



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월08일

(11) 등록번호 10-2793383

(24) 등록일자 2025년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7037733

(22) 출원일자(국제) 2016년07월12일

심사청구일자 2021년06월30일

(85) 번역문제출일자 2017년12월28일

(65) 공개번호 10-2018-0029205

(43) 공개일자 2018년03월20일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/066476

(87) 국제공개번호 WO 2017/009312

국제공개일자 2017년01월19일

(30) 우선권주장

1512203.9 2015년07월13일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

W02007011907 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

하. 룬드벡 아크티에셀스카브

덴마크 디케이-2500 발뷔 오티리아바이 9

(72) 발명자

칼룬키 페카

덴마크 2500 발뷔 오티리아바이 9 하. 룬드벡 아
크티에셀스카브

포그 카리나

덴마크 2500 발뷔 오티리아바이 9 하. 룬드벡 아
크티에셀스카브

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 17 항

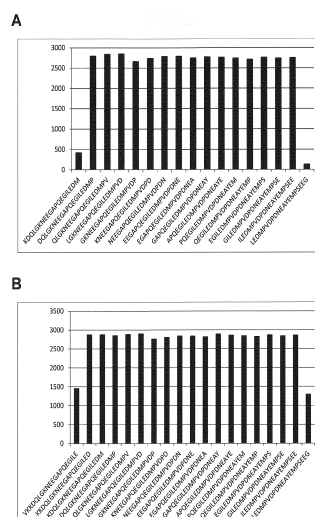
심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 시누클레인병증의 치료를 위한 제제, 용도 및 방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 모노클로날 항-알파-시누클레인 항체에 관한 것이다. 항체는 시누클레인병증, 예컨대 파킨슨병 (파킨슨병의 특발성 및 유전 형태 포함), 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축의 치료를 위해 이용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
G01N 2800/2835 (2013.01)

(72) 발명자

베스테라게르 루이세 부르

덴마크 2500 발뷔 오티리아바이 9 하. 룬드백 아크
티에셀스카브

베르스트림 안-루이세

덴마크 2500 발뷔 오티리아바이 9 하. 룬드백 아크
티에셀스카브

소튀 플로렌세

덴마크 2500 발뷔 오티리아바이 9 하. 룬드백 아크
티에셀스카브

사틴 다피트

네덜란드 엔엘-씨엠 3584 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비. 브이

판 덴 브링크 에드바르트

네덜란드 엔엘-씨엠 3584 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비. 브이

파렌 파울

네덜란드 엔엘-씨엠 3584 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비. 브이

라데마케르 릭

네덜란드 엔엘-씨엠 3584 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비. 브이

팡크 톰

네덜란드 엔엘-씨엠 3584 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비. 브이

말릭 이브라힘 온

덴마크 2500 발뷔 오티리아바이 9 하. 룬드백 아크
티에셀스카브

몬테신호 릴리아나 크리스티나 페레이라

덴마크 2500 발뷔 오티리아바이 9 하. 룬드백 아크
티에셀스카브

스테이븐헤이건 제프리 비

미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 웨스트 5번 애
비뉴 55 아파트먼트 3비

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는, 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체:

- (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1;
- (b) SEQ ID NO:2의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2;
- (c) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3;
- (d) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1;
- (e) SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3.

청구항 2

제1항에 있어서,

SEQ ID NO:7의 가변 도메인을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:8의 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 3

다음을 포함하는, 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체:

- (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1;
- (b) SEQ ID NO:33의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2;
- (c) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3;
- (d) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1;
- (e) SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3.

청구항 4

제3항에 있어서,

SEQ ID NO:30의 가변 도메인을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:8의 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 5

다음을 포함하는, 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체:

- (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1;
- (b) SEQ ID NO:34의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2;
- (c) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3;
- (d) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1;
- (e) SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3.

청구항 6

제5항에 있어서,

SEQ ID NO:31의 가변 도메인을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:8의 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 7

다음을 포함하는, 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체:

- (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1;
- (b) SEQ ID NO:35의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2;
- (c) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3;
- (d) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1;
- (e) SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3.

청구항 8

제7항에 있어서,

SEQ ID NO:32의 가변 도메인을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:8의 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 9

다음을 포함하는, 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체:

- (a) SEQ ID NO:20의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1;
- (b) SEQ ID NO:21의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2;
- (c) SEQ ID NO:22의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3;
- (d) SEQ ID NO:23의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1;
- (e) SEQ ID NO:24의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO:25의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3.

청구항 10

제9항에 있어서,

SEQ ID NO:26의 가변 도메인을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:27의 가변 도메인을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

모노클로날 항체가 서브타입 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 파킨슨병, 파킨슨병의 특발성 및 유전 형태, 고서병(GD), 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 또는 다계통 위축의 치료에서 이용하기 위한 약학적

조성물.

청구항 13

제11항의 모노클로날 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 파킨슨병, 파킨슨병의 특발성 및 유전 형태, 고셔병(GD), 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 또는 다계통 위축의 치료에서 이용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
약제의 제조에서 이용하기 위한 모노클로날 항체.

청구항 15

제11항에 있어서,
약제의 제조에서 이용하기 위한 모노클로날 항체.

청구항 16

제14항에 있어서,
파킨슨병, 파킨슨병의 특발성 및 유전 형태, 고셔병(GD), 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 또는 다계통 위축의 치료를 위한 약제의 제조에서 이용하기 위한 모노클로날 항체.

청구항 17

제15항에 있어서,
파킨슨병, 파킨슨병의 특발성 및 유전 형태, 고셔병(GD), 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 또는 다계통 위축의 치료를 위한 약제의 제조에서 이용하기 위한 모노클로날 항체.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알파-시누클레인에 특이적으로 결합하는 신규한 클래스의 모노클로날 항체뿐만 아니라 시누클레인병 증의 치료 및 진단에서 이러한 분자 및 이의 알파-시누클레인 결합 단편의 이용 방법에 관한 것이다.

[0002] **서열 목록에 대한 참조:**

[0003] 본 출원에는 37 C.F.R. 1.821 et seq.에 따른 하나 이상의 서열 목록이 포함되며, 이는 컴퓨터로 읽을 수 있는 매체(파일명 0992_ST25.txt, 2016년 6월 22일 생성, 44 kB 크기)에 개시되고, 이 파일은 본원에 그 전체가 참조로 포함된다.

배경 기술

[0004] 레비 소체병(LBD)으로도 알려져 있는 시누클레인병증은 단백질 알파-시누클레인이 주성분인, 레비 소체(LB) 및/또는 레비 신경돌기로서 현미경으로 볼 수 있는 세포내 단백질 응집물의 침적을 특징으로 한다(Jellinger, Mov Disord. 2012 Jan;27(1):8-30; McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). 시누클레인병증에는 파킨슨병(PD)(파킨슨병의 특발성 및 유전 형태 포함) 및 광범위 레비 소체(DLB)병(레비 소체 함유 치매(DLB), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병(CAPD), 순수 자율신경 부전(PAF) 및 다계통 위축(MSA; 예컨대, 올리브다리뇌소뇌 위축, 선조체흑색질 변성 및 샤이-드래거 증후군)로도 알려져 있음)이 포함된다. 시누클레인병증은 종종 파킨슨증에서의 중심 운동 결함(경축, 운동완만증, 안정시 떨림)에 관여하는, 도파민성 선조체흑색질 시스템의 변성을 갖지만, 또한 비-운동 기능이상, 예컨대 치매 및 자율 신경계 결함과 연관되는 중추, 말초 및 자율신경계 및 뇌 영역 그리고 다른 기관에서 레비 소체 및 비정상조직 레비 신경돌기가 널리 발생한다. 몇몇 비-운동 징후 및 증상은 파킨슨병 및 다른 시누클레인병증에서의 운동 증상에 선행하는 것으로 여겨진다. 이러한 조기 징후에는, 예를 들어, REM 수면 행동 장애(RBD) 및 후각 상실 및 변비가 포함된다(Mahowald et al., Neurology (2010) 75:488-489). 시누클레인병증은 계속해서 노령층에서의 운동 장애 및 인식 저하의 공통 원인이 되고 있다(Galasko et al., Arch. Neurol. (1994) 51:888-95).

[0005] 알파-시누클레인은 베타- 및 감마-시누클레인 및 시노레틴을 포함하는 단백질 패밀리의 구성원이다. 알파-시누클레인은 시냅스와 연관된 정상 상태에서 발현되며, 시냅스 소포 방출의 조절에 관여함으로써 신경 커뮤니케이션, 유연성, 학습 및 기억에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

[0006] 몇몇 연구에서는 알파-시누클레인이 PD 병리에서 중추적 역할을 갖는 것으로 시사하였다. 병리 상태에서는 단백질이 응집하여 세포내 불용성 피브릴을 형성할 수 있다. 예를 들어, 시누클레인은 LB에 축적된다(Spillantini et al., Nature (1997) 388:839-40; Takeda et al., J. Pathol. (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. (1997) 239:45-8). 알파-시누클레인 유전자에서의 돌연변이뿐만 아니라 유전자의 2중 복제 및 3중 복제는 파킨슨증의 희귀한 선천성 형태와 함께 분리된다(Kruger et al., Nature Gen. (1998) 18:106-8; Polymeropoulos, et al., Science (1997) 276:2045-7). 중요한 발견은 알파-시누클레인이 세포외액 내로 분비될 수 있고 혈장 및 뇌척수액(CSF)에 존재할 수 있다는 것이었다. 몇몇 연구, 예를 들어 Pacheco 등(2015)의 연구 및 다른 연구(Pacheco et al J Neurochem. 2015 Mar;132(6):731-4; Conway et al., Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:571-576; Volles et al., J. Biochem. 42:7871-7878, 2003)에서는 세포외-시누클레인이 뇌에서 병리적 역할을 담당함을 제시하였다. 이들은 세포외 알파-시누클레인 올리고머가 뇌 신경 형질막에 대한 신경독성을 보유함을 실증하였다. 시누클레인 분비 데이터에 기반한 다른 흥미로운 가설은 알파-시누클레인의 프리온-유사 전파가 파킨슨병 및 다른 시누클레인병증의 진행에 내재된다는 것이다(Lee et al. 2014, Nat Rev Neurol. 2014 Feb;10(2):92-8; Hansen and Li 2012, Trends Mol Med. 2012 May;18(5):248-55). 이들 발견은 세포외-시누클레인이 면역치료법에 의한 표적이 될 수 있다는 희망을 불러일으켰다(Vekrellis et al. 2011, Lancet Neurol. 2011 Nov;10(11):1015-25).

[0007] 자연 발생 알파-시누클레인 자가-항체는 PD 환자 및 건강한 대조군에 모두 존재하는 것으로 나타났으며(Smith et al. 2012, PLoS One. 2012;7(12):e52285; Maetzler et al. 2014, PLoS One. 2014 Feb 21;9(2):e88604, Papachroni et al. 2007 J Neurochem. 2007 May;101(3):749-56 및 Woulfe et al. 2002, Neurology. 2002 May 14;58(9):1435-6), 때때로 건강한 대조군에 비해 PD에서 알파-시누클레인에 대해 증가된 수준의 자가-항체(Gruden et al. 2011, J Neuroimmunol. 2011 Apr;233(1-2):221-7, Gruden et al. 2012, Neuroimmunomodulation. 2012;19(6):334-42 및 Yanamandra 2011, PLoS One. 2011 Apr 25;6(4):e18513)

또는 PD 환자에서 알파-시누클레인에 대해 감소된 자가-항체가 보고되었다(Besong-Agbo et al 2013, *Neurology*. 2013 Jan 8;80(2):169-75). 자가-항체의 발견 후 매우 초기에 순환하는 항-알파-시누클레인 자가항체가 알파-시누클레인 응집에 대한 보호 역할을 담당할 수 있다는 가능성이 제시되었다(Woulfe et al. 2002, *Neurology*. 2002 May 14;58(9):1435-6).

[0008] 트랜스제닉 마우스에서 알파-시누클레인의 과발현은 레비 소체병의 일부 병리적 양태를 모사한다. 알파-시누클레인을 과발현하는 마우스의 몇몇 상이한 트랜스제닉 라인이 지난 십여 년 간 생성되었다(다음 문헌[Koehler et al 2014, *PLoS One*. 2013 May 31;8(5):e64649; Fleming and Chesselet, 2006, *Behav Pharmacol*. 2006 Sep;17(5-6):383-91; Springer and Kahle 2006, *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2006 Sep;6(5):432-6]에서 리뷰로 다뤄짐). Thy-1 및 PDGF-베타 프로모터를 포함하는 마우스 라인에서는 운동 결함 및 인지 결함이 발생하며 생체 내 알파-시누클레인에 대해 유도된 항체의 신경보호 효과를 실증하기 위해 이용되었다. 그러나, 어느 트랜스제닉 라인도 도파민성 뉴론의 강력한 변성을 갖지 않으며, 종종 운동 표현형은 파킨슨병에서 보통 변성되지 않는 운동 뉴론에서의 발현에 의해 유도된다. 따라서, 잠재적인 질환 변형 치료의 긍정적 결과가 도파민성 뉴론 또는 다른 중추 신경계 뉴론에 대한 효과를 통해 매개되는지는 명확하지 않다.

[0009] 트랜스제닉 마우스 모델에서 본 발명자들의 강력한 발견의 하나는 인간 알파-시누클레인의 만성 과발현이 시냅스 기능을 손상시킨다는 것이었다. 시험관내 및 생체내 시스템 모두에서의 연구를 이용하여, 야생형(wt) 인간 알파-시누클레인의 과발현은 해마에서 시냅스 전파를 손상시키는 것으로 나타났다(Nemani et al. 2010, *Neuron*. 2010 Jan 14;65(1):66-79; Paumier et al. 2013, *PLoS One*. 2013 Aug 1;8(8):e70274). 이는 두 연구에서 모두 기본 시냅스 전파를 감소시키는 것으로 나타난 해마의 CA1 영역에서 나타났다. 그 배후 기전은 알파-시누클레인의 세포내 축적이 이상기능 시냅스 방출로 이어지는 것으로 추정되었다. 그러나, 시냅스에서 세포외 공간 내로의 알파-시누클레인의 분비 및 시냅스 기능에 대한 알파-시누클레인 올리고머의 독성 효과에 관한 최근 발견은 시냅스 이상기능에서 세포외 알파-시누클레인의 역할에 대한 가능성, 및 이와 같은 치료 항체가 결함을 구제하는 능력에 대한 가능성을 열어 준다.

[0010] 알파-시누클레인을 과발현하기 위한 바이러스 벡터의 이용은 상기 접근이, 마우스 또는 래트에서의 유전적 돌연변이에 의해 아직 재생되지 않은 특징인 선조체흑색질 뉴론의 비교적 빠른 진행성 변성을 일으키므로, 설치류에서 PD를 모델링하는 중요한 방식을 나타낸다(Kirik and Bjorklund, 2003, *Trends Neurosci*. 2003 Jul;26(7):386-92). 또한, 바이러스 유전자 전달은 wt 알파-시누클레인이 선조체흑색질 병리를 유도하는 능력을 드러내었고(Kirik et al. 2002, *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):2780-91), 이 발견은 알파-시누클레인 2중 복제 및 3중 복제를 갖는 PD의 선천성 형태에서의 증거와 일치한다(Lee and Trojanowski, 2006, *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):33-8). 하나의 연구에서, 알파-시누클레인 N-말단에 대한 염소 항체 풀은 도파민성 세포사에 대해 보호하고 파킨슨병의 AAV-알파-시누클레인 기반 래트 모델에서 행동 결함을 완화하는 것으로 나타났다(Shahaduzzaman et al 2015, *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0116841).

[0011] 알파-시누클레인 병리의 프리온 유사 확산은 최근에 알파-시누클레인 병리를 발생시키며 또한 도파민성 세포사를 발생시키는 것으로 나타났다(Luk et al. 2012, *Science*. 2012 Nov 16;338(6109):949-53). 상기 모델은 알파-시누클레인 항체가 병리를 완화할 수 있음을 나타내기 위해 이용되었다(Tran et al. 2014, *Cell Rep*. 2014 Jun 26;7(6):2054-65). 상기 모델에서, 항체 처리는 흑색질에서의 도파민성 뉴론을 포함하는, 몇몇 뇌 영역에서 인산화 알파-시누클레인의 축적을 감소시키고, 운동 결함의 발생을 감소시킬 수 있었다.

[0012] 돌연변이에 부가하여, 알파-시누클레인 유전자의 대안적 스플라이싱 및 단백질의 번역 후 변형, 예컨대 인산화, 유비퀴틴화, 질산화, 및 절단은 알파-시누클레인의 응집 및/또는 독성 형태를 형성하는 능력이 증강된 알파-시누클레인 단백질 형태를 생성할 수 있다(Beyer and Ariza, *Mol Neurobiol*. 2013 Apr;47(2):509-24). 그러나, 알파-시누클레인의 정확한 병리적 종은 알려지지 않고 남아있다. 올리고머부터 피브릴까지 범위의 다양한 미스폴딩/응집/분비 종, 및 상이한 번역-후 변형이 독성과 연관되었으나, 가장 중요한, 실제로 하나의 독성 종이 존재하는지에 대한 합의가 존재하지 않는다.

[0013] 인간, 마우스, 및 파리와 같이 다양한 동물 모델에서 유사한 형태적 및 신경학적 변형을 갖는 알파-시누클레인의 전반적 축적은 상기 분자가 레비 소체병의 병리에서 중추적임을 제시한다.

[0014] 알파-시누클레인에 대한 몇몇 상이한 항체는 전임상 동물 모델에서 치료 효과를 갖는 것으로 나타났다. 알파-시누클레인 잔기 91~99가 관여되는 에피토프를 표적으로 하는 항체 및 알파-시누클레인 잔기 118~126이 관여되는 에피토프를 표적으로 하는 항체는 모두 트랜스제닉 마우스에서 운동 및 인지 결함에 대한 효과를 갖는 것으로 나타났다(Games et al. 2014, *J Neurosci*. 2014 Jul 9;34(28):9441-54). 가장 개선된 이러한 항체는 알파-시누

클레인 잔기 118~126이 관여되는 에피토프를 표적으로 하는 마우스 모노클로날 항체 9E4에 기반한 인간화 항체로, 현재 I 상 임상 시험 중이다. 알파-시누클레인 잔기 120~140이 관여되는 에피토프를 표적으로 하는 C-말단 항체 274(Bae et al. 2012, J Neurosci. 2012 Sep 26;32(39):13454-69)는 또한 세포에서 세포로의 병리 확산에 대해 전임상 모델에서 효과를 갖는 것으로 나타났다. 이에 부가하여, 알파-시누클레인의 입체형태 중, 예컨대 올리고머 및 피브릴을 표적으로 하는 항체는 이러한 아마도 독성인 알파-시누클레인 중의 수준을 적어도 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다(Lindstroem et al. 2014, Neurobiol Dis. 2014 Sep;69:134-43 및 Spencer et al. 2014, Mol Ther. 2014 Oct;22(10):1753-67). 생체내 알파-시누클레인 올리고머 수준을 낮추는 이러한 입체형태 항체, 예컨대 mab47도 아미노산 121~125로부터의, 알파-시누클레인의 C-말단에서의 에피토프를 표적으로 하는 것으로 나타났다(US20120308572). 다른 입체형태, 피브릴 및 올리고머 특이적 항체도 C-말단 서열을 표적으로 한다(Vaikath et al. Neurobiol Dis. 2015;79:81-99).

[0015]

알파-시누클레인의 독성 형태가 알려져 있지 않으므로, 치료 항체는 이상적으로는 대안적 스플라이싱 또는 번역 후 변형, 예컨대 절단에 의해 형성되는 대부분의 알파-시누클레인 중뿐만 아니라 올리고머 및 피브릴 형태에 결합할 수 있어야 한다. 상기 논의된 바와 같이, 전임상 모델에서 치료제로서 평가된 현재 항체들의 하나의 문제는 이들 중 다수가 알파-시누클레인의 일부 주요 절단 형태에서 나타나지 않는 C-말단 에피토프를 표적으로 한다는 것이다. 예를 들어, 9E4의 결합을 위해 중요한 아미노산은 아스파라긴 122 및 티로신 125이며(특히 US20140127131에 나타난 알라닌 스캐닝에 따라), 이는 상기 항체가, 파킨슨 뇌 조직에서의 일부 주요 절단 중인 아미노산 119, 및 122에서 절단되는 알파-시누클레인에 결합할 수 없음을 의미한다(Kellie et al. Sci Rep. 2014;4:5797). 이는 항체 274 및 항체 mab47(US8,632,776)의 경우에서도 마찬가지일 것이다. 또한, 아미노 말단 항체는 아마도 알파-시누클레인의 처음 아미노산들이 없는 일부 주요 절단 중, 예컨대 아미노산 5~140으로 절단된 알파-시누클레인에 결합할 수 없을 것이다. 9E4 항체에 있어서, 항체는 프로테아제가 알파-시누클레인을 절단할 곳과 동일 영역에 결합할 것이므로, 하나의 제시된 작용 기전은 세포의 공간에서 아미노산 119~122에서의 절단 방지이다(Games et al. 2014, J Neurosci. 2014 Jul 9;34(28):9441-54). 이 부위에 가까이 인접한 항체로 유사한 작용 기전이 또한 나타날 수 있으며, 이에 따라 상기 영역 근처의 여러 항체가 상기 활성을 가질 것으로 예상될 것이다.

[0016]

동물 모델에서 절단된 알파-시누클레인 중의 독성 역할에 대한 일부 뒷받침이 존재한다. 티로신-하이드록실라제 프로모터 하의 절단된 알파-시누클레인의 발현은, 트랜스제닉 알파-시누클레인 모델에서 보통 나타나지 않는 선조체흑색질 병리를 일으키는 것으로 나타났다(Tofaris et al. 2006, J Neurosci. 2006 Apr 12;26(15):3942-50; Wakamatsu et al. 2006, Neurobiol Aging. 2008 Apr;29(4):574-85). 예를 들어, A53T 돌연변이를 갖는 인간 알파-시누클레인 단백질의 아미노산 1~130의 발현은 흑색질 부분에서 도파민성 뉴런의 배아 손실을 유도한 반면, 전장 단백질의 발현은 이를 유도하지 않았다(Wakamatsu et al. 2006, Neurobiol Aging. 2008 Apr;29(4):574-85). 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제 II 알파(CamKII-알파) 프로모터 하의 120 아미노산 알파-시누클레인 분자의 발현은 알파-시누클레인 응집 및 Barnes 미로 및 신규 물체 인식을 포함하는 피질-해마 기억 시험에서의 진행성 결함과 연관되었다(Hall et al. 2015, Exp Neurol. 2015 Feb;264:8-13). 또한 래트 AAV 모델에서, C-말단 절단된 알파-시누클레인의 공동-발현은 전장 알파-시누클레인-유도 병리를 증강시켰다(Ulusoy et al. 2010, Eur J Neurosci. 2010 Aug;32(3):409-22).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017]

본 발명에서, 독성 알파-시누클레인 단편 1~119/122에 결합하고 알파-시누클레인의 상기 절단된 형태를 중화할 수 있는 항체(예컨대 실시예에 기재된 "GM37" 및 "GM285")가 생성되었다. 본 발명의 항체, 예컨대 GM37 및 GM285는 알파-시누클레인의 다른 올리고머 형태에 결합하고 질환의 확산을 감소시키는 방식으로 다른 CNS 체류 세포에 의한 이의 섭취를 변경할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체, 예컨대 GM37 및 285는 놀랍게도 인간 뇌에서 상이한 알파-시누클레인 중의 결합에서 선행 기술의 항체, 예컨대 9E4에 비해 더 우수한 것으로 나타났으며, 세포의 알파-시누클레인의 제거 및 생체내 비정상 알파-시누클레인의 존재에 의해 유도되는 손상된 시냅스 전파의 정상화에 대해 놀랍게도 더 우수한 효과를 갖는다. 이의 치료능을 추가로 예시하며, 본 발명의 항체, 예컨대 GM37 및 285는 파킨슨병의 래트 모델에서 질환 관련 운동 표현형의 출현을 방지할 수 있다. 마지막으로, 항체 GM37 및 GM285는 일차 마우스 뉴런에서 세포의 첨가된 재조합 병리적 알파-시누클레인 씨드에 의해 유도되는 내인성 알파-시누클레인의 응집 씨드화 및 인산화를 억제할 수 있다. 항체, 예컨대 GM37 및 285는 또한 파킨슨병의 마우스 모델을 이용하는 생체내 도파민성 뉴런 내로의 알파-시누클레인 병리의 씨드화를 억제할 수 있어

서, 병리의 세포 대 세포 전과 방지에서 이들 항체의 치료능을 추가로 뒷받침한다. 이들 데이터는 함께, 질환 병리가 파킨슨 환자 뉴런 간에 확산되는 기전의 억제를 통해 질환을 변형할 수 있는 신규 치료제로서의 이러한 신규 항체, GM37 및 GM285의 용도를 강력히 뒷받침한다.

[0018] 본 발명의 추가 양태에서, GM37 항체의 3가지 아미노산 변이체가 제공된다. 모든 변이체는 모체 항체, GM37과 유사한 기능적 관독을 갖지만, 제조가능성을 위해 개선된 특성을 갖는다. 변이체는 GM37 항체의 결합 도메인 내에서 생성되는 번역-후 변형의 위험을 감소시키며 항체 제조에서 일부 개선을 제공한다. 이는 항체의 대규모 임상적 또는 상업적 제조가 복잡하고 고가이므로 유리하며, 약제에서 균질한 산물의 제공은 특히 면역글로불린 및 단백질에 있어서 중추적이다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명은 알파-시누클레인에서 아미노산 112~117 내의 에피토프(SEQ ID NO:9(ILEDMP))에 특이적으로 결합할 수 있는, 신규한 모노클로날 항체, 및 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 본 발명의 항체 또는 이의 항체-결합 단편, 예컨대 예시적 항체 "GM37", 또는 "GM285"에 의해 결합되는 에피토프는 본원에서 "112~117 에피토프"로 불린다. 본 발명의 항체는 112~117 에피토프 내의 에피토프에 특이적으로 결합하며, 하나의 구현예에 따르면 아미노산 112~117 내의 에피토프로의 결합에 대해 항체 GM37 또는 GM285와 경쟁할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 알파-시누클레인의 아미노산 112~117 내의 에피토프로의 결합에 대해 SEQ ID NO:7의 가변 도메인으로 구성되는 중쇄 및 SEQ ID NO:8의 가변 도메인으로 구성되는 경쇄와 경쟁할 수 있다. 이러한 경쟁적 결합 역제는 당분야에 널리 공지된 검정 및 방법, 예를 들어 비표지 결합 검정, 예컨대 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 인간 알파-시누클레인을 고정화하고 평가될 항체 또는 결합 단편과의 인큐베이션 전에 기준 항체 'GM37'을 포함하거나 포함하지 않고 인큐베이션한다. 대안적으로, 페어식 맵핑 접근이 이용될 수 있고, 여기서 기준 항체 'GM37'이 표면에 고정화되고, 인간 알파-시누클레인 항원이 고정화 항체에 결합된 후, 제2 항체가 인간 알파-시누클레인에 대한 동시적 결합력에 대해 시험된다(그 개시가 본원에 참조로 포함되는, 'BIAcore® Assay Handbook', GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA 05/2012 참고).

[0020] 보다 구체적으로, GM285 항체는 알파-시누클레인의 잔기 112~115(ILED; SEQ ID NO:19)를 포함하는 알파-시누클레인의 잔기 112~117 내의 에피토프에 결합한다.

[0021] 하나의 구현예에서, 본 발명은 모노클로날 항체 GM37, 그 변이체(예컨대, GM37 변이체 1, GM37 변이체 2 및 GM37 변이체 3), 또는 GM285에 관한 것이다.

[0022] 특히, 본 발명은 모노클로날 항체 GM37, 그 변이체(예컨대, GM37 변이체 1, GM37 변이체 2 및 GM37 변이체 3), 또는 GM285를 제공하며, 이러한 항체뿐만 아니라 인간 시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 부위를 형성하기에 충분한 수(예컨대, 1, 2, 또는 3개)의 경쇄 CDR 및 충분한 수(예컨대, 1, 2, 또는 3개)의 중쇄 CDR을 보유하는 이의 유도체를 포괄한다. 바람직하게는, 이러한 항체는 아래에 정의된 바와 같이 3개의 경쇄 CDR 및 3개의 중쇄 CDR을 보유할 것이다. 상기 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 IMGT®(the international ImMunoGeneTics information system®) 또는 문헌[Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917]을 따른다.

[0023] 하나의 구현예에서, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는

[0024] (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1; 및/또는

[0025] (b) SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2; 및/또는

[0026] (c) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3; 및/또는

[0027] (d) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1; 및/또는

[0028] (e) SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2; 및/또는

[0029] (f) SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3

- [0030] 을 포함하거나 이로 구성되는 시누클레인 항원-결합 단편을 보유한다.
- [0031] 다른 구현예에서, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는
- [0032] (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1;
- [0033] (b) SEQ ID NO:33, 34 또는 35의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2;
- [0034] (c) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3;
- [0035] (d) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1;
- [0036] (e) SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2; 및
- [0037] (f) SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3;
- [0038] 을 포함하거나 이로 구성되는 시누클레인 항원-결합 단편을 보유한다.
- [0039] 다른 구현예에서, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는
- [0040] (a) SEQ ID NO:20의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1; 및/또는
- [0041] (b) SEQ ID NO:21의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2; 및/또는
- [0042] (c) SEQ ID NO:22의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3; 및/또는
- [0043] (d) SEQ ID NO:23의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1; 및/또는
- [0044] (e) SEQ ID NO:24의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2; 및/또는
- [0045] (f) SEQ ID NO:25의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3
- [0046] 을 포함하거나 이로 구성되는 시누클레인 항원-결합 단편을 보유한다.
- [0047] 하나의 구현예에서, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 자연 발생 항-알파-시누클레인 항체의 서열과 상이한 아미노산 서열을 (그 CDR, 그 가변 도메인, 그 프레임워크 잔기 또는 그 불변 도메인에) 포함하고, (상기 자연 발생 항-알파-시누클레인 항체에 비해) 다음을 나타내는 시누클레인 항원-결합 단편을 보유한다:
- [0048] (i) 알파-시누클레인에 대한 결합 친화도(KD)의 차이;
- [0049] (ii) 알파-시누클레인 피브릴의 프로테아제 절단 억제능의 차이;
- [0050] (iii) F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파의 손상 역전능의 차이;
- [0051] (iv) 생체내 미세투석으로 측정되는 마우스 해마에서 알파-시누클레인의 수준 감소능의 차이; 및/또는
- [0052] (v) 만성 투여되는 경우, 파킨슨병의 래트 모델에서 운동 기능 회복능의 차이
- [0053] (vi) 알파-시누클레인의 씨드화(예컨대 시험관내 및/또는 파킨슨병의 마우스 모델에서 불용성 인산화 알파-시누클레인의 축적) 방지능의 차이; 및/또는
- [0054] (vii) 인간 뇌에서 절단된 알파-시누클레인에 대한 결합능의 차이.
- [0055] 본 발명의 항체 및 이의 항원-결합 단편은 시누클레인병증, 예컨대 파킨슨병((PD), 파킨슨병의 특발성 및 유전 형태 포함), 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 고셔병(GD), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병(CAPD), 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축을 치료하거나, 진단하거나, 조영하기 위한 방법에서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1은 하이브리도마의 생성을 위한 면역화 프로토콜을 나타낸다. 표는 GM37 및 GM285의 확인을 위해 이용된 면역원 및 마우스 계통의 차이를 개략한다. 상이한 HCo17-Balb/c 및 HCo12/Balb/c 마우스를 독립적으로 면역화하였다(이들 마우스의 설명은 아래에 제공됨). GM37을 발현하는 하이브리도마는 아미노산 1~140 피브릴을 함유하는 전장 알파-시누클레인으로 면역화되고 전장(FL) 알파-시누클레인(SEQ ID NO 10)의 절단된 알파-시누클레인

단편 1~60 및 1~119로 추가접종된 마우스로부터 확인되었다. 항체 GM285를 발현하는 하이브리도마는 HCo12-Balb/c 마우스가 전장 단량체성 알파-시누클레인, 아미노산 1~140으로 면역화된 후 전장 피브릴성 알파-시누클레인으로 추가접종된 면역화 프로토콜로부터 얻었다(실시예 1).

도 2(패널 a~c)는 알파 시누클레인, 알파-시누클레인 동족체 및 오르소그로의 결합에 대한 GM37의 스크리닝을 나타낸다.

- a) 무세척 용액 기반 ELISA(FMAT)를 이용한 알파-시누클레인에 대한 항체 GM37의 결합.
- b) GM37의 SPR(Fortebio) 결합의 이용은 알파-시누클레인(알파 패널)에 특이적이며, 다른 관련된 시누클레인 패밀리 단백질인 베타-시누클레인(베타 패널) 및 감마-시누클레인(감마 패널)에는 결합하지 않는다. 측정은 SPR(Fortebio Octetred)을 이용하여 수행되었고 GM37은 계잡이 원숭이(Cyno 패널) 및 마우스(마우스 패널)로부터의 알파-시누클레인에 대해 유사한 결합을 나타낸다(실시예 1).
- c) 항체 GM285의 SPR(Fortebio Octetred) 결합의 이용은 알파-시누클레인에 특이적이며, 다른 관련된 시누클레인 패밀리 단백질인 베타-시누클레인 및 감마-시누클레인에는 결합하지 않는다. 측정은 SPR(Fortebio Octetred)을 이용하여 수행하였고 계잡이 원숭이(Cyno) 및 마우스(마우스)로부터의 알파-시누클레인에 대한 GM285의 유사한 결합을 나타낸다(실시예 1).

도 3(패널 a~c)은 GM37의 실시간 결합 친화도를 나타낸다.

- a) SPR(BIAcore® 3000)에 의해 결정되는 경시적인(X-축) RU(상대 단위)(y-축)로 측정되는 알파-시누클레인에 대한 항체 GM37의 결합. 염소 항-인간 IgG를 CM5 칩 상에 고정화하였다. GM37을 염소 항-인간 IgG 고정화 칩 상에 포획하고 인간 알파-시누클레인의 농도 시리즈(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM)를 표면으로의 결합에 대해 시험하였다. 센서 표면은 각 사이클 사이에 재생시켰다.
- b) 상이한 농도에서의 결합으로부터의 신호를 결합 곡선으로 전환하였다.
- c) 항체 GM37(hlgG1-6004-037-C106S로 표시됨)의 계산된 결합 상수(실시예 2).

도 4(패널 a~c)는 GM285의 실시간 결합 친화도를 나타낸다.

