



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년03월07일  
(11) 등록번호 10-1600095  
(24) 등록일자 2016년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)  
C12N 5/20 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-7000699  
(22) 출원일자(국제) 2008년06월12일  
심사청구일자 2013년06월12일  
(85) 번역문제출일자 2010년01월12일  
(65) 공개번호 10-2010-0027216  
(43) 공개일자 2010년03월10일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/007317  
(87) 국제공개번호 WO 2008/156621  
국제공개일자 2008년12월24일  
(30) 우선권주장  
60/943,541 2007년06월12일 미국(US)  
(뒷면에 계속)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02003039467 A2\*  
W02005081872 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
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 설피제, 루에 두 센트  
레 42에이  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 43 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **모노클로날 항 베타 아밀로이드 항체**

**(57) 요약**

본 출원은 아밀로이드증, 즉 알츠하이머병과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 장애 및 이상의 그룹을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 기인하거나 이와 관련된 질환 및 장애의 치료에서 치료적 및 진단적 사용을 위한 방법 및 조성물과 관련된다. 본 출원은 다양한 베타-아밀로이드 단백질들로부터의 특정 에피토프를 특히 인식하고 이에 결합하는 능력을 가진 매우 특이적이고 매우 효과적인 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 출원의 교시에 의해 가능한(enabled) 항체는 아밀로이드증, 즉 알츠하이머병(AD) 같은 신경계 장애(neurological disorders)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 그룹을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 기인하거나 이와 관련된 질환 및 장애의 치료에 유용하다.

(72) 발명자

**무스, 안드레아스**

스위스, 씨에이치-1009 폴리, 에비뉴 데스 체리시  
에르스 39비

**왓츠, 라이언**

미합중국, 캘리포니아 94402, 샌 마테오 예일 드라  
이브 524

(30) 우선권주장

60/943,543 2007년06월12일 미국(US)

60/943,790 2007년06월13일 미국(US)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

베타 아밀로이드에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편으로서, 상보적 결정 영역 (complementarity determining regions, CDRs) 1-3을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 CDR 1-3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며,

a. 상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 CDR은:

- i. 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR1;
- ii. 서열 식별 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR2;
- iii. 서열 식별 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR3;
- iv. 서열 식별 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR1;
- v. 서열 식별 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR2; 및
- vi. 서열 식별 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR3;이거나, 또는

b. 상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 CDR은:

- i. 서열 식별 번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR1;
- ii. 서열 식별 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR2;
- iii. 서열 식별 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 경쇄 가변 영역의 CDR3;
- iv. 서열 식별 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR1;
- v. 서열 식별 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR2; 및
- vi. 서열 식별 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR3;인 것인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 2**

베타 아밀로이드에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편은:

- a. 서열 식별 번호: 7에 주어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열 식별 번호: 8에 주어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 또는
  - b. 서열 식별 번호: 17에 주어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열 식별 번호: 18에 주어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 또는
  - c. 서열 식별 번호: 19에 주어진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열 식별 번호: 20에 주어진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인
- 을 포함하는, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 3**

청구항 1에 있어서,

상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편은, 기탁번호 DSM ACC2844로 기탁된 하이브리도마 세포주(hybridoma cell line) EJ1A9; 기탁번호 DSM ACC2845로 기탁된 하이브리도마 세포주 FG1F9E4; 또는 기탁번호 DSM ACC2846으로 기탁된 하이브리도마 세포주 FK2A6A6에 의해 생산된 것인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 4**

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 5**

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 단리되는 것인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 6**

청구항 5에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체인 것인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 7**

청구항 5에 있어서, 상기 항체는 인간화된 항체인 것인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 8**

청구항 1에 있어서, 상기 에피토프-결합 단편은 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv 또는 Fv 단편인 것인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 9**

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편을 인코드하는(encoding) 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 10**

청구항 9에 있어서, 서열 식별 번호: 15-16, 및 서열 식별 번호: 27-30에 주어진 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 11**

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편을 치료적 유효량으로 포함하는,

a. 대상에서 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태의 치료; 또는

b. 대상에서 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태의 영향을 치료 또는 완화; 또는

c. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태에 걸린 대상의 뇌

내의 플라크 부하를 감소; 또는

d. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태에 걸린 대상의 뇌 내의 플라크의 양을 감소; 또는

e. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태에 걸린 대상의 뇌 내의 가용성 A $\beta$ 의 총량을 감소; 또는

f. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태를 나타내는 대상에서 인지 기억 능력을 유지 또는 증가;

시키는 데 사용하기 위한, 치료적 조성물.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, 항-자가사멸 화합물, 금속 킬레이터(chelator), DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술폰산(3APS), 1,3-프로판디술폰네이트(1,3PDS), 세크레타아제 활성제(secretase activator),  $\beta$ - 및  $\gamma$ -세크레타아제 억제제, 타우 단백질(tau protein), 신경전달물질(neurotransmitter), 항-염증 분자, 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs), 영양 보조제 및 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 또는 황반 변성(macular degeneration)의 투약(medication)에 사용되는 화합물에서 선택되는 하나 이상의 생물학적 활성 물질을 더 포함하는, 치료적 조성물.

**청구항 13**

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

a. 대상에서 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태의 치료; 또는

b. 대상에서 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련

치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태(condition)의 영향을 치료 또는 완화; 또는

c. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태에 걸린 대상의 뇌내의 플라크 부하를 감소; 또는

d. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태에 걸린 대상의 뇌내의 플라크의 양을 감소; 또는

e. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태에 걸린 대상의 뇌내의 가용성 A $\beta$ 의 총량을 감소; 또는

f. 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태를 나타내는 대상에서 인지 기억 능력을 유지 또는 증가;

시키는 데 사용하기 위한, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 14**

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편을 생산하는 것을 특징으로 하는 세포주.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서, 상기 세포주는:

- a. 2007년 5월 25일에 기탁되어 기탁번호 DSM ACC2844를 부여받은 하이브리도마 EJ1A9, 또는
- b. 2007년 5월 25일에 기탁되어 기탁번호 DSM ACC2845를 부여받은 하이브리도마 FG1F9E4, 또는
- c. 2007년 5월 25일에 기탁되어 기탁번호 DSM ACC2846을 부여받은 하이브리도마 FK2A6A6인 것인, 세포주.

**청구항 16**

대상에서 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple

sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상의 질환 또는 병태에 대한 소인(predisposition)을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

- (a) 베타 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 환자로부터 얻어진 샘플을 청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편을 상기 베타 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 단계;
- (c) 상기 면역복합체의 형성을 검출(detect)하는 단계; 및
- (d) 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 상기 샘플 내의 베타 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계

를 포함하는, 환자로부터 얻어진 샘플 내에서 베타 아밀로이드 단백질의 에피토프에 대한 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 면역특이적 결합을 검출하는 것을 포함하는, 방법.

**청구항 17**

대상의 조직 내에서 아밀로이드형성(amyloidogenic) 플라크 존재량의 정도를 측정하는 방법으로서,

- (a) 청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편으로, 조사중인 대상으로부터 얻어진 샘플을 베타 아밀로이드 단백질의 존재에 대해 테스트하는 단계로서, 상기 샘플은 상기 대상의 조직을 나타내는 것인 단계;
- (b) 항원에 결합된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 양을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 대상의 조직 내의 플라크 존재량을 계산하는 단계

를 포함하는 측정 방법.

**청구항 18**

대상에서 최소 잔류 질환을 모니터링하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서, 상기 질환은 아밀로이드증, 신경학적 장애, 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)으로부터 선택되는 하나 이상이며, 상기 방법은 :

- (a) 베타 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 대상으로부터 얻어진 샘플을 청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편이 상기 베타 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 단계;
- (c) 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 단계;
- (d) 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 상기 샘플 내의 베타 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계; 및
- (e) 상기 면역복합체의 양을 정상 대조군 값과 비교하는 단계

를 포함하고,

여기서 정상 대조군 값에 대한 상기 면역복합체의 양의 증가는 상기 대상이 여전히 최소 잔류 질환(minimal residual disease)에 걸려 있음을 나타내는 것인, 방법.

**청구항 19**

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편으로 치료될 대상의 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

(a) 베타 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 대상으로부터 얻어진 샘플을 청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편과 접촉시키는 단계;

(b) 상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편이 상기 베타 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 단계;

(c) 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 단계;

(d) 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 상기 샘플 내의 베타 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계; 및

(e) 상기 치료 개시 전과 후의 상기 면역복합체의 양을 비교하는 단계

를 포함하고,

여기서 면역복합체의 양의 감소는 상기 대상이 상기 치료에 대해 반응할 높은 잠재성을 가지는 것을 나타내는 것인, 방법.

**청구항 20**

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편을 포함하는 테스트 키트.

**청구항 21**

청구항 11에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 및 부형제에서 선택되는 하나 이상의 구성을 더 포함하는, 치료적 조성물.

**청구항 22**

청구항 20에 있어서, 상기 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 사용을 위한 설명서를 더 포함하는 테스트 키트로서, 베타 아밀로이드 단백질에 결합시켜 면역복합체를 형성하고, 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를 베타 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키도록 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 것을 목적으로 하는, 테스트 키트.

**청구항 23**

청구항 14에 기재된 세포주를 배양하는 단계를 포함하는, 베타 아밀로이드에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 제조 방법.

**청구항 24**

청구항 9에 기재된 폴리뉴클레오티드를 발현하는 단계를 포함하는, 베타 아밀로이드에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 제조 방법.

**청구항 25**

청구항 23에 있어서, 상기 세포주로부터의 항체를 얻는 단계를 더 포함하는, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편의 제조 방법.

**청구항 26**

청구항 11에 있어서, 상기 신경학적 장애는 알츠하이머병(Alzheimer's Disease, AD)인, 치료적 조성물.

**청구항 27**

청구항 11에 있어서, 상기 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태는 경증 인지 장애(mild cognitive impairment, MCI), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후

군(Down's syndrome), 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis(Dutch type)) 및 괄 파킨슨-치매 복합증(Guam Parkinson-Dementia complex)으로 구성된 군에서 선택되는 것인, 치료적 조성물.

**청구항 28**

청구항 13에 있어서, 상기 신경학적 장애는 알츠하이머병(Alzheimer's Disease, AD)인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 29**

청구항 13에 있어서, 상기 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태는 경증 인지 장애(mild cognitive impairment, MCI), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down's syndrome), 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis(Dutch type)) 및 괄 파킨슨-치매 복합증(Guam Parkinson-Dementia complex)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 30**

청구항 12에 있어서, 상기 DNA 수복 억제제는 피렌제핀 (pirenzepine) 또는 그의 대사물인, 치료적 조성물.

**청구항 31**

청구항 12에 있어서, 상기 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs)는 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 도네페질(donepezil), 및 갈란타민(galantamine)으로부터 선택되는 것인, 치료적 조성물.

**청구항 32**

청구항 11에 있어서, 상기 대상은 포유류인, 치료적 조성물.

**청구항 33**

청구항 32에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 치료적 조성물.

**청구항 34**

청구항 13에 있어서, 상기 대상은 포유류인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 35**

청구항 34에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 항체 또는 그의 에피토프-결합 단편.

**청구항 36**

청구항 16에 있어서, 상기 대상은 포유류인, 방법.

**청구항 37**

청구항 36에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 방법.

**청구항 38**

청구항 17에 있어서, 상기 대상은 포유류인, 방법.

**청구항 39**

청구항 38에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 방법.

**청구항 40**

청구항 18에 있어서, 상기 대상은 포유류인, 방법.

**청구항 41**

청구항 40에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 방법.

**청구항 42**

청구항 19에 있어서, 상기 대상은 포유류인, 방법.

**청구항 43**

청구항 42에 있어서, 상기 포유류는 인간인, 방법.

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

**청구항 51**

삭제

**청구항 52**

삭제

**청구항 53**

삭제

**청구항 54**

삭제

**청구항 55**

삭제

**청구항 56**

삭제

**청구항 57**

삭제

**청구항 58**

삭제

**청구항 59**

삭제

**청구항 60**

삭제

**청구항 61**

삭제

**청구항 62**

삭제

**청구항 63**

삭제

**청구항 64**

삭제

**청구항 65**

삭제

**청구항 66**

삭제

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

삭제

**청구항 69**

삭제

**청구항 70**

삭제

**청구항 71**

삭제

**청구항 72**

삭제

**청구항 73**

삭제

**청구항 74**

삭제

**청구항 75**

삭제

**청구항 76**

삭제

**청구항 77**

삭제

**청구항 78**

삭제

**청구항 79**

삭제

**청구항 80**

삭제

**청구항 81**

삭제

**청구항 82**

삭제

**청구항 83**

삭제

**청구항 84**

삭제

**청구항 85**

삭제

**청구항 86**

삭제

**청구항 87**

삭제

**청구항 88**

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 특허 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미합중국 가출원 제60/943,543호(2007년 6월 12일자 출원), 미합중국 가출원 제60/943,541호(2007년 6월 12일자 출원), 및 미합중국 가출원 제60/943,790호(2007년 6월 13일자 출원)에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 본 발명은 알츠하이머병(Alzheimer's disease)과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 이상(abnormality) 및 장애(disorder) 그룹인 아밀로이드증(amyloidosis)을 포함하는, 아밀로이드 또는 아밀로이드 유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 질환 및 장애의 치료에서 치료 및 진단적 사용을 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 기관 또는 신체 시스템의 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 뒤 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 감염을 가진 사람들에게서 발생한다.

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

[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, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI)와 같은 인지 기억 능력의 손실을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 포함하는, 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)과 같은 신경계 장애를 포함한다. 아밀로이드-유사 단백질에 기반하거나 또는 이와 관련된 다른 질환으로는 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis); 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증; amyotrophic lateral sclerosis), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 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 전-염증성(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)의 동시 침착과 관련될 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 $\beta$  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  $\beta$  및  $\gamma$  세크레타아제(secretase)에 의한, 대부분의 세포에서 구성적으로 발현되고 이화되는(catabolized) 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 순차적 절단(cleavage)은 39 내지 43 아미노산 A $\beta$  펩타이드의 방출을 가져온다. APP의 분해는 플라크에서 그들의 응집하려는 경향을 증가시키는 것으로 보인다. A $\beta$ (1-42) 단편(fragment)이 특히 응집물(aggregate) 형성 경향이 높는데, 이는 그의 C-말단에서의 2개의 극소수성(very hydrophobic) 아미노산 모이어티에 기인한다. 따라서, 상기 A $\beta$ (1-42) 단편은 AD에서 신경 플라크(neuritic plaque) 형성의 개시에 주로 관여하고 또한 원인이 되는 것으로 여겨지며, 따라서 높은 병리적 가능성을 갖는 것으로 여겨진다. 따라서 아밀로이드 플라크 형성을 타겟으로 하고 이를 흐트러뜨릴 수 있는 특이적 항체에 대한 필요성이 존재한다.

[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 없을 수도 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 "가능한(possible)" 또는 "유력한(probable)" AD의 진단만을 수행할 수 있다. 통상의 방법을 사용하여, 내과의사는 "유력한" AD를 진단하기 위한 여러 도구

를 이용하여 90 퍼센트 이하의 정확도로 AD를 진단할 수 있다. 내과의사는 사람의 일반적인 건강, 과거의 병력, 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<sup>®</sup>, Morris Plains, NJ), 도네페질(donepezil) (ARICEPT<sup>®</sup>, Tokyo, JP), 리바스티그민 (EXELON<sup>®</sup>, East Hanover, NJ), 또는 갈란타민(galantamine) (REMINYL<sup>®</sup>, New Brunswick, NJ)은 한정된 시간 동안 일부 증상이 악화되는 것을 방지하는 것을 도울 수 있다. 다른 약물인, 메만틴(memantine) (NAMENDA<sup>®</sup>, 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 작용제 가위약(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 약물처치에 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 경증 인지 장애, 루이 소체 치매(LBD), 근육위축가쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 및 황반 변성, 특히 연령 관련 황반 변성(AMD)이다.

[0015] 경증 인지 장애(MCI)는 미약하지만 측정가능한 기억력 장애로서 가장 통상적으로 정의되는 일반적인 용어이다. MCI를 가진 사람들은 노화와 함께 통상적으로 예측되는 것보다 더 큰 기억력 문제를 경험하지만, 손상된 판단력 또는 사고력과 같은 치매의 다른 증상을 나타내지는 않는다. MCI는 AD의 전임상 단계를 종종 반영하는 병태(condition)이다.

[0016] 내비 피질(EC) 내  $\beta$ -아밀로이드의 침착은 고령자에서 경증 인지 장애(MCI)의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 이는 일단 AD가 임상적으로 명백하게 되면 CSF-A  $\beta$  (1-42) 수준이 유의하게 감소한다는 관찰과 같은 선상에 있다. CSF-A  $\beta$  (1-42)과 대조적으로 CSF-타우 수준은 MCI 단계에서 유의하게 감소하며, 이들 값은 그 이후 지속적으로 상승하는데, 이는 증가된 수준의 CSF-타우가, AD로 진행할 것으로 예측되는 MCI 대상을 탐지하는 것을 도울 수 있는 것을 나타낸다.

[0017] 루이 소체 치매(LBD)는 65세 이상의 사람들에서 발생할 수 있는 신경변성 장애이며, 이는 통상적으로 인지(사고) 장애 및 비정상적 행동 변화의 증상을 가져온다. 증상들은 인지 장애, 신경계 신호(neurological sign), 수면 장애, 및 자율신경 부전(autonomic failure)을 포함할 수 있다. 인지 장애는 대부분의 경우 LBD의 대표적인 특징이다. 환자들은 진행적으로 악화되는 의식장애(confusion)의 재발하는 에피소드를 가진다. 인지 능력의 기복은 종종 주의력 및 각성도의 정도가 바뀌는 것과 관련이 있다. 인지 장애 및 사고의 기복은 몇분, 몇시간, 또는 몇일에 걸쳐 변할 수 있다.

[0018] 루이 소체들은 인산화 및 비인산화 신경미세섬유 단백질로부터 형성되고; 이들은 시냅스 단백질 알파-시누클레인(alpha-synuclein) 및 유비퀴틴(ubiquitin)을 포함하며, 이는 손상된 또는 비정상 단백질의 제거와 관련이 있다. 루이 소체에 더하여, 신경 세포의 세포 프로세스에서 봉입체인 루이 신경돌기(Lewy neurites)도 존재할 수 있다. 아밀로이드 플라크들은 DLB로 고통받는 환자들 뇌에 형성될 수 있지만, 이들은 알츠하이머 질환을 가진 환자들에게서 발견되는 것보다는 그 수가 훨씬 더 적은 경향이 있다. AD의 다른 마이크로병리학적 특징인 신경섬유 매듭은, DLB의 주요 특성은 아니지만, 아밀로이드 플라크에 더하여 종종 존재한다.

[0019] 근육위축가쪽경화증(ALS)은 상부 및 하부 운동 뉴런의 변성을 특징으로 한다. 일부 ALS 환자들에게서는, 치매 또는 실어증이 나타날 수 있다(ALS-D). 치매는 가장 통상적으로 전측두엽 치매(FTD)이며, 많은 이들 케이스들이 전두엽 및 측두엽의 표면층 및 치아 이랑(dentate gyrus)의 뉴런에 유비퀴틴-양성, 타우(tau)-음성 봉입을

찾는다.

- [0020] 붕입체 근염(IBM)은 50세 이상의 사람들에서 통상적으로 발견되는 큰 손상을 주는 질환이며, 근 섬유들에 염증이 진행되고, 위축되기 시작하지만 - 뇌는 손상받지 않고, 환자들은 그들의 완전한 사고력을 유지한다. 아밀로이드-β 단백질의 생성과 관련된 2개의 효소들이, 고령자에서 이러한 가장 통상적인 진행성 근육 질환을 가진 환자들의 근 세포 내에서 증가하는 것으로 밝혀졌고, 아밀로이드-β도 또한 증가된다.
- [0021] 아밀로이드-유사 단백질의 축적물 및 침착물과 관련되거나 또는 이에 기인하는 다른 질환은 황반 변성이다.
- [0022] 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. 황반의 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.
- [0023] 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.
- [0024] 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.
- [0025] 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.
- [0026] 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.
- [0027] 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 드루젠의 축적이다. Anderson 등에 의해 수행된 최근의 연구는 드루젠이 아밀로이드 베타를 함유하는 것을 확인하였다. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).
- [0028] 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.
- [0029] 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 가져오는 제형 또한 바람직하다. 경구 투여 형태로 투여하는 항생제의 용이성은 치료 동안 환자 순응도를 증가시킨다.

[0030] 필요한 것은 높은 특이성 및 높은 효과성 항체의 생성을 위한 효과적인 방법 및 조성물이며, 이는 항체가 경구 투여 형태로 제공될 경우에 필수이다. 바람직하게는 그러한 항체가 아밀로이드 단백질과 같은 다양한 항원들에서 특이적 에피토프를 인식한다.

[0031] 따라서, 필요한 것은 아밀로이드증을 포함하는, 아밀로이드 또는 아밀로이드 유사 단백질에 의해 유발되거나 이와 관련된 치료를 필요로 하는 대상에서의 질환 또는 장애와 관련된 합병증, 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI)와 같은 인지 기억 능력의 손실을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 포함하는, 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)과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축기경화증), 봉입체 근염(IBM), 성인발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 증양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹과 관련된 합병증을 예방 또는 처리하기 위한 효과적인 조성물 및 방법이다. 특히 필요한 것은, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 펩타이드의 섬유(fiber)의 응집과 관련된 플라크의 형성과 같은 질환의 생리적 표지에 반대작용할 수 있는 특수화되고 매우 효과적인 항체이다.

[0032] 프로인트 완전 또는 불완전 보조제와 혼합된 Aβ<sub>1-42</sub>의 접종에 의해 유발된 항-아밀로이드 항체는 인간 알츠하이머병에 대한 형질전환(transgenic) 마우스(mouse)에서 아밀로이드 존재량(burden)을 감소시킬 수 있는 것으로 입증되었다 (Schenk 등, 1999).

[0033] 리포솜 내에서 재구성된 테트라팔미토일화된 Aβ<sub>1-16</sub>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 입증되었다 (Nicolau 등, 2002).

[0034] 아밀로이드 플라크 및 섬유의 분해가 일어나는 가능한 메카니즘은 Bard 등 (2000)에 의해 최초로 제안되었는데, 그들은 그들의 데이터에 기반하여, 항체가 플라크를 오폐소닌화(opsonized)하고, 이어서 이것은 미세아교세포의 포식세포에 의해 실질적으로 파괴되는 것으로 결론을 도출하였다. De Mattos 등(2001)은 β-아밀로이드의 중앙도메인에 대해 지향된 mAb가 혈장 아밀로이드에 결합하여 완전히 격리시킬 수 있음을 나타내었다. 이들은, 순환 내에서 이들 mAb의 존재가 뇌와 혈장 간의 Aβ의 평형을 시프트(shift)시켜서, 뇌 내에서의 침착 대신 주변 제거(peripheral clearing) 및 이화작용(catabolism)을 촉진하는 것을 나타냈다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0035] (특허문헌 0001) W02004/058258
- (특허문헌 0002) W096/1359
- (특허문헌 0003) W096/29605

**비특허문헌**

- [0036] (비특허문헌 0001) Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson- Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000). Nature Med. 6, 916-919.
- (비특허문헌 0002) Barghom 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.
- (비특허문헌 0003) Baschong W, Wrigley NG (1990) Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview. *J Electron Microscop Tech* 14:313-323.
- (비특허문헌 0004) Blond and Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84 | no. 5 | 1147-1151 Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 289-302.
- (비특허문헌 0005) Burdick, D. et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546-554 (1992).
- (비특허문헌 0006) DeMattos, Bales, KR, Cummins, DJ, Dodart, JC, Paul, SM, Holtzman, D.M (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.
- (비특허문헌 0007) Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF (2000) Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci* 20:6452-6458.
- (비특허문헌 0008) Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K, Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22:3445-3453.
- (비특허문헌 0009) Glenner and Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 885-890 (1984)
- (비특허문헌 0010) Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))
- (비특허문헌 0011) Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22.
- (비특허문헌 0012) Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)
- (비특허문헌 0013) Iwate M, Asakura T, Williamson MP. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 199-211.
- (비특허문헌 0014) Kirschner.D.A., Abraham,C, & Selkoe.D.J. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 503-507 (1986).
- (비특허문헌 0015) Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)
- (비특허문헌 0016) Kennedy, J. H., et al., 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31)
- (비특허문헌 0017) Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.
- (비특허문헌 0018) Kohler and Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975))
- (비특허문헌 0019) LeVine, H. III, (2002). *Arch Biochem Biophys* 404, 106-115.
- (비특허문헌 0020) Luca et al., 2001
- (비특허문헌 0021) McGeer et al., 1994
- (비특허문헌 0022) Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.

- (비특허문헌 0023) Nelson, R. & Eisenberg, D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. Curr. Opin. Struct. Biol. (2006).
- (비특허문헌 0024) Nicolau, C, Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., and Hopkins, R. J. (2002). Proc Natl Acad Sci U S A 99, 2332-2337.
- (비특허문헌 0025) Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)
- (비특허문헌 0026) Pearson W.R. (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98
- (비특허문헌 0027) Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. J.Mol.Biol. 2004; 335: 247-260.
- (비특허문헌 0028) Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A; 99: 16742-16747.
- (비특허문헌 0029) Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986
- (비특허문헌 0030) Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadnarski, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader, T. and Riesner, D. (2004). J Biol Chem 279, 47497-47505.
- (비특허문헌 0031) Sambrook et al. Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- (비특허문헌 0032) Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Smith, S. O., and Bormann, B. J. (1995). Proc Natl Acad Sci U S A 92, 488-491.
- (비특허문헌 0033) Schenk et al., 1999
- (비특허문헌 0034) Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40)
- (비특허문헌 0035) Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000, 924:17-25.
- (비특허문헌 0036) Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Eur J Cell Biol 38:87-93.
- (비특허문헌 0037) Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489
- (비특허문헌 0038) Van de Ven, I, Wera S, Van LF, Henderson ST (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. Nutr Metab (Lond) 2:28.
- (비특허문헌 0039) Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 - 270
- (비특허문헌 0040) Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2000). Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5123-5128.
- (비특허문헌 0041) Zrein et al. (1998), Cerebral and Diagnostic Laboratory Immunology, 5(1): 45-49.
- (비특허문헌 0042) Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0037]

본 발명은, 특정  $\beta$ -아밀로이드 단백질을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 고도로 특이적이고 또한 고도로 효과적인 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 교시에 의해 가능해진 항체는, 아밀로이드증을 포함하는, 아밀로이드 또는 아밀로이드 유사 단백질에 의해 유발되거나 이와 관련된 치료를 필요로 하는 대상에서의 질환 및 장애, 일부 지명하자면, 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI)와 같은 인지 기억 능력의 손실을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 포함하는, 알츠하이머병(AD),

루이 소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down's syndrome), 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type)); 괄 콰킨슨-치매 복합증(Guam Parkinson-Dementia complex)과 같은 신경계 장애; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥병, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 콰킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 붕입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 중양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹의 치료에 특히 유용하다.

[0038] 또한, 본 발명은 그러한 치료를 필요로 하는 대상, 특히 포유동물, 보다 특히 인간에게, 본 발명에 따른 치료적 유효량의 모노클로날 항체를 투여하는 것을 포함하는 아밀로이드-관련 질환 또는 병태를 나타내는 포유동물의 인지 기억 능력을 유지 또는 증가시키는 신규의 방법 및 조성물을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

[0039] 본 발명은 바람직한 항원 입체형태(conformation)의 개선된 노출 및 안정화를 야기하는 항원 제시(antigen presentation)를 이용하여, 궁극적으로 독특한 특성을 갖는 항체를 발생시킨다.

[0040] 본 발명의 일 구체예에서는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)와 같은 친수성 모이어티로, 또는, 선택적으로, 예를 들어, 팔미트산과 같은 소수성 모이어티로 변형된 β-아밀로이드 펩티드의, 특히 β-아밀로이드 펩티드의 선택된 단편(fragment)의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩티드를 포함하는 초분자 항원 구조물에 대해 생성된(raised), 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체 또는 이의 기능부, 또는, 더 특히, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 여기서 상기 친수성 및 소수성 모이어티는, 적어도 하나, 특히 하나 또는 두 개의, 상기 펩티드 단편에 상기 친수성 및 소수성 모이어티를 커플링하기 위한 연결 장치로서 작용(serving)할 수 있는, 예를 들어, 라이신, 글루타민산 및 시스테인과 같은 아미노산 또는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 아미노산 유사체를 통해 상기 항원성 펩티드의 각 말단에 공유적으로 결합한다.

[0041] PEG와 같은 친수성 모이어티가 사용될 때, 상기 β-아밀로이드 펩티드의 선택된 단편은 아미노산 서열 Aβ<sub>22-35</sub> 및 Aβ<sub>29-40</sub> 각각에 상응하는 단편일 수 있고, 또한 자유 PEG 말단은, 예를 들어, 리포솜의 이중층 내에 상기 항원성 구조체를 파묻기(embed) 위해, 포스파티딜에탄올아민 또는 앵커링 요소로서 기능하기에 적합한 임의의 다른 화합물에 공유적으로 결합할 수 있다.

[0042] 팔미트산과 같은 소수성 모이어티가 사용될 때, 상기 β-아밀로이드 펩티드의 선택된 단편은 아미노산 서열 Aβ<sub>1-15</sub>에 상응하는 단편일 수 있고, 또한 이 소수성 모이어티는, 예를 들어, 리포솜의 이중층 내에 상기 항원성 구조체를 파묻기 위해, 앵커링 요소로서 직접적으로 작용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 구체예에서는, 입체형태 에피토프(conformational epitope)를 인식하고 이에 결합하며, 또한 폴리머성 가용성 아밀로이드에 및 아밀로이드 피브릴(fibril) 또는 섬유 각각에, 특히 폴리머성 가용성 아밀로이드 Aβ 펩티드 및 아밀로이드 Aβ 피브릴 또는 섬유 각각에 결합하는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공된다.

[0044] 본 발명의 일 구체예에서는, 우선적으로 폴리머성 가용성 아밀로이드 및 올리고머성 아밀로이드 펩티드 각각 상에, 특히 복수의 모노머성 Aβ<sub>1-42</sub> 펩티드를 각각 포함하는 폴리머성 가용성 아밀로이드 Aβ 펩티드 및 올리고머성 아밀로이드 Aβ 펩티드 상에 디스플레이된(displayed) 입체형태 에피토프를 인식하고 결합하는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공된다.

[0045] 본 발명의 일 구체예에서는, 우선적으로 폴리머성 가용성 아밀로이드 및 올리고머성 아밀로이드 펩티드 각각 상에, 또한 아밀로이드 피브릴 또는 섬유 상에, 특히 복수의 모노머성 Aβ<sub>1-42</sub> 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 아밀로이드 Aβ 펩티드 및 올리고머성 아밀로이드 Aβ 펩티드 상에, 및 복수의 상기 올리고머성 펩티드를 포함하는(incorporating) 아밀로이드 피브릴 또는 섬유 각각 상에 디스플레이된 입체형태 에피토프를 인식하고 이에 결합하는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공된다.

[0046] 아포지단백E (apoE4) 단백질의 ε4 대립유전자(allele)의 유전(inheritance)은 AD에 대한 강한 유전적 위험 요인이다. 이 단백질은 아밀로이드에 결합할 수 있으며, 혈액-뇌-장벽(blood-brain-barrier)을 가로지르는 Aβ의

제거(clearance)뿐만 아니라 A $\beta$  침착(deposition)의 촉진 모두에 관여하는 것으로 알려져 있다. 반대로, 상기 아밀로이드의 결합은 ApoE의 소수성 지질단백질 결합 영역 내에서 지도위치(map)되며, 이 회합(association)은 ApoE의 전체 지질 결합능을 극적으로 감소시킨다.

- [0047] 따라서, 본 발명의 추가 구체예는, 본원에 기술된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 대상(subject), 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내에서의, 특히 뇌 내의 A $\beta$ 의 증가된 농도와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내에서의 ApoE4와 아밀로이드의 상호작용을 억제하거나 또는 적게할 수 있다. 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는, 따라서 폴리머성 가용성 아밀로이드 및 올리고머성 아밀로이드 펩티드 각각에, 특히 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 A $\beta$  펩티드 및 올리고머성 A $\beta$  펩티드 각각에 우선적으로 결합한다. 일 구체예에서 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 펩티드에 결합하나, 30 잔기보다 적은 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 펩티드, 특히 20 잔기 미만을 갖는 펩티드, 더 특히 10 잔기 미만을 갖는 펩티드, 특히 8 이하의 잔기를 갖는 펩티드에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 나타내지 않는다.
- [0048] 일 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로, 상기 항체는 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 펩티드에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 및 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 나타내지 않는다.
- [0049] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않는다.
- [0050] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보인다.
- [0051] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합(intermediated binding)을 보인다.
- [0052] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고, 또한 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보인다.
- [0053] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본원에 기술된 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고, 또한 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않는다.
- [0054] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$ 1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이고, 또한 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않는다.

- [0055] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고, 또한 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며, 또한 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않는다.
- [0056] 일 구체예에서 본원에 기술된 본 발명의 항체는, 모노머성 및/또는 올리고머성 형태인 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 모노머성 및/또는 올리고머성 형태인 A $\beta$  모노머성 펩티드와, 특히 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드 및/또는 복수의 상기 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 올리고머성 펩티드와, 특히 항체 대 A $\beta$  1-42가 1:1000까지의 몰농도비로, 특히 1:10 내지 1:100인 몰농도비로 공동-향온보관(co-incubation)하면, A $\beta$  모노머 및/또는 올리고머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집(aggretation)되는 것을 억제한다.
- [0057] 특히, 본 발명의 항체와 아밀로이드 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와의 공동-향온보관은 28 $^{\circ}$ C 내지 40 $^{\circ}$ C, 특히 32 $^{\circ}$ C 내지 38 $^{\circ}$ C, 더 특히 37 $^{\circ}$ C의 온도에서 24시간 내지 60시간, 특히 30시간 내지 50시간, 더 특히 48시간 동안 수행된다.
- [0058] 본 발명의 특정 구체예에서는, 아밀로이드 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와의 공동-향온보관은 37 $^{\circ}$ C의 온도에서 48시간 동안 이루어진다.
- [0059] 특히, 상기 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 A $\beta$  1-40 모노머성 펩티드에 우선적으로 결합하고 또한, A $\beta$  1-40 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 공동-향온보관하면 A $\beta$  모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을 억제한다.
- [0060] 일 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  1-40 모노머성 펩티드에, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 우선적으로 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고, 또한 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며, 또한 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며, 또한 A $\beta$  1-42 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 공동-향온보관하면 A $\beta$  모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을 억제한다.
- [0061] 일 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  1-40 모노머성 펩티드에, 및 A $\beta$  1-42, 올리고머성 및/또는 폴리머성 펩티드에도 우선적으로 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며 및/또는 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한, A $\beta$  1-42 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 공동-향온보관하면 A $\beta$  모노머 및/또는 올리고머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을 억제한다.
- [0062] 일 구체예에서, 상기 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 A $\beta$  모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을, 버퍼 내에서 향온보관된 각각의 아밀로이드 펩티드 모노머(대조군)와 비교하여 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85-90% 또는 그 이상 억제한다.
- [0063] 일 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  1-40 모노머성 펩티드에, 및 A $\beta$  1-42, 올리고머성 및/또는 폴리머성 펩티드에도 우선적으로 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며 및/또는 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한, A $\beta$  1-42 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 37 $^{\circ}$ C의 온도에서 24시간 동안 공동-향온보관하면 A $\beta$  모노머 및/또는 올리고머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을, 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석, 특히 이하의 실시예 1.4 및 2.4에 기술된 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정된 바와 같이, 항체 대 A $\beta$  1-42가 1:100인 몰농도비에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적

어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85-90%, 및 항체 대  $A\beta_{1-42}$ 가 1:10인 몰농도비에서 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85-90% 억제한다.

[0064] 아밀로이드형성(amyloidogenic) 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드에 대한, 특히, 아밀로이드 형태 (1-42)에 대한 본원에 기술된 본 발명의 항체의 결합은 모노머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드형성 펩티드가 고분자 피브릴 또는 필라멘트로 응집되는 것을 억제한다. 상기 아밀로이드형성 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집의 억제를 통해 본 발명의 항체는 아밀로이드 플라크, 특히 이차 입체형태의 변화에 의해 불용성이 되는 및 질환에 걸린 동물 또는 인간의 뇌 내의 아밀로이드 플라크의 대부분이 되는 것으로 알려져 있는 아밀로이드 형태 (1-42)의 형성을 예방하거나 또는 감소시킬 수 있다.

[0065] 본 발명의 항체의 응집 억제 잠재성은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법, 예를 들어 농도-구배 초원심분리 및 뒤이은 미리형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석에 의해 및/또는 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0066] 일 구체예에서, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본원에 기술된 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는, 모노머성 및/또는 올리고머성 형태인 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는  $A\beta$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된, 복수의 상기 모노머성 펩티드, 특히  $A\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드를 포함하는 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와, 특히 1:10 내지 1:1000의 몰농도비로, 더특히 1:100의 비율로 공동-항온보관하면, 상기 미리 형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 35%, 특히 적어도 40%, 더 특히 적어도 50%, 더욱더 특히 적어도 60%, 특히 적어도 70% 이상 해체(disaggregating)시킬 수 있다.

[0067] 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 항체의 응집 억제 및 해체 잠재성 각각은 농도-구배 초원심분리 및 뒤이은 미리 형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석에 의해 측정된다.

[0068] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 상기 항체의 응집 억제 및 해체 잠재성 각각은 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정된다.

[0069] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 항체는 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 28°C 내지 40°C, 특히 32°C 내지 38°C, 더 특히 37°C의 온도에서 12시간 내지 36시간, 특히 18시간 내지 30시간, 더 특히 24시간 동안 공동-항온보관된다.

[0070] 특히, 상기 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와의 공동-항온보관은 37°C의 온도에서 24시간 동안 수행된다.

[0071] 일 구체예에서, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는  $A\beta_{1-40}$  모노머성 펩티드에, 특히  $A\beta$  모노머성 펩티드 1-40에 및 복수의  $A\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 우선적으로 결합하나,  $A\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고, 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며,  $A\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한,  $A\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 공동-항온보관하면 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를, 특히 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 특히 적어도 30%, 더 특히 적어도 40%, 더욱더 특히 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 및 더욱더 특히 70% 이상 해체할 수 있다.

