



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0055103
(43) 공개일자 2015년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7011525(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년06월12일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2010-7000719
원출원일자(국제) 2008년06월12일
심사청구일자 2013년06월12일
- (85) 번역문제출일자 2015년04월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/007318
(87) 국제공개번호 WO 2008/156622
국제공개일자 2008년12월24일
- (30) 우선권주장
60/943,509 2007년06월12일 미국(US)
- (71) 출원인
에이씨 이문 에스.에이.
스위스, 체하-1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프
엘 이노베이션 파크
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
파이퍼, 안드레아
스위스, 씨에이치-1806 성-레지에, 르페 데 페닐
16에이
필그렌, 마리아
스위스, 씨에이치-1025 성 설피세, 루에 두 센트
레 42에이
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
한양특허법인

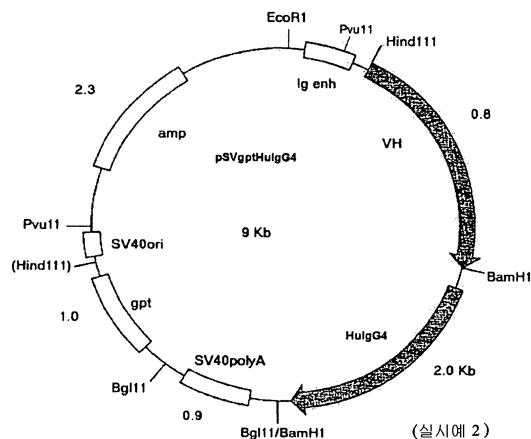
전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 발명의 명칭 아밀로이드 베타에 대해 인간화된 항체

(57) 요약

본 발명은 키메라 항체 및 인간화된 항체에 관한 것이고, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 이상(abnormality) 및 장애(disorder) 그룹인 아밀로이드증(amyloidosis)의 치료에서 치료 및 진단 용도를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/4711 (2013.01)

C07K 16/46 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

(72) 발명자

무스, 안드레아스

스위스, 씨에이치-1009 풀리, 에비뉴 데쓰 체리시
에르스 39비

왓츠, 라이언

미합중국, 캘리포니아 94402, 샌 마테오, 예일 드
라이브 524

명세서

청구범위

청구항 1

β -아밀로이드 단백질 상의 하나 이상의 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편으로서, 여기서 상기 에피토프는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기들을 포함하고, 여기서 상기 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기들은 하기로 구성되는 그룹으로부터 선택되고:

a) 하기의 코어 서열(서열 식별 번호: 10) 내에 끼워진 -Lys-Leu- :

Xaa1 - Xaa2 - Lys - Leu - Xaa3

여기서, Xaa1은 His, Asn, Gln, Lys, 및 Arg로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산이고,

Xaa2는 Asn 및 Gln로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산이며,

Xaa3은 Ala, Val, Leu, 노르류신(norleucine), Met, Phe, 및 Ile로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산이고, 및

b) 하기의 코어 서열(서열 식별 번호: 9) 내에 끼워진 Phe-Phe- :

Xaa3 - Phe - Phe - Xaa4 - Xaa5 - Xaa6

여기서, Xaa3은 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,

Xaa4는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,

Xaa5는 Glu 및 Asp로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,

Xaa6은 Glu 및 Asp로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,

여기서 상기 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편은 변형 Fc 영역(variant Fc region)을 포함하고, 또한 여기서 상기 변형 Fc 영역은 야생형(wild-type) Fc 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 변형(amino acid modification)을 포함하여, 상기 분자가 야생형 Fc 영역에 비해 변형된 이펙터 기능(modified effector function)을 갖는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 β -아밀로이드 단백질 상의 둘 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 여기서 상기 둘 이상의 에피토프는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하며, 이는 각각 -Phe-Phe- 및 -Lys-Leu-이고, 여기서 상기 둘 이상의 별개의 결합 부위(distinct binding site)는, 각각 서열 식별 번호 : 7로 나타낸 아미노산 서열 -Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - 및 서열 식별 번호 : 8로 나타낸 아미노산 서열 His - Gln - Lys - Leu - Val - 을 나타내는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 3

가변 영역(variable region) 내에 비인간 기원의 하나 이상의 CDR 및 하나 이상의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역과, 선택적으로, 인간 또는 영장류 기원 항체로부터 유래된 불변 영역(constant region)을 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편으로서, 인간화된 항체 또는 이의 단편이 β -아밀로이드 단백질, β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 복수의 β -아밀로이드 모노머 단위를 포함하는 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드, β -아밀로이드 섬유, 피브릴(fibril) 또는 필라멘트(filament), 및 β -아밀로이드 플라크의 일부로서 또는 분리된 β -아밀로이드 폴리머성 펩타이드에, 하기의 아미노산 서열(서열 식별 번호: 11)을 포함하는 에피토프에서,

특이적으로 결합할 수 있는 인간화된 항체 또는 이의 단편:

Xaa1 - Xaa2 - Lys - Leu - Xaa3 - Phe - Phe- Xaa4 - Xaa5 - Xaa6

여기서

Xaa1은 His, Asn, Gln로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 His이고;

Xaa2는 Asn 및 Gln로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Gln이며; 또한

Xaa3은 Val, Leu, 및 Ile로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Val이고;

Xaa4는 Ala 및 Val로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Ala이며;

Xaa5는 Glu 및 Asp로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Glu이고; 또한

Xaa6은 Glu 및 Asp로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Asp이다.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 인간화된 항체가, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3과, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR 및 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역을 가지는 가변 영역을 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 5

서열 식별 번호: 1-6으로 주어진 경쇄 및 중쇄 CDR 영역의 아미노산 중 하나 이상이, 항체가 그의 완전한 기능성(full functionality)을 유지하도록 보존적 치환(conservative substitution)을 통해 바뀌는, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 서열 식별 번호: 5로 주어진 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR2의 아미노산 서열 내에서, Kabat 위치 50의 Lys는 Arg, Gln 또는 Glu에 의해, 특히 Arg으로 교체되고, 및/또는 Kabat 위치 53의 Ser은 Asn 또는 Thr에 의해, 특히 Asn에 의해 교체되고, 및/또는 Kabat 위치 53의 Asn은 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile에 의해; 특히 Ser에 의해 교체되는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역의 아미노산 중 하나 이상은 마우스의 (murine) 항체 ACI-O1-Ab7C2의 대응 영역으로부터의 아미노산으로의 치환 또는 이에 대한 보존적 치환을 통해 바뀌는 것인, 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 8

청구항 162에 있어서,

서열 식별 번호: 15에 나타난 중쇄 가변 영역의 상기 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 47의 Trp는 Leu, 노르류신, Ile, Val, Met, Ala, 및 Phe로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해, 특히 Leu 및 Ile에 의해, 특별히 Leu에 의해 교체되고, 및/또는

서열 식별 번호: 15에 나타난 중쇄 가변 영역의 상기 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 94의 Arg은 Ser 및 Thr로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해, 특히 Ser에 의해 교체되고, 및/또는

서열 식별 번호: 12에 나타난 경쇄 가변 영역의 상기 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 87의 Tyr은 Phe, Leu, Val, Ile, 및 Ala로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해, 특히 Leu 및 Phe에 의해, 특별히 Phe에 의해 교체되는 것인,

인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역(HCVR)이, 각각 서열 식별 번호 : 15 및 16에 정의된 서열과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98%, 보다 더 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역(LCVR)이, 각각 서열 식별 번호 : 12 및 13에 정의된 서열과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98%, 보다 더 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR 영역들의 적어도 2개, 특히 3개가, 서열 식별 번호 : 1 - 3에 기술된 상응하는 CDR 영역과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98%, 보다 더 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 것인, 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR 영역들의 적어도 2개, 특히 3개가, 서열 식별 번호 : 4 - 6에 기술된 상응하는 CDR 영역과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98%, 보다 더 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 것인, 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 항체가 A β 모노머의 응집(aggregation)을 억제 가능하고, 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트, 특히 고도의 입체형태적 민감도(conformational sensitivity)로 작지어진 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 해체(disaggregation) 가능한 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 14

청구항 1에 있어서, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 및 1-42로부터 선택된 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 및/또는 복수의 상기 A β 모노머성 펩타이드를 포함하는 폴리머성 가용성 β -아밀로이드 펩타이드와, 및 특히 A β 1-42 모노머성 펩타이드 및/또는 복수의 A β 1-42 모노머성 펩타이드를 포함하는 A β 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드와 공동-인큐베이션(co-incubation) 시에, 항체가 A β 모노머의 고분자 폴리머성(high molecular polymeric) 피브릴 또는 필라멘트로의 응집을 억제하고, 또한, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 및 1-42로부터 선택된 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드의 응집에 의해, 및 특히 A β 1-42 모노머성 펩타이드의 응집에 의해 형성된 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와의 공동-인큐베이션 시에, 항체가 상기 미리 형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 해체 가능한 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 항체가 포유류 및 인간으로부터 선택된 대상의 뇌 내에서 응집된 A β 에 실질적으로 결합하는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 항체가 포유류 또는 인간의 뇌 내에서 A β 플라크 존재량(burden)을 감소시키는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 17

청구항 1에 기재된 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편을 인코딩하는(encoding) 뉴클레오타이드 서열 또는

각각, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 상보성 결정 영역(CDR) 2 및 3을 나타내는 서열 식별 번호 : 2 및 서열 식별 번호 : 3을 인코딩하는 서열, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR 1을 나타내는 서열 식별 번호 : 4를 인코딩하는 서열,

서열 식별 번호 : 18, 서열 식별 번호 : 19, 서열 식별 번호 : 20, 서열 식별 번호 : 22의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열, 서열 식별 번호 : 22의 경쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호 : 23의 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 서열, 서열 식별 번호 : 25의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열, 및 서열 식별 번호 : 25의 중쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호 : 26의 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 서열로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열

을 포함하는 핵산 분자.

청구항 18

청구항 17에 기재된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 19

청구항 18에 기재된 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 20

임의의 기능적으로 균등한 항체 또는 이의 기능성 부분(functional part)을 포함하는 청구항 1에 기재된 항체를 치료적 유효량으로 포함하고, 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 21

임의의 기능적으로 균등한 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 청구항 1에 기재된 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 선택적으로 치료적 유효량의 추가적 생물학적 활성 물질 및/또는 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 추가로 포함하는 조성물로서, 여기서 상기 추가적 생물학적 활성 물질이, 아밀로이드증의 치료에 사용되는 화합물, 산화적 스트레스에 대한 화합물, 항-자가사멸 화합물, 금속 킬레이터(chelator), 피렌제핀(pirenzepin) 및 대사물과 같은 DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술폰산(3APS), 1,3-프로판디술폰네이트(1,3PDS), α -세크레타아제 활성제(α -secretase activator), β - 및 γ -세크레타아제 억제제, 타우 단백질(tau protein), 신경전달물질(neurotransmitter), β -시트 파괴제(sheet breaker), 아밀로이드 베타 제거(clearing)/고갈(depleting) 세포 성분에 대한 유인물질(attractant), 피로글루타메이트화(pyroglutamated) 아밀로이드 베타 3-42를 포함하는 N-말단 잘린 아밀로이드 베타의 억제제, 항-염증 분자, 및 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 도네페질(donepezil), 및/또는 갈란타민(galantamine)과 같은 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs), M1 작용제 및 임의의 아밀로이드 또는 타우 변형 약물 및 영양 보조제를 포함하는 다른 약물, 및, 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 22

질환의 방지, 치료 또는 완화를 필요로 하는 대상에서 아밀로이드증, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 판 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펔트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인발병형 당뇨병, 노인성 심아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성으로부터 선택된 하나 이상의 아밀로이드증-관련 질환의 영향을 방지, 치료 또는 완화시키기 위한 방법으로서, 치료적 유효량으로 상기 질환에 걸린 대상에게 청구항 1에 기재된 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편 및/또는 이의 기능성 부분을 투여하는 것을 포함하는, 질환의 영향을 방지, 치료 또는 완화시키기 위한 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 아밀로이드-관련된 병태(condition)로부터 고통받는 대상, 특히 포유류 또는 인간의 치료가, 인지 기억 능력의 유지의 증가 또는 그 완전한 회복을 가져오는 것인, 질환의 영향을 방지, 치료 또는 완화시키기 위한 방법.

청구항 24

(a) 아밀로이드 단백질을 보유하는 것으로 의심되는 대상의 조직 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역을 청구항 1에 기재된 항체와 접촉시키는 단계;

(b) 상기 아밀로이드 단백질에 상기 항체가 결합하도록 하는 단계;

- (c) 상기 단백질에 결합된 항체를 검출하는 단계; 및
- (d) 항체 결합의 존재 또는 부재를, 상기 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 구역 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계
- 를 포함하는, 대상에서 아밀로이드 관련 질환 또는 병태의 진단 방법.

청구항 25

- (a) 조사중인 대상에서 조직 및/또는 체액을 대표하는 샘플을 수득하는 단계;
- (b) 청구항 1에 기재된 항체로 아밀로이드 단백질의 존재에 대해 상기 샘플을 테스트하는 단계;
- (c) 상기 단백질에 결합된 항체의 양을 측정하는 단계; 및
- (d) 상기 대상의 조직 및/또는 체액 내의 플라크 존재량을 계산하는 단계
- 를 포함하는 대상의 조직 및/또는 체액 내에서 아밀로이드 형성(amyloidogenic) 플라크 존재량의 정도를 측정하는 방법.

청구항 26

청구항 1에 기재된 항체, 및 선택적으로 아밀로이드 단백질에 결합시켜 면역 복합체를 형성하고 상기 면역 복합체의 형성을 검출하여 상기 면역 복합체의 존재 또는 부재를 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 것을 목적으로 하는 상기 항체의 사용을 위한 설명서를 추가로 포함하는, 아밀로이드 관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 위한 테스트 키트.

청구항 27

인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역, 및 서열 식별 번호 4, 서열 식별 번호 5, 및 서열 식별 번호 6으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 CDR을 포함하는 분리된(isolated) 경쇄 가변 영역(LCVR).

청구항 28

인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역, 및 서열 식별 번호 2 및 서열 식별 번호 3으로 구성된 서열의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 CDR을 포함하는 분리된 중쇄 가변 영역(HCVR).

청구항 29

서열 식별 번호 12의 경쇄 가변 영역(LCVR).

청구항 30

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 A β 모노머, 및/또는 A β 섬유, 피브릴 또는 필라멘트 및/또는 가용성 폴리머성 아밀로이드 베타에 실질적으로 결합하고, 여기서 상기 항체 또는 이의 단편이 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성(cross-reactivity)도 나타내지 않는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 항체 또는 단편이 적어도 약 1×10^{-7} M 내지 적어도 약 1×10^{-12} M, 적어도 약 1×10^{-8} M 내지 적어도 약 1×10^{-11} M, 적어도 약 1×10^{-8} M 내지 적어도 약 1×10^{-10} M, 및 적어도 약 1×10^{-8} M 내지 적어도 약 5×10^{-8} M 으로 구성된 그룹에서 선택된 범위의 KD로 표시되는 결합 친화도로 A β 모노머에 결합하고, 또한 여기서 상기 항체 또는 단편이 적어도 약 1×10^{-7} M 내지 적어도 약 1×10^{-12} M, 적어도 약 1×10^{-8} M 내지 적어도 약 1×10^{-11} M, 적어도 약 1×10^{-9} M 내지 적어도 약 1×10^{-10} M, 및 적어도 약 2×10^{-9} M 내지 적어도 약 8×10^{-9} M 으로 구성된 그룹에서 선택된 범위의 KD로 표시되는 결합 친화도로 A β 섬유, 피브릴 또는 필라멘트에 결합하는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 32

청구항 30에 있어서, 상기 항체가 A β 모노머에 비해, 가용성 폴리머성 아밀로이드 베타 및 A β 섬유, 피브릴 또는 필라멘트에 대한 더 높은 친화도를 갖는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 A β 모노머에 대한 결합 친화도에 비해 10배 이상, 특히 15배 이상, 보다 특히 20배 이상, 및 특히 25배 이상 더 높은, A β 섬유, 피브릴 또는 필라멘트에 대한 결합 친화도를 나타내는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 34

청구항 1에 있어서, 상기 항체가 포유류, 특히 인간 뇌 내에서, 응집된 A β , A β 플라크, 및/또는 가용성 섬유에 실질적으로 결합하지만, 바람직하게는, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성도 나타내지 않는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 35

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이, 조직 및/또는 체액, 특히 뇌 내에서, 입체형태의 시프트 유도에 의해 섬유를 가용성 폴리머 및 모노머 형태로 해체시킴으로써, 그의 가용성 상태 및 응집된 상태의 A β 사이의 평형을 그의 가용성 형태로 시프트시키고, 또한 상기 해체된 및 가용화된 A β 형태에 결합 및 안정화시킬 수 있는, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이, β -시트 입체형태의 α -나선 및/또는 랜덤 코일 입체형태, 특히 랜덤 코일 입체형태, 보다 특히 분자 내 주어진 위치에서, 특히 A β 단백질의 Tyr 10 및 Val 12의 환경에서 랜덤 코일 입체형태로의 전이를 유도할 수 있고, 이는 β -시트 입체형태를 손실시켜 랜덤 코일 입체형태를 증가시키고, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트의 개선된 가용화를 가져오는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 상기 β -시트 입체형태의 감소는 완충액 내에서 인큐베이트된 각각의 미리형성된 아밀로이드 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트(대조군)에 비교하여 30% 이상, 특히 35% 이상, 또한 보다 특히 40% 이상에 달하는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 38

청구항 35에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 폴리머성 가용성 A β 단백질 종(species) 및/또는 덜 응집된 가용성 A β 단백질 종 및/또는 가용성 A β 단백질의 모노머 형태에 실질적으로 결합하고, 그에 따라 이들 A β 단백질 종의 주변 제거(peripheral clearing) 및 이화작용(catabolism)을 변형시키고 또한 이들의 독성 효과를 감소시키는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 39

청구항 23에 있어서, 상기 인간화된 항체 또는 이의 단편이 뇌 밖에서 응집된 아밀로이드 베타와 결합하는 것인, 질환의 영향을 방지, 치료 또는 완화시키기 위한 방법.

청구항 40

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이, 섬유를 가용성 폴리머 및 모노머 형태로 해체시킴으로써, A β 의 가용성 및 응집된 상태 사이의 평형을 그의 가용성 형태를 향해 시프트시킬 수 있는, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 41

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이, 인간 조직 및/또는 체액, 특히 뇌 내에서 A β 에 실질적으로 결합하지 않으나, 입체형태 내에서 시프트의 유도에 의해 섬유를 가용성 폴리머 및 모노머 형태로 해체시킴으로써 A β 의 가용성 및 응집된 상태 사이의 평형을 그의 가용성 형태를 향해 시프트시키고 또한, 조직 및/또는 체액, 특히 뇌 내에서, 상기 해체된 및 가용화된 A β 형태에 결합 및 안정화시킬 수 있는 것인, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 42

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 마우스 항체의 결합 친화도에 비해 5배, 10배 이상 특히 15배 이상, 보다 특히 20배 이상, 특히 100배 이상 더 높은 결합 친화도를 나타내는 것인, 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 43

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편의 친화도, 특이성 및 안정성이 글리코실화 프로파일(glycosylation profile)의 변화에 의해 변형된 것인, 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 44

청구항 1에 있어서, 상기 아미노산 변형이 감소된 이펙터 기능을 초래하는 것인, 항체.

청구항 45

청구항 44에 있어서, Fc 영역 아미노산 변형은 아미노산 위치 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 또는 439의 하나 이상에서의 변화를 포함하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 46

청구항 44에 있어서, Fc 영역 아미노산 변형은 D265A 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인, 항체 또는 이의 단편.

청구항 47

서열 식별 번호: 27 또는 서열 식별 번호: 29에 기술된 하나 이상의 가변 영역을 포함하는 항체, 또는 이의 변형체(variant).

청구항 48

청구항 47의 항체를 발현하는 세포주.

청구항 49

hC2 항체를 미리형성된 베타-아밀로이드 섬유와 상호작용시키는 것을 포함하는, 미리형성된 베타-아밀로이드 섬유를 해체시키기 위한 방법.

청구항 50

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편이 뉴런을 A베타-유도된 분해(degradation)로부터 보호하는, 인간화된 항체 또는 이의 단편.

청구항 51

청구항 1에 기재된 인간화된 항체 또는 이의 단편의 유효량으로 뉴런을 처리하는 것을 포함하는 A베타-유도된 뉴런 분해를 방지하는 방법.

청구항 52

청구항 1에 있어서, 상기 변형 Fc 영역이 변형 IgG1 Fc 영역인 것인, 항체 또는 이의 단편.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 특허 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미합중국 가출원 제60/943,509호(2007년 6월 12일자 출원)에 대한 우선권을 주장하며, 이는 인용에 의해 본 명세서에 일체화된다.

[0003] 본 발명은 알츠하이머병(Alzheimer's disease)과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 이상(abnormality) 및 장애(disorder) 그룹인 아밀로이드증(amyloidosis)의 의 치료 및 진단을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 아밀로이드증(amyloidosis)은 단일 질환(single disease entity)이 아니라 오히려, 하나 이상의 기관 또는 신체 내에 축적되는, 아밀로이드로 불리는 밀랍상(waxy), 전분-유사 단백질의 세포외 조직 침착물(deposit)을 특징으로 하는 진행성 질환 과정의 다양한 그룹이다. 상기 아밀로이드 침착물이 축적됨에 따라, 이는 상기 기관 또는 신체의 정상 기능을 방해하기 시작한다. 적어도 15개의 상이한 유형의 아밀로이드증이 존재한다. 주된 형태는 공지된 선행징후(antecedent)가 없는 원발성 아밀로이드증(primary amyloidosis), 일부 다른 병태(condition)에 따르는 속발성 아밀로이드증(secondary amyloidosis), 및 유전성 아밀로이드증(hereditary amyloidosis)이다.

[0005] 속발성 아밀로이드증은 결핵(tuberculosis), 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever)로 불리는 세균 감염, 뼈 감염(골수염(osteomyelitis)), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 소장염(육아종회장염(granulomatous ileitis)), 호지킨병(Hodgkin's disease), 및 나병(leprosy)과 같은 염증 질환 또는 만성 감염 도중 발생한다.

[0006] 아밀로이드 침착물은 아밀로이드 P(오각형) 성분(AP), 정상 혈청 아밀로이드 P (SAP)와 관련된 당단백질, 및 연결 조직의 복합 탄수화물인 황산화 글리코사미노글리칸(sulfated glycosaminoglycan; GAG)을 포함한다. 아밀로이드 물질의 약 90%를 차지하는 아밀로이드 단백질 피브릴(fibril)은 여러 상이한 유형의 단백질 중 하나를 포함한다. 이들 단백질들은 아밀로이드 단백질의 독특한 염색 특성을 가져오는 콩고 레드(Congo red)에 대한 결합 부위를 나타내는 독특한 단백질 배열(configuration)인, 소위 "베타-플리드(beta-pleated)" 시트 피브릴로 접힐 수 있다.

[0007] 많은 노화 질환은 아밀로이드-유사 단백질에 기반하거나 이와 관련되고, 질환의 발병기전뿐만 아니라 진행에 기여하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 물질의 세포외 침착물의 형성을 일부 특징으로 한다. 이들 질환은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 신경계 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down's syndrome), 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type)); 괄 파킨슨-치매 복합증(Guam Parkinson-Dementia complex)을 포함한다. 아밀로이드-유사 단백질에 기반하거나 또는 이와 관련된 다른 질환으로는 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis); 크로이츠펔트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, ALS(근육위축측경화증(amyotrophic lateral sclerosis)), 성인 발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes); 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis); 내분비 종양, 및 황반 변성(macular degeneration)을 포함하는 그 밖의 질환이 있다.

[0008] 비록 이들 질환의 발병기전은 다양할 수 있지만, 이들의 특징적인 침착물은 종종 많은 공통적인(shared) 분자 성분을 함유한다. 이는 전염증성(pro-inflammatory) 경로의 국부적 활성화에 상당한 정도로 기여할 수 있어, 활성화된 보체 성분(complement component), 급성기 반응물질(acute phase reactant), 면역 조절물질(immune modulator), 및 다른 염증 매개체(inflammatory mediator)가 동시 침착을 가져올 수 있다(McGeer 등, 1994).

[0009] 알츠하이머병(AD)은 뇌 내 단백질의 이상 침착물의 축적물인 아밀로이드 플라크에 기인하는 것으로 주로 생각되는 신경계 장애이다. 병에 걸린 사람의 뇌에서 발견되는 가장 흔한 아밀로이드의 유형은 주로 A β 피브릴로 구성된다. 과학적 증거는, 플라크에서의 베타-아밀로이드 단백질의 생산 및 축적의 증가가 신경 세포 사멸을 초래한다는 것을 증명하고 있는데, 신경 세포의 사멸은 AD의 발생 및 진행에 기여한다. 이어서, 중요한(strategic) 뇌 영역에서의 신경세포의 손실은 신경 전달 물질의 감소와 기억의 손상을 유발한다. 플라크 형성에 주로 필수적인 단백질은 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 및 2개의 프레세닐린(presenilin)(프레세닐린 I 및

프레세닐린 II)을 포함한다. 효소 β 및 γ 세크레타아제(secretase)에 의한, 대부분의 세포에서 구성적으로 발현되고 이화되는(catabolized) 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 순차적 분할(cleavage)은 39 내지 43 아미노산 $A\beta$ 펩타이드를 방출시킨다. APP의 분해는 그들의 플라크로 응집하려는 경향을 증가시키는 듯 하다. 응집체(aggregate) 형성 경향이 높은 것은 특히 $A\beta$ (1-42) 단편(fragment)인데, 이는 그의 C-말단에서의 2개의 극소수성(very hydrophobic) 아미노산 잔기에 기인한다. 따라서, 상기 $A\beta$ (1-42) 단편은 AD에서 신경 플라크(neutritic plaque) 형성의 개시에 주로 관여하고 또한 원인이 되는 것으로 여겨지며, 따라서 높은 병리적 가능성을 갖는 것으로 여겨진다. 따라서 아밀로이드 플라크 형성을 예방하기 위한 및 AD에서 존재하는 플라크를 흐트러뜨리기 위한 작용제가 필요하다.

[0010] AD의 증상은 서서히 나타나며, 최초의 증상은 단지 가벼운 건망증일 뿐이다. 이 단계에서, 사람들은 최근의 사건, 활동, 잘 아는 사람들 또는 사물들의 이름을 잊어버릴 수 있으며, 간단한 수학 문제를 풀 수 없을수도 있다. 질환이 진행함에 따라, 증상은 보다 쉽게 인지되고 AD에 걸린 사람 또는 그의 가족 구성원이 의학적 도움을 찾을만큼 심각해진다. AD의 중기 단계의 증상은 몸치장(grooming)과 같은 간단한 일을 하는 법을 잊어버리는 것을 포함하고, 말하기, 이해하기, 읽기 또는 쓰기에서 문제점이 발생한다. 후기 단계의 AD 환자는 불안해하거나 또는 공격적이 될 수 있고, 집을 잃어버릴 수 있으며 결국 종합 간병을 필요로 한다.

[0011] 현재, AD를 진단하기 위한 명확한 방법은 개체의 사망 후 부검에서 뇌 조직의 플라크 및 매듭(tangle)을 확인하는 것이 유일하다. 따라서, 사람이 아직 살아있는 동안, 의사는 "있을법한(possible)" 또는 "유력한(probable)" AD의 진단만을 수행할 수 있다. 통상의 방법을 사용하여, 내과의사는 "유력한" AD를 진단하기 위한 여러 도구를 이용하여 90 퍼센트 이하의 정확도로 AD를 진단할 수 있다. 내과의사는 사람의 일반적인 건강, 과거의 의료적 문제, 및 일상 활동을 수행하며 갖는 모든 어려움의 히스토리(history)에 대해 질문한다. 기억력, 문제 해결, 집중력, 계산, 및 언어의 행동 테스트는 인지 퇴행의 정보를 제공하며, 의학적 테스트, 예컨대 혈액, 소변, 또는 척수액의 테스트 및 뇌 스캔은 일부 추가적 정보를 제공할 수 있다.

[0012] AD의 관리는 투약-기반 및 비투약 기반 치료로 구성된다. 질환의 근원적 과정의 변화(진행의 지연 또는 되돌림)를 목표로 한 치료는 지금까지 대부분 실패해왔다. 신경 세포의 화학적 전달자(신경전달물질)의 결핍(결손), 또는 기능부전(malfunctioning)을 회복시키는 약물, 특히 타크린(tacrine) 및 리바스티그민(rivastigmine)과 같은 콜린에스테라제 억제제(ChEI)는 증상의 개선을 나타내어 왔다. ChEI는 신경전달물질의 효소적 분해를 방해하여 뇌에서의 신경 신호를 전달할 수 있는 화학적 전달자의 양을 증가시킨다.

[0013] 질환 초기 및 중기 단계의 일부 사람들을 위한 약물들인, 타크린 (COGNEX[®], Morris Plains, NJ), 도네페질(donepezil) (ARICEPT[®], Tokyo, JP), 리바스티그민 (EXELON[®], East Hanover, NJ), 또는 갈란타민(galantamine) (REMINYL[®], New Brunswick, NJ)은 한정된 시간 동안 일부 증상이 악화되는 것을 방지하는 것을 도울 수 있다. 다른 약물인, 메만틴(memantine) (NAMENDA[®], New York, NY)은 중등도 내지 중증 AD의 치료를 위해 승인되었다. 투약은 또한 AD의 정신병적 증상(manifestation)을 다룰(address) 수 있다. 또한, 일부 약은 불면, 초조, 유주성(wandering), 불안 및 우울증과 같은 AD의 행동 증상의 제어를 도울 수 있다. 이들 증상의 치료는 종종 환자를 보다 편안하게 만들고 또한 간병인에게는 간병이 보다 수월해지도록 한다. 불행히도, 이 클래스의 작용제가 위약(placebo)보다 일반적으로 나은 것을 나타내는 유의한 치료적 진보에도 불구하고, 질환은 계속 진행되고, 정신 기능에서의 평균 효과는 그다지 크지 않다. 예를 들어, ChEI와 같이, AD 약물치치에 사용되는 다수의 약물은 위장관 기능장애, 간 독성 및 체중 감소를 포함하는 부작용도 갖는다.

[0014] 아밀로이드-유사 단백질의 축적 및 침착에 기반하거나 또는 이와 관련된 다른 질환은 황반 변성이다.

[0015] 황반 변성은 흔한 안질환으로, 망막 (감광(light-sensitive) 세포가 뇌로 시각 신호를 보내는 눈 뒤쪽의 종이처럼 얇은 조직)의 중심 영역인 황반의 악화(deterioration)를 유발한다. 선명한, 맑은, '거짓없는(straight ahead)' 시력은 황반에 의해 처리된다. 황반에의 손상은 맹점(blind spot) 및 흐려보임 또는 난시의 진행을 야기한다. 연령-관련 황반 변성(AMD)은 미국에서 65세가 넘는 사람들에게서 시각 손상의 주된 원인이며, 백인 중 법적 맹인의 주요 원인이다. 약 180만명의 40세 이상의 미국인들이 진행된(advanced) AMD에 걸려 있으며, 중간(intermediate) AMD에 걸린 다른 730만명의 사람들은 시력 상실에 대한 실질적 위험에 처해 있다. 정부는 2020년까지 290만명의 사람이 진행된 AMD에 걸릴 것으로 추정하고 있다. AMD의 희생자는 종종, 이 눈을 멀게 하는 병태의 치료 및 원인에 대해 알려진 바가 매우 적다는 것을 발견하고 놀라고 좌절한다.

[0016] 황반 변성은, 건성 황반 변성(dry macular degeneration) 및 습성 황반 변성(wet macular degeneration)의 두

형태가 있다. 황반의 세포가 천천히 파괴되기 시작하는 건성 형태는, 황반 변성 사례의 85 퍼센트에서 진단된다. 한쪽 눈이 시력을 상실하고, 다른쪽 눈이 병에 걸리지 않은 상태로 남아있을 수 있지만, 통상적으로 양쪽 눈 모두 AMD에 걸린다. 망막 아래의 황색 침착물인 드루젠(drusen)은, 건성 AMD의 통상적인 초기 징후이다. 진행된 건성 AMD 또는 습성 AMD의 발전 위험은 드루젠의 크기 또는 수가 증가할수록 증가한다. 건성 AMD는 진행하여, 질환의 습성 형태로 변하지 않고 시력 상실을 유발하는 것이 가능하다; 그러나, 초기 단계의 건성 AMD가 갑자기 습성 형태로 변화하는 것 또한 가능하다.

[0017] 습성 형태는, 비록 사례의 15 퍼센트만을 차지하지만, 실명의 90퍼센트를 초래하고, 진행된 AMD로 여겨진다 (습성 AMD의 초기 또는 중기 단계는 없다). 습성 AMD는 언제나 질환의 건성 형태가 선행한다. 건성 형태가 악화되면, 일부 사람들은 황반 뒤에 자라는 비정상적인 혈관을 갖기 시작한다. 이들 혈관들은 매우 연약하여 유체와 혈액이 새 것이고 (따라서, '습성' 황반 변성), 황반에 대한 급속한 손상을 유발한다.

[0018] AMD의 건성 형태는 처음에 종종 약간 흐려보이는 시야를 유발할 것이다. 그 후 특히 시야의 중심이 흐려지고, 질환이 진행함에 따라 이 영역은 더욱 커진다. 한쪽 눈만 병에 걸렸다면 어떠한 증상도 인지하지 못할 수 있다. 습성 AMD에서는, 직선이 물결모양인 것 같이 보일 수 있고, 중심 시력 상실이 급속히 발생할 수 있다.

[0019] 황반 변성의 진단은 일반적으로 확장된 눈 검사(dilated eye exam), 시력 테스트(visual acuity test), 및 AMD의 진단을 돕기 위한 안저검사(fundoscopy)로 불리는 절차를 이용하여 눈의 뒤쪽을 관찰하는 것을 포함하고, 또한 - 만약 습성 AMD가 의심된다면 - 형광 혈관조영술(fluorescein angiography)도 수행될 수 있다. 만약 건성 AMD가 진행 단계에 도달했다면, 시력 상실을 예방할 수 있는 통용되는 치료는 존재하지 않는다. 그러나, 항산화제 및 아연의 특정 고용량 제형은, 중간 AMD의 진행된 단계로의 진행을 지연시키거나 또는 예방할 수 있다. 마큐젠(Macugen)®(페갑타닙 나트륨 주사액(pegaptanib sodium injection)), 레이저 광응고(laser photocoagulation) 및 광선역학요법(photodynamic therapy)은 황반에서의 비정상적인 혈관 성장 및 출혈을 제어할 수 있으며, 이는 습성 AMD에 걸린 일부 사람들에게 도움이 된다; 그러나, 이미 상실한 시력은 이들 기술에 의해 회복되지 않을 것이다. 시력이 이미 상실되었다면, 삶의 질을 향상시키는데 도움이 될 수 있는 저시력 보조기(low vision aid)가 존재한다.

[0020] *연령-관련 황반 변성(AMD)의 최초의 징후 중 하나는 브루크막(Bruch's membrane; BM)과 망막색소상피(retinal pigmented epithelium; RPE)의 바닥판(basal lamina) 사이에 드루젠으로 알려진 세포의 침착물의 축적이다. Anderson 등에 의해 수행된 최근의 연구는 드루젠이 아밀로이드 베타를 함유하는 것을 확인하였다. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

[0021] AMD에 기여할 수 있는 환경적, 유전적, 및 식이적(dietary) 요인들을 탐구하는 연구와 함께 진행중인 연구가 계속되고 있다. 각막 세포 이식, 질환의 진행을 예방할 또는 감속시킬 약물, 방사선 요법, 유전자 요법, 시력을 자극시키는 것을 도울 수 있는 망막에 삽입되는 컴퓨터 칩 및 황반 아래의 신생 혈관의 성장을 예방할 작용제를 포함하는 새로운 치료 전략 또한 탐구될 것이다.

[0022] 새로운 약물의 개발 시 고려되어야 할 중요한 인자는 타겟 환자에 대한 사용의 용이성이다. 경구 약물 전달 - 구체적으로는 정제, 캡슐 및 소프트겔 -은 환자의 편의상, 소비되는 모든 투여 형태(dosage form)의 70%를 차지한다. 약물 개발자는 환자가 주사를 맞는 것 또는 약의 투여에서의 보다 침습적인 형태(invasive form)인 그 밖의 것에 비해 경구 전달을 선호하는 것에 동의한다. 낮은 투약 간격(즉, 1일 1회 또는 지속성 방출(sustained release))을 초래하는 제형 또한 바람직하다. 경구 투여 형태로 투여하는 항생제의 용이성은 치료 동안 환자 순응도를 증가시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0023] 필요한 것은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질과 관련되거나 또는 이에 기반하는 다른 질환을 포함하는, 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증과 관련된 합병증을 예방 또는 처리하

기 위한 효과적인 조성물 및 방법이다. 특히 필요한 것은, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 펩타이드의 섬유(fiber)의 응집과 관련된 플라크의 형성과 같은 질환의 생리적 표시에 반대작용할 수 있는 작용제이다.

[0024]

프로인트 완전 또는 불완전 보조제와 혼합된 $A\beta_{1-42}$ 의 접종에 의해 유발된 항-아밀로이드 항체는 인간 알츠하이머병에 대한 트랜스제닉(transgenic) 마우스에서 아밀로이드 존재량(burden)을 감소시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Schenk 등, 1999). 리포솜 내에서 재구성된 테트라팔미토일화된 $A\beta_{1-16}$ 을 NORBA 트랜스제닉 마우스에게 복막내 접종하면 유의한 역가의 항-아밀로이드 항체를 유발하며, 이는 인 비트로 및 인 비보 상에서 아밀로이드 섬유 및 플라크를 가용화할 수 있는 것으로 보고되었다(Nicolau 등, 2002).

[0025]

아밀로이드 플라크 및 섬유의 분해가 일어나는 가능한 메카니즘은 Bard 등(2000)에 의해 최초로 제안되었는데, 그는 항체가 플라크를 옹소닌화(opsonized)하고, 이어서 이것은 미세아교세포의 포식세포에 의해 실질적으로 파괴된다고 결론지었다. De Mattos 등(2001)은 β -아밀로이드의 중앙 도메인에 대해 지향된 mAb가 혈장 아밀로이드에 결합하여 완전히 격리시킬 수 있음을 나타내었다. 이들은, 순환 내에서 이들 mAb의 존재가 뇌와 혈장 간의 $A\beta$ 의 평형을 시프트(shift)시켜서, 뇌 내에서의 침착 대신 주변 제거(peripheral clearing) 및 이화작용(catabolism)을 촉진한다고 주장하였다.

[0026]

설치류 항체로의 연장된 인간 치료는 투여 후 약 8-12일에 검출가능하고 약 20-30일에 피크(peak)에 도달하는 항글로불린(antiglobulin) 반응을 일으킬 수 있다. 그러한 항글로불린 반응이 나타나면(encountered), 상기 치료는 약 10일 이내에 중단되어야 하고 또한 이후의 재-치료는 이차 항글로불린 반응의 빠른 개시를 야기하기 때문에 일반적으로 배제된다. 설치류 항체가 인간 항체의 서열과 서열 보존의 상당한 양을 공유하지만, 설치류 항체와 인간 항체 사이에는 설치류 항체가 인간 내에서 면역원성이 되기에 충분한 많은 서열 상이성이 존재한다.

[0027]

이 문제는 인간에서 직접적으로 항체를 생성하거나 또는 "인간화된"(달리 말하면 "재형상화된(reshaped)" 항체)의 생성에 의해 극복될 수 있다. 인간화된 항체는 인간 또는 인간-유사 프레임워크 서열 내에 산재된 설치류-유래된 CDR을 포함하는 가변 영역(variable region) 아미노산 서열을 가진다. 상기 인간화된 항체의 특이성이 설치류-유래된 CDR에 의해 제공되기 때문에, 그들의 잔기는 실질적으로 변화없이 사용되어야 하고, 그의 표적 항원에 대한 상기 항체의 친화도 및 특이성을 실질적으로 방해하지 않는 중요치 않은 변형만이 허용된다. 프레임워크 잔기는 임의의 영장류로부터 또는, 특히, 임의의 인간 가변 영역으로부터 유래될 수 있고 또는 이의 조합일 수 있으며 또한 결과물인 설계된 가변 영역은 재형상화된 것으로 여겨질 것이다.

