单抗、茄尼醇

单抗、冈特莫单抗、克瑞珠单抗、阿杜单抗、C16H15N04、BMS-986016、GSK2831781、IMP321、ELN484228、NCGC607、美格鲁特、依鲁司他 (Cerdelga)、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、普拉克索、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱。

## 附图说明

[0051] 图1显示用于产生杂交瘤的免疫方案。下表列出了用于鉴定GM37和GM285的免疫原和小鼠品系的差异。独立地对不同HCo17-Balb/c和HCo12/Balb/c小鼠进行免疫(以下提供这些小鼠的描述)。从小鼠中鉴定了表达GM37的杂交瘤,这些小鼠使用包含氨基酸1-140原纤维的全长 $\alpha$ -突触核蛋白进行免疫,并用全长(FL) $\alpha$ -突触核蛋白(SEQ ID NO 10)的截短的 $\alpha$ -突触核蛋白片段1-60和1-119进行强化。表达抗体GM285的杂交瘤来自一个免疫方案,其中HCo12-Balb/c小鼠使用全长单体 $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸1-140进行免疫,随后用全长纤维 $\alpha$ -突触核蛋白进行强化(实例1)。

[0052] 图2(小图A-C)显示针对结合 $\alpha$ -突触核蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白同系物和直向同源物的GM37的筛选。

[0053] A) 使用基于无洗涤溶液的ELISA(FMAT)将抗体GM37与 $\alpha$ -突触核蛋白结合。

[0054] B) 使用SPR(Fortebio公司)结合抗体GM37对于 $\alpha$ -突触核蛋白是特异性的( $\alpha$ 小图),并且不结合其他相关突触核蛋白家族蛋白、 $\beta$ -突触核蛋白( $\beta$ 小图)和 $\gamma$ -突触核蛋白( $\gamma$ 小图)。使用SPR(Fortebio Octetred)进行测量,GM37对来自食蟹猴(食蟹猴小图)和小鼠(小鼠小图)的 $\alpha$ -突触核蛋白显示相似的结合。(实例1)。

[0055] C) 使用SPR(Fortebio Octetred)结合抗体GM285对于 $\alpha$ -突触核蛋白是特异性的,并且不结合其他相关突触核蛋白家族蛋白、 $\beta$ -突触核蛋白和 $\gamma$ -突触核蛋白。使用SPR(Fortebio Octetred)进行测量,GM285对来自食蟹猴(食蟹猴小图)和小鼠(小鼠小图)的 $\alpha$ -突触核蛋白显示相似的结合(实例1)。

[0056] 图3(小图A-C)显示GM37的实时结合亲和力

[0057] A) 如通过SPR(BIAcore®3000)所确定的,以随时间(x轴)变化的RU(相对单位)(y轴)测量抗体GM37对 $\alpha$ -突触核蛋白的结合。山羊抗人IgG被固定在CM5芯片上。GM37被捕获在山羊抗人IgG固定化的芯片上并且测试了人 $\alpha$ -突触核蛋白的浓度系列(3.125、6.25、12.5、25、50、100nM)对表面的结合。每个循环之间重新产生传感器表面。

[0058] B) 将来自在不同浓度结合的信号转换成结合曲线。

[0059] C) 计算了抗体GM37的结合常数(表示为h1lgG1-6004-037-C106S)(实例2)。

[0060] 图4(小图A-C)显示GM285的实时结合亲和力

[0061] A) 如通过SPR(BIAcore®3000)所确定的,以随时间(x轴)变化的RU(y轴)测量抗体GM285对 $\alpha$ -突触核蛋白的结合。山羊抗人IgG被固定在CM5芯片上。GM285被捕获在山羊抗人IgG固定化的芯片上并且测试了人 $\alpha$ -突触核蛋白的浓度系列(3.125、6.25、12.5、25、50、100nM)对表面的结合。每个循环之间重新产生传感器表面。B) 将来自在不同浓度结合的信号转换成结合曲线。

[0062] C) 计算了抗体GM285的结合常数(表示为h1lgG1-6004-285)(实例2)。

[0063] 图5(小图A-C)显示对比抗体9E4的实时结合亲和力

[0064] A) 如通过SPR(BIAcore®3000)所确定的,显示以随时间(x轴)变化的RU(y轴)测量

的9E4对 $\alpha$ -突触核蛋白的结合。山羊抗人IgG被固定在CM5芯片上。9E4通过结合至山羊抗人IgG被捕获在芯片上,该山羊抗人IgG被固定在芯片上。测试了人 $\alpha$ -突触核蛋白的浓度系列(3.125、6.25、12.5、25、50、100nM)对表面的结合。每个循环之间重新产生传感器表面。

[0065] B)将来自在不同浓度结合的信号转换成结合曲线。

[0066] C)计算了抗体9E4的结合常数。(实例2)。

[0067] 图6显示了 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸序列。人脑组织中的主要截短位点(由箭头表示)通过质谱法鉴定(Kellie JF,Higgs RE,Ryder JW,Major A,Beach TG,Adler CH,Merchant K,Knierman MD,Quantitative measurement of intact alpha-synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain tissue by mass spectrometry[通过质谱法定量测量来自事后对照和帕金森氏病脑组织的完好的 $\alpha$ -突触核蛋白的蛋白形式],Sci Rep.[科学报告]2014年7月23日;4:5797,doi:10.1038/srep05797)。

[0068] 图7(小图A-B)显示抗体GM37和GM285的表位作图。ELISA数据显示抗体与衍生自 $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸序列95-132的连续的多肽(20聚体)结合的相对水平(其他非结合多肽未示出)。

[0069] A)GM37表位要求肽序列ILEDMP(SEQ ID NO:9)以完全结合。

[0070] B)GM285要求肽ILED(SEQ ID NO:19)以完全结合。(实例3)。

[0071] 图8(小图A-B)显示 $\alpha$ -突触核蛋白的截短形式的示意图。

[0072] A)GM37/285(ILEDMP;SEQ ID NO:9)和9E4(NEAYE;SEQ ID NO:36)的结合表位在 $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸序列(SEQ ID NO:10)上以粗体显示。箭头指示图6中C-末端截短位点。

[0073] B)已经从人脑材料中鉴定出 $\alpha$ -突触核蛋白的主要截短形式。在右侧显示出基于氨基酸数量的大小。全长 $\alpha$ -突触核蛋白是140个氨基酸。因为可以从表位扣除,GM37、其变体1-3、和GM285应当结合全长和1-119/122、1-135片段。抗体9E4将仅结合全长和1-135片段。截短后留下的更小的C-末端片段的特异性性质未示出。

[0074] 图9显示抗体GM37和GM285、免疫沉淀物、人脑的全长 $\alpha$ -突触核蛋白和截短的 $\alpha$ -突触核蛋白。将人DLB大脑的粗匀浆与测试抗体(珠(无抗体(No ab)、不结合 $\alpha$ -突触核蛋白的B12-人IgG1对照抗体、GM-37、GM37变体2、GM-285、和小鼠(m)9E4)孵育,并且将免疫耗尽的上清液和免疫沉淀物质在SDS-PAGE上分离。蛋白质印迹显示了从上清液被耗尽和与抗体一起被免疫沉淀(IP)的表示 $\alpha$ -突触核蛋白的全长和不同截短形式的条带。如可以看到的,GM37、GM37v2和GM285抗体从上清液耗尽主要的 $\alpha$ -突触核蛋白种类,并且IP显示了这些种类,截短的1-135、1-119/122种类和全长的 $\alpha$ -突触核蛋白。该9E4不影响1-119/122种类,但只有IP全长和1-135(实例4)。

[0075] 图10显示在氨基酸119/122被钙蛋白酶裂解的 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的蛋白质水解示意图。添加 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维(PFF)到具有(PFF+)或没有(PFF)测试抗体的培养物。GM-37/285的存在抑制细胞中截短的 $\alpha$ -突触核蛋白的形成和分泌到细胞培养基。

[0076] 图11A显示在培养基和使用PFF处理过的初级小鼠皮质培养物的细胞裂解物两者中GM37抑制截短的条带(12KD)形成。蛋白通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分离以检测 $\alpha$ -突触核蛋白的不同种类。在只有PFF或对照抗体(B12)处理的细胞中在12kDa和14kDa检测到两个单体 $\alpha$ -突触核蛋白的条带,分别代表截短的和全长的 $\alpha$ -突触核蛋白。在GM-37存在下12Kd只有

微弱的条带,表明大部分裂解被阻止。这种影响也反映在细胞的培养基中。积累的相对水平也可以通过GM-37的存在被抑制,如反映在14Kd条带的相对强度的降低。可替代地,可用于细胞摄取的14Kd条带的量能被减少。(实例5)。

[0077] 图11B显示了由抗体GM37、GM37变体2和GM285进行的 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维蛋白质水解的剂量依赖性抑制。在低抗体浓度(0.1 $\mu$ g/ml)下,在初级小鼠皮层培养物的细胞裂解物中有一个代表全长(FL) $\alpha$ -突触核蛋白的条带和一个代表C-末端截短(CT)的 $\alpha$ -突触核蛋白的条带(由箭头表示)。增加抗体浓度至1 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml和10 $\mu$ g/ml导致细胞中 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的蛋白质水解减少。使用抗体GM37、GM37v2和GM285都有观察到这一现象。使用不能识别 $\alpha$ -突触核蛋白的人IgG1抗体B12处理对照样品。也有不添加抗体(无抗体(No ab))的对照,和未添加 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维(无 $\alpha$ -突触核蛋白(No A<sub>syn</sub>))的细胞。相比B12或“无抗体”对照,使用37、37v2和285处理的样品中 $\alpha$ -突触核蛋白的总量也被减少,表明所有三种抗体以浓度依赖性的方式减少细胞中 $\alpha$ -突触核蛋白的累积。在凝胶顶部的肌动蛋白(actin)条带显示等量的样品加载(实例5)。

[0078] 图12显示GM37和GM285对 $\alpha$ -突触核蛋白聚集和 $\alpha$ -突触核蛋白磷酸化在小鼠初级皮质神经元的播种的影响。

[0079] 12A) 当使用1ng $\alpha$ -突触核蛋白的纯种子或粗种子播种细胞时,针对磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白染色的初级神经元(在细胞中以斑点或点状染色出现)的图像的实例。

[0080] 12B) 初级皮质神经元蛋白质的蛋白质印迹分离为可溶性和不溶性级分。该印迹使用人 $\alpha$ -突触核蛋白特异性抗体(4B12/H a-syn),磷酸丝氨酸-129- $\alpha$ -突触核蛋白特异性抗体(ab51253/pS-a-Syn)和小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白特异性抗体(D37A2/M a-syn)染色,并且该印迹显示,在初级神经元中添加粗种子导致在不溶性级分中内源性小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白和磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白的积累和 $\alpha$ -突触核蛋白的较高分子量多聚体的积累。

[0081] 12C) GM37、GM37变体2和GM285抑制磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白的出现,该磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白的数量通过Cellomics ARRAYSCAN<sup>TM</sup>自动显微镜测量为细胞中 $\alpha$ -突触核蛋白磷酸丝氨酸129阳性斑点的数量。GM37、GM37v2和GM285在细胞中以剂量依赖性方式减少磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白斑点的量。

[0082] 12D) 以抗体最高剂量(133nM)处理,并针对肌动蛋白、人 $\alpha$ -突触核蛋白、磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白和小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白染色的初级皮质神经元匀浆的蛋白质印迹显示,抗体37、37v2和285抑制在不溶性级分被细胞摄取的 $\alpha$ -突触核蛋白粗种子的截短。所有抗体也抑制磷酸化、内源性小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白和较高分子量多聚体的磷酸化小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白在不溶性级分中的积累。在凝胶顶部的肌动蛋白条带显示等量的样品加载(实例6)。

[0083] 图13显示在F28-snca转基因的和年龄匹配的对照小鼠的海马体内的谢弗侧枝(Schaffer collateral)CA1区突触的基础突触传递。场兴奋性突触后电位(fEPSP)被应用到谢弗侧枝的单一刺激诱发,并且基础突触传递通过测量随着刺激强度而变化的fEPSP斜率进行评估。短期突触可塑性是通过诱导双脉冲易化来评估。不同刺激强度为0、25、50、75、100、150、200、300、400、和500 $\mu$ A,并且以增加的顺序依次施加,每个强度重复2至3次。相比年龄匹配的对照小鼠,基础突触传递在过量表达的野生型 $\alpha$ -突触核蛋白的F28-snca转基因小鼠中发现被显著损害(实例7)。

[0084] 图14显示单一剂量人9E4(15mg/kg,腹膜内)的全身给予对F28-snca转基因小鼠的

海马体内谢弗侧枝CA1区突触的基础突触传递损害的影响。场兴奋性突触后电位 (fEPSP) 被应用到谢弗侧枝的单一刺激诱发, 并且基础突触传递通过测量随着刺激强度而变化的 fEPSP 斜率进行评估。使用 h9E4 急性治疗在 F28-snca 转基因小鼠内诱导基础突触传递损害的显著逆转 (Tg-snca+h9E4 对比 Tg-snca+PBS,  $p=0.002$ )。然而, 通过 h9E4 的逆转只是局部的, 如相比使用 PBS 处理的同窝仔畜显著降低的基础突触传递指示的 ( $p=0.007$ ) (实例7)。

[0085] 图15显示单一剂量人GM37 (15mg/kg, 腹膜内) 或同种型对照抗体 (B12) 的全身给予对 F28-snca 转基因小鼠的海马体内谢弗侧枝CA1区突触的基础突触传递损害的影响。场兴奋性突触后电位 (fEPSP) 被应用到谢弗侧枝的单一刺激诱发, 并且基础突触传递通过测量随着刺激强度而变化的 fEPSP 斜率进行评估。使用 GM37 急性治疗在 F28-snca 转基因小鼠内诱导基础突触传递损害的完全逆转 (Tg-snca+GM37 对比 Tg-snca+B12,  $p=0.004$ ) (实例7)。

[0086] 图16显示单一剂量人GM285 (15mg/kg, 腹膜内) 的全身给予对 F28-snca 转基因小鼠的海马体内谢弗侧枝CA1区突触的基础突触传递损害的影响。场兴奋性突触后电位 (fEPSP) 被应用到谢弗侧枝的单一刺激诱发, 并且基础突触传递通过测量随着刺激强度而变化的 fEPSP 斜率进行评估。使用 GM285 急性治疗诱导在 F28-snca 转基因小鼠内基础突触传递损害的完全逆转 (Tg-snca+GM285 对比 Tg-snca+PBS,  $p=0.001$ ) (实例7)。

[0087] 图17 (小图A-B) 显示人9E4、GM37或同种型对照抗体 (抗HEL) 的全身给予 (15mg/kg, 腹膜内) 对自由移动的 F28-snca 转基因小鼠的海马体内间质液 (isf) 内人  $\alpha$ -突触核蛋白的水平的影响。将每一个动物抗体治疗之前2-3个基础值 (4h-6h) 的平均值当作基线并设为 100%。采用双因素方差分析 (ANOVA) 与重复测量来分析差异。在海马体中人  $\alpha$ -突触核蛋白的基础水平为  $8.1 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$  (平均值  $\pm$  SEM,  $n=25$ , 未对体外透析探针恢复进行修正)。相比两个对比抗体 (人9E4和对照同种型), GM37的给予诱导了 F28 小鼠海马体内人  $\alpha$ -突触核蛋白较大减少, 显示使用 GM37 或对照抗体处理的动物之间的  $\alpha$ -突触核蛋白的水平显著差异的抗HEL时间点由星号表示。(实例8)。

[0088] 图18显示了抗体治疗时间表的示意图 (向下箭头), 在大鼠 AAV 人  $\alpha$ -突触核蛋白模型中的病毒注射和行为评估在图19中示出 (实例9)。

[0089] 图19显示在大鼠 AAV 模型中抗体 GM37 在长期治疗后可以减少帕金森氏病运动缺陷。在 AAV-人  $\alpha$ -突触核蛋白大鼠中使用 GM37 或 PBS 长期治疗对运动不对称的影响在圆柱体试验 (cylinder test) 中进行评估。通过监测5分钟来测试每只大鼠对前爪的使用。计算每只动物使用右前爪 (注射同侧) 和使用左前爪 (右前爪对侧+) 的百分比 (如在 y 轴所示), 相比 GFP-PBS 大鼠,  $*p<0.05$  和  $**p<0.01$ 。使用 PBS 处理的大鼠仍然有爪使用显著不对称, 而使用抗体 GM37 处理的动物不再有显著缺陷。(实例9)。

[0090] 图20A-20C显示使用抗体 GM37 长期治疗可以减少将病理  $\alpha$ -突触核蛋白纤维种子注入到小鼠纹状体诱导的病理  $\alpha$ -突触核蛋白磷酸化。图20A显示了表明关于种子注射和细胞计数的相对于处理时间的示意图。在将重组  $\alpha$ -突触核蛋白纤维种子注射入小鼠背侧纹状体一天前给予抗体 GM37, 然后每周一次持续六个星期。给药方案是静脉内注射 15mg/kg 或腹膜内注射 30mg/kg。图20B显示了根据注射部位和剂量, GM37 在血浆中的暴露水平。注射新抗体剂量前取每周的样品。图20C显示了在研究结束时根据剂量和注射部位 GM37 在脑脊液中的暴露水平。图20D比较细胞的数量与使用 GM37 或 PBS 对照处理后在黑质中每个第六部分计入的磷酸化  $\alpha$ -突触核蛋白阳性包含物。使用静脉内注射 15mg/kg GM37 和腹膜内注射 30mg/kg

GM37处理的小鼠相比PBS处理的小鼠在细胞中具有显著减少的磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白包含物(实例10)。

[0091] 图21显示了人 $\alpha$  (SEQ ID NO:10)、 $\beta$  (SEQ ID NO:37) 和  $\gamma$  (SEQ ID NO:38) 突触核蛋白蛋白质的比对。突出了与 $\alpha$ -突触核蛋白不同的氨基酸残基。缺口由点表示。括号内是SwissProt号。

[0092] 图22显示了 $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物的比对(食蟹猴, SEQ ID NO:39; 大鼠, SEQ ID NO:40; 小鼠, SEQ ID NO:41)。突出了与人 $\alpha$ -突触核蛋白 (SEQ ID NO:10) 不同的氨基酸残基。括号内显示的是SwissProt号。

[0093] 图23显示GM37(名为GM37野生型(wt))和3个GM37变体(名为GM37变体1、2和3)的瞬时表达。星号表示蛋白A纯化和中和后确定的数据。 $\dagger$ 表示从关于表达培养物规模(0.4L)的蛋白A纯化和中和后获得的产率计算的数据。

[0094] 图24显示了测量四种抗体GM37野生型、GM37变体1、GM37变体2和GM37变体3与人 $\alpha$ -突触核蛋白结合的竞争ELISA。涂覆 $\alpha$ -突触核蛋白的板被用于检测在每种抗体(0.3 $\mu$ g/ml)的溶液中与浓度增加的 $\alpha$ -突触核蛋白(0-1000nM)预孵育后剩余的抗体量。所有四种抗体显示对 $\alpha$ -突触核蛋白相似的结合。

[0095] 图25显示了一个表,该表比较GM37野生型及其变体1-3与固定的重组人 $\alpha$ -突触核蛋白的结合率动力学参数。使用SPR测量该结合,并使用1:1结合算法(BIAcore®T200)确定结合比率。

[0096] 图26比较 $\alpha$ -突触核蛋白抗体对使用病理 $\alpha$ -突触核蛋白纤维种子处理的小鼠初级神经元内磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白水平的影响。在GM37、GM37变体1、GM37变体2和GM37变体3(2 $\mu$ g) 四者存在或不存在时使用种子(10ng)处理初级神经元。3周后神经元被固定和染色,并且通过Cellomics ARRAYSCAN™分析 $\alpha$ -突触核蛋白磷酸化丝氨酸129阳性斑点。使用单独的种子或种子加同种型对照抗体(B12)处理的细胞显示显著上升水平的磷酸化。使用GM37野生型和3个变体处理的细胞能够抑制 $\alpha$ -突触核蛋白的磷酸化,它们都与没有接受种子的细胞显示相同水平的磷酸化。数据显示为平均值 $\pm$ SD,如同在5个孔中从每孔7张图像来确定。 $N=2$ 。

[0097] 图27比较了野生型GM37、变体1、变体2和变体3的温度依赖性聚集。各抗体的样品经受随时间稳定增加的温度,并且同时通过多角度光散射法测定聚集水平(普罗米修斯(Prometheus)NT.48, NanoTemper技术公司(NanoTemper Technologies))。开始聚集的温度对于GM37和GM37变体是相似的,然而GM37-变体2观察到最低水平的聚合。

## 具体实施方式

[0098] 定义

[0099] 如在此使用的,术语“ $\alpha$ -突触核蛋白”与“ $\alpha$ -突触核蛋白蛋白质”同义,并且是指任何 $\alpha$ -突触核蛋白蛋白质亚型(例如在UniProt中鉴定为P37840,1-3)。关于如下显示的SEQ ID NO:10,给予 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸编号,其中蛋氨酸(M)是氨基酸残基1:

[0100] SEQ ID NO:10:

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV  
GSKTKEGVVH GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK  
[0101] TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE **GILEDMPVDP**  
DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

[0102] 本发明涉及能够与 $\alpha$ -突触核蛋白特异性结合(并特别是与人 $\alpha$ -突触核蛋白结合)的抗体和抗体片段。特别地,抗体及其片段展现出与人 $\alpha$ -突触核蛋白的112-117内的表位特异性结合的能力。

[0103] 本发明上下文中的术语“抗体(Ab)”是指免疫球蛋白分子,或根据本发明的一些实施例是指能够与分子(“抗原”)的表位特异性结合的免疫球蛋白分子的片段。天然存在的抗体典型地包含四聚体,该四聚体通常由至少两条重(H)链和至少两条轻(L)链构成。每条重链由重链可变结构域(在此缩写为VH)和重链恒定结构域构成,重链恒定结构域通常由3个结构域(CH1、CH2和CH3)构成。重链可以具有任何同种型,包括IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚型)、IgA(IgA1和IgA2亚型)、IgM以及IgE。每条轻链由轻链可变结构域(在此缩写为VL)和轻链恒定结构域(CL)构成。轻链包括 $\kappa$ 链和 $\lambda$ 链。重链和轻链可变结构域典型地负责抗原识别,而重链和轻链恒定结构域可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q))的结合。VH和VL区可以进一步细分成称作“互补决定区”的超变区,它们中间穿插着更保守的称为“构架区”(FR)的区域。每个VH和VL由三个CDR结构域和四个FR结构域构成,按以下顺序从氨基末端排到羧基末端:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重链和轻链可变结构域含有与抗原相互作用的结合结构域。特别相关的是已经“被分离”以便存在于与它可以在自然界中存在的不同于物理环境中的或者已经被修饰以便在氨基酸序列上不同于天然存在的抗体的抗体及其抗原结合片段。

[0104] 术语“表位”意指能够特异性结合抗体的抗原决定簇。表位通常由如氨基酸或糖侧链分子的表面基团组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和线性表位的区别在于,在变性溶剂的存在下常常丧失与前者而非后者的结合。表位可以包含直接牵涉在结合中的氨基酸残基以及其他没有直接牵涉在结合中的氨基酸残基,如被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基(换言之,氨基酸残基在特异性抗原结合肽的影响范围之内)。术语“112-117表位”是指含有112-117人 $\alpha$ -突触核蛋白的6个氨基酸残基中的至少4个的人 $\alpha$ -突触核蛋白的一个区域,该表位不包括人 $\alpha$ -突触核蛋白的1-111的任何残基(包括106-111中的任何残基),也不包括人 $\alpha$ -突触核蛋白的118-140(包括残基118-120)的任何残基。如在此使用的,抗体据说能够与“112-117表位”内的表位特异性结合,如果它能够通过与112-117表位的6个氨基酸残基中的至少4个结合来与人 $\alpha$ -突触核蛋白特异性结合。

[0105] 如在此使用的,术语“抗体的抗原结合片段”意指能够与表位特异性结合的抗体的片段、部分、区域或结构域(无论它是如何产生的(例如,经由切割、重组、合成等)),并且因此术语“抗原结合”旨在意指与“表位结合”是相同的,这样使得例如,“抗体的抗原结合片段”旨在是与“抗体的表位结合片段”是相同的。抗原结合片段可以含有这种抗体的1、2、3、4、5或所有6个CDR结构域,并且尽管能够与这种表位特异性结合,仍可以展现出对不同于这

种抗体的表位的针对这种表位的特异性、亲和力或选择性。然而,优选地,抗原结合片段含有这种抗体的所有6个CDR结构域。抗体的抗原结合片段可以是单条多肽链(例如,scFv)的一部分或包含单条多肽链,或者可以是两条或更多条多肽链(各自具有氨基末端和羧基末端)(例如,双抗体、Fab片段、Fab<sub>2</sub>片段等)的一部分或包含两条或更多条多肽链。可以例如通过完整抗体的蛋白酶切割来获得展现出抗原结合能力的抗体片段。更优选地,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独基因或编码此类基因序列的多核苷酸(例如,其编码cDNA)天然地编码,但是可以将这两个结构域使用重组方法通过柔性接头连接,该柔性接头使得这两个结构域能够成为单条蛋白链,在该单条蛋白链中VL区和VH区缔合以形成单价抗原结合分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人,(1988) Science[科学]242:423-426;和Huston等人,(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) [美国国家科学院院刊]85:5879-5883)。可替代地,通过采用太短(例如,小于约9个残基)的柔性接头以使得单条多肽链的VL区和VH区缔合在一起,可以形成双特异性抗体、双抗体或类似分子(其中两条此类多肽链缔合在一起以形成二价抗原结合分子)(关于双抗体的描述,参见例如PNAS USA[美国国家科学院院刊]90(14),6444-8(1993))。本发明所涵盖的抗原结合片段的实例包括(i) Fab'或Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段,或如描述于WO 2007059782中的单价抗体;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含两个由二硫键在铰链结构域连接的Fab片段的二价片段;(iii)基本上由VH结构域和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)基本上由VL结构域和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等人,Nature[自然]341,544-546(1989)),其基本上有VH结构域组成并且也称为结构域抗体(Holt等人,Trends Biotechnol.[生物技术趋势]2003年11月;21(11):484-90);(vi) 骆驼或纳米抗体(Revetz等人,Expert Opin Biol Ther.[生物疗法的专家意见]2005年1月;5(1):11-24)以及(vii)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分离基因编码,但是可以使用重组方法通过合成接头将它们连接,该合成接头使得它们能够成为单条蛋白链,在该单条蛋白链中VL区和VH区配对以形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人,Science[科学]242,423-426(1988)和Huston等人,PNAS USA[美国国家科学院院刊]85,5879-5883(1988))。在此进一步讨论在本发明上下文中的这些和其他有用抗体片段。还应理解的是,除非另外指明,否则术语抗体还包括抗体样多肽,如通过任何已知技术(如酶促切割、肽合成和重组技术)提供的嵌合抗体和人源化抗体以及保留与抗原特异性结合能力的抗体片段(抗原结合片段)。这样产生的抗体可以具有任何同种型。如在此使用的,“同种型”是指由重链恒定结构域基因编码的免疫球蛋白类别(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。使用本领域的普通技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段;可以按与完整抗体相同的方式针对实用性容易地对能够与希望的表位结合的适合片段进行筛选。

[0106] 术语“双特异性抗体”是指含有各自靶向独立靶标的两个独立抗原结合片段的抗体。这些靶标可以是存在于不同蛋白质上的表位或存在于相同靶标上的不同表位。可以使用亲本单特异性二价抗体分子的HC的恒定结构域中的补偿氨基酸变化制备双特异性抗体分子。所得异源二聚体抗体含有一个由两个不同亲本单特异性抗体贡献的Fab。Fc结构域中的氨基酸变化导致具有随时间稳定的双特异性的异源二聚体抗体的稳定性增加。(Ridgway等人,Protein Engineering[蛋白质工程]9,617-621(1996);Gunasekaran等人,JBC 285,19637-1(2010);Moore等人,MAbs 3:6 546-557(2011);Strop等人,JMB[生物化学杂志]

420,204-219 (2012); Metz等人, Protein Engineering [蛋白质工程] 25:10 571-580 (2012); Labrijn等人, PNAS [美国国家科学院院刊] 110:113, 5145-5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein等人, MAbs [MAbs杂志] 5:5 646-654 (2013)。双特异性抗体还可以包括使用ScFv融合物产生的分子。然后将两个单特异性scfv独立地连接至能够形成稳定异源二聚体的Fc结构域,以产生单个双特异性分子 (Mabry等人, PEDS 23:3 115-127 (2010))。双特异性分子具有双重结合能力。例如,出于输送治疗性抗体穿过血脑屏障以治疗CNS疾病的目的,同时定位治疗靶标和转胞表面受体。

[0107] 术语GM37、GM-37、GM37野生型(wt)、mab37和6004-37在此可互换地使用,并且都指相同的抗体。

[0108] 术语抗体GM37旨在包括抗体或其抗原结合片段,它们包含或由如在SEQ ID No:1-3中给出的重链CDR1-3和如在SEQ ID No:4-6中给出的轻链CDR1-3组成。在一个实施例中,抗体GM37或其抗原结合片段可以包含或由SEQ ID NO:7的重链可变结构域和/或SEQ ID NO:8的轻链可变结构域组成。例如,该抗体GM37可以是IgG抗体,该IgG抗体包括由SEQ ID NO:7的可变结构域和SEQ ID NO:18的恒定结构域一起组成的重链以及由SEQ ID NO:8的可变结构域和SEQ ID NO:17的 $\kappa$ 恒定结构域组成的轻链。

[0109] 蛋白质(在此情况下抗体)的脱氨基作用可以在制造和储存过程中自发发生,而且还可以在体内自发发生,并使得最终的制药药物的质量难以控制。在一些情况下脱氨基作用也可以影响该分子的活性。脱氨基作用发生在天冬酰胺残基,但相关的天冬酰胺的位置可能难以肯定地预测,但在一些情况下也可以被天冬酰胺-甘氨酸基序影响。在GM37抗体中发现若干可能的脱氨基基序,但是,脱氨基的一个可能位点被发现是在重链的残基54处。天冬酰胺被另一个氨基酸后续取代不是直接的,但是GM37的3个变体(GM37变体(var)1、2和3)被发现保留了原始GM37(GM37野生型(wt))的活性。

[0110] 术语GM37变体是指脱氨基的变体1、2或3,其中,相比上文描述的GM37抗体,变体1具有N54S取代,变体2具有N54Q取代和变体3具有N54H取代。

[0111] 因而抗体GM37变体(var)1、2和3旨在包括抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含或由GM37的SEQ ID No:1和3中给出的重链CDR1和3以及由GM37的SEQ ID No:4-6中给出的轻链CDR1-3组成,但是它们的重链CDR2不同以至于变体1具有SEQ ID NO:33的CDR2,变体2具有SEQ ID NO:34的CDR2并且变体3具有SEQ ID NO:35的CDR2。

[0112] 在一个实施例中,抗体GM37变体或其抗原结合片段可以包含或由SEQ ID NO:30、31和32(分别对于变体1、2和3)的重链可变结构域和SEQ ID NO:8的轻链可变结构域组成。该抗体GM37可以是IgG抗体,该IgG抗体包括由SEQ ID NO:30、31或32的可变结构域和SEQ ID NO:18的恒定结构域一起组成的重链以及由SEQ ID NO:8的可变结构域和SEQ ID NO:17的 $\kappa$ 恒定结构域组成的轻链。

[0113] 术语GM285、GM-285、mab285和6004-285在此可互换地使用,并且都指相同的抗体。

[0114] 术语抗体GM285旨在包括抗体或其抗原结合片段,它们包含或由如在SEQ ID NO:20-22中给出的重链CDR1-3和如在SEQ ID NO:23-25中给出的轻链CDR1-3组成。在一个实施例中,抗体GM37或其抗原结合片段可以包含或由SEQ ID NO:26的重链可变结构域和/或SEQ ID NO:27的轻链可变结构域组成。例如,该抗体GM37可以是IgG抗体,该IgG抗体包括由SEQ ID NO:26的可变结构域和SEQ ID NO:28的恒定结构域一起组成的重链以及由SEQ ID NO:

27的可变结构域和SEQ ID NO:29的 $\kappa$ 恒定结构域组成的轻链。

[0115] GM285抗体与人 $\alpha$ -突触核蛋白(SEQ ID NO:10)的序列112-115(ILED;SEQ ID NO:19)内的表位特异性结合。

[0116] 除非在此另外指明,这个区域中氨基酸残基的编号是根据IMGT®, 国际免疫遗传学信息系统®(the international ImMunoGeneTics information system®)或Kabat,E.A.,Wu,T.T.,Perry,H.M.,Gottesmann,K.S.和Foeller,C.(1991),Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学目的蛋白质序列],第5版,NIH出版号91-3242U.S.Department of Health and Human Services.[美国健康与人服务部]Chothia,C.和Lesk,A.M.(1987).Canonical structures for the hypervariable domains of immunoglobulins[免疫球蛋白的超变结构域的典型结构].J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196,901-917)。

[0117] 如上文定义的,“抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体”或“ $\alpha$ -突触核蛋白抗体”(在此可互换地使用,这取决于其中书面的上下文)是与 $\alpha$ -突触核蛋白或 $\alpha$ -突触核蛋白片段(特别是对应于SEQ ID NO 9和/或19的 $\alpha$ -突触核蛋白序列)特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0118] 如在此使用的,术语“人抗体”(其可以缩写为“humAb”或“HuMab”)旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变结构域和恒定结构域的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,在体外通过随机或位点特异性诱变或在基因重排期间或在体内通过体细胞突变引入的突变)。在本发明的方法/用途的上下文中,如在此使用的,术语“组合”包括给予治疗有效量的:1)根据本发明的 $\alpha$ -突触核蛋白抗体和2)用于治疗帕金森氏病(包括帕金森氏病的特发性和遗传性形式)、戈谢病(GD)、弥漫性路易体病(DLBD)、阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩的化合物。2种药物的给予可以同时或分别以治疗有效量进行,以达到组合治疗的希望的治疗效果。

[0119] 这些另外的药物可以选自下组,该组包括:多巴胺、半胱天冬酶抑制剂、钙蛋白酶抑制剂、LRRK2抑制剂、BACE1抑制剂、聚集抑制剂、识别任何形式的淀粉样蛋白- $\beta$ 的抗体、炎症抑制剂、LAG-3抗体、伊拉地平、逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的小胶质细胞吞噬活性的减少的分子、尼古丁、咖啡因、葡糖脑苷脂酶调节剂、MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A2A拮抗剂,将这些药物以有效量给予所述受试者。

[0120] 根据本发明的实施例,这些另外的药物选自下组,该组包括:普拉克索、VX-765(普雷卡桑)、ABT-957、PF-06447475、NB-360、神经孔NPT100-18A、NPT200-11、EGCG、巴品珠单抗、茄尼醇单抗、冈特莫单抗、克瑞珠单抗、阿杜单抗、C16H15N04、BMS-986016、GSK2831781、IMP321、ELN484228、NCGC607、美格鲁特、依鲁司他(Cerdelga)、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、普拉克索、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱。

[0121] 用于组合治疗的化合物可以同时给予或者在这两种化合物的给予之间有时间间隔。可以在同一天或在不同的天或以时间间隔给予这两种化合物。

[0122] 如在此使用的,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组合物的抗体分子制剂。常规的单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。在某些实施例中,单克隆抗体可以由多于一种Fab结构域构成,由此增加对多于一种靶标的特异性。术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”并不旨在受限于任何具体产生方法(例如,

重组的、转基因的、杂交瘤等)。

[0123] 术语“人源化的”是指通常使用重组技术制备的具有衍生自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点和基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的剩余免疫球蛋白结构的分子。抗原结合位点可以包含融合至人恒定结构域的完全非人抗体可变结构域或仅包含接枝到人可变结构域的适当人构架区的此类可变结构域的互补决定区(CDR)。此类人源化分子的构架残基可以是野生型的(例如,全人的)或者它们可以被修饰成包含一种或多种未在其序列已经充当人源化的基础的人抗体中发现的氨基酸取代。人源化减小或消除该分子的恒定结构域充当人个体中的免疫原的可能性,但是仍存在对外源可变结构域做出免疫应答的可能性(LoBuglio,A.F.等人,(1989)“Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man:Kinetics And Immune Response”[人体内的小鼠/人嵌合单克隆抗体:动力学与免疫应答]Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) [美国国家科学院院刊]86:4220-4224)。另一种方法不仅集中于提供人衍生的恒定结构域,还集中于修饰可变结构域以便将它们改造地尽可能接近人形式。已知的是,重链和轻链两者的可变结构域都含有三个互补决定区(CDR),它们应答于所讨论的抗原而改变并且决定结合能力,其侧翼为四个构架区(FR),这些构架区在给定物种中是相对保守的并且推定为CDR提供支架。当相对于特定抗原制备非人抗体时,可以通过在有待修饰的人抗体中存在的FR上接枝衍生自非人抗体的CDR来“改造”或“人源化”可变结构域。这种方法应用至不同抗体已经由以下报道:Sato,K.等人,(1993)Cancer Res [癌症研究]53:851-856.Riechmann,L.等人,(1988)“Reshaping Human Antibodies for Therapy”[改造人抗体用于疗法]Nature[自然]332:323-327;Verhoeyen,M.等人,(1988)“Reshaping Human Antibodies:Grafting An Antilysozyme Activity”[改造人抗体:接枝溶菌酶抗体活性]Science[科学]239:1534-1536;Kettleborough,C.A.等人,(1991)“Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting:The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation”[通过CDR接枝小鼠单克隆抗体的人源化:框架残基对环构象的重要性]Protein Engineering[蛋白质工程化]4:773-3783;Maeda,H.等人,(1991)“Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity”[具有HIV中和活性的改造人抗体的构建]Human Antibodies Hybridoma[人抗体杂交瘤]2:124-134;Gorman,S.D.等人,(1991)“Reshaping A Therapeutic CD4Antibody”[改造治疗性CD4抗体]Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) [美国国家科学院院刊]88:4181-4185;Tempest,P.R.等人,(1991)“Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo”[改造人单克隆抗体以抑制人呼吸道合胞病毒的体内感染]Bio/Technology[生物/技术]9:266-271;Co,M.S.等人,(1991)“Humanized Antibodies For Antiviral Therapy”[用于抗病毒疗法的人源化抗体]Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) [美国国家科学院院刊]88:2869-2873;Carter,P.等人,(1992)“Humanization Of An Anti-p185her2Antibody For Human Cancer Therapy”[抗p185her2抗体的人源化用于人癌症疗法]Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) [美国国家科学院院刊]89:4285-4289;以及Co,M.S.等人,(1992)“Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33Antigen”[具有针对CD33抗原的特异性的嵌合和人源化抗体]J.Immunol.[免疫学杂志]148:1149-1154。在一些实施例中,人源化抗体保留所有CDR序列(例如,含有来自小鼠抗