[0072] 특히, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는  $A\beta_{1-40}$  모노머성 펩티드에, 및  $A\beta_{1-42}$ , 올리고머성 및/또는 폴리머성 펩티드에도 우선적으로 결합하나,  $A\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며 및/또는  $A\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한,  $A\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 공동-항온보관하면 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를, 특히 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 특히 적어도 30%, 더 특히 적어도

40%, 더욱더 특히 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 그 이상 해체할 수 있다.

- [0073] 본 발명의 일 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는  $A\beta_{1-40}$  모노머성 펩티드에, 및  $A\beta_{1-42}$ , 올리고머성 및/또는 폴리머성 펩티드에도 우선적으로 결합하나,  $A\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며 및/또는  $A\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한  $A\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 37°C의 온도에서 24시간 동안 공동-항온보관하면 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를, 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석, 특히 이하의 실시예 1.4 및 2.4에 기술된 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정된 바와 같이, 항체 대  $A\beta_{1-42}$ 가 1:100인 몰농도비에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 55%, 특히 적어도 60%, 더 특히 적어도 70% 이상, 및 항체 대  $A\beta_{1-42}$ 가 1:10인 몰농도비에서 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85%-90% 해체시킨다.
- [0074] 아밀로이드 단백질의 응집의 억제를 통해 및 아밀로이드형성 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트의 해체를 통해, 본 발명의 항체는 아밀로이드 플라크의 형성을 예방 또는 감소시킬 수 있으며 이는 상기 질환과 관련된 증상을 완화시키고, 및 그의 진행을 지연시키거나 역행시킨다.
- [0075] 따라서, 본 발명의 추가적 구체예는 본원에 기술된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 뇌 내의  $A\beta$ 의 증가된 농도와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의  $A\beta$ 의 총량을 감소시킬 수 있다.
- [0076] 본 발명의 다른 구체예에서는 본원에 기술된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 플라크를 붕괴시켜, 뇌 내의 증가된 플라크 부하(plaque load)와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크 부하를 감소시킬 수 있다. 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 이의 기능부는 상기 뇌 내의 플라크 부하를 적어도 10%, 적어도 20%, 특히 적어도 25%, 더 특히 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85%-90% 감소시킨다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 구체예에서는 본원에 기술된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는, 뇌 내의 증가된 플라크 부하와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크의 양의 감소와 관련된 플라크의 가용화가 가능하다. 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 이의 기능부는 상기 뇌 내의 플라크의 양을 적어도 10%, 특히 적어도 15%, 더 특히 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85%-90% 줄일 수 있다.
- [0078] 본 발명의 항체는 본원에 기술된 구체적인 특성을 하나, 둘 이상 다양한 조합으로 나타낼 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0079] 예를 들어, 일 구체예에서, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 본원에 정의된 바와 같은 응집 억제 특성뿐만 아니라 해체 특성 모두를, 특히 고도의 입체형태적 민감도와 짝지어 나타내는 이중-특이성(bi-specific) 또는 이중-효과성(bi-effective)이다.
- [0080] 일 구체예에서, 본원에 기술된 본 발명의 항체는 이중-특이성 또는 이중-효과성이고 또한, 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 가지고, 모노머성 및/또는 올리고머성 형태인,  $A\beta$  모노머성 펩티드 및/또는 복수의 상기 모노머성 펩티드를 포함하는  $A\beta$  올리고머성 펩티드와, 특히  $A\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 공동-항온보관하면,  $A\beta$  모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집하는 것을 억제하고 또한, 추가로, 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 가지고, 모노머성 및/또는 올리고머성 형태인,  $A\beta$  모노머성 펩티드 및/또는 복수의 상기 모노머성 펩티드를 포함하는  $A\beta$  올리고머성 펩티드, 특히  $A\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 공동-항온보관하면, 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 해체시킬 수 있다.

- [0081] 특히, 아밀로이드 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드 및 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와의 공동-항온보관은, 각각, 1:1000까지의 몰농도비에서, 특히 1:10 내지 1:100의 몰농도비에서, 특히 1:100의 몰농도비에서 일어난다.
- [0082] 아밀로이드 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 본 발명의 항체의 공동-항온보관은 28℃ 내지 40℃, 특히 32℃ 내지 38℃, 더 특히 37℃의 온도에서 24시간 내지 60시간 동안, 특히 30시간 내지 50시간 동안, 더 특히 48시간 동안 수행되며, 반면 아밀로이드 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와의 공동-항온보관은 28℃ 내지 40℃, 특히 32℃ 내지 38℃, 더 특히 37℃의 온도에서 12시간 내지 36시간 동안, 특히 18시간 내지 30시간 동안, 더 특히 24시간 동안 수행된다.
- [0083] 일 구체예에서, 본원에 기술된 본 발명의 이중-특이성 또는 이중-효과성 항체는, 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 55%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 70%, 더욱더 특히 적어도 70%, 특히 적어도 75%-80% 해체시킬 수 있다.
- [0084] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 이중-특이성 또는 이중-효과성 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 가지고, 모노머성 및/또는 올리고머성 형태인, Aβ 모노머성 펩티드 및/또는 복수의 상기 모노머성 펩티드를 포함하는 Aβ 올리고머성 펩티드, 특히 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집을 버퍼 내에서 항온보관된 각각의 아밀로이드 펩티드 모노머(대조군)와 비교하여 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85-90% 또는 그 이상 억제한다.
- [0085] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 이중-특이성 또는 이중-효과성 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 Aβ<sub>1-40</sub> 모노머성 펩티드에 대해, 특히 Aβ 모노머성 펩티드 1-40에 대해 및 복수의 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 대해 높은 특이성을 나타내지만, Aβ<sub>1-28</sub>, Aβ<sub>17-40</sub>, Aβ<sub>1-38</sub>, Aβ<sub>1-39</sub>, Aβ<sub>1-41</sub>, 및/또는 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드로 이루어지는 그룹에서 선택된 아밀로이드 펩티드 모노머에 대해 교차-반응성(cross-reactivity)을 본질적으로 전혀 보이지 않거나 또는 작은 내지 중등도의(moderate) 교차-반응성만을 보인다.
- [0086] 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는 아밀로이드 펩티드 Aβ<sub>1-40</sub>에 대해 Aβ<sub>1-28</sub>, Aβ<sub>17-40</sub>, Aβ<sub>1-38</sub>, Aβ<sub>1-39</sub>, Aβ<sub>1-41</sub>, Aβ<sub>1-42</sub>에 비해 1000배 이하, 특히 50 내지 100배, 더 특히 80 내지 100배, 특히 100배 더 민감하여, 아밀로이드형성 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집을, *인 비트로* 및 *인 비보* 억제할 수 있다.
- [0087] 일 구체예에서는, 본원에 기술된 이중-특이성 또는 이중-효과성 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 Aβ<sub>1-40</sub> 모노머성 펩티드에, 및 Aβ<sub>1-42</sub>, 올리고머성 및/또는 폴리머성 펩티드에도 우선적으로 결합하나, Aβ 모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 모노머성 펩티드 1-42에 대해서는 중간 정도의 결합을 보이며 및/또는 Aβ 모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한, Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 37℃의 온도에서 24시간 동안 공동-항온보관하면 Aβ 모노머 및/또는 올리고머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을, 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석, 특히 이하의 실시예 1.4 및 2.4에 기술된 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정된 바와 같이, 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:100인 몰농도비에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 55%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 70%, 및 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:10인 몰농도비에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 특히 적어도 60%, 특히 적어도 65%, 더 특히 적어도 75%, 더욱더 특히 적어도 80%, 특히 적어도 85-90% 억제하며, 또한 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 37℃의 온도에서 24시간 동안 공동-항온보관하면 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:100인 몰농도비에서 적어도 10%, 및 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:10인 몰농도비에서 적어도 20% 해체시킨다.

- [0088] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는 아밀로이드 펩티드  $A\beta_{1-40}$ 에 대해 높은 결합 민감도를 가지고, 0.01 $\mu\text{g}$ 까지의 농도, 특히 0.5 $\mu\text{g}$  내지 0.01 $\mu\text{g}$ 의 농도 범위, 더 특히 0.1 $\mu\text{g}$  내지 0.01 $\mu\text{g}$ , 특히 0.01  $\mu\text{g}$ 의 농도의  $A\beta_{1-42}$  가용성 올리고머 및/또는 폴리머성 아밀로이드 펩티드를 검출할 수 있다.
- [0089] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하고, 상기 항체는 소수성 팔미트산 모이어티로 변형된  $\beta$ -아밀로이드 펩티드  $A\beta_{1-15}$ 의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩티드를 포함하는 초분자 항원 구조물에 대해 생성되었으며, 여기서 상기 소수성 모이어티는 예를 들어, 라이신과 같은 아미노산 또는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 링커 분자로서 작용할 수 있는 아미노산 유사체를 통해 각 말단에 공유적으로 결합한다.
- [0090] 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 입체형태 에피토프를 인식하고 결합한다.
- [0091] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 7에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 9-11을 갖는 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역(natural framework region) 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0092] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 12-14를 갖는 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0093] 추가로, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 7에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 9-11을 갖는 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0094] 추가로, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 12-14를 갖는 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0095] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로, 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 또는 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 9-14를 갖는 중쇄 및 경쇄 CDR의 일부 또는 전체를 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0096] 본 발명은 또한 서열 식별 번호: 7 및/또는 서열 식별 번호: 8에 도시된 폴리펩티드 서열을 포함하는 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다. 본 발명은 또한 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 모노클로날 항체 ACI-24-Ab-3에 관한 것이다.
- [0097] 본 발명은 또한, 항체가 본질적으로 그의 전체 기능성을 유지하도록, 서열 식별 번호: 7-8의 서열 내에 적어도 하나, 특히 적어도 둘, 더 특히 적어도 셋 이상의 보존적 치환(conservative substitution)을 도입함으로써, 그 서열이 변경(alter)되어 있는 항체를 포함한다.
- [0098] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 9에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR1 및/또는 서열 식별 번호: 10에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR2 및/또는 서열 식별 번호: 11에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR3를 포함하는 펩티드 단편에 관한 것이다.

- [0099] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 12에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR1 및/또는 서열 식별 번호: 13에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR2 및/또는 서열 식별 번호: 14에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR3를 포함하는 펩티드 단편에 관한 것이다.
- [0100] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 9에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR1에 관한 것이다.
- [0101] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 10에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR2에 관한 것이다.
- [0102] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 11에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR3에 관한 것이다.
- [0103] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 12에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR1에 관한 것이다.
- [0104] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 13에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR2에 관한 것이다.
- [0105] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 14에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR3에 관한 것이다.
- [0106] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 7에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 9-11을 갖는 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 인코딩하는(encoding) 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 12-14를 갖는 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0107] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이고 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 7에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 9-11을 갖는 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워넣어진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0108] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이고 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 12-14를 갖는 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워넣어진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0109] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이고 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 또는 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 9-14를 갖는 경쇄 및 중쇄 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0110] 본 발명의 다른 구체예에서는, 본원에 기술된 본 발명의 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 특히 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 모노클로날 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특히 이들 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 식별 번호: 15-16이다.
- [0111] 다른 구체예에서는, 엄격 조건(stringent condition) 하에서 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 모노클로날 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 하이브리다이즈(hybridize)되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특히 엄격 조건 하에서 뉴클레오티드 서열 서열 식별 번호: 15-16에 하이브리다이즈되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0112] 특히, 서열 식별 번호: 8의 위치 52는 임의의 아미노산일 수 있다. 추가의 구체예에서, 위치 52는 타이로신, 세린, 또는 시스테인 잔기일 수 있다. 더 특히 위치 52는 시스테인 잔기이다.

- [0113] 특정 구체예에서, 본 발명은 2007년 5월 25일에 기탁되고 기탁번호 DSM ACC2844를 부여받은 하이브리도마 세포주 EJ1A9에 의해 생산된 항체의 특징을 갖는 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0114] 특히, 본 발명은 2007년 5월 25일에 기탁되고 기탁번호 DSM ACC2844를 부여받은 하이브리도마 세포주 EJ1A9에 의해 생산된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0115] 특히, 본 발명은 또한 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 결합하는 A $\beta$  에피토프에 관한 것이며, 상기 항체는 소수성 팔미트산 모이어티로 변형된  $\beta$ -아밀로이드 펩티드 A $\beta_{1-15}$ 의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩티드를 포함하는 초분자 항원 구조물에 대해 생성되었으며, 여기서 상기 소수성 모이어티는, 예를 들어, 라이신과 같은 아미노산 또는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 링커 분자로서 작용할 수 있는 아미노산 유사체를 통해 각 말단에 공유적으로 결합한다. 본 발명은 추가로 모노클로날 항체 ACI-24-Ab-3에 결합하는 A $\beta$  에피토프에 관한 것이다.
- [0116] 일 구체예에서 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로, 상기 항체는 적어도 10, 특히 적어도 20, 더 특히 적어도 30, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 펩티드에, 및/또는 복수의 상기 아밀로이드 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 아밀로이드 펩티드에 및/또는 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 아밀로이드 섬유 또는 피브릴에, 특히 A $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드 및 복수의 A $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유에 결합하고, 또한 8개 이하의 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 펩티드에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않는다.
- [0117] 일 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로, 상기 항체는 적어도 30, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 펩티드에, 및/또는 복수의 상기 아밀로이드 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 아밀로이드 펩티드에 및/또는 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 아밀로이드 섬유 또는 피브릴에, 특히 A $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드 및 복수의  $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유에 결합하지만, A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않는다.
- [0118] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42 및 복수의 A $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보인다.
- [0119] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42 및 복수의 A $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고, A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않는다.
- [0120] 특히, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 상기 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 A $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드 및 복수의 A $\beta_{1-42}$  모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며, 또한, A $\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 공동-항온보관하면, A $\beta$  모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을 억제한다.
- [0121] 일 구체예에서, 상기 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는, A $\beta$  모노머 및/또는 올리고머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을 버퍼 내에서 항온보관된 각각의 아밀로이드 펩티드 모노머(대조군)와 비교하여 적어도 20%, 적어도 30%, 특히 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 더 특히 적어도 60%, 더욱더 특히 적어도 70%, 특히 적어도 80-90% 또는 그 이상 억제한다.
- [0122] 본 발명의 일 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체

또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드 및 복수의 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 Aβ 펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 Aβ 피브릴 또는 섬유에 결합하나, Aβ 모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 Aβ 모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한, Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 37℃의 온도에서 24시간 동안 공동-항온보관하면 Aβ 모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을, 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석, 특히 실시예 1.4 및 2.4에 기술된 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정된 바와 같이, 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:100인 몰농도비에서 적어도 20%, 적어도 30%, 특히 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 더 특히 적어도 60%, 더욱더 특히 적어도 70%, 및 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:10인 몰농도비에서 적어도 50%, 더 특히 적어도 60%, 더 특히 적어도 65%, 더욱더 특히 적어도 70% 억제한다.

[0123] 특히, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드 및 복수의 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 Aβ 펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 Aβ 피브릴 또는 섬유에 결합하나, Aβ 모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 Aβ 모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며, 또한, Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 공동-항온보관하면, 상기 미리 형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를, 특히 적어도 10%, 적어도 20%, 특히 적어도 30%, 더 특히 적어도 40%, 더욱더 특히 적어도 50%, 특히 적어도 60% 이상 해체시킬 수 있다.

[0124] 본 발명의 일 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드 및 복수의 Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 Aβ 펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 Aβ 피브릴 또는 섬유에 결합하나, Aβ 모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 Aβ 모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한, Aβ<sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 37℃의 온도에서 24시간 동안 공동-항온보관하면 상기 미리 형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를, 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석, 특히 이하의 실시예 1.4 및 2.4에 기술된 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정된 바와 같이, 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:100인 몰농도비에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 특히 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 더 특히 적어도 60%, 더욱더 특히 적어도 70%, 및 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>가 1:10인 몰농도비에서 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 더 특히 적어도 60%, 더욱더 특히 적어도 70% 해체시킨다.

[0125] 아밀로이드 단백질의 응집의 억제를 통해 및 아밀로이드형성 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트의 해체를 통해, 본 발명의 항체는 아밀로이드 플라크의 형성을 예방 또는 감소시킬 수 있으며 이는 상기 질환과 관련된 증상을 완화시키고, 및 그의 진행을 지연시키거나 역행시킨다.

[0126] 따라서, 본 발명의 추가적 구체예는 본원에 기술된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 뇌 내의 Aβ의 증가된 농도와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 Aβ의 총량을 감소시킬 수 있다.

[0127] 본 발명의 다른 구체예에서는 본원에 기술된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부가 제공되며, 상기 항체는 플라크를 붕괴시켜, 뇌 내의 증가된 플라크 부하와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크 부하를 감소시킬 수 있다. 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 이의 기능부는 뇌 내의 플라크 부하를 적어도 20%만큼, 특히 적어도 25%만큼, 더 특히 적어도 30%만큼, 더욱더 특히 30%를 초과하여 감소시킨다.

[0128] 본 발명의 또 다른 구체예에서는 본원에 기술된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능적인 부분이 제공되며, 상기 항체는, 뇌 내의 증가된 플라크 부하와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크의 양의 감소와 관련된 플라크의 가용화가 가능하다. 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 이의 기능부는 뇌 내의 플라크의 양을 적어도 10%, 특히 적어도 15%, 더 특히 적어도 20% 줄인다.

[0129] 본 발명의 항체는 본원에 기술된 구체적인 특성을 하나, 둘 이상 다양한 조합으로 나타낼 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

- [0130] 예를 들어, 일 구체예에서, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 본원에 정의된 응집 억제 특성뿐만 아니라 해체 특성 모두를 나타낸다는 점에서 이중-특이성 또는 이중-효과성이며, 이는 특히 고도의 입체형태적 민감도와 짝지어 나타난다.
- [0131] 일 구체예에서, 본원에 기술된 본 발명의 항체는 이중-특이성 또는 이중-효과성이고 또한, 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와, 특히 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 공동-항온보관하면, A $\beta$  모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집하는 것을 억제하고 또한, 추가로, 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드, 특히 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 공동-항온보관하면, 상기 미리형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 해체시킬 수 있다.
- [0132] 특히, 아밀로이드 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드 및 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와의 공동-항온보관은, 각각, 1:1000까지의 물농도비에서, 특히 1:10 내지 1:1000의 물농도비에서, 특히 1:100의 물농도비에서 일어난다.
- [0133] 아밀로이드 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 본 발명의 항체의 공동-항온보관은 28°C 내지 40°C, 특히 32°C 내지 38°C, 더 특히 37°C의 온도에서 24시간 내지 60시간 동안, 특히 30시간 내지 50시간 동안, 더 특히 48시간 동안 수행되며, 반면 아밀로이드 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와의 공동-항온보관은 28°C 내지 40°C, 특히 32°C 내지 38°C, 더 특히 37°C의 온도에서 12시간 내지 36시간 동안, 특히 18시간 내지 30시간 동안, 더 특히 24시간 동안 수행된다.
- [0134] 일 구체예에서, 본원에 기술된 본 발명의 이중특이성 또는 이중-효과성 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 상기 미리 형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 특히 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 더 특히 적어도 60%, 더욱더 특히 적어도 70% 해체시킬 수 있다.
- [0135] 일 구체예에서, 본원에 기술된 본 발명의 이중-특이성 또는 이중-효과성 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는, 적어도 30, 특히 적어도 35, 더 특히 적어도 38, 더욱더 특히 적어도 40 아미노산 잔기를 갖는 A $\beta$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드, 특히 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집을, 버퍼 내에서 항온보관된 각각의 아밀로이드 펩티드 모노머(대조군)와 비교하여 적어도 30%, 특히 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 더 특히 적어도 60%, 더욱더 특히 적어도 70%, 특히 적어도 80-90% 또는 그 이상 억제할 수 있다.
- [0136] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 이중-특이성 또는 이중-효과성 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드에 대해서는 높은 특이성을 나타내지만, A $\beta$ <sub>1-28</sub>, 및 A $\beta$ <sub>17-40</sub> 모노머성 펩티드로 이루어지는 그룹에서 선택된 아밀로이드 펩티드 모노머에 대한 교차-반응성을 본질적으로 전혀 보이지 않거나 또는 작은 교차-반응성만을 보인다.
- [0137] 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는 아밀로이드 펩티드 A $\beta$ <sub>1-42</sub>에 대해 A $\beta$ <sub>1-28</sub>, 및/또는 A $\beta$ <sub>17-40</sub>에 비해 1000배 이하, 특히 50 내지 100배, 더 특히 80 내지 100배, 특히 100배 보다 민감하여, 인 비트로 및 인 비보 아밀로이드형성 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집을 억제할 수 있고 및/또는 미리 형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 해체시킬 수 있다.
- [0138] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 이중-특이성 또는 이중-효과성 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하며, 상기 항체는 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드 및 복수의 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드 및 복수의 상기 폴리머성 펩티드를 포함하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유에 결합하나, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 대해서는 실질적으로 보다 약한 결합을 보이고 및/또는 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 대해서는 본질적으로 어떠한 결합도 보이지 않으며 또한, A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드와 37°C의 온도에서 24시간 동안 공동-항온보관하면 A $\beta$  모노머가 고분자 폴리머성 피브릴로 응집되는 것을, 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석, 특히 이하의 실시예 1.4 및 2.4에 기술된 티오플라빈 T(Th-T) 형광 분석에 의해 측정된 바와 같이, 항체 대 A $\beta$ <sub>1-42</sub>가 1:100인 물농도비에서 적어도 30%, 및 항

체 대  $A\beta_{1-42}$ 가 1:10인 물농도비에서 적어도 65% 억제하며 또한,  $A\beta_{1-42}$  모노머성 및/또는 올리고머성 펩티드의 응집에 의해 형성된 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 피브릴 또는 필라멘트와 37°C의 온도에서 24시간 동안 공동-항온보관하면 상기 미리 형성된 폴리머성 피브릴 또는 필라멘트를 항체 대  $A\beta_{1-42}$ 가 1:100인 물농도비에서 적어도 20%, 및 항체 대  $A\beta_{1-42}$ 가 1:10인 물농도비에서 적어도 50% 해체시킨다.

[0139] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이며, 상기 항체는 아밀로이드 펩티드  $A\beta_{1-42}$ 에 대해 높은 결합 민감도를 가지고, 0.01 $\mu$ g까지의 농도, 특히 0.5 $\mu$ g 내지 0.01 $\mu$ g의 농도 범위, 더 특히 0.1 $\mu$ g 내지 0.01 $\mu$ g, 특히 0.01  $\mu$ g의 농도의  $A\beta_{1-42}$  섭취를 검출할 수 있다.

[0140] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 제공하고, 상기 항체는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)와 같은 친수성 모이어티로 변형된  $\beta$ -아밀로이드 펩티드  $A\beta_{22-35}$  및  $A\beta_{29-40}$  각각의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩티드를 포함하는 초분자 항원 구조물에 대해 생성되었으며, 여기서 상기 친수성 모이어티는 예를 들어, 라이신과 같은 아미노산 또는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 링커 분자로서 작용할 수 있는 아미노산 유사체를 통해 각 말단에 공유적으로 결합한다.

[0141] 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 입체형태 에피토프를 인식하고 결합한다.

[0142] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 17 및 서열 식별 번호: 19 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부에 관한 것이다.

[0143] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 20 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부에 관한 것이다.

[0144] 추가로, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 17 및 서열 식별 번호: 19 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.

[0145] 추가로, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 20 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.

[0146] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것으로, 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 17, 서열 식별 번호: 19, 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 20에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 또는 상기 중쇄 및 경쇄 CDR의 일부 또는 전체를 포함하는 이의 기능부를 포함한다.

[0147] 본 발명은 또한 서열 식별 번호: 17 및 서열 식별 번호: 19 및/또는 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 20에 주어진 폴리펩티드 서열을 포함하는 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다. 본 발명은 또한 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 17-18을 갖는 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9 및 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 19-20을 갖는 모노클로날 항체 ACI-12-Ab-11에 관한 것이다.

[0148] 본 발명은 또한, 항체가 본질적으로 그의 전체 기능성을 유지하도록, 서열 식별 번호: 17-18 및 서열 식별 번호: 19-20 각각의 서열 내에 적어도 하나, 특히 적어도 둘, 더 특히 적어도 셋 이상의 보존적 치환을 도입함

으로써, 그 서열이 변경되어 있는 항체를 포함한다.

- [0149] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 21에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR1 및/또는 서열 식별 번호: 22에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR2 및/또는 서열 식별 번호: 23에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR3를 포함하는 펩티드 단편에 관한 것이다.
- [0150] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 24에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR1 및/또는 서열 식별 번호: 25에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR2 및/또는 서열 식별 번호: 26에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR3를 포함하는 펩티드 단편에 관한 것이다.
- [0151] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 21에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR1에 관한 것이다.
- [0152] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 22에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR2에 관한 것이다.
- [0153] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 23에 주어진 바와 같은 경쇄 CDR3에 관한 것이다.
- [0154] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 24에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR1에 관한 것이다.
- [0155] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 25에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR2에 관한 것이다.
- [0156] 일 구체예에서 본 발명은 서열 식별 번호: 26에 주어진 바와 같은 중쇄 CDR3에 관한 것이다.
- [0157] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 17 및 서열 식별 번호: 19 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 서열 식별 번호: 21-23에 도시된 바와 같은 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0158] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 20 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 서열 식별 번호: 24-26에 도시된 바와 같은 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0159] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 17 및 서열 식별 번호: 19 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의, 서열 식별 번호: 21-23에 도시된 바와 같은 경쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0160] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 20 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 중쇄 가변 도메인, 또는 적어도 하나, 특히 적어도 두 개, 더 특히 적어도 세 개의 서열 식별 번호: 24-26에 도시된 바와 같은 중쇄 CDR, 특히 그들의 천연 골격 영역 내에 끼워넣어진 모든 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0161] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로 여기서 상기 항체는 서열 식별 번호: 17 및 서열 식별 번호: 19 및 서열 식별 번호: 18 및 서열 식별 번호: 20 각각에 주어진 서열에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 나타내는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 또는 서열 식별 번호: 21-26에 도시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 CDR을 포함하는 이의 기능부를 포함한다.
- [0162] 본 발명의 다른 구체예에서는, 본원에 기술된 본 발명의 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 특히 서열 식별 번호: 17-18의 폴리펩티드 서열을 갖는 모노클로날 항체 또는 서열 식별 번호: 19-20의 폴리펩티드 서열을 갖는 모노클로날 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특히, 서열 식별 번호: 17-18 및 서열 식별 번호: 19-20을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 각각 서열 식별 번호: 27-28 및 서열

식별 번호: 29-30이다.

- [0163] 다른 구체예에서는, 엄격 조건 하에서 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 17-18을 갖는 모노클로날 항체 또는 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 19-20을 갖는 모노클로날 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 하이브리다이징되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특히 엄격 조건 하에서 뉴클레오티드 서열 서열 식별 번호: 27-28 또는 서열 식별 번호: 29-30에 하이브리다이징되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특정 구체예에서, 본 발명은 2007년 5월 25일에 DSM ACC2845로서 기탁된 하이브리도마 세포주 FG1F9E4에 의해 생산된 항체의 특징을 갖는 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0164] 특히, 본 발명은 2007년 5월 25일에 DSM ACC2845로서 기탁된 하이브리도마 세포주 FG1F9E4에 의해 생산된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0165] 특정 구체예에서, 본 발명은 2007년 5월 25일에 DSM ACC2846으로서 기탁된 하이브리도마 세포주 FK2A6A6에 의해 생산된 항체의 특징을 갖는 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0166] 특히, 본 발명은 2007년 5월 25일에 DSM ACC2846으로서 기탁된 하이브리도마 세포주 FK2A6A6에 의해 생산된 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 관한 것이다.
- [0167] 특히, 본 발명은 또한 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부에 결합하는 A $\beta$  에피토프에 관한 것이며, 상기 항체는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 친수성 모이어티로 변형된  $\beta$ -아밀로이드 펩티드 A $\beta$ <sub>22-35</sub> 및 A $\beta$ <sub>29-40</sub> 각각의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩티드를 포함하는 초분자 항원 구조물에 대해 생성되었으며, 여기서 상기 친수성 모이어티는, 예를 들어, 라이신과 같은 아미노산 또는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 링커 분자로서 작용할 수 있는 아미노산 유사체를 통해 각 말단에 공유적으로 결합한다. 본 발명은 또한 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9에 결합하는 A $\beta$  에피토프에 관한 것이다. 본 발명은 또한 모노클로날 항체 ACI-12-Ab-11에 결합하는 A $\beta$  에피토프에 관한 것이다. 일 양상에서, 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는, 뇌 내의 가용성 A $\beta$ 의 증가된 농도와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 가용성 A $\beta$ 의 총량을 감소시킬 수 있다.
- [0168] 일 양상에서, 본원에 기술된 본 발명의 항체는 플라크를 붕괴시켜, 뇌 내의 증가된 플라크 부하와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크 부하를 감소시킬 수 있다.
- [0169] 다른 양상에서, 본원에 기술된 본 발명의 항체는 뇌 내의 증가된 플라크 부하와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크의 양의 감소와 관련된 플라크의 가용화가 가능하다.
- [0170] 본 발명의 다른 목적은 아밀로이드증 (알츠하이머병(AD)과 같은 신경학적 장애, 예를 들면, 경증 인지 장애(mild cognitive impairment, MCI), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down's syndrome), 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis(Dutch type))과 같은 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 손실(loss)을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 괄 파킨슨-치매 복합증(Guam Parkinson-Dementia complex); 및 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환 및 병태; 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes); 및 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis)을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 질환들과 같은 속발성 아밀로이드증(secondary amyloidosis) 및 연령-관련 아밀로이드증(age-related amyloidosis)을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹); 내분비 종양(endocrine tumor), 및 황반 변성(macular degeneration)을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 질환 및 장애의 예방 및/또는 치료적 처치 및/또는 완화를 위해, 이를 필요로 하는 대상에서, 예를 들어, 포유류 또는 인간을 포함하는 대상을 본원에 기술된 본 발명의 항체로 수동적으로 면역화하는 것에 의한 방법 및 본원에 기술된 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0171] 본 발명의 특정 양상에서, 이들 방법의 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 ACI-24-Ab-3 또는 이의 기능부이다.

- [0172] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 이들 방법의 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 17-18을 갖는 ACI-11-Ab-9 또는 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 9-10을 갖는 ACI-12-Ab-11, 각각, 또는 이의 기능부이다.
- [0173] 본 발명은 또한 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를, 치료적 유효량으로, 포함하는 치료적 조성물에 관한 것이다.
- [0174] 일 구체예에서, 상기 억제학적 조성물은 억제학적으로 허용가능한 담체, 특히 치료적 유효량의 억제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0175] 일 구체예에서, 본 발명은 아밀로이드증, 종양, 및 황반 변성을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 질환 및 장애의 치료에서의 사용을 위한 본원에 기술된 조성물을 제공한다.
- [0176] 그러한 구체예의 특정 양상에서, 사용된 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 ACI-24-Ab-3 또는 이의 기능부이다.
- [0177] 그러한 구체예의 다른 특정 양상에서, 사용된 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 17-18을 갖는 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9 및 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 19-20을 갖는 모노클로날 항체 ACI-12-Ab-11에서 선택되거나 또는 이의 기능부이다.
- [0178] 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 상기 질환의 치료를 위해 다른 생물학적 활성 물질 또는 다른 치료 과정과 조합되어 투여될 수 있다. 상기 다른 생물학적 활성 물질은 혼합물의 형태로 본 발명의 항체를 이미 포함하는 동일한 조성물의 일부일 수 있으며, 여기서 상기 항체 및 다른 생물학적 활성 물질은 동일한 억제학적으로 허용가능한 용매 및/또는 담체와 또는 이에 혼합(intermix)되고, 또는 상기 항체 및 다른 생물학적 활성 물질은 개별 조성물의 일부로서 개별적으로 제공될 수 있으며, 이는 구성물(part)의 키트의 형태로 개별적으로 또는 함께 제공될 수 있다.
- [0179] 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 본 발명의 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부는 이를 필요로 하는 대상에게 다른 생물학적 활성 물질 또는 물질들과 동시에, 간헐적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 기능적으로 동등한 임의의 항체 또는 이의 기능부를 포함하는 본 발명의 모노클로날 항체는 제 1 추가적 생물학적 활성 물질과 동시에 또는 상기 항체의 투여 전 또는 그 후 순차적으로 투여될 수 있다. 하나 이상의 추가적 생물학적 활성 물질이 적어도 하나의 본 발명의 항체와 함께 투여되는 적용 계획이 선택된다면, 여러 조합의 화합물 또는 물질은 부분적으로 동시에, 부분적으로 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0180] 일 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효량의 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부 및 추가적 생물학적 활성 물질 또는 화합물, 특히 아밀로이드증, 내분비종양, 및 황반 변성을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 질환 및 장애의 투약(medication)에 사용되는 화합물 및/또는 억제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0181] 일 구체예에서는, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 포함하는, 및 추가로 산화적 스트레스에 효과적인 화합물, 항-자가사멸 화합물, 금속 킬레이터(chelator), 피렌제핀(pirenzepin) 및 대사물과 같은 DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술폰산(3APS), 1,3-프로판디술폰이트(1,3PDS), 세크레타아제 활성제(secretase activator),  $\beta$ - 및  $\gamma$ -세크레타아제 억제제, 타우 단백질(tau protein), 신경전달물질(neurotransmitter),  $\beta$ -시트 파괴제(sheet breaker), 항-염증(anti-inflammatory) 분자, 또는 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 도네페질(donepezil), 및/또는 갈란타민(galantamine)과 같은 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs), 및 다른 약물 및 영양 보조제로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물, 및, 선택적으로, 억제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 본원에 기술된 본 발명의 조성물이 제공된다.
- [0182] 특정 구체예에서, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 본원에 기술된 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 포함하는, 추가로 적어도 하나의 화합물 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs)를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0183] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 본원에 기술된 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 포함하는, 추가로 타크린, 리바스티그민, 도네페질, 갈란타민, 니아신 및 메탄

턴으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 부가적 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0184] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 본원에 기술된 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 포함하는, 추가로 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 적어도 하나의 "비전형적 항정신병약(atypical antipsychotic)"을 포함하는, 및, 선택적으로, 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0185] 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 본 발명의 항체 또는 이의 기능부와 조합되어 조성물에 적절하게 사용될 수 있는 다른 화합물은, 예를 들어 WO 2004/058258 (특히 16 및 17페이지 참조)에 설명되어 있으며, 이는 치료 약물 표적(36-39페이지), 알칸술폰산 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 증식체-활성화된 수용체(peroxisome proliferators-activated receptor; PPAR) 작용제(63-67페이지), 콜레스테롤-저하제(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 내의 생물학적 활성 물질의 유용성을 증가시키는 화합물(89-93페이지 참조) 및 전구약물(prodrug)(93 및 94페이지)을 포함하고, 상기 문서는 본원에 참조로서 삽입되어 있다.
- [0186] 특히, 본 발명의 조성물은, 치료적 유효량의, 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는, 모노클로날 항체 또는 이의 기능부 및/또는 생물학적 활성 물질을 포함한다.
- [0187] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 생산하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 소수성 모이어티, 특히 팔미트산 모이어티로 변형된  $\beta$ -아밀로이드 펩티드 또는 이의 단편, 특히  $\beta$ -아밀로이드 펩티드  $A\beta_{1-15}$ , 또는, 선택적으로, 친수성 모이어티, 특히 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티로 변형된, 특히  $\beta$ -아밀로이드 펩티드  $A\beta_{22-35}$  및  $\beta$ -아밀로이드 펩티드  $A\beta_{29-40}$  각각의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩티드를 포함하는 초분자 항원 구조물에 대한 항체를 적합한 숙주 유기체 내에서 생성시키는 단계로서, 여기서 상기 소수성 또는 친수성 모이어티는, 적어도 하나, 특히 하나 또는 두 개의, 예를 들어, 라이신, 글루타민산 및 시스테인과 같은 아미노산 또는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 링커 분자로서 작용할 수 있는 아미노산 유사체를 통해 각 말단에 공유적으로 결합하는 것인, 단계; 및 상기 항체를 단리하는(isolating) 단계를 포함한다.
- [0188] PEG와 같은 친수성 모이어티가 사용될 때, 상기  $\beta$ -아밀로이드 펩티드의 선택된 단편은 아미노산 서열  $A\beta_{22-35}$  및  $A\beta_{29-40}$  각각에 상응하는 단편일 수 있고, 또한 자유 PEG 말단은, 예를 들어, 리포좀의 이중층 내에 상기 항원성 구조체를 파묻기 위해, 포스포티딜에탄올아민 또는 앵커링 요소로서 기능하기에 적합한 임의의 다른 화합물에 공유적으로 결합할 수 있다.
- [0189] 일 구체예에서, 본 발명은 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 질환 및 장애의 영향을 치료 또는 완화를 필요로 하는 대상에서 상기 치료 또는 완화를 위한 약제의 조제를 위한, 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부의, 및/또는 본원에 기술된 본 발명의 약제학적 조성물의, 또는 본원에 기술된 본 발명의 혼합물의 용도에 관한 것이다.
- [0190] 일 구체예에서, 본 발명은 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 영향을 치료 또는 완화시키는 것을 필요로 하는 대상에서 상기 치료 또는 완화에 사용하기 위한, 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 사용하는 본원에 기술된 본 발명의 혼합물 또는 약제학적 조성물의 조제를 위한 방법에 관한 것이다.
- [0191] 일 구체예에서, 본 발명은 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 영향을 예방, 치료 또는

완화시키는 것을 필요로 하는 대상에서 상기 예방, 치료 또는 완화를 위한, 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부, 약제학적 조성물 또는 혼합물을 사용하는 약제의 조제를 위한 방법을 제공한다.

