

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 9일 (09.01.2020)



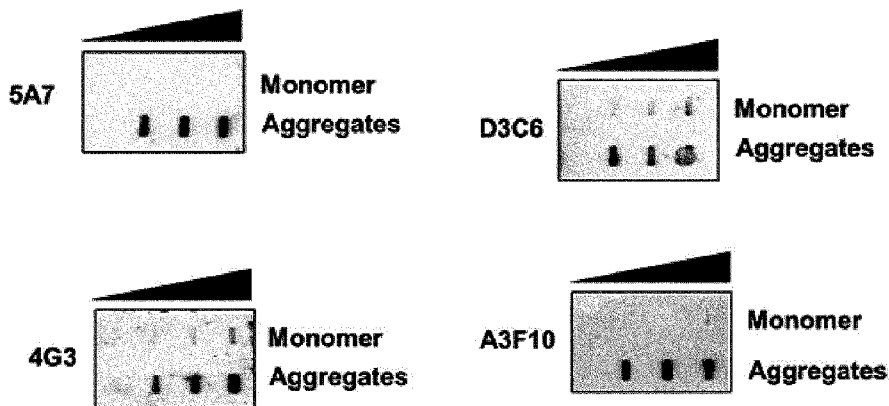
(10) 국제공개번호
WO 2020/009482 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01) (CHOI, Min Sun); 16988 경기도 용인시 기흥구 언동로 217번길 31, 205동 1704호, Gyeonggi-do (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/008170 (74) 대리인: 특허법인 하나 (HANA IP LAW FIRM); 06235 서울시 강남구 테헤란로 14길 5, 3층, Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2019년 7월 3일 (03.07.2019)
- (25) 출원언어: 한국어 (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (26) 공개언어: 한국어 (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 우선권정보: 62/693,469 2018년 7월 3일 (03.07.2018) US
- (71) 출원인: 에이비엘바이오 주식회사 (ABL BIO, INC.) [KR/KR]; 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김동인 (KIM, Dongin); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR). 김연주 (KIM, Yeunju); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR). 안성원 (AN, Sungwon); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR). 안진형 (AHN, Jinhyung); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR). 손용규 (SON, Yong-Gyu); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR). 이승재 (LEE, Seung-Jae); 05065 서울시 광진구 아차산로 262, D동 3902호, Seoul (KR). 김태경 (KIM, Tae Kyung); 08767 서울시 관악구 조원로 16길 12, 102동 805호, Seoul (KR). 최민선

(54) Title: ANTI-ALPHA-SYNUCLEIN ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 항 알파-시누클레인 항체 및 그 용도

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to an anti- α -Syn antibody or antigen-binding fragment thereof, and α -Syn detection and diagnosis of related diseases using same.

(57) 요약서: 본 발명은 항 a-Syn 항체 또는 이의 항원 결합단편, 이를 이용한 a-Syn 검출 및 관련 질환의 진단에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/009482 A1

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 항 알파-시누클레인 항체 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편, 이를 이용한 알파-시누클레인 검출 및 관련 질환의 진단에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 알파-시누클레인(α -Synuclein, α -syn)은 뉴론의 전 시냅스 말단에서 주로 발현되며, 정상 상태에서는 자연적으로 접하지 않은 상태의 단량체로 존재한다. 알파-시누클레인은 자발적 및 비자발적 운동의 시작과 정지를 제어하는 중요한 일종의 신경 전달 물질인 도파민의 방출을 규제하는 것을 돕는다. 특히 알파-시누클레인의 기능은 시냅스 활동의 증가 및 나이가 들에 따라서 중요하며, 신경퇴화의 중요한 인자이다.
- [3] 그러나, 병적인 상태에서 알파-시누클레인은 액적(droplet), 인지질 이중막 또는 지질막 등과의 결합 및 상호작용을 통해 구조적 변화를 일으켜 접힌 또는 폴딩된 α -헬리칼 형태의 2차 구조를 형성하여 이량체(dimer), 올리고머(oligomer) 및/또는 섬유상 형태의 분자를 포함하는 응집체를 형성하게 된다.
- [4] 이러한 알파-시누클레인 응집체는 세포에 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 다계통 위축증 (multiple system atrophy, MSA), 루이소체 치매 (dementia with Lewy bodies, DLB), 그 외 다양한 질환의 신경세포 내에서 발견되는 비정상적인 단백질 응집체인 루이소체의 주성분이다. 또한 알파-시누클레인의 인산화, 또는 유비퀴틴화와 같은 번역 후 변형도 알파-시누클레인의 응집 및 신경독성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 알파-시누클레인은 동물실험 및 세포실험에서도 도파민 신경세포를 사멸시키고 염증반응을 유발하며, 실험동물에서 파킨슨 병증과 유사한 운동증상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 알파-시누클레인 응집은 파킨슨 병, 파킨슨질환성 치매, 루이소체 치매, 다계통위축증 및 기타 다수의 신경축삭 질환을 포함하는 시누클레인병(synucleinopathy)라고 불리는 일군의 신경퇴행성 질환의 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.
- [5] 이에, 알파-시누클레인이 시누클레인병 치료에 대한 표적이 되고 있으며, 나아가 이를 표적으로 하여 조기에 진단함으로써 치료 효과를 더욱 높이기 위한 기술 개발이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편을 제공하는 것이다.

- [7] 본 발명의 다른 목적은 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 포함하는 재조합 세포를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 알파-시누클레인 검출용 조성물, 알파-시누클레인 검출용 키트 및 알파-시누클레인 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 시누클레인병(a-synocleinopathy) 진단용 키트 및 시누클레인병 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 시누클레인병 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 일 예는 항 알파-시누클레인(α -Synuclein, α -syn) 항체 또는 이의 항원 결합단편으로서, 상기 항체 또는 항원결합 단편은 (i) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3의 상보성 결정부위를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 (ii) CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 상보성 결정부위를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하며, 상기 CDRH1은 서열번호 1 내지 5로부터 선택되고, 상기 CDRH2는 서열번호 6 내지 10으로부터 선택되고, 상기 CDRH3는 서열번호 11 내지 15로부터 선택되며; 상기 CDRL1은 서열번호 16 내지 20으로부터 선택되고, 상기 CDRL2는 서열번호 21 내지 25로부터 선택되고, 상기 CDRL3는 서열번호 26 내지 30으로부터 선택되는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편에 관한 것이다.
- [12] 구체적으로, 상기 상기 중쇄 가변영역의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 상기 경쇄 가변영역의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 서열은 다음 중 어느 하나인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편인 것일 수 있다.
- [13] (a) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 1, 6 및 11 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 16, 21 및 26;
- [14] (b) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 2, 7 및 12 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 17, 22 및 27;
- [15] (c) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 3, 8 및 13 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 18, 23 및 28;
- [16] (d) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 4, 9 및 14 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 19, 24 및 29; 또는
- [17] (e) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 5, 10 및 15 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 20, 25 및 30.
- [18] 또한 구체적으로, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 31 내지 35로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편인 것일 수 있다.
- [19] 또한 구체적으로, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 36 내지 40으로부터

선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편인 것일 수 있다.

[20] 또한 구체적으로, 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 31 및 36; 서열번호 32 및 37; 서열번호 33 및 38; 서열번호 34 및 39; 또는 서열번호 35 및 40으로 표시되는 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[21] 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 중쇄 가변영역의 CDR1 내지 CDR3 서열은 하기 표 1에 나타난 아미노산 서열 중에서 선택되거나, 선택된 아미노산 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[22] [표1]

클론명	서열 번호	VH_CDRH1 아미노산서열	서열 번호	VH_CDRH2 아미노산서열	서열 번호	VH_CDRH3 아미노산서열
A3F10	1	GFTFSNYAMS	6	GISYDSGSKYYADSVKG	11	YLATFDY
D3C8	2	GFTFSNYSMS	7	GISPGGGSIYYADSVKG	12	DVRPCTRRNCSYD DGMDV
4G3	3	GYSFTGYWIQ	8	AIYPGDGDTR	13	GDGYYPY
5A7	4	GFTFNTNAMN	9	RIRSKSNNYATYYADSV KD	14	HGDFDY
7B7	5	GFIFSDYYMY	10	TISNGGSIYYPDSVKG	15	EGFAY

[23] 또한, 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 경쇄 가변영역의 CDR1 내지 CDR3 서열은 하기 표 2에 나타난 아미노산 서열 중에서 선택되거나, 선택된 아미노산 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[24] [표2]

클론명	서열 번호	VL_CDRL1 아미노산서열	서열 번호	VL_CDRL2 아미노산서열	서열 번호	VL_CDRL3 아미노산서열
A3F10	16	SGSSSNIGSNYVT	21	ADSKRPS	26	GTWDSLSGYV
D3C8	17	TGSSSNIGSNYVS	22	SDSNRPS	27	ATWDASLSAYV
4G3	18	KSSQSLNSTRN NYLA	23	WASTRES	28	WQSYSLPT
5A7	19	KSSQSLLDSDGKT YLN	24	LVSKLDS	29	WQGTHFPHT
7B7	20	KSSQSLLDSDGETY LN	25	LVSKLDS	30	WQGSHPHT

[25] 또한, 본 발명의 항체 중쇄 가변영역의 서열은 하기 표 3에 나타난 아미노산 서열 중에서 선택되거나, 선택된 아미노산 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[26]

[표3]

클론명	서열번호	중쇄가변영역 아미노산서열
A3F10	31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSG ISYDSGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYLA TFDYWGQGTLLTVSS
D3C6	32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYSMSWVRQAPGKGLEWVSG ISPGGGSIIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVRF CTRRNCSYDDGMDVWGQGTLLTVSS
4G3	33	EVQLQESGAE LAGPGASVRLSCKASGYSFTGYWIQWVKQRPGQGLEWIGAI YPGDGDTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGDG YYPYWGQGTTLTVSS
5A7	34	EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMN NLKTEDTAMY YCV RHGDFDYWGQGTTLTVSS
7B7	35	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSDYYMYWVRQTPERRLEWVATI SNGGSYIYPDSVKGRFTISRDN AKNNLYLQMSLLKSEDTAIYYCVTEGFAY WGQGTLLTVSS

[27] 또한, 본 발명의 항체 경쇄 가변영역의 서열은 하기 표 4에 나타난 아미노산 서열 중에서 선택되거나, 선택된 아미노산 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[28] [표4]

클론명	서열번호	경쇄가변영역 아미노산서열
A3F10	36	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVTWYQQLPGTAPKLLIYA DSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDSSLG YVFG GGTKLTVLG
D3C6	37	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNYVSWYRQLPGTAPKLLIYS DSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDASLSAYVFG GGTKLTVLG
4G3	38	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRNNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCWQSYSLP TFGAGTKLELK
5A7	39	DIVMTQSPLTLSVTFGQFPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQQSPKR LIYLVSKLDSAVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGT HFPH TFGAGTKLELK
7B7	40	DIVMTQSPLTLSVTFGQFPASISCKSSQSLDSDGETYLNWLLQRPQQSPKR LIYLVSKLDSAVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHPHT FGAGTKLELK

[29] 상기의 실질적인 서열 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 70%의 서열 상동성, 보다 바람직하게는 80%의 상동성 또는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일 구현예에서

개시된 중쇄 가변영역과 약 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 가질 수 있다. 또한, 다른 구현예에서 개시된 경쇄 가변영역과 약 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 가질 수 있다. 예를 들면 본 발명에 개시된 항체 또는 항원 결합단편의 서열과 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 나타내는 변이체의 경우, 임의의 변이는 CDR 보다는 가변영역의 골격에서 발생될 수 있다.