体的所有六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其他实施例中,人源化抗体具有一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),它们相对于原始抗体是改变的,它们还被称作为一个或多个“衍生自”来自原始抗体的一个或多个CDR的CDR。人源化抗体的能力是熟知的(参见例如,美国专利号5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,859,205;6,407,213;6,881,557)。

[0124] 如在此使用的,抗体或其抗原结合片段被说成与另一分子的区域(即,表位)“特异性”结合,如果它相对于替代表位与该表位更加频繁地、更加快速地、以更长的持续时间和/或以更大的亲和力或亲合性反应或缔合的话。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段比另一分子至少10倍更强烈地与其靶标(人 $\alpha$ -突触核蛋白)结合;优选地强至少50倍并且更优选地强至少100倍。优选地,抗体或其抗原结合片段在生理条件下(例如,在体内)结合。因此,能够与人 $\alpha$ -突触核蛋白的残基112-117(ILEDMP(SEQ ID NO:9))内的表位的抗体“特异性结合”涵盖能够以这种特异性和/或在此类条件下与人 $\alpha$ -突触核蛋白的残基112-117内的表位的抗体或其抗原结合片段结合。适合于确定这种结合的方法是本领域的普通技术人员已知的,并且示例性方法描述于所附实例中。如在此使用的,在抗体与预定抗原结合的上下文中,术语“结合”典型地是指以对应于约 $10^{-7}$ M或更小(如约 $10^{-8}$ M或更小、如约 $10^{-9}$ M或更小)的KD的亲和力结合,当用抗原作为配体并且抗体作为分析物在BIAcore®3000或T200仪器中通过例如表面等离子体共振(SPR)技术确定时,并且以对应于以下KD的亲和力与预定抗原结合,该KD比该抗体对与除预定抗原或紧密相关抗原之外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力低至少十倍,如低至少100倍、例如低至少1,000倍、如低至少10,000倍、例如低至少100,000倍。亲和力低的量依赖于抗体的KD,这样使得当抗体的KD非常低(即,该抗体具高度特异性)时,低于对非特异性抗原的亲和力的对抗原的亲和力的量可以是至少10,000倍。

[0125] 如在此使用的,术语“kd”(sec<sup>-1</sup>或1/s)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值又称为koff值。

[0126] 如在此使用的,术语“ka”(M<sup>-1</sup>sec<sup>-1</sup>或1/Msec)是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。

[0127] 如在此使用的,术语“KD”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数并且通过kd除以ka获得。

[0128] 如在此使用的,术语“KA”(M<sup>-1</sup>或1/M)是指特定抗体-抗原相互作用的缔合平衡常数并且通过ka除以kd获得。

[0129] 在一个实施例中,本发明涉及抗体或其抗原结合片段,其展现出以下特性中的一种或多种:

[0130] i. 对于 $\alpha$ -突触核蛋白的结合亲和力(KD),该结合亲和力在0.5-10nM之间,如1-5nM或1-2nM;

[0131] ii. 抑制 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的蛋白酶截短的能力;

[0132] iii. 在F28-snca转基因小鼠中逆转基础突触传递的损害的能力;

[0133] iv. 如通过体内微透析测量的降低小鼠海马体内 $\alpha$ -突触核蛋白的水平的能力;

[0134] v. 当长期给予时,能在帕金森氏病的大鼠模型中恢复运动功能的能力;

[0135] vi. 预防 $\alpha$ -突触核蛋白播种(如在体外和/或在帕金森氏病小鼠模型中不可溶的磷酸化的 $\alpha$ -突触核蛋白的积累)的能力;和/或

[0136] vii.在人脑中结合截短的 $\alpha$ -突触核蛋白的能力。

[0137]  $\alpha$ -突触核蛋白的结合亲和力(KD)可以使用本技术领域熟知的方法(例如,如描述于实例2中)来确定。

[0138] 术语“抑制 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的蛋白酶截短的能力”包括抑制钙蛋白酶-1诱导形成初级皮质神经元内人 $\alpha$ -突触核蛋白的片段1-119-122的能力(参见实例5)。

[0139] 术语“在F28-snca转基因小鼠中逆转基础突触传递的损害的能力”包括在F28-snca转基因小鼠的海马体CA1区逆转突触传递和可塑性的损害的能力,例如通过电生理测量的诱发的fEPSP斜率表明的(参见实例6)。

[0140] 术语“如通过体内微透析测量的降低小鼠海马体内 $\alpha$ -突触核蛋白水平的能力”包括如使用体内微透析测量的,降低海马体清醒、自由活动的F28-snca转基因小鼠中人 $\alpha$ -突触核蛋白水平的能力(参见实例7)。

[0141] 术语“当长期给予时,能在帕金森氏病的大鼠模型中恢复运动功能的能力”包括在帕金森氏病的大鼠重组腺相关病毒载体(rAAV)模型中减少或消除运动不对称的能力(参见实例8)。

[0142] 在一些抗体中,仅需CDR的一部分(即结合所需的CDR残基亚群,称为SDR)在人源化抗体中保持结合。可以通过分子建模和/或凭经验或者如描述于Gonzales,N.R.等人,(2004)“SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity”[使用多个人种系模板对鼠类抗体进行SDR接枝以最小化其免疫原性]Mol.Immunol.[分子免疫学]41:863-872中的,基于先前研究(例如CDR H2中的残基H60-H65通常是不需要的)从位于乔西亚(Chothia)超变环外的卡巴特(Kabat)CDR区域(参见Kabat等人,(1992)Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学目的蛋白质序列]National Institutes of Health[美国国立卫生研究院],公开号91-3242;Chothia,C.等人,(1987)“Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins”[免疫球蛋白的超变结构域的典型结构],J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917)中鉴定不接触相关表位并且不在SDR中的CDR残基。在此类人源化抗体中,在一个或多个供体CDR残基不存在或整个供体CDR被省略的位置处,占据该位置的氨基酸可以是在受体抗体序列中占据相应位置(通过卡巴特编号)的氨基酸。在包含在内的CDR中受体对供体氨基酸的此类取代的数目反映了竞争考虑的平衡。此类取代在降低人源化抗体中的小鼠氨基酸的数目方面并且因此在降低潜在的免疫原性方面是潜在有利的。然而,取代还可以引起亲和力变化,并且优选避免亲和力的显著减少。还可以凭经验选择CDR内的取代位置和待取代的氨基酸。

[0143] CDR残基的单个氨基酸改变可以导致失去功能性结合的事实(Rudikoff,S.等人,(1982)“Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-binding Specificity”[单个氨基酸取代改变抗原结合特异性]Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)[美国国家科学院院刊]79(6):1979-1983)提供了用于系统性鉴定可替代的功能性CDR序列的手段。在一种用于获得此类变体CDR的优选方法中,将编码CDR的多核苷酸诱变(例如经由随机诱变或通过位点定向方法(例如,用编码突变座位的引物进行聚合酶链式介导的扩增))以产生具有取代的氨基酸残基的CDR。通过比较原始(功能性)CDR序列中的相关残基的身份与取代的(非功能性)变体CDR序列的身份,可以鉴定出该取代的BLOSUM62.ii j取代得分。BLOSUM系统提供

了通过分析序列数据库创建的氨基酸取代矩阵,用于可信比对 (Eddy, S.R. (2004) “Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?” [BLOSUM62比对得分矩阵来自哪里?] Nature Biotech. [自然生物技术] 22 (8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) “Amino acid substitution matrices from protein blocks” [来自蛋白质嵌段的氨基酸取代矩阵] Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) [美国国家科学院院刊] 89:10915-10919; Karlin, S. 等人, (1990) “Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes” [通过使用通用评分方案评估分子序列特征的统计显著性的方法] Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) [美国国家科学院院刊] 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) “Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective” [来自信息理论视角的氨基酸取代矩阵] J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 219, 555-565)。目前,最先进的BLOSUM数据库是BLOSUM62数据库 (BLOSUM62.iij)。表1呈现了BLOSUM62.iij取代得分 (得分越高取代越保守,并且因此更加可能地,该取代将不会影响功能)。如果包含所得CDR的抗原结合片段不能与 $\alpha$ -突触核蛋白结合,例如,则BLOSUM62.iij取代得分被认为是不充分保守的,并且选择且产生新的具有更高取代得分的候选取代。因此,例如,如果原始残基是谷氨酸 (E) 并且非功能性取代残基是组氨酸 (H),则BLOSUM62.iij取代得分将为0,并且更保守的变化 (如到天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺或赖氨酸) 是优选的。

[0144]

| 表 1 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |    |    |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|
|     | A  | R  | N  | D  | C  | Q  | E  | G  | H  | I  | L  | K  | M  | F  | P  | S  | T  | W   | Y  | V  |
| A   | +4 | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -1 | 0  | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | +1 | 0  | -3  | -2 | 0  |
| R   | -1 | +5 | 0  | -2 | -3 | +1 | 0  | -2 | 0  | -3 | -2 | +2 | -1 | -3 | -2 | -1 | -1 | -3  | -2 | -3 |
| N   | -2 | 0  | +6 | +1 | -3 | 0  | 0  | 0  | +1 | -3 | -3 | 0  | -2 | -3 | -2 | +1 | 0  | -4  | -2 | -3 |
| D   | -2 | -2 | +1 | +6 | -3 | 0  | +2 | -1 | -1 | -3 | -4 | -1 | -3 | -3 | -1 | 0  | -1 | -4  | -3 | -3 |
| C   | 0  | -3 | -3 | -3 | +9 | -3 | -4 | -3 | -3 | -1 | -1 | -3 | -1 | -2 | -3 | -1 | -1 | -2  | -2 | -1 |
| Q   | -1 | +1 | 0  | 0  | -3 | +5 | +2 | -2 | 0  | -3 | -2 | +1 | 0  | -3 | -1 | 0  | -1 | -2  | -1 | -2 |
| E   | -1 | 0  | 0  | +2 | -4 | +2 | +5 | -2 | 0  | -3 | -3 | +1 | -2 | -3 | -1 | 0  | -1 | -3  | -2 | -2 |
| G   | 0  | -2 | 0  | -1 | -3 | -2 | -2 | +6 | -2 | -4 | -4 | -2 | -3 | -3 | -2 | 0  | -2 | -2  | -3 | -3 |
| H   | -2 | 0  | +1 | -1 | -3 | 0  | 0  | -2 | +8 | -3 | -3 | -1 | -2 | -1 | -2 | -1 | -2 | -2  | +2 | -3 |
| I   | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -4 | -3 | +4 | +2 | -3 | +1 | 0  | -3 | -2 | -1 | -3  | -1 | +3 |
| L   | -1 | -2 | -3 | -4 | -1 | -2 | -3 | -4 | -3 | +2 | +4 | -2 | +2 | 0  | -3 | -2 | -1 | -2  | -1 | +1 |
| K   | -1 | +2 | 0  | -1 | -3 | +1 | +1 | -2 | -1 | -3 | -2 | +5 | -1 | -3 | -1 | 0  | -1 | -3  | -2 | -2 |
| M   | -1 | -1 | -2 | -3 | -1 | 0  | -2 | -3 | -2 | +1 | +2 | -1 | +5 | 0  | -2 | -1 | -1 | -1  | -1 | +1 |
| F   | -2 | -3 | -3 | -3 | -2 | -3 | -3 | -3 | -1 | 0  | 0  | -3 | 0  | +6 | -4 | -2 | -2 | +1  | +3 | -1 |
| P   | -1 | -2 | -2 | -1 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -1 | -2 | -4 | +7 | -1 | -1 | -4  | -3 | -2 |
| S   | +1 | -1 | +1 | 0  | -1 | 0  | 0  | 0  | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -2 | -1 | +4 | +1 | -3  | -2 | -2 |
| T   | 0  | -1 | 0  | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | +1 | +5 | -2  | -2 | 0  |
| W   | -3 | -3 | -4 | -4 | -2 | -2 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | -3 | -1 | +1 | -4 | -3 | -2 | +11 | +2 | -3 |
| Y   | -2 | -2 | -2 | -3 | -2 | -1 | -2 | -3 | +2 | -1 | -1 | -2 | -1 | +3 | -3 | -2 | -2 | +2  | +7 | -1 |
| V   | 0  | -3 | -3 | -3 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | +3 | +1 | -2 | +1 | -1 | -2 | -2 | 0  | -3  | -1 | +4 |

[0145] 本发明因此考虑了随机诱变用于鉴定改善的CDR的用途。在本发明上下文中,保守取代可以由反映在以下三个表中的一个或多个中的氨基酸类别内的取代定义:

[0146] 保守取代的氨基酸残基类别：

|        |            |                                           |
|--------|------------|-------------------------------------------|
| [0147] | <b>表 2</b> |                                           |
|        | 酸性残基       | Asp (D) 和 Glu (E)                         |
|        | 碱性残基       | Lys (K)、Arg (R) 和 His (H)                 |
|        | 亲水性不带电残基   | Ser (S)、Thr (T)、Asn (N) 和 Gln (Q)         |
|        | 脂肪族不带电残基   | Cly (G)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L) 和 Ile (I) |
|        | 非极性不带电残基   | Cys (C)、Met (M) 和 Pro (P)                 |
|        | 芳香族残基      | Phe (F)、Tyr (Y) 和 Trp (W)                 |

[0148] 替代性保守氨基酸残基取代类别：

|        |            |   |   |   |
|--------|------------|---|---|---|
| [0149] | <b>表 3</b> |   |   |   |
|        | 1          | A | S | T |
|        | 2          | D | E |   |
| [0150] | 3          | N | Q |   |
|        | 4          | R | K |   |
|        | 5          | I | L | M |
|        | 6          | F | Y | W |

[0151] 氨基酸残基的替代性物理和功能分类：

|        |            |                             |
|--------|------------|-----------------------------|
| [0152] | <b>表 4</b> |                             |
|        | 含有醇基团的残基   | S 和 T                       |
|        | 脂肪族残基      | I、L、V 和 M                   |
|        | 环烯基相关残基    | F、H、W 和 Y                   |
|        | 疏水性残基      | A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W 和 Y |
|        | 带负电荷的残基    | D 和 E                       |
|        | 极性残基       | C、D、E、H、K、N、Q、R、S 和 T       |
|        | 带正电荷的残基    | H、K 和 R                     |
|        | 小残基        | A、C、D、G、N、P、S、T 和 V         |
|        | 非常小的残基     | A、G 和 S                     |
|        | 转角形成中涉及的残基 | A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P 和 T |
|        | 柔性残基       | Q、T、K、S、G、P、D、E 和 R         |

[0153] 更保守的取代分组包括：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0154] 还可以使用描述于例如Creighton(1984)Proteins:Structure and Molecular Properties[蛋白质:结构与分子特性](第2版1993),W.H.Freeman and Company[W.H.弗里曼公司]中的原理制定另外的氨基酸组群。

[0155] 噬菌体展示技术可替代地被用于增加(或降低)CDR亲和力。被称为亲和力成熟的这种技术采用诱变或“CDR步移”并且重选择使用靶抗原或其抗原性抗原结合片段来鉴定具有如下CDR的抗体,这些CDR当与初始抗体或亲本抗体相比时以更高(或更低)亲和力与抗原

结合(参见例如,Glaser等人,(1992)J.Immunology[免疫学杂志]149:3903)。诱变整个密码子而不是单个核苷酸产生氨基酸突变的半随机谱。可构建由一组变体克隆所组成的库,每一克隆都在单个CDR中相差单个氨基酸改变,并且这些克隆包含代表了每个CDR残基的每个可能氨基酸取代的变体。可通过使固定化突变体与标记的抗原相接触来筛选对抗原的结合亲和力增加(或减少)的突变体。本领域中已知的任何筛选方法(例如ELISA)可以用于鉴定对抗原具有增加或降低的亲合力的突变体抗体(参见Wu等人,1998,Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)[美国国家科学院院刊]95:6037;Yelton等人,1995,J.Immunology[免疫学杂志]155:1994)。可以可能地使用使轻链随机化的CDR步移(参见例如Schier等人,1996,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]263:551)。

[0156] 用于完成此类亲和力成熟的方法描述于以下中,例如:Krause,J.C.等人,(2011)“An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody”[使抗体结合部位构造变形的插入突变增强人抗体的功能]MBio.2(1)pii:e00345-10.doi:10.1128/mBio.00345-10;Kuan,C.T.等人,(2010)“Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas”[靶向恶性胶质瘤和黑色素瘤的亲和力成熟的抗糖蛋白NMB重组免疫毒素]Int.J.Cancer[国际癌症杂志]10.1002/ijc.25645;Hackel,B.J.等人,(2010)“Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes”[稳定性和CDR组成偏移富集粘合剂功能性景观]J.Mol.Biol.[分子生物学]401(1):84-96;Montgomery,D.L.等人,(2009)“Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1gp41”[针对HIV-1gp41的人单克隆抗体的亲和力成熟与表征]MAbs 1(5):462-474;Gustchina,E.等人,(2009)“Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic *Naïve* Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth”[通过源自于合成的原初人抗体文库的单克隆Fab的CDR-H2环的定向多样化以及针对Gp41的内部三聚物的卷曲螺旋进行的亲和力成熟产生一组具有改善的HIV-1中和效价以及幅度的Fab]Virology[病毒学]393(1):112-119;Finlay,W.J.等人,(2009)“Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy:Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions”[用于抗RAGE疗法的人源化大鼠抗体的亲和力成熟:综合诱变揭示在互补决定区内部和外部两者的高水平的突变可塑性]J.Mol.Biol.[分子生物学]388(3):541-558;Bostrom,J.等人,(2009)“Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development”[改善抗体结合亲和力以及特异性用于治疗性开发]Methods Mol.Biol.[分子生物学方法]525:353-376;Steidl,S.等人,(2008)“In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification”[通过定向CDR多样化进行人GM-CSF抗体的体外亲和力成熟]Mol.Immunol.[分子免疫学]46(1):135-144;以及Barderas,R.等人,(2008)“Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling”[通过计算机建模辅助的

抗体亲和力成熟]Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)[美国国家科学院院刊]105(26):9029-9034。

[0157] 因此,所涵盖的抗体或其抗原结合片段的CDR变体的序列可以通过取代而不同于亲本抗体GM37、GM37变体1-3、或285的CDR的序列;例如取代的4个氨基酸残基、3个氨基酸残基、2个氨基酸残基或氨基酸残基中的1个。根据本发明的实施例,此外设想的是,CDR区中的氨基酸可以用保守取代进行取代,如在上面3个表中所定义的。

[0158] 如在此使用的,术语“治疗(treatment或treating)”意指改善、减缓、减弱或逆转疾病或障碍的进展或严重性,或者改善、减缓、减弱或逆转这种疾病或障碍的一种或多种症状或副作用。出于本发明的目的,“治疗(treatment或treating)”另外意指用于获得有益的或希望的临床结果的方法,其中“有益的或希望的临床结果”包括但不限于症状的缓解、障碍或疾病程度的减小、稳定化的(即没有恶化的)疾病或障碍状态、疾病或障碍状态进展的延缓或减缓、疾病或障碍状态的改善或减轻以及疾病或障碍的缓解,不论是部分地或全部地、可检出的或不可检出的。

[0159] 当应用于本发明的抗体或其抗原结合片段时,“有效量”是指以所需剂量并且持续所需时间段足以达到预期生物效应或希望的治疗结果(包括但不限于临床结果)的量。当应用于本发明的抗体或其抗原结合片段时,短语“治疗有效量”旨在表示足以改善、减轻、稳定、逆转、减缓、减弱或延缓障碍或疾病状态的进展,或者该障碍或疾病的症状的进展的抗体或其抗原结合片段的量。在实施例中,本发明的方法提供了抗体或其抗原结合片段与其他化合物组合的给予。在此类情况下,“有效量”是足以引起预期的生物效应的该组合的量。

[0160] 本发明的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体或其抗原结合片段的治疗有效量可以根据以下因素而变化,如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体在个体中引起希望的应答的能力。治疗有效量还是抗体或抗体部分的有益治疗效果超过其任何毒性或有害效果的量。

[0161] 如以上指出,本发明特别涉及单克隆抗体,该单克隆抗体能够与人 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸112-117(SEQ ID NO:9(ILEDMP))内的表位特异性结合。在一个实施例中,该抗体能够与抗体GM37竞争以结合 $\alpha$ -突触核蛋白的112-117氨基酸内的表位。

[0162] 本发明的抗体(通过GM37、其变体GM37变种1-3和GM285和它们的 $\alpha$ -突触核蛋白结合片段举例说明)能够结合由 $\alpha$ -突触核蛋白的残基的1-119/122组成的毒性 $\alpha$ -突触核蛋白片段并中和其毒性(例如,通过与 $\alpha$ -突触核蛋白片段细胞外结合),从而防止它被细胞摄取。出人意料地,本发明的抗体(这些抗体能够与 $\alpha$ -突触核蛋白的氨基酸112-117内的表位结合),在与人脑中的有毒 $\alpha$ -突触核蛋白种类结合方面优于现有技术的抗体(如抗体9E4),并且对清除细胞外 $\alpha$ -突触核蛋白和正常化体内由 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的损害的突触传递方面具有优异的效果。本发明的抗体还能够改善在帕金森氏病大鼠模型中相关运动表型的出现。

[0163] 本发明的抗体优选是人或人源化抗体。

[0164] 本发明还提供了在患者中减少 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的形成的方法,该方法包括向需要此类治疗的患者给予治疗有效量的本发明的抗体。

[0165] 这些抗体可以与选自下组的另一种药物一起或同时或分开给予,该组包括:多巴胺、半胱天冬酶抑制剂、钙蛋白酶抑制剂、LRRK2抑制剂、BACE1抑制剂、聚集抑制剂、识别任何形式的淀粉样蛋白- $\beta$ 的抗体、炎症抑制剂、LAG-3抗体、伊拉地平、逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导

的小胶质细胞吞噬活性的减少的分子、尼古丁、咖啡因、葡糖脑苷脂酶调节剂、MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A<sub>2A</sub>拮抗剂。

[0166] 这些药物可以特异性地选自下组,该组包括:普拉克索、VX-765(普雷卡桑)、ABT-957、PF-06447475、NB-360、神经孔NPT100-18A、NPT200-11、EGCG、巴品珠单抗、茄尼醇单抗、冈特莫单抗、克瑞珠单抗、阿杜单抗、C16H15N04、BMS-986016、GSK2831781、IMP321、ELN484228、NCGC607、美格鲁特、依鲁司他(Cerdelga)、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、普拉克索、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱。

[0167] 此外,抗体可以与药学上可接受的载体、稀释剂和/或稳定剂一起处于组合物中。本发明的抗体可以在疗法中使用。特别地,本发明的抗体可以被用于治疗共核蛋白病,如帕金森氏病(包括帕金森氏病的特发性和遗传性形式)、戈谢病、弥漫性路易体病(DLBD)、阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩。

[0168] 通过本发明所设想的治疗可以是长期的并且患者可以接受至少2周(如至少持续1个月、6个月、1年或更久)治疗。

[0169] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以在不同细胞系中产生,如人细胞系、非人哺乳动物细胞系和昆虫细胞系,例如CHO细胞系、HEK细胞系、BHK-21细胞系、鼠类细胞系(如骨髓瘤细胞系)、纤维肉瘤细胞系、PER.C6细胞系、HKB-11细胞系、CAP细胞系和HuH-7人细胞系(Dumont等人,2015,Crit Rev Biotechnol.[生物技术评论性综述]9月18日:1-13.,将其内容通过引用包括在此)。

[0170] 本发明的抗体可以例如是通过杂交瘤方法产生的单克隆抗体,该方法首次由Kohler等人,Nature[自然]256,495(1975)进行描述,或者可以通过重组DNA方法产生的单克隆抗体。还可以使用描述于例如Clackson等人,Nature[自然]352,624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]222,581-597(1991)中的技术从噬菌体抗体文库分离单克隆抗体。单克隆抗体可以从任何适合的来源获得。因此,例如,单克隆抗体可以从制备自鼠类脾脏B淋巴细胞的杂交瘤获得,这些淋巴细胞获得自用目的抗原或编码目的抗原的核酸免疫的小鼠,例如,这些淋巴细胞处于在表面表达该抗原的细胞的形式。单克隆抗体还可以从来源于免疫的人的或来自非人哺乳动物(如大鼠、兔、狗、绵羊、山羊、灵长类动物等)的表达抗体的细胞的杂交瘤获得。

[0171] 在一个实施例中,本发明的抗体是人抗体。可以使用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生针对 $\alpha$ -突触核蛋白的人单克隆抗体。此类转基因和转染色体小鼠包括在此分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠。

[0172] HuMAb小鼠含有人免疫球蛋白基因微座位连同定向突变,该微座位编码非重排人重链可变和恒定( $\mu$ 和Y)以及轻链可变和恒定( $\kappa$ )免疫球蛋白序列,这些定向突变使内源 $\mu$ 和 $\kappa$ 链座位失活(Lonberg,N.等人,Nature[自然]368,856-859(1994))。因此,小鼠展现出减少的小鼠IgM或Ig $\kappa$ 表达,并且应答于免疫,所引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和力人IgG, $\kappa$ 单克隆抗体(Lonberg,N.等人,(1994),同上;综述于Lonberg,N.,Handbook of Experimental Pharmacology[实验药理学手册]113,49-101(1994);Lonberg,N.和Huszar,D.,Intern.Rev.Immunol.[国际免疫学评论]第13卷65-93(1995)和Harding,F和Lonberg,N.,Ann.N.Y.Acad.Sci[纽约科学院年刊]764 536-546

(1995))。HuMAb小鼠的制备详细描述于Taylor,L.等人,Nucleic Acids Research[核酸研究]20,6287-6295(1992),Chen,J.等人,International Immunology[国际免疫学]5,647-656(1993),Tuailon等人,J.Immunol.[免疫学杂志]152,2912-2920(1994),Taylor,L.等人,International Immunology[国际免疫学]6,579-591(1994),Fishwild,D.等人,Nature Biotechnology[自然生物技术]14,845-851(1996)。还参见US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,789,650、US 5,877,397、US 5,661,016、US 5,814,318、US 5,874,299、US 5,770,429、US 5,545,807、WO 98/24884、WO 94/25585、WO 93/1227、WO 92/22645、WO 92/03918以及WO 01/09187。

[0173] HCo7、HCo12、HCo17和HCo20小鼠在其内源轻链( $\kappa$ )基因中具有JKD破坏(如描述于Chen等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12,811-820(1993)),在其内源重链基因中具有种CMD破坏(如描述于WO 01/14424的实例1)以及KCo5人 $\kappa$ 轻链转基因(如描述于Fishwild等人,Nature Biotechnology[自然生物技术]14,845-851(1996)中)。此外,HCo7小鼠具有HCo7人重链转基因(如描述于US 5,770,429中),HCo12小鼠具有HCo12人重链转基因(如描述于WO 01/14424的实例2中),HCo17小鼠具有HCo17人重链转基因(如描述于WO 01/09187的实例2中)并且HCo20小鼠具有HCo20人重链转基因。所得小鼠在对内源小鼠重链和 $\kappa$ 轻链座位破坏纯合的背景下表达人免疫球蛋白重链和 $\kappa$ 轻链转基因。

[0174] 在KM小鼠品系中,内源小鼠 $\kappa$ 轻链基因已经被同型结合地破坏,如描述于Chen等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12,811-820(1993),并且内源小鼠重链基因已经被同型结合地破坏,如描述于WO 01/09187的实例1中。这个小鼠品系携带人 $\kappa$ 轻链转基因KCo5,如描述于Fishwild等人,Nature Biotechnology[自然生物技术]14,845-851(1996)中。这个小鼠品系还携带由染色体14片段hCF(SC20)构成的人重链转染色体,如描述于WO 02/43478中。HCo12-Balb/c、HCo17-Balb/c和HCo20-Balb/c小鼠可以通过将HCo12、HCo17和HCo20与KCo5[J/K](Balb)杂交来产生,如描述于WO 09/097006中。

[0175] 在KM小鼠品系中,内源小鼠 $\kappa$ 轻链基因已经被同型结合地破坏,如描述于Chen等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12,811-820(1993),并且内源小鼠重链基因已经被同型结合地破坏,如描述于WO 01/09187的实例1中。这个小鼠品系携带人 $\kappa$ 轻链转基因KCo5,如描述于Fishwild等人,Nature Biotechnology[自然生物技术]14,845-851(1996)中。这个小鼠品系还携带由染色体14抗原结合片段hCF(SC20)构成的人重链转染色体,如描述于WO 02/43478中。

[0176] 来自这些转基因小鼠的脾细胞可以用于根据熟知的技术产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤。本发明的人单克隆抗体或多克隆抗体或者源于其他物种的本发明的抗体还可以通过产生对于目的免疫球蛋白重链和轻链序列而言转基因的另一非人哺乳动物或植物并且从其中产生可回收形式的抗体而转基因地产生。与哺乳动物中的转基因生产相结合,抗体可以从山羊、奶牛或其他哺乳动物的乳中产生和回收。参见例如US 5,827,690、US 5,756,687、US 5,750,172和US 5,741,957。

[0177] 本发明的抗体可以具有任何同种型。同种型的选择典型地将由希望的效应子功能(如ADCC诱导)来指导。示例性同种型是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。可以使用人轻链恒定结构域 $\kappa$ 或 $\lambda$ 中任一者。如果希望的话,可以通过已知方法转换本发明的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的类别。例如,最初是IgM的本发明抗体可以类别转换为本发明的IgG抗体。此外,类别转换技

术可以用来将一个IgG亚类转化成另一亚类,例如从IgG1到IgG2。因此,本发明的抗体的效应子功能可以通过同种型切换变为例如IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4抗体,用于各种治疗用途。在一个实施例中,本发明的抗体是IgG1抗体,例如IgG1, $\kappa$ 。抗体被说成属于特定同种型,如果其氨基酸序列相对于其他同种型与该同种型大部分同源的话。

[0178] 在一个实施例中,本发明的抗体是全长抗体,优选IgG抗体,特别是IgG1, $\kappa$ 抗体。在另一个实施例中,本发明的抗体是抗体片段或单链抗体。

[0179] 抗体及其抗原结合片段可以例如使用常规技术通过抗原结合片段化来获得,并且按与如在此针对完整抗体描述的相同方式针对实用性对抗原结合片段进行筛选。例如,F(ab')<sub>2</sub>抗原结合片段可以通过用胃蛋白酶处理抗体而产生。可以处理所得F(ab')<sub>2</sub>抗原结合片段,以减少二硫键,从而产生Fab'抗原结合片段。Fab'抗原结合片段可以通过用木瓜蛋白酶处理IgG抗体而获得;Fab'抗原结合片段可以用胃蛋白酶消化IgG抗体而获得。F(ab')<sub>2</sub>抗原结合片段还可以经由硫醚键或二硫键通过结合以下描述的Fab'而产生。Fab'抗原结合片段是通过切割F(ab')<sub>2</sub>的铰链结构域的二硫键获得的抗体抗原结合片段。Fab'-抗原结合片段可以通过用还原剂(如二硫苏糖醇)处理F(ab')<sub>2</sub>抗原结合片段而获得。抗体抗原结合片段还可以通过在重组细胞中表达编码此类抗原结合片段的核酸而产生(参见例如Evans等人,J.Immunol.Meth.[免疫学方法杂志]184,123-38(1995))。例如,编码F(ab')<sub>2</sub>抗原结合片段的一部分的嵌合基因可以包括编码H链的CH1区和铰链结构域的DNA序列,随后是翻译终止密码子,以产生这样一种截短的抗体抗原结合片段分子。

[0180] 在一个实施例中,抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体是单价抗体,优选是具有铰链结构域缺失的单价抗体,如描述于WO 2007059782(将其通过引用以其全文结合在此)中。因此,在一个实施例中,抗体是单价抗体,其中所述抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体通过以下方法构建,该方法包括:i)提供编码所述单价抗体的轻链的核酸构建体,所述构建体包含编码所选抗原特异性抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的VL区的核苷酸序列和编码Ig的恒定CL区的核苷酸序列,其中编码所选抗原特异性抗体的VL区的所述核苷酸序列和编码Ig的CL区的所述核苷酸序列被可操作地连接在一起,并且其中,在IgG1亚型的情况下,编码CL区的核苷酸序列已经被修饰,这样使得在多克隆人IgG的存在下或当给予给动物或人时,该CL区不含有能够与包含该CL区的相同氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价键的任何氨基酸;ii)提供编码所述单价抗体的重链的核酸构建体,所述构建体包含编码所选抗原特异性抗体的VH区的核苷酸序列和编码人Ig的恒定CH区的核苷酸序列,其中编码CH区的核苷酸序列已经被修饰,这样使得在多克隆人IgG的存在下或当给予给动物、人时,对应于铰链结构域和(如由Ig亚型所要求的)CH区的其他区域(如CH3区)的区域不包含参与和包含人Ig的CH区的相同氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价或稳定的非共价重链间键的任何氨基酸残基,其中编码所选抗原特异性抗体的VH区的所述核苷酸序列和编码所述Ig的CH区的所述核苷酸序列被可操作地连接在一起;iii)提供用于产生所述单价抗体的细胞表达系统;iv)通过在(iii)的细胞表达系统的细胞中共表达(i)和(ii)的核酸构建体来产生所述单价抗体。

[0181] 类似地,在一个实施例中,抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体是单价抗体,其包含:

[0182] (i)如在此描述的本发明抗体的可变结构域或所述区的抗原结合部分,以及

[0183] (ii)免疫球蛋白的CH结构域或其包含CH2和CH3结构域的结构域,其中该CH结构域或其结构域已经被修饰,这样使得对应于铰链结构域和(如果该免疫球蛋白不是IgG4亚型

的话)CH结构域的其他结构域(如CH3结构域)的结构域不包含任何氨基酸残基,这些任何氨基酸残基能够与相同CH结构域形成二硫键或在多克隆人IgG的存在下与相同CH结构域形成其他共价或稳定的非共价重链间键。

[0184] 在一个另外的实施例中,单价 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的重链已经被修饰,这样使得已经缺失整个铰链结构域。

[0185] 在另一个另外的实施例中,所述单价抗体的序列已经被修饰,这样使得它不包含用于N-连接的糖基化的任何受体位点。

[0186] 本发明还包括“双特异性抗体”,其中抗 $\alpha$ -突触核蛋白结合区(例如,抗 $\alpha$ -突触核蛋白单克隆抗体的 $\alpha$ -突触核蛋白结合区)是靶向一种以上表位的二价或多价双特异性支架的一部分(例如第二表位可以包含主动转运受体的表位,这样使得该双特异性抗体将展现出跨生物屏障(如血脑屏障)的改善的胞转作用)。因此,在另一个另外的实施例中,抗突触核蛋白抗体的单价Fab可以连接到另外的靶向不同蛋白的Fab或scFv,以产生双特异性抗体。双特异性抗体可以具有双重功能,例如由抗突触核蛋白结合结构域赋予的治疗功能和可以与受体分子结合以增强跨生物屏障(如血脑屏障)转移的转运功能。

[0187] 本发明的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体及其抗原结合片段还包括单链抗体。单链抗体是其中重链和轻链Fv区相连的肽。在一个实施例中,本发明提供了单链Fv(scFv),其中本发明的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的Fv中的重链和轻链由柔性肽接头(典型地为约10、12、15或更多个氨基酸残基)连接成单条肽链。产生此类抗体的方法描述于例如US 4,946,778;Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies[在单克隆抗体药理学]第113卷, Rosenberg和Moore编辑, Springer-Verlag[施普林格出版公司], 纽约, 第269-315页(1994);Bird等人, Science[科学]242, 423-426(1988);Huston等人, PNAS USA[美国国家科学院院刊]85, 5879-5883(1988)和McCafferty等人, Nature[自然]348, 552-554(1990)。单链抗体可以是单价的, 如果仅使用单个VH和VL的话;可以是二价的, 如果使用两个VH和VL的话;或可以是多价的, 如果使用两个以上VH和VL的话。

[0188] 可以通过包含任何适合数目的经修饰的氨基酸和/或与此类偶联取代基缔合来修饰在此描述的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体及其抗原结合片段。在此上下文中适合性通常由至少基本上保留与非衍生化亲本抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体相关的 $\alpha$ -突触核蛋白选择性和/或 $\alpha$ -突触核蛋白特异性的能力决定。一个或多个经修饰的氨基酸的包含在例如增加多肽血清半衰期、降低多肽抗原性或增加多肽储存稳定性中可以有利的。对一种或多种氨基酸进行修饰, 例如, 在重组产生的过程中与翻译同时进行或在翻译之后进行(例如, 在哺乳动物细胞中表达过程中在N-X-S/T基序上的N-连接的糖基化作用), 或通过合成手段进行修饰。经修饰的氨基酸的非限制性实例包括糖基化的氨基酸、硫酸化的氨基酸、异戊二烯化(例如, 法尼基化、香叶基-香叶基化(geranylgeranylated))的氨基酸、乙酰化的氨基酸、酰化的氨基酸、聚乙二醇化的氨基酸、生物素酰化的氨基酸、羧基化的氨基酸、磷酸化的氨基酸等。足够指导本领域中的普通技术人员进行氨基酸修饰的参考文献在文献中相当充分。示例性方案见于Walker(1998)Protein Protocols On CD-Rom[关于CD-Rom的蛋白质方案]Humana Press[胡马纳出版社], Totowa[托托华], 新泽西州。经修饰的氨基酸可以例如选自糖基化的氨基酸、聚乙二醇化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素酰化的氨基酸、偶联到脂质部分的氨基酸或偶联到有机衍化剂的氨基酸。

