



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0078366
(43) 공개일자 2009년07월17일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7011537(분할)

(22) 출원일자 1998년11월30일

심사청구일자 2009년06월23일

(62) 원출원 특허 10-2000-7005913

원출원일자 2000년05월31일

심사청구일자 2003년11월29일

(85) 번역문제출일자 2009년06월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US1998/025386

(87) 국제공개번호 WO 1999/27944

국제공개일자 1999년06월10일

(30) 우선권주장

60/067,740 1997년12월02일 미국(US)

60/080,970 1998년04월07일 미국(US)

(71) 출원인

엘란 파마 인터내셔널 리미티드

아일랜드 카운티 웨스트미스 애슬론 몽크스랜드

(72) 발명자

셴크 데일 비

미국 캘리포니아 94010-5941 벨링에임 로스 알토
스 드라이브 1542

(74) 대리인

김성기, 김진희

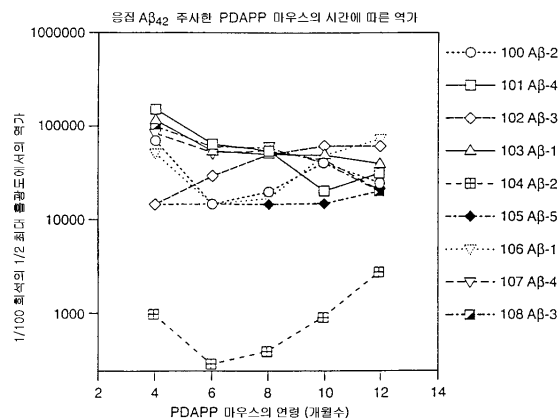
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 아밀로이드증 유발 질환의 예방 및 치료

(57) 요약

본 발명은 아밀로이드증 유발 질환의 치료를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 환자에게서의 아밀로이드 침적에 대한 이로운 면역 반응을 유발하는 체제를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 특히 알츠하이머 질환의 예방적 및 치료적 처치에 유용하다. 이러한 방법에서, 적절한 체제는 A β 펩티드 또는 이에 대한 항체이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

환자에게서 β -아밀로이드(A β)에 결합하여 면역반응을 유발하는 A β 에 대한 항체로서, 환자의 아밀로이드 침착물로 특징되는 질환의 예방 또는 치료용 항체 또는 이 항체의 분절 또는 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서, 모노클로날 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 인간화된 항체 또는 인간 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 이소타입이 인간 IgG1인 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 Fv 분절인 항체 또는 단일쇄 항체.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 해리(dissociated) 형태에 결합하지 않고, A β 펩티드의 응집(aggregated) 형태에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 응집 형태에 결합하지 않고, A β 펩티드의 해리 형태에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, A β 펩티드의 응집 형태 및 해리 형태 모두에 결합하는 항체.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 아밀로이드 침착물이 응집 A β 펩티드를 포함하는 항체.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 환자가 사람인 항체.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 질환이 알츠하이머 병인 항체.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 환자가 임의로 50세 이하의 무증후성 환자 및/또는 알츠하이머 질환에 대한 이환성(susceptibility)을 나타내는 유전적 위험 요소를 갖고 있는 항체.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 경구, 피하, 근육내, 국소 또는 정맥내 투여되는 항체.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 숙주 체중 Kg당 약 0.01 mg 내지 5 mg의 투여량으로 투여되는 항체.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 1차 면역화 후 6주 간격으로 추가 항원 자극 주사하거나, 또는 1차 면역화 후 1개월, 2개월 및 12개월후 추가 항원 자극 주사하거나, 또는 일생 동안 매 2개월 마다 주사하는 항체.

청구항 16

알츠하이머 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 제1항 내지 제8항 중 어느 하나에 기재된 항체를 환자에 투여하고, 환자로부터 채취한 시료에서 A β 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 검출하는 단계; 및

이 검출된 항체의 농도를 가지고 환자의 이후 치료 요법을 결정하는 단계를 포함하는, 환자의 알츠하이머 질환 또는 이 질환의 이환성을 시험관내 모니터링 하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제8항 중 어느 하나에 기재된 항체로 치료한 환자로부터의 조직 시료 중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체의 양을 수치로 측정하는 단계;

제1항 내지 제8항 중 어느 하나에 기재된 항체의 치료로 인한 알츠하이머 질환 징후의 개선을 경험하거나 또는 이 징후가 전혀 없는 환자의 모집단으로부터 측정한 대조값과 상기 수치를 비교하는 단계를 포함하며,

이때, 환자에게서의 수치가 대조값 이상인 경우 이 치료에 대한 양성반응을 나타내는 것인, 환자에게서의 알츠하이머 치료방법의 효율을 시험관내 평가하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 관련 출원에 대한 참조

<2> 본 출원은 본 명세서에서 참고로 인용하는 1997년 12월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 일련번호 제60/067,740호 및 1998년 4월 7일자로 출원된 미국 특허 출원 일련번호 제60/080,970호를 우선권 주장으로 하는 출원이다.

<3> 본 발명은 면역학 및 의학의 기술 분야에 관한 것이다.

배경기술

<4> 알츠하이머 질환(AD)은 노인성 치매로 악화되는 진행성 질환이다. 참조 문헌[Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy et al., W092/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff et al., Nature 373, 476-477 (1995); Games et al., Nature 373, 523 (1995)]. 이러한 질환은 크게 고령(65세 이상의 연령)에서 발병하는 말기 발병형 및 노년기 이전, 즉 35-60세에 주로 발병하는 초기 발병형의 2 가지의 범주로 나눌 수 있다. 이들 2 가지 유형의 질환에서 발병이 연령이 낮은 단계에서 시작되는 경우에는 병리학적인 병변은 동일하나, 이상(abnormality)이 더 심각하며 더 많이 퍼지게 된다. 이러한 질환은 2 가지 유형의 뇌 손상, 즉 노년반 및 신경원섬유 엉킴 등을 그 특징으로 한다. 노년반은 뇌조직 절편의 현미경 분석에 의해 식별할 수 있는 중앙에 세포외성 아밀로이드 침적물을 포함하는 150 μ m 이하의 조직봉괴된 신경섬유망 부위를 일컫는다. 신경원섬유 엉킴은 쌍을 이루어 서로 꼬여 있는 2 개의 필라멘트로 구성된 타우(tau) 단백질의 세포내성 침적물을 일컫는다.

<5> 이러한 플라크의 주성분은 A β 또는 β -아밀로이드 펩티드로 불리우는 펩티드이다. A β 펩티드는 아밀로이드 전구체 단백질(APP)로 불리우는 전구체 단백질의 39-43 아미노산의 내부 분절이다. APP 단백질내에서의 특정의 변이는 알츠하이머 질환의 존재와 상관 관계를 갖는다. 참조 문헌[Goate et al., Nature 349, 704 (1991) (발린⁷¹⁷ 내지 이소류신); Chartier Harlan et al., Nature 353, 844 (1991)) (발린⁷¹⁷ 내지 글리신); Murrell et al., Science 254, 97(1991) (발린⁷¹⁷ 내지 페닐알라닌); Mullan et al., Nature Genet. 1, 345 (1992) (리신⁵⁹⁵-메티오닌⁵⁹⁶에서 아스파라긴⁵⁹⁵-류신⁵⁹⁶으로 변화하는 이중 변이)]. 이러한 변이는 APP를 A β 로의 증가되거나

변형된 프로세싱, 특히 APP를 A β 의 증가된 함량의 장쇄형(즉, A β 1-42 및 A β 1-43)으로의 프로세싱에 의해 알츠하이머 질환을 유발하는 것으로 판단된다. 초로성(presenilin) 유전자, PS1 및 PS2와 같은 기타의 유전자에서의 변이는 증가된 양의 장쇄형 A β 를 생성하는 APP의 프로세싱 간접적으로 영향을 미치는 것으로 판단된다. 참조 문헌[Hardy, *TINS* 20, 154 (1997)]. 이러한 고찰은 A β , 특히 이의 장쇄형은 알츠하이머 질환의 원인이 되는 요소가 된다.

<6> McMichael의 EP 제526,511호에는 만성 AD 환자에게 동종요법 투여량(1일 10⁻² mg 이하)의 A β 를 투여하는 것이 제안되어 있다. 약 5 l의 혈장을 갖는 전형적인 사람의 경우, 상기 투여량의 상한치에서도 2 pg/ml 이하의 농도가 생성된다. 사람 혈장내의 A β 의 정상 농도는 통상적으로 50~200 pg/ml 이내가 된다. 참조 문헌[Seubert et al., *Nature* 359, 325-327 (1992)]. EP 제526,511호에서 제안된 투여량은 내인성 순환 A β 의 농도를 거의 변경시키지 못하며, EP 제526,511호는 아쥬반트의 사용을 제안하지도 않았기 때문에, 어떠한 치료상의 잇점을 얻을 수 있을지에 대해서도 신빙성을 주지 못한다.

<7> 반대로, 본 발명은 그 중에서도 환자의 이로운 면역 반응을 생성하는 상태에서 환자에게 A β 또는 기타의 면역 항원을 투여함으로써 알츠하이머 질환 또는 기타의 아밀로이드증 유발 질환의 치료에 관한 것이다. 그래서, 본 발명은 알츠하이머 질환의 신경병리학을 예방 또는 개량시키기 위한 치료학적 섭생에 대한 다년간의 수요를 충족시키고자 하는 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 제1의 특징으로서, 본 발명은 환자의 아밀로이드 침적을 그 특징으로 하는 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하고자 하는 것이다. 이러한 방법은 환자에서의 아밀로이드 침적의 펩티드 성분에 대한 면역 반응의 유발을 수반한다. 이러한 유발은 면역항원의 투여에 의해 능동형을 띌 수 있거나 또는, 항체 또는 항체의 활성 분절 또는 유도체의 투여에 의해 수동형이 될 수 있다. 특징의 환자에게서는, 아밀로이드 침적이 응집 A β 펩티드가 되며, 이러한 질환이 알츠하이머 질환이 된다. 특징의 방법에서는 환자가 무증후성이 된다. 특징의 방법에서는 환자의 연령이 50 세 이하가 된다. 특징의 방법에서 환자는 알츠하이머 질환에 대한 이환성을 나타내는 유전적 위험 요소를 지니고 있다. 이러한 위험 요소는 초로성 유전자 PS1 또는 PS2에서의 여러가지의 대립유전자 및 APP의 여러가지 형태를 포함한다. 기타의 방법에서는 환자는 알츠하이머 질환에 대한 기지의 위험 요소를 지니고 있지 않다.

<9> 알츠하이머 질환을 앓고 있는 환자의 치료의 경우, 치료 섭생은 면역 반응을 유발하도록 환자에게 A β 펩티드를 투여하는 것을 수반한다. 특징의 방법에 있어서, A β 펩티드를 아쥬반트와 함께 투여하여 A β 펩티드에 대한 면역 반응을 향상시킨다. 특징의 방법에서, 아쥬반트는 명반이다. 특징의 방법에서는 아쥬반트는 MPL이다. 환자에게 투여되는 A β 펩티드의 투여량은 아쥬반트와 함께 투여할 경우에는 통상적으로 1 또는 10 μ g 이상, 아쥬반트 없이 투여할 경우에는 50 μ g 이상이 된다. 특징의 방법에서 투여량은 100 μ g 이상이 된다.

<10> 특징의 방법에서, A β 펩티드는 A β 1-42이다. 특징의 방법에서, A β 펩티드는 응집 형태로 투여된다. 기타의 방법에서 A β 펩티드는 해리 형태로 투여된다. 특징의 방법에서, 치료제는 유효량의 A β , 이의 활성 분절 또는 이의 유도체를 암호화하는 핵산이 된다. A β 또는 이의 분절을 암호화하는 핵산은 환자에게서 형질발현되어 A β 또는 이의 활성 분절을 생성하도록 하며, 이는 면역 반응을 유발한다. 이와 같은 특징의 방법에서, 핵산은 피부를 통해, 임의로 패취에 의해 투여한다. 특징의 방법에서, A β 에 대한 항체와 반응성을 갖는 화합물을 식별하기 위한 화합물의 라이브러리를 스크리닝하여 치료제를 식별하고, 화합물을 환자에게 투여하여 면역 반응을 유발시킨다.

<11> 특징의 반응에서, 면역 반응은 해리된 A β 펩티드와는 관련없이 응집 A β 펩티드와 관련이 있다. 예를 들면, 면역 반응은 해리된 A β 펩티드에 결합하지 않고 응집 A β 펩티드에 결합하는 항체를 포함할 수도 있다. 특징의 방법에서, 면역 반응은 CD8 또는 CD4 세포상에서의 MHCII 또는 MCHI과 착체를 형성하는 A β 에 결합하는 T-세포를 포함한다. 기타의 방법에서는 A β 에 대한 항체를 환자에게 투여하여 면역 반응을 유발시킨다. 특징의 방법에서, 면역 반응은 환자로부터의 T-세포를 제거하고, T-세포가 초희항원자극을 받은 상태하에 A β 펩티드와 T-세포를 접촉시키며, 환자에서 T-세포를 교체함으로써 면역 반응이 유발된다.

<12> 치료제는 통상적으로 경구, 비강내, 피내, 피하, 근육내, 국소 또는 정맥내 투여된다. 특징의 방법에서, 환자를 모니터한 후, 면역 반응을 평가한다. 모니터링에 의해 시간 경과에 따른 면역 반응이 감소된 것으로 나타날 경우, 환자에게 1 회 이상의 제제의 추가 투여할 수 있다.

- <13> 또다른 특징에 의하면, 본 발명은 경구 및 기타의 투여 경로에 적합한 부형제 및 A β 를 포함하는 의약 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 환자에게서 A β 에 대한 면역 반응을 유발시키기에 충분한 양의 제제 및 의약적 허용 아주번트를 함유하는 의약 조성물을 제공하고자 한다. 이와 같은 특징의 조성물에서, 제제는 A β 또는 이의 활성 분절이다. 특징의 조성물에 있어서, 아주번트는 명반을 포함한다. 특징의 조성물에서, 아주번트는 수중유 에멀전을 포함한다. 특징의 조성물에서는, A β 또는 활성 분절은 폴리락티드 폴리글리콜리드 공중합체(PLPG) 성분 또는 기타의 입자이다. 본 발명은 추가로, 환자의 혈류에 A β 의 전달을 촉진하고 및/또는 A β 에 대한 면역 반응을 촉진하는 콘쥬게이트 분자에 결합된 A β 또는 활성 분절을 포함하는 조성물을 제공하고자 한다. 예를 들면, 콘쥬게이트는 A β 에 대한 면역 반응을 촉진하는 것으로 작용할 수 있다. 특징의 조성물에서, 콘쥬게이트는 콜레라 독소이다. 특징의 조성물에서, 콘쥬게이트는 면역글로불린이다. 특징의 조성물에서, 콘쥬게이트는 약독화된 디프테리아 독소 CRM 197이다. 참조 문헌[Gupta, Vaccine 15, 1341-3 (1997)].
- <14> 또한, 본 발명은 환자에게 A β 에 대한 면역원성 반응을 유발시키기에 충분한 양의 제제를 함유하되, 단 이 의약 조성물이 완전 프로인트 아주번트를 함유하지 않는 의약 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 A β 에 대한 면역 반응을 유발시키기에 유효한 A β 또는 이의 활성 분절을 암호화하는 바이러스 벡터를 함유하는 조성물을 제공하고자 한다. 바이러스 벡터의 적절한 예로는 헤르페스, 아데노바이러스, 아데노관련 바이러스, 레트로바이러스, 신드비스, 세미리키 포레스트 바이러스, 중두증 또는 조류 두진 등이 있다.
- <15> 본 발명은 또한 알츠하이머 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하고자 한다. 이와 같은 방법에서, 유효량의 A β 펩티드를 환자에게 투여한다. 또한, 본 발명은 알츠하이머 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 A β 펩티드 또는 이에 대한 항체를 제공하고자 하는 것이다.
- <16> 또다른 특징으로서, 본 발명은 환자에 있어서의 알츠하이머 질환의 치료 방법의 효능을 평가하는 방법을 제공하고자 한다. 이러한 방법에 있어서, A β 펩티드에 특이성을 갖는 항체의 기준 함량은 제제로 처치하기 이전 환자로부터의 조직 시료중에서 측정한다. 제제를 사용한 처치 후의 환자로부터의 조직 시료 중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체 양을 A β 펩티드 특이성 항체의 기준 함량과 비교한다. 치료후 측정된 A β 펩티드 특이성 항체의 양은 A β 펩티드 특이성 항체의 기준 함량보다 훨씬 높은 경우, 이는 양성의 처치 결과를 나타낸다.
- <17> 환자에게 있어서의 알츠하이머 질환의 치료 방법의 효능을 평가하는 기타의 방법에 있어서, 제제를 사용한 처치 이전에 환자로부터의 조직 시료 중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체의 기준 함량을 측정한다. 제제를 사용한 처치 이후에 검체로부터의 조직 시료 중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체 양을 A β 펩티드 특이성 항체의 기준 함량과 비교한다. 처치후 측정된 A β 펩티드 특이성 항체의 양과 A β 펩티드 특이성 항체의 기준량과 비교한 유의적 차이가 감소되거나 또는 차이가 없는 경우, 이는 음성의 처치 결과를 나타낸다.
- <18> 환자에서의 알츠하이머 질환 치료 방법의 효능을 평가하는 또다른 방법으로서, A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 대조량의 항체를 대조용 모집단으로부터의 조직 시료 중에서 측정한다. 제제의 투여후 환자로부터의 조직 시료 중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체의 함량을 A β 펩티드 특이성 항체의 대조량과 비교한다. 치료후 측정된 A β 펩티드 특이성 항체의 함량이 A β 펩티드 특이성 항체의 대조량보다 상당히 클 경우, 이는 양성의 치료 결과를 나타낸다.
- <19> 환자에게서의 알츠하이머 질환 치료 방법의 효능을 평가하기 위한 다른 방법에서, 대조용 모집단으로부터의 조직 시료중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체의 대조량을 측정한다. 제제를 투여한 후 환자로부터의 조직 시료 중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체의 함량을 A β 펩티드 특이성 항체의 대조량과 비교한다. 처치 개시후 측정된 A β 펩티드 특이성 항체의 함량과 A β 펩티드 특이성 항체의 대조량 사이의 유의적 차이가 없을 경우, 이는 음성의 치료 결과를 나타낸다.
- <20> 환자에게서의 알츠하이머 질환 또는 이에 대한 이환도를 모니터링하는 기타의 방법은 환자로부터의 시료 중의 A β 펩티드에 대한 면역 반응을 측정하는 것을 포함한다. 이러한 방법에 있어서, 환자에게 알츠하이머 질환을 치료 또는 예방하는데 유효한 제제를 투여하고, 반응도로서 환자의 추가의 처치 섭생을 결정한다.
- <21> 환자에서의 알츠하이머 질환의 치료 방법에서의 효능을 평가하는 기타의 방법에서, 제제를 사용하여 처치한 환자로부터의 조직 시료 중의 A β 펩티드에 대해 특이성을 갖는 항체 양에 대한 값을 측정한다. 이 값을 제제를 사용한 처치로 인해서 알츠하이머 질환의 징후가 개선된 것을 경험하거나 또는 이러한 징후가 전혀 없는 환자의 모집단으로부터 측정된 대조값과 비교한다. 환자에서의 이러한 값이 대조값 이상인 경우, 이는 처치에 대해 양성 반응임을 나타낸다.
- <22> 본 발명은 추가로 상기의 방법을 수행하기 위한 진단 키트를 제공하고자 한다. 이러한 키트는 통상적으로 A β 에

대한 항체에 특이적으로 결합하거나 또는 Aβ와 반응성을 갖는 T-세포의 증식을 촉진하는 제제를 포함한다.

과제 해결수단

<23> 용어 설명

<24> 용어 "실질적인 동일성"이라는 것은 디폴트(default) 간극 추를 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최초로 정렬시킬 경우 2 개의 펩티드 서열이 65% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 80% 또는 90% 이상의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성(예를 들면 99% 이상의 서열 동일성)을 공유한다. 서로 동일하지 않은 잔기 부위에는 보존 아미노산 치환에 의해 상이한 것이 바람직하다.

<25> 서열 비교의 경우, 하나의 서열은 테스트 서열을 비교하는 참고 서열로서 통상적으로 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 경우, 테스트 서열 및 참고 서열을 컴퓨터에 입력시키고, 필요할 경우 부분열(subsequence) 좌표를 지정한 후, 서열 알고리즘 프로그램 변수를 지정한다. 그후, 서열 비교 알고리즘을 지정된 프로그램 변수를 기준으로 하여 참고 서열을 기준으로 하여 테스트 서열(들)에 대한 서열 동일성 비율(%)을 계산하였다.

<26> 비교용 서열의 최적의 정렬은 참고 문헌[Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 참고 문헌[Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 참고 문헌[Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)]와 유사한 방법에 대한 조사에 의해, 이들 알고리즘[GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 위스컨신 지네틱스 소프트웨어 팩키지, 지네틱스 컴퓨터 그룹, 575 사이언스 Dr., 미국 위스컨신주 매디슨 소재]의 컴퓨터 수행에 의해 또는 육안 검사[Ausubel et al., *상동*]에 의해 수행될 수 있다. 서열 동일성 비율 및 서열 유사성을 측정하는데 있어서 적합한 알고리즘의 한 예로는 BLAST 알고리즘이 있는데, 이는 문헌[Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 인포메이션(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)으로부터 제공받을 수 있다. 주문형 변수들을 사용할 수도 있으나, 통상적으로, 디폴트 프로그램 변수를 사용하여 서열 비교를 수행한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램을 단어길이(W) 3, 기대값(E) 10을 디폴트로서 사용하고, BLOSUM62 스코어링 매트릭스를 사용한다. 참고 문헌[Henikoff & Henikoff, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989)].

<27> 보존물 또는 비보존물로서 아미노산 치환체를 분류하기 위해서, 아미노산을 그룹 I(소수성 측쇄): 노르류신, met, ala, val, leu, ile; 그룹 II(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV(염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 V(쇄 배향에 영향을 미치는 잔기): gly, pro 및 그룹 VI(방향족 측쇄): trp, tyr, phe로 분류한다. 보존성 치환물은 동일 분류에서의 아미노산 사이의 치환물을 포함한다. 비보존성 치환물은 이들 분류 중의 한 멤버를 다른 분류 중의 한 멤버와 교환하는 것으로 구성된다.

<28> 본 발명의 치료제는 통상적으로 거의 순수하다. 이는 곧 제제의 순도가 통상적으로 약 50% w/w(중량/중량) 이상일 뿐 아니라, 방해 단백질 및 오염물을 거의 포함하지 않는다는 것을 의미한다. 때때로, 제제는 그 순도가 약 80% w/w, 바람직하게는 90% w/w 이상 또는 약 95% w/w 이상이 된다. 그러나, 통상의 단백질 정제 기법을 사용하면 99% w/w 이상의 균질한 펩티드를 얻을 수 있다.

<29> 2 종의 독립체 사이의 특이성 결합이라는 것은 친화도가 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M⁻¹ 또는 10^{10} M⁻¹ 이상이라는 것을 의미한다. 친화도는 10^8 M⁻¹ 이상인 것이 바람직하다.

<30> 용어 "항체"라는 것은 무상해 항체 및 이의 결합 분절을 포함하는 것으로 사용된다. 통상적으로, 분절은 항원에 특이적으로 결합시키기 위해 유도되는 무상해 항체와 경쟁하게 된다. 임의로, 항체 또는 이의 결합 분절은 기타의 단백질을 갖는 융합 단백질과 화학적으로 콘주게이트를 형성하거나 또는 이러한 융합 단백질로서 형질발현될 수 있다.

<31> APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ 및 APP⁷⁷⁰ 각각은 사람의 APP 유전자에 의해 암호화된 695, 751 및 770 아미노산 잔기 장쇄 폴리펩티드를 일컫는다. 참고 문헌[Kang et al., *Nature* 325, 773 (1987); Ponte et al., *Nature* 331, 525 (1988); Kitaguchi et al., *Nature* 331, 530 (1988)]. 사람의 아밀로이드 전구체 단백질(APP)내의 아미노산은 APP770 이소 형태의 서열에 의해 숫자가 부여된다. Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 및 Aβ43은 아미노산 잔기 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 및 1-43을 함유하는 Aβ 펩티드를 의미한다.

<32> 용어 "에피토프" 또는 "항원성 결정인자"라는 것은 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원상에서의 부위를 의미한다. B-세포 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병렬배치된 인접하는 아미노산 또는 비인접 아미노산

모두로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매에 노출시 보유되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매를 사용한 처리시에 상실된다. 에피토프는 통상적으로 3 이상, 보다 통상적으로는 5 이상 또는 8~10의 아미노산이 독특한 공간 구조에 포함된다. 에피토프의 공간 구조를 측정하는 방법의 예로는 X-선 결정학 및 2차원적인 핵자기 공명 등이 있다. 참조 문헌 [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, 글렌 이. 모리스 편저 (1996)]. 동일한 에피토프를 인지하는 항체는 표적 항원에 기타의 항체를 결합시키는 것을 방해하는 하나의 항체의 능력을 나타내는 단순 면역분석법으로 확인할 수 있다. T-세포는 CD8 세포의 경우 약 9 종의 아미노산의 연속 에피토프를 인지하고, CD4 세포의 경우에는 약 13~15의 아미노산의 연속 에피토프를 인지한다. 에피토프를 인지하는 T 세포는 에피토프에 대해 반응하는 초회항원자극을 받은 T 세포에 의한 ³H-티미딘 혼입에 의해 측정된 바와 같이 항원 의존성 증식을 측정하는 시험관내 분석에 의해[참고 문헌: Burke et al., J. Inf. Dis. 170, 1110-19 (1994)], 항원의존성 사멸에 의해[참고 문헌: 세포독성 T 림프세포 분석, Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901-3910] 또는 시토킨 분비에 의해 식별될 수 있다.

<33> 용어 "면역학적" 또는 "면역" 반응은 수용체 환자에게서의 아밀로이드 펩티드에 대한 이로운 체액성(항체 매개된) 및/또는 세포성(항원 특이성 T 세포 또는 이의 분비 생성물 매개된) 반응의 전개를 의미한다. 이러한 반응은 면역항원의 투여에 의해 유발되는 능동 반응 또는, 항체 또는 초회항원자극을 받은 T-세포의 투여에 의해 야기된 수동 반응이 될 수 있다. 세포성 면역 반응은 유형 I 또는 유형 II MHC 분자와 결합하는 폴리펩티드 에피토프의 제시에 의해 도출되어 항원 특이성 CD4⁺ T 헬퍼 세포 및/또는 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 활성화시킨다. 또한, 반응은 단핵세포, 대식세포, NK 세포, 호염기체, 수상돌기 세포, 성상세포, 소신경세포, 호산구 또는 기타의 선천성 면역 성분의 활성화를 포함할 수 있다. 세포 개재된 면역학적 반응의 존재는 증식 분석(CD4⁺ T 세포) 또는 CTL(세포독성 T 림프세포) 분석에 의해 측정할 수 있다. 참고 문헌[Burke, 상동; Tigges, 상동]. 면역항원의 보호 또는 치료적 효능에 대한 체액성 반응 및 세포성 반응의 상대적 기여도는 면역화된 선천성 동물로부터의 IgG 및 T 세포를 각각 분리하고, 제2의 검체에서의 보호 또는 치료 효능을 측정함으로써 식별될 수 있다.