- [30] 본 발명에서, "항체"는 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 생체 내에서 생성된 것, 재조합적으로 생성된 것, 또는 인공적으로 합성된 것일 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에서 항체는 동물 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 및 인간 항체를 모두 포함한다. 또한 본 발명에서 항체란 항원 결합능을 보유한 항체의 항원 결합단편을 모두 포함할 수 있다.
- [31] 구체적으로, 상기 항체는 모든 서브타입의 면역글로불린(예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등)에서 선택된 것일 수 있다. 상기 IgG 형태의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입, 예컨대 IgG1 또는 IgG2 서브타입 형태일 수 있다. 또한, 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 미니바디, 도메인 항체, 항체 모방체(또는 합성 항체), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체 융합체(또는 항체 접합체) 및 이의 단편을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [32] 본 발명에서, "항원 결합 단편"은 항원에 대한 특이적 결합능을 갖는 항체의 일부 또는 이를 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. 예컨대, 항원결합단편은 항원(예컨대, 에피토프)과 상호작용하여, 항체에 항원에 대한 특이성 및/또는 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 일부 또는 이를 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 상기 상보성 결정 영역을 하나 이상 포함하는 항체 단편, 예컨대, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 생물학적 활성 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 생산되거나, 또는 예를 들면 온전한 항체를 효소적 또는 화학적 절단하여 생산될 수 있다. 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편에는 이로 제한하는 것은 아니다.
- [33] 상기 "상보성 결정 영역 (Complementarity-determining regions, CDR)"라 함은, 항체의 가변 영역 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위를 의미한다.
- [34] 본 발명에서, 알파-시누클레인은 인간 알파-시누클레인, 원숭이 알파-시누클레인 (예컨대, Rhesus 알파-시누클레인), 마우스 알파-시누클레인, 래트 알파-시누클레인 등의 포유동물 알파-시누클레인 들 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, 인간 알파-시누클레인은 알파-시누클레인(NCBI ID: NP_000336) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 알파-시누클레인은 인간 알파-시누클레인을 지칭하는 것일 수 있고, 본 발명에서 제공되는 항체 또는 이의 항원결합단편은 인간 알파-시누클레인 뿐만 아니라 원숭이(예컨대, Rhesus), 래트, 및/또는 마우스 알파-시누클레인에도 특이적인 결합능을 가질 수 있다. 나아가, 자연적으로 생산된 것이 아닌 재조합된 것일 수

있으며(non-naturally occurring; 예컨대, 화학적 합성 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다), 상기 재조합은 당해 기술 분야에 널리 공지된 기술을 이용할 수 있다.

- [35] 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은 알파-시누클레인의 C-말단 부위에 결합하며, 구체적으로 인간 알파-시누클레인 단백질의 서열번호 41의 아미노산 서열에서, C-말단 영역, 예를 들면 110번 잔기 내지 120번 잔기 또는 111번 잔기 내지 122번 잔기를 포함하는 연속하는 적어도 11개 또는 12개 아미노산으로 구성된 펩타이드를 포함하는 C-말단 영역일 수 있다. 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원결합단편은 상기 항원인식부위를 인식하여 알파-시누클레인 응집체에 대한 높은 친화도로 결합하는 것이 확인되었다.
- [36] 본 발명에서 "친화성 또는 친화도(affinity)"는 항체 또는 이의 항원 결합단편과 항원 사이의 상호작용의 강도이며, 항체 또는 항원결합 단편의 CDR 서열, 및/또는 항체 또는 항원결합 단편의 물리화학적 특성 (친수성/소수성, 정전기적 특성 등), 항원의 크기, 모양, 및/또는 전하와 같은 항원의 특징 등에 의해 결정될 수 있다. 이러한 친화도를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 통상적으로 해리 상수(dissociation constant, KD)로 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명에서, "경쇄"는 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 제공하기에 충분한 가변영역 서열을 갖는 전장의 경쇄 및 이의 단편을 포함한다. 전장 경쇄는 가변영역 도메인 VL, 및 불변영역 도메인 CL을 포함한다. 경쇄의 가변영역 도메인은 경쇄 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재한다. 경쇄의 종류에는 카파 및 람다 사슬이 포함된다.
- [38] 본 발명에서, "중쇄"는 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 제공하기에 충분한 가변영역 서열을 갖는 전장 중쇄 및 이의 단편을 포함한다. 전장 중쇄는 가변영역 도메인 VH 및 3개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. VH 도메인은 중쇄 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재하고, CH 도메인은 카복시 말단에 존재하며, CH3가 카복시-말단에 가장 가깝게 위치한다. 중쇄는 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 서브타입 포함), IgA(IgA1 및 IgA2 서브타입 포함), IgM 및 IgE의 아이소타입을 포함한다.
- [39] 본 발명에서, "알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체에 특이적 결합한다"함은 알파-시누클레인 단량체 또는 알파-시누클레인 응집체에 대한 친화도가 다른 항원과 비교하여 상대적으로 높은 것을 의미하는 것으로, 특히 알파-시누클레인 응집체에 대해 친화도가 ELISA, BIAcore 및 Octet 분석 모두에서 해리 상수(K_D) $4.0 \times 10^{-8} M$ 이하를 나타낼 수 있고, 더욱 구체적으로 $1.0 \times 10^{-13} M$ 내지 $2 \times 10^{-8} M$ 을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 본 발명 일 실시예에서는 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편이 적용 대상(subject)의 신경계, 대상 신경계의 신경세포 외부, 세포 외 공간 등에 존재하면서 이동을 통해 뇌 전반으로 퍼져나가는 알파-시누클레인

또는 이의 응집체와 높은 친화도로 결합할 수 있음을 확인하였으며, 특히 응집체에 대해 높은 친화도를 나타내어 이를 더욱 특이적으로 결합할 수 있음을 확인하였다(도 1 내지 도 4).

- [41] 본 발명의 다른 일 예는 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 항원결합 단편을 코딩하는, 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [42] 상기 폴리뉴클레오티드는 공지된 화학적 합성법에 의해서 제조될 수 있으며, 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 항원결합 단편을 코딩하는 단일 또는 이중가닥의 뉴클레오타이드 폴리머로서 DNA, RNA 또는 이의 변형체를 모두 포함한다.
- [43] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터에 관한 것이다.
- [44] 상기 "제조합 벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 제조합 벡터와의 작동 가능한 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 제조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 이용할 수 있다.
- [45] 구체적으로, 상기 벡터는 발현벡터일 수 있으며, 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.
- [46] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 제조합 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다.
- [47] 상기 "형질전환된 세포"는 숙주세포에 목적으로 하는 폴리뉴클레오티드 또는 제조합 벡터를 도입한 세포를 의미한다. 형질전환은 상기 '도입' 방법에 의해 외래 DNA를 세포 내로 유입시킨 것일 수 있고, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 또한, 상기 형질전환된 세포의 종류는 제한되지 않는다.
- [48] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 항원결합 단편을 포함하는, 알파-시누클레인 검출용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 알파-시누클레인은 응집체(agggregates) 형태인 것일 수 있다.
- [49] 또한 구체적으로, 상기 검출용 조성물에 포함되는 항체는 전형적으로 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 적절한 표지 물질은 방사성동위원소 또는 방사성핵종(예를 들면, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), 형광 물질(예를 들면, FITC, 로다민, 란탄족 형광체), 효소(예를 들면, 호스래디쉬 퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리성 포스파타제), 화학발광기, 바이오터널기, 또는 2차 리포터에 의해 인식되는 폴리펩타이드 에피토프(예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열, 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)가 포함되나 이로 제한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 표지 물질은 잠재적인 입체 장애를 감소시키기 위하여 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링 될

수 있다. 단백질을 표지화하기 위한 다양한 방법이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 필요에 따라 적용될 수 있다.

- [50] 또한 구체적으로, 상기 본 발명의 항체는 알파-시누클레인 응집체를 포함하는 조직의 식별에 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 표지물질로 표지되고, 표지된 항체의 알파-시누클레인 응집체에 대한 결합이 검출될 수 있다.
- [51] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 알파-시누클레인 검출용 조성물을 포함하는 알파-시누클레인 검출용 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 본 발명의 알파-시누클레인, 시누클레인 응집체 등을 검출할 수 있는 제제 뿐 아니라, 각종 표지물질, 완충액 등이 함께 사용될 수 있으며, 당업계에 공지된 모든 키트의 구성을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 본 발명의 또 다른 일 예는 a) 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 항원결합 단편을 시료와 반응시키는 단계; 및 b) 상기 a) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는, 알파-시누클레인 검출 방법에 관한 것이다.
- [53] 구체적으로, 상기 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액, 눈물 또는 뇨 뿐만 아니라, 시험관 내 세포 배양 성분의 시료, 예를 들면, 세포 성분, 세포배양배지, 재조합세포 등을 포함할 수 있다.
- [54] 상기 검출 방법은 인비트로 또는 인비보에서 수행될 수 있다. 인비보 이미징은 예를 들면 PET(positron emission tomography), SPECT(single photon emission tomography), NIR(near infrared) 광학 이미징 또는 MRI(magnetic resonance imaging)을 이용하여 수행될 수 있다.
- [55] 또한, 인비트로 방법은 당업자에게 널리 알려진 웨스턴블랏, 면역침전, ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), 방사성면역분석법(Radio Immuno Assay, RIA) 또는 면역조직화학적 방법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [56] 본 발명 일 실시예에서는 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편이 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체에 높은 친화도로 결합함으로써 소량의 알파-시누클레인 응집체까지 검출할 수 있음을 확인하였다(도 2 내지 4). 이로부터 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편을 이용하여 뇌, 중추신경계 등에서의 알파-시누클레인 응집체의 존재를 응집체의 농도가 높아지기 전 조기에 검출해냄으로써 시누클레인 병을 조기에 진단해낼 수 있다.
- [57] 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 알파-시누클레인 검출용 조성물을 포함하는 시누클레인병(synocleinopathy) 진단용 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 본 발명의 알파-시누클레인, 시누클레인 응집체 등을 검출할 수 있는 제제 또는 시누클레인병을 진단할 수 있는 제제 뿐 아니라, 각종 표지물질, 완충액 등이 함께 사용될 수 있으며, 당업계에 공지된 모든 키트의 구성을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [58] 본 발명에서, "시누클레인병(synocleinopathy)"은 병리학적 시누클레인 응집체를 특징으로 하는 모든 신경퇴행성 장애를 포함한다. 파킨슨병,

파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매 (dementia with Lewy bodies, DLB), 루이소체병, 루이소체를 동반한 치매, 치매를 동반한 파킨슨 증후군, 다계통 위축증 (multiple system atrophy, MSA), 다발성 신경계 위축 및 뇌 철 침착 동반한 신경변성 I형(NBIA Type I)을 포함하는 몇 가지 신경퇴행성 장애는 시누클레인병으로서 집합적으로 그룹화된다. 또한, 알파-시누클레인 응집은 이차적으로 알츠하이머 질환에서도 발견된다(Kim et al. Alzheimer's Research & Therapy 2014, 6:73).