[0189] 抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体还可以通过共价偶联到聚合物而化学地修饰,以例如增加其循环半衰期。示例性聚合物以及将它们附接到肽的方法说明于例如US 4,766,106;US 4,179,337;US 4,495,285和US 4,609,546中。另外的说明性聚合物包括聚氧乙基化的多元醇和聚乙二醇(PEG)(例如,分子量在约1,000与约40,000之间,如在约2,000与约20,000之间,例如约3,000-12,000g/mol的PEG)。

[0190] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以在不同细胞系中产生,如人细胞系、非人哺乳动物细胞系和昆虫细胞系,例如CHO细胞系、HEK细胞系、BHK-21细胞系、鼠类细胞系(如骨髓瘤细胞系)、纤维肉瘤细胞系、PER.C6细胞系、HKB-11细胞系、CAP细胞系和HuH-7人细胞系(Dumont等人,2015,Crit Rev Biotechnol.[生物技术评论性综述]9月18日:1-13.,将其内容通过引用包括在此)。

[0191] 在甚至另外的方面,本发明涉及重组真核或原核宿主细胞(如转染瘤),其产生如在此定义的本发明的抗体或其抗原结合结构域或如在此定义的本发明的双特异性分子。宿主细胞的实例包括酵母、细菌和哺乳动物细胞(如CHO或HEK细胞)。例如,在一个实施例中,本发明提供了包含稳定地整合进细胞基因组中的核酸的细胞,该基因组包含编码本发明的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体或其抗原结合片段的表达的序列。在另一个实施例中,本发明提供了包含非整合型核酸(如质粒、粘粒、噬菌粒或线性表达元件)的细胞,该核酸包含编码本发明的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的表达的序列。

[0192] 在一个实施例中,本发明涉及一种制剂,如此术语在此使用的,该制剂包含如在此定义的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体,并且基本上不含天然产生的不能与 $\alpha$ -突触核蛋白结合或不实质性地改变该制剂的抗 $\alpha$ -突触核蛋白功能性的抗体。因此,这种制剂不涵盖天然产生的血清或这种血清的经纯化的衍生物,该制剂包含抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体和另一种抗体的混合物,该另一种抗体不改变该制剂的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的功能性;其中这种功能性选自由以下组成的组:

[0193] (i)该抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体对 $\alpha$ -突触核蛋白的结合亲和力(KD);

[0194] (ii)该抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体抑制 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的蛋白酶截短的能力;

[0195] (iii)在F28-snca转基因小鼠中该抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体逆转基础突触传递的损害的能力;

[0196] (iv)如通过体内微透析测量的,该抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体降低小鼠海马体内 $\alpha$ -突触核蛋白水平的能力;和

[0197] (v)当长期给予时,该抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体能在帕金森氏病的大鼠模型中恢复运动功能的能力;

[0198] (vi)预防 $\alpha$ -突触核蛋白播种(如在体外和/或在帕金森氏病小鼠模型中不可溶的磷酸化的 $\alpha$ -突触核蛋白的积累)的能力;和/或

[0199] (vii)在人脑中结合截短的 $\alpha$ -突触核蛋白的能力。

[0200] 本发明具体涉及在其氨基酸序列中(在任何其CDR、可变结构域、构架残基和/或恒定结构域中)相对于天然存在的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的结构具有结构改变的这样一种抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的制剂,其中所述结构改变使得抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体单克隆抗体相对于由所述天然存在的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体展现出的功能性展现出显著改变的功能性(即,在功能性方面,差异超过20%、差异超过40%、差异超过60%、差异超过80%、差异超过100%、差

异超过150%、差异超过2倍、差异超过4倍、差异超过5倍或差异超过10倍)；其中这种功能性是：

[0201] (i) 该抗 $\alpha$ -突触核蛋白单克隆抗体对 $\alpha$ -突触核蛋白的结合亲和力(KD)；

[0202] (ii) 该抗 $\alpha$ -突触核蛋白单克隆抗体抑制 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的蛋白酶截短的能力；(iii) 在F28-snca转基因小鼠中该抗 $\alpha$ -突触核蛋白单克隆抗体逆转基础突触传递的损害的能力；

[0203] (iv) 如通过体内微透析测量的，该抗 $\alpha$ -突触核蛋白单克隆抗体降低小鼠海马体内 $\alpha$ -突触核蛋白水平的能力；和/或

[0204] (v) 当长期给予时，该抗 $\alpha$ -突触核蛋白单克隆抗体能在帕金森氏病的大鼠模型中恢复运动功能的能力；

[0205] (vi) 预防 $\alpha$ -突触核蛋白播种(如在体外和/或在帕金森氏病小鼠模型中不可溶的磷酸化的 $\alpha$ -突触核蛋白的积累)的能力；

[0206] 和/或

[0207] (vii) 在人脑中结合截短的 $\alpha$ -突触核蛋白的能力。

[0208] 尤其是其中这样改变的功能性是结构改变的结果并且因此与它不可分。

[0209] 术语“基本上不含”天然产生的抗体是指在此类制剂中完全不存在此类天然产生的抗体，或在此类制剂中包含不实质上影响这些制剂的 $\alpha$ -突触核蛋白结合特性的浓度的此类天然产生的抗体。抗体被说成是“分离的”，如果它具有非天然产生的对应物或已经从天然伴随它的组分中分离或纯化出来的话。

[0210] 当它涉及此类制剂时，术语“天然产生的抗体”是指作为活的人或其他动物的免疫系统发挥功能的自然结果在活的人或其他动物体内诱出的抗体(包括天然产生的自身抗体)。

[0211] 因此，本发明的制剂不排除并且的确明确地涵盖含有抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体和有意添加的另外的抗体的此类制剂，该另外的抗体能够与不为 $\alpha$ -突触核蛋白所具有的表位结合。此类制剂具体包括制剂在治疗以下共核蛋白病中展现出增强的功效的其实例，该共核蛋白病如帕金森氏病(包括帕金森氏病的特发性和遗传性形式)、戈谢病、弥漫性路易体病(DLBD)、阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩。

[0212] 在甚至另外的方面，本发明涉及药物组合物，该药物组合物包括：

[0213] (i) 抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体或其抗原结合片段，两者均如在此定义的，或包含这样一种抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体或其抗原结合片段的制剂，如此术语在此定义的；

[0214] (ii) 药学上可接受的载体。

[0215] 药物组合物可以用药学上可接受的载体或稀释剂连同任何其他已知的佐剂和赋形剂根据常规技术配制，这些常规技术是如以下披露的那些：Remington: The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿：药学科学与实践]第22版，Gennaro编辑，Mack Publishing Co.[马克出版公司]，Easton[伊斯顿]，宾夕法尼亚州，2013。

[0216] 药学上可接受的载体或稀释剂连同任何其他已知的佐剂和赋形剂应该适合于本发明的所选化合物和所选给予方式。对于载体和药物组合物的其他组分的适合性是基于对本发明的所选化合物或药物组合物的希望的生物特性缺乏显著负面影响(例如对表位结合

的实质性影响小(10%或更低的相对抑制,5%或更低的相对抑制等))而确定的。

[0217] 本发明的药物组合物还可以包含稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、洗涤剂(例如,非离子型洗涤剂,如Tween-20或Tween-80)、稳定剂(例如,糖或无蛋白氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或适于包含在药物组合物中的其他材料。将稀释剂选择为不影响组合的生物活性。此类稀释剂的实例为蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和汉克氏溶液。此外,药物组合物或配制品还可以包含其他载体,或无毒的、非治疗性的、非免疫原性的稳定剂等。组合物还可以包含大的、缓慢代谢的大分子,如蛋白质、多糖(像壳聚糖)、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(例如,乳胶功能化的交联琼脂糖、琼脂糖、纤维素等)、聚合氨基酸、氨基酸共聚物以及脂质聚集体(例如,油滴或脂质体)。

[0218] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化,以获得对于特定患者、组合物和给予方式而言有效实现希望的治疗应答的活性分量。所选的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所采用的本发明具体组合物或其酰胺的活性,给予途径,给予时间,所采用的具体化合物的排泄速率,治疗持续时间,与所采用的具体组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、病情、一般健康状况和既往病史以及医学领域熟知的类似因素。

[0219] 药物组合物可以通过任何适合的途径和方式给予,包括:用于预防性和/或治疗性治疗的胃肠外、局部、口服或鼻内手段。在一个实施例中,胃肠外地给予本发明的药物组合物。如在此使用的,短语“胃肠外给予(parenteral administration)”和“胃肠外地给予(administered parenterally)”意指除肠内和局部给予之外的给予方式,通常是通过注射,并且包括表皮、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、腱内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、颅内、胸腔内、硬膜外以及胸骨内注射和输注。另外的适合的在体内和在体外给予本发明化合物的途径在本领域是熟知的并且可以由本领域的普通技术人员进行选择。在一个实施例中,通过静脉内或皮下注射或输注给予该药物组合物。

[0220] 药学上可接受的载体包括任何和所有适合的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂、抗氧化剂和吸收延迟剂以及可与本发明的化合物生理上兼容的类似物。

[0221] 可以在本发明药物组合物中采用的适合的水性和非水性载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适合的混合物、植物油(如橄榄油、玉米油、花生油、棉籽油和芝麻油)、羧甲基纤维素胶体溶液、黄耆胶和可注射有机酯(如油酸乙酯)和/或各种缓冲剂。其他载体在制药领域是熟知的。

[0222] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉剂。使用此类介质和试剂用于药物活性物质在本领域是已知的。除了在任何常规介质或试剂与活性化合物不兼容的情况下,考虑了其在本发明药物组合物中的使用。

[0223] 可以例如通过使用包衣材料(如卵磷脂),通过维持所需的粒度(在分散体的情况下)和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0224] 本发明的药物组合物还可以包含药学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;以及(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷

酸等。

[0225] 本发明的药物组合物还可以在组合物中包含等渗剂,如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇、甘油)或氯化钠。

[0226] 本发明的药物组合物还可以含有一种或多种适用于所选给予途径的佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲剂,这些试剂可以增强药物组合物的保质期或有效性。本发明的化合物可以与载体一起制备,这些载体可以保护化合物免于被快速释放,如控释配制品,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。此类载体可以包括明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、可生物降解的生物兼容聚合物(如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸)(单独的或与蜡一起)或本领域熟知的其他材料。用于制备此类配制品的方法通常是本领域普通技术人员已知的。参见例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems[缓释和控释递药系统],J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.[马歇尔德克公司],纽约,1978。

[0227] 在一个实施例中,可以将本发明的化合物配制成确保在体内恰当分布。用于胃肠外给予的药理学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉剂。使用此类介质和试剂用于药物活性物质在本领域是已知的。除了在任何常规介质或试剂与活性化合物不兼容的情况下,考虑了其在本发明药物组合物中的使用。还可以将补充活性化合物掺入组合物中。

[0228] 注射用药物组合物通常在生产和保存条件下典型地必须是无菌且稳定的。可以将组合物配制为溶液、微乳液、脂质体或适于高药物浓度的其他有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适合的混合物、植物油(如橄榄油)和可注射有机酯(如油酸乙酯)的水性或非水性溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂),通过维持所需的粒度(在分散体的情况下)和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选的是在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(如甘油、甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟抗体吸收的试剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来实现。无菌可注射溶液可以通过按需要将所需量的活性化合物与一种例如像上文列举的成分或成分的组合掺在适当溶剂中,随后灭菌微孔过滤来制备。通常,通过将活性化合物掺入无菌运载体中来制备分散体,该无菌载体含有基础分散介质和例如来自上文列举的那些的其他所需成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),这从其之前的无菌过滤溶液得到活性成分和任何另外的希望的成分的粉剂。

[0229] 无菌可注射溶液可以通过按需要将所需量的活性化合物与一种上文列举的成分或成分的组合掺在适当溶剂中,随后灭菌微孔过滤来制备。通常,通过将活性化合物掺入无菌运载体中来制备分散体,该无菌载体含有基础分散介质和来自上文列举的那些的其他所需成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),这从其之前的无菌过滤溶液得到活性成分和任何另外的希望的成分的粉剂。

[0230] 调整在以上治疗方法和在此描述的使用中的剂量方案,以提供最佳希望的应答(例如,治疗应答)。例如,可以给予单次推注,可以随时间给予若干分次剂量或者可以由治疗情况的紧迫性所指示的按比例减少或增加剂量。为了便于给予和剂量统一,胃肠外组合

物可以被配制为剂量单位形式。如在此使用的,剂量单位形式是指作为针对待治疗受试者的单一剂量适合的物理上离散的单位;每个单位含有经计算产生与所需药物载体相关的希望的治疗效果的活性化合物的预定量。针对本发明的剂量单位形式的描述受指示于并且直接取决于(a)活性化合物的独特特征和待达到的具体治疗效果,以及(b)在复合这种活性化合物以在个体中获得灵敏治疗的领域中固有的限制。

[0231] 抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的有效剂量和剂量方案取决于待治疗的疾病或病症并且可以由本领域的普通技术人员确定。在剂量给予的任何一天,剂量的范围可以从约0.0001至约100mg/kg宿主体重,并且更通常是从约0.01至约5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg体重的范围内。因此示例性剂量包括:从约0.1至约10mg/kg体重、从约0.1至约5mg/kg/体重、从约0.1至约2mg/kg/体重、从约0.1至约1mg/kg/体重,例如约0.15mg/kg/体重、约0.2mg/kg/体重、约0.5mg/kg/体重、约1mg/kg/体重、约1.5mg/kg/体重、约2mg/kg/体重、约5mg/kg/体重、或约10mg/kg/体重。

[0232] 具有本领域普通技术的医师可以容易地确定并且开出所需药物组合物的有效量。例如,医师可以按低于为了达到希望的治疗效果所需的水平开始给予药物组合物中采用的抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体,并且逐步增加剂量直至达到希望的效果。通常,本发明组合物的适合日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物量。这样一个有效剂量通常将取决于上述因素。给予可以例如是静脉内的、肌内的、腹膜内的或皮下的。如果希望的话,药物组合物的有效日剂量可以在一整天以适当的时间间隔分开为两个、三个、四个、五个、六个或更多个子剂量来给予,任选地以单位剂型给予。虽然本发明的化合物可以单独给予,但是优选的是作为如上文描述的药物组合物给予该化合物。

[0233] 在另外的方面,本发明涉及用于在医学中使用的抗体或其抗原结合片段。

[0234] 在另外的方面,本发明涉及本发明的抗体或其抗原结合片段与选自下组的另一种药物组合在治疗共核蛋白病中使用,该组包括:多巴胺、半胱天冬酶抑制剂、钙蛋白酶抑制剂、LRRK2抑制剂、BACE抑制剂、聚集抑制剂、 $A\beta$ 抗体、炎症抑制剂、LAG-3抗体、伊拉地平、逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的小胶质细胞吞噬活性的减少的分子、尼古丁、咖啡因和葡糖脑苷脂酶调节剂、MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A2A拮抗剂。

[0235] 在一个实施例中,所述药物可以选自下组,该组包括:普拉克索、VX-765(普雷卡桑)、ABT-957、PF-06447475、NB-360、神经孔NPT100-18A、NPT200-11、EGCG、巴品珠单抗、茄尼醇单抗、冈特莫单抗、克瑞珠单抗、阿杜单抗、C16H15N04、BMS-986016、GSK2831781、IMP321、ELN484228、NCGC607、美格鲁特、依鲁司他(Cerdelga)、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、普拉克索、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱

[0236] 在一个另外的实施例中,单克隆抗体或其抗原结合片段与上文提到的另外的药物一起用于在治疗帕金森氏病、特发性帕金森氏病、常见形式的帕金森氏病、弥漫性路易体病(DLBD)、阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩中使用。

[0237] 在另外的方面,本发明涉及本发明的抗体或其抗原结合片段与一种上文提及的另外的药物一起制备用于治疗共核蛋白病的药物。

[0238] 在另一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体的用途,该用途用于制备在治疗帕金森氏病(包括帕金森氏病的特发性和遗传性形式)、戈谢病(GD)、弥漫性路易体病(DLBD)、

阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩中使用的药物,其中用选自下组的另外的药物治疗患者,该组包括:多巴胺、半胱天冬酶抑制剂、钙蛋白酶抑制剂、LRRK2抑制剂、BACE抑制剂、聚集抑制剂、针对AB的抗体、炎症抑制剂、LAG-3抗体、伊拉地平、逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的小胶质细胞吞噬活性的减少的分子、尼古丁、咖啡因和葡糖脑苷脂酶调节剂、MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A<sub>2</sub>A拮抗剂。在另外的实施例中,患者可以用选自下组的另外的药物治疗,该组包括:普拉克索、VX-765(普雷卡桑)、ABT-957、PF-06447475、NB-360、神经孔NPT100-18A、NPT200-11、EGCG、巴品珠单抗、茄尼醇单抗、冈特莫单抗、克瑞珠单抗、阿杜单抗、C16H15N04、BMS-986016、GSK2831781、IMP321、ELN484228、NCGC607、美格鲁特、依鲁司他(Cerdelga)、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、普拉克索、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱。

[0239] 在另外的方面,本发明涉及对帕金森氏病或其他共核蛋白病进行治疗的方法,包括给予有效剂量的本发明的抗体或其抗原结合片段以及有效治疗量的上文提及的另一种药物。

[0240] 优选地,在本发明的那些方面的用途和方法中,治疗是长期的,并且优选持续至少2周,如至少持续1个月、6个月、1年或更久。

[0241] 此外,本发明涉及包含根据本发明的抗体和选自下组的药物的试剂盒,该组包括:多巴胺、半胱天冬酶抑制剂、钙蛋白酶抑制剂、LRRK2抑制剂、BACE抑制剂、聚集抑制剂、针对AB的抗体、炎症抑制剂、LAG-3抗体、伊拉地平、逆转 $\alpha$ -突触核蛋白诱导的小胶质细胞吞噬活性的减少的分子、尼古丁、咖啡因和葡糖脑苷脂酶调节剂、MAO-B抑制剂、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂和A<sub>2</sub>A拮抗剂。在另一个实施例中,该试剂盒可以含有根据本发明的抗体和选自下组的第二种药物,该组包括:普拉克索、VX-765(普雷卡桑)、ABT-957、PF-06447475、NB-360、神经孔NPT100-18A、NPT200-11、EGCG、巴品珠单抗、茄尼醇单抗、冈特莫单抗、克瑞珠单抗、阿杜单抗、C16H15N04、BMS-986016、GSK2831781、IMP321、ELN484228、NCGC607、美格鲁特、依鲁司他(Cerdelga)、雷沙吉兰、司来吉兰、Zelapar、普拉克索、罗匹尼罗、溴麦角环肽、Comtess、答是美和伊曲茶碱。

[0242] 该试剂盒可用于治疗帕金森氏病)、戈谢病(GD)、弥漫性路易体病(DLBD)、阿尔茨海默氏病的路易体变体(LBV)、组合型阿尔茨海默氏和帕金森氏病、纯自主神经衰竭和多系统萎缩。

[0243]

|              |                              |
|--------------|------------------------------|
| SEQ ID NO:1  | GM37 CDR 1 重链                |
| SEQ ID NO:2  | GM37 CDR 2 重链                |
| SEQ ID NO:3  | GM37 CDR 3 重链                |
| SEQ ID NO:4  | GM37 CDR 1 轻链                |
| SEQ ID NO:5  | GM37 CDR 2 轻链                |
| SEQ ID NO:6  | GM37 CDR 3 轻链                |
| SEQ ID NO:7  | GM37 重链可变结构域                 |
| SEQ ID NO:8  | GM37 轻链可变结构域                 |
| SEQ ID NO:9  | 人 $\alpha$ -突触核蛋白的表位 112-117 |
| SEQ ID NO:10 | 人 $\alpha$ -突触核蛋白            |
| SEQ ID NO:11 | A-Syn-AAKK-BAP               |
| SEQ ID NO:12 | A-Syn-BAAK-BAP               |
| SEQ ID NO:13 | A-Syn-BBAA-BAP               |
| SEQ ID NO:14 | A-Syn-BBKK-BAP               |
| SEQ ID NO:15 | A-Syn-120-140_Del-BAP        |
| SEQ ID NO:16 | 人 $\alpha$ -突触核蛋白的残基 1-119   |
| SEQ ID NO:17 | $\kappa$ 轻链恒定结构域             |
| SEQ ID NO:18 | IgG1 重链恒定结构域                 |
| SEQ ID NO:19 | GM285 表位 112-115             |
| SEQ ID NO:20 | GM285 CDR 1 重链               |
| SEQ ID NO:21 | GM285 CDR 2 重链               |

[0244]

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| SEQ ID NO:22 | GM285 CDR 3 重链            |
| SEQ ID NO:23 | GM285 CDR 1 轻链            |
| SEQ ID NO:24 | GM285 CDR 2 轻链            |
| SEQ ID NO:25 | GM285 CDR 3 轻链            |
| SEQ ID NO:26 | GM285 重链可变结构域             |
| SEQ ID NO:27 | GM285 轻链可变结构域             |
| SEQ ID NO:28 | GM285 IgG1 重链恒定结构域        |
| SEQ ID NO:29 | GM285 $\kappa$ 轻链恒定结构域    |
| SEQ ID NO:30 | GM37 变体 1 重链可变结构域         |
| SEQ ID NO:31 | GM37 变体 2 重链可变结构域         |
| SEQ ID NO:32 | GM37 变体 3 重链可变结构域         |
| SEQ ID NO:33 | GM37 变体 1 重链 CDR 2        |
| SEQ ID NO:34 | GM37 变体 2 重链 CDR 2        |
| SEQ ID NO:35 | GM37 变体 3 重链 CDR 2        |
| SEQ ID NO:36 | 9E4 结合表位                  |
| SEQ ID NO:37 | 人 $\beta$ -突触核蛋白          |
| SEQ ID NO:38 | 人 $\gamma$ -突触核蛋白         |
| SEQ ID NO:39 | 食蟹猴的 $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物 |
| SEQ ID NO:40 | 大鼠的 $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物  |
| SEQ ID NO:41 | 小鼠的 $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物  |
| SEQ ID NO:42 | 9E4 HC                    |
| SEQ ID NO:43 | 9E4 LC                    |

[0245] 实例

[0246] 实例1:抗体筛选

[0247] 1.免疫原和配体生产

[0248] 如图1所示,获得或生产以下蛋白质作为免疫原使用。使用三种免疫原使小鼠免疫,这些免疫原包括:全长重组人 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维;包含氨基酸1-60的人 $\alpha$ -突触核蛋白重组蛋白质(Rpeptide公司,博加特(Bogart),乔治亚洲(Georgia))和包含氨基酸1-119的人 $\alpha$ -突触核蛋白重组蛋白质。为了从全长 $\alpha$ -突触核蛋白中制得原纤维,使用了来自乔治亚洲博加特的Rpeptide公司(目录号S-1001-2)的冻干产品。此物以1mg/ml的蛋白质浓度溶解在20mM Tris和300mM NaCl的缓冲液中。为了制得原纤维,蛋白质溶液以170 $\mu$ l等份在每个孔具有直径为70 $\mu$ m的陶瓷珠的96孔板上以200rpm在Vortemp56摇床培养箱(Labnet国际公司(Labnet International),Edison(爱迪生市),NJ(新泽西州),美国)于37 $^{\circ}$ C孵育7天,并且原纤维形成后随后添加硫磺素T并且在这些孔的一个中测量荧光。含有氨基酸1-60的重组 $\alpha$ -突触核蛋白溶解在水中以得到1mg/ml的浓度。

[0249] 用下面的构建体制备包含氨基酸1-119的重组 $\alpha$ -突触核蛋白:编码6个氨基酸的组氨酸标签、随后是Xa因子切割位点和人 $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸1-119的编码序列的合成基因:

MAHHHHHHIE GRMDVFMKGL SKAKEGVVAA AEKTKQGVAE AAGKTKEGVL

[0250] YVGSKTKEGV VHGVATVAEK TKEQVTNVGG AVVTGVTAVA QKTVEGAGSI  
AAATGFVKKD QLGKNEEGAP QEGILEDMPV D (SEQ ID NO:16)

[0251] 该合成基因通过金斯瑞(Genscript)合成并且被克隆到pET24a(+)表达载体(诺沃根公司(Novagen))的NdeI-XhoI位点。

[0252] 表达载体被转化到大肠杆菌BL21并且挑选单个菌落用于表达,该表达使用来自诺沃根公司(Novagen)(用户协议TB383rev.H1005)的隔夜表达自动诱导系统。规模为500ml的终培养体积。细胞通过在6000g离心10分钟收获并且随后使用BugBuster蛋白提取试剂(用户协议TB245Rev.0304)裂解。裂解后,样品通过离心分离,并且上清液被用于进一步纯化。

[0253] His-标记的蛋白经5ml的HisTrap柱(通用电气医疗集团(GE healthcare))纯化,该柱在20mM磷酸钠(pH 7.5)、1M NaCl(A缓冲液)中平衡。样品上样并使用A缓冲液冲洗后,将蛋白质用20倍柱体积的A缓冲液以0.25M咪唑的梯度进行洗脱。收集5ml的级分并通过SDS-PAGE进行分析。具有目的蛋白的级分被合并、浓缩,并应用到在10mM tris(pH 7.4)、300mM NaCl中的S200(26/60)尺寸排阻柱(通用电气医疗集团)。按照具有预期大小的条带在SDS-PAGE中的存在再次合并级分。

[0254] 为了去除N-末端标签,使用诺沃根(Novagen)试剂盒(69037-3FRX),将纯化的his-标记的 $\alpha$ -突触核蛋白1-119与Xa因子以1:50的比例一起孵育。过夜孵育后,使用Xarrest琼脂糖分批地去除Xa因子。如上文描述的,最终通过许可的HisTrap色谱纯化切割的 $\alpha$ -突触核蛋白1-119。纯化的 $\alpha$ -突触核蛋白1-119从流出的液体获得并使用centricon浓缩装置浓缩至约400 $\mu$ g/ml。

[0255]  $\alpha$ -突触核蛋白(Rpeptide公司)以2mg/ml在PBS中进行再水化并且在搅拌的同时逐滴地添加过氧亚硝酸盐(100 $\mu$ L/mg蛋白质)。然后将亚硝基化 $\alpha$ -突触核蛋白在5L PBS中透析并储存于-20 $^{\circ}$ C。

[0256] 多巴胺被用来氧化 $\alpha$ -突触核蛋白。合并相同体积的在10mM的PBS(pH 7.4)中制备的200 $\mu$ M多巴胺-HCL(西格玛公司(Sigma)P5244)溶液和在10mM的PBS(pH 7.4)中的28 $\mu$ M $\alpha$ -突触核蛋白(Rpeptide公司)溶液。所得的14 $\mu$ M $\alpha$ -突触核蛋白/100 $\mu$ M多巴胺在37 $^{\circ}$ C、0/N(过夜)孵育。然后,氧化的 $\alpha$ -突触核蛋白在PBS中透析并储存于-20 $^{\circ}$ C。

[0257] 产生突触核蛋白蛋白质的不同天然和嵌合形式以筛选抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的多样性文库。筛选的构建体包括以下:人、小鼠、大鼠和食蟹猴的 $\alpha$ -突触核蛋白,人 $\beta$ -突触核蛋白,人 $\gamma$ -突触核蛋白(图21和22)以及最后缺乏 $\alpha$ -突触核蛋白残基120-140的 $\alpha$ -突触核蛋白衍生物。此外,产生了一系列4个改组构建体:A-Syn-AAKK-BAP、A-Syn-BAAK-BAP、A-Syn-BBAA-BAP、A-Syn-BBKK-BAP(SEQ ID No:11-14)。这些构建体含有人 $\alpha$ -突触核蛋白(A)、人 $\beta$ -突触核蛋白(B)和鸡 $\alpha$ -突触核蛋白(K)的线性延伸物。被克隆的基因含有生物素受体肽(BAP)标记,该标记融合到配体的C-末端以便于促进各配体的位点特异性生物素酰化。生物素酰化允许配体附着于被用于可溶性ELISA形式的珠。构建了哺乳动物表达载体,该载体携带不同的 $\alpha$ -突触核蛋白BAP标签融合构建体(ASynBAP)。使用瞬时转染(Genmab公司(Genmab A/S)),配体在HEK 293细胞中表达。

[0258] 2. 免疫

[0259] 抗体HuMab-突触核蛋白来源于HuMab小鼠品系HCo17-BALB/c和HCo12-BALB/c小鼠的免疫、小鼠免疫球蛋白(Ig)重链和小鼠 $\kappa$ 轻链的双敲除,其防止抗体的表达,这些抗体完全为小鼠的(人单克隆抗体;梅达瑞克斯公司(Medarex Inc.),圣何塞(San Jose),加利福尼亚州,美国)。通过插入人Ig重链和人Ig $\kappa$ 轻链座位使得不同小鼠品系成为转基因的并且

区别在于人VH(重链的可变结构域)和VL(轻链的可变结构域)基因的数目。

[0260] 以14天的间隔交替使用20 $\mu$ g抗原经腹膜内(IP)和使用相同免疫原经皮下(SC,在尾根处)使48只小鼠免疫。进行最多八次免疫,4次IP和4次SC。

[0261] 用完全弗氏佐剂(CFA;Difco实验室(Difco Laboratories),底特律,密歇根州,美国)中的 $\alpha$ -突触核蛋白免疫原进行第一次免疫,之后的免疫在不完全弗氏佐剂(IFA)中进行。当发现血清滴度足够(针对至少两个连续的、双周的、筛选事件,在如上文描述的抗原特异性筛选测定中,发现1/50或更低的血清稀释度呈阳性)时,在融合之前四天和三天,将小鼠另外用100 $\mu$ L PBS中的10 $\mu$ g $\alpha$ -突触核蛋白免疫原蛋白静脉内地(IV)强化两次。

[0262] 免疫方案示于图1。

[0263] 抗体37来自使用人全长 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的免疫方案,交替使用具有氨基酸1-60和1-119的 $\alpha$ -突触核蛋白C-末端截短形式。

[0264] 抗体285来自如下免疫方案,其中人 $\alpha$ -突触核蛋白单体1-140被用于第一个4次免疫。如果没有滴度,免疫使用原纤维(腹膜内/皮下)继续,否则使用单体继续。

[0265] 3.HuMab杂交瘤产生

[0266] 将具有如上定义的足够抗原特异性滴度发生的HuMAb小鼠处死并且收集腹主动脉与腔静脉两侧的脾脏和淋巴结。基本上根据制造商的说明书,使用CEEF 50电融合系统(细胞脉冲科学(Cyto Pulse Sciences),格伦伯尼,马里兰州,美国)通过电融合进行脾细胞和淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞系的融合。将融合的细胞接种在融合培养基中,该培养基含有在HyQ mADCF-Mab(普达生物公司(Perbio))中的10%Fetal Clone I牛血清(普达生物公司)、1mM丙酮酸钠(康伯司公司(Cambrex))、0.5U/mL青霉素、0.5U/mL链霉素(康伯司公司)、50 $\mu$ M 2-巯基乙醇(英杰公司(Invitrogen))、600ng/mL白介素6(IL-6)(施特拉特曼公司(Strathmann))、1x HAT(西格玛公司)和0.5mg/mL卡那霉素(英杰公司)。十天之后,收获上清液并且将细胞培养基更换为收获培养基,该收获培养基含有在HyQ mADCF-Mab中的10%Fetal Clone I牛血清、0.5U/mL青霉素、0.5U/mL链霉素、600ng/mL IL-6和1x proHT(康伯司公司)。杂交瘤培养物的上清液通过初级筛选试验进行筛选。上清液的特征在于与八个不同的配体结合。这些包括4种直向同源物:人、小鼠、大鼠和食蟹猴的人 $\alpha$ -突触核蛋白、 $\beta$ -突触核蛋白和人 $\gamma$ -突触核蛋白(SEQ ID NO 37-41),并且最后测试它们与缺乏 $\alpha$ -突触核蛋白残基120-140的人 $\alpha$ -突触核蛋白衍生物结合的能力。

[0267] 使用自动化液体处理系统(Genmab公司(Genmab A/S))以高通量悬浮ELISA形式进行抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的筛选。板的读数是由两个系统进行的,来自应用生物系统公司(Applied Biosystems)的FMAT 8200被用来读384孔板并且来自分子装置公司(Molecular Devices)的ImageXpress Velos细胞分析仪被用来读取1536孔板。

[0268] 在初级筛选中,克隆以结合8种不同配体的能力为特征。这些包括一系列的4个改组构建体:A-Syn-AAKK-BAP、A-Syn-BAKK-BAP、A-Syn-BBAA-BAP、A-Syn-BBKK-BAP(SEQ ID NO:11-14), $\alpha$ -突触核蛋白120-140缺失-BAP,硝化的人 $\alpha$ -突触核蛋白-BAP和氧化的人 $\alpha$ -突触核蛋白-BAP。

[0269] 简言之,潜在包含 $\alpha$ -突触核蛋白特异性抗体的血清或上清液被添加到珠以允许结合于 $\alpha$ -突触核蛋白和/或 $\alpha$ -突触核蛋白衍生的构建体。抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的结合是使用荧光偶联、DyLight649偶联的山羊抗人IgG、Fc特异性来检测。两种已知的小鼠抗 $\alpha$ -突触核

蛋白抗体, LB509和Syn211, 作为阳性对照被列入筛选。为了确保 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的特异性检测, 在384孔格式滴度筛选中, 使用抗 $\alpha$ -突触核蛋白的血清池作为阴性对照, 而在基于1536孔格式8珠的实验中使用人ChromPure IgG。

[0270] 将来自最佳初级孔的杂种瘤细胞接种于半固体培养基中, 该培养基由40%克隆培养基(CloneMedia) (基因有限公司(Genetix), 汉普郡(Hampshire), 英国) 和60%HyQ 2x完全培养基(Hyclone公司, 沃尔瑟姆(Waltham), 美国) 制成。对于每个初级孔, 接种Genetix黑色6孔板的孔。使用ClonePix系统(基因有限公司) 从每个孔中挑取25个亚克隆。将亚克隆挑取在收获培养基中。七天之后, 针对突触核蛋白特异性人IgG结合再次对亚克隆上清液进行筛选并且使用Octet (Fortebio公司, 门洛帕克(Menlo Park), 美国) 测量人IgG浓度。从每个初级孔选择最佳亚克隆并且在仅含有600ng/mL IL-6、0.5U/mL青霉素、0.5U/mL链霉素和1x proHT的扩增培养基中进行扩增。将亚克隆从一个96孔板孔扩增到一个24孔板孔, 到四个24孔板孔, 到六个6孔板孔。通过这种方法得到的克隆被指定为初级克隆(PC)。

[0271] 使用Octet 384RED (Fortebio公司, 门洛帕克, 美国) 进行另外的抗体结合研究。通过稀释于样品稀释剂(ForteBio公司, 品号18-5028) 中制备2 $\mu$ g/ml的HuMab抗体溶液。将胺反应性传感蛋白(ForteBio公司, 品号18-0008) 用于HuMab的固定。在偶联至胺反应性传感蛋白之前, 将HuMab稀释在MES pH 6.0缓冲液(18-5027) 中。如下在30 $^{\circ}$ C和1000rpm下进行偶联: 将胺反应性传感蛋白在PBS中预湿并且随后用EDC/NHS (ForteBio公司, 品号18-1033/18-1034) 活化溶液(根据制造商的说明书) 活化300秒。在600秒期间用HuMab固定活化的传感蛋白。

[0272] 在Octet中, 将37和285与重组人、食蟹猴和小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白结合, 并且不结合人 $\beta$ -或 $\gamma$ -突触核蛋白, 这显示在图2中

[0273] 4. 突触核蛋白特异性HuMab可变结构域的序列分析和在表达载体中的克隆

[0274] 从0.2至5x10<sup>6</sup>个杂交瘤细胞制备总RNA并且根据制造商的说明书, 使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒(克罗泰克公司(Clontech)) 从100ng总RNA制备5'-RACE-互补DNA(cDNA)。通过PCR扩增VH和VL编码区并且框内地直接在p33G1f和p33 $\kappa$ 表达载体(含有人IgG1./ $\kappa$ 恒定结构域编码序列) 中通过连接独立克隆进行克隆(Aslanidis, C. 和P. J. de Jong, Nucleic Acids Res[核酸研究]1990;18(20):6069-74)。对于每个抗体, 对16个VL克隆和16个VH克隆进行测序。选择具有正确开放阅读框(ORF) 的克隆进行进一步研究和表达。使用293fectin在Freestyle<sup>TM</sup>293-F细胞中瞬时共表达重链和轻链的所有组合的载体。

[0275] 在GM37的情况下VH区的测序确定了在CDR3结构域位置106处的额外的半胱氨酸。为了消除由于二硫键形成导致的错误折叠的可能性和抗体活性的潜在损失, 将在位置106处的半胱氨酸突变为丝氨酸。

[0276] 基于来源于杂交瘤PTA-8221(美国专利20080175838) (SEQ ID NO 42和43) 的VH和VL序列产生对比抗体9E4

[0277] 5. 抗体的表达/纯化

[0278] 使用pTT5载体和PEIpro作为瞬时转染试剂(加拿大国家研究理事会(National Research Council of Canada)), 通过在HEK293 6E细胞中进行转染产生抗体。总之, 使用PEIpro (VWR) 将重链和轻链转染到HEK293细胞中, 并且转染24小时后向细胞补充TN1 (西格玛公司)。细胞生长直至生存力接近50%, 并且抗体的产率通过简单的IgG滴度(赛默公司