- a) SPR(BIAcore® 3000)에 의해 결정되는 경시적인(X-축) RU(y-축)로 측정되는 알파-시누클레인에 대한 항체 GM285의 결합. 염소 항-인간 IgG를 CM5 칩 상에 고정화하였다. GM285를 염소 항-인간 IgG 고정화 칩 상에 포획하고 인간 알파-시누클레인의 농도 시리즈(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM)를 표면으로의 결합에 대해 시험하였다. 센서 표면은 각 사이클 사이에 재생시켰다.
- b) 상이한 농도에서의 결합으로부터의 신호를 결합 곡선으로 전환하였다.
- c) 항체 GM285(hlgG1-6004-285로 표시됨)의 계산된 결합 상수(실시예 2).

도 5(패널 a~c)는 비교물질 항체 9E4의 실시간 결합을 나타낸다.

- a) SPR(BIAcore® 3000)에 의해 결정되는 경시적인(X-축) RU(y-축)로 측정되는 알파-시누클레인에 대한 9E4의 결합을 나타낸다. 염소 항-인간 IgG를 CM5 칩 상에 고정화하였다. 9E4를 칩에 고정화된 염소 항-인간 IgG로의 그 결합에 의해 칩 상에 포획하였다. 인간 알파-시누클레인의 농도 시리즈(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM)를 표면으로의 결합에 대해 시험하였다. 센서 표면은 각 사이클 사이에 재생시켰다.
- b) 상이한 농도에서의 결합으로부터의 신호를 결합 곡선으로 전환하였다.
- c) 항체 9E4에 대해 계산된 결합 상수(실시예 2).

도 6은 알파-시누클레인의 아미노산 서열을 나타낸다. 인간 뇌 조직에서 질량 분광측정에 의해 확인된 주요 절단 부위(화살표로 나타냄)(Kellie JF, Higgs RE, Ryder JW, Major A, Beach TG, Adler CH, Merchant K, Knierman MD. Quantitative measurement of intact alpha-synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain tissue by mass spectrometry. Sci Rep. 2014 Jul 23;4:5797. doi: 10.1038/srep05797)

도 7(패널 a~b)은 항체 GM37 및 GM285의 에피토프 맵핑을 나타낸다. 알파-시누클레인 아미노산 서열 95~132에서 유래되는 순차적 펩타이드(20머)에 대한 항체 결합의 상대적 수준을 나타내는 ELISA 데이터(다른 비결합 펩타이드는 나타내지 않음).

- a) GM37 에피토프는 완전 결합을 위해 펩타이드 서열 ILEDMP(SEQ ID NO:9)를 필요로 한다.
- b) GM285는 완전 결합을 위해 펩타이드 ILED(SEQ ID NO:19)를 필요로 한다(실시예 3).

도 8(패널 a~b)은 알파-시누클레인의 절단된 형태의 모식적 표시를 나타낸다.

a) GM37/285의 결합 에피토프(ILEDMP; SEQ ID NO:9) 및 9E4의 결합 에피토프(NEAYE; SEQ ID NO:36)를 알파-시누클레인 아미노산 서열(SEQ ID NO:10) 상에서 진한 글씨체로 나타낸다. 화살표는 도 6에서 c-말단 절단 부위를 나타낸다.

b) 인간 뇌 물질로부터 확인된 알파-시누클레인의 주요 절단 형태. 아미노산 수에 기반한 크기를 오른쪽에 나타낸다. 전장 알파-시누클레인은 140 아미노산이다. 에피토프로부터 추론될 수 있듯이, GM37, 그 변이체 1~3, 및 GM285는 전장 및 1~119/122, 1~135 단편에 결합할 것이다. 항체 9E4는 전장 및 1~135 단편에만 결합할 것이다. 절단 후 남아있는 더 작은 c-말단 단편의 구체적인 성질은 나타내지 않았다.

도 9는 항체 GM37 및 GM285가 전장 알파-시누클레인뿐만 아니라 인간 뇌로부터의 절단된 알파-시누클레인을 면역침전시킴을 나타낸다. 인간 DLB 뇌의 조정제 균질화물을 시험 항체(비드(ab 없음), B12-알파-시누클레인에 결합하지 않는 인간 IgG1 대조군 항체, GM-37, GM37 변이체 2, GM-285 및 쥐파 (m)9E4)와 인큐베이션하고 면역고갈된 상청액 및 면역침전된 물질을 SDS-PAGE 상에서 분리하였다. 웨스턴 블롯은 상청액으로부터 고갈되고 항체(IP)와 면역침전되는 알파-시누클레인의 전장 및 상이한 절단 형태를 표시하는 밴드를 나타낸다. 알 수 있듯이, GM37, GM37v2 및 GM285 항체는 상청액으로부터 주요 알파-시누클레인 종을 고갈시켰고, IP는 이들 중, 절단된 종 1~135, 1~119/122 및 전장 알파 시누클레인을 나타낸다. 9E4는 1~119/122 종에 영향을 미치지 않고, 전장 및 1~135만 면역침전(IP)시킨다(실시예 4).

도 10은 아미노산 119/122에서 칼파인에 의해 절단된 알파-시누클레인 피브릴의 단백질 분해 모식도를 나타낸다. 알파-시누클레인 피브릴(PFF)을 시험 항체 함유(PFF+) 또는 비함유(PFF) 배양에 첨가한다. GM-37/285의 존재는 세포 내 및 세포 배지 내로 분비된 절단된 알파-시누클레인의 형성을 억제한다.

도 11a는 GM37이 PFF로 처리된 일차 마우스 피질 배양의 배지 및 세포 용해액에서 모두 절단된 밴드(12 KD)의 형성을 억제함을 나타낸다. 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고 웨스턴 블로팅하여 알파-시누클레인의 상이한 종을 검출하였다. PFF로만 또는 대조군 항체(B12)로만 처리된 세포에서, 2개의 단량체성 알파-시누클레인 밴드가 12 및 14 kDa에서 검출되며, 각각 절단된 및 전장 알파-시누클레인을 나타낸다. GM-37의 존재 하에, 12 Kd에서 희미한 밴드만 존재하여, 대부분의 절단이 차단됨을 시사한다. 상기 효과는 세포 배지에서도 반영된다. 축적의 상대 수준도 14 Kd 밴드의 상대 세기의 감소에 의해 반영되는 바와 같이, GM-37의 존재에 의해 억제될 수 있다. 대안적으로, 세포에 의한 섭취를 위해 이용 가능한 14 Kd 밴드의 양이 감소될 수 있다(실시예 5).

도 11b는 항체 GM37, GM37 변이체 2 및 GM285에 의한 알파-시누클레인 피브릴의 농도 의존적인 단백질 분해 억제를 나타낸다. 낮은 항체 농도(0,1 ug/ml)에서 일차 마우스 피질 배양의 세포 용해액에는 전장(FL) 알파-시누클레인을 나타내는 밴드 및 C-말단 절단(CT) 알파-시누클레인을 나타내는 밴드가 모두 존재한다(화살표로 나타냄). 1, 5 및 10 ug/ml의 증가하는 항체 농도는 세포에서 알파-시누클레인 피브릴의 감소된 단백질 분해로 이어진다. 이는 항체 GM37, GM37v2 및 GM285 모두에서 관찰된다. 대조군 샘플은 알파-시누클레인을 인식하지 않는 인간 IgG1 항체 B12로 처리한다. 또한 항체 비첨가(ab 없음), 및 알파-시누클레인 피브릴 비첨가 세포(Asyn 없음) 대조군이 존재한다. 알파-시누클레인의 총량도 B12 또는 "항체 없음" 대조군 대비 37, 37v2 및 285로 처리된 샘플에서 감소되어, 모든 3 항체가 농도 의존적 방식으로 세포에서 알파-시누클레인의 축적을 감소시킴을 시사한다. 겔 상부의 액틴 밴드는 샘플의 동량 로딩을 나타낸다(실시예 5).

도 12는 마우스 일차 피질 뉴론에서 알파-시누클레인 응집의 씨드화 및 알파-시누클레인 인산화에 대한 GM37 및 GM285의 영향을 나타낸다.

12a) 세포에 1 ng의 알파-시누클레인의 순수한 씨드 또는 조정제 씨드가 씨드접종되는 경우, 세포에서 스팟 또는 반점 염색으로 나타나는, 인산화 알파-시누클레인에 대해 염색된 일차 뉴론의 이미지 예.

12b) 가용성 및 불용성 분획에서 분리된 일차 피질 뉴론으로부터의 단백질의 웨스턴 블롯. 블롯을 인간 알파-시누클레인 특이적 항체(4B12/H a-syn), 포스포-Ser-129-알파-시누클레인 특이적 항체(ab51253/pS-a-Syn) 및 마우스 알파-시누클레인 특이적 항체(D37A2/M a-syn)로 염색하였고, 일차 뉴론에서 조정제 씨드의 첨가가 불용성 분획에서 내인성 마우스 알파-시누클레인 및 인산화 알파-시누클레인 및 알파-시누클레인의 더 고분자량 다량체의 축적으로 이어짐을 나타낸다.

12c) GM37, GM37 변이체 2 및 GM285는 Cellomics ARRAYSCAN™ 자동화 현미경에 의해 세포에서 알파-시누클레인 포스포세린 129 양성 스팟의 수로 정량되는 인산화 알파-시누클레인의 출현을 억제한다. GM37, GM37v2 및 GM285는 용량 의존적 방식으로 세포에서 인산화 알파-시누클레인 스팟의 양을 감소시킨다.

12d) 최고 용량의 항체(133 nM)로 처리되고, 액틴, 인간 알파-시누클레인, 인산화 알파-시누클레인 및 마우스 알파-시누클레인에 대해 염색된 일차 피질 뉴론으로부터의 균질화물의 웨스턴 블롯은 항체 37, 37v2 및 285가 불용성 분획에서 세포에 의해 섭취되는 알파-시누클레인 조정제 씨드의 절단을 억제함을 나타낸다. 모든 항체는 또한 불용성 분획에서 인산화, 내인성 마우스 알파-시누클레인 및 인산화 마우스 알파-시누클레인의 더 고분자량 다량체의 축적을 억제한다. 겔 상부의 액틴 밴드는 샘플의 동량 로딩을 나타낸다(실시예 6).

도 13은 F28-snca 트랜스제닉 및 연령-매칭된 대조군 마우스의 해마에서 Schaffer 측부-CA1 시냅스에서의 기본 시냅스 전파를 나타낸다. 필드 흥분성 시냅스-후 전위(fEPSP)를 Schaffer 측부에 적용되는 단일 자극에 의해 유발하고, 자극 세기의 함수로서 fEPSP 경사를 측정하여 기본 시냅스 전파를 평가하였다. 단기 시냅스 유연성을 패어링된-펄스 촉진의 유도에 의해 평가하였다. 상이한 세기의 자극은 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 및 500 μ A였고, 각각의 세기에 대해 2 내지 3회 반복하며 증가하는 순서로 연속 적용하였다. 기본 시냅스 전파는 연령-매칭된 대조군 마우스에 비해 야생형 알파-시누클레인을 과발현하는 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 현저히 손상된 것으로 나타났다(실시예 7).

도 14는 F28-snca 트랜스제닉 마우스의 해마에서 Schaffer 측부-CA1 시냅스에서의 기본 시냅스 전파의 손상에 대한 단일 용량의 인간 9E4(15 mg/kg, i.p.)의 전신 투여 효과를 나타낸다. 필드 흥분성 시냅스-후 전위(fEPSP)를 Schaffer 측부에 적용되는 단일 자극에 의해 유발하고, 자극 세기의 함수로서 fEPSP 경사를 측정하여 기본 시냅스 전파를 평가하였다. h9E4를 이용한 급성 처리는 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파 손상의 현저한 역전을 유도하였다(Tg-snca + h9E4 대 Tg-snca + PBS, $p=0.002$). 그러나, h9E4에 의한 역전은, PBS로 처리된 한배새끼에 비해 현저히 더 낮은 기본 시냅스 전파에 의해 시사되는 바와 같이, 단지 부분적이었다($p=0.007$)(실시예 7).

도 15는 F28-snca 트랜스제닉 마우스의 해마에서 Schaffer 측부-CA1 시냅스에서의 기본 시냅스 전파의 손상에 대한 단일 용량의 인간 GM37(15 mg/kg, i.p.) 또는 이소형 대조군 항체(B12)의 전신 투여 효과를 나타낸다. 필드 흥분성 시냅스-후 전위(fEPSP)를 Schaffer 측부에 적용되는 단일 자극에 의해 유발하고, 자극 세기의 함수로서 fEPSP 경사를 측정하여 기본 시냅스 전파를 평가하였다. GM37을 이용한 급성 처리는 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파 손상의 완전 역전을 유도하였다(Tg-snca + GM37 대 Tg-snca + B12, $p=0.004$)(실시예 7).

도 16은 F28-snca 트랜스제닉 마우스의 해마에서 Schaffer 측부-CA1 시냅스에서의 기본 시냅스 전파의 손상에 대한 단일 용량의 인간 GM285(15 mg/kg, i.p.)의 전신 투여 효과를 나타낸다. 필드 흥분성 시냅스-후 전위(fEPSP)를 Schaffer 측부에 적용되는 단일 자극에 의해 유발하고, 자극 세기의 함수로서 fEPSP 경사를 측정하여 기본 시냅스 전파를 평가하였다. GM285를 이용한 급성 처리는 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파 손상의 완전 역전을 유도하였다(Tg-snca + GM285 대 Tg-snca + PBS, $p=0.001$)(실시예 7).

도 17(패널 a~b)은 자유롭게 움직이는 F28-snca 트랜스제닉 마우스의 해마에서 간질액(isf) 중 인간 알파-시누클레인의 수준에 대한 인간 9E4, GM37 또는 이소형 대조군 항체(항-HEL)의 전신 투여(15 mg/kg, i.p.) 효과를 나타낸다. 항체 처리 전(4 h~6 h) 2~3회 기본값의 평균을 기준선으로 취하고 각각의 동물에 대해 100%로 설정하였다. 반복 측정으로 2웨이 분산 분석(ANOVA)을 이용하여 차이를 분석하였다. 해마에서 인간 알파-시누클레인의 기본 수준은 8.1 ± 1.1 ng/ml(평균 $\pm$ SEM, $n = 25$, 시험관내 투석 탐침 회복에 대해 교정되지 않음)이었다. GM37의 투여는 비교물질 항체, 인간 9E4, 및 대조군 이소형, 항-HEL 둘 다에 비해 F28 마우스의 해마에서 인간 알파-시누클레인의 더 큰 감소를 유도하였다. GM37 또는 대조군 항체로 처리된 동물 간 알파-시누클레인의 수준에서 유의차를 나타내는 시점을 별표로 나타낸다(실시예 8).

도 18은 **도 19**에 나타난 래트 AAV 인간 알파-시누클레인 모델에서 항체 처리(아래쪽 화살표), 바이러스 주사 및 행동 평가에 대한 스케줄의 모식적 표시를 나타낸다(실시예 9).

도 19는 항체 GM37이 래트 AAV 모델에서 만성 처리 후 파킨슨증 운동 결함을 감소시킬 수 있음을 나타낸다. 운동 비대칭에 대한 AAV-인간-알파-시누클레인 래트에서의 GM37 또는 PBS를 이용한 만성 치료 효과를 실린더 시험에서 평가한다. 각각의 래트를 5분 동안 모니터링하여 앞발의 이용에 대해 시험하였다. 오른쪽 앞발(주사와 같은 쪽)의 이용 및 왼쪽(오른쪽 앞발 반대쪽+)의 이용 백분율을 각 동물에 대해 계산하였다(y-축 상에 나타냄)

GFP-PBS 래트 대비 *, ** $p < 0.05$ 및 0.01 . PBS 처리된 래트는 여전히 앞발 이용에서 현저한 비대칭성을 갖는 반면, 항체 GM37로 처리된 동물은 더 이상 현저한 결함을 갖지 않는다(실시예 9).

도 20a ~20c는 항체 GM37을 이용한 만성 처리가 마우스 선조체 내로의 병리적 알파-시누클레인 피브릴성 씨드의 주사에 의해 유도된 병리적 알파-시누클레인 인산화를 감소시킬 수 있음을 나타낸다. 도 20a는 씨드 주사 및 세포 계수에 대한 상대 처리 시간을 시사하는 모식도를 나타낸다. 항체 GM37을 마우스의 등쪽 선조체 내로 제조합 알파-시누클레인 피브릴성 씨드의 주사 1일 전에 투여한 후, 6주 동안 매주 투여하였다. 투여 방식은 15 mg/kg iv 또는 30 mg/kg ip였다. 도 20b는 주사 부위 및 용량에 기반한 혈장 중 GM37의 노출 수준을 나타낸다. 새로운 항체 용량의 주사 전에 매주 샘플을 채취하였다. 도 20c는 연구 종료 시 용량 및 주사 부위에 기반한 csf 중 GM37의 노출 수준을 나타낸다. 도 20d는 GM37 또는 PBS 대조군을 이용한 처리 후 흑색질에서 6번째 구획마다 카운팅된 인산화 알파-시누클레인 양성 봉입체를 갖는 세포의 수를 비교한다. 15 mg/kg iv 및 30 mg/kg ip 모두의 GM37로 처리된 마우스는 PBS 처리 마우스에 비해 인산화 알파-시누클레인 봉입체를 갖는 세포가 현저히 감소하였다(실시예 10).

도 21은 인간 α (SEQ ID NO:10), β (SEQ ID NO:37) 및 γ (SEQ ID NO:38) 시누클레인 단백질의 정렬을 나타낸다. α -시누클레인과 상이한 아미노산 잔기를 강조표시한다. 꺾은 점으로 나타낸다. SwissProt 번호는 괄호 내에 나타낸다.

도 22는 알파-시누클레인 오르소로그의 정렬을 나타낸다(게잡이 원숭이, SEQ ID NO:39; 래트, SEQ ID NO:40; 마우스, SEQ ID NO:41). 인간 알파-시누클레인(SEQ ID NO:10)과 상이한 아미노산 잔기를 강조표시한다. SwissProt 번호는 괄호 내에 나타낸다.

도 23은 GM37(GM37 야생형(wt))으로 명명된 및 GM37 var 1, 2 및 3으로 명명된 3 GM37 변이체의 일시적 발현을 나타낸다. 별표는 데이터가 단백질 A 정제 및 중화 후 결정됨을 시사한다. †는 데이터가 발현 배양 규모(0.4 L)에 대해 단백질 A 및 중화 후 달성된 수율로부터 계산됨을 시사한다.

도 24는 인간 알파-시누클레인에 대한 4개 항체 GM37 wt, GM37 var 1, GM37 var 2 및 GM37 var 3의 경쟁 ELISA 측정 결함을 나타낸다. 알파-시누클레인으로 코팅된 플레이트를 이용하여 증가하는 농도의 알파-시누클레인 (0~1000 nM)으로 각각의 항체의 용액(0.3 μ g/ml) 중 사전 인큐베이션 후 잔여하는 항체의 양을 검출한다. 모든 4개 항체가 알파-시누클레인에 대해 유사한 결함을 나타낸다.

도 25는 고정화된 제조합 인간 알파-시누클레인에 대한 GM37wt 및 변이체 1~3의 결합 속도 동역학 파라미터를 비교하는 표를 나타낸다. 결합은 SPR을 이용해서 측정하고, 속도는 1:1 결합 알고리즘(BIAcore® T200)을 이용하여 결정하였다.

도 26은 병리적 알파-시누클레인 피브릴성 씨드로 처리된 쥐과 일차 뉴론에서 인산화 알파-시누클레인 수준에 대한 알파-시누클레인 항체의 효과를 비교한다. 일차 뉴론을 4개의 GM37, GM37 var 1, GM37 var 2 및 GM37 var 3(2 μ g)의 존재 또는 부재 하에 씨드(10 ng)로 처리하였다. 뉴론을 3주 후 고정 & 염색하고, 알파-시누클레인 포스포 세린 129 양성 스팟에 대해 Cellomics ARRAYSCAN™에 의해 분석하였다. 씨드 단독으로 또는 씨드 + 이소형 대조군 항체(B12)로 처리된 세포는 현저히 증가된 인산화 수준을 나타낸다. GM37wt 및 3개 변이체로 처리된 세포는 알파-시누클레인의 인산화를 억제할 수 있고, 이들은 모두 씨드를 수여받지 않은 세포와 동일한 인산화 수준을 나타낸다. 데이터는 5개 웰에서 웰 당 7개 이미지로부터 결정되는 평균 $\pm$ SD로 나타낸다. N=2.

도 27은 wt GM37, var1, var2 및 var3의 온도 의존적 응집을 비교한다. 각 항체의 샘플로 경시적으로 일정한 온도 증가를 거치고, 응집 수준을 다중각 광 산란에 의해 동시 측정하였다(Prometheus NT.48, NanoTemper Technologies). 응집 개시를 위한 온도는 GM37 및 GM37-변이체에 있어 유사하지만, GM37-Var2에 대해 최저 응집 수준이 관찰되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본원에서 이용되는 용어 "알파-시누클레인"은 "알파-시누클레인 단백질"과 동의어이며, 임의의 알파-시누클레인 단백질 이소형을 나타낸다(예를 들어, UniProt에서 P37840, 1~3에서 확인됨). 알파-시누클레인의 아미노산 넘버링을 아래에 나타내는 SEQ ID NO:10에 대해 나타내며, 메티오닌(M)이 아미노산 잔기 1이다:

[0059]

SEQ ID NO:10;

```
MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV
GSKTKEGVVH GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK
TVEGAGSIAA ATGFVKKQDL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP
DNEAYEMPSE EGYQDYEPFA
```

[0060]

본 발명은 알파-시누클레인, 특히 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 항체 단편에 관한 것이다. 특히, 항체 및 이의 단편은 인간 알파-시누클레인의 112~117 내의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 나타낸다.

[0062]

본 발명의 맥락에서 "항체"(Ab)라는 용어는 면역글로불린 분자 또는 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 분자("항원")의 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 면역글로불린 분자의 단편을 나타낸다. 자연 발생 항체는 전형적으로 보통 적어도 2개의 중쇄(H) 및 적어도 2개의 경쇄(L)로 이루어지는 사량체를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 도메인(본원에서 VH로 약칭) 및 보통 3개 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 이루어지는 중쇄 불변 도메인으로 이루어진다. 중쇄는 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 서브타입), IgA(IgA1 및 IgA2 서브타입), IgM 및 IgE를 포함하는 임의의 이소형일 수 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 도메인(본원에서 VL로 약칭) 및 경쇄 불변 도메인(CL)으로 이루어진다. 경쇄에는 카파 사슬 및 람다 사슬이 포함된다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 전형적으로 항원 인식에 관여하는 반면, 중쇄 및 경쇄 불변 도메인은 면역계의 다양한 세포(예컨대, 효과기 세포) 및 전통적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. VH 및 VL 영역은 "프레임워크 영역"(FR)으로 명명되는 보다 보존된 서열 영역이 분산된, "상보성 결정 영역"으로 명명되는 고가변성 영역으로 추가 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 다음 순서로 아미노-말단에서부터 카복시-말단으로 배열된 3개의 CDR 도메인 및 4개의 FR 도메인으로 이루어진다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 자연에서 발생할 수 있는 것과 구별되는 물리적 환경에서 존재하기 위해 "단리된" 또는 아미노산 서열이 자연 발생 항체와 상이하도록 변형된 항체 및 이의 항원-결합 단편이 특히 관련된다.

[0063]

"에피토프"라는 용어는 항체에 대한 특이적 결합이 가능한 항원 결정기를 의미한다. 에피토프는 보통 분자의 표면 기, 예컨대 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며 보통 특이적인 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 갖는다. 입체형태 및 선형 에피토프는 후자가 아닌 전자에 대한 결합이 항상 변성 용매의 존재 하에 소실된다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접 관여되는 아미노산 잔기 및 결합에 직접 관여되지 않는 다른 아미노산 잔기, 예컨대 특이적으로 항원-결합 펩타이드에 의해 효과적으로 차단되는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(다시 말하면, 아미노산 잔기는 특이적으로 항원-결합 펩타이드의 풋프린트(footprint) 내에 있음). "112~117 에피토프"라는 용어는 112~117 인간 알파-시누클레인의 6개 아미노산 잔기 중 적어도 4개를 함유하는 인간 알파-시누클레인 영역을 나타내며, 이 에피토프에는 인간 알파-시누클레인의 1~111로부터의 임의의 잔기(106~111로부터의 임의의 잔기 포함), 또는 인간 알파-시누클레인의 118~140로부터의 임의의 잔기(잔기 118~120 포함)는 포함되지 않는다. 본원에서 이용되는 항체는 112~117 에피토프의 6개 아미노산 잔기 중 적어도 4개에 대한 결합에 의해 인간 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 경우, "112~117 에피토프" 내의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로 언급된다.

[0064]

본원에서 이용되는 "항체의 항원-결합 단편"이라는 용어는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 단편, 부분, 영역 또는 도메인(이것이 어떻게(예컨대, 절단을 통해, 재조합적으로, 합성적으로 등) 제조되는지와 무관하게)을 의미하며, 이에 따라 "항원-결합"이라는 용어는 "에피토프-결합"과 동일함을 의미하려는 것이며, 이에 따라, 예를 들어 "항체의 항원-결합 단편"이 "항체의 에피토프-결합 단편"과 동일하게 의도된다. 항원-결합 단편은 이러한 항체의 CDR 도메인의 1, 2, 3, 4, 5 또는 모든 6개를 함유할 수 있고, 이러한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있지만, 이러한 에피토프에 대해 이러한 항체와 상이한 특이성, 친화도 또는 선택성을 나타낼 수 있다. 그러나 바람직하게는, 항원-결합 단편은 이러한 항체의 CDR 도메인의 모든 6개를 함유할 것이다. 항체의 항원-결합 단편은 단일 폴리펩타이드 사슬(예컨대, scFv)의 일부이거나, 이를 포함할 수 있고, 또는 각각 아미노-말단 및 카복실 말단을 갖는, 2개 이상의 폴리펩타이드 사슬의 일부이거나, 이를 포함할 수 있다(예컨대, 디아바디, Fab 단편, Fab₂ 단편 등). 항원-결합력을 나타내는 항체의 단편은, 예를 들어, 온전한 항체의 프로테아제 절단에 의해 수득될 수 있다. 보다 바람직하게는, Fv 단편의 2개 도메인, VL 및 VH가 별도 유전자에 의해 자연적으로 인코딩되지만, 또는 이러한 유전자 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 이의 인코딩 cDNA)가 재조합 방법을 이용하여, VL 및 VH 영역이 연합하여 1가 항원-결합 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬로 제조될 수 있도록 하는 가요성 링커에 의해 연결될 수 있다(단일쇄 Fv(scFv)로 알려져 있음; 예컨대, 문헌[Bird

et al., (1988) Science 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883] 참고). 대안적으로, 단일 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 영역이 함께 연합하도록 하기에 너무 짧은(예컨대, 약 9개 잔기 미만인) 가요성 링커를 채택함으로써, 이중특이적 항체, 디아바디, 또는 유사한 분자를 형성할 수 있다(여기서 2개의 이러한 폴리펩타이드 사슬은 함께 연합하여 2가 항원-결합 분자를 형성함)(예를 들어, 디아바디의 설명에 대해서는 문헌[PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993)] 참고). 본 발명 내에서 포괄되는 항원-결합 단편의 예에는 (i) Fab' 또는 Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성되는 1가 단편, 또는 W02007059782에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) F(ab')₂ 단편, 힌지 도메인에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) 본질적으로 VH 및 CH1 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (iv) 본질적으로 VL 및 VH 도메인으로 구성되는 Fv 단편, (v) 본질적으로 VH 도메인으로 구성되며 또한 도메인 항체로 불리는 dAb 단편 (Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989))(Holt *et al.*; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) 카멜리드 또는 나노바디(Revets *et al.*; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):11-24) 및 (vii) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)이 포함된다. 또한, Fv 단편의 2개 도메인, VL 및 VH가 별도 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 이용하여, VL 및 VH 영역이 페어링하여 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬로 제조될 수 있도록 하는 합성 링커에 의해, 연결될 수 있다(단일쇄 항체 또는 단일쇄 Fv(scFv)로 알려져 있음, 예를 들어 문헌[Bird *et al.*, Science 242, 423-426 (1988) 및 Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 참고). 본 발명의 맥락에서 이들 및 다른 유용한 항체 단편이 본원에서 추가로 논의된다. 또한 항체라는 용어에는, 달리 명시되지 않는 한, 또한 항체-유사 폴리펩타이드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 임의의 공지된 기법, 예컨대 효소 절단, 펩타이드 합성, 및 재조합 기법에 의해 제공되는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체 단편(항원-결합 단편)이 포함됨이 이해되어야 한다. 생성되는 항체는 임의의 이소형을 보유할 수 있다. 본원에서 이용되는 "이소형"은 중쇄 불변 도메인 유전자에 의해 인코딩되는 면역글로불린 클래스(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)를 나타낸다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적 기법을 이용하여 수득된다; 원하는 에피토프에 결합할 수 있는 적합한 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 쉽게 스크리닝될 수 있다.

[0065] "이중특이적 항체"라는 용어는 각각 독립적 표적을 표적으로 하는 2개의 독립적 항원-결합 단편을 함유하는 항체를 나타낸다. 이들 표적은 상이한 단백질 상에 존재하는 에피토프 또는 동일한 표적 상에 존재하는 상이한 에피토프일 수 있다. 이중특이적 항체 분자는 모체 단일특이적 2가 항체 분자의 HC의 불변 도메인에서 보상 아미노산 변화를 이용하여 제조될 수 있다. 생성되는 헤테로이량체 항체는 2개의 상이한 모체 단일특이적 항체로부터 기여되는 하나의 Fab를 함유한다. Fc 도메인에서의 아미노산 변화는 경시적으로 안정한 이중특이성을 갖는 이중이량체 항체의 증가된 안정성으로 이어진다(Ridgway *et al.*, Protein Engineering 9, 617-621 (1996), Gunasekaran *et al.*, JBC 285, 19637-1(2010), Moore *et al.*, MAbs 3:6 546-557 (2011), Strop *et al.*, JMB 420, 204-219 (2012), Metz *et al.*, Protein Engineering 25:10 571-580 (2012), Labrijn *et al.*, PNAS 110:113, 5145-5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein *et al.*, MAbs 5:5 646-654 (2013)). 이중특이적 항체에는 또한 ScFv 융합을 이용하여 생성되는 분자가 포함될 수 있다. 이어서 2개의 단일특이적 scfv가 안정한 이중이량체를 형성할 수 있는 Fc 도메인에 독립적으로 연결되어 단일 이중특이적 분자를 생성한다(Mabry *et al.*, PEDS 23:3 115-127 (2010)). 이중특이적 분자는 이중 결합능을 갖는다. 예를 들어, CNS 질환을 치료하기 위해 혈액 뇌 장벽을 통과해 치료 항체를 전달하기 위한 목적으로 치료 표적 및 트랜스사이토시스화 표면 수용체를 모두 표적으로 한다.

[0066] GM37, GM-37, GM37 야생형(wt), mab37 및 6004-37이라는 용어들은 본원에서 상호 교환적으로 이용되며, 모두 동일한 항체를 나타낸다.

[0067] 항체 GM37이라는 용어는 SEQ ID No:1~3의 CDR1~3에 주어지는 중쇄 및 SEQ ID No:4~6에 주어지는 경쇄 CDR1~3을 포함하거나 이로 구성되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하려는 것이다. 하나의 구현예에서, 항체 GM37 또는 이의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:7의 중쇄 가변 도메인 및/또는 SEQ ID NO:8의 경쇄 가변 도메인을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 예를 들어, 항체 GM37은 SEQ ID NO:7의 가변 도메인 및 SEQ ID NO:18의 불변 도메인으로 구성되는 중쇄를 SEQ ID NO:8의 가변 도메인 및 SEQ ID NO:17의 카파 불변 도메인으로 구성되는 경쇄를 함께 포함하는 IgG 항체일 수 있다.

[0068] 단백질, 및 이러한 경우 항체의 탈아민화는 제조 및 보관 동안 자발적으로 일어날 수 있지만, 또한 생체내에서 최종 약제의 품질을 제어하기 어렵게 만든다. 탈아민화는 또한 일부 경우 분자의 활성에 영향을 미칠 수 있다. 탈아민화는 아스파라긴 잔기에서 일어나지만, 관련 아스파라긴의 위치는 확실히 예측하기 어려울 수 있고, 일부 경우 아스파라긴-글리신 모티프에 의해 영향을 받을 수 있다. 몇몇 가능한 탈아민화 모티프가 GM37 항체 상에서

확인되지만, 탈아민화의 하나의 가능한 부위는 중쇄의 잔기 54에 있는 것으로 나타났다. 다른 아미노산에 의한 아스파라긴의 후속 치환은 직접적이지 않지만, GM37의 3 변이체(GM37 변이체(var) 1, 2 및 3)는 원래 GM37(GM37 야생형(wt))의 활성을 보유하는 것으로 나타났다.

