



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I765890 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：106118078

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/06/02 美國

62/344,746

(71)申請人：英商梅迪繆思有限公司 (英國) MEDIMMUNE LIMITED (GB)

英國

(72)發明人：史考菲爾德 戴倫 SCHOFIELD, DARREN (GB)；普金頓 麥可 PERKINTON, MICHAEL (GB)；爾文 洛藍尼 IRVING, LORRAINE (GB)；托姆 喬治 THOM, GEORGE (GB)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 102869680A

WO 2008/103472A2

期刊 Dora Games et al., "Reducing C-Terminal-Truncated Alpha-Synuclein by Immunotherapy Attenuates Neurodegeneration and Propagation in Parkinson's Disease-Like Models", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 34, no. 28, 9 July 2014, pages 9441-9454.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：19 共 135 頁

(54)名稱

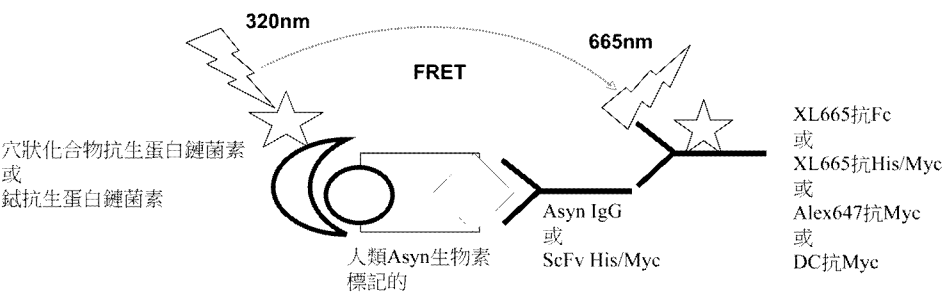
針對 α -突觸核蛋白之抗體及其用途

(57)摘要

本發明提供抗體，該抗體以高親和性特異性結合人類 α -突觸核蛋白且降低 α -突觸核蛋白在活體內擴散；包含該等抗體或其抗原結合片段之重組多肽及用於產生此類多肽之方法；以及用於產生 α -突觸核蛋白抗體之組合物及方法；以及使用 α -突觸核蛋白抗體以用於治療中樞神經系統之疾病 (特定言之 α -突觸核蛋白病) 的方法。

The invention provides antibodies that specifically bind human α -synuclein with a high affinity and reduces α -synuclein spreading in vivo, recombinant polypeptides comprising said antibodies or antigen-binding fragment thereof and methods for generating such polypeptides, as well as compositions and methods for generating α -synuclein antibodies, and methods of using α -synuclein antibodies for the treatment of diseases of the central nervous system, in particular alpha-synucleinopathies.

指定代表圖：



【圖1】



I765890

公告本

【發明摘要】

申請日：106/06/01

IPC分類：C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

【中文發明名稱】

針對 α -突觸核蛋白之抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTIBODIES TO ALPHA-SYNUCLEIN AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供抗體，該抗體以高親和性特異性結合人類 α -突觸核蛋白且降低 α -突觸核蛋白在活體內擴散；包含該等抗體或其抗原結合片段之重組多肽及用於產生此類多肽之方法；以及用於產生 α -突觸核蛋白抗體之組合物及方法；以及使用 α -突觸核蛋白抗體以用於治療中樞神經系統之疾病(特定言之 α -突觸核蛋白病)的方法。

【英文】

The invention provides antibodies that specifically bind human α -synuclein with a high affinity and reduces α -synuclein spreading in vivo, recombinant polypeptides comprising said antibodies or antigen-binding fragment thereof and methods for generating such polypeptides, as well as compositions and methods for generating α -synuclein antibodies, and methods of using α -synuclein antibodies for the treatment of diseases of the central nervous system, in particular alpha-synucleinopathies.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

針對 α -突觸核蛋白之抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTIBODIES TO ALPHA-SYNUCLEIN AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明係關於 α -突觸核蛋白抗體及其在預防或治療疾病，特定言之 α -突觸核蛋白病且更特定言之帕金森氏病(Parkinson's disease，PD)中的用途。

【先前技術】

α -突觸核蛋白病(亦稱為路易體病(Lewy body disease，LBD))為均以其核心 α -突觸核蛋白作為關鍵病理標誌的神經退化性疾病的家族(Jellinger, Mov Disord (2003), 18增刊6: S2-12；及Spillantini及Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27；兩者均以引用之方式併入本文中)。 α -突觸核蛋白病包括帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(dementia with Lewy bodies，DLB)及多發性系統萎縮症(MSA)。

PD為影響大於1%之超過65歲之人類的緩慢進行性老年性運動障礙。PD為在阿爾滋海默症(Alzheimer's disease)之後的第二最常見神經退化性病況。

α -突觸核蛋白病之界定標誌病變為路易體及路易神經突，該等路易體及路易神經突為在屍檢後組織病理學檢查時顯示之大腦之神經元內部發現的聚集蛋白質的不溶包含物。

非運動大腦區(諸如，基底前腦、中腦橋系統、杏仁體、新皮質、迷

走神經之拮運動核、嗅球、藍斑(locus coeruleus)及腦幹)中之路易病變及神經元缺失之存在可造成認知缺陷及癡呆、嗅覺減退、睡眠紊亂(包括快速眼部運動睡眠行為障礙(RBD))、情緒障礙(包括抑鬱症及焦慮症)、自主功能障礙(包括心臟血管問題及諸如便秘之腸胃問題)及疲乏與嗜睡。此等非運動症狀中的一些似乎表徵疾病之運動前期或前驅性期(Kalia等人 Lancet (2015), 386(9996): 896-912；以引用之方式併入本文中)。

運動大腦區中之路易病變及神經元缺失之存在(最值得注意地包括黑質中之多巴胺激導性神經元之死亡)可造成靜止震顫、僵硬、動作遲緩及姿勢不穩定(Spillantini及Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27；以引用之方式併入本文中)。

α -突觸核蛋白(Alpha-synuclein) (亦稱為「 α -突觸核蛋白(α -synuclein)」或「 α -syn」)蛋白質為路易體及路易神經突之主要結構成分。 α -突觸核蛋白為由140個胺基酸組成之小型酸性蛋白質(14 kDa)。人類天然野生型 α -突觸核蛋白具有如在UniProtKB寄存編號P37840下描述之胺基酸序列SEQ ID NO: 1。除非自上下文另外清楚的，否則對於 α -突觸核蛋白或其片段之參考包括上文所指示之天然人類野生型胺基酸序列及其人類對偶基因變異體，特定言之與路易體疾病相關聯之彼等變異體(例如，E46K、A30P、H50Q、G51D及A53T，其中首字母指示SEQ ID NO: 1中之胺基酸，數字為SEQ ID NO: 1中之密碼子位置，且第二字母為對偶基因變異體中之胺基酸)。此類變異體可視情況單獨地存在或以任何組合存在。增強 α -突觸核蛋白聚集之經誘導突變E83Q、A90V、A76T亦可單獨地存在或與彼此組合存在及/或與人類對偶基因變異體(E46K、A30P、H50Q、G51D及A53T)組合存在。在結構層面上， α -突觸核蛋白包含三個

獨特的區：兩親性的N端 α -螺旋域，其具有脂質及膜結合特性(殘基1至60)；中央疏水性的澱粉狀蛋白結合域，其編碼斑塊之非澱粉狀蛋白 β 成分(NAC) (殘基61至95)及富含酸性脯胺酸的C端尾端(殘基96至140)。威信NAC域之殘基71至82藉由使蛋白質能夠自無規捲曲結構轉換成 β -片狀結構而成為 α -突觸核蛋白之聚集/纖維化特性的關鍵(Bisaglia等人FASEB J (2009), 23(2): 329-40；以引用之方式併入本文中)。儘管C端域不含顯著二級結構，但其在殘基Ser129及在胞溶質 α -突觸核蛋白包涵物中硝化之多個酪胺酸殘基處含有關鍵磷酸化位點。 α -突觸核蛋白之N端及C端截斷形式亦存在。蛋白質之轉譯後修飾可影響 α -突觸核蛋白聚集及毒性(Oueslati等人 Prog Brain Res (2010), 183: 115-45；以引用之方式併入本文中)。

α -突觸核蛋白在中樞神經系統(CNS)/大腦中為豐富的，其中該 α -突觸核蛋白在神經元及神經膠質中之胞內以及腦脊髓液(CSF)中(Mollenhauer等人 J Neural Transm (2012), 119(7): 739-46；以引用之方式併入本文中)與沐浴且包圍大腦細胞之間質液(ISF) (Emmanouilidou等人 PLoS One (2011), 6(7): e22225；以引用之方式併入本文中)之胞外兩者中存在。 α -突觸核蛋白為顯著在以下之神經元中表現之突觸蛋白質：新皮質、海馬體、黑質、視丘及小腦(Iwai等人 Neuron (1995), 14: 467-475；以引用之方式併入本文中)。在生理性條件下，其係位於神經元突觸末梢中且在獲取相關的突觸重排期間在突觸前末梢處特異性地上調(Fortin等人 J Neurosci (2005), 25: 10913-10921；以引用之方式併入本文中)。

活體外研究已展示， α -突觸核蛋白單體可形成用於聚集過程的起始點。單體可集成各種小型寡聚物種，該等小型寡聚物種接著利用 β 片狀相互作用穩定化，繼續形成可聚合成不可溶原纖維性結構之原原纖維，使

人聯想到在路易體中鑑別出之彼等(Cremades等人 Cell (2012), 149(5): 1048-59；以引用之方式併入本文中)。

在病理性條件下，異常 α -突觸核蛋白聚集可能對於在 α -突觸核蛋白病中見到之病理性改變為關鍵的(Lashuel等人 Nature (2002), 418: 291；及Tsigelny等人 FEBS Journal (2007), 274: 1862-1877；兩者以引用之方式併入本文中)。活體外及活體內研究已展示， α -突觸核蛋白之神經毒性效果似乎係由小型可溶寡聚構象異構體或原原纖維引起(Winner等人 Proc Natl Acad Sci U S A (2011), 108(10): 4194-9；及Danzer等人 J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32；兩者以引用之方式併入本文中)。儘管 α -突觸核蛋白之原纖維聚集體係PD之特徵，但 α -突觸核蛋白之寡聚形式係毒性物種(Danzer等人 J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32；Lashuel等人 Nature (2002), 418: 291；及Winner等人 Proc Natl Acad Sci USA (2011), 108: 4194-4199；其中之各者以引用之方式併入本文中)。

α -突觸核蛋白寡聚物可被釋放至胞外環境且由鄰近細胞以「傳播」機制吸收(Angot及Brundin, Parkinsonism Relat Disord (2009), 15增刊3: S143-147；Desplats等人 Proc Natl Acad Sci USA (2009), 106: 13010-13015；及Lee等人 J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272；其中之各者以引用之方式併入本文中)。 α -突觸核蛋白之聚集體可經由朊病毒樣擴散機制來傳播錯誤摺疊(Lee等人 Nat Rev Neurol (2010), 6: 702-706；Luk等人 J Exp Med (2012), 209(5): 975-86；及Luk等人 Science (2012), 338(6109): 949-53；其中之各者以引用之方式併入本文中)。因此， α -突觸核蛋白可藉由寡聚物毒性或傳播及朊病毒樣擴散來誘發神經退化。

現已良好確立且公認，包括神經元之細胞在正常條件下以及在細胞

應激之條件下可分泌不同形式之 α -突觸核蛋白(單體、寡聚物、聚集體)，在細胞應激條件下單體及聚集形式之 α -突觸核蛋白之分泌提高，且經由 α -突觸核蛋白至胞外環境中之此釋放，病理性傳染性形式之 α -突觸核蛋白可在神經元之間傳播(Recasens及Dehay, *Front Neuroanat* (2014), 8: 159；以引用之方式併入本文中)。

α -突觸核蛋白在PD中之作用可延伸超出對脆弱的神經元細胞之立即損害。像大部分神經退化性疾病一樣，亦觀測到促發炎細胞反應(Lee等人 *J Biol Chem* (2010), 285: 9262-9272；以引用之方式併入本文中)。循環 α -突觸核蛋白及/或活化的星形膠質細胞可活化微神經膠質細胞，從而導致反應性氧物種之產生、氧化氮及細胞介素製造提高，且進一步加重神經退化(Lee等人 *J Biol Chem* (2010), 285: 9262-9272；以引用之方式併入本文中)。

各種不同實驗模型已證實 α -突觸核蛋白在培養細胞中之細胞至細胞傳遞，或 α -突觸核蛋白病變之活體內擴散及傳播。已經在將移植物以治療方式移植至PD患者之紋狀體中超過10年後的胚胎中腦神經元移植物內觀測到路易體病變。具體言之，移植的神經元含有 α -突觸核蛋白染色陽性之多個路易體樣包涵物，從而指示， α -突觸核蛋白病變之宿主至移植物傳遞已出現(Li等人 *Nat Med* (2008), 14(5): 501-3；及Kordower等人 *Nat Med* (2008), 14(5): 504-6；兩者以引用之方式併入本文中)。

此外，預先形成的重組 α -突觸核蛋白原纖維及 α -突觸核蛋白寡聚物可由培養細胞及神經元內化，且已經證實在類似於路易病變之 α -突觸核蛋白包涵物之形成之情況下 α -突觸核蛋白自供體至受體細胞之直接轉移(Danzer等人 *J Neurosci* (2007), 27(34): 9220-32；Volpicelli-Daley等人

Neuron (2011), 72(1): 57-71 ; 及Luk等人 Proc Natl Acad Sci U S A (2009), 106(47): 20051-6 ; 其中之各者以引用之方式併入本文中)。將自老齡 α -突觸核蛋白轉殖基因小鼠之大腦提取之含有預先形成的合成 α -突觸核蛋白原纖維或路易體樣 α -突觸核蛋白的物質注射至無症狀受體小鼠之大腦中，促進路易體樣病變在受體動物之宿主神經元中形成以及神經退化及神經缺陷(Luk等人 J Exp Med (2012), 209(5): 975-86 ; 及Luk等人 Science (2012), 338(6109): 949-53 ; 兩者以引用之方式併入本文中)。接種至獼猴及小鼠之黑質或紋狀體中的自PD大腦分離的含有 α -突觸核蛋白之路易體提取物由宿主細胞快速吸收(在24小時內)，接著紋狀體多巴胺激導性末梢較慢缺失(其中在超過一年之後細胞缺失明顯)(Recasens等人 Ann Neurol (2014), 75(3): 351-62 ; 以引用之方式併入本文中)。類似地，用來源於具有突觸核蛋白病DLB或MSA之患者之大腦勻漿接種小鼠，觸發宿主小鼠中之 α -突觸核蛋白路易樣病變(Watts等人 Proc Natl Acad Sci U S A (2013), 110(48): 19555-60 ; 及Masuda-Suzukake等人 Brain (2013), 136(Pt 4): 1128-38 ; 兩者以引用之方式併入本文中)。最後，單體及寡聚 α -突觸核蛋白兩者自嗅球至互連大腦結構轉移與傳遞已經在小鼠中證實(Rey等人 Acta Neuropathol (2013), 126(4): 555-73 ; 以引用之方式併入本文中)。

藉由抗體靶向 α -突觸核蛋白之被動免疫治療途徑已經在大量臨床前 α -突觸核蛋白病小鼠模型中測試(Lawand等人 Expert Opin Ther Targets (2015): 1-10 ; 以引用之方式併入本文中)。具體言之，使用針對 α -突觸核蛋白之單株抗體(9E4)之研究已展示在活體內清除 α -突觸核蛋白聚集體及病變、行為運動改良及神經保護性效果(WO 2014/058924 ; 其以引用之方

式併入本文中)。

使用藉助於9E4單株抗體被動免疫研發作為PD/DLB之實驗模型之 α -突觸核蛋白轉殖基因小鼠之另外研究已展示抗體可清除 α -突觸核蛋白病變，減少突觸及軸突缺陷，消除紋狀體酪胺酸羥化酶纖維之缺失及顯著降低記憶缺陷與運動功能障礙(Games等人 J Neurosci (2014), 34(28): 9441-54 ; Bae等人 J Neurosci (2012), 32(39): 13454-69 ; 及 Masliah等人 PLoS One (2011), 6(4): e19338 ; 其中之各者以引用之方式併入本文中)。另外已經證實，在經合成 α -突觸核蛋白預先形成的原纖維(pff)以紋狀體內方式注射之野生型小鼠中被動投與抗 α -突觸核蛋白單株抗體，導致路易病變之穩定減小，預防黑質中之多巴胺神經元缺失且顯著改良運動障礙(其在pff處理後之小鼠模型中為明顯的) (Tran等人 Cell Rep (2014), 7(6): 2054-65 ; 以引用之方式併入本文中)。

另外，與用大分子療法(諸如，抗體)治療CNS之病症相關聯之主要挑戰之一為使此等藥物進入受影響組織中。大分子通過大腦及脊髓很大程度上受限於血腦障壁(BBB)。BBB保護且調節大腦之內穩定並防止分子自由通過大腦之大部分中，藉此限制許多大腦疾病之治療。基本分子(諸如，養分、生長因子及激素)之轉運係經由調節跨越大腦內皮細胞通過之一系列特定轉運體及受體來達成。因此，生物製劑及其他藥物至大腦之遞送代表重大挑戰。另外，似乎存在自大腦快速移除抗體的轉運機制，大概用以預防歸因於Fc與促進促發炎反應之效應配位體的接合的發炎性反應。

在過去十年間，已出現抗體跨越BBB轉運之報導，其中與轉運體分子之細胞外域結合有助於受體抗體複合物跨越內皮細胞層之轉胞吞作用。

BBB主要由大腦毛細管內皮細胞組成，該等大腦毛細管內皮細胞具

有特定特徵(諸如，緊密接合)以限制分子轉運至大腦中(Reese等人 1967, J. Cell Biol. 34: 207-217；Brightman等人 1969, J. Cell Biol. 40: 648-677；Rubin等人 1999, Ann. Rev. Neurosci. 22: 11-28)，儘管其他細胞類型(諸如，外被細胞、星形膠質細胞及神經元細胞)亦在BBB之功能中起重要作用。通常，低於0.1%之周邊給藥的抗體到達大腦(Boado等人 2010, Mol. Pharm. 7: 237-244；Pepinsky等人 2011, Nat. Neurosci. 8: 745-751)。BBB充當生理、代謝及免疫障壁(Gaillard等人 2003, Microvasc. Res. 65: 24-31)。

抗體跨越BBB的轉運可藉由觸發在大腦內皮細胞上之受體介導的轉胞吞作用來增強。經由此過程，抗原接合在內皮細胞之管腔側上可誘發內化及抗體跨越細胞之梭移，且接著其隨後釋放至組織中。

當前針對PD之藥物療法主要聚焦於治療運動相關的疾病症狀。目前不存在可治療或預防 α -突觸核蛋白病之市售或可用的療法。

因此，此項技術中存在對於治療特定言之人類中之 α -突觸核蛋白病的療法的需要。

【發明內容】

本發明涉及針對人類 α -突觸核蛋白之經分離抗體。本發明提供具有 aslo0452 ngl-3 抗體之功能性特性中之一或多者的抗體或其抗原結合片段。舉例而言：

本發明提供特異性地結合人類 α -突觸核蛋白之C端區的抗體或其抗原結合片段。本發明提供一種特異性地結合包含人類 α -突觸核蛋白(例如，SEQ ID NO: 1)之約胺基酸102至約胺基酸130之區的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段與包含人類 α -突觸核蛋白

(SEQ ID NO: 1)之約胺基酸120至約胺基酸130之區特異性結合。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段與同與9E4抗體結合之抗體不相同的抗原決定基結合。

本發明提供一種結合人類 α -突觸核蛋白而非人類 β -突觸核蛋白或人類 γ -突觸核蛋白的抗體或其抗原結合片段。

本發明提供一種與人類、大鼠及獼猴 α -突觸核蛋白結合的抗體或其抗原結合片段。

本發明提供一種以高親和性與人類 α -突觸核蛋白結合的抗體或其抗原結合片段。在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段以以下 K_D 與 α -突觸核蛋白結合：低於500皮莫耳(pM)、低於400 pM、低於300 pM、低於200 pM、低於150 pM、低於120 pM、低於110 pM或106 pM或更少，如例如使用Octet分析所量測。在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段以以下 K_D 與 α -突觸核蛋白結合：低於400皮莫耳(pM)、低於300 pM、低於250 pM、低於200 pM、低於150 pM、低於120 pM、低於110 pM、低於100 pM、低於80 pM或74 pM或更少，如例如使用KinExA分析所量測。

本發明提供一種與原生內源性人類 α -突觸核蛋白結合的抗體或其抗原結合片段。

本發明提供一種與單體形式之人類 α -突觸核蛋白結合的抗體或其抗原結合片段。

本發明提供一種與人類 α -突觸核蛋白之聚集體結合的抗體或其抗原結合片段。

本發明提供一種結合疾病相關、病理性形式的 α -突觸核蛋白的抗體

或其抗原結合片段。

本發明提供一種減少大腦間質液中之 α -突觸核蛋白含量之本發明之抗體或其抗原結合片段。特定言之，根據本發明之抗體或其抗原結合片段減少大腦間質液中之游離未結合 α -突觸核蛋白含量。

本發明提供一種減少腦脊髓液中之 α -突觸核蛋白含量之本發明之抗體或其抗原結合片段。特定言之，根據本發明之抗體或其抗原結合片段減少腦脊髓液中之游離未結合 α -突觸核蛋白含量。

如本文所使用，術語「游離未結合 α -突觸核蛋白」係指未與根據本發明之抗體或其抗原結合片段結合的 α -突觸核蛋白。該游離未結合 α -突觸核蛋白可適用於呈其單體或寡聚形式或聚集形式的 α -突觸核蛋白。此等術語一般而言適用於任何病理性形式之 α -突觸核蛋白。

本發明提供一種減少 α -突觸核蛋白在活體內擴散的抗體或其抗原結合片段。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段與抗體aslo0452ngl-3競爭結合人類 α -突觸核蛋白。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段與抗體aslo0452ngl-3結合人類 α -突觸核蛋白上相同的抗原決定基。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段源自抗體asyn0087，該抗體asyn0087包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之可變重鏈區(VH)及胺基酸序列SEQ ID NO: 3之可變輕鏈區(VL)，如在此所揭示的。

在一特定實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段源自抗體asyn0087，其中該抗體或抗原結合片段具有低於500 mM之 K_D 且與在此描

述之抗體asyn0087、aslo0452 ngl-3及aslo0543中之任一者結合相同的抗原決定基。

如在此所使用，「H-CDR」表示抗體或其抗原結合片段之重鏈區上之互補決定區(CDR)，且「L-CDR」表示抗體或其抗原結合片段之輕鏈區上之互補決定區(CDR)。

在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含至少一個選自以下之CDR：

- (i) SEQ ID NO: 5之H-CDR1，
- (ii) SEQ ID NO: 6之H-CDR2，
- (iii) SEQ ID NO: 7之H-CDR3，
- (iv) SEQ ID NO: 9之L-CDR1，
- (v) SEQ ID NO: 10之L-CDR2，
- (vi) SEQ ID NO: 11之L-CDR3。

在又一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段之重鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之重鏈之SEQ ID NO: 16的CDR3；且/或根據本發明之抗體或其抗原結合片段之輕鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之輕鏈之SEQ ID NO: 21的CDR3。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有選自抗體aslo0452 ngl-3之CDR之至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個或全部，亦即選自SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 21中之任一者的至少一個CDR。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段之重鏈之CDR3為

抗體aslo0452 ngl-3之重鏈的CDR3；且/或本發明之抗體或其抗原結合片段之輕鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之輕鏈的CDR3。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段之重鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之重鏈的CDR3。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段之輕鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之輕鏈的CDR3。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段之重鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之重鏈的CDR3，且本發明之抗體或其抗原結合片段之輕鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之輕鏈的CDR3。

本發明提供一種具有抗體aslo0452 ngl-3之六個CDR的抗體或其抗原結合片段。

因此，在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含：

a) 三個重鏈CDR，其具有以下序列：

- (i) SEQ ID NO: 5之H-CDR1，
- (ii) SEQ ID NO: 15之H-CDR2；及
- (iii) SEQ ID NO: 16之H-CDR3，及

b) 三個輕鏈CDR，其具有以下序列：

- (i) SEQ ID NO: 20之L-CDR1，
- (ii) SEQ ID NO: 10之L-CDR2，及
- (iii) SEQ ID NO: 21之L-CDR3。

本發明提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 13界定之核苷酸序列至少具

有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 18界定之核苷酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性。

本發明提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 14界定之胺基酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 19界定之胺基酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性。

本發明提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含具有SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的可變重鏈及具有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列的可變輕鏈。

在一特定實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含具有藉由SEQ ID NO: 4界定之序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 8界定之序列的可變輕鏈。

在又一特定實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含具有藉由SEQ ID NO: 4界定之序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 8界定之序列的可變輕鏈，且以低於500 pM之 K_D 與人類 α -突觸核蛋白結合並與asyn0087、aslo0452 ngl-3或aslo0543結合相同的抗原決定基。

在另一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 14界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 19界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性。

在一特定實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含具有藉由SEQ ID NO: 14界定之序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 19界定之序列的可變輕鏈。

在又一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 14界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 19界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，且其進一步包含：

a) 三個重鏈CDR，其具有以下序列：

- (i) SEQ ID NO: 5之H-CDR1，
- (ii) SEQ ID NO: 15之H-CDR2；及
- (iii) SEQ ID NO: 16之H-CDR3，及

b) 三個輕鏈CDR，其具有以下序列：

- (i) SEQ ID NO: 20之L-CDR1，
- (ii) SEQ ID NO: 10之L-CDR2；及
- (iii) SEQ ID NO: 21之L-CDR3。

本發明亦提供一種抗體或其抗原結合片段，其包含具有藉由SEQ ID NO: 13界定之核苷酸序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 18界定之核苷酸序列的可變輕鏈。

本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其包含具有藉由SEQ ID NO: 14界定之胺基酸序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 19界定之胺基酸序列的可變輕鏈。

亦提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含具有藉由SEQ

ID NO: 12界定之胺基酸序列的重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 17界定之胺基酸序列的輕鏈。

在另一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 24界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 30界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性。

在一特定實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含具有藉由SEQ ID NO: 24界定之序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 30界定之序列的可變輕鏈。

在又一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 24界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 30界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，且其進一步包含：

c) 三個重鏈CDR，其具有以下序列：

(iv) SEQ ID NO: 25之H-CDR1，

(v) SEQ ID NO: 26之H-CDR2；及

(vi) SEQ ID NO: 27之H-CDR3，及

d) 三個輕鏈CDR，其具有以下序列：

(iv) SEQ ID NO: 31之L-CDR1，

(v) SEQ ID NO: 32之L-CDR2；及

(vi) SEQ ID NO: 33之L-CDR3。

本發明亦提供一種抗體或其抗原結合片段，其包含具有藉由SEQ ID NO: 24界定之核苷酸序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 30界定之核苷酸序列的可變輕鏈。

本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其包含具有藉由SEQ ID NO: 24界定之胺基酸序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 30界定之胺基酸序列的可變輕鏈。

亦提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含藉由SEQ ID NO: 22界定之胺基酸序列的重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 28界定之胺基酸序列的輕鏈。

