



등록특허 10-2789446



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월01일
(11) 등록번호 10-2789446
(24) 등록일자 2025년03월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7019487
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월13일
심사청구일자 2021년12월03일
- (85) 번역문제출일자 2020년07월06일
- (65) 공개번호 10-2020-0099160
- (43) 공개일자 2020년08월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/084697
- (87) 국제공개번호 WO 2019/115674
국제공개일자 2019년06월20일

(30) 우선권주장
1720975.0 2017년12월15일 영국(GB)

- (56) 선행기술조사문현
KR1020140081898 A
KR1020160078998 A
KR1020160010402 A

전체 청구항 수 : 총 18 항

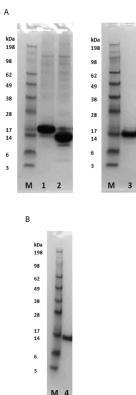
심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 항-알파 시누클레인 항체

(57) 요 약

본 발명은 단량체로서의 그리고 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 결합하고 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지할 수 있는 알파 시누클레인에 결합하는 항체 및 이의 단편에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 파킨슨 질환을 포함하는 알파 시누클레인병증의 치료에 사용하기 위한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/567 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

베이커 테렌스 슈워드

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 바쓰 로드
208 유씨비 셀텍 아이피디 내

타이슨 캐리 루이스

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 바쓰 로드
208 유씨비 셀텍 아이피디 내

더 리처터밸더 로렌조

벨기에 1070 브뤼셀 알레 더 라 러쉐르쉐 60 유씨
비 바이오파마 에스피알엘 아이피 데파트먼트 내

라이트우드 다니엘 존

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 바쓰 로드
208 유씨비 셀텍 아이피디 내

맥밀란 데이비드 제임스

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔 슬라우 바쓰 로드
208 유씨비 셀텍 아이피 데파트먼트 내

명세서

청구범위

청구항 1

알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

- i. 서열 번호 1로 이루어진 CDR-L1;
- ii. 서열 번호 2로 이루어진 CDR-L2; 및
- iii. 서열 번호 3으로 이루어진 CDR-L3; 및

b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

- i. 서열 번호 4로 이루어진 CDR-H1;
- ii. 서열 번호 5로 이루어진 CDR-H2; 및
- iii. 서열 번호 6으로 이루어진 CDR-H3

을 포함하는, 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에의 알파 시누클레인에 결합하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 에피토프는 추가로 A124 및 G132를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서,

- (a) 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인의 응집을 방지하고/하거나;
- (b) 단량체로서의 그리고 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 결합할 수 있고/있거나;
- (c) 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대한 것보다 단량체성 알파 시누클레인에 대해 적어도 10배 높은 해리 상수(K_D)를 특징으로 하는, 단량체성 알파 시누클레인과 비교하여 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖고/갖거나;
- (d) 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대해 300 pM 이하의 (K_D)를 갖고/갖거나;
- (e) 베타 시누클레인 및/또는 감마 시누클레인에 결합하지 않는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 항체가 키메라, 또는 인간화 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서,

- (a) 항체가 전장 항체이거나; 또는
- (b) 항원 결합 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 scFv로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제6항에 있어서, 전장 항체가 IgG1, IgG4 또는 IgG4P로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서,

- a. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
 - b. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄
- 를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 10

제9항에 있어서,

- a. 경쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는
 - i. 서열 번호 16과 적어도 90% 동일하거나;
 - ii. 서열 번호 16을 포함하거나;
 - iii. 서열 번호 16으로 이루어지는 것인 경쇄 가변 영역;
- b. 중쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는
 - i. 서열 번호 32와 적어도 90% 동일하거나;
 - ii. 서열 번호 32를 포함하거나;
 - iii. 서열 번호 32로 이루어지는 것인 중쇄 가변 영역;
- c. 경쇄로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는
 - i. 서열 번호 18과 적어도 90% 동일하거나;
 - ii. 서열 번호 18을 포함하거나;
 - iii. 서열 번호 18로 이루어지는 것인 경쇄;
- d. 중쇄로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는
 - i. 서열 번호 34와 적어도 90% 동일하거나;
 - ii. 서열 번호 34를 포함하거나;
 - iii. 서열 번호 34로 이루어지는 것인 중쇄

를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제9항에 따른 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터.

청구항 12

- a. 제9항에 따른 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는
 - b. 제11항에 따른 하나 이상의 발현 벡터
- 를 포함하는 숙주 세포.

청구항 13

제1항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하는 방법으로서, 제9항에 따른 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 상기 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 밸현 벡터를 포함하는 숙주 세포를, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함하는, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하는 방법.

청구항 14

제1항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는, 하나 이상의 시누클레인병증을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 시누클레인병증이 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1)으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 시누클레인병증이 파킨슨 질환인, 약학 조성물.

청구항 17

제1항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 알파 시누클레인병증의 진단에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 알파 시누클레인병증이 파킨슨 질환인 약학 조성물.

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

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항-알파 시누클레인 항체 및 시누클레인병증(synucleinopathy)을 치료하기 위해 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 항-인간 알파 시누클레인 항체 및 파킨슨 질환의 치료에서 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

알파 시누클레인은 철저히 상이한 형태로 존재하는 작은 가용성 140개 아미노산 길이의 단백질이다. 알파 시누클레인은 주로 신경 말단에서 발견되며, 이의 정확한 기능은 공지되어 있지 않지만, 연구자들은 다수의 신경변성 과정에서 중심적인 역할을 한다고 믿는다.

[0003]

지난 15년 동안 알파 시누클레인은 모든 형태의 파킨슨 질환의 발병기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 알파 시누클레인 유전자의 유전자 돌연변이 또는 유전자 증가는 가족성 조기 발병 파킨슨 질환(PD)을 유발한다. 흥미롭게도, 유전자 좌위 증가 가족에서, 발병 효과는 명백히 유전자 양에 달려있다. 유전자 듀플리케이션은 정상적인 질환 과정을 갖는 비교적 초기 발병 형태의 PD(~47세)를 유발하는 반면, 유전자 트리플리케이션은 매우 이른 발병 나이(~33세) 및 매우 빠른 질환 과정과 연관된다. 모든 형태의 파킨슨 질환에서, 알파 시누클레인은 질환의 주요 병리학적 특징인 루이소체의 주요 성분이다.

[0004]

루이소체 병리는 질환 과정 동안 확장되며, 알파 시누클레인은 프리온 유사 단백질로 작용하고 이는 병에 걸린 뉴런으로부터 병에 걸리지 않은 뉴런으로 확산될 수 있는 독성을 가지고며 및 응집체를 형성하도록 미스풀딩된다. 제안된다(Olanow C.W et al. Movement Disorders, Vol 28, No. 1, 2013). 현재의 기존 요법은 질환이 확산되는 것을 막을 수 없으며 운동 뉴런 의존적 활동의 점진적인 손실과 연관된 증상의 치료만을 돋는다. 2014년, 트란 에이치.티. 등(Tran H.T. et al, Cell Reports 7, 2054-2065, 2014)은, 알파 시누클레인의 사전 형성된 퍼브릴로 이전에 선조체내 주사된 마우스에게 미스풀딩된 알파 시누클레인에 대한 모노클로날 항체를 복강내 투여함으로써 루이소체 병리가 감소되고, 흑색질 도파민작용성 뉴론 손실이 개선되고, 운동 손상이 개선된다는 것을 보여주었다. 따라서, PD 및 다른 알파 신경병증에서 치료 효과를 발휘할 수 있는 수동 면역 요법의 필요성이 여전히 남아있다.

발명의 내용

[0005]

본 발명은 하기 실시양태에 따른 항-알파 시누클레인 항체를 제공함으로써 상기 확인된 요구를 해결한다.

[0006]

실시양태 1: 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 항체는

[0007]

a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0008]

i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;

[0009]

ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

- [0010] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0011] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0012] i. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0013] ii. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및

[0014] iii. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3

[0015] 을 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0016] 실시양태 2: 실시양태 1에 있어서, 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0017] 실시양태 3: 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편이 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인의 응집을 방지하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편

[0018] 실시양태 4: 실시양태 1 내지 실시양태 3 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 단량체로서의 그리고 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 결합할 수 있는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0019] 실시양태 5: 실시양태 1 내지 실시양태 4 중 어느 한 실시양태에 있어서, 단량체로서의 알파 시누클레인과 비교하여 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖고, 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대한 것보다 단량체성 알파 시누클레인에 대해 적어도 10배 높은 해리 상수(K_D)를 특징으로 하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0020] 실시양태 6: 실시양태 1 내지 실시양태 5 중 어느 한 실시양태에 있어서, 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대해 300 pM 이하의 (K_D)를 갖는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0021] 실시양태 7: 실시양태 1 내지 실시양태 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 베타 시누클레인 및/또는 감마 시누클레인에 결합하지 않는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0022] 실시양태 8: 실시양태 1 내지 실시양태 7 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체가 키메라, 인간화 또는 인간 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0023] 실시양태 9: 실시양태 1 내지 실시양태 8 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체가 전장 항체인 항체.

[0024] 실시양태 10: 실시양태 9에 있어서, 전장 항체가 IgG1, IgG4 또는 IgG4P로부터 선택되는 것인 항체.

[0025] 실시양태 11: 실시양태 1 내지 실시양태 8 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원 결합 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dAb 또는 V_{HH}로부터 선택되는 것인 이의 항원 결합 단편.

[0026] 실시양태 12: 실시양태 1 내지 실시양태 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

[0027] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

[0028] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

[0029] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄

[0030] 를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0031] 실시양태 13: 실시양태 1 내지 실시양태 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

[0032] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

[0033] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

- [0034] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 25를 포함하는 중쇄
를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0035] 실시양태 14: 실시양태 1 내지 실시양태 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이
- [0037] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0038] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 35를 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0039] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 29 또는 37을 포함하는 중쇄
를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0041] 실시양태 15: 실시양태 1 내지 실시양태 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이
- [0042] a. 서열 번호 7을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0043] b. 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0044] c. 서열 번호 21을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 25 또는 33을 포함하는 중쇄
를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0046] 실시양태 16: 실시양태 1 내지 실시양태 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이
- [0047] a. 서열 번호 7을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0048] b. 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 35를 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0049] c. 서열 번호 21을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 29 또는 37을 포함하는 중쇄
를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0051] 실시양태 17: a. 알파 시누클레인에 결합하는 것에 대해 실시양태 1 내지 실시양태 16 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하고; 및/또는
- [0052] b. 알파 시누클레인에 결합하는 것에 대해 실시양태 1 내지 실시양태 16 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 교차 차단하거나 그에 의해 교차 차단되고; 및/또는
- [0053] c. 실시양태 1 내지 실시양태 16 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 동일한 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고; 및/또는
- [0054] d. 서열 번호 23, 서열 번호 31, 서열 번호 27 또는 서열 번호 35에 따른 서열과 적어도 80% 동일성 또는 유사성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고; 및/또는
- [0055] e. 서열 번호 15 또는 서열 번호 19에 따른 서열과 적어도 80% 동일성 또는 유사성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0056] 실시양태 18: 실시양태 1 내지 실시양태 16 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.
- [0057] 실시양태 19: 실시양태 18에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 하기를 코딩하는 것인 단리된 폴리뉴클레오티드:
- [0058] a. 경쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 경쇄 가변 영역:
- [0059] i. 서열 번호 16 또는 서열 번호 20과 적어도 90% 동일; 또는
- [0060] ii. 서열 번호 16 또는 20을 포함; 또는

- [0061] iii. 서열 번호 16 또는 서열 번호 20으로 본질적으로 이루어짐;
- [0062] b. 중쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 중쇄 가변 영역:
- [0063] i. 서열 번호 24 또는 서열 번호 28 또는 서열 번호 32 또는 서열 번호 36과 적어도 90% 동일; 또는
- [0064] ii. 서열 번호 24 또는 서열 번호 28 또는 서열 번호 32 또는 서열 번호 36을 포함; 또는
- [0065] iii. 서열 번호 24 또는 서열 번호 28 또는 서열 번호 32 또는 서열 번호 36으로 본질적으로 이루어짐;
- [0066] c. 경쇄로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 경쇄:
- [0067] i. 서열 번호 18 또는 서열 번호 22와 적어도 90% 동일; 또는
- [0068] ii. 서열 번호 18 또는 22를 포함; 또는
- [0069] iii. 서열 번호 18 또는 서열 번호 22로 본질적으로 이루어짐;
- [0070] d. 중쇄로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 중쇄:
- [0071] i. 서열 번호 26 또는 서열 번호 30 또는 서열 번호 34 또는 서열 번호 38과 적어도 90% 동일; 또는
- [0072] ii. 서열 번호 26 또는 서열 번호 30 또는 서열 번호 34 또는 서열 번호 38을 포함; 또는
- [0073] iii. 서열 번호 26 또는 서열 번호 30 또는 서열 번호 34 또는 서열 번호 38로 본질적으로 이루어짐.
- [0074] 실시양태 20: 실시양태 18 또는 실시양태 19에 따른 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터.
- [0075] 실시양태 21: 하기를 포함하는 숙주 세포:
- [0076] a. 실시양태 18 또는 실시양태 19에 따른 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는
- [0077] b. 실시양태 20에 따른 하나 이상의 발현 벡터.
- [0078] 실시양태 22: 실시양태 21에 따른 숙주 세포를 실시양태 1 내지 실시양태 17 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계 및 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함하여, 실시양태 1 내지 실시양태 17 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하는 방법.
- [0079] 실시양태 23: 실시양태 1 내지 실시양태 17 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.
- [0080] 실시양태 24: 실시양태 1 내지 실시양태 17 중 어느 한 실시양태의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 실시양태 23의 약학 조성물에 있어서, 요법에 사용하기 위한 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 약학 조성물.
- [0081] 실시양태 25: 실시양태 1 내지 실시양태 17 중 어느 한 실시양태의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 실시양태 23의 약학 조성물에 있어서, 하나 이상의 시누클레인병증의 치료에 사용하기 위한 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 약학 조성물.
- [0082] 실시양태 26: 실시양태 25에 있어서, 시누클레인병증이 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1)으로부터 선택되는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0083] 실시양태 27: 실시양태 26에 있어서, 시누클레인병증이 파킨슨 질환인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0084] 실시양태 28: 시누클레인병증 환자에게 치료 유효량의 실시양태 1 내지 실시양태 17 중 어느 한 실시양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 실시양태 23에 따른 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, 환자에서 시누클레인병증을 치료하는 방법.
- [0085] 실시양태 29: 실시양태 28에 있어서, 시누클레인병증이 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1), 바람직

하게는 파킨슨 질환으로부터 선택되는 것인 방법.

[0086]

실시양태 30: 실시양태 1 내지 실시양태 16 중 어느 한 실시양태에 있어서, 알파 시누클레인병증의 진단, 바람직하게는 파킨슨 질환의 진단에 사용하기 위한 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

도면의 간단한 설명

[0087]

도 1. (A) 알파 시누클레인 발현 샘플의 SDS-PAGE. (1) His 태그를 갖는 알파 시누클레인 및 (2) TEV 프로테아제에 의한 His 태그 제거 후의 알파 시누클레인, (3) TEV 프로테아제 처리된 인간 알파 시누클레인에 대한 슈퍼덱스(Superdex) 75 크기 배제 크로마토그래피. (M) 단백질 분자량 마커 SeeBluePlus2(Invitrogen). (B) (4) 야생형 태그 부착되지 않은 단백질로서 Expi293 상청액으로부터 정제된 인간 알파 시누클레인의 SDS-PAGE. (M) 단백질 분자량 마커 SeeBluePlus2(Invitrogen).

도 2. (A) 형광이 없는 단량체 및 540 nm에서 최대 형광을 갖는 피브릴의 JC-1 검정에 의한 피브릴 분석. (B) 단량체성 인간 알파 시누클레인의 랜덤 코일 스펙트럼(파장 1646 cm^{-1}) 및 재조합 인간 알파 시누클레인 피브릴에서 인터 β -시트 형성(파장 $1625\text{--}1630\text{cm}^{-1}$)에 대한 전형적인 예.

도 3. ELISA 결합 검정. 재조합 인간 알파 시누클레인 단량체 및 피브릴 및 인간 알파 시누클레인의 웨პ티드 PVDPDNEAYE에 대한 토끼 6470 IgG1의 ELISA 결합.

도 4. (A) 인간 알파 시누클레인 및 인간 베타 시누클레인에 대한 토끼 6470 IgG1의 결합을 나타내는 웨스턴 블롯. 1, 인간 알파 시누클레인; 2, 인간 알파 시누클레인(rPeptide); 3, 인간 베타 시누클레인(rPeptide); 마커, MagicMark XP. (B) 인간 알파 시누클레인에 대한 6470의 예상된 에피토프를 나타내는 NMR 화학적 쉬프트 변화.

도 5. 고정된 알파 시누클레인에 대한 6470 IgG의 결합의 억제(시험된 웨პ티드 각각에 대해 각각 왼쪽이 단량체 및 오른쪽이 피브릴의 막대).

도 6. 웨პ티드 123-132와의 복합체에서 6470 Fab의 도식도.

도 7. 웨პ티드 123-132와 접촉한 6470 Fab 중쇄의 도식도. 웨პ티드 잔기는 직접적으로 표지되고, 6470 가변 중쇄 잔기는 vL-잔기 번호로 표지된다.

도 8. 웨პ티드 123-132와 접촉한 6470 Fab 경쇄의 도식도. 웨პ티드 잔기는 직접적으로 표지되고, 6470 가변 경쇄 잔기는 vL-잔기 번호로 표지된다.

도 9. 경쇄 인간화. 6470은 토끼 가변 경쇄 서열에 대한 것이다. 6470gL3은 어셉터 프레임워크로서 IGKV1-16 인간 배선을 사용하는 6470 가변 경쇄의 인간화 그래프트에 대한 것이다. CDR은 굽게/밀줄로 표시된다. 도너 잔기는 굽게/이탈릭체로 표시되고 음영처리된다: Q48 및 Q72. CDRL1 N33R의 돌연변이는 굽게/밀줄로 표시되고 음영 처리된다.

도 10. 중쇄 인간화. 6470은 토끼 가변 중쇄 서열에 대한 것이다. 6470gH23 및 gH36은 어셉터 프레임워크로서 IGHV3-23 인간 배선을 사용하는 6470 가변 중쇄의 인간화 그래프트에 대한 것이다. CDR은 굽게/밀줄로 표시된다. 도너 잔기는 굽게/이탈릭체로 표시되고 음영처리된다: V24, Y47, I48, G49, S73, V78 및 R97. 각각 CDRH2 및 CDRH3에서의 돌연변이 S56N 및 N102H는 굽게/밀줄로 표시되고 음영처리된다.

도 11. 공기-액체 계면에서의 스트레스. 볼텍싱 후 3시간 및 24시간에 3개의 사전-제형 벼퍼 중의 6470 항체 및 돌연변이체.

도 12. 면역조직화학. (A-E) PD 및 (F-H) 비-PD 환자로부터의 뇌 절편에서의 면역반응성. (A-C) PD 환자의 측두 피질에서, 항체 6470은 회색질에서 신경망 및 루이소체-유사 구조(흰색 화살표)를 표지하였다. (D, E) 항체 6470은 PD 환자의 흑색질에서 루이소체-유사 특징(흰색 화살표)을 표지하였다. (F, G) 비-PD 측두 피질 조직에서, 6470은 신경망을 또한 표지하였으나, 루이소체-유사 구조는 관찰되지 않았다. (H) 비-PD 개체의 흑색질에서 루이소체-유사 구조가 관찰되지 않았다; 검은색 화살표는 비-특이적 표지화를 나타낸다. 축척 막대 = $50\text{ }\mu\text{m}$.

도 13. 세포 기반 응집 검정(HEK 세포). 본 발명의 항체는 5 nM 미만의 IC₅₀으로 알파 시누클레인에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 억제할 수 있었다. 오차 막대는 측정의 표준 오차를 나타낸다(SEM, N=3, n=9). 범례에서, 각각의 항체 명칭 끝에 있는 FL은 "전장"을 의미한다.

도 14. 세포 기반 응집 검정(일차 뉴론). 본 발명에 따른 대표적인 항체는 4 nM 미만의 IC₅₀으로, 내인성 수준의 알파 시누클레인을 발현하는 마우스 일차 뉴론 상의 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 억제할 수 있었다. 오차 막대는 측정의 표준 오차를 나타낸다(SEM, N=4, n=18).

도 15. 각각 마우스 또는 인간 PFF로 주사된 수컷 C57B1/6J 야생형 마우스 (A) 및 SNCA-OVX 마우스 (B)의 상이한 뇌 영역에서 알파 시누클레인 병리(화살표)의 면역조직화학 사진.

도 16. 마우스 PFF로 주사된 C57B1/6J 야생형 마우스의 상이한 뇌 영역(A: 대뇌 피질; B: 선조체; C: 편도체 및 D: 흑색질)에서 알파 시누클레인 병리의 정량화.

도 17. 알파 시누클레인 항체의 약동학 프로파일: A. 야생형 마우스에서의 6470 항체; B. 6470 및 시노몰구스 원숭이에서의 비교기(comparator) 항체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0088] 본 개시는 특정한 비제한적 측면 및 이의 실시양태와 관련하여 특정 도면 및 실시예를 참조하여 설명될 것이다.
- [0089] 기술 용어는 달리 지시되지 않는 한 그들의 일반적 의미로 사용된다. 특정 의미가 특정 용어에 전달되는 경우, 용어의 정의는 그 용어가 사용된 문맥에서 제공될 것이다.
- [0090] 용어 "포함하는"이 본 발명의 설명 및 청구범위에서 사용되는 경우, 그는 다른 요소를 배제시키지 않는다. 본 개시의 목적 상, 용어 "로 이루어진"은 용어 "를 포함하는"의 바람직한 실시양태인 것으로 간주된다.
- [0091] 단수 형태는 명시적으로 다른 언급이 없는 한 복수 형태를 포함한다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리 학적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지하는 관점에서 예방적일 수 있고/있거나 질환 및/또는 질환으로 인한 유해 효과에 대한 부분적 또는 완전한 치료의 관점에서 치료적일 수 있다. 따라서, 치료는 포유동물, 특히 인간에서 질환의 임의의 치료를 포함하며, (a) 질환에 걸리기 쉽지만 아직 진단을 받지 않은 대상체에서 질환이 발생하는 것을 방지하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉 이의 발달을 저지하는 것; (c) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 유발하는 것을 포함한다.
- [0093] "치료 유효량"은 질환을 치료하기 위해 포유동물 또는 다른 대상체에게 투여될 때 질환에 대한 이러한 치료를 생성하기에 충분한 항-알파 시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 양을 지칭한다. 치료 유효량은 항-알파 시누클레인 항체 또는 그 항원 결합 단편, 질환 및 이의 중증도 및 치료될 대상체의 나이, 체중 등에 따라 달라질 것이다.
- [0094] 용어 "단리된"은, 본 명세서 전반에 걸쳐, 항체, 항원 결합 단편 또는 폴리뉴클레오티드가 경우에 따라 자연에서 발생할 수 있는 것과는 다른 물리적 환경에 존재한다는 것을 의미한다. 본 발명은 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 항체는
 - a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:
 - i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;
 - ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및
 - iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및
 - b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:
 - iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
 - v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및
 - vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3
- [0103] 을 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0104] 서열 번호 44에서, Xaa는 아스파라긴(Asn; N) 또는 아르기닌(Arg; R)이다. 독립적으로, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린(Ser; S) 또는 아스파라긴(Asn N)이고, 서열 번호 46에서, Xaa는 아스파라긴(Asn N) 또는 히스티딘(His; H)이다.

- [0105] 한 실시양태에서, 서열 번호 44 및 46에서, Xaa는 아스파라긴이고, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린이다.
- [0106] 한 실시양태에서, 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0107] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:
- [0108] i. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1;
- [0109] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및
- [0110] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및
- [0111] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:
- [0112] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
- [0113] v. 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및
- [0114] vi. 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3.
- [0115] 알파 시누클레인 (또는 알파 syn; a-시누클레인; a-syn 또는 임의의 다른 공지된 동의어)은 이 단백질의 일반명을 지칭하며, 제한 없이, 다른 스플라이싱 변이체, 돌연변이체 및 다른 종(마우스, 원숭이 등)으로부터의 알파 시누클레인을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 인간 알파 시누클레인이 의도되거나 명시적으로 언급되는 경우, 이러한 알파 시누클레인은 서열 번호 10 또는 Uniprot P37840에 제공된 서열을 포함한다.
- [0116] 본원에 사용된 용어 "항체"는 일반적으로 온전한(전체) 항체, 즉 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄의 요소를 포함하는 항체에 관한 것이다. 항체는, 예컨대 WO 2007/024715에 개시된 바와 같은 분자 DVD-Ig, 또는 WO2011/030107에 기재된 소위 ($\text{FabFv})_2\text{Fc}$ 에 따라 추가의 결합 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 항체는 2가, 3가 또는 4가 전장 항체를 포함한다.
- [0117] 항체의 항원 결합 단편은 단일쇄 항체(즉, 전장 중쇄 및 경쇄); Fab, 변형된 Fab, Fab' , 변형된 Fab' , $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fv, $\text{Fab}-\text{Fv}$, $\text{Fab}-\text{dsFv}$, 단일 도메인 항체(예컨대, V_H 또는 V_L 또는 $V_{H,L}$), scFv, 이가, 삼가 또는 사가 항체, Bis-scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 상기 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편을 포함한다(예컨대, 문현(Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217) 참조). 이를 항체 단편을 생성 및 제조하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다(예컨대, 문현(Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181) 참조). $\text{Fab}-\text{Fv}$ 포맷은 WO2009/040562에 처음 개시되었고, 이의 디슬퍼드 안정화된 버전인 $\text{Fab}-\text{dsFv}$ 는 WO2010/035012에 처음 개시되었다. 본 발명에 사용하기 위한 다른 항체 단편은 국제 특허 출원 WO2005/003169, WO2005/003170 및 WO2005/003171에 기재된 Fab 및 Fab' 단편을 포함한다. 다가 항체는 다중 특이성, 예컨대 이 중 특이성을 포함할 수 있거나 단일 특이성을 수 있다(예컨대, WO 92/22583 및 WO05/113605 참조). 후자의 그러한 하나의 예는 WO92/22583에 기재된 바와 같은 Tri-Fab (또는 TFM)이다.
- [0118] 대안적인 항원 결합 단편은 2개의 scFv 또는 dsscFv에 연결된 Fab를 포함하고, 각각의 scFv 또는 dsscFv는 동일하거나 상이한 표적에 결합한다(예컨대, 치료 표적에 결합하는 하나의 scFv 또는 dsscFv 및 예컨대 알부민에 결합함으로써 반감기를 증가시키는 하나의 scFv 또는 dsscFv). 이러한 항체 단편은 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015/197772에 기재되어 있으며, 이는 전체가, 특히 항체 단편의 논의와 관련하여 본원에 참조로 포함된다.
- [0119] 전형적인 Fab' 분자는 중쇄 및 경쇄 쌍을 포함하고, 여기서 중쇄는 가변 영역 VH, 불변 도메인 CH1 및 천연 또는 변형된 헌지 영역을 포함하고, 경쇄는 가변 영역 VL 및 불변 도메인 CL을 포함한다. 본 개시에 따른 Fab' 의 이 량체는, 예컨대 이량체화가 헌지를 통해 이루어질 수 있는 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 를 생성한다.
- [0120] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인의 에피토프에 결합한다.
- [0121] 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0122] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:
- [0123] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;
- [0124] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

- [0125] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및
- [0126] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:
- [0127] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
- [0128] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및
- [0129] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3
- [0130] 을 포함하고, 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.
- [0131] 서열 번호 44에서, Xaa는 아스파라긴(Asn; N) 또는 아르기닌(Arg; R)이다. 독립적으로, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린(Ser; S) 또는 아스파라긴(Asn N)이고, 서열 번호 46에서, Xaa는 아스파라긴(Asn N) 또는 히스티딘(His; H)이다.
- [0132] 한 실시양태에서, 서열 번호 44 및 46에서, Xaa는 아스파라긴이고, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린이다.
- [0133] 한 실시양태에서, 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0134] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:
- [0135] i. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1;
- [0136] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및
- [0137] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및
- [0138] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:
- [0139] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
- [0140] v. 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및
- [0141] vi. 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3
- [0142] 을 포함하고, 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.
- [0143] 본 발명 내에서, 용어 "에피토프"는 입체형태 및 선형 에피토프 둘 다에 대해 상호교환적으로 사용되며, 여기서 입체형태 에피토프는 항원의 아미노산 일차 서열의 불연속 부분으로 구성되고 선형 에피토프는 연속 아미노산에 의해 형성된 서열에 의해 형성된다.
- [0144] 에피토프는 본 발명에 의해 제공된 항체 중 임의의 하나와 조합하여 당업계에 공지된 임의의 적합한 에피토프 매핑 방법에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법의 예는 본 발명의 항체 또는 이의 단편에 결합하기 위해 전장 알파 시누클레인으로부터 유래되는 다양한 길이의 웨비드를 스크리닝하는 단계 및 항체에 의해 인식되는 에피토프의 서열을 함유하는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 가장 작은 단편을 확인하는 단계를 포함한다. 알파 시누클레인 웨비드는 합성적으로 또는 알파 시누클레인 단백질의 단백분해에 의해 생성될 수 있다. 항체에 결합하는 웨비드는, 예컨대 질량 분광측정 분석에 의해 확인될 수 있다. 또 다른 예에서, NMR 분광법 또는 X-선 결정학을 이용하여 본 발명의 항체에 의해 결합되는 에피토프를 확인할 수 있다. 전형적으로, 에피토프 결정이 X-선 결정학에 의해 수행되는 경우, CDR로부터 4Å 내의 항원의 아미노산 잔기는 에피토프의 아미노산 잔기 부분인 것으로 간주된다. 일단 확인되면, 에피토프는 본 발명의 항체에 결합하는 단편을 제조하는 데 사용될 수 있고, 필요한 경우, 동일한 에피토프에 결합하는 추가의 항체를 수득하기 위한 면역원으로 사용된다.
- [0145] 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 에피토프는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 123 내지 132를 포함하는 알파 시누클레인 웨비드를 사용하여 X-선 결정학에 의해 결정된다.
- [0146] 바람직하게는, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지한다.
- [0147] 이러한 특정 맥락에서, 용어 "방지하다" (및 이의 문법적 변형)는 본원에서 용어 "억제하다"와 상호교환적으로 사용되며, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집과 관련하여 본 발명에 따른 항체의

효과를 나타낸다. 효과는 응집을 완전히 또는 부분적으로 방지하거나; 이미 추가의 프로세싱을 시작한 응집을 완전히 또는 부분적으로 감소, 즉 차단하거나, 추가의 응집의 발생을 완전히 또는 부분적으로 감소시키거나; 이미 발생한 응집을 완전히 또는 부분적으로 되돌린다는 관점에서 예방적일 수 있다.

- [0148] 이론에 구애됨이 없이, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0149] i) 단량체 형태의 알파 시누클레인에 결합하고, 알파 시누클레인이 올리고며 및 응집체를 형성하는 것을 방지하고; 및/또는
- [0150] ii) 올리고며 및 피브릴 형태의 알파 시누클레인에 결합하고, 알파 시누클레인이 뉴론에서 뉴론으로 확산되는 것을 방지하고; 및/또는
- [0151] iii) 올리고며 및/또는 피브릴 형태의 알파 시누클레인에 결합하고, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집, 바람직하게는 내인성 알파 시누클레인 응집을 방지한다.
- [0152] 알파 시누클레인과 관련하여 본원에 사용된 용어 "피브릴", "피브릴 형태" 또는 "피브릴 상태의"는, 뇌 구조 내 및 사이의 확산 촘을 구성할 수 있는, 알파 시누클레인 올리고머를 포함하는 알파 시누클레인의 비-단량체 형태를 지칭하는 것을 의미한다.
- [0153] 따라서, 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고,
- [0154] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:
 - i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;
 - ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및
 - iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및
- [0155] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:
 - iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
 - v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및
 - vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3
- [0156] [0157] [0158] [0159] [0160] [0161] [0162] [0163] [0164] [0165] [0166] [0167] [0168] [0169] [0170] [0171] [0172] [0173] [0162]를 포함하고, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지한다. 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.

서열 번호 44에서, Xaa는 아스파라긴(Asn; N) 또는 아르기닌(Arg; R)이다. 독립적으로, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린(Ser; S) 또는 아스파라긴(Asn N)이고, 서열 번호 46에서, Xaa는 아스파라긴(Asn N) 또는 히스티딘(His; H)이다.

한 실시양태에서, 서열 번호 44 및 46에서, Xaa는 아스파라긴이고, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린이다.

하나의 바람직한 실시양태에서, 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

 - i. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1;
 - ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및
 - iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

 - iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
 - v. 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및
 - vi. 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3

- [0174] 을 포함하고, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지한다. 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.
- [0175] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단량체로서의 그리고 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 결합할 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단량체로서의 알파 시누클레인과 비교하여 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대해 더 강한 결합 친화도를 갖는다. 이는 피브릴 상태의 알파 시누클레인보다 단량체성 알파 시누클레인에 대해 적어도 10배 높은 해리 상수(K_D)를 특징으로 한다.
- [0176] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단량체성 알파 시누클레인에 대해 15 nM 미만의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대해 10 nM 미만의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대해 300 pM 미만의 해리 상수(K_D)를 갖는다.
- [0177] 본원에 사용된 용어 " K_D "는 K_d 대 K_a 의 비(즉, K_d/K_a)로부터 수득되는 해리 상수를 지칭하며, 몰 농도(M)로 표시된다. K_d 및 K_a 는 각각 특정 항원-항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 상호작용의 해리율 및 회합률을 지칭한다. 항체에 대한 K_D 값은 당업계에 널리 확립된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 항체의 K_D 를 결정하는 방법은 단리된 천연 또는 재조합 알파 시누클레인, 이의 적합한 융합 단백질/폴리펩티드 또는 이의 피브릴을 사용하여 표면 플라스몬 공명, 예컨대 본원의 실시예에 기재된 Biacore® 시스템을 이용하는 것이다. 하나의 예에서 친화도는 본원의 실시예에 기재된 재조합 인간 알파 시누클레인을 사용하여 측정된다. 표면 플라스몬 공명을 위해, 표적 분자는 고체상에 고정되고 유동 셀을 따라 진행하는 이동상의 리간드에 노출된다. 고정된 표적에 리간드 결합이 발생하면, 국소 굴절률이 변화하여 SPR 각도를 변화시키고, 이는 반사된 광의 강도 변화를 검출함으로써 실시간으로 모니터링될 수 있다. SPR 신호의 변화율은 결합 반응의 회합 및 해리 상에 대한 겉보기 속도 상수를 산출하기 위해 분석될 수 있다. 이를 값의 비는 겉보기 평형 상수(친화도)를 제공한다(예컨대, 문헌(Wolff et al, Cancer Res. 53:2560-65 (1993)) 참조).
- [0178] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단량체로서의 알파 시누클레인과 비교하여 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 대한 더 높은 결합 친화도(즉, 더 작은 K_D)를 갖는다. 용어 "친화도"는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 알파 시누클레인 사이의 상호작용의 강도를 지칭한다.
- [0179] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 차단하기 위해 10 nM 미만의 IC_{50} 을 가지며, 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 차단하기 위해 5 nM 미만의 IC_{50} 을 갖는다. 세포 기반 응집 검정의 예는 실시예에 개시되어 있다.
- [0180] 본원에 사용된 용어 IC_{50} 은 특정 생물학적 또는 생화학적 기능을, 본 발명에서는 알파 시누클레인, 바람직하게는 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 의해 유도되는 응집을 억제하는 데 있어서 항체와 같은 물질의 효과의 척도인 절반 최대 억제 농도를 지칭한다. IC_{50} 은 주어진 생물학적 과정의 절반을 억제하는 데 필요한 특정 물질의 양을 나타내는 정량적 척도다.
- [0181] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 차단하기 위해 10 nM 미만의 IC_{50} 을 가지며, 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 시험판내 검정에서 피브릴 상태의 알파 시누클레인에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 차단하기 위해 5 nM 미만의 IC_{50} 을 갖는다.
- [0182] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 베타 시누클레인 및/또는 감마 시누클레인에 결합하지 않으며 알파 시누클레인에 특이적이다.
- [0183] 본원에 사용된 "특이적"은, 특이적인 항원만을 인식하는 항체, 또는 비-특이적인 항원(감마 및 베타 시누클레인)에 대한 결합과 비교하여 특이적인 항원(예컨대, 알파 시누클레인)에 대해 상당히 높은 결합

친화도, 예컨대 적어도 5, 6, 7, 8, 0, 10배 높은 결합 친화도를 갖는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0184] 본 발명에 따른 항체는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 수득될 수 있다. 융합 단백질을 포함하는 알파 시누클레인 폴리펩티드/단백질, 폴리펩티드를 (재조합적으로 또는 자연적으로) 발현하는 세포는 알파 시누클레인을 특이적으로 인식하는 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 폴리펩티드는 '성숙한' 폴리펩티드 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 유도체일 수 있다.

