



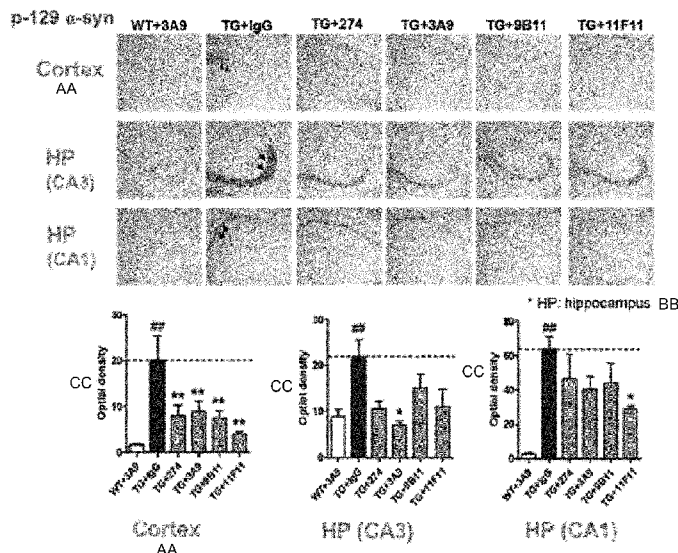
2018 년 7 월 12 일 (12.07.2018) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/000239
- (22) 국제출원일: 2018 년 1 월 5 일 (05.01.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
62/443,151 2017 년 1 월 6 일 (06.01.2017) US
10-2018-0001641 2018 년 1 월 5 일 (05.01.2018) KR
- (71) 출원인: 에이비엘바이오 주식회사 (ABL BIO INC.)
[KR/KR]; 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712
번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 안진형 (AHN, Jinhyung); 13488 경기도 성남
시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 안

성원 (AN, Sungwon); 13488 경기도 성남시 분당구 대
왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 김동인 (KIM,
Dongin); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번
길 16, Gyeonggi-do (KR). 성은실 (SUNG, Eunsil); 13488
경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeong-
gi-do (KR). 엄재현 (EOM, Jaehyun); 13488 경기도 성남
시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 이
상훈 (LEE, Sang Hoon); 13488 경기도 성남시 분당구 대
왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 이승재 (LEE,
Seung-Jae); 05065 서울시 광진구 아차산로 262, 더샵
스타시티 D동 3902호, Seoul (KR). 김태경 (KIM, Tae
Kyung); 08767 서울시 관악구 조원로16길 12, 102동 805
호, Seoul (KR). 최민선 (CHOI, Min Sun); 16894 경기도
용인시 기흥구 구성로 411, Gyeonggi-do (KR). 유원규
(YOU, Weonkyoo); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판
교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 정재호 (JUNG, Jae-
ho); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길
16, Gyeonggi-do (KR). 김주희 (KIM, Juhee); 13488 경기

(54) Title: ANTI- α -SYN ANTIBODY AND USE THEREOF(54) 발명의 명칭: 항 α -SYN 항체 및 그 용도

[도8a]



AA ... Cortex
BB ... HP: hippocampus
CC ... Optical density

(57) Abstract: The present application discloses an anti- α -syn antibody which preferentially recognizes α -syn aggregates. The antibody according to the present application binds with high affinity and specificity to α -syn aggregates, thereby inhibits accumulation thereof or intercellular communication thereof, and thus can be usefully employed in the detection, diagnosis, and/or treatment or prevention of various diseases caused by α -syn aggregate accumulation.

(57) 요약서: 본원은 α -Syn 응집체를 선호적으로 인식하는 항- α -Syn 항체를 개시한다. 본원에 따른 항체는 α -Syn 응집체에 높은 친화도 및 특이성으로 결합하여, 이의 축적 또는 이의 세포간 전달을 억제하여, α -Syn 응집체 축적으로 인한 다양한 질환의 검출, 진단 및/또는 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.



도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 정진원 (**JUNG, Jinwon**); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 김연주 (**KIM, Yeunju**); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 손용규 (**SON, Yong-gyu**); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 성병제 (**SUNG, Byungje**); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 박원미 (**PARK, Weonmee**); 06224 서울시 강남구 논현로 412, 603호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 항 α -SYN 항체 및 그 용도

기술분야

- [1] 본원은 항- α -syn 항체 및 그 용도에 관한 기술이다.

배경기술

- [2] 알파-시뉴클레인(α -Synuclein)은 뉴론의 전 시냅스 말단에서 주로 발현되는, 140개 아미노산으로 이루어진 단백질로, 정상 상태에서는 자연적으로 접히지 않은 상태의 단량체로 존재한다. 알파-시뉴클레인은 전 시냅스 말단에서 시냅스 베시클 공급을 유지하고, 수의 또는 불수의 운동을 조절하는 뉴로트랜스미터인 도파민의 방출을 조절하는 것으로 알려져 있다.
- [3] 하지만 병적인 상태에서 알파-시뉴클레인은 액적(droplet), 인지질 이중막 또는 지질막 등과의 결합 및 상호작용을 통해 구조적 변화를 일으켜 접힌 또는 폴딩된 α -헬리칼 형태의 2차 구조를 형성하여 이량체(dimer), 올리고머(oligomer) 및/또는 섬유상 형태의 분자를 포함하는 응집체를 형성하게 된다. 이러한 응집체는 세포에 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 파킨슨병, 루이소체 치매, 그 외 다양한 질환의 신경세포 내에서 발견되는 비정상적인 단백질 응집체인 루이소체의 주성분이다. 또한 알파-시뉴클레인의 인산화, 또는 유비퀴틴화와 같은 번역 후 변형도 알파-시뉴클레인의 응집 및 신경독성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.
- [4] 이러한 알파-시뉴클레인 응집은 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA) 및 기타 다수의 신경축삭 질환을 포함하는 α -synucleinopathies라고 불리는 일군의 신경퇴행성 질환의 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Kim et al. Alzheimer's Research & Therapy 2014, 6:73).
- [5] 나아가 파킨슨 질환 환자의 뇌척수액 및 혈장 샘플에서 올리고머 형태 및 모노머 형태의 알파-시뉴클레인이 모두 발견되었는데, 이는 작은 분자량의 알파-시뉴클레인 응집체가 세포막을 투과하여 세포외 공간에 접근할 수 있음을 나타낸다. 또한 폴딩된 알파-시뉴클레인이 엑소사이토시스에 의해 세포로부터 방출된 후, 프리온 단백질처럼, 세포간 전달에 의해 뇌의 한 영역에서 다른 영역으로 전달될 수 있는 것으로 나타났다 (Brundin P. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2010, 11:301-307).
- [6] 이에 알파-시뉴클레인이 파킨슨 질환과 같은 α -synucleinopathy 의 치료제 개발의 표적이 되고 있다. 주요 개발 전략은 응집체 형성 억제, 유전자 사일런싱 및 응집체 제거를 포함한다. 전자의 경우, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)(Bieschke J. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010 107:7710-7715),

3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole (anle138b)(Wagner J. et al. Acta Neuropathol 2013, 125:795-813), CLR0120 (Prabhudesai S. et al.

Neurotherapeutics 2012, 9:464-476) 및 프롤릴 올리고펩티다제 억제제 KYP-20479 (Myohanen T. T. et al. Brit J Pharmacol 2012, 166:1097-1113)를 포함한다.

알파-시뉴클레인에 결합하는 항체는 특허 US8,609,820, 및 US8,940,276 등에 개시되어 있다.

- [7] 저분자 화합물의 경우 표적 특이적인 결합력이 떨어지고 낮은 반감기로 인하여 높은 용량을 투여해야 한다. 항체는 저분자 화합물과 비교하여 표적 특이적이고, 높은 반감기를 나타내나, 질환 치료 가능성을 높이기 위해서는 높은 결합력으로 응집체에 선호적으로 결합하는 항체가 필요하다.

- [8] 따라서 α -syn 응집체의 비정상적 축적과 연관된 질환의 치료를 위해, 알파 시뉴클레인, 특히 응집체에 선호적으로 결합할 수 있는 항체의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본원은 알파-시뉴클레인, 특히 α -Syn 응집체를 높은 결합력으로 특이적으로 인식할 수 있는 항체를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [10] 한 양태에서 본원은 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편으로, 상기 항체 또는 항원결합 단편은 (i) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3의 상보성 결정부위를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 (ii) CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 상보성 결정부위를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하며, 상기 CDRH1은 서열번호 1 내지 14로 구성되는 군으로부터 선택되고; 상기 CDRH2는 서열번호 15 내지 28로 구성되는 군으로부터 선택되고; 상기 CDRH3은 서열번호 29 내지 42로 구성되는 군으로부터 선택되고; 상기 CDRL1은 서열번호 43 내지 56으로 구성되는 군으로부터 선택되고; 상기 CDRL2는 서열번호 57 내지 70으로 구성되는 군으로부터 선택되고; 상기 CDRL3은 서열번호 71 내지 84로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편을 제공한다.

- [11] 일부 구현예에서 상기 중쇄 가변영역의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 상기 경쇄 가변영역의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 서열은 다음 중 어느 하나인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편을 제공한다: (aa) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 1, 15, 및 29, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 43, 57 및 71; (ab) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 2, 16, 및 30, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 44, 58 및 72; (ac) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 3, 17, 및 31, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 45, 59 및 73; (ad) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 4, 18, 및 32, 그리고 상기

CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 46, 60 및 74; (ae) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 5, 19, 및 33, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 47, 61 및 75; (af) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 6, 20, 및 34, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 48, 62 및 76; (ag) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 7, 21, 및 35, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 49, 63 및 77; (ah) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 8, 22, 및 36, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 50, 64 및 78; (ai) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 9, 23, 및 37, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 51, 65 및 79; (aj) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 10, 24, 및 38, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 52, 66 및 80; (ak) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 11, 25, 및 39, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 53, 67 및 81; (al) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 12, 26, 및 40, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 54, 68 및 82; (am) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 13, 27, 및 41, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 55, 69 및 83; 또는 (an) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 14, 28, 및 42, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 56, 70 및 84.

- [12] 일부 구현예에서, 본원에 따른 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편의 중쇄가변 영역은 서열번호 85 내지 98로부터 선택되는 아미노산 서열; 서열번호 85 내지 98로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 서열; 또는 서열번호 85 내지 98로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함한다.
- [13] 일부 구현예에서, 본원에 따른 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편의 경쇄 가변영역은, 서열번호 99 내지 112로부터 선택되는 아미노산 서열; 서열번호 99 내지 112로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상; 또는 서열번호 99 내지 112로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함한다.
- [14] 일부 구현예에서, 본원에 따른 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편의 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 85 및 99; 서열번호 86 및 100; 서열번호 87 및 101; 서열번호 88 및 102; 서열번호 89 및 103; 서열번호 90 및 104; 서열번호 91 및 105; 서열번호 92 및 106; 서열번호 93 및 107; 서열번호 94 및 108; 서열번호 95 및 109; 서열번호 96 및 110; 서열번호 97 및 111; 또는 서열번호 98 및 112로 표시되는 서열을 포함한다.
- [15] 일부 항체 또는 항원결합 단편은 모노클로날 또는 scFV 항체인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편이다.
- [16] 상기 임의의 본원에 따른 항체는 모노클로날 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체이다.

- [17] 상기 임의의 본원에 따른 모노클로날 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 형이다.
- [18] 상기 임의의 항체 또는 항원결합 단편은 모노클로날 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, diabody 또는 scFV이다.
- [19] 일부 구현예에서, 본원에 따른 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체는 다음 중 어느 하나의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편이다: 상기 경쇄 및 중쇄는 각각 서열번호 113 및 서열번호 141; 서열번호 114 및 서열번호 142; 서열번호 115 및 서열번호 143; 서열번호 116 및 서열번호 144; 서열번호 117 및 서열번호 145; 서열번호 118 및 서열번호 146; 서열번호 119 및 서열번호 147; 서열번호 120 및 서열번호 148; 서열번호 121 및 서열번호 149; 서열번호 122 및 서열번호 150; 서열번호 123 및 서열번호 151; 서열번호 124 및 서열번호 152; 서열번호 125 및 서열번호 153; 또는 서열번호 126 및 서열번호 154;로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 항체는 불변역으로 마우스 IgG2a를 포함한다.
- [20] 일부 구현예에서, 본원에 따른 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체는 다음 중 어느 하나의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편이다: 상기 경쇄 및 중쇄는 각각 서열번호 127 및 서열번호 155; 서열번호 128 및 서열번호 156; 서열번호 129 및 서열번호 157; 서열번호 130 및 서열번호 158; 서열번호 131 및 서열번호 159; 서열번호 132 및 서열번호 160; 서열번호 133 및 서열번호 161; 서열번호 134 및 서열번호 162; 서열번호 135 및 서열번호 163; 서열번호 136 및 서열번호 164; 서열번호 137 및 서열번호 165; 서열번호 138 및 서열번호 166; 서열번호 139 및 서열번호 167; 또는 서열번호 140 및 서열번호 168. 상기 항체는 불변영역으로서 인간 IgG1을 포함한다.
- [21] 상기 본원에 따른 임의의 항체 또는 항원결합 단편은, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체를 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제할 수 있다.
- [22] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 상기 항체 또는 항원결합 단편을 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오타이드의 예로는 서열번호 169 내지 224로 표시되는 서열을 들 수 있다.
- [23] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [24] 또 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 상기 발현 벡터로 형질전환된 원핵 또는 진핵 세포 또는 세포주를 제공한다.
- [25] 또 다른 양태에서 본원은 또한 상기 본원에 따른 세포를 상기 항체 또는 항원결합 단편이 발현되기에 충분한 조건에서 배양하는 단계; 및 상기 세포주로부터 항체 또는 그 항원결합 단편을 분리하는 단계를 포함하는, α -Syn에 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

- [26] 또 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 임의의 항체 또는 그 항원결합 단편을 포함하는 조성물 또는 키트를 제공하며, 상기 조성물은 약학 또는 진단 조성물로 제공될 수 있으며, 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있으며, 진단조성물은 진단 또는 검출에 필요한 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [27] 본원에 따른 약학 조성물 또는 키트는 α -synucleinopathy 치료용으로 예를 들면 상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함한다.
- [28] 또 다른 양태에서 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하는 단계; 및 상기 항체 또는 항원결합 단편을 α -Syn 응집체 검출이 필요한 생물학적 시료와 접촉하는 단계를 포함하는 생물학적 시료에서 α -Syn 응집체 검출방법을 제공한다. 생물학적 시료는 α -Syn 응집체의 검출이 필요한 다양한 시료를 포함하며, 예를 들면, 뇌척수액, 혈장을 포함하는 혈액 또는 소변을 포함하며, 또한 세포, 조직 또는 기관을 포함한다. 상기 방법은 인비트로 또는 인비보에서 수행될 수 있다. 인비보 이미징은 예를 들면 PET(positron emission tomography), SPECT(single photon emission tomography), NIR(near infrared) 광학 이미징 또는 MRI(magnetic resonance imaging)을 이용하여 수행될 수 있다.
- [29] 또 다른 양태에서 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물을 α -synucleinopathy의 치료 및/또는 α -syn 응집체의 농도 조절이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체의 α -synucleinopathy 치료 또는 상기 대상체에서 α -syn 응집체의 농도를 조절하는 방법을 제공한다.
- [30] 또 다른 양태에서 본원은 α -synucleinopathy의 진단이 필요한 대상체에서 α -synucleinopathy를 진단하는 방법으로, 상기 방법은 상기 대상체에서 α -Syn 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 본원에 따른 임의의 항체 또는 항원 결합 단편로 측정/검출하는 단계; 및 상기 대상체에서 측정된 상기 α -Syn 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 대조군 시료의 결과와 비교하는 단계를 포함하며, 상기 대조군의 결과와 유사 또는 차이는 상기 대상체가 α -synucleinopathy에 걸린 것을 나타낸다. 상기 방법에서 대조군은 정상 또는 α -synucleinopathy 질환이 걸린 시료일 수 있다.
- [31] 또 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물의 α -synucleinopathy 대상체의 상기 질환 치료용 용도를 제공하며, 상기 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물은 상기 대상체, 또는 대상체의 뇌에서, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제한다.
- [32] 또 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를

포함하는 조성물의 뇌 세포에서 α -Syn 응집체 농도 조절용 용도로, 상기 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물은 상기 대상체의 뇌에서, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제할 수 있다.

발명의 효과

- [33] 본원에 개시된 항체는 α -Syn, 특히 α -Syn 응집체에 높은 결합력으로 선호적으로 결합한다. 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 α -Syn 응집체 형성을 감소시킬 수 있어 뇌의 응집체의 농도를 낮출 수 있다. 또한 α -Syn 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 중추신경계 바깥에서의 α -Syn 응집체 형성을 감소시킬 수 있어, 결국 뇌혈관장벽을 경계로 한 α -Syn 형태들 간의 평형상태를 변경시켜, 중추신경계 내의 응집체의 농도를 낮추는 효과를 가져올 수 있다.
- [34] 또한 높은 친화도로 인해 낮은 투여량으로 투여될 수 있는 장점이 있다. 이는 항체를 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 보다 간편한 피하주사와 같은 방식으로 투여해도 충분한 효능을 얻을 수 있기 때문에, 임상에서 큰 장점이 있다.
- [35] 본원에 개시된 항체는 α -Syn 응집체를 효과적으로 제거하거나 분해를 촉진할 수 있고, α -Syn의 세포간 전달을 억제할 수 있어, α -Syn의 응집체 축적과 관련된 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [36] 도 1은 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 응집된 형태의 native α -syn을 특이적으로 인식하는지 여부를 측정한 닛블롯 결과로, α -syn 응집체에 선호적으로 결합하는 것을 나타낸다.
- [37] 도 2는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체의 친화도를 ELISA로 측정한 결과이다. 본원에 따른 항체는 α -syn 응집체에 높은 친화도로 선호적으로 결합하며, 단일체에 대해서는 응집체보다 낮거나 또는 결합하지 않기 때문에, 친화도를 도출할 수 없었다. 이러한 결과는 파킨슨병과 같은 알파 시큐클레인 병인을 갖는 신경퇴행성 질환의 원인물질을 효과적으로 제거할 수 있거나 활동을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [38] 도 3a는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 α -Syn 응집체에 대한 선호적 결합 특이성 및 친화도를 BIAcore로 분석한 결과이다. 본원에 따른 항체가 높은 친화도로 응집체에 결합하는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 파킨슨병과 같은 알파 시큐클레인 병인을 갖는 신경퇴행성 질환의 원인물질을 효과적으로 제거할 수 있거나 활동을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [39] 도 3b는 도 3a의 결과를 표로 나타낸 것이다.
- [40] 도 4는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 α -Syn 응집체에 선호적 결합 특이성을 Octet으로 분석한 결과로, α -syn 응집체에 선호적으로

- 결합하는 것을 나타내며, 도 1의 결과와 일치하는 것이다. 비교군으로 사용된 #274 항체의 경우 단량체 및 응집체에 모두 잘 결합하는 것으로 나타났다.
- [41] 도 5는 본원에 따른 일 구현예에서 파아지 디스플레이를 통해 선별된 항체가 응집된 형태의 native α -syn을 특이적으로 인식하는지 여부를 측정한 닛블롯 결과로, α -syn 응집체에 선호적으로 결합하는 것을 나타낸다.
- [42] 도 6은 도 5의 항체의 α -Syn 응집체에 대한 친화도를 Octet으로 분석한 결과이다. 이는 본원에 따른 항체가 높은 친화도로 응집체에 결합하는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 파킨슨병과 같은 알파 시큐클레인 병인을 갖는 신경퇴행성 질환의 원인물질을 효과적으로 제거할 수 있거나 활동을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [43] 도 7은 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 α -syn의 세포 간 전파(cell to cell transmission)를 억제하는지를 분석하는 원리(위) 및 실험 결과를 나타낸 것이다. 여기서 파란색은 핵이며, 초록색은 세포밖으로 나온 α -syn이 다른 세포안으로 전파되어 다른 α -syn을 만나 응집체를 만들었을 때의 신호이다. 본원에 따른 항체 9B11, 3A9 및 11F11 처리군에서는 음성대조군인 IgG 대비 초록색 시그널을 나타내는 세포의 개수가 현저히 줄어들었으며, 이는 응집체에 높은 친화도로 특이적으로 결합하는 본원에 따른 항체가 α -syn의 세포간 전파를 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [44] 도 8a는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 인간 α -Syn을 과발현하는 마우스 동물모델(TG)에서 α -Syn 응집체를 제거할 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 p-129 α -Syn 항체를 이용하여 마우스 뇌 조직을 염색하여 측정한 결과이다. 도면에서 HP는 Hippocampus이고, p-129 α -syn은 129번째 잔기가 인산화된 형태의 응집체의 마커이며, 화살표는 인산화된 α -syn을 나타낸다. 이는 본원에 따른 항체가 α -Syn을 현저하게 제거할 수 있음을 나타내는 결과이다. WT 및 IgG는 음성대조군이며, 항체 274는 단량체와 응집체 모두에 결합하는 비교군이다. 이러한 결과는 본원에 따른 항체는 응집체 α -syn의 축적을 효과적으로 억제할 수 있어, α -syn 병인과 관련된 질환의 예방 및/또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [45] 도 8b는 도 8a와 동일한 실험이나, 총 α -syn에 대한 항체를 사용하여 염색한 결과이다. 화살표는 인간 α -syn을 나타낸다. 9B11, 11F4, 11F11 항체는 총 α -syn의 축적을 효과적으로 억제하였다. 총 α -syn 검출은 본원에 따른 항체가 synuclein 자체의 제거능(clearing) 및 항체의 세포 간 전달(cell to cell transmission) 억제능이 있음을 나타내는 것이다. 또한 다른 측면에서 단량체의 응집체로의 형성의 억제, 또는 단량체를 모두 제거할 수 있는 것으로 해석될 수 있다.
- [46] 도 9a는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보에서 microgliosis를 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 Iba-1(microgliosis) 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 활성화된 마이크로글리아를 의미하는 것으로 3A9, 9B11,

11F11 항체를 투여한 쥐의 뇌에서 마이크로글리아 활성화가 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있다.

- [47] 도 9b는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보에서 astrogliosis를 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 GFAP (astrogliosis) 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 활성화된 에스트로사이트를 의미하는 것으로 3A9, 9B11, 11F11 항체들이 효과적으로 유의한 수준으로 astrogliosis를 억제함을 확인할 수 있었다.
- [48] 도 9c는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보에서 염증성 사이토카인을 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 IL-1 베타 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 IL-1 베타를 발현하고 있는 세포를 나타낸다. IL-1 베타는 염증을 유발하여 다양한 신경세포의 사멸 및 염증 반응을 유도하게 되는데, 본원에 따른 항체를 투여한 쥐의 뇌조직에서 IL-1 베타가 현저하게 감소한 것을 나타낸다.
- [49] 도 9d는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보에서 염증성 사이토카인을 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 IL-6 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 염증성 사이토카인인 IL-6를 발현하는 세포를 나타낸다. 본원에 따른 항체를 투여한 쥐의 뇌조직에서 IL-6가 감소한 것을 나타낸다.
- [50] 도 10a 및 도 10b는 각각 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 단일클론 항체 3A9 및 11F11가 인간 뇌조직에서 루이소체(Lewy body) 및 루이 신경돌기(Lewy neurites)를 특이적으로 인식할 수 있는 지를 각각 측정한 결과이다. 본원에 따른 항체가 루이소체(화살표) 및 루이 신경돌기(왼쪽 아래 실 같은 모양)에 결합하는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 본원의 항체가 실제 인간 뇌조직에 존재하는 α -syn 응집체와 특이적으로 결합할 수 있음을 나타내는 것으로, α -syn 병인과 관련된 질환의 예방 및/또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [51] 도 11은 본원에서 제조된 항체의 에피토프 맵핑 결과를 도식적으로 나타낸 것으로, 본원에 따른 항체들은 대부분 C-말단 부위에 결합하는 것으로 나타났다. N-말단을 인식하는 α -syn 항체들은 α -synuclein 관련 질환을 통칭하는 synucleinopathy에 속하는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)와 같은 다른 질병의 응집체는 인식하지 못하는 반면, C-말단 부위를 인식하는 α -syn 항체들은 파킨슨 병뿐 아니라 기타 다양한 synucleinopathy 질환의 응집체도 인식한다는 장점을 가진다.

발명의 실시를 위한 형태

- [52] 본원은 α -syn, 특히 응집체에 높은 결합력으로 특이적으로 결합할 수 있어, α -syn 응집체의 검출은 물론, α -syn 응집체 감소 및/또는 α -syn 응집체 형성의 억제 및/또는 α -syn 응집체의 세포간 전달을 억제할 수 있는 항체의 개발을 근거로 한 것이다.

- [53] 본 항목에서 사용된 제목은 명세서 기재의 편리성을 위한 것일 뿐, 본 발명을 이로 제한하는 것은 아니다.
- [54] 본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 과학 및 기술적 용어는 본 기술분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 대로의 의미를 가진다. 나아가 문맥상 특별히 요구되지 않는다면, 단수는 복수를 포함하고, 복수는 단수를 포함한다.
- [55] 정의
- [56] 본원에서 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 단일 또는 이중가닥의 뉴클레오타이드 폴리머를 포함한다. 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 이들의 변형된 형태일 수 있다.
- [57] 본원에서 다르게 명시되지 않으면, 본원에서 언급된 폴리뉴클레오타이드의 왼쪽 말단은 5' 말단이고, 오른쪽 말단은 3' 말단을 나타낸다.
- [58] 본원에서 "분리된 핵산 분자"는 그 전부 또는 일부가 자연에 존재하는 폴리뉴클레오타이드와 관련성이 없거나, 또는 자연에서 관찰되지 않는 폴리뉴클레오타이드에 연결되어 있는, 유전체 기원의 DNA 또는 RNA, 또는 합성 기원의 mRNA, cDNA 또는 이들 조합을 의미한다. 본원의 목적하에서, 특정한 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자는 온전한(intact) 염색체를 포함하지 않는다. 대신 특정 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자는 그 특정 서열에 부가하여, 최소 수 개의 부가적인 단백질 코딩 서열을 포함할 수 있거나, 또는 상기 특정 핵산 서열의 발현을 위한 조절서열 및/또는 벡터를 추가로 포함할 수 있다.
- [59] 본원에서 용어 "조절서열"은 이에 작동 가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현과 프로세싱에 영향을 줄 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열의 특징은 숙주의 종류에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들면 원핵세포에서 작용할 수 있는 조절서열은 프로모터, 경우에 따라 오폐레이터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 진핵세포에서 조절서열은 전사인자가 결합하는 복수 개의 인식부위를 포함하는 프로모터, 전사 인핸서, 폴리아데닐화 서열 및 전사 종결서열을 포함할 수 있다. 조절서열을 리더서열 및/또는 융합 파트너 서열을 또한 포함할 수 있다.
- [60] 본원에서 "벡터"는 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 숙주세포로 전달하는데, 사용되는 예를 들면, 핵산, 플라스미드, 박테리오파지 또는 바이러스를 포함하는 임의의 분자를 의미한다.
- [61] 본원에서 "발현 벡터"는 숙주세포의 형질전환에 적합하며, 발현 벡터에 작동 가능하게 연결되어 목적하는 단백질을 코딩하는 이중 서열의 발현을 조절하는 핵산서열을 포함하는 벡터를 의미한다. 이러한 발현벡터는 또한 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되어, 이의 전사, 번역, 그리고 인트론이 존재하는 경우, RNA 스플라이싱을 조절하거나 이에 영향을 미치는 서열을 포함할 수 있다.

- [62] 본원에서 "작동 가능하게 연결된"은 연결될 핵산 서열들이 적절한 조건하에서 목적하는 기능을 수행할 수 있도록 위치함을 의미한다. 예를 들면 코딩 서열 및 조절 서열을 포함하는 벡터에서 적절한 조건에서 상기 코딩 서열의 전사가 상기 조절서열에 의해 영향을 받으면, 작동 가능하게 연결된 것이다.
- [63] 본원에서 "숙주 세포"는 목적하는 핵산 서열로 형질전환 되었거나, 또는 형질전환될 수 있는, 목적 유전자를 발현할 수 있는 세포를 의미한다. 상기 용어는 상기 숙주 세포와 형태 및 유전적 구성의 동일성 여부와 상관없이, 목적하는 유전자를 발현하는 한, 상기 숙주 세포의 자손도 포함한다.
- [64] 본원에서 "형질도입"은 통상적으로 박테리오파지에 의한 한 세균에서 다른 세균으로 핵산의 이동을 의미한다. 예를 들면, 복제를 하지 못하는 레트로바이러스를 이용한 진행 세포로의 핵산의 이동을 포함한다.
- [65] 본원에서 "전달이입(transfection)"은 세포, 특히 진행세포가 외래 또는 외인성 DNA를 취하는 것을 의미하고, 이 경우 DNA는 세포막을 통해 세포내로 도입된다. 이는 당해 기술 분야에 공지된 방법 예를 들면, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates을 참조할 수 있다.
- [66] 본원에서 "형질전환"은 세포가 새로운 DNA 또는 RNA를 포함하도록 변형된, 세포의 유전적 특징의 변화를 의미한다. 예를 들면, 세포는 전달이입, 형질도입, 또는 기타 기술을 통해 새로운 유전 물질이 도입되어, 유전적 특징이 변해, 형질전환될 수 있다. 형질도입 또는 전달이입을 포함하는 방법 등에 의해 형질전환된 DNA는 세포의 염색체 내로 물리적으로 통합되어 존재할 수 있거나, 복제 없이 에피솜 형태, 또는 복제 가능한 플라스미드로 일시적으로 존재할 수 있다. 형질전환된 DNA가 숙주 세포 분열과 함께 복제될 때, 안정하게 형질전환된 것으로 간주된다.
- [67] 본원에서 "아미노산"은 당해 기술 분야에서 이해되는 통상의 의미를 포함한다. 20개의 자연-발생 아미노산 및 이들의 약어는 당업계에서 통용되는 것에 따른다 (Immunology-A Synthesis, 2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Green, eds., Sinauer Associates: Sunderland, Mass. 1991). 아미노산은 전형적인 아미노산은 물론, 전형적인 20개 아미노산의 입체이성질체(D-아미노산), 비-자연 아미노산, 예를 들면, α -, α -이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 및 기타 비-전형적인 아미노산을 포함한다. 비-전형적인 아미노산의 예로는 4-하이드록시프롤린, γ -카복시글루타메이트, ϵ -N,N,N-트리메틸리신, ϵ -N-아세틸리신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시리신, σ -N-메틸아르기닌, 및 기타 유사한 아미노산과 이미노산(예를 들면 4-하이드록시프롤린)이 포함된다. 본원에 사용된 폴리펩타이드 표기에서, 당업계에서 일반적으로 통용되는 바와 같이, 서열의 왼쪽은 아미노 말단이고, 오른쪽은 카복시 말단을 나타낸다.

- [68] 본원에서 "폴리펩타이드" 또는 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하는 것으로, 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이는 또한 자연적으로 발생 아미노산 잔기의 중합체 뿐만 아니라, 이의 유사체 또는 모방체의 아미노산의 중합체를 포함한다. 또한 폴리펩타이드 또는 단백질은 인산화 또는 당화를 위한 탄수화물의 추가 등의 변형을 포함할 수 있다. 또한 폴리펩타이드 또는 단백질은 재조합 또는 자연에서 발견되는 세포에서 생산될 수 있다. 또한 폴리펩타이드 또는 단백질은 야생형 서열, 또는 상기 아미노산 서열의 일부가 결실, 부가 및/또는 치환된 것을 포함한다. 또한 폴리펩타이드 또는 단백질은 항체 예를 들면, 항- α -Syn 항체(또는 α -Syn 항체), α -Syn 결합 단백질, 또는 항원 결합 단편의 하나 이상의 아미노산이 결실, 부가 및/또는 치환된 서열을 포함한다. 또한 "폴리펩타이드 단편"은 전장 단백질과 비교하여 아미노 말단 결실, 카복실 말단 결실 및/또는 내부 결실을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 이러한 단편은 또한 전장 단백질과 비교하여 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 단편은 길이가 약 5개 내지 500개 아미노산 예를 들면, 단편은 적어도 길이가 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 450개 아미노산 일 수 있다. 본원의 목적을 고려하면, 유용한 폴리펩타이드 단편은 항원 결합 도메인을 포함하는 항체의 면역학적 기능성 단편이 포함된다. α -Syn 결합 항체의 경우에, 이러한 유용한 단편은 중쇄 또는 경쇄의 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 CDR 서열, 중쇄 또는 경쇄의 가변영역, 또는 항체 사슬의 일부를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [69] 본원에서 "분리된 폴리펩타이드, 항체 또는 단백질"은 이들과 통상적으로 함께 발견될 수 있는 다른 단백질이 존재하지 않으며, 자연적으로 이들과 결합되어 있는 지질, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드의 적어도 약 50% 이상이 제거된 것이다. 전형적으로 분리된 단백질, 폴리펩타이드 또는 항체는 소정의 조성물에서, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 25%, 또는 적어도 약 50%를 구성한다. 이러한 폴리펩타이드는 합성 기원의 게놈 DNA, cDNA, mRNA 또는 기타 RNA, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 코딩될 수 있다. 특히, 분리된 단백질 폴리펩타이드 또는 항체는 이의 치료적, 진단적, 예방적 연구 또는 기타 용도로의 적용을 방해하는 다른 단백질 또는 다른 폴리펩타이드의 오염물질이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [70] 본원에서 예를 들면 항원 결합 단편, 단백질, 또는 항체와 같은 폴리펩타이드의 "변이체"는 다른 폴리펩타이드 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기에 삽입, 결실, 부가 및/또는 치환이 발생한 폴리펩타이드이나 본원에 개시된 항체의 생물학적 활성을 유지하는 것으로, 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 또한 단백질 변이체는 단백질 효소 절단, 인산화 또는 기타 후번역 변형에 의해 변형되었으나, 본본원에 개시된 항체의 생물학적 활성 예를 들면 알파-시뉴클레인 응집체에 결합을 유지하는 것을 포함한다. 변이체는 본원에 개시된 항체 또는 그 항원 결합단편 의 서열과 약 99%, 98%, 97%, 96%, 95%,

94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 또는 80% 동일한 것일 수 있다.

