



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월29일  
(11) 등록번호 10-1401159  
(24) 등록일자 2014년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7010552(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2006년12월11일  
심사청구일자 2012년04월24일  
(85) 번역문제출일자 2012년04월24일  
(65) 공개번호 10-2012-0089483  
(43) 공개일자 2012년08월10일  
(62) 원출원 특허 10-2008-7012289  
원출원일자(국제) 2006년12월11일  
심사청구일자 2008년12월29일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/011914  
(87) 국제공개번호 WO 2007/068429  
국제공개일자 2007년06월21일  
(30) 우선권주장  
05027090.9 2005년12월12일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02003070760 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
에프. 호프만-라 로슈 아게  
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라세 124  
(72) 발명자  
로에트쉬에르 한스루에디  
스위스 피흘린 프란켄스트라세 18  
후베르 발테르  
스위스 카이세라우그스트 지에켈호프베그 62  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김명신, 이동기, 박지하

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 김정아

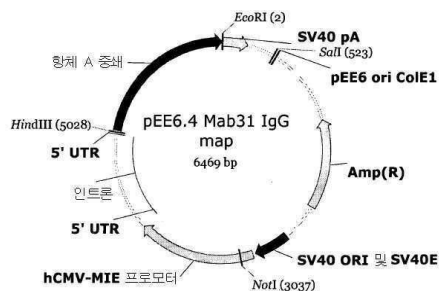
(54) 발명의 명칭 가변 부위에 글리코실화를 가지는 아밀로이드 베타에 대한 항체

(57) 요약

본 발명은 정제된 항체 분자에 관한 것으로서,

1개 이상의 항원 결합 자리는 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하며, 보다 특히 상기 항체 분자 및 항체 혼합물을 포함하는 약학적 및 진단 조성물은 β-A4 펩티드/Aβ4를 특이적으로 인식할 수 있도록 제공되고, 본 발명은 특히 중쇄의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)이 있는 1개 또는 2개의 글리코실화 항원 결합 자리를 포함하는 항체 혼합물, 즉 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위에 글리코실화 Asn을 포함하는 항체 이성질체의 혼합물, 또한 특이적 글리코실화 항체 이성질체를 포함하는 항체 조제 또는 조성물에 관한 것이며, 추가로 상기 항체용의 약학적 및 진단학적 용도에 관한 것이고, 상기 항체 이성질체는 예를 들어 아밀로이드 생성 또는 아밀로이드-플라크 형성의 약학적 예방 및/또는 진단에 사용할 수 있는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

**쉬우흐마우에르 디아나**

스위스 바젤 부헨스트라세 42

**베예르 카를**

독일 바드 벨링겐 임 룬펠 16

**브로크하우스 팬프레드**

스위스 벵턴겐 탈베그 29

**보어만 베른드**

스위스 바젤 르헤인가세 63

**콜 한스**

독일 오베르로스 블루에테난게르 42

**쉬아우브마르 안드레아스**

독일 펜즈베르그 세인트 클라라 스트라세 41

**란그 쿠르트**

독일 펜즈베르그 란고네르 스트라세 10

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

항체 분자를 포함하는 조성물로서,

상기 항체 분자는  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4를 특이적으로 인지할 수 있고,

상기 항체 분자는 모노-글리코실화 항체 분자(mono-glycosylated antibody molecule) 또는 이중-글리코실화 항체 분자(double-glycosylated antibody molecule)이거나, 상기 조성물은 상기 모노-글리코실화 항체 분자와 상기 이중-글리코실화 항체 분자의 혼합물을 포함하고,

상기 모노-글리코실화 항체 분자는 중쇄의 가변 부위의 서열 번호: 2의 52 위치 또는 서열 번호: 6의 52 위치에 하나의 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하며,

상기 이중-글리코실화 항체 분자는 항체 결합 자리 둘다의 중쇄의 가변영역의 서열 번호: 2의 52 위치 또는 서열 번호: 6의 52 위치에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하고,

상기 항체 분자는 서열번호: 10으로 나타나는 가변 중쇄의 CDR1, 서열 번호: 12로 나타나는 가변 중쇄의 CDR2, 서열 번호: 14로 나타나는 가변 중쇄의 CDR3, 서열번호: 16으로 나타나는 가변 경쇄(light chain)의 CDR1, 서열 번호: 18로 나타나는 가변 경쇄의 CDR2 및 서열 번호: 20으로 나타나는 가변 경쇄의 CDR3 를 포함하며,

상기 조성물은 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위에 글리코실화(glycosylation)을 포함하지 않는 글리코실화되지 않은 항체 분자(non-glycosylated antibody molecule)를 5 % 이하로 포함하고,

치매 또는 알츠하이머병의 진단 및 치료를 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위의 글리코실화 아스파라긴(Asn)은 CDR-2(서열번호: 12) 부위에 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 글리코실화되지 않은 항체 분자(non-glycosylated antibody molecule)는 항체 분자의 항원 결합 자리가 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하지 않는 것인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4는 하기의 서열, 또는 하기 서열 중 15개 이상의 아미노산 부분을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물:

**DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA**

(서열 번호: 3)

### 청구항 6

삭제

## 청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 항체 분자는 하기 (a), (b) 또는 (c) 에 의해서 암호화되는 중쇄( $V_H$ )를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

(a) 서열 번호: 1로 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자;

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCA  
GCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCG  
ATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCG  
CTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTC  
GTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATG  
AACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGA  
AGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCTGTTATTTTGATGTTGGG  
GCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA;

(b) 서열 번호: 2로 나타내는 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자; 또는

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK  
GLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL  
RAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSS

(서열 번호 : 2);

(c) 상기 (a) 및 (b) 중 어느 하나에서 기재한 핵산 서열로 퇴화(degeneration)되는 핵산 서열.

## 청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 항체 분자는 하기 (a) 및 (b)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

(a) 서열 번호: 5, 23 또는 25에서 나타내는 핵산 분자에 의해 암호화되는 중쇄 폴리펩티드; 및

(b) 서열 번호: 6 또는 26에서 나타내는 아미노산 서열을 가지는 중쇄 폴리펩티드.

## 청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

$V_H$  부위의 Asn 상의 상기 글리코실화는 하기 (a), (b), (c) 및 (d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물:

(a) 바이안테나 복합체 타입(biantennary complex type)의 당 구조;

(b) 바이안테나 하이브리드 타입의 당 구조;

(c) 바이안테나 올리고만노스 타입의 당 구조; 및

(d) 도 5 또는 도 27에서 제공하는 구조들 중 임의의 당 바이-안테나 구조.

## 청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 당 구조는 코어 푸코실화(core fucosylation)를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 항체 분자는 재조합형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 항체 분자는 CHO-세포에서 제조되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 CHO 세포는 CHO K1 또는 CHO K1 SV인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 조성물은 진단 조성물 또는 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 19

아밀로이드 생성 및 아밀로이드-플라크 형성 중 어느 하나 이상과 관련된 질환의 예방, 치료 또는 예방과 치료를 위한 약제를 제조하는데 사용하기 위한 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 조성물로서,

상기 질환은 치매 또는 알츠하이머병인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 20

아밀로이드 생성 및 아밀로이드-플라크 형성 중 어느 하나 이상과 관련된 질환을 검출하기 위한 진단 키트를 제조하는데 사용하기 위한 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 조성물로서,

상기 질환은 치매 또는 알츠하이머병인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 21

$\beta$ -아밀로이드 플라크를 분해하기 위한 약제를 제조하는데 사용하기 위한 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 조성물로서,

치매 또는 알츠하이머병의 진단 및 치료를 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 22

$\beta$ -아밀로이드 플라크 형성에 대한 수동 면역화를 위한 약학적 조성물을 제조하는데 사용하기 위한 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 조성물로서,

치매 또는 알츠하이머병의 진단 및 치료를 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 23

아밀로이드 생성 및 아밀로이드-플라크 형성 중 어느 하나 이상과 관련된 질환에 대한 예방적 치료용의 약학적 조성물을 제조하는데 사용하기 위한 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 조성물로서,

상기 질환은 치매 또는 알츠하이머병인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 24

제 23 항에 있어서,

아밀로이드- $\beta$ 의 응집 중간체 또는 선재성 플라크를 감소시키기 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 25

환자의 아밀로이드 생성 및 아밀로이드-플라크 형성 중 어느 하나 이상과 관련된 질환의 진단을 위한 진단 키트를 제조하는데 사용하거나, 또는 아밀로이드 생성 및 아밀로이드-플라크 형성 중 어느 하나 이상과 관련된 질환의 발병에 있어서 환자의 민감성(susceptibility)을 진단하기 위한 진단 키트를 제조하는데 사용하기 위한 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 조성물로서,

상기 질환은 치매 또는 알츠하이머병인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 26

제 1 항 또는 제 2 항의 조성물을 포함하는 키트(kit).

### 청구항 27

삭제

### 청구항 28

삭제

### 청구항 29

삭제

### 청구항 30

삭제

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 1개 이상의 항원 결합 자리가 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하는 것이 특징인 정제된 항체 분자의 제조에 관한 것이다. 보다 특히 정제된 항체 분자는  $\beta$ -A4 펩티드/ $A\beta$ 4를 특이적으로 인지하고, 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화를 포함할 수 있도록 제공된다. 본 발명은 중쇄의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)이 있는 1개 또는 2개의 글리코실화 항원 결합 자리를 포함하는 항체 혼합물, 즉 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화 Asn을 포함하는 항체 이성질체의 혼합물에 관한 것이다. 또한 특이적인 글리코실화 항체 이성질체를 포함하는 조성물 또는 항체의 제조를 밝히고 있다. 추가로 이러한 항체의 약학적 및 진단학적 용도에 대해서 밝히고 있다. 예를 들면 아밀로이드 생성 또는 아밀로이드-플라크 형성의 약학적 중재 및/또는 진단에 항체 이성질체를 사용할 수 있다.

### 배경기술

[0002] 모든 경우의 치매 중 약 70 %는 인지에 중요한 뇌 영역과 신경 회로망의 선택적 손상과 관련된 알츠하이머병에 의해 발생한다. 알츠하이머병은 대개 진정된 할로(defused halos)와 아밀로이드 침착의 치밀한 중심부를 포함하는 다수의 아밀로이드 플라크와 해마의 추체신경세포의 신경섬유원의 농축이 특징이다.

- [0003] 세포외 신경염 플라크는 "아밀로이드  $\beta$ ", "A-베타", " $A\beta_4$ ", " $\beta$ -A4" 또는 " $A\beta$ "라고 하는 다량의 우세한 원섬 유상 펩티드를 함유한다; Selkoe(1994), Ann. Rev. Cell Biol. 10, 373-403, Koo(1999), PNAS Vol. 96, pp. 9989-9990, US 4,666,829 또는 Glenner(1984), BBRC 12, 1131 참조. 상기 아밀로이드  $\beta$ 는 "알츠하이머 전구 단백질/ $\beta$ -아밀로이드 전구 단백질"(APP)로부터 유도된다. APPs는 내재성 막 당단백질[Sisodia(1992), PNAS Vol. 89, pp. 6075]이며, 원형질막 단백질분해효소인  $\alpha$ -세크라타제에 의해서  $A\beta$  서열내가 단백질내 가수분해적으로 분리된다[Sisodia(1992), loc. cit. 참조]. 또한 추가 세크라타제 활성화, 특히  $\beta$ -세크라타제 및  $\gamma$ -세크라타제 활성화로 39 아미노산( $A\beta_{39}$ ), 40 아미노산( $A\beta_{40}$ ), 42 아미노산( $A\beta_{42}$ ) 또는 43 아미노산( $A\beta_{43}$ )을 포함하는 아밀로이드- $\beta$  ( $A\beta$ )의 세포외 방출을 유도한다; Sinha(1999), PNAS 96, 11094-1053; Price(1998), Science 282, 1078 내지 1083; WO 00/72880 또는 Hardy(1997), TINS 20, 154 참조.
- [0004]  $A\beta$ 는 몇가지 자연 발생적 형태가 있으며, 인간의 형태는 상기에서 언급한  $A\beta_{39}$ ,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{41}$ ,  $A\beta_{42}$  및  $A\beta_{43}$ 과 같이 나타내는 것을 유의해야 한다. 가장 두드러진 형태인  $A\beta_{42}$ 는 (N-말단에서 시작하여) 하기와 같은 아미노산 서열을 갖는다: DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIA (서열 번호: 3).  $A\beta_{41}$ ,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{39}$ 에서는 각각 C-말단 아미노산 A, IA 및 VIA가 없다.  $A\beta_{43}$ -형태에서 추가의 트레오닌 잔기는 상기에서 언급한 서열(서열 번호: 3)의 C-말단에 포함된다.
- [0005]  $A\beta_{40}$  원섬유를 핵형성시키는데 필요한 시간은  $A\beta_{42}$  원섬유를 핵형성시키는데 필요한 시간 보다 현저하게 길다고 알려져 있다; Koo, loc. cit. 및 Harper(1997), Ann. Rev. Biochem. 66, 385-407 참조. Wagner(1999), J. Clin. Invest. 104, 1239-1332에서 검토한 것과 같이  $A\beta_{42}$ 는 보다 자주 신경염 플라크와 관련되어 있는 것으로 확인되며, 실험실내에서 더 많은 섬유화 성향이 있는 것으로 생각된다. 또한  $A\beta_{42}$ 는 순서 비-결정  $A\beta$  펩티드의 핵형성-의존 중합화에서 "시드(seed)"로서 작용하는 것으로도 알려져 있다; Jarrett(1993), Cell 93, 1055-1058.
- [0006] 단백질 침착을 함유하는 세포외 플라크의 발생 및/또는 변형된 APP 처리는 알츠하이머 병상에서 뿐만 아니라 기타 신경 및/또는 퇴행성 신경 질환으로 고통받는 피험체에서도 알려져 있다. 이러한 질환들로는 그 중에서도 특히 다운 증후군, 네덜란드형 아밀로이드증이 있는 유전성 뇌출혈, 파킨슨병, ALS(근위축성 측색경화증), 크로이츠펠트 야콥병, HIV 관련 치매 및 운동 신경병증을 포함한다.
- [0007] 현재까지 아밀로이드 관련 질환에 있어서의 제한된 의학적 중재 계획만이 알려져 있다. 예를 들면 갈란타민, 리바스티그민 또는 도네페질과 같은 콜린에스테라아제 억제제가 질환을 완화시키기 위해서 약한 알츠하이머 환자에게만 유리하다고 알려져 있다. 그러나 이러한 약물의 콜린성 활성화에 의한 불상사도 보고되었다. 이러한 콜린성이 강화된 치료(cholinergic-enhancing treatment)는 몇가지의 증상에 따른 이점이 있는 반면에 치료상 반응으로는 치료 환자의 대다수에 있어서 만족스럽지 않다. 치료 환자 중 단지 약 5 %에서만 현저한 인지 개선이 나타났다고 평가되었으며, 상기 치료가 이러한 진행성 질환의 진행을 현저하게 바꾼다는 증후는 거의 없다.
- [0008] 결론적으로 보다 효과적인 치료에 놀랄만한 임상적인 필요성이 요구되며, 특히 이러한 질환의 진행을 정지시키거나 연기시킬 수 있는 것이 요구된다.
- [0009] 또한 최근에는 메만틴과 같은 NMDA-수용체 길항제를 사용한다. 그러나 약학적 활성화로 인한 부작용이 보고되었다. 추가로 상기 NMDA-수용체 길항제에 의한 상기와 같은 치료는 질병을 변형시키는 것이 아닌 단지 징후적 접근법으로 생각할 수 있다.
- [0010] 또한 아밀로이드 관련 질병의 치료에 있어서의 면역조절 접근법이 제안되었다. WO 99/27944에서는 담체 분자 및  $A\beta$  펩티드의 일부를 포함하는 콘주게이트를 개시하고 있으며, 상기 담체 분자는 면역 반응을 강화시켜야 한다. 또 다른 즉효성 면역 접근법은 WO 00/72880에서 언급하고 있으며, 또한  $A\beta$  단편을 사용하여 면역 반응을 유도한다.
- [0011] 또한 일반적인 항- $A\beta$  항체에 의한 수동 면역 접근법이 WO 99/27944 또는 WO 01/62801에 기재되어 있으며,  $A\beta$  영역에 대해 직접적으로 유도된 특이적인 인간화 항체가 WO 02/46237, WO 02/088306 및 WO 02/088307에 기재되어 있다. WO 00/77178에는 가수분해 중  $\beta$ -아밀로이드에 의해 채택된 변이 상태에 결합된 항체가 기재되어 있다. WO 03/070760에는  $A\beta$  펩티드 상의 2개의 불연속 아미노산 서열을 인지하는 항체 분자가 기재되어 있다.
- [0012] WO 03/016466에는 Wallick(1998) J. Exp. Med. 168, 1099-1109에서 항체의 가변 부위의 글리코실화를 주장하기 때문에 중쇄에 잠재적 글리코실화를 피하기 위해서 변형된 인간화 항- $A\beta$  항체를 기재하고 있다.

## 발명의 내용

## 해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 기초를 이루는 기술적인 문제는 아밀로이드 질환의 의학적 치료에 효과적인 수단 및 방법, 특히 (상응하는) 의학적 중재의 필요에 따라 환자에게 해로운 아밀로이드 플라크를 감소시키는 방법 및 수단을 제공하는 것이다.

## 과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 기초를 이루는 기술적인 문제는 아밀로이드 질환의 의학적 치료에 효과적인 수단 및 방법, 특히 (상응하는) 의학적 중재의 필요에 따라 환자에게 해로운 아밀로이드 플라크를 감소시키는 방법 및 수단을 제공하는 것이다.