(Thermo)) 测量。将培养物上清液经0.2 $\mu$ m死端过滤器进行过滤,加载在5mL蛋白A柱(rProtein A FF,阿莫仙生物科学公司(Amersham Bioscience))上并且用0.1M柠檬酸-NaOH(pH 3)洗脱。将洗脱物立即用2M Tris-HCl(pH 9)中和并且用12.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140mM NaCl,pH 7.4(贝朗公司(B.Braun)),0/N透析。透析之后,将样品经0.2 $\mu$ m死端过滤器进行无菌过滤。通过SDS-PAGE确定纯度并且通过比浊法和280nm处的吸光度测量浓度。将纯化的抗体等分并且储存在-80℃。

[0279] 实例2:利用表面等离子体共振表征抗体

[0280] 使用BIAcore®3000测定抗体与 $\alpha$ -突触核蛋白的实时结合。在CM5芯片(BIAcore®)的第一流动细胞(Fc1)和第二流动细胞(Fc2)中通过胺耦合的多克隆兔抗小鼠抗体(部分小鼠抗体捕获试剂盒(Mouse Antibody Capture Kit),通用电气医疗集团(GE Healthcare),目录号:BR-1008-38)制备捕获表面。在Fc2中以达到约500RU的配体水平所需的浓度捕获小鼠抗体。在Fc1-2中以30 $\mu$ l/min注射分析物(ASynBAP)之前,基线被允许稳定10min。ASynBAP分别以100-3200nM和25-3200RU运行。将最高浓度在每个滴定系列中重复一次运行。每一个周期结束时,用10mM甘氨酸-HCl(pH 1.7)(30sec注射)再生表面以去除捕获的小鼠抗体和分析物。HBS-EP(通用电气医疗集团(GE Healthcare),目录号:BR-1001-88)被用作运行缓冲液并且在所有实验中的样品稀释和试验在25℃运行。在获得前所有样品保持在4℃。

[0281] 将记录在Fc1中的应答(其中捕获抗体已被固定化但没有 $\alpha$ -突触核蛋白抗体被捕获)从在Fc2中的应答减去。使用BIA评估软件(BIAevaluation software)版本4.1.1,将1:1或2:1结合算法适合于数据集。显示抗体37、285和9E4与人 $\alpha$ -突触核蛋白结合的结果可以在图3、4和5中看到。

[0282] 实例3:表位作图

[0283] 使用在肽扫描(Pepscan)(Pepscan Zuidersluisweg 2 8243RC,荷兰莱利斯塔德(Lelystad,The Netherlands))上的重叠线性肽的阵列进行抗体与 $\alpha$ -突触核蛋白的表位作图。抗体对每个合成的20聚体肽的结合在基于Pepscan的ELISA中进行检测。覆盖 $\alpha$ -突触核蛋白的整个编码序列的线性肽阵列,以及具有氧化的蛋氨酸或亚硝基酪氨酸的所有肽,用初级抗体溶液(在4℃过夜)孵育。洗涤后,在25℃用1/1000稀释的抗体过氧化物酶偶联物(SBA,cat.nr.2010-05)将肽阵列孵育1小时。洗涤后,添加过氧化物酶底物2,2'-连氨基-二-3-乙基苯噻唑啉磺酸盐(ABTS)和2 $\mu$ l/ml的3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。1小时后,测定显色。用电荷耦合装置(CCD)-摄像机和图像处理系统定量显色。对于数据处理,从CCD摄像机获得范围从0到3000mAU的值,类似于标准的96孔板ELISA阅读器。将结果进行量化,并存储到Peplab数据库。偶尔一个孔包含导致假阳性值的气泡,该卡被手动检查并且气泡造成的任何值都记录为0。抗体37和285分别与包含序列ILEDMP或ILED的肽的结合数据可在图7中看到。

[0284] 实例4:来自路易体痴呆患者扣带皮层的人脑匀浆的 $\alpha$ -突触核蛋白的免疫沉淀反应

[0285] 通过免疫沉积作用分析抗体结合并拉低来自人DLB或健康对照(标有\*)的扣带皮层粗匀浆 $\alpha$ -突触核蛋白的能力。在低温恒温器中解剖来自人的扣带皮层的冷冻样品(从苏格兰的组织溶液公司(Tissue Solutions)获得),并且添加100mg样品到1600 $\mu$ l cellLytic M细胞裂解试剂(西格玛C2978)中,该试剂包含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(罗氏公司(Roche))。使用Precellys珠匀浆器(贝尔坦技术公司(Bertin technologies),法国),以4x

30sec、5000rpm使脑组织均匀化直到样品完全溶解。溶液在3000x g离心并将上清液用作免疫沉淀作用的粗匀浆。

[0286] 对于免疫沉淀作用,使用制造商的说明(英国佩斯利生命技术公司(Life Technologies,Paisley,UK)),将10 $\mu$ g抗体与磁性免疫磁珠(Dynabeads)蛋白G珠混合。粗脑匀浆物在裂解缓冲液(西格玛公司)中稀释30倍。抗体偶联的免疫磁珠(dynabeads)与500 $\mu$ l稀释的匀浆混合,并在室温、旋转器中连续混合条件下孵育90分钟。孵育后,根据制造商的说明(免疫磁珠G试验方案(Dynabeads G protocol),英国佩斯利生命技术公司(Life Technologies,Paisley,UK)),在洗涤缓冲液中洗涤珠,并且使用非变性洗脱缓冲液洗脱结合的抗原。免疫沉淀作用的产率用蛋白质印迹显现,使用的是检测的小鼠单克隆抗人 $\alpha$ -突触核蛋白抗体(4B12,赛默科技公司(Thermo Scientific))进行。代表被拉低的 $\alpha$ -突触核蛋白的不同分子量形式的条带图案在37、37变体2和285抗体与对比抗体9E4之间不同,因为37、37v2和285抗体可以免疫沉淀主要的 $\alpha$ -突触核蛋白种类:全长 $\alpha$ -突触核蛋白(FL asyn 1-140)和C-末端截短种类(1-135和1-119/122),而抗体9E4不能免疫沉淀截短种类1-119/122。图9。

[0287] 实例5:细胞培养物中的抗体抑制 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的蛋白酶截短

[0288] 重组 $\alpha$ -突触核蛋白单体和原纤维可以通过在培养基中的初级神经元摄取。如在图10中示意性示出,在神经元中摄取 $\alpha$ -突触核蛋白后,它可以通过细胞内的蛋白酶,如钙蛋白酶I处理,该钙蛋白酶I在氨基酸119/122具有主要的蛋白酶敏感位点。为了调查蛋白酶截断 $\alpha$ -突触核蛋白,如描述于Elvang等人(2009)中的制备小鼠初级皮层神经元(Elvang等人,J Neurochem[神经化学杂志]2009;110(5):1377-87),并且在DIV3(体外3天)用阿糖胞苷处理以抑制星形细胞的生长。在DIV4(在体外4天),用超声(5min,在杯角超声器中以50%的功率)预形成的 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维(PFF)以0.7 $\mu$ M的终浓度单独或与指定浓度的抗体一起处理神经元。孵育24小时后,将培养基收获并裂解细胞。使用4B12抗体(图11A)(Pierce MA1-90346)和第二抗小鼠抗体,对培养基和细胞裂解物都进行蛋白质印迹。使用4B12+抗小鼠探测后,将印迹剥离并用抗人IgG抗体进行再探测。在使用4B12的印迹上可以看出,在使用PFF单独处理细胞的培养基中,在14和12kDa有很强的条带,其中14kDa代表全长 $\alpha$ -突触核蛋白(FL-asyn)并且12kDa代表C-末端截短的片段1-119/122(CT-asyn)。除此之外,还有较高分子量条带,最有可能代表耐SDS的低聚物种类。使用同种型对照抗体B12共处理没有改变蛋白水解或摄取的这种模式。

[0289] 在来自使用原纤维与37一起处理的细胞的培养基中,主要有全长 $\alpha$ -突触核蛋白(14kD)和少量的末端截条带(12kD)。在来自使用原纤维与37一起处理的细胞的细胞裂解物中,只有FL- $\alpha$ -突触核蛋白,这表明37防止FL- $\alpha$ -突触核蛋白的裂解。此外,FL- $\alpha$ -突触核蛋白的总量相对于只用PFF或B12对照抗体处理的细胞减少了。若干组群已经显示 $\alpha$ -突触核蛋白可以被钙蛋白酶-1裂解(Games等人,Am J of Pathol[美国病理学杂志]第182卷,第3期,2013年3月;Ritchie等人,Health[健康]第4卷,特刊,1167-1177,2012;Mishizen-Eberz,Biochemistry[生物化学]2005,44,7818-7829;Dufty等人,Am J of Pathol[美国病理学杂志]第170卷,第5期,2007年5月)。钙蛋白酶-1对原纤维 $\alpha$ -突触核蛋白的裂解位点已被发现是在区域114-122(Mishizen-Eberz,J of Neurochem[神经化学杂志]86,836-847,2003)。在体内转基因动物和人脑的1-119/122似乎是 $\alpha$ -突触核蛋白中主要的裂解产物,裂解可能

是天门冬氨酸119或天冬酰胺122后,其被脱酰胺基为天冬氨酸,并且由钙蛋白酶或具有类似的切割特异性的另一个蛋白酶切割。这些结果表明,抗体37能够抑制 $\alpha$ -突触核蛋白的C-末端截短。抗体37的表位与酶钙蛋白酶-1结合位点重叠,所以37与 $\alpha$ -突触核蛋白结合可以直接抑制由钙蛋白酶-1介导的结合和裂解(图10和11)。

[0290] 285的表位与37的表位重叠,并也被预期抑制蛋白酶裂解。37v2的氨基酸序列与37仅在CDR的一个氨基酸处不同,并与37具有相似的结合,因此,它也被预期以与37类似的方式抑制蛋白酶切割。为了调查抗体的效应是否是剂量依赖性的,使用PFF和抗体共同添加初级皮质神经元来建立24小时实验。PFF的浓度是稳定的(10 $\mu$ g/ml),然而被测试的对照抗体B12的浓度和抗体37、37v2和285的浓度为10、5、1和0.1 $\mu$ g/ml。使用1904/4B12抗体(艾碧康公司(Abcam))检测蛋白质印迹上的 $\alpha$ -突触核蛋白,该1904/4B12抗体在区域103-108具有表位,从而与FL-和C-末端截短的 $\alpha$ -突触核蛋白结合(图11B)。如从图11B中可以看出,GM37、37v2和GM285具有蛋白酶裂解的剂量依赖性抑制,在抗体的高浓度具有几乎完全的裂解抑制。

[0291] 实例6:抗体介导的抑制 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体在细胞培养物中播种

[0292] 若干研究已经表明外源性添加的重组 $\alpha$ 突触核蛋白纤丝状聚集体可进入细胞并招募内源性 $\alpha$ -突触核蛋白,以及在体外和体内诱导 $\alpha$ -突触核蛋白聚集和磷酸化,这类似于LB。(Volpicelli-Daley等人,2011;Luk等人,2012a;Luk等人,2012b;Recasens等人,2013;Peelaerts等人,2015)。为了通过重组 $\alpha$ -突触核蛋白种子研究内源性小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白的播种,如上制备的小鼠初级皮质神经元被接种在96孔板(每孔15,000个细胞)。在体外培养(DIV)第5天,50%的培养基被改变并补充阿糖胞苷(终浓度1 $\mu$ M)。在DIV 6,使用 $\alpha$ -突触核蛋白纤丝材料,无论是粗的原纤维种子或纯种子,一半培养基被改变成神经胶质调节的培养基。粗的原纤维种子由重组单体人 $\alpha$ -突触核蛋白制成,其从细菌中分离并且单体通过Amicon Ultra 100.000切断滤器(密理博公司(Millipore),目录号UFC510096)过滤,并在PBS(pH 7.4)中调节至1mg/ml的浓度。为了制成原纤维粗种子,单体溶液在加热搅拌器中(37 $^{\circ}$ C)并伴随连续搅拌(800rpm)孵育,直到达到模板水平(用硫磺素S通过日常措施评估)。为了尽量减少蒸发,添加矿物油的液滴以覆盖溶液。孵育的总时间为5-7天,纯种子从粗的原纤维种子制成,离心原纤维种子以纯化它们并且将聚合的颗粒再悬浮在新鲜的PBS中并被超声处理。在DIV 6,抗体与 $\alpha$ -突触核蛋白粗种子一起一次性添加。将在初级神经元中一半培养基每周替换成神经胶质调节的培养基以保持它们直到DIV21。固定神经元,并使用对 $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸S129的磷酸化特异的兔抗体(艾碧康51253),随后使用荧光标记的抗兔抗体使磷酸突触核蛋白染色,利用自动荧光显微镜(Cellomics Arrayscan)量化荧光。核在一个信道进行检测,并确定有效细胞的数量。在核周围预先定义的环形成区域中的另一信道中检测磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白斑点,从而代表细胞的细胞质。计算每个细胞的斑点的平均数量。细胞染色的实例示于图12A。磷酸化 $\alpha$ 突触核蛋白斑点不会出现在未经处理的神经元。粗的或纯种子孵育的神经元(每孔1-10ng)诱导 $\alpha$ -突触核蛋白的磷酸化(图12A)。在神经突,磷酸化突触核蛋白以斑点或点状出现,且有的磷酸化突触核蛋白在神经突以伸长的形式出现。

[0293] 对于级分研究,在磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)中收获细胞并离心。沉淀物再悬浮在含有蛋白酶抑制剂的1%Triton缓冲液中。样品保持在冰上15min,随后进行超声处理。将样品

在 $100,000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 离心30min。将上清液收集并标记为可溶性级分。将沉淀在Triton缓冲液中洗涤一次,并重新悬浮在1%SDS缓冲液中,随后进行超声处理。以 $100,000\times g$ 将样品再次离心30min。收集呈不溶性级分的上清液。测定蛋白质浓度并且样品在4-12%SDS-PAGE凝胶上运行,印迹于膜上,并且通过4B12/1904抗体(赛默科技公司:MA1-90346-人突触核蛋白)、S129P-asyn抗体(艾碧康51253)和小鼠突触核蛋白抗体(细胞信号-D37A6)分别检测 $\alpha$ -突触核蛋白和磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白(S129P)。

[0294] 图12B显示具有和不具有粗种子时初级神经元的可溶性和不溶性级分的蛋白质印迹。从图12B可以看出,种子的添加导致内源性小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白及p-S129- $\alpha$ -突触核蛋白和磷酸化小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白的多聚体在细胞的不溶性级分中积累。

[0295] 为了测试抗体是否能抑制播种, $\alpha$ -突触核蛋白种子以6.6nM(10ng/孔)的浓度被使用。不同浓度的抗体和 $\alpha$ -突触核蛋白种子在DIV 6上一起添加以获得剂量应答(从最高抗体浓度133nM开始降至133pM)。将神经元再固定,并针对磷酸突触核蛋白(艾碧康51253)染色,并且细胞中的荧光使用自动荧光显微镜(Cellomics arrayscan)进行定量。每个孔的斑点/点在自动荧光显微镜(Cellomics arrayscan)中进行计数。从图12C中可以看出,抗体37、37v2和抗体285都以剂量依赖性方式减少神经元中的 $\alpha$ -突触核蛋白磷酸化,其中使用约5nM的EC50时37、37v2和285具有类似的最大抑制(70%-75%左右)。使用最高浓度(133nM)的抗体治疗后细胞蛋白分级为可溶性和不溶性级分,显示抗体37、37v2和285抑制重组粗种子的截短和C-末端截短片段(CT  $\alpha$ -syn)的积累,并降低了磷酸化的内源性小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白和小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白的聚集形式在不溶性级分中的积累,如在图12D中所示。

[0296] 实例7. $\alpha$ -突触核蛋白抗体在体内急性电生理作用

[0297] 人 $\alpha$ -突触核蛋白的高表达水平存在于F28-snca转基因小鼠的海马体中,该小鼠是在小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白启动子的控制下过量表达野生型 $\alpha$ -突触核蛋白的模型(Westerlund M等人,Mol Cell Neurosci[分子细胞神经科学]2008年12月;39(4):586-91)。通过体内电生理学对4至6个月大的雄性F28-snca转基因和年龄匹配的对照小鼠中的海马体CA1区域的突触传递和可塑性进行了评估。数据表明,相比年龄匹配的对照小鼠,基础突触传递在F28-snca转基因小鼠中显著损害(图13)。

[0298] 年龄为4至6个月的F28-snca转基因小鼠和年龄匹配的对照雄性小鼠(CRO繁殖,欧洲泰康利(Taconic Europe A/S))单个安置在受控制的温度( $22^{\circ}\text{C}\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ )和湿度(55%-65%)条件下并保持在12:12小时明/暗循环中(在06:00点开灯)。食物和水可随意获得。

[0299] 动物用尿烷(1.2g/kg)经腹膜内(i.p.)注射麻醉。然后,将小鼠固定在立体定位框架,其温度通过加热垫调节至 $37.5^{\circ}\text{C}$ ,并且颅骨被暴露。铂丝置于额骨作为参考的作用,并且钻出另外的孔用于在海马体中插入记录和刺激电极,该孔根据大鼠脑立体定位图谱集(Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates[帕西诺斯和富兰克林立体定位坐标中的小鼠脑],第4版,2001)处于以下坐标:记录,前囟后1.5-1.7mm,中线侧面1.0-1.2mm,大脑表面下方1.4-1.7mm;刺激,前囟后1.8-2.0mm,中线侧面1.5-1.7mm,大脑表面下方1.5-1.7mm。在整个记录持续时间动物留在立体定位架内,并定期检查其麻醉水平。

[0300] 每30秒通过谢弗侧枝的电刺激在CA1区诱发场电位(fEPSP),并且调节记录电极的深度直到应答单极矩形脉冲记录下负fEPSP。诱发的fEPSP斜率被测定为fEPSP的最大振幅

的30%和70%之间。

[0301] 一旦最佳fEPSP被诱导,基础突触传递通过刺激强度和诱发的fEPSP(输入输出关系)的斜率之间的关系进行评估。不同刺激强度为0、25、50、75、100、150、200、300、400、和500 $\mu$ A,并且以增加的顺序依次施加,每个强度重复2至3次。相比年龄匹配的对照小鼠,基础突触传递在F28-snca转基因小鼠中发现被显著损害。

[0302] 在F28-snca转基因小鼠中基础突触传递所识别的损害被用来测试GM37、GM285和对比h9E4阻止 $\alpha$ -突触核蛋白介导的效应的能力。

[0303] 以15mg/kg(i.p.)的剂量给予单剂量抗体3h至6h后在所有实验中进行记录。如果可能,在每个动物的两个海马体中都记录基础突触传递,并且记录为单独的实验。

[0304] 使用h9E4急性治疗在F28-snca转基因小鼠内诱导基础突触传递损害的显著逆转(Tg-snca+h9E4对比Tg-snca+PBS,  $p=0.002$ ,图14)。然而,通过h9E4进行的逆转只是局部的,如相比使用PBS处理的同窝仔畜中基础突触传递的显著差异所指示的( $p=0.007$ )。

[0305] 使用GM37急性治疗在F28-snca转基因小鼠内诱导基础突触传递的损害的显著逆转(Tg-snca+GM37对比Tg-snca+PBS,  $p=0.004$ ,图15)。使用GM37处理的转基因小鼠的基础突触传递与使用PBS处理的同窝仔畜基础突触传递没有显著不同,表示损害的完全逆转(图15)。

[0306] GM285也在F28-snca转基因小鼠内诱导基础突触传递损害的显著逆转(图16)。使用GM285处理的转基因小鼠的基础突触传递与使用PBS处理的同窝仔畜基础突触传递没有显著不同,表示损害的完全逆转。

[0307] 实例8.用于评估在清醒自由活动动物的脑中 $\alpha$ -突触核蛋白的微透析

[0308] 使用推拉式微透析方法来评估在脑间质液(ISF)中的人 $\alpha$ -突触核蛋白的水平。将小鼠在受控的温度( $22^{\circ}\text{C}\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ )和湿度条件(55%-65%)下单独饲养并且保持12:12小时光/暗循环(在06:00h时开灯)。食物和水可随意获得。目前的研究是在F28-snca转基因小鼠(50-54周龄)的海马体内进行。为了使得能够在海马体中进行微透析,将小鼠用异氟烷麻醉并且将颅内引导套管(CMA)立体定向地植入脑中,从而根据Paxinos and Franklin[帕西诺斯和富兰克林](2001)将微透析探针定位在海马体中(探针尖的坐标:前囟后面3.1mm并且前囟侧面2.8mm,并且相对于硬脑膜1.3mm)。固定螺栓和丙烯酸接合剂被用于固定导向套管。套管植入后,允许小鼠在透析前从手术恢复2-3天。

[0309] 在实验的当天,2-mm、1000kDa截断CMA探针通过引导套管插入。探针被连接到具有两个通道(MAB20;Microbiotech)的微透析蠕动泵并以推拉模式运行。微透析探针的入口管连接到将人工脑脊液(aCSF;以mM计:147NaCl,2.7KCl,1.2CaCl<sub>2</sub>,0.85MgCl<sub>2</sub>)灌注到探针的蠕动泵。蠕动泵也被连接到出口管以防止通过拉动流体穿过管时灌注液从探针中丢失。作为灌注缓冲液,在使用的当天用人工CSF将25%牛血清白蛋白级分V(西格玛公司)稀释至0.2%,并通过0.1- $\mu$ m滤膜过滤。在不连接探针的情况下确定泵的实际流速。在取样前后对样品管进行称重持续给定时间段并且计算流速。然后将泵设置为1 $\mu$ L/min的恒流。在整个实验期间使用120min的采样方案。为了避免组织损伤的干扰,探针植入后实验窗口设置为从14小时至48小时。实验开始后14h-16h,注射(腹膜内)15mg/kg的GM37、h9E4或同种型对照(抗HEL),并且收集另外的6个样品(收集12h)。透析液被储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 。人 $\alpha$ -突触核蛋白的浓度通过ELISA(Covance公司的ELISA试剂盒)进行测定。

[0310] 将每一个动物抗体治疗之前2-3个基础值(4h-6h)的平均值当作基线并设为100%。采用双因素方差分析(ANOVA)与重复测量来评估数据以评估统计相关性。在海马体中人 $\alpha$ -突触核蛋白的基础水平为 $8.1 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$ (平均值 $\pm$ SEM,  $n=25$ , 未对体外透析探针恢复进行修正)。相比两个对比抗体(人9E4和同种型对照(抗HEL)), GM37的给予诱导了F28小鼠海马体内人 $\alpha$ -突触核蛋白较大减少。(图17)。

[0311] 实例9:体内 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的长期效果。抗体GM37改善大鼠帕金森模型中的运动表型。

[0312] 人 $\alpha$ -突触核蛋白在大鼠中脑的多巴胺能神经元中的靶向表达可以使用重组腺相关病毒载体(rAAV)来实现,并与在黑质中的多巴胺能细胞的渐进损失以及运动障碍有关。

[0313] 通过注射AAV2/5血清型的腺相关病毒,成年雌性Sprague-Dawley大鼠(225-250g)被用于在黑质(SN)中表达人 $\alpha$ -突触核蛋白,如前所述,该腺相关病毒包含鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子、具有来自巨细胞病毒的启动子的增强子元件、随后是人 $\alpha$ -突触核蛋白的cDNA和WPRE元件(Xu L, Daly T, Gao C, Flotte TR, Song S, Byrne BJ, Sands MS, Ponder KP(2001))。在这个模型中,已经表明,人 $\alpha$ -突触核蛋白表达导致多巴胺能神经元的神经变性。Maingay M等人, CNS Spectr[中枢神经系统光谱]2005年3月;10(3):235-44)。为了检验在此模型中 $\alpha$ -突触核蛋白的治疗性抗体的效果,在病毒注射前2至4天开始抗体治疗,并且该治疗持续直到研究结束(图18)。以相同体积(5ml/kg: IP)的PBS给予作为对照。GM37以15mg/kg (IP)的剂量每周给药两次。包含人野生型 $\alpha$ -突触核蛋白或绿色荧光蛋白(GFP)基因的病毒颗粒(rAAV2/5)被单侧注入到SN中。将动物用Hypnorm®和Dormicum®的组合以2.0ml/kg(皮下)麻醉并放置在立体定位架。它们的温度是通过加热垫调节至37.5°C,并暴露其头骨。根据大鼠脑立体定位图谱集(Paxinos和Watson, 1998),以下列坐标在右SN上面钻孔:前囟后部5.5mm和前囟侧面2.0mm。在低于硬脑膜物质7.2mm深度进行3 $\mu$ L的rAAV2/5- $\alpha$ -syn或rAAV2/5-GFP的单次注射,并且使用Hamilton注射器以0.2 $\mu$ L/min的流速连接到立体注射器。将针留在原地另外5min以允许在SN下载体扩散。手术后,将动物返回到它们的饲养笼,并放置在加热的环境中允许它们从麻醉中恢复。在AAV注射之前以及AAV注射3、7和10周以后,评价在圆柱体试验中运动不对称的测试。呈现的数据对应于使用右前爪相比左和右前爪全部使用两者之间的比率。病毒注射10周后,拍摄每个动物在圆柱体中的表现共计5min,并且在测试的最后一天对5分钟内使用左前爪和右前爪触摸的数量进行人工计分。相比AAV-GFP注射的大鼠,第10周在AAV-syn中存在显著的损害( $p=0.012$ )。显示了对于GM37处理的动物的逆转趋势,因为它们的表现与GFP大鼠不同(对于gm37分别为 $p=0.163$ 和 $p=0.407$ )。这一发现表明,抗体GM37能够改善在此大鼠模型中帕金森氏病的运动表型(图18和19)。

[0314] 实例10:体内 $\alpha$ -突触核蛋白抗体的长期效果。抗体GM37抑制内源小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体和磷酸化的播种

[0315] 将重组蛋白制成的 $\alpha$ -突触核蛋白预成形的原纤维注射到野生型小鼠的背侧纹状体来招募内源小鼠 $\alpha$ -突触核蛋白,并在皮层、杏仁核和黑质的神经元内诱导形成Ser-129磷酸化的聚集体(Luk等人, 2012, Science[科学]2012年11月16日;338(6109):949-53)。为了看出 $\alpha$ -突触核蛋白特异性单克隆抗体GM37是否能够在体内降低 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维诱导的磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白内含物形成的出现,使用了总共45只小鼠。小鼠被给予了30mg/kg

GM37(腹膜内)、15mg/kg GM 37(静脉内)或运载体(腹膜内)(PBS)。一天后,将小鼠麻醉并立体定位在具有2 $\mu$ l重组人 $\alpha$ -Syn的粗种子的一个半球中,如先前所描述来制得(实例6)(每只动物总共2 $\mu$ g粗种子)。为了注入粗种子,通过钻孔打开颅骨并且将单个玻璃吸管(坐标:前囟前方+0.5mm,中线侧面+2.0mm)插入右侧前脑以将接种体定位于背侧纹状体(硬脑膜下+2.6mm)。在恢复之后,小鼠每周接受腹膜内或静脉内抗体注射,直到45天被处死。对组(15只/组)的给药是通过静脉内注射15mg/kg的GM37、腹膜内注射30mg/kg的GM37、或腹膜内注射PBS(10ml/kg),每周一次。

[0316] 为了在血浆中测量抗体的浓度,下一次注射之前每周一次采集脸颊血液,即最后一次注射后7天。由2000g旋转获得血浆,在室温下孵育15min,随后在-20℃冷冻上清液。在研究结束时采集CSF样品并在-20℃冷冻。血浆和CSF样品通过MSD进行了分析以确定人IgG的浓度。简言之,小鼠抗-人IgG(克隆MH16-1(M1268)被用于捕获,血浆或CSF在孔中孵育,随后是磺基-TAG山羊抗人作为检测抗体(MSD目录号:R32AJ-1)。通过MSD从电化学发光分析板。

[0317] 在血浆中的抗体水平显示于图20B中,并且显示六周内抗体血浆浓度的剂量依赖性增加以及血浆抗体的积累。在csf的抗体水平显示于图20C中,并且显示0.1%左右的血浆抗体水平可在csf中进行测量。

[0318] 在将 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维种子注射45天后,将小鼠麻醉,用PBS经心脏灌注,随后用中性缓冲的多聚甲醛(4%)灌注。取出大脑并在中性缓冲的多聚甲醛中固定后培养过夜。通过神经科学关联物在45 $\mu$ m厚的连续切片上进行免疫组化法。简要地说,使用MultiBrain®技术,每块最多25个小鼠大脑包埋在一起,分成3块,在冠状面冷冻切片为45 $\mu$ m厚,并收集到含有抗原保存溶液的杯中。每第六节与抗体染色成Ser-129磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白(抗 $\alpha$ -突触核蛋白(磷酸S129)抗体[Psyn/81A]ab184674)以揭露Ser129磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白反应性结构。

[0319] 通过人工计数免疫反应阳性细胞来进行pSyn病理的定量,该细胞来自于从每第六部分的覆盖了整个黑质的5-7部分的10倍放大率图像。进行蒙蔽计数。在杏仁核和黑质中的细胞计数通过单因素方差分析,随后通过邦费罗尼t检验(Bonferroni t-test)进行分析,其中GM37抗体的效果与PBS处理进行比较。

[0320] 从图20C可以看出,与PBS对照相比,无论使用腹腔内或静脉内治疗,用抗体GM37治疗显著减少了黑质中细胞内包含物的数量。这些数据表明,通过阻断细胞外病理 $\alpha$ -突触核蛋白进入神经元,通过阻断其神经元之间的传播和/或通过摄取神经胶质细胞促进从ISF中清除,抗体GM37可以在PD中具有治疗效果。内含物的这种出现已与在动物模型中多巴胺能神经元的丧失和帕金森氏病的运动障碍的发展相关联,使用抗体GM37治疗可能对PD中的多巴胺能细胞的损失和运动障碍的发展具有治疗效果。

[0321] 实例11:GM37和GM37变体的可制造性

[0322] 抗 $\alpha$ -突触核蛋白抗体在哺乳动物细胞培养物中于模拟将被用于生产在患者中使用的临床级材料的生产条件的条件下生产。熟知的是,以这种方式产生的蛋白质经受了可能影响抗体的治疗效力和影响抗体随时间的稳定性的生物物理属性的翻译后修饰。数十年的研究确定的经验知识鉴定了一组已知为特定分子的显影提供风险的翻译后修饰。这些翻译后修饰已显示与存在于重链和轻链蛋白的一级序列中的氨基酸串相关。已经产生算法,

该算法可以鉴别这些序列并确定它们对治疗性抗体的制造性和显影性的潜在风险。

[0323] 抗体的一级序列的计算机分析可以用于有潜力被开发为治疗剂的分子脱风险。特别地,VH和VL区的详细分析可以鉴定被认为对分子活性重要的但也可以是其随时间的稳定性的潜在危险独特的氨基酸。序列特异性脱酰胺已被鉴定为蛋白质结构的潜在危险。蛋白质脱酰胺可以发生在谷氨酰胺或天冬酰胺残基的酰胺侧链并将它们转化为羧酸酯基团(Lorenzo等人,PLoSone[公共科学图书馆期刊]DOI:10.1371(2015年12月))。对于天冬酰胺,在中性pH下非酶脱酰胺发生更快,因此被认为比谷氨酰胺具有更高的风险。活性进一步被序列中的随后的氨基酸影响,并且能以数天或数年的速率发生。蛋白质经历脱酰胺的实际命运需要通过实验评估以确定改变对它的稳定性和活性两者的影响。

[0324] 我们鉴定了GM37的VH结构域内脱酰胺的位点。氨基酸残基54是天冬酰胺(N),随后是位置55上的甘氨酸(G)。N54有自发脱酰胺高风险。为了减轻这种风险,我们产生一组3个变体,用丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)或组氨酸(H)取代天冬酰胺(N)。所有3个变体在哺乳动物细胞培养物中使用瞬时转染方法生产(实例1.5)。所有3个变体显示出与GM37野生型类似的表达和纯化特性。(图23)。

[0325] 对于八个产物中的每一个,使用已经在培养基中至少2周的CHO-K1SV GS-KO细胞进行400ml瞬时转染。转染前24小时,进行细胞传代培养。所有转染使用基因脉冲XCell(伯乐公司(Bio-Rad))通过电穿孔进行。对于每次转染,将活细胞重悬于补充有6mM的L-谷氨酰胺的预热的CD-CHO培养基中至 $2.86 \times 10^7$ 细胞/ml。将40 $\mu$ g包含适当的重链和轻链的各自建立的SGV DNA等分到每个反应杯(伯乐公司, GenePulser反应杯, 0.4cm空隙, 165-2088)中,并添加700 $\mu$ l细胞悬浮液。将细胞在300V、900 $\mu$ F进行电穿孔。转染的细胞被转移到在Erlenmeyer烧瓶中的rep-温热培养基中并且还将用预热的培养基漂洗两次的反应杯的内容物转移到烧瓶中。转染的培养物在振荡培养箱中于36.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、85%湿度、140rpm下孵育6天。细胞活力在收获时使用Cedex HiRes自动细胞计数器(罗舍公司(Rosche))测量。

[0326] 为了评价残基54在结合人 $\alpha$ -突触核蛋白中的重要性,我们在两个不同的实验中分析了变体结合的能力。使用竞争ELISA形式,我们评估了在残基54上的变化将会对GM37与溶液中 $\alpha$ -突触核蛋白结合的能力的影响。通过评估能够抑制抗体与涂覆ELISA板的突触核蛋白的结合的突触核蛋白的浓度,我们发现所有三种变体保持与GM37野生型相同的结合并与 $\alpha$ -突触核蛋白结合具有导致1-2nM的IC<sub>50</sub>的高亲和力(图24)。在室温下使用固定浓度(0.3 $\mu$ g/ml)的以下抗体中的每一种:GM37(即GM 37野生型)、GM37变体1、GM37变体2和GM37变体3,与0-1000nM范围内的人 $\alpha$ -突触核蛋白预孵育60分钟来进行竞争测定。剩余的未结合的抗体被捕获,并在涂覆100ng/ml重组人 $\alpha$ -突触核蛋白的ELISA板上使用抗人检测抗体通过电化学发光(MSD公司,盖瑟斯堡(Gathersburg),马里兰州(MD))来测定。对于GM37野生型、GM37变体1、GM37变体2和GM37变体3,相互作用的IC<sub>50</sub>分别是1.9nM、1.6nM、2.1nM和1.4nM(如使用Prism Graphpad®确定的)。

[0327] 使用表面等离子体共振(SPR),我们评估了GM37野生型(2个批次)和这三种变体(实例2)的结合的实时动力学。人 $\alpha$ -突触核蛋白被捕获到载玻片(配体)并且将抗体作为分析物在多个浓度下分别进行了测试。在多个浓度的抗体存在下的结合曲线的分析表明,所有四种抗体的速率是相同的,类似地,当抗体从缓冲液去除时测得的远离速率显示抗体之间无统计学差异。使用1:1的结合算法,所有4种抗体具有几乎相同的结合常数(图25)。

[0328] 为了评估在N54上的变化对GM37的功能活性的影响,我们分析了抗体阻断初级神经元培养物中的突触核蛋白播种活性的能力(实例6)。播种的水平使用特异于磷酸突触核蛋白的抗体来测定。如由磷酸突触核蛋白信号测得的,所有3种抗体都能够阻断播种(图26)。此外,抑制水平对于所有4种抗体是相同的。该基于细胞的数据进一步证实了与人 $\alpha$ -突触核蛋白的结合亲和力或播种的抑制(在基于初级细胞的测定中)不需要VH结构域中的氨基酸54的结合数据。此外,我们发现所有这三种抗体均能够使用标准表达和纯化方法生产。有趣的是,N54Q变体中的一个显示出比其他变体在生产上的改善,当抗体要大规模商业化生产时这是非常重要的。这些数据支持通过使用其他氨基酸替换天冬酰胺(N)而不需要关注效力损失来减少脱酰胺作用的潜在危险的可能性。

[0329] 各抗体(野生型GM37、变体1、变体2和变体3)的样品经受随时间而稳定增加的温度,并且同时通过多角度光散射法测定聚集水平(普罗米修斯(Prometheus)NT.48, NanoTemper技术公司)。发现GM37和GM37变体开始聚集的温度是相似的,然而GM37-变体2观察到最低水平的聚集(图27)。

## 序列表

<110> H. Lundbeck A/S (灵北公司)

<120> 用于治疗共核蛋白病的药剂、用途和方法

<130> 1069

<160> 43

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

[0330] <220>

<223> GM37 CDR 1 重链

<400> 1

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM37 CDR2 重链

<400> 2

Ala Ile Arg Ser Asn Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM37 CDR3 重链

<400> 3

Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser  
1 5

[0331]

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM37 CDR1 轻链

<400> 4

Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM37 CDR 2 轻链

<400> 5

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM37 CDR 3 轻链

<400> 6

[0332]

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM37 CDR 重链

<400> 7

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln 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 Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

[0333]

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM 37 轻链

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

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

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

[0334] <220>

<223> 表位 112-117

<400> 9

Ile Leu Glu Asp Met Pro  
1 5

<210> 10

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223>  $\alpha$ -突触核蛋白

<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

[0335] 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> 165

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> A-Syn-AAKK-BAP

<400> 11

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 Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Leu val Lys  
                     85                    90                    95  
 Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly  
                     100                    105                    110  
 Met val Asn Asn Thr Asp Ile Pro val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr  
                     115                    120                    125  
 [0336] Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly  
                     130                    135                    140  
 Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys  
                     145                    150                    155                    160  
 Ile Glu Trp His Glu  
                                     165

<210> 12

<211> 165

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> A-Syn-BAAK-BAP

<400> 12

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu 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 Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly  
 100 105 110  
 Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr  
 115 120 125  
 Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly  
 130 135 140  
 Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys  
 145 150 155 160  
 Ile Glu Trp His Glu  
 165

[0337]

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 162

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A-Syn-BBAA-BAP

&lt;400&gt; 13

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys  
 20 25 30  
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val  
 35 40 45  
 Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser  
 50 55 60  
 His Leu 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 Gly Ser Ala Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
 145 150 155 160

His Glu

<210> 14

<211> 165

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> A-Syn-BBKK-BAP

<400> 14

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

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

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

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

His Leu Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys  
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys  
85 90 95

Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly  
100 105 110

[0339] Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr  
115 120 125

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

Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys  
145 150 155 160

Ile Glu Trp His Glu  
165

<210> 15

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> A-Syn-120-140\_De1-BAP

<400> 15

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

[0340] 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 Gly Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu  
115 120 125

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu  
130 135 140

<210> 16

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223>  $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸 1-119

<400> 16

Met Ala His His His His His Ile Glu Gly Arg Met Asp Val Phe  
1 5 10 15

Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu  
20 25 30

Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys Thr Lys Glu Gly  
35 40 45

Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val Val His Gly Val  
50 55 60

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

Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly  
85 90 95

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

[0341]

Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp Met  
115 120 125

Pro Val Asp  
130

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; K (LC 恒定区)

&lt;400&gt; 17

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
1 5 10 15  
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
20 25 30  
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
35 40 45  
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
50 55 60  
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65 70 75 80  
[0342] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
85 90 95  
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 18

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> IgG1 (HC 恒定区)

<400> 18

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 [0343] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 325

[0344]

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; GM285 表位 112-115

&lt;400&gt; 19

Ile Leu Glu Asp

1

<210> 20  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> GM285 CDR1 重链

<400> 20

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Thr Met Thr  
1 5 10

<210> 21  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工的

[0345] <220>  
<223> GM285 CDR2 重链

<400> 21

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> GM285 CDR3 重链

<400> 22

Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM285 CDR1 轻链

<400> 23

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

<210> 24

<211> 7

[0346] <212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM285 CDR2 轻链

<400> 24

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM285 CDR3 轻链

<400> 25

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM285 VH

<400> 26

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

[0347] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe  
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Leu Thr Val 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 Asn Trp Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM285 VL

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser  
20 25 30

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

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

[0348]

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

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

<210> 28

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM285 IgG1 恒定区

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 [0349] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
325

[0350]

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; GM285 K 链

&lt;400&gt; 29

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0351] <223> GM37 变体 1 重链

<400> 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln 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 Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu val  
100 105 110

Thr val Ser Ser  
115

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM 37 变体 2 重链

<400> 31

[0352]

Glu val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Thr 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 Thr Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp val  
35 40 45

Ser Ala Ile Arg Ser Gln Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln 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 Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu val  
100 105 110

Thr val Ser Ser  
115

<210> 32  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> GM 37 变体 3 重链

<400> 32

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

[0353]

Ser Ala Ile Arg Ser His Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln 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 Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu val  
100 105 110

Thr val Ser Ser  
115

<210> 33  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> GM37 变体 1 重链 CDR 2

<400> 33

Ala Ile Arg Ser Ser Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0354] <223> GM37 变体 2 CDR 2 重链

<400> 34

Ala Ile Arg Ser Gln Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GM37 变体 3 CDR 2 重链

<400> 35

Ala Ile Arg Ser His Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 9E4 结合表位

<400> 36

Asn Glu Ala Tyr Glu  
 1 5

[0355]

<210> 37

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人  $\beta$ -突触核蛋白

<400> 37

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

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

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

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

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala  
65 70 75 80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu  
85 90 95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met  
100 105 110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln  
115 120 125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala  
130

<210> 38

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工的

[0356] <220>

<223> 人  $\gamma$ -突触核蛋白

<400> 38

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

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

Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val  
35 40 45

Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn  
50 55 60

Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys  
65 70 75 80

Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg  
85 90 95

Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala Ser  
100 105 110

Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp  
115 120 125

<210> 39

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 食蟹猴的  $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物

<400> 39

[0357]

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 Ile Lys  
85 90 95

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

Leu Gln 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> 40  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 大鼠的  $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物

<400> 40

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys  
 20 25 30  
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val  
 35 40 45  
 [0358] Val His Gly Val Thr 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 Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
 85 90 95  
 Lys Asp Gln Met Gly Lys Gly Glu Glu Gly Tyr Pro Gln Glu Gly Ile  
 100 105 110  
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Ser Ser Glu Ala Tyr Glu Met Pro  
 115 120 125  
 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
 130 135 140

<210> 41  
 <211> 140  
 <212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 小鼠的  $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物

<400> 41

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 Thr 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

[0359]

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

Lys Asp Gln Met Gly Lys Gly Glu Glu Gly Tyr Pro Gln Glu Gly Ile  
100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Gly Ser 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> 42

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 9E4 HC

&lt;400&gt; 42

Glu val Gln Leu val 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 Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp val  
 35 40 45  
 Ala ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 [0360] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu val  
 100 105 110  
 Thr val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125  
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140  
 val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro val Thr val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Thr Ser Gly val His Thr Phe Pro Ala val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175  
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser val val Thr val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205  
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

[0361]

<210> 43  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 9E4 LC

<400> 43

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

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

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

[0362] Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

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

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

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

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

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

[0363] Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

[0001] 序列表

[0002] <110> H.隆德贝克有限公司(H. Lundbeck A/S)

[0003] <120> 用于治疗共核蛋白病的药剂、用途和方法

[0004] <130> 1069

[0005] <160> 43

[0006] <170> PatentIn版本3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 10

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人工的(Artificial)

[0011] <220>

[0012] <221>

[0013] <222>

[0014] <223> GM37 CDR 1 重链

[0015] <400> 1

[0016] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Thr

[0017] 1 5 10

[0018] <210> 2

[0019] <211> 17

[0020] <212> PRT

[0021] <213> 人工的(Artificial)

[0022] <220>

[0023] <221>

[0024] <222>

[0025] <223> GM37 CDR2 重链

[0026] <400> 2

[0027] Ala Ile Arg Ser Asn Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

[0028] 1 5 10 15

[0029] Gly

[0030] <210> 3

[0031] <211> 9

[0032] <212> PRT

[0033] <213> 人工的(Artificial)

[0034] <220>

[0035] <221>

[0036] <222>

[0037] <223> GM37 CDR3 重链

[0038] <400> 3

[0039] Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser  
[0040] 1 5  
[0041] <210> 4  
[0042] <211> 11  
[0043] <212> PRT  
[0044] <213> 人工的(Artificial)  
[0045] <220>  
[0046] <221>  
[0047] <222>  
[0048] <223> GM37 CDR1 轻链  
[0049] <400> 4  
[0050] Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
[0051] 1 5 10  
[0052] <210> 5  
[0053] <211> 7  
[0054] <212> PRT  
[0055] <213> 人工的(Artificial)  
[0056] <220>  
[0057] <221>  
[0058] <222>  
[0059] <223> GM37 CDR 2 轻链  
[0060] <400> 5  
[0061] Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
[0062] 1 5  
[0063] <210> 6  
[0064] <211> 9  
[0065] <212> PRT  
[0066] <213> 人工的(Artificial)  
[0067] <220>  
[0068] <221>  
[0069] <222>  
[0070] <223> GM37 CDR 3 轻链  
[0071] <400> 6  
[0072] Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
[0073] 1 5  
[0074] <210> 7  
[0075] <211> 116  
[0076] <212> PRT  
[0077] <213> 人工的(Artificial)

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0078] | <220>                                                           |
| [0079] | <221>                                                           |
| [0080] | <222>                                                           |
| [0081] | <223> GM37 CDR 重链                                               |
| [0082] | <400> 7                                                         |
| [0083] | Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly |
| [0084] | 1 5 10 15                                                       |
| [0085] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr |
| [0086] | 20 25 30                                                        |
| [0087] | Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |
| [0088] | 35 40 45                                                        |
| [0089] | Ser Ala Ile Arg Ser Asn Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val |
| [0090] | 50 55 60                                                        |
| [0091] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr |
| [0092] | 65 70 75 80                                                     |
| [0093] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| [0094] | 85 90 95                                                        |
| [0095] | Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |
| [0096] | 100 105 110                                                     |
| [0097] | Thr Val Ser Ser                                                 |
| [0098] | 115                                                             |
| [0099] | <210> 8                                                         |
| [0100] | <211> 108                                                       |
| [0101] | <212> PRT                                                       |
| [0102] | <213> 人工的(Artificial)                                           |
| [0103] | <220>                                                           |
| [0104] | <221>                                                           |
| [0105] | <222>                                                           |
| [0106] | <223> GM 37 轻链                                                  |
| [0107] | <400> 8                                                         |
| [0108] | Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly |
| [0109] | 1 5 10 15                                                       |
| [0110] | Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser |
| [0111] | 20 25 30                                                        |
| [0112] | Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu |
| [0113] | 35 40 45                                                        |
| [0114] | Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser |
| [0115] | 50 55 60                                                        |
| [0116] | Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu |

|        |                                                                 |     |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| [0117] | 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| [0118] | Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro |     |     |     |
| [0119] |                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| [0120] | Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys                 |     |     |     |
| [0121] |                                                                 | 100 | 105 |     |
| [0122] | <210> 9                                                         |     |     |     |
| [0123] | <211> 6                                                         |     |     |     |
| [0124] | <212> PRT                                                       |     |     |     |
| [0125] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |     |
| [0126] | <220>                                                           |     |     |     |
| [0127] | <221>                                                           |     |     |     |
| [0128] | <222>                                                           |     |     |     |
| [0129] | <223> 表位112-117                                                 |     |     |     |
| [0130] | <400> 9                                                         |     |     |     |
| [0131] | Ile Leu Glu Asp Met Pro                                         |     |     |     |
| [0132] | 1                                                               | 5   |     |     |
| [0133] | <210> 10                                                        |     |     |     |
| [0134] | <211> 140                                                       |     |     |     |
| [0135] | <212> PRT                                                       |     |     |     |
| [0136] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |     |
| [0137] | <220>                                                           |     |     |     |
| [0138] | <221>                                                           |     |     |     |
| [0139] | <222>                                                           |     |     |     |
| [0140] | <223> $\alpha$ -突触核蛋白                                           |     |     |     |
| [0141] | <400> 10                                                        |     |     |     |
| [0142] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val |     |     |     |
| [0143] | 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| [0144] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys |     |     |     |
| [0145] |                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| [0146] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val |     |     |     |
| [0147] |                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| [0148] | Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr |     |     |     |
| [0149] |                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| [0150] | Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys |     |     |     |
| [0151] | 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| [0152] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys |     |     |     |
| [0153] |                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| [0154] | Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile |     |     |     |
| [0155] |                                                                 | 100 | 105 | 110 |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0156] | Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro |
| [0157] | 115 120 125                                                     |
| [0158] | Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala                 |
| [0159] | 130 135 140                                                     |
| [0160] | <210> 11                                                        |
| [0161] | <211> 165                                                       |
| [0162] | <212> PRT                                                       |
| [0163] | <213> 人工的(Artificial)                                           |
| [0164] | <220>                                                           |
| [0165] | <221>                                                           |
| [0166] | <222>                                                           |
| [0167] | <223> A-Syn-AAKK-BAP                                            |
| [0168] | <400> 11                                                        |
| [0169] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val |
| [0170] | 1 5 10 15                                                       |
| [0171] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys |
| [0172] | 20 25 30                                                        |
| [0173] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val |
| [0174] | 35 40 45                                                        |
| [0175] | Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr |
| [0176] | 50 55 60                                                        |
| [0177] | Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys |
| [0178] | 65 70 75 80                                                     |
| [0179] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys |
| [0180] | 85 90 95                                                        |
| [0181] | Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly |
| [0182] | 100 105 110                                                     |
| [0183] | Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr |
| [0184] | 115 120 125                                                     |
| [0185] | Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly |
| [0186] | 130 135 140                                                     |
| [0187] | Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys |
| [0188] | 145 150 155 160                                                 |
| [0189] | Ile Glu Trp His Glu                                             |
| [0190] | 165                                                             |
| [0191] | <210> 12                                                        |
| [0192] | <211> 165                                                       |
| [0193] | <212> PRT                                                       |
| [0194] | <213> 人工的(Artificial)                                           |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0195] | <220>                                                           |
| [0196] | <221>                                                           |
| [0197] | <222>                                                           |
| [0198] | <223> A-Syn-BAAK-BAP                                            |
| [0199] | <400> 12                                                        |
| [0200] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val |
| [0201] | 1 5 10 15                                                       |
| [0202] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys |
| [0203] | 20 25 30                                                        |
| [0204] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val |
| [0205] | 35 40 45                                                        |
| [0206] | Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr |
| [0207] | 50 55 60                                                        |
| [0208] | Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys |
| [0209] | 65 70 75 80                                                     |
| [0210] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys |
| [0211] | 85 90 95                                                        |
| [0212] | Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly |
| [0213] | 100 105 110                                                     |
| [0214] | Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr |
| [0215] | 115 120 125                                                     |
| [0216] | Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly |
| [0217] | 130 135 140                                                     |
| [0218] | Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys |
| [0219] | 145 150 155 160                                                 |
| [0220] | Ile Glu Trp His Glu                                             |
| [0221] | 165                                                             |
| [0222] | <210> 13                                                        |
| [0223] | <211> 162                                                       |
| [0224] | <212> PRT                                                       |
| [0225] | <213> 人工的(Artificial)                                           |
| [0226] | <220>                                                           |
| [0227] | <221>                                                           |
| [0228] | <222>                                                           |
| [0229] | <223> A-Syn-BBAA-BAP                                            |
| [0230] | <400> 13                                                        |
| [0231] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val |
| [0232] | 1 5 10 15                                                       |
| [0233] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys |

|        |                                                                 |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0234] | 20                                                              | 25  | 30  |
| [0235] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val |     |     |
| [0236] | 35                                                              | 40  | 45  |
| [0237] | Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser |     |     |
| [0238] | 50                                                              | 55  | 60  |
| [0239] | His Leu Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys |     |     |
| [0240] | 65                                                              | 70  | 75  |
| [0241] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys |     |     |
| [0242] | 85                                                              | 90  | 95  |
| [0243] | Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile |     |     |
| [0244] | 100                                                             | 105 | 110 |
| [0245] | Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro |     |     |
| [0246] | 115                                                             | 120 | 125 |
| [0247] | Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Ala Gly |     |     |
| [0248] | 130                                                             | 135 | 140 |
| [0249] | Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp |     |     |
| [0250] | 145                                                             | 150 | 155 |
| [0251] | His Glu                                                         |     |     |
| [0252] | <210> 14                                                        |     |     |
| [0253] | <211> 165                                                       |     |     |
| [0254] | <212> PRT                                                       |     |     |
| [0255] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |
| [0256] | <220>                                                           |     |     |
| [0257] | <221>                                                           |     |     |
| [0258] | <222>                                                           |     |     |
| [0259] | <223> A-Syn-BBKK-BAP                                            |     |     |
| [0260] | <400> 14                                                        |     |     |
| [0261] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val |     |     |
| [0262] | 1                                                               | 5   | 10  |
| [0263] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys |     |     |
| [0264] | 20                                                              | 25  | 30  |
| [0265] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val |     |     |
| [0266] | 35                                                              | 40  | 45  |
| [0267] | Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser |     |     |
| [0268] | 50                                                              | 55  | 60  |
| [0269] | His Leu Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys |     |     |
| [0270] | 65                                                              | 70  | 75  |
| [0271] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys |     |     |
| [0272] | 85                                                              | 90  | 95  |

|        |                                                                 |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0273] | Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly |     |     |
| [0274] | 100                                                             | 105 | 110 |
| [0275] | Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr |     |     |
| [0276] | 115                                                             | 120 | 125 |
| [0277] | Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly |     |     |
| [0278] | 130                                                             | 135 | 140 |
| [0279] | Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys |     |     |
| [0280] | 145                                                             | 150 | 155 |
| [0281] | Ile Glu Trp His Glu                                             |     | 160 |
| [0282] | 165                                                             |     |     |
| [0283] | <210> 15                                                        |     |     |
| [0284] | <211> 141                                                       |     |     |
| [0285] | <212> PRT                                                       |     |     |
| [0286] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |
| [0287] | <220>                                                           |     |     |
| [0288] | <221>                                                           |     |     |
| [0289] | <222>                                                           |     |     |
| [0290] | <223> A-Syn-120-140_Del-BAP                                     |     |     |
| [0291] | <400> 15                                                        |     |     |
| [0292] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val |     |     |
| [0293] | 1                                                               | 5   | 10  |
| [0294] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys |     |     |
| [0295] | 20                                                              | 25  | 30  |
| [0296] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val |     |     |
| [0297] | 35                                                              | 40  | 45  |
| [0298] | Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr |     |     |
| [0299] | 50                                                              | 55  | 60  |
| [0300] | Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys |     |     |
| [0301] | 65                                                              | 70  | 75  |
| [0302] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys |     |     |
| [0303] | 85                                                              | 90  | 95  |
| [0304] | Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile |     |     |
| [0305] | 100                                                             | 105 | 110 |
| [0306] | Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Gly Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu |     |     |
| [0307] | 115                                                             | 120 | 125 |
| [0308] | Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu             |     |     |
| [0309] | 130                                                             | 135 | 140 |
| [0310] | <210> 16                                                        |     |     |
| [0311] | <211> 131                                                       |     |     |

|        |                                                                 |                         |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|
| [0312] | <212>                                                           | PRT                     |
| [0313] | <213>                                                           | 人工的(Artificial)         |
| [0314] | <220>                                                           |                         |
| [0315] | <221>                                                           |                         |
| [0316] | <222>                                                           |                         |
| [0317] | <223>                                                           | $\alpha$ -突触核蛋白氨基酸1-119 |
| [0318] | <400>                                                           | 16                      |
| [0319] | Met Ala His His His His His His Ile Glu Gly Arg Met Asp Val Phe |                         |
| [0320] | 1 5 10 15                                                       |                         |
| [0321] | Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu |                         |
| [0322] | 20 25 30                                                        |                         |
| [0323] | Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys Thr Lys Glu Gly |                         |
| [0324] | 35 40 45                                                        |                         |
| [0325] | Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val Val His Gly Val |                         |
| [0326] | 50 55 60                                                        |                         |
| [0327] | Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly |                         |
| [0328] | 65 70 75 80                                                     |                         |
| [0329] | Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly |                         |
| [0330] | 85 90 95                                                        |                         |
| [0331] | Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys Lys Asp Gln Leu |                         |
| [0332] | 100 105 110                                                     |                         |
| [0333] | Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp Met |                         |
| [0334] | 115 120 125                                                     |                         |
| [0335] | Pro Val Asp                                                     |                         |
| [0336] | 130                                                             |                         |
| [0337] | <210>                                                           | 17                      |
| [0338] | <211>                                                           | 106                     |
| [0339] | <212>                                                           | PRT                     |
| [0340] | <213>                                                           | 人工的(Artificial)         |
| [0341] | <220>                                                           |                         |
| [0342] | <221>                                                           |                         |
| [0343] | <222>                                                           |                         |
| [0344] | <223>                                                           | $\kappa$ (LC恒定区)        |
| [0345] | <400>                                                           | 17                      |
| [0346] | Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln |                         |
| [0347] | 1 5 10 15                                                       |                         |
| [0348] | Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr |                         |
| [0349] | 20 25 30                                                        |                         |
| [0350] | Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser |                         |

|        |                                                                 |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0351] | 35                                                              | 40  | 45  |
| [0352] | Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr |     |     |
| [0353] | 50                                                              | 55  | 60  |
| [0354] | Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys |     |     |
| [0355] | 65                                                              | 70  | 75  |
| [0356] | His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro |     |     |
| [0357] | 85                                                              | 90  | 95  |
| [0358] | Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys                         |     |     |
| [0359] | 100                                                             | 105 |     |
| [0360] | <210> 18                                                        |     |     |
| [0361] | <211> 329                                                       |     |     |
| [0362] | <212> PRT                                                       |     |     |
| [0363] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |
| [0364] | <220>                                                           |     |     |
| [0365] | <221>                                                           |     |     |
| [0366] | <222>                                                           |     |     |
| [0367] | <223> IgG1(HC恒定区)                                               |     |     |
| [0368] | <400> 18                                                        |     |     |
| [0369] | Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys |     |     |
| [0370] | 1                                                               | 5   | 10  |
| [0371] | Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr |     |     |
| [0372] | 20                                                              | 25  | 30  |
| [0373] | Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser |     |     |
| [0374] | 35                                                              | 40  | 45  |
| [0375] | Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser |     |     |
| [0376] | 50                                                              | 55  | 60  |
| [0377] | Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr |     |     |
| [0378] | 65                                                              | 70  | 75  |
| [0379] | Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys |     |     |
| [0380] | 85                                                              | 90  | 95  |
| [0381] | Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys |     |     |
| [0382] | 100                                                             | 105 | 110 |
| [0383] | Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro |     |     |
| [0384] | 115                                                             | 120 | 125 |
| [0385] | Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys |     |     |
| [0386] | 130                                                             | 135 | 140 |
| [0387] | Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp |     |     |
| [0388] | 145                                                             | 150 | 155 |
| [0389] | Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu |     |     |

|        |                                                                 |     |     |     |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0390] |                                                                 | 165 |     | 170 |     | 175 |
| [0391] | Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu |     |     |     |     |     |
| [0392] |                                                                 | 180 |     | 185 |     | 190 |
| [0393] | His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn |     |     |     |     |     |
| [0394] |                                                                 | 195 |     | 200 |     | 205 |
| [0395] | Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly |     |     |     |     |     |
| [0396] |                                                                 | 210 |     | 215 |     | 220 |
| [0397] | Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu |     |     |     |     |     |
| [0398] | 225                                                             |     | 230 |     | 235 | 240 |
| [0399] | Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr |     |     |     |     |     |
| [0400] |                                                                 | 245 |     | 250 |     | 255 |
| [0401] | Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn |     |     |     |     |     |
| [0402] |                                                                 | 260 |     | 265 |     | 270 |
| [0403] | Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe |     |     |     |     |     |
| [0404] |                                                                 | 275 |     | 280 |     | 285 |
| [0405] | Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn |     |     |     |     |     |
| [0406] |                                                                 | 290 |     | 295 |     | 300 |
| [0407] | Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr |     |     |     |     |     |
| [0408] | 305                                                             |     | 310 |     | 315 | 320 |
| [0409] | Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly                             |     |     |     |     |     |
| [0410] |                                                                 | 325 |     |     |     |     |
| [0411] | <210> 19                                                        |     |     |     |     |     |
| [0412] | <211> 4                                                         |     |     |     |     |     |
| [0413] | <212> PRT                                                       |     |     |     |     |     |
| [0414] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |     |     |     |
| [0415] | <220>                                                           |     |     |     |     |     |
| [0416] | <221>                                                           |     |     |     |     |     |
| [0417] | <222>                                                           |     |     |     |     |     |
| [0418] | <223> GM285 表位112-115                                           |     |     |     |     |     |
| [0419] | <400> 19                                                        |     |     |     |     |     |
| [0420] | Ile Leu Glu Asp                                                 |     |     |     |     |     |
| [0421] | 1                                                               |     |     |     |     |     |
| [0422] | <210> 20                                                        |     |     |     |     |     |
| [0423] | <211> 13                                                        |     |     |     |     |     |
| [0424] | <212> PRT                                                       |     |     |     |     |     |
| [0425] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |     |     |     |
| [0426] | <220>                                                           |     |     |     |     |     |
| [0427] | <221>                                                           |     |     |     |     |     |
| [0428] | <222>                                                           |     |     |     |     |     |

[0429] <223> GM285 CDR1 重链  
 [0430] <400> 20  
 [0431] Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Thr Met Thr  
 [0432] 1 5 10  
 [0433] <210> 21  
 [0434] <211> 17  
 [0435] <212> PRT  
 [0436] <213> 人工的(Artificial)  
 [0437] <220>  
 [0438] <221>  
 [0439] <222>  
 [0440] <223> GM285 CDR2 重链  
 [0441] <400> 21  
 [0442] Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 [0443] 1 5 10 15  
 [0444] Gly  
 [0445] <210> 22  
 [0446] <211> 9  
 [0447] <212> PRT  
 [0448] <213> 人工的(Artificial)  
 [0449] <220>  
 [0450] <221>  
 [0451] <222>  
 [0452] <223> GM285 CDR3 重链  
 [0453] <400> 22  
 [0454] Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Tyr  
 [0455] 1 5  
 [0456] <210> 23  
 [0457] <211> 12  
 [0458] <212> PRT  
 [0459] <213> 人工的(Artificial)  
 [0460] <220>  
 [0461] <221>  
 [0462] <222>  
 [0463] <223> GM285 CDR1 轻链  
 [0464] <400> 23  
 [0465] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala  
 [0466] 1 5 10  
 [0467] <210> 24

[0468] <211> 7  
 [0469] <212> PRT  
 [0470] <213> 人工的(Artificial)  
 [0471] <220>  
 [0472] <221>  
 [0473] <222>  
 [0474] <223> GM285 CDR2 轻链  
 [0475] <400> 24  
 [0476] Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 [0477] 1 5  
 [0478] <210> 25  
 [0479] <211> 9  
 [0480] <212> PRT  
 [0481] <213> 人工的(Artificial)  
 [0482] <220>  
 [0483] <221>  
 [0484] <222>  
 [0485] <223> GM285 CDR3 轻链  
 [0486] <400> 25  
 [0487] Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
 [0488] 1 5  
 [0489] <210> 26  
 [0490] <211> 116  
 [0491] <212> PRT  
 [0492] <213> 人工的(Artificial)  
 [0493] <220>  
 [0494] <221>  
 [0495] <222>  
 [0496] <223> GM285 VH  
 [0497] <400> 26  
 [0498] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0499] 1 5 10 15  
 [0500] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe  
 [0501] 20 25 30  
 [0502] Thr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0503] 35 40 45  
 [0504] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0505] 50 55 60  
 [0506] Lys Gly Arg Leu Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

|        |                                                                 |     |     |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
| [0507] | 65                                                              | 70  | 75  | 80 |
| [0508] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |    |
| [0509] | 85                                                              | 90  | 95  |    |
| [0510] | Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |    |
| [0511] | 100                                                             | 105 | 110 |    |
| [0512] | Thr Val Ser Ser                                                 |     |     |    |
| [0513] | 115                                                             |     |     |    |
| [0514] | <210> 27                                                        |     |     |    |
| [0515] | <211> 108                                                       |     |     |    |
| [0516] | <212> PRT                                                       |     |     |    |
| [0517] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |    |
| [0518] | <220>                                                           |     |     |    |
| [0519] | <221>                                                           |     |     |    |
| [0520] | <222>                                                           |     |     |    |
| [0521] | <223> GM285 VL                                                  |     |     |    |
| [0522] | <400> 27                                                        |     |     |    |
| [0523] | Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly |     |     |    |
| [0524] | 1                                                               | 5   | 10  | 15 |
| [0525] | Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser |     |     |    |
| [0526] | 20                                                              | 25  | 30  |    |
| [0527] | Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu |     |     |    |
| [0528] | 35                                                              | 40  | 45  |    |
| [0529] | Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser |     |     |    |
| [0530] | 50                                                              | 55  | 60  |    |
| [0531] | Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Arg Leu Glu |     |     |    |
| [0532] | 65                                                              | 70  | 75  | 80 |
| [0533] | Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro |     |     |    |
| [0534] | 85                                                              | 90  | 95  |    |
| [0535] | Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys                 |     |     |    |
| [0536] | 100                                                             | 105 |     |    |
| [0537] | <210> 28                                                        |     |     |    |
| [0538] | <211> 329                                                       |     |     |    |
| [0539] | <212> PRT                                                       |     |     |    |
| [0540] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |    |
| [0541] | <220>                                                           |     |     |    |
| [0542] | <221>                                                           |     |     |    |
| [0543] | <222>                                                           |     |     |    |
| [0544] | <223> GM285 IgG1恒定区                                             |     |     |    |
| [0545] | <400> 28                                                        |     |     |    |

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0546] | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys |
| [0547] | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| [0548] | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr |
| [0549] |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| [0550] | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser |
| [0551] |     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| [0552] | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser |
| [0553] |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| [0554] | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr |
| [0555] | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| [0556] | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |
| [0557] |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| [0558] | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys |
| [0559] |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| [0560] | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro |
| [0561] |     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| [0562] | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys |
| [0563] |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| [0564] | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp |
| [0565] | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| [0566] | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu |
| [0567] |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |
| [0568] | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu |
| [0569] |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| [0570] | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn |
| [0571] |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| [0572] | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly |
| [0573] |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| [0574] | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu |
| [0575] | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| [0576] | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr |
| [0577] |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |
| [0578] | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn |
| [0579] |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |
| [0580] | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe |
| [0581] |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| [0582] | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn |
| [0583] |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| [0584] | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr |

|        |                                                                 |     |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| [0585] | 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| [0586] | Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly                             |     |     |     |
| [0587] | 325                                                             |     |     |     |
| [0588] | <210> 29                                                        |     |     |     |
| [0589] | <211> 106                                                       |     |     |     |
| [0590] | <212> PRT                                                       |     |     |     |
| [0591] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |     |
| [0592] | <220>                                                           |     |     |     |
| [0593] | <221>                                                           |     |     |     |
| [0594] | <222>                                                           |     |     |     |
| [0595] | <223> GM285 κ链                                                  |     |     |     |
| [0596] | <400> 29                                                        |     |     |     |
| [0597] | Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln |     |     |     |
| [0598] | 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| [0599] | Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr |     |     |     |
| [0600] | 20 25 30                                                        |     |     |     |
| [0601] | Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser |     |     |     |
| [0602] | 35 40 45                                                        |     |     |     |
| [0603] | Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr |     |     |     |
| [0604] | 50 55 60                                                        |     |     |     |
| [0605] | Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys |     |     |     |
| [0606] | 65 70 75 80                                                     |     |     |     |
| [0607] | His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro |     |     |     |
| [0608] | 85 90 95                                                        |     |     |     |
| [0609] | Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys                         |     |     |     |
| [0610] | 100 105                                                         |     |     |     |
| [0611] | <210> 30                                                        |     |     |     |
| [0612] | <211> 116                                                       |     |     |     |
| [0613] | <212> PRT                                                       |     |     |     |
| [0614] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |     |
| [0615] | <220>                                                           |     |     |     |
| [0616] | <221>                                                           |     |     |     |
| [0617] | <222>                                                           |     |     |     |
| [0618] | <223> GM37 变体1 重链                                               |     |     |     |
| [0619] | <400> 30                                                        |     |     |     |
| [0620] | Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly |     |     |     |
| [0621] | 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| [0622] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr |     |     |     |
| [0623] | 20 25 30                                                        |     |     |     |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0624] | Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |
| [0625] | 35 40 45                                                        |
| [0626] | Ser Ala Ile Arg Ser Ser Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val |
| [0627] | 50 55 60                                                        |
| [0628] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr |
| [0629] | 65 70 75 80                                                     |
| [0630] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| [0631] | 85 90 95                                                        |
| [0632] | Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |
| [0633] | 100 105 110                                                     |
| [0634] | Thr Val Ser Ser                                                 |
| [0635] | 115                                                             |
| [0636] | <210> 31                                                        |
| [0637] | <211> 116                                                       |
| [0638] | <212> PRT                                                       |
| [0639] | <213> 人工的(Artificial)                                           |
| [0640] | <220>                                                           |
| [0641] | <221>                                                           |
| [0642] | <222>                                                           |
| [0643] | <223> GM 37 变体2 重链                                              |
| [0644] | <400> 31                                                        |
| [0645] | Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly |
| [0646] | 1 5 10 15                                                       |
| [0647] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr |
| [0648] | 20 25 30                                                        |
| [0649] | Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |
| [0650] | 35 40 45                                                        |
| [0651] | Ser Ala Ile Arg Ser Gln Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val |
| [0652] | 50 55 60                                                        |
| [0653] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr |
| [0654] | 65 70 75 80                                                     |
| [0655] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| [0656] | 85 90 95                                                        |
| [0657] | Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |
| [0658] | 100 105 110                                                     |
| [0659] | Thr Val Ser Ser                                                 |
| [0660] | 115                                                             |
| [0661] | <210> 32                                                        |
| [0662] | <211> 116                                                       |

[0663] <212> PRT  
 [0664] <213> 人工的(Artificial)  
 [0665] <220>  
 [0666] <221>  
 [0667] <222>  
 [0668] <223> GM 37 变体3 重链  
 [0669] <400> 32  
 [0670] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly  
 [0671] 1 5 10 15  
 [0672] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 [0673] 20 25 30  
 [0674] Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0675] 35 40 45  
 [0676] Ser Ala Ile Arg Ser His Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0677] 50 55 60  
 [0678] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr  
 [0679] 65 70 75 80  
 [0680] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0681] 85 90 95  
 [0682] Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 [0683] 100 105 110  
 [0684] Thr Val Ser Ser  
 [0685] 115  
 [0686] <210> 33  
 [0687] <211> 17  
 [0688] <212> PRT  
 [0689] <213> 人工的(Artificial)  
 [0690] <220>  
 [0691] <221>  
 [0692] <222>  
 [0693] <223> GM37 变体1 重链 CDR 2  
 [0694] <400> 33  
 [0695] Ala Ile Arg Ser Ser Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 [0696] 1 5 10 15  
 [0697] Gly  
 [0698] <210> 34  
 [0699] <211> 17  
 [0700] <212> PRT  
 [0701] <213> 人工的(Artificial)

[0702] <220>  
[0703] <221>  
[0704] <222>  
[0705] <223> GM37 变体2 CDR 2 重链  
[0706] <400> 34  
[0707] Ala Ile Arg Ser Gln Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
[0708] 1 5 10 15  
[0709] Gly  
[0710] <210> 35  
[0711] <211> 17  
[0712] <212> PRT  
[0713] <213> 人工的(Artificial)  
[0714] <220>  
[0715] <221>  
[0716] <222>  
[0717] <223> GM37 变体3 CDR 2 重链  
[0718] <400> 35  
[0719] Ala Ile Arg Ser His Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
[0720] 1 5 10 15  
[0721] Gly  
[0722] <210> 36  
[0723] <211> 5  
[0724] <212> PRT  
[0725] <213> 人工的(Artificial)  
[0726] <220>  
[0727] <221>  
[0728] <222>  
[0729] <223> 9E4结合表位  
[0730] <400> 36  
[0731] Asn Glu Ala Tyr Glu  
[0732] 1 5  
[0733] <210> 37  
[0734] <211> 134  
[0735] <212> PRT  
[0736] <213> 人工的(Artificial)  
[0737] <220>  
[0738] <221>  
[0739] <222>  
[0740] <223> 人 $\beta$ -突触核蛋白