在一個實施例中，如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段為IgA、IgD、IgE、IgM、IgG（諸如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4）抗體或其抗原結合片段。

在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有經修飾Fc區。合適的修飾已為熟習此項技術者所熟知，且可尤其包括增加或減少半衰期、剝蝕、減小或增強效應功能，提供帶有游離硫醇之經取代半胱胺酸以用於結合的修飾。此類修飾之實例為增加半衰期及/或TM以降低效應功能的YTE。在一些實施例中，本文揭示之抗體或抗原結合片段中之任一者包含抗體之Fc區中之突變M252Y/S254T/T256E (YTE) (Dall'Acqua等人, 2006, J. Biol. Chem, 281:23514-23524)。在一些實施例中，本文揭示之抗體或抗原結合片段中之任一者包含Fc區中之L234F/L235E/P331S之三重突變(本文縮寫為「TM」) (Oganesyan等人 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, (2008) 64: 700-704)。在一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段可為IgG1 TM抗體或其抗原結合片段。在另一實施例中，本發

明之抗體或其抗原結合片段可包含具有YTE突變之Fc區。

在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段可經偶合至血腦障壁(BBB)轉運體部分，其中該BBB轉運體部分能夠跨越BBB轉運抗體或其抗原結合片段。

在一實施例中，BBB轉運體部分可為抗體。在一實施例中，BBB抗體可與抗 α -突觸核蛋白抗體或其抗原結合片段形成多特異性構築體。BBB轉運體部分可包含免疫球蛋白可變重鏈互補決定區-1 (VH-CDR1)、免疫球蛋白可變重鏈互補決定區-2 (VH-CDR2)、免疫球蛋白可變重鏈互補決定區-3 (VH-CDR3)、免疫球蛋白可變輕鏈互補決定區-1 (VL-CDR1)、免疫球蛋白可變輕鏈互補決定區-2 (VL-CDR2)及免疫球蛋白可變輕鏈互補決定區-3 (VL-CDR3)；其中VH-CDR1包含SEQ ID NO: 40或SEQ ID NO: 49，VH-CDR2包含SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 50，VH-CDR3包含SEQ ID NO: 42或SEQ ID NO: 51，VL-CDR1包含SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 44或SEQ ID NO: 53，VL-CDR2包含SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 45或SEQ ID NO: 54，且VL-CDR3包含SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 46或SEQ ID NO: 55。

在一些實施例中，轉運體部分包含免疫球蛋白可變重鏈(VH)區，該免疫球蛋白可變重鏈區包含SEQ ID NO: 47或SEQ ID NO: 39。在一些實施例中，轉運體部分包含免疫球蛋白可變輕鏈(VL)區，該免疫球蛋白可變輕鏈區包含SEQ ID NO: 43。

另外，轉運體部分可選自完全抗體、Fv片段、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、二硫鍵鍵聯(dsFv)片段、單鏈Fv (scFV)片段、sc(Fv)₂片段、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、微型抗體及單鏈抗體。在一

特定實施例中，轉運體部分包含scFV片段，該scFV片段包含經由連接子融合在一起之VH域及VL域。在一些情況下，連接子可為(Gly4Ser)ⁿ (SEQ ID NO: 56)，其中n為選自由以下各者組成之群的正整數：1、2、3、4、5、6、7、8、9及10。

在一些實施例中，本發明之任何轉運體分子可如本文所描述與本發明之任何 α -突觸核蛋白結合分子結合以提供本發明之多特異性結合分子。

本發明提供如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段，其用作藥劑。

本發明亦提供如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段，其適用於預防或治療 α -突觸核蛋白病。

在一個實施例中， α -突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)及多發性系統萎縮症(MSA)。

在一個實施例中， α -突觸核蛋白病為帕金森氏病(PD)。

本發明提供一種治療或預防患者體內之疾病，特定言之與中樞神經系統相關聯之疾病的方法，該方法包含向患者投與如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段。

在一個實施例中，疾病為 α -突觸核蛋白病。

在一個實施例中， α -突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)及多發性系統萎縮症(MSA)。

在一個實施例中， α -突觸核蛋白病為帕金森氏病(PD)。

本發明提供一種醫藥組合物，其包含如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受賦形劑。

片語「醫藥學上可接受賦形劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、

包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑，及與醫藥投與相容之類似物。此類介質及試劑用於醫藥活性物質之用途為此項技術中所熟知。組合物亦可含有提供補充功能、額外功能或增強治療性功能的其他活性化合物。醫藥組合物亦可與用於投與之說明書一起包括於容器、封裝或分配器中。

本發明之醫藥組合物經調配成與其預定投與途徑相容。實現投與之方法為一般技術者所已知。投與可(例如)為靜脈內、腹膜內、肌內、腔內、皮下或經皮。

本發明提供一種經分離核酸分子，其編碼如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段。

在一特定實施例中，本發明提供一種經分離核酸分子，其包含SEQ ID NO: 13及/或SEQ ID NO: 18。

在另一特定實施例中，本發明提供一種經分離核酸分子，其包含SEQ ID NO: 23及/或SEQ ID NO: 29。

一旦具備此資訊，熟習此項技術者可容易地獲得編碼所揭示抗體或其抗原結合片段的核酸分子。核酸可包含DNA或RNA，且可為完全或部分合成或重組的。參考核苷酸序列涵蓋具有指定序列之DNA分子，且涵蓋具有指定序列之RNA分子，其中U取代T，其中除非上下文另外要求。

本發明之核酸分子包含本文揭示之CDR、VH域及/或VL域之編碼序列。

本發明亦提供呈質體、載體、噬菌粒、轉錄或表現卡匣形式的構築體，該等構築體包含至少一種核酸分子，該核酸分子編碼如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段，特定言之編碼本文揭示之

CDR、VH域及/或VL域。

本發明進一步提供一種包含一或多種如上構築體的宿主細胞。

亦提供編碼任何一或多個本文揭示之CDR (H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3)、VH或VL域的核酸以及製造編碼產物的方法。該方法包含自編碼核酸表現編碼產物。表現可藉由在適當條件下培養含有核酸之重組宿主細胞來達成。在表現生產後，VH或VL域或特異性結合成份可使用任何合適的技術來分離及/或純化，接著適當時使用。

抗原結合片段、VH及/或VL域及編碼核酸分子以及載體可自其天然環境來分離及/或純化呈實質上純或均質的形式，或就核酸而言，不含或基本上不含除編碼具有所需功能之多肽的序列以外之核酸或起源的基因。

用於在各種不同宿主細胞中選殖及表現多肽之系統為此項技術中所熟知。對於適合於生產抗體之細胞，參見Gene Expression Systems, Academic Press, Fernandez等人編, 1999。簡言之，合適的宿主細胞包括細菌、植物細胞、哺乳動物細胞及酵母以及桿狀病毒系統。此項技術中用於表現異源多肽之可用的哺乳動物細胞株包括中國倉鼠卵巢細胞、海拉細胞(HeLa cell)、幼倉鼠腎細胞、NS0小鼠骨髓瘤細胞及許多其他細胞。常用細菌宿主為大腸桿菌(E. coli)。與本發明相容之任何蛋白質表現系統可用於生產所揭示抗體。合適的表現系統包括描述於Gene Expression Systems, Academic Press編 Fernandez等人, 1999中的轉殖基因動物。

可選擇或構築合適的載體，使得其按需要含有適當調節序列，該等調節序列包括啟動子序列、終止子序列、聚腺苷酸化序列、強化子序列、標記基因及其他序列。載體按需要可為質體或病毒，例如，噬菌體或噬菌

粒。欲見更多詳情，參見(例如)Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。用於(例如，在製備核酸構築體、突變誘發、定序、將DNA引入至細胞中及基因表現以及蛋白質分析中)操縱核酸之許多已知技術及方案詳細地描述在Current Protocols in Molecular Biology, 第2版, Ausubel等人編, John Wiley & Sons, 1992中。

本發明之另一態樣提供一種包含如此處所揭示之核酸之宿主細胞，特定言之，一種包含編碼如上文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段的核酸分子的載體。

又一態樣提供一種包含將此類核酸引入至宿主細胞中的方法。該引入可採用任何可用的技術。對於真核細胞，合適的技術可包括磷酸鈣轉染、DEAE-葡聚糖、電穿孔、脂質體介導的轉染及使用反轉錄病毒或其他病毒(例如，牛痘或針對昆蟲細胞為桿狀病毒)的轉導。對於細菌細胞，合適的技術可包括氯化鈣轉化、電穿孔及使用噬菌體之轉染。在將核酸引入至細胞中之後，可能引起或允許(例如)藉由在用於表現基因之條件下培養宿主細胞來自核酸表現。

本發明現將參考附圖及序列表來更詳細地描述，其中展示：

諸SEQ ID NO之關鍵：

名稱	描述	SEQ ID NO:
人類α突觸核蛋白	胺基酸序列	1
asyn0087	VH胺基酸序列	2
	VL胺基酸序列	3
源自asyn0087之抗體之通用序列	VH胺基酸序列	4
	H-CDR1胺基酸序列	5
	H-CDR2胺基酸序列	6
	H-CDR3胺基酸序列	7

	VL胺基酸序列	8
	L-CDR1胺基酸序列	9
	L-CDR2胺基酸序列	10
	L-CDR3胺基酸序列	11
aslo0452 ngl-3	重鏈胺基酸序列	12
	VH核苷酸序列	13
	VH胺基酸序列	14
	H-CDR1胺基酸序列	5
	H-CDR2胺基酸序列	15
	H-CDR3胺基酸序列	16
	輕鏈胺基酸序列	17
	VL核苷酸序列	18
	VL胺基酸序列	19
	L-CDR1胺基酸序列	20
	L-CDR2胺基酸序列	10
	L-CDR3胺基酸序列	21
aslo0543	重鏈胺基酸序列	22
	VH核苷酸序列	23
	VH胺基酸序列	24
	H-CDR1胺基酸序列	25
	H-CDR2胺基酸序列	26
	H-CDR3胺基酸序列	27
	輕鏈胺基酸序列	28
	VL核苷酸序列	29
	VL胺基酸序列	30
	L-CDR1胺基酸序列	31
	L-CDR2胺基酸序列	32
	L-CDR3胺基酸序列	33
通用BBB轉運體	VH胺基酸序列	34
	VL胺基酸序列	35
	L-CDR1胺基酸序列	36
	L-CDR2胺基酸序列	37
	L-CDR3胺基酸序列	38
BBBt0626gl	VH胺基酸序列	39
	H-CDR1胺基酸序列	40
	H-CDR2胺基酸序列	41
	H-CDR3胺基酸序列	42
	VL胺基酸序列	43
	L-CDR1胺基酸序列	44
	L-CDR2胺基酸序列	45
	L-CDR3胺基酸序列	46

BBBt0626	VH胺基酸序列	47
	H-CDR1胺基酸序列	40
	H-CDR2胺基酸序列	41
	H-CDR3胺基酸序列	42
	VL胺基酸序列	43
	L-CDR1胺基酸序列	44
	L-CDR2胺基酸序列	45
	L-CDR3胺基酸序列	46

BBBt0632gl	VH胺基酸序列	48
	H-CDR1胺基酸序列	49
	H-CDR2胺基酸序列	50
	H-CDR3胺基酸序列	51
	VL胺基酸序列	52
	L-CDR1胺基酸序列	52
	L-CDR2胺基酸序列	54
	L-CDR3胺基酸序列	55

表1：在兩種親和性量測平台上進行之關鍵抗 α -突觸核蛋白抗體針對人類 α -syn的親和性測定。

【圖式簡單說明】

圖1：HTRF[®]分析之示意圖。

圖2：asyn0087、aslo0452ngl-3及aslo0543重鏈可變區(VH) (分別為SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 14及SEQ ID NO: 24)及輕鏈可變區(VL) (分別為SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 19及SEQ ID NO: 30)之胺基酸序列的比較。帶下劃線的胺基酸對應於CDR。

圖3A至圖3D：aslo0452 ngl-3之核苷酸及胺基酸序列。圖3A及圖3B分別地展示aslo0452 ngl-3之可變重鏈及可變輕鏈核苷酸序列與胺基酸序列。圖3A按出現之次序分別地揭示SEQ ID NO: 13及SEQ ID NO: 14。圖3B按出現之次序分別地揭示SEQ ID NO: 18及SEQ ID NO: 19。圖3C及圖3D展示此等序列與最接近人類生殖系序列的比對。圖3C展示aslo0452

ngl-3可變重鏈域胺基酸序列(SEQ ID NO: 14)與生殖系IGHV3-23序列(SEQ ID NO: 58)及JH6序列(SEQ ID NO: 59)的比對。圖3D展示aslo0452 ngl-3可變輕鏈域胺基酸序列(SEQ ID NO: 19)與生殖系IGLV5-45序列(SEQ ID NO: 60)及JL2 (SEQ ID NO: 61)、3序列的比對。互補決定區(CDR)為帶下劃線的且標記的。與生殖系之差異以粗體及勾勒來突出顯示。輕鏈構架區中之所有非Vernier殘基為人類生殖系胺基酸。尚未改變Vernier殘基(*)以匹配生殖系胺基酸。

圖4A及圖4B：使用一組 α -syn截斷物之前導分離純系選殖體之抗原決定基結合。ELISA孔塗佈有表示蛋白質之以下不同界定區之一系列市售 α -syn截斷物：1-140：全長 α -syn；1-60：僅N端區；61-140：斑塊之非澱粉狀蛋白成分(NAC)加C端區；1-95：N端區及NAC區；96-140：僅C端區； Δ NAC：NAC區缺失；NCAP：為遺失胺基酸103-129之可替代地剪接形式的 α -syn(rPeptide)。用於偵測之初級抗體為(圖4A) Asyn087；及(圖4B) Aslo0452 ngl-3 (黑色棒)、aslo0543 (淺灰色棒)及NIP228同型匹配對照(深灰色棒)。用抗人類IgG Eu³⁺二級抗體(圖4A)或抗人類IgG-HRP二級抗體(圖4B)來偵測結合。

圖5：使用DELFI A 抗原決定基競爭分析，aslo0452 ngl-3及aslo0543針對 α -syn相對於突觸核蛋白家庭成員的特異性。使用抗原決定基競爭HTRF分析，親和性最佳化之aslo0452 ngl-3及aslo0543純系選殖體針對 α -syn之特異性係藉由滴定未標記之 α -syn、 β -syn及 γ -syn來測定。自此來測定IC₅₀值。

圖6：使用HTRF抗原決定基競爭分析，aslo0452 ngl-3及aslo0543針對人類、食蟹獼猴及大鼠 α -syn之特異性。使用抗原決定基競爭HTRF

分析，親和性最佳化之純系選殖體之物種交叉反應性曲線係在類似分析中藉由滴定未標記之 α -syn及導出 α -syn之各物種的IC₅₀值來測定。

圖7A及圖7B：代表性流動式細胞測量術結果表明，親和性最佳化之純系選殖體與人類神經母細胞瘤細胞株中之原生人類 α -syn結合。

圖7A及圖7B之圖A、圖C、圖E及圖G展示與 α -syn陰性人類乳癌細胞株BT20結合。圖7A及圖7B之圖B、圖D、圖F及圖H展示與 α -syn陽性人類神經母細胞瘤細胞株SHSY5Y結合。圖7A：用於此研究之初級人類抗體為asyn0087及Hu IgG對照。人類抗體結合係使用二級抗人類IgG-FITC (Jackson)來偵測。圖7B：用於此研究之初級人類抗體為aslo0452 ngl-3、aslo0543及NIP228同型匹配的IgG1 TM對照。人類抗體結合係使用二級抗人類IgG-FITC (Jackson)來偵測。所使用之初級小鼠抗體為4D6 (Covance)及同型匹配的陰性對照(R&D Systems)。小鼠抗體結合係使用二級抗小鼠IgG-FITC (Sigma)來偵測。

圖8：藉由DELFA ELISA，最佳化之抗 α -syn IgG針對聚集的人類 α -syn的特異性。曲線展示，aslo0452 ngl-3及aslo0543(兩種高親和性 α -syn特異性純系選殖體)及前導抗體asyn0087偵測到經俘獲的聚集形式之 α -syn (黑色棒)但並未偵測到經俘獲的單體 α -syn。

圖9A至圖9C：藉由免疫組織化學法，親和性最佳化之純系選殖體在疾病相關組織中的特異性。圖9A、圖9B及圖9C分別地展示用aslo0452 ngl-3、asyn0087及aslo0543的染色。圖A、圖B及圖C展示染色PD大腦組織中之黑質之路易體(圖A及圖B)及路易神經突(圖C)兩者的aslo0452 ngl-3。圖D展示，aslo0452 ngl-3展示來自正常大腦切片中之顳皮質之細胞中的 α -syn的低含量染色。圖E、圖F及圖G展示染色PD大腦組織中之杏仁體

的路易體、路易神經突及路易斑點的aslo0452 ngl-3。圖H展示表明在PD大腦組織中之杏仁體中未染色的同型匹配的對照抗體。圖I至圖M展示PD大腦組織中之藍斑之asyn0087染色；所鑑別之病理性特徵為路易體(圖I及圖L)、神經元聚集體(圖J)、路易神經突(圖K)及蒼白體(圖M)。圖N及圖O展示染色PD大腦組織中之黑質中之路易體及路易神經突的aslo0543。圖P展示來自正常大腦切片中之顳皮質之細胞中的 α -syn之aslo0543低含量染色。

圖10A及圖10B：全身性投與aslo0452 ngl-3快速降低大鼠前額葉皮質中之游離 α -syn含量。經aslo0452 ngl-3 (經靜脈內30 mg/kg；實心符號)或媒劑(空心符號)治療的大鼠之ISF中的平均值 $\pm$ SEM絕對(圖10A)或相對(圖10B)游離 α -突觸核蛋白濃度。

圖11A及圖11B：在全身性投與後，aslo0452 ngl-3劑量及時間依賴性地降低大鼠之CSF中之游離 α -syn含量。經aslo0452 ngl-3 (經靜脈內3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg；實心符號)或媒劑(空心符號)治療的大鼠之CSF中之平均值 $\pm$ SEM絕對(圖11A)或相對(圖11B)游離 α -突觸核蛋白濃度。

圖12A至圖12C：抗 α -突觸核蛋白抗體(aslo0452 ngl-3及aslo0452 ngl-3-D265A)阻斷同側至對側 α -突觸核蛋白擴散。(圖12A)：經LV- α -syn注射至右側海馬體(黑色箭頭)中之非tg小鼠用每週一次劑量的抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體：aslo0452 ngl-3、aslo0452 ngl-3 D265A、9E4或用NIP228同型對照抗體來被動地免疫13週，隨後藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析來測定 α -突觸核蛋白擴散。(圖12B)：自A中表示之同側海馬冠切片之免疫細胞化學分析獲得的 α -突觸核蛋白免疫反應性

資料之定量。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。(圖12C)：自A圖中表示之對側海馬冠切片之免疫細胞化學分析獲得的 α -突觸核蛋白免疫反應性資料之定量。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。

圖13A至圖13C：抗 α -突觸核蛋白抗體(aslo0452 ngl-3及aslo0452 ngl-3-D265A)減少慢病毒表現的 α -突觸核蛋白沿軸突之沈積及散佈。(圖13A)：經LV- α -syn注射至右側海馬體中之非tg小鼠用每週一次劑量的抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體：aslo0452 ngl-3、aslo0452 ngl-3 D265A、9E4或用NIP228同型對照抗體來被動地免疫13週，隨後進行 α -突觸核蛋白沿同側及對側跨海馬軸突(黑色箭頭)沈積的免疫細胞化學分析。(圖13B)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定的同側軸突 α -突觸核蛋白沈積的定量。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。(圖13C)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定的對側軸突 α -突觸核蛋白沈積的定量。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。

圖14A至圖14C：抗 α -突觸核蛋白抗體aslo0452 ngl-3及aslo0452 ngl-3-D265A減少CA1海馬神經元及第5層新皮質神經元中之 α -突觸核蛋白沈積。(圖14A)：經LV- α -syn注射至右側海馬體中之非tg小鼠用每週一次劑量的抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體：aslo0452 ngl-3、aslo0452 ngl-

3 D265A、9E4或用NIP228同型對照抗體來被動地免疫13週，隨後進行同側CA1海馬神經元及同側第5層新皮質神經元(黑色箭頭)中之 α -突觸核蛋白沈積的免疫細胞化學分析。(圖14B)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定之同側第5層新皮質神經元中之 α -突觸核蛋白沈積的定量。所展示資料表示每0.1平方毫米 α -突觸核蛋白陽性細胞(神經元)之數目。各柱為10個獨立抗體治療($n=10$ 隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 * $P<0.05$ ；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。(圖14C)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定之同側CA1海馬神經元中之 α -突觸核蛋白沈積的定量。所展示資料表示每0.1平方毫米 α -突觸核蛋白陽性細胞(神經元)之數目。各柱為10個獨立抗體治療($n=10$ 隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 * $P<0.05$ ；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。

圖15A至圖15C：aslo0452 ngl-3及aslo0452 ngl-3-D265A抗體阻斷 α -突觸核蛋白在 α -突觸核蛋白轉殖基因小鼠中擴散。(圖15A)：經LV- α -syn注射至右側海馬體(黑色箭頭)中之 α -syn tg小鼠用每週一次劑量的抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體：aslo0452 ngl-3、aslo0452 ngl-3 D265A、9E4或用NIP228同型對照抗體來被動地免疫13週，隨後藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析來進行 α -突觸核蛋白擴散測定。(圖15B)：自A圖中表示之同側海馬冠切片之免疫細胞化學分析獲得之 α -突觸核蛋白免疫反應性資料之定量。各柱為10個獨立抗體治療($n=10$ 隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 * $P<0.05$ ；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。(圖15C)：自A圖中表示之對側海馬冠切片之免疫細胞化學分析獲得之 α -突觸核蛋白免疫反應性資料之定量。各柱為10個獨立抗體

治療 (n=10 隻小鼠 / 抗體治療組) 之平均值 $\pm$ SEM 值。對比 NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。

圖16A至圖16C：aslo0452 ngl-3抗體及aslo0452 ngl-3-D265A抗體減少慢病毒表現的 α -突觸核蛋白沿轉殖基因小鼠中之軸突的沈積及散佈。
(圖16A)：經LV- α -syn注射至右側海馬體中之 α -syn tg小鼠用每週一次劑量的抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體：aslo0452 ngl-3、aslo0452 ngl-3 D265A、9E4或用NIP228同型對照抗體來被動地免疫13週，隨後進行沿同側及對側跨海馬軸突(黑色箭頭)之 α -突觸核蛋白沈積的免疫細胞化學分析。(圖16B)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定之同側軸突 α -突觸核蛋白沈積的定量。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠 / 抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM 值。對比 NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。(圖16C)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定之對側軸突 α -突觸核蛋白沈積的定量。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠 / 抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM 值。對比 NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。

圖17A至圖17D：aslo0452 ngl-3抗體及aslo0452 ngl-3-D265A抗體減少 α -突觸核蛋白轉殖基因小鼠中之CA1海馬神經元及第5層新皮質神經元中之 α -突觸核蛋白沈積。
(圖17A)：經LV- α -syn注射至右側海馬體中之 α -syn tg小鼠用每週一次劑量的抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體：aslo0452 ngl-3、aslo0452 ngl-3 D265A、9E4或用NIP228同型對照抗體來被動地免疫13週，隨後進行同側CA1海馬神經元及同側第5層新皮質神經元(黑色箭頭)中之 α -突觸核蛋白沈積的免疫細胞化學分析。(圖17B)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定之同側第5層新皮質神經元

中之 α -突觸核蛋白沈積的定量。所展示資料表示每0.1平方毫米 α -突觸核蛋白陽性細胞(神經元)之數目。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。(圖17C)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定之同側CA1海馬神經元中之 α -突觸核蛋白沈積的定量。所展示資料表示每0.1平方毫米 α -突觸核蛋白陽性細胞(神經元)之數目。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。(圖17D)：藉由使用SYN-1之免疫細胞化學法及自動影像分析測定之對側CA1海馬神經元中之 α -突觸核蛋白沈積的定量。所展示資料表示每0.1平方毫米 α -突觸核蛋白陽性細胞(神經元)之數目。各柱為10個獨立抗體治療(n=10隻小鼠/抗體治療組)之平均值 $\pm$ SEM值。對比NIP228 *P<0.05；單因子ANOVA與鄧尼特事後檢定。

圖 18 aslo452-ngl3-hIgG1TM 與 BBBt0626gl-ScFv-Bs2-also0452-ngl-3-hIgG1TM之抗原決定基競爭在HTRF分析中證實，併入BBB部分並不更改aslo452-ngl3-hIgG1TM之結合特異性。 Dylight650標記之抗 α -突觸核蛋白抗體(aslo0452hgl3-hIgG1TM)與生物素標記之 α 突觸核蛋白結合，該生物素標記之 α 突觸核蛋白轉而與穴狀化合物標記之抗生蛋白鏈菌素結合。在激發穴狀化合物之後，產生能量轉移(FRET)，且當在dylight650標記之aslo0452hgl3-hIgG1TM存在下時，dylight650被激發並產生螢光。若競爭者IgG存在，則dylight650標記之aslo0452之結合被阻斷，且dylight650標記之aslo0452之激發被阻止，從而導致螢光信號減少。未經標記之aslo0452及Bbbt0626-Bs2-also0452 hIgG1TM兩者能夠類

似地競爭dylight650標記之aslo0452-ngl3-hIgG1TM。

圖19 BBBt0626gl-BS2-aslo452-ngl-3-hIgG1TM之小鼠大腦內皮細胞結合表明當偶合至aslo452-ngl3-hIgG1TM時BBB部分之有效靶結合。FMAT (螢光微體積分析技術)或Mirror-ball分析技術兩者已被用於測定抗體針對大腦內皮細胞之特異性結合。此分析量測人類IgG針對小鼠大腦內皮細胞(b.End3)之結合。B.End3細胞類似地由Bbbt0626 hIgG1TM、Bbbt0626glscFv-Bs2-aslo0452-hIgG1TM及Bbbt0626glscFv-Bs2-NIP228 hIgG1TM而非由對照抗體NIP228 hIgG1TM結合。此結合係用小鼠抗Fc mAb (人類特異性) (其轉而用Alexafluor647標記之山羊抗小鼠Fc來偵測)來偵測。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2016年6月2日申請之美國臨時申請案第62/344,746號的優先權。前述申請案之說明書以全文引用之方式併入本文中。

本發明係根據aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體之出人意料及出乎意外的發現。此發現導致抗體之新群組具有由aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體共用之特徵，以及抗體之亞群組分別地具有aslo0452 ngl-3及aslo0543之特徵。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段源自抗體asyn0087，該抗體asyn0087包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之可變重鏈區(VH)及胺基酸序列SEQ ID NO: 3之可變輕鏈區(VL)，如在此所揭示的。

在一特定實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段源自抗體

asyn0087，其中該抗體或抗原結合片段具有低於500 nM之 K_D ，且結合與在此所描述之抗體asyn0087、aslo0452ngl-3及aslo0543中之任一者相同的抗原決定基。