[0015] 첫번째 측면에서 본 발명은 1개 이상의 항원 결합 자리가 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하는 것이 특징인 정제된 항체 분자를 제공하는 것이다. 여기서 제공하는 독창적인 정제된 항체 또는 항체 조성물은 특히  $A\beta$  및/또는  $A\beta$ 의 단편에 대해서 직접 유도된다. 여기서 제공되는 정제된 항체 분자 및 특히 항체 조성물 또는 본 발명의 항체 조제는 아밀로이드증 및/또는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환의 치료, 개선 및 예방에 있어서의 약학적 또는 진단학적 조성물의 제조에 유용하다. 이러한 질환의 예로는 알츠하이머병이 있다.

[0016] 본 발명의 전후 관계에서 1개 이상의 항원 결합 자리가 예를 들어 아밀로이드 플라크의 감소에 특히 유용한 중쇄의 가변 부위에 N-연결형 글리코실화를 포함하는 정제된 항체 분자의 발견이 놀랄만한 것이다. 추가로 여기서 제공되는 글리코실화 항체 또는 항체 조성물은 특히 매우 효과적인 플라크 결합에 의해 설명할 수 있는 것과 같이 생체내에 혈뇌 장벽/혈뇌 경계를 유용하고 효과적으로 가로지른다는 것을 본 발명의 전후 관계에서 발견하였다.

[0017] 상기는 종래 문헌의 학설과는 완전하게 대조적인 것이다. WO 03/016466에서는 중쇄에 N-글리코실화 자리가 없도록 특이적으로 설계된 항체를 개시하고 있으며, 가변 부위 구조에서의 글리코실화는 항체 결합 친화력에 역효과를 준다는 것이 알려져 있다. 중쇄 가변 CDR2 부위의 탈글리코실화 형태의 기재된 항- $A\beta$  항체는 실험실내에서의 합성 및 정제된  $A\beta$  펩티드에 현저하게 높은 친화력이 있다는 것은 종래 문헌에서 알 수 있다.

[0018] 따라서 본 발명은  $A\beta 4/A\beta$  펩티드(아밀로이드  $\beta$ )에 대해 직접 유도되고, 생체내에서 매우 효과적인 개선되고 정제된 항체 분자 또는 항체 조제, 특히 항체 분자 조제에 관한 것이다. 본 발명의 항체 분자/항체 조제의 개선점은 중쇄의 가변 부위 중 1개 이상, 예를 들면 중쇄의 가변 부위의 CDR2에 N-글리코실화를 포함하는 정제된 항체 분자의 제공에 있다. 상기에서 언급한 것과 같이 상기는 예를 들어  $A\beta$ 에 대해 직접 유도된 항체에서는 N-글리코실화를 피해야 한다고 기재하고 있는 종래 문헌 WO 03/016466과는 대조적이다.

[0019] 본 발명의 항체 분자의 예로는 면역글로불린 분자, 예를 들면 IgG 분자들이 있다. IgG들은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄(예를 들어 도 14에 도시되어 있음)를 포함하는 것이 특징이며, 이들 분자들은 2개의 항원 결합 자리를 포함한다. 상기 항원 결합 자리는 중쇄( $V_H$ ) 부분과 경쇄( $V_L$ ) 부분으로 구성되는 "가변 부위(variable regions)"을 포함한다. 항원-결합 자리는  $V_H$ 와  $V_L$  도메인의 병치(juxtaposition)에 의해서 형성된다. 항체 분자 또는 면역글로브린 분자의 일반적인 정보는 Abbas "Cellular and Molecular Immunology", W.B. Saunders Company(2003)인 통상적인 교본도 또한 참조할 수 있다.

[0020] 하나의 측면에서 예를 들면 본 발명에서 특징하는 면역글로불린 분자의 제공에서 항체는 **1개**의 항원 결합 자리가 중쇄( $V_H$ )의 상응하는 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함한다고 기재되어 있다. 상기 항체는 이후에는 "모노-글리코실화 항체(mono-glycosylated ANTIBODY)"라고 하였다; 또한 도 14 참조.

[0021] 또 다른 측면에서 상응하는 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하는 **두개**의 항원 결합 자리가 있는 면역글로불린 분자를 제공한다. 상기 항체 분자를 이후에는 "이중-글리코실화 항체(double-glycosylated ANTIBODY)"라고 하였다; 도 14 참조.

[0022] 항원 결합 자리가 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하지 **않는** 면역글로불린을 이후에는 "비-글리코실화 항체(non-glycosylated ANTIBODY)"라고 하였다.

[0023] 모노-글리코실화 항체, 이중-글리코실화 항체 및 비-글리코실화 항체는 동일한 아미노산 서열 또는 상이한 아미



노산 서열을 포함할 수 있다. 따라서 "항체(ANTIBODY)"라는 용어는 면역글로불린과 같은 항체 분자, 특히 재조합형으로 제조된 항체 분자를 포함한다. 그러나 하기에서 설명하는 것과 같이 "항체 분자(들)(ANTIBODY molecule(s))"이라는 용어는 또한 단일-사슬 항체 또는 단일 사슬 Fv 단편(scAB/scFv) 또는 이중특이성 항체 구성체와 같은 면역글로불린의 공지된 이성질체 및 변형체를 포함할 수도 있으며, 상기 이성질체 및 변형체는 여기서 규정하는 1개 이상의 글리코실화  $V_H$  부위를 포함하는 것이 특징이다. 상기 이성질체 또는 변형체의 특이적 예로는  $V_H-V_L$  또는  $V_L-V_H$  형태의 sc(단일 사슬) 항체일 수 있으며, 상기  $V_H$ 는 여기서 기재하고 있는 글리코실화를 포함한다. 또한 이중특이성 scFvs는 예를 들어  $V_H-V_L-V_H-V_L$ ,  $V_L-V_H-V_H-V_L$ ,  $V_H-V_L-V_L-V_H$ 의 형태로 관찰되며, 상기 CDR-2 부위에 여기서 기재하고 있는 글리코실화를 포함한다.

[0024] 본 발명의 전후 관계에서 대문자 "항체(ANTIBODY)"라는 용어는 보다 명확하게 하기 위해서 이용하였다. 그러나 소문자를 사용한 "항체(antibody)"라는 용어도 또한 본 응용의 전후 관계에 사용하였다. "ANTIBODY/ANTIBODIES/antibody" 및 "antibodies"는 상호교환해서 사용하였다.

[0025] 모노-글리코실화 항체 및 이중-글리코실화 항체는 여기서 이전에 "글리코실화 항체 이성질체"라고 하였다. 1개 이상의 항원 결합 자리에 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위의 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하는 정제된 항체 분자는 이중-글리코실화 항체 및 비-글리코실화 항체로부터 선택된 이성질체와 관련 정도가 매우 낮거나 또는 없는 모노-글리코실화 항체, 즉 "정제된 모노-글리코실화 항체"이다. 본 발명의 전후 관계에서 이중-글리코실화 항체는 모노-글리코실화 항체 및 비-글리코실화 항체로부터 선택된 이성질체와 관련 정도가 매우 낮거나 또는 없는, 즉 "정제된 이중-글리코실화 항체"이다.

[0026] 여기서 사용하는 "없거나 또는 매우 작은 정도(which is free of or to a very low extent)"라는 것은 10 % 이하, 예를 들면 5 % 이하, 예를 들면 4 % 이하, 예를 들면 3 % 이하, 예를 들면 2 % 이하, 예를 들면 1 % 이하, 예를 들면 0.5 % 이하, 예를 들면 0.3 % 이하, 예를 들면 0.2 % 이하의 농도로 또 다른 (글리코실화) 이성질체의 존재 또는 각각의 다른 (글리코실화) 이성질체의 완전한 부재를 나타낸다. 이러한 것과 관련한 또 다른 정보는 하기의 첨부된 실시예에서 제공하였다.

[0027] 본 발명의 전후 관계에서 "모노-글리코실화 항체(들)(mono-glycosylated antibody(ies))" 또는 "모노-글리코실화 항체(들)(mono-glycosylated ANTIBODY(IES))"라는 용어는 각각의 항체 분자, 예를 들면 면역글로불린, 예를 들어 IgG, 예를 들어 IgG1의 1개의 ( $V_H$ )-부위에 N-글리코실화를 포함하는 항체 분자를 나타낸다. 예를 들면 상기 "모노-글리코실화 형태"는 하기에서 규정하고 있는 것과 같은 아스파라긴 위치 "Asn 52"와 같은 중쇄의 1개의 가변 부위에 글리코실화를 포함한다. 이러한 "모노-글리코실화 IgG1-형태 또는 모노-글리코실화 이성질체"는 또한 여기서 설명하는 것과 같이 비-가변 Fc-부분에 아스파라긴 Asn 306과 같은, Fc-부분에 잘 보존된 글리코실화 자리의 글리코실화를 포함할 수도 있다.

[0028] 본 발명의 취지에서 용어 "이중-글리코실화 항체(들)(double-glycosylated antibody(ies))" 또는 "이중-글리코실화 항체(들)(double-glycosylated ANTIBODY(IES))"는 중쇄( $V_H$ )-부위의 두개의 가변 부위상에 상기에서 규정하는 글리코실화를 포함한다. 또한 상기 "이중 글리코실화 형태"는 두개의 중쇄의 가변 부위상, 특히 하기에서 설명하고 첨부된 실시예에서 예로 든 것과 같이 아스파라긴 위치 Asn 52에 글리코실화를 포함한다. 이러한 "이중-글리코실화 IgG1-형태 또는 이중-글리코실화 이성질체"는 여기서 설명하는 것과 같이 비-가변/불변 Fc-부분의 잘 보존된 글리코실화 자리, 특히 대표적인 면역글로불린의 위치 306에 글리코실화를 포함할 수도 있다. 첨부된 도 14에서 상응하는 항체 분자를 설명하고 있다.

[0029] 중쇄의 두개의 가변 부위(두개의 ( $V_H$ )-부위)와 같은 가변 부위에 상기 해독후 변형(post-translational modification)이 없는 항체는 본 발명의 전후 관계에 있어서 중쇄의 가변 부위에 글리코실화가 없는 "비-글리코실화 형태"라고 간주한다. 게다가 그럼에도 불구하고 상기 "비-글리코실화 형태"는 (a) 항체의 불변 부위(C-부위), 예를 들면 가장 일반적으로는 Fc-부분의 잘 보존된 글리코실화 자리, 특히 여기서 규정하는 비-가변/불변 Fc-부분의 아스파라긴(Asn) 306에 글리코실화(들)를 포함한다(서열 번호: 6 참조).

[0030] 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위의 글리코실화 아스파라긴(Asn)은 상보성 결정 부위 2(CDR2 부위)에 있을 수 있다. 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위의 상기 글리코실화 아스파라긴(Asn)은 하기에 규정한 가변 부위의 52 위치에 있을 수 있으며, 서열 번호 2(또는 여기서 규정하는 항체 중쇄의 Fc-부분을 포함하는 서열 번호: 6의 52 위치)에서 확인할 수 있다.

[0031] 항체 이성질체는 또한 예를 들면 IgG1의 Fc-부분인 IgG의 Fc-부분과 같은 항체 분자의 불변/비-가변 부분에 글리코실화(들)를 추가로 포함할 수도 있다. Fc-부분의 상기 글리코실화는 하기의 서열에 따른 중쇄의 Asn306 위치상에 위치하는 것이 특징인 잘 보존된 글리코실화를 나타낸다:

[0032] QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRT  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDV  
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호 : 6)

[0033] 상기 서열은 또한 하기에 나타내었으며, 2개의 N-글리코실화 자리(N52 및 N306)뿐만 아니라 CDRs, CH-부위, 중쇄 부위가 나타나 있다:

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
AINASGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  
GKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH  
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSL  
SPGK. (서열 번호 : 6)

사각형틀:CDR1, 2, 3

밑줄 : CH1

이탈릭 : 경첩

밑줄 두번 : CH2

점선 : CH3

굵은 N : N-연결형 글리코실화 자리

[0034] [0035] 본 발명의 항체의 IgG-Fc 부위는 사슬사이 이황 결합된 경첩 부위(interchain disulphide bonded hinge regions)으로 구성되는 호모다이며, C<sub>H</sub>2의 아스파라긴 306(Asn-306)에 N-연결형 올리고사카라이드를 함유하는 글리코실화 C<sub>H</sub>2 도메인, 및 비-공유 결합 C<sub>H</sub>3 도메인(non-covalently paired C<sub>H</sub>3 domains)일 수 있다. Asn-306에서 글리코실화의 올리고사카라이드는 복합체 바이안테나 타입(complex biantennary type)이며, 외부 팔 당(outer arm sugars)을 가변적으로 추가한 코어 헵타사카라이드 구조(core heptasaccharide structure)를 포함할 수 있다.

[0036] 올리고사카라이드는 Fc 구조와 기능을 결정하거나 또는 영향을 줄 수 있다(Jefferis(1998) Immunol Rev. 163, 50-76). 특히 특이 IgG-Fc/효과기 리간드 상호작용을 포함하는 효과기 기능(effector function)이 논의되었다(Jefferis(2002) Immunol Lett. 82(1-2), 57-65 및 Krapp(2003) J Mol Biol. 325(5), 979-89). 이러한 보존된 Fc-위치 Asn-306은 카배트-시스템(Kabat-system)의 "Asn-297"과 일치한다(Kabat(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD).

[0037] 대표적인 중쇄는 하기 서열로 암호화될 수 있다:

```
cagggtggaattgggtgaaagcggcgggcctgggtgcaaccggcgggcagcctgcgtcagctgcgcggcctccggattaccttttag
cagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccccgggaagggtctcagtggtgagcgcctattaatgcttctggtactcgtacttattatgc
tgattctgtaagggtcgttttaccatttcacgtgataattcgaataacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgcgtgcggaagatacggcc
gtgtattatgcgcgcgtgtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgttatttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacgggtt
agctcagcctccaccaagggtccatcgggtctccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggggcacagcggccctgggtgcctg
gtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacag
tcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagc
ccagcaacaccaagggtggacaagaagttagcccgatgtcgcgatctgtgcaatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgc
ccagcactgaactcctggggggaccgtcagttctctctccccccaaaacccaaggacacccatgatctccggaccctgaggtca
catgcgtgggtggagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagaca
aagccgcgggagagcagtaacacgacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggagt
acaagtgaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggt
gtacacccctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaggcttctatccagcgacatcgc
cgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagacaactacaagaccagcctccgtgctggactccgacggctccttctctctaca
gcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtctctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacg
cagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (서열 번호 : 5)
```

[0038]

[0039] 상기 중쇄는 또한 "선도 서열(leader sequences)"과 같은 추가 서열을 (특히 이의 제조합 제조 중에) 포함할 수도 있다. 상응하는 예는 하기 서열로 암호화한다:

```
atgaaacacctgtggttcttctcctgctgggtgagcgtcccagatgggtcctgtcc (이후에)
cagggtggaattgggtgaaagcggcgggcctgggtgcaaccggcgggcagcctgcgtcagctgcgcggcctccggattaccttttag
cagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccccgggaagggtctcagtggtgagcgcctattaatgcttctggtactcgtacttattatgc
tgattctgtaagggtcgttttaccatttcacgtgataattcgaataacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgcgtgcggaagatacggcc
gtgtattatgcgcgcgtgtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgttatttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacgggtt
agctcagcctccaccaagggtccatcgggtctccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggggcacagcggccctgggtgcctg
gtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacag
tcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagc
ccagcaacaccaagggtggacaagaagttagcccgatgtcgcgatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctgg
ggggaccgtcagttctcttccccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtgacgt
gagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggagggagca
gtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctcca
acaaagccctccagccccatcgagaaaacctctcaaaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacccctgccccatc
ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaaggcttctatccagcgacatcggcgtggagtgaggagagca
atgggcagccggagacaactacaagaccagcctccctgctggtgactccgacggctccttctctctacagcaagctaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgt
ctccgggtaaatga (서열 번호 : 25)
```

[0040]

[0041] 상응하는 아미노산 서열은 하기와 같을 것이다:

```
MKHLWFFLLVAAPRWVLS (이후에)
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRT
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDV
WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPELPPGKPKATLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL
DGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호 : 26)
```

[0042]

[0043] 상기 서열은 또한 "신호 펩티드(signal peptide)"를 포함할 수도 있다. 상기 신호 펩티드는 CHO 세포와 같은 숙주 세포에 독창적인 항체 분자의 제조 중에 분비 경로 중 숙주 신호 펩티드 분해효소에 의해서 단백질 가수분



해로 분해된다.