- [59] 시누클레인병은 공통적인 병리학적 특성을 공유하는 신경퇴행성 장애의 다양한 그룹이다: 신경병리적 실험에서, 특유의 병변은 뉴런(neuron) 및 희소돌기신경교(oligodendrocyte)의 선택된 집단 내에서 알파-시누클레인 단백질의 비정상적 응집을 포함하며 감지될 수 있다. 알파-시누클레인은 신경질, 해마, 치상회, 후 신경구, 선조체, 시상 및 소뇌에서 광범위하게 발현되는 140개 아미노산의 단백질이다. 알파-시누클레인은 또한 B-세포, T-세포 및 NK 세포를 비롯하여 단핵구 및 혈소판을 포함하는 조혈세포에서 높게 발현된다. 이러한 세포 내에서 알파-시누클레인의 정확한 역할은 알려지지 않았으나, 거핵구(혈소판 전구체)의 분화와 관련이 있는 것으로 여겨지고 있다.
- [60] 본 발명에서 "알파-시누클레인 응집체와 관련된 질환"은 시누클레인병 이라고 불리는 일군의 신경퇴행성 질환으로, 뉴런 및 교세포(glia) 집단을 포함하는 병소에서 알파-시누클레인 응집체가 발견되는 특징을 가진다. 이러한 질환에는 파킨슨 질환, 파킨슨질환성 치매, 루이소체 치매, 알츠하이머 루이소체 질환, 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병, 다계통위축증 및 기타 다수의 신경축삭 질환을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서, 상기 항체는 파킨슨 병의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [61] 본 발명의 또 다른 일 예는 a) 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 항원결합 단편을 검체 시료와 반응시켜 알파-시누클레인을 검출하는 단계; 및 b) 검출된 알파-시누클레인의 농도 또는 세포내 위치를 대조군 시료의 결과와 비교하는 단계를 포함하는, 시누클레인병 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 구체적인 시누클레인병은 상기 설명한 바와 같다. 또한 구체적으로, 상기 알파-시누클레인은 응집체 형태인 것일 수 있다.
- [62] 상기 알파-시누클레인 응집체는 알파-시누클레인 구조의 변화에 의한 것으로서, 올리고머, 프로토피브릴, 피브릴 및/또는 상기 구조 중 하나 이상을 포함하는 구조 또는 응집체를 포함하며, 알파-시누클레인이 응집되어 있는 형태 또는 구조는 제한없이 모두 포함될 수 있다.
- [63] 본 발명에서, 상기 '검체 시료'는 시누클레인병 질환이 있거나, 있을 것으로 추정 또는 예측되는 임의의 물질을 말한다. 시료는 천연 또는 합성된 것일 수 있고, 통상의 기술자에게 공지된 임의 수단을 통해 획득될 수 있다. 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액, 눈물 또는 뇨 뿐만 아니라, 시험관 내 세포 배양 성분의 시료, 예를 들면, 세포 성분,

- 세포배양배지, 재조합세포 등을 포함할 수 있다.
- [64] 본 발명에서 "대조군 시료"는 시누클레인병이 발병하지 않은 개체로부터 얻어진 생물학적 시료를 말한다.
- [65] 검체 시료와 대조군 시료의 비교를 통해 알파-시누클레인 응집체 농도가 증가한 경우, 시누클레인병으로 진단할 수 있다.
- [66] 또한, 상기 진단에는 연령, 도파민 트랜스포터(dopamine transporter)에 대한 PET(DATscan) 영상 데이터, Montreal cognitive assessment(moca)와 같은 인지 능력 관련 문진, Unified Parkinson's Disease Rating Scale(UPDRS) 및 Hoehn & Yahr stage와 같은 운동/ 비운동 증상 관련 문진 데이터가 매치될 수 있다.
- [67] 진단 용도를 위해 항체는 전형적으로 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있으며, 표지될 수 있는 형태는 상기 설명한 바와 같다.
- [68] 본 발명 일 실시예에서는 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편이 시누클레인병의 원인이 되는 알파-시누클레인 응집체를 높은 민감도로 검출해낼 수 있음을 확인하였는 바(도 1 내지 도 4), 시누클레인병의 진단에 유용하게 적용될 수 있다.
- [69] 본 발명의 또 다른 일 예는 a) 검체 시료에 시누클레인병 치료제 후보물질을 처리하는 단계; b) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 검체 시료를 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 항원결합 단편과 반응시키는 단계; 및 c) 후보물질 처리 후 알파-시누클레인 응집체가 감소된 경우 시누클레인병 치료제로 선별하는 단계를 포함하는, 시누클레인병 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 구체적인 시누클레인병, 검체 시료 등은 상기 설명한 바와 같다.
- [70] 본 발명에서, 시누클레인병 치료제는 소분자, 화합물, 항체, 면역항암제, 바이러스 등의 형태일 수 있으며, 시누클레인 응집체를 감소시키는 등의 효과를 통해 시누클레인병을 치료 또는 개선시킬 수 있는 제제이면 제한없이 모두 적용될 수 있다.
- [71] 본 발명에서는 시누클레인병 치료제 후보물질을 처리한 시료에 대하여 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 또는 항원결합 단편과 시누클레인, 특히 응집체 형태의 시누클레인의 결합 정도의 변화를 측정함으로써, 해당 후보물질의 시누클레인병 억제능 및 시누클레인병 치료 효과를 판단할 수 있다. 예를 들어, 후보물질의 처리에 따라 시료 내 시누클레인 응집체가 감소 또는 제거되는 경우, 해당 후보물질을 시누클레인병 치료제로 선별할 수 있다.
- [72] 또한 구체적으로, 상기 알파-시누클레인 응집체의 감소 여부는 유리 항체의 양을 검출하는 단계를 포함함으로써 판단할 수 있다. 유리 항체, 즉, 알파-시누클레인 응집체에 결합되지 않은 항체 농도의 증가는 후보물질이 알파-시누클레인 응집체 결합에 대하여 항체와 경쟁할 수 있음을 시사하며, 후보물질 처리 후 유리 항체가 증가한 경우에도 후보물질이 시누클레인병 치료제로서 적용될 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

발명의 효과

- [73] 본 발명의 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편은 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 높은 친화도로 결합함으로써, 알파-시누클레인을 높은 정확도 및 민감도로 검출할 수 있다.
- [74] 특히, 본 발명의 항체는 높은 친화도를 통해 알파-시누클레인 응집체의 농도가 낮더라도 검출해낼 수 있음에 따라, 시누클레인병을 조기에 진단할 수 있어 시누클레인병 진단에 높은 유용성을 가진다.

도면의 간단한 설명

- [75] 도 1은 본 발명의 일 예에서 제조된 항 알파-시누클레인 항체가 응집된 형태의 native 알파-시누클레인을 특이적으로 인식하는지 여부를 측정된 닷블롯 결과를 나타낸 것이다.
- [76] 도 2는 본 발명의 일 예에서 제조된 항 알파-시누클레인 항체의 친화도를 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [77] 도 3은 본 발명의 일 예에서 제조된 항 알파-시누클레인 항체가 알파-시누클레인 응집체에 대한 선호적 결합 특이성 및 친화도를 BIAcore로 분석한 결과를 나타낸 것이다(7B7).
- [78] 도 4는 본 발명의 일 예에서 제조된 항 알파-시누클레인 항체의 알파-시누클레인 응집체에 대한 선호적 결합 특이성을 Octet으로 분석한 결과를 나타낸 것이다(A: 5A7, B: D3C6).
- [79] 도 5는 본 발명의 일 예에서 제조된 항 알파-시누클레인 항체 5A7 및 7B7이 인간 세포 발현 알파-시누클레인 단백질을 인지하여 결합하는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [80] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [81] 실시예 1. 마우스 알파-시누클레인 항체의 제조
- [82] 1-1. 면역화 및 하이브리도마 생산
- [83] 항원으로는 전장 (140 잔기) 또는 C-말단 21개 잔기가 절단된 알파-시누클레인 단량체를 37 °C thermomixer C에 넣고 14일 동안 1050 rpm으로 흔들며 응집화시켰으며 소니케이션 하여 사용하였다. 상기 제조된 1 mg/ml 농도의 140개 및 119개 잔기의 알파-시누클레인 피브릴 각각을 아주번트(adjutant)와 1:1(vol:vol)로 혼합하여 잘 섞어 주었다.
- [84]

[표5]

인간 알파-시누클레인 의 아미노산 서열	서열번호 41	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAEAA GKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKE QVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAAT GFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNE AYEMPSEEGYQDYEPEA
-----------------------------	------------	---

- [85] 이어, 상기 준비한 혼합물 200 μL를 5~7주령 BALB/c 암컷 마우스의 피하에 주사하였고, 2주 후에 동일한 방법으로 제조한 혼합물 200 μL를 추가로 피하주사하여 부스팅시켰다. 부스팅 1주일 후에 혈액을 채취하여 투여항원을 붙인 ELISA 방법을 사용하여 면역화 적정(immunization titeration)을 수행하였다. 이어 3차 부스팅은 항원만을 피하주사 하였다.
- [86] 상기와 같이 면역이 완료된 마우스의 비장을 제거하여, 이로부터 세포를 확보하였다. 이어 비장 세포를 10% FBS가 첨가된 Hybridoma-SFM 배지(Thermo Fisher Scientific, USA)에 현탁시켰다. 하이브리도마를 제조하기 위해 무린 골수종 세포인 SP2/0-Ag14와 비장 세포를 혈청이 포함되지 않은 Hybridoma-SFM 배지에서 혼합한 후 원심분리를 하여 배지를 제거하였다. 이어 세포 펠렛에 PEG를 첨가한 후 37 °C 에서 1분간 배양하여 세포 융합을 유도하였다.
- [87] 1-2. 단세포 클로닝 및 항체 정제
- [88] 융합 2주 후에, 세포 배양 배지를 이용하여 마우스에 투여한 항원을 붙인 ELISA 방법을 사용하여 항체를 생산하는 마우스 B 세포와의 융합을 확인하였다. 이어 하이브리도마를 이용하여 단세포 클로닝을 수행하여 단클론항체를 생산하는 하이브리도마를 3 개 선별하였다.
- [89] 전장(140 잔기) 알파-시누클레인 응집체를 항원으로 이용하여 5A7(IgG1 kappa) 클론을 수득하였고, C-말단 21개 잔기가 절단된 알파-시누클레인 응집체를 항원으로 이용하여 4G3 및 7B7(각각 IgG1 kappa, IgG2b kappa)의 클론을 수득하였다.
- [90] 상기 항체의 정제를 위해서, 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에서 각 하이브리도마를 배양하다 항체 생산을 위해 serum이 없는 SFM 배지로 배양 배지를 교체한 후 4일 정도 배양하였다. 세포 배양 상층액을 분리하여 원심분리한 후 0.22 μm 필터로 거른 후 IgG1 타입은 protein G column으로 나머지 항체들은 protein A 컬럼으로 정제하였다.
- [91] 1-3. 가변영역 서열 결정
- [92] 가변영역 및 CDR 서열은 Ahn et al, Mol. Cells 2004, 18(2):237-241 논문을 참조하여 결정하였다. 하이브리도마를 배양한 후 원심분리하여 세포만을 분리하였다. 분리된 하이브리도마에 트라이졸을 넣어 RNA를 분리하였으며 이를 템플릿으로 하여 cDNA를 합성한 후 염기서열 분석을 통해 가변영역 및 CDR 서열을 확인하였다.