[0185] 한 실시양태에서, 폴리펩티드(즉, 항원)는, 바람직하게는 하기 실시예에 기재된 바와 같이 제조되는, 인간 알파 시누클레인 단량체 또는 이의 단편이다.

[0186] 숙주를 면역화하는 데 사용하기 위한 폴리펩티드는 발현 시스템을 포함하는 유전자 조작된 숙주 세포로부터 당업계에 널리 공지된 공정에 의해 제조될 수 있거나 천연 생물학적 공급원으로부터 회수될 수 있다. 본 출원에서, 용어 "폴리펩티드"는 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 이들은 상호교환적으로 사용된다. 알파 시누클레인 폴리펩티드 또는 이의 단편은 일부 경우에 더 큰 단백질, 예컨대 친화성 태그 또는 유사물에 융합된 융합 단백질의 일부일 수 있다.

[0187] 알파 시누클레인 폴리펩티드에 대해 생성되는 항체는 동물의 면역화가 필요한 경우에 널리 공지된 통상적인 프로토콜을 이용하여 폴리펩티드를 동물, 바람직하게는 비-인간 동물에 투여함으로써 수득될 수 있으며, 예컨대 문헌(Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986)을 참조한다. 많은 온혈 동물, 예컨대 토끼, 마우스, 래트, 양, 소, 낙타 또는 돼지가 면역화될 수 있다. 그러나, 마우스, 토끼, 돼지 및 래트가 일반적으로 가장 적합하다.

[0188] 보노클로날 항체는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예컨대 하이브리도마 기술(Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), 트리오마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술(Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) 및 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985)로 제조될 수 있다.

[0189] 본 발명에서 사용하기 위한 항체는 또한 특정 항체의 생성을 위해 선택된 단일 림프구로부터 생성되는 면역글로불린 가변 영역 cDNA를 클로닝하고 발현함으로써 단일 림프구 항체 방법, 예컨대 문헌(Babcock, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848; WO92/02551; WO2004/051268 and WO2004/106377)에 기재된 방법을 이용하여 생성될 수 있다.

[0190] 항체에 대한 스크리닝은 알파 시누클레인에 대한 결합을 측정하기 위한 검정 및/또는 항체 또는 이의 단편의 존재 하에 알파 시누클레인의 피브릴 형성 억제를 측정하기 위한 검정을 이용하여 수행될 수 있다.

[0191] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄에서 3개 및 경쇄에서 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 일반적으로, CDR은 프레임워크 내에 존재하며 함께 가변 영역을 형성한다. 통상적으로, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역의 CDR은 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 지칭되고 경쇄 가변 영역의 CDR은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 지칭된다. 그들은 각각의 쇄의 N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로 넘버링된다.

[0192] CDR은 통상적으로 카바트(Kabat) 등에 의해 고안된 시스템에 따라 넘버링된다. 이 시스템은 문헌(Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA)(이하 "Kabat et al. (상기 참조)")에 제시되어 있다. 이 넘버링 시스템은 달리 지시되지 않는 한 본 명세서에서 사용된다.

[0193] 카바트 잔기 지정이 항상 아미노산 잔기의 선형 넘버링과 직접적으로 일치하는 것은 아니다. 실제 선형 아미노산 서열은 기본 가변 도메인 구조의 프레임워크 또는 상보성 결정 영역(CDR)에 무관하게 구조적 성분으로 단축 또는 삽입에 상응하게 업격한 카바트 넘버링에서 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 잔기의 정확한 카바트 넘버링은 항체 서열에서 상동성 잔기를 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬시킴으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0194] 중쇄 가변 도메인의 CDR은 카바트 넘버링 시스템에 따라 잔기 31-35(CDR-H1), 잔기 50-65(CDR-H2) 및 잔기 95-102(CDR-H3)에 위치된다. 그러나, 초티아(Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987))에 따르면 CDR-H1과 동등한 루프는 잔기 26에서 잔기 32까지 연장된다. 따라서, 달리 지시되지 않는 한, 본원에 사용된 'CDR-H1'은 카바트 넘버링 시스템 및 초티아의 토폴로지 루프 정의의 조합에 의해 기술된 잔기 26 내지 35를 지칭하는 것으로 의도된다.

- [0195] 경쇄 가변 도메인의 CDR은 카바트 넘버링 시스템에 따라 잔기 24-34(CDR-L1), 잔기 50-56(CDR-L2) 및 잔기 89-97(CDR-L3)에 위치된다.
- [0196] 하나의 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1, 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1, 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0197] 대안적으로, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0198] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 7을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0199] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 7을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0200] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체가 생성되는 동물의 프레임워크 영역을 포함할 수 있다. 예컨대, 항체가 토키에서 생성되는 경우, 그는 상기 정의된 바와 같은 CDR 및 토키 항체, 예컨대 서열 번호 11(뉴클레오티드 서열은 서열 번호 12에 제시됨)에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열번호 13(뉴클레오티드 서열은 서열 번호 14에 제시됨)에 따른 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 프레임워크 영역을 포함할 것이다.
- [0201] 한 실시양태에서, 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체 또는 이의 단편일 수 있다.
- [0202] 키메라 항체는 전형적으로 재조합 DNA 방법을 이용하여 생성된다. DNA는 인간 L 및 H 쇄에 대한 코딩 서열을 상응하는 비-인간(예컨대, 뮤린) H 및 L 불변 영역 대신 치환함으로써 변형될 수 있다(Morrison; PNAS 81, 6851 (1984)).
- [0203] 인간 항체는 항체의 가변 영역 또는 전장 쇄가 인간 배선 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템에서 수득되는 경우 특정 배선 서열"의 생성물"이거나 특정 배선 서열"로부터 유래되는" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 전장 중쇄 또는 경쇄를 포함한다. 이러한 시스템은 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스를 관심 항원으로 면역화하거나 과지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 관심 항원으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 배선 면역글로불린 서열"의 생성물"이거나 인간 배선 면역글로불린 서열"로부터 유래되는" 인간 항체 또는 이의 단편은, 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 배선 면역글로불린의 아미노산 서열과 비교하고 인간 항체의 서열에 대해 서열 상 가장 근접한(즉, 최대 동일성%) 인간 배선 면역글로불린 서열을 선택함으로써 확인될 수 있다. 특정 인간 배선 면역글로불린 서열"의 생성물"이거나 특정 인간 배선 면역글로불린 서열"로부터 유래되는" 인간 항체는, 예컨대 자연 발생 체세포 돌연변이 또는 부위 지시된 돌연변이의 의도적 도입으로 인해 배선 서열과 비교하여 아미노산 차이를 함유할 수 있다. 그러나, 선택된 인간 항체는 전형적으로 인간 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 아미노산 서열 상 적어도 90% 동일하고, 다른 종의 배선 면역글로불린 아미노산 서열(예컨대, 뮤린 배선 서열)과 비교하는 경우 인간 항체를 인간으로 확인하는 아미노산 잔기를 함유한다. 특정한 경우에, 인간 항체는 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 대해 아미노산 서열 상 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 적어도 95%, 또는 더욱 더 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있다. 전형적으로, 특정 인간 배선 서열로부터 유래되는 인간 항체는 인간 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 10개 이하의 아미노산 차이를 나타낼 것이다. 특정한 경우에, 인간 항체는 배선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 5개 이하, 또는 더욱 더 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 나타낼 수 있다.
- [0204] 인간 항체는 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 생성될 수 있다. 인간 항체는 인간 골수종 또는 마우스-인간 이종골수종 세포주를 사용하는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다(Kozbor, J Immunol; (1984) 133:3001; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63, Marcel Dekker Inc, 1987). 대안적인 방법은 인간 가변 영역 레퍼토리를 이용하는 과지 라이브러리 또는 트랜스제닉 마우스의 사용을 포함한다(Winter G; (1994) Annu Rev Immunol 12:433-455, Green LL, (1999) J Immunol

Methods 231 : 1 1-23).

[0205] 본 발명의 하나의 바람직한 실시양태에서, 본 개시에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된다.

[0206] 따라서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고,

[0207] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0208] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;

[0209] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0210] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0211] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0212] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0213] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및

[0214] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3

[0215] 를 포함하고, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된다. 바람직하게는, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 더욱 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.

[0216] 서열 번호 44에서, Xaa는 아스파라긴(Asn; N) 또는 아르기닌(Arg; R)이다. 독립적으로, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린(Ser; S) 또는 아스파라긴(Asn N)이고, 서열 번호 46에서, Xaa는 아스파라긴(Asn N) 또는 히스티딘(His; H)이다.

[0217] 한 실시양태에서, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고,

[0218] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0219] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;

[0220] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0221] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0222] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0223] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0224] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및

[0225] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3

[0226] 을 포함하고, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 서열 번호 44에서, Xaa는 아스파라긴(Asn; N)이고, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린(Ser; S)이고, 서열 번호 46에서, Xaa는 아스파라긴(Asn N)이다.

[0227] 하나의 바람직한 실시양태에서, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고,

[0228] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0229] i. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1;

[0230] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0231] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0232] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0233] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

- [0234] v. 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및
- [0235] vi. 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3
- [0236] 를 포함하고, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합한다.
- [0237] 본원에 사용된 용어 "인간화" 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 중쇄 및/또는 경쇄가 어셉터 항체(예컨대, 인간 항체)의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 프레임워크로 그래프팅된 도너 항체(예컨대, 비-인간 항체, 예컨대 뮤린 또는 토끼 모노클로날 항체)로부터의 하나 이상의 CDR(원하는 경우, 하나 이상의 변형된 CDR 포함)을 함유하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 검토를 위해 문헌(Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998)을 참조한다. 한 실시양태에서, 전체 CDR이 전달되기 보다는, 본원에서 상기 기재된 CDR 중 어느 하나로부터 하나 이상의 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 전달된다(예컨대, 문헌(Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34) 참조). 한 실시양태에서, 본원에서 상기 기재된 하나 이상의 CDR로부터 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 전달된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 본원에 기재된 각각의 CDR로부터 특이성 결정 잔기만이 인간 항체 프레임워크로 전달된다.
- [0238] CDR이 그래프팅되는 경우, 마우스, 영장류 및 인간 프레임워크 영역을 포함하여, CDR이 유래되는 도너 항체의 부류/유형과 관련하여 임의의 적절한 어셉터 가변 영역 프레임워크 서열이 사용될 수 있다.
- [0239] 적합하게는, 본 발명에 따른 인간화 항체는 인간 어셉터 프레임워크 영역 뿐만 아니라 본원에 구체적으로 제공된 하나 이상의 CDR을 포함하는 가변 도메인을 갖는다. 따라서, 한 실시양태에서 알파 시누클레인, 바람직하게는 인간 알파 시누클레인에 결합하는 차단 인간화 항체가 제공되며, 여기서 가변 도메인은 인간 어셉터 프레임워크 영역 및 비-인간 도너 CDR을 포함한다.
- [0240] 본 발명에 사용될 수 있는 인간 프레임워크의 예는 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY 및 POM이다(Kabat et al., 상기 참조). 예컨대 KOL 및 NEWM은 중쇄에 사용될 수 있고 REI는 경쇄에 사용될 수 있고 EU, LAY 및 POM은 중쇄와 경쇄에 모두 사용될 수 있다. 대안적으로, 인간 배선 서열이 사용될 수 있으며; 이들은 <http://www.imgt.org/>에서 이용 가능하다.
- [0241] 본 발명에 따른 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, 어셉터 중쇄 및 경쇄는 반드시 동일한 항체로부터 유래될 필요는 없으며, 원하는 경우, 상이한 쇄로부터 유래되는 프레임워크 영역을 갖는 복합 쇄를 포함할 수 있다.
- [0242] 본 발명에 따른 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄에 적합한 프레임워크 영역은 서열 번호 39를 갖는 인간 배선 IGKV1-16 JK4(뉴클레오티드 서열은 서열번호 40에 제시됨)로부터 유래된다.
- [0243] 본 발명에 따른 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄에 적합한 프레임워크 영역은 서열 번호 41에 나타낸 서열을 갖는 인간 배선 IGHV3-23 JH4(뉴클레오티드 서열은 서열 번호 42에 제시됨)로부터 유래된다.
- [0244] 따라서, 한 실시양태에서, 하기를 포함하는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다:
- [0245] - CDR-L1에 대해 서열 번호 1 또는 서열 번호 7에 제공된 서열, CDR-L2에 대해 서열 번호 2에 제공된 서열 및 CDR-L3에 대해 서열 번호 3에 제공된 서열, 여기서 경쇄 프레임 워크 영역은 인간 배선 IGKV1-16 JK4F부터 유래됨; 및
- [0246] - CDR-H1에 대해 서열 번호 4에 제공된 서열, CDR-H2에 대해 서열 번호 5 또는 서열 번호 8에 제공된 서열, 및 CDR-H3에 대해 서열 번호 6 또는 서열 번호 9에 제공된 서열, 여기서 중쇄 프레임워크 영역은 인간 배선 IGHV3-23 JH4로부터 유래됨.
- [0247] 본 발명에 따른 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, 프레임워크 영역은 어셉터 항체와 동일한 정확한 서열을 갖지 않을 수 있다. 예컨대, 특이한 잔기는 그 어셉터 쇄 부류 또는 유형에 대해 보다 빈번하게 발생하는 잔기로 변경될 수 있다. 대안적으로, 어셉터 프레임워크 영역 내의 선택된 잔기는 그들이 도너 항체의 동일한 위치에서 발견되는 잔기에 상응하도록 변경될 수 있다(문헌(Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324) 참조). 이러한 변화는 도너 항체의 친화성을 회복하는 데 필요한 최소한으로 유지되어야 한다. 변경될 필요가 있는 어셉터 프레임워크 영역에서 잔기를 선택하기 위한 프로토콜이 WO91/09967에 제시되어 있다.
- [0248] 따라서, 한 실시양태에서, 프레임워크의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 잔기가 대안적 아미노산 잔기로 대체

된다.

[0249] 따라서, 한 실시양태에서, 경쇄의 가변 도메인의 (서열 번호 15 또는 19를 참조하여) 적어도 위치 48 및 72 각각의 잔기가 도너 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 예컨대 서열 번호 15, 17, 19 및 21에 제공된 서열을 참조한다. 바람직하게는, 경쇄 가변 도메인의 잔기 48은 글루타민이고/하거나 경쇄 가변 도메인의 잔기 72는 글루타민이다.

[0250] 더욱 바람직하게는, 잔기 48 및 72는 모두 본 발명에 따른 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 인간화 경쇄 가변 영역에서 글루타민이다.

[0251] 또 다른 실시양태에서, 중쇄의 가변 도메인의 (서열 번호 서열 번호 31 또는 35를 참조하여) 적어도 위치 24, 47, 48, 49, 73 및 97 또는 (서열 번호 23 및 27을 참조하여) 24, 47, 48, 49, 78 및 97 각각의 잔기가 도너 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 예컨대 서열 번호 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 및 37에 제공된 서열을 참조한다.

[0252] 바람직하게는, 중쇄 가변 도메인의 잔기 24는 발린이고/하거나 중쇄 가변 도메인의 잔기 47은 티로신이고/거나 중쇄 가변 도메인의 잔기 48은 이소류신이고/이나 중쇄 가변 도메인의 잔기 49는 글리신이고/이나 중쇄 가변 도메인의 잔기 97은 아르기닌이고/이나 중쇄 가변 도메인의 잔기 73은 세린이고/이나 중쇄 가변 도메인의 잔기 78은 발린이다.

[0253] 바람직하게는 본 발명에 따른 인간화 중쇄 가변 영역에서 잔기 24는 발린이고, 잔기 47은 티로신이고, 잔기 48은 이소류신이고, 잔기 49는 글리신이며, 잔기 73은 세린이며, 잔기 97은 아르기닌이다. 또한, 바람직하게는 본 발명에 따른 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 인간화 중쇄 가변 영역에서 잔기 24는 발린이고, 잔기 47은 티로신이고, 잔기 48은 이소류신이고, 잔기 49는 글리신이고, 잔기 78은 발린이고, 잔기 97은 아르기닌이다.

[0254] 본 발명의 하나의 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고, 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0255] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:

[0256] - 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

[0257] - 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 35를 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

[0258] - 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

[0259] - 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 35를 포함하는 중쇄 가변 영역.

[0260] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 서열과 80% 유사 또는 동일한 서열, 예컨대 관련 서열, 예컨대 가변 도메인 서열, CDR 서열 또는 CDR을 제외한 가변 도메인 서열의 일부 또는 전체에 대해 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 유사 또는 동일한 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 한 실시양태에서, 관련 서열은 서열 번호 15이다. 한 실시양태에서 관련 서열은 서열 번호 23 또는 서열 번호 31이다.

[0261] 한 실시양태에서, 본 발명은 경쇄를 포함하는 인간 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 경쇄의 가변 도메인은 서열 번호 15 또는 서열 번호 19에 제공된 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하고/하거나 중쇄의 가변 도메인은 서열 번호 31, 서열 번호 23, 서열 번호 27 또는 서열 번호 35에 제공된 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함한다.

[0262] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 15에 제공된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 유사 또는 동일한 경쇄 가변 도메인을 가지나, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CDR-L1에 대해 서열 번호 1 또는 서열 번호 7에 제공된 서열을 갖고, CDR-L2에 대해 서열 번호 2에 제공된 서열을 갖고, CDR-L3에 대해 서열 번호 3에 제공된 서열을 갖는다.

[0263] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 알파 시누클레인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 31에 제공된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%

96%, 97%, 98% 또는 99% 유사 또는 동일한 중쇄 가변 도메인을 가지나, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CDR-H1에 대해 서열 번호 4에 제공된 서열을 갖고, CDR-H2에 대해 서열 번호 5 또는 서열 번호 8에 제공된 서열을 갖고, CDR-H3에 대해 서열 번호 6 또는 서열 번호 9 제공된 서열을 갖는다.

[0264] 본원에 사용된 "동일성"은 정렬된 서열의 임의의 특정 위치에서 아미노산 잔기가 서열들 사이에서 동일하다는 것을 나타낸다. 본원에 사용된 "유사성"은 정렬된 서열의 임의의 특정 위치에서 아미노산 잔기는 서열들 사이에서 유사한 유형이다. 예컨대, 류신이 이소류신 또는 발린 대신 치환될 수 있다. 종종 서로 치환될 수 있는 다른 아미노산은 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0265] - 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 갖는 아미노산);

[0266] - 리신, 아르기닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 갖는 아미노산);

[0267] - 아스파르테이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 갖는 아미노산);

[0268] - 아스파라긴 및 글루타민(아미드 측쇄를 갖는 아미노산); 및

[0269] -시스테인 및 메티오닌(황-함유 측쇄를 갖는 아미노산).

[0270] 동일성 및 유사성의 정도는 쉽게 계산될 수 있다(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, the BLAST™ software available from NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656)).

[0271] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항원 결합 단편은 Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', F(ab')2, Fv, 단일 도메인 항체(예컨대, VH 또는 VL 또는 VHH), scFv, dsscFv, 이가, 삼가 또는 사가 항체, Bis-scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 상기 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편일 수 있으나 이에 제한되지 않는다(예컨대, 문현(Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews – Online 2(3), 209-217) 참조). 이를 항체 단편을 생성 및 제조하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다(예컨대, 문현(Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181) 참조). 본 발명에 사용하기 위한 다른 항체 단편은 WO2005/003169, WO2005/003170 및 WO2005/003171에 기재된 Fab 및 Fab' 단편을 포함한다. 다가 항체는 다중 특이성, 예컨대 이중 특이성을 포함할 수 있거나 단일 특이적일 수 있다(예컨대, WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 및 WO2010/035012 참조).

[0272] 대안적인 항원 결합 단편은 2개의 scFv 또는 dsscFv에 연결된 Fab를 포함하고, 각각의 scFv 또는 dsscFv는 동일하거나 상이한 표적(예컨대, 치료 표적에 결합하는 하나의 scFv 또는 dsscFv 및 예컨대 알부민에 결합함으로써 반감기를 증가시키는 하나의 scFv 또는 dsscFv). 이러한 항체 단편은 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015/197772에 기재되어 있으며, 이는 전체가, 특히 항체 단편의 논의와 관련하여 본원에 참조로 포함된다.

[0273] 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 예컨대 Fab 또는 Fab' 단편으로서 본 발명의 융합된 항원 결합 단편, 및 예컨대 WO2009/040562, WO2010035012, WO2011/030107, WO2011/061492 및 WO2011/086091(모두 참조로 본원에 포함됨)에 기재된 바와 같이, 직접적으로 또는 간접적으로 연결된 하나 또는 2개의 단일 도메인 항체(dAb)을 포함하는 알파 시누클레인 결합 융합 단백질의 일부이다. 한 실시양태에서, 융합 단백질은 2개의 도메인 항체, 예컨대 디슬피드 결합에 의해 임의적으로 연결된 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 쌍을 포함한다.

[0274] 한 실시양태에서, 융합 단백질의 Fab 또는 Fab' 요소는 단일 도메인 항체 또는 항체들과 동일하거나 유사한 특이성을 갖는다. 한 실시양태에서, Fab 또는 Fab'는 단일 도메인 항체 또는 항체들에 대해 상이한 특이성을 가지며, 즉 융합 단백질은 다가이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 다가 융합 단백질은 알부민 결합 부위를 갖고, 예컨대 VH/VL 쌍이 알부민 결합 부위를 제공한다.

[0275] 본 발명의 항체 분자의 불변 영역 도메인은, 존재하는 경우, 항체 분자의 제안된 기능, 특히 필요할 수 있는 이

펙터 기능과 관련하여 선택될 수 있다. 예컨대, 불변 영역 도메인은 인간 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 도메인일 수 있다. 특히, 인간 IgG 불변 영역 도메인은, 항체 분자가 치료 용도로 의도되고 항체 이펙터 기능이 요구되는 경우, 특히 IgG1 및 IgG3 이소형의 도메인이 사용될 수 있다. 대안적으로, 항체 분자가 치료 목적으로 의도되고 항체 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우, IgG2 및 IgG4 이소형이 사용될 수 있다. 이들 불변 영역 도메인의 서열 변이체가 또한 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 예컨대, 위치 241의 세린이 문헌(Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108)에 기재된 바와 같이 프롤린을 변경된 IgG4 분자(본원에서 IgG4P로 불림)가 사용될 수 있다.

[0276] 한 실시양태에서, 항체는 전장 항체이고, 바람직하게는 IgG1, 및 IgG4 또는 IgG4P로부터 선택된다.

[0277] 따라서, 본 발명은 알파 시누클레인에 결합하고,

[0278] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0279] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;

[0280] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0281] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0282] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0283] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0284] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및

[0285] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3

[0286] 를 포함하는 전장 인간화 항체를 제공하며, 여기서 인간화 항체는 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함하고, 여기서 항체는 IgG4P 이소형이다.

[0287] 서열 번호 44에서, Xaa는 아스파라긴(Asn; N) 또는 아르기닌(Arg; R)이다. 독립적으로, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린(Ser; S) 또는 아스파라긴(Asn N)이고, 서열 번호 46에서, Xaa는 아스파라긴(Asn N) 또는 히스티딘(His; H)이다.

[0288] 하나의 바람직한 실시양태에서, 알파 시누클레인에 결합하는 전장 인간화 항체는,

[0289] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0290] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;

[0291] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0292] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0293] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0294] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0295] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및

[0296] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3

[0297] 을 포함하고, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함하고, 여기서 항체는 IgG4P 이소형이고, 여기서 서열 번호 44에서, Xaa은 아스파라긴(Asn; N)이고, 서열 번호 45에서, Xaa는 세린(Ser; S)이고, 서열 번호 46에서, Xaa는 아스파라긴(Asn N)이다.

[0298] 가장 바람직한 실시양태에서, 알파 시누클레인에 결합하는 전장 인간화 항체는,

[0299] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

- [0300] i. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1;
- [0301] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및
- [0302] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및
- [0303] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:
- [0304] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
- [0305] v. 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및
- [0306] vi. 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3
- [0307] 을 포함하고, 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.
- [0308] 항체는 다양한 해독 후 변형을 겪을 수 있다는 것을 당업자는 또한 이해할 것이다. 이들 변형의 유형 및 정도는 종종 배양 조건 뿐만 아니라 항체를 발현하는 데 사용되는 숙주 세포주에 의존한다. 이러한 변형은 글리코실화, 메티오닌 산화, 디케토페라진 형성, 아스파르테이트 이성화 및 아스파라긴 탈아미드화의 변형을 포함할 수 있다. 빈번한 변형은 카르복시펩ти다제의 작용으로 인한 카복시-말단 염기성 잔기(예컨대, 리신 또는 아르기닌)의 손실이다(Harris, RJ. Journal of Chromatography 705:129–134, 1995). 따라서, 항체 중쇄의 C-말단 리신이 부재할 수 있다.
- [0309] 한 실시양태에서, 항체로부터의 C-말단 아미노산은 해독 후 변형 동안 절단된다.
- [0310] 한 실시양태에서, 항체로부터의 N-말단 아미노산은 해독 후 변형 동안 절단된다.
- [0311] 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 31로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 예컨대, 항체는 서열 번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 31로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 전장 IgG4 항체일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 번호 17에 따른 경쇄 및 서열 번호 25 또는 서열 번호 33에 따른 중쇄를 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단편은 서열 번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 31로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 Fab'이다.
- [0312] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 서열 번호 35로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 예컨대, 항체는 서열 번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 서열 번호 35로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 번호 17에 따른 경쇄 및 서열 번호 29 또는 서열 번호 37에 따른 중쇄를 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단편은 서열 번호 15에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 서열 번호 35로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 Fab'이다.
- [0313] 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 19에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 서열 번호 35로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 예컨대, 항체는 서열 번호 19에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 서열 번호 35로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 번호 21에 따른 경쇄 및 서열 번호 29 또는 서열 번호 37에 따른 중쇄를 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단편은 서열 번호 19에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 27 또는 서열 번호 35로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 Fab'이다.
- [0314] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 19에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 31로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 예컨대, 항체는 서열 번호 19에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 31로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 번호 21에 따른 경쇄 및 서열 번호 25 또는 서열 번호 33에 따른 중쇄를 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단편은 서열 번호 21에 따른 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 25 또는 서열 번호 33으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 Fab'이다.
- [0315] 바람직한 실시양태에서, 항체는 알파 시누클레인에 결합하고, 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변을 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 더욱 바람직하게는, 항체는 알파 시누클레인 피

브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 더욱 더 바람직하게는 항체는 서열 번호 10을 참조하여 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하며, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.

[0316] 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 알파 시누클레인에 결합하고, 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄 가변을 포함하는 전장 IgG4 항체이다. 더욱 바람직하게는, 항체는 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 더욱 더 바람직하게는 항체는 서열 번호 10을 참조하여 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하며, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.

[0317] 또한, 본 발명은 알파 시누클레인에 결합하는 것에 대해 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0318] 따라서, 본 발명은 알파 시누클레인에 결합하는 것에 대해 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 교차 차단하거나 그에 의해 교차 차단됨으로써 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 특히 서열 번호 23, 서열 번호 31, 서열 번호 27 또는 서열 번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 15 또는 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0319] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 동일한 에피토프에서 알파 시누클레인에 결합하기 위해 경쟁하고, 특히 서열 번호 23, 서열 번호 31, 서열 번호 27 또는 서열 번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 15 또는 서열 번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 항원 결합 단편과 적어도 잔기 M127, P128, S129, E130 및 E131, 바람직하게는 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하기 위해 경쟁한다.

[0320] 한 실시양태에서, 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편과 경쟁하고, 서열 번호 23, 서열 번호 31, 서열 번호 27 또는 서열 번호 35에 따른 서열과 적어도 80% 동일성 또는 유사성을 갖는 중쇄 가변 영역을 가지며; 및/또는 서열 번호 15 또는 서열 번호 19에 따른 서열과 적어도 80% 동일성 또는 유사성을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는다.

[0321] 경쟁 항체는 당업계의 임의의 적합한 방법, 예컨대 인간 알파 시누클레인에 대한 교차 차단 항체의 결합이 본 발명의 항체의 결합을 방지하거나 그 반대인 경쟁 ELISA 또는 비아코어(BIAcore) 검정을 이용하여 확인될 수 있다. 이러한 경쟁 검정은 단리된 천연 또는 재조합 알파 시누클레인 또는 적합한 융합 단백질/폴리펩티드를 사용할 수 있다. 한 예에서, 경쟁은 재조합 인간 알파 시누클레인(서열 번호 10)을 사용하여 측정된다. 한 예에서, N-말단 또는 C-말단에 태그 부착된 재조합 인간 알파 시누클레인(예컨대, TEV 인식 부위를 갖는 6xHis 태그 융합물)이 본원에서의 실시예에 따라 사용된다. 또 다른 예에서, 경쟁은 재조합 인간 알파 시누클레인 피브릴을 사용하여 측정된다.

[0322] 한 실시양태에서, 경쟁 항체는 완전히 인간 또는 인간화된다. 한 실시양태에서, 경쟁 항체는 100 pM 이하, 바람직하게는 50 pM 이하의 인간 알파 시누클레인에 대한 친화도를 갖는다.

[0323] 생물학적 분자, 항체 또는 단편은 산성 및/또는 염기성 작용기를 함유함으로써 분자에 순 양전하 또는 음전하를 제공한다. 전체 "관찰된" 전하의 양은 실체의 절대 아미노산 서열, 3D 구조에서 하전된 기의 국소 환경 및 분자의 환경 조건에 의존할 것이다. 등전점(pI)은 특정 분자 또는 이의 용매 접근 가능한 표면이 순 전하를 갖지 않는 pH이다. 한 예에서, 본 발명에 따른 항-알파 시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 적절한 등전점을 갖도록 조작될 수 있다. 이는 보다 강력한 특성, 특히 적합한 용해도 및/또는 안정성 프로파일 및/또는 개선된 정제 특성을 갖는 항체 및/또는 단편을 초래할 수 있다.

[0324] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 알파 시누클레인에 결합하고 최초에 확인된 항체와 다른 등전점을 갖도록 조작된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 항체는, 예컨대 산성 아미노산 잔기를 하나 이상의 염기성 아미노산 잔기로 교체하는 것과 같이 아미노산 잔기를 교체함으로써 조작될 수 있다. 대안적으로, 염기성 아미노산 잔기가 도입될 수 있거나 산성 아미노산 잔기가 제거될 수 있다. 대안적으로, 분자가 허용할 수 없을 정도로 높은 pI 값을 갖는 경우, 필요에 따라 산성 잔기가 도입되어 pI를 낮출 수 있다. pI 조작 시 항체 또는 단편의 바람직한 활성을 유지하기 위해 주의를 기울여야 한다는 것이 중요하다. 따라서, 한 실시양태에서 조작된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "변형되지 않은" 항체 또는 단편과 동일하거나 실질적으로 동일한 활성을 갖

는다.

[0325] 프로그램, 예컨대 **ExPASY http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, 및 http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html이 항체 또는 단편의 등전점을 예측하는 데 사용될 수 있다.

[0326] 본 발명에 의해 제공된 항체의 친화도는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 변경될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 알파 시누클레인, 특히 인간 알파 시누클레인에 대해 개선된 친화도를 갖는 본 발명의 항체 분자의 변이체에 관한 것이다. 이러한 변이체는 CDR 돌연변이(Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), 쇄 샤플링(Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), 이. 콜리의 돌연변이제 균주 사용(Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), DNA 샤플링(Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), 파지 디스플레이(Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) 및 성적 PCR(Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998)를 포함하는 다수의 친화도 성숙 프로토콜에 의해 수득될 수 있다. 문현(Vaughan et al. (상기 참조))은 이들 친화도 성숙 방법을 논의한다.

[0327] 본 발명에서, 친화도 성숙은 IOTA(WO2014198951)에 의해 수행되었다.

[0328] 필요한 경우, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 이펙터 분자(들)에 전주개이션될 수 있다. 이펙터 분자는 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 부착될 수 있는 단일 모이어티를 형성하도록 연결된 단일 이펙터 분자 또는 2개 이상의 이러한 분자를 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 이펙터 분자에 연결된 항체 단편을 수득하는 것이 필요한 경우, 이는 항체 단편이 직접 또는 커플링제를 통해 이펙터 분자에 연결된 표준 화학적 또는 재조합 DNA 절차에 의해 제조될 수 있다. 이러한 이펙터 분자를 항체에 전주개이션하는 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다(문현(Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 and Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123) 참조). 특정한 화학적 절차는, 예컨대 WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 및 WO 03/031581에 기재된 것을 포함한다. 대안적으로, 이펙터 분자가 단백질 또는 폴리펩티드인 경우, 연결은, 예컨대 WO 86/01533 및 EP0392745에 기재된 바와 같은 재조합 DNA 절차를 이용하여 달성될 수 있다.

[0329] 본원에 사용된 용어 이펙터 분자는, 예컨대 항신생물체, 약물, 독소, 생물학적 활성 단백질, 예컨대 효소, 다른 항체 또는 항체 단편, 합성 또는 자연 발생 중합체, 핵산 및 이의 단편, 예컨대 DNA, RNA 및 이의 단편, 방사성 핵종, 특히 방사성요오드, 방사성동위원소, 킬레이트화된 금속, 나노입자 및 리포터기, 예컨대 형광 화합물 또는 NMR 또는 ESR 분광법으로 검출될 수 있는 화합물을 포함한다.

[0330] 이펙터 분자의 예는 세포에 치명적인(예컨대, 사멸시키는) 임의의 작용제를 포함하는 세포독소 또는 세포독성제를 포함할 수 있다. 예는 콤브레스타틴, 돌라스타틴, 에포틸론, 스타우로스포린, 메이탄시노이드, 스폰기스타틴, 리족신, 할리콘드린, 로리딘, 헤미아스테를린, 탁솔, 시토찰라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로미드, 애메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빙크리스틴, 빙블라스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 푸로마이신 및 이의 유사체 또는 상동체를 포함한다.

[0331] 이펩터 분자는 또한 항대사제(예컨대, 메토트렉세이트, 6-메르캅토푸린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예컨대, 메클로로에타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라시클린(예컨대, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예컨대, 닥티노마이신(이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 안트라마이신(AMC), 칼리체아미신 또는 두오카르마이신), 및 항유사분열제(예컨대, 빙크리스틴 및 빙블라스틴)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0332] 다른 이펩터 분자는 킬레이트화된 방사성 핵종, 예컨대 111In 및 90Y, Lu177, 비스무트213, 칼리포르늄252, 이리듐192 및 텅스텐188/레늄188; 또는 약물, 예컨대, 제한 없이, 알킬포스포콜린, 토포이소머라제 I 억제제, 탁소이드 및 수라민을 포함할 수 있다.