- [0069] GM37 변이체라는 용어는 탈아민화된 변이체 1, 2 또는 3을 나타내며, 여기서 변이체 1은 본원에서 상술된 GM37 항체에 비해 N54S 치환을 가지며, 변이체 2는 N54Q 치환을 가지고, 변이체 3은 N54H를 갖는다.
- [0070] 따라서 항체 GM37 변이체(var) 1, 2 및 3은 GM 37로부터의 SEQ ID No:1 및 3의 CDR1 및 3에 주어지는 중쇄 및 SEQ ID No:4~6에 주어지는 GM37로부터의 경쇄 CDR1~3을 포함하거나 이로 구성되지만, 이의 중쇄 CDR2가 상이하여 변이체 1은 SEQ ID NO:33의 CDR2를 가지며, 변이체 2는 SEQ ID NO:34의 CDR2를 가지고, 변이체 3은 SEQ ID NO:35의 CDR2를 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하려는 것이다.
- [0071] 하나의 구현예에서, 항체 GM37 변이체 또는 이의 항원-결합 단편은 각각 변이체 1, 2 및 3에 대해 SEQ ID NO:30, 31 및 32의 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:8의 경쇄 가변 도메인을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 항체 GM37은 SEQ ID NO:30, 31 또는 32의 가변 도메인 및 SEQ ID NO:18의 불변 도메인으로 구성되는 중쇄를 SEQ ID NO:8의 가변 도메인 및 SEQ ID NO:17의 카파 불변 도메인으로 구성되는 경쇄와 함께 포함하는 IgG 항체일 수 있다.
- [0072] GM285, GM-285, mab285 및 6004-285라는 용어는 본원에서 상호 교환적으로 이용되며, 모두 동일한 항체를 나타낸다.
- [0073] 항체 GM285라는 용어는 SEQ ID No:20~22 CDR1~3에 주어지는 중쇄 및 SEQ ID No:23~25에 주어지는 경쇄 CDR1~3을 포함하거나 이로 구성되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하려는 것이다. 하나의 구현예에서, 항체 GM37 또는 이의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:26의 중쇄 가변 도메인 및/또는 SEQ ID NO:27의 경쇄 가변 도메인을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 예를 들어, 항체 GM37은 SEQ ID NO:26의 가변 도메인 및 SEQ ID NO:28의 불변 도메인으로 구성되는 중쇄를 SEQ ID NO:27의 가변 도메인 및 SEQ ID NO:29의 카파 불변 도메인으로 구성되는 경쇄와 함께 포함하는 IgG 항체일 수 있다.
- [0074] GM285 항체는 인간 알파-시누클레인(SEQ ID NO:10)의 서열 112~115 내의 에피토프(ILED; SEQ ID NO:19)에 특이적으로 결합한다.
- [0075] 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 상기 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 IMGT®(the international ImmunoGeneTics information system®) 또는 문헌[Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services. Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable domains of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917]에 따른다.
- [0076] "항-알파-시누클레인 항체" 또는 "알파-시누클레인 항체"(그 기재된 맥락에 따라, 본원에서 상호 교환적으로 이용됨)는 본원에서 상기 정의되는 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 단편, 특히 SEQ ID NO 9 및/또는 19에 대응하는 알파-시누클레인의 서열에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0077] 본원에서 이용되는 "인간 항체"("humAb" 또는 "HuMab"로 약술할 수 있음)라는 용어는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에서 유래되는 가변 및 불변 도메인을 갖는 항체를 포함하려는 것이다. 본 발명의 인간 항체에는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않는 아미노산 잔기(예컨대, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이화에 의해 또는 생체내 유전자 재배열 동안 또는 체세포 돌연변이에 의해 도입되는 돌연변이)가 포함될 수 있다.
- [0078] 본원에서 이용되는 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"이라는 용어는 단일 분자 조성의 항체 분자 조제물을 나타낸다. 통상적인 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 소정 구현예에서, 모노클로날 항체는 하나를 초과하는 Fab 도메인으로 이루어짐으로써 하나를 초과하는 표적에 대한 특이성을 증가시킬 수 있다. "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"이라는 용어는 임의의 특정 제조 방법(예컨대, 재조합, 트랜스제닉, 하이브리도마 등)에 의해 제한하려는 것이 아니다.
- [0079] "인간화"라는 용어는 비-인간 종으로부터의 면역글로불린에서 유래되는 항원-결합 부위 및 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 기반하는 나머지 면역글로불린 구조를 가지는, 일반적으로 재조합 기법을 이용해서 제조되는 분자를 나타낸다. 항원-결합 부위는 인간 불변 도메인에 융합된 전체 비-인간 항체 가변 도메인, 또는 인간 가변 도메인의 적절한 인간 프레임워크 영역에 그래프팅된 이러한 가변 도메인의 상보성 결정 영역(CDR)만을 포

함할 수 있다. 이러한 인간화 분자의 프레임워크 잔기는 야생형일 수도 있고(예컨대, 완전 인간) 또는 이들은 그 서열이 인간화를 위한 기본으로 작용한 인간 항체에서 확인되지 않는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하도록 변형될 수도 있다. 인간화는 분자의 불변 도메인이 인간 개체에서 면역원으로서 작용할 가능성을 경감시키거나 제거하지만, 외래 가변 도메인에 대한 면역 반응의 가능성은 남아있다(LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). 다른 접근은 인간-유래 불변 도메인을 제공할 뿐만 아니라 이들을 최대한 인간 형태에 가깝게 재형상화하기 위해 가변 도메인도 변형하는 데 초점을 맞춘다. 중쇄 및 경쇄 모두의 가변 도메인은 주어진 종에서 비교적 보존되고 CDR에 대한 골격을 제공하는 것으로 추정되는 4개의 프레임워크 영역(FR)이 인접하는, 관심 항원에 대해 반응하여 변하며 결합능을 결정하는 3개의 상보성-결정 영역(CDR)을 함유하는 것으로 알려져 있다. 특정 항원에 대해 비인간 항체가 제조되는 경우, 가변 도메인은 변형될 인간 항체에 존재하는 FR 상에 비인간 항체에서 유래되는 CDR을 그래프팅하여 "재형상화" 또는 "인간화"될 수 있다. 다양한 항체에 대한 상기 접근의 적용은 문헌[Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; 및 Co, M.S. *et al.* (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154]에 보고되었다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 모든 CDR 서열을 보존한다(예를 들어, 마우스 항체로부터의 모든 6개 CDR을 함유하는 인간화 마우스 항체). 다른 구현예에서, 인간화 항체는 원래 항체로부터의 하나 이상의 CDR"에서 유래되는" 하나 이상의 CDR로도 명명되는, 원래 항체에 대해 변경되는 하나 이상의 CDR(1, 2, 3, 4, 5, 6개)을 갖는다. 항원을 인간화하는 능력은 널리 공지되어 있다(예컨대, US 특허 번호 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,859,205; 6,407,213; 6,881,557 참고).

[0080] 본원에서 이용되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이것이 대안적 에피토프 대비 해당 에피토프와 더 빈번하게, 더 빠르게, 더 긴 기간 및/또는 더 큰 친화도 또는 결합력으로 반응하거나 연합하는 경우, 다른 분자의 영역(즉, 에피토프)과 "특이적으로" 결합하는 것으로 언급된다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 다른 분자보다 그 표적(인간 알파 시누클레인)에 대해 적어도 10배 더 강력하게; 바람직하게는 적어도 50배 더 강력하게 그리고 보다 바람직하게는 적어도 100배 더 강력하게 결합한다. 바람직하게는, 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 생리적 조건 하에, 예를 들어, 생체내에서 결합한다. 따라서, 인간 알파-시누클레인의 잔기 112~117 내의 에피토프(ILETMP(SEQ ID NO:9))에 "특이적으로 결합"할 수 있는 항체는 이러한 특이성으로 및/또는 이러한 조건 하에 인간 알파-시누클레인의 잔기 112~117 내의 에피토프에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포괄한다. 이러한 결합의 결정에 적합한 방법은 당업자에게 공지되어 있을 것이며, 예시적 방법은 동반되는 실시예에 기재되어 있다. 본원에서 이용되는 소정 항원에 대한 항체 결합의 맥락에서의 "결합"이라는 용어는, 예를 들어 리간드로서 항원을 및 분석물질로서 항체를 이용하는 BIAcore® 3000 또는 T200 기기에서 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술에 의해 결정되는 경우, 전형적으로 약 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하의 KD에 대응하는 친화도를 갖는 결합을 나타내며, 소정 항원 또는 가깝게 관련된 항원 이외의 비특이적 항원(예컨대, BSA, 카제인)으로의 결합에 대한 그 친화도보다 적어도 10배 미만, 예컨대 적어도 100배 미만, 예를 들어 적어도 1,000배 미만, 예컨대 적어도 10,000배 미만, 예를 들어 적어도 100,000배 미만인 KD에 대응하는 친화도로 소정 항원에 결합한다. 친화도가 더 낮은 양은 항체의 KD에 의존하며, 이에 따라 항체의 KD가 매우 낮은(즉, 항체가 매우 특이적인) 경우, 비특이적 항원에 대한 친화도보다 항원에 대한 친화도가 더 낮은 양은 적어도 10,000배일 수 있다.

[0081] 본원에서 이용되는 "kd"(초-1 또는 1/s)라는 용어는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 속도 상수를 나타낸다. 상기 값은 koff값으로도 불린다.

- [0082] 본원에서 이용되는 "ka" ($M^{-1} \times \text{초}^{-1}$ 또는 $1/M\text{초}$)라는 용어는 특정한 항체-항원 상호작용의 연합 속도 상수를 나타낸다.
- [0083] 본원에서 이용되는 "KD" (M)라는 용어는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 나타내며, kd를 ka로 나누어 수득된다.
- [0084] 본원에서 이용되는 "KA" (M^{-1} 또는 $1/M$)라는 용어는 특정한 항체-항원 상호작용의 연합 평형 상수를 나타내며, ka를 kd로 나누어 수득된다.
- [0085] 하나의 구현예에서, 본 발명은 하나 이상의 다음 특성을 나타내는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다:
- [0086] i. 0.5~10 nM, 예컨대 1~5 nM 또는 1~2 nM의 알파-시누클레인에 대한 결합 친화도(KD);
- [0087] ii. 알파-시누클레인 피브릴의 프로테아제 절단 억제능;
- [0088] iii. F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파의 손상 역전능;
- [0089] iv. 생체내 미세투석에 의해 측정되는 마우스 해마에서 알파-시누클레인의 수준 감소능;
- [0090] v. 만성 투여되는 경우, 파킨슨병의 래트 모델에서 운동 기능 회복능
- [0091] vi. 알파-시누클레인의 씨드화(예컨대 시험관내 및/또는 파킨슨병의 마우스 모델에서 불용성 인산화 알파-시누클레인의 축적) 방지능; 및/또는
- [0092] vii. 인간 뇌에서 절단된 알파-시누클레인에 대한 결합능.
- [0093] 알파-시누클레인에 대한 결합 친화도(KD)는 당분야에 널리 공지된, 예컨대 실시예 2에 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0094] "알파-시누클레인 피브릴의 프로테아제 절단 억제능"이라는 용어에는 일차 피질 뉴론에서 인간 알파 시누클레인의 단편 1~119~122의 칼파인-1 유도 형성의 억제능이 포함된다(실시예 5 참고).
- [0095] "F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파의 손상 역전능"이라는 용어에는, 예를 들어 전기생리적으로 측정되는 유발 fEPSP 경사에 의해 시사되는, F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 해마의 CA1 영역에서의 시냅스 전파 및 유연성 손상의 역전능이 포함된다(실시예 6 참고).
- [0096] "생체내 미세투석에 의해 측정되는 마우스 해마에서 알파-시누클레인의 수준 감소능"이라는 용어에는 생체내 미세투석을 이용해서 측정되는, 깨어있는, 자유롭게 움직이는 F28-snca 트랜스제닉 마우스 해마에서 인간 알파 시누클레인의 수준 감소능이 포함된다(실시예 7 참고).
- [0097] "만성 투여되는 경우, 파킨슨병의 래트 모델에서 운동 기능 회복능"이라는 용어에는 파킨슨병의 래트 재조합 아데노-연관 바이러스 벡터(rAAV) 모델에서 운동 비대칭성의 감소능 또는 제거능이 포함된다(실시예 8 참고).
- [0098] 일부 항체에서, CDR의 일부, 즉 SDR로 명명되는, 결합을 위해 요구되는 CDR 잔기의 하위세트만이 인간화 항체에서 결합을 보유하기 위해 필요하다. 관련 에피토프와 접촉하지 않고 SDR에 있지 않는 CDR 잔기는 이전 연구(예를 들어 CDR H2에서의 잔기 H60~H65가 종종 요구되지 않음)에 기반하여 Chothia 고가변 루프 밖에 놓인 Kabat CDR 영역으로부터(문헌[Kabat *et al.* (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. *et al.* (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917 참고), 분자 모델링에 의해 및/또는 실험적으로, 또는 문헌[Gonzales, N.R. *et al.* (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity," Mol. Immunol. 41:863-872]에 기재된 바와 같이 확인될 수 있다. 이러한 인간화 항체에서, 하나 이상의 공여체 CDR 잔기가 부재하거나 전체 공여체 CDR이 생략되는 위치에서, 그 위치를 점유하는 아미노산은 수신체 항체 서열에서 대응하는 위치(Kabat 넘버링에 의해)를 점유하는 아미노산일 수 있다. 포함될 CDR에서의 공여체 아미노산에 대한 수신체의 이러한 치환의 수는 경쟁하는 고려사항의 밸런스를 반영한다. 이러한 치환은 인간화 항체에서 마우스 아미노산의 수를 감소시키고 이에 따라 잠재적 면역원성을 감소시키는 데 잠재적으로 유리하다. 그러나, 치환은 또한 친화도 변화를 유도할 수 있고, 친화도의 현저한 감소가 바람직하게 회피된다. CDR 내의 치환 위치 및 치환할 아미노산은 또한 실험적으로 선택될 수 있다.

[0099]

CDR 잔기의 단일 아미노산 변경이 기능적 결합의 손실을 일으킬 수 있다는 사실(Rudikoff, S. *etc.* (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983)은 대안적인 기능적 CDR 서열의 체계적 확인 수단을 제공한다. 이러한 변이체 CDR을 수득하기 위한 하나의 바람직한 방법에서, CDR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 돌연변이되어(예를 들어 무작위 돌연변이화를 통해 또는 부위-지정 방법(예컨대, 돌연변이된 유전자위를 인코딩하는 프라이머를 이용한 폴리머라제 연쇄-매개 증폭)에 의해) 치환된 아미노산 잔기를 갖는 CDR을 제조한다. 원래의 (기능적) CDR 서열에서 관련 잔기의 정체를 치환된(비기능적) 변이체 CDR 서열의 정체와 비교함으로써, 그 치환에 대한 BLOSUM62.iiij 치환 스코어가 확인될 수 있다. BLOSUM 시스템은 신뢰되는 정렬을 위해 서열 데이터베이스를 분석하여 생성되는 아미노산 치환 매트릭스를 제공한다(Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919; Karlin, S. *et al.* (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565. 현재, 가장 진보된 BLOSUM 데이터베이스는 BLOSUM62 데이터베이스(BLOSUM62.iiij)이다. 표 1은 BLOSUM62.iiij 치환 스코어를 제공한다(스코어가 높을수록 치환이 더 보존적이며, 이에 따라 치환이 기능에 영향을 미치지 않을 가능성이 더 높다). 예를 들어, 생성되는 CDR을 포함하는 항원-결합 단편이 알파-시누클레인에 결합하지 못하는 경우, BLOSUM62.iiij 치환 스코어는 불충분하게 보존적인 것으로 간주되고, 더 높은 치환 스코어를 갖는 새로운 후보 치환이 선택되어 제조된다. 따라서 예를 들어, 원래 잔기가 글루타메이트(E)이고, 비-기능적 치환 잔기가 히스티딘(H)인 경우, BLOSUM62.iiij 치환 스코어는 0일 것이고, 보다 보존적인(예컨대 아스파르테이트, 아스파라긴, 글루타민, 또는 라이신으로의) 변화가 바람직하다.

[0100]

[표 1]

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

[0101]

[0102] 따라서 본 발명은 개선된 CDR을 확인하기 위한 무작위 돌연변이화의 이용을 고려한다. 본 발명의 맥락에서, 보존적 치환은 다음 3개 표 중 하나 이상에서 반영되는 아미노산 클래스 내의 치환에 의해 정의될 수 있다.

[0103] [표 2]

보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 클래스

표 2	
산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
친수성 비하전 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
지방족 비하전 잔기	Cly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비극성 비하전 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0104]

[0105] [표 3]

대안적인 보존적 아미노산 잔기 치환 클래스

표 3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0106]

[0107] [표 4]

아미노산 잔기의 대안적인 물리적 및 기능적 분류

표 4	
알코올기-함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V 및 M
사이클로알케닐-연관 잔기	F, H, W 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y
음으로 하전된 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S 및 T
양으로 하전된 잔기	H, K 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T 및 V
매우 작은 잔기	A, G 및 S
턴 형성에 관여되는 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P 및 T
유연한 잔기	Q, T, K, S, G, P, D, E 및 R

[0108]

[0109] 보다 보존적인 치환 그룹에는 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 및 아스파라긴-글루타민이 포함된다.

[0110] 아미노산의 추가 그룹은 또한, 예컨대 문헌[Creighton (1984) Proteins: Structure and Molecular Properties

(2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company]에 기재된 원리를 이용하여 제형화될 수 있다.

- [0111] 과지 디스플레이 기술이 CDR 친화도를 증가시키기 위해(또는 감소시키기 위해) 대안적으로 이용될 수 있다. 친화도 성숙으로 불리는 상기 기술은 돌연변이화 또는 "CDR 위킹"을 채택하며 재선택은 최초 또는 모체 항체와 대비되는 경우, 항원에 대해 더 높은(또는 더 낮은) 친화도로 결합하는 CDR을 갖는 항체를 확인하기 위해 표적 항원 또는 이의 항원성 항원-결합 단편을 이용한다(예컨대, 문헌[Glaser *et al.* (1992) *J. Immunology* 149:390-3]참고). 단일 뉴클레오티드가 아닌 전체 코돈의 돌연변이화는 아미노산 돌연변이의 반-무작위화 레퍼토리를 생성한다. 라이브러리는 단일 CDR에서 단일 아미노산 변경에 의해 상이하며 각각의 CDR 잔기에 대한 각각의 가능한 아미노산 치환을 나타내는 변이체를 함유하는 각각의 변이체 클론의 풀로 구성되어 구축될 수 있다. 항원에 대해 증가된(또는 감소된) 결합 친화도를 갖는 돌연변이체는 고정화된 돌연변이체를 표지된 항원과 접촉시켜 스크리닝될 수 있다. 당분야에 공지된 임의의 스크리닝 방법이 항원에 대해 증가되거나 감소된 친화도를 갖는 돌연변이체 항체를 확인하기 위해 이용될 수 있다(예컨대, ELISA)(문헌[Wu *et al.* 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155:1994] 참고). 경쇄를 무작위화하는 CDR 위킹이 가능하게 이용될 수 있다(문헌[Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551] 참고).
- [0112] 이러한 친화도 성숙을 달성하기 위한 방법은 예를 들어, 문헌[Krause, J.C. *et al.* (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody," *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. *et al.* (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. *et al.* (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes," *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. *et al.* (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. *et al.* (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," *Virology* 393(1):112-119; Finlay, W.J. *et al.* (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. *et al.* (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," *Methods Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. *et al.* (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," *Mol. Immunol.* 46(1):135-144; 및 Barderas, R. *et al.* (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034]에 기재되어 있다.
- [0113] 따라서, 포괄된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 CDR 변이체의 서열은 치환; 예를 들어, 치환된 4개 아미노산 잔기, 3개 아미노산 잔기, 2개 아미노산 잔기 또는 1개 아미노산 잔기를 통해 모체 항체, GM37, GM37 var 1~3, 또는 285의 CDR의 서열과 상이할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현예에 따르면, CDR 영역에서의 아미노산이 상기 3개 표에 정의된 바와 같은, 보존적 치환으로 치환될 수 있음이 또한 고려된다.
- [0114] 본원에서 이용되는 "치료" 또는 "치료하는"이라는 용어는 질환 또는 장애의 진행 또는 중증도의 완화, 지연, 약화 또는 역전, 또는 이러한 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상 또는 부작용의 완화, 지연, 약화 또는 역전을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, "치료" 또는 "치료하는"은 추가로 유익하거나 요망되는 임상 결과를 수득하기 위한 접근을 의미하며, 여기서 "유익하거나 요망되는 임상 결과"에는 비제한적으로, 부분적이건 전체적이건, 검출 가능한건 검출 불가능하건 무관하게, 증상의 경감, 장애 또는 질환 정도의 감소, 안정화된(즉, 약화되지 않은) 질환 또는 장애 상태, 질환 또는 장애 상태의 진행 지체 또는 지연, 질환 또는 장애 상태의 완화 또는 억제, 및 질환 또는 장애의 차도가 포함된다.
- [0115] 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 적용되는 경우 "유효량"은 필요한 투여량 및 시기 동안, 비제한적으로 임상 결과를 포함하는 의도되는 생물학적 효과 또는 요망되는 치료 결과를 달성하기 위해 충분한 양을 나타낸다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 적용되는 경우 "치료 유효량"이라는 어구는 장애 또는 질환 상태의, 또는 장애 또는 질환 증상의 진행 완화, 억제, 안정화, 역전, 지연, 약화 또는 지체를 위해 충분한, 항체, 또는 이의 항원-결합 단편의 양을 표시하려는 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 다른 화합물과의 조합으로, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여를 제공한다. 이러한 경우, "유효량"은 의도되는 생물학

적 효과를 유도하기 충분한 조합의 양이다.

- [0116] 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중과 같은 요인, 및 항-알파-시누클레인 항체가 개체에서 요망되는 반응을 일으키는 능력에 따라 변할 수 있다. 치료 유효량은 또한 항체 또는 항체 부분의 임의의 독성 또는 유해 효과를 치료적으로 유익한 효과가 능가하는 양이다.
- [0117] 상기 나타난 바와 같이, 본 발명은 특히 인간 알파-시누클레인의 아미노산 112~117 내의 에피토프(SEQ ID NO:9(ILEDMP))에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 항체는 알파-시누클레인의 112~117 아미노산 내의 에피토프로의 결합에 대해 항체 GM37과 경쟁할 수 있다.
- [0118] GM37로 예시되는, 본 발명의 항체, 그 변이체 GM37 var 1~3 및 GM285, 및 이의 알파-시누클레인 결합 단편은 알파-시누클레인의 잔기 1~119/122로 구성되는 독성 알파-시누클레인 단편에 결합할 수 있고 그 독성을 중화할 수 있고(예를 들어, 알파-시누클레인 단편으로의 세포의 결합에 의해 이에 의해 세포로부터 섭취되는 것을 방지할 수 있다. 놀랍게도 알파-시누클레인의 아미노산 112~117 내의 에피토프에 결합할 수 있는 본 발명의 항체는 인간 뇌에서 독성 알파-시누클레인 중에 대한 결합에서 선행 기술의 항체, 예컨대 항체 9E4보다 우수하고, 세포의 알파-시누클레인을 제거하고 생체내 알파-시누클레인에 의해 유도되는 손상된 시냅스 전파를 정상화하는 데 있어서 더 우수한 효과를 갖는다. 본 발명의 항체는 또한 파킨슨병에 대한 래트 모델에서 관련 운동 표현형의 출현을 완화할 수 있다.
- [0119] 본 발명의 항체는 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다.
- [0120] 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 치료 유효량을, 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 알파-시누클레인 응집물 형성을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0121] 또한 항체는 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 및/또는 안정화제와 함께 조성물에 있을 수 있다. 본 발명의 항체는 치료법에서 이용될 수 있다. 특히 본 발명의 항체는 시누클레인병증, 예컨대 파킨슨병(파킨슨병의 특발성 유전 형태 포함), 고서병, 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축의 치료에서 이용될 수 있다.
- [0122] 본 발명에 의해 고려되는 치료는 만성일 수 있고, 환자는 적어도 2주, 예컨대 적어도 1개월, 6개월, 1년 이상 치료받을 수 있다.
- [0123] 본 발명의 이의 항원-결합 단편의 항체는 상이한 세포주, 예컨대 인간 세포주, 포유류 비-인간 세포주, 및 곤충 세포주, 예를 들어 CHO 세포주, HEK 세포주, BHK-21 세포주, 쥐과 세포주(예컨대 골수종 세포주), 섬유육종 세포주, PER.C6 세포주, HKB-11 세포주, CAP 세포주 및 HuH-7 인간 세포주(Dumont et al, 2015, Crit Rev Biotechnol. Sep 18:1-13., 그 내용은 본원에 참조로 포함됨)에서 제조될 수 있다.
- [0124] 본 발명의 항체는 예를 들어 문헌[Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에 최초 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조되는 모노클로날 항체일 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어, 문헌[Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)]에 기재된 기법을 이용하여 과지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 모노클로날 항체는 임의의 적합한 원천으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 모노클로날 항체는, 예를 들어, 표면 상에 항원, 또는 관심 항원을 인코딩하는 핵산을 발현하는 세포 형태로, 관심 항원으로 면역화된 마우스로부터 수득되는 쥐과 비장 B 림프구 세포로부터 제조되는 하이브리도마로부터 수득될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 면역화된 인간 또는 비-인간 포유류, 예컨대 래트, 토끼, 개, 양, 염소, 영장류 등의 항체-발현 세포에서 유래되는 하이브리도마로부터 수득될 수 있다.
- [0125] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 알파-시누클레인에 대해 유도되는 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템이 아닌 인간 면역계의 일부를 수반하는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 마우스를 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 트랜스제닉 및 트랜스염색체 마우스에는 본원에서 각각 HuMAb 마우스 및 KM 마우스로 불리는 마우스가 포함된다.
- [0126] HuMAb 마우스는 내인성 μ 및 κ 사슬 유전자위를 불활성화하는 표적화된 돌연변이와 함께, 재배열되지 않은 인간 중쇄 가변 및 불변(μ 및 Y) 및 경쇄 가변 및 불변(κ) 사슬 면역글로불린 서열을 인코딩하는 인간 면역글로불린 유전자 미니유전자위를 함유한다(Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 Ig κ 의 감소된 발현을 나타내며, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스유전자

가 클래스 스위치 및 체세포 돌연변이를 거쳐 고친화도 인간 IgG, κ 모노클로날 항체를 생성한다(Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌; 문헌[Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) 및 Harding, F. and Lonberg, N., Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)]에서 리뷰로 다뤄짐). HuMAb 마우스의 제조는 문헌[Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 상세히 기재되어 있다. 또한 US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 및 WO 01/09187을 참고한다.

[0127] HCo7, HCo12, HCo17 및 HCo20 마우스는 이의 내인성 경쇄(카파) 유전자에 JKD 손상(문헌[Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)]에 기재됨), 이의 내인성 중쇄 유전자에 CMD 손상(WO 01/14424의 실시예 1에 기재됨), 및 KCo5 인간 카파 경쇄 트랜스유전자를 갖는다(문헌[Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 기재됨). 추가로, HCo7 마우스는 HCo7 인간 중쇄 트랜스유전자를 가지며(US 5,770,429에 기재됨), HCo12 마우스는 HCo12 인간 중쇄 트랜스유전자를 가지고(WO 01/14424의 실시예 2에 기재됨), HCo17 마우스는 HCo17 인간 중쇄 트랜스유전자를 가지고(WO 01/09187의 실시예 2에 기재됨) 및 HCo20 마우스는 HCo20 인간 중쇄 트랜스유전자를 갖는다. 생성되는 마우스는 내인성 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 유전자위의 손상을 위한 동종접합성 배경에서 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 트랜스유전자를 발현한다.

[0128] KM 마우스 계통에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 문헌[Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)]에 기재된 바와 같이 동종접합성으로 손상되었고 내인성 마우스 중쇄 유전자는 WO 01/09187의 실시예 1에 기재된 바와 같이 동종접합성으로 손상되었다. 상기 마우스 계통은 문헌[Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 기재된 바와 같이, 인간 카파 경쇄 트랜스유전자, KCo5를 수반한다. 상기 마우스 계통은 또한 WO 02/43478에 기재된 바와 같이 염색체 14 단편 hCF(SC20)로 이루어진 인간 중쇄 트랜스염색체를 수반한다. HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c 및 HCo20-Balb/c 마우스는 WO 09/097006에 기재된 바와 같이 HCo12, HCo17 및 HCo20을 KCo5[J/K](Balb)와 교배하여 생성될 수 있다.

[0129] KM 마우스 계통에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 문헌[Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)]에 기재된 바와 같이 동종접합성으로 손상되었고 내인성 마우스 중쇄 유전자는 WO 01/09187의 실시예 1에 기재된 바와 같이 동종접합성으로 손상되었다. 상기 마우스 계통은 문헌[Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 기재된 바와 같이, 인간 카파 경쇄 트랜스유전자, KCo5를 수반한다. 상기 마우스 계통은 또한 WO 02/43478에 기재된 바와 같이 염색체 14 항원-결합 단편 hCF(SC20)로 이루어진 인간 중쇄 트랜스염색체를 수반한다.

[0130] 이러한 트랜스제닉 마우스로부터의 비장세포는 널리 공지된 기법에 따라 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생성하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 인간 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 또는 다른 종에서 유래되는 본 발명의 항체는 또한 관심 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열에 대해 트랜스제닉인 다른 비-인간 포유류 또는 식물의 생성 및 이로부터 회수 가능한 형태로의 항체 제조를 통해 트랜스유전자를 이용해서 생성될 수 있다. 포유류에서의 트랜스제닉 제조에 관해, 항체는 염소, 소, 또는 다른 포유류의 모유에서 제조되고 이로부터 회수될 수 있다. 예를 들어, US 5,827,690, US 5,756,687, US 5,750,172 및 US 5,741,957을 참고한다.

[0131] 본 발명의 항체는 임의의 이소형일 수 있다. 이소형의 선택은 전형적으로 요망되는 효과기 기능, 예컨대 ADCC 유도에 의해 가이드될 것이다. 예시적 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4이다. 인간 경쇄 불변 도메인, 카파 또는 람다가 이용될 수 있다. 요망되는 경우, 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체의 클래스는 공지된 방법에 의해 스위치될 수 있다. 예를 들어, 원래 IgM이던 본 발명의 항체는 본 발명의 IgG 항체로 클래스 스위치될 수 있다. 또한, 클래스 스위칭 기법은 하나의 IgG 서브클래스를 다른 서브클래스로, 예를 들어 IgG1에서 IgG2로 전환하기 위해 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체의 효과기 기능은, 예컨대, 다양한 치료 용도를 위해 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체로의 이소형 스위칭에 의해 변화될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체는 IgG1 항체, 예를 들어 IgG1, κ 이다. 항체는 그 아미노산 서열이 다른 이소형에 비해 해당 이소형과 가장 상동성인 경우, 특정한 이소형인 것으로 언급된다.

[0132] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체는 전장 항체, 바람직하게는 IgG 항체, 특히 IgG1, κ 항체이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 항체 단편 또는 단일쇄 항체이다.

- [0133] 항체 및 이의 항원-결합 단편은, 예컨대 통상적 기법을 이용하여 항원-결합 단편화에 의해 수득될 수 있고, 항원-결합 단편은 전체 항체에 대해 본원에 기재된 것과 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 항원-결합 단편은 항체를 펩신으로 처리하여 생성될 수 있다. 생성되는 F(ab')₂ 항원-결합 단편은 디설파이드 가교를 환원시키도록 처리되어 Fab' 항원-결합 단편을 제조할 수 있다. Fab 항원-결합 단편은 IgG 항체를 파파인으로 처리하여 수득될 수 있다; Fab' 항원-결합 단편은 IgG 항체의 펩신 소화로 수득될 수 있다. F(ab') 항원-결합 단편은 또한 티오에테르 결합 또는 디설파이드 결합을 통해 후술되는 Fab'의 결합에 의해 제조될 수 있다. Fab' 항원-결합 단편은 F(ab')₂의 힌지 도메인의 디설파이드 결합을 절단하여 수득되는 항체 항원-결합 단편이다. Fab'-항원-결합 단편은 F(ab')₂ 항원-결합 단편을 환원제, 예컨대 디티오프로 처리하여 수득될 수 있다. 항체 항원-결합 단편은 또한 제조할 세포에서 이러한 항원-결합 단편을 인코딩하는 핵산의 발현에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)]참고). 예를 들어, F(ab')₂ 항원-결합 단편 부분을 인코딩하는 키메라 유전자에는 CH1 영역 및 H 사슬의 힌지 도메인을 인코딩하는 DNA 서열에 이어, 번역 중지 코돈이 포함되어, 이러한 절단된 항체 항원-결합 단편 분자를 산출할 수 있다.
- [0134] 하나의 구현예에서, 항-알파-시누클레인 항체는 1가 항체, 바람직하게는 힌지 도메인이 결실된 W02007059782(그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 1가 항체이다. 따라서, 하나의 구현예에서, 항체는 1가 항체이며, 여기서 상기 항-알파-시누클레인 항체는 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 구축된다: i) 상기 1가 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산 구축물을 제공하는 단계로, 상기 구축물은 선택된 항원 특이적 항-알파-시누클레인 항체의 VL 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 Ig의 불변 CL 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 VL 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 상기 Ig의 CL 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 함께 작동 가능하게 연결되고, IgG1 서브타입의 경우, CL 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 CL 영역이 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 또는 인간에게 투여되는 경우 CL 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩타이드와 디설파이드 결합 또는 공유 결합을 형성할 수 있는 임의의 아미노산을 함유하지 않도록 변형되는 단계; ii) 상기 1가 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 구축물을 제공하는 단계로, 상기 구축물은 선택된 항원 특이적 항체의 VH 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 인간 Ig의 불변 CH 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, CH 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 힌지 도메인에 대응하는 영역, 및 Ig 서브타입에 의해 요구되는 바에 따라 CH 영역의 다른 영역, 예컨대 CH3 영역이 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 인간에게 투여되는 경우 인간 Ig의 CH 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩타이드와 디설파이드 결합 또는 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄-간 결합의 형성에 참여하는 임의의 아미노산 잔기를 함유하지 않도록 변형되며, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 VH 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 상기 Ig의 CH 영역을 인코딩하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 함께 작동 가능하게 연결되는 단계; iii) 상기 1가 항체를 제조하기 위한 세포 발현 시스템을 제공하는 단계; iv) (iii)의 세포 발현 시스템의 세포에서 (i) 및 (ii)의 핵산 구축물을 공동 발현하여 상기 1가 항체를 제조하는 단계.
- [0135] 유사하게, 하나의 구현예에서, 항-알파-시누클레인 항체는 다음을 포함하는 1가 항체이다:
- [0136] (i) 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 항체의 가변 도메인 또는 상기 영역의 항원-결합 부분, 및
- [0137] (ii) 면역글로불린의 CH 도메인 또는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 이의 도메인으로서, CH 도메인 및 이의 도메인은 힌지 도메인에 대응하는 도메인, 및 면역 글로불린이 IgG4 서브타입이 아닌 경우, CH 도메인의 다른 도메인, 예컨대 CH3 도메인이 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 동일한 CH 도메인과 디설파이드 결합 또는 동일한 CH 도메인과 다른 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄간 결합을 형성할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된 도메인.
- [0138] 추가 구현예에서, 1가 항-알파-시누클레인 항체의 중쇄는 전체 힌지 도메인이 결실되도록 변형되었다.
- [0139] 다른 추가 구현예에서, 상기 1가 항체의 서열은 이것이 N-연결 글리코실화를 위한 임의의 수신체 부위를 포함하지 않도록 변형되었다.
- [0140] 본 발명에는 또한 "이중특이적 항체"가 포함되며, 여기서 항-알파-시누클레인 결합 영역(예컨대, 항-알파-시누클레인 모노클로날 항체의 알파-시누클레인-결합 영역)은 하나를 초과하는 에피토프를 표적으로 하는 2가 또는 다가 이중특이적 스캐폴드의 일부이다(예를 들어, 제2 에피토프는 이중특이적 항체가 생물학적 장벽, 예컨대 혈액 뇌 장벽을 통과해서 개선된 트랜스사이토시스를 나타내도록, 활성 수송 수용체의 에피토프를 포함할 수 있음). 따라서 다른 추가 구현예에서, 항-시누클레인 항체의 1가 Fab는 상이한 단백질을 표적으로 하는 추가적인 Fab 또는 scfv로 연결되어 이중특이적 항체를 생성할 수 있다. 이중특이적 항체는 이중 기능, 예를 들어 항-

시누클레인 결합 도메인에 의해 부여되는 치료 기능 및 생물학적 장벽, 예컨대 혈액 뇌 장벽을 거친 수송을 증강시키는 수용체 분자에 결합할 수 있는 수송 기능을 가질 수 있다.