[0028]

재형상화된 항체 내에 친화도가 유지될 가능성을 최대화하기 위해, 프레임워크 영역을 적절히 선택하는 것이 중요하다. 프레임워크 서열은 항원과의 상호작용을 위해 그들의 정확한 공간적 배향에서 CDR을 유지하도록 기능하고, 또한 프레임워크 잔기는 때때로 항원 결합에서조차 관여할 수 있음이 알려져 있다. 그의 항원에 대한 항체의 친화도를 유지하기 위해 설치류 프레임워크의 서열과 가장 유사한 인간 프레임워크 서열을 선택하는 것이 유리하다. 그 후 친화도의 상실을 피하기 위해 인간 프레임워크 서열 내의 하나 이상의 아미노산을 설치류 프레임워크 내의 대응 잔기로 교체하는 것이 더 필요할 수도 있다. 이 교체는 컴퓨터 모델링에 의해 도움받을 수 있다.

과제의 해결 수단

[0029]

본 발명은, 모노머, 다이머, 트라이머 등, 응집형, 섬유형, 필라멘트(filament)형 또는 플라크의 응축형의 형태인 폴리머 형태로 항체에 대해 제시될 수 있는 β -아밀로이드 항원의 범위로부터의 특정 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 고도로 특이적이고 또한 고도로 효과적인 항체, 특히 이의 단편을 포함하는 키메라 항체(키메라 항체), 보다 특히 이의 단편을 포함하는 부분적으로 또는 완전히 인간화된 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 교시에 의해 가능해진 항체는, 일부 지명하자면 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증상 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 아밀로이드증상 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축기쪽경화증), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질과 관련되거나 또는 이에 기반하는 다른 질환을 포함하는, 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 치료에 특히 유용하다.

[0030]

일 구체예에서, 본 발명은 β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 한 개의 별개의 결합 부위(distinct binding

site), 특히 적어도 두 개의 별개의 결합 부위, 또한 보다 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 이에 결합하는, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 상기 하나, 상기 적어도 두 개 및 상기 적어도 세 개의 결합 부위 각각은 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 한 개의 또는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 포함한다.

[0031] 특히, 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편은 β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 두 개의, 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위에 결합하고, 여기서 상기 적어도 세 개 중 두 개의 별개의 결합 부위는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 포함하고 또한 상기 적어도 세 개 중 하나의 별개의 결합 부위는 적어도 한 개의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0032] 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 포함하는 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 항원 상에 상호 근접하게 위치되고, 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여하는 적어도 한 개의 아미노산 잔기에 의해 분리 및/또는 플랭크되고(flanked), 따라서 입체형태적(conformational) 불연속 에피토프를 형성한다.

[0033] 상기 항체의 결합에 주로 관여하는, 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기 및 적어도 한 개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 적어도 세 개의 별개의 결합 부위는 에피토프 상에 상호 근접하게 위치되고, 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 항체의 결합에 주로 관여하는 아미노산 잔기에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여하는 적어도 한 개의 아미노산 잔기에 의해 분리 및/또는 플랭크되고, 따라서 입체형태적 불연속 에피토프를 형성한다.

[0034] 특히, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 이는 β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 한 개의 별개의 결합 부위, 특히 적어도 두 개의 별개의 결합 부위, 보다 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하며 여기서 상기 적어도 한 개의 또는 상기 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하고, 여기서 상기 제1 결합 부위를 나타내는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기는 하기의 코어(core) 서열(서열 식별 번호: 9) 내에 끼워진 -Phe-Phe-이다:

Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆,
여기서

[0035] Xaa₃은 Ala, Val, Leu, 노르류신(norleucine), Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0037] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0038] Xaa₅는 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,

[0039] Xaa₆은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며,

[0040] 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ 및 Xaa₆은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 -Phe-Phe- 결합 부위에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여한다.

[0041] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서

[0042] Xaa₃은 Val 또는 Leu, 특히 Val이며;

[0043] Xaa₄는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이며;

[0044] Xaa₅는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이고;

[0045] Xaa₆는 Glu 또는 Asp, 특히 Asp이다.

[0046] 특히, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 이는 β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 한 개의 별개의 결합 부위, 특히 적어도 두 개의 별개의 결합 부위, 보다 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하며 여기서 상기 별개의 결합 부위는 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 한 개 및 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하고, 여기서 상기 제1 결합 부위를 나타내는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기는 하기의 코어 서열 내에 끼워진 -Phe-Phe-이고 또한 적어도

한 개의 아미노산 잔기는 하기의 코어 서열 내에 끼워진 -His-이다:

-Xaa₁-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Phe-Phe-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-,

여기서

Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고

Xaa₃은 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며

Xaa₄는 His, Asn, Gln, Lys 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고

Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

Xaa₆은 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고

Xaa₇은 Ala, Val, Leu 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며

Xaa₈은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,

Xaa₉는 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며, 또한 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ 및 Xaa₉는 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 -His- 및 -Phe-Phe- 결합 부위 각각에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.

본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서

Xaa₃은 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이며;

Xaa₄는 Lys이고

Xaa₅는 Leu이며

Xaa₆는 Val 또는 Leu, 특히 Val이고;

Xaa₇는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이며;

Xaa₈는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이고; 또한

Xaa₉는 Asp 또는 Glu, 특히 Asp이다.

본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 이는 β-아밀로이드 단백질 상의 적어도 한 개의 별개의 결합 부위, 특히 적어도 두 개의 별개의 결합 부위, 보다 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하며, 여기서 상기 적어도 한 개 또는 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 각각 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 포함하고, 여기서 제2 결합 부위를 나타내는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기는 하기의 코어 서열(서열 식별 번호: 10) 내에 끼워진 -Lys-Leu-이다:

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃

여기서

Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys, 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

Xaa₂는 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

Xaa₃은 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산이고; 또한 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 -Lys-Leu- 결합 부위에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.

[0070] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 이는 β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 한 개의 별개의 결합 부위, 특히 적어도 두 개의 별개의 결합 부위, 보다 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하고, 여기서 상기 별개의 결합 부위는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 한 개 및 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하며, 여기서 항체의 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 아미노산 잔기에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여하는 적어도 한 개의 아미노산 잔기에 의해 분리되는 적어도 한 개 및 적어도 두 개의 연속적인 아미노산은, 각각, 하기의 코어 서열 내에 끼워진 -His- 및 -Lys-Leu-이다:

[0071] His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ - Xaa₈ - 여기서

[0072] Xaa₂는 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0073] Xaa₃은 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0074] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0075] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0076] Xaa₆은 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0077] Xaa₇은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며,

[0078] Xaa₈은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고

[0079] 또한 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 -His- 및 -Lys-Leu- 결합 부위 각각에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.

[0080] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서

[0081] Xaa₂는 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이며;

[0082] Xaa₃은 Val 또는 Leu, 특히 Val이고;

[0083] Xaa₄는 Phe이고

[0084] Xaa₅는 Phe이며

[0085] Xaa₆은 Ala 또는 Val, 특히 Ala이고;

[0086] Xaa₇은 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이고; 또한

[0087] Xaa₈은 Asp 또는 Glu, 특히 Asp이다.

[0088] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 이는 β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 두 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하고 여기서 상기 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하며, 여기서 상기 적어도 두 개의 연속적인 아미노산은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 연속적인 아미노산 잔기에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여하는 적어도 한 개의 아미노산 잔기에 의해 분리되고, 이는 하기의 코어 서열 내에 끼워진 제1 및 제2 결합 부위를 각각 나타내는 -Phe-Phe- 및 -Lys-Leu-이다:

[0089] Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, 여기서

[0090] Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys, 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0091] Xaa₂는 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

- [0092] Xaa₃은 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0093] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0094] Xaa₅는 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,
- [0095] Xaa₆은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며 또한 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ 및 Xaa₆은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -Lys-Leu- 및 -Phe-Phe- 결합 부위 각각에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0096] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 이는 β-아밀로이드 단백질 상의 적어도 한 개의 별개의 결합 부위, 특히 적어도 두 개의 별개의 결합 부위, 보다 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하며 여기서 상기 별개의 결합 부위는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 한 개 및 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하고, 여기서 적어도 한 개 및 적어도 두 개의 연속적인 아미노산은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 아미노산 잔기에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여하는 적어도 한 개의 아미노산 잔기에 의해 분리되고, 또한 여기서 상기 아미노산 잔기는 각각 하기의 코어 서열 내에 끼워진 -His- 및 -Phe-Phe- 및 -Lys-Leu-이다:
- [0097] His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, 여기서
- [0098] *Xaa₂는 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0099] *Xaa₃은 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0100] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0101] Xaa₅는 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며,
- [0102] Xaa₆은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고, 또한 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -His-, -Lys-Leu- 및 -Phe-Phe- 결합 부위 각각에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0103] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서
- [0104] Xaa₂는 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이며;
- [0105] Xaa₃은 Val 또는 Leu, 특히 Val이고;
- [0106] Xaa₄는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이며;
- [0107] Xaa₅는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이고; 또한
- [0108] Xaa₆은 Asp 또는 Glu, 특히 Asp이다.
- [0109] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 이는 β-아밀로이드 단백질 상의 적어도 두 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하며 여기서 상기 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하고, 여기서 상기 적어도 두 개의 연속적인 아미노산은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 연속적인 아미노산 잔기에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여하는 적어도 한 개의 아미노산 잔기에 의해 분리되고, 이는 각각 하기의 코어 서열 내에 끼워진 제1 및 제2 결합 부위를 나타내는 -Phe-Phe- 및 -Lys-Leu-이다:

- [0110] $Xaa_1 - Xaa_2 - Lys - Leu - Xaa_3 - Phe - Phe - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6$, 여기서
- [0111] Xaa_1 은 His, Asn, Gln, Lys 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0112] Xaa_2 는 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0113] Xaa_3 은 Val, Ala, Leu, Met, Phe, 노르류신 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0114] Xaa_4 는 Ala, Val, Leu 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0115] Xaa_5 는 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,
- [0116] Xaa_6 은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기이며, 또한 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa_2 , Xaa_3 , Xaa_4 , Xaa_5 , Xaa_6 은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -Lys-Leu- 및 -Phe-Phe- 결합 부위 각각에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0117] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서
- [0118] Xaa_1 은 His 또는 Arg, 특히 His이며;
- [0119] Xaa_2 는 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이고;
- [0120] Xaa_3 은 Val 또는 Leu, 특히 Val이며;
- [0121] Xaa_4 는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이고;
- [0122] Xaa_5 는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이며; 또한
- [0123] Xaa_6 은 Asp 또는 Glu, 특히 Asp이다.
- [0124] 본 발명의 일 구체예에서, β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 두 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하는, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 상기 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하며, 이는 -Phe-Phe-Ala-Glu-, 특히 -Phe-Phe-Ala-, 특히 -Phe-Phe- 및 -Lys-Leu- 각각이고, 또한 여기서 상기 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 각각 서열 식별 번호: 7에 나타난 아미노산 서열 -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp- 및 서열 식별 번호: 8에 나타난 아미노산 서열 His-Gln-Lys-Leu-Val-을 나타낸다.
- [0125] 본 발명의 일 구체예에서, β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 한 개의 별개의 결합 부위, 특히 적어도 두 개의 별개의 결합 부위, 보다 특히 적어도 세 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하는, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 상기 적어도 한 개 또는 상기 적어도 두 개의 별개의 결합 부위는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 적어도 한 개 및 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하며, 이는 각각 -Phe-Phe- 및 -Lys-Leu-, 및 -His- 이고, 여기서 상기 별개의 결합 부위는 각각 아미노산 서열 -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-, 및 아미노산 서열 -His-Gln-Lys-Leu-Val-에 끼워넣어진다.
- [0126] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편은 β -아밀로이드 단백질 상의 적어도 두 개의 별개의 결합 부위를 인식하고 또한 이에 결합하는 항원 인식 및 결합 부위를 포함하고 여기서 상기 둘 이상의 별개의 결합 부위는, 서열 식별 번호: 7 및 8로 각각 주어진 아미노산 서열 내에 적어도 두 개의 연속적인 아미노산 잔기들을 각각 포함하고, 여기서 상기 연속적인 아미노산 잔기, 특히 -Phe-Phe- 및 -Lys-Leu-는 β -아밀로이드 단백질의 결합에 주로 관여한다.
- [0127] 본 발명의 특정 구체예에서, 본원에서 전술된 바와 같은 인식 및 결합 부위는, 아미노산 잔기 12 내지 24 사이, 특히 잔기 14 내지 23 사이, 보다 특히 아미노산 잔기 14 내지 20 사이의 β -아밀로이드 단백질의 영역 내에 위치한 입체형태적 불연속 에피토프를 형성하고, 여기서 적어도 2 개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 적어도 두

개의 독특한 인식 및 결합 부위는 위치 16 및 17 및 위치 19 및 20에 각각 위치되고, 또한 여기서 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하는 적어도 한 개의 독특한 인식 및 결합 부위는 위치 14에 위치되고, 상기 잔기는 β -아밀로이드 단백질의 결합에 주로 관여하며 또한 여기서 상기 독특한 인식 및 결합 부위는 적어도 일측 상에서 아미노산 잔기, 특히 잔기 21 및 22에 의해 플랭크되고, 또한 위치 15 및 18에 위치된 하나의 아미노산 잔기에 의해 분리되고, 상기 아미노산 잔기는 항원의 결합에 직접적으로 관여하지 않거나 또는, 적어도, 실질적으로 더 적은 정도로 관여한다.

[0128] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 적어도 세 개의 독특한 인식 및 결합 부위는 아미노산 잔기, 특히 잔기 12 및 13, 및 잔기 21 및 22에 의해 양쪽 모두에 플랭크되고 또한 위치 15 및 18에 위치된 하나의 아미노산 잔기에 의해 분리되고, 상기 아미노산 잔기는 항원의 결합에 직접적으로 관여하지 않거나 또는, 적어도, 실질적으로 더 적은 정도로 관여한다.

[0129] 특정 구체예에서, β -아밀로이드 단백질의 결합에 주로 관여하는 상기 연속적인 아미노산 잔기, 특히 위치 16 및 17의 -Lys-Leu- 및 위치 19 및 20의 -Phe- Phe-는 하기의 코어 영역 내에 끼워진다:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

[0130]

[0131] 다른 특정 구체예에서, β -아밀로이드 단백질의 결합에 주로 관여하는 상기 아미노산 잔기, 특히 위치 16 및 17의 -Lys-Leu- 및 위치 19 및 20의 -Phe- Phe-, 및 위치 14의 -His-는 하기의 코어 영역 내에 끼워진다:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-	Val-	Gly-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

[0132]

[0133] 본 발명의 다른 구체예에서, 경쇄(light chain) 및 중쇄(heavy chain) 가변 영역(variable region) 내에서 각각 하나 이상의 인간- 또는 영장류-유래의 프레임워크 영역 내에 끼워진 비인간 기원의 적어도 한 개의 CDR, 특히 비인간 기원의 두 개의 CDR, 보다 특히 비인간 기원의 세 개의 CDR 및, 선택적으로, 인간 또는 영장류 기원 항체로부터 유래된 불변 영역을 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 상기 인간화된 항체 또는 이의 단편은 β -아밀로이드 단백질, 특히 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 보다 특히 β -아밀로이드 폴리머성 펩타이드, 보다 더 특히 β -아밀로이드 플라크의 일부분 또는 분리된 β -아밀로이드 섬유, 피브릴 또는 필라멘트에, 이하의 아미노산 서열(서열 식별 번호: 11)을 포함하는 에피토프에서 특이적으로 인식하고 또한 결합할 수 있다:

[0134] **Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe- Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆,** 여기서

[0135] Xaa₁은 His, Asn, Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 His이고;

[0136] Xaa₂는 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Gln이며; 또한

[0137] Xaa₃은 Val, Leu, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Val이고;

[0138] Xaa₄는 Ala 및 Val를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Ala이며;

[0139] Xaa₅는 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Glu이고;

[0140] Xaa₆은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Asp이다.

[0141] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 경쇄 및 중쇄 가변 영역 내에 각각, 하나 이상의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 끼워진 비인간 기원의 적어도 한 개의 CDR, 특히 비인간 기원의 두 개의 CDR, 보다 특히 비인간 기원의 세 개의 CDR 및, 선택적으로, 인간 또는 영장류 기원 항체로부터 유래된 불변 영역을 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 상기 인간화된 항체 또는 이의 단편은 β -아밀로이드 단백질, 특히 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 보다 특히 β -아밀로이드 폴리머성 펩타이드, 보다 특히 β -아밀로이드 플라크의 일부분 또는 분리된 β -아밀로이드 섬유, 피브릴 또는 필라멘트에, 이하의 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에서 인식하고 또한 결합할 수 있다:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe- Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, 여기서

Xaa₂는 Asn 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Gln이고; 또한

Xaa₃은 Val, Leu, 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Val이며;

Xaa₄는 Ala 및 Val를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Ala이고;

Xaa₅는 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Glu이며;

Xaa₆은 Glu 및 Asp를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Glu이고; 또한 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -His- 및 -Lys-Leu- 및 -Phe-Phe- 결합 부위에 비교하여 더 적은 정도로 관여한다.

본 발명의 특정 구체예에서, 비인간 기원의 CDR은 상기 별개의 결합 부위를 함유하지 않는 항원 단편에 대해 생성된 도너(donor) 항체로부터, 특히 마우스의(murine) 도너 항체로부터 취득된다. 상기 에피토프 영역 내의 이 시프트는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)와 같은 친수성 모이어티로 변형된, β -아밀로이드 펩타이드, 특히 β -아밀로이드 펩타이드 A β_{1-16} 의 아미노산 서열에 대응하는 항원성 펩타이드를 포함하는 초분자 항원성 구조체(supramolecular antigenic construct)의 사용에 의해 적어도 부분적으로 야기될 수 있고, 여기서 상기 친수성 모이어티는 면역화 공정에서 본원의 이하에서 기술된 바와 같이 예를 들어, 라이신, 글루타민산 및 시스테인 또는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 상기 친수성 모이어티를 상기 펩타이드 단편에 커플링하기 위한 연결 장치로서 작용할 수 있는 아미노산 유사체와 같은, 적어도 하나, 특히 1 또는 2개의 아미노산을 통해 상기 항원성 펩타이드의 각 말단에 공유 결합한다. PEG가 친수성 모이어티로 사용될 때, 자유 PEG 말단은, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 리포솜 이중층 내에 항원성 구조체를 파묻기(embed) 위해, 포스포티딜에탄올아민 또는 앵커링 요소로서 작용하기에 적합한 임의의 다른 화합물에 공유 결합한다.

특히, (부다페스트 조약의 규정 하에, 브라운슈바이그 38124, 마체로테르 베그 1 비, 브라운슈바이그 (Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig) 소재 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)"에 2005년 12월 1일 기탁된 접근 번호 DSM ACC2750 하의 (본 출원 전체에서 "mC2"로도 명명된) ACI-01-Ab7C2의 특질을 나타내는 비인간 기원의 CDR이 쥐 도너 항체로부터 취득된다.

본 발명의 일 구체예에서, 비인간 기원의 CDR은 (부다페스트 조약의 규정 하에, 브라운슈바이그 38124, 마체로테르 베그 1 비, 브라운슈바이그 소재 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)"에 2005년 12월 1일 기탁된 접근 번호 DSM ACC2750 하의 (본 출원 전체에서 "mC2"로도 명명된) 쥐 도너 항체 ACI-01-Ab7C2로부터 취득된다.

또한 면역화 프로토콜의 일부로서 지질 A의 사용은 에피토프 영역 내에서의 시프트에 이바지할 수 있다.

특정 구체예에서, 본 발명은, 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된(integrated), 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3를 나타내는 서열 식별 번호: 3 및 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 한 개의 펩타이드를 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 상기 인간화된 항체는, 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3를 나타내는 서열 식별 번호: 3으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 한 개의 펩타이드를 포함한다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 상기 인간화된 항체는, 인간- 또는 영장류-유래된 경쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함한다.

특히, 본 발명은, 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 적어도 한 개의 펩타이드를 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)에 관한 것이다.

- [0156] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 한 개의 펩타이드를 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)에 관한 것이다.
- [0157] 본 발명은 또한 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 이는 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된 적어도 두 개의 펩타이드를 포함하며, 이 펩타이드는 상이하고 또한 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3 및 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 나타내며, 여기서 동일한 CDR은 상기 항체 내에 두 번 존재하지 않는다. 특히, 존재하는 적어도 두 개의 CDR이 모두 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR이라면, 상기 CDR 중 적어도 하나는 서열 식별 번호: 4로 나타내어지는 CDR1이어야 한다.
- [0158] 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편, 특히 상기 항체 내에 동일한 CDR이 두 번 존재하지 않는 인간화된 항체 또는 이의 단편 또한 포함한다.
- [0159] 특히, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)에 관한 것이다.
- [0160] 추가의 구체예에서, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 경쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [0161] 특히, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 경쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 가지는 경쇄 가변 영역(LCVR)에 관한 것이고, 여기서 동일한 CDR은 상기 항체 내에 두 번 존재할 수 없고 또한, 특히, 상기 CDR 중 하나 이상은 서열 식별 번호: 4로 나타내어지는 CDR1이어야 한다.
- [0162] 본 발명은 또한 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는, 특히 상기에 표시된 순서로 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [0163] 특히, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는, 특히 상기에 표시된 순서로 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)에 관한 것이다.
- [0164] 또한 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 경쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는, 특히 상기에 표시된 순서로 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0165] 특히, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 경쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를, 특히 상기에 표시된 순서로 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)에 관한 것이다.
- [0166] 본 발명은 또한 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3 및 경쇄

가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 세 개의 펩타이드를 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편, 특히 상기 항체 내에 동일한 CDR이 두번 존재하지 않는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0167] 다른 구체예에서 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3 및 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 네 개의 펩타이드를 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편, 특히 상기 항체 내에 동일한 CDR이 두번 존재하지 않는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0168] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3 및 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6으로 이루어지는 서열 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 다섯 개의 펩타이드를 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편, 특히 상기 항체 내에 동일한 CDR이 두번 존재하지 않는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0169] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3 및 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4, CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0170] 특정 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR), 또는, 이의 단편에 관한 것으로, 여기서 상기 인간화된 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 적어도 한 개의 펩타이드를 포함한다.

[0171] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편에 관한 것으로, 여기서 상기 인간화된 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 적어도 한 개의 펩타이드를 포함한다.

[0172] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편에 관한 것으로, 상기 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR), 또는 이의 단편은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1 및 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함한다.

[0173] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편에 관한 것으로, 상기 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함한다.

[0174] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편에 관한 것으로, 상기 항체, 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 이의 단편은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함한다.

[0175] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 1, 중쇄 가변 영역 (HCVR)의 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 2 및 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR 및 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역을 갖는 가변 영역을 포함하는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0176] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체, 경쇄 가변 영역 (LCVR) 또는 이의 단편에 관한 것으로, 상기 항체, 경쇄 가변 영역 (LCVR) 또는 이의 단편은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된,

경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4 및 CDR2를 나타내는 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함한다.

[0177] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체, 경쇄 가변 영역 (LCVR) 또는 이의 단편에 관한 것으로, 상기 항체, 경쇄 가변 영역 (LCVR) 또는 이의 단편은 인간- 또는 영장류-유래된 중쇄 프레임워크 영역 내에 통합된, 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR1을 나타내는 서열 식별 번호: 4 및 CDR3을 나타내는 서열 식별 번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 적어도 두 개의 펩타이드를 포함한다.

[0178] 본 발명은 또한 인간화된 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 마우스 C2 항체의 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR) 모두는 상기 인간화된 항체의 그의 CDR 영역의 적어도 하나 내지 CDR 영역의 적어도 둘에 각각 기여한다. 따라서 결과적인 인간화된 항체 또는 이의 단편은,

[0179] - 적어도 CDR1 (LCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 4의 아미노산 서열과 조합된 CDR1 (HCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 1의 아미노산 서열;

[0180] - 적어도 CDR1 (LCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 4의 아미노산 서열과 조합된 CDR2 (HCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열;

[0181] - 적어도 CDR1 (LCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 4의 아미노산 서열과 조합된 CDR3 (HCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열;

[0182] - 적어도 CDR1 (LCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열과 조합된 CDR2 (HCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 1의 아미노산 서열;

[0183] - 적어도 CDR2 (LCVR)를 나타내는 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열과 조합된 CDR2 (HCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열;

[0184] - 적어도 CDR3 (LCVR)를 나타내는 서열 식별 번호: 6의 아미노산 서열과 조합된 CDR2 (HCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열;

[0185] - 적어도 CDR1 (LCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 6의 아미노산 서열과 조합된 CDR3 (HCVR)를 나타내는 서열 식별 번호: 1의 아미노산 서열;

[0186] - 적어도 CDR2 (LCVR)를 나타내는 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열과 조합된 CDR3 (HCVR)을 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열;

[0187] - 적어도 CDR3 (LCVR)를 나타내는 서열 식별 번호: 6의 아미노산 서열과 조합된 CDR3 (HCVR)를 나타내는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열

[0188] 을 포함할 수 있다.

[0189] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에서 진술된 바와 같은 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 상기 항체는 인간 또는 영장류 기원의 경쇄 및/또는 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0190] 추가의 구체예에서, 본 발명은 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 1-6에 주어진 바와 같은 경쇄 및/또는 중쇄 CDR 영역의 아미노산을 나타내는 하나 이상, 특히 하나 이상 5 이하, 보다 특히 하나 이상 4 이하, 보다 더 특히 하나 이상 3 이하, 특히 하나 이상 2 이하의 상기 항체가 그의 완전한 기능성(full functionality)을 유지하도록 보존적 치환을 통해 바뀐다.

[0191] 특히, 본 발명은 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 5로 주어진 바와 같은 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR2에서 Kabat 위치 50의 Lys는 Arg, Gln 및 Glu를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Arg으로 교체된다.

[0192] 특히, 본 발명은 경쇄 가변 영역(LCVR)에 관한 것이고 여기서 서열 식별 번호: 5로 주어진 바와 같은 CDR2에서 Kabat 위치 50의 Lys는 Arg, Gln 및 Glu를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Arg으로 교체된다.

[0193] 다른 구체예에서, 본 발명은 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 5로 주어진 바와 같은 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR2에서 Kabat 위치 53의 Ser은 Asn 또

는 Thr를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Asn으로 교체된다.

- [0194] 특히, 본 발명은 경쇄 가변 영역(LCVR)에 관한 것이고 여기서 서열 식별 번호: 5로 주어진 바와 같은 CDR2에서 Kabat 위치 53의 Ser은 Asn 또는 Thr를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기, 특히 Asn으로 교체된다.
- [0195] 본 발명의 일 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 중쇄 가변 영역(HCVR)은 서열 식별 번호: 15 및 16으로 주어진 각각의 서열과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98% 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0196] 본 발명의 다른 구체예에서, 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 경쇄 가변 영역(LCVR)은 서열 식별 번호: 12 및 13으로 주어진 각각의 서열과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98% 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0197] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR 영역의 적어도 둘, 특히 셋은 서열 식별 번호: 1-3으로 주어진 바와 같은 대응 CDR 영역과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98% 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0198] 본 발명의 추가의 구체예에서, 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR 영역의 적어도 둘, 특히 셋은 서열 식별 번호: 4-6으로 주어진 바와 같은 대응 CDR 영역과 90%, 특히 95%, 보다 특히 98% 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0199] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고 여기서 중쇄 가변 영역(HCVR)은 서열 식별 번호: 15 및 16 각각으로 주어진 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0200] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고 여기서 경쇄 가변 영역(LCVR)은 서열 식별 번호: 12 및 13 각각으로 주어진 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0201] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR 영역의 적어도 하나, 특히 적어도 둘, 특히 셋은 서열 식별 번호: 1 - 3에 주어진 바와 같은 대응 CDR 영역에 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0202] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것이고, 여기서 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR 영역의 적어도 하나, 특히 적어도 둘, 특히 셋은 서열 식별 번호: 4 - 6에 주어진 바와 같은 대응 CDR 영역에 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0203] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 인간 생식계열(germline) V_H 및 V_K 서열 각각으로부터 획득된 수용체 프레임워크 서열을 나타내는 하나 이상의 아미노산은 쥐 항체 ACI-01-Ab7C2의 대응 영역으로부터의 아미노산으로의 치환 또는 이의 보존적 치환을 통해 바뀐다.
- [0204] 특히, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타낸 바와 같은 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 획득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 47의 Trp는, Leu, 노르류신, Ile, Val, Met, Ala, 및 Phe, 특히 Leu 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Leu으로 교체된다.
- [0205] 또한 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타낸 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 획득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 94의 Arg는 Ser 및 Thr를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Ser으로 교체된다.
- [0206] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타낸 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 획득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 47의 Trp는 Leu, 노르류신, Ile, Val, Met, Ala, 및 Phe, 특히 Leu 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Leu으로 교체되고, 또한 Kabat 위치 94의 Arg는 Ser 및 Thr를 포함하는 그룹으로부터

선택된 아미노산, 특히 Ser으로 교체된다.

- [0207] 본 발명은 또한 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 상기 경쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{KII} 의 인간 생식계열 V_K 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 45의 Gln은 Lys, Arg, Gln, 및 Asn, 특히 Lys 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Lys으로 교체된다.
- [0208] 본 발명은 또한 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 상기 경쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{KII} 의 인간 생식계열 V_K 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 50의 Leu은 Lys, Arg, Gln, 및 Asn, 특히 Lys 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Lys으로 교체된다.
- [0209] 본 발명은 또한 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 상기 경쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{KII} 의 인간 생식계열 V_K 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 87의 Tyr은 Phe, Leu, Val, Ile, 및 Ala, 특히 Leu 및 Phe를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Phe으로 교체된다.
- [0210] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 상기 경쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{KII} 의 인간 생식계열 V_K 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 53의 Asn은 Gln, His, Lys 및 Arg, 특히 His 및 Gln를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 교체된다.
- [0211] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 47의 Trp는 Leu, 노르류신, Ile, Val, Met, Ala, 및 Phe, 특히 Leu 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Leu으로 교체되고, 또한 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 94의 Arg은 Ser 및 Thr를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Ser으로 교체되고, 또한 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 상기 경쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{KII} 의 인간 생식계열 V_K 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 87의 Tyr은 Phe, Leu, Val, Ile, 및 Ala, 특히 Leu 및 Phe를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Phe으로 교체된다.
- [0212] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 47의 Trp는 Leu, 노르류신, Ile, Val, Met, Ala, 및 Phe, 특히 Leu 및 Ile를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Leu으로 교체된다.
- [0213] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 94의 Arg은 Ser 및 Thr를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Ser으로 교체된다.
- [0214] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 47의 Trp는 Leu 및 Ile, 특히 Leu으로 교체되고, 또한 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 94의 Arg은 Ser으로 교체된다.
- [0215] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 상기 경쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{KII} 의 인간 생식계열 V_K 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 87의 Tyr은 Phe으로 교체된다.
- [0216] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간화된 항체에 관한 것이고, 여기서 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 상기 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_{HIII} 의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 수득된 수용체 프레임워크 서열 내

Kabat 위치 47의 Trp는 Leu 및 Ile, 특히 Leu으로 교체되고, 또한 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_H III의 인간 생식계열 V_H 서열로부터 취득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 94의 Arg는 Ser으로 교체되고, 또한 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 경쇄 가변 영역의 KABAT 서브그룹 V_K II의 인간 생식계열 V_K 서열로부터 취득된 수용체 프레임워크 서열 내 Kabat 위치 87의 Tyr은 Phe으로 교체된다.

- [0217] 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 12의 경쇄 가변 영역에 관한 것이다.
- [0218] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 12의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0219] 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 13에 나타난 바와 같은 신호 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역에 관한 것이다.
- [0220] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 13에 나타난 바와 같은 신호 서열을 포함하는 완전 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0221] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 12의 경쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호: 14의 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0222] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 13의 완전 경쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호: 14의 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0223] 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 15의 중쇄 가변 영역에 관한 것이다.
- [0224] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 15의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0225] 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 16에 나타난 바와 같은 신호 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역에 관한 것이다.
- [0226] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 16에 나타난 바와 같은 신호 서열을 포함하는 완전 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0227] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 15의 중쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호: 17의 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0228] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 인간화된 항체가 제공되고, 이는 서열 식별 번호: 16의 중쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호: 17의 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0229] 일 구체예에서 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 인간화된 항체는, 30 이상, 특히 35 이상, 보다 특히 38 이상, 보다 더 특히 40 이상의 아미노산 잔기를 갖는 $A\beta$ 모노머성 펩타이드 및/또는 복수의 상기 $A\beta$ 모노머 단위를 포함하는 $A\beta$ 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 및/또는 복수의 상기 $A\beta_{1-42}$ 모노머 단위를 포함하는 $A\beta$ 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드와, 특히 항체 대 $A\beta_{1-42}$ 의 몰농도비가 1:1000 이하, 특히 1:10 내지 1:100의 몰농도비에서 공동-인큐베이트(co-incubation)하면, 상기 $A\beta$ 모노머가 고분자 폴리머성 피브릴(high molecular polymeric fibril)로 응집하는 것을 억제한다.
- [0230] 특히, 아밀로이드 모노머성 및/또는 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드와 본 발명의 항체의 공동-인큐베이트는 28℃ 내지 40℃, 특히 32℃ 내지 38℃, 보다 특히 37℃ 온도에서 24시간 내지 60시간 동안, 특히 30시간 내지 50시간 동안, 보다 특히 48시간 동안, 특히 24시간 동안 수행된다.
- [0231] 본 발명의 특정 구체예에서, 아밀로이드 모노머성 및/또는 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드와의 공동-인큐베이트는 37℃의 온도에서 24시간 동안 이루어진다.
- [0232] 특히, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분(functional part)을 포함하는 본 발명의 항체, 특히 인간화된 항체는 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드 및/또는 복수의 상기 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 단위를 포함하는 $A\beta$ 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드에 결합하고 또한 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드 및/또는 복수의 상기 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 단위를 포함하는 $A\beta$ 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드와 공동-인큐베이트하면, 상기 $A\beta$ 모노머 및/또는 폴

리머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을 억제한다.

- [0233] 일 구체예에서, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 항체, 특히 본 발명의 인간화된 항체는 A β 모노머 및/또는 복수의 상기 A β 모노머 단위를 포함하는 A β 가용성 폴리머의 고분자 폴리머성 피브릴로의 응집을, 항체 대 A β 1-42의 몰농도비 1:1000 이하에서, 특히 몰농도비 1:10 내지 1:100에서, 특히 몰농도비 1:10에서, 버퍼(대조군) 내에서 인큐베이트된 각각의 아밀로이드 펩타이드 모노머에 비하여, 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 보다 특히 적어도 75%, 보다 더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85%-90% 이상 억제한다.
- [0234] 본 발명의 특정 구체예에서, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 항체, 특히 본 발명의 인간화된 항체는 A β 모노머 및/또는 복수의 상기 A β 모노머 단위를 포함하는 A β 가용성 폴리머의 고분자 폴리머성 피브릴로의 응집을, 항체 대 A β 1-42의 몰농도비 1:100에서 적어도 30% 억제한다.
- [0235] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 항체, 특히 본 발명의 인간화된 항체는 A β 모노머 및/또는 복수의 상기 A β 모노머 단위를 포함하는 A β 가용성 폴리머의 고분자 폴리머성 피브릴로의 응집을, 항체 대 A β 1-42의 몰농도비 1:10에서 적어도 80% 억제한다.
- [0236] 아밀로이드 형성 모노머성 및/또는 폴리머성 펩타이드, 특히 아밀로이드 형태 (1-42)에 대한 본원에서 기술된 바와 같은 본 발명의 항체의 결합은 모노머성 및/또는 폴리머성 아밀로이드 형성 펩타이드의 고분자량 피브릴 또는 필라멘트의 응집을 억제시킨다. 아밀로이드 형성 모노머성 및/또는 폴리머성 펩타이드의 응집의 억제를 통해 본 발명의 항체는 아밀로이드 플라크, 특히 이차 입체형태의 변화에 의해 불용성이 되고 또한 질환에 걸린 동물 또는 인간의 뇌 내의 아밀로이드 플라크의 대부분이 되는 것으로 알려진 아밀로이드 형태 (1-42)의 형성을 방지하거나 감소시킬 수 있다.
- [0237] 본 발명의 항체의 응집 억제 잠재성은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법, 특히 농도-구배 초원심분리에 따르는 미리형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석 및/또는 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0238] 일 구체예에서, 본 발명은 항체, 특히 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 본원에서 기술된 바와 같은 인간화된 항체에 관한 것이고, 상기 항체는, 30개 이상, 특히 35개 이상, 보다 특히 38개 이상, 보다 더 특히 40개 이상의 아미노산 잔기를 갖는 A β 모노머성 펩타이드, 특히 A β 1-42 모노머성 펩타이드의 응집에 의해 형성된, 미리형성된 고 분자량 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와, 특히 몰농도비 1:10 내지 1:1000로, 보다 특히 1:100의 비율로 공동-인큐베이트하면, 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 적어도 20%, 특히 적어도 30%, 보다 특히 적어도 35%, 보다 더 특히 적어도 40%, 특히 적어도 50% 이상 해체시킬 수 있다.
- [0239] 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 항체의 응집 억제 및 해체 잠재성 각각은 농도-구배 초원심분리에 이어 미리형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석에 의해 측정된다.
- [0240] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 상기 항체의 응집 억제 및 해체 잠재성은 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 각각 측정된다.
- [0241] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 항체는 아밀로이드 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 28℃ 내지 40℃, 특히 32℃ 내지 38℃, 보다 특히 37℃의 온도에서 12시간 내지 36시간, 특히 18시간 내지 30시간, 보다 특히 24시간 동안 공동-인큐베이트된다.
- [0242] 특히, 미리형성된 고 분자량 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와의 공동-인큐베이트는 37℃의 온도에서 24시간 동안 수행된다.
- [0243] 본 발명의 특정 구체예에서, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 항체, 특히 본 발명의 인간화된 항체는 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 항체 대 A β 1-42의 몰농도비 1:100에서 적어도 24% 해체시킬 수 있다.
- [0244] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 항체, 특히 본 발명의 인간화된 항체는 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 항체 대 A β 1-42의 몰농도비 1:10에서 적어도 32% 해체시킬 수 있다.
- [0245] 본 발명의 항체는, 아밀로이드 형성 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트의 해체를 통해 아밀로이드 플라크의 형성을

예방 또는 감소시킬 수 있으며, 이는 상기 질환과 관련된 증상을 완화시키고, 그의 진행을 지연 또는 되돌린다.

[0246] 따라서, 본 발명의 추가 구체예는 본원에서 기재된 바와 같은 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 항체, 특히 인간화된 항체를 제공하고, 상기 항체는, 뇌 내 A β 의 농도를 증가시키는 질환 또는 병태에 걸린 동물, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내 A β 의 총량을 감소시킬 수 있다.

[0247] 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 인간화된 항체에 관한 것으로, 이 항체는 특히 고도의 입체형태적 민감도와 짝지어져서, 응집 억제 특성뿐만 아니라 해체 특성 모두를 나타내는 점에서 이중-효과성(bi-effective)이다.

[0248] 특히, 본 발명은 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것으로, 상기 항체는 아밀로이드 모노머성 및/또는 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드, 특히 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41 또는 1-42와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 및/또는 복수의 상기 A β 모노머 단위를 포함하는 폴리머성 가용성 β -아밀로이드 펩타이드, 특히 A β_{1-42} 모노머성 및/또는 복수의 상기 A β_{1-42} 모노머 단위를 포함하는 A β 폴리머성 가용성 아밀로이드 펩타이드와 공동-인큐베이트하면, A β 모노머의 고분자 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트의 응집을 억제하고 또한, 추가로, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41 또는 1-42와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드와, 특히 A β_{1-42} 모노머성 펩타이드의 응집에 의해 형성된 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 공동-인큐베이트하면, 상기 미리형성된 피브릴 또는 필라멘트를 해체시킬 수 있다.