- [0192] 특정 구체예에서, 본 발명은 특히 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부를 사용하고, 특히 상기 항체가 조성물 내에 치료적 유효량으로 포함되도록, 상기 항체를 약제학적으로 허용가능한 형태로 제형화하는 것을 포함하는, 약제학적 조성물의 조제 방법에 관한 것이다.
- [0193] 본 발명의 일 양상에서는, 뇌 내의 증가된 플라크 부하와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크 부하를 감소시키기 위한, 그러한 치료를 필요로 하는 대상, 특히 포유류, 더 특히 인간에게 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부, 또는 조성물 또는 혼합물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.
- [0194] 본 발명의 특정 양상에서, 이들 방법에 사용된 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 ACI-24-Ab-3 또는 이의 기능부이다. 특히, 상기 모노클로날 항체는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2844로서 기탁된 하이브리도마 EJ1A9에 의해 생산된다.
- [0195] 본 발명의 추가의 특정 양상에서, 이들 방법에 사용된 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 17-18을 갖는 ACI-11-Ab-9 및 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 19-20을 갖는 ACI-12-Ab-11를 포함하는 항체의 그룹으로부터 선택된 모노클로날 항체 또는 이의 기능부이다. 특히, 상기 모노클로날 항체는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2845로서 기탁된 하이브리도마 FG1F9E4에 의해 생산되거나, 또는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2846으로서 기탁된 하이브리도마 FK2A6A6에 의해 생산된다.
- [0196] 특히, 상기 플라크 부하는 적어도 20%, 특히 적어도 25%, 더 특히 적어도 30%, 더욱더 특히 30%를 초과하여 감소된다.
- [0197] 본 발명의 다른 양상에서는, 뇌 내의 증가된 플라크 부하와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크의 양을 감소시키기 위한, 그러한 치료를 필요로 하는 대상, 특히 포유류, 특히 인간에게 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부, 또는 조성물 또는 혼합물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0198] 본 발명의 특정 양상에서, 그러한 방법에 사용된 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 ACI-24-Ab-3 또는 이의 기능부이다. 특히, 상기 모노클로날 항체는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2844로서 기탁된 하이브리도마 EJ1A9에 의해 생산된다.
- [0199] 본 발명의 추가의 특정 양상에서, 이들 방법에 사용된 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 17-18을 갖는 ACI-11-Ab-9 및 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 19-20을 갖는 ACI-12-Ab-11를 포함하는 항체의 그룹으로부터 선택된 모노클로날 항체 또는 이의 기능부이다. 특히, 상기 모노클로날 항체는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2845로서 기탁된 하이브리도마 FG1F9E4에 의해 생산되거나, 또는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2846으로서 기탁된 하이브리도마 FK2A6A6에 의해 생산된다.
- [0200] 특히, 상기 뇌 내의 플라크의 양은 적어도 10%, 특히 적어도 15%, 더 특히 15%를 초과하여 감소된다.
- [0201] 본 발명의 또 다른 양상에서는, 뇌 내의 가용성 A $\beta$ 의 증가된 농도와 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상, 특히 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 가용성 A $\beta$ 의 총량을 감소시키기 위한, 그러한 치료를 필요로 하는 대상, 특히 포유류, 더 특히 인간에게 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부, 또는 조성물 또는 혼합물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.
- [0202] 본 발명의 특정 양상에서, 이들 방법의 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 7-8을 갖는 ACI-24-Ab-3 또는 이의 기능부이다. 특히, 상기 모노클로날 항체는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2844로서 기탁된 하이브리도마 EJ1A9에 의해 생산된다.
- [0203] 본 발명의 추가의 특정 양상에서, 이들 방법에 사용된 모노클로날 항체는 본원에 기술된 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 17-18을 갖는 ACI-11-Ab-9 및 폴리펩티드 서열 서열 식별 번호: 19-20을 갖는 ACI-12-Ab-11 또는 이의 기능부를 포함하는 항체의 그룹으로부터 선택된 모노클로날 항체이다. 특히, 상기 모노클로날 항체는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2845로서 기탁된 하이브리도마 FG1F9E4에 의해 생산되거나, 또는 2007년 5월 25일에

DSM ACC2846으로서 기탁된 하이브리도마 FK2A6A6에 의해 생산된다.

- [0204] 본 발명의 또 다른 양상에서는, 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 질환 및 장애의 영향을 예방, 치료 또는 완화를 필요로 하는 대상에서, 그러한 장애에 의해 영향받은 동물, 포유류, 또는 인간에서 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부, 또는 조성물 또는 혼합물의 치료적 유효량을 그러한 치료를 필요로 하는 대상, 특히 포유류, 더 특히 인간에게 투여함에 의해 상기 질환 및 장애의 영향을 예방, 치료 또는 완화시키기 위한 방법이 제공된다.
- [0205] 본 발명의 또 다른 양상에서는, 아밀로이드-관련 질환 또는 병태를 나타내는 포유류에서 인지 기억 능력을 유지 또는 증가시키기 위한, 그러한 치료를 필요로 하는 동물, 특히 포유류, 더 특히 인간에게 본원에 기술된 본 발명의 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 항체, 특히 모노클로날 항체 또는 이의 기능부, 또는 조성물 또는 혼합물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.
- [0206] 일 구체예에서, 본 발명은, 본원에 기술된 본 발명의 모노클로날 항체를 생산하는 것을 특징으로 하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다.
- [0207] 특히, 본 발명은 2007년 5월 25일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2844를 부여받은 하이브리도마 EJ1A9에 의해 생산된 항체의 특징을 갖는 모노클로날 항체를 생산하는 것을 특징으로 하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다.
- [0208] 본 발명의 특정 구체예에서는, 2007년 5월 25일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2844를 부여받은 하이브리도마 세포주 EJ1A9가 제공된다.
- [0209] 특히, 본 발명은 2007년 5월 25일에 DSM ACC2845로서 기탁된 하이브리도마 FG1F9E4, 또는 2007년 5월 25일에 DSM ACC2846으로서 기탁된 하이브리도마 FK2A6A6에 의해 생산된 항체의 특징을 갖는 모노클로날 항체를 생산하는 것을 특징으로 하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다.
- [0210] 본 발명의 특정 구체예에서는, 2007년 5월 25일에 DSM ACC2845로서 기탁된 하이브리도마 세포주 FG1F9E4가 제공된다.
- [0211] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 2007년 5월 25일에 DSM ACC2846로서 기탁된 하이브리도마 세포주 FK2A6A6이 제공된다.
- [0212] 일 구체예에서, 본 발명은
- [0213] (a) 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역을 본 발명의 항체와 접촉시키는 단계로서, 상기 항체는 상기 아밀로이드 단백질의 입체형태 에피토프에 결합하는 것인, 단계;
- [0214] (b) 상기 항체가 상기 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 단계;
- [0215] (c) 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 단계, 특히 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키도록 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 단계; 및
- [0216] (d) 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 구역 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계
- [0217] 를 포함하는, 샘플 내의 또는 *인 시투(in situ)* 아밀로이드 단백질의 에피토프에 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부의 면역특이적 결합을 검출하는 것을 포함하는 대상에서 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 진단 방법에 관한 것이다.
- [0218] 특정 구체예에서 상기 단계 (a)의 조성물은 상기 대상의 치료를 위한 항체들의 조합을 포함한다.
- [0219] 일 구체예에서는,
- [0220] (a) 조사중인 대상의 조직을 대표하는 샘플을 수득하는 것;
- [0221] (b) 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부로 아밀로이드 플라크의 존재에 대해 상기 샘플을 테스트하는 것;
- [0222] (c) 상기 샘플에 결합된 항체의 양을 측정하는(determining) 것, 특히 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를 아밀로이드 플라크의 존재 또는 부재와 서로 관련시키도록 상기 샘플에 결합된 항체의 양을 측정하는 것; 및

- [0223] (d) 상기 대상의 조직 내의 플라크 존재량(burden)을 계산하는 것
- [0224] 을 포함하는 아밀로이드형성 플라크 존재량의 정도를 검출하는 것을 필요로 하는 대상의 조직 내에서 아밀로이드형성 플라크 존재량의 정도를 측정하는 방법이 제공된다.
- [0225] 일 구체예에서는,
- [0226] (a) 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역을 항체와 접촉시키는 단계로서, 상기 항체는 상기 아밀로이드 단백질의 입체형태 에피토프에 결합하는 것인, 단계;
- [0227] (b) 상기 항체가 상기 샘플 내의 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 단계;
- [0228] (c) 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 단계;
- [0229] (d) 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 구역 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계; 및
- [0230] (e) 상기 면역복합체의 양을 정상 대조군 값과 비교하는 단계
- [0231] 를 포함하고,
- [0232] 여기서 정상 대조군 값과 비교되는 상기 복합체의 양의 증가는 상기 환자가 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 걸린 것 또는 상기 질환 또는 병태가 발생할 위험에 있는 것을 나타내는 것인,
- [0233] 샘플 내의 또는 *인 시투(in situ)* 아밀로이드 단백질의 에피토프에, 본원에 기술된 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부의 특이적 결합을 검출하는 것을 포함하는 대상에서의 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 대한 소인(predisposition)을 진단하기 위한 방법이 제공된다.
- [0234] 일 구체예에서는, 본 발명의 항체 또는 조성물로의 치료 후 대상에서 최소 잔류 질환(minimal residual disease)을 모니터링하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0235] (a) 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역을 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부와 접촉시키는 단계로서, 상기 항체는 상기 아밀로이드 단백질의 입체형태 에피토프에 결합하는 것인, 단계;
- [0236] (b) 상기 항체가 상기 아밀로이드 단백질에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 단계;
- [0237] (c) 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 단계;
- [0238] (d) 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 상기 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 구역 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계; 및
- [0239] (e) 상기 면역복합체의 양을 정상 대조군 값과 비교하는 단계
- [0240] 를 포함하고,
- [0241] 여기서 정상 대조군 값과 비교되는 상기 복합체의 양의 증가는 상기 대상이 여전히 최소 잔류 질환에 걸려 있음을 나타내는 것이다.
- [0242] 특정 구체예에서 상기 단계 (a)의 조성물은 상기 대상의 치료를 위한 항체들의 조합을 포함한다.
- [0243] 일 구체예에서는,
- [0244] (a) 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 구역을 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부와 접촉시키는 단계로서, 상기 항체는 상기 아밀로이드 단백질의 입체형태 에피토프에 결합하는 것인, 단계;
- [0245] (b) 상기 항체가 상기 아밀로이드 항원에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 단계;
- [0246] (c) 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 단계;
- [0247] (d) 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 상기 대상의 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 구역 내의 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계; 및
- [0248] (e) 상기 치료 개시 전과 후의 상기 면역복합체의 양을 비교하는 단계

- [0249] 를 포함하고,
- [0250] 여기서 상기 면역복합체의 양의 감소는 상기 대상이 상기 치료에 대해 반응할 높은 잠재성을 가짐을 나타내는 것인,
- [0251] 본 발명의 항체 또는 조성물로 치료될 대상의 반응성을 예측하기 위한 방법이 제공된다.
- [0252] 특정 구체예에서 상기 단계 (a)의 조성물은 상기 대상의 치료를 위한 항체들의 조합을 포함한다.
- [0253] 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 본 발명의 항체, 특히 기능적으로 동등한 임의의 항체를 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 기능부, 및 상기 항체의 사용을 위한 설명서를 포함하는 테스트 키트로서, 아밀로이드 단백질에 대해 결합시켜 면역복합체를 형성하고, 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부재와 서로 관련시키도록 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 것을 목적으로 하는, 아밀로이드-관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 필요로 하는 대상에서 아밀로이드-관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 위한 테스트 키트에 관한 것이다.
- [0254] 본 발명의 이점 및 다른 목적, 특성 및 이점은 이하에 개시된 구체예의 상세한 설명 및 첨부된 청구항의 검토 후 명백해질 것이다.
- [0255] 정의
- [0256] 여기에서 사용되는, 용어 "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 호환가능하고 펩티드 결합으로 연결된 아미노산으로 구성된 생분자를 의미하기 위하여 정의된다.
- [0257] 여기에서 사용되는 용어 "하나" 및 "그"는 "하나 이상"을 의미하기 위하여 정의되고 문맥이 적절하지 않은 한 복수를 포함한다.
- [0258] 여기에서 사용되는 용어 "검출하는" 또는 "검출되는"은 면역화학 또는 조직학적 방법 같은 생물학 분자의 검출을 위한 알려진 기술을 사용하는 것을 의미하고, 조사하에서 생분자의 존재 또는 농도를 정성적으로 또는 정량적으로 측정하는 것을 지칭한다.
- [0259] "아밀로이드(amyloid)  $\beta$ , A $\beta$  또는  $\beta$ -아밀로이드"는 당업계에서 인식된 용어이고 아밀로이드  $\beta$  단백질 및 펩티드, 아밀로이드  $\beta$  전구체 단백질(APP)뿐만 아니라 그것의 변형, 단편(fragment), 임의의 기능적 균등물(equivalents)을 지칭한다. 여기에서 사용된, 아밀로이드  $\beta$ 는 APP의 단백질 분해(proteolytic cleavage)에 의하여 생성되는 임의의 단편을 지칭하지만, A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-39</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-41</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>, 및 A $\beta$ <sub>1-43</sub>을 포함하지만 이에 한정되지 않는 특히 아밀로이드 병리학과 연관되거나 관련된 단편들을 뜻한다.
- [0260] 상기 언급된 것처럼 아밀로이드  $\beta$  펩티드의 구조 및 서열은 당업자에게 잘 알려져있고 상기 펩티드를 생산하는 방법 또는 뇌 및 다른 조직(tissues)으로부터 그것들을 추출하는 방법이 예를 들어, Glenner 과 Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984)에 기재되어 있다. 더욱이, 아밀로이드  $\beta$  펩티드는 또한 다양한 형태로 상업적으로 이용가능하다.
- [0261] "A $\beta$  피브릴(fibril)" 또는 "A $\beta$  필라멘트(filament)" 또는 "아밀로이드 피브릴" 또는 "프로토-피브릴(proto-fibrils)"은 수용성 매질에서 불용성이고 그것들의 코어에 대량의 크로스(cross)- $\beta$  구조를 함유하는 (대부분 피브릴 축에 수직인 베타-스트랜드를 가진) 일정한 섬유 직경을 가진 개별적인 또는 번들(bundled)로 된 섬유를 형성하는 모노머성 단백질의 폴리머성 형태이다.
- [0262] "모노머성(monomeric) A $\beta$ " 또는 "A $\beta$  모노머(monomer)"는 수용성 매질에서 응집되는 복합체 없이 완전히 용해되는 아밀로이드 베타 단백질이다.
- [0263] 여기에서 사용된 것처럼 "프로토-피브릴" 또는 "프로토-피브릴 제제(proto-fibrillar preparation)"는 중합 A $\beta$  아밀로이드 펩티드의 더 높은 분자량 분획을 지칭하는데, 이에는 가용성 아밀로이드 A $\beta$  올리고머가 풍부하다.
- [0264] "폴리머성 가용성 아밀로이드(polymeric soluble amyloid)" 및 "올리고 아밀로이드 펩티드 A $\beta$ " 및 "A $\beta$  올리고머"는 여기에서 상호 호환적으로 사용되고, 수용성 배지에서의 인비트로(in vitro) 및 포유동물 또는 인체, 특히 뇌에서의 인비보(in vivo)에서도 모두 가용성인, 올리고머성 또는 폴리머성 구조를 형성하는 아밀로이드 펩티드, 또는 아밀로이드-유사 펩티드, 또는 변형되거나 끝이 잘린(truncated) 아밀로이드 펩티드, 또는 아밀로이드 펩티드의 다른 유도체의 다중 응집 모노머(multiple aggregated monomers)를 지칭하지만, 특히 아밀로이드 펩티드 또는 변형되거나 끝이 잘린 아밀로이드 펩티드 또는 그것의 유도체의 다중 응집 모노머를 지칭하는데,

이는 포유동물 또는 인체, 더 특히 뇌에서 가용성이다.

- [0265] "폴리머성 가용성 아밀로이드 A $\beta$  펩티드" 및 "올리고 아밀로이드 A $\beta$  펩티드" 및 "A $\beta$  올리고머"는 여기에서 상호 호환적으로 사용되고, 수용성 배지에서의 인비트로(in vitro) 및 포유동물 또는 인체, 특히 뇌에서의 인비보(in vivo)에서도 모두 가용성인, 올리고머성 또는 폴리머성 구조를 형성하는 아밀로이드 A $\beta$  펩티드, 또는 변형되거나 끝이 잘린(truncated) 아밀로이드 A $\beta$  펩티드, 또는 아밀로이드 A $\beta$  펩티드의 다른 유도체의 다중 응집 모노머(multiple aggregated monomers)를 지칭하지만, 특히 아밀로이드  $\beta$ (A $\beta$ ) 또는 변형되거나 끝이 잘린 아밀로이드  $\beta$ (A $\beta$ ) 펩티드 또는 그것의 유도체의 다중 응집 모노머이고, 이는 포유동물 또는 인체, 더 특히 뇌에서 가용성이다.
- [0266] 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 이의 기능부를 포함하는 모노클로날 항체에 관하여, 이 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40, 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40 및 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하고, 이는 다수의 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하지만, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28과 실질적으로 더 약한 결합(binding) 및 모노머성 펩티드 1-42와 중간 정도의 결합 및 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40과 본질적으로 비결합을 보여주는데; "실질적으로 더 약한 결합"에 의하여 결합은 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에의 결합보다 적어도 약 80%, 특히 적어도 약 85%, 더 특히 적어도 약 90%이지만, 적어도 약 95% 적은 것을 의미한다.
- [0267] 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 이의 기능부를 포함하는 모노클로날 항체에 관하여, 이 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42 및 다수의 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드에 결합하며, 다수의 상기 폴리머성 펩티드를 혼입하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유에 결합하지만, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 실질적으로 더 약한 결합 및 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 본질적으로 비결합을 보여주는데, "실질적으로 더 약한 결합"에 의하여 결합은 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42에 결합보다 적어도 약 60%, 특히 적어도 약 65%, 더 특히 적어도 약 70%, 더욱 특히 적어도 약 80%이지만 특히 적어도 약 90% 및 100%까지 더 적은 것을 의미한다.
- [0268] 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 그것의 기능적인 부분을 포함하는 모노클로날 항체에 관하여, 이 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40 및 다수의 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드와 결합하지만, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 실질적으로 더 약한 결합 및 모노머성 펩티드 1-42에 중간 정도의 결합 및 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 본질적으로 비결합을 보여주는데; "중간 정도의 결합(intermediate binding)"에 의하여 결합은 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에의 결합보다 적어도 약 60%, 특히 적어도 약 65%, 더 특히 적어도 약 70%, 더욱 특히 적어도 약 80% 더 적은 것을 의미한다.
- [0269] 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 이의 기능부를 포함하는 모노클로날 항체에 관하여, 이 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40 특히 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40 및 다수의 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 가용성 폴리머성 및/또는 올리고머성 아밀로이드 펩티드에 결합하지만, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 실질적으로 더 약한 결합 및 모노머성 펩티드 1-42에 중간 정도의 결합 및 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 본질적으로 비결합을 보여주는데; "본질적으로 비결합"에 의하여 결합은 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-40에의 결합보다 적어도 약 95%, 특히 적어도 약 98%이지만 특히 적어도 약 99% 및 100%까지 적은 것을 의미한다.
- [0270] 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 이의 기능부를 포함하는 모노클로날 항체에 관하여, 이 항체는 A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42 및 다수의 A $\beta$  1-42 모노머성 펩티드를 포함하는 폴리머성 가용성 A $\beta$  펩티드 및 다수의 상기 폴리머성 펩티드를 혼입하는 A $\beta$  피브릴 또는 섬유와 결합하지만, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-28에 실질적으로 더 약한 결합 및 A $\beta$  모노머성 펩티드 17-40에 본질적으로 비결합을 보여주는데, "본질적으로 비결합"에 의하여 결합은, A $\beta$  모노머성 펩티드 1-42에의 결합보다 적어도 약 85%, 특히 적어도 약 90%, 더 특히 적어도 약 95%, 더욱 특히 적어도 약 98%이지만, 특히 적어도 약 99% 및 100% 까지 적은 것을 의미한다.
- [0271] 여기에서 기술된, 본 발명에 따른 항체, 특히 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 그것의 기능적인 부분을 포함하는 모노클로날 항체의, A $\beta$  모노머성 펩티드에의 결합은 ELISA-타입 분석, 특히 바이오틴화된 A $\beta$  모노머성 펩티드를 사용하는 ELISA 분석이지만 특히 하기 실시예 1.16 및 2.16에서 기술되는 것과 같은 ELISA 측정에 의하여 측정된다.
- [0272] "단리된(isolated)"은 그것과 자연적으로 발생하는 적어도 몇몇의 구성요소로부터 자유로운 생물학적 분자를 의미한다.
- [0273] 언어 "아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 의해 야기되거나 이와 관련되는 질환 또는 장애"는 모노머성,

피브릴, 또는 폴리머성 상태, 또는 상기 셋의 임의의 조합인 아밀로이드-유사 단백질의 존재 또는 활성에 의하여 야기되는 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0274] 용어 "아밀로이드증(amyloidosis)"은 알츠하이머 병같은 신경계 장애를 포함하나 이에 한정되지 않는 질환 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하지만 이에 한정되지 않는 아밀로이드 플라크(plaque) 형성과 관련이 있는 질환 및 장애의 그룹을 지칭하는데, 이는 예를 들면, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)같은 인지 기억력(cognitive memory capacity)의 손실에 의하여 특징되는 질환 또는 병태; 광 파킨슨-치매 복합증뿐만 아니라; 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증 같은 아밀로이드-유사 단백질과 연관되거나 이에 기초한 다른 질환; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축기축경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 및 노인성 심아밀로이드증, 및 황반 변성, 드루젠-관련 시신경병증, 및 베타-아밀로이드 침착으로 인한 백내장을 포함하는 다양한 안질환(eye diseases)을 포함한다.

[0275] 여기에서 사용되는 것처럼, 용어 "항체" 또는 "항체들"은 당업계에 인식된 용어이고, 이는 알려진 항체, 특히 면역글로불린 분자 및 즉 항체에 면역특이적으로 결합하는 결합 장소를 포함하는 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편을 지칭하는 것으로 이해된다. 본 발명에 따른 면역글로불린은 임의의 타입(type)(IgG, IgM, IgD, IgE, IgA and IgY) 또는 클래스(class)(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 서브클래스(subclasses)일 수 있다.

[0276] "항체들"은 본원 발명의 범위 안에서 모노클로날, 폴리클로날, 키메라(chimeric), 단일 사슬, 이중특이성 또는 이중효과적(bieffective), 유인원화, 인간 및 인간화된 항체뿐만 아니라 그것의 활성 단편을 포함하는 것으로 의도된다. 알려진 항체에 결합하는 분자의 활성 단편의 예는 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv 및 Fv 단편을 포함하고, 이는 상기에서 언급된 임의의 항체들 및 단편의 에피토프-결합 단편 및 Fab 면역글로불린 발현 라이브러리(library)의 생산물을 포함한다.

[0277] 그러한 활성 단편은 다수의 당업계에 알려진 테크닉에 의하여 본원 발명의 항체로부터 유도될 수 있다. 예를 들어, 정제된 모노클로날 항체는 펩신(pepsin) 같은 효소로 절단될 수 있고, HPLC 겔 여과의 대상이 될 수 있다. Fab 단편을 함유하는 적당한 단편은 그리고 나서 막 여과 등에 의하여 수집되고 농축될 수 있다. 항체의 활성 단편의 분리를 위한 일반적인 테크닉의 추가 기술에 대해서는, 예를 들어 Khaw, B. A. 등 J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982); Rousseaux 등 Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986 를 참조하라.

[0278] "인간화된 항체"는 비인간 제공 면역글로불린, 하나의 (또는 그 이상의) 인간 면역글로불린으로부터 유도되는 분자의 남은 면역글로불린-유도 부분으로부터 유도된 그것의 CDR을 가지는 가공된(engineered) 항체의 타입을 지칭한다. 추가로, 골격 지지 잔기는 결합 친화도(binding affinity)를 유지하기 위하여 변경될 수도 있다. "인간화된 항체"를 얻기 위한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. (예를 들어, Queen 등, Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson 등, Bio/Technology, 9:421 (1991) 참조)

[0279] "인간화된 항체"는 또한 예를 들어, 토끼 같은 큰 동물에서 친화도-성숙된(affinity-matured) 인간 유사 폴리클로날 항체의 생산을 가능하게 하는 신규한 유전공학적 접근에 의하여 얻어질 수도 있다(예를 들어, 미국 특허공보 제7,129,084호 참조).

[0280] 용어 "모노클로날 항체(monoclonal antibody)"는 또한 당업계에서 잘 인식되어있고, 단일 클론(clone)으로부터 실험실에서 대량 생산되고 오직 하나의 항원을 인식하는 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체는 전형적으로 보통 수명이 짧은, 항체-생산 B 세포를 암 세포(때때로 "불멸" 세포로 지칭됨) 같은 빨리 성장하는 세포에 융합시킴에 의하여 만들어질 수 있다. 생성되는 하이브리드 세포, 즉 하이브리도마(hybridoma)는 빨리 증식해서, 많은 양의 항체를 생산하는 클론을 형성한다. 본원 발명의 목적에 대하여, "모노클로날 항체"는 또한 아직 전체 모노클론성(full monoclonality)에 도달하지 않은 마더 클론(mother clone)에 의해 생산되는 항체들을 포함하는 것으로 이해된다.

[0281] 용어 "CDR"은 항체의 추가변(hypervariable) 영역을 지칭한다. 용어 "추가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는, 여기에서 사용될 때, 서열에서 추가변이거나 및/또는 구조적으로 규정된(defined) 루프(loops)를 형성하는 항체 가변 도메인(antibody variable domain)의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체들은 6개의 추가변 영역을 포함한다; VH(H1, H2, H3)에서 3개, 및 VL(L1, L2, L3)에서 3개이다. 다수의 추가변 영역 묘사는 여기에서 일반적으로 사용되고 포함된다. Kabat 상보적 결정 영역(Kabat Complementarity Determining Regions)은 서열 변이성에 기초하고 가장 통상적으로 사용된다.(Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th

Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))

[0282] 용어 "CDR"을 앞서는 글자 "HC" 및 "LC"는 각각 중쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain)의 CDR을 지칭한다. Chothia는 대신에 구조적 루프의 위치를 지칭한다(Chothia 와 Lesk J. Mol. Biol.196:901-917 (1987)). AbM 초가변 영역은 Kabat CDRs 및 Chothia 구조적 루프간 절충(compromise)을 표현하고, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의하여 사용된다. "접촉(contact)" 초가변 영역은 이용할 수 있는 복잡한 크리스탈 구조(crystal structure)의 분석에 기초한다. 이러한 각 초가변 영역으로부터의 잔기는 하기에 기재되었다.

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat Numbering)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia Numbering)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0283]

[0284] 초가변 영역은 하기와 같이 "연장되는 초가변 영역(extended hypervariable regions)"을 포함할 수도 있다: VL에서 24- 36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 및 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 이러한 정의에 대하여, 앞의 논문 Kabat 등에 따라 번호부여된다.

[0285] 용어 "Kabat에서와 같은 가변 도메인 잔기 번호부여" 또는 "Kabat에서와 같은 아미노산 위치 번호부여" 및 그것의 변이는 Kabat(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))에서의 항체의 컴파일(compilation)의 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역을 위하여 사용되는 시스템을 계산하는 것을 지칭한다.

[0286] 이러한 번호부여 시스템을 사용하면, 실제의 선형 아미노산 서열(actual linear amino acid sequence)은 가변 도메인의 FR 또는 HVR로의 단축 또는 주입에 대응하는 더 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수도 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입물(insert)(Kabat에 따른 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기(예를 들어, Kabat에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c)을 포함할 수 있다. 잔기의 Kabat 계산은 주어진 항체에 대하여 "표준" Kabat 번호부여된 서열을 갖는 항체의 서열의 상동성(homology) 영역에서의 정렬(alignment)에 의하여 결정될 수도 있다.

[0287] "기능적으로 동등한 항체"는 본원 발명의 범위 안에서 실질적으로 항체와 적어도 하나의 주요 기능적 특성, 예를 들어 여기에서 기술되는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 기능적 특성을 공유하는 항체: 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 때, 베타-아밀로이드 단백질, 특히  $A\beta_{1-42}$  단백질, 및 더 특히  $A\beta_{1-42}$  단백질의 4-16 에 피토프 영역에의 결합 특이성, 인비트로(in vitro)에서 면역반응성,  $A\beta$  모노머의 높은 분자 폴리머성 피브릴로의 응집의 억제 및/또는 수행된  $A\beta_{1-42}$  폴리머성 피브릴의 해체, 및/또는 베타-시트 깨짐 특성 및 아밀로이드증, 내분비계 중앙, 및 황반 변성을 포함하나 이에 한정되지 않는, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 이와 연관된 질환 및 장애의 영향을 감소시키는 것. 항체들은 IgG, IgM, 또는 IgA 등 같은 임의의 클래스 또는 IgG1, IgG2a 등 같은 임의의 서브클래스 및 여기에서 기술되거나 또는 당업계에서 알려진 다른 서브클래스일 수 있으나 특히 IgG4 클래스일 수 있다. 게다가, 항체들은 파지 디스플레이(phage display) 같은 임의의 방법으로 생산되거나 임의의 유기체 또는 세포주에서 생산될 수 있고, 이는 인간화된 항체 같은 원하는 특성을 가진 항체를 생산하는 박테리아, 곤충, 포유류, 세포의 다른 타입 또는 세포주를 포함한다. 항체들은 또한 다른 종으로부터 Fab 부분 및 Fc 영역을 조합함에 의하여 형성될 수도 있다.

[0288] 용어 "이중 특이성" 또는 "이중 기능적" 및 "이중-효과적인"은 이 출원의 범위 안에서 동의적으로 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 섬유 형성에 대한 억제 특성 및 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 섬유의 해체 특성을 모두 나타내는 항체를 특정 지우기 위하여 사용된다.

[0289] 용어 "항원"은 유기체, 특히 동물, 더 특히 인간을 포함하는 포유류에서 면역 반응을 유도할 수 있는 실제

(entity) 또는 그것의 단편을 지칭한다. 상기 용어는 항원성(antigenicity) 또는 항원결정기(antigenic determinants)를 책임지는 면역원 및 그것의 영역을 포함한다.

- [0290] 여기에서 사용되는 것처럼, 용어 "가용성"은 부분적으로 또는 완전히 수용액에서 용해되는 것을 의미한다.
- [0291] 또한 여기에서 사용되는 것처럼, 용어 "면역원성(immunogenic)"은 면역원제(immunogenic agent)에 대하여 지정되는 항체, T 세포, 또는 다른 반응성 면역 세포의 생성을 유발하거나 강화하고, 인간 또는 동물에서의 면역 반응에 기여하는 물질(substances)을 지칭한다.
- [0292] 면역 반응(immune response)은 개체(individual)가 치료될 장애를 경감하거나 완화하기 위한 본원 발명의 투여된 면역원성 조성물에 대한 충분한 항체, T 세포, 및 다른 반응성 면역 세포를 생산할 때 발생한다.
- [0293] "폴리머성 가용성 아밀로이드"는 올리고머성 또는 폴리머성 구조를 형성하는, 아밀로이드 펩티드, 또는 아밀로이드-유사 펩티드, 또는 변형되거나 끝이 잘린 아밀로이드 펩티드, 또는 아밀로이드 펩티드의 다른 유도체의 다중 응집 모노머를 지칭하거나 또는 포유류 또는 인체, 더 특히 뇌에서 가용성이지만, 이는 특히 아밀로이드  $\beta$  ( $A\beta$ ) 또는 변형되거나 끝이 잘린(truncated) 아밀로이드  $\beta$  ( $A\beta$ ) 펩티드 또는 그것의 유도체의 다중 응집 모노머를 지칭하거나, 이는 포유류 또는 인체, 더 특히 뇌에서 가용성이다.
- [0294] 용어 "하이브리도마(hybridoma)"는 당업계에서 인식되고, 당업자에게 항체-생산 세포 및 불멸 세포(immortal cell), 예를 들어 다발 골수종 세포의 융합에 의하여 생산되는 세포를 지칭하는 것으로 이해된다. 그러한 하이브리드 세포는 항체의 지속적인 공급을 할 수 있다. 융합의 당업계에 알려진 방법의 더 자세한 기술을 위하여 상기 "모노클로날 항체"의 정의 및 하기 실시예를 참고하라.
- [0295] 여기에서 사용되는 용어 "운반체(carrier)"는 그 안에서 항원 펩티드 또는 초분자 구조물이 혼입되거나 관련될 수 있는 구조를 의미하고, 그것에 의하여 인간 또는 동물의 면역계에 항원 펩티드 또는 펩티드의 부분을 나타내거나 노출시킨다. 예를 들어, 소포(vesicle), 입자(particle) 또는 미립자체(particulate body) 같은 동물 또는 인간 치료에서 적합하게 사용될 수 있는 임의의 입자는 본원 발명의 문맥 안에서 운반체로 사용될 수도 있다. 상기 용어는 운반의 방법을 더 포함하는데, 여기에서 항원 펩티드를 포함하는 초분자 항원 구조물 조성물은 운반 메커니즘에 의하여 원하는 위치에 이동될 수도 있다. 그러한 운반 시스템의 한 예는 교질염화금(colloidal gold) 같은 교질 금속(colloidal metals)을 활용한다. 용어 "운반체"는 키홀림펫헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin (KLH)), 소혈청알부민(bovine serum albumin), 및 다른 항원보강제(adjuvant)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업자에게 알려진 운반 메커니즘을 더 포함한다.
- [0296] 본원 발명에 따른 초분자 항원 구조물에서, 리포솜(liposome)은 여기에서 기술된 초분자 구조물을 포함하는 운반체로서 사용될 수 있고, 동시에, 본 발명에 따른 치료 백신으로 취급되는 타겟 동물 또는 인간 안에서 면역 반응을 증가시키거나 자극하는 항원보강제로서 기능한다는 점에서, 이중기능을 가질 수도 있다. 그것은 또한 본원 발명의 초분자 항원 구조물 조성물이 예를 들어, 지질 A, 백반(alum), 인산 칼슘, 인터루킨 1(interleukin 1), 및/또는 폴리사카라이드의 미소캡슐(microcapsules) 및 단백질, 그러나 특히 모노포스포릴(monophosphoryl) 또는 디포스포릴(diphosphoryl) 지질 A 같은 해독되는(detoxified) 지질 A, 또는 백반, 추가의 보존제, 희석제(diluents), 에멀전화제(emulsifiers), 안정화제(stabilizers), 및 당업계에서 알려지고 백신으로 사용되는 다른 구성요소 같은 추가의 항원보강제를 더 포함할 수 있다. 더욱이, 당업계에서 알려진 임의의 항원보강제 시스템은 본원 발명의 조성물에서 사용될 수 있다. 그러한 항원보강제는 Freund의 불완전 항원보강제, Freund의 완전 보강제, 복잡분산된(polydispersed)  $\beta$ -(1,4) 연결된 아세틸화된 만난(mannan)("Acemannan"), TiTERMAX<sup>®</sup> (CytRx 회사로부터의 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 코폴리머 항원보강제), Chiron 회사의 변형된 지질 항원보강제, Cambridge Biotech의 사포닌(saponin) 유도체 항원보강제, 죽은 보르데텔라 페르투스시스(killed Bordetella pertussis), 그람-음성 박테리아의 지질다당류(lipopolysaccharide (LPS)), 황산 텍스트란 같은 큰 폴리머성 음이온, 및 백반, 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄 같은 무기 겔(gel)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0297] 본원 발명의 초분자 항원 구조물 조성물에서 사용될 수 있는 운반체 단백질은 말토스 결합 단백질 "MBP"; 소혈청 알부민 "BSA"; 키홀림펫헤모시아닌 "KLH"; 난알부민(ovalbumin); 플라젤린(flagellin); 티로글로불린(thyroglobulin); 임의의 종의 혈청 알부민; 임의의 종의 감마글로불린(gamma globulin); 유전자적 동계의 세포(syngeneic cells); Ia 항원을 지니는 유전자적 동계의 세포; 및 D- 및/또는 L- 아미노산의 폴리머를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0298] 게다가, 용어 "치료상으로 효과적인 양"은 인간 또는 동물에 투여될 때, 상기 인간 또는 동물에의 치료적 효과

를 유발하기에 충분한 면역 반응을 유도하는 항체의 양을 지칭한다. 효과적인 양은 일상적인 절차를 따라, 당업자에 의하여 쉽게 결정될 수 있다.

[0299] 두 서열간의 "상동성(Homology)"은 서열 동질성(identity)에 의하여 측정된다. 서로 비교되는 두 서열이 길이가 다르면, 서열 동질성은, 바람직하게는 더 긴 서열의 뉴클레오타이드(nucleotide) 잔기와 동일한 더 짧은 서열의 뉴클레오타이드 잔기의 퍼센트(percentage)와 관련이 있다. 서열 동질성은 통상적으로 Bestfit 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711) 같은 컴퓨터 프로그램의 사용으로 결정될 수 있다. Bestfit은 두 서열 간의 가장 높은 서열 동질성을 가지는 부분(segment)을 발견하기 위하여, Smith 와 Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489 의 국소(local) 상동성 알고리즘을 활용한다. 특정 서열이 예를 들어, 본원 발명의 참조 서열과 95% 동질성을 가지는지 측정하기 위하여, Bestfit 또는 다른 서열 정렬 프로그램을 사용할 때, 동질성 퍼센트가 참조 서열의 전체 길이에 걸쳐서 계산되고 참조 서열에서의 뉴클레오타이드의 총 숫자의 5%까지의 상동성 갭(gap)이 허용될 수 있도록, 파라미터는 바람직하게 맞춰진다. Bestfit을 사용할 때, 소위 선택적 파라미터(optional parameter)는 바람직하게 그것들의 미리 정해진("디폴트(default)") 값에 남는다. 본 발명의 주어진 서열 및 상기 기술된 서열 간 비교에서 나타나는 편차(deviation)는 예를 들어 추가, 삭제, 치환, 삽입, 또는 재조합에 의하여 야기될 수도 있다. 그러한 서열 비교는 바람직하게는 프로그램 "fasta2Ou66"(1998년 9월 William R. Pearson 및 the University of Virginia에 의한 version 2.0u66,; 또한 W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, 첨부된 실시예 및 <http://workbench.sdsc.edu/> 참조)으로도 실행될 수 있다. 이러한 목적을 위하여 "디폴트" 파라미터 세팅이 사용될 수도 있다.