[93]

[94] 실시예 2. 항 알파-시누클레인 (키메릭) 항체의 제조

[95] 2-1. 항체 클로닝 및 발현

[96] 확보한 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역의 항체 뉴클레오티드 서열을 이용하여, 짧은 단편의 뉴클레오티드인 gblock(m.biotech)을 합성하였고, 이를 이용하여 동물세포 배양용 벡터(pcDNA3.4)에 클로닝하였다. 가변영역 앞뒤에 중첩된 뉴클레오티드를 약 20 bp 정도 포함하여 gblock을 합성하였고, pcDNA3.4 벡터의 가변영역을 제외한 부분을 PCR로 증폭 후 준비하여, Gibson assembly 방법으로 클로닝하였다.

[97] 상기 클로닝된 항체를 Transfection 및 발현하기 위해서, 상기 제조된 벡터를 maxi-prep(Qiagen) 하여, 다량의 plasmid DNA를 확보 후, 다음과 같이 세포에 도입하였다. 형질주입 전날, ExpiCHO™ (Gibco, Cat: A29127)세포를 ExpiCHO™ expression medium (Gibco, Cat: A29100-01) 배지에 $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ viable cells/mL 농도를 맞춘 후, 8% CO₂, 37 °C, 120 rpm에서 1일 동안 배양하였다. DNA 형질주입 당일 $7 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ viable cells/mL, 생존율은 95% 이상으로 자란 세포를 신선한 배지를 이용하여 6×10^6 viable cells/mL로 희석하여 준비하였다.

[98] 준비된 모세포에 형질주입을 위해 ExpiFectamine™ CHO transfection kit(Gibco, Cat: A29129)를 사용하여, EExpiFectamine™ CHO 및 plasmid DNA 복합체를 준비하였다. 차가운 OptiPRO™SFM®(Gibco, Cat: 12309019) 배지를 각각 분주하여, 적정농도로 준비한 DNA 및 ExpiFectamine™ CHO 시약을 각각 접종 후, 혼합하여 상온에서 5분간 정치하고, 모세포에 접종하여 형질주입 후 배양을 시작하였다. 형질주입 다음날에는 ExpiFectamine™ CHO transfection kit에 포함된 enhancer 및 feed를 형질주입 세포에 접종하였고, 5일 후에는 feed 를 추가 접종 후, 8% CO₂, 37 °C, 120 rpm 조건에서 10일간 배양하여 생산을 완료하였다.

[99] 생산이 완료된 배양액의 수득을 위해 원심분리용 병에 배양액을 옮기고 4 °C, 6500 rpm 에서 30분간 원심분리 후, 0.2 μm 의 크기인 필터로 필터링을 진행하여, 부유물을 제외한 배양액을 확보하여 이후 정제과정을 진행하였다.

[100] 2-2. 항체의 정제 및 서열확인

[101] HiTrap MabSelectSure(GE Healthcare, 11-0034-94)을 사용하여 배양액을 정제하였다. 평형화 버퍼(50 mM Tris-HCl pH7.2, 100 mM NaCl)을 사용하여 평형화 시킨 후, 회수된 배양액을 컬럼에 로딩하였다. 로딩이 완료되면 50 mM 구연산나트륨(Sodium Citrate) pH 5.0으로 중간세척 후, 50 mM 구연산나트륨 pH 3.4를 이용하여 용출을 하였다. 용출액에 1M Tris-HCl pH 9.0을 첨가하여 pH 6.0이 되도록 중화하였다. 이후 용출액을 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 버퍼교환 및 농축하여 사용시까지 4 °C에 보관하였다.

[102] 추가 정제가 필요할 경우, HiLoad 26/600 superdex 200 컬럼에 1X PBS를 버퍼로 1차 정제분을 통과시켜 용출 시료의 크기를 바탕으로 2차 정제를 수행하였다. 상기 정제된 항체의 아미노산 서열을 질량분석방법으로 분석하였으며, 마우스

유래 단일클론항체의 가변영역과 일치함을 확인하였다.

- [103] 상기 방법으로 확인된 4G3, 5A7, 7B7 항체들의 가변영역을 인간 IgG1 아이소타입의 backbone 가변영역 부분에 치환하여 키메라 형태의 인간 IgG1 항체를 제작하였다.

[104]

- [105] 실시예 3. 인간 항체의 제조

- [106] 3-1. 라이브러리 파아지(Library phage) 준비

- [107] 키메라 항체의 CDR1, CDR2, CDR3 residue에 human framework을 결합시키면서 각 CDR residue에 마우스 혹은 인간 유래 서열이 도입된 미니 라이브러리를 제작하였다. 해당 라이브러리의 competent cell을 클로람페니콜(Sigma, C0857) 34 µg/ml, 2% 글루코스(Sigma, G5400) 및 5 mM MgCl₂(Sigma, M2393)이 포함된 2X YT[Tryptone (CONDA, 1612.00) 17g, 이스트 추출물(CONDA, 1702.00) 10g, NaCl(Sigma, S7653) 5g] 배지에 접종 후, 37 °C에서 3시간 정도 배양하여 OD600 값이 0.5에서 0.7이 되도록 한 후, 헬퍼 파아지(helper phage)를 감염시킨 후, 클로람페니콜 34 µg/ml, 5 mM MgCl₂, 카나마이신(Sigma, K1876) 70 µg/ml, 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025)를 첨가한 2X YT 배지에서 30 °C, 16시간 동안 배양하여 파아지 패키징을 유도하였다. 이어 배양액을 4500 rpm, 4 °C 조건에서 15분 동안 원심분리한 후, 상등액에 4% PEG 6000(Fluka, 81253)과 3% NaCl(Sigma, S7653)을 첨가하여 잘 녹인 후, 얼음에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 다시 4 °C 조건에서 8,000 rpm, 20분간 원심분리한 후, 펠렛을 PBS로 현탁한 후, 다시 4 °C 조건에서 12,000 rpm, 10분간 원심분리 하여 라이브러리 파아지를 포함하는 상등액을 수득하여 새 튜브에 넣어 사용시까지 4 °C에서 보관하였다.

[108]

- [109] 3-2. 파아지 디스플레이 패닝(panning)

- [110] 구체적으로 면역시험관(immunotube, maxisorp 444202)에 10 µg/ml 농도의 재조합 알파-시누클레인 응집체를 PBS에 첨가하여 4 °C 에서 밤새 시험관 표면에 단백질을 흡착시킨 후 우혈청 알부민(BSA, Bovine serum albumin) 3% 용액을 시험관에 첨가하여 알파-시누클레인 응집체가 흡착되지 않은 표면을 보호하였다. 시험관을 비운 후 BSA 3% 용액에 분산된 10¹²CFU의 항체 파지 라이브러리를 알파-시누클레인 단량체 단백질이 흡착되어 있는 면역시험관에 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다(네거티브 선별). 알파-시누클레인 단량체에 비결합된 파지들을 회수하여 알파-시누클레인 응집체가 부착된 면역시험관에 상온에서 2시간 결합시켰다. 이어 비특이적으로 결합한 파지를 PBS-T(0.05% Tween 20)용액으로 5회~30회 씻어낸 후 남아있는 항원 특이적 파지항체를 100mM 트리에틸아민 용액을 이용하여 회수하였다. 회수된 파지를 1M 트리스 버퍼(pH 7.4)로 중화시킨 후 ER2537 대장균에 37 °C에서 1시간 감염시키고 감염된 대장균을 카베니실린을 함유하는 2X YT 한천배지에 도말하여 37 °C에서 밤새 배양하였다. 다음날 배양된 대장균을 4ml의 2X YT 카베니실린 배양액에

현탁하고 15% 글리세롤을 첨가하여 일부는 -80 °C에 보관하고 나머지는 다음 라운드의 패닝을 위해 파아지를 제조하였다. 이러한 과정을 총 3라운드 반복하여 항원 특이적인 항체를 증폭시켰다. 패닝 라운드가 진행될수록 PBS-T를 이용한 세척회수를 증가시켜 항원특이적 파지를 증폭 및 농축하였다.

[111]

[112] 3-3. 단일클론 파아지 항체 선별(single clone screening)

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

[114] 농축된 풀로부터 단일클론을 분리하기 위해, LB-테트라사이클린/카베니실린 한천배지에 상기 파아지 풀을 도말한 후 배양하여 단일 콜로니를 확보하였다. 이어 단일 클론을 웰당 400 μL 의 2X YT-테트라사이클린/카베니실린 배지가 들어간 96 웰 플레이트에 접종하여 밤새 키운 후, 배양액 10 μL 를 새로운 390 μL 의 2X YT-테트라사이클린/카베니실린 배지가 포함된 96 웰 플레이트에 넣어 37 °C에서 4시간 배양했다. 상기 배양액에 1mM IPTG 되게 넣어 주고 30 °C에서 밤새 배양했다. 밤새 배양한 배양액을 원심분리하여 상등액을 취하였다.

[115] 이어 ELISA 방법을 사용하여 알파-시누클레인 응집체와 결합하는 단일클론 가용성 scFv를 발현하는 클론을 선택하였다. 구체적으로 96 웰 플레이트에 실시예 1-2에서 선별된 7B7 항체를 넣고, 4 °C에서 밤새 코팅하였다. 3% BSA를 각 웰당 200 μL 씩 넣어 37 °C에서 2시간 블로킹하였다. 이어 알파-시누클레인 응집체와 단량체를 100ng/well의 농도로 각각 로딩 한 후 37 °C에서 2시간 반응시켰다. 이어 PBS-T 300 μL 로 5회 세척하였다. 상기 준비된 단일 클론 상등액은 3% BSA와 1:1(vol:vol)로 섞은 후 상기 혼합액을 상기 응집체 및 단량체와 결합시킨 플레이트에 100 μL 씩 로딩한 뒤 37 °C에서 2시간 반응시켰다. 이어 PBS-T 300 μL 로 5회 세척한 후, 항-HA HRP 결합 항체를 넣고 37 °C에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 5회 세척하였다. TMB(Tetramethylbenzidine, Sigma, T0440) 100 μL 를 넣어 발색한 후, 1N H₂SO₄ 50 μL 를 넣어 반응을 정지한 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 0.5 이상인 클론들을 결합에 의한 양성반응으로 간주하였으며 BSA 비특이적으로 결합하는 클론들은 배제시켰다.

[116] 라이브러리에서 발견된 클론의 CDR residue들은 in silico 방식으로 분석을 병행하여 framework과의 결합에 심각한 문제가 생기거나 CDR을 제외한 framework 부분에 T-cell epitope, B cell epitope 및 MHCII epitope이 존재하지 않는 클론을 선별하였다.

[117] 이후 인간화 항체의 가변영역을 인간 IgG1 아이소타입의 backbone 가변영역 부분에 치환하여 IgG1 backbone의 인간 항체를 제작하였다. 이와 같은 방법으로 D3C6 및 A3F10를 얻었다.

[118]

[119] 실시예 4. 알파-시누클레인 항체의 항원 결합 특이성 및 결합력 분석

[120] 4-1. 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 닷블롯 분석

[121] 본원에 따른 항체가 네이티브 상태에서의 단량체 또는 응집체에 결합하는지를 분석하기 위해 닷블롯 실험을 수행하였다. 이를 위해 항원으로서 50 ng 혹은 100 ng의 알파-시누클레인 모노머 또는 피브릴 단백질(서울대학교 이승재 교수 lab에서 제조함; Bae et al., J. Neurosci 32:13454, 2012)을 Dot blot apparatus(BioRad)를 이용하여 나이트로셀룰로스 멤브레인에 스팟 로딩하였다. 2배씩 희석한 모노머 또는 피브릴 단백질은 멤브레인의 오른쪽에서부터 왼쪽으로 순차적으로 로딩하였다(12.5, 25, 50, 100 ng 또는 25, 50, 100 ng). 멤브레인을 TBST 조성의 5% non-fat dry milk로 1시간 동안 상온에서 블로킹한 뒤, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3에서 제조한 알파-시누클레인 항체를 1 mg/ml의 농도로 1% bovine serum albumin 함유 TBST에 넣고 멤브레인과 해당 항체를 1시간 동안 상온에서 인큐베이션하였다. 이어 TBST로 세척한 뒤 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 2차 항체 및 기질로서 chemiluminescence substrate(NEN)를 제조자의 방법대로 사용하여 신호를 분석하였다. 결과는 LAS-3000 Luminescent Image Analysis System (FUJIFILM Life Science)을 이용하여 이미징하였다. 결과는 도 1에 나타내었다.