[0249] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편에 관한 것으로, 상기 항체는 β -시트 입체형태의 α -나선 및/또는 랜덤 코일 입체형태, 특히 랜덤 코일 입체형태, 보다 특히 분자 내 주어진 위치에서, 특히 A β 단백질의 Tyr 10 및 Val 12의 환경에서 랜덤 코일 입체형태로의 전이를 유도할 수 있고, 이는 상기 β -시트 입체형태를 손실시켜 랜덤 코일 입체형태를 증가시키고 또한 상기 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트의 개선된 가용화를 이끈다. 특히 상기 β -시트 입체형태의 감소는 버퍼(대조군) 내에서 인큐베이트된 각각의 미리형성된 아밀로이드 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트에 비교하여 적어도 30%, 특히 적어도 35%, 또한 보다 특히 적어도 40% 이상에 달한다.

[0250] 이차 구조에서의 전이를 유도시키는 상기 항체의 잠재성은 고체 상태 ^{13}C NMR 분광학(solid state ^{13}C NMR spectroscopy)에 의해, 특히 A β_{1-42} 펩타이드 내 Tyr 10 및 Val 12 C β 의 입체형태의 적분 강도(integral intensity)를 측정함으로써 측정된다.

[0251] 본 발명의 추가의 구체예에서는, 적어도 한 개의 경쇄 또는 이의 단편 또는 적어도 한 개의 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 상기 항체 또는 단편은 적어도 약 1×10^{-7} M 내지 적어도 약 1×10^{-12} 특히 적어도 약 1×10^{-8} 내지 적어도 약 1×10^{-11} , 보다 특히 적어도 약 1×10^{-9} 내지 적어도 약 1×10^{-10} , 보다 더 특히 적어도 약 1×10^{-8} 내지 적어도 약 2×10^{-8} 의 결합 친화도로 A β 모노머에 결합하지만, 바람직하게는, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성도 나타내지 않는다.

[0252] 본 발명의 다른 구체예에서는, 적어도 한 개의 경쇄 또는 이의 단편 또는 적어도 한 개의 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 상기 항체 또는 단편은 적어도 약 1×10^{-7} 내지 적어도 약 1×10^{-12} , 특히 적어도 약 1×10^{-8} 내지 적어도 약 1×10^{-11} , 보다 특히 적어도 약 1×10^{-9} 내지 적어도 약 1×10^{-10} , 보다 더 특히 적어도 약 2×10^{-9} 내지 적어도 약 5×10^{-9} 범위의 결합 친화도로 A β 섬유, 피브릴 또는 필라멘트에 결합하지만, 바람직하게는, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성도 나타내지 않는다.

[0253] 다른 구체예에서, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 A β 섬유, 피브릴 또는 필라멘트에 대해, A β 모노머에 대한 결합친화도보다 적어도 10배, 특히 적어도 15배, 보다 특히 적어도 20배, 특히 적어도 25배 더 높은 결합 친화도를 나타낸다.

- [0254] 또 다른 구체예에서, 본원에 전술된 바와 같은 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되며, 상기 항체는 포유류, 특히 인간 뇌 내에서, A β 플라크를 포함하는 응집된 A β 에 실질적으로 결합하지만, 바람직하게는, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성도 나타내지 않는다.
- [0255] 본 발명의 다른 측면에서, 본원에서 전술된 바와 같은 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되며, 상기 항체는 포유류, 특히 인간 뇌 내에서, A β 모노머를 포함하는 가용성 폴리머성 아밀로이드, 특히 아밀로이드 β (A β)에 실질적으로 결합하지만, 바람직하게는, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성도 나타내지 않는다.
- [0256] 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 추가로 제공되며, 상기 항체는 포유류, 특히 인간 뇌 내에서 A β 플라크 존재량을 실질적으로 감소시킨다. 이는 포유류 및 인간을 포함하는, 대상의 조직 및/또는 체액, 특히 대상의 뇌 내에서, 플라크에 대한 항체의 결합에 의해서나, 또는 입체형태의 시프트의 유도에 의해 섬유를 가용성 폴리머 및 모노머 형태로 해체시킴으로써, 아밀로이드, 특히 아밀로이드 β (A β) 사이의 평형을 그의 불용성 및 응집된 상태에서 그의 가용성 형태로 시프트시키고, 또한 상기 해체된 및 가용화된 아밀로이드 형태, 특히 아밀로이드 β (A β) 형태에 결합 및 안정화에 의해 달성될 수 있다. 그에 따라 본 발명의 항체의 활성을 통해 대상의 조직 및/또는 체액, 특히 뇌 내에서 침착 대신 주변 제거 및 이화작용이 선호된다. 따라서 본 발명의 항체의 유의한 효과는 상기 항체의 플라크에의 결합 없이 얻어질 수 있다.
- [0257] 이 안정화 활성을 통해, 본 발명의 항체는, 대상, 특히 포유류, 및 보다 특히 인간의 조직 및/또는 체액 내 폴리머성 및 덜 응집된 가용성 아밀로이드 단백질, 특히 아밀로이드 β (A β) 단백질의 독성 효과를 중화할 수 있다. 따라서 본 발명의 특정 구체예에서 본 발명의 항체는 대상의 뇌 내에서 응집된 아밀로이드 베타에 반드시 결합하지 않고 그의 유의한 효과를 달성할 수 있다.
- [0258] 본 발명의 추가적 측면에서는, 마우스 도너 항체로부터, 특히 2005년 12월 1일, 브라운슈바이그 38124, 마체로 데르 베그 1 비, 브라운슈바이그 소재 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)"에 기탁되어 접근 번호 DSM ACC2750을 부여받은 (본 출원 전체에서, "mC2"로 또한 인간화된 C2 항체에 대해서는 hC2로 명명된) 마우스 항체 ACI-01-Ab7C2로부터 수득된 적어도 하나, 특히 둘 또한, 특히 세 개의 CDR 영역을 삽입하는 적어도 한 개의 경쇄 또는 이의 단편 또는 적어도 한 개의 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 여기서 상기 항체 또는 이의 단편은, A β 항원에 대해, 마우스 도너 항체의 친화도보다 적어도 5배, 특히 적어도 8배, 보다 특히 적어도 10배, 특히 적어도 15배 더 높은 친화도를 가진다.
- [0259] 일 구체예에서, 본 발명의 항체는 임의의 이소타입 및 서브타입(예컨대, IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 및 IgA2)의 (예컨대, 두 전체 길이 경쇄 및 두 전체 길이 중쇄를 갖는) 전체(whole) 항체; 특히 IgG4 이소타입의 항체일 수 있고; 대안적으로, 다른 구체예에서, 전체 항체의 항원-결합 단편(예컨대, Fab, F(ab')₂, 및 Fv)일 수 있다.
- [0260] 따라서 본 발명은 또한 본원에서 기술된 항체의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 단편은 Fab 면역글로불린 발현 라이브러리의 산물을 포함하는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)₂ 단편, 및 Fv 단편 및 상기에 언급된 모든 항체 및 단편의 에피토프-결합 단편을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0261] 다른 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 폴리에틸렌 글리콜에 컨주게이트된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체의 불변 영역은 변형되어, 변형되지 않은 항체에 비해 적어도 한 개의 불변 영역-매개된 생물학적 이펙터 기능이 감소된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 변형된 이펙터 기능을 갖는 Fc 영역을 포함한다.
- [0262] 본 발명은 또한 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다.
- [0263] 특히, 본 발명은 각각 서열 식별 번호: 2 및 3으로 주어진 인접하는(인접하는) 아미노산 분자의 스트레치를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 또는 중쇄 가변 영역(HCVR)의 상보성 결정 영역(CDR) 2 및 3을 나타내는 상보적 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다.
- [0264] 보다 특히, 본 발명은 서열 식별 번호: 4로 주어진 바와 같은 인접하는 아미노산 분자의 스트레치를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 또는 경쇄 가변 영역(LCVR)의 상보성 결정 영역(CDR) 1을 나타내는 상보적 서열을 포함하는

뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다.

- [0265] 본 발명의 다른 구체예에서 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 19로 주어진 바와 같은 뉴클레오타이드 서열, 또는 중쇄 가변 영역(HCVR)의 CDR 2 및 CDR3의 아미노산 서열을 각각 인코딩하는 상보적 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다.
- [0266] 본 발명의 다른 구체예에서 서열 식별 번호: 20으로 주어진 바와 같은 뉴클레오타이드 서열, 또는 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR 1의 뉴클레오타이드 서열을 인코딩하는 상보적 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다.
- [0267] 본 발명의 다른 구체예에서 서열 식별 번호: 21의 뉴클레오타이드 서열, 또는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 상보적 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다.
- [0268] 본 발명의 다른 구체예에서 서열 식별 번호: 22의 뉴클레오타이드 서열, 또는 신호 서열을 포함하는 완전 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 상보적 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다.
- [0269] 본 발명의 다른 구체예에서 서열 식별 번호: 22의 경쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호: 23의 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다. 본 발명은 또한 상기 뉴클레오타이드 분자의 상보적 가닥을 포함한다.
- [0270] 본 발명의 다른 구체예에서 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열 식별 번호: 24의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다. 본 발명은 또한 상기 뉴클레오타이드 분자의 상보적 가닥을 포함한다.
- [0271] 본 발명의 다른 구체예에서 신호 서열을 포함하는 완전 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열 식별 번호: 25의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다. 본 발명은 또한 상기 뉴클레오타이드 분자의 상보적 가닥을 포함한다.
- [0272] 본 발명의 다른 구체예에서 서열 식별 번호: 25의 중쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호: 26의 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 분자가 제공된다. 본 발명은 또한 상기 뉴클레오타이드 분자의 상보적 가닥을 포함한다.
- [0273] 본 발명은 또한 보다 큰 뉴클레오타이드 분자의 일부로서의 또는 분리된, 본 발명의 상술된 항체-인코딩 뉴클레오타이드 서열 중 하나, 특히 이의 상보적 가닥에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0274] 특히, 본 발명은 통상적인 혼성화 조건 하, 특히 엄격한 혼성화 조건 하에서 서열 식별 번호: 18-26 및 29-32로 주어진 뉴클레오타이드 서열 중 어느 것에, 특히 이의 상보적 가닥에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이다.
- [0275] 본 발명의 다른 구체예에서 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
- [0276] 본 발명의 다른 구체예에서 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 핵산을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 세포가 제공된다.
- [0277] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효량의, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 모든 유도체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 본 발명의 항체, 특히 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물, 특히 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약제학적 조성물 또는 치료적 조성물인 조성물에 관한 것이다.
- [0278] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 조성물은 치료적 유효량의 항체를 포함한다.
- [0279] 본 발명은, 치료적 유효량의, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 유도체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편 및, 선택적으로, 추가적 생물학적 활성 물질 및/또는 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 추가로 포함한다.
- [0280] 특히, 본 발명은 조성물 또는 혼합물에 관한 것으로, 여기서 상기 추가적 생물학적 활성 물질은 알츠하이머병에 관여하는 A β 단백질과 같은 아밀로이드-유사 단백질 또는 아밀로이드와 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 약물치료(medication)에 사용되는 화합물이다.
- [0281] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 다른 생물학적 활성 물질 또는 화합물은 또한 아밀로이드 β 에 기인하는 아밀로이드증의 치료에 사용될 수 있거나 또는 다른 신경계 장애의 투약에 사용될 수 있는 치료제가 될 수 있다.

- [0282] 상기 다른 생물학적 활성 물질 또는 화합물은 본 발명의 항체와 동일한 또는 유사한 메카니즘에 의해 또는 연관되지 않은 작용 메카니즘에 의해 또는 연관된 및/또는 연관되지 않은 작용 메카니즘의 다양성(multiplicity)에 의해 그의 생물학적 효과를 발휘할 수 있다.
- [0283] 일반적으로, 상기 다른 생물학적 활성 화합물은 중성자-전달 증강제(neutron-transmission enhancer), 정신치료제(psychotherapeutic drug), 아세틸콜린 에스테라아제 억제제, 칼슘-채널 차단제(blocker), 생원성(biogenic) 아민, 벤조디아제핀 진정제(tranquillizer), 아세틸콜린 합성, 저장 또는 방출 증강제, 아세틸콜린 시냅스 후부의 수용체 작용제, 모노아민 옥시다아제-A 또는 -B 억제제, N-메틸-D-아스파르테이트 글루타메이트 수용체 길항제, 비스테로이드성 항염증제, 항산화제, 및 세로토닌 수용체(serotonergic receptor) 길항제를 포함할 수 있다.
- [0284] 보다 특히, 본 발명은 산화적 스트레스에 효과적인 화합물, 항-자가사멸 화합물, 금속 킬레이터(chelator), 피렌제핀(pirenzepin) 및 대사물과 같은 DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술포산(3APS), 1,3-프로판디술포네이트(1,3PDS), α -세크레타아제 활성화제(α -secretase activator), β - 및 γ -세크레타아제 억제제, 타우 단백질(tau protein), 신경전달물질(neurotransmitter), β -시트 파괴제(sheet breaker), 아밀로이드 베타 제거(clearing)/고갈(depleting) 세포 성분에 대한 유인물질(attractant), 피로글루타메이트화(pyroglutamated) 아밀로이드 베타 3-42를 포함하는 N-말단 잘린 아밀로이드 베타의 억제제, 항-염증 분자, 또는 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 도네페질(donepezil), 및/또는 갈란타민(galantamine)과 같은 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs), M1 작용제 및 임의의 아밀로이드 또는 타우 변형 약물 및 영양 보조제, 및 영양 보조제를 포함하는 다른 약물을 포함하는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 화합물과, 본 발명의 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 함께 포함하는 혼합물에 관한 것이다.
- [0285] 본 발명은 또한 조성물 또는 혼합물에 관한 것으로, 여기서 상기 화합물은 콜린에스테라아제 억제제(ChEI), 특히 혼합물이며, 여기서 상기 화합물은 타크린, 리바스티그민, 도네페질, 갈란타민, 니아신 및 메만틴으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 하나이다.
- [0286] 추가의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 항체와 함께 니아신(niacin) 또는 메만틴(memantine) 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0287] 본 발명의 또 다른 구체예에서 제공되는 조성물은, 치료를 필요로 하는 대상에서, 환각(hallucination), 망상(delusion), (두드러진 사고산란(marked incoherence), 탈선(derailment), 사고이탈(tangentiality)로 표시되는) 사고 장애(thought disorder), 및 기묘한 또는 혼란된 행동, 뿐만 아니라 무쾌감증(anhedonia), 정서둔마(flattened affect), 무감동(apathy), 및 사회적 위축(social withdrawal)을 포함하는 양성 및 음성 정신병 증상의 치료를 위해, 예를 들어, 클로자핀(clozapine), 지프라시돈(ziprasidone), 리스페리돈(risperidone), 아리피프라졸(aripiprazole) 또는 올란자핀(olanzapine)과 같은 "비전형적 항정신병약(atypical antipsychotics)"을, 항체, 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 특히 본원에서 기술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께 포함한다.
- [0288] 본 발명의 특정 구체예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물 및 혼합물은 치료적 유효량의 상기 항체 및 생물학적 활성 물질을 각각 포함한다.
- [0289] 본 발명의 항체와 조합되어 혼합물에 적절하게 사용될 수 있는 다른 화합물은, 치료 약물 표적(36-39페이지), 알칸술포산 및 알칸올황산(39-51페이지), 콜린에스테라아제 억제제(51-56페이지), NMDA 수용체 길항제(56-58페이지), 에스트로겐(58-59페이지), 비스테로이드성 항-염증제(60-61페이지), 항산화제(61-62페이지), 퍼옥시좀 증식제-활성화된 수용체(peroxisome proliferators-activated receptor; PPAR) 작용제(63-67페이지), 콜레스테롤-저하 작용제(68-75페이지); 아밀로이드 억제제(75-77페이지), 아밀로이드 형성 억제제(77-78페이지), 금속 킬레이터(78-79페이지), 항-정신병약 및 항-우울제(80-82페이지), 영양 보충제(83-89페이지) 및 뇌 내 생물학적 활성 물질의 유용성을 증가시키는 화합물(89-93페이지 참조) 및 전구약물(prodrug)(93 및 94페이지)을 포함하는, 본원에 참조로서 삽입된 문서인 WO 2004/058258 (특히 16 및 17페이지 참조)에 설명된다.
- [0290] 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효량의 생물학적 활성 물질 및/또는 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0291] 본 발명은 이를 필요로 하는 대상에서, 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운

증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펔트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환을 포함하는 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 영향을 완화 또는 치료하기 위한 약제의 조제를 위한 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편 및/또는 이의 기능성 부분 및/또는 상기 항체를 포함하는 약제학적 조성물, 또는 혼합물의 용도에 관한 것이다.

[0292]

본 발명은 또한 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편을 약제학적으로 허용가능한 형태로 제형화하는 것을 포함하고, 이를 필요로 하는 대상에서, 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펔트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환을 포함하는 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 영향을 예방, 치료 또는 완화시키는 방법에서의 사용을 위한, 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편 및/또는 이의 기능성 부분 및/또는 상기 항체 및/또는 이의 기능성 부분을 포함하는 약제학적 조성물, 또는 혼합물, 특히 치료적 유효량의 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편 및/또는 이의 기능성 부분 및/또는 상기 항체 및/또는 이의 기능성 부분을 포함하는 약제학적 조성물, 또는 혼합물의 제조 방법을 포함한다.

[0293]

본 발명은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펔트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환을 포함하는 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 영향을, 이를 필요로 하는 대상에서, 항체 및/또는 이의 기능성 부분, 특히 인간화된 항체 및/또는 이의 기능성 부분, 또는 상기 항체 및/또는 이의 기능성 부분을 포함하는 조성물 또는 혼합물을, 상기 장애에 걸린 포유류 또는 인간을 포함하는 대상에게 치료적 유효량으로 투여함에 의해, 예방, 치료 또는 완화시키기 위한 방법을 추가로 포함한다.

[0294]

장애에 걸린 대상, 특히 포유류 또는 인간에게, 항체, 특히 본원에 전술된 바와 같은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여함에 의해, 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하는 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증, 특히 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 치료 방법을 제공하는 것 또한 본 발명의 목적이다.

[0295]

특정 구체예에서 본 발명은 대상, 특히 포유류 또는 인간에게 항체, 특히 본원에서 기술된 바와 같은 본 발명의 약제학적 조성물 또는 치료적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여함으로써 기억 손상에 걸린 대상, 특히 포유류 또는 인간의 인지 기억 능력을 유지시키거나 또는 증가시키는, 특히, 인지 기억 능력을 회복시키는 방법을 제공한다.

[0296]

본 발명의 추가의 목적은, 본원에 전술된 바와 같은 본 발명의 항체를 사용하는, 이에 한정되는 것은 아니지만, 신경계 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD)을 포함하는 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증, 특히 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 치료적 조성물 및 그러한 조성물을 생산하는 방법뿐만 아니라 치료를 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0297]

특히, 본 발명은 인지 기억 능력을 보유(retention)시키는, 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 아밀로이드-관련 병태에 걸린 대상, 특히 포유류 또는 인간의 치료에 관한 것이다.

[0298]

본 발명은 또한

- [0299] (a) 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역을, 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편, 및/또는 이의 기능성 부분과 접촉시키는 단계로서, 상기 항체는 상기 아밀로이드 단백질의 에피토프에 결합하는 것인 단계;
- [0300] (b) 상기 항체 및/또는 이의 기능성 부분이 상기 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역 복합체를 형성하도록 하는 단계;
- [0301] (c) 상기 면역 복합체의 형성을 검출하는 단계; 및
- [0302] (d) 상기 면역 복합체의 존재 또는 부재를, 상기 대상의 상기 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계
- [0303] 를 포함하는, 샘플 내 또는 인 시투(in situ) 아밀로이드 단백질의 에피토프에 대한 항체 또는 이의 활성 단편의 면역특이적 결합을 검출하는 것을 포함하는, 대상에서 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 진단 방법에 관한 것이다.
- [0304] 본 발명은 또한,
- [0305] (a) 조사 중인 대상의 조직 및/또는 체액의 샘플 표본을 수득하는 것;
- [0306] (b) 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편, 및/또는 이의 기능성 부분으로 아밀로이드 단백질의 존재에 대해 상기 샘플을 테스트하는 것;
- [0307] (c) 상기 단백질에 결합된 항체의 양을 측정하는 것; 및
- [0308] (d) 상기 대상의 상기 조직 및/또는 체액 내의 플라크 존재량(burden)을 계산하는 것
- [0309] 을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상의 조직 및/또는 체액 내 아밀로이드 형성 플라크 존재량의 정도를 측정하는 방법도 포함한다.
- [0310] 특히, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상의 조직 및/또는 체액 내 아밀로이드 형성 플라크 존재량의 정도를 측정하는 방법에 관한 것으로, 여기서 단계 c)의 면역 복합체의 형성은 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련되는 상기 면역 복합체의 존재 또는 부재로 측정된다.
- [0311] 본 발명의 다른 구체예에서, 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편, 및/또는 이의 기능성 부분을 포함하는 대상의 아밀로이드-관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 위한 테스트 키트가 제공된다.
- [0312] 특히, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 항체 및/또는 이의 기능성 부분을 담은 용기(container), 및 아밀로이드 단백질에 대해 결합시킬 목적으로 면역 복합체를 형성하고 상기 면역 복합체의 형성을 검출하여, 상기 면역 복합체의 존재 또는 부재를 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 것을 목적으로 하는 상기 항체의 사용을 위한 설명서를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상에서 아밀로이드-관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 위한 테스트 키트에 관한 것이다.
- [0313] 또다른 측면에서, 본 발명은 변형 Fc 영역(variant Fc region)을 추가로 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역글로불린을 사용하여 이를 필요로 하는 대상에서 아밀로이드증과 관련된 질환을 예방, 치료 또는 검출하기 위한 방법 및 조성물을 제공하며, 여기서 상기 변형 Fc 영역은 야생형(wild-type) Fc 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다. Fc 영역은 항체 또는 그 단편의 이펙터 기능을 매개한다. 항체 또는 그 단편의 Fc 부위의 그 수용체에 대한 결합 또는 이를 활성화시키는 능력을 조절하는 것에 의해, 항체 또는 그 단편의 이펙터 기능을 폐기하거나 또는 향상시키는 것이 가능하다.
- [0314] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변이를 포함하는 변형 Fc 영역을 추가로 포함하는 본 발명의 항체 또는 그 단편을 제공한다. 그러한 한 측면에서, 상기 하나 이상의 아미노산 변이는 항체 또는 그 단편의 글리코실화(glycosylation)를 감소시킨다. 그러한 또다른 측면에서, 상기 하나 이상의 아미노산 변이는 동족의(cognate) Fc 수용체에 대한 결합을 감소시킨다. 그러한 또다른 측면에서, 상기 하나 이상의 아미노산 변이는 항체 또는 그 단편의 결합시 동족의 Fc 수용체의 활성을 감소시킨다. 그러한 한 측면에서, 상기 변형 Fc 영역은 가변 IgG1 Fc 영역이다. 그러한 한 측면에서, 항체 또는 그 단편은

Fc 영역에서 D265A 변이를 포함한다.

[0315]

또다른 측면에서, 본 발명은 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변이를 포함하는 변형 Fc 영역을 추가로 포함하는 본 발명의 항체 또는 그 단편을 제공한다. 그러한 한 측면에서, 상기 하나 이상의 아미노산 변이는 항체 또는 그 단편의 글리코실화를 증가시킨다. 그러한 또다른 측면에서, 상기 하나 이상의 아미노산 변이는 동족의 Fc 수용체에 대한 결합을 증가시킨다. 그러한 또다른 측면에서, 상기 하나 이상의 아미노산 변이는 항체 또는 그 단편의 결합시 동족의 Fc 수용체의 활성을 증가시킨다. 본 발명의 이들 및 다른 목적, 특성 및 이점은 이하에 개시된 구체예의 상세한 설명 및 첨부된 청구항의 검토 후 명백해질 것이다.

발명의 효과

[0316]

본 발명의 교시에 의해 가능해진 항체는, 일부 지명하자면 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질과 관련되거나 또는 이에 기반하는 다른 질환을 포함하는, 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 치료에 특히 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0317]

도 1 (실시예 2): 키메라 항체의 중쇄 발현 벡터;

도 2 (실시예 2): 키메라 항체의 경쇄 발현 벡터;

도 3 (실시예 2): 키메라 항체의 마우스 경쇄 가변 영역의 발현 카세트;

도 4 (실시예 2): 키메라 항체의 마우스 중쇄 가변 영역의 발현 카세트;

도 5 (실시예 5.2): 마우스 중쇄 가변 영역과 가장 가까운 쥐 생식 계열 서열의 비교;

도 6 (실시예 8): 정제된 인간화된 C2 항체의 활성;

도 7 (실시예 9): 정제된 항체 및 일과성 트랜스펙션(transient transfection)에 의해 생산된, 키메라 항체 C2ChVHAF/ChVK와 비교한, C2 키메라 중쇄와 병합된 C2 변형된 CDRL2 구조물의 일과성 발현에 의해 생산된 항체의 결합 활성;

도 8 (실시예 11): 키메라 항체 AF(IgG4) 및 인간화된 항체 H4K1(IgG4)으로의 면역조직화학 결합 분석의 결과;

도 9 (실시예 12): 아밀로이드 섬유에서 mC2의 기능성. A) 24시간 동안 PBS(대조군으로서 사용된 왼쪽) 또는 ACI-7-C2(오른쪽)로 인큐베이션되고 이어서 동결건조된 Val12-표지된 아밀로이드 β 1-42 섬유 및 U- ^{13}C Tyr10에 대한 피트 및 ^{13}C CPMAS 스펙트럼의 비교. c33 ppm에서의 피크는 섬유의 베타 시트 입체형태에 상응하고, 반면 30 ppm에서의 피크는 랜덤 코일 입체형태의 결과이다. B) Val12 C β 의 두 개의 입체형태에 대해 피트된 파라미터들의 비교. 상기 두 입체형태에 대해 피트된 화학적 시프트는 매우 유사하지만, 적분 강도(integral intensity)는 매우 상이하고, 이는 원래의 베타 시트 입체형태의 대략 35%((1-(53.5/81.7)) 감소를 반영하며, 이는 형광 측정으로부터 수득한 값과 매우 밀접하게 일치한다.

도 10 (실시예 12): ELISA에서의 인간화된 C2의 결합 친화도;

도 11 (실시예 14): 상이한 클래스(class)의 아밀로이드 단백질에 대한 mC2의 입체형태 특이적 결합. 본 도면에 대한 설명에서 펠렛 준비물은 A β 1-42 섬유를 나타내고, 상청액 준비물은 아밀로이드 모노머를 나타낸다;

도 12: 쥐 서열 및 인간 수용체 서열 DPK15 및 J κ 1과 비교한 인간화된 C2 VK 서열;

도 13: 쥐 서열 및 인간 수용체 서열 DP54 및 J μ 6과 비교한 인간화된 C2 VH 서열;

도 14: 인간화된 C2 항체, C2HuVK1의 경쇄 가변 영역의 완전 DNA 및 단백질 서열;

도 15a ~ 15e : 인간화된 C2 항체의 경쇄 불변 영역 (인간 C 카파)의 완전 DNA 및 단백질 서열;

도 16a ~ 16b : 인간화된 C2 항체의 중쇄 불변 영역 (인간 IgG4 ser228-pro)의 완전 DNA 및 단백질 서열;

도 17 1~3 (실시에 15): 에피토프 매핑 실험의 결과;

도 18 (실시에 13): 응집 분석 실험의 결과;

도 19 (실시에 13): 해체 분석 실험의 결과;

도 20: (실시에 16): 인간화된 항체 C2로의 신경보호 실험의 결과;

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0318] 본원에서 사용된 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 교차사용할 수 있으며 또한 펩타이드 결합에 의해 연결된 아미노산으로 구성된 생체분자를 의미하는 것으로 정의된다.
- [0319] 본원에서 사용된 용어 "a", "an" 및 "the"는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 정의되며, 문맥에 부적절하지 않으면 복수를 포함한다.
- [0320] 용어 "아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 질환 및 장애"는 이에 한정되는 것은 아니지만, 모노머성, 피브릴, 또는 폴리머성 상태, 또는 상기 세 가지의 임의의 조합인 아밀로이드-유사 단백질의 존재 또는 활성화에 기인하는 질환 및 장애를 포함한다. 그러한 질환 및 장애는 이에 한정되는 것은 아니지만, 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함한다.
- [0321] 용어 "아밀로이드증"은 이에 한정되는 것은 아니지만, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애, 예를 들면, 경증 인지 손상(mild cognitive impairment, MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펔트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병, 및 노인성 심아밀로이드증; 및 황반 변성, 드루젠-관련 시각 신경병증(drusen-related optic neuropathy), 및 베타-아밀로이드 침착에 의한 백내장(cataract)을 포함하는 다양한 안질환(eye disease)과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 다른 질환을 포함하는 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아닌 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹을 나타낸다.
- [0322] 본원에서 사용된 용어 "검출하는(detecting)" 또는 "검출된(detected)"은, 면역화학적 또는 조직학적(histological) 방법과 같은 생물학적 분자의 검출을 위한 공지의 기술을 사용하는 것을 의미하고, 또한 조사중인 생체분자의 존재 또는 농도를 정성적으로 또는 정량적으로 측정하는 것을 나타낸다.
- [0323] "폴리머성 가용성 아밀로이드"는 포유류 또는 인체 내, 보다 특히 뇌 내에서 가용성인 올리고머성 또는 폴리머성 구조를 형성하는, 아밀로이드 펩타이드의, 또는 아밀로이드-유사 펩타이드의, 또는 변형된 또는 잘린(truncated) 아밀로이드 펩타이드의 또는 아밀로이드 펩타이드의 다른 유도체의 다수의 응집된 모노머, 특히 아밀로이드 β ($A\beta$)의 또는 변형된 또는 잘린 아밀로이드 β ($A\beta$) 펩타이드의 또는 이의 유도체의 다수의 응집된 모노머를 나타내며, 이는 포유류 또는 인체 내, 보다 특히 뇌 내에서 가용성이다.
- [0324] "아밀로이드 β , $A\beta$ 또는 β -아밀로이드"는 기술 공인 용어이며, 아밀로이드 β 단백질 및 펩타이드, 아밀로이드 β 전구체 단백질(APP), 뿐만 아니라 변형물, 단편 및 이의 모든 기능적 균등물을 나타낸다. 특히, 본원에서 사용된 아밀로이드 β 는 APP의 단백질 분해적 분해에 의해 생산된 모든 단편, 특히 $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$ 및 $A\beta_{1-43}$ 을 포함하나 이에 한정되는 것은 아닌 아밀로이드 병리에 관여하거나 이와 관련되는 이들 단편을 의미한다.
- [0325] 상기에 언급된 아밀로이드 β 펩타이드의 구조 및 서열은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 상기 펩타이드를 생산하는 방법 또는 뇌 및 다른 조직으로부터 상기 펩타이드를 추출하는 방법은 예를 들어, Glenner 및 Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984) 에 기술되어 있다. 게다가, 다양한 형태의 아밀로이드 β 펩타이드는 상업적으로도 입수 가능하다.
- [0326] "분리된(isolated)"은 자연적으로 발생했을 때 가졌던 성분의 적어도 일부가 없는 생물학적 분자를 의미한다.
- [0327] 본원에서 사용된 용어 "항체" 또는 "항체들"은 기술 공인 용어이고, 공지된 항원에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편, 특히 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역적으로 활성인 부분, 즉 항원에 특이적으로 결

합하는 결합 부위를 포함하는 분자를 나타내는 것으로 이해된다. 면역글로불린은 실질적으로 면역글로불린 카파(kappa) 및 람다(lambda), 알파(alpha), 감마(gamma), 델타(delta), 입실론(epsilon) 및 뮤(mu) 불변 영역 유전자, 뿐만 아니라 무수한(myriad) 면역글로불린 가변 영역 유전자로 인코딩된 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 단백질이다. 경쇄는 카파 또는 람다 중 어느 하나로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 입실론으로 분류되며, 이는 각각 차례로 면역글로불린 클래스, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 정의된다. 또한 상기 중쇄의 서브클래스도 알려져있다. 예를 들어, 인간에서 IgG 중쇄는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 서브클래스 중 어느 것일 수 있다. 본 발명의 면역글로불린은 임의의 클래스(IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY) 또는 면역글로불린 분자의 서브클래스(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)일 수 있다.

[0328] 본원에서 사용된 바와 같은, 항체에 관해 "특이적으로 결합하는"은 상기 항체가 그의 표적 항원에, 구조적으로 상이한 항원(들)에 대한 친화도 보다 큰 친화도로 결합하는 것을 의미한다.

[0329] 전형적인 면역글로불린 구조적 단위는 테트라머(tetramer)를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각 테트라머는 동일한 폴리펩타이드 체(chain) 두 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경"쇄 (약 25kD) 및 하나의 "중"쇄 (약 50-70 kD)를 갖는다. 각 체의 N-말단은 항원 인식을 주로 담당하는 약 100 내지 110 이상의 아미노산의 가변 영역으로 정의한다. 용어 가변 경쇄(V_L) 및 가변 중쇄(V_H)는 이들 경쇄 및 중쇄를 각각 나타낸다.

[0330] 항체는 전체 길이 무손상 항체(full length intact antibody)로서 또는 다양한 펩티다아제(peptidase) 또는 화학물질로의 소화(digestion)에 의해 생산된 다수의 적절히-특징부여된(well-characterized) 단편으로서 존재한다. 따라서, 예를 들어, 펩신(pepsin)은 힌지 영역(hinge region) 내의 디설파이드 결합(disulfide linkage) 아래에서 항체를 소화하여, 그 자체가 디설파이드 결합에 의해 V_H-CH₁에 연결된 경쇄인 Fab의 다이머인 F(ab')₂를 생산한다. F(ab')₂는 온화한 조건 하에 감소되어 힌지 영역 내의 디설파이드 결합이 끊기고 이에 의해 F(ab')₂ 다이머가 Fab' 모노머로 전환될 수 있다. 상기 Fab' 모노머는 실질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab 단편이다 (다른 항체 단편의 보다 상세한 설명을 위해서는 Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993) 참조). 다양한 항체 단편이 무손상 항체의 소화로 정의되는 한편, 당업자는 모든 여러 가지 항체 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 이용함으로써 처음부터(de novo) 합성될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같은 용어 항체는 전체 항체의 변형에 의해 생산된 또는 처음부터 합성된 항체 단편 또는 재조합 DNA 방법론을 사용함으로써 얻어진 항체 및 단편도 포함한다.

[0331] 본 발명의 범위 내의 "항체들"은 단일클론성 항체, 다클론성 항체, 키메라, 단쇄(single chain), 이중특이성, 유인원화된(simianized), 인간 및 인간화된 항체뿐만 아니라 이들의 활성 단편을 포함하는 것을 의도한다. 공지된 항원에 결합하는 분자의 활성 단편의 예는, Fab 면역글로불린 발현 라이브러리의 산물 및 모든 항체의 에피토프-결합 단편 및 상기 언급된 단편들을 포함하는, 분리된 경쇄 및 중쇄, Fab, Fab/c, Fv, Fab', 및 F(ab')₂ 단편을 포함한다.

[0332] 이들 활성 단편은 다수의 기술에 의해 본 발명의 항체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 단일클론성 항체는 펩신과 같은 효소로 절단될 수 있고, 또한 HPLC 겔 여과될 수 있다. 그 후 Fab 단편을 함유하는 적절한 분획이 수합되어 막 여과 등에 의해 농축될 수 있다. 항체의 활성 단편의 분리를 위한 일반적 기술의 추가적 설명은 예를 들어, Khaw, B. A. 등 J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux 등 Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986를 참조한다.

[0333] 재조합적으로 제조된 항체는 통상적인 전체 길이 항체, 단백질 가수분해 소화로부터 알려진 활성 항체 단편, Fv 또는 단쇄 Fv(scFv)와 같은 독특한 활성 항체 단편, 도메인 결실된 항체 등일 수 있다. Fv 항체는 약 50Kd의 크기이고 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 단쇄 Fv("scFv") 폴리펩타이드는 직접 연결되거나 또는 펩타이드-인코딩 링커에 의해 연결된 V_H- 및 V_L- 인코딩 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현될 수 있는 공유결합된 V_H::V_L 헤테로다이머이다. Huston 등 (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883을 참조한다. 자연적으로 응집된, 그러나 항체 V 영역으로부터 화학적으로 분리된 경쇄 및 중쇄 폴리펩타이드(light and heavy polypeptide chain)를 scFv 분자로 전환시키기 위한 다수의 구조는 실질적으로 항원-결합 부위의 구조와 유사한 3차원 구조로 접힐 것이다. 예컨대, 미국 특허 제5,091,513호, 제5,132,405호 및 제4,956,778호를 참조한다.

[0334] 결합 부위(combining site)는 항원 결합에 관여하는 항체 분자의 일부를 나타낸다. 상기 항원 결합 부위는 중("H")쇄 및 경("L")쇄의 N-말단 가변("V") 영역의 아미노산 잔기로 형성된다. 상기 항체 가변 영역은 "프레임워크 영역(framework region, FR)"으로 알려진 보다 보존된 플랭킹 스트레치(flanking stretch)들 사이에 끼워진 "과가변 영역(hypervariable region)" 또는 "상보성 결정 영역(CDR)으로 언급된 세 개의 고도로 분기하는

(highly divergent) 스트레치를 포함한다. 항체 분자 내에서, 상기 세 개의 경쇄의 과가변 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3) 및 세 개의 중쇄의 과가변 영역(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)은 3차원 공간 내에서 서로에 대해 배치되어 항원 결합 표면 또는 포켓(pocket)을 형성한다. 따라서 상기 항원 결합 부위는 항원의 CDR을 구성하는 아미노산 및 결합 부위 포켓을 구성하는 모든 프레임워크 잔기를 나타낸다.

[0335] 조합 부위를 이루는 특정 항체 내 아미노산 잔기의 동일성은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 항체 CDR은 Kabat 등에 의해 최초로 정의된 과가변 영역으로서 확인될 수 있다 ("Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat 등, U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G 및 Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu> 참조). CDR의 위치는 또한 Chothia 및 다른 이들에 의해 최초로 밝혀진 구조적 루프 구조로서 확인될 수 있다 (Chothia 및 Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia 등, Nature 342, 877 (1989), 및 Tramontano 등, J. Mol. Biol. 215, 175 (1990) 참조). 다른 방법은 Kabat과 Chothia 사이의 절충이고 또한 옥스포드 몰레큘러 사(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어 (현재 Accelrys)를 사용하여 얻어지는 "AbM 정의(AbM definition)" 또는 Macallum 등 ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography," J Mol Biol. 1996 Oct 11;262(5):732-45)에 의한 CDR의 "접촉 정의(contact definition)"를 포함한다. 이하의 표는 여러가지 공지된 정의를 기초로 하여 CDR을 확인한다.

루프	Kabat	AbM	Chothia	접촉
---	-----	-----	-----	-----
L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 -- H32..34	H30 -- H35B
(Kabat 넘버링)				
H1	H31 -- H35	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
(Chothia 넘버링)				
H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

[0336]

[0337] 서열만으로 항체 내의 CDR을 확인할 수 있는 일반적인 지침은 이하와 같다:

[0338] LCDR1:

[0339] 시작 - 대략 잔기 24.

[0340] 앞서는 잔기는 항상 Cys이다.

[0341] 뒤따르는 잔기는 항상 Trp이다. 일반적으로 TRP는 TYR-GLN가 뒤따르나, LEU-GLN, PHE-GLN, 또는 TYR-LEU가 뒤따를 수도 있다.

[0342] 길이는 10 내지 17 잔기이다.

[0343] LCDR2:

[0344] 시작 - L1의 끝 이후 16 잔기

[0345] 앞서는 서열은 일반적으로 ILE-TYR이지만, VAL-TYR, ILE-LYS, 또는 ILE-PHE일 수도 있다.

[0346] 길이는 일반적으로 7 잔기이다.

[0347] LCDR3:

[0348] 시작 - 일반적으로 L2의 끝 이후 33 잔기.

[0349] 앞서는 잔기는 Cys이다.