[0300] 여기에서 사용되는 "보존적 변화(conservative change)"는 실질적으로 입체 형태적 또는 항원성적으로 중립인 변형을 지칭하고, 각각 본래의 단백질과 비교할 때, 돌연변이 폴리펩티드의 삼차 구조의 최소의 변화를 초래하거나 돌연변이 폴리펩티드의 항원 결정소(antigenic determinants)의 최소 변화를 초래한다. 본 발명의 항체들 및 항체 단편들을 지칭할 때, 보존적 변화는 대상 수용체에 결합할 수 없는 항체가 되게 하지 않는 아미노산 치환(substitution)을 의미한다. 당업자는 입체 형태적 및 항원성적으로 중립인 가능성을 높게 유지하면서, 어느 아미노산 치환이 이루어질 수 있는지를 예측할 수 있을 것이다. 그러한 유도(guidance)는 예를 들어 Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940 및 Bowie 등 (1990) *Science* 247: 1306-1310에서 제공된다. 입체 형태적 및 항원성적으로 중립성을 유지하는 가능성에 영향을 미치는 고려될 요소는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: (a) 소수성 잔기가 단백질 안쪽에 위치할 가능성이 더 높아 소수성 아미노산의 치환이 항원성에 영향을 미칠 가능성이 더 적고, (b) 치환된 아미노산이 본래의 아미노산을 구조적으로 모방하기 때문에 생리화학적으로 유사한 아미노산의 대체가 입체 형태에 영향을 미칠 가능성이 더 적고; (c) 진화적으로 보존된 서열의 변형은 그러한 보존이 아미노산의 서열이 기능상 중요성을 가질 수도 있다는 것을 암시하기 때문에 입체 형태에 불리하게 영향을 미칠 것 같다. 당업자는 미세보체(microcomplement) 고정(fixation) 방법(예를 들어, 4 Wasserman 등 (1961) *J. Immunol.* 87:290-295; Levine 등 (1967) *Meth. Enzymol.* 11 :928-936 참조) 같은, 그런데 이에 한정되지 않는 잘 알려진 측정을 사용하는 단백질 입체형태(conformation)에서 및 입체 형태-의존적 모노클로날 항체를 사용하는 결합 연구(Lewis 등 (1983) *Biochem.* 22:948-954 참조)를 통하여 변형을 평가할 수 있을 것이다.

[0301] 여기에서 사용되는 용어 "하이브리다이즈(hybridize)"는 통상적인 하이브리다이제이션(hybridization) 조건, 바람직하게는 5xSSPE, 1% SDS, 1xDenhardtts 용액이 용액으로서 사용되거나 및/또는 교배 온도는 35 °C 및 70 °C, 바람직하게는 65 °C 사이에 있는 하이브리다이제이션 조건을 지칭한다. 하이브리다이제이션 후, 세척은 2xSSC, 1% SDS 및 뒤이어 35 °C 및 70 °C, 바람직하게는 65 °C 사이에 있는 온도에서 0.2xSSC로 바람직하게 진행된다 (SSPE, SSC 및 Denhardtts 용액에 관하여서는 Sambrook 등 *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 참조). 예를 들어 상기 Sambrook 등에서 기술된 것처럼 엄격 하이브리다이제이션 조건이 특히 선호된다. 특히 선호되는 엄격 하이브리다이제이션 조건은 예를 들어 만일 하이브리다이제이션 및 세척이 상기 지시된 것처럼 65 °C에서 발생한다면 존재한다. 예를 들어 45 °C에서 진행되는 하이브리다이제이션 및 세척을 갖는 비-엄격 하이브리다이제이션 조건은 덜 선호되고 35 °C에는 더욱 덜 선호된다.

[0302] 본원 발명은 여기에 포함된 구체적인 구체예의 다음의 상세한 기재를 참조로 더 쉽게 이해될 수도 있다. 비록 본원 발명이 그것의 어떤 구체예의 구체적인 세부사항에 관하여 기재되었지만, 그러한 세부사항이 본 발명의 범위에 대한 제한으로서 취급되어야 하는 것으로 의도된 것은 아니다.

[0303] 본원 발명은 입체 형태적으로 민감한 항체인 항체들 및 이의 기능부를 제공한다. 이러한 항체들은 다양한 아미

로이드 단백질성 항원의 상기 구체적인 에피토프를 인식한다. 항체들은 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 이와 관련된 질환 및 장애, 및 특히 알츠하이머 병에서의 진단적 및 치료적 개입(intervention)에 유용하다.

- [0304] 항체들은 알츠하이머병 같은 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 이와 관련된 다양한 질환 또는 장애에 대항하여 그것들을 간접적으로(passively) 면역시키기 위하여 개체들에게 투여될 수 있다.
- [0305] 여기에서 제공되는 항체들은 알츠하이머병 같은 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 이와 관련된 다양한 질환 또는 장애의 개시, 진행, 및/또는 악화에서 연루되는 항원성 펩티드에 대해 결합 특이성을 가지는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체이다.
- [0306] 본 발명에 따른 항체들은 본래의(native) 또는 인간 항체를 생산할 수 있는 마우스(mouse), 래트(rat), 토끼 또는 임의의 다른 동물 중 같은 동물을 초분자 항원 구조물 조성물로 면역화시킴에 의하여 제조된다.
- [0307] 여기에서 기재되는 초분자 항원 구조물은 일반적으로 항원성 효과를 강화시키도록 변형된 펩티드를 포함하는데, 여기에서 그러한 펩티드는 페길레이션(pegylation)(폴리에틸렌 글리콜 또는 변형된 폴리에틸렌 글리콜을 사용)을 통한 변형, 또는 팔미트산(palmitic acid), 폴리-아미노산(예를 들어, 폴리-글리신, 폴리-히스티딘), 폴리사카라이드(예를 들어, 폴리-갈락투론산, 폴리락트산, 폴리글리콜리드, 키틴(chitin), 키토산(chitosan)), 합성 폴리머(폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리에스테르) 또는 코폴리머(예를 들어, 폴리(메트아크릴산) 및 N-(2-히드록시) 프로필 메트아크릴아미드) 등에 의하는 것 같은 다른 방법을 통한 변형이 된다.
- [0308] 팔미트산에 의한 변형(팔미테일화(palmitoylation))은 C<sub>16:0</sub> 지방산 모이어티의 상대적으로 감소된 길이로 인한, 리포솜 이중층(bilayer)에서 펩티드를 위한 앵커(anchor)를 제공하는 동안, 사실상 상기 펩티드가 리포솜 표면에 놓이는 것을 초래한다. 그러므로, 항원을 처리(process)하는 세포는 상기 펩티드를 가진 전체 리포솜을 차지해야만(take up) 할 것인데, 이는 대부분은, 상대적 용어(term)로 더 느린 면역 반응을 유발한다.
- [0309] 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 아밀로이드 Aβ<sub>22-35</sub> 펩티드 및 Aβ<sub>29-40</sub> 펩티드는 각각 항체, 특히 본 발명에 따른 모노클로날 항체의 제조에서 사용된다.
- [0310] 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 아밀로이드 Aβ<sub>1-15</sub> 펩티드는 항체, 특히 본 발명에 따른 모노클로날 항체의 제조에서 사용된다.
- [0311] 변형된 Aβ<sub>1-15</sub> 펩티드는 Nicolau 등(2002)에서 보고된 방법에 따라 합성될 수도 있다. Nicolau 등에서 보고된 접근은 상당히 높은 순도의 생산물을 유발하는 미리 형성된 펩티드의 말단(terminal) 아미노산 잔기에 친지질성(lipophilic) 또는 소수성 모이어티(moiety)의 수지상 이식(on-resin grafting)에 의하여 항원성 펩티드를 변형시키는 것을 포함한다. 특히, 보호되는 아미노산, 특히 Fmoc-보호되는 아미노산은 알려진 커플링 화학(coupling chemistry)을 사용한 수지에 부착된다. 보호기는 제거되고 제 2의 보호된 아미노산 잔기가 커플링된다. 그리고 나서 알려진 보호 화학(protecting chemistry), 특히 Fmoc/tBu 화학을 사용한 표준 자동화된 펩티드 합성 및 표준 곁사슬(side-chain) 보호기가 펩티드 단편을 생산하는 아밀로이드 단백질 Aβ<sub>1-42</sub>의 각 아미노산 22 내지 25, 29 내지 40, 및 1 내지 15를 커플링에 의하여 Aβ 항원성 펩티드를 합성하기 위하여 사용된다. 펩티드 단편을 생산. 마지막 단계에서, 두 개의 더 보호되는 아미노산은 사라나는 펩티드 단편과 커플링한다. Mtt 기는 그리고 나서 선택적으로 절단되고 팔미트산과 커플링한다. 상기 수지의 세척 후에, 보호기는 제거되고 수지는 동시에 절단되고, 표준 방법(methodology)을 사용하는 곁사슬 탈보호(deprotection)가 뒤따른다. 그리고 나서 최종 생산물은 높은 순도로 얻어질 수 있고, 동질성이 전기분무 질량 분광 분석 방법(electrospray mass spectrometry) 같은 당업계에서 알려진 방법에 의하여 확인될 수 있다.
- [0312] 본원 발명에 따른 친지질성 또는 소수성 잔기는 지방산, 트리글리세리드(triglyceride), 또는 인지질일 수도 있는데, 여기에서 지방산 탄소 백본(back bone)은 적어도 10개의 탄소 원자를 가진다. 특히, 친지질성 또는 소수성 잔기는 적어도 대략 14개의 탄소 원자 및 대략 24개의 탄소 원자까지의 탄소 백본을 가진 지방산인데, 탄소 원자의 각 개개의 수는 또한 본원 발명의 부분인 이러한 범위 안에 들어간다. 더 특히, 친지질성 또는 소수성 잔기는 적어도 14 개의 탄소 원자의 탄소 백본을 가진다. 소수성 잔기의 예는 팔미트산, 스테아르산, 미리스트산(myristic acid), 라우르산(lauric acid), 올레산, 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid) 및 콜레스테롤 또는 DSPE를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본원 발명의 구체적인 구체예에서, 친지질성 또는 소수성 잔기는 팔미트산이다.

- [0313] 면역 반응을 강화시키기 위하여, 다른 앵커/스페이서(anchor/spacer)가 리포솜, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에서 펩티드를 재구성하도록 적합하게 적용될 수 있다.
- [0314] PEG는 펩티드의 양 말단에서 결합된 아미노산 잔기, 특히 GIu, Cys 또는 Lys 아미노산 잔기 또는 펩티드에 공유적으로 PEG를 결합시키도록 적합하게 사용될 수 있는 임의의 다른 아미노산 잔기와 공유적으로 부착된다. 사슬의 다른 끝에서 소수성 잔기는 예를 들어, 포스파티딜 에탄올 아민(PEA) 같은 리포솜 이중층에서 고정하는 요소로서 기능하도록 공유적으로 결합할 수도 있다. 따라서, 리포솜은 여전히 항원보강제로서 기능하고, 이중층으로부터 충분히 멀리 있는 펩티드는 혼자 처리될 수 있고, 따라서 팔미토일화된(palmitoylated) 항원과 비교할 때 그 면역원성을 증가시킨다.
- [0315] 어떤 구체예에서, 본원 발명의 범위 안에서 사용되는 초분자 항원 구조물은 각 말단에 하나, 페길레이트된 라이신에 공유적으로 부착된 펩티드 서열을 포함한다. PEG(폴리에틸렌글리콜) 사슬의 길이는  $n=8$  내지  $n=150.000$  또는 더 특히  $n=10$  내지  $n=80.000$ , 더 특히  $n=20$  내지  $n=10.000$ 으로 다양할 수가 있다. 본 발명의 구체적인 구체예에서, PEG 사슬의 길이는  $n=45$  미만, 특히  $n=5$  내지  $n=40$ 이고, 더 특히  $n=10$  내지  $n=30$ 이며, 더욱 특히  $n=10$ 이다.
- [0316] 여기에서 기술되는 초분자 구조물은 자동 펩티드 합성 및 알려진 보호 화학, 특히 Fmoc/tBu 화학 및 표준 결사슬 보호기를 사용하면서 합성될 수 있다. 전형적으로, 펩티드의 페길레이션은 구조이성질체(regioisomers)의 혼합물을 유발한다.
- [0317] A $\beta$ 의 C- 및 N- 말단 모두에 PEG-지질 컨쥬게이트(conjugate)의 위치-특이적 부착을 달성하기 위하여 부분적으로 보호되는 펩티드가 사용될 수도 있다. 내부의 Lys 또는 His 잔기를 함유하는 이러한 펩티드 서열에 대하여 직각으로(orthogonally) 보호되는 Lys(ivDde)가 각 말단에 추가된다. 추가의 Gly는 합성을 촉진하기 위하여 C-말단에 추가될 수도 있다. 보호기는 제거되고 무수 아세트산(acetic anhydride)을 사용하여 N-아세틸화되고 ivDde 기의 선택적 절단이 뒤따른다.
- [0318] 산 민감하고 따라서 보호된 펩티드의 분리를 가능하게 하는 수지, 특히 2-클로로트리틸(2-chlorotriptyl) 수지가 선호된다.
- [0319] 본 발명의 구체적인 구체예에서, 커플링 반응은 용액 상(pahse)에서 수행된다. 그리고 나서 온화한 조건에서 수지로부터 선택적인 절단이 내부적으로 보호되는 펩티드를 방출한다.
- [0320] 용액-상 커플링은 예를 들어, DSPE 같은 지방산-포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)에 의하여 변형된 PEG 분자에, 예를 들어, A $\beta_{22-35}$  및 A $\beta_{29-40}$ , 각각, 또는 A $\beta_{1-15}$  같은 베타-아밀로이드 단백질 서열로부터 유도되는 펩티드로 성공적으로 달성되었다. 최종 결사슬 탈보호 전에 모노- 및 디-커플된 생산물의 분리(separation)는 양이온-교환 크로마토그래피를 사용하는 것으로 달성될 수 있다. 뒤이은 펩티드 결사슬 탈보호는 허용될 수 있는 순도로 원하는 컨쥬게이트의 단리(isolation)를 유도한다. 정제는 예를 들어, HPLC 등 같은 당업계에서 잘 알려진 방법으로 달성될 수 있다.
- [0321] 보호되는 펩티드를 사용하는 N- 및 C-말단 지질-PEG 베타-아밀로이드 항원의 합성에 대한 이러한 접근은 다양한 펩티드 서열에 적용할 수 있다.
- [0322] 본 발명에 따른 리포솜 항원은 그리고 나서 Nicolau 등(2002)에서 기재된 것과 같이 제조될 수 있다. 변형된 아밀로이드 A $\beta$  항원성 펩티드, 특히 변형된 페길레이트된(PEGylated) A $\beta_{22-35}$  및 A $\beta_{29-40}$  항원 펩티드, 또는 팔미토일화된(palmytoylated) A $\beta_{1-15}$  항원 펩티드는 리포솜, 특히 디미리스토일 포스파티딜 콜린(dimyristoyl phosphatidyl choline(DMPC)), 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(dimyristoyl phosphatidyl ethanolamine(DMPEA)), 디미리스토일 포스파티딜 글리세롤(dimyristoyl phosphatidyl glycerol(DMPG)) 및 콜레스테롤로 이루어진 구조물에서 재구성될 수도 있고, 선택적으로 모노포스포릴 지질 A를 함유할 수 있다.
- [0323] 본 발명의 구체적인 구체예에서, 지질 A를 갖는 리포솜은 항-아밀로이드 백신을 제조하기 위해 항원 보강제로서 사용된다. 디미리스토일포스파티딜-콜린, -글리세롤 및 콜레스테롤은 특히 0.9:1.0:0.7의 몰비로 혼합된다. 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A 같은 강한 면역조절제(immunomodulator)는 그리고 나서 적당한 농도, 특히 mmol 당 30 내지 50 mg, 더 특히 인지질의 mmol 당 40 mg에서 첨가된다. 변형된 항원성 A $\beta$  펩티드는 그리고 나서 1:30 내지 1:200의 인지질에 대한 펩티드 몰비, 특히 1:1000, 1:50, 및 1:120, 더 특히 1:100의 몰비에서 첨가된다. 용매는 예를 들어 증발을 통하여 제거되고, 발생하는 필름은 예를 들어 PBS 같은 무균 버퍼 용액과 수화

된다(hydrated).

- [0324] 리포솜은 또한 기술한 것처럼, 횡류(crossflow) 주입 테크닉, 예를 들어 Wagner 등 (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 - 270에 의하여 제조될 수도 있다. 수용성 버퍼 시스템(aqueous buffer system)으로 지질 용액을 주입하는 동안, 지질은 "침전물(precipitate)"을 형성하는 경향이 있고, 소포에 자체 배열이 뒤따른다. 얻어진 소포 크기는 지질 농도, 교반 속도, 주입 속도 및 지질의 선택 같은 요소에 의존한다. 제조 시스템은 횡류(crossflow) 주입 모듈, 극성 상(예를 들어, PBS 버퍼 용액)을 위한 용기(vessels), 에탄올/지질 용액 용기 및 압력 장치, 그런데 특히 질소 압력 장치로 구성될 수도 있다. 수용성 또는 극성 용액이 횡류 주입 모듈을 통하여 펌프되는(pumped) 동안에, 에탄올/지질 용액은 적용되는 변화하는 압력을 적용하면서 극성 상(polar phase)으로 주입된다.
- [0325] 리포솜은 여전히 항원보강제로서 기능하고, 이중층으로부터 충분히 멀리 있는 펩티드는 단독 처리될 수 있고 따라서 팔미토일화된(palmitoylated) 항원과 비교할 때 면역원성을 증가시킬 수 있다.
- [0326] 자유 PEG 말단은 앵커링(anchoring) 요소로서 기능하기 위하여 공유적으로 포스파티딜-에탄올아민의 분자(여기에서 지방산은 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 올레산 등 또는 그것의 조합이 될 수 있음)에 부착된다. 이러한 초분자 구조는 인지질 및 콜레스테롤(다양한 물비의 포스파티딜에탄올 아민, 포스파티딜 글리세롤, 콜레스테롤)로 구성된 리포솜에서 재구성에 의하여 고정될 수도 있다. 다른 인지질이 사용될 수 있다. 지질 A는 인지질의 대략 40  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 의 농도에서 사용된다.
- [0327] 어떤 구체예에서, 팔미토일화된(palmitoylated) 또는 페길레이트된 초분자 항원 구조물은 베타-아밀로이드의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 포함한다. 상기 펩티드는 또한 전체 아밀로이드 베타 펩티드 및 그것의 활성 단편에 포함하거나 대응할 수도 있다. 추가적으로, 본원 발명에 유용한 펩티드는 특히  $A\beta_{22-35}$  및  $A\beta_{29-40}$ , 각각, 또는  $A\beta_{1-15}$  및 그것의 활성 단편을 포함한다.
- [0328] 항체를 유도하고 제조하고 변형된  $A\beta$  항원 구조물의 면역원성을 측정하기 위하여 마우스(mice), 래트(rats), 토끼, 돼지, 새 등 그런데 특히 마우스, 특히 C57BL/6 마우스(mice)로 구성된 그룹에서 선택된 적합한 동물이 항원 펩티드로 면역화된다. 항원 구조물의 면역원성은 예를 들어, ELISA 측정 같은 면역분석(immunoassay)을 사용하는 면역화(immunization) 후 적합한 시간간격으로 혈청 샘플(sera samples)을 탐침(probing)하여 측정된다.
- [0329] 본원 발명의 모노클로날 항체는 당업계에 잘 알려진 전통적인 클로닝 및 세포 융합 테크닉을 사용하여 제조될 수 있다. 관심있는 면역원(항원)은 전형적으로 천연 또는 인간 항체를 생산할 수 있는 와일드 타입(wild type) 또는 순계 마우스(inbred mice)(예를 들어, BALB/c 또는 특히 C57BL/6 마우스), 래트(rats), 토끼 또는 다른 동물 종 또는 유전자삽입 마우스에 투여(예를 들어, 복강내 주입)된다. 면역원은 혼자 투여되거나, 항원보강제와 혼합되거나, 벡터(VEE replicon vector, vaccinia)로부터 발현되거나, 면역반응을 야기하는 융합 단백질 또는 DNA로서 투여될 수 있다. 융합 단백질은, 예를 들어 베타-갈락토시데이스(beta-galactosidase), 글루타티온 S-전이효소(glutathione S-transferase), 키홀립토헤모시아닌(KLH), 및 소혈청 알부민 같은 운반체 단백질과 커플링된, 면역반응이 소망되는, 펩티드를 포함한다. 이러한 경우에, 상기 펩티드는 운반체 단백질과 함께 합텐(haptens)으로서 작용한다. 동물이 예를 들어 두 배 이상 부스트된 후, 비장(spleen) 세포가 면역화된 동물로부터 수확되고, Kohler 와 Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) 및 Harlow 와 Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))의 잘 알려진 과정을 사용하는 뮤린(murine) SP2/O 골수종 세포(ATCC, Manassas, VA) 같은 골수종 세포주(cell line)와 민감화된(sensitized) 비장 세포를 융합함에 의하여 하이브리도마가 발생된다.
- [0330] 본 발명의 구체적인 구체예에서, 본 발명에 따른 항원 구조물, 특히 약학적으로 허용될 수 있는 형태로 상기 항원 구조물을 포함하는 백신 조성물이 반복된 용량(doses), 특히 1 내지 15 용량, 더 특히 2 내지 10 용량, 더욱 더 특히 3 내지 7 용량 그런데 특히 4 내지 6 용량으로, 1 내지 10 주의 시간 간격, 특히 1 내지 6 주 사이의 시간 간격, 더 특히 1 내지 4 주 사이의 시간 간격, 및 더욱더 특히 2 내지 3 주의 시간 간격에서 투여된다. 면역반응은 부스팅(boosting) 후에 적합한 시간, 특히 부스팅 후 3 내지 10일, 더 특히 부양 후 4 내지 8일 및 더 특히 부양 후 5 내지 6일에서 혈청 샘플을 채취(taking), 및 알려진 방법, 예를 들어 ELISA 분석 같은, 특히 통상적으로 사용되는 면역분석의 하나를 사용하여 항원 구조물의 면역원성을 측정하여 관찰된다.
- [0331] 본 발명에 따른 항원 구조물을 갖는, 그런데 특히 약학적으로 허용될 수 있는 형태의 본 발명에 따른 항원 구조물을 포함하는 백신 조성물을 가진 면역화는 처리된(treated) 동물에서 중요한 면역 반응을 유도한다. 동물, 그

런데 특히 치료 역가(therapeutic titers)를 갖는 마우스(mice)는 세포, 특히 골수종 세포주 같은, 지속적으로 성장하거나 불멸 세포주를 갖는 B-림프구를 생산하는 항체의 융합을 위하여 선택된다. 상기 세포는 폴리에틸렌 글리콜의 첨가에 의하여 융합이 유도된다. 치료 역가는 1:4000 내지 1:6000, 특히 1:4500 내지 1:5500의 희석으로 ELISA 분석에서 양성 결과(positive result)를 주는 것들이다.

- [0332] 생성되는 하이브리드 세포는 그리고 나서 통상적인 방식, 예를 들어, 제한 희석(limiting dilution)을 사용하여 클로닝되고, 원하는 모노클로날 항체를 생산하는 생성되는 클론이 배양된다.
- [0333] 그렇게 얻어진 하이브리도마는 하이포산틴(hypoxanthine), 아미노테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)을 포함하는 선택 배지(selection medium)에서 세포를 plating하여 화학적으로 선택된다.
- [0334] 하이브리도마는 특정 아밀로이드-관련 질환 또는 장애에 대하여 모노클로날 항체를 생산하는 능력을 위하여 뒤이어 스크린닝된다(screened). 관심의 항체를 생산하는 하이브리도마는 추후의 생산을 위하여 클론되고, 증량되고(expanded), 냉동 저장된다. 선호되는 하이브리도마는 IgG 이소타입(isotype)을 가지는 모노클로날 항체를 생산한다.
- [0335] 폴리클로날 항체는 여기에서 기술된 본원 발명의 초분자 항원 구조물 조성물을 갖는 마우스(mice) 또는 토끼, 또는 임의의 다른 적합한 동물 같은 면역화된 동물에 의하여 제조된다. 혈청은 이후에 동물로부터 수집되고, 혈청의 항체는 아밀로이드 단백질에 대한 결합 반응성에 대해서 스크린닝된다.
- [0336] 본 발명에 따른 항체들은 생리학적으로 허용될 수 있는 제형(formulation)으로 제조될 수 있고 알려진 테크닉을 사용하면서 약학적으로 허용될 수 있는 운반체, 희석제 및/또는 첨가제를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 기능적으로 동등한 항체 또는 이의 기능부, 특히 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 이의 기능부를 포함하는 모노클로날 항체를 포함하는, 본 발명에 따르면 여기에서 기술된 것과 같은 항체는 치료적 조성물을 형성하기 위하여 약학적으로 허용될 수 있는 운반체, 희석제 및/또는 첨가제와 결합한다. 적합한 약학적 운반체, 희석제 및/또는 첨가제는 당업계에서 잘 알려져 있고, 예를 들어, 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline), 물, 기름/물 에멀전 같은 에멀전, 다양한 타입의 습윤제(wetting agents), 무균 용액(sterile solution) 등을 포함한다.
- [0337] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 제형은 당업자에게 알려진 표준 방법(standard methodology)에 따라 달성될 수 있다.
- [0338] 본원 발명의 조성물은 적합하고 약학적으로 효과적인 용량에서, 고체, 액체, 또는 에어로졸의 형태로 대상에 투여될 수도 있다. 고체 조성물의 예는 알약(pill), 크림, 및 이식성(implantable) 투여 유닛을 포함한다. 알약은 경구로 투여될 수도 있다. 치료 크림은 국소적으로 투여될 수도 있다. 이식성 투여 유닛은 국부적으로, 예를 들어 중앙 자리에 투여될 수 있거나, 치료 조성물의 체계적인 방출을 위하여, 예를 들어 피하로(subcutaneously) 이식될 수도 있다. 액체 조성물의 예는 근육 내로, 피하로, 정맥 내로, 동맥 내로 주입을 위해 채택되는 제형 및 국소 및 안내(intraocular) 투여를 위한 제형을 포함한다. 에어로졸 제형의 예는 폐에 투여를 위한 흡입 제형을 포함한다.
- [0339] 조성물은 투여의 표준 경로에 의하여 투여될 수도 있다. 일반적으로, 조성물은 국소적, 경구적, 직장의(rectal), 코의(nasal), 경피(interdermal), 복강내, 또는 비경구적인(예를 들어, 정맥, 피하, 또는 근육 내) 경로에 의하여 투여될 수도 있다. 추가로, 조성물은 생분해성 폴리머 같은 지속적인(sustained) 방출 매트릭스로 혼입될 수도 있는데, 폴리머는 운반이 바람직한 주변, 예를 들어 중앙 자리에 이식된다. 상기 방법은 단일 투여, 미리 정해진 시간간격에 반복되는 용량의 투여, 및 미리 정해진 시간 동안 지속적 투여를 포함한다.
- [0340] 여기에서 사용되는 것처럼, 지속적 방출 매트릭스는 물질, 보통 효소적 또는 산/염기 가수분해 또는 용해에 의하여 분해할 수 있는 폴리머로 만들어지는 매트릭스이다. 한번 체내로 주입되면, 매트릭스는 효소 및 몸의 유체에 의하여 작동된다. 지속적 방출 매트릭스는 바람직하게는 리포솜, 폴리락티드(폴리락티드 산), 폴리글리콜리드(글리콜산의 폴리머), 폴리락티드 코-글리콜리드(락트산 및 글리콜산의 공폴리머), 폴리아나하이드라이드(polyanhydrides), 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩티드, 히알루론산(hyaluronic acid), 콜라겐, 황산 콘드로이틴(chondroitin sulfate), 카르복실산, 지방산, 인산지질, 다당류(polysaccharide), 핵산, 폴리아미노산, 페닐알라닌 같은 아미노산, 티로신, 이소루신, 폴리뉴클레오타이드(polynucleotides), 폴리비닐 프로피렌, 폴리비닐 피롤리돈 및 실리콘 같은 생적합성(biocompatible) 물질에 의하여 선택된다. 선호되는 생분해성 매트릭스는 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 폴리락티드 코-글리콜리드(락트산 및 글리콜산의 공폴리머) 중 하나인 매트릭스이다.
- [0341] 상기 조성물의 용량은 예를 들어, 처리되는 조건, 사용되는 특정 조성물, 및 중량, 크기, 성별, 및 환자의 일반

적인 건강 조건, 신체 표면적, 투여되는 특정 화합물 또는 조성물, 함께 투여되는 다른 약물, 및 투여 경로 같은 다양한 요소에 의존할 것이라는 것이 해당 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0342] 상기 조성물은 생물학적으로 활성인 물질 또는 화합물을 포함하는 다른 조성물과 조합하여 투여될 수 있는데, 화합물은 특히 산화 스트레스에 대한 화합물, 항-아파트시스 화합물, 금속 킬레이터, 피레제핀 및 대사물(metabolites) 같은 DNA 복구 억제제, 3-아미노-1-프로판설폰산(3APS), 1,3-프로판디설폰네이트(1,3PDS), 세크리타제 활성화제(secretase activator), 베타- 및 감마-세크리타제 억제제, 타우(tau) 단백질, 신경전달물질(neurotransmitter), 베타-시트 파괴자( $\beta$ -sheet breaker), 항-염증 분자, 예를 들어 클로자핀(clozapine), 지프라시돈(ziprasidone), 리스페리돈(risperidone), 아리피프라졸(aripiprazole) 또는 올란자핀(olanzapine) 같은 "비전형적 항정신병제(atypical antipsychotics)" 또는 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 도네페질(donepezil), 및/또는 갈란타민(galantamine) 및 다른 약물 같은 콜린에스테라제 억제제(ChEIs) 및 예를 들어 비타민 B12, 시스테인, 아세틸콜린의 전구물질, 레시틴(lecithin), 콜린(choline), 징코 블로바(Ginkgo biloba), 아세틸-L-카르니틴(acyetyl-L-carnitine), 이데베논(idebenone), 프로펜토포릴린(propentofylline), 또는 크산틴(xanthine) 유도체 같은 영양 보충제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물이고, 본원 발명에 따른 항체와 함께 및 선택적으로 질환 치료를 위한 약학적으로 허용될 수 있는 운반체 및/또는 희석제 및/또는 첨가제 및 설명(instruction)과 함께 투여될 수도 있다.

[0343] 단백질성(Proteinaceous) 약학적 활성물(active matter)은 용량 당 1 ng 내지 10 mg의 양으로 존재할 수도 있다. 일반적으로, 투여의 요법은 본 발명에 따른 항체의 0.1  $\mu$ g 내지 10 mg의 범위, 특히 0.1  $\mu$ g 내지 1.0 mg의 범위, 및 더 특히 0.1  $\mu$ g 내지 100  $\mu$ g의 범위에 있어야 하는데, 이러한 범위 안의 모든 개개의 수는 또한 본 발명의 일부이다. 만일 투여가 연속적인(continuous) 주입을 통하여 발생하면, 더 적절한 용량은 시간당 신체 중량의 킬로그램 당 0.01  $\mu$ g 내지 10 mg 유닛의 범위에 있을 수 있는데, 이러한 범위 안의 모든 개개의 수는 또한 본 발명의 일부이다.

[0344] 투여는 일반적으로 비경구적으로, 예를 들어 정맥 내로 될 수 있다. 비경구적 투여를 위한 제제는 무균 수용성 또는 비수용성 용액, 서스펜션(suspensions) 및 에멀전을 포함한다. 비-수용성 용액은 그것에 제한되지 않고, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일 같은 야채 오일, 및 에틸 올레이트 같은 주입가능한 유기 에스테르를 포함한다. 수용성 용액은 식염수(saline) 및 완충 매질(buffered media)를 포함하는 물, 알코올/수용성 용액, 에멀전 또는 서스펜션으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수도 있다. 비경구적 매개체(vehicles)는 염화 나트륨 용액, 링거(Ringer)의 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화 나트륨, 락테이트 링거, 또는 고정유(fixed oil)를 포함한다. 정맥 매개체는 유체 및 영양 보충제, (링거 텍스트로스에 기초한 것들 같은) 전해질 보충제 및 다른 것들을 포함한다. 보존제는 또한 예를 들어, 항균제(antimicrobial), 항-산화제, 킬레이트제, 불활성 가스(inert gas) 등 같은 것으로 존재할 수도 있다.

[0345] 약학적 조성물은 예를 들어, 혈청 알부민 또는 면역글로불린, 특히 인간의 기관 같은 단백질성 운반체를 더 포함할 수도 있다. 추가의 생물학적 활성제는 그것의 의도된 용도에 의존하는 본 발명의 약학적 조성물로 존재할 수도 있다.

[0346] 결합 타겟(binding target)이 뇌에 위치할 때, 본 발명의 어떤 구체에는 혈액뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과하기 위하여 항체 또는 그것의 활성인 단편을 준비한다. 어떤 신경변성 질환은 혈액뇌장벽의 투과성의 증가와 연관이 있어서, 항체 또는 그것의 활성 파편이 쉽게 뇌에 도입될 수 있다. 혈액뇌장벽이 무손상으로 남으면, 이를 가로지르는 분자를 이동시키기 위하여, 여러 가지 업계 공지된 접근이 존재하는데, 이는 물리적 방법, 지질계(lipid-based) 방법, 및 수용체 및 채널계(channel-based) 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0347] 혈액뇌장벽을 가로지르는 항체 또는 그것의 활성 단편을 이동시키는 물리적 방법은 전체적으로 혈액뇌장벽을 우회하거나 혈액뇌장벽에서 개구(opening)를 형성하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 우회 방법(circumvention methods)은 뇌로 직접 주입(예를 들어, Papanastassiou 등, Gene Therapy 9: 398-406 (2002) 참조) 및 뇌에 운반 장치를 이식하는 것(예를 들어, Gill 등, Nature Med. 9: 589-595 (2003); 및 Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical 참조)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 장벽에 개구를 형성하는 방법은 초음파(예를 들어, 미국 특허공보 제2002/0038086호 참조), 삼투압(예를 들어, 고장 만니톨에 의하여(hypertonic mannitol)(Neuwel에pManipulation, VoIs 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), 예를 들어 브래디키닌(bradykinin) 또는 퍼미어빌라이저(permeabilizer)A-7에 의한 투과화(permeabilization)(예를 들어, 미국 특허공보 제5,112,596호, 제5,268,164호, 제5,506,206호, 및 제5,686,416호 참조), 및 항체 또는 항체-결합 단편을 인코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 혈액뇌장벽을 걸치는(straddle) 신경을 트랜스펙션(transfection)

(예를 들어, 미국 특허공보 제2003/0083299호 참조)하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0348] 혈액뇌장벽을 가로질러 항체 또는 그것의 활성화 단편을 이동시키는 지질계 방법은 혈액뇌장벽의 혈관 내피 (vascular endothelium) 상의 수용체에 결합하는 그것의 활성화 단편과 커플링하는 리포솜에서의 항체 또는 그것의 활성화 단편을 캡슐화(encapsulating)(예를 들어, 미국 특허공보 제20020025313호 참조)하고, 저점도 지질단백질(lipoprotein) 입자(예를 들어, 미국 특허공보 제20040204354호 참조) 또는 아포지단백(apolipoprotein) E (예를 들어, 미국 특허공보 제20040131692호 참조)에 항체 또는 그것의 활성화 단편을 코팅하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0349] 혈액뇌장벽을 가로지르는 항체 또는 그것의 활성화 단편을 이동시키는 채널계 방법 및 수용체는 혈액뇌장벽의 투과성을 증가시키는 당류코르티코이드(glucocorticoid) 차단제(blocker)를 사용(예를 들어, 미국 특허공보 제 2002/0065259호, 제2003/0162695호, 및 제2005/0124533호 참조); 칼륨 채널을 활성화(예를 들어, 미국 특허공보 제2005/0089473호 참조), ABC 약물 전달체(transporter)를 억제(예를 들어, 미국 특허공보 제2003/0073713호 참조); 트란스페린(transferrin)으로 항체를 코팅하고 하나 이상의 트란스페린 수용체의 활성을 조절(예를 들어, 미국 특허공보 제2003/0129186호 참조), 및 항체들을 양이온화(cationizing)(예를 들어, 미국 특허공보 제5,004,697호 참조)하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0350] 추가 구체예에서 본원 발명은 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 진단 및 검출(detection), 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 대한 소인을 진단, 또는 환자의 최소한의 잔류 질환을 모니터링, 또는 본원 발명에 따르면 여기에서 기술된 것처럼 항체 또는 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위한 방법 및 키트를 제공한다. 이러한 방법은 생물학적 샘플 또는 인시투(in situ) 조건에서의 물질을 검출하거나 정량화하기 위하여 통상적으로 사용되는 알려진 면역적 방법을 포함한다.
- [0351] 아밀로이드-관련 질환 또는 병태 또는 환자의 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 대한 소인의 진단은 본 발명의 항체의 면역특이적 결합, 특히 샘플 또는 인시투(in situ)에서의 아밀로이드 단백질의 에피토프에 모노클로날 항체 또는 그것의 활성화 단편을 검출하여 달성될 수도 있는데, 이는 아밀로이드 단백질의 에피토프와 결합하는 항체와 접촉하는 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 영역을 제공하는 것, 항체가 면역 복합체(immunologic complex)를 형성하는 아밀로이드 단백질과 결합하게 하는 것, 면역 복합체의 형성을 검출하는 것, 및 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 영역에서 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부존재와 면역 복합체의 존재 또는 부존재를 상관관계시키는 것, 선택적으로는 정상 대조 값에 상기 면역 복합체의 양을 비교하는 것을 포함하는데, 여기에서, 정상 대조 값과 비교되는 상기 면역 복합체의 양의 증가는 상기 환자가 아밀로이드-관련 질환 또는 병태로부터 고통받거나 이를 발전시킬 위험에 있는 것을 가리킨다. 아밀로이드 단백질은 모노머성(monomelic), 피브릴, 및/또는 폴리머성 형태로 있을 수 있다. 항체 또는 그것의 활성화 부분은 아밀로이드 단백질의 모노머성, 피브릴, 및/또는 폴리머성 형태에 특이적일 수 있다.
- [0352] 본 발명에 따른 항체 또는 백신 조성물로 치료를 한 다음에 환자의 최소 잔류 질환을 모니터링하는 것은, 본 발명의 항체, 특히 샘플 또는 인시투(in situ)에서의 아밀로이드 단백질의 에피토프에 모노클로날 항체 또는 그것의 활성화 단편의 면역특이적 결합을 검출하여 달성될 수도 있는데, 이는 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 영역을 아밀로이드 단백질의 에피토프를 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 항체가 면역 복합체를 형성하는 아밀로이드 단백질과 결합하도록 하는 것, 면역 복합체의 형성을 검출하는 것, 및 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 영역에서 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부존재와 면역 복합체의 존재 또는 부존재를 상관관계시키는 것, 선택적으로는 상기 면역 복합체의 양을 정상 대조군 값에 비교하는 것을 포함하는데, 여기에서, 정상 대조 값과 비교되는 상기 면역 복합체의 양의 증가는 상기 환자가 여전히 최소 잔류 질환으로부터 고통받을 수도 있다는 것을 가리킨다. 아밀로이드 단백질은 모노머성, 피브릴, 및/또는 폴리머성 형태일 수도 있다. 항체 또는 그것의 활성화 부분은 아밀로이드 단백질의 모노머성, 피브릴, 및/또는 폴리머성 형태에 특이적일 수도 있다.
- [0353] 본 발명에 따른 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하는 것은 샘플 또는 인시투(in situ)에서 아밀로이드 단백질의 에피토프에 모노클로날 항체 또는 그것의 활성화 단편의 면역특이적 결합을 검출하는 것에 의하여 달성될 수도 있는데, 이는 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 영역을 아밀로이드 단백질의 에피토프를 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 항체가 면역 복합체를 형성하는 아밀로이드 단백질과 결합하도록 하는 것, 면역 복합체의 형성을 검출하는 것, 및 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 영역에서 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부존재와 면역 복합체의 존재 또는 부존재를 상관관계시키는 것, 선택적으로는 치료의 시작 전후 상기 면역 복합체의 양을 비교하는 것을 포함하는데, 여기에서 상기 면역 복합

체 양의 감소는 상기 환자가 치료에 반응하는 높은 가능성을 가진다는 것을 가리킨다. 아밀로이드 단백질은 모노머성, 피브릴, 및/또는 폴리머성 형태일 수도 있다. 항체 또는 그것의 활성 부분은 아밀로이드 단백질의 모노머성, 피브릴, 및/또는 폴리머성 형태에 특이적일 수도 있다.