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0741] | <400> 37                                                        |
| [0742] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val |
| [0743] | 1 5 10 15                                                       |
| [0744] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys |
| [0745] | 20 25 30                                                        |
| [0746] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val |
| [0747] | 35 40 45                                                        |
| [0748] | Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser |
| [0749] | 50 55 60                                                        |
| [0750] | His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala |
| [0751] | 65 70 75 80                                                     |
| [0752] | Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu |
| [0753] | 85 90 95                                                        |
| [0754] | Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met |
| [0755] | 100 105 110                                                     |
| [0756] | Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln |
| [0757] | 115 120 125                                                     |
| [0758] | Glu Tyr Glu Pro Glu Ala                                         |
| [0759] | 130                                                             |
| [0760] | <210> 38                                                        |
| [0761] | <211> 127                                                       |
| [0762] | <212> PRT                                                       |
| [0763] | <213> 人工的(Artificial)                                           |
| [0764] | <220>                                                           |
| [0765] | <221>                                                           |
| [0766] | <222>                                                           |
| [0767] | <223> 人 $\gamma$ -突触核蛋白                                         |
| [0768] | <400> 38                                                        |
| [0769] | Met Asp Val Phe Lys Lys Gly Phe Ser Ile Ala Lys Glu Gly Val Val |
| [0770] | 1 5 10 15                                                       |
| [0771] | Gly Ala Val Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys |
| [0772] | 20 25 30                                                        |
| [0773] | Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val |
| [0774] | 35 40 45                                                        |
| [0775] | Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn |
| [0776] | 50 55 60                                                        |
| [0777] | Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys |
| [0778] | 65 70 75 80                                                     |
| [0779] | Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg |

|        |                                                                 |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0780] | 85                                                              | 90  | 95  |
| [0781] | Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala Ser |     |     |
| [0782] | 100                                                             | 105 | 110 |
| [0783] | Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp     |     |     |
| [0784] | 115                                                             | 120 | 125 |
| [0785] | <210> 39                                                        |     |     |
| [0786] | <211> 140                                                       |     |     |
| [0787] | <212> PRT                                                       |     |     |
| [0788] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |
| [0789] | <220>                                                           |     |     |
| [0790] | <221>                                                           |     |     |
| [0791] | <222>                                                           |     |     |
| [0792] | <223> 食蟹猴的 $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物                                 |     |     |
| [0793] | <400> 39                                                        |     |     |
| [0794] | Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val |     |     |
| [0795] | 1 5 10 15                                                       |     |     |
| [0796] | Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys |     |     |
| [0797] | 20 25 30                                                        |     |     |
| [0798] | Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val |     |     |
| [0799] | 35 40 45                                                        |     |     |
| [0800] | Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr |     |     |
| [0801] | 50 55 60                                                        |     |     |
| [0802] | Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys |     |     |
| [0803] | 65 70 75 80                                                     |     |     |
| [0804] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Ile Lys |     |     |
| [0805] | 85 90 95                                                        |     |     |
| [0806] | Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile |     |     |
| [0807] | 100 105 110                                                     |     |     |
| [0808] | Leu Gln Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro |     |     |
| [0809] | 115 120 125                                                     |     |     |
| [0810] | Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala                 |     |     |
| [0811] | 130 135 140                                                     |     |     |
| [0812] | <210> 40                                                        |     |     |
| [0813] | <211> 140                                                       |     |     |
| [0814] | <212> PRT                                                       |     |     |
| [0815] | <213> 人工的(Artificial)                                           |     |     |
| [0816] | <220>                                                           |     |     |
| [0817] | <221>                                                           |     |     |
| [0818] | <222>                                                           |     |     |

|        |                                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0819] | <223> 大鼠的 $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0820] | <400> 40                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0821] | Met                            | Asp | Val | Phe | Met | Lys | Gly | Leu | Ser | Lys | Ala | Lys | Glu | Gly | Val | Val |
| [0822] | 1                              |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| [0823] | Ala                            | Ala | Ala | Glu | Lys | Thr | Lys | Gln | Gly | Val | Ala | Glu | Ala | Ala | Gly | Lys |
| [0824] |                                |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| [0825] | Thr                            | Lys | Glu | Gly | Val | Leu | Tyr | Val | Gly | Ser | Lys | Thr | Lys | Glu | Gly | Val |
| [0826] |                                |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |
| [0827] | Val                            | His | Gly | Val | Thr | Thr | Val | Ala | Glu | Lys | Thr | Lys | Glu | Gln | Val | Thr |
| [0828] |                                |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| [0829] | Asn                            | Val | Gly | Gly | Ala | Val | Val | Thr | Gly | Val | Thr | Ala | Val | Ala | Gln | Lys |
| [0830] | 65                             |     |     |     |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  | 80  |
| [0831] | Thr                            | Val | Glu | Gly | Ala | Gly | Asn | Ile | Ala | Ala | Ala | Thr | Gly | Phe | Val | Lys |
| [0832] |                                |     |     |     |     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  | 95  |
| [0833] | Lys                            | Asp | Gln | Met | Gly | Lys | Gly | Glu | Glu | Gly | Tyr | Pro | Gln | Glu | Gly | Ile |
| [0834] |                                |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 | 110 |
| [0835] | Leu                            | Glu | Asp | Met | Pro | Val | Asp | Pro | Ser | Ser | Glu | Ala | Tyr | Glu | Met | Pro |
| [0836] |                                |     |     |     |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 | 125 |
| [0837] | Ser                            | Glu | Glu | Gly | Tyr | Gln | Asp | Tyr | Glu | Pro | Glu | Ala |     |     |     |     |
| [0838] |                                |     |     |     |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 | 140 |
| [0839] | <210> 41                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0840] | <211> 140                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0841] | <212> PRT                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0842] | <213> 人工的(Artificial)          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0843] | <220>                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0844] | <221>                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0845] | <222>                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0846] | <223> 小鼠的 $\alpha$ -突触核蛋白直向同源物 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0847] | <400> 41                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0848] | Met                            | Asp | Val | Phe | Met | Lys | Gly | Leu | Ser | Lys | Ala | Lys | Glu | Gly | Val | Val |
| [0849] | 1                              |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| [0850] | Ala                            | Ala | Ala | Glu | Lys | Thr | Lys | Gln | Gly | Val | Ala | Glu | Ala | Ala | Gly | Lys |
| [0851] |                                |     |     |     |     |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  | 30  |
| [0852] | Thr                            | Lys | Glu | Gly | Val | Leu | Tyr | Val | Gly | Ser | Lys | Thr | Lys | Glu | Gly | Val |
| [0853] |                                |     |     |     |     |     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  | 45  |
| [0854] | Val                            | His | Gly | Val | Thr | Thr | Val | Ala | Glu | Lys | Thr | Lys | Glu | Gln | Val | Thr |
| [0855] |                                |     |     |     |     |     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  | 60  |
| [0856] | Asn                            | Val | Gly | Gly | Ala | Val | Val | Thr | Gly | Val | Thr | Ala | Val | Ala | Gln | Lys |
| [0857] | 65                             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 70  | 75  |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0858] | Thr Val Glu Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys |
| [0859] | 85 90 95                                                        |
| [0860] | Lys Asp Gln Met Gly Lys Gly Glu Glu Gly Tyr Pro Gln Glu Gly Ile |
| [0861] | 100 105 110                                                     |
| [0862] | Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Gly Ser Glu Ala Tyr Glu Met Pro |
| [0863] | 115 120 125                                                     |
| [0864] | Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala                 |
| [0865] | 130 135 140                                                     |
| [0866] | <210> 42                                                        |
| [0867] | <211> 446                                                       |
| [0868] | <212> PRT                                                       |
| [0869] | <213> 人工的(Artificial)                                           |
| [0870] | <220>                                                           |
| [0871] | <221>                                                           |
| [0872] | <222>                                                           |
| [0873] | <223> 9E4 HC                                                    |
| [0874] | <400> 42                                                        |
| [0875] | Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |
| [0876] | 1 5 10 15                                                       |
| [0877] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr |
| [0878] | 20 25 30                                                        |
| [0879] | Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |
| [0880] | 35 40 45                                                        |
| [0881] | Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val |
| [0882] | 50 55 60                                                        |
| [0883] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr |
| [0884] | 65 70 75 80                                                     |
| [0885] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| [0886] | 85 90 95                                                        |
| [0887] | Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |
| [0888] | 100 105 110                                                     |
| [0889] | Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala |
| [0890] | 115 120 125                                                     |
| [0891] | Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu |
| [0892] | 130 135 140                                                     |
| [0893] | Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly |
| [0894] | 145 150 155 160                                                 |
| [0895] | Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser |
| [0896] | 165 170 175                                                     |

|        |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0897] | Gly                   | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |
| [0898] |                       |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |
| [0899] | Gly                   | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr |
| [0900] |                       |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |
| [0901] | Lys                   | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |
| [0902] |                       |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |
| [0903] | Cys                   | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
| [0904] |                       |     |     |     | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |
| [0905] | Leu                   | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |
| [0906] |                       |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| [0907] | Glu                   | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |
| [0908] |                       |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |
| [0909] | Lys                   | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |
| [0910] |                       |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |
| [0911] | Lys                   | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |
| [0912] |                       |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |
| [0913] | Leu                   | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |
| [0914] |                       |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |
| [0915] | Lys                   | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |
| [0916] |                       |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| [0917] | Lys                   | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |
| [0918] |                       |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |
| [0919] | Ser                   | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val |
| [0920] |                       |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |
| [0921] | Lys                   | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly |
| [0922] |                       |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |
| [0923] | Gln                   | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp |
| [0924] |                       |     |     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |
| [0925] | Gly                   | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp |
| [0926] |                       |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| [0927] | Gln                   | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His |
| [0928] |                       |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |
| [0929] | Asn                   | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |
| [0930] |                       |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |
| [0931] | <210> 43              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0932] | <211> 220             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0933] | <212> PRT             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0934] | <213> 人工的(Artificial) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0935] | <220>                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

110

| 抗体抗体  | 免疫原                                                                                         | 方案                 | 小鼠品系         |  |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------|--|
| GM37  | 全长人 $\alpha$ -突触核蛋白原纤维<br><br>交替使用<br><br>1-60 $\alpha$ -突触核蛋白<br><br>1-119 $\alpha$ -突触核蛋白 | 完全弗氏佐剂<br>和不完全弗氏佐剂 | HCo17-Balb/c |  |
| GM285 | 全长人 $\alpha$ -突触核蛋白单体，随后是原纤维或单体                                                             | 完全弗氏佐剂<br>和不完全弗氏佐剂 | HCo12-Balb/c |  |

图1

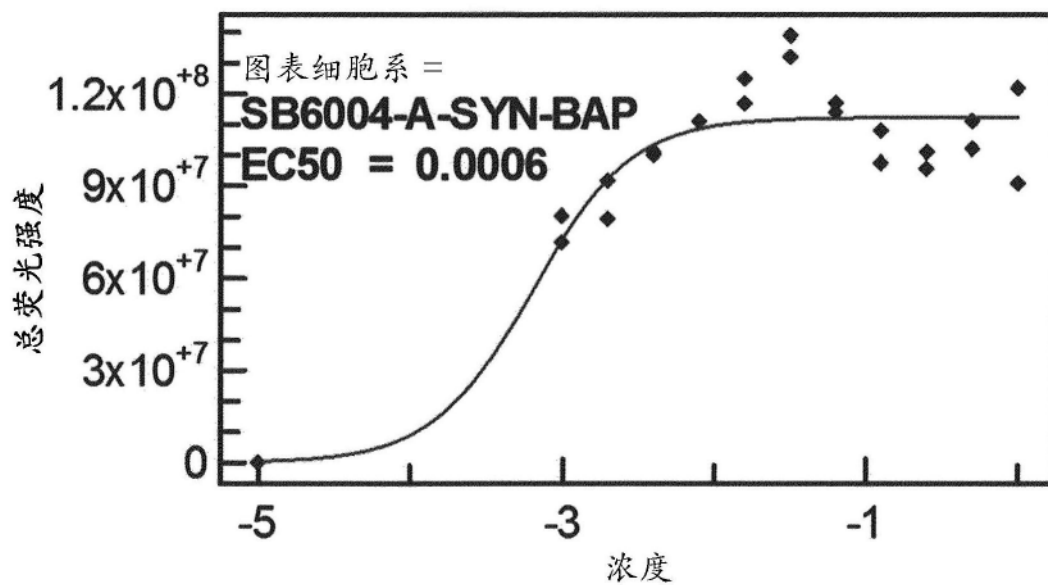


图2A

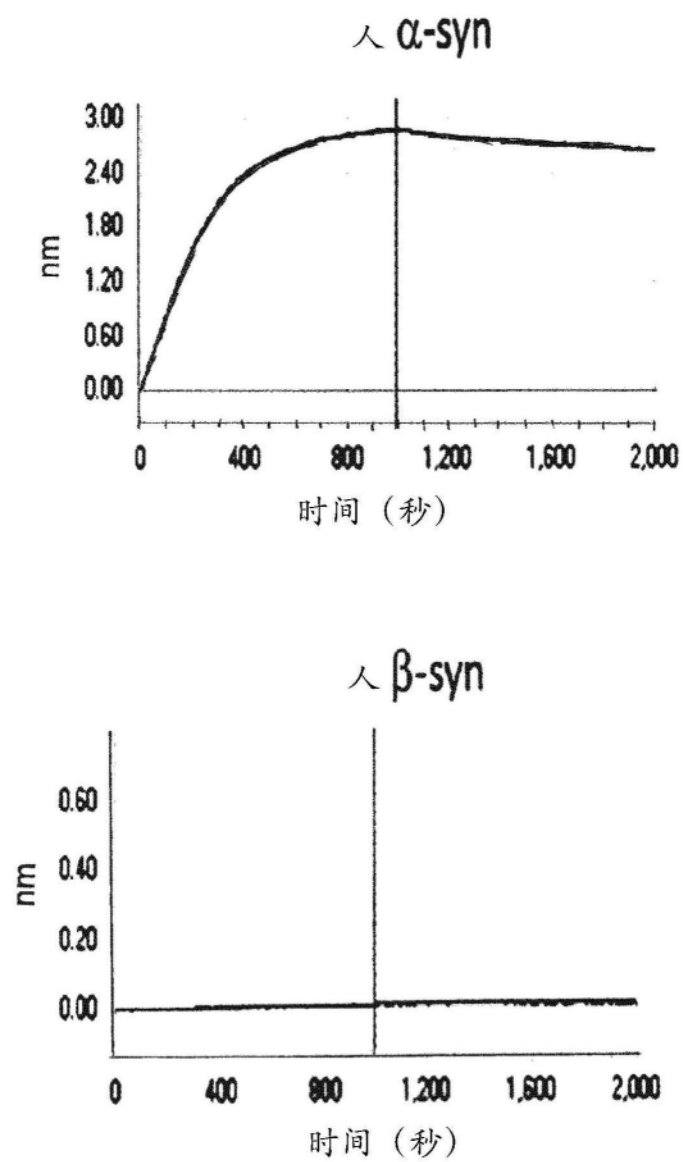


图2B

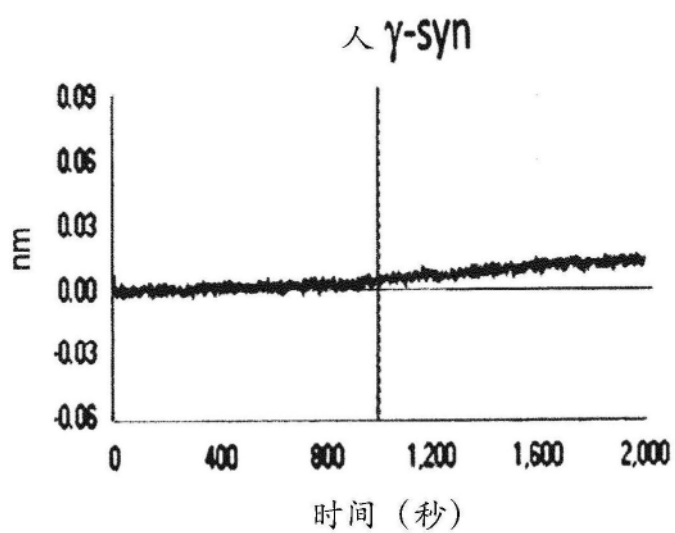
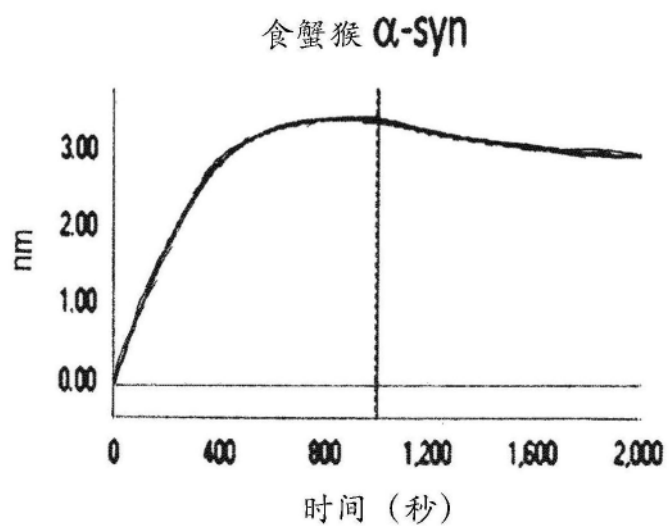


图2B(续)

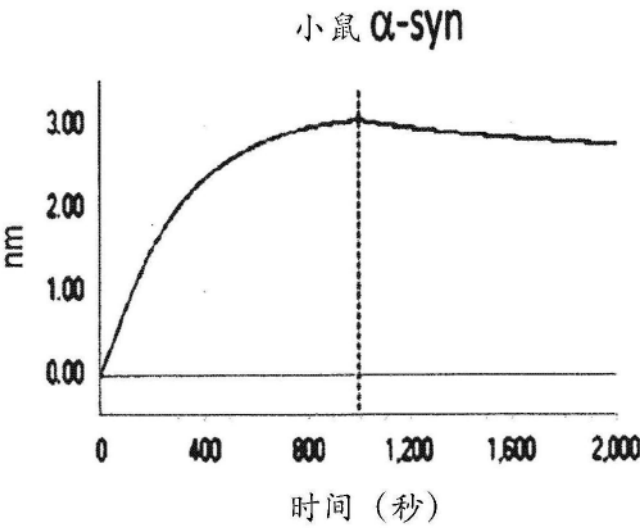


图2B(续)

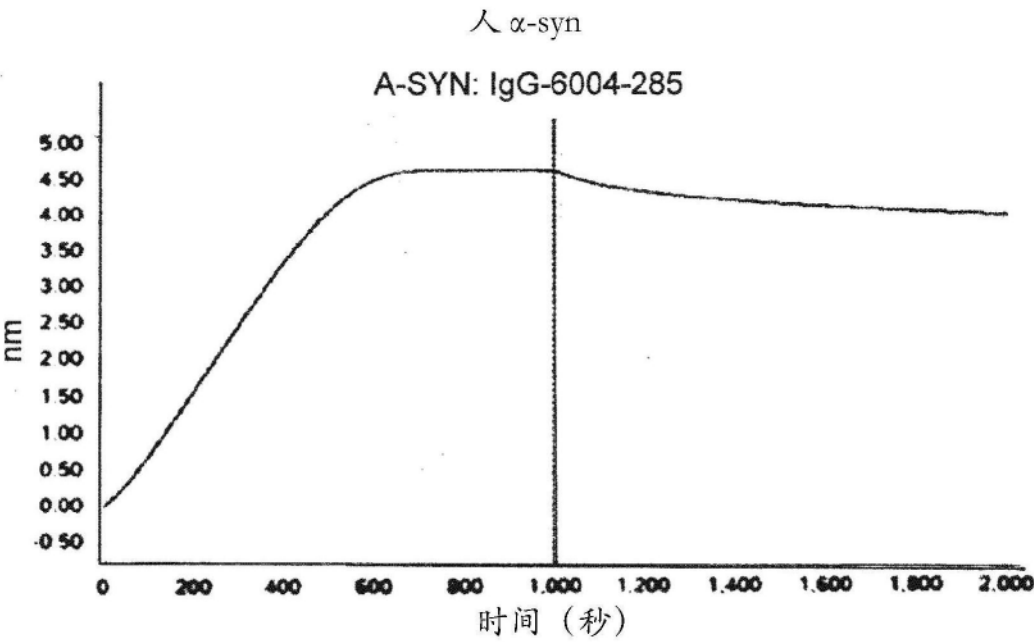


图2C

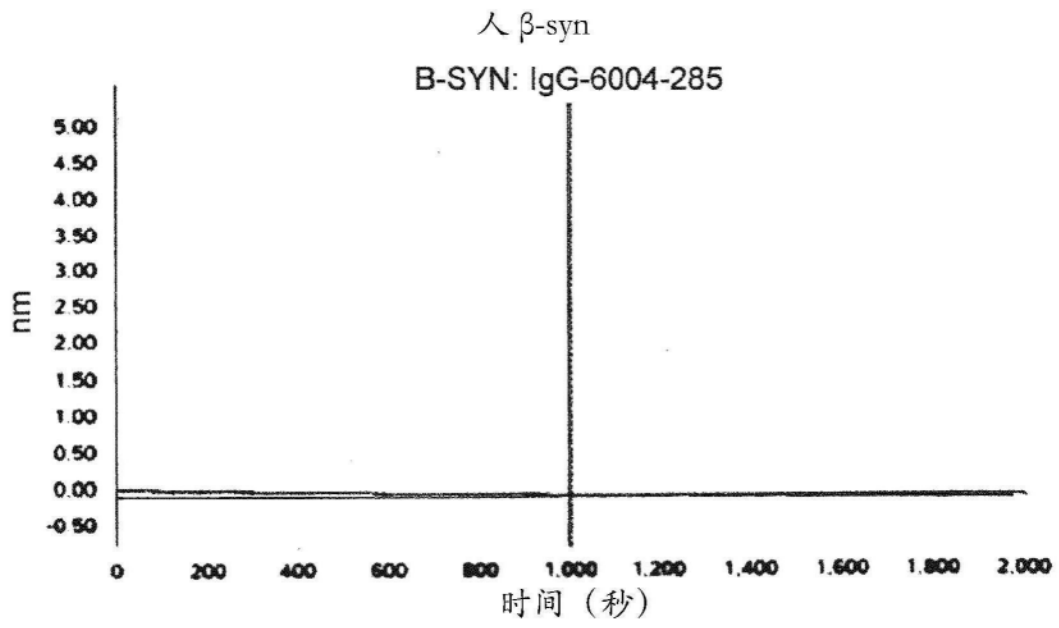


图2C(续)

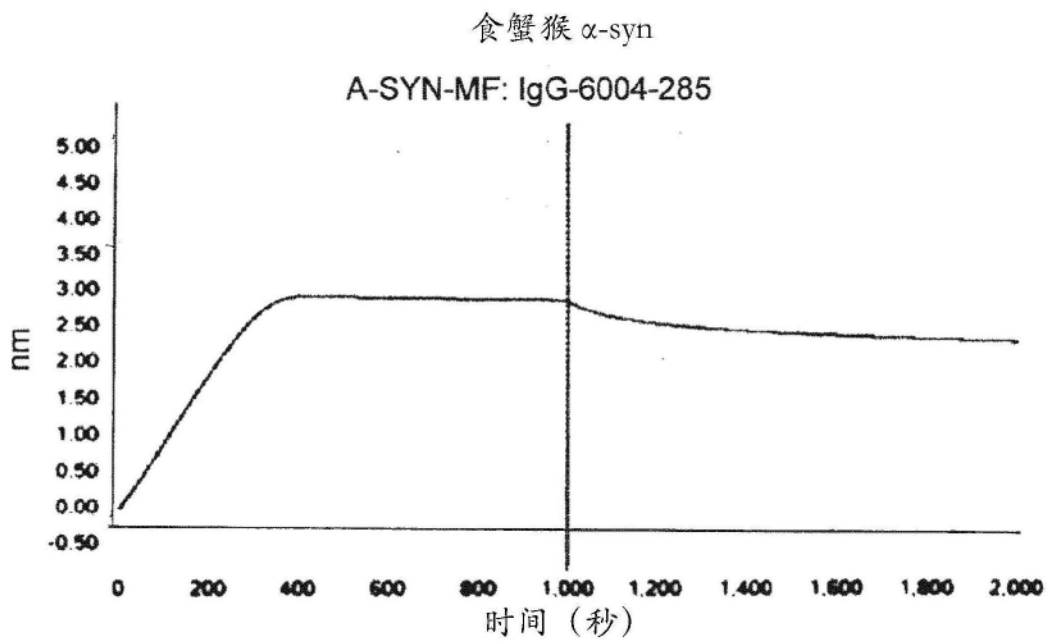


图2C(续)

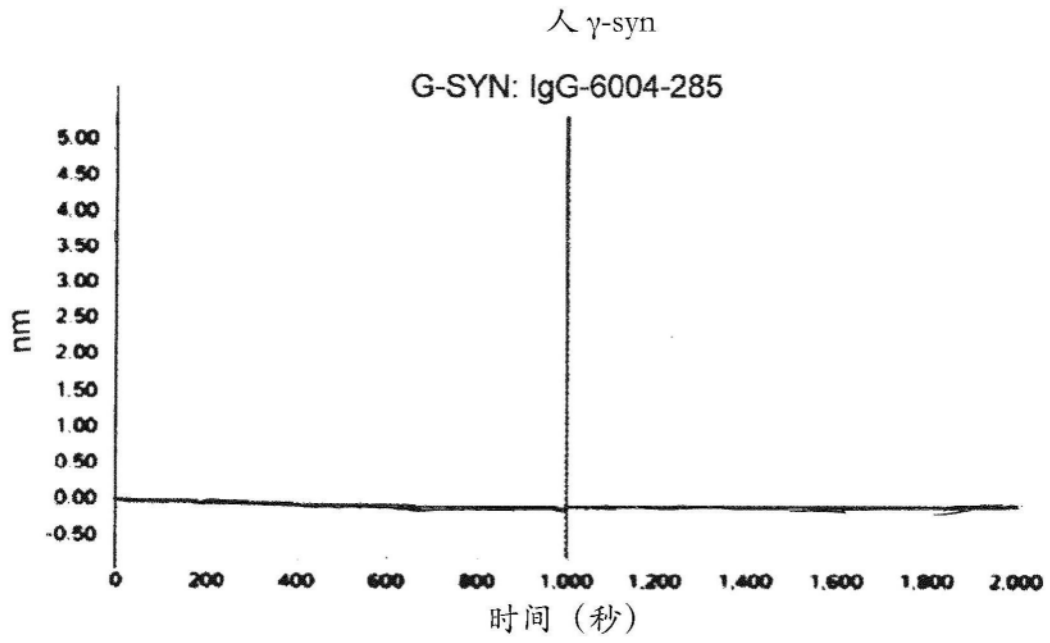


图2C(续)

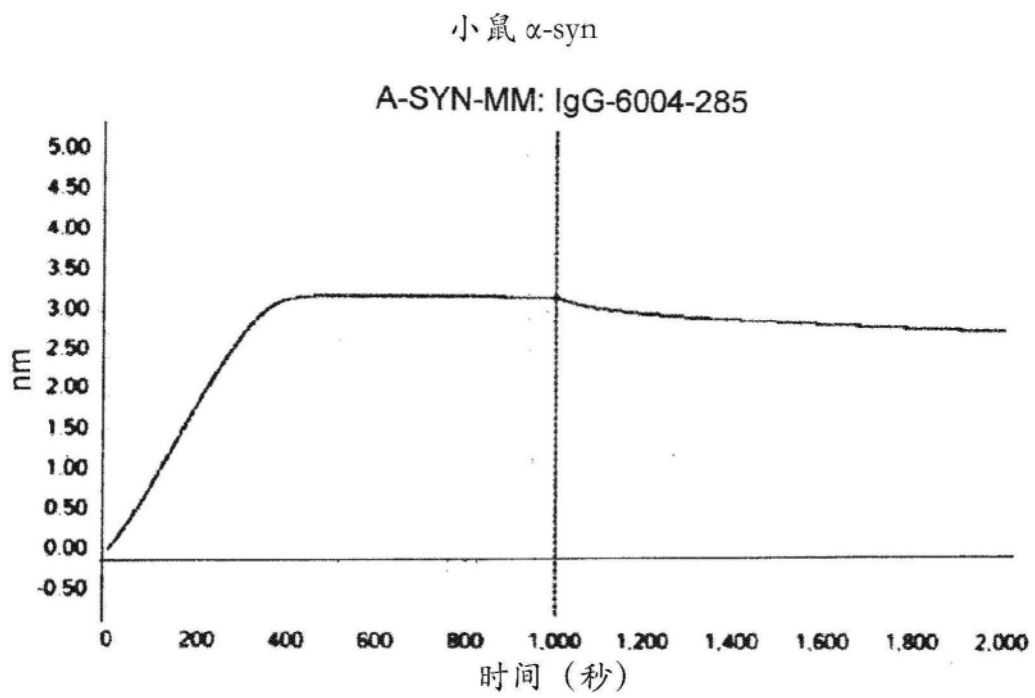


图2C(续)

A

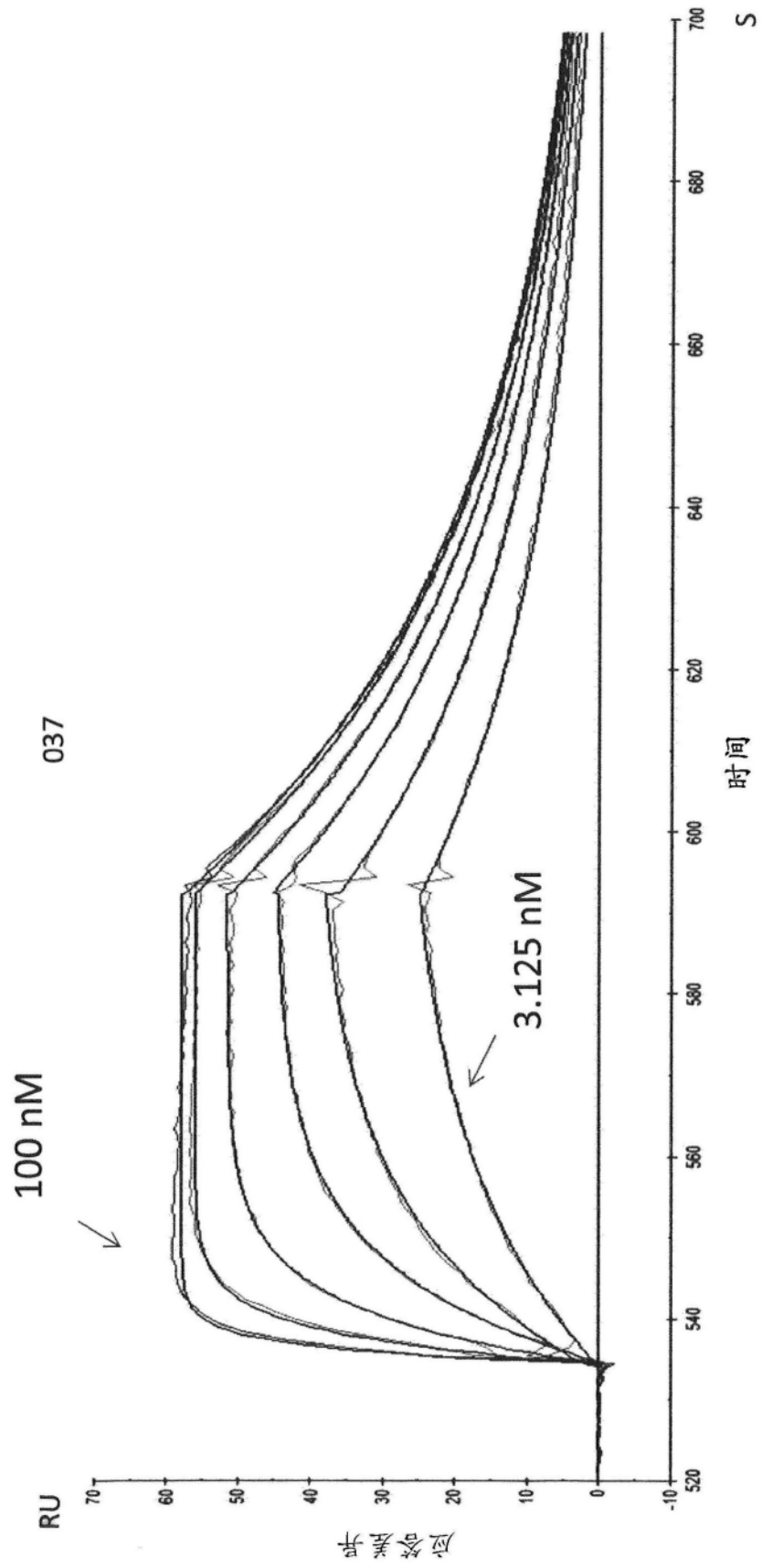
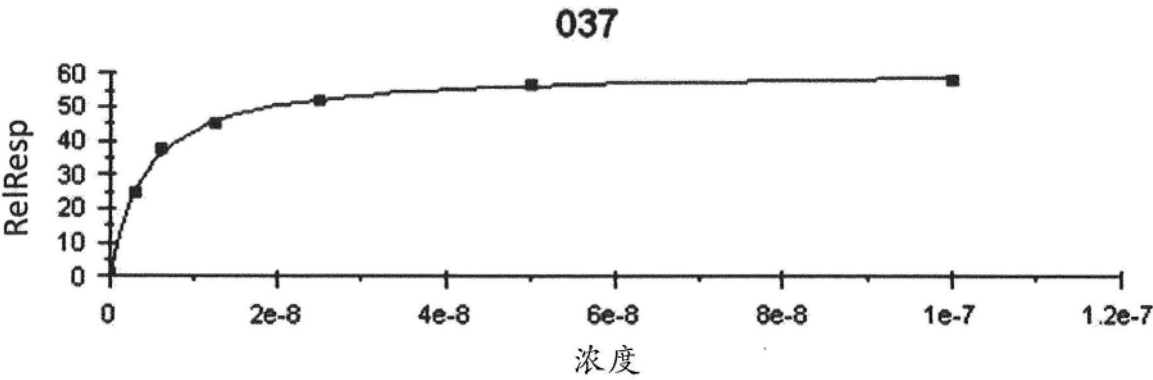


图3

B



C

| 名称                      | KA(1/M)  | KD(nM) | R最大值 | Chi2 |
|-------------------------|----------|--------|------|------|
| hlgG1-6004-037<br>C106S | 2.33E+08 | 4.29   | 61.1 | 0.96 |

图3(续)

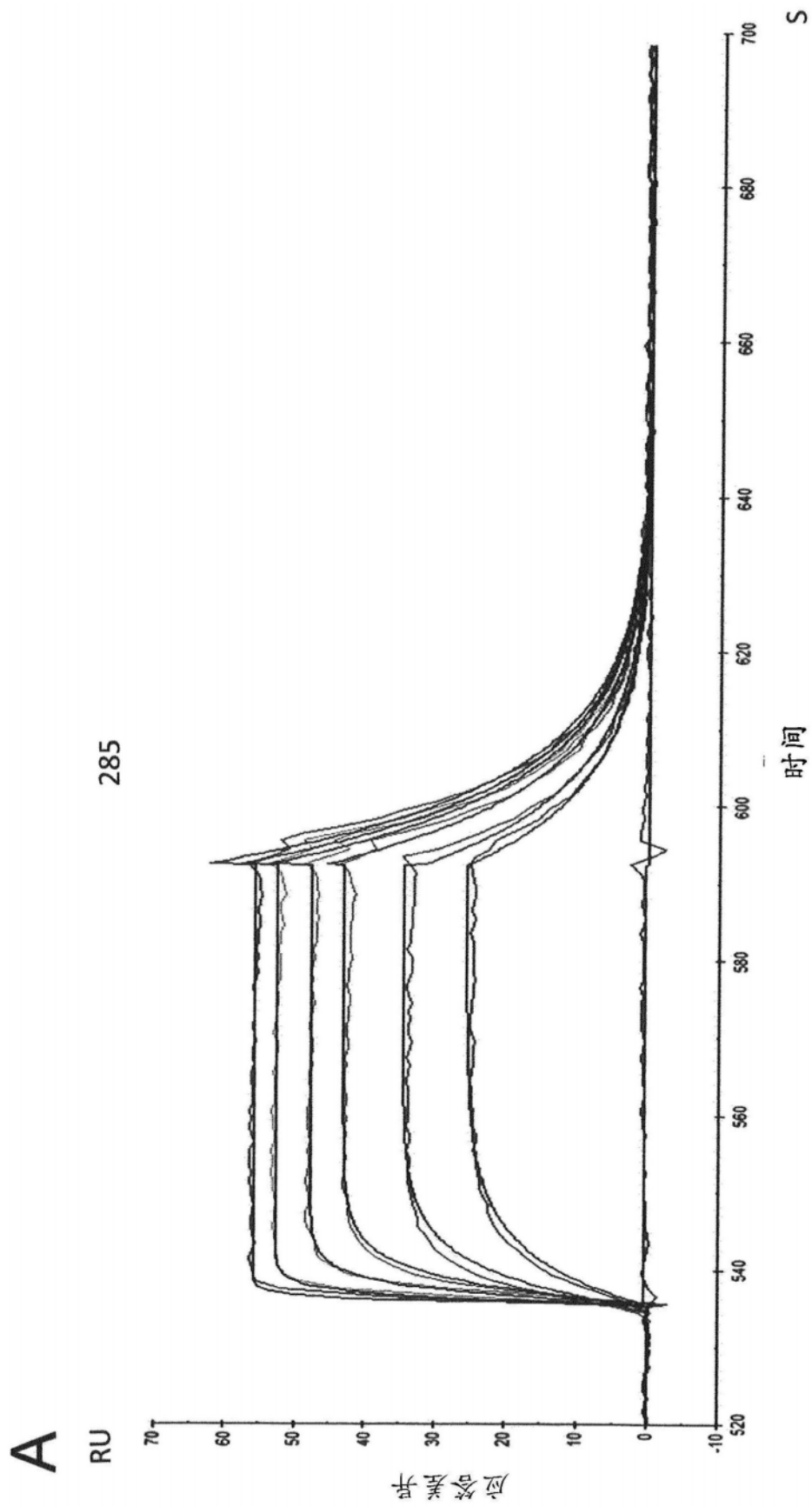
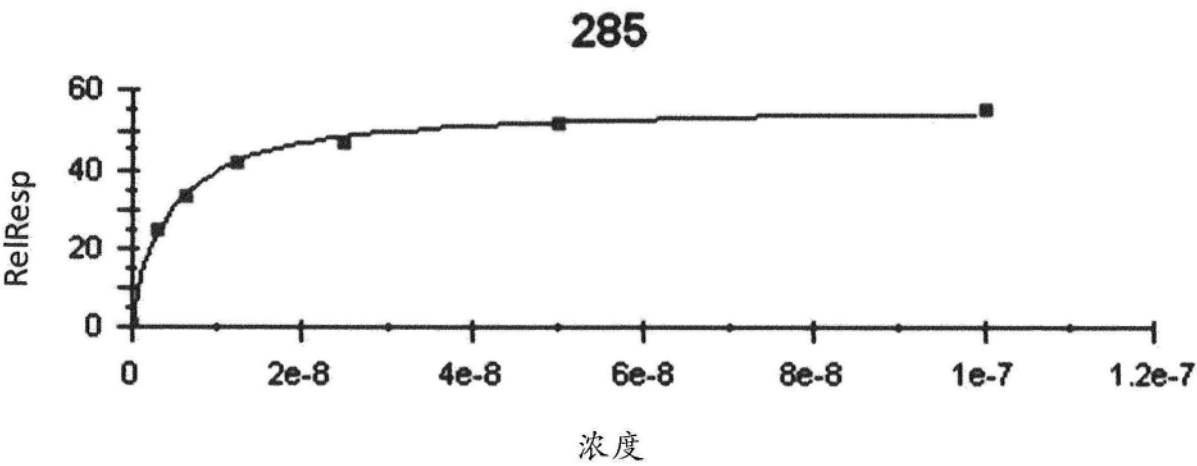


图4

B



C

| 名称             | KA(1/M)  | KD(nM) | R最大值 | Chi2 |
|----------------|----------|--------|------|------|
| hlgG1-6004-085 | 2.33E+08 | 4.30   | 56.3 | 0.77 |

图4(续)