- [0350] 뒤따르는 서열은 PHE-GLY-X-GLY이다.
- [0351] 길이는 7 내지 11 잔기이다.
- [0352] HCDR1 :
- [0353] 시작 - 대략 잔기 26 (CYS 이후 4 잔기) [Chothia / AbM 정의] Kabat 정의는 5 잔기 이후 시작한다.
- [0354] 앞서는 서열은 CYS-X-X-X이다.
- [0355] 뒤따르는 잔기는 TRP이고, 일반적으로 VAL이 뒤따르지만, ILE 또는 ALA가 뒤따를 수도 있다.
- [0356] Chothia 정의는 마지막 4 잔기를 제외한 반면 AbM 정의 하에서의 길이는 10 내지 12 잔기이다.
- [0357] HCDR2:
- [0358] 시작 - CDR-H1의 Kabat /AbM 정의의 끝 이후 15 잔기
- [0359] 앞서는 서열은 일반적으로 LEU-GLU-TRP-ILE-GLY(서열 식별 번호. 1)이지만, 다수의 변형(variation)이 가능하다.
- [0360] 뒤따르는 서열은 LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA이다.
- [0361] 길이는 Kabat 정의 하에서 16 내지 19 잔기이다 (AbM 정의는 7 잔기 먼저 끝난다).
- [0362] HCDR3:
- [0363] 시작 - CDR-H2의 끝 이후 33잔기 (CYS 이후 2 잔기).
- [0364] 앞서는 서열은 CYS-X-X이다 (일반적으로 CYS-ALA-ARG).
- [0365] 뒤따르는 서열은 TRP-GLY-X-GLY이다.
- [0366] 길이는 3 내지 25 잔기이다.
- [0367] 특정 항체 내 아미노산 잔기가 CDR의 외측(outside)이지만, 그럼에도 불구하고 결합 부위의 라이닝(lining)의 일부인 측쇄를 가짐으로써 결합 부위의 일부를 구성하는 것(즉, 상기 결합 부위를 통해 연결시킬 수 있다)의 확인은 분자 모델링 및 X-선 결정학과 같은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예컨대, Riechmann 등, (1988) Nature, 332::323-327을 참조한다.
- [0368] 키메라 항체는 상기 항체의 하나 이상의 영역이 한 종의 동물로부터의 것이고 또한 상기 항체의 하나 이상의 영역이 다른 종의 동물로부터의 것인 항체이다. 바람직한 키메라 항체는 영장류 면역글로불린으로부터의 영역을 포함하는 것이다. 인간 임상 용도를 위한 키메라 항체는 일반적으로 인간으로부터의 불변 영역과 비인간 동물, 예컨대 설치류로부터의 가변 영역을 갖는 것으로 이해된다. 반대로, 인간화된 항체는 인간 면역글로불린으로부터의 불변 영역 전부 및 가변 프레임워크 영역의 대부분 또는 전부와 비인간 항체로부터의 CDR을 사용한다. 인간 키메라 항체는 일반적으로 설치류로부터의 가변 영역을 가지는 것으로 이해된다. 일반적인 인간 키메라 항체는 설치류 항체 유래의 중쇄 및 경쇄 모두의 가변 영역과 인간 중쇄 불변 영역 및 인간 경쇄 불변 영역을 가진다. 키메라 항체는 인간 불변 영역의 본래의(native) 아미노산 서열 및 본래의 설치류 가변 영역 서열에 대해 일부 변화를 포함할 수 있다. 키메라 및 인간화된 항체는 CDR 이식(grafting) 방법(예를 들어, 미국 특허 제 5,843,708호; 제 6,180,370호; 제 5,693,762호; 제 5,585,089호; 제 5,530,101호 참조), 쇄 셔플링(chain shuffling) 방법(예를 들어, 미국 특허 제 5,565,332호; Rader 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915 참조), 분자 모델링 방법(미국 특허 제 5,639,641호) 등을 포함하는 당업계에 공지된 방법에 의해 준비될 수 있다.
- [0369] 두 쇄(two chain) 항체의 경우에서 본원에서 사용된 바와 같은 "인간화된 항체"는 적어도 한 개의 쇄가 인간화된 것이다. 인간화된 항체 쇄는 하나 이상의 프레임워크 영역이 인간인 가변 영역을 가진다. 단일쇄인 인간화된 항체는 상기 쇄가 하나 이상의 프레임워크 영역이 인간인 가변 영역을 가지는 것이다. 인간화된 항체 쇄 또

는 이의 단편의 가변 영역의 비인간 부분은 비인간 근원(non-human source), 특히 비인간 항체, 일반적으로 설치류 기원으로부터 유래한다. 인간화된 항체에의 비인간 기여(contribution)는 일반적으로 하나 (이상의) 인간 면역글로불린(들)으로부터 유래된 프레임워크 영역 중에 산재된(interspersed) 적어도 한 개의 CDR 영역의 형태로 제공된다. 추가로, 프레임워크 지지 잔기(framework support residue)는 결합 친화도를 보존하기 위해 변경될 수 있다.

[0370] 인간화된 항체는 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다 (예컨대, 경쇄의 경우 적어도 한 개의 불변 영역 또는 이의 부분, 및 중쇄의 경우 바람직하게는 세 개의 불변 영역). 인간화된 항체의 불변 영역이 존재한다면 일반적으로 인간이다.

[0371] *"인간화된 항체"를 수득하는 방법은 당업자들에게 공지되어 있다 (예를 들어, Queen 등, Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson 등, Bio/Technology, 9:421 (1991) 참조).

[0372] "인간화된 항체"는 예를 들어, 토끼 및 마우스와 같은 큰 동물에서 친화도-성숙된(affinity-matured) 인간유사 다클론성 항체를 생산할 수 있는 신규한 유전공학 수단에 의해서도 수득될 수 있다. 미국 특허 제 6,632,976호 참조.

[0373] [여기에서 * 섹션은 위의 정의로 대체되었다]

[0374] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 불변 영역(CR)은 면역글로불린의 불변 영역 유전자를 나타낸다. 상기 불변 영역 유전자는 이펙터 기능(effector function)을 부여하는 항체 분자의 부분을 인코딩한다. 키메라 인간 항체 및 인간화된 항체에 있어서, 일반적으로 비인간 (예컨대, 쥐), 불변 영역은 인간 불변 영역에 의해 치환된다. 대상 키메라 또는 인간화된 항체의 불변 영역은 일반적으로 인간 면역글로불린에서 유래된다. 중쇄 불변 영역은 다섯가지 이소타입: 알파, 델타, 입실론, 감마 또는 뮤 중 어느 것으로부터 선택될 수 있다. 또한, (중쇄의 IgG 서브클래스와 같은) 여러가지 서브클래스의 중쇄는 상이한 이펙터 기능을 야기하므로, 원하는 중쇄 불변 영역을 선택함으로써, 원하는 이펙터 기능을 갖는 항체를 생산할 수 있다. 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있는 불변 영역은 감마 1(IgG1), 특히 감마 1(IgG1) 이소타입, 감마 3(IgG3) 및 특히 감마 4(IgG4)의 Fc 영역이다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 유형, 바람직하게는 카파 유형의 것일 수 있다. 일 구체예에서 경쇄 불변 영역은 인간 카파 불변 채이고 (Heiter 등 (1980) Cell 22:197-207) 또한 중쇄 불변 영역은 인간 IgG4 불변 채이다.

[0375] 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. "Fc 영역"은 본래의 서열 Fc 영역 또는 변형 Fc 영역(variant Fc region)일 수 있다. 비록 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 Pro230으로부터 또는 위치 Cys226에서 아미노산 잔기로부터, 그 카르복실-말단까지 신장하도록 정의된다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 두 개의 불변 도메인, CH2 및 CH3을 포함한다.

[0376] "기능적 Fc 영역"은 본래의 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능(effector function)"을 포함한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC); 포식작용(phagocytosis); 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 그러한 이펙터 기능은 일반적으로 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변성 도메인)과 결합될 Fc 영역을 필요로 하고, 예를 들어, 여기에 기재된 바와 같은 다양한 분석을 사용하여 평가될 수 있다. 기능적 Fc 영역은 조합된 폴리펩타이드를 포함하는 두 개의 중쇄 CH2 및 CH3을 일반적으로 포함한다.

[0377] "본래의 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열 및 자연적으로 발생하는 그 변형체와 동일한 아미노 부가 서열(amino add sequence)을 포함한다.

[0378] "변형 Fc 영역"은, 여기에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 "아미노산 변형(amino acid modification)"에 의해 본래의 서열 Fc 영역의 그것과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변형 Fc 영역은 부모 폴리펩타이드(parent polypeptide)의 Fc 영역에 비해 또는 본래의 서열 Fc 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 치환체, 예를 들어 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역에서 또는 본래의 서열 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환체, 및 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환체를 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역에 또는 본래의 서열 Fc 영역에 갖는다. 여기에서 변형 Fc 영역은 바람직하게는 본래의 서열 Fc 영역 및/또는 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성, 및 더욱 바람직하게는 그들과 적어도 약 90%의 상동성, 더 바람직하게는

그들과 적어도 약 95% 상동성을 보유할 것이다.

[0379] "아미노산 변형"은 소정의(predetermined) 아미노산 서열의 아미노산 서열에서의 변화를 의미한다. 예시적인 변형은 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결손을 포함한다. 여기에서 바람직한 아미노산 변형은 치환이다.

[0380] *특정 위치, 예를 들어 Fc 영역 "에서 아미노산 변형"은 특정 잔기의 치환 또는 결손, 또는 특정 잔기에 인접한 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입을 의미한다. 특정 잔기에 "인접한" 삽입은 그들의 하나 내지 두 잔기 내의 삽입을 의미한다. 삽입은 특정 잔기에 N-말단 또는 C-말단일 수 있다.

[0381] "아미노산 치환"은 소정의 아미노산 서열에서 하나 이상의 존재하는 아미노산 잔기의 또다른 상이한 "대체(replacement)" 아미노산 잔기로의 대체를 의미한다. 대체 잔기 또는 잔기들은 "천연적으로 발생하는(naturally occurring) 아미노산 잔기들"(즉, 유전 부호에 의해 인코딩됨)일 수 있고, 알라닌(Ala); 아르기닌(Arg); 아스파라긴(Asn); 아스파르트산(Asp); 시스테인(Cys); 글루타민(Gln); 글루탐산(Glu); 글리신(Gly); 히스티딘(His); 이소류신(Ile); 류신(Leu); 라이신(Lys); 메티오닌(Met); 페닐알라닌(Phe); 프롤린(Pro); 세린(Ser); 트레오닌(Thr); 트립토판(Trp); 티로신(Tyr); 및 발린(Val)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는, 대체 잔기는 시스테인이 아니다. 하나 이상의 비-천연적으로 발생하는 아미노산 잔기로의 치환은 또한 여기에서 아미노산 치환의 정의에 포함된다.

[0382] "비-천연적으로 발생하는 아미노산 잔기"는 상기에서 나열된 천연적으로 발생하는 아미노산 잔기 이외의 잔기를 의미하며, 이는 폴리펩타이드 사슬에 있는 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유 결합할 수 있다. 비-천연적으로 발생하는 아미노산 잔기들의 예로는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린 및 기타 아미노산 잔기 유사체, 예컨대 Ellman 등의 Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)에 기재된 것들을 포함한다. 그러한 비-천연적으로 발생하는 아미노산 잔기들을 생성하기 위하여, Noren 등의 Science 244:182 (1989) 및 위의 Ellman 등의 Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)의 과정이 사용될 수 있다. 요약하면, 이들 과정들은 비-천연적으로 발생하는 아미노산 잔기로 서프래서 tRNA를 화학적으로 활성화하고, 이어서 RNA의 인 비트로 전사 및 번역과 관련이 있다.

[0383] "아미노산 삽입"은 소정의 아미노산 서열 내로 하나 이상의 아미노산의 도입(incorporation)을 의미한다. 삽입은 통상적으로 하나 또는 2개의 아미노산 잔기의 삽입으로 구성될 것인 반면, 본 출원은, 예를 들어 약 3 내지 약 5개 또는 심지어 약 10개 이하의 아미노산 잔기들의 삽입과 같이, 더 큰 "펩타이드 삽입"을 포함한다. 삽입된 잔기(들)은 전술한 바와 같이 천연적으로 발생하는 또는 비-천연적으로 발생하는 것일 수 있다.

[0384] "아미노산 결손"은 소정의 아미노산 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기의 제거를 의미한다.

[0385] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 표적 세포에 의해 발현된 표적 항원에 부착된 분비된 항체가, 특정 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살상(NK) 세포, 중성구, 및 마크로파지) 상에 존재하는 Fc 수용체들(FcRs)에 의해 인식되는 세포독성의 형태를 의미하며, 상기 특정 세포독성 세포는 이들 세포 독성 이펙터 세포가 특이적으로 결합하도록 하여 표적 세포로 코팅된 항체를 인식하고 후속하여 세포독소를 가진 표적 세포를 죽인다. ADCC를 매개하는 일차 세포, NK 세포는Fc.gamma.RIII만을 발현하고, 반면 단핵구는 Fc.gamma.RI, Fc.gamma.RII 및 Fc.gamma.RIII를 발현한다. 조혈 세포에서 FcR 발현은 Ravetch 및 Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)의 464페이지, 표 3에 요약되어 있다. 관심을 가진 분자의 ADCC 활성을 측정하기 위하여, 미합중국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 것과 같은 인 비트로 ADCC 분석이 수행될 수 있다. 그러한 분석을 위한 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살상(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 관심을 가진 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 Clynes 등의 PNAS (USA) 95:652-656 (1998)에 기재된 것과 같은 동물 모델에서, 인 비로로 평가될 수 있다.

[0386] "면역 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcRs를 발현하고, 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이 세포는 적어도 Fc.gamma.RIII을 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC 를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 중성 킬러(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구를 포함하며; PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 그들 본래의 소스로부터, 예를 들어 여기에서 기재된 바와 같이 혈액 또는 PBMC로부터 분리될 수 있다.

[0387] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는, 표적 세포에 의해 발현된 항원과 반응성인 항체에 의해 부착되는 표적 세포의 보체 의존성 용해를 나타낸다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 그들의 동족의 항원에 결합하는 (적절한 서브클래스의) 항체에 대한 보체 시스템(C1q)의 제1 성분의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 측정하기 위하여, 예를 들어, Gazzano-Santoro 등의, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)에 기재된 바와 같은 CDC 분석이

수행될 수 있다.

[0388] "변형된(altered)" FcR 결합 친화도 또는 ADCC 활성을 갖는 가변 IgG Fc를 갖는 폴리펩타이드는, 부모 폴리펩타이드 또는 본래의 서열 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드와 비교시 증가 또는 감소된 FcR 결합 활성(Fc.gamma.R 또는 FcRn) 및/또는 ADCC 활성을 가진 것이다. FcR에 대한 "증가된 결합을 나타내는" 가변 Fc는 부모 폴리펩타이드에 비해 더 우수한 친화도를 가진 하나 이상의 FcR와 결합한다. 부모 폴리펩타이드와 비교시 결합의 향상은 약 3배, 바람직하게는 약 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, 500 배 이하, 또는 결합에서 약 25% 내지 1000% 향상일 수 있다. FcR에 대한 "감소된 결합을 나타내는" 폴리펩타이드 변형체는 부모 폴리펩타이드에 비해 더 나쁜 친화도를 가진 하나 이상의 FcR와 결합한다. 부모 폴리펩타이드와 비교시 결합의 감소는 결합에서 약 40% 이상의 감소일 수 있다. FcR에 대한 감소된 결합을 나타내는 그러한 Fc 변형체는, 예를 들어 여기에서의 실시예에서 측정된 바와 같이, 본래의 서열 IgG Fc 영역과 비교시, 예를 들어 FcR에 대한 0-20% 결합과 같이, FcR에 거의 또는 전혀 주목할만한 결합을 갖지 않는다.

[0389] 야생형 IgG Fc를 보유하는 폴리펩타이드에 비해 더 효과적으로 인간 이펙터 세포의 존재 중에서 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 매개하거나 또는 "증가된 ADCC를 나타내는" 변형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드는, 분석에서 사용된 야생형 Fc 영역을 가진 폴리펩타이드 및 변형 Fc 영역을 가진 폴리펩타이드의 양이 실질적으로 동일할 때(모든 다른 인자들은 동일함), 인 비트로 또는 인 비보에서 ADCC를 매개하는데 실질적으로 더욱 효과적인 것이다. 일반적으로, 그러한 변형체들은 인 비트로 ADCC 분석을 사용하여 확인될 것이지만, 예를 들어, 동물 모델 등에서, ADCC 활성을 측정하기 위한 다른 분석 또는 방법들이 고려된다. 바람직한 변형체는 야생형 Fc에 비해 ADCC를 매개하는데 약 5배 내지 약 100배, 예를 들어 약 25배 내지 약 50배 더 효과적이다.

[0390] 용어 "단일클론성 항체"는 또한 당업계에서 잘 인지될 수 있으며, 또한 단일 클론된 항체 생산 세포의 산물인 항체를 나타낸다. 단일클론성 항체는 일반적으로, 정상적으로 단명하는, 항체-생산 B 세포를 (때때로 "불멸(immortal)" 세포로 나타내어지는) 암세포와 같은 빨리-성장하는 세포와 융합하여 제조된다. 결과물인, 항체를 생산(create)하는 클론(clone)을 생성하는 하이브리드(hybrid) 세포, 또는 하이브리도마는 빠르게 증식한다.

[0391] 본 발명의 목적을 위해, "단일클론성 항체"는 완전한 단일클론성(full monoclonality)에 미쳐 도달하지 않은 모 클론(mother clone)에 의해 생산되는 항체를 포함하는 것으로도 이해된다.

[0392] "기능적으로 균등한 항체"는, β -아밀로이드 단백질, 특히 $A\beta_{1-42}$ 단백질, 또한 보다 특히 $A\beta_{1-42}$ 단백질의 16-21 에피토프 영역에 대한 결합 특이성, 인 비트로 면역반응성, $A\beta_{1-42}$ 모노머의 고분자 폴리머성 피브릴로의 응집의 억제 및/또는 미리형성된 $A\beta_{1-42}$ 폴리머성 피브릴의 해체, 및/또는 β -시트 파괴 특성 및 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 때, 예를 들면, 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 질환; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 다른 질환을 포함하나 이에 한정되는 것은 아닌 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 영향을 완화시키는 것을 포함하는 본원에 기재된 및 상기에 언급된 항체와 적어도 한 개의 주요 작용 특성을 실질적으로 공유하는 항체를 나타내는 것으로 본 발명의 범위 내에서 이해된다. 상기 항체는 IgG, IgM, 또는 IgA 등과 같은 임의의 클래스 또는 IgG1, IgG2a등과 같은 임의의 서브클래스 및 당업계에 알려지거나 또는 본원의 상기에 언급된 다른 서브클래스일 수 있으며, 특히 IgG4 클래스의 항체일 수 있다. 또한, 상기 항체는 파아지 디스플레이(phage display)와 같은 임의의 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 인간화된 항체와 같은, 원하는 특색을 갖는 항체를 생산하는 세균의, 곤충의, 포유류의 또는 다른 유형의 세포 또는 세포주를 포함하는 임의의 유기체 또는 세포주에서 생산된다. 상기 항체는 상이한 종으로부터의 Fab 부분 및 Fc 영역을 조합함으로써 형성될 수도 있다.

[0393] 사용된 용어 "혼성화하다(hybridize)"는 통상적인 혼성화 조건, 바람직하게는 5xSSPE, 1% SDS, 1x 덴하르트 용액이 용액으로서 사용되는 혼성화 조건 및/또는 혼성화 온도가 35°C 내지 70°C, 바람직하게는 65°C인 혼성화 조건을 나타낸다. 혼성화 후, 세척은 바람직하게는 35°C 내지 70°C, 바람직하게는 65°C의 온도에서 처음에는 2xSSC, 1% SDS로, 그리고 이어서 0.2xSSC로 수행된다 (SSPE, SSC 및 덴하르트 용액의 정의에 대해 Sambrook 등 인용된 곳에서 참조). 예를 들면 앞의 Sambrook 등에 기술된 바와 같은 엄격한 혼성화 조건이 특히

바람직하다. 특히 바람직한 엄격한 혼성화 조건은 예를 들어 상술하여 나타낸 바와 같이 혼성화 및 세척이 65℃에서 일어나는 것이다. 예를 들어 혼성화 및 세척이 45℃에서 수행되는 엄격하지 않은 혼성화 조건은, 보다 덜 바람직하며, 35℃에서 수행되는 혼성화 조건은 바람직하지 않다.

[0394] 두 서열간의 "상동성(homology)"은 서열 동일성에 의해 결정된다. 만약 상호 길이 면에서 상이한 두 서열이 비교된다면, 서열 동일성은 바람직하게는 더 긴 서열의 뉴클레오타이드 잔기와 동일한 더 짧은 서열의 뉴클레오타이드 잔기의 백분율과 관련된다. 서열 동일성은 통상적으로 Bestfit 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix용 Version 8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711)과 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. Bestfit은, 두 서열간 가장 높은 서열 동일성을 갖는 세그먼트를 찾기 위해, Smith 및 Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489의 로컬 상동성 알고리즘을 사용한다. 예를 들어 특정 서열이 본 발명의 참조 서열과 95% 동일성을 가지는지를 측정하기 위해 Bestfit 또는 다른 서열 정렬 프로그램을 사용할 때, 파라미터는 바람직하게는 동일성의 백분율이 참조 서열의 전체 길이로 나누어 계산되도록, 또한 참조 서열 내 뉴클레오타이드의 총 수의 5%이하의 상동성 갭(gap)으로 보정된다. Bestfit을 사용할 때, 소위 선택가능한(optional) 파라미터는 바람직하게는 그들의 미리세트된 ("디폴트") 값을 버린다. 본 발명의 상기 서열과 주어진 서열 사이의 비교에서 나타나는 편차는 예를 들어 첨가, 결실, 치환, 삽입 또는 재조합에 기인할 수 있다. 상기 서열 비교는 바람직하게는 프로그램 "fasta2Ou66"로도 수행될 수 있다 (version 2.0u66, William R. Pearson 및 버지니아 대학에 의해 1998년 9월; W. R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, 첨부된 실시예 및 <http://workbench.sdsc.edu/> 또한 참조). 이 목적을 위해, 상기 "디폴트" 파라미터 세팅이 사용될 것이다.

[0395] 본 발명의 항체는 (다가(multivalent)라면) 이의 동일한 결합 부위를 각각 가지는 것으로 이해되는 면역글로불린 또는 항체일 수 있고 또는, 선택적으로, "이중특이성(bispecific)" 또는 "이기능성(bifunctional) 항체"일 수 있다.

[0396] 용어 "이중특이성" 또는 "이기능성 항체"는 두 개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 두 개의 상이한 결합 부위를 가지는 인공적 하이브리드 항체이다. 이중특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하는 여러 가지 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny 등, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992) 참조.

[0397] 용어 "단편"은 무손상 또는 완전(complete) 항체 또는 항체 쇄보다 더 적은 아미노산 잔기를 포함하는 항체 또는 항체 쇄의 일부 또는 부분을 나타낸다. 단편은 무손상 또는 완전 항체 또는 항체 쇄의 화학적 또는 효소 처리를 통해 획득될 수 있다. 단편은 또한 재조합 수단에 의해 획득될 수 있다. 대표적 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc 및/또는 Fv 단편을 포함한다. 용어 "항원-결합 단편"은 항원에 결합하거나 또는 항원 결합(즉, 특이적 결합)을 위해 무손상 항체와(즉, 그들이 유래된 무손상 항체와) 경쟁하는 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩타이드 단편을 나타낸다.

[0398] 결합 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 또는 무손상 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 분할에 의해 생산된다. 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, 단일쇄, 및 단일-쇄 항체를 포함한다.

[0399] "단편"은 또한 다른 폴리펩타이드 아미노산 서열의 적어도 5개의 인접하는(contiguous) 아미노산 잔기, 적어도 10개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 15개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 20개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 25개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 40개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 50개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 60개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 70개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 80개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 90개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 100개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 125개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 150개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 175개의 인접하는 아미노산 잔기, 적어도 200개의 인접하는 아미노산 잔기, 또는 적어도 250개의 인접하는 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 나타낸다. 특정 구체예에서, 폴리펩타이드의 단편은 상기 폴리펩타이드의 적어도 한 개의 작용을 유지한다.

[0400] 용어 "항원"은 항체에 결합할 수 있는 존재(entity) 또는 이의 단편을 나타낸다. 면역원은 유기체, 특히 동물, 보다 특히 인간을 포함하는 포유류 내에서 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 나타낸다. 용어 항원은 항원성(antigenicity) 또는 항원 결정기의 원인인 항원 내에 존재하는 접촉(contact residue)을 돕는데 유의한 역할을 하거나 또는 접촉되는) 항원의 부분을 나타내는 항원 결정기 또는 에피토프로 알려진 영역을 포함한다.

[0401] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "가용성"은 수용액에 부분적으로 또는 완전히 용해되는 것을 의미한다.

- [0402] 또한 본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역원성"은 면역원의 항원에 대해 지향되는 항체, T-세포 및 다른 반응성 면역 세포의 생산을 이끌어내는 물질을 나타낸다.
- [0403] 면역 반응은 치료될 장애를 절제시키거나 또는 완화시키기 위해, 투여된 본 발명의 면역원성 조성물에 대해, 개체가 충분한 항체, T-세포 및 다른 반응성 면역 세포를 생산할 때 일어난다.
- [0404] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 면역원성은 수령자(recipient)에 투여될 때 (체액성 또는 세포성) 면역 반응을 유발하는 항원의 능력의 정도를 나타낸다. 본 발명은 대상 인간 키메라 또는 인간화된 항체의 면역원성을 감소시키는 수단에 관한 것이다.
- [0405] 감소된 면역원성의 인간화된 항체는 부모 항체(parent antibody), 예컨대 쥐 항체에 대해 감소된 면역원성을 나타내는 인간화된 항체를 나타낸다.
- [0406] 실질적으로 부모 항체의 결합 특성을 유지하는 인간화된 항체는 그러한 인간화된 항체를 생산하기 위해 사용된 부모 항체에 의해 인식되는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 인간화된 항체를 나타낸다. 바람직하게는 상기 인간화된 항체는 부모 항체와 동일한 또는 실질적으로 동일한 항원-결합 친화도 또는 결합력(avidity)을 나타낼 것이다. 이상적으로, 상기 항체의 친화도는 부모 항체 친화도의 10% 미만은 아닐 것이고, 보다 바람직하게는 약 30% 미만은 아니며, 또한 가장 바람직하게는 부모 항체의 50% 미만은 아닐 것이다. 항원-결합 친화도를 분석하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있고 또한 반-최대(half-maximal) 결합 분석, 경쟁 분석, 및 스캐처드(Scatchard) 분석을 포함한다. 적합한 항원 결합 분석은 본 출원에 기술된다.
- [0407] "복귀 돌연변이(back mutation)"는 인간화된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 내에 도입된 돌연변이로서, 상기 돌연변이는 부모 항체(예컨대, 도너 항체, 예를 들면, 쥐 항체) 내 아미노산에 대응하는 아미노산을 유발한다. 부모 항체로부터의 어떤 프레임워크 잔기는, 부모 항체의 결합 특성을 실질적으로 유지하기 위해 본 발명의 항체의 인간화 동안 유지될 수 있는데 이때 동시에 결과물인 항체의 잠재적 면역원성을 최소화하도록 한다. 본 발명의 일 구체예에서, 부모 항체는 마우스 유래의 것이다. 예를 들어, 복귀 돌연변이는 인간 프레임워크 잔기를 부모 쥐 잔기로 바꾼다. 복귀 돌연변이될 수 있는 프레임워크 잔기의 예는 CDR H3에 가까운(CDR 외에 플랫폼을 형성하는) "베르니에 존(Vernier Zone)" 내의 잔기(Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499), 결합 부위에 가까운 보기드문 부모 잔기, 인터페이스 팩킹 잔기(interface packing residue), 캐노니컬 잔기(canonical residue)를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0408] 본원에서 사용된 바와 같은 "보존적 변화(conservative change)"는 본래의 단백질과 비교하여, 각각, 돌연변이 폴리펩타이드의 항원 결정기 내에 최소의 변화를 생성하는, 또는 돌연변이 폴리펩타이드의 3차 구조 내에 최소 변화를 생성하는, 실질적으로 입체형태적으로 또는 항원적으로 중성인 변경(alteration)을 나타낸다. 본 발명의 항체 및 항체 단편을 언급할 때, 보존적 변화는 대상 수용체에 대한 결합이 불가능한 항체를 표현하지 않는 아미노산 치환을 의미한다. 당업자는 아미노산 치환이 입체형태적으로 및 항원적으로 중성이 되는 높은 가능성을 유지하면서 제조될 수 있음을 예상할 수 있다. 그러한 안내는 예를 들어 Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940 및 Bowie 등 (1990) *Science* 247:1306-1310에서 제공된다. 입체형태적 및 항원적 중성의 유지의 가능성에 영향을 미치는 것으로 여겨지는 요인은 하기를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다: (a) 소수성 아미노산의 치환은 항원성에 영향을 미칠 가능성이 적은데, 소수성 잔기가 단백질의 내부에 보다 위치되려고 하기 때문이다; (b) 물리화학적으로 유사한 아미노산의 치환은 입체형태에 영향을 미칠 가능성이 적은데, 상기 치환된 아미노산이 구조적으로 본래의 아미노산의 모방(mimic)이기 때문이다; 또한 (c) 진화적으로 보존된 서열의 변경은 입체형태에 불리하게 영향을 미칠 가능성이 있고 그러한 보존은 아미노산 서열이 기능적 중요성을 가질 수 있음을 제안한다. 당업자는 마이크로컴플렉스 고정 방법(microcomplement fixation method)(Wasserman 등 (1961) J. Immunol. 87:290-295; Levine 등 (1967) Meth. Enzymol. 11:928-936) 등에 제한되지 않는 잘 알려진 분석의 사용 및 입체형태-의존적 단일클론성 항체를 사용하는 결합 연구(Lewis 등 (1983) Biochem. 22:948-954)를 통해 단백질 입체형태의 변경을 평가할 수 있다.
- [0409] 또한, 용어 "치료적 유효량"은 인간 또는 동물에게 투여될 때, 상기 인간 또는 동물에서 치료적 효과를 유발하기에 충분한 항체의 양을 나타낸다. 유효량은 관례적 과정을 따라 당업자에 의해 미리 결정된다.
- [0410] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료하다", "예방하다", "예방하는" 및 "예방"은 예방제 또는 치료제의 투여로 야기되는, 대상에서 장애의 하나 이상의 증상의 재발 또는 발병의 예방을 나타낸다.
- [0411] **인간화된 항체의 구축**

- [0412] 본 발명은 본원에 포함된 이하의 특정 구체예의 상세한 설명에 대한 참조로서 보다 쉽게 이해될 것이다. 비록 본 발명은 어떤 구체예의 특정 상세한 설명에 대한 참조로서 기술되었지만, 이에 대해, 상기 상세한 설명은 본 발명의 범위에 대한 제한으로서 간주되어야 하는 것으로 의도하는 것은 아니다.
- [0413] 본 발명은 β -아밀로이드 항원의 범위로부터의 특정 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 고도로 특이적이고 또한 고도로 효과적인 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 교시에 의해 가능해진 항체는, 특히 일부 지명하자면 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 다른 질환을 포함하나 이에 한정되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증의 치료에 유용하다.
- [0414] 본 발명에 따라 완전히 인간화된 또는 재형상화된 가변 영역은 인간-유래 프레임워크 서열 내에 끼워진 비인간, 특히 설치류-유래 CDR, 특히 쥐 항체 ACI-O1-Ab7C2(본 출원 전체에 "mC2"로 명명되고 또한 부다페스트 조약의 규정 하에, 2005년 12월 1일, 브라운슈바이그 38124, 마셰로데르 베그 1 비, 브라운슈바이그(Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig) 소재 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)"에 기탁되어 접근 번호 DSM ACC2750을 부여받음)로부터 유래된 CDR을 함유하는 가변 영역 아미노산 서열을 우선 설계함으로써 본 발명의 범위 내에서 생성될 수 있다. 본 발명의 항체로부터 수득될 수 있는 비인간, 특히 설치류-유래 CDR은 원하는 특이성을 제공한다. 따라서, 이들 잔기는 본질적으로 변화되지 않은 재형상화된 가변 영역의 설계에 포함된다. 따라서 임의의 변형은 항체의 특이성 및 친화도의 변화에 있어 최소로 제한되어야 하며 또한 엄중히 주시되어야 되어야 한다. 한편, 이론 상의 프레임워크 잔기는 모든 인간 가변 영역으로부터 유래될 수 있다.
- [0415] 용인할 수 있는 또는 한층 개선된 친화도를 나타내는 재형상화된 항체를 생성하기 위해, 재형상화된 가변 영역을 생성하기에 및 항원 친화도를 유지하기에 균등하게 적합한 인간 프레임워크 서열이 선택되어야 한다.
- [0416] 본 목적을 달성하기 위해, 최적-적합 방법(best-fit strategy)이 개발되었다. 프레임워크 서열이 항원과의 상호작용에 대한 그들의 올바른 공간적 배향 내에 CDR을 유지하고, 또한 프레임워크 잔기는 때때로 항원 결합에 보다 관여하는 것으로 알려져 있는 바와 같이, 이 방법은 비인간, 특히 설치류-유래된 가변 영역에 가장 상동적인 또는 유사한 인간 가변 영역으로부터 항체 재형상화를 위해 사용된 인간 프레임워크 서열을 유도함으로써 항체의 3차원 구조에 부정적 영향을 줄 수 있는 변화를 최소화하는 것을 목표로 한다. 이는 또한 상기 재형상화된 항체 내에서 친화도가 유지될 가능성을 최대화할 것이다.
- [0417] 그의 가장 간단한 수준에서, "최적-적합" 방법은 모든 알려진 인간 V-영역 아미노산 서열과 도너 설치류 V-영역을 비교, 및 그 후 가장 상동성이 높은 것의 선택에 관여하여 인간화 과제를 위한 수용체 프레임 영역을 제공한다. 실제로 여러 다른 요소가 고려되어야 하며, 이는 수용체 프레임워크 영역의 최종 선택에 영향을 미칠 수 있다. 이점에서 분자 모델링 예측(Molecular modelling prediction)은 결과물인 재형상화된 항체의 친화도를 최대화하기 위한 시도에서의 모든 실험에 선행되어 사용될 수 있다. 본질적으로, 상기 모델링의 목표는 가장 상동성이 높은 인간 프레임워크의 (만약 있다면) 기본 잔기(key residue)가 설치류 내에 잔류해야하는지 예측하여 상기 재형상화된 항체 내의 최적의 친화도를 수득하는 것이다.
- [0418] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 CDR은 마우스 단일클론성 항체로부터, 특히 2005년 12월 12일 출원되어 동시계류 중인 출원 EP 05 02 7092.5에 기술된 (본 출원 전체에 "mC2"로 명명된) 마우스 단일클론성 항체 ACI-O1-Ab7C2로부터 수득가능하고, 이의 개시는 본원에 참조로서 삽입된다.
- [0419] 동시계류 출원 EP05027092.5의 마우스 단일클론성 항체 ACI-O1-Ab7C2 (본 출원 전체에서 "mC2"로 명명되고 또한 인간화된 C2 항체에 대해서는 hC2로 명명됨)를 생산하는 하이브리도마 세포 FP-12H3-C2는 부다페스트 조약의 규정 하에, 2005년 12월 1일, 브라운슈바이그 38124, 마셰로데르 베그 1 비, 브라운슈바이그 소재 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)"에 기탁되어 접근 번호 DSM ACC2750을 부여받았다.
- [0420] 예를 들어, 팔미트산과 같은 소수성 모이어티 또는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 친수성 모이어티 또는 이들 둘의 조합으로 변형된 β -아밀로이드 펩타이드, 특히 β -아밀로이드 펩타이드 $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ 및 $A\beta_{1-}$

¹⁶(Δ_{14})의 아미노산 서열에 대응하는 항원성 펩타이드를 포함하는 마우스 항체는 초분자 항원성 구조체에 대해 생성될 수 있고, 여기서 상기 소수성 및 친수성 모이어티 각각은 상기 소수성 및 친수성 모이어티를 펩타이드 단편에 커플링시키기 위한 연결 장치로서 작용할 수 있는 예를 들어, 라이신, 글루타민산 및 시스테인 또는 임의의 적합한 아미노산 또는 아미노산 유사체와 같은, 적어도 하나, 특히 하나 또는 두 개의 아미노산을 통해 항원성 펩타이드의 말단 각각에 공유 결합된다. PEG가 상기 친수성 모이어티로 사용될 때, 자유 PEG 말단은 포스파티딜에탄올아민 또는 예를 들어, 리포솜 이중층 내에 항원성 구조체를 끼워넣기 위한 앵커링 요소로서 작용하기에 적합한 임의의 다른 화합물에 공유 결합된다.

[0421] 특히, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 친수성 모이어티와 같은 친수성 모이어티로 변형된 β -아밀로이드 펩타이드 A β_{1-16} 의 아미노산 서열에 대응하는 항원성 펩타이드를 포함하는 초분자 항원성 구조체에 대해 생성될 수 있는 마우스 항체는 상기 소수성 및 친수성 모이어티를 펩타이드 단편에 커플링시키기 위한 연결 장치로서 작용할 수 있는 예를 들어, 라이신, 글루타민산 및 시스테인 또는 임의의 적합한 아미노산 또는 아미노산 유사체와 같은, 적어도 하나, 특히 하나 또는 두 개의 아미노산을 통해 상기 항원성 펩타이드의 말단 각각에 공유 결합된다. PEG가 상기 친수성 모이어티로 사용될 때, 자유 PEG 말단은 포스파티딜에탄올아민 또는 예를 들어, 리포솜 이중층 내에 항원성 구조체를 끼워넣기 위한 앵커링 요소로서 작용하기에 적합한 임의의 다른 화합물에 공유 결합된다.

[0422] 본 발명의 구체예에서, 가변 영역 내에 하나 이상의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 끼워진 비인간 기원의 적어도 한 개의 CDR을 포함하고 또한 인간 또는 영장류 기원 항체로부터 유래된 불변 영역과 조합된 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편이 제공되고, 상기 키메라 항체 또는 이의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 이의 단편은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드의 특이적인 인식 및 결합을 가능하게 한다.

[0423] 상기 CDR은 항원에 결합할 가능성이 가장 높고 또한 상기 재형상화된 항체 내에 유지되어야 하는 잔기를 포함한다. CDR은 Kabat 등, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991에 따르는 서열에 의해 한정된다. CDR은 기본 잔기가 CDR 루프의 구조적 입체형태의 대부분을 결정하는 캐노니컬 클래스(Chothia 등, 1989 *Nature*, 342, 877-883)에 해당한다. 이들 잔기는 대부분 언제나 상기 재형상화된 항체 내에 유지된다.

[0424] 본 발명의 인간화된 항체를 준비하기 위한 공정에서, C2 중쇄 및 경쇄 가변 영역(V_H 및 V_K)의 아미노산 서열은 NCBI 및 Kabat 데이터베이스의 설치류 항체 V_H 및 V_K 서열과 비교된다.

[0425] C2 V_K 에 대해 가장 가까운 매치(match) 마우스 생식계열 유전자는 bb1, 로커스(Locus) MMU231201이다 (Schable 등, 1999). 비교는 이 생식 계열 서열과 모두 CDRL1 내에 위치한 두 아미노산이 상이함을 나타낸다. 유사한, 그러나 동일하지 않은 서열을 가지는 성숙한 쥐 항체가 발견될 수 있다. 몇몇은 동일한 CDRL2 및 동일한 CDRL3를 가질 것이나, C2의 CDRL1은 독특한 것으로 보인다. 인간 생식 계열 V_K 서열과 비교는 서브그룹 V_{KII} 로부터의 유전자가 C2 V_K 에 최적의 매치임을 나타낸다 (Cox 등, 1994). 따라서 C2 V_K 는 Kabat 서브그룹 MUV $_{KII}$ 서열로 지정될 수 있다.

[0426] 인간화된 V_K 에 대한 수용체 프레임워크 서열을 제공하기 위해 인간 J 영역 HuJ $_{K1}$ 과 함께 DPK15가 선택될 수 있다.