<34> "면역원성 제제" 또는 "면역항원"은 임의로 아쥬번트와 함께 환자에게 투여시 그 자체에 대한 면역학적 반응을 유발할 수 있는 능력을 의미한다.

<35> 용어 "네이키드(naked) 폴리뉴클레오티드"라는 것은 콜로이드성 물질과 착체를 형성하지 않는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 때때로, 네이키드 폴리뉴클레오티드는 플라스미드 벡터내에 클로닝된다.

<36> 용어 "아쥬번트"라는 것은 항원과 함께 투여시, 항원에 대한 면역 반응이 증가되지만, 단독으로 투여시에는 항원에 대한 면역반응을 생성하지 않는 화합물을 의미한다. 아쥬번트는 림프세포의 채용, B 및/또는 T 세포의 자극 및 대식세포의 자극 등의 여러가지 기전에 의해 면역반응을 증가시킬 수 있다.

<37> 용어 "환자"라는 것은 예방 또는 치료적 처치를 수용하는 사람 및 기타의 포유류 검체를 의미한다.

<38> 비응집성 또는 단량체성 Aβ는 Aβ의 가용성 단량체성 펩티드 단위를 의미한다. 단량체성 Aβ를 제조하는 한 방법은 초음파를 사용하여 니트 DMSO 중에 동결건조된 펩티드를 용해시키는 것이 있다. 생성된 용액을 원심분리하여 임의의 불용성 미립자를 제거하였다. 응집 Aβ는 단량체 단위가 비공유 결합에 의해 함께 결합된 올리고머의 혼합물을 의미한다.

<39> 1 종 이상의 인용된 성분을 "포함"하는 조성물 또는 방법은 특정하게 명기되지 않은 기타의 성분도 포함할 수 있다. 예를 들면, Aβ 펩티드를 포함하는 조성물은 커다란 폴리펩티드 서열의 성분으로서 유리된 Aβ 펩티드 및 Aβ 펩티드 모두를 포괄한다.

<40> 상세한 설명

<41> I. 총론

<42> 본 발명은 아밀로이드 침적물의 축적을 그 특징으로 하는 질환의 예방 및 치료적 처치를 위한 의약 조성물 및 이를 위한 방법을 제공하고자 한다. 아밀로이드 침적은 불용성 물질에 응집된 펩티드를 포함한다. 펩티드의 특성은 여러가지의 질환에 따라서 달라지기는 하나, 대부분의 경우에서 응집물은 β-병풍 구조를 지니며, 콩고 레드 염료로 염색된다. 아밀로이드 침적을 그 특징으로 하는 질환은 알츠하이머 질환(AD)이 있으며, 이 질환에는 말기 발병형 및 초기 발병형이 있다. 이들 양 유형에서, 아밀로이드 침적은 Aβ로 불리우는 펩티드를 포함하며, 이는 병에 걸린 환자의 뇌에 축적된다. 아밀로이드 침적을 그 특징으로 하는 특성의 기타의 질환의 예로는 광우병, 크로이트펠트-야콥병, 양의 스크라피 및 멍크의 해면양뇌증을 비롯한 해면 양뇌증, 다발성 골수종, 유전성

아이슬란드 증후군 및 SAA 아밀로이드증 등이 있다. 참고 문헌[Weissmann et al., *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 695-700 (1997); Smits et al., *Veterinary Quarterly* 19, 101-105 (1997); Nathanson et al., *Am. J. Epidemiol.* 145, 959-969 (1997)]. 이러한 질환에서의 응집물을 형성하는 펩티드는 처음 3 종에 대해서는 각각 혈청 아밀로이드 A, 시스테인 C, IgG 카파 경쇄, 나머지에 대해서는 프리온 단백질이다.

II. 치료제

1. 알츠하이머 질환

본 발명에 사용하기 위한 치료제는 A β 펩티드에 대한 면역 반응을 유발한다. 이러한 치료제의 예로는 A β 펩티드 자체, 이의 변형체, A β 펩티드에 대한 항체와 교차반응하는 및/또는 이를 유발하는 유사체 및 모사체, A β 펩티드와 반응성을 갖는 항체 또는 T-세포 등이 있다. 면역 반응의 유발은 면역항원 투여시 환자에게서 A β 와 반응성을 갖는 항체 또는 T-세포를 유발하는 경우 능동형이 되며, 항체의 투여시 환자에게서 그 자체가 A β 에 결합되는 경우 수동형이 된다.

A β , 또한, β -아밀로이드 펩티드로도 알려져 있는 것 또는 A4 펩티드[참조 문헌: 미국 특허 제4,666,829호; Glenner & Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1131 (1984)]는 39-43 아미노산의 펩티드이며, 이는 알츠하이머 질환의 특징적인 플라크의 주성분이 된다. A β 는 β 및 γ 세크레타제로 불리는 2 종의 효소에 의해 커다란 단백질 APP를 처리하여 생성된다. 참고 문헌[Hardy, *TINS* 20, 154(1997)]. 알츠하이머 질환과 관련한 APP에서의 기지의 변이는 β 및 γ 세크레타제의 부위에 근접하게 또는 A β 내에서 발생한다. 예를 들면, 717 위치는 A β 로의 프로세싱에 APP의 γ 세크레타제 분열 부위에 근접하게 되며, 670/671 위치는 β 세크레타제 분열 부위에 근접하게 된다. 변이는 생성된 A β 의 42/43 아미노산 형태의 양을 증가시키도록 A β 를 형성시키는 분열 반응과 상호 반응하여 AD 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다.

A β 는 전통적인 보체 다단계 및 교호 보체 다단계 모두를 정착 및 활성화시킬 수 있는 독특한 특성을 갖는다. 특히, 이는 C1q에 결합하며, 궁극적으로는 C3bi에 결합한다. 이러한 관계는 대식세포로의 결합을 촉진시켜 B 세포를 활성화시킨다. 또한, C3bi는 추가로 분해되어 이러한 세포의 활성화시에 10,000 증가시키는 방법에 따라서 T 세포내에서의 B 세포상의 CR2에 결합하게 된다. 이러한 기전으로 인해서, A β 는 기타의 항원의 면역 반응보다 과도하게 면역 반응을 일으키게 된다.

본 발명의 방법에 사용된 치료제는 임의의 천연 형태의 A β 펩티드, 특히 사람의 형태, 즉 A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 또는 A β 43이 될 수 있다. 이러한 펩티드의 서열 및 APP 전구체와의 관계는 참고 문헌[Hardy et al., *TINS* 20, 155-158 (1997)]의 도 1에 예시되어 있다. 예를 들면, A β 42는 서열 H₂N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH를 갖는다.

A β 41, A β 40 및 A β 39는 각각 C-말단 단부로부터 Ala, Ala-Ile 및 Ala-Ile-Val이 결실되어 있기 때문에 A β 42와는 상이하다. A β 43은 C-말단에서 트레오닌 잔기가 존재하기 때문에 A β 42와는 상이하다. 또한, 치료제는 사람에게 투여시 유사한 예방적 또는 치료적 면역 반응을 유발하는 에피토프를 함유하는 천연의 A β 펩티드의 활성 분절 또는 유사체가 될 수 있다. 면역원성 분절은 천연 펩티드로부터 적어도 3, 5, 6, 10 또는 20의 인접 아미노산 서열을 갖는 것이 통상적이다. 면역원성 분절의 예로는 A β 1-5, 1-6, 1-12, 13-28, 17-28, 25-25, 35-40 및 35-42 등이 있다. A β 의 N-말단 절반으로부터의 분절이 특정의 방법에서는 바람직하다. 유사체의 예로는 대립유전자, 중 및 유발된 변형체 등이 있다. 이러한 유사체는 통상적으로 종종 보존성 치환에 의해 하나의 부위 또는 특정의 부위에서의 천연의 펩티드와는 상이하다. 유사체는 통상적으로 천연 펩티드와 80 또는 80% 이상의 서열 동일성을 나타낸다. 또한, 이러한 유사체는 비천연 아미노산 또는 N 또는 C 말단 아미노산의 변형물을 포함한다. 비천연 아미노산의 예로는 α , α -이중 치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산, 4-히드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트, ϵ -N,N,N-트리메틸리신, ϵ -N-아세틸리신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-히드록시리신, ω -N-메틸아르기닌 등이 있다. 분절 및 유사체는 이하에서 기재한 바와 같이 돌연변이 동물 모델에서의 예방 또는 치료학적 효능에 대해 스크리닝할 수 있다.

A β , 이의 분절, 유사체 및 기타의 아밀로이드증 유발 펩티드는 고체상 펩티드 합성 또는 재조합 형질발현에 의해 합성될 수 있거나 또는 천연 공급원으로부터 얻을 수 있다. 지동 펩티드 합성물은 미국 캘리포니아주 포스터 시티에 소재하는 애플라이드 바이오시스템즈와 같은 다양한 공급업자로부터 시판된다. 재조합 형질발현은 이. 콜리, 효모, 곤충의 세포 및 포유동물의 세포와 같은 박테리아에 존재할 수 있다. 재조합 형질발현의 절차는 참고 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(C.S.H.P. 프레스, 뉴욕, 2판, 1989)].

또한, 특정 형태의 A β 펩티드도 또한 시판된다(예, 미국 캘리포니아주 서니베일에 소재하는 어메리칸 펩티즈 캄파니 및 미국 캘리포니아주 나파에 소재하는 캘리포니아 펩티드 리서치).

<51> 또한, 치료제는 예를 들면 A β 펩티드, 활성 분절 또는, 기타의 아미노산과의 유사체를 포함하는 장쇄 폴리펩티드 등이 있다. 예를 들면, A β 펩티드는 무상해 APP 단백질 또는 이의 분절, 예컨대 A β 의 N-말단에서 시작하여 APP의 말단까지 연속되는 C-100 분절로서 존재할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 전술한 바와 같은 동물 모델에서의 예방 또는 치료학적 효능에 대해 스크리닝할 수 있다. A β 펩티드, 유사체, 활성 분절 또는 기타의 폴리펩티드는 결합 형태(즉, 아밀로이드 펩티드로서)로서 또는 해리 형태로서 투여될 수 있다. 또한, 치료제는 단량체성 면역원성 제제의 다합체를 포함한다.

<52> 추가의 변형예에서, A β 와 같은 면역원성 펩티드는 바이러스 또는 박테리아 백신으로서 제시될 수 있다. 면역원성 펩티드를 암호화하는 핵산을 바이러스 또는 박테리아의 게놈 또는 에피솜에 혼입시킨다. 펩티드가 디스플레이 되도록 박테리아의 경막 단백질 또는 바이러스의 외표면 단백질을 갖는 융합 단백질을 갖는 융합 단백질로서 면역원성 펩티드가 형질발현되는 방식으로 핵산을 혼입한다. 이와 같은 방법에 사용된 바이러스 또는 박테리아는 비병원성이어야 하거나 또는 약독화되어야만 한다. 바이러스의 적절한 예로는 아데노바이러스, HSV, 중두증 및 조류 두진 등이 있다. HBV의 HBsAg에 대한 면역원성 펩티드의 융합이 특히 적절하다. 또한, 치료제는 A β 와는 유의적 아미노산 서열 유사성을 반드시 지닐 필요는 없으나, 그럼에도 불구하고 A β 의 모사체로서 작용하고 유사 면역 반응을 유발하는 기타의 화합물 및 펩티드를 포함한다. 예를 들면, β -병풍 구조를 형성하는 임의의 단백질 및 펩티드를 적합성(suitability)에 대해 스크리닝시킬 수도 있다. A β 또는 기타의 아밀로이드증 유발 펩티드에 대한 모노클로날 항체의 항-유전인자형(anti-idiotypic)도 또한 사용할 수 있다. 이러한 항-Id 항체는 항원을 모방하고, 이에 대한 면역 반응을 생성한다. 참고 문헌[*Essential Immunology*, Roit 편저, 블랙웰 사이언티픽 퍼블리케이션즈, 팔로 알토, 6판, 181 페이지].

<53> 또한, 펩티드 또는 기타의 화합물의 랜덤 라이브러리도 적합성에 대해 스크리닝할 수 있다. 단계적 방식으로 합성할 수 있는 많은 유형의 화합물에 대해서 조합형 라이브러리를 생성할 수 있다. 이러한 화합물의 예로는 폴리펩티드, 베타-베타-턴 유사체, 다당류, 인지질, 호르몬, 프로스타글란딘, 스테로이드, 방향족 화합물, 헤테로시클릭 화합물, 벤조디아제핀, 올리고머 N-치환된 글리신 및 올리고카르바메이트 등이 있다. 이러한 화합물의 커다란 조합형 라이브러리는 각각 본 명세서에서 참고로 인용하는 Affymax, W095/12608, Affymax, W093/06121, 컬럼비아 유니버시티, W094/08051, Pharmacopeia, W095/35503 및 Scripps, W095/30642에 기재된 암호화된 합성 라이브러리 (ESL) 기법에 의해 구조될 수 있다. 또한, 펩티드 라이브러리는 파아지 디스플레이 기법에 의해 생성될 수도 있다. 참고 문헌[Devlin, W091/18980].

<54> 조합형 라이브러리 및 기타의 화합물은 A β 또는 기타의 아밀로이드증 유발 펩티드에 대해 특이성을 갖는 것으로 알려진 림프세포(B 또는 T) 또는 항체에 결합하는 이의 능력을 측정함으로써 적합성에 대해 초기에 스크리닝한다. 예를 들면, 초기의 스크리닝은 A β 또는 기타의 아밀로이드증 유발 펩티드에 대한 임의의 폴리클로날 혈청 또는 모노클로날 항체를 사용하여 수행한다. 이러한 스크린에 의해 확인된 화합물은 추가로 A β 또는 기타의 아밀로이드증 유발 펩티드에 대한 반응성 림프세포 또는 항체를 유발하는 능력에 대해 추가로 분석한다. 예를 들면, 혈청의 다수의 희석은 A β 펩티드를 사용하여 예비 코팅시킨 미량역가 평판상에서 테스트할 수 있거나 또는 표준 ELISA를 A β 에 대한 반응성 항체에 대한 테스트를 수행할 수 있다. 그후, 실시예에 기재한 바와 같이 아밀로이드증 유발 질환에 걸리기 쉬운 돌연변이 동물에서의 예방 및 치료 효능에 대해 화합물을 테스트할 수 있다. 이러한 동물은 예를 들면 Games et al.의 문헌에 기재된 APP의 717 돌연변이를 갖는 마우스 및, McConlogue et al.의 미국 제5,612,486호 및 Hsiao et al.의 참고 문헌[*Science* 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt et al., *Neuron* 19, 939-945 (1997)]에 기재된 바와 같은 APP의 스웨덴 돌연변이 등이 있다. 동일한 스크리닝 접근 방식을 전술한 A β 의 분절, A β 의 유사체 및 A β 를 포함하는 장쇄 펩티드와 같은 기타의 포텐셜 제제에 사용할 수 있다.

<55> 또한, 본 발명의 치료제는 A β 에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 이러한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날이 될 수 있다. 이와 같은 항체는 해리 형태에 결합되지 않고 A β 의 응집 형태에 특이적으로 결합된다. 일부의 항체는 응집 형태에 결합되지 않고 해리 형태에 특이적으로 결합한다. 또다른 일부의 항체는 응집 형태 및 해리 형태 모두에 결합된다. 비-사람 모노클로날 항체, 예를 들면 쥐과 동물 또는 래트에서의 모노클로날 항체의 생성은 예를 들면 A β 를 사용하여 동물을 면역화시키므로써 수행한다. 본 명세서에서 참고로 인용하는 참고 문헌[Harlow & Lane, *Antibodies*, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988)]. 이러한 면역항원은 펩티드 합성 또는

재조합 형질발현에 의해 천연의 공급원으로부터 얻을 수 있다.

<56> 마우스 항체의 사람화된 형태는 재조합 DNA 기법에 의해 사람의 정상부에 대한 비-사람의 항체의 CDR 부위를 결합시키므로써 생성될 수 있다. 참고 문헌[Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033 (1989) 및 W090/07861(본 명세서에서 참고로 인용함)].

<57> 사람의 항체는 파아지-디스플레이 기법을 사용하여 얻을 수 있다. 참고 문헌[Dower et al., W091/17271; McCafferty et al., W092/01047]. 이러한 방법에서, 멤버가 이의 외표면상의 여러가지의 항체를 디스플레이하는 파아지의 라이브러리를 생성한다. 항체는 일반적으로 Fv 또는 Fab 분절로서 디스플레이된다. 소정의 특이성을 갖는 파아지 디스플레이 항체는 Aβ 또는 이의 분절의 친화도 강화에 의해 선택된다. 또한, Aβ에 대한 사람의 항체는 적어도 사람 면역 글로불린 유전자좌 및 불활성화된 내인성 면역글로불린 유전자좌를 암호화하는 돌연변이 유전자좌를 갖는 비-사람 돌연변이 포유동물로부터 생성될 수 있다. 참고 문헌[Lonberg et al., W093/12227 (1993); Kucherlapati, W091/10741 (1991)(각 문헌은 본 명세서에 참고로 인용함)]. 사람의 항체는 경쟁적 결합 실험에 의해 선택될 수 있거나 또는 특정 마우스 항체와 동일한 에피토프 특이성을 갖는 것으로 선택될 수도 있다. 이와 같은 항체는 특히 마우스 항체의 유용한 작용성 특성을 공유하는 것 같다. 사람의 폴리클로날 항체는 면역원성 제제를 사용하여 면역화된 사람으로부터의 혈청 형태로 제공될 수 있다. 임의로, 이와 같은 폴리클로날 항체는 친화도 제제로서 Aβ 또는 기타의 아밀로이드 펩티드를 사용하여 친화도 정제에 의해 농축될 수 있다.

<58> 사람 또는 사람화된 항체는 IgG, IgD, IgA 및 IgE 정상부 및, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 비롯한 임의의 아이소타입을 갖도록 디자인할 수 있다. 항체는 별도의 중쇄, 경쇄로서, Fab, Fab' F(ab')₂ 및 Fv로서 또는 중쇄 및 경쇄 가변성 도메인이 스페이서를 통해 결합되는 단일쇄 항체로서 2개의 경쇄 및 2 개의 중쇄를 함유하는 사합체로서 형질발현될 수 있다.

<59> 또한, 본 방법에 사용하기 위한 치료제의 예로는 Aβ 펩티드에 결합되는 T-세포를 포함한다. 예를 들면, T-세포는 곤충의 세포주로부터 사람의 MHC 유형 I 유전자 및 사람의 β-2-마이크로글로불린 유전자를 형질발현시키므로써 Aβ 펩티드에 대해서 활성화시키므로써 공(empty) 착체가 세포의 표면에 형성되며 Aβ 펩티드에 결합될 수 있다. 세포주와 접촉하게 되는 T-세포는 펩티드에 대해 특이적으로 활성화된다. 참고 문헌[Peterson et al., 미국 특허 제5,314,813호]. MHC 유형 II 항원을 형질발현시키는 곤충 세포주도 유사하게 CD4 T 세포를 활성화시키는데 사용할 수 있다.

<60> 2. 기타의 질환

<61> 동일하거나 또는 유사한 원리를 사용하여 기타의 아밀로이드증 유발 질환의 치료를 위한 치료제의 생성을 결정한다. 일반적으로, 알츠하이머 질환의 치료에 사용하기 위한 전술한 제제는 다운 증후군과 관련된 알츠하이머 질환의 초기 발병의 치료에 사용될 수 있다. 광우병의 경우에는, 알츠하이머 질환의 치료에서의 Aβ 펩티드, 활성 분절, 유사체, Aβ 펩티드에 대한 항체 대신에 프리온 펩티드, 활성 분절 및 유사체, 프리온 펩티드에 대한 항체를 사용한다. 다발성 골수종 치료의 경우, IgG 경쇄 및 유사체, 이에 대한 항체를 사용하며, 기타의 질환에도 사용한다.

<62> 3. 담체 단백질

<63> 면역 반응을 유발시키기 위한 특정의 제제는 아밀로이드 침적물에 대한 면역 반응을 유발시키기 위한 해당 에피토프를 함유하나, 이들은 너무 작아서 면역원성을 갖지 않는다. 이러한 상황에서, 펩티드 면역항원은 면역 반응이 도출되는 것을 돕기 위해 적절한 담체에 결합될 수 있다. 담체의 적절한 예로는 혈청 알부민, 키홀 림페트 헤모시아닌, 면역글로불린 분자, 티로글로불린, 난알부민, 파상풍 독소이드 또는, 기타의 병원성 박테리아, 예컨대 디프테리아, 이. 콜리, 콜레라 또는 에이치. 파이롤리 또는 약독화된 독소 유도체 등으로부터의 독소가 있다. 면역 반응을 자극 또는 향상시키기 위한 기타의 담체의 예로는 시토킨, 예컨대 IL-1, IL-1α 및 β 펩티드, IL-2, γ-INF, IL-10, GM-CSF 및 케모킨, 예컨대 MIP1α 및 β 및 RANTES 등이 있다. 또한, 면역원성 제제는 O'Mahony의 W097/17613 및 W097/17614에 기재된 바와 같이 조직을 통한 수송을 향상시키는 펩티드에 결합할 수 있다.

<64> 면역원성 제제는 화학적 가교 형성에 의해 담체에 결합될 수 있다. 담체에 면역항원을 결합시키는 기법은 예를 들면 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜-티오)프로피오네이트(SPDP) 및 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)를 사용한 이황화물 결합의 형성을 포함한다(펩티드가 설프히드릴기를 갖고 있지 않을 경우 시스테인 잔기의 첨가에 의해 제공될 수 있음). 이러한 제제는 자체의 이황화물 결합, 하나의 단백질 상에

서의 펩티드 시스템인 잔기 및 리신 상의 ϵ -아미노를 통한 아미드 결합 또는 기타의 아미노산내에서의 기타의 자유 아미노기를 생성한다. 이와 같은 다양한 이황화물/아미드 형성 제제는 참고 문헌[*Immun. Rev.* 62, 185 (1982)]에 기재되어 있다. 기타의 이중작용성 커플링제는 이황화물 결합보다는 티오에테르를 형성한다. 이들 티오-에테르 형성 제제의 다수는 시판되고 있으며, 이들의 예로는 6-말레이미도카프로산, 2-브로모아세트산 및 2-요오도아세트산, 4-(N-말레이미도-메틸)시클로헥산-1-카르복실산의 반응성 에스테르 등이 있다. 카르복실기는 이들을 숙신이미드 또는 1-히드록시-2-니트로-4-설폰산, 나트륨염과 혼합하므로써 활성화될 수 있다.

<65> 또한, 면역원성 펩티드는 담체와 단백질이 융합되는 것으로 형질발현될 수 있다. 면역원성 펩티드는 아미노 말단, 카르복실 말단에서 결합되거나 또는 담체의 내부에 결합될 수 있다. 임의로, 면역원성 펩티드의 다중 반복기는 융합 단백질내에 존재할 수 있다.

<66> 4. 면역항원을 암호화하는 핵산

<67> 또한, 아밀로이드 침착물에 대한 면역 반응은 A β 펩티드 또는 기타의 펩티드 면역항원을 암호화하는 핵산을 투여하여 유발시킬 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA가 될 수 있다. 면역항원을 암호화하는 핵산 분절은 통상적으로 프로모터 및 인핸서와 같은 조절 요소에 결합되며, 이는 환자의 의도하는 표적 세포내의 DNA 분절을 형질발현시킨다. 혈액 세포중에서의 형질발현의 경우, 면역 반응의 유발에 대하여 바람직한 바와 같이 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 유전자로부터의 프로모터 및 인핸서 요소, 또는 CMV 주요 중간체 초기 프로모터 및 인핸서가 직접적인 형질발현에 적합하다. 결합된 조절 요소 및 암호화 서열은 벡터로 종종 클로닝된다.

<68> 레트로바이러스계[참고 문헌: Lawrie 및 Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)]; 아데노바이러스 벡터[참고 문헌: Bett et al., *J. Virol.* 67, 5911 (1993)]; 아데노 결합된 바이러스 벡터[참고 문헌: Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)], 신드비스 및 세미리키 포레스트 바이러스로부터 유도된 것과 같은 알파 바이러스속으로부터의 중두증 바이러스 및 조류 두진 바이러스를 비롯한 두진 패밀리로부터의 바이러스 벡터[참고 문헌: Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)] 및 유두종바이러스[참고 문헌: Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., W094/12629 및 Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)]를 비롯한 다양한 바이러스 벡터계가 입수가능하다.

<69> 면역항원을 암호화하는 DNA 또는 이들 함유하는 벡터를 리포솜으로 포장할 수 있다. 적절한 지질 및 관련 유사체는 미국 특허 제5,208,036호, 제5,264,618호 및 제5,279,833호 및 제5,283,185호에 기재되어 있다. 또한, 면역항원을 암호화하는 DNA 및 벡터는 입상 담체에 흡착되거나 또는 이에 결합될 수 있으며, 이러한 것의 예로는 폴리메틸 메타크릴레이트 중합체 및 폴리락티드 및 폴리(락티드-코-글리콜리드) 등이 있다. 참조 문헌[McGee et al., *J. Micro Encap.* (1996)].

<70> 유전자 치료 벡터 또는 네이키드 DNA는 통상적으로 전신 투여(예, 정맥내, 복강내, 비강, 위, 피내, 근육내, 피부하, 두개내 주입) 또는 국소 투여(참고 문헌 미국 특허 제5,399,346호)에 의해 각각의 환자에게 투여하여 생체내 전달할 수 있다. 또한, DNA는 유전자 건(gun)을 사용하여 투여될 수도 있다. 참고 문헌[Xiao & Brandsma, 상동]. 면역항원을 암호화하는 DNA는 극미세 금속 비이드의 표면에 침전된다. 현미투영기를 팽창 헬륨 기체 또는 충격파로 가속화시키고, 조직을 수개 세포층의 두께로 통과시킨다. 예를 들면, 미국 위스컨신주 미들턴에 소재하는 아가세터스, 인코포레이티드에서 제조하는 AccelTM Gene Delivery Device가 적절하다. 또는, 네이키드 DNA를 피부상에서 화학적 또는 기계적 자극에 의해 단순히 스포팅시켜 피부를 통한 혈류로 네이키드 DNA를 통과시킨다[참고 문헌: W095/05853].

<71> 추가의 변형예에서, 면역항원을 암호화하는 벡터는, 예를 들면 각 개인으로부터 외식된 세포(예, 림프세포, 골수 흡인물, 조직 생검) 또는 보편공여자 조혈 간세포에 탈체식으로 전달한 후, 일반적으로 벡터에 혼입되는 세포에 대해 선택후 환자에게 세포를 재이식할 수 있다.