像asyn0087，aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體結合人類 α -突觸核蛋白之C端區(殘基96至殘基140)更具體言之，aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體或其抗原結合片段結合包含在人類 α -突觸核蛋白(例如，SEQ ID NO: 1)之約胺基酸102及約胺基酸130之間的區。在一些實施例中，本文揭示之抗體或抗原結合片段中之任一者結合包含在人類 α -突觸核蛋白(例如，SEQ ID NO: 1)之約胺基酸120及約130之間的區。在一些實施例中，本文揭示之抗體或抗原結合片段中之任一者結合與同9E4抗體結合之抗原決定基不相同抗原決定基的抗原決定基。

aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體對 α -突觸核蛋白具有選擇性。抗體或其抗原結合片段並不與諸如 β -突觸核蛋白或 γ -突觸核蛋白之其他突觸核蛋白家庭成員結合。更具體言之，抗體或其抗原結合片段對人類 α -突觸核蛋白具有特異性。

aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體與人類、大鼠或獼猴 α -突觸核蛋白結合。aslo0452 ngl-3及aslo0543與人類、食蟹獼猴及大鼠 α -突觸核蛋白結合之能力指示，相比於並不與人類、食蟹獼猴及大鼠 α -突觸核蛋白結合之抗體，而與人類 α -突觸核蛋白上之不同抗原決定基結合。因此，aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體能夠用於在食蟹獼猴及大鼠疾病模型中的活體內安全性評價及研究。

aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543以高親和性與人類 α -突觸核蛋白結合。aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體以以下之 K_D 與 α -突觸核蛋白結

合：低於500皮莫耳(pM)、低於400 pM、低於300 pM、低於150 pM、低於120 pM、低於115 pM、低於110 pM或106 pM或更少，如例如使用Octet分析所量測(參見例如實例9)。aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體以以下之 K_D 與 α -突觸核蛋白結合：低於300皮莫耳(pM)、低於250 pM、低於200 pM、低於150 pM、低於120 pM、低於110 pM或108 pM、低於100 pM、低於80 pM或74 pM或更少，如例如使用KinExA分析所量測(參見KinExA分析方案，參見例如實例9)。

aslo0452 ngl-3 Fab片段以高親和性與人類 α -突觸核蛋白結合。aslo0452 ngl-3 Fab片段以以下之 K_D 與 α -突觸核蛋白結合：低於300皮莫耳(pM)、低於200 pM、低於180 pM、174 pM或更少，如例如使用KinExA分析所量測(參見例如實例9.3)。

aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543與原生內源性人類 α -突觸核蛋白結合。aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體與人類 α -突觸核蛋白之聚集體結合。特定言之，因此抗體與不為聚集所需之抗原決定基結合。aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體能夠螯合單體及聚集兩者形式之 α -突觸核蛋白。本發明之抗體或其抗原結合片段能夠結合單體及聚集形式之 α -突觸核蛋白。

aslo0452 ngl-3抗體及aslo0543抗體結合疾病相關、病理性形式之 α -突觸核蛋白，例如，帕金森氏病大腦組織中之路易體、路易神經突、路易斑點。在正常(未患病)大腦中觀測到微小染色。

aslo0452 ngl-3抗體降低大腦間質液中之 α -突觸核蛋白含量。特定言之，aslo0452 ngl-3抗體降低大腦間質液中之游離未結合 α -突觸核蛋白含量。

aslo0452 ngl-3抗體降低腦脊髓液中之 α -突觸核蛋白含量。特定言之，aslo0452 ngl-3抗體降低腦脊髓液中之游離未結合 α -突觸核蛋白含量。aslo0452 ngl-3抗體降低 α -突觸核蛋白在活體內擴散。抑制 α -突觸核蛋白擴散之此新穎功能指示，相比於並不抑制擴散之抗體，而與人類 α -突觸核蛋白上之不同抗原決定基結合。

在一些實施例中，本文揭示之抗體或其抗原結合片段中之任一者具有aslo0452 ngl-3之功能特性中之任何一或多者，例如，本文所述之aslo0452 ngl-3功能特性中之任一者。在一些實施例中，本文揭示之抗體或其抗原結合片段中之任一者具有aslo0543之功能特性中之任何一或多者，例如，本文所述之aslo0543功能特性中之任一者。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段與抗體aslo0452 ngl-3及/或aslo0543競爭結合人類 α -突觸核蛋白。在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段與抗體aslo0452 ngl-3及/或aslo0543結合人類 α -突觸核蛋白上相同之抗原決定基。

可容易地測定，抗體或其抗原結合片段是否與如上所定義之參考抗體或抗原結合片段之抗原決定基結合。此類方法在此項技術中係常規的。舉例而言，抗體可與另一抗體藉由生物化學競爭分析來比較，其中將兩種抗體(一種經標記以用於目的偵測而另一種不標記)與給定抗原同時培育。若獲得標記抗體之結合信號，則兩種抗體稱為識別所關注的蛋白質上相異、不重疊的抗原決定基。若未獲得結合信號，則相反地其將表徵為在蛋白質序列上具有重疊抗原決定基，此係因為一種抗體之結合空間上阻礙第二抗體之結合。此外，給定抗原決定基之胺基酸位置亦可使用經修飾蛋白質(諸如截斷物、源自抗原的一級胺基序列之線性肽序列、物種直系同源

物)及藉由與給定蛋白質結合之抗體之蛋白分解消化及質譜分析來鑑別。此等方法用以產生抗體與抗原之間的相互作用區。

可進行額外常規實驗(諸如，肽突變及結合分析)以確認任何所觀測到之結合之缺乏實際上是否係歸因於結合本發明之抗原決定基或是否係由於一些其他現象(諸如，位阻(steric hindrance))。此類實驗可使用ELISA、RIA、Biacore、流動式細胞測量術或其他已知抗體結合分析來進行。

舉例而言，對於特異性抗原決定基之精確映射，抗原決定基:互補位界面之數學模型可由經由使用高解析度成像方法(諸如，用X射線繞射之共結晶)來解析抗原:抗體複合物之結構所產生的資料來導出。為確認所導出之數學模型關於鑑別界定抗原決定基之關鍵接觸殘基的相關性，隨後必須進行抗原之點突變誘發及對於由此類所建立突變所致之抗原與抗體之間的結合強度的影響的分析。使用此方法組合，可建立包含抗原決定基之關鍵接觸殘基之準確映射。

與本發明之抗體或其抗原結合片段之抗原決定基結合之抗體或其抗原結合片段可藉由生產本發明之抗體或其抗原結合片段之變異體來產生。此類變異抗體或其抗原結合片段可具有擁有與本發明之抗體或其抗原結合片段之CDR高水準一致性的CDR。舉例而言，在一些實施例中，本文揭示之抗體或抗原結合片段中之任一者之本文揭示之CDR中之任一者可相比於本文所提及的特異性CDR序列(例如，具有SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 21之CDR中之任何一或多者)中的任何一或多者相差1或2個胺基酸殘基。另外，此類抗體可在構架區中具有一或多種變異(例如，保守胺基酸取代)。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有CDR胺基酸序列中之變異，該等胺基酸序列與抗體aslo0452 ngl-3之CDR維持至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%及高達99%序列一致性。

特定言之，涵蓋保守胺基酸取代。保守置換為發生在具有相關側鏈之胺基酸家族內的彼等。以基因方式編碼的胺基酸一般而言分成以下家族：(1)酸性家族：天冬胺酸、麩胺酸；(2)鹼性家族：離胺酸、精胺酸、組胺酸；(3)非極性家族：丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸；及(4)不帶電極性家族：甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸。此等家族可進一步分類：絲胺酸及蘇胺酸為脂族-羥基家族；天冬醯胺及麩醯胺酸為含醯胺家族；丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸為脂族家族；以及苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸為芳族家族。因此，一般而言，吾人可預期，單獨用異白胺酸或纈胺酸置換白胺酸，麩胺酸置換天冬胺酸、絲胺酸置換蘇胺酸或用結構上相關胺基酸類似置換胺基酸，將對於所得抗體之結合功能或特性不具有主要影響，尤其當置換並不涉及CDR位點內之胺基酸時。

在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含至少一個選自以下之CDR：

- (i) SEQ ID NO: 5之H-CDR1，
- (ii) SEQ ID NO: 6之H-CDR2，
- (iii) SEQ ID NO: 7之H-CDR3，
- (iv) SEQ ID NO: 9之L-CDR1，
- (v) SEQ ID NO: 10之L-CDR2，

(vi) SEQ ID NO: 11之L-CDR3。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有選自抗體aslo0452 ngl-3之CDR之至少一個CDR，亦即選自SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 21中之任一者的至少一個CDR。

在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段之重鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之重鏈的CDR3；且/或本發明之抗體或其抗原結合片段之輕鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之輕鏈的CDR3。因此，在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段之重鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之重鏈之SEQ ID NO:16的CDR3；且/或根據本發明之抗體或其抗原結合片段之輕鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之輕鏈之SEQ ID NO: 21的CDR3。

在又一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段之重鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之重鏈的CDR3。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段之輕鏈之CDR3為抗體aslo0452 ngl-3之輕鏈的CDR3。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有抗體aslo0452 ngl-3之六個CDR，亦即具有胺基酸序列SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 16之三個重鏈CDR；及具有SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之三個輕鏈CDR。

本發明提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 13界定之核苷酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該

可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 18界定之核苷酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性。

本發明亦提供一種抗體或其抗原結合片段，其包含具有藉由SEQ ID NO: 13界定之核苷酸序列的可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 18界定之核苷酸序列的可變輕鏈。

本發明提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 14界定之胺基酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 19界定之胺基酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性。

在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段包含(i)可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 14界定之胺基酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 19界定之胺基酸序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，及(ii)抗體aslo0452 ngl-3之六個CDR。

本發明提供一種根據本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含具有SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之可變重鏈及具有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之可變輕鏈。

在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段具有抗體aslo0543之六個CDR。

因此，在一個實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含：

a) 三個重鏈CDR，其具有以下序列：

(i) SEQ ID NO: 25之H-CDR1，

(ii) SEQ ID NO: 26之H-CDR2；及

(iii) SEQ ID NO: 27之H-CDR3，及

b) 三個輕鏈CDR，其具有以下序列：

(i) SEQ ID NO: 31之L-CDR1，

(ii) SEQ ID NO: 32之L-CDR2；及

(iii) SEQ ID NO: 33之L-CDR3。

在又一實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈及可變輕鏈，該可變重鏈與藉由SEQ ID NO: 14界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，該可變輕鏈與藉由SEQ ID NO: 19界定之序列至少具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性，且其進一步包含：

a) 三個重鏈CDR，其具有以下序列：

(vii) SEQ ID NO: 25之H-CDR1，

(viii) SEQ ID NO: 26之H-CDR2；及

(ix) SEQ ID NO: 27之H-CDR3，及

b) 三個輕鏈CDR，其具有以下序列：

(vii) SEQ ID NO: 31之L-CDR1，

(viii) SEQ ID NO: 32之L-CDR2；及

(ix) SEQ ID NO: 33之L-CDR3。

本發明亦提供一種抗體或其抗原結合片段，其包含具有藉由SEQ ID NO: 23界定之核苷酸序列之可變重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 29界定之核

苷酸序列之可變輕鏈。

本發明亦提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其包含具有SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之可變重鏈及具有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之可變輕鏈。

在又一實施例中，抗體或其抗原結合片段包含具有藉由SEQ ID NO: 22界定之胺基酸序列之重鏈及具有藉由SEQ ID NO: 28界定之胺基酸序列之輕鏈。

構架區及CDR或抗體可被精確界定(參見Kabat等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services (1991), 91-3242, 1991；及Chothia等人 J. Mol. Biol. (1987), 196:901-917, 兩者以引用之方式併入本文中)。

本發明之抗體或其抗原結合片段之胺基酸序列的微小變異被認為涵蓋在本發明內，其限制條件為胺基酸序列的變異與如本文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段維持至少75%，更佳地至少80%、至少90%、至少95%，且最佳至少99%序列一致性。特定言之，涵蓋保守胺基酸置換。

本發明亦提供一種單鏈胺基酸序列，其包含如本文任何地方所定義之本發明之之抗體或其抗原結合片段的輕鏈。本發明亦提供一種單鏈胺基酸序列，其包含如本文任何地方所定義之本發明之抗體或其抗原結合片段的重鏈。

用於比較之序列之最佳比對可(例如)藉由以下來進行：藉由Smith及Waterman之局部同源比對演算法(Smith及Waterman Adv. Appl. Math. 2 (1981), 484；以引用之方式併入本文中)；藉由Needleman及Wunsch之演

算法(Needleman及Wunsch, J. Mol. Biol. (1970), 48: 443 ; 以引用之方式併入本文中) ; 藉由Pearson及Lipman之相似性搜索方法(Pearson及Lipman, Proc Natl Acad Sci U S A (1988), 85: 2444 ; 以引用之方式併入本文中) ; 藉由此等演算法之電腦實施方式(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA - Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) ; 或藉由視覺檢查(參見Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausbel等人, 編, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, In. 及John Wiley & Sons, Inc. (1995增刊) Ausubel ; 以引用之方式併入本文中)。

適合於測定百分比序列相似性或一致性之演算法之實例為BLAST及BLAST 2.0演算法(參見Altschul等人 J. Mol. Biol. (1990), 215(3): 403-410 ; 及 National Center for Biotechnology Information 之「<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>」 ; 兩者以引用之方式併入本文中)。

在一個實施例中，分離本發明之抗體或其抗原結合片段。在另一實施例中，純化本發明之抗體或其抗原結合片段。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段為單株抗體。在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段為人類化抗體。在又一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段為人類抗體。

在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段為IgA、IgD、IgE、IgM或IgG (諸如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4)抗體或其抗原結合片段。

在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有針對IgG Fc

受體之降低的結合親和性。因此，本發明之抗體或抗原結合片段具有較低免疫原性影響。在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段為IgG1TM抗體或其抗原結合片段。IgG1TM為IgG1三重突變，其含有Fc域中之降低抗體或其抗原結合片段針對Fc- γ 受體(Fc γ R)之結合親和性的3個點突變(L234F/L235E/P331S) (Oganesyan 等人 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, (2008) 64: 700-704；以引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，因此，藉由本發明之抗體而抗體介導的 α -突觸核蛋白擴散預防並不需要Fc相關的效應功能作為操作之關鍵機制。

抗原結合片段包括Fab、Fv、scFv、dAb、Fd、Fab'、F(ab')₂或具有用以結合之足夠構架的分離互補決定區(CDR)。Fab片段可為由VL域、VH域、CL域及CH1域組成之單價片段。F(ab')₂片段可為包含在鉸鏈區處由二硫橋鍵鍵聯之兩個Fab片段的二價片段。Fc片段可由CH2域及CH3域組成。Fv片段可由抗體之單一臂之VL域及VH域組成。dAb片段(Ward等人 *Nature* (1989), 341: 544-546；以引用之方式併入本文中)可由VH域組成。具有用以結合之足夠構架的經分離互補決定區(CDR)可為可變區之抗原結合部分。

輕鏈可變區之抗原結合部分及重鏈可變區之抗原結合部分(例如，Fv片段之兩個域(VL及VH))可使用重組方法藉由合成連接子來接合，該合成連接子使得其能夠被製成為VL區及VH區在其中配對以形成單價分子之單一蛋白質鏈(被稱為單鏈Fv (scFv)；參見例如Bird等人 *Science* (1988), 242(4877): 423-426；及Huston等人 *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988), 85: 5879-5883；兩者以引用之方式併入本文中)。此等係使用為熟習此項技術者已知之習知技術來獲得，且以與完整抗體相同之方式篩檢部分之效

用。

本發明之抗體或其抗原結合片段可具有如上文所定義之有利特性之任一或所有或其組合。特定言之，本發明之抗體或其抗原結合片段針對 α -突觸核蛋白可為選擇性的，且能夠減緩或阻止活體內 α -突觸核蛋白之細胞至細胞傳遞及擴散。

本發明之所得抗體或其抗原結合片段之功能性且詳言之(i)其結合 α -突觸核蛋白之抗原決定基之能力；及(ii)其減緩或阻止活體內 α -突觸核蛋白之細胞至細胞傳遞及擴散的能力，可容易地藉由使用實例中之本文所描述之該等技術來分析其比活性來測定。

本發明提供用於使用轉運體分子將根據本發明之抗體或其抗原結合片段跨越血腦障壁(BBB)遞送的組合物，該等轉運體分子當與該抗體或片段締合時(例如，當與該抗體或片段融合或結合時)可跨過大腦內皮細胞。本文提供BBB序列。

如本文所使用，術語「有效負載」係用作如在此描述之抗體或其抗原結合片段的簡寫，該抗體或其抗原結合片段的跨越BBB轉運可由如本文所提供之轉運體分子來幫助。在特定實施例中，「有效負載」覆蓋本發明之抗體之重鏈可變區，更特定言之also0452 ngl-3或aslo0543之重鏈可變區。

有效負載可為轉運體分子(例如)作為融合多肽之部分，或經由二硫鍵或其他共價鍵與多肽接合。可替代地，有效負載可以將使得轉運體分子幫助其跨越BBB轉運之任何方式來與轉運體分子締合，如下文進一步描述。在某些態樣中，有效負載在BBB轉運後保留轉運體分子之一部分，且以彼形式保持中樞神經系統(CNS)活性。可替代地，有效負載可在BBB轉運期

間但以使得其在**BBB**轉運後與轉運體分子解離的方式來與轉運體分子締合。

本發明進一步提供用於治療或診斷**CNS**之疾病或病症，特定言之 α -突觸核蛋白病的方法，該等方法包含使用與根據本發明之抗體或其抗原結合片段締合的此類轉運體分子。

在某些態樣中，本發明提供一種經分離轉運體分子，其包含源自免疫球蛋白之多肽。在某些態樣中，多肽為駱駝抗體(camelid antibody)FC5之模擬劑或非模擬劑，使用螢光微體積分析技術(FMAT)來鑑別及分離以偵測針對大腦微血管內皮細胞(**BMVEC**) (例如，小鼠**B.End3**細胞)的結合。在某些態樣中，源自免疫球蛋白之多肽為抗體或其活性片段，其中「活性」意謂轉運體分子可(例如)與一或多種物種中之**BMVEC**(例如，小鼠**BMVEC**、大鼠**BMVEC**、食蟹獼猴**BMVEC**或人類**BMVEC**)結合，內化至一或多個物種之**BMVEC**中，及/或單獨或與有效負載締合跨過血腦障壁。

在一些實施例中，**BBB**轉運體分子為描述於美國臨時專利申請案第62/094,503號中之**BBB**轉運體分子，其以全文引用之方式併入本文中。在某些態樣中，轉運體分子包含以下中之一或多者：**Bbbt0241**、**Bbbt0626**、**Bbbt0626gl**、**Bbbt0632**、**BBBt0632gl**、**Bbbt0654**、**Bbbt0726**、**Bbbt0727**、**Bbbt0732**、**Bbbt0754**、**Bbbt0674**、**Bbbt0755**、**Bbbt0643**、**Bbbt0579**或**Bbbt0671**，如美國臨時專利申請案第62/094,503號中所描述，其以全文引用之方式併入本文中。

在一特定實施例中，**BBB**轉運體分子為**Bbbt0626**或**BBBt0632**。

在某些實施例中，**BBB**轉運體分子為生殖系化的，例如，

Bbbt0626gl為Bbbt0626之生殖系版本，稱為「Bbbt0626gl」。

在又一特定實施例中，BBB轉運體分子為BBBt0632gl或Bbbt0626gl。

在某些態樣中，轉運體分子並不與BMVEC結合，但仍能夠跨越BBB轉運，如在活體外轉胞吞作用分析中所指示。

參考BBB轉運體分子，所描述之VH CDR序列對應於經典Kabat編號位置，亦即Kabat H-CDR1係在位置31至位置35處，H-CDR2係在位置50至位置65處，且H-CDR3係在位置95至位置102處。L-CDR2及L-CDR3亦對應於經典Kabat編號部位，亦即分別地位置50至位置56及位置89至位置97。如本文所用，術語「L-CDR1」或「輕鏈CDR1」對應於位於VL中之Kabat位置23至34處的序列(對比而言，根據Kabat編號概要之經典L-CDR1位置對應於位置24至位置34)。

在某些態樣中，源自免疫球蛋白之多肽包含免疫球蛋白重鏈互補決定區(CDR)。舉例而言，源自免疫球蛋白之多肽可包括免疫球蛋白重鏈互補決定區-1 (H-CDR1)、免疫球蛋白重鏈互補決定區-2 (H-CDR2)、免疫球蛋白重鏈互補決定區-3 (H-CDR3)。在某些態樣中，源自免疫球蛋白之多肽可進一步包含或可替代地包含免疫球蛋白輕鏈CDR。舉例而言，源自免疫球蛋白之多肽可包括免疫球蛋白輕鏈互補決定區-1 (L-CDR1)、免疫球蛋白輕鏈互補決定區-2 (L-CDR2)及免疫球蛋白輕鏈互補決定區-3 (L-CDR3)。

在某些態樣中，源自免疫球蛋白之多肽含有分別地具有以下胺基酸序列之H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3：

(a) SEQ ID NO: 40作為H-CDR1，SEQ ID NO: 41作為H-CDR2，

SEQ ID NO: 42作為H-CDR3，SEQ ID NO: 36作為L-CDR1，SEQ ID NO: 37作為L-CDR2及SEQ ID NO: 38作為L-CDR3，其中CDR類似於Bbbt0626及Bbbt0626g1之彼等；

(b) SEQ ID NO: 40作為H-CDR1，SEQ ID NO: 41作為H-CDR2，SEQ ID NO: 42作為H-CDR3，SEQ ID NO: 44作為L-CDR1，SEQ ID NO: 45作為L-CDR2及SEQ ID NO: 46作為L-CDR3，其中CDR與Bbbt0626及Bbbt062g1之彼等一致。

在某些態樣中，源自免疫球蛋白之多肽含有分別地具有以下胺基酸序列之H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3：

(a) SEQ ID NO: 49作為H-CDR1，SEQ ID NO: 50作為H-CDR2，SEQ ID NO: 51作為H-CDR3，SEQ ID NO: 53作為L-CDR1，SEQ ID NO: 54作為L-CDR2及SEQ ID NO: 55作為L-CDR3，其中CDR類似於Bbbt0632g1之彼等；

(b) SEQ ID NO: 49作為H-CDR1，SEQ ID NO: 50作為H-CDR2，SEQ ID NO: 51作為H-CDR3，SEQ ID NO: 53作為L-CDR1，SEQ ID NO: 54作為L-CDR2及SEQ ID NO: 55作為L-CDR3，其中CDR與Bbbt0632g1之彼等一致。

在某些替代實施例中，除(例如)1、2、3、4或5個單一胺基酸缺失、取代或插入以外，如上文所描述之一或多個CDR與所述CDR一致。

在某些實施例中，如上文所提供之轉運體分子可跨過血腦障壁。

在某些態樣中，H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3可定位於免疫球蛋白構架區中以製造抗體VH及抗體VL。在某些態樣中，構架區可為源自人類的構架區。在某些態樣中，抗體VH及抗

體VL係(例如)經由可撓性肽連接子來融合在一起以形成scFv分子。在某些態樣中，VH及VL進一步包含一或多個免疫球蛋白恆定域，例如，CH1域、鉸鏈區、CH3域、CH3域、CL- κ 域及/或CL- λ 域。在某些態樣中，該一或多個免疫球蛋白恆定域源自人類免疫球蛋白，例如，人類IgG1免疫球蛋白。在某些態樣中，VH、VL及/或恆定域可包含諸突變，該等突變有助於(例如)加長或簡短半衰期、增加或減少效應功能、或經由肽融合、雙硫鍵或化學結合連接有效負載分子的能力。

在本發明之某些態樣中，提供與轉運體分子締合之根據本發明之抗體或其抗原結合片段，該轉運體分子可如在此所描述跨過大腦內皮細胞。

在特定態樣中，本發明提供一種與轉運體分子締合之根據本發明之抗體或其抗原結合片段，該轉運體分子包含源自免疫球蛋白之多肽，其中該多肽包含免疫球蛋白重鏈可變區(VH)區及免疫球蛋白輕鏈可變區(VL)區。在某些態樣中，源自免疫球蛋白之多肽包含本文所提供之序列，其包括：

(a) VH胺基酸序列，其與SEQ ID NO: 39至少80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致；及VL胺基酸序列，其與SEQ ID NO: 43至少80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，其中SEQ ID NO: 39及SEQ ID NO: 43編碼Bbbt0626g1之VH區及VL區，

(b) VH胺基酸序列，其與SEQ ID NO: 47至少80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致；及VL胺基酸序列，其與SEQ ID NO: 43至少80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，其中SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 43編碼Bbbt0626之VH區及VL

區，

(c) VH胺基酸序列，其與SEQ ID NO: 48至少80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致；及VL胺基酸序列，其與SEQ ID NO: 43至少80%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，其中SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 43編碼Bbbt0632之VH區及VL區。

在某些態樣中，本發明提供一種與轉運體分子締合之根據本發明之抗體或其抗原結合片段，該轉運體分子包含源自免疫球蛋白之多肽，其中源自免疫球蛋白之多肽包含VH區及VL區，其中：

- (a) VH區包含SEQ ID NO: 34，且VL區包含SEQ ID NO: 35；或
- (b) VH區包含SEQ ID NO: 39，且VL區包含SEQ ID NO: 43；或
- (c) VH區包含SEQ ID NO: 39，且VL區包含SEQ ID NO: 35；或
- (d) VH區包含SEQ ID NO: 47，且VL區包含SEQ ID NO: 43；或
- (e) VH區包含SEQ ID NO: 47，且VL區包含SEQ ID NO: 35；或
- (f) VH區包含SEQ ID NO: 48，且VL區包含SEQ ID NO: 52。

在又一實施例中，如上文所描述之轉運體分子之VH區及VL區以共價方式鍵聯以形成單鏈片段(ScFv)。

在某些態樣中，在此提供之轉運體分子具有轉運體活性，例如，其可與來自一或多種物種之BMVEC(例如，小鼠、大鼠、食蟹獼猴或人類的BMVEC)結合，其可內化至一或多種物種之BMVEC中，或其可跨過血腦障壁。

在某些態樣中，如本文所提供之轉運體分子包含源自免疫球蛋白之多肽，其中源自免疫球蛋白之多肽包含抗體或其BBB可穿透片段。

如本文所描述之「**BBB**可穿透片段」為轉運體分子之可特異性地與一或多種物種之**BMVEC**結合且經由**BMVEC**在活體外或活體內自周邊血管跨過至**CNS**血管中的片段。給定片段是否為**BBB**可穿透片段可藉由為一般技術者已知之各種活體外或活體內分析來測試。舉例而言，轉運體分子可以活體外轉胞吞作用分析、以活體內分析(諸如，如US 62/094,503中所描述之利尿分析)來測試。可用於在活體內量測有效負載跨越**BBB**之遞送的其他分析包括(但不限於)慢性收縮損傷(CCI)、坐骨神經損傷(SNI)模型或脊神經結紮(SNL)，以上所有可經由腳爪撥動或哈貴夫士方法(Hargreaves method)(Hargreaves K, 等人, Pain; 1988; 32; 77-88)來量測。在某些態樣中，如本文所提供之轉運體分子可與來自一或多種物種(例如，人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠或牛**BMVEC**)之**BMVEC**結合。結合可以為一般技術者已知之各種方式來證實，例如，如US 62/094,503中所描述之FMAT分析。在某些態樣中，**BMVEC**為大腦毛細管內皮細胞(**BCEC**)。在某些態樣中，如本文所提供之轉運體分子在活體外轉胞吞作用分析中可穿過**BCEC**單層。在某些態樣中，轉運體分子活性可藉由**CNS**中之轉運體分子之可視化來證實。舉例而言，氚標記的轉運體分子可經周邊(例如經靜脈內)遞送向個體(例如，小鼠)，且接著經由定量全身放射照相術來在**CNS**中觀測。在某些態樣中，轉運體分子定位在**CNS**之特定區中，例如，小腦之皮質、大腦之灰質、脊髓之灰質、腦橋或其組合。