[0044]

대안적으로 상기 중쇄는 하기 서열에 의해 예시되는 재조합 제조에 있어서 최적화된 핵산 서열에 의해서 암호화될 수 있다:

```

1  atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtga
51  ttcatggaga aatagagaga ctgagtgtga gtgaacatga gtgagaaaaa
101 ctggatttgt gtggcatttt ctgataacgg tgctcttctg tttgcagggtg
151 tccagtgt

```

이후에

```

ca ggtggagctg gtggagtctg ggggaggcct ggtccagcct
201 ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca ccttcagtag
251 ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctcgagtggg
301 tgtccgcat aaacgccagc ggtaccgcga cctactatgc agactccgtg
351 aagggccgat tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct
401 gcaaatgaac agcctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcca
451 gaggcaaggg gaacaccac aagccctacg gctacgtacg ctactttgac
501 gtgtggggcc aaggaaccct ggtcacgcgc tcctcaggtg agtctcaca
551 acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgtccag
601 ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagttg atggtgacaa
651 tttcagggtc agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tggaatatag
701 gtcaccttga agactaaaga ggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg

```

[0045]

```

751 gaacagaatg tggaacaatg acttgaatgg ttgattcttg tgtgacacca
801 agaattggca taatgtctga gttgcccaag ggtgatctta gctagactct
851 ggggtttttg tgggtacag aggaataacc cactattgtg attactatgc
901 tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga
951 atggcctctc caggctctta tttttaacct ttgttatgga gttttctgag
1001 cattgcagac taatcttggg tatttcccct gaggagccg gctgagagaa
1051 gttgggaaat aaatctgtct agggatctca gagcctttag gacagattat
1101 ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatggtgt tgggtggagtc
1151 cctggatgat gggataggga ctttggaggc tcatttgagg gagatgctaa
1201 aacaatccta tggctggagg gatagtggg gctgtagtgt gagattttca
1251 gtttttagaa tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga
1301 caaccatttt atacagtatc caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc
1351 actttcttta gatttgtgag gaatgttcca cactagattg tttaaaactt
1401 catttgttgg aaggagctgt cttagtgtt gagtcaaggg agaaaggcat
1451 ctacccctcg tctcaaaagg gtatgtgctg tctagagagg tctggtggag
1501 cctgcataag tccagcttcc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata
1551 ttagaagatg ttgcttttac tcttaagttg gttcctagga aaaatagtta
1601 aatactgtga ctttaaaatg tgagagggtt ttcaagtact cattttttta
1651 aatgtccaaa atttttgtca atcaatttga ggtcttgttt gtgtagaact
1701 gacattactt aaagtttaac cgaggaaatg gagtgaggct ctctcatacc
1751 ctattcagaa ctgactttta acaataataa attaagttta aaatattttt
1801 aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg
1851 aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg
1901 ggaagggaaa ataaaaccac taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa
1951 gtggttttga aacactctgt ccagccccc caaaccgaaa gtccaggctg
2001 agcaaaaacac cacctgggta atttgcaatt ctaaaataag ttgaggattc
2051 agccgaaact ggagagggtc tcttttaact tattgagttc aaccttttaa
2101 ttttagcttg agtagttcta gtttcccaa acttaagttt atcgacttct
2151 aaaatgtatt tagaattcga gtcggtaca gctttctggg gcaggccagg
2201 cctgaccttg gctttggggc agggaggggg ctaagggtgag gcaggtggcg
2251 ccagcaggtg cacacccaat gccatgagc ccagacactg gacgtgaac
2301 ctgcgggaca gtttaagaacc caggggcctc tgcgcctggg cccagctctg
2351 tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgagcc tccaccaagg
2401 gccatcgggt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc

```

[0046]

2451 acagcgggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac  
 2501 ggtgtcgtgg aactcaggcg cctgaccag cggtcgcac accttccccg  
 2551 ctgtcttaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg  
 2601 cctccagca gcttgggac ccagacctac atctgcaacg tgaatcaca  
 2651 gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tggtagaggg ccagcacagg  
 2701 gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca  
 2751 tccccggtat gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc  
 2801 tcttcacccg gagcctctgc ccgccccact catgctcagg gagagggtct  
 2851 tctggctttt tcccaggctc tgggcaggca caggctaggt gcccctaacc  
 2901 caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc  
 2951 catatccggg aggaccctgc cctgaccta agcccacccc aaaggcaca  
 3001 ctctccaact cctcagctcg gacaccttct ctctcccag attccagtaa  
 3051 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca  
 3101 tgcccaccgt gccaggtaa gccagccag gctcgcct ccagctcaag  
 3151 gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gcccagccg  
 3201 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg  
 3251 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga  
 3301 tctcccgac cctgaggte acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa  
 3351 gacctgagg tcaagttaa ctggtagctg gacggcgtgg aggtgcataa  
 3401 tgccaagaca aagccgcggg agggagcagta caacagcacg taccgtgtgg  
 3451 tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac  
 3501 aagtgcagg tctccaacaa agecctccca gcccctatcg agaaaaccat  
 3551 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga  
 3601 ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc  
 3651 tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat  
 3701 cccgggatga getgaccaag aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa  
 3751 ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca atgggcagcc  
 3801 ggagaacaac tacaagaca cgcctccgt gctggactcc gacggctct  
 3851 tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg  
 3901 aacgtctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactaac  
 3951 gcagaagagc ctctccctgt cccggggcaa atga (서열 번호 : 23)

[0047]

[0048]

서열 번호: 23과 같은 상기에서 나타낸 "대안적(alternative)" 단백질 서열은 그러나 인트론 추가와 같은 약간 상이한 계통 구조 및 약간 상이한 "선도 서열"/"신호 서열"에 첫번째 대안으로서 동일한 암호화 서열을 포함한다. 상기 "선도 서열"은 또한 상기에서 나타낸 것과 같이 (추가) 인트론(들)을 포함할 수도 있다. 당업에 통상의 지식을 가진 자들은 종래의 방법으로 상응하는 엑손/인트론 구조를 여기서 나타낸 서열에서 용이하게 추론할 수 있다.

[0049]

여기서 기재하는 대표적인 항체는 또한 경쇄를 포함할 수도 있으며, 상기 경쇄는 하기 아미노산 서열을 가지거나 또는 포함할 수 있다:

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP  
 ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTL  
 TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 : 8)

[0050]

[0051]

상기 서열은 하기 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다:

gatatcgtgctgaccagagcccgccgacccctgagccgtgctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagccagagcgtga  
 gcagcagctatctggcgtggtaccagcagaacaacaggtcaagcaccgcgtctattaattatggcgcgagcagccgtgcaactggggctc  
 cggcgcggttttagcggctctggtaccggcagcggtatttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgcgactattattgccttca  
 gattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaaattaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccgccatctga  
 tgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaagtacagtgaagggtggataacg  
 cctccaatcgggtaactcccagagagtgatcacagagcagagacgaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag  
 caaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcaggcgctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacaggg  
 gagagtgttag (서열 번호 : 7)

[0052]

[0053]

또한 여기서 기재하는 대표적인 항체의 "경쇄"는 기술적 제조에 특히 유용한 "선도 서열"을 포함할 수 있다.

상응하는 서열은 하기 서열일 수 있다(또는 벡터 시스템에 포함될 수도 있음):

```
atgggtgtgcagaccagggtcttcattctctgtgtgctctggatctctggctacggg
gatatcgtgctgaccagagcccggcgacctgagcctgtctccggcgaaactgctgaccctgagctgcagagcgagccagagcgtga
gcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaccagggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagccgtgcaactgggggtcc
cggcgcggttttagcggctctggatccggcacggatfttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgcgacitatttgccttca
gattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgtgaaattaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcattctccgccatctga
tgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaggtggataacg
ccctccaatcgggtaactcccagagaggtgtcagagcagcagcagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgag
caaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggcgctgagctcggcgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgttag (서열 번호 : 27)
```

상기 서열은 하기 아미노산 서열로 암호화된다:

```
MVLQTQVFISLLWISGAYG
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTL
TLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열 번호 : 28)
```

대안적으로 상기 경계는 또한 하기 서열에 의해 예시되는 것과 같이 재조합 제조에 적합하도록 최적화된 핵산 서열에 의해 암호화될 수도 있다:

```
1 atggacatga gggctcctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt
51 cccaggtaag gatggagaac actagcagtt tactcagccc aggggtgctca
101 gtactgtcttt actattcagg gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt
151 ggacatttgt ttttatgttt ccaatctcag gcgccagatg t
```

(이후에)

```
gatatcgtg
201 ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac
251 cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt
301 accagcagaa acctggccag gcgccaggc tctcatcta tggcgcatcc
351 agcagggcca ctggcgtgcc agccagggtc agtggcagtg ggtctgggac
401 agacttcact ctcaccatca gcagcctgga gcctgaagat ttcgcgacct
451 attactgtct gcagatttac aacatgccta tcacgttcgg ccaagggacc
501 aaggtggaaa tcaaactgta gtagaattta aacttttgcg ccgcctagac
551 gtttaagtgg gagatttggg ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata
601 gaaaagggct gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac
651 tttgaagata aactgaatga cccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga
701 ggggcctgga gctctgagaa gagaaggaga ctcacccgtg ttgagtttcc
751 acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa gtgggatagc agagttgagt
801 gagccgtagg ctgagttctc tcttttgtct cctaagtttt tatgactaca
851 aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgttt gaaagtatga
901 ctgcttgcca ttagataacc atgtcttgct gaatgatcag aagagggtgtg
951 actcttattc taaaatttgt cacaataatgt caaaatgaga gactctgtag
1001 gaacgagtc ttgacagaca gctcaagggg tttttttcct ttgtctcatt
1051 tctacatgaa agtaatttg aaatgatctt ttttattata agagtagaaa
1101 tacagttggg tttgaactat atgttttaat ggccacgggt ttgtaagaca
1151 tttggtcctt tgttttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc
1201 agcaatggac tgaaacggtc cgcaacctct tctttacaac tgggtgacct
1251 cgcggctgtg ccagccattt ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg
1301 aacccccgcg gtagcatccc ttgctccgcg tggaccactt tcctgaggca
1351 cagtgtatag aacagagcca ctaatctgaa gagaacagag atgtgacaga
1401 ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaaagg gtgacttatt ggagatttca
1451 gaaataaaat gcatttatta ttatattccc ttattttaat tttctattag
```



```

1501 ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaaagctt
1551 aatgtatata atcttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcattg
1601 taaatatctt ttgactgaac tctcactaaa ctctctataa ttatatgtca
1651 tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt gacatgacct taactggtta
1701 ggtaggatat ttttcttcat gcaaaaatat gactaataat aatttagcac
1751 aaaaatatct cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca
1801 gctactataa tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgtttg
1851 acccttcctt agccaaagcg aactatttaa ggacccttta aaactcttga
1901 aactacttta gagtcattaa gttatttaac cacttttaat tactttaaaa
1951 tgatgtcaat tcccttttaa ctattaattt attttaaggg gggaaaggct
2001 gctcataatt ctattgtttt tcttggtaaa gaactctcag ttttcgtttt
2051 tactacctct gtcaccaag agttggcatc tcaacagagg ggaacttccg
2101 agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc
2151 tcccaggcag gtggccaga ttacagttga cctgttctgg tgtggctaaa
2201 aattgtccca tgtggttaca aaccattaga ccagggtctg atgaattgct
2251 cagaatatct ctggacaccc aaatacacac cctggcttaa ggcctgtcc
2301 atacagtagg tttagcttgg ctacacacaa ggaagccata cagaggctaa
2351 tatcagagta ttcttgaag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc
2401 tcttacctta tgtgcttgtg ttcagactcc caaacatcag gagtgtcaga
2451 taaactggtc tgaatctctg tctgaagcat ggaactgaaa agaattaggt
2501 ttcagggaag aaaggcaata gaaggagcc tgagaatacg gatcaattct
2551 aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga
2601 gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa gccctcagaa tggctgcaaa
2651 gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta
2701 ggaagaaact caaaacatca agatttttaa tacgcttctt ggtctccttg
2751 ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc
2801 cctgtgatta tccgcaaaac acacacccaa gggcagaact ttgttactta
2851 aacaccatcc tgtttgcttc tttctcagg aactgtggct gcaccatctg
2901 tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct
2951 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg
3001 gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag
3051 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
3101 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca
3151 tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt
3201 ag (서열 번호: 24)

```

[0059]

[0060]

대표적인 경우에 있어서 상기 "서열"은 또한 약간 상이한 게놈 구조를 가질 수도 있다. 이러한 "대안적인 서열"은 상이하거나 및/또는 추가의 인트론을 포함한다. 따라서 "중쇄"에 있어서 기재한 실시양태는 여기서 필요한 변경을 가할 수 있다.

[0061]

본 발명의 전후 관계에서 "항체 분자"라는 용어는 완전한 면역글로불린 분자, 예를 들면 IgMs, IgDs, IgEs, IgAs 또는 IgGs, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG2b, IgG3 또는 IgG4 뿐만 아니라 상기 면역글로불린 분자의 일부, 예컨대 Fab-단편, Fab'-단편, F(ab)2-단편, 키메라 F(ab)2 또는 키메라 Fab' 단편, 키메라 Fab-단편 또는 분리된 V<sub>H</sub>- 또는 CDR-부위(상기 분리된 V<sub>H</sub>- 또는 CDR-부위는 예를 들면 상응하는 "프레임워크(들)"에 설계되거나 또는 통합되어 있음)를 말한다. 또한 "항체 분자"에 포함된 것은 예를 들면 WO 00/24782에 기재된 펩티바디(petibody)와 같은 1개 이상의 항원 결합 부분/펩티드에 부착된 매체(vehicle)로서 항체 Fc 도메인을 포함하는 디아바디(diabody) 또는 분자이다. 따라서 본 발명의 전후 관계에서 "중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위"라는 용어는 완전한 면역글로불린의 가변 부위에 제한할 뿐만 아니라 가변 부위의 상응하는 "프레임워크" 또는 CDR1, 2 및/또는 3의 결합 또는 단독으로 CDR들과 같은 중쇄(V<sub>H</sub>)의 상기 가변 부위의 상응하는 일부를 나타낸다. 따라서 본 발명의 항체 분자는 또한 글리코실화 중쇄(V<sub>H</sub>)의 주어진 가변 부위의 1개 이상의 CDR 또는 CDR들을 항원 결합 자리로서 포함하는 항체 구조체일 수도 있다. 본 발명의 항체 구조체에서 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위의 상기 상응하는 부분은 여기서 규정하는 것과 같이 글리코실화되며, 예를 들면 항원 결합 자리에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함한다. 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위의 이러한 "분리된 부분"의 예로는 서열 번호: 12(또는 서열 번호: 11에서 나타내는 핵산 서열에 의해 암호화됨)에 포함되는 여기의 대표적인 CDR2 부위이다.

[0062]

추가로 "항체 분자"라는 용어는 키메라, 인간화 또는 완전한 인간화 항체와 같은 변형 및/또는 대안의 항체 분

자를 나타낸다.

- [0063] 상기 "완전한 인간화 항체(fully humanized antibody)"라는 용어는 "완벽한 인간(completely human)" 항체라고 특징화 및 기재할 수 있다. 이러한 모든 항체는 당업에 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들면 파아지 발현 기술에 의한 재조합 항체 분자는 Knappik(2000) J Mol Biol. 296(1), 57-86 및 Rauchenberger(2003) J Biol Chem. 278(40), 38194-205에 기재된 서브클래스-1 프레임워크(IgG1)인 완전한 인간 면역글로불린  $\gamma$ 를 사용하는 실험실내 변형을 사용하여 발생시킬 수 있다.
- [0064] 첨부한 실시예에서 설명하고 있는 것과 같이 항체라는 용어는 예를 들면 IgG 분자 및 IgG1을 나타낸다. 또한 상기 용어는 변형 또는 대안 단클론 또는 다클론 항체뿐만 아니라 재조합 또는 합성으로 발생/합성된 항체를 나타낸다. 또한 상기 용어는 온전한 항체뿐만 아니라 항체 단편/이의 일부, 예컨대 분리된 경쇄 및 중쇄, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')<sub>2</sub>를 나타낸다. "항체 분자"라는 용어는 또한 항체 유도체, 2작용성 항체 및 항체 구조체, 예컨대 단일 사슬 Fvs(scFv) 또는 항체-퓨전 단백질을 포함할 수도 있다. 또한 예를 들면 여기서 규정하는 것과 같은 글리코실화 V<sub>H</sub>-CDR인 글리코실화 V<sub>H</sub> 도메인을 포함하는 촉매 및/또는 단백질 항체를 포함한다. "항체 분자"라는 용어는 또한 (예를 들면 A $\beta$ /A $\beta$ 에 대한) 하나의 특이성이외에 또 다른 또는 추가의 특이성을 포함할 수 있는 재조합 제조 항체 분자/항체 구조체를 나타낸다. 이러한 구조체를 포함할 수 있지만 "2-특이성(bi-specific)" 또는 "3-특이성(tri-specific)" 구조체에 제한하지는 않는다. 본 발명의 "항체 분자"라는 용어의 추가의 상세한 설명은 하기에 나타낸다.
- [0065] 상기에서 지정한 것과 같이 단일-사슬 항체, 키메라 항체, CDR-그래프트화 항체, 이가 항체-구조체, 항체-퓨전 단백질, 가교-클론화 항체 또는 합성 항체(여기서 규정하는 중쇄의 1개 이상의 가변 부위에 1개 이상의 항원 결합 자리에 여기서 규정한 글리코실화를 포함하고, 글리코실화됨)를 포함한다고 추정할 수 있다. 예를 들어 단일-사슬 항체를 제조하는 경우 여기서 규정하는 "중쇄의 가변 부위"는 원래 중쇄에 제한하지는 않으며, 또한 완전한 항체, 예를 들면 완전한 면역글로불린 예컨대 IgG의 중쇄에서 유도된 상응하는 부분에 관한 것을 의미한다. 이러한 부분은 이들의 상응하는 프레임워크의 일부 또는 하나에 상응하는 CDR들일 수 있다. 추가로 면역글로불린 유전자의 유전자 변이주(genetic variant)도 또한 본 발명의 내용에 포함되는 것으로 추정된다. 예를 들어 면역글로불린 중쇄 G 서브클래스 1(IgG1)의 유전자 변이주는 CH1 도메인의 G1m(17) 또는 G1m(3) 알로타입 마커(allotypic marker), 또는 CH3 도메인의 G1m(1) 또는 G1m(비-1) 알로타입 마커를 포함할 수 있다. 여기서 Gm(17)(z) 및 Gm(1)(a) 알로타입의 IgG1을 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 항체 분자는 또한 변형 또는 돌연변이 항체, 예컨대 Fc-수용체 결합 또는 상보적 활성이 강화되거나 또는 약화된 돌연변이 IgG를 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서 본 발명에 따라 제공되는 항체는 완전한-인간화 항체 또는 "완전한 인간" 항체이다.
- [0066] 따라서 본 발명의 항체는 또한 가교-클론화 항체, 즉 여기서 규정하는 1개 이상의 부모 항체(parental antibody)(들) 또는 친화성-최적화 항체(affinity-optimized antibody)(들)에서 상이한 항체 부위(예를 들면 CDR-부위들)를 포함하는 항체를 포함할 수도 있다. 상기 가교-클론화 항체는 몇가지의 상이한 프레임워크, 예를 들면 IgG-프레임워크, 예를 들어 (인간) IgG1-, IgG2a 또는 IgG2b-프레임워크의 항체일 수 있다. 예를 들면 상기 항체 프레임워크는 포유류, 예를 들어 인간 프레임워크이다. 경쇄 및 중쇄상의 도메인은 동일한 일반적 구조를 가지며, 각 도메인은 상보성 결정 부위(CDR1-3)로 공지되어 있는 3개의 극가변 도메인에 의해 결합된 비교적 보존이 잘 된 서열인 4개의 프레임워크 부위를 포함한다.
- [0067] 여기서 사용하는 것과 같이, "인간 프레임워크 부위(human framework region)"는 인간 면역글로불린을 자연적으로 발생시키는 프레임워크 부위와 실제로 동일한(약 85 % 이상, 통상적으로는 90-95 % 이상) 프레임워크 부위를 나타낸다. 항체의 프레임워크 부위(예를 들면 경쇄 및 중쇄를 구성하는 결합된 프레임워크 부위)는 위치를 제공하며, CDR들과 결합한다. 상기 CDR들은 우선 항원 에피토프와 결합해야 한다. 여기서 기재한 가교-클론화 항체는 바람직한 (인간) 항체 프레임워크에 존재할뿐만 아니라, 또한 여기서 기재한 항체로부터 CDR들을 포함하는 항체 분자는 면역글로불린 프레임워크에 도입될 수 있다는 것을 알아야 한다. 프레임워크에 있어서의 예로는 IgG1, IgG2a 및 IgG2b를 포함한다. 인간 프레임워크 및 인간 IgG1 프레임워크, 예컨대 특허 서열 번호: 6에서 나타난 항체의 중쇄와 같은 인간 프레임워크 및 인간 IgG1 프레임워크가 가장 바람직하다.
- [0068] 하나의 실시양태에서 항체 이성질체는 하기 아미노산을 포함하는 CDR1을 가변성 중쇄 부위에 포함할 수 있다:
- [0069] GFTFSSYAMS(서열 번호: 10)
- [0070] 상기 CDR1은 하기 핵산 서열에 의해 암호화할 수 있다:



- [0071] ggatttaccttttagcagctatgcgatgagc(서열 번호: 9)
- [0072] 항체 이성질체는 중쇄의 가변 부위에 하기 **CDR2**를 포함할 수 있다:
- [0073] AINASGTRTYADSVKG(서열 번호: 12)
- [0074] (N: 완전한 중쇄의 Asn-52에 N-연결형 글리코실화 자리)
- [0075] 상기 **CDR2**는 하기 핵산 서열에 의해 암호화할 수 있다:
- [0076] gctattaatgcttctggtactcgtacttattatgctgattctgttaagggt(서열 번호: 11)
- [0077] 본 발명에 따른 N-글리코실화는 예를 들면 상기 CDR2 부위에 포함되며, 중쇄의 가변 부위의 상응하는 Asn52에 위치하고, 상기 가변 부위(V<sub>H</sub>)는 서열 번호: 1에서 나타낸 것과 같은 핵산 분자에 의해서 암호화되며, 서열 번호: 2에서 나타낸 것과 같은 아미노산 서열을 가진다.
- [0078] 또한 항체 이성질체는 이들의 가변 중쇄 부위에 하기 아미노산 서열을 포함하는 **CDR3**를 포함할 수 있다:
- [0079] GKGNTHKPYGYVRYFDV(서열 번호: 14)
- [0080] 상기 **CDR3**는 하기 핵산 서열에 의해 암호화할 수 있다:
- [0081] ggtaagggttaactcataagccttatggttatgttcgttattttgatgtt(서열 번호: 13)
- [0082] 항체 이성질체는 하기 CDR들이 특징일 수 있는 경쇄(L)를 포함할 수 있다:
- [0083] **CDR1**: RASQSVSSSYLA(서열 번호: 16)
- [0084] agagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcg(서열 번호: 15)
- [0085] **CDR2**: GASSRAT(서열 번호: 18)
- [0086] ggcgcgagcagccgtgcaact(서열 번호: 17)
- [0087] **CDR3**: LQIYNMPI(서열 번호: 20)
- [0088] cttcagatttataatatgcctatt(서열 번호: 19)
- [0089] 항체 이성질체는 비-가변 Fc-부분에 Asn 306에 잘 보존된 글리코실화 자리[카배트-시스템에서의 "Asn297"에 상응함(Kabat(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> ed., Bethesda, Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine)]와 같은 항체의 중쇄의 아미노산 서열에 추가의 잠재적 글리코실화 자리(Asn-X-Ser/Thr 모티브를 포함하는 것으로 당업에 공지되어 있음)를 포함할 수 있으며, 상기 중쇄는 서열 번호: 6(서열 번호: 5에 의해 암호화된 것과 같음)인 상기에서 제공한 서열이거나 또는 이러한 서열을 포함할 수 있다.
- [0090] 본 발명의 하나의 실시양태에서 항체 이성질체는 1개 이상의 항원 결합 자리가 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하는 것이 특징이며, 상기 V<sub>H</sub>는 하기 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)에 의해 암호화된다:
- [0091] (a) 서열 번호: 1에서 나타낸 것과 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열;
- CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGCGCGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGC  
AGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATG  
CGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGA  
GCGCTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCTGTAAAG  
GGTCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGC  
AAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC  
GTGGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGAT  
GTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA (서열 번호: 1);
- [0092]

[0093] (b) 서열 번호: 2에서 나타난 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자;

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA  
SGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP  
YGYVRYFDVWGQGLTVTVSS (서열 번호: 2; 여기서 나타내는 굵은 "N"은  
중쇄의 가변 부위의 52 위치 상의 Asn임)

[0094]

[0095] (c) (a) 또는 (b)의 핵산 분자에 하이브리드화되며, 하기 아미노산 서열에서 나타내는 것과 같은  $\beta$ -A4 펩티드 /A $\beta$ 4, 또는 15개 이상의 아미노산을 포함하는 이의 단편에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자;

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA  
(서열 번호: 3)

[0096]

[0097] (d) (a) 또는 (b)의 핵산 분자에 하이브리드화되며, 하기 아미노산 서열에서 나타내는 것과 같은  $\beta$ -A4 펩티드 /A $\beta$ 4 상의 2개 이상의 부위, 또는 15개 이상의 아미노산을 포함하는 서열 번호: 3의 단편의 2개 이상의 부위에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자(상기  $\beta$ -A4 펩티드 A $\beta$ 4 상의 2개 부위 또는 상기 이의 단편은 서열 번호 3의 18 내지 26 위치 및 3 내지 6 위치 상의 아미노산을 포함함); 또는

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA  
(서열 번호: 3)

[0098]

[0099] (e) (a) 내지 (d) 중 임의의 하나에서 규정하는 것과 같은 핵산 서열로 퇴화된 핵산 서열.

[0100] 당업에 통상의 지식을 가진 자들은 여기서 사용하는 "(a) 또는 (b)의 핵산 분자에 하이브리드화되며,  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4 상의 2개 이상의 부위에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자"라는 문장은 이중 가닥 핵산 분자의 암호화 가닥을 나타내며, 비-암호화 가닥은 (a) 및 (b)의 상기에서 규정하는 핵산 분자에 하이브리드된다는 것을 알고 있다.

[0101] 상기에서 지정한 것과 같이 여기서 규정하는 Asn-글리코실화를 포함하는 정제된 항체 분자는 특히 글리코실화 Asn을 포함하는 가변 부위가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄에 포함되는 항체 분자로서 기재되어 있으며, 이것이 특징이다:

[0102] (a) 서열 번호: 5, 23 또는 25에 나타난 것과 같은 핵산 분자에 의해 암호화되는 중쇄 폴리펩티드;

[0103] (b) 서열 번호: 6 또는 26에 나타난 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 중쇄 폴리펩티드;

[0104] (c) (a)의 핵산 분자에 하이브리드화되며, 하기 아미노산 서열에서 나타내는 것과 같은  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4 또는 15개 이상의 아미노산을 포함하는 이의 단편에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩티드; 또는

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA  
(서열 번호: 3)

[0105]

[0106] (d) (a)의 핵산 분자에 하이브리드화되며, 하기 아미노산 서열에서 나타내는 것과 같은  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4 상의 2개 이상의 부위, 또는 15개 이상의 아미노산을 포함하는 서열 번호 3의 단편 중 2개 이상의 부위에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자에 의해 암호화되는 중쇄 폴리펩티드(상기  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4 상의 2개 부위 또는 상기 이의 단편은 3 내지 6 위치 및 18 내지 26 위치 상의 아미노산을 포함함).

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA  
(서열 번호: 3)

[0107]

[0108] 상기에서 명시한 항체(예를 들면 본 발명의 대표적인 항체)는 또한 하기 아미노산 서열을 갖는 L-사슬을 포함할 수도 있으며:

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP  
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL  
TLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 22)

[0109]

[0110] 또는 하기 핵산 서열에 의해 암호화하는 L-사슬을 포함할 수도 있다:

```
gatatcgtgctgaccagagccggcgaccctgagcctgctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagccagagcgtga
gcagcagctatctggcgtgtaccagcagaaccaggctcaagcaccgcgtctattaattatggcgagcagccgtgcaactgggtcc
cggcgcgcttttagcgctctggatccggcagcggattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgcgactattatgcctca
gatttataatgcctattacctttggcagggtacgaaagtgaaattaacgtacgggtggctgcaccatctgtctcattctccgccatctga
tgagcagttgaaatcgggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataactctctccagagaggccaagtacagtggaaggtggataacg
ccctccaatcgggtaactccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
caaagcagactacgagaacacaaagctacgctgcgaagtcacccatcaggcgctgagctgcccgtcacaaagagctcaacagggg
gagagtggttag (서열 번호 : 21)
```

[0111]

[0112] 상기에서 지정한 것과 같이 중쇄에 여기서 규정하는 Asn-글리코실화를 포함하는 정제된 항체 분자는 추가로 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄를 포함할 수도 있다:

[0113] (a) 서열 번호: 7, 21, 24 또는 27에 나타난 것과 같은 핵산 분자에 의해 암호화하는 경쇄 폴리펩티드;

[0114] (b) 서열 번호: 8, 22 또는 28에 나타난 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 경쇄 폴리펩티드;

[0115] (c) (a)의 핵산 분자에 하이브리드화되며, 하기 아미노산 서열에서 나타내는 것과 같은  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4 또는 15개 이상의 아미노산을 포함하는 이의 단편에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자에 의해 암호화되는 경쇄 폴리펩티드; 또는

**DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA**

[0116] (서열 번호 : 3)

[0117] (d) (a)의 핵산 분자에 하이브리드화되며, 하기 아미노산 서열에서 나타내는 것과 같은  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4 상의 2개 이상의 부위, 또는 15개 이상의 아미노산을 포함하는 서열 번호 3의 단편 중 2개 이상의 부위에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자에 의해 암호화되는 경쇄 폴리펩티드.

**DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA**

[0118] (서열 번호 : 3)

[0119] 핵산 분자/DNA 서열에 관해 여기서 사용하는 "하이브리드화(hybridization)" 또는 "하이브리드화하다(hybridizes)"라는 용어는 강제적 또는 비-강제적 조건하에서의 하이브리드화를 나타낼 수 있다. 추가로 규정하지 않는다면 이러한 조건은 비-강제적인 것이 바람직하다. 상기 하이브리드화 조건은 예를 들어 Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.(2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates 및 Wiley Interscience, N.Y.(1989) 또는 Higgins 및 Hames(Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC,(1985)에 기재된 종래의 방법에 따라서 정할 수 있다. 조건의 설정은 장인의 기술 범위 내가 좋으며, 당업에 기재된 방법에 따라 결정할 수 있다. 따라서 단지 특이적인 하이브리드화 서열의 검출은 강제적인 하이브리드화가 통상적으로 필요할 것이며, 65 °C에서 0.1×SSC, 0.1 % SDS와 같은 세척 조건이 요구된다. 상동 또는 확실하게 상보적이지 않은 서열의 검출에 있어서의 비-강제적 하이브리드화 조건은 65 °C에서 6×SSC, 0.1 % SDS로 설정할 수 있다. 잘 공지되어 있는 것과 같이 결정해야 할 핵산의 조성물 및 프로브의 길이는 하이브리드화 조건의 추가 파라미터를 구성한다. 상기 조건의 다양성은 하이브리드화 실험에서 배경을 막기 위해 사용하는 대안적인 블로킹 시약을 대체하기 위한 대체물 및/또는 함유물을 통해서 성립시킬 수 있다는 것을 알아야 한다. 통상적인 블로킹 시약은 덴하르트 시약(Denhardt's reagent), BLOTTO, 해파린, 변성 살몬 스펜(salmon sperm) DNA 및 시판품인 특허 제제를 포함한다. 특이적인 블로킹 시약의 함유물은 융화성의 문제로 상기에서 기재된 하이브리드화 조건의 변형이 요구될 수 있다. 하이브리드화 핵산 분자는 또한 상기에서 기재된 분자의 단편을 포함한다. 이러한 단편은 여기서 규정하는 CDR, 또는 이의 비-관능성 단편 또는 비-관능성 항체 분자를 암호화하며, 12개 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 15개 이상, 보다 바람직하게는 18개 이상, 보다 바람직하게는 21개 이상의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 30개 이상의 뉴클레오티드, 보다 더 바람직하게는 40개 이상의 뉴클레오티드, 가장 바람직하게는 60개 이상의 뉴클레오티드 길이를 갖는 핵산 서열을 나타낼 수 있다. 또한 상기에서 언급한 핵산 분자 중 임의의 것과 하이브리드화하는 핵산 분자는 상기 분자의 상보적인 단편, 유도체 및 대립형질 변이주(allelic variant)를 포함한다. 또한 하이브리드화 복합체는 상보적인 G 및 C 염기사이 및 상보적인 A 및 T 염기사이의 수소 결합 형성에 의한 2개의 핵산 분자 서열 사이의 복합체를 나타낸다; 상기 수소 결합은 추가로 염기 스택킹 상호작용(base stacking interaction)에 의해서 안정화될 수

있다. 2개의 상보적인 핵산 서열 수소는 비평행 구조로 결합한다. 하이브리드화 복합체는 용액(예를 들면 Cot 또는 Rot 분석), 또는 용액내에 존재하는 1개의 핵산 서열 사이 및 고형 지지체(예를 들면 세포가 고정된 막, 필터, 칩, 핀 또는 유리 슬라이드) 상에 고정된 또 다른 핵산 서열에서 형성될 수 있다. 상보성 또는 상보적 상태라는 용어는 염기-짝짓기에 의한 온도 조건 및 복제 허용 염(permissive salt)하에서의 폴리뉴클레오티드의 자연적인 결합을 나타낸다. 예를 들어 "A-G-T" 서열은 상보적인 서열인 "T-C-A"와 결합한다. 2개의 단일-가닥 분자 사이의 상보적 상태는 단지 몇몇 핵산만이 결합하는 "부분적"일 수 있거나, 또는 총 상보적 상태가 단일-가닥 분자 사이에 존재하는 경우 완성될 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보적 상태 정도는 핵산 가닥 사이의 하이브리드화의 효율성과 강도에 크게 영향을 미친다. 특히 핵산 가닥 사이의 결합에 따라 달라지는 증폭 반응에서 중요하다.

[0120] "하이브리드화 서열"이라는 용어는 항체 분자를 암호화하는 상기에서 규정한 핵산 서열과의 동일성이 40 % 이상, 바람직하게는 50 % 이상, 보다 바람직하게는 60 % 이상, 보다 더 바람직하게는 70 % 이상, 특히 바람직하게는 80 % 이상, 보다 특히 바람직하게는 90 % 이상, 보다 더 특히 바람직하게는 95 % 이상, 가장 바람직하게는 97 % 이상인 서열 동일성을 나타내는 서열인 것이 바람직하다. 또한 "하이브리드화 서열"이라는 용어는 여기 상기에서 기재하는 항체 분자의 아미노산 서열과의 동일성이 40 % 이상, 바람직하게는 50 % 이상, 보다 바람직하게는 60 % 이상, 보다 더 바람직하게는 70 % 이상, 특히 바람직하게는 80 % 이상, 보다 특히 바람직하게는 90 % 이상, 보다 더 바람직하게는 95 % 이상, 가장 바람직하게는 97 % 이상의 서열 동일성을 갖는 항체 분자를 암호화하는 서열을 나타내는 것이 바람직하다.