<72> III. 처치될 수 있는 환자

<73> 처치될 수 있는 환자는 현재 증후를 나타내고 있는 환자 뿐 아니라, 증후는 나타나고 있지 않더라도 질환의 위험을 안고 있는 개인 등이 포함된다. 알츠하이머 질환의 경우, 사실상, 모든 사람이 장수할 경우 이 병에 걸릴 위험성을 갖고 있다. 그러므로, 본 발명의 방법은 검체 환자의 위험성에 대한 어떠한 평가 없이도 일반적인 모집단에게 예방적으로 투여할 수 있다. 본 발명의 방법은 특히 알츠하이머 질환의 공지된 유전적 위험성을 갖고 있는 개개의 사람에게 특히 유용하다. 이러한 개개의 사람의 예로는 친척중에 이러한 질환을 경험한 적이 있는 사람, 유전적 또는 생화학적 마커의 분석에 의한 리스크를 갖고 있는 사람 등이 있다. 알츠하이머에 대한 리스크의 유전적 마커는 APP 유전자에서의 돌연변이, 특히 717 위치에서의 돌연변이, 각각 Hardy 및 스웨덴 돌연변이

이로서 불리우는 670 위치 및 671 위치에서의 돌연변이가 있다[Hardy, *TINS*, 상동]. 리스크에 대한 기타의 마커는 프레세닐린 유전자, PS1 및 PS2 및 ApoE4에서의 돌연변이, AD, 콜레스테롤과잉혈증 또는 아테롬경화증의 가계사 등이 있다. 현재 알츠하이머 질환을 앓고 있는 사람은 전술한 바와 같은 리스크 요소의 존재 뿐 아니라, 특징적인 치매로 인해서 이를 식별할 수 있다. 또한, AD를 앓고 있는 사람을 식별하기 위한 다수의 진단적 테스트도 입수가능하다. 이러한 것의 예로는 CSF 타우 및 A β 42 레벨의 측정을 포함한다. 증가된 타우 및 감소된 A β 42 레벨은 AD의 존재를 나타낸다. 또한, 알츠하이머 질환을 앓고 있는 개인은 실시예 부분에 기재되어 있는 바와 같은 MMSE 또는 ADRDA 기준에 의해 진단될 수 있다.

<74> 무증후성 환자의 경우, 어떠한 연령대(예, 10, 20, 30)에서도 처치를 개시할 수 있다. 그러나, 일반적으로, 환자의 연령이 40, 50, 60 또는 70에 이를 때까지 처치를 할 필요는 없다. 처치는 통상적으로 일정 시간에 걸쳐서 다수회의 투여를 수반한다. 이러한 처치는 시간 경과에 따른 치료제(예, A β 펩티드)에 대한 항체, 또는 활성화된 T-세포 또는 B-세포 반응을 분석하여 모니터링할 수 있다. 반응이 감소될 경우, 추가항원자극의 용량을 표시한다. 잠재적 다운 증후군 환자의 경우, 산모에게 치료제를 투여하여 출생전에 처치를 개시하거나 또는 출생 직후에 개시할 수도 있다.

<75> IV. 처치 섭생

<76> 예방적 차원에서, 의약 조성물 또는 투약물을 질환의 위험성을 배제시키거나 또는 감소시키거나 또는 발병을 지연시키는데 있어서 충분한량으로 특정 질환에 감염되기 쉬운 환자 또는 이러한 질환의 리스크를 갖는 환자에게 투여한다. 치료의 차원에서, 조성물 또는 투약물을 이러한 질환에 걸리기 쉬운 환자 또는 이미 앓고 있는 환자에게 질환의 징후 및 이의 합병증을 치유 또는 적어도 부분적으로 중지시키는데 있어서의 충분한량으로 투여한다. 이를 얻는데 있어서의 적량은 치료적으로 또는 의약적으로 효능이 있는 투여량으로서 정의된다. 예방 및 치료 섭생 모두에 있어서, 제제는 일반적으로 충분한 면역 반응이 얻어질 때까지 여러개의 투여량으로 투여한다. 통상적으로 면역 반응을 모니터링하고, 면역 반응이 감소되기 시작할 경우 반복된 용량을 투여한다.

<77> 전술한 조건의 처치에 대해 유효량의 본 발명의 조성물의 유효 투여량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리적 상태, 환자가 사람이나 동물이나의 여부, 투여되는 기타의 약물, 처치가 예방 또는 치료를 위한 것이냐 등의 여러가지의 다양한 요소에 의해 달라질 수 있다. 일반적으로 환자는 사람이나, 특정의 질환, 예컨대 광우병같은 경우에는 환자는 사람이 아닌 포유류, 예컨대 소가 될 수 있다. 처치량은 안전성 및 효능을 최적화하고자 역가를 측정하여야만 한다. 면역항원의 함량은 아쥘버트를 투여하느냐의 여부에 따라 결정되는데, 아쥘버트를 사용하지 않는 경우에는 보다 많은 양을 필요로 하게 된다. 때때로, 면역항원의 양은 환자 1인당 1 μ g~500 μ g, 통상적으로는 사람 투여의 경우 주사 1회당 5 μ g~500 μ g이 될 수 있다. 때로는, 주사 1회당 1~2 mg의 보다 많은 양을 사용한다. 통상적으로 각 사람의 주사에 사용하는 경우에는 약 10 μ g, 20 μ g, 50 μ g 또는 100 μ g을 사용한다. 투여 시간은 하루 1 회 내지는 1 년에 1 회 내지는 10 년에 1 회 정도로 다양하다. 면역항원 투여를 하는 해당 일에, 투여량은 아쥘버트를 투여하는 경우에는 환자 1인당 1 μ g보다 크고, 일반적으로는 10 μ g 보다 크며, 아쥘버트를 투여하지 않는 경우에는 환자 1인당 10 μ g 보다 크며, 일반적으로는 100 μ g보다 크다. 통상의 섭생은 면역화 이후, 6 주의 간격으로 추가항원자극 주사를 실시한다. 또다른 섭생은 면역화 이후, 1 개월, 2 개월, 12 개월 경과후 추가항원자극 주사를 실시한다. 또는 섭생은 일생 동안 매 2개월 마다 주사를 수반한다. 또는 추가항원자극 주사는 면역 반응의 모니터링에 의해 표시된 바와 같은 불규칙적인 기준하에 수행될 수 있다. 항체를 사용한 수동형 면역화의 경우, 투여량은 숙주 체중 1 kg당 약 0.0001~100 mg, 보다 일반적으로는 0.01~5 mg이 된다. 면역항원을 암호화하는 핵산의 투여량은 환자 1인당 약 10 ng~1 g, 100 ng~100 mg, 1 μ g~10 mg 또는 30~300 μ g의 DNA가 된다. 감염 바이러스 벡터에 대한 투여량은 투여 1회당 $10 \sim 10^9$ 또는 그 이상의 비리온이 될 수 있다.

<78> 면역 반응을 유발하는 제제는 예방 및/또는 치료적 처치를 위한 비경구, 국소, 정맥내, 경구, 피하, 복강내, 비강내 또는 근육내 수단에 의해 투여될 수 있다. 투여 경로는 모든 방법이 동일하게 효과적일 수도 있으나, 피하가 가장 통상적이다. 그 다음으로는 근육내 주사가 있다. 이러한 주사 유형은 팔 또는 다리 근육에 실시하는 것이 통상적이다. 정맥내 주사 뿐 아니라, 복강내 주사, 동맥내, 두개내 또는 피내 주사도 면역 반응을 생성하는데 있어서 효과적이다. 특정의 방법에서, 치료제는 침적물이 축적되어 있는 특정의 조직으로 직접 주사한다.

<79> 본 발명의 제제는 임의로 아밀로이드증 유발 질환의 처치에 부분적으로 유효한 기타의 제제와의 조합물로서 투여될 수 있다. 알츠하이머 및 다운 증후군의 경우, 이들 증후군은 아밀로이드 침적이 뇌에 발생하는 것으로서, 본 발명의 제제의 혈액-뇌 장벽의 통과가 증가되는 기타의 제제와 함께 투여될 수 있다.

<80> 본 발명의 면역항원 제제, 예컨대 펩티드는 때때로 아쥘버트와 함께 투여된다. 면역 반응을 얻기 위해 다양한

아주번트를 펩티드, 예컨대 A β 와 함께 사용할 수 있다. 아주번트는 반응의 정성적인 형태에 영향을 미치는 면역항원의 입체배와 변화를 일으키지 않으면서 면역항원에 대한 고유의 반응을 증가시키는 것이 바람직하다. 바람직한 아주번트의 예로는 명반, 3 De-O-아실화 모노포스포릴 지질 A(MPL)(GB 제2,220,211호) 등이 있다. QS21은 남아메리카에서 발견되는 *Quillaja Saponaria Molina* 나무의 수피로부터 분리한 사포닌 또는 트리테르펜 글리코사이드이다[참조 문헌: Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Ajuvant Approach* (포웰 및 뉴먼 편저), 플레넘 프레스, 뉴욕, 1995; 미국 특허 제5,057,540호]. 기타의 아주번트의 예로는 모노포스포릴 지질 A와 같은 면역 자극물과 임의로 혼합된 수중유 에멀전(예, 스쿠알렌 또는 낙화생유) 등이 있다[참조 문헌: Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)]. 또다른 아주번트는 CpG이다[Bioworld Today, 1998년 11월 15일]. 또는, A β 는 아주번트에 결합될 수 있다. 예를 들면, 참고 문헌[Livingston, J. *Immunol.* 159, 1383-1392 (1997)]에 B형 간염 항원 접종에 대해 기재된 바와 같이, 팔미트산 또는 기타의 지질을 A β 의 N-말단에 직접 커플링시키므로써 A β 의 리포펩티드 변형물을 제조할 수 있다. 그러나, 이러한 커플링은 이에 대한 면역 반응의 특성에 영향을 주도록 A β 의 입체배를 거의 변형시키지 않아야 한다. 아주번트는 활성제와 함께 치료 조성물의 성분으로서 투여할 수 있거나 또는 치료제의 투여와 별도로, 투여 이전에, 투여와 동시에 또는 투여 후 아주번트를 투여할 수 있다.

<81> 아주번트의 바람직한 유형으로는 알루미늄염(명반), 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄 등이 있다. 이러한 아주번트는 MPL 또는 3-DMP, QS21과 같은 기타의 특이성 면역 자극제 또는 폴리글루탐산 또는 폴리리신과 같은 중합체 또는 단량체 아미노산과 함께 사용하거나 또는 아주번트만을 사용할 수도 있다. 기타 유형의 아주번트는 수중유 에멀전 제제이다. 이러한 아주번트는 기타의 특이성 면역 자극제, 예컨대 무라밀 펩티드(예, N-아세틸무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(nor-MDP), N-아세틸무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민-L-알라닌-2-(1',2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)에틸아민(MTP-PE), N-아세틸글루크사미닐-N-아세틸무라밀-L-Ala-D-이소글루-L-Ala-디팔미톡시 프로필아미드(DTP-DPP) 테르아미드TM) 또는 기타의 박테리아 세포벽 성분과 함께 사용하거나 또는 아주번트만을 사용할 수도 있다. 수중유 에멀전으로는 (a) Model 110Y 미세유동화기(미국 매사추세츠주 뉴턴에 소재하는 마이크로플루이딕스 시판)와 같은 미세유동화기를 사용하여 마이크론 단위 이하의 크기를 갖는 입자로 제제화시킨, 스쿠알렌 5%, Tween 80 0.5%, Span 85 0.5%(임의로 다양한 함량의 MTP-PE 함유)를 함유하는 MF59 (W090/14837), (b) 입자 크기가 더 큰 에멀전을 생성하기 위해 와동 처리하거나 또는 마이크론 단위 이하의 크기를 갖는 에멀전으로 미세유동화시킨 Squalene 10%, Tween 80 0.4%, 플루론-블록킹 중합체 L121 5% 및 thr-MDP를 함유하는 SAF 및 (c) 모노포스포릴지질 A(MPL), 트레할로즈 디미콜레이트(TDM) 및 세포벽 골격(CWS)으로 구성된 군으로부터의, 바람직하게는 MPL+CWS(DetoxTM)의 1 종 이상의 박테리아 세포벽 성분, Squalene 2% 및 Tween 80 0.2%를 함유하는 RibiTM 아주번트계(RAS)(미국 매사추세츠주 해밀턴에 소재하는 리비 이뮤노캡 시판)등이 있다. 바람직한 아주번트의 기타의 유형으로는 사포닌 아주번트, 예컨대 StimulonTM (QS21, 미국 매사추세츠주 위세스터에 소재하는 아킬라에서 시판) 또는 이로부터 생성된 입자, 예컨대 ISCOM(면역 자극 착체) 및 ISCOMATRIX 등이 있다. 기타의 아주번트로는 완전 프로인트 아주번트(CFA) 및 불완전 프로인트 아주번트(IFA)등이 있다. 기타의 아주번트로는 시토킨, 예컨대 인터류킨(IL-1, IL-2 및 IL-12), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF) 등이 있다.

<82> 아주번트는 단일 조성으로서 면역항원과 함께 투여할 수 있거나, 면역항원의 투여 이전, 투여와 동시에 또는 투여 이후 아주번트를 투여할 수도 있다. 면역항원 및 아주번트는 동일한 바이알내에 포장되어 공급될 수 있거나 또는 별도의 바이알내에 포장되어 사용 직전에 혼합할 수도 있다. 면역항원 및 아주번트는 통상적으로 포장시 의도하는 치료 용도를 표시한 라벨을 부착한다. 면역항원 및 아주번트를 별도로 포장하고자 하는 경우, 포장에는 통상적으로 사용 직전에 혼합하라는 지시사항을 표기한다. 아주번트 및/또는 담체의 선택은 아주번트 함유 백신의 안정도, 투여 경로, 투여 일정, 접종하고자 하는 종에 대한 아주번트의 효능 및 사람의 경우 의약적 허용 아주번트가 이미 승인된 것이냐 또는 해당 규제 단체에 의해 사람 투여에 대해서 승인 가능성이 있느냐에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 완전 프로인트 아주번트는 사람 투여용으로는 적절치 않다. 명반, MPL 및 QS21이 바람직하다. 임의로, 2 종 이상의 상이한 아주번트를 동시에 사용할 수도 있다. 바람직한 조합물로는 명반과 MPL, 명반과 QS21, MPL과 QS21, 명반, QS21 및 MPL의 조합 등이 있다. 또한, 명반, QS21 및 MPL 중 임의의 것 및 이들의 조합물과 함께 불완전 프로인트 아주번트를 사용할 수도 있다. 참고 문헌[Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)].

<83> 본 발명의 제제는 활성 치료제 및 다양한 기타의 의약적 허용 성분을 포함하는 의약 조성물로서 투여된다. 참고

문헌[Reminton's Pharmaceutical Science, 15 판, 맥 퍼블리싱 캄파니, 미국 펜실베이니아주 이스턴 소재, 1980]. 바람직한 제형은 의도하는 투여 형태 및 치료적 용도에 따라 다르게 된다. 또한, 조성물은 의도하는 제제에 따라서 의약적 허용 비독성 담체 또는 희석제를 포함할 수 있으며, 이는 동물 또는 사람의 투여를 위한 의약 조성물을 제제하기 위해 통상적으로 사용되는 부형제로서 정의된다. 희석제는 조합물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택한다. 이러한 희석제의 예로는 증류수, 생리적 인산염 완충 염수, 링거액, 텍스트로즈 용액 및 행크스 용액 등이 있다. 또한, 의약 조성물 또는 제제는 기타의 담체, 아쥘론 또는 비독성, 비치료적, 비면역원성 안정화제 등을 포함할 수도 있다. 그러나, 동물 투여에 적합한 특성의 제제, 예컨대 프로인트 아쥘론은 통상적으로 사람에게 사용하기 위한 조성물에는 사용하지 않는다.

<84> 또한, 약학적 조성물은 크기가 크고 느리게 대사되는 고분자물, 예컨대 단백질, 다당류, 폴리락타산, 폴리글리콜산 및 공중합체(예, 라텍스 작용화 세파로즈, 아가로스, 셀룰로즈 등), 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체 및 지질 응집물(예, 오일 소적 또는 리포솜) 등을 포함할 수도 있다. 또한, 이러한 담체는 면역 자극제(예, 아쥘론)로서 작용할 수도 있다.

<85> 비경구 투여의 경우, 본 발명의 제제는 무균액, 예컨대, 워터 오일, 염수, 글리세롤 또는 에탄올이 될 수 있는 의약적 담체와 생리적 허용가능한 희석제 중의 물질의 용제 또는 현탁제의 주사가능한 용량으로 투여될 수 있다. 또한, 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등이 조성물 중에 존재할 수도 있다. 의약 조성물의 기타의 성분으로는, 석유, 동물성 오일, 식물성 오일, 또는 합성 오일, 예컨대 낙화생유, 대두유, 및 광유 등이 있다. 일반적으로, 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 바람직한 액상 담체이며, 특히 주사용 용제로서 바람직하다.

<86> 조성물은 통상적으로 액상 용제 또는 현탁제 등의 주사제로서 제조되거나 또는 주사 이전에 액상 부형제 중의 용제 또는 현탁제에 적합한 고형 제형으로서 제조될 수 있다. 또한, 제제는 전술한 바와 같이 폴리락티드, 폴리글리콜리드 또는 향상된 아쥘론 효능을 위한 공중합체로서의 리포솜 또는 미립자내에 캡슐화되거나 또는 유화될 수도 있다. 참고 문헌[Langer, Science 249, 1527 (1990) 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)]. 본 발명의 제제는 활성 성분의 서방형 또는 박동형 방출이 가능하도록 하는 방식으로 제제화될 수 있는 저장 주사 또는 이식물 제제의 형태로 투여될 수 있다.

<87> 기타 유형의 투여에 적절한 추가의 제제의 예로는 경구, 비강내 및 폐를 위한 제제, 좌약 및 경피용 등이 있다.

<88> 좌약의 경우, 결합제 및 담체의 예로는 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세리드 등이 있으며, 이러한 좌약은 0.5~10%, 바람직하게는 1~2% 범위내로 활성 성분을 함유하는 혼합물로 형성될 수 있다. 경구 제제의 예로는 부형제, 예컨대 의약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로즈 및 탄산마그네슘을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 용제, 현탁제, 정제, 환제, 캡슐, 서방형 제제 또는 분말의 형태로 섭취될 수 있으며, 활성 성분을 10~95%, 바람직하게는 25~70%를 함유한다.

<89> 국소투여용으로는 경피 또는 피내 전달이 있다. 국소 투여는 콜레라 독소 또는 해독된 유도체 또는 이의 서브유닛 또는 기타 유사한 박테리아 독소 등과 제제를 동시 투여함으로써 촉진될 수 있다. 참고 문헌[Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)]. 동시 투여는 융합 단백질로서의 형질발현 또는 화학적 가교에 의해 얻는 결합된 분자로서 또는 혼합물로서 성분을 사용하여 얻을 수 있다.

<90> 또한, 경피 전달은 피부용 패치를 사용하거나 또는 트랜스페로솜을 사용하여 이루어질 수 있다. 참고 문헌[Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)].

<91> V. 진단 방법

<92> 본 발명은 알츠하이머 질환을 앓고 있거나 또는 이 질환에 걸리기 쉬운 환자에게서의 A β 펩티드에 대한 면역 반응을 검출하는 방법을 제공하고자 한다. 이 방법은 환자에게 투여되는 처치 경로를 모니터링하기에 특히 유용하다. 이러한 방법을 사용하여 증상이 있는 환자에게서의 치료를 위한 처치 및 무증후의 환자에게서의 예방을 위한 처치 모두를 모니터링하는데 사용될 수 있다.

<93> 특성의 방법은 투여량의 제제를 투여하기 이전에 환자에게서의 면역 반응의 기준값을 측정하고, 이를 처치후의 면역 반응에 대한 값과 비교하는 것으로 이루어진다. 면역 반응에 대한 값에서의 유의적 증가(예, 이러한 측정의 평균값으로부터의 표준 편차로서 나타내는, 동일 시료의 반복된 측정에서의 실험 오차의 통상의 한계치보다 큰 경우)는 양성의 처치 결과를 나타낸다(즉, 제제의 투여가 면역 반응을 이루거나 또는 이를 증가시킴). 면역 반응에 대한 값이 유의적으로 변화되지 않거나 또는 감소되었을 경우, 음성의 처치 결과를 나타낸다. 일반적으로, 제제를 사용한 처치의 초기 경로를 경험한 환자는 연속적인 투여량을 사용한 면역 반응을 증가시키는 것으

로 나타났으며, 결국에는 평탄부에 이르게 된다. 일반적으로 제제의 투여를 지속시키면 면역반응이 증가하게 된다. 평탄부에 도달한 것은 투여 처치가 단속되거나 또는, 투여량 또는 횟수에 있어서 감소되었을 수도 있다는 것을 나타낸다.

<94> 기타의 방법에서, 면역 반응의 대조값(즉, 평균값 및 표준 편차)은 대조용 모집단에 대해 측정한다. 통상적으로, 대조용 모집단에서의 개개인은 처치 이전에는 수용되지 않는다. 치료제를 투여한 후 환자에게서의 면역 반응의 측정값을 대조값과 비교한다. 대조값에 비해서 유의적으로 증가된 것은(즉, 평균으로부터의 표준 편차보다도 큰 경우)는 양성의 처치 결과를 나타낸다. 유의적 증가 또는 감소가 없는 경우에는 음성의 처치 결과를 나타낸다. 일반적으로 제제의 투여를 지속시키면 면역반응이 대조값에 비해서 증가하게 된다. 전술한 바와 같이, 대조값에 비해서 평탄부에 도달한 것은 투여 처치가 단속되거나 또는, 투여량 또는 횟수에 있어서 감소되었을 수도 있다는 것을 나타낸다.

<95> 기타의 방법에서, 면역 반응의 대조값(예, 평균 및 표준 편차)을 치료제를 사용하여 처치한 사람과, 면역 반응이 처치에 대한 반응에 있어서 평탄부를 이룬 사람 개개인의 대조용 모집단으로부터 측정한다. 환자에 있어서의 면역 반응의 측정치를 대조값과 비교한다. 환자에게 있어서의 측정치가 대조값과 유의적으로 상이하지 않을 경우(즉, 표준 편차 이상일 경우), 처치를 단속시킬 수 있다. 환자에게서의 반응이 대조값보다 유의적으로 낮은 경우, 이는 제제의 지속적 투여를 입증하는 것이다. 환자에서의 반응이 대조값보다 지속적으로 낮은 경우, 처치 섭생 변화, 예를 들면 다양한 아주벤트를 사용하였다는 것을 나타낼 수도 있다.

<96> 기타의 방법에서, 현재는 처치를 수용하고 있지는 않으나, 이전의 처치 경로를 경험한 환자에 대해 처치의 재개가 필요한지의 여부에 대해 결정하기 위해 면역 반응에 대해 모니터링한다. 환자에 있어서의 면역 반응의 측정치를 이전의 처치 경로 이후의 환자에게서 이미 형성된 면역 반응의 값과 비교할 수도 있다. 이전의 측정치에 비해서 유의적으로 감소된 것(즉, 동일한 시료의 반복된 측정에서의 오차의 통상적인 한계치 보다 큰 경우)은 처치가 재개될 수도 있다는 것을 의미한다. 또는, 환자에게서 측정한 값이 처치 경로를 경험한 후의 환자의 모집단에서 측정한 대조값(평균값+표준 편차)과 비교할 수도 있다. 또는, 환자에게서의 측정값을 질환의 징후를 보이지 않는, 예방을 위해 처치된 환자의 모집단에서, 또는 질환의 특성이 개선된 것으로 나타난, 치료를 위해 처치된 환자의 모집단에서의 대조값과 비교할 수도 있다. 이러한 모든 경우에 있어서, 대조값에 비해 유의적 감소된 것(즉, 표준 편차보다 큰 경우)은 환자에게 처치가 재개되어야만 한다는 것을 나타낸다.

<97> 분석용 조직 시료는 통상적으로 환자로부터의 혈액, 혈장, 혈청, 점액 또는 대변 척수액이 된다. 시료는 Aβ 펩티드의 임의의 형태, 통상적으로 Aβ 42로 면역 반응의 지시물에 대해 분석한다. 면역 반응은 예컨대 Aβ 펩티드에 특이적으로 결합되는 T-세포 또는 항체의 존재로부터 측정될 수 있다. Aβ에 대해 특이적인 항체를 검출하는 ELISA 기법은 실시예 부문에 기재되어 있다. 반응성 T-세포를 검출하는 방법은 전술하였다(정의 부문 참조).

<98> 추가로, 본 발명은 전술한 진단 방법을 수행하기 위한 진단 키트를 제공하고자 한다. 통상적으로, 이러한 키트는 Aβ에 대한 항체에 특이적으로 결합하거나 또는 Aβ에 대해 특이성을 갖는 T-세포와 반응하는 제제를 함유한다. 또한, 키트는 표지를 포함할 수 있다. Aβ에 대한 항체의 검출의 경우, 표지는 통상적으로 표지된 항유전형 항체의 형태가 된다. 항체의 검출의 경우, 제제는 고정 페이스, 예컨대 미량역가 접시의 벽면에 미리 부착시킨 채 공급될 수 있다. 반응성 T-세포의 검출의 경우, 라벨은 증식 반응을 측정하기 위해 ³H-티미딘으로서 공급될 수도 있다. 또한, 키트는 키트를 사용하기 위한 지시 사항을 제공하는 라벨을 포함한다. 라벨링은 측정된 표지의 라벨과 Aβ에 대한 항체 또는 Aβ와 반응성을 갖는 T-세포의 라벨과 상관관계를 갖는 차트 또는 기타의 지시 사항을 포함할 수도 있다. 용어 라벨링이라는 것은 제조, 수송, 판매 또는 사용 동안의 어느 시점에서 키트에 부착되거나 또는 키트에 수반되는 문서 형태의 기록물을 의미한다. 예를 들면, 라벨링이라는 용어는 키트에 직접 인쇄된 기록물 뿐 아니라, 광고용 전단 및 팜플렛, 포장재, 지시사항, 오디오 또는 비디오 카세트, 컴퓨터 디스크 등도 모두 포괄한다.

효 과

<99> 본 발명은 아밀로이드증 유발 질환의 치료를 위한 조성물 및 방법을 포함하며, 이러한 방법은 환자에게서의 아밀로이드 침적에 대한 이로운 면역 반응을 유발하는 제제를 투여하는 것을 포함하며, 특히 알츠하이머 질환의 예방적 및 치료적 처치에 유용한 효과를 갖는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<100> I. AD에 대한 Aβ의 예방 효능

<101> 본 실시예는 717 위치에서 돌연변이를 일으킨 APP(APP_{717V→F})를 과잉형질발현시킨 돌연변이 마우스에게 Aβ₄₂ 펩티드를 투여하여 알츠하이머 질환과 같은 신경병리증을 일으키도록 한 것으로서, 상기 위치에서의 돌연변이로 인해서 마우스는 알츠하이머 질환에 걸리기 쉬워지게 된다. 이러한 마우스(PDAPP 마우스)의 생성 및 특성은 참고 문헌[Games et al., *Nature*, 상동]에 기재되어 있다. 이러한 이형접합체 형태의 동물은 Aβ가 6 월령 이후에 침적되기 시작한다. 15 월령까지, 동물은 알츠하이머 질환에서 나타나는 것에 해당하는 Aβ 침적이 나타났다. PDAPP 마우스에게 응집 Aβ₄₂(응집 Aβ₄₂) 또는 인산염 완충 염수를 주사하였다. 응집 Aβ₄₂는 Aβ의 다중 에피토프에 대한 항체를 유발하는 능력을 지니기 때문에 이를 사용하였다.

<102> **A. 방법**

<103> **1. 마우스 공급원**

<104> PDAPP 이중발생성 마우스 암컷 30 마리를 무작위로 나누어서 10 마리에게는 응집 Aβ₄₂(한마리는 수송중에 죽음)를, 5 마리에게는 PBS/아주번트 또는 PBS를 주사하고, 10 마리는 주사하지 않은 대조군으로 하였다. 혈청 아밀로이드 단백질(SAP)을 5 마리의 마우스에게 주사하였다.

