

(51) 국제특허분류:
미분류

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/014123

(22) 국제출원일: 2018년 11월 16일 (16.11.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
62/588,018 2017년 11월 17일 (17.11.2017) US
62/687,848 2018년 6월 21일 (21.06.2018) US(71) 출원인: 에이비엘바이오 주식회사 (ABL BIO INC.)
[KR/KR]; 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, 2층, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이상훈 (LEE, Sang Hoon); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 유원규 (YOU, Weonkyoo); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 안진형 (AHN, Jinhyung); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 안성원 (AN, Sungwon); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 정진원 (JUNG, Jinwon); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 이보라 (LEE, Bora); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 김동인 (KIM, Dongin); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 성병제 (SUNG, Byungje); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712

번길 16, Gyeonggi-do (KR). 손용규 (SON, Yonggyu); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 김연주 (KIM, Yeunju); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 엄재현 (EOM, Jaehyun); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 안세원 (AHN, Seawon); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 박영돈 (PAK, Youngdon); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 염동훈 (YEOM, Donghoon); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 송대해 (SONG, Daehae); 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR).

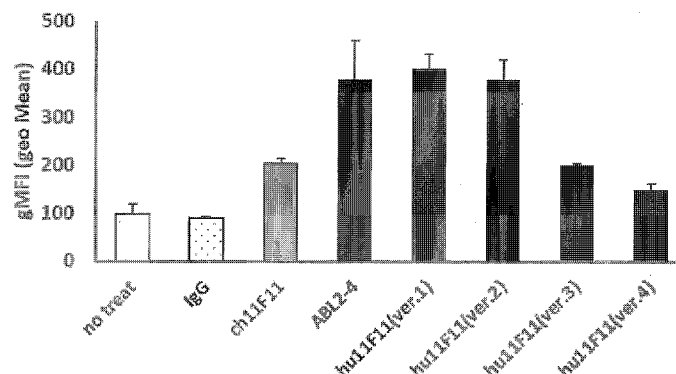
(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).

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

(54) Title: ANTIBODIES TO α -SYNUCLEIN AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: 알파-시누클레인에 대한 항체 및 그 용도

【도 10a】

(57) Abstract: The present invention relates to anti- α -synuclein antibodies, which preferentially recognize α -synuclein aggregates, and uses for detection, diagnosis, and/or treatment or prevention of a variety of diseases or disease symptoms related thereto due to accumulation of α -synuclein aggregates by using the anti- α -synuclein antibodies.

(57) 요약서: 본 발명은 알파-시누클레인 응집체를 선호적으로 인식하는 항-알파-시누클레인 항체와, 상기 항-알파-시누클레인 항체를 이용하여 알파-시누클레인 응집체 축적으로 인한 다양한 질환 또는 이의 관련 증상질환의 검출, 진단 및/또는 치료 또는 예방 용도에 관한 것이다.





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

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

알파-시누클레인에 대한 항체 및 그 용도

【기술분야】

5 본 발명은 알파-시누클레인 항체 및 그 용도에 관한 기술이다.

【배경기술】

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
10 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.

그러나, 병적인 상태에서 알파-시누클레인은 액적(droplet), 인지질 이중막 또는 지질막 등과의 결합 및 상호작용을 통해 구조적 변화를 일으켜
15 접힌 또는 폴딩된 α -헬리칼 형태의 2차 구조를 형성하여 이량체(dimer), 올리고머(oligomer) 및/또는 섬유상 형태의 분자를 포함하는 응집체를 형성하게 된다.

이러한 알파-시누클레인 응집체는 세포에 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성
20 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
25 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
30 시누클레인병 (α -synucleinopathies)라고 불리는 일군의 신경퇴행성 질환의 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

나아가 파킨슨 질환 환자의 뇌척수액 및 혈장 샘플에서 올리고머

형태 및 모노머 형태의 알파-시누클레인이 모두 발견되었는데, 이는 작은 분자량의 알파-시누클레인 응집체가 세포막을 투과하여 세포외 공간에 접근할 수 있음을 나타낸다. 또한 폴딩된 알파-시누클레인이 엑소사이토시스에 의해 세포로부터 방출된 후, 프리온 단백질처럼, 세포간 전달에 의해 뇌의 한 영역에서 다른 영역으로 전달될 수 있는 것으로 나타났다.

이에, 알파-시누클레인이 파킨슨 질환과 같은 시누클레인병의 치료제 개발의 표적이 되고 있다. 주요 개발 전략은 응집체 형성 억제, 유전자 사일런싱 및 응집체 제거를 포함한다. 전자의 경우, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), 3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole (anle138b, CLR0120 및 프롤릴 올리고펩티다제 억제제 KYP-20479를 포함한다.

저분자 화합물의 경우 표적 특이적인 결합력이 떨어지고 낮은 반감기로 인하여 높은 용량을 투여해야 한다. 항체는 저분자 화합물과 비교하여 표적 특이적이고, 높은 반감기를 나타내나, 질환 치료 가능성을 높이기 위해서는 높은 결합력으로 응집체에 선호적으로 결합하는 항체가 필요하다. 따라서 알파-시누클레인 응집체의 비정상적 축적과 연관된 질환의 치료를 위해, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인의 응집체에 선호적으로 결합할 수 있는 항체의 개발이 필요하다.

20

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 명세서에서는 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고자 한다. 상기 알파-시누클레인에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 알파-시누클레인을 특이적으로 인식하고 결합할 수 있으며, 특히 알파-시누클레인의 C-말단 부위에 결합하는 것일 수 있다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합하여, 대상(subject)의 신경계에서 알파-시누클레인의 수준을 감소시키는 항체를 제공한다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 알파-시누클레인 응집체, 구체적으로, 아밀로이드 피브릴(amyloid fibrils), 프로토피브릴(protofibrils) 및 올리고머(oligomers)), 특히 아밀로이드 피브릴에 대해 높은 결합 친화성을

가치며, 알파-시누클레인 모노머(monomer)에 대해 낮은 결합 친화성을 가지는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (i) 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체에 특이적인 결합, (ii) 대상의 신경계에서 알파-시누클레인, 또는 알파-시누클레인 응집체의 수준 감소, (iii) 신경세포간 알파-시누클레인 또는 이의 응집체의 이동 (cell-to-cell transmission) 감소 또는 저해, 및 (vi) 신경세포에 의한 알파-시누클레인 또는 이의 응집체의 식세포 작용 (phagocytic uptake)의 증진으로 이루어지는 군에 선택된 1종 이상의 활성을 갖는 것일 수 있다.

바람직하게는, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 활성 (i) 내지 (iv)를 모두 가지는 것일 수 있다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 시누클레인병의 예방, 경감, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을, 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 시누클레인병의 예방, 경감, 개선 또는 치료방법에 관한 것이다. 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 투여량은 대상의 신경계에서, 더욱 자세하게는 신경계의 신경세포외 영역에서 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체의 수준을 감소시키는 유효량일 수 있다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 대상의 신경계에서, 더욱 자세하게는 신경계의 신경세포외 영역에서 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체의 수준을 감소시키는 방법 또는 신경계의 신경세포외 영역에서 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체의 수준을 감소시키는 용도에 관한 것이다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 대상의 신경계에서, 더욱 자세하게는 신경세포간 알파-시누클레인 또는 이의 응집체의 이동 (cell-to-cell transmission) 감소 또는 저해시키는 방법, 또는 신경계의 신경세포간 알파-시누클레인 또는

이의 응집체의 이동 (cell-to-cell transmission) 감소 또는 저해시키는 용도에 관한 것이다.

- 본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 대상의 신경계에서 미세교세포 (microglia)에 의한 알파-시누클레인 또는 이의 응집체의 식세포 작용(phagocytic uptake)을 증가시키는 방법, 또는 대상의 신경계에서 미세교세포 (microglia)에 의한 알파-시누클레인 또는 이의 응집체의 식세포 작용(phagocytic uptake)을 증가시키는 용도에 관한 것이다.

10 【기술적 해결방법】

이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

- 본 발명은 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고자 한다. 상기 알파 시누클레인에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 베타 (β)- 혹은 감마 (γ)-시누클레인에 결합하지 않고 알파-시누클레인을 특이적으로 인식하고 결합할 수 있으며, 아밀로이드 베타 (amyloid beta) 및 타우 (tau)의 응집체에 결합하지 않고 알파-시누클레인의 응집체에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.

- 본원에서 용어 "항원" 또는 "면역원"은 예를 들면 항원 결합 단백질 (예를 들면, 항체 또는 이의 면역학적으로 기능적인 항원 결합 단편)이 결합할 수 있으며, 동물에서 항원에 결합할 수 있는 항체 생산에 사용될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 의미한다. 항원은 상이한 항체 또는 이의 단편과 상호작용할 수 있는 하나 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서 항원은 알파-시누클레인 단백질 또는 알파-시누클레인 응집체일 수 있다. 구체적으로 상기 알파-시누클레인 응집체는 아밀로이드 피브릴(amyloid fibrils), 프로토피브릴(protofibrils) 및 올리고머(oligomers)), 특히 아밀로이드 피브릴일 수 있다. 본 발명에 따른 알파-시누클레인 또는 이의 응집체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 항원 결합 단편은, 특히 알파-시누클레인의 C-말단 부위에 결합하는 것일 수 있다. N-말단을 인식하는 알파-시누클레인 항체들은 알파-시누클레인 관련 질환을 통칭하는 시누클레인병에 속하는 다계통위축증과 같은 다른 질병의 응집체는 인식하지 못하는 반면, C-말단 부위를 인식하는 알파-

시누클레인 항체들은 파킨슨 질병뿐 아니라 기타 다양한 시누클레인병 질환의 응집체도 인식한다는 장점을 가진다.

본원에서 용어 "중화"는 결합 단백질이 항원에 특이적으로 결합할 때, 상기 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 감소하는 것이다. 일 구현예에서 중화 단백질 또는 중화 항체는 항원 (알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체)에 결합하여, 대상의 신경계에서 신경세포의 영역에서 항원의 수준을 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%를 감소시키거나, 신경세포의 영역에서 항원의 수준 증가를 사전에 예방할 수 있다.

본원에서 "알파-시누클레인"은 SNCA 유전자에 의해 코딩되는 140개 잔기 아미노산으로 구성된 네이티브 α -Syn (NCBI ID: NP_000336)으로, 전장의 비처리된 것은 물론 처리된 다양한 형태의 것을 포함한다. 또한 자연적으로 나타나는 알파-시누클레인의 변이체, 예를 들면 돌연변이, 스플라이스 변이체 또는 대립 변이체를 또한 포함하는 것이다. 변이체로는 140개 잔기 단백질 이외에, 엑손 3 및 엑손 5가 결실된 126개 및 112개 잔기 단백질 형태도 존재한다 (CAG3339.1). 또한 SNCA 유전자의 특정 다형성(polymorphism) 또는 미스센스(missense) 돌연변이가 파킨슨 질환의 발생과 관련성이 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 돌연변이체도 포함된다. 알파-시누클레인의 호몰로그인 베타- 및 감마-시누클레인이 존재한다. 일 구현예에서 본원에 따른 항체는 알파-시누클레인을 특이적으로 인식한다. 알파-시누클레인의 아미노산 서열은 서열번호 225로 표시된다.

본원에서 "알파-시누클레인 응집체"는 알파-시누클레인의 구조(conformation)의 변화로 인한 것으로, 올리고머, 프로토피브릴, 피브릴 및/또는 상기 구조 중 하나 이상을 포함하는 구조 또는 응집체를 포함한다.

본 명세서에서 제공되는 항체가 항원으로 인식하는 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. 본 명세서에 다르게 언급되지 않는 한, 알파-시누클레인은 인간 알파-시누클레인을 지칭하는 것일 수 있고, 본

명세서에서 제공되는 항체 또는 이의 항원결합단편은 인간 알파-시누클레인 뿐만 아니라 원숭이(예컨대, Rhesus), 래트, 및/또는 마우스 알파-시누클레인에도 특이적인 결합능을 갖는 것일 수 있다.

상기 항체 또는 이의 항원결합단편이 결합하는 알파-시누클레인의 C-말단 부위에 결합하며, 구체적으로 인간 알파-시누클레인 단백질은 서열번호 126의 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.

본 명세서에서 "친화성 또는 친화도 (affinity)"는 항체 또는 이의 항원 결합단편과 항원 사이의 상호작용의 강도이며, 항체 또는 항원결합단편의 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.

본 명세서에서, "알파-시누클레인 단백질 또는 알파-시누클레인 응집체에 특이적 결합한다"함은 알파-시누클레인단백질 또는 알파-시누클레인응집체에 대한 친화도가 다른 항원과 비교하여 상대적으로 높은 것을 의미하는 것으로, 예컨대, 알파-시누클레인 응집체, 구체적으로, 아밀로이드 피브릴(amyloid fibrils), 프로토피브릴(protofibrils) 및 올리고머(oligomers), 특히 아밀로이드 피브릴에 대해 친화도가 Octet 및 SPR 분석에서 각각 0.1×10^{-10} M 내지 2×10^{-10} M, 또는 0.05×10^{-10} M 내지 0.3×10^{-9} M 이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 일예에 따른 경쇄 및 중쇄를 포함하는 인간화 알파-시누클레인 항체, 예를 들면 Hu11F11(ver.1), Hu11F11(ver.2), 및 Hu11F11_ABL2-4의 경우, 키메라 알파-시누클레인항체에 비하여 높은 식세포 작용 촉진 활성을 나타낸다. Hu11F11(ver.1), Hu11F11(ver.2), Hu11F11(ver.3), Hu11F11(ver.4), ABL2-4의 경우, 키메라 알파-시누클레인 항체에 비하여 피브릴의 신경세포막 결합에 대한 높은 억제능을 보이며, Hu11F11(ver.2), Hu11F11(ver.4), ABL2-4의 경우, 키메라 알파-시누클레인

항체 대비, 알파-시누클레인 과발현 세포로부터 분리된 알파-시누클레인의 다른 신경세포로의 전파에 대한 높은 억제능을 나타낸다. 알파-시누클레인 응집체에 대한 결합력, 예를 들면 cell-based assay에서는 측정된 결합력은 키메라 알파-시누클레인 항체와 유사하거나 우수한 활성을 갖는다.

본 발명에 따른 알파-시누클레인 항체는 적용 대상(subject)의 신경계에서 신경세포 밖으로 분리된 알파-시누클레인 응집체가 세포 외 공간(extracellular space)에서 다른 정상 세포로 이동하여 해당 신경세포를 일종의 감염시키는 작용을 억제하며 (inhibit cell-to-cell transmission of aggregates), 또한, 미세교세포가 세포 외 공간에 위치하는 알파-시누클레인 응집체에 대한 식세포 작용 촉진능을 가진다. 알파-시누클레인 응집체는 프리온처럼 한 세포에서 다른 세포로 전파되면서 해당 정상 세포 내에도 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체가 뇌 전반으로 퍼져나가면서 시누클레인병을 초래한다. 따라서, 알파-시누클레인 응집체는 뇌 신경세포에 독성이 있으며, 뇌 신경세포 사멸(neurodegeneration), 뇌염증 반응(neuroinflammation)을 일으키는 것으로 잘 알려져있다. 따라서 알파-시누클레인 응집체가 뇌의 여러 부위에 퍼져나가면서 뇌세포 사멸과 뇌염증 반응이 증가할 것이며, 이로 인하여 시누클레인병, 예를 들면 파킨슨 병이 진행되면서 확인되는 뇌세포 사멸 및 이로 인한 행동, 인지 기능의 장애가 나타난다.

이에, 본 발명의 알파-시누클레인 항체는 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체의 신경세포간 이동을 억제하여 알파-시누클레인 응집체가 뇌의 다양한 영역으로 퍼져나가는 현상을 방지할 수 있으며, 또한, 미세교세포의 식세포 작용을 촉진하여, 대상 신경계에서 신경세포 외부에 존재하는 알파-시누클레인 응집체 자체의 감소 또는 제거를 통해 시누클레인병의 중요한 원인인 알파-시누클레인 응집체의 수준을 감소시켜, 뇌 신경세포 사멸 및 뇌 염증 반응을 줄이고 나아가서 시누클레인병, 예컨대 파킨슨 병의 증상 및 병의 진행을 개선, 경감 또는 예방하는 효과를 기대할 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 알파-시누클레인 항체는 (i) 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체의 신경세포간 이동을 억제, 및 (ii) 미세교세포의 식세포 작용을 촉진을 통한 뇌 신경계의 알파-시누클레인 응집체의 수준 감소와 관련하여 두 가지 기능을 모두 수행할 수 있는

점에서 우수한 활성을 가진다 (본원 cell-based assay 결과 참고). 특히, 현재까지 임상 시험이 진행중이거나 논문에 공개된 알파-시누클레인 항체들은 상기 (i) 및 (ii) 활성 중에서 한 가지 활성을 가지므로, 이는 본원의 알파-시누클레인 항체는 알려진 알파-시누클레인 항체에 비해

5 우수한 시누클레인병의 예방 또는 치료에 장점이 있음을 나타낸다. 따라서, 본원 발명에 따른 알파-시누클레인 항체는 알파-시누클레인 응집체의 제거 및 감소와, 병인으로서의 작용을 억제하는 효능이 더욱 우수하고, 따라서 시누클레인병 또는 이와 관련한 증상적 질병 (예, 인지 장애 등)에 더욱 효과적이다.

- 10 알파-시누클레인 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 알파-시누클레인 응집체 형성을 감소시킬 수 있어 뇌의 응집체의 농도를 낮출 수 있다. 또한 알파-시누클레인 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 중추신경계 바깥에서의 알파-시누클레인 응집체 형성을 감소시킬 수 있어,
- 15 결국 뇌혈관장벽을 경계로한 알파-시누클레인 형태들 간의 평형상태를 변경시켜, 중추신경계 내의 응집체의 농도를 낮추는 효과를 가져올 수 있다.

- 이는 항체를, 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 보다 간편한 피하주사와 같은 방식으로 투여해도 충분한 효능을 얻을 수 있기 때문에, 임상에서 큰 장점이 있다. 나아가 알파-시누클레인 응집체에 대한 높은
- 20 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 알파-시누클레인 응집체 형성 및/또는 축적 및/또는 세포가 전달을 억제 및/또는 감소시킬 수 있어 뇌에서 응집체의 농도를 낮출 수 있다. 또한 알파-시누클레인 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 중추신경계 바깥에서의 알파-시누클레인 응집체 형성을 감소시킬 수 있어,
- 25 결국 뇌혈관장벽을 경계로 한 알파-시누클레인 형태들 간의 평형상태를 변경시켜, 중추신경계 내의 응집체의 농도를 낮추는 효과를 가져올 수 있다. 또한 본 이론으로 한정하는 것은 아니나, 본원에 따른 항체 또는 항원 결합단편은 단량체의 제거를 통한 응집체 형성 억제, 또는 단량체와 응집체를 모두 제거할 수 있다.

- 30 본 명세서에서 제공되는 알파-시누클레인 단백질 또는 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편은 자연적으로 생산된 것이 아닐 수 있다 (non-naturally occurring; 예컨대,

화학적 합성 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다). 상기과 같은 재조합 기술은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

본 명세서에서 "항체"는 임의의 아이소타입의 온전한 면역글로불린, 또는 표적 항원에의 결합을 위해 완전한 항체와 경쟁을 할 수 있는 항원 결합 단편을 의미한다. 예를 들면, 키메라, 인간화, 완전 인간 또는 이중특이적 항체 또는 이들의 항원 결합 단편을 포함한다. 항체는 그 자체로 항원 결합 단백질의 일종이기도 하다. 완전한 항체는 일반적으로 적어도 2개의 전장 중쇄와 2개의 전장 경쇄를 포함하지만, 일부 경우에 항체가 단지 중쇄만을 포함할 수도 있다.

항체 또는 이의 항원 결합 단편은 오직 단일 원(source)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 키메라일 수 있다, 키메라 항체는 2 종류의 상이한 항체로부터 유래된 부분을 포함하며, 아래 보다 상세하게 기술된다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하이브리도마, 재조합 DNA 기술 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다. 다른 언급이 없다면, 본원에서 용어 항체는 2개의 전장 중쇄와 2개의 전장 경쇄를 포함하는 항체는 물론, 이들의 유도체, 변이체, 단편, 및 돌연변이체를 포함하고, 이들의 예는 아래 기술된 바와 같다.

일 구현예에서, 항체는 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 미니바디, 도메인 항체, 항체 모방체 (또는 합성 항체), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체 융합체(또는 항체 접합체), 및 이의 단편을 포함하나, 이에 국한되지 않으며 본원에 개시된 다양한 형태의 항체를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 개시된 항체의 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 단일체인 단편 (scFv), 디아바디 또는 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 스페이서를 통해 연결된 단일 쇠의 단쇄 항체 분자일 수 있다.

본원에서 "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 CL 을 포함한다. 경쇄의 가변영역 도메인은 경쇄 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재한다. 경쇄의 종류에는 카파 및 람다 사슬이 포함된다.

본원에서 "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),
 5 IgA (IgA1 및 IgA2 서브타입 포함), IgM 및 IgE의 아이소타입을 포함한다.

본 명세서에 기재된 "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
 10 항체의 일부 또는 이를 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 이러한 항원결합단편은 전형적으로, 하나 이상의 "상보성 결정 부위"(Complementary Determining Region, or CDR)을 포함할 수 있으며, 여기에 더하여, 하나 이상의 "프레임워크" 영역을 포함할 수 있다. CDR은 항체의 항원 결합의 특이성과 친화성에 기여하는 아미노산 서열이고,
 15 프레임워크 영역은 이들 CDR의 적절한 형태(conformation)를 유지하는데 기여하는 아미노산 서열 부위로, 항원 결합 영역과 항원 사이에 결합을 촉진할 수 있다.

본원에 사용된, 항체 또는 면역글로불린의 사슬(중쇄 또는 경쇄)의 "항원 결합 단편"은 전장 사슬과 비교하여 일부 아미노산이 결여되었지만,
 20 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일부를 포함하는 것이다. 이러한 단편은 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있고, 또는 다른 항체 또는 항원 결합 단편과 특정 에피토프에 결합하기 위해 경쟁할 수 있다는 측면에서 생물학적으로 활성이 있다고 할 수 있다. 한 양태에서, 이러한 단편은 전장 경쇄 또는 중쇄 내에 존재하는 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 일부
 25 구현예에서, 단쇄 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 이의 일부를 포함한다. 이러한 생물학적 활성 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 생산되거나, 또는 예를 들면 온전한 항체를 효소적 또는 화학적 절단하여 생산될 수 있다. 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편에는 이로 제한하는 것은 아니나, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체 및 단쇄 항체(예컨대, scFv, scFv-Fc 등)를
 30 포함한다. 또한 이로 제한하는 것은 아니나, 인간, 마우스, 랫트, 카멜리드 또는 토끼를 포함하는 임의의 포유동물에서 유래될 수 있다. 본 명세서에 개시된 하나 이상의 CDR과 같은 항체의 기능적인 부분은 제2의 단백질 또는

저분자 화합물과 공유결합으로 연결되어 특정 표적에 대한 표적 치료제로서 사용될 수 있다.

본원에서 "Fab 단편"은 1개의 경쇄와 CH1 및 가변영역만을 포함하는 1개 중쇄로 구성된다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 디설파이드 결합을 형성할 수 없다.

본원에서 "Fc" 영역은 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 중쇄 단편을 두 분자 포함한다. 이들 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 디설파이드 결합 및 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 서로 결합되어 있다.

본원에서 "Fab' 단편"은 Fab 단편에 중쇄의 CH1과 CH2 도메인 사이에 존재하는 영역을 추가로 포함하여, 두 분자의 Fab' 단편의 두 개의 중쇄사이에서 사슬간 다이설파이드 결합이 형성되어, F(ab')₂ 분자를 형성할 수 있다.

본원에서 "F(ab')₂ 단편"은 앞서 기술한 바와 같이, 2개의 경쇄, 및 가변영역, CH1과 CH1과 CH2 도메인 사이에 불변영역의 일부를 포함하는 중쇄 2 분자를 포함하여, 2 분자의 중쇄 사이에서 사슬간 다이설파이드 결합이 형성된다. 따라서, F(ab')₂ 단편은 2개의 Fab' 단편으로 구성되며, 상기 두 개의 Fab' 단편은 이들 간의 다이설파이드 결합에 의해 서로 회합되어 있다.

본원에서 "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄의 가변영역을 포함하지만 불변영역은 포함하지 않는 항체이다.

본원에서 "단쇄 항체"는 중쇄 및 경쇄 가변영역이 유연한 링커에 의해 연결된 항원 결합 영역의 단일 폴리펩타이드 사슬이다. 예컨대, 상기 단쇄 항체는 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 단일 사슬 형태로 연결된 scFv, 중쇄가변영역, 경쇄가변영역, 및 Fc 가 단일사슬 형태로 연결된 scFv-Fc 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 단쇄 항체는 예를 들면 미국 특허 제5,260,203호를 참조할 수 있다.

본원에서 "2가의 항원 결합 단백질" 또는 "2가 항체"는 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 이러한 2가 항체에 포함된 2개의 항원 결합 부위는 동일한 항원 특이성을 갖거나, 또는 각각 상이한 항원에 결합하는 이중특이적 항체일 수 있다. 본원에서 "다중 특이적 항원 결합 단백질" 또는 "다중 특이적 항체"는 두 개 이상의 항원 또는 에피토프를 표적으로 하는 것이다.

본원에서 "이특이적," "이중 특이적" 항원 결합 단백질 또는 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 하이브리드 항원 결합 단백질 또는 항체이다. 이러한 이특이적 항체는 다중 특이적 항원 결합 단백질 또는 다중 특이적 항체의 일종으로, 공지된 다양한 방법 예를 들면
5 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결에 의해 생산될 수 있다.

본원에서 "이특이적," "이중 특이적" 항원 결합 단백질 또는 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 하이브리드 항원 결합 단백질 또는 항체이다. 이러한 이특이적 항체는 다중 특이적 항원 결합 단백질 또는 다중 특이적 항체의 일종으로, 공지된 다양한 방법 예를 들면
10 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편 혹은 scFv 단편의 연결에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 1990, 79:315-321; Kostelny et al. J. Immunol. 1992, 148:1547-1553 등을 참조할 수 있다. 이특이적 항원 결합 단백질 또는 항체의 2개의 항원 결합 부위가 결합하는 2개의 서로 상이한 에피토프는 동일 또는 상이한 단백질
15 표적에 위치할 수 있다. 본원에 따른 일구현예에서 본원에 따른 항체는 혈관뇌장벽을 통과하여 전달되기 위해 전달체에 대한 결합을 추가로 포함하는 이중특이적 항체의 형태를 취할 수 있다. 혈관뇌장벽을 통하여 약물을 전달하기 위한 한 가지 방법은 세포에 내재된 글루코스 및 아미노산 전달체, 인슐린 또는 트랜스페린의 수용체 매개 트랜스사이토시스와 같은
20 전달 시스템의 사용을 포함한다.