[0333] 다른 이펩터 분자는 단백질, 웨პ티드 및 효소를 포함한다. 관심 효소는 단백분해 효소, 히드롤라제, 리아제, 이소머라제, 트랜스페라제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 관심 단백질, 폴리펩티드 및 웨პ티드는 면역글로불린, 독소, 예컨대 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소, 단백질, 예컨대 인슐린, 종양 괴

사 인자, α -인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래된 성장 인자 또는 조직 플라스미노겐 활성자, 혈전제 또는 항혈관형성제, 예컨대 안기오스타틴 또는 엔도스타틴, 또는 생물학적 반응 변형제, 예컨대 림포카인, 인터류킨-1(IL-1), 인터류킨-2(IL-2), 과립구 대식구 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 신경 성장 인자(NFG) 또는 다른 성장 인자 및 면역글로불린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0334] 다른 이펙터 분자는, 예컨대 진단에 유용한 검출 가능한 물질을 포함할 수 있다. 검출 가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보조군, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 핵종, 양전자 방출 금속(양전자 방출 단층촬영에 사용), 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 일반적으로 진단제로서 사용하기 위해 항체에 컨주게이션 될 수 있는 금속 이온에 대해 미국 특허 번호 4,741,900을 참조한다. 적합한 효소는 페옥시다제, 알갈리 포스파타제, 베타 갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보조군은 스트렙트아비딘, 아비딘 및 비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질은 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 및 피코에리트린을 포함하고; 적합한 형광 물질은 루미놀을 포함하고; 적합한 생물발광 물질은 루시페라제, 루시페린, 및 애큐오린을 포함하고; 적합한 방사성 핵종은 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In 및 ^{99}Tc 를 포함한다.

[0335] 또 다른 예에서, 이펙터 분자는 생체내에서 항체의 반감기를 증가시키고/시키거나 항체의 면역원성을 감소시키고/시키거나 면역계에 대한 상피 장벽을 통한 항체의 전달을 향상시킬 수 있다. 이러한 유형의 적합한 이펙터 분자의 예는 WO05/117984에 기재된 것과 같은 중합체, 알부민, 알부민 결합 단백질 또는 알부민 결합 화합물을 포함한다.

[0336] 이펙터 분자가 중합체인 경우, 일반적으로 합성 또는 자연 발생 중합체, 예컨대 임의로 치환된 칙체 또는 분자쇄 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 중합체 또는 분지형 또는 비분지형 다당류, 예컨대 동종 또는 이종 다당류일 수 있다.

[0337] 상기 언급된 합성 중합체에 존재할 수 있는 특정한 임의적인 치환기는 하나 이상의 히드록시, 메틸 또는 메톡시기를 포함한다.

[0338] 합성 중합체의 구체적인 예는 임의적으로 치환된 칙체 또는 분자쇄 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(프로필렌글리콜) 폴리(비닐알콜) 또는 이의 유도체, 특히 임의적으로 치환된 폴리(에틸렌글리콜), 예컨대 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 이의 유도체를 포함한다.

[0339] 특정한 자연 발생 중합체는 락토스, 아밀로스, 텍스트란, 글리코겐 또는 이의 유도체를 포함한다.

[0340] 한 실시양태에서, 중합체는 알부민 또는 이의 단편, 예컨대 인간 혈청 알부민 또는 이의 단편이다.

[0341] 본원에 사용된 "유도체"는 반응성 유도체, 예컨대 말레이이미드 등과 같은 티올-선택성 반응기를 포함하는 것으로 의도된다. 반응기는 직접적으로 또는 링커 절편을 통해 중합체에 연결될 수 있다. 이러한 기의 잔기는 일부 경우에 항체 단편과 중합체 사이의 연결기로서 생성물의 일부를 형성할 것이라는 것이 이해될 것이다.

[0342] 중합체의 크기는 필요에 따라 변할 수 있지만, 일반적으로 500 Da 내지 50000 Da, 예컨대 5000 내지 40000 Da, 예컨대 20000 내지 40000 Da의 평균 분자량 범위일 것이다. 중합체 크기는 특히 제품의 의도된 용도, 예컨대 종양과 같은 특정 조직으로 국소화하거나 순환 반감기를 연장시키는 능력에 기초하여 선택될 수 있다(검토를 위해 문헌(Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545) 참조). 따라서, 예컨대 생성물이 예컨대 종양의 치료에 사용하기 위해 순환을 떠나 조직을 관통하도록 의도된 경우, 예컨대 분자량이 약 5000 Da인 저분자량 중합체를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 생성물이 순환 상태로 유지되는 적용의 경우, 예컨대 20000 Da 내지 40000 Da 범위의 분자량을 갖는 보다 고분자량의 중합체를 사용하는 것이 유리할 수 있다.

[0343] 적합한 중합체는 폴리알킬렌 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 특히 메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 또는 이의 유도체, 특히 약 15000 Da 내지 약 40000 Da 범위의 분자량을 갖는 것을 포함한다.

[0344] 한 예에서, 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 폴리(에틸렌글리콜)(PEG) 모이어티에 부착된다. 하나의 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 항원 결합 단편 및 PEG 분자는 항체 단편에 위치된 임의의 이용 가능한 아미노산 측쇄 또는 말단 아미노산 작용기, 예컨대 임의의 유리 아미노, 이미노, 티올, 히드록실 또는 카르복실기를 통해 부착될 수 있다. 이러한 아미노산은 항체 단편에서 자연적으로 발생하거나 재조합 DNA 방법을 이용하여 단편으로 조작될 수 있다(예컨대, US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024 참조). 한 예에서, 본 발명의 항체 분자는 변형된 Fab 단편이며, 여기서 변형은 이펙터 분자의 부착을 허용하기 위해 하나 이상의 아미노산을 중쇄의 C-말단에 첨가한다. 적합하게는, 추가의 아미노산은 이펙터 분자가 부착될 수 있는 하나 이

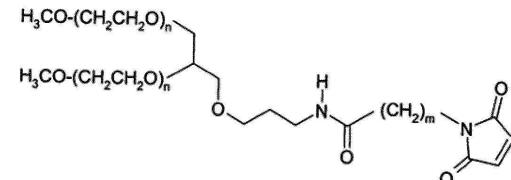
상의 시스테인 잔기를 함유하는 변형된 힌지 영역을 형성한다. 2개 이상의 PEG 분자를 부착시키기 위해 다수의 부위가 사용될 수 있다.

[0345] 적합하게 PEG 분자는 항체 단편에 위치된 적어도 하나의 시스테인 잔기의 티올기를 통해 공유적으로 연결된다. 변형된 항체 단편에 부착된 각각의 중합체 분자는 단편에 위치된 시스테인 잔기의 황 원자에 공유적으로 결합될 수 있다. 공유 결합은 일반적으로 디슬피드 결합, 특히 황-탄소 결합일 것이다. 티올기가 부착 포인트로서 사용되는 경우, 적절하게 활성화된 이펙터 분자, 예컨대 말레이미드 및 시스테인 유도체와 같은 티올 선택적 유도체가 사용될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이 중합체-변형된 항체 단편의 제조에서 출발 물질로서 활성화된 중합체가 사용될 수 있다. 활성화된 중합체는 티올 반응기를 함유하는 임의의 중합체, 예컨대 α -할로카르복실산 또는 에스테르, 예컨대 요오도아세트아미드, 이미드, 예컨대 말레이미드, 비닐 술폰 또는 디슬피드일 수 있다. 이러한 출발 물질은 상업적으로 입수될 수 있거나(예컨대, Nektar, 이전에는 Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA), 통상적인 화학 절차를 이용하여 상업적으로 이용 가능한 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 특정 PEG 분자는 20K 메톡시-PEG-아민(입수처: Nektar, 이전에는 Shearwater; Rapp Polymere; and SunBio) 및 M-PEG-SPA(입수처: Nektar, 이전에는 Shearwater)를 포함한다.

[0346] 한 실시양태에서, 항체는 폐길화된(PEGylated), 즉 예컨대 EP 0948544 또는 EP1090037에 개시된 방법에 따라 공유적으로 부착된 PEG(폴리(에틸렌글리콜))를 갖는 변형된 Fab 단편, Fab' 단편 또는 diFab이다(또한 문헌("Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545) 참조). 한 예에서, PEG는 힌지 영역의 시스테인에 부착된다. 한 예에서, PEG 변형된 Fab 단편은 변형된 힌지 영역에서 단일 티올기에 공유적으로 연결된 말레이미드기를 갖는다. 리신 잔기는 말레이미드기에 공유적으로 연결될 수 있고, 리신 잔기 상의 각각의 아민기에 분자량이 약 20,000 Da인 메톡시폴리(에틸렌 글리콜) 중합체가 부착될 수 있다. 따라서 Fab 단편에 부착된 PEG의 총 분자량은 대략 40,000 Da일 수 있다.

[0347] 특정 PEG 분자는 PEG2 MAL40K(입수처: Nektar, 이전에는 Shearwater)로도 공지된 N,N'-비스(메톡시폴리(에틸렌 글리콜) MW 20,000) 변형된 리신의 2-[3-(N-말레이미도)프로파온아미도]에틸 아미드를 포함한다.

[0348] PEG 링커의 대안적 공급원은 GL2-400MA3(하기 구조에서 m은 5임) 및 GL2-400MA(m은 2임)을 공급하는 NOF를 포함하며, n은 대략 450이다:



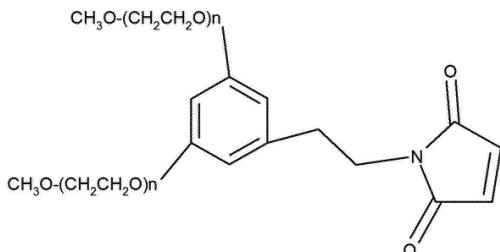
[0349]

[0350] m은 2 또는 5이다.

[0351] 즉, 각각의 PEG는 약 20,000 Da이다.

[0352] 따라서, 한 실시양태에서, PEG는 2,3-비스(메틸폴리옥시에틸렌-옥시)-1-{[3-(6-말레이미도-1-옥소헥실)아미노]프로필옥시} 헥산(2 아암 분지된 PEG, -CH2-3NHCO(CH2)5-MAL, Mw 40,000(SUNBRIGHT GL2-400MA3으로 공지됨)이다.

[0353] 하기 유형의 추가의 대안적인 PEG 이펙터 분자가 닉터 레디(Dr Reddy), NOF 및 젠켐(Jenken)으로부터 입수 가능하다:



[0354]

[0355] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 Fab 또는 Fab'는 PEG 분자에 친주게이션된다.

[0356]

[0356] 한 실시양태에서, 쇄의 아미노산 226, 예컨대 중쇄의 아미노산 226(순차적 넘버링에 의함), 예컨대 서열 번호 33의 아미노산 223에서 또는 그 근처의 시스테인 아미노산 잔기를 통해 부착된, 폐길화된(예컨대, 본원에 기재된 PEG를 사용) 항체가 제공된다.

[0357]

[0357] 한 실시양태에서, 본 개시는 하나 이상의 PEG 중합체, 예컨대 1 또는 2개의 중합체, 예컨대 40 kDa 중합체 또는 중합체들을 포함하는 Fab'PEG 분자를 제공한다.

[0358]

[0358] 본 개시에 따른 Fab'-PEG 분자는 그들이 Fc 단편과 무관한 반감기를 갖는다는 점에서 특히 유리할 수 있다. 한 실시양태에서, 중합체, 예컨대 PEG 분자, 전분 분자 또는 일부민 분자에 친주게이션된 Fab'가 제공된다. 한 실시양태에서, 중합체, 예컨대 PEG 분자, 전분 분자 또는 일부민 분자에 친주게이션된 scFv가 제공된다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 Fab 또는 Fab'는 인간 혈청 일부민에 친주게이션된다. 한 실시양태에서, 항체 또는 단편은, 예컨대 반감기를 증가시키기 위해 전분 분자에 친주게이션된다. 전분을 단백질에 친주게이션하는 방법은 본원에 참조로 포함된 US 8,017,739에 기재된다.

[0359]

[0359] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 화학 프로세싱, cDNA, 게놈 DNA 또는 이의 임의의 조합에 의해 생성된 합성 DNA를 포함할 수 있다.

[0360]

[0360] 분자 생물학의 표준 기술을 이용하여 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 DNA 서열을 제조할 수 있다. 원하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오티드 합성 기술을 이용하여 완전히 또는 부분적으로 합성될 수 있다. 부위 지시된 돌연변이유발 및 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술이 적절하게 이용될 수 있다.

[0361]

[0361] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드는 하기를 코딩한다:

[0362]

a. 경쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 경쇄 가변 영역:

i. 서열 번호 16 또는 서열 번호 20과 적어도 90% 동일; 또는

ii. 서열 번호 16 또는 20을 포함; 또는

iii. 서열 번호 16 또는 서열 번호 20으로 본질적으로 이루어짐;

[0366]

b. 중쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 중쇄 가변 영역:

i. 서열 번호 24 또는 서열 번호 28 또는 서열 번호 32 또는 서열 번호 36과 적어도 90% 동일; 또는

ii. 서열 번호 24 또는 서열 번호 28 또는 서열 번호 32 또는 서열 번호 36을 포함; 또는

iii. 서열 번호 24 또는 서열 번호 28 또는 서열 번호 32 또는 서열 번호 36으로 본질적으로 이루어짐;

[0370]

c. 경쇄로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 경쇄:

i. 서열 번호 18 또는 서열 번호 22와 적어도 90% 동일; 또는

ii. 서열 번호 18 또는 22를 포함; 또는

iii. 서열 번호 18 또는 서열 번호 22로 본질적으로 이루어짐;

[0374]

d. 중쇄로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 중쇄:

i. 서열 번호 26 또는 서열 번호 30 또는 서열 번호 34 또는 서열 번호 38과 적어도 90% 동일; 또는

ii. 서열 번호 26 또는 서열 번호 30 또는 서열 번호 34 또는 서열 번호 38을 포함; 또는

- [0377] iii. 서열 번호 26 또는 서열 번호 30 또는 서열 번호 34 또는 서열 번호 38로 본질적으로 이루어짐;
- [0378] e. 경쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 경쇄 가변 영역:
- [0379] i. 서열 번호 12와 적어도 90% 동일; 또는
- [0380] ii. 서열 번호 12를 포함; 또는
- [0381] iii. 서열 번호 12로 본질적으로 이루어짐;
- [0382] f. 중쇄 가변 영역으로서, 여기서 폴리뉴클레오티드는 하기와 같은 것인 중쇄 가변 영역:
- [0383] i. 서열 번호 14와 적어도 90% 동일; 또는
- [0384] ii. 서열 번호 14를 포함; 또는
- [0385] iii. 서열 번호 14로 본질적으로 이루어짐.
- [0386] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호 24, 28, 32 또는 36에 제공된 서열을 포함하는 본 발명의 항체 Fab'단편 또는 IgG1 또는 IgG4 항체의 중쇄를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또한, 서열 번호 16 또는 20에 제공된 서열을 포함하는 본 발명의 항체 Fab'단편 또는 IgG1 또는 IgG4 항체의 경쇄를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 또한 제공된다.
- [0387] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 IgG4(P) 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 26, 30, 34 또는 38에 제공된 서열을 포함하고, 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 18 또는 22에 제공된 서열을 포함한다.
- [0388] 본 발명은 또한 본원에 기재된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터를 제공한다. 한 예에서, 본 발명에 따른 클로닝 또는 발현 벡터는 서열 번호 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 또는 38로부터 선택되는 서열을 포함하는 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0389] 벡터가 구축될 수 있는 일반적인 방법, 형질감염 방법 및 배양 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이와 관련하여 문헌("Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing)을 참조한다.
- [0390] 또한, 본 발명에 따른 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 본 발명의 항체를 코딩하는 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 임의의 적합한 숙주 세포/벡터 시스템이 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 발현에 사용될 수 있다. 박테리아, 예컨대 이. 콜리 및 다른 미생물 시스템이 사용될 수 있거나 진핵생물, 예컨대 포유동물 숙주 세포 발현 시스템이 또한 사용될 수 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포는 CHO, 골수종 또는 하이브리도마 세포를 포함한다.
- [0391] 본 발명에 사용하기에 적합한 유형의 중국 햄스터 난소(CHO 세포)는 DHFR 선별가능 마커와 함께 사용될 수 있는 CHO-DG44 세포 및 CHO-DXB11 세포와 같은 dhfr-CHO 세포를 포함하는 CHO 및 CHO-K1 세포 또는 글루타민 신테타제 선별가능 마커와 함께 사용될 수 있는 CHOK1-SV 세포를 포함할 수 있다. 항체 발현에 사용되는 다른 세포 유형은 립프구 세포주, 예컨대 NSO 골수종 세포 및 SP2 세포, COS 세포를 포함한다. 숙주 세포는 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 발현 벡터로 안정적으로 형질전환되거나 형질감염될 수 있다.
- [0392] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 숙주 세포는 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터, 바람직하게는 서열 번호 18 및 26 또는 서열 번호 18 및 34 또는 서열 번호 18 및 30 또는 서열 번호 18 및 38에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터로 안정적으로 형질감염된 CHO-DG44 세포이다.
- [0393] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 숙주 세포를 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계 및 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생성 방법을 제공한다.
- [0394] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드만을 포함할 수 있으며, 이 경우 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드 코딩 서열만이 숙주 세포를 형질감염시키는 데 사용되어야 한다. 중쇄 및 경쇄 둘 다를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생성을 위해, 세포주는 경쇄 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터 및 중쇄 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터의 2개의 벡터로 형질감염될 수 있다. 대안적으로, 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 코딩하는

서열을 포함하는 단일 벡터가 사용될 수 있다.

[0395] 따라서, 숙주 세포를 배양하고 항체 또는 이의 단편을 발현시키고, 후자를 단리하고 임의적으로 이를 정제하여 단리된 항체 또는 단편을 제공하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 방법은 이팩터 분자를 단리된 항체 또는 단편에 컨주케이션시키는 단계, 예컨대 특히 본원에 기재된 바와 같은 PEG 중합체에 컨주케이션시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0396] 따라서, 한 실시양태에서, 내독소 및/또는 숙주 세포 단백질 또는 DNA로부터 실질적으로 정제된, 특히 이들이 없는 또는 실질적으로 없는, 정제된 항-알파 시누클레인 항체 또는 이의 단편, 예컨대 인간화 항체 또는 이의 단편, 특히 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편이 제공된다.

[0397] 내독소가 실질적으로 없는 것은 일반적으로 항체 생성물 mg당 1 EU 이하, 예컨대 생성물 mg당 0.5 또는 0.1 EU의 내독소 함량을 지칭하는 것으로 의도된다.

[0398] 숙주 세포 단백질 또는 DNA가 실질적으로 없는 것은 일반적으로 적절한 경우 항체 생성물 mg당 400 μg 이하, 예컨대 mg당 100 μg 이하, 특히 mg당 20 μg의 숙주 세포 단백질 및/또는 DNA 함량을 지칭하는 것으로 의도된다.

[0399] 본 발명의 항체는 알파 시누클레인병증과 같은 병리학적 상태의 치료, 진단 및/또는 예방에 유용하므로, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제와 조합하여 포함하는 약학적 또는 진단 조성물을 제공한다.

[0400] 바람직하게는, 약학적 또는 진단 조성물은 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함하는 인간화 항체를 포함한다:

[0401] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0402] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;

[0403] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0404] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0405] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0406] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0407] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및

[0408] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3.

[0409] 더욱 바람직하게는, 약학적 또는 진단 조성물은 알파 시누클레인에 결합하는 인간화 항체를 포함하고 하기를 포함한다:

[0410] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0411] i. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1;

[0412] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0413] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0414] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0415] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0416] v. 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및

[0417] vi. 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3.

[0418] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단독 활성 성분이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 추가의 활성 성분과 조합된다. 대안적으로, 약학 조성물은 단독 활성 성분인 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 이는 다른 작용제, 약물 또는 호르몬과 조합하여(예컨대, 동시에, 순차적으로 또는 별도로) 환자에게 개별적으로 투

여될 수 있다.

- [0419] 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 서열 번호 15 또는 19의 경쇄 가변 영역을 포함하고 서열 번호 23, 27, 31 또는 35의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 예컨대 서열 번호 15 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 15 및 서열 번호 31을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0420] 바람직하게는, 본 발명은 알파 시누클레인에 결합하고 서열 번호 15의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0421] 본 발명에 따른 약학 조성물은 필요한 치료 유효량을 확인하기 위해 환자에게 적합하게 투여될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "치료 유효량"은 표적된 질환 또는 병태를 치료, 개선 또는 예방하거나, 검출 가능한 치료 또는 예방 효과를 나타내는 데 필요한 치료제의 양을 지칭한다. 임의의 항체에 대해, 치료 유효량은 세포 배양 검정 또는 동물 모델, 일반적으로 설치류, 토끼, 개, 돼지 또는 영장류에서 초기에 추정될 수 있다. 동물 모델은 또한 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는 데 사용될 수 있다. 이러한 정보는 인간에게 투여하기에 유용한 용량 및 경로를 결정하는 데 사용될 수 있다.
- [0422] 인간 대상체에 대한 정확한 치료 유효량은 질환 상태의 중증도, 대상체의 일반적인 건강, 대상체의 나이, 체중 및 성별, 식이, 투여 시간 및 빈도, 약물 조합(들), 반응 민감성 및 요법에 대한 내성/반응에 의존할 것이다. 이 양은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있으며 임상의의 판단에 따른다. 일반적으로, 치료 유효량은 0.01 mg/kg 내지 500 mg/kg, 예컨대 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 예컨대 100 mg/kg일 것이다. 약학 조성물은 용량당 미리 결정된 양의 본 발명의 활성제를 함유하는 단위 용량 형태로 편리하게 제공될 수 있다.
- [0423] 치료 조성물에서 약학적으로 허용되는 담체는 물, 식염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체를 추가로 함유할 수 있다. 또한, 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조 물질이 이러한 조성물에 존재할 수 있다. 이러한 담체는 약학 조성물이 환자에 의한 섭취를 위해 정제, 환제, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리 및 혼탁액으로 제형화될 수 있게 한다.
- [0424] 투여에 적합한 형태는 정맥내, 흡입 또는 피하 형태의 비경구 투여, 예컨대 주사 또는 주입에 의한, 예컨대 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 투여에 적합한 형태를 포함한다. 제품이 주사 또는 주입용인 경우, 유성 또는 수성 비히클에서 혼탁액, 용액 또는 에멀젼의 형태를 취할 수 있으며 혼탁제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 사용하기 전에 적절한 멸균 액체로 재구성하기 위한 건조 형태일 수 있다. 주사 전 액체 비히클 중의 용액 또는 혼탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다.
- [0425] 일단 제형화되면, 본 발명의 조성물은 대상체에게 직접 투여될 수 있다. 따라서, 의약의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도가 본원에 제공된다.
- [0426] 치료될 대상체는 동물일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 약학 조성물은 인간 대상체에게 투여하기에 적합하다.
- [0427] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 요법에 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하며, 하기를 포함한다:
- [0428] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:
- [0429] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;
- [0430] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및
- [0431] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및
- [0432] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:
- [0433] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;
- [0434] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및
- [0435] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3.
- [0436] 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화되고 알파 시누클레인 퍼브릴에 의해 유도되는 알파 시

누클레인 응집을 방지하고, 더욱 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.

[0437] 바람직한 실시양태에서, 요법에 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다:

[0438] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0439] i. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1;

[0440] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0441] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0442] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0443] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0444] v. 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및

[0445] vi. 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3.

바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화되고 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 더욱 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.

[0446] 특히, 요법에서의 용도는 하나 이상의 알파 시누클레인병증의 치료에서의 용도를 포함한다.

[0447] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성을 시누클레인병증의 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 환자에서 하나 이상의 시누클레인병증을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함한다:

[0448] a. 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0449] i. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1;

[0450] ii. 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및

[0451] iii. 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3; 및

[0452] b. 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0453] iv. 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1;

[0454] v. 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및

[0455] vi. 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3.

바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화되고 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 더욱 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.

[0456] 하나의 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성을 하나 이상의 알파 시누클레인병증의 치료에 사용하기 위한 것이며, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함한다:

[0457] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

- [0460] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0461] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄.
- [0462] 바람직하게는, 이 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화되고 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 더욱 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.
- [0463] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 알파 시누클레인병증의 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 환자에서 하나 이상의 알파 시누클레인병증을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함한다:
- [0464] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0465] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0466] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄.
- [0467] 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화되고 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 방지하고, 더욱 바람직하게는 서열 번호 10을 참조하여 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함하는 에피토프에 따라 알파 시누클레인에 결합하고, 여기서 에피토프는 임의적으로 A124 및 G132를 포함한다.
- [0468] 대안적으로, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물은 치료에 사용하기 위한 또는 하나 이상의 알파 시누클레인병증의 치료에 사용하기 위한 것이며, 하기를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다:
- [0469] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1 또는 서열 번호 7; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5 또는 서열 번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6 또는 서열 번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0470] b. 서열 번호 15 또는 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 27 또는 서열 번호 31 또는 서열 번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0471] c. 서열 번호 17 또는 서열 번호 21을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 25 또는 서열 번호 29 또는 서열 번호 33 또는 서열 번호 37을 포함하는 중쇄.
- [0472] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 알파 시누클레인병증 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 환자에서 하나 이상의 알파 시누클레인병증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함한다:
- [0473] a. 서열번호 1 또는 서열번호 7을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5 또는 서열 번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6 또는 서열 번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0474] b. 서열 번호 15 또는 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 27 또는 서열 번호 31 또는 서열 번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0475] c. 서열 번호 17 또는 서열 번호 21을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 25 또는 서열 번호 29 또는 서열 번호 33 또는 서열 번호 37을 포함하는 중쇄.
- [0476] 본 발명에 따른 알파 시누클레인병증은 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 측적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 알파 시누클레인병증은 파킨슨 질환(PD)이다.

- [0477] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1), 바람직하게는 파킨슨 질환(PD)을 치료하는 데 사용하기 위한 것이고, 하기를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다:
- [0478] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0479] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0480] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄.
- [0481] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1), 바람직하게는 파킨슨 질환(PD)을 치료하기 위한 것이고, 하기를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다:
- [0482] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1 또는 서열 번호 7; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5 또는 서열 번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6 또는 서열 번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0483] b. 서열 번호 15 또는 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23 또는 서열 번호 27 또는 서열 번호 31 또는 서열 번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0484] c. 서열 번호 17 또는 서열 번호 21을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 25 또는 서열 번호 29 또는 서열 번호 33 또는 서열 번호 37를 포함하는 중쇄.
- [0485] 또 다른 실시양태에서, 치료 유효량의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1), 바람직하게는 파킨슨 질환(PD) 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 환자에서 상기 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0486] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0487] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0488] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄.
- [0489] 또 다른 실시양태에서, 환자에서 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1), 바람직하게는 파킨슨 질환(PD)을 치료하는 방법은 상기 환자에게 치료 유효량의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0490] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1 또는 서열 번호 7; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5 또는 서열 번호 8을 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6 또는 서열 번호 9를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0491] b. 서열 번호 15 또는 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 서열 번호 27 또는 서열 번호 31 또는 서열 번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는

- [0492] c. 서열 번호 17 또는 서열 번호 21을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 25 또는 서열 번호 29 또는 서열 번호 33 또는 서열 번호 37을 포함하는 중쇄.
- [0493] 대안적으로, 본 발명은 또한 알파 시누클레인병증 치료용 약제의 제조를 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공하며, 여기서 알파 시누클레인병증은 바람직하게는 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1), 더욱 바람직하게는 파킨슨 질환(PD)이고, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0494] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0495] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0496] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄.
- [0497] 또한, 본 발명의 일부는 진단 활성제로서 또는 진단 검정에서 사용하기 위한, 예컨대 알파 시누클레인병증, 예컨대 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매(DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨 질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1)을 진단하기 위한 항-알파 시누클레인 항체 또는 항원 결합 단편의 용도이다.
- [0498] 진단은 바람직하게는 생물학적 샘플에 대해 수행될 수 있다. "생물학적 샘플"은 개체로부터 수득된 다양한 샘플 유형을 포함하며 진단 또는 모니터링 검정에 사용될 수 있다. 상기 정의는 뇌척수액, 혈장 및 혈청과 같은 혈액, 및 소변 및 타액과 같은 생물학적 기원의 다른 액체 샘플, 생검 시료와 같은 고형 조직 샘플 또는 이로부터 유래된 조직 배양물 또는 세포 및 이의 자손을 포함한다. 상기 정의는 샘플을 확보한 후, 예컨대 시약 처리, 가용화 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 특정 성분에 대한 농축에 의해 임의의 방식으로 조작된 샘플을 포함한다.
- [0499] 진단 시험은 바람직하게는 인간 또는 동물 신체와 접촉되지 않는 생물학적 샘플에 대해 수행될 수 있다. 이러한 진단 시험은 시험관내 시험으로도 지칭된다. 시험관내 진단 시험은 i) 생물학적 샘플을 본원에 기재된 항-알파 시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및 ii) 항-알파 시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 알파 시누클레인에 대한 결합을 검출하는 단계를 포함하는, 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에서 알파 시누클레인을 검출하는 시험관내 방법에 의존할 수 있다. 검출된 알파 시누클레인 수준 또는 특정한 해독후 변형된 형태의 알파 시누클레인의 존재를 적절한 대조군과 비교함으로써, 하나 이상의 알파 시누클레인병증이 확인될 수 있다. 따라서, 이러한 검출 방법은 알파 시누클레인병증의 단계(중증도)를 결정하는 것을 포함하여 대상체가 알파 시누클레인병증이 있는지 또는 발병 위험이 있는지를 결정하는 데 이용될 수 있다.
- [0500] 따라서, 본 발명은 알파 시누클레인병증의 진단, 바람직하게는 파킨슨 질환의 진단에 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함한다:
- [0501] a. 서열 번호 44를 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 45를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 46을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역.
- [0502] 바람직하게는, 본 발명은 알파 시누클레인병증의 진단, 바람직하게는 파킨슨 질환의 진단에 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파 시누클레인에 결합하고 하기를 포함한다:
- [0503] a. 서열번호 1을 포함하는 CDR-L1; 서열 번호 2를 포함하는 CDR-L2 및 서열 번호 3을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열 번호 4를 포함하는 CDR-H1; 서열 번호 5를 포함하는 CDR-H2 및 서열 번호 6을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0504] b. 서열 번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역; 또는
- [0505] c. 서열 번호 17을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 33을 포함하는 중쇄.

[0506] 본 발명에 포함된 서열은 표 1에 제시된다:

[0507]

명칭	서열 번호	서열
CDR-L1	1	QASQSVYKNNYLA
CDR-L2	2	GASTLAS
CDR-L3	3	AGYKGGRNDGFA
CDR-H1	4	GIDLSSHDMY
CDR-H2	5	AIYASGSTYYASWAKG
CDR-H3	6	IHYGNSSGL
CDR-L1 N33R	7	QASQSVYKNRYLA
CDR-H2 S56N	8	AIYASGNTYYASWAKG
CDR-H3 N102H	9	IHYGHNSGL
인간 알파 시누클레인 P37840	10	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGvat VAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAP QEGLIEDMPVPDPNIEAYEMPSEEQYQDYEPEA
토끼 VL	11	AIVMTQTPSSKSVAVGDTVTINCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGQFPKQLIYGAS TLASGVPSRFKGSGSGTQFTLITSDVVVDDAATYYCAGYKGGRNDGFAFGGGTE VVVK
토끼 VL 뉴클레오티드	12	Gccatctgtgatcccaggactccatctccaaatgttgcgtggggagacaca gtcacccatcaatgtccggccatcgatgttataaaaactacttgttgcgtcc tggtttcaacagaaacccaggccatcgatgttgcgtggggacacac actctggcatctggggatccatcgatgttgcgtggggacacac ttcattcttcacccatcgatgttgcgtggggacacac gcaggatataaaaggatgttgcgtatgtatgttgcgttgcgtggggaggccagg gtggatgttgcgttgcgtggggacacac
토끼 VH	13	Q5VEESGGRLVTPTGPTLTLCTVSGIDLSSHDMDYWVRQAPGKGLEYIGAIYASG STYYASWAKGRFTISKTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARIHYGNSSGLWGQGT LTVSS
토끼 VH 뉴클레오티드	14	Cagtccgtggaggatccgggggtcgccgttgcacgcctgggacacccctgaca cttcacatgtcacaatgttgcgtatcgaccctatcgatgttgcgtggggatgttgcgt cgccaggatgtccggatggggatgttgcgtatcgatgttgcgtggggatgttgcgt agcacatatactacgcgcgtatgttgcgtggggaaaggccatgttgcgt accacatgttgcgtggggatgttgcgtatcgatgttgcgtggggatgttgcgt ttctgttgcgtggggatgttgcgtatcgatgttgcgtggggatgttgcgt ctgttgcgtggggatgttgcgtatcgatgttgcgtggggatgttgcgt

[0508]

6470 gL3 VL	15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGKAPKQLIYGAS TLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRNDGFAFGGGTK VEIK
6470 gL3 VL 뉴클레오티드	16	Gacattcagatgaccaggcccccttcatcaactgtcccgagcgtgggcacaga tgacccattacgtgccaaaggccaggccgtgtacaagaacaactacctggcc tggttcagaaaaaggccggaaaggccaaaaacagttatctacgggtcatcc actctcgctccggagtgccgagccgttctcgggatctgggtccggaaacttag ttcacccgtactatctcgccctgcaccccgaggatttcgcacccactactgc gccggctataaggggaggacggaaaggccggatctcggtttgtggaggccacaag gtcgaatcaacgtacgggtggccgtccctccgtgtcatctcccaacctcc gacgagcagctgaagtccggaccgcctccgtgtgcctgtgaacaacttc taccccccggggccagggtcagttggaaagggtgacaaacgcccgtcagtcggc aactcccgaggaaatccgtcaccggcagggactccaaaggacagcacccactcc tcctccaccctgaccctgtcaaggccactacgaaaaacaaagggtgtacgcc tgcgaatgtcggccaccaggccgttccagccccgtgaccaactccgtcaacccg ggcggatgtc
6470 gL3 경쇄 뉴클레오티드	17	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGKAPKQLIYGAS TLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRNDGFAFGGGTK VEIKRTVAAPSVDIFPPSDDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESTEQDQSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
6470 gL3 경쇄 뉴클레오티드	18	Gacattcagatgaccaggcccccttcatcaactgtcccgagcgtgggcacaga tgacccattacgtgccaaaggccaggccgtgtacaagaacaactacctggcc tggttcagaaaaaggccggaaaggccaaaaacagttatctacgggtcatcc actctcgctccggagtgccgagccgttctcgggatctgggtccggaaacttag ttcacccgtactatctcgccctgcaccccgaggatttcgcacccactactgc gccggctataaggggaggacggaaaggccggatctcggtttgtggaggccacaag gtcgaatcaacgtacgggtggccgtccctccgtgtcatctcccaacctcc gacgagcagctgaagtccggaccgcctccgtgtgcctgtgaacaacttc taccccccggggccagggtcagttggaaagggtgacaaacgcccgtcagtcggc aactcccgaggaaatccgtcaccggcagggactccaaaggacagcacccactcc tcctccaccctgaccctgtcaaggccactacgaaaaacaaagggtgtacgcc tgcgaatgtcggccaccaggccgttccagccccgtgaccaactccgtcaacccg ggcggatgtc
6470 gL3 VL N33R	19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYKNRYLAWFQQKPGKAPKQLIYGAS TLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRNDGFAFGGGTK VEIK
6470 gL3 VL N33R 뉴클레오티드	20	Gacattcagatgaccaggcccccttcatcaactgtcccgagcgtgggcacaga tgacccattacgtgccaaaggccaggccgtgtacaagaacccgttacctggcc tggttcagaaaaaggccggaaaggccaaaaacagttatctacgggtcatcc actctcgctccggagtgccgagccgttctcgggatctgggtccggaaacttag ttcacccgtactatctcgccctgcaccccgaggatttcgcacccactactgc gccggctataaggggaggacggaaaggccggatctcggtttgtggaggccacaag gtcgaatcaacgtacgggtggccgtccctccgtgtcatctcccaacctcc gacgagcagctgaagtccggaccgcctccgtgtgcctgtgaacaacttc taccccccggggccagggtcagttggaaagggtgacaaacgcccgtcagtcggc aactcccgaggaaatccgtcaccggcagggactccaaaggacagcacccactcc tcctccaccctgaccctgtcaaggccactacgaaaaacaaagggtgtacgcc tgcgaatgtcggccaccaggccgttccagccccgtgaccaactccgtcaacccg ggcggatgtc
6470 gL3 경쇄 N33R	21	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYKNRYLAWFQQKPGKAPKQLIYGAS TLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCAGYKGGRNDGFAFGGGTK VEIKRTVAAPSVDIFPPSDDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESTEQDQSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
6470 gL3 경쇄 N33R 뉴클레오티드	22	Gacattcagatgaccaggcccccttcatcaactgtcccgagcgtgggcacaga tgacccattacgtgccaaaggccaggccgtgtacaagaacccgttacctggcc tggttcagaaaaaggccggaaaggccaaaaacagttatctacgggtcatcc actctcgctccggagtgccgagccgttctcgggatctgggtccggaaacttag ttcacccgtactatctcgccctgcaccccgaggatttcgcacccactactgc gccggctataaggggaggacggaaaggccggatctcggtttgtggaggccacaag gtcgaatcaacgtacgggtggccgtccctccgtgtcatctcccaacctcc gacgagcagctgaagtccggaccgcctccgtgtgcctgtgaacaacttc taccccccggggccagggtcagttggaaagggtgacaaacgcccgtcagtcggc aactcccgaggaaatccgtcaccggcagggactccaaaggacagcacccactcc tcctccaccctgaccctgtcaaggccactacgaaaaacaaagggtgtacgcc tgcgaatgtcggccaccaggccgttccagccccgtgaccaactccgtcaacccg ggcggatgtc