- [71] 본원에서 폴리펩타이드의 "유도체"는, 삽입, 결실, 부가 또는 치환 변이체와는 상이한, 다른 화학적 모이어티와의 컨주게이션을 통해 화학적으로 변형된 폴리펩타이드를 의미한다.
- [72] 본원에서 폴리펩타이드, 핵산, 숙주 세포 등과 관련하여 사용된 용어 "자연에서 발견되는"은 자연적으로 존재하는 물질을 의미한다.
- [73] 본원에서 " α -Syn"은 SNCA 유전자에 의해 코딩되는 140개 잔기 아미노산으로 구성된 네이티브 α -Syn (NCBI ID: NP_000336)으로, 전장의 비처리된 것은 물론 처리된 다양한 형태의 것을 포함한다. 또한 자연적으로 나타나는 α -Syn의 변이체, 예를 들면 돌연변이, 스플라이스 변이체 또는 대립 변이체를 또한 포함하는 것이다. 변이체로는 140개 잔기 단백질 이외에, 엑손 3 및 엑손 5가 결실된 126개 및 112개 잔기 단백질 형태도 존재한다 (CAG3339.1). 또한 SNCA 유전자의 특정 다형성(polymorphism) 또는 미스센스(missense) 돌연변이가 파킨슨 질환의 발생과 관련성이 있는 것으로 알려져 (Singleton AB, et al., Science 2003, 302:841) 있으며, 이러한 돌연변이체도 포함된다. α -Syn의 호몰로그인 베타- 및 감마-Syn가 존재한다. 일 구현예에서 본원에 따른 항체는 α -Syn을 특이적으로 인식한다. α -Syn의 아미노산 서열은 서열번호 225로 표시된다.
- [74] 본원에서 " α -Syn 응집체"는 α -Syn의 구조(conformation)의 변화로 인한 것으로, 올리고머, 프로토피브릴, 피브릴 및/또는 상기 구조 중 하나 이상을 포함하는 구조 또는 응집체를 포함한다.
- [75] 본원에서 "동일성"은 두 개 이상의 폴리펩타이드 또는 두 개 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열을 정렬하고 비교하여 결정되는, 두 개 이상 폴리펩타이드 또는 두 개 이상 폴리뉴클레오타이드의 서열 유사성을 의미한다. 이러한 서열간 동일성은 일반적으로 "동일성 퍼센트"로 표시되며, 이는 비교되는 분자 간의 동일한 아미노산 또는 뉴클레오타이드 비율을 의미하며, 비교되는 분자 중, 가장 작은 크기의 분자를 기초로 계산된다. 핵산 또는 폴리펩타이드를 정렬하여 다 분자간의 동일성을 계산하는데 사용될 수 있는 방법은 다음 문헌을 참조할 수 있다: *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, New York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073.
- [76] 동일성 퍼센트를 계산할 때, 비교되는 서열은 서열 사이에 최대 매칭을 제공하는 방식으로 정렬되며, 정렬된 서열에는 갭, 매칭 및 미스-매치가 존재할

수 있으며 이는 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 알고리즘으로 처리된다. 일 구현예에서 이러한 동일성 퍼센트는 Needleman 및 Wunsch 알고리즘을 사용하여, 비교되는 서열간의 매치는 최대화하고, 갭의 수는 최소화하는 식으로 두 서열을 정렬하는 GAP 프로그램을 포함하는 GCG 프로그램 패키지를 이용하여 결정될 수 있다 (Devereux et al. Nucl. Acid Res. 1984, 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, USA). 컴퓨터 알고리즘 GAP은 비교되는 두 개의 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열에서 이들 간의 매치는 최대화하고, 갭의 수는 최소화하는 식으로 두 서열을 정렬하여 "매칭 구간(span)"을 결정한다. 상기 알고리즘은 또한 갭 개방 페널티(gap opening penalty)[이는 $3 \times$ 평균 향(average diagonal)으로 계산되고, 여기서 "평균 향(average diagonal)"은 사용되는 비교 매트릭스(comparison matrix)의 향의 평균이고; "향"은 특정 비교 매트릭스에 의한 각각의 완전한 아미노산 매치에 할당된 스코어 또는 숫자이다] 및 갭 확장 페널티(gap extension penalty)(이는 통상적으로, 갭 개방 페널티의 1/10배이다), 그리고 예를 들면, PAM 250 또는 BLOSUM 62와 같은 비교 매트릭스를 함께 사용한다. 특정 구현예에서, 표준 비교 매트릭스(PAM 250 비교 매트릭스는 Dayhoff et al. Atlas of Protein Sequence and Structure 1978, 5:345-352 참조; BLOSUM 62 비교 매트릭스는 Henikoff et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, 89:10915-10919 참조)를 사용한다. 일 구현예에서 GAP 프로그램을 사용한 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 동일성 퍼센트를 결정하기 위해 권장되는 파라미터는 아래와 같다: 알고리즘: Needleman et al. J. Mol. Biol. 1970, 48:443-453; 비교 매트릭스: BLOSUM 62(Henikoff et al., 1992, supra); 갭 페널티: 12(말단 갭에 대한 페널티 없음); 갭 길이 페널티: 4; 유사성 문턱값: 0.

- [77] 특정 파라미터를 사용해서 두 개의 서열을 정렬할 때, 두 개의 서열 사이에 유의한 관련성이 없음에도 불구하고, 짧은 서열 영역에서 높은 동일성으로 매칭되는 결과가 도출될 수 있다. 이런 경우, 두 개의 서열이 최소 50개의 연속적 아미노산에 걸쳐 정렬되도록, GAP 프로그램과 같은 사용되는 알고리즘의 파라미터를 수정할 수 있다.
- [78] 본원에서 사용된 "실질적으로 순수한"은 목적하는 대상 분자가 우세한 종으로 존재하는 것이다. 즉, 물 기준에서, 동일한 혼합물 내에서 임의의 기타 다른 개별 종보다 농도가 더 높다는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 실질적으로 순수한 분자는 조성물에 포함된 모든 고분자 종류의 최소 약 50%(물 기준), 최소 약 80%, 약 85%, 최소 약 90%, 최소 약 95%, 또는 최소 약 99%로 포함된다. 다른 구현예에서, 목적하는 대상 분자는 공지의 방법을 사용하여 더 이상 오염물이 검출되지 않을 정도까지 실질적으로 균질하게 정제되고, 이에 따라 조성물은 균질한 한 종류의 고분자 물질만을 포함한다.
- [79] 한 양태에서 본원은 α -Syn 단백질, 또는 인간 α -Syn에 결합하는 제조합 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 이러한 측면에서, "제조합 단백질"은

제조합 기술을 사용하여, 예를 들면 본원에 기재된 바와 같은 제조합 핵산의 발현을 통하여 제조된 단백질이다. 제조합 단백질의 생산을 위한 방법과 기술은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

- [80] 본원에서 "친화성" 또는 "친화도" 또는 "결합력"은 항체 또는 그 항원 결합단편과 항원 사이의 상호작용의 강도이며, 항원의 크기, 모양 및/또는 전하와 같은 항원의 특징 및 항체 또는 항원결합 단편의 CDR 서열에 의해 결정된다. 이러한 친화도를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 또한 하기를 참조할 수 있다.
- [81] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 해리 상수(dissociation constant, K_D)가 $\leq 10^{-6}$ M의 친화도로 결합할 때, 항원과 같은 이의 표적에 "특이적으로 결합한다"라고 할 수 있다. 항체는 K_D 가 $\leq 1 \times 10^{-8}$ M일 때, "높은 친화성"으로 표적에 특이적으로 결합한다. 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편의 응집체에 대한 친화도는 $\leq 1 \times 10^{-9}$ M, 특히 $\leq 1 \times 10^{-10}$ M, 특히 $\leq 1 \times 10^{-11}$ M의 높은 친화도를 가진다.
- [82] 본원에서 "선호적으로 결합"은 α -syn 응집체에만 결합하거나, 또는 α -syn 응집체 및 단량체에 모두 결합하지만 단량체 보다는 응집체에 더욱 높은 친화도로 결합하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 α -Syn 단량체에는 결합하지 않고, 응집체만 높은 친화도로 특이적으로 결합한다. 또 다른 구현예에서는 본원에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단량체 또는 응집체에 모두 결합하나, 단량체와 비교하여 α -Syn 응집체에 더 높은 친화도로 결합한다. 일 구현예에서 α -Syn 응집체에 대한 친화도는 α -Syn 단량체에 대한 친화도 보다 최소 2배 이상 높으며, 또는 항체로서 특이적으로 결합하는 것으로 판단할 수 없는 낮은 결합력으로, 또는 실험가능한 농도 범위의 항체에서는 측정가능하지 않는 결합력으로 결합한다.
- [83] 본원에 따른 일 구현예에서는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합단편의 α -Syn 응집체에 대한 높은 결합력은 $K_D \leq 1.0 \times 10^{-8}$ M; 다른 구현예에서, $K_D \leq 1.0 \times 10^{-9}$ M; 또 다른 구현예에서, $K_D \leq 1.0 \times 10^{-10}$ M; 또 다른 구현예에서, $K_D \leq 1 \times 10^{-11}$ M, 또 다른 구현예에서, $K_D \leq 1 \times 10^{-12}$ M 이다. 이러한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 이보다 낮은 친화도 예를 들면 K_D 가 10^{-7} M 또는 10^{-8} M 보다 큰 항체와 비교하여 더 낮은 투여량으로 투여될 수 있는 장점이 있다. 이는 항체를 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니다. 보다 간편한 피하주사와 같은 방식으로 투여해도 충분한 효능을 얻을 수 있기 때문에, 임상에서 큰 장점이 있다. 나아가 α -Syn 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 α -Syn 응집체 형성을 감소시킬 수 있어 뇌의 응집체의 농도를 낮출 수 있다. 또한 α -Syn 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 중추신경계 바깥에서의 α -Syn 응집체 형성을 감소시킬 수 있어, 결국 뇌혈관장벽을 경계로한 α -Syn 형태들 간의 평형상태를 변경시켜, 중추신경계 내의 응집체의 농도를 낮추는 효과를 가져올 수 있다.
- [84] 본원에서 "항원 결합 영역 또는 부위"는 특정 항원에 특이적으로 결합하는

단백질 또는 단백질의 부분을 의미한다. 이는 예를 들면, 항원과 상호작용하여, 항체에 항원에 대한 특이성 및 친화성을 제공하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 일부가 이에 해당한다. 이러한 항원 결합 영역은 전형적으로, 하나 이상의 "상보성 결정 부위"(Complementary Determining Region, 또는 CDR)을 포함한다. 특정 항원 결합 영역은 또한 하나 이상의 "프레임워크" 영역을 포함한다. CDR은 항원 결합의 특이성과 친화성에 기여하는 아미노산 서열이다. 프레임워크 영역은 이들 CDR의 적절한 형태(conformation)를 유지하는데 도움을 주어 항원 결합 영역과 항원 사이에 결합을 촉진할 수 있다.

- [85] 본원에서 "항체"는 임의의 아이소타입의 온전한 면역글로불린, 또는 표적 항원에의 결합을 위해 온전한 항체와 경쟁을 할 수 있는 항원 결합 단편을 의미한다. 예를 들면, 키메라, 인간화, 완전 인간 또는 이종특이적 항체 또는 이들의 항원 결합 단편을 포함한다. 항체는 그 자체로 항원 결합 단백질의 일종이기도 하다. 온전한 항체는 일반적으로 적어도 2개의 전장 중쇄와 2개의 전장 경쇄를 포함하지만, 낙타과 동물에서 자연적으로 발견되는 바와 같이 일부 경우에 항체가 단지 중쇄만을 포함할 수도 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 오직 단일 원(source)로부터 유래될 수 있거나, 또는 키메라일 수 있다, 키메라 항체는 2종류의 상이한 항체로부터 유래된 부분을 포함하며, 아래 보다 상세하게 기술된다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하이브리도마, 재조합 DNA 기술 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다. 다른 언급이 없다면, 본원에서 용어 항체는 2개의 전장 중쇄와 2개의 전장 경쇄를 포함하는 항체는 물론, 이들의 유도체, 변이체, 단편, 및 돌연변이체를 포함하고, 이들의 예는 아래 기술된 바와 같다.
- [86] 본원에서 "경쇄"는 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 제공하기에 충분한 가변 영역 서열을 갖는 전장의 경쇄 및 이의 단편을 포함한다. 전장 경쇄는 가변 영역 도메인 VL, 및 불변 영역 도메인 CL을 포함한다. 경쇄의 가변 영역 도메인은 경쇄 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재한다. 경쇄의 종류에는 카파 및 람다 사슬이 포함된다.
- [87] 본원에서 "중쇄"는 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 제공하기에 충분한 가변 영역 서열을 갖는 전장 중쇄 및 이의 단편을 포함한다. 전장 중쇄는 가변 영역 도메인 VH 및 3개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. VH 도메인은 중쇄 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재하고, CH 도메인은 카복시 말단에 존재하며, CH3가 카복시-말단에 가장 가깝게 위치한다. 중쇄는 IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4 서브타입 포함), IgA (IgA1 및 IgA2 서브타입 포함), IgM 및 IgE의 아이소타입을 포함한다.
- [88] 본원에 사용된, 항체 또는 면역글로불린의 사슬(중쇄 또는 경쇄)의 "항원 결합 단편"은 전장 사슬과 비교하여 일부 아미노산이 결여되었지만, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일부를 포함하는 것이다. 이러한 단편은 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있고, 또는 다른 항체 또는 항원 결합 단편과 특정

에피토프에 결합하기 위해 경쟁할 수 있다는 측면에서 생물학적으로 활성이 있다고 할 수 있다. 한 양태에서, 이러한 단편은 전장 경쇄 또는 중쇄 내에 존재하는 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 일부 구현예에서, 단쇄 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 이의 일부를 포함한다. 이러한 생물학적 활성 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 생산되거나, 또는 예를 들면 온전한 항체를 효소적 또는 화학적 절단하여 생산될 수 있다. 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편에는 이로 제한하는 것은 아니나, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체 및 단쇄 항체를 포함한다. 또한 이로 제한하는 것은 아니나, 인간, 마우스, 랫트, 카멜리드 또는 토끼를 포함하는 임의의 포유동물에서 유래될 수 있다. 본원에 개시된 하나 이상의 CDR과 같은 항체의 기능적인 부분은 제2의 단백질 또는 저분자 화합물과 공유결합으로 연결되어 특정 표적에 대한 표적 치료제로서 사용될 수 있다.

- [89] 본원에서 "Fab 단편"은 1개의 경쇄와 CH1 및 가변 영역만을 포함하는 1개 중쇄로 구성된다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 디설파이드 결합을 형성할 수 없다.
- [90] 본원에서 "Fc" 영역은 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 중쇄 단편을 두 분자 포함한다. 이들 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 디설파이드 결합 및 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 서로 결합되어 있다.
- [91] 본원에서 "Fab' 단편"은 Fab 단편에 중쇄의 CH1과 CH2 도메인 사이에 존재하는 영역을 추가로 포함하여, 두 분자의 Fab' 단편의 두 개의 중쇄사이에서 사슬간 디설파이드 결합이 형성되어, F(ab')₂ 분자를 형성할 수 있다.
- [92] 본원에서 "F(ab')₂ 단편"은 앞서 기술한 바와 같이, 2개의 경쇄, 및 가변영역, CH1과 CH1과 CH2 도메인 사이에 불변 영역의 일부를 포함하는 중쇄 2 분자를 포함하여, 2 분자의 중쇄 사이에서 사슬간 디설파이드 결합이 형성된다. 따라서, F(ab')₂ 단편은 2개의 Fab' 단편으로 구성되며, 상기 두 개의 Fab' 단편은 이들 간의 디설파이드 결합에 의해 서로 회합되어 있다.
- [93] 본원에서 "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함하지만 불변 영역은 포함하지 않는 항체이다.
- [94] 본원에서 "단쇄 항체"는 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 유연한 링커에 의해 연결된 항원 결합 영역의 단일 폴리펩타이드 사슬이다. 단쇄 항체는 예를 들면 미국 특허 제5,260,203호를 참조할 수 있다.
- [95] 본원에서 "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 포함하는 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편이다. 일 구현예에서는 2개 이상의 VH 영역이 펩타이드 링커에 의한 공유결합으로 연결되어, 2가(bivalent)의 도메인 항체를 형성한다. 이러한 2가 도메인 항체의 2개의 VH 영역은 동일 또는 상이한 항원을 표적으로 할 수 있다.
- [96] 본원에서 "2가의 항원 결합 단백질" 또는 "2가 항체"는 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 이러한 2가 항체에 포함된 2개의 항원 결합 부위는 동일한 항원

- 특이성을 갖거나, 또는 각각 상이한 항원에 결합하는 이중특이적 항체일 수 있다.
- [97] 본원에서 "다중 특이적 항원 결합 단백질" 또는 "다중 특이적 항체"는 두 개 이상의 항원 또는 에피토프를 표적으로 하는 것이다.
- [98] 본원에서 "이특이적," "이중 특이적" 항원 결합 단백질 또는 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 하이브리드 항원 결합 단백질 또는 항체이다. 이러한 이특이적 항체는 다중 특이적 항원 결합 단백질 또는 다중 특이적 항체의 일종으로, 공지된 다양한 방법 예를 들면 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 1990, 79:315-321; Kostelny et al. J. Immunol. 1992, 148:1547-1553 등을 참조할 수 있다. 이특이적 항원 결합 단백질 또는 항체의 2개의 항원 결합 부위가 결합하는 2개의 서로 상이한 에피토프는 동일 또는 상이한 단백질 표적에 위치할 수 있다.
- [99] 본원에서 용어 "항원" 또는 "면역원"은 예를 들면 항원 결합 단백질(예를 들면, 항체 또는 이의 면역학적으로 기능적인 항원 결합 단편)이 결합할 수 있으며, 동물에서 항원에 결합할 수 있는 항체 생산에 사용될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 의미한다. 항원은 상이한 항체 또는 이의 단편과 상호작용할 수 있는 하나 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서 항원은 전장 α -Syn 또는 C-말단이 결실된 잔기 1-120 아미노산 잔기를 포함하는 α -Syn 이다.
- [100] 본원에서 "에피토프"는 항원 결합 단백질 또는 항체에 의해 결합되는 또는 이들이 인식하는 분자의 부분으로, 예를 들면, 항체 또는 T-세포 수용체와 같은 항원결합 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 결정인자를 포함한다. 에피토프는 연속적 또는 비연속적일 수 있으며, 예를 들면, 폴리펩타이드 서열에서는 서로 연속적이지 않지만, 분자의 측면에서는 구조적(conformational) 에피토프와 같이, 하나의 항원결합 단백질에 의해 결합되거나 서로 떨어진 위치의 아미노산 잔기일 수 있다. 일 구현예에서, 에피토프는 항체 생산에 사용되는 에피토프와 유사한 3차원 구조를 포함하지만, 상기 에피토프에서 발견되는 잔기를 전혀 포함하지 않거나 또는 일부 잔기만을 포함할 수 있다는 측면에서 모방체일 수 있다. 일반적으로 에피토프는 단백질이지만, 핵산과 같은 다른 종류의 물질일 수 있다. 에피토프 결정인자는 예를 들면, 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴기 또는 설포닐기와 같은 분자에 의해 표면에 형성된 화학적 활성 그룹일 수 있거나 또는 특정한 3차원 구조 특징 및/또는 특정한 전하 특징을 가질 수 있다. 일반적으로 특정 표적 항원에 특이적인 항체는 단백질 및/또는 고분자의 복합체 내에 존재하는 표적 항원 상의 에피토프를 인식한다. 본원에 따른 항체는 C-말단을 인식하는 것으로 나타났다. 일 구현예에서 본원에 따른 항체는 α -Syn 단백질의 C-말단 특히 110-120 잔기; 또는 다른 구현예에서는 111-122 잔기를 인식한다. 특히 110~122 사이를 인식하는 경우 응집체 선호적인

결합을 보이는 것으로 나타났다.

- [101] 본원에서 "컨쥬게이트"는 본원에 개시된 항체 또는 그 항원결합 단편과 다른 분자, 특히 후술하는 혈관뇌장벽 전달체 또는 치료제와의 키메라 분자를 일컫는 것이다. 컨쥬게이트에서 본원에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편은 다른 분자와 예를 들면 공유결합 또는 반데스발스 또는 소수성상호작용에 의한 물리적 힘, 캡슐화, 매립화(embedding) 또는 상기 조합을 포함하는 방법에 의해 물리적으로 결합된다. 일 구현예에 따른 컨쥬게이트에서 본원에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편은 펩타이드 링커를 통해 연결될 수 있다. 또한 컨쥬게이트에서 본원에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편은 치료제와 기존의 화학합성 방법(예를 들면 US2010/0028370)을 이용하여 알콜기 산기, 카르보닐기, 싸올기 또는 아민기를 통해 연결될 수 있다. 본원에서 본원에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편은 다른 펩타이드에 공유결합 또는 펩타이드를 통해 연결되는 경우는 융합 단백질을 형성한다.
- [102] 본원에서 "혈관뇌장벽" 또는 BBB는 뇌 및 척추와 그 주변 순환계 사이에 존재하는 뇌의 모세혈관 내피세포 막내에 타이트 결합(junction)에 의해 형성된 장벽이다. 이러한 장벽은 매우 견고해서 약 60Da 분자량의 저분자 물질이 뇌로 통과하는 것도 제한한다. 뇌의 혈관뇌장벽, 척추의 혈관척수장벽 그리고 망막의 혈관망막장벽은 중추신경계내의 연속적인 모세혈관 장벽으로, 통상 BBB로 칭한다.
- [103] 본원에서 "혈관뇌장벽 전달체"는 이러한 혈관뇌장벽을 통과하여, 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 전달할 수 있는 분자 예를 들면, 펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 단백질, 핵산, 항체, 또는 저분자 화합물을 포함한다.
- [104] 본원에 "치료제"는 목적하는 치료 효과를 위해 대상체에게 투여되는 분자를 일컫는다. 대상체는 비인간 포유류 예를 들면 영장류 또는 인간을 포함한다. 치료제의 예로는 펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 단백질, 핵산, 항체, 또는 저분자 화합물을 포함한다. 다른 측면에서 치료제는 일 구현예에서 본원에 따른 항체와 결합되어, α -Syn 응집체와 관련된 질환의 치료제로서 사용될 수 있다.
- [105] 본원에서 용어 "치료하는"은 예를 들면, 부상, 질환, 또는 질환 증상 또는 상태의 감소, 완화, 경감, 또는 환자가 부상, 질병, 또는 질환의 증상 또는 병적 상태를 보다 잘 견딜 수 있는 상태로 만들어 주는 것, 부상, 질환, 또는 질환의 증상 또는 병적 상태의 악화 속도를 늦추는 것, 또는 정신적 또는 신체적으로 환자의 삶의 질의 향상을 포함하는 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터를 포함하는, 부상, 질환, 또는 질환의 증상 또는 병적 상태의 경감 또는 치료를 의미한다. 이러한 부상, 질환, 또는 질환의 증상 또는 병적 상태의 치료 또는 개선은 신체검사, 질환과 연관된 각종 지표 검사 및 영상학적 검사 결과를 근거로 판단될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 따른 방법에서 α -Syn와 연관된 질환의 치료, 질환 발생 빈도의 감소, 질환 심각성을 감소시키고/시키거나

α -Syn와 연관된 질환의 증상을 경감시키는 것을 포함한다.

- [106] 본원에서 " α -Syn 응집체와 관련된 질환"은 루이소체질환 또는 α -synucleinopathy 라고 불리는 일군의 신경퇴행성 질환으로, 뉴론 및 글리아 집단을 포함하는 병소에서 α -Syn 응집체가 발견되며, 도파민성 시스템의 퇴화, 운동능력변화, 인지장애 및 루이소체 및/또는 루이 뉴라이트의 형성과 같은 특징을 가진다 (Kim et al. Alzheimer's Research & Therapy 2014, 6:73; McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). 이러한 질환에는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA) 및 기타 다수의 신경축삭 질환을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서, 본원에 따른 항체는 PD의 치료에 효과적으로 사용된다.
- [107] 본원에서 "유효량"은 일반적으로, 질환, 특히 α -Syn와 연관된 질환으로 인한 증상의 심각성 및/또는 발생 빈도의 감소, 질환, 특히 α -Syn와 연관된 질환으로 인한 증상 및/또는 질환 발생의 근본 원인 제거, 또는 질환, 특히 α -Syn와 연관된 질환으로 인한 증상 및/또는 근본 원인 발생의 예방, 및/또는 질환, 특히 α -Syn와 연관된 질환으로 인한 손상을 개선 또는 교정하기에 충분한 양을 의미한다. 일부 구현예에서, 유효량은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량이다. "치료적 유효량"은 질환, 특히 α -Syn와 연관된 상태 또는 증상을 치료하거나, 또는 질환, 특히 α -Syn와 연관된 상태 또는 증상의 예방, 지체, 또는 그 진행을 역전시킬 만큼 충분한 양이다. "예방적 유효량"은 대상체에게 투여될 때, 의도된 대로, 질환, 특히 α -Syn와 연관된 질환의 발병 또는 재발, 또는 질환, 특히 α -Syn와 연관된 질환 또는 관련된 증상을 예방 또는 지연시키고, 그 발생 가능성을 감소시키는 양이다. 완전한 치료적 또는 예방적 효과는 복용량의 1회 투여에 의해 발생하기 보다는 복용량의 수회 투여에 의해 발생할 수 있다. 따라서 치료적 또는 예방적 유효량은 1회 이상의 투여에 의해 전달될 수 있다.
- [108] 항체 또는 항원 결합 단편
- [109] 본원은 인간 α -Syn 단백질을 포함하는 α -Syn 단백질에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 개시한다. 본원에 따른 항체는 본원에 개시된 바와 같이, 하나 이상의 상보성 결정영역 또는 부위(CDR)를 포함하는 폴리펩타이드이다.
- [110] 일 구현예에서, CDR은 "프레임워크" 영역에 포함되며, 프레임워크는 이러한 CDR(들)이 적절한 항원 결합 특성을 가질 수 있도록 CDR(들)을 배향한다.
- [111] 본원에 따른 항체는 인간 유래의 뇌에서 발견되는 α -Syn, 특히 α -Syn 응집체에 높은 친화도로 특이적으로 결합할 수 있다.
- [112] 일 구현예에서, 본원에 따른 항체는 특히 α -Syn 응집체에 높은 친화도로 선호적으로 결합하며, 이의 농도를 감소시킬 수 있다. 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편에 의한 α -Syn 응집체의 감소 또는 분해는 항원 항체 복합체가

세포내에서 라이소좀에 의한 분해를 촉진하여 병인 물질을 효과적으로 제거 분해하는 것을 포함한다.

- [113] 또 다른 구현예에서 본원에 항체 또는 그 항원 결합 단편은 α -Syn 응집체에 높은 친화도로 선호적으로 결합하여, α -Syn 응집체가 추가로 형성되는 것을 방해고, 그 농도를 낮추며, 세포간 전이를 억제할 수 있으며, 또한 약물로 개발시 유효 투여량을 낮출 수 있다.
- [114] 또 다른 구현예에서 본원에 항체 또는 그 항원 결합 단편은 α -Syn 응집체에 높은 친화도로 선호적으로 결합하여, α -Syn 응집체가 한 세포에서 다른 세포로 전달되는 것을 억제 또는 방지한다.
- [115] 일 구현예에서, 항체는 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 미니바디, 도메인 항체, 항체 모방체(또는 합성 항체), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체 융합체(또는 항체 접합체), 및 이의 단편을 포함하나, 이에 국한되지 않으며 본원에 개시된 다양한 형태의 항체를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 개시된 항체의 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 디아바디 또는 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 스페이서를 통해 연결된 단일 쇄의 단쇄 항체 분자일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본원에 개시된 항체는 표 1a 및 표 1b에 개시된 가변영역을 포함하는 경쇄만의 또는 중쇄만의 폴리펩타이드로 이루어질 수 있다.
- [116] 본원에 개시된 항체는 본원에 개시된 다른 항체와 특정 영역 또는 서열을 공유한다. 일 구현예에서는 항체 또는 항원결합단편의 불변영역을 공유할 수 있다. 다른 구현예에서는 Fc 영역을 공유할 수 있다. 또 다른 구현예에서는 가변영역의 프레임을 공유할 수 있다.
- [117] 본원에 개시된 항체는 인간 α -Syn 응집체에 높은 친화도로 결합하는 것이 확인되었다. 이하 실시예에서 추가로 기재된 바와 같이, 다수의 항체 클론을 테스트한 결과 C-말단의 110-120 또는 111-122 잔기에 에피토프가 존재하는 것으로 나타났다. 본 이론으로 한정하는 것은 아니나, 기존 C 말단의 121-130 잔기를 인식하는 항체와 비교하여, 본원 항체들의 응집체에 대한 선호적 결합 및 높은 친화도는 110-120 부위를 인식하는 것에 기인할 수 있다.
- [118] 일 구현예에서 본원에 따른 항체는 자연에서 발견되는 항체의 전형적인 구조를 가진다. 이러한 항체의 구조적 단위체는, 낙타과 동물이 단일 중쇄로 구성된 항체를 생산하지만, 일반적으로 사량체 폴리펩타이드를 포함하며, 사량체는 상이한 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 한 쌍의 폴리펩타이드 사슬체를 두 개 포함한다. 전형적인 항체에서, 상기 한 쌍의 폴리펩타이드 사슬체는 하나의 전장 경쇄(약 25kDa) 및 하나의 전장 중쇄(약 50 내지 70kDa)를 포함한다. 각 사슬은, 특징적인 접힘 패턴을 나타내며, 약 90 내지 110개 아미노산으로 이루어진, 수 개의 면역글로불린 도메인으로 구성되어 있다. 이러한 도메인은 항체 폴리펩타이드를 구성하고 있는 기본 단위체이다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 전형적으로 항원을 인식하는 부분인 가변 영역 또는 V 영역으로 지칭되는

부분을 포함한다. 카복시-말단 부분은 아미노-말단 보다 진화적으로 보다 보존되었으며 불변 영역 또는 C 영역으로 지칭되는 부분을 포함한다. 인간 경쇄는 일반적으로 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄로서 분류되고, 이들 각각은 하나의 가변 영역 및 하나의 불변 영역을 포함한다. 중쇄는 전형적으로 뮤(μ), 델타(δ), 감마(γ), 알파(α) 또는 엡실론(ϵ) 쇄로서 분류되고, 이들은 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE 이소타입으로 정의된다. IgG는 IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4를 포함하나, 이에 제한되지 않는 다수의 서브타입을 또한 포함한다. IgM 서브타입은 IgM 및 IgM2를 포함한다. IgA 서브타입은 IgA1 및 IgA2를 포함한다. 인간에서, IgA 및 IgD 이소타입은 4개의 중쇄 및 4개의 경쇄를 포함하고; IgG 및 IgE 이소타입은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하고, IgM 이소타입은 5개의 중쇄 및 5개의 경쇄를 포함한다. 중쇄 불변 영역은 전형적으로 효과기 기능을 나타내는 하나 이상의 도메인을 포함한다. 중쇄 불변 영역 도메인의 수는 이소타입에 따라 달라진다. IgG 중쇄는, 예를 들면, 각각 C_H1, C_H2 및 C_H3으로 공지된 3개의 C 영역 도메인을 포함한다. 본원에 개시된 항체는 이러한 이소타입 및 서브타입 중의 임의의 하나일 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 따른 α -Syn 항체는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 또는 IgG4 서브타입을 가질 수 있다.

- [119] 본원에 따른 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 인간 불변 영역의 적어도 일부에 연결될 수 있다. 불변영역의 선택은 부분적으로 항체 의존적 세포 매개 세포독성, 항체 의존적 세포 식균작용 및/또는 보체 의존적 세포독성이 요구되는지에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 인간 동종형 IgG1 및 IgG3은 보체 의존적 세포독성을 갖고, 인간 동종형 IgG2 및 IgG4는 이러한 세포독성을 갖지 않는다. 또한, 인간 IgG1 및 IgG3은 인간 IgG2 및 IgG4보다 더 강한 세포 매개 이펙터 기능을 유도한다. 경쇄 불변 영역은 람다 또는 카파일 수 있다.
- [120] 다른 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이고, 중쇄 불변영역은 IgG1-, IgG2- IgG3- 또는 IgG4-형 일 수 있다. 추가의 구현예에서, 본원의 항체는 IgG1- 또는 IgG2-형이다.
- [121] 전장의 경쇄 및 중쇄에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산 길이인 "J" 영역에 의해 결합되고, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 예를 들면, Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press를 참조할 수 있다. 전형적으로 항체의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역이 항원 결합 부위를 형성한다.
- [122] 면역글로불린 사슬의 가변 영역은 일반적으로 전체적 구조가 동일하며, "상보적 결정부위 또는 영역 또는 도메인" 또는 CDR로 지칭되는 3개의 초가변 영역에 의해 이어지는 비교적 보존된 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 중쇄/경쇄 쌍을 구성하는 각 사슬 유래의 가변영역의 CDR은 전형적으로 프레임워크 영역에 의해 정렬되어 표적 단백질(α -Syn)의 특정 에피토프와 특이적으로 결합하는 구조를 형성한다. 자연 발생 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 이러한 요소는 N-말단으로부터 C-말단까지 전형적으로 다음 순서로 포함된다:

FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 가변영역에서 이들 각각에 해당하는 아미노산 서열의 위치는 Kabat 넘버링 시스템 (Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD), 또는 Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196:901-917; Chothia et al. 1989, Nature 1989, 342:878-883에 기재된 것을 따른다.