[0354] 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 대한 소인을 진단 또는 환자의 최소 잔류 질환을 모니터링하거나, 본 발명에 따르면 여기에서 기술된 것과 같은 항체 또는 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위한, 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 진단에서 사용될 수도 있는 생물학적 샘플은 예를 들어, 혈청(serum), 플라즈마(plasma), 타액(saliva), 위산 분비액(gastric secretion), 점액(mucus), 뇌척수액(cerebrospinal fluid), 림프액(lymphatic fluid) 등 같은 유체 또는 신경, 뇌, 심장 또는 혈관 조직 같은 유기체(organism)로부터 얻어지는 조직 또는 세포 샘플이다. 샘플에서 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부존재를 측정하기 위하여, 당업자에게 알려진 임의의 면역분석, 예를 들면 검출을 위한 2차 시약을 사용하는 간접적 검출 방법, ELISA 및 면역침전(immunoprecipitation) 및 응집반응(agglutination) 분석을 활용하는 분석 같은 것이 사용될 수도 있다. 이러한 분석의 구체적인 기술은 예를 들면 Harlow 와 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612), 국제 공개공보 제96/13590호 내지 Maertens 와 Stuyver, Zrein 등 (1998) 및 국제 공개공보 제96/29605호에서 제공된다.

[0355] 인시투(in situ) 진단을 위하여, 항체 또는 그것의 임의의 활성이고 기능적인 부분, 예를 들어 아밀로이드 단백질 위의 에피토프 영역을 갖는 본 발명에 따른 항체 사이에 특이적 결합이 발생할 수도 있도록, 정맥, 코 안(intranasal), 복강 내, 뇌 내(intracerebral), 동맥 내(intraarterial) 주입 같은 당업계에서 알려진 방법에 의하여 진단되는 유기체에 투여될 수도 있다. 항체/항원 복합체는 항체 또는 그것의 기능적 단편에 붙은 라벨(label) 또는 임의의 다른 업계 알려진 검출 방법을 통하여 편리하게 검출될 수도 있다.

[0356] 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 대한 소인을 진단 또는 환자의 최소 잔류 질환을 모니터링, 또는 본 발명에 따르면 여기에서 기술된 것과 같은 항체 또는 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위한 적용 또는 진단적 적용에서 사용되는 면역분석은, 전형적으로 검출을 위한 표지된 항원, 항체, 또는 2차 시약에 의존한다. 이러한 단백질 또는 시약은 당업자에게 일반적으로 알려진 화합물로 표지될 수 있는데, 이는 효소, 방사선 동위원소(radioisotope), 및 콜로이드 금 및 라텍스 비드 같은, 톳(tot) 색깔있는 입자를 포함하지만 이에 한정되지 않는 형광(fluorescent), 발광(luminescent), 및 색소(chromogenic) 물질을 포함한다. 이 중에, 방사성 표지는 거의 모든 타입의 분석에 대하여 대부분의 변이를 가지고 사용될 수 있다. 효소-컨쥬게이트된(enzyme-conjugated) 표지는 방사선을 피해야만 할 때 또는 빠른 결과가 필요할 때 특히 유용하다. 플루오로크롬(fluorochrome)은, 비록 사용을 위하여 비싼 장비가 요구되지만, 매우 민감한 검출 방법을 제공한다. 이러한 분석에서 유용한 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 및 친화 정제(affinity purified)된 폴리클로날 항체를 포함한다.

[0357] 대안으로, 항체는 단백질 A 또는 G 또는 제 2 항체 같은 면역글로불린에 대해 친화도를 가지는 표지된 물질과의 반응에 의하여 간접적으로 표지될 수도 있다. 항체는 제 2의 물질과 컨쥬게이션될 수도 있고 항체와 컨쥬게이션하는 제 2 물질에 대해 친화도를 가지는 표지된 제 3 물질로 검출될 수도 있다. 예를 들어, 항체는 비오틴(biotin)과 결합하고, 항체-비오틴 컨쥬게이트(conjugate)는 표지된 아비딘(avidin) 또는 스트렙트아비딘(streptavidin)을 사용하여 검출될 수도 있다. 유사하게, 항체는 합텐(hapten)과 컨쥬게이트 되고, 항체-합텐 컨쥬게이트는 표지된 항-합텐 항체를 사용하여 검출될 수도 있다.

[0358] 당업자는 이러한 것 및 본원 발명에 따라 이용될 수도 있는 다른 적합한 표지를 알 것이다. 이러한 표지의 항체 또는 그것의 단편에의 결합은 당업자에게 통상적으로 알려진 표준 테크닉을 사용하여 성취될 수 있다. 전형적인 테크닉은 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 의하여 기재된다. 나중에 언급되는 커플링 테크닉(Coupling techniques)은 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 방법, 과옥소산(periodate) 방법, 디말레이미드(dimaleimide) 방법, 및 다른 것들인데, 모든 것은 여기의 참조에 의하여 구체화된다(incorporated).

[0359] 최근의 면역분석은 분석물(analyte)의 존재를 검출하기 위한 이중 항체 방법을 활용하는데, 여기에서 항체는 검출가능한 표지로 표지되는 제 2 항체를 갖는 반응성에 의하여 간접적으로 표지된다. 제 2 항체는 바람직하게는 그것으로부터 모노클로날 항체가 유도되는 동물의 항체와 결합하는 것이다. 다시 말해, 만일 모노클로날 항체가 마우스 항체라면, 표지된 제 2 항체가 항-마우스 항체이다. 여기에서 기재된 분석에서 사용되는 항체에 대하여, 이러한 표지는 바람직하게는 항체-코팅 비드(bead), 특히 자기 비드(magnetic bead)이다. 여기에서 기술되는 면역분석에서 이용되는 항체에 대하여, 표지는 바람직하게는 방사성, 형광, 또는 전기화학발광 물질 같은 검출가

능한 분자이다.

[0360] 그것들이 분석물 존재의 빠른 측정에 채택되기 때문에, 종종 빠른 포맷 시스템(fast format systems)으로도 지칭되는, 대체 이중 항체 시스템(double antibody system)은 또한 본원 발명의 범위 안에서 이용될 수도 있다. 시스템은 항체 및 분석물 사이에서 높은 친화도가 요구된다. 본원 발명의 일 구체예에 따르면, 아밀로이드 단백질의 존재는 아밀로이드 단백질에 대한 각각 특이적인 한 쌍의 항체를 사용하면서 측정된다. 상기 항체들의 쌍의 하나는 여기에서 "검출 항체(detector antibody)"로 지칭되고, 상기 항체의 쌍의 다른 것은 여기에서 "포획 항체(capture antibody)"로서 지칭된다. 본원 발명의 모노클로날 항체는 포획 항체 또는 검출 항체로서 사용될 수 있다. 본원 발명의 모노클로날 항체는 또한 단일 분석에서 함께 포획 및 검출 항체 모두로서 사용될 수 있다. 본원 발명의 일 구체예는 따라서 생물학적 유체의 샘플에서 아밀로이드 단백질을 검출하기 위한 이중 항체 샌드위치 방법을 사용한다. 이러한 방법에서, 분석물(아밀로이드 단백질)은 검출 항체 및 포획 항체 사이에서 샌드위치되는데, 포획 항체는 비가역적으로 고체 지지체로 고정화된다(immobilized). 검출 항체는 항체-분석물 샌드위치의 존재를 확인하고 따라서 분석물의 존재를 확인하기 위하여, 검출가능한 표지를 함유할 것이다.

[0361] 예시적인(exemplary) 고체상 물질은 방사면역분석(radioimmunoassay) 및 효소 면역분석의 분야에서 잘 알려진 미량 역가 플레이트(microtiter plates), 폴리스티렌의 시험관, 자기, 플라스틱 또는 유리 비드 및 슬라이드(slides)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 고체상에 항체를 커플링하기 위한 방법은 또한 당업자에게 잘 알려져 있다. 더 최근에, 나일론, 니트로셀룰로오스, 아세트산 셀룰로오스, 유리 섬유 및 다른 많은 다공성(porous) 폴리머 같은 많은 다공성 물질이 고체 지지체로서 이용되어 오고 있다.

[0362] 본원 발명은 또한 상기에서 정의된 것처럼 조성물을 포함하는 생물학적 샘플에서 아밀로이드 단백질을 검출하기 위한 진단 키트와 관련이 있다. 더욱이, 본원 발명은 상기에서 정의된 것과 같은 조성물에 추가하여, 상기에서 정의된 것처럼 검출 시약을 포함하는 뒤의 진단적 키트와 관련이 있다. 용어 "진단 키트(diagnostic kit)"는 일반적으로 당업계에서 알려진 임의의 진단 키트와 관련이 있다. 더욱 특히, 뒤의 용어는 Zrein 등 (1998)에서 기재되는 것과 같은 진단 키트를 지칭한다.

[0363] 본원 발명에 따른 항체를 포함하는 아밀로이드-관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 위한 신규한 면역탐지자(immunoprobes) 및 시험 키트를 제공하는 것이 게다가 또 다른 본원 발명의 목적이다. 면역탐지자에 대하여, 항체들은 적합한 수용체 분자, 예를 들어 효소 또는 방사선핵(radionuclide)에 직접 또는 간접으로 붙는다. 시험 키트는 면역 복합체를 형성하는 아밀로이드 항원에 결합하는 것 및 면역 복합체의 형성을 검출하는 것의 목적을 위한 항체를 사용하기 위하여 본원 발명 및 설명서에 따른 하나 이상의 항체들을 홀딩하는 컨테이너를 포함하는데, 이는 면역 복합체의 존재 또는 부존재가 아밀로이드 단백질의 존재 또는 부존재와 상관관계를 가지도록 한다.

**발명의 효과**

[0364] 본 출원은 다양한 베타-아밀로이드 단백질들로부터의 특정 에피토프를 특히 인식하고 이에 결합하는 능력을 가진 매우 특이적이고 매우 효과적인 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 출원의 교시에 의해 가능한(enabled) 항체는 아밀로이드증, 즉 알츠하이머병(AD) 같은 신경계 장애(neurological disorders)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 그룹을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 기인하거나 이와 관련된 질환 및 장애의 치료에 유용하다.

**도면의 간단한 설명**

[0365] 도 1은 Aβ 1-42의 완전한 아미노산 서열을 커버하는 겹치는 펩티드의 펩티드 라이브러리를 사용하는 ELISA에 의해 수행되는 뮤린 모노클로날 항체 ACI-24-Ab-3의 에피토프 맵핑(epitope mapping) 연구의 결과를 보여준다. 완전한 Aβ 1-42에 결합하는 것은 양성 대조군(positive control)으로 사용되었다. 모든 다른 펩티드는 8-10 아미노산 길이였다. 펩티드 번호는 펩티드가 시작하는 Aβ 1-42의 아미노산에 대응한다. 결과는 O.D.로써 표현된다.

도 2는 Aβ 1-28, 17-40, 1-40, 1-42A(Anaspec), 또는 1-42B(Bachem)을 커버하는 더 긴 펩티드를 사용하는 ELISA에 의해 수행되는 뮤린(murine) 모노클로날 항체 ACI-24-Ab-3의 에피토프 맵핑 연구의 결과를 보여준다. 결과는 백그라운드를 뺀 후에, O.D.로써 표현된다. 결과는 2 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 3은 1:100 및 1 :10의 항체 대 Aβ1-42의 몰비에서 Aβ1-42 응집의 ACI-24-Ab-3-매개 억제를 묘사한다. 결과는 2 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 4는 1:100 및 1 :10의 항체 대 Aβ1-42의 몰비에서 미리 응집된 Aβ1-42의 ACI-24-Ab-3-매개 해체를 묘사한다. 결과는 2 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 5는 ACI-24-Ab-3 항체의 Aβ1-42 펩티드의 저분자량(LMW) 모노머성 제제 및 농축된 고분자량(HMW) 프로토-피브릴(PF) 올리고머에의 결합을 묘사한다.

도 6은 6E10 양성 대조군 항체의 Aβ1-42 펩티드의 고분자량(HMW) 프로토-피브릴(PF) 올리고머농축된 프로토-피브릴 및 저분자량(LMW) 모노머성 제제에의 결합을 묘사한다.

도 7은 항체 ACI-24-Ab-3(A) 및 대조군 항체 6E10(B)의 Aβ1-42 펩티드의 모노머 및 올리고머에의 결합을 묘사한다. 결과는 3 회의 독립적 실험의 평균 (±SEM) 흡광도(O.D.) 값으로서 보고된다.

도 8은 Aβ1-42의 완전한 아미노산 서열을 커버하는 중첩되는 펩티드의 펩티드 라이브러리를 사용하는 ELISA에 의하여 수행되는 무린 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9의 에피토프 맵핑 연구 결과를 보여준다. 완전한 Aβ1-42에의 결합은 양성 대조군(positive control)으로서 사용되었다. 모든 다른 펩티드는 8-10 아미노산 길이였다. 펩티드 번호는 펩티드가 시작하는 Aβ1-42 서열의 아미노산에 대응한다. 결과는 O.D.로써 표현된다.

도 9는 Aβ1-28, 17-40, 1-40, 1-42A (Anaspec), 또는 1-42B (Bachem)를 커버하는 더 긴 펩티드를 사용하는 ELISA에 의해 수행되는 무린 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9의 에피토프 맵핑 연구 결과를 보여준다. 결과는 백그라운드를 뺀 후에, O.D.로써 표현된다. 결과는 2 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 10은 Aβ1-42의 완전한 아미노산 서열을 커버하는 중첩되는 펩티드의 펩티드 라이브러리를 사용하는 ELISA에 의해 수행되는 무린 모노클로날 항체 ACI-12-Ab-11의 에피토프 맵핑 연구 결과를 보여준다. 완전한 Aβ1-42에의 결합은 양성 대조군으로써 사용되었다. 모든 다른 펩티드는 8-10 아미노산 길이였다. 펩티드 번호는 펩티드가 시작하는 Aβ1-42 서열의 아미노산에 대응한다. 결과는 O.D.로써 표현된다.

도 11은 Aβ1-28, 17-40, 1-40, 1-42A(Anaspec), 또는 1-42B(Bachem)를 커버하는 더 긴 펩티드를 사용하는 ELISA에 의해 수행되는 무린 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9의 에피토프 맵핑 연구 결과를 보여준다. 결과는 백그라운드를 뺀 후에, O.D.로써 표현된다. 결과는 2 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 12는 1:100 및 1 :10의 항체 대 Aβ1-42의 몰비에서 Aβ1-42 응집의 ACI-11-Ab-9-매개 억제를 묘사한다. 결과는 2 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 13은 1:100 및 1 :10의 항체 대 Aβ1-42의 몰비에서 Aβ1-42 미리 응집된 ACI-11-Ab-9-매개 해체를 묘사한다. 결과는 3 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 14는 도 13은 1:100 및 1 :10의 항체 대 Aβ1-42의 몰비에서 Aβ1-42 응집의 ACI-12-Ab-11-매개 억제를 묘사한다. 결과는 3 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 15는 1:100 및 1 :10의 항체 대 Aβ1-42의 몰비에서 Aβ1-42 미리 응집된 ACI-12-Ab-11-매개 해체를 묘사한다. 결과는 2 회의 독립적 실험의 평균 ±1 표준 에러를 보여준다.

도 16은 Aβ1-42 펩티드의 올리고머 및 모노머에 대한 ACI-12-Ab-11 항체(A) 및 대조군 항체 6E10(B)의 결합을 묘사한다. 결과는 3 회의 독립적 실험의 평균(±SEM) 흡광도(O.D.)로서 보고된다.

도 17은 rhApoE4의 Aβ<sub>42</sub>-비오틴에 대한 결합을 분석하기 위하여 사용될 수 있는 ELISA 측정에서의 단계를 개략적으로 묘사한다.

도 18은 rhApoE4 대 Aβ<sub>42</sub>-비오틴 결합을 위한 ELISA 측정의 현상으로부터 얻어진 결과를 표시한다. rhApoE4 및 Aβ<sub>42</sub>-비오틴의 농도를 최적화하기 위하여, rhApoE4의 희석들이 Aβ<sub>42</sub>-비오틴의 일정한 농도로 테스트되었다.

도 19는 묘사된 ELISA 분석에서 rhApoE4에 복합체로 된 Aβ<sub>42</sub>-비오틴의 결합에 대한 과잉의 Aβ<sub>42</sub>-비오틴의 효과를 묘사한다.

도 20은 묘사된 ELISA 분석을 위한 Aβ<sub>42</sub>-비오틴의 최적의 샘플 결정을 묘사한다.

- 표 1.1은 여기에서 기술된 특정 항체들을 생성시키기 위하여 사용되는 항원성의 구성체 및 항체들을 설명한다.
- 표 1.2 ACI-24-Ab-3에 대한 A $\beta$  펩티드의 결합. 결과는 백그라운드를 뺀 후 O.D.로써 표현된다.
- 표 1.3 ACI-24-Ab-3의 ELISA에 의하여 분석된 A $\beta$  1-42의 33 중첩되는 펩티드에의 결합. 완전한 A $\beta$  1-42에의 결합은 양성 대조군(positive control)으로써 사용되었다. 모든 다른 펩티드는 8-10 아미노산 길이였다. 펩티드 번호는 펩티드가 시작하는 A $\beta$  1-42 서열의 아미노산과 대응한다. 결과는 O.D.으로써 표현된다.
- 표 1.4 ACI-24-Ab-3(마우스 EJ1A9) 항체의 A $\beta$  1-42 펩티드의 저분자량(LMW) 모노머성 제제 및 농축된 고분자(HMW) 프로토-피브릴(PF) 올리고머에의 결합.
- 표 1.5 6E10 대조군 항체의 A $\beta$  1-42 펩티드의 프로토-피브릴 및 농축된 고분자량(HMW) 프로토-피브릴(PF) 올리고머 및 저분자량(LMW) 모노머성 제제에의 결합.
- 표 1.6 ACI-24-Ab-3(마우스 EJ1 A9) 항체의 A $\beta$  1-42의 모노머 및 올리고머에의 결합. 결과는 O.D. 값으로 표현된다.
- 표 1.7 6E10 대조군 항체의 A $\beta$  1-42의 모노머 및 올리고머에의 결합. 결과는 O.D. 값으로 표현된다.
- 표 2.1은 여기에서 기재된 어떤 항체를 기르기(raising) 위하여 사용되는 항체 및 항원 구조물을 설명한다.
- 표 2.2 A $\beta$  펩티드의 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11에의 결합. 결과는 백그라운드를 뺀 후 O.D.로 표현된다.
- 표 2.3 ELISA로 분석된 것과 같은 A $\beta$  1-42의 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 중첩(overlapping) 펩티드에의 결합. 완전 A $\beta$  1-42에의 결합은 양성 대조군으로서 사용되었다. 모든 다른 펩티드는 8-10 아미노산 길이였다. 펩티드 번호는 펩티드가 시작한 A $\beta$  1-42 서열의 아미노산에 대응한다. 결과는 O.D.로 표현된다.
- 표 2.4 ACI-11-Ab-9(클론 FK2A6A6) 항체의 A $\beta$  1-42 펩티드의 모노머 및 올리고머에의 결합. 결과는 O.D.로 표현된다.
- 표 2.5 6E10 대조군 항체의 A $\beta$  1-42 펩티드의 모노머 및 올리고머에의 결합. 결과는 O.D. 값으로 표현된다.
- SEQ ID NO: 1: 항원 펩티드(Antigenic peptide) A $\beta$ <sub>22-35</sub>
- SEQ ID NO: 2: 항원 펩티드 A $\beta$ <sub>29-40</sub>
- SEQ ID NO: 3: A $\beta$  펩티드 단편 A $\beta$ <sub>1-28</sub>
- SEQ ID NO: 4: A $\beta$  펩티드 단편 A $\beta$ <sub>17-40</sub>
- SEQ ID NO: 5 A $\beta$  펩티드 단편 A $\beta$ <sub>1-40</sub>
- SEQ ID NO: 6 A $\beta$  펩티드 단편 A $\beta$ <sub>1-42</sub>
- SEQ ID NO: 7 ACI-24-Ab-3의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열.
- SEQ ID NO: 8 ACI-24-Ab-3의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열.
- SEQ ID NO: 9 경쇄 아미노산 서열 CDR1
- SEQ ID NO: 10 경쇄 아미노산 서열 CDR2
- SEQ ID NO: 11 경쇄 아미노산 서열 CDR3
- SEQ ID NO: 12 중쇄 아미노산 서열 CDR1
- SEQ ID NO: 13 중쇄 아미노산 서열 CDR2
- SEQ ID NO: 14 중쇄 아미노산 서열 CDR3
- SEQ ID NO: 15 ACI-24-Ab-3의 경쇄 가변 도메인 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- SEQ ID NO: 16 ACI-24-Ab-3의 중쇄 가변 도메인 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- SEQ ID NO: 17 ACI-11-Ab-9의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열.

- SEQ ID NO: 18 ACI-11-Ab-9의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열.
- SEQ ID NO: 19 ACI-12-Ab-11의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열.
- SEQ ID NO: 20 ACI-12-Ab-11의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열.
- SEQ ID NO: 21 경쇄 아미노산 서열 CDR1
- SEQ ID NO: 22 경쇄 아미노산 서열 CDR2
- SEQ ID NO: 23 경쇄 아미노산 서열 CDR3
- SEQ ID NO: 24 중쇄 아미노산 서열 CDR1
- SEQ ID NO: 25 중쇄 아미노산 서열 CDR2
- SEQ ID NO: 26 중쇄 아미노산 서열 CDR3
- SEQ ID NO: 27 ACI-11-Ab-9의 경쇄 가변 도메인 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- SEQ ID NO: 28 ACI-11-Ab-9의 중쇄 가변 도메인 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- SEQ ID NO: 29 ACI-12-Ab-11의 경쇄 가변 도메인 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- SEQ ID NO: 30 ACI-12-Ab-11의 경쇄 가변 도메인 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0366] 실시예 1: 팔미토일화된(palmitoylated)  $A\beta_{1-15}$  초분자 항원 구조물을 갖는 면역화를 통하여 발생하는 항체

[0367] **실시예 1.1  $A\beta_{1-15}$  팔미토일화된 초분자 항원 구조물을 만들기 위한 방법**

[0368] 1.1.1 테트라(팔미토일 라이신)- $A\beta_{1-15}$  펩티드 항원의 합성

[0369] 팔미토일화된 아밀로이드 1-15 펩티드는 향상된 이전의 보고된 방법(Nicolau et. al. 2002)을 따라 합성되었다. 이러한 새로운 접근은 변형된 아미노산 9-플루오레닐메톡시카르보닐 (Fmoc)-Lys(Pal)-OH을 혼입하는 단계적 고체상 합성 대신 미리 형성된 펩티드의 말단 Lys 잔기에 팔미트산의 수지상(on-resin) 이식(grafting)을 수반하였다. 이러한 새로운 접근은 커플링 효율을 향상시키고 상당히 더 높은 순도의 생산물을 생산한다. 따라서, 직교적으로(orthogonally) 보호되는 아미노산 Fmoc-Lys(Mtt)-OH은 [2-(1 H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트] (HBTU) 커플링 화학을 사용하여 Wang 수지에 붙었다. Fmoc 기는 DMF 의 20% 피페리딘을 사용하여 제거되었고 Fmoc-Lys(Mtt)-OH의 제 2 잔기는 커플링 되었다. Fmoc/tBu 화학 및 표준 결사술 보호기를 사용하는 표준 자동 펩티드 합성은 그리고 나서 펩티드 서열을 만들기 위하여 다음의(the next) 15 아미노산 위에 커플링되기 위하여 사용된다. 마침내, 커플링된 마지막 두 개의 아미노산이 Fmoc-Lys(Mtt)-OH이었다. Mtt 기는 그리고 나서 펩티드 파편을 방출하도록 디클로로메탄의 1% 트리플로로아세트 산 (TFA)을 사용하여 선택적으로 절단되었고, 그리고 나서 HBTU를 사용하여 팔미트산과 커플링 되었다. 수지 세척(wash) 후에, Fmoc 기는 디메틸포름아미드(DMF)의 20% 피페리딘으로 제거되었고 마지막으로 표준 조건 하에 TFA를 사용하여 동시적인 수지 절단 및 결사술 탈보호(deprotections)가 수행되었다. 차가운 디에틸 에테르로부터의 분쇄(trituration)는 백색 고체의 생산물을 생산한다. 전기분무 질량 분석 방법(electrospray mass spectrometry)은 생산물의 정체(identity)를 확인하였고 (m/z expected: 1097.9 ([M]3+); found: 1096.8 ([M-3H]3+), 다른 트리-, 디- 또는 모노- 팔미토일화된 펩티드는 검출되지 않았다.

[0370] **실시예 1.2: 초분자 항원 구조물에 의하여 얻어진 항체**

[0371] **팔미토일화된  $A\beta_{1-15}$  초분자 항원 구조물에 대한 mAbs를 제조**

[0372] 팔미토일화된 항원(ACI-24,  $A\beta_{1-15}$ )은 2 주 간격으로 C57BL/6의 면역화를 위하여 사용되었다. 10-12 마리의 동물들은 각 항원(주입량: 8 nmole 펩티드를 함유한 200 $\mu$ l)으로 면역화되었다. 마지막 주입은 동물의 희생(sacrifice) 4일전에 수행되었다. 5번 부스팅(boostings) 후에, 치료 역가(titers)를 갖는 마우스(1:5000으로 희석된 혈청이 ELISA에서 양성(positive)인 경우가 융합(fusion)을 위하여 선택되었다. 비장(spleen) 세포는 면역화된 동물로부터 수확하였고, 골수종 세포주를 민감화된 비장 세포와 융합시켜 하이브리도마를 만들었다. 비장으로부터 마우스의 B-림프구의 융합은 Kohler 와 Milstein(Nature 256: 495-497 (1975)), 및 Harlow 와

Lane(Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))의 잘 알려진 과정을 사용하여 골수종 세포주 SP2-0(ATCC, Manassas, VA)의 세포로 수행되었다.

[0373] 세포는 폴리에틸렌 글리콜을 첨가함으로써 융합하도록 유도되었다. 생성된 하이브리드 세포는 그리고 나서 클론 성장(clonal growth)을 허용하도록 통상적인 방식으로 10 ± 14 일 동안 항온보관되었다. 초기의 클론 선택(clonal selection)은 제한 희석(limiting dilution)을 통해 이루어졌다. IgG 생산하는 하이브리도마 클론은 Aβ<sub>1-42</sub> 펩티드에 그것들이 특이적 결합하는 지를 ELISA를 통해 실험하여 선택하였고 생성되는 클론, 즉 원하는 모노클로날 항체를 생산하는 클론이 항온보관되었다.

[0374] 그렇게 얻어진 하이브리도마는 하이포산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin), 및 티미딘(thymidine)(HAT)을 함유하는 선택 배지에서 세포를 플레이팅(plating)하여 화학적으로 선택하였다.

[0375] 뒤이어, 하이브리도마는 특정 아밀로이드-관련 질환 또는 장애에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 능력에 대해 스크리닝되었다. 일단 마더 클론(mother clone)이 식별되면, 단일클론성(monoclonality)을 확인하고 하이브리드가 안정화되도록 하기 위하여 네 번 서브클로닝되었다. 관심있는 항체를 생산하는 하이브리도마는 클로닝되고, 증량되고, 장래 생산을 위하여 냉동 저장되었다.

[0376] 항체는 상업적으로 이용가능한 마우스 모노클로날 이소타이핑(isotyping) 키트에 의하여 이소타입여부가 확인되었고, 안정한 클론은 항체 생산을 위하여 무혈청 배지(serum free medium)에 적응시켰고 바이오리액터(bioreactor)에 놓였다.

[0377] 바람직한 하이브리도마는 IgG1 이소타입을 가지는 모노클로날 항체를 생산하였다.

[0378] **실시예 1.3: 항체 mACI-24-Ab3에 대한 특이성 결정(determination)**

[0379] 항체 mACI-24-Ab3(상이한 농도의 미리 형성된 아밀로이드 1-42, 1-40, 및 17-40)의 특이성을 분석하기 위하여, 1-28 피브릴을 하이브드 ECL 니트로셀룰로오스 막(Hybond ECL Nitrocellulose Membrane)(Amersham BioSciences) 위에 블로팅(blot)하였다. 10% 건조 밀크 및 0.7% Tween 20으로 차단한 후에, 막(membranes)은 실온에서 2 시간 동안 20 μg/ml에서 일차 항체로 항온보관된다. 세척 후에, 막은 실온에서 1 시간 동안 양고추냉이 과산화효소가 컨주게이트된 양 항-마우스 IgG 항체(horse radish peroxidase conjugated sheep anti-mouse IgG)(Amersham Biosciences)로 항온보관되고 세척되고, 화학발광제(chemiluminescent) 용액으로 반응되고 나서 엑스레이 필름에 노출되었다.

[0380] 아밀로이드 β 1-42, 1-40, 및 17-40에 대한 mAb mACI-24-Ab3의 결합을 측정하기 위하여 1-28 피브릴은 37°C에서 7일 동안 미리 형성되고 막에서 블로팅되었다. 20 μg/ml 항체가 결합 능력을 측정하기 위하여 사용되고 결합 항체는 노출 20분 동안 양고추냉이 과산화효소가 컨주게이트된 양 항-마우스 IgG 항체에 의하여 검출된다.

[0381] **실시예 1.4: 티오플라빈 T (Th-T) 형광 측정(fluorescent assay)**

[0382] 응집(aggregation)의 억제 및 mAb의 해체(disaggregation) 특성 모두를 측정하기 위하여 피브릴 Aβ<sub>1-15</sub> 분자에 특이적으로 결합하는 티오플라빈 T (Th-T) 형광 측정이 사용되었고 뒤이어 형광 방출 강도(fluorescent emission intensity)가 용액에 존재하는 Aβ<sub>1-42</sub> 필라멘트(filament)의 양과 상관관계가 있다.

[0383] Aβ<sub>1-42</sub> 동결 건조된 분말은 헥사플루오로이소프로판올(HFIP)에서 1 mM로 재구성되었다. 펩티드 용액은 실온에서 15분 동안 초음파 처리되었고, 밤새 휘저어지고, 비실리콘 미량원심분리기(microcentrifuge) 튜브로 등분(aliquot)된다. HFIP는 그리고 나서 아르곤(argon) 기류속에서 증발된다. 생성되는 펩티드 필름은 10 분 동안 진공 건조되고 사용될 때까지 -80°C에서 저장된다.

[0384] 1.4.1 Aβ<sub>1-42</sub> 응집 분석

[0385] Aβ<sub>1-42</sub> 응집에 대한 항체-매개의 억제를 분석하기 위하여 항체는 PBS에서 미리 희석되었고 다음의 성분을 함유하는 분석 용액이 비실리콘 항온보관 튜브에서 만들어 졌다: 3.3 또는 0.33 μM 미리 희석된 항체, 10 μM 티오플라빈 T, 33 μM Aβ<sub>1-42</sub>, 및 8.2% DMSO. 따라서, 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>의 최종 몰비는 1:10 및 1:100 이었다. 적합한 대조군 용액(control solutions)도 제조되었다. 그 용액은 그리고 나서 37°C에서 24 시간동안 항온보관시켰고 형광분광(spectrofluorescence) (상대 형광 유닛(relative fluorescence units); RFU)이 Perkin-Elmer FluoroCount 형광분광광도계(spectrofluorometer) 상에서 흑색 348-웰(well) 플레이트(plates)에서 6 번 반복

으로 판독(read)되었다. 응집의 억제 또는 해체는 각각, 다음의 공식에 따라 평균 % 억제 또는 해체로 표현된다.

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

[0386]

평균 26% (2회 독립 실험)이고, 반면 1:10 몰비에서 억제는 51%(2회 독립 실험)였다.

[0387]

[0388]

1.4.2 Aβ<sub>1-42</sub> 해체 분석

[0389]

mAb의 해체 특성을 측정하기 위하여, 피브릴 Aβ<sub>1-42</sub> 분자에 특이적으로 결합하는 티오플라빈 T(ThT) 형광 분석이 사용되었고 그 후에 형광 방출 강도는 용액에 존재하는 Aβ<sub>1-42</sub> 필라멘트의 양과 상관관계가 있다.

[0390]

미리 응집된 Aβ<sub>1-42</sub>의 항체-매개 해체에 대하여 분석하기 위하여 상기 기재된 것처럼 제조된 저분자량의 Aβ<sub>1-42</sub>이 27% DMSO 및 1x PBS중 110 μM 용액으로서 제조(make up)되었다. 이러한 용액은 그리고 나서 24시간 동안 37°C에서 응집되었고, 그 후에 다음이 첨가되었다: 3.3 또는 0.33 μM 미리 희석된 항체, 및 10 μM 티오플라빈 T. 이것은 Aβ<sub>1-42</sub>의 몰비가 1 : 10 및 1 : 100가 되었고 8.2% DMSO를 함유된다. 이러한 용액은 그리고 나서 37°C에서 추가 24 시간동안 항온보관되었다. 형광분광은 그리고 나서 측정되었고 % 해체는 상기에 기재된 것처럼 계산되었다.

[0391]

항체 ACI-24-Ab-3은 해체 분석에서 미리 응집된 Aβ<sub>1-42</sub>의 중요한 해체를 보여준다. 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>의 몰비 1:100에서 해체는 평균 12%(2회 독립 실험)였고, 반면 1:10 몰비에서 해체는 20%(2회 독립 실험)였다.

[0392]

상기 결과로부터 Aβ<sub>1-42</sub>의 응집을 억제 및 미리 형성된 Aβ<sub>1-42</sub> 섬유를 해체할 수 있다는 점에서, ACI-24-Ab-3가 Aβ<sub>1-42</sub> 필라멘트와 상호작용하는 이중 기능성(bi-functionality)을 나타낸다는 것이 명백하다.

[0393]

**실시예 1.5: mACI-01Ab7 C2 Aβ<sub>1-42</sub> 상호작용**

[0394]

아밀로이드 펩티드 Aβ<sub>1-42</sub>와 항체 ACI-24-Ab-3 간 상호작용은 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 사용하여 연구된다. 마우스 항체의 Aβ<sub>1-42</sub>의 섬유 또는 모노머에의 결합이 측정된다.

[0395]

모든 SPR 실험은 Biacore X 기기(Biacore AB)로 수행된다. 러닝(running) 버퍼와 샘플 버퍼 HBS-EP 뿐만 아니라 고정화(immobilization)에 필요한 시약(EDC, NHS 및 에탄올아민), CM5 센서칩과 SA 센서칩은 Biacore AB에서 구입한다. 아세트산 나트륨(10 mM, pH 5.0)은 커플링 수율을 증가시키기 위하여 커플링 버퍼로 사용된다. 피브릴(Fibrillar) Aβ<sub>1-42</sub> (Bachem)는 Aβ<sub>1-42</sub>에 PBS 버퍼를 3 mg/ml의 최종 농도로 첨가하여 그 바이얼을 7일 동안 37°C에 둬으로써 제조된다. 피브릴 Aβ<sub>1-42</sub>는 표면-결합된 카르복시메틸 텍스트란 매트릭스를 함유하는 CM5 센서칩에 커플링된다. 바이오틴화된 모노머성 Aβ<sub>1-42</sub>(Bachem)은 공유적으로 결합된 스트렙타아비딘을 갖는 카르복시메틸 텍스트란으로 이루어진 센서 칩 SA에 커플링된다. 전형적으로 mAb의 4 또는 5 농도는 러닝 버퍼를 이용하여 계열 희석(serial dilution)에 의하여 측정된다. 주입은 최저 농도로부터 시작하면서 수행되고 3분 동안 30 μL/min의 유속에서 fc 1 및 2 모두 통과된다. 플로우 셀(flow cell) 2는 언데리바타이즈되고(underivatized) 반응은 기기 소음 및 벌크(bulk) 굴절변화를 교정하기 위하여 fc 1로부터 감해진다(subtracted). 주입이 끝난 후에, 표면은 즉시 5분간 러닝 버퍼로 세척된다. 남은 결합된 항체를 Aβ<sub>1-42</sub> 피브릴로부터 제거하기 위하여 표면 재생은 10mM NaOH의 펄스(pulses) 주입에 의하여 수행된다. 동역학적 분석(kinetic analysis)은 수치 적분(numerical integration)을 위한 알고리즘을 사용하여 수행되고 글로벌 분석은 BIAevaluation 3.0을 사용하여 수행된다. 상이한 농도에서 분석물의 주입에 대해 얻어지는 곡선(curves)은 겹쳐지고(overlaid) 기저선이 영(zero)에 맞추어진다. 곡선 피팅(curve fitting)을 위하여, 모든 데이터는 동시에 1:1 균질 복합체(homogeneous complex)에 피팅된다.

[0396]

마우스 ACI-24-Ab-3 항체의 아밀로이드에의 결합이 측정된다.