[122] 도 1에 나타난 바와 같이 본원에 따른 알파-시누클레인 항체는 알파-시누클레인 모노머(monomer)와 비교하여, 응집체(agggregates)에 선호적으로 결합하는 것으로 나타났다. 특히 5A7 은 응집체에만 특이적으로 결합하는 것으로 나타났으며 D3C6, 4G3 및 A3F10는 응집체에 선호적으로 결합하는 것으로 나타났다.

[123]

[124] 4-2. 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 ELISA 분석

[125] 본원에 따른 항체의 항원에 대한 결합력을 정량적으로 분석하기 위해 ELISA를 수행하였다. 이를 위해 실시예 1에서 얻어진 마우스 항-알파-시누클레인 항체를 1 ug/ml의 농도로 96웰 플레이트에 코팅한 후, 여기에 10, 100, 1000, 10,000 ng/ml 농도의 알파-시누클레인 피브릴 응집체를 처리한 후, PBS로 세척하고, 이어 바이오틴이 결합된 2차 항체 및 HRP가 결합된 스트렙타비딘을 처리한 후 기질로서 TMB와 반응한 후 흡광도를 측정하였고, 그 측정 결과를 도 2에 나타냈다. 파지 라이브러리로부터 확보한 인간화 항체도 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였으며 그 측정 결과를 도 2에 나타내었다.

[126] 도 2에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 응집체에 높은 결합력을 가지고 응집체에 선호적으로 결합하는 것으로 나타났다. 특히 4G3 및 A3F10은 1×10^{-9} M ~ 3×10^{-9} M 정도의 친화력을 보였다. 이러한 결과는 본 발명의 항체들이 혈액 내 알파 시누클레인 응집체를 효과적으로 검출할 수 있음을 나타내는 것이다.

[127]

[128] 4-3. 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 BIAcore 분석

[129] 실시예 1에서 제조된 알파-시누클레인 항체의 단량체 및 응집체 항원 결합에

대한 정량적 분석을 BIAcore를 사용하여 수행하였다.

[130] 기기는 T200(GE Healthcare, S/N: 1565888)을 사용하였다. Chip은 Protein A를 사용하였으며(GE Healthcare, Cat. 29-1275-56), Regeneration buffer는 10 mM Glycine-HCl pH1.5(GE Healthcare, Cat. BR-1003-54), Running buffer와 analyte 희석, 샘플 희석 완충액으로는 HBS-EP를 사용하였다. 실시예 1 에서 제조된 항 알파-시누클레인 항체(5A7 및 7B7)는 1X HBS-EP(GE Healthcare, Cat. BR-1006-69)로 희석하였으며, 알파-시누클레인 단량체(1 mg/ml) 또는 피브릴 단백질(3 mg/ml) (analyte)은 2배씩 순차적으로 희석하여, 0 nM 포함 총 6개 농도 (0, 0.39, 1.56, 6.25, 25, 100nM)에서 분석하였다. 캡처의 경우 단량체는 표적 RU를 800 (theoretical)으로, 피브릴은 표적 RU를 100(theoretical)으로 하고, 캡처 phase를 contact time을 60초, flow rate을 30 µl/min으로, stabilization period를 180초로 진행하였다. Association phase에서는 association time을 120초로, flow rate를 30 µl/min으로 하였으며, dissociation phase에서는 dissociation time을 360초로, flow rate를 30 µl/min으로 하였다. Regeneration phase에서는, flow rate을 30 µl/min으로 하여 regeneration time을 240초(1차), 60초(2차), 두 번에 걸쳐 진행하였다. bivalent model을 사용하여 fitting 하였으며, evaluation software는 BIAcore T200 Evaluation software를 사용하였다(GE healthcare). 결과는 도 3에 기재되어 있다.

[131] 도 3은 본 발명의 일 예에서 제조된 단일클론 항체가 알파-시누클레인의 응집체에 매우 높은 친화도를 가짐을 보여주는 BIAcore 분석 결과이다. BIAcore분석결과에서, 하기 표 6에 나타난 바와 같이 측정된 알파-시누클레인 응집체에 대한 본 발명의 일 예에서 제조된 단일클론 항체의 해리 상수(K_D)는 1 x 10⁻¹² M이하로 나타났다.

[132] [표6]

항체명	해리 상수(K _D)
7B7	9.417 x 10 ⁻¹³ M

[133] 도 3의 결과는 본 발명의 일 예에서 제조된 단일클론 항체가 알파-시누클레인 응집체에 대하여 높은 결합친화도를 지니므로 파킨슨병과 같은 알파-시누클레인 병인을 갖는 신경퇴행성 질환의 원인물질을 효과적으로 검출하는데 있어 적용 가능한 항체임을 나타내는 것이다.

[134]

[135] 4.4. 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 Octet 분석

[136] 실시예 1에서 제조된 마우스 항 알파-시누클레인 항체(5A7) 및 실시예 3에서 제조된 인간 항체(D3C6)의 응집체 항원 결합에 대한 정량적 분석을 Octet을 사용하여 수행하였다.

[137] 구체적으로 running buffer는 1X KB buffer (cat. 18-1092) 혹은 1X PBS buffer를 1000 rpm에서 사용하였으며, immobilization buffer는 sodium acetate, pH 5 (10mM, Cat. 18-1068)을 사용하였다. α-syn 피브릴은 테스트 항체를 immobilization

시켰다. target concentration은 0.4 µg/ml로 하였으며, kinetics concentration은 α-syn 피브릴을 100 nM부터 2배씩 차례로 희석하여 총 7개의 포인트를 설정하였다. Association/Dissociation 시간은 5분/25분이었으며, Biosensor는 ARG2를, fitting은 1:1 fitting을 사용하였다. 결과는 도 4에 기재되어 있다. 도 4는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체의 α-Syn 응집체에 대한 결합 특이성을 Octet으로 분석한 결과이다.

[138] 도 4에 나타난 바와 같이, 5A7 및 D3C6의 경우 응집체에 잘 결합하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Dot blot, ELISA에서의 결과들과 유사 혹은 일치하는 결과로, 5A7 및 D3C6가 Octet에서도 응집체에 결합하는 것으로 나타났다. 도 4a 및 도 4b의 결과는 5A7 및 D3C6가 알파-시누클레인 응집체에 결합하는 것을 나타내며, 하기 표 7에 나타난 바와 같이 측정된 해리 상수 값은 5A7 및 D3C6 모두 4×10^{-9} M 또는 3.5×10^{-9} M 이하로 나타났다.

[139] [표7]

항체명	해리 상수(K _D)
5A7	8.51×10^{-10} M
D3C6	3.11×10^{-9} M

[140]

[141] 4-5. 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 면역침강(immunoprecipitation) 분석

[142] 실시예 1에서 제조된 마우스 알파-시누클레인 항체 7B7 및 5A7가 인간 세포에서 발현하는 알파-시누클레인을 인식할 수 있는지를 면역침강(immunoprecipitation) 방법으로 분석하였다.

[143] 인간 신경모세포종(neuroblastoma) 세포주인 SH-SY5Y에 알파-시누클레인을 과발현시키는 벡터를 transfection 시켜, 알파-시누클레인을 발현하도록 한 다음, 배양된 세포들에 PBS, 1% Triton X-100, 1% (v/v) protease inhibitor mixture (Sigma)를 포함한 1X PBS 용액을 투여하여 세포막을 파괴하였다. 해당 용해물(lysate)을 4 °C, 16,000g에서 10분 원심분리하여 세포 껍질 및 핵을 제거하고 상등액을 사용하였다. 상등액 2 mg과 mouse IgG, 7B7 또는 5A7 10 ug을 처리하여 총 부피가 1 ml이 되도록 한 후 4 °C에서 12시간 동안 gentle shaking으로 반응시켰다. Protein A/G를 50 ul 처리하고 4 °C에서 2시간 gentle rotation으로 반응시킨 뒤, 4번 차가운 1X PBS로 wash 하였으며, 2X sampling buffer를 첨가 후 100 °C에서 가열하였다. 원심분리 직후 상등액을 input (I), Protein A/G와 2시간 반응시키고 남은 용액을 flow through (F), Protein A/G를 sampling buffer와 끓인 용액을 eluant (E)로 정의하고, 각 10 µl씩 SDS-PAGE에 로딩하고 mouse IgG에 대한 웨스턴 블롯팅을 수행하여 그 밴드를 살펴보았다. 용리액(eluent)에서는 면역침강 샘플 내 Protein A/G에 결합하는 동시에 타겟에 결합하는 항체들(즉, IgG, 7B7, 5A7)의 중쇄와 경쇄가 각각 50 kDa, 25 kDa에서 진하게 나타났다(도 5,

별표).

- [144] 또한 mouse IgG 처리군의 E에 그 외 존재하는 밴드들은 비특이적(non-specific)인 밴드로 여겨졌다. 알파-시누클레인 단량체 크기가 15 kDa이므로 15 kDa 근방의 밴드 및 mouse IgG 음성 대조군에서 나타나지 않은 밴드들(검은 화살표 머리)은 모두 7B7 또는 5A7에 의해 인식된 알파-시누클레인 단량체 및 응집체로 판단하였다. Mouse IgG 처리군의 경우 eluant에서 15 kDa에 해당하는 밴드가 없으며, 따라서 input 내의 알파-시누클레인이 해당 레인에는 존재하지 않는다고 판단할 수 있다. 5A7 및 7B7 모두 15 kDa의 뚜렷한 알파-시누클레인 단량체 밴드가 나타났다.
- [145] 특히 7B7 처리군의 경우 mouse IgG 레인에 존재하지 않는 올리고머 크기의 밴드를 보였다. 해당 결과는, 특히 7B7 클론이 통상적으로 사용되는 제조합 알파-시누클레인 단백질 뿐 아니라 포유류 세포에 의하여 실제 생산되는, 즉포유류 세포의 실제 생리학적 조건에서 발견되는 알파-시누클레인을 매우 민감하게 인식함을 나타낸다(도 5). 면역침강(immunoprecipitation) 분석법의 구체적인 실험조건(가열 등)에 따라 다른 클론들에 대해서도 올리고머 내지 응집체에 결합할 수 있음을 당업자는 예상할 수 있을 것이다. 단 7B7 클론이 가장 민감하게 실제 생리학적 조건에서 발견되는 알파-시누클레인에 대하여 가장 높은 친화도로 결합하여 민감하게 검출할 수 있음을 알 수 있다.
- [146] 상기 결과들은 본 발명의 항 알파-시누클레인(a-Syn) 항체 또는 이의 항원 결합단편을 이용하여 자연의 생리학적 조건에서 발견되는 포유류의 알파-시누클레인 또는 이와 유사한 알파-시누클레인을 검출해낼 수 있으며, 나아가 이를 이용하여 시누클레인병을 진단할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [147] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [148] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