<105> **2. 면역항원의 제조**

<106> 응집 Aβ₄₂의 제조: Aβ₄₂(미국 유에스 펩티즈 인코포레이티드, 로트 K-42-12) 2 mg을 물 0.9 ml에 용해시키고, 0.1 ml 10×PBS를 첨가하여 1 ml가 되도록 하였다. 이를 와동 처리한 후, 펩티드가 응집되는 조건하에서 밤새 37℃에서 항온배양하였다. 임의의 미사용 Aβ를 무수 동결건조 분말로서 -20℃에서 그 다음의 주사 때까지 보관하였다.

<107> **3. 주사액의 제조**

<108> 마우스 1 마리당 PBS중의 응집 Aβ₄₂ 100 μg을 제1차 면역화에 대해 에멀전 400 μl의 최종 부피로 1:1의 비율로 완전 프로인트 아주번트(CFA)와 유화시킨 후, 2 주에 불완전 프로인트 아주번트(IFA) 중의 동량의 면역항원으로 추가항원자극하였다. IFA 중의 추가의 2 개의 투여량을 1 개월 간격으로 투여하였다. 차후의 면역화는 1 개월 간격의 PBS 500 μl로 수행하였다. 주사는 복강내(ip)로 전달하였다.

<109> 동일한 일정을 수행한 후 PBS 주사하고, 마우스 1 마리당 400 μl의 1:1의 PBS/아주번트 혼합물 또는 마우스 1 마리당 500 μl의 PBS를 주사하였다. 1회 주사당 100 μg의 투여량을 사용하는 동일한 일정을 수행한 후, SAP 주사를 마찬가지로 수행하였다.

<110> **4. 마우스 방혈, 조직 생성 및 면역조직화학적 역가**

<111> 이 방법은 이하의 「일반적인 물질 및 방법」에 기재되어 있다.

<112> **B. 결과**

<113> PDAPP 마우스에게 응집 Aβ₄₂(응집 Aβ₄₂), SAP 펩티드 또는 인산염 완충 염수를 주사하였다. 또한, PDAPP 마우스군은 주사하지 않은 양성 대조군으로 하였다. 마우스가 1 년령이 될 때까지 응집 Aβ₄₂에 대한 마우스의 역가를 4차 추가항원자극후 격일로 모니터하였다. 마우스를 13개월째에 죽였다. 모든 조사 시점에서, 응집 Aβ₄₂ 마우스 9 마리중 8 마리의 항체 역가가 높게 나타났으며, 이는 일련의 주사 동안 높게 유지되었다(역가가 1/10000 보다 높음). 나머지 1 마리의 마우스는 역가가 낮았으나, 이는 약 1/1000으로 측정가능하다(도 1, 표 1). SAPP-주사한 마우스는 이 면역항원에 대한 역가가 1:1,000~1:30,000이고, 단 한마리의 마우스만이 1:10,000 보다 높았다.

<114> **표 1**

50% 최대 흡광도에서의 역가					
응집 Aβ 주사한 마우스					

PDAP P 연령	마 우스 100	마 우스 101	마 우스 102	마 우스 103	마 우스 104	마 우스 105	마우스 106	마 우스 107	마우스 108			
4	7000 0	1500 00	1500 0	1200 00	1000	1500 0	50000	80 00 0	100000			
6	1500 0	650 00	3000 0	550 00	300	1500 0	15000	50 00 0	60000			
8	2000 0	550 00	5000 0	500 00	400	1500 0	18000	50 00 0	60000			
10	4000 0	200 00	6000 0	500 00	900	1500 0	50000	20 00 0	40000			
12	2500 0	300 00	6000 0	400 00	2700	2000 0	70000	25 00 0	20000			
1/100에서의 면역항원 모두에 대한 PBS 주사한 마 우스												
		PDAP P 연령	마 우스 113	마 우스 114	마 우스 115	마 우스 116	마우스 117					
		6	<4 ×b kg	<4 ×b kg	<4×bkg	<4×bkg	<4×bkg					
		10	5 ×b kg	<4 ×b kg	<4×bkg	<4×bkg	<4 × b kg					
		12	<4 ×b kg	<4 ×b kg	<4×bkg	<4×bkg	<4 × b kg					

<115> PBS-처리된 마우스를 6 개월, 10 개월 및 12 개월에서 응집 A β_{42} 에 대한 역가를 측정하였다. 1/100 희석으로, 응집 A β_{42} 의 역가 측정시, PBS 마우스의 경우 한 데이터 시점에서만 기준치의 4 배를 초과하였으나, 이들은 모든 시점에서는 기준치의 4 배 미만이다(표 1). SAP 특이성 반응은 이러한 시점에서 무시해도 되며, 모든 역가는 300 미만이었다.

<116> 응집 A β 1-42군에서의 마우스 9 마리중 7 마리는 이의 뇌에서 아밀로이드가 검출되지 않았다. 반대로, SAP군 및 PBS군에서의 마우스로부터의 뇌조직은 전두 피질 및 대상 피질 뿐 아니라, 해마에서도 다양한 3D6-양성 아밀로이드 침적물을 함유한다. 침적의 유형은 무처리 대조군과 유사하며, 이는 취약한 소구역, 예를 들면 해마 치상회의 외부 분자층의 특징적 침습(involverment)이 존재한다. A β 1-42 주사한 군으로부터의 마우스 1 마리는 해마에 한정되어 있는 아밀로이드 축적량이 크게 감소되었다. 분리된 플라크는 다른 A β 1-42-처리된 마우스에서와 동일하였다.

<117> 해마에서의 아밀로이드 축적량의 정량적 영상 분석에 의해 AN1792 처리된 동물에서 급격한 감소가 입증되었다(도 2). PBS군에 대한 아밀로이드 축적량(2.22%) 및 무처리 대조군에 대한 아밀로이드 축적량(2.65%)에 대한 중앙값은 AN1792로 면역화된 것(0.00%, p=0.0005)보다 훨씬 컸다. 반대로, SAP 펩티드(SAPP)로 면역화시킨 군의 중앙값은 5.74%이었다. 무처리 대조군의 마우스로부터의 뇌 조직은 비장후위 피질 뿐 아니라, 해마에서의 A β 특이성 모노클로날 항체(mAb) 3D6를 사용하여 가시화된 다양한 A β 아밀로이드 침적물을 함유한다. 또한, SAPP 또는 PBS로 면역화된 마우스에서도 유사한 형태의 아밀로이드 침적이 관찰되었다(도 2). 또한, 이들 후자의 3 가지의 군에서는 이들 군 중 3 개의 군 모두에서 해마 치상회의 외부 분자층과 같이 AD에서 통상적으로 관찰되는

뇌의 취약성 소구역의 특징적인 침습이 존재한다.

<118> 또한, A β 침적물을 함유하지 않는 뇌에는 사람의 APP 항체 8E5를 갖는 PDAPP 마우스에서 통상적으로 가시화되는 신경성 플라크가 결여되어 있다. 나머지 군(SAP 주사한 마우스, PBS 마우스 및 무주사 마우스)은 무처리 PDAPP 마우스에서 통상적인 다양한 신경성 플라크를 갖는다. 소수의 신경성 플라크는 AN1792로 처리한 한마리의 마우스 내에 존재하며, 이영양성 신경돌기의 단일의 집합체는 AN1792로 처리한 제2의 마우스에서 발견된다. 도 3에 도시한 해마의 영상 분석에 의하면, PBS 수용체(중양값 0.28%, $p=0.0005$)와 비교하여 AN1792 처리한 마우스(중양값 0.00%)에서의 이영양성 신경돌기가 실질적으로 제거된 것으로 나타났다.

<119> 플라크 관련된 염증의 이영양증 특성은 A β 1-42 주사한 군의 뇌에서는 존재하지 않았다. 다른 군에 속하는 마우스로부터의 뇌에는 A β 플라크 관련된 신경교증식증에는 통상적인 GFAP-양성 성상세포가 풍부하게 집합되어 있다. GFAP 반응된 슬라이드의 서브세트는 티오플라빈 S로 대비염색시켜 A β 침적물을 국재화시켰다. GFAP 양성 성상세포는 SAP, PBS 및 무처리 대조군에서의 A β 플라크와 결합된다. 이러한 결합은 플라크-음성 A β 1-42 처리된 마우스에서는 발견되지 않았으나, AN1792로 처리한 마우스 한마리에서는 최소 플라크-결합된 신경교증식증이 식별되었다.

<120> 부신후위 피질에 대해 도 4에 도시한 영상 분석에 의하면, AN1792 처리군의 경우에는 중양값이 1.56%이나, SAP 펩티드, PBS 또는 무처리($p=0.0017$)로 면역화시킨 군의 경우에는 6% 보다 큰 것으로서 성상세포증이 유의적으로 감소되었다는 것이 입증되었다.

<121> PBS 주사한 마우스 및 A β 1-42 주사한 마우스의 서브세트로부터 A β 1-42 주사한 마우스에서는 플라크 결합된 MHC II 면역반응성이 나타나지 않았으며, 이는 A β 관련 감염 반응이 결여되었다는 것과 일치함을 입증한다.

<122> 또한, 마우스 뇌의 절편을 MAC-1, 세포 표면 단백질에 대해 특이성을 갖는 mA β 와 반응시켰다. MAC-1(CD11b)는 인테그린족의 일원이며, CD18과의 이질이랑체로서 존재한다. CD11b/CD18 착체는 단핵세포, 대식세포, 호중구 및 천연 킬러 세포(Mak 및 Simard)상에 존재한다. 뇌에서의 상재군 MAC-1-반응성 세포 유형은 MAC-1 면역반응된 절편내의 유사한 표현형 형태학을 기초로 한 소신경교세포와 유사하다. 플라크 결합된 MAC-1 라벨링은 PBS 대조군과 비교하여 AN1792로 처리된 마우스의 뇌에서 낮으며, 이러한 발견은 A β 유발된 염증 반응이 없는 것과도 일치한다.

<123> C. 결론

<124> A β 1-42 주사한 마우스의 뇌에서의 A β 플라크 및 반응성 신경원세포 및 신경교의 변화가 없다는 것은 이들의 뇌에 아밀로이드가 전혀 또는 아주 약간 침적되어 있고, 신경교증식증 및 신경성 병리학과 같은 병리학적 결과가 없다는 것을 나타낸다. A β 1-42로 처리된 PDAPP 마우스는 대조용 비-돌연변이 마우스와 동일하게 병리학적 증상이 없는 것으로 나타났다. 그러므로, A β 1-42 주사는 뇌 조직으로부터 사람 A β 의 제거 또는 침적의 예방에 매우 효과적이며, 차후의 신경원세포 및 염증 퇴행성 변화의 배제에 매우 효과적이다. 그래서, A β 펩티드의 투여는 AD의 예방에 있어서 치료상 잇점을 갖는다.

<125> II. 투여량 반응 실험

<126> 5 주령의 스위스 웹스터 암컷 마우스군(그룹당 N=6)을 CFA/IFA중에 제제화된 A β 300, 100, 33, 11, 3.7, 1.2, 0.4 또는 0.13 μ g를 복강내 투여하여 면역화하였다. 3 회의 투여량을 격주로 투여한 후, 이를 1개월 후 4차 투여하였다. 제1회 투여량을 CFA로 유화시키고, 나머지 투여량은 IFA로 유화시켰다. 항체 역가 측정에 대해 2차 투여 이후 각각의 면역화를 개시하여 동물을 4~7 일째에 방혈시켰다. 백신 투여량에 따른 항체 반응의 감소를 모니터링하는 4차 면역화 이후, 4 개월 동안 대략 1 개월 간격으로 항원 11 μ g, 33 μ g 또는 300 μ g으로 면역화한 3 개의 군의 서브세트에서의 동물을 추가로 방혈시켰다. 이들 동물에게 실험 개시후 7개월에서 최종 5차 면역화를 실시하였다. 마우스를 1 주일후 죽인 후, AN1792에 대한 항체 반응을 측정하고, 독물학적 분석을 수행하였다.

<127> 투여량이 300 μ g에서 3.7 μ g으로는 감소되는 투여량 반응이 관찰되었으며, 2 개의 최저 투여량에서는 반응이 나타나지 않았다. 항체의 평균 역가는 3 회 투여후 약 1:1000이고, 11~300 μ g의 항원의 4 회 투여후에는 약 1:10,000이다.(도 5 참조).

<128> 항체 역가는 5 배~25 배로 GMT가 증가된 3차 면역화 이후의 최저 투여를 제외하고는 모든 경우에서 급격하게 상승하였다. 0.4 μ g의 수용체에서조차도 낮은 항체 반응이 검출되었다. 1.2 및 3.7 μ g군에서 GMT가 약 1000인 상당한 역가가 나타났으며, 최고 4 회의 투여는 GMT가 약 25,000에 밀집되어 있고, 예외로 33 μ g의 투여 군의 GMT가 3000으로 낮았다. 4차 면역화 이후에, 역가 증가는 대부분의 군에서는 온화하였다. 0.14 μ g 내지 11 μ g의

낮은 항원 투여군에서, 0.14 μg 의 수용체에 대해서는 항체가 검출되지 않은 것으로부터 11 μg 의 수용체에 대해서는 GMT 36,000인 것으로 변화되는 뚜렷한 투여 반응이 나타난다. 다시, 11~300 μg 의 최고 투여군 4개에 대한 역가는 서로 밀집되었다. 그래서, 2 회의 면역화 이후, 항체 역가는 0.4~300 μg 의 광범위한 항원 투여량에 대한 의존성을 갖게 된다. 3차 면역화에 의해, 최고 4 가지의 투여량의 역가는 모두 상당하였으며, 이들은 추가의 면역화 이후에는 역가가 평탄부를 형성하였다.

<129> 4차 면역화 이후 1 개월 경과시, 역가는 면역화 후 5일 경과시 취한 혈액으로부터 측정된 것보다 300 μg 군에서 2 배 내지는 3 배 높았다(도 6 참조). 이러한 결과는 최고의 기왕 항체 반응이 후-면역화 5일 이후에 발생한다는 것을 의미한다. 더욱 온화한(50%) 증가는 이러한 시점에서의 33 μg 군에서 관찰된다. 300 μg 투여군의 경우, 최종 투여후 2 개월 경과시, GMT가 약 70% 정도 급격하게 감소한다. 또다른 1 개월 경과후, 감소는 45%(100 μg)로 덜 급격하게 감소하며, 33 μg 및 11 μg 의 투여량의 경우에는 약 14%로 감소하게 된다. 그래서, 면역화 정지후 순환되는 항체 역가에서의 감소율은 피이크 반응 이후의 첫 1개월은 급격하게 감소하고 나서, 그후에는 보다 온화하게 감소하는 이중상 형태인 것으로 나타났다.

<130> 이들 스위스 웹스터 마우스의 반응의 역학 및 항체 역가는 평행 방식으로 면역화된 어린 이형집합체 PDAPP 돌연변이 마우스와 유사하다. 사람에서의 면역 반응을 유발하는 유효량은 통상적으로 마우스에서의 유효량과 통상적으로 유사하다.

<131> II. 만성 AD에 대한 치료 효능의 스크리닝

<132> 본 분석은 노령의 동물에서의 AD의 신경병리학적 특성을 정지시키거나 또는 역전시키는데 있어서의 활성에 대해 면역원성 제제를 테스트하고자 하는 것이다. 아미노산 장쇄 A β (AN1792)를 사용한 면역화는 아밀로이드 플라크가 PDAPP 마우스의 뇌에 이미 존재하는 경우의 시점에서 개시하였다.

<133> 본 실험에 사용된 시간경과에 대해서, 무처리 PDAPP 마우스는 수많은 신경변성 변화가 전개되며, 이 변화는 AD에서 발견되는 것과 유사하다. 참고 문헌[Games et al., 상동 및 Johnson-Wood et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1550-1555 (1997)]. A β 의 아밀로이드 플라크로의 침착은 이영양성 신경돌기로 불리우는 변형 축삭 및 수상돌기 요소로 구성된 퇴행성 신경원세포 반응과 관련이 있다. 이영양성 신경돌기로 둘러싸이고 이를 함유하는 아밀로이드 침착물은 신경성 플라크로 칭한다. AD 및 PDAPP 마우스 모두에서, 이영양성 신경돌기는 뚜렷한 구형 구조를 지니며, APP 및 세포골격 성분을 인식하는 항체의 패널과 면역반응성을 지니고, 초미세구조 수준에서 복합 서브세포성 퇴행성 변화를 나타낸다. 이러한 특성으로 인해서, PDAPP 뇌에서의 신경성 플라크의 형성의 질병관련, 선택적 및 재현가능한 측정이 가능하게 된다. PDAPP 신경성 플라크의 이영양성 신경원세포 성분은 사람의 APP(mA β 8E5)에 대해 특이성을 갖는 항체를 사용하여 용이하게 가시화되고, 컴퓨터를 사용한 영상 분석에 의해 용이하게 측정할 수 있다. 그러므로, 아밀로이드 플라크 형성에서의 AN1792의 효과를 측정하는 것 이외에, 본 출원인은 신경성 이영양증의 전개에 대한 이러한 처치의 효능을 모니터링하였다.

<134> 성상세포 및 소신경교세포는 비-신경원성 세포로서, 이는 신경원세포 상해 정도에 해당되는 것으로, 이를 반영하게 된다. GFAP-양성 성상세포 및 MHC II-양성 소신경교세포는 통상적으로 AD에서 관찰되며, 이의 활성화는 질환의 경증도에 따라 증가하게 된다. 그러므로, 본 출원인은 AN1792 처치된 마우스에서의 반응성 성상세포증 및 소신경교증증의 전개를 모니터링한다.

<135> A. 물질 및 방법

<136> 11~11.5 월령의 찰즈 리버로부터 입수한 이형집합체 PDAPP 마우스 암컷 48 마리를 무작위로 2 개의 군으로 나누어서, 24 마리는 AN1792 100 μg 으로 면역화시키고, 24 마리는 PBS로 면역화시키는데, 이들 각각을 프로인트 아쥬번트와 혼합한다. 마우스가 약 15 개월령이 되었을 경우 다시 AN1792 및 PBS 군을 나눈다. 15 개월령에서, AN1792 처치 동물 및 PBS 처치 동물의 각 군의 약 절반을 안락사시키고(각각 n=10 및 9), 나머지는 최종 약 18 개월령이 될때까지 면역화를 지속 수행하였다(각각 n=9 및 12). 이 실험 동안 총 8 마리(AN1792 5 마리, PBS 3 마리)가 죽었다. 면역화된 동물 이외에, 1 년령(n=10), 15 개월령(n=10) 및 18 개월령(n=9 및 12)의 무처리 PDAPP 마우스를 ELISA 분석에서의 비교를 위해 포함시켜 뇌에서의 A β 및 APP 레벨을 측정하고, 1 년령의 동물을 또한 면역조직화학적 분석에 포함시켰다.

<137> 특별한 언급이 없는한, 기법은 실시예 1에 기재된 바와 같다. AN1792의 캘리포니아 펩티즈 로트 ME0339 및 유에스 펩티즈 로트 12를 사용하여 15 개월의 시점 이전에 투여한 6 회의 면역화 반응에 대한 항원을 생성하였다. 캘리포니아 펩티즈 로트 ME0339 및 ME0439를 15~18 개월 동안 투여한 추가의 3회의 면역화에 사용하였다.

<138> 면역화의 경우, PBS 200 μl 중의 AN1792 100 μg 또는 PBS 단독으로 최종 부피 400 μl 로 완전 프로인트 아쥬번트

(CFA) 또는 불완전 프로인트 아췁번트(IFA) 또는 PBS로 1:1(v:v) 유화시켰다. 아췁번트로서 CFA를 사용하여 1차 면역화를 전달하고, IFA를 사용하여 그다음 4 회의 투여를 수행하고, 최종 4 회의 투여는 아췁번트를 첨가하지 않고 PBS만으로 수행하였다. 총 9 회의 면역화를 6개월에 걸쳐서 수행하되, 처음 3회의 면역화는 2 주간의 일정으로 수행한 후, 나머지의 주사는 4주 간격으로 실시한다. 15 개월령에서 안락사 시킨 4 개월 처치군은 처음의 6 회의 면역화만을 수용하도록 하였다.

B. 결과

1. 아밀로이드 축적량에 대한 AN1792 처치의 효과

정량적 영상 분석에 의해 측정된 피질 아밀로이드 축적량에 대한 AN1792 처치의 결과를 도 7에 도시한다. 피질 아밀로이드 축적량의 중앙값은 무처리 12 개월령 PDAPP 마우스군에서 0.28%이고, 이 값은 실험의 개시시에 마우스에게 플라크 로드값을 나타낸다. 18 개월에서, 아밀로이드 축적량은 PBS 처치된 마우스에서 4.87%로 17 배 정도로 증가한 반면, AN1792 처치된 마우스에서는 단 0.01%의 크게 감소된 아밀로이드 축적량을 나타내며, 이 값은 12 개월의 무처리군 및 15 개월 및 18 개월의 PBS 처치군 모두보다 훨씬 낮다. 아밀로이드 축적량은 15 개월 (96% 감소, $p=0.003$) 및 18 개월(>99% 감소, $p=0.0002$) 모두에서 AN1792 수용체에서 크게 감소되었다.

통상적으로 PDAPP 마우스에서의 피질 아밀로이드 침적은 전두 피질 및 대상 피질(RSC)에서 개시되며, 복면-측면 방향으로 진행되어 측두 피질 및 엔토리날(entorhinal) 피질(EC)에 침습한다. AN 1792를 1차로 투여한 비슷한 연령의 12 월령의 마우스의 EC에서는 아밀로이드가 거의 또는 전혀 발견되지 않았다. AN1792 처치의 4 개월 후, 아밀로이드 침적은 RSC에서 크게 감소하였으며, EC의 진행적 침습은 AN1792 처치에 의해 완전하게 제거되었다. 후자의 관찰에 의하면, AN1792가 아밀로이드의 진행을 완전히 중지시켰으며, 이는 RSC에서의 정지되거나 또는 가능한한 역전된 침적 뿐 아니라, 측두 피질 및 복측 피질을 정상적으로 침습하였다는 것을 나타낸다.

PDAPP 마우스에서의 피질 아밀로이드 축적량의 전개에 대한 AN1792 처치의 지대한 효과는 7 개월간 처치한 18 월령군에 의해 예시된다. 피질 아밀로이드의 거의 완전한 부재는 AN1792 처치된 마우스에서 밀집된 침적물에서의 감소 뿐 아니라, 확산 플라크가 완전히 존재하지 않는 것으로서 나타난다.

2. AN1792 처치와 관련된 세포성 및 형태학적 변화

A β 양성 세포의 모집단은 통상적으로 아밀로이드 침적물을 함유하는 뇌 영역에서 발견된다. 놀랍게도, AN1792 수용체로부터의 여러 뇌에서는 세포외성 피질 아밀로이드 플라크가 거의 또는 전혀 관찰되지 않는다. 대부분의 A β 면역반응성은 커다란 소엽 또는 응집된 세포체를 갖는 세포내에 함유되는 것으로 보인다. 이러한 세포들은 표현형이 활성 소신경교세포 또는 단핵세포와 유사하다. 이들은 활성화된 단핵세포 및 소신경교세포(MHC II 및 CD11b)에 의해 형질발현되는 항체 인식 리간드와의 면역반응성을 지니며, 때때로는 혈관벽 또는 혈관강과 결합된다. A β 및 MHC II 특이성 항체로 표지된 인접한 절편의 비교에 의하면, 이들 세포의 유사한 패턴이 항체의 2 가지 유형에 의해 인식되는 것으로 나타났다. AN1792 처치된 뇌의 상세한 검사에 의하면, MHC II 양성의 세포가 이들 동물내에 잔류하는 제한된 아밀로이드의 부근에 한정되는 것으로 나타났다. 사용된 고정 조건하에서, 세포는 T 세포(CD3, CD3e) 또는 B 세포(CD45RA, CD45RB) 리간드 또는 백혈구 공통 항원(CD45)를 인식하는 항체와는 면역반응성을 갖지 않지만, 단핵세포와 교차반응하는 항체 인식 류코시알린(CD43)과 반응성을 갖는다. 이러한 세포는 임의의 PBS 처치된 마우스에서 발견되지 않는다.

PDAPP 마우스는 해마 치상회의 외부 분자층에서 아밀로이드 침적이 크게 형성된다. 침적은 천공 통로, 통상적으로 AD에서의 아밀로이드 플라크를 함유하는 소구역내의 뚜렷한 줄무늬를 형성한다. PBS 처치된 마우스에서의 침적의 특징적 외관은 무처리 PDAPP 마우스에서의 특징과 유사하다. 아밀로이드 침적은 연속 밴드내에서 확산 및 밀집 플라크 모두로 구성된다. 반대로, AN1792 처치된 마우스로부터의 많은 뇌에서는 이러한 패턴이 급격하게 변형되었다. 해마 아밀로이드 침적은 더이상 확산 아밀로이드를 함유하지 않으며, 밴드형 패턴은 완전하게 분열되었다. 그 대신에, 항-A β 항체와 반응성을 갖는 색다른 소반점이 있는 구조가 존재하며, 몇몇은 아밀로이드 함유 세포인 것으로 밝혀졌다.

MHC II 양성 세포는 흔히 AN1792 처치된 동물에서의 세포외성 아밀로이드에 인접하게 종종 관찰된다. 아밀로이드와 A β 양성 세포의 결합 패턴은 AN1792 처치된 마우스로부터의 여러 뇌에서 매우 유사하다. 이러한 단핵세포의 분포는 침적된 아밀로이드와 인접하게 한정되며, A β 플라크를 함유하지 않는 다른 뇌 부위로부터는 전혀 존재하지 않는다.

MHC II 및 MAC I 표지된 절편의 정량적 영상 분석은 PBS군과 비교하여 AN1792 처치된 마우스의 해마 및 RSC에서의 면역반응성이 증가되는 경향이 있는 것으로 밝혀졌으며, 상기 PBS 군은 해마에서의 MAC 1 반응성 측정치가

유의성을 갖는다.

<149> 이러한 결과에 의해 플라크를 함유하는 뇌 영역에서는 아밀로이드가 활성 세포 매개로 제거되었다는 것을 나타낸다.

<150> 3. A β 레벨에 대한 AN1792 효과: ELISA 측정

<151> (a) 피질 레벨

<152> 무처리 PDAPP 마우스에서, 12 개월에서의 피질내의 총 A β 의 중앙값은 1,600 ng/g이고, 이는 15 개월에서는 8,700 ng/g으로 증가하였다. 18 개월에서, 이 값은 22,000 ng/g이고, 실험 전체 시간 동안 10 배 이상 증가하였다. PBS 처치한 동물은 15 개월에서 총 A β 8,600 ng/g이었으며, 18 개월에서는 19,000 ng/g으로 증가하였다. 반대로, AN1792 처치된 동물은 PBS 면역화된 군보다 15 개월에서 총 A β 가 81%미만이 된다(1,600 ng/g). AN1792 및 PBS군과 비교하여 18 개월에서는 총 A β (5,200 ng/g) 보다 유의적으로 적으며, 이는 A β 가 72% 감소한 것을 나타낸다. A β 42의 피질값을 비교하였을때 유사한 결과를 얻었으며, 이른바, AN1792 처치군은 A β 42 보다 적게 함유하나, 이는 AN1792와 PBS 사이의 차이는 15 개월(p=0.04) 및 18 개월(p=0.0001, 표 2) 모두에서 유의적이다.