[0397]

**실시예 1.6: ACI-24-Ab-3 모노클로날 항체의 아밀로이드에의 결합**

- [0398] 미리 형성된 섬유 위에 항체 ACI-24-Ab-3의 분자 결합 면(binding side)을 분석하기 위하여 음성 조영된(negatively contrasted) 투과 전자현미경(transmission electronic microscopy)(TEM)이 수행된다.
- [0399] 항체 ACI-24-Ab-3은 Slot JW(Geuze HJ (1985))에 따라 8 nm 교질연화금(colloidal gold)과 커플링된다. 아밀로이드 1-42(A $\beta$ <sub>1-42</sub>)의 동시-항온보관(co-incubation)을 위하여 6.65  $\mu$ M 섬유(fibers)가 1:100 몰비로 금-표지성 항체와 실온에서 24 시간 동안 항온보관된다. 그 후에 샘플 5  $\mu$ l가 45 초 동안 팔로디움(parlodium)/C 필름으로 덮인 새로 글로우-방전시킨(glow-discharged) Cu 그리드(grid)(mesh 200) 위에 항온보관되고, 물로 세 번 세척하고 2%의 프레쉬하게 희석되고 여과된 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 한 번 세척된다. 샘플은 15-20 초 동안 2% 우라닐 아세테이트에서 염색(stain)된다. 그리드 위의 여분의 염색액은 빨아들여지고 그 결과로 기건(air-dried)된다. 각 샘플의 세 개의 그리드가 제조된다. 그리드는 투과 전자 현미경 Hitachi 7000에서 분석된다.
- [0400] **실시예 1.7: 밀도 구배(Density-Gradient) 초원심분리기(Ultracentrifugation)에 의한 분획**
- [0401] A $\beta$ <sub>1-42</sub> 섬유 중합(polymerization)을 억제하는 것 및 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 섬유의 해체에서의 모노클로날 항체 ACI-24-Ab-3의 특성은 밀도구배 초원심분리기(Rzepecki 등, 2004)로 연구되는데, 이는 항체와 함께 또는 항체 없이 항온보관 후에 상이한 크기로 생성되는 펩티드 간에 분배를 하고 이어서 미리 형성된 구배(OptiPrep™) 위에 SDS-PAGE 침강 분석(sedimentation analysis)이 뒤따르는 원리에 기초한다. 미리 형성된 A $\beta$  섬유의 집단, 공동-항온보관 항체의 응집 특성의 억제 및 해체, 항체의 섬유에의 결합의 동시 분석(simultaneous analysis)은 이러한 방법의 명백한 장점이다.
- [0402] A $\beta$ <sub>1-42</sub> 응집의 억제를 위하여, A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머는 50  $\mu$ M의 A $\beta$  최종 농도를 갖는 두 개의 상이한 몰비(mAb보다 30 또는 100배 더 높은 모노머 A $\beta$ <sub>1-42</sub>의 몰비)에서 mAb ACI-24-Ab-3과 함께 항온보관된다. 37°C에서 24 시간 항온보관 후에, 샘플은 Optiprep™의 비연속적인 구배 위에 겹쳐 놓이고 튜브는 4°C에서 3 시간 동안 259 000 g에서 스핀(spin)된다. 15개 분획(fraction)이 수확되었고(각 140  $\mu$ L), 분획 1은 구배의 정상으로부터 최소 밀도 분획이고 분획 15는 구배의 바닥으로부터 가장 밀도가 높은 분획이다. 펠렛(pellet)도 취득된다. 수집된 분획들은 은염색(silver staining)과 함께 SDS-PAGE에 의해 분석된다. 억제 분석(inhibition assay)을 위한 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 농도는 아밀로이드 응집 키네틱(kinetic)을 감소시키고 선형 위상(linear phase) 범위 내에서 측정을 확실하게 하는 해체 분석(disaggregation assay)을 위한 농도보다 다섯 배 적다.
- [0403] 미리 형성된 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 피브릴이 mAb ACI-24-Ab-3(두 개의 상이한 몰비 1:30 및 1:100, mAb + 246  $\mu$ M의 A $\beta$  최종 농도를 갖는 모노머 A $\beta$ <sub>1-42</sub>)과 함께 항온보관되어 해체되게 하기 위하여, 샘플은 37°C에서 24 시간 동안 항온보관된다. 24 시간 후에 샘플은 초원심분리기에 의하여 분획되고 상기 및 전에 기재(Rzepecki 등, 2004)된 것처럼 SDS-PAGE에 의해 분리된다.
- [0404] **실시예 1.8: mAb ACI-24-Ab-3과 공동-항온보관에 의한 필라멘트 응집의 억제 및 미리 형성된 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 필라멘트의 해체를 평가하기 위한 형광 분석(Fluorescent Assay)**
- [0405] BIS-ANS 형광 분석
- [0406] mAb의 억제 특성을 평가하기 위하여, 특이적으로 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 필라멘트의 모노머 또는 비-피브릴(non-fibrillous) 집단을 검출하는 BIS-ANS (LeVine, 2002) 형광 분석이 사용된다. 형광 측정 전에, A $\beta$ <sub>1-42</sub> 모노머가 대조군(control)로서의 버퍼 또는 mAb ACI-24-Ab-3(몰비 1:100, mAb 대 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 펩티드)와 37°C에서 14 시간 동안 미리 항온보관된다. 상대적인 형광 유닛은 자동적으로 기록되고 결과는 대조군에 대한 변화로서 퍼센트로 표현된다.
- [0407] **실시예 1.9: <sup>13</sup>C-표지된 베타-아밀로이드 1-42 펩티드를 갖는 ACI-24-Ab-3 모노클로날 항체의 상호 작용의 NMR 및 형광 특성화(fluorescence characterization)**
- [0408] mAb가 미리 형성된 섬유를 녹이거나 섬유 형성을 억제하는지 가능기작(potential mechanism)을 평가하기 위하여, U-<sup>13</sup>C Tyr10 및 Val12-표지 베타-아밀로이드 1-42 펩티드의 Th-T 형광 분석 및 고체상 NMR 간의 헤드투헤드-실험(head-to-head-experiment)이 수행된다. 따라서, 이러한 조사의 목표는 베타-아밀로이드 펩티드에서 및 모노클로날 항체의 존재에서 고체상 NMR 분광법에 의하여 베타-시트(sheet) 전이(transition)를 추적하고(follow), 이것을 Th-T 형광 분석으로 측정된 해체 능력과 직접 비교하는 것이다.

- [0409] 고체상 NMR 분광법은 2차 구조에서 전이를 검출하는 것뿐 아니라, 구조적 전이를 좌우하는  $A\beta_{1-42}$  펩티드의 도메인(domain) 위치를 알 수 있게 해준다. 고체상 NMR은  $A\beta_{1-42}$  섬유의 구조 결정에 기여해 왔기 때문에 이 문제에 대한 그 적용성을 입증하여 왔다(Petkova 등, 2004, Petkova 등, 2002). 특히  $^{13}C_{\alpha}$  및  $^{13}C_{\beta}$ 의 화학적 시프트(chemical shift)와 2차 구조와의 상관관계(Cornilescu 등, 1999, Luca 등, 2001, Iwadate et al, 1999)는 펩티드 안에서 2차 구조의 변화를 시험할 수 있는 소중한 도구이다.
- [0410] 12번 위치(12Val)에  $^{13}C$ 로 미리 표지된 발린(valine) 및 10번 위치(10Tyr)에  $^{13}C$ 로 미리 표지된 타이로신(tyrosine)을 포함하는 표지된 펩티드의 합성이 Fmoc 합성 프로토콜(protocol)에 의해 수행된다. 펩티드의 정체(Identity) 및 순도는 MALDI 질량 분광법에 의해 확인된다. 표지된 베타-아밀로이드 펩티드(1-42)는 37°C에서 1 주동안 PBS 버퍼에서 펩티드 용액을 항온보관하여 섬유를 발생시키기 위하여 사용된다. PBS 버퍼에서 아밀로이드 베타-펩티드의 부족한 가용성이라는 주요 문제점은 다음의 방식으로 해결될 수 있었다: PBS 버퍼 값이 미량의 암모니아에 의해 증가되어 아밀로이드 베타-펩티드를 용해시킨다. PBS 버퍼의 원래 pH 값은 암모니아의 휘발성 특성을 사용하여 더 큰 PBS 배스(bath)의 존재에서 샘플을 항온보관함으로써 다시 얻어진다.
- [0411] 베타-시트를 파괴하는 항체의 영향을 측정하기 위하여, 섬유 용액은 NMR 및 Th-T 분석 모두를 위해 37°C에서 24 시간 동안 항체로 항온보관된다. 실시간 비교를 위해 동일한 용액의 분취량(aliquot)이 Th-T 형광 측정을 위해 사용되고, 남은 용액은 NMR 측정을 위해 동결건조된다.
- [0412] ACI-24-Ab-3의 해체 능력은 Th-T 형광 분석을 사용하여 미리 형성된  $^{13}C$ -표지 아밀로이드 베타-섬유와 공동항온 보관으로 분석된다.
- [0413] PBS(대조군) 및 mAb 항온보관 간의 상이성을 조사하기 위하여 각 스펙트럼은 PeakFit ([www.systat.com/-products/PeakFit](http://www.systat.com/-products/PeakFit))을 사용하여 역합성곱을 구한다(deconvoluted). 라인은 혼합된 Lorentzian/Gaussian 피팅 절차(fitting procedure)를 이용하여 잘 매치된다.
- [0414] **실시예 1.10: 아밀로이드 섬유에의 ACI-24-Ab-3의 기능성**
- [0415] 12.1 ACI-24-Ab-3 항체의 결합 후에  $A\beta_{1-42}$  섬유의 입체형태의 변형 및 해체의 시작
- [0416] 그것에 의해 항체가 미리 형성된 베타-아밀로이드( $A\beta_{1-42}$ )섬유를 풀리게 할 수 있는 지에 대한 메카니즘을 평가하기 위하여, 해체를 측정하는 티보플라빈-T(Th-T) 형광 분석 및 2차 입체 형태를 분석하는  $U-^{13}C$  타이로신 10 및 발린 12-표지  $A\beta_{1-42}$  펩티드의 고체상 핵자기공명(NMR)의 헤드투헤드 비교가 수행된다.
- [0417] **실시예 1.11: 모노클로날 항체 ACI-24-Ab-3의 에피토프 매핑(epitope mapping)**
- [0418] 모노클로날 항체 ACI-24-Ab-3의 에피토프 매핑은  $A\beta_{1-42}$ 의 완전 아미노산(aa) 서열(Mimotopes, Clayton Victoria, Australia에서 생산되고 ANAWA Trading SA, Wangen Switzerland로 부터 구입됨)을 커버하는 총 33 바이오틴화된 펩티드를 포함하는 펩티드 라이브러리를 사용하는 ELISA로 수행되었다. 펩티드 라이브러리의 펩티드는 8, 9, 또는 10-mer 아미노산 펩티드로 구성되었다.
- [0419] 바이오틴화된 완전  $A\beta_{1-42}$  펩티드(인간 서열)는 양성 대조군(Bachem, Bubendorf, Switzerland)으로서 사용되었다. 게다가,  $A\beta_{1-28}$ ,  $A\beta_{17-40}$ ,  $A\beta_{1-40}$ , 및  $A\beta_{1-42}$ 을 커버하는 더 긴 펩티드는 이러한 항체들이 결합할 수 있는 더 넓은 영역을 규정하기 위하여 사용되었다. 이러한 네 개의 펩티드들도 바이오틴화된다(Anaspec에서 제조되고 ANAWA Trading SA, Switzerland에서 구입됨). 에피토프 매핑은 제조사(Mimotopes)의 설명서에 따라 행하여졌다. 약술하면, 스트랩타비딘 코팅 플레이트(NUNC, Roskilde, Denmark)는 4°C에서 밤새 PBS에서 0.1% BSA로 차단되었다. 플레이트를 PBS-0.05% Tween 20로 세척한 후, 라이브러리로부터의 상이한 펩티드를 0.1% BSA, 0.1% 아지드 나트륨(Sodium Azide)을 함유하는 PBS에 10  $\mu$ M의 최종 농도로 희석하여 실온에서 1 시간 동안 코팅하였다. 세척 후, 플레이트는 상이한 항체를 2% BSA, 0.1% 아지드 나트륨을 함유하는 PBS에 ACI-24-Ab-3에 대해 10  $\mu$ g/ml로 희석하여 실온에서 1 시간 동안 항온보관되었다. 판은 다시 세척되고 RT에서 1h 동안 알칼리성 포스파타아제 컨주게이트된 염소 항 마우스 IgG(alkaline phosphatase conjugated goat anti mouse IgG)(Jackson Immunresearch West Grove, PA, USA)로 항온보관되었다. 최종 세척 후, 판은 포스파타아제 기질(pNPP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)로 항온보관되었고 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 405 nm에서 3 시간 항온보관 후에 판독되었다.

- [0420] Aβ<sub>1-42</sub>의 응집을 억제하는 그 능력에도 불구하고, ACI-24-Ab-3는 놀랍게도 의외로 Aβ<sub>1-42</sub>와 현저하게 결합하지는 않는 것으로 밝혀졌고, 또한 라이브러리의 다른 펩티드의 어떤 것과도 결합을 보이지 않았다.
- [0421] ACI-24-Ab-3가 다른 Aβ 펩티드를 인식하는지 측정하기 위하여, Aβ<sub>1-28</sub>, Aβ<sub>17-40</sub>, 및 Aβ<sub>1-40</sub> 및 Aβ<sub>1-42</sub>에 의 결합이 평가되었다. ACI-24-Ab-3은 Aβ<sub>17-40</sub>에 비결합성, Aβ<sub>1-28</sub> 및 Aβ<sub>1-42</sub>에는 낮거나 비결합성을 보였으나, Aβ<sub>1-40</sub>에는 상당한 결합성을 보였다. 이러한 결과는 ACI-24-Ab-3가 Aβ<sub>1-40</sub>에 특이적일 수도 있다는 것을 암시한다.
- [0422] **실시예 1.12: 단일 유전자삽입(single transgenic) hAPP 마우스의 뇌 아밀로이드 부하(amyloid load)에 대한 ACI-24-Ab-3와 간접 백신접종(passive vaccination)의 영향**
- [0423] 가용성 아밀로이드를 결합하고 뇌 밖으로 제거하는 ACI-24-Ab-3 모노클로날 항체의 인비보(in vivo)내 능력을 평가하기 위하여, 성별과 연령이 매치된 6개월된 단일 hAPP 마우스가 상이한 용량으로 간접 면역(passive immunization) 연구를 위하여 사용된다. 가용성 아밀로이드 부하는 동물 뇌를 수확하고 Aβ<sub>1-40</sub> 및 Aβ<sub>1-42</sub> 특이적 ELISA(TGC, Germany)를 수행함으로써 연구 마지막에 분석된다.
- [0424] 그룹당 8-13 마리의 동물이 200 μl PBS의 100, 300, 및 1000 μg 모노클로날 항체를 한 주 간격으로 두 번 주입을 받고, PBS 단독 주입은 대조군으로서 제공된다. 두 번째 주입 하루 지나서, 동물은 가용성 아밀로이드 분획의 생화학적 분석을 위하여 희생되었다. 뇌 마쇄물(homogenates)의 가용성 분획에서 및/또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)(CSF)에서의 인간 Aβ<sub>1-40</sub> 및 인간 Aβ<sub>1-42</sub>의 양을 정량화하기 위하여, 상업적으로 이용할 수 있는 효소-연결-면역-측정법(Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay)(ELISA) 키트가 사용된다(h 아밀로이드 β<sub>1-40</sub> 또는 β<sub>1-42</sub> ELISA 고감도, TGC, Switzerland). ELISA는 제조사의 프로토콜에 따라 수행된다. 약술하면, 표준(합성 Aβ<sub>1-40</sub> 또는 Aβ<sub>1-42</sub>의 희석) 및 샘플이 단백질 결합 능력 없는 96-well 폴리프로필렌 플레이트에서 제조된다(Greiner, Germany). 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3 및 15.6 pg/ml의 최종 농도를 갖는 표준 희석 및 샘플은 60 μl 최종 부피에, ELISA 키트가 제공되고, 샘플 희석제(diluent)에서 제조된다. 아밀로이드 레벨이 마우스의 연령과 함께 증가하고 실제 평가는 샘플의 관독이 표준 커브의 선형 부분 안에 있다는 것을 요구하기 때문에, Aβ<sub>40</sub> 분석을 위한 샘플은 2:3 희석되고, Aβ<sub>42</sub> 분석을 위한 샘플은 희석되지 않는다.
- [0425] 샘플, 스탠다드, 및 블랭크(50 μl)는 또한(in addition) 선택적인 항-Aβ-항체 컨쥬게이트(바이오틴화된 검출 항체)로 항-Aβ-코팅 폴리스티롤 판(포획 항체는 선택적으로 항원의 C-말단 끝을 인식한다.)에 추가되고 항체-아밀로이드-항체-복합체의 형성을 하도록 4°C에서 밤새 항온보관된다. 다음날, 스트렙타비딘-퍼옥시다제-컨쥬게이트가 첨가되고, TMB/퍼옥시드(peroxide) 혼합물의 첨가로 30분 지나서, 기질의 발색산물(colored product)로의 변환을 유발하고, 색강도(color intensity)가 450 nm 필터로 ELISA-관독기와 광측정기(photometry)에 의해 측정된다. 샘플의 Aβ 함유량(content)의 정량(quantification)은 합성(synthetic) Aβ<sub>1-40</sub> 또는 Aβ<sub>1-42</sub>으로 만들어진 스탠다드 커브에 흡광도(absorbance)를 비교하여 얻어진다. 데이터는 평균 대조군 값에 대한 개개의 변화로서 표현된다(대조군에 퍼센트로).
- [0426] **실시예 1.13: 이중 유전자삽입 hAPPxPS1 마우스의 플라크 부하(plaque load)에 대한 ACI-24-Ab-3의 만성 간접 투여(chronic passive administration)의 영향**
- [0427] 뇌에서 아밀로이드 플라크와 결합하고 감소시키는 ACI-24-Ab-3 모노클로날 항체의 생체내 능력을 평가하기 위하여, 성별 및 연령이 매치된 3.5 개월 된 이중 형질전환 hAPPxPS1 쥐가 4 개월된 만성 간접 투여 연구를 위해 사용된다. 아밀로이드 플라크는 티오플라빈 S의 결합에 의한 동물 뇌의 조직화학(histochemistry)에 의해 연구 마지막에 분석된다.
- [0428] 15 마리의 유전자삽입 동물은 PBS에서 500 μg 모노클로날 항체를 16회의 매주 주입을 받는다. 15 마리의 동물들은 대조군으로서, PBS만 주입된다. 모든 주입은 주어진 복강내 주사되었다. 희생(sacrifice)시, 마우스는 마취되고(anesthetized) 뇌혈관으로부터 혈액을 제거하기 위하여 4°C에서 생리적 혈청(physiological serum)으로 트랜스-카디알(trans-cardially) 플러쉬(flush)된다. 그 후에, 뇌는 두개골로부터 제거되고, 후뇌와 전뇌(forebrain)는 관상면(coronal/frontal plane)에서 절개되어 분리된다. 전뇌는 중선선 시상면 절개(midline sagittal cut)를 이용하여 좌우 반구(hemisphere)로 균등하게 분할된다. 하나의 반구는 조직학(histology)을 위해 4% 파라포름알데히드에서 밤새 후고정(post-fixed)된다. 시상 비브라토믹 섹션(sagittal vibratome sections)은 프리플로팅(free floating) 항온보관을 위해 절단되고 0.1% 아지드 나트륨을 함유하는 PBS에서 염색할 때까지 4°C에서 저장된다. 상이한 레벨에서 다섯 개 섹션은 티오플라빈 S로 밀집 플라크(dense plaque)에 대해 염색된다. 사용된 모든 동물의 섹션은 염색(staining) 및 블라인드 정량을 위해 무작위화된다

(randomized). 이미지는 Sony DXC-9100P 카메라가 장착된 Leica DMR 현미경으로 얻어지고 Leica Q-Win 소프트웨어를 사용하여 컴퓨터로 분석된다. 현미경을 위한 광도 및 집광기(condenser)의 세팅은 이미지 수집 과정 내 일정하게 유지된다. 모든 수집된 이미지는 조사자 편견을 최소화하기 위하여 같은 컴퓨터 서버루틴을 거친다. 밀도 절편(density slice) 임계치는 분석 내내 단일하게 적용된다. 해마이행부(subiculum) 영역은 티오플라빈 S 염색에서 아밀로이드 부하의 자동 정량을 위하여 선택된다.

[0429] **실시예 1.14: 단일 유전자삽입 hAPP 마우스의 기억력(memory capacity)에 대한 ACI-24-Ab-3을 갖는 간접 백신 접종의 영향**

[0430] 인지 기능성(cognitive functionality)을 변형시키거나 증가시키는 ACI-24-Ab-3 항체의 인비보내 능력을 분석하기 위하여, 성별 및 연령이 매치된, 9개월 된 단일 hAPP 쥐(mice)가 간접 면역화 연구를 위하여 사용된다. 비공간 인지(non-spatial cognition)는 새로운 ORT(Object Recognition Task)에 의해 평가된 면역화 기간의 마지막에 평가되었다.

[0431] 그룹당 12 마리의 동물들은 200  $\mu$ l PBS 중 400  $\mu$ g 모노클로날 항체를 두 번에 걸쳐 복강 내 주입을 받은 반면, PBS만의 주입은 대조군으로 역할한다. 두 번째 주입한 다음 날 인지 능력이 새로운 ORT(Object Recognition Task)<sup>12,13</sup>에서 연구되었다. ORT 등록 마우스는 행동 영역으로 10분간 놓이고 새로운 미지의 물체에 접하게 된다. 탐색시간(exploration time)은 기록된다. 세 시간 후에 같은 동물이 제2 세션을 위해 같은 영역에 재위치 되지만, 오래된 이전에 탐색된 것과 접하고, 추가로 새로운 물체와 접하게 된다. 다시, 양 물체에 대한 탐색 시간이 기록되고 생성되는 인지 인덱스는 총 탐색 시간에 대한 새로운 물체에 대한 탐색 시간의 비율로서 계산되고, 대조군에 대한 비율 변화로서 표현된다.

[0432] **실시예 1.15 - 저분자량(LMW) 모노머 보다 A $\beta$  1-42 펩티드의 고분자량(HMW) 프로토-피브릴(PF) 올리고머 농축 제제에 대한 마우스 모노클로날 항체의 우선적인 결합**

[0433] 마우스 항-아밀로이드 베타 모노클로날 항체의 저분자량(LMW) 모노머 A $\beta$  1-42 펩티드 및 고분자량 프로토-피브릴(PF)의 A $\beta$  1-42 펩티드의 올리고머 농축 제제에 대한 결합은 ELISA를 사용하여 수행될 수도 있다.

[0434] 2 SEC 칼럼, Superdex 75 HR 10/30(범위 3-70 kDa) 및 Superose 6 HR 10/30 (범위 5-5,000 kDa)을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)(SEC)가 A $\beta$  1-42 펩티드의 고분자량 프로토-피브릴(PF)의 올리고머 농축 및 저분자량(LMW) 모노머 제제로 이루어진 A $\beta$  1-42 펩티드 분획을 제조하기 위하여 사용되었다. 생성되는 용출액(eluate)은 그리고 나서 용출되는 A $\beta$  1-42 분획의 구조적 형태(morphology)를 입증하기 위하여, 우라닐 아세테이트로 염색되고, 100kV에서 고분해능 투과 전자현미경(high-resolution transmission electron microscopy)(TEM)에 의해 시험되었다.

[0435] ELISA는 그리고 나서 밤새 고-결합(high-binding) 분석 플레이트 위에 2  $\mu$ M의 A $\beta$  1-42 분획을 코팅함에 의해 수행된다. 코팅된 플레이트는 그리고 나서 1.0% BSA로 차단되었고, ACI-24-Ab-3 (mouse EJ1A9) 항체가 20  $\mu$ g/ml에서 시작하는 계열 희석에 첨가된다. 표준 항체(6E10, Chemicon)의 계열 희석이 또한 사용되었다. 알칼리성 포스파타아제에 컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 항체 및 4-니트로페닐 포스페이트는 결합 검출을 위해 사용되었다. 플레이트는 405 nm에서 판독되었다. 모든 조건은 0.2 이하의 변이계수(coefficient of variation)(CV)로 중복(in duplicate) 분석되었다.

[0436] 마우스 항-A $\beta$  항체 ACI-24-Ab-3 (마우스 EJ1A9) 및 대조군 항체 6E10는 ELISA로 측정되었다. 표 1.4 및 도 5는 인간 A $\beta$  1-42 펩티드의 프로토-피브릴(PF) 올리고머 축적된 제제 및 LMW 모노머 제제에 결합시의 ACI-24-Ab-3(mouse EJ1A9) 항체의 흡광도(O.D.) 값을 보여준다. 표 1.5 및 도 6은 인간 A $\beta$  1-42 펩티드의 프로토-피브릴(PF) 올리고머 축적된 제제 및 LMW 모노머 제제에의 결합시의 6E10 항-A $\beta$  1-42 대조군 항체의 흡광도(O.D.) 값을 보여준다.

[0437] 이러한 결과는 ACI-24-Ab-3 모노클로날 항체가 LMW 모노머성 펩티드보다 고차의 PF/올리고(oligo) 형태를 갖는 A $\beta$  1-42 펩티드에 더 강한 결합을 보여준다는 것을 나타낸다. 게다가, 이러한 결과는 ACI-24-Ab-3가 바람직하게는 A $\beta$  1-42의 프로토-피브릴(PF) 올리고머가 축적된 분획에 디스플레이되는(displayed) 에피토프에 결합한다는 것을 암시한다.

[0438] **실시예 1.16: 항체 ACI-24-Ab-3의 아밀로이드 베타 1-42 펩티드의 모노머 및 올리고머에의 결합**

[0439] 항-아밀로이드 베타 항체 ACI-24-Ab-3 (클론: EJ1A9)의 A $\beta$  1-42 펩티드의 모노머 및 올리고머에의 결합이 평가되었다. 연구에 사용되기 전에, 항체는 -80  $^{\circ}$ C에 저장되었다. A $\beta$  1-42 펩티드(WM, Keck Facility, Yale

University)는 사용일까지 동결 건조된 분말로서 저장되었다. 모든 다른 재료는 달리 표시되지 않는 한, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)로부터 왔다.

[0440] Aβ 1-42 펩티드의 향상된 올리고머-축적으로 모노머 및 고분자 분획을 제조하기 위하여, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용하는 향상된 방법(methodology)이 사용되었다. 두 개의 SEC 컬럼, Supelco TSK G4000PW-XL (범위: 10-1500 kDa; Sigma) 및 Superose 6 HR 10/30 (범위 5-5,000 kDa; GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Sweden)가 LMW 모노머 및 더 높은 중량의 올리고머가 농축된 Aβ 1-42 펩티드 분획을 제조하기 위하여 사용되었다. Aβ 1-42 분획의 구조적 형태를 입증하기 위하여, 생성되는 SEC 용출액은 그리고 나서 우라닐 아세테이트로 염색되었고, 100kV에서 고분해능 투과 전자 현미경(TEM)으로 검사되었다(표시되지 않음). 항체의 Aβ 1-42 분획에의 결합을 조사하기 위하여, ELISA가 수행되었다. Aβ 1-42 분획은 2 시간 동안 PBS에서 2.2 μM에서 고-결합 분석 플레이트 위에 코팅되었다. 코팅된 플레이트는 그리고 나서 PBS에서 0.05% Tween-20로 다섯 번 세척되었고, 1.0% BSA로 차단되었다. 대조군 항체(6E10)를 포함하는, 항-Aβ 항체는 표시된 농도에서 시작하는 연속 희석으로 첨가되었다. 알칼리성 포스파타아제에 컨쥬게이트 항-마우스(mouse) IgG 항체(Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England), 및 4-니트로페닐 포스페이트는 결합 검출을 위하여 사용되었다. 판(plate)은 실온에서 14 시간 항온보관한 뒤에 405 nm에서 판독되었다. 분석은 세 번 반복되었다. 도 7은 세 번의 별개 ELISA 분석에서 얻어진 평균(±SEM) 흡광도(O.D.) 값을 보여준다. 항체 ACI-24-Ab-3는 올리고머에 축적되지 않은 분획과 비교하여 올리고머에 축적된 Aβ 1-42 제제에의 우수한 결합 및 주로 Aβ 1-42 모노머로 구성된다는 것을 나타내었다(도 7A). 비교하여, 대조군 항체 6E10은 Aβ 1-42 분획 양쪽에 균등하게 잘 결합하였다. 표 1.6 및 1.7은 항체 ACI-24-Ab-3 및 6E10에 대하여 각각, ELISA 분석 1, 2, 및 3에서 얻어진 O.D. 값을 보여준다.

[0441] 이러한 결과는 항체 ACI-24-Ab-3 (클론: EJ1A9)가 Aβ 1-42 의 모노머성 제제에 결합하는 것보다 Aβ 1-42의 올리고머-축적 제제에 우수한 결합 친화도를 보인다는 것을 나타낸다.

[0442] **실시에 2: 페길레이트된 초분자 항원 구조물과 면역화를 통해 생성된 항체**

[0443] **실시에 2.1: 초분자 항원 구조물을 만들기 위한 방법**

[0444] 2.1.1 페길레이트(pegylated)된 베타-아밀로이드 펩티드 항원의 합성

[0445] 면역 반응을 강화하기 위하여, 앵커/스페이서(anchor/spacer)가 리포좀의 펩티드를 재구성하기 위하여 적용되었다(예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)). PEG는 공유적으로 펩티드의 양 말단에 결합된 라이신 잔기에 붙었다. 사슬(PEG n=70)의 다른 끝에서, 포스파티딜 에탄올 아민(PEA)은 리포좀 이중층에서 고정 요소로서 기능하기 위하여 공유적으로 결합되었다. 따라서, 리포좀은 여전히 항원 보강제(adjuvant)로서 기능하고 이중층으로부터 충분히 멀리 떨어진 펩티드는 혼자 처리될 수 있고 따라서 팔미토일화된 항원과 비교하여 면역원성을 증가시킬 수 있다.

[0446] 여기에서 기재된 초분자 구조물은 표준 Fmoc/tBu 아미노산 결사슬 보호를 사용하여 독특하게 합성되었다. 전형적으로, 펩티드의 페길레이션(pegylation)은 위치이성질체(regioisomer)의 혼합물을 유발한다. 여기에서 PEG-지질 컨쥬게이트의 양(both) Aβ C- 및 N- 말단에서의 위치-특이적 부착을 위한 편리한 방법이 설명된다.

[0447] 이러한 내부(internal) Lys 또는 His 잔기(22-35)를 함유하는 펩티드 서열에 대하여, 직각적으로(orthogonally) 보호되는 Lys(ivDde)는 각 말단에 첨가되었다. 추가적인 Gly는 합성을 촉진하기 위해 C-말단에 첨가되었다. Fmoc기는 DNF에서 20% 피페리딘으로 제거되고 무수아세트산(acetic anhydride)을 사용하여 N-아세틸화되었다. ivDde 기의 선택적 절단은 한 시간 동안 DMF에서 3% 히드라진 히드레이트(hydrazine hydrate)로 달성되었다.

[0448] 앞의 것(former)이 히드라진분해(hydrazinolysis)에 훨씬 더 내성이 있는 것으로 증명되었기 때문에, 2-클로로트리틸(2-chlorotriptyl) 수지는 더 널리 사용되는 Wang 수지 보다 선호되었다. 게다가, 2-클로로트리틸 수지는 극도로 산에 민감하고, 따라서, Wang 수지와 달리, 보호된 펩티드의 단리를 가능하게 한다. 정말, 수지-결합 펩티드의 프리-활성(pre-activated) 페길레이트된 지질 시약 DSPE-PEG-SPA에의 커플링이 어떤 커플링 생산물도 낳지 못하기 때문에, 용액 상에서 커플링 반응을 수행하는 것이 필요했다. 따라서 온화한 조건 하(아세트산/트리플루오르에탄올/디클로로메탄, 1:1:8, 1h, 실온)에서 수지로부터의 선택적 절단은 내부적으로 보호된 펩티드를 생산하였다.

[0449] 용액-상 커플링은 DMSO 및 초과 베이스(base)에서 DSPE-PEG-SPA에, Aβ<sub>22-35</sub> 및 Aβ<sub>29-40</sub> 각각 서열로부터 유도된

펩티드와 성공적으로 달성되었다. 반응은 그리고 나서 2 시간 동안 여분의 에탄올아민 및 동결건조된 용액의 첨가에 의해 소광(quenched)되었고 용액은 동결건조되었다.

[0450] 서열 29-40에 대해, 특별한 보호 전략은 요구되지 않았다.

[0451] HPLC(semi-preparative 역상(reverse-phase) C<sub>4</sub> 칼럼(column))에 의한 정제(purification)는 50-70% 순도의 N- 및 C- 말단 PEG-지질 컨쥬게이트가 되고, 그 정체(identities)는 MALDI(matrix assisted laser desorption ionization)에 의해 확인되었다. 각 서열은 커플링 반응의 용이한 상당한 변이(variation)를 보여주었고, 조건은 따라서 맞춰졌다(온도, molar equivalents DSPE-PEG-SPA 수, 시간). 원하는 생산물로부터 초과 DSPE-PEG-SPA의 분리에 대하여, HPLC 정제가 적용되었다. 최종 결사슬 탈보호(deprotection) 전에 모노- 및 디- 커플된 생산물의 분리는 양이온-교환 크로마토그래피를 사용하여 달성될 수 있다. 뒤이어 펩티드 결사슬 탈보호 및 초과 DSPE-PEG-SPA의 분리(separation)는 수용될 수 있는 순도로 원하는 컨쥬게이트의 단리(isolation)를 유도한다.

[0452] 보호된 펩티드를 사용한 N- 및 C- 말단 지질-PEG 베타-아밀로이드 항원의 합성에 대한 이러한 접근은 다양한 펩티드 서열에 적용가능하다.

[0453] **실시예 2.2: 초분자 항원 구조물에 의해 얻어진 항체**

[0454] 페길레이트된 Aβ<sub>22-35</sub> 및 Aβ<sub>29-40</sub> 초분자 항원 구조물에 대하여 길러진(raised) mAb의 제조

[0455] 리포솜 항원은 기재된 것처럼 제조되었다(Nicolau 등, 2002, PNAS, 99, 2332- 37). 서열 PEG-Aβ<sub>22-35</sub> 및 Aβ<sub>29-40</sub>은 모노포스포틸 지질 A(40 mg/mM 포스포리피드)를 함유하는 디미리스토일 포스파티딜 콜린(DMPC), 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPEA), 디미리스토일 포스파티딜 글리세롤(DMPG) 및 콜레스테롤(0.9:0.1:0.1:0.7 몰비)로 만들어진 리포솜으로 구성된 구조물에서 재구성되었다. 이러한 항원은 2주간격으로 C57BL/6 마우스에서 면역화를 위해 사용되었다. 10-12 마리의 동물은 각 항원으로 면역화되었다. 3 내지 6 부스팅(boosting) 후에, 치료 역가(titer)를 가진 마우스(1:5,000으로 희석된 혈청이 ELISA에서 양성인 경우)는 융합(fusion)을 위해 선택되었다. 비장(spleen) 세포는 면역화된 동물로부터 수확하였고, 골수종 세포주를 민감화된 비장 세포와 융합시켜 하이브리도마를 만들었다. 비장으로부터 마우스의 B-림프구의 융합은 Kohler 와 Milstein(Nature 256: 495-497 (1975)) 및 Harlow와 Lane(Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))의 잘 알려진 과정을 사용하여 골수종 세포주 SP2-0 세포(ATCC, Manassas, VA)로 수행되었다.

[0456] 세포는 폴리에틸렌 글리콜을 첨가함으로써 융합하도록 유도되었다. 생성되는 하이브리드 세포는 그리고 나서 통상적인 방식, 예를 들어 제한 희석을 사용하는 것으로 클론되었다. IgG 생산하는 하이브리도마 클론은 Aβ<sub>1-42</sub> 펩티드에 그것들이 특이적 결합하는 지를 ELISA를 통해 실험하여 선택하였고 생성되는 클론, 즉 원하는 모노클로날 항체를 생산하는 클론이 항온보관되었다.

[0457] 그렇게 얻어진 하이브리도마는 하이포산틴, 아미노프테린, 및 티미딘(HAT)을 함유하는 선택 배지에서 세포를 플레이트(plating)하여 화학적으로 선택하였다.

[0458] 뒤이어, 하이브리도마는 특정 아밀로이드-관련 질환 또는 장애에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 능력에 대해 스크리닝되었다. 관심있는 항체를 생산하는 하이브리도마는 장래 생산을 위하여 클로닝되고, 증량되며, 냉동 저장되었다. 바람직한 하이브리도마는 IgG 이소타입을 가지는 모노클로날 항체를 생산한다.

[0459] **실시예 2.3: 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11을 위한 특이성 결정**

[0460] 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 특이성을 분석하기 위하여, 이미 형성된 상이한 농도의 아밀로이드 1-42, 1-40 및 17-40로, 1-28 피브릴이 하이본드 ECL 니트로셀룰로오스 막(Hybond ECL Nitrocellulose Membrane)(Amersham Biosciences) 위에 블로팅된다. 10% 건조 밀크 및 0.7 % Tween 20로 차단 후에, 막(membrane)은 실온에서 2시간 동안 20μg/ml에서 일차 항체와 함께 항온보관된다. 세척 후에, 막은 양고추냉이 과산화효소가 컨쥬게이트된 양 항-마우스 IgG 항체(Amersham Biosciences)로 실온에서 1h 동안 항온보관되고, 세척되고, 화학발광제(chemiluminescent) 용액으로 항온보관되고 나서 막은 엑스레이 필름에 노출되었다.

[0461] mAb ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 아밀로이드 β 1-42, 1-40, 및 17-40에의 결합을 측정하기 위하여 1-28 피브릴은 37°C에서 7일 동안 미리 형성되고 막에서 블로팅되었다. 20 μg/ml 항체가 결합 능력을 측정하기 위하여 사용되고 결합 항체는 노출 20분 동안 양고추냉이 과산화효소가 컨쥬게이트된 양 항-마우스 IgG 항체에 의해

여 검출된다.

[0462] 실시예 2.4: 티오플라빈 T (Th-T) 형광 측정(fluorescent assay)

[0463] 상기 mAb의 응집(aggregation)의 억제 및 해체(disaggregation) 특성 모두를 측정하기 위하여, 피브릴 Aβ<sub>1-15</sub> 분자에 특이적으로 결합하는 티오플라빈 T (Th-T) 형광 측정이 사용되었고 뒤이어 형광 방출 강도(fluorescent emission intensity)가 용액에 존재하는 Aβ<sub>1-42</sub> 필라멘트(filament)의 양과 상관관계가 있다.

[0464] Aβ<sub>1-42</sub> 동결 건조된 분말은 헥사플루오로이소프로판올(HFIP)에서 1 mM로 재구성되었다. 펩티드 용액은 실온에서 15분 동안 초음파 처리되었고, 밤새 휘저어지고, 비실리콘 미량원심분리기(microcentrifuge) 튜브로 등분(aliquot)된다. HFIP는 그리고 나서 아르곤(argon) 기류속에서 증발된다. 생성되는 펩티드 필름은 10 분 동안 진공 건조되고 사용될 때까지 -80℃에서 저장된다.