在某些態樣中，如本文所描述之轉運體分子包含抗體或其**BBB**可穿透片段，該抗體或其**BBB**可穿透片段包含兩個或更多個次單位或由其組成，例如，重鏈或其片段及輕鏈或其片段，其中重鏈及輕鏈經締合例如作為單一融合蛋白質(例如，**scFv**)或作為由一或多個二硫鍵結合在一起之兩

個次單位。在某些態樣中，重鏈包含VH域或區，且輕鏈包含VL域或區。

在一個實施例中，本發明提供一種根據本發明之與如在此描述之血腦障壁轉運體分子締合的抗體或其抗原結合片段。

在一特定實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段與血腦障壁轉運體分子締合，其中轉運體分子為包含以下之單鏈片段(scFv)：

i. SEQ ID NO: 39之BBBt0626g1之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 43之BBBt0626g1之輕鏈可變區(VL)，或

ii. SEQ ID NO: 47之BBBt0626之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 43之BBBt0626之輕鏈可變區(VL)，

iii. SEQ ID NO: 48之BBBt0632g1之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 52之BBBt0632g1之輕鏈可變區(VL)。

在某些態樣中，重鏈進一步包含重鏈恆定域，例如，CH1域、鉸鏈、CH2域及/或CH3域，或其片段。在某些態樣中，重鏈恆定域為IgG恆定域或其片段，例如，人類IgG恆定域，例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恆定域。在某些態樣中，IgG恆定域或其片段包含相對於野生型IgG恆定域之更改的糖基化及/或一或多個胺基酸取代，其中經修飾之IgG具有特定特性，例如，相比於具有野生型IgG恆定域之IgG之半衰期而半衰期延長或縮短，相對於野生型IgG恆定域增加或減少效應功能，或經由例如肽鍵、雙硫鍵或化學結合連接異源部分的能力。在某些態樣中，IgG恆定域或其片段具有相對於野生型IgG恆定域之更改的糖基化，其中經修飾之IgG具有特定特性，例如，相比於具有野生型IgG恆定域之IgG之半衰期而半衰期延長或縮短，相對於野生型IgG恆定域增加或減少效應功能。

在一些實施例中，根據本發明之抗體或其抗原結合片段與如在此所

定義之BBBt0626或BBBt0626gl締合，從而形成雙特異性抗體分子。

在其他實施例中，根據本發明之該等雙特異性抗體包含與單鏈片段(scFv)締合之人類IgG1 TM骨架(亦即，IgG1 TM之重鏈CH1區、CH2區、CH3區)，該單鏈片段包含移植至根據本發明之抗 α -突觸核蛋白抗體之重鏈之N端(「BiS2格式」)或C端(「BiS3」格式)或VL之N端(「BiS1格式」)的BBBt0626或BBBt0626gl的VH區及VL區。BiS格式參考如揭示於DiMasi等人J Mol Biol. 2009年10月30日;393(3):672-92中。

在一些實施例中，根據本發明之該等雙特異性抗體進一步包含輕鏈，該輕鏈包含與根據本發明之抗 α -突觸核蛋白抗體之VL締合的 κ CL區或 λ CL區。

在特定實施例中，根據本發明之雙特異性抗體包含與以下締合之人類IgG1 TM骨架：

(i) BBBt0626gl之單鏈片段(scFv)，其包含SEQ ID NO: 39之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 43之輕鏈可變區(VL)；或

(ii) Bbbt0626之單鏈片段(scFv)，其包含SEQ ID NO: 47之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 43之輕鏈可變區(VL)，

其中該ScFv被移植至SEQ ID NO: 12之aslo0452 ngl-3之重鏈的N端(BiS2格式)或C端(BiS3格式)，或SEQ ID NO: 17之輕鏈的N端(「BiS1格式」)。

在又另一特定實施例中，根據本發明之雙特異性抗體包含與BBBt0626gl之單鏈片段(scFv)締合之人類IgG1 TM骨架，該單鏈片段包含(i)SEQ ID NO: 39之重鏈可變區(VH)及(ii)SEQ ID NO: 43之輕鏈可變區(VL)；其中該ScFv被移植至SEQ ID NO: 12之aslo0452 ngl-3之重鏈的

N端(BiS2格式)或C端(BiS3格式)，或SEQ ID NO: 17之輕鏈的N端(「BiS1格式」)。

在其他特定實施例中，根據本發明之雙特異性抗體包含與以下締合的人類IgG1 TM骨架：

(i) BBBt0626g1之單鏈片段(scFv)，其包含SEQ ID NO: 39之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 43之輕鏈可變區(VL)；或

(ii) Bbbt0626之單鏈片段(scFv)，其包含SEQ ID NO: 47之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 43之輕鏈可變區(VL)，

其中該ScFv被移植至SEQ ID NO: 22之aslo0543之重鏈的N端(BiS2格式)或C端(BiS3格式)，或SEQ ID NO: 28之輕鏈的N端(「BiS1格式」)。

本發明亦提供本發明之抗體或其抗原結合片段，其用作藥劑。

本發明亦提供一種本發明之抗體或其抗原結合片段，其適用於預防或治療中樞神經系統之疾病，特定言之 α -突觸核蛋白病。在一個實施例中， α -突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)及多發性系統萎縮症(MSA)。在一較佳實施例中， α -突觸核蛋白病為帕金森氏病(PD)。

本發明亦提供本發明之抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造用於預防或治療中樞神經系統之疾病，特定言之 α -突觸核蛋白病的藥劑。在一個實施例中， α -突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)及多發性系統萎縮症(MSA)。在一較佳實施例中， α -突觸核蛋白病為帕金森氏病(PD)。

本發明亦提供一種治療或預防患者體內之疾病的方法，該方法包含

向患者投與本發明之抗體或其抗原結合片段。在一個實施例中， α -突觸核蛋白病係選自帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)及多發性系統萎縮症(MSA)。在一較佳實施例中， α -突觸核蛋白病為帕金森氏病(PD)。

在使用時，本發明之抗體或其抗原結合片段能夠藉由抑制 α -突觸核蛋白在活體內之傳播及擴散來治療或預防疾病進展。因此，本發明之抗體或其抗原結合片段提供優於其他療法的獨特優勢。本發明亦提供一種減緩或預防有此需要的個體體內的疾病進展的方法，該方法包含向患者投與本發明之抗體或其抗原結合片段。

在一個實施例中，治療疾病之該方法包含投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段。在另一實施例中，預防疾病或減緩或預防疾病進展之該方法包含投與預防有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段。

用於投與本發明之抗體或其抗原結合片段之劑量範圍為產生所需治療性效果的彼等。應瞭解，所需劑量範圍視以下而定：抗體或其抗原結合片段或組合物之確切性質、投與途徑、調配物之性質、患者年齡、患者病況的性質、程度或嚴重程度、禁忌(若存在)及主治醫師的判斷。此等劑量含量之差異可使用用於最佳化之標準經驗方法來調整。

合適的劑量係在每公斤體重1 mg至50 mg範圍內。其可在5 mg/kg至30 mg/kg、10 mg/kg至25 mg/kg或15 mg/kg至20 mg/kg之範圍內。可以每天一次或更不頻繁地(例如，每週一次或每月一次)投與單位劑量。

投與可藉由重複投與本發明之抗體或其抗原結合片段來實現，以用於延長時段。投與可為並行或連續的，且可以任何次序來起作用。

本文所定義之預防或治療可應用作為單獨療法，或除本發明之抗體或抗原結合片段以外可涉及投與其他試劑或通常用於治療 α -突觸核蛋白病

之已建立的療法(諸如，L-3,4-二羥基苯丙胺酸(L-DOPA)、多巴胺(受體)促效劑、兒茶酚-O-甲基轉移酶(COMT)抑制劑及/或單胺B型氧化酶(MAO-B)抑制劑)。投與其他試劑或已建立的療法可與本發明之抗體或抗原結合片段組合或作為其輔助或與其結合，且可藉助於同時、連續或分開給藥治療之個別組分。

組合治療可以如由熟習此項技術者認為所必需或方便的任何方式且出於本說明書之目的來進行，預期對於用於組合之化合物之次序、量、重複或相對量無限制。

治療有效量係指抗體或其抗原結合片段當單獨或以組合形式向患者投與以用於治療疾病或疾病之臨床症狀中之至少一者時的量，其足以影響疾病或症狀之此類治療。治療有效量可(例如)視抗體及/或疾病之症狀、待治療之患者之年齡、體重及/或健康及處方醫師之判斷而變化。在任何給定個例中之合適治療有效量可由熟習此項技術者來確定或能夠由常規實驗來確定。治療有效量亦為在該量下抗體或其抗原結合片段之有益效果超過其任何毒性或不利效果的量。

「預防有效量」為當單獨或組合形式向患者投與時抑制或延遲疾病或疾病臨床症狀中之至少一者之發作或復發的抗體或其抗原結合片段的任何量。在一些實施例中，預防有效量完全預防疾病之發作或復發。「抑制」發作意謂減輕疾病發作之可能性，或完全預防疾病發作。

本發明亦提供醫藥組合物，其包含本發明之抗體或其抗原結合片段。因此，本發明提供一種醫藥組合物，其包含本發明之抗體或其抗原結合片段與醫藥學上可接受賦形劑。合適的醫藥學上可接受賦形劑可有助於將活性化合物加工成適合於醫藥投與的製劑。

本發明之醫藥組合物可經調配以用於(但不限於)非經腸遞送，例如，肌內、皮下或靜脈內。適合於肌內、皮下或靜脈內注射之組合物包括無菌水溶液。

醫藥組合物可呈水溶液形式，且可包括生理學上相容緩衝液(諸如，漢克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution))或生理學上緩衝鹽水。醫藥組合物可另外地或可替代地含有增加懸浮液黏度的物質，諸如，羧甲基纖維素鈉、山梨醇或葡聚糖。醫藥組合物可視需要製備為油性注射懸浮液。合適的親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油(諸如，芝麻油)或合成脂肪酸酯(諸如，油酸乙酯或甘油三酯)或脂質體。視情況，醫藥組合物可含有合適的穩定劑或增加化合物之可溶性的試劑以允許製備高濃縮溶液。

本發明提供一種經分離核酸分子，其編碼本發明之抗體或其抗原結合片段。本發明亦提供一種載體，其包含本發明之經分離核酸分子。本發明進一步提供一種宿主細胞，其包含本發明之載體。

本發明之抗體或抗原結合片段不限於產生或製造的特定方法。因此，本發明提供已經由分泌抗體之融合瘤製造的抗體以及由以重組方式製造的已經轉化或經轉染有編碼抗體之一或多種核酸的細胞產生的抗體。此類融合瘤、以重組方式製造的細胞及核酸形成本發明之一部分。

實例

實例1：抗體製造

對重組人類 α -syn (「hu α -syn」)(被動地固定至微量滴定孔上及游離在溶液中兩種)使用一系列選擇循環，自噬菌體展示庫分離抗 α -syn特異性抗體。選殖至基於絲狀噬菌體M13之噬菌粒載體中的原生人類單鏈Fv

(scFv)噬菌體展示庫用於選擇(Lloyd等人, Protein Eng Des Sel. (2009), 22(3):159-68；及Vaughan等人, Nat Biotechnol. (1996), 14(3); 309-14；兩者以引用之方式併入本文中)。

在兩輪或三輪上文所描述之選擇之後，從篩選生產品中先篩選出代表數目的個別純系選殖體，其篩選係呈周質大腸桿菌提取物中之可溶scFv片段形式以在均質FRET（螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer)) HTRF[®] (均質時差式螢光(Homogeneous Time-Resolved Fluorescence), Cisbio International))分析中進行與可溶人類 α -突觸核蛋白結合(Kipriyanov等人 J Immunol Methods (1997) 200: 69-77；以引用之方式併入本文中)。

HTRF[®]分析(圖1)係利用在緊密接近之供體與受體螢光團之間的螢光共振能量轉移的均質分析技術(Mathis G Clin Chem (1995) 41: 1391-1397.；以引用之方式併入本文中)。此分析用於藉由直接或間接將所關注的分子中之一者偶合至供體螢光團(例如，鎔(Eu³⁺)穴狀化合物)及將所關注的另一分子偶合至受體螢光團XL665 (穩定交聯的別藻藍蛋白)來量測大分子的相互作用。穴狀化合物分子(在337 nm下)之激發引起在620 nm下螢光發射。來自此發射之能量轉移至緊密接近穴狀化合物之XL665，從而產生來自XL665之特定長壽命螢光(在665 nm下)的發射。量測供體(在620 nm下)及受體(在665 nm下)兩者之特定信號，允許計算補償分析中存在有色化合物之665/620 nm比率。

測試未純化抗 α -syn scFv樣品與生物素標記之 α -syn的結合。將含有與0.8 nM抗生蛋白鏈菌素鹼(Cisbio International, 610SATLB)組合之40 nM生物素標記之人類 α -syn的5微升溶液添加至384孔低體積分析盤

(Costar, 3676)。接下來，將10微升之各稀釋度之抗體測試樣品添加至盤。最後，將含有DC抗myc (Cisbio International, 661MYCDAB)之5微升溶液添加至分析盤。所有稀釋均係在含有0.8 M氟化鉀(BDH 103444T)及0.1%牛血清白蛋白(BSA, Sigma A9576)於杜爾貝科(Dulbeccos)PBS (Invitrogen, 14190185)中的分析緩衝液中進行。將分析盤在室溫下培育3小時，隨後在4℃下培育16小時，隨後使用EnVision盤讀取器(Perkin Elmer)在620 nm及665 nm發射波長下讀取時差式螢光。

藉由計算各樣品之665/620 nm比率繼而 $\Delta F\%$ 值來分析資料。665/620 nm比率用於使用以下方程式來校正樣品干擾：

$$665/620 \text{ nm比率} = \left(\frac{665 \text{ nm信號}}{620 \text{ nm信號}} \right) \times 10,000$$

接著，使用以下方程式來計算各樣品之 $\Delta F\%$ ：

$$\Delta F(\%) = \left(\frac{\text{樣品}665/620 \text{ nm比率} - \text{陰性對照}665/620 \text{ nm比率}}{\text{陰性對照}665/620 \text{ nm比率}} \right) \times 10,000$$

陰性對照(非特異性結合)係藉由用未標記之人類或大鼠 α -syn置換測試樣品來定義。

$\Delta F\%$ 值隨後用於計算如以下方程式中所描述之特異性結合%：

$$\text{特異性結合}\% = \left(\frac{(\text{樣品}\Delta F\% - \text{NSB } \Delta F\%)}{(\text{總結合}\Delta F\% - \text{NSB } \Delta F\%)} \right) \times 100$$

使用 GraphPad Prism 軟體藉由使用四參數推理方程式(logistic equation)進行曲線擬合來測定 IC_{50} 值：

$$Y = \text{底部} + (\text{頂部} - \text{底部}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

X為濃度之對數。

Y為特異性結合

Y在底部處開始，且以S形向頂部前進。

將與人類 α -syn結合而呈未純化周質提取物之單鏈Fv純系選殖體進行DNA定序(Osbourn等人, Immunotechnology (1996), 2: 181-196; 及Vaughan等人, Nat Biotechnol. (1996), 14(3); 309-14; 兩者以引用之方式併入本文中)。獨特scFv再次在細菌中表現, 且利用親和性層析法(如WO 01/66754中所描述; 以引用之方式併入)來純化。此等樣品之效能係藉由在如上文所描述之HTRF分析中針對與生物素標記之人類 α -syn的結合滴定經純化製劑來測定。選擇顯現最強 α -syn相互作用之經純化scFv製劑以用於轉化成IgG格式。

藉由在HTRF分析中滴定抗體, 針對與 α -syn結合之強度將純系選殖體分級。針對在Octet Red生物感測器上作為IgG與 α -syn結合之動力學(k_{off}) (參見如實例9中所描述之方法), 以及針對突觸核蛋白家族成員選擇性(人類 α -syn、 β -syn、 γ -syn) (參見如實例4中所描述之方法), 及針對與鼠類 α -syn之交叉反應性(參見如實例5中所描述之方法), 來進一步分析最佳 α -syn結合劑。

實例2: aslo0452 ngl-3之衍生

C端反應性 α -syn特異性純系選殖體(asyn0087)係藉由篩檢在DELFLIA分析中與人類 α -syn結合(參見如實例4中所描述之方法)來鑑別。Asyn0087與人類、食蟹獼猴及啮齒動物 α -syn特異性地結合(參見如實例5中所描述之方法)。將Asyn0087恢復至最接近的可能人類生殖系序列(Tomlinson VBASE. MRC Centre of Protein Engineering, Cambridge, UK. 1997; 以引用之方式併入本文中), 其在最佳化之前不藉由標準突變誘發技術影響效能。在生殖系化之後, 針對與 α -syn之結合再評估純系選殖體。未觀測到不利的影響。

藉由使用如Clarkson及Lowman (2004) (Phage display: A practical approach. Oxford: Oxford University Press ; 以引用之方式併入本文中) 中所描述之標準分子生物學技術使可變重鏈(VH)互補決定區(CDR) 2及3及輕鏈(VL)CDR 1及CDR 3進行寡核苷酸定向性地突變誘發，來創建衍生自前導純系選殖體之大型scFv-噬菌體庫。該等庫經受對可溶生物素標記之人類 α -syn進行的基於親和性之噬菌體展示選擇，以便選擇對於人類 α -syn具有較高親和性的變異體。除降低用於所進行之各輪選擇之可溶生物素標記之人類 α -syn的濃度以外，該等選擇基本上係如先前上文所描述來進行。

將來自各選擇產出之代表性純系選殖體相對抗親本 α -syn結合純系選殖體asyn0087進行競爭結合可溶 α -syn的能力，在HTRF分析中將該等代表性純系選殖體以呈周質大腸桿菌提取物中的可溶scFv片段首先篩檢出來。此等群體篩檢中之各庫之效能用於告知哪些CDR突變誘發庫係以基因方式添加在一起或『經重組』以建立新庫，且此等重組庫經受對可溶生物素標記之人類 α -syn進行的其他輪的親和性驅動選擇。

對於源自單獨及重組突變誘發庫之純系選殖體兩者，在序列分析陽性結合劑之後，使純系選殖體表現且呈scFv片段及IgG兩者純化並結合至可溶 α -syn(其由抗原決定基競爭HTRF分析再確認)。藉由在HTRF抗原決定基競爭分析中滴定抗體，純系選殖體藉由相比於親本IgG asyn0087之與 α -syn結合的相對改良的其IC₅₀值分級。另外針對突觸核蛋白家族成員選擇性(人類 α -syn、 β -syn、 γ -syn)及針對與獼猴及大鼠 α -syn之交叉反應性藉由直接結合HTRF分析或抗原決定基競爭HTRF分析兩者或任一者，來分析最佳 α -syn結合劑。

自此等多輪反覆庫重組及篩檢，鑑別出兩種強效 α -syn特異性、獼猴及大鼠 α -syn交叉反應純系選殖體aslo0452 ngl-1及aslo0467。

針對CDR中之每一者，對aslo0452 ngl-1進行單一點突變誘發，其中已觀測到IC₅₀效能之積極改良。所選擇CDR中之各位置單獨地經由所有20種可能胺基酸殘基來突變，且藉由抗原決定基競爭HTRF分析相比於aslo0452 ngl-1 IgG針對經改良IC₅₀再次進行篩檢。在aslo0452 ngl-1及aslo0467兩者上鑑別且組合跨越四種CDR (H2、H3、L1及L3)之多個殘基，並藉由抗原決定基競爭HTRF分析相比於aslo0452 ngl-1針對經改良IC₅₀再次進行評定。自此等實驗，該兩種最大改良的結合劑經鑑別為aslo0452 ngl-3及aslo0543。

圖2比較asyn0087、aslo0452 ngl-3及aslo0543之VH區與VL區之胺基酸序列。

實例2.1：scFv至IgG1 TM之重新格式化

將具有所要 α -syn結合特性之單鏈Fv純系選殖體轉化成效應功能剔除式完整免疫球蛋白G1 TM (IgG1 TM) (Oganesyan等人 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2008), 64(Pt 6):700-4；以引用之方式併入本文中)抗體格式，基本上如由Persic等人所描述(Persic等人 Gene (1997) 187: 9-18；以引用之方式併入本文中)，具有以下修改。OriP片段包括於表現載體中以有助於與CHO短暫細胞一起使用且允許游離型複製。將可變重鏈(VH)域選殖至含有人類重鏈恆定域及調節元件的載體(pEU1.4)中以及在哺乳動物細胞中表現完整IgG1 TM重鏈。類似地，將可變輕鏈(VL)域選殖至用於表現人類輕鏈(λ)恆定域及調節元件之載體(pEU4.4)中以及在哺乳動物細胞中表現完整IgG輕鏈。為獲得IgG，將重鏈及輕鏈IgG表現載體轉染至CHO

短暫哺乳動物細胞中(Daramola等人, *Biotechnol Prog* (2014) 30: 132-141; 以引用之方式併入本文中)。IgG經表現且分泌至培養基中。過濾收集物，隨後純化，接著使用蛋白質A層析對IgG進行純化。將培養物上清液裝載在合適大小之陶瓷蛋白質A (BioSeptra)之管柱上，且用50 mM pH 8.0之Tris-HCl、250 mM NaCl洗滌。使用0.1 M檸檬酸鈉(pH 3.0)自管柱溶離出經結合IgG，且藉由添加Tris-HCl (pH 9.0)對其進行中和。使用Nap10管柱(Amersham, #17-0854-02)將經溶離物質緩衝交換至PBS中，且使用消光係數基於IgG之胺基酸序列以分光光度法測定IgG之濃度(Mach等人, *Anal Biochem* (1992) 200: 74-80; 以引用之方式併入本文中)。針對聚集及降解純度，使用SEC-HPLC及藉由SDS-PAGE對經純化IgG進行分析。

使用IgG1 TM作為候選藥物格式之基本原理係使歸因於免疫細胞及補體活化(亦即，過量製造可造成發炎的C3a)之旁觀殺傷效應降至最低。旁觀細胞殺傷可藉由免疫複合物之潛在積聚來觸發，該等免疫複合體由候選藥物及胞外 α -突觸核蛋白形成，已經證實會與脂質膜相互作用(Bartels等人, *Biophys. J.* (2010), 99: 2116-2124; 以引用之方式併入本文中)。選擇IgG1 TM格式，因為已經證實其具有與Fc γ 受體(Fc γ R)可忽略的結合且利用免疫複合物降低C1q介導的補體活化(Oganesyan等人 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* (2008), 64(Pt 6):700-4; 以引用之方式併入本文中)。

為使免疫原性之任何可能風險降至最低，在不影響效能之情況下使aslo0452 ngl-3之構架儘可能接近於人類生殖系胺基酸序列。此意謂，aslo0452 ngl-3中的一些胺基酸(包括Vernier殘基(Foote及Winter, *J Mol*

Biol. (1992), 224(2): 487-99；以引用之方式併入本文中)並未突變成最接近的人類生殖系序列。對於aslo0452 ngl-3之V_H域，在V區中存在未突變成人類生殖系IGVH3-23及IGJH6序列的一個Vernier殘基(圖3C)。對於aslo0452 ngl-3之V_L域，所有構架殘基匹配人類生殖系IGLV5-45及IGJL2或IGJL3序列(圖3D)。

實例3：親和性最佳化之抗 α -syn IgG抗原決定基確認

自rPeptide LLC獲得重組人類 α -突觸核蛋白、 β -突觸核蛋白及 γ -突觸核蛋白、重組截斷版本之人類 α -突觸核蛋白(aa1-60、aa1-95、aa61-140、96-140、 Δ NAC及NCAP)及小鼠 α -突觸核蛋白。使用市售 α -syn截斷物進行粗略抗原決定基定位。

簡言之，在4°C下將每毫升一微克之各截斷物塗佈至微量滴定孔隔夜。在以PBS沖洗孔之後，添加各抗 α -syn抗體之1 μ g/ml稀釋液。在培育1 h且進行洗滌之後，藉由添加與HRP或Eu³⁺結合的抗人類IgG來偵測經結合的抗體。在培育並進行洗滌之後，添加合適偵測基質(分別為TMB或DELFI A增強溶液)，且在微量滴定盤讀取器上讀取盤。

此等抗原決定基結合研究顯示，前導分離物(asyn0087)識別位於 α -syn蛋白質之胺基酸102與胺基酸130之間的C端區中的抗原決定基(圖4A)。aslo0452 ngl-3及aslo0543兩者維持其識別與其親本前導分離物asyn0087相同的位於 α -syn蛋白質之胺基酸102與胺基酸130之間的C端區中的抗原決定基(圖4B)。

實例4：使用抗原決定基競爭HTRF分析，aslo0452 ngl-3及aslo0543針對 α -syn相對於突觸核蛋白家庭成員的特異性

對於意欲用於治療性應用的抗體至關重要的係，對人類 α -syn具有特

異性以便使關於與其他突觸核蛋白(β -突觸核蛋白及 γ -突觸核蛋白)之靶標外相互作用的任何可能安全性風險降至最低。

aslo0452 ngl-3 及 aslo0543 針對 α -syn 優於其他突觸核蛋白家庭成員(β -syn 及 γ -syn)之特異性係使用HTRF 抗原決定基競爭分析來測定，該HTRF 抗原決定基競爭分析量測生物素標記之人類 α -syn 與溶液中之抗體的結合。

將 α -syn、 β -syn 及 γ -syn 滴定至分析中，且 aslo0452 ngl-3 IgG 及 aslo0543 IgG 之選擇性係藉由量測對生物素標記之人類 α -syn 與 aslo0452 ngl-3/aslo0543 結合的抑制程度來評定。IC₅₀ 值係藉由使用PRISM6®軟體(Graphpad)將資料曲線擬合至四參數推理方程式來測定。量測IgG 與人類 α -syn、 β -syn 及 γ -syn 之直接結合的更靈敏的HTRF 分析亦用於確認 α -syn 特異性(資料未展示)。對於陰性對照，用同型對照抗體或僅緩衝液來置換抗體測試樣品。

在 aslo0452 ngl-3 及 aslo0543 HTRF 抗原決定基競爭分析中用 α -syn 蛋白質、 β -syn 蛋白質及 γ -syn 蛋白質獲得的代表性IC₅₀ 值展示於圖5 中。在所測試濃度(高達5 μ M)下未觀測到與 β -syn 及 γ -syn 結合，從而表明 aslo0452 ngl-3 及 aslo0543 對 α -syn 具有選擇性。

實例5：使用HTRF 抗原決定基競爭分析，aslo0452 ngl-3 針對人類、食蟹獼猴及大鼠 α -syn 之特異性

鑒於治療性應用，至關重要的係，抗體與獼猴 α -突觸核蛋白交叉反應，且希望其與大鼠 α -突觸核蛋白交叉反應至在針對人類 α -syn 觀測到的10 倍內。此使得安全性研究能夠在食蟹獼猴及大鼠物種兩者中進行。