[0121] 본 발명에 따르면 2개 이상의 핵산 또는 아미노산 서열에 관해서 "동일한(identical)" 또는 "동일성 퍼센트(percent identity)"라는 용어는 메뉴얼 방식 또는 시각 검사에 의해서, 또는 종래문헌에 공지된 서열 비교 알고리즘을 사용해서 측정된 지정된 부위 상에서 또는 비교가능한 것의 최대 일치에 있어서의 비교 및 결합하는 경우 동일하거나, 또는 동일한(예를 들면 60 % 또는 65 %의 동일성, 바람직하게는 70-95 % 동일성, 보다 바람직하게는 95 % 이상의 동일성) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 특이적 퍼센트를 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열(subsequence)을 나타낸다. 예를 들면 60 % 내지 95 % 이상의 서열 동일성을 갖는 서열은 실제로 동일하다고 간주한다. 이러한 규정은 또한 테스트 서열의 보체에도 적용된다. 바람직하게 기재된 동일성은 약 15 이상 내지 25 아미노산 또는 뉴클레오티드의 길이 부위, 보다 바람직하게는 약 50 내지 100 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이 부위에 걸쳐 존재한다. 당업에 기술을 가진 자들은 예를 들어 당업에 공지된 FASTDB(Brutlag Comp. App. Biosci. 6(1990), 237-245) 또는 CLUSTALW 컴퓨터 프로그램(Thompson Nucl. Acids Res. 2(1994), 4673-4680)을 기초로한 알고리즘과 같은 것을 사용하여 서열 사이/서열 중의 동일성 퍼센트를 결정하는 방법을 알고 있을 것이다.

[0122] FASTDB 알고리즘은 이의 계산상의 갭(gap)인 서열의 첨가 또는 내부 비-매칭 삭제 부분을 고려하지 않는 것이 통상적이지만, % 동일성의 과평가를 피하기 위한 올바른 메뉴얼일 수 있다. 그러나 CLUSTALW는 이의 동일성 계산에 서열 갭을 고려한다. 또한 당업에 기술을 가진 자들이 이용가능한 것은 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있다(Altschul, Nucl. Acids Res. 25(1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36(1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215(1990), 403-410). 핵산 서열을 위한 BLASTN 프로그램은 워드 길이(W) 11, 기대값(E) 10, M=5, N=4 및 두개 가닥의 비교값을 디폴트로서 사용한다. 아미노산 서열에 있어서 BLASTP 프로그램은 워드길이(W) 3 및 기대값(E) 10을 디폴트로서 사용한다. BLOSUM62 스코어링 매트릭스(Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989), 10915)는 정렬성(B) 50, 기대값(E) 10, M=5, N=4 및 두개 가닥의 비교값을 사용한다.

[0123] 또한 본 발명은 상기에서 기재한 하이브리드화 분자의 서열과 비교해서 퇴화된 서열의 핵산 분자를 나타낸다. 본 발명에 따라 사용하는 경우 "유전자 코드의 결과로서 퇴화(being degenerate as a result of the genetic code)"라는 문장의 의미는 유전자 코드의 과잉으로 동일한 아미노산의 뉴클레오티드 서열 코드가 상이하다는 것을 의미한다.

[0124] 주어진 항체 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 잔기가 예를 들면 서열 번호: 1, 5, 23 및 25 중 어떤 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열의 특정 위치에 상응하는지의 여부를 결정하기 위해서 당업에 통상의 지식을 가진 자들은 예를 들면 "하이브리드화" 용어의 정의 및 상동 정도와 연계해서 상기에서 언급하고 하기에 추가로 언급한 컴퓨터 프로그램을 사용하거나 또는 메뉴얼에 의해 예를 들면 정렬도(alignment)인 당업에 잘 공지된 수단과 방법을 사용할 수 있다.

[0125] 예를 들면 Basic Local Alignment Search Tool BLAST(Altschul(1997), loc. cit.; Altschul(1993), loc.



cit.; Altschul(1990), loc. cit.)를 나타내는 BLAST 2.0은 로컬 서열 정렬도를 확인하기 위해 사용할 수 있다. 상기에서 언급한 BLAST는 서열 유사성을 결정하기 위해서 뉴클레오타이드와 아미노산 서열 둘 다의 정렬도를 제시한다. 정렬도의 로컬 특성때문에 BLAST는 정확하게 매칭하는지를 결정하거나 또는 유사한 서열을 규명하기에 특히 유용하다. BLAST 알고리즘 출력의 기본 단위는 고점 단편 쌍(High-scoring Segment Pair, HSP)이다. HSP는 임의의 2개의 서열 단편으로 구성되지만, 정렬도의 점수가 사용자가 설정한 분할 스코어 또는 한계 스코어이거나 또는 초과하고, 정렬도가 국소적으로 최대인 것과 동일한 길이다. BLAST 접근법은 의문의 서열과 데이터베이스 서열 사이의 HSP들을 찾아서 임의의 발견된 매칭의 통계적인 의미를 평가하고 사용자가 선택한 의미의 한계를 만족시키는 매칭을 보고하기 위한 것이다. 파라미터 E는 데이터베이스 서열 매칭을 보고하기 위한 통계적인 의미의 한계를 수립한다. E는 전체 데이터베이스 연구의 내용에서 HSP(또는 HSP들의 세트)의 기회 발생의 기대되는 반복의 상한 경계로서 해석한다. E를 만족하는 매칭의 데이터베이스 서열을 프로그램 출력으로 기록한다.

[0126] BLAST(Altschul(1997), loc. cit.; Altschul(1993), loc. cit.; Altschul(1990), loc. cit.)를 사용한 아날로그 컴퓨터 기술을 GenBank 또는 EMBL과 같은 뉴클레오타이드 데이터베이스와 동일하거나 또는 관계된 분자를 찾는 데 사용한다. 이러한 분석은 다층 막 기본 하이브리드화보다 매우 신속하다. 또한 컴퓨터 관독의 민감성도 변형시켜 어떠한 특정 매치가 완전하거나 또는 유사한 범주인지의 여부를 확인할 수 있다. 상기 관독의 원칙은 하기 수학적식으로 규정한 제품 스코어이며, 이것은 서열 매치의 길이와 2개 서열 사이의 동일성 정도 둘 다를 고려한다:

### 수학적식 1

$$\frac{\%서열동일성 \times \%최대BLAST점수}{100}$$

[0127]

[0128] 예를 들면 제품 스코어 40인 매치는 1-2 % 오차내에서 정확할 것이며; 및 70인 매치는 정확할 것이다. 유사한 분자는 낮은 스코어가 관련 분자와 동일할 수 있다고 해도 15 내지 40 사이의 제품 스코어를 나타내는 것을 선별함으로써 명확하게 하는 것이 통상적이다. 서열 정렬도를 발생시킬 수 있는 프로그램에 있어서의 또 다른 예로는 당업에 공지된 CLUSTALW 컴퓨터 프로그램(Thompson, Nucl. Acids Res. 2(1994), 4673-4680) 또는 FASTDB(Brutlag Comp. App. Biosci. 6(1990), 237-245)가 있다.

[0129] 하나의 실시양태에서 본 발명은 글리코실화 항체 이성질체를 제공하며,  $V_H$  부위의 Asn 상의 글리코실화는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0130] (a) 코어 푸코실화가 없는 바이안테나 복합체 타입의 당 구조;

[0131] (b) 바이안테나 하이브리드 타입의 당 구조;

[0132] (c) 바이안테나 올리고만노스 타입의 당 구조; 및

[0133] (d) 첨부 도면 5 또는 첨부 도면 27에서 제공하는 것과 같은 구조 중 임의의 바이-안테나 구조.

[0134] 본 발명의 항체/항체들의 하나의 실시양태에서 상응하는 당 구조는 코어 푸코실화를 포함하지 않는다.

[0135] 상응하는 N-글리코실화는 코어 푸코실화는 없고 80 % 까지의 안테나로 높게 시알리데이션화된 바이안테나 복합체 타입( $\geq 75\%$ ; 주로 80-90 %)의 당 구조로 주로 구성된다. 보다 작은 당 구조는 각각 바이안테나 하이브리드 및 올리고만노스 타입( $\leq 25\%$ )에 속하며, 또한 첨부 도면 5 및 27에 나타내었다. 가변 부위의 글리코실화 구조는 단백질(아미노산 폴리펩티드)로부터의 N-글리코시다아제 F에 의한 분해에 저항력이 있다.

[0136] 하나의 실시양태에서 우세한 복합체 바이안테나 당 구조는 추가로 하기와 같은 특징이 있다:

[0137] - 하나 또는 다른 안테나, 또는 두개의 안테나에 부착된 하나 또는 두개의 시알산을 함유한다. 상기 시알산은 N-아세틸 뉴라민산 타입이며, 주로 말단 베타 1,4 연결형 갈락토스에 알파 2,3 결합으로 결합되어 있다.

[0138] - 코어 푸코실화가 없다, 즉 당 사슬의 환원성 말단에 가장 깊은 부분의 N-아세틸-글루코사민에 알파 1,6 결합으로 부착된 푸코스 잔기가 없다.

- [0139] 하나의 실시양태에서 하이브리드 당 구조는 추가로 하기와 같은 특징이 있다:
- [0140] - 바이-안테나 구조의 하나의 팔로서 복합체 타입 안테나(코어 당 구조에 부착된 락토사미닐 유닛(GlcNAc-Gal))을 함유한다. 상기 팔은 말단 베타 1,4 연결형 갈락토스에 부착된 N-아세틸 뉴라민산을 주로 함유한다.
- [0141] - 다른 안테나로서 코어 당 구조에 부착된 3개까지의 추가의 만노스 서브유닛을 가진다.
- [0142] - 코어 푸코실화가 없다, 즉 당 사슬의 환원 말단에 가장 깊은 부분의 N-아세틸-글루코사민에 알파 1,6 결합으로 부착된 푸코스 잔기가 없다.
- [0143] 하나의 실시양태에서 올리고만노스 타입 당 구조는 추가로 하기와 같은 특징이 있다:
- [0144] - 통상적인 N-연결형 코어 당 구조에 존재하는 3 가지형 만노스 서브유닛을 포함하는, 완전한 당 구조에 4(Man4→GlcNAc2), 5(Man5→GlcNAc2) 또는 6(Man6→GlcNAc2) 만노스 서브유닛을 함유한다.
- [0145] - 코어 푸코실화가 없다, 즉 당 사슬의 환원 말단에 가장 깊은 부분의 N-아세틸-글루코사민에 알파 1→6 결합으로 부착된 푸코스 잔기가 없다.
- [0146] 본 발명의 또 다른 실시양태에서 조성물은 하나의 항원 결합 자리가 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하는 것이 특징인 항체 분자, 및 두개의 항원 결합 자리가 중쇄( $V_H$ )의 가변 부위에 글리코실화 아스파라긴(Asn)을 포함하는 것이 특징인 항체 분자를 포함하는 것으로 제공되며, 즉 조성물은 모노-글리코실화 항체 및 이중-글리코실화 항체를 포함하며, 이후에는 항체 조성물이라고 한다. 항체 조성물이라는 용어는 또한 여기서 규정하는 1개 이상의 글리코실화  $V_H$  부위, 또는 상기  $V_H$  부위의 1개 이상의 글리코실화 CDR을 포함하는 분자를 포함하는 조성물을 나타내며, 상기 분자는 특히 상기에서 기재한 면역글로불린 또는 면역글로불린 이성질체 및 변형체일 수 있다. 예를 들면 상기 조성물은 또한 단일 사슬 항체(scFvs) 또는 글리코실화  $V_H$ -유도 CDR 부위를 포함하는 2특이성 분자를 포함할 수도 있다.
- [0147] 본 발명의 항체 조성물의 추가의 규정은 하기에 제공된다.
- [0148] 상기 항체 조성물은 " $V_H$ 에 비-글리코실화" 항체 분자가 매우 적은 함량이거나 또는 없으며, 즉 이러한 항체는 여기서 규정하는 가변 부위, 특히 중쇄( $V_H$ )의 가변 부분에 글리코실화를 포함하지 않는 항체이다.
- [0149] 본 발명의 내용에서 특히 여기서 제공하는 항체 혼합물의 내용에서 "비-글리코실화 항체 분자가 없거나 매우 적은 함량으로 포함한다(does not or does merely to a very low extent comprise non-glycosylated antibody molecules)"이라는 문장은 항체 조성물이 여기서 규정하는 비-글리코실화 이성질체를 10 % 이하, 예를 들면 5 % 이하, 예를 들면 4 % 이하, 예를 들면 3 % 이하, 예를 들면 2 % 이하, 예를 들면 1 % 이하, 예를 들면 0.5 % 이하 포함한다는 것을 의미한다.
- [0150] 따라서 하나의 실시양태에서 본 발명은 모노-글리코실화 및/또는 이중-글리코실화 항체(상기 글리코실화는 중쇄의 가변 부위에 위치함)를 포함하며, 가변 부위에 글리코실화가 없는 항체 분자가 없도록 하는 항체 조제 방법을 제공한다.
- [0151] 또한 "가변 부위에 글리코실화가 없는 항체 분자는 피한다(devoid of antibody molecules without glycosylation in the variable region)"라는 문장은 상기에서 규정한 비-글리코실화 이성질체가 10 % 이하, 예를 들면 5 % 이하, 예를 들면 4 % 이하, 예를 들면 3 % 이하, 예를 들면 2 % 이하, 예를 들면 1 % 이하, 예를 들면 0.5 % 이하, 예를 들면 4 % 이하, 예를 들면 3 % 이하, 예를 들면 2 % 이하, 예를 들면 1 % 이하, 예를 들면 0.5 % 이하, 예를 들면 0.3 % 이하, 예를 들면 0.2 % 이하 포함하는 항체 조제/항체 혼합물/항체 풀(pool)을 나타낸다.
- [0152] 하나의 실시양태에서 본 발명은 이들의 가변 부위에 비-글리코실화가 있는, 예를 들면 중쇄의 가변 부위에 비-글리코실화가 있는 항체 이성질체가 0.5 % 이상 포함하지 않는 조성물을 제공한다.
- [0153] 상기에서 지정한 것과 같이 본 발명의 하나의 실시양태에서 모노- 및 이중-글리코실화 항체, 예를 들면 면역글로불린의 혼합물이 제공되며, 상기 혼합물은 가변 부위에 글리코실화가 없는 항체 분자가 없다. 가변 부위, 예를 들면 중쇄의 두개의 가변 부위(두개의 ( $V_H$ )-부위)에 해독후 변형이 없는 항체는 본 발명의 내용에서 중쇄의 가변 부위에 글리코실화를 포함하지 않는 "비-글리코실화 형태"라고 생각한다. 또한 이러한 "비-글리코실화 형태"는 그림에도 불구하고 항체의 불변 부위(C-부위), 통상적으로는 Fc-부분의 잘 보존된 글리코실화 자리, 특히

여기서 규정하는 비-가변/불변 Fc-부분의 아스파라긴(Asn) 306에 글리코실화(들)를 포함할 수 있다.