[123] 본원의 일 구현예에 따른 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR 서열은 표 1a 및 표 1b에 개시된다. 각 가변영역에서 CDR 서열은 밑줄로 나타냈으며, 앞부터 뒤의 순서로 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 나타낸다.

[124] [표 1a]

[125]

clone	VH CDR SEQ ID NOs			Heavy chain variable region VH amino acid sequence and SEQ ID NOs.	
	H1	H2	H3	NO	amino acid sequence
1E4	1	15	29	85	EVQLQESGAELVRFPGTSVYVSKASGYAFTNYLIEWVKQPGGGLWIGVIN PGSGGTNYNEKFKGRATLTADKSSSTAYMQLSLTSDDSAVPCASGNYDTY WGQGTLLTVSA
9B11	2	16	30	86	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNVRQAPGKGLWVARI SKSNNTYATYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLGQNNLKTEDTAMYYCVRQDFD YWGQGTLLTVSS
3A9	3	17	31	87	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTFEKRLEWVATIS NGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLASEDTAMYYCARHITTVR FTKYPDYWGQGTLLTVSS
10F10	4	18	32	88	EVQLQESGFGLVQPSQSLSLTCSVTGYSITGGFYWNWIRQFFGNLWNGYI NYDQSSDYSFSLKNIISITRDTSKNQFPLNLSVTEDTATYYCVRGDYDWG QGTLLTVSS
11F11	5	19	33	89	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQFPGRLEWIAASR NKANDYTYEYASVKGRIIVSRDTSGSILYLGQNNALRAEDTAMYYCARDAGH KPPAYWGQGTLLTVSA
AC8	6	20	34	90	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMSWVRQAFGKGLWVSGIS SGGSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAKIFHNFD YWGQGTLLTVSS
AE8	7	21	35	91	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLWVSAIS SGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARRPLYFD YWGQGTLLTVSS
AA9	8	22	36	92	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAFGKGLWVSAIY PGSSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHAATFD YWGQGTLLTVSS
DG5	9	23	37	93	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLWVSVIS PGSGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARVTIACF TKRCSYSDGMDVWGQGTLLTVSS
AD2	10	24	38	94	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLWVSAIS HSGSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARSONNFD YWGQGTLLTVSS
AD7	11	25	39	95	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLWVSAIS PNGGNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARRPVYFD YWGQGTLLTVSS
DG11	12	26	40	96	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLWVSVIS PGSGSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAKVTISCA RMRCYADGMDVWGQGTLLTVSS
DG8	13	27	41	97	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHMSWVRQAPGKGLWVSVIS HGNKSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARVASRCR RGRCSYSDGMDVWGQGTLLTVSS
DA9	14	28	42	98	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLWVSVIS PSDSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARVTLSCR ASRCYSYSDGMDVWGQGTLLTVSS

[126] [표 1b]

[127]

clone	VL CDR SEQ ID NOs			Light chain variable region VL amino acid sequence and SEQ ID NOs.	
	L1	L2	L3	NO	amino acid sequence
1E4	43	57	71	99	DIYMTQSELSLPVSLGDAQASISCRSSQSILVHSGNNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRPSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSSTHVPRTFGGGTKLEIK
9B11	44	58	72	100	DIYMTQSELSLPVSLGDAQASISCRSSQSILVHSGNNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRPSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSSTHVPRTFGGGTKLEIK
3A9	45	59	73	101	DIYMTQSPKPMSTSVGDRVSIITCKASQNVGTTVAWYQORPGQSPKLLIYSASNNRYTGVPPDRFTGSGSGTDFTLTISNMGSEDLADYFCQOYSNYPLTFFGAGTKLEIK
10F10	46	60	74	102	DIYMTQSELTSLVITIGQFASISCKSSQSLLDSGDETILNWLQKPGQSPKLLIYLVSRLDSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQGGTHFPQTFGGGTKLEIK
11F11	47	61	75	103	DIYMTQSPSSSLAVSVEGKVTMSCKSSQSLLYSNQNKYLAWYQORPGQSPKLLIYMASTRESGVPPDRFTGSGSGTDFTLTISVRAEDLAVYFCQOYSYVPWTFGGGTKLEIK
AC8	48	62	76	104	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDSQRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCASWDASLSAYVFGGGTKLTVLG
AE8	49	63	77	105	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYANNRRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSMDASLNGYVFGGGTKLTVLG
AA9	50	64	78	106	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYGDNRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAMDASLSGYVFGGGTKLTVLG
DG5	51	65	79	107	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYSNRRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAMDASLSGYVFGGGTKLTVLG
AD2	52	66	80	108	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNRRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSMDASLSGYVFGGGTKLTVLG
AD7	53	67	81	109	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYNNRRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAMDSSLNGYVFGGGTKLTVLG
DG11	54	68	82	110	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYANSRRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAMDASLSAYVFGGGTKLTVLG
DG8	55	69	83	111	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYANNRRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAMDSSLAYVFGGGTKLTVLG
DA9	56	70	84	112	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSPSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYANSHRRPSGVPPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSMDASLNGYVFGGGTKLTVLG

[128] 다른 구현예에서 상기 표 1a 및 표 1b에 개시된 중쇄 및 경쇄의 가변영역은 다양한 형태의 항체의 제조를 위해 자유롭게 조합될 수 있다. 또한 상기 표 1a 및 표 1b에 개시된 경쇄의 각 가변영역의 CDR과 중쇄의 각 가변영역의 CDR은 자유롭게 조합될 수 있다.

[129] 본원에 개시된 각각의 가변 영역은 온전한 항체의 각각 중쇄 및 경쇄를 형성하기 위해 목적하는 다양한 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 결합될 수 있다. 또한, 이렇게 불변영역에 결합된 각각의 중쇄 및 경쇄 서열은 또한 온전한 항체 구조를 형성하기 위해 조합될 수 있다.

[130] 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 불변 영역의 적어도 일부에 연결될 수 있다. 불변 영역은 항체 의존성 세포 매개 세포 독성, 항체 의존성 세포성 포식작용 및/또는 보체 의존성 세포 독성 등이 필요한지에 따라 선택될 수 있다. 예를 들어, 인간 아이소타입 IgG1 및 IgG3은 보체 의존성 세포 독성을 가지며 인간 아이소타입 IgG2 및 IgG4는 세포 독성을 가지지 않는다. 인간 IgG1 및 IgG3은 또한 인간 IgG2 및 IgG4보다 강한 세포 매개 효과기 기능을 유도한다. 예를 들면 중쇄 가변영역은 IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4를 포함하는 IgG

불변영역에, 경쇄 가변영역은 카파 또는 람다 불변영역과 결합될 수 있다. 상기 불변영역은 목적하는 바에 따라 적절한 것이 사용될 수 있으며, 예를 들면 인간 또는 마우스 유래의 것이 사용될 수 있다.

- [131] 일 구현예에서 본원에 개시된 중쇄 가변영역은 마우스 IgG2a 불변영역, 또는 인간 IgG1 불변영역에 연결될 수 있으며, 이는 각각 서열번호 113 내지 126 (마우스 IgG2a 불변영역 포함) 또는 서열번호 127 내지 140 (인간 IgG1 불변영역 포함)으로 나타낼 수 있다.
- [132] 다른 구현예에서, 본원에 개시된 경쇄 가변영역은 마우스 카파 또는 인간 카파 불변영역에 연결될 수 있으며, 이는 각각 서열번호 141 내지 154 (마우스 카파 불변영역) 및 서열번호 155 내지 168 (인간 카파 불변영역)로 나타낼 수 있다.
- [133] 또한 본원에 개시된 가변 영역과 조합될 수 있는 이러한 불변 영역 서열은 예시적인 것이고, 당업자라면, 안정성, 발현, 제조 가능성 또는 다른 목적하는 특징 등을 위해 변형된 불변 영역을 포함하는 다른 불변 영역이 사용될 수 있음을 알 수 있을 것이다.
- [134] 본원은 또한 본원에 개시된 하나 이상의 아미노산 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함한다. 실질적 동일성이란 본원은 서열변이가 존재하는 본원에 개시된 효과를 유지하는 것을 의미한다. 일 구현예에서 표 1에 개시된 중쇄 가변영역과 약 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 가진다. 다른 구현예에서 표 1에 개시된 경쇄 가변영역과 약 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 가진다. 예를 들면 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합단편의 서열과 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 나타내는 변이체의 경우, 임의의 변이는 CDR 보다는 가변영역의 골격에서 발생된다.
- [135] 본원은 또한 본원에 개시된 항체 또는 그 항원결합 단편의 전부 또는 일부를코딩하는 핵산이 개시된다. 상기 핵산은 항체 각 사슬, 또는 상기 항체의 단편, 그 돌연변이, 유도체, 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 또는 단지 CDR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 혼성화 프로브로서 사용하기에 충분한 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭, 규명, 분석 또는 돌연변이 유발에 사용되는 PCR 또는 염기서열분석 프라이머를 포함한다. 핵산은 임의의 길이일 수 있다. 이들은, 예를 들면, 길이가 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1,000, 1,500개 이상의 폴리뉴클레오타이드일 수 있고/있거나, 하나 이상의 추가의 서열, 예를 들면, 조절 서열을 포함할 수 있고/있거나, 보다 큰 핵산, 예를 들면, 벡터의 일부일 수 있다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, RNA 및/또는 DNA 폴리뉴클레오타이드, 및 이의 인공 변이체(예, 펩타이드 핵산)를 포함할 수 있다.
- [136] 일 구현예에서 본원에 개시된 항체를 코딩하는 핵산은 본원에 개시된 CDR, 상기 CDR을 포함하는 가변영역, 가변영역 및 불변영역을 포함하는 전장 항체를 코딩하는 핵산이다. 아미노산 서열이 결정되면, 핵산서열은 공지의 역전사

프로그램 및 코돈사용빈도(codon usage) 등을 고려하여 용이하게 결정될 수 있다. 예시적인 핵산 서열은 서열번호 169 내지 182 (마우스 IgG2a 불변영역을 포함하는 중쇄), 서열번호 183 내지 196 (인간 IgG1 불변영역을 포함하는 중쇄), 서열번호 197 내지 210 (마우스 카파 불변 영역을 포함하는 경쇄) 및 서열번호 211 내지 224 (인간 카파 불변 영역을 포함하는 경쇄)를 들 수 있다.

- [137] 본원은 또한 본원에 개시된 하나 이상의 핵산 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 실질적 동일성이란 핵산의 변이가 아미노산 치환을 수반하지 않는 보존적 치환 또는 아미노산의 변이를 초래하는 경우라도 상기 핵산에 의해 코딩되는 항체 또는 항원결합 단편이 본원에 개시된 효과를 유지하는 것을 의미한다.

[138] 항체의 응집체에 대한 특이성 및 친화도

- [139] 본원에 따른 항체 또는 항원 결합단편은 특히 α -Syn 응집체에 대한 특이성 및 높은 친화도를 가진다. 일 구현예에서, 도 6에 따르면, 응집체에 대한 친화도는 $K_D \leq 1.0 \times 10^{-9} M$; 또 다른 구현예에서, $K_D \leq 1.0 \times 10^{-10} M$; 또 다른 구현예에서, $K_D \leq 1 \times 10^{-11} M$ 이다. 이러한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 이 보다 낮은 친화도 예를 들면 친화도가 $10^{-7} M$ 또는 $10^{-8} M$ 보다 큰 항체와 비교하여 더 낮은 투여량으로 투여될 수 있는 장점이 있다. 이는 항체를, 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 보다 간편한 피하주사와 같은 방식으로 투여해도 충분한 효능을 얻을 수 있기 때문에, 임상에서 큰 장점이 있다. 나아가 α -Syn 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 α -Syn 응집체 형성 및/또는 축적 및/또는 세포가 전달을 억제 및/또는 감소시킬 수 있어 뇌에서 응집체의 농도를 낮출 수 있다. 또한 α -Syn 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 중추신경계 바깥에서의 α -Syn 응집체 형성을 감소시킬 수 있어, 결국 뇌혈관장벽을 경계로 한 α -Syn 형태들 간의 평형상태를 변경시켜, 중추신경계 내의 응집체의 농도를 낮추는 효과를 가져올 수 있다. 또한 본 이론으로 한정하는 것은 아니나, 본원에 따른 항체 또는 항원 결합단편은 단량체의 제거를 통한 응집체 형성 억제, 또는 단량체와 응집체를 모두 제거할 수 있다.

[140] 항체의 가변 영역

- [141] 본원은 또한 상기 표 1a 및 표 1b에 나타낸 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역 또는 항체 중쇄 가변 영역 및 이러한 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 면역학적 기능적 단편, 유도체, 돌연변이 단백질 및 변이체를 포함하는 항체(및 상응하는 핵산 서열)가 개시된다.
- [142] 또한, 표 1a 및 표 1b에 나타낸 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열이 포함된다. 이러한 핵산 서열은 본원에 개시된 서열번호 169 내지 182 (마우스 IgG2a 불변영역을 포함하는 중쇄), 서열번호 183 내지 196 (인간 IgG1 불변영역을 포함하는 중쇄), 서열번호 197 내지 210 (마우스 카파 불변 영역을 포함하는 경쇄) 및 서열번호 211 내지 224 (인간 카파 불변 영역을 포함하는 경쇄)에

개시된 전장 항체를 코딩하는 핵산 서열에 포함되기 때문에, 별도로 기재되지 않으며, 당업자라면, 표 1에 개시된 가변 영역의 단백질 서열을 기초로, 이를 코딩하는 핵산 서열을 용이하게 확인할 수 있을 것이다.

- [143] 본원에 따른 중쇄 및 경쇄의 가변영역은 다양하게 조합될 수 있다. 이렇게 다양하게 조합된 항체는 "VHx/VLy"로 나타낼 수 있으며, 여기서 "x"는 중쇄 가변 영역 서열번호에 상응하고, "y"는 경쇄 가변 영역의 서열번호에 상응한다. 일 구현예에서 본원에 따른 가변영역은 다음과 같은 조합을 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다: VH85/VL99, VH85/VL100, VH85/VL101, VH85/VL102, VH85/VL103, VH85/VL104, VH85/VL105, VH85/VL106, VH85/VL107, VH85/VL108, VH85/VL109, VH85/VL110, VH85/VL111, VH85/VL112; VH86/VL99, VH86/VL100, VH86/VL101, VH86/VL102, VH86/VL103, VH86/VL104, VH86/VL105, VH86/VL106, VH86/VL107, VH86/VL108, VH86/VL109, VH86/VL110, VH86/VL111, VH86/VL112; VH87/VL99, VH87/VL100, VH87/VL101, VH87/VL102, VH87/VL103, VH87/VL104, VH87/VL105, VH87/VL106, VH87/VL107, VH87/VL108, VH87/VL109, VH87/VL110, VH87/VL111, VH87/VL112; VH88/VL99, VH88/VL100, VH88/VL101, VH88/VL102, VH88/VL103, VH88/VL104, VH88/VL105, VH88/VL106, VH88/VL107, VH88/VL108, VH88/VL109, VH88/VL110, VH88/VL111, VH88/VL112; VH89/VL99, VH89/VL100, VH89/VL101, VH89/VL102, VH89/VL103, VH89/VL104, VH89/VL105, VH89/VL106, VH89/VL107, VH89/VL108, VH89/VL109, VH89/VL110, VH89/VL111, VH89/VL112; VH90/VL99, VH90/VL100, VH90/VL101, VH90/VL102, VH90/VL103, VH90/VL104, VH90/VL105, VH90/VL106, VH90/VL107, VH90/VL108, VH90/VL109, VH90/VL110, VH90/VL111, VH90/VL112; VH91/VL99, VH91/VL100, VH91/VL101, VH91/VL102, VH91/VL103, VH91/VL104, VH91/VL105, VH91/VL106, VH91/VL107, VH91/VL108, VH91/VL109, VH91/VL110, VH91/VL111, VH91/VL112; VH92/VL99, VH92/VL100, VH92/VL101, VH92/VL102, VH92/VL103, VH92/VL104, VH92/VL105, VH92/VL106, VH92/VL107, VH92/VL108, VH92/VL109, VH92/VL110, VH92/VL111, VH92/VL112; VH93/VL99, VH93/VL100, VH93/VL101, VH93/VL102, VH93/VL103, VH93/VL104, VH93/VL105, VH93/VL106, VH93/VL107, VH93/VL108, VH93/VL109, VH93/VL110, VH93/VL111, VH93/VL112; VH94/VL99, VH94/VL100, VH94/VL101, VH94/VL102, VH94/VL103, VH94/VL104, VH94/VL105, VH94/VL106, VH94/VL107, VH94/VL108, VH94/VL109, VH94/VL110, VH94/VL111, VH94/VL112; VH95/VL99, VH95/VL100, VH95/VL101, VH95/VL102, VH95/VL103, VH95/VL104, VH95/VL105, VH95/VL106, VH95/VL107, VH95/VL108, VH95/VL109, VH95/VL110, VH95/VL111, VH95/VL112;

VH96/VL99, VH96/VL100, VH96/VL101, VH96/VL102, VH96/VL103, VH96/VL104, VH96/VL105, VH96/VL106, VH96/VL107, VH96/VL108, VH96/VL109, VH96/VL110, VH96/VL111, VH96/VL112; VH97/VL99, VH97/VL100, VH97/VL101, VH97/VL102, VH97/VL103, VH97/VL104, VH97/VL105, VH97/VL106, VH97/VL107, VH97/VL108, VH97/VL109, VH97/VL110, VH97/VL111, VH97/VL112; VH98/VL99, VH98/VL100, VH98/VL101, VH98/VL102, VH98/VL103, VH98/VL104, VH98/VL105, VH98/VL106, VH98/VL107, VH98/VL108, VH98/VL109, VH98/VL110, VH98/VL111, 또는 VH98/VL112.

[144] 앞서 언급한 바와 같은 상기 다양한 가변영역의 조합은 온전한 항체 또는 scFV 등을 포함하는 다양한 형태의 항체로 사용될 수 있다.

[145] **CDR**

[146] 본원에 개시된 항체는 하나 이상의 CDR이 그래프트, 삽입 및/또는 연결된 폴리펩타이드이다. 일 구현예에서 항체는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR을 가질 수 있다. 항체는 따라서, 예를 들면, 하나의 중쇄 CDR1("CDRH1"), 및/또는 하나의 중쇄 CDR2("CDRH2"), 및/또는 하나의 중쇄 CDR3("CDRH3"), 및/또는 하나의 경쇄 CDR1("CDRL1"), 및/또는 하나의 경쇄 CDR2("CDRL2"), 및/또는 하나의 경쇄 CDR3("CDRL3")을 가질 수 있다.

[147] 일반적으로 항체의 상보적 결정부위(CDR) 및 프레임 영역(FR)은 문헌(참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991)에 기재된 시스템을 사용하여 식별할 수 있다.

[148] 본원에 따른 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR은 표 1a 및 1b (또는 중쇄 CDR H1은 서열번호 1 내지 14, H2는 서열번호 15 내지 28, H3는 서열번호 29 내지 42로 표시되고, 경쇄 CDR L1은 서열번호 43 내지 56, L2는 서열번호 57 내지 70, L3는 서열번호 71 내지 84)에 개시되어 있다.

[149] 본원은 또한 표 1a 및 1b에 개시된 하나 이상의 아미노산 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함한다. 실질적 동일성이란 본원은 서열변이가 존재하는 본원에 개시된 효과를 유지하는 것을 의미한다.

[150] 자연 발생 항체의 CDR의 구조 및 특성은 앞에 언급한 바와 같다. 간단하게, 전형적인 항체에서 CDR은 항원 결합 및 인식에 관여하는 영역을 구성하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 중의 프레임워크 내에 포함된다. 가변 영역은 프레임워크 영역내에 적어도 3개의 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함한다 (Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; 또한 Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196:901-917; Chothia et al. 1989, Nature 1989, 342:877-883). 그러나, 본원에 개시된 CDR은 전형적인 항체 구조의 항원 결합 도메인을 정의하기 위해 사용되며, 또한 본원에 기재된 바와 같이, 다른 다양한 폴리펩타이드 구조에 포함되어 사용될 수 있다.

- [151] 당업자라면 항체가 본원에 개시된 하나 이상의 CDR을 포함하는 경우, 개시된 각 CDR은 서로 독립적으로 선택되어 조합될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 독립적으로 선택된 CDR을 갖는 항체가 생성될 수 있다. 또한 조합을 위해 CDR이 선택될 때, 같은 종류의 CDR이 반복적으로 사용되지 않으며, 예를 들면 항체는 일반적으로 두 개의 CDRH2 영역을 포함하여 제조되지 않는다는 것을 당업자라면 알 것이다.
- [152] 모노클로날 항체
- [153] 본원에 개시된 항체는 α -Syn 특히 이의 응집체에 결합하는 모노클로날 항체를 포함한다. 모노클로날 항체는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 면역화된 형질전환 동물로부터 수확된 비장 세포를 불멸화시킴으로써 생산될 수 있다. 비장 세포는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여, 예를 들면, 이들을 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생산함으로써 불멸화시킬 수 있다. 하이브리도마-생산 융합 절차에 사용하기 위한 골수종 세포는 바람직하게는 비-항체-생산성이고, 높은 융합 효율을 갖고, 그리고 특정 효소가 결여되어 이들이 목적하는 융합 세포(하이브리도마)만의 성장을 지원하는 특성의 선택 배지 중에서 성장을 할 수 없게 한다. 마우스 융합에 사용하기 위한 적절한 세포주의 예로는 Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XXO Bul이 포함되고; 랫트 융합에 사용되는 세포주의 예로는 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210이 포함된다. 세포 융합에 유용한 다른 세포주는 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6을 들 수 있다.
- [154] 일부 경우에, 하이브리도마 세포주는 동물(예를 들면, 인간 면역글로불린 서열을 갖는 형질전환 동물, α -Syn 면역원으로 면역화된 동물로부터 비장 세포를 수확하고; 수확된 비장 세포를 골수종 세포주에 융합하여 하이브리도마 세포를 생성하고; 하이브리도마 세포로부터 하이브리도마 세포주를 확립하고, α -Syn에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 식별함으로써 생산된다.
- [155] 하이브리도마 세포주에 의해 분비된 모노클로날 항체는 당해 기술 분야에 공지된 기술을 사용하여 정제할 수 있다.
- [156] 키메라 및 인간화 항체
- [157] 항체는 또한 다양한 목적을 위해 다양한 방식으로 변형될 수 있다. 키메라 및 인간화 항체가 또한 제공된다. 키메라 항체는 상이한 항체로부터 유래된 폴리펩타이드 단편들이 공유결합으로 연결되어 면역학적으로 기능적인 경쇄, 중쇄 또는 그 단편을 형성하는 항체이다. 일반적으로 키메라 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 일부분은 특정 종 또는 특정 클래스 또는 서브타입에 속하는 서열이고, 나머지 서열은 다른 종 또는 다른 클래스 또는 서브타입에 속한다. 키메라 항체 제조 방법에 대하여, 예를 들면, 미국 특허 제4,816,567호; 및

Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 81:6851-6855을 참조할 수 있다. CDR 이식(grafting)은, 예를 들면, 미국 특허 제6,180,370호, 제5,693,762호, 제5,693,761호, 제5,585,089호 및 제5,530,101호를 참조할 수 있다.

- [158] 일반적으로, 키메라 항체를 제조하는 목적은 항체가 사용되는 생물체에서 발견되는 아미노산의 수를 최대로 포함하는 것이다. 일례는 "CDR-이식(CDR-grafted)" 항체인데, 여기서 상기 항체는 특정 한 종, 또는 특정 클래스 또는 서브타입 유래의 하나 이상의 CDR을 포함하며, 나머지 부분은 다른 종, 또는 다른 클래스 또는 서브타입 항체 유래이다. 인간에 사용하기 위하여, 설치류 항체의 가변 영역 또는 선택된 CDR이 인간 항체 내로 이식되어 인간 항체의 자연적으로 나타나는 가변 영역 또는 CDR을 대체하게 된다.
- [159] 키메라 항체의 한 가지 유용한 유형은 "인간화" 항체이다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 동물에서 최초 생성된 모노클로날 항체로부터 생산된다. 이러한 모노클로날 항체에서, 전형적으로 항체의 비-항원 인식 부분을 구성하는 특정 아미노산 잔기가 인간 항체의 상응하는 아이소타입의 상응하는 잔기와 상동성이 되도록 변형된다. 인간화는, 예를 들면, 공지된 다양한 방법을 이용하여, 설치류 가변 영역의 적어도 일부를 인간 항체의 상응하는 영역으로 치환함으로써 수행될 수 있다(미국 특허 제5,585,089호 및 제5,693,762호; Jones et al., Nature 1986, 321:522-525; Riechmann et al., Nature 1988, 332:323-27; Verhoeven et al., Science 1988, 239:1534-1536).
- [160] 한 측면에서, 본원에 개시된 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 CDR은 계통발생적으로 동일하거나 상이한 종에서 유래된 항체의 프레임워크 영역(FR)에 이식된다. 예를 들면, 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 CDR은 보존된 인간 FR에 이식될 수 있다. 보존된 인간 FR을 생성하기 위하여, 여러 종류의 인간 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열을 정렬하고 이로부터 FR이 컨센서스 아미노산 서열을 도출할 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 개시된 중쇄 또는 경쇄의 FR은 상이한 중쇄 또는 경쇄의 FR로 대체된다. 한 양태에서, 항- α -Syn 항체의 중쇄 및 경쇄의 FR 내에만 발견되는 특이한 아미노산은 대체되지 않는 반면, 나머지 FR 아미노산은 대체될 수 있다. 특별한 아미노산은 통상적으로 FR 내에서 관찰되지 않는 위치에 존재하는 특정 아미노산이다. 대안적으로, 하나의 중쇄 또는 경쇄로부터 이식된 가변 영역은 본원에 개시된 바와 같은 특별한 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역과는 상이한 불변 영역과 함께 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 이식된 가변 영역은 단일쇄 Fv 항체의 일부이다. 본원에 개시된 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 CDR은 모든 항체에 이식되어 사용될 수 있다.
- [161] 또한 일 구현예에서, 인간 이외의 종으로부터 유래한 불변 영역은 인간 유래의 가변 영역과 조합된 하이브리드 항체가 사용될 수 있다.
- [162] 완전 인간 항체
- [163] 완전 인간 항체가 또한 개시된다. 인간을 항원에 노출시키지 않으면서도

소정의 항원("완전 인간 항체")에 특이적인 완전 인간 항체를 제조할 수 있다. 완전 인간 항체를 생성하는 한 가지 방법은 마우스 체액성 면역계를 "인간화"하는 것이다. 내인성 Ig 유전자가 비활성화된 마우스에 인간 면역글로불린(Ig) 유전자좌의 도입하여, 마우스에서 완전 인간 모노클로날 항체(mAb)를 생성할 수 있다. 완전 인간 항체를 사용하면, 마우스 또는 마우스-유래된 mAb를 인간에 투여함으로써 유발될 수 있는 면역원성 반응 및 알레르기 반응을 최소화할 수 있다.

- [164] 완전 인간 항체는 내인성 면역글로불린 생성이 결핍되어 인간 항체를 생성할 수 있는 형질전환 동물(통상적으로, 마우스)을 면역화시킴으로써 생성될 수 있다. 이러한 목적을 위한 항원은 전형적으로, 6개 또는 그 이상의 연속적 아미노산을 갖고, 임의로 담체, 예를 들면, 합텐에 접합된다. 예를 들어, 다음을 참조할 수 있다: Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:2551-2555; Jakobovits et al., *Nature* 1993, 362:255-258; 그리고 Bruggermann et al., *Year in Immunol.* 1993, 7:33. 일례로 이러한 방법에서 형질전환 동물은 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬을 코딩하는 내인성 마우스 면역글로불린 유전자 좌위가 무력화되고, 인간 중쇄 및 경쇄 단백질을 코딩하는 인간 게놈 DNA를 포함하는 유전자좌(loci) 단편이 마우스 게놈 내로 삽입되어 생성된다. 인간 면역글로불린 유전자좌를 부분적으로 포함하는 부분적으로 변형된 마우스를 교차 교배하여 온전한 인간 면역글로불린 유전자좌가 도입된 마우스를 생성한다. 상기 동물에 면역원이 투여되면, 상기 면역원에 면역 특이적이지만 가변 영역을 포함한 항체가 류린이 아닌 인간 아미노산 서열을 가진다. 이러한 방법은 예를 들면, WO96/33735 및 WO94/02602를 참조한다. 인간 항체를 제조하기 위한 형질전환 마우스에 관련된 방법은 미국 특허 제5,545,807호; 제6,713,610호; 제6,673,986호; 제6,162,963호; 제5,545,807호; 제6,300,129호; 제6,255,458호; 제5,877,397호; 제5,874,299호 및 제5,545,806호; WO91/10741호, 제WO90/04036호, 및 EP 제546073B1호를 참조할 수 있다.

- [165] 이어 하이브리도마 기술을 사용하여, 목적하는 특이성을 갖는 항원-특이적 인간 mAb가 유전자도입 마우스, 예를 들면, 앞서 기술된 것들로부터 생성되고 선택될 수 있다. 이러한 항체는 적절한 벡터 및 숙주 세포를 사용하여 클로닝되고 발현되거나, 또는 상기 항체는 배양된 하이브리도마 세포로부터 수확될 수 있다.

- [166] 완전 인간 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리(phage-display library)로부터 유래될 수 있다(Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 1991, 227:381; 그리고 Marks et al., *J. Mol. Biol.* 1991, 222:581). 파지 디스플레이 기술은 필라멘트(filamentous) 박테리오파지의 표면 상에서 항체 레퍼토리를 디스플레이하여, 이로부터 목적하는 항원에 결합하는 파지를 선별하는 일종의 면역 선택(immune selection)을 모방한 방법이다. 이러한 한 가지 기술은 본원의 실시예 또는 PCT 공개공보 제WO 99/10494호를 참조할 수 있다. 일 구현예에서,

본원의 인간화 α -Syn 항체는 파지 디스플레이 방법을 통해 선별된다(Krebber et al., J. Immunol. Methods. 1997, 201:35).

[167] 이중특이적 또는 이중기능성 항체

[168] 본원에 개시된 항체는 또한 상기한 바와 같은 하나 이상의 CDR 또는 하나 이상의 가변 영역을 포함하는 이중특이적 항체 및 이중기능성 항체를 포함한다. 일부 경우에, 이중특이적 또는 이중기능성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이적 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결과 같은 다양한 방법을 이용하여 제조될 수 있다 (Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 1990, 79:315-321; Kostelny et al., J. Immunol. 1992, 148:1547-1553). 본원에 따른 일구현예에서 본원에 따른 항체는 혈관뇌장벽을 통과하여 전달되기 위해 전달체에 대한 결합을 추가로 포함하는 이중특이적 항체의 형태를 취할 수 있다. 혈관뇌장벽을 통하여 약물을 전달하기 위한 한 가지 방법은 세포에 내재된 글루코스 및 아미노산 전달체, 인슐린 또는 트랜스페린의 수용체 매개 트랜스사이토시스와 같은 전달 시스템의 사용을 포함한다. 예를 들면 수용체 매개 트랜스사이토시스의 시스템의 수용체의 예는 다음과 같다: insulin receptor (e.g., human insulin receptor), transferrin receptor, LRP (e.g., LRP1, LRP6 and LRP8), melanocortin receptor, nicotinic acetylcholine receptor, VACM-1 receptor, IGFR, EPCR, EGFR, TNFR, Leptin receptor, M6PR, Lipoprotein receptor, NCAM, LIFR, LfR, MRP1, AchR, DTr, Glutathione transporter, SR-B1, MYOF, TFRC, ECE1, LDLR, PVR, CDC50A, SCARF1, MRC1, HLA-DRA, RAMP2, VLDLR, STAB1, TLR9, CXCL16, NTRK1, CD74, DPP4, endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3, glucocorticoid receptor, ionotropic glutamate receptor, M3 receptor, aryl hydrocarbon receptor, GLUT-1, inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor, N-methyl-D-aspartate receptor, S1P1, P2Y receptor, TMEM30A, 및 RAGE.

[169] 다양한 항체 변이체

[170] 본원에 개시된 항체는 또한 상기 본원에 개시된 항체의 변이체이다. 예를 들면, 항원의 일부는 상기 개시된 중쇄 또는 경쇄, 가변 영역 또는 CDR 서열의 하나 이상의 잔기에서 보존적(conservative) 아미노산 치환을 포함한다. 자연-발생 아미노산은 측쇄 특성에 공통적 특징에 기초하여 다음과 같이 분류될 수 있다. 1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; 2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; 3) 산성: Asp, Glu; 4) 염기성: His, Lys, Arg; 5) 사슬 방향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; 및 6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[171] 보존적 아미노산 치환은 상기 분류 중에서 동일한 분류에 속하는 다른 잔기로의 치환을 일컫는다. 보존적 아미노산 치환은 또한 펩타이드 모방체와 같은 비-자연-발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 이러한 잔기는 전형적으로 세포가 아닌, 화학적 합성에 의해 도입된다.

[172] 비-보존적 치환은 상기 분류 중에서 다른 분류에 속하는 잔기로 치환을

포함한다. 이러한 치환은 인간 항체와 상동성인 항체의 영역 또는 비-상동성 영역 내로 도입될 수 있다.