Aslo0452 ngl-3 及 aslo0543 針對人類、食蟹獼猴及大鼠 α -syn 之特異

性係使用HTRF抗原決定基競爭分析來測定，該HTRF抗原決定基競爭分析量測生物素標記之**人類 α -syn**與溶液中之aslo0452 ngl-3的結合。

將人類、食蟹獼猴及大鼠 α -syn滴定至分析中，且抗體之選擇性係藉由量測對生物素標記之**人類 α -syn**與抗體結合的抑制程度來評定。IC₅₀值係藉由使用PRISM6®軟體(Graphpad)將資料曲線擬合至四參數推理方程式來測定。aslo0452 ngl-3及aslo0543之物種交叉反應性亦係使用直接結合HTRF分析格式來確認(未展示)。藉由HTRF分析，將Aslo0452 ngl-3 (或aslo0543)滴定至分析中以競爭與aslo0452 ngl-3 (或aslo0543)結合之**人類或食蟹獼猴或大鼠 α -syn**。對於陰性對照，用同型對照抗體或僅緩衝液來置換抗體測試樣品。

在HTRF抗原決定基競爭分析中用人類、食蟹獼猴及大鼠 α -syn蛋白質獲得之代表性IC₅₀值展示於圖6中。Aslo0452 ngl-3與人類及獼猴 α -syn結合，其中IC₅₀值分別地為5.7 nM及6.8 nM；且與大鼠 α -syn結合，其中IC₅₀值為19.6 nM，在4倍內。Aslo0543與人類及獼猴 α -syn結合，其中IC₅₀值分別地為2.0 nM及2.1 nM；且與大鼠 α -syn結合，其中IC₅₀值為3.8 nM，在2倍內。

Aslo0452 ngl-3與人類、食蟹獼猴及大鼠 α -syn結合的能力指示，相比於並不與人類及食蟹獼猴以及大鼠 α -syn結合的抗體，與人類 α -突觸核蛋白上的不同抗原決定基結合。

實例6：藉由流動式細胞測量術量測，親和性最佳化之純系選殖體針對原生 α -syn的特異性

親和性最佳化之抗 α -syn IgG (aslo0452 ngl-3及aslo0543)針對與原生、內源性人類 α -syn結合的特異性係藉由流動式細胞測量術使用 α -syn陽

性及陰性細胞株來測定。

簡言之，SHSY5Y神經母細胞瘤細胞(α -syn陽性)及BT-20乳癌細胞(α -syn陰性)以0.01%甲醛來固定，且接著用0.5% (v/v) Tween 20滲透，隨後與抗 α -syn抗體、陽性對照或同型對照抗體一起培育。在深入洗滌之後，藉由與抗人類或抗小鼠IgG-FITC二級抗體一起培育來偵測結合的抗體。在進一步洗滌之後，用FACS Canto II設備(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)來分析細胞，且使用FlowJo軟體(Tree Star, Ashland, OR)來進行資料分析。

將資料繪製為展示在單獨染色之細胞相對於初級抗體染色之細胞之間的差異的直方圖。圖7A中之結果展示，相比於同型對照及僅二級抗體(圖B)，在asyn0087 (圖D)存在下， α -syn陽性SH-SY5Y細胞中之螢光信號偏移，從而指示識別內源性表現之 α -syn。Asyn0087並不與 α -syn陰性人類乳癌細胞株(BT-20)結合(圖C)。圖7B中之結果展示，相比於陽性對照抗體，在aslo0452 ngl-3或aslo0543 (圖H)存在下，4D6對於 α -syn陽性SH-SY5Y細胞之螢光信號的強偏移(圖F)且對於 α -syn陰性BT-20細胞無偏移(圖G)。此表明，aslo0452 ngl-3及aslo0543兩者均與原生、內源性表現的胞內人類 α -syn結合。

實例7：藉由DELFI ELISA，最佳化抗 α -syn IgG針對聚集的人類 α -syn的特異性

人類 α -syn之原纖製劑或聚集體係如由Emadi等人所描述來產生(Emadi等人, Biochemistry (2004), 43: 2871-2878.; 以引用之方式併入本文中)。簡言之，將200 μ l之50 μ M重組 α -syn等分至1.8 ml Sarstedt管中且於37°C振盪培育箱中在280 rpm下置放3天。藉由併入添加至10 μ M之最

終濃度的硫代黃素T，在暗處在室溫下培育1 h且在450 nm之激發波長及485 nm之發射波長處在Envision微盤讀取器上讀取螢光來測定聚集的 α -syn之存在。

使用DELFI[®]A抗體俘獲分析來測定親和性最佳化之抗 α -syn IgG (aslo0452 ngl-3及aslo0543)及前導抗體asyn0087針對聚集的人類 α -syn的特異性。此分析量測在逐對ELISA中由aslo0452 ngl-3、aslo0543或asyn0087對聚集的人類 α -syn之俘獲。簡言之，將抗 α -syn抗體之小鼠IgG1版本固定至96孔微量滴定盤(Nunc)之孔上。在阻斷之後，在孔中培育聚集或單體形式的人類 α -syn。在洗滌之後，藉由添加相同抗 α -syn抗體之人類IgG1 TM版本且隨後抗人類IgG-鎳結合物(Perkin Elmer)或抗人類IgG-HRP結合物來偵測所俘獲的人類 α -syn。在培育並進行洗滌之後，添加合適偵測基質(分別為TMB或DELFI[®]A增強溶液)，且在微量滴定盤讀取器上讀取盤。

在此分析中，僅聚集的人類 α -syn將被俘獲及偵測到，此係因為其在單一聚集體上呈現相同抗原決定基之多個複本。對於單體 α -syn，僅一個抗原決定基複本存在，因此偵測第二抗體不能在俘獲抗體存在下結合。資料概述在圖8中。前導分離物asyn0087能夠與聚集的重組人類 α -syn結合。因此，與asyn0087結合之抗原決定基自身並不參與 α -syn之聚集。aslo0452 ngl-3及aslo0543兩者保持其與聚集的重組人類 α -syn結合的能力。

實例8：藉由免疫組織化學，最佳化之抗 α -syn IgG在疾病相關組織中的特異性

藉由帕金森氏病大腦組織之免疫組織化學染色來測定親和性最佳化

之抗 α -syn IgG (aslo0452 ngl-3及aslo0543)及前導抗體asyn0087針對疾病相關形式之人類 α -syn的特異性。結果展示於圖9中，且表明，如同asyn0087一樣，aslo0452 ngl-3及aslo0543均可識別帕金森氏病大腦組織切片中之疾病相關病理性形式之人類 α -syn，包括路易體、路易神經突、神經元聚集體、路易斑點及背景大腦組織。在正常或健康大腦組織中未觀測到非特異性染色。

實例9：抗 α -syn抗體親和性測定

使用兩種平台技術：Octet Red (Forte Bio)及KinExA (Sapidyne Instruments)來測定針對人類 α -syn之抗 α -syn IgG的平衡解離常數(K_D)。

兩種分析系統展示出良好一致性，從而指示aslo0452 ngl-3親和性係在亞奈莫耳範圍中。表1展示源自在整個前導分離及前導最佳化過程中產生之關鍵抗 α -syn純系選殖體的親和性量測值。

純系選殖體ID	方法	親和性- K_D	95% CI
asyn0087	Octet	> 1.0 μ M	n/a
aslo0452 ngl-1	Octet	1.1 nM	0.3-2.3 nM
aslo0452 ngl-3	KinExa	74 pM	15-177 pM
aslo0452 ngl-3	Octet	106 pM	10-292 pM
aslo0543	KinExa	108 pM	34-223 pM
aslo0543	Octet	113 pM	5-333 pM

[表1]

實例9.1：利用Octet，aslo0452 ngl-3之親和性

使用Octet Red儀器來估計aslo0452 ngl-3 IgG針對以重組細菌方式表現之單體人類avi-tag α -syn-Flag-His的親和性。將Aslo0452 ngl-3與不同

濃度之各配位體預混，直至達到平衡。接著，使用Octet藉由使用固定至抗生蛋白鏈菌素塗佈之感測器上之生物素標記的 α -syn俘獲游離aslo0452 ngl-3來量測游離抗體的量。將在各 α -syn濃度下偵測到之游離抗體之量針對配位體之濃度來繪製，且KinExA軟體用於計算平衡解離常數(K_D)。展示於表1中之結果表明，aslo0452 ngl-3 IgG以106 pM之親和性與人類 α -syn結合。

實例9.2：利用KinExA，aslo0452 ngl-3之親和性

另外，使用KinExA儀器(Sapidyne Instruments)來測定aslo0452 ngl-3 IgG針對以重組細菌方式表現之單體人類生物素標記之 α -syn的溶液相親和性(K_D)。將Aslo0452 ngl-3與不同濃度之各配位體預混，直至達到平衡。接著，使用KinExA藉由使用 α -syn塗佈之珠粒俘獲游離aslo0452 ngl-3，洗滌掉未結合物質及使用螢光標記之物種特異性抗體偵測結合的抗體來量測游離抗體的量。將在各 α -syn濃度下偵測到之游離抗體之量針對配位體之濃度來繪製，且KinExA軟體用於計算平衡解離常數(K_D)。展示於表1中之結果表明，aslo0452 ngl-3 IgG以74 pM之親和性與 α -syn結合，從而展示與上文Octet溶液相親和性分析的良好一致性。

實例9.3：利用KinExA，aslo0452 ngl-3 Fab片段之親和性

Aslo0452 ngl-3 Fab片段以高親和性結合 α -突觸核蛋白。如藉由KinExA分析(如上文針對完全抗體之實例中所描述)所量測，aslo0452 ngl-3 Fab片段針對 α -突觸核蛋白之 K_D 值為174 pM (95% CI：15-177 pM)。

實例10：aslo0452 ngl-3對於雄性史泊格多利(Sprague Dawley)大鼠之前額葉皮質間質液(ISF)中之游離未結合 α -突觸核蛋白含量的影響

將成年雄性史泊格多利大鼠(293 g至417 g；Harlan, the Netherlands)麻醉且將導引裝置植入在前額葉皮質中。

在實驗前一天，使用立體框架將推抽式探針(1-3 MDa聚乙 烯膜4 mm)植入在前額葉皮質中(探針之座標：AP=-3.4 mm (至前囟)、側面+0.8 mm (至中線)、腹側-5.0 mm (至硬腦膜)，門牙棒設定在-3.3 mm處(所有座標根據 Paxinos 及 Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York, 第6版, 2008))。用不鏽鋼螺釘及牙齒膠結劑將探針附接於顱骨。

在實驗之日，用可撓性PEEK導管(Western Analytical Products Inc. USA; PK005-020)將推抽式微量透析探針連接至微量灌流泵(Harvard)，且以0.5 μ L/min之流動速率用人工CSF (灌注液)灌注，該人工CSF含有 147 mM NaCl、3.0 mM KCl、1.2 mM CaCl_2 及 1.2 mM MgCl_2 +0.2%BSA。將探針之出口連接至可撓性FEP導管。在最少兩個小時之預穩定之後，將在PBS中調配之aslo0452 ngl-3或僅PBS (媒劑)分別地以30 mg/kg或0 mg/kg給藥。以2 mL/kg經靜脈內投與化合物。每隔120分鐘採集微量透析樣品。採集樣品至微型小瓶(Microbiotech/se AB, Sweden; 4001029)中。所有樣品均儲存在-80°C下。

為測定大鼠ISF中之游離 α -突觸核蛋白濃度，使微量透析樣品首先經受免疫沈澱以移除aslo0452 ngl-3。免疫沈澱共沈澱與治療性抗體結合的 α -突觸核蛋白，而未結合「游離」 α -突觸核蛋白保留在上清液中。將蛋白質A珠粒(Dynabeads®蛋白質A)之溶液添加至96孔無裙邊盤(聚丙烯0.2 mL)，且使用磁體(DynaMag™ 96側)用TBST (50mM TBS加0.1% Tween 20)洗滌兩次以自溶液分離珠粒。將解凍的大鼠ISF微量透析樣品(10 μ L或20 μ L)添加至各孔，藉由上下移液與珠粒混合，且在4°C下在傾斜旋轉下培育10分鐘。接著，使用磁體使珠粒集結兩次以確保珠粒之完全移除。在樣品稀釋緩衝液已添加至100 μ L之總體積之情況下，將免疫沈澱ISF樣品自抗 α -突觸核蛋白ELISA套組(Sensolyte™定量ELISA套組，人類/小鼠/

大鼠，AnaSpec,US, AS-55550)轉移至96孔盤。將校準樣品(100 μ L/孔)一式兩份地添加至盤，且將50 μ L之偵測抗體工作溶液添加至各孔。將盤在+4 $^{\circ}$ C至8 $^{\circ}$ C下同時振盪且避光培育隔夜，且接著用350 μ L之洗滌緩衝液洗滌六次。最後，將100 μ L TMB彩色基質添加至各孔，且將盤在室溫下在暗處培育10分鐘至15分鐘。為停止反應，將50 μ L之停止溶液添加至各孔，且在2小時內在450 nm之吸光度下讀取盤。藉由將標準曲線之回應繪製為線性標度上之吸光度單位對比對數標度上之濃度來進行定量。四參數函式用於曲線擬合。

在單次靜脈內投與30 mg/kg之aslo0452 ngl-3之後，在ISF中證實游離 α -突觸核蛋白之時間依賴性減少(圖10)。

實例11：aslo0452 ngl-3對於雄性史泊格多利大鼠之CSF中之游離未結合 α -突觸核蛋白含量的影響

將成年雄性史泊格多利大鼠麻醉，且將導管置放於小腦延髓池(cisterna magna)中以便供CSF取樣。將0.8 cm留置導管插入至小腦延髓池中，且經由顱骨頂部上之切口使導管外置。用牙齒丙烯酸膠結劑將CSF導管之末端固定在適當位置，且用三個不鏽鋼螺釘附接於顱骨。使動物恢復最少2天，隨後投與化合物。

在緩衝液中調配Aslo0452 ngl-3以用於以3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg或100 mg/kg給藥。以2 mL/kg經靜脈內來投與化合物或僅媒劑。

在花費最少兩天採集至少四個潔淨CSF樣品之後，投與化合物。所有動物在第「0」天均用aslo0452 ngl-3或媒劑來給藥。在各指示時間點處採集CSF樣品。所有樣品均儲存在-80 $^{\circ}$ C下直至裝運。

為測定CSF中之游離 α -突觸核蛋白，在分析之前藉由免疫沈澱(IP)來移除與aslo0452 ngl-3結合之 α -突觸核蛋白。IP將共沈澱與治療性抗體結合之 α -突觸核蛋白，而未結合「游離」 α -突觸核蛋白保留在上清液中。使

用自Anaspec獲得之商業ELISA套組對上清液中之 α -突觸核蛋白之游離含量進行測定。如針對ISF結果(如實例10中所描述)所描述來進行分析。

在以劑量範圍3 mg/kg至100 mg/kg單次靜脈內投與aslo0452 ngl-3之後，在CSF中證實游離 α -突觸核蛋白之劑量及時間依賴性減少(圖11)。

實例12：aslo0452 ngl-3之功能特徵在於降低 α -突觸核蛋白在 α -突觸核蛋白病之慢病毒活體內模型中擴散

使用 α -突觸核蛋白病之慢病毒活體內小鼠模型來研究高親和性抗 α -突觸核蛋白抗體aslo0452 ngl-3阻斷 α -突觸核蛋白之擴散的能力。出於此目的，非轉殖基因野生型小鼠(非tg)及 α -突觸核蛋白過度表現之轉殖基因小鼠(α -syn tg)兩者用表現 α -突觸核蛋白之慢病毒載體(LV- α -syn)來注射至右側海馬體中，且接著用抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體(包括aslo0452 ngl-3)及同型對照小鼠IgG1 NIP228每週一次對其進行被動免疫13週。在免疫期結束時，對小鼠進行安樂死，且將其大腦固定在4% PFA中，接著進行冠狀面地切片並藉由用免疫細胞化學與自動影像分析來針對LV- α -syn注射之位點之同側及對側的 α -突觸核蛋白免疫反應性的含量進行分析。

手術及被動免疫

三至四個月大之非轉殖基因野生型小鼠(非tg；n=40)及 α -突觸核蛋白轉殖基因小鼠(α -syn tg；n=40)接受右側海馬體單一單側注射(距前囟-2.0、-1.5、-1.3)表現 α -突觸核蛋白之慢病毒載體(LV- α -syn)。在LV- α -syn注射手術兩週之後，小鼠接受每週一次劑量之抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體：aslo0452 ngl-3 (非tg n=10； α -syn tg n=10)、aslo0452 ngl-3 D265A (非tg n=10； α -syn tg n=10)、9E4 (非tg n=10； α -syn tg n=10)，或用NIP228同型對照小鼠IgG1 (非tg n=10； α -syn tg n=10)對其進行給藥。

所有小鼠IgG均以20 mg/kg利用腹膜內(IP)途徑來給藥13週。將動物

以每籠最大量或4隻分組圈養。在任意獲取食物及水之情況下，使動物保持在12/12光/暗循環。一週更換籠一次，且每天一次對其進行監測。報告任何不良事件。所有動物均耐受手術程序以及免疫。在抗體治療期結束時，按照人道處理動物之指導原則對小鼠進行安樂死，且將其大腦在冠狀軸上進行連續切片，並藉由免疫細胞化學方法來評估針對 α -突觸核蛋白擴散之神經病理學分析。

α -突觸核蛋白免疫細胞化學

移除大腦，固定在4%多聚甲醛中，且使用振動切片機在冠狀軸上以40 μ m間隔切割切片並在-30℃下儲存在冷凍保護培養基(30%丙三醇、30%乙二醇、40% PBS)中。在PBS洗滌及阻斷緩衝液步驟之後，在4℃下將切片與初級抗體(抗 α -突觸核蛋白 mAb SYN-1，來自BD，稀釋度為1:500)一起培育隔夜，在PBS中洗滌，並在室溫下與二級抗體(生物素標記的抗小鼠IgG，來自Vector Laboratories，稀釋度為1:100)一起培育1小時。在最終PBS洗滌步驟之後，使用抗生素蛋白/生物素-過氧化酶複合物偵測系統(Elite ABC, Vector Laboratories)定位 α -突觸核蛋白染色。接著，用自動影像分析針對慢病毒載體(LV- α -syn)注射之位點的同側及對側的 α -突觸核蛋白含量來對切片進行分析。

統計

使用GraphPad Prism軟體(San Diego California, USA)來分析自跨非tg及 α -syn tg治療組之 α -突觸核蛋白含量之自動影像獲取產生的資料。單因子ANOVA與鄧尼特多重比較事後檢定(Dunnett's Multiple Comparison post-test)一起進行。展示於圖中之資料呈現為平均值 $\pm$ 平均值之標準誤差(SEM)。當 $p < 0.05$ 時，組間差異被視為統計學顯著的。所有分析均係由不知情的評價者來進行。抗體治療組對評價者亦為不知情的。

結果

在非tg小鼠及 α -syn tg小鼠兩者中，對於LV- α -syn注射的同側之 α -突觸核蛋白免疫反應性在神經纖維網中係強烈的，且覆蓋海馬體之大部分表面(圖12A、圖15A；NIP228-同側)。非tg小鼠及 α -syn tg小鼠之對側未注射的海馬體亦顯示高含量之 α -突觸核蛋白免疫反應性，從而指示慢病毒表現的 α -突觸核蛋白已自所注射右側海馬體擴散至左側海馬體(圖12A、圖15A；NIP228-對側)。在此慢病毒 α -突觸核蛋白注射小鼠模型中，前述實驗已展示，僅表現的 α -突觸核蛋白蛋白質擴散至對側而無慢病毒自身轉移之跡象，如藉由PCR分析測定(資料未展示)。

用9E4抗體(9E4-PRX002之小鼠版本(Prothena))被動免疫之非tg小鼠中之慢病毒表現的 α -突觸核蛋白之同側海馬含量及對側海馬含量，幾乎與用NIP228同型對照小鼠IgG1被動免疫的非tg小鼠中之慢病毒表現的 α -突觸核蛋白之同側海馬含量及對側海馬含量一致(圖12A、圖12B、圖12C；9E4與NIP228相比)，從而指示，9E4當經由IP途徑以20 mg/kg每週一次給藥13週時並不阻斷 α -突觸核蛋白在此 α -突觸核蛋白擴散模型中之散佈。

對比而言，用aslo0452 ngl-3抗體或aslo0452 ngl-3之效應子剔除式突變版本(aslo0452-ngl-3-D265A) (其中，小鼠IgG1中位置265處之天冬胺酸被丙胺酸置換(D265A)導致在微神經膠質細胞上發現此同型IgG Fc受體與低親和性IgG Fc受體(Fc γ RIIB及Fc γ RIII)之間的相互作用缺失)被動免疫的非tg小鼠中之慢病毒表現的 α -突觸核蛋白的同側海馬含量及對側含量兩者，高度顯著低於用NIP228同型對照小鼠IgG1被動免疫的非tg小鼠中之慢病毒表現的 α -突觸核蛋白的同側海馬含量及對側海馬含量(圖12A、圖12B、圖12C；aslo0452-ngl-3及aslo0452-ngl-3-D265A與NIP228相

比)。此指示，用aslo0452-ngl-3或aslo0452-ngl-3之效應子剔除式D265A突變版本對小鼠進行之被動免疫穩固地阻斷 α -突觸核蛋白在此 α -突觸核蛋白病之小鼠模型中擴散。當將LV- α -syn載體注射至 α -syn tg小鼠之右側海馬體中時獲得類似結果；當相比於NIP228治療之 α -syn tg小鼠時，用aslo0452-ngl-3或aslo0452-ngl-3-D265A而非9E4進行之被動免疫導致海馬體中之 α -突觸核蛋白免疫反應性的同側含量及對側含量兩者的穩定且統計學上顯著的降低(圖15A、圖15B、圖15C)。

在較高放大倍率下，沿非tg小鼠之注射側之同側軸突及未注射側之對側軸突兩者可觀察到慢病毒表現的 α -突觸核蛋白免疫反應性沈積(圖13A；黑色箭頭展示跨海馬軸突)，從而表明， α -突觸核蛋白擴散至對側海馬體可大體上沿軸突發生(跨軸突擴散)。用9E4抗體或NIP228同型對照小鼠IgG1被動免疫的非tg小鼠中之軸突 α -突觸核蛋白沈積的同側含量及對側含量並無顯著差異(圖13A、圖13B、圖13C；9E4與NIP228相比)，從而指示，在吾等實驗條件下，9E4既不影響軸突 α -突觸核蛋白沈積之含量其亦不降低 α -突觸核蛋白在此慢病毒 α -突觸核蛋白病擴散模型中沿軸突之散佈。

對比而言，用aslo0452 ngl-3抗體或aslo0452-ngl-3之效應子剔除式突變版本(aslo0452-ngl-3-D265A)被動免疫的非tg小鼠中之軸突 α -突觸核蛋白沈積的同側含量及對側含量兩者，均顯著低於用NIP228同型對照小鼠IgG1治療之非tg小鼠中之軸突 α -突觸核蛋白沈積的含量(圖13A、圖13B、圖13C；aslo0452-ngl-3及aslo0452-ngl-3-D265A與NIP228相比)，從而指示，用aslo0452-ngl-3或aslo0452-ngl-3之效應子剔除式D265A突變版本對小鼠進行之被動免疫清除軸突 α -突觸核蛋白沈積，且穩固地阻斷

α -突觸核蛋白在此慢病毒 α -突觸核蛋白病小鼠模型中沿軸突的同側至對側轉移。

當將LV- α -syn載體注射至 α -syn tg小鼠之右側海馬體中時獲得極類似的結果；當相比於NIP228治療的 α -syn tg小鼠時，用aslo0452-ngl-3或aslo0452-ngl-3-D265A而非9E4進行之被動免疫導致沿軸突之 α -突觸核蛋白免疫反應性的同側含量及對側含量兩者穩定且統計學上顯著的降低(圖16A、圖16B、圖16C)。

在LV- α -syn注射的非tg小鼠中，在較高放大倍率下，在同側海馬體之神經纖維網中偵測到強烈的 α -突觸核蛋白免疫反應性，且在同側新皮質之神經纖維網中偵測到較小程度(圖14A)。另外，在同側海馬體之CA1區中之多個可鑑別的神經元細胞體(胞體)中偵測到強烈的 α -突觸核蛋白之沈積，且在同側新皮質之第5層神經元中偵測到較弱的 α -突觸核蛋白免疫反應性(圖14；黑色箭頭)。儘管當相比於用NIP228同型對照小鼠IgG免疫之非tg小鼠時，用9E4抗體治療並不顯著改變含有 α -突觸核蛋白沈積之同側CA1海馬神經元或同側第5層新皮質神經元的數目(圖14A、圖14B、圖14C；9E4與NIP228相比)，但相比於NIP228同型對照小鼠IgG治療的非tg小鼠，用aslo0452 ngl-3抗體或aslo0452-ngl-3之效應子剔除式突變版本(aslo0452-ngl-3-D265A)治療之非tg小鼠的含有 α -突觸核蛋白沈積之同側CA1神經元及同側第5層神經元的數目顯著降低(圖14A、圖14B、圖14C；aslo0452-ngl-3及aslo0452-ngl-3-D265A與NIP228相比)。

此外，相比於NIP228同型對照小鼠IgG治療的非tg小鼠，海馬體之同側CA1區及新皮質之同側第5層區之神經纖維網及神經元中的 α -突觸核蛋白免疫反應性的強度在aslo0452-ngl-3-治療及aslo0452-ngl-3-D265A治療

的非tg小鼠中顯著地降低(圖14A；aslo0452-ngl-3及aslo0452-ngl-3-D265A與NIP228相比)。

當將LV- α -syn載體注射至 α -syn tg小鼠之右側海馬體中時獲得類似結果；當相比於NIP228治療的 α -syn tg小鼠時，用aslo0452-ngl-3或aslo0452-ngl-3-D265A而非9E4進行的治療導致在同側CA1海馬及第5層新皮質區中以及在對側CA1海馬區中含有強烈 α -突觸核蛋白免疫反應性的神經元之數目統計學上顯著降低(圖17A、圖17B、圖17C、圖17D)。

已經證實，用高親和性抗 α -突觸核蛋白小鼠IgG1抗體aslo0452-ngl-3對非tg野生型小鼠或 α -syn tg小鼠(其已立體定位地在海馬體之一側上注射有驅動人類 α -突觸核蛋白表現的慢病毒載體)進行的被動免疫穩固地降低在此 α -突觸核蛋白傳播之小鼠模型中觀測到的慢病毒表現的 α -突觸核蛋白之同側至對側跨軸突擴散。此最新揭示的抑制 α -突觸核蛋白在活體內擴散的抗 α -突觸核蛋白抗體之特性指示，相比於並不抑制在所測試模型中擴散的抗體(例如，9E4抗體)，而與人類 α -突觸核蛋白之不同抗原決定基結合。

此外，展示aslo0452-ngl-3之效應子剔除式D265A突變版本與aslo0452-ngl-3在降低 α -突觸核蛋白在模型中擴散上同樣有效的資料指示，抗體介導的 α -突觸核蛋白擴散之預防並不需要Fc相關的效應功能作為作用之關鍵機制，且詳言之其指示，微神經膠質細胞上存在的Fc受體(Fc γ RIIB及Fc γ RIII)在抗體介導的 α -突觸核蛋白擴散之阻斷中似乎係不需要或無作用的。