[0509]

[0510]

		gcgggttactattgcgcgcgtattcattatggcacagtggtgggttgtgggt cagggtactctggtaaccgtctcgagc
6470 gH23 종쇄 S56N N102H	29	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMDWVRQAPGKGLEYIGAIYAS GSTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARIHYGNSGGLG QGTLVTVSSASTKGPSVF LAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTWSNSGA LTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGP CPCPAPEFLGGPSVFLFP PKD TL MISRTPEVTCVV DV SQEDPEV QFNWYDVGVEVHNAKTPREEQFN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEW ESNGQPENNYKTT PVL SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK
6470 gH23 종쇄 S56N N102H 뉴클레오티드	30	gaggttcagtcgtggaggtctggaggccgtgtccacgcctggaggagcctg cg tctcttctgtgcagtaagcggcatgcacctgtccaggccacatgtattgg gtacgtcaggcaccggtaaaggctgtgaatacatcgccgcattatgtctagt ggtataatcatactacgcgcagtcggcgaaggccgttccatctcccggtac aactctaaaacaccgtgtacctgcagatgaactctctgcgtcgccaa gagact gcggttactat tgcgcgcgtattcattatgtcacagtggtgggtgtgggt cagggtactctggtaaccgtctcgacgcgttccatcaaaggccctccgtgttc cctctggcccccgtctccggcgtccaccctccgcgttccatctcccggtc ctggtaaggactactcccgagccgtgacagtgtccctggaaactctggcgcc ctgacccctccggcgtgcacacccctccgtccgcgtgcagtcctccggcgttac tccctgtccctccgtgcacccgtgcctccgcgttccatctcccggtc acctgtaa cgtggaccacaaggccctccaacaccaagggtggacaaggccgg tctaactacgccccctccctgccccctgcctgcctgcaatttctggcgga ccttcctgttccctgttccccc aaaggcccaaggacaccctgtatgatctccgg acccccaagtgtacccctgcctccgcaggaaaggatgaccaaga accagg cagttcaatgttacgtggacccgttccactacccatccgcgttccatctcccggt agagaggaaaggctgacccgcggacttccatccgcgttccatctcccggt caccaggacttgcgtgacccgcggacttccatccgcgttccatctcccggt ctgcctccagcatcgaaaagaccatctccatccgcggccaggcccg ccccagggttacccctgcctccgcaggaaaggatgaccaaga accagg tccctgcctgttccatccgcgttccatctcccggttccatctcccggt gagtccacccggccaggccagaacaactacaacccatccgcgttccatctcccggt agcgcacccgcgttccatccgcgttccatctcccggt caggaaaggccatccgcgttccatctcccggt tacaccaggaaatccctgtccctgcggccatccgcgttccatctcccggt [0511]
6470 gH36 VH	31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMDWVRQAPGKGLEYIGAIYAS GSTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARIHYGNSGGLG QGTLVTVSS
6470 gH36 VH 뉴클레오티드	32	Gaggttcagtcgtggaggtctggaggccgtgtccacgcctggaggagcctg cg tctcttctgtgcagtaagcggcatgcacctgtccaggccacatgtattgg gtacgtcaggcaccggtaaaggctgtgaatacatcgccgcattatgtctagt ggtacgcatacatactacgcgcagtcggcgaaggccgttccatctcccggtac tccagaaaaacaccctgtacctgcagatgaactctctgcgtcgccaa gagact gcggttactat tgcgcgcgtattcattatgttaatagtgggtgggtgtgggt cagggtactctggtaaccgtctcgagc
6470 gH36 종쇄	33	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSHDMDWVRQAPGKGLEYIGAIYAS GSTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARIHYGNSGGLG QGTLVTVSSASTKGPSVF LAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTWSNSGA LTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGP CPCPAPEFLGGPSVFLFP PKD TL MISRTPEVTCVV DV SQEDPEV QFNWYDVGVEVHNAKTPREEQFN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEW ESNGQPENNYKTT PVL SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK

6470 gH36 중쇄 뉴클레오티드	34	gagggttcagctgtggagtctggaggccgggttgcacgcctggaggaggcctg cgctctcttgtgcagtaagccgcacgcctgtccacgcacatgtattgg gtacgtcaggcacccggtaaaaggctgtgaatacatcgccgcatttatgtact ggtagacacatactacgcgagctggccgaaaaggccgttaccatctccgtgac tccagaaaaaacaccctgtacctgcagatgactctctgcgtcgaaagacact gcccgttactatgcgcgcgtattcatatgttaatagtgggggtgtgggg cagggtactctgtttaccgtctcgagccgttacaaaggccctccgtgttc cctctggccctgtctccggccaccctccgagttaccgcgtctgggtgtc ctggtaaaggactactcccccggccgtgacagtgtcttgcacacttggcc ctgacccctccgcgtgcacaccctccctgccttgccttgccttgccttgc [0512]
6470 gH36 VH S56N N102H	35	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSLSSHDMDYWRQAPGKLEYIGAIYAS GNTYYASWAKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHYGHSGGLWG QGTLVTVSS
6470 gH36 VH S56N N102H 뉴클레오티드	36	Gagggttcagctgtggagtctggaggccgggttgcacgcctggaggaggcctg cgctctcttgtgcagtaagccgcacgcctgtccacgcacatgtattgg gtacgtcaggcacccggtaaaaggctgtgaatacatcgccgcatttatgtact ggtaatatactacgcgagctggccgaaaaggccgttaccatctccgtgac tccagaaaaaacaccctgtacctgcagatgactctctgcgtcgaaagacact gcccgttactatgcgcgcgtattcatatgttaatagtggcc cagggtactctgtttaccgtctcgac
6470 gH36 중쇄 S56N N102H	37	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSLSSHDMDYWRQAPGKLEYIGAIYAS GNTYYASWAKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIHYGHSGGLWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVDRDYFPEPVTSWSNSGA LTSGVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTTCNVNDHKPSNTKVDKRVE SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLPPPKPDTLMSRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWVYDGVDEVHNAKTRPREEOFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKG LPSSIEKTISKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSITCLVKGFYPSDIAVEW ESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVHMHEALHNH YTQKSLSLSLGK
6470 gH36 중쇄 S56N N102H 뉴클레오티드	38	gagggttcagctgtggagtctggaggccgggttgcacgcctggaggaggcctg cgctctcttgtgcagtaagccgcacgcctgtccacgcacatgtattgg gtacgtcaggcacccggtaaaaggctgtgaatacatcgccgcatttatgtact ggtaatatactacgcgagctggccgaaaaggccgttaccatctccgtgac tccagaaaaaacaccctgtacctgcagatgactctctgcgtcgaaagacact gcccgttactatgcgcgcgtattcatatgttaatagtggcc cagggtactctgtttaccgtctcgagccgttacaaaggccctccgtgttc cctctggccctgtctccggccaccctccgagttaccgcgtctgggtgtc ctggtaaaggactactcccccggccgtgacagtgtcttgcacacttggcc ctgacccctccgcgtgcacaccctccctgccttgccttgccttgccttgc

		tccctgtcctccgtcgtaaccgtgcctccctccagcctggcaccaagaccta acctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaagggtggacaagcgggtggaa tctaagtacggccctccctgcccccccgcctgcggccctgaatttcggcgg ccttcgttccctgtcccccaaaagcccaaggacacccgtatgtatccccc accccaagaatgtacccgtgtggatggacgtgtccaggaaagatcccgaggtc cagttcaattgtacgtgtggacggcgtggaaatgtacaatgtccaaagcc agagagaaacgttcaactccacatccacccgtgtccgtgctgaccgtgt caccaggactgtcgtaacgcgaaaagacttccacccgtgtccgtgctgacc ctggccctccagcatcgaaaagccatctccaaaggccaggccagccccgg ccccaggactgtacccgttccctgtggacggcgtggaaatgtacaatgtcc tccctgtgttccctgtgtccaggacttccctgtggatgtccgtgaaatgg gagtccaaacggccaggccgagaacaactacaagaccaccccccgtgt agcgcacgttccctgttccctgtacttcgtgtggacaaatgtcccggtgg caggaaggcaacgttccctgtccgtatgtcggcggccctgcacaacc tacacccagaatgtccctgtccctgagccctggcaaa
인간 IGKV1-16 JK4 어셉터 프레임워크	39	DIQMTQSPSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYASSL QSGVPSPRFSGSGSTDFLTISLQPEDFATYYCQQNSYPLTFGGGTKEIK
인간 IGHV1-16 JK4 어셉터 프레임워크 뉴클레오티드	40	Gacatccagatgacccagtctccatctcaactgtctgcattgttaggagacaga gtcaccatcacttgtccggcgagtccaggcatatgtttagccgttt cagcagaacaggaaagccctaaatgtccctgtatgtccgtatcccgatcc caaatgtgggtccatcaagggtcagccgtggcgtggatctggacagatttact ctcaccatcagcagccgtccaggatgtcaacttattactgtccaaac tataatagtacccttcacttcggccggaggacaaatgtggagatcaaa
인간 IGHV3-23 JK4 어셉터 프레임워크 뉴클레오티드	41	EVQLLESGGGVQPGGSSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYFDYWGQTL VIVSS
인간 IGHV3-23 JK4 어셉터 프레임워크 뉴클레오티드	42	Gaggtgcagctgtggaggtctggggaggcttgcacagcctggggggccctg agacttcctgtgcagccctgtggattcaccttagcagctatccatgagctgg gtccggcaggctccaggaaaggctggagtggtctcagctattgtgttagt gtgttagcactacccgtactccggactccgtgaaggccgggtcaccatcc gacaatttccaaacacccgttatctgcataatgtacccgttgagagccgagg acggcgttatattactgtgcgaaatactttactactggggccaaaggctt gtcaccgtctccat
래비트 Fc 인간 68- 140 α-syn	43	GAVVTGVAVAQKTVVEGAGSIAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGLIEDMPVDPD NEAYEMPSEECYQDYEPPEAVEKTVAPSTCSKPTCPPELLGGPSVFIFPPPKD TLMISRTPETVCCVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQNISTIRVV STLMIHQDWLRGEFKCKVHNKALPAPIEKTIKARGQPLEPKVYTMGPPREE LSSRSVSLTCMINGFYPSPDISVWEKNGKAEDNYKTPAVLSDSDGSYFLYSKLS VPTSEWRQGDVFTCSVMEALHNHYTQKSISRSPGK
CDR-L1 X33	44	QASQSVYKNXYLA (X = N 또는 R)
CDR-H2 X56	45	AIYASGXTYASWAKG (X = S 또는 N)
CDR-H3	46	IHYGXSGGL (X = N 또는 H)

[0513]

X102		
6470 토끼 경쇄	47	AIVMTQTPSSKSVAVGDTVTINCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGQPPKQLIY GAS TLASGPSPRFKGSGSGTQFTLTIISDVCCDDAATYYCAGYKGGRNNDGFAFGGGTE VVVKRTPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTG IENSKTPQNSADCTYNLSSLTLLTSTQYNSHKEYTKVTOQGTTSVVOSFNRGDC
6470 토끼 중쇄	48	QSVEESGGRLVTPGTPLLTCTVSGIDLSHDMWYWRQAPGKGLYEIYAIYASG STYVSAWAKGRFTISKTSTVDLKMTSLTTEDTATYFCARIHYGNSSGLWQGTT LTVVSSQPKAPSVEPVLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTN GVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPTVCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSK PTCPPELLGGPSVFIFPPKPDTLMISRTPETVCCVVDVSQDDPEVQFTWYIN NEQVRTARPPPLREQFNSTIRVSTLPIAHQDWLRGEFKCKVHNKALPAPIEK TISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSPDISVWEKNGKAE DNYKTPAVLSDSDGSYFLYSKLSPVSEWRQGDVFTCSVMEALHNHYTQKSIS RSPGK
6470 토끼 Fab 중쇄	49	QSVEESGGRLVTPGTPLLTCTVSGIDLSHDMWYWRQAPGKGLYEIYAIYASG STYYASWAKGRFTISKTSTVDLKMTSLTTEDTATYFCARIHYGNSSGLWQGTT LTVVSSQPKAPSVEPVLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTN GVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPTVCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSK PHHHHHHHHHHH

[0514]

본 발명은 이제 첨부된 도면에 예시된 실시양태를 참조하여 예시로서 더욱 설명될 것이다.

실시예

실시예 1: 인간 알파 시누클레인 단량체 및 피브릴의 발현

인간 알파 시누클레인을 코딩하는 유전자를 합성적으로 생성하고 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 벡터 pMH 10His TEV(CMV 프로모터 포함)로 서브클로닝하여 N-말단 10His-TEV 태그를 갖는 알파 시누클레인을 생성하도록 조작된 벡터를 생성하였다. 생성된 벡터를 제조사의 프로토콜에 따라 Expi293TM 발현 시스템(Invitrogen)을 사용하여 Expi293F 세포로 형질감염시켰다. 알파 시누클레인 단백질은 배양 배지에 축적되었으며, 이로부터 고정

된 금속 이온 친화성 크로마토그래피 히스트랩(HisTrap) 엑셀 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 회수되었다. 컬럼을 25 mM 트리스HCl(TrisHCl), 300 mM NaCl, pH8.0으로 세척하고 단백질을 동일한 버퍼 중의 500 mM 이미다졸의 단계적 구배로 용출시켰다. TEV 프로테아제를 사용하여 10His 태그를 제거하였다. 이어서, 절단된 단백질을 히스트랩 엑셀 컬럼에 재적용하고 흐름에서 절단된 알파 시누클레인을 수집하기 전에 샘플을 농축시키고 탈염시켰다. 알파 시누클레인을 히로드(HiLoad) 26/600 슈퍼텍스 75 컬럼(GE Healthcare)에서 겔 여과에 의해 추가로 정제하고, 프로테우스 노엔도(Proteus NoEndo) 카트리지(Generon)를 통과시켜 내독소를 제거하였다. 정제된 알파 시누클레인은 SEC MALS에 의해 단량체인 것으로 확인되었다(도 1a).

[0519] 야생형(태그 부착되지 않은) 인간 알파 시누클레인은 또한 Expi293F 세포에서 발현되었다. 단백질을 히트랩(HiTrap) Q 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 음이온 교환을 통해 배양 배지로부터 회수하였다. 컬럼을 20 mM 트리스HCl pH 8.0으로 세척하고, 단백질을 염화나트륨 구배를 사용하여 400 mM로 용출시켰다. 분획을 HiPrep 26/10 컬럼(GE Healthcare)을 통과시켜 농축 및 탈염시키고 20 mM 트리스HCl pH 8.0으로 용출시켰다. 단백질을 MonoQ 10/100GL 컬럼을 사용하여 추가로 정제하고 20 mM 트리스HCl pH 8.0에서 염화나트륨 구배로 400 mM로 용출시키고 히로드 26/600 슈퍼텍스 75 컬럼(GE Healthcare) 상에서 겔 여과하고 PBS pH 7.4에서 용출시켰다(도 1b).

[0520] 이 야생형(태그 부착되지 않은) 알파 시누클레인 단량체를 사용하여, 정제된 재조합 알파 시누클레인 단량체(PBS pH7.4 중 9-10 mg/mL)를 10일 동안 연속적으로 보르템프56(Vortemp56) 진탕 인큐베이터(Labnet)에서 1200rpm, 37°C에서 교반함으로써 알파 시누클레인 피브릴을 제조하였다. 피브릴 형성은 JC-1 분석(Lee et al., Biochem. J. 2009, 418, 311-323) 및 용액의 C 푸리에 변환 적외선 분광법에 의해 평가되었다. 피브릴 용액 중의 편입되지 않은 단량체는 초원심분리 및 100 kDa 컷-오프 막을 통과시킨 후 겔 전기영동에 의해 평가되었다. JC-1 반응 > 15, 소량의 가용성 단량체(<5%) 및 1625와 1630 cm⁻¹ 사이의 주요 흡수를 갖는 FTIR 스펙트럼을 갖는 피브릴만이 추가 연구에서 사용되었다(도 2). 제조된 피브릴을 -80°C에서 저장하였다.

실시예 2: 면역화 및 항체 단리

[0522] 다양한 종 및 면역원을 사용하는 많은 면역화 전략이 수행되었다. 항체 6470은 토끼 Fc에 융합된 인간 알파 시누클레인 잔기 68-140을 포함하는 토끼 Fc 융합 단백질(서열 번호 43)로 피하 면역화를 받은 암컷 뉴질랜드 흰 토끼(> 2kg)로부터 유래되었다.

[0523] 면역화를 위한 알파 시누클레인(68-140) 토끼 Fc 융합 단백질을 제조사의 프로토콜에 따라 Expi293™ 발현 시스템(Invitrogen)을 사용하여 Expi293F 세포에서 발현시켰다. 단백질을 맵실렉트슈어(MabSelectSure) 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 상청액으로부터 정제하였다. 컬럼을 50 mM 글리신/나트륨 글리시네이트 pH 8.8 버퍼로 평형화시키고, 동일한 버퍼 중의 0.1 M 시트르산 pH 2.0의 구배로 용출시켰다. 단백질 분획을 2 M 트리스 HCl pH 8.5로 중화시키고, 농축시키고, PBS pH 7.4에서 평형화되고 용출되는 히로드 26/600 슈퍼텍스 200 컬럼(GE Healthcare) 상에서의 겔 여과에 의해 추가로 정제하였다. 토끼는 동일 부피의 완전한 프로인트 애주번트(CFA)에 유화된 500 µg의 융합 단백질을 포함하는 일차 면역화를 받았다. 토끼에게 불완전 프로인트 애주번트(IFAb)를 사용하여 21일 간격으로 2회 부스터 주사를 제공하였으며, 면역화 14일 후 귀로부터 출혈이 있었다. 최종 부스팅 후 14일에 종료가 발생하였으며, 비장, 골수 및 말초 혈액 단핵 세포의 단일 세포 현탁액을 제조하고 -80°C에서 테아 송아지 혈청(FCS) 중의 10% 디메틸 솔ュ시드(DMSO)에 동결하였다.

B 세포 배양

[0525] B 세포 배양은 문현(Tickle et al., 2015. J Biomol Screen: 20 (4), 492-497)에 기재된 방법과 유사한 방법을 이용하여 제조되었다. 간략하게, 면역화된 동물로부터의 립프절 또는 비장세포 유래된 B 세포를 5% CO₂의 분위기에서 37°C에서 7일 동안 10% FCS(Sigma Aldrich), 2% HEPES(Sigma Aldrich), 1% L-글루타민(Gibco BRL), 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액(Gibco BRL), 0.1% β-메르캅토에탄올(Gibco BRL), 1% 활성화된 인간 PBMC 상청액(BSS) 및 X-선 조사된 돌연변이체 EL4 뮤린 흥선종 세포(5×10^4 개/웰)로 보충된 200 µl/웰 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)를 갖는 바-코딩된 96-웰 조직 배양 플레이트에서 웰당 대략 2000-5000개 세포의 밀도로 배양하였다. 면역화된 모든 동물로부터의 B 세포를 사용하여 배양물을 설정하고, 총 대략 1.7×10^9 개의 B 세포를 샘플링하였다.

[0526] 본 발명에 따른 항체인 6470은 웰당 대략 5000개 세포의 밀도로 배양된 활성화된 립프절 유래된 B 세포로부터 생성되었다. 립프절은 항체 발견을 위해 비장세포 이외에 우리에게 새로운 항체를 샘플링하고 확인하기 위한 대

안적 B 세포 공급원을 제공하는 데 사용되었다. 관련 서열을 갖는 항체가 비장이 아닌 림프절로부터 유래된 B 세포로부터 확인되었다. 인간 알파 시누클레인 C-말단 단백질 면역화된 토끼로부터 대략 9.6×10^7 개의 세포를 샘플링하였다.

[0527] 일차 스크리닝

B 세포 배양 상청액에서 인간 알파 시누클레인-특이적 항체의 존재는 표적 항원의 공급원으로서 비오티닐화된 재조합 인간 알파 시누클레인 전장 단량체로 코팅된 Superavidin™ 비드(Bangs Laboratories)를 사용하는 균질 형광 기반 결합 검정을 이용하여 결정되었다. 본원에 기재된 재조합 인간 알파 시누클레인은 3배 몰 과량의 비오틴을 사용하여 비오티닐화되었다. 알파 시누클레인 분자 내에 존재하는 모든 7개의 리신 잔기의 완전한 변형을 피하기 위해 낮은 몰 과량의 비오틴을 사용하였다. 알파 시누클레인 단량체를 비오틴과 함께 40°C에서 밤새 인큐베이션하고, 유리 비오틴을 다음 날 Zeba™ 스핀 탈염 컬럼을 사용하여 제거하였다. 스크리닝은 바코딩된 96-웰 조직 배양 플레이트로부터의 10 μ l의 상청액을 아질렌트 브라보(Agilent Bravo) 액체 핸들러를 사용하여 슈퍼아비딘(Superavidin) 비드(10 μ l/웰)에 고정된 비오티닐화된 재조합 인간 알파 시누클레인 단량체를 함유하는 바코딩된 384-웰 블랙-벽 결합 플레이트로 옮기는 것을 포함하였다. 결합을 염소 항-토끼 IgG Fc γ -특이적 알렉사플루오르647(Alexafluor647) 컨주케이트(Jackson)로 나타내었다. 알파 시누클레인-특이적 IgG를 함유하는 웰을 확인하기 위해 플레이트를 TTP 랩텍 미러볼(TTP Labtech Mirrorball)에서 판독하였다.

[0529] 이차 스크리닝

일차 스크리닝 후, 양성 상청액을 베크만 코울터 바이오맥NXP(Beckman Coulter BiomekNXP) 히트-피킹 로봇을 사용하여 96-웰 바코딩된 마스터 플레이트에 통합시키고 세포 배양 플레이트 내의 B 세포를 -80°C에서 동결시켰다. 이어서 마스터 플레이트를 비오티닐화된 재조합 인간 알파 시누클레인 단량체 또는 비오티닐화된 재조합 인간 알파 시누클레인 피브릴을 사용하여 스트렙트아비딘-포획 ELISA 검정으로 스크리닝하였다. 이는 단량체성 재조합 인간 알파 시누클레인 및 피브릴 재조합 인간 알파 시누클레인 둘 다에 결합하는 웰을 확인하고, Superavidin™ 비드에 대한 표적의 결합을 나타내는 임의의 위양성 웰을 배제시키기 위해 수행되었다. 피브릴의 불용성 특성을 고려할 때, 용액 상태의 단백질과 사용되는 통상의 ELISA 코팅 프로토콜은 선호되지 않았다. 피브릴 구조를 보존하고 스트렙트아비딘으로 사전 코팅된 ELISA 플레이트에서 피브릴의 효율적인 코팅을 용이하게 하기 위해 최소 비오티닐화 프로토콜을 이용하는 것이 결정되었다.

비오티닐화된 재조합 알파 시누클레인 단량체(상기 기술됨)를 PBS에서 50배 과량의 비표지된 재조합 알파 시누클레인과 조합함으로써 본원에 기술된 바와 같이 비오티닐화된 알파 시누클레인 총 피브릴을 생성하였다. 피브릴 형성은 JC1 검정에 의해 확인되었다(Lee et al., Biochem. J. 2009, 418, 311-323).

PBS 중의 비오티닐화된 단량체 또는 비오티닐화된 피브릴을 카보네이트 코팅 베퍼($dH_2O + 0.16\%Na_2CO_3 + 0.3\%NaHCO_3$) 중의 스트렙트아비딘으로 코팅된 384-웰 막시소프(Maxisorp) 플레이트에 포획하였다. 플레이트를 1% w/v PEG/PBS로 차단한 후, 10 μ l/웰의 B 세포 배양 상청액(차단 베퍼로 1:1 희석됨)과 함께 인큐베이션하였다. 이차 HRP-컨주케이션된 염소 항-토끼 IgG Fc 항체(Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch)를 플레이트에 첨가한 후, TMB 기질(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, EMD Millipore; 10 μ l/웰)로 결합을 가시화하였다. 광학 밀도를 바이오텍 시너지(BioTek Synergy) 2 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 630 nM에서 측정하였다. 일차 결합 검정은 640개의 히트를 확인하였고 ELISA 스크리닝 후, 이를 중 491개가 단량체성 재조합 인간 알파 시누클레인 및 피브릴 재조합 인간 알파 시누클레인 둘 다에 결합하는 것으로 나타났다.

재조합 피브릴에 대한 가장 강한 ELISA 결합 신호를 나타내는 B 세포 상청액을 표면 플라즈몬 공명에 의한 추가 분석을 위해 선택하여 재조합 인간 알파 시누클레인 단량체, 재조합 인간 알파 시누클레인 피브릴 및 재조합 마우스 알파 시누클레인 피브릴에서 가장 우수한 오프율(off-rate)을 갖는 것들을 확인하였다. 80개의 상이한 B 세포로부터의 상청액을 시험하였고, 9개의 웰은 재조합 인간 피브릴에 대해 $<1 \times 10^{-5}$ 의 오프율(kd)을 제공하였다. 이를 중 7개는 재조합 마우스 피브릴에 대해 1×10^{-5} 미만의 오프율(kd)을 제공하였고, 2개는 재조합 인간 단량체에 대해 1×10^{-5} 미만의 오프율(kd)을 제공하였다. 가변 영역 회수를 위해 9개의 상청액이 모두 선택되었다.

[0534] 가변 영역 회수

관심 상청액의 선택으로부터 항체 가변 영역 유전자를 회수하기 위해서는, 이종 집단의 B 세포를 함유하는 주어진 웰에서 항원-특이적 B 세포를 확인할 수 있도록 디콘볼루션 단계를 수행해야 했다. 이는 형광 초점 방법을

이용하여 달성되었다(Clargo et al., 2014. Mabs: 6 (1), 143-159). 간단히, 양성 웰로부터의 면역글로불린-분비 B 세포를 (상기 기재된 바와 같이 1:50 혼합물을 사용하여 생성된) 비오티닐화된 재조합 인간 알파 시누클레인 피브릴로 코팅된 스트렙트아비딘 비드(New England Biolabs) 및 염소 항-토끼 Fc γ 단편-특이적 FITC 컨주케이트(Jackson)의 1:1200 최종 희석액과 혼합하였다. 37°C에서 1시간 동안 정적 인큐베이션한 후, 항원-특이적 B 세포는 B 세포를 둘러싸는 형광테의 존재로 인해 확인될 수 있었다. 이어서 올림푸스(Olympus) 현미경을 사용하여 확인된 다수의 이를 개별 B 세포 클론을 에펜도르프(Eppendorf) 마이크로조작기로 취하여 PCR 튜브에 침착시켰다.

[0536]

항체 가변 영역 유전자를 중쇄 및 경쇄 가변 영역-특이적 프라이머를 사용하여 역전사(RT)-PCR에 의해 단일 세포로부터 회수하였다. 가변 영역을 토끼 IgG(VH) 또는 토끼 카파(VL) 포유동물 발현 벡터로 클로닝할 수 있도록 3' 및 5' 말단에 제한 부위를 포함시키는 네스티드(nested) 2° PCR로 2회 라운드의 PCR을 수행하였다. 5개의 상이한 상청액으로부터의 항-알파 시누클레인 항체 유전자가 발현 벡터 내로 성공적으로 클로닝되었다. 중쇄 및 경쇄 구축물을 에피펙타민(ExpiFectamine) 293(Invitrogen)를 사용하여 Expi-293 세포로 공동 형질감염시키고 재조합 항체를 125 ml 엘렌메이어(Erlenmeyer) 플라스크에서 30 ml 부피로 발현시켰다. 5-7일 발현 후, 상청액을 수거하고 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0537]

트랜센트(transient) 상청액의 ELISA 스크리닝

[0538]

이어서, 정제된 항체를 ELISA에 의해 추가로 스크리닝하였다. 비오티닐화된 재조합 인간 알파 시누클레인 단량체 및 피브릴은 카보네이트 코팅 버퍼(dH2O + 0.16%Na₂CO₃ + 0.3% NaHCO₃) 중의 스트렙트아비딘으로 코팅된 384-웰 막시소프 플레이트(ThermoScientific/Nunc) 상에 포획되었다. 또한, 별개의 플레이트를 서열 번호 10(펩티드 PVDPDNEAYE)에 따라 인간 알파 시누클레인의 잔기 117 내지 126에 상응하는 비오티닐화된 웨프티드로 코팅하여 트랜센트가 분자 상의 이 영역 또는 상이한 영역에 결합하는지를 점검하였다. 플레이트를 1% w/v PEG/PBS로 차단한 다음 정제된 트랜센트 상청액의 여러 희석액과 함께 인큐베이션하였다. 이차 HRP-컨주케이션된 염소 항-토끼 IgG Fc 항체(Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch)를 플레이트에 첨가한 후, TMB 기질(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, EMB Millipore; 10 μl/웰)로 결합을 가시화하였다. 광학 밀도를 바이오텍 시너지 2 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 630 nM에서 측정하였다. 6470에 대한 데이터는 도 3에 도시되어 있다. 알 수 있는 바와 같이, 6470은 단량체성 재조합 인간 알파 시누클레인 및 피브릴 재조합 인간 알파 시누클레인 둘 다에 대한 결합을 나타내지만, 117-126 웨프티드에 대한 결합은 나타내지 않는다.

[0539]

이어서, 항체(IgG)를 실시에 7에서 후술하는 바와 같은 세포 기반 응집 검정으로 시험하였다. 이어서, 세포 검정에서 활성을 나타내는 모든 항체의 결합 동역학은 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정되었다. 항체를 각각 IgG 및 Fab로 시험하여 각각 결합활성(avidity)(이가 결합) 및 친화도(일가 결합)를 결정하였다.

[0540]

실시예 3: 항체 특징규명

[0541]

비아코어 동역학

[0542]

상호작용 동역학을 비아코어 T200 기기에서 표면 플라즈몬 공명 기술을 이용하여 결정하였다. 본원에 기재된 바와 같이 제조된 재조합 전장 인간 알파 시누클레인 단량체, 정제된 재조합 인간 알파 시누클레인 피브릴 및 정제된 재조합 마우스 알파 시누클레인 피브릴을 포함하는 3개의 상이한 리간드가 각각 아민-커플링 화학을 이용하여 CM5 침 표면의 3개의 상이한 유동 셀 상에 고정되었다. 3개의 리간드를 10 mM NaAc, pH 3.5에서 제조하고, 10 μl/분의 유속으로 각각 알파 시누클레인 단량체의 경우 약 30 반응 단위(RU), 인간 알파 시누클레인 피브릴의 경우 약 40 RU, 및 마우스 알파 시누클레인 피브릴의 경우 약 300 RU의 고정화 수준에 도달하도록 별도의 유동 셀 표면에 고정시켰다. 버퍼 HBS-EP+(GE Healthcare Bio-Sciences AB)를 리간드 고정화 및 동역학 검정 모두를 위한 러닝 버퍼로 사용하였다. 이어서, 3개의 리간드에 대한 모노클로날 6470 토끼 IgG1(서열 번호 47 및 48을 포함) 및 모노클로날 6470 토끼 Fab(서열 번호 47 및 49를 포함)의 결합을 측정하였다. 모노클로날 IgG 또는 Fab 항체는 3분의 접촉 시간 및 30분의 해리 시간을 갖는 3개의 유동 셀에 대해 100 μl/분의 유속으로 800 nM에서 0.195 nM까지의 7개의 상이한 농도로 주입되었다. 표면을 10 μl/분으로 90초 동안 50 mM HC1의 1회 주입 및 10 μl/분으로 60 초 동안 50 mM HC1의 또 다른 주입으로 재생시켰다. 데이터는 IgG 포맷에 대해 가정된 벌크 기여도 없음(RI=0) 및 글로벌 Rmax를 갖는 이가 분석물 모델, 및 유연한 벌크 기여도(로컬 RI) 및 글로벌 Rmax를 갖는 1:1 모델을 사용하여 비아코어 T200 평가 소프트웨어(버전 3.0)를 사용하여 분석되었다.

[0543]

고정된 표적에 대한 IgG 및 Fab 결합 둘 다의 동역학 값이 표 2에 제시된다. IgG 포맷은 해리 상수 KD가 인간 피브릴에 대해 10배 초과로 낮기 때문에 인간 알파 시누클레인 단량체에 대한 친화도와 비교하여 인간 알파 시

누클레인 피브릴에 대한 명백한 선택적 친화도를 나타내었다.

[0544]

[표 2]

샘플	인간 단량체			인간 피브릴			마우스 피브릴		
	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)
6470 토끼 Fab									
	1.80E+06	2.67E-02	14.79	1.83E+06	2.25E-02	12.35	1.38E+06	2.43E-02	17.65
6470 토끼 IgG1									
	4.75E+06	1.42E-02	2.98	1.76E+06	4.78E-04	0.27	8.89E+05	3.07E-04	0.34

[0545]

베타 시누클레인에 대한 결합

[0546]

인간 알파 시누클레인에 대해 생성된 항체의 인간 베타 시누클레인에 대한 결합은 rPeptide 베타 시누클레인을 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 시험되었다. 1 마이크로그램의 시누클레인을 4-12% 비스/트리스(Bis/Tris) 겔에서 작동시키고 PVDF 막 상에 블로팅하였다. 막은 3% BSA 및 0.1% 트윈20(Tween20)을 갖는 PBS에서 차단되었다. 6470 토끼 IgG1 항체를 차단된 블롯에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, PBS, 0.1% 트윈20으로 세척하고, 이차 항체-HRP 컨주케이트(항 토끼 H+L HRP 컨주케이트, Bethyl, A120-101P)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 블롯을 0.1% 트윈20을 갖는 PBS, PBS 및 물로 광범위하게 세척하였다. ECL 웨스턴 블롯 기질(Pierce)을 첨가한 후 화학 발광을 측정하였다. 도 4a 레인 3에 도시된 바와 같이, 6470 토끼 IgG1은 인간 베타 시누클레인에 결합하지 않는다.