- [173] 이러한 치환을 도입함에 있어서, 일 구현예에서 아미노산의 소수성 또는 친수성을 나타내는 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질의 지수 프로파일(hydropathic profile)은 각 아미노산에 지수를 지정하고, 이후 폴리펩타이드 따라서 이들 값을 반복적으로 평균함으로써 계산된다. 각 아미노산의 지수는 소수성과 전하 특성을 기초로 다음과 같이 지정된다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 리신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [174] 단백질에 상호작용적인 생물학적 기능을 부여함에 있어서, 지수 프로파일의 중요성은 당업계에 알려진 것이다 (Kyte et al., J. Mol. Biol. 1982, 157:105-131). 특정 아미노산은 이와 유사한 수치 지수 또는 스코어를 갖는 다른 아미노산으로 치환될 수 있으며 유사한 생물학적 활성을 유지할 수 있는 것으로 알려져 있다. 일 구현예에서, 지수에 기초한 변화를 수행하는데 있어서, 지수가 ± 2 내, ± 1 내, 또는 ± 0.5 내에 있는 아미노산의 치환이 포함된다.
- [175] 또한, 유사한 아미노산끼리의 치환, 특히 치환에 의해 생성되는 단백질이 본원에 개시된 것과 같은 면역학적으로 활성이 있는 단백질인 경우에, 친수성을 기초로 해서 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 인접 아미노산의 친수성에 의해 결정되는, 단백질의 최대 로컬 평균 친수성 값이 면역원성 및 항원-결합성과 같은 단백질의 생물학적 특성과 관련성이 있다.
- [176] 아미노산 잔기의 친수성 값은 다음과 같다: 아르기닌(+3.0); 리신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트(+3.0 $\pm$ 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 트레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 $\pm$ 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 류신(-1.8); 이소류신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5) 및 트립토판(-3.4). 유사한 친수성 값을 근거로 치환을 하는 경우, 일 구현예에서, 친수성 값이 ± 2 내, ± 1 내, 또는 ± 0.5 내에 있는 아미노산의 치환이 포함된다. 또한 친수성에 기초하여 1차 아미노산 서열로부터 에피토프를 식별할 수도 있다. 이들 영역은 또한 "에피토프 코어 영역"으로 지칭된다.
- [177] 예시적인 보존성 아미노산 치환은 표 2에 나타낸다.
- [178] [표 2] 보존적 아미노산 치환

[179]

original residue	Exemplary substitution
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[180] 당업자라면 공지된 기술을 사용하여 본원에 개시된 폴리펩타이드의 적절한 변이체를 결정할 수 있을 것이다. 당업자라면 폴리펩타이드에서 활성에 중요한 것으로 생각되지 않는 영역을 변이체의 표적으로 하여, 활성을 파괴하지 않으면서도 단백질을 변화시킬 수 있는 부위를 찾아낼 수 있을 것이다. 당업자라면 또한 유사한 폴리펩타이드 간에서 보존되는 잔기 및 부분을 식별할 수 있을 것이다. 또한 다른 구현예에서, 생물학적 활성 또는 구조에 중요한 것으로 생각되는 부분도 생물학적 활성을 파괴하지 않으면서, 또는 폴리펩타이드 구조에 부정적인 영향을 주지 않으면서 보존적 아미노산 치환이 수행될 수 있다.

[181] 나아가, 당업자는 유사한 폴리펩타이드에서 활성 또는 구조에 중요한 잔기를

식별하기 위해 구조-기능적 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석을 통해, 한 단백질에서, 이와 유사한 단백질의 활성 또는 구조에 중요한 아미노산 잔기에 상응하는 잔기를 찾아, 목적하는 단백질에서 중요한 아미노산 잔기를 예측할 수 있다. 당업자는 이렇게 예측된 중요한 아미노산 잔기를 이와 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환을 할 수 있다.

[182] 당업자는 또한, 유사한 폴리펩타이드의 3차원 구조와 이와 연관된 아미노산 서열 분석을 근거로 항체의 3차원 구조와 관련된 아미노산 잔기를 예측할 수 있다. 당업자는 단백질의 표면에 존재할 것으로 예측되는 아미노산 잔기는 다른 분자와의 중요한 상호작용에 관여할 수 있기 때문에 급격한 변화를 도입하지 않는다. 게다가, 당업자는 각각의 목적하는 아미노산 잔기에서 단일 아미노산 치환을 포함하는 시험 변이체를 생성할 수 있다. 이들 변이체는 이후, 항원에 대한 결합력을 이용하여 스크리닝되어, 어떤 아미노산 치환이 목적에 부합되는 지에 대한 정보를 수득할 수 있다. 이러한 정보를 이용하여, 당업자라면, 당업자는 치환이 될 수 있는 위치, 회피되어야 할 위치를 용이하게 결정할 수 있다.

[183] 또한 단백질의 2차 구조를 근거로 치환되는 위치를 결정할 수 있다. 예를 들면 2차 구조를 예측하는 한 가지 방법은 상동성 모델링(homology modeling)에 기초한다. 예를 들면, 30% 초과 of 서열 동일성, 또는 40% 초과 of 유사성을 갖는 2개의 폴리펩타이드 또는 단백질은 유사한 구조적 위상을 가질 수 있다 (Holm et al., Nucl. Acid. Res. 1999, 27:244-247). 2차 구조를 예측하는 부가적인 방법에는 "트레딩(threading)"(Jones, Curr. Opin. Struct. Biol. 1977, 7:377-387; Sippl et al., Structure 1996, 4:15-19), "프로필 분석"(Bowie et al., Science 1991, 253:164-170; Gribskov et al., Meth. Enzym. 1990, 183:146-159; Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 1987, 84:4355-4358), 및 "진화적 연쇄(evolutionary linkage)"(Holm, 1999, *ibid*; 및 Brenner, 1997, *ibid*)가 포함된다.

[184] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 (1) 단백질 분해에 대한 민감성을 감소, (2) 산화에 대한 민감성을 감소, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친화성을 변경, (4) 항원 결합 친화성을 변경 및/또는, (4) 단백질에 다른 물리화학적 또는 기능적 특성을 부여하도록 변경이 수행된다. 예를 들면, 보존적 치환을 포함하는 단일 또는 복수개의 아미노산 치환은 항체에서, 분자간 접촉에 관여하는 도메인이 아닌, 그 외의 부분에서 치환이 수행될 수 있다. 이러한 구현예에서, 모 서열의 구조적 특징을 실질적으로 변화시키지 않는 보존적 아미노산 치환 예를 들면, 모 항체의 2차 구조를 변경시키지 않는 하나 이상의 아미노산으로 치환이 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에서 알려진 폴리펩타이드 2차 및 3차 구조의 예는 Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company; Introduction to Protein Structure (Branden and Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; 및 Thornton et al., Nature 1991, 354:105)를 참조할 수 있다.

- [185] 추가의 바람직한 항체 변이체에는 모 서열 내에서 하나 이상의 시스테인 잔기가 결실되거나, 또는 시스테인 잔기가 세린과 같은 다른 아미노산으로 치환된 변이체가 포함된다. 시스테인 변이체는 특히 항체가 생물학적 활성을 갖는 구조로 다시 폴딩(folding)되어야 할 때 유용하다. 시스테인 변이체는 모 항체와 비교하여 적은 수의 시스테인 잔기를 가질 수 있고, 짝이 없는 시스테인으로 인한 상호작용을 최소화시키기 위하여 일반적으로 짝수로 포함된다.
- [186] 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄, 가변 영역 도메인 및 CDR은 α -Syn에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제조하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 표 1에 개시된 CDR 중의 하나 이상은 폴리펩타이드와 같은 분자에 비공유 또는 공유 결합되어, 면역성접착분자로 사용될 수 있다. 이러한 면역성접착분자는 CDR이 큰 고분자 내에 통합된 것이거나, CDR이 다른 폴리펩타이드에 연결된 것일 수 있다. 이러한 면역성접착분자는 이에 연결된 폴리펩타이드 또는 기타 물질을 목적하는 항원 예를 들면 α -Syn 또는 에피토프에 특이적 결합을 가능하게 한다.
- [187] 본원에 개시된 가변 영역 및 CDR에 기초한 펩타이드 모방체가 또한 제공된다. 이러한 모방체는 펩타이드, 비-펩타이드, 또는 펩타이드와 비-펩타이드의 조합일 수 있으며, 다음을 참조할 수 있다: Fauchere, Adv. Drug Res. 1986, 15:29; Veber and Freidinger, 1985, TINS p. 392; 및 Evans et al., J. Med. Chem. 1987, 30:1229. 한 유용한 폴리펩타이드와 구조적으로 유사한 펩타이드 모방체는 원래 폴리펩타이드와 유사한 효과를 가진다. 이러한 화합물은 컴퓨터 분자 모델링(computerized molecular modeling)을 이용하여 개발될 수 있다. 일반적으로, 펩타이드 모방체는 목적하는 생물학적 활성, 예를 들면, 본원에서 α -Syn에 특이적으로 결합하는 능력을 나타내는 항체에 구조적으로 유사하지만, 하나 이상의 펩타이드 결합이 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법에 의해, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-\text{CH}-$ (시스 및 트랜스), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 및 $\text{CH}_2\text{SO}-$ 로부터 선택되는 결합으로 대체될 수 있다. 보다 안정적인 단백질의 생산을 위해, 하나 이상의 보존 서열의 잔기를 동일한 유형의 D-아미노산(예를 들면, L-리신 대신에 D-리신)으로 치환할 수 있다. 또한, 펩타이드를 고리화할 수 있는 분자가 가교 형성 시스테인 잔기를 내부에 도입하여 보존적 서열에 구조적으로 제약을 가하는 펩타이드를 생성할 수 있다 (Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 1992, 61:387).
- [188] 본원은 또한 본원에 개시된 항체의 유도체를 제공한다. 유도체화된 항체는 항체 또는 그 단편에 목적하는 특성, 예를 들면, 특정 용도에서 증가된 반감기를 제공하는 임의의 분자 또는 물질을 포함할 수 있다. 유도체화된 항체는, 예를 들면, 검출가능(또는 표지화) 잔기(예: 방사성, 비색성, 항원성 또는 효소 분자, 검출가능한 비드(예: 자기 또는 전자밀도(예: 금) 비드), 또는 다른 분자(예: 비오틴 또는 스트렙타비딘)에 결합하는 분자), 치료적 또는 진단적 잔기(예:

방사성, 세포독성, 또는 약학적 활성 잔기), 또는 특별한 용도(예를 들면, 대상체, 예를 들면, 인간 대상체에 투여, 또는 기타 생체내 또는 시험관내 사용)를 위한 항체의 적합성을 증가시키는 분자를 포함할 수 있다. 항체를 유도체화시키는데 사용될 수 있는 분자의 예에는 알부민(예: 인간 혈청 알부민) 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다. 항체의 알부민-연결된 및 폐길화된 유도체는 당해 기술 분야에 널리 공지된 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 일 구현예에서는 폐길화 단쇄 폴리펩타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 항체는 트랜스타이레틴(transthyretin, TTR) 또는 TTR 변이체에 접합되거나, 또는 연결된다. TTR 또는 TTR 변이체는, 예를 들면, 텍스트란, 폴리(n-비닐 피롤리돈), 폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리비닐 알코올로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물로 화학적으로 변형될 수 있다.

[189] 다른 유도체는, 예를 들면, α -Syn 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 이중 폴리펩타이드를 포함하는 재조합 융합 단백질의 발현에 의해 제조될 수 있는 α -Syn 결합 단백질과 다른 단백질 또는 폴리펩타이드의 공유 또는 응집 접합체를 포함한다. 예를 들면, 접합된 펩타이드는 이중 신호(또는 리더) 폴리펩타이드, 예를 들면, 효모 알파-인자 리더, 또는 펩타이드, 예를 들면, 에피토프 태그일 수 있다. α -Syn 항체-포함 융합 단백질은 α -Syn 결합 단백질(예: 폴리-His)의 정제 또는 식별을 용이하게 하기 위하여 추가된 펩타이드를 포함할 수 있다. α -Syn 결합 단백질은 또한 Hopp et al., Bio/Technology 1988, 6:1204; 및 미국 특허 제5,011,912호에 기재된 바와 같은 FLAG 펩타이드에 연결될 수 있다. FLAG 펩타이드는 항원성이 뛰어나, 특정 모노클로날 항체(mAb)에 의해 가역적으로 결합될 수 있는 에피토프로 작용하여, 재조합 단백질의 신속한 확인 및 용이한 정제를 가능하게 한다.

[190] 일 구현예에서 α -Syn 결합 단백질에 융합된 펩타이드 잔기 사이의 공유 또는 비-공유 상호작용을 통해 결합되는 복수의 α -Syn-결합 폴리펩타이드를 포함하는 올리고머에 관한 것이다. 이러한 결합되는 펩타이드는 펩타이드 링커(스페이서), 또는 올리고머화를 촉진하는 성질을 갖는 류신 지퍼(leucine zipper)와 같은 펩타이드 일 수 있다. 일 구현예에서, 올리고머는 2개 내지 4개의 α -Syn 결합 단백질을 포함한다. 올리고머의 α -Syn 결합 단백질 잔기는 상기한 바와 같은 임의의 형태, 예를 들면, 변이체 또는 단편일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머는 α -Syn 결합 활성을 갖는 α -Syn 결합 단백질을 포함한다.

[191] 일 구현예에서, 올리고머는 면역글로불린으로부터 유래된 폴리펩타이드를 사용하여 제조된다. 항체-유래된 폴리펩타이드의 다양한 부위(Fc 도메인 포함)에 융합된 이중 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질의 제조는, 예를 들면 Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:10535; Byrn et al., Nature 1990, 344:677; 및 Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion

Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11을 참조할 수 있다.

- [192] 다른 구현에는 항체의 Fc 영역에 α -Syn 결합 단백질이 융합된 2개의 융합 단백질을 포함하는 이량체에 관한 것이다. 상기 이량체는, 예를 들면, 융합 단백질을 코딩하는 유전자 융합체를 적절한 발현 벡터 내로 삽입하고, 제조된 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포 내에서 유전자 융합체를 발현시키고, 발현된 융합 단백질이 항체 분자와 유사하게 조합할 수 있도록 함으로써 제조될 수 있고, 여기서 사슬간 디설파이드 결합이 Fc 잔기 사이에 형성되어 이량체가 수득된다.
- [193] 본원에서 사용된 용어 "Fc 폴리펩타이드"는 항체의 Fc 영역으로부터 유래된 폴리펩타이드로 야생형 또는 돌연변이 형태를 포함한다. 이량체화를 촉진하는 힌지 영역을 포함하는 절단된 형태의 폴리펩타이드도 또한 포함된다. Fc 잔기를 포함하는 융합 단백질 및 이로부터 형성된 올리고머는 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼을 이용한 친화성 크로마토그래피로 용이하게 분리할 수 있는 장점이 있다.
- [194] 적절한 Fc 폴리펩타이드의 예로는 미국 특허 제5,426,048호 및 제5,262,522호, 제5,457,035호 및 Baum et al., EMBO J. 1994, 13:3992-4001)에 기재된 것을 들 수 있다. 이러한 돌연변이 단백질의 아미노산 서열은 야생형 아미노산 19번 잔기가 Leu에서 Ala로 치환되고, 아미노산 20번 잔기가 Leu에서 Glu로 치환되고, 아미노산 22가 Gly에서 Ala으로 치환되었다. 돌연변이 단백질은 Fc 수용체에 대한 친화성이 감소된다.
- [195] 다른 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 α -Syn 결합 단백질의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역은 다른 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변영역으로 치환되어 들어갈 수 있다.
- [196] 표지 및 효과기 그룹
- [197] 일부 구현예에서, 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 하나 이상의 표지(label)를 포함할 수 있다. "표지"는 임의의 검출가능한 물질을 의미한다. 적절한 표지 기의 예에는 방사성동위원소 또는 방사성핵종(예: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), 형광성 기(예: FITC, 로다민, 란탄족 형광체), 효소 기(예: 호스래디쉬퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제), 화학발광성 그룹, 바이오티닐 그룹, 또는 2차 리포터에 의해 인식되는 소정의 폴리펩타이드 에피토프(예를 들면, 류신지퍼 쌍 서열, 2차 항체 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 표지화기는 잠재적인 입체 장애(steric hindrance)를 감소시키기 위하여 다양한 길이의 스페이서 암(arm)을 통해 항체에 커플링된다. 단백질을 표지하기 위한 다양한 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있고 당업자라면 특정 목적을 위해 적절한 표지 및 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.
- [198] 본원에서 용어 "효과기 그룹"은 항체에 커플링되는 세포독성제로서 기능하는 물질로 임의의 물질을 의미한다. 적절한 효과기 그룹의 예는 방사성동위원소

또는 방사성 핵종(예: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I)이다. 일부 구현예에서, 효과기 그룹은 잠재적인 입체 장애를 감소시키기 위하여 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링된다.

- [199] 일반적으로, 표지는 검출방법에 따라 분류될 수 있다: a) 방사성 또는 동위원소 표지; b) 자기 표지(예: 자기 입자); c) 산화환원 활성 잔기; d) 광학 염료; 효소 그룹(예로는 호스래디쉬퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제); e) 바이오티닐 기; 및 f) 2차 리포터에 의해 인식되는 소정의 폴리펩타이드 에피토프(예: 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체를 위한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그 등). 일부 구현예에서, 표지화 그룹은 잠재적인 입체 장애를 감소시키기 위하여 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링된다. 단백질을 표지화하기 위한 다양한 방법이 당해 기술 분야에 공지되어 있다.
- [200] 일 구현예에서 표지는 발색단, 인광체 및 형광체를 포함하는 광학성 염료가 포함되나, 이로 제한하는 것은 아니다. 형광체는 저분자 형광물질 또는 단백질성 형광물질일 수 있다.
- [201] "형광 표지"는 물질이 갖는 형광 특성을 통해 검출될 수 있는 임의의 분자를 의미한다. 형광 표지의 예로는 플루오레세인, 로다민, 테트라메틸로다민, 에오신, 에리쓰로신, 쿠마린, 메틸-쿠마린, 피렌, 말라카이트 그린, 스틸벤, 루시페 옐로우, 캐스케이드 블루제이(Cascade BlueJ), 텍사스 레드, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC 레드 640, Cy 5, Cy 5.5, LC 레드 705, 오레곤 그린, 알렉사-플루오르 염료(알렉사 플루오르 350, 알렉사 플루오르 430, 알렉사 플루오르 488, 알렉사 플루오르 546, 알렉사 플루오르 568, 알렉사 플루오르 594, 알렉사 플루오르 633, 알렉사 플루오르 647, 알렉사 플루오르 660, 알렉사 플루오르 680), 캐스케이드 블루, 캐스케이드 옐로우 및 R-피코에리쓰린(PE), FITC, Cy5, Cy5.5, 및 Cy7 등이 포함되지만 이로 제한되는 것은 아니다. 다양한 광학적 염료는 Molecular Probes Handbook, Richard P. Haugland를 참조할 수 있다.
- [202] 단백질성 형광 표지 물질에는 레닐라(Renilla), 프틸로사르쿠스(Ptilosarcus) 또는 에퀴리아(Aequorea) 종의 GFP를 포함하는 녹색 형광 단백질(Chalfie et al., Science 1994, 263:802-805), EGFP(Clontech Labs., Inc., Genbank Accession Number U55762), 청색 형광 단백질(BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., Quebec, Canada; Stauber, Biotechniques 1998, 24:462-471; Heim et al., Curr. Biol. 1996, 6:178-182), 향상된 황색 형광 단백질(EYFP, Clontech Labs., Inc.), 루시페라제(Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β 갈락토시다제(Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607)를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [203] 핵산
- [204] 한 양태에서 본원은 특정 혼성화 조건에서 본원에 개시된 핵산에 교잡되는 핵산에 관한 것이다. 핵산의 혼성화 방법은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들면 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.

(1989), 6.3.1-6.3.6을 참조할 수 있다. 본원에서 엄격한 혼성화 조건은 5x 염화나트륨/구연산나트륨(SSC)을 포함하는 전세척 용액, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA(pH 8.0); 약 50% 포름아미드의 혼성화 완충제, 6x SSC, 및 55°C의 혼성화 온도(또는 다른 유사한 혼성화 용액, 예를 들면, 약 50% 포름아미드를 포함하는 용액, 42°C의 혼성화 온도), 및 0.5x SSC, 0.1% SDS에서 60°C의 세척 조건을 사용한다. 엄격한 혼성화 조건은 45°C에서 6x SSC, 그 이후에 68°C에서 0.1x SSC, 0.2% SDS에서 1회 이상의 세척에 의해 혼성화된다. 나아가 당업자는 서열 간에 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산이 전형적으로 서로 혼성화된 상태를 유지하는데 필요한 적절한 혼성화 조건을 선택할 수 있을 것이다.

[205] 혼성화 조건의 선택에 영향을 주는 기본 파라미터 및 적절한 조건은 예를 들면, Sambrook, Fritsch, and Maniatis, (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 상기; 및 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., 섹션 2.10 및 6.3-6.4를 참조할 수 있다. 이러한 조건은 예를 들면 핵산의 길이 및/또는 염기 조성(A, G, C 및 T (U)의 구성) 등에 기초하여, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[206] 본원에 개시된 핵산은 돌연변이 변이체를 또한 포함한다. 핵산 내로 돌연변이에 의해 상기 핵산이 코딩하는 폴리펩타이드(항체 또는 항체 유도체)의 아미노산 서열에서 변화를 유도할 수 있다. 돌연변이는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 도입될 수 있다. 예를 들면, 부위-지시된 돌연변이유발(site-directed mutagenesis) 방법, 무작위 돌연변이유발(random mutagenesis) 방법이 사용될 수 있다. 이렇게 제조된 핵산 돌연변이체는 목적하는 특징을 갖는 폴리펩타이드에 대하여 선별된다.

[207] 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 현저하게 변화시키지 않으면서, 돌연변이가 핵산 내로 도입될 수 있다. 예를 들면, 비-필수 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 유발하는 뉴클레오티드 치환을 수행할 수 있다. 대안적으로, 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 선택적으로 변화시키는 하나 이상의 돌연변이가 상기 핵산 내로 도입될 수 있다. 예를 들면, 돌연변이는 생물학적 활성을 정량적으로 또는 정성적으로 변화시킬 수 있다. 정량적 변화의 예에는 활성의 증가, 감소 또는 제거가 포함된다. 정성적 변화의 예에는 항체의 항원에 대한 특이성 변화가 포함된다. 일 구현예에서, 본원에서 개시된 임의의 항체를 코딩하는 핵산은 당해 기술 분야에 널리 알려진 분자 생물학 기술을 사용하여 아미노산 서열이 변경되도록 돌연변이화될 수 있다.

[208] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 개시된 핵산 서열의 검출을 위한 프라이머 또는 혼성화 프로브로서 사용하기에 적합한 핵산 분자에 관한 것이다. 이러한 핵산 분자는 예를 들면, 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있는 전장

폴리펩타이드를 코딩하는 핵산의 단편 또는 폴리펩타이드의 활성 부분(α -Syn 결합 부분)을 코딩하는 단편 핵산과 같은 전장 핵산 서열의 부분을 포함할 수 있다.

[209] 핵산 서열을 근거하여 제조된 프라이머 및 프로브는 본원에 개시된 핵산 또는 유사한 핵산, 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 전사체를 검출하는데 사용될 수 있다. 일 구현예에서 이러한 프로브는 본원에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 식별하는데 사용될 수 있다. 프라이머 또는 프로브는 방사성동위원소, 형광성 화합물, 효소, 또는 효소 보조-인자와 같은 표지물질로 표지될 수 있다.

[210] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 폴리펩타이드 또는 그 부분(예를 들면, 하나 이상의 CDR 또는 하나 이상의 가변 영역 도메인을 포함하는 단편)을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터의 예에는 플라스미드, 바이러스 벡터, 비-에피솜 포유동물 벡터 및 (재조합) 발현 벡터 등을 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다. 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태의 핵산을 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 발현에 사용되는 숙주 세포에 기초하여 선택되는 하나 이상의 조절 서열을 포함하고, 이러한 조절 서열은 발현되는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 조절 서열에는 많은 종류의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 발현을 조절할 수 있는, 예를 들면, SV40 초기 유전자 인핸서, 라우스 육종 바이러스 프로모터 및 사이토메갈로바이러스 프로모터와 같은 프로모터; 또는 특정한 숙주 세포 내에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는, 예를 들면, 조직-특이적 조절 서열 (Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236:1237), 및 특별한 처리 또는 조건에 반응하여 뉴클레오티드 서열의 유도성 발현을 지시하는, 예를 들면, 포유동물 세포에서 작용하는 메탈로티오닌 프로모터, 및 원핵 생물 및 진핵 생물 시스템 둘 다에서 작용하는 *tet*-반응성 및/또는 스트렙토마이신 반응성 프로모터)(참조: 상동)이 포함된다. 당업자라면, 형질전환되는 숙주 세포의 종류, 목적하는 단백질의 발현 정도와 같은 요소를 고려하여 적절한 벡터 및 조절서열을 선택할 수 있을 것이다. 선택된 발현 벡터는 숙주 세포 내로 전달되어 본원에 개시된 것과 같은 핵산에 의해 코딩되는 단백질의 생산에 사용될 수 있다.

[211] 또 다른 측면에서 본원은 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 임의의 원핵세포(예를 들면 *E. coli*) 또는 진핵세포(예를 들면, 효모, 곤충, 또는 포유동물 세포)일 수 있다. 벡터 DNA는 공지된 형질전환 또는 전달이입 기술을 통해 원핵 또는 진핵세포 내로 도입될 수 있다. 포유동물 세포에서 안정한 전달이입의 경우, 사용되는 발현 벡터의 종류 및 형질 감염 기술에 따라, 적은 수의 세포만이 전달이입에 의해 전달되는 DNA를 그 게놈내로 통합할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 전달이입된 세포를 식별하고 선택하기 위하여, 일반적으로 항생제 내성 마커와 같은 선택가능한 마커를 코딩하는 유전자가 목적하는 유전자와 함께 숙주 세포 내로 도입된다. 바람직한

선택가능한 마커에는 약물, 예를 들면, G418, 하이그로마이신 및 메소트리세이트에 대한 내성을 제공하는 것들이 포함된다. 목적하는 핵산이 안정적으로 도입된 세포의 선별은 약물 처리를 통해 생존하는 세포만을 선택함으로써 달성될 수 있다.

[212] 항체의 제조

[213] 본원에서 비-인간 항체는, 예를 들면, 임의의 항체-생성 동물, 예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼, 염소, 당나귀, 또는 비-인간 영장류(예를 들면, 시노몰구스 또는 붉은털 원숭이와 같은 원숭이) 또는 유인원(예를 들면 침팬지))로부터 유래될 수 있다. 비인간 항체는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 사용하여 동물을 면역화시킴으로써 생성될 수 있다. 항체는 폴리클로날, 모노클로날일 수 있거나, 또는 재조합 DNA를 발현시킴으로써 숙주 세포 내에서 합성될 수 있다. 완전 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자 좌를 포함하는 형질전환 동물에 항원을 투여하거나, 또는 인간 항체의 레퍼토리를 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리를 항원으로 처리하여, 목적하는 항체를 선택함으로써 제조될 수 있다.

[214] 모노클로날 항체(mAb)는 종래의 모노클로날 항체 방법, 예를 들면, 문헌(참조: Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495)의 표준 체세포 혼성화 기술을 비롯한 다양한 기술에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로는 예를 들면, B-림프구를 바이러스 또는 종양유전자로 형질전환시켜 사용하는 방법이 사용될 수 있다. 뮤린 시스템은 하이브리도마 세포의 생산에 널리 사용되는 동물 시스템이다. 면역화 프로토콜 및 융합을 위한 면역화된 마우스의 비장세포의 분리기술은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 방법에서 면역화된 마우스로부터 유래된 B 세포는 예를 들면, 뮤린 골수종세포주와 같은 불멸화 융합 파트너 세포와 융합된다. 필요에 따라 마우스 대신에 랫트 또는 다른 포유동물이 면역화될 수 있고, 이러한 동물로 유래의 B 세포를 뮤린 골수종 세포주와 융합하여, 하이브리도마를 생성할 수 있다. 대안적으로, 융합에 사용되는 골수종 세포주는 마우스 이외의 동물 유래의 것이 사용될 수 있다. 이러한 하이브리도마를 제조하기 위한 융합 절차도 또한 널리 공지되어 있다.

[215] 본원에 개시된 단쇄 항체는 아미노산 가교(짧은 펩타이드 링커)를 이용하여, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(Fv 영역) 단편을 연결하여 생성될 수 있다. 이러한 단쇄 Fv(scFv)는 2개의 가변 도메인 폴리펩타이드(V_L 및 V_H)를 코딩하는 DNA 사이에 펩타이드 링커를 코딩하는 DNA를 융합함으로써 제조될 수 있다. 제조된 폴리펩타이드는 접힘에 의해 항원-결합 단량체를 형성하거나, 또는 2개의 가변 도메인 사이에 유연성 링커의 길이에 따라, 다량체(예를 들면, 이량체, 삼량체 또는 사량체)를 형성할 수 있다 (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). 상이한 V_L 과 V_H -포함 폴리펩타이드를 조합함으로써, 상이한 에피토프에 결합하는 다량체성 scFv를 형성할 수 있다 (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). 나아가 추가의 단쇄 항체의

생성을 위한 기술은 예를 들면 하기를 참조할 수 있다: 미국 특허 제4,946,778호; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-387. 본원에 개시된 단쇄 항체는 표 1a 및 1b에 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 도메인 조합을 포함하는 scFv, 또는 표 1에 개시된 CDR을 포함하는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 조합이 포함되지만 이로 제한되는 것은 아니다.

- [216] 본원에 개시된 항체는 또한 서브타입 스위칭을 통해, 상이한 서브타입 항체로 변경될 수 있다. 따라서 IgG 항체는, 예를 들면, IgM 항체로부터 유래될 수 있고, 그 역도 가능하다. 이러한 기술을 통해 모항체와 항원 결합 특성은 동일하나, 모항체와는 상이한 바뀐 서브타입에 특징적인 생물학적 특성을 갖는 새로운 항체의 제조가 가능하다. 이러한 스위칭에 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있다. 예를 들면, 목적하는 아이소타입 항체의 불변 도메인을 코딩하는 DNA가 이러한 항체의 제조에 사용될 수 있다. 예를 들어, Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-316를 참조할 수 있다. 또한 IgG4의 스위칭의 경우, IgG4 항체에서 이질성을 유발할 수 있는 중쇄내 디설파이드 결합을 형성하는 경향을 경감시키기 위하여 문헌 Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407 에 기술된 바와 같이 힌지 영역 내에 점 돌연변이(CPSCP->CPPCP)를 도입하는 것이 바람직할 수도 있다.
- [217] 따라서, 본원에 개시된 항체에는, 예를 들면, 목적하는 아이소타입(예를 들면, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, 및 IgD)으로 스위칭된 본원에 개시된 가변 도메인 조합 항체가 포함된다.
- [218] 또한 항원에 대한 다양한 친화성을 갖는 항체와 같은 상이한 특징을 갖는 항체를 제조하는 기술이 또한 공지되어 있다. 이러한 기술은 예를 들면 파지 디스플레이로 불리는 필라멘트 박테리오파지의 표면에 면역글로불린 가변 도메인 유전자 레퍼토리의 디스플레이하여 수행되는 사슬 셔플링(chain shuffling)을 들 수 있다. 추가의 기술은 Marks et al., 1992, BioTechnology 10:779에 기재된 것을 참조할 수 있다.
- [219] 목적하는 바람직한 기능적 및 생화학적 특징을 갖는 α -Syn 결합 단백질을 생성하기 위하여, 표 1A 및 1B에 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 또는 CDR에 보존적 변형(및 코딩 핵산에 상응하는 변형)이 수행될 수 있다. 이러한 변형을 수행하는 방법은 상술한 바와 같다.
- [220] α -Syn 항체는 다양한 방식으로 추가로 변형될 수 있다. 예를 들면, 치료 목적에 사용되는 경우, 혈청 반감기를 증가시키거나, 단백질 전달을 향상시키기 위하여 폴리에틸렌 글리콜과 접합, 즉 폐길화 될 수 있다. 대안적으로, 본원의 항체 또는 이의 단편의 가변 영역은 상이한 항체 분자의 Fc 영역과 융합될 수 있다. 이러한 목적에 사용되는 Fc 영역은 보체에 결합하지 않아 따라서 융합 단백질이 치료제로서 사용될 때 환자 내에서 세포 용해(cell lysis)의 발생이 감소되는 방향으로 변형된다. 또한, 본원의 항체 또는 이의 기능적 단편은 항체 또는 이의

항원 결합 단편의 혈청 반감기를 향상시키기 위하여 인간 혈청 알부민과 접합될 수 있다. 항체 또는 이이 항원 결합 단편에 다른 유용한 융합 파트너는 트랜스티레틴(TTR)이다. TTR은 사량체를 형성하는 능력을 갖고, 따라서 항체-TTR 융합 단백질은 융합되는 단백질의 결합 친화력(binding avidity)가 증가된 다가 항체(multivalent antibody)를 형성할 수 있다.