- [0154] 그 자체 또는 모노-글리코실화 및 이중-글리코실화 이성질체와 결합한 글리코실화 항체 이성질체는 알츠하이머병(AD), 및 기타 아밀로이드 관련 질환, 예컨대 다운 증후군, 네덜란드형 아밀로이드증이 있는 유전성 뇌출혈, 파킨슨병, ALS(근위축성 측색경화증), 크로이츠펔트 야콥병, HIV 관련 치매 및 운동 신경병증과 같은 질환의 치료를 위한 치료적 항체 제제로 매우 유용하며 이롭다. 이들 자체 또는 모노-글리코실화 및 이중-글리코실화 이성질체와 결합한 글리코실화 항체 이성질체는 또한 유일한 진단적 방법이다.
- [0155] 여기서 기재한 두개의 글리코실화 이성질체는 **생체내**에서 개선되며 매우 효과적인 뇌 침투를 나타낸다. 효과적인 뇌 침투 및 아밀로이드- $\beta$  플라크에 특이적 결합을 AD-관련 아밀로이드증에 있어서의 마우스 모델인 PS2APP 마우스에서 확인할 수 있다.
- [0156] 또한 현저하게 감소된 비특이적 점력의 실험실내 면역조직화학 염색에 의해 순수한 인간 아밀로이드- $\beta$  플라크에 있어서 개선된 특이성이 검출되었다. 인간 아밀로이드- $\beta$  플라크에 일관된 염색을 위한 최소한의 유효량은 첨부한 실시예에서 설명하고 있는 것과 같이 10 ng/ml이다.
- [0157] 첨부된 실시예에서 설명한 것과 같이 다르게 글리코실화된 항체, 예를 들면 면역글로불린의 분리 및 특징은 중쇄 가변 부위의 글리코실화가 A $\beta$  펩티드에 항원 결합, 진단값, 약학적 프로파일 및 기능 활성에 크게 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 정제된 항체 분자로 MS-분석, 가용성 A $\beta$ 에 결합 연구(Biacore) 및 에피통 맵핑(웹스팟 분석, Pepspot analysis) 결합, 응집 A $\beta$ 의 분리 및  $\beta$ -아밀로이드 플라크의 생체내 및 실험실내 결합의 현미경 분석을 실행하였다.
- [0158] 본 발명의 하나의 실시양태에서 정제된 항체 또는 항체 조성물은  $\beta$ -A4 펩티드/A $\beta$ 4를 특이적으로 인지할 수 있다.
- [0159] 따라서 여기서 기재한 것과 같이 정제된 항체 또는 항체 조성물은 특이 실시양태에서 A $\beta$ /A $\beta$ 4의 2개 부위(N-말단 부위 및 중심/중간 부분)를 특이적으로 인지할 수 있는 항체 또는 항체 조성물에 관한 것이다.
- [0160] "특이적 인지(specifically recognizing)"이라는 용어는 본 발명에 따르면 항체 분자가 여기서 규정하는  $\beta$ -A4의 2개 부위의 각각의 2개 이상의 아미노산에 결합하거나 및/또는 특이적으로 상호작용할 수 있다는 것을 의미한다. 상기 용어는 항체 분자의 특이성을 나타내며, 즉  $\beta$ -A4 펩티드의 관련된 부위 또는 또 다른 것이 아닌, 즉 APP-관련 단백질/펩티드/(비관련) 시험-펩티드가 아닌, 여기서 규정하는 것과 같은  $\beta$ -A4 펩티드의 특이 부위와 또 다른 것 사이를 구별할 수 있는 능력을 나타낸다. 따라서 특이성은 당업에 공지된 방법 및 여기서 밝히고 개시한 방법에 의해서 실험적으로 결정할 수 있다. 이러한 방법은 이에 제한하지는 않지만 웨스턴 블롯, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-시험 및 펩티드 스캔을 포함한다. 이러한 방법은 또한 특히 첨부된 실시예에서 설명하고 있는 것과 같이  $K_D$ -값의 결정을 포함한다. 펩티드 스캔(웹스팟 분석)은 폴리펩티드 항원에 직선형 에피통을 맵핑하기 위해 통상적으로 사용한다. 폴리펩티드의 주 서열은 또 다른 것과 겹치는 펩티드로 활성화 셀룰로스 상에서 계속 합성된다. 특이 항원/에피통을 검출하거나 또는 인지할 수 있는 능력을 시험하기 위해 항체에 의한 특정 펩티드의 인지는 당업에 공지된 유사한 수단 또는 화학발광 반응에 의해서 일상적인 색상을 개발(효소 또는 다이, 예컨대 양고추냉이 과산화효소 또는 4-클로로나프톨 또는 과산화수소를 갖는 이차 항체) 시켜 점수화한다. 특히 화학발광 반응 또는 이차 형광 항체를 사용하는 경우에 반응을 정량화할 수 있다. 항체가 펩티드와 겹치는 특정 셋트와 반응하는 경우 반응에 필요한 최소 아미노산 서열을 추론할 수 있다; 본 발명에 따라 제공되는 설명에 도움이 되는 실시예 참조.
- [0161] 동일한 분석으로 불연속, 즉 항원 폴리펩티드의 배좌 에피통(conformational epitope)을 인지하는 반응성 펩티드의 2개의 떨어진 클러스터를 밝힐 수 있다(Geyzen(1986), Mol. Immunol. 23, 709-715).
- [0162] 웹스팟 분석에 더하여 표준 ELISA 분석을 실행할 수 있다. 첨부된 실시예에서 설명하고 있는 것과 같이 작은 헥사펩티드는 단백질과 쌍을 이루어, 면역플레이트에 코팅하여 시험할 항체와 반응시킬 수 있다. 스코어 확인은 표준 색채 개발에 의해서 실행할 수 있다(예를 들면 과산화 수소를 갖는 테트라메틸 벤지딘 및 양고추냉이 과산화효소를 갖는 이차 항체). 특정 웰(well)의 반응은 예를 들면 450 nm의 광학 밀도로 스코어를 확인한다. 통상적 참고(=음성 반응)는 0.1 OD일 수 있으며, 통상적 양성 반응은 1 OD일 수 있다. 이것은 양성/음성 차이의 (비율)이 10 배 이상일 수 있다는 것을 의미한다. 추가의 상세한 것은 첨부된 실시예에서 나타났다. 또한  $\beta$ -A4 펩티드의 여기서 규정하는 2개의 부위의 "특이적 인지" 능력과 특이성을 결정하기 위한 정량적 방법은 하기에 나타내었다.

- [0163] " $\beta$ -A4 펩티드의 2개 부위(two regions of the  $\beta$ -A4 peptide)"라는 문장은 예를 들어 서열 번호 18 내지 24의 아미노산( $\beta$ -A4 펩티드) 위치 상에 중심/중간 에피토프 및 N-말단 아미노산 3 내지 6과 관련된 2개 부위를 나타낸다. 첨부된 실시예에서 설명하고 있는 것과 같이, 특히 여기서 예로 들고 제공되는 이중-글리코실화 항체 A 이성질체(첨부된 실시예 참조)는 (서열 번호: 3에서 나타난 것과 같은) A $\beta$ 의 중심/중간 부분의 17 내지 26 아미노산을 포함하는 두번째 부분 및 N-말단의 1 내지 10 아미노산을 포함하는 첫번째 부분인 A $\beta$  분자의 2개 부위를 검출한다. 따라서 여기서 제공하는 항체의 모노- 뿐만 아니라 이중-글리코실화 이성질체를 포함하는 여기서 제공하는 항체 혼합물에서 2개 부위는 약간 넓어질 수도 있으며, 그렇게 되면 예를 들면 아미노산 1 내지 10(또는 11 또는 12) 또는 이의 더 짧은 부분, 및 아미노산 17 내지 26(또는 아미노산 16 내지 27) 또는 아미노산 17 내지 26 사이에 포함되는 더 짧은 부분, 예컨대 아미노산 19 내지 26 또는 20 내지 26을 포함한다. 본 발명의 내용에 관해서 " $\beta$ -A4 펩티드"라는 용어는 상기에서 기재한 A $\beta$ 39, A $\beta$ 41, A $\beta$ 43, 특히 A $\beta$ 40 및 A $\beta$ 42를 나타낸다. A $\beta$ 42는 첨부된 서열 번호: 3에 나타나 있다. " $\beta$ -A4 펩티드의 2개 부위"라는 용어는 또한  $\beta$ -A4 펩티드 또는 이의 부분의 여기서 규정하는 2개 부위를 포함하는 "에피토프" 및/또는 "항원 결정기"를 나타낼 수도 있다는 것을 알아야 한다. 본 발명에 따르면 상기  $\beta$ -A4 펩티드의 2개 부위는 1개 이상의 아미노산, 예를 들어 2개 이상의 아미노산, 예를 들어 3개 이상의 아미노산, 예를 들어 4개 이상의 아미노산, 예를 들어 5개 이상의 아미노산, 예를 들어 6개 이상의 아미노산에 의해  $\beta$ -A4 펩티드의 1차 구조(아미노산 서열의 수준 상)에서 분리된다. 첨부된 실시예에서 설명하고 여기에 나타난 것과 같이 독창적인 항체들/항체 분자들은 여기서 규정하는  $\beta$ -A4 펩티드의 2개 부위에 결합하거나 및/또는 2개 부위와 상호작용/검출되며, 상기 2개 부위는 1개 이상의 아미노산에 의해 (아미노산 서열의 1차 구조 수준 상에서) 분리되며, 서열 분리에서 상기 2개 부위/"에피토프"은 7개 아미노산 이상, 8개 아미노산 이상, 10개 아미노산 이상 또는 심지어 약 14개의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0164] " $\beta$ -A4 펩티드의 2개 부위"라는 용어는 또한 상기 2개 부위 또는 이의 부분으로 구성된 불연속 에피토프 또는 배좌 에피토프를 나타낼 수도 있다; Geysen(1986), loc. cit. 참조. 본 발명의 내용에서 배좌 에피토프는 폴리펩티드가 원래 존재하는 단백질(native protein)에 포개지는 경우 표면 상에 함께 있는 1차 서열에서 분리된 2개 이상의 분리된 아미노산 서열에 의해 규정된다(Sela, (1969) Science 166, 1365 및 Laver, (1990) Cell 61, 553-6). 본 발명의 항체 분자는 여기서 기재한  $\beta$ -A4의 2개 부위 또는 하기에 개시하는 것과 같은 이의 부분을 포함하거나 및/또는 이것으로 구성된 배좌 에피토프(들)과 특이적으로 결합/상호작용하는 것으로 확인된다. 본 발명의 "항체 분자"는 (a)  $\beta$ -A4의 아미노산 1 내지 11(또는 이의 부분(들))을 포함하는 아미노산 스트레치 및 (b) (서열 번호: 3)  $\beta$ -A4의 아미노산 16 내지 27(또는 이의 부분(들))을 포함하는 아미노산 스트레치에 동시에 및 독립적으로 이중 특이성을 포함하는 것으로 생각된다. 이러한 스트레치의 단편 또는 부분은 2개 이상, 대부분의 경우에는 3개 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0165] 항체 분자, 예를 들어 면역글로불린은 특히 3개의 시스템으로 표현할 수 있다: a) 에피스테인 바 바이러스 핵 항원(Epstein barr virus nuclear antigen, HEK 293 EBNA, Invitrogen)을 함유하는 일시적으로 감염된 인간 배아 신장 세포, b) 일시적으로 감염된 중국 햄스터 난소 세포(CHO) 및 c) 안정되게 감염된 CHO 세포주(CHO K1 및 CHO K1 SV, Lonza Biologics). 3개의 상이한 항체 분자(비-, 모노 또는 이중-글리코실화)는 단백질 A 정제, 양이온 교환 크로마토그래피뿐만 아니라 사이즈 컬럼 분리(하기에 상세하게 기술됨)에 의해 분리될 수 있다.
- [0166] 본 발명의 하나의 실시양태에서 항체 분자는 예를 들면 CHO-세포 또는 HEK 293 세포, 바람직하게는 CHO-세포에서 재조합적으로 제조된다. 특정 실시양태에서 상기에서 규정한 글리코실화 패턴은 CHO-세포에서의 발현 후에 획득될 수 있다. CHO-세포는 당업에 잘 공지되어 있으며, 특히 CHO K1 또는 CHO K1 SV 세포와 같은 실험적 부분에 이용되는 CHO-세포를 포함한다. 통상적으로 HEK 293 세포는 HEK 293 EBNA이 사용된다.
- [0167] 글리코실화된 독창적인 항체의 재조합 발현은 특히 CHO-세포에서 유핵 발현 시스템으로 실시예에서 나타난 것과 같이 실행한다. 그러나 추가의 발현 세포, 예를 들면 유핵 세포도 관찰할 수 있다. 유핵 세포는 예를 들면 균주 세포 또는 동물 세포도 포함된다. 적당한 균주 세포의 예로는 효모 세포, 예를 들면 사카로마이세스 속의 세포, 예를 들면 사카로마이세스 세레비시아 종의 세포이다. 적당한 동물 세포는 예를 들어 곤충 세포, 척추 동물 세포, 예를 들면 포유동물 세포, 예컨대 NSO, MDCK, U2-OSHeLa, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A이다. 또한 인간 세포주가 있다. 이러한 숙주 세포, 예를 들어 CHO-세포는 올바른 자리, 즉 중쇄의 가변 부위에 분자의 가장 중요한 글리코실화 및 H(중) 사슬 및 L(경) 사슬의 조합 및 포개진 선두 펩티드 또는 신호 서열 제거를 포함하는 본 발명의 항체 분자에 번역후 변형을 제공한다. 이러한 신호 펩티드 또는 선두 서열은 예를 들어 CHO 세포에서 이의 재조합 제조 중에 분비 경로 중에 숙주 신호 펩티다아제에 의해서 단백질 분해로 분리된다. 또한 당업에 공지된 적당한 세포주는 예를 들어 American Type Culture Collection(ATCC)와 같은 세포주 은행에서 수득할 수 있다. 본 발명에 따르면 1차 세포/세포 배양은



숙주 세포로서 기능을 할 수 있다는 것이 확인되었다. 상기 세포는 특히 곤충(예컨대 *Drosophila* 또는 *Blatta* 종의 곤충) 또는 포유류(예컨대 인간, 오리, 마우스 또는 쥐)에서 유도한다. 상기 숙주 세포는 또한 신경아 세포주와 같은 세포주로부터의 세포를 포함하거나 또는 이로부터 유도할 수 있다.

- [0168] 따라서 본 발명의 항체 분자는 재조합 발현 시스템을 사용하여 제조한다. 이러한 시스템의 예로는 상기에서 지적인 것과 같이 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 사용한 포유류 발현 시스템이다. 상기에는 글루타민 합성효소(GS) 시스템을 사용할 수 있다(WO 87/04462; WO 89/01036; Bebbington, 1992, Biotechnology(NY), 10, 169-75). 이러한 시스템은 목적하는 항체 유전자 및 GS 효소를 암호화하는 유전자로 CHO 세포를 감염시키는 것을 포함한다. 그 다음에 CHO 세포를 글루타민이 없는 배지에서 성장시켜 선택하고, 또한 메티오닌 선택시민(MSX)를 사용하여 GS 효소를 억제시킨다. 생존하기 위해서 세포는 GS 효소 발현 및 동시에 mAb 발현을 증폭할 것이다.
- [0169] 또 다른 가능한 발현 시스템은 CHO dhfr-시스템이며, 여기서 CHO 세포는 디하이드로폴레이트 환원효소(dhfr-)가 부족하고, 성장을 위해 티미딘 및 하이폭사민에 의존한다. 원래의 CHO dhfr- 세포주를 항체로 감염시키면 dhfr 유전자가 dhfr+ 표현형의 CHO 세포 전환체의 선별을 가능하게 한다. 선별은 티미딘과 하이폭사민의 부재 하에 실행한다. 항체 유전자의 발현은 메토크사이트(MTX)를 사용한 증폭에 의해서 증가시킬 수 있다. 이러한 제제는 dhfr 효소의 직접적인 억제제이며, 이들의 dhfr 유전자 수를 증폭하는 저항성 콜로니를 분리하여 항체 유전자가 이러한 조건하에서도 효과적으로 생존하게 한다.
- [0170] 정제된 항체 분자, 예를 들어 면역글로불린은 하기 단계를 포함하는 방법으로 제조할 수 있다:
- [0171] (a) 포유동물 세포, 예를 들어 CHO 또는 HEK 293 세포에서 상기에서 규정한 항체 분자를 암호화하는 이중 핵산 분자를 재조합적으로 발현시키는 단계; 및
- [0172] (b) 하기 단계를 포함하는 방법으로 상기 재조합형 발현 항체 분자를 정제하는 단계;
- [0173] (b1) 단백질 A 컬럼 정제;
- [0174] (b2) 이온 교환 컬럼 정제, 예를 들어 양이온 교환 크로마토그래피; 및
- [0175] (b3) 선택적으로 크기 배제 컬럼 정제.
- [0176] 정제 방법은 추가로 농축 단계, 예를 들어 분석 컬럼과 관련된 분석 단계 또는 정용 여과와 같은 추가 단계를 포함할 수 있다. 방법/방식은 또한 여과/나노-여과를 경유하는 바이러스 제거 단계 및/또는 바이러스 비활성화 단계를 포함할 수도 있다. 또한 특정 단계를 반복(예를 들어 두번의 이온 교환 크로마토그래피 단계를 실행할 수 있음)하거나 또는 특정 단계를 제거(예를 들어 크기 배제 크로마토그래피)할 수도 있는 유연성이 있다.
- [0177] 단백질 A는 대부분의 IgG1 이소타입의 Fc 부위에 결합하는 특이적인 리간드 군이다. 상기는 스타피로코커스 아우레우스의 몇몇 계통에 의해 합성되며, 이것으로부터 분리될 수 있고, 크로마토그래피 비드에 결합될 수 있다. 몇가지 형태의 겔 준비는 시판품으로 이용할 수 있다.
- [0178] 사용할 수 있는 단백질 A 컬럼의 예로는 MabSelect(상표명) 컬럼이 있다. 이상적으로 컬럼은 25 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA로 평형화시키고, 세포 배양 상층액을 컬럼 상에 로딩하고, 컬럼을 1 M Tris/HCl pH 7.2로 세척하고, 항체를 100 mM 아세트산을 사용하여 pH 3.2에서 용출시킨다.
- [0179] 양이온-교환 크로마토그래피는 이동상의 시료와 정지상의 양전하 사이의 상호작용을 이용한다. 약한 양이온 교환기(예를 들어 CM Toyopearl 650(상표명))를 사용하는 경우에는 하기의 크로마토그래피 단계를 실행한다: 100 mM 아세트산 pH 4로 전평형화시킨 후에 단백질 A 용출물을 로딩하고 100 mM 아세트산 pH 4로 세척하고, 250 mM 아세트산 나트륨(pH 7.8-8.5) 및 500 mM 아세트산 나트륨(pH 7.8-8.5)를 이용하는 단계에 의해서 항체를 용출 및 분획화한다. 첫번째 단계로 이중-글리코실화 이성질체 분획물과 모노-글리코실화 이성질체 분획물의 혼합물이 용출되는 것이 통상적이며, 두번째 단계를 사용해서 비-글리코실화 이성질체가 용출되는 것이 일반적이다.
- [0180] 강한 양이온 교환기(예를 들면 SP Toyopearl 650)로부터 염 단계에 의해서 항체를 용출시킬 수 있다: 50 mM 아세트산 pH 5.0으로 컬럼을 평형화시킨 후에 50 mM 아세트산과 210 mM 염화나트륨을 사용하여 첫번째 용출 단계에서 pH 4의 단백질 A 용출액을 로딩한다. 그 다음에 50 mM 아세트산과 350 mM 염화나트륨의 두번째 용출 단계를 실행한다. 첫번째 염 단계에서 이중-글리코실화 이성질체 분획물과 모노-글리코실화 이성질체 분획물의 혼합물이 용출되는 것이 일반적이며, 두번째 염 단계에서 비-글리코실화 이성질체가 용출되는 것이 일반적이다.