본원에서 "컨쥬게이트"는 본원에 개시된 항체 또는 그 항원결합 단편과 다른 분자, 특히 후술하는 혈관뇌장벽 전달체 또는 치료제와의 키메라 분자를 일컫는 것이다. 컨쥬게이트에서 본원에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편은 다른 분자와 예를 들면 공유결합 또는 반데스발스 또는
25 소수성상호작용에 의한 물리적 힘, 캡슐화, 매립화(embedding) 또는 상기 조합을 포함하는 방법에 의해 물리적으로 결합된다. 일 구현예에 따른 컨쥬게이트에서 본원에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편은 펩타이드 링커를 통해 연결될 수 있다.

본원은 또한 본원에 개시된 하나 이상의 아미노산 서열과 실질적인
30 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함한다. 실질적 동일성이란 본원은 서열변이가 존재하는 본원에 개시된 효과를 유지하는 것을 의미한다. 일 구현예에서 개시된 중쇄 가변영역과 약 90%, 95%, 또는

99% 동일성을 가진다. 다른 구현예에서 개시된 경쇄 가변영역과 약 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 가진다. 예를 들면 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합단편의 서열과 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 나타내는 변이체의 경우, 임의의 변이는 CDR 보다는 가변영역의 골격에서 발생된다.

- 5 본 발명에 따른 알파-시누클레인 또는 이의 응집체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 항원 결합 단편은, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3의 상보성 결정부위를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 상보성 결정부위를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

- 10 일 구현예에서, 상기 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은 하기 CDR 서열을 포함할 수 있다:

서열번호 1 및 서열번호 6의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1),

서열번호 2 내지 4 및 서열번호 7 내지 8의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2),

- 15 서열번호 5 및 서열번호 9의 아미노산 서열중에서 하나를 중쇄 CDR3 (H-CDR3),

서열번호 10 및 서열번호 13의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1),

- 20 서열번호 11 및 서열번호 14의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및

서열번호 12 및 서열번호 15의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄 CDR3 (L-CDR3).

상기 중쇄 CDR1 내지 CDR3의 아미노산 서열과 경쇄 CDR1 내지 CDR3의 아미노산 서열을 표 1 및 표 2에 정리하였다:

25

[표 1] 중쇄 CDR1 내지 CDR3의 아미노산 서열

클론명명	SE Q ID NO	VH_CDR1 아미노산서열	SE Q ID NO	VH_CDR2 아미노산서열	SE Q ID NO	VH_CDR3 아미노산서열
ch11F11-VH	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYAASVK	5	DAHGKPFAY

-VH1				G		
Hu11F11 -VH2	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYAASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH3	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYADSVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH4	1	GFTFSDFYME	3	AIRNKANDYTTEYADSVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VHv3	1	GFTFSDFYME	4	ATRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 - VHv1mul newmu	1	GFTFSDFYME	4	ATRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VHv3 newmu	1	GFTFSDFYME	4	ATRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH-v1	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH-v2	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH-v3	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
Hu11F11 -VH-v4	1	GFTFSDFYME	2	ASRNKANDYTTEYSASVK G	5	DAHGKPFAY
ch3A9- VH	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9- VH1	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9- VH2	6	GFTFSSYAMS	8	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9- VH3	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9- VH4	6	GFTFSSYAMS	8	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9- VH-v1	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD Y
Hu3A9-	6	GFTFSSYAMS	7	TISNGGGYTYYPDSVKG	9	HITTVRPTKYFD

VH-v2						Y
-------	--	--	--	--	--	---

[표 2] 경쇄 CDR1 내지 CDR3의 아미노산 서열

클론명명	SEQ ID NO	VL_CDR1 아미노산서열	SEQ ID NO	VL_CDR1 아미노산서열	SEQ ID NO	VL_CDR1 아미노산서열
ch11F11-VL	10	KSSQSLLYSSNQKNYLA	11	WASTRES	12	QQYYSYPW T
Hu11F11-VL1	10	KSSQSLLYSSNQKNYLA	11	WASTRES	12	QQYYSYPW T
Hu11F11-VL2	10	KSSQSLLYSSNQKNYLA	11	WASTRES	12	QQYYSYPW T
Hu11F11-VL3	10	KSSQSLLYSSNQKNYLA	11	WASTRES	12	QQYYSYPW T
Hu11F11-VL4	10	KSSQSLLYSSNQKNYLA	11	WASTRES	12	QQYYSYPW T
Hu11F11-VL5	10	KSSQSLLYSSNQKNYLA	11	WASTRES	12	QQYYSYPW T
Hu11F11-VLv3 4c	10	KSSQSLLYSSNQKNYLA	11	WASTRES	12	QQYYSYPW T
ch3A9-VL	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL1	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL2	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL3	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL4	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v1	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	13	KASQNVGTTVA	14	SASNRYT	15	QQYSNYPLT

일 구체예에서, 상기 항-알파-시누클레인 항체 또는 그의 항원결합단편은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1), 서열번호 2 내지 4의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2), 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 (H-CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10의 아미노산 서열을

포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1), 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 (L-CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

또한, 상기 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은,
 5 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1), 서열번호 7 내지 8의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2), 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 (H-CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1), 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2),
 10 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 (L-CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

다른 구체예에서, 상기 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은,

H-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR1)로서,
 15 서열번호 16 내지 17 및 서열번호 35 내지 40의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함,

H-CDR1과 H-CDR2 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR2)로서, 서열번호 18 내지 19 및 서열번호 41 내지 44의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함,

20 H-CDR2와 H-CDR3 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR3)로서, 서열번호 20 내지 31 및 서열번호 45 내지 50의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함,

H-CDR3의 C 말단에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR4)로서, 서열번호 32 내지 34 및 서열번호 51 내지 52의 아미노산 서열중에서
 25 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함,

L-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (L-FR1)로서, 서열번호 53 내지 58 및 서열번호 71 내지 77의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함,

L-CDR1과 L-CDR2 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (L-FR2)로서, 서열번호 59 내지 61 및 서열번호 78 내지 81의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함,
 30

L-CDR2와 L-CDR3 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (L-FR3)로서, 서열번호 62 내지 67 및 서열번호 82 내지 88의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함, 및/또는

5 L-CDR3의 C 말단에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (L-FR4)로서, 서열번호 68 내지 70 및 서열번호 89의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 폴리펩타이드 단편을 포함하는 것일 수 있다.

본 명세서에서 프레임워크로 사용 가능한 아미노산 서열로서, 중쇄가변영역 프레임워크 서열을 표 3 및 표 4에, 경쇄가변영역 프레임워크 및 표 5 및 표 6에 예시하였다.

10 [표 3] 중쇄 프레임워크 1 내지 2의 아미노산 서열

clone	SEQ ID NO	VH-FR1-Sequence	SEQ ID NO	VH-FR2 Sequence
ch11F11-VH	16	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH1	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGLEWIA
Hu11F11-VH2	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGLEWIA
Hu11F11-VH3	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGLEWIA
Hu11F11-VH4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	19	WVRQAPGKGLEWVA
Hu11F11-VHv3	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VHv1mul newmu	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VHv3 newmu	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v1	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v2	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v3	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	18	WVRQPPGKRLEWIA

ch3A9-VH	35	EVQLQESGGGLVQPGGSLKLSAAS	41	WVRQTPEKRLEWVA
Hu3A9-VH1	36	QVQLLES GGGLVQPGGSLRLS AAS	42	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH2	37	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS AAS	43	WVRQAPDKGLEWVA
Hu3A9-VH3	38	EVQLVES GGGLVQPGGSLRLS AAS	42	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH4	38	EVQLVES GGGLVQPGGSLRLS AAS	42	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH-v1	39	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS AAS	44	WVRQTPEKGLEWVA
Hu3A9-VH-v2	40	EVQLLES GGGLVQPGGSLKLS AAS	44	WVRQTPEKGLEWVA

[표 4] 중쇄 프레임워크 3 내지 4의 아미노산 서열

clone	SEQ ID NO	VH-FR3-Sequence	SEQ ID NO	VH-FR4 Sequence
ch11F11-VH	20	RFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCAR	32	WGQGTLVTVSA
Hu11F11-VH1	21	RFTVSRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR	33	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH2	22	RFTISRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR	33	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH3	23	RFTVSRDTSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	33	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH4	24	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	33	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VHv3	25	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VHv1mul newmu	26	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR	34	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VHv3 newmu	27	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v1	28	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v2	29	RFTVSRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTVTVSS

Hu11F11-VH-v3	30	RFTISRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTTVTVSS
Hu11F11-VH-v4	31	RFTVSRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR	34	WGQGTTTVTVSS
ch3A9-VH	45	RFTISRDNNAKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCAR	51	WGQGTTTLTVSS
Hu3A9-VH1	46	RFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRSEDSAMYYCAR	52	WGQGTTLTVTVSS
Hu3A9-VH2	47	RFTISRDNNAKNTLYLQMSSLKAEDSAVYYCAR	52	WGQGTTLTVTVSS
Hu3A9-VH3	48	RFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	52	WGQGTTLTVTVSS
Hu3A9-VH4	49	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	52	WGQGTTLTVTVSS
Hu3A9-VH-v1	50	RFTISRDNNAKNTLYLQMSSLRAEDTAMYYCAR	51	WGQGTTTLTVSS
Hu3A9-VH-v2	50	RFTISRDNNAKNTLYLQMSSLRAEDTAMYYCAR	51	WGQGTTTLTVSS

[표 5] 경쇄 프레임워크 1 내지 2의 아미노산 서열

clone	SEQ ID NO	VH-FR1-Sequence	SEQ ID NO	VH-FR2 Sequence
ch11F11-VL	53	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSC	59	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu11F11-VL1	54	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL2	55	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTITC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL3	56	DIVMTQSPSSLAVSLGERATINC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL4	57	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	61	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu11F11-VL5	53	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSC	60	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VLv3 4c	58	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSC	59	WYQQKPGQSPKLLIY
ch3A9-VL	71	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITC	78	WYQQKPGQSPKLLIY

Hu3A9-VL1	72	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	79	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL2	73	DIVMTQSPSTLSASVGDRVITC	80	AWYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL3	74	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSC	81	WYQQKPGQAPRLLIY
Hu3A9-VL4	75	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	79	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL-v1	76	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	78	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-v2	77	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITC	78	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-v2	77	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITC	78	WYQQKPGQSPKLLIY

[표 6] 경쇄 프레임워크 3 내지 4의 아미노산 서열

clone	SEQ ID NO	VH-FR3-Sequence	SEQ ID NO	VH-FR4 Sequence
ch11F11-VL	62	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL1	63	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	69	FGGGTKVEIK
Hu11F11-VL2	64	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL3	63	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL4	65	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	70	FGQGTKVEIK
Hu11F11-VL5	66	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC	68	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VLv3 4c	67	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDVAVYYC	68	FGGGTKLEIK
ch3A9-VL	82	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL1	83	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	89	FGAGTKLELR

Hu3A9-VL2	84	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFASYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL3	85	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL4	86	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v1	87	GVPDRFSGSGSGTDFTFTISSMQSEDIATYFC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v2	88	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLADYYC	89	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v2	88	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLADYYC	89	FGAGTKLELR

다른 구체예에서, 상기 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은, 서열번호 1 및 서열번호 6의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1), 서열번호 2 내지 4 및 서열번호 7 내지 8의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2), 서열번호 5 및 서열번호 9의 아미노산 서열중에서 하나를 중쇄 CDR3 (H-CDR3) 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며,

상기 중쇄가변영역은 서열번호 16 내지 17 및 서열번호 35 내지 40의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR1), 서열번호 20 내지 31 및 서열번호 45 내지 50의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR2), 서열번호 20 내지 31 및 서열번호 45 내지 50의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR3), 및 서열번호 32 내지 34 및 서열번호 51 내지 52의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR4)를 포함할 수 있다. 더욱 자세하게는, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 H-FR1, 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 H-FR2, 서열번호 29 내지 31의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 H-FR3, 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 H-FR4을 포함할 수 있다.

또한, 상기 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은, 서열번호 10 및 서열번호 13의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1), 서열번호 11 및 서열번호 14의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및 서열번호 12 및 서열번호 15의 아미노산

서열중에서 하나를 포함하는 경쇄 CDR3 (L -CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며,

상기 경쇄가변영역은 추가로 서열번호 53 내지 58 및 서열번호 71 내지 77의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR1), 서열번호 59 내지 61 및 서열번호 78 내지 81의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR2), 서열번호 62 내지 67 및 서열번호 82 내지 88의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR3), 및 서열번호 68 내지 70 및 서열번호 89의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR4)를 포함할 수 있다. 더욱 자세하게는, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 L-FR1, 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 L-FR2, 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 L-FR3, 및 서열번호 34의 아미노산을 포함하는 L-FR4을 포함할 수 있다.

다만, 본 발명에 따른 항- 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은, 서열번호 1, 2 및 5의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR1-CDR3와 서열번호 10, 11, 및 12의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 CDR1-CDR3를 포함하고, 서열번호 16, 18, 20 및 32의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 FR1-FR4와 서열번호 53, 59, 62 및 68의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 FR1-FR4와를 갖는 마우스 항체 또는 키메라 항체 또는 이의 항원결합단편을 포함하지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 항- 알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은, 서열번호 6, 7 및 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR1-CDR3와 서열번호 13, 14, 및 15의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 CDR1-CDR3를 포함하고, 서열번호 35, 41, 45 및 51의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 FR1-FR4와 서열번호 71, 78, 82 및 89의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 FR1-FR4와를 갖는 마우스 항체 또는 키메라 항체 또는 이의 항원결합단편을 포함하지 않는다. 구체적인 예로서, 서열번호 90의 중쇄 가변영역 서열(ch11F11-VH)과 서열번호 109의 경쇄 가변영역 서열 (ch11F11-VL)을 포함하는 항체 또는 서열번호 102의 중쇄 가변영역 서열(ch11F11-VH)과 서열번호 116의 경쇄 가변영역 서열 (ch11F11-VL)을 포함하는 Ch3A9 항체는 본 발명에 따른 항 알파-시누클레인 항체에 포함되지 않는다.

본 발명의 구체적인 일예에 따른 항-알파-시누클레인 항체 또는
 5 이의 항원결합단편은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1), 서열번호 2 내지 4의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2), 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 (H-CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1), 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 (L-CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며,

10 상기 중쇄가변영역은 서열번호 16 내지 17의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR1), 서열번호 18 내지 19의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR2), 서열번호 20 내지 31의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR3), 및 서열번호 32 내지 34의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR4)를 포함하고,

15 상기 경쇄가변영역은 서열번호 53 내지 58의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR1), 서열번호 59 내지 61의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR2), 서열번호 62 내지 67의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR3), 및 서열번호 68 내지 70의 아미노산 서열중에서
 20 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR4)를 포함할 수 있다.

바람직하게는, 본 발명의 구체적인 일예에 따른 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역과, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을
 25 포함하는 경쇄 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 H-FR1, 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 H-FR2, 서열번호 29 내지 31의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 H-FR3, 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 H-FR4을 포함할 수 있으며, 상기 경쇄 가변 영역은,
 30 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 L-FR1, 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 L-FR2, 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 L-FR3, 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 L-FR4을 포함할 수 있다.

본 발명의 구체적인 일예에 따른 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1), 서열번호 7 내지 8의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2), 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 (H-CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1), 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 (L-CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며,

상기 중쇄가변영역은 서열번호 35 내지 40의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR1), 서열번호 41 내지 44의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR2), 서열번호 45 내지 50의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR3), 및 서열번호 51 내지 53의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR4)를 포함하고,

상기 경쇄가변영역은 서열번호 71 내지 77의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR1), 서열번호 78 내지 81의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR2), 서열번호 82 내지 88의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR3), 및 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR4)를 포함할 수 있다.

전장의 경쇄 및 중쇄에서, 가변영역 및 불변영역은 약 12개 이상의 아미노산 길이인 "J" 영역에 의해 결합되고, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 예를 들면, Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press 를 참조할 수 있다. 전형적으로 항체의 경쇄/중쇄 쌍의 가변영역이 항원 결합 부위를 형성한다.

면역글로불린 사슬의 가변영역은 일반적으로 전체적 구조가 동일하며, "상보적 결정부위 또는 영역 또는 도메인" 또는 CDR 로 지칭되는 3 개의 추가변영역에 의해 이어지는 비교적 보존된 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 중쇄/경쇄 쌍을 구성하는 각 사슬 유래의 가변영역의 CDR 은 전형적으로 프레임워크 영역에 의해 정렬되어 표적 단백질(알파-시누클레인)의 특정 에피토프와 특이적으로 결합하는 구조를 형성한다.

자연 발생 경쇄 및 중쇄 가변영역의 이러한 요소는 N-말단으로부터 C-말단까지 전형적으로 다음 순서로 포함된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 가변영역에서 이들 각각에 해당하는 아미노산 서열의 위치는 Kabat 넘버링 시스템 (Kabat Sequences of Proteins of Immunological
5 Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD), 또는 Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883에 기재된 것을 따른다.

본 명세서에 개시된 다양한 중쇄 및 경쇄 가변영역은 표 7 및 표 8에 개시된다. 이러한 각각의 가변영역은 온전한 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄를
10 형성하기 위해 상기 중쇄 및 경쇄 불변영역에 결합될 수 있다. 또한, 이렇게 생성된 각각의 중쇄 및 경쇄 서열은 또한 완전한 항체 구조를 형성하기 위해 조합될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은, 서열번호 90 내지 101 또는 서열번호 102 내지 108의 아미노산 서열중에서 하나의 중쇄 가변 영역과,
15 서열번호 109 내지 115 또는 서열번호 116 내지 123의 아미노산 서열중에서 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하며, 더욱 자세하게는 서열번호 90 내지 101의 아미노산 서열중에서 하나의 중쇄 가변 영역과 서열번호 109 내지 115의 아미노산 서열중에서 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 서열번호 102 내지 108의 아미노산 서열중에서 하나의 중쇄 가변 영역과 서열번호
20 116 내지 123의 아미노산 서열중에서 하나의 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

본 발명의 구체적인 일예에서, 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은 서열번호 98 내지 101의 아미노산 서열중에서 하나의 중쇄 가변영역과, 서열번호 115의 아미노산 서열의 경쇄 가변영역을 포함할 수
25 있거나(예, Hu11F11_(ver.1), Hu11F11_(ver.2), Hu11F11_(ver.3), Hu11F11_(ver.4), 등) 또는 서열번호 92의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역과 서열번호 113의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다(예, Hu11F11_(ABL2-4) 항체).

다만, 상기 항-알파-시누클레인 항체 또는 이의 항원결합단편은,
30 서열번호 90의 중쇄 가변영역 및 서열번호 109의 경쇄가변영역으로

이루어지는 것 및 서열번호 102의 중쇄 가변영역 및 서열번호 116의 경쇄가변영역으로 이루어지는 것은 제외된다.

일 구현예에 따른 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열을 표 7 및 표 8에 예시하였다.

5 [표 7] 중쇄 가변영역

clone	SEQ ID NO	Amino acid sequence
ch11F11-VH	90	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNAL RAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTLTVSA
Hu11F11-VH1	91	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGK GLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTVSRDTSKNSLYLQMNSL KTEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGTLTVSS
Hu11F11-VH2	92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGK GLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTISRDTSKNSLYLQMNSLK TEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGTLTVSS
Hu11F11-VH3	93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGK GLEWIAAIRNKANDYTTEYADSVKGRFTVSRDTSQNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGTLTVSS
Hu11F11-VH4	94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGK GLEWVAAIRNKANDYTTEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRDAHGKPFAYWGQGTLTVSS
Hu11F11-VHv3	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTTVTVSS
Hu11F11-VHv1mu1 newmu	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSSSLYLQMNSL KTEDTAVYYCARDAHGKPFAYWGQGTTTVTVSS
Hu11F11-VHv3 newmu	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAATR NKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTTVTVSS
Hu11F11-VH-v1	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTTVTVSS
Hu11F11-VH-v2	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDDSKSSLYLQMNS LRAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTTVTVSS
Hu11F11-VH-v3	100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAHGKPFAYWGQGTTTVTVSS

Hu11F11-VH-v4	101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDTSKSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAGKPFAYWGQGTTTVTVSS
ch3A9-VH	102	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWV ATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCAR HITTVRPTKYFDYWGGGTTTLTVSS
Hu3A9-VH1	103	QVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWV ATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDSAMYYCA RHITTVRPTKYFDYWGGGTLTVTVSS
Hu3A9-VH2	104	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPDKGLEW VATISNGGGYTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKAEDSAVYYCA RHITTVRPTKYFDYWGGGTLTVTVSS
Hu3A9-VH3	105	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWV ATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR HITTVRPTKYFDYWGGGTLTVTVSS
Hu3A9-VH4	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWV ATISNGGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR HITTVRPTKYFDYWGGGTLTVTVSS
Hu3A9-VH-v1	107	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKLEWV ATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAMYYCAR HITTVRPTKYFDYWGGGTTTLTVSS
Hu3A9-VH-v2	108	EVQLLES GGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKLEWV ATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAMYYCAR HITTVRPTKYFDYWGGGTTTLTVSS
ch9B11-VH	124	EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSM LYLQMNNLKTEDTAMYYCVRQDFDYWGQGTTTLTVSS

[표 8] 경쇄 가변영역

clone	SEQ ID NO	Amino acid sequence
ch11F11-VL	109	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDL AVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIK
Hu11F11-VL1	110	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSPWTFGGGKVEIK
Hu11F11-VL2	111	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVA VYYCQQYYSPWTFGGGKLEIK
Hu11F11-VL3	112	DIVMTQSPSSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSPWTFGGGKLEIK

Hu11F11-VL4	113	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYSPWTFGGGTKVEIK
Hu11F11-VL5	114	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDL AVYYCQQYYSPWTFGGGTKLEIK
Hu11F11-VLv3 4c	115	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDV AVYYCQQYYSPWTFGGGTKLEIK
ch3A9-VL	116	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSP KLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQ QYSNYPLTFGAGTKLELR
Hu3A9-VL1	117	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGTTVAWYQQKPGKAP KLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYSNYPLTFGGGTKLEIK
Hu3A9-VL2	118	DIVMTQSPSTLSASVGDRVITITCKASQNVGTTVAWYQQKPGKAP KLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFASYCQ QYSNYPLTFGGGTKVEIK
Hu3A9-VL3	119	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWYQQKPGQAP RLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YSNYPLTFGGGTKVEIK
Hu3A9-VL4	120	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGTTVAWYQQKPGK APKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYSNYPLTFGGGTKVEIK
Hu3A9-VL-v1	121	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSP KLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSMQSEDIATYFCQ QYSNYPLTFGGGTKLEIK
Hu3A9-VL-v2	122	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSP KLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDIADYYCQ QYSNYPLTFGGGTKLEIK
Hu3A9-VL-v2	123	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSP KLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLADYYCQ QYSNYPLTFGGGTKLEIK
ch9B11-VL	125	DIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKP GQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVPLTFGAGTKLEQKR

또한, 일 구현예에 따른 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 조합과 불변영역을 포함하는, 예시적인 항체를 표 9에 기재하였다.

sample Name	chain	Amino acid sequence
hu11F11(ver.1)	heavy (SEQ ID NO: 127)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAGHKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
	light (SEQ ID NO: 128)	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDV AVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11(ver.2)	heavy (SEQ ID NO: 129)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDDSKSSLYLQMNS LRAEDTAIYYCARDAGHKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
	light (SEQ ID NO: 130)	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDV AVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11(ver.3)	heavy (SEQ ID NO: 131)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSKSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAGHKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

		VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
	light (SEQ ID NO: 132)	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDV AVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11(ver.4)	heavy (SEQ ID NO: 133)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGK RLEWIAASRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDTSKSSLYLQMNSL RAEDTAIYYCARDAGKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
	light (SEQ ID NO: 134)	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDV AVYYCQQYYSPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11(H2L4)	Heavy (SEQ ID NO: 135)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGK GLEWIAAIRNKANDYTTEYAASVKGRFTISRDTSKNSLYLQMNSLK TEDTAVYYCARDAGKPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
	light (SEQ ID NO: 136)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYSPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu3A9(VH5/L3)	heavy (SEQ ID NO: 137)	EVQLQESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEK GLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR SEDTAVYYCARHITTVRPTKYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

		PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
	light (SEQ ID NO: 138	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWYQQKPGQAP RLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ YSNYPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 본 명세서에 개시된 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 온전한 항체의 중쇄 및 경쇄를 형성하기 위하여, 각각 중쇄 불변영역 및 경쇄 불변영역에 결합될 수 있다. 이와 같이 생성된 각각의 중쇄 및 경쇄는
- 5 적절하게 짝지워져 중쇄-경쇄 조합을 이룰 수 있고, 상기 중쇄-경쇄 조합은 다합체를 형성 (예컨대, IgG 타입 항체의 경우 이합체를 형성)하여 온전한 항체 구조를 이룰 수 있다.

- 상기 불변영역은 면역글로불린 (예컨대, 인간 면역글로불린)의 중쇄 불변영역 및 경쇄 불변영역에서 적절히 선택될 수 있다. 예컨대, 중쇄 불변영역은 IgG1 중쇄 불변영역, IgG3 중쇄 불변영역, 또는 IgG4 중쇄 불변영역일 수 있고, 경쇄 불변영역은 카파 불변영역 또는 람다 경쇄 불변영역일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 항체 안정성, 제조
- 10 가능성, 항원 친화성, 및/또는 기타 목적하는 특징 등을 위하여 다른 유형의 불변영역 또는 변형된 불변영역을 적절하게 선택하여 사용할 수
- 15 있으며, 이는 당업자가 명확하게 알 수 있는 사항이다.

다른 구현예에서 상기 표 7 및 표 8에 개시된 중쇄 가변영역 및 경쇄 각 가변영역은 서로 자유롭게 조합되어 다양한 항체를 형성할 수 있고, 단일사슬 형태로 연결되어 scFv와 같은 단쇄 항체를 형성할 수도 있다.

- 본 명세서에 개시된 항체는 본 명세서에 개시된 다른 항체와 특정
- 20 영역 또는 서열을 공유한다. 일 구현예에서는 항체 또는 항원결합단편의 불변영역을 공유할 수 있다. 다른 구현예에서는 Fc 영역을 공유할 수 있다.