- [221] 대안적으로, 본원에 개시된 항체의 기능적 및/또는 생화학적 특징에서 실질적인 변경은, 예를 들면, (a) 시트 또는 나선형 형태와 같은 치환 부위내에서 분자 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 상기 분자의 전하 또는 소수성 정도, 또는 (c) 측쇄의 벌크성에 유의한 영향을 미치는, 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열 내에서 치환을 통해 달성될 수 있다.
- [222] 본원에 개시된 항체의 아미노산 치환(보존적 또는 비-보존적)은 통상의 기술을 적용함으로써 당업자에 의해 수행될 수 있다. 아미노산 치환은 본원에 개시된 항체의 중요한 잔기를 식별하거나, 또는 인간 α -Syn에 대한 이들 항체의 친화성을 증가 또는 감소시키거나, 또는 본원에서 개시된 다른 항체의 결합 친화성을 변화시키는데 사용될 수 있다.
- [223] 항체를 발현하는 방법
- [224] 본원은 또한 상술한 바와 같은 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트의 형태의 발현 시스템 및 구축물, 그리고, 상기 발현 시스템 또는 구축물을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [225] 본원에 개시된 항체는 다수의 종래의 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, α -Syn 항체는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 재조합 발현 시스템에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.) Plenum Press, New York (1980); 및 Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)을 참조할 수 있다.
- [226] 항체는 하이브리도마 세포주 또는 하이브리도마 이외의 세포주에서 발현될 수 있다. 항체를 코딩하는 발현 구축물은 포유동물, 곤충 또는 미생물 숙주 세포를 형질전환시키는데 사용될 수 있다. 플라스미드와 같은 구축물은 앞서 기술된 바와 같이 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 다양한 임의의 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 구체적인 방법은 숙주세포의 종류에 따라 달라질 수 있을 것이다. 이중 폴리뉴클레오티드를 포유동물 세포 내로 도입하는 방법은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들면 텍스트란 매개 전달입, 인산칼슘 침전, 폴리브렌 매개 전달입, 원형질체(protoplast) 융합, 전기천공, 리포솜을 이용한 전달되는 폴리뉴클레오티드의 캡슐화, 핵산과 양으로 하전된 지질의 혼합, 및 핵 내로 DNA의 직접적인 미세주입에 의해 수행될 수 있지만, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [227] 재조합 발현 구축물은 전형적으로 다음 중의 하나 이상을 포함하는

폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다: 본원에 개시된 하나 이상의 CDR; 경쇄 불변 영역; 경쇄 가변 영역; 중쇄 불변 영역(예를 들면, CH1, CH2 및/또는 CH3); 및/또는 α -Syn 항체의 그 외 스캐폴드(scaffold) 부분. 이들 핵산 서열은 표준 라이게이션 기술을 사용하여 적절한 발현 벡터 내로 삽입된다. 일 구현예에서, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역은 항- α -Syn-특이적 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 C-말단에 연결되고 발현 벡터 내로 라이게이션된다. 벡터는 벡터가 사용되는 특정 숙주 세포 내에서 기능할 수 있도록 선택된다. 즉, 벡터는 사용되는 숙주 세포의 기구를 이용하여 벡터에 포함된 유전자의 증폭 및/또는 발현될 수 있어야 한다. 일 구현예에서, 단백질 리포터, 예를 들면, 미국 특허 제6,270,964호에 개시된 디하이드로폴레이트 리덕타제를 사용한 단백질-단편 상보성(complementation) 분석을 사용하는 벡터가 사용된다. 적절한 발현 벡터 시중에서, 예를 들면 Life Technologies 또는 BD Biosciences와 같은 회사에서 구입할 수 있다. 항체 및 단편을 클로닝하고 발현하는데 유용한 다른 벡터의 예는 Bianchi and McGrew, 2003, *Biotech. Biotechnol. Bioeng.* 84:439-44; *Methods Enzymol.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press에 개시된 것을 참조할 수 있다.

- [228] 전형적으로, 임의의 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 플라스미드 유지 및 외인성 뉴클레오티드 서열의 클로닝과 발현에 필요한 기본 서열을 포함할 것이다. 특정 구현예에서 이러한 기본 서열은 전형적으로 하나 이상의 다음 뉴클레오티드 서열을 포함할 것이다: 프로모터, 하나 이상의 인핸서 서열, 복제 기원, 전사 종결 서열, 공여자와 수용자 스플라이싱 부위를 포함하는 온전한 인트론 서열, 폴리펩타이드 분비를 위한 리더 서열을 코딩하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현되는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 영역, 및 선택가능한 마커 서열.
- [229] 선택적으로 벡터는 "태그"-인코딩 서열, 즉 α -Syn 결합 단백질 코딩 서열의 5' 또는 3'말단에 위치하는 올리고뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있다; 상기 올리고뉴클레오티드 서열은 polyHis(예: hexaHis), 또는 시판 항체에 존재하는 다른 "태그", 예를 들면, FLAG®, HA(헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스), 또는 myc를 코딩할 수 있다. 이러한 태그는 전형적으로 폴리펩타이드에 융합되고 발현되고, 숙주 세포에서 α -Syn 결합 단백질 분리시에 친화성 정제 또는 검출의 수단으로서 기능할 수 있다. 친화성 정제는, 예를 들면, 친화성 매트릭스로서 태그에 대한 항체를 사용한 칼럼 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 선택적으로 이러한 태그는 이후에 특정 펩티다제의 사용을 포함하는 다양한 수단에 의해 정제된 α -Syn 결합 단백질로부터 제거될 수 있다.
- [230] 상술한 기본 서열은 동종, 이종, 또는 하이브리드, 합성 또는 고유의 것일 수 있다. 이와 같이, 기본 서열은 숙주 세포 기구에서 활성화될 수 있고, 기능할 수 있다면, 임의의 원핵 또는 진핵 생물, 임의의 척추동물 또는 무척추 생물, 또는 임의의 식물 유래의 것이 사용될 수 있다.

- [231] 벡터에 포함된 유용한 기본 서열은 당해 기술 분야에 널리 공지된 여러 방법에 의해 수득될 수 있다. 전형적으로, 본원에 사용되는 기본 서열은 맵핑(mapping) 및/또는 제한효소 절단을 통해 미리 확인되어, 적절한 제한효소를 사용하여 적절한 조직 공급원으로부터 분리될 수 있다. 일부 경우에, 기본 서열의 전체 뉴클레오티드 서열은 공지된 것일 수 있으며, 기본 서열은 본원에 개시된 핵산 합성 또는 클로닝 방법을 사용하여 합성될 수 있다.
- [232] 기본 서열의 전부 또는 일부 서열의 공지 여부에 상관없이, 기본 서열은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여, 및/또는 적절한 프로브, 예를 들면, 동일하거나 상이한 종으로부터 올리고뉴클레오티드 및/또는 기본 서열 단편으로 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 기본 서열이 알려져 있지 않으면, 기본 서열을 포함하는 DNA의 단편은 예를 들면, 코딩 서열 또는 심지어 다른 유전자(들)를 포함할 수 있는 더 큰 DNA의 단편으로부터 분리될 수 있다. 목적하는 단편은 제한효소 처리, 아가로스겔 정제 및 칼럼 크로마토그래피 또는 당업자에게 공지된 기타 방법을 사용하여 분리될 수 있다. 당업자라면 이러한 목적을 달성하기 위한 적절한 효소를 선택할 수 있음이 자명하다.
- [233] 복제 기원은 숙주 세포 내에서 벡터의 증폭에 필요한 것으로, 전형적으로는 시판되는 원핵 발현 벡터에 포함되어 있다. 선택 벡터가 복제 기원을 포함하지 않으면, 공지된 서열에 기초하여 화학적으로 합성되고, 벡터 내로 라이게이션 될 수 있다. 예를 들면, 플라스미드 pBR322(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)의 복제 기원은 대부분의 그람-음성 세균에 적합하고, 다양한 바이러스 기원(예를 들면, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 또는 유두종바이러스, 예를 들면, HPV 또는 BPV)은 포유동물 세포 내에서 벡터를 클로닝하는데 유용하다. 일반적으로, 복제 기원은 포유동물 발현 벡터에는 필요하지 않다(예를 들면, SV40 기원은 또한 바이러스 초기 프로모터를 포함하기 때문에 사용된다).
- [234] 전사 종결 서열은 전형적으로 폴리펩타이드 코딩 영역의 3'말단에 위치하고, 전사를 종결시키는 기능을 한다. 일반적으로, 원핵세포에서 전사 종결 서열은 폴리-T 서열이 따르는 G-C가 풍부한 단편이다. 이러한 서열은 라이브러리로부터 용이하게 클로닝 될 수 있거나 또는 시중에서 구입 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산 합성 방법을 사용하여 수득될 수 있다.
- [235] 선택 마커 유전자는 숙주 세포의 선택 배양 배지에서 생존 및 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 전형적인 선택 마커 유전자는 (a) 항생제 또는 기타 독소, 예를 들면, 원핵 숙주 세포의 경우에 암피실린, 테트라사이클린, 또는 카나마이신에 대한 내성을 제공; (b) 세포의 영양요구성 결함(auxotrophic deficiency)을 보완; 또는 (c) 복합 배지 또는 규정 배지로에서 얻을 수 없는 중요한 영양분을 공급하는 단백질을 코딩한다. 일 구현예에서 선택가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자, 및 테트라사이클린 내성

유전자이다. 네오마이신 내성 유전자는 또한 원핵 및 진핵 숙주 세포 둘 모두에서 선택을 위해 사용될 수 있다.

- [236] 다른 선택 유전자는 발현되는 유전자의 증폭에 사용될 수 있다. 증폭은 세포의 성장 또는 생존에 중요한 단백질의 생산에 필요한 유전자가 후속세대의 재조합 세포의 염색체 내에서 직렬식으로 반복되는 과정이다. 포유동물 세포에 적합한 선택 마커의 예로는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 및 프로모터 없는 티미딘 키나제 유전자가 포함된다. 포유동물 세포 형질전환체에는 형질전환체만이 벡터 내에 존재하는 선택 유전자에 의하여 생존가능하도록 작용하는 선택 압력(selection pressure)이 가해진다. 선택 압력은 배지에 포함된 선택제의 농도를 점차적으로 증가시켜, 선택 유전자 및 다른 유전자, 예를 들면, α -Syn에 결합하는 항체를 코딩하는 유전자 모두가 증폭되도록 하는 조건하에서 세포를 배양함으로써 가해질 수 있다. 따라서 증폭된 DNA로 인해 발현되는 폴리펩타이드 예를 들면, 항체의 양이 증가하게 된다.
- [237] 리보솜-결합 부위는 일반적으로, mRNA의 번역 개시에 필요하고 Shine-Dalgarno(샤인-달가노) 서열(원핵생물) 또는 코작(Kozak) 서열(진핵생물)을 특징으로 한다. 이는 전형적으로 프로모터의 3' 및 발현되는 폴리펩타이드의 코딩 서열의 5'에 위치한다.
- [238] 진핵 숙주 세포 발현 시스템에서 글리코실화가 필요한 경우, 글리코실화 또는 수율을 개선하기 위하여 다양한 프리(pre)- 또는 프로(pro)-서열을 조작할 수 있다. 예를 들면, 특정 신호 펩타이드의 펩티다제 절단 부위를 변경하거나, 또는 글리코실화에 영향을 미칠 수 있는 프로서열(prosequence)을 추가할 수 있다. 최종 단백질 생성물은 이들 아미노산은 완전하게 제거되지 않아 -1 위치(성숙 단백질의 첫 번째 아미노산에 대해)에서 하나 이상의 추가의 아미노산을 가질 수 있다. 예를 들면, 최종 단백질 생성물은 아미노-말단에 부가된 펩티다제 절단 부위에서 발견되는 1개 또는 2개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 대안적으로, 단백질 절단 효소를 사용하면, 절단 부위가 목적하는 단백질 내에 포함되어 있는 경우에는 절단된 형태의 단백질이 생산될 수 있다.
- [239] 발현 및 클로닝은 전형적으로 숙주 생물체에 의해 인식되는 α -Syn 결합 단백질을 코딩하는 분자에 작동가능하게 연결되는 프로모터의 사용을 포함한다. 프로모터는 구조 유전자의 전사를 조절하는(일반적으로, 약 100 내지 1000 bp 내의) 구조 유전자의 개시 코돈의 상류 측, 5'에 위치하는 비전사 서열이다. 프로모터는 유도성 프로모터 및 상시 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화 예를 들면, 배지의 특정 성분의 존재 또는 부재, 또는 온도의 변화에 반응하여 이에 연결된 DNA로부터 전사를 개시 또는 조절한다. 한편, 상시 프로모터는 이에 작동가능하게 연결된 유전자의 전사를 조절하지 않고, 일정하게 발현한다. 다양한 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 널리 알려져 있다. 적절한 프로모터는 제한효소를 사용하여 주형 DNA로부터 프로모터를 제거한 후, 이를 벡터 내로 삽입함으로써, α -Syn 결합

- 단백질을 포함하는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된다.
- [240] 효모 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터도 또한 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 효모 프로모터와 함께 효모 인핸서가 또한 사용될 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 사용하기 적합한 프로모터로는, 바이러스, 예를 들면, 폴리오마 바이러스, 계두(pharynx) 바이러스, 아데노바이러스(예, 아데노바이러스 2), 소유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 및 유인원 바이러스 40(SV40)의 게놈으로부터 수득된 것이 포함될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 다른 적절한 포유동물 프로모터의 예로는 이종 포유동물 프로모터, 예를 들면, 열-쇼크 프로모터 및 액틴 프로모터가 포함된다.
- [241] 추가의 프로모터에는 SV40 초기 프로모터(Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); CMV 프로모터(Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); 라우스 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복체(long terminal repeat)에 포함된 프로모터(Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터(Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); 메탈로티오닌 유전자의 프로모터 및 조절 서열(Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); 및 원핵 프로모터, 예를 들면, 베타-락타마제 프로모터(Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); 또는 tac 프로모터(DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)가 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 조직 특이성을 나타내는 형질전환 동물에 사용되는, 다음과 같은 동물의 전사 조절 영역이 사용될 수 있다: 췌장 샘파리 세포에서 활동성인 엘라스타제 I 유전자 조절 영역(Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); 췌장 베타 세포에서 활동성인 인슐린 유전자 조절 영역(Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); 림프계 세포에서 활동성인 면역글로불린 유전자 조절 영역(Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); 고환, 유방, 림프계 및 비만(mast) 세포에서 활동성인 마우스 유선 종양 바이러스 조절 영역(Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); 간에서 활동성인 알부민 유전자 조절 영역(Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); 간에서 활동성인 알파-페토-단백질 유전자 조절 영역(Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); 간에서 활동성인 알파 1-안티트립신 유전자 조절 영역(Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); 골수 세포에서 활동성인 베타-글로빈 유전자 조절 영역(Mogam et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); 뇌 내의 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)에서 활동성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역(Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); 골격근에서 활동성인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역(Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); 및 시상하부에서

활동성인 성선자극호르몬 방출 호르몬 유전자 조절 영역(Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

- [242] 인헨서 서열은 고등 진핵생물에서 인간 α -Syn 결합 단백질을 포함하는 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 DNA의 전사를 증가시키기 위하여 벡터 내로 삽입될 수 있다. 인헨서는 프로모터에 작용하여 전사를 증가시키는 통상적으로 약 10-300 bp 길이를 갖는 DNA의 시스-작용 요소이다. 인헨서는 전사 단위체의 5' 및 3' 위치 둘 모두에서 관찰되며, 상대적으로 위치 및 방향에 영향을 받지 않는다. 포유동물 유전자에서 다수의 인헨서 서열이 알려져 있다(예를 들면 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-페토-단백질 및 인슐린). 그러나, 전형적으로, 바이러스로 유래의 인헨서가 사용된다. 당해 기술분야에 공지된 프로모터의 활성화를 위한 예시적 인헨서는 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인헨서는 벡터 내에서 코딩 서열의 5' 또는 3'에 배치될 수 있지만, 전형적으로 프로모터의 5' 부위에 위치된다. 적절한 고유의 또는 이중 신호 서열(리더 서열 또는 신호 펩타이드)을 코딩하는 서열은 항체의 세포외 분비를 촉진하기 위하여 발현 벡터 내로 통합될 수 있다. 신호 펩타이드 또는 리더 서열의 선택은 항체가 생산되는 숙주 세포의 종류에 따라 결정되고, 고유 신호 서열을 이중 신호 서열로 대체할 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 기능적인 신호 펩타이드의 예에는 미국 특허 제4,965,195호에 기재된 인터류킨-7(IL-7)에 대한 신호 서열; 문헌 Cosman et al., 1984, Nature 312:768에 기재된 인터류킨-2 수용체에 대한 신호 서열; EP 특허 제0367 566호에 기재된 인터류킨-4 수용체 신호 펩타이드; 미국 특허 제4,968,607호에 기재된 유형 I 인터류킨-1 수용체 신호 펩타이드; EP 특허 제0 460 846호에 기재된 유형 II 인터류킨-1 수용체 신호 펩타이드가 포함된다.
- [243] 본원에서 발현 벡터는 시판되는 벡터를 이용하여 제작될 수 있다. 이러한 벡터는 목적하는 기본 서열의 전부 또는 일부를 포함하거나 전혀 포함하지 않을 수 있다. 본원에서 기재된 기본 서열 중의 하나 이상이 벡터 내에 미리 존재하지 않는 경우에, 이들은 개별적으로 수득되어 벡터 내로 라이게이션될 수 있다. 기본 서열에 포함된 각 서열을 수득하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.
- [244] 벡터를 제조하여, 경쇄, 중쇄, 또는 α -Syn 항원 결합 서열을 포함하는 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산 분자를 상기 벡터의 적절한 부위 내로 삽입된 이후, 이러한 재조합 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩타이드 발현을 위하여 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 항체 발현 벡터를 선택된 숙주 세포 내로 도입하는 방법은 전달이입, 감염, 인산칼슘 공동-침전, 전기천공, 미세주입, 리포펙션(lipofection), DEAE-덱스트란 매개 전달이입, 또는 기타 널리 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다. 도입방법은 주로 사용되는 숙주세포의 종류에 따라 결정된다. 이러한 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 예를 들면, 상술한 문헌 Sambrook et al., 2001을 참조할 수 있다.

- [245] 이어 숙주 세포를 적절한 조건에서 배양한 후, 항체를 배양 배지로부터(숙주 세포가 항체를 배지 내로 분비하는 경우), 또는 이를 생성하는 숙주 세포로부터 직접적으로(항체가 분비되지 않는 경우) 수득한다. 적절한 숙주 세포의 선택은 다양한 요소, 예를 들면, 목적하는 발현 수준, 활성을 위하여 바람직하거나 필수적인 폴리펩타이드 변형(예를 들면, 글리코실화 또는 포스포릴화), 및 생물학적 활성 분자의 생성을 위한 접합의 용이성 등에 좌우된다.
- [246] 발현을 위한 이용가능한 포유동물 세포주로는 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들면 ATCC(American Type Culture Collection)으로부터 구입가능한 불멸화 세포 예를 들면 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예, Hep G2), 및 다수기타 세포주가 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 세포주는 α -Syn 결합 특성을 갖는 항체를 계속적으로, 높은 발현량으로 발현하는지에 따라 결정될 수 있다. 다른 구현예에서는 자신의 항체를 제조하지 못하지만 이중 항체를 제조하고 분비하는 능력을 갖는 B 세포 계통으로부터의 세포주가 선택될 수 있다.
- [247] 질환에서 α -Syn의 역할
- [248] α -Syn은 뉴론의 전 시냅스 말단에 주로 발현되는, 140개 아미노산으로 이루어진 단백질로, 정상 상태에서는 세포질에 자연적으로 접하지 않은 상태의 단량체로 존재한다. α -Syn의 정확한 기능은 밝혀지지 않았으나, 시냅스가 발달한 후에만 검출되는 것으로부터, 성숙한 전 시냅스 말단에서 시냅스 메시지를 공급 유지에 중요한 역할(Murphy DD et al. J Neurosci 2000, 20:3214-3220)을 하며, 불수의 또는 수의 운동을 조절하는 도파민의 방출을 조절하거나 또는 기억 및 인지 기능에 영향을 미칠 수 있다(Kokhan VS et al. Behav Brain Res 2012, 231:226230). 특히 α -Syn의 기능은 시냅스 활동의 증가 및 나이가 들에 따라서 중요하며, 신경퇴화의 중요한 인자이다.
- [249] 병적인 상태에서 α -syn은 지질미적(droplet), 인지질 이중막 또는 지질막 등과의 결합 및 상호작용을 통해 구조적 변화를 일으켜 폴딩된 α -헬리칼 2차 구조를 형성하여 이량체(dimer), 올리고머(oligomer) 및 섬유상 형태의 분자를 포함하는 응집체를 형성하게 된다.
- [250] 특히 α -syn 응집은 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA) 및 기타 다수의 신경축삭 질환을 포함하는 α -synucleinopathy라고 불리는 일군의 신경퇴행성 질환의 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 이차적으로 알츠하이머 질환에서도 발견된다(Kim et al. Alzheimer's Research & Therapy 2014, 6:73).
- [251] 나아가 파킨슨 질환 환자의 뇌척수액 및 혈장 샘플에서 올리고머 형태 및 모노머 형태의 알파-시뉴클레인 단백질이 모두 발견되었으며, 이는 작은 분자량의 알파-시뉴클레인 응집체가 세포막을 투과하여 세포외 공간에 접근할 수 있음을

나타낸다. 또한 잘못 폴딩된 알파-시뉴클레인이 엑소사이토시스에 의해 세포로부터 방출된 후, 프리온 단백질처럼, 세포간 전달에 의해 뇌의 한 영역에서 다른 영역으로 전달될 수 있는 것으로 나타났다 (Brundin P et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2010, 11:301-307).

- [252] α -synucleinopathy는 세포내(intracellularly)에 α -syn 응집체를 포함하는 엔티티(entity) 또는 소체(body)가 존재하는 것을 특징으로 하는 일군의 신경퇴행성 질환이다. 이러한 소체는 질환에 따라서 겉모양이 어느 정도 상이하며, 파킨슨 질환 및 루이소체 치매(DLB)에서는 루이소체, MSA에서는 교질 세포질 소체, 신경축삭 질환에서는 축삭 스페로이드(spheroid)로 불린다. 본원에 따른 항체는 α -syn 응집체를 선호적 및 특이적으로 인식하기 때문에, 이러한 소체를 인식할 수 있다.
- [253] 루이소체 질환(Lewy Body Disease, LBD) 또는 알파-시뉴클레인 신경질환은 도파민 시스템의 변성, 운동 장애, 인지 손상 및 루이소체(LB) 형성을 특징으로 한다 (McKeith et al. Neurology 1996, 47:1113-24). 루이소체는 신경 세포에서 발견되는 구형의 단백질 침착물이다. 루이소체는 뇌에서 아세틸 콜린과 도파민을 포함한 화학적 메신저의 작용을 방해하여 뇌의 정상적 기능을 방해한다. 루이소체 질환에는 파킨슨 병(특발성 파킨슨 병(PD) 포함), 루이소체 치매(DLB)로도 불리는 확산성 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 병 및 파킨슨 병 복합 질환 및 다발성 위축증(MSA)을 포함한다. DLBD는 알츠하이머 및 파킨슨 질환과 증상이 동일하나, 루이소체의 위치가 파킨슨 질환과 상이하다. DLBD에서 루이소체는 주로 피질에 존재하고, 파킨슨 질환에서는 주로 흑색질에 존재한다.
- [254] 다른 루이소체 질환은 Pure Autonomic Failure, 루이소체 장애(dysphagia), Incidental LBD, Inherited LBD(예를 들면 α -syn 유전자 PARK3 및 PARK4 유전자 돌연변이) 및 다계통위축증(Multiple System Atrophy, MSA 예를 들면, Olivopontocerebellar Atrophy, Striatonigral Degeneration 및 Shy-Drager Syndrome)을 포함한다.
- [255] 본원에 따른 α -Syn 응집체를 높은 친화도로 특이적으로 인식하며, α -Syn 항체가 이러한 질환의 진단, 또는 검출에 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다. 나아가 본원에 따른 α -Syn 응집체를 특이적으로 인식하는 α -Syn 항체는 α -Syn 응집체의 형성을 억제하거나 또는 응집체를 분해하고, 세포간 응집체의 전달을 억제하여, α -synucleinopathy, 특히 루이소체 질환, 파킨슨 병의 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [256] 치료 및 진단의 목적을 위한 인간 α -Syn 항체의 용도
- [257] 본원에 개시된 항체는 생물학적 시료에서 α -Syn, 특히 루이소체와 같은 α -Syn 응집체의 검출 및 α -Syn 응집체를 포함하는 세포 또는 조직의 식별에 유용하다. 예를 들면, α -Syn 항체는 진단, 예를 들면, 생물학적 시료 예를 들면 혈장을 포함하는 혈액, 뇌척수액(CSF, Cerebrospinal fluid) 또는 소변, 조직 또는 세포

내에서 발현된 α -Syn 응집체를 검출하고/하거나 정량하는 분석, 및 이를 근거로 한 α -synucleinopathy의 진단에 사용될 수 있다.

- [258] 또한 특히 응집체에 특이적으로 결합하는 본원에 따른 항체는 α -Syn 응집체와 관련된 질환의 치료, 진단, 및/또는 검출이 필요한 대상체에서 α -Syn 응집체 관련 질환의 치료에 사용될 수 있다. 본원에 따른 항체 또는 항원결합 단편은 α -Syn 응집체의 생성을 억제하고, 분해를 촉진하며, 세포 간 전달을 억제하여, 상술한 바와 같은 α -Syn 응집체와 관련된 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[259] 진단 방법

- [260] 본원에 개시된 항체는 α -Syn과 관련된 질환 및/또는 증상을 검출, 진단, 또는 모니터링하기 위한 진단 목적에 사용될 수 있다. 일 구현예에서 본원에 따른 방법은 α -synucleinopathy의 진단이 필요한 대상체에서 α -synucleinopathy를 진단하는 방법으로, 상기 방법은 상기 대상체에서 α -Syn 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편으로 측정하는 단계; 및 상기 대상체에서 측정된 상기 α -Syn 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 대조군 시료의 결과와 비교하는 단계를 포함하며, 상기 대조군의 결과와 유사 또는 차이는 상기 대상체가 α -synucleinopathy에 걸린 것을 나타내는 것이다.
- [261] 상기 방법에서 대상체는 증상이 없거나 또는 증상이 나타나기 전의 환자를 포함하는 것이다. 일 구현예에서 대조군은 PD, DLB 또는 MSA를 포함하는 α -synucleinopathy 환자일 수 있으며, 이 경우, 상기 비교 단계에서 대조군과의 유사성은 상기 대상체를 α -synucleinopathy 환자로 진단한다. 다른 구현예에서 대조군은 정상인 유래의 시료인 경우에, 상기 비교단계에서 대조군과의 차이, 예를 들면 응집체 농도의 증가는 상기 대상체를 α -synucleinopathy로 진단한다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체와 대조군의 연령이 매치될 수 있다. 상기 방법은 인비보 또는 대상체에서 분리된 생물학적 시료 예를 들면 혈액, 뇌척수액(CSF, Cerebrospinal fluid) 또는 소변 시료에서 수행될 수 있다.
- [262] 상기 방법은 인비보 이미징으로 수행될 수 있다. 인비보 이미징은 예를 들면 PET(positron emission tomography), SPECT(single photon emission tomography), NIR(near infrared) 광학 이미징 또는 MRI(magnetic resonance imaging)를 이용하여 수행될 수 있다.
- [263] 상기 방법은 인비트로에서 수행될 수 있다. 상기 방법은 당업자에게 널리 알려진 웨스턴블랏, 면역침전, ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), 방사성면역분석법(Radio Immuno Assay, RIA) 또는 면역조직화학적 방법을 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들면, Tijssen, 1993, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen et al., 1987, J. Cell Biol. 105:3087-3096).
- [264] 진단 용도를 위해 항체는 전형적으로 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다.

적절한 표지 물질은 방사성동위원소 또는 방사성핵종(예를 들면, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), 형광 물질(예를 들면, FITC, 로다민, 란탄족 형광체), 효소(예를 들면, 호스래디쉬 퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스포타제), 화학발광기, 바이오티닐 기, 또는 2차 리포터에 의해 인식되는 폴리펩타이드 에피토프(예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)가 포함되거나 이로 제한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 표지 물질은 잠재적인 입체 장애를 감소시키기 위하여 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링 될 수 있다. 단백질을 표지화하기 위한 다양한 방법이 당해 기술 분야에 공지되어 있고 본원에 적용될 수 있다.

- [265] 다른 양태에서 본원의 항체는 α -Syn 응집체를 포함하는 조직의 식별에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체는 표지물질로 표지되고, 표지된 항체의 α -Syn 응집체에 대한 결합이 검출된다. 일 구현예에서, α -Syn 응집체에 대한 항체의 결합은 생체내에서 검출된다.
- [266] 다른 양태에서 본원은 본원에 개시된 항체와 α -Syn 응집체에의 결합에 대하여 경쟁하는 시험 물질을 검출 또는 선별하는 것을 개시한다. 예를 들면 시험물질의 존재 또는 부재에서 α -Syn 응집체를 포함하는 용액 내에서 유리 항체의 양을 검출하는 단계를 포함한다. 유리 항체, 즉, α -Syn 응집체에 결합되지 않은 항체 농도의 증가는 시험 분자가 α -Syn 응집체 결합에 대하여 항체와 경쟁할 수 있음을 지시할 것이다. 일 구현예에서, 항체는 표지 기로 표지된다. 대안적으로, 시험물질은 표지되고, 유리된 시험 물질의 양은 항체의 존재 및 부재로 모니터링 한다.
- [267] 그 외 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 다양한 유용성을 가진다. 예를 들면 특이적 결합 분석, 친화도를 기초로 한 α -Syn 정제, 또는 α -Syn 길항제 규명을 위한 스크리닝 방법 등에 사용될 수 있다.
- [268] 치료방법: 약학적 제형, 투여 경로
- [269] 본원에 따른 항체 또는 항원결합 단편은 α -Syn 응집체의 생성을 억제하고, 분해를 촉진하며, 세포 간 전달을 억제하여, 상술한 바와 같은 α -Syn 응집체와 관련된 질환의 치료에 유용하다.
- [270] 이에 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 사용한 치료 방법이 또한 제공된다. 일 구현예에서 항체는 환자에 제공된다. 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편이 사용되어 효과를 볼 수 있는 질환의 종류 및 환자는 앞서 언급한 바와 같다.
- [271] 일 구현예에서 본원에 따른 항체는 혈관뇌장벽 통과를 위해 전달체와 연결되어 사용될 수 있다. 혈관뇌장벽을 통하여 약물을 전달하기 위한 다수의 방법이 개시되어 있다. 예를 들면 브래드키닌, 또는 HIFU(High density focues ultrasound)과 같은 방법을 사용하여 BBB의 삼투압을 와해시키는 방법이 있다. 또한 세포에 내재된 글루코스 및 아미노산 전달체, 인슐린 또는 트랜스페린의 수용체 매개 트랜스사이토시스와 같은 전달 시스템의 사용 또는 당단백질의

활성 유출 전달(efflux transporter)을 차단하는 것을 포함한다. 예를 들면 수용체 매개 트랜스사이토시스(Transcytosis)의 시스템의 수용체의 예는 다음과 같다: insulin receptor (e.g., human insulin receptor), transferrin receptor, LRP (e.g., LRP1, LRP6 and LRP8), melanocortin receptor, nicotinic acetylcholine receptor, VACM-1 receptor, IGFR, EPCR, EGFR, TNFR, Leptin receptor, M6PR, Lipoprotein receptor, NCAM, LIFR, LfR, MRP1, AchR, DTr, Glutathione transporter, SR-B1, MYOF, TFRC, ECE1, LDLR, PVR, CDC50A, SCARF1, MRC1, HLA-DRA, RAMP2, VLDLR, STAB1, TLR9, CXCL16, NTRK1, CD74, DPP4, endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3, glucocorticoid receptor, ionotropic glutamate receptor, M3 receptor, aryl hydrocarbon receptor, GLUT-1, inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor, N-methyl-D-aspartate receptor, S1P1, P2Y receptor, TMEM30A, 및 RAGE.

- [272] 또 다른 구현예에서 본원에 따른 항체는 다른 치료제와 연결되어 병합사용되어, α -Syn 응집체와 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [273] 항체의 치료적 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 방부제 및/또는 보조제를 포함하는 약학적 조성물도 또한 제공된다. 또한, 예를 들면, 이러한 약학적 조성물을 투여함으로써 α -Syn와 연관된 환자를 치료하는 방법이 포함된다. 용어 "환자"는 인간 환자를 포함한다.
- [274] 허용가능한 제형 물질은 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다. 특정 구현예에서, 치료적 유효량의 인간 α -Syn 항체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [275] 특정 구현예에서, 허용가능한 제형 물질은 바람직하게는 사용되는 용량 및 농도에서 환자에게 무독성이다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은, 예를 들면, 조성물의 pH, 오스몰농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 향기, 무균성, 안정성, 용해 또는 방출의 속도, 흡수 또는 침투의 변경, 유지 또는 보존을 위한 특정 제형 물질을 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 적절한 제형 물질에는 아미노산(예: 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신); 항미생물제; 산화방지제(예: 아스코르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨); 완충제(예: 붕산염, 중탄산염, Tris-HCl, 구연산염, 인산염 또는 다른 유기산); 벌크화제(예: 만니톨 또는 글리신); 킬레이트화제(예: 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)); 착화제(예: 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-사이클로덱스트린 또는 하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린); 충전제; 당류; 이당류; 및 기타 탄수화물(예: 글루코스, 만노스 또는 덱스트린); 단백질(예: 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제, 풍미제 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체(예: 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩타이드; 염-형성 반대이온(예: 나트륨); 방부제(예: 벤잘코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페닐알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소); 용매(예: 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당 알코올(예: 만니톨 또는 소르비톨); 현탁제; 계면활성제 또는

습윤제(예: 플루로닉스(Pluronic), PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트, 예를 들면, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 티록사팔); 안정성 증진제(예: 수크로스 또는 소르비톨); 강장 증진제(예: 알칼리성 금속 할라이드, 바람직하게는, 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨 소르비톨); 전달 비히클; 희석제; 부형제 및/또는 약학적 보조제가 포함되지만 이로 제한하는 것은 아니나, 예를 들어, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company을 참조할 수 있다.