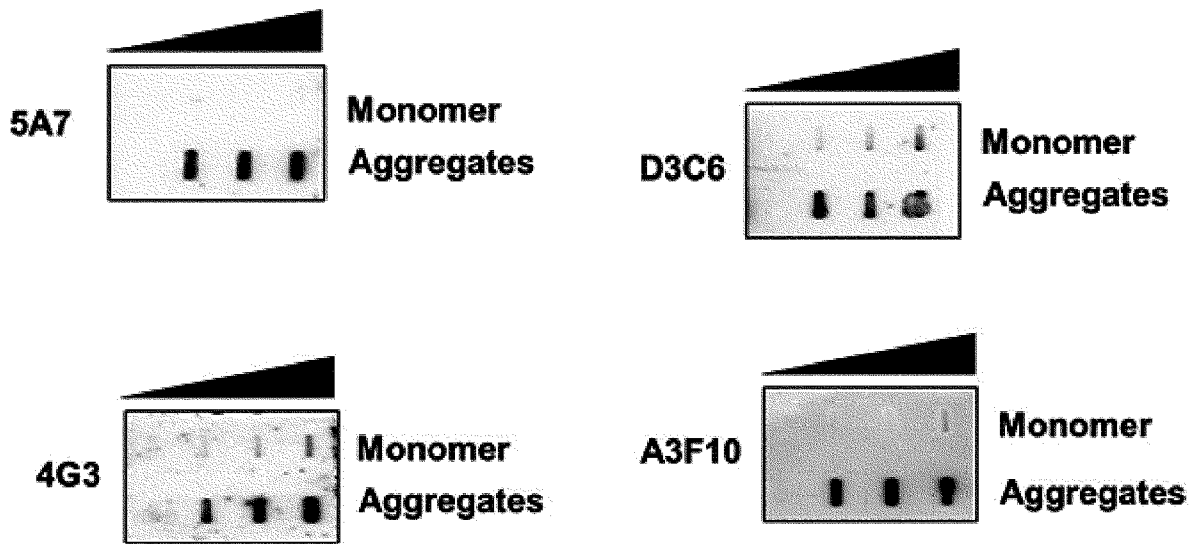
청구범위

- [청구항 1] 항 알파-시누클레인(a-Syn) 항체 또는 이의 항원 결합단편으로서, 상기 항체 또는 항원결합 단편은 (i) CDRH1, CDRH2 및 CDRH3의 상보성 결정부위를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 (ii) CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 상보성 결정부위를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하며, 상기 CDRH1은 서열번호 1 내지 5로부터 선택되고, 상기 CDRH2는 서열번호 6 내지 10으로부터 선택되고, 상기 CDRH3는 서열번호 11 내지 15로부터 선택되며; 상기 CDRL1은 서열번호 16 내지 20으로부터 선택되고, 상기 CDRL2는 서열번호 21 내지 25로부터 선택되고, 상기 CDRL3는 서열번호 26 내지 30으로부터 선택되는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 상기 경쇄 가변영역의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 서열은 다음 중 어느 하나인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편:
 (a) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 1, 6 및 11 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 16, 21 및 26;
 (b) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 2, 7 및 12 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 17, 22 및 27;
 (c) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 3, 8 및 13 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 18, 23 및 28;
 (d) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 4, 9 및 14 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 19, 24 및 29; 또는
 (e) 상기 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3는 각각 서열번호 5, 10 및 15 그리고 상기 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 20, 25 및 30.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은, 서열번호 31 내지 35로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은, 서열번호 36 내지 40으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 각각 서열번호 31 및 36; 서열번호 32 및 37;

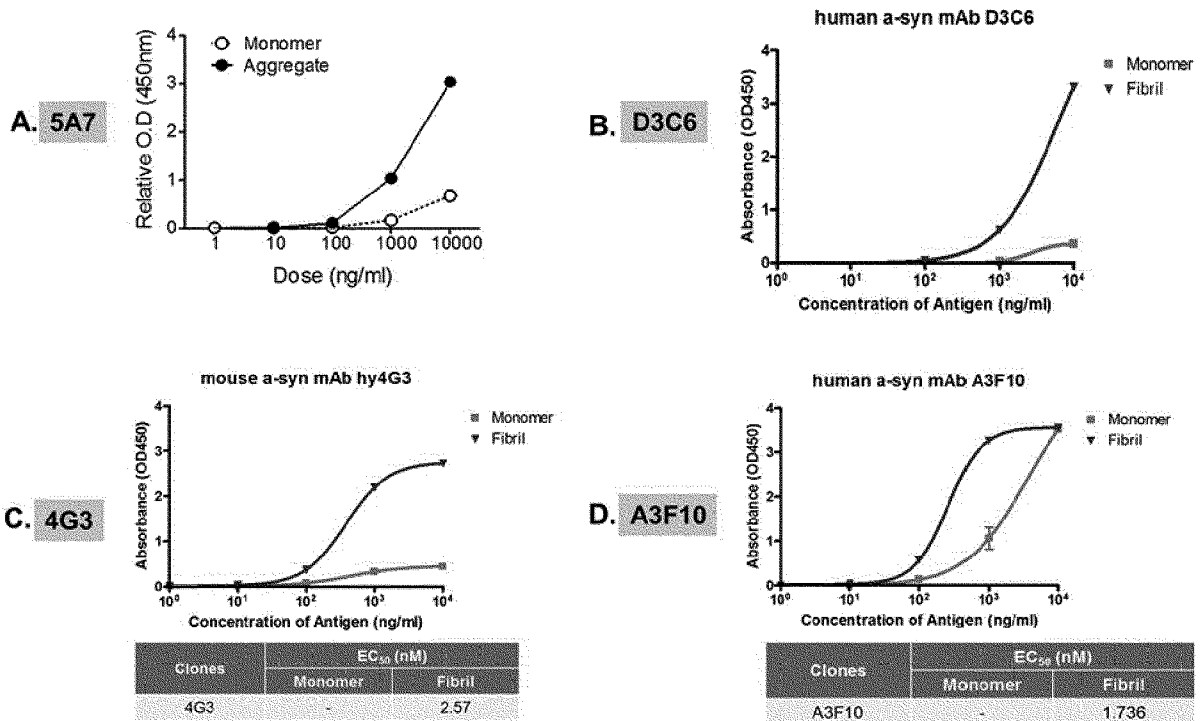
- 서열번호 33 및 38;
 서열번호 34 및 39; 또는
 서열번호 35 및 40으로 표시되는 서열을 포함하는 것인, 항
 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 형태인 것인, 항 알파-시누클레인
 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
 상기 항원 결합단편은 scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로
 이루어진 군에서 선택되는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원
 결합단편.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원
 결합단편은 인간, 원숭이, 랫트, 및 마우스 알파-시누클레인 단백질의
 C-말단 영역에 특이적으로 결합하는 것인, 항 알파-시누클레인 항체 또는
 이의 항원 결합단편.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 항 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원
 결합단편은 4.0×10^{-8} M 이하의 해리상수(K_D)를 나타내는 것인, 항
 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원결합 단편을 코딩하는,
 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 12] 제11항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 13] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원결합 단편을 포함하는,
 알파-시누클레인 검출용 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
 상기 알파-시누클레인은 응집체(aggregate) 형태인 것인, 알파-시누클레인
 검출용 조성물.
- [청구항 15] 제13항의 조성물을 포함하는, 알파-시누클레인 검출용 키트.
- [청구항 16] a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원결합 단편을 시료와
 반응시키는 단계; 및
 b) 상기 a) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는,
 알파-시누클레인 검출 방법.
- [청구항 17] 제13항의 조성물을 포함하는, 시누클레인병(synucleinopathy) 진단용
 키트.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
 상기 시누클레인병은 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성
 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with
 Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of

- Alzheimer's disease, LBV), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease) 및 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 진단용 키트.
- [청구항 19] a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원결합 단편을 검체 시료와 반응시켜 알파-시누클레인을 검출하는 단계; 및
b) 검출된 알파-시누클레인의 농도 또는 세포내 위치를 대조군 시료의 결과와 비교하는 단계를 포함하는, 시누클레인병 진단에 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 시누클레인병은 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease, LBV), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease) 및 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 시누클레인병 진단에 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 21] 제19항에 있어서,
상기 알파-시누클레인은 응집체(aggregate) 형태인 것인, 시누클레인병 진단에 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 22] a) 검체 시료에 시누클레인병 치료제 후보물질을 처리하는 단계;
b) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 검체 시료를 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원결합 단편과 반응시키는 단계; 및
c) 후보물질 처리 후 알파-시누클레인 응집체가 감소된 경우 시누클레인병 치료제로 선별하는 단계를 포함하는, 시누클레인병 치료제 스크리닝 방법.
- [청구항 23] 제22항에 있어서,
상기 시누클레인병은 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease, LBV), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease) 및 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 시누클레인병 치료제 스크리닝 방법.

[도 1]



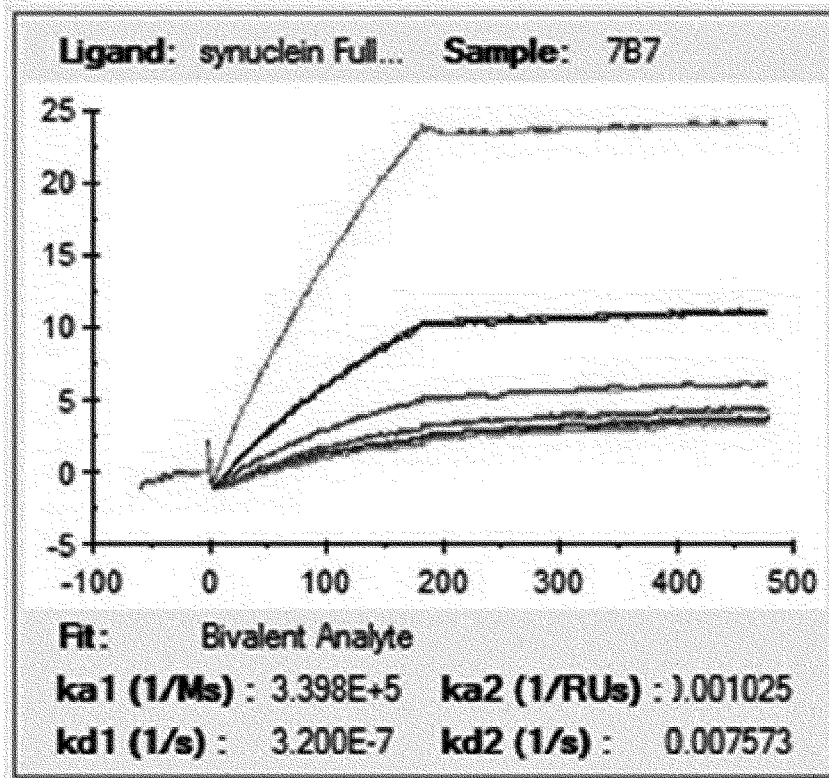
[도 2]



[도3]