일 예에서, 본 명세서에서 제공되는 항-알파-시누클레인 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체일 수 있다. 다른 예에서, 상기 항-

알파-시누클레인 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 또는 동물유래 항체일 수 있다. 다른 예에서, 상기 항-알파-시누클레인 항체는 재조합적 또는 화학적으로 합성된 것일 수 있다.

일 구현예에서, 본 명세서에 개시된 항체의 항원결합단편 또는 항체
5 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 미니바디, 디아바디, 및 scFv 등의 단쇄 항체 분자들로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

다른 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체이고, 다양한 이소타입 (예를 들면, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE,
10 또는 IgD)일 수 있으며, 특히, IgG1-, IgG2- IgG3- 또는 IgG4-유형, 예컨대, IgG1- 또는 IgG2-유형일 수 있다.

또 다른 구현예에서, 항-알파-시누클레인 항체는 상기 기재된 경쇄 또는 중쇄만으로 이루어진 것일 수 있다. 다른 구현예에서, 항-알파-시누클레인 항체는 경쇄 가변영역 또는 중쇄 가변영역만으로 이루어진 것일
15 수 있다.

당업자라면 항체가 본 명세서에 개시된 하나 이상의 CDR 을 포함하는 경우, 개시된 각 CDR 은 서로 독립적으로 선택되어 조합될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 독립적으로 선택된 CDR 을 갖는 항체가 생성될 수 있다. 또한 조합을 위해 CDR 이 선택될 때, 같은 종류의
20 CDR 이 반복적으로 사용되지 않으며, 예를 들면 항체는 일반적으로 두 개의 CDRH2 영역을 포함하여 제조되지 않는다는 것을 당업자라면 알 것이다.

일 구현예에서, 상기 항체는 모노클로날 항체 또는 다클론항체일 수 있다. 본 명세서에 개시된 항체는 알파-시누클레인에 결합하는 모노클로날 항체를 포함한다. 모노클로날 항체는 당해 기술 분야에 공지된 임의의
25 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 면역화된 형질전환 동물로부터 수확된 비장 세포를 불멸화시킴으로써 생산될 수 있다. 하이브리도마 세포주에 의해 분비된 모노클로날 항체는 당해 기술 분야에 공지된 기술을 사용하여 정제할 수 있다.

다른 구체예에서, 상기 항체는 동물유래 항체 (예컨대, 마우스 항체
30 등), 키메라 항체 (예컨대, 마우스-인간 키메라 항체), 인간화 항체, 또는

인간 항체일 수 있다. 항체는 또한 다양한 목적을 위해 다양한 방식으로 변형될 수 있다. 키메라 및 인간화 항체가 또한 제공된다. 키메라 항체는 상이한 항체로부터 유래된 폴리펩타이드 단편들이 공유결합으로 연결되어 면역학적으로 기능적인 경쇄, 중쇄 또는 그 단편을 형성하는 항체이다.

- 5 이러한 모노클로날 항체에서, 전형적으로 항체의 비-항원 인식 부분을 구성하는 특정 아미노산 잔기가 인간 항체의 상응하는 아이소타입의 상응하는 잔기와 상동성이 되도록 변형된다. 인간화는, 예를 들면, 공지된 다양한 방법을 이용하여, 설치류 가변영역의 적어도 일부를 인간 항체의 상응하는 영역으로 치환함으로써 수행될 수 있다(미국 특허 제5,585,089호
10 및 제5,693,762호; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536).

- 완전 인간 항체는 내인성 면역글로블린 생성이 결핍되어 인간 항체를 생성할 수 있는 형질전환 동물(통상적으로, 마우스)을 면역화시킴으로써
15 생성될 수 있다. 완전 인간 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리(phage-display library)로부터 유래될 수 있다. 완전 인간 항체를 사용하면, 마우스 또는 마우스-유래된 mAb 를 인간에 투여함으로써 유발될 수 있는 면역원성 반응 및 알레르기 반응을 최소화할 수 있다.

- 일 구현예에서, 본원의 인간 알파-시누클레인 항체는 파지
20 디스플레이 방법을 통해 선별된다. 파아지 스크리닝을 통해 선별한 알파-시누클레인 특이적인 단일클론 파이지 항체를 전체 IgG (full IgG) 형태로 변환하기 위해 재조합 방법을 이용하였다. 항-알파-시누클레인 항체의 재조합 제조를 위해 각 단일클론 파아지 항체의 서열을 확보한다. 확보한 서열에서 중쇄 가변영역 서열은 중쇄 불변영역서열에, 경쇄 가변영역
25 서열은 경쇄 불변영역 서열에 이식한 후 코돈최적화 (codon optimization) 방법을 통해 아미노산 서열을 핵산 서열로 변경한다. 확보한 핵산 서열을 동물 세포 배양용 벡터에 클로닝 한 후, CHO 세포 등의 단백질 생산용 숙주 세포에 상기 벡터를 이용해 형질전환 하여, 배양한다. 상기 배양액에 포함된 항체를 정제하기 위해 친화도 크로마토그래피등의 정제 기술을
30 이용하여 재조합 항체를 분리 정제한다.

다른 구체예에서, 상기 항체는 자연에서 발견되는 항체의 전형적인 구조를 갖거나 변형된 구조를 갖는 항체일 수 있다.

상기 전형적인 구조를 갖는 항체는 서로 다른 두 개의 폴리펩타이드 사슬 (즉, 중쇄 및 경쇄)을 포함하는 구조적 단위체를 포함하는 다합체 구조를 가질 수 있다. 상기 서로 다른 두 개의 폴리펩타이드 사슬은 전장 경쇄 (약 25kDa) 및 전장 중쇄 (약 50 내지 70kDa)를 포함할 수 있다. 각 사슬은, 특징적인 접힘 패턴을 나타내며, 약 90 내지 110개 아미노산으로 이루어진, 수 개의 면역글로불린 도메인으로 구성되어 있다. 이러한 도메인은 항체 폴리펩타이드를 구성하고 있는 기본 단위체이다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 전형적으로 항원을 인식하는 부분인 가변영역 또는 V 영역으로 지칭되는 부분을 포함한다. 카복시-말단 부분은 아미노-말단 보다 진화적으로 보다 보존되었으며 불변영역 또는 C 영역으로 지칭되는 부분을 포함한다. 인간 경쇄는 일반적으로 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄로서 분류되고, 이들 각각은 하나의 가변영역 및 하나의 불변영역을 포함한다. 중쇄는 일반적으로 뮤(μ), 델타(δ), 감마(γ), 알파(α) 또는 엡실론(ϵ) 쇄로서 분류되고, 이들은 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE 이소타입으로 정의된다. IgG 는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하나, 이에 제한되지 않는 다수의 서브타입을 갖는다. 중쇄 불변영역은 전형적으로 효과기 기능을 나타내는 하나 이상의 도메인을 포함한다. 중쇄 불변영역 도메인의 수는 이소타입에 따라 달라진다. IgG 중쇄는, 예를 들면, 각각 CH1, CH2 및 CH3으로 공지된 3개의 C 영역 도메인을 포함한다. 본 명세서에 개시된 항체는 이러한 이소타입 및 서브타입 중의 임의의 하나일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 항-알파-시누클레인 항체는 IgG 이소타입, 예컨대, IgG1, IgG2 또는 IgG4 서브타입일 수 있다.

본 명세서에 개시된 항체는 또한 상기 본 명세서에 개시된 항체의 변이체이다. 예를 들면, 항원의 일부는 상기 개시된 중쇄 또는 경쇄, 가변영역 또는 CDR 서열의 하나 이상의 잔기에서 보존적 (conservative) 아미노산 치환을 포함한다. 당업자라면 공지된 기술을 사용하여 본 명세서에 개시된 폴리펩타이드의 적절한 변이체를 결정할 수 있을 것이다. 당업자라면 폴리펩타이드에서 활성에 중요한 것으로 생각되지 않는 영역을 변이체의 표적으로 하여, 활성을 파괴하지 않으면서도 단백질을 변화시킬 수 있는 부위를 찾아낼 수 있을 것이다.

본원은 또한 본원에 개시된 항체의 유도체를 제공한다. 유도체화된 항체는 항체 또는 그 단편에 목적하는 특성, 예를 들면, 특정 용도에서 증가된 반감기를 제공하는 임의의 분자 또는 물질을 포함할 수 있다. 유도체화된 항체는, 예를 들면, 검출가능(또는 표지화) 잔기(예: 방사성, 비색성, 항원성 또는 효소 분자, 검출가능한 비드(예: 자기 또는 전자밀도(예: 금) 비드), 또는 다른 분자(예: 비오틴 또는 스트렙타비딘)에 결합하는 분자), 치료적 또는 진단적 잔기(예: 방사성, 세포독성, 또는 약학적 활성 잔기), 또는 특별한 용도(예를 들면, 대상체, 예를 들면, 인간 대상체에 투여, 또는 기타 생체내 또는 시험관내 사용)를 위한 항체의 적합성을 증가시키는 분자를 포함할 수 있다.

다른 구현에는 항체의 Fc 영역에 알파-시누클레인 결합 단백질이 융합된 2개의 융합 단백질을 포함하는 이량체에 관한 것이다. 상기 이량체는, 예를 들면, 융합 단백질을 코딩하는 유전자 융합체를 적절한 발현 벡터 내로 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포 내에서 유전자 융합체를 발현시키고, 발현된 융합 단백질이 항체 분자와 유사하게 조합할 수 있도록 함으로써 제조될 수 있고, 여기서 사슬간 디설파이드 결합이 Fc 잔기 사이에 형성되어 이량체가 수득된다.

본원에서 사용된 용어 "Fc 폴리펩타이드"는 항체의 Fc 영역으로부터 유래된 폴리펩타이드로 야생형 또는 돌연변이 형태를 포함한다. 이량체화를 촉진하는 hinge 영역을 포함하는 절단된 형태의 폴리펩타이드도 또한 포함된다. Fc 잔기를 포함하는 융합 단백질 및 이로부터 형성된 올리고머는 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼을 이용한 친화성 크로마토그래피로 용이하게 분리할 수 있는 장점이 있다.

다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 상기 항체 또는 항원결합 단편을 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 또 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 상기 발현 벡터로 형질전환된 원핵 또는 진핵 세포 또는 세포주를 제공한다.

또 다른 양태에서 본원은 또한 상기 본원에 따른 세포를 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 발현되기에 충분한 조건에서 배양하는 단계; 및 상기 세포주로부터 항체 또는 그 항원결합 단편을 분리하는 단계를 포함하는, 알파-시누클레인에 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 명세서에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 다양한 유용성을 가진다. 예를 들면 특이적 결합 분석, 친화도를 기초로 한 알파-시누클레인 정제, 또는 알파-시누클레인길항제 규명을 위한 스크리닝 방법 등에 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 따른 항체는 알파-
 5 시누클레인응집체의 형성 억제, 신경계에서 알파-시누클레인응집체의 제거, 알파-시누클레인응집체의 세포간 이동 억제, 알파-시누클레인응집체에 대한 식세포 작용에 의한 세포의 알파-시누클레인응집체의 제거 및 감소에 유용할 수 있다.

본원에 따른 항체는 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인응집체와
 10 관련된 다양한 질환의 검출 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예를 들면 질환은 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체에 관련된 질병, 증상 또는 질환의 검출, 치료, 경감, 완화에 유용한다 또한 본원에 따른 항체는 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인응집체와 관련된 다양한 질환 또는 증상의 진단 또는 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인응집체의 유무
 15 검출에 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (i) 알파-시누클레인 또는 알파-시누클레인 응집체에 특이적인 결합, (ii) 대상의 신경계에서 알파-시누클레인, 또는 알파-시누클레인 응집체의 수준 감소, (iii) 신경세포간 알파-시누클레인 또는 이의 응집체의 이동 (cell-to-cell
 20 transmission) 감소 또는 저해, 및 (vi) 신경세포에 의한 알파-시누클레인 또는 이의 응집체의 식세포 작용 (phagocytic uptake)의 증진으로 이루어지는 군에 선택된 1종 이상의 활성을 갖는 것일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 활성 (i) 내지 (iv)를 모두 가지는 것일 수 있다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 시누클레인병의 예방, 경감, 개선 또는 치료용 조성물에 관한
 25 것이다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인
 30 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을, 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 시누클레인병의 예방, 경감, 개선 또는 치료방법에 관한 것이다. 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 투여량은 대상의 신경계에서, 더욱 자세하게는 신경계의 신경세포의

영역에서 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체의 수준을 감소시키는 유효량일 수 있다.

본 발명의 일 예는, 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 대상의 신경계에서, 더욱 자세하게는 신경계의 신경세포의 영역에서 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체의 수준을 감소시키는 방법 또는 신경계의 신경세포의 영역에서 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체의 수준을 감소시키는 용도에 관한 것이다.

또 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 임의의 항체 또는 그 항원결합 단편을 포함하는 조성물 또는 키트를 제공하며, 상기 조성물은 약학 또는 진단 조성물로 제공될 수 있으며, 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있으며, 진단조성물은 진단 또는 검출에 필요한 시약을 추가로 포함할 수 있다.

본원에서 "혈관뇌장벽" 또는 BBB (blood-brain barrier)는 뇌 및 척추와 그 주변 순환계 사이에 존재하는 뇌의 모세혈관 내피세포 막내에 타이트 결합 (junction)에 의해 형성된 장벽이다. 이러한 장벽은 매우 견고해서 약 60Da 분자량의 저분자 물질이 뇌로 통과하는 것도 제한한다. 뇌의 혈관뇌장벽, 척추의 혈관척수장벽 그리고 망막의 혈관망막장벽은 중추신경계내의 연속적인 모세혈관 장벽으로, 통상 BBB로 칭한다.

본원에서 "혈관뇌장벽 전달체"는 이러한 혈관뇌장벽을 통과하여, 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 전달할 수 있는 분자 예를 들면, 펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 단백질, 핵산, 항체, 또는 저분자 화합물을 포함한다.

본원에 "치료제"는 목적하는 치료 효과를 위해 대상체에게 투여되는 분자를 일컫는다. 대상체는 비인간 포유류 예를 들면 영장류 또는 인간을 포함한다. 치료제의 예로는 펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 단백질, 핵산, 항체, 또는 저분자 화합물을 포함한다. 다른 측면에서 치료제는 일 구현예에서 본원에 따른 항체와 결합되어, 알파-시누클레인 응집체와 관련된 질환의 치료제로서 사용될 수 있다.

시누클레인병에서 알파-시누클레인의 축적이 신경퇴행의 전형적인 특성을 유도하는 정확한 메카니즘 및 시누클레인병의 고유의 증상이 충분히 이해되지 않고 있음에도 불구하고, 최근 연구는 알파-시누클레인응집체의 비정상적 형성 및 축적이 잠재적인 시누클레인병의 발생 및 퇴행성 진행에

관련됨을 암시하고 있다.

본 발명에 따르면, 용어 "시누클레인병"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).

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-시누클레인 (처음에 PARK1 및 PARK4로 판명됨)은 신피질, 해마, 치상회, 후 신경구, 선조체, 시상 및 소뇌에서 광범위하게 발현되는 140개 아미노산의 단백질이다. 알파-시누클레인 또한 B-, T-, 및 NK 세포를 비롯하여 단백질 및 혈소판을 포함하는 조혈세포에서 높게 발현된다. 이러한 세포 내에서의 정확한 역할은 알려지지 않았으나, 거핵구(혈소판 전구체)의 분화와 관련이 있었다.

본원에 따른 알파-시누클레인 응집체를 높은 친화도로 특이적으로 인식하며, 알파-시누클레인 항체가 이러한 질환의 진단, 또는 검출에 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다. 나아가 본원에 따른 알파-시누클레인응집체를 특이적으로 인식하는 알파-시누클레인 항체는 알파-시누클레인 응집체의 형성을 억제하거나 또는 응집체를 분해하고, 세포간 응집체의 전달을 억제하여, 시누클레인병, 특히 파킨슨 병의 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

본원에서 "알파-시누클레인 응집체와 관련된 질환"은 시누클레인병이라고 불리는 일군의 신경퇴행성 질환으로, 뉴런 및 교세포(glia) 집단을 포함하는 병소에서 알파-시누클레인 응집체가 발견되며, 도파민성 시스템의 퇴화, 운동능력변화, 인지장애 및 루이소체 및/또는 루이 뉴라이트의 형성과 같은 특징을 가진다(Kim et al. Alzheimer's Research & Therapy

2014, 6:73; McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). 이러한 질환에는 파킨슨 질환, 파킨슨질환성 치매, 루이소체 치매, 알츠하이머 루이소체 질환, 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병, 다계통위축증 및 기타 다수의 신경축삭 질환을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 일

5 구현예에서, 본원에 따른 항체는 파킨슨 병의 치료에 효과적으로 사용된다.

본원에서 "유효량"은 일반적으로, 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 질환으로 인한 증상의 심각성 및/또는 발생 빈도의 감소, 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 질환으로 인한 증상 및/또는 질환 발생의 근본 원인 제거, 또는 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 질환으로 인한

10 증상 및/또는 근본 원인 발생의 예방, 및/또는 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 질환으로 인한 손상을 개선 또는 교정하기에 충분한 양을 의미한다. 일부 구현예에서, 유효량은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량이다. "치료적 유효량"은 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 상태 또는 증상을 치료하거나, 또는 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 상태

15 또는 증상의 예방, 지체, 또는 그 진행을 역전시킬 만큼 충분한 양이다. "예방적 유효량"은 대상체에게 투여될 때, 의도된 대로, 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 질환의 발병 또는 재발, 또는 질환, 특히 알파-시누클레인과 연관된 질환 또는 관련된 증상을 예방 또는 지연시키고, 그 발생 가능성을 감소시키는 양이다. 완전한 치료적 또는 예방적 효과는

20 복용량의 1회 투여에 의해 발생하기 보다는 복용량의 수회 투여에 의해 발생할 수 있다. 따라서 치료적 또는 예방적 유효량은 1회 이상의 투여에 의해 전달될 수 있다.

본 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편

25 또는 이를 포함하는 조성물을 이용하여, 시누클레인병을 갖는 대상체의 상기 질환 치료용 용도를 제공하며, 상기 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물은 상기 대상체, 또는 대상체의 뇌에서, 알파-시누클레인응집체의 세포간 전달의 억제, 알파-시누클레인응집체 분해, 알파-시누클레인 응집체 형성을 억제, 또는 알파-시누클레인 응집체의

30 미세교세포에 의한 식세포작용의 증가를 포함한다.

본 명세서에서, "치료"는 질병 또는 질병 증상을 감소, 완화, 경감, 또는 제거하거나, 질병의 증상 또는 병적 상태를 보다 잘 견딜 수 있는 상태로 만들어 주는 것, 또는 질병의 증상 또는 병적 상태의 악화 속도를

늦추는 것 등을 포함하는, 질병 또는 질병의 증상 또는 병적 상태의 경감 또는 제거와 관련된 모든 작용을 의미할 수 있다. 용어 “대상” 또는 “환자”는 인간 또는 인간 환자를 포함한다.

항체의 치료적 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 방부제 및/또는 보조제를 포함하는 약학적 조성물도 또한 제공된다. 또한, 예를 들면, 이러한 약학적 조성물을 투여함으로써 알파-시누클레인과 연관된 환자를 치료하는 방법이 포함된다. 생체내 투여에 사용되는 약학적 조성물은 전형적으로 무균 제제로서 제공된다. 일단 약학적 조성물이 제형화되면, 이는 용액, 현탁액, 겔, 에멀전, 고체, 결정, 또는 탈수되거나 동결건조된 분말로서 무균 바이알 내에 저장될 수 있다. 이러한 제형은 즉시 사용가능한 형태, 또는 투여 직전에 재구성되는 형태(예를 들면, 동결건조됨)로 저장될 수 있다.

약학적 조성물의 투여 경로는 공지된 방법, 예를 들면, 경구; 정맥내, 복막내, 뇌내(실질내), 뇌실내, 근육내, 안구내, 동맥내, 문맥내, 또는 병소내 경로를 통한 주사; 지속 방출 시스템 또는 이식 장치가 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 블루스 주사에 의해, 또는 주입 또는 이식 장치에 의해 연속적으로 투여될 수 있다.

본원에 따른 약학 조성물 또는 키트는 시누클레인병 치료용으로 예를 들면 상기 시누클레인병 는 파킨슨 병, 파킨슨질환성 치매, 루이소체 치매, 알츠하이머 루이소체 질환, 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병, 또는 다계통위축증 를 포함한다.

또 다른 양태에서 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물을 시누클레인병의 치료 및/또는 알파-시누클레인 응집체의 농도 조절이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체의 시누클레인병치료 또는 상기 대상체에서 알파-시누클레인 응집체의 농도를 조절하는 방법을 제공한다.

일 구현예에서 본원에 따른 항체는 BBB 통과를 위해 전달체와 연결되어 사용될 수 있다. BBB를 통하여 약물을 전달하기 위한 다수의 방법이 개시되어 있다. 예를 들면 브래드키닌, 또는 HIFU(High density focues ultrasound)과 같은 방법을 사용하여 BBB의 삼투압을 와해시키는 방법이 있다. 또한 세포에 내재된 글루코스 및 아미노산 전달체, 인슐린

또는 트랜스페린의 수용체 매개 트랜스사이토시스와 같은 전달 시스템의 사용 또는 당단백질의 활성 유출 전달(efflux transporter)을 차단하는 것을 포함한다.

또 다른 구현예에서 본원에 따른 항체는 다른 치료제와 연결되어 병합사용되어, 알파-시누클레인 응집체와 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다. 항체의 치료적 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 방부제 및/또는 보조제를 포함하는 약학적 조성물도 또한 제공된다.

허용가능한 제형 물질은 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다. 특정 구현예에서, 치료적 유효량의 인간 알파-시누클레인 항체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 허용가능한 제형 물질은 바람직하게는 사용되는 용량 및 농도에서 환자에게 무독성이다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은, 예를 들면, 조성물의 pH, 오스몰농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 향기, 무균성, 안정성, 용해 또는 방출의 속도, 흡수 또는 침투의 변경, 유지 또는 보존을 위한 특정 제형 물질을 포함할 수 있다.

특정 구현예에서, 최적의 약학적 조성물은, 예를 들면, 목적하는 투여 경로, 전달방법 및 목적하는 용량에 따라서 당업자에 의해 결정될 것이다 (상기 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 참조). 특정 구현예에서, 이들 조성물은 본원에 개시된 항체의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 클리어런스(clearance)의 속도에 영향을 줄 수 있다. 특정 구현예에서, 약학적 조성물 중의 주요한 비히클 또는 담체는 수성 또는 비-수성일 수 있다. 예를 들면, 적절한 비히클 또는 담체는 가능하게는 비경구 투여용 조성물에서 통상적인 다른 물질로 보충된 주사용수, 생리 염수 용액일 수 있다. 추가로, 특정 구현예에서, 인간 알파-시누클레인 항체는 적절한 부형제, 예를 들면, 수크로스를 사용하여 동결건조물(lyophilizate)로서 제형화될 수 있다.

약학적 조성물은 비경구 전달될 수 있으며, 치료적 조성물은 목적하는 인간 α -Syn 결합 단백질을 약학적으로 허용가능한 비히클 내에 포함하며, 파이로젠을 포함하지 않는 비경구에 허용되는 수용액의 형태로 제공될 수 있다.

일단 약학적 조성물이 제형화되면, 이는 용액, 현탁액, 겔, 에멀전, 고체, 결정, 또는 탈수되거나 동결건조된 분말로서 무균 바이알 내에

저장될 수 있다. 이러한 제형은 즉시 사용가능한 형태, 또는 투여 직전에 재구성되는 형태(예를 들면, 동결건조됨)로 저장될 수 있다. 단일-용량 투여 단위체를 생성하기 위한 키트도 또한 제공된다. 투여 빈도는 사용된 제형의 인간 알파-시누클레인 항체의 약물동태학적 파라미터에 좌우될 것이다.

또한, 생체외에서 인간 알파-시누클레인 항체 약학적 조성물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 환자로부터 제거된 세포, 조직 또는 기관은 인간 알파-시누클레인 항체 약학적 조성물에 노출되고, 이후 세포, 조직 및/또는 기관은 후속적으로 환자 내로 이식된다. 특히, 인간 알파-시누클레인 항체는 폴리펩타이드를 발현하고 분비하기 위하여, 본원에 기재된 것들과 같은 방법을 사용하여 유전자 조작된 특정 세포를 이식함으로써 전달될 수 있다.

또 다른 양태에서 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하는 단계; 및 상기 항체 또는 항원결합 단편을 알파-시누클레인 응집체 검출이 필요한 생물학적 시료와 접촉하는 단계를 포함하는 생물학적 시료에서 알파-시누클레인 응집체 검출방법을 제공한다. 생물학적 시료는 알파-시누클레인 응집체의 검출이 필요한 다양한 시료를 포함하며, 예를 들면, 뇌척수액, 혈장을 포함하는 혈액 또는 소변을 포함하며, 또한 세포, 조직 또는 기관을 포함한다. 상기 방법은 인비트로 또는 인비보에서 수행될 수 있다. 인비보 이미징은 예를 들면 PET(positron emission tomography), SPECT(single photon emission tomography), NIR(near infrared) 광학 이미징 또는 MRI(magnetic resonance imaging)을 이용하여 수행될 수 있다.

또 다른 양태에서 본원은 시누클레인병의 진단이 필요한 대상체에서 시누클레인병을 진단하는 방법으로, 상기 방법은 상기 대상체에서 알파-시누클레인 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 본원에 따른 임의의 항체 또는 항원 결합 단편으로 측정/검출하는 단계; 및 상기 대상체에서 측정된 상기 알파-시누클레인 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 대조군 시료의 결과와 비교하는 단계를 포함하며, 상기 대조군의 결과와 유사 또는 차이는 상기 대상체가 시누클레인병에 걸린 것을 나타낸다. 상기 방법에서 대조군은 정상 또는 시누클레인병에 걸린 시료일 수 있다. 검출 또는 진단 용도를 위해 항체는 전형적으로 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다.

본원에 개시된 항체는 알파-시누클레인과 관련된 질환 및/또는 증상을 검출, 진단, 또는 모니터링하기 위한 진단 목적에 사용될 수 있다.