[0427] 가변 경쇄 및 중쇄 사이의 경계에서의 잔기는 한정되어 있다 (Chothia 등, 1985 *J. Mol. Biol.*, 186, 651-663). 이들은 보통 재형상화된 항체 내에 유지된다. 상기 경계에서 마우스 C2 V_K 의 위치 87의 Phe는 드문 반면, Tyr은 V_{KII} 서브그룹 내에서 보다 일반적이며, 이는 이 프레임워크 잔기가 항체 활성화에 중요할 수 있음을 지시한다. Tyr 87은 인간 생식계열 및 인간화된 C2VK에 존재한다.

[0428] 따라서 인간화된 V_K 서열은, C2HuVK1가 인간 J $_{K1}$ 및 DPK 15로부터의 프레임워크를 갖는 마우스 C2 V_K CDR로 이루어도록 설계될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 쥐 잔기는 위치 45, 및/또는 87에서, 및/또는 50 및/또는 53에서 인간 프레임워크 영역에서 치환될 수 있다. 잔기 45는 CDR의 입체형태를 지지하는 것에 관여할 수 있다. 잔기 87은 V_H 및 V_K 도메인의 경계에 위치된다. 따라서 이들 잔기는 항체 결합의 유지에 결정적일 수 있

다.

- [0429] C2 V_H AF에 가장 가까운 매치 마우스 생식 계열 유전자는 VH7183, 로커스 AF 120466이다 (Langdon 등, 2000). 인간 생식 계열 V_H 서열과의 비교는 서브그룹 V_HIII로부터의 유전자가 C2 V_H에 대한 최적의 매치인 것을 나타낸다. C2 V_H AF는 Kabat 서브그룹 MuV_HIID로 지정될 수 있다. 인간화된 V_H를 위한 수용체 프레임워크 서열을 제공하기 위해 인간 J 영역 HuJ_H6과 함께 서열 DP54가 선택될 수 있다.
- [0430] 상기 비교는 상기 C2 V_H와 인간 수용체 생식 계열 서열 DP54 및 J_H6 사이에 9개 아미노산 상이성이 있으며, 대부분이 CDRH2에 위치하고 있음을 나타낸다. 동일한 또는 유사한 (하나의 잔기가 상이) CDRH1을 갖는 또는 유사한 CDRH2 (하나의 잔기가 상이)를 갖는 성숙한 쥐 항체가 발견되었으나, 모든 세 CDR 중 어떤 것도 C2 V_H AF와 동일하지 않다. 단지 세 개의 잔기로 이루어지는 C2 항체의 CDRH3은 매우 짧다. 그러나, 이 길이의 CDRH3를 갖는 다른 항체가 데이터베이스에서 발견된다. C2 V_H의 잔기 47은 보다 일반적인 Trp보다 Leu이고, 또한 잔기 94는 보통의 Arg보다는 Ser이며, 이는 이들 프레임워크 잔기가 항체 활성화에 중요할 수 있음을 나타낸다.
- [0431] 다양한 인간화된 V_H 서열이 설계될 수 있다. C2HuVH1은 DP54 및 HUJ_H6로부터의 프레임워크를 갖는 C2 V_H AF CDR로 이루어진다. 본 발명의 특정 구체예에서, 쥐 잔기는 인간 프레임워크 영역 내 위치 47 또는 94 또는 모두에서 치환될 수 있다. 프레임워크 2 내 잔기 47은 상기 CDR 및 상기 V_K 도메인 모두와 접촉을 이룬다. 잔기 94는 CDR의 입체형태의 지지에 관여할 수 있다. 따라서 이들 잔기는 항체 결합의 유지에 있어 결정적일 수 있다.
- [0432] 상이한 HCVR 및 LCVR이 설계될 수 있으며, 이는 본래의 또는 변형된 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 끼워진 도너 항체, 예를 들어, 쥐 항체로부터 수득가능한 비인간 CDR을 포함한다. 이 변형은 특히, 각각의 서브그룹 내 이 위치에서 보다 일반적으로 발견되는 비인간 잔기, 특히 쥐 잔기에 의한 또는 각각의 서브그룹 내 이 위치에서 보다 일반적으로 발견되는 것에 유사한 특성을 가지는 잔기에 의한 프레임워크 영역 내부의 하나 이상의 아미노산 잔기의 교환에 관여할 수 있다.
- [0433] 프레임워크 영역의 변형 프레임워크 서열은 항원과의 상호작용을 위해 그들의 정확한 공간적 배향에서 CDR을 유지하고, 또한 프레임워크 잔기는 때때로 항원 결합에 보다 관여할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서 재형상화된 항체에서 친화도가 유지될 가능성을 최대화하기 위해, 선택된 인간 프레임워크 서열을 설치류 프레임워크의 서열에 가장 유사하게 하도록 추가로 개조하기 위한 조치가 취해진다.
- [0434] 따라서, 인간 프레임워크 영역 내의 쥐 잔기는 치환될 수 있다. 특히, 중쇄 가변(HCVR) 영역의 인간 프레임워크 영역 내 위치 47 또는 94 또는 모두의 쥐 잔기 및 경쇄 가변(LCVR) 영역의 인간 프레임워크 영역 내 위치 45 및/또는 87 및/또는 50 및/또는 53의 쥐 잔기가 각각 치환될 수 있다.
- [0435] 인간 프레임워크 영역 내의 상기 지시된 위치에서 발견된 잔기는 각각의 서브그룹 내의 이 위치에서 보다 일반적으로 발견되는 쥐 잔기로 교환될 수 있다. 특히, 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 47의 Trp는 Leu에 의해 또는 유사한 특성을 갖는 아미노산 잔기에 의해 교체될 수 있고 또한 상기 치환은 돌연변이체(mutant) 폴리펩타이드의 3차 구조에서 최소 변화를 생성하는, 또는 항원성 결정기에서의 최소 변화를 생성하는, 실질적으로 입체형태적으로 또는 항원적으로 중성인 변형을 야기한다. 특히, 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 47의 Trp는 노르류신, Ile, Val, Met, Ala, 및 Phe를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Ile에 의해 추가로 교체될 수 있다. 입체형태적으로 및 항원적으로 중성인 선택적 보존적 치환이 예상될 수 있다.
- [0436] 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 94의 Arg는 Ser에 의해 또는 유사한 특성을 갖는 아미노산 잔기에 의해 교체될 수 있고 또한 상기 치환은 돌연변이체 폴리펩타이드의 3차 구조에서 최소 변화를 생성하는, 또는 항원성 결정기에서의 최소 변화를 생성하는, 실질적으로 입체형태적으로 또는 항원적으로 중성인 변형을 야기한다. 특히, 서열 식별 번호: 15에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 94의 Arg는 Thr에 의해 선택적으로 교체될 수 있다.
- [0437] 본 발명의 다른 구체예에서, 인간화된 항체 내의 두 잔기는 모두 교체될 수 있다.
- [0438] 서열 식별 번호: 12에 나타난 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat

위치 45의 Gln은 Lys에 의해 또는 유사한 특성을 갖는 아미노산 잔기에 의해 교체될 수 있고 또한 상기 치환은 돌연변이체 폴리펩타이드의 3차 구조에서 최소 변화를 생성하는, 또는 항원성 결정기에서의 최소 변화를 생성하는, 실질적으로 입체형태적으로 또는 항원적으로 중성인 변경을 야기한다. 특히, 서열 식별 번호: 12에 나타낸 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 45의 Gln은 Arg, Gln, 및 Asn를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Arg에 의해 교체될 수 있다.

[0439]

서열 식별 번호: 12에 나타낸 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 50의 Leu은 Lys에 의해 또는 유사한 특성을 갖는 아미노산 잔기에 의해 교체될 수 있고 또한 상기 치환은 돌연변이체 폴리펩타이드의 3차 구조에서 최소 변화를 생성하는, 또는 항원성 결정기에서의 최소 변화를 생성하는, 실질적으로 입체형태적으로 또는 항원적으로 중성인 변경을 야기한다. 특히, 서열 식별 번호: 12에 나타낸 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 50의 Leu은 Arg, Gln, 및 Asn를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Arg에 의해 교체될 수 있다.

[0440]

서열 식별 번호: 12에 나타낸 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 53의 Asn은 His 및 Gln에 의해 또는 유사한 특성을 갖는 아미노산 잔기에 의해 교체될 수 있고 또한 상기 치환은 돌연변이체 폴리펩타이드의 3차 구조에서 최소 변화를 생성하는, 또는 항원성 결정기에서의 최소 변화를 생성하는, 실질적으로 입체형태적으로 또는 항원적으로 중성인 변경을 야기한다. 특히, 서열 식별 번호: 12에 나타낸 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 53의 Asn은 Gln, His, Lys 및 Arg를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 교체될 수 있다.

[0441]

서열 식별 번호: 12에 나타낸 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 87의 Thr은 Phe에 의해 또는 유사한 특성을 갖는 아미노산 잔기에 의해 교체될 수 있고 또한 상기 치환은 돌연변이체 폴리펩타이드의 3차 구조에서 최소 변화를 생성하는, 또는 항원성 결정기에서의 최소 변화를 생성하는, 실질적으로 입체형태적으로 또는 항원적으로 중성인 변경을 야기한다. 특히, 서열 식별 번호: 12에 나타낸 바와 같은 경쇄 가변 영역의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내 Kabat 위치 87의 Tyr은 Leu, Val, Ile, 및 Ala를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산, 특히 Leu에 의해 교체될 수 있다.

[0442]

하나 이상의 인간- 또는 영장류-유래된 프레임워크 영역 내에 끼워진 비인간 기원의 적어도 한 개의 CDR을 포함하는, 이렇게 수득된 가변 영역은 그 후 인간 또는 영장류 기원 항체로부터 유래된 불변 영역, 특히 인간 IgG4 또는 κ 불변 영역 각각과 조합될 수 있다. 상기 IgG4 불변 영역은 예를 들어, 힌지 영역 내 위치 228의 세린을 프롤린으로 바꿈으로써 변형될 수 있다 (HuIgG4 Ser-Pro). 이 돌연변이는 사슬간(interchain) 디설파이드 결합을 안정화시키고 또한 본래의 인간 IgG4 제조에서 발생할 수 있는 하프 분자(half molecule)의 형성을 막는다. IgG4 불변 영역은 서열 식별 번호: 16에 나타낸 바와 같이 위치 439의 말단 Lys의 결실에 의해 추가로 변형될 수 있다.

[0443]

상기 변형된 가변 영역은 예를 들어, 오버래핑(overlapping) PCR 재조합과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 키메라 항체를 위한 발현 카세트, C2 ChV_H AF 및 C2 ChV_K는 요구되는 서열에 대해 프레임워크 영역의 돌연변이생성(mutagenesis)을 위한 주형으로 사용될 수 있다. 돌연변이생성 프라이머 쌍의 세트는 변경되어야 할 영역을 포함하여 합성된다. 생산된 인간화된 V_H 및 V_K 발현 카세트는 당업계에 공지된 적절한 클로닝 벡터, 예를 들어, pUC19 등에 클로닝될 수 있다. 상기 전체 DNA 서열이 각 V_H 및 V_K에 대해 정확한지를 확인한 후, 변형된 중쇄 및 경쇄 V-영역 유전자를 발현 카세트로서 클로닝 벡터로부터 잘라내고, 적절한 발현 벡터로 옮겨질 수 있다.

[0444]

Fc 영역의 돌연변이

[0445]

본 발명은 폴리펩타이드 변형체, 특히 가변 영역을 포함하는 항체를 만드는 방법을 제공한다. 예를 들어, 변형 Fc 영역을 포함하는 그러한 항체는 아밀로이드증과 같은 질환 또는 장애의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0446]

"부모(parent)" "시작(starting)" 또는 "비변형(nonvariant)" 폴리펩타이드는 예를 들어, Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 생성하기 위해서 기술분야에서 이용가능한 기술을 사용하여 제조된다. 본 발명의 바람직한

[0447]

본 발명의 바람직한 구체예에서, 부모 폴리펩타이드는 항체이며 항체를 생성하기 위한 예시적인 방법은 하기 섹션에서 보다 상세히 설명된다. 그러나, 부모 폴리펩타이드는 Fc 영역, 예를 들어 면역부착소(immunoadhesin)를 포함하는, 임의의 다른 폴리펩타이드일 수 있다. 면역부착소를 만드는 방법은 하기에 보다 자세히 설명된다.

[0448]

대안의 구체예에서, 변형 Fc 영역은 여기에 기재된 방법에 따라 생성될 수 있으며, 이 "변형 Fc 영역"은, 수용

체 또는 리간드의 항체 가변 도메인 또는 결합 도메인과 같이, 선택에 따른 이중 폴리펩타이드에 융합될 수 있다.

[0449] 부모 폴리펩타이드는 Fc 영역을 포함한다. 일반적으로, 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역은 본래의 서열 Fc 영역, 및 바람직하게는 인간 본래의 서열 Fc 영역을포함할 것이다. 그러나, 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역은 본래의 서열 Fc 영역으로부터의, 하나 이상의 미리-존재하는 아미노산 서열 변경 또는 변형을 가질 수 있다. 예를 들어, Fc 영역의 Clq 결합 활성은 미리 변형될 수 있다(Fc 영역 변형의 다른 유형은 하기에서 보다 상세히 설명된다). 추가의 구체예에서, 부모 폴리펩타이드 Fc 영역은 "개념적인(conceptual)" 것이고, 한편 이는 물리적으로 존재하는 것은 아니며, 항체 공학자는 원하는 변형 Fc 영역 아미노산 사열에 따라 결정하고 원하는 변형 Fc 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA 또는 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 생성할 수 있다.

[0450] 그러나, 본 발명의 바람직한 구체예에서, 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역을 인코딩하는 핵산이 이용가능하며, 이러한 핵산 서열은 변형되어 Fc 영역 변형체 D265A를 인코딩하는 가변 핵산 서열을 생성한다.

[0451] 출발 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변형체를 인코딩하는 DNA는 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들 방법은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 폴리펩타이드를 인코딩하는 먼저 제조된 DNA의 카세트 돌연변이생성, 위치-지시된(또는 올리고뉴클레오티드-매개된) 돌연변이생성, PCR 돌연변이생성에 의한 제조를 포함한다.

[0452] 위치-지시된 돌연변이생성은 치환 변형체의 제조를 위한 바람직한 방법이다. 이러한 기술은 기술분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Carter 등, *Nucleic Acids Res.* 13:4431- 4443 (1985) 및 Kunkel 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1987)을 참조한다). 요약하면, DNA의 위치-지시된 돌연변이생성을 수행함에 있어서, 출발 DNA는, 그러한 출발 DNA의 단일 가닥으로 원하는 돌연변이를 인코딩하는 올리고뉴클레오티드를 첫번째로 혼성화하는 것에 의해 변형된다. 혼성화 이후, DNA 중합효소가 사용되어, 프라이머로서 혼성화된 올리고뉴클레오티드를 사용하고, 또한, 주형으로서 출발 DNA의 단일 가닥을 사용하여, 원하는 제2 가닥을 합성한다. 따라서, 원하는 돌연변이를 인코딩하는 올리고뉴클레오티드가 결과물인 이중가닥 DNA에 도입된다.

[0453] PCR 돌연변이생성도 또한 출발 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변형체를 만드는데 적합하다. Higuchi[*PCR Protocols*, pp.177-183 (Academic Press, 1990)]; 및 Vallette 등의 *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989)를 참조한다. 요약하면, PCR에서 출발 물질로서 소량의 주형 DNA가 사용될 때, 주형 DNA에서 상응하는 영역으로부터의 서열에서 약간 상이한 프라이머가 사용되어, 프라이머가 주형과 상이한 위치에서만 주형 서열과 상이한, 상대적으로 대량의 특정 DNA 단편을 생성할 수 있다.

[0454] 변형체를 제조하는 또다른 방법인, 카세트 돌연변이생성은 Wells 등, *Gene* 34:315-323 (1985)에 기재된 기술에 기반한다. 출발 물질은 돌연변이될 출발 폴리펩타이드 DNA를 포함하는 플라스미드(또는 다른 벡터)이다. 돌연변이될 출발 DNA에서 코돈(들)이 확인된다. 확인된 돌연변이 부위(들)의 각각의 측에는 독특한 제한 엔도뉴클레아제가 존재해야 한다. 그러한 제한 부위가 존재하지 않는 경우, 이들은 출발 폴리펩타이드 DNA의 적절한 위치에 이들을 도입하는, 전술한 올리고뉴클레오티드-매개된 돌연변이생성 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 플라스미드 DNA는 이러한 부위에서 절단되어 그것을 선형화한다. 제한 부위들 간의 DNA의 서열을 인코딩하지만 원하는 돌연변이(들)을 포함하지 않는 이중가닥 올리고뉴클레오티드는 표준의 과정들을 사용하여 합성되며, 여기에서 올리고뉴클레오티드의 2개의 가닥은 독립적으로 합성되며, 이어서 표준의 기술을 사용하여 함께 혼성화된다. 이러한 이중가닥 올리고뉴클레오티드는 카세트로 언급된다. 이러한 카세트가 설계되어 선형화된 플라스미드의 말단과 양립가능한 5' 및 3' 말단을 갖고, 그리하여 플라스미드로 직접적으로 결합될 수 있다. 이 플라스미드는 이제 돌연변이된 DNA 서열을 포함한다.

[0455] 대안적으로, 또는 부가적으로, 폴리펩타이드 변형체를 인코딩하는 원하는 아미노산 서열이 결정될 수 있고, 그러한 아미노산 서열 변형체를 인코딩하는 핵산 서열이 합성으로 생성될 수 있다.

[0456] 인 비트로 및/또는 인 비보의 변형된 세포 매개된 세포독성(CDC) 활성 및/또는 인 비트로 및/또는 인 비보의 변형된 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 활성 및/또는 인 비트로 및/또는 인 비보의 변형된 Fc 수용체 결합 친화도 또는 활성을 갖는 변형 Fc 영역을 생성하기 위하여, 부모 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 변형된다.

[0457] 일반적으로, 변형은 하나 이상의 아미노산 치환을 수반한다. 치환은, 예를 들어, "보존적 치환"일 수 있다. Fc 영역의 생물학적 특성에서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선형 입체형태로서, 치환 영역에서 폴리펩타이드 백본의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 소수성 또는 전하, 또는 (c) 측쇄의 양을 유지하는 효과에 있어서 크게 상이한 치환체를 선택하는 것에 의해 수행될 수 있다.

- [0458] 천연적으로 발생하는 잔기는 통상의 측쇄 특성에 기반한 그룹들로 나뉜다.
- [0459] (1) 소수성 : 노르류신, met, ala, val, leu, ile;
- [0460] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;
- [0461] (3) 산성 : asp, glu;
- [0462] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
- [0463] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기 : gly, pro; 및
- [0464] (6) 방향성 : tip, tyr, phe.
- [0465] 아미노산 치환체와는 별도로, 본 발명은 예를 들어, 변형된 이펙터 기능을 가지는 Fc 영역 변형체를 생성하기 위하여 부모 영역 아미노산 서열의 다른 변형을 고려한다.
- [0466] 예를 들어, FcR에 대한 결합을 감소시키기 위하여 Fc 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기들을 삭제할 수 있다. 일반적으로, 그러한 Fc 영역 변형체를 생성하기 위하여 FcR 결합에 영향을 미치는 것으로 여기에서 확인된 Fc 영역 잔기의 하나 이상이 삭제될 것이다. 일반적으로, 1 내지 약 10 이내의 Fc 영역 잔기가 본 발명의 이러한 구체예에 따라 삭제될 것이다. 여기에서 하나 이상의 아미노산 결손을 포함하는 Fc 영역은, 바람직하게는 약 80% 이상, 및 바람직하게는 약 90% 이상, 더 바람직하게는 약 95% 이상의, 본래의 서열 인간 Fc 영역의 또는 부모 Fc 영역을 보유할 것이다.
- [0467] 부모 Fc 영역에 적절한 아미노산 서열 변형체를 도입하는 것에 의해, 예를 들어, (a) 보다 더 또는 덜 효과적으로 인간 이펙터 세포의 존재 중에서 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 매개하는, 및/또는 (b) 부모 폴리펩타이드에 비해 보다 더 또는 덜 친화적으로 Fc 감마 수용체(Fc.gamma.R)에 결합하는, 변형 Fc 영역을 생성할 수 있다. 그러한 Fc 영역 변형체들은 Fc 영역에서 하나 이상의 아미노산 변형을 일반적으로 포함할 것이다. 아미노산 변형을 결합하는 것이 특히 바람직한 것으로 생각된다. 예를 들어, 변형 Fc 영역은 예를 들어, 여기에서 확인된 특정 Fc 영역 위치의, 2, 3, 4, 5 등의 치환체를 그 안에 포함할 수 있다.
- [0468] 예를 들어, IgG1 문맥에서, Fc 영역 변형체는 Fc 영역의 임의의 하나 이상의 아미노산 위치 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 또는 439에 아미노산 변형을 도입하는 것에 의해 Fc.gamma.R에 대한 감소된 결합으로 생성될 수 있다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제6,737,056호를 참조한다.
- [0469] Fc.gamma.RI에 대한 감소된 결합을 나타내는 IgG1 변형체는 임의의 하나 이상의 아미노산 위치 238, 265, 269, 270, 327, 또는 329에 Fc 영역 아미노산 변형을 포함하는 것들을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제6,737,056호를 참조한다.
- [0470] Fc.gamma.RII에 대한 감소된 결합을 나타내는 IgG1 변형체는 임의의 하나 이상의 아미노산 위치 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 또는 439에 Fc 영역 아미노산 변형을 포함하는 것들을 포함한다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제6,737,056호를 참조한다.
- [0471] Fc.gamma.RIII에 대한 감소된 결합을 나타내는 IgG1 Fc 영역 변형체는 임의의 하나 이상의 아미노산 위치 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 또는 437에 Fc 영역 아미노산 변형을 포함하는 것들을 포함한다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제6,737,056호를 참조한다.
- [0472] 비록 잔기들의 수가 상이할 수 있지만, 다른 Ig Fc 영역에서 특정 잔기들을 변경하는 것에 의해 유사한 효과가 얻어질 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제6,737,056호를 참조한다.
- [0473] 예를 들어, Clq 결합 및/또는 FcR 결합을 변경시키고, 그에 의해 CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 변화시키는 것에 의해, 변형된 이펙터 기능을 가지는 Fc 영역을 설계할 수 있다. 예를 들어, 향상된 Clq 결합 및 향상된 Fc.gamma.RIII 결합을 가지는; 예를 들어, 향상된 ADCC 활성 및 향상된 CDC 활성 양자를 가지는, 변형 Fc 영역을 생성할 수 있다. 대안적으로, 이펙터 기능이 감소되거나 또는 제거되는 것이 요구되는 곳에서, 감소된 CDC

활성 및/또는 감소된 ADCC 활성을 가지는 변형 Fc 영역을 처리할 수 있다. 다른 구체예에서, 예를 들어, 향상된 ADCC 활성과 감소된 CDC 활성을 가지거나, 그 반대의 Fc 영역 변형체를 생성하기 위하여, 이들 활성 중 단 하나만을 증가시킬 수 있고, 임의로 다른 활성을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제 6,737,056호를 참조한다.

[0474] 추가의 아미노산 서열 변형체와 관련하여, 폴리펩타이드 변형체의 적절한 입체형태를 유지하는 것과 관련이 없는 임의의 시스템인 잔기는 또한, 일반적으로 세린으로 치환되어, 분자의 산화 안정성을 향상시키고, 변종의 교차 결합을 방지할 수 있다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제 6,737,056호를 참조한다.

[0475] 아미노산 치환의 또다른 타입은 폴리펩타이드의 글리코실화 패턴을 변경하는 역할을 한다. 이는 폴리펩타이드에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 제거하는 것에 의해, 및/또는 폴리펩타이드에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 추가하는 것에 의해 달성될 수 있다. 폴리펩타이드의 글리코실화는 통상적으로, N-결합의 또는 O-결합이다. N-결합은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. X가 프롤린을 제외한 임의의 아미노산인, 트리펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌은, 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소적 부착에 대한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드에서 이들 트리펩타이드 서열 중 어느 것의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-결합 글리코실화는 수산화아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 대한 당 N-아세틸갈락토스아민, 갈락토스, 또는 자일로스 중 하나의 부착을 의미하며, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신 또한 사용될 수 있다. 폴리펩타이드에 대한 글리코실화 부위의 부가는, 하나 이상의 전술한 트리펩타이드 서열(N-결합 글리코실화 부위에 대하여)을 포함하도록, 아미노산 서열을 변경하는 것에 의해 용이하게 수행된다. 이러한 변경은 또한 (O-결합 글리코실화 부위에 대하여) 원래의 폴리펩타이드의 서열에 대해 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 치환 또는 부가에 의해 행해질 수 있다. 예시적인 글리코실화 변형체는 중쇄의 잔기 Asn 297의 아미노산 치환을 갖는다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제 6,737,056호를 참조한다.

[0476] 또한, Fc 영역의 클래스, 서브클래스 또는 알로타입은 하나 이상의 추가적인 아미노산 치환에 의해 변형되어, 원하는 바와 같은 상이한 클래스, 서브클래스 또는 알로타입에 대해 보다 상동인 아미노산 서열을 갖는 Fc 영역을 생성할 수 있다. 예를 들어, 쥐 Fc 영역은 변형되어 인간 Fc 영역에 보다 상동인 아미노산 서열을 생성할 수 있고; 인간 비-A 알로타입 IgG1 Fc 영역은 변형되어 인간 A 알로타입 IgG1 Fc 영역 등을 생성할 수 있다. 한 구체예에서, FcR 결합 및/또는 ADCC 활성을 변경시킨 여기에서의 아미노 변형체(들)은 Fc 영역의 CH2 도메인에서 만들어지고, CH3 도메인은 삭제되거나 또는 또다른 이합체화 도메인으로 대체된다. 그러나, 바람직하게는, (여기에서 기재된 바와 같은 이펙터 기능을 변경하는 여기에서의 아미노산 변형과는 별도로) CH3 도메인은 유지된다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제 6,737,056호를 참조한다.

[0477] **결합 분석**

[0478] FcR에 결합하는 폴리펩타이드 변형체의 능력이 평가될 수 있다. FcR이 높은 친화도 Fc 수용체, 예컨대 Fc.gamma.RI, FcRn 또는 Fc.gamma.RIIIA-V158인 경우에, 모노머성 폴리펩타이드 변형체를 적정하고, 표준 ELISA 포맷으로 폴리펩타이드 변형체에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 부착된 폴리펩타이드 변형체를 측정하는 것에 의해 결합을 측정할 수 있다. 예를 들어, Presta의 미국 특허 제 6,737,056호를 참조한다. 낮은 친화도 FcR에 대한 FcR 결합 분석은 기술 분야에 잘 알려져 있고, 즉, Presta의 미국 특허 제 6,737,056호에 기재되어 있다.

[0479] 폴리펩타이드 변형체의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 변하는 이펙터 : 표적 비율을 사용하여 인 비트로 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 그러한 분석에 대한 유용한 "이펙터 세포"는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살상(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 폴리펩타이드 변형체의 ADCC 활성이, 예를 들어, Clynes 등의, PNAS (USA) 95:652-656 (1998)에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 인 비보로 평가될 수 있다.

[0480] **발현 벡터**

[0481] 임의의 적절한 발현 벡터가 사용되어 본 발명을 실행할 수 있다. 예를 들어, 기술분야의 당업자는 예를 들어 pSVgpt에 IgG1을 발현할 수 있다. 발현 벡터 pSVgpt는 pSV₂gpt (Mulligan 및 Berg, 1980)를 기반으로 하고 또한 세균 세포의 선택을 위한 암피실린 저항성 유전자, 포유류 세포의 선택을 위한 gpt 유전자, 쥐 중쇄 번역클로닝 인핸서 영역, 불변 영역 유전자를 인코딩하는 게놈 서열 및 SV40 폴리 A 서열을 포함한다. 발현을 위한 중쇄 가변 영역은 HindIII 내지 BamHI 단편으로서 삽입된다.

[0482] 발현 벡터 pSVhyg는 세균 세포의 선택을 위한 암피실린 저항성 유전자, 포유류 세포의 선택을 위한 hyg 유전자,

취 중쇄 면역글로불린 인핸서 영역, 카파 영역 유전자를 인코딩하고 또한 카파 인핸서를 포함하는 게놈 서열 및 SV40 폴리 A 서열을 포함한다. 발현을 위한 경쇄 가변 영역은 *Hind*III 내지 *Bam*HI 단편으로서 삽입된다.

[0483] 그 후 발현 벡터 내의 인간화된 V_H 및 V_K 를 위한 DNA 서열이 정확한지 여부가 확인된다.

[0484] 항체 생산을 위해 인간화된 중쇄 및 경쇄 발현 벡터는 예를 들어, NS0 세포와 같이 당업계에 알려진 적절한 생산 세포주 내에 도입될 수 있다. 발현 벡터의 도입은 전기천공(electroporation)을 통한 공동-트랜스펙션(co-transfection) 또는 당업계에서 가능한 임의의 다른 적합한 형질전환 기술에 의해 달성될 수 있다. 그 후 항체 생산 세포주가 선택되고, 증대되고, 또한 인간화된 항체가 정제될 수 있다. 상기 정제된 항체는 그 후 SDS-PAGE와 같은 표준 기술에 의해 분석될 수 있다.

[0485] **개선된 친화도, 특이성, 안정성을 갖는 항체**

[0486] 마우스 C2 항체의 CDRL2 서열("KVSNRFS")은 항체 활성화에 유해하게 영향을 미치지 않으면서 약간 변형될 수 있다. 보존적 치환은 위치 50의 K에 대해 R로 또한 위치 53의 N에 대해 S로의 교환을 통해 이루어질 수 있다. 따라서 두 선택적 CDRL2 서열은 각각 "RVSNRFS" 및 "KVSSRFS"이다. 이들은 각각 C2 VK-R 및 C2 VK-S로서 어떠한 변화 없이 취 V_K 서열 내부로 삽입된다.

[0487] 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체 또는 이의 단편의 친화도, 특이성 및 안정성은 그의 글리코실화(glycosylation) 프로파일 또는 패턴의 변화에 의해 변형되어 개선된 치료적 능력을 야기할 수 있다.

[0488] 이 글리코실화 패턴 내 변화를 달성하기 위해, 숙주 세포는 이분(bisecting) GlcNAc를 운반하는 복합체 N-링크된 올리고당을 증가시키는 바람직한 범위의 당단백-변형 글리코실 트랜스퍼라아제(glycoprotein-modifying glycosyl transferase) 활성을 발현할 수 있도록 조작될 수 있다. 또한, 당단백의 변형된 당형태(glycoform), 예를 들어 전체 항체 분자를 포함하는 항체, 항체 단편, 또는 향상된 Fc-매개된 세포적 세포독성을 갖는, 면역 글로불린의 Fc 영역에 균등한 영역을 포함하는 융합 단백질이 수득될 수 있다.

[0489] 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 항체의 수득 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어, EP 1071700, US2005272128, Ferrara 등 (2006) J Biol Chem 281(8), 5032-5036; Ferrara 등 (2006) Biotechnology and Bioengineering 93(5), 851-861에 기술되어 있다.

[0490] **약제학적 제제 및 투여**

[0491] *본 발명의 항체, 특히 본 발명의 단일클론성 항체는 생리학적으로 허용가능한 제형으로 조제될 수 있고, 공지된 기술을 사용하여 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체, 특히, 기능적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 단일클론성 항체는 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 조합되어 치료적 조성물을 형성한다. 적절한 약제학적 담체, 희석제 및/또는 부형제는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 인산염 초음파처리 염수 용액, 물, 유/수 에멀션과 같은 에멀션, 다양한 형태의 습윤제, 멸균 용액 등을 포함한다.

[0492] 본 발명의 약제학적 조성물의 제형화는 당업자에게 공지된 규격 방법론에 따라 달성될 수 있다.

[0493] 본 발명의 조성물은 적절한, 약제학적 유효량의 고체, 액체 또는 에어로졸의 형태로 대상에게 투여될 수 있다. 고체 조성물의 예는 환제, 크림 및 삽입가능한 투여량 유닛(implantable dosage unit)을 포함한다. 환제는 경구로 투여될 수 있다. 치료 크림은 국소적으로 투여될 수 있다. 삽입가능한 투여량 단위는 국부적으로(locally), 예를 들어, 종양 부위에 투여될 수 있고, 또는 상기 치료 조성물의 전신 방출을 위해, 예를 들어, 피하적으로 삽입될 수 있다. 액체 조성물의 예는 근육내, 피하, 정맥내, 동맥내 주입을 위해 적응(adapt)된 제형, 및 국소 및 안내(intraocular) 투여를 위한 제형을 포함한다. 에어로졸 제형의 예는 폐에 대한 투여를 위한 흡입기 제형을 포함한다.

[0494] 상기 조성물은 표준 투여 루트(route)에 의해 투여될 수 있다. 일반적으로, 상기 조성물은 국소, 경구, 직장, 비강, 진피내(interdermal), 복막내, 또는 비경구적(예를 들어, 정맥내, 피하, 또는 근육내) 루트로 투여될 수 있다. 추가로, 상기 조성물은 생분해성 폴리머와 같은 서방성(sustained release) 매트릭스 내로 함침될 수 있고, 상기 폴리머는 전달이 희망되는 곳의, 예를 들어, 종양 부위 부근에 삽입(implant)될 수 있다. 상기 방법은 단일 용량의 투여, 미리결정된 시간 간격에서의 반복 용량의 투여, 및 미리결정된 시기에 대한 지속 투여

(sustained administration)를 포함한다.

- [0495] 본원에서 사용된 서방성 매트릭스는 재료, 일반적으로 효소적 또는 산/염기 가수분해 또는 용해(dissolution)에 의해 분해가능한 폴리머로 제조된 매트릭스이다. 체내에 삽입되면, 상기 매트릭스는 효소 및 체액에 의해 작용한다. 상기 서방성 매트릭스는 리포솜, 폴리락티드(폴리락티드산), 폴리글리콜리드(글리콜산의 폴리머), 폴리락티드 코-글리콜리드 (락트산과 글리콜산의 코폴리머), 폴리안히드라이드(polyanhydride), 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩타이드, 히알루론산, 콜라겐, 황산콘드로이틴, 카르복실산, 지방산, 인지질, 다당류, 핵산, 폴리아미노산, 페닐알라닌, 타이로신, 이소류신과 같은 아미노산, 폴리뉴클레오티드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘과 같은 생체적합한 재료에 의해 바람직하게 선택된다. 바람직한 생분해성 매트릭스는 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 폴리락티드 코-글리콜리드 (락트산 및 글리콜산의 코폴리머)의 어느 하나인 매트릭스이다.
- [0496] 상기 조성물의 투여량이 예를 들어, 처리될 병태, 사용되는 특정 조성물, 및 환자의 체중, 키, 성별 및 일반적인 건강 상태와 같은 다른 임상적 요소, 체표면적, 투여될 특정 화합물 또는 조성물, 동시에 투여될 다른 약물, 및 투여 경로와 같은 여러 요소에 의존적일 것임은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0497] 상기 조성물은 생물학적 활성 물질 또는 화합물, 특히 산화적 스트레스에 대한 화합물, 항-자가사멸 화합물, 금속 킬레이터, 피렌제핀 및 대사물과 같은 DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술포산(3APS), 1,3-프로판디술포네이트(1,3PDS), α -세크레타아제 활성제, β - 및 γ -세크레타아제 억제제, 타우 단백질, 신경전달물질, β -시트 파괴제, 아밀로이드 베타 제거/고갈 세포 성분에 대한 유인물질, 피로글루타메이트와 아밀로이드 베타 3-42를 포함하는 N-말단 잘린 아밀로이드 베타의 억제제, 항-염증 분자, 예를 들어, 클로자핀, 지프라스돈, 리스페리돈, 아리피프라졸 또는 올란자핀과 같은 "비전형적 항정신병약" 또는 타크린, 리바스티그민, 도네페질, 및/또는 갈란타민과 같은 콜린에스테라아제 억제제(ChEI), M1 작용제 및 임의의 아밀로이드 또는 타우 변형 약물 및 예를 들어, 비타민 B12, 시스테인, 아세틸콜린의 전구체, 레시틴, 콜린, 은행(Ginkgo biloba), 아세틸-L-카르니틴, 이데베논(idebenone), 프로펜토포릴린(propentofylline) 또는 크산틴 유도체와 같은 영양 보조제를 포함하는 다른 약물을 포함하는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 포함하는 다른 조성물은 본 발명의 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제 및 질환의 치료를 위한 과정을 조합하여 투여될 수 있다.
- [0498] 단백질성(Proteinaceous) 약제학적 활성 물질은 용량당 1 ng 내지 10 mg의 양으로 존재할 수 있다. 일반적으로, 투여의 투약 계획(regime)은 본 발명의 항체의 0.1 μ g 내지 10mg의 범위 내, 특히 1.0 μ g 내지 1.0mg 내에, 보다 특히 1.0 μ g 내지 100 μ g 내에 있어야 하며, 모든 개별적 수는 본 발명의 일부가 되는 범위 내에 있어야 한다. 만약 투약이 지속 주입을 통해 일어난다면, 보다 바람직한 투여량은 시간당 킬로그램 체중당 0.01 μ g 내지 10 mg 유닛의 범위 내에 있을 수 있으며, 이들 범위에 해당되는 모든 개별적 수는 본 발명의 일부가 되는 범위 내에 있을 수 있다.
- [0499] 투여는 일반적으로 비경구적으로 예를 들어, 정맥내로일 것이다. 비경구적 투여를 위한 제제는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 에멀션을 포함한다. 비수성 용매는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올리에이트(ethyl oleate)와 같은 주사가 가능한 유기 에스테르를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 수성 용매는 염수 및 초음파처리 매체를 포함하는 물, 알코올/수성 용액, 에멀션 또는 현탁액을 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 비경구적 비히클(vehicle)은 염화나트륨 용액, 링거의 덱스트로오스(Ringer's dextrose), 덱스트로오스 및 염화나트륨, 락테이트가 첨가된 링거(lactated Ringer's), 또는 고정유(fixed oil)를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제(nutrient replenisher), (링거의 덱스트로오스를 기반으로 하는 것들과 같은) 전해질 보충제 및 그 외를 포함한다. 예를 들어, 항균제(antimicrobial), 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스(inert gas) 등과 같은 방부제도 존재할 수 있다.
- [0500] 약제학적 조성물은 예를 들어, 혈청 알부민 또는 면역글로불린, 특히 인간 기원의 혈청 알부민 또는 면역글로불린과 같은 단백질성 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물 내에는 의도된 용도에 따라 추가의 생물학적 활성제가 존재할 수 있다.
- [0501] 결합 타겟이 뇌 내에 위치될 때, 본 발명의 어떤 구체예는 상기 항체 또는 이의 활성 단편을 제공하여 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier)을 가로지른다. 어떤 신경퇴행성 질환은 혈액-뇌 장벽의 투과성의 증가와 관련되어, 항체 또는 이의 활성 단편이 뇌 내에 쉽게 도입될 수 있다. 혈액-뇌 장벽이 손상없이 존재할 때, 이를 가로질러 분자를 수송하기 위한 물리적 방법, 지질-기반 방법, 및 수용체 및 채널-기반 방법을 포함하나 이에 한정되는 것은 아닌 여러 기전에 알려져 있는 수단이 존재한다.