표 2

<153>

피질 내에서의 A β 중앙값(ng/g)									
연령	무처리			PBS			AN1792		
	총 A β	A β 42	(n)	총 A β	A β 42	(n)	총 A β	A β 42	(n)
12	1,600	1,300	(10)						
15	8,700	8,300	(10)	8,600	7,200	(9)	1,600	1,300*	(10)
18	22,200	18,500	(10)	19,000	15,900	(12)	5,200**	4,000**	(9)
* p=0.0412									
** p=0.0001									

<154> (b) 해마 레벨

<155> 무처리 PDAPP 마우스에서, 12 월령에서 총 A β 의 해마 중앙값은 15,000 ng/g이고, 이는 15 개월에서 51,000 ng/g으로 증가하였고, 18 개월에서, 이 값은 81,000 ng/g으로 증가하였다(표 3). 유사하게, PBS 면역화된 마우스는 15 개월 및 18 개월에서 각각 40,000 ng/g 및 65,000 ng/g인 것으로 나타났다. AN1792 면역화된 동물은 총 A β 이 15 개월 및 18 개월 시점에서 각각 25,000 ng/g 및 51,000 ng/g 보다 낮게 나타났다. 18 개월의 AN1792 처치군의 중앙값은 PBS 처치된 군(p=0.0105, 표 3)의 값보다 훨씬 낮게 나타났다. A β 42의 측정값은 동일한 유형의 결과로 나타났으며, 이른바, AN1792 처치군은 18 개월의 평가에서 PBS군(각각 39,000 ng/g vs 57,000 ng/g) 보다 훨씬 낮다(표 3).

표 3

<156>

해마 내에서의 A β 중앙값(ng/g)									
연령	무처리			PBS			AN1792		
	총 A β	A β 42	(n)	총 A β	A β 42	(n)	총 A β	A β 42	(n)
12	15,500	11,100	(10)						
15	51,500	44,400	(10)	40,100	35,700	(9)	24,500	22,100	(10)
18	80,800	64,200	(10)	65,400	57,100	(12)	50,900*	38,900**	(9)
* p=0.0105									
** p=0.0022									

<157> (c) 소뇌 레벨

<158> 12 개월의 무처리 PDAPP 마우스에서, 총 A β 의 소뇌 중앙값은 15 ng/g이었다(표 4). 15 개월에서는, 이러한 중

양값이 28 ng/g으로 증가하였으며, 18 개월에서는 35 ng/g으로 증가하였다. PBS 처치된 동물은 총 A β 의 중앙값이 15 개월에서는 21 ng/g이고, 18 개월에서는 43 ng/g이었다. AN1792 처치된 동물은 15 개월에서는 총 A β 가 22 ng/g이고, 18 개월(25 ng/g)에서는 총 A β 가 해당 PBS군에서 보다 상당히 낮았다(p=0.002) (표 4).

표 4

<159>

소뇌에서의 A β 중앙값(ng/g)						
	무처리		PBS		AN1792	
연령(개월)	총 A β	(n)	총 A β	(n)	총 A β	(n)
12	15.6	(10)				
15	27.7	(10)	20.8	(9)	21.7	(10)
18	35.0	(10)	43.1	(12)	24.8*	(9)
*p=0.0018						

4. APP 레벨에 대한 AN1792 처치의 효과

APP- α 및 전장 APP 분자 모두는 A β 서열의 전부 또는 일부를 포함하며, 그리하여 AN1792에 대한 면역 반응의 생성에 의해 잠재적으로 영향을 미칠 수 있다. 최근의 실험에서, APP 레벨에서의 약간의 증가는 PDAPP 마우스에서의 신경병리학적 증가로서 나타난다. 피질에서, APP- α /FL(전장) 또는 APP- α 의 값은 처치에 의해서도 거의 불변하였으나, 단 APP- α 는 AN1792 처치군 대 PBS 처치군에서의 18 개월 시점에서 19% 정도 감소되었다. 18 개월 AN1792 처치된 APP값은 12 개월 및 15 개월의 무처리군 및 15 개월의 PBS군의 값과 크게 다르지 않다. 모든 경우에 있어서, APP값은 PDAPP 마우스에서 정상적으로 관찰되는 범위내에 포함된다.

5. 신경변성 및 신경교증식성 병리학에 대한 AN1792 처치의 효과

신경성 플라크 축적량은 15 월령(84%; p=0.03) 및 18 월령(55%; p=0.01) 모두에서의 PBS군과 비교하여 AN1792 처치된 마우스의 전두 피질에서 크게 감소하였다(표 8). 신경성 플라크 축적량의 중앙값은 15 월령 내지 18 월령 사이의 PBS군에서 0.32%에서 0.49%로 증가하였다. 이는 AN1792군에서의 신경성 플라크의 전개가 크게 감소되고, 신경성 플라크 축적량의 중앙값이 15 개월군 및 18 개월군 각각에서 0.05% 및 0.22%인 것과 대조를 이룬다.

AN1792로 면역화된 것은 내성이 큰 것으로 보이며, 반응성 성상세포증은 15 월령(56%; p=0.011) 및 18 월령(39%; p=0.028)에서 PBS군과 비교시 AN1792 처치된 마우스의 RSC에서 크게 감소하였다(도 9). PBS군에서의 성상세포증의 % 중앙값은 15 개월 내지 18 개월에서 4.26%에서 5.21%로 증가하였다. AN1792 처치는 두 시점에서 성상세포증의 전개를 1.89% 및 3.2%로 각각 억제하였다. 이는 신경섬유망이 제거 과정에 의해 손상되지 않는다는 것을 암시한다.

6. 항체 반응

전술한 바와 같이, 11 개월령의 이형접합체 PDAPP 마우스(n=24)에게 프로인트 아주번트로 유화된 AN1792 100 μ g으로 5 회 면역화시킨 후, 0, 2, 4, 8 및 12 주에서 복강내 투여하고, 16 주에 PBS 단독으로(프로인트 아주번트를 함유하지 않음) 6차 면역화시켰다. 음성 대조군으로서, 24마리의 연령이 맞는 평행 세트의 돌연변이 마우스에게 동일한 아주번트로 유화된 PBS를 면역화시키고, 동일한 일정으로 전달하였다. 동물을 각각 2차 투여 후 개시한 각각의 면역화 이후, 3 일 내지 7 일째에 방혈시켰다. AN1792에 대한 항체 반응은 ELISA로 측정하였다. AN1792로 면역화된 동물에 대한 기하학적 평균 역가(GMT)는 2 차 투여, 3 차 투여 및 최종(6차) 투여 이후에 각각 1,900, 7,600 및 45,000이었다. A β 특이성 항체는 6차 면역화 이후의 대조용 동물에서 검출되지 않았다.

동물의 약 절반을 추가의 3 개월 동안 처치하도록 하여 약 20 주, 24 주 및 27 주에서 면역화시켰다. 이들 각각의 투여량은 프로인트 아주번트를 함유하지 않고 PBS 부형제 단독으로 전달되도록 하였다. 평균 항체 역가는 이 시기에서는 변화되지 않았다. 사실상 항체 역가는 5차 내지 9차 주사 기간에 해당하는 4차 내지 8차 방혈에서 안정하게 유지되는 것으로 나타났다.

AN1792 처치된 마우스 혈청에서 검출된 면역화에 의해 도출된 A β 특이성 항체가 침적된 뇌 아밀로이드와의 관련 여부를 결정하기 위해서, AN1792 처치된 마우스 및 PBS 처치된 마우스로부터의 절편의 서브세트를 마우스 IgG에 대해 특이성을 갖는 항체와 반응시켰다. PBS군과는 대조적으로, AN1792 처치된 뇌에서의 A β 플라크는 내인성 IgG로 코팅시켰다. 이러한 2 가지 군사이의 차이는 15 개월군 및 18 개월 군에서도 나타난다. 특히 이러한 마우스

스에서 아밀로이드 축적량이 큰 것에도 불구하고 PBS군에서의 라벨링이 없는 것은 놀라운 일이다. 이러한 결과는 합성 A β 단백질을 사용한 면역화가 아밀로이드 플라크에서의 A β 에 생체내에서 인식하고 결합하는 항체를 생성한다.

<169> 7. 세포성 매개 면역 반응

<170> 9차의 면역화 이후 7일째에 AN1792 면역화된 18 월령 PDAPP 마우스 9 마리 및 PBS 면역화된 18 월령 PDAPP 마우스 12 마리로부터 비장을 떼어내었다. 비장 세포를 분리하고, 72 시간 동안 A β 40, A β 42 또는 A β 40-1(역순서의 단백질)의 존재하에 항온배양하였다. 마이토젠 Con A는 양성 대조군으로서 작용한다. 단백질 >1.7 μ M로 최적의 반응을 얻었다. 9 마리의 AN1792 처리된 동물 모두로부터의 세포를 A β 1-40 또는 A β 1-42 단백질에 대한 혼입량으로 양 단백질에 대해 반응하여 증식시켰다(도 10의 상단 도). A β 40-1 역단백질에 대해서는 반응이 없었다. 대조용 동물로부터의 세포는 임의의 A β 단백질에 대해서 반응하지 않았다(도 10의 하단 도)

<171> C. 결론

<172> 본 실험의 결과에 의하면, 현존 아밀로이드 침적물을 갖는 PDAPP 마우스의 AN1792 면역화는 고령의 PDAPP 마우스 뇌에서의 진행성 아밀로이드 침적 및 지연성 필연의 신경병리학적 변이를 늦추며 이를 예방한다는 것을 알 수 있다. AN1792를 사용한 면역화는 아밀로이드증으로 정상적으로 전개되는 구조물내에서의 아밀로이드의 전개를 거의 중단시키게 된다. 그래서, A β 펩티드의 투여는 AD의 치료에 있어서 치료적 효능을 갖는다.

<173> IV. A β 분절의 스크리닝

<174> 9~11 월령의 PDAPP 마우스 100 마리를 APP 및 A β 의 9가지 상이한 영역으로 면역화시켜 에피토프가 반응을 전달하는지의 여부를 결정하였다. 9 개의 상이한 면역항원 및 1 종의 대조군에게 전술한 바와 같이 복강내 투여하였다. 면역항원은 4개의 사람 A β 펩티드 콘주게이트 1-12, 13-28, 32-42, 1-5를 포함하며, 이들 모두는 시스템 결합; APP 폴리펩티드 aa 592-695, 응집된 사람 A β 1-40, 응집된 사람의 A β 25-35 및 응집된 설치류 A β 42를 통해 양 항-마우스 IgG에 결합된다. 응집 A β 42 및 PBS를 대조군으로 사용한다. 10 마리의 마우스를 각각의 처리군에 사용하였다. 전술한 바와 같이 역가를 모니터링하였으며, 마우스는 주사 4 개월의 종반에 안락사시켰다. 조직화학, A β 농도 및 독성학을 사후에 측정하였다.

<175> A. 물질 및 방법

<176> 1. 면역항원의 제조

<177> 커플링 A β 펩티드의 제조: 4 종의 사람 A β 펩티드 콘주게이트(아미노산 잔기 1-5, 1-12, 13-28 및 33-42, 각각은 양 항-마우스 IgG에 콘주게이트됨)는 가교제 설포-EMCS를 사용하여 A β 펩티드에 첨가된 인공 시스테인을 통해 커플링시키므로써 생성하였다. A β 펩티드 유도체는 하기의 아미노산 서열을 사용하여 합성하였다. 각각의 경우에 있어서, 삽입된 시스테인 잔기의 부위는 밑줄로 나타내었다. A β 13-28 펩티드 유도체는 또한 전술한 바와 같이 카르복실 말단 시스테인 이전에 첨가된 2 종의 글리신 잔기를 갖는다.

<178> A β 1-12 펩티드 NH₂-DAEFRHDSGYEVC COOH

<179> A β 1-5 펩티드 NH₂-DAEFRC COOH

<180> A β 33-42 펩티드 NH₂-C-아미노-헵타노산-GLMVGGVVIA COOH

<181> A β 13-28 펩티드 Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGGC-COOH

<182> 커플링 반응을 준비하기 위해, 양 항-마우스 IgG(잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈) 10 mg을 밤새 10 mM의 붕산 나트륨 완충액, pH 8.5로 투석하였다. 투석된 항체는 Amicon Centriprep 관을 사용하여 2 ml의 부피로 농축시켰다. 설포-EMCS[N-(ϵ -말레이미도쿠프로일옥시)숙신이미드](몰레큘러 사이언시즈 캄파니) 10 mg을 1 ml의 탈이온수에 용해시켰다. 40 배 몰 과량의 설포-EMCS를 교반하면서 양 항-마우스 IgG에 적가한 후, 용액을 추가의 10 분 동안 교반하였다. 활성화된 양 항-마우스 IgG를 정제하고, NaPO₄ 0.1 M, EDTA 5 mM, pH 6.5로 평형화된 10 ml 겔 여과 컬럼(피어스 프레스토 컬럼, 피어스 케미칼즈 시판)에 통과시켜 완충 교환시켰다. 항체 함유 분획은 280 nm에서 특징적인 흡광도를 가지며, 이를 푸울링 하고, 흡광 계수로서 OD당 1.4 mg을 사용하여 약 1 mg/ml의 농도로 희석한다. 40 배의 몰 과량의 A β 펩티드를 10 mM NaPO₄ 20 ml, pH 8.0에 용해시키나, 단, A β 33-42 펩티드는 10 mg은 0.5 ml의 DMSO에 용해시킨 후, 10 mM NaPO₄ 완충액으로 20 ml로 희석하였다. 펩티드 용액을 각각

활성화된 양 항-마우스 IgG 10 ml에 첨가하고, 이를 실온에서 4 시간 동안 흔들어 주었다. 생성된 콘주게이트를 10 ml 미만의 최종 농도로 Amicon Centriprep관을 사용하여 농축시킨 후, 이를 PBS에 대해 투석시켜 완충액을 완충 교환시키고, 유리 펩티드를 제거하였다. 콘주게이트를 살균시키기 위해 0.22 μ 의 공극 크기를 갖는 필터에 통과시킨 후, 1 mg의 분획으로 나누고, 이를 -20℃로 냉동시켰다. 콘주게이트의 농도는 BCA 단백질 분석(피어스 케미칼스)을 이용하여 표준 곡선에 대한 말의 IgG로 측정하였다. 콘주게이션은 활성화된 양 항-마우스 IgG의 것과 비교하여 콘주게이트 펩티드의 분자량 증가가 보고되었다. A β 1-5 양 항-마우스 콘주게이트는 2 가지 콘주게이트의 푸울이며, 나머지는 단일 제제로부터의 것이다.

2. 응집 A β 펩티드의 생성

사람 1-40(AN1528; 캘리포니아 펩티즈 인코포레이티드, 로트 ME0541), 사람 1-42(AN1792; 캘리포니아 펩티즈 인코포레이티드, 로트 ME0339 및 ME0439), 사람 25-35 및 설치류 1-42(캘리포니아 펩티즈 인코포레이티드, 로트 ME0218) 펩티드를 -20℃에서 무수 보관한 동결건조 분말로부터의 각각의 주사액 세트의 제조를 위해 새롭게 가용화시켰다. 이와 동일한 목적으로, 펩티드 2 mg을 탈이온수 0.9 ml에 첨가하고, 혼합물을 와동 처리하여 상대적으로 균질한 용제 또는 현탁액을 생성하였다. 4 가지 중에서, AN1528은 이 단계에 가용성을 갖는 유일한 펩티드이다. 10X PBS(1X PBS; 0.15 M NaCl, 0.01 M 인산나트륨, pH 7.5)의 100 μ l 분액을 AN1528이 첨가되기 시작하는 시점에서 첨가한다. 현탁액을 다시 와동 처리하고, 이를 그 다음날 사용하기 위해 37℃에서 밤새 항온배양하였다.

pBx6 단백질의 제조: 형질발현 플라스미드 암호화 pBx6, 100-아미노산 박테리오파지 MS-2 폴리머라제 N-말단 리드 서열 이후에, APP의 아미노산 592-695(β APP)로 구성된 융합 단백질을 참고 문헌[Oltsersdorf et al., *J. Biol. Chem.* 265, 4492-4497 (1990)]에 기재된 바와 같이 구성하였다. 플라스미드를 이. 콜리로 형질전환시키고, 프로모터의 유발후 단백질을 형질발현시켰다. 박테리아를 8 M 우레아 중에 용해시키고, pBx6를 정제용 SAS PAGE로 부분적으로 정제하였다. pBx6 함유 분획은 토끼 항-pBx6 폴리클로날 항체를 사용하는 웨스턴 블롯으로 동정, 푸울링한 후, Amicon Centriprep관을 사용하여 농축시키고, PBS에 대해서 투석시켰다. 제제의 순도는 Coomassie 블루로 염색된 SDS PAGE로 평가하여 약 5~10%이었다.

B. 결과 및 토의

1. 실험 설계

9 월령 내지 11 월령의 이형접합체 PDAPP 돌연변이 마우스 암컷 및 수컷 100 마리를 찰즈 리버 래버러토리 엔 테코닉 래버러토리로부터 입수하였다. 마우스를 10 개의 군으로 분류하여 프로인트 아주번트와 혼합된 A β 또는 APP의 상이한 부위로 면역화하였다. 동물을 성별, 연령, 태생 및 군내의 동물의 공급원에 따라서 가능한 한 비슷한 부류로 분류하였다. 면역항원은 사람 서열 1-5, 1-12, 13-28 및 33-42로부터 유도된 4 종의 A β 펩티드를 포함하며, 이들 각각은 양 항-마우스 IgG, 4 개의 응집 A β 펩티드, 사람 1-40(AN1528), 사람 1-42(AN1792), 사람 25-35 및 설치류 1-42; pBx6로 표기하고, APP 아미노산 잔기 592-695를 함유하는 융합 폴리펩티드로 콘주게이트된다. 10 번째 군은 대조군으로서 아주번트와 혼합된 PBS로 면역화시킨다.

각각의 면역화의 경우, PBS 200 μ l 중의 각각의 A β 펩티드 100 μ g 또는 동일한 부피의 PBS 또는 PBS 단독으로 APP 유도체 pBx6 200 μ g을 1차 면역화의 경우에는 최종 부피 400 μ l로 완전 프로인트 아주번트와 1:1(v/v) 융합시킨 후, 이후의 4 회의 투여에 대해서는 불완전 프로인트 아주번트(IFA)로, 최종의 투여에 대해서는 PBS로 동량의 면역항원의 추가항원자극을 실시하였다. 처음 3회의 투여의 경우에는 격주로 면역화를 복강내에 전달한 후, 그후로는 1 개월 일정으로 수행하였다. 항체 역가의 측정에 대한 2차 투여 이후에 개시되는 각각의 면역화 후 4~7일에서 동물을 방혈시켰다. 최종 투여후 약 1 주일에 동물을 안락사시켰다.

2. 뇌에서의 A β 및 APP 레벨

다양한 A β 펩티드 또는 APP 유도체를 사용한 면역화의 약 4 개월 이후, 뇌를 염수 관류시킨 동물로부터 떼어내었다. 뇌의 절반은 면역조직화학적 분석을 위해 준비하고, 나머지 반구는 A β 및 APP 레벨의 정량화에 사용하였다. 베타 아밀로이드 펩티드 및 아밀로이드 전구체 단백질의 다양한 형태의 농도를 측정하기 위해, 반구를 절개하고, 해마, 피질 및 소뇌 부위의 균등액을 5 M의 구아니딘 중에서 준비하였다. 이를 희석하고, 아밀로이드 또는 APP의 값을 ELISA 포맷에서 농도를 알고 있는 A β 펩티드 또는 APP의 표준물의 일련의 희석과 비교하여 정량하였다.

PBS로 면역화시킨 대조군에 대한 총 A β 의 농도 중앙값은 피질에서보다 해마에서 5.8 배 더 높았다(중앙값 해마 조직 24,318 ng/g 및 피질 4,221 ng/g). 대조군의 소뇌의 중앙값(23.4 ng/g 조직)은 해마에서보다 약 1,000 배

낮았다. 이러한 중양값은 이러한 연령의 이중접합체 PDAPP 돌연변이 마우스에 대해 종래에 보고되었던 것과 유사하다. 참고 문헌[Johnson-Woods et al., 1997, 상동].

<193> 피질의 경우, 처치군의 서브세트는 대조군과는 크게 다른 총 A β 및 A β 1-42 중양값을 가지며, 이러한 동물에게는 도 11에 도시한 바와 같이 AN1792, 설치류 A β 1-42 또는 A β 1-5 펩티드 콘주게이트를 투여하였다. 총 A β 의 중양값은 이러한 처치군에 대한 대조군에 비해서 각각 75%, 79% 및 61%로 감소하였다. 임의의 군에 대한 뇌의 피질 부위에서의 A β 특이성 항체 역가 및 A β 중양값 사이에는 어떠한 뚜렷한 상관관계도 성립하지 않았다.

<194> 해마의 경우, AN1792 처치와 관련된 총 A β 의 중양값 감소(46%, $p=0.0543$)는 피질에서의 관찰값(75%, $p=0.0021$)보다 크지 않다. 그러나, 감소량은 피질에서보다 해마에서 훨씬 더 컸으며, 해마에서의 총 감소율은 11,186 ng/g 조직이고, 피질에서는 3,171 ng/g 조직이었다. 설치류 A β 1-42 또는 A β 1-5를 투여한 동물군의 경우, 총 A β 중양값은 각각 36% 및 26%로 감소하였다. 그러나, 양 군에서의 동물간의 아밀로이드 펩티드 값의 높은 변이성 및 작은 군의 크기에 따라서, 이러한 감소는 그리 중요치 않다. A β 1-42의 중양값을 해마에서 측정할 경우, 처치에 의해 유도된 감소는 유의성을 갖지 않게 된다. 그러므로, 피질에서는 A β 축적량이 작기 때문에, 이러한 부위에서의 변화는 치료 효능을 더욱 민감하게 반영하게 된다. ELISA에 의해 피질내에서 측정된 A β 중양값의 변화는 면역조직화학적 분석으로부터의 결과와 유사하나, 그리 중요하지 않다(이하 참조).

<195> 총 A β 는 또한 소뇌에서 측정하였으며, 이 부위는 AD 병리학에 있어서 영향을 받지 않는다. 다양한 A β 펩티드 또는 APP 유도체로 면역화된 군의 A β 농도 중양값은 대조군에서 뇌의 이와 같은 부위에서의 농도와 다르지 않다. 이러한 결과는 A β 의 비-병원성 수치가 치료에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 암시한다.

<196> 또한, APP 농도는 처치군 마우스 및 대조군 마우스로부터의 피질 및 소뇌에서의 ELISA로 측정한다. 2 개의 상이한 APP 분석을 사용하였다. APP- α /FL로 표시한 제1의 것은 APP-알파(α , A β 서열내에서 분열되는 APP의 분비 형태) 및 전장 형태(FL)의 APP 모두를 인식하며, 제2의 것은 APP- α 만을 인식한다. 처치군의 서브세트에서의 A β 의 처치 관련 감소와는 반대로, APP의 값은 대조군 동물에 비해서 처치군 모두에서 불변하였다. 이러한 결과는 A β 펩티드를 사용한 면역화가 결실 APP를 상실하는 것이 아니라, 치료 효능이 A β 에 대해 특이성을 갖는다는 것을 나타낸다.

<197> 요약하면, 총 A β 및 A β 1-42 레벨은 AN1792, 설치류 A β 1-42 또는 A β 1-5 콘주게이트를 사용한 처치에 의해 피질내에서 크게 감소되었다. 해마에서는 총 A β 가 AN1792 처치에 의해서만 크게 감소되었다. 해마, 피질 또는 소뇌 영역 중에서의 A β 또는 APP 레벨에서의 어떠한 처치 관련 변이도 유의적이지 않았다.

<198> 2. 조직화학적 분석

<199> 6 개군의 서브세트로부터의 뇌를 면역조직화학적 분석을 위해 준비하고, 3 개의 군은 A β 펩티드 콘주게이트 A β 1-5, A β 1-12 및 A β 13-28로 면역화시키고, 2 개의 군은 전장 A β 응집 AN1792 및 AN1528로 면역화시키며, 나머지 군은 PBS 처치된 대조군으로 하였다. 이들 군으로부터의 뇌 영역내의 아밀로이드 축적량의 영상 분석 결과들도 도 12에 도시하였다. 대조군의 동물과 비교하여 3 개의 처치군의 피질 부위에서의 아밀로이드 축적량이 크게 감소하였다. 중양값이 97%($p=0.001$)로 감소된 AN1792 투여군에서 아밀로이드 축적량의 감소가 가장 컸다. AN1528(95%, $p=0.005$) 및 A β 1-5 펩티드 콘주게이트(67%, $p=0.02$)로 처치한 이들 동물에서는 유의적 감소가 관찰되었다.

<200> ELISA에 의한 총 A β 또는 A β 1-42의 정량화에 의해 얻은 결과와 영상 분석에 의한 아밀로이드 축적량은 어느 정도 달랐다. AN1528로 처치한 것은 정량적 영상 분석으로 측정시에는 피질 아밀로이드 축적량에 유의적 영향을 미치나, ELISA로 측정시에는 동일한 부위에서 총 A β 의 농도에 아무런 영향을 미치지 않았다. 이들 2 가지의 결과의 차는 분석의 특이성에서 기인한 것으로 보인다. 영상 분석은 플라크로 응집된 불용성 A β 만을 측정한다. 반대로, ELISA는 가용성 및 불용성, 단량체성 및 응집성 등의 모든 형태의 A β 를 측정한다. 질환 병인론은 A β 의 불용성 플라크 결합 형태와 관련이 있는 것으로 판단되기 때문에, 영상 분석 기법은 처치 효능을 규명하기 위해 감도가 더 커야 한다. 그러나, ELISA가 더 신속하고 간편한 분석법이기 때문에, 스크리닝 목적으로는 매우 유용하다. 또한, 처치와 관련한 A β 의 감소는 총 A β 보다도 플라크와의 결합의 경우가 더 크다.

<201> A β 특이성 항체가 침적된 뇌 아밀로이드와 반응한 처치 동물에서의 면역화에 의해 도출되는지의 여부를 측정하기 위해서, 처치된 동물 및 대조군으로부터의 절편의 서브세트를 마우스 IgG에 대해 특이성을 갖는 항체와 반응시켰다. PBS군과는 대조적으로, A β 함유 플라크는 A β 펩티드 콘주게이트 A β 1-5, A β 1-12 및 A β 13-28, 전장 A β 응집 AN1792 및 AN1528로 면역화된 동물에 대한 내인성 IgG로 코팅된다. 기타의 A β 펩티드 또는 APP 펩티드 pBx6으로 면역화된 동물로부터의 뇌는 이 분석에서는 분석하지 않았다.