일 구현예에서 본원에 따른 방법은 시누클레인병의 진단이 필요한 대상체에서 시누클레인병을 진단하는 방법으로, 상기 방법은 상기 대상체에서 알파-시누클레인 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편으로 측정하는 단계; 및 상기 대상체에서

5 측정된 상기 알파-시누클레인 응집체의 농도 또는 세포내 위치를 대조군 시료의 결과와 비교하는 단계를 포함하며, 상기 대조군의 결과와 유사 또는 차이는 상기 대상체가 시누클레인병에 걸린 것을 나타내는 것이다.

상기 방법에서 대상체는 증상이 없거나 또는 증상이 나타나기 전의 환자를 포함하는 것이다. 일 구현예에서 대조군은 파킨슨병, 루이소체 치매

10 또는 다계통 위축증을 포함하는 시누클레인병 환자일 수 있으며, 이 경우, 상기 비교 단계에서 대조군과의 유사성은 상기 대상체를 시누클레인병 환자로 진단한다. 다른 구현예에서 대조군은 정상인 유래의 시료인 경우에, 상기 비교단계에서 대조군과의 차이, 예를 들면 응집체 농도의 증가는 상기 대상체를 시누클레인병으로 진단한다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체와

15 대조군의 연령이 매치될 수 있다. 상기 방법은 인비보 또는 대상체에서 분리된 생물학적 시료 예를 들면 혈액, 뇌척수액(CSF, Cerebrospinal fluid) 또는 소변 시료에서 수행될 수 있다.

진단 용도를 위해 항체는 전형적으로 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 적절한 표지 물질은 방사성동위원소 또는 방사성핵종(예를

20 들면, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), 형광 물질(예를 들면, FITC, 로다민, 란탄족 형광체), 효소(예를 들면, 호스래디쉬 퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제), 화학발광기, 바이오티닐 기, 또는 2차 리포터에 의해 인식되는 폴리펩타이드 에피토프(예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속

25 결합 도메인, 에피토프 태그)가 포함되나 이로 제한되는 것은 아니다.

다른 양태에서 본원의 항체는 알파-시누클레인 응집체를 포함하는 조직의 식별에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체는 표지물질로 표지되고, 표지된 항체의 알파-시누클레인 응집체에 대한 결합이 검출된다. 일 구현예에서, 알파-시누클레인 응집체에 대한 항체의 결합은 생체내에서

30 검출된다.

다른 양태에서 본원은 본원에 개시된 항체와 알파-시누클레인 응집체에의 결합에 대하여 경쟁하는 시험 물질을 검출 또는 선별하는 것을 개시한다. 예를 들면 시험물질의 존재 또는 부재에서 알파-시누클레인

응집체를 포함하는 용액 내에서 유리 항체의 양을 검출하는 단계를 포함한다.

유리 항체, 즉, 알파-시누클레인 응집체에 결합되지 않은 항체 농도의 증가는 시험 분자가 알파-시누클레인 응집체 결합에 대하여 항체와
5 경쟁할 수 있음을 지시할 것이다. 일 구현예에서, 항체는 표지 기로 표지된다. 대안적으로, 시험물질은 표지되고, 유리된 시험 물질의 양은 항체의 존재 및 부재로 모니터링 한다.

그 외 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 다양한 유용성을 가진다. 예를 들면 특이적 결합 분석, 친화도를 기초로 한 알파-시누클레인
10 정제, 또는 알파-시누클레인 길항제 규명을 위한 스크리닝 방법 등에 사용될 수 있다.

본원에 개시된 항체는 생물학적 시료에서 알파-시누클레인, 특히 루이소체와 같은 알파-시누클레인 응집체의 검출 및 알파-시누클레인 응집체를 포함하는 세포 또는 조직의 식별에 유용하다. 예를 들면, 알파-
15 시누클레인 항체는 진단, 예를 들면, 생물학적 시료 예를 들면 혈장을 포함하는 혈액, 뇌척수액(CSF, Cerebrospinal fluid) 또는 소변, 조직 또는 세포 내에서 발현된 알파-시누클레인 응집체를 검출하고/하거나 정량하는 분석, 및 이를 근거로 한 시누클레인병의 진단에 사용될 수 있다.

【발명의 효과】

본원에 개시된 항체는 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 높은 결합력으로 선호적으로 결합한다. 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 알파-시누클레인 응집체 형성을 감소시킬 수 있어 뇌의 응집체의 농도를 낮출 수 있다. 또한 알파-
20 시누클레인 응집체에 대한 높은 친화도를 갖는 본원에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 중추신경계 바깥에서의 알파-시누클레인 응집체 형성을 감소시킬 수 있어, 결국 뇌혈관장벽을 경계로 한 알파-시누클레인 형태들 간의 평형상태를 변경시켜, 중추신경계 내의 응집체의 농도를 낮추는 효과를 가져올 수 있다. 또한 높은 친화도로 인해 낮은 투여량으로 투여될 수 있는 장점이 있다. 이는 항체를 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나,
25 보다 간편한 피하주사와 같은 방식으로 투여해도 충분한 효능을 얻을 수 있기 때문에, 임상에서 큰 장점이 있다.

본원에 개시된 항체는 알파-시누클레인 응집체를 효과적으로 제거하거나 분해를 촉할 수 있고, 알파-시누클레인의 세포간 전달을 억제할

수 있어, 알파-시누클레인 의 응집체 축적과 관련된 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

5 도 1은 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 응집된 형태의 native 알파-시누클레인을 특이적으로 인식하는지 여부를 측정한 닛블롯 결과를 나타낸다.

 도 2는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체의 친화도를 ELISA로 측정한 결과이다.

10 도 3a는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 알파-시누클레인 응집체에 대한 선호적 결합 특이성 및 친화도를 BIAcore로 분석한 결과이다. 도 3b는 도 3a의 결과를 표로 나타낸 것이다.

 도 4a는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 알파-시누클레인 응집체에 선호적 결합 특이성을 Octet으로 분석한 결과이다. 도 15 4b는 도 4a의 결과를 표로 나타낸 것이다.

 도 5는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 알파-시누클레인의 세포 간 전파(cell to cell transmission)를 억제하는 지를 분석하는 원리(위) 및 실험 결과를 나타낸 것이다.

 도 6a는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 인간 알파- 20 시누클레인을 과발현하는 마우스 동물모델(TG)에서 알파-시누클레인 응집체를 제거할 수 있는 지를, 마우스에 항체 투여 후 p-129 α-Syn 항체를 이용하여 마우스 뇌 조직을 염색하여 측정한 결과이다. 도면에서 HP는 Hippocampus이고, p-129 α-syn은 129번째 잔기가 인산화된 형태의 응집체의 마커이며, 화살표는 인산화된 알파-시누클레인을 나타낸다

25 도 6b는 도 6a와 동일한 실험이나, 마커로서, 총 알파-시누클레인에 대한 항체를 사용하여 염색한 결과이다. 화살표는 인간 알파-시누클레인을 나타낸다. 9B11, 11F4, 11F11 항체는 총 알파-시누클레인의 축적을 효과적으로 억제하였다.

 도 7a는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보 (in 30 vivo)에서 microgliosis를 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 Iba-1(microgliosis) 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이며, 화살표는 활성화된 마이크로글리아를 의미하는 것이다.

도 7b는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보에서 astrogliosis를 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 GFAP (astrogliosis) 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이며, 화살표는 활성화된 에스트로사이트를 의미하는 것이다.

- 5 도 7c는 본 발명의 일예에서 단일클론 항체가 인비보에서 염증성 사이토카인을 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 IL-1베타 (IL-1 β) 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이며, 화살표는 IL-1 베타를 발현하고 있는 세포를 나타낸다.

- 10 도 7d는 본 발명의 일예에 따른 단일클론 항체가 인비보에서 염증성 사이토카인을 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 IL-6 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이며, 화살표는 염증성 사이토카인인 IL-6를 발현하는 세포를 나타낸다.

- 15 도 8a 및 도 8b는 각각 본 발명의 일예에 따른 단일클론 항체 3A9 및 11F11가 인간 뇌조직에서 루이소체 (Lewy body) 및 루이 신경돌기 (Lewy neurites)를 특이적으로 인식할 수 있는 지를 각각 측정한 결과이다. 본원에 따른 항체가 루이소체(화살표) 및 루이 신경돌기(왼쪽 아래 실 같은 모양)에 결합하는 것을 나타낸다.

- 20 도 9은 본 발명의 일예에 따른 항체의 에피토프 맵핑 결과를 도식적으로 나타낸 것으로, 본원에 따른 항체들은 대부분 C-말단 부위에 결합하는 것으로 나타났다.

도 10a 및 도 10b는 본 발명의 일예에 따른 키메라 항체 및 인간화 항체들의 미세교세포의 알파-시누클레인 응집체에 대한 식세포 작용 촉진능 분석 결과를 나타낸 것이며, 도 10a는 인간화 11F11 항체에 관한 것이고, 도 10b는 인간화 3A9에 관한 것이다.

- 25 도 11은 본 발명의 일예에 따른 키메라 항체 및 인간화 항체들이 알파-시누클레인 응집체의 신경세포 표면에서의 결합을 저해하는 능력에 관한 분석 결과이다.

- 30 도 12는 본 발명의 일예에 따른 키메라 항체 및 인간화 항체들이 알파-시누클레인을 과발현하는 신경세포에서 분비되어 정상 신경세포로 알파-시누클레인 응집체가 이동하는 세포 간 전파를 억제하는 효능 분석 결과이다.

도 13은 본 발명의 일예에서 제조된 키메라 항체와 인간화 11F11 항체의 친화도를 ELISA로 측정한 결과이다.

도 14는 본 발명의 일예에서 제조된 키메릭 항체와 인간화 11F11 항체가 알파-시누클레인 응집체에 대한 선호적 결합 특이성 및 친화도를 BIAcore로 분석한 결과이다.

5 도 15a, 15b, 15c는 본 발명의 일예에서 제조된 키메릭 항체가 베타-시누클레인, 감마-시누클레인, 혹은 아밀로이드 베타 (amyloid beta₁₋₄₂), 타우 (tau) 유래 응집체가 아닌 알파-시누클레인, 특히 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합하는 특이성을 ELISA 및 닛블롯으로 분석한 결과이다.

10 【발명의 실시를 위한 형태】

이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다.

15 실시예 1: 마우스 알파-시누클레인 항체의 제조

면역화

20 항원으로는 전장 (140 잔기) 또는 C-말단 21개 잔기가 절단된 알파-시누클레인 단량체를 37도 thermomixer C에 넣고 14일 동안 1050 rpm으로 흔들어 응집화 시켰으며 소니케이션 하여 사용하였다. 상기 제조된 1 mg/ml 농도의 140개 및 119개 잔기의 알파-시누클레인 피브릴 각각을 아주번트와 1:1(vol : vol)로 혼합하여 잘 섞어 주었다.

Homo sapiens alpha-synuclein	Amino acid sequence	
SEQ ID NO:126		MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKT KEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGK NEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA

이어, 상기 준비한 혼합물 200 μL를 5-7주령 BALB/c 암컷 마우스의

피하에 주사하였고, 2주 후에 동일한 방법으로 제조한 혼합물 200 μ L를 추가로 피하주사 하여 부스팅시켰다. 부스팅 1주일 후에 혈액을 채취하여 투여항원을 붙인 ELISA 방법을 사용하여 면역화 적정(immunization titeration)을 수행하였다. 이어 3차 부스팅은 항원만을 피하주사 하였다.

5

하이브리도마 생산

이어 상기와 같이 면역이 완료된 마우스의 비장을 제거하여, 이로부터 세포를 확보하였다. 이어 비장 세포를 10% FBS가 첨가된 Hybridoma-SFM 배지(Thermo Fisher Scientific, USA)에 현탁시켰다.

10 하이브리도마를 제조하기 위해 무린 골수종 세포인 SP2/0-Ag14와 비장 세포를 혈청이 포함되지 않은 Hybridoma-SFM 배지에서 혼합한 후 원심분리를 하여 배지를 제거하였다. 이어 세포 펠렛에 PEG를 첨가한 후 37°C에서 1분간 배양하여 세포 융합을 유도하였다.

15

단세포 클로닝

융합 2주 후에, 세포 배양 배지를 이용하여 마우스에 투여한 항원을 붙인 ELISA 방법을 사용하여 항체를 생산하는 마우스 B 세포와의 융합을 확인하였다. 이어 하이브리도마를 이용하여 단세포 클로닝을 수행하여 단클론항체를 생산하는 하이브리도마를 총 16개 선별하였다. 전장(140

20 잔기) 알파-시누클레인 응집체를 항원으로 이용하여 9B11 (각각 IgG1 kappa) 클론을 수득하였고, C-말단 21개 잔기가 절단된 알파-시누클레인 응집체를 항원으로 이용하여 3A9 및 11F11 (각각 IgG2b kappa, IgG2b kappa)의 클론을 수득하였다.

25

항체의 정제

10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에서 각 하이브리도마를 배양하다 항체 생산을 위해 serum이 없는 SFM 배지로 배양 배지를 교체한 후 4일 정도 배양한다. 세포 배양 상층액을 분리하여 원심분리한 후 0.22 μ m 필터로 거른 후 IgG1 타입은 protein G column으로 나머지 항체들은

30 protein A column으로 정제하였다.

가변영역 서열 결정

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 트라이zol을 넣어 RNA를 분리하였으며 이를 템플릿으로 하여 cDNA를 합성한 후 염기서열 분석을 통해 가변영역 및 CDR 서열을 확인하였다. 따라서, 항체 3A9, 9B11, 11F11을 얻었다.

실시예 2. 알파-시누클레인 항체를 이용한 항원 결합 특이성 및 결합력 분석

실시예 2-1: 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 닷블롯 분석

본원에 따른 항체가 네이티브 상태에서의 단량체 또는 응집체에 결합하는 지를 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). 멤브레인을 TBST 조성의 5% non-fat dry milk로 1시간 동안 상온에서 블로킹한 뒤, 실시예 1에서 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 기재되어 있다.

도 1에 나타난 바와 같이 본원에 따른 알파-시누클레인 항체는 알파-시누클레인 모노머와 비교하여, 응집체에만 선호적으로 결합하는 것으로 나타났다. 특히 9B11, 3A9 및 11F11은 응집체에만 결합하는 것으로 나타났다. 274 항체 (Bae et al., J Neurosci. 2012 Sep 26; 32(39): 13454-13469)는 단량체 및 응집체에 모두 결합하는 비교 항체이다.

실시예 2-2: 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 ELISA 분석

본원에 따른 항체의 항원에 대한 결합력을 정량적으로 분석하기 위해

ELISA를 수행하였다. 이를 위해 본원에 따른 알파-시누클레인 항체를 1 mg/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.

도 2에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 응집체에 높은 결합력으로 선호적으로 결합하는 것으로 나타났다. ELISA 결과를 통해 항체를 분석해 보면 응집체 선호적으로 결합하는 항체들은 0.1×10^{-9} M ~ 2×10^{-9} M 정도의 친화력을 보였으며 단량체 및 응집체에 모두 결합하는 항체는 이보다 높은 $\sim 1 \times 10^{-10}$ M값을 보였다. 본 발명에 따른 항체는 알파-시누클레인 응집체에 높은 친화도로 선호적으로 결합하며, 단일체에 대해서는 응집체보다 낮거나 또는 결합하지 않기 때문에, 친화도를 도출할 수 없었다. 이러한 결과는 파킨슨병과 같은 알파 시누클레인 병인을 갖는 신경퇴행성 질환의 원인물질을 효과적으로 제거할 수 있거나 활동을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.

실시예 2-3. 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 BIAcore 분석

실시예 1에서 제조된 알파-시누클레인 항체의 단량체 및 응집체 항원 결합에 대한 정량적 분석을 BIAcore를 사용하여 수행하였다.

기기는 T200 (GEHealthcare, S/N: 1565888)을 사용하였다. Chip은 Protein A를 사용하였으며 (GE Healthcare, Cat. 29-1275-56), Regeneration buffer는 10 mM Glycine-HCl pH1.5 (GE Healthcare, Cat. BR-1003-54), Running buffer와 analyte 희석, 샘플 희석 완충액으로는 HBS-EP를 사용하였다. 실시예 1에서 제조된 α -syn 항체 (3A9, 9B11, 11F11)는 1X HBS-EP (GE Healthcare, Cat. BR-1006-69)로 희석하였으며, α -syn 단량체 (1 mg/ml) 또는 피브릴 단백질 (3 mg/ml) (analyte)은 2배씩 순차적으로 희석하여, 0 nM 포함 총 6개 농도 (0, 0.39, 1.56, 6.25, 25, 100nM)에서 분석하였다. 캡처의 경우 단량체는 표적 RU를 800 (theoretical)으로, 피브릴은 표적 RU를 100 (theoretical)으로 하고, 캡처 phase를 contact time을 60초, flow rate을 30 μ l/min으로, stabilization period를 180초로 진행하였다. association phase에서는 association time을 120초로, flow rate를 30 μ l/min으로 하였으며, dissociation phase에서는

dissociation time을 360초로, flow rate를 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 하였다. Regeneration phase에서는, flow rate을 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 하여 regeneration time을 240초(1차), 60초(2차), 두 번에 걸쳐 진행하였다. 1:1 binding model을 사용하여 fitting 하였으며, evaluation software는 BIAcore T200
 5 Evaluation software를 사용하였다 (GE healthcare). 결과는 도 3a 및 도 3b에 기재되어 있다.

도 3a는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 알파-시누클레인 응집체에 대한 선호적 결합 특이성 및 친화도를 BIAcore로 분석한 결과이다. 본원에 따른 항체가 높은 친화도로 응집체에 결합하는
 10 것을 나타낸다. 이러한 결과는 파킨슨병과 같은 알파-시누클레인 병인을 갖는 신경퇴행성 질환의 원인물질을 효과적으로 제거할 수 있거나 활동을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다. 도 3b는 도 3a의 결과를 표로 나타낸 것이다.

15 도 3a 및 도 3b의 결과에 나타난 바와 같이, 분석한 4개의 알파-시누클레인 항체 중 상술한 다른 방법에서 응집체에 선호적으로 결합하는 항체들인, 3A9, 9B11, 및 11F11이 BIAcore에서도 응집체에만 결합하는 것으로 나타났으며, 약 $1\sim 3 \times 10^{-9}$ M의 높은 친화도를 갖는 것으로 나타났다.

20 실시예 2-4. 항-알파-시누클레인 항체를 이용한 Octet 분석

실시예 1에서 제조된 알파-시누클레인 항체(3A9, 9B11, 11F11)의 단량체 및 응집체 항원 결합에 대한 정량적 분석을 Octet를 사용하여 수행하였다.

구체적으로 running buffer는 1X KB buffer (cat. 18-1092) 혹은 1X
 25 PBS buffer를 1000 rpm에서 사용하였으며, immobilization buffer는 sodium acetate, pH 5 (10mM, Cat. 18-1068)을 사용하였다. α -syn 모노머는 α -syn 항원을 immobilization 시켰으며, 피브릴의 경우 테스트 항체를 immobilization 시켰다. target concentration은 모노머의 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 피브릴의 경우 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하였으며, kinetics concentration은 모노머의
 30 경우 50 nM부터, 피브릴의 경우 100 nM부터 2배씩 차례로 희석하여 총 7개의 포인트를 설정하였다. Association/Dissociation 시간은 모노머의 경우 5분/20분, 피브릴은 5분/25분이었으며, Biosensor는 ARG2를, fitting은 1:1 fitting을 사용하였다. 결과는 도 4에 기재되어 있다. 도

4는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 α -Syn 응집체에 선호적 결합 특이성을 Octet으로 분석한 결과이다.

도 4a에 나타난 바와 같이, 3A9, 9B11 및 11F11의 경우 단량체에는 거의 결합하지 않으며(붉은 점선 박스), 응집체에는 잘 결합하는 것으로 나타났다(붉은 점선 박스 내의 그래프가 올라감). 이러한 결과는 Dot blot, Octet, ELISA에서의 결과들과 유사 혹은 일치하는 결과로, 테스트한 4개의 α -syn 항체 중 상기 다른 방법들에서 응집체에 선호적으로 결합하는 항체들인, 3A9, 9B11 및 11F11이 Octet에서도 응집체에만 결합하는 것으로 나타났다. 도 4b는 도 4a의 결과를 표로 나타낸 것이다. 도 4a 및 도 4b의 결과는 알파-시누클레인 응집체에 선호적으로 결합하는 것을 나타내며, 도 1의 결과와 일치하는 것이다. 비교군으로 사용된 #274 항체의 경우 단량체 및 응집체에 모두 잘 결합하는 것으로 나타났다.

실시예 3. 항-알파-시누클레인 항체의 세포간 알파-시누클레인 응집체의 전달 억제 효과 분석

알파-시누클레인 응집체의 세포간 전달이 알파-시누클레인 응집체 관련 질환의 한 가지 병인으로 제시되고 있기 때문에, 이를 억제할 수 있는 항체는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 이를 위해 BiFC (bimolecular fluorescence complementation) 분석을 다음과 같이 수행하였다. BiFC 원리는 도 5의 상부에 도식적으로 나타났다.

도 5는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 알파-시누클레인의 세포 간 전파(cell to cell transmission)를 억제하는 지를 분석하는 원리(위) 및 실험 결과를 나타낸 것이다. 여기서 파란색은 핵이며, 초록색은 세포밖으로 나온 알파-시누클레인 이 다른 세포안으로 전파되어 다른 알파-시누클레인을 만나 응집체를 만들었을 때의 신호이다.

BiFC 분석을 위한 세포 배양

알파-시누클레인과 절반의 Venus 형광 단백질 (Venus 1- α Syn(V1S), α Syn-Venus2(SV2))을 각각 발현하는 SH-SY5Y 인간 뉴로블라스토마 세포주는 실험 전까지 종전에 기술된 바와 같이 배양되었다 (Lee H-J et al. J. Neurosci. 2004;24:1888-1896). 실험에 앞서 V1S, SV2를 발현하는 세포 180,000개를 커버슬립 위에 혼합하여 깔아준 뒤 3일간 배양하였다. 계속적인 알파-시누클레인의 세포 간 이동을 확인하기 위하여 co-culture는

매 48시간마다 sub-culture 되었다. 별도의 실험에서 6 계대(passage) 정도에서 전달의 정도가 최대임을 확인하였으므로(데이터 나타내지 않음), 본 실시예에서 항체의 세포간 전달 억제효능은 6 계대의 co-culture를 이용하여 분석하였다.

5

BiFC 실험/항체 처리

이미징 전 날 co-culture에 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 IgG 또는 테스트 항체 (3A9, 9B11, 11F11)를 추가하였다. 각 co-culture에서 나타나는 Venus channel에서의 신호는 알파-시누클레인의 응집으로 인한 응집체를 나타내며, 이는 알파-시누클레인이 한 세포에서 다른 세포로 이동하여 생성된 응집체로 간주하였다. 이러한 신호는 IN Cell Analyzer (GE Lifescience)로 자동 분석하였다 (기기 설정: puncta size: 0.1~0.4 μm , intensity: 4000~7000). 결과는 도 5에 개시되어 있다.

구체적으로, 파란색은 핵, 초록색은 하나의 세포에서 밖으로 나온 알파-시누클레인이 다른 세포내의 알파-시누클레인을 만나 응집체를 형성하였음을 나타낸다. 오른쪽 그래프는 시그널의 세기를 나타낸 것이다. 9B11, 11F11, 및 3A9 각 처리군에서는 음성대조군인 IgG 대비 초록색 시그널을 나타내는 세포의 개수가 줄어듦을 알 수 있으며, 이는 본원에 따른 항체가 응집체의 세포간 전달을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내는 것이다. 본원에 따른 항체 9B11, 3A9 및 11F11 처리군에서는 음성대조군인 IgG 대비 초록색 시그널을 나타내는 세포의 개수가 현저히 줄어들었으며, 이는 응집체에 높은 친화도로 특이적으로 결합하는 본원에 따른 항체가 알파-시누클레인의 세포간 전파를 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.

25

실시예 4. 항-알파-시누클레인 항체의 인비보에서 알파-시누클레인 응집체 제거 효과 분석

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

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

병리학적 분석은 다음과 같이 이루어졌다. 파라포름알데하이드에
고정된 뇌 반쪽은 Vibratome을 이용하여 free-floating 방식으로 40 μ m
두께의 연속절편으로 잘라내었다. 각 투여군의 뇌 내 알파-시누클레인 의
발현 정도를 확인하기 위해, cortex, striatum, hippocampus를 포함한
10 절편을 알파-시누클레인 항체 (응집체의 마커인 p129 α -syn 항체, abcam,
ab59264 또는 총 알파-시누클레인 항체, Cell Signaling Technology,
#2642)와 4℃에서 밤새 배양하였다. 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 정도,
소교세포(microglia)의 활성 정도 확인을 위해, 상기 절편을 GFAP(glial
fibrillary acidic protein)(AB5804, millipore) 혹은 Iba1에 대한
15 항체(019-19741, Wako)를 각각 처리하였다. 또한
뇌염증(neuroinflammation) 정도를 확인하기 위해, IL-6 (NB600-1131,
Novus Biologicals) 또는 IL-1 β 에 대한 항체(ab9722, abcam)를 각각
처리하였다. 1차 항체와의 배양 후에 바이오틴이 결합된 goat anti-rabbit
IgG (1:100, Vector Laboratories) 및 Avidin D-horseradish peroxidase
20 (1:200, ABC Elite, Vector Laboratories)를 처리하고
DAB(diaminobenzidine)로 검출하였다. 면역염색된 각 절편은 명시야
현미경으로 관찰하여 광학밀도를 측정하였다. 결과는 도 6a 및 도 6b에
개시되어 있다. 도 8a는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 인간
 α -Syn을 과발현하는 마우스 동물모델(TG)에서 알파-시누클레인 응집체를
25 제거할 수 있는 지를, 마우스에 항체 투여 후 p-129 α -Syn 항체를
이용하여 마우스 뇌 조직을 염색하여 측정한 결과이다. 도면에서 HP는
Hippocampus이고, p-129 α -syn은 129번째 잔기가 인산화된 형태의
응집체의 마커이며, 화살표는 인산화된 알파-시누클레인을 나타낸다.