- [276] 특정 구현예에서, 최적의 약학적 조성물은, 예를 들면, 목적하는 투여 경로, 전달방법 및 목적하는 용량에 따라서 당업자에 의해 결정될 것이다 (상기 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 참조). 특정 구현예에서, 이들 조성물은 본원에 개시된 항체의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 클리어런스(clearance)의 속도에 영향을 줄 수 있다. 특정 구현예에서, 약학적 조성물 중의 주요한 비히클 또는 담체는 수성 또는 비-수성일 수 있다. 예를 들면, 적절한 비히클 또는 담체는 가능하게는 비경구 투여용 조성물에서 통상적인 다른 물질로 보충된 주사용수, 생리 염수 용액일 수 있다. 또한 중성의 완충된 염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 염수는 비히클로 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 약학적 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 Tris 완충제, 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세테이트 완충제를 포함하고, 소르비톨 또는 적절한 대체물을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 α -Syn 항체 조성물은 저장을 위해, 동결건조된 케이크 또는 수용액의 형태로 목적하는 정도의 순도를 갖는 선택된 조성물을 임의의 제형화제(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 참조)와 혼합하여 제조될 수 있다. 추가로, 특정 구현예에서, 인간 α -Syn 항체는 적절한 부형제, 예를 들면, 수크로스를 사용하여 동결건조물(lyophilizate)로서 제형화될 수 있다.
- [277] 약학적 조성물은 비경구 전달될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 소화관을 통한, 예를 들면, 경구로 흡입 또는 전달될 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 조성물의 제조는 당해 기술 분야의 기술수준의 범위내이다.
- [278] 제형에 필요한 성분은 바람직하게는 투여 부위에 허용되는 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, 완충제가 조성물을 생리학적 pH 또는 약간 낮은 pH, 전형적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내로 유지하기 위하여 사용된다.
- [279] 비경구 투여의 경우, 치료적 조성물은 목적하는 인간 α -Syn 결합 단백질을 약학적으로 허용가능한 비히클 내에 포함하며, 파이로젠을 포함하지 않는 비경구에 허용되는 수용액의 형태로 제공될 수 있다. 비경구 주입에 특히 적합한 비히클은 무균 증류수이고, 여기서 인간 α -Syn 항체는 적절하게 보존된 무균 등장성 용액으로 제형화된다. 특정 구현예에서, 이러한 제형은 데포 주입(depot injection)을 통해 전달될 수 있는, 조성물의 조절 방출 또는 서방형 방출을 제공할 수 있는 제제, 예를 들면, 주사가 가능한 미소구(microsphere), 생체-부식성 입자,

중합체성 화합물(예: 폴리락트산 또는 폴리글리콜산), 비드 또는 리포솜을 이용한 제형화를 수반할 수 있다. 특정 구현예에서, 혈액에서의 지속 시간을 증가시키는 효과를 갖는 히알루론산이 또한 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 목적하는 항체를 전달하기 위하여 이식가능한 약물 전달 장치(implantable drug delivery device)가 또한 사용될 수 있다.

- [280] 또한 약학적 조성물은 흡입용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 인간 α -Syn 항체는 건성의 흡입가능한 분말로서 제형화된다. 특정 구현예에서, 인간 α -Syn 항체 흡입 용액은 또한 에어로졸 전달용 추진제로 제형화될 수 있다. 특정 구현예에서, 용액은 분무될 수 있다. 이러한 폐 투여 및 제형화 방법은 국제 특허출원 제PCT/US94/001875호에 추가로 기재되어 있다. 일부 제형은 경구 투여될 수 있다. 이러한 방식으로 투여되는 인간 α -Syn 항체는 고형 투약체, 예를 들면, 정제 및 캡슐의 제조에 통상적으로 사용되는 담체와 함께 또는 이들 담체 없이 제형화될 수 있다. 특정 구현예에서, 캡슐은 생체이용율이 극대화되고 전-전신 분해(pre-systemic degradation)가 최소화되는 위장관 내의 지점에서 제형의 활성 부분을 방출하도록 설계될 수 있다. 인간 α -Syn 항체의 흡수를 촉진시키기 위해 추가의 제제가 포함될 수 있다. 희석제, 풍미제, 저융점 왁스, 식물성 오일, 윤활제, 현탁제, 정제 붕해제, 및 결합제도 또한 사용될 수 있다.
- [281] 일부 약학적 조성물은 정제의 제조에 적합한 무독성 부형제와 혼합된 유효량의 인간 α -Syn 항체를 포함한다. 무균수, 또는 다른 적절한 비히클에 정제를 용해시킴으로써, 용액은 단위 투약체(unit-dose form)로 제조될 수 있다. 적절한 부형제에는 불활성 희석제, 예를 들면, 탄산칼슘, 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 락토스 또는 인산칼슘; 또는 결합제, 예를 들면, 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 또는 윤활제, 예를 들면, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 활석이 포함되지만 이로 제한되는 것은 아니다.
- [282] 지속된- 또는 조절된-전달 제형을 포함하는 기타 인간 α -Syn 항체를 포함하는 제형을 비롯한 추가의 약학적 조성물은 당업자에게 명백할 것이다. 다양한 다른 지속- 또는 조절-전달 수단, 예를 들면, 리포솜 담체, 생물-부식성 미립자 또는 다공성 비드 및 데포 주입물을 제형화하는 기술도 또한 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 다공성 중합체성 미립자의 조절된 방출을 기재하고 하고 있는 PCT/US93/00829호가 참조될 수 있다. 지속-방출 제제는 성형된 물품, 예를 들면, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 지속 방출 매트릭스는 폴리에스테르, 하이드로겔, 폴리락티드(미국 특허 제3,773,919호 및 유럽 특허출원 공보 제EP 058481호에 개시), L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), 폴리(2-하이드록시에틸-인에타크릴레이트)(Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; 및 Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), 에틸렌 비닐 아세테이트(Langer et al., 1981, 상기) 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산(유럽 특허출원 공보 제EP 133,988호)을 포함할

수 있다. 지속 방출 조성물은 또한 당해 기술 분야에 공지된 여러 방법 중의 하나에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 포함할 수 있다. 예를 들어, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; 유럽 특허출원 공보 제EP 036,676호; 제EP 088,046호 및 제EP 143,949호를 참조할 수 있다.

- [283] 생체내 투여에 사용되는 약학적 조성물은 전형적으로 무균 제제로서 제공된다. 무균은 무균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조될 때, 동결건조 때는 물론, 이를 용액에 녹이는 과정이 무균적으로 수행되어야 한다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조된 형태 또는 용액으로 저장될 수 있다. 비경구 조성물은 예를 들면, 피하 주사침이 들어갈 수 있는 마개가 달린 바이알 또는 정맥투여용 용액 백과 같은 일반적으로 무균의 접근 포트(sterile access port)를 갖는 용기에 포함된다.
- [284] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 제조합 항체를 발현하는 세포는 전달을 위하여 캡슐화 될 수 있다 (Invest. Ophthalmol Vis Sci 43:3292-3298, 2002; 및 Proc. Natl. Acad. Sciences 103:3896-3901, 2006).
- [285] 특정 제형에서, 항체는 적어도 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml 또는 150 mg/ml의 농도를 갖는다. 일부 제형은 완충제, 수크로스 및 폴리소르베이트를 포함한다. 제형의 일례는 50-100 mg/ml의 항체, 5-20 mM 나트륨 아세테이트, 5-10% w/v 수크로스, 및 0.002-0.008% w/v 폴리소르베이트를 포함하는 것이다. 특정 정제는, 예를 들면, 9-11 mM 나트륨 아세테이트 완충제 중의 65-75 mg/ml의 항체, 8-10% w/v 수크로스, 및 0.005-0.006% w/v 폴리소르베이트를 포함한다. 이러한 특정 제형의 pH는 4.5-6의 범위 내이다. 다른 제형은 5.0-5.5의 pH(예를 들면, 5.0, 5.2 또는 5.4의 pH)를 갖는다.
- [286] 일단 약학적 조성물이 제형화되면, 이는 용액, 현탁액, 겔, 에멀전, 고체, 결정, 또는 탈수되거나 동결건조된 분말로서 무균 바이알 내에 저장될 수 있다. 이러한 제형은 즉시 사용가능한 형태, 또는 투여 직전에 재구성되는 형태(예를 들면, 동결건조됨)로 저장될 수 있다. 단일-용량 투여 단위체를 생성하기 위한 키트도 또한 제공된다. 이러한 키트는 건조된 단백질을 갖는 제1 용기 및 수성 제형을 갖는 제2 용기를 포함한다. 특정 구현예에서, 단일 및 복수-챔버가 있는 미리-충전된 시린지를 포함하는 키트가 제공된다. 사용되는 인간 α -Syn 항체-포함 약학적 조성물의 치료적 유효량은, 예를 들면, 치료적 상황 및 목적에 좌우될 것이다. 당업자라면 치료에 적절한 용량은 적어도 부분적으로 인간 α -Syn 항체가 사용되는 질환, 투여 경로, 및 환자의 신체 상태(체중, 체표면 또는 기관 크기) 및/또는 상태(연령 및 전반적인 건강)에 따라 달라질 것을 이해할 수 있을 것이다. 특정 구현예에서, 임상가는 최적 치료 효과를 획득하기 위하여 최적 용량을 결정하고 투여 경로를 변경할 수 있다.
- [287] 전형적인 투여량은 상기 언급한 요소를 고려하여 약 1 μ g/kg 내지 약 30 mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 특정 구현예에서, 용량은 10 μ g/kg 내지 약 30

mg/kg, 선택적으로 0.1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 또는 대안적으로 0.3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 범위일 수 있다. 일부 경우에, 용량은 0.5 mg/kg 내지 20 mg/kg이다. 일부 경우에, 항체는 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 또는 20 mg/kg으로 투여된다.

- [288] 투여 빈도는 사용된 제형의 인간 α -Syn 항체의 약물동태학적 파라미터에 좌우될 것이다. 전형적으로, 임상의는 목적하는 효과를 달성하는 용량이 도달될 때까지 조성물을 투여한다. 따라서, 조성물은 시간의 걸쳐 단일 복용량(single dose), 또는 2회 또는 그 이상의 복용량으로서 투여되거나, 또는 이식가능한 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 용량은 적절한 용량-반응 데이터의 사용을 통하여 확인될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체는 오랜 시간에 걸쳐 환자에 투여될 수 있다. 항체의 만성적 투여는 완전 인간인 아닌 항체, 예를 들면, 비-인간 동물에서 인간 항원에 대하여 생성된 항체, 예를 들면, 비-완전 인간 항체 또는 비-인간 동물에서 생성된 비-인간 항체는 통상적으로 수반되는 유해한 면역 반응 또는 알레르기 반응을 최소화한다.
- [289] 약학적 조성물의 투여 경로는 공지된 방법, 예를 들면, 경구; 정맥내, 복막내, 뇌내(실질내), 뇌실내, 근육내, 안구내, 동맥내, 문맥내, 또는 병소내 경로를 통한 주사; 지속 방출 시스템 또는 이식 장치가 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 볼루스 주사에 의해, 또는 주입 또는 이식 장치에 의해 연속적으로 투여될 수 있다.
- [290] 조성물은 또한 목적하는 분자가 흡수되거나 캡슐화되어 있는 막, 스펀지 또는 기타 적절한 물질을 이식하여 국소 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 이식 장치가 사용되는 경우에, 상기 장치는 임의의 적절한 조직 또는 기관 내로 이식될 수 있고, 목적하는 분자의 전달은 확산, 시간에 맞춘 볼루스 또는 연속 투여를 통해 달성될 수 있다.
- [291] 또한, 생체외에서 인간 α -Syn 항체 약학적 조성물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 환자로부터 제거된 세포, 조직 또는 기관은 인간 α -Syn 항체 약학적 조성물에 노출되고, 이후 세포, 조직 및/또는 기관은 후속적으로 환자 내로 이식된다.
- [292] 특히, 인간 α -Syn 항체는 폴리펩타이드를 발현하고 분비하기 위하여, 본원에 기재된 것들과 같은 방법을 사용하여 유전자 조작된 특정 세포를 이식함으로써 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, 이러한 세포는 동물 또는 인간 세포일 수 있고, 자가조직, 타가조직, 또는 이종 유래일 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 불멸화될 수 있다. 다른 구현예에서, 면역반응을 감소시키기 위하여, 세포는 주변 조직으로의 침투를 막기 위해 캡슐화될 수 있다. 추가의 구현예에서, 캡슐화 물질은 전형적으로 단백질 생성물의 방출을 가능하게 하지만, 환자의 면역계 또는 주변 조직으로부터 다른 유해 인자에 의한 세포의 파괴를 방지하는 생물적합성의 반-투과성 중합성 인클로저 또는 막이다.
- [293] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나

하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

- [294] 본원에서 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화 등과 관련해서 본원에 사용된 용어 및 기술은 본 기술분야에서 널리 사용되며, 알려진 것이다. 본원에 개시된 방법 및 기술은 달리 언급이 없는 세포생물학, 세포배양, 분자생물학, 유전자 형질전환 기술, 미생물학, DNA 재조합기술, 면역학의 당업자의 기술수준 내인 통상의 기술을 사용하여 실시될 수 있다. 일반적인 기술에 관한 보다 자세한 설명은 다음의 책 및 문헌을 참조할 수 있다. 분자생물학 및 생화학에 관한 일반적인 방법에 관해서는 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel et al., eds.); 및 Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press); Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 등을 참조할 수 있다. 단백질 반응 및 정제 기술은 당업계에서 통상적으로 또는 본원에 기재된 바와 같이 제조자의 방법에 따라 수행된다. 본원에서, 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의약 및 약학 화학 실험 기술 및 방법과 관련되어 사용되는 용어는 당업계에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것이다. 화학 합성, 화학 분석, 약학제제, 약학제형 및 투여, 환자 치료 등에는 표준 기술을 사용할 수 있다.
- [295] 실시예 1: α -syn 항체의 제조
- [296] 실시예 1-1: 마우스 모노클로날 항체
- [297] 면역화
- [298] 항원으로는 전장(140 잔기) 또는 C-말단 21개 잔기가 절단된 α -syn 단량체를 37도 thermomixer C에 넣고 14일 동안 1050 rpm으로 흔들며 응집화 시켰으며 소니케이션 하여 사용하였다. 상기 제조된 1 mg/ml 농도의 140개 및 119개 잔기의 α -syn fibril 각각을 아주번트와 1:1(vol : vol)로 혼합하여 잘 섞어 주었다.
- [299] 이어, 상기 준비한 혼합물 200 μ L를 5~7주령 BALB/c 암컷 마우스의 피하에 주사하였고, 2주 후에 동일한 방법으로 제조한 혼합물 200 μ L를 추가로 피하주사 하여 부스팅시켰다. 부스팅 1주일 후에 혈액을 채취하여 투여항원을 붙인 ELISA 방법을 사용하여 면역화 적정(immunization titration)을 수행하였다. 이어 3차 부스팅은 항원만을 피하주사 하였다.
- [300] 하이브리도마 생산

- [301] 이어 상기와 같이 면역이 완료된 마우스의 비장을 제거하여, 이로부터 세포를 확보하였다. 이어 비장 세포를 10% FBS가 첨가된 Hybridoma-SFM 배지(Thermo Fisher Scientific, USA)에 현탁시켰다. 하이브리도마를 제조하기 위해 무린 골수종 세포인 SP2/0-Ag14와 비장 세포를 혈청이 포함되지 않은 Hybridoma-SFM 배지에서 혼합한 후 원심분리를 하여 배지를 제거하였다. 이어 세포 펠렛에 PEG를 첨가한 후 37°C에서 1분간 배양하여 세포 융합을 유도하였다.
- [302] 단세포 클로닝
- [303] 융합 2주 후에, 세포 배양 배지를 이용하여 마우스에 투여한 항원을 붙인 ELISA 방법을 사용하여 항체를 생산하는 마우스 B 세포와의 융합을 확인하였다. 이어 하이브리도마를 이용하여 단세포 클로닝을 수행하여 단클론항체를 생산하는 하이브리도마를 총 16개 선별하였다. 전장(140 잔기) α -syn 응집체를 항원으로 이용하여 1E4 및 9B11(각각 IgG1 kappa, IgG3 kappa 및 IgG3 kappa) 클론을 수득하였고, C-말단 21개 잔기가 절단된 α -syn 응집체를 항원으로 이용하여 3A9, 10F10 및 11F11 (각각 IgG2b kappa, IgG2a kappa, IgG2b kappa)의 클론을 수득하였다.
- [304] 항체의 정제
- [305] 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에서 각 하이브리도마를 배양하다 항체 생산을 위해 serum이 없는 SFM 배지로 배양 배지를 교체한 후 4일 정도 배양한다. 세포 배양 상층액을 분리하여 원심분리한 후 0.22 μ m 필터로 거른 후 IgG1 타입은 protein G column으로 나머지 항체들은 protein A column으로 정제하였다.
- [306] 가변영역 서열 결정
- [307] 가변영역 및 CDR 서열은 Ahn et al, Mol. Cells 2004, 18(2):237-241 논문을 참조하여 결정하였다. 하이브리도마를 배양한 후 원심분리하여 세포만을 분리하였다. 분리된 하이브리도마에 트라이졸을 넣어 RNA를 분리하였으며 이를 템플릿으로 하여 cDNA를 합성한 후 염기서열 분석을 통해 가변영역 및 CDR 서열을 확인하였다.
- [308] 아미노산 서열은 표 1, 뉴클레오타이드 서열은 표 2에 개시되어 있다.
- [309] 실시예 1-2. 파아지 라이브러리 스크리닝
- [310] 라이브러리 파아지(Library phage) 준비
- [311] 다양성을 가진 인간 유래 ScFv (Single-chain variable fragment) 라이브러리 competent cell(이화여대로부터 도입) 1×10^{10} 개를 클로람페니콜 (Sigma, C0857) 34 μ g/ml, 2% 글루코스 (Sigma, G5400) 및 5 mM $MgCl_2$ (Sigma, M2393)이 포함된 2X YT [Tryptone (CONDA, 1612.00) 17g, 이스트 추출물 (CONDA, 1702.00) 10g, NaCl (Sigma, S7653) 5g] 배지에 접종 후, 37°C에서 3시간 정도 배양하여 OD600 값이 0.5에서 0.7이 되도록 한 후, 헬퍼 파아지(helper phage)를 감염시킨 후, 클로람페니콜 34 μ g/ml, 5 mM $MgCl_2$, 카나마이신 (Sigma, K1876) 70 μ g/ml, 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025)를 첨가한 2X YT 배지에서 30°C, 16시간 동안

배양하여 파아지 패킹을 유도하였다. 이어 배양액을 4500 rpm, 4°C 조건에서 15분 동안 원심분리한 후, 상등액에 4% PEG 6000 (Fluka, 81253)과 3% NaCl (Sigma, S7653)을 첨가하여 잘 녹인 후, 얼음에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 다시 4°C 조건에서 8000 rpm, 20분간 원심분리한 후, 펠렛을 PBS로 현탁한 후, 다시 4°C 조건에서 12000 rpm, 10분간 원심분리 하여 라이브러리 파아지를 포함하는 상등액을 수득하여 새 튜브에 넣어 사용시까지 4°C에서 보관하였다.

[312] 파아지 디스플레이 패닝(panning)

[313] 이어 알파-시뉴클레인 응집체를 단량체 대비 선호하여 결합하는 항체를 선별하기 위해 실시예 1에서 준비한 전장 알파-시뉴클레인 응집체를 이용하여 패닝을 진행하였고, 총 3회 패닝을 다음과 같이 진행하였다.

[314] 구체적으로 면역시험관(immunotube, maxisorp 444202)에 10 μ g/ml 농도의 제조합 시뉴클레인 응집체와 단량체를 PBS에 첨가하여 4°C에서 밤새 시험관 표면에 단백질을 흡착시킨 후 우혈청 알부민(BSA, Bovine serum albumin) 3% 용액을 시험관에 첨가하여 시뉴클레인 응집체 또는 단량체가 흡착되지 않은 표면을 보호하였다. 시험관을 비운 후 BSA 3% 용액에 분산된 10¹²CFU의 항체 파지 라이브러리를 시뉴클레인 단량체 단백질이 흡착되어 있는 면역시험관에 넣고 상온에서 1시간 반응 시켰다(네커티브 선별). 시뉴클레인 단량체에 비결합된 파지들을 회수하여 시뉴클레인 응집체가 부착된 면역시험관에 상온에서 2시간 결합시켰다. 이어 비특이적으로 결합한 파지를 PBS-T(0.05% Tween 20)용액으로 5회~30회 씻어낸 후 남아있는 항원 특이적 파지항체를 100mM 트리에틸아민 용액을 이용하여 회수하였다. 회수된 파지를 1M 트리스 버퍼(pH 7.4)로 중화시킨 후 ER2537 대장균에 37°C에서 1시간 감염시키고 감염된 대장균을 카베니실린을 함유하는 2X YT 한천배지에 도말하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날 배양된 대장균을 4ml의 2X YT 카베니실린 배양액에 현탁하고 15% 글리세롤을 첨가하여 일부는 -80°C에 보관하고 나머지는 다음 라운드의 패닝을 위해 파아지를 제조하였다. 이러한 과정을 총 3라운드 반복하여 항원 특이적인 항체를 증폭시켰다. 패닝 라운드가 진행될수록 PBS-T를 이용한 세척회수를 증가시켜 항원특이적 파지를 증폭 및 농축하였다.

[315] 단일클론 파아지 항체 선별(single clone screening)

[316] 상기 패닝을 통해 수득한 파아지 풀(phage pool)로부터 시뉴클레인 응집체에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 선별하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[317] 농축된 풀로부터 단일클론을 분리하기 위해, LB-테트라사이클린/카베니실린 한천배지에 상기 파아지 풀을 도말한 후 배양하여 단일 콜로니를 확보하였다. 이어 단일 클론을 웰당 400 μ l의 2 X YT-테트라사이클린/카베니실린 배지가 들어간 96 깊은 웰 플레이트에 접종하여 밤새 키운 후, 배양액 10 μ l를 새로운 390 μ l의 2 X YT-테트라사이클린/카베니실린 배지가 포함된 96 깊은 웰 플레이트에 넣어 37°C에서 4시간 배양했다. 상기 배양액에 1mM IPTG 되게 넣어

주고 30°C에서 밤새 배양했다. 밤새 배양한 배양액을 원심분리하여 상등액을 취하였다.

- [318] 이어 다음과 같이 ELISA 방법을 사용하여 시큐클레인 응집체와 결합하는 단일클론 가용성 scFv를 발현하는 클론을 선택하였다 (Steinberger, Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual. 1sted. ColdSpring Harbor Laboratory Press. NY. USA. pp.11.9-11.12). 구체적으로 96 웰 플레이트에 실시예 1-1에서 선별된 7B7 항체를 넣고, 4°C에서 밤새 코팅하였다. 3% BSA를 각 웰당 200 μ L씩 넣어 37°C에서 2시간 블로킹하였다. 이어 시큐클레인 응집체와 단량체를 100ng/well의 농도로 각각 로딩 한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이어 PBS-T 300 μ L로 5회 세척하였다. 상기 준비된 단일 클론 상등액은 3% BSA와 1:1(vol:vol)로 섞은 후 이를 상기 응집체 및 단량체와 결합시킨 플레이트에 100 μ L씩 로딩한 뒤 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이어 PBS-T 300 μ L로 5회 세척한 후, 항-HA HRP 결합 항체를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 5회 세척 하였다. TMB(Tetramethylbenzidine, Sigma, T0440) 100 μ L를 넣어 발색한 후, 1N H₂SO₄ 50 μ L를 넣어 반응을 정지한 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 0.5 이상인 클론들을 결합에 의한 양성반응으로 간주하였으며 BSA 비특이적으로 결합하는 클론들은 배제시켰다.
- [319] 이로부터 시큐클레인 응집체에 특이적으로 결합하는 AC8, AE8, AA9, DG5, AD2, AD7, DG11, DG8 및 DA9 항체 클론을 선별하였고 이 클론들은 단백질 및 염기서열을 분석하였다. 상기 클론들의 핵산서열은 본문 서열번호 169 내지 224에 개시되어 있다.
- [320] 실시예 2. α -Syn 항체를 이용한 항원 결합 특이성 및 결합력 분석
- [321] 실시예 2-1: 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체를 이용한 Dot blot 분석
- [322] 본원에 따른 항체가 네이티브 상태에서의 단량체 또는 응집체에 결합하는 지를 분석하기 위해 Dot blot 실험을 수행하였다. 이를 위해 항원으로서 50 ng 혹은 100 ng의 α -syn 모노머 또는 피브릴 단백질(서울대학교 이승재 교수 lab에서 제조함; Bae et al., J. Neurosci 32:13454, 2012)을 Dot blot apparatus(BioRad)를 이용하여 나이트로셀룰로스 멤브레인에 스팟 로딩하였다. 2배씩 희석한 모노머 또는 피브릴 단백질은 멤브레인의 오른쪽에서부터 왼쪽으로 순차적으로 로딩하였다 (12.5, 25, 50, 100 ng). 멤브레인을 TBST 조성의 5% non-fat dry milk로 1시간 동안 상온에서 블로킹한 뒤, 실시예 1에서 제조한 α -syn 항체를 1 mg/ml의 농도로 1% bovine serum albumin 함유 TBST에 넣고 멤브레인과 해당 항체를 1시간 동안 상온에서 인큐베이션하였다. 이어 TBST로 세척한 뒤 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 2차 항체 및 기질로서 chemiluminescence substrate (NEN)를 제조자의 방법대로 사용하여 신호를 분석하였다. 결과는 LAS-3000 Luminescent Image Analysis System (FUJIFILM Life Science)을 이용하여 이미징하였다. 결과는 도 1에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 본원에 따른 α -syn 항체는 α -syn 모노머와 비교하여, 응집체에만 선택적으로 결합하는 것으로 나타났다.

특히 1E4, 9B11, 3A9 및 11F11은 응집체에만 결합하고, 10F10은 응집체 및 단량체에 모두 결합하는 것으로 나타났다. 274 항체 (Bae et al., J Neurosci. 2012 Sep 26; 32(39): 13454-13469)는 단량체 및 응집체에 모두 결합하는 비교 항체이다.

- [323] 실시예 2-2: 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체를 이용한 ELISA 분석
- [324] 본원에 따른 항체의 항원에 대한 결합력을 정량적으로 분석하기 위해 ELISA를 수행하였다. 이를 위해 본원에 따른 알파-시뉴클레인 항체를 1 mg/ml의 농도로 96웰 플레이트에 코팅한 후, 여기에 10, 100, 1000, 10,000 ng/ml 농도의 알파-시뉴클레인 피브릴 응집체를 처리한 후, PBS로 세척하고, 이어 바이오틴이 결합된 2차 항체 및 HRP가 결합된 스트렙타비딘을 처리한 후 기질로서 TMB와 반응한 후 흡광도를 측정하였다. 결과는 도 2에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 응집체에 높은 결합력으로 선호적으로 결합하는 것으로 나타났다. ELISA 결과를 통해 항체를 분석해 보면 응집체 선호적으로 결합하는 항체들은 $0.1 \sim 2 \times 10^{-9}$ M 정도의 친화력을 보였으며 단량체 및 응집체에 모두 결합하는 항체는 이보다 높은 $\sim 1 \times 10^{-10}$ M값을 보였다.
- [325] 실시예 2-3. 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체를 이용한 BIAcore 분석
- [326] 이어 실시예 1에서 제조된 알파-시뉴클레인 항체의 단량체 및 응집체 항원 결합에 대한 정량적 분석을 BIAcore를 사용하여 수행하였다.
- [327] 기기는 T200 (GEHealthcare, S/N: 1565888)을 사용하였다. Chip은 Protein A를 사용하였으며 (GE Healthcare, Cat. 29-1275-56), Regeneration buffer는 10 mM Glycine-HCl pH1.5 (GE Healthcare, Cat. BR-1003-54), Running buffer와 analyte 희석, 샘플 희석 완충액으로는 HBS-EP를 사용하였다. 실시예 1에서 제조된 α -syn 항체 (3A9, 9B11, 11F11)는 1X HBS-EP (GE Healthcare, Cat. BR-1006-69)로 희석하였으며, α -syn 단량체 (1 mg/ml) 또는 피브릴 단백질 (3 mg/ml) (analyte)은 2배씩 순차적으로 희석하여, 0 nM 포함 총 6개 농도 (0, 0.39, 1.56, 6.25, 25, 100nM)에서 분석하였다. 캡처의 경우 단량체는 표적 RU를 800 (theoretical)으로, 피브릴은 표적 RU를 100 (theoretical)으로 하고, 캡처 phase를 contact time을 60초, flow rate를 30 μ l/min으로, stabilization period를 180초로 진행하였다. association phase에서는 association time을 120초로, flow rate를 30 μ l/min으로 하였으며, dissociation phase에서는 dissociation time을 360초로, flow rate를 30 μ l/min으로 하였다. Regeneration phase에서는, flow rate를 30 μ l/min으로 하여 regeneration time을 240초(1차), 60초(2차), 두 번에 걸쳐 진행하였다. 1:1 binding model을 사용하여 fitting 하였으며, evaluation software는 BIAcore T200 Evaluation software를 사용하였다 (GE healthcare). 결과는 도 3a 및 도 3b에 기재되어 있다. 분석한 4개의 알파-시뉴클레인 항체 중 상술한 다른 방법에서 응집체에 선호적으로 결합하는 항체들인, 3A9, 9B11, 및 11F11이 BIAcore에서도 응집체에만 결합하는 것으로 나타났으며, 약 $1 \sim 3 \times 10^{-9}$ M의 높은 친화도를 갖는 것으로 나타났다.

- [328] 실시예 2-4. 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체를 이용한 Octet 분석
- [329] 실시예 1에서 제조된 알파-시뉴클레인 항체(3A9, 9B11, 11F11)의 단량체 및 응집체 항원 결합에 대한 정량적 분석을 Octet를 사용하여 수행하였다.
- [330] 구체적으로 running buffer는 1X KB buffer (cat. 18-1092) 혹은 1X PBS buffer를 1000 rpm에서 사용하였으며, immobilization buffer는 sodium acetate, pH 5 (10mM, Cat. 18-1068)을 사용하였다. α -syn 모노머는 α -syn 항원을 immobilization 시켰으며, 피브릴의 경우 테스트 항체를 immobilization 시켰다. target concentration은 모노머의 경우 20 μ g/ml, 피브릴의 경우 0.4 μ g/ml로 하였으며, kinetics concentration은 모노머의 경우 50 nM부터, 피브릴의 경우 100 nM부터 2배씩 차례로 희석하여 총 7개의 포인트를 설정하였다. Association/Dissociation 시간은 모노머의 경우 5분/20분, 피브릴은 5분/25분 이었으며, Biosensor는 ARG2를, fitting은 1:1 fitting을 사용하였다.
- [331] 결과는 도 4에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이, 3A9, 9B11 및 11F11의 경우 단량체에는 거의 결합하지 않으며(붉은 점선 박스), 응집체에는 잘 결합하는 것으로 나타났다(붉은 점선 박스 내의 그래프가 올라감). 이러한 결과는 Dot blot, Octet, ELISA에서의 결과들과 유사 혹은 일치하는 결과로, 테스트한 4개의 α -syn 항체 중 상기 다른 방법들에서 응집체에 선호적으로 결합하는 항체들인, 3A9, 9B11 및 11F11이 Octet에서도 응집체에만 결합하는 것으로 나타났다.
- [332] 실시예 2-5. ScFV 항 α -Syn 항체를 이용한 Dot blot
- [333] 실시예 1-2에서 선별된 ScFV 항 α -Syn 항체를 사용하여 실시예 2-1에 기재된 바와 같이 Dot blot을 수행하였다. 항원은 왼쪽 첫 번째 라인부터 6.25ng, 12.5ng, 25ng 및 50ng의 순으로 로딩하였다. 항체는 1 μ g/ml 농도로 처리하였으며 anti-human Fc-HRP 2nd Ab를 이용하여 확인하였다.
- [334] 결과는 도 5에 개시되어 있다. M은 단량체 항원, A는 응집체 항원을 나타낸다. 각 항체의 단량체 또는 응집체에 대한 선택적 결합을 오른쪽에 표로 나타냈다. AA9, AD2, AD7, AC8, DG8, DG11, DA9, DG5은 응집체에만 결합하는 것으로 나타났으며, AE8은 응집체에 선호적으로 결합하며, 단량체에는 매우 약하게 결합하는 것으로 나타났다.
- [335] 실시예 2-6. ScFV 항 α -Syn 항체를 이용한 Octet 분석
- [336] 실시예 1-2에서 선별된 ScFV 항 α -Syn 항체를 사용하여 실시예 2-4에 기재된 바와 같이 Octet 분석을 수행하였다. 결과는 도 6에 개시되어 있다. 이들 항체들은 α -syn 응집체에 $\sim 10^{-9}$ 내지 $\sim 10^{-11}$ M 수준의 높은 친화도를 갖는 것으로 나타났다.
- [337] 실시예 3. 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체의 세포간 알파-시뉴클레인 응집체 전달 억제 효과 분석
- [338] 알파-시뉴클레인 응집체의 세포간 전달이 알파-시뉴클레인 응집체 관련 질환의 한 가지 병인으로 제시되고 있기 때문에, 이를 억제할 수 있는 항체는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 이를 위해 BiFC (bimolecular

fluorescence complementation) 분석을 다음과 같이 수행하였다. BiFc 원리는 도 7의 위에 도식적으로 나타냈다.