[0547]

에피토프 매팅

[0548]

NMR

[0549]

인간 알파 시누클레인을 pET28a 발현 벡터로 클로닝하여, 단백질을 어떠한 태그도 없이 발현시켰다. 구축물을 이. 콜리 BL21(DE3) 세포(Stratagene)로 형질전환시키고, 중수소 산화물(D_2O)의 존재 및 부재하에 C^{13} 표지된 DL-글루코스 및 N^{15} 표지된 황산암모늄을 갖는 한정된 배지에서 세포를 성장시켰다. 300 mM IPTG를 사용하여 OD600 nM = 1에서 발현을 유도하고 배양물을 30°C에서 4시간 동안 인큐ベ이션하였다. 세포를 펠렛화시키고 100 mL 용해 버퍼(20 mM 트리스/HCl pH 8.0, 25 단위 벤조나제(Merck Millipore), 완전한 EDTA 유리 프로테아제 억제제 카테일(2개의 정제, Roche) 및 10 mg 리소자임(Sigma))에서 3회의 동결-해동 사이클에 의해 펠렛화하고 용해시켰다. 용해물을 18,000 rpm에서 원심분리하여 정화하고, 정화된 용해물을 0.22 μm 필터(Stericup, Millipore)를 통과시켰다. 멸균 용해물을 20 mM 트리스/HCl pH 8.0, 5CV로 평형화된 MonoQ 10/100GL(GE Healthcare)에 로딩하고, 단백질을 동일한 버퍼 중의 500 mM NaCl로 구배로 용출시켰다. 20 mM 트리스/HCl pH 8.0에 5배 희석한 후, MonoQ 10/100GL 컬럼에서 가장 순수한 분획의 추가 정제를 반복하였다. 가장 순수한 분획을 모으고, 10 kDa MWCO 원심 농축기(Centrifprep, Millipore)로 농축하고, 히로드 26/600 슈퍼텍스 75 컬럼(GE Healthcare)에서 크기 배제로 정제하고, 25 mM 인산나트륨 버퍼, 100 mM NaCl(pH 6.4)에서 용출시켰다. 슈퍼텍스 75 컬럼으로부터 분획을 모으고, 아지드화나트륨(0.02% 최종 농도) 및 AEBSF(10 μM 최종 농도)를 첨가하였다. 최종 단백질 농도는 대략 5 mg/mL였다.

[0550]

토끼 6470 Fab(서열 번호 11의 VL 및 서열 번호 13의 VH를 포함하고 또한 서열 번호 47 및 49를 포함함)를 CHO SXE에서 His 태그 부착된 실체로서 발현시키고, 상청액으로부터 His-태그 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다(상청액으로부터 단백질을 히스트랩 액셀(GE Healthcare)에 결합시키고 이를 PBS 중의 250 mM 이미다졸로 용출시킴). 용출 풀을 히트랩 감마빈드 플러스 세파로스(HiTrap GammaBind Plus Sepharose)(GE Healthcare)에 로딩하고, 컬럼을 PBS로 세척하고 단백질을 0.1 M 글리신-HCl pH 2.6으로 용출시키고 pH를 0.75 M 인산나트륨 pH 9로 pH 6으로 조정하였다. 용출된 Fab-His 단백질을 히프렙(HiPrep) 26/10 탈염 컬럼에서 NMR 버퍼(25 mM 인산나트륨 pH 6.4, 100 mM NaCl)로 버퍼 교환하였다. Fab-His 단백질 분획을 농축시키고 프로테아제 억제제 AEBSF(10 μM 최종 농도) 및 아지드화나트륨(0.02% 최종 농도)을 첨가하고 밀렉스(Millex) GV 0.22 μm 필터 상에서 필터 멸균하였다. 결정학을 위해, 농축된 6470 Fab-His를 평형화된 히로드 26/600 슈퍼텍스 75(GE

Healthcare) 컬럼 상에서 제조용 크기 배제 크로마토그래피로 정제하고 25 mM 인산나트륨 pH 6.4, 100 mM NaCl로 용출시켰다. 최종 풀의 순도는 UPLC-SEC에서 >99% 순도로 시험되었다. 최종 풀을 멸균을 위해 밀렉스 GV 0.22 Mm 필터를 통과시켰다.

a-시누클레인의 골격 할당

[0553] NMR 샘플은 전형적으로 5 mm 시게미(Shigemi) 튜브에서 360 μm $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 표지되거나 430 μm $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 표지된 인간 a-시누클레인의 단백질 농도를 갖는 350 μl 부피였다. 버퍼 조건은 100 mM NaCl, 25 mM 인산나트륨 pH 6.4, 10 μM AEBSF, 0.02% NaN₃이었다. 모든 실험은 극저온 냉각 프로브가 장착된 600 MHz 브루커(Bruker) AVIII 또는 800 MHz 브루커 AVII 분광기에서 20°C에서 기록되었다. 단백질 내 잔기의 골격 NMR 신호들, H_N(i)-N(i)-N(i±1) 사이의 순차적 연결은, 중분당 8 스캔 및 1.5 s 이완 지연과 함께, 각각 ^{15}N , ^{15}N 및 ^1H 치수에서 28, 28 및 10 ppm의 스펙트럼 폭 및 117 (F1), 117 (F2) 및 140 (F3) ms의 획득 시간으로 기록되는, 3D (H)N(CA)NNH 실험을 이용하여 이루어졌다((Weisemann et al., 1993 3D Triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and 15N resonances in 15N- and 13C-labelled proteins. J. Biomol. NMR 3). 비-균일 샘플링은 10%의 샘플링 밀도(40000 하이퍼-컴플렉스 포인트 중 4000)로 이용되어 총 획득 시간은 2.75일이었다. 순차적 연결이 확인되었고 잔기 유형은 TROSY-HNCA(Grzesiek and Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440; Salzmann et.al., 1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 13585-90) 및 TROSY-HNCACB(Wittekind and Mueller, 1993 HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. J. Magn. Reson. Ser. B 101, 201-205; Salzmann et.al., 1999. TROSY-type Triple Resonance Experiments for Sequential NMR Assignment of Large Proteins. J. Am. Chem. Soc. 121, 844-848) 실험을 이용하여 확인되었다. TROSY-HNCA 실험은 각각 ^{13}C , ^{15}N 및 ^1H 치수에서 23, 28, 10 ppm의 스펙트럼 폭 및 12.1 (F1), 21.7 (F2) 및 100 (F3) ms의 획득 시간으로 기록되고(중분당 8 스캔, 1.5 s 이완 지연, 1일 총 획득 시간), TROSY-HNCACB는 각각 ^{13}C , ^{15}N 및 ^1H 치수에서 56, 28 및 10 ppm의 스펙트럼 폭 및 8.2 (F1), 21.7 (F2) 및 100 (F3) ms의 획득 시간으로 기록되었다(중분당 8 스캔, 1.5 s 이완 지연, 1.7일 총 획득 시간). 골격 카르보닐 할당은 각각 ^{13}C , ^{15}N 및 ^1H 치수에서 10, 29, 10 ppm의 스펙트럼 폭 및 80 (F1), 21.7 (F2) 및 150 (F3) ms의 획득 시간으로 기록된 TROSY-HNCO 스펙트럼(Grzesiek and Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440; Salzmann et.al., 1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 13585-90)으로부터 얻어졌다(중분당 8 스캔, 1.5 s 이완 지연). 비-균일 샘플링은 15%의 샘플링 밀도(8050 하이퍼-컴플렉스 포인트 중 1208)로 이용되어 총 획득시간은 19시간이었다. NMR 스펙트럼은 NMRPipe(Delaglio et al., 1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR 6, 277-93)를 사용하여 처리되었으며 선형 예측은 질소에서 유효 획득 시간을 최대 1배 연장하는 데 이용되었다. 비-균일 샘플링된 데이터는 하버드 반복 소프트 임계값 방법(Hyberts et al., 2012)을 이용하여 재구성되었으며, 데이터는 다음 푸리에(Fourier) 수로 재구성되어 간접 획득 시간을 최대 60%까지 증가시켰다. 스파키(Sparky)(Goddard and Kneller, D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco)를 사용하여 데이터 분석을 수행하여 잔기(프롤린 잔기 및 N-말단 메티오닌 제외)의 99%에 상응하는 133개 잔기의 아미드 양성자 및 질소 공명을 할당하였다.

[0554] 6470 Fab의 결합 부위의 매핑은 10% 몰 과량의 비표지된 6470 Fab를 함유하는 $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 표지된 인간 알파 시누클레인의 150 μM 샘플을 사용하여 수행되었다. 알파 시누클레인의 골격 할당을 위해 상기 기재된 바와 동일한 버퍼에서 샘플을 제조하였다. ^1H , ^{15}N 및 ^{13}C 화학적 쉬프트 변화는 알파 시누클레인/Fab 복합체에 기록된 TROSY-HNCO(Grzesiek and Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440; Salzmann et.al., 1998. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 13585-90) 스펙트럼과 유리 알파 시누클레인에 기록된 동등한 대조군 스펙트럼의 비교에 의해 결정되었다. 유리 알파 시누클레인의 대조군 TROSY-HNCO 실험은 각각 ^{13}C , ^{15}N , 및 ^1H 치수에서 10, 28 및 10 ppm의 스펙트럼 폭 및 80 (F1), 22 (F2) 및 150 (F3) ms의 획득 시간으로 기록되었다(중분당 16 스캔, 1.5 s 이완 지연). 비-균일 샘플

링은 25%의 샘플링 밀도(8050 하이퍼-컴플렉스 포인트 중 2013)로 이용되어 총 획득 시간은 2.7일이었다. 알파 시누클레인/Fab 복합체의 TROSY-HNCO 실험은 각각 ^{13}C , ^{15}N , 및 ^1H 치수에서 10, 28 및 10 ppm의 스펙트럼 폭 및 80 (F1), 21.7 (F2) 및 80 (F3) ms의 획득 시간으로 기록되었다(증분당 32 스캔, 1.5 s 이완 지연). 비-균일 샘플링은 25%의 샘플링 밀도(4477 하이퍼-컴플렉스 포인트 중 1119)로 이용되어 총 획득 시간은 2.8일이었다. NMR 스펙트럼은 NMRPipe(Delaglio et al., 1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR 6, 277-93)를 사용하여 처리되었으며 NUS 데이터의 재구성은 mddnmr을 이용하여 수행되었다(Analysis of non-uniformly sampled spectra with Multi-Dimensional Decomposition. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 59, p 271-292). 질소 치수의 유효 획득 시간은 데이터 재구성 동안 최대 1배까지 증가되었다.

[0555] 화학적 쉬프트 변화는, 카르보닐 화학적 쉬프트를 포함하기 위해 조합된 화학적 쉬프트 변화($\Delta \delta$)를 계산하는데 사용된 수학식의 변형을 제외하고는, 본질적으로 이전에 기재된 바와 같이((Veverka et al., 2008 Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. Oncogene 27, 585-95) 최소 쉬프트 접근법((Williamson et al., 1997 Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. Biochemistry 36, 13882-9)을 이용하여 분석하여, 하기 수학식을 생성하였다:

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

[0556]

[0557] 상기 식에서, $\Delta \delta \text{HN}$, $\Delta \delta \text{N}$ 및 $\Delta \delta \text{C}$ 는 각각 ^1H , ^{15}N 및 ^{13}C 화학적 쉬프트의 차이이다. αN 및 αC 는 아미드 양성자, 질소 및 카르보닐 화학적 쉬프트의 화학적 쉬프트 범위의 차이를 설명하기 위해 사용된 각각 0.2 및 0.35의 스케일링 계수에 해당한다.

[0558]

알파 시누클레인 상의 Fab 결합 부위(에피토프)를 확인하기 위해, 조합된 최소 쉬프트 대 단백질 서열의 히스토그램을 사용하여 상당히 교란된 신호를 함유하는 알파 시누클레인의 영역을 밝혔다. 개별 아미노산에 대한 조합된 화학적 쉬프트 변화의 크기가 모든 아미노산에 대한 조합된 화학적 쉬프트 변화의 평균 + 그 평균으로부터 1 표준 편차의 임계값을 초과하는 경우, 이를 잔기는 Fab 결합 부위에서 가능한 접촉 잔기로서 추가 평가를 위해 선택되었다.

[0559]

[0559] 상당히 교란된 잔기는 최소 쉬프트가 모든 계산된 쉬프트의 평균 + 1 표준 편차보다 큰 것으로 확인되었다. Fab에 의해 결합된 잔기를 확인하기 위해 4개의 상이한 임계값이 적용되었다. 결합 부위에 관여되는 잔기는 하기와 같이 염격성이 증가함에 따라 점수가 매겨진다: 최소 쉬프트가 모든 계산된 쉬프트의 평균 + 1 표준 편차를 초과하는 것(>0.018925); 최소 쉬프트가 모든 계산된 쉬프트의 평균 + 2 표준 편차를 초과하는 것(>0.032049); 최소 쉬프트가 모든 계산된 쉬프트의 평균 + 3 표준 편차를 초과하는 것(>0.045174); 최소 쉬프트가 모든 계산된 쉬프트의 평균 + 4 표준 편차를 초과하는 것(> 0.058299). 이 분석에서 프롤린 잔기는 아미드 양성자를 함유하지 않으므로 확인될 수 없다.

[0560]

따라서, 6470 Fab에 대한 에피토프는 염격성이 증가함에 따라 모든 계산된 쉬프트의 평균 + 1 표준 편차: D121, N122, E123, A124, Y125, E126, M127, S129, E130, Y133, Q134, D135 및 Y136; 모든 계산된 시프트의 평균 + 2 표준 편차: E123, A124, Y125, E126, M127, S129, E130, D135 및 Y136; 모든 계산된 시프트의 평균 + 3 표준 편차: Y125, M127, S129, 및 D135; 모든 계산된 쉬프트의 평균 + 4 표준 편차: M127, S129 및 D135로 정의된다.

[0561]

도 4b에 도시된 바와 같이, 항체 6470은 NMR 연구에 의해 인간 알파 시누클레인(서열 번호 10)의 적어도 하기 잔기(평균 + 3 SD) Y125, M127, S129 및 D135에 결합하고 또한 모든 하기 잔기(평균 + 1 SD) D121, N122, E123, A124, E126, E130, Y133, Q134 및 Y136에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[0562]

웹티드 매핑

[0563]

6470에 의해 결합되는 에피토프의 추가 특징규명은 인간 알파 시누클레인의 C-말단 영역을 대표하고 그를 포함하는 짧은(전형적으로 9-mer 또는 10-mer) 웹티드를 사용하여 수행되었다. 이들을 경쟁적 표면 플라즈몬 공명 검정에 사용하여 비아코어 칩 상에 고정된 단량체성 알파 시누클레인 또는 사전 형성된 알파 시누클레인 피브릴

에 대한 항체의 결합을 억제할 수 있는지를 시험하였다. 이어서, 정확한 에피토프를 확인하기 위해 최대 수준의 억제를 나타내는 웨티드를 항체와의 공동 결정화 연구를 위해 선택하였다.

[0564] 웨티드는 웨티드 프로테인 리씨치 엘티디.(Peptide Protein Research Ltd., Bishop's Waltham, U.K.)에 의해 애씨턴 및 쉐파드 방법(Atherton, E.; Sheppard, R.C. (1989). Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press)에 따라 Fmoc 고체상 웨티드 화학에 의해 합성되었다. 아미노 및 카르복실기가 각각 유리된 상태인 α-시누클레인의 N-말단 및 C-말단을 나타내는 웨티드의 경우를 제외하고는 N 및 C 웨티드 말단은 각각 아세틸 및 아미드기로 캡핑되었다. 웨티드 스톡 용액을 DMSO에서 10 mM로 제조하였다. 전체 웨티드 목록은 표 3에 제시된다.

[0565] [표 3]

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

[0566]

[0567] 재조합 인간 알파 시누클레인 단량체 및 사전 형성된 알파 시누클레인 피브릴을 비아코어 3000 기기(GE Healthcare)를 사용하여 CM5 칩 상에 고정시켰다. 10 μl/분의 유속으로 50 mM N-히드록시숙신이미드 및 200 mM 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이이미드의 신선한 1:1(v/v) 혼합물 100 μl를 주입하여 카르복시메틸 텍스트란 표면을 활성화시킨 후(러닝 버퍼로서 HBS-EP(GE Healthcare)), 분리된 유동 셀에 10 mM 아세테이트 pH 5.0 중 5 μM의 단량체 및 피브릴 100 μl를 주입함으로써 커플링을 달성하였다. 참조 유동 셀을 동일한 방식으로 활성화시킨 후, 모든 유동 셀 표면을 50 μl 펄스의 1 M 에탄올아민 HCl pH 8.5로 불활성화시켰다.

[0568]

웨티드 용액을 러닝 버퍼에서 100 μM로 제조하고, 웨티드 블랭크 대조군을 러닝 버퍼에서 DMSO의 100분의 1의 희석률로 제조하였다. 6470 토끼 Fab(서열 번호 47 및 49를 포함)의 용액을 러닝 버퍼에서 50.5 nM로 제조한 후 198 μl를 2 μl의 블랭크 대조군 또는 희석된 웨티드와 사전 인큐베이션하여 50 nM Fab와 1 μM 웨티드 또는 대조군의 최종 혼합물을 수득하였다. 30 μl의 혼합물을 10 μl/분으로 주입하고 주입 종료 5초 전에 보고 포인트를 기록함으로써 각 샘플에 대해 센소그램을 기록하였다. 침을 각각의 사이를 말기에 40 mM HCl의 2회의 10 μl 주입 및 5 mM NaOH의 1회 주입에 의해 재생시켰다. 대조군 사이클은 웨티드 사이클과 교대되었다.

[0569]

각각의 웨티드의 억제 정도는 인접한 대조군 사이클의 평균과 비교하여 보고 포인트에서 측정된 반응 단위의 변화 퍼센트로 계산되었다.

[0570]

각각의 알파 시누클레인 웨티드의 억제 수준은 도 5에 도시되어 있다. 알파 시누클레인 단량체 또는 피브릴에 대한 6470 Fab의 상당한 억제는 3개의 웨티드: AS121-130, AS123-132 및 AS125-134에서만 관찰되었으며, 가장 높은 수준의 억제는 각각 단량체 및 피브릴에 대한 항체의 결합에 대해 37% 및 54%로 AS123-132에 대해 관찰되었다. 약간 낮은 수준의 억제는 웨티드 AS125-134에 대해 각각 34% 및 52%로 수득되었으며, 에피토프의 주요 성분이 잔기 125 내지 132를 포함한다는 것을 나타낸다. 웨티드 AS121-130은 각각 20% 및 27%의 낮은 수준으로 억제하였으며, 3개의 웨티드 모두에 공통인 잔기: 125 내지 130가 에피토프에 가장 많이 기여한다는 것을 제시한다.

[0571]

6470 항체의 에피토프가 적어도 서열 YEMPSEEG를 포함하는 것으로 나타났으므로, AS123-132 웨티드가 6470 Fab 와의 공동 결정화 연구에서 조사되었다.

[0572]

X-선 결정학

[0573]

복합체를 제조하기 위해, 대략 10 mg/mL의 정제된 6470 토끼 Fab 1 ml를 1:2의 Fab:웨티드 몰비로 알파 시누클레인 웨티드 123-132(EAYEMPSEEG)와 혼합하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 결정 성장에 적합한 조

건은 상업적으로 이용 가능한 결정화 스크린(Qiagen)을 사용하여 시팅 드롭(sitting drop) 증기 확산 방법에 의해 확인되었다. 회절 품질 결정을 생성하기 위해, 행잉 드롭(hanging drop) 증기 확산 방법이 이용되었다.

[0574] 6470 Fab-펩티드 123-132 복합체의 경우, 1 μl의 단백질 용액을 1.6 M 황산암모늄 및 0.1 M 헤페스(Hepes) 버퍼 pH 7.5를 함유하는 1 μl의 저장 용액과 혼합하였다. 결정을 수거하고 1.6 M 황산암모늄, 0.1 M 헤페스 버퍼 pH 7.5 및 20% 글리세롤을 함유하는 동결보호제 용액을 간단히 통과시킨 후 액체 질소에 급속 동결시켰다. 결정을 수거하고 0.2 M 황산암모늄 및 35%(v/v) 폴리에틸렌 글리콜 8000을 함유하는 동결보호제 용액을 간단히 통과시킨 후 액체 질소에 급속 동결시켰다.

[0575] 2.9 Å까지의 회절 데이터는 다이아몬드 신크로트론(Diamond Synchrotron, Didcot, Oxfordshire, UK)의 린라인 i04-1에서 6470 Fab-펩티드 123-132의 단결정으로부터 수집되었으며, 모스플름(Mosflm), 에임리스(Aimless) 및 트런케이트(Truncate)를 사용하여 처리되었다. 복합체의 구조는 검색 모델로서 인-하우스 Fab의 좌표를 사용하여 페이저(Phaser)로 분자를 교체함으로써 해결되었다.

[0576] 리파인먼트(Refinement) 및 모델 빌딩의 사이클은 모든 리파인먼트 통계가 두 모델에 대해 수렴될 때까지 CNS(Brunger et al., (2007) Nature Protocols 2, 2728-2733) 및 COOT(Emsley et al., (2004) Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60, 2126-2132)를 사용하여 수행되었다. 모델 기하학은 몰프로비티43(Molprobity43)을 사용하여 검증되었다. 분자 시각화는 피몰44(Pymol44)로 생성되었다. 하기에 기재된 에피토프 정보는 Fab/펩티드 접촉 표면에서 4 Å 거리 내의 원자를 고려함으로써 도출되었다. 데이터 수집 및 리파인먼트 통계는 표 4a 및 표 4b에 제시된다.

[0577] [표 4a]

구조	VR6470 Fab-펩티드 123-132
공간 그룹	P 3 ₁ 2 1
셀 치수	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.78, 111.78, 71.93
α , β , γ (°)	90.00, 90.00, 120.00
해상도 (Å)	30.00 - 2.90 (3.08- 2.90)
<i>R</i> _{merge}	0.07 (0.36)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	17.0 (5.1)
완결성 (%)	99.9 (100)
증복성	9.8(10.2)

[0578]

[표 4b]

리파인먼트	VR6470 Fab-펩티드 123-132
해상도 (Å)	30.00 - 2.90
반사수	11762
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.2587/0.3192
원자수	
단백질	3259
물	0
리간드	30
<i>B</i> -계수	
펩티드	81.8
Fab	67.4
R.m.s. 편차	
결합길이 (Å)	0.005
결합각 (°)	1.125

[0580]

[0581] 팔호 안의 값은 고해상도 셀을 나타낸다. $R_{sym} = \Sigma |I - \langle I \rangle| / \Sigma(I)$, 여기서 *I*는 관찰된 통합 강도이고, $\langle I \rangle$ 는 다중 측정에서 수득된 평균 통합 강도이며, 합산은 모든 관찰된 반사에 대한 것이다.

$R_{work} = \Sigma |F_{obs}| - k|F_{calc}| / \Sigma |F_{obs}|$, 여기서 *F*_{obs} 및 *F*_{calc}는 각각 관찰 및 계산된 구조적 계수이다. *R*_{free}는 무작위로 선택되고 리파인먼트 계산에서 생략된 반사 데이터의 5%를 사용하여 *R*_{work}로 계산된다.

[0582] 중쇄 및 경쇄 잔기와 펩티드 사이의 주요 접촉은 표 5에 제시된다.

[0583]

[표 5]

쇄	잔기 (서열 번호 13)	원자	쇄	펩티드 아미노산	펩티드 표적 원자	거리 (Å)
H	96 (HIS)	NE2 [N]	A	125(TYR)	CD1 [C]	3.93
H	96 (HIS)	CD2 [C]	A	125(TYR)	CD1 [C]	3.93
			A	125(TYR)	CE1 [C]	3.69
H	99(ASN)	CB [C]	A	125(TYR)	CD2 [C]	3.34
H	99(ASN)	N [N]	A	125(TYR)	CD2 [C]	3.57

[0584]

H	99(ASN)	CB [C]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.85
H	96 (HIS)	CA [C]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.85
H	96 (HIS)	CB [C]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.93
H	97(TYR)	N [N]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.81
H	99(ASN)	CA [C]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.99
H	98(GLY)	N [N]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.42
H	98(GLY)	CA [C]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.91
H	98(GLY)	C [C]	A	125(TYR)	CE2 [C]	4
H	99(ASN)	N [N]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.12
H	96 (HIS)	CA [C]	A	125(TYR)	CZ [C]	3.5
H	96 (HIS)	CB [C]	A	125(TYR)	CZ [C]	3.96
H	96 (HIS)	C [C]	A	125(TYR)	CZ [C]	3.79
H	97(TYR)	N [N]	A	125(TYR)	CZ [C]	3.32
H	98(GLY)	N [N]	A	125(TYR)	CZ [C]	3.72
H	96 (HIS)	CA [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.19
H	97(TYR)	N [N]	A	125(TYR)	OH [O]	2.32
H	97(TYR)	C [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.64
H	98(GLY)	N [N]	A	125(TYR)	OH [O]	3.1
H	97(TYR)	CG [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.51
H	97(TYR)	CE1 [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.86
H	97(TYR)	CA [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.19
H	97(TYR)	CB [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.38
H	97(TYR)	CD1 [C]	A	125(TYR)	OH [O]	2.84
H	32(ASP)	OD1 [O]	A	126(GLU)	CA [C]	3.34
			A	126(GLU)	CB [C]	3.78
H	52(ALA)	CB [C]	A	126(GLU)	CG [C]	3.92
H	32(ASP)	OD1 [O]	A	126(GLU)	CG [C]	3.16
			A	126(GLU)	CD [C]	3.47
H	52(ALA)	N [N]	A	126(GLU)	OE2 [O]	3.82
H	52(ALA)	CB [C]	A	126(GLU)	OE2 [O]	3.92
H	32(ASP)	OD1 [O]	A	126(GLU)	OE2 [O]	2.99
H	51(TYR)	CB [C]	A	126(GLU)	OE2 [O]	3.93
H	32(ASP)	CG [C]	A	126(GLU)	OE2 [O]	3.89
H	51(TYR)	CD2 [C]	A	126(GLU)	OE2 [O]	3.7
H	32(ASP)	OD1 [O]	A	126(GLU)	C [C]	3.2
H	32(ASP)	CG [C]	A	126(GLU)	C [C]	3.72
H	32(ASP)	OD2 [O]	A	126(GLU)	C [C]	3.79
H	32(ASP)	OD1 [O]	A	126(GLU)	O [O]	2.4
H	32(ASP)	CG [C]	A	126(GLU)	O [O]	2.8

[0585]

H	32(ASP)	OD2 [O]	A	126(GLU)	O [O]	2.73
H	51(TYR)	CD2 [C]	A	126(GLU)	O [O]	3.87
H	51(TYR)	CE2 [C]	A	126(GLU)	O [O]	3.96
			A	127(MET)	CB [C]	3.99
			A	127(MET)	C [C]	3.85
H	51(TYR)	CD2 [C]	A	127(MET)	O [O]	3.1
H	51(TYR)	CE2 [C]	A	127(MET)	O [O]	3.03
H	57(TYR)	OH [O]	A	129(SER)	CB [C]	3.05
H	57(TYR)	CZ [C]	A	129(SER)	CB [C]	3.96
H	57(TYR)	OH [O]	A	129(SER)	OG [O]	2.78
H	57(TYR)	CE2 [C]	A	129(SER)	OG [O]	3.79
H	57(TYR)	CZ [C]	A	129(SER)	OG [O]	3.7
쇄	잔기 (서열번호 11)	원자	쇄	펩티드 아미노산	펩티드 표적 원자	거리 (옹스트롬)
L	34(TYR)	OH [O]	A	123(GLU)	CD [C]	3.63
			A	123(GLU)	OE1 [O]	3.46
L	34(TYR)	CE1 [C]	A	123(GLU)	OE2 [O]	3.68
L	34(TYR)	CZ [C]	A	123(GLU)	OE2 [O]	3.74
L	34(TYR)	OH [O]	A	123(GLU)	OE2 [O]	3.01
			A	125(TYR)	CE2 [C]	3.89
L	34(TYR)	CE2 [C]	A	125(TYR)	CE2 [C]	3.85
			A	125(TYR)	CZ [C]	3.59
L	34(TYR)	CD2 [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.66
L	34(TYR)	CE2 [C]	A	125(TYR)	OH [O]	3.39
L	93(TYR)	CE2 [C]	A	127(MET)	CB [C]	3.75
L	93(TYR)	CZ [C]	A	127(MET)	CB [C]	3.62
L	93(TYR)	OH [O]	A	127(MET)	CB [C]	3.05
L	93(TYR)	CE2 [C]	A	127(MET)	CG [C]	3.4
L	93(TYR)	CZ [C]	A	127(MET)	CG [C]	3.69
L	93(TYR)	OH [O]	A	127(MET)	CG [C]	3.67
L	34(TYR)	CE2 [C]	A	127(MET)	CG [C]	3.95
L	34(TYR)	CZ [C]	A	127(MET)	SD [S]	3.49
L	34(TYR)	OH [O]	A	127(MET)	SD [S]	3.16
L	34(TYR)	CE2 [C]	A	127(MET)	SD [S]	3.05
L	34(TYR)	CZ [C]	A	127(MET)	CE [C]	3.72
L	34(TYR)	OH [O]	A	127(MET)	CE [C]	3.75
L	93(TYR)	CE2 [C]	A	127(MET)	CE [C]	3.22
L	30(TYR)	CG [C]	A	127(MET)	CE [C]	3.79

[0586]

L	30 (TYR)	CD2 [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.35
L	30 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.33
L	34 (TYR)	CE2 [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.33
L	30 (TYR)	CZ [C]	A	127 (MET)	CE [C]	3.75
L	30 (TYR)	OH [O]	A	128 (PRO)	CD [C]	3.86
			A	128 (PRO)	CG [C]	3.43
L	30 (TYR)	CZ [C]	A	128 (PRO)	CG [C]	3.98
L	93 (TYR)	OH [O]	A	128 (PRO)	O [O]	3.45
L	96 (GLY)	N [N]	A	128 (PRO)	O [O]	3.41
L	96 (GLY)	CA [C]	A	129 (SER)	CA [C]	3.88
L	96 (GLY)	O [O]	A	129 (SER)	CA [C]	3.4
L	96 (GLY)	N [N]	A	129 (SER)	CA [C]	3.99
L	96 (GLY)	O [O]	A	129 (SER)	CB [C]	3.56
			A	129 (SER)	C [C]	3.52
L	96 (GLY)	CA [C]	A	130 (GLU)	N [N]	3.99
L	96 (GLY)	C [C]	A	130 (GLU)	N [N]	3.6
L	96 (GLY)	O [O]	A	130 (GLU)	N [N]	2.73
L	96 (GLY)	N [N]	A	130 (GLU)	N [N]	3.78
L	96 (GLY)	O [O]	A	130 (GLU)	CA [C]	3.71
			A	130 (GLU)	CB [C]	3.81
L	97 (ARG)	CD [C]	A	130 (GLU)	CB [C]	3.78
			A	130 (GLU)	CG [C]	3.93
			A	130 (GLU)	CD [C]	3.72
L	97 (ARG)	CG [C]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	3.85
L	94 (LYS)	CG [C]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	3.77
L	97 (ARG)	CD [C]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	2.77
L	97 (ARG)	NE [N]	A	130 (GLU)	OE1 [O]	3.75
L	94 (LYS)	CG [C]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.69
L	94 (LYS)	O [O]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.63
L	94 (LYS)	CD [C]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.77
L	94 (LYS)	CE [C]	A	130 (GLU)	OE2 [O]	3.26
L	97 (ARG)	NE [N]	A	131 (GLU)	C [C]	3.94
L	97 (ARG)	CD [C]	A	131 (GLU)	O [O]	3.75
L	97 (ARG)	NE [N]	A	131 (GLU)	O [O]	2.94
L	97 (ARG)	CZ [C]	A	131 (GLU)	O [O]	3.79
L	97 (ARG)	NH2 [N]	A	131 (GLU)	O [O]	2.79

[0587]

[0588] 요약하면, 에피토프는 잔기 E123, Y125, E126, M127, P128, S129, E130 및 E131을 포함한다. 도 6은 웨티드 123-132와의 복합체에서의 6470 Fab를 나타내고, 도 7 및 8은 웨티드 123-132와 각각 6470 Fab 중쇄 및 경쇄 사이의 접촉을 각각 나타낸다.

[0589]

실시예 4: 항체 인간화 및 친화도 성숙

[0590]

토끼 V-영역으로부터의 CDR을 인간 배선 항체 V-영역 프레임워크 상에 그래프팅함으로써 토끼 항체 6470을 인간화하였다. 항체의 활성을 회복시키기 위해, 토끼 V-영역으로부터의 다수의 프레임워크 잔기가 또한 인간화 서열에 유지되었다. 이를 잔기는 문헌(Adair et al. (1991) WO91/09967)에 개요된 프로토콜을 이용하여 선택되었다. 토끼 항체(도너) V-영역 서열과 인간 배선(어셉터) V-영역 서열의 정렬은 설계된 인간화 서열과 함께 도 9 및 10에 도시되어 있다. 도너로부터 어셉터 서열로 그래프팅된 CDR은 조합된 초티아/카바트 정의가 사용되는 CDR-H1을 제외하고(Adair et al., WO91/09967) 카바트에 의해 정의된 바와 같다(Kabat et al., 1987).

[0591]

많은 변이체 중쇄 및 경쇄 V-영역 서열을 코딩하는 유전자는 DNA2.0 인크.(DNA2.0 Inc.)의 자동 합성 접근법에 의해 설계되고 구축되었다. 중쇄 및 경쇄 V-영역의 추가 변이체는, 일부 경우에 CDR 내에 돌연변이를 포함하는 것을 포함하여, 올리고뉴클레오티드 지시된 돌연변이유발에 의해 VH 및 VK 유전자를 변형시킴으로써 생성되었다. 포유동물 세포에서의 일시적 발현을 위해, 인간화 경쇄 V-영역 유전자를 인간 카파 쇄 불변 영역(Km3 동종이형)을 코딩하는 DNA를 함유하는 UCB 경쇄 발현 벡터 pMhCK에 클로닝하였다. 인간화 중쇄 V-영역 유전자를 헌지 안정화 돌연변이 S241P를 갖는 인간 감마-4 중쇄 불변 영역을 코딩하는 DNA를 함유하는 UCB 인간 감마-4 중쇄 발현 벡터 pMhγ4PFL에 클로닝하였다(Angal et al., Mol. Immunol. 1993, 30 (1):105-8). 토끼 V-영역(서열 번호 11 및 13) 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 6470도 유사하게 제조되어 비교기 항체로서 사

용되었다. 생성된 중쇄 및 경쇄 벡터를 Expi293™ 혼탁 세포로 공동 형질감염시켜 인간 IgG4P에서 인간화 재조합 항체의 발현을 제공하였다.

[0592] 인간 V-영역 IGKV1-16 + JK4 J-영역(IMGT, <http://www.imgt.org/>)은 항체 6470 경쇄 CDR에 대한 어셉터로 선택되었다. 그래프트 gL3의 경쇄 프레임워크 잔기는 모두 잔기 48 및 72(서열 번호 15를 참조)를 제외하고는 인간 배선 유전자 유래이며, 도너 잔기 글루타민(Q48) 및 글루타민(Q72)은 각각 유지되었다. 잔기 Q48 및 Q72의 보유는 인간 알파 시누클레인 피브릴에 결합하기 위한 인간화 항체의 완전한 효능에 필수적이었다(도 9 및 표 6).