도 6a는 알파-시누클레인 응집체의 마커인 p-129 α -Syn 항체(Ser
30 129번에 인산화가 일어난 알파-시누클레인을 인식하는 항체)로 분석한
결과로 본원에 따른 항체가 투여된 TG(TransGenic) 마우스는 IgG만 투여된
대조군 마우스와 비교하여 cortex 및 hippocampus의 CA1 및 CA3에서
응집체에 양이 현저하게 줄어든 것으로 나타났다(해당 부위는 IgG 시료에서

화살표 머리로 표시됨). 이는 본원에 따른 항체가 알파-시누클레인을 현저하게 제거할 수 있음을 나타내는 결과이다. WT 및 IgG는 음성대조군이며, 항체 274는 단량체와 응집체 모두에 결합하는 비교군이다. 이러한 결과는 본원에 따른 항체는 응집체 알파-시누클레인의 축적을

5 효과적으로 억제할 수 있어, 알파-시누클레인 병인과 관련된 질환의 예방 및/또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

도 6b는 도 6a와 동일한 실험이나, 마커로서, 총 알파-시누클레인 항체로 염색한 결과이며, 화살표는 인간 알파-시누클레인을 나타낸다. TG mouse에서 증가한 인간 알파-시누클레인은 항체 투여에 의해 효과적으로

10 제거되었으며 이러한 결과는 본원에 따른 항체가 알파-시누클레인 응집체를 효과적으로 감소시켜, 파킨슨 질환과 같은 시누클레인병의 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타내는 것이다. 9B11, 11F4, 11F11 항체는 총 알파-시누클레인의 축적을 효과적으로 억제하였다. 총 알파-시누클레인 검출은 본원에 따른 항체가 알파-시누클레인 자체의 제거능(clearing) 및

15 항체의 세포 간 전달(cell to cell transmission) 억제능이 있음을 나타내는 것이다. 또한 다른 측면에서 단량체의 응집체로의 형성의 억제, 또는 단량체를 모두 제거할 수 있는 것으로 해석될 수 있다.

실시예 5. 항-알파-시누클레인 항체의 Microgliosis 및 Astrogliosis

20 감소 및 염증성 사이토카인 방출 감소 효과 분석

글리오시스(gliosis)는 BBB의 손상, TGF-베타 또는 인터류킨과 같은 물질에 의해 촉발되는, 중추신경계에 손상이 있는 경우 이에 대한 반응으로 교세포(glial cell)에서 일어나는 비특이적 반응이다. 대표적인 것으로, Microgliosis 및 Astrogliosis를 포함하며, 각각 Iba-1 및 GFAP 단백질이

25 마커로 사용된다. 이에 실시예 4에 기술된 바와 같이 본원에 따른 항체를 마우스에 투여하여 Microgliosis 및 Astrogliosis 감소 및 이를 촉발하는 염증성 사이토카인 방출 감소에 미치는 영향을 분석하였다. 분석 결과는 도 7a, 도 7b, 도 7c 및 도 7d에 개시되어 있다.

도 7a는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보(in vivo)에서 microgliosis를 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후

30 마커로서 Iba-1(microgliosis) 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 활성화된 마이크로글리아를 의미하는 것으로 3A9, 9B11, 11F11 항체를 투여한 쥐의 뇌에서 마이크로글리아

활성화가 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있다.

도 7b는 본 발명의 일예에서 제조된 단일클론 항체가 인비보에서 astrogliosis를 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 GFAP (astrogliosis) 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 활성화된 에스트로사이트를 의미하는 것으로 3A9, 9B11, 11F11 항체들이 효과적으로 유의한 수준으로 astrogliosis를 억제함을 확인할 수 있었다.

도 7c는 본 발명의 일예에서 단일클론 항체가 인비보에서 염증성 사이토카인을 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 IL-1 베타 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 IL-1 베타를 발현하고 있는 세포를 나타낸다. IL-1 베타는 염증을 유발하여 다양한 신경세포의 사멸 및 염증 반응을 유도하게 되는데, 본원에 따른 항체를 투여한 쥐의 뇌조직에서 IL-1 베타가 현저하게 감소한 것을 나타낸다.

도 7d는 본 발명의 일예에 따른 단일클론 항체가 인비보에서 염증성 사이토카인을 감소시킬 수 있는지를, 마우스에 항체 투여 후 마커로서 IL-6 항체를 이용하여 마우스의 뇌 조직을 염색으로 측정한 결과이다. 화살표는 염증성 사이토카인인 IL-6를 발현하는 세포를 나타낸다. 본원에 따른 항체를 투여한 쥐의 뇌조직에서 IL-6가 감소한 것을 나타낸다.

상기 도면에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 대조군과 비교하여, Microgliosis 및 Astrogliosis를 감소시키며, 이를 촉발하는 염증성 사이토카인 IL-1beta 및 IL-6의 방출을 감소시키는 것으로 나타났다.

실시예 6. 항-알파-시누클레인 항체의 인간 뇌 조직에서 루이소체 검출 분석

10 마이크로미터 두께의 파라핀 포매된 파킨슨 질환으로 사망한 환자의 뇌조직절편을 실시예 5에 사용된 본원에 따른 항체를 이용하여 조직 절편내 루이소체와 루이 신경돌기(neurite)를 다음과 같이 염색하였다. 90% 포르산으로 조직 절편을 3분간 처리하여 antigen retrieval을 진행한 다음, 1% H2O2 (50% ethanol base)를 이용하여 조직 자체의 peroxidase 활성을 억제하였다. 조직의 non-specific binding을 막기 위하여 10% normal horse serum을 처리하였다. 이어 인산완충액으로 세척한 후 본원에 따른 3A9, 11F11 및 11F11 항체를 adjacent section에 4℃에서 밤새 처리하였다.

인산완충액으로 세척 후, 바이오틴이 결합된 anti-인간 IgG 항체를 37°C에서 30분간 처리한 뒤, avidin-biotin complex를 상온에서 30분간 반응시켰다 (Vectastatin Elite kit; Vector Laboratories). 이어 0.005% H2O2를 포함한 DAB로 발색하였고, 해당 section을 0.5% cresyl violet으로 카운터 염색하여 각 세포를 구분하였다. 결과는 도 8a 및 도 8b에 개시되어 있다.

도 8a 및 도 8b는 각각 본 발명의 일예에 따른 단일클론 항체 3A9 및 11F11가 인간 뇌조직에서 루이소체(Lewy body) 및 루이 신경돌기(Lewy neurites)를 특이적으로 인식할 수 있는 지를 각각 측정한 결과이다. 본원에 따른 항체가 루이소체(화살표) 및 루이 신경돌기(왼쪽 아래 실 같은 모양)에 결합하는 것을 나타낸다.

도 8a 및 8b에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 루이소체 및 루이 신경돌기에 효과적으로 결합(화살표로 표시)하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 인간 뇌조직에 있는 루이소체의 구성 성분인 알파-시누클레인 응집체에 효과적으로 결합할 수 있음을 의미하는 것이다. 인간 뇌로 전달된 항체가 효과적으로 알파-시누클레인 응집체에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여주는 것이다. 이러한 결과는 본원의 항체가 실제 인간 뇌조직에 존재하는 알파-시누클레인 응집체와 특이적으로 결합할 수 있음을 나타내는 것으로, 알파-시누클레인 병인과 관련된 질환의 예방 및/또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

실시예 7. 항-알파-시누클레인 항체의 에피토프 분석

본원에 따른 3A9 및 11F11 항체에 대한 에피토프 맵핑은 PEPSCAN (The Netherlands)에 펩타이드 어레이 분석을 의뢰하여 수행되었다. 결과는 도 9에 개시되어 있다. 도 9은 본 발명의 일예에 따른 항체의 에피토프 맵핑 결과를 도식적으로 나타낸 것이다.

도 9에 나타난 바와 같이 본원에 따른 항체는 C-말단을 인식하는 것으로 나타났다. 본원에 따른 항체들은 대부분 C-말단 부위에 결합하는 것으로 나타났다. N-말단을 인식하는 알파-시누클레인 항체들은 알파-시누클레인 관련 질환을 통칭하는 시누클레인병에 속하는 다계통위축증과 같은 다른 질병의 응집체는 인식하지 못하는 반면, C-말단 부위를 인식하는 알파-시누클레인 항체들은 파킨슨 병뿐 아니라 기타 다양한 시누클레인병의 응집체도 인식한다는 장점을 가진다. 특히 앞서 설명한 바와 같이 110~122

사이클을 인식하는 경우 응집체 선호적인 결합을 나타냈다.

실시예 8. 항 알파-시누클레인 (키메릭) 항체의 제조 클로닝

- 5 인간화를 진행 후 확보한 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역의 항체 nucleotide 서열을 이용하여, 짧은 단편의 nucleotide인 gblock(m.biotech)을 합성하였고, 이를 이용하여 동물세포 배양용 벡터 (pcDNA3.4)에 클로닝하였다. 가변영역 앞뒤에 증첩된 nucleotide를 약 20 bp 정도 포함하여 gblock을 합성하였고, pcDNA3.4 vector의 가변영역을
10 제외한 부분을 PCR로 증폭 후 준비하여, Gibson assembly 방법으로 클로닝하였다.

Transfection 및 발현

- 상기 제조된 벡터를 maxi-prep(Qiagen) 하여, 다량의 plasmid DNA를
15 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
20 신선한 배지를 이용하여 6×10^6 viable cells/mL로 희석하여 준비하였다.

- 준비된 모세포에 형질주입을 위해 ExpiFectamine™ CHO transfection kit(Gibco, Cat: A29129)를 사용하여, ExpiFectamine™ CHO & plasmid DNA 복합체를 준비하였다. 차가운 OptiPRO™SFM®(Gibco, Cat: 12309019) 배지를 각각 분주하여, 적정농도로 준비한 DNA 및 ExpiFectamine™CHO
25 시약을 각각 접종 후, mix 하여 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.

- 30 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.

항체의 정제

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 Sodium Citrate pH 5.0으로 중간세척 후, 50 mM Sodium Citrate 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℃에 보관하였다. 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, mouse 유래 단일클론항체의 가변영역과 일치함을 확인하였다.

상기 방법으로 확인된 3A9, 9B11, 11F11 항체들의 가변영역을 인간 IgG1 아이소타입의 backbone 가변영역 부분에 치환하여 키메라 형태의 인간 IgG1 항체를 제작하였다. 상기 얻어진 키메라 항체 중에서, 특히 Ch11F11 항체는 IgG 형태의 항체로서 서열번호 90의 중쇄 가변영역 서열(ch11F11-VH)과 서열번호 109의 경쇄 가변영역 서열 (ch11F11-VL)의 조합을 포함하며, Ch 3A9 항체는 IgG 형태의 항체로서, 서열번호 102의 중쇄 가변영역 서열(ch11F11-VH)과 서열번호 116의 경쇄 가변영역 서열 (ch11F11-VL)의 조합을 포함한다.

실시예 9: 인간화 항체의 제조

라이브러리 파아지(Library phage) 준비

키메라 항체의 CDR1, CDR2, CDR3 residue에 human framework을 결합시키면서 각 CDR residue에 mouse 혹은 인간 유래 sequence가 도입된 mini 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℃에서 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℃, 16시간 동안 배양하여 파아지 패킹을 유도하였다. 이어 배양액을 4500 rpm, 4℃ 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
 5 다시 4℃ 조건에서 8000 rpm, 20분간 원심분리한 후, 펠렛을 PBS로 현탁한 후, 다시 4℃ 조건에서 12000 rpm, 10분간 원심분리 하여 라이브러리 파아지를 포함하는 상등액을 수득하여 새 튜브에 넣어 사용시까지 4℃에서 보관하였다.

10 파아지 디스플레이 패닝(panning)

구체적으로 면역시험관(immunotube, maxisorp 444202)에 10μg/ml 농도의 재조합 알파-시누클레인 응집체를 PBS에 첨가하여 4℃에서 밤새 시험관 표면에 단백질을 흡착시킨 후 우혈청 알부민(BSA, Bovine serum albumin) 3% 용액을 시험관에 첨가하여 알파-시누클레인 응집체가 흡착되지
 15 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
 20 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℃에서 1시간 감염시키고 감염된 대장균을 카베니실린을 함유하는 2X YT 한천배지에 도말하여 37℃에서 밤새
 25 배양하였다. 다음날 배양된 대장균을 4ml의 2X YT 카베니실린 배양액에 현탁하고 15% 글리세롤을 첨가하여 일부는 -80℃에 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
 30 농축하였다.

단일클론 파아지 항체 선별(single clone screening)

상기 패닝을 통해 수득한 파아지 풀(phage pool)로부터 알파-

시누클레인 응집체에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 선별하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

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

이어 다음과 같이 ELISA 방법을 사용하여 알파-시누클레인 응집체와 결합하는 단일클론 가용성 scFv를 발현하는 클론을 선택하였다 (Steinberger, Rader and Barbas III, 2000, Phage display vectors. In: 15 Phage Display Laboratory Manual, 1st ed. ColdSpring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp.11.9-11.12). 구체적으로 96 웰 플레이트에 실시예 1-1에서 선별된 7B7 항체를 넣고, 4°C에서 밤새 코팅하였다. 3% BSA를 각 웰당 200 μ L씩 넣어 37°C에서 2시간 블로킹하였다. 이어 알파-시누클레인 응집체와 단량체를 100ng/well의 농도로 각각 로딩 한 후 37°C에서 2시간 20 반응시켰다. 이어 PBS-T 300 μ L로 5회 세척하였다. 상기 준비된 단일 클론 상등액은 3% BSA와 1:1(vol:vol)로 섞은 후 이를 상기 응집체 및 단량체와 결합시킨 플레이트에 100 μ L씩 로딩한 뒤 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이어 PBS-T 300 μ L로 5회 세척한 후, 항-HA HRP 결합 항체를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 5회 세척하였다. TMB(Tetramethylbenzidine, 25 Sigma, T0440) 100 μ L를 넣어 발색한 후, 1N H₂SO₄ 50 μ L를 넣어 반응을 정지한 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 0.5 이상인 클론들을 결합에 의한 양성반응으로 간주하였으며 BSA 비특이적으로 결합하는 클론들은 배제시켰다.

라이브러리에서 발견된 클론의 CDR residue들은 in silico 방식으로 30 분석을 병행하여 framework과의 결합에 심각한 문제가 생기거나 CDR을 제외한 framework 부분에 T-cell epitope, B cell epitope 및 MHCII epitope이 존재하지 않는 클론을 선별하였다.

이후 다음과 같은 중쇄, 경쇄의 가변영역의 조합으로 만들어진 5개

항체에 대해서, 의 인간화 항체의 가변영역을 인간 IgG1 아이소타입의 backbone 가변영역 부분에 치환하여 5개의 IgG1 backbone의 인간화 항체를 제작하였다. 구체적으로, Hu11F11_(ABL2-4)는 IgG 형태의 항체로서, 서열번호 92의 중쇄 가변영역 서열(Hu11F11-VH2)과 서열번호 113의 경쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VL4)의 조합을 포함하며, Hu11F11_(ver.1)는 IgG 형태의 항체로서, 서열번호 98의 중쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VH-v1)와 서열번호 115의 경쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VLv3 4c)의 조합을 포함하며, Hu11F11_(ver.2)은 IgG 형태의 항체로서 서열번호 99의 중쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VH-v2) 와 서열번호 115의 경쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VLv3 4c)의 조합을 포함하며, Hu11F11_(ver.3)는 IgG 형태의 항체로서 서열번호 100의 중쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VH-v3)와 서열번호 115의 경쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VLv3 4c)의 조합을 포함한다.

Hu11F11(ver.4)은 서열번호 101의 중쇄 가변영역 서열(Hu11F11-VH-v4)와 서열번호 115의 경쇄 가변영역 서열 (Hu11F11-VLv3 4c)의 조합임.

15

실시에 10. 인간화 항체의 식세포 촉진능 분석시험

실시에 8에서 얻어진 키메라 항체 및 실시에 9에서 얻어진 인간화 항체들인 hu11F11(ver.1), hu11F11(ver.2), hu11F11(ver.3), hu11F11(ver.4) 및 ABL2-4가 미세교세포에 의한 세포 밖 알파-시누클레인 응집체의 식세포 작용을 촉진하는 효능을 평가하기 위하여 식세포 촉진능 분석시험을 다음과 같이 수행하였다.

구체적으로, 마우스 미세아교세포주인 BV-2 를 RPMI1640 과 10% FBS로 배양하다가 2×10^6 cells/ml의 농도로 준비한 후 U-bottom 96 웰 플레이트에 100 μ l씩 분주하였다. 별도의 용기에 알파-시누클레인 응집체와 실시에 8 및 실시에 9에서 제작된 키메라 11F11 혹은 Hu11F11_11F11(ver.1) 혹은 Hu11F11_11F11 (ver.2) 혹은 Hu11F11_11F11(ver.3) 혹은 Hu11F11_11F11(ver.4) 혹은 Hu11F11_ABL2-4 항체들을 상온에서 20분간 반응시킨 뒤, 해당 mixture를 96 웰 플레이트의 BV-2에 첨가 후 15분간 반응하였다. 1,200 rpm으로 5분간 centrifuge하여 결합하지 않은 알파-시누클레인 응집체와 항체를 제거한 뒤 4% formaldehyde로 세포를 고정시키고 3회 PBS wash 이후 0.5 % triton X-100으로 세포를 permeablize한다. 시누클레인을 인지하는 항체 (Santa Cruz)를 1시간 동안 incubation 한뒤 0.1% Tween20이 포함된 PBS로 3회

30

wash 후 anti-rabbit-Alexa-488 항체를 1시간 incubation하고, wash 후 FACS caliber로 분석하였다. 실험결과를 도 12a 및 도 12b에 나타내며, 이는 본 발명의 일예에 따른 키메릭 항체 및 인간화 항체들의 미세교세포의 알파-시누클레인 응집체에 대한 식세포 작용 촉진능 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 10a는 인간화 11F11 항체에 관한 것이고, 도 10b는 인간화 3A9에 관한 것이다.

도 10a 및 도 10b에 나타낸 바와 같이, IgG 대조군 대비 본원에 기재된 키메릭 항체는 약 2배, 인간화 항체들은 BV-2에 의한 알파-시누클레인 응집체의 uptake를 4배까지 증가시켰다. 이 중 11F11의 인간화 항체 variant들, 즉 Hu11F11_ABL2-4 (Hu11F11-VH2와 Hu11F11-VL4의 조합), Hu11F11_ver.1(Hu11F11-VH-v1 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), Hu11F11_(ver.2)(Hu11F11-VH-v2 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합)은 키메릭 11F11 항체대비 BV-2의 식세포 촉진 능력이 탁월하였다. Hu11F11_ver.3)(Hu11F11-VH-v3 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.4)(Hu11F11-VH-v4와 Hu11F11-VLv3 4c)은 키메릭 11F11 항체와 유사한 식세포 촉진능을 보였다.

실시예 11: Fibril binding assay

알파-시누클레인 응집체가 세포 간 전파를 통하여 이웃 신경세포로 전염되는 현상의 전초 단계인 신경세포 결합을 억제하는 항체의 효능을 분석하기 위하여 fibril binding assay를 수행하였다.

구체적으로, 신경세포주인 SH-SY5Y 세포에 알파-시누클레인 응집체를 1 μ M, 키메릭 11F11 항체, 인간화 11F11 variant, 즉 Hu11F11_ver1, Hu11F11_ver2, Hu11F11_ver3, Hu11F11_ver4, Hu11F11_ABL2-4를 각 20 nM 으로 10 분간 처리한 뒤 세포를 4% formaldehyde로 고정하였다. Wash 이후 non-permeable 조건에서 모든 형태의 알파-시누클레인을 인지하는 알파-시누클레인 항체 (BD)를 1:250으로 처리한 뒤 wash하고 confocal microscope으로 이미징하였다. 이미징 직전에 DAPI를 처리하여 세포 핵을 나타내었다.

그 결과, 본원의 항체들은 IgG 대조군 대비 알파-시누클레인 응집체의 세포막 결합 정도를 효과적으로 감소시켰으며, 특히 11F11의 인간화 항체들은 11F11 키메릭 항체 대비 유사하거나 더 효율적으로 결합 정도를 감소시켰다. 도 11은 본 발명의 일예에 따른 키메릭 항체 및 인간화

항체들이 알파-시누클레인 응집체의 신경세포 표면에서의 결합을 저해하는 능력에 관한 분석 결과이다.

도 11에 나타난 바와 같이, 본원의 항체들은 IgG 대조군 대비 알파-시누클레인 응집체의 세포막 결합 정도를 최대 23배까지 효과적으로 감소시켰으며, 특히 11F11의 인간화 항체들은 11F11 키메릭 항체 대비 유사하거나 더 효율적으로 결합 정도를 감소시켰다. hu11F11(ver.1)(Hu11F11-VH-v1 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.3)(Hu11F11-VH-v3 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.4)(Hu11F11-VH-v4 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합)은 키메릭 11F11 항체 대비 우수한 효능을 보였으며, ABL2-4 (Hu11F11-VH2와 Hu11F11-VL4의 조합), hu11F11(ver.2)(Hu11F11-VH-v2 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합)은 키메릭 11F11 항체와 유사한 감소능을 보였다.

실시예 12: Dual chamber assay

본 발명에 따른 인간화 항체가 알파-시누클레인 응집체의 세포 간 전파를 억제하는 효능을 보다 직접적으로 분석하기 위하여 dual chamber assay를 수행하였다. permeable membrane이 있는 insert에 알파-시누클레인을 과발현하는 SH-SY5Y 세포 (donor cell)를, 정상 SH-SY5Y 세포 (recipient cell)를 12 웰 플레이트 안의 coverslip 위에 각각 plating한 뒤 알파-시누클레인 과발현 세포주가 배양된 insert를 위에 올려 겹쳐 overnight 동안 배양하였다. 동시에 recipient 세포 쪽에 본원의 항체를 20 nM 처리하였다. 이후 4% formaldehyde로 recipient 세포를 고정하고 wash 한 뒤 0.5% TritonX-100을 처리하여 permeable condition을 만들었다. Wash 후 실시예 14와 동일한 detection 항체 및 DAPI를 처리하고 confocal microscope로 이미징하였다. 상기 분석된 이미지는 도 12에 나타냈다.

그 결과, 본 발명에 따른 인간화 항체들은 IgG 대조군 대비 알파-시누클레인 응집체의 recipient 세포로의 전파 정도를 효과적으로 감소시켰으며, 특히 11F11의 인간화 항체들은 11F11 키메릭 항체 대비 유사하거나 더 효율적으로 알파-시누클레인 응집체의 recipient 세포로의 전파를 감소시켰다.

도 12는 본 발명의 일예에 따른 키메릭 항체 및 인간화 항체들이 알파-시누클레인을 과발현하는 신경세포에서 분비되어 정상 신경세포로 알파-시누클레인 응집체가 이동하는 세포 간 전파를 억제하는 효능 분석

결과이다. top chamber에 plating된 알파-시누클레인 과발현 SH-SY5Y 신경 세포주는 알파-시누클레인을 세포 밖으로 분비하며, 이는 아래의 12 웰 플레이트에 plating된 정상 SH-SY5Y 세포주로 전달된다. 당사의 항체들은 IgG 대조군 대비 아래 플레이트의 정상 SH-SY5Y 세포주 내로 유입되는

5 알파-시누클레인의 양을 현저히 감소시켰다. 특히 본원의 인간화 항체들 중 11F11 클론의 인간화 항체들은 키메릭 항체 대비 아래 플레이트의 recipient 세포 내로 알파-시누클레인 유입의 감소 정도를 더욱 증가시키는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로 hu11F11(ver.2)(Hu11F11-VH-v2 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.4)(Hu11F11-VH-v4 와 Hu11F11-VLv3

10 4c의 조합)은 키메릭 항체 대비 우수한 억제능을, hu11F11(ver.1)(Hu11F11-VH-v1 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.3)(Hu11F11-VH-v3 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합)은 키메릭 항체와 유사한 억제능을 보였다.

IgG 대조군 대비 알파-시누클레인 응집체의 전파 정도를 약 22배까지 효과적으로 감소시켰으며, 특히 11F11의 인간화 항체들은 11F11 키메릭

15 항체 대비 유사하거나 더 효율적으로 알파-시누클레인 응집체의 recipient 세포로의 전파를 감소시켰다.

실시에 13. 인간화 항체의 ELISA 분석시험

상기 실시예 2-2와 실질적으로 동일한 방법으로, 실시예 8에서

20 얻어진 키메릭 항체 및 실시예 9에서 얻어진 인간화 항체들의 결합력을 정량적으로 분석하기 위하여 sandwich ELISA를 수행하였다.

구체적으로, 각각 항체들을 0.04~400 nM의 농도로 1/10씩 희석하여 96웰 플레이트에 코팅한 뒤, 여기에 2000 ng/ml의 응집체를 각 웰에 처리하였다. 1XPBS로 세척 후 이어 바이오틴이 결합된 capture 항체 및

25 HRP가 결합된 스트렙타빈을 처리한 뒤 기질로서 TMB와 반응시킨 뒤 그 흡광도를 측정하였다. 결과는 도 13에 기재되어 있다.

도 13에 나타난 것과 같이, 본 발명에 다른 인간화된 항체들, 특히 키메릭 11F11에서 유래된 인간화 항체(인간화 11F11 항체)들은 키메릭 11F11 클론과 동등한 결합력을 보이는 것으로 확인되었다. 인간화 항체들,

30 특히 11F11 유래 variant들인, hu11F11(ver.1), 즉 Hu11F11-VH-v1 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합, hu11F11(ver.2), 즉 Hu11F11-VH-v2 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합, hu11F11(ver.3), 즉 Hu11F11-VH-v3 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합, hu11F11(ver.4), 즉 Hu11F11-VH-v4 와 Hu11F11-VLv3 4c 은 키메릭

11F11 클론과 유사한 결합력을 보이는 것으로 확인되었으며, 그 EC₅₀는 11.5 ~ 15.1 nM로, 키메릭 11F11 항체의 EC₅₀인 12.5 nM와 유사한 값을 보였다.

실시예 14: 항 알파-시누클레인 항체를 이용한 BIAcore 분석

- 5 상기 실시예 2-3과 실질적으로 동일한 방법으로, 실시예 8에서 얻어진 키메릭 항체 및 실시예 9에서 얻어진 인간화 항체들의 결합력을 BIAcore를 사용하여 정량적으로 분석하였다. 상기 분석 결과를 도 14와 하기 표에 나타낸다.

[표 10]

클론명	KD(nM)
Ch11F11	0.02472
Hu11F11_v2	0.0596
Hu11F11_v3	0.0316
Hu11F11_v4	0.0204

10

- 그 결과, 본원에 기재된 인간화 항체들, 특히 11F11의 variant들, 즉, hu11F11(ver.2)(Hu11F11-VH-v2 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.3)(Hu11F11-VH-v3 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.4)(Hu11F11-VH-v4 와 Hu11F11-VLv3 4c) 은 키메릭 11F11 클론과 유사한 KD 값을 보이는 것으로 확인되었으며, 그 결합 정도로는
 15 인간화 클론들이 $0.02\text{--}0.06 \times 10^{-9}$ M의 KD, 키메릭 11F11 클론이 0.02×10^{-9} M의 낮은 KD 값, 즉 응집체에 대한 높은 결합력을 보였다.