總而言之，藉由阻斷或減緩 α -突觸核蛋白病理性吸收至受體細胞中及預防 α -突觸核蛋白病變在解剖學上連接之大腦區之間的接種及傳輸，靶

向 α -突觸核蛋白之本發明之抗體以及其抗原結合片段在PD或DLB或MSA中具有緩和疾病的潛能。以此方式，靶向 α -突觸核蛋白之抗體可治療或預防疾病進展，且對患有突觸核蛋白病(諸如，PD、DLB或MSA)之患者具有治療效益。

實例13：0452 ngl-3-BBBt0626gl雙特異性抗體之產生

如下文所描述來產生根據本發明之例示性雙特異性抗體，其包含與BBBt0626gl之單鏈片段(scFv)締合、經移植至aslo0452 ngl-3之重鏈之N端(Bis2格式)或C端(Bis3格式)的人類IgG1 TM主鏈。

根據本發明之呈Bis2格式之雙特異性抗體係藉由合成製造DNA片段來產生，該DNA片段編碼含有BssHII及BstEII側接核酸內切酶限制位點(分別在Bbbt0626glscFv或Bbbt0626wt之上游及aslo0452 ngl-3 VH之下游)的Bbbt0626glscFv-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3 VH或Bbbt0626wt-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3 VH。接著，將經消化的DNA片段定向性地選殖至hIgG1TM載體主鏈中。

根據本發明之呈Bis3格式之雙特異性抗體係藉由PCR擴增隨後使用限制核酸內切酶位點(SfiI及XbaI)定向性地選殖來產生。產生兩個PCR片段：(1)自SfiI限制位點至CH3域之C端擴增hIgG1TM-CH3域及(2)重疊PCR片段，具有併有CH3-(G4S)x3連接子(SEQ ID NO: 57)之C端及Bbbt0626gl scFv之N端之正向PCR寡核苷酸以及擴增Bbbt0626gl scFv之C端及超過XbaI限制位點的緊接著的下游載體序列的寡核苷酸。在拼接PCR(pull-through PCR)反應中將兩個PCR片段縫合在一起，且隨後經由SfiI及XbaI限制核酸內切酶位點定向性地選殖至pEU1_4 (人類IgG1TM載體)中。

在基於CHO之表現系統中表現此等雙特異性抗體，且所得抗體經由蛋白質A管柱純化來純化。所有源自Bbbt0626之雙特異性抗體針對活體外與小鼠大腦內皮細胞株(b.end3)進行結合測試，以確認BBB轉運體部分之結合活性，以及在基於HTRF之抗原決定基競爭分析中針對競爭結合also0452 ngl-3進行測試以確認與aslo0452 ngl-3抗原決定基的結合。

【序列表】

<110> 英商梅迪繆思有限公司(MEDIMMUNE LIMITED)
<120> 針對α-突觸核蛋白之抗體及其用途
<130> 1848081-0002-091
<140> TW 106118078
<141> 2017-06-01
<150> US 62/344,746
<151> 2016-06-02
<160> 61
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 140
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1
Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu
20	Ser	Cys	Ala
25	Ala	Ser	Gly
30	Phe	Thr	Phe
Ser	Ser	Tyr	
Ala	Met	Ser	Trp
35	Val	Arg	Gln
40	Ala	Pro	Gly
45	Lys	Gly	Leu
Glu	Trp	Val	
Ser	Ala	Ile	Ser
50	Gly	Ser	Gly
55	Gly	Ser	Thr
60	Tyr	Tyr	Ala
Asp	Ser	Val	
Lys	Gly	Arg	Phe
65	Thr	Ile	Ser
70	Arg	Asp	Asn
75	Ser	Lys	Asn
80	Thr	Leu	Tyr
Leu	Gln	Met	Asn
85	Ser	Leu	Arg
90	Ala	Glu	Asp
95	Thr	Ala	Val
Tyr	Tyr	Cys	
Ala	Gly	Gly	Ala
100	Val	Asn	Val
105	Tyr	Tyr	Tyr
110	Gly	Met	Asp
Val	Trp		
Gly	Gln	Gly	Thr
115	Met	Val	Thr
120	Val	Ser	Ser
<210> 3			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 3			
Gln	Ala	Val	Leu
1	5	10	15
Ser	Ala	Ser	Leu
20	Thr	Cys	Thr
25	Leu	Arg	Ser
30	Gly	Asn	Asn
Val	Gly	Asn	
Tyr	Arg	Ile	Tyr
35	Trp	Tyr	Gln
40	Gln	Lys	Ser
45	Gly	Ser	Pro
Pro	Gln	Tyr	
Leu	Leu	Arg	Tyr
50	Lys	Ser	Asp
55	Ala	Asp	Lys
60	His	Gln	Gly
Ser	Gly	Val	
Pro	Ser	Arg	Phe
65	Ser	Gly	Ser
70	Lys	Asp	Ala
75	Ser	Ala	Asn
80	Ala	Gly	Ile
Leu	Phe	Ile	Ser
85	Gly	Leu	Gln
90	Ser	Glu	Asp
95	Glu	Ala	Asp
Tyr	Tyr	Cys	
Met	Val	Trp	His
100	Ser	Gly	Ala
105	Trp	Val	Phe
110	Gly	Gly	Gly
Thr	Lys	Leu	
Thr	Val	Leu	
115			

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (50)..(50)
<223> Ser或Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (53)..(53)
<223> His或Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (54)..(54)
<223> Leu或Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (101)..(101)
<223> Asn或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (102)..(102)
<223> His或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (103)..(103)
<223> Val或Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (104)..(104)
<223> Lys或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (105)..(105)
<223> Tyr或Ile

<400> 4
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Gly Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Ser或Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> His或Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Leu或Ser

<400> 6
Xaa Ile Ser Xaa Xaa Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Asn或Arg

<220>
<221> MOD_RES

<222> (4) . . (4)
<223> His或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) . . (5)
<223> Val或Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6) . . (6)
<223> Lys或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) . . (7)
<223> Tyr或Ile

<400> 7
Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 8
<211> 114
<212> PRT
<213> 斜人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27) . . (27)
<223> Gly或Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28) . . (28)
<223> Ala或Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29) . . (29)
<223> Pro或Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) . . (30)
<223> Leu或Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31) . . (31)
<223> Pro或Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32) . . (32)
<223> Lys或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42) . . (42)
<223> Ser或Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (82) . . (82)

<223> Phe或Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (99) .. (99)
<223> Asp或Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (100) .. (100)
<223> His或Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (102) .. (102)
<223> Val或Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (104) .. (104)
<223> Val或Tyr

<400> 8
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Xaa Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Xaa Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met
85 90 95

Val Trp Xaa Xaa Gly Xaa Trp Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
100 105 110

Val Leu

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Gly或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6) .. (6)

<223> Ala或Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7) .. (7)

<223> Pro或Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8) .. (8)

<223> Leu或Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9) .. (9)

<223> Pro或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10) .. (10)

<223> Lys或Arg

<400> 9

Thr Leu Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Arg Ile Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> Asp或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (5)

<223> His或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7) .. (7)

<223> Val或Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9) .. (9)

<223> Val或Tyr

<400> 11

Met Val Trp Xaa Xaa Gly Xaa Trp Xaa

15

<210> 12
<211> 452
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
202530
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045
Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
505560
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65707580
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095
Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
100105110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115120125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130135140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145150155160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165170175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180185190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195200205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210215220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225230235240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(366)

<400> 13	
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gla cag cct ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tec ctg aga ctg tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tea tcc att tcc cac ctg ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg	192
Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg gga ggg gca aac cac ggg aag tac tac tac gga atg gac aag tgg	336
Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp	
100 105 110	
ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tea	366
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120	
<210> 14	
<211> 122	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 14	
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp	
100 105 110	

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15
Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16
Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 221
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

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

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

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

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

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
145 150 155 160

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
165 170 175

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
180 185 190

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

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215 220

<210> 18
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<400> 18
caggetgtgc tgaeteagee ggetteecte teigegteie etggageate agceagteie 60
acctgcacct tgegcagtgg ggcgccectg cegaagiata ggatafacig glateageag 120
aagecaggga glecteacea glatectctg agglacaaal cagacgcaga taacaccag 180
ggetctggag tccccagecg etttcttggg tccaaagatg etteggccaa tgcagggatl 240
ttactcatet ctgggetcca gtctgaggat gaggetgacl attattgtat ggittgggac 300
cacggcgiet ggatttcgg cggaggggacc aagetgaccg tccata 345

<210> 19
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile

65					70					75					80
Leu	Leu	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Met	Val	Trp	Asp	His	Gly	Val	Trp	Tyr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
			100					105					110		
Thr	Val	Leu													
		115													
<210> 20															
<211> 14															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 20															
Thr	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Lys	Tyr	Arg	Ile	Tyr		
1				5					10						
<210> 21															
<211> 9															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 21															
Met	Val	Trp	Asp	His	Gly	Val	Trp	Tyr							
1				5											
<210> 22															
<211> 452															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 22															
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
<210> 23															
<211> 453															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 23															
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20						25				30		
<210> 24															
<211> 454															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 24															
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
<210> 25															
<211> 455															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 25															
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
<210> 26															
<211> 456															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 26															
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
<210> 27															
<211> 457															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 27															
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
<210> 28															
<211> 458															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 28															
Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Lys	Trp
			100					105					110		

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370

375

380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385

390

395

400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405

410

415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420

425

430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435

440

445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 23

<211> 366

<212> DNA

<213> 智人

<400> 23

gagglgcagc tglgggagtc tgggggagge ttggfacage etgggggggic cctgagactc 60

tcctlgcagc cctciggait cacctllage agctatgcca tgagctgggt cegccagget 120

ccaggaagg ggcctggagtg ggtctcagct attagtggtt ggggtggtag cacatactac 180

gcagactcgc tgaagggcgc gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240

ctgcaaatga acagccagag agccgaggac aeggcctgtt attactgic gggaggggca 300

cggecggggc gcactaciac cggaatggac aaatggggcc aagggacaaac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65						70						75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
			85						90					95				
Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Lys	Trp			
			100					105					110					
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115					120											
<210> 25																		
<211> 5																		
<212> PRT																		
<213> 智人																		
<400> 25																		
Ser	Tyr	Ala	Met	Ser														
1			5															
<210> 26																		
<211> 17																		
<212> PRT																		
<213> 智人																		
<400> 26																		
Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys			
1			5						10					15				
Gly																		
<210> 27																		
<211> 13																		
<212> PRT																		
<213> 智人																		
<400> 27																		
Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Lys						
1			5						10									
<210> 28																		
<211> 221																		
<212> PRT																		
<213> 智人																		
<400> 28																		
Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Ala			
1			5						10					15				
Ser																		
Ala																		
Ser																		
Leu																		
Thr																		
Cys																		
Thr																		
Leu																		
Arg																		
Ser																		
Ser																		
Gly																		
Asp																		
Phe																		
Ser																		
Arg																		
Tyr																		
Arg																		
Ile																		
Tyr																		
Trp																		
Tyr																		
Gln																		
Gln																		
Lys																		
Pro																		
Gly																		
Ser																		
Pro																		
Pro																		
Gln																		
Tyr																		
35																		
40																		
45																		

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

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

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

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

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

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
145 150 155 160

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
165 170 175

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
180 185 190

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

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215 220

<210> 29
<211> 345
<212> DNA
<213> 病人

<400> 29
caggelgtgc tgaacagcc ggttccctc tetggtctc etggagcacc agccagtctc 60
acctgcacct tgcgcagttc cggggacttc tcccggtata ggalatactg gtaacagcag 120
aagccaggga gtctctccca gtactctctg aggtacaaat cagaacgaga taacaccag 180
ggctctggag tccccagcgg ctcttctgga tccaaagatg ctctggccaa tgcagggatt 240
ttactcatct ctgggcctca gtctgaggat gaggctgacl attattglat ggtttggtec 300
agcggegtt ggtacltggg cggagggaac aagctgaacc tccata 345

<210> 30
<211> 115
<212> PRT
<213> 病人

<400> 30
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

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

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

Thr Val Leu
115

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31
Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg Tyr Arg Ile Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32
Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33
Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr
1 5

<210> 34
<211> 123
<212> PRT

<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gln或Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Val或Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (75)..(75)
<223> Ser或Arg

<400> 34
Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Xaa Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Xaa Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Arg、Gly或Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> Thr或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> Ser、Arg或Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32)..(32)
<223> Ala或Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Asn或Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (37)..(37)
<223> His或Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> Val或Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (47)..(47)
<223> Met或Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (50)..(50)
<223> Lys或Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (51)..(51)
<223> Asn或Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (57)..(57)
<223> Val或Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (65)..(65)
<223> Ser或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (68)..(68)
<223> Asn或Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (92)..(92)
<223> Ser或Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (93)..(93)
<223> Ser或Thr

<220>
<221> MOD_RES

<222> (95)..(95)
<223> Asn、Lys或His

<220>
<221> MOD_RES
<222> (96)..(96)
<223> His或Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (97)..(97)
<223> Val或Trp

<400> 35
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Xaa Gln
1 5 10 15

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

Xaa Trp Tyr Gln Xaa Lys Pro Gly Gln Ala Pro Xaa Leu Val Xaa Tyr
35 40 45

Gly Xaa Xaa Asn Arg Pro Ser Gly Xaa Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Xaa Ser Gly Xaa Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Thr或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Ser、Arg或Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ala或Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Asn或Ser

<400> 36
Gln Gly Asp Ser Leu Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Lys或Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Asn或Asp

<400> 37
Gly Xaa Xaa Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser或Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser或Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Asn、Lys或His

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> His或Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Val或Trp

<400> 38
Asn Ser Arg Asp Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Val
1 5 10

<210> 39
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41
Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42
Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
1 5 10

<210> 47
<211> 123

<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> Bbbt0626 VH

<400> 47
Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Arg Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49
Thr Tyr Ser Ile Thr
1 5

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50
Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 52
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65707580

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
100105110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115120

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53
Thr Tyr Ser Ile Thr
15

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54
Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
151015

Gly

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55
Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
1510

<210> 56
<211> 50
<212> PRT
<213> 人口序列

<220>
<223> 人口序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(50)
<223> 此序列可涵蓋1至10個「Gly Gly Gly Gly Ser」重複單元

<220>
<223> 參見如相對取代及較佳實施例之詳細描述所申請的說明書

<400> 56
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser
50

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> 人口序列

<220>
<223> 人口序列之描述：合成肽

<400> 57
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 58
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 60
<211> 102
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Thr
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

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

Met Ile Trp His Trp Val
100

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種與人類 α -突觸核蛋白(synuclein)結合之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

a) 三個重鏈CDR，其具有以下序列：

(i) SEQ ID NO: 5之H-CDR1，

(ii) SEQ ID NO: 15之H-CDR2；及

(iii) SEQ ID NO: 16之H-CDR3，及

b) 三個輕鏈CDR，其具有以下序列：

(i) SEQ ID NO: 20之L-CDR1，

(ii) SEQ ID NO: 10之L-CDR2；及

(iii) SEQ ID NO: 21之L-CDR3。

【請求項2】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含與SEQ ID NO: 14之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項3】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含與SEQ ID NO: 14之胺基酸序列至少95%一致的胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列。

【請求項5】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含與SEQ ID NO: 19之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項6】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含與SEQ ID NO: 19之胺基酸序列至少95%一致的胺基酸序列。

【請求項7】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

【請求項8】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈，該重鏈包含與SEQ ID NO: 12之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項9】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈，該重鏈包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。

【請求項10】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含輕鏈，該輕鏈包含與SEQ ID NO: 17之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項11】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含輕鏈，該輕鏈包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列。

【請求項12】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含與SEQ ID NO: 14之胺基酸序列至少95%一致的胺基酸序列，且其中該抗體或其抗原結合片段進一步包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含與SEQ ID NO: 19之胺基酸序列至少95%一致的胺基酸序列。

【請求項13】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列，且其中該抗體或其抗原結合片段進一步包含可變輕鏈，該可變輕鏈包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列。

【請求項14】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈，該重鏈包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列，且其中該抗體或其抗原結合片段進一步包含輕鏈，該輕鏈包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列。

【請求項15】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為抗體。

【請求項16】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段

包含於Fc區中，根據Kabat編號對應至L234F/L235E/P331S之三重突變。

【請求項17】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受賦形劑。

【請求項18】

一種經分離核酸分子，其編碼如請求項1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【請求項19】

如請求項18之經分離核酸分子，其中該核酸分子包含與SEQ ID NO: 13之核苷酸序列至少90%一致的核苷酸序列。

【請求項20】

如請求項18之經分離核酸分子，其中該核酸分子包含與SEQ ID NO: 18之核苷酸序列至少90%一致的核苷酸序列。

【請求項21】

一種包含載體之宿主細胞，該載體包含如請求項18至20中任一項之核酸分子。

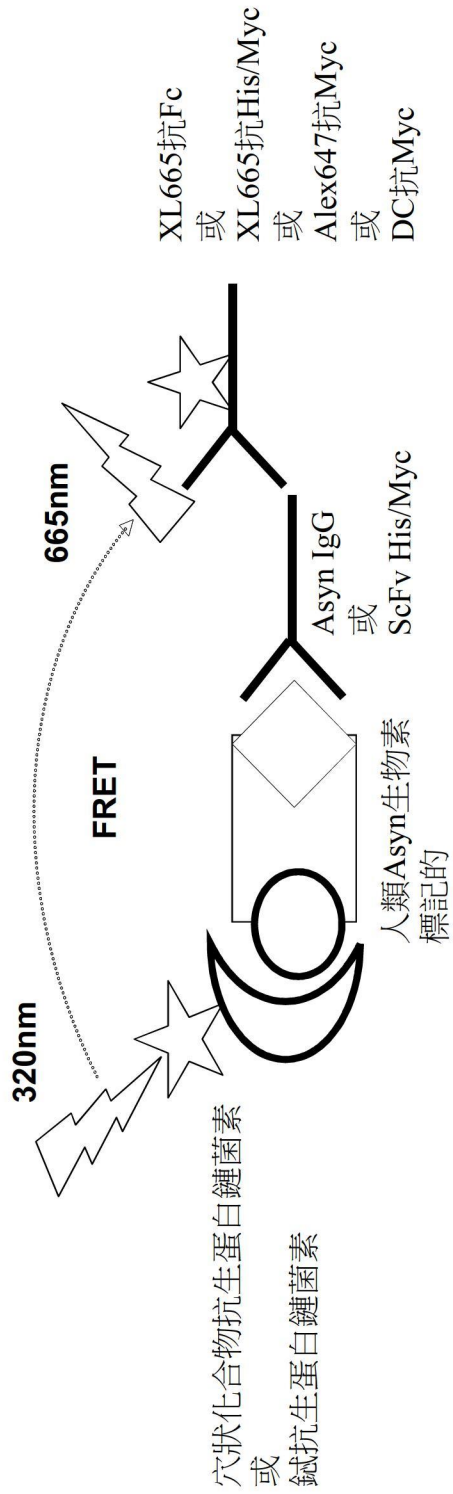
【請求項22】

一種如請求項1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段的用途，其係用於製備治療患者中樞神經系統(central nervous system；CNS)之 α -突觸核蛋白疾病的藥物。

【請求項23】

如請求項22之用途，其中該 α -突觸核蛋白疾病係帕金森氏病(PD)、路易體癡呆(DLB)或多發性系統萎縮症(MSA)。

【發明圖式】



【圖1】

VH比對		CDR1	CDR2
asyn0087		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE
aslo0452	ngl-3	S..HL.....	EDTAVYYCAG
aslo0543			
		CDR3	
asyn0087		GAVNYYYYGMDVWGQGTMTVTVSS	
aslo0452	ngl-3	..NHGK.....K.....T.....	
aslo0543		..RRGRI.....K.....T.....	
VL比對		CDR1	CDR2
asyn0087		QAVLTQPSLSASPGASASLTCTLRSGNNVGNRYRIYWYQQKSGSPQYLLRPYKSDADKHQSGVPSRFSGSKDASANAGILFISGLQSE	DEADYYC
aslo0452	ngl-3	A.....APLPK.....P.....L.....	
aslo0543		A.....SGDFSR.....P.....L.....	
		CDR3	
asyn0087		MVWHSGAWVFGGGTKLTVL	
aslo0452	ngl-3	...DH.V.Y.....	
aslo0543		...S.....Y.....	

【圖2】

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG
E V Q L L E S G G L V Q P G G S L

AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT GCC ATG AGC TGG
R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
VHCDR1

GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA TCC ATT TCC CAC CTT
V R Q A P G K G L E W V S S I S H L
VHCDR2

GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA
G S T Y Y A D S V K G R F T I S R

GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D

ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG GGA GGG GCA AAC CAC GGG AAG TAC TAC TAC GGA
T A V Y Y C A G G A N H G K Y Y Y G
VHCDR3

ATG GAC AAG TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
M D K W G Q G T T V T V S S |

【圖3A】

CAG	GCT	GTG	CTG	ACT	CAG	CCG	GCT	TCC	CTC	TCT	GCG	TCT	CCT	GGA	GCA	TCA	GCC
Q	A	V	L	T	Q	P	A	S	L	S	A	S	P	G	A	S	A
AGT	CTC	ACC	TGC	ACC	TTG	CGC	AGT	GGG	GCG	CCC	CTG	CCG	AAG	TAT	AGG	ATA	TAC
S	L	T	C	T	L	R	S	G	A	P	L	P	K	Y	R	I	Y
VLCDR1																	
TGG	TAT	CAG	CAG	AAG	CCA	GGG	AGT	CCT	CCC	CAG	TAT	CTC	CTG	AGG	TAC	AAA	TCA
W	Y	Q	Q	K	P	G	S	P	P	Q	Y	L	L	R	Y	K	S
VLCDR2																	
GAC	GCA	GAT	AAA	CAC	CAG	GGC	TCT	GGA	GTC	CCC	AGC	CGC	TTT	TCT	GGA	TCC	AAA
D	A	D	K	H	Q	G	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	K
GAT	GCT	TCG	GCC	AAT	GCA	GGG	ATT	TTA	CTC	ATC	TCT	GGG	CTC	CAG	TCT	GAG	GAT
D	A	S	A	N	A	G	I	L	L	I	S	G	L	Q	S	E	D
GAG	GCT	GAC	TAT	TAT	Y	C	ATG	GTT	TGG	GAC	CAC	GGC	GTC	TGG	TAT	TTC	GGC
E	A	D	Y	Y	M	V	M	V	W	D	H	G	V	W	Y	F	G
VLCDR3																	
GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA											
G	T	K	L	T	V	L											

【圖3B】

aslo0452 ngl-3 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
IGHV3-23*01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
Vernier (*) * * * *

VHCDR1

【圖3C】

aslo0452 ngl-3 SISHLGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG
IGHV3-23*01 AISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
Vernier (*) * * * *

VHCDR2

aslo0452 ngl-3 GANHGKYYYGMDKWGGTITVSS
IGHJH6 WGQGTTITVSS
Vernier (*) *

VHCDR3

aslo0452 ngl-3 QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGAPLPKYRIYWYQQKPGSPQQYLLR
IGLV5-45*01 QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWYQQKPGSPQQYLLR
Vernier (*) * * * *

VLCDR1

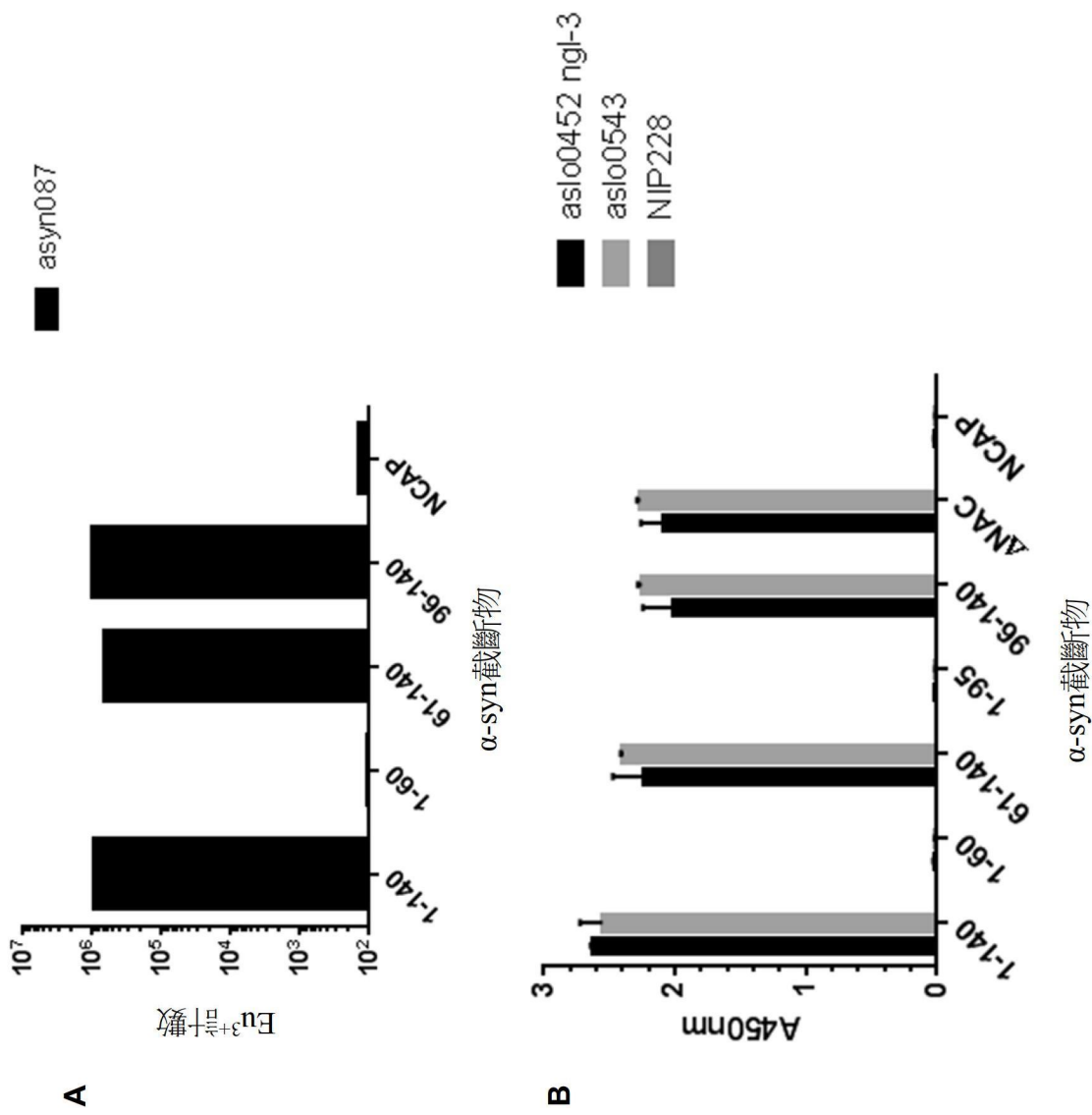
【圖3D】

aslo0452 ngl-3 YKSDADKHQQSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMVDHGVWY
IGLV5-45*01 YKSDSDKQQSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWH...WV
Vernier (*) * * * *