[0593] [표 6]

항체 변이체	경쇄	중쇄	인간 피브릴 친화도 (KD)
	도너 잔기	도너 잔기	pM
키메라 6470	-	-	99
6470gL3gH23	Q48, Q72	V24, Y47, I48, G49, V78, R97	148
6470gL3gH36	Q48, Q72	V24, Y47, I48, G49, S73, R97	166
6470gL6gH23	Q72	V24, Y47, I48, G49, V78, R97	547
6470gL6gH36	Q72	V24, Y47, I48, G49, S73, R97	377
6470gL8gH23	Q48	V24, Y47, I48, G49, V78, R97	246
6470gL8gH36	Q48	V24, Y47, I48, G49, S73, R97	198
6470gL3gH25	Q48, Q72	V24, I48, G49, K71, S73, V78, R97	76000
6470gL3gH26	Q48, Q72	V24, Y47, G49, K71, S73, V78, R97	300
6470gL3gH27	Q48, Q72	V24, Y47, I48, K71, S73, V78, R97	22300
6470gL3gH35	Q48, Q72	V24, Y47, I48, G49, K71, S73, V78	5282
6470gL3gH46	Q48, Q72	Y47, I48, G49, V78, R97	316
6470gL3gH50	Q48, Q72	Y47, I48, G49, S73, R97	580

[0594]

[0595] 인간 V-영역IGHV3-23 + JH4 J-영역(IMGT, <http://www.imgt.org/>)은 항체 6470의 중쇄 CDR에 대한 어셉터로 선택되었다. 많은 토끼 항체와 마찬가지로, 항체 6470의 VH 유전자는 선택된 인간 어셉터보다 짧다. 인간 어셉터 서열과 정렬 시, 항체 6470의 VH 영역의 프레임워크 1은 인간화 항체에서는 보유된 N-말단 잔기가 결여된다(도 10). 6470 토끼 VH 영역의 프레임워크 3은 또한 베타 시트 가닥 D와 E 사이의 루프에서 2개의 잔기(75 및 76)가 결여된다: 인간화 그래프트에서 캡은 선택된 인간 어셉터 서열로부터의 상응하는 잔기로 채워진다(리신 75, K75; 아스파라긴 76, N76)(도 10). 그래프트 gH23 및 gH36의 중쇄 프레임워크 잔기는 모두 잔기 24, 47, 48, 49, 73, 78 및 97(서열 번호 23 및 31을 참조)을 포함하는 군으로부터의 하나 이상의 잔기를 제외하고는 인간 배선 유전자로부터 유래되며, 도너 잔기 발린(V24), 티로신(Y47), 이소류신(I48), 글리신(G49), 세린(S73), 발린(V78) 및 아르기닌(R97)은 각각 유지되었다. 잔기 V24, Y47, I48, G49 및 R97의 보유는 인간 알파 시누클레인 피브릴에 결합하기 위한 인간화 항체의 완전한 효능에 필수적이었다.

[0596] 또한, 인간화된 VH 유전자를 10개의 히스티딘 잔기의 C-말단 태그를 갖는 인간 감마-1 CH1-한지 도메인을 코딩하는 DNA를 함유하는 UCB 인간 Fab-HIS 발현 벡터 pMhFab10HIS에 클로닝하였다: 히스티딘 태그는 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 Fab의 정제를 용이하게 한다. 생성된 중쇄 및 경쇄 벡터를 Expi293™ 혼탁 세포로 공동 형질감염시켜 Fab-HIS 포맷의 인간화 재조합 항체를 발현시켰다.

[0597] 친화도 성숙은 WO2014198951에 기재된 IOTA 방법에 따라 수행되었다. X-선 결정학에 의해 결정된 복합체에서 6470 토끼 Fab와 알파 시누클레인 웨티드 EAYEMPSEEG(123-132) 사이의 계면을 분석하여 알파 시누클레인 단백질에 대한 6470 토끼 Fab의 친화성을 잠재적으로 개선시킬 수 있는 돌연변이를 확인하였다. IOTA는 단백질 계면 또는 결합 부위에서 주어진 접촉 원자 유형의 확률을 결정하기 위한 통계적 잠재적 도구이다.

[0598] 인간 알파 시누클레인 단량체 또는 피브릴에 결합하기 위한 항체의 효능에 대한 이들 돌연변이의 효과를 평가하기 위해, 돌연변이는 먼저 6470 토끼 Fab에서 먼저 연구되었다(표 7a). 상호작용 동역학은 실시예 3에 기재된 바와 같이 비아코어 T200 기기에서 표면 플라즈몬 공명 기술을 이용하여 결정되었다. CDRL1의 잔기 33(서열 번호 11을 참조)을 아스파라긴(N)에서 아르기닌(R) 또는 리신으로 돌연변이시켰다: 잔기 33의 아르기닌(K)으로의 돌연변이로 알파 시누클레인에 대한 친화성이 증가되었다(표 7a). CDRH2의 잔기 55는 세린(S)에서 아스파라긴(N)으로 돌연변이되었고, CDRH3의 잔기 99는 아스파라긴(N)에서 리신(K), 또는 글루타민(Q) 또는 히스티딘(H) 또는 트립토판(W)으로 돌연변이되었고(서열 번호 13을 참조), 잔기 55의 아스파라긴으로의 돌연변이 및 잔기 99의 히스티딘으로의 돌연변이로 알파 시누클레인에 대한 친화성이 증가되었다(표 7a). CDRH3에서 아스파라긴의 돌연변이(N99H)는 또한 잠재적 탈아미드화 부위를 제거한다.

[0599]

[표 7a]

돌연변이	쇄	단량체			피브릴		
		ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (nM)
6470 토끼 Fab	-	7.23E+06	1.24E-01	17.2	4.58E+06	4.76E-02	10.3
Y30W	L	2.99E+06	1.51E-01	50.4	4.75E+06	8.95E-02	18.8
N33R	L	1.92E+07	7.99E-02	7.9	9.98E+06	2.89E-02	2.9
N33K	L	2.84E+06	4.33E-02	15.2	6.93E+06	4.98E-02	7.1
H31R	H	2.65E+05	4.40E-01	1658.4	5.98E+06	3.73E-01	62.3
H31K	H	6.17E+06	9.38E-01	151.9	9.06E+06	4.23E-01	46.7
H31Q	H	8.00E+06	1.85E-01	23.1	7.83E+06	9.72E-02	12.4
S53N	H	4.56E+04	5.17E-02	1132.6	5.75E+06	2.86E-01	49.6
S55N	H	1.39E+07	1.91E-02	1.9	9.20E+06	1.30E-02	1.4
N99R	H	1.22E+07	1.70E-01	16.9	1.89E+07	1.54E-01	15.3
N99K	H	7.89E+06	1.89E-01	23.9	1.58E+07	2.07E-01	20.7
N99Q	H	3.75E+05	4.93E-01	1314.1	1.03E+07	4.25E-01	42.4
N99H	H	1.33E+07	7.45E-03	0.7	6.20E+06	4.01E-03	0.4
N99W	H	9.22E+06	5.66E-01	61.3	5.27E+06	1.34E-01	25.3

[0600]

[0601]

마지막으로, 새로 확인된 돌연변이가 또한 이전에 생성된 전장 인간화 항체에서 시험되었으며(표 6), 인간 피브릴에 대한 그들의 선택성이 시험되었다(표 7b). 상호작용 동역학은 실시예 3에 기재된 바와 같이 비아코어 T200 기기에서 표면 플라즈몬 공명 기술을 이용하여 결정되었다. 표 7b에 나타난 바와 같이, 경쇄(서열 번호 19를 참조)의 위치 33에서의 돌연변이 및 중쇄(서열 번호 27 및 35를 참조)의 위치 33에서의 돌연변이는 인간 피브릴에 대한 친화성을 증가시키며, 이는 표적에 결합하기 위해 혈액 농장벽을 가로 질러야 하는 항체에 유리한 특징이다. 항체를 전신적으로 투여 시, 항체는 복잡한 생리학적 장벽을 가로지르는 데 제한된 시스템을 갖고 있기 때문에 투여되는 항체의 다양성이 손실될 수 있다.

[0602]

[표 7b]

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

[0603]

[0604]

변이체 인간화 항체 쇄 및 이의 조합이 발현되었으며 모 항체에 대비한 그들의 효능, 그들의 생물물리학적 특성 및 다운스트림 프로세싱에 대한 적합성에 대해 평가되었다.

[0605]

실시예 5: 인간화 항체의 특징규명

[0606]

6개의 인간화 6470 IgG4P 항체(표 8, 표 1에 서열)에 대한 생물물리학적 특징규명을 수행하였다.

[0607]

[표 8]

디스크립터
gL3gH23
gL3gH36
gL3-N33RgH23-S56N-N102H
gL3-N33RgH36-S56N-N102H
gL3gH23-S56N-N102H
gL3gH36-S56N-N102H

[0608]

[0609] 돌연변이가 특히 친화성, 안정성 및 개발가능성에 대해 영향을 끼치는지 여부를 결정하기 위해 모든 항체를 열 안정성(T_m), 실험적 pI, 소수성, 용해도(PEG 침전 검정) 및 공기/액체 계면에서의 응집 안정성에 기초하여 스크리닝하였다.

[0610]

스크리닝 공정은 또한 항체가 하기를 갖기 때문에 화학적 안정성(탈아미드화, 아스파르트산 이성화 경향)의 평가를 포함하였다:

[0611]

1. gL3gH23 및 gL3gH36에 대해서만 중쇄 CDR3에서 Asn(102)S 모티프(탈아미드화);

[0612]

2. 모든 항체에 대해 경쇄 CDR3에서 Asn(98)Asp(99) 모티프(탈아미드화);

[0613]

3. N33 돌연변이체를 제외한 모든 항체의 경쇄 CDR1에서 Asn(32)Asn(33) 모티프(탈아미드화);

[0614]

4. 모든 항체에 대해 경쇄 CDR3에서 Asp(99)G 모티프(Asp 이성화).

[0615]

이들 부위에서의 화학적 불안정성은 생성물 비균질성 및 면역원성을 초래할 수 있다.

[0616]

열 안정성(T_m) 측정

[0617]

용해 온도(T_m) 또는 언폴딩의 중간점 온도를 써모플루오르(Thermofluor) 검정을 이용하여 결정하였다. 이 방법에서, 형광 염료 SYPRO® 오렌지는 온도가 증가함에 따라 노출되는 소수성 영역에 결합함으로써 단백질 언폴딩 과정을 모니터링하는 데 사용되었다.

[0618]

반응 혼합물은 5000X 스톡 용액으로부터 PBS로 희석된 30x SYPRO® 오렌지 염료(Invitrogen™) 5 μ l 및 0.12 mg/mL의 샘플(PBS pH 7.4 중) 45 μ l를 함유하였다. 약 10 μ l의 혼합물을 384 PCR 광학 웰 플레이트에 4중으로 분배하고 7900HT 고속 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems™)에서 작동시켰다. PCR 시스템 가열 장치는 1.1°C/분의 증가 속도로 20°C에서 99°C로 설정되었다. 전하 커플링 장치는 웰의 형광 변화를 모니터링하였다. 강도 증가를 플로팅하고, 경사(들)의 변곡점을 사용하여 하기에 기재된 바와 같이 T_m 을 계산하였다.

[0619]

모든 항체에 대해 2개의 언폴딩 전이가 관찰되었다. 첫 번째는 CH2 도메인의 T_m 에 기인할 수 있다. 두 번째는 문현(Garber E, Demarest SJ. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 13;355(3):751-7)에 따른 Fab 언폴딩 도메인 및 CH3 도메인의 평균 T_m 에 기인할 수 있다. 표 9는 결과를 요약한다.

[0620]

[표 9]

디스크립터	Fab 도메인 T_m	SD	CH ₂ 도메인 T_m	SD
gL3gH23	73.1	0.6	64.8	0.2
gL3gH36	73.5	0.3	64.7	0.0
gL3gH23-S56N-N102H	72.8	0.2	64.8	0.3
gL3gH36-S56N-N102H	73.4	0.2	65.1	0.3
gL3-N33R-gH23-S56N-N102H	73.9	0.5	65.2	0.1
gL3-N33R-gH36-S56N-N102H	73.3	0.2	64.7	0.3

[0621]

[0622] 열 안정성은 IgG4 분자에 대한 정상 예상 범위 내에 있다(Heads et al "Relative stabilities of IgG1 and IgG4 Fab domains: influence of the light-heavy interchain disulfide bond architecture". Protein Sci.

2012 Sep;21(9):1315-22).

[0623] 실험적 pI

[0624] 6470 항체의 실험적 pI는 전체 모세관 이미지화된 cIEF iCE3™ 시스템(ProteinSimple)을 사용하여 수득되었다.

[0625] 샘플은 하기를 혼합함으로써 제조되었다: 30 μL 샘플(HPLC 등급 물 중의 1 mg/mL 스톡으로부터의 것), 35 μL의 1% 메틸셀룰로스 용액(Protein Simple), 4 μL pH 3-10 양성전해질(Pharmalyte), 0.5 μL의 4.65 및 0.5 μL 9.77 합성 pI 마커(ProteinSimple), 12.5 μL의 8 M 우레아 용액(Sigma-Aldrich®). HPLC 등급 물을 사용하여 최종 부피를 100 μL로 만들었다. 혼합물을 간단히 볼텍싱하여 완전히 혼합하고 분석 전에 기포를 제거하기 위해 3분 동안 10,000 rpm에서 원심분리하였다. 샘플을 1.5 kV에서 1분 동안, 이어서 3 kV에서 5분 동안 포커싱하고, 프로테인심플(ProteinSimple) 소프트웨어를 사용하여 모세관의 A280 이미지를 촬영하였다. 생성된 전기영동도를 먼저 iCE3 소프트웨어를 사용하여 분석하고 pI 값을 할당하였다(pI 마커들 간의 선형 관계). 이어서, 교정된 전기영동도를 Empower® 소프트웨어(Waters)를 사용하여 통합하였다.

[0626] 모든 6470 항체에 대한 실험적 pI는 8.4-9.2의 범위에 있었다. 분자들 사이에 하전된 종의 비에는 약간의 차이가 있었지만, 이는 IgG4P 분자에 대해 예상치 못한 것은 아니다. 모든 pI는 높았으므로 항체의 제조 과정을 도울 것이다.

[0627] 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)

[0628] 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 증가하는 소수성 순으로 분자를 분리한다. 분자는 고농도의 극성 염의 존재 하에서 소수성 정지상에 결합하고 염의 농도가 감소함에 따라 이동상으로 탈착된다. 정체 시간이 길수록 소수성이 커진다.

[0629] 2 mg/mL의 샘플을 1.6 M 황산암모늄 및 PBS(pH 7.4)로 1:2로 희석하였다. 5 μg(5 μL)의 샘플을 형광 검출기를 갖는 아질렌트 1200 바이너리 HPLC에 직렬로 연결된 Dionex ProPac™ HIC-10 컬럼(100 mm x 4.6 mm)에 주입하였다. 분리를 고유 형광(여기 파장 및 방출 파장이 각각 280 nm 및 340 nm)으로 모니터링하였다.

[0630] 버퍼 A(0.8 M 황산암모늄 100 mM 포스페이트 pH 7.4) 및 버퍼 B(100 mM 포스페이트 pH 7.4)를 사용하여 샘플을 하기와 같은 구배 용출을 이용하여 분석하였다: (i) 0% B에서 2분 유지, (ii) 30분(0.8 mL/분)에 0 내지 100% B까지의 선형 구배, (iii) 컬럼을 100% B로 2분 동안 세척하고 다음 샘플 주입 전에 10분 동안 0% B에서 재평형화시켰다. 컬럼 온도는 20°C로 유지되었다.

[0631] 낮은 소수성 및 높은 소수성을 나타내는 표준물 및 대조군을 또한 동일한 실행 순서로 분석하여 정체 시간을 정규화하였다(표 11). 샘플의 정체 시간(RT)은 하기 수학식을 이용하여 낮은 소수성 및 높은 소수성 표준물에 대해 정규화되었다:

$$[(\text{샘플(RT)} - \text{낮은 표준물(RT)}) / (\text{높은 표준물(RT)} - \text{낮은 표준물(RT)})] \times 100$$

[0633] [표 10]

항체(주요 피크)	정체 시간(분)	정규화된 정체 시간(분)
gL3gH23	9	3.8
gL3gH36	8.8	3.1
gL3gH23-S56N-N102H	8.9	3.5
gL3gH36-S56N-N102H	8.8	3.1
gL3-N33RgH23-S56N-N102H	8.8	3.1
gL3-N33RgH36-S56N-N102H	8.8	3.1

[0634]

[0635] 모든 6470 항체 및 돌연변이체는 유사한 정규화된 정체 시간 및 유사한 낮은 소수성을 나타내었다. 상업적으로 이용 가능한 치료 항체는 낮은 소수성을 나타내는 경향이 있다(Jain et al "Biophysical properties of the clinical-stage 항체 landscape" Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jan 31;114(5):944-949). 낮은 소수성은 제조 과정에서 안정성을 높인다(즉, 응집 감소).

[0636] 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 침전 검정을 이용한 용해도 측정

콜로이드 안정성을 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 침전 검정을 이용하여 분석하였다. PEG는 PEG(w/v)의 농도를 증가시키고 용액에 남아 있는 단백질의 양을 측정함으로써 정량적으로 정의 가능한 방식으로 단백질 용해도를 감소시키기 위해 사용되었다. 이 검정은 통상적인 농축 방법을 이용하지 않고 고농도 용해도의 효과를 모방하는 데 이용될 수 있다. 6470 항체의 PEG-유도된 침전은 PBS pH 7.4, 50 mM 나트륨 아세테이트/125 mM 염화나트륨 pH 5.0(아세테이트 pH 5) 및 20 mM L-히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0에서 7-18% PEG-3350의 존재 하에서 조사되었다. 필요에 따라 투석을 이용하여 샘플을 벼퍼 교환하고 농도를 2 mg/mL로 조정하였다. 비-평형 침전을 최소화하기 위해, 샘플 제제는 2x 단백질 및 2x PEG 용액을 1:1 부피비로 혼합하는 것으로 이루어졌다. 혼합 후, 샘플을 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하여 비-평형 응집체를 재용해시켰다. 20°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 샘플을 60분 동안 원심분리하였다(4000g). 상청액의 분취물을 절반 부피 96 웰 광학 플레이트로 옮기고, 280nm에서의 흡광도를 플레이트 판독기 BMG Labtech FLUOstar[®] Omega LVIS A280을 사용하여 측정하였다. 농도 데이터를 PEG%에 대해 플로팅하고, 비선형 곡선 피팅에 의해 생성된 계산된 중간점(LogEC50), 가변 기울기를 샘플의 상대적 콜로이드 용해도의 척도로서 수득하였다. 이 검정에서, LogEC50이 더 높으면 콜로이드 안정성이 더 크다.

[0638] 결과(도시되지 않음)는 벼퍼 pH가 증가함에 따라 모든 6470 항체에 대해 콜로이드 안정성이 감소되었음을 나타내었다. 또한, 가용성이 큰 것에서 낮은 것에 이르기까지 하기 경향이 얻어졌다: gL3gh23 및 gL3gh36 > gL3gh23-S56N-N102H 및 gL3gh36-S56N-N102H > gL3-N33Rgh23-S56N-N102H 및 gL3-N33Rgh36-S56N-N102H.

[0639] 따라서, 친화도 성숙을 위해 도입된 돌연변이는 항체 분자의 콜로이드 안정성을 감소시켰다. gL3gh23 및 gL3gh36 그래프트 간에는 차이가 관찰되지 않았다.

[0640] 공기-액체 계면에서의 스트레스의 영향(응집 검정)

[0641] 단백질은 소수성 표면이 소수성 환경(공기)에 제시되고 친수성 표면이 친수성 환경(물)에 제시되는 공기-액체 계면에 노출될 때 언풀딩되는 경향이 있다. 단백질 용액의 교반은 응집을 유도할 수 있는 큰 공기-액체 계면을 달성하다. 이 검정은 분자가 제조(예컨대, 한외여과) 동안 받는 스트레스를 모방하고 상이한 항체 분자를 구별하기 위해 엄격한 조건을 제공하는 역할을 한다.

[0642] PBS pH 7.4, 50 mM 나트륨 아세테이트/125 mM 염화나트륨 pH 5.0(아세테이트 pH 5) 및 20 mM L-히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 중의 샘플을 Eppendorf Thermomixer Comfort[™]를 사용하여 볼텍싱하여 스트레스를 가하였다. 벼퍼는 일반적인 사전-제형 벼퍼로 선택되었다. 볼텍싱하기 전에, 적절한 흡광 계수(1.35 Abs 280 nm, 1 mg/mL, 1 cm 경로 길이)를 사용하여 농도를 1 mg/mL로 조정하고 280 nm, 340 nm 및 595 nm에서의 흡광도를 Varian Cary[®] 50-Bio 분광광도기를 사용하여 수득하여 제로 시간 판독을 설정하였다. 각각의 샘플을 1.5 mL 원뿔형 Eppendorf[®]-스타일 캡핑 투브(4x 250 µl)로 부분-분취하고 25°C에서 1400 rpm에서 최대 24시간 동안 볼텍싱하여 견고성을 시험하기 위한 엄격한 조건에 적용하였다. 시간 의존적 응집(탁도)을 Varian Cary[™] 50-바이오 분광광도기를 사용하여 595 nm에서 볼텍싱 후 3시간 및 24시간에 샘플을 측정함으로써 모니터링하였다. 평균 흡광도 값을 각각의 샘플에 대한 시간에 대해 플로팅하였다.

[0643] 결과가 도 11에 도시되어 있다. 24시간에서는 3개의 벼퍼 중 어느 것에서도 6470 항체 간에 차이가 없었지만, 볼텍싱 후 3시간 후에는 응집 경향에서 작은 차이가 확인되었으며 벼퍼 의존적으로 보였다.

[0644] 탈아미드화/Asp 이성화 스트레스 연구

[0645] 4개의 확인된 잠재적 서열 라이어빌리티(liability)의 탈아미드화/Asp-이성화 경향을 결정하기 위해, 6470 항체 gL3gh23 및 gL3gh36을 사용하여 스트레스 연구를 설정하였다: 중쇄 CDR3에서 Asn(102)S(탈아미드화 모티프); 경쇄 CDR3에서 Asn(98)Asp(99)(탈아미드화 모티프); 경쇄 CDR1에서 Asn(32)Asn(33)(탈아미드화 모티프) 및 경쇄 CDR3에서 Asp(99)G(Asp 이성화 모티프). 탈아미드화 및 Asp-이성화 경향/속도는 일차 서열 및 3D 구조 뿐만 아니라 용액 특성에 의존하므로 예상될 수 없다(R C Stephenson and S Clarke (1989); K. Diepold *et al* (2012); Jasmin F. Sydow *et al* (2014); N.E. Robinson *et al* (2004))

[0646] 기본 탈아미드화 수준(비-스트레스 샘플)도 수득되었다 - 낮은 수준은 낮은 감수성을 나타내지만 상이한 제조 배치/조건으로 인해 수준이 변할 수 있다.

[0647] 2개의 6470 항체를 (i) Asn(N) 잔기의 탈아미드화에 유리한 것으로 공지된 벼퍼(트리스 pH 8/37°C), 및 (ii) Asp 이성화에 유리한 것으로 공지된 벼퍼(아세테이트, pH 5/37°C)로 벼퍼 교환하였다. 각각의 벼퍼 중 샘플의

최종 농도를 ~6.5 mg/mL로 조정한 다음, 2개의 분취물로 나누고, 하나는 4°C에서 하나는 37°C에서 최대 4주 동안 저장하였다. 분취물을 즉시(T0), 2주 및 4주에 꺼내고 -20°C에서 저장하였다.

[0648] 2주 샘플을 해동하고 화학적 변형 분석을 위해 하기와 같이 트립신 분해/질량 분석법(MS)으로 분석하였다. 스트레스를 받은 단백질의 샘플을 TCEP로 환원시키고 0.1% w/v 라피게스트(Rapigest) 세제를 함유하는 트리스-HCL 버퍼 pH 8.0에서 클로로아세트산으로 알킬화시켰다. 트립신을 첨가하고(1:25 w/w), 샘플을 실온에서 밤새 분해시켰다. 포름산을 1% v/v로 첨가하여 단백분해를 중단시키고, 침전된 Rapigest™를 제거하기 위해 원심분리하기 전에 샘플을 0.5 mg/mL로 희석하였다. 생성된 웨프티드를 분리하고, 충돌 유도된 해리(CID) 단편화를 갖는 +ve-아이온, 데이터-의존적 오비트랩-오비트랩 방법을 실행하는 Thermo Fusion™ 질량 분석기에 연결된 워터스(Waters) BEH C18 컬럼에서 분석하였다. LC-MS 데이터는 Thermo Xcalibur™ 및 Pepfinder software™를 사용하여 분석되었다.

[0649] 또한, 크기 배제 HPLC 및 SDS PAGE를 수행하여 응집/분해를 모니터링하였다.

[0650] 웨프티드 매핑/질량 분석의 결과는 3개의 CDR 부위 모두에서 기본 Asn 탈아미드화 수준은 <1.5%이고, 탈아미드화는 중쇄 CDR3에서 Asn(102)S 부위에 대해 pH 8.0 및 37°C에서 2주 후 최대 ~6%까지 최대로 증가함을 나타내었다.

[0651] 경쇄 CDR3에서 Asp(99) 변형(숙신이미드 형성)은 pH 5.0 및 37°C에서 2주 후에 ~25%였다.

[0652] 재조합 전장 인간 알파 시누클레인 단량체 및 정제된 재조합 인간 알파 시누클레인 피브릴에 대한 친화성/결합 활성에 대한 화학적 변형(중쇄 CDR3 상의 Asn(102)에서 탈아미드화 및 경쇄 CDR3 상의 Asp(99)에서 숙신이미드 중간체 형성)의 효과를 평가하였다. 완전히 탈아미드화된 생성물(Asn(102)Asp) 및 스트레스를 받은 물질(pH 5/2 주/37°C)을 연구에 사용하였다.

실시예 6: 면역조직화학

[0654] 면역조직화학은 아스테란드 바이오사이언스(Asterand Bioscience, Royston, United Kingdoms)에 의해 수행되었다. 동결절편(cryosection)(10 μm)을 먼저 자동 가열 및 냉각과 함께 97°C에서 20분 동안 다코 PT 링크(Dako PT Link) 및 엔비전 FLEX 타겟 리트리벌 용액(EnVision FLEX Target Retrieval Solution)(pH 6)을 사용하는 항원 재생 절차로 처리하였다. 모든 후속 인큐베이션 단계는 실온에서 수행되었다. 동결절편을 30분 동안 공기 건조시키고, 10분 동안 1X PBS에 제조된 4% 파라포름알데히드에 고정시키고, Dako EnVision™ FLEX 세척 버퍼(Dako)로 세척한 다음 다코 오토스트레이너 플러스(Dako Autostainer Plus)에 로딩하였다. 절편을 다코 페옥시다제 블록(D(Dako)과 5분 동안 인큐베이션함으로써 내인성 페옥시다제 활성을 차단하였다. 이어서, 절편을 1X PBS로 2회 세척한 후 다코 CSA II 단백질 블록(Dako)과 10분 동안 인큐베이션하였다. 단백질 차단 용액을 에어제트로 제거하고, 절편을 다코 항체 희석제(Dako)에 희석된(0.05 μg/ml) 6470 토끼 IgG1(서열 번호 47 및 48을 포함)과 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 절편을 1X PBS로 2회 세척한 다음, 항-토끼 다코 플렉스 중합체-HRP 기질(Dako)과 20분 동안 인큐베이션하고, 2회 세척한 다음, 디아미노벤지딘 기질(Dako)과 10분 동안 인큐베이션하였다. 증류수로 슬라이드를 세정함으로써 색소생성 반응을 중지시켰다. 색소생성 후, 절편을 다코 오토스트레이너 플러스에서 꺼내고 수동으로 혼마록실린으로 대조 염색하고, 상승하는 일련의 에탄올에서 탈수하고, 크실렌의 3회 교체로 클리어링하고, DPX 장착 매질(Sigma-Aldrich) 하에 커버 슬리핑하였다. 염색된 절편의 디지털 이미지를 아페리오 스캔스코프 AT 터보 시스템(Aperio ScanScope AT Turbo system, Leica Biosystems)을 사용하여 수득하였다. 항체 6470을 5개의 상이한 pS129-α-시누클레인 양성 및 3개의 상이한 pS129-α-시누클레인 음성 도너로부터 유래된 뇌 절편에서 시험하였다(1개의 절편/도너). 항체 6470은 PD 환자의 측두 피질 및 흑색질에서 신경망 및 루이소체-유사 특징을 표지하였다(도 12a-e). 비-PD 뇌 조직에서, 항체 6470은 측두 피질에서 신경망을 표지하였으나, 피질 또는 흑색질에서 루이소체-유사 구조는 관찰되지 않았다(도 12f-h). 이들 관찰은 항체 6470이 PD 및 비-PD 환자로부터의 뇌 조직의 신경망에서 정상적인 α-시누클레인에 결합하는 반면, PD 환자에서만 루이소체에 존재하는 병리학적 α-시누클레인에 결합함을 제시한다.

실시예 7: 세포 기반 응집 검정

[0656] HEK 프리스타일 293F 세포(현탁 세포)를 프리스타일 293 발현 배지(Invitrogen™)에서 0.7×10^6 개 세포/mL로 제조하고, 300×10^6 개 세포/mL로 배양하였다. 형질감염을 제조사의 지시에 따라 수행하였으며, 간단히 알파 시누클레인 유전자를 포함하는 600 μg의 pcDNA3.1(+)는 20 mL의 OptiMEM 배지에서 혼합하고, 293Fectin은 OptiMEM 배지(Invitrogen™)에서 희석하고 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 희석된 DNA를 첨가하고 실온에서 20분 동

안 인큐베이션한 후 세포에 적가하였다(20 μ l/플라스크). 세포를 37°C, 125 rpm, 8% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 즉시 사용하거나 FBS + 10% DMSO 중 5백만개 세포/m1의 농도로 동결시켰다.

[0657] 세포가 이전에 동결된 경우, 동결바이알을 해동하고, 세포를 프리스타일 293 배지에 재현탁시키고, 500g에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버리고, 펠렛을 Pen/Strep(Invitrogen™)을 포함하는 프리스타일 293 배지(Life Technologies™)에 2×10^6 개 세포/m1로 재현탁시켰다. 384-웰 플레이트(Grainer™)에서, 20 μ l의 세포 혼탁액을 첨가하였다(총 약 40,000개 세포/웰). 각각의 웰에, 150 nM의 인간 알파 시누클레인 피브릴(본원의 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조됨)을 첨가한 후, (다양한 농도의) 시험될 PBS 중의 항체(6470 gL3gh23; 6470 gL3gh36; 6470 gL3N33gh23 S56N N102; 6470 gL3N33gh36 S56N N102; 6470 gL3gh23 S56N N102; 6470 gL3gh36 S56N N102; 모두 전장 IgG4P, 표 1의 서열)를 첨가하였다. 플레이트를 세포 배양 인큐베이터에서 2일 동안 37°C, 5% CO₂, 95% 습도에서 인큐베이션하였다.

[0658] 제2일 말기에, 배지를 모든 웰로부터 흡인시키고, 플레이트를 세척하고 웰당 20 μ l를 남겼다. 약 50 μ l의 PBS를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 500 g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 플레이트 와셔로 모든 웰로부터 흡인시켜 각각의 웰에 20 μ l의 배지를 남겼다. 베르센(Versene)(Lonza™)을 첨가하고(50 μ l/웰), 플레이트를 500 g에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 흡인시켜 웰당 20 μ l의 배지를 남겼다. 각각의 웰을 PBS 중의 20 μ l 8% 포름알데히드(물 중 16% 용액, Life Technologies™) + 2% 트리톤(Triton) X-100(VWR™)으로 보충하였다. 플레이트를 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, HBSS(칼슘-마그네슘 비함유 VWR™) + 2% FBS + 2 mM EDTA(Life Technologies™)로 이루어진 50 μ l의 FACS 버퍼를 첨가하였다. 플레이트를 2000g에서 1분 동안 원심분리하고 상청액을 흡인하여 각각의 웰에 단지 20 μ l의 배지를 남겼다. 각각의 웰을 1:300으로 회석된 항-pSer129 알파 시누클레인 항체(AbCam™)를 갖는 20 μ l의 FACS 버퍼로 추가로 보충하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 각각의 웰을 50 μ l의 FACS 버퍼로 보충한 후, 2000g에서 1분 동안 다시 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후, 각각의 웰을 1:500 회석된 알렉사플루오르647-컨주게이션된 항-토끼-이차 항체(Life Technologies™) 및 DAPI(Life Technologies™)로 보충하였다. 플레이트를 어두운 곳에서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션한 다음, 50 μ l의 FACS 버퍼를 첨가하고, 플레이트를 2000g에서 1분 동안 원심분리하였다. 세척 후, 더 많은 FACS 버퍼가 첨가되고, 플레이트는 판독을 위해 유세포 분석기(BD FACS Canto II)에 배치될 준비가되었다.

[0659] FACS 데이터를 플로우조(FlowJo) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 먼저, 전방 및 측면 산란기를 사용하여 살아있는 단일 세포를 게이팅하였다. 두 번째로, DAPI+ 이벤트가 게이팅되었고, 그들의 수는 살아있는 유핵 단일 세포의 수의 척도로서 사용되었다. 마지막으로, 포스포-세린 129-알파 시누클레인-양성(PSer129+) 세포가 게이팅되었다. 모든 DAPI+ 세포에 대비한 pSer129+ 세포의 퍼센트를 응집의 척도로 사용하였다. 데이터는 피브릴로만 처리되고 항체가 없는 웰에 대비하여 정규화되었으며 퍼센트로 표현되었다.

[0660] 결과가 도 13에 요약되어 있으며, 알파 시누클레인을 발현하는 세포에서 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 응집을 억제하는 시험되는 항체의 능력을 나타낸다. 이들 데이터는 본 발명의 항체가 5 nM 미만의 IC₅₀으로 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 응집을 차단할 수 있었음을 입증한다.

[0661] 오차 막대는 측정의 표준 오차(SEM, N=3, n=9)를 나타낸다.

실시예 8: 일차 뉴론 응집 검정

[0663] E17 마우스 배아로부터의 해마를 해부 버퍼(칼슘 및 마그네슘이 없는 HBSS, 0.6% D-(+)-글루코스, 20 mM 헤페스)에서 해부하였다. 이어서 해부 버퍼를 제거하고 해리 용액(칼슘 및 마그네슘이 없는 HBSS, 0.6% D-(+)-글루코스, 20 mM HEPES, 40 U/ml 파파인, 1 mg/mL DNase, 1 mM L-시스테인, 0.5 mM EDTA)으로 대체하였다. 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 해리 버퍼를 제거하고 해마를 플레이팅 배지(Neurobasal™ 배지, 2% B27 보충제, 1 mM GlutaMAX, 2.5% FBS, 50 단위/ml 폐니실린-스트렙토마이신)로 3x 세척하였다. 조직 덩어리를 1 ml 페펫으로 분쇄하여 단일 세포 혼탁액을 수득하였다. 세포를 플레이팅 배지에서 적절한 농도로 회석하였다. 약 15000개의 세포를 PDL 코팅된 384-웰 플레이트의 각각의 웰에 플레이팅하였다. 이어서 세포를 37°C, 5% CO₂, 95% 습도에서 세포 배양 인큐베이터에서 유지시켰다.