실시예 15. 인간화 항체의 생산성 평가

- 20 11F11 키메릭 항체 및 11F11의 인간화 항체 variant 4종(Hu11F11(ver.1), Hu11F11(ver.2), Hu11F11(ver.3), Hu11F11(ver.4))을 실시예 8에 기재된 대로 transfection 및 배양, 1차 및 2차 정제까지 완료 후 최종적으로 정제된 시료의 항체량 및 순도를 분석하였다.

- 항체량은 Thermo Scientific™ NanoDrop™ spectrophotometer을
 25 이용하여 측정하였는데, 먼저 1XPBS를 loading하여 영점을 확인한 뒤 일정량의 정제 시료를 loading 하고 단백질 정량에 사용되는 280 nm의 UV 파장에서 시료를 측정하였다. NanoDrop™에서 확인된 시료의 농도를 시료의 총 부피와 곱하여 총 수득량을 구하는 동시에, 총 수득량을 총 부피로

나누어 생산성 (yield (g/L))를 도출하였다. 최종 정제 산물의 순도는 HLC-001(Agilent 1200 series)HPLC 로 분석하였는데, TSK gel G3000SWXL 에서 1X PBS, 200mM Arginine-HCl(pH 6.8)의 mobile phase를 사용하여 그 main peak의 비율을 정량하였다. 상기 생산성 분석 결과를 하기 표에 나타냈다.

5 [표 11]

시료항체	농도 (mg/mL)	Purity (injection 중량%)	Yield (g/L)
Ch11F11(-RD)	5.2	99.5	0.282
Hu11F11_v1	5	100	0.155
Hu11F11_v2	15	98.96	0.423
Hu11F11_v3	5	100	0.100
Hu11F11_v4	5	99.87	0.068

그 결과, 키메릭 11F11 항체 및 11F11의 인간화 variant들인 hu11F11(ver.1), 즉 hu11F11(ver.1)(Hu11F11-VH-v1 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.2)(Hu11F11-VH-v2 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합),
 10 hu11F11(ver.3)(Hu11F11-VH-v3 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합), hu11F11(ver.4)(Hu11F11-VH-v4 와 Hu11F11-VLv3 4c)의 생산성은 0.068 ~ 0.423 g/L로서 transient transfection으로 생산되는 통상의 항체 생산 수율보다 우수하였다. 특히 hu11F11(ver.2), 즉 Hu11F11-VH-v2 와 Hu11F11-VLv3 4c의 조합은 0.423 g/L의 생산성을 보여줌으로서 키메릭 11F11 항체의
 15 0.282 g/L보다 높은 생산성을 보여주었다.

실시예 16. 키메릭 항체의 알파-시누클레인 특이적 결합 평가

키메릭 항체 3A9, 9B11, 11F11 3종을 실시예 8에 따라 생산 후 해당 항체들의 알파-시누클레인의 결합 특이성을 그 호몰로그인 베타-, 감마-
 20 시누클레인과 ELISA과 비교하였다.

이를 위해 인간 베타-시누클레인 (Uniprot: Q16143) 단백질 (CUSABIO, Cat: CSB-EP624090HU), 혹은 인간 감마-시누클레인 (Uniprot: 076070) 단백질 (CUSABIO, Cat: CSB-EP021915HU)을 각각 100 ng/ml의 농도로 96웰 플레이트에 코팅한 후, wash 한 다음에 5% BSA로 2시간 동안 blocking
 25 하였다. 이 때 알파, 베타, 감마-시누클레인에 모두 결합하는 pan-Syn 항체

(santacruz, Cat: FL-140, sc-10717, rabbit)를 양성 대조군으로 사용하였다. Wash 후, 여기에 400 nM에서 0.04 nM까지 1/10씩 희석된 키메릭 항체 (3A9, 9B11, 11F11)를 2시간 동안 처리한 후, PBS로 세척하고, 이어 goat anti-hFc항체에 HRP가 결합된 detection 항체를 처리한 후
 5 기질로서 TMB와 반응한 후 450nm, 650nm에서 흡광도를 측정하였고, 양성 대조군의 경우 detection항체로 goat anti-rabbit 항체에 HRP가 결합된 항체를 사용하였다.

실험결과를 도 15a 및 도 15b에 나타내며, 이는 본 발명의 일예에 따른 키메릭 항체들 (3A9, 9B11, 11F11)의 인간 베타-시누클레인 및 인간
 10 감마-시누클레인에 대한 매우 낮은 결합력을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다. 이와 반대로 양성 대조군인 pan-Syn 항체는 베타- 및 감마-시누클레인에 대하여 높은 결합력을 나타냈다. 도 15a는 인간 베타-시누클레인에 관한 것이고, 도 15b는 인간 감마-시누클레인에 관한 것이다.

또한 상기 3가지 항체를 아밀로이드 베타₁₋₄₂ (Uniprot: P05067; CAS
 15 number: 107761-42-2) 및 타우 (Uniport: P10636-8) 단백질로 만들어진 응집체와 닷블롯으로 반응시켜 해당 항체들의 알파-시누클레인 응집체에 대한 특이적인 결합력을 분석하였다. 그 이유는 다음과 같다. 아밀로이드 베타₁₋₄₂ 및 타우는 응집체를 형성하여 퇴행성 신경질환, 특히 알츠하이머병에 중요한 병인으로 생각되며, 해당 응집체는 알파-
 20 시누클레인의 응집체와 유사하게 올리고머, 프로토피브릴, 피브릴 등의 구조를 가진다고 알려져 있다. 따라서 해당 닷블롯은 키메릭 항체 3A9, 9B11, 11F11들이 알파-시누클레인의 특이적인 시퀀스를 인식하고 알파-시누클레인, 아밀로이드 베타, 타우 유래 응집체가 응집체로서 가지는 공통적인 구조를 인식하지 않는 것을 확인하기 위한 것이다.

본 실시예의 닷블롯 방법은 상기 실시예 2-3과 실질적으로 동일한 방법으로, 수행되었으며, recombinant 아밀로이드 베타₁₋₄₂ 및 타우 단백질 및 이에 대한 응집체는 서울대학교 이승재 교수 lab에서 제조되었다. Syn-1, 6E10, Tau5는 각각 알파-시누클레인, 아밀로이드 베타₁₋₄₂, 타우 단백질에 결합하는 것으로 알려진 항체들이다. 분석 결과는 도 15c에 기재되었다.

30 실험결과를 도 15c에 나타내며, 이는 본원의 키메릭 항체들인 3A9, 9B11, 11F11이 알파-시누클레인 유래 응집체에만 특이적으로 결합하며, 아밀로이드 베타₁₋₄₂ 및 타우 유래 응집체에는 결합하지 않음을 보여준 결과이다. 이와 상이하게 아밀로이드 베타₁₋₄₂ 및 타우에 각각 결합하는

것으로 알려진 6E10 및 Tau5 항체는 닷블롯 상에서 해당 응집체에 결합함을 보여주었다.

- 상기의 결과에 따라, 해당 키메릭 항체들이 알파-시누클레인의 호몰로그 및 상이한 단백질 유래 응집체에 결합하지 않음은, 해당 항체들이
- 5 타겟 단백질에만 효율적으로 결합하여 호몰로그 및 상이한 단백질 유래 응집체에 결합하는 항체 혹은 약물 대비 그 효능이 뛰어날 수 있음을 시사한다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

- α -Syn의 응집체에 결합하는 항체 또는 그 항원결합 단편으로서
 서열번호 1 및 서열번호 6의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는
 5 중쇄 CDR1 (H-CDR1),
 서열번호 2 내지 4 및 서열번호 7 내지 8의 아미노산 서열중에서
 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2),
 서열번호 5 및 서열번호 9의 아미노산 서열중에서 하나를 중쇄 CDR3
 (H-CDR3),
 10 서열번호 10 및 서열번호 13의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는
 경쇄 CDR1 (L-CDR1),
 서열번호 11 및 서열번호 14의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는
 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및
 서열번호 12 및 서열번호 15의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는
 15 경쇄 CDR3 (L-CDR3)을 포함하는, 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 2】

- 제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 그 항원결합 단편은, 서열번호
 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1), 서열번호 2 내지 4의
 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2), 및 서열번호
 20 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 (H-CDR3)을 포함하는 중쇄 가변
 영역; 및
 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1),
 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및 서열번호
 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 (L-CDR3)을 포함하는 경쇄 가변
 25 영역을 포함하는 것인 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 3】

- 제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 그 항원결합 단편은, 서열번호
 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 (H-CDR1), 서열번호 7 내지 8의
 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 중쇄 CDR2 (H-CDR2), 및 서열번호
 30 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 (H-CDR3)을 포함하는 중쇄 가변
 영역; 및

서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 (L-CDR1),
 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 (L-CDR2), 및 서열번호

15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 (L-CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

5 서열번호 16 내지 17 및 서열번호 35 내지 40의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크1 (H-FR1),

10 서열번호 18 내지 19 및 서열번호 41 내지 44의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR1과 H-CDR2 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR2)

서열번호 20 내지 31 및 서열번호 45 내지 50의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR2와 H-CDR3 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR3) 및

15 서열번호 32 내지 34 및 서열번호 51 내지 52의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 H-CDR3의 C 말단에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR4)를 포함하는 것인 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은,

20 서열번호 53 내지 58 및 서열번호 71 내지 77의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크1 (L-FR1),

서열번호 59 내지 61 및 서열번호 78 내지 81의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR1과 L-CDR2 사이에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR2)

25 서열번호 62 내지 67 및 서열번호 82 내지 88의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR2와 L-CDR3 사이에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR3) 및

30 서열번호 68 내지 70 및 서열번호 89의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 L-CDR3의 C 말단에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR4)를 포함하는 것인 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 6】

제 2 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은, 서열번호 16 내지 의 아미노산 서열중에서

하나를 포함하는, H-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크1 (H-FR1),

서열번호 18 내지 19의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR1과 H-CDR2 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR2)

5 서열번호 20 내지 31의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR2와 H-CDR3 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR3) 및

서열번호 32 내지 34의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 H-CDR3의 C 말단에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR4)를 포함하는 것이며,

10 상기 경쇄 가변 영역은, 서열번호 53 내지 58의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크1 (L-FR1),

서열번호 59 내지 61의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR1과 L-CDR2 사이에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR2)

15 서열번호 62 내지 67의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR2와 L-CDR3 사이에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR3) 및

서열번호 68 내지 70의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 L-CDR3의 C 말단에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR4)를 포함하는 것인 항체 또는 그 항원결합 단편.

20 【청구항 7】

제 3 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은, 서열번호 35 내지 40의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크1 (H-FR1),

25 서열번호 41 내지 44의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR1과 H-CDR2 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR2)

서열번호 45 내지 50의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, H-CDR2와 H-CDR3 사이에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR3) 및

30 서열번호 51 내지 52의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 H-CDR3의 C 말단에 위치하는 중쇄가변영역 프레임워크 (H-FR4)를 포함하는 것이며,

상기 경쇄 가변 영역은, 서열번호 71 내지 77의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR1의 N-말단쪽에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크1

(L-FR1),

서열번호 78 내지 81의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR1과 L-CDR2 사이에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR2)

서열번호 82 내지 88의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는, L-CDR2와 L-CDR3 사이에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR3) 및

서열번호 89의 아미노산 서열중에서 하나를 포함하는 L-CDR3의 C 말단에 위치하는 경쇄가변영역 프레임워크 (L-FR4)를 포함하는 것인 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은,

서열번호 90 내지 101 또는 서열번호 102 내지 108로부터 선택되는 아미노산 서열;

서열번호 90 내지 101 또는 서열번호 102 내지 108로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 서열; 또는

서열번호 90 내지 101 또는 서열번호 102 내지 108로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은,

서열번호 109 내지 115 또는 서열번호 116 내지 123로부터 선택되는 아미노산 서열;

서열번호 109 내지 115 또는 서열번호 116 내지 123로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상; 또는

서열번호 109 내지 115 또는 서열번호 116 내지 123로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 10】

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 그 항원결합 단편은 서열번호 90 내지 101의 아미노산 서열중에서 하나의 중쇄 가변 영역과 서열번호 109 내지 115의 아미노산 서열중에서 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 11】

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 그 항원결합 단편은 서열번호 102

내지 108의 아미노산 서열중에서 하나의 중쇄 가변 영역과 서열번호 116 내지 123의 아미노산 서열중에서 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 12】

- 5 제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 그 항원결합 단편은 서열번호 127의 중쇄 가변영역과 서열번호 128의 경쇄 가변영역을 포함, 서열번호 129의 중쇄 가변영역과 서열번호 130의 경쇄 가변영역을 포함, 서열번호 131의 중쇄 가변영역과 서열번호 132의 경쇄 가변영역을 포함, 서열번호 133의 중쇄 가변영역과 서열번호 134의 경쇄 가변영역을 포함, 서열번호 10 135의 중쇄 가변영역과 서열번호 136의 경쇄 가변영역을 포함, 또는 서열번호 137의 중쇄 가변영역과 서열번호 138의 경쇄 가변영역을 포함하는 것인 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 13】

- 제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원결합 단편은 모노클로날 항체, 15 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, diabody 또는 scFV인 α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 14】

- 제 13 항에 있어서, 상기 모노클로날 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 형인, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 또는 그 항원결합 20 단편.

【청구항 15】

- 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원결합 단편은, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체를 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제하는, α -Syn의 응집체에 결합하는 분리된 항체 25 또는 그 항원결합 단편.

【청구항 16】

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원결합 단편을 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 17】

- 30 제 16 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

【청구항 18】

제 17 항에 따른 발현 벡터로 형질전환된 세포.

【청구항 19】

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그 항원결합 단편을 포함하는, 조성물.

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는 α -synucleinopathy의 치료용인, 조성물.

【청구항 21】

제 20 항에 있어서, 상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함하는 것인, 조성물.

【청구항 21】

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하는 단계; 및

상기 항체 또는 항원결합 단편을 α -Syn 응집체 검출이 필요한 생물학적 시료와 접촉하는 단계를 포함하는 생물학적 시료에서 인비보 또는 인비트로 α -Syn 응집체 검출방법.

【청구항 22】

약학적으로 유효한 양의 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물을 α -synucleinopathy의 치료 및/또는 α -syn 응집체의 농도 조절이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체의 α -synucleinopathy 치료 또는 상기 대상체에서 α -syn 응집체의 농도를 조절하는 방법.

【청구항 23】

제 22 항에 있어서, 상기 α -synucleinopathy는 파킨슨 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를 포함하는 것인, 방법.

【청구항 24】

대상체에서 α -synucleinopathy를 진단하는 방법으로, 상기 방법은
 상기 대상체에서 α -Syn 응집체의 농도 및/또는 세포내 위치를 제 1
 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편로
 5 측정하는 단계; 및

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

10 【청구항 25】

제 24 항에 있어서, 상기 α -synucleinopathy는 파킨슨
 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease
 dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB),
 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease
 15 (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and
 Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를
 포함하는 것인, 방법.

【청구항 26】

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합
 20 단편 또는 이를 포함하는 조성물의 α -synucleinopathy 대상체의 상기 질환
 치료용 용도로, 상기 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이를 포함하는
 조성물은 상기 대상체의 뇌에서, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -
 Syn 응집체 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제하는 것인, 용도.

【청구항 27】

제 26 항에 있어서, 상기 α -synucleinopathy는 파킨슨
 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease
 dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB),
 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease
 (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and
 30 Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를
 포함하는 것인, 용도.

【청구항 28】

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합

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

5 **【청구항 29】**

뇌에서, α -Syn 응집체의 세포간 전달의 억제; α -Syn 응집체 분해; 또는 α -Syn 응집체 형성을 억제하는, 뇌 세포에서 α -Syn 응집체 농도 조절용의 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편.

10 **【청구항 30】**

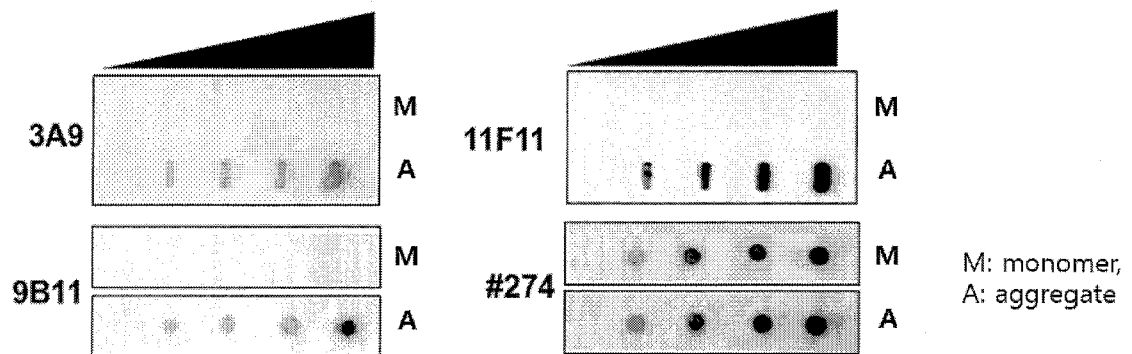
α -synucleinopathy 치료에 사용되는 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편.

【청구항 31】

제 30 항에 있어서, 상기 α -synucleinopathy는 파킨슨
 15 질환(Parkinson's disease, PD), 파킨슨질환성 치매(Parkinson's disease dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 알츠하이머 루이소체 질환(Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)), 복합성 알츠하이머 및 파킨슨 병(Combined Alzheimer's and Parkinson disease), 또는 다계통위축증(multiple system atrophy, MSA)를
 20 포함하는 것인, 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편.

【도면】

【도 1】

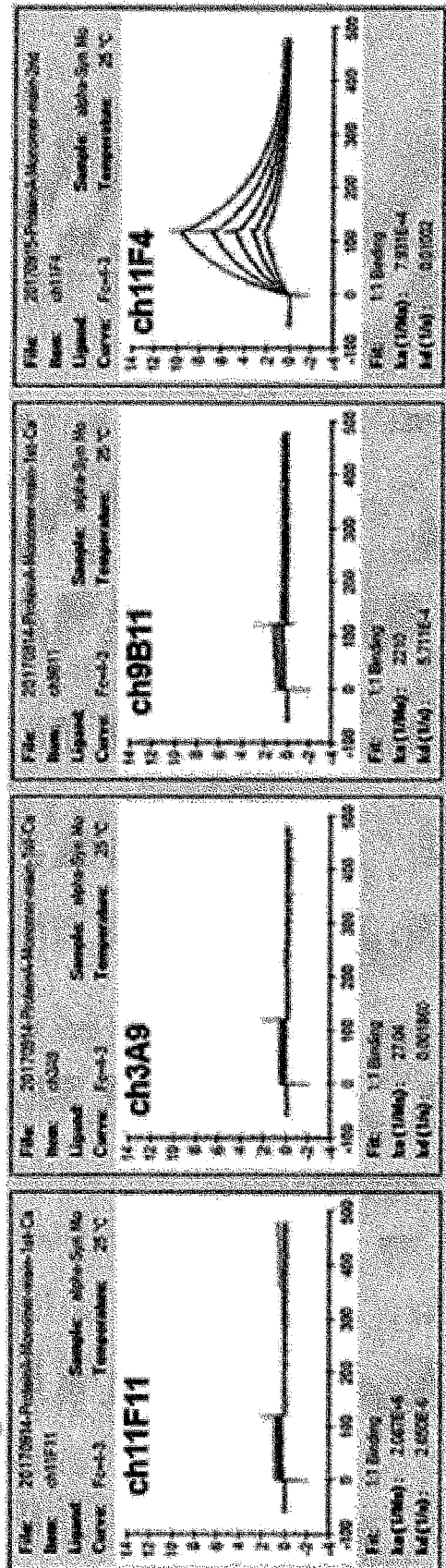


【도 2】

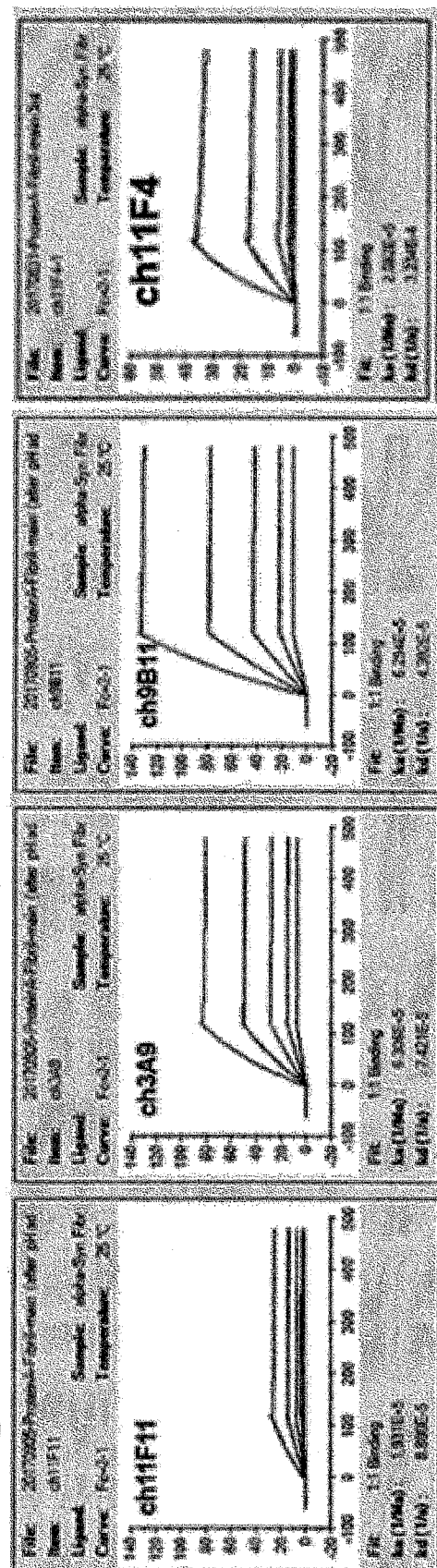
Clones	EC50 (ng/ml)		EC50 (nM)	
	Monomers	Fibrils	Monomers	Fibrils
3A9	-	319.4	-	2.129
9B11	-	184.9	-	1.233
11F11	-	326.5	-	2.177