[0141] 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체, 및 이의 항원-결합 단편에는 또한 단일쇄 항체가 포함된다. 단일쇄 항체는 중쇄 및 경쇄 Fv 영역이 연결된 펩타이드이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 단일쇄 Fv(scFv)를 제공하며, 여기서 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체의 Fv 내 중쇄 및 경쇄는 단일 펩타이드 사슬에서 가요성 펩타이드 링커(전형적으로 약 10, 12, 15개 이상의 아미노산 잔기)로 연결된다. 이러한 항체의 제조 방법은, 예를 들어 문헌[US 4,946,778, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 및 McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990)]에 기재되어 있다. 단일쇄 항체는 단일 VH 및 VL만 이용되는 경우 1가, 2개의 VH 및 VL이 이용되는 경우 2가, 또는 2개를 초과하는 VH 및 VL이 이용되는 경우 다가일 수 있다.

[0142] 본원에 기재되는 항-알파-시누클레인 항체 및 이의 항원-결합 단편은 임의의 적합한 수의 변형된 아미노산의 도입 및/또는 이러한 콘주게이션된 치환체와의 연합에 의해 변형될 수 있다. 상기 맥락에서의 적합성은 일반적으로 비-유도체화된 모체 항-알파-시누클레인 항체와 연관되는 알파-시누클레인 선택성 및/또는 항-알파-시누클레인 특이성을 적어도 실질적으로 보유하는 능력에 의해 결정된다. 하나 이상의 변형된 아미노산의 도입은, 예를 들어, 폴리펩타이드 혈청 반감기의 증가, 폴리펩타이드 항원성의 감소, 또는 폴리펩타이드 보관 안정성의 증가에서 유리할 수 있다. 아미노산(들)은, 예를 들어, 재조합적 제조 동안 번역과 함께 또는 번역 후에 변형(예컨대, 포유류 세포에서 발현 동안 N-X-S/T 모티프에서의 N-연결 글리코실화)되거나 합성 수단에 의해 변형된다. 변형된 아미노산의 비제한적 예에는 글리코실화 아미노산, 황산화 아미노산, 프레닐화(예컨대, 파네실화, 게라닐게라닐화) 아미노산, 아세틸화 아미노산, 아실화 아미노산, PEG화 아미노산, 바이오틴화 아미노산, 카복실화 아미노산, 인산화 아미노산 등이 포함된다. 아미노산의 변형에서 당업자를 가이드하기 적절한 참고문헌은 문헌을 통해 제공된다. 예시적 프로토콜은 문헌[Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJ]에서 확인된다. 변형된 아미노산은, 예를 들어, 글리코실화 아미노산, PEG화 아미노산, 파네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 바이오틴화 아미노산, 지질 모이어티에 콘주게이션된 아미노산, 또는 유기 유도체 화제에 콘주게이션된 아미노산으로부터 선택될 수 있다.

[0143] 항-알파-시누클레인 항체는 또한, 예를 들어 이의 순환 반감기를 증가시키기 위해 중합체에 대한 공유 콘주게이션에 의해 화학적으로 변형될 수 있다. 예시적 중합체, 및 이를 펩타이드에 부착하는 방법은, 예를 들어 US 4,766,106, US 4,179,337, US 4,495,285 및 US 4,609,546에 예시된다. 추가적인 예시적 중합체에는 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)(예컨대, 분자량 약 1,000 내지 약 40,000, 예컨대 약 2,000 내지 약 20,000, 예컨대 약 3,000~12,000 g/mol을 갖는 PEG)이 포함된다.

[0144] 본 발명의 항체는 추가로 진단 방법에서 또는 진단 조영 리간드로서 이용될 수 있다.

[0145] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 방사선표지 아미노산을 포함하는 항-알파-시누클레인 항체가 제공된다. 방사선표지 항-알파-시누클레인 항체는 진단 및 치료 목적 모두를 위해 이용될 수 있다(방사선표지 분자에 대한 콘주게이션은 다른 가능한 특징임). 이러한 표지의 비제한적 예에는 비제한적으로 비스무스(^{213}Bi), 탄소(^{11}C , ^{13}C , ^{14}C), 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co , ^{60}Co), 구리(^{64}Cu), 디스프로슘(^{165}Dy), 에르븀(^{169}Er), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd , ^{159}Gd), 갈륨(^{68}Ga , ^{67}Ga), 게르마늄(^{68}Ge), 금(^{198}Au), 홀름(^{166}Ho), 수소(^3H), 인듐(^{111}In , ^{112}In , ^{113}In , ^{115}In), 요오드(^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), 이리듐(^{192}Ir), 철(^{59}Fe), 크립톤($^{81\text{m}}\text{Kr}$), 란타넘(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 질소(^{13}N , ^{15}N), 산소(^{15}O), 팔라듐(^{103}Pd), 인(^{32}P), 칼륨(^{42}K), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메튬(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re , ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루비듐(^{81}Rb , ^{82}Rb), 루테튬(^{82}Ru , ^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀레늄(^{75}Se), 나트륨(^{24}Na), 스트론튬(^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{92}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 탈륨(^{201}Tl), 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 제논(^{133}Xe), 이테르븀(^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Yb), 이트륨(^{90}Y) 및 아연(^{65}Zn)이 포함된다. 방사선표지 아미노산 및 관련 펩타이드 유도체의 제조 방법은 당분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) 및 US 4,681,581, US 4,735,210, US 5,101,827, US 5,102,990 (US RE35,500), US 5,648,471 및 US 5,697,902] 참고. 예를 들어, 방사선통위원소는 클로라민 T 방법에 의해 콘주게이션될 수 있다(Lindgren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-

(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate,” Nucl. Med. Biol. 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) “Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor,” J. Med. Chem. 36(9):1255-1261; Rea, D.W. et al. (1990) “Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors,” Cancer Res. 50(3 Suppl):857s-861s).

[0146] 본 발명은 또한, 모두 광학 검출에 적합한, 형광 표지(예컨대 회토류 킬레이트(예컨대, 유로퓸 킬레이트)), 플루오레신-유형 표지(예컨대, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 5-카복시플루오레신, 6-카복시플루오레신, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신), 로다민-유형 표지(예컨대, ALEXA FLUOR® 568(Invitrogen), TAMRA® 또는 단일 클로라이드), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™(Perkin Elmer), 피코에리트린; 옴벨리페론, 리싸민(Lissamine); 시아닌; 피코에리트린, 텍사스 레드(Texas Red), BODIPY FL-SE®(Invitrogen) 또는 이의 유사체를 이용하여 검출 가능하게 표지되는 항-알파-시누클레인 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 화학발광 표지가 채택될 수 있다(예컨대, 루미놀, 루시페라제, 루시페린, 및 애쿠오린). 이러한 진단 및 검출은 또한 비제한적으로 다양한 효소, 비제한적으로 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하는 효소를 포함하는 검출 가능한 성분으로, 또는 보철기 복합체, 예컨대 비제한적으로 스트렙타비딘/바이오틴 및 애비딘/바이오틴으로 본 발명의 진단 분자를 커플링하여 달성될 수 있다.

[0147] 화학발광 표지가 채택될 수 있다(예컨대, 루미놀, 루시페라제, 루시페린, 및 애쿠오린). 이러한 진단 및 검출은 또한 비제한적으로 다양한 효소, 비제한적으로 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하는 효소를 포함하는 검출 가능한 성분으로, 또는 보철기 복합체, 예컨대 비제한적으로 스트렙타비딘/바이오틴 및 애비딘/바이오틴으로 본 발명의 진단 분자를 커플링하여 달성될 수 있다. 상자성 표지가 또한 채택될 수 있고, 바람직하게는 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 단일-광자 방출 전산화 단층촬영(SPECT)을 이용하여 검출된다. 이러한 상자성 표지에는 비제한적으로 알루미늄(Al), 바륨(Ba), 칼슘(Ca), 세륨(Ce), 디스프로슘(Dy), 에르븀(Er), 유로퓸(Eu), 가돌리늄(Gd), 홀뮴(Ho), 이리듐(Ir), 리튬(Li), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 몰리브덴(M), 네오디뮴(Nd), 오스뮴(Os), 산소(O), 팔라듐(Pd), 백금(Pt), 로듐(Rh), 루테튬(Ru), 사마륨(Sm), 나트륨(Na), 스트론튬(Sr), 테르븀(Tb), 툴륨(Tm), 주석(Sn), 티탄(Ti), 텅스텐(W), 및 지르코늄(Zr)의 상자성 이온, 및 특히, Co^{+2} , Cr^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Ni^{+2} , Ti^{+3} , V^{+3} , 및 V^{+4} , 다양한 양전자 방출 단층촬영을 이용하는 양전자 방출 금속, 및 비-방사활성 상자성 금속 이온을 함유하는 화합물이 포함된다.

[0148] 따라서 하나의 구현예에서, 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체는 형광 표지, 화학발광 표지, 상자성 표지, 방사선동위원소 표지 또는 효소 표지로 표지될 수 있다. 표지된 항체는 대상체의 뇌에서 상기 알파-시누클레인의 존재 또는 양의 검출 또는 측정에서 이용될 수 있다. 상기 방법은 상기 알파-시누클레인에 결합된 항-알파-시누클레인 항체의 생체내 조영의 검출 또는 측정을 포함할 수 있고 상기 알파-시누클레인에 결합된 상기 항-알파-시누클레인 항체의 생체의 조영을 포함할 수 있다.

[0149] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 발현 벡터에 관한 것이다. 이러한 발현 벡터는 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편의 재조합적 제조를 위해 이용될 수 있다.

[0150] 본 발명의 맥락에서 발현 벡터는 염색체, 비-염색체, 및 합성 핵산 벡터(적합한 발현 제어 요소 세트를 포함하는 핵산 서열)를 포함하는 임의의 적합한 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 이러한 벡터의 예에는 SV40 유도체, 박테리아 플라스미드, 파지 DNA, 배컬로바이러스, 효모 플라스미드, 플라스미드 및 파지 DNA의 조합에서 유래되는 벡터, 및 바이러스 핵산(RNA 또는 DNA) 벡터가 포함된다. 하나의 구현예에서, 항-알파-시누클레인 항체를 인코딩하는 핵산은, 예를 들어 선형 발현 요소를 포함하는 네이키드 DNA 또는 RNA 벡터(예를 들어, 문헌[Sykes and Johnston, Nat Biotech 12, 355-59 (1997)]에 기재됨), 압축 핵산 벡터(예를 들어, US 6,077,835 및/또는 WO 00/70087에 기재됨), 플라스미드 벡터, 예컨대 pBR322, pUC 19/18, 또는 pUC 118/119, “밋지(midge)” 최소-크기 핵산 벡터(예를 들어, 문헌[Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)]에 기재됨), 또는 침전 핵산 벡터 구축물, 예컨대 CaPO_4 -침전 구축물로서(예를 들어, 문헌[WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), 및 Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603 (1981)]에 기재됨) 포함된다. 이러한 핵산 벡터 및 이의 이용은 당분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, US 5,589,466 및 US 5,973,972 참고).

[0151] 하나의 구현예에서, 벡터는 박테리아 세포에서 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현에 적

합하다. 이러한 벡터의 예에는 발현 벡터, 예컨대 BlueScript(Stratagene), pIN 벡터(Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989), pET 벡터(Novagen, Madison, WI) 등)가 포함된다.

[0152] 발현 벡터는 또한 또는 대안적으로 효모 시스템에서의 발현에 적합한 벡터일 수 있다. 효모 시스템에서 발현에 적합한 임의의 벡터가 채택될 수 있다. 적합한 벡터에는, 예를 들어, 구성적 또는 유도성 프로모터, 예컨대 알파 인자, 알코올 옥시다제 및 PGH를 포함하는 벡터가 포함된다(문헌[F. Ausubel *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), Grant *et al.*, Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987), Mattanovich, D. *et al.* Methods Mol. Biol. 824, 329-358 (2012), Celik, E. *et al.* Biotechnol. Adv. 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. *et al.* Appl. Biochem. Biotechnol. 142(2), 105-124 (2007), Boer, E. *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 77(3), 513-523 (2007), van der Vaart, J.M. Methods Mol. Biol. 178, 359-366 (2002), 및 Holliger, P. Methods Mol. Biol. 178, 349-357 (2002)]에서 리뷰로 다뤄짐).

[0153] 본 발명의 발현 벡터에서, 항-알파-시누클레인 항체를 인코딩하는 핵산은 임의의 적합한 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현 촉진 요소를 포함하거나 이와 연관될 수 있다. 이러한 요소의 예에는 강력 발현 프로모터(예컨대, 인간 CMV IE 프로모터/인핸서뿐만 아니라 RSV, SV40, SL3-3, MMTV, 및 HIV LTR 프로모터), 효과적인 폴리(A) 종결 서열, 대장균에서의 플라스미드 산물을 위한 복제 기원, 선별 마커로서의 항생제 내성 유전자, 및/또는 편리한 클로닝 부위(예컨대, 폴리링크어)가 포함된다. 핵산은 또한 구성적 프로모터와 대비되는 유도성 프로모터, 예컨대 CMV IE를 포함할 수 있다(당업자는 이러한 용어가 실제로 소정 조건 하의 유전자 발현 정도의 서술자임을 인식할 것이다).

[0154] 본 발명의 이의 항원-결합 단편의 항체는 상이한 세포주, 예컨대 인간 세포주, 포유류 비-인간 세포주, 및 곤충 세포주, 예를 들어 CHO 세포주, HEK 세포주, BHK-21 세포주, 쥐과 세포주(예컨대 골수종 세포주), 섬유육종 세포주, PER.C6 세포주, HKB-11 세포주, CAP 세포주 및 HuH-7 인간 세포주(Dumont *et al.*, 2015, Crit Rev Biotechnol. Sep 18:1-13., 그 내용은 본원에 참조로 포함됨)에서 제조될 수 있다.

[0155] 추가 양태에서, 본 발명은 본원에서 정의된 바와 같은 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 도메인 또는 본원에서 정의된 바와 같은 이중특이적 분자를 제조하는, 제조할 진핵 또는 원핵 숙주 세포, 예컨대 트랜스펙토마(transfectoma)에 관한 것이다. 숙주 세포의 예에는 효모, 박테리아, 및 포유류 세포, 예컨대 CHO 또는 HEK 세포가 포함된다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 코딩하는 서열을 포함하는 세포 계능 내로 안정적으로 통합된 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 통합되지 않은 핵산, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 또는 선형 발현 요소를 포함하는 세포를 제공하며, 이는 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체의 발현을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0156] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항-알파-시누클레인 항체의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 a) 본원에서 상술된 본 발명의 하이브리도마 또는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 b) 배양 배지로부터 본 발명의 항체를 정제하는 단계를 포함한다.

[0157] 하나의 구현예에서, 본 발명은 본원에서 이용되는 용어인, 본원에서 정의된 바와 같은 항-알파-시누클레인 항체를 포함하며, 알파-시누클레인에 결합할 수 없거나 조제물의 항-알파-시누클레인 작용성을 실질적으로 변경하지 않는 자연-발생 항체가 실질적으로 없는 조제물에 관한 것이다. 따라서, 이러한 조제물은 항-알파-시누클레인 항체 및 조제물의 항-알파-시누클레인 항체의 작용성을 변경하지 않는 다른 항체의 혼합물을 포함하는, 자연-발생 혈청, 또는 이러한 혈청의 정제된 유도체를 포괄하지 않으며; 여기서 상기 작용성은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된다:

[0158] (i) 알파-시누클레인에 대한 항-알파-시누클레인 항체의 결합 친화도(KD);

[0159] (ii) 알파-시누클레인 피브릴의 프로테아제 절단을 억제하는 항-알파-시누클레인 항체의 능력;

[0160] (iii) F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파의 손상을 역전시키는 항-알파-시누클레인 항체의 능력;

[0161] (iv) 생체내 미세투석으로 측정되는 마우스 해마에서 알파-시누클레인의 수준을 감소시키는 항-알파-시누클레인 항체의 능력; 및

[0162] (v) 만성 투여되는 경우, 파킨슨병의 래트 모델에서 운동 기능을 회복시키는 항-알파-시누클레인 항체의 능력.

- [0163] (vi) 알파-시누클레인의 씨드화(예컨대 시험관내 및/또는 파킨슨병의 마우스 모델에서 불용성 인산화 알파-시누클레인의 축적)를 방지하는 능력; 및/또는
- [0164] (vii) 인간 뇌에서 절단된 알파-시누클레인에 대해 결합하는 능력.
- [0165] 본 발명은 특히 자연 발생 항-알파-시누클레인 항체의 구조 대비 그 아미노산 서열에(임의의 그 CDR, 가변 도메인, 프레임워크 잔기 및/또는 불변 도메인에) 구조적 변화를 갖는 이러한 항-알파-시누클레인 항체의 조제물에 관한 것이며, 여기서 상기 구조적 변화는 항-알파-시누클레인 모노클로날 항체가 상기 자연 발생 항-알파-시누클레인 항체에 의해 나타나는 작용성 대비 현저히 변경된 작용성(즉, 작용성에서 20% 초과 차이, 40% 초과 차이, 60% 초과 차이, 80% 초과 차이, 100% 초과 차이, 150% 초과 차이, 2배 초과 차이, 4배 초과 차이, 5배 초과 차이, 또는 10배 초과 차이)을 나타내도록 유도하고; 이러한 작용성은
- [0166] (i) 알파-시누클레인에 대한 항-알파-시누클레인 모노클로날 항체의 결합 친화도(KD);
- [0167] (ii) 알파-시누클레인 피브릴의 프로테아제 절단을 억제하는 항-알파-시누클레인 모노클로날 항체의 능력;
- [0168] (iii) F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파의 손상을 역전시키는 항-알파-시누클레인 모노클로날 항체의 능력;
- [0169] (iv) 생체내 미세투석으로 측정되는 마우스 해마에서 알파-시누클레인의 수준을 감소시키는 항-알파-시누클레인 모노클로날 항체의 능력; 및/또는
- [0170] (v) 만성 투여되는 경우, 파킨슨병의 래트 모델에서 운동 기능을 회복시키는 항-알파-시누클레인 모노클로날 항체의 능력;
- [0171] (vi) 알파-시누클레인의 씨드화(예컨대 시험관내 및/또는 파킨슨병의 마우스 모델에서 불용성 인산화 알파-시누클레인의 축적)를 방지하는 능력; 및/또는
- [0172] (vii) 인간 뇌에서 절단된 알파-시누클레인에 대해 결합하는 능력이고,
- [0173] 특히 이러한 변경된 작용성은 구조적 변화의 결과이고, 이에 따라 이로부터 분리 불가능하다.
- [0174] 자연 발생 항체가 "실질적으로 없는"이라는 용어는 이러한 조제물에서 이러한 자연 발생 항체의 완전 부재, 또는 조제물의 알파-시누클레인-결합 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 이러한 조제물 내 이러한 자연 발생 항체 농도의 도입을 나타낸다. 항체는 이것이 자연 발생 대응부를 갖지 않거나 이에 자연적으로 수반되는 성분으로부터 분리되거나 정제된 경우, "단리된" 것으로 언급된다.
- [0175] 이러한 조제물과 관련되는 "자연 발생 항체"라는 용어는 이의 면역계의 기능에 대한 자연적 결과로서, 살아있는 인간 또는 다른 동물 내에서 유발되는 항체(자연-발생 자가항체 포함)를 나타낸다.
- [0176] 따라서, 본 발명의 조제물은 항-알파-시누클레인 항체 및 알파-시누클레인에 의해 보유되지 않는 에피토프에 결합할 수 있는 고의로 첨가된 추가 항체를 함유하는 이러한 조제물을 배제하지 않으며, 실제로 명시적으로 포괄한다. 이러한 조제물에는 특히 이의 구현예가 포함되며, 여기서 조제물은 시누클레인병증, 예컨대 파킨슨병(파킨슨병의 특발성 및 유전 형태 포함), 고셔병, 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축의 치료에서 증강된 유효성을 나타낸다.
- [0177] 추가 양태에서, 본 발명은
- [0178] (i) 둘 다 본원에서 정의된 바와 같은 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 이러한 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 본원에 정의된 용어인 조제물, 및
- [0179] (ii) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0180] 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제뿐만 아니라 통상적 기법에 따른 임의의 다른 공지된 아주반트 및 부형제, 예컨대 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013]에 개시된 것들과 함께 제형화될 수 있다.
- [0181] 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제뿐만 아니라 임의의 다른 공지된 아주반트 및 부형제는 본 발명의 선택된 화합물 및 선택된 투여 방식에 적합해야 한다. 약학적 조성물의 담체 및 다른 성분에 대한 적합성은 본 발명의 선택된 화합물 또는 약학적 조성물의 요망되는 생물학적 특성에 대한 현저한 부정적 영향의 부재(예컨대,

에피토프 결합에 대한 실질적 영향 미만(10% 이하 상대 억제, 5% 이하 상대 억제 등))에 기반하여 결정된다.

- [0182] 본 발명의 약학적 조성물에는 또한 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세제(예컨대, 비이온성 세제, 예컨대 Tween-20 또는 Tween-80), 안정화제(예컨대, 당 또는 단백질-비함유 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 가용화제, 및/또는 약학적 조성물 내 도입에 적합한 다른 물질이 포함될 수 있다. 희석제는 조합의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는 증류수, 생리 인산염 완충 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 및 헥스 용액이다. 또한, 약학적 조성물 또는 제형물에는 또한 다른 담체, 또는 무독성, 비치료, 비-면역원성 안정화제 등이 포함될 수 있다. 조성물에는 또한 크고, 느리게 대사되는 거대분자, 예컨대 단백질, 다당류, 예컨대 키토산, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 공중합체(예컨대, 라텍스 작용화 세파로스, 아가로스, 셀룰로스 등), 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 액체 응집물(예컨대, 오일 액적 또는 리포솜)이 포함될 수 있다.
- [0183] 본 발명의 약학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투여량 수준은 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 요망되는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 변화될 수 있다. 선택된 투여량 수준은 채택되는 본 발명의 특정 조성물, 또는 이의 아마이드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 채택되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 다른 약물, 채택되는 특정 조성물과 병용되는 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반 건강 및 이전 병력 등 의학 분야에 널리 공지된 요인을 포함하는 다양한 약동학적 요인에 근거할 것이다.
- [0184] 약학적 조성물은 예방적 및/또는 치료적 처치를 위한 비경구, 국소, 경구 또는 비강내 수단을 포함하는 임의의 적합한 경로 및 방식에 의해 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여된다. 본원에서 이용되는 "비경구 투여" 및 "비경구 투여되는"이라는 어구는 보통 주사에 의한, 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 피부, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수내, 낭내, 안구내, 심장내, 피내, 복강내, 힘줄내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 낭하, 지주막하, 척추내, 두개내, 흉강내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입이 포함된다. 생체내 및 시험관내 본 발명의 화합물 투여의 추가적인 적합한 경로는 당분야에 널리 공지되어 있으며, 당업자에 의해 선택될 수 있다. 하나의 구현예에서, 약학적 조성물은 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.
- [0185] 약학적으로 허용 가능한 담체에는 본 발명의 화합물과 생리적으로 상용성인 임의의 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장화제, 항산화제 및 흡수 지연제 등이 포함된다.
- [0186] 본 발명의 약학적 조성물에서 채택될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예에는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 에탄올, 텍스트로스, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브유, 옥수수유, 땅콩유, 면실유, 및 참기름, 카복시메틸 셀룰로스 콜로이드성 용액, 트래거캔스 고무 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트, 및/또는 다양한 완충액이 포함된다. 다른 담체는 약학 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0187] 약학적으로 허용 가능한 담체에는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 임시 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 약학 활성 성분을 위한 이러한 매질 및 제제의 이용은 당분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적 매질 또는 제제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고, 본 발명의 약학적 조성물에서의 이의 이용이 고려된다.
- [0188] 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 이용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다.
- [0189] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 예를 들어 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 바이설파이트, 나트륨 메타바이설파이트, 나트륨 설파이트 등; (2) 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페놀 등; 및 (3) 금속 킬레이트화제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함할 수 있다.
- [0190] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 조성물에 등장화제, 예컨대 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 나트륨 클로라이드를 포함할 수 있다.
- [0191] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 선택된 투여 경로에 적절한 하나 이상의 아주반트, 예컨대 보존제, 수화제, 유화제, 분산제, 보존제 또는 완충제를 함유할 수 있고, 이는 약학적 조성물의 보관 수명 또는 효과를 증강시킬 수 있다. 본 발명의 화합물은 신속한 방출로부터 화합물을 보호할 담체와 함께, 예컨대 임플란트, 경피 패치, 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형물로 제조될 수 있다. 이러한 담체에는 젤라틴, 글리

세틸 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 다중무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르, 및 폴리락트산이 단독으로 또는 왁스 또는 당분야에 널리 공지된 다른 물질과 함께 포함될 수 있다. 이러한 제형물의 제조 방법은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 예컨대, 문헌[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참고한다.

[0192] 하나의 구현예에서, 본 발명의 화합물은 생체내 적절한 분포를 보장하도록 제형화될 수 있다. 비경구 투여를 위한 약학적으로 허용 가능한 담체에는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 임시 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 약학 활성 성분을 위한 이러한 매질 및 제제의 이용은 당분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적 매질 또는 제제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고, 본 발명의 약학적 조성물에서의 이의 이용이 고려된다. 보조 활성 화합물이 또한 조성물 내로 포함될 수 있다.

[0193] 주사용 약학적 조성물은 전형적으로 제조 및 보관 조건 하에 멸균되고 안정해야 한다. 조성물은 높은 약물 농도에 적합한 용액, 마이크로-에멀전, 리포솜, 또는 다른 규칙화된 구조로 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유하는 수성 또는 비수성 용매 또는 분산 매질, 및 이의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브유, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅, 예컨대 레시틴의 이용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다. 여러 경우에서, 바람직하게는 조성물에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 글리세롤, 만니톨, 소르비톨, 또는 나트륨 클로라이드를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 항체 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시켜 일으킬 수 있다. 멸균 주사용 용액은 적절한 용매 중 요구되는 양의 활성 화합물을, 필요에 따라 성분, 예컨대 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 포함시킨 후 멸균 미세여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 요구되는 다른 성분, 예컨대 상기 열거된 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 포함시켜 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법의 예는 활성 성분 + 이전에 멸균 여과된 이의 용액으로부터의 임의의 추가적인 요망되는 성분의 분말을 산출하는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)이다.

[0194] 멸균 주사용 용액은 적절한 용매 중 요구되는 양의 활성 화합물을 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 포함시킨 후 멸균 미세여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 도입하여 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법의 예는 활성 성분 + 이전에 멸균 여과된 이의 용액으로부터의 임의의 추가적인 요망되는 성분의 분말을 산출하는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)이다.

[0195] 본원에 기재되는 상기 치료 및 이용 방법에서의 투여량 요법은 최적의 요망되는 반응(예컨대, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 몇몇 분할 용량이 경시적으로 투여될 수 있거나, 용량이 치료 상황의 긴급성에 의해 시사되는 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 제형화될 수 있다. 본원에서 이용되는 투여량 단위 형태는 치료받을 대상체에 대한 단위 투여량으로 적합한 물리적 개별 단위를 나타낸다; 각각의 단위는 요구되는 약학적 담체와 연합되어 요망되는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여량 단위 형태에 대한 사양은, (a) 활성 화합물의 고유한 특징 및 달성될 특정한 치료 효과, 및 (b) 개체에서 민감성 치료를 위한 이러한 활성 화합물 배합 분야에 내재적인 제한에 의해 지정되고, 이에 직접 의존한다.

[0196] 항 알파-시누클레인 항체에 대한 유효 투여량 및 투여량 요법은 치료될 질환 또는 상태에 의존하며 당업자에 의해 결정될 수 있다. 투여량이 주어지는 임의의 주어진 날에, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001 내지 약 100 mg/kg, 및 보다 일반적으로 약 0.01 내지 약 5 mg/kg 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 1 mg/체중kg 또는 10 mg/체중kg 또는 1~10 mg/체중kg 범위 내일 수 있다. 따라서 예시적인 투여량에는 약 0.1 내지 약 10 mg/kg/체중, 약 0.1 내지 약 5 mg/kg/체중, 약 0.1 내지 약 2 mg/kg/체중, 약 0.1 내지 약 1 mg/kg/체중, 예를 들어 약 0.15 mg/kg/체중, 약 0.2 mg/kg/체중, 약 0.5 mg/kg/체중, 약 1 mg/kg/체중, 약 1.5 mg/kg/체중, 약 2 mg/kg/체중, 약 5 mg/kg/체중, 또는 약 10 mg/kg/체중이 포함된다.

[0197] 당분야의 일반 숙련도를 갖는 의사는 요구되는 약학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사는 요망되는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 낮은 수준에서 약학적 조성물에 채택되는 항-알파-시누클레인 항체 용량으로 시작하고 요망되는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다.

일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 1일 용량은 치료 효과를 생성하기에 효과적인 최저 용량인 화합물의 양 일 것이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 전술된 요인에 근거할 것이다. 투여는, 예컨대, 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하일 수 있다. 요망되는 경우, 약학적 조성물의 유효 1일 용량은 선택적으로 단위 투여량 형태로, 하루에 걸쳐 적절한 간격으로 별도 투여되는 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 하위용량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 단독 투여될 수 있지만, 화합물을 전술된 바와 같은 약학적 조성물로 투여하는 것이 바람직하다.

[0198] 본 발명의 표지 항체는 질환 또는 장애를 검출하거나, 진단하거나, 모니터링하기 위해 진단 목적을 위해 이용될 수 있다. 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 비제한적으로 파킨슨병, 특발성 파킨슨병, 선천성 파킨슨병, 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 또는 다계통 위축을 포함하는 신경퇴화 또는 인지 질환 또는 장애의 검출 또는 진단을 제공한다: (a) 알파-시누클레인에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체를 이용하여 대상체의 세포 또는 조직 샘플에서 알파-시누클레인 중 및 단편의 존재를 검정하는 단계; 및 (b) 항원 수준을 대조군 수준, 예컨대 정상 조직 샘플에서의 수준과 비교함으로써, 항원의 대조군 수준 대비 항원의 검정된 수준에서의 증가가 질환 또는 장애를 시사하거나, 질환 또는 장애의 중증도를 시사하는 단계.

[0199] 본 발명의 항체는 당분야에 널리 공지된 면역조직화학 방법을 이용하여 생물학적 샘플에서 알파-시누클레인의 알파-시누클레인 단량체, 올리고머, 피브릴 형태 또는 단편을 검정하기 위해 이용될 수 있다. 단백질 검출에 유용한 다른 항체-기반 방법에는 면역검정, 예컨대 효소 연관 면역검정(ELISA), 방사선면역검정(RIA) 및 메조스케일 탐색 플랫폼 기반 검정(MSD)이 포함된다. 적합한 항체 표지는 이러한 키트 및 방법에서 이용될 수 있고, 당분야에 공지된 표지에는 효소 표지, 예컨대 알칼리성 포스파타제 및 글루코스 옥시다제; 방사선동위원소 표지, 예컨대 요오드(^{125}I , ^{131}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 트리튬(^3H), 인듐(^{121}In), 및 테크네튬($^{99\text{m}}\text{Tc}$); 및 발광 표지, 예컨대 루미놀 및 루시페라제; 및 형광 표지, 예컨대 플루오레신 및 로다민이 포함된다.

[0200] 표지 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 알파-시누클레인-결합 단편의 존재는 진단 목적을 위해 생체내 검출될 수 있다. 하나의 구현예에서, 진단은 a) 이러한 표지 분자의 유효량을 대상체에 투여하는 단계; b) 표지 분자가 Aβ 침적 부위(존재하는 경우)에서 농축되도록 허용하고, 비결합 표지 분자가 배경 수준으로 제거되도록 허용하기 위해 투여 후 일정 시간 간격 동안 대기하는 단계; c) 배경 수준을 결정하는 단계; 및 d) 배경 수준을 초과하는 표지 분자의 검출은 대상체가 질환 또는 장애를 가짐을 시사하거나 질환 또는 장애의 중증도를 시사하도록 대상체에서 표지 분자를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 구현예에 따르면, 분자는 당업자에게 공지된 특정 조영 시스템을 이용하여 검출에 적합한 조영 모이어티로 표지된다. 배경 수준은 검출된 표지 항체의 양을 특정 조영 시스템에 대해 이전에 결정된 표준 값과 비교하는 단계를 포함하는, 당분야에 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 진단 방법에서 이용될 수 있는 방법 및 시스템에는 비제한적으로 전산화 단층촬영(CT), 전신 스캐닝, 예컨대 양전자 방출 단층촬영(PET), 자기 공명 조영(MRI), 및 초음파측정이 포함된다.

[0201] 추가 양태에서, 본 발명은 의약에서 이용하기 위한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.

[0202] 추가 양태에서, 본 발명은 시누클레인병증의 치료, 진단 또는 조영에서 이용하기 위한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.

[0203] 하나의 구현예에서, 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 파킨슨병, 특발성 파킨슨병, 선천성 파킨슨병, 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축의 치료에서 이용하기 위한 것이다.

[0204] 추가 양태에서, 본 발명은 시누클레인병증의 치료, 진단 또는 조영을 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[0205] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합 단편의 유효 투여량을 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 또는 다른 시누클레인병증의 치료, 진단 또는 조영에 관한 것이다.

[0206] 바람직하게는, 본 발명의 이들 양태의 용도 및 방법에서, 치료는 만성이고, 바람직하게는 적어도 2주, 예컨대 적어도 1개월, 6개월, 1년 이상 동안이다.

[0207] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다.