3. 항체 역가의 측정

마우스의 2차 면역화 이후 개시된 각각의 면역화 후 4~7 일째에 마우스를 방혈시키고, 총 5회 방혈시켰다. 항체 역가는 Aβ 1-42로 코팅된 플라스틱 멀티웰 평판을 사용한 샌드위치 ELISA를 사용하여 Aβ 1-42 결합 항체로서 측정하였다. 도 13에 도시한 바와 같이, AN1792 특이성 항체, AN1792(피이크 GMT: 94,647), AN1528(피이크 GMT: 88,231), Aβ 1-12 콘쥬게이트(피이크 GMT: 47,216) 및 설치류 Aβ 1-42(피이크 GMT: 10,766)의 최대 역가를 도출하는 4 종의 백신에 대한 4차 투여 후 피이크 항체 역가가 도출되었다. 이들 군에 대한 역가는 5차 및 6차 투여 이후에 다소 감소되었다. 나머지 5 개의 면역항원의 경우에는, 5차 및 6차 투여 이후 피이크 역가가 형성되었으며, 이들은 Aβ 1-5 콘쥬게이트(피이크 GMT: 2,356), pBx6(피이크 GMT: 1,986), Aβ 13-28 콘쥬게이트(피이크 GMT: 1,183), Aβ 33-42 콘쥬게이트(피이크 GMT: 658), Aβ 25-35(피이크 GMT: 125)의 4 개의 최대 역가 군보다도 훨씬 낮다. 또한, 면역항원의 서브세트에 대해 동일한 ELISA 샌드위치 포맷을 사용한 동종 펩티드에 대해 항체 역가를 측정하였으며, 이들 군은 Aβ 1-5, Aβ 13-28, Aβ 25-35, Aβ 33-42 또는 설치류 Aβ 1-42로 면역화시켰다. 이들 역가는 동종 면역항원에 대한 항체 역가가 약 2 배 이상인 설치류 Aβ 1-42 면역항원의 경우를 제외하고는 Aβ 1-42에 대해 측정한 것과 거의 동일하였다, 각각의 동물의 AN1792 특이성 항체 역가의 크기 또는 처치군의 평균값은 피질에서의 Aβ의 감소로서 측정되는 효능과는 상관 관계를 갖지 않았다.

4. 림프세포증식성 반응

Aβ 의존성 림프세포증식성은 최종 6차 면역화 이후 약 1 주일째에 수집한 비장 세포를 사용하여 측정하였다. 방금 수집한 세포, 웰당 10^5 를 5 일 동안 Aβ 1-40의 존재하에 자극을 위해 5 μM의 농도로 배양하였다. 또한, 10 개의 군중 7 개의 서브세트로부터의 세포를 역펩티드 Aβ 40-1의 존재하에 배양하였다. 양성 대조군으로서, 추가의 세포를 T 세포 미토겐, PHA로 배양하고, 음성 대조군으로서, 펩티드를 첨가하지 않고 세포를 배양하였다.

대다수의 동물로부터의 림프세포를 PHA에 대한 반응으로 증식시켰다. Aβ 40-1 역펩티드에 대한 유의적 반응은 없었다. Aβ 1-40으로 자극시켜 AN1792의 수용체에서 최대의 cpm을 이루는 경우 거대 응집 Aβ 펩티드, AN1792, 설치류 Aβ 1-42 및 AN1528로 면역화된 동물로부터의 세포가 강력하게 증식되었다. 각각의 군에서 동물 1 마리를 Aβ 1-40에 반응하여 증식된 Aβ 25-35, Aβ 13-28 콘쥬게이트 및 Aβ 1-12 콘쥬게이트로 면역화시켰다. Aβ 1-5 콘쥬게이트, Aβ 33-42 콘쥬게이트 pBx6 또는 PBS를 투여한 나머지 군에는 Aβ-자극 반응을 갖는 동물이 없었다. 이러한 결과를 하기 표 5에 요약한다.

표 5

면역항원	콘쥬게이트	Aβ 아미노산	반응
Aβ 1-5	있음	5-mer	0/7
Aβ 1-12	있음	12-mer	1/8
Aβ 13-28	있음	16-mer	1/9
Aβ 25-35		11-mer	1/9
Aβ 33-42	있음	10-mer	0/10
Aβ 1-40		40-mer	5/8
Aβ 1-42		42-mer	9/9
rAβ 1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

이러한 결과는 AN1792 및 AN1528이 강한 T 세포 반응을 자극하며, CD4⁺ 표현형에서 가장 그러할 것이다. Aβ 1-5로 면역화된 동물에서의 Aβ 특이성 T 세포 반응은 놀라운 사실이 아닌데, 이는 더 짧은 펩티드가 낮은 효능으로 작용할 수도 있기는 하지만, CD4⁺ T 세포에 의해 인식되는 펩티드 에피토프는 일반적으로 그 길이가 약 15 아미노산이 된다. 그래서, 4 종의 콘쥬게이트 펩티드에 대한 대부분의 헬퍼 T 세포 에피토프는 Aβ 영역이 아니라, IgG 콘쥬게이트 파트너내에 체류하는 것 같다. 이러한 가정은 각각의 처치군에서의 동물에 대한 증식 반응의 발생이 낮다는 것에 의한 것이다. Aβ 1-5 콘쥬게이트가 Aβ 특이성 T 세포가 명백하게 존재하지 않는 뇌에서의 Aβ 증양값을 크기 감소시키는데 효과적이기 때문에, 이러한 펩티드와의 면역화에 의해 유발되는 중요 작동물질 면

역 반응은 항체인 것으로 나타났다.

<209> 모든 A β 잔기를 비롯한 APP 아미노산 592-695를 망라하는 융합 펩티드 pBx6로부터의 낮은 항체 반응 및 T-세포의 결여는 이러한 특성의 제제의 면역원성이 불량하기 때문일 수도 있다. A β 25-35 응집물의 불량한 면역원성은 펩티드가 너무 작아서 항체 반응을 유발하도록 돕는 우수한 T 세포 에피토프를 함유할 것 같지 않아서이다. 이러한 펩티드가 담체 단백질에 콘주게이트를 형성한다면, 이는 아마도 면역원성이 될 것이다.

<210> V. 수동형 보호에 대한 폴리클로날 항체의 제조

<211> 20 마리의 비-돌연변이 마우스를 A β 또는 기타의 면역항원, 임의로 아쥬번트와 함께 면역화시키고, 이를 4~5개월에 안락사시킨다. 혈액을 면역화된 마우스로부터 수집한다. 임의로 IgG를 다른 혈액 성분과 분리한다. 면역항원에 대해 특이성을 갖는 항체는 친화도 크로마토그래피에 의해 부분적으로 정제될 수 있다. 면역항원-특이성 항체의 약 0.5~1 mg의 평균은 마우스 한마리당으로 하여 총 5~10 mg을 얻었다.

<212> VI. A β 에 대한 항체를 사용한 수동형 면역화

<213> 각각의 7~9 월령의 마우스군을 하기와 같이 폴리클로날 항-A β 또는 특이성 항-A β 모노클로날의 PBS 중의 0.5 mg로 주사하였다. 모든 항체 제제를 정제하여 내독소 함량을 낮게 하였다. A β 의 분절 또는 장쇄형을 마우스에게 주사하고, 하이브리도마를 생성시킨 후, A β 의 기타의 비중첩 분절에 결합되지 않고 목적하는 A β 의 분절에 특이적으로 결합하는 항체에 대한 하이브리도마를 스크리닝하므로써 분절에 대한 모노클로날을 생성시킬 수 있다.

표 6

항체	에피토프
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
마우스 폴리클로날 항-사람 A β 42	항-응집 A β 42

<215> 마우스를 필요량만큼 4 개월에 걸쳐서 복강내 투여하여 A β 42 또는 기타의 면역항원에 대해 ELISA에 의해 정의된 1/1000보다 높은 ELISA 역가로 측정된 순환 항체 농도를 유지하였다. 역가를 전술한 바와 같이 모니터링하고, 마우스를 주사 4 개월의 종반에 안락사시켰다. 조직화학적 분석, A β 레벨 및 독성학을 죽은 마우스에게 실시하였다. 각 군당 10 마리의 마우스를 사용하였다.

<216> VII. 여러가지의 아쥬번트의 비교

<217> 본 실시예는 면역 반응을 자극시키는 용량에 대해 CFA, 명반, 수중유 에멀전 및 MPL을 비교하였다.

<218> A. 물질 및 방법

<219> 1. 실험 설계

<220> 엘름 혈에서 입수한 6 주령의 하틀리 군주 기니 피그 암컷 100 마리를 10 개의 군으로 분류하여 다양한 아쥬번트와 혼합된 AN1792 또는 이의 팔미토일레이트화 유도체로 면역화시키고자 한다. 7 개의 군에게는 a) PBS, b) 프로인트 아쥬번트, c) MPL, d) 스쿠알렌, e) MPL/스쿠알렌, f) 소량의 명반 또는 g) 다량의 명반(300 μ g AN1792)과 혼합된 AN1792(특별한 언급이 없는한 33 μ g)를 주사하였다. 2 개의 군은 a) PBS 또는 b) 스쿠알렌과 혼합된 AN1792(33 μ g)의 팔미토일레이트화 유도체를 주사하였다. 마지막으로 10 번째 군은 항원 또는 추가의 아쥬번트를 사용하지 않고 PBS만을 주사하였다. 프로인트 아쥬번트를 투여한 군의 경우, 1차 투여물은 CFA로 유화시키고, 나머지 4 개의 투여물은 IFA로 유화시켰다. 다량의 명반군의 경우, 300 μ g의 AN1792를 투여한 것을 제외하고는 모든 군에서 33 μ g의 투여량으로 투여하였다. CFA/IFA에 대해서는 복강내 주사하고, 다른 모든 군에 대해서는 오른쪽과 왼쪽을 번갈아서 뒷다리 사두근에 근육내 주사하였다. 처음 3회의 투여는 격주의 일정으로 실시하고, 그후 2회의 투여는 1 개월 간격으로 실시한다. 항체 역가를 측정하기 위해, 2차 투여후 개시하는 각각의 면역화 후 6~7일째에 혈액을 채취하였다.

<221> **2. 면역항원의 제조**

<222> 2 mg의 Aβ 42(캘리포니아 펩티드, 로트 ME0339)를 0.9 ml의 탈이온수에 첨가하고, 혼합물을 와동 처리하여 비교적 균질한 현탁액을 생성하였다. 10X PBS(1X PBS, 0.15 M NaCl, 0.01 M 인산나트륨, pH 7.5)의 100 μl 분액을 첨가하였다. 현탁액을 다시 와동 처리하고, 이를 그 다음날 사용하기 위해 37℃에서 밤새 항온배양하였다. 미사용 Aβ 1-42를 동결건조된 분말로서 -20℃에서 건조제와 함께 보관하였다.

<223> AN1792의 팔미토일레이트화 유도체는 디메틸 포름아미드에 용해시킨 팔미트산 무수물을 AN1792의 아미노 말단 잔기에 결합시킨 후, 수소화불소산을 사용한 처리에 의해 수지로부터 발생기의 펩티드를 제거하였다.

<224> 완전 프로인트 아췌번트(CFA)(군 2)를 사용한 백신 투여물을 제조하기 위해, 1차 면역화를 위해 200 μl의 PBS중의 AN1792 33 μg을 최종 부피 400 μl로 CFA와 1:1(v/v)로 유화시켰다. 이후의 면역화에 대해서는 항원을 불완전 프로인트 아췌번트(IFA)로 유사하게 유화시켰다.

<225> 군 5 및 8에 대해서는 MPL을 사용한 백신 투여물을 제조하기 위해, 동결건조된 분말(미국 몬타나주 해밀턴에 소재하는 리비 이뮤노캠 리서치, 인코포레이티드)을 0.2%의 수성 트리에틸아민에 첨가하여 최종 농도를 1 mg/ml로 만들고, 이를 와동 처리하였다. 혼합물을 65℃~70℃로 30 초 동안 가열하여 약간 불투명한 마이셀 균질 현탁액을 생성하였다. 용액을 각각의 세트의 주사액으로 새롭게 만들었다. 군 5에서의 각각의 주사의 경우, 16.5 μl PBS, 50 μg의 MPL(50 μl) 및 162 μl의 PBS 중의 AN1792 33 μg을 보로실리케이트관에서 사용 직전에 혼합하였다.

<226> 소량의 수중유 에멀전으로 백신 투여물을 제조하기 위해, PBS중의 AN1792를 PBS중의 5%의 스쿠알렌, 0.5%의 Tween 80, 0.5%의 Span 85에 첨가하여 250 μl 중의 33 μg의 AN1792의 최종 단일 투여 농도를 이루게 하였다(군 6). 혼합물을 2 개의 챔버가 구비된 수동 장치에 15~20 회 통과시켜 에멀전 소적의 직경이 현미경으로 보았을 때 표준 라텍스 비이드의 직경 1.0 μm가 될 때까지 유화시켰다. 생성된 현탁액은 유백광을 갖는 유백색을 띤다. 에멀전을 각각의 일련의 주사물로 생성하였다. 군 8의 경우, 0.2%의 트리에틸아민 중의 MPL을 1 투여당 50 μg의 농도로 전술한 바와 같은 유화 반응을 위한 세제 혼합물 및 스쿠알렌에 첨가하였다. 팔미토일 유도체(군 7)의 경우, 팔미토일-NH-Aβ 1-42 단위 투여당 33 μg을 스쿠알렌에 첨가하고, 이를 와동 처리하였다. Tween 80 및 Span 85를 와동 처리하면서 첨가하였다. 이 혼합물을 PBS에 첨가하여 5%의 스쿠알렌, 0.5%의 Tween, 0.5%의 Span 85의 최종 농도가 되도록 하고, 혼합물을 전술한 바와 같이 유화 처리하였다.

<227> 명반(군 9 및 10)을 사용한 백신 투여물을 제조하기 위해, PBS 중의 AN1792를 Alhydrogel(수산화알루미늄 겔, 미국 뉴욕주 웨스트버리에 소재하는 아큐레이트)에 첨가하여 최종 투여물 부피 250 μl로 명반 5 mg당 33 μg(소량 투여, 군 9) 또는 300 μg(다량 투여, 군 10)의 AN1792의 농도가 되게 하였다. 현탁액을 4 시간 동안 실온에서 약하게 혼합하였다.

<228> **3. 항체 역가의 측정**

<229> 기니 피그의 2차 면역화 이후 개시된 면역화 후 6~7일째에 방혈시키고, 총 4 회 방혈시켰다. Aβ 42에 대한 항체 역가를 일반적인 물질 및 방법에 기재된 바와 같은 ELISA에 의해 측정하였다.

<230> **4. 조직 제조**

<231> 약 14 주후, 모든 기니 피그에게 CO₂를 투여하였다. 뇌척수액을 수집하고, 뇌를 제거하고, 뇌의 3 개의 영역(해마, 피질 및 소뇌)를 절단하고, ELISA를 사용한 총 Aβ 단백질의 농도의 측정에 사용하였다.

<232> **B. 결과**

<233> **1. 항체 반응**

<234> 면역화 이후 AN1792에 대한 항체 반응으로서 측정할 경우 다양한 아췌번트의 효력이 광범위하다. 도 14에 도시한 바와 같이, PBS중의 AN1792를 투여할 경우, 2 또는 3회의 면역화 이후 항체가 검출되지 않았으며, 4차 및 5차의 투여 이후에는 기하학적 평균 역가(GMT)가 약 45 정도인 미미한 반응이 검출되었다. o/w 에멀전은 3차 투여(GMT 255) 이후 적절한 역가를 유발하며, 4차 투여(GMT 301) 이후에는 이러한 역가가 유지되다가 최종 투여(GMT 54) 이후에는 감소한다. 명반에 결합된 AN1792에 대한 항원 투여 반응은 뚜렷하였으며, 300 μg을 사용한 것이 33 μg을 사용한 것보다 모든 시점에서 면역원성이 컸다. 항체 반응의 피이크에서, 4 차 면역화 이후, 2 개의 투여 사이의 차는 43%이었으며, GMT는 약 1940(33 μg) 및 3400(300 μg)이었다. 33 μg의 AN1792와 MPL의 항체 반응은 명반에 결합된 10 배 정도의 다량의 항원(300 μg)을 사용하여 생성된 반응과 매우 유사하다. o/w 에멀전에 MPL을 첨가하면 단독의 아췌번트로서 MPL을 사용한 것에 비해서 백신의 효력이 75% 정도로 감소되었다.

AN1792의 팔미토일레이트화 유도체는 PBS중에 투여하였을 경우에는 완전 비-면역원성이며, 3차 방혈 및 4차 방혈의 경우 GMT가 340 및 105인 o/w 에멀전내에서 제공될 경우 적당한 역가를 제공하게 된다. 피이크 GMT가 약 87,000인 프로인트 아쥬번트를 사용할 경우 최대의 항체 역가가 생성되며, 이 값은 그 다음의 2 가지의 유효한 백신, MPL 및 다량의 AN1792/명반의 GMT보다도 거의 30배 정도 높다.

<235> 이 실험에서 확인된 가장 유망한 아쥬번트는 MPL 및 명반이다. 물론 이들 2 종의 아쥬번트 중에서, MPL이 바람직한 것으로 보이는데, 이는 명반을 사용하여 얻은 항체 역가와 동일한 항체 역가를 얻는데 10 배 정도로 적은량의 항원이 사용되기 때문이다. 항원 및/또는 아쥬번트의 투여량을 증가시키고, 면역화 일정을 최적화함으로써 반응을 증가시킬 수도 있다. o/w 에멀전은 AN1792에 대해서는 매우 약한 아쥬번트로서, o/w 에멀전을 MPL 아쥬번트에 첨가하면 MPL 단독의 고유한 아쥬번트 활성을 감소시키게 된다.

<236> 2. 뇌에서의 Aβ 레벨

<237> 약 14 주에서, 기니 피그를 안락사시키고, 프로인트 아쥬번트(군 2), MPL(군 5), 다량의 300 μg의 AN1792를 포함하는 명반(군 10) 및 PBS 면역화된 대조군(군 3)의 서브세트의 동물로부터 뇌척수액(CSF)을 얻고, 뇌를 동물로부터 절제하였다. Aβ 펩티드 레벨을 측정하기 위해, 하나의 반구를 절개하고, 해마, 피질 및 소뇌 부위의 균질물을 5 M의 구아니딘 중에 생성하였다. 이들을 희석하고, ELISA 포맷으로 농도를 알고 있는 Aβ 표준 단백질의 일련의 희석물과 비교하여 정량화시켰다. 해마, 피질 및 소뇌에서의 Aβ 단백질의 레벨은 이들 백신에 의해 도출된 Aβ에 대한 광범위한 항체 반응에도 불구하고, 4 종의 군 모두에 대해 거의 유사하였다. 조직의 평균 Aβ 레벨은 해마에서 25 ng/g, 피질에서 21 ng/g, 소뇌에서 12 ng/g이었다. 그래서, 특정의 이들 동물에서, 거의 3 개월의 기간 동안 Aβ에 대한 높은 순환 항체 역가로 인해서 이들의 뇌에서의 총 Aβ 레벨이 변하지 않게 되었다. CSF에서의 Aβ 레벨은 또한 이들 군사이에서도 매우 유사하였다. 내인성 Aβ에 대한 AN1792 면역화에서 커다란 효능이 없는 것은 면역 반응이 Aβ의 병리학적 형성에 초점이 맞추어져 있다는 것을 의미한다.

<238> VIII. 마우스에서의 다양한 아쥬번트에 대한 면역 반응

<239> 6 주령의 스위스 웹스터 마우스 암컷을 1 개의 군당 10~13 마리의 동물을 이 실험에 사용하였다. 0 일째, 14 일째, 28 일째, 60 일째, 90 일째 및 20 일째에 200 μl의 투여량으로 피하투여하여 면역화시켰다. 모든 제제에 대한 완충액으로서 PBS를 사용하였다. ELISA에 의한 항체 역가 분석에 대해 2 차 투여후 개시된 각각의 면역화 이후 7 일째에 동물을 방혈시켰다. 각 군의 처치 섭생을 하기 표 7에 요약하였다.

표 7

베타블록 실험 010의 실험 설계					
군	N ^a	아쥬번트 ^b	투여량	항원	투여량 (μg)
1	10	MPL	12.5 μg	AN1792	33
2	10	MPL	25 μg	AN1792	33
3	10	MPL	50 μg	AN1792	33
4	13	MPL	125 μg	AN1792	33
5	13	MPL	50 μg	AN1792	150
6	13	MPL	50 μg	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		없음	33
9	10	유화된 스쿠알렌	5%	AN1792	33
10	10	혼합된 스쿠알렌	5%	AN1792	33
11	10	명반	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL+명반	50 μg/2 mg	AN1792	33
13	10	QS21	5 μg	AN1792	33
14	10	QS21	10 μg	AN1792	33
15	10	QS21	25 μg	AN1792	33
16	13	QS21	25 μg	AN1792	150
17	13	QS21	25 μg	AN1528	33
18	13	QS21+MPL	25 μg/50 μg	AN1792	33

19	13	QS21+명반	25 μ g/2 mg	AN1792	33
^a 실험 개시에서의 각 군에서의 마우스 마리수					
^b 아쥬번트를 표시함. 모든 제제에 대한 완충액은 PBS이었음. 군 8의 경우에는 아쥬번트와 항원을 포함하지 않음					

<241> 각 군에서의 A β 에 대한 항체의 ELISA 역가는 하기 표 8에 기재하였다.

표 8

<242>

기하학적 평균 항체 역가					
방혈 주					
처치군	2.9	5.0	8.7	12.9	16.7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

<243> 표 8에 의하면, 역가는 군 4, 5 및 18에서 최고이었으며, 여기서 아쥬번트는 125 μ g의 MPL, 50 μ g의 MPL 및 QS21+MPL이었다.

<244> IX. 상이한 아쥬번트의 치료 효능

<245> 치료 효능 실험은 A β 에 대한 면역 반응을 강화하는 능력 및 뇌에서의 아밀로이드 침적에 대한 면역 매개된 제거를 유발하는 능력을 측정하기 위해 사람에게 사용하기에 적절한 일련의 아쥬번트를 사용하여 PDAPP 돌연변이 마우스를 실험하였다.

<246> 7.5~8.5 월령의 이형접합체 PDAPP 돌연변이 마우스 수컷과 암컷 180 마리를 찰즈 리버 래보러토리즈에서 입수 하였다. 마우스를 한 군당 15~23 마리로 하여 9 개의 군으로 분류하고, 다양한 아쥬번트와 혼합된 AN1792 또는 AN1528로 면역화시켰다. 동물을 군에서 성별, 연령 및 태생에 따라서 가능한한 비슷한 부류로 분류하였다. 아쥬번트는 명반, MPL 및 QS21이 있으며, 이들 각각은 항원 및, AN1792만으로 혼합된 프로인트 아쥬번트(FA) 모두와 혼합하였다. 추가의 군은 PBS 완충액 중에 제제화된 AN1792와 아쥬번트를 포함하지 않는 보존제 티메로살로 면역화시켰다. 9 번째 군은 음성 대조군으로서 PBS만으로 면역화시켰다.

<247> 응집 A β 펩티드의 제조: 사람의 A β 1-40(AN1528; 미국 캘리포니아주 나파에 소재하는 캘리포니아 펩티즈 인코포레이티드; 로트 ME0541) 및 사람의 A β 1-42(AN1792; 캘리포니아 펩티즈 인코포레이티드; 포트 ME0439) 펩티드를 -20°C에서 무수 보관된 동결건조 분말로부터의 일련의 각 주사액을 제조하기 위해 가용화시켰다. 이를 위해서, 2 mg의 펩티드를 0.9 ml의 탈이온수에 첨가하고, 혼합물을 와동 처리하여 비교적 균질한 용액 또는 현탁액을 생성하였다. AN1528은 AN1792와는 반대로 이 단계에서 가용성을 지닌다. 10X PBS(1X PBS:0.15 M NaCl, 0.01 인산 나트륨, pH 7.5)의 100 μ l 분액을 AN1528이 침강하기 시작하는 시점에서 첨가하였다. 현탁액을 다시 와동 처리

하고, 이를 밤새 37℃에서 그 다음날 사용하기 위해 항온배양하였다.

- <248> 명반을 사용하여 백신 투여물을 제조하기 위해(군 1 및 5), PBS중의 Aβ 펩티드를 Alhydrogel(2% 수성 수산화알루미늄 겔, 사전트, 인코포레이티드, 미국 뉴저지주 클리프턴 소재)에 첨가하여 명반 1 mg당 Aβ 펩티드 100 μg의 농도를 이루도록 하였다. 1X PBS중의 최종 투여물 부피가 200 μl가 되도록 10X PBS를 첨가하였다. 그후, 현탁액을 주사 전에 4 시간 동안 실온에서 약하게 혼합하였다.
- <249> MPL을 사용하여 백신 투여물을 제조하기 위해(군 2 및 6), 동결건조시킨 분말(리비 이뮤노캠 리서치, 인코포레이티드, 미국 몬타나주 해밀턴 소재; 로트 67039-E0896B)을 최종 농도가 1 mg/ml가 되도록 0.2%의 수성 트리에틸아민을 첨가하고, 이를 와동 처리하였다. 혼합물을 65℃~70℃에서 30 초 동안 가열하여 미셀의 약간 불투명한 균질 현탁액을 생성하였다. 용액을 4℃에서 보관하였다. 각각의 주사액에 대해, 투여당 50 μl PBS중의 100 μg 펩티드, 투여(50 μl)당 50 μg MPL 및 투여당 100 μl의 PBS를 보로실리케이트관에서 사용 직전에 혼합하였다.
- <250> QS21을 사용하여 백신 투여물을 제조하기 위해(군 3 및 7), 동결건조된 분말(아퀴일라, 미국 매사추세츠주 프래밍엄 소재; 로트 A7018R)을 PBS, pH 6.6~6.7에 최종 농도가 1 mg/ml가 되도록 첨가하고, 이를 와동 처리하였다. 용액을 -20℃에서 보관하였다. 각각의 주사물에 대해서, 투여당 50 μl PBS중의 100 μg 펩티드, 투여당 25 μl의 PBS중의 25 μg QS21 및 투여당 125 μl의 PBS를 보로실리케이트관에서 사용 직전에 혼합하였다.
- <251> 프로인트 아췌번트를 사용하여 백신 투여물을 제조하기 위해(군 4), 200 μl의 PBS 중의 100 μg AN1792를 1차 면역화의 경우 최종 부피가 400 μl로 완전 프로인트 아췌번트(CFA)로 1:1(v/v) 유화시켰다. 이후의 면역화의 경우에는 항원을 불완전 프로인트 아췌번트(IFA)로 유사하게 유화시켰다. 아췌번트 명반, MPL 또는 QS21을 함유하는 백신의 경우, 투여당 100 μg의 AN1792 또는 AN1528을 명반(투여당 1 mg) 또는 MPL(투여당 50 μg) 또는 QS21(투여당 25 μg)과 200 μl의 PBS의 최종 부피로 혼합하고, 견갑골 사이의 등에 피하 접종으로 전달하였다. FA를 투여한 군의 경우, 100 μg의 AN1792를 완전 프로인트 아췌번트(CFA)와 1:1(v/v)의 비로 최종 부피가 400 μl가 되도록 유화시키고, 이를 1차 면역화의 경우 복강내 전달하고, 이후의 5 회의 투여의 경우에는 불완전 프로인트 아췌번트중의 동량의 면역항원으로 추가항원자극을 수행하였다. 아췌번트를 사용하지 않고 AN1792를 투여한 군의 경우, 10 μg의 AN1792를 5 μg의 티메로살과 최종 부피 50 μl의 PBS로 혼합하고, 이를 피하 전달하였다. 9번째 군(대조군)만이 200 μl PBS를 피하 투여하여 전달하였다. 처음 3 회의 투여의 경우에는 면역화를 격주의 일정으로 수행하고, 그후 0 일째, 16 일째, 28 일째, 56 일째, 85 일째 및 112 일째 되는 날에는 1 개월 단위의 일정으로 실시하였다. 항체 역가를 측정하기 위해 2차 투여 후부터 개시한 각각의 면역화 이후 6~7 일째에 동물을 방혈시켰다. 최종 투여후 약 1 주일에 동물을 안락사시켰다. 뇌에서의 Aβ 및 APP 레벨에 대한 ELISA 분석으로 결과를 측정하고, 뇌 절편에서의 아밀로이드 플라크의 존재의 면역조직화학적 평가로 결과를 얻었다. 또한, Aβ 특이성 항체 역가 및 Aβ 의존성 증식 및 시토킨 반응을 측정하였다.
- <252> 표 9에는 Aβ 1-42에 대한 항체 역가는 FA 및 AN1792에 의해서가 가장 높았으며, 4차 면역화(피이크 GMT: 75,386) 이후에 역가가 피이크에 이른 후, 최종 6 차의 면역화후 59% 감소하였다. MPL과 AN1792에 의해 도출된 피이크 평균 역가는 FA를 사용하여 생성된 것(피이크 GMT: 28,867)보다 62% 낮았으며, 또한, 3 회 투여 이후에서는, 면역화 일정에서의 초기 단계에서 피이크 평균 역가가 달성되었으며, 피이크 값은 6회 면역화 이후에 28% 감소하였다. AN1792와 혼합된 QS21을 사용하여 생성된 피이크 평균 역가(GMT: 1,511)는 MPL을 사용하여 얻은 것보다 약 5 배 낮았다. 또한, 반응의 속도는 느렸는데, 이는 추가의 면역화가 피이크 반응에 도달하는데 필요하기 때문이다. 명반 결합된 AN1792에 의해 생성된 역가는 QS21을 사용하여 얻은 것보다 약간 크고, 반응 속도는 매우 빠르다. 티메로살과 함께 PBS중에 전달된 AN1792의 경우, 역가의 빈도수 및 크기는 PBS 단독보다 거의 높지 않다. MPL 및 AN1528을 사용하여 생성된 피이크 역가(피이크 GMT 3099)는 AN1792를 사용한 것보다 약 9 배 낮다. 명반 결합된 AN1528은 면역원성이 매우 낮으며, 몇몇의 동물에서만 낮은 역가가 생성되었다. PBS 단독으로 면역화시킨 대조 동물에서는 항체 반응이 관찰되지 않았다.