【도 3a】

Sensograms with monomers



Sensograms with fibrils

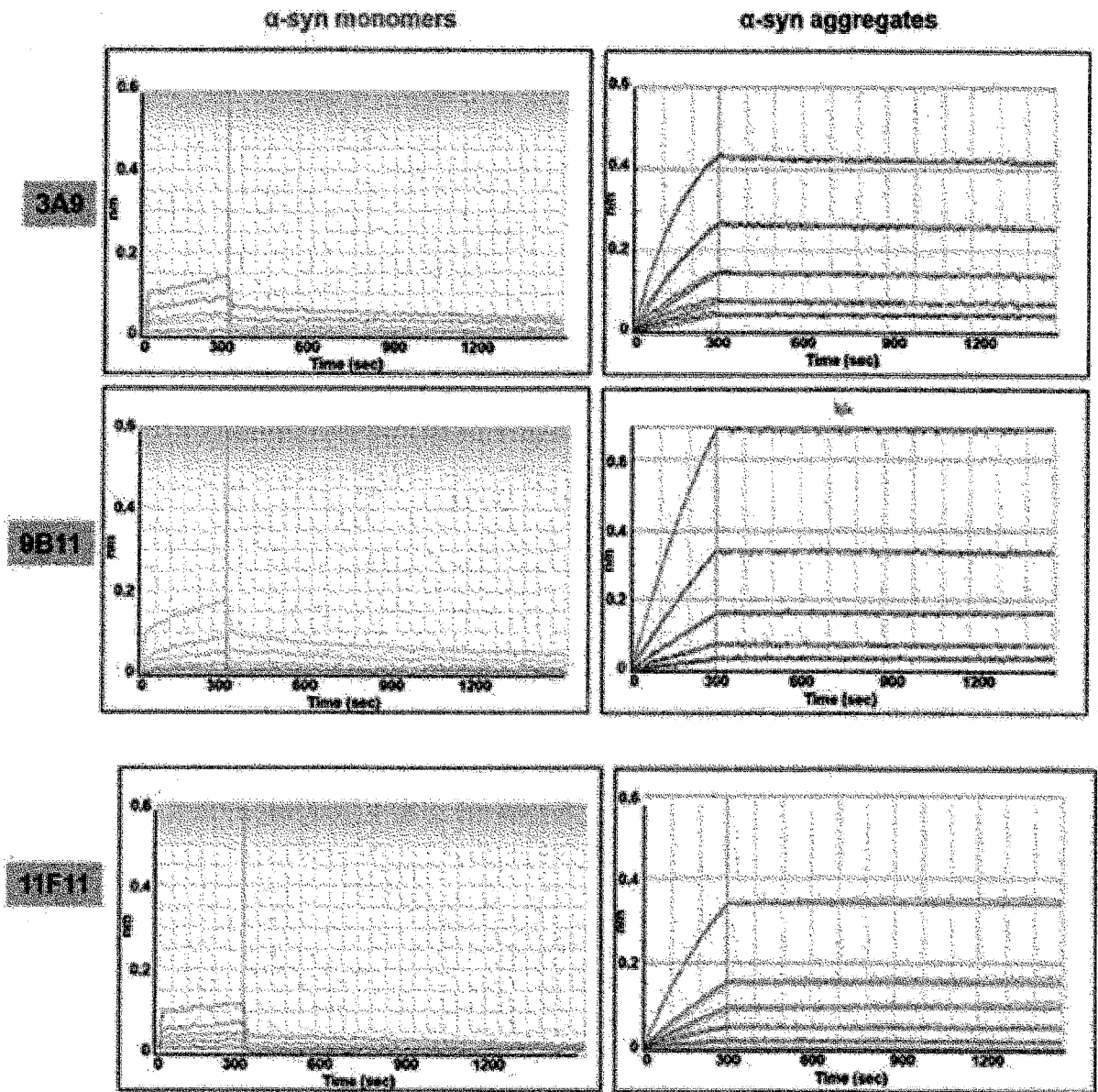


【도 3b】

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

-:tested, but not available

【도 4a】

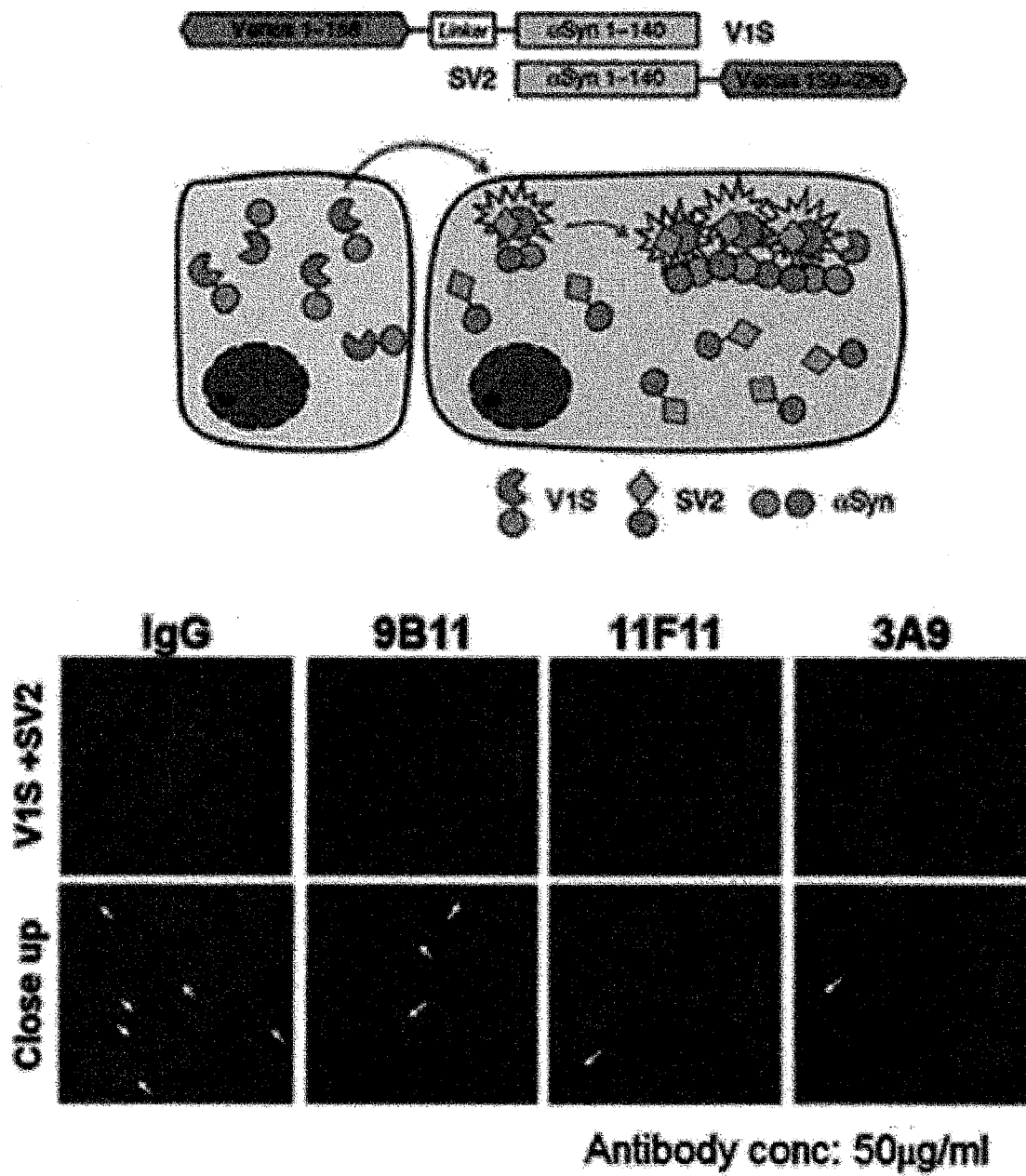


【도 4b】

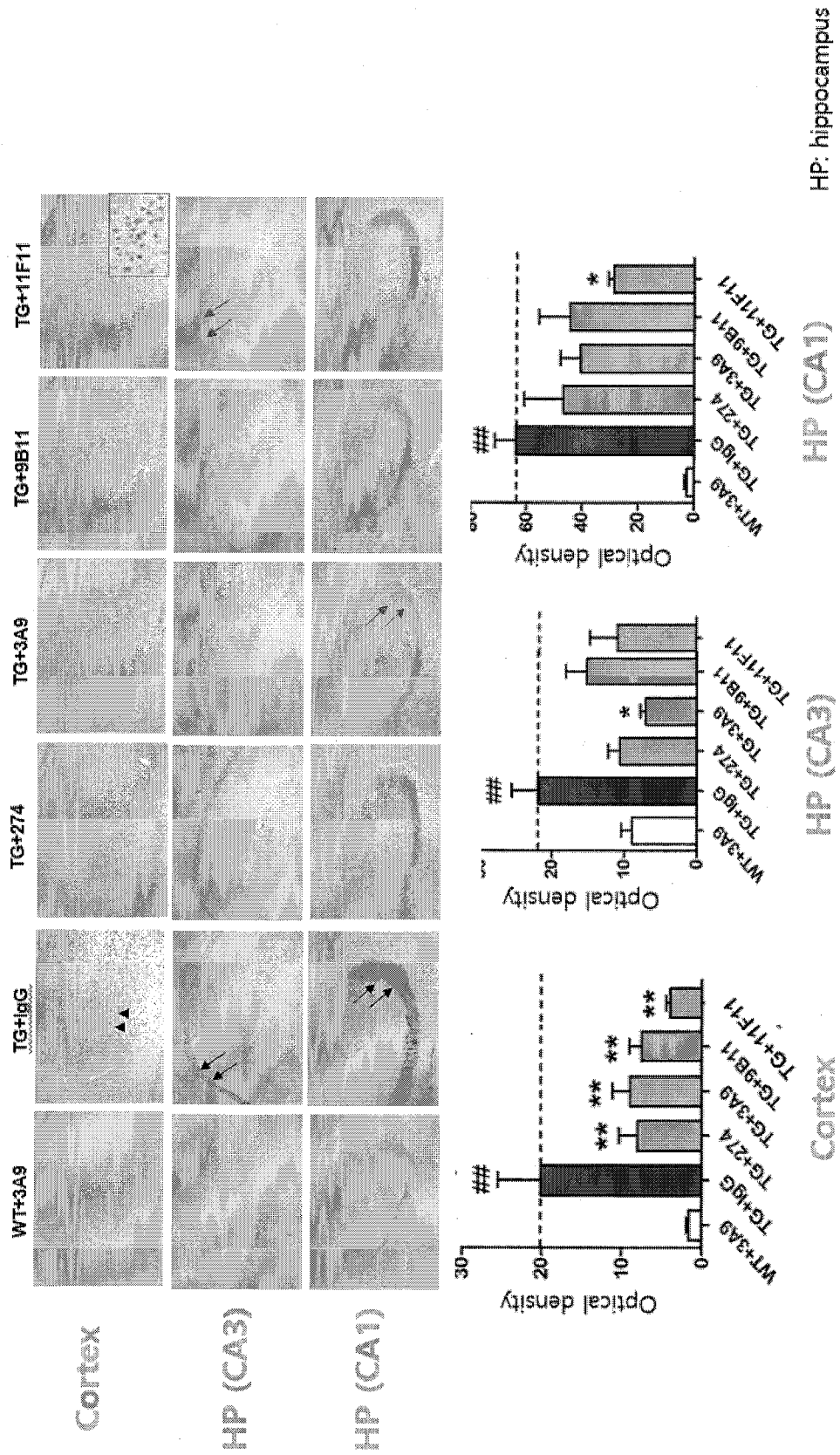
Clones	KD (10^{-9} M)	
	Monomers	Fibrils
3A9	-	0.13
9B11	-	0.018
11F11	-	0.16