- [0181] 또한 항체는 염 그래디언트에 의해서 강한 양이온 교환기 컬럼(예를 들면 SP-Sepharose(상표명))으로부터 용출시킬 수 있다: 전평형화 후에 pH 4.5에서 컬럼을 세척 및 로딩하고 50 mM MES pH 5.8 내지 50 mM MES/1 M 염화나트륨 pH 5.8의 염 그래디언트를 적용시킨다. 여기서 이중-글리코실화 이성질체, 모노-글리코실화 이성질체 및 비-글리코실화 이성질체 분획물이 분리해서 용출되는 것이 일반적이다. 이후에 이중-글리코실화 이성질체 분획물 및 모노-글리코실화 이성질체 분획물이 고여서 제품 풀 및/또는 목적하는 항체 혼합물이 생성된다.
- [0182] 이중- 및 모노-글리코실화 항체 분자, 예를 들면 면역글로불린의 혼합물의 추가 정제는 크기 배제 크로마토그래피로 실행할 수 있다. 유용한 컬럼의 예로는 Superdex 200(상표명) 컬럼이 있다. 러닝 완충액의 예로는 히스티딘/염화나트륨, 예를 들어 10 mM 히스티딘/125 mM 염화나트륨/pH 6 및 인산 완충 식염수(PBS)가 포함된다.
- [0183] 특정 상태를 통한 흐름의 음이온 교환 크로마토그래피 이후의 농축/정용 여과는 대안적인 정제 단계이다. Q-Sepharose(상표명)는 음이온 교환 단계의 수지의 예이다. 예를 들면 SP 크로마토그래피에서의 용출액을 37.5 mM Tris/HCl pH 7.9로 3배 희석하고, 25 mM Tris/83 mM 아세트산 나트륨으로 전-평형화된 Q-Sepharose 컬럼 상을 통과시킨다. 흐름 통과액을 수집하고, pH 5.5로 적정하고, 예를 들어 Hydrosart 30 kD(상표명) 막을 이용한 초여과로 농축시킨다. 이후의 농축물은 예를 들면 20 mM 히스티딘/HCl pH 5.5 10 부피로 정용 여과할 수 있다.
- [0184] 상기에서 인용한 정제 방법은 또한 Mono-S HR5/5 컬럼의 사용과 같은 분석 크로마토그래피 단계를 추가 단계(c)로서 포함할 수도 있다. 그러나 정용 여과와 같은, 예를 들어 항체 분자의 농축에 있어서의 추가 단계가 있다.
- [0185] 본 발명의 하나의 실시양태에서 조성물, 항체 조제 또는 항체 풀은 여기서 기재한 항체 분자 또는 상기에서 제공한 방법으로 제조한 항체 분자를 포함하여 제공된다. 본 발명의 이러한 실시양태에서 상기 조성물은 모노- 또는 이중-글리코실화 항체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서 상기 조성물은 모노- 및 이중-글리코실화(중쇄(들)의 가변 부위(들)에) 항체를 포함하며, 상기 조성물은 가변 부위에 글리코실화가 없는 항체 분자에서 유도된다. 상기 실시양태의 내용에서 "항체 풀(antibody pool)"이라는 용어는 각각 분리된 이후에 하나의 혼합물로 결합한 모노- 및 이중-글리코실화 (중쇄(들)의 가변 부위(들)에) 항체의 혼합물을 나타낸다. 여기서 제공하는 항체 혼합물 또는 항체 풀은 여기서 규정하는 50 % 모노-글리코실화 및 50 % 이중-글리코실화 항체를 포함할 수 있다. 그러나 또한 30/70 내지 70/30의 비율로 관찰된다. 또한 당업에 통상의 지식을 가진 자들은 본 발명의 항체 혼합물의 또 다른 비율을 확인할 수 있다는 것을 알고 있다. 예를 들면 또한 10/90 또는 90/10, 20/80 또는 80/20 뿐만 아니라 40/60 또는 60/40이 본 발명의 내용에 사용될 수 있다. 또한 실시예에서 나타난 것과 같이 상기에서 규정한 것과 같이 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 항체를 포함하는 본 발명의 항체 혼합물의 특히 유용한 비율은 40/60 내지 45/55의 비율이다.
- [0186] 여기서 제공되는 조성물은 특히 약학적 조성물 또는 진단학적 조성물에 유용하다.
- [0187] 따라서 본 발명은 하기를 포함하는 진단학적 또는 약학적 조성물 용으로 제공된다:
- [0188] (a) 글리코실화 Asn이 있는 1개의 항원 결합 자리를 포함하는 상기에서 규정한 항체 분자;
- [0189] (b) 글리코실화 Asn이 있는 2개의 항원 결합 자리를 포함하는 상기에서 규정한 항체 분자; 또는 보다 바람직하게는
- [0190] (c) 항체 분자 (a) 및 (b)의 결합물.
- [0191] 글리코실화 Asn이 있는 1개의 항원 결합 자리를 포함하는 항체 분자(들) 및 글리코실화 Asn이 있는 2개의 항원 결합 자리를 포함하는 항체 분자(들)를 포함하는 여기서 제공되는 결합물 (c)는 (중쇄의 가변 부위에 관해) 비-글리코실화 이성질체가 없다. 상기에서 지정한 것과 같이 "비-글리코실화 (중쇄의 가변 부위에 관해) 이성질체가 없는(devoid of non-glycosylated (in respect to the variable region of the heavy chain) isoform)" 이란 문장은 결합물/항체 풀/항체 조제를 나타내며, 상기 결합물 중 항체 종이 5 % 이하, 예를 들어 4 % 이하, 3 % 이하, 2 % 이하, 1 % 이하 또는 심지어 0.5 % 이하가 중쇄의 가변 부위의 비-글리코실화이다. 실시예에서 설명한 것과 같이 상기 결합물/항체 풀/항체 조제는 비-글리코실화 이성질체를 거의 포함하지 않을 수 있다(0.5 % 이하). 주어진 항체 조성물 중 주어진 글리코실화 이성질체(여기서 규정한 것과 같으며, 예를 들어 중쇄의 가변 부위의 글리코실화로 특히 첨부된 도면 14 참조)의 퍼센트 및/또는 양은 당업에 공지되어 있는 방법에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 상기 방법들은 이에 제한하지는 않지만 질량 스펙트로미터, SDS-PAGE 분석 이온 교환, HPLC, ELISA 등을 포함한다.
- [0192] 첨부된 실시예에서 나타내는 것과 같이 본 발명의 항체에 의해서 순수한 알츠하이머 β-아밀로이드 플라크의 특

이적이고 민감한 면역-데코레이션은 AD 환자로부터의 인간 뇌 조직의 시편 준비를 사용해서 면역조직화학적 염색 실험으로 실험실내에서 증명하였다. 뇌 슬라이스로부터의  $\beta$ -아밀로이드 플라크의 효과적인 염색은 또한 A $\beta$ 로 백신화된 환자에게서 인간 항-A $\beta$  항체로 증명하였다(Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275). 또한 면역-데코레이션은 또한 인간  $\beta$ -아밀로이드 플라크 존재량이 특징인 유전자 도입 동물 모델로 증명하였다(Richards, 2003, J. Neuroscience, 23, 8989-9003). 유사한 동물 모델에서 이러한 플라크 결합이 이들의 제거를 유도하고, 이후에는 질환 관련 증상이 개선되는 반면에 Fc-의존 과정의 관련성이 검토되었다는 것을 증명하였다(Bard, 2000, Nature Medicine, 6, 916-919; Wilcock, 2003, Neurobiology Disease, 15, 11-20; Wilcock, 2004, J. Neuroscience, 24, 6144-6151). 또한  $\beta$ -아밀로이드 플라크에 항-A $\beta$  항체의 효과적인 결합이 질병의 진전을 느리게 하는 것과 관련이 있다고 보고되었다(Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275; Hock, 2003, Neuron, 38, 547-554). 이것과 인간 뇌 조직의 사후 분석으로 미세신경교 세포의 탐식 작용이 인간의 플라크 제거와 메카니즘에서 관련이 있다는 것을 알았다(Nicoll, 2003, Nature Medicine, 9, 448-452). 따라서 본 발명의 항체 또는 약학적 조성물에 특히 포함되는 항체는 인간 IgG1이며, 이것은 주로 인간의 FcR-의존 프로세스의 원인이다. 본 발명의 혼합물/본 발명의 항체의 효과적인  $\beta$ -아밀로이드 플라크 면역-데코레이션으로 약제가 인간의  $\beta$ -아밀로이드 플라크의 형성을 막고, 플라크 존재를 제거하기 위한 수동 면역화에 효과적인 것임을 확인하였다.

[0193] 또한 항체는 혈액-뇌-장벽을 가로질러 이들의 목적 장소에 도달해야 하는 것이 바람직하다. 인간 IgG들로서 큰 크기 분자에 있어서 상기 방법은 급격하게 바뀌어 단지 약 0.1 % 내지 0.2 %의 항체의 플라즈마 농도만이 CSF에 도달할 수 있다. 플라크 제거의 메카니즘은 여전히 논쟁거리이며, A $\beta$  펩티드 상의 주변 효과와 관련이 있을 것이다(Dodart, 2002, Nature Neuroscience, 5: 452-457). 따라서 본 발명의 (가변 부위 중쇄에) 모노- 및 이중 글리코실화의 상응하는 독창적인 혼합물 또는 발생된 치료적 항체도 또한 Fc-의존 프로세스의 관련 없이 실험실내에서 A $\beta$  다중체가 단량체로 분해되고, CSF내의 가용성 A $\beta$  단량체 및 올리고머와 결합하는 특성이 있으며, 이것은 가용성 단량체 A $\beta$  펩티드 또는 올리고머 A $\beta$  펩티드(예를 들면 응집 중간체)의 중화가 또한 전체 아밀로이드 저하 효과에 기여할 수 있다(Du, 2003, Brain, 126: 1-5).

[0194] 본 발명의 조성물은 고체 또는 액체 형태로 투여될 수 있으며, 특히 분말(들), 정제(들), 용액(들) 또는 에어로졸(들)의 형태일 수 있다. 상기 조성물은 여기서 규정한 모노- 및 이중-글리코실화 항체의 혼합물이 보다 바람직한 본 발명의 1개 이상의 항체/항체 분자를 포함할 수 있다.

[0195] 상기 약학적 조성물은 선택적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 것이 바람직하다. 여기서 개시한 약학적 조성물은 특히 신경 및/또는 퇴행성 신경 질환의 치료에 유용할 수 있다. 상기 질환은 이에 제한되지는 않지만 알츠하이머병, 근위축성 측색경화증(ALS), 네덜란드형 아밀로이드증이 있는 유전성 뇌출혈, 다운 증후군, HIV-치매, 파킨슨병 및 노화와 관련된 신경 질환을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 특히 아밀로이드 플라크 형성의 강력한 억제제로서, 또는 아밀로이드 플라크의 단량체화를 위한 강력한 촉진제로서 나타난다. 따라서 본 발명은 아밀로이드 질환/질병의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물용으로 제공된다. "아밀로이드 질환/질병(amyloidogenic disease/disorder)"은 아밀로이드 원섬유의 형성 또는 침착, 및/또는 병원성 APP 단백 용해에 의해서 또는 이와 관련된 임의의 질환을 포함한다. 대표적인 아밀로이드 질환은 이에 제한되지는 않지만 알츠하이머병(AD), 다운 증후군, 루이소체 형성과 관련된 치매, 치매가 있는 파킨슨병, 경도인지장애, 아밀로이드 뇌혈관 병증 및 혈관성 치매가 포함된다. 상이한 아밀로이드 질환은 아밀로이드 침착의 폴리펩티드-성분의 특성에 의해 규정되거나 및/또는 특징화된다. 예를 들면 아밀로이드- $\beta$  단백질은 알츠하이머병을 갖는 피험체에서 아밀로이드 침착이 발견되는 것이 특징이다.

[0196] 적당한 약학적 담체, 부형제 및/또는 희석제의 예는 당업에 잘 공지되어 있으며, 인산 완충 식염수 용액, 물, 에멀전, 에센스 오일/물 에멀전, 다양한 타입의 습윤제, 무균 용액 등을 포함한다. 상기 담체를 포함하는 조성물은 잘 공지되어 있는 종래 방법으로 제제화할 수 있다. 적당한 담체는 항-A $\beta$  특이 결합제 또는 항체와 결합하는 경우 A $\beta$ 와의 높은 결합 친화도를 보유하는 임의의 물질을 포함할 수 있으며, 부형제, 계면활성제, 강직성 물질(tonicity agent) 등을 포함하는 환자의 면역 시스템과 비반응성이다; Remington's Pharmaceutical Sciences(1980) 16th edition, Osol, A. Ed.참조. 이러한 약학적 조성물은 적당한 양으로 피험체에게 투여할 수 있다. 적당한 조성물의 투여로 비경구, 피하, 복막 내부, 국소, 기관지 내부, 폐 내부 및 코 내부 투여, 및 국소 치료를 원한다면 병변내 투여에 의한 상이한 방법으로 달성할 수 있다. 비경구 투여는 복막 내부, 근육 내부, 피부 내부, 피하, 정맥 또는 동맥 내부 투여를 포함한다. 상기 투여는 뇌 조직에 직접 또는 동맥의 자리로의 주입 및/또는 운반에 의해서 실행되는 것이 특히 바람직하다. 본 발명의 조성물은 예를 들어 뇌와 같은 외부 또는 내부 목표 위치에 바이오리스팅 운반(biolistic delivery)에 의해 목표 위치에 직접 투여할 수도 있

다.

- [0197] 여기서 기재한 글리코실화 항체를 포함하는 약학적 조성물은 선택적으로 생리학적 허용 담체, 부형제, 안정화제, 계면활성제, 완충제 및/또는 강직성 물질과 목적하는 정제도를 갖는 항체를 혼합하여 제조하였다. 허용가능한 담체, 부형제 및/또는 안정화제는 사용하는 농도와 투여량에서 부형제에 독성이 없으며, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충제를 포함한다; 아스코르브산, 글루타치온, 시스테인, 메티오닌 및 시트르산을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대 에탄올, 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 벤잘코늄 클로라이드 또는 이들의 결합물); 아미노산, 예컨대 알기닌, 글리신, 오르니틴, 리신, 히스티딘, 글루타민산, 아스파르트산, 이소류이신, 루이신, 알라닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 프롤린 및 이들의 결합물; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 카보하이드레이트; 저분자량(약 10 잔기 이하) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 젤라틴 또는 혈청 알부민; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 트레할로스, 슈크로스, 락토스, 글루코스, 만노스, 말토스, 갈락토스, 프락토스, 소르보스, 라피노스, 글루코사민, N-메틸글루코사민(소위 "메글루민"이라함), 갈락토사민 및 뉴라민산; 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈, Brij Pluronic, 트리톤-X 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG).
- [0198] 약학적 조성물은 액상 형태, 동결건조 형태 또는 동결건조 형태를 재구성화한 액상 형태일 수 있으며, 동결건조 조제는 투여전에 멸균 용액으로 재구성화될 것이다. 동결건조 조성물의 재구성을 위한 기본 방법은 순수한 물의 양(동결건조 중에 제거된 부피와 동량인 것인 통상적임)을 다시 첨가하는 것이지만 또한 항균제를 포함하는 용액을 비경구 투여에 있어서 약학적 조성물의 제조를 위해 사용할 수도 있다; Chen(1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54 참조.
- [0199] 약학적 조성물의 대표적인 항체 농도는 약 1 mg/mL 내지 약 200 mg/mL 또는 약 50 mg/mL 내지 약 200 mg/mL, 또는 약 150 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 범위일 수 있다. 명확한 이유를 위해서 여기서 지시하는 농도는 액상 또는 고형물에서 정확하게 재구성한 액체의 농도를 나타낸다.
- [0200] 항체의 수성 제제는 예를 들어 pH가 약 4.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.0 내지 약 6.0의 범위, 또는 대안적으로 약 5.5인 pH-완충 용액으로 제조할 수 있다. 상기 범주내의 pH로 적당한 완충제의 예로는 포스페이트-, 히스티딘-, 시트레이트-, 숙시네이트-, 아세테이트-완충제 및 기타 유기산 완충제를 포함한다. 완충제 농도는 제제의 목적하는 강직성 및 완충제에 따라서 달라지는 약 1 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM일 수 있다.
- [0201] 강직성 물질은 제제의 강직성을 조절할 수 있는 항체 제제에 포함할 수 있다. 대표적인 강직성 물질은 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린 및 아미노산, 당뿐만 아니라 이들의 결합물로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 성분을 포함한다. 수성 제제는 고장액 또는 저장액이 적당할 수 있는데도 불구하고 등장이 바람직하다. "등장(isotonic)"이라는 용어는 비교되는 몇몇 기타 용액으로서 동일한 강직성을 갖는 용액, 예컨대 생리학적 염 용액 및 혈액 혈청을 나타낸다. 강직성 물질은 약 5 mM 내지 약 350 mM, 특히 105 mM 내지 305 mM의 양으로 사용할 수 있다.
- [0202] 계면활성제는 또한 제제화된 항체의 응집을 줄이고, 및/또는 제제에 미립자의 형성을 최소화시키고, 및/또는 흡착을 줄이기 위해서 항체 제제에 첨가할 수도 있다. 대표적인 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(트윈), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(Brij), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르(트리톤-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 코폴리머(플록사머, 플로닉) 및 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함한다. 바람직한 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산 에스테르는 폴리소르베이트 20(상표명 트윈 20<sup>TM</sup>으로 시판) 및 폴리소르베이트 80(상표명 트윈 80<sup>TM</sup>으로 시판)이다. 바람직한 폴리옥시에틸렌-폴리프로필렌 코폴리머는 상표명 플로닉® F68 또는 플록사머 188<sup>TM</sup>으로 시판되는 것이다. 바람직한 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르는 상표명 Brij<sup>TM</sup>으로 시판되는 것이다. 계면활성제의 대표적인 농도는 약 0.001 % 내지 약 1 % w/v의 범위일 수 있다.
- [0203] 동결건조보호제(lyoprotectant)도 또한 동결건조 공정 중에 불안정 조건에 대항해서 불안정한 활성 성분(예들 들면 단백질)을 보호하기 위해서 첨가할 수도 있다. 예를 들어 공지된 동결건조보호제는 당(글루코스와 슈크로스를 포함함); 폴리올(만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함함); 및 아미노산(알라닌, 글리신 및 글루타민산을 포함함)을 포함한다. 동결건조보호제는 약 10 mM 내지 약 500 mM의 양으로 사용하는 것이 일반적이다.
- [0204] 하나의 실시양태에서 제제는 상기에서 규정한 제제(즉 글리코실화 항체, 계면활성제, 완충제, 안정화제 및/또는 강직성 물질)를 함유하며, 1개 이상의 방부제, 예컨대 에탄올, 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 벤잘코늄 클로라이드 및 이들의 결합물이 실질적으로 없다. 또 다른 실시양태에서



방부제는 예를 들어 약 0.001 내지 약 2 %(w/v)의 범위의 농도로 제제에 포함할 수 있다.