[0465] 2.4.1 Aβ<sub>1-42</sub> 응집 분석

[0466] Aβ<sub>1-42</sub> 응집에 대한 항체-매개 억제를 분석을 하기 위하여 항체는 PBS에서 미리 희석되었고 다음의 성분을 함유하는 분석 용액이 비-실리콘화된 항온보관 튜브에서 만들어 졌다: 3.3 또는 0.33 μM 미리 희석된 항체, 10 μM 티오플라빈 T, 33 μM Aβ<sub>1-42</sub>, 및 8.2% DMSO. 따라서, 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>의 최종 몰비는 1:10 및 1:100이었다. 적합한 대조군 용액(control solutions)도 제조되었다. 그 용액은 그리고 나서 37℃에서 24 시간동안 항온보관되었고 형광분광(spectrofluorescence) (상대 형광 유닛(relative fluorescence units); RFU)이 Perkin-Elmer FluoroCount 형광분광광도계(spectrofluorometer) 상에서 흑색 348-well 플레이트(plates)에서 6 번 반복으로 판독(read)되었다. 응집의 억제 또는 해체는 각각, 다음의 공식에 따라 평균 % 억제 또는 해체로 표현된다.

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

[0467]

[0468] 항체 ACI-11-Ab-9는 대조군과 비교할 때 Aβ<sub>1-42</sub> 응집의 의미있는 억제를 보여줬다. Aβ<sub>1-42</sub> 1:100의 몰비에 대해 항체에서, 억제는 평균 34%(3회 독립실험), 반면 1:10 몰비에서 억제는 69%(2회 독립실험)이었다.

[0469] 항체 ACI-12-Ab-11는 대조와 비교할 때, 또한 Aβ<sub>1-42</sub> 응집의 의미있는 억제를 보여줬다. Aβ<sub>1-42</sub> 1:100의 몰비에 대해 항체에서, 억제는 평균 30%(2회 독립실험), 반면 1:10 몰비에서 억제는 66%(2회 독립실험)이었다.

[0470] 2.4.2 Aβ<sub>1-42</sub> 해체 분석(disaggregation assay)

[0471] mAb의 해체 특성을 측정하기 위하여, 피브릴(fibrillar) Aβ<sub>1-42</sub> 분자에 특이적으로 결합하는 티오플라빈 T(ThT) 형광 분석이 사용되었고 뒤이어 형광 방출 강도는 용액에 존재하는 Aβ<sub>1-42</sub> 필라멘트의 양과 상관관계가 있다.

[0472] 미리 응집된 Aβ<sub>1-42</sub>의 항체-매개 해체에 대하여 분석하기 위하여 상기 기재된 것처럼 제조된 저분자량의 Aβ<sub>1-42</sub>이 27% DMSO 및 1x PBS 중 110 μM 용액으로 제조(make up)되었다. 이러한 용액은 그리고 나서 24시간 동안 37℃에서 응집되었고, 그 후에 다음이 첨가되었다: 3.3 또는 0.33 μM 미리 희석된 항체, 및 10 μM 티오플라빈 T. 이것은 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>의 몰비가 1 : 10 및 1 : 100가 되었고 8.2% DMSO를 함유한다. 이러한 용액은 그리고 나서 37℃에서 추가 24 시간동안 항온보관되었다. 형광분광은 그리고 나서 측정되었고 % 해체는 상기에 기재된 것처럼 계산되었다.

[0473] 항체 ACI-11-Ab-9는 해체 분석에서 미리 응집된 Aβ<sub>1-42</sub>의 의미있는 해체를 보여준다. 항체 대 Aβ<sub>1-42</sub>의 몰비 1:100에서 해체는 평균 22%(3회 독립 실험)였고, 반면 1:10 몰비에서 해체는 52%(3회 독립 실험)였다.

[0474] 항체 ACI- 12-Ab- 11은 또한 해체 분석에서 미리 응집된 Aβ<sub>1-42</sub>의 의미있는 해체를 보여준다. 1:100의 Aβ<sub>1-42</sub> 몰비 항체에서 해체는 평균 18%(2회 독립 실험)였고, 반면 1:10 몰비에서 해체는 54%(2회 독립 실험)이었다.

[0475] 상기 결과로부터 양(both) 항체가 Aβ<sub>1-42</sub>의 응집의 억제 및 미리 형성된 Aβ<sub>1-42</sub> 섬유를 해체를 억제할 수 있다는 점에서, 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11가 Aβ<sub>1-42</sub> 필라멘트와 상호작용에서 이중 기능을 나타낸다는 것

이 명백하다.

[0476] **실시예 2.5: ACI-11-Ab-9 및 ACI-12- Ab- 11 상호작용**

[0477] 아밀로이드 펩티드  $A\beta_{1-42}$ 와 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11간 상호작용은 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 사용하여 연구된다. 마우스 항체의  $A\beta_{1-42}$ 의 섬유 또는 모노머에의 결합이 결정된다.

[0478] 모든 SPR 실험은 Biacore X 기기(Biacore AB)로 수행된다. 러닝(running) 버퍼와 샘플 버퍼 HBS-EP 뿐만 아니라 고정화(immobilization)에 필요한 시약(EDC, NHS 및 에탄올아민), CM5 센서칩과 SA 센서칩은 Biacore AB에서 구입한다. 아세트산 나트륨(10 mM, pH 5.0)은 커플링 수율을 증가시키기 위하여 커플링 버퍼로 사용된다. 피브릴(Fibrillar)  $A\beta_{1-42}$  (Bachem)는  $A\beta_{1-42}$ 에 PBS 버퍼를 3 mg/ml의 최종 농도로 첨가하여 그 바이얼을 7일 동안 37°C에 둬으로써 제조된다. 피브릴  $A\beta_{1-42}$ 는 표면-결합된 카르복시메틸 텍스트란 매트릭스를 함유하는 CM5 센서칩에 커플링된다. 바이오틴화된 모노머성  $A\beta_{1-42}$ (Bachem)은 공유적으로 결합된 스트렙타비딘을 갖는 카르복시메틸 텍스트란으로 이루어진 센서 칩 SA와 커플링된다. 전형적으로 mAb의 4 또는 5 농도는 러닝 버퍼를 이용하여 계열(serial) 희석에 의하여 측정된다. 주입은 최저 농도로부터 시작하면서 수행되고 3분 동안 30  $\mu$ L/min의 유속에서 fc 1 및 2 모두 통과된다. 플로우 셀(flow cell) 2는 언데리바타이즈되고(underivatized) 반응은 기기 소음 및 벌크(bulk) 굴절변화를 교정하기 위하여 fc 1로부터 감해진다(subtracted). 주입이 끝난 후에, 표면은 즉시 5분간 러닝 버퍼로 세척된다. 남은 결합된 항체를  $A\beta_{1-42}$  피브릴로부터 제거하기 위하여 표면 재생은 10mM NaOH의 펄스(pulses) 주입에 의하여 수행된다. 동역학적 분석(kinetic analysis)은 수치 적분(numerical integration)을 위한 알고리즘을 사용하여 수행되고 글로벌 분석은 BIAevaluation 3.0을 사용하여 수행된다. 상이한 농도에서 분석물의 주입에 대해 얻어지는 곡선(curves)은 겹쳐지고(overlaid) 기저선이 영(zero)에 맞추어진다. 곡선 피팅(curve fitting)을 위하여, 모든 데이터는 동시에 1:1 균질 복합체(homogeneous complex)에 피팅된다.

[0479] 마우스 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 항체의 아밀로이드에의 결합이 측정된다.

[0480] **실시예 2.6: ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 모노클로날 항체의 아밀로이드에의 결합**

[0481] 미리 형성된 섬유 위에 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 분자 결합 면(binding side)을 분석하기 위하여, 음성 조영된(negatively contrasted) 투과 전자현미경(transmission electronic microscopy)(TEM)이 수행된다.

[0482] 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11은 Slot JW(Geuze HJ (1985))에 따라 8 nm 교질연화금(colloidal gold)과 커플링된다. 아밀로이드 1-42( $A\beta_{1-42}$ )의 동시-향온보관(co-incubation)을 위하여 6.65  $\mu$ M 섬유(fibers)가 1:100 물비로 금-표지성 항체와 실온에서 24 시간 동안 향온보관된다. 뒤이어 샘플 5  $\mu$ l가 45 초동안 팔로디움(parlodium)/C 필름으로 덮인 새로 글로우-방전시킨(glow-discharged) Cu 그리드(grid)(mesh 200) 위에 향온보관되고, 물로 세 번 세척하고 2%의 프레쉬하게 희석되고 여과된 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 한 번 세척된다. 샘플은 15-20 초 동안 2% 우라닐 아세테이트에서 염색(stain)된다. 그리드 위의 여분의 염색액은 빨아들여지고 그 결과로 기건(air-dried)된다. 각 샘플의 세 개의 그리드가 제조된다. 그리드는 투과 전자 현미경 Hitachi 7000에서 분석된다.

[0483] **실시예 2.7: 밀도 구배(Density-Gradient) 초원심분리기(Ultracentrifugation)에 의한 분획**

[0484]  $A\beta_{1-42}$  섬유 폴리머화(polymerization)를 억제하는 것 및  $A\beta_{1-42}$  섬유의 해체에서의 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 특성은 밀도구배 초원심분리기(Rzepecki 등, 2004)로 연구되는데, 이는 항체와 함께 또는 항체 없이 향온보관 후에 상이한 크기로 생성되는 펩티드 간에 분배를 하고 이어서 미리 형성된 구배(OptiPrep™) 위에 SDS-PAGE 침강 분석(sedimentation analysis)이 뒤따르는 원리에 기초한다. 미리 형성된  $A\beta$  섬유의 집단, 공동-향온보관 항체의 응집 특성의 억제 및 해체, 항체의 섬유에의 결합의 동시 분석은 이러한 방법의 명백한 장점이다.

[0485]  $A\beta_{1-42}$  응집의 억제를 위하여,  $A\beta_{1-42}$  모노머는 50  $\mu$ M의  $A\beta$  최종 농도를 갖는 두 개의 상이한 물비(mAb보다 30 또는 100배 더 높은 모노머  $A\beta_{1-42}$ 의 물비)에서 mAb ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11과 함께 향온보관된다. 37°C에서 24 시간 향온보관 후에, 샘플은 Optiprep™의 비연속적인 구배 위에 겹쳐 놓이고 튜브는 4°C에서 3 시간 동안 259 000 g 에서 스핀(spin)된다. 15개 분획(fraction)이 수확되었고(각 140  $\mu$ L), 분획 1은 구배의 정상으로부터 최소 밀도이고 분획 15는 구배의 바닥으로부터 가장 밀도가 높은 분획이다. 펠렛(pellet)도 취득된다.

수집된 분획들은 은염색(silver staining)과 함께 SDS-PAGE에 의해 분석된다. 억제 분석(inhibition assay)을 위한  $A\beta_{1-42}$  농도는 아밀로이드 응집 키네틱(kinetic)을 감소시키고 선형 위상(linear phase) 안에서 측정을 확실하게 하는 해체 분석(disaggregation assay)을 위한 것보다 다섯 배 적다.

[0486] mAb ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11과 공동-항온보관(두 개의 상이한 물비 1:30 및 1:100, mAb + 246  $\mu\text{M}$ 의  $A\beta$  최종 농도를 갖는 모노머  $A\beta_{1-42}$ )에 의한 미리 형성된  $A\beta_{1-42}$  피브릴의 해체에 대하여, 샘플은 37°C에서 24 시간 동안 항온보관된다. 24 시간 후에 샘플은 초원심분리기에 의하여 분획되고 상기 및 전에 기재(Rzepecki 등, 2004)된 것처럼 SDS-PAGE에 의해 분리된다.

[0487] **실시예 2.8: mAb ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11과 공동-항온보관에 의한 필라멘트 응집의 억제 및 미리 형성된  $A\beta_{1-42}$  필라멘트의 해체를 평가하기 위한 형광 분석(Fluorescent Assay)**

[0488] BIS-ANS 형광 분석

[0489] mAb의 억제 특성을 평가하기 위하여, 특이적으로  $A\beta_{1-42}$  필라멘트의 모노머 또는 비-피브릴(non-fibrillous) 집단을 검출하는 BIS-ANS (LeVine, 2002) 형광 분석이 사용된다. 형광 측정 전에,  $A\beta_{1-42}$  모노머가 대조군으로서의 버퍼 또는 mAb ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11(물비 1:100, mAb 대  $A\beta_{1-42}$  펩티드)와 37°C에서 14 시간 동안 미리 항온보관된다. 상대적인 형광 유닛은 자동적으로 기록되고 결과는 대조군에 대한 변화로서 퍼센트로 표현된다.

[0490] **실시예 2.9:  $^{13}\text{C}$ -표지된 베타-아밀로이드 1-42 펩티드를 갖는 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 모노클로날 항체의 상호 작용의 NMR 및 형광 특성화(fluorescence characterization)**

[0491] mAb가 미리 형성된 섬유를 용해하거나 섬유 형성을 억제하는 가능기작(potential mechanism)을 평가하기 위하여, U- $^{13}\text{C}$  Tyr10 및 Val12-표지 베타-아밀로이드 1-42 펩티드의 Th-T 형광 분석 및 고체상 NMR 간의 헤드투헤드-실험(head-to-head-experiment)이 수행된다. 따라서, 이러한 조사의 목표는 베타-아밀로이드 펩티드에서 및 모노클로날 항체의 존재에서 고체상 NMR 분광법에 의하여 베타-시트(sheet) 전이(transition)를 추적하고(follow), 이것을 Th-T 형광 분석으로 측정된 해체 능력과 직접 비교하는 것이다.

[0492] 고체상 NMR 분광법은 2차 구조에서 변이를 검출하는 것뿐 아니라, 구조적 전이를 좌우하는  $A\beta_{1-42}$  펩티드의 도메인(domain) 위치를 알 수 있게 해준다. 고체상 NMR은  $A\beta_{1-42}$  섬유의 구조 결정에 기여해 왔기 때문에 이 문제에 대한 그 적용성을 입증하여 왔다(Petkova 등, 2004, Petkova 등, 2002). 특히  $^{13}\text{C}_\alpha$  및  $^{13}\text{C}_\beta$ 의 화학적 시프트(chemical shift)와 2차 구조의 상관관계(Cornilescu 등, 1999, Luca 등, 2001, Iwdate et al, 1999)는 펩티드 안에서 2차 구조의 변화를 시험할 수 있는 소중한 도구이다.

[0493] 12번 위치(12Val)에  $^{13}\text{C}$ 로 미리 표지된 발린(valine) 및 10번 위치(10Tyr)에  $^{13}\text{C}$ 로 미리 표지된 타이로신(tyrosine)을 포함하는 표지된 펩티드의 합성이 Fmoc 합성 프로토콜(protocol)에 의해 수행된다. 펩티드의 정체(Identity) 및 순도는 MALDI 질량 분광법에 의해 확인된다. 표지된 베타-아밀로이드 펩티드(1-42)는 37°C에서 1 주 동안 PBS 버퍼에서 펩티드 용액을 항온보관하여 섬유를 발생시키기 위하여 사용된다. PBS 버퍼에서 아밀로이드 베타-펩티드의 부족한 가용성이라는 주요 문제점은 다음의 방식으로 해결될 수 있었다: PBS 버퍼 값이 미량의 암모니아에 의해 증가되어 아밀로이드 베타-펩티드를 용해시킨다. PBS 버퍼의 원래 pH 값은 암모니아의 휘발성 특성을 사용하여 더 큰 PBS 배스(bath)의 존재에서 샘플을 항온보관함으로써 다시 얻어진다.

[0494] 베타-시트를 파괴하는 항체의 영향을 측정하기 위하여, 섬유 용액은 NMR 및 Th-T 분석 모두를 위해 37°C에서 24 시간 동안 항체로 항온보관된다. 실시간 비교를 위해 동일한 용액의 분취량(aliquot)이 Th-T 형광 측정을 위해 사용되고, 남은 용액은 NMR 측정을 위해 동결건조된다.

[0495] ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 해체 능력은 Th-T 형광 분석을 사용하여 미리 형성된  $^{13}\text{C}$ -표지 아밀로이드 베타-섬유와 공동-항온보관으로 분석된다.

[0496] PBS(대조군) 및 mAb 항온보관 간의 차이를 조사하기 위하여 각 스펙트럼은 PeakFit (www.systat.com/products/PeakFit)을 사용하여 역합성곱을 구한다(deconvoluted). 라인은 혼합된 Lorentzian/Gaussian 피팅 절차(fitting procedure)를 이용하여 잘 매치된다.

- [0497] **실시예 2.10: 아밀로이드 섬유에의 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 기능성**
- [0498] 12.1 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 항체의 결합 후에 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 섬유의 입체형태의 변형 및 해체의 시작
- [0499] 항체가 미리 형성된 베타-아밀로이드(A $\beta$ <sub>1-42</sub>)섬유를 풀리게 할 수 있는 지에 대한 메커니즘을 평가하기 위하여, 해체를 측정하는 티오프라빈-T(Th-T) 형광 분석 및 2차 입체 형태를 분석하는 U-<sup>13</sup>C 타이로신 10 및 발린 12-표지 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 펩티드의 고체상 핵자기공명(NMR)의 헤드투헤드 비교가 수행된다.
- [0500] **실시예 2.11: 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 의 에피토프 매핑(epitope mapping)**
- [0501] 모노클로날 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 에피토프 매핑은 A $\beta$ <sub>1-42</sub>의 완전 아미노산(aa) 서열(Mimotopes, Clayton Victoria, Australia에서 생산되고 ANAWA Trading SA, Wangen Switzerland로 부터 구입됨)을 커버하는 총 33 바이오틴화된 펩티드를 포함하는 펩티드 라이브러리를 사용하는 ELISA로 수행되었다. 펩티드 라이브러리의 펩티드는 8, 9, 또는 10-mer 아미노산 펩티드로 구성되었다. 바이오틴화된 완전 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 펩티드(인간 서열)는 양성 대조군(Bachem, Bubendorf, Switzerland)으로서 사용되었다. 게다가, A $\beta$ <sub>1-28</sub>, A $\beta$ <sub>17-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub>, 및 A $\beta$ <sub>1-42</sub>를 커버하는 더 긴 펩티드는 이러한 항체들이 결합할 수 있는 더 넓은 영역을 규정하기 위하여 사용되었다. 이러한 네 개의 펩티드들도 바이오틴화된다(Anaspec에서 제조되고 ANAWA Trading SA, Switzerland에서 구입됨). 에피토프 매핑은 제조사(Mimotopes)의 설명서에 따라 행하여졌다. 약술하면, 스트렙타비딘 코팅 플레이트(NUNC, Roskilde, Denmark)는 4°C에서 밤새 PBS에서 0.1% BSA로 차단되었다. 플레이트를 PBS-0.05% Tween 20로 세척한 후, 라이브러리로부터의 상이한 펩티드를 0.1% BSA, 0.1% 아지드 나트륨(Sodium Azide)을 함유하는 PBS에 10  $\mu$ M의 최종 농도로 희석하여 실온에서 1 시간 동안 코팅하였다. 세척 후, 플레이트는 상이한 항체를 2% BSA, 0.1% 아지드 나트륨을 함유하는 PBS에 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11에 대해 10  $\mu$ g/ml로 희석하여 실온에서 1 시간 동안 항온보관되었다. 플레이트는 다시 세척되고 실온에서 1h 동안 알칼리성 포스파타아제 컨쥬게이트된 염소 항 마우스 IgG(alkaline phosphatase conjugated goat anti mouse IgG)(Jackson Immunresearch West Grove, PA, USA)로 항온보관되었다. 최종 세척 후, 플레이트는 포스파타아제 기질(pNPP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)로 항온보관되었고 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 405 nm에서 3 시간 항온보관 후에 판독되었다.
- [0502] ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11은 A $\beta$ <sub>1-42</sub>과 의미있게 결합하는 것이 보여졌지만, 펩티드 라이브러리에서 짧은 펩티드의 어떤 것이라도 결합할 수 없었다. 따라서, 항체는 에피토프를 결합하기 위해 8 aa 이상이 필요하거나 및/또는 ACI-11-Ab-9은 전체 길이 A $\beta$ <sub>1-42</sub>로 존재하기만 하는 입체형태적 에피토프를 인식할 수도 있다는 것이 결론지어진다.
- [0503] ACI-12-Ab-11은 또한 A $\beta$ <sub>1-42</sub>와 의미있는 결합을 보여주지만, ACI-11-Ab-9와 유사하게, ACI-12-Ab-11은 펩티드 라이브러리에서 짧은 펩티드 어떤 것이라도 결합하지 않았다.
- [0504] 항체 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11가 다른 A $\beta$  펩티드를 인식하는지 측정하기 위하여, A $\beta$ <sub>1-28</sub>, A $\beta$ <sub>17-40</sub>, 및 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 및 A $\beta$ <sub>1-42</sub>에의 결합이 평가되었다.
- [0505] ACI-11-Ab-9은 A $\beta$ <sub>1-28</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub> 및 A $\beta$ <sub>1-42</sub>와 상당한 결합을 보였으나, A $\beta$ <sub>17-40</sub>과는 어떤 결합도 보이지 않았다.
- [0506] 함께 얻어진, 이러한 결과는 ACI-11-Ab-9의 에피토프는 A $\beta$ 의 1-28 영역에 있고 에피토프는 8 aa보다 길거나 및/또는 A $\beta$ 에의 결합은 A $\beta$ 의 입체형태(conformation)에 의존한다는 것을 암시한다.
- [0507] ACI-12-Ab-11은 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 및 A $\beta$ <sub>1-42</sub>과 의미있는 결합을 보였으나, A $\beta$ <sub>1-28</sub> 및 A $\beta$ <sub>17-40</sub>과는 어떤 결합도 보이지 않았다. 따라서, ACI-12-Ab-11은 전체 길이 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 및 A $\beta$ <sub>1-42</sub>에 오직 결합할 수 있고, A $\beta$ 의 더 짧은 펩티드와는 결합할 수 없었다. 이러한 결과는 A $\beta$ 의 24- 또는 28-mers가 항체의 결합에 불충분할 때 조차, ACI-12-Ab-11에 의해 인식된 에피토프가 A $\beta$ 의 입체형태에 의존한다는 것을 암시한다.
- [0508] **실시예 2.12: 단일 유전자 삽입(single transgenic) hAPP 마우스의 뇌 아밀로이드 부하에 대한 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11와 간접 백신접종(passive vaccination)의 영향**
- [0509] 가용성 아밀로이드를 결합하고 뇌 밖으로 제거하는 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 모노클로날 항체의 인비보(in vivo) 능력을 평가하기 위하여, 성별과 연령이 매치된 6개월된 단일 hAPP 마우스(mice)가 상이한 투여량으로 간접 면역(passive immunization) 연구를 위하여 사용된다. 가용성 아밀로이드 부하는 동물 뇌를 수확하고 A $\beta$ <sub>1-</sub>

40 및 Aβ1-42 특이적 ELISA(TGC, Germany)를 수행함으로써 연구 마지막에 분석된다.

- [0510] 그룹당 8-13 마리의 동물이 200 μl PBS의 100, 300, 및 1000 μg 모노클로날 항체를 한 주 간격으로 두 번 주입을 받고, PBS 단독 주입은 대조군으로서 제공된다. 두 번째 주입 하루 지나서, 동물은 가용성 아밀로이드 분획의 생화학적 분석을 위하여 희생되었다. 뇌 마쇄물(homogenates)의 가용성 분획에서 및/또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)(CSF)에서의 인간 Aβ1-40 및 인간 Aβ1-42의 양을 정량화하기 위하여, 상업적으로 이용할 수 있는 효소-연결-면역-측정법(Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)(ELISA) 키트가 사용된다(h 아밀로이드 β1-40 또는 β1-42 ELISA 고감도, TGC, Switzerland). ELISA는 제조사의 프로토콜에 따라 수행된다. 약술하면, 표준(합성 Aβ1-40 또는 Aβ1-42의 희석) 및 샘플이 단백질 결합 능력 없는 96-well 폴리프로필렌 플레이트에서 제조된다(Greiner, Germany). 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3 및 15.6 pg/ml의 최종 농도를 갖는 표준 희석 및 샘플은 60 μl 최종 부피에, ELISA 키트가 제공되고, 샘플 희석제(diluent)에서 제조된다. 아밀로이드 레벨이 마우스의 연령과 함께 증가하고 실제 평가는 샘플의 판독이 표준 커브의 선형 부분 안에 있다는 것을 요구하기 때문에, Aβ 40 분석을 위한 샘플은 2:3 희석되고, Aβ 42 분석을 위한 샘플은 희석되지 않는다.
- [0511] 샘플, 스탠다드, 및 블랭크(50 μl)는 또한(in addition) 선택적인 항-Aβ-항체 컨쥬게이트(바이오틴화된 검출 항체)로 항-Aβ-코팅된 폴리스티롤 플레이트(포획 항체는 선택적으로 항원의 C-말단 끝을 인식한다.)에 추가되고 항체-아밀로이드-항체-복합체의 형성을 하도록 4°C에서 밤새 항온보관된다. 다음 날, 스트렙타비딘-퍼옥시다제-컨쥬게이트가 첨가되고, TMB/퍼옥시드(peroxide) 혼합물의 첨가로 30분 지나서, 기질의 발색산물(colored product)로의 변환을 유발하고, 색강도(color intensity)가 450 nm 필터로 ELISA-판독기와 광측정기(photometry)에 의해 측정된다. 샘플의 Aβ 함유량(content)의 정량(quantification)은 합성(synthetic) Aβ 1-40 또는 Aβ 1-42으로 만들어진 스탠다드 커브에 흡광도(absorbance)를 비교하여 얻어진다. 데이터는 평균 대조군 값에 대한 개개의 변화로서 표현된다(대조군에 퍼센트로).
- [0512] **실시예 2.13: 이중 유전자삽입 hAPPxPS1 쥐(mice)의 플라크 부하(plaque load)에 대한 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 만성 간접 투여(chronic passive administration)의 영향**
- [0513] 뇌에서 아밀로이드 플라크와 결합하고 감소시키는 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 모노클로날 항체의 인비보(in vivo)내 능력을 평가하기 위하여, 성별 및 연령이 매치된 3.5 개월 된 이중 유전자삽입 hAPPxPS1 쥐가 4 개월의 만성 간접 투여 연구를 위해 사용된다. 아밀로이드 플라크는 티오플라빈 S의 결합에 의한 동물 뇌의 조직화학(histochemistry)에 의해 연구 마지막에 분석된다.
- [0514] 15 마리의 유전자삽입 동물은 PBS에서 500 μg 모노클로날 항체를 16회의 매주 주입을 받는다. 15 마리의 동물들은 대조군으로서, PBS만 주입된다. 모든 주입은 복강내 주사되었다. 희생(sacrifice)시, 마우스는 마취되고(anesthetized) 뇌혈관으로부터 혈액을 제거하기 위하여 4°C에서 생리적 혈청(physiological serum)으로 트랜스-카디알(trans-cardially) 플러쉬(flush)된다. 뒤이어, 뇌는 두개골로부터 제거되고, 후뇌와 전뇌(forebrain)는 관상면(coronal/frontal plane)에서 절개되어 분리된다. 전뇌는 중심선 시상면 절개(midline sagittal cut)를 이용하여 좌우 반구(hemisphere)로 균등하게 분할된다. 하나의 반구는 조직학(histology)을 위해 4% 파라포름알데히드에서 밤새 후고정(post-fixed)된다. 시상 비브라톱 색전(sagittal vibratome sections)(40 μm)은 프리플로팅(free floating) 항온보관을 위해 절단되고 0.1% 아지드 나트륨을 함유하는 PBS에서 염색할 때까지 4°C에서 저장된다. 상이한 레벨에서 다섯 개 색전은 티오플라빈 S로 밀집 플라크에 대해 염색된다. 사용된 모든 동물의 색전은 염색(staining) 및 블라인드 정량을 위해 무작위화된다(randomized). 이미지는 Sony DXC-9100P 카메라가 장착된 Leica DMR 현미경으로 얻어지고 Leica Q-Win 소프트웨어를 사용하여 컴퓨터로 분석된다. 현미경을 위한 광도(light intensity) 및 집광기(condenser)의 세팅은 이미지 수집 과정 내 일정하게 유지된다. 모든 수집된 이미지는 조사자 편견을 최소화하기 위하여 같은 컴퓨터 서브루틴을 거친다. 밀도 절편(density slice) 임계치는 분석 내내 단일하게 적용된다. 해마이행부(subiculum) 영역은 티오플라빈 S 염색에서 아밀로이드 부하의 자동 정량을 위하여 선택된다.
- [0515] **실시예 2.14: 단일 유전자삽입 hAPP 마우스의 기억력(memory capacity)에 대한 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11을 갖는 간접 백신접종의 영향**
- [0516] 인지 기능성(cognitive functionality)을 변형시키거나 증가시키는 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11 항체의 인비보내 능력을 분석하기 위하여, 성별 및 연령이 매치된 9개월 된 단일 hAPP 마우스가 간접 면역화 연구를 위하여 사용된다. 비공간 인지(non-spatial cognition)는 새로운 ORT(Object Recognition Task)에 의해 평가된 면역화 기간의 마지막에 평가되었다.

- [0517] 그룹당 12 마리의 동물들은 200  $\mu$ l PBS 중 400  $\mu$ g 모노클로날 항체를 두 번에 걸쳐 복강 내 주입을 받은 반면, PBS만의 주입은 대조군으로 역할한다. 두 번째 주입한 다음 날 인지 능력이 새로운 ORT(Object Recognition Task)<sup>12,13</sup> 에서 연구되었다. ORT 등록 마우스는 행동 영역으로 10분간 놓이고 새로운 미지의 물체에 접하게 된다. 탐색시간(exploration time)은 기록된다. 세 시간 후에 같은 동물이 제2 세션을 위해 같은 영역에 재위치 되지만, 오래된 이전에 탐색된 것과 접하고, 추가로 새로운 물체와 접하게 된다. 다시, 양 물체에 대한 탐색 시간이 기록되고 생성되는 인지 인덱스는 총 탐색 시간에 대한 새로운 물체에 대한 탐색 시간의 비율로서 계산되고, 대조군에 대한 비율 변화로서 표현된다.
- [0518] **실시예 2.15 - 저분자량(LMW) 모노머 보다 A $\beta$  1-42 펩티드의 고분자량(HMW) 프로토-피브릴(PF) 올리고머 농축 제제에 대한 마우스 모노클로날 항체의 우선적인 결합**
- [0519] 마우스(mouse) 항-아밀로이드 베타 모노클로날 항체의 저분자량(LMW) 모노머 A $\beta$  1-42 펩티드 및 고분자량 프로토-피브릴(PF)의 A $\beta$  1-42 펩티드의 올리고머 농축 제제에 대한 결합은 ELISA를 사용하여 수행될 수도 있다.
- [0520] 2 SEC 칼럼, Superdex 75 HR 10/30(범위 3-70 kDa) 및 Superose 6 HR 10/30 (범위 5-5,000 kDa)을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)(SEC)가, A $\beta$  1-42 펩티드의 고분자량 프로토-피브릴(PF)의 올리고머 농축 및 저분자량(LMW) 모노머 체제로 이루어진 A $\beta$  1-42 펩티드 분획을 제조하기 위하여 사용되었다. 생성되는 용출액(eluate)은 그리고 나서 용출되는 A $\beta$  1-42 분획의 구조적 형태(morphology)를 입증하기 위하여, 우라닐 아세테이트로 염색되고, 100kV에서 고분해능 투과 전자현미경(high-resolution transmission electron microscopy)(TEM)에 의해 시험되었다.
- [0521] ELISA는 그리고 나서 밤새 고-결합(high-binding) 분석 플레이트 위에 2  $\mu$ M의 A $\beta$  1-42 분획을 코팅함에 의해 수행된다. 코팅된 판은 그리고 나서 1.0% BSA로 차단되었고, ACI-24-Ab-3 (마우스 EJ1A9) 항체가 20  $\mu$ g/ml에서 시작하는 계열(serial) 희석에 첨가된다. 표준 항체(6E10, Chemicon)의 계열 희석도 사용되었다. 알칼리성 포스파타아제 컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 항체 및 4-니트로페닐 포스페이트는 결합 검출을 위해 사용되었다. 플레이트는 405 nm에서 판독되었다. 모든 조건은 0.2 이하의 변이계수(coefficient of variation)(CV)로 중복(in duplicate) 분석되었다.
- [0522] **실시예 2.16: ACI-12-Ab-11 모노클로날 항체(Clone FK2A6A6)의 A $\beta$  1-42 펩티드의 모노머 및 올리고머 축적 분획에의 결합**
- [0523] 항-A $\beta$  팔로우-온(follow-on) 항체 ACI-12-Ab-11 (clone: FK2A6A6)의 A $\beta$  1-42 펩티드의 모노머 및 올리고머에의 결합이 평가되었다. 연구에 사용되기 전에, 항체는 -80  $^{\circ}$ C에 저장되었다. A $\beta$  1-42 펩티드(WM. Keck Facility, Yale University)는 사용일까지 동결 건조된 분말로서 저장되었다. 모든 다른 재료는 달리 표시되지 않는 한, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)로부터 왔다.
- [0524] A $\beta$  1-42 펩티드의 향상된 올리고머-축적으로 모노머 및 고분자 분획을 제조하기 위하여, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용하는 향상된 방법(methodology)이 사용되었다. 두 개의 SEC 칼럼, Supelco TSK G4000PW-XL (범위: 10-1500 kDa; Sigma) 및 Superose 6 HR 10/30 (범위 5-5,000 kDa; GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Sweden)가 LMW 모노머 및 더 높은 중량의 올리고머가 농축된 A $\beta$  1-42 펩티드 분획을 제조하기 위하여 사용되었다. A $\beta$  1-42 분획의 구조적 형태를 입증하기 위하여, 생성되는 SEC 용출액은 그리고 나서 우라닐 아세테이트로 염색되었고, 100kV에서 고분해능 투과 전자 현미경(TEM)으로 검사되었다(표시되지 않음). 항체의 A $\beta$  1-42 분획에의 결합을 조사하기 위하여, ELISA가 수행되었다. A $\beta$  1-42 분획은 2 시간 동안 PBS에서 2.2  $\mu$ M에서 고-결합 분석 플레이트 위에 코팅되었다. 코팅된 플레이트는 그리고 나서 PBS에서 0.05% Tween-20로 다섯 번 세척되었고, 1.0% BSA로 차단되었다. 대조군 항체(6E10)를 포함하는, 항-A $\beta$  항체는 표시된 농도에서 시작하는 연속 희석으로 첨가되었다. 알칼리성 포스파타아제에 컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England), 및 4-니트로페닐 포스페이트는 결합 검출을 위하여 사용되었다. 플레이트는 실온에서 14 시간 항온보관한 뒤에 405 nm에서 판독되었다. 분석은 세 번 반복되었다.
- [0525] 도 16은 세 번의 별개 ELISA 분석에서 얻어진 평균 ( $\pm$ SEM) 흡광도(O.D.) 값을 보여준다. 항체 ACI-12-Ab-11는 올리고머에 축적되지 않은 분획과 비교하여 올리고머에 축적된 A $\beta$  1-42 제제에의 우수한 결합 및 주로 A $\beta$  1-42 모노머로 구성된다는 것을 나타내었다(도 16A). 비교하여, 대조군 항체 6E10은 A $\beta$  1-42 분획 양쪽에 균등하게 잘 결합하였다(도 16B). 표 2.4 및 2.5는 항체 ACI-12-Ab-11 및 6E10에 대하여 각각, ELISA 분석 1, 2, 및 3에서 얻어진 O.D. 값을 보여준다.
- [0526] 이러한 결과는 항체 ACI-12-Ab-11 (클론: FK2A6A6)가 모노머성 A $\beta$  1-42에 결합하는 것보다 A $\beta$  1-42 의 올리고

모-촉적 분획에 우수한 결합 친화도를 보인다는 것을 나타낸다.

[0527] **실시예 3: Aβ-ApoE4 결합의 억제**

[0528] 본 발명에 따른 ApoE4의 아밀로이드에의 결합 및 ApoE4 및 Aβ 42 펩티드간 상호작용을 억제하는 모노클로날 항체의 능력이 평가된다.

[0529] 인간 재조합(recombinant) ApoE4는 PBS로 200nM로 희석되고 -80 °C에서 0.5 ml 분취량(aliquot)으로 저장된다. Aβ<sub>42</sub>-비오틴 펩티드 1 mg는 DMSO 20 μl에서, 그리고 나서 PBS/0.1%, BSA/0.1% 아지드 나트륨의 1980 μl에서 리서스펜드(resuspend)되어 0.5 mg/ml의 최종 용액을 얻는다. ELISA 분석은 rhApoE4의 Aβ 42에의 결합을 측정하기 위하여 사용된다. rhApoE4(100 nM)은 Aβ<sub>1-42</sub>-비오틴(1 μM)과 함께 상기 단백질의 상기 펩티드에의 결합을 허용하기 위하여 37°C에서 3시간 동안 항온보관된다. 혼합물은 PBST(PBS+ 0.05% Tween 20)로 세 번 미리 세척된 스트렙타비딘(streptavidin)-코팅 판 위에 적용된다. 실온에서 1h 항온보관 후에, 플레이트는 PBST로 3번 세척되고 0.1% BSA를 함유한 PBS로 4°C에서 밤새 차단(block)된다. 결합된 ApoE4은 PBS 1:3000 희석으로 사용된 IgG1 마우스 항-인간 ApoE 항체로 검출되고 실온에서 2.5 시간 동안 플레이트 위에 적용된다. 플레이트는 PBST로 네 번 세척되고 나서 검출항체, 즉 PBS에서 1:5000로 희석된 알칼리성 포스파타제(AP)와 커플링된 항-마우스 IgG와 함께 실온에서 1시간 동안 항온보관된다. 4x PBST로 최종 세척 후, 플레이트는 AP 기질 pNPP(포스파타제 기질, 4-니트로페닐 포스페이트 디소듐 염 헥사하이드레이트(Phosphatase substrate, 4- Nitrophenyl phosphate Disodium salt Hexahydrate))로 5.5 시간 동안 항온보관되고 ELISA 판독기를 사용하여 405 nm에서 판독된다. 도 17은 실험을 요약한다.