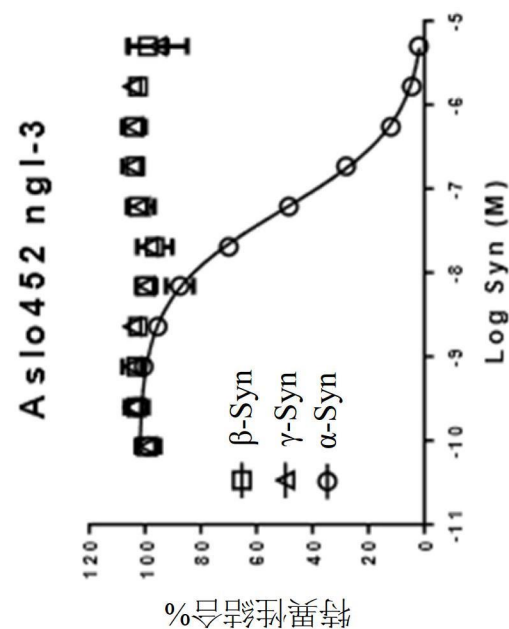
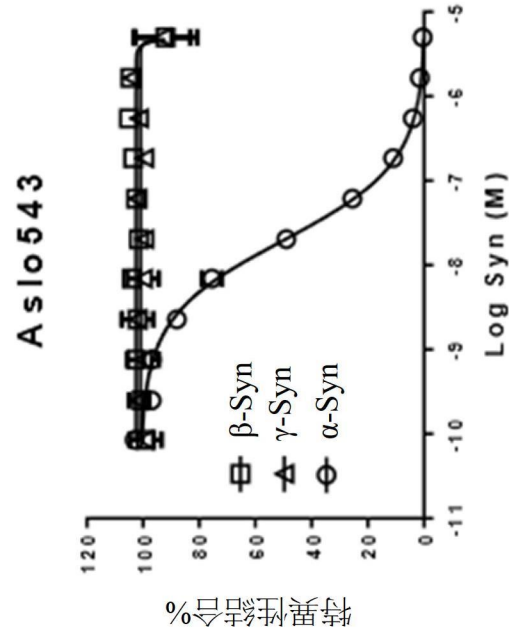
VLCDR2

VLCDR3

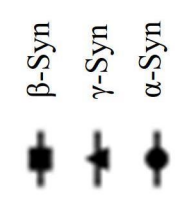
aslo0452 ngl-3 FGGGTKLTV---L
IGJL2, 3 FGGGTKLTV---L
Vernier (*) *



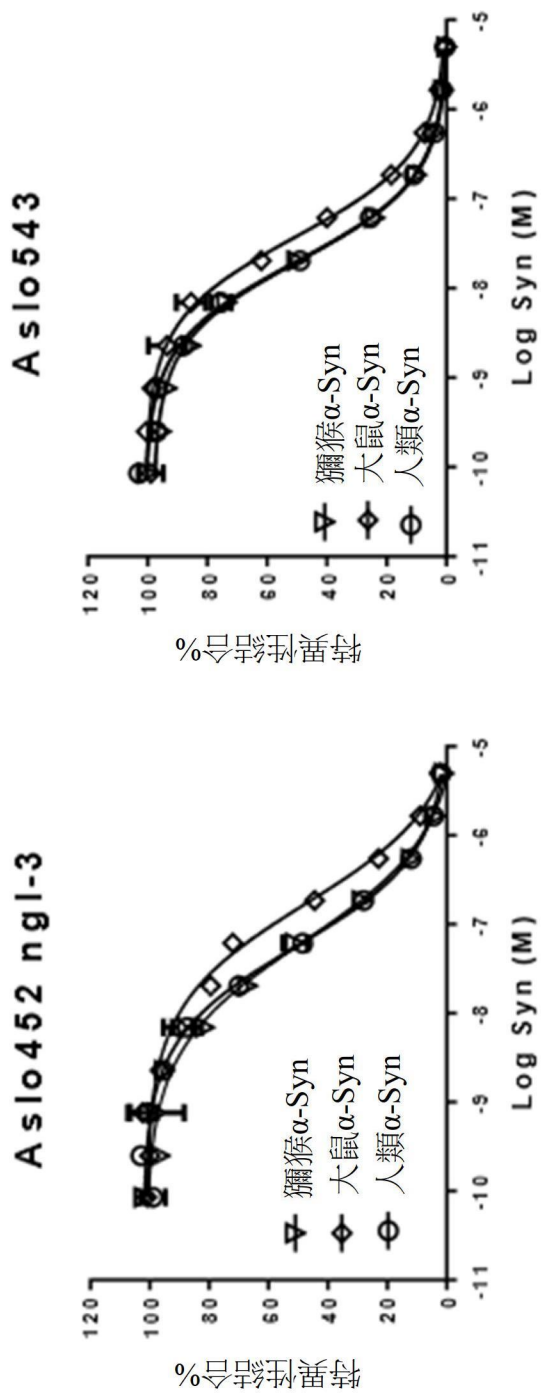
【圖4】



IC50 (nM)		
Aslo452 ngl-3	Aslo543	
NI	NI	
NI	NI	
5.7	2.0	

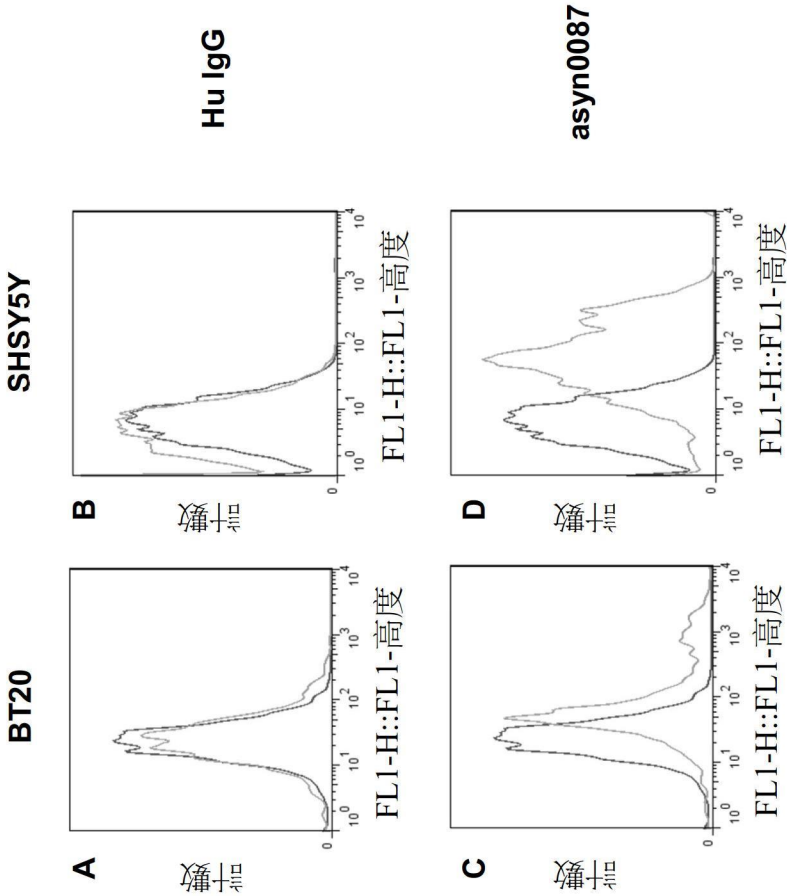


【圖5】

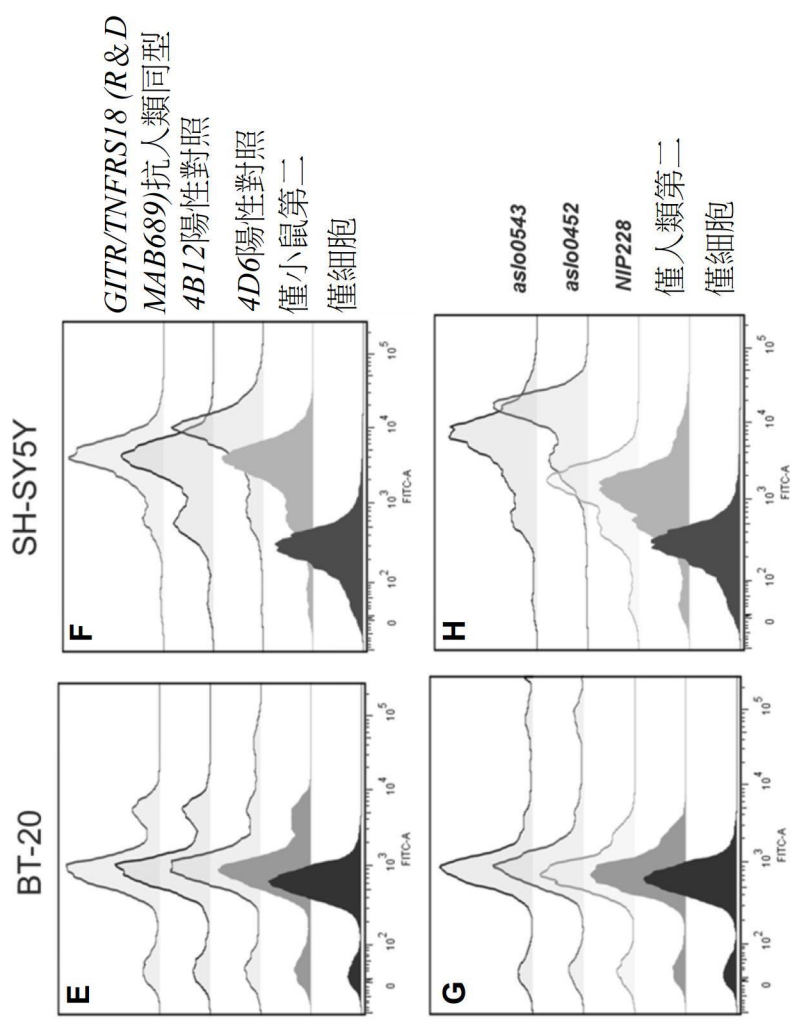


IC50 (nM)		
Aslo452 ngl-3	Aslo543	
獼猴 α -Syn	2.1	
大鼠 α -Syn	3.8	
人類 α -Syn	2.0	
6.8		
19.6		
5.7		

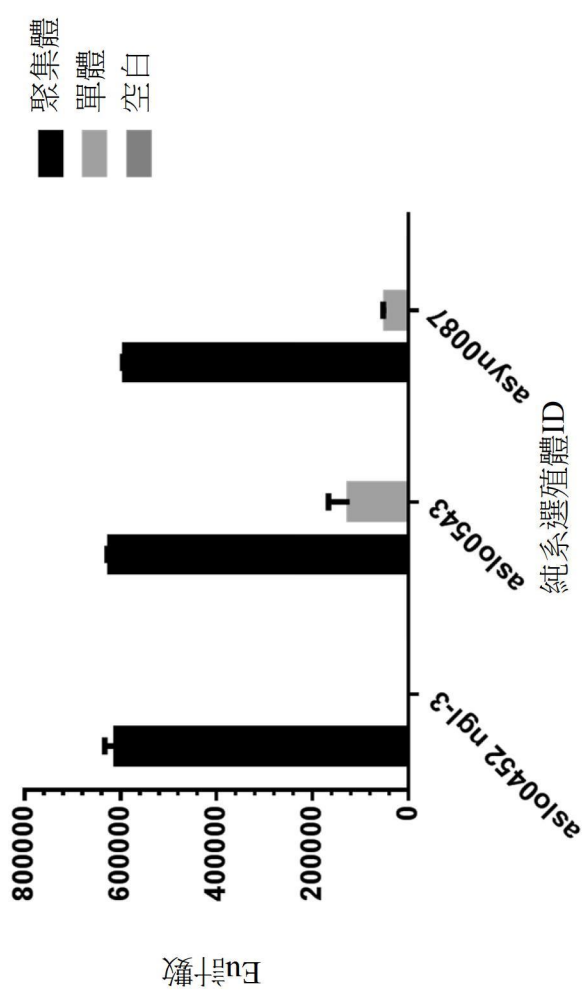
【圖6】



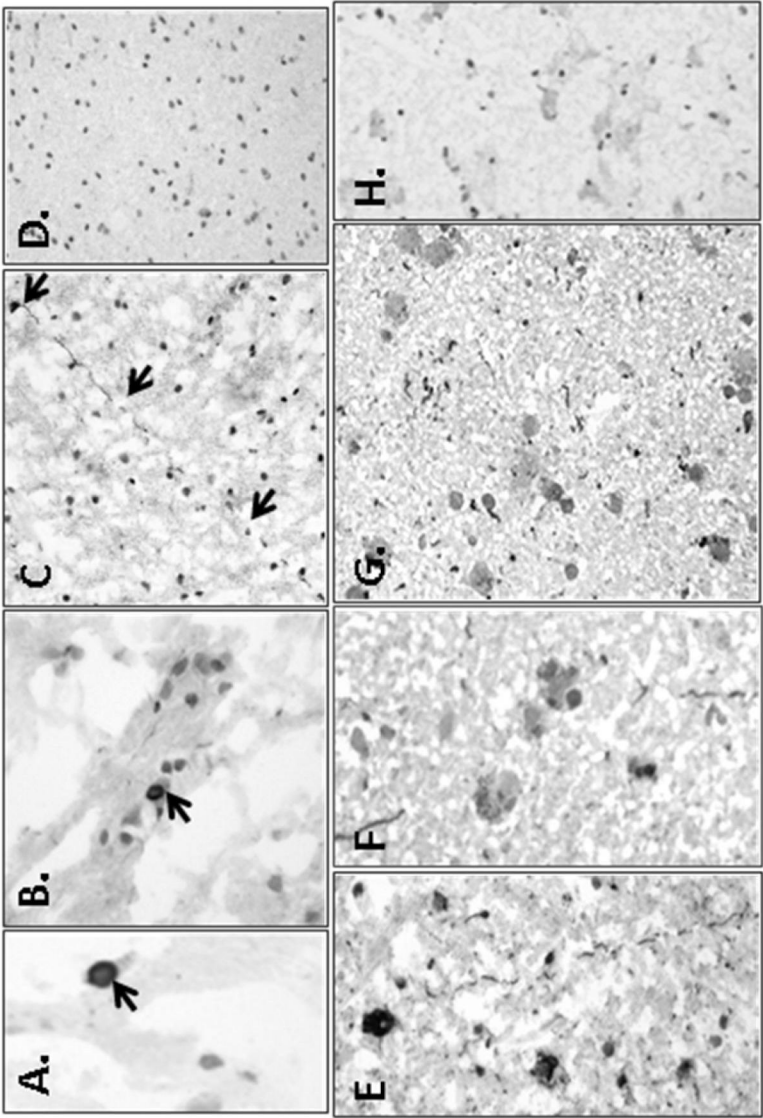
【圖7A】



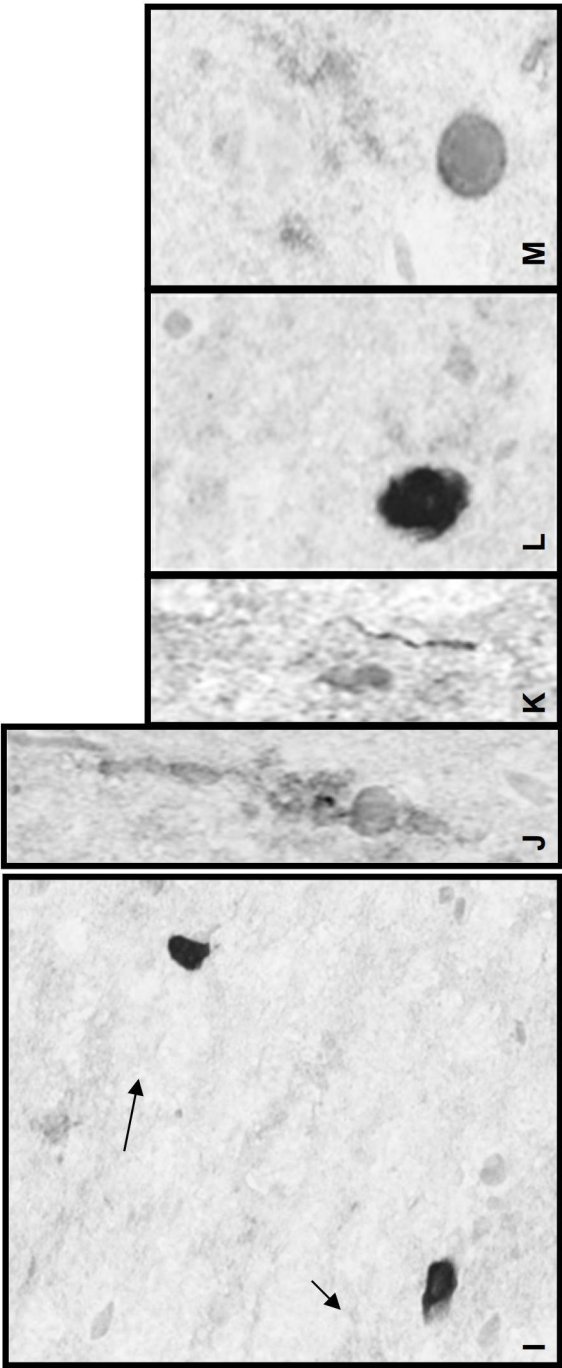
【圖7B】



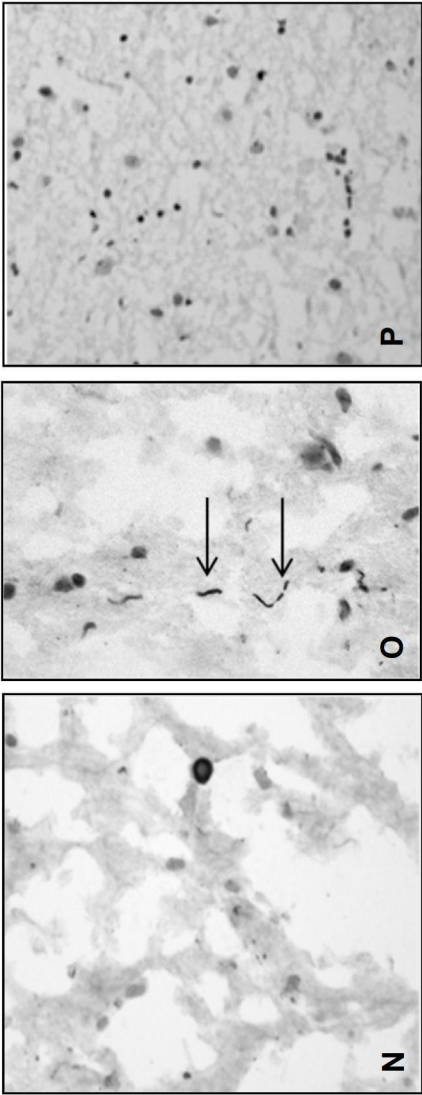
【圖8】



【圖9A】

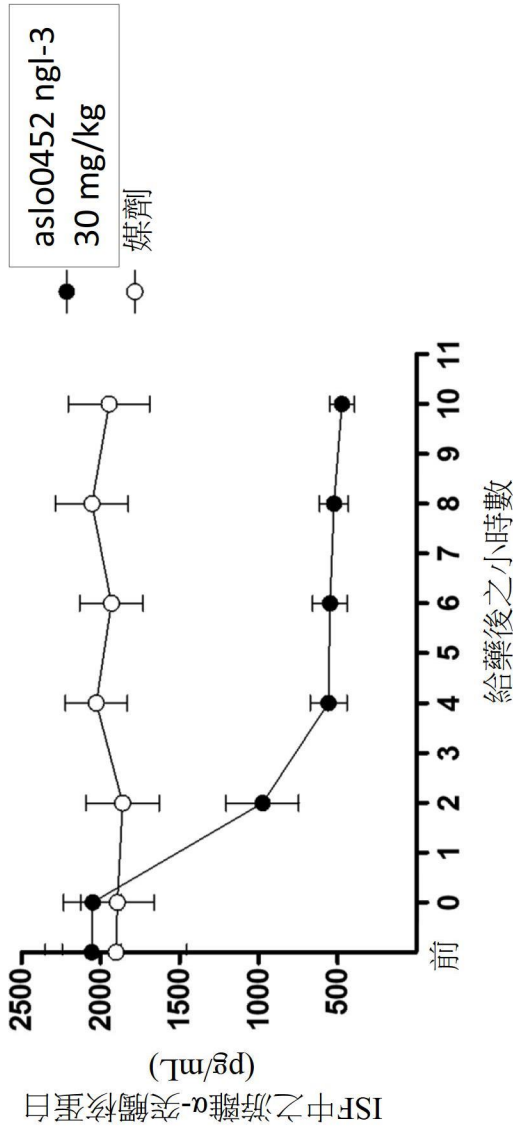


【圖9B】

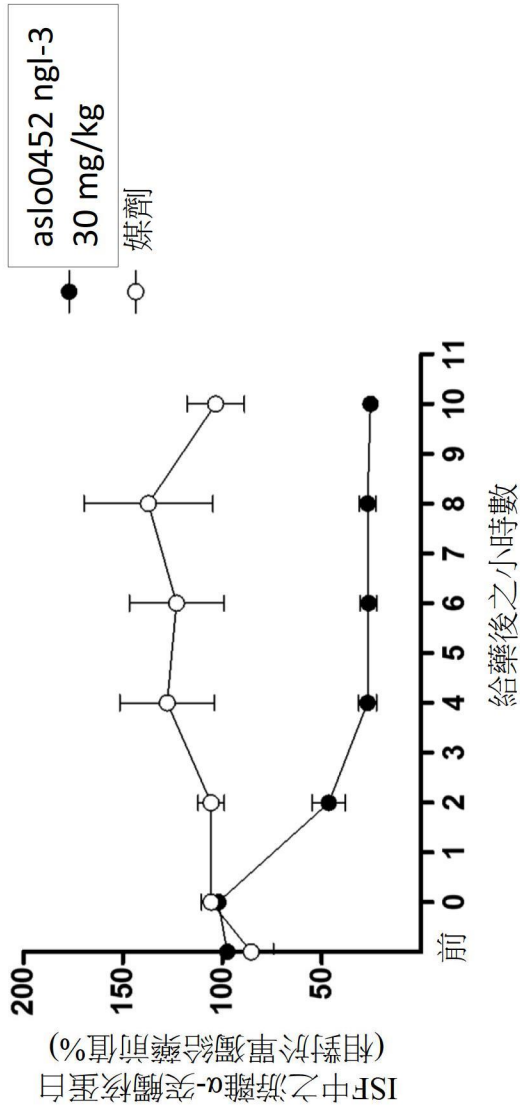


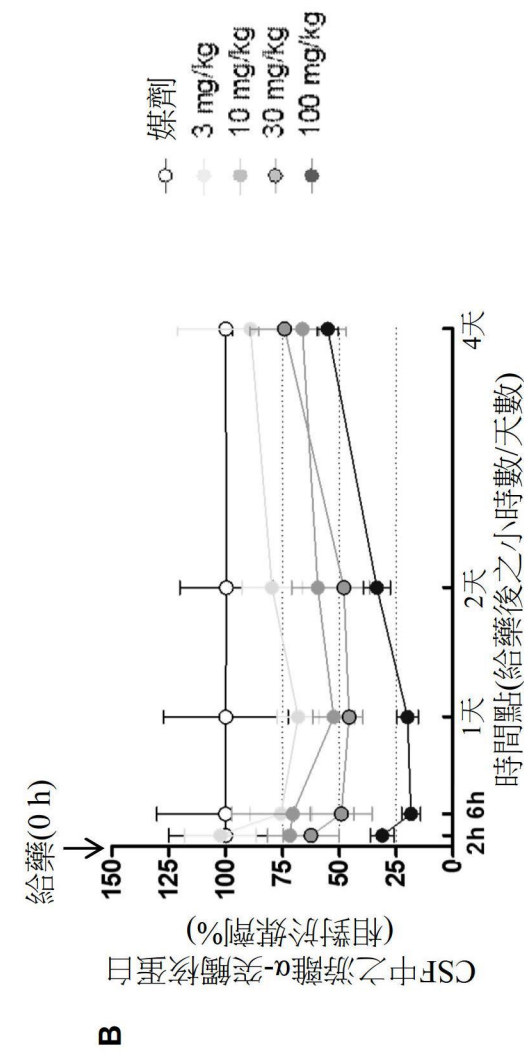
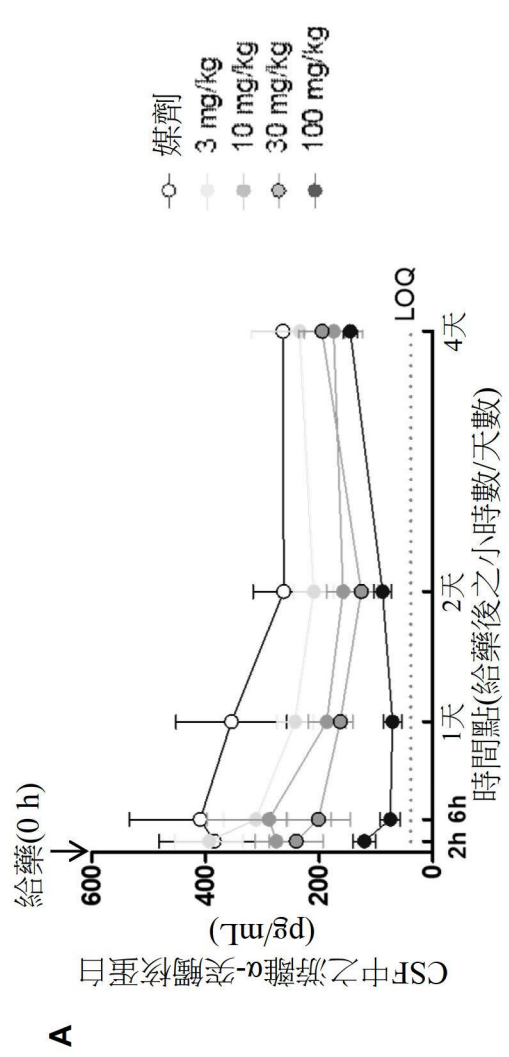
【圖9C】