[339] BiFC 분석을 위한 세포 배양

[340] 알파-시뉴클레인과 절반의 Venus 형광 단백질 (Venus 1- α Syn(V1S), α Syn-Venus2(SV2))을 각각 발현하는 SH-SY5Y 인간 뉴로블라스토마 세포주는 실험 전까지 종전에 기술된 바와 같이 배양되었다 (Lee H-J et al. J. Neurosci. 2004;24:1888-1896). 실험에 앞서 V1S, SV2를 발현하는 세포 180,000개를 커버슬립 위에 혼합하여 깔아준 뒤 3일간 배양하였다. 계속적인 알파-시뉴클레인의 세포 간 이동을 확인하기 위하여 co-culture는 매 48시간마다 sub-culture 되었다. 별도의 실험에서 6 계대(passage) 정도에서 전달의 정도가 최대임을 확인하였으므로(데이터 나타내지 않음), 본 실시예에서 항체의 세포간 전달 억제효능은 6 계대의 co-culture를 이용하여 분석하였다.

[341] BiFC 실험/항체 처리

[342] 이미징 전 날 co-culture에 50 μ g/ml의 IgG 또는 테스트 항체 (3A9, 9B11, 11F11)를 추가하였다. 각 co-culture에서 나타나는 Venus channel에서의 신호는 알파-시뉴클레인의 응집으로 인한 응집체를 나타내며, 이는 α -syn이 한 세포에서 다른 세포로 이동하여 생성된 응집체로 간주하였다. 이러한 신호는 IN Cell Analyzer (GE Lifescience)로 자동 분석하였다 (기기 설정: puncta size: 0.1~0.4 μ m, intensity: 4000-7000).

[343] 결과는 도 7에 개시되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 파란색은 핵, 초록색은 하나의 세포에서 밖으로 나온 알파-시뉴클레인이 다른 세포내의 α -syn을 만나 응집체를 형성하였음을 나타낸다. 오른쪽 그래프는 시그널의 세기를 나타낸 것이다. 9B11, 11F11, 및 3A9 각 처리군에서는 음성대조군인 IgG 대비 초록색 시그널을 나타내는 세포의 개수가 줄어듦을 알 수 있으며, 이는 본원에 따른 항체가 응집체의 세포간 전달을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.

[344] 실시예 4. 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체의 인비보에서 알파-시뉴클레인 응집체 제거 효과 분석

[345] 본원에서 제조된 α -Syn 항체의 인비보에서 효과를 분석하기 위해, 인간 알파-시뉴클레인을 과발현하는 형질전환 생쥐(mThy-1 human α -synuclein, UC San Diego)에 10 mg/kg의 본원에 따른 항체 또는 IgG를 3개월 동안 매주 복강 투여하였다. 그룹 당 6마리의 생쥐를 사용하였으며, 비형질전환 생쥐(non-transgenic littermate)를 대조군으로 사용하였다. 이어 관류를 다음과 같이 수행하였다.

[346] 마지막 투여가 완료된 후 뇌 내의 병리 분석을 위하여, 인도적 규정에 의하여 해당 동물들은 chloral hydrate로 마취된 뒤, 0.9 %의 생리식염수로 심장 관류되었다. 이어 관류된 뇌의 반쪽(saggital section)은 인산완충액 중의 4% 파라포름알데하이드(pH7.4, 4°C)에 분석 시점까지 보관하였으며, 다른 반쪽은 바로 냉동 상태로 보관하였다(70°C).

- [347] 병리학적 분석은 다음과 같이 이루어졌다. 파라포름알데하이드에 고정된 뇌 반쪽은 Vibratome을 이용하여 free-floating 방식으로 40 μ m 두께의 연속절편으로 잘라내었다. 각 투여군의 뇌 내 α -syn의 발현 정도를 확인하기 위해, cortex, striatum, hippocampus를 포함한 절편을 α -syn 항체 (응집체의 마커인 p129 α -syn 항체, abcam, ab59264 또는 총 α -syn 항체, Cell Signaling Technology, #2642)와 4°C에서 밤새 배양하였다. 또는 정상세포(astrocyte)의 활성 정도, 소교세포(microglia)의 활성 정도 확인을 위해, 상기 절편을 GFAP(glial fibrillary acidic protein)(AB5804, millipore) 혹은 Iba1에 대한 항체(019-19741, Wako)를 각각 처리하였다. 또한 뇌염증(neuroinflammation) 정도를 확인하기 위해, IL-6 (NB600-1131, Novus Biologicals) 또는 IL-1 β 에 대한 항체(ab9722, abcam)를 각각 처리하였다. 1차 항체와의 배양 후에 바이오틴이 결합된 goat anti-rabbit IgG (1:100, Vector Laboratories) 및 Avidin D-horseradish peroxidase (1:200, ABC Elite, Vector Laboratories)를 처리하고 DAB(diaminobenzidine)로 검출하였다. 면역염색된 각 절편은 명시야 현미경으로 관찰하여 광학밀도를 측정하였다.
- [348] 결과는 도 8a 및 도 8b에 개시되어 있다. 도 8a는 α -Syn 응집체의 마커인 p-129 α -Syn 항체(Ser 129번에 인산화가 일어난 α -syn을 인식하는 항체)로 분석한 결과로 본원에 따른 항체가 투여된 TG(TransGenic) 마우스는 IgG만 투여된 대조군 마우스와 비교하여 cortex 및 hippocampus의 CA1 및 CA3에서 응집체 양이 현저하게 줄어든 것으로 나타났다(해당 부위는 IgG 시료에서 화살표 머리로 표시됨). 도 8b는 총 α -Syn 항체로 염색한 결과이다. TG mouse에서 증가한 인간 α -syn은 항체 투여에 의해 효과적으로 제거되었으며 이러한 결과는 본원에 따른 항체가 α -syn 응집체를 효과적으로 감소시켜, 파킨슨 질환과 같은 α -synucleinopathy의 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [349] 실시예 5. 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체의 Microgliosis 및 Astrogliosis 감소 및 염증성 사이토카인 방출 감소 효과 분석
- [350] 글리오시스(gliosis)는 BBB의 손상, TGF-베타 또는 인터류킨과 같은 물질에 의해 촉발되는, 중추신경계에 손상이 있는 경우 이에 대한 반응으로 아교세포(glial cell)에서 일어나는 비특이적 반응이다. 대표적인 것으로, Microgliosis 및 Astrogliosis를 포함하며, 각각 Iba-1 및 GFAP 단백질이 마커로 사용된다.
- [351] 이에 실시예 4에 기술된 바와 같이 본원에 따른 항체를 마우스에 투여하여 Microgliosis 및 Astrogliosis 감소 및 이를 촉발하는 염증성 사이토카인 방출 감소에 미치는 영향을 분석하였다.
- [352] 결과는 도 9a, 도 9b, 도 9c 및 도 9d에 개시되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 대조군과 비교하여, Microgliosis 및 Astrogliosis를 감소시키며, 이를 촉발하는 염증성 사이토카인 IL-1 β 및 IL-6의 방출을 감소시키는 것으로 나타났다.
- [353] 실시예 6. 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체의 인간 뇌 조직에서 루이소체 검출

분석

- [354] 십 마이크로미터 두께의 파라핀 포매된 파킨슨 질환으로 사망한 환자의 뇌조직(Dr. Halliday, University of Sydney) 절편을 실시예 5에 사용된 본원에 따른 항체를 이용하여 조직 절편내 루이소체와 루이 신경돌기(neurite)를 다음과 같이 염색하였다. 90% 포르산으로 조직 절편을 3분간 처리하여 antigen retrieval을 진행한 다음, 1% H₂O₂ (50% ethanol base)를 이용하여 조직 자체의 peroxidase 활성을 억제하였다. 조직의 non-specific binding을 막기 위하여 10% normal horse serum을 처리하였다. 이어 인산완충액으로 세척한 후 본원에 따른 3A9, 11F11 및 11F11 항체를 adjacent section에 4°C에서 밤새 처리하였다. 인산완충액으로 세척 후, 바이오틴이 결합된 anti-인간 IgG 항체를 37°C에서 30분간 처리한 뒤, avidin-biotin complex를 상온에서 30분간 반응시켰다 (Vectastatin Elite kit; Vector Laboratories). 이어 0.005% H₂O₂를 포함한 DAB로 발색하였고, 해당 section을 0.5% cresyl violet으로 카운터 염색하여 각 세포를 구분하였다.
- [355] 결과는 도 10a 및 도 10b에 개시되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 루이소체 및 루이 신경돌기에 효과적으로 결합(화살표로 표시)하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 인간 뇌조직에 있는 루이소체의 구성 성분인 α -syn 응집체에 효과적으로 결합할 수 있음을 의미하는 것이다. 인간 뇌로 전달된 항체가 효과적으로 α -syn 응집체에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여주는 것이다.
- [356] 실시예 7. 마우스 모노클로날 항 α -Syn 항체의 에피토프 분석
- [357] 본원에 따른 3A9 및 11F11 항체에 대한 에피토프 맵핑은 PEPSCAN (The Netherlands)에 펩타이드 어레이 분석을 의뢰하여 수행되었다.
- [358] 결과는 도 11에 개시되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 C-말단을 인식하는 것으로 나타났다. 특히 앞서 설명한 바와 같이 110~122 사이를 인식하는 경우 응집체 선호적인 결합을 나타냈다.
- [359] 전술한 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

청구범위

- [청구항 1] α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편으로, 상기 항체 또는 항원결합 단편은 (i) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3의 상보성 결정부위를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 (ii) CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 상보성 결정부위를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하며, 상기 CDRH1은 서열번호 1 내지 14로부터 선택되고; 상기 CDRH2는 서열번호 15 내지 28로부터 선택되고; 상기 CDRH3은 서열번호 29 내지 42로부터 선택되고, 상기 CDRL1은 서열번호 43 내지 56으로부터 선택되고; 상기 CDRL2는 서열번호 57 내지 70으로부터 선택되고; 상기 CDRL3은 서열번호 71 내지 84로부터 선택되는 것인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 상기 경쇄 가변영역의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 서열은 다음 중 어느 하나인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편:
- (aa) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 1, 15, 및 29, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 43, 57 및 71;
 - (ab) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 2, 16, 및 30, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 44, 58 및 72;
 - (ac) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 3, 17, 및 31, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 45, 59 및 73;
 - (ad) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 4, 18, 및 32, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 46, 60 및 74;
 - (ae) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 5, 19, 및 33, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 47, 61 및 75;
 - (af) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 6, 20, 및 34, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 48, 62 및 76;
 - (ag) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 7, 21, 및 35, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 49, 63 및 77;
 - (ah) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 8, 22, 및 36, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 50, 64 및 78;
 - (ai) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 9, 23, 및 37, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 51, 65 및 79;
 - (aj) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 10, 24, 및 38, 그리고 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 52, 66 및 80;
 - (ak) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 11, 25, 및 39, 그리고

상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 53, 67 및 81;
 (al) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 12, 26, 및 40, 그리고
 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 54, 68 및 82;
 (am) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 13, 27, 및 41, 그리고
 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 55, 69 및 83; 또는
 (an) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 14, 28, 및 42, 그리고
 상기 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3은 각각 서열번호 56, 70 및 84.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은,
 서열번호 85 내지 98로부터 선택되는 아미노산 서열;
 서열번호 85 내지 98로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 서열; 또는
 서열번호 85 내지 98로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은,
 서열번호 99 내지 112로부터 선택되는 아미노산 서열;
 서열번호 99 내지 112로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상; 또는
 서열번호 99 내지 112로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.

[청구항 5] 제 1 항에 있어서,
 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 각각
 서열번호 85 및 99;
 서열번호 86 및 100;
 서열번호 87 및 101;
 서열번호 88 및 102;
 서열번호 89 및 103;
 서열번호 90 및 104;
 서열번호 91 및 105;
 서열번호 92 및 106;
 서열번호 93 및 107;
 서열번호 94 및 108;
 서열번호 95 및 109;
 서열번호 96 및 110;
 서열번호 97 및 111; 또는
 서열번호 98 및 112로 표시되는 서열을 포함하는 것인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.

- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 항체 또는 항원결합 단편은 모노클로날 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, diabody 또는 scFV인 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 모노클로날 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서,
상기 모노클로날 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 형인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 항체는 다음 중 어느 하나의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편:
상기 경쇄 및 중쇄는 각각 서열번호 113 및 서열번호 141; 서열번호 114 및 서열번호 142; 서열번호 115 및 서열번호 143; 서열번호 116 및 서열번호 144; 서열번호 117 및 서열번호 145; 서열번호 118 및 서열번호 146; 서열번호 119 및 서열번호 147; 서열번호 120 및 서열번호 148; 서열번호 121 및 서열번호 149; 서열번호 122 및 서열번호 150; 서열번호 123 및 서열번호 151; 서열번호 124 및 서열번호 152; 서열번호 125 및 서열번호 153; 또는 서열번호 126 및 서열번호 154;로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 항체는 다음 중 어느 하나의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편:
상기 경쇄 및 중쇄는 각각 서열번호 127 및 서열번호 155; 서열번호 128 및 서열번호 156; 서열번호 129 및 서열번호 157; 서열번호 130 및 서열번호 158; 서열번호 131 및 서열번호 159; 서열번호 132 및 서열번호 160; 서열번호 133 및 서열번호 161; 서열번호 134 및 서열번호 162; 서열번호 135 및 서열번호 163; 서열번호 136 및 서열번호 164; 서열번호 137 및 서열번호 165; 서열번호 138 및 서열번호 166; 서열번호 139 및 서열번호 167; 또는 서열번호 140 및 서열번호 168.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원결합 단편은, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체를 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제하는, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 12] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원결합 단편을 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

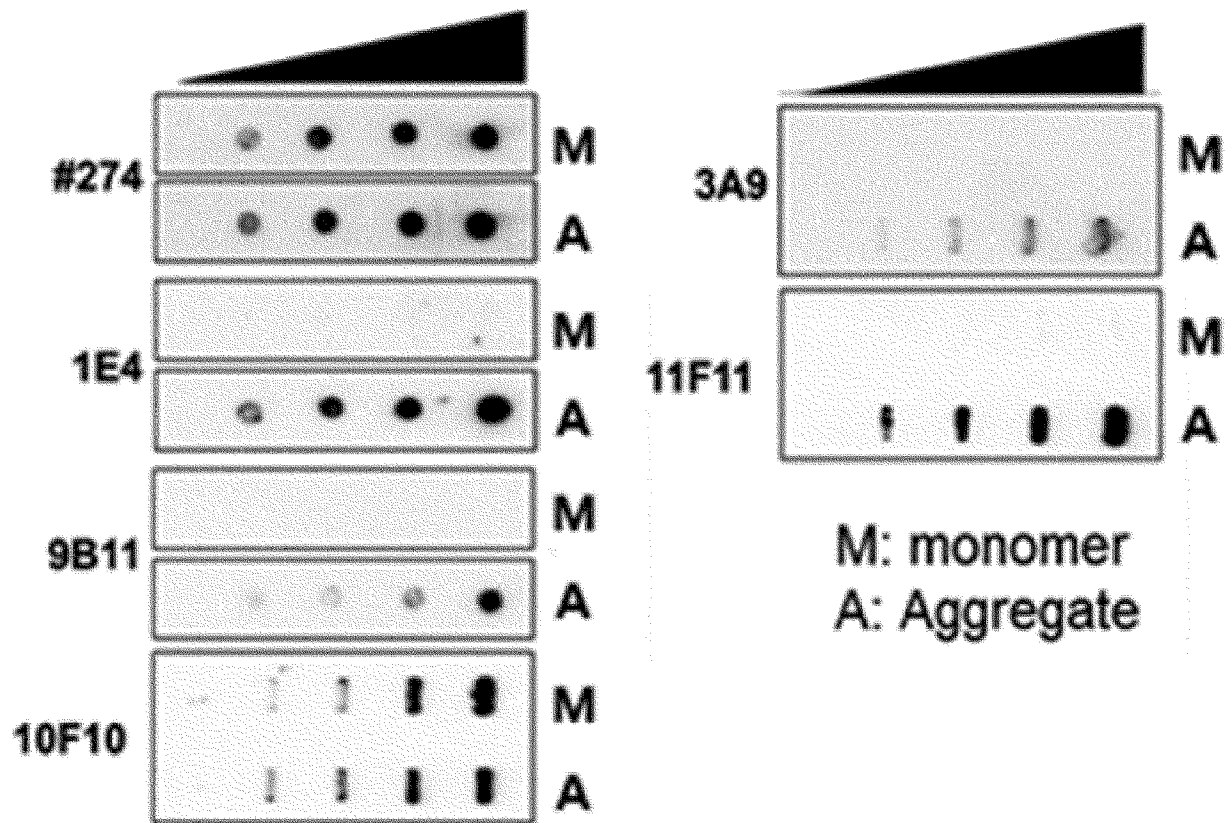
- [청구항 13] 제 12 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 14] 제 13 항에 따른 발현 벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 15] 제 14 항에 따른 세포를 배양하는 단계; 및
상기 세포주로부터 항체 또는 그 항원결합 단편을 분리하는 단계를 포함하는, α -Syn에 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편의 제조 방법.
- [청구항 16] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편을 포함하는, 조성물.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는 α -synucleinopathy의 치료용인, 조성물.
- [청구항 18] 제 17 항에 있어서,
상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 19] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하는 단계; 및
상기 항체 또는 항원결합 단편을 α -Syn 응집체 검출이 필요한 생물학적 시료와 접촉하는 단계를 포함하는 생물학적 시료에서 인비보 또는 인비트로 α -Syn 응집체 검출방법.
- [청구항 20] 약학적으로 유효한 양의 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물을 α -synucleinopathy의 치료 및/또는 α -syn 응집체의 농도 조절이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체의 α -synucleinopathy 치료 또는 상기 대상체에서 α -syn 응집체의 농도를 조절하는 방법.
- [청구항 21] 제 20 항에 있어서,
상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 22] 대상체에서 α -synucleinopathy를 진단하는 방법으로, 상기 방법은
상기 대상체에서 α -Syn 응집체의 농도 및/또는 세포내 위치를 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편으로 측정하는 단계; 및

상기 대상체에서 측정된 상기 α -Syn 응집체의 농도 및/또는 세포내 위치를 대조군 시료의 결과와 비교하는 단계를 포함하며, 상기 대조군의 결과와 유사 또는 차이는 상기 대상체가 α -synucleinopathy에 걸린 것을 나타내는 것인, 방법.

- [청구항 23] 제 22 항에 있어서,
상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 24] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물의 α -synucleinopathy 대상체의 상기 질환 치료용 용도로, 상기 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물은 상기 대상체의 뇌에서, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제하는 것인, 용도.
- [청구항 25] 제 24 항에 있어서,
상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함하는 것인, 용도.
- [청구항 26] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물의 뇌 세포에서 α -Syn 응집체 농도 조절용 용도로, 상기 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물은 상기 대상체의 뇌에서, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제하는 것인, 용도.
- [청구항 27] 뇌에서, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제하는, 뇌 세포에서 α -Syn 응집체 농도 조절용의 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편.
- [청구항 28] α -synucleinopathy 치료에 사용되는 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편.
- [청구항 29] 제 28 항에 있어서,
상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨

병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는
다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함하는 것인, 제 1 항
내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편.

[도1]



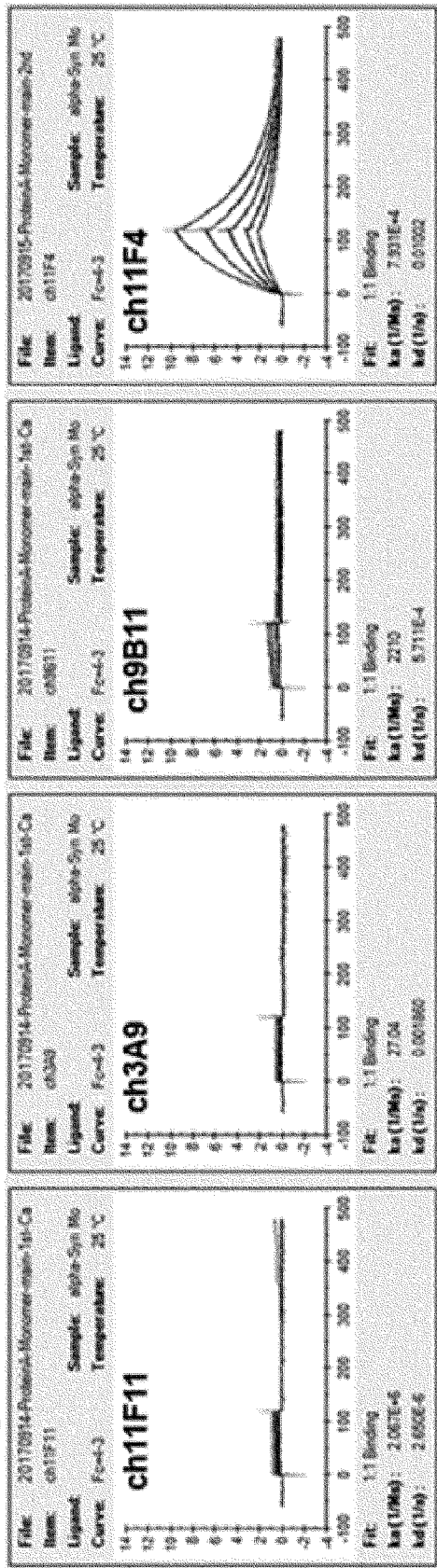
[도2]

Clones	EC50 (ng/ml)		EC50 (nM)	
	Monomers	Fibrils	Monomers	Fibrils
1E4	-	24.47	-	0.163
3A9	-	319.4	-	2.129
9B11	-	184.9	-	1.233
10F10	23.30	13.12	0.155	0.087
11F11	-	326.5	-	2.177
274	26.82	15.13	0.179	0.101

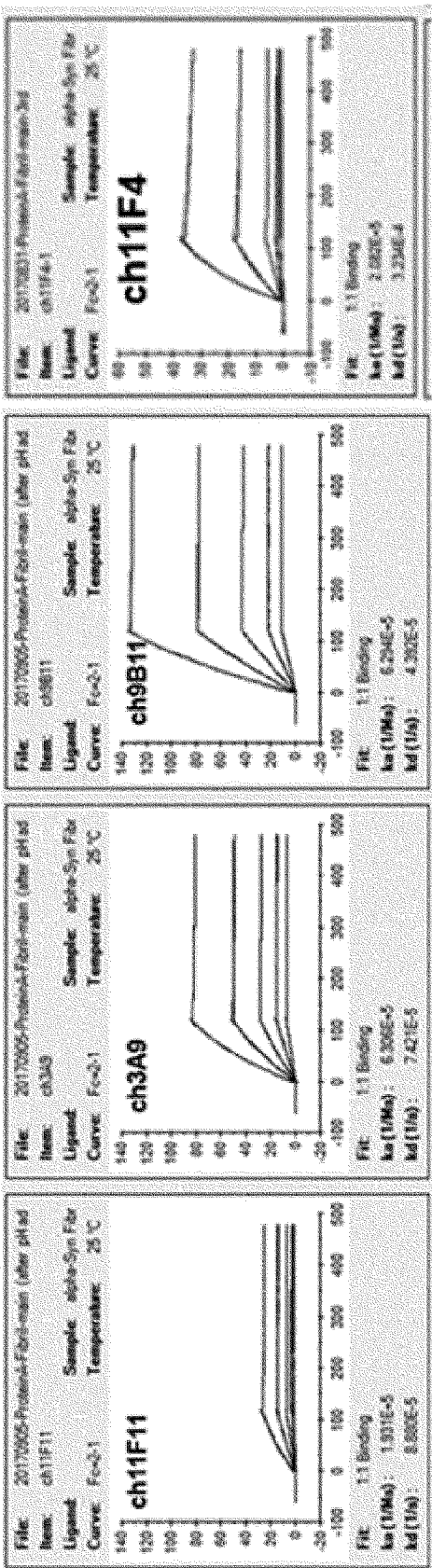
-: tested, but not available

[도3a]

Sensograms with monomers



Sensograms with fibrils

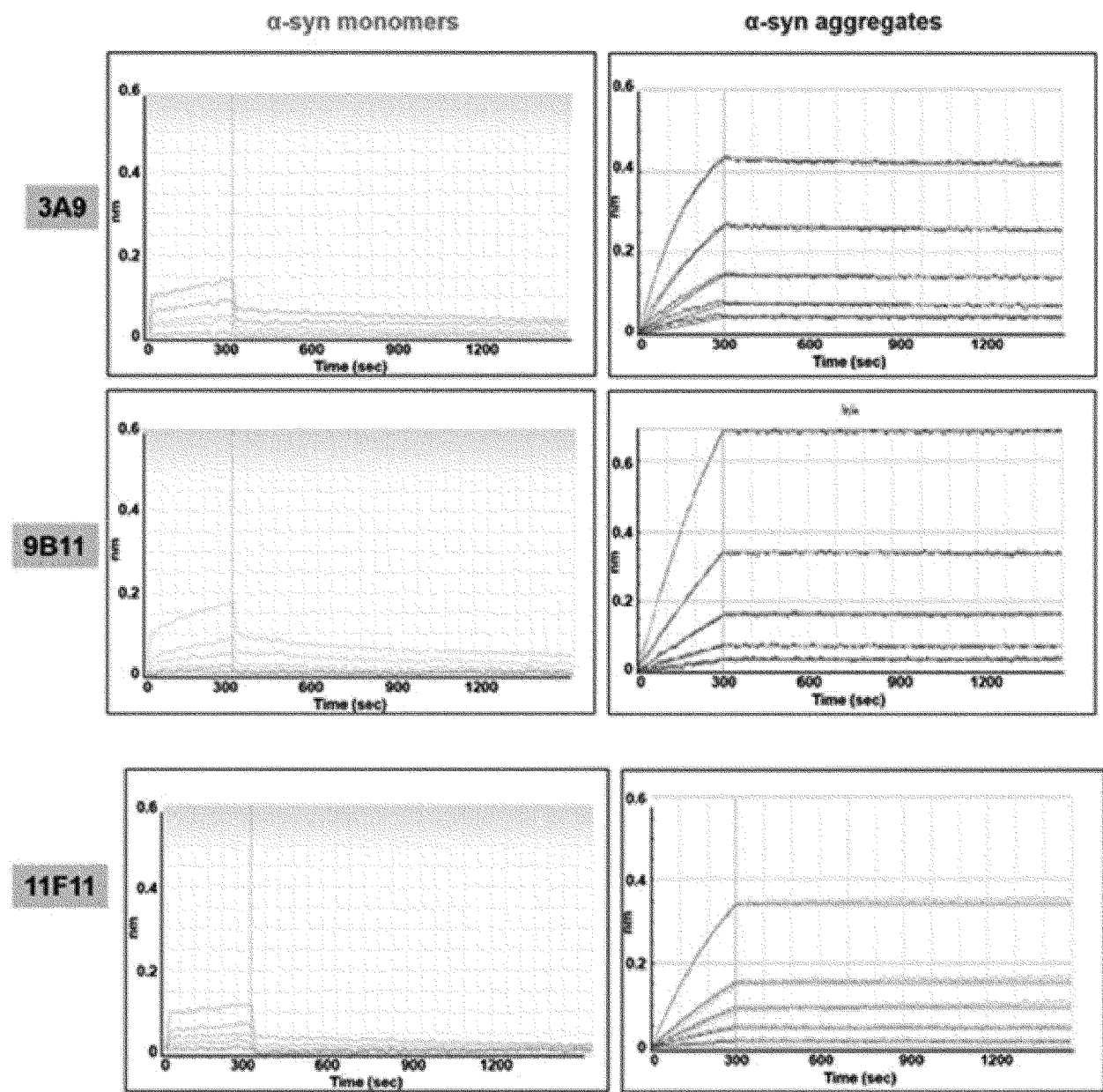


[도3b]

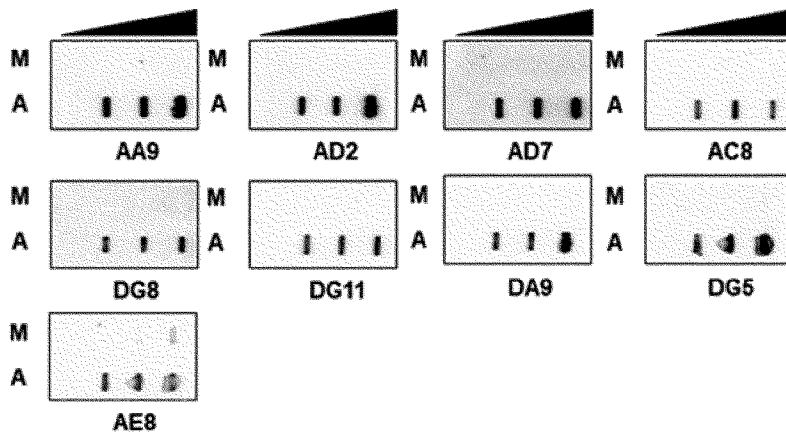
Clones	KD (M, X 10 ⁻⁹)	
	Monomers	Fibrils
3A9	-	1.320
9B11	-	0.904
11F11	-	2.873

-tested, but not available

[도4]



[도5]

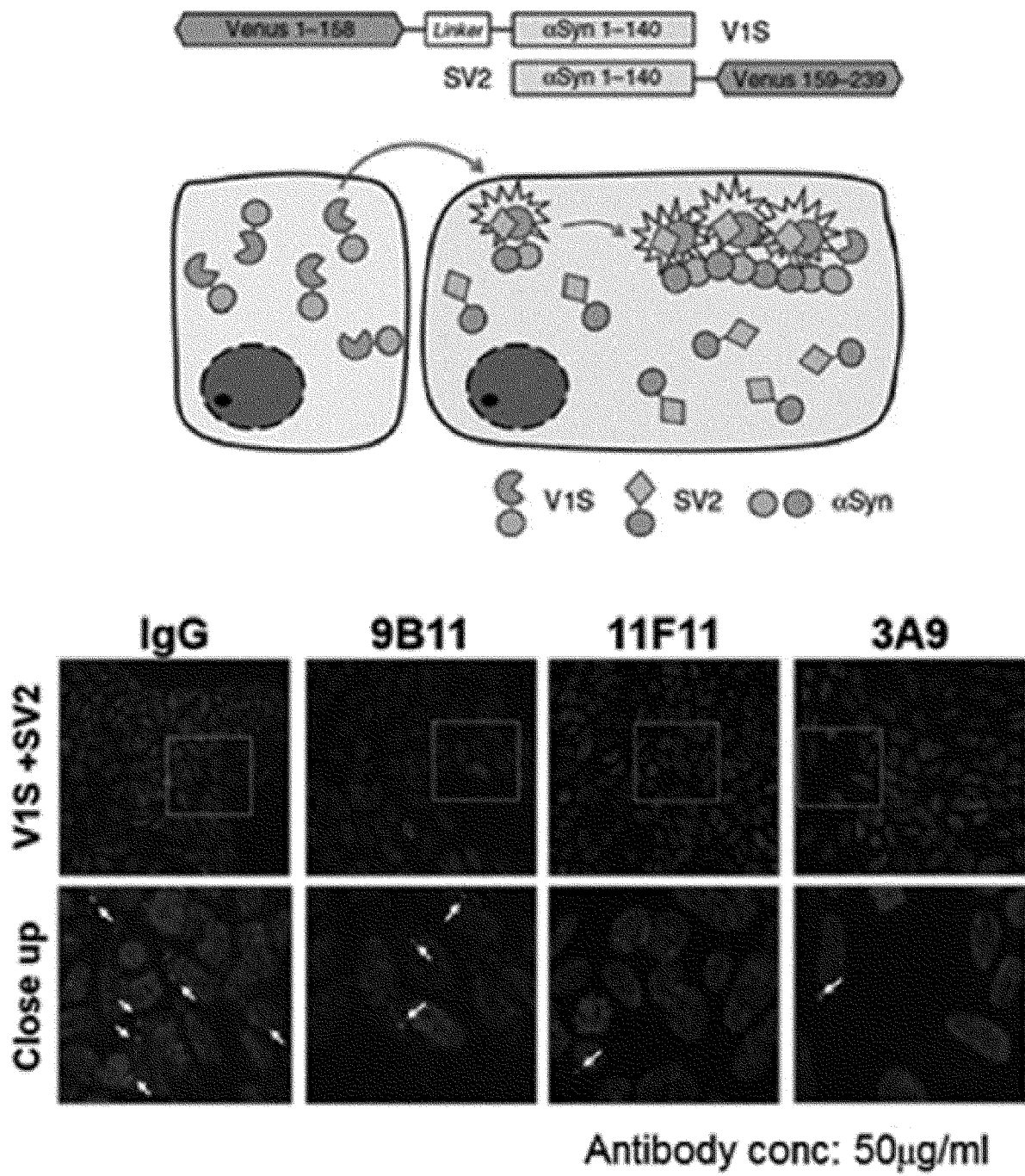


Clones	Selectivity
AA9	Aggregates
AD2	Aggregates
AD7	Aggregates
AC8	Aggregates
DG8	Aggregates
DG11	Aggregates
DA9	Aggregates
DG5	Aggregates
AE8	Both