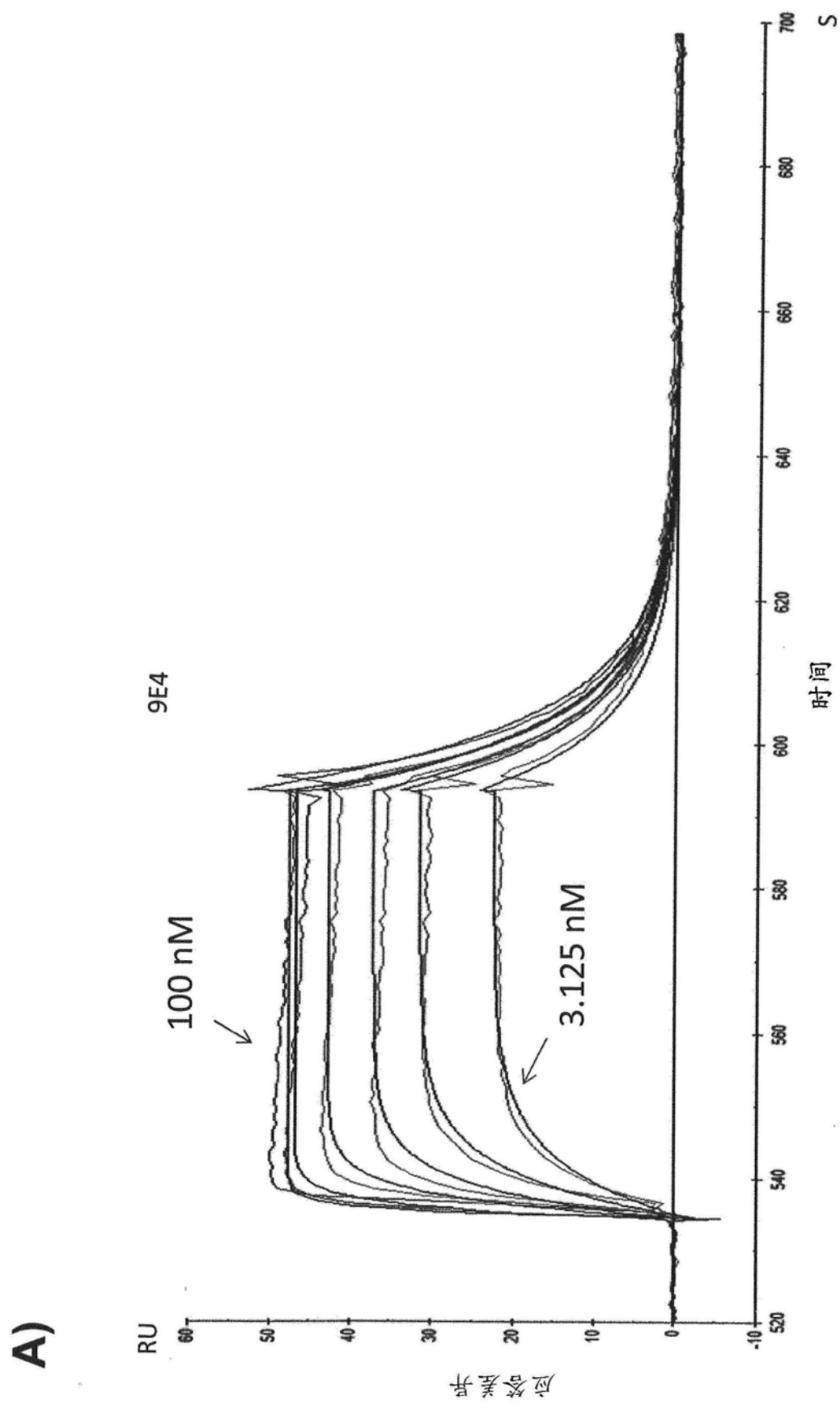
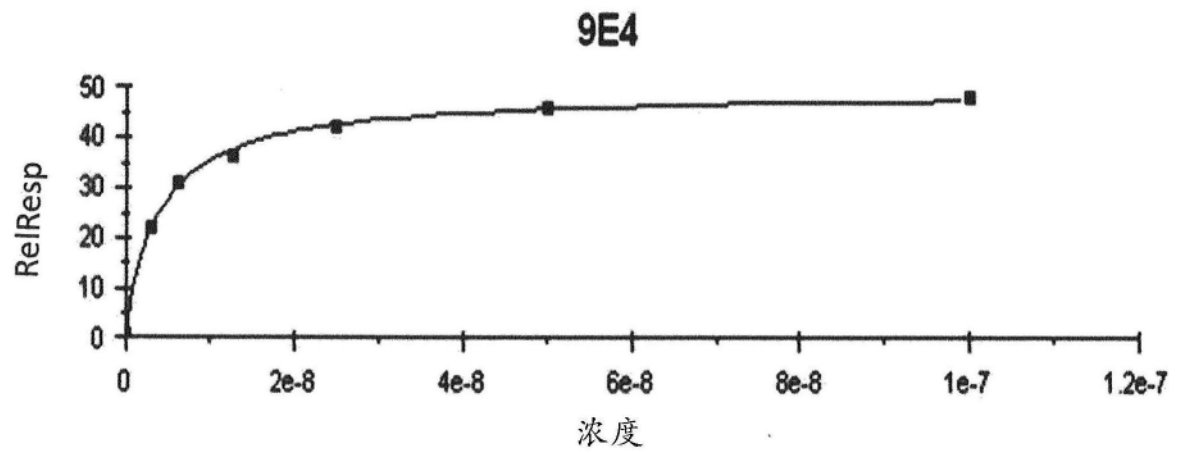


图5

B)



C)

| 名称        | KA(1/M)  | KD(nM) | R最大值 | Chi2 |
|-----------|----------|--------|------|------|
| hlgG1-9E4 | 2.58E+08 | 3.88   | 49.2 | 0.61 |

图5(续)

↓  
MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVV  
TGVTAQAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA  
↑ ↑ ↑

图6

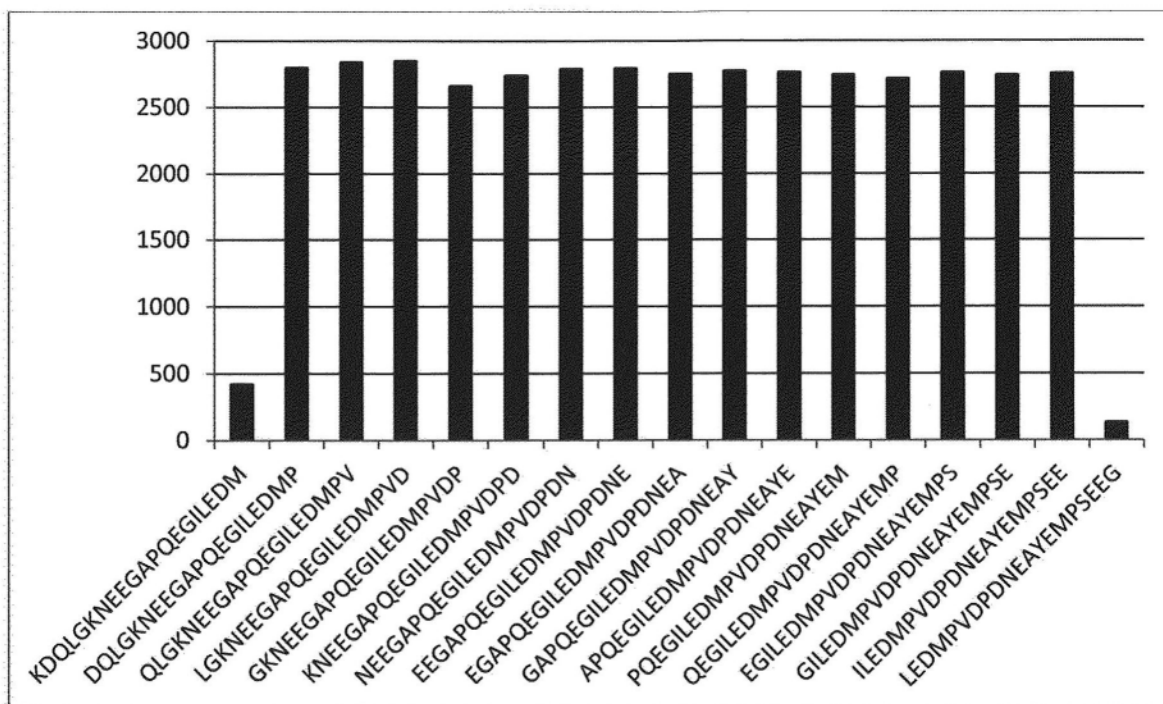
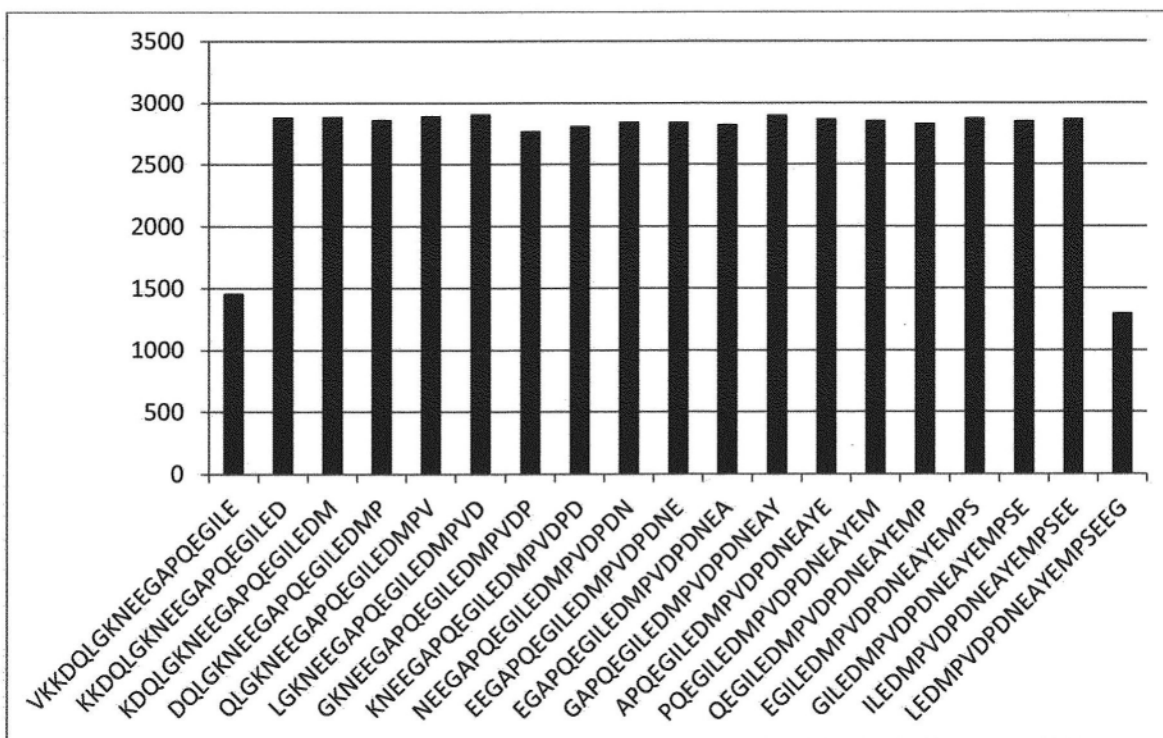
**A****B**

图7



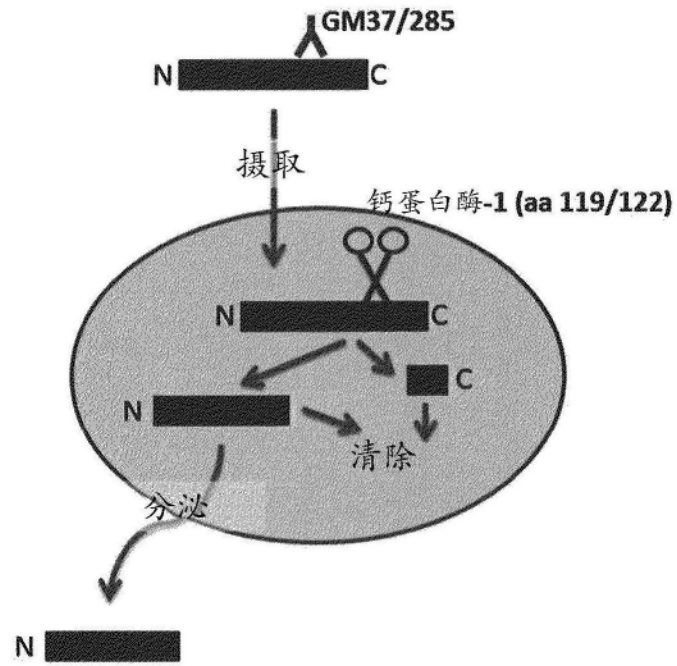


图10

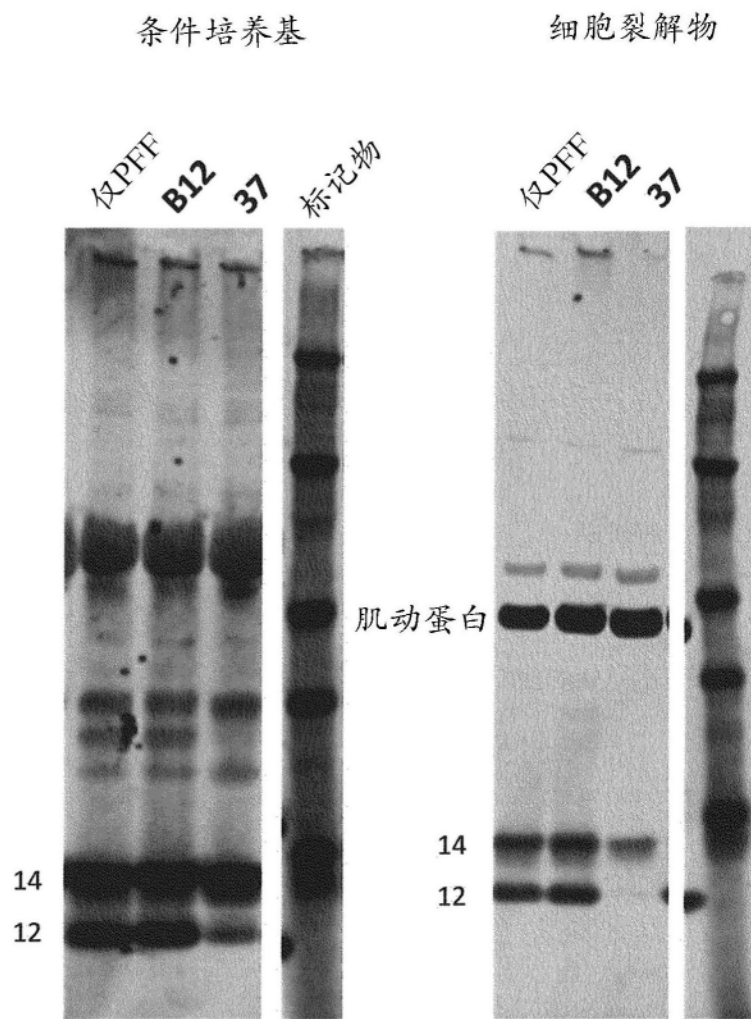
**A**

图11A

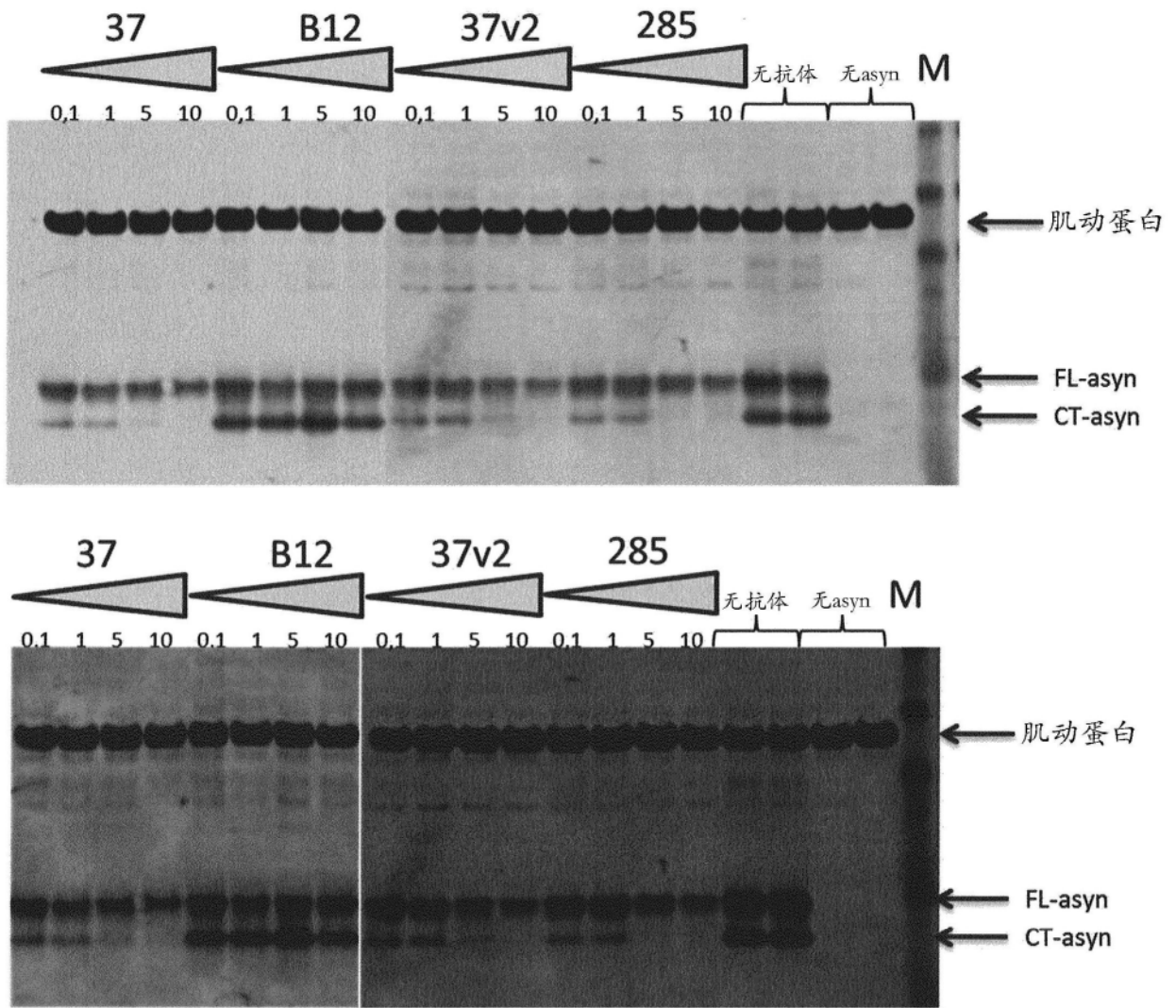


图11B

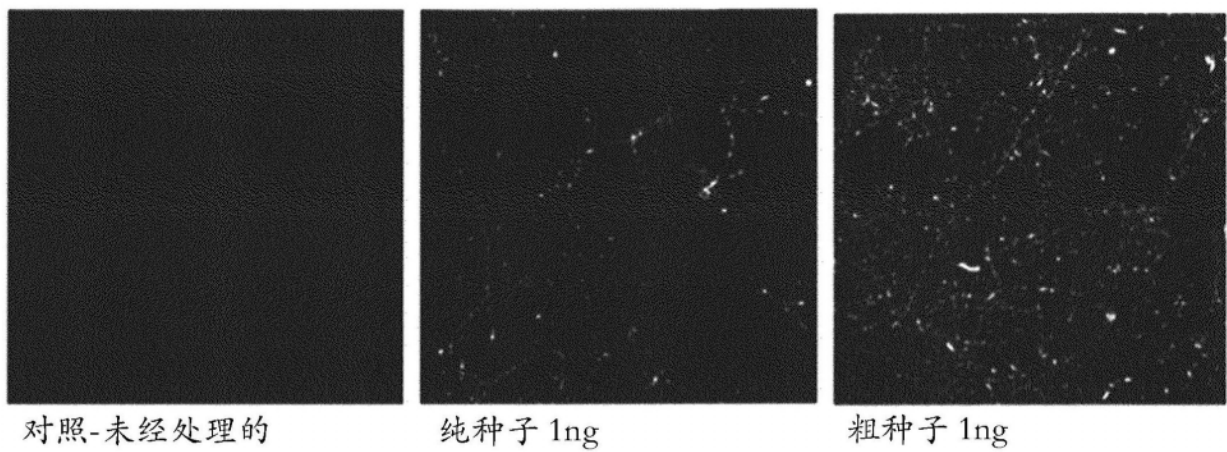


图12A

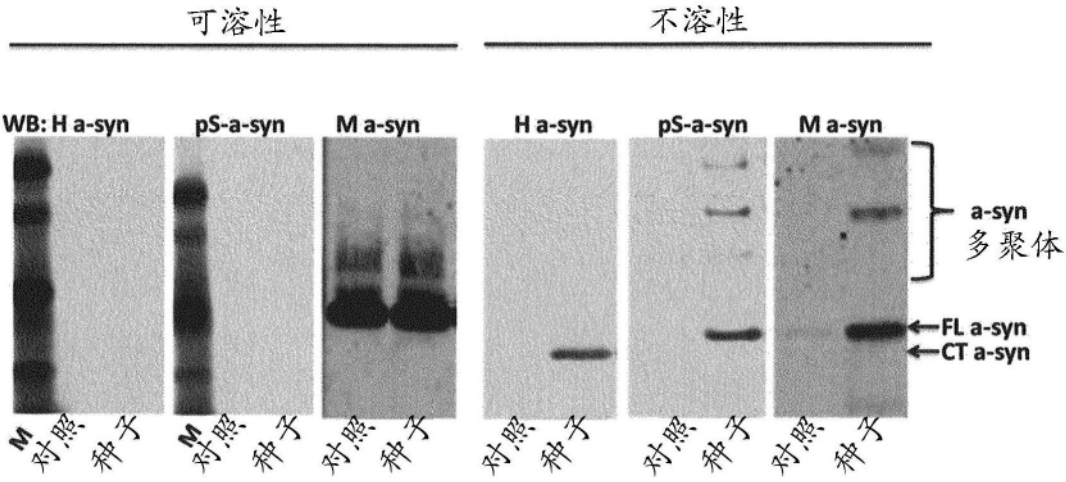


图12B

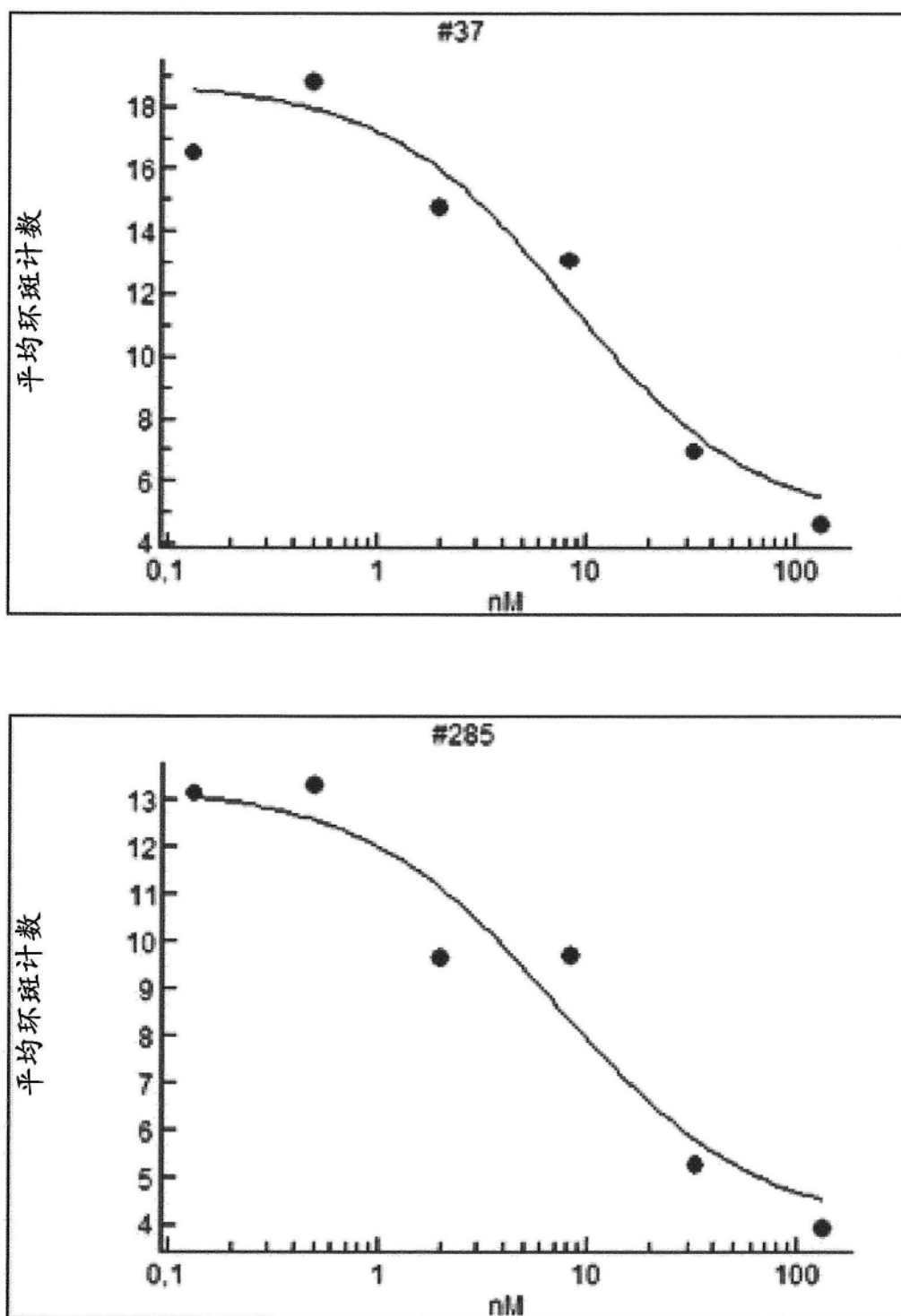


图12C

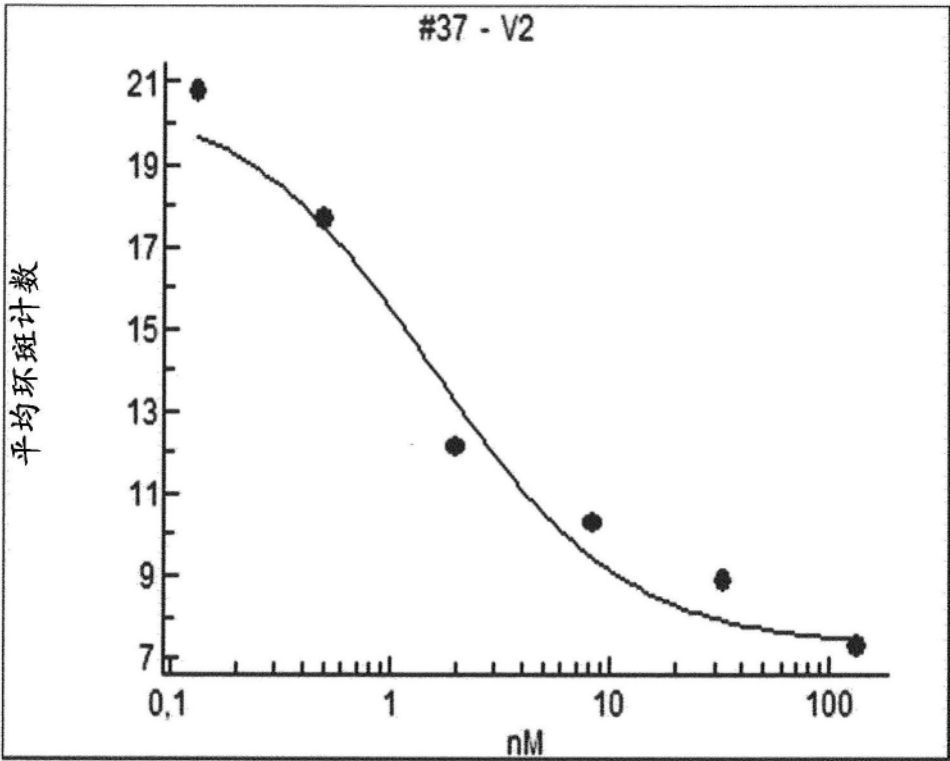


图12C(续)