- [0664] 다음날, 배지의 80%를 FBS가 없는 플레이팅 배지로 교체하였다[Neurobasal™ 배지, 2% B27 보충제, 1 mM GlutaMAX, 50 단위/ml 폐니실린-스트렙토마이신]. 플레이팅 7일 후, 배지를 제거하여 각각의 웰에 20 μ l를 남겼다. 각각의 웰에, 100 nM의 인간 알파 시누클레인 피브릴(본원의 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조됨)을 첨가한 후, (다양한 농도로) 시험될 PBS 중의 항체 6470(6470gL3gh36 hIgG4P; 서열 번호 17 및 서열 번호 33을 포함하는 도 14의 VR6470)를 첨가하였다. 플레이트를 추가의 7일 동안 세포 배양 인큐베이터에서 37°C, 5% CO₂, 95% 습도에서 인큐베이션하였다. 플레이팅 14일 후, 배지를 모든 웰로부터 흡인시켜 웰당 20 μ l를 남겼다. 각각의 웰을 80 μ l의 둘베코(Dulbecco) 포스페이트 완충된 식염수(DPBS)로 세척하였다. DPBS를 제거하고, 세포를 웰당 40 μ l의 고정 벼페(4% 파라포름알데히드를 갖는 DPBS)에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 고정 벼페를 제거하고 세포를 80 μ l의 DPBS로 다시 세척하였다. DPBS를 제거하고 웰당 40 μ l의 투과 벼페(0.1% 트리톤 X-100을 갖는 DPBS)로 대체하였다. 10분 후, 투과 벼페를 제거하고, 세포를 웰당 40 μ l의 차단 벼페(1% BSA 및 0.1% 트리톤 X-100을 갖는 PBS)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 차단 벼페를 제거하고 40 μ l/웰의 일차 항체 용액(0.3% 토끼 항-포스포-세린 129 알파 시누클레인 항체(AbCam™ ab51253)을 갖는 차단 벼페)으로 교체하였다. 항체 용액을 세포에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 3회 세척하였다(각각 90 μ l, PBS). 마지막 세척 후, PBS를 제거하고 40 μ l의 이차 항체 용액(0.2% 알렉사플루오르488-컨주케이션된 항-베타-III-튜불린 항체를 갖는 PBS 중의 0.1% 알렉사플루오르647-컨주케이션된 항-토끼 항체)으로 대체하였다. 이차 항체 용액을 세포에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 40 μ l의 0.3% CellMask Blue™를 포함하는 PBS로 대체하였다. 5분 인큐베이션 후, 웰을 80 μ l의 PBS로 3회 세척하고, 이어서 웰당 50 μ l의 PBS로 충전시킨 후, 플레이트를 투명 플라스틱 필름으로 밀봉하였다.
- [0665] 플레이트를 어레이스캔 플레이트 이미저(Arrayscan plate imager)(ThermoFisher Scientific™)에서 이미지화하였다. 동일한 제조사로부터의 HCS Scan™ 소프트웨어를 사용하여 이미지를 분석하였다. 베타-III-튜불린 신호를 사용하여 뉴런 밀도를 모니터링하였다. 희박한(sparse) 필드 또는 표면에서 베타-III-튜불린 신호의 현저한 감소에 의해 반영된 손상된 뉴런 세포 층을 나타내는 필드는 제외되었다. 마지막으로, 필드당 pSer129 알파 시누클레인 신호의 표면을 사용하여 병리학적 알파 시누클레인 응집을 정량하였다.
- [0666] 알파 시누클레인의 S129에서의 인산화는 알파 시누클레인 정상 기능의 제어 뿐만 아니라 이의 응집, LB 형성 및 신경독성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 정상적인 조건 하에서는, 뇌에서 단지 소량의 알파 시누클레인이 S129에서 구성적으로 인산화되는 반면(Fujiwara H, et al. (2002) Nat Cell Biol, 4, 160-164), pS129의 극적인 축적이 시누클레인병증을 앓는 환자의 뇌에서 관찰되었다(Kahle PJ, et al. (2000) Ann N Y Acad Sci, 920, 33-41); Okochi M, et al. (2000) J Biol Chem, 275, 390-397); Anderson JP, et al. (2006) J Biol Chem, 281, 29739-29752).
- [0667] 데이터는 피브릴로만 처리되고 항체가 없는 웰에 대비하여 정규화되었으며 퍼센트로 표현되었다. 도 14에 도시된 바와 같이, 6470gL3gh36(VR6470으로 나타냄)은 내인성 수준의 알파 시누클레인을 발현하는 마우스 일차 뉴런에서 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 알파 시누클레인 응집을 억제한다. 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM, N=4, n=18)를 나타낸다. 이들 데이터는 6470gL3gh36이 4 nM 미만의 IC₅₀으로 마우스 일차 뉴런에서 알파 시누클레인 피브릴에 의해 유도되는 응집을 차단할 수 있었음을 입증한다.
- [0668] 실시예 9: 생체내에서 VR6470 효능 평가**
- [0669] 항체 6470gL3gh36 IgG4P(이 실시예에서 VR6470으로 명명되고 서열 번호 17 및 서열 번호 33을 포함)를 야생형 수컷 마우스 C57B1/6J(Janvier, France) 및 인간 알파 시누클레인을 발현하는 α-시누클레인 녹아웃 마우스의 트랜스체닉 모델(이후, SNCA-OVX로 명명됨; Charles River, France)에서 시험하였다.
- [0670] C57B1/6J 및 SNCA-OVX 마우스에 6470gL3gh36 IgG4P 및 뮤린의 사전 형성된 피브릴(PFF)(본원의 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조됨)을 주사하였다. 음성 대조군 항체(101.4) 및 비히클을 또한 마지막 9개의 C-말단 잔기에서 알파 시누클레인에 결합하는 비교기 항-알파 시누클레인 항체(비교기 C-말단 Ab)와 함께 주사하였다. 이러한 비교기 항체(본 발명에 따른 항체와 상이한 CDR을 가짐)는 본 발명의 항체에 필적하는 결합 특성을 나타내었다. 비교기 항체는 본 발명의 항체보다 알파 시누클레인에 대한 높은 친화도 및 유사한 생물물리학적 특성을 갖는다. 또한, 실시예 8에 따른 HEK 세포 기반 검정에서 알파 시누클레인 응집을 방지하는 데 동일하게 효과적 이었다(표 11).

[0671]

[표 11]

항체	단량체			피브릴			IC_{50} (nM)
	$ka1$ (1/Ms)	$kd1$ (1/s)	KD1 (nM)	$ka1$ (1/Ms)	$kd1$ (1/s)	KD1 (nM)	
VR6470	1.15E+06	0.01742	15.10	1.07E+06	3.17E-04	0.298	5 미만
비교기 C-말단 Ab	4.76E+05	1.03E-02	21.64	1.08E+06	2.20E-05	0.02	5 미만

[0672]

[0673] 항체를 동물의 뇌에 직접 투여하기 전에 실온에서 진탕기에서 30분 동안 PFF와 함께 사전 인큐베이션하였다. 항체/PFF 혼합물을 PBS에서 $1\text{ }\mu\text{g}$ PFF/ $10\text{ }\mu\text{g}$ 항체의 비율로 제조하였다. 비히를 용액으로서 pH 7.4의 PBS를 사용하였다. 조합된 뇌내 투여 24시간 전에 1회 주사를 수행하였다.

[0674]

[0674] 이어서, 항체를 30 mg/kg 의 용량으로 마우스에 복강내 투여하였다. 두 번째 복강내 주사는 첫 번째 주사 후 7일에 제공되었고, 야생형 수컷 마우스 C57Bl/6J의 경우 총 4회 주사에 대해 4주 동안 및 SNCA-OVX 마우스의 경우 총 12회 주사 동안 11주 동안 동일한 요법(10 ml/kg 의 투여 부피에 대해 30 mg/kg 의 용량으로 주당 1회 복강내 주사)으로 진행하였다. 두 실험 모두에서, 마우스는 약물 처리 그룹에 무작위로 할당되었고 실험자들은 처리에 대해 알 수 없었다.

[0675]

[0675] 동물 실험은 유럽 지침 2010/63/EU 및 벨기에 법률의 지침에 따라 수행되었다. UCB 바이오파마(Biopharma) SPRL(LA1220040 및 LA2220363)로부터의 동물 실험에 대한 윤리위원회가 실험 프로토콜(ASYN-IC-PARKINSON-MO)을 승인하였다. 마우스의 체중은 25 내지 30 g 이고 수술시 17 주령이었다. 마우스를 케이지에 넣었다(케이지 당 4마리의 마우스, 마크롤톤 유형 2). 그들은 06:00h에 점등되는 12:12 명/암 사이클로 유지되었다. 온도는 $20\text{-}21^\circ\text{C}$ 로 유지되었고 습도는 대략 40%였다. 모든 동물은 실험 그룹에 배정되기 전에 표준 펠렛 음식 및 물에 자유롭게 접근하였다. 수술 전후에 추가의 강화 및 복지가 제공되었다(Enviro-dri, Pharma Serv). 동물 관리 직원이 매일 동물 건강을 모니터링하였다. 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다. 희생은 마취 하에 이루어졌다.

[0676]

[0676] 수술은 전신 마취 하에 복강내 주사되는 50 mg/kg 의 케타민(Nimatek, Eurovet Animal Health B.V.)과 0.5 mg/kg 의 메데토미딘(Domitor, Orion Corporation)의 혼합물을 사용하여 수행되었다. 또한, 2.5 mg/kg 아티파메졸(Antisedan, Orion Corporation)이 각성을 지원하도록 제공되었다. 재조합 정제된 PFF를 해동시키고 실온에서 음파처리하였다(Qsonica 500 - 20 kHz ; 65% 전력, 1s ON의 30 펄스에 대해, 1분 동안 1s OFF). 이어서, PFF를 30분 동안 항체와 사전 혼합하고 뇌 주사 전에 실온에서 30분 동안 진탕시켰다. 용액($2\text{ }\mu\text{l}$)을 $0.2\text{ }\mu\text{l}/\text{분}$ 의 속도로 주입하고 추가 2.5 분 동안 바늘을 그대로 둔 후 서서히 빼내었다. 주사는 AP= +0.20 mm, ML= -2.00 mm, DV= -3.20 mm 좌표에서 오른쪽 선조체에서 일측으로 수행되었다.

[0677]

[0677] 마취 후, 마우스를 좌심실을 통해 $6\text{ ml}/\text{분}$ 의 유속으로 9분 동안 10 U/ml 헤파린을 함유하는 빙냉각된 0.9% PBS로 경심 관류로 관류시켰다. 우심방은 유출 경로로 절단되었다. 이어서, 동물에게 $6\text{ ml}/\text{분}$ 의 유속으로 15분 동안 PBS 중의 빙냉각된 4% 파라포름알데히드를 관류시켰다. 뇌를 4°C 에서 4% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS에서 밤새 사후 고정시켰다(0일). 다음날 아침(+1일), 4% 파라포름알데히드를 버리고 뇌를 냉각된 이소펜탄에 담가 빠르게 동결시키고, A0860 슬라이딩 마이크로토م의 동결 스테이지에 탐재하였다. MultiBrain® 블록을 $40\text{ }\mu\text{m}$ 의 관상면에서 절편화하였다. 모든 절편을 항원 보존 용액($49\text{% PBS pH }7.0$, $50\text{% 에틸렌 글리콜, 1\% 폴리비닐 피롤리돈}$)으로 충전된 블록당 24개의 용기에 순차적으로 수집하였다. 즉시 염색되지 않는 절편은 -20°C 에서 저장되었다.

[0678]

[0678] 뇌 절편화는 뉴로사이언스 어쏘시에이츠(Neuroscience Associates, TN, USA)에서 수행되었다. 먼저, 뇌를 동결 인공물을 방지하기 위해 20% 글리세롤 및 2% 디메틸су폴시드로 밤새 처리하고, MultiBrain® 기술을 이용하여 젤라틴 매트릭스에 포매시켰다. 경화 후, 블록을 분쇄된 드라이 아이스로 -70°C 로 냉각된 이소펜탄에 담가 빠르게 동결시키고, A0860 슬라이딩 마이크로토م의 동결 스테이지에 탐재하였다. MultiBrain® 블록을 $40\text{ }\mu\text{m}$ 의 관상면에서 절편화하였다. 모든 절편을 항원 보존 용액($49\text{% PBS pH }7.0$, $50\text{% 에틸렌 글리콜, 1\% 폴리비닐 피롤리돈}$)으로 충전된 블록당 24개의 용기에 순차적으로 수집하였다. 즉시 염색되지 않는 절편은 -20°C 에서 저장되었다.

[0679]

[0679] 자유 부유 절편은 1:30,000으로 회색된 pSer129 알파 시누클레인 항체(마우스 항 알파 시누클레인(PSer129) 비오틴-(Wako - 010-26481))로 면역화학에 의해 염색되었다. 차단 혈청에서 나오는 모든 인큐베이션 용액은 비히클로서 트리톤 X-100을 갖는 트리스 완충된 식염수(TBS)를 사용하였으며; 모든 세정은 TBS로 수행되었다. 내인성 페옥시다제 활성은 0.9% 과산화수소 처리에 의해 차단되었고, 비-특이적 결합은 1.26% 전체 정상 혈청으로 차단되었다. 세정 후, 절편을 일차 항체로 밤새 실온에서 염색하였다. 비히클 용액은 투과성을 위해 0.3% 트리톤 X-100을 함유하였다. 세정 후, 절편을 실온에서 1시간 동안 아비딘-비오틴-HRP 복합체(Vectastain Elite ABC

kit Vector Laboratories, Burlingame, CA)와 함께 인큐베이션하였다. 세정 후, 절편을 디아미노벤지딘 테트라히드로클로리드(DAB) 및 0.0015% 과산화수소로 처리하여 가시적인 반응 생성물을 생성하고, 젤라틴화된(서빙된(subbed)) 유리 슬라이드에 탑재하고, 공기 건조시키고, 티오닌으로 가볍게 염색하고, 알콜에서 탈수시키고, 크실렌에서 클리어링하고, 퍼마운트(Permount)로 커버-슬리핑하였다.

[0680] p62/SQSTM1에 대한 형광 면역조직화학(P62는 인간의 루이소체에서 공동 응집되는 것으로 공지됨) 및 아미트랙커(Amytacker)(일반적으로 단백질 응집체에 대한 것) 염색은 부유 뇌 절편에서 수행되었다. VR6470은 아미트랙커로 염색된 응집 단백질의 수를 감소시키고 pS129와 함께 공동 국소화하는 것으로 나타났다. 이는 VR6470 항체가 포스포-시누클레인을 감소시킬 뿐만 아니라 시누클레인 응집체를 감소시킨다는 것을 나타낸다(데이터는 나타내지 않음).

[0681] 필드 pSer129 알파 시누클레인 신호당 pSer129 알파 시누클레인 신호의 정량화를 이용하여 선조체, 피질, 기저 측 편도체, 및 흑색질의 동측에서 병리학적 알파 시누클레인 응집을 정량하였다. 관심 영역(ROI)을 수동으로 표시하고, 상이한 뇌 영역에서 pSer129 알파 시누클레인 신호의 자동 정량화를 비시오파(VisioPharm) 6 소프트웨어(VisioPharm)로 수행하였다. pSer129 알파 시누클레인 신호를 정량하기 위해, 신호 면적(μm^2 의 마커 면적)의 값을 제공하는 선형 베이지안(Bayesian) 알고리즘이 이용되었다. 마커 면적은 상이한 뇌 영역을 커버하는 pSer129 알파 시누클레인 병리의 양을 반영한다. 모든 정량화는 통계 분석이 끝날 때까지 분별 없이 이루어졌다.

[0682] 데이터 분석이 마커 면적%(즉, μm^2 의 pSer129 신호 면적과 μm^2 의 관심 영역 면적 간의 비율)에 대해 수행되었다. 마커 면적%은 머리-꼬리에(rostro-caudally) 위치된 다수의 뇌 절편에 대해 반복적으로 평가되었으며(선조체: 브레그마(Bregma) +1.1에서 -0.94까지의 13-14 절편; 피질: +1.1에서 -0.94까지의 13-14 절편; 기저 측 편도체: -0.58에서 -2.06까지의 6-10 절편; 흑색질: -2.54에서 -3.88까지의 6-8 절편), AUC는 모든 시험 대상체에 대해 별도로 계산되었다.

[0683] 통계 분석을 위해 일원 분산 분석(ANOVA)을 고려하였다. 분산 분석 후, 어떠한 다중도 조정도 없이 평균들 간의 다중 쌍별 비교가 이어졌다(**, $p < 0.01$ 및 *, $p < 0.05$). 데이터는 정규성 및 등분산성 기준을 충족시키기 위해 로그 변환되었다. 그래프는 변환되지 않은 데이터의 기하 평균을 나타낸다.

[0684] 도 15a 및 도 15b에 도시된 바와 같이, 6470 항체(6470gL3gH36 IgG4P에 상응)는 수컷 C57B1/6J 야생형 마우스에 뮤린 PFF 투여 후 1개월(도 15a) 및 수컷 SNCA-OVX 마우스에 인간 PFF 투여 후 3개월(도 15b)에 선조체, 대뇌 피질, 편도체 및 흑색질을 포함한 4개의 상이한 동측 뇌 영역에서, 3개의 대조군 그룹과 비교하여, 알파 시누클레인 병리(즉, pSer129 알파 시누클레인 신호)를 현저히 감소시켰다.

[0685] 도 16은 각각 C57B1/6J 야생형 마우스의 동측 피질, 선조체, 편도체 및 흑색질에서 Ser129에서 인산화된 알파 시누클레인의 정량화(마커 면적의 AUC%)을 도시한다. 음성 대조군 항체 및 비교기 C-말단 항체는 비히클 처리된 그룹과 비교하여 알파 시누클레인 병리를 감소시키지 않았다. 대조적으로, 6470 항체는 뮤린 PFF로 주사된 C57B1/6J 마우스의 3개의 대조군 그룹과 비교하여 피질, 선조체, 편도체 및 흑색질에서 병리 수준(즉, pSer129 알파 시누클레인 신호)을 상당히 감소시켰다($P < 0.01$). C57B1/6J 야생형 마우스에서 시험 시, 6470으로 처리된 그룹은 4개의 상이한 구조 및 그 중에서 주사 부위로부터 면 3개의 영역(피질, 흑색질 및 편도체)에서 상당히 감소된 수준의 pSer129 알파 시누클레인을 나타내었다.

[0686] 인간 PFF로 주사된 SNCA OVX 마우스에서, 6470 항체는 비히클, 음성 대조군 항체(101.4) 및 비교기 C-말단 항체를 받은 마우스와 비교하여 피질 및 선조체에서 병리 수준을 상당히 감소시켰다. SNCA-OVX 마우스에서, 6470은 주사 부위로부터 면 적어도 하나의 구조(대뇌 피질)와 함께 적어도 2개의 상이한 뇌 구조(피질 및 선조체)에서 상당히 감소된 수준의 pSer129를 나타내었다.

[0687] 이들 결과는 본 발명의 구조적 특징을 포함하는 항체, 예컨대 6470gL3gH36 IgG4P가 Ser129에서 인산화된 알파 시누클레인의 생체내 출현을 방지할 수 있음을 입증한다.

[0688] 또한, 결과는 C-말단 영역에서 a-syn에 결합하는 모든 항체가 생체내에서 효과적이지 않다는 것을 입증한다. 높은 친화도로 알파 시누클레인의 C-말단에 결합하고 세포 기반 검정에서 알파 시누클레인 응집을 방지하는 데 효과적인 비교기 항체는 생체내에서 Ser129 인산화를 방지하지 못하였다.

[0689] 따라서, 본 발명의 항체는 파킨슨 질환(PD)(파킨슨 질환의 특발성 및 유전된 형태 포함), 루이소체를 갖는 치매 (DLB), 광범위 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머 질환의 루이소체 변이(LBVAD), 조합된 알츠하이머 및 파킨슨

질환, 다계통 위축증(MSA), 및 뇌 철 축적 유형-1을 갖는 신경변성(NBIA-1)을 포함하는, 예컨대 Ser129 인산화의 증가를 특징으로 하는 경우, 알파 시누클레인병증을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0690] 실시예 10: 마우스에서 항체 6470의 약동학

수컷 C57/B16 마우스(약물당 n=3)에 항체 6470gL3gh36 IgG4P(서열 번호 17 및 33을 포함; 도 17 및 이후에는 간단히 6470으로 지칭)를 2 mg/kg의 단일 용량으로 정맥내 주사하였다.

꼬리 정맥으로부터 혈액 샘플을 채취하고(주사로부터 0.083, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168 및 336시간) 실온에서 응고시켰다. 원심분리 후 혈청을 분리한 후, 분석할 때까지 동결시켰다. LC-MS/MS에 의해 6470을 정량하였다. 연구로부터의 혈청 샘플을 해동시키고, 대조군 마우스 혈청으로 상이한 농도로 스파이킹된 6470 또는 비교기 항체를 사용하여 준비된 교정선에 대해 정량하였다. LC-MS/MS 시스템에 시료를 주입하기 전에, 혈청을 각각 아세토니트릴(VWR, UK), TCEP-트리스(2-카르복시에틸) 포스핀 히드로클로리드(Sigma, UK) 및 요오도아세트아미드(Sigma, UK)를 사용하여 변성, 환원 및 알킬화하였다. 이어서, 알킬화된 샘플을 100 mM 중탄산암모늄 버퍼(Sigma, UK)에서 재구성하고 37°C에서 트립신(Promega, UK) 효소를 사용하여 밤새 분해시켰다. pH를 낮추기 위해 샘플에 포름산을 침가함으로써 분해를 중단시킨 후, 워터스 HLB SPE 플레이트를 사용하여 탈염시켰다. 생성된 용출물을 진공 증발기를 사용하여 증발시켰다. 샘플을 완전히 건조시킨 후, 0.1% 포름산을 함유하는 95/5: 물/아세토니트릴로 재구성하고 LC-MS/MS 시스템에 주입하였다. LC-MS/MS 분석은 AB Sciex QTrap 6500 삼중 사중 질량 분석기에 커플링된 시마주 프로미넌스(Sachimadzu prominence) HPLC 시스템에 의해 수행되었다. 분해된 샘플을 오토 샘플러로 50°C로 유지된 역상 고성능 액체 크로마토그래피 컬럼(Phenomenex Aeris C18 peptide column 100X2.1mm, 2.6 μm)에 주입하였다. 0.1% 포름산 중의 5-70% 아세토니트릴의 선형 구배를 6분 동안 적용한 후, 0.6 ml/분의 유속으로 0.8분에 걸쳐 0.1% 포름산 중의 95% 아세토니트릴로 증가시켰다. 질량 분석기는 전이당 50 밀리초의 정체 시간에서 6470 또는 5811의 웹티드의 다중 전이를 검출하기 위해 다중 반응 모니터링 분석을 실행하도록 설정되었다. 데이터 분석은 어날리스트(Analyst) 1.6 소프트웨어 버전을 사용하여 수행되었다.

[0693] 이들 데이터는 항체 6470이 측정된 낮은 청소율 값에 기초하여 마우스에서 매우 우수한 약동학 특성(표 12 및 도 17a)을 보유한다는 것을 입증한다. 이들은 마우스에 투여된 인간 IgG 약물에 대해 인용된 전형적인 범위보다 우수한 것으로 보인다(3-16 ml/일/kg; Deng et al 2011 mabs 3:1 61-66).

[0694] 항체 6470의 약동학 특성은 또한 시노몰구스 원숭이에서도 조사되었으며 종래 기술의 항체와 비교되었다. 수컷 시노몰구스 원숭이(약물당 n=3 또는 n=6)는 2 또는 3 mg/kg의 항체 6470gL3gh36 IgG4P(6470) 및 또 다른 비교기 항-알파 시누클레인 항체(아미노산 118-126 내에서 알파 시누클레인에 결합하는 항-알파 시누클레인 IgG1 항체; WO2013/063516)의 단일 용량으로 정맥내 주사되었다.

[0695] 혈액 샘플을 다수 시점(주사로부터 0.083, 1, 3, 6, 24, 48, 96, 168, 240, 336, 504, 576, 672시간)에서 취하여 실온에서 응고시켰다. 원심분리 후 혈청을 분리한 후, 분석할 때까지 동결시켰다. 샘플을 해동시키고 LC/ESI MS/MS를 사용하여 분석하였다. 6470의 경우, 본 실시예에서 이전에 기재된 방법을 이용하였으며, 정량화는 시노몰구스 혈청에서 표준 곡선을 설정함으로써 수행하였다. 비교기 항체의 경우, 말 미오글로빈을 내부 표준으로서 사용하였으며, 정량화는 신호를 내부 표준 신호와 비교함으로써 수행되었다. 제조를 위해, 샘플을 내부 표준과 혼합하였다. 이어서, 샘플을 변성시키고, 알킬화시키고, 결과적으로 밤새 효소 분해(트립신)하였다. 분해 후, 샘플을 회석하고, 모든 분석물의 시그너처 웹티드를 LC-MS/MS 분석하였다. 샘플은 한 번만 제조하고 2회 주입하였다(각 방법에 대해 한번).

[0696] 농도-시간 프로파일을 각각의 개별 동물에 대한 청소율 및 반감기 약동학 파라미터를 유도하기 위해 비-구획 분석을 이용하는 파사이트 포에닉스(Pharsight Phoenix) 6을 사용하여 분석하였다. 각 문자에 대한 평균 및 표준 편차 파라미터가 보고되었다.

[0697] 도 17b 및 표 12에 나타난 바와 같이, 항체 6470은 또한 낮은 청소율을 나타내는 시노몰구스 원숭이에서 우수한 약동학 특성을 나타낸다. 마우스에서와 같이, 약동학 거동은 시노몰구스 원숭이에게 투여된 인간 IgG 약물에 대해 인용된 전형적인 범위보다 우수한 것으로 보인다(5-12 ml/일/kg; Deng et al 2011 mabs 3:1 61-66).

[0698] 비교기 항체에 대해 관찰된 시노몰구스에서의 빠른 청소율은 공개된 인간 데이터와 일치한다(JAMA Neurology 2018, 75, 10:1206-14). 항체 6470은 저조한 비정형 약동학 특징 및 파라미터를 나타내는 비교기 항체와 비교하여 노출 및 청소율 둘 다에서 비교기 항체보다 우수하다.

[0699]

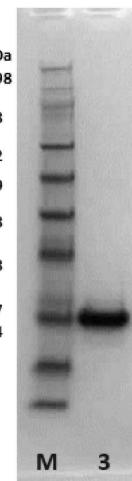
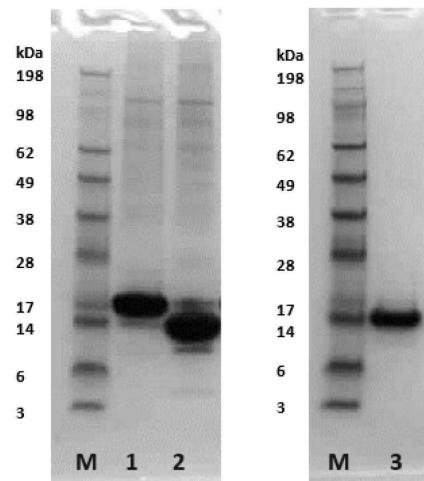
[표 12]

항체	청소율 (SD) ml/day/kg	
	마우스	시노물구스
6470	3.1 (0.7)	4.7 (0.8)
비교제		23.4 (9.8)

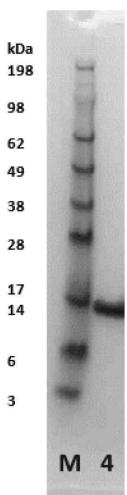
[0700]