SEQ ID NO:1	GM37 CDR 1 중쇄
SEQ ID NO:2	GM37 CDR 2 중쇄
SEQ ID NO:3	GM37 CDR 3 중쇄
SEQ ID NO:4	GM37 CDR 1 경쇄
SEQ ID NO:5	GM37 CDR 2 경쇄
SEQ ID NO:6	GM37 CDR 3 경쇄
SEQ ID NO:7	GM37 중쇄 가변 도메인
SEQ ID NO:8	GM37 경쇄 가변 도메인
SEQ ID NO:9	인간 알파-시누클레인의 에피토프 112~117
SEQ ID NO:10	인간 알파-시누클레인
SEQ ID NO:11	A-Syn-AAKK-BAP
SEQ ID NO:12	A-Syn-BAKK-BAP
SEQ ID NO:13	A-Syn-BBAA-BAP
SEQ ID NO:14	A-Syn-BBKK-BAP
SEQ ID NO:15	A-Syn-120-140 Del-BAP
SEQ ID NO:16	인간 알파-시누클레인의 장기 1-119
SEQ ID NO:17	카파 경쇄 불변 도메인
SEQ ID NO:18	IgG1 중쇄 불변 도메인
SEQ ID NO:19	GM285 에피토프 112~115
SEQ ID NO:20	GM285 CDR 1 중쇄
SEQ ID NO:21	GM285 CDR 2 중쇄
SEQ ID NO:22	GM285 CDR 3 중쇄
SEQ ID NO:23	GM285 CDR 1 경쇄
SEQ ID NO:24	GM285 CDR 2 경쇄
SEQ ID NO:25	GM285 CDR 3 경쇄
SEQ ID NO:26	GM285 중쇄 가변 도메인
SEQ ID NO:27	GM285 경쇄 가변 도메인
SEQ ID NO:28	GM285 IgG1 중쇄 불변 도메인
SEQ ID NO:29	GM285 카파 경쇄 불변 도메인
SEQ ID NO:30	GM37 변이체 1 중쇄 가변 도메인
SEQ ID NO:31	GM37 변이체 2 중쇄 가변 도메인
SEQ ID NO:32	GM37 변이체 3 중쇄 가변 도메인
SEQ ID NO:33	GM37 변이체 1 중쇄 CDR 2
SEQ ID NO:34	GM37 변이체 2 중쇄 CDR 2
SEQ ID NO:35	GM37 변이체 3 중쇄 CDR 2
SEQ ID NO:36	9E4 결합 에피토프
SEQ ID NO:37	인간 베타-시누클레인
SEQ ID NO:38	인간 감마-시누클레인
SEQ ID NO:39	게잡이 원숭이에 대한 알파-시누클레인 오프소로그
SEQ ID NO:40	랫트에 대한 알파-시누클레인 오프소로그
SEQ ID NO:41	마우스에 대한 알파-시누클레인 오프소로그
SEQ ID NO:42	9E4 HC
SEQ ID NO:43	9E4 LC

[0208]

[0209] 발명의 구현예

[0210] 텍스트 및 실시예로부터 자명할 바와 같이, 본 발명은 추가로 아래의 구현예에 관한 것이다.

[0211] 1. 알파-시누클레인에서 아미노산 112~117 내의 에피토프(SEQ ID NO:9(ILEDMP))에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

[0212] 2. 구현예 1에 있어서, 상기 에피토프로의 결합에 대해 항체 GM37과 경쟁하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

[0213] 3. 구현예 1에 있어서, GM37, GM37 변이체 1, GM37 변이체 2 또는 GM37 변이체 3인 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

[0214] 4. 알파-시누클레인에서 아미노산 112~115 내의 에피토프(SEQ ID NO:19(ILED))에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

[0215] 5. 구현예 1 또는 4에 있어서, GM285인 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

[0216] 6. 구현예 1 내지 5에 있어서, 항체가 온전한 항체를 포함하거나 이로 구성되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

- [0217] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, Fv 단편(예컨대 단일쇄 Fv 및 디설파이드-결합 Fv), Fab-유사 단편(예컨대 Fab 단편, Fab' 단편 및 F(ab)₂ 단편) 및 도메인 항체(예컨대 단일 V_H 가변 도메인 또는 V_L 가변 도메인)로 구성되는 군으로부터 선택되는 항원-결합 단편을 포함하거나 이로 구성되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0218] 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 모노클로날 항체가 서브타입 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0219] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편이 다음 특성 중 하나 이상을 나타내는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편:
- [0220] (i) 0.5~10 nM, 예컨대 1~5 nM 또는 1~2 nM의 알파-시누클레인에 대한 결합 친화도(K_D);
- [0221] (ii) 알파-시누클레인 피브릴의 프로테아제 절단 억제능;
- [0222] (iii) F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파의 손상 역전능;
- [0223] (iv) 생체내 미세투석에 의해 측정되는 마우스 해마에서 알파-시누클레인의 수준 감소능;
- [0224] (v) 만성 투여되는 경우, 파킨슨병의 래트 모델에서 운동 기능 회복능;
- [0225] (vi) 알파시누클레인의 씨드화(예컨대 시험관내 및/또는 파킨슨병의 마우스 모델에서 불용성 인산화 알파시누클레인의 축적) 방지능; 및/또는
- [0226] (vii) 인간 뇌에서 절단된 알파-시누클레인에 대한 결합능.
- [0227] 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 인간 또는 인간화된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0228] 11. 구현예 1 내지 3 및 6 내지 10에 있어서, 다음 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편:
- [0229] a) GFTFSSYAMT(**SEQ ID NO:1**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열;
- [0230] b) AIRS(N/S/Q/H) GDRTD YADSVK(**SEQ ID No:2, 33, 34, 35**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0231] c) AKNWAPFDS(**SEQ ID NO:3**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열.
- [0232] 12. 구현예 11에 있어서, **SEQ ID NO:1 및 3의 CDR 및 SEQ ID NO:2 및 33, 34 또는 35** 중 하나를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0233] 13. 구현예 11에 있어서, 다음으로 구성되는 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인을 포함하거나 이로 구성되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편:
- a) EVQLLES^{GGG} LVQTGGSLRL SCAASGFTFS SYAMTWVRQA
PGKGLEWVSA IRSNGDRTDY ADSVKGRFTI SRDNSQNTLY
LQMNSLRAED TAVYYCAKNW APFDSWGQGT LVTVSS (**SEQ ID NO:7**),
- b) EVQLLES^{GGG} LVQTGGSLRL SCAASGFTFS SYAMTWVRQA
PGKGLEWVSA IRSSGDRTDY ADSVKGRFTI SRDNSQNTLY
LQMNSLRAED TAVYYCAKNW APFDSWGQGT LVTVSS (**SEQ ID NO:30**),
- c) EVQLLES^{GGG} LVQTGGSLRL SCAASGFTFS SYAMTWVRQA
PGKGLEWVSA IRSQGDRTDY ADSVKGRFTI SRDNSQNTLY
LQMNSLRAED TAVYYCAKNW APFDSWGQGT LVTVSS (**SEQ ID NO:31**),
또는
- d) EVQLLES^{GGG} LVQTGGSLRL SCAASGFTFS SYAMTWVRQA
PGKGLEWVSA IRSHGDRTDY ADSVKGRFTI SRDNSQNTLY
LQMNSLRAED TAVYYCAKNW APFDSWGQGT LVTVSS (**SEQ ID NO:32**).
- [0234]
- [0235] 14. 구현예 1 내지 3 및 6 내지 13에 있어서, 다음 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편:

- [0236] a) ASQSVSSSYLA(**SEQ ID NO:4**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열;
- [0237] b) GASSRAT(**SEQ ID NO:5**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열;
- [0238] c) QQYGSSPWT(**SEQ ID NO:6**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열.
- [0239] 15. 구현예 14에 있어서, **SEQ ID NO:4, 5 및 6**의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0240] 16. 구현예 14에 있어서, 다음 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편:
- EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK (**SEQ ID NO:8**).
- [0241]
- [0242] 17. 구현예 14에 있어서, 다음 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편:
- EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK (**SEQ ID NO:8**).
- [0243]
- [0244] 18. 구현예 1~3 및 6~17에 있어서, **SEQ ID NO:8**의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인 및 **SEQ ID No:7, 33, 34 또는 35**에 주어진 아미노산을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0245] 19. 구현예 1~3 및 6~18에 있어서, GM37 wt 대비 65℃ 초과 온도에서 2%~10% 더 안정한, GM37 wt 대비 65℃ 초과 온도에서 2%~8% 더 안정한, 또는 GM37 wt 대비 65℃ 초과 온도에서 2%~5% 더 안정한 증가된 열 안정성, 예컨대 도 27에 나타낸 바와 같이 응집을 방지하고 언폴딩하는 증가된 안정성을 가지는, **SEQ ID NO:8**의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 및 **SEQ ID No:34**에 주어진 아미노산을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0246] 20. 구현예 1 내지 10에 있어서, 다음 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편:
- [0247] a) AASGFTFSRFTMT(**SEQ ID NO:20**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열;
- [0248] b) AISGSGGTS YADSVKG(**SEQ ID NO:21**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0249] c) AKNWAPFDY(**SEQ ID NO:22**) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열.
- [0250] 21. 구현예 20에 있어서, **SEQ ID NO:20, 21 및 22**의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0251] 22. 구현예 20에 있어서, 다음 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편:
- EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RFTMTWVRQA
PGKGLEWVSA ISGSGGGTSY ADSVKGRLTV SRDNSKNTLY
LQMNSLRAED TAVYYCAKNW APFDYWGQGT LVTVSS (**SEQ ID NO 26**).
- [0252]
- [0253] 23. 구현예 1 내지 10 및 20 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 다음 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편:

- [0254] d) RASQSVSRSYLA(SEQ ID NO:23) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열;
- [0255] e) GASSRAT(SEQ ID NO:24) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열; 또는
- [0256] f) QQYGSSPWT(SEQ ID NO:25) 또는 4개 이하의 아미노산 차이, 또는 3개 이하의 아미노산 차이, 또는 2개 이하의 아미노산 차이, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열.
- [0257] 24. 구현예 23에 있어서, SEQ ID NO:23, 24 및 25의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0258] 25. 구현예 24에 있어서, 다음 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편:
- EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RSYLAWYQQK
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:27).
- [0259]
- [0260] 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, SEQ ID NO:27의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인 및 SEQ ID No:26에 주어진 아미노산을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0261] 27. 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, Fc 영역을 포함하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0262] 28. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 제제의 생체내 반감기를 증가시키기 위한 모이어티를 추가로 포함하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0263] 29. 구현예 28에 있어서, 생체내 반감기를 증가시키기 위한 모이어티가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 인간 혈청 알부민, 글리코실화기, 지방산 및 텍스트란으로 구성되는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0264] 30. 구현예 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 항체 폴리펩타이드가 검출 가능한 모이어티를 추가로 포함하는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0265] 31. 구현예 30에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 형광 표지, 화학발광 표지, 상자성 표지, 방사선동위원소 표지 또는 효소 표지인 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0266] 32. 구현예 30 또는 31에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 방사선동위원소를 포함하거나 이로 구성되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0267] 33. 구현예 32에 있어서, 방사선동위원소가 ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁹Zr, ¹²³I 및 ²⁰¹Tl로 구성되는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0268] 34. 구현예 30에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 상자성 동위원소를 포함하거나 이로 구성되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0269] 35. 구현예 34에 있어서, 상자성 동위원소가 ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Cr 및 ⁵⁶Fe로 구성되는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0270] 36. 구현예 30 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 조영 기법, 예컨대 SPECT, PET, MRI, 광학 또는 초음파 조영에 의해 검출 가능한 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0271] 37. 구현예 30 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 연결 모이어티를 통해 간접적으로 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0272] 38. 구현예 37에 있어서, 연결 모이어티가 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10, 테트라아세트산(DOTA)의 유도체, 데페록사민(DFO), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)의 유도체, S-2-(4-이소티오시아나토벤질)-1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA)의 유도체 및 1,4,8,11-테트라아자사이클로도데칸-

1,4,8,11-테트라아세트산(TETA)의 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

- [0273] 39. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나의 항체, 또는 이의 항원-결합 단편 또는 이의 성분 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 단리된 핵산 분자.
- [0274] 40. 구현예 39에 있어서, cDNA 분자인 핵산 분자.
- [0275] 41. 구현예 30 또는 31에 있어서, 항체 중쇄 또는 이의 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 분자.
- [0276] 42. 구현예 39 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 항체 경쇄 또는 이의 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 분자.
- [0277] 43. 구현예 39 내지 42 중 어느 하나의 핵산 분자를 포함하는 벡터.
- [0278] 44. 구현예 39 내지 42 중 어느 하나의 핵산 분자 또는 구현예 43의 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포.
- [0279] 45. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편의 제조 방법으로서, 인코딩된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 구현예 44에서 정의된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.
- [0280] 46. 구현예 1 내지 35 중 어느 하나의 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.
- [0281] 47. 구현예 1 내지 35에 있어서, 의약에서 이용하기 위한 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0282] 48. 구현예 1 내지 35에 있어서, 시누클레인병증의 치료, 진단 또는 조영에서 이용하기 위한 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0283] 49. 구현예 48에 있어서, 파킨슨병(파킨슨병의 특발성 및 유전 형태 포함), 고서병, 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축의 치료에서 이용하기 위한 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0284] 50. 시누클레인병증의 치료, 진단 또는 조영을 위한 약제의 제조에서 구현예 1 내지 35의 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도.
- [0285] 51. 구현예 50에 있어서, 파킨슨병(파킨슨병의 특발성 및 유전 형태 포함), 고서병, 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축의 치료를 위한 약제의 제조에서 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도.
- [0286] 52. 대상체에서 시누클레인병증의 치료, 진단 또는 조영 방법으로서, 구현예 46의 약학적 조성물을 유효량으로 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0287] 53. 구현예 48, 50 또는 52에 있어서, 파킨슨병(파킨슨병의 특발성 및 유전 형태 포함), 고서병, 광범위 레비 소체병(DLBD), 알츠하이머병의 레비 소체 변이(LBV), 복합 알츠하이머 및 파킨슨병, 순수 자율신경 부전 및 다계통 위축의 치료를 위해 이용하기 위한 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 용도, 또는 방법.
- [0288] 54. 구현예 52 또는 53에 있어서, 치료가 만성인, 이용하기 위한 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 용도; 또는 방법.
- [0289] 55. 구현예 52에 있어서, 만성 치료가 적어도 2주, 예컨대 적어도 1개월, 6개월, 1년 이상 동안인, 이용하기 위한 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 용도; 또는 방법.
- [0290] 56. 구현예 47 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 인간인, 이용하기 위한 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 용도; 또는 방법.
- [0291] 57. 구현예 1 내지 35의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 키트.
- [0292] 58. 구현예 57에 있어서, 의약에서 이용하기 위한 키트.
- [0293] 59. 구현예 30 내지 35에 있어서, 대상체의 뇌 또는 체액에서 상기 알파-시누클레인의 존재 또는 양을 검출하거나 측정하는 데 이용하기 위한 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0294] 60. 구현예 59에 있어서, 상기 검출 또는 측정이 상기 알파-시누클레인에 결합된 상기 항-시누클레인 항체의 생

체내 조영을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

[0295] 61. 구현에 30 내지 35에 있어서, 상기 검출 또는 측정이 상기 알파-시누클레인에 결합된 상기 항-시누클레인 항체의 생체의 조영을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

[0296] 실시예

[0297] 실시예 1: 항체 스크리닝

[0298] 1. 면역원 및 리간드 제조

[0299] 다음 단백질을 도 1에 나타난 면역원으로서 이용하기 위해 획득하거나 제조하였다. 마우스를 3가지 면역원: 전장 재조합 인간 알파-시누클레인 피브릴; 아미노산 1~60을 함유하는 인간 알파-시누클레인 재조합 단백질 (Rpeptide, Bogart, Georgia) 및 아미노산 1~119를 함유하는 인간 알파-시누클레인 재조합 단백질로 면역화하였다. 전장 알파-시누클레인으로부터 피브릴을 제조하기 위해, Rpeptide, Bogart, Georgia의 동결건조 산물 (Catalog number S-1001-2)을 이용하였다. 이를 1 mg/ml 단백질 농도로 20 mM tris 및 300 mM NaCl 완충액에 용해시켰다. 피브릴을 제조하기 위해, 단백질 용액을 7일 동안 37°C에서 Vortemp 56 진탕장치 인큐베이터 (Labnet International, Edison, NJ, USA)에서 200 rpm으로 각 웰 내 70 μ m 지름 세라믹 비드를 포함하는 96웰 플레이트에서 170 μ l 분취물을 인큐베이션하고, 피브릴 형성 후 티오폴라빈 T를 첨가하고 하나의 웰에서 형광을 측정하였다. 아미노산 1~60을 함유하는 재조합 알파-시누클레인을 수중 용해시켜 1 mg/ml의 농도를 얻었다.

[0300] 아미노산 1~119를 함유하는 재조합 알파-시누클레인을 다음 구축물을 이용하여 제조하였다: 6개 아미노산 히스틴 태그를 코딩하는 합성 유전자에 이어 인자 Xa 절단 부위 및 인간 알파-시누클레인 아미노산 1~119를 코딩하는 서열:

MAHHHHHHHIE GRMDVFMKGL SKAKEGVVAA AEKTKQGVAE AAGKTKEGVL
YVGSKTKEGV VHG VATVAEK TKEQVTNVGG AVVTGVTAVA QKTVEGAGSI
AAATGFVKKD QLGKNEEGAP QEGILEDMPV D (SEQ ID NO:16)

[0301]

[0302] 을 Genscript에 의해 합성하고 pET24a(+) 발현 벡터(Novagen) 내 NdeI-XhoI 부위 내로 클로닝하였다.

[0303] 발현 벡터를 대장균 BL21 내로 형질전환하고 Novagen의 하룻밤 발현 자가유도 시스템(사용자 프로토콜 TB383 rev. H1005)을 이용하여 단일 콜로니를 발현에 대해 피킹(picking)하였다. 규모는 500 ml의 최종 배양 부피였다. 6000 g에서 10분 원심분리하여 세포를 수확한 후 BugBuster 단백질 추출 시약(사용자 프로토콜 TB245 Rev. 0304)을 이용하여 용해시켰다. 용해 후, 샘플을 원심분리에 의해 청정화하고 상청액을 추가 정제를 위해 이용하였다.

[0304] His-태그화 단백질을 20 mM 나트륨 포스페이트 pH 7.5, 1 M NaCl(A-완충액) 중에 평형화된 5 ml HisTrap 컬럼 (GE healthcare) 상에서 정제하였다. 샘플 적용 및 A-완충액을 이용한 세척 후, 단백질을 20 컬럼 부피에 걸쳐 A-완충액 중 0.25 M 이미다졸로 구배로 용출하였다. 5 ml 분획을 수집하고 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 관심 단백질 함유 분획을 풀링하고, 농축하고, 10 mM tris pH 7.4, 300 mM NaCl 중 S200(26/60) 크기 배제 컬럼(GE healthcare)에 적용하였다. 다시 분획을 SDS-PAGE에서 예상 크기를 갖는 밴드의 존재에 따라 풀링하였다.

[0305] N-말단 태그를 제거하기 위해, 정제된 his-태그화 알파-시누클레인 1~119를 Novagen 키트(69037-3FRX)를 이용해서 1:50비로 인자 Xa와 인큐베이션하였다. 하룻밤 동안 인큐베이션 후, 인자 Xa를 Xarrest 아가로스를 이용하여 배치식으로 제거하였다. 절단된 알파-시누클레인 1~119를 전술된 바와 같이 허용성 HisTrap 크로마토그래피에 의해 최종 정제하였다. 플로우 스루로부터, 정제된 알파-시누클레인 1~119를 수득하고, centricon 농축 장치를 이용하여 약 400 μ g/ml로 농축하였다.

[0306] 알파-시누클레인(Rpeptide)을 2 mg/ml로 PBS 중에 재수화하고 퍼옥시니티라이트(100 μ l/단백질mg)를 혼합하면서 적가하였다. 이어서 니트로실화 알파-시누클레인을 5 L PBS 중에 투석하고 -20°C에서 보관하였다.

[0307] 도파민을 이용하여 알파-시누클레인을 산화시켰다. 10 mM PBS, pH 7.4 중 제조된 동일 부피의 도파민-HCL(Sigma P5244)의 200 μ M 용액 및 10 mM PBS, pH 7.4 중 알파-시누클레인(Rpeptide)의 28 μ M 용액을 조합하였다. 생성된 14 μ M 알파-시누클레인/100 μ M 도파민을 37°C에서 O/N(하룻밤 동안) 인큐베이션하였다. 이어서 산화 알파-시누클레인을 PBS 중에 투석하고 -20°C에서 보관하였다.

[0308] 항-알파-시누클레인 항체의 다양한 라이브러리를 스크리닝하기 위해 상이한 원상태 및 키메라 버전의 시누클레인 단백질을 제조하였다. 스크리닝 구축물에는 인간, 마우스, 래트 및 게잡이 원숭이 알파-시누클레인, 인간 베

타-시누클레인, 인간 감마-시누클레인(도 21 및 22) 및 마지막으로 알파-시누클레인의 잔기 120~140이 없는 알파-시누클레인 유도체가 포함되었다. 또한, 4개 서플 구축물 시리즈: A-Syn-AAKK-BAP, A-Syn-BAKK-BAP, A-Syn-BBAA-BAP, A-Syn-BBKK-BAP(SEQ ID No:11~14)를 제조하였다. 이들 구축물은 인간 알파-시누클레인(A), 인간 베타-시누클레인(B) 및 닭 알파-시누클레인(K)의 선형 연신물을 함유하였다. 각각의 리간드의 부위 특이적 바이오틴화를 촉진하기 위해, 리간드의 C-말단에 융합된 바이오틴 수신체 펩타이드(BAP) 태그를 함유하는 유전자를 클로닝하였다. 바이오틴화는 가용성 ELISA 포맷에서 이용되는 비드에 대한 리간드의 부착을 허용하였다. 상이한 알파-시누클레인 BAP 태그 융합 구축물(ASynBAP)을 수반하는 포유류 발현 벡터를 구축하였다. 리간드를 일시적 형질감염(Genmab A/S)을 이용하여 HEK 293 세포에서 발현하였다.

[0309] 2. 면역화

[0310] 완전 쥐과인 항체 발현을 방지하는, 마우스 면역글로불린(Ig) 중쇄 및 마우스 카파 경쇄에 대해 이중 녹아웃인 HuMab 마우스 계통 HCo17-BALB/c 및 HCo12-BALB/c 마우스의 면역화로 항체 HuMab-시누클레인을 유도하였다(인간 모노클로날 항체; Medarex Inc., San Jose, CA, USA). 인간 Ig 중쇄 및 인간 Ig 카파 경쇄 유전자좌의 삽입에 의해 트랜스제닉이고 인간 VH(중쇄의 가변 도메인) 및 VL(경쇄의 가변 도메인) 유전자의 수가 상이한 다양한 마우스 계통을 만들었다.

[0311] 48마리 마우스를 14일 간격으로, 동일한 면역원을 이용하여, 20 μ g 항원으로 복강내(IP) 및 피하(SC, 꼬리기부에서)로 교대하며 면역화하였다. 4회 IP 및 4회 SC의 최대 8회 면역화를 수행하였다.

[0312] 최초 면역화는 완전 프로인트 아주반트(CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 중 알파-시누클레인 면역원으로 수행하였고, 이후 면역화는 불완전 프로인트 아주반트(IFA) 중에 수행하였다. 혈청 역가가 충분한 것으로 나타나면(적어도 2회 순차적으로, 2주 1회, 스크리닝 이벤트에서 본원에 상술된 항원 특이적 스크리닝 검정에서 1/50 이하의 혈청 희석이 양성으로 나타나면), 마우스를 추가로 융합 4일 및 3일 전에, 100 μ l PBS 중 10 μ g 알파-시누클레인 면역원 단백질로 정맥내(IV) 2회 추가접종하였다.

[0313] 면역화 프로토콜을 도 1에 나타낸다.

[0314] 항체 37은 아미노산 1~60 및 1~119를 갖는 알파-시누클레인 C-말단 절단된 형태를 교대하여, 인간 전장 α -시누클레인-피브리타이 이용되는 면역화 프로토콜에서 얻었다.

[0315] 항체 285는 인간 α -시누클레인-단량체 1~140을 최초 4회 면역화를 위해 이용한 면역화 프로토콜에서 얻었다. 역가가 없는 경우, 피브리타이 면역화를 계속하였고(ip/sc), 다른 경우 단량체로 계속하였다.

[0316] 3. HuMab 하이브리도마 생성

[0317] 상기 정의된 바와 같이 충분한 항원-특이적 역가가 발생한 HuMab 마우스를 희생시키고, 복부 대동맥 및 대정맥에 인접한 비장 및 림프절을 수집하였다. 비장세포 및 림프절 세포와 마우스 골수종 세포주의 융합을 본질적으로 제조업체의 지침에 따라, CEEF 50 Electrofusion System(Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA)을 이용하여 전기융합에 의해 수행하였다. 융합된 세포를 HyQ mADCF-Mab(Perbio) 중 10% 태아 클론 I 소 혈청(Perbio), 1 mM 나트륨 피루베이트(Cambrex), 0.5 U/mL 페니실린, 0.5 U/mL 스트렙토마이신(Cambrex), 50 μ M 2-머캅토에탄올(Invitrogen), 600 ng/mL 인터류킨 6(IL-6)(Strathmann), 1 x HAT(Sigma) 및 0.5 mg/mL 카나마이신(Invitrogen)을 함유하는 융합 배지 중에 접종하였다. 10일 후, 상청액을 수확하고, 세포를 HyQ mADCF-Mab 중 10% 태아 클론 I 소 혈청, 0.5 U/mL 페니실린, 0.5 U/mL 스트렙토마이신, 600 ng/mL IL-6 및 1 x proHT(Cambrex)를 함유하는 수확 배지로 리프레시화하였다. 하이브리도마 배양 상청액을 일차 스크리닝 검정에 의해 스크리닝하였다. 상청액을 8개의 상이한 리간드로의 결합에 대해 특성규명하였다. 이들에는 인간, 마우스, 래트 및 게잡이 원숭이의 4가지 오르소로그, 인간 알파-시누클레인 베타 시누클레인 및 인간 감마-시누클레인(SEQ ID NO 37~41)이 포함되었고 마지막으로 이들을 알파-시누클레인의 잔기 120~140이 없는 인간 알파-시누클레인 유도체에 결합하는 이의 능력에 대해 시험하였다.

[0318] 항-알파-시누클레인 항체의 스크리닝을 자동화 액체 취급 시스템(Genmab A/S)을 이용하여 고처리량 현탁 ELISA 포맷을 이용하여 수행하였다. 플레이트 판독은 2가지 시스템에 의해 수행하여, Applied Biosystems의 FMAT 8200은 384웰 플레이트를 판독하기 위해 이용하였고 Molecular Devices의 ImageXpress Velos Cytometer는 1536웰 플레이트를 판독하기 위해 이용하였다.

[0319] 일차 스크리닝에서, 클론을 8개의 상이한 리간드에 결합하는 이의 능력에 의해 특성규명하였다. 이들에는 4개의 서플 구축물 시리즈: A-Syn-AAKK-BAP, A-Syn-BAKK-BAP, A-Syn-BBAA-BAP, A-Syn-BBKK-BAP(SEQ ID No:11~14),

알파-시누클레인 120~140 결실-BAP, 질산화 인간 알파-시누클레인-BAP 및 산화 인간 알파-시누클레인-BAP가 포함되었다.

[0320] 요약하면, 알파-시누클레인 특이적 항체를 잠재적으로 함유하는 혈청 또는 상청액을 비드에 첨가하여 알파-시누클레인 및/또는 알파-시누클레인 유래 구축물로의 결합을 허용하였다. 항-알파-시누클레인 항체의 결합을 형광 콘주게이트, DyLight649 콘주게이션된 염소 항인간 IgG, Fc 특이적 물질을 이용해서 검출한다. 2개의 공지된 마우스 항-알파-시누클레인 항체, LB509 및 Syn211이 양성 대조군으로 스크리닝에 포함되었다. 알파-시누클레인 항체의 특이적 검출을 보장하기 위해, 항-알파-시누클레인 혈청 풀을 384웰 포맷 역가 스크리닝에서 음성 대조군으로 이용하는 반면, 인간 ChromPure IgG를 1536웰 포맷 8-비드 기반 검정에서 이용한다.

[0321] 최적 일차 웰로부터의 하이브리도마 세포를 40% CloneMedia(Genetix, Hampshire, UK) 및 60% HyQ 2x 완전 배지(Hyclone, Waltham, USA)로 제조된 반고체 배지 중에 접종하였다. 각각의 일차 웰에 대해, Genetix 검은색 6-웰 플레이트의 한 웰에 접종하였다. 각각의 웰로부터, 25개 서브클론을 ClonePix 시스템(Genetix)을 이용하여 피킹하였다. 서브클론을 수확 배지 중에서 피킹하였다. 7일 후, 서브클론 상청액을 다시 시누클레인-특이적 인간 IgG 결합에 대해 스크리닝하고, 인간 IgG 농도를 Octet(Fortebio, Menlo Park, USA)를 이용하여 측정하였다. 각각의 일차 웰로부터, 최적 서브클론을 선택하여 600 ng/mL IL-6, 0.5 U/mL 페니실린, 0.5 U/mL 스트렙토마이신 및 1 x proHT만 함유하는 증식 배지 중에 증식시켰다. 서브클론을 하나의 96웰 플레이트 웰로부터 하나의 24웰 플레이트 웰로, 4개의 24웰 플레이트 웰로, 6개의 6웰 플레이트 웰로 증식시켰다. 상기 공정에 의해 유도된 클론을 일차 클론(PC)으로 명명하였다.

[0322] 추가적인 항체 결합 연구를 Octet 384RED(Fortebio, Menlo Park, USA)를 이용하여 수행하였다. 2 µg/ml의 HuMab 항체 용액을 샘플 희석제(ForteBio, art. No. 18-5028) 중 희석에 의해 제조하였다. 아민 반응성 센서(ForteBio, art.no. 18-0008)를 HuMab의 면역화를 위해 이용하였다. 아민 반응성 센서로의 커플링 전에, HuMab를 MES pH 6.0 완충액(18-5027) 중에 희석하였다. 커플링은 다음과 같이 30℃ 및 1000 rpm에서 수행하였다: 아민 반응성 센서를 PBS 중에 사전 수화시킨 후 EDC/NHS(ForteBio, Art.no. 18-1033/18-1034) 활성화 용액(제조업체의 지침에 따라)으로 300초 동안 활성화하였다. 활성화 센서를 600초 동안 HuMab으로 고정화하였다.

[0323] 재조합 인간, 게잡이원숭이 및 마우스 알파-시누클레인에 대한 Octet 중 37 및 285의 결합, 및 인간 베타- 또는 감마-시누클레인에 대한 결합의 부재를 도 2에 나타낸다.

[0324] 4. 시누클레인-특이적 HuMab 가변 도메인의 서열 분석 및 발현 벡터 내 클로닝

[0325] 총 RNA를 0.2 내지 5x106 하이브리도마 세포로부터 제조하고 5'-RACE-상보성 DNA(cDNA)를 제조업체의 지침에 따라, SMART RACE cDNA Amplification 키트(Clontech)를 이용하여 100 ng 총 RNA로부터 제조하였다. VH 및 VL 코딩 영역을 PCR에 의해 증폭하고, 결합 독립적 클로닝에 의해 p33G1f 및 p33Kappa 발현 벡터(인간 IgG1/카파 불변 도메인 인코딩 서열 함유) 내에 인 프레임으로 직접 클로닝하였다(Aslanidis, C. and P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18(20): 6069-74). 각각의 항체에 있어서, 16개의 VL 클론 및 16개의 VH 클론을 서열 분석하였다. 정확한 개방 해독틀(ORF)을 갖는 클론을 추가 연구 및 발현을 위해 선택하였다. 모든 조합의 중쇄 및 경쇄의 벡터를 293fectin을 이용하여 FreestyleTM 293-F 세포에서 일시적으로 공동-발현하였다.

[0326] GM37의 경우, VH 영역의 서열분석으로 위치 106에서 CDR3 도메인에서 추가 시스테인을 확인하였다. 디설파이드 결합 형성으로 인한 미스폴딩 가능성 및 항체 활성의 잠재적 손실을 제거하기 위해, 위치 106에서 시스테인을 세린으로 돌연변이시켰다.

[0327] 비교인자 항체 9E4를 하이브리도마 PTA-8221(US 특허 20080175838)에서 유래되는 VH 및 VL 서열(SEQ ID NO 42 및 43)에 기반하여 생성하였다.

[0328] 5. 항체의 발현/정제

[0329] 항체를 pTT5 벡터 및 일시적 형질감염제로서 PEIpro를 이용하여 HEK293 6E 세포에서 형질감염에 의해 제조하였다(National Research Council of Canada). 요약하면, 중쇄 및 경쇄를 PEIpro(VWR)를 이용하여 HEK293 세포 내로 형질감염하고, 형질감염 24시간 후 세포에 TN1(Sigma)을 보충하였다. 생활성이 50%에 접근할 때까지 세포를 성장시키고, 항체 수율을 easy IgG titre(Thermo)에 의해 측정하였다. 배양 상청액을 0.2 µm 데드-엔드 필터를 통해 여과하고, 5 mL 단백질 A 컬럼(rProtein A FF, Amersham Bioscience) 상에 로딩하고, 0.1 M 시트르산-NaOH, pH 3으로 용출하였다. 용출액을 2 M Tris-HCl, pH 9로 즉시 중화하고, 12.6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7.4(B.Braun)로, 0/N 투석하였다. 투석 후, 샘플을 0.2 µm 데드-엔드 필터를 통해 멸균 여과하였다. 순도를

SDS-PAGE에 의해 결정하고, 농도를 혼탁측정 및 280 nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다. 정제된 항체를 분취하고 -80℃에서 보관하였다.

[0330] **실시예 2: 표면 플라즈몬 공명을 이용한 항체 특성규명**

[0331] 알파-시누클레인에 대한 항체의 실시간 결합을 BIAcore® 3000을 이용하여 측정하였다. 포획 표면을 CM5 칩(BIAcore®)의 제1 플로우 셀(Fc1) 및 제2 플로우 셀(Fc2)에서 폴리클로날 토끼 항-마우스 항체(Mouse Antibody Capture Kit의 일부, GE Healthcare, Cat. No: BR-1008-38)의 아민-커플링에 의해 제조하였다. 마우스 항체를 500 RU 근처의 리간드 수준을 달성하기 위해 요구되는 농도에서 Fc2에서 포획하였다. 기준선이 10분 동안 안정화하도록 둔 후 30 μ l/분으로 Fc1~2 중 분석물질(ASynBAP)을 주입하였다. ASynBAP을 각각 100~3200 nM 및 25~3200 RU로 수행하였다. 각각의 적정 시리즈에서의 최고 농도를 2개씩 수행하였다. 표면을 10 mM 글리신-HCl, pH 1.7(30초 주사)로 재생하여 각 사이클 말기에 포획된 마우스 항체 및 분석물질을 제거하였다. HBS-EP(GE Healthcare, Cat. No: BR-1001-88)를 모든 실험에서 수행 완충액 및 샘플 희석제로 이용하였고 검정을 25℃에서 수행하였다. 모든 샘플을 획득 전까지 4℃에서 유지하였다.

[0332] 포획 항체가 고정화되었지만 알파-시누클레인 항체는 포획되지 않은 Fc1에 기록된 반응을 Fc2에서의 반응으로부터 감산하였다. 1:1 또는 2:1 결합 알고리즘을 BIAevaluation 소프트웨어 버전 4.1.1.을 이용하여 데이터세트에 피팅하였다. 결과는 인간 알파-시누클레인에 대한 항체 37, 285 및 9E4의 결합을 나타내는 도 3, 4 및 5에서 확인할 수 있다.