표 9

<253>

기하학적 평균 항체 역가 ^a					
방혈 주					
처치	3.3	5.0	9.0	13.0	17.0
명반/ AN1792	102 (12/21) ^b	1,081 (17/20)	2,366 (21/21)	1,083 (19/21)	572 (18/21)

MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28,867 (21/21)	1,1242 (21/21)	5,665 (20/20)	8,204 (20/20)
QS21 AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1,511 (17/18)	1,188 (14/18)
CFA/ AN1792	10,076 (15/15)	61,279 (15/15)	75,386 (15/15)	41,628 (15/15)	30,574 (15/15)
명반/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ A1528	184 (15/21)	2,591 (20/21)	1,653 (21/21)	1,156 (20/20)	3,099 (20/20)
QS21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS + 티메로살	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)
^a Aβ 1-42에 대한 기하학적 평균 항체 역가					
^b 각 군당 반응 횟수					

<254>

ELISA에 의해 측정된 12 월령의 마우스에서의 피질 아밀로이드 축적량에 대한 다양한 아췌번트 또는 티메로살을 사용한 AN1792 또는 AN1592의 결과를 도 15에 도시하였다. PBS 대조용 PDAPP 마우스에서, 12 개월에서의 피질내의 총 Aβ의 중앙값은 1,817 ng/g이었다. 특히, AN1792 + CFA/IFA, AN1792 + 명반, AN1792 + MPL 및 QS21 + AN1792로 처리한 마우스에서 Aβ 레벨이 감소된 것으로 관찰되었다. 이러한 감소는 AN1792 + CFA/IFA의 경우에만 통계학적 유의성(p<0.05)에 도달하였다. 그러나, 실시예 I 및 실시예 III에서와 같이, Aβ 레벨의 감소에 대한 면역화의 효과는 15 월령 마우스와 18 월령의 마우스에서 실질적으로 컸다. 그래서, 적어도 AN1792 + 명반, AN1792 + MPL 및 AN1792 + QS21 조성은 노령의 마우스의 처리에 있어서 통계학적 유의성을 지니는 것으로 기대된다. 반대로, AN1792 + 보존제 티메로살은 PBS 처리된 마우스에서와 동일한 Aβ의 중앙값을 갖는다. Aβ 42의 피질 레벨을 비교하여도 유사한 결과를 얻었다. PBS 대조군에서의 Aβ 42의 중앙값은 1624 ng/g이었다. AN1792 + CFA/IFA, AN1792 + 명반, AN1792 + MPL 및 AN1792 + QS21을 사용하여 처리한 마우스에서는 중앙값이 403, 1149, 620 및 714로 상당히 감소되었으며, 이러한 감소는 AN1792 CFA/IFA 처리군의 경우 통계학적 유의성(p=0.05)이 감소되었다. AN1792 티메로살 처리된 마우스에서의 중앙값은 1619 ng/g Aβ 42이었다.

<255>

X. 독성 분석

<256>

실시예 2, 3 및 7에 기재된 실험의 종반에 조직병리학적 검사를 위해 조직을 수집하였다. 또한, 혈액학 및 임상적 화학을 실시예 3 및 7로부터의 말단 혈액 시료에 수행하였다. 뇌, 폐, 림프구, 위장, 간, 신장, 부신 및 생식선을 비롯한 대부분의 기관을 평가하였다. 실험 동물에서 산발성 병변이 관찰되기는 하였지만, AN1792 처리 동물과 무처리 동물 사이에서의 병변 경중도 또는 감염된 조직에서의 뚜렷한 차이는 없었다. PBS 처리된 동물 및 무처리된 동물과 비교하여 AN1782 면역화된 동물에서는 독특한 조직병리학적 병변이 관찰되지 않았다. 또한, 실시예 7에서 PBS 처리된 동물과 아췌번트군 사이의 임상적 화학 프로파일의 차이도 없었다. PBS 처리된 동물과 비교하여 실시예 7에서의 프로인트 아췌번트와 AN1792로 처리한 동물간에 여러 혈액학적 변수에 있어서, 유의적인 증가가 존재하기는 하지만, 프로인트 아췌번트 처리 및 이에 수반되는 복막염에 대해 이와 같은 유효한 효능이 기대되며, AN1792 처리로부터의 불리한 효능은 나타나지 않았다. 독물학적 평가의 일부는 아니지만, PDAPP 마우스 뇌의 병리학은 효능 종말점의 일부로서 광범위하게 검사되었다. 뇌 형태에 대한 부작용과 관련된 처리의 징후는 어느 실험에서도 보고되지 않았다. 이러한 결과로부터 AN1792 처리가 내성이 있으며, 적어도 부작용이 거의 없다는 것을 알 수 있다.

<257>

XI. 검체의 예방 및 치료

<258>

안전성에 대해 조사하기 위해 단일 투여상 I 실험을 수행하였다. 추정 효능의 약 0.01로부터 시작하여 여러 환자에게 증가되는 투여량의 치료제를 투여하고, 마우스 유효량의 약 10 배 정도가 도달될 때까지 3의 배수(factor)로 증가하여 투여하였다.

<259> 상 III 실험을 수행하여 치료 효능을 측정하였다. 가상의 AD에 대한 알츠하이머 질환 및 관련 질병 위원회 (ADRDA)의 기준을 사용하여 정의되는 초기 내지 중기 발병형 알츠하이머 질환을 앓고 있는 환자를 선택하였다. 환자의 해당 등급을 Mini-Mental State Exam(MMSE)로 12-26 범위의 등급으로 나누었다. 기타의 선택 기준은 실험 기간동안 환자가 생존할 것 같은지 그리고, 부수적인 약물의 사용과 같은 복잡한 문제가 발생하지 않을 것 등이 있다. 알츠하이머 질환 상태 및 기능을 갖는 환자를 평가하기 위한 포괄적인 등급으로서, MMSE 및 ADAS와 같은 전통적인 심리측정법을 사용하여 환자 기능의 기준 평가를 작성하였다. 이러한 심리측정 등급은 알츠하이머 질환의 상태의 진행 측정을 제공한다. 또한, 정성적인 수명 등급을 사용하여 처치를 모니터링하였다. 질환의 진행을 MRI로 모니터링할 수도 있다. 또한, 면역항원 특이성 항체 및 T 세포 반응의 분석을 포함한 환자의 혈액 프로파일을 모니터링할 수도 있다.

<260> 기준 측정 이후, 환자에게 처치를 시작하였다. 환자를 무작위로 분류하고, 맹검 형태로 플라시보 또는 치료제로 처치하였다. 적어도 매 6개월마다 환자를 모니터링하였다. 플라시보군에 비해서 처치군에서의 진행이 훨씬 감소되는 것으로 효능이 측정되었다.

<261> 제2의 상 II의 실험을 수행하여 통상적으로 노화 관련 기억 상실증(AAMI)으로 불리우는 초기 기억 상실의 비-알츠하이머 질환의 환자가 ADRDA 기준에 의해 정의된 가상의 알츠하이머 질환으로 전환되는 것을 평가하였다. 알츠하이머 질환으로의 전환의 위험성이 높은 환자는 알츠하이머 질환에 대한 높은 위험성을 예측하기 위해 발견되는 기타의 특징, 성별, 연령, 유전적 위험 요소, 알츠하이머 질환의 가계도, 예비알츠하이머의 증후와 관련된 기타의 증후 또는 기억 상실증의 초기 징후에 대한 기준 모집단을 스크리닝하여 비-임상적 모집단으로부터 선택한다. 정상 모집단을 평가하기 위해 설계된 기타의 미터법(metrics)과 함께 MMSE 및 ADAS를 비롯한 적절한 미터법을 기준으로 한 기준 등급을 수집하였다. 이들 환자 모집단을 제제를 사용한 투여 대안에 대한 플라시보 대조군과 함께 적절한 군으로 나누었다. 이들 환자 모집단은 약 6 개월의 간격으로 수행하고, 각 환자에 대한 종료점은 환자가 관찰의 중반에 ADRDA 기준에 의해 정의된 가상의 알츠하이머 질환으로 전환되는지의 여부와 관련되어 있다.

<262> XII. 일반적인 물질 및 방법

<263> 1. 항체 역가의 측정

<264> 꼬리 정맥에 작은 눈금을 표시하고, 마이크로퓨즈관에 약 200 μ l의 혈액을 수집하여 마우스를 방혈시켰다. 뒷무릎 부위를 우선 면도하고, 18 게이지의 바늘을 사용하여 중족 정맥에 눈금을 새기고, 마이크로퓨즈관에 혈액을 수집하였다. 혈액을 1 시간 동안 실온에서 응고되도록 하고, 이를 와동 처리한 후, 14,000 $\times$ g에서 10 분 동안 원심분리하여 응괴를 혈청으로부터 분리하였다. 혈청을 깨끗한 마이크로퓨즈관에 옮기고, 이를 역가 측정까지 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

<265> 항체 역가를 ELISA로 측정하였다. 96 웰 미량역가 평판(코스타 EIA 평판)을 웰 코팅 완충액(0.1 M의 인산나트륨, pH 8.5, 0.1% 나트륨 아지드) 중에서 각각의 리포트에서 전술한 바와 같이 A β 42 또는 SAPP 또는 기타의 항원 10 μ g/ml을 함유하는 100 μ l 용액으로 코팅시키고, 이를 밤새 실온에서 유지하였다. 웰을 흡인시키고, Specimen 희석물(0.014 M의 인산나트륨, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.6% 소 혈청 알부민, 0.05% 티메로살) 중의 1/100의 희석으로 출발하여 웰에 혈청을 첨가하였다. 시료의 7 개의 일련의 희석을 평판상에서 3 중 단계로 직접 수행하여 최종 희석율이 1/218,700이 되도록 하였다. 희석물을 코팅 평판 웰에서 1 시간 동안 실온에서 항온배양하였다. 평판을 0.05%의 Tween 20 함유 PBS로 4 회 세척하였다. 양고추냉이 퍼옥시다제(베링거 만하임에서 입수)에 콘주게이트를 형성한 제2의 항체, 염소 항-마우스 Ig를 Specimen 희석물중의 1/3000 희석율의 100 μ l로 웰에 첨가하였다. 평판을 PBS, Tween 20중에서 4 회 다시 세척하였다. 색소원을 전개시키기 위해, Slow TMB(피어스 케미칼즈에서 입수한 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘) 100 μ l를 각각의 웰에 첨가하고, 이를 15 분 동안 실온에서 항온배양하였다. 25 μ l의 2 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지시켰다. Molecular Devices Vmax 450 nm~650 nm에서 색상 강도를 판독하였다.

<266> 역가는 최대 흡광도의 절반을 제공하는 혈청의 희석율의 역수로서 정의된다. 최대 흡광도는 일반적으로 최대 흡광도를 얻기 위해서 높은 초기 희석율이 필요한 경우인 역가가 매우 높은 경우를 제외하고, 초기 1/100 희석율로부터 취한다. 50% 포인트가 2 개의 희석율 범위에 포함될 경우, 선형 외삽에 의해 최종 역가를 계산한다. 기하학적 평균 항체 역가를 계산하기 위해, 100 미만의 역가를 25의 역가값으로 임의로 할당하였다.

<267> 2. 림프세포 증식 분석

<268> 마우스를 이소플루란으로 마취시켰다. 비장을 떼어내고, 10% 열-불활성화된 태내 소 혈청(PBS-FBS)을 함유하는

PBS 5 ml로 2회 세척한 후, 메디머신(다코)으로 1.5 ml PBS-FBS중의 50 μ Centricon 유닛(덴마크의 다코 에이/에스) 중에서 10 초 동안 100 rpm에서 균질화시킨 후, 100 μ 공극 크기를 갖는 나일론 메쉬로 여과하였다. 비장세포를 15 ml PBS-FBS로 1회 세척한 후, 이를 200 $\times$ g으로 5 분 동안 원심분리하여 펠릿으로 만들었다. 0.15 M NH_4Cl , 1 M KHCO_3 , 0.1 M NaEDTA , pH 7.4를 함유하는 5 ml 완충액 중에 펠릿을 5 분 동안 실온에서 재현탁시켜 적혈구 세포를 용해시켰다. 백혈구를 전술한 바와 같이 세척하였다. 방금 분리된 비장 세포(웰당 10^5 세포)를 3 중 세트로 96 웰 U자형 바닥의 조직 배양 처리된 미량역가 평판(코닝, 미국 매사추세츠주 케임브릿지 소재)에서 2.05 mM L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10% 열-불활성화 FBS가 보충된 RPMI 1640 배지(JRH 바이오 사이언스, 미국 캔사스주 레넥사 소재)에서 96 시간 동안 37 $^\circ\text{C}$ 에서 항온배양하였다. 다양한 $\text{A}\beta$ 펩티드, $\text{A}\beta$ 1-16, $\text{A}\beta$ 1-40, $\text{A}\beta$ 1-42 또는 $\text{A}\beta$ 40-1 역서열 단백질을 4 단계 동안 5 μM ~0.18 μM 의 투여량으로 첨가하였다. 대조용 웰의 세포를 단백질을 첨가하지 않고 Concanavalin A(Con A)(시그마, cat. #C-5275, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 항온배양하였다. 세포를 최종 24 시간 동안 ^3H -티미딘(1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$, 애머샴 코포레이션, 미국 일리노이주 알링턴 하이츠 소재)으로 맥동 처리하였다. 유니필터 평판상에서 세포를 수거하고, 이를 탐 카운트 마이크로플레이트 신틸레이션 카운터(팩커드 인스트루먼트, 미국 일리노이주 다운너즈 그로브 소재)로 계수하였다. 결과는 불용성 고분자에 혼입된 방사능의 분당 계수(cpm)로 기재하였다.

<269> 4. 뇌 조직 생성

<270> 동물을 안락사시킨 후, 뇌를 떼어내고, 뇌의 반구를 면역조직화학적 분석을 위해 준비하고, 이때, 3 개의 뇌 부위(해마, 피질 및 소뇌)를 다른 반구로부터 절제하고, 이를 특이성 ELISA를 사용한 APP 형태 및 다양한 $\text{A}\beta$ 단백질의 농도 측정에 사용하였다(Johnson-Wood et al., 상동).

<271> ELISA를 위한 조직을 10 부피의 얼음 냉각된 구아니딘 완충액(5.0 M의 구아니딘-HCl, 50 mM의 트리스-HCl, pH 8.0)으로 균질화시켰다. 균질액을 애덤즈 뉴테이터(피셔)를 사용하여 3~4 시간 동안 실온에서 약하게 교반하여 혼합한 후, 이를 $\text{A}\beta$ 및 APP의 정량 이전에 -20 $^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 상기 실험에 의하면, 피분석물이 이러한 저장 조건하에서 안정하며, 합성 $\text{A}\beta$ 단백질(바캠)은 한배의 마우스로부터의 대조용 뇌 조직의 균질액에 스파이크 처리할 때 정량적으로 회수될 수 있다는 것을 나타낸다(Johnson-Wood et al., 상동).

<272> 5. $\text{A}\beta$ 레벨의 측정

<273> 뇌 균질액은 얼음 냉각된 카제인 희석물(0.25% 카제인, PBS, 0.05% 나트륨 아지드, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아프로티닌, 5 mM EDTA pH 8.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 류펩틴)로 1:10 배로 희석하고, 이를 16,000 $\times$ g으로 20 분 동안 4 $^\circ\text{C}$ 에서 원심분리하였다. 최종 조성물에 0.5 M의 구아니딘 및 0.1%의 소 혈청 알부민(BSA)을 포함하는 합성 $\text{A}\beta$ 단백질 표준물(1-42 아미노산) 및 APP 표준물을 준비하였다. "총" $\text{A}\beta$ 샌드위치 ELISA는 포착 항체로서 $\text{A}\beta$ 의 아미노산 13-28(Seubert et al.)에 대해 특이성을 갖는 모노클로날 항체(m $\text{A}\beta$) 266 및, 리포터 항체로서 $\text{A}\beta$ 의 아미노산 1-5(Johnson-Wood et al.)에 대해 특이성을 갖는 바이오티닐레이트화 m $\text{A}\beta$ 3D6를 사용한다. 3D6 m $\text{A}\beta$ 는 분비된 APP 또는 전장 APP를 인식하지 않으나, 아미노 말단의 아스파르트산을 갖는 $\text{A}\beta$ 종만을 검출한다. 이러한 분석은 감도의 하한치가 ~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (11 pM)이고, 1 ng/ml 이하의 농도에서 내인성 쥐과 $\text{A}\beta$ 단백질(Johnson-Wood et al., 상동).에 대한 교차 반응성은 나타나지 않았다.

<274> $\text{A}\beta$ 1-42 특이성 샌드위치 ELISA는 포착 항체로서 $\text{A}\beta$ (Johnson-Wood et al.)의 아미노산에 대해 특이성을 갖는 m $\text{A}\beta$ 21F12를 사용한다. 또한, 비오틴레이트화 m $\text{A}\beta$ 3D6는 감도의 하한치가 약 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (28 pM, Johnson-Wood et al.)인 분석에서 리포터 항체가 된다. $\text{A}\beta$ ELISA의 경우, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서의 m $\text{A}\beta$ 21F12 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서의 m $\text{A}\beta$ 266 100 μl 를 실온에서 밤새 항온배양시켜 96 웰 면역 분석 평판(코스타)의 웰에 코팅시켰다. 흡인으로 용액을 제거하고, PBS 완충액 중의 0.25%의 사람 혈청 알부민 200 μl 를 1 시간 이상 동안 실온에서 첨가하여 웰을 블로킹시켰다. 블로킹 용액을 제거하고, 평판을 4 $^\circ\text{C}$ 에서 사용시까지 무수 보관하였다. 사용 전에 평판을 세척 완충액[트리스-완충된 염수(0.15 M NaCl , 0.01 M 트리스-HCl, pH 7.5)+0.05% Tween 20]으로 재수화시켰다. 시료 및 표준물을 웰당 100 μl 의 3중 분액으로 첨가한 후, 이를 밤새 4 $^\circ\text{C}$ 에서 항온배양시켰다. 평판을 3 회 이상 세척 완충액으로 분석의 각 단계 사이에서 세척하였다. 카제인 분석 완충액(0.25% 카제인, PBS, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 중에서 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석한 비오틴레이트화 m $\text{A}\beta$ 3D6를 첨가하고, 웰 중에서 시간 동안 실온에서 항온배양하였다. 아비딘-양고추냉이 퍼옥시다제 콘주게이트(아비딘-HRP, 벡터 시판, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재)를 카제인 분석 완충액 중에서 1:4000으로 희석하고, 이를 1 시간 동안 실온에서 웰에 첨가하였다. 비색제 기제, 슬로우 TMB-ELISA(피어스)를 첨가하고, 이를 15 분 동안 실온에서 반응시킨 후, 25 μl 의 2 N의 H_2SO_4 를 첨가하여 효소 반응을 정지시켰다. 450 nm 및 650 nm에서의 흡광도차를 측정하는 Molecular Device

V_{max}를 사용하여 반응 생성물을 정량화하였다.

6. APP 레벨의 측정

2 개의 상이한 APP 분석을 사용하였다. APP- α /FL로 표시된 제1의 분석은 APP의 전장(FL) 형태 및 APP-알파(α) 모두를 인지한다. 제2의 분석은 APP- α 에 대해 특이성을 지닌다. APP- α /FL 분석은 제1의 A β 의 12개의 아미노산을 포함하는 분비된 APP를 인지한다. 리포터 항체(2H3)는 APP695의 아미노산 612-613의 사이에 존재하는 α -클립 부위에 대해 특이성이 없으며[참고 문헌: Esch et al., *Science* 248, 1122-1124 (1990)]; 이 분석은 또한 전장 APP(APP-FL)을 인지한다. APP-FL의 뇌 균질액을 소모시키는 APP-FL의 세포질 꼬리에 대한 부동화 APP 항체를 사용하는 예비 실험으로 약 30~40%의 APP- α /FL APP가 FL이라는 것을 시사한다(데이터는 제시하지 않음). APP- α /FL 및 APP- α 분석 모두에 대한 포착 항체는 APP695 형태의 아미노산 444~592에 대해 산출된 mAb 8E5이다(참고 문헌: Games et al., 상동). APP- α /FL 분석에 대한 리포터 mAb는 APP695(Johnson-Wood et al., 상동)의 아미노산 597-608에 대한 특이성을 갖는 mAb 2H3이며, APP- α 분석에 대한 리포터 항체는 APP의 아미노산 605~611에 대해 산출된 mAb 16H9의 비오틴레이트화 유도체이다. APP- α /FL 분석에서의 감도의 하한치는 약 11 ng/ml(150 pM)이고(Johnson-Wood et al., 상동), APP- α 특이성 분석에 대한 하한치는 22 ng/ml(0.3 nM)이다. APP 분석 모두에 대해서, mAb 8E5를 mAb 266에 대해 전술한 바와 같이 96 웰 EIA 평판의 웰상에 코팅시켰다. 정제된 재조합 분비된 APP- α 를 APP- α 분석 및 APP- α /FL 분석에 대한 참고 표준로서 사용하였다(Esch et al., 상동). 5 M의 구아니딘 중의 뇌 균질액 시료를 ELISA Specimen 희석물(0.014 M 인산염 완충액, pH 7.4, 0.6% 소 혈청 알부민, 0.05% 티메로살, 0.5 M NaCl, 0.1% NP40)중의 1:10으로 희석하였다. 이들을 0.5 M의 구아니딘을 함유하는 Specimen 희석물로 1:4로 희석하였다. 희석한 균질액을 16,000×g으로 15 초동안 실온에서 원심분리하였다. APP 표준물 및 시료를 이중 분액으로 평판에 첨가하고, 이를 1.5 시간 동안 실온에서 항온배양하였다. 비오틴레이트화 리포터 항체 2H3 또는 16H9을 시료와 함께 1 시간 동안 실온에서 항온배양하였다. 스트렙타비딘-알칼리성 포스파타제(베링거 만하임)를 시료 희석물중에 1:1000으로 희석하고, 이를 웰 중에서 1 시간 동안 실온에서 항온배양하였다. 형광 기재 4-메틸-옴베리페틸-인산염을 30 분 동안 실온에서의 항온배양에 첨가하고, 평판을 CytofluorTM 2350 형광측정계(밀리포어)상에서 365 nm의 여기 상태 및 450 nm에서의 방출 상태로 판독하였다.

7. 면역조직화학적 분석

뇌를 3 일 동안 4°C에서 PBS중의 4% 파라포름알데히드중에서 고정시키고, 이를 1~7 일동안 4°C에서 1% 파라포름알데히드, PBS 중에서 절편화될 때까지 보관하였다. 40 마이크론 두께의 코로날 절편을 실온에서 진동자로 절단하고, 이를 한랭방위제(인산염 완충액 중의 30% 글리세롤, 30% 에틸렌 글리콜)를 -20°C에서 보관한 후, 면역조직화학적 처리를 수행하였다. 각각의 뇌의 경우, 등쪽 해마의 레벨에서의 6 개의 절편 각각을 연속 240 μ m의 간격으로 분리하고, 이를 밤새 하기의 항체 중 하나로 항온배양하였다. (1) PBS 및 1% 말 혈청 중의 2 μ g/ml의 농도로 희석된 비오틴레이트화 항-A β (mAb, 3D6, 사람의 A β 에 대해 특이성이 있음); 또는 (2) PBS 및 1.0%의 말 혈청 중의 3 μ g/ml의 농도로 희석된 사람 APP, 8E5에 대해 특이성이 있는 비오틴레이트화 mAb; 또는 (3) 트리스-완충 염수, pH 7.4(TBS) 중의 1% 말 혈청 및 0.25% Triton X-100으로 1:500으로 희석된 신경교 원섬유 산성 단백질(GFAP; 시그마 케미칼 캄파니)에 대해 특이성을 갖는 mAb; 또는 (4) TBS 중의 1% 토끼 혈청 및 0.25%의 Triton X-100으로 1:100 희석된 CD11b, MAC-1 항원(케미콘 인터내셔널)에 대해 특이성을 갖는 mAb; 또는 (5) TBS중의 1% 토끼 혈청 및 0.25%의 Triton X-100으로 1:100 희석된 MHC II 항원(파민젠)에 대해 특이성을 갖는 mAb; (6) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:100 희석된 CD 43(파민젠)에 대해 특이성을 갖는 래트 mAb; 또는 (7) PBS중의 1% 토끼 혈청으로 1:100 희석된 CD 45RA(파민젠)에 대해 특이성을 갖는 래트 mAb; 또는 (8) PBS중의 1% 토끼 혈청으로 1:100 희석된 CD 45RB(파민젠)에 대해 특이성을 갖는 래트 모노클로날 A β ; 또는 (9) PBS중의 1% 토끼 혈청으로 1:100 희석된 CD 45(파민젠)에 대해 특이성을 갖는 래트 모노클로날 A β ; 또는 (10) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:100 희석된 CD3e(파민젠)에 대해 특이성을 갖는 비오틴레이트화 폴리클로날 햄스터 A β 또는 (11) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:200 희석된 CD3(세로텍)에 대해 특이성을 갖는 래트 mAb; 또는 (12) 1% 정상 말 혈청을 함유하는 1차 항체가 결여되어 있는 PBS 용액.