- [0502] 혈액-뇌 장벽을 가로질러 항체 또는 이의 활성 단편을 수송하기 위한 물리적 방법은, 혈액-뇌 장벽을 전체적으로 우회(circumventing)하거나 또는 혈액-뇌 장벽에 개구(opening)를 생성하는 것을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 우회 방법은 뇌 내에 직접 주사하는 것 (예를 들어 Papanastassiou 등, Gene Therapy 9: 398-406 (2002) 참조) 및 뇌 내에 전달 장치를 삽입하는 것 (예를 들어, Gill 등, Nature Med. 9: 589-595 (2003); 및 Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical 참조)을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 장벽 내에 개구를 생성하는 방법은 초음파 (예를 들어, 미국 특허 공개 제 2002/0038086호 참조), 삼투압 (예를 들어, 고장(hypertonic) 만니톨의 투여에 의해 (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), 예를 들어 브래디키닌(bradykinin) 또는 투과제(permeabilizer) A-7에 의한 투과화(permeabilization) (예를 들어, 미국 특허 제 5,112,596호, 제 5,268,164호, 제 5,506,206호, 및 제 5,686,416호 참조), 및 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 유전자를 함유하는 벡터와 혈액-뇌 장벽을 걸치는 뉴런의 트랜스펙션 (예를 들어, 미국 특허 공개 제 2003/0083299호 참조)을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0503] 혈액-뇌 장벽을 가로질러 항체 또는 이의 활성 단편을 수송하는 지질-기반 방법은 혈액-뇌 장벽의 혈관 내피 상 수용체에 결합하는 항체 결합 단편에 커플되는 항체 또는 이의 활성 단편을 리포솜 내에 캡슐화하는(encapsulating) 것 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 20020025313호 참조), 및 저밀도 지단백 입자 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 20040204354호 참조) 또는 아포지단백 E (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 20040131692호 참조)로 항체 또는 이의 활성 단편을 코팅하는 것을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0504] 혈액-뇌 장벽을 가로질러 항체 또는 이의 활성 단편을 수송하는 수용체 및 채널-기반 방법은 혈액-뇌 장벽의 투과성을 증가시키기 위해 글루코코르티코이드 차단제를 사용하는 것 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2002/0065259호, 제 2003/0162695호, 및 제 2005/0124533호 참조); 칼륨 채널을 활성화하는 것 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2005/0089473호 참조), ABC 약물 수송자(transporter)를 억제하는 것 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2003/0073713호 참조); 항체를 트랜스페린으로 코팅하여 하나 이상의 트랜스페린 수용체의 활성을 조절(modulate)하는 것 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2003/0129186호 참조), 및 항체를 양이온화하는 것 (예를 들어, 미국 특허 제 5,004,697호 참조)을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0505] **검출/진단**
- [0506] 추가의 구체예에서 본 발명은, 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 검출 및 진단을 위한 방법 및 키트를 제공한다. 이들 방법은 생물학적 샘플 내에서 또는 인 시투 조건에서 물질을 검출 또는 정량하기 위해 일반적으로 사용되는 공지의 면역학적 방법을 포함한다.
- [0507] 환자에서의 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 진단은 샘플 내 또는 인 시투의 아밀로이드 단백질의 에피토프에의 단일클론성 항체 또는 이의 활성 단편의 면역특이적 결합을 검출함으로써 달성될 수 있으며, 이는 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역을 아밀로이드 단백질의 에피토프에 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 상기 항체가 상기 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역 복합체를 형성하도록 하는 것, 상기 면역 복합체의 형성을 검출하는 것, 및 상기 면역 복합체의 존재 또는 부재를 상기 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 것을 포함한다.
- [0508] 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 진단에 사용될 수 있는 생물학적 샘플은 예를 들어, 혈청, 혈장, 타액, 소변, 분비물, 점액, 척수액, 림프액 등과 같은 유체, 또는 신경, 뇌, 심장 또는 혈관 조직과 같은 유기체로부터 수득한 조직 또는 세포 샘플이다. 샘플 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재를 측정하기 위해, 예를 들어, 검출을 위한 이차 시약을 사용하는 간접적 검출 방법을 사용하는 분석, ELISA's 및 면역침강 및 응집(agglutination) 분석과 같은 당업계의 보통의 기술자에게 알려진 임의의 면역분석 (Harlow 및 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612) 참조)가 사용될 수 있다. 이들 분석의 상세한 설명은 예를 들어, Maertens 및 Stuyver의 W096/13590, Zrein 등 (1998), 및 W096/29605에 주어진다.
- [0509] 인 시투 진단을 위해, 항체 또는 이의 모든 활성부 및 기능성 부분은 예를 들어, 정맥내, 비강내, 복막내, 뇌내, 동맥내 주사와 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 진단될 생명체에 투여될 수 있으며, 이로써 본 발명의 항체와 아밀로이드 단백질의 에피토프 영역 사이의 특이적 결합이 발생할 수 있다. 항체/항원 복합체는 상기 항체 또는 이의 기능적 단편에 부착된 표지(label)를 통해 검출될 수 있다.

- [0510] 진단적 적용에 사용되는 면역분석은 일반적으로 검출을 위해 표지된 항원, 항체, 또는 이차 시약에 의존한다. 이들 단백질 또는 시약은 효소, 방사능동위원소, 및 형광물질, 발광물질 및 콜로이드 금 및 라텍스 비드와 같은 착색 입자를 포함하는 발색성(chromogenic) 물질을 포함하는 일반적으로 당업자에게 알려진 화학물질로 표지될 수 있다. 이들 중, 방사능 표지는 대부분의 모든 유형의 분석을 위해 또한 대부분의 변형물과 함께 사용될 수 있다. 효소-컨쥬게이트된 표지는 방사능활성이 회피되어야 할 때 또는 빠른 결과가 필요할 때 특히 유용하다. 형광 색소(fluorochrome)는, 그들의 사용에 값비싼 장비가 요구됨에도 불구하고, 매우 민감한 검출 방법을 제공한다. 이들 분석에 유용한 항체는 단일클론성 항체, 다클론성 항체, 및 친화도 정제된 다클론성 항체를 포함한다.
- [0511] 대안적으로, 상기 항체는 단백질 A 또는 G와 같은 면역글로불린 또는 이차 항체에 대한 친화도를 갖는 표지된 물질과의 작용에 의해 간접적으로 표지될 수 있다. 상기 항체는 이차 물질과 컨쥬게이트될 수 있고, 상기 항체에 컨쥬게이트된 상기 이차 물질에 대한 친화도를 갖는 표지된 삼차 물질(third substance)로 검출될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 비오틴에 컨쥬게이트될 수 있고, 상기 항체-비오틴 컨쥬게이트는 표지된 아비딘 또는 스트렙타비딘을 사용하여 검출될 수 있다. 유사하게, 상기 항체는 합텐에 컨쥬게이트 될 수 있고, 상기 항체-합텐 컨쥬게이트는 표지된 항-합텐 항체를 사용하여 검출될 수 있다.
- [0512] 당업자는 이들 및 다른 적절한 표지가 본 발명에 따라 사용될 수 있음을 알 것이다. 항체 또는 이의 단편에의 이들 표지의 결합은 당업자에게 일반적으로 알려진 표준 기술을 이용하여 달성될 수 있다. 일반적인 기술은 Kennedy, J. H., 등, 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), 및 Schurs, A. H. W. M., 등 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40)에 의해 기재되었다. 후자(latter)에 언급된 커플링 기술은 글루타르알데하이드 방법, 과요오드산염(periodate) 방법, 디말레이미드 방법, 및 그 외이고, 이들 모두는 본원에 참조로서 삽입되었다.
- [0513] 여기서, 통용되는 면역분석은 분석물의 존재를 검출하기 위해 이중 항체 방법을 사용한다. 상기 항체는 검출 가능한 표지로 표지된 이차 항체와의 반응성에 의해 간접적으로 표지된다. 상기 이차 항체는 바람직하게는 단일클론성 항체가 유래된 동물의 항체에 결합하는 것이다. 바꿔 말하면, 만약 상기 단일클론성 항체가 마우스 항체라면, 표지된 이차 항체는 항-마우스 항체이다. 이하에 기재된 분석에서 사용되는 단일클론성 항체에 대해, 이 표지는 바람직하게는 항체-코팅된 비드, 특히 자성 비드이다. 본원에 기재된 면역분석에서 사용되는 다클론성 항체에 대해, 상기 표지는 바람직하게는 방사성(radioactive), 형광 또는 전기화학발광 물질과 같은 검출 가능한 분자이다.
- [0514] 분석물의 존재의 빠른 측정에 대해 유연하게 변경되는 것에서 종종 빠른 포맷 시스템으로 언급되는, 대안적인 이중 항체 시스템(alternative double antibody system)은 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있다. 상기 시스템은 항체와 분석물 간에 높은 친화도를 요구한다. 본 발명의 일 구체예에 따라, 아밀로이드 단백질의 존재는 각각 아밀로이드 단백질에 특이적인 한쌍의 항체를 사용하여 측정된다. 상기 한쌍의 항체 중 하나는 "검출자 항체(detector antibody)"로서 본원에서 언급되고, 상기 한쌍의 항체 중 다른 하나는 "포획 항체(capture antibody)"로서 본원에서 언급된다. 본 발명의 단일클론성 항체는 포획 항체 또는 검출자 항체 중 어느 것으로든 사용될 수 있다. 본 발명의 단일클론성 항체는 단일 분석에서 함께, 포획 및 검출자 항체 모두로서도 사용될 수 있다. 따라서 본 발명의 일 구체예는 생물학적 유체인 샘플 내에서 아밀로이드 단백질을 검출하기 위해 이중 항체 샌드위치 방법을 사용한다. 이 방법에서, 상기 분석물(아밀로이드 단백질)은 검출자 항체와 포획 항체 사이에 샌드위치되고, 상기 포획 항체는 고체 지지체 상에 불가역적으로 고정된다. 상기 검출자 항체는 항체-분석물 샌드위치의 존재를 확인하여 상기 분석물의 존재를 확인하기 위해 검출가능한 표지를 함유한다.
- [0515] 예시적인 고체상 물질(solid phase substance)은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 방사면역분석(radioimmunoassay) 및 효소 면역분석 분야에 잘 알려져 있는 폴리스티렌의 마이크로타이터(microtiter) 플레이트, 테스트 튜브, 자성, 플라스틱 또는 유리 비드 및 슬라이드를 포함한다. 항체를 고체상에 커플링시키기 위한 방법 또한 당업자에게 공지되어 있다. 보다 최근에, 나일론, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 유리섬유 및 다른 다공성 폴리머와 같은 몇 가지의 다공성 물질이 고체 지지체로서 사용되어왔다.
- [0516] 본 발명은 또한 상기에 정의된 바와 같은 조성물을 포함하는, 생물학적 샘플 내의 아밀로이드 단백질을 검출하기 위한 진단 키트에 관한 것이다. 게다가, 본 발명은 상기에 정의된 바와 같은 조성물에 추가로, 상기에 정의된 바와 같은 검출 시약도 포함하는 후자(latter)의 진단 키트에 관한 것이다. 용어 "진단 키트"는 일반적으로 당업계에 공지된 모든 진단 키트를 나타낸다. 보다 특히, 후자의 용어는 Zrein 등 (1998)에 기술된 바와 같은 진단 키트를 나타낸다.
- [0517] 본 발명의 또 다른 목적은 아밀로이드-관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 위한 본 발명의 항체를 포함하는 신

구한 면역프로브(immunoprobe) 및 테스트 키트를 제공하는 것이다. 면역프로브를 위해, 상기 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 적절한 리포터 분자, 예를 들어 효소 또는 방사성 핵종(radionuclide)에 부착된다. 상기 테스트 키트는, 본 발명의 하나 이상의 항체를 담는 용기, 및 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역 복합체를 형성하기 위해 상기 항체를 사용하기 위한 및 상기 면역 복합체의 존재 또는 부재(absence)가 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련이 있으므로 상기 면역 복합체의 형성을 검출하기 위한 설명서를 포함한다.

[0518] 실시예

[0519] 재료

[0520] 마우스 단일클론성 항체 ACI-01-Ab7C2(본 출원 전체적으로 "mC2"로 명명되었으며 또한 인간화된 C2 항체에 대해 hC2로 명명됨)의 개발 및 제조는 2005년 12월 12일에 출원된 동시계류중인 출원 EP 05 02 7092.5 내에 기재되며, 이의 개시는 본원에 참조로서 삽입된다.

[0521] 동시계류중인 출원 제 EP05027092.5호의 마우스 단일클론성 항체 ACI-01-Ab7C2(본 출원 전체적으로 "mC2"로 명명되었으며 또한 인간화된 C2 항체에 대해 hC2로 명명됨)를 생산하는 하이브리도마 세포 FP-12H3-C2는, 부다페스트 조약의 규정 하에, 브라운슈바이그 38124, 마세로테르 베그 1 비, 브라운슈바이그 소재 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)"에 2005년 12월 1일 기탁되어 접근 번호 DSM ACC2750을 부여받았다.

[0522] 하이브리도마 세포는 10% 우태아혈청 및 항생제(페니실린/스트렙토마이신)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium)에서 배양하였다. 생산된 항체의 이소타입을 체크하였으며 기대한 바와 같이 마우스 IgG2b/카파로 밝혀졌다.

[0523] 분석(Assay)

[0524] 아밀로이드 베타에 대한 결합을 위한 ELISA는 C2 항체의 역가(potency)의 믿을만한 수치를 제공하였다. 양성 대조군 항체는 쥐 FP-12H3-C2 항체(Genovac 제품번호: AK379/01), 및 표준 케미콘(Chemicon) 항체 1560(제품번호: 0508008791).

[0525] 인간 불변 영역의 선정

[0526] 면역계 동원(recruitment)은 임상적 항체 후보로서 바람직하지 않으므로, 중쇄를 위해 선택된 인간 불변 영역은 힌지 영역 내 위치 228의 세린이 프롤린으로 바뀌도록 변형된 인간 IgG4이다(HuIgG4 Ser-Pro). 이 돌연변이는 사슬간 디설파이드 결합을 안정화시키고 또한 본래의 인간 IgG4 제조에서 발생할 수 있는 하프 분자의 형성을 막을 것이다. 생산 세포주로부터 발현된 항체는 또한 말단 라이신이 제거되어 있을 것이다. 인간 불변 영역 HuIgG4 Ser-Pro 및 인간 카파의 서열은 서열 식별 번호: 17 및 서열 식별 번호: 14에 각각 주어진다.

[0527] 실시예 1항체 가변 영역의 클로닝 및 시퀀싱(Sequencing)

[0528] 3×10^6 하이브리도마 세포 (하나의 T175 플라스크)로부터의 총 RNA는 키아젠 알엔이지 미니 키트(Qiagen RNeasy mini kit, 카탈로그 번호: 74104)를 사용하여 준비하였다. RNA는 50 μ L 물로 용리하였고 1.2% 아가로스 겔 상에서 체크하였다. 세포로부터의 조건 배지(conditioned medium)는 보존하였으며, 항체 활성 분석에서 실험을 위한 샘플로서 사용하였다.

[0529] V_H 및 V_K cDNA는 마우스 IgG 및 κ 불변 영역 프라이머와 역전사효소(reverse transcriptase)를 사용하여 준비하였다. 제1 가닥 cDNA는 다수의 신호 서열 프라이머 세트를 사용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. 상기 증폭된 DNA는 겔-정제하였으며 또한 벡터 pGem® T Easy (Promega)내에 클로닝하였다. 수득된 V_H 및 V_K 클론은 PCR에 의해 원하는 크기의 인서트(insert)에 대해 스크리닝하였으며, 선택된 클론의 DNA 서열은 자동화된 DNA 시퀀싱에 의해 측정하였다. 서열 내 상보성 결정 영역(CDR)의 위치는 다른 항체 서열을 참조하여 측정하였다 (Kabat EA 등, 1991). 항체 가변 영역에 대한 Kabat의 넘버링 규정(numbering convention)은 본 출원 전체에서 사용된다; 따라서 잔기 수는 완전한 직선상 수(strict linear number)와 상이할 수 있다.

[0530] mC2 V_K 에 대한 DNA 서열 및 유추되는(deduced) 아미노산 서열은 서열 식별 번호: 29 및 27 각각에 나타낸다. 네 개의 클론이 이 동일한 생산성 서열을 나타내었다. 하이브리도마 융합 파트너로부터 기인하는 비생산성 이상형(aberrant) V_K 서열 또한 다수의 클론에서 발견되었다.

[0531] mC2 V_H를 위해, 두 상이한 생산성 서열이 분리(isolate)되었다. mC2 V_H AF 서열(서열 식별 번호: 30 참조)은 총 29개의 클론에서 발견되는데, 각각의 클론에서 14 단일 염기쌍 변화가 있었다. mC2 V_H B 서열은 총 8개의 클론에서 발견되었다. 이들 중 다섯은 다수(major)의 서열을 나타내고, 다른 3 클론은 이의 이형이다. 이들 유사한 V_H B 서열은 PCR 증폭의 인공산물(artifact)로서 발생되었을 수 있다. 비생산성 이상형 V_H는 C2 하이브리도마로부터 또한 수득되었고, 불완전 V-D-J 결합(defective V-D-J joining)에 기인한 것으로 생각된다.

[0532] 정확한 활성 mC2 V_H를 측정하기 위해, 정확한 항체 활성이 테스트되어야 하는 mC2 V_K와 조합된 두 상이한 서열 AF 및 B를 갖는 두 키메라 항체를 준비했다.

[0533] 실시예 2키메라 항체 유전자의 구축

[0534] 가장 일반적인 형태인 인간 키메라 항체는 쥐 (또는 다른 비인간) 가변 영역에 연결된 인간 불변 영역으로 이루어진다. 키메라 항체는, 첫째로 정확한 가변 영역이 식별되었는지 확인하기 위한, 둘째로 항원 결합 분석에서 동일한 이펙터 기능을 갖는 대조군 항체로서 사용하기 위한 인간화된 또는 조작된 항체와 동일한 이차 검출 시약을 사용하는 매우 유용한 수단을 제공하고, 또한 항체에 대한 특정 타겟을 참조하여 인간 불변 영역의 약동학 및 기타 특성을 조사하기 위해 사용될 수도 있다.

[0535] 발현 벡터 pSVgpt(도 1) 내 HuIgG4(Ser-Pro) 불변 영역에 연결된 mC2 V_H AF 또는 mC2 V_H B 가변 영역으로 이루어지는 두 키메라 중쇄 발현 벡터를 구축하였다. 이는 pSV₂gpt (Mulligan 및 Berg, 1980)를 기반으로 하며, 또한 세균 세포 내 선택을 위한 암피실린 저항 유전자, 포유류 세포 내 선택을 위한 gpt 유전자, 쥐 중쇄 면역글로불린 로블린 인헨서 영역, 불변 영역 유전자를 인코딩하는 게놈 서열 및 SV40 폴리 A 서열을 포함한다. 발현을 위한 중쇄 가변 영역은 Hind III 내지 BamHI 단편으로서 삽입된다.

[0536] 발현 벡터 pSVhyg(도 2) 내 인간 C 카파 불변 영역에 연결된 C2 V_K로 이루어지는 키메라 경쇄 벡터를 구축하였다 (Hieter PA 등, 1980). pSVhyg는 세균 세포 중에서 선택을 위한 암피실린 저항 유전자, 포유류 세포 중에서 선택을 위한 hyg 유전자, 쥐 중쇄 면역글로불린 인헨서 영역, 카파 불변 영역 유전자를 인코딩하고 또한 카파 인헨서를 포함하는 게놈 서열 및 SV40 폴리 A 서열을 포함한다. 발현을 위한 경쇄 가변 영역은 HindIII 내지 BamHI 단편으로서 삽입된다.

[0537] 쥐 C2 V_H 및 V_K 서열을 위한 발현 카세트는, 주형으로서 벡터 V_H-PCR1 및 V_K-PCR1를 사용하여, 리더 신호 펩타이드(leader signal peptide), 리더 인트론 및 쥐 면역글로불린 프로모터를 포함하는 5' 플랭킹 서열, 및 스플라이스(splice) 부위 및 인트론 서열을 포함하는 3' 플랭킹 서열을 첨가함으로써 구축하였다 (Riechmann 등, 1988). 키메라 발현 벡터 내의 V_H 및 V_K를 위한 DNA 서열이 정확한가 여부를 확인하였다. 상기 발현 카세트 내 V_H 및 V_K 유전자의 DNA 및 아미노산 서열을 도 3 및 4에 나타낸다.

[0538] 실시예 3키메라 항체의 발현

[0539] 3.1 안정한(stable) 세포주에서의 발현

[0540] 항체 발현을 위한 숙주 세포주로서, 면역글로불린을 생산하지 않는 마우스 골수종(myeloma)인 NS0은 European Collection of Animal Cell Cultures (Porton UK)로부터 수득하였다 (ECACC No 85110503). 중쇄 및 경쇄 발현 벡터는 전기천공법에 의해 NS0 세포 내에 동시-트랜스펙트(co-transfect)하였다. gpt 유전자를 발현하는 콜로니는 10% 우태아 혈청(FBS), 0.8 µg/ml 마이코페놀산(mycophenolic acid) 및 250 µg/ml 잔틴(xanthine)이 첨가된 DMEM 내에서 선택하였다. 트랜스펙트된 세포 클론은 인간 IgG에 대한 ELISA에 의해 인간 항체의 생산에 대해 스크린하였다. 항체를 분비하는 세포주를 증대시키고 최고의 생산 세포주를 선택하여 액체 질소 내에서 동결하였다. 각 항체에 대한 최고의 생산 세포주를 5% FBS만을 갖는 상기 배지에서 증대시켰다. 키메라 항체를 Prosep®-A (Bioprocessing Ltd)를 사용하여 정제하였다. 농도는 인간 IgG κ 항체에 대한 ELISA에 의해 측정하였다. 상기 항체는 또한 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

[0541] 3.2 키메라 항체의 일과성(transient) 발현

[0542] 상이한 키메라 항체의 실험을 신속하게 처리하기 위해, 실험을 위한 재조합 항체를 함유하는 작은 양의 세포 상청액을 재빨리 생산하기 위한 일과성 발현을 사용하였다. 일과성 발현을 위해, mC2 V_H 및 V_K 발현 카세트를 pcDNA3.1 (Invitrogen)를 기반으로 한 벡터에 옮겼다. 중쇄 벡터는 인간 IgG 불변 영역을 포함하였다. 경쇄

백터는 인간 카파 불변 영역을 포함하였다. mC2 V_H AF 및 mC2 V_H B 둘 모두는 mC2 V_K와 함께, 제조사에 의해 공급된 프로토콜에 따라 리포펙타민 2000 시약 (Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen 카탈로그 번호: 11668)으로 인간 배아 신장(HEK 298) 세포 내에 트랜스펙트시켰다. 트랜스펙션 3일 후 세포로부터 조건 배지를 수합하였다. 생산된 항체의 양을 인간 IgG_K 항체에 대한 ELISA에 의해 측정하였다.

실시에 4키메라 C2 항체의 활성

4.1 일과성 트랜스펙션에 의해 생산된 키메라 C2 항체의 활성

두 상이한 키메라 항체에 대한 일과성 트랜스펙션으로부터의 조건 배지의 샘플을 아밀로이드 베타에의 결합에 대해 ELISA로 테스트하였다. 결과는 C2 V_H AF가 정확한 서열인 것을 명확하게 나타내었다. C2 V_H AF/C2 V_K 키메라 항체는 분석에서 잘 결합하였으나, C2 V_H B/C2 V_K는 어떠한 결합도 전혀 나타내지 않았다. 케미콘 1560 쥐 대조군 항체는 양호한 결합을 나타내었으나, 공급된 정제된 쥐 C2 항체에 의한 결합은 낮았다. 인간 불변 영역을 갖는 키메라 항체에 비하여 마우스 불변 영역을 갖는 쥐 항체에 대해 상이한 이차 항체가 사용되어 결과가 직접적으로 비교가능하지 않음을 유념해야한다. C2 하이브리도마로부터의 조건 배지가 분석에서 좋은 결과를 나타내는 것을 이후에 발견하였다.

4.2 정제된 키메라 C2 항체의 활성

기재된 바와 같이 안정한 NS0 세포주로부터 두 상이한 C2 키메라 항체를 정제하고 아밀로이드 베타 ELISA를 사용하여 테스트하였다. 수득된 결과는 일과성으로 발현된 항체로 수득된 결과와 일치하였다. C2 ChVH AF/ChVK 항체는 ELISA에서 잘 결합하였으며, C2 ChVH B/ChVK 항체는 전혀 결합하지 않았다.

실시에 5인간화된 C2 항체 유전자의 설계

mC2 V_H 및 V_K 아미노산 서열을 NCBI 및 Kabat 데이터베이스의 설치류 항체 V_H 및 V_K 서열과 비교하였다.

5.1 경쇄 가변 영역

mC2 V_K에 가장 가까운 매치 마우스 생식 계열 유전자는 bb1, 로커스 MMU231201이다 (Schable 등, 1999). 모두 CDRL1 내에 위치한 두 아미노산만이 이 생식 계열 서열과 상이하다. 유사하지만 동일하지 않은 서열을 가지는 성숙한 쥐 항체가 발견된다. 몇몇은 동일한 CDRL2 및 동일한 CDRL3을 가지지만, mC2의 CDRL1은 독특하게 보인다. mC2 V_K는 Kabat 서브그룹 MuV_KII로 지정할 수 있다. mC2 V_K의 위치 87은 서브그룹 내에 보다 일반적인 Y 라기보다 F이고, 이는 이 프레임워크 잔기가 항체 활성화에 대해 중요할 것이라는 것을 나타낸다. 인간 생식 계열 V_K 서열과의 비교는 서브그룹 V_KII으로부터의 유전자가 mC2 V_K에 대한 최고의 매치임을 나타낸다 (Cox 등, 1994). 인간화된 V_K를 위한 수용체 프레임워크 서열을 제공하기 위해 인간 J 영역 HuJ_K1과 함께 서열 DPK15를 선택하였다.

네 개의 인간화된 V_K 서열을 설계하였다. C2HuVK1은 인간 J_K1 및 DPK 15로부터의 프레임워크를 갖는 mC2 V_K CDR로 이루어진다. 버전 2, 3 및 4에서 프레임워크 내 위치 45 또는 87 또는 둘 모두의 쥐 잔기는 치환되어 있다. 잔기 45는 CDR의 입체형태를 지지하는 것에 관여할 수 있다. 잔기 87은 V_H 및 V_K 도메인의 경계에 위치된다. 따라서 이들 잔기는 항체 결합의 유지에 결정적일 수 있다.

경쇄 프레임워크 영역 내에 만들어진 변화 및 위치를 표 1, 인간화된 서열과 mC2 V_K 서열과의, 또한 DPK15와 인간 J_K1과의 비교에 나타낸다.

5.2 중쇄 가변 영역

mC2 V_H AF에 가장 가까운 매치 마우스 생식 계열 유전자는 VH7183, 로커스 AF120466이다 (Langdon 등, 2000). 비교는 도 5에 나타낸다. 9개의 아미노산이 이 생식 계열 서열과 상이하고, 대부분 CDR2 내에 위치된다. 동일한 또는 유사한 (하나의 잔기가 상이한) CDR1을 갖는 또는 유사한 (하나의 잔기가 상이한) CDR2를 갖는 성숙한 쥐 항체가 발견되었으나, 어떠한 것도 모든 세 CDR이 mC2 V_H AF에 동일하지는 않았다. mC2 항체의 CDR3는 유별나게 짧은데, 단지 세 개의 잔기로 이루어진다. 그러나, 이 길이의 CDR3를 갖는 다른 항체가 데이터베이스에서 발견된다. mC2 V_H AF는 Kabat 서브그룹 MuV_HIIID로 지정할 수 있다. mC2 V_H의 잔기 47은 보다 일반적인 W 라기

보다 L이고, 또한 잔기 94는 보통의 R이라기보다 S이며, 이는 이 프레임워크 잔기가 항체 활성화에 대해 중요할 것이라는 것을 나타낸다. 인간 생식 계열 V_H 서열과의 비교는 서브그룹 V_{HIII} 로부터의 유전자가 $mC2 V_H$ 에 대한 최고의 매치임을 나타낸다. 인간화된 V_H 를 위한 수용체 프레임워크 서열을 제공하기 위해 인간 J 영역 HuJ_H6 과 함께 서열 DP54를 선택하였다.

[0556] 네 개의 인간화된 V_H 서열을 설계하였다. $C2HuVH1$ 은 HuJ_H6 및 DP54로부터의 프레임워크를 갖는 $mC2 V_H$ AF CDR로 이루어진다. 버전 2, 3 및 4에서 프레임워크 내 위치 47 또는 94 또는 둘 모두의 쥐 잔기는 치환되어 있다. 프레임워크 2 내 잔기 47은 CDR과 및 V_H 도메인과 모두 접촉하도록 한다. 잔기 94는 CDR의 입체형태를 지지하는데 관여할 수 있다. 따라서 이들 잔기는 항체 결합의 유지에 결정적일 수 있다.

[0557] 중쇄 프레임워크 영역 내에 만들어진 변화 및 위치를 표 2에 나타낸다.

[0558] **실시에 6인간화된 항체 유전자의 구축**

[0559] 오버래핑 PCR 재조합 방법에 의해 변형된 가변 영역을 구축하였다. 키메라 항체에 대한 발현 카세트인 $C2 ChV_H$ AF 및 $C2 ChV_K$ 를 프레임워크 영역의 요구되는 서열로의 돌연변이생성을 위한 주형으로서 사용하였다. 변경될 영역을 포함하는 돌연변이생성 프라이머 쌍의 세트를 합성하였다. 생성된 인간화된 V_H 및 V_K 발현 카세트를 pUC19 내에 클로닝하고 전체 DNA 서열이 각 V_H 및 V_K 에 대해 정확한지를 확인하였다. 변형된 중쇄 및 경쇄 V-영역 유전자를 *HindIII* 내지 *BamHI* 발현 카세트로서 pUC19로부터 잘라내었다. 키메라 항체 벡터에 대하여, 이들을 인간 IgG4 Ser-pro 또는 κ 불변 영역 각각을 포함하는 발현 벡터 pSVgpt 및 pSVhyg에 옮겼다. 발현 벡터 내의 인간화된 V_H 및 V_K 에 대한 DNA 서열이 정확한지 확인하였다.

[0560] **실시에 7인간화된 항체의 발현**

[0561] **7.1 안정한 세포주에서의 발현**

[0562] 키메라 항체의 발현에 대해서와 같이, 인간화된 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 전기천공법에 의해 NS0 세포 내에 동시-트랜스펙트하였다. 항체 생산 세포주를 선택하여 증대시키고 인간화된 항체를 정제하는데, 키메라 항체에 대한 정제에서와 동일하게 수행하였다. 상기 정제된 항체는 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

[0563] **7.2 인간화된 항체의 일과성 발현**

[0564] 상이한 인간화된 V_H 및 V_K 구조체의 실험을 신속하게 처리하기 위해, 섹션 7.2에 기재된 일과성 발현을 위한 벡터에 $C2$ 인간화된 V_H 및 V_K 발현 카세트를 또한 옮겼다. 네 개의 인간화된 $C2 V_K$ 구조체를 키메라 $C2 V_H$ 구조체와 함께 HEK293 세포 내에 동시-트랜스펙션하였다. 유사하게, 네 개의 인간화된 $C2 V_H$ 구조체를 키메라 $C2 V_K$ 구조체와 함께 HEK293 세포 내에 동시-트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 3일 후 세포로부터 조건 배지를 수합하였다. 생산된 항체의 양을 인간 IgG κ 항체에 대한 ELISA에 의해 측정하였다.

[0565] **실시에 8인간화된 C2 항체의 활성화**

[0566] **8.1 일과성 트랜스펙션에 의해 생산된 인간화된 C2 항체의 활성화**

[0567] 일과성 트랜스펙션으로부터의 조건 배지의 샘플을 아밀로이드 베타 ELISA에서 테스트하였다. 수득된 결과는 인간화된 VH 구조체 $C2 HuVH$ AF 버전 2 및 4가 키메라 $C2$ 카파 쇄와 조합될 때 기능적이고, 또한 분석에서 키메라 $C2$ 항체에 필적함을 명확하게 지시한다. 반대로, 키메라 $C2$ 카파 쇄와 조합된 $C2 HuVH$ AF 버전 1 및 3을 함유하는 항체는 분석에서 어떠한 결합도 나타내지 않는다. 이는 위치 94에서의 쥐 잔기의 치환이 항체 활성화에 필수적임을 나타낸다. 네 개의 인간화된 $C2$ 카파 쇄와 조합된 키메라 $C2$ 중쇄를 함유하는 항체는 ELISA에서 모두 키메라 항체에 필적하는 좋은 결합을 나타냈다.

[0568] **8.2 정제된 인간화된 C2 항체의 활성화**

[0569] 두 개의 인간화된 중쇄 및 네 개의 인간화된 경쇄의 모든 조합을 포함하는 여덟 개의 상이한 인간화된 $C2$ 항체를 기술된 바와 같이 지속적인 NS0 세포주로부터 정제하였으며 아밀로이드 베타 ELISA를 사용하여 테스트하였다 (도 6).

[0570] 수득된 결과는 $C2 HuVH4$ 항체가 $C2 HuVH2$ 항체에 비해 분석에서 보다 잘 작용함을 명확하게 지시한다. $C2$

HuVH2 항체 중, C2 HuVH2/HuVK3은 가장 좋은 결합 활성을 나타내지만, 이는 키메라 대조군 항체 C2 ChVHAF/ChVK에 비교하여 약 2배 감소된 것이다. C2 HuVH2/HuVK2 활성은 대조군에 비교하여 4 내지 5배 감소된 것이다. 네 개의 상이한 인간화된 경쇄를 갖는 C2HuVH4를 포함하는 항체의 활성은 유사하다. 가장 높은 활성은 C2HuVH4/HuVK1에서 관찰되었고, 네 항체 모두가 분석에서 대조군 키메라 항체에 근접한다.

실시에 9CDRL2에 대한 변형

9.1 변형된 CDR 2를 갖는 경쇄 설계

상기에 기재된 바와 같이, 많은 항체는 C2 항체와 같이 동일한 CDRL2 서열("KVSNRFS")을 공유한다. CDRL2가 항체 활성에 유해한 영향을 끼치지 않으면서 약간 변형될 수 있는지를 테스트하기로 했다. 두 보존적 치환을 선택하였다: 위치 50의 K에 대해 R 및 위치 53의 N에 대해 S. 따라서 두 대체적 CDRL2 서열은 "RVSNRFS" 및 "KVSSRFS"이다. 이들은 각각 mC2 VK-R 및 mC2 VK-S로서 다른 변화 없이 쥐 V_K 서열 내부로 삽입되었다.

9.2 변형된 CDRL2 항체의 일과성 발현

섹션 11.2.1에 기재된 변형된 CDRL2를 갖는 두 C2 경쇄 구조체를 일과성 발현을 위한 경쇄 벡터 내에 클로닝하였다. 각각을 키메라 C2 V_H 벡터와 함께 HEK293 세포 내부에 공동-트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 3일 후 세포로부터 조건 배지를 수확하였다. 생산된 항체의 양을 인간 IgG_K 항체에 대한 ELISA에 의해 측정하였다.

9.3 변형된 CDRL2를 갖는 C2 항체의 활성

mC2 V_H와 조합된 변형된 CDRL2를 갖는 mC2 V_KS의 일과성 트랜스펙션으로부터의 조건 배지의 샘플을 아밀로이드 베타 ELISA에서 테스트하였다 (도 7). VK-R 및 VK-S 항체 모두 키메라 C2 항체에 필적하고, 이는 분석에서 선택된 CDRL2에 대한 개별적 변형은 항체의 활성에 현저하게 영향을 끼치지 않음을 나타낸다.

실시에 10친화도 측정

마우스 (ACI-01-Ab-7-C2) 키메라 (AF) 및 인간화된 항체(H4K1; H4K4)의 결합 특이성 및 친화도를 평가하기 위해, CM5 칩 상에 고정된 항원으로서 아밀로이드 베타 1-42 모노머 및 섬유를 사용하는 BIACORE.RTM. 분석을 수행하였다. BIACORE.RTM. 기술은 표면층 상에 고정된 항원의 항체의 결합에 따른 상기 표면층에서 굴절률의 변화를 이용한다. 결합은 상기 표면으로부터의 레이저 광 굴절의 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance, SPR)에 의해 검출된다. 신호 동역학(kinetics) 회합 속도(on rate) 및 해리 속도(off rate)의 분석은 비특이적 및 특이적 상호작용 사이의 식별을 가능하게 한다. 사용된 항체의 농도는 0.05 μM 내지 1.0 μM의 범위였다.

	모노머			섬유		
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)
마우스 ACI-01-Ab-7-C2	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
키메라 AF	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
인간화된 H4K1	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
인간화된 H4K4	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

실시에 11면역조직화학적 결합 분석

11.1 인간 뇌 섹션(section)

건강하고, 치매가 아닌 예비-AD(pre-AD) 및 AD 환자로부터의 뇌를 윤리적 승인 후 본(Bonn)의 유니버시티타트스클리닉(Universitätsklinik)으로부터 받았다. 뇌는 포름알데히드에서 고정하였으며 해마(hippocampus) 영역은 탈수하고 파라핀에 묻어 마이크로톰(microtome)으로 5 μm 섹션으로 절단하였다. 파라핀 섹션은 사용하기 전까지 실온(RT)에서 저장하였다. 신선한 재료를 위해, 냉동미세절단기(cryostat)로 5 μm 냉동섹션(cryosection)을 절단하였으며, 섹션을 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

11.2 면역조직화학

파라핀 섹션은 파라핀을 제거하고, 슬라이드를 자일렌, 그 후 100% 에탄올, 90% 에탄올 및 70% 에탄올에 담금

(bathing)으로써 재수화(rehydrate)하였다. 배경(background)은 10% H_2O_2 , 10% 메탄올 수용액 내에서 30분간 인큐베이션함으로써 감소되었다. 상기 슬라이드를 100% 포름산에서 3분간 인큐베이션함으로써 항원 복구(retrieval)를 수득하였다. TBS(Tris buffered saline, pH 7.5)에서 3번 세척 후, TBS에 녹인 10% BSA, 0.25% 트리톤 X-100 내에서 슬라이드의 인큐베이션을 2시간 행함으로써 비특이적 표지를 블로킹시켰다. 세척 (TBS에서 3번 세척) 후 비표지된 항-인간 IgG (Biomeda)를 첨가하고 슬라이드를 RT의 습한 챔버 내에서 하룻밤 인큐베이션함으로써 내재적 항체의 블로킹을 수행하였다. 또 다시 3회 세척 후, 슬라이드에 일차 인간 항 아밀로이드 항체를 첨가하고 RT에서 또 다시 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase) 표지된 이차 항 인간 IgG (Sigma)를 상기 슬라이드에 첨가하고 RT에서 2시간동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 슬라이드를 리퀴드 퍼머넌트 레드(Liquid permanent Red, Dakocytomation)로 현상하고, 물로 세척하고 퍼머넌트 마운팅 매체(permanent mounting media, corbitbalsam)로 마운팅하기 전에 공기건조시켰다.

[0586] 냉동색션은 $-80^{\circ}C$ 의 메탄올에서 30분간 고정하였으며, 배경은 차가운 메탄올에 H_2O_2 를 첨가하여 최종 농도 10%로 하여 RT에서 30분간 인큐베이션함으로써 감소되었다. 상기한 바와 같이 TBS(pH 7.5)에서 3번 세척 후, TBS에 녹인 10% BSA, 0.25% 트리톤 X-100 내에서 상기 슬라이드의 인큐베이션을 2시간 행함으로써 비특이적 표지를 블로킹시키고 상기한 바와 동일한 염색 과정을 수행하였다.

[0587] 색션은 라이카(Leica) DMLB 현미경으로 검사하였으며 라이카 DC500 카메라 및 라이카 FireCam1.2.0 소프트웨어를 사용하여 사진촬영하였다.

[0588] 인간 항체 A 및 C 둘 모두 AD 질환 환자로부터의 뇌의 플라크를 표지하였다 (도 8). 광범위(diffuse) 및 중심성(cored) 플라크 모두 표지되었다. 게다가, 치매가 아닌 예비-AD 환자에서의 광범위 플라크 또한 상기 A 및 C 항체에 의해 검출될 수 있었다. 대뇌 아밀로이드 맥관병증(cerebral amyloid angiopathy, CAA)에서 아밀로이드는 두 항체 모두로 표지되었으며 세포내 아밀로이드에 대응할 수 있는 뉴런의 일부 염색 또한 검출되었다. 건강한 환자로부터의 대조군 뇌에서는 어떠한 표지도 볼 수 없었다. 포름산으로 전처리된 파라핀 색션 상의 플라크는 검출될 수 있었으나, 포름산 전처리 하지 않은 파라핀 색션 상 및 메탄올로 고정된 냉동색션 상에서는 어떠한 플라크도 표지되지 않았다. 인간 항체 B는 파라핀 색션 상의 플라크를 검출하지 않았으며 마우스 항체는 인간 뇌의 파라핀 또는 냉동색션 어느 것도 염색하지 않았다.