[0333] **실시예 3: 에피토프 맵핑**

[0334] 알파-시누클레인에 대한 항체의 에피토프 맵핑을 Pepscan(Pepscan Zuidersluisweg 2 8243 RC Lelystad, The Netherlands)에서 중복되는 선형 펩타이드 어레이로 수행하였다. 각각의 합성된 20머 펩타이드에 대한 항체의 결합을 Pepscan 기반 ELISA에서 시험하였다. 알파-시누클레인의 전체 코딩 서열을 커버하는 선형 펩타이드 어레이뿐만 아니라 산화 메티오닌 또는 니트로실화 티로신을 포함하는 모든 펩타이드를 일차 항체 용액과 인큐베이션하였다(4℃에서 하룻밤 동안). 세척 후, 펩타이드 어레이를 25℃에서 1시간 동안 항체 퍼옥시다제 콘주게이트(SBA, cat. nr. 2010-05)의 1/1000 희석액과 인큐베이션하였다. 세척 후, 퍼옥시다제 기질 2,2'-아지노-디-3-에틸벤즈티아졸린 설포네이트(ABTS) 및 2 μ l/ml의 3% H2O2를 첨가하였다. 1시간 후, 발색을 측정하였다. 발색을 전하 커플링 장치(CCD) - 카메라 및 이미지 프로세싱 시스템으로 정량하였다. 데이터 프로세싱을 위해, 표준 96웰 플레이트 ELISA-판독장치와 유사하게, 0 내지 3000 mAU 범위의 CCD 카메라로부터 값을 취득하였다. 결과를 정량하고 Peplab 데이터베이스 내에 저장하였다. 때때로, 웰이 위양성 값을 생성하는 기포를 함유하여, 카드를 수동 검사하고 기포에 의해 유도된 임의의 값을 0으로 스코어링한다. 각각 서열 ILEDMP 또는 ILED를 함유하는 펩타이드에 대한 항체 37 및 285의 결합 데이터는 도 7에서 확인할 수 있다.

[0335] **실시예 4: 레비 소체를 갖는 치매 환자로부터 대상 피질의 인간 뇌 균질화물로부터 알파-시누클레인의 면역침전**

[0336] 인간 DLB 또는 건강한 대조군(*로 표시됨)으로부터의 대상 피질의 조정제 균질화물로부터 알파-시누클레인에 결합하고 이를 풀다운하는 항체의 능력을 면역침전에 의해 분석하였다. 인간 대상 피질로부터의 냉동 샘플(throughTissue Solutions Ltd, Scotland에서 취득됨)을 크리오스타트에서 절제하고, 100 mg 샘플을 프로테아제 억제제 및 포스파타제 억제제(Roche)를 함유하는 1600 μ l 세포용해성 M 세포 용해 시약(Sigma C2978)에 첨가하였다. 5000 rpm에서 4x30초 Precellys 비드 균질화장치(Bertin technologies, France)를 이용하여 샘플이 완전 용해될 때까지 뇌 조직을 균질화하였다. 용액을 3000 x g에서 원심분리하고 상청액을 면역침전을 위한 조정제 균질화물로 이용하였다.

[0337] 면역침전을 위해 10 μ g의 항체를 제조업체의 지침을 이용하여 자기 Dynabeads 단백질 G 비드(Life Technologies, Paisley, UK)와 혼합하였다. 조정제 뇌 균질화물을 용해 완충액(Sigma) 중에 30배 희석하였다. Dynabeads에 커플링된 항체를 500 μ l의 희석 균질화물과 혼합하고 회전장치 내에서 연속 혼합 하에 실온에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 비드를 세척 완충액 중에 세척하고, 결합 항원을 제조업체의 지침에 따라 비-변성 용출 완충액을 이용하여 용출하였다(Dynabeads G 프로토콜, Life Technologies, Paisley UK). 면역침전 수율을 검출 마우스 모노클로날 항-인간 알파-시누클레인 항체(4B12, Thermo Scientific)로 웨스턴 블로팅에 의해 가시화하였다. 풀다운된 알파-시누클레인의 상이한 분자량 형태를 나타내는 밴드 패턴은 37, 37v2 및 285 항체가 주요 알파-시누클레인 종인 전장 알파-시누클레인(FL asyn 1~140) 및 C-말단 말단 절단된 종(1~135 및 1~119/122)을 면역침전시킬 수 있는 반면, 항체 9E4는 절단된 종 1~119/122를 면역침전시킬 수 없다는 점에서, 37, 37 변이체 2 및 285 항체 및 비교인자 항체 9E4 간에 상이하다. 도 9.

[0338] **실시예 5: 세포 배양에서 항체에 의한 알파-시누클레인 피브릴의 프로테아제 절단의 억제**

[0339] 제조합 알파-시누클레인 단량체 및 피브릴은 배양 중 일차 뉴론에 의해 섭취될 수 있다. 도 10에 모식적으로 나타낸 바와 같이, 뉴론에서 알파-시누클레인의 섭취 후, 이는 세포내 프로테아제, 예컨대 칼파인 I에 의해 처리될 수 있고, 주요 프로테아제 감수성 부위는 아미노산 119/122에 있다. 프로테아제에 의한 알파-시누클레인의 절단을 조사하기 위해, 마우스 일차 피질 뉴론을 문헌[Elvang et al. 2009 (Elvang et al., J Neurochem. 2009;110(5):1377-87)]에 기재된 바와 같이 제조하고, DIV3(시험관내 3일차)에 시타라빈으로 처리하여 아교세포 성장을 억제하였다. DIV4(시험관내 4일차)에, 뉴론을 단독으로 또는 나타낸 농도의 항체와 함께 0.7 μ M의 최종 농도로 초음파분쇄 처리된(킵 혼 소니케이터에서 50% 파워로 5분) 사전 형성된 알파-시누클레인 피브릴(PFF)로 처리하였다. 24시간 인큐베이션 후, 배지를 수확하고 세포를 용해시켰다. 4B12 항체(도 11a)(Pierce MA1-90346) 및 이차 항-마우스 항체를 이용하여 배지 및 세포 용해액 상에서 모두 웨스턴 블롯을 수행하였다. 4B12 + 항-마우스로 탐침처리 후, 블롯을 박리하고 항-인간-IgG 항체로 재탐침처리하였다. 4B12로 블롯 시, PFF만으로 처리된 세포로부터의 배지에서, 14 및 12 kDa에 강한 밴드가 존재했음을 알 수 있고, 여기서 14 kDa는 전장 알파-시누클레인(FL-asyn)을 나타내고 12 kDa는 C-말단 절단된 단편 1~119/122(CT-asyn)를 나타낸다. 이에 부가하여, SDS-내성 올리고머성 종을 가장 잘 나타낼 수 있는, 더 고분자량 밴드가 존재하였다. 이소형 대조군 항체 B12와의 공동-처리하는 상기 단백질해 또는 섭취 패턴을 변화시키지 않았다.

[0340] 37과 함께 피브릴이 처리된 세포로부터의 배지에는 주로 전장 알파-시누클레인(14 kD) 및 단지 소량의 말단 절단된 밴드(12 kD)가 존재하였다. 37과 함께 피브릴이 처리된 세포로부터의 세포 용해액에는 전장 알파-시누클레인만 존재하여, 37이 FL-알파-시누클레인의 절단을 방지함을 시사하였다. 또한, FL-알파-시누클레인의 총량은 PFF 단독 또는 B12 대조군 항체로 처리된 세포에 비해 감소된다. 몇몇 그룹에 의해(Games et al, Am J of Pathol, Vol. 182, No. 3, March, 2013; Ritchie et al, Health, Vol. 4, Special Issue, 1167-1177, 2012; Mishizen-Eberz, Biochemistry, 2005, 44, 7818-7829; Dufty et al, Am J of Pathol, Vol. 170, No. 5, May 2007) 알파-시누클레인이 칼파인-1에 의해 절단될 수 있는 것으로 나타났다. 피브릴화 알파-시누클레인에 대한 칼파인-1의 절단 부위는 영역 114~122에 있는 것으로 나타났다(Mishizen-Eberz, J of Neurochem, 86, 836-847, 2003). 생체내 트랜스제닉 동물 및 인간 뇌에서, 1~119/122는 알파-시누클레인에서, 주요 절단 산물인 것으로 보이며, 절단은 아스파르트 119 또는 아스파라긴 122 이후일 수 있고, 이는 아스파르테이트로 탈아마이드화되고 칼파인 또는 유사한 절단 특이성을 갖는 다른 프로테아제에 의해 절단된다. 이들 결과는 항체 37이 알파-시누클레인의 C-말단 절단을 억제할 수 있음을 시사한다. 항체 37의 에피토프는 효소 칼파인-1 결합 부위와 중복되므로, 알파-시누클레인에 대한 37의 결합은 칼파인-1에 의해 매개되는 결합 및 절단을 직접 억제할 수 있었다(도 10 및 11).

[0341] 285의 에피토프는 37의 에피토프와 중복되고, 또한 프로테아제 절단을 억제할 것으로 예상될 것이다. 37v2의 아미노산 서열은 CDR에서 하나의 아미노산만이 37과 상이하고 37과 유사한 결합을 가지므로, 또한 37과 유사한 방식으로 프로테아제 절단을 억제할 것으로 예상될 것이다. 항체의 효과가 용량 의존적인지를 조사하기 위해, 일차 피질 뉴론으로의 PFF 및 항체의 공동-첨가를 포함하는 24시간 실험을 설정하였다. PFF의 농도는 안정한 반면 (10 μ g/ml), 시험한 대조군 항체 B12, 및 항체 37, 37v2 및 285의 농도는 10, 5, 1 및 0.1 μ g/ml였다. 웨스턴 블롯 상의 알파-시누클레인을 영역 103~108에 에피토프를 가지고 이에 따라 FL 및 C-말단 절단된 알파-시누클레인에 모두 결합하는 1904/4B12 항체(Abcam)로 검출하였다(도 11b). 도 11b로부터 알 수 있듯이, GM37, 37v2 및 GM285는 모두 프로테아제 절단의 용량 의존적 억제를 가지며, 고농도 항체에서 거의 완전한 절단 억제를 갖는다.

[0342] **실시예 6: 세포 배양에서 알파-시누클레인 응집 씨드화의 항체-매개 억제**

[0343] 몇몇 연구에서 제조합 알파 시누클레인 피브릴 응집물의 외인성 첨가가 세포로 들어가서 내인성 알파-시누클레인을 모집하여 LB와 유사하게 시험관내 및 생체내 알파-시누클레인 응집 및 인산화를 유도할 수 있음을 나타내었다(Volpicelli-Daley et al. 2011, Luk et al. 2012a, Luk et al. 2012b, Recasens et al. 2013, Peelaerts et al. 2015). 제조합 알파-시누클레인 씨드에 의한 내인성 마우스 알파-시누클레인의 씨드화를 연구하기 위해, 상기와 같이 제조된 마우스 일차 피질 뉴론을 96웰 플레이트에 평면접종하였다(웰 당 15,000 세포). 시험관내 배양(DIV) 5일차에, 50%의 배지를 교환하고 시토신 아라비노사이드로 보충하였다(최종 농도 1 μ M). DIV 6에, 배지 절반을 조정제 피브릴 씨드 또는 순수 씨드인 알파 시누클레인 피브릴 물질을 함유하는 아교세포 컨디셔닝된 배지로 교환한다. 조정제 피브릴 씨드를 제조합 단량체성 인간 알파-시누클레인으로부터 제조하고, 이를 박테리 아로부터 분리하고 단량체를 Amicon Ultra 100.000 컷오프 필터(Millipore cat. No UFC510096)를 통해 여과하고 PBS, pH 7.4 중 1 mg/ml 농도로 조정하였다. 피브릴 조정제 씨드를 제조하기 위해, 단량체 용액을 정제기에

도달할 때까지(티오폴라빈 S로 매일 측정에 의해 평가) 연속 혼합하며(800 rpm) 37C에서 열혼합장치에서 인큐베이션하였다. 증발을 최소화하기 위해, 미네랄 오일 방울을 첨가하여 용액을 커버하였다. 인큐베이션을 위한 총 시간은 5~7일이었으며, 이들을 정제하기 위해 원심분리한 조정제 피브릴 씨드로부터 순수 씨드를 제조하고, 응집된 펠렛을 신선 PBS 중에 재현탁하여 초음파분쇄한다. DIV 6에 항체를 알파-시누클레인 조정제 씨드와 함께 한번 첨가한다. 일차 뉴론에서 배지 절반을 매주 아교세포 컨디셔닝된 배지로 대체하여 이들을 DIV21까지 유지한다. 뉴론을 고정하고 아미노산 S129에서 알파-시누클레인의 인산화에 특이적인 토끼 항체(abcam 51253)를 이용하여 포스포-시누클레인에 대해 염색한 후, 항-토끼 항체로 형광 표지하고, 자동화 형광 현미경, Cellomics Arrayscan을 이용하여 형광을 정량한다. 한 채널에서 핵을 검출하고 유효 세포의 수를 정의하였다. 인산화된 알파-시누클레인 스팟을 핵 주변의 사전-정의된 링-형상 영역 내 다른 채널에서 검출함으로써, 세포의 세포질을 나타내었다. 세포 당 평균 스팟수를 계산하였다. 세포 염색의 예를 도 12a에 나타낸다. 인산화된 알파 시누클레인 스팟은 미처리 뉴론에서는 보이지 않는다. 조정제 또는 순수 씨드(웰 당 1~10 ng)와 인큐베이션된 뉴론은 알파 시누클레인의 인산화를 유도한다(도 12a). 신경돌기에서, 인산화된 시누클레인은 스팟 또는 반점으로 보이며, 신경돌기에서 일부 포스포-시누클레인은 신장된 것으로 보인다.

[0344] 분획화 연구를 위해, 세포를 인산염 완충 식염수 용액(PBS)에 수확하고 원심분리하였다. 펠렛을 프로테아제 억제제를 함유하는 1% triton 완충액 중 재현탁하였다. 샘플을 15분 동안 얼음 상에 유지한 후, 초음파분쇄하였다. 샘플을 4C에서 30분 동안 100,000xg로 원심분리하였다. 상청액을 수집하고 가용성 분획으로 표지한다. 펠렛을 triton 완충액 중 1회 세척하고 1% SDS 완충액 중 재현탁한 뒤 초음파분쇄하였다. 샘플을 30분 동안 100,000xg에서 다시 원심분리하였다. 상청액을 불용성 분획으로 수집한다. 단백질 농도를 측정하고, 샘플을 4~12% SDS-PAGE 겔 상에 걸고, 막 상으로 블롯팅하여, 알파 시누클레인 및 인산화된 알파 시누클레인(S129P)을 각각 4B12/1904 항체(Thermo scientific: MA1-90346-인간 시누클레인), S129P- α -syn 항체(abcam 51253) 및 마우스 시누클레인 항체(cell signalling-D37A6)에 의해 검출한다.

[0345] 도 12b는 조정제 씨드를 포함하는 및 포함하지 않는 일차 뉴론으로부터의 가용성 및 불용성 분획의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 도 12b로부터 알 수 있듯이, 씨드 첨가는 세포의 불용성 분획에서 내인성 마우스 알파-시누클레인 및 p-S129-알파-시누클레인 및 인산화된 마우스 알파-시누클레인 다량체의 축적으로 이어진다.

[0346] 항체가 씨드화를 억제할 수 있는지를 시험하기 위해, 알파 시누클레인 시누클레인 씨드를 6.6 nM(10 ng/웰)의 농도로 이용하였다. 상이한 농도의 항체 및 알파-시누클레인 씨드를 DIV 6에 함께 첨가하여, 용량 반응을 일으켰다(최고 항체 농도 133 nM에서 시작하여 133 pM까지 낮추며). 뉴론을 다시 고정하고, 포스포-시누클레인(abcam 51253)에 대해 염색하고 세포로부터의 형광을 자동화 형광 현미경, Cellomics arrayscan을 이용하여 정량하였다. 세포 당 스팟/반점을 Cellomics arrayscan에서 카운팅하였다. 도 12c로부터 알 수 있듯이, 항체37, 37v2 및 항체 285는 모두 37, 37v2 및 285(약 70~75%)에 대해 유사한 최대 억제 및 약 5 nM의 EC50을 가지며 용량 의존적 방식으로 뉴론에서 알파 시누클레인 인산화를 감소시켰다. 최고 농도(133 nM)로 항체로 처리 후 가용성 및 불용성 분획에 대한 세포 단백질의 분획화는 도 12d에서 알 수 있듯이, 항체 37, 37v2 및 285 모두가 재조합 조정제 씨드의 절단 및 C-말단 절단된 단편(CT α -syn)의 축적을 억제하였으며 불용성 분획에서 인산화된 내인성 마우스 알파-시누클레인 및 응집된 형태의 마우스 알파-시누클레인의 축적을 감소시켰음을 나타낸다.

[0347] **실시예 7. 생체내 알파-시누클레인 항체의 급성 전기생리적 효과**

[0348] 마우스 알파-시누클레인 프로모터의 제어 하에 야생형 알파-시누클레인을 과발현하는 모델인 F28-snca 트랜스제닉 마우스의 해마에 인간 알파-시누클레인의 높은 발현 수준이 존재한다(Westerlund M, et al. Mol Cell Neurosci. 2008 Dec; 39 (4):586-91). 4 내지 6월령 수컷 F28-snca 트랜스제닉 및 연령-매칭된 대조군 마우스에서 해마의 CA1 영역에서의 시냅스 전파 및 유연성 평가를 생체내 전기생리학에 의해 수행하였다. 데이터는 기본 시냅스 전파가 연령-매칭된 대조군 마우스에 비해 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 현저히 손상됨을 나타낸다(도 13).

[0349] 4 내지 6월령 F28-snca 트랜스제닉 및 연령-매칭된 대조군 수컷 마우스(CRO 교배, Taconic Europe A/S)를 조절되는 온도($22 \pm 1.5^\circ\text{C}$) 및 습도 조건(55~65%)에 단독-수용하고 12:12시간 명/암 사이클(06:00 h에 조명 켜)로 유지하였다. 음식 및 물은 자유롭게 이용 가능하였다.

[0350] 동물을 우레탄(1.2 g/kg)의 복강내(i.p.) 주사로 마취하였다. 이어서 마우스를 정위 프레임에 올리고, 이의 체온을 히팅 패드를 통해 37.5°C 로 조정하고, 두개골을 노출시켰다. 기준으로 작용하도록 이마뼈에 백금 와이어를 배치하고, 해마에 기록 및 자극 전극의 삽입을 위해 Paxinos 및 Franklin의 도해에 따라 다음 좌표에서 추가 구멍을 뚫었다(Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th Edition, 2001): 기

록, 1.5~1.7 mm 정수리점 후방, 1.0~1.2 mm 중간선 측방, 1.4~1.7 mm 뇌 표면 아래; 자극, 1.8~2.0 mm 정수리점 후방, 1.5~1.7 mm 중간선 측방, 1.5~1.7 mm 뇌 표면 아래. 동물을 전체 기록 기간에 걸쳐 정위 프레임에 놔두고, 이의 마취 수준을 정기적으로 확인하였다.

[0351] 필드 전위(fEPSP)를 30초마다 Schaffer 측부의 전기 자극에 의해 CA1에서 유발하고, 음의 fEPSP가 단극 제곱파에 반응하여 기록될 때까지 기록 전극의 깊이를 조정하였다. 유발 fEPSP의 경사를 fEPSP의 최대 크기의 30 내지 70%에서 측정하였다.

[0352] 일단 최적 fEPSP가 유도되면, 기본 시냅스 전파를 자극 세기 및 유발 fEPSP의 경사 간 관계(인풋-아웃풋 관계)에 의해 평가하였다. 상이한 세기의 자극은 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 및 500 μ A였고, 각각의 세기에 대해 2 내지 3회 반복하며 증가하는 순서로 연속 적용하였다. 기본 시냅스 전파는 연령-매칭된 대조군 마우스 대비 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 현저히 손상된 것으로 나타났다.

[0353] F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파의 확인된 손상을 이용하여 GM37, GM285 및 비교인자 h9E4가 알파 시누클레인 매개 효과를 차단하는 이의 능력에 대해 시험하였다.

[0354] 모든 실험에서 15 mg/kg(i.p.) 용량으로 단회 용량의 항체 투여 후 3 내지 6 h 기록을 수행하였다. 가능한 경우 각 동물의 두 해마에서 기본 시냅스 전파를 기록하고, 또한 개별 실험으로 기록하였다.

[0355] h9E4를 이용한 급성 처리는 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파 손상의 현저한 역전을 유도하였다(Tg-snca + h9E4 대 Tg-snca + PBS, $p=0.002$, 도 14). 그러나, h9E4에 의한 역전은, PBS로 처리된 한배새끼에서의 기본 시냅스 전파에 대한 현저한 차별화로 시사되는 바와 같이, 단지 부분적이었다($p=0.007$)

[0356] GM37을 이용한 급성 처리는 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파 손상의 현저한 역전을 유도하였다(Tg-snca + GM37 대 Tg-snca + PBS, $p=0.004$, 도 15). GM37-처리 트랜스제닉 마우스에서의 기본 시냅스 전파는 PBS-처리 한배새끼에서의 기본 시냅스 전파와 현저하게 상이하지 않아서, 손상의 완전 역전을 시사하였다(도 15).

[0357] GM285는 또한 F28-snca 트랜스제닉 마우스에서 기본 시냅스 전파 손상의 현저한 역전을 유도하였다(도 16). GM285-처리 트랜스제닉 마우스에서의 기본 시냅스 전파는 PBS-처리 한배새끼에서의 기본 시냅스 전파와 현저하게 상이하지 않아서, 손상의 완전 역전을 시사하였다.

[0358] **실시예 8. 깨어서 자유롭게 움직이는 동물의 뇌에서 인간 알파-시누클레인을 평가하기 위한 미세투석**

[0359] 밀기-당기기 미세투석 방법을 이용하여 뇌 간질액(ISF)에서 인간 알파-시누클레인 수준을 평가하였다. 마우스를 조절되는 온도($22\pm1.5^{\circ}\text{C}$) 및 습도 조건(55~65%)에 단독-수용하고 12:12시간 명/암 사이클(06:00 h에 조명 켜)로 유지하였다. 음식 및 물은 자유롭게 이용 가능하였다. 본 연구를 F28-snca 트랜스제닉 마우스(50~54주령)의 해마에서 수행하였다. 해마에서 미세투석을 구현하기 위해, 마우스를 이소플루란으로 마취하고, 뇌내 가이드 캐놀라(CMA)를 뇌 내로 정위 임플란트하여, 해마에서 미세투석 탐침을 Paxinos 및 Franklin 2001 도해에 따라 배치하였다(탐침 팁의 좌표: 3.1 mm 정수리점 후방 및 2.8 mm 정수리점 측방 및 경막 대비 1.3 mm). 가이드 캐놀라의 고정을 위해 앵커 나사 및 아크릴계 시멘트를 이용하였다. 캐놀라의 임플란트 후, 마우스를 투석 전 2~3일 동안 수술에서 회복하게 두었다.

[0360] 실험 당일, 2-mm, 1000 kDa 컷오프 CMA 탐침을 가이드 캐놀라를 통해 삽입하였다. 탐침을 2 채널을 갖는 미세투석 연동 펌프(MAB20; Microbiotech)에 연결하고 푸시-풀 모드로 작동시켰다. 미세투석 탐침의 입구 튜브를 연동 펌프로 연결하여 탐침을 인공 뇌척수액(aCSF; (mM): 147 NaCl, 2.7 KCl, 1.2 CaCl_2 , 0.85 MgCl_2)으로 관류하였다. 튜브를 통해 액체를 당겨냄으로써, 탐침으로부터의 관류액 손실을 방지하기 위해 연동 펌프를 또한 출구 튜브로 연결하였다. 관류 완충액으로, 25% 소 알부민 분획 V(Sigma)를 이용 당일 인공 CSF로 0.2%로 희석하여 0.1- μm 막을 통해 여과하였다. 펌프의 실제 유속을 탐침이 연결되지 않은 채 결정하였다. 주어진 시기 동안 샘플링 이전 및 이후 샘플 튜브를 칭량하고, 유속을 계산하였다. 이어서 펌프를 1 μL /분의 일정 유속으로 설정하였다. 실험 기간에 걸쳐 120분 샘플링 방식을 이용하였다. 조직 손상의 간섭을 배제하기 위해, 실험 윈도우를 탐침 임플란트 후 14 내지 48 hr으로 설정하였다. 실험 시작 14~16 h 후, GM37, 인간 9E4 또는 이소형 대조군(항-HEL)을 15 mg/kg으로 i.p. 주사하고, 추가 6개 샘플(12 h 수집)을 수집하였다. 투석물을 -80°C 에 보관하였다. 인간 알파 시누클레인의 농도를 ELISA(Covance ELISA 키트)에 의해 결정하였다.

[0361] 항체 처리 전(4 h~6 h) 2~3회 기본값의 평균을 기준선으로 취하고 각각의 동물에 대해 100%로 설정하였다. 데이터를 투웨이 분산 분석(ANOVA)을 이용해서 반복 측정으로 평가하여 통계적 관련성을 평가하였다. 해마에서 인간

알파-시누클레인의 기본 수준은 8.1 ± 1.1 ng/ml(평균 $\pm$ SEM, $n = 25$, 시험관내 투석 탐침 회복에 대해 교정하지 않음)였다. GM37의 투여는 비교인자 항체, 인간9E4, 및 이소형 대조군(항-HEL) 모두에 비해 F28 마우스의 해마에서 인간 알파-시누클레인의 더 큰 감소를 유도하였다(도 17).

[0362] **실시예 9: 생체내 알파-시누클레인 항체의 만성적 효과. 항체 GM37은 래트 파킨슨 모델에서 운동 표현형을 완화함.**

[0363] 래트 중뇌에서 도파민성 뉴론에 대한 인간 알파-시누클레인의 표적화된 과발현은 재조합 아데노-연관 바이러스 벡터(rAAV)를 이용하여 달성할 수 있으며, 흑색질에서 도파민성 세포의 진행성 손실뿐만 아니라 운동 손상과 연관된다.

[0364] 사이토메갈로바이러스 프로모터로부터의 인헨서 요소와 닭 베타-액틴 프로모터에 이어, 전술된 바와 같은 인간 알파-시누클레인 cDNA 및 WPRE 요소를 함유하는 AAV2/5 혈청형의 아데노 연관 바이러스의 주사에 의해, 성체 암컷 Sprague-Dawley 래트(225~250 g)를 이용하여 흑색질(SN)에서 인간 알파-시누클레인을 발현시켰다(Xu L, Daly T, Gao C, Flotte TR, Song S, Byrne BJ, Sands MS, Ponder KP (2001)). 상기 모델에서, 인간 알파-시누클레인 발현은 도파민성 뉴론의 신경변성으로 이어지는 것으로 나타났다(Maingay M, et al. CNS Spectr. 2005 Mar;10(3):235-44). 상기 모델에서 알파 시누클레인 치료 항체의 효과를 시험하기 위해, 항체 처리를 바이러스 주사 2 내지 4일 전 개시하고, 연구 종료시까지 계속하였다(도 18). 동일 부피의 PBS 투여(5 ml/kg: IP)를 대조군으로 이용하였다. GM37을 15 mg/kg 용량으로 주 2회 투여하였다(IP). 인간 wt 알파-시누클레인 또는 녹색 형광 단백질(GFP)에 대한 유전자를 함유하는 바이러스 입자(rAAV2/5)를 SN에 단측 주사하였다. 동물을 2.0 ml/kg 으로 s.c. Hypnorm® 및 Dormicum®의 조합으로 마취하고 정위 프레임에 배치하였다. 이의 체온을 히팅 패드를 통해 37.5℃로 조정하고, 이의 두개골을 노출시켰다. Paxinos 및 Watson 도해(Paxinos & Watson, 1998)에 따라, 다음 좌표에서 오른쪽 SN 위에 구멍을 뚫었다: 5.5 mm 정수리점 후방 및 2.0 mm 정수리점 측방. 3 μ l의 rAAV2/5-알파-syn 또는 rAAV2/5-GFP의 단회 주사를 7.2 mm 경질막 아래 깊이에서, 정위 주사장치에 연결된 Hamilton 시린지를 이용해서 0.2 μ l/분의 유속으로 수행하였다. 바늘을 추가 5분 동안 제 자리에 두어 SN에서의 벡터 확산을 허용하였다. 수술 후, 동물을 이의 홈 우리로 복귀시키고 이들이 마취로부터 회복할 수 있도록 난방 환경에 배치하였다. 실린더 시험에서 운동 비대칭 시험을 AAV 주사 전뿐만 아니라 AAV 주사 후 3, 7 및 10주차에 평가하였다. 나타난 데이터는 왼쪽 및 오른쪽 앞발 모두의 전체 이용 대비 오른쪽 앞발의 이용 간 비에 해당한다. 각 동물의 실린더 내 수행을 총 5분 동안 촬영하고, 5분 동안 왼쪽 및 오른쪽 앞발을 이용한 터치 수의 수동 스코어링을 바이러스 주사 후 10주차 최종 시험일에 대해 수행하였다. 10주차에 AAV-GFP 주사 래트 대비 AAV-syn에 유의미한 손상이 존재한다($p=0.012$). GM37 처리 동물에 대한 역전 경향성이 나타났으며 이의 수행은 GFP 래트와 상이하다(각각 gm37에 대해, $p=0.163$ 및 $p=0.407$). 상기 발견은 항체 GM37이 상기 래트 모델에서 파킨슨증 운동 표현형을 완화할 수 있음을 시사한다(도 18 및 19).

[0365] **실시예 10: 생체내 알파-시누클레인 항체의 만성적 효과. 항체 GM37은 내인성 마우스 알파 시누클레인 응집의 씨드화 및 인산화를 억제함**

[0366] 야생형 마우스의 등쪽 선조체 내로 재조합 단백질로 제조된 알파 시누클레인 사전형성 피브릴의 주사는 내인성 마우스 알파 시누클레인을 모집하며, 피질, 편도 및 흑색질에서 뉴론 내부에 Ser-129 인산화 응집물의 형성을 유도한다(Luk et al. 2012, Science. 2012 Nov 16;338(6109):949-53). 알파-시누클레인 특이적 모노클로날 항체 GM37이 생체내 알파-시누클레인 피브릴-유도된 인산화 알파 시누클레인 봉입체 형성의 출현을 감소시킬 수 있는지를 보기 위해, 총 45마리 마우스를 이용하였다. 마우스에 GM 37을 30 mg/kg으로 i.p, GM 37을 15 mg/kg로 i.v. 또는 비히클을 ip(PBS) 투여하였다. 1일 후, 마우스를 마취하고 하나의 반구에 전술된 바와 같이 제조된(실시예 6) 2 μ l의 재조합 인간 알파-Syn 조정제 씨드를 정위 주사하였다(동물 당 총 2 μ g의 조정제 씨드). 조정제 씨드를 주사하기 위해, 구멍을 뚫어 두개골을 개방하고, 오른쪽 전뇌 내로 단일 유리 피펫을 삽입하여(좌표: +0.5 mm 정수리점 전방, +2.0 mm 중간선 측방) 등쪽 선조체(+2.6 mm 경질막 아래)로 점종물을 표적화하였다. 회복 후, 마우스는 45일차에 희생시키기 전까지, 매주 항체의 i.p. 또는 i.v. 주사를 수여받았다. 15마리 마우스/군의 그룹에 iv로 GM37 15 mg/kg, ip로 GM37 30 mg/kg, 또는 PBS(10 ml/kg)를 ip로 주 1회 투여하였다.

[0367] 혈장 중 항체 농도를 측정하기 위해, 불의 혈액을 다음 주사 직전, 즉 최종 주사 후 7일차에 주 1회 인출하였다. 2000 g 회전, RT에서 15분 인큐베이션에 의해 혈장을 수득한 후, 상청액을 -20℃에서 냉동하였다. CSF 샘플을 연구 말기에 채취하고, -20℃에서 냉동하였다. 혈장 및 CSF 샘플을 분석하여 MSD에 의해 인간 IgG의 농도를 결정하였다. 요약하면, 마우스 항-인간 IgG(클론 MH16-1(M1268))를 포획을 위해 이용하였고, 혈장 또는

CSF를 웰에서 인큐베이션한 후 검출 항체로서 설폰-TAG 염소 항-인간(MSD cat no: R32AJ-1)을 이용하였다. 플레이트를 MSD에 의해 전기화학발광으로 분석하였다.

[0368] 혈장 중 항체 수준을 도 20b에 나타내며, 6주 동안 항체 혈장 농도의 용량 의존적 증가 및 혈장 중 항체의 축적을 나타낸다. csf 중 항체 수준을 도 20c에 나타내며, 혈장 중 약 0.1%의 항체 수준을 csf 중 측정할 수 있음을 나타낸다.

[0369] 45일차에, 알파 시누클레인 피브릴성 씨드의 주사 시부터 마우스를 마취하고, PBS로 경심 관류한 후 중성 완충 파라포름알데하이드(4%)로 관류하였다. 뇌를 제거하고, 후-고정을 위해 중성 완충 파라포름알데하이드 중 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 신경과학 학자가 45 μ m 두께의 연속 섹션 상에서 면역조직화학을 수행하였다. 간략하게, MultiBrain® 기술을 이용하여, 최대 25개의 마우스 뇌를 블록 별로 함께 3개 블록씩 임베딩하고, 관상면에서 45 μ m 두께로 냉동 섹션화하고, 항원 보존 용액을 함유하는 컵 내로 수집하였다. 6번째 섹션 마다 Ser-129 인산화 알파-시누클레인에 대한 항체(항-알파 시누클레인(포스포 S129) 항체[Psyn/81A] ab184674)로 염색하여 Ser129 인산화 알파 시누클레인 반응성 구조를 드러내었다.

[0370] 6번째 섹션마다의 전체 흑색질을 커버하는 5-7개 섹션으로부터 10x 확대 이미지에서 면역반응성 양성 세포를 수동 카운팅하여 pSyn 병리의 정량을 수행하였다. 카운팅은 맹검 수행하였다. 편도 및 흑색질에서의 세포 카운트를 원-웨이 ANOVA에 이어 Bonferoni t-시험에 의해 분석하고, 여기서 GM37 항체의 효과를 PBS 처리와 비교하였다.

[0371] 도 20c에서 알 수 있듯이, 항체 GM37로의 처리는 ip 또는 iv 처리 어느 것으로도, PBS 대조군과 비교하는 경우 흑색질에서 세포내 봉입체의 수를 현저히 감소시켰다. 데이터는 항체 GM37이 세포의 병리적 알파-시누클레인의 뉴론 내로의 진입을 차단하여, 뉴론 간 그 전파를 차단하여 및/또는 미세아교세포 내로의 섭취에 의한 ISF로부터의 제거를 촉진하여, PD에서 치료 효과를 가질 수 있었음을 나타낸다. 상기 봉입체의 출현은 동물 모델에서 도파민성 뉴론의 손실 및 파킨슨증 운동 결함의 발생에 연관되었으므로, 항체 GM37을 이용한 처리는 도파민성 세포의 손실 및 PD에서 운동 결함의 발생에 대한 치료 효과를 가질 수 있었다.