Full length α -Syn aggregate

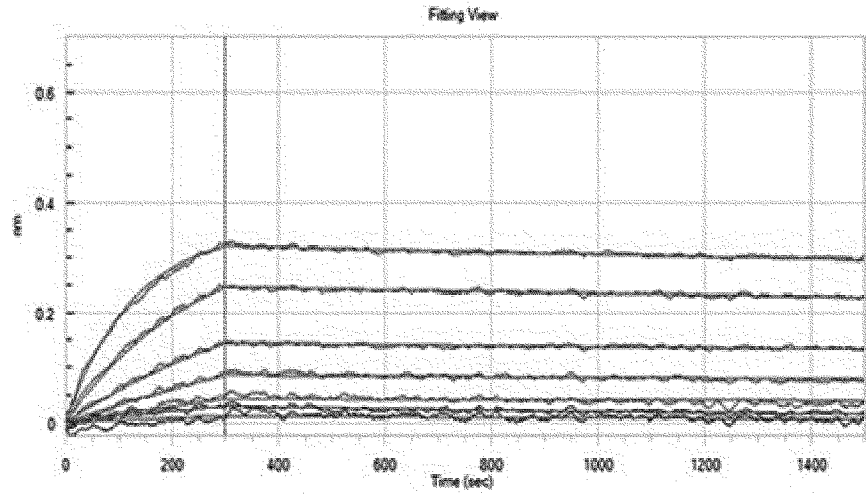
7B7



[도4]

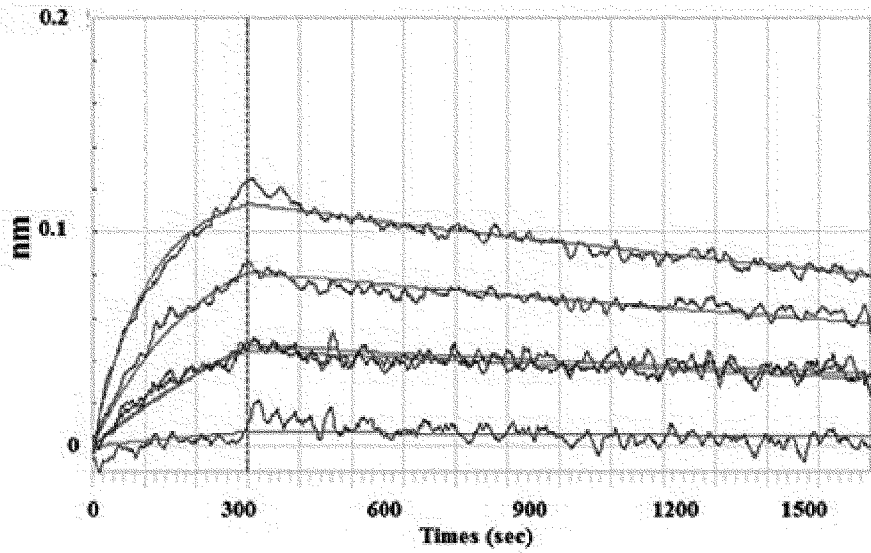
A. 5A7

a-Syn aggregate

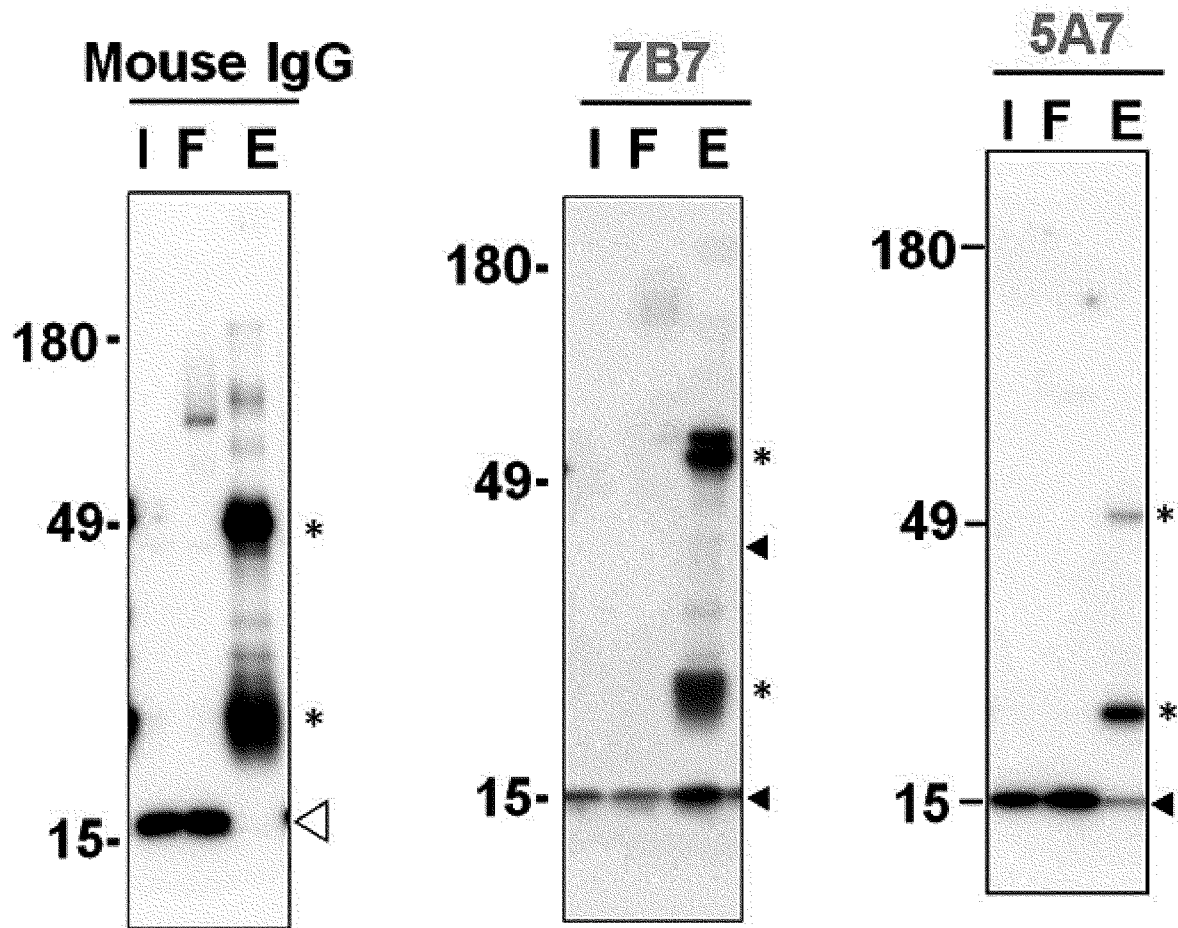


B. D3C6

a-Syn aggregate



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18; A61K 38/17; A61K 39/395; G01N 33/53; G01N 33/543; G01N 33/577; G01N 33/68

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: α -synuclein, antibody, CDRH, CDRL, synucleinopathy, aggregate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014-0363447 A1 (BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB.) 11 December 2014 See paragraphs [0020], [0039], [0053], [0067]; and claims 1, 9, 17, 19.	1-23
A	US 2016-0108113 A1 (GENENTECH, INC.) 21 April 2016 See the entire document.	1-23
A	KR 10-2011-0110200 A (PANIMA PHARMACEUTICALS AG. et al.) 06 October 2011 See the entire document.	1-23
A	KR 10-2016-0010402 A (UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY) 27 January 2016 See the entire document.	1-23
A	KR 10-2014-0095074 A (BIOGEN IDEC INTERNATIONAL NEUROSCIENCE GMBH.) 31 July 2014 See the entire document.	1-23
A	KR 10-2012-0090672 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 17 August 2012 See the entire document.	1-23
A	WO 2009-133521 A2 (BIOARTIC NEUROSCIENCE AB.) 05 November 2009 See the entire document.	1-23



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 OCTOBER 2019 (15.10.2019)

Date of mailing of the international search report

15 OCTOBER 2019 (15.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008170

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EMADI, S. et al. Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric α -synuclein that inhibits aggregation and prevents α -synuclein-induced toxicity. <i>Journal of Molecular Biology</i> . 2007, vol. 368, pages 1132-1144 See the entire document.	1-23
A	PAPACHRONI, K. K. et al. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. <i>Journal of Neurochemistry</i> . 2007, vol. 101, pages 749-756 See the entire document.	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/008170

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
US 2014-0363447 A1	11/12/2014	AU 2011-219414 A1	06/09/2012		
		AU 2011-219414 B2	20/11/2014		
		CA 2789963 A1	01/09/2011		
		CN 102869680 A	09/01/2013		
		CN 102869680 B	05/10/2016		
		CN 106397588 A	15/02/2017		
		CY 1120014 T1	12/12/2018		
		DK 2539366 T3	05/02/2018		
		EP 2539366 A1	02/01/2013		
		EP 2539366 B1	08/11/2017		
		ES 2661925 T3	04/04/2018		
		HR P20180230 T1	09/03/2018		
		HU E038313 T2	29/10/2018		
		JP 2013-525266 A	20/06/2013		
		JP 5894939 B2	30/03/2016		
		LT 2539366 T	25/04/2018		
		NO 2539366 T3	07/04/2018		
		PL 2539366 T3	29/06/2018		
		PT 2539366 T	13/02/2018		
		RS 57029 B1	31/05/2018		
		RU 2012140954 A	10/04/2014		
		RU 2555526 C2	10/07/2015		
		SI 2539366 T1	31/05/2018		
		US 2012-0308572 A1	06/12/2012		
		US 2013-0309251 A1	21/11/2013		
		US 2015-0139900 A1	21/05/2015		
		US 8632776 B2	21/01/2014		
		US 8859501 B2	14/10/2014		
		US 8968734 B2	03/03/2015		
		US 9084832 B2	21/07/2015		
		WO 2011-104696 A1	01/09/2011		
		US 2016-0108113 A1	21/04/2016	CN 107074938 A	18/08/2017
				EP 3207057 A2	23/08/2017
JP 2017-536102 A	07/12/2017				
US 2017-0320940 A1	09/11/2017				
US 9732148 B2	15/08/2017				
WO 2016-061389 A2	21/04/2016				
WO 2016-061389 A3	09/06/2016				
KR 10-2011-0110200 A	06/10/2011	AU 2009-328505 A1	28/07/2011		
		AU 2009-328505 A2	11/08/2011		
		AU 2009-328505 B2	27/11/2014		
		BR P10923157 A2	23/10/2018		
		CA 2746778 A1	24/06/2010		
		CA 2746778 C	23/04/2019		
		CN 102317316 A	11/01/2012		
		CN 102317316 B	13/08/2014		
		CY 1116584 T1	15/03/2017		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/008170

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		DK 2370466 T3	03/08/2015
		DK 2949666 T3	25/03/2019
		EA 030826 B1	31/10/2018
		EA 201190041 A1	28/02/2012
		EP 2370466 A1	05/10/2011
		EP 2370466 B1	06/05/2015
		EP 2370466 B8	24/06/2015
		EP 2949666 A1	02/12/2015
		EP 2949666 B1	19/12/2018
		EP 3521309 A1	07/08/2019
		ES 2544569 T3	01/09/2015
		HK 1156638 A1	22/01/2016
		HK 1217722 A1	20/01/2017
		HR P20150831 T1	09/10/2015
		HU E025150 T2	28/01/2016
		IL 213482 A	31/07/2011
		IL 213482 B	29/05/2017
		JP 2012-512634 A	07/06/2012
		JP 2014-221835 A	27/11/2014
		JP 5810413 B2	11/11/2015
		KR 10-1781228 B1	22/09/2017
		MX 2011006422 A	15/09/2011
		NZ 593964 A	21/12/2012
		PH 12016500658 A1	08/01/2018
		PT 2370466 E	21/09/2015
		RS 54259 B1	29/02/2016
		SG 172121 A1	28/07/2011
		SI 2370466 T1	30/11/2015
		SI 2949666 T1	29/03/2019
		SI EP2370466 T1	30/11/2015
		SM T201500186 B	30/10/2015
		US 2011-0300077 A1	08/12/2011
		US 2015-0232542 A1	20/08/2015
		US 2016-0244515 A1	25/08/2016
		US 2018-0371065 A1	27/12/2018
		US 8940276 B2	27/01/2015
		US 9896504 B2	20/02/2018
		WO 2010-069603 A1	24/06/2010
KR 10-2016-0010402 A	27/01/2016	CN 105121473 A	02/12/2015
		EP 2961774 A1	06/01/2016
		HK 1217107 A1	23/12/2016
		JP 2016-511254 A	14/04/2016
		JP 6261621 B2	17/01/2018
		KR 10-1990096 B1	19/06/2019
		US 10208111 B2	19/02/2019
		US 2014-0241984 A1	28/08/2014
		US 2014-0241987 A1	28/08/2014
		US 2017-0190765 A1	06/07/2017
		US 9534044 B2	03/01/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/008170