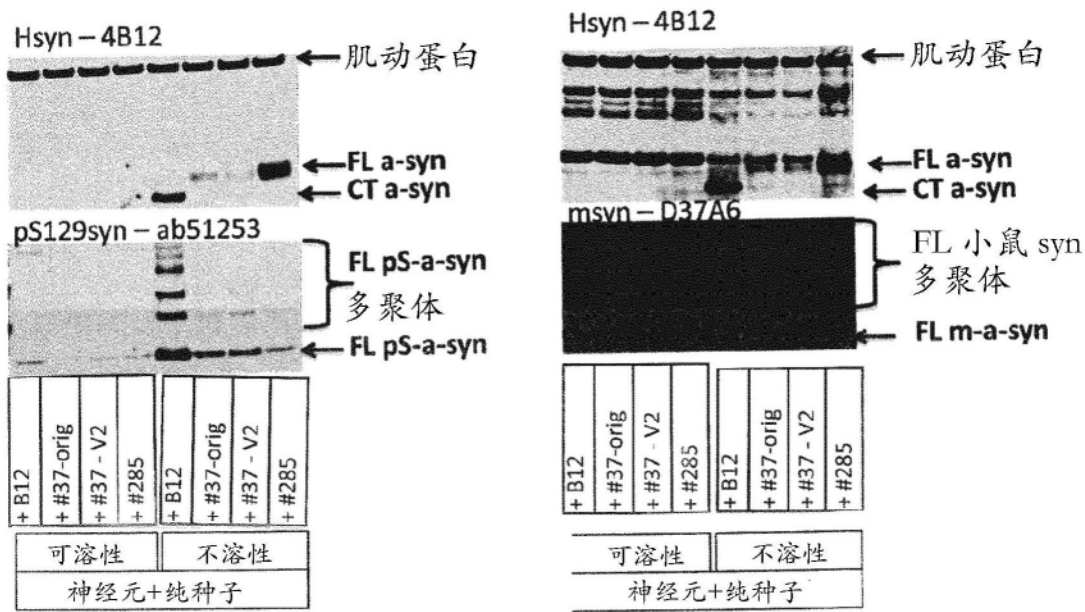


图12D

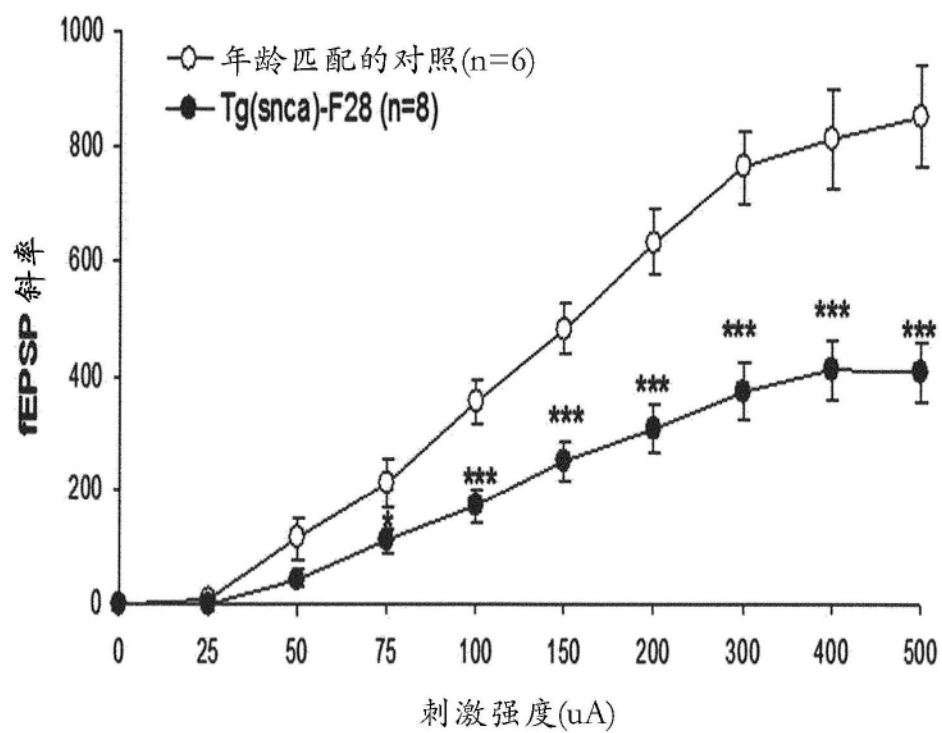


图13

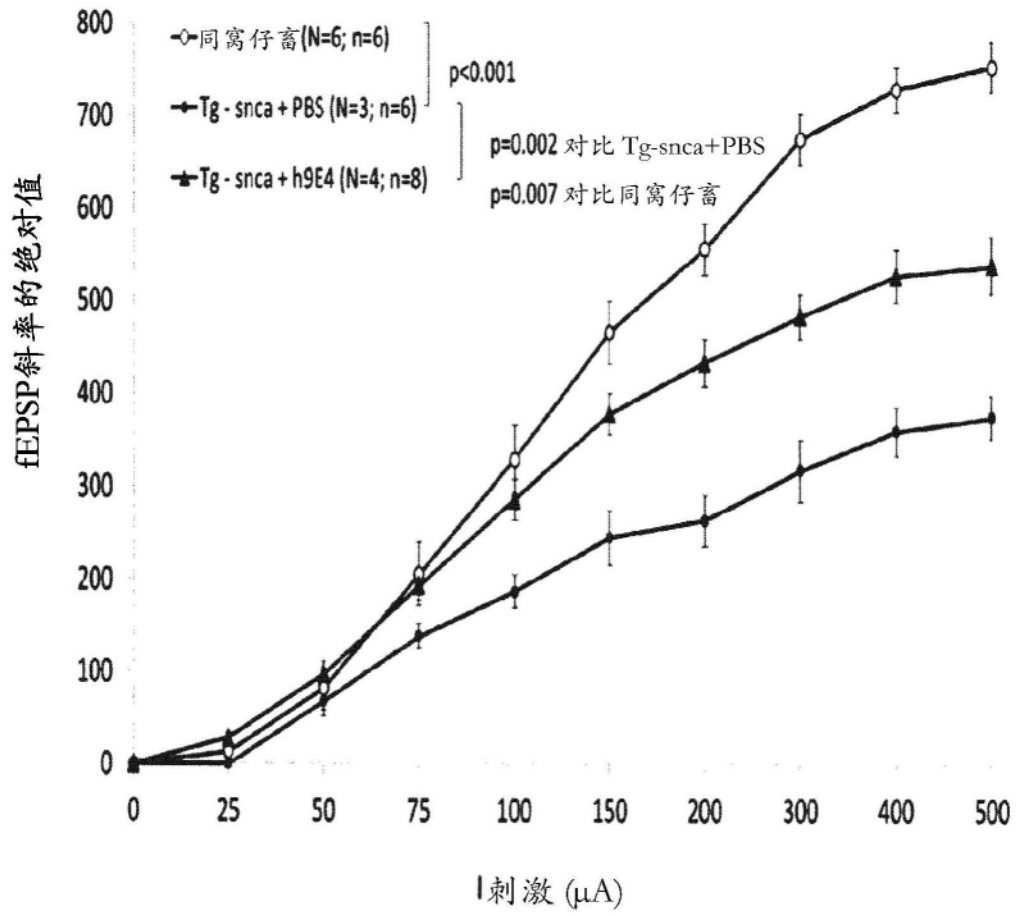


图14

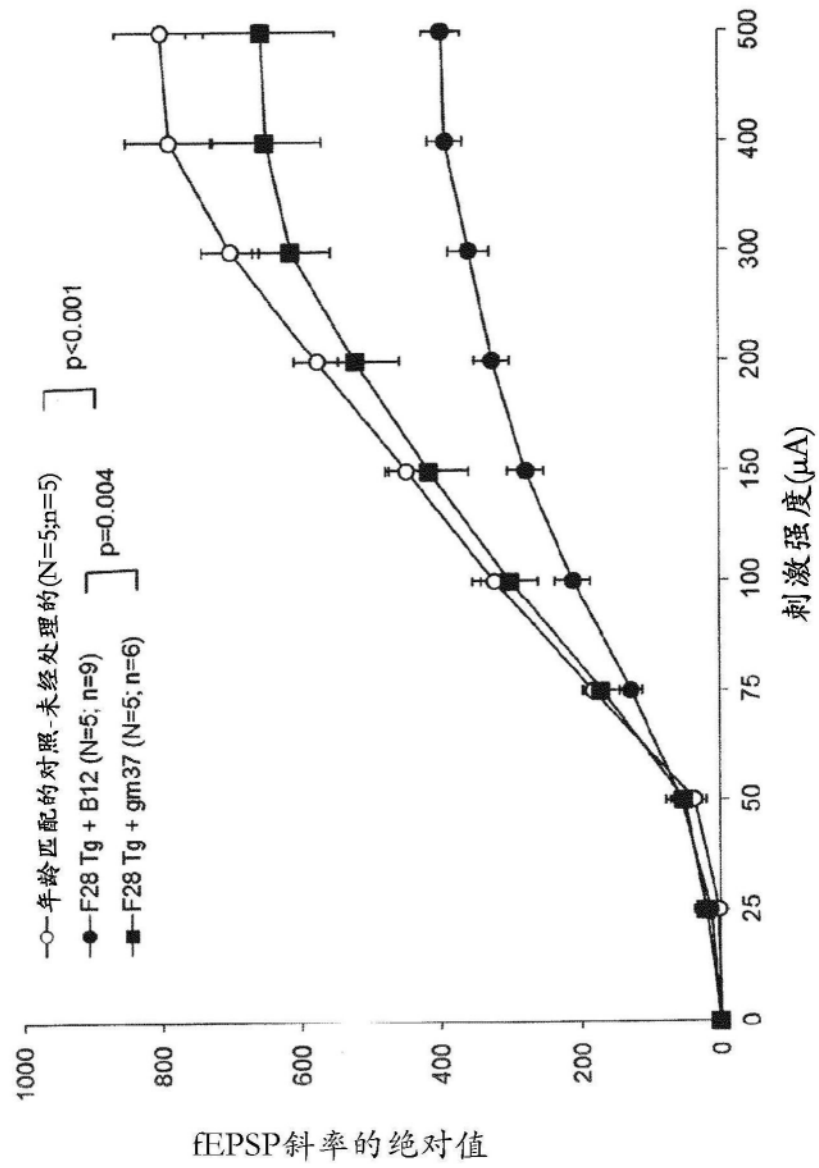


图15

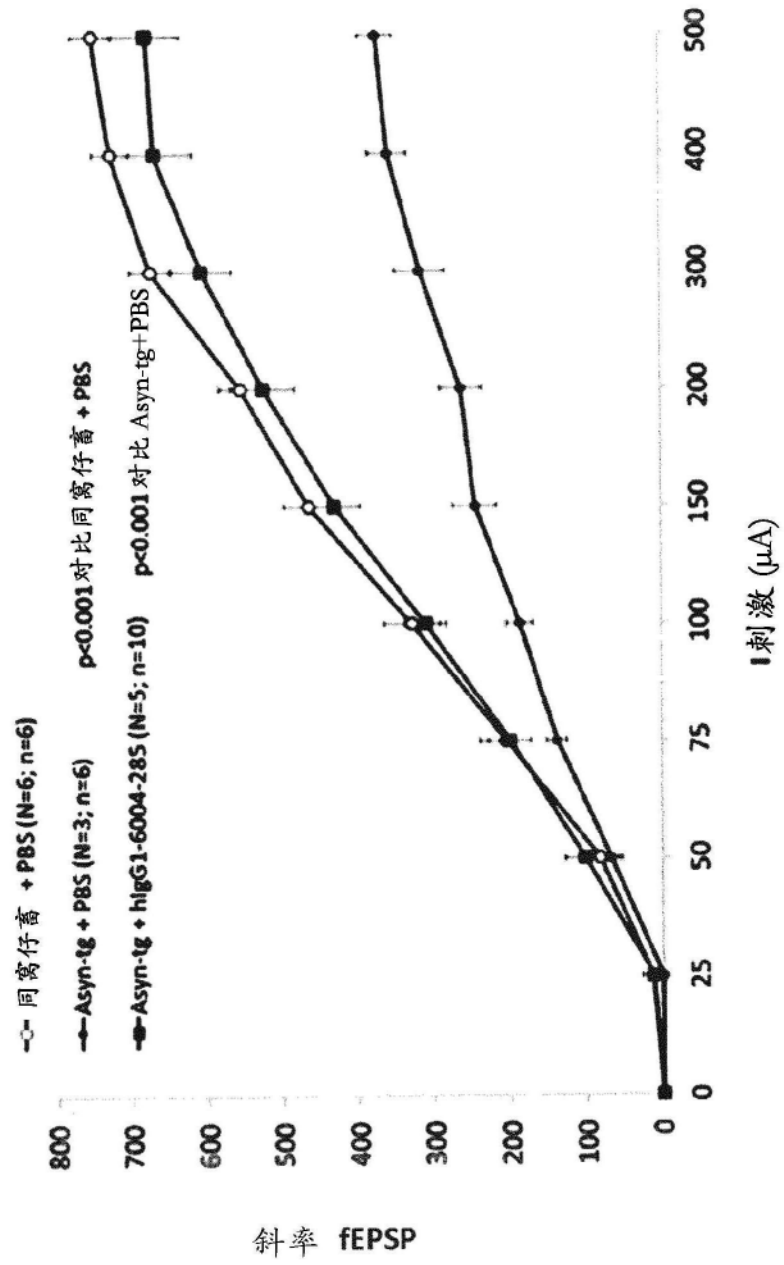


图16

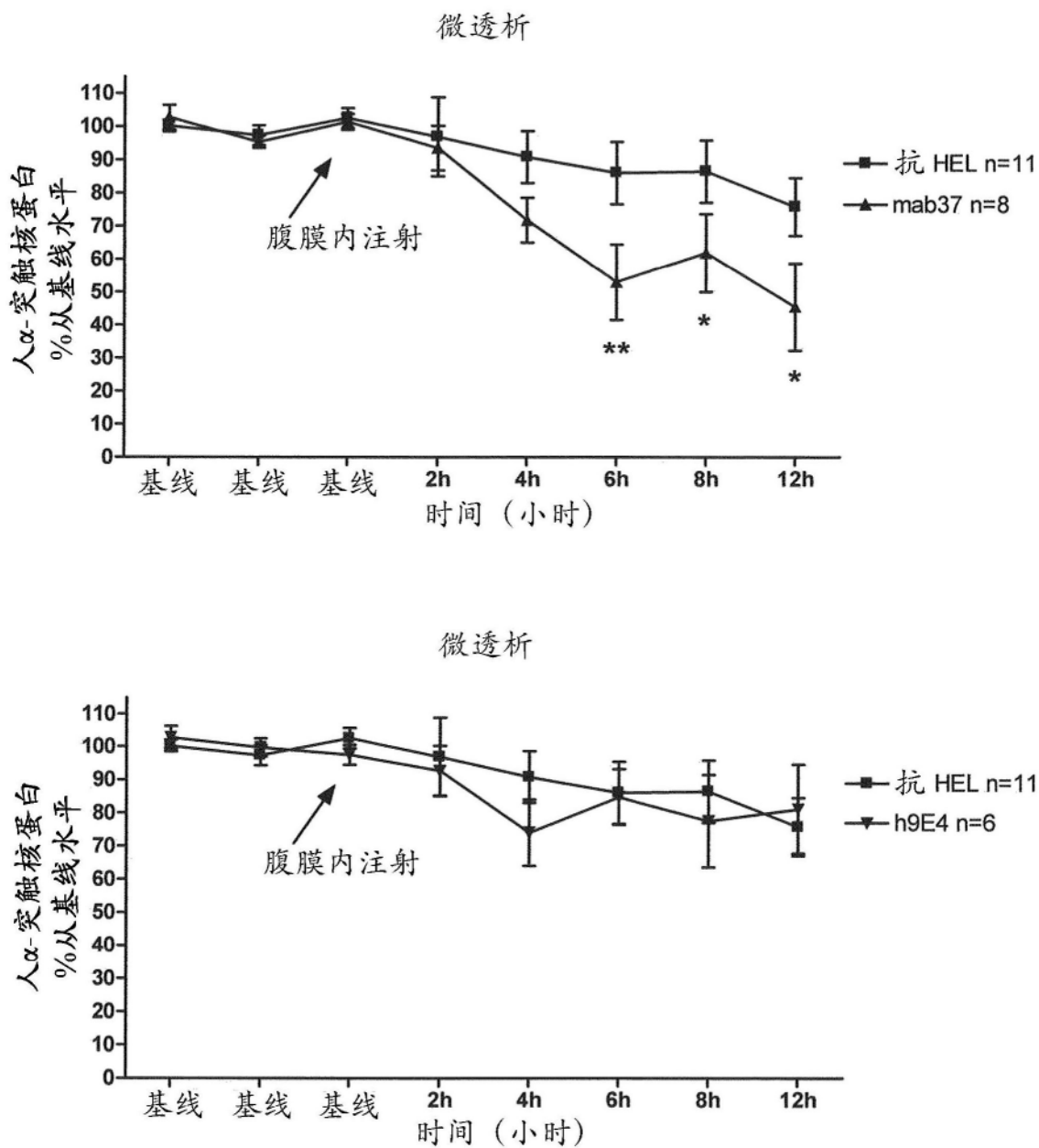


图17

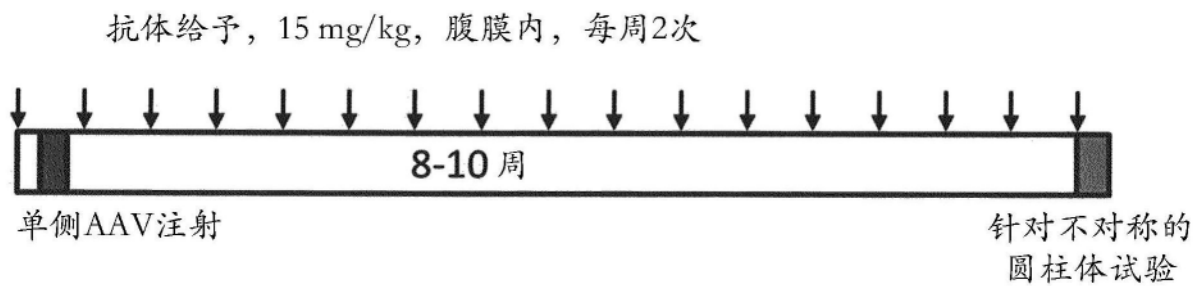


图18

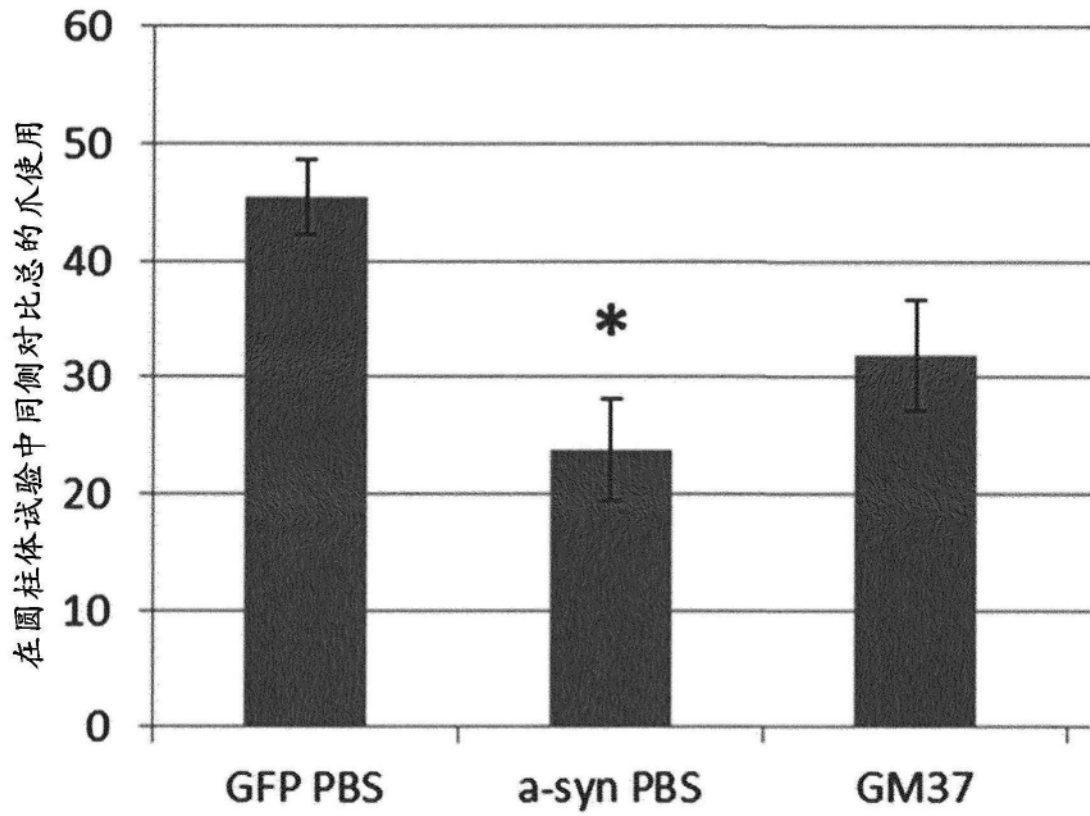


图19

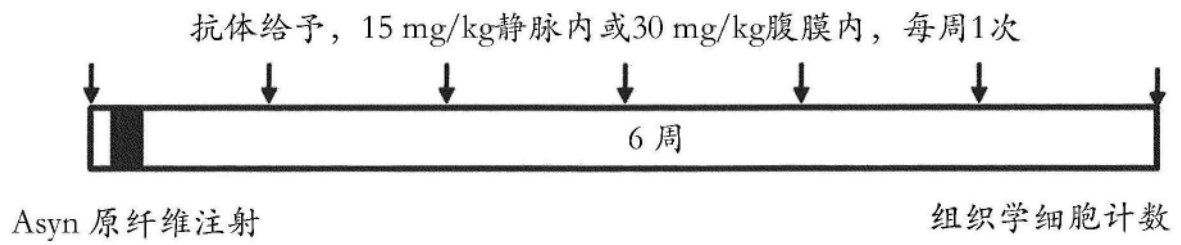


图20A

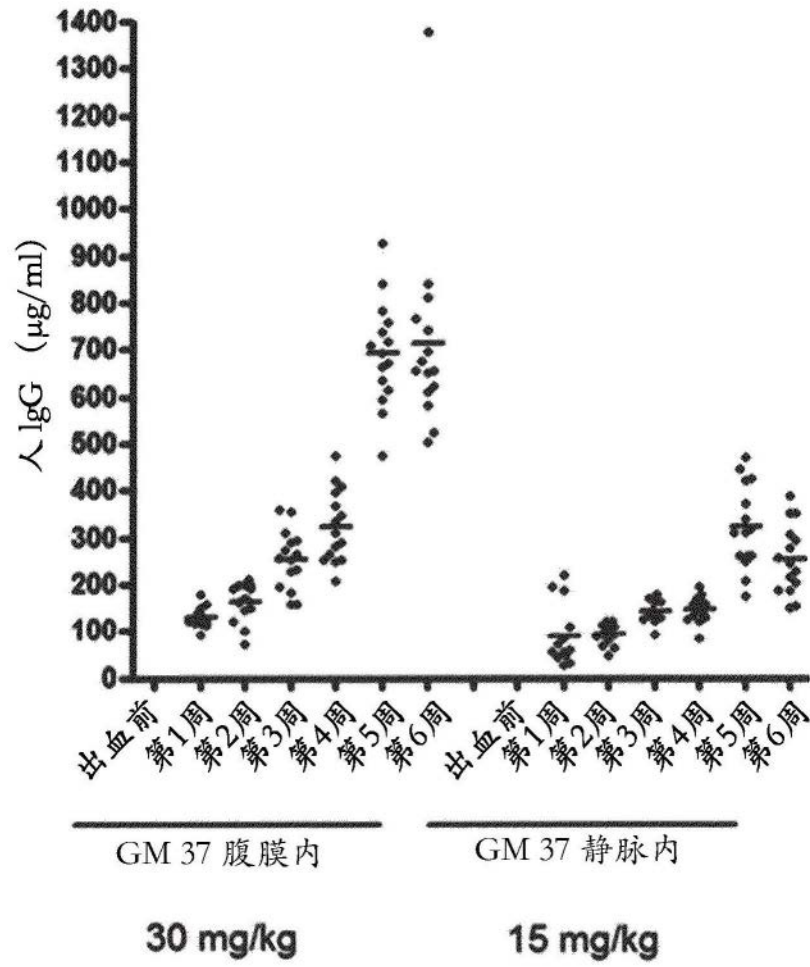


图20B

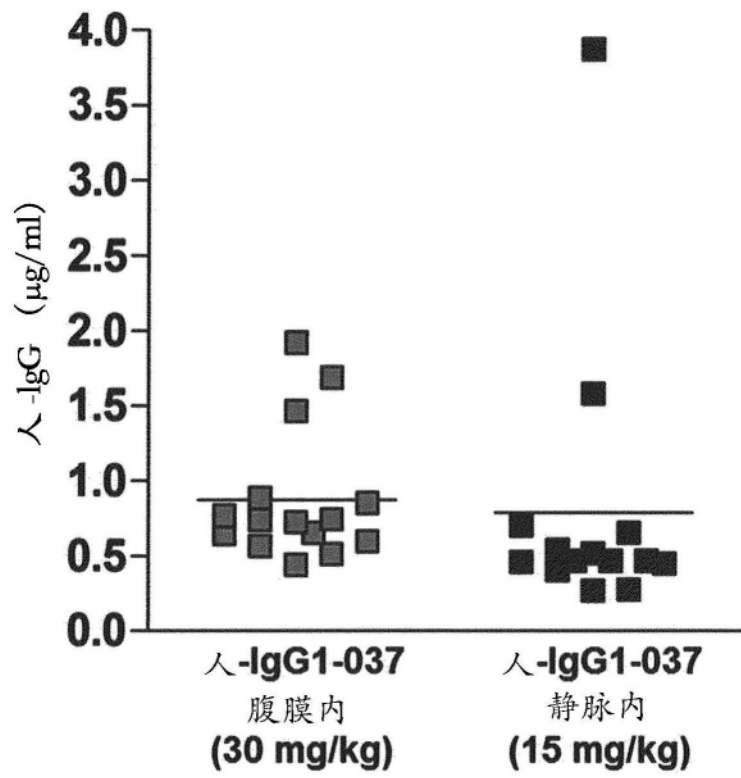


图20C

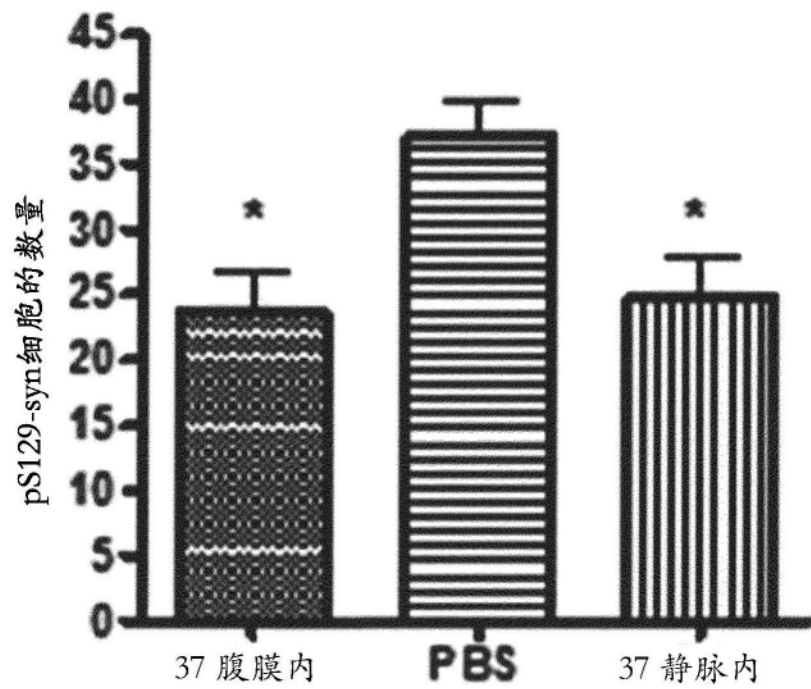


图20D

|    | $\alpha$ -突触核蛋白(P37840) | $\beta$ -突触核蛋白(Q16143) | $\gamma$ -突触核蛋白(O76070) |
|----|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1  | M                       | M                      | M                       |
| 2  | D                       | D                      | D                       |
| 3  | V                       | V                      | V                       |
| 4  | F                       | F                      | F                       |
| 5  | M                       | M                      | K                       |
| 6  | K                       | K                      | K                       |
| 7  | L                       | L                      | G                       |
| 8  | S                       | S                      | F                       |
| 9  | K                       | M                      | S                       |
| 10 | K                       | I                      | I                       |
| 11 | A                       | A                      | A                       |
| 12 | K                       | K                      | K                       |
| 13 | E                       | E                      | E                       |
| 14 | G                       | G                      | G                       |
| 15 | V                       | V                      | V                       |
| 16 | V                       | V                      | V                       |
| 17 | A                       | A                      | G                       |
| 18 | A                       | A                      | V                       |
| 19 | A                       | A                      | A                       |
| 20 | E                       | E                      | E                       |
| 21 | K                       | K                      | K                       |
| 22 | T                       | T                      | T                       |
| 23 | K                       | K                      | K                       |
| 24 | Q                       | Q                      | Q                       |
| 25 | G                       | G                      | G                       |
| 26 | V                       | V                      | V                       |
| 27 | A                       | T                      | T                       |
| 28 | E                       | E                      | E                       |
| 29 | A                       | A                      | A                       |
| 30 | A                       | A                      | A                       |
| 31 | G                       | E                      | E                       |
| 32 | T                       | K                      | K                       |
| 33 | K                       | K                      | K                       |
| 34 | E                       | E                      | E                       |
| 35 | G                       | G                      | G                       |
| 36 | E                       | E                      | E                       |
| 37 | V                       | V                      | V                       |
| 38 | L                       | L                      | M                       |
| 39 | Y                       | Y                      | Y                       |
| 40 | V                       | V                      | V                       |
| 41 | G                       | G                      | G                       |
| 42 | S                       | S                      | A                       |
| 43 | K                       | K                      | K                       |
| 44 | T                       | T                      | T                       |
| 45 | K                       | R                      | K                       |
| 46 | E                       | E                      | E                       |
| 47 | G                       | G                      | N                       |
| 48 | V                       | V                      | V                       |
| 49 | V                       | V                      | V                       |
| 50 | H                       | Q                      | Q                       |
| 51 | G                       | G                      | S                       |
| 52 | V                       | V                      | V                       |
| 53 | A                       | A                      | T                       |
| 54 | T                       | S                      | S                       |
| 55 | V                       | V                      | V                       |
| 56 | A                       | A                      | A                       |
| 57 | E                       | E                      | E                       |
| 58 | K                       | K                      | K                       |
| 59 | T                       | T                      | T                       |
| 60 | K                       | K                      | K                       |
| 61 | E                       | E                      | E                       |
| 62 | Q                       | Q                      | Q                       |
| 63 | V                       | A                      | A                       |
| 64 | T                       | S                      | N                       |
| 65 | N                       | H                      | A                       |
| 66 | V                       | L                      | V                       |
| 67 | G                       | G                      | S                       |
| 68 | A                       | A                      | E                       |
| 69 | V                       | V                      | V                       |
| 70 | V                       | V                      | V                       |
| 71 | V                       | F                      | S                       |
| 72 | S                       | S                      | S                       |
| 73 | S                       | S                      | S                       |

图21

图21(续)

|    | 人(P37840) | 食蟹猴(P61142) | 大鼠(P37377) | 小鼠(O55042) |    | 人(P37840) | 食蟹猴(P61142) | 大鼠(P37377) | 小鼠(O55042) |
|----|-----------|-------------|------------|------------|----|-----------|-------------|------------|------------|
| 1  | M         | M           | M          | M          | 36 | G         | G           | G          | G          |
| 2  | D         | D           | D          | D          | 37 | V         | V           | V          | V          |
| 3  | F         | F           | F          | F          | 38 | L         | L           | L          | L          |
| 4  | M         | M           | M          | M          | 39 | Y         | Y           | Y          | Y          |
| 5  | K         | K           | K          | K          | 40 | V         | V           | V          | V          |
| 6  | K         | K           | K          | K          | 41 | G         | G           | G          | G          |
| 7  | G         | G           | G          | G          | 42 | S         | S           | S          | S          |
| 8  | L         | L           | L          | L          | 43 | K         | K           | K          | K          |
| 9  | S         | S           | S          | S          | 44 | T         | T           | T          | T          |
| 10 | K         | K           | K          | K          | 45 | K         | K           | K          | K          |
| 11 | A         | A           | A          | A          | 46 | E         | E           | E          | E          |
| 12 | K         | K           | K          | K          | 47 | G         | G           | G          | G          |
| 13 | E         | E           | E          | E          | 48 | V         | V           | V          | V          |
| 14 | V         | V           | V          | V          | 49 | V         | V           | V          | V          |
| 15 | V         | V           | V          | V          | 50 | H         | H           | H          | H          |
| 16 | A         | A           | A          | A          | 51 | G         | G           | G          | G          |
| 17 | A         | A           | A          | A          | 52 | V         | V           | V          | V          |
| 18 | A         | A           | A          | A          | 53 | A         | A           | T          | T          |
| 19 | A         | A           | A          | A          | 54 | T         | T           | T          | T          |
| 20 | E         | E           | E          | E          | 55 | V         | V           | V          | V          |
| 21 | K         | K           | K          | K          | 56 | A         | A           | A          | A          |
| 22 | T         | T           | T          | T          | 57 | E         | E           | E          | E          |
| 23 | K         | K           | K          | K          | 58 | K         | K           | K          | K          |
| 24 | Q         | Q           | Q          | Q          | 59 | T         | T           | T          | T          |
| 25 | G         | G           | G          | G          | 60 | K         | K           | K          | K          |
| 26 | V         | V           | V          | V          | 61 | E         | E           | E          | E          |
| 27 | A         | A           | A          | A          | 62 | Q         | Q           | Q          | Q          |
| 28 | E         | E           | E          | E          | 63 | V         | V           | V          | V          |
| 29 | A         | A           | A          | A          | 64 | T         | T           | T          | T          |
| 30 | A         | A           | A          | A          | 65 | N         | N           | N          | N          |
| 31 | G         | G           | G          | G          | 66 | V         | V           | V          | V          |
| 32 | K         | K           | K          | K          | 67 | G         | G           | G          | G          |
| 33 | T         | T           | T          | T          | 68 | G         | G           | G          | G          |
| 34 | E         | E           | E          | E          | 69 | V         | V           | V          | V          |
| 35 | K         | K           | K          | K          | 70 | A         | A           | A          | A          |

图22

|     | 人(P37840) | 食蟹猴(P61142) | 大鼠(P37377) | 小鼠(O55042) |     | 人(P37840) | 食蟹猴(P61142) | 大鼠(P37377) | 小鼠(O55042) |
|-----|-----------|-------------|------------|------------|-----|-----------|-------------|------------|------------|
| 71  | V         | V           | V          | V          | 106 | G         | G           | G          | G          |
| 72  | T         | T           | T          | T          | 107 | A         | A           | Y          | Y          |
| 73  | G         | G           | G          | G          | 108 | P         | P           | P          | P          |
| 74  | V         | V           | V          | V          | 109 | Q         | Q           | Q          | Q          |
| 75  | A         | A           | A          | A          | 110 | E         | E           | E          | E          |
| 76  | T         | T           | T          | T          | 111 | G         | G           | G          | G          |
| 77  | V         | V           | V          | V          | 112 | I         | I           | I          | I          |
| 78  | A         | A           | A          | A          | 113 | L         | L           | L          | L          |
| 79  | Q         | Q           | Q          | Q          | 114 | E         | Q           | E          | E          |
| 80  | K         | K           | K          | K          | 115 | D         | D           | D          | D          |
| 81  | T         | T           | T          | T          | 116 | M         | M           | M          | M          |
| 82  | V         | V           | V          | V          | 117 | P         | P           | P          | P          |
| 83  | E         | E           | E          | E          | 118 | V         | V           | V          | V          |
| 84  | G         | G           | G          | G          | 119 | D         | D           | D          | D          |
| 85  | A         | A           | A          | A          | 120 | P         | P           | P          | P          |
| 86  | S         | S           | N          | N          | 121 | D         | S           | S          | G          |
| 87  | I         | I           | I          | I          | 122 | N         | N           | S          | S          |
| 88  | A         | A           | A          | A          | 123 | E         | E           | E          | E          |
| 89  | A         | A           | A          | A          | 124 | A         | A           | A          | A          |
| 90  | A         | A           | A          | A          | 125 | Y         | Y           | Y          | Y          |
| 91  | T         | T           | T          | T          | 126 | M         | M           | M          | M          |
| 92  | G         | G           | G          | G          | 127 | P         | P           | P          | P          |
| 93  | F         | F           | F          | F          | 128 | S         | S           | S          | S          |
| 94  | V         | I           | V          | V          | 129 | S         | S           | S          | S          |
| 95  | K         | K           | K          | K          | 130 | E         | E           | E          | E          |
| 96  | K         | K           | K          | K          | 131 | E         | E           | E          | E          |
| 97  | K         | K           | K          | K          | 132 | G         | G           | G          | G          |
| 98  | D         | D           | D          | D          | 133 | Y         | Y           | Y          | Y          |
| 99  | Q         | Q           | Q          | Q          | 134 | D         | D           | D          | D          |
| 100 | L         | M           | M          | M          | 135 | D         | D           | D          | D          |
| 101 | G         | G           | G          | G          | 136 | Y         | Y           | Y          | Y          |
| 102 | K         | K           | K          | K          | 137 | E         | E           | E          | E          |
| 103 | N         | G           | G          | G          | 138 | P         | P           | P          | P          |
| 104 | E         | E           | E          | E          | 139 | E         | E           | E          | E          |
| 105 | E         | E           | E          | E          | 140 | A         | A           | A          | A          |

图22(续)

| 产物       | 批号            | 浓度 <sup>#</sup> (mg/ml) | 体积 <sup>#</sup> (ml) | 产率 <sup>#</sup> (mg) | 滴度 <sup>†</sup> (mg/L) |
|----------|---------------|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| GM37_野生型 | 319-121115-01 | 2.11                    | 6.0                  | 12.6                 | 31.6                   |
| GM37_变体1 | 319-121115-02 | 1.70                    | 5.0                  | 8.5                  | 21.2                   |
| GM37_变体2 | 319-121115-03 | 2.57                    | 5.8                  | 14.9                 | 37.2                   |
| GM37_变体3 | 319-121115-04 | 1.85                    | 5.0                  | 9.3                  | 23.2                   |

图23

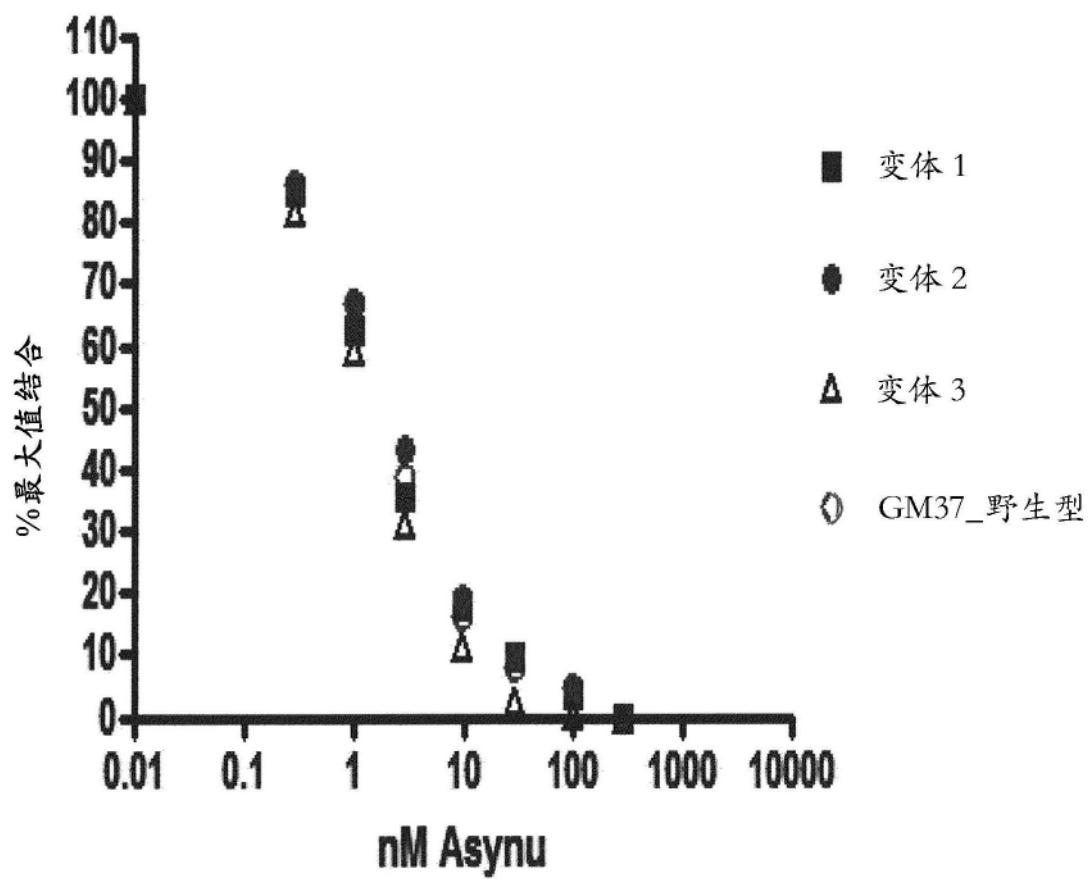


图24

| 样品            | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (nM) | R最大值 (TU) | Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> ) | U值 |
|---------------|-----------|----------|---------|-----------|-------------------------------------|----|
| GM37_野生型, 第2批 | 7,01E+05  | 1,92E-02 | 27      | 1,4       | 0,0022                              | 3  |
| GM37_野生型, 第1批 | 5,28E+05  | 1,48E-02 | 28      | 1,5       | 0,0024                              | 2  |
| GM37_变体1      | 6,34E+05  | 1,37E-02 | 22      | 1,5       | 0,0022                              | 2  |
| GM37_变体2      | 4,15E+05  | 1,24E-02 | 30      | 1,4       | 0,0021                              | 3  |
| GM37_变体3      | 5,77E+05  | 2,28E-02 | 40      | 1,5       | 0,0016                              | 2  |
| 同种型对照         |           |          | 无       | 无         |                                     |    |

图25

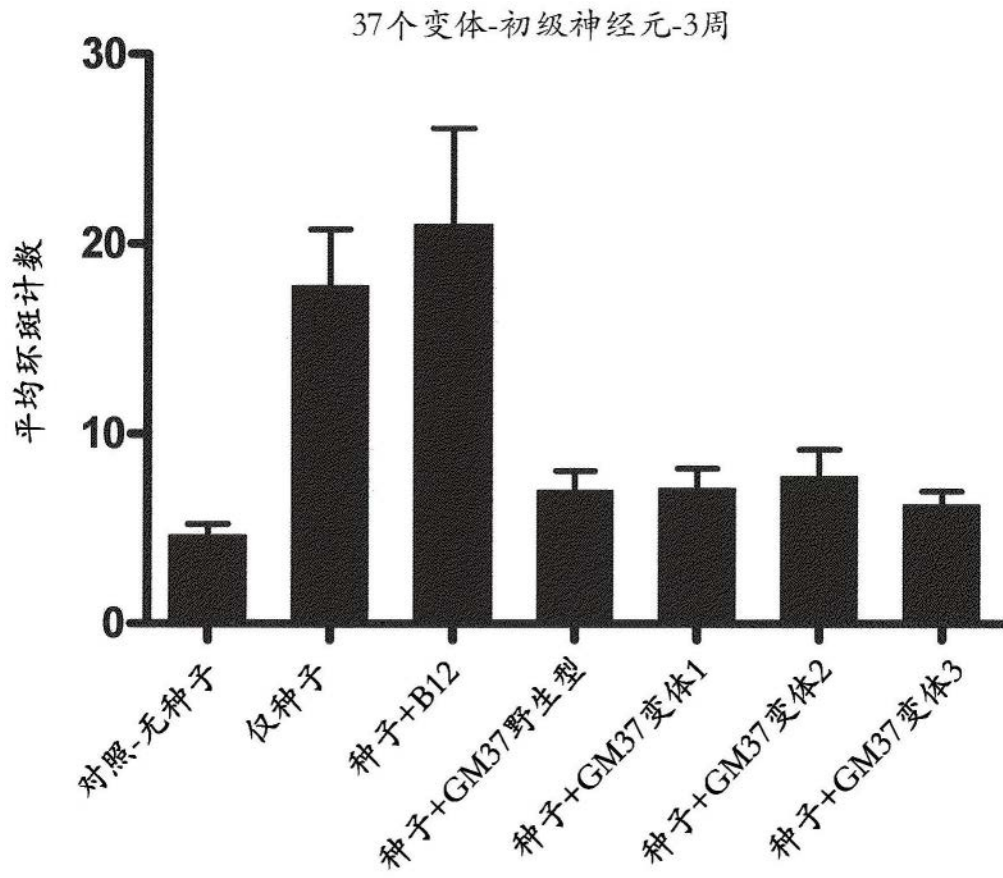


图26

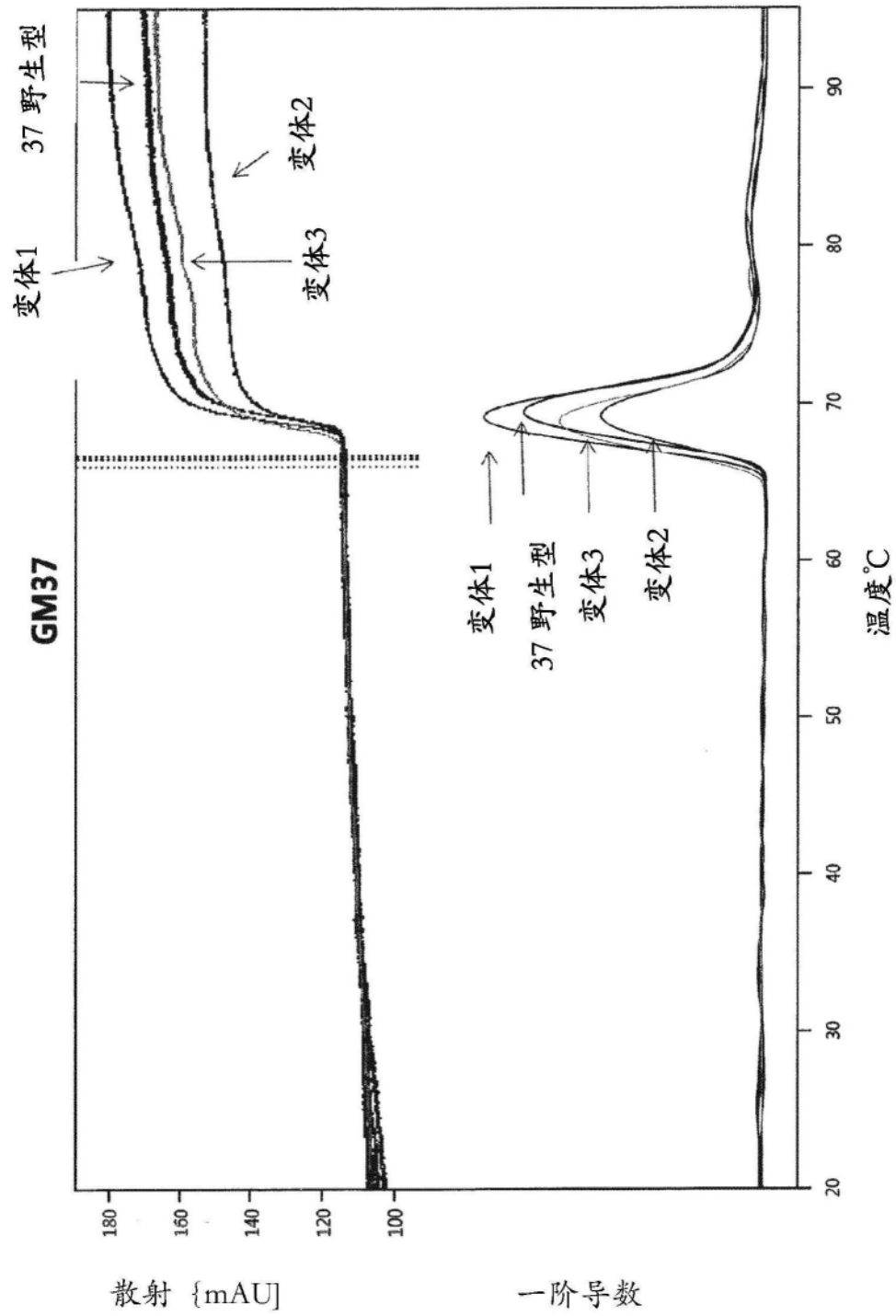


图27