[0372] **실시예 11: GM37 및 GM37 변이체의 제조 가능성**

[0373] 환자에서의 이용을 위한 임상 등급 물질의 제조를 위해 이용될 제조 조건을 모사하는 조건 하에 포유류 세포 배양에서 항-알파-시누클레인 항체를 제조한다. 상기 방식으로 제조된 단백질은 항체의 치료 효능뿐만 아니라 경시적으로 항체의 안정성에 영향을 미치는 생물리적 속성에 모두 영향을 미칠 수 있는 번역-후 변형을 거치는 것으로 널리 공지되어 있다. 수 십여 년의 연구로부터 확인된 실험적 지식으로 특정 분자의 개발 가능성에 대해 위험을 제공하는 것으로 공지된 번역-후 변형 세트를 확인하였다. 이들 번역-후 변형은 중쇄 및 경쇄 단백질의 일차 서열에 존재하는 아미노산 스트링과 연관된 것으로 나타났다. 이러한 서열을 확인하고 치료 항체의 제조 가능성 및 개발 가능성에 대해 가질 잠재적 위험을 결정할 수 있는 알고리즘이 생성되었다.

[0374] 항체의 일차 서열의 컴퓨터내 분석은 치료제로 개발될 그 가능성을 위해 분자의 위험을 제거하기 위해 이용될 수 있다. 특히, VH 및 VL 영역의 상세 분석은 분자 활성화에 대해 중요하게 간주되지만 경시적으로 그 안정성에 대해 잠재적 위험일 수 있는 독특한 아미노산을 확인할 수 있다. 서열 특이적 탈아미이드화는 단백질 구조에 대한 잠재 위험으로 확인되었다. 단백질 탈아미이드화는 글루타민 또는 아스파라긴 잔기의 아미이드 측쇄 상에서 일어나서 이를 카복실레이트기로 변환할 수 있다(Lorenzo et al. PLOSone, DOI:10.1371, Dec. (2015)). 중성 pH에서의 비효소적 탈아미이드화는 아스파라긴에서 더 빠르게 일어나므로, 글루타민에 비해 더 높은 위험으로 간주된다. 활성화는 서열에서 후속 아미노산에 의해 추가로 영향을 받으며, 수 일 또는 수 년의 속도로 일어날 수 있다. 탈아미이드화를 거치는 단백질의 실제 운명은 그 안정성 및 활성 모두에 대한 변화의 영향을 결정하기 위해 실험적으로 평가되어야 한다.

[0375] 본 발명자들은 GM37의 VH 도메인 내의 탈아미이드화 부위를 확인하였다. 아미노산 잔기 54는 아스파라긴(N)이고 위치 55에 글리신(G)이 뒤따른다. N54는 자발적 탈아미이드화에 대한 위험이 높다. 상기 위험을 경감시키기 위해, 아스파라긴(N)을 세린(S), 글루타민(Q) 또는 히스티딘(H)으로 대체하는 3개의 변이체 세트를 생성하였다. 모든 3개 변이체를 일시적 형질감염 방법(실시예 1.5)을 이용하여 포유류 세포 배양에서 제조하였다. 모든 3개 변이체는 GM37wt과 유사한 발현 및 정제 특성을 나타내었다(도 23).

[0376] 8개 산물의 각각에 대해 최소 2주 동안 배양한 CHOK1SV GS-KO 세포를 이용하여 400 ml 일시적 형질감염을 수행하였다. 세포를 형질감염 전 24시간 동안 계대배양하였다. 모든 형질감염을 Gene Pulse XCell(Bio-Rad)을 이용하여 전기천공을 통해 수행하였다. 각각의 형질감염에 있어서, 생활성 세포를 6 mM L-글루타민이 보충된 사전-

가온된 CD-CHO 배지 중에 2.86×10^7 세포/ml로 재현탁하였다. 적절한 중쇄 및 경쇄를 함유하는 각각의 확립된 SGV DNA 40 μ g을 각각의 큐벳(Bio-Rad, GenePulser 큐벳, 0.4 cm 갭, 165-2088) 내로 분취하고 700 μ l의 세포 현탁액을 첨가하였다. 세포를 300 V, 900 μ F에서 전기천공하였다. 형질감염된 세포를 에를렌마이어 플라스크에서 사전-가온된 배지로 옮기고 사전 가온된 배지로 2회 행군 큐벳 내용물도 플라스크로 옮겼다. 형질감염체 배양을 6일 동안 36.5°C, 5% CO₂, 85% 습도, 140 rpm으로 진탕 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 세포 생활성을 Cedex HiRes 자동화 세포 카운팅 장치(Rosche)를 이용하여 수확 시 측정하였다.

[0377] 인간 알파-시누클레인으로의 결합에서 잔기 54의 중요성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 2개의 상이한 실험에서 변이체가 결합하는 능력을 분석하였다. 경쟁 ELISA 포맷을 이용하여, 본 발명자들은 잔기 54에서의 변화가 용액 중 알파-시누클레인에 결합하는 GM37의 능력에 대해 가질 영향을 평가하였다. 시누클레인 코팅된 ELISA 플레이트에 대한 항체의 결합을 억제할 수 있는 시누클레인의 농도를 평가함으로써, 본 발명자들은 모든 3개 변이체가 GM37wt과 동일한 결합을 유지하였으며 1~2 nM의 IC50을 생성하는 고친화도로 알파-시누클레인에 결합함을 나타내었다(도 24). 실온에서 60분 동안 0~1000 nM 범위의 인간 알파-시누클레인과 고정된 농도(0.3 μ g/ml)의 각각의 다음 항체, GM37(GM 37wt로 명명됨), GM37 변이체 1, GM37 변이체 2 및 GM37 변이체 3의 사전 인큐베이션을 이용하여 경쟁 검정을 수행하였다. 잔여 미결합 항체를 포획하고 전기화학발광(MSD, Gathersburg, MD)에 의해 항-인간 검출 항체를 이용하여 100 ng/ml의 재조합 인간 알파-시누클레인으로 코팅된 ELISA 플레이트 상에서 측정하였다. 상호작용의 IC50은 각각 GM37 wt, GM37 변이체 1, GM37 변이체 2 및 GM37 변이체 3에 대해 1.9 nM, 1.6 nM, 2.1 nM 및 1.4 nM이다(Prism Graphpad®를 이용하여 결정됨).

[0378] 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 이용하여, 본 발명자들은 GM37 wt(2개 배치) 및 3개 변이체의 실시간 결합 동역학을 평가하였다(실시예 2). 인간 알파-시누클레인을 슬라이드로 포획하고(리간드) 항체를 각각 분석물질로서 여러 농도에서 시험하였다. 여러 농도에서 항체의 존재 하 결합 곡선의 분석은 항체가 완충액으로부터 제거된 경우와 유사하게, 온 속도가 모든 4개 항체에 대해 동일함을 나타내었고, 측정된 오프-속도는 항체 간 통계적 차이를 나타내지 않았다. 1:1 결합 알고리즘을 이용하여, 모든 4개 항체는 거의 동일한 결합 상수를 갖는다(도 25).

[0379] GM37의 기능적 활성에 대한 N54에서의 변화의 영향을 평가하기 위해, 본 발명자들은 일차 뉴런 배양에서 시누클레인 씨드화 활성을 차단하는 항체의 능력을 분석하였다(실시예 6). 씨드화 수준을 포스포-시누클레인에 특이적인 항체를 이용하여 측정한다. 모든 3개 항체는 포스포-시누클레인 신호에 의해 측정되는 씨드화를 차단할 수 있었다(도 26). 또한, 억제 수준은 모든 4개 항체에 대해 동일하였다. 상기 세포 기반 데이터는 추가로 VH 도메인에서의 아미노산 54가 인간 알파-시누클레인에 대한 결합 친화도를 위해 또는 일차 세포 기반 검정에서 씨드화의 억제를 위해 요구되지 않는다는 결합 데이터를 확인시켜 준다. 또한, 본 발명자들은 모든 3개의 이들 항체가 표준 발현 및 정제 방법을 이용하여 제조할 수 있음을 확인하였다. 흥미롭게도, 변이체 중 하나인 N54Q는 다른 변이체에 비해 제조에서 개선을 나타내었으며, 이는 항체가 대규모로 상업적으로 제조되는 경우 큰 중요성을 갖는다. 이들 데이터는 아스파라긴(N)을 효능 손실에 대한 우려 없이 다른 아미노산으로 대체하여 탈아미드화의 잠재적 위험을 감소시키는 가능성을 뒷받침한다.

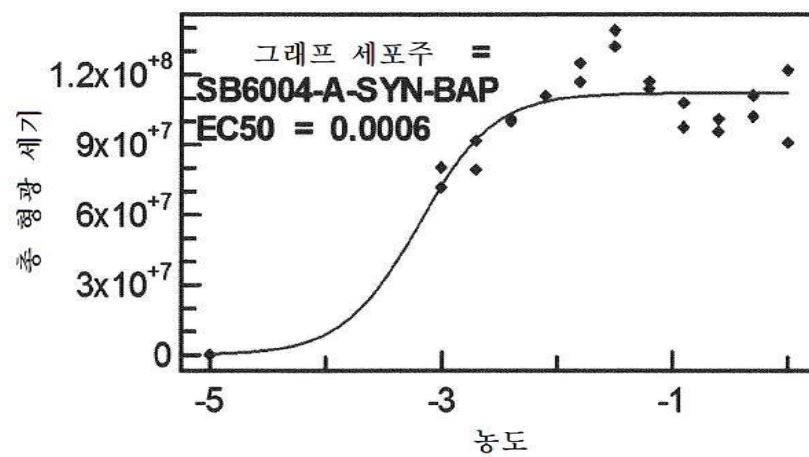
[0380] 각각의 항체 wt GM37, var1, var2 및 var3의 샘플은 경시적인 온도의 일정한 증가를 거치고, 응집 수준을 다중 각 광 산란에 의해 동시 측정하였다(Prometheus NT.48, NanoTemper Technologies). 응집 개시를 위한 온도는 GM37 및 GM37-변이체에 대해 유사한 것으로 나타났지만, GM37-Var2에 대해 최저 응집 수준이 관찰되었다(도 27).

도면

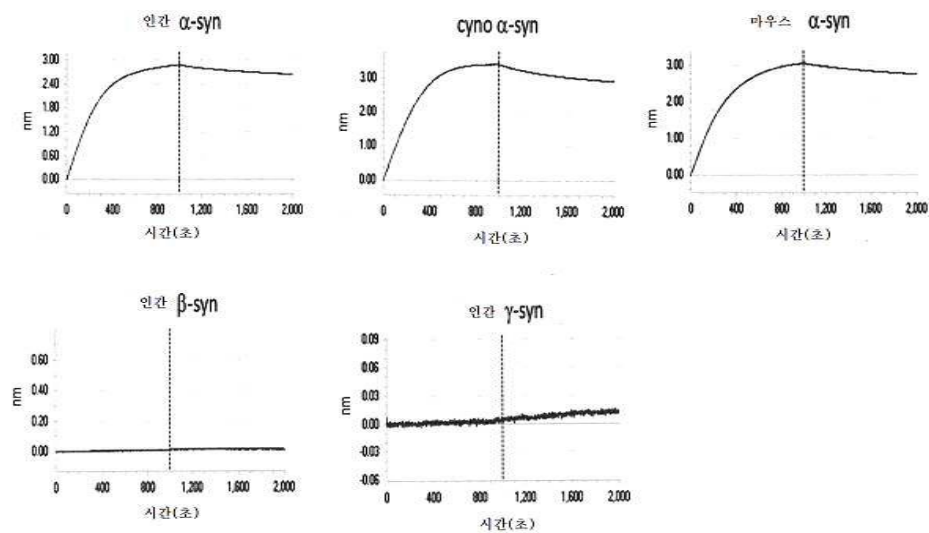
도면1

항제	면역원	프로토콜	마우스 계통	
GM37	1~60 알파-시누클레인과 1~119 알파-시누클레인이 교대하는 FL 인간 알파-시누클레인 피브릴	완전 프로인트 아주반트 및 불완전 프로인트 아주반트	EC017-Balb/c	
GM285	FL 인간 알파시누클레인 단량체에 이어지는 피브릴 또는 단량체	완전 프로인트 아주반트 및 불완전 프로인트 아주반트	EC012-Balb/c	

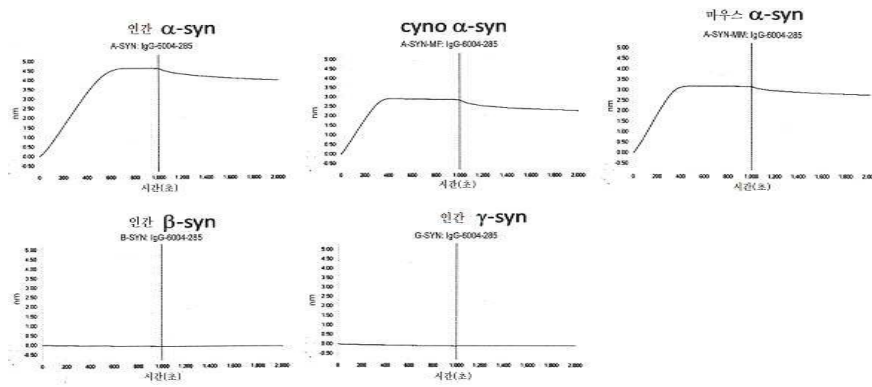
도면2a



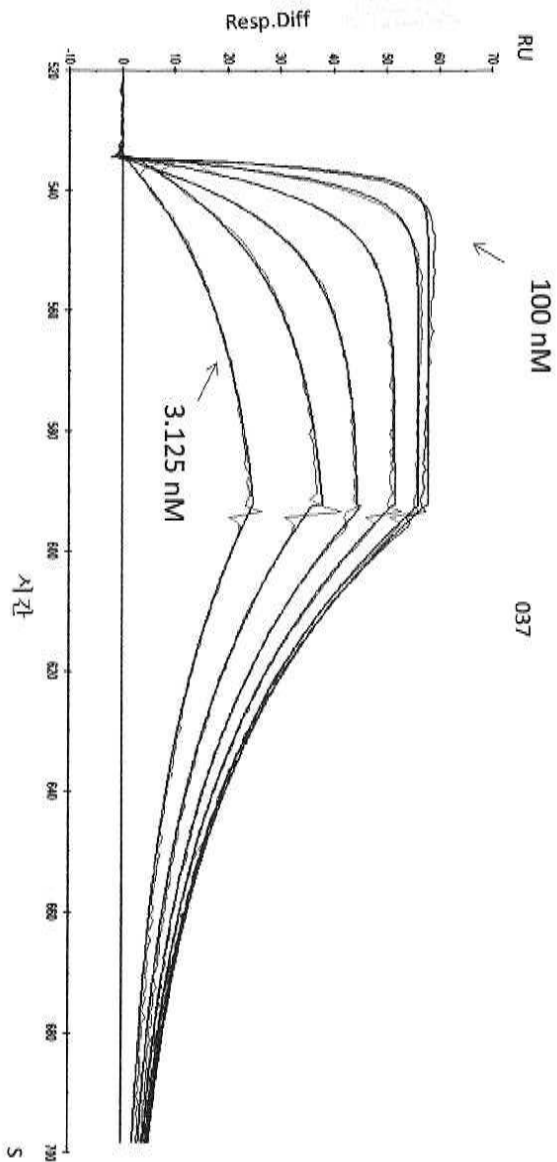
도면2b



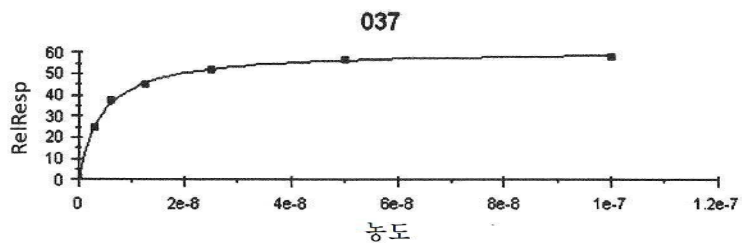
도면2c



도면3a



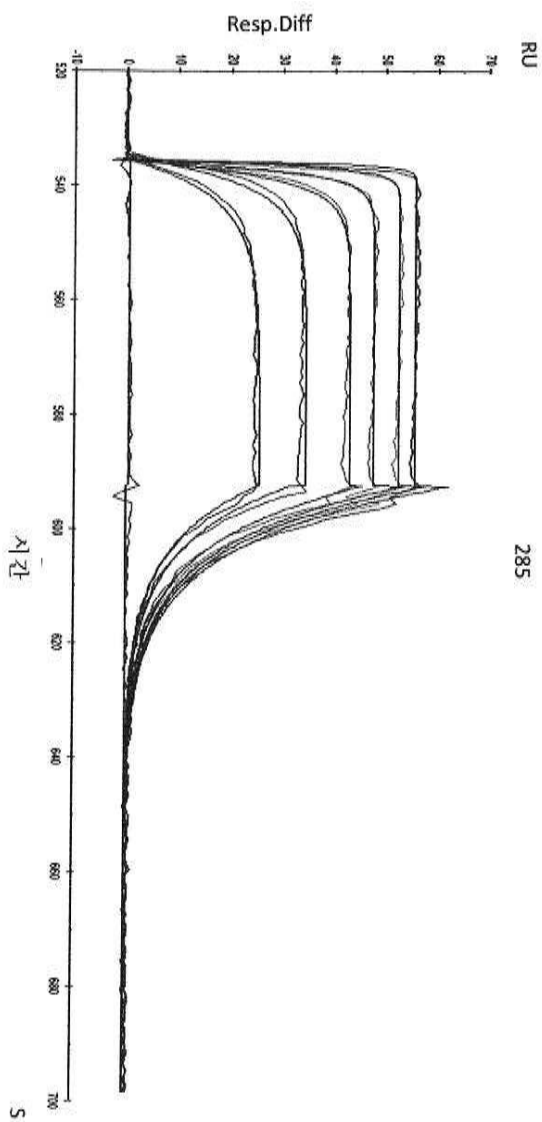
도면3b



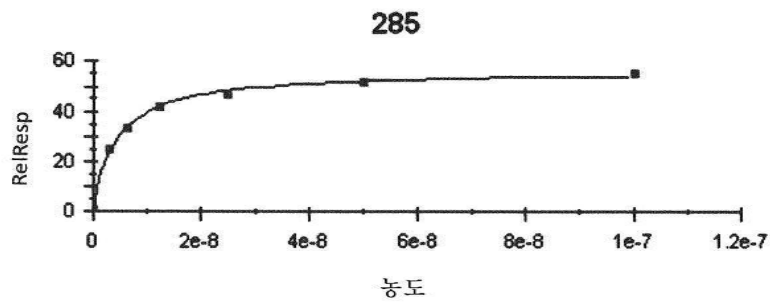
도면3c

명칭	KA(1/M)	KD(nM)	Rmax	Chi2
hlgG1-6004-037 C106S	2.33E+08	4.29	61.1	0.96

도면4a



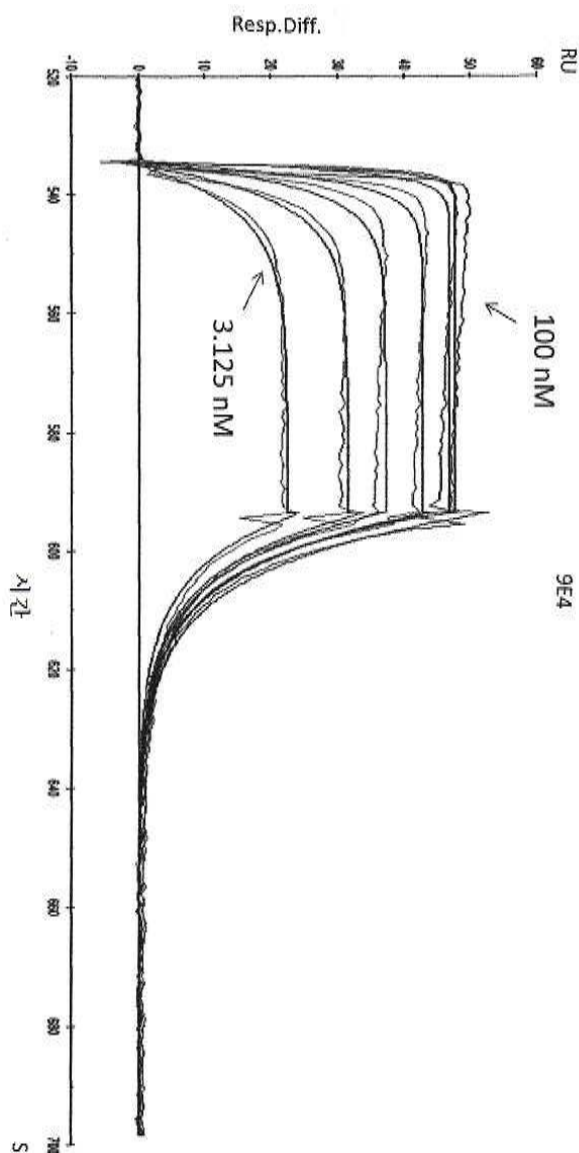
도면4b



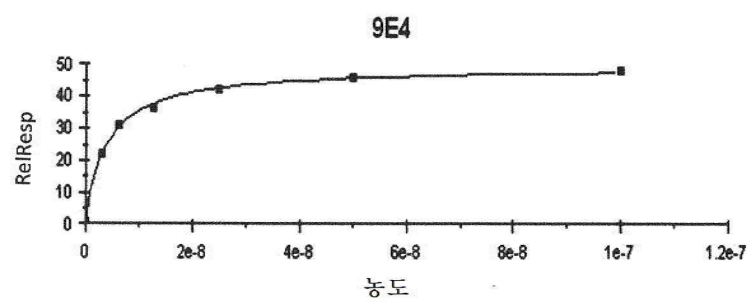
도면4c

명칭	KA(1/M)	KD(nM)	Rmax	Chi2
hlgG1-6004-085	2.33E+08	4.30	56.3	0.77

도면5a



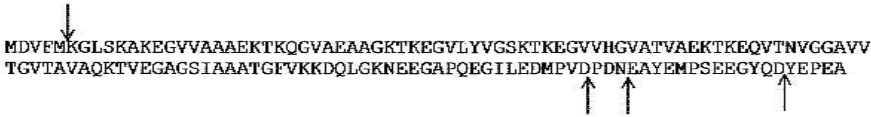
도면5b



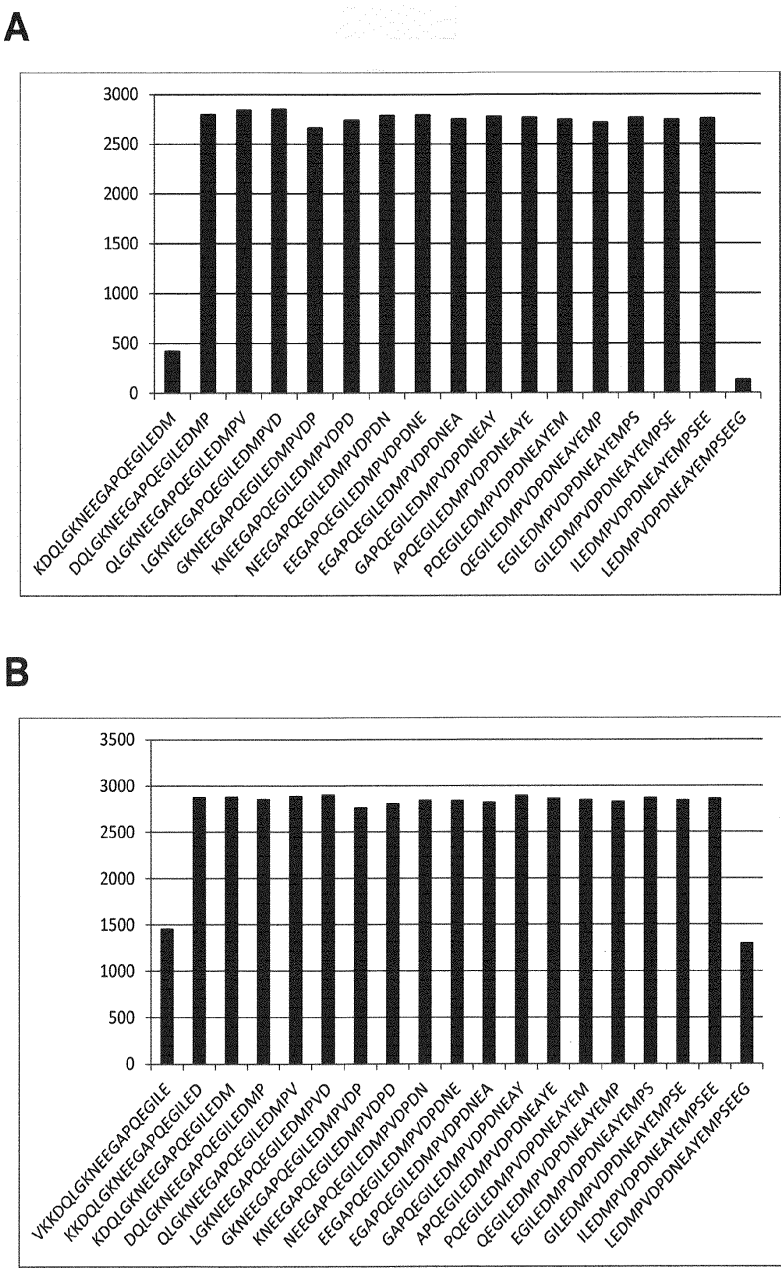
도면5c

명 칭	KA(1/M)	KD(nM)	Rmax	Chi2
hlgG1-9E4	2.58E+08	3.88	49.2	0.61

도면6



도면7

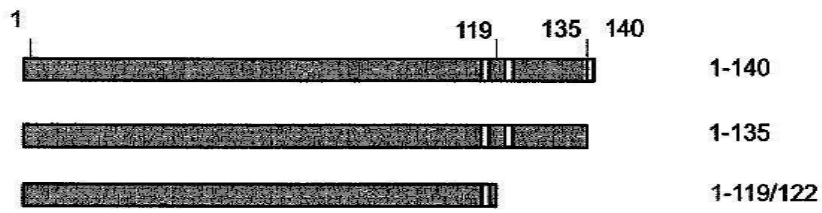


도면8a

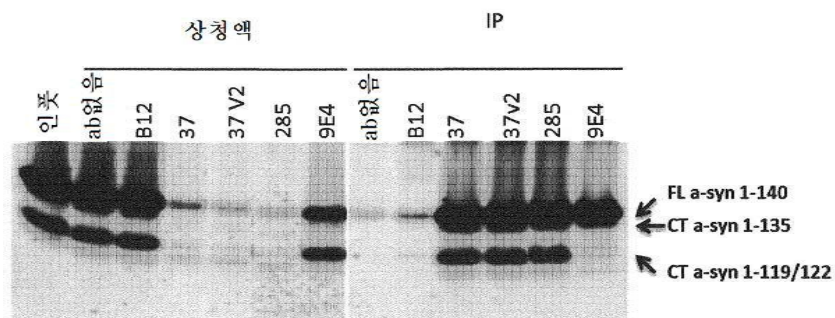
MDVFMKGLSKAKKEGVVAAAERTKQGVAAAGKTKEGVLYVGSRTKEGVVHG VATVAERTKEQVTNVGGAVVTGVTAV
AQKTVBGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA

↑ ↑ ↑

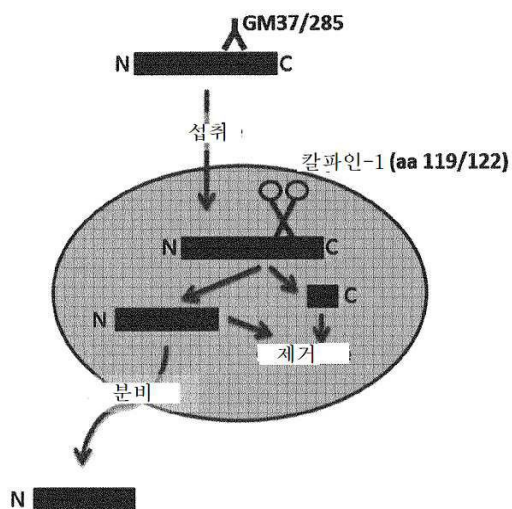
도면8b



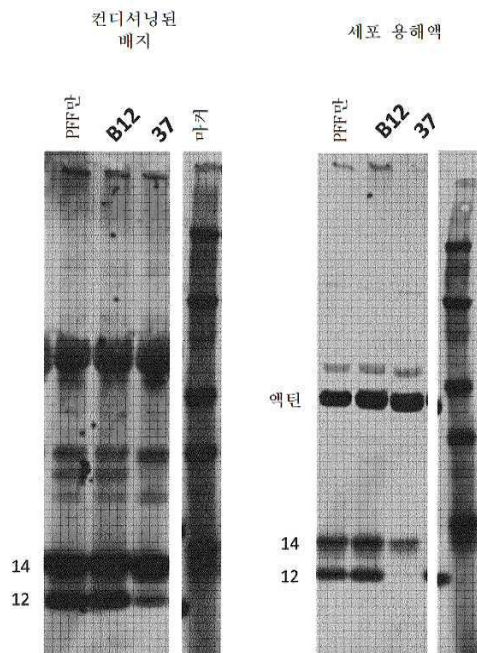
도면9



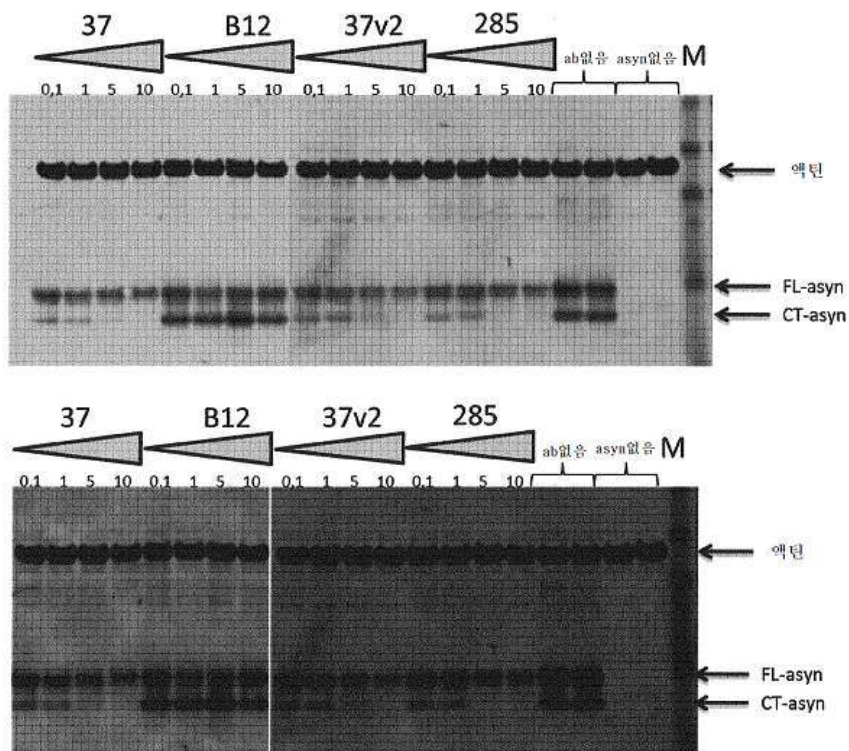
도면10



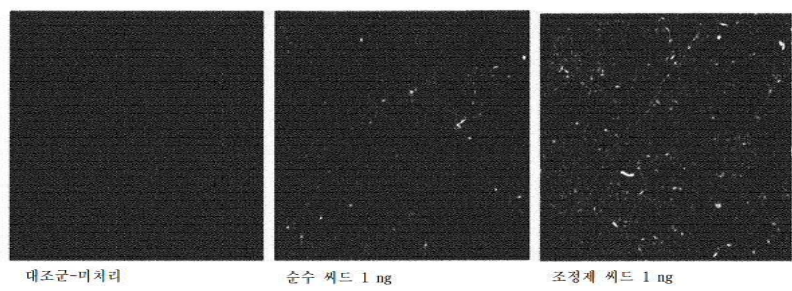
도면11a



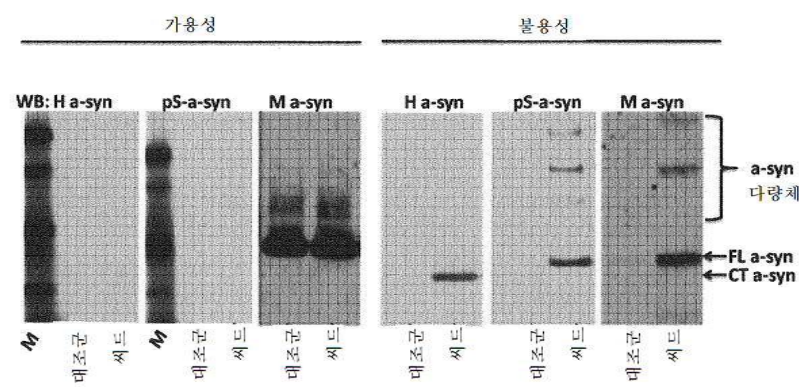
도면11b



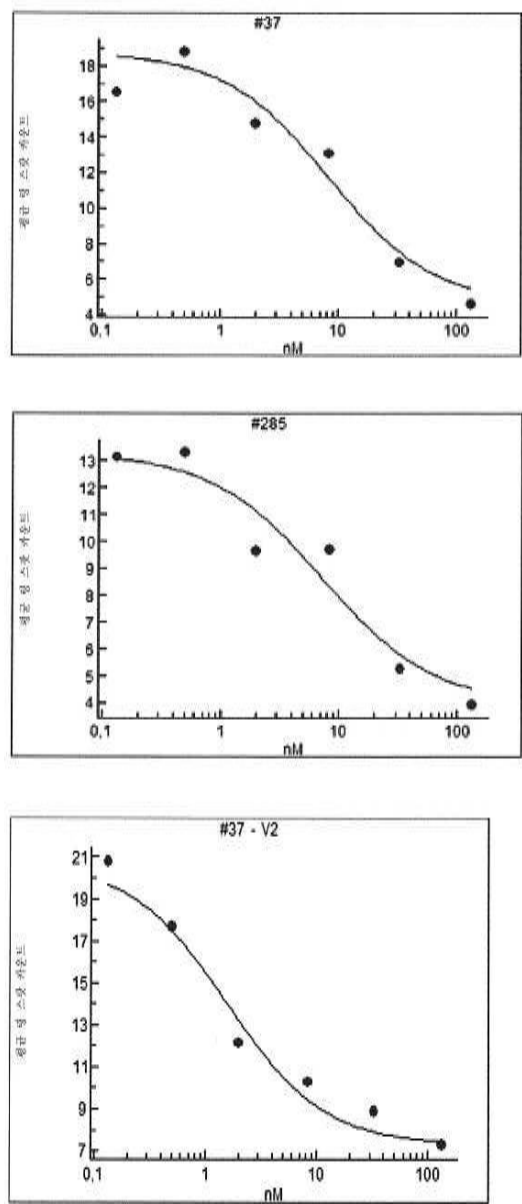
도면12a



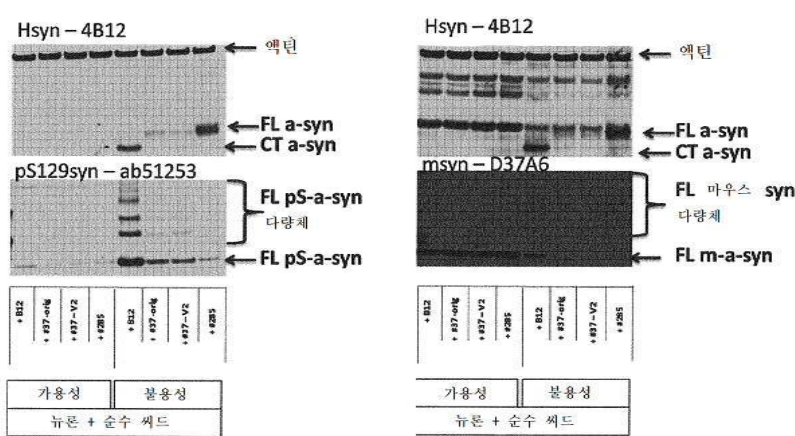
도면12b



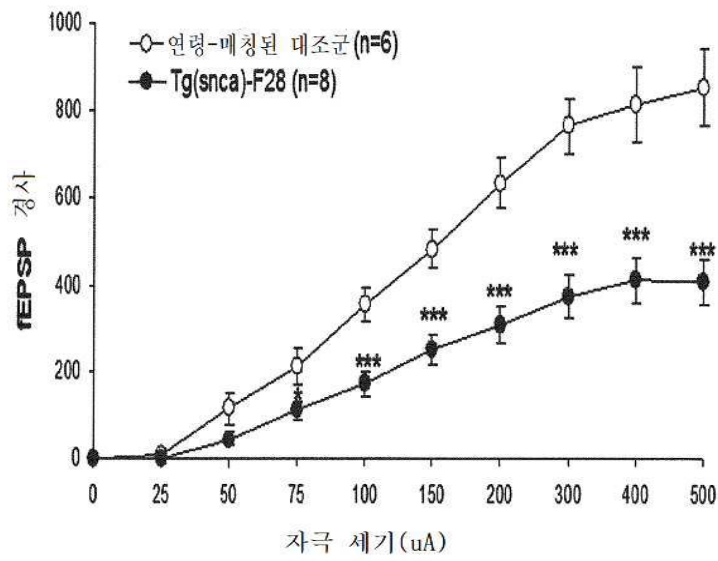
도면12c



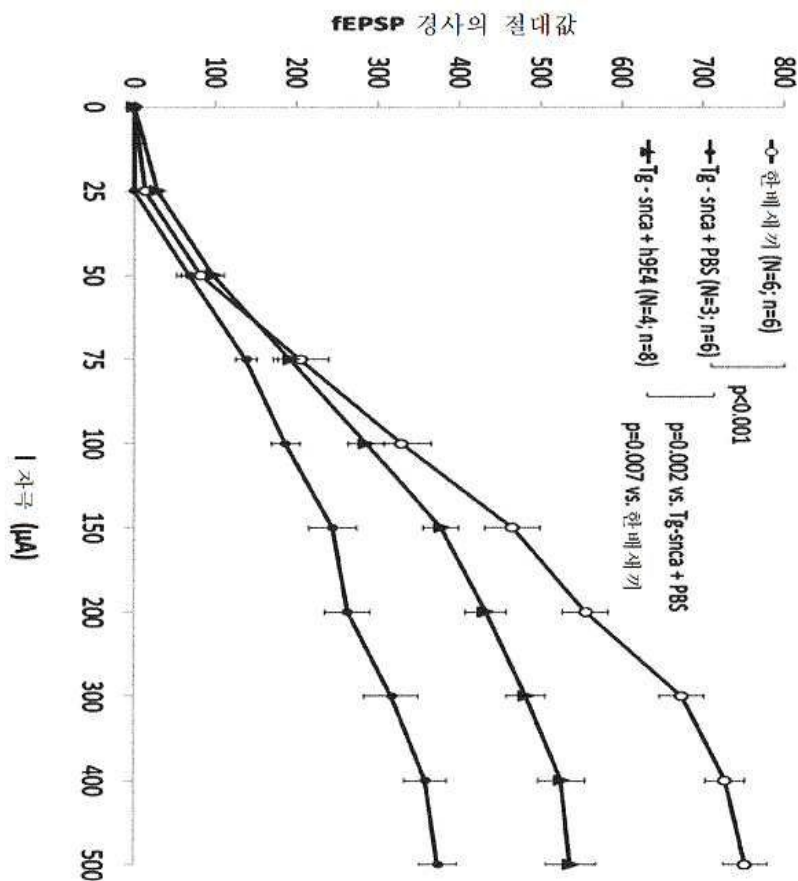
도면12d



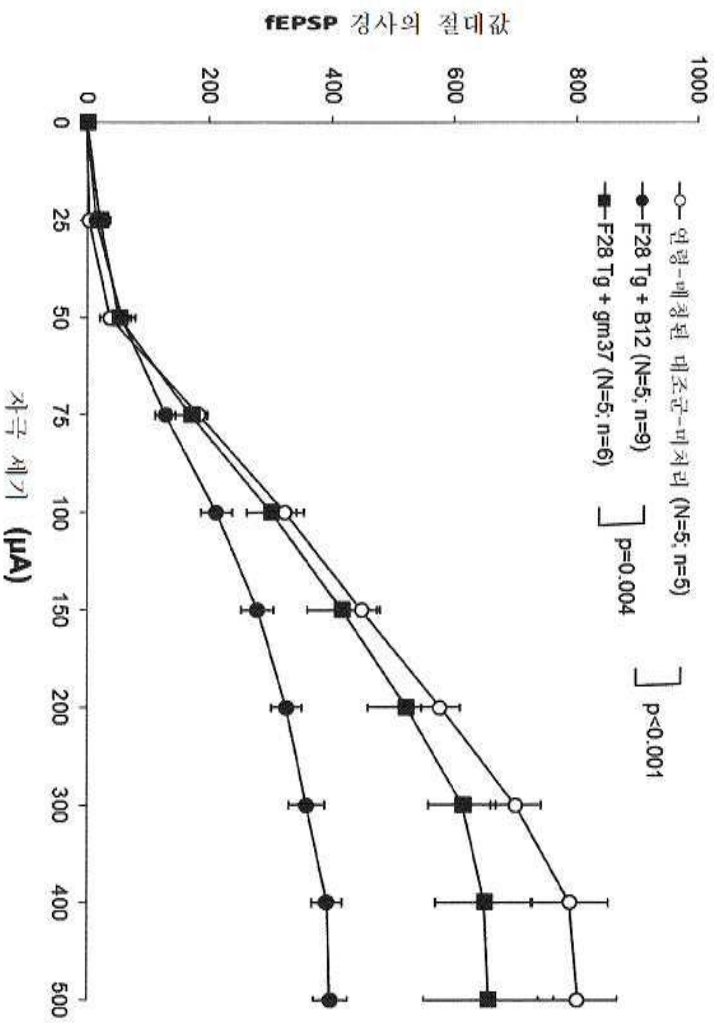
도면13



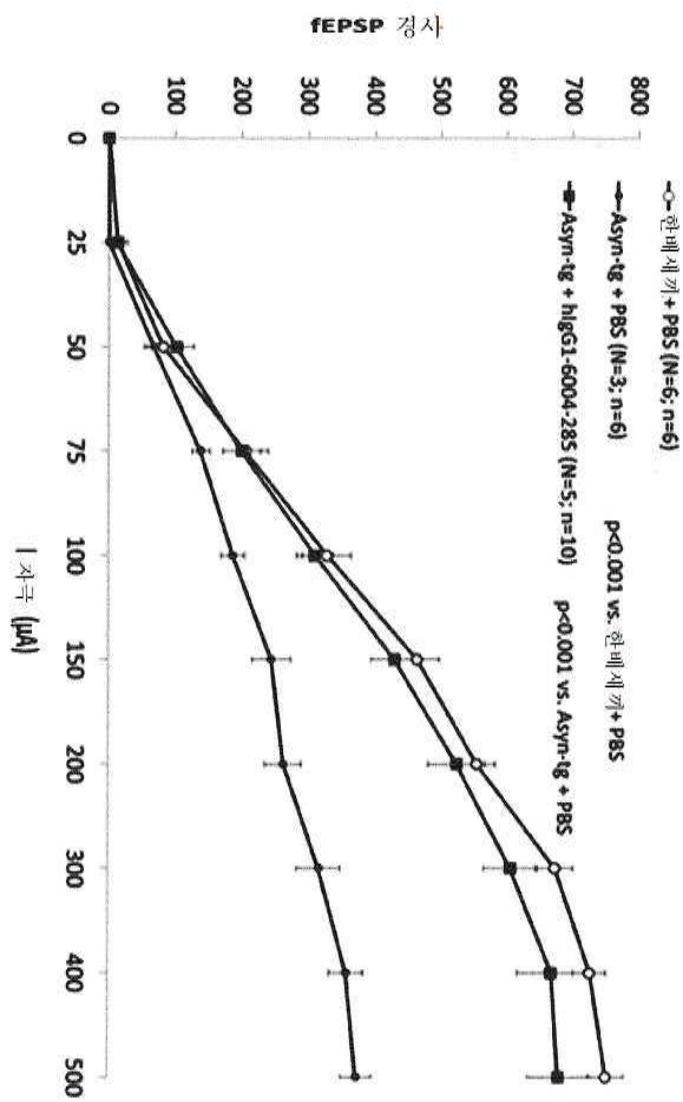
도면14



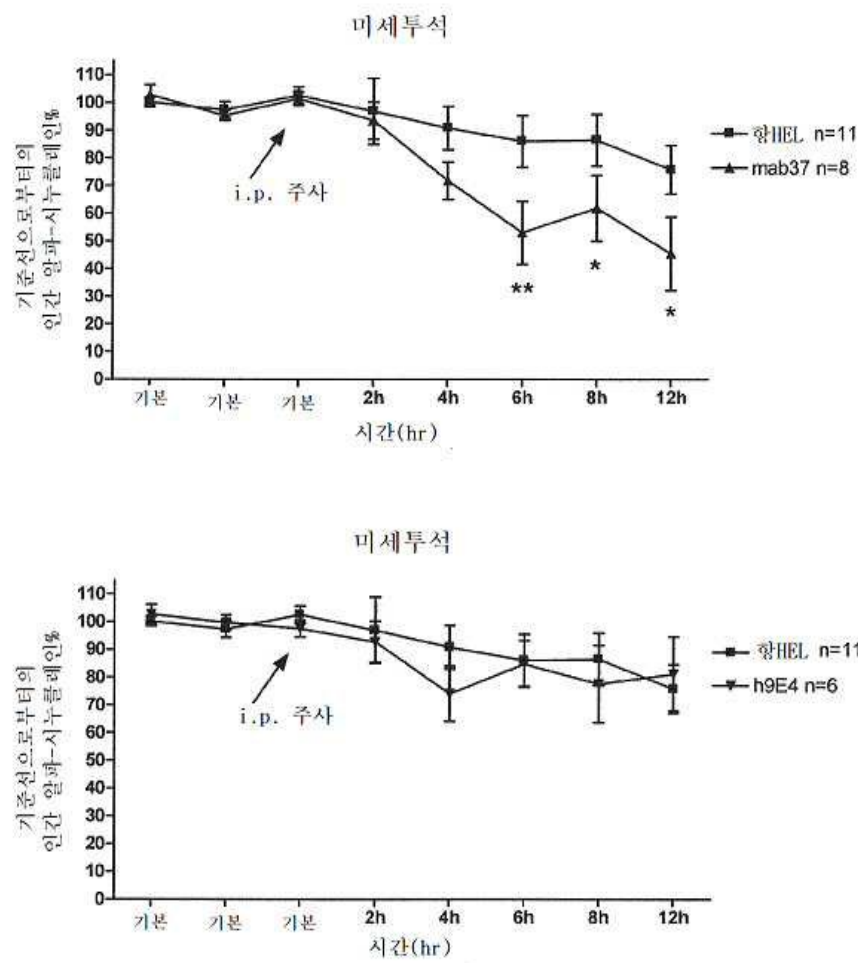
도면15



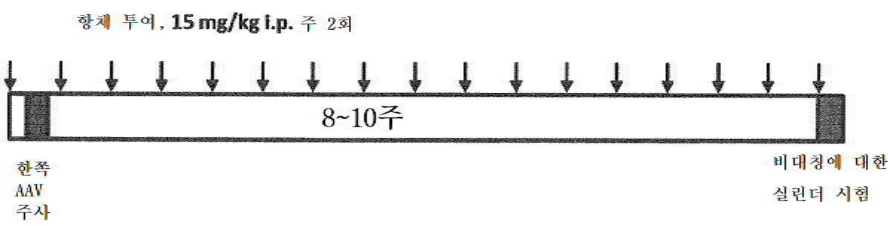
도면16



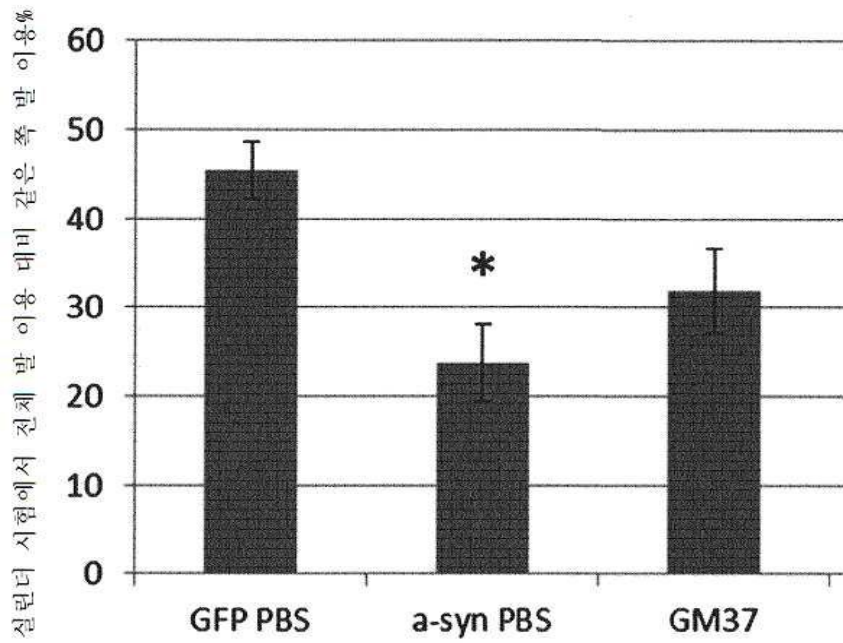
도면17



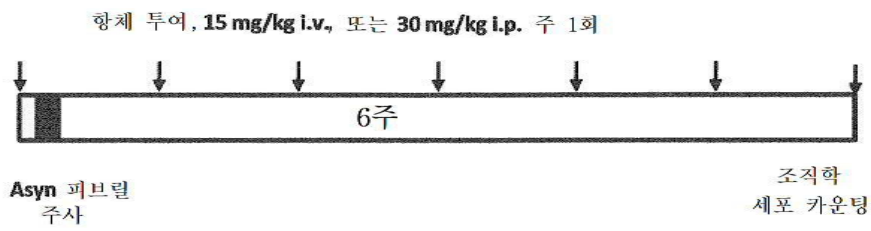
도면18



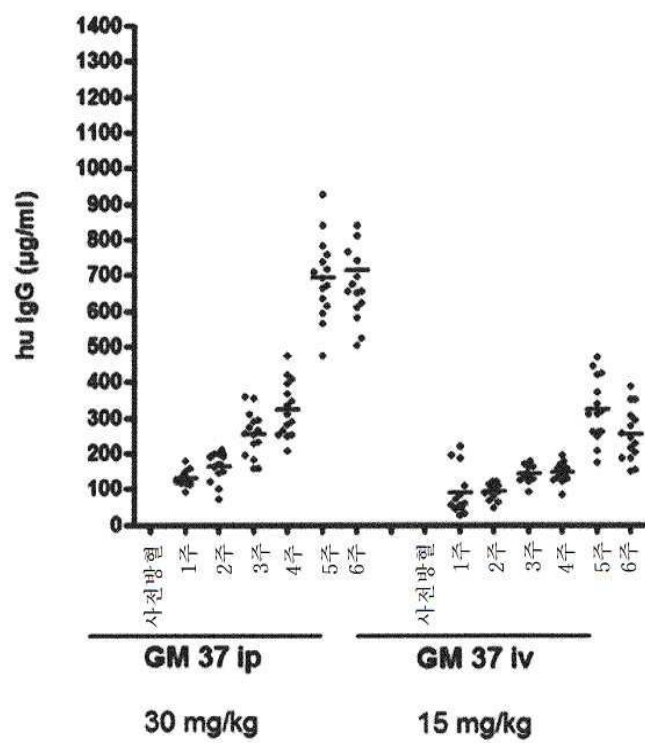
도면19



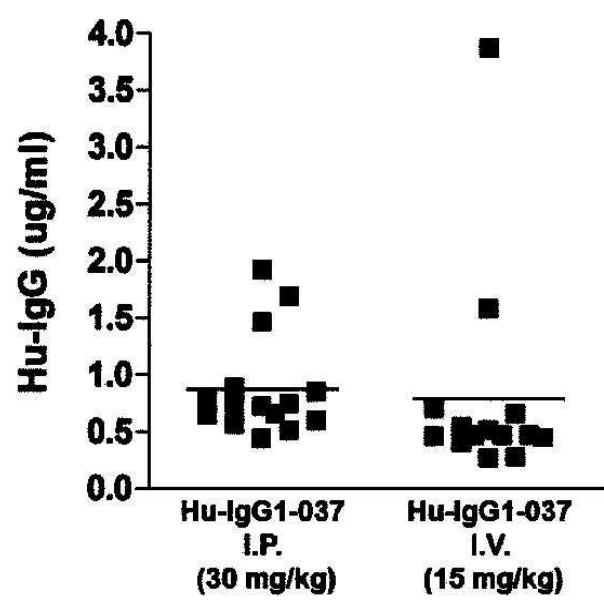
도면20a



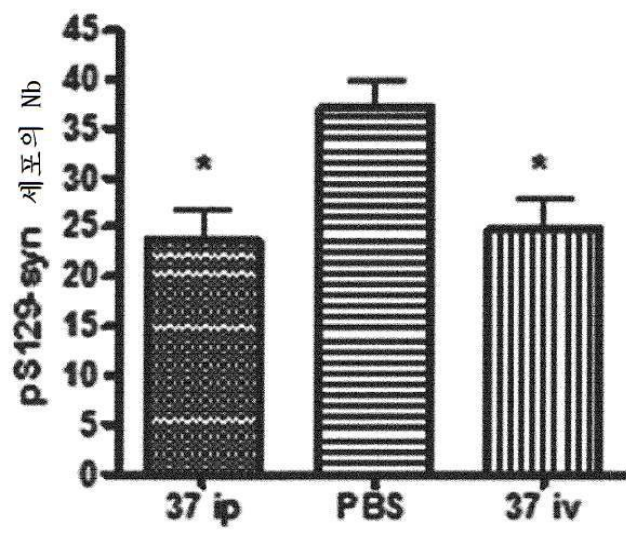
도면20b



도면20c



도면20d



도면21

α-식각용액인(P37840) MDVFMMKGLSKAKEGVVAAEKTKQGVVAEAGKTKEGVLVVGSKTKEGVHGVAATVAEKTKQVTINVGAVYTG
B-식각용액인(O216143) MDVFMMKGLSKAKEGVVAAEKTKQGVTEAAEKTKEGVLVVGSKTKEGVHGVAATVAEKTKQVTINVGAVYTG
γ-식각용액인(O760701) MDVFMMKGLSKAKEGVVAAEKTKQGVTEAAEKTKEGVLVVGSKTKEGVHGVAATVAEKTKQVTINVGAVYTG
α-식각용액인(P37840) VTAAQKIVEGAGSIAAATGFVKKDQKNEEG...AP-QEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEGGYQDYEP
B-식각용액인(O216143) VTAAQKIVEGAGSIAAATGFVKKDQKNEEG...AP-QEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEGGYQDYEP
γ-식각용액인(O760701) VTAAQKIVEGAGSIAAATGFVKKDQKNEEG...AP-QEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEGGYQDYEP

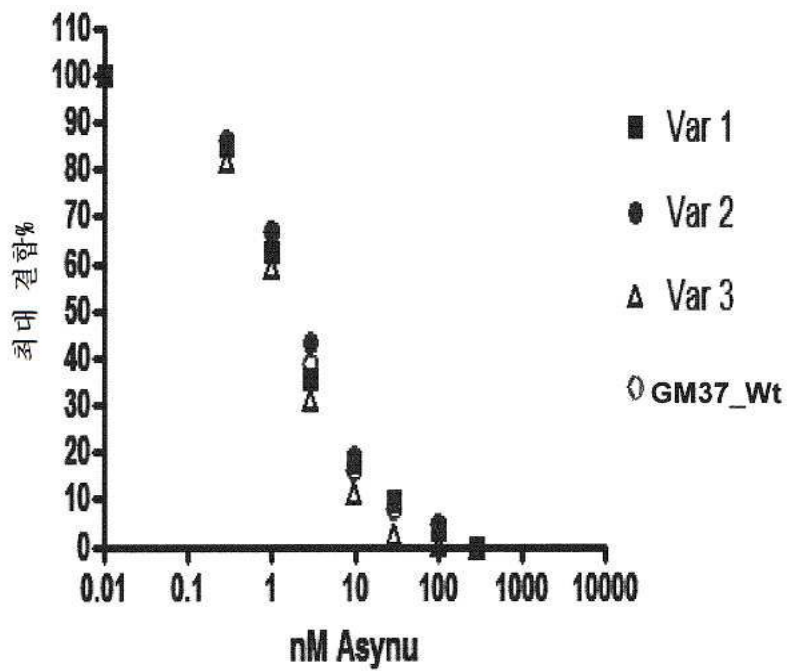
도면22

인간 (P37840)	인간 (P37840)
Cyno (P61142)	Cyno (P61142)
랫트 (P37377)	랫트 (P37377)
마우스 (O55042)	마우스 (O55042)
71	1
72	2
73	3
74	4
75	5
76	6
77	7
78	8
79	9
80	10
81	11
82	12
83	13
84	14
85	15
86	16
87	17
88	18
89	19
90	20
91	21
92	22
93	23
94	24
95	25
96	26
97	27
98	28
99	29
100	30
101	31
102	32
103	33
104	34
105	35
106	36
107	37
108	38
109	39
110	40
111	41
112	42
113	43
114	44
115	45
116	46
117	47
118	48
119	49
120	50
121	51
122	52
123	53
124	54
125	55
126	56
127	57
128	58
129	59
130	60
131	61
132	62
133	63
134	64
135	65
136	66
137	67
138	68
139	69
140	70

도면23

제품	로트 번호	농도 [§] (mg/ml)	부피 [§] (ml)	수율 [§] (mg)	역가 [†] (mg/L)
GM37 _{-wt}	319-121115-01	2.11	6.0	12.6	31.8
GM37 _{-var1}	319-121115-02	1.70	5.0	8.5	21.2
GM37 _{-var2}	319-121115-03	2.57	5.8	14.9	37.2
GM37 _{-var3}	319-121115-04	1.85	5.0	9.3	23.2

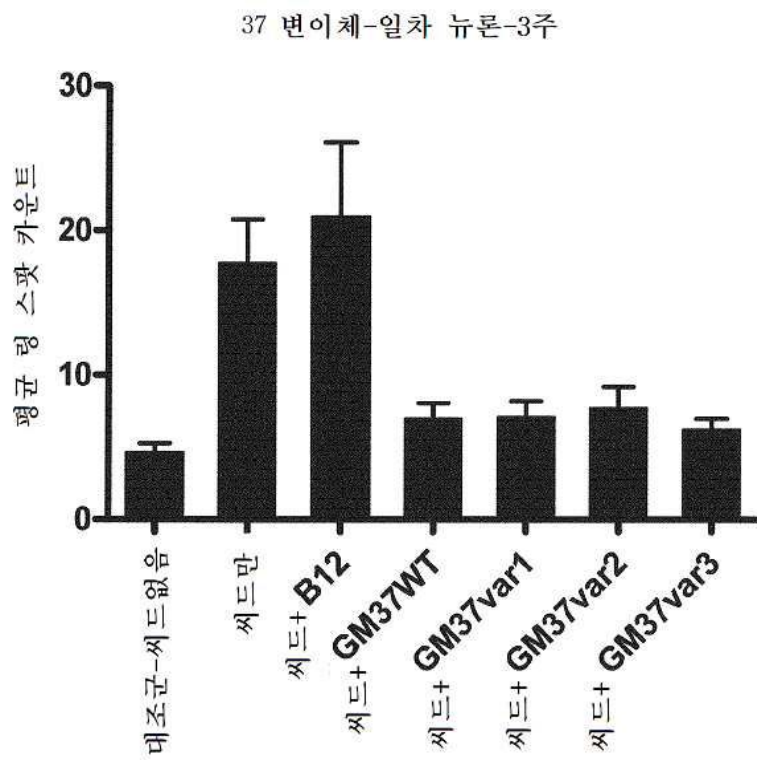
도면24



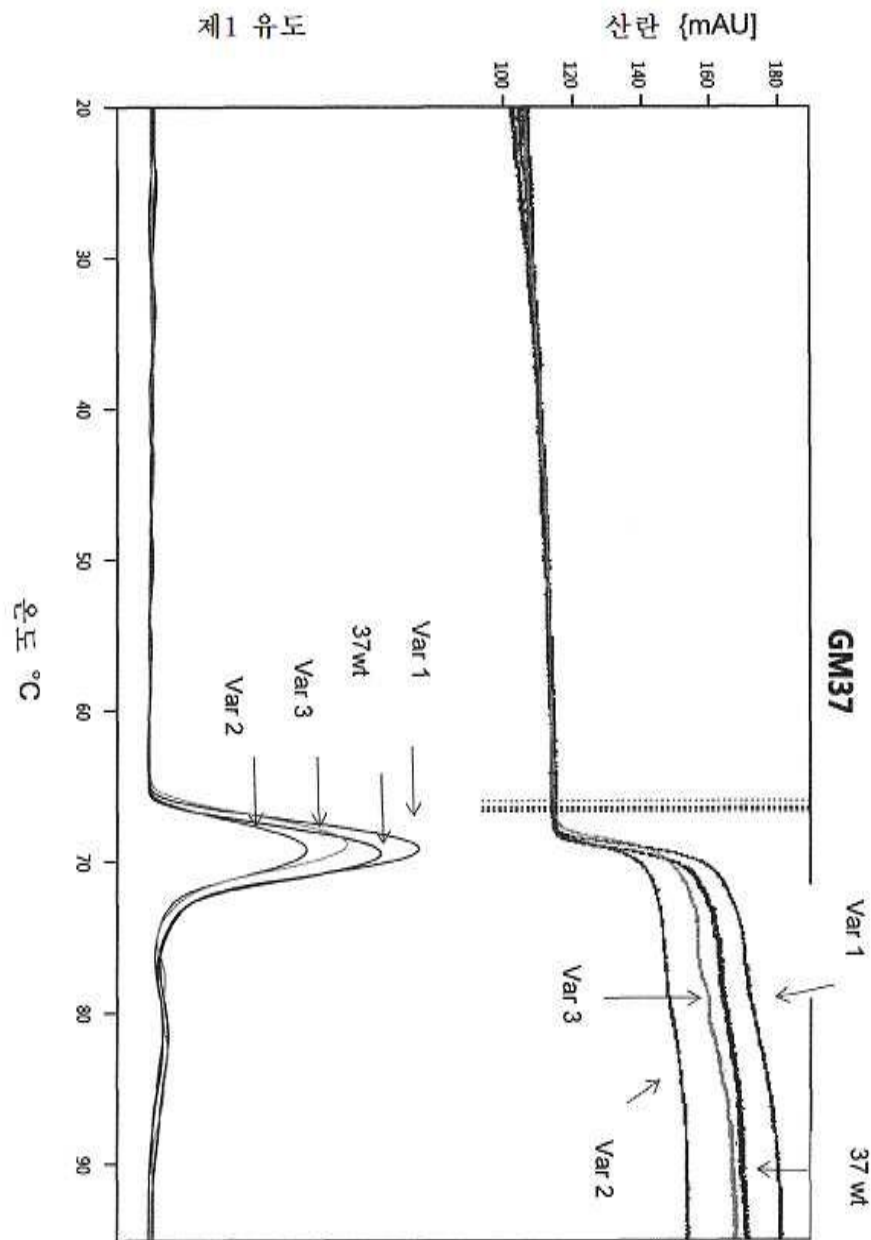
도면25

샘플		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)	U-값
GM37_wt, 배치 2	2	7,01E+05	1,92E-02	27	1,4	0,0022	3
GM37_wt, 배치 1	1	5,28E+05	1,48E-02	28	1,5	0,0024	2
GM37_변이체 1	1	6,34E+05	1,37E-02	22	1,5	0,0022	2
GM37_변이체 2	2	4,15E+05	1,24E-02	30	1,4	0,0021	3
GM37_변이체 3	3	5,77E+05	2,28E-02	40	1,5	0,0016	2
이소형 대조군				NB	NB		

도면26



도면27



서열 목록

- <110> H. Lundbeck A/S
- <120> AGENTS, USES AND METHODS FOR THE TREATMENT OF SYNUCLEINOPATHY
- <130> 0992
- <150> GB1512203.9
- <151> 2015-07-13
- <160> 43
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM37 CDR 1 Heavy Chain

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Thr

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM37 CDR2 Heavy Chain

<400> 2

Ala Ile Arg Ser Asn Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM37 CDR3 Heavy Chain

<400> 3

Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM37 CDR1 Light Chain

<400> 4

Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM37 CDR 2 Light Chain
 <400> 5

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> GM37 CDR 3 Light Chain
 <400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223>

> GM37 CDR Heavy Chain

<400> 7

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

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM 37 Light Chain

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope 112-117

<400> 9

Ile Leu Glu Asp Met Pro

1 5

<210> 10

<211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Alpha-synuclein

<400> 10

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys

65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys

85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile

100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro

115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala

130 135 140

<210> 11

<211> 165

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A-Syn-AAKK-BAP

<400> 11

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15

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

20 25 30
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50 55 60
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys
 85 90 95
 Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly
 100 105 110
 Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr

115 120 125
 Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly
 130 135 140
 Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
 145 150 155 160
 Ile Glu Trp His Glu
 165

<210> 12
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A-Syn-BAAK-BAP
 <400> 12

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
 20 25 30
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35 40 45
 Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr

50 55 60
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly
 100 105 110
 Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr
 115 120 125
 Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly
 130 135 140
 Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys

145 150 155 160
 Ile Glu Trp His Glu
 165

<210> 13
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> A-Syn-BBAA-BAP
 <400> 13

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
 20 25 30
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val

 35 40 45
 Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
 50 55 60
 His Leu Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys

85 90 95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115 120 125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Ala Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
145 150 155 160
His Glu

<210> 14
<211> 165
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> A-Syn-BBKK-BAP
<400> 14

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
20 25 30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
35 40 45
Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
50 55 60
His Leu Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys
85 90 95
Lys Asp Gln Leu Ala Lys Gln Asn Glu Glu Gly Phe Leu Gln Glu Gly
100 105 110
Met Val Asn Asn Thr Asp Ile Pro Val Asp Pro Glu Asn Glu Ala Tyr

115 120 125
 Glu Met Pro Pro Glu Glu Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly
 130 135 140
 Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys

145 150 155 160
 Ile Glu Trp His Glu

165

<210> 15

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A-Syn-120-140_Del-BAP

<400> 15

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys

65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys

85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile

100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Gly Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Leu

115 120 125

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

130 135 140

<210> 16

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-synuclein amino acids 1-119

<400> 16

Met Ala His His His His His His Ile Glu Gly Arg Met Asp Val Phe

1 5 10 15

Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu

20 25 30

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

35 40 45

Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val Val His Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys Lys Asp Gln Leu

100 105 110

Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp Met

115 120 125

Pro Val Asp

130

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> kappa (LC constant region)

<400> 17

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 18

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 (HC Constant region)

<400> 18

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 epitope 112-115

<400> 19

Ile Leu Glu Asp

1

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 CDR1 Heavy Chain

<400> 20

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Thr Met Thr

1

5

10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 CDR2 Heavy Chain

<400> 21

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

1

5

10

15

Gly

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 CDR3 Heavy Chain

<400> 22

Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Tyr

1

5

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 CDR1 Light Chain

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 CDR2 Light Chain

<400> 24

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 CDR3 Light Chain

<400> 25

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 VH

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
Lys Gly Arg Leu Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser

115
<210> 27
<211> 108
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 VL

<400> 27
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 28
<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM285 IgG1 constant region

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			

145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

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

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

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

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

290 295 300

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 29
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM285 Kappa chain
 <400> 29

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM37 Variant 1 heavy chain

<400> 30

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM 37 variant 2 heavy chain

<400> 31

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Arg Ser Gln Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser

115
 <210> 32
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM 37 variant 3 heavy chain
 <400> 32
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Arg Ser His Gly Asp Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Lys Asn Trp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser

115
 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM37 variant 1 heavy chain CDR 2
 <400> 33

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

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM37 variant 2 CDR 2 heavy chain
 <400> 34

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

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM37 variant 3 CDR 2 heavy chain
 <400> 35

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

Gly

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E4 binding epitope

<400> 36

Asn Glu Ala Tyr Glu

1 5

<210> 37

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HUMAN Beta-synuclein

<400> 37

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala

65 70 75 80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu

85 90 95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met

100 105 110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln

115 120 125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala

130

<210> 38

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HUMAN Gamma-synuclein

<400> 38

Met Asp Val Phe Lys Lys Gly Phe Ser Ile Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val

35 40 45

Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn

50 55 60

Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys

65 70 75 80

Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg

85 90 95

Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala Ser

100 105 110

Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp

115 120 125

<210> 39

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-synuclein ortholog for Cynomolgus monkey

<400> 39

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
20 25 30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35 40 45
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Ile Lys
85 90 95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100 105 110

Leu Gln Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115 120 125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130 135 140

<210> 40

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-synuclein ortholog for Rat

<400> 40

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

20 25 30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35 40 45
Val His Gly Val Thr Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80

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

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

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

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

<210> 41

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-synuclein ortholog for Mouse

<400> 41

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1 5 10 15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys

20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Gly Ser Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115 120 125

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

<210> 42
 <211> 446
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E4 HC

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

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

<210> 43

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E4 LC

<400> 43

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

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

195 200 205

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