[0530] ELISA 분석은 rhApoE4 (150 nM) 및 Aβ42-biotin (1.5 μM)의 혼합물을 8번의 2배 희석들을 하여 현상된다(developed). 다음의 음성 대조군(negative controls)이 첨가된다:(1) rhApoE4 단독; (2) Aβ42-비오틴; 및 (3) rhApoE4-Aβ42-비오틴 (마우스 항-ApoE4 없는 프로토콜). 도 18은 양성 시그널이 rhApoE4 및 Aβ42-비오틴 모두가 존재하고 완전한 ELISA 프로토콜이 이어질 때만 오직 얻어진다는 것을 보여준다.

[0531] 분석에서 rhApoE4 및 Aβ42-비오틴의 농도를 최적화하기 위하여, rhApoE4(예를 들어, 150 nM)의 희석이 Aβ42-비오틴의 일정한 농도(예를 들어, 노말: 1.5 μM 또는 초과: 15 μM)로 시험된다. 도 19는, rhApoE4와 복합체를 이룬 더 적은(less) Aβ42-비오틴이 플레이트에 결합하기 때문에, 과잉의 결합 Aβ42-비오틴이 ELISA 분석의 시그널을 희석한다는 것을 보여준다. 이러한 시험(test)에 기초하여, rhApoE4의 최적 농도가 선택된다.

[0532] 분석에서 Aβ42-비오틴의 농도는 100 nM rhApoE4의 일정한 농도를 사용하여 최적화된다. Aβ42-비오틴의 희석들(예를 들어, 1.5 μM의 시작 농도로(더 낮은 농도, 예를 들어 1500 nM 만큼 낮게 희석됨))은 ELISA 셋업(set-up)에서 시험된다. 도 20에 보여진 결과에 기초하여, Aβ42-비오틴 1 μM의 최적 농도는 rhApoE4의 Aβ42-비오틴에의 결합에 대한 모노클로날 항체의 영향을 측정하기 위하여 선택된다.

[0533] rhApoE4의 Aβ42-비오틴에의 결합에 대한 본 발명의 하나 이상의 항체의 영향은 상기 기재된 ELISA 분석을 사용하여 평가되지만, 추가로 플레이팅(plating)전의 결합 혼합물에서 본 발명의 항체를 포함한다. 예를 들어, 50 μg/mL 농도에서 시작해서, 항체의 두 배(two-fold) 희석들이 사용될 수도 있다. 항체의 포함(inclusion)은 ApoE4 및 Aβ42-비오틴이 처음 결합할 때 있을 수 있고, 또는 ApoE4 및 Aβ42-비오틴이 처음 결합된 후(예를 들어, 수시간 후)에 있을 수도 있다. 먼저의 예에서, ApoE4 및 Aβ42-비오틴의 상호작용을 방지하거나 억제하는 본 발명의 항체의 능력이 평가되고, 반면 나중의 예에서, ApoE4 및 Aβ42-비오틴 간 이미 존재하는 복합체를 붕괴시키는 본 발명의 항체의 능력이 평가된다.

[0534] [표 1.1] 상기 항체들을 생성하기 위해 사용되는 항체 및 항원성 구조물

마우스 mAb	클론	이소타입	항원/서열	링커	앵커	항원보강제
mACI-24-Ab3	EJ1A9	IgG1	Aβ <sub>1-15</sub>	-	팜(Palm)	지질 A

[0535]

[0536]

[표 1.2] Aβ 펩티드의 ACI-24-Ab-3에의 결합. 결과는 백그라운드를 뺀 후 O.D.로서 표현된다.

펩티드	항체	
	ACI-24-Ab-3	
1-28 <sup>1</sup>	Mean	0.13
	SD	0.08
	SEM	0.06
17-40 <sup>1</sup>	Mean	-0.23
	SD	0.07
	SEM	0.05
1-40 <sup>1</sup>	Mean	0.90
	SD	0.22
	SEM	0.16
1-42A <sup>1</sup>	Mean	0.31
	SD	0.35
	SEM	0.24
1-42B <sup>2</sup>	Mean	0.27
	SD	0.07
	SEM	0.05

<sup>1</sup> Anaspec 의 펩티드  
<sup>2</sup> Bachem 의 펩티드

[0537]

[0538]

[표 1.3] ELISA에 의해 분석된 ACI-24-Ab-3의 Aβ 1-42의 33 중첩하는 펩티드에의 결합

펩티드	항체
	ACI-24-Ab-3
1	0.32
2	0.26
3	0.37
4	0.36
5	0.32
6	0.34
7	0.30
8	0.21
9	0.19
10	0.20
11	0.23
12	0.34
13	0.23
14	0.30
15	0.32
16	0.34
17	0.31
18	0.30
19	0.30
20	0.22
21	0.21
22	0.21
23	0.20
24	0.18
25	0.23
26	0.25
27	0.26
28	0.26
29	0.27
30	0.29
31	0.31
32	0.31
33	0.26
Aβ1-42	0.36
Aβ1-42	0.36
Aβ1-42	0.35

[0539]

[0540]

[표 1.4] ACI-24-Ab-3(마우스 EJ1A9) 항체의 Aβ 1-42 펩티드의 고분자량(HMW) 프로토-피브릴 및 LMW 모노머성 제제에의 결합

ACI-24-Ab-3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	A $\beta$ 1-42 제제		O.D. 차이
	프로토-피브릴 (O.D.)	LMW 모노머 (O.D.)	
20	3.765	1.946	1.82
10	2.546	0.836	1.71
5	1.629	0.619	1.01
2.5	1.101	0.331	0.77
1.25	0.642	0.295	0.35
0.6250	0.457	0.177	0.28
0.3125	0.253	0.143	0.11
0.1563	0.167	0.115	0.05

[0541]

[0542]

[표 1.5] 6E10 대조군 항체의 A $\beta$ 1-42 펩티드의 고분자량(HMW) 프로토-피브릴 및 LMW 모노머성 제제에의 결합

6E10 ( $\mu\text{g/ml}$ )	A $\beta$ 1-42 제제		O.D. 차이
	프로토-피브릴 (O.D.)	LMW 모노머 (O.D.)	
1	2.550	2.677	0.13
0.5	1.998	2.126	0.13
0.25	1.442	1.563	0.12
0.125	0.863	0.999	0.14
0.0625	0.544	0.574	0.03
0.0313	0.286	0.329	0.04
0.0156	0.201	0.207	0.01
0.0078	0.116	0.133	0.02

[0543]

[0544]

[표 1.6] ACI-24-Ab-3(마우스 EJ1A9) 항체의 A $\beta$ 1-42의 올리고머- 및 모노머- 농축된 제제에의 결합

항체 희석 <sup>b</sup>	모노머 (O.D.)					올리고머 (O.D.)				
	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM
1:1	2.03	0.95	1.82	1.60	0.33	2.74	3.65	3.13	3.17	0.26
1:2	1.17	0.57	1.16	0.97	0.20	1.84	3.26	2.25	2.45	0.42
1:4	0.83	0.37	0.86	0.69	0.16	1.16	2.62	1.57	1.79	0.43
1:8	0.55	0.24	0.56	0.45	0.10	0.84	1.87	1.10	1.27	0.31
1:16	0.39	0.15	0.34	0.29	0.07	0.59	1.22	0.69	0.83	0.20
1:32	0.28	0.10	0.23	0.20	0.05	0.31	0.73	0.42	0.49	0.13
1:64	0.22	0.10	0.18	0.17	0.04	0.27	0.41	0.32	0.33	0.04
1:128	0.18	0.10	0.18	0.15	0.03	0.21	0.24	0.28	0.24	0.02

<sup>a</sup> O.D.: 405 nm에서의 흡광도

<sup>b</sup> ACI-24-Ab-3 (클론: EJ1A9)을 위한 시작 희석(Starting dilution)은 30  $\mu\text{g/ml}$ 였다.

[0545]

[0546]

[표 1.7] 6E10 대조군 항체의 Aβ 1-42 펩티드의 올리고머- 및 모노머- 농축된 제제에의 결합

항체 희석 <sup>b</sup>	모노머 (O.D.)					올리고머 (O.D.)				
	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM
1:1	3.67	3.77	4.04	3.83	0.11	3.36	3.67	3.89	3.64	0.15
1:2	3.30	3.48	4.00	3.59	0.21	3.39	3.55	3.83	3.59	0.13
1:4	3.00	3.29	3.52	3.27	0.15	3.10	3.37	3.64	3.37	0.16
1:8	2.67	3.00	2.80	2.82	0.10	2.73	2.99	3.23	2.98	0.15
1:16	1.78	1.94	2.23	1.98	0.13	1.78	1.92	2.07	1.92	0.08
1:32	1.18	1.34	1.54	1.36	0.10	1.27	1.30	1.40	1.32	0.04
1:64	0.81	0.94	1.08	0.94	0.08	0.93	0.88	0.95	0.92	0.02
1:128	0.64	0.75	0.86	0.75	0.06	0.62	0.61	0.66	0.63	0.02

<sup>a</sup> O.D.: 405 nm에서의 흡광도

<sup>b</sup> 6E10을 위한 시작 희석은 0.5 μg/ml였다.

[0547]

[0548]

[표 2.1] 상기 항체를 생성하기 위해 사용되는 항체 및 항원성 구조물

마우스 mAb	클론	항원/서열	링커	앵커	항원 보강제
ACI-11-Ab-9	FG1F9E4	Aβ <sub>22-35</sub>	PEG	DSPE	Lipid A
ACI-12-Ab-11	FK2A6A6	Aβ <sub>29-40</sub>	PEG	DSPE	Lipid A

[0549]

[0550]

[표 2.2] Aβ 펩티드의 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11에의 결합. 결과는 백그라운드를 뺀 후 O.D.로서 표현된다.

펩티드		항체	
		ACI-11-Ab-9	ACI-12-Ab-11
1-28 <sup>1</sup>	Mean	0.53	-0.02
	SD	0.06	0.00
	SEM	0.04	0.00
17-40 <sup>1</sup>	Mean	0.02	-0.02
	SD	0.04	0.01
	SEM	0.03	0.00
1-40 <sup>1</sup>	Mean	1.02	0.62
	SD	0.39	0.18
	SEM	0.27	0.13
1-42A <sup>1</sup>	Mean	0.78	0.44
	SD	0.12	0.15
	SEM	0.08	0.11
1-42B <sup>2</sup>	Mean	1.54	1.07
	SD	0.38	0.20
	SEM	0.27	0.14

<sup>1</sup> Anaspec 의 펩티드

<sup>2</sup> Bachem 의 펩티드

[0551]

[0552]

[표 2.3] ELISA에 의해 분석된 ACI-11-Ab-9 및 ACI-12-Ab-11의 Aβ1-42의 33 중첩되는 펩티드에의 결합

펩티드	항체	항체
	ACI-11-Ab-9	ACI-12-Ab-11
1	0.10	0.10
2	0.10	0.10
3	0.12	0.11
4	0.11	0.10
5	0.11	0.10
6	0.11	0.10
7	0.11	0.10
8	0.11	0.10
9	0.11	0.10
10	0.13	0.10
11	0.11	0.11
12	0.24	0.21
13	0.17	0.15
14	0.16	0.12
15	0.14	0.10
16	0.14	0.14
17	0.13	0.12
18	0.11	0.10
19	0.10	0.10
20	0.10	0.10
21	0.10	0.09
22	0.10	0.10
23	0.11	0.10
24	0.10	0.10
25	0.11	0.11
26	0.12	0.12
27	0.13	0.12
28	0.12	0.11
29	0.20	0.11
30	0.11	0.11
31	0.12	0.11
32	0.12	0.11
33	0.11	0.11
Aβ1-42	0.80	0.69
Aβ1-42	0.81	0.69
Aβ1-42	0.80	0.69

[0553]

[0554]

[표 2.4] ACI-12-Ab-11(클론: FK2A6A6)의 Aβ1-42 펩티드의 모노머- 및 올리고머-농축된 제제에의 결합

항체 희석 <sup>b</sup>	모노머(O.D.)					올리고머(O.D.)				
	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM
1:1	1.60	1.04	1.37	1.34	0.16	2.24	1.85	2.27	2.12	0.14
1:2	0.85	0.51	0.75	0.70	0.10	1.33	1.04	1.32	1.23	0.10
1:4	0.53	0.30	0.45	0.43	0.07	0.70	0.64	0.80	0.71	0.05
1:8	0.29	0.18	0.25	0.24	0.03	0.44	0.42	0.47	0.44	0.02
1:16	0.25	0.12	0.18	0.18	0.04	0.30	0.25	0.28	0.28	0.01
1:32	0.19	0.10	0.14	0.14	0.03	0.20	0.16	0.20	0.18	0.01
1:64	0.15	0.09	0.13	0.12	0.02	0.19	0.14	0.16	0.16	0.01
1:128	0.14	0.09	0.12	0.12	0.02	0.16	0.14	0.15	0.15	0.01

<sup>a</sup>O.D.: 405 nm 에서의 흡광도

<sup>b</sup> ACI-12-Ab-12(클론: FK2A6A6)을 위한 시작 희석(Starting dilution)은 40 μg/ml 였다.

[0555]

[0556] [표 2.5] 6E10 대조군 항체의 Aβ 1-42 펩티드의 모노머- 및 올리고머-농축된 제제에의 결합

항체 희석 <sup>b</sup>	모노머 (O.D.)					올리고머(O.D.)				
	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM	측정 1	측정 2	측정 3	평균	SEM
1:1	3.67	3.77	4.04	3.83	0.11	3.36	3.67	3.89	3.64	0.15
1:2	3.30	3.48	4.00	3.59	0.21	3.39	3.55	3.83	3.59	0.13
1:4	3.00	3.29	3.52	3.27	0.15	3.10	3.37	3.64	3.37	0.16
1:8	2.67	3.00	2.80	2.82	0.10	2.73	2.99	3.23	2.98	0.15
1:16	1.78	1.94	2.23	1.98	0.13	1.78	1.92	2.07	1.92	0.08
1:32	1.18	1.34	1.54	1.36	0.10	1.27	1.30	1.40	1.32	0.04
1:64	0.81	0.94	1.08	0.94	0.08	0.93	0.88	0.95	0.92	0.02
1:128	0.64	0.75	0.86	0.75	0.06	0.62	0.61	0.66	0.63	0.02

<sup>a</sup> O.D.: 405 nm에서의 흡광도  
<sup>b</sup> 6E10을 위한 시작 희석은 0.5 μg/ml였다.

[0557]

[0558] 기탁

[0559] 기탁기관명 :

[0560] 수탁번호 : DSMZ2844

[0561] 수탁일자 : 2007525

[0562] 기탁기관명 :

[0563] 수탁번호 : DSMZ2845

[0564] 수탁일자 : 2007525

[0565] 기탁기관명 :

[0566] 수탁번호 : DSMZ2846

[0567] 수탁일자 : 2007525

[0568] 다음 하이브리도마 세포주는 부다페스트 조약의 규정(provisions) 하에 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) at (Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig)"로 기탁되었다.

하이브리도마 주 명명	항체 명명	기탁일	접근 번호
EJ1A9	ACI-24-Ab-3	2007.5.25	DSM ACC2844
FG1F9E4	ACI-11-Ab-9	2007.5.25	DSM ACC2845
FK2A6A6	ACI-12-Ab-11	2007.5.25	DSM ACC2846

[0569]

수탁번호

[0570]

기탁기관명 : 데에스엠제-도이체잡농폰미크로오르가니즈멘운트젤쿨투렌게엠베하(DSMZ-DEUTSCHESAMMLUNGVONMIKROORGANISMENUNDZELLKULTURENGmbH)

수탁번호 : DSMZ02844

수탁일자 : 20070525

기탁기관명 : 데에스엠제-도이체잡농폰미크로오르가니즈멘운트젤쿨투렌게엠베하(DSMZ-DEUTSCHESAMMLUNGVONMIKROORGANISMENUNDZELLKULTURENGmbH)

수탁번호 : DSMZ02845

수탁일자 : 20070525

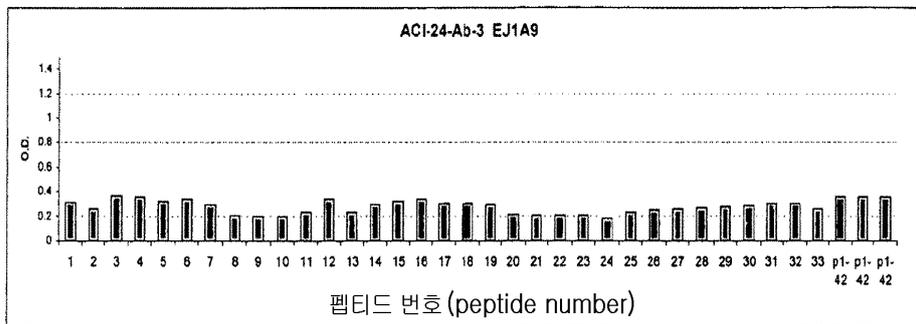
기탁기관명 : 데에스엠제-도이체잡농폰미크로오르가니즈멘운트젤쿨투렌게엠베하(DSMZ-DEUTSCHESAMMLUNGVONMIKROORGANISMENUNDZELLKULTURENGmbH)

수탁번호 : DSMZ02846

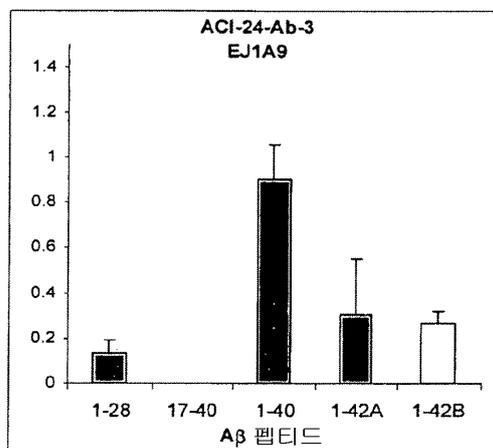
수탁일자 : 20070525

**도면**

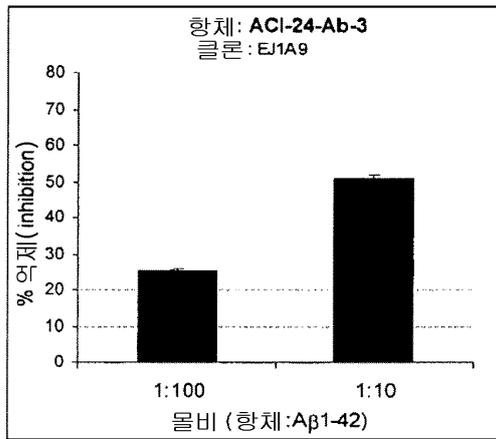
**도면1**



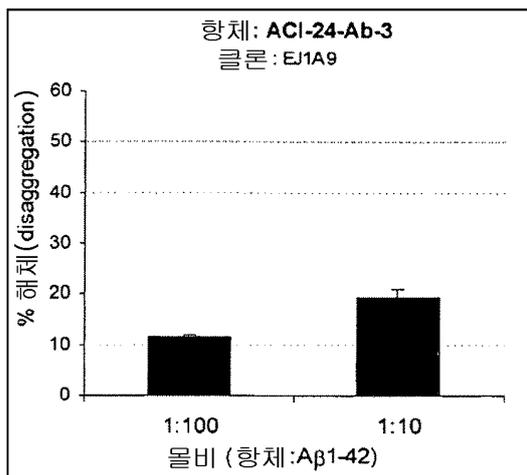
**도면2**



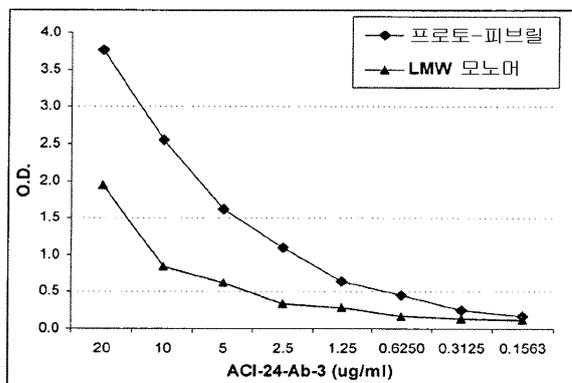
도면3



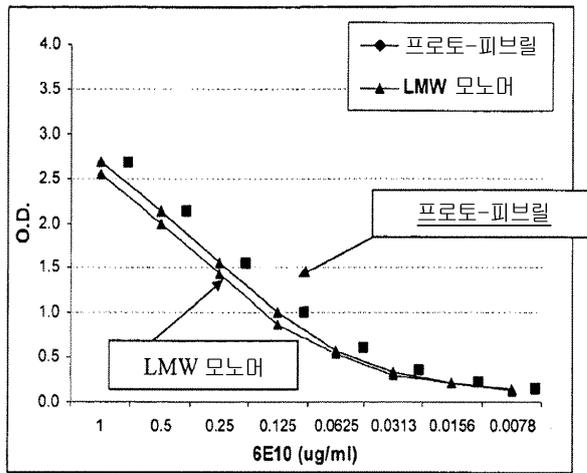
도면4



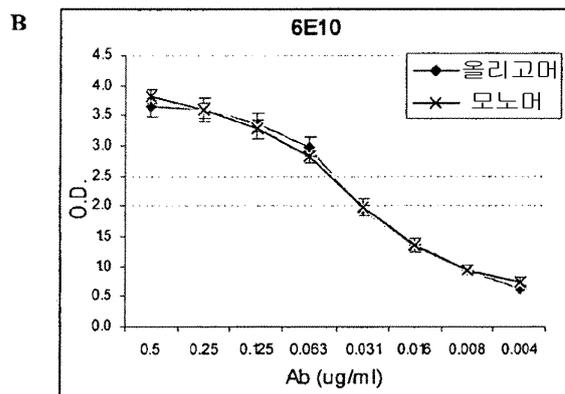
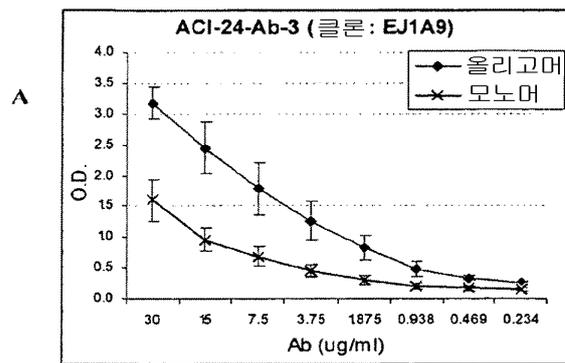
도면5



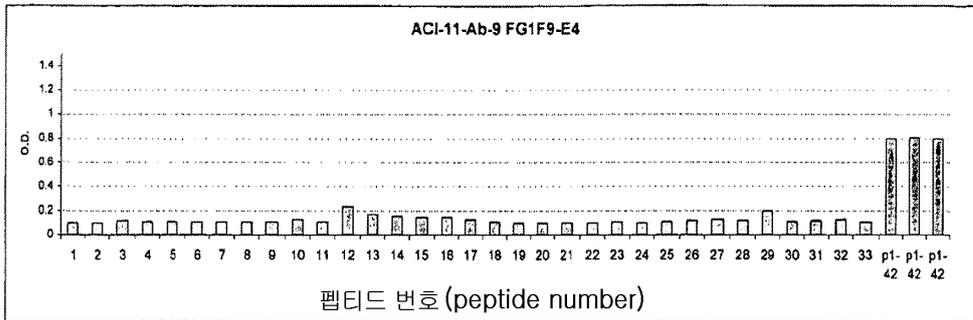
도면6



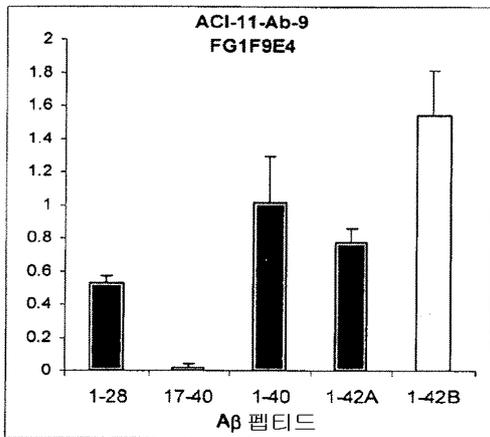
도면7



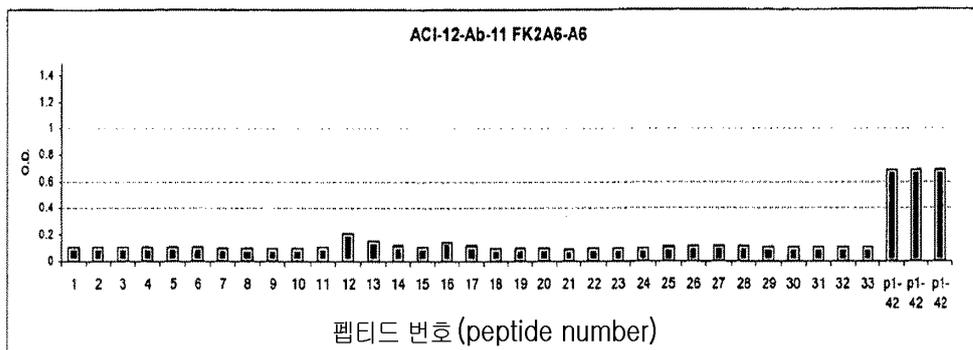
도면8



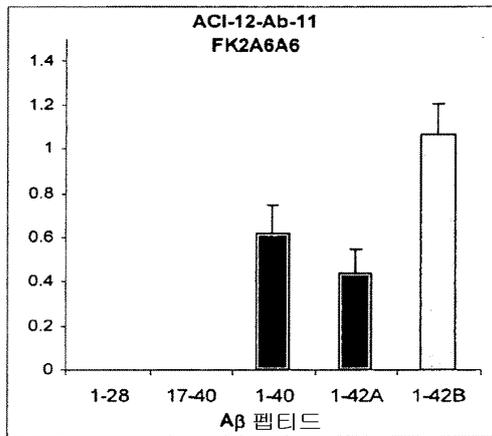
도면9



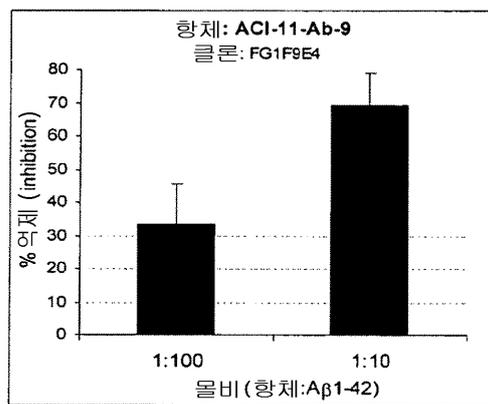
도면10



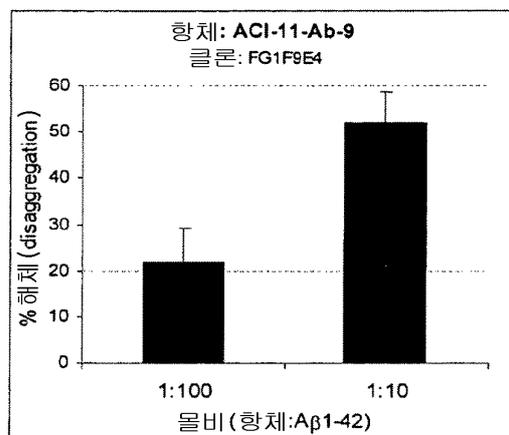
도면11



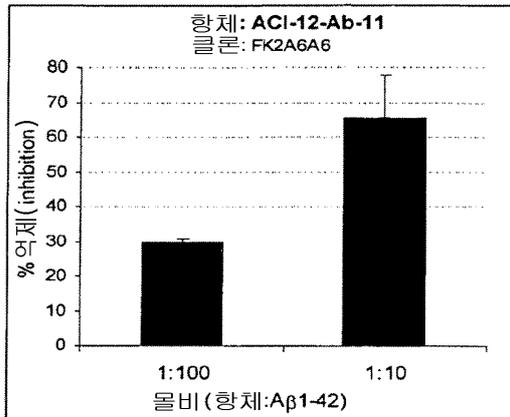
도면12



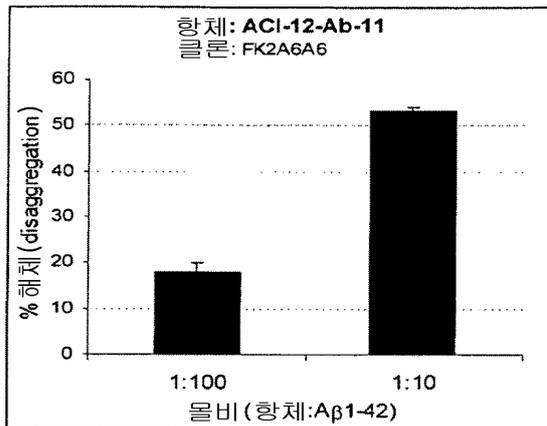
도면13



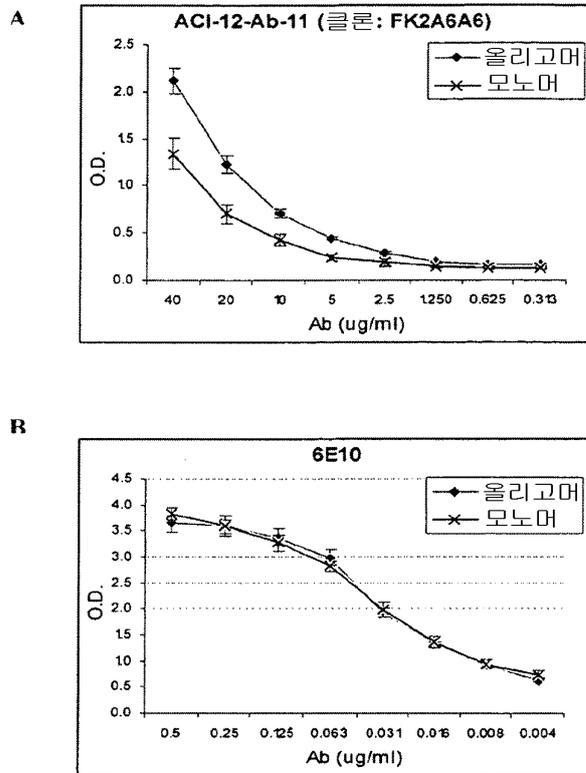
도면14



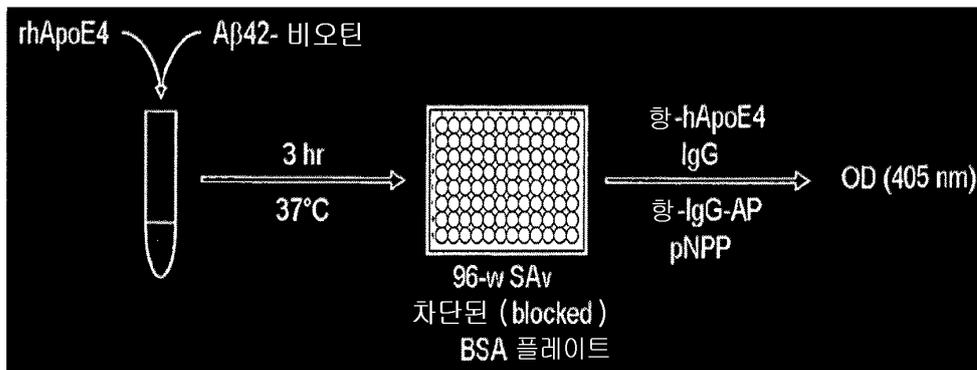
도면15



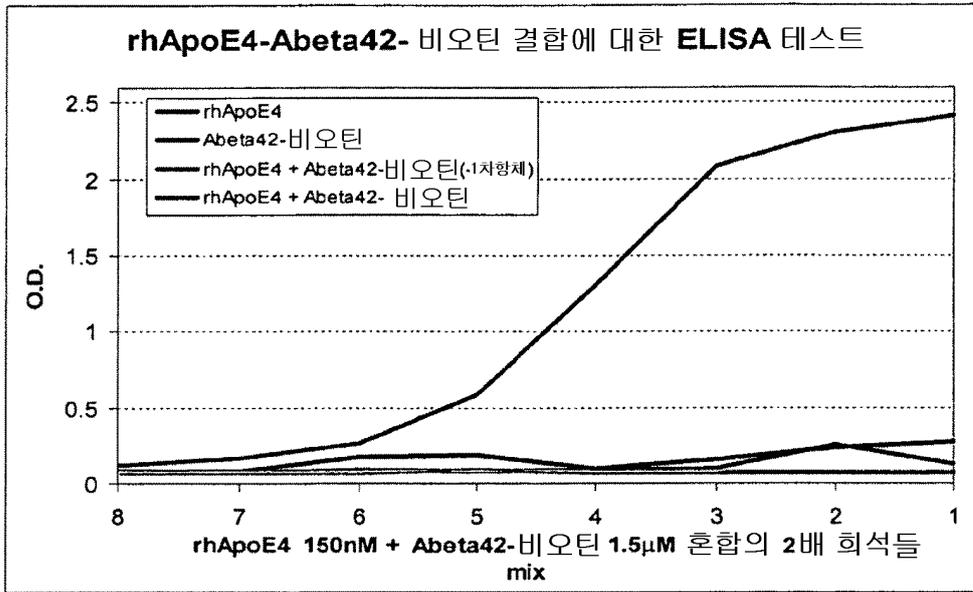
도면16



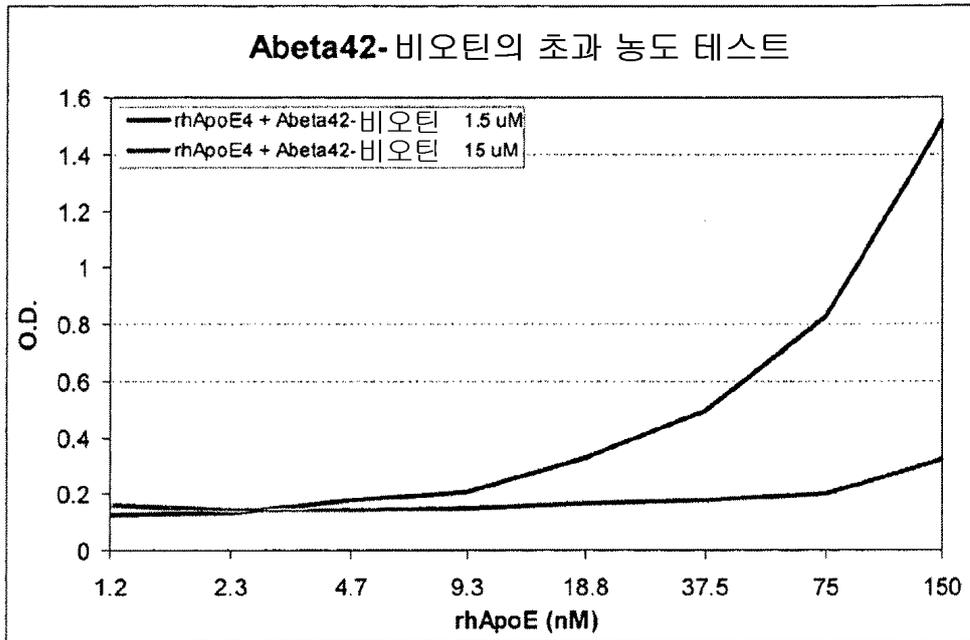
도면17



도면18



도면19





<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1 5 10

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

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

20 25

<210> 4

<211>

24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

1 5 10 15

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

20

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile



<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<

221> MOD\_RES

<222> (52)..(52)

<223> Any amino acid

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Arg Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Xaa Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Ile Tyr Tyr Gly Arg Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 13

Glu Ile Xaa Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Ser Ile Tyr Tyr Gly Arg Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 15

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

gatatcgtga tgaccacagtc tcaactcttc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60  
 gtcacctgca aggccagtc gaatgtggct actaatgtag cctggatca acagaaacca 120  
 gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtcctgat 180  
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgctcac gttcgggtct 300  
 gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 16

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60  
 tctgcaagg cttctggcta caccttcaca agctatgta taagtggtg gaagcagaga 120  
 actggacagg gccttgatg gattggagag attgtccta gaagtggcaa tacttactac 180  
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacagtg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagatcgatt 300  
 tactacggta gacctacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360  
 tca 363

<210> 17

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

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

1 5 10 15

Thr Val Ile Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Asp Ala Met Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Thr

85 90 95

His Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65                      70                      75                      80  
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85                      90                      95  
 Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100                      105                      110  
 Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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

1                      5                      10                      15  
 Thr Val Ile Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20                      25                      30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

35                      40                      45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Val Arg Phe

50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

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

85                      90                      95  
 His Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100                      105

<210> 20

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His  
                          20                    25                    30  
 Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                          35                    40                    45  
  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
                          50                    55                    60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
                          65                    70                    75                    80  
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
    85                    90                    95  
 Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
    100                    105                    110

Leu Thr Val Ser Ser  
                          115

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1                    5                    10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro

1                    5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Ala Leu Trp Tyr Ser Thr His Tyr Val

1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Thr Ile His

1 5 10

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Asp Tyr Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 27

<211> 327

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 27

caggcagttg tgactcagga atctgcactc accacgtcac ctggtggaac agtcatactc 60

actgtgcgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa 120

aaaccagatc atttattcac tggcttaata ggtggtacca gcaaccgagc tccaggtgtt 180  
 cctgtcagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcacat cacaggggca 240  
 cagactgagg atgatgcaat gtatttctgt gctctatggt acagcaccca ttatgttttc 300

ggcgggtgaa ccaaggtcac tgtccta 327

<210> 28

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 28

caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggagcttc agtgaagata 60  
 tcctgcaagg tttctggcta caccttact gaccatacta ttcactggat gaagcagagg 120  
 cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttaccta gagatggtag tactaagtac 180  
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagactat 300

ggttacgctt ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcttc a 351

<210> 29

<211> 327

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

caggccgttg tgactcagga atctgcactc accacgtccc ctggtggaac agtcatactc 60  
 acttgtcgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa 120  
 aaaccagatc atttattcac tggcttaata ggtggtacca gcaaccgagc tccaggtgtt 180  
 cctgtcagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcacat cacaggggca 240  
 cagactgagg atgatgcaat gtatttctgt gctctatggt acagcaccca ttatgttttc 300

ggcgggtgaa ccaaggtcac tgtccta 327

<210> 30

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 30

caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggagcttc agtgaagata 60

tcttgaagg tttctggcta caccttact gaccatacta ttcactggat gaagcagagg 120  
cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttatccta gagatggtag tactaagtac 180  
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagactat 300  
  
ggttacgctt ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 351