【圖10A】

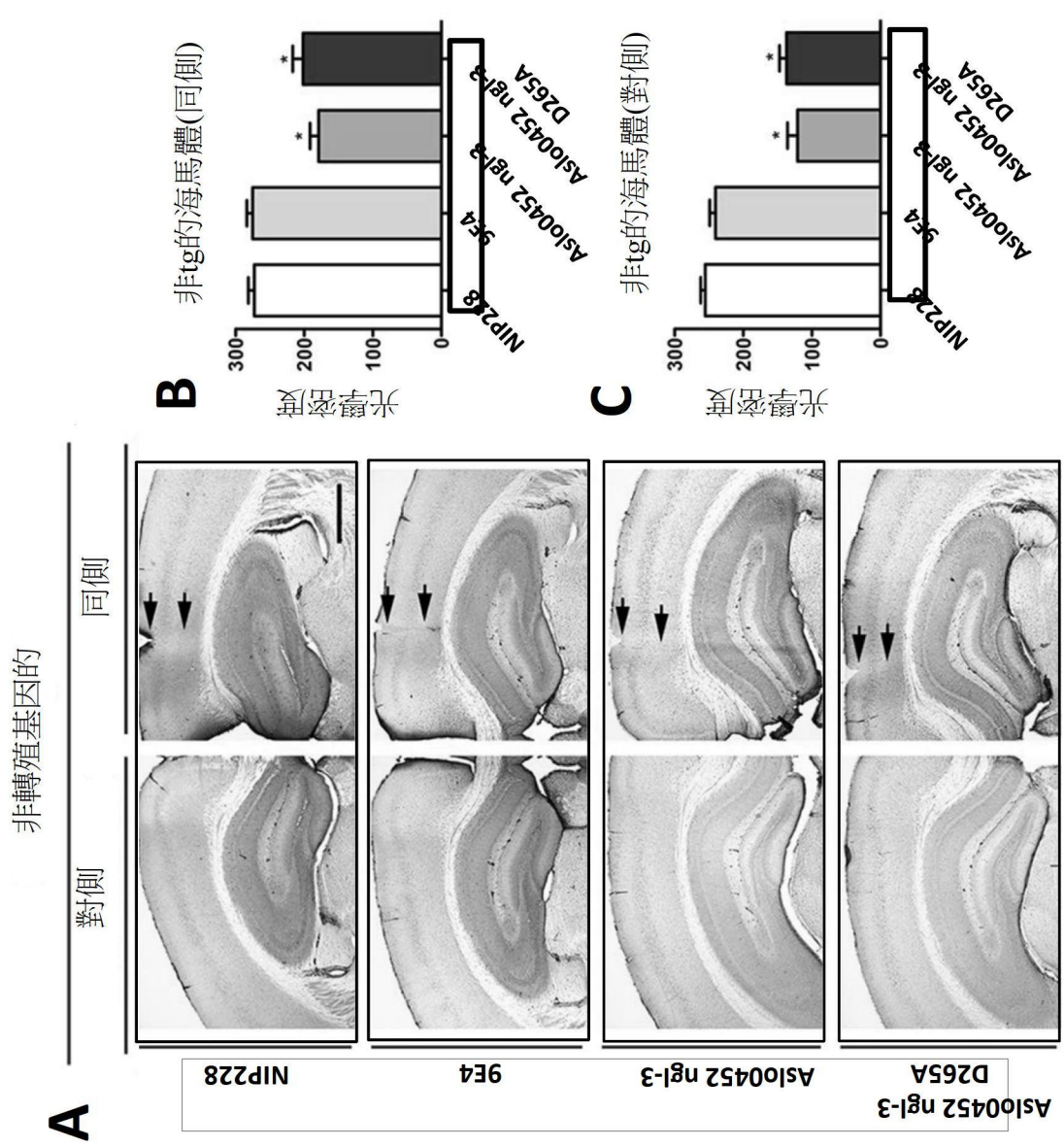


【圖10B】

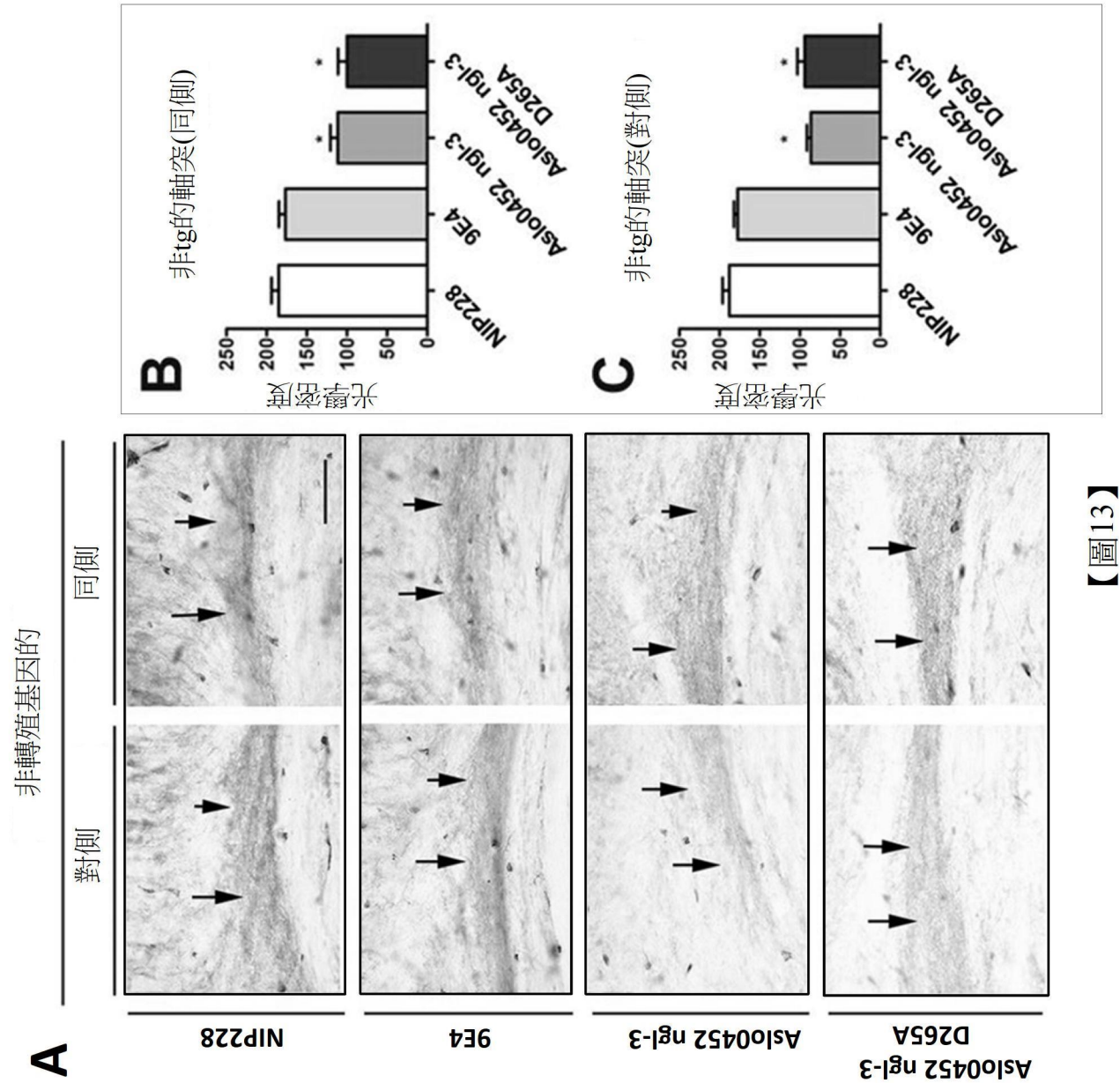




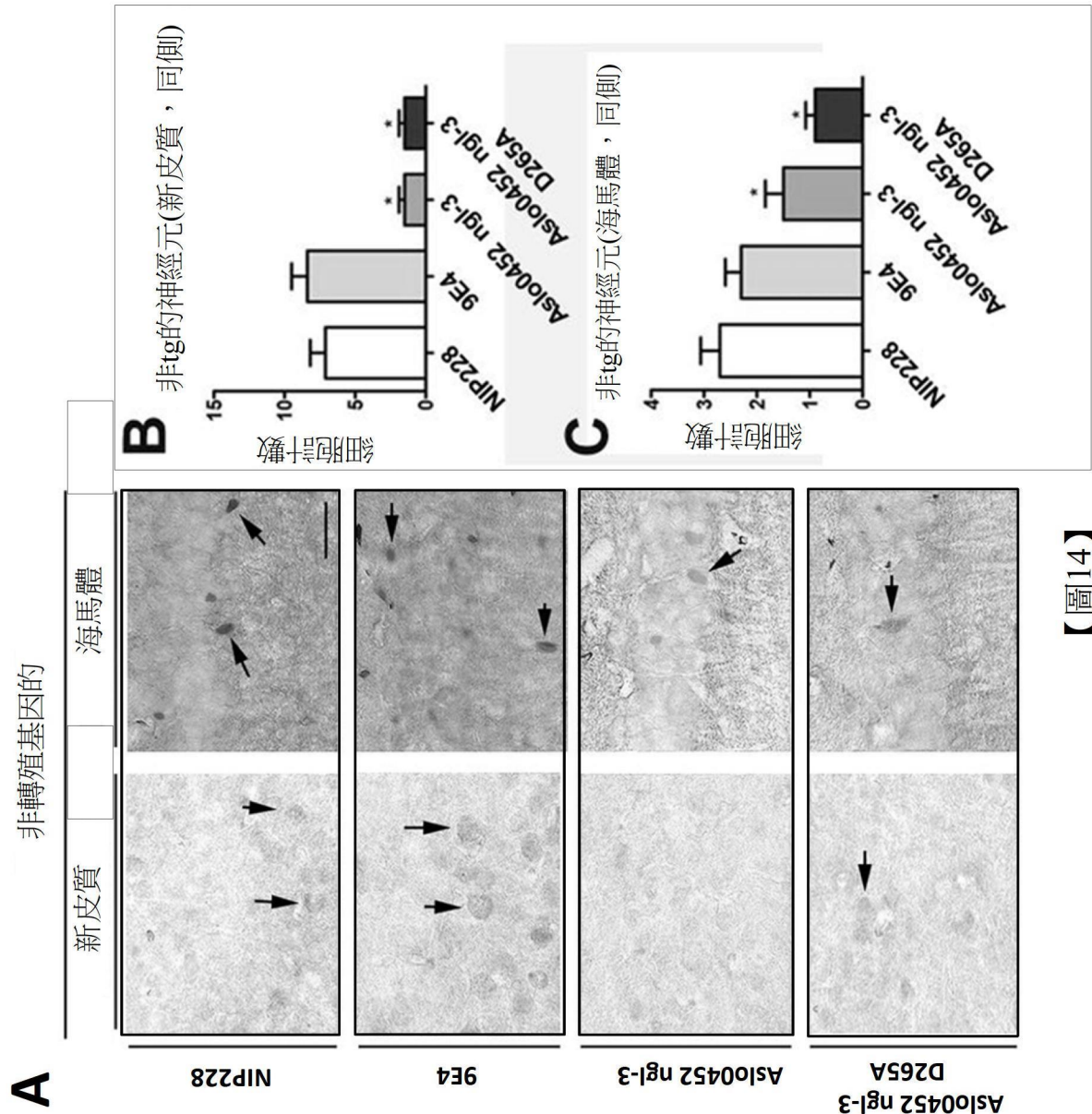
【圖11】



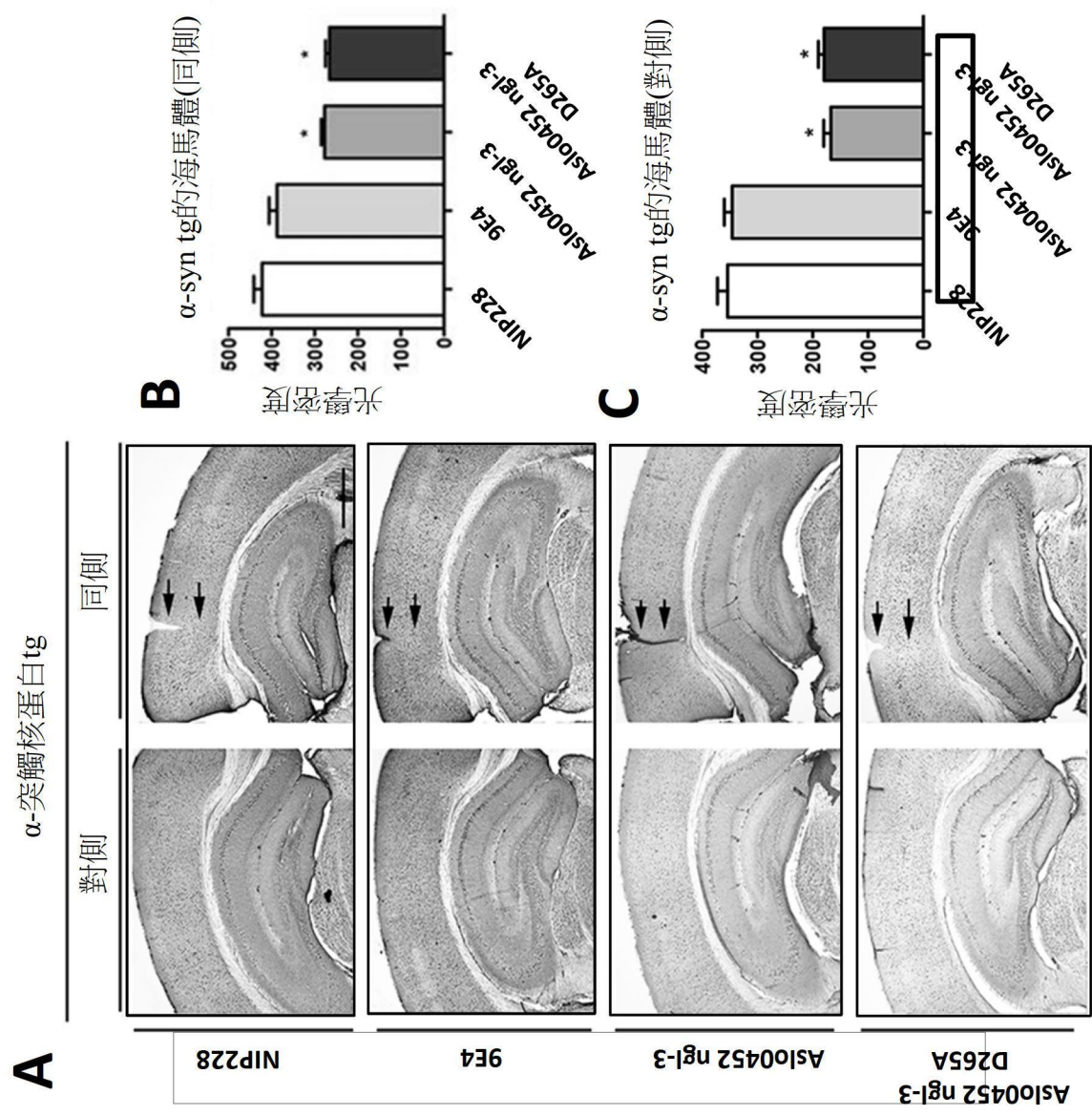
【圖12】



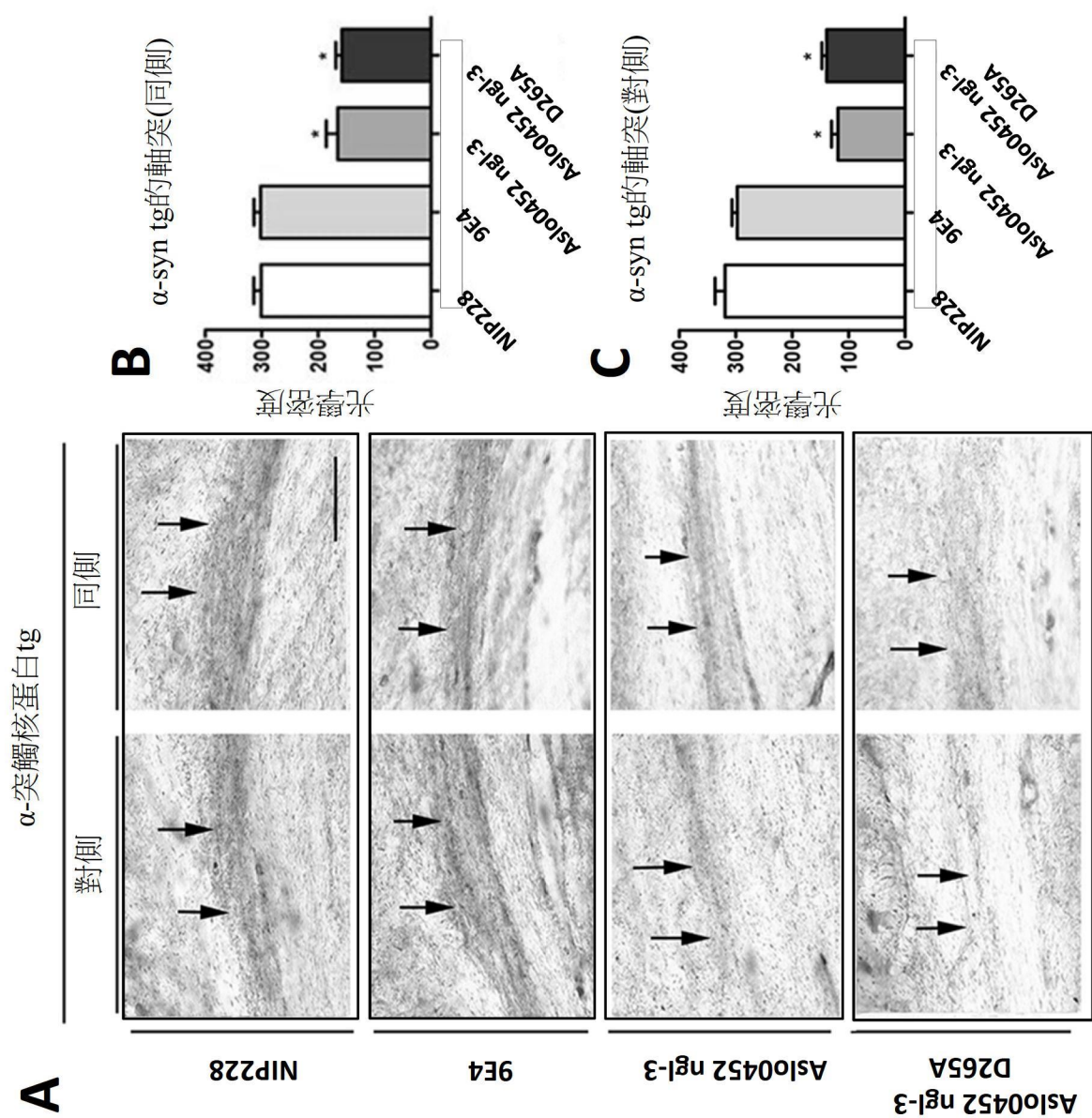
【圖13】



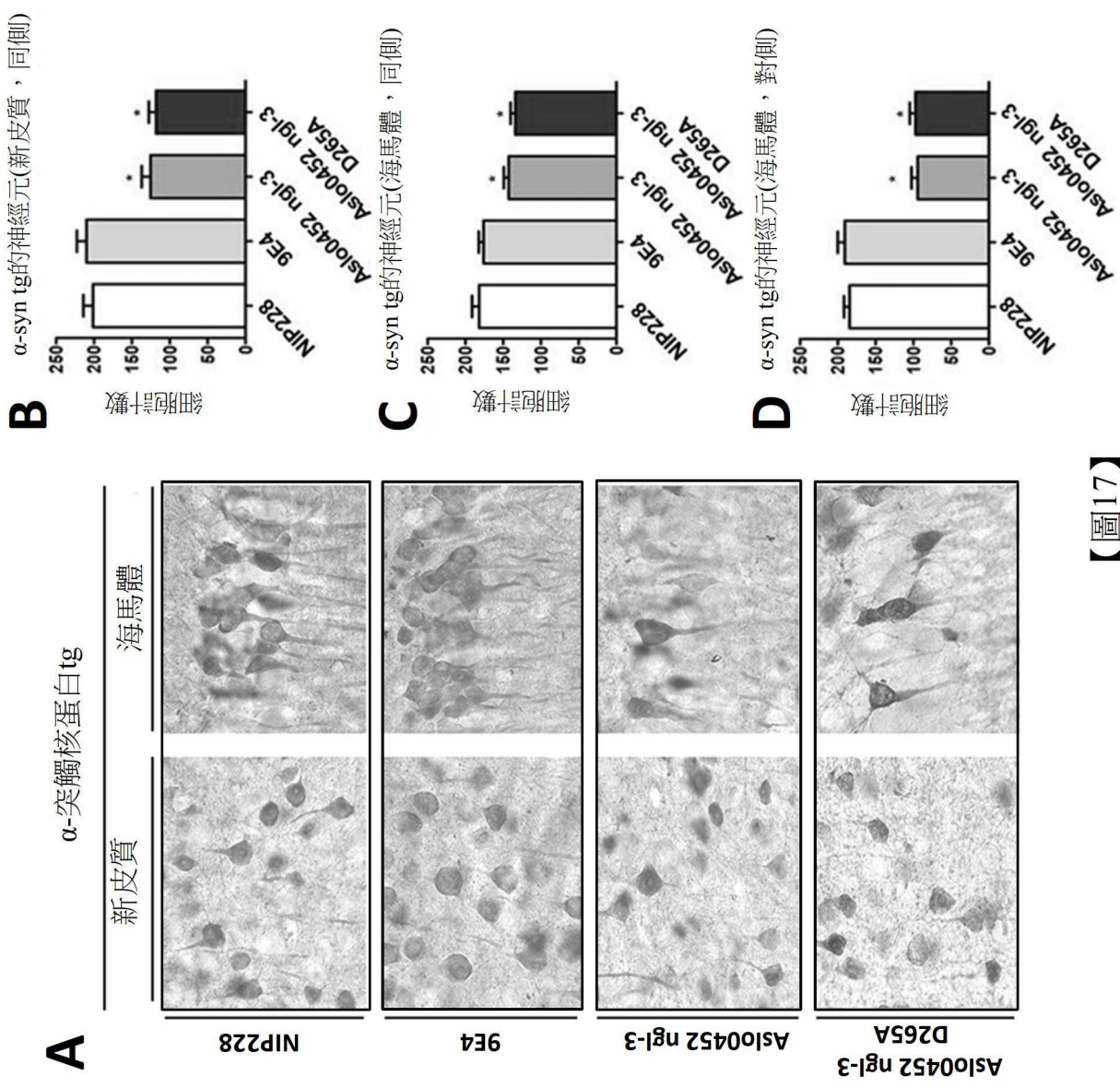
【圖14】



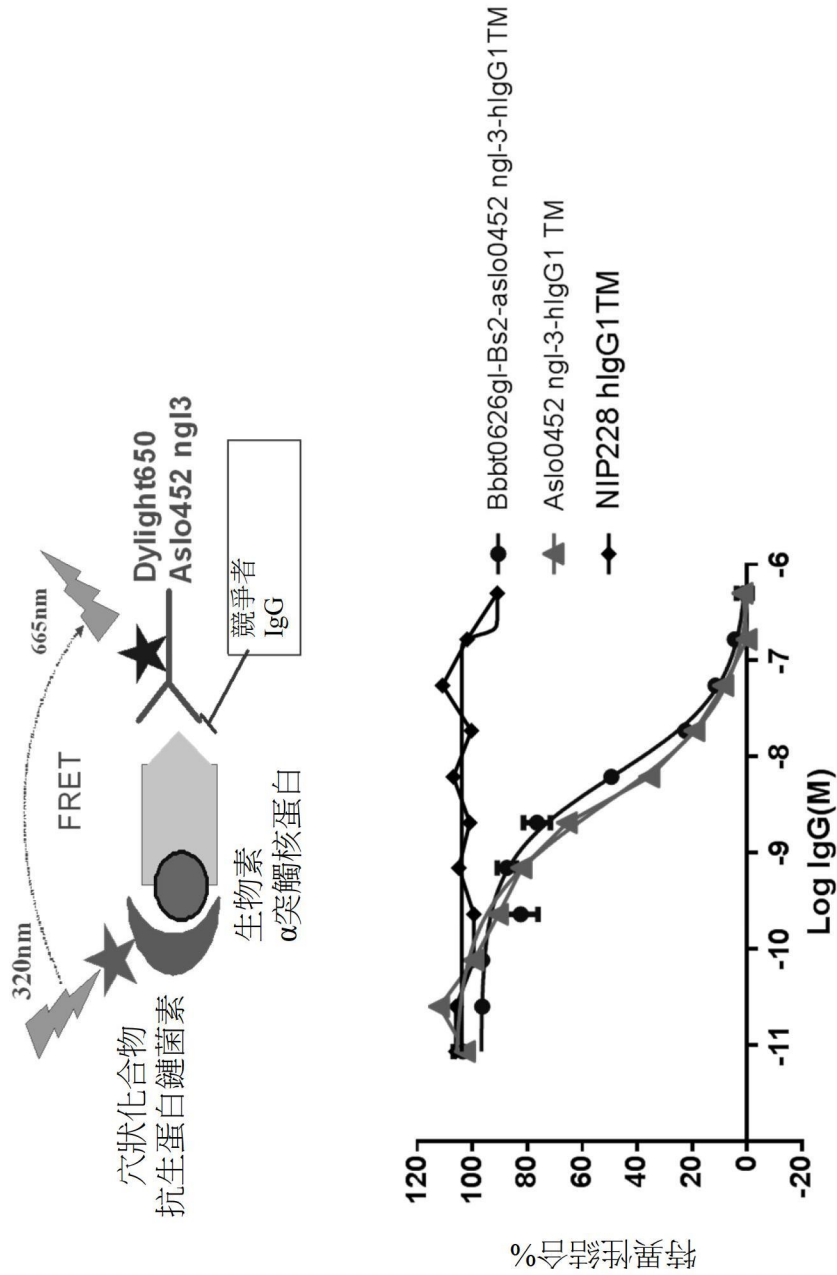
【圖15】



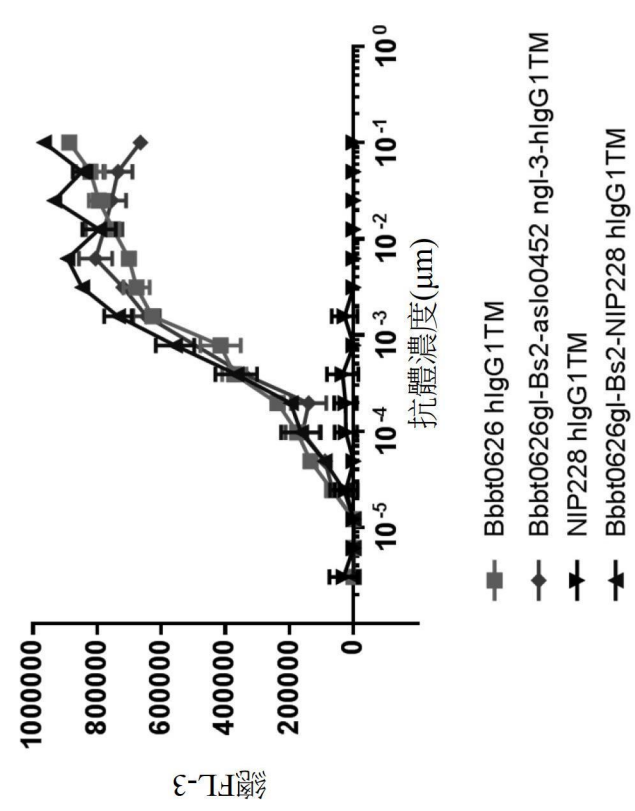
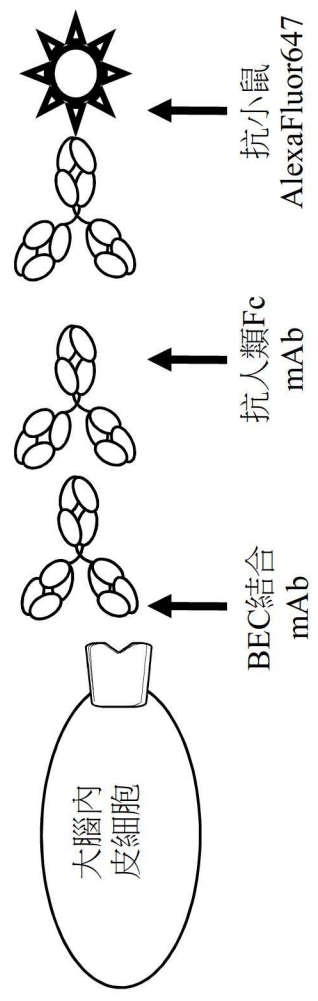
【圖16】



【圖17】



【圖18】



【圖19】