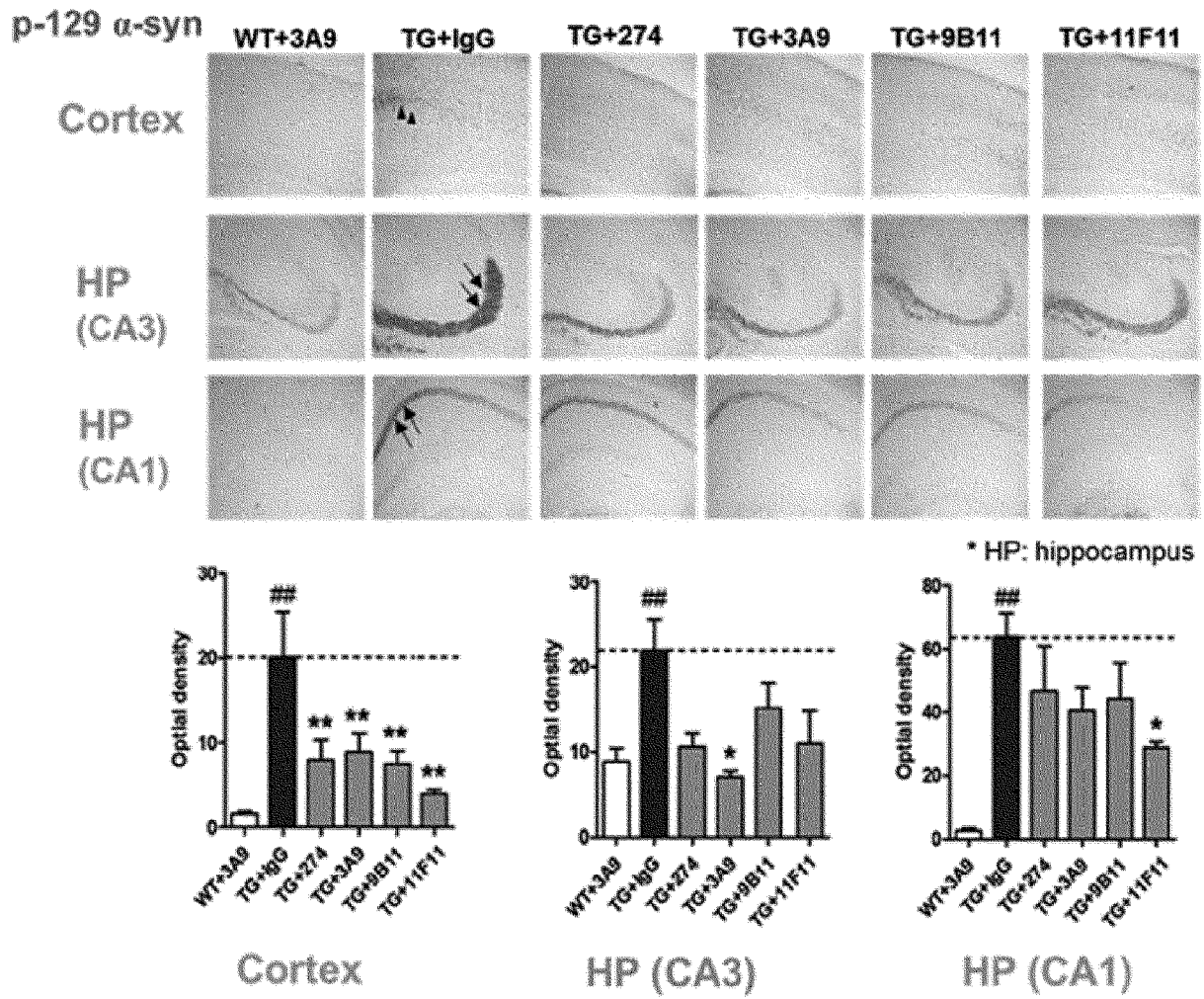
[도6]

Clones	KD (10^{-9} M)	Clones	KD (10^{-9} M)
1E4	0.18	AA9	0.88
10F10	0.81	DG5	1.26
11F4	0.14	AD2	1.67
3A9	0.13	AD7	0.17
9B11	0.018	DG11	2.66
11F11	0.16	DG8	3.80
AC8	0.24	DA9	4.31
AE8	0.39		

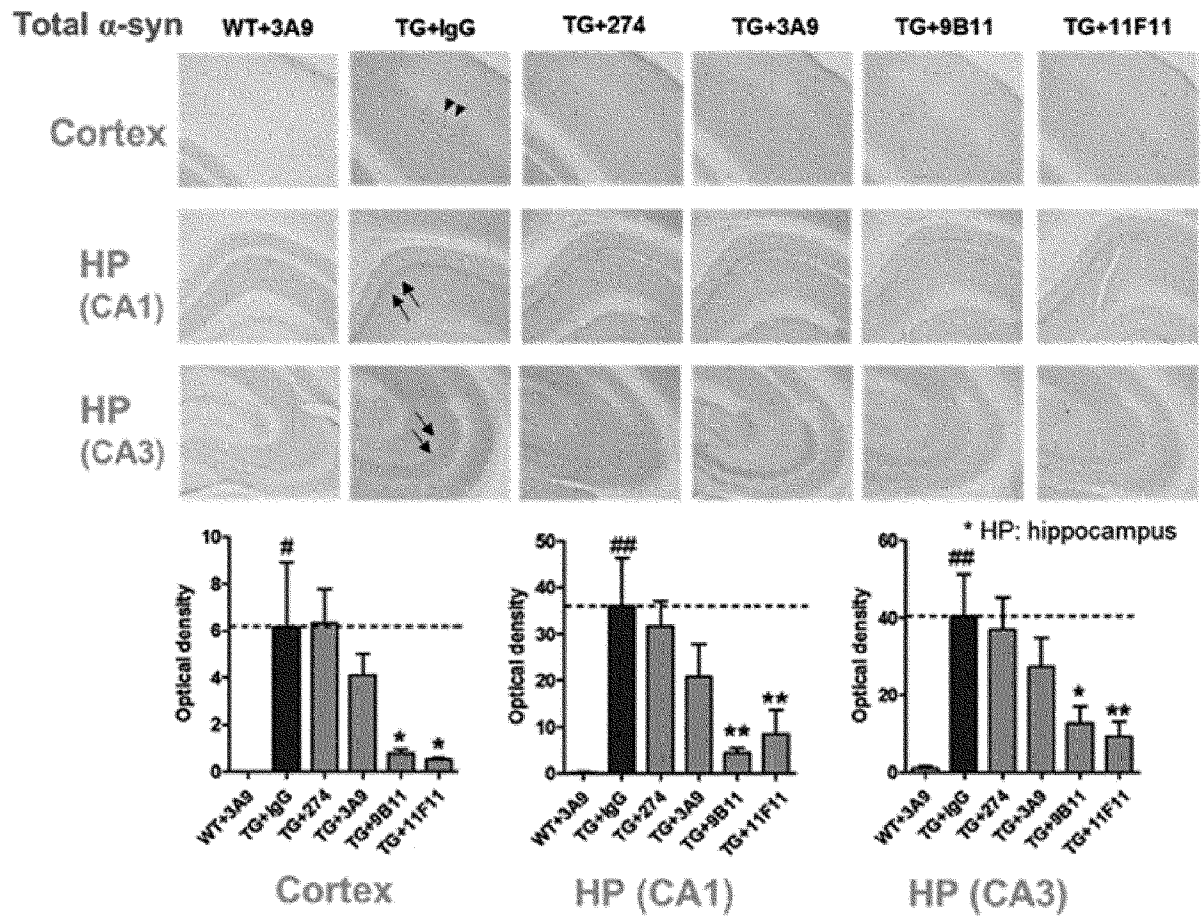
[도7]



[도8a]

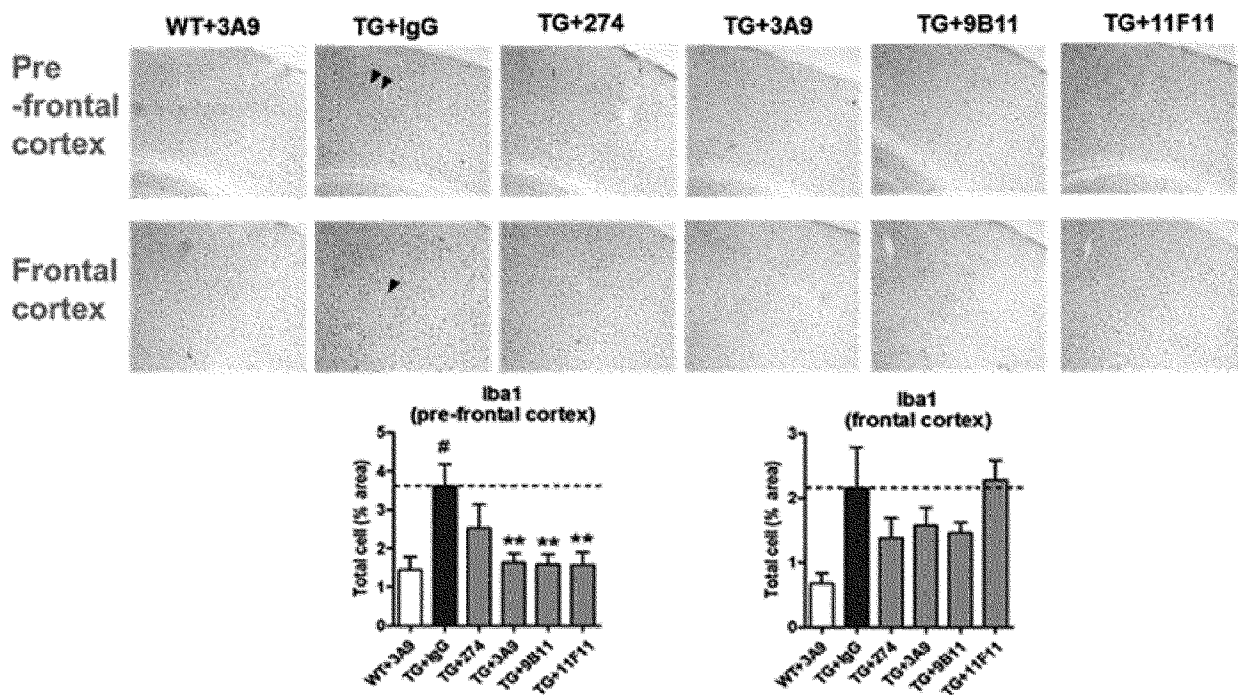


[도8b]



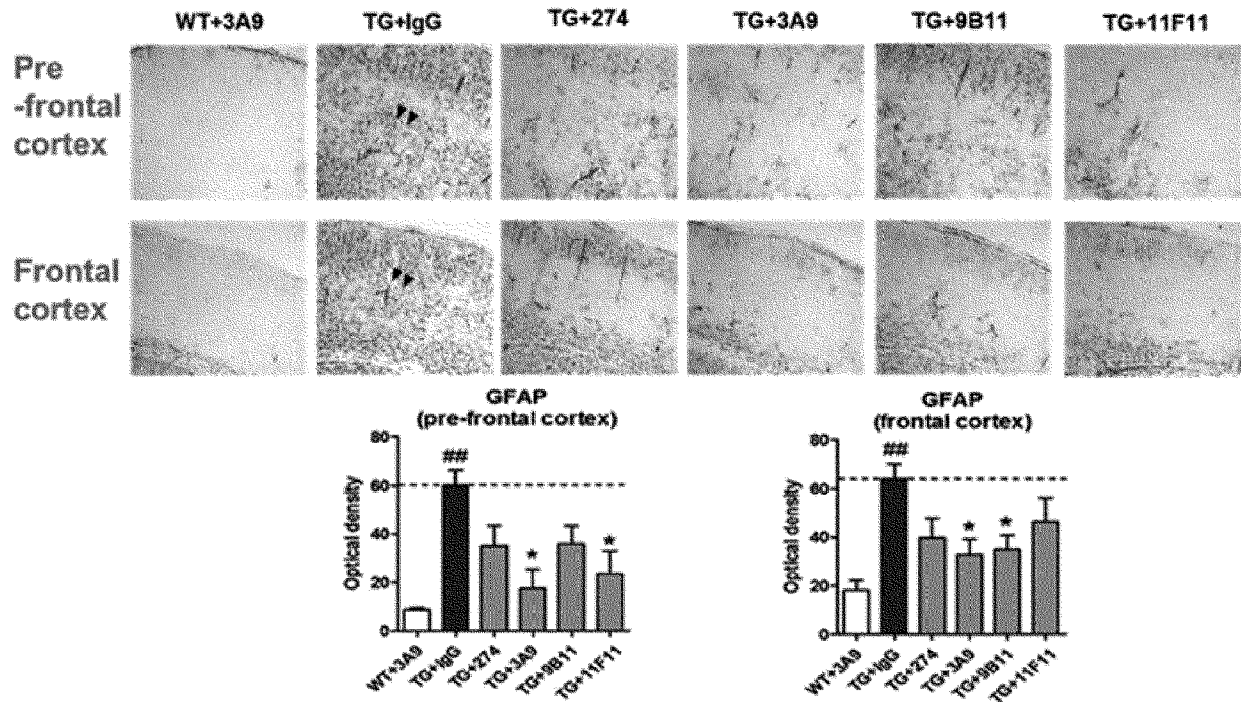
[도9a]

Marker: Iba-1 (microgliosis) ; Areas: Cortex

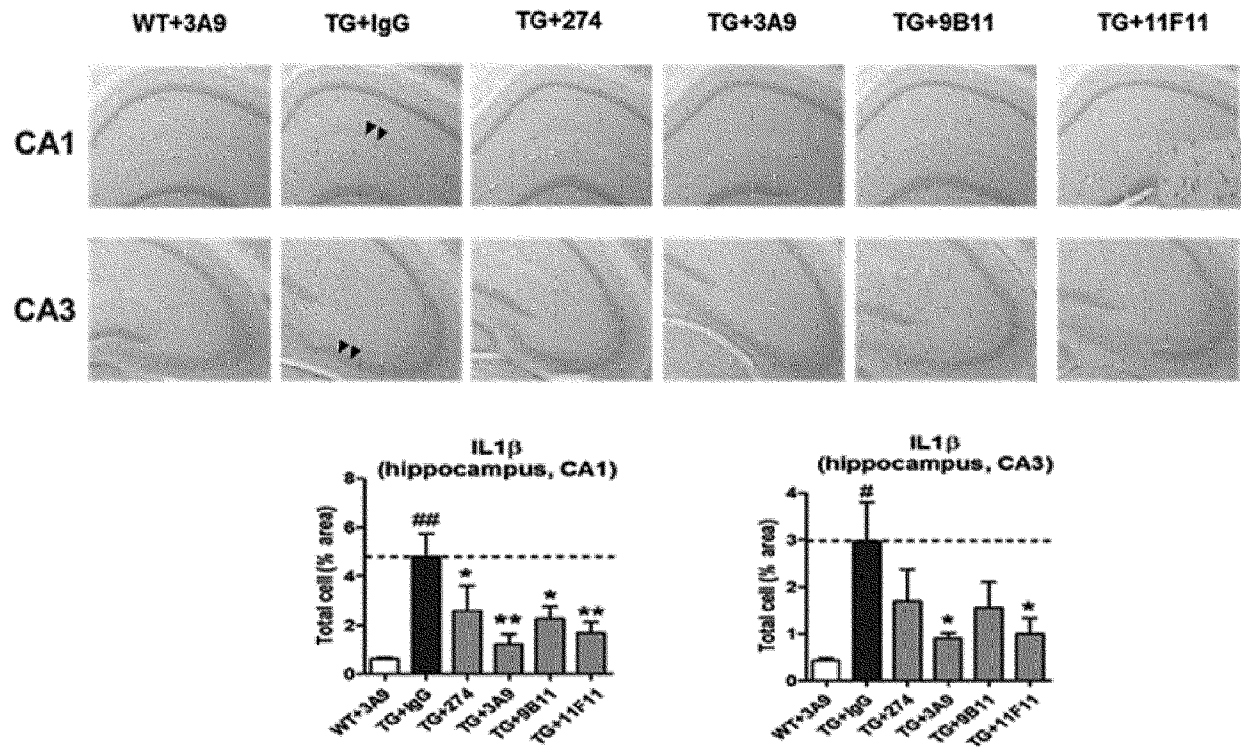


[도9b]

Marker: GFAP (astrogliosis) ; Areas: Cortex

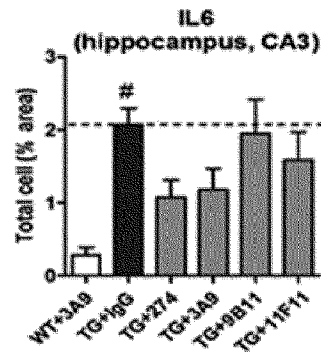
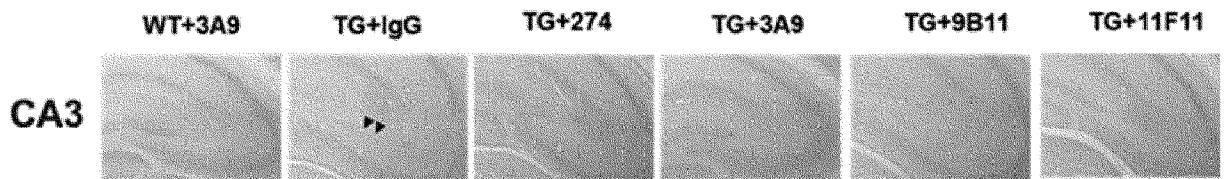


[도9c]

Marker: IL1 β ; Areas: Hippocampus

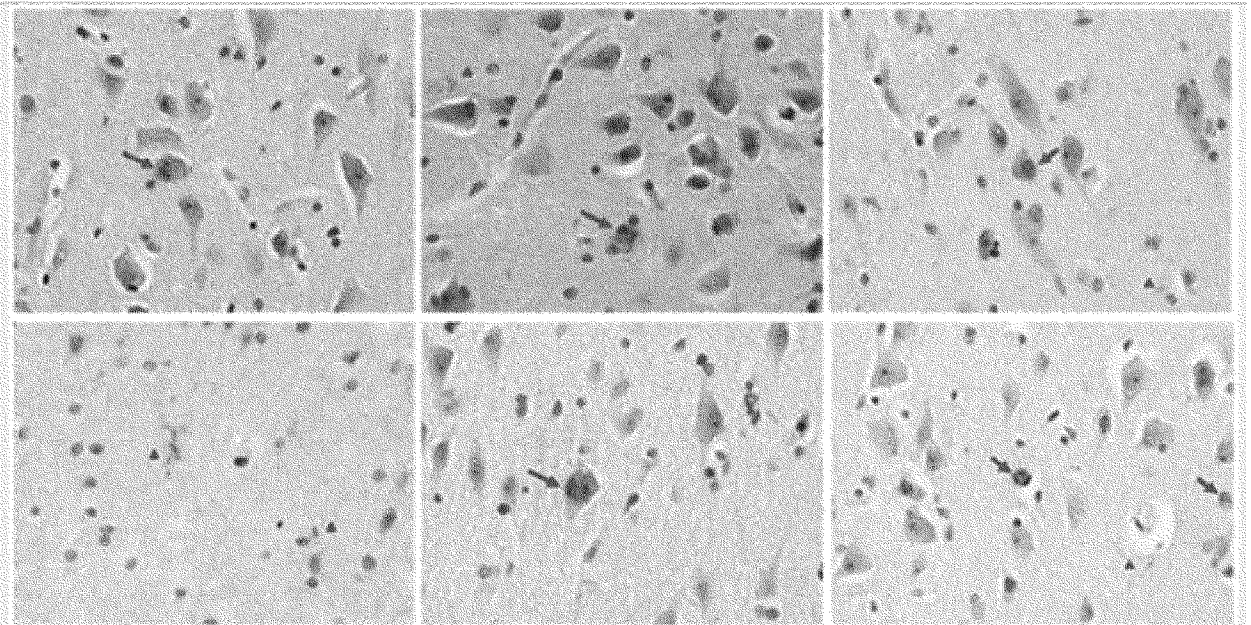
[도9d]

Marker: IL6 ; Areas: Hippocampus



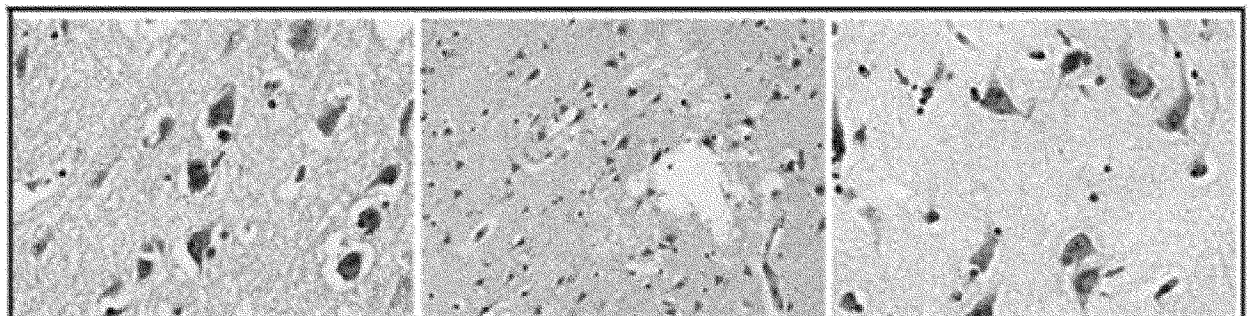
[도10a]

3A9

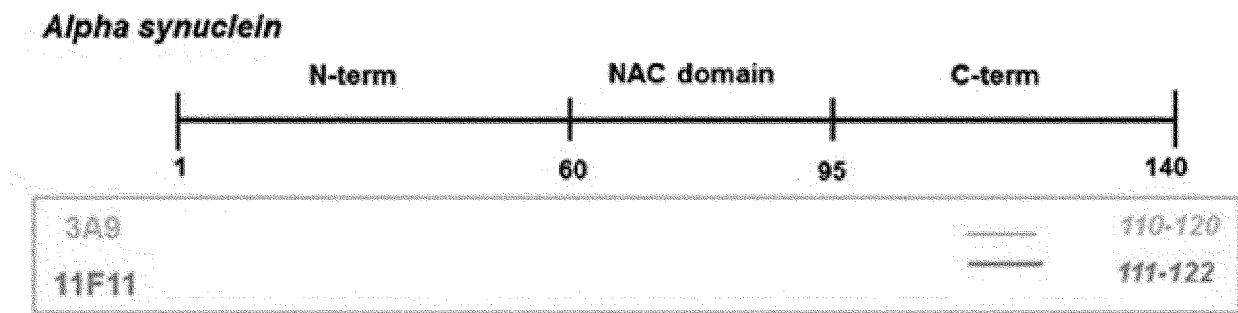


[도10b]

11F11



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/000239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18; A61K 39/395; G01N 33/543; G01N 33/53; G01N 33/68; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: anti-syn antibody, syn aggregate, detection, nerve disorder, Parkinson's disease, treatment, brain

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014-0363447 A1 (BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB.) 11 December 2014 See paragraphs [0020], [0039], [0053], [0067]; and claims 1, 9, 17, 19.	1-19,22-29
A	US 2016-0108113 A1 (GENENTECH, INC.) 21 April 2016 See paragraphs [0079]-[0082], [0093], [0103], [0135], [0161], [0261], [0271]-[0272]; and claims 1, 30.	1-19,22-29
A	KR 10-2011-0110200 A (PANIMA PHARMACEUTICALS AG. et al.) 06 October 2011 See claims 1, 3-4, 7-8, 12-15, 20, 23, 25-27, 29.	1-19,22-29
A	KR 10-2016-0010402 A (UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY) 27 January 2016 See abstract; claims 1-7, 20-21, 24; and table 8.	1-19,22-29
A	KR 10-2014-0095074 A (BIOGEN IDEC INTERNATIONAL NEUROSCIENCE GMBH.) 31 July 2014 See abstract; and claims 1-2, 6, 14-25, 32.	1-19,22-29
A	GenBank: AML30890.1: Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region, Partial [Mus musculus] (10 March 2016.) See the entire document.	1-19,22-29



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 APRIL 2018 (12.04.2018)

Date of mailing of the international search report

12 APRIL 2018 (12.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/000239

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **20-21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 20 and 21 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, or to a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/000239

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0363447 A1	11/12/2014	AU 2011-219414 A1	06/09/2012
		AU 2011-219414 B2	20/11/2014
		CA 2789963 A1	01/09/2011
		CN 102869680 A	09/01/2013
		CN 102869680 B	05/10/2016
		CN 106397588 A	15/02/2017
		DK 2539366 T3	05/02/2018
		EP 2539366 A1	02/01/2013
		EP 2539366 B1	08/11/2017
		JP 2013-525266 A	20/06/2013
		JP 5894939 B2	30/03/2016
		RU 2012-140954 A	10/04/2014
		RU 2555526 C2	10/07/2015
		US 2012-0308572 A1	06/12/2012
		US 2013-0309251 A1	21/11/2013
		US 2015-0139900 A1	21/05/2015
		US 8632776 B2	21/01/2014
		US 8859501 B2	14/10/2014
		US 8968734 B2	03/03/2015
		US 9084832 B2	21/07/2015
		WO 2011-104696 A1	01/09/2011
US 2016-0108113 A1	21/04/2016	CN 107074938 A	18/08/2017
		EP 3207057 A2	23/08/2017
		JP 2017-536102 A	07/12/2017
		US 2017-0320940 A1	09/11/2017
		US 9732148 B2	15/08/2017
		WO 2016-061389 A2	21/04/2016
		WO 2016-061389 A3	09/06/2016
KR 10-2011-0110200 A	06/10/2011	AU 2009-328505 A1	28/07/2011
		AU 2009-328505 A2	11/08/2011
		AU 2009-328505 B2	27/11/2014
		CA 2746778 A1	24/06/2010
		CN 102317316 A	11/01/2012
		CN 102317316 B	13/08/2014
		CY 1116584 T1	15/03/2017
		DK 2370466 T3	03/08/2015
		EA 201190041 A1	28/02/2012
		EP 2370466 A1	05/10/2011
		EP 2370466 B1	06/05/2015
		EP 2370466 B8	24/06/2015
		EP 2949666 A1	02/12/2015
		ES 2544569 T3	01/09/2015
		HK 1156638 A1	22/01/2016
		HK 1217722 A1	20/01/2017
		JP 2012-512634 A	07/06/2012
		JP 2014-221835 A	27/11/2014
		JP 5810413 B2	11/11/2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/000239

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		KR 10-1781228 B1	22/09/2017
		MX 2011006422 A	15/09/2011
		NZ 593964 A	21/12/2012
		PH 12016500658 A1	08/01/2018
		PT 2370466 E	21/09/2015
		RS 54259 B1	29/02/2016
		SG 172121 A1	28/07/2011
		SI 2370466 T1	30/11/2015
		US 2011-0300077 A1	08/12/2011
		US 2015-0232542 A1	20/08/2015
		US 2016-0244515 A1	25/08/2016
		US 8940276 B2	27/01/2015
		US 9896504 B2	20/02/2018
		WO 2010-069603 A1	24/06/2010
KR 10-2016-0010402 A	27/01/2016	CN 105121473 A	02/12/2015
		EP 2961774 A1	06/01/2016
		EP 2961774 A4	26/10/2016
		HK 1217107 A1	23/12/2016
		JP 2016-511254 A	14/04/2016
		JP 6261621 B2	17/01/2018
		US 2014-0241984 A1	28/08/2014
		US 2014-0241987 A1	28/08/2014
		US 2017-0190765 A1	06/07/2017
		US 9534044 B2	03/01/2017
		WO 2014-132210 A1	04/09/2014
KR 10-2014-0095074 A	31/07/2014	AU 2012-332814 A1	12/06/2014
		AU 2012-332814 B2	14/12/2017
		BR 112014010664 A2	25/04/2017
		CA 2854131 A1	10/05/2013
		CN 104040342 A	10/09/2014
		CN 107091931 A	25/08/2017
		EA 201490883 A1	30/10/2014
		EP 2773957 A1	10/09/2014
		EP 2773957 A4	24/06/2015
		EP 2773957 B1	29/11/2017
		HK 1201585 A1	04/09/2015
		JP 2014-533357 A	11/12/2014
		JP 6263473 B2	31/01/2018
		MX 2014005378 A	19/01/2015
		NZ 625217 A	29/07/2016
		US 2014-0295465 A1	02/10/2014
		US 2018-0011112 A1	11/01/2018
		WO 2013-066818 A1	10/05/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/18; A61K 39/395; G01N 33/543; G01N 33/53; G01N 33/68; A61K 39/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항-syn 항체, syn 응집체, 검출, 신경 질환, 파킨슨병, 치료, 뇌

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2014-0363447 A1 (BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB) 2014.12.11 단락 [0020], [0039], [0053], [0067]; 및 청구항 1, 9, 17, 19 참조.	1-19, 22-29
A	US 2016-0108113 A1 (GENENTECH, INC.) 2016.04.21 단락 [0079]-[0082], [0093], [0103], [0135], [0161], [0261], [0271]-[0272]; 및 청구항 1, 30 참조.	1-19, 22-29
A	KR 10-2011-0110200 A (파니마 파마슈티컬스 아게 등) 2011.10.06 청구항 1, 3-4, 7-8, 12-15, 20, 23, 25-27, 29 참조.	1-19, 22-29
A	KR 10-2016-0010402 A (유나이티드 아랍에미리트 대학교) 2016.01.27 요약; 청구항 1-7, 20-21, 24; 및 표 8 참조.	1-19, 22-29
A	KR 10-2014-0095074 A (바이오젠 아이텍 인터내셔널 뉴로사이언스 게엠베하) 2014.07.31 요약; 및 청구항 1-2, 6, 14-25, 32 참조.	1-19, 22-29
A	GenBank: AML30890.1: immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Mus musculus] (2016.03.10.) 전문 참조.	1-19, 22-29

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 04월 12일 (12.04.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 04월 12일 (12.04.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

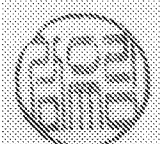
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 20-21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 20-21은 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0363447 A1	2014/12/11	AU 2011-219414 A1 AU 2011-219414 B2 CA 2789963 A1 CN 102869680 A CN 102869680 B CN 106397588 A DK 2539366 T3 EP 2539366 A1 EP 2539366 B1 JP 2013-525266 A JP 5894939 B2 RU 2012-140954 A RU 2555526 C2 US 2012-0308572 A1 US 2013-0309251 A1 US 2015-0139900 A1 US 8632776 B2 US 8859501 B2 US 8968734 B2 US 9084832 B2 WO 2011-104696 A1	2012/09/06 2014/11/20 2011/09/01 2013/01/09 2016/10/05 2017/02/15 2018/02/05 2013/01/02 2017/11/08 2013/06/20 2016/03/30 2014/04/10 2015/07/10 2012/12/06 2013/11/21 2015/05/21 2014/01/21 2014/10/14 2015/03/03 2015/07/21 2011/09/01
US 2016-0108113 A1	2016/04/21	CN 107074938 A EP 3207057 A2 JP 2017-536102 A US 2017-0320940 A1 US 9732148 B2 WO 2016-061389 A2 WO 2016-061389 A3	2017/08/18 2017/08/23 2017/12/07 2017/11/09 2017/08/15 2016/04/21 2016/06/09
KR 10-2011-0110200 A	2011/10/06	AU 2009-328505 A1 AU 2009-328505 A2 AU 2009-328505 B2 CA 2746778 A1 CN 102317316 A CN 102317316 B CY 1116584 T1 DK 2370466 T3 EA 201190041 A1 EP 2370466 A1 EP 2370466 B1 EP 2370466 B8 EP 2949666 A1 ES 2544569 T3 HK 1156638 A1 HK 1217722 A1 JP 2012-512634 A JP 2014-221835 A JP 5810413 B2	2011/07/28 2011/08/11 2014/11/27 2010/06/24 2012/01/11 2014/08/13 2017/03/15 2015/08/03 2012/02/28 2011/10/05 2015/05/06 2015/06/24 2015/12/02 2015/09/01 2016/01/22 2017/01/20 2012/06/07 2014/11/27 2015/11/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-1781228 B1	2017/09/22
		MX 2011006422 A	2011/09/15
		NZ 593964 A	2012/12/21
		PH 12016500658 A1	2018/01/08
		PT 2370466 E	2015/09/21
		RS 54259 B1	2016/02/29
		SG 172121 A1	2011/07/28
		SI 2370466 T1	2015/11/30
		US 2011-0300077 A1	2011/12/08
		US 2015-0232542 A1	2015/08/20
		US 2016-0244515 A1	2016/08/25
		US 8940276 B2	2015/01/27
		US 9896504 B2	2018/02/20
		WO 2010-069603 A1	2010/06/24
KR 10-2016-0010402 A	2016/01/27	CN 105121473 A	2015/12/02
		EP 2961774 A1	2016/01/06
		EP 2961774 A4	2016/10/26
		HK 1217107 A1	2016/12/23
		JP 2016-511254 A	2016/04/14
		JP 6261621 B2	2018/01/17
		US 2014-0241984 A1	2014/08/28
		US 2014-0241987 A1	2014/08/28
		US 2017-0190765 A1	2017/07/06
		US 9534044 B2	2017/01/03
		WO 2014-132210 A1	2014/09/04
KR 10-2014-0095074 A	2014/07/31	AU 2012-332814 A1	2014/06/12
		AU 2012-332814 B2	2017/12/14
		BR 112014010664 A2	2017/04/25
		CA 2854131 A1	2013/05/10
		CN 104040342 A	2014/09/10
		CN 107091931 A	2017/08/25
		EA 201490883 A1	2014/10/30
		EP 2773957 A1	2014/09/10
		EP 2773957 A4	2015/06/24
		EP 2773957 B1	2017/11/29
		HK 1201585 A1	2015/09/04
		JP 2014-533357 A	2014/12/11
		JP 6263473 B2	2018/01/31
		MX 2014005378 A	2015/01/19
		NZ 625217 A	2016/07/29
		US 2014-0295465 A1	2014/10/02
		US 2018-0011112 A1	2018/01/11
		WO 2013-066818 A1	2013/05/10