도면**도면1**

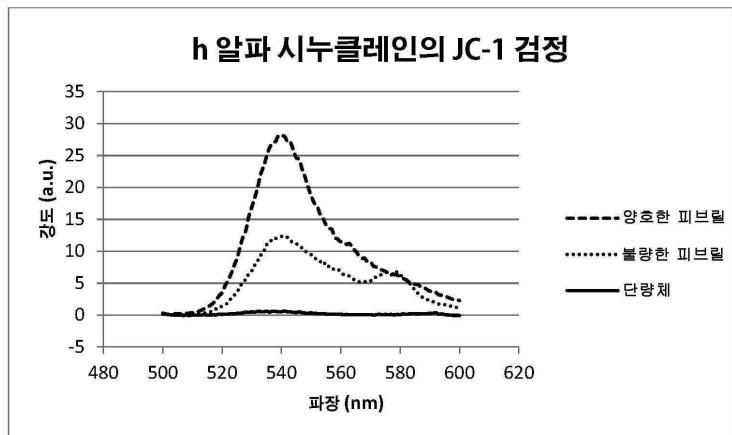
A



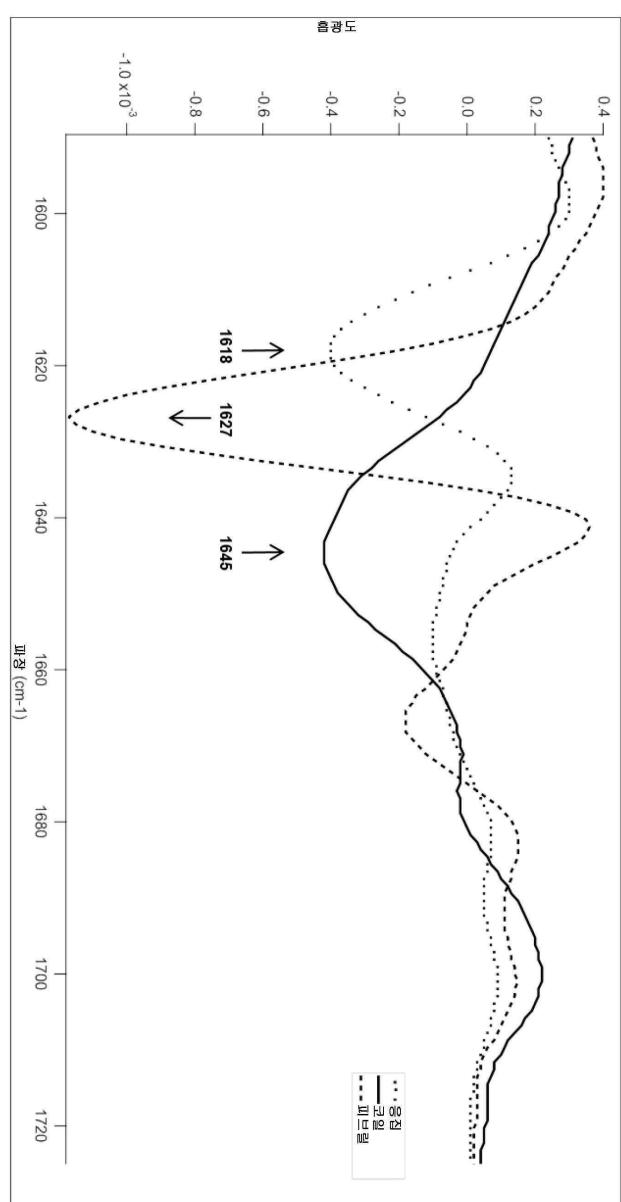
B



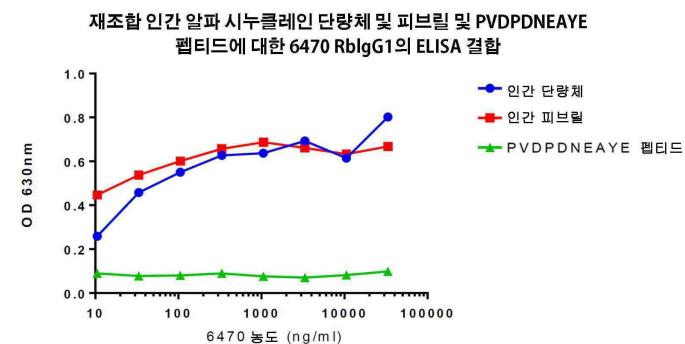
도면2a



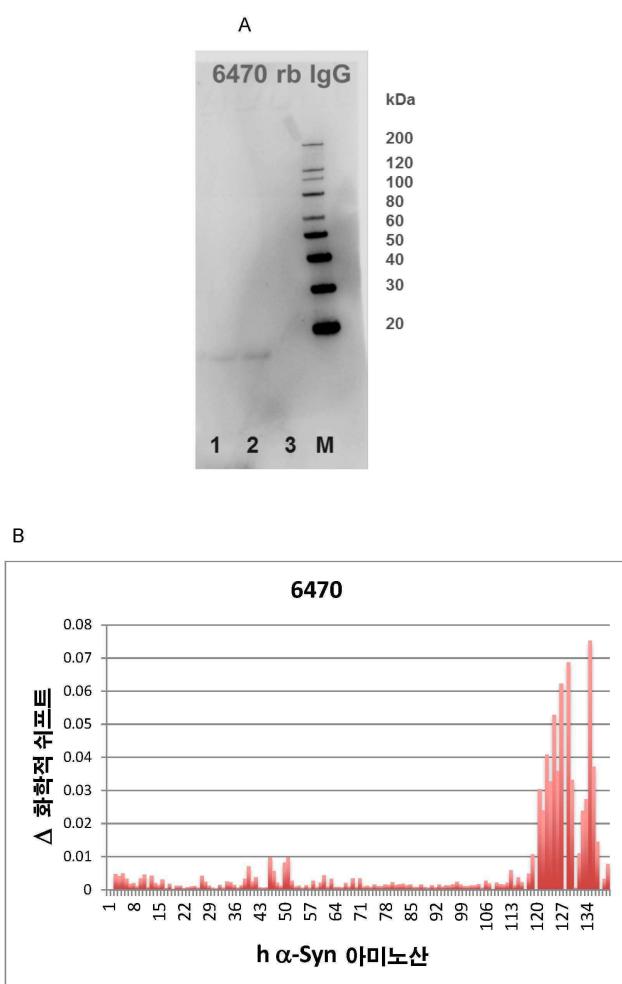
도면2b



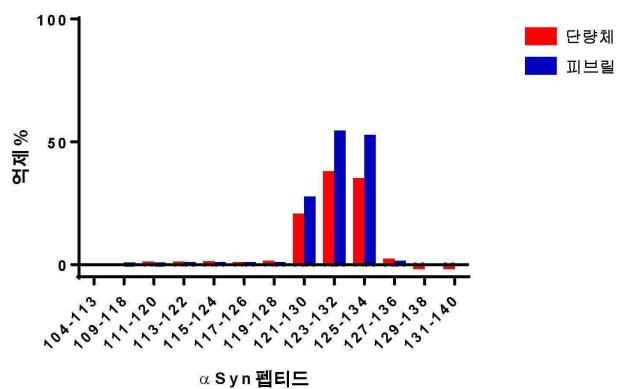
도면3



도면4

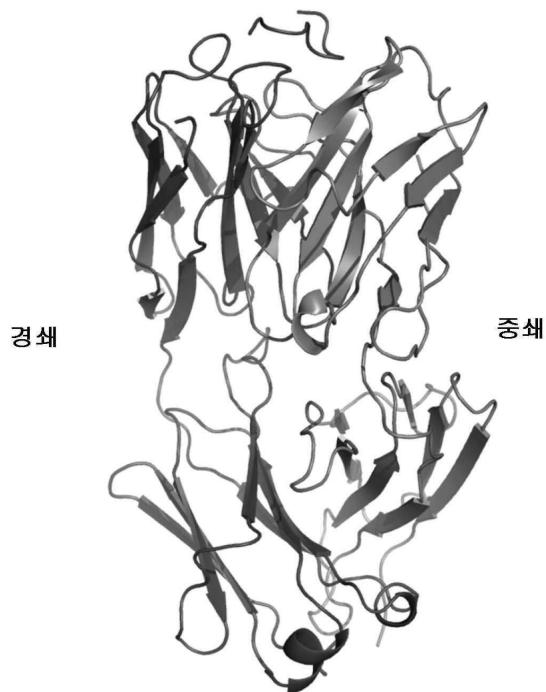


도면5

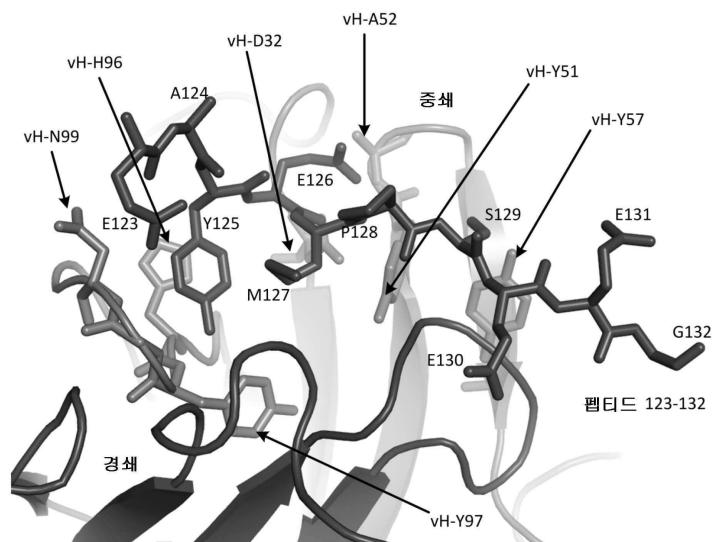


도면6

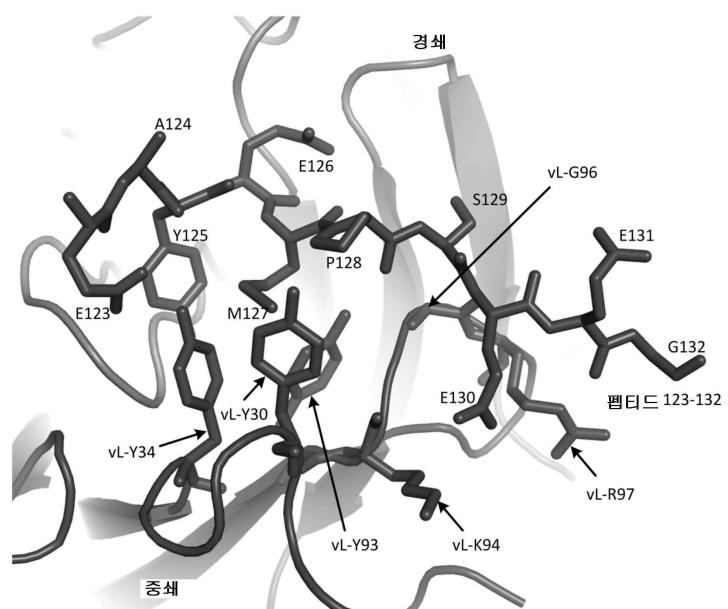
6470 펩티드 123-132



도면7



도면8

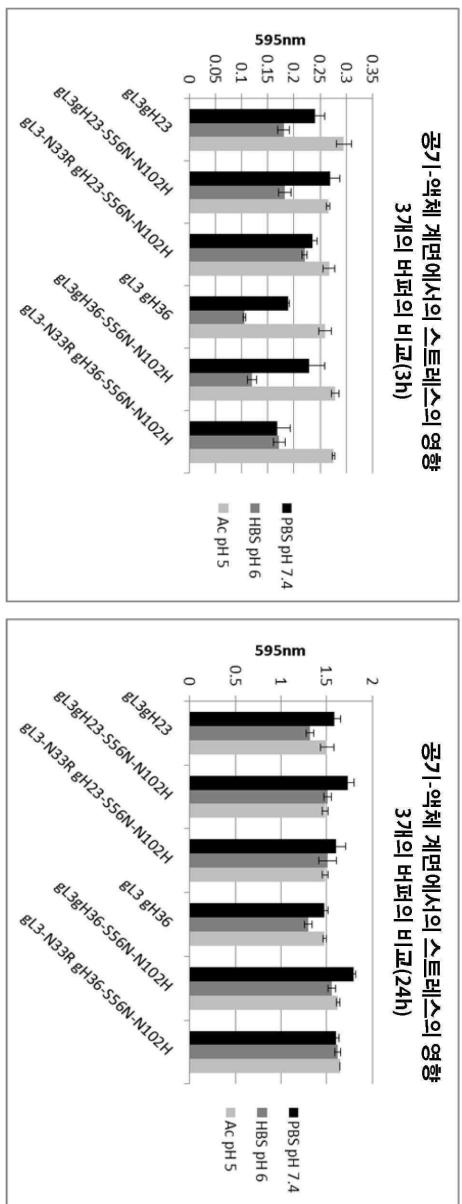


도면9

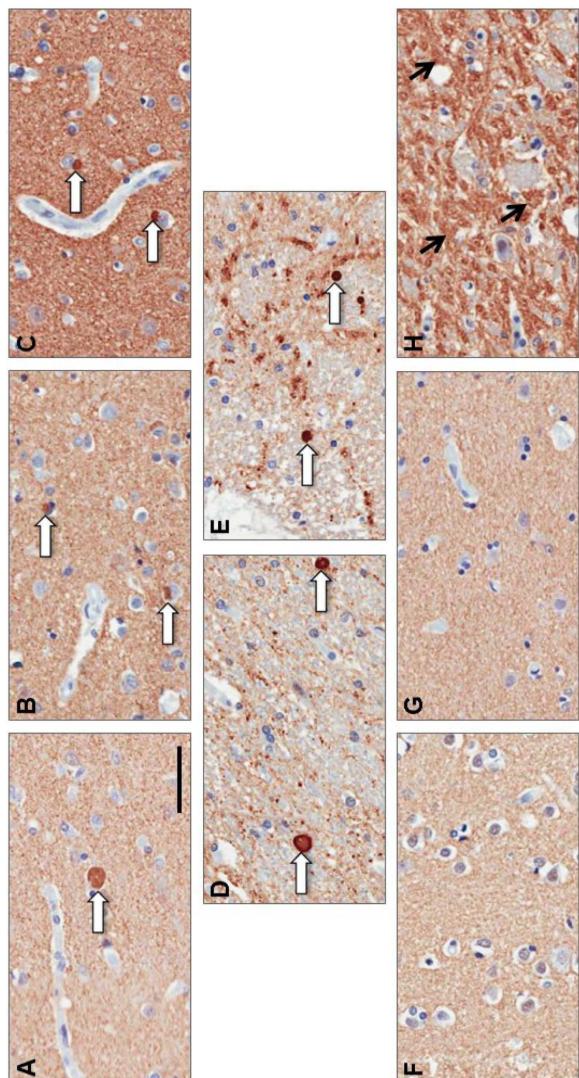
정체 6470
 AIVNQPSKSAVGDWVINGQASQSYKNYLAWFOOKGQPKLIVYASHTAAGVPSRFGSGSGTQFNTSDVCDAAATVYAGYGGNDGKJARGGJEEVVK
 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 IGKV1-16
 DQMTQSPSSLSAVGRVITOTRASOG SN - YIATWFOOKGQPKSPTIYASSLQGIVSRSGSGDFTTISLQPERFATVYCQOMSYP---LTTGGCKVIEK
 64709L3 N33R
 DICMTQPSLISASVGVRVITOCASQSYKNTYLAWFOOKGQPKLIVYASHTAAGVPSRFGSGSGQOPTMISLQPEDFATVYCAGYGGNDGDPAPGGTKVIEK
 DIQMTQPSLISASVGVRVITOCASQSYKNTYLAWFOOKGQPKLIVYASHTAAGVPSRFGSGSGQOPTMISLQPEDFATVYCAGYGGNDGDPAPGGTKVIEK

도면10

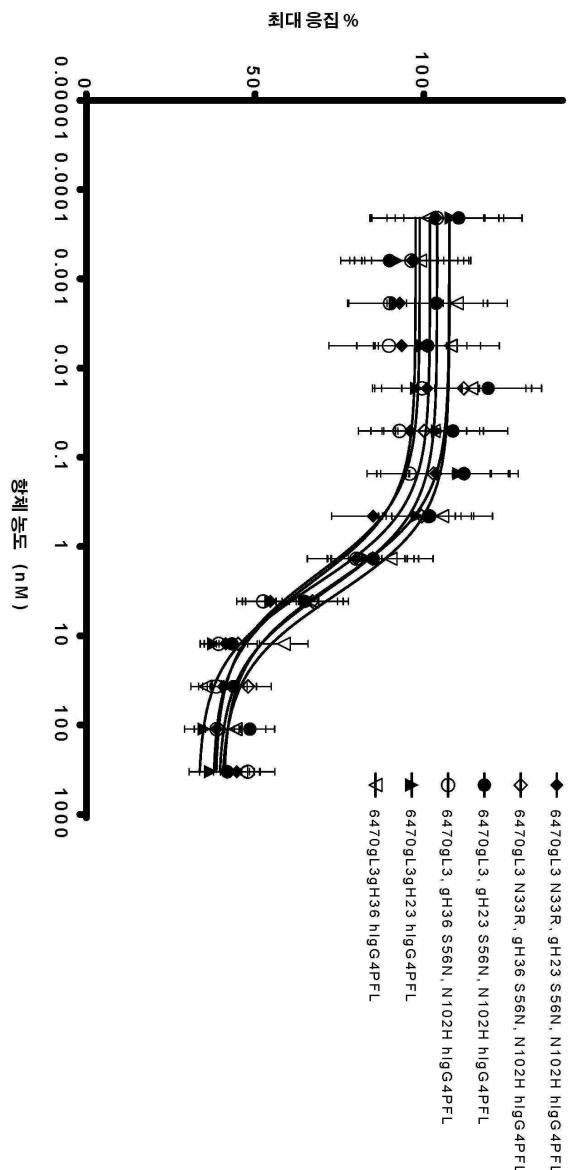
도면11



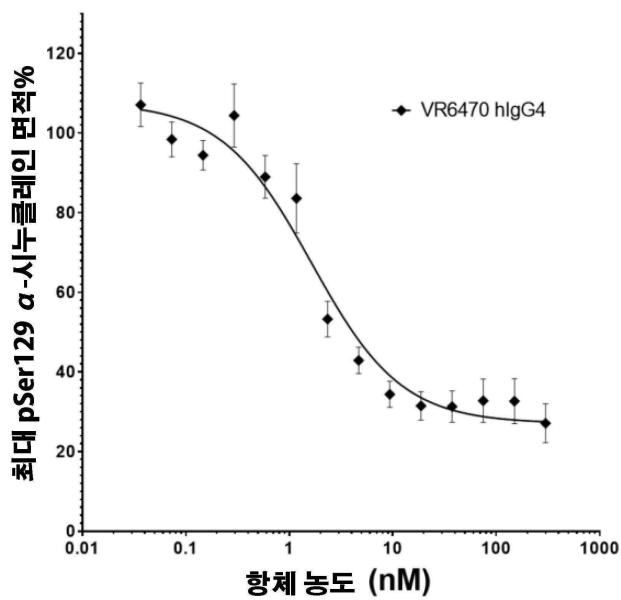
도면12



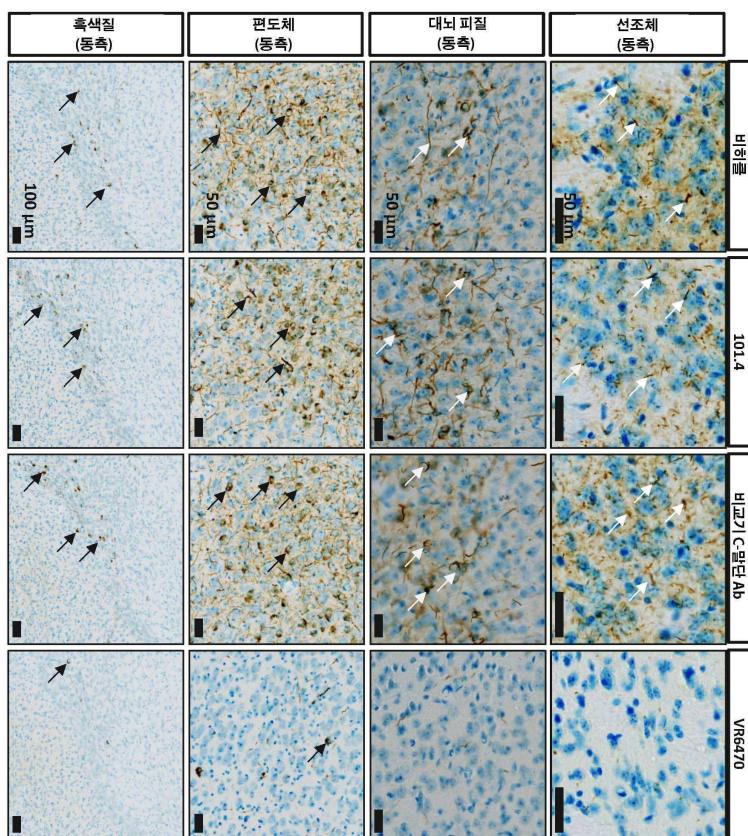
도면13



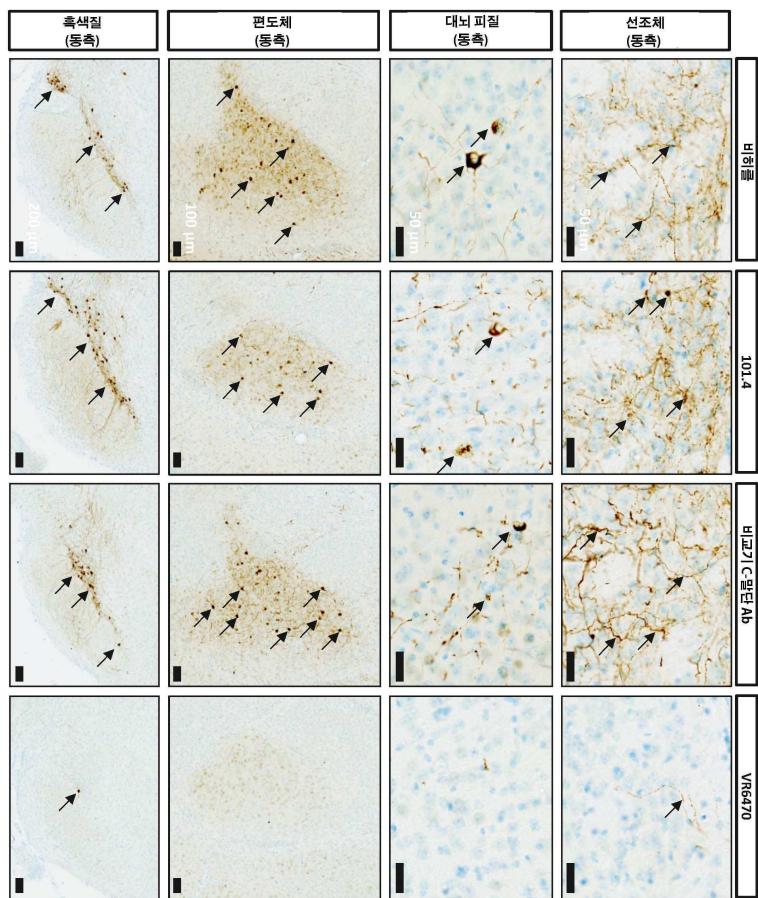
도면14



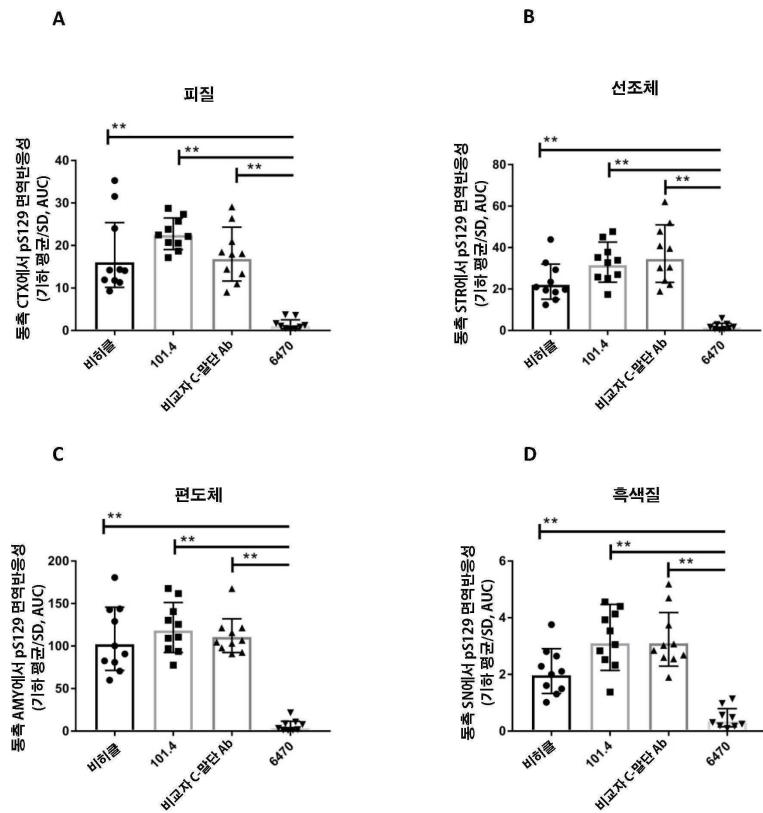
도면15a



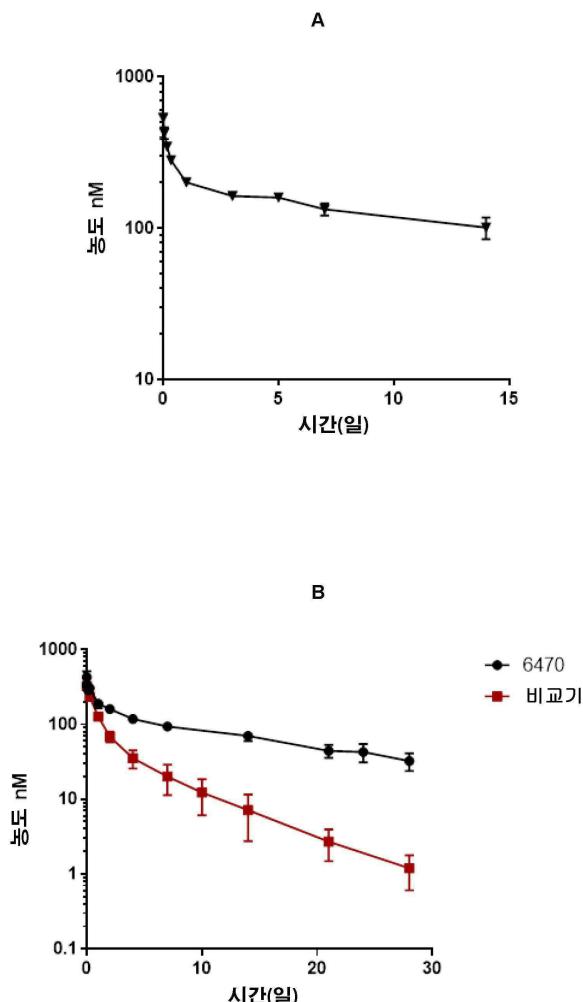
도면 15b



도면16



도면17



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> UCB Biopharma Sprl

<120> Antibodies

<130> PF0130-W0

<150> GB1720975.0

<151> 2017-12-15

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 1

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

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 2

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 3

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

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 4

Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp Met Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 5

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 6

Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu

1 5

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 N33R

<400> 7

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

1 5 10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 S56N

<400> 8

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10

15

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 N102H

<400> 9

Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu

1 5

<210> 10

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 11

Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Ala Val Gly

1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

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

<210> 12

<211> 336

<212> DNA

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 12

gccccatcgta tgacccagac tccatcttcc aagtctgtcg ctgtgggaga cacagtcacc 60

atcaattgcc aggccagtca gagtgtttat aagaacaact acttagcctg gtttcaacag 120
 aaaccagggc agccctccaa acaactgatc tatggtgcgt ccactctggc atctggggtc 180
 ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttaa ctctcaccat cagcgatgt 240
 gtgtgtgacg atgctgccac ttactactgt gcaggatata aagggtggtcg taatgtggt 300
 ttgcgtttcg gcccggggac cgaggtggtg gtcaaa 336

<210> 13

<211> 114

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 13

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr

65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His
 85 90 95
 Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 14

<211> 342

<212> DNA

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 14

cagtcgggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc	60
tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc cacgacatgt attgggtccg ccaggctcca	120

ggaaagggc tggaaatacat tggagccatt tatgcttagtg gtagcacata ctacgcgagc	180
tggcgaaag gccgattcac catctccaag acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc	240
agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgccca gaattcatta tgtaatagt	300
ggtgggttgt gggccaagg caccctggtc accgtctcga gt	342

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gL3 VL

<400> 15

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50	55	60
----	----	----

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly

85 90 95

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 16

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gL3 VL nucl.

<400> 16

gacattcaga tgacccagtc cccttcatca ctgtccgcga gcgtggcga cagagtgacc 60

attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaacaact acctggctg gttccagcaa 120

aagccggga aggccccaaa acagcttatac tacggtgcat ccactctcgc ctggggagtg 180

ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctgcgtccctg 240

caacccgagg atttcgccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc 300

ttcgcttttgc tgaggcac caaggtcgaa atcaag 336

<210> 17

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gL3 Light chain

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

65	70	75	80
----	----	----	----

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly

85	90	95
----	----	----

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210	215
-----	-----

<210> 18

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gL3 Light chain nucl.

<400> 18

gacattcaga tgaccaggc cccttcata ctgtccgcga gcgtggcgca cagagtgacc	60
---	----

attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaacaact acctggcctg gttccagcaa	120
---	-----

aagccggga aggcgc当地 acagcttata tacggtgcat ccactctcgc ctcgggagtg	180
--	-----

ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg	240
---	-----

caacccgagg atttcggcac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc	300
---	-----

ttcgctttg gtggaggcac caaggtcgaa atcaagcgta cggtggccgc tccctccgtg	360
--	-----

ttcatttcc caccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt cgtgtgcctg	420
ctgaacaact tctaccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag	480
tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg	540
tcctccaccc tgaccctgac caaggccgac tacgagaagc acaagggtgt a cgcctgcgaa	600
gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagtcc tcaaccgggg cgagtgc	657

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gL3 VL N33R

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly

85 90 95

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 20

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gL3 VL N33R nucl.

<400> 20

gacattcaga tgacctagtc cccttcatca ctgtccgcga gcgtggcga cagagtgacc 60

attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaaccgtt acctggcctg gttccagcaa	120
aagccggga aggcccaaa acagcttata tacgggtcat ccactctgc ctcgggagt	180
ccgagccgct tctcggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg	240
caacccgagg attcgcccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc	300
ttcgctttg gtggaggcac caaggtcgaa atcaag	336

<210

> 21

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gL3 Light chain N33R

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly

85 90 95

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 22		
<211> 657		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 6470 gL3 Light chain N33R nucl.		
<400> 22		
gacattcaga tgaccaggc cccttcatca ctgtccgcga gcgtggcgca cagagtgacc		60
attacgtgcc aagccagcca gtccgtgtac aagaaccgtt acctggcctg gttccagcaa		
aagccccgga aggccgc当地 aacgcttatac tacgggtcat ccactctcgc ctcgggagtg		
ccgagccgct tctcgggatc tgggtccgga actcagttca ccctgactat ctcgtccctg		
caacccgagg atttcgcccac ctactactgc gccggctata agggaggacg gaacgacggc		
ttcgcttttgc gtggaggcac caaggtcgaa atcaagcgta cggtggccgc tccctccgt		
ttcatcttcc caccctccgaa cgagcagctg aagtccggca cccgcctccgt cgtgtgcctg		
ctgaacaact tctaccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgcgcctgcag		
tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg		
tcctccaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaagggtgta cgcctgcgaa		
gtgacccacc agggcctgtc cagcccggtg accaagtctt tcaacccgggg cgagtgc		
<210> 23		
<211> 117		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 6470 gH23 VH		
<400> 23		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
		15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6479gH23 VH nucl.

<400> 24

gagggttcagc tgctggagtc tggaggcgaa cttgtccagc ctggaggagg cctgcgtctc	60
--	----

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca	120
---	-----

ccgggttaaag gtctggaata catcggcgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgca	180
--	-----

agctgggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg	240
--	-----

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggttact attgcgcgcg tattcattat	300
--	-----

ggtaatagtg gtgggttggt gggtcagggt actctggta ccgtctcgag c	351
---	-----

<210> 25

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gH23 Heavy chain

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		

275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
305	310	315
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		

340	345	350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
385	390	395
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		

405	410	415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
420	425	430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		

435 440
<210> 26

<211> 1332

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470gH23 Heavy chain nucl.

<400> 26

gagggttcagc tgctggagtc tggaggcggt cttgtccagc ctggaggggag cctgcgtctc 60

tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca	120
ccggtaaag gtctggaata catcgccgc atttatgcta gtggtagcac atactacgca	180
agctggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg	240
cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggttact attgcgcgcg tattcattat	300
gttaatagtgtgggttgc gggtcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca	360
aaggcccct ccgtgtcccc tctggcccct tgctcccggt ccaccccgaa gtctaccgcc	420
gctctggct gcctggtaa ggactactc cccgagcccg tgacagtgtc ctgaaactct	480
ggcggccctga cctccggcgt gcacacccctc cctgcgtgc tgcaactc cggcctgtac	540
tccctgtcct ccgtcgtgac cgtgcctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt	600
aacgtggacc acaaggccctc caacaccaag gtggacaagc gggtaatc taagtacggc	660
cctccctgcc cccctgccc tgccctgaa ttctggcg gacccctcg gttcctgttc	720
cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc tcccgaccc ccgaagtgc ctgcgtgggt	780
gtggacgtgt cccaggaaga tcccgagggtc cagttcaatt ggtacgtgaa cggcgtggaa	840
gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca actccaccta cgggtgggt	900
tccgtgtcga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtcaaggtg	960
tccaacaagg gcctgcctc cagcatgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc	1020
cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaa gaaccagggt	1080
tccctgacct gtctggtaa gggcttctac ccctccgaca ttgcgtgaa atgggagttcc	1140
aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccgt tgctggacag cgacggctcc	1200
ttcttcgtgt actctcggt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtttc	1260
tcctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg	1320
agcctggca ag	1332

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gH23 VH S56N N102H

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His

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

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gH23 VH S56N N102H nucl.

<400> 28

gagggttcagc tgctggagtc tggaggcgaa cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc	60
tcttgtgcag taagcgccat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca	120
ccgggttaaag gtcttgaata catcgccgcc atttatgcta gtggtaatac atactacgca	180
agctggcgaa aaggccgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg	240
cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcgggttact attgcgcgca tattcattat	300

ggtcacagtgtgggttggc gggtcagggt actctggta ccgtctcgag c	351
---	-----

<210> 29

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gH23 Heavy chain S56N N102H

<400> 29

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His			
20	25	30	
Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile			
35	40	45	
Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys			
50	55	60	
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
115	120	125	
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
130	135	140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
165	170	175	
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
180	185	190	
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn			
195	200	205	
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro			
210	215	220	
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260 265 270

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

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 30

<211> 1332

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gH23 heavy chain S56N N102H nucl.

<400> 30

gagggttcagc tgctggagtc tggaggcggt cttgtccagc ctggaggggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaag gtctgaaata catcgccgc atttatgcta gtggtaatac atactacg 180

agctggcgaa aaggccgtt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtac 240
 cagatgaact ctctcggtc ggaagacact gcggttact attgcgcgcg tattcattat 300
 ggtcacagt gtgggttg 360
 aaggccccct ccgtgttccc tctggccct tgctcccggt ccacccgaa gtctacc 420
 gctctggct gcctggtaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaa 480
 ggcgccctga cctccggcgt gcacacccctc cctgcccgtc tgca 540
 tccctgtcct ccgtcggtac cgtgccctcc tccagccctgg gcaccaagac ctacac 600

aacgtggacc acaaggccctc caacaccaag gtggacaagc gggtgaaatc taagtac 660
 cctccctgccccc tggccctgaa ttctggcg gacccctcggttcc 720
 cccccaaggcccaaggacac cctgatgatc tccggaccc ccgaagtgtac ctgcgtgg 780
 gtggacgtgt cccaggaaga tcccgaggc cagttcaatt ggtacgtgaa cggcgtgg 840
 gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagtta actccaccta ccgggtgg 900
 tccgtgtcga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagg 960
 tccaacaagg gcctggccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccag 1020

cgcgagcccc aggtgtacac cctggccctt agccaggaag agatgaccaa gaaccagg 1080
 tccctgacct gtctggtaa gggcttctac ccctccgaca ttggccgtgaa atgggagtcc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccgt tgctggacag cgacggctcc 1200
 ttcttcgtt actctcggt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtttc 1260
 tcctgctccg tggatgcacga gggccctgca aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320
 agcctggca ag 1332

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gh36 VH

<400> 31

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His

20	25	30
----	----	----

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

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> 6470 gh36 VH nucl.

<400> 32

gagggtcagc tgctggagtc tggaggcgaa cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacactgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120

ccgggttaaag gtctggaata catcgccgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgca 180

agctgggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcgggttact attgcgcgcg tattcattat 300

ggttaatagtg gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag c 351

<210> 33

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gh36 Heavy chain

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His
 20 25 30
 Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ile His Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
305	310	315
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
340	345	350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
385	390	395
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
405	410	415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
420	425	430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	
<210> 34		
<211> 1332		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 6470 gh36 Heavy chain nucl.		
<400> 34		
gagggttcagc tgctggagtc tggaggcggt cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60		
tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120		
ccgggttaag gtctggaata catcgccgcc atttatgcta gtggtagcac atactacgct 180		

agctggcga aaggccgtt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtactg	240
cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggttact attgcgcg tattcattat	300

gttaatagtgtgggttgggtactctggta cctgtcgag cgcttctaca	360
aaggccccct ccgtgttccc tctggccct tgctcccggt ccaccccgaa gtctaccgcc	420
gctctggct gcctggtaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctgaaactct	480
ggcgcctgaa cctccggcgt gcacacccctt cctgcccgtc tgcaactcctc cggcctgtac	540
tccctgtcct ccgtcgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt	600
aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc gggtggaaatc taagtacggc	660
cctccctgccc cccctgccc tgccctgaa ttctggcgt gacccctgtc gttccctgttc	720

cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc tcccgaccc cccaaggatgac ctgcgtggtg	780
gtggacgtgt cccaggaaga tcccggaggtc cagttaatt ggtacgtgga cggcgtggaa	840
gtgcacaatg ccaagaccaa gcccgagag gaacagttca actccaccta ccgggtggtg	900
tccgtgtga ccgtgtgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg	960
tccaaacaagg gcctgcctc cagcatgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc	1020
cgcgagccccc aggtgtacac cctggccctt agccaggaag agatgaccaa gaaccagggt	1080
tccctgacct gtctggtaa gggcttctac ccctccgaca ttgcgtgga atggagtcc	1140

aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccgt tgctggacag cgacggctcc	1200
ttcttcgtt actctcggtt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtcttc	1260
tcctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg	1320
agcctggca ag	1332

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gH36 VH S56N N102H

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His

20 25 30

Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Tyr Ile

35	40	45
Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys		
50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
65	70	75
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
100	105	110
Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 36		
<211> 351		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 6470 gH36 VH S56N N102H nucl.		
<400> 36		
gaggttcagc tgctggagtc tggaggcgaa cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60		
tcttgtcag taagcggcat cgacctgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120		
ccgggttaag gtctggaata catcgccgcc atttatgcta gtggtaatac atactacgca 180		
agctggcgaa aaggccgttt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240		
cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggttact attgcgcgcg tattcattat 300		
ggtcacagtgtgtgggttgggt actctggta ccgtctcgag c 351		
<210> 37		
<211> 444		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 6470 gH36 Heavy chain S56N N102H		
<400> 37		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His		

20	25	30
Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Tyr Ile		
35	40	45
Gly Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys		
50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
65	70	75
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Ile His Tyr Gly His Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
115	120	125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
145	150	155
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
180	185	190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn		
195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
260	265	270

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

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 38

<211> 1332

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6470 gH36 Heavy chain S56N N102H nucl.

<400> 38

gagggttcagc tgctggagtc tggaggcggt cttgtccagc ctggaggggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacactgtcc agccacgaca tgtattgggt acgtcaggca 120

ccgggttaag gtctggaata catcgccgcc atttatgcta gtggtaatac atactacgcg 180

agctgggcga aaggccgttt caccatctcc cgtgactcca gcaaaaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgca tattcattat	300
gtcacagt gtgggttgtg gggtcagggt actctggta ccgtctcgag cgcttctaca	360
aaggccccct ccgtgttccc tctggccct tgctcccggt ccaccccgaa gtctaccgcc	420
gctctggct gcctgtcaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaaactct	480

ggcgcctgta cctccggcgt gcacacccctc cctgcgtgc tgcaagtccctc cggcctgtac	540
tccctgtcct ccgtcgtgac cgtgcctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacaccgt	600
aacgtggacc acaaggccctc caacaccaag gtggacaagc gggtgaaatc taagtacggc	660
cctccctgcc cccctgccc tgccctgaa ttctggcgt gacccctccgt gttcctgttc	720
cccccaagg ccaaggacac cctgatgatc tcccgaccc ccgaagtgtac ctgcgtgggt	780
gtggacgtgt cccaggaaga tcccgagggtc cagttcaatt ggtacgtgaa cggcgtggaa	840
gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagtta actccaccta cgggtgggt	900

tccgtgtga ccgtgtgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggt	960
tccaacaagg gcctgcctc cagcatgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc	1020
cgcgagcccc aggtgtacac cctgccccct agccaggaag agatgaccaaa gaaccagggt	1080
tccctgacct gtctggtcaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgaa atgggagtcc	1140
aacggccage ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggctcc	1200
ttcttcgtt actctcggt gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtttc	1260
tcctgctccg ttagtgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg	1320

agcctggca ag	1332
--------------	------

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IGKV1-16 JK4 acceptor framework

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

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

<210> 40

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IGKV1-16 JK4 acceptor framework nucl.

<400> 40

gacatccaga tgaccaggc tccatctca ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtccacc	60
atcaacttgtc gggcgagtca gggcattagc aattatttgc cctgggttca gcagaaaccca	120
gggaaaagccc ctaagtcctt gatctatgtc gcatccagg ttgaaatgtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctctcac tttcgccgga	300

gggaccaagg tggagatcaa a	321
-------------------------	-----

<210> 41

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IGHV3-23 JH4 acceptor framework

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

100 105 110
 Ser

<210> 42
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> HumanIGHV3-23 JH4 acceptor framework nucl.

<400> 42

gaggtgcagc tgggggaggc ttggtagc ctgggggtc cctgagactc	60
tcctgtcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggttag cacatactac	180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat	240

ctgcaa atga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatacttt	300
gactactggg gccaaggaac cctggtcacc gtctcctca	339

<210> 43

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rabbit Fc - human 68-140 a-syn

<400> 43

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

1 5 10 15	
Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys Lys Asp Gln	
20 25 30	

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

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 100 105 110
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp
 115 120 125
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg
 130 135 140
 Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg
 145 150 155 160

 Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys
 165 170 175
 Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 180 185 190
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr
 195 200 205
 Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu
 210 215 220

 Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp
 225 230 235 240
 Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val
 245 250 255
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro
 260 265 270
 Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His

275

280

285

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

290

295

300

Gly Lys

305

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 X33

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Asn (N) or Arg (R)

<400> 44

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

1

5

10

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 X56

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Ser (S) or Asn (N)

<400> 45

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Xaa Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1

5

10

15

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 X102

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Asn (N) or His (H)

<400> 46

Ile His Tyr Gly Xaa Ser Gly Gly Leu

1 5

<210

> 47

<211> 216

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 47

Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Ala Val Gly

1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Gly Gly

85 90 95

Arg Asn Asp Gly Phe Ala Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100 105 110

Arg Thr Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp

115 120 125

Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr

130 135 140

Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser

180 185 190

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

195 200 205

Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys

210 215

<210> 48

<211> 437

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 48

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys

115 120 125

Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys

130 135 140

Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu

145 150 155 160

Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val
 180 185 190
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 195 200 205
 Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu
 210 215 220
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 225 230 235 240
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 245 250 255
 Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu
 260 265 270
 Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser
 275 280 285
 Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu
 290 295 300
 Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro
 325 330 335
 Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser
 340 345 350
 Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser
 355 360 365
 Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr
 370 375 380
 Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser

405	410	415
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser		
420	425	430
Arg Ser Pro Gly Lys		
435		
<210> 49		
<211> 227		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 6470 rabbit Fab-His heavy chain		
<400> 49		
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro		
1	5	10
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His Asp		
20 25 30		
Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly		
35	40	45
Ala Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly		
50	55	60
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr		
65	70	75
Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile His		
85 90 95		
Tyr Gly Asn Ser Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
100	105	110
Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys		
115	120	125
Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys		
130	135	140
Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu		
145	150	155
Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu		

165

170

175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Gln Pro Val

180

185

190

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr

195

200

205

Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro His His His His His His

210

215

220

His His His

225