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2014-132210 A1	04/09/2014
KR 10-2014-0095074 A	31/07/2014	AU 2012-332814 A1	12/06/2014
		AU 2012-332814 B2	14/12/2017
		BR 112014010664 A2	25/04/2017
		CA 2854131 A1	10/05/2013
		CN 104040342 A	10/09/2014
		CN 107091931 A	25/08/2017
		EA 201490883 A1	30/10/2014
		EP 2773957 A1	10/09/2014
		EP 2773957 B1	29/11/2017
		HK 1201585 A1	04/09/2015
		IL 232373 A	30/08/2018
		JP 2014-533357 A	11/12/2014
		JP 6263473 B2	31/01/2018
		MX 2014005378 A	19/01/2015
		MX 356797 B	14/06/2018
		NZ 625217 A	29/07/2016
		US 2014-0295465 A1	02/10/2014
		US 2018-0011112 A1	11/01/2018
		US 2019-0094245 A1	28/03/2019
		WO 2013-066818 A1	10/05/2013
ZA 201403879 B	28/11/2018		
KR 10-2012-0090672 A	17/08/2012	KR 10-1308898 B1	23/09/2013
WO 2009-133521 A2	05/11/2009	DK 2282758 T3	25/02/2019
		EP 2282758 A2	16/02/2011
		EP 2282758 B1	21/11/2018
		EP 3470079 A1	17/04/2019
		ES 2709048 T3	15/04/2019
		HR P20190092 T1	22/03/2019
		HU E041223 T2	28/05/2019
		JP 2011-518874 A	30/06/2011
		JP 2015-057433 A	26/03/2015
		JP 5747414 B2	15/07/2015
		LT 2282758 T	12/03/2019
		PL 2282758 T3	30/04/2019
		SI 2282758 T1	29/03/2019
		US 2011-0052498 A1	03/03/2011
		US 2014-0335088 A1	13/11/2014
		US 2016-0199522 A1	14/07/2016
		US 8809506 B2	19/08/2014
		US 9315569 B2	19/04/2016
		WO 2009-133521 A3	01/04/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

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

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/18; A61K 38/17; A61K 39/395; G01N 33/53; G01N 33/543; G01N 33/577; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 알파-시누클레인(α-synuclein), 항체(antibody), CDRH, CDRL, 시누클레인 병(synucleinopathy), 응집체(aggregate)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2014-0363447 A1 (BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB) 2014.12.11 단락 [0020], [0039], [0053], [0067]; 및 청구항 1, 9, 17, 19 참조.	1-23
A	US 2016-0108113 A1 (GENENTECH, INC.) 2016.04.21 전체 문헌 참조.	1-23
A	KR 10-2011-0110200 A (파니마 파마슈티컬스 아게 등) 2011.10.06 전체 문헌 참조.	1-23
A	KR 10-2016-0010402 A (유나이티드 아랍에미리트 대학교) 2016.01.27 전체 문헌 참조.	1-23
A	KR 10-2014-0095074 A (바이오젠 아이텍 인터내셔널 뉴로사이언스 게엠베하) 2014.07.31 전체 문헌 참조.	1-23
A	KR 10-2012-0090672 A (건국대학교 산학협력단) 2012.08.17 전체 문헌 참조.	1-23
A	WO 2009-133521 A2 (BIOARTIC NEUROSCIENCE AB) 2009.11.05 전체 문헌 참조.	1-23

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

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

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 10월 15일 (15.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 15일 (15.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



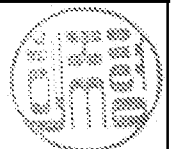
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	EMADI, S. 등, 'Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric α -synuclein that inhibits aggregation and prevents α -synuclein-induced toxicity', Journal of Molecular Biology, 2007, 368권, 페이지 1132-1144 전체 문헌 참조.	1-23
A	PAPACHRONI, K. K. 등, 'Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease', Journal of Neurochemistry, 2007, 101권, 페이지 749-756 전체 문헌 참조.	1-23

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0363447 A1	2014/12/11	AU 2011-219414 A1	2012/09/06
		AU 2011-219414 B2	2014/11/20
		CA 2789963 A1	2011/09/01
		CN 102869680 A	2013/01/09
		CN 102869680 B	2016/10/05
		CN 106397588 A	2017/02/15
		CY 1120014 T1	2018/12/12
		DK 2539366 T3	2018/02/05
		EP 2539366 A1	2013/01/02
		EP 2539366 B1	2017/11/08
		ES 2661925 T3	2018/04/04
		HR P20180230 T1	2018/03/09
		HU E038313 T2	2018/10/29
		JP 2013-525266 A	2013/06/20
		JP 5894939 B2	2016/03/30
		LT 2539366 T	2018/04/25
		NO 2539366 T3	2018/04/07
		PL 2539366 T3	2018/06/29
		PT 2539366 T	2018/02/13
		RS 57029 B1	2018/05/31
		RU 2012140954 A	2014/04/10
		RU 2555526 C2	2015/07/10
		SI 2539366 T1	2018/05/31
		US 2012-0308572 A1	2012/12/06
		US 2013-0309251 A1	2013/11/21
		US 2015-0139900 A1	2015/05/21
		US 8632776 B2	2014/01/21
		US 8859501 B2	2014/10/14
		US 8968734 B2	2015/03/03
		US 9084832 B2	2015/07/21
		WO 2011-104696 A1	2011/09/01
US 2016-0108113 A1	2016/04/21	CN 107074938 A	2017/08/18
		EP 3207057 A2	2017/08/23
		JP 2017-536102 A	2017/12/07
		US 2017-0320940 A1	2017/11/09
		US 9732148 B2	2017/08/15
		WO 2016-061389 A2	2016/04/21
WO 2016-061389 A3	2016/06/09		
KR 10-2011-0110200 A	2011/10/06	AU 2009-328505 A1	2011/07/28
		AU 2009-328505 A2	2011/08/11
		AU 2009-328505 B2	2014/11/27
		BR PI0923157 A2	2018/10/23
		CA 2746778 A1	2010/06/24
		CA 2746778 C	2019/04/23
		CN 102317316 A	2012/01/11
		CN 102317316 B	2014/08/13
		CY 1116584 T1	2017/03/15

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		DK 2370466 T3	2015/08/03
		DK 2949666 T3	2019/03/25
		EA 030826 B1	2018/10/31
		EA 201190041 A1	2012/02/28
		EP 2370466 A1	2011/10/05
		EP 2370466 B1	2015/05/06
		EP 2370466 B8	2015/06/24
		EP 2949666 A1	2015/12/02
		EP 2949666 B1	2018/12/19
		EP 3521309 A1	2019/08/07
		ES 2544569 T3	2015/09/01
		HK 1156638 A1	2016/01/22
		HK 1217722 A1	2017/01/20
		HR P20150831 T1	2015/10/09
		HU E025150 T2	2016/01/28
		IL 213482 A	2011/07/31
		IL 213482 B	2017/05/29
		JP 2012-512634 A	2012/06/07
		JP 2014-221835 A	2014/11/27
		JP 5810413 B2	2015/11/11
		KR 10-1781228 B1	2017/09/22
		MX 2011006422 A	2011/09/15
		NZ 593964 A	2012/12/21
		PH 12016500658 A1	2018/01/08
		PT 2370466 E	2015/09/21
		RS 54259 B1	2016/02/29
		SG 172121 A1	2011/07/28
		SI 2370466 T1	2015/11/30
		SI 2949666 T1	2019/03/29
		SI EP2370466 T1	2015/11/30
		SM T201500186 B	2015/10/30
		US 2011-0300077 A1	2011/12/08
		US 2015-0232542 A1	2015/08/20
		US 2016-0244515 A1	2016/08/25
		US 2018-0371065 A1	2018/12/27
		US 8940276 B2	2015/01/27
		US 9896504 B2	2018/02/20
		WO 2010-069603 A1	2010/06/24
KR 10-2016-0010402 A	2016/01/27	CN 105121473 A	2015/12/02
		EP 2961774 A1	2016/01/06
		HK 1217107 A1	2016/12/23
		JP 2016-511254 A	2016/04/14
		JP 6261621 B2	2018/01/17
		KR 10-1990096 B1	2019/06/19
		US 10208111 B2	2019/02/19
		US 2014-0241984 A1	2014/08/28
		US 2014-0241987 A1	2014/08/28
		US 2017-0190765 A1	2017/07/06
		US 9534044 B2	2017/01/03

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2014-132210 A1	2014/09/04
KR 10-2014-0095074 A	2014/07/31	AU 2012-332814 A1	2014/06/12
		AU 2012-332814 B2	2017/12/14
		BR 112014010664 A2	2017/04/25
		CA 2854131 A1	2013/05/10
		CN 104040342 A	2014/09/10
		CN 107091931 A	2017/08/25
		EA 201490883 A1	2014/10/30
		EP 2773957 A1	2014/09/10
		EP 2773957 B1	2017/11/29
		HK 1201585 A1	2015/09/04
		IL 232373 A	2018/08/30
		JP 2014-533357 A	2014/12/11
		JP 6263473 B2	2018/01/31
		MX 2014005378 A	2015/01/19
		MX 356797 B	2018/06/14
		NZ 625217 A	2016/07/29
		US 2014-0295465 A1	2014/10/02
		US 2018-0011112 A1	2018/01/11
		US 2019-0094245 A1	2019/03/28
		WO 2013-066818 A1	2013/05/10
		ZA 201403879 B	2018/11/28
KR 10-2012-0090672 A	2012/08/17	KR 10-1308898 B1	2013/09/23
WO 2009-133521 A2	2009/11/05	DK 2282758 T3	2019/02/25
		EP 2282758 A2	2011/02/16
		EP 2282758 B1	2018/11/21
		EP 3470079 A1	2019/04/17
		ES 2709048 T3	2019/04/15
		HR P20190092 T1	2019/03/22
		HU E041223 T2	2019/05/28
		JP 2011-518874 A	2011/06/30
		JP 2015-057433 A	2015/03/26
		JP 5747414 B2	2015/07/15
		LT 2282758 T	2019/03/12
		PL 2282758 T3	2019/04/30
		SI 2282758 T1	2019/03/29
		US 2011-0052498 A1	2011/03/03
		US 2014-0335088 A1	2014/11/13
		US 2016-0199522 A1	2016/07/14
		US 8809506 B2	2014/08/19
		US 9315569 B2	2016/04/19
		WO 2009-133521 A3	2010/04/01