[0589] 약어(Abbreviation):

[0590] A = 결합 키메라 항체 AF (IgG4)

[0591] B = 비결합 키메라 항체 B (IgG4)

[0592] C = 결합 인간화된 항체 H4K1 (IgG4)

[0593] 마우스 = ACI-01-Ab-C2 마우스 항체 (IgG2b)

[0594] **실시에 12아밀로이드 섬유 상에서의 mC2의 기능성**

[0595] *12.1 A β 1-42 섬유의 입체형태의 변형 및 mC2 항체의 결합 후 해체의 개시*

[0596] 미리형성된 베타-아밀로이드(A β ₁₋₄₂) 섬유를 항체가 해체시킬 수 있는 메커니즘을 평가하기 위해, 이차 입체형태를 분석하는 U-¹³C 타이로신10(Tyrosine10) 및 발린12(Valine12)-표지된 A β 1-42 펩타이드의 고체-상태(solid-state) 핵 자기 공명(Nuclear Magnetic Resonance; NMR) 및 해체를 측정하는 티오플라빈-T(Th-T) 형광 분석의 헤드-투-헤드 비교(head-to-head comparison)가 수행되었다 (도 9A). 상기 mC2 항체는 미리형성된 A β 1-42 섬유의 35.4 %를 가용화시켰으며, 동시에 베타 시트로부터 랜덤 코일로의 이차 입체형태의 이동을 유도하였다. 랜덤 코일에 대한 베타 시트 입체형태의 개체의 감소는 약 35%이고, 따라서 형광 Th-T 분석를 이용하여 측정된 값과 매우 유사하다 (도 9B). 이들 데이터는, 상기 mC2 항체의 결합이, 신장된(elongated) 섬유의 보다 작은 단편으로의 쪼개짐에 영향을 미치는 베타 시트의 평행(parallel) 분자내 배열의 불안정화를 잠재적으로 야기하는 이차 구조의 전이를 개시함을 나타낸다.

[0597] *12.2mC2 항체의 입체형태-의존적 결합 친화도*

[0598] 항체-항원 결합 에너지의 일부가 항원의 입체형태의 에너지-의존적 변형을 위해 사용될 수 있음이 과학적 문헌에서 잘 알려져 있기 때문에(Blond 및 Goldberg, 1987), 전체 A β ₁₋₄₂ 단백질 및 더 작은, 아홉개의 아미노산 길이의, 항체의 에피토프를 포함하는 펩타이드에 대한 C2 항체의 결합 친화도의 비교 실험을 수행하였다 (도 10).

이 비교를 위해, 상기 인간화된 항체 C2의 친화도는 C2의 에피토프의 완전 아미노산 서열을 커버하는 비오틴화된 펩타이드 (Mimotopes에 의해 생산되고 ANAWA Trading SA로부터 구입) 및 비오틴화된 완전 A β ₁₋₄₂ 펩타이드 (Bachem)를 사용하는 ELISA에 의해 분석하였다. 이 분석은 제조사(Mimotopes)의 설명서에 따라 수행하였다. 도 10에서 증명된 바와 같이, 상기 항체는 완전한 A β ₁₋₄₂ 단백질에 대한 것보다 그의 특이적 에피토프를 포함하는 펩타이드(A β ₁₋₄₂서열의 아미노산 13-21)에 36.0% 더 높은 친화도로 결합한다. 따라서 이는 결합 친화도 에너지에서의 차이가 항체 상호작용을 위해 보다 접근가능한 위치에 항원을 제시하기 위해 아밀로이드 단백질의 이차 입체형태의 에너지-소비 전이를 위해 사용되었음을 제시한다. 이는 왜 분리된 서브유닛에 대한 항체의 친화도에 비해 본래의 것(전체 아밀로이드 단백질)에 대한 항체의 친화도가 더 낮은가에 대해 설명한다.

실시에 13아밀로이드 베타 1-42 펩타이드의 응집에 대한 항-아밀로이드 hC2의 효과

인간화된 항-인간 아밀로이드 베타 단일클론성 항체 hC2의 아밀로이드 베타(A β)의 항-응집 및 해체 효과를 매개하는 능력을 평가하기 위해 티오플라빈 T 분광형광 분석(thioflavin T spectrofluorescence assay)을 수행하였다.

13.1 응집의 억제 분석

A β 1-42 동결건조된 분말을 헥사플루오로이소프로판올(hexafluoroisopropanol, HFIP)로 1mM이 되도록 액상화하였다(reconstitute). 상기 펩타이드 용액을 실온에서 15분간 소니케이트하고, 밤새 교반하고, 실리코화 되지 않은 마이크로원심분리기 튜브에 분취하였다. 그 후 아르곤의 스트림 하에 HFIP를 증발시켰다. 결과물인 펩타이드 필름을 10분간 진공건조시키고 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

A β 1-42 응집의 항체-매개된 억제에 대해 분석하기 위해 hC2 항체를 PBS에 미리희석하고 이하의 성분을 함유한 분석 용액을 실리코화 되지 않은 인큐베이트 튜브에 조제하였다: 3.3 또는 0.33 μ M 미리희석한 항체, 10 μ M 티오플라빈 T, 33 μ M A β 1-42, 및 8.2% DMSO. 따라서 항체 대 A β 1-42의 최종 몰비는 1:10 내지 1:100이다. 적절한 대조군 용액을 조제하였다. 그 후 용액을 37℃에서 24시간 동안 인큐베이트하였으며, 분광형광(relative fluorescence units; RFU)은 Perkin-Elmer FluoroCount 분광형광계 상에서 검은 384-웰 플레이트(Perkin-Elmer) 내 여섯 개의 복제물(replicate)에서 읽었다. 그 후 분광형광을 측정하고 이하에 기재된 바와 같이 해체%를 계산하였다.

13.2 해체 분석

미리-응집된 A β 1-42의 항체-매개 해체를 분석하기 위해, 상기과 같이 준비된 저분자량 A β 1-42를 27% DMSO 및 1x PBS에서 110 μ M로서 제조하였다. 그 후 3.3 또는 0.33 μ M 미리희석한 항체, 및 10 μ M 티오플라빈 T를 첨가한 후 이 용액이 37℃에서 24시간 동안 응집하도록 하였다. 항체 대 A β 1-42의 몰비는 1:10 및 1:100이 되었다. 그 후 이 용액을 37℃에서 추가적 24시간 동안 인큐베이트하였다. 그 후 분광형광을 측정하고 이하에 기재된 바와 같이 해체%를 계산하였다.

13.3 계산

응집의 억제 또는 분해는 이하의 방정식에 따라 각각 평균 억제 또는 분해 % \pm 평균값의 표준 오차 (SEM) 로서 표현된다:

$$\text{억제 \%} = \frac{(\text{양성 대조군의 RFU} - \text{음성 대조군의 RFU}) - (\text{A}\beta\text{1-42를 가지는 샘플의 RFU} - \text{A}\beta\text{1-42가 없는 샘플의 RFU})}{(\text{양성 대조군의 RFU} - \text{음성 대조군의 RFU})} \times 100\%$$

13.4 결과

13.4.1 A β 1-42 응집의 억제

hC2 항체를 이용한 A β 1-42 응집의 억제를 표 1 및 도 18에 나타낸다. 항체 대 A β 1-42의 몰비 1:100에서 억제는 평균 30%이었지만 (2 독립적 실험), 반면 몰비 1:10에서 억제율은 80%였다 (2 독립적 실험; 표 1 참조).

표 1. 항체 대 Aβ 1-42의 몰비 1:100 및 1:10에서 Aβ 1-42 응집의 hC2-매개된 억제

항체	몰비 (항체 대 Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30.0 ± 4.1%	80.4 ± 6.9%

13.4.2 미리-응집된 Aβ 1-42의 해체

hC2 항체를 이용한 미리응집된 Aβ 1-42의 해체를 표 2 및 도 19에 나타낸다. 항체 대 Aβ 1-42의 몰비 1:100에서 해체는 평균 24%이었지만, 반면 몰비 1:10에서 해체는 32%였다 (3 독립적 실험; 표 2 참조).

표 2. 항체 대 Aβ 1-42의 몰비 1:100 및 1:10에서 미리응집된 Aβ 1-42의 hC2-매개된 해체

항체	몰비 (항체 대 Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23.9 ± 4.4%	31.9 ± 3.5%

티오플라빈 T 분석을 사용하여, 항-Aβ 인간화된 항체 hC2의 이기능적 특성, 즉 Aβ 1-42가 병원성 원시섬유성 (protofibrillar) 입체형태로의 응집을 억제하는 특성 및 또한 미리형성된 Aβ 1-42 원시섬유를 해체하는 특성이 증명될 수 있다. hC2는 항체 대 Aβ 1-42의 몰비 1:10에서 Aβ 1-42 응집을 80% 억제하였다. 미리응집된 Aβ 1-42의 원시섬유(protofibril)를 해체시키는 hC2의 능력은 1:10 몰비에서 32%인 것으로 나타났다.

실시예 14: 상이한 클래스의 아밀로이드 단백질에 대한 mC2의 입체형태-특이적 결합

상이한 단계의, 폴리머화된 아밀로이드 단백질, 모노머성, 폴리머성 가용성, 및 피브릴성 아밀로이드에 대한 mC2의 특이성을 평가하기 위해, 이들 상이한 단계의 폴리머성 베타-아밀로이드로 코팅된 ELISA를 수행하였다 (도 11). 모노머는 (Klein, 2002)에 공개된 변형된 방법에 따라 준비되었으며, 가용성 폴리머성 아밀로이드 베타는 (Barghorn 등, 2005)에 따라 준비되었으며, 반면 섬유는 Tris/HCl (pH 7.4)에 최종 농도 1 μg/μl로 녹인 아밀로이드(Bachem, Switzerland)를 37℃에서 5일간 인큐베이트한 후 이어지는 원심분리 단계(5분간 10,000 rpm)로 수행되었다. 그 후 아밀로이드 폴리머를 55 μg/ml의 최종 농도로 ELISA 플레이트 상에 코팅하였으며, 알칼리 포스파타아제가 표지된 항-마우스 IgG 단일클론성 항체(Jackson)를 사용하여 결합 친화도 ELISA를 수행하였다. 도 11에서 증명된 바와 같이 mC2 항체는 섬유에 대해서 보다 더 높은 친화도로 가용성 폴리머 아밀로이드 베타에 결합하고, 모노머에 대해서는 가장 낮은 결합 친화도로 결합한다. 이들 데이터는, 상기 항체의 결합은 아밀로이드 에피토프에 의해서 뿐만 아니라 상이한 아밀로이드 응집체의 입체형태에 의해 영향받을 수 있다.

실시예 15: 에이씨 이뮤너(AC Immune)의 단일클론성 항체 hC2의 에피토프 매핑

인간화된 단일클론성 항체 hC2의 에피토프 매핑은 3개의 상이한 펩타이드 라이브러리를 사용하는 ELISA에 의해 수행하였다. 한 라이브러리는 Aβ 1-42의 완전 아미노산(aa) 서열을 커버하는 총 33개의 비오틴화된 펩타이드 (Mimotopes에 의해 생산 및 ANAWA Trading SA로부터 구입)를 포함하고, 두번째 라이브러리는 상기 첫번째 펩타이드 라이브러리로부터 펩타이드 12 (Aβ의 aa12-20)를 사용하고 또한 서열 내 각 aa를 알라닌으로 치환하는 비오틴화된 펩타이드를 함유하며 (이하의 표 3 참조), 또한 세번째 라이브러리는 각각의 경우에서 마지막 아미노산을 알라닌으로 또는 이미 알라닌인 aa21에 있어서는 글리신으로 치환하는, 비오틴화된 펩타이드 13, 14, 또는 15 (Aβ의 aa13-21, 14-22 또는 15-23)를 함유한다 (이하의 표 4 참조). 비오틴화된 완전 Aβ 1-42 펩타이드는 양성 대조군으로 사용되었다 (Bachem). 에피토프 매핑은 제조사의(Mimotopes) 설명서에 따라 수행되었다. 간단히 말해, 스트렙타비딘 코팅된 플레이트 (NUNC)는 4℃에서 PBS에 녹인 0.1% BSA로 밤새 블로킹하였다. PBS-0.05% 트윈(Tween) 20으로 세척한 후, 플레이트는 PBS에 녹인 0.1% BSA, 0.1% 소듐 아자이드(Sodium Azide)에 최종 농도 10 μM로 희석된 상기 라이브러리로부터의 상이한 펩타이드로 RT에서 1시간 동안 코팅하였다. 세척 후, 플레이트는 PBS에 녹인 2% BSA, 0.1% 소듐 아자이드에 200 ng/ml로 희석된 hC2 항체 또는 Aβ 비결합 키메라 IgG4 항체와 RT에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. 플레이트는 다시 세척하였으며, 알칼리 포스파타아제 컨쥬게이트된 염소 항 인간 IgG와 RT에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. 최종 세척 후, 플레이트는 포스파타아제

기질 (pNPP)과 인큐베이트하고, ELISA 플레이트 리더를 사용하여 405 nm에서 리드(read)하였다.

[0623] 상기 인간화된 단일클론성 항체 hC2는 첫번째 펩타이드 라이브러리의 펩타이드 12, 13, 14, 15 및 16에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다. 이들 펩타이드는 Aβ 1-42의 aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 및 16-24를 각각 포함하며, 에피토프가 Aβ의 영역 12-24 내에 놓이는 것을 제시한다. 알라닌 치환을 갖는 두번째 라이브러리는 Aβ 12-20 (VHHQKLVEF)에의 결합에 대해 결정적인 aa를 측정하기 위해 사용하였다. hC2 항체의 결합은 아미노산 16, 17, 19 또는 20이 알라닌으로 치환되었을 때 완전히 상실되었으며, 이들 aa가 Aβ에의 항체의 결합에 절대적으로 결정적임을 지시한다. hC2 항체의 결합은 aa 15 및 18이 치환되었을 때 부분적으로 상실된다.

[0624] 상기 결합은 또한 aa 14가 알라닌으로 치환되었을 때 거의 완전히 상실되었고, aa 14 또한 결합에 매우 중요한 것임을 지시한다.

[0625] 마지막으로, 세번째 라이브러리는 aa 21, 22 또는 23이 에피토프에의 결합에 결정적인지 측정하기 위해 사용하였다. aa 15-23에의 항체의 결합은 aa 23이 알라닌으로 치환되었을 때 감소하였으며, aa 23이 결합에 또한 중요함을 지시한다. 상기 결합은 aa 21이 글리신으로 치환되었을 때 부분적으로 상실되었으며, aa 22가 알라닌으로 치환되었을 때 약간 상실되었다.

[0626] 실시예 16: hC2 항체에 의한 신경보호

[0627] 항체 hC2의 A베타 올리고머-유도된 분해(변성)로부터 뉴런을 보호하는 능력을 인 비트로 분석으로 평가하였다. 배아 일수 16.5-17.5(Embryonic day 16.5-17.5)의 마우스 겔질(cortical) 뉴런을 분리하고, 분해하여, N3-F12 배지에서 인 비트로 배양하였다. 세포를 총 9일간 배양하였으며, 3일째 및 A베타 올리고머, 또는 A베타 올리고머 플러스 항-A베타 항체 hC2를 첨가한 날에 영양 공급되었다. 5일 ("4일간의 A베타") 또는 6일 ("3일간의 A베타")째, 일부 세포의 웰(well)은 2 μM A베타 올리고머를 단독으로, 또는 2 μM A베타 올리고머 및 50 μg/mL 항-A베타 항체 hC2의 조합으로 처리하였다.

[0628] A베타 올리고머는 HFIP에 A베타 1-42 (rPeptide)를 용해시킴으로써 준비하였으며, 여기서 A베타 펩타이드는 1 mg/ml의 10 μl 분취물로 분주하고 그 후 흡 후드(fume hood) 내에서 30분간 증발시키고 펩타이드 필름은 사용할 때까지 -80℃에 보관하였다. 사용할 때, 상기 펩타이드 필름을 10 μl의 DMSO에 용해시킨 후, 78.6 μl의 HAMS F12에 용해시키고, A베타 펩타이드 용액을 4C에서 24-48 시간동안 인큐베이트하였다 (A베타의 최종 농도 25 μM).

[0629] 대조군 세포에 있어서, 5일째에 A베타-DMSO와 동일한 부피의 DMSO-F12를 단독으로 첨가하고, 세포를 어떠한 추가적 처리 없이 4일간 더 배양하였다. 9일째에, 모든 배양 조건으로부터의 뉴런을 고정하고 Tuj 1(항-베타-튜블린 항체)로 염색한 후, FITC로 표지된 이차 항체로 염색하여 미소관(microtubule)을 가시화시켰고, 따라서 일반적으로 신경 프로세스를 가시화하였다. 결과를 도 20에 나타낸다. 비처리된 마우스 배아 겔질 뉴런은 배양 9일 후 정상적인 형태(morphology)를 나타낸다 (도 20, 가장 왼쪽 패널). 3일간 세포의 A베타 올리고머로의 처리는 축삭(axon) 퇴행을 유발하고 축삭의 총 수의 감소를 야기하며 (도 20, 아래쪽 중간 패널), 이 효과는 4일간 처리에서 훨씬 더 두드러졌다(도 20, 위쪽 중간 패널). 반대로, A베타 올리고머와 항-A베타 항체 hC2의 조합으로 처리된 세포는 대조군 세포와 유사하게 보였다 (도 20, 위쪽 및 아래쪽 오른쪽 패널). 이들 결과는 항-A베타 항체 hC2가 A베타 올리고머-유도된 분해로부터 배아 마우스 겔질 뉴런을 보호할 수 있음을 나타낸다.

[0630] 표 1: 인간화된 C2 경쇄 프레임워크 영역 내에 마련된 변화 및 위치

위치 경쇄	45	87	50	53
마우스 C2V _K	K	F	K	N
인간화된 C2HuV _K 1	Q	Y	K	N
인간화된 C2HuV _K 2	Q	F	K	N
인간화된 C2HuV _K 3	K	Y	K	N
인간화된 C2HuV _K 4	K	F	K	N
인간 생식 계열 dpk15	Q	Y	L	N
마우스 C2V _K -R			R	
마우스 C2V _K -S				S

[0631]

[0632] 표 2: 인간화된 C2 중쇄 프레임워크 영역 내에 마련된 변화 및 위치

위치 중쇄	47	94
마우스 C2VHAF	L	S
인간화된 C2HuVHAF1	W	R
인간화된 C2HuVHAF2	W	S
인간화된 C2HuVHAF3	L	R
인간화된 C2HuVHAF4	L	S
인간 생식 계열 DP-54	W	R

[0633]

[0634] 인간화된 C2HuV_K1, C2HuV_K2, C2HuV_K3, C2HuV_K4의 경쇄 및 C2HuVHAF4 및 C2HuVHAF2의 중쇄를 갖는 총 8개의 상이한 항체가 구축되었다.

[0635] 표 3. 두번째 라이브러리에 사용된 펩타이드의 요약. 결합에 중요한 aa는 이탤릭체 및 밑줄로 마크되며, 결합에 절대적으로 결정적인 aa는 이탤릭체 및 볼드체로 마크된다.

p12-20 V H H Q K L V F F
A12 A H H Q K L V F F
A13 V A H Q K L V F F
A14 V H A Q K L V F F
A15 V H H A K L V F F
A16 V H H Q A L V F F
A17 V H H Q K A V F F
A18 V H H Q K L A F F
A19 V H H Q K L V A F
A20 V H H Q K L V F A
aa 번호. 12 13 *14* *15* *16* *17* *18* *19* *20*

[0636]

[0637] 표 2. 세번째 라이브러리에 사용된 펩타이드의 요약. 결합에 중요한 aa는 이탤릭체 및 밑줄로 마크되며, 결합에 절대적으로 결정적인 aa는 이탤릭체 및 볼드체로 마크된다.

p13-21 H H Q K L V F F A
p13-21 G21 H H Q K L V F F **G**
p14-22 H Q K L V F F A E
p14-22 A22 H Q K L V F F A **A**
p15-23 Q K L V F F A E D
p15-23 A23 Q K L V F F A E **A**
aa 번호. 13 *14* *15* *16* *17* *18* *19* *20* 21 22 *23*

[0638]

[0639]

참조 리스트

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. J Neurochem 95:834-847.

Blond and Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84 | no. 5 | 1147-1151

Cox JPL, Tomlinson IM and Winter G. Eur. J. Immunol. 1994; **24**: 827-836. A directory of human germ-line V κ segments reveals a strong bias in their usage.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. Neurochem Int 41(5):345-352.

Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. and Tedder TF. Immunogenetics 2000; **51**: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution

Mulligan RC and Berg P. Science 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, Nature 1988; **332**: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.

Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I and

[0640]

Zachau HG. Eur. J. Immunol. 1999; **29**: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome.

Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB and Winter G. J. Mol. Biol. 1992; **227**: 776-798. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops

[0641]

부호의 설명

[0642]

[서열의 간단한 설명]

서열 식별 번호: 1 C2 HuVH AF 4 인간화된 중쇄 가변 영역 (CDR1)의 아미노산 서열

서열 식별 번호: 2 C2 HuVH AF 4 인간화된 중쇄 가변 영역 (CDR2)의 아미노산 서열

서열 식별 번호: 3 C2 HuVH AF 4 인간화된 중쇄 가변 영역 (CDR3)의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 4 C2 HuVK 1 인간화된 경쇄 가변 영역 (CDR1)의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 5 C2 HuVK 1 인간화된 경쇄 가변 영역 (CDR2)의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 6 C2 HuVK 1 인간화된 경쇄 가변 영역 (CDR3)의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 7 A β 에피토프 영역 2의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 8 A β 에피토프 영역 1의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 9 변형된 A β 에피토프 영역 2의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 10 변형된 A β 에피토프 영역 1의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 11 에피토프 영역의 아미노산 서열 (변형, 완전)
 서열 식별 번호: 12 C2 HuVK 1 인간화된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 13 C2 인간화된 경쇄의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 14 인간화된 C2 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 15 C2 HuVH AF 4 인간화된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 16 C2 인간화된 중쇄의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 17 IG 감마-4 사슬 C-영역의 아미노산 서열 - 변형
 서열 식별 번호: 18 C2 HuVH AF 4 인간화된 중쇄 가변 영역의 CDR2의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 19 C2 HuVH AF 4 인간화된 중쇄 가변 영역의 CDR3의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 20 C2 HuVK 1 인간화된 경쇄 가변 영역의 CDR1의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 21 C2 HuVK 1 인간화된 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 22 C2 인간화된 경쇄의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 23 C2 인간화된 경쇄 불변 영역의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 24 C2 HuVH AF 4 인간화된 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 25 C2 인간화된 중쇄의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 26 C2 인간화된 중쇄 불변 영역의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 27 마우스 C2 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 28 마우스 C2 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열
 서열 식별 번호: 29 마우스 C2 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 30 마우스 C2 경쇄의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 31 마우스 C2 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
 서열 식별 번호: 32 마우스 C2 중쇄의 뉴클레오티드 서열

수탁번호

[0643]

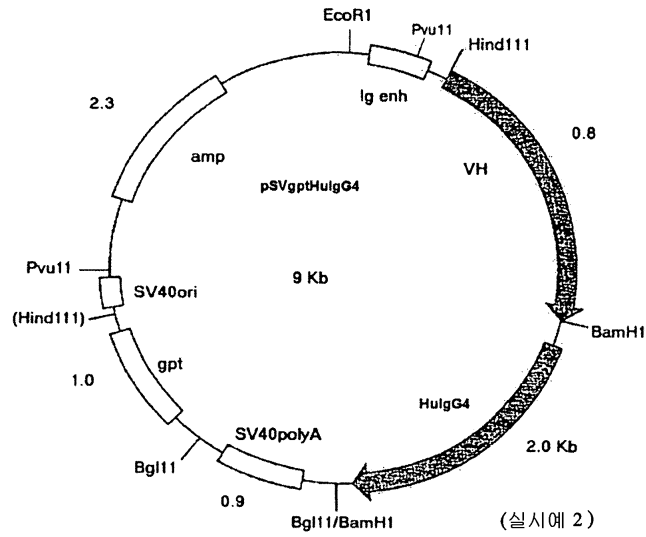
기탁기관명 : 데에스엠제-도이체잠룡폰미크로오르가니즈멘운트젤쿨투렌게엠베하(DSMZ-DEUTSCHESAMMLUNGVONMIKROORGANISMENUNDZELLKULTURENGmbH)

수탁번호 : DSMDSMACC2750

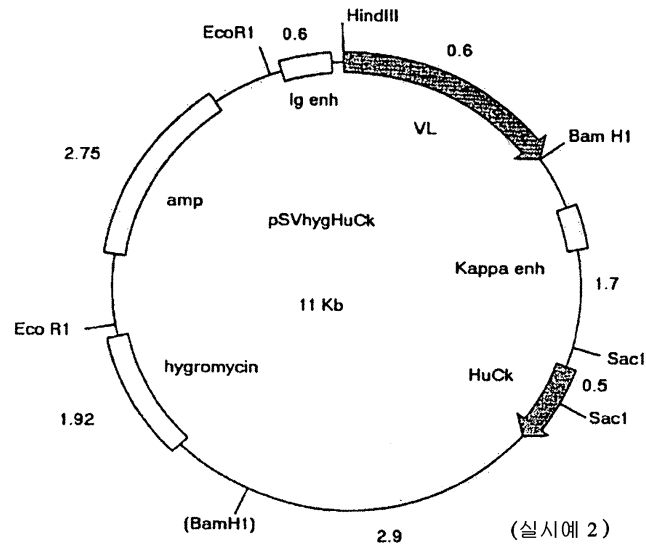
수탁일자 : 20051201

도면

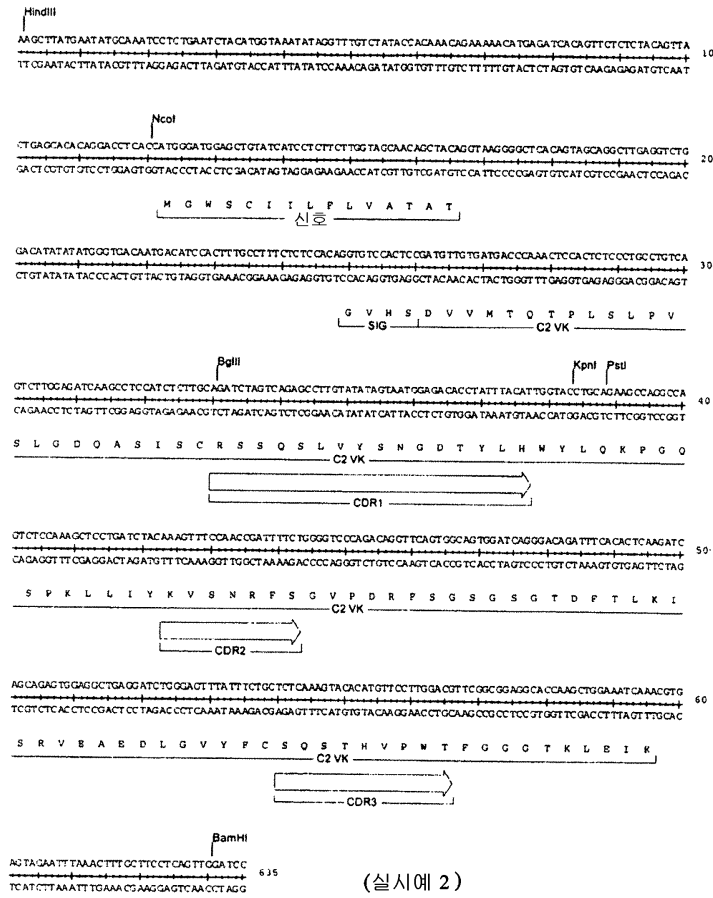
도면1



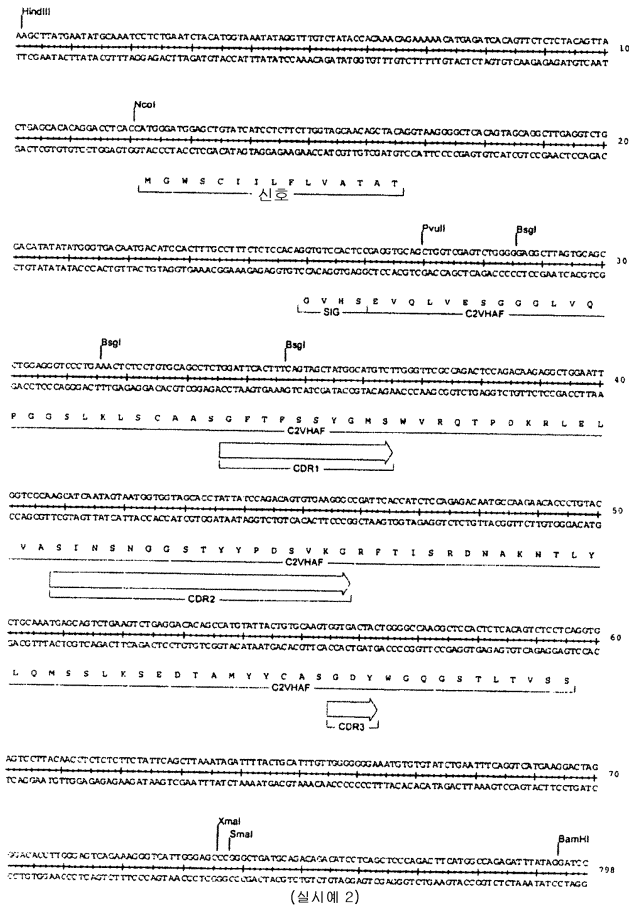
도면2



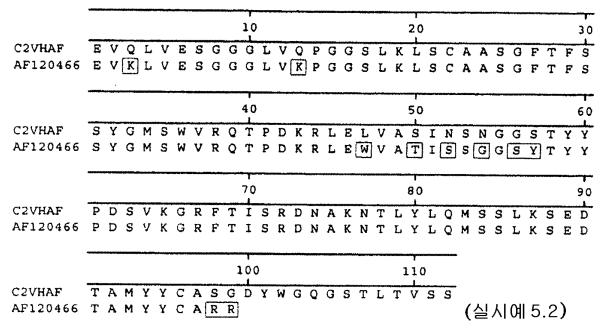
도면3



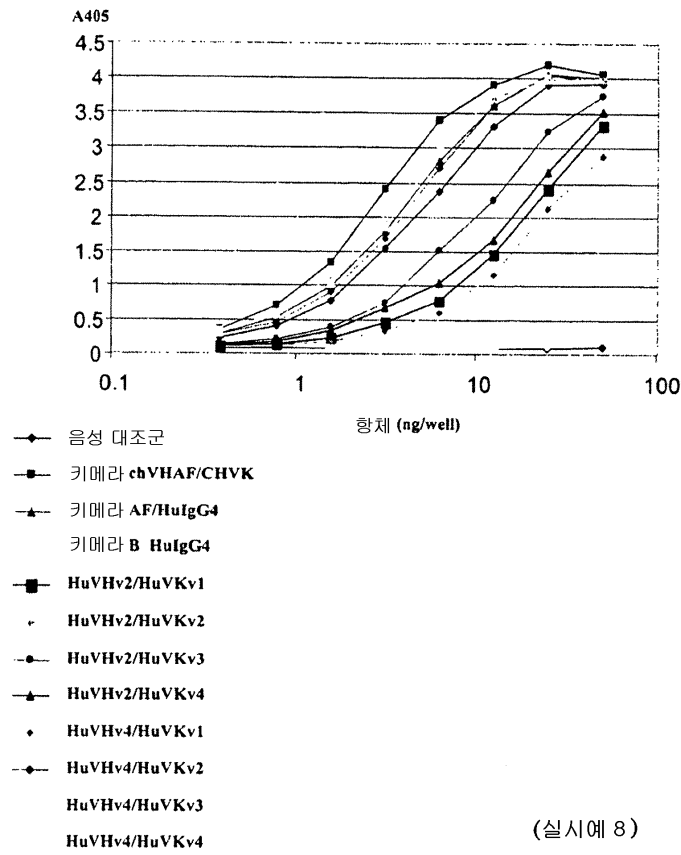
도면4



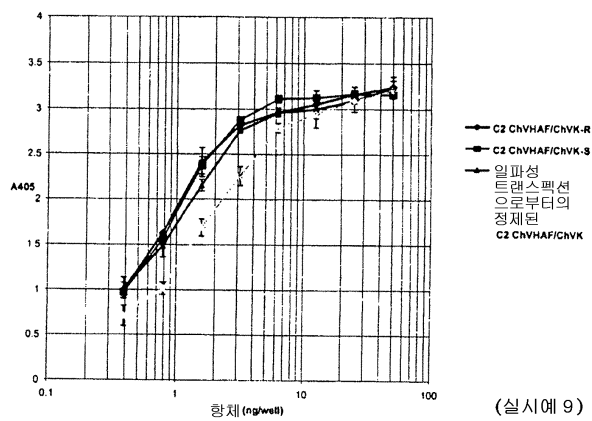
도면5



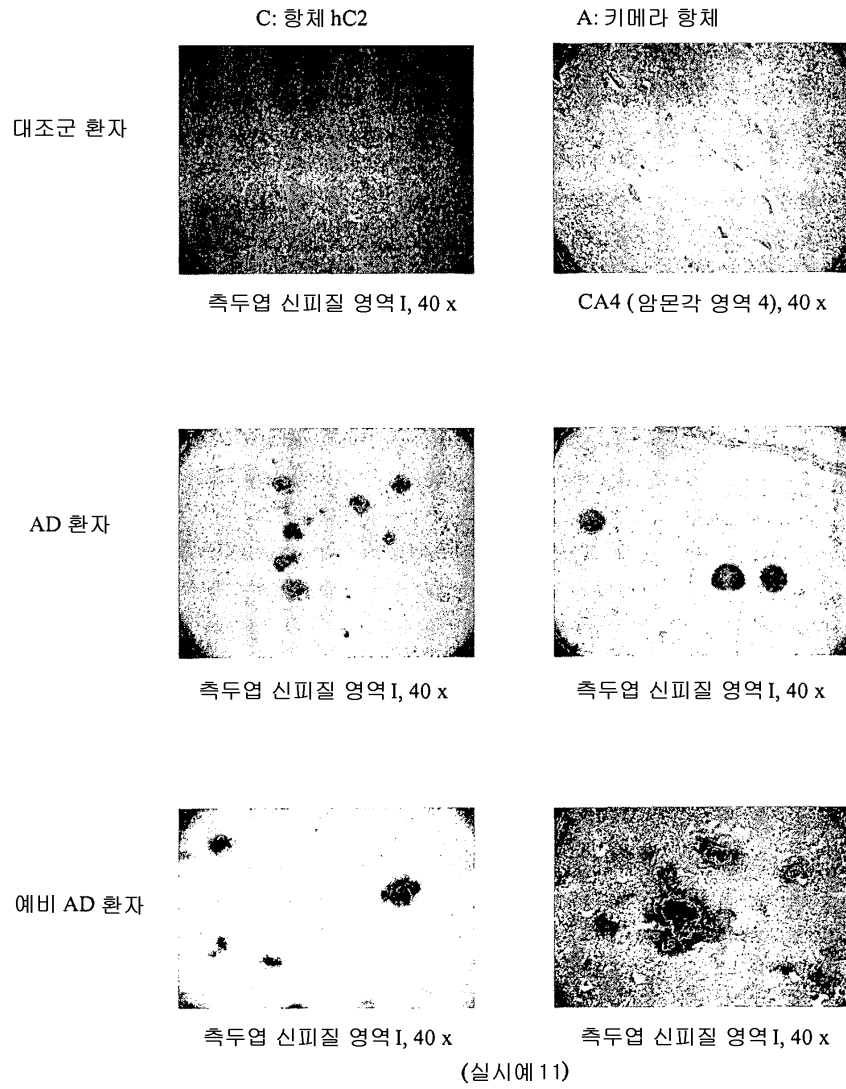
도면6



도면7

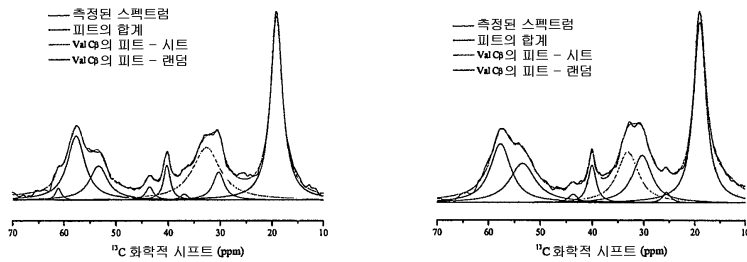


도면8



도면9

A)



B)

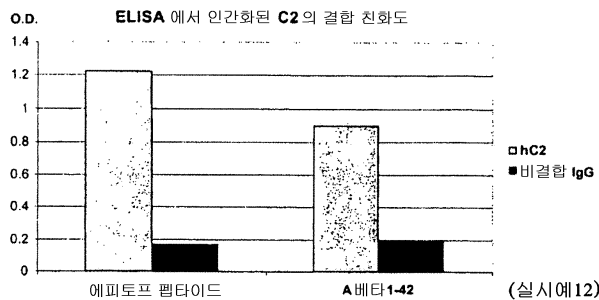
공명	PBS			마우스 C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	적분 강도 %	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	적분 강도 %
Val C β - 시트	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
Val C β - 랜덤	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

A) PBS (왼쪽; 대조군으로서 사용됨) 또는 ACL-7-C2 (오른쪽)과 24시간 동안 인큐베이션 후 동결 건조된 U-¹³C Tyr10 및 Val12 표지된 아밀로이드 β 1-42 섬유에 대한 ¹³C CPMAS 스펙트럼 및 피트의 비교. Val 12 C β 의 두 배좌에 대한 피트는 녹색 (시트) 및 청색 (랜덤 코일)으로 나타낸다. c33 ppm에서의 피크는 섬유의 베타 시트 배좌에 상응하고 한편 30 ppm에서의 피크는 랜덤 코일 배좌의 결과이다.

B): Val 12 C β 의 두 배좌에 대해 피트된 파라미터의 비교. 상기 두 배좌에 대해 피트된 화학적 시프트는 매우 유사하지만 적분 강도는 매우 상이하고, 이는 원래의 베타 시트 배좌의 대략 35% (1-(53.5/81.7)) 감소를 반영한다. 이는 본 발명자들이 형광 측정으로부터 수득한 값과 매우 밀접하게 일치한다.