1, 2 및 6-12에 기재된 항체 용액과 반응한 절편을 PBS 중의 1.0% Triton X-100, 0.4% 과산화수소로 20 분 동안 실온에서 예비처리하여 내인성 퍼옥시다제를 블록킹시켰다. 이들을 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 항온배양하였다. 3D6 또는 8E5 또는 CD3e mAb와 반응한 절편을 1 시간 동안 실온에서 PBS중에서 1:75로 희석된 키트 성분 "A" 및 "B"를 포함하는 양고추냉이 퍼옥시다제-아비딘-비오틴-착체(벡터 에일리트 스탠더드 키트, 벡터 랩스, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재)와 반응시켰다. 1차 항체를 포함하지 않는 CD 45RA, CD 45RB, CD 45,

CD3 및 PBS 용액에 대해 특이성을 갖는 항체와 반응한 절편을 1 시간 동안 실온에서 PBS 중에 1:75로 희석된 비오틴레이트화 항-랫 IgG(백터) 또는 PBS 중의 1:75로 희석된 비오틴레이트화 항-마우스 IgG(백터)와 함께 항온배양하였다. 절편을 1 시간 동안 실온에서 PBS중에서 1:75로 희석된 키트 성분 "A" 및 "B"를 포함하는 양고 추냉이 퍼옥시다제-아비딘-비오틴-착체(백터 에일리트 스탠더드 키트, 백터 랩스, 미국 캘리포니아주 버클리임 소재)와 반응시켰다.

<280> 절편을 0.01%의 과산화수소, 0.05%의 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)중에서 실온에서 전개시켰다. GFAP 특이성 항체, MAC-1 특이성 항체, MHC II 특이성 항체와 함께 항온배양하고자 하는 절편을 0.6%의 과산화수소로 실온에서 예비처리하여 내인성 퍼옥시다제를 블록킹시킨 후, 이를 밤새 4℃에서 1차 항체와 함께 항온배양시켰다. GFAP 항체와 반응한 절편을 1 시간 동안 실온에서 TBS로 1:200으로 희석된 말에게서 형성된 비오틴레이트화 항-마우스 IgG(백터 래보라토리즈; 백타스테인 에일리트 ABC 키트)와 함께 항온배양하였다. 그 다음, TBS와 1:1000로 희석된 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 착체(백터 래보라토리즈; 백타스테인 에일리트 ABC 키트)와 절편을 1 시간 동안 반응시켰다. 그후, 1차 항체로서 MAC-1 특이성 mAb 또는 MHC II 특이성 mAb과 항온배양된 절편을 1 시간 동안 실온에서 TBS로 1:200로 희석된 랫에서 형성된 비오틴레이트화 항-랫 IgG와 반응시킨 후, TBS로 1:1000으로 희석된 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 착체와 1 시간 동안 항온배양 처리하였다. GFAP 특이성 항체, MAC-1 특이성 항체 및 MHC II 특이성 항체로 항온배양된 절편을 실온에서 0.05%의 DAB, 0.01%의 과산화수소, 0.04%의 염화니켈, TBS로 4 시간 11 분 동안 각각 처리하여 가시화하였다.

<281> 면역 표지화된 절편을 유리 슬라이드(VWR, Superfrost 슬라이드)에 장착하고, 이를 밤새 공기 건조시킨 후, Propar(Anatech)중에 침지시키고, 장착 매질로서 Permount(피셔)를 사용하여 커버슬립으로 씌웠다.

<282> Aβ 플라크를 교차염색시키기 위해, 면역조직화학 처리 이후, GFAP 양성 절편을 Superfrost 슬라이드에 장착하고, 수성 1% Thioflavin S(시그마) 중에서 7 분 동안 항온배양하였다. 절편을 탈수시키고, Propar중에서 세정한 후, Permount가 장착된 커버슬립으로 씌웠다.

<283> 8. 영상 분석

<284> CCD 비디오 카메라 및 소니 트리니트론 모니터를 통해 니콘 Microphot-FX 현미경에 연결된 Videometric 150 영상 분석계(온커, 인코포레이티드, 미국 매릴랜드주 게이터스버그 소재)를 면역반응 슬라이드의 정량화에 사용하였다. 절편의 영상을 비디오 버퍼 중에서 저장하고, 색상 및 포화를 기준으로한 한계치를 측정하여 면역표지된 구조가 차지하는 총 픽셀 부위를 선택하고 계산하였다. 각각의 절편의 경우, 손으로 해마 윤곽을 그리고 해마가 차지하는 총 픽셀 부위를 계산하였다. 아밀로이드 축적량(%)을 다음과 같이 계산하였다. (mAb 3D6과 면역반응성을 갖는 Aβ 침착물을 함유하는 해마 부위의 분율)×100. 유사하게, 신경성 축적량(%)은 다음과 같이 계산하였다. (mAb 8E5와 반응성을 갖는 이영양성 신경돌기를 함유하는 해마 부위의 분율)×100. Simple 32 소프트웨어 애플리케이션 프로그램을 작동시키는 C-영상화 계(컴팩스, 인코포레이티드, 미국 펜실베이니아주 크랜버리 타운쉽 소재)를 Optronics 카메라를 통해 니콘 Microphot-FX 현미경에 연결하고, 이를 사용하여 GFAP-양성 이영양증 및 MAC-1 양성 소신경교세포 및 MHC II 양성 소신경교세포가 차지하는 부신후위 피질의 비율(%)을 정량화하였다. 면역 반응된 절편의 영상을 비디오 버퍼중에 보관하고, 단색계 한계치를 측정하여 면역표지된 세포가 차지하는 총 픽셀 부위를 선택하여 면적을 계산하였다. 각각의 절편의 경우, 손으로 부신후위 피질(RSC) 윤곽을 그리고, RSC가 차지하는 총 픽셀 부위를 계산하였다. 정상세포증 비율(%)은 다음과 같이 계산하였다. (GFAP 반응성 정상세포증이 차지하는 RSC의 분율)×100. 유사하게, 미세신경교증식증의 비율(%)은 다음과 같이 정의한다. (MAC-1 반응성 소신경교세포 또는 MHC II 반응성 소신경교세포가 차지하는 RSC의 분율)×100. 모든 영상 분석의 경우, 등쪽의 해마의 레벨에서의 6 개의 절편을 각각의 동물에 대해 정량화하였다. 모든 경우에 있어서, 관찰자는 동물의 처치 상태를 모르는 상태로 실시하였다.

<285> 본 발명을 상기에서와 같이 이해를 돕고자 상세하게 기재하기는 하였으나, 하기에 첨부된 청구의 범위내에서 특정의 변형에도 가능하다. 본 명세서에서 인용한 모든 참조 문헌 및 특허 문헌은 마치 각각을 개별적으로 명시하는 것과 같은 정도로 모든 목적에 대해서 완전한 참고로서 인용하였다.

도면의 간단한 설명

<286> 도 1은 Aβ 1-42를 돌연변이 마우스에 주사한 후의 항체 역가를 도시한다.

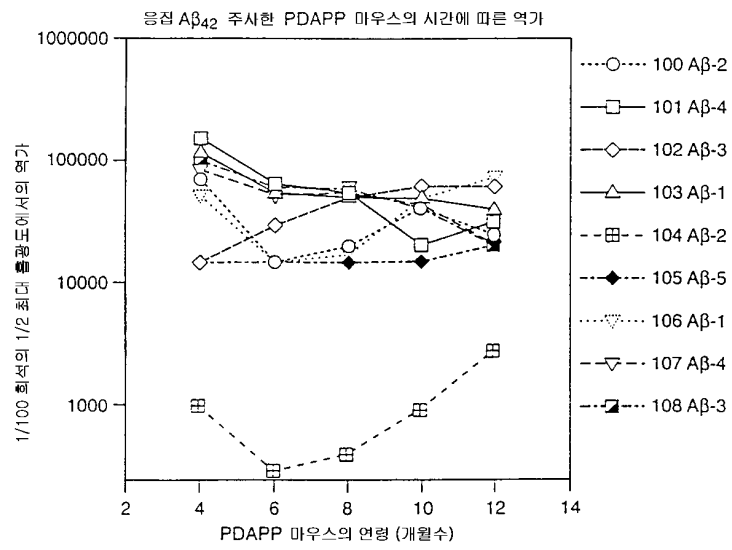
<287> 도 2는 해마에서의 아밀로이드 축적량을 나타낸다. 아밀로이드 플라크가 차지하는 해마 부위의 면적율은 Aβ-특이성 mAb 3D6와의 반응성으로서 정의되며, 이는 면역 반응을 나타낸 뇌 절편을 컴퓨터를 사용하여 정량적으로 영상 분석하여 측정한다. 각각의 마우스에 대한 값을 처치군에 따라 분류하여 도시하였다. 각각의 군에 대한 기

준선은 분포에 있어서의 중앙값을 나타낸다.

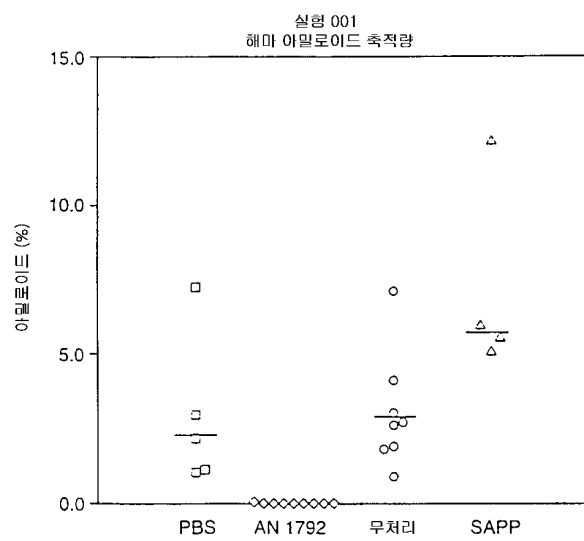
- <288> 도 3은 해마에서의 신경성 이영양증을 도시한다. 이영양성 신경돌기가 차지하는 해마 부위의 면적율은 사람의 APP-특이성 mAb 8E5와의 반응성으로 정의되며, 이는 면역 반응을 나타낸 뇌 절편을 컴퓨터를 사용하여 정량적으로 영상 분석하여 측정한다. 각각의 마우스에 대한 값을 AN1792 처치군과 PBS 처치 대조군에 대하여 나타낸다. 각각의 군에 대한 기준선은 분포에 있어서의 중앙값을 나타낸다.
- <289> 도 4는 비장후위 피질을 도시한다. 신경교 원섬유 산성 단백질(GFAP) 양성 정상세포가 차지하는 피질 부위의 면적율은 면역반응을 나타낸 뇌 절편을 컴퓨터를 사용하여 정량적으로 영상 분석하여 측정한다. 각각의 마우스에 대한 값을 처치군에 따라 분류하고, 중앙값을 기준선으로 나타낸다.
- <290> 도 5는 0.14 μ g, 0.4 μ g, 1.2 μ g, 3.7 μ g, 11 μ g, 33 μ g, 100 μ g 또는 300 μ g의 AN1792를 함유하는 8 가지의 투여량 범위로 면역화 시킨 후의 A β 1-42에 대한 기하학적 평균 항체 역가를 도시한다.
- <291> 도 6은 AN1792 면역화에 대한 항체 반응의 역학을 도시한다. 역가는 각 군에서 6 마리의 동물에 대한 값의 기하학적 평균값으로서 나타낸다.
- <292> 도 7은 PBS 처치된 마우스 및 AN1792 처치된 마우스에서의 피질 아밀로이드 축적량의 정량적 영상 분석을 도시한다.
- <293> 도 8은 PBS 처치된 마우스 및 AN1792 처치된 마우스에서의 신경성 플라크 축적량의 정량적 영상 분석을 도시한다.
- <294> 도 9는 PBS 처치된 마우스 및 AN1792 처치된 마우스에서의 정상세포증이 차지하는 비장후위 피질의 비율의 장량적 영상 분석을 도시한다.
- <295> 도 10은 AN1792 처치된 마우스(위쪽 도면) 또는 PBS 처치된 마우스(아래쪽 도면)로부터의 비장 세포에서의 림프 세포 증식 분석을 도시한다.
- <296> 도 11은 피질에서의 총 A β 의 양을 도시한다. 프로인트 아췌번트와 혼합된 A β 또는 APP 유도체로 면역화된 마우스에서의 각각의 A β 프로파일의 산점도를 도시한다.
- <297> 도 12는 A β 펩티드 콘쥬게이트 A β 1-5, A β 1-12 및 A β 13-28, 전장 A β 응집 AN1792 (A β 1-42) 및 AN1528(A β 1-40) 및 PBS 처치된 대조군을 사용하여 면역화된 마우스에 대한 면역 반응을 나타내는 뇌 절편에서의 정량적 영상 분석으로 측정한 피질내의 아밀로이드 축적량을 도시한다.
- <298> 도 13은 프로인트 아췌번트와 혼합한 A β 또는 APP 유도체로 면역화된 마우스 군에 대한 A β 특이성 항체의 기하학적 평균 역가를 도시한다.
- <299> 도 14는 다양한 아췌번트와 혼합된 AN1792 또는 이의 팔미토일레이트화 유도체로 면역화된 기니 피그의 군에 대한 A β 특이성 항체의 기하학적 평균 역가를 도시한다.
- <300> 도 15는 다양한 아췌번트를 포함하는 AN1792 또는 AN1528로 처치한 12 월경 PDAPP의 피질에서의 A β 양을 도시한다.

도면

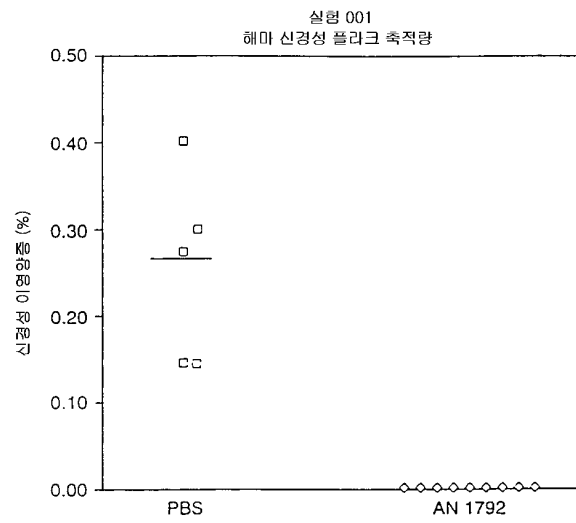
도면1



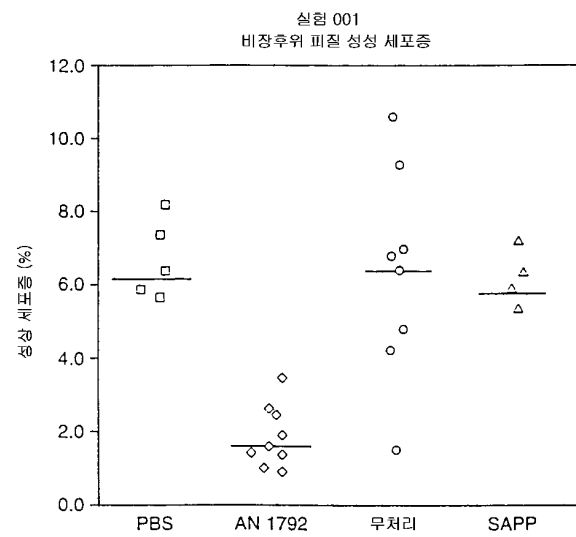
도면2



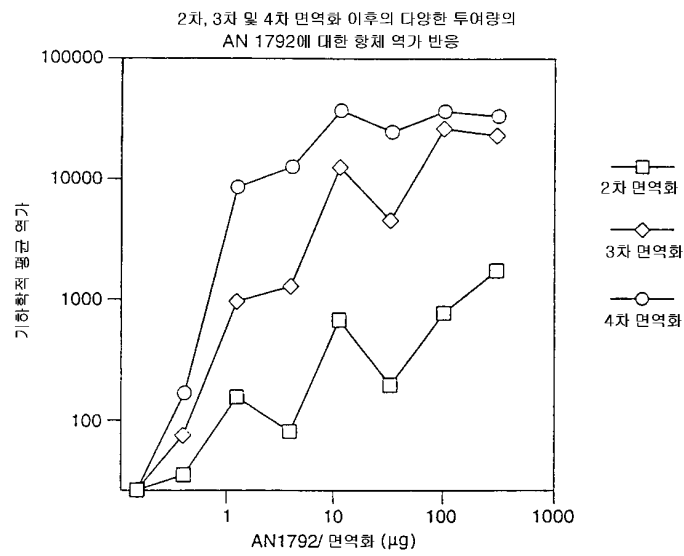
도면3



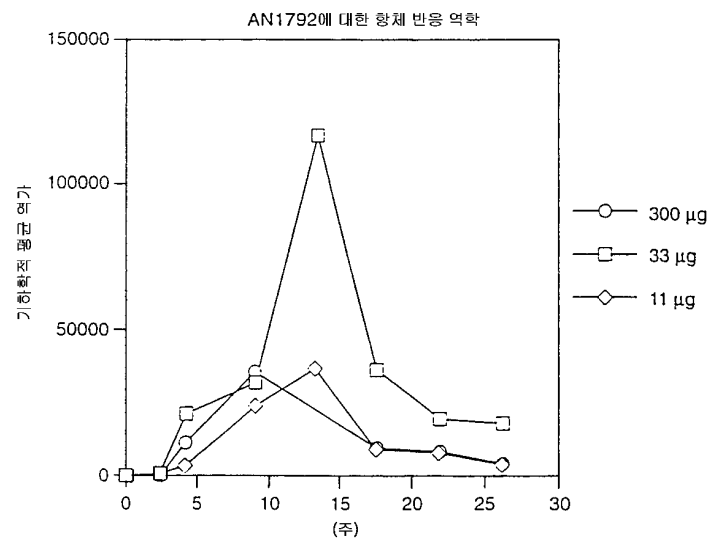
도면4



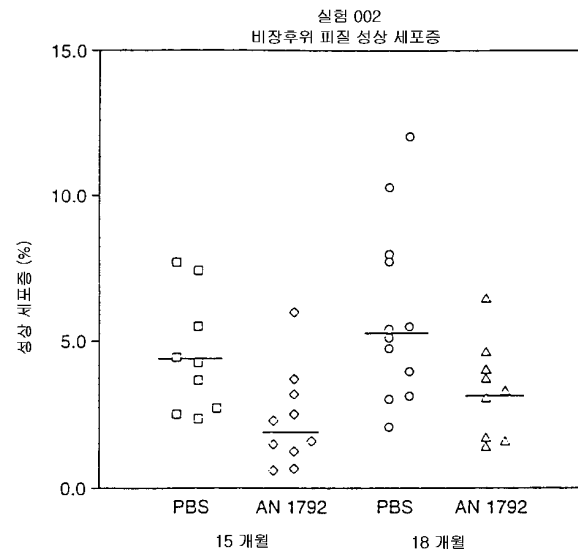
도면5



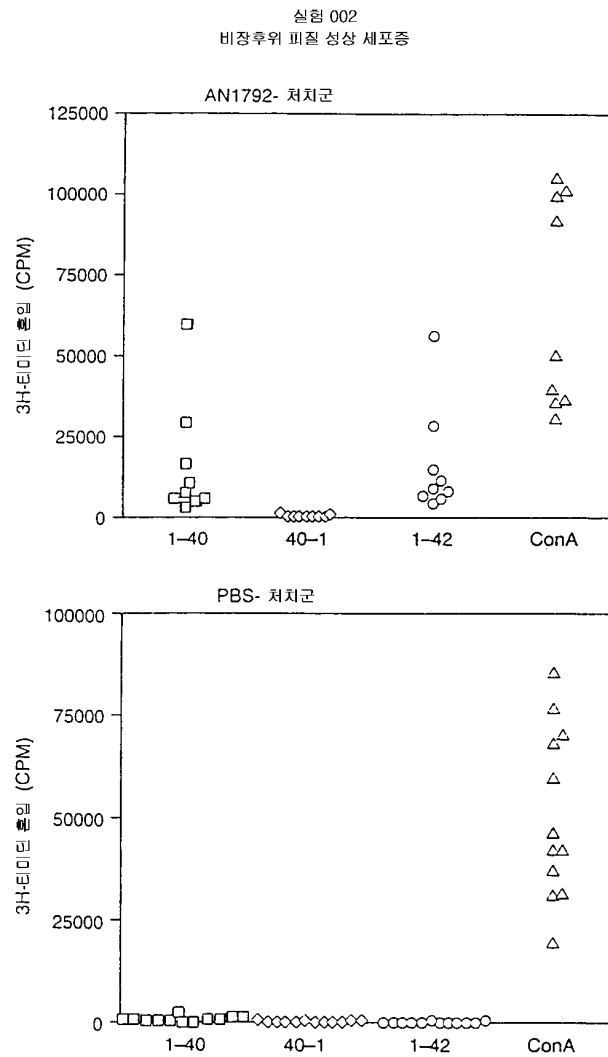
도면6



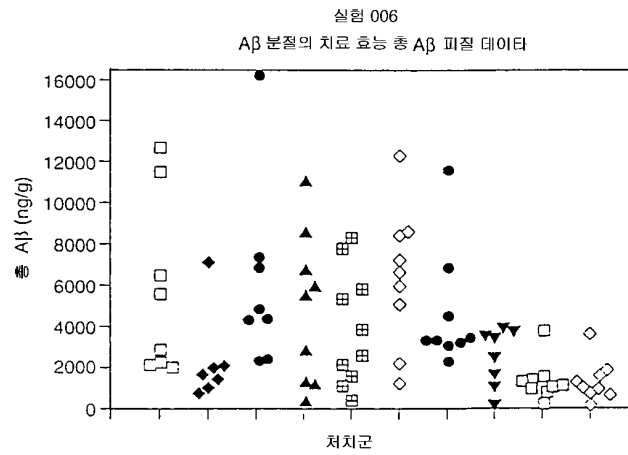
도면9



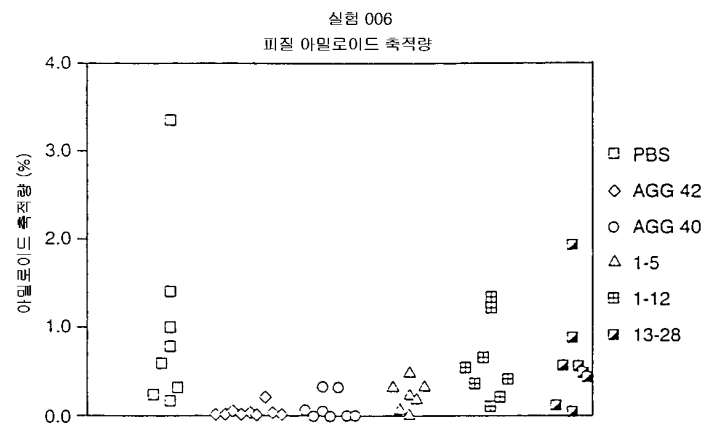
도면10



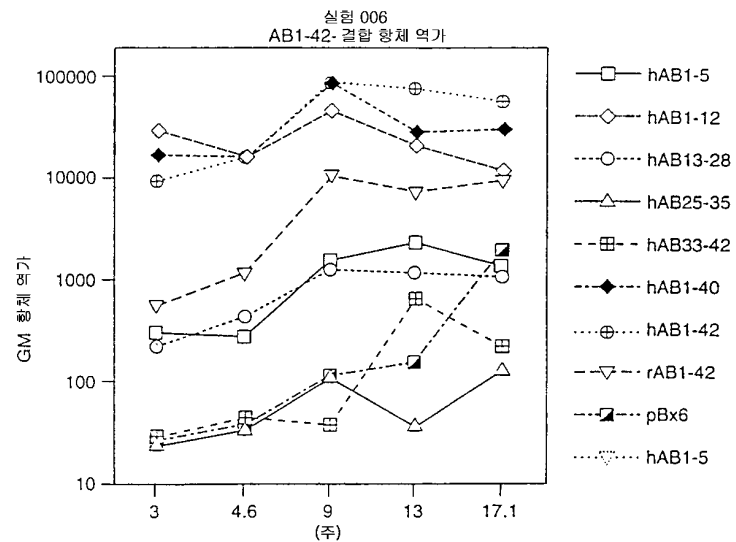
도면11



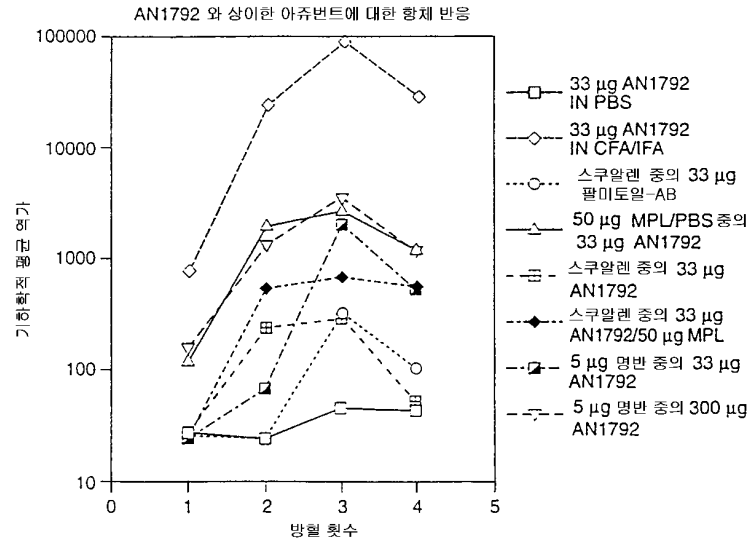
도면12



도면13



도면14



도면15a

피질

PBS 대조용		무처리 대조용	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
829-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
중앙값 p MALUE (M-W)	1817	중앙값 p MALUE (M-W)	1153
평균	1931	평균	1825
표준 편차	1718	표준 편차	1769
% CV	89	% CV	97
p값 (t 테스트)	n=16	p값 (t 테스트)	n=15

도면15b

피질

2 mg 명반 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
663-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
중앙값 p MALUE (M-W)	2051	중앙값 p MALUE (M-W)	1741
평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=20	2407 1913 79 n=20	평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=21	2140 1659 78 n=21

도면15c

피질

25 µg QS21 100 µg AN1528		CEA/IFA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
중앙값 p MALUE (M-W)	1199	중앙값 p MALUE (M-W)	475 0.0481
평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=21	1552 1364 88 n=21	평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=15	637 655 103 0.0106 n=15

도면15d

피질

5 µg 티메로살/PBS 10 µg AN1792		2 µg 명반 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
중앙값 p MALUE (M-W)	1687	중앙값 p MALUE (M-W)	1375 0.5000
평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=15	2718 2685 99	평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=21	1394 1166 84 0.2650 n=21

도면15e

피질

50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
중앙값 p MALUE (M-W)	774 0.1710	중앙값 p MALUE (M-W)	950 0.4076
평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=21	1192 1299 109 0.1506 n=21	평균 표준 편차 % CV p값 (t 테스트) n=18	2199 4187 190 0.8131 n=18