-: tested, but not available

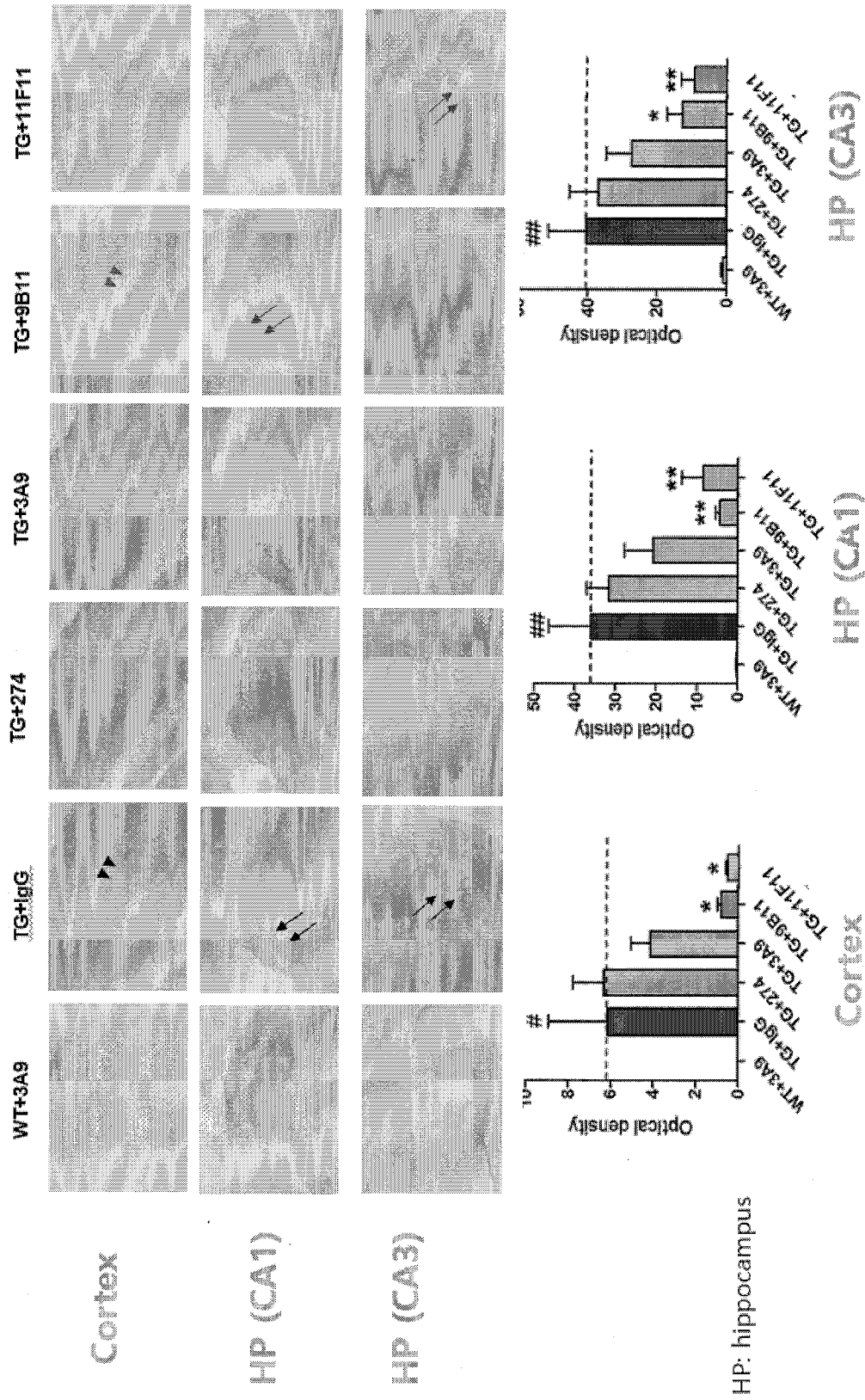
【도 5】



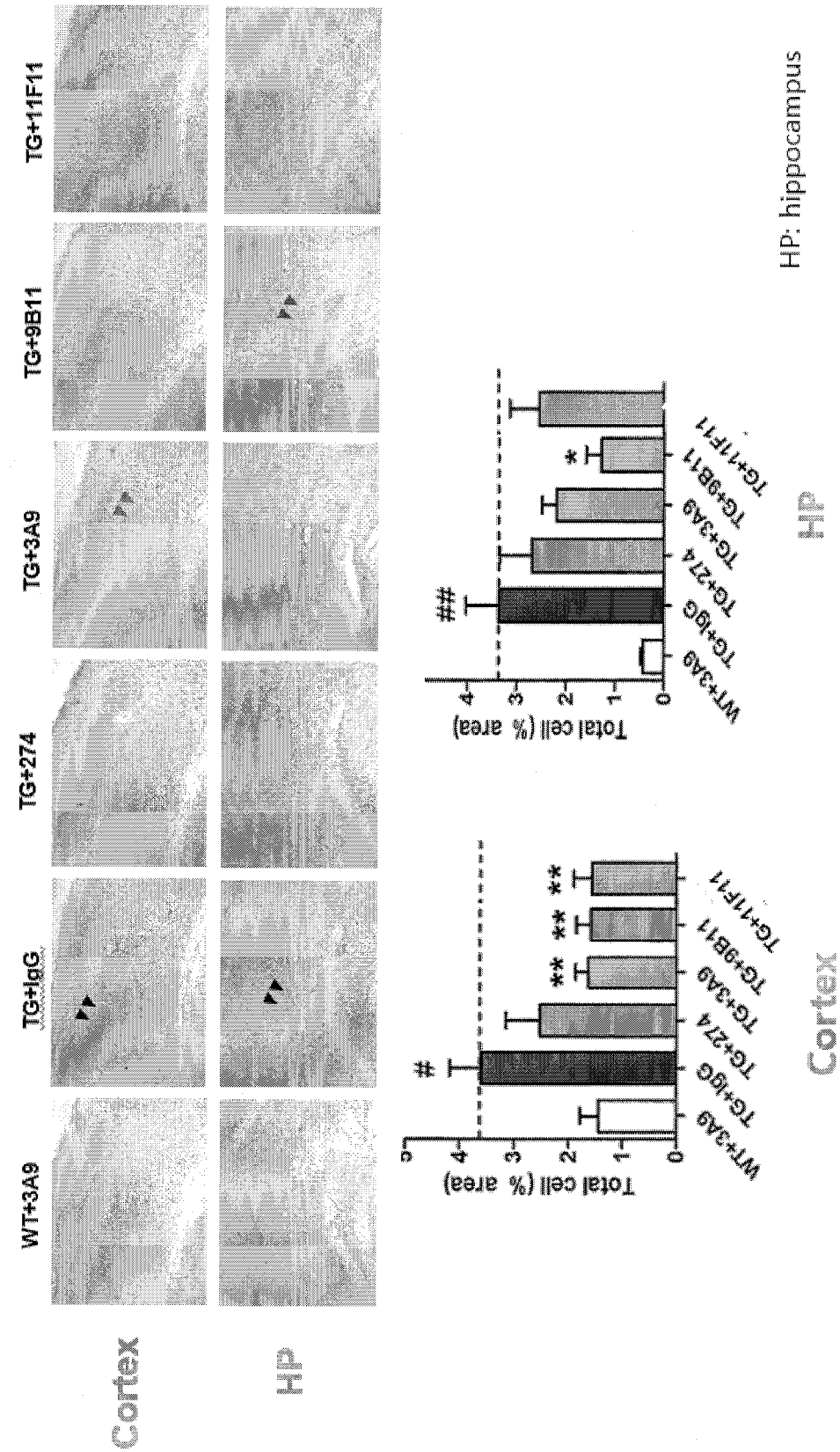
【도 6a】



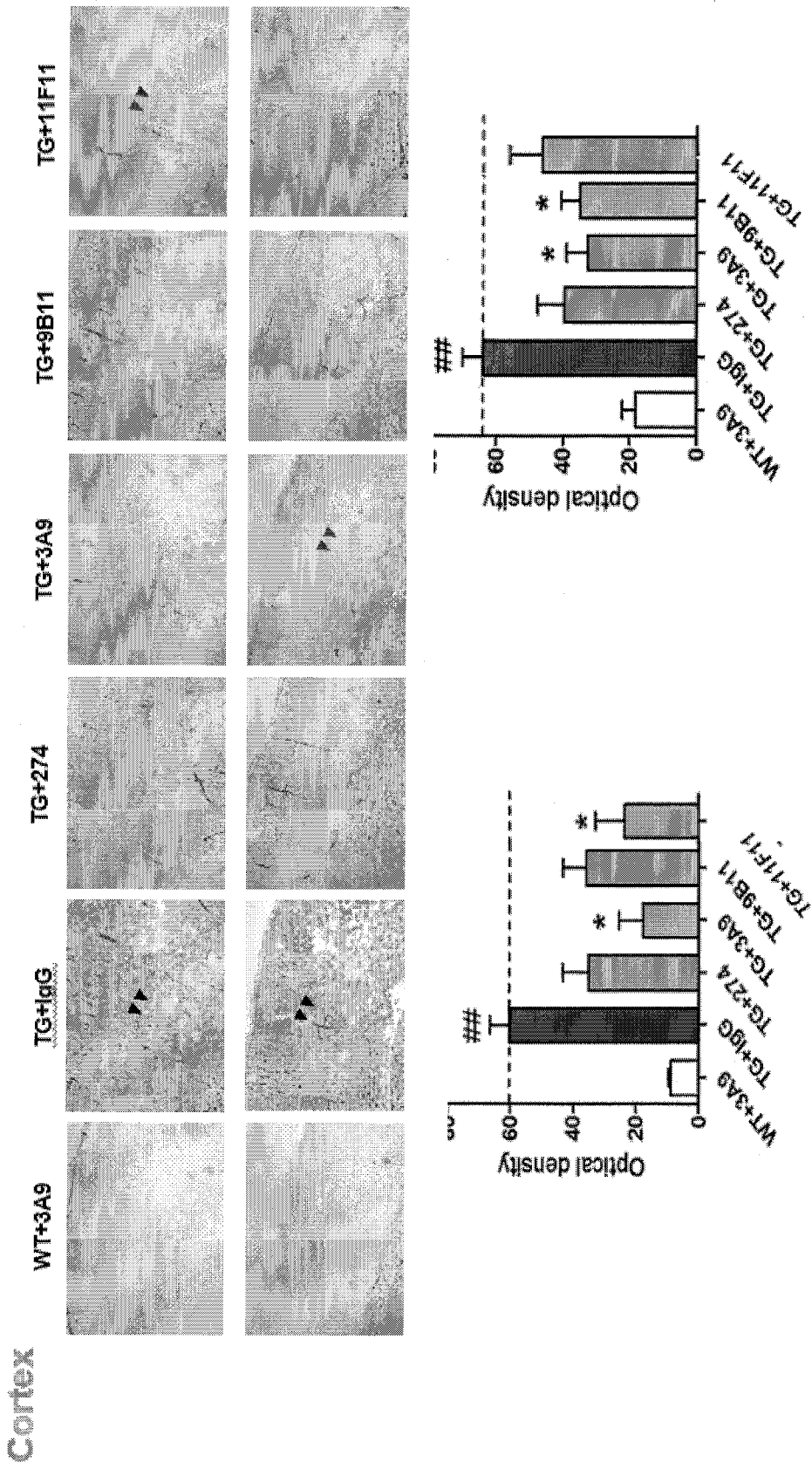
【도 6b】

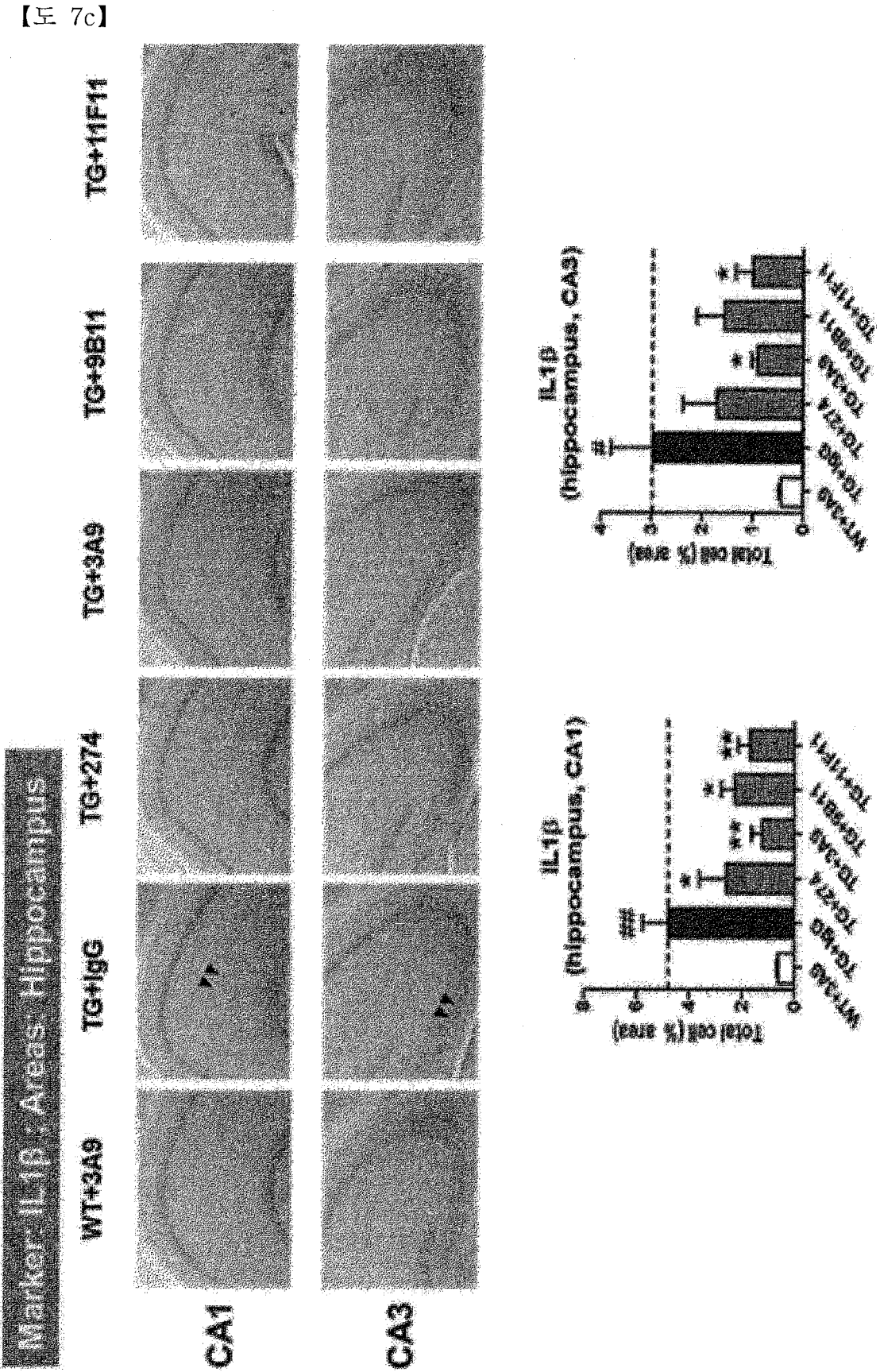


【도 7a】

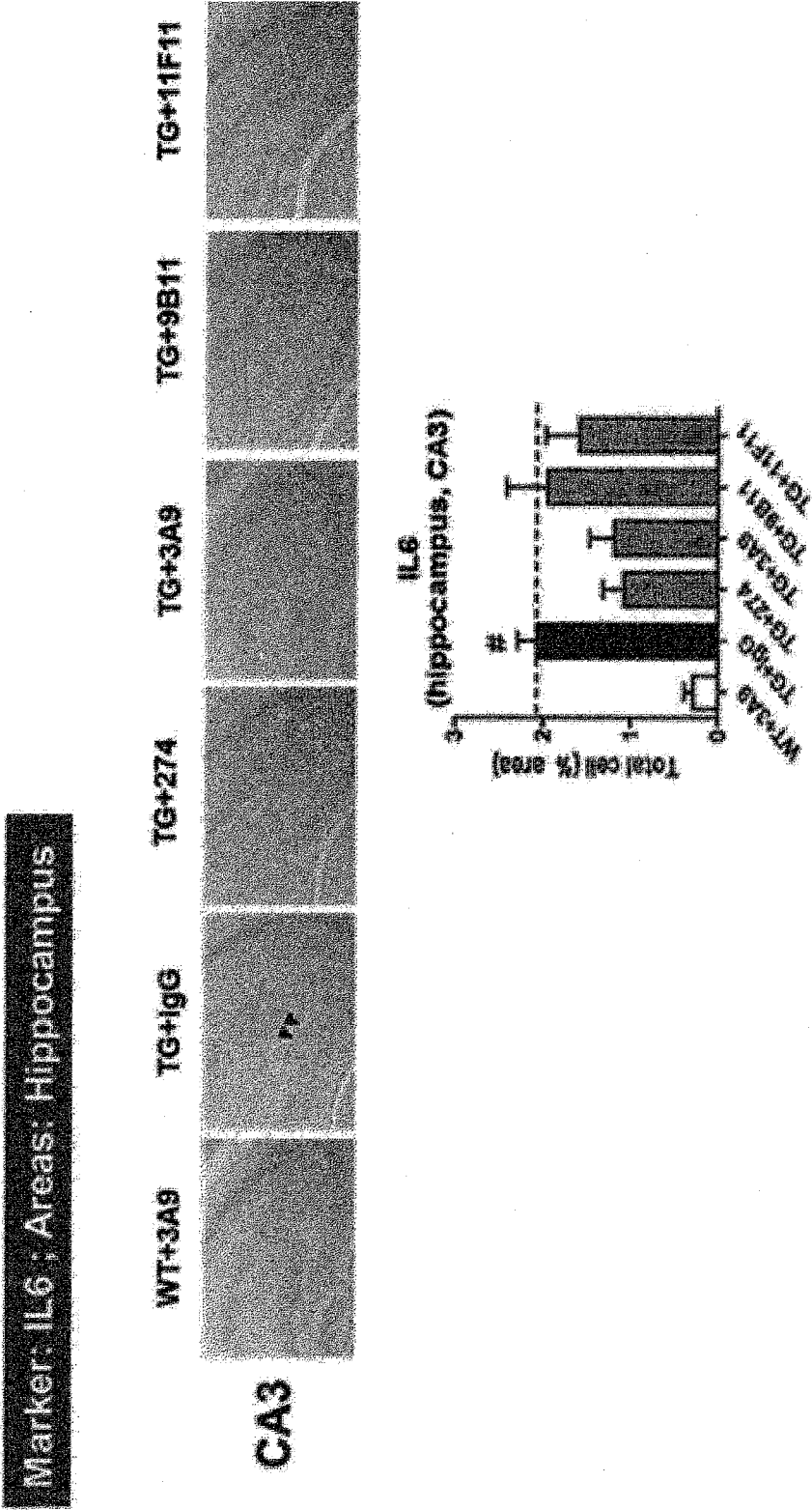


【도 7b】

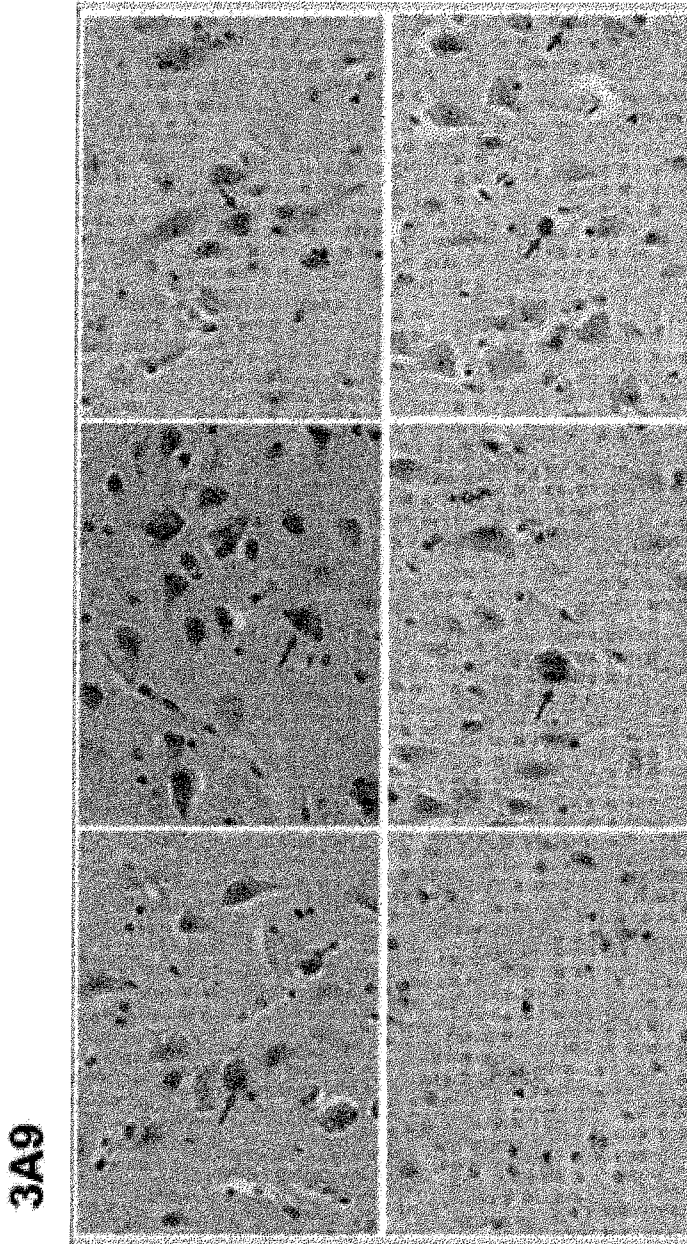




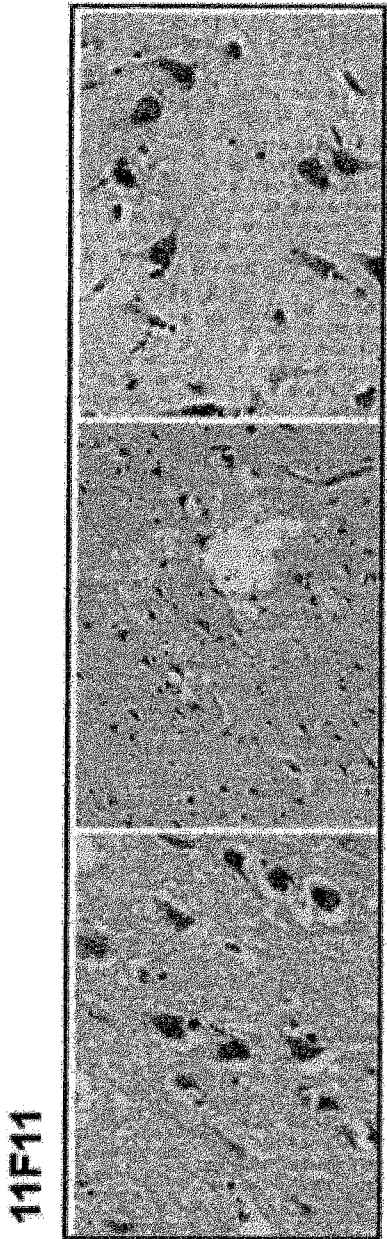
【도 7d】



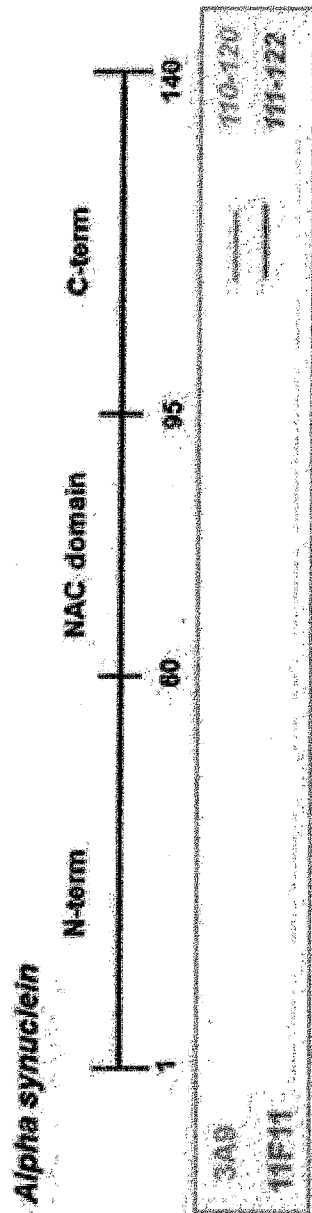
【도 8a】



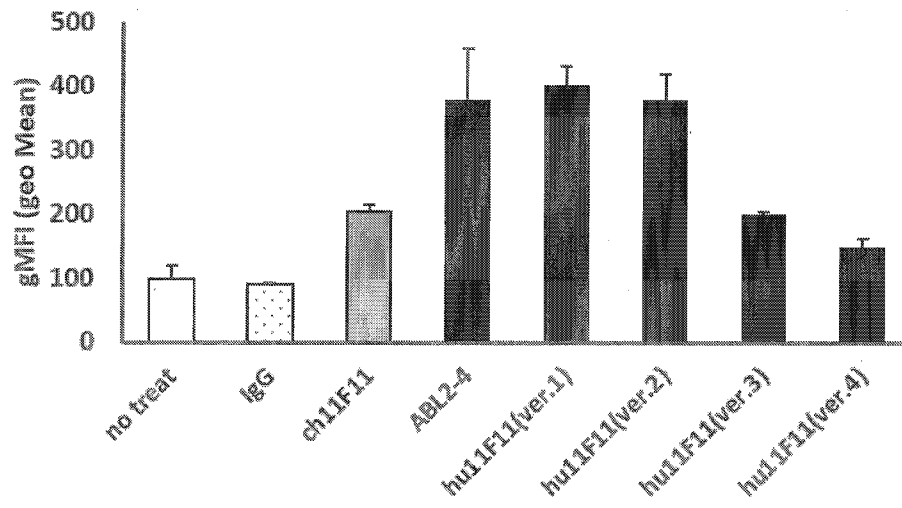
【도 8b】



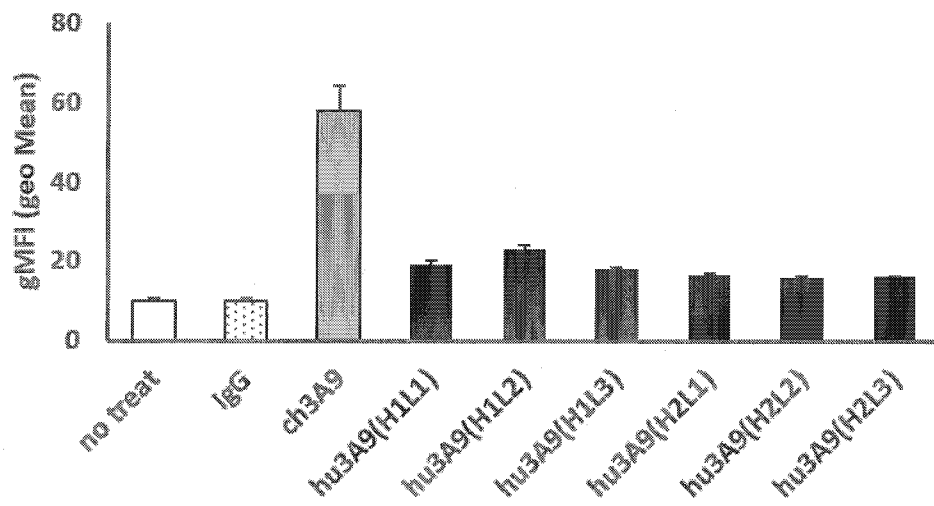
【도 9】



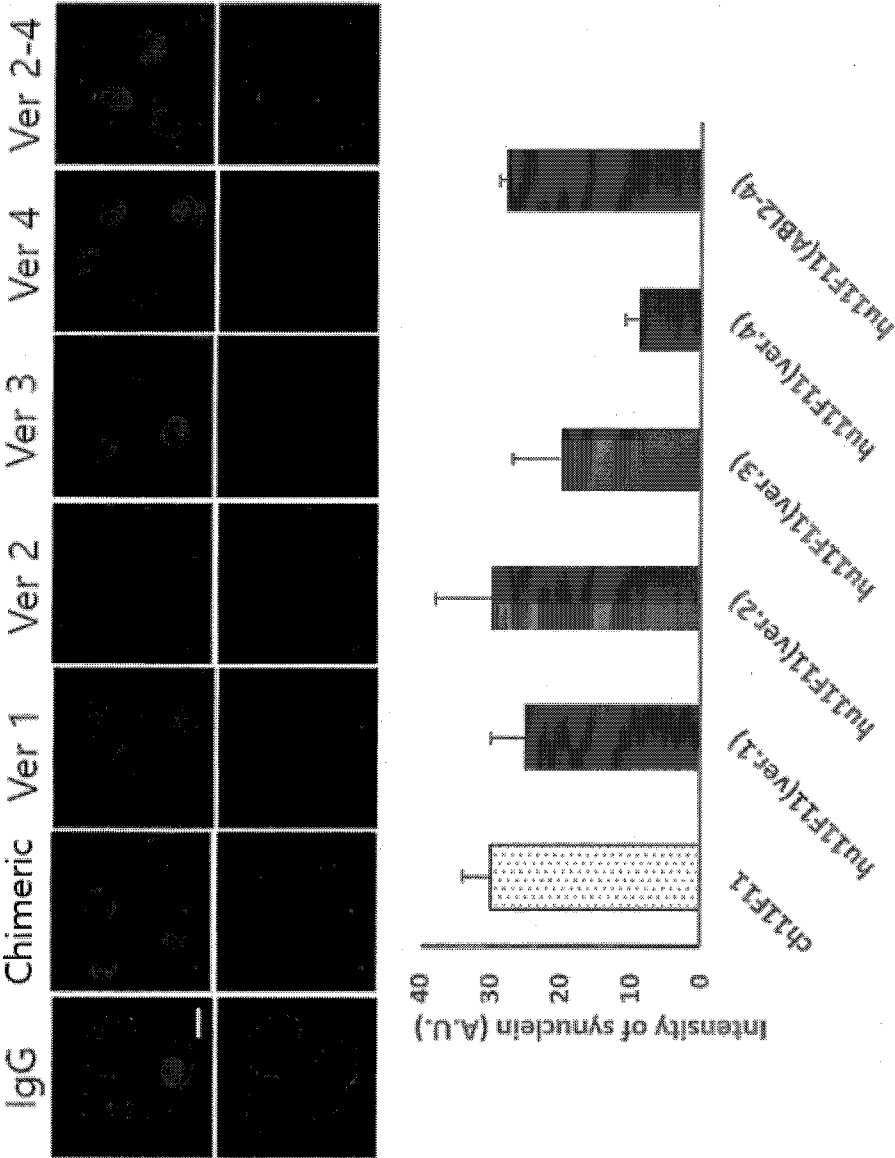
【도 10a】



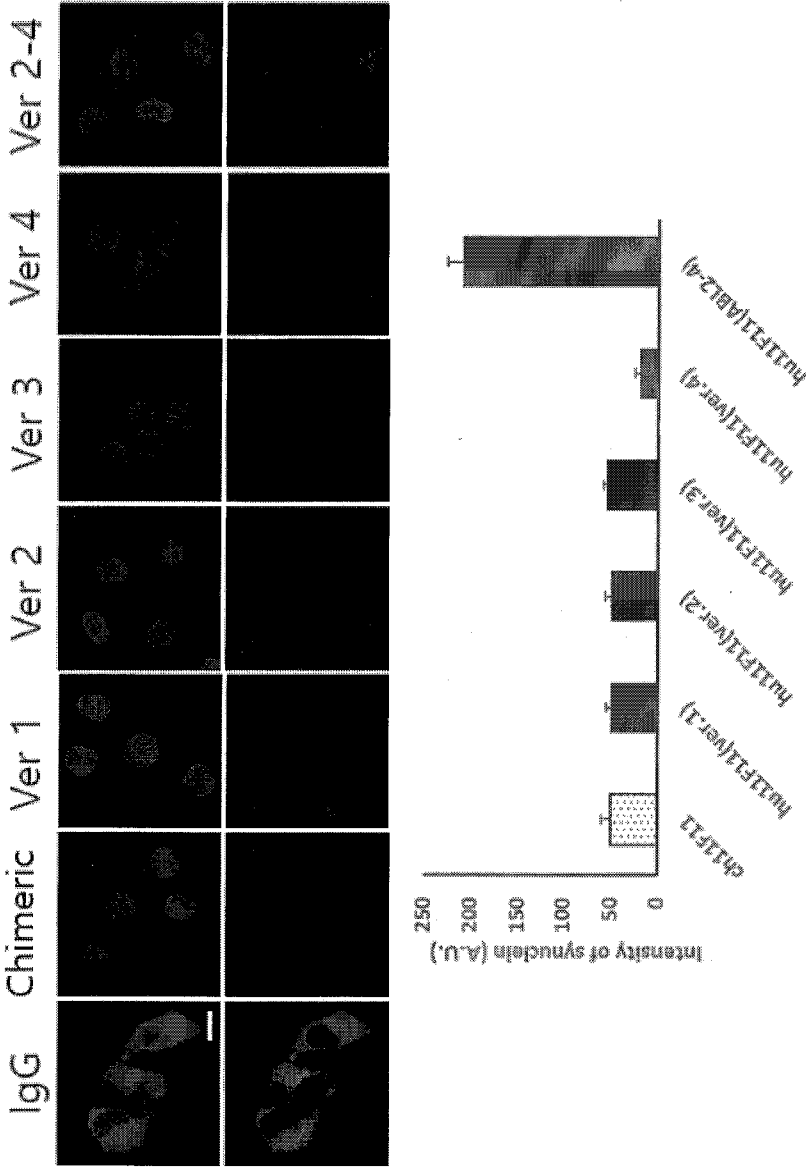
【도 10b】



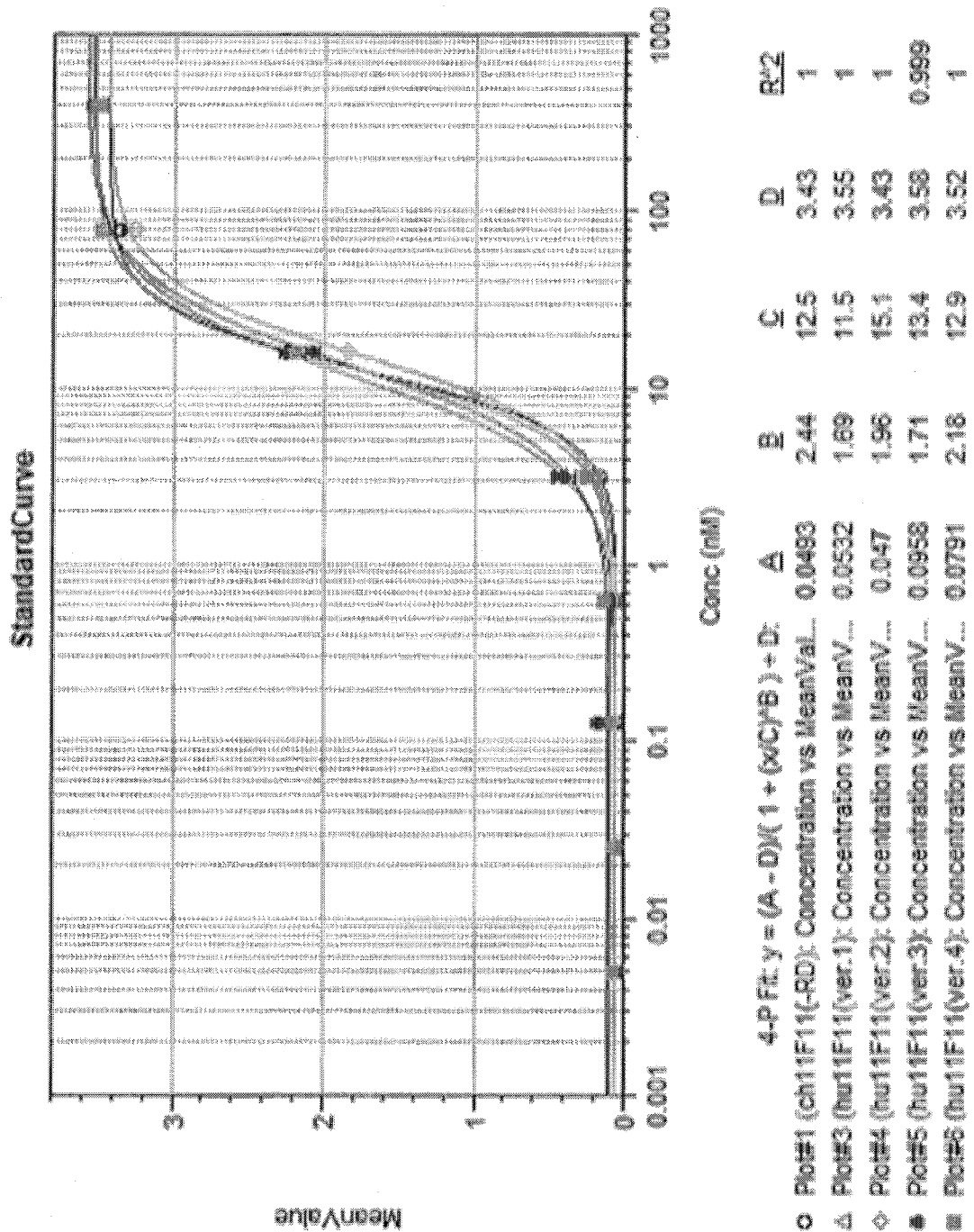
【표 11】



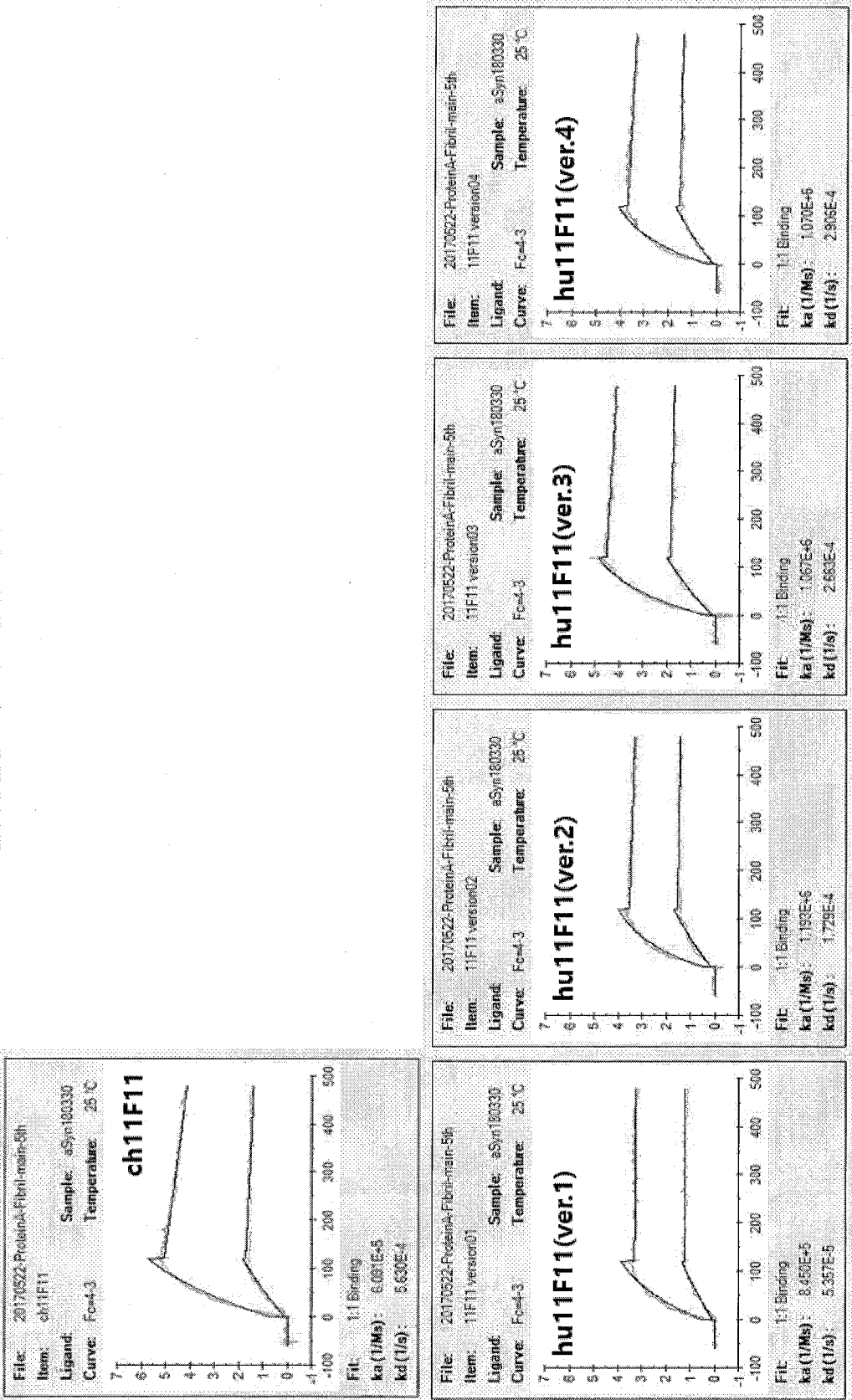
【도 12】



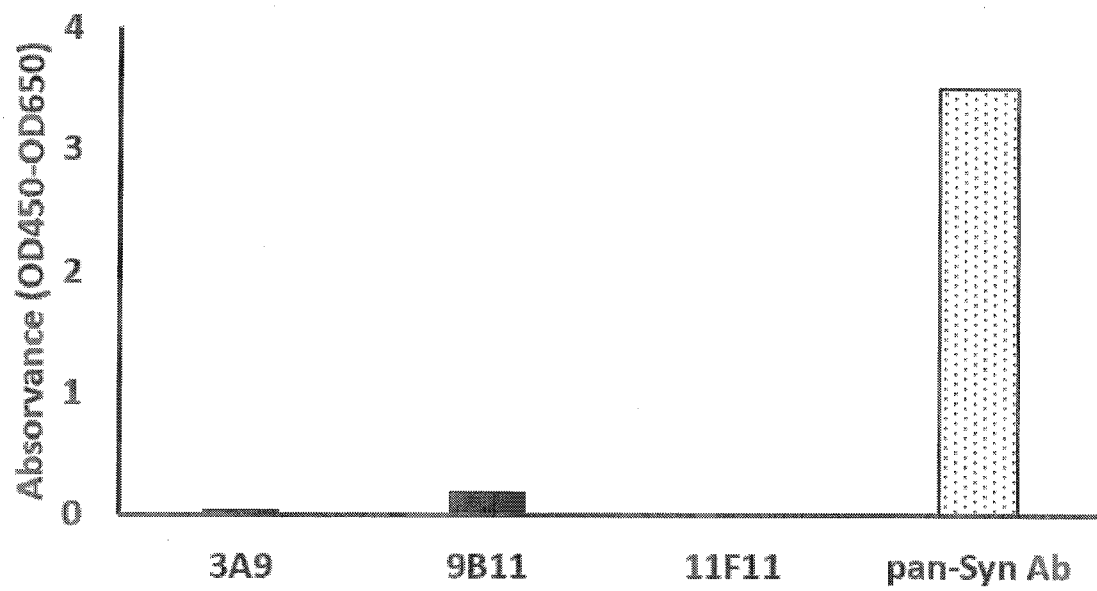
【도 13】



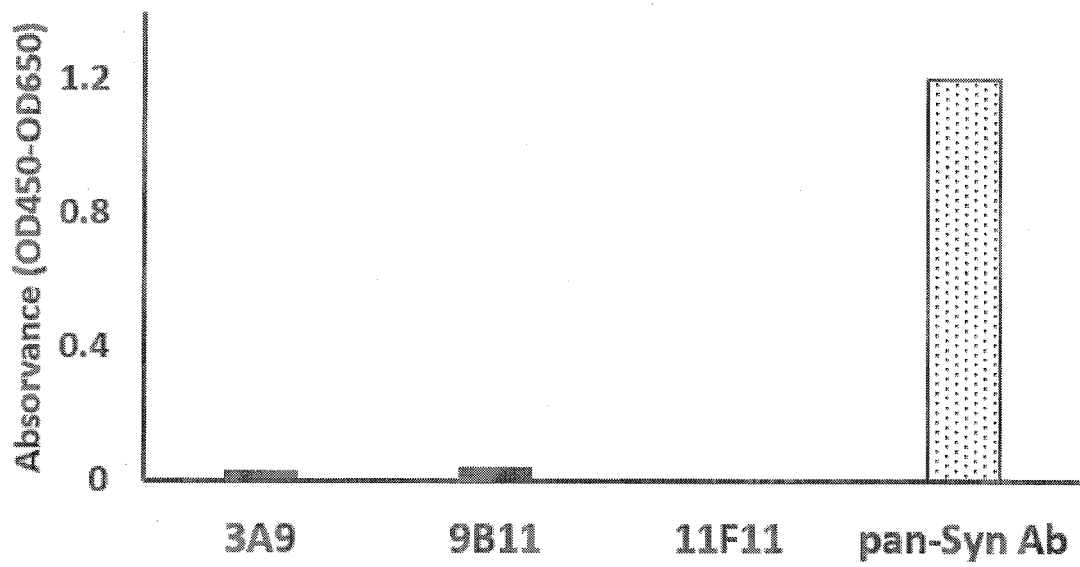
【도 14】



【도 15a】



【도 15b】



【도 15c】