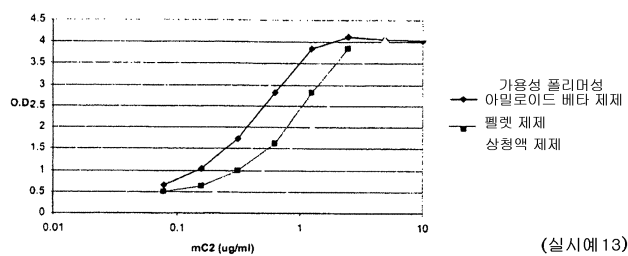
(실시예12)

도면10



(실시예12)

도면11

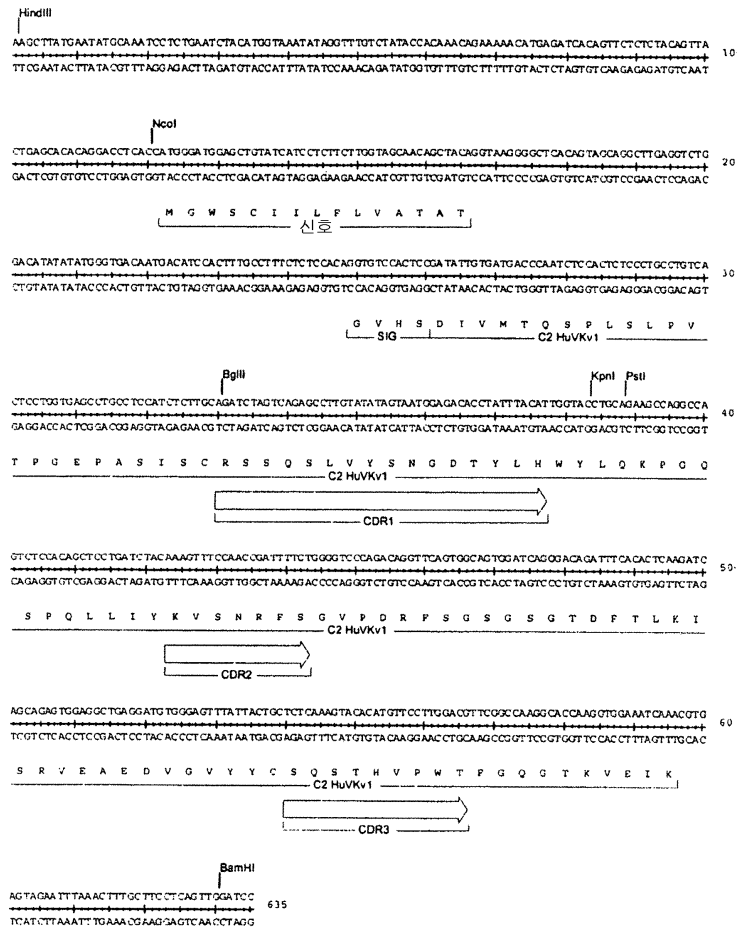


(실시예 13)

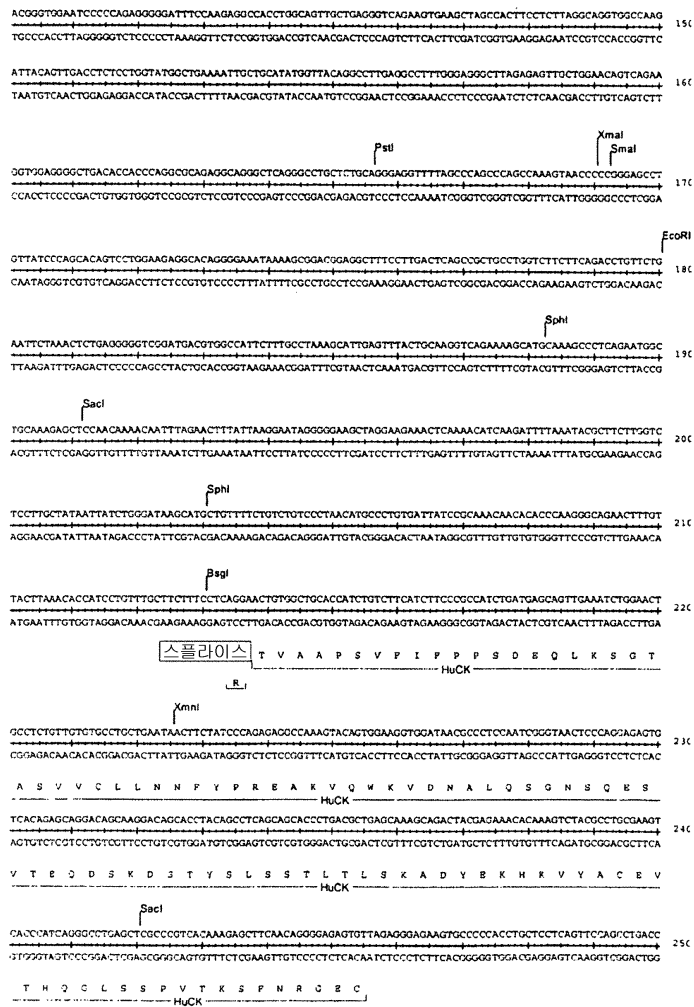
도면13

- 73 -

도면14



도면15b



- 77 -

도면15d

TTGAGCCCTGAATGAGTCTGCTTCCAGGCTCAAGGTGCTCAACAAAACACAGGCTGCTATTTCTGCGCATCTGCGCCTTTTGGCTAGCTAGGA 40C
AACTCGGGACTTACTCGACGGAGGTCCGAGTTCCACGAGTGTGTTTTGTTGTCGGACGATAAAGGACCGTAGACACGGGACAAACCGATCGATCCT

GCACACATACATAGAAATTAATGAAACGACCTTCAGCAAGGGGACAGAGGACAGAAATTAACCTTGGCCACACACTGGAAACCCATGTATGAACACTCA 41C
CGTGATATGTATCTTTAATTACTTTGCTCGAAGTGTTCCTGCTCTGCTTAATTGGAACGGGTCTGTGACCTTTGGGTACATACTTGTGAGT

CATGTTTGGGAAGGGGAGGGACATGTAAATGAGGACTCTGCTCATTTCTATGGGGCACTTGGCCCTGCCCCCTCTGACTACTCATCCATCCAACAC 42C
GTACAAACCTTCCCTCCCTGCTGATCTTACTCCTGAGAGGAGTAAGATACCCCTGAGACCGGGAGAGAGTGGATGAGTAGGTAGGTTGTG

XmnI
ACCTTCTAAGTACCTCTCTGCTGCTACACTCGAAGGGTTGAGGAGTAACCTAACACAGCATCCCTCCCTCAATGACTGACCATCCCTTTGCTCTGC 43C
TGGAAAGATTGATGGAGAGACGGATGTGAGACTTCCCAAGTCTCATTTGATTTGTGCTAGGGAAGGAGTTTACTGACTGTAGGGAACAGGACG

TTTGTGTTTCTTTCCAGTCACTACTGGAAAGTGGGAAGGACAGTCACTGAAAACTACATAAGGAAGCACCTTGCCCTTTCTGCTCTTGAGAAATGTTG 44C
AAACAAAAAGAAAGTCACTCATGACCTTCAACCCCTCTGTGAGTACTTTTGTATGTTTCTTGTGGAACGGGAAGACGGGAAGTCTTACAAAC

ATGAGTATCAAACTTTTCAAACTTTGAGGTTTGAAGTGGGGTGAAGTCACTGATGATGCTTCCAAATGACATGAACCTTGCTCACTCATCCCTGGGGGCC 45C
TACTCATAGTTTGAAGATTGAAACTCCAAACTCATCCCACTCTGAGTCATTACAGGGAAGTTACTGTACTTGAACGAGTGAAGGAGCCCTGG

EcoRI
AAATTGAACAACTAAAGGCAGGCATAATCCAGTTATGAATCAAACCTTCTTCTCAGAAGATAACACTCTCAAGGGAAACCCACCATAACTAAGCAAG 46C
TTTAAGTGTGTAGTTTCCCTCCGTATAGTCAATCTTAAGTTGGAAGAGAGTCTTCTATTGTGAGACTTCCCTTTGGGTGGGTATTGGAATTCGTTTC

PstI
TGAGACAGGTCCTGCAAGTGGAAATGTGTCTTCAAAAAGGTATGCTCAACTCTTGCTCTTGGTACTCAAAATGGGTACATAAATGTGACTTTATT 47C
ACCTTCTGTCAGACGTCCACCTTAAACAGGAAGTTTTCATACAGAGTTGAGGAACGAGAACCATGATTTACCCAGTGATTTACACTGAAATTA

TGAAATAGGCTCTTTCAGAGGTAATCAAGTCAAAATAGCTCATCTGAAATGTTTGTGAGGATGCGGTGAAATGGATCATATATTGCTGGTG 48C
ACCTTTATCCGAGAAAGCTCTCATTAGTTCAGTTTAAATCCAGTATGACTTTACAAAGACTCCCTACGGCACTTTTACCTAGTAAGTATAACGACCAAC

XbaI
GGAATATAAAGGTATAGCTACTCTAGAAAAAGTTGTGAGTTTCTTGA AAAACTAAACAAAGACACTACCATATGACCCAGGAATTTACTCCTTG 49C
CCTTATATTTTCCCATATCGATGAGATCTTTTATCAACAGTCAAGAACTTTTGTATTTTCTGTGGATGTATACTGGGTCTTAAATGAGGAAC

GGAATTTACCCCAAGAAATAAAACTTATGTCACACAGAACCCATACATGATTTGTCACAGCAGCTTTATTTGTTGTAGCCAAAGCTAGAAAGGCCA 50C
CCTTAAATGGGGCTCTTTATTTTGAATACAGGTGTGCTTGGGTATGTACTAACAGGTGTCGTGAAATAAACACATCGGTTTCCATCTTTCTCGGT

ACCCATCCCTCAATAGGCACTAGCTCAACAAATGTAATATATCCATGCCATAGAATGCTATGAGGCAATAAAAAGGAACGAAGTGTTCATACAGAGAA 51C
TGGGTAGGGAGTTATCGUATGATCGGATGTTTAACTATATAGGTACGGTATCTTAGGATACTCGGTATTTTCTGCTTCACAGTATGTCTCTT

CTGGAGTGAATCTCAAGGACTTTCTACTGAGTGA AAAAGCCAACTCGAAAGGTCACATACCATGTGATTCCTTTTATGTAACATTTTGAAGTGAACA 52C
GACCTCACTAAGACTCTCTGAAAGATGACTCACTTTTTCGGTTAGACTTCCCAAGTGTATGGTACACTAAGGAAATACATTTGTAACAACTTCACTGTT

도면15e

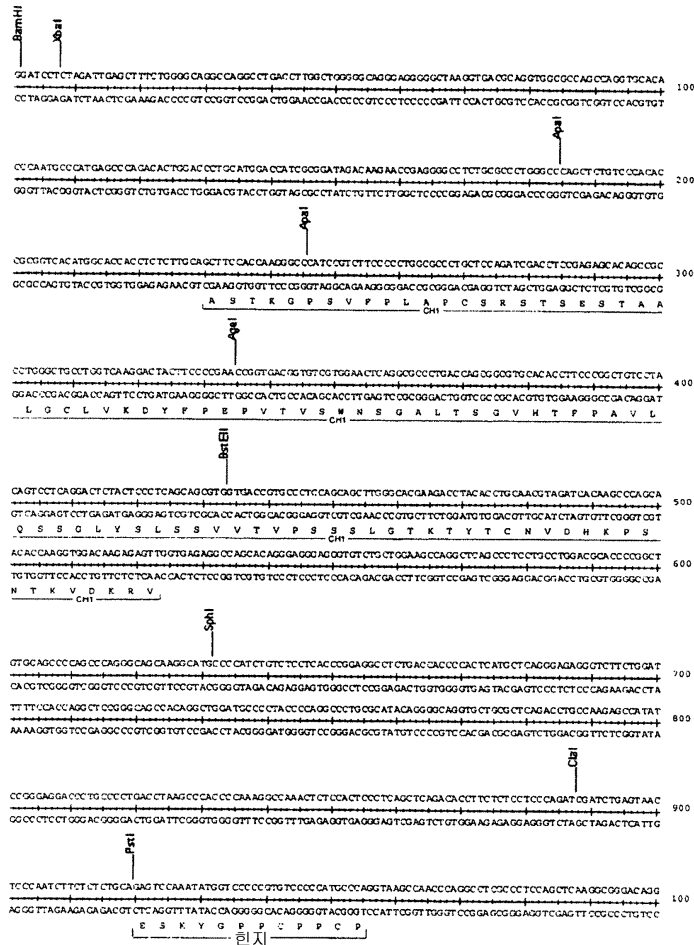
XmnI BglII
AATTATAGGATAGAGAACAGATTCTGTTTCCAGGGTTAGGGTGGTGGAGAAAGAGTAGGGGAAACTATAAGGGAGATCTTTGTGATCATGGGA 53C
TTAATATCCCTATCTCTTGTCTAAGACCAAGGTCCTCAATCCACACCTCTTCTCTATCCGCTTGTATTTCCCTCTAGAAACATAGTACCTT

XbaI
TAAATCTGTATCTTGTTCAGTGTAGTTGCAAGCATCTAGACATGTGATAAATGACATAGAACTGTACACACTTATTTTATCAATGTCAAAATTTCTG 54C
ATTTAGACATAGAACTAACGTCAACGTCCGTAGATCTGTACACTATTTTACTGTATCTTGACATGTGTGAATAAATAGTTACAGTTTAAAGAAC

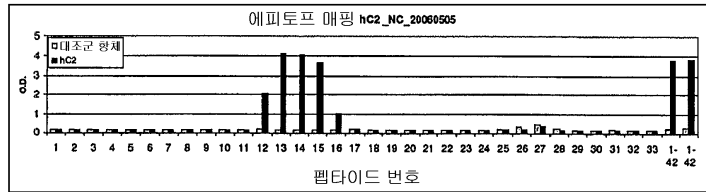
BglI
GTTTAAATATGTAATTAATTAAGTAAAGTAACCAACAGGAGAACTGGGTGAGGAGACATCAGACCTCTGTGCTTTATATCTGTCTTTGCTACT 55C
CAAAATTAGATACACATTAAATGCAATTTCTCAATGCTGCTCTTTGACCAAGTCTGTAGTCTGAGACACGAAATATAGGACAGAAACGATGA

TTCTGTGAATCTATAATTAATTTCCAAATAATTTTAAACTTTTATATGCTGGATGG 5541
AAGACACTTAGATATTAATAAGGTTTATTAATAAAATTTGAAAAAAATACGACCTAGC

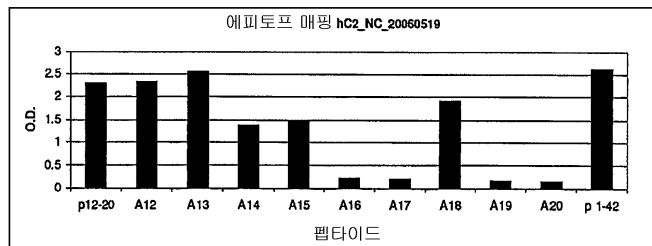
도면16a



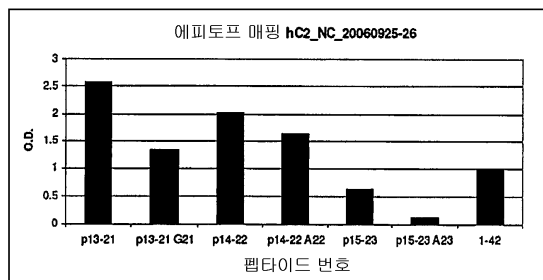
도면17



도 1. hC2는 A β 1-42 펩타이드 라이브러리의 펩타이드 12, 13, 14, 15 및 16에 결합한다. A β 1-42의 오버래핑 펩타이드에 대한 hC2의 결합은 ELISA에 의해 분석하였다. 전체 A β 1-42에 대한 결합 및 비결합 키메라 항체 (대조군 항체)의 결합은 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다. 펩타이드 번호는 펩타이드가 시작되는 A β 1-42 서열 내 아미노산에 상응한다. 결과는 OD로서 표현한다.

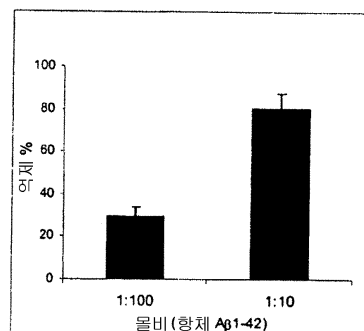


도 2. A β 12-20에 대한 hC2결합은 aa 16,17,19 및 20에 완전히 의존적이고 또한 aa 14,15 및 18에 부분적으로 의존적이다. A β 12-20 및 알라닌 치환된 A β 12-20에 대한 hC2결합은 ELISA에 의해 분석하였다. 전체 A β 1-42에 대한 결합은 양성 대조군으로 사용하였다. 번호는 알라닌에 의해 치환된 aa에 상응한다. 결과는 OD로서 표현한다.

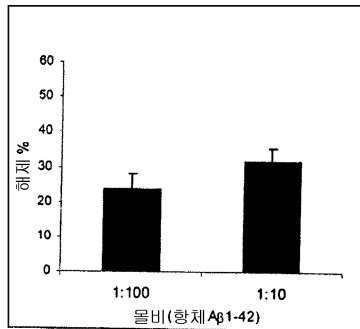


도 3. A β 15-23에 대한 hC2결합은 aa 23에 의존적이고 또한 aa 21에 부분적으로 의존적이며 또한 aa 22에 약간 의존적이다. A β 13-21, 14-22 또는 15-23 및 13-21G21, 14-22A22 또는 15-23A23에 대한 hC2의 결합은 ELISA에 의해 분석하였다. 전체 A β 1-42에 대한 결합은 양성 대조군으로 사용하였다. 결과는 OD로서 표현한다.

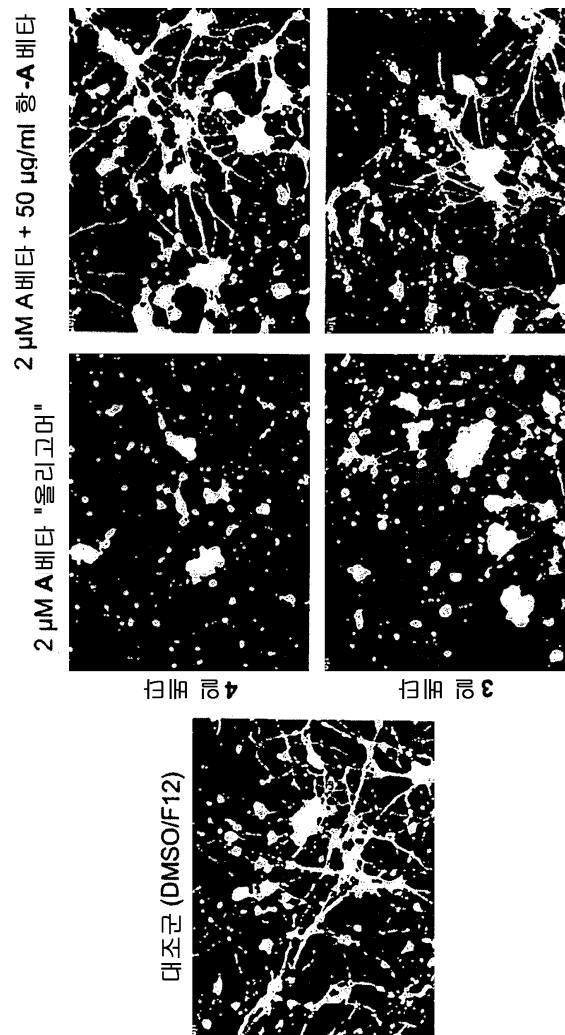
도면18



도면19



도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> AC IMMUNE S.A.

<120> HUMANIZED ANTIBODY IGG1

<130> 089667-0133 (12593-004-228)

<140> PCT/US08/007318

<141> 2008-06-12

<150> 60/943,509

<151> 2007-06-12

<160> 83

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 3

Gly Asp Tyr

1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His

1

5

10

15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1

5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

His Gln Lys Leu Val

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Val" or "Leu" or "norleucine" or "Met" or "Phe" or "Ile"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Val" or "Leu" or "Ser" or "Ile"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(6)

<223> /replace="Asp"

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the
annotations for said positions"

<400> 9

Ala Phe Phe Ala Glu Glu

1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /replace="Asn" or "Gln" or "Lys" or "Arg"
 <220><221> VARIANT
 <222> (2).. (2)
 <223> /replace="Gln"
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(2)
 <223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"
 <220><221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Val" or "Leu" or "norleucine" or "Met" or "Phe" or "Ile"
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotation for said position"
 <400> 10
 His Asn Lys Leu Ala
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT

 <213> Homo sapiens
 <220><221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /replace="Asn" or "Gln"
 <220><221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Leu" or "Ile"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Val"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Asp"

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Glu"

<400> 11

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5 10

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

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

165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 14

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

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

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

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 16

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90				95							
Ala	Ser	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
100				105				110							
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
115				120				125							
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
130				135				140							
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
145				150				155				160			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
165				170				175							
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
180				185				190							
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
195				200				205							
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
210				215				220							
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
225				230				235				240			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
245				250				255							
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
260				265				270							
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
275				280				285							
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
290				295				300							
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu

305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435
 <210> 17
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly

325

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 18

agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 19

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 19

ggtgactac 9

<210> 20

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 20

agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

<210> 21

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 21

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctgtgtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gccaaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 22

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 22

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctggtga gcctgcctcc 60
atctcttgca gatctagta gagccttgta tatagtaag gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gccaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgacgtctgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 23

aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgcct ccaatcggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 24

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 24

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggttag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca 336

<210> 25

<211> 1317

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 25

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggttag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc 360

ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgcctt gggctgcctg 420
 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
 ggcggtgcaca ccttccgggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600
 cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gattccaaat atgttccccc gtgtcccca 660
 tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttccccc aaaaccaag 720
 gacactctca tgaictcccg gaccctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag 780
 gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 840

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 900
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaaggcctc 960
 ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1020
 tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtcttc gattccgacg gctccttctt cctctacagc 1200
 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
 catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317

<210> 26

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 26

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag 60
 agcacagccg ccttgggtcg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
 aaatatggtc ccccggtgcc cccatgcccc gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc 360

tctctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggctgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720

aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggctttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt cctcgattcc 840

gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val

35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

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

85 90 95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 29

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

gatgttgatga tgacccaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtc gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 30

<211> 417

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 30

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgtcttc cagcagtgat 60
gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttcagat ctagtacagag ccttgatat agtaatggag acacctatctt acattggatc 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
gggggtccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 31

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 31

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atgggtgtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
tactggggcc aaggtccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 32

<211

> 408

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 32

atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaaggtgt ccaatgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
gacaagaggc tggaattggg cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac 360
tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220><221> VARIANT

```

<222> (1)..(1)
<223> /replace="Asn" or "Gln " or "Lys" or "Arg"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Gln"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Val" or "Leu" or "norleucine" or "Met" or "Phe" or "Ile"

<220><221> misc_feature
<222> (5) . . (5)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Val" or "Leu" or "Ser" or "Ile"
<220><221> VARIANT
<222> (9)..(10)
<223> /replace="Asp"
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(10)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<
400> 33
His Asn Lys Leu Ala Phe Phe Ala Glu Glu
1           5           10
<210> 34
<211> 10
<212> PRT

```

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Gln "

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Val" or "Leu" or "norleucine" or "Met" or "Phe" or "Ile"

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Val" or "Leu" or "Ser" or "Ile"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(10)

<223> /replace="Asp"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(10)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 34

His Asn Lys Leu Ala Phe Phe Ala Glu Glu

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

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

```

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
<220><221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Asn" or "Gln " or "Lys" or "Arg"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Gln"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Ala" or "Leu" or "Met" or "Phe" or "norleucine" or "Ile"
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Val" or "Leu" or "Ile"
<220><221> VARIANT
<222> (9)..(10)
<223> /replace="Asp"
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(10)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 35
His Asn Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Glu

```


1 5 10

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 36

Phe Phe Ala Glu

1

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 37

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 38

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> /replace="Asn"
 <220><221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Leu" or "Ile"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace="Val"
 <220><221> VARIANT
 <222> (9)..(10)
 <223> /replace="Asp"
 <400> 39
 His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Glu
 1 5 10
 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 40
 Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5
 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 41
 Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 42
 Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 43
 Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 1 5

 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 44
 Ala His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 45

Val Ala His Gln Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 46

Val His Ala Gln Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 47

Val His His Ala Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 48

Val His His Gln Ala Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Val His His Gln Lys Ala Val Phe Phe

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 50

Val His His Gln Lys Leu Ala Phe Phe

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Val His His Gln Lys Leu Val Ala Phe

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 52

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Ala

1 5

<210> 53

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 53
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 1 5
 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 54
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Gly
 1 5
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 55
 His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
 1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"
 <400> 56
 His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Ala

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 57

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic peptide"

<400> 58

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Ala

1 5

<210> 59

<211> 635

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<220>

<221> CDS

<222> (122)...(166)

<220>

<221> CDS

<222> (249)...(596)

<400> 59

aagcttatga atagcaaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca 60

caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctcac 120

c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 166

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

1 5 10 15

ggtaaggggc tcacagtagc aggcttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat 226

ccactttgcc tttctctcca ca ggt gtc cac tcc gat gtt gtg atg acc caa 278

Gly Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln

20 25

act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 326

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

30 35 40

tgc aga tct agt cag agc ctt gta tat agt aat gga gac acc tat tta 374

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu

45 50 55

cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac 422

His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

60 65 70

aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt 470

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

75 80 85

gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 518

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

90 95 100 105

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt cct tgg acg 566

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

110 115 120

ttc ggc gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgtgagtaga atttaaactt 616

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125 130

tgcttcctca gttggatcc 635

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 60

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

1 5 10 15

<210> 61

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 61

Gly Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65 70 75 80
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe

85 90 95

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

100 105 110

Leu Glu Ile Lys

115

<210> 62

<211> 798

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic polynucleotide

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

$\langle 222 \rangle$ (122) ... (166)

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (249)...(596)

<400> 62

aagcttatga atatgcaaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca 60

caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctcac 120

c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 166

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

1 5 10 15

ggtaagggggc tcacagtagc aggcttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat 226

ccactttgcc tttctctcca ca ggt gtc cac tcc gag gtg cag ctg gtc gag 278

Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

20 25

tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt 326

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

30 35 40

gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat ggc atg tct tgg gtt cgc 374

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg

45 50 55

cag act cca gac aag agg ctg gaa ttg gtc gca agc atc aat agt aat 422

Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Ser Ile Asn Ser Asn

60 65 70

ggt ggt agc acc tat tat cca gac agt gtg aag ggc cga ttc acc atc 470

Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile

75 80 85

tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac ctg caa atg agc agt ctg 518

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu

90 95 100 105

aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt gca agt ggt gac tac tgg 566

Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp

110 115 120

ggc caa ggc tcc act ctc aca gtc tcc tca ggtgagtcct tacaacctct 616

Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser

125 130

ctcttctatt cagcttaaat agattttact gcattttgttg ggggggaaat gtgtgtatct 676

gaatttcagg tcatgaagga ctaggacac cttgggagtc agaaagggtc attgggagcc 736

cgggctgatg cagacagaca tctcagctc ccagacttca tggccagaga tttataggat 796

cc 798

<210> 63

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 63

Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg

35 40 45

Leu Glu Leu Val Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala

85 90 95

Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 64

<211> 99

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 64

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

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

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 65

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

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

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

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 66

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 67

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 67

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

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

85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 68

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Leu Gln Thr Pro
 100

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10
 <210> 70
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 70
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 <210> 71
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic polypeptide
 <400> 71
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

100 105 110

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 72

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

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

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 74

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

<210> 75

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 1 5 10 15
 Thr Val Ser Ser
 20

<210> 76

<211> 635

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<220><221> CDS

<222> (122)...(166)

<220><221> CDS

<222> (249)...(596)

<400> 76

aagcttatga atatgcaaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca 60
 caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctcac 120
 c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 166
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15

ggtaaggggc tcacagtagc aggcttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat 226

ccactttgcc tttctctcca ca ggt gtc cac tcc gat att gtg atg acc caa 278

Gly Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln

20

25

tct cca ctc tcc ctg cct gtc act cct ggt gag cct gcc tcc atc tct 326

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

30

35

40

tgc aga tct agt cag agc ctt gta tat agt aat gga gac acc tat tta 374

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu

45

50

55

cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca cag ctc ctg atc tac 422

His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr

60

65

70

aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt 470

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

75

80

85

gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 518

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

90

95

100

105

gat gtg gga gtt tat tac tgc tct caa agt aca cat gtt cct tgg acg 566

Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

110

115

120

ttc ggc caa ggc acc aag gtg gaa atc aaa cgtgagtaga atttaaactt 616

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

125

130

tgcttcctca gttggatcc

635

<210> 77

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 77

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

1 5 10 15

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65 70 75 80

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

100 105 110

Val Glu Ile Lys

115

<210> 78

<211> 5561

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<220><221> CDS

<222> (2138)...(2455)

<400> 78

ggatcctggc agagtctcac agatgcttct gagacaacat ttgctttcaa aaaatgaacc 60
 acacacatcc taaagatctc agccacttcc catgtttcat tttatgttac agcaaacatc 120
 acaacaatca ttctacaga tcaccactgc atgtgatcaa taaaatagtt tttgcaacaa 180
 tggtaacttat gataatcatc ttttattgtt tacaataact gctttacaat agttattcgg 240

 ttgcaactgtt catattagat ttccaattag ctcaacttagg aacataagtc cctcgaacag 300
 ctcaactcatc tttttcatc ctgtttctat cccctacatc tctttccttt gcagacgact 360
 atctcctaca ctgaacacagg aaagctagct ttttttttc agtgctatct aattatttca 420
 atatcctctc atcaaatgta tttaaataac aaaagctcaa ccaaaaagaa agaaatatgt 480
 aattctttca gagtaaaaat cacacccatg acctggccac tgagggttg atcaattcac 540
 tttgaatttg gcattaaata ccattaaggt atattaactg attttaaaat aagatatatt 600
 cgtgaccatg ttttaactt tcaaaaatgt agctgccagt gtgtgatttt atttcagtgt 660
 taaaaatat ctaaacctat agcaatgtga ttaataaaaa cttaaacata tttccagta 720

 ccttaattct gtgataggaa aattttaatc tgagtatttt aatttcataa tctctaaaat 780
 agtttaatga tttgtcattg tgttgctgtc gtttacccca gctgatctca aaagtatat 840
 ttaaggagat tattttggtc tgcaacaact tgataggact attttagggc ctttttaag 900
 ctctattaaa actaacttac aacgattcaa aactgtttta aactatttca aaatgatttt 960
 agagcctttt gaaaactctt ttaaacactt tttaaactct attaaaacta ataagataac 1020
 ttgaataat tttcatgtca aatacattaa ctgtttaatg tttaatgcc agatgaaaaa 1080
 tgtaaagcta tcaagaattc acccagatag gagtatcttc atagcatgtt tttccctgct 1140
 tattttccag tgatcacatt attttgtac catggttatt ttatacaatt atctgaaaaa 1200

 aattagtatt gaagattaaa agagaagaaa atattaaaca taagagattc agtctttcat 1260
 gttgaactgc ttggttaaca gtgaagttag ttttaaaaaa aaaaaaaact atttctgtta 1320
 tcagctgact tctccctatc tgttgacttc tcccagcaa agattcttat tttacatttt 1380
 aactactgct ctcccacca acgggtggaa tccccagag ggggatttcc aagaggccac 1440
 ctggcagttg ctgagggtca gaagtgaagc tagccacttc ctcttaggca ggtggccaag 1500
 attacagttg acctctctg gtatggctga aaattgctgc atatggttac aggccttgag 1560
 gcctttggga gggcttagag agttgctgga acagtcagaa ggtggagggg ctgacaccac 1620
 ccaggcgag aggcagggtc cagggcctgc tctgcaggga ggttttagcc cagcccagcc 1680

 aaagtaacc cggggagcct gttatccag cacagtctg gaagaggcac aggggaaata 1740
 aaagcggagc gaggtttcc ttgactcagc cgctgcctgg tcttcttcag acctgttctg 1800
 aattctaac tctgaggggg tcggatgacg tggccattct ttgcctaaag cattgagttt 1860

actgcaaggt cagaaaagca tgcaaagccc tcagaatggc tgcaaagagc tccaacaaaa 1920
 caatttagaa ctttattaag gaataggggg aagctaggaa gaaactcaaa acatcaagat 1980
 tttaaatagc cttcttggtc tccttgctat aattatctgg gataagcatg ctgttttctg 2040
 tctgtcccta acatgccctg tgattatccg caaacaacac acccaagggc agaactttgt 2100
 tacttaacaa ccatactgtt tgcttctttc ctcagga act gtg gct gca cca tct 2155

Thr Val Ala Ala Pro Ser

1 5

gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc 2203
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

10 15 20

tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta 2251
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

25 30 35

cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt 2299
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser

40 45 50

gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc 2347
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr

55 60 65 70

ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc 2395
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys

75 80 85

gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac 2443
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn

90 95 100

agg gga gag tgt tagagggaga agtgcccca cctgctctc agttccagcc 2495

Arg Gly Glu Cys

105

tgacccctc ccatccttg gcctctgacc ctttttcac aggggaccta cccctattgc 2555

ggctctccag ctcatcttcc acctcacccc cctctctctc cttggcttta attatgctaa 2615

tgttggagga gaatgaataa ataaagtga tctttgcacc tgtggtttct ctctttcctc 2675

atctaataat tattatctgt tgttttacca actactcaat ttctcttata agggactaaa 2735

tatgtagtca tctaaggcg cataaccatt tataaaaaac atccttcatt ctattttacc 2795

ctatcatcct ctgcaagaca gtctctcctc aaaccacaaa gccttctgtc ctacacgtcc 2855

cctgggcat ggtaggagag acttgcttcc ttgttttccc ctctcagca agccctcata 2915

gtccttttta agggtagacag gtcttacagt catatatcct ttgattcaat tccctgagaa 2975

tcaaccaaag caaattttcc aaaagaagaa acctgctata aagagaatca ttcattgcaa 3035

catgatataa aataacaaca caataaaagc aattaaataa acaacaata gggaaatgtt 3095

taagttcatc atggtactta gacttaatgg aatgtcatgc cttatttaca tttttaaaca 3155

ggtactgagg gactcctgtc tgccaagggc cgtattgagt actttccaca acctaattta 3215

atccacacta tactgtgaga ttaaaaacat tcattaaaat gttgcaaagg ttctataaag 3275

ctgagagaca aatatattct ataactcagc aatcccactt ctatgatgact gagtgtcccc 3335

accacacaaa aaactatgca agaattgtca aagcagcttt atttacaaaa gccaaaaatt 3395

ggaaatagcc cgattgtcca acaatagaat gatttatata actgtggtat gtttatacat 3455

tagaataccc aatgaggaga attaacaagc tacaactata cctactcaca cagatgaatc 3515

tcataaaaat aatgttcatc aagagaaact caatgcaaaa gatatgttct gtatgttttc 3575

atccataata agttcaaac caggtaaaaa taaagttaga aatttggatg gaaattactc 3635

ttagctgggg gtggcgaggt tagtgcctgg gagaagacaa gaaggggctc ctggggctctt 3695

ggtaatgttc tgttctctgt gtggggttgt gcagttatga tctgtgcact gttctgtata 3755

cacattatgc ttcaaaataa cttcacataa agaacatctt ataccagtt aatagataga 3815

agaggaataa gtaataggtc aagaccatgc agctggtaag tgggggggcc tgggatcaaa 3875

tagctacctg cctaactctg cctcttgag cctgaaatga gtctgccttc cagggtctca 3935

ggtgctcaac aaaacaacag gcctgctatt ttctggcat ctgtgccctg tttggctagc 3995

taggagcaca catacataga aattaaatga aacagacctt cagcaagggg acagaggaca 4055

gaattaacct tgcccagaca ctggaaaccc atgtatgaac actcacatgt ttgggaaggg 4115

ggaagggcac atgtaaatga ggactcttcc tcattctatg gggcactctg gccctgcccc 4175
 tctcagctac tcatccatcc aacacacctt tctaagtacc tctctctgcc tacactctga 4235
 aggggttcag gagtaactaa cacagcatcc cttccctcaa atgactgacc atccctttgt 4295
 cctgctttgt ttttctttcc agtcagtact gggaaagtgg ggaaggacag tcatggaaaa 4355
 actacataag gaagcacctt gcccttctgc ctcttgagaa tgttgatgag tatcaaactt 4415
 ttcaaacttt ggaggtttga gtaggggtga gactcagtaa tgtcccttcc aatgacatga 4475
 acttgctcac tcatccctgg gggccaaatt gaacaatcaa aggcaggcat aatccagtta 4535

tgaattcaaa ccttcttctc agaagataac actctgaagg gaaaccacc cataacctaa 4595
 gcaagtgaag acagggtctg cagggtgaat tgtgtccttc aaaaaggat gctcaactcc 4655
 ttgctcttgg taccataaa tgggtcacat aaatgtgact ttatttggaa atagggtctt 4715
 tgcagaggta atcaagtcaa aattaggta tactgaaatg tttgtgagga tgcggtgaaa 4775
 atggatcatt catatattgc tgggtgggaat ataaaagggt atagctactc tagaaaatag 4835
 ttgtcagttt cttgaaaaac taaacaaaag acacctacca tatgaccag gaattgtact 4895
 ccttgggaat ttacccccag gaaataaaaa cttatgtcca cacagaacc atacatgatt 4955
 gttcacagca gctttatttg ttgtagcaa agctagaaag agccaacca tccctcaata 5015

ggcaactagc ctaacaaatt gtaatatatc catgcatag aatgctatga ggcaataaaa 5075
 aggaacgaag tgttgataga gagaactgga gtgattctga aggactttct actgagtga 5135
 aaaagccaat ctgaaagggt cacataccat gtgattcctt ttatgtaaca ttgttgaagt 5195
 gacaaaatta taggataga gaacagattc tgggtgccag gggtagggt ggtggagaaa 5255
 gaagagtagg cgaaactata aaggagatc tttgtgatca tgggataaat ctgtatcttg 5315
 attgcagtg tagttgcagg catctagaca tgtgataaaa tgacatagaa ctgtacacac 5375
 ttattttatc aatgtcaaat tcttggtttt aatatcgtac tgtaattacg taagaagtaa 5435
 ccaacaggag aaactgggtg caggacacat cagacctctg tgctttatat cctgtctttg 5495

ctactttctg tgaatctata attatttcca aataattttt ttaaactttt tttttatgct 5555
 ggatcg 5561

<210> 79

<211> 2027

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<220><221> CDS

<222> (230)...(523)

<220><221> CDS

<222> (920)...(955)

<220><221> CDS

<222> (1074)...(1403)

<220><221> CDS

<222> (1501)...(1821)

<400> 79

ggatcctcta gattgagctt tctggggcag gccaggcctg accttggctg ggggcaggga 60

gggggctaag gtgacgcagg tggcgccagc caggtgcaca cccaatgccc atgagcccag 120

acactggacc ctgcatggac catcgcgat agacaagaac cgaggggcct ctgcgcctg 180

ggcccagctc tgtccacac cgcggtcaca tggcaccacc tctcttgca gct tcc acc 238

Ala Ser Thr

1

aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc aga tcg acc tcc 286

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

5

10

15

gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa 334

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

20

25

30

35

ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac 382

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

40

45

50

acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc 430

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

55

60

65

gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc tac acc tgc 478

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

70 75 80

aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt 523

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val

85 90 95

ggtgagaggc cagcacaggg agggaggggtg tctgctggaa gccaggctca gccctcctgc 583

ctggacgcac cccggctgtg cagccccagc ccagggcagc aaggcatgcc ccattctgtct 643

cctcaccggg aggcctctga ccacccact catgctcagg gagagggtct tctggatttt 703

tccaccaggc tccgggcagc cacaggctgg atgccctac cccaggcct gcgcatacag 763

gggcagggtgc tgcgctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gccctgacc 823

taagcccacc ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cagacacctt ctctctccc 883

agatcgatct gagtaactcc caattctctc tctgca gag tcc aaa tat ggt ccc 937

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

100

ccg tgt ccc cca tgc cca ggtaagccaa cccaggcctc gccctccagc 985

Pro Cys Pro Pro Cys Pro

105 110

tcaaggcggg acaggtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc 1045

tgacgcatcc acctccatct ctctctca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca 1097

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

115

tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctg atg atc tcc 1145

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

120 125 130

cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac 1193

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

135	140	145	150	
ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtg gag gtg cat aat 1241				
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn				
	155	160	165	
gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg 1289				
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val				
	170	175	180	
gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag 1337				
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu				
	185	190	195	
tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa 1385				
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys				
	200	205	210	
acc atc tcc aaa gcc aaa ggtgggaccc acggggtgcg agggccacat 1433				
Thr Ile Ser Lys Ala Lys				
215	220			
ggacagaggt cagctcgccc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt 1493				
ccctaca ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 1542				
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser				
	225	230		
cag gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 1590				
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys				
235	240	245	250	
ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 1638				

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 255 260 265

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtc ctc gat tcc gac ggc 1686
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 270 275 280

tcc ttc ttc ctc tac agc agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag 1734

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 285 290 295

gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 1782
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 300 305 310

cac tac aca cag aag agc ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tgagtgccag 1831
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 315 320 325

ggccggcaag cccccgtcc ccgggtcttc ggggtcgcgc gaggatgctt ggcacgtacc 1891

ccgtctacat acttcccagg caccagcat ggaaataaag caccaccac tgcctgggc 1951
 cccgtgaga ctgigtggt tctttccacg ggtcaggccg agtctgaggc ctgagtgaca 2011
 tgagggaggc agatcc 2027

<210> 80

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 80

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

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

85 90 95
Arg Val

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 81

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 82

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 83

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
1 5 10 15

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

20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105