- [0205] 하나의 실시양태에서 본 발명의 항체 제제는 비경구 투여에 적당한 액상 또는 동결건조 제제이며, 하기를 포함할 수 있다:
- [0206] - 약 1 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0207] - 약 0.001 내지 약 1 %의 1개 이상의 계면활성제;
- [0208] - 약 1 내지 약 100 mM의 완충제;
- [0209] - 선택적으로 약 10 내지 약 500 mM의 안정화제 및/또는 약 5 내지 약 305 mM의 강직성 물질;
- [0210] - 약 4.0 내지 약 7.0의 pH.
- [0211] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 비경구 제제는 하기를 포함하는 액상 또는 동결건조 제제이다:
- [0212] - 약 1 내지 약 200 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0213] - 0.04 % 트윈 20 w/v;
- [0214] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0215] - 250 mM 슈크로스;
- [0216] - pH 5.5.
- [0217] 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 비경구 제제는 또한 하기를 포함하는 동결건조 제제를 포함할 수도 있다:
- [0218] - 15 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0219] - 0.04 % 트윈 20 w/v;
- [0220] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0221] - 250 mM의 슈크로스;
- [0222] - pH 5.5;
- [0223] 또는
- [0224] - 75 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0225] - 0.04 % 트윈 20 w/v;
- [0226] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0227] - 250 mM의 슈크로스;
- [0228] - pH 5.5;
- [0229] 또는
- [0230] - 75 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0231] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0232] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0233] - 250 mM의 슈크로스;
- [0234] - pH 5.5;
- [0235] 또는
- [0236] - 75 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0237] - 0.04 % 트윈 20 w/v;

- [0238] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0239] - 250 mM의 트레할로스;
- [0240] - pH 5.5;
- [0241] 또는
- [0242] - 75 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0243] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0244] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0245] - 250 mM의 트레할로스;
- [0246] - pH 5.5.
- [0247] 또 다른 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 비경구 제제는 하기를 포함하는 액상 제제를 포함할 수도 있다:
- [0248] - 7.5 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0249] - 0.022 % 트윈 20 w/v;
- [0250] - 120 mM의 L-히스티딘;
- [0251] - 250 125 mM의 슈크로스;
- [0252] - pH 5.5;
- [0253] 또는
- [0254] - 37.5 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0255] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0256] - 10 mM의 L-히스티딘;
- [0257] - 125 mM의 슈크로스;
- [0258] - pH 5.5;
- [0259] 또는
- [0260] - 37.5 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0261] - 0.01 % 트윈 20 w/v;
- [0262] - 10 mM의 L-히스티딘;
- [0263] - 125 mM의 슈크로스;
- [0264] - pH 5.5;
- [0265] 또는
- [0266] - 37.5 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0267] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0268] - 10 mM의 L-히스티딘;
- [0269] - 125 mM의 트레할로스;
- [0270] - pH 5.5;
- [0271] 또는
- [0272] - 37.5 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;

- [0273] - 0.01 % 트윈 20 w/v;
- [0274] - 10 mM의 L-히스티딘;
- [0275] - 125 mM의 트레할로스;
- [0276] - pH 5.5;
- [0277] 또는
- [0278] - 75 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0279] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0280] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0281] - 250 mM의 트레할로스;
- [0282] - pH 5.5;
- [0283] 또는
- [0284] - 75 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0285] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0286] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0287] - 250 mM의 만니톨;
- [0288] - pH 5.5;
- [0289] 또는
- [0290] - 75 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0291] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0292] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0293] - 140 mM의 염화나트륨;
- [0294] - pH 5.5;
- [0295] 또는
- [0296] - 150 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0297] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0298] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0299] - 250 mM의 트레할로스;
- [0300] - pH 5.5;
- [0301] 또는
- [0302] - 150 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;
- [0303] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0304] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0305] - 250 mM의 만니톨;
- [0306] - pH 5.5;
- [0307] 또는
- [0308] - 150 mg/mL의 여기서 기재한 글리코실화 항체 또는 항체 조성물;

- [0309] - 0.02 % 트윈 20 w/v;
- [0310] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0311] - 140 mM의 염화나트륨;
- [0312] - pH 5.5;
- [0313] 또는
- [0314] - 10 mg/mL의 A베타 항체;
- [0315] - 0.01 % 트윈 20 w/v;
- [0316] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0317] - 140 mM의 염화나트륨;
- [0318] pH 5.5에서.
- [0319] 하나의 실시양태에서 본 발명의 약학적 조성물은 하기를 포함하는 액상 제제이다:
- [0320] - 10 mg/mL의 A베타 항체;
- [0321] - 0.01 % 트윈 20 w/v;
- [0322] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0323] - 140 mM의 염화나트륨;
- [0324] pH 5.5에서.
- [0325] 또 다른 실시양태에서 본 발명의 약학적 조성물은 하기를 포함하는 동결건조 제제이다:
- [0326] - 75 mg/mL의 A베타 항체;
- [0327] - 0.04 % 트윈 20 w/v;
- [0328] - 20 mM의 L-히스티딘;
- [0329] - 250 mM의 슈크로스;
- [0330] pH 5.5에서.
- [0331] 대표적인 제제에 관한 내용에서 "여기서 기재한 글리코실화 항체(herein described glycosylated antibodies)"라는 문장은 본 발명에 여기서 규정한 모노-글리코실화 항체, 여기서 규정한 이중-글리코실화 항체뿐만 아니라 이들의 결합물을 포함할 수 있다.
- [0332] 투여량 처방 계획은 주치의와 임상적 인자에 의해서 결정될 것이다. 의학 분야에 잘 공지되어 있는 것과 같이 임의의 환자에 투여량은 환자의 사이즈, 몸체 표면 영역, 나이, 투여하는 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 투여 경로, 통상적인 건강 상태 및 기타 동시에 투여하는 약제를 포함하는 많은 인자에 따라서 달라진다. 단백질 약학적 활성 문제는 투여량 당 1 ng 내지 20 mg/kg 몸무게, 예를 들어 0.1 mg 내지 10 mg/kg 몸무게, 예를 들어 0.5 mg 내지 5 mg/kg 몸무게의 양으로 존재할 수 있으며; 그러나 특히 상기에서 기재한 여러 인자를 고려하여 상기 대표적인 범위 이하 또는 이상의 투여량을 계획한다. 처방 계획이 연속적인 주입 계획이라면 또한 분 당 몸무게 kg 당 1 ug 내지 10 mg 범위내여야 한다.
- [0333] 여기서 기재한 약학적 조성물은 짧은-효과(short-acting), 신속한-방출(fast-releasing), 긴-효과(long-acting) 또는 서방출(sustained-releasing)로 제제화할 수 있다. 따라서 약학적 조성물은 또한 방출을 늦추거나 또는 방출을 제어하기 위해 적당할 수도 있다.
- [0334] 서방출 조제는 당업에 공지되어 있는 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 서방출 조제의 적당한 예로는 매트릭스가 예를 들어 마이크로캡슐 또는 필름과 같은 성형 물질 형태인 항체를 함유하는 고형 소수성 폴리머의 반투성 매트릭스를 포함한다. 서방출 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, L-글루타민산과 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 하이드로겔, 폴리락티드, 분해성 락트산-글리콜산 코폴리머 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티릭산을 포함한다. 서방출 조제에 포함되는 항체의 면역원성의 가능한 변화 및 생물학적



활성의 가능한 손실은 적당한 첨가제 사용, 수분 함량의 조절 및 특이 폴리머 매트릭스 조성물의 개발에 의해서 예방할 수 있다.

[0335] 방법은 주기적 평가로 모니터링할 수 있다. 즉 본 발명의 모노- 및/또는 이중-글리코실화 항체, 또는 이들의 혼합물의 조성물은 국소적으로 또는 전신으로 투여할 수 있다. 주변에 투여된 항체는 중추 신경계로 들어갈 수 있다(특히 Bard(2000), Nature Med. 6, 916-919 참조). 비경구 투여를 위한 조제는 멸균 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액 및 에멀전을 포함한다. 비-수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성유, 예컨대 올리브유, 및 주입 가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트가 있다. 수성 담체는 물, 알콜/수성 용액, 에멀전 또는 식염수 및 완충 매질을 포함하는 현탁액을 포함한다. 비경구 매체(parenteral vehicles)로는 염화나트륨 용액, 포도당 링거액, 포도당 및 염화나트륨, 유산 링거액 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 매체는 수액 및 영양 보충제, 전해질 보충제(예컨대 포도당 링거액을 기본으로 하는 것들) 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제도 또한 예를 들어 항균제, 항-산화제, 킬레이팅제 및 불활성가스 등이 존재할 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 의도된 사용에 따른 추가의 약제를 포함할 수 있다. 상기 약제는 중추 신경계에 활성이 있는 약제, 예컨대 신경방어 인자, 콜린에스테라아제 억제제, M1 무스카린성 수용체의 작용제, 호르몬, 항산화제, 염증 억제제 등일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 예를 들어 신경전달물질 및/또는 신경전달물질의 대체 분자, 비타민 E 또는 알파-리포산과 같은 약제를 추가로 포함하는 것이 특히 바람직하다.

[0336] 특히 생화학자, 생물학자, 화학자, 약학자 및 상기 전문인들의 그룹에 제한하지 않지만 당업에 통상의 지식을 가진 자들은 용이하게 상기에서 인용한 약학적 조성물을 사용 및 생성할 수 있다. 또한 주치의와 같은 당업에 통상의 지식을 가진 의학자들도 또한 상기 약학적 조성물을 여기서 규정하는 약학적 조성물로 치료해야 하는 환자에게 투여하는 방법을 알고 있다. 상기 투여는 예를 들어 주입 및/또는 주사에 의한 전신 투여를 포함할 수 있다. 그러나 본 발명의 화합물 및/또는 본 발명의 화합물 혼합물을 뇌에 직접 투여하는 것도 있다. 예를 들어 화합물 또는 화합물 혼합물 또는 화합물 조제를 바람직하게는 느린 주입을 통해 뇌 연조직에 충격을 최소화시키기 위해서 뇌에 뇌실내 또는 수막강내 주입으로 직접 투여할 수 있다. 또한 뇌에서 느린 방출 임플란트(slow release implant)를 사용할 수도 있다. 또한 유전자 치료 접근법을 예를 들어 본 발명에서 규정하는 항체를 제조하는 임플란트 재조합 세포를 사용하여 이용한다. 이러한 "재조합 세포(recombinant cells)"는 특히 본 발명의 항-A $\beta$  항체와 같은 여기서 규정하는 항체의 가변 부위/부분에 여기서 규정하는 글리코실화를 제공할 수 있어야 한다. 게다가 상기에서 지정한 것과 같이 본 발명의 항체/항체 혼합물의 하나의 이점은 혈액-뇌 장벽을 가로지르고 아밀로이드 플라크와 결합할 수 있는 이것의 능력이다. 아래에서 설명하는 본 발명의 약학적 조성물은 병리학적 APP 응집 또는 병리학적 APP 진행에 따라 좌우되거나 또는 관련되거나 또는 지금까지 공지되어 있는 모든 종류의 질병을 치료하기 위해 사용할 수 있다. 아밀로이드- $\beta$ 의 세포의 침착이 역할인 알츠하이머병 및 기타 질환의 치료에 특히 유용하다. 동물 치료에서도 또한 여기서 규정하는 방법, 용도 및 조성물을 포함하지만 인간에 이용하는 것이 바람직하다.

[0337] 본 발명의 바람직한 실시양태에서 상기에서 규정하는 본 발명의 조성물은 선택적으로 검출을 위한 적당한 수단을 추가로 포함하는 진단 조성물이다. 진단 조성물은 본 발명의 상기에서 언급한 화합물, 즉 여기서 규정하는 글리코실화 항체 중 1개 이상을 포함한다.

[0338] 상기 진단 조성물은 본 발명의 화합물, 특히 본 발명의 글리코실화 항체 분자, 가용성 형태/액체 상을 포함할 수 있지만 또한 상기 화합물은 고형 지지체(solid support)에 연결되거나 및/또는 부착되거나/결합되어 있는 것으로 파악된다.

[0339] 고형 지지체는 여기서 규정하는 진단 조성물과 결합하여 사용할 수 있으며, 또는 본 발명의 화합물은 상기 고형 지지체에 직접 연결할 수 있다. 상기 지지체는 당업에 잘 공지되어 있으며, 특히 컬럼 물질, 폴리스티렌 비드, 라텍스 비드, 마그네틱 비드, 콜로이드 금속 입자, 유리 및/또는 실리콘 칩 및 표면, 니트로셀룰로스 스트립, 막, 시트, 듀라사이트(duracite), 반응 트레이의 웰(well) 및 벽(wall), 플라스틱 튜브 등을 포함한다. 본 발명의 화합물(들), 특히 본 발명의 항체는 여러 상이한 담체에 연결될 수 있다. 잘 공지된 담체의 예로는 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트, 텍스트란, 나일론, 아밀로스, 천연 및 변형 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 아가로스 및 마그네타이트(magnetite)를 포함한다. 담체의 특성은 본 발명의 목적에 있어서 가용성이거나 불용성일 수 있다. 적당한 라벨 및 라벨링 방법은 상기에 규정하였으며, 또한 하기에 추가로 언급하였다. 본 발명의 상기 화합물(들)의 고착/고정(fixing/immobilizing)에 적합한 방법은 잘 공지되어 있으며, 이에 제한하지는 않지만 이온, 소수성, 공유 상호작용 등을 포함한다.

[0340] 본 발명의 진단 조성물은 아밀로이드- $\beta$ 와 같은 APP 및/또는 APP-프로세싱 제품의 검출 및/또는 정량, 또는 병

리학적 및/또는 (통상적으로) 변형된 APP-분해 사이드의 검출 및/또는 정량에 이용하는 것이 특히 바람직하다.

- [0341] 첨부된 실시예에서 설명하는 것과 같이 독창적인 글리코실화 항체 분자는 간접 면역현광법으로 알츠하이머병 환자의 뇌 부분에 순수한 인간 아밀로이드 플라크 검출의 진단 시약으로서 특히 유용하다.
- [0342] 진단 조성물에 이용하기 위한 본 발명의 상기 화합물은 검출가능하도록 라벨링하는 것이 바람직하다. 갖가지 기술을 생분자의 라벨링에 이용할 수 있으며, 이것은 당업에 잘 공지되어 있고, 본 발명의 범주내의 것이다. 여러 상이한 라벨이 있으며, 라벨링 방법은 당업에 통상적인 기술을 가진 자들에게 공지되어 있다. 본 발명에 사용할 수 있는 라벨 타입의 예로는 효소, 방사성동위원소, 콜로이드 금속, 형광 화합물, 화학발광 화합물 및 생물발광 화합물을 포함한다.
- [0343] 통상적으로 사용되는 라벨은 특히 형광물질(예컨대 플루오레세인, 로다민, 텍사스 레드 등), 효소(예컨대 양고 추냉이 과산화효소,  $\beta$ -갈락토시다아제, 알칼리성 인산분해효소), 방사성 동위원소(예컨대  $^{32}\text{P}$  또는  $^{125}\text{I}$ ), 비오틴, 디곡시제닌(digoxigenin), 콜로이드 금속, 화학발광 또는 생물발광 화합물(예컨대 디옥세탄, 루미놀 또는 아크리디니움)을 포함한다. 라벨링 방법, 예컨대 효소 또는 비오틴닐기의 공유 결합, 요오드화, 인산화, 비오틴화 등은 당업에 잘 공지되어 있다.
- [0344] 검출 방법은 이에 제한하지는 않지만 자기방사법, 형광 현미경, 직접 및 간접 효소 반응 등을 포함한다. 통상적으로 사용되는 검출 분석은 방사성동위원소 또는 비-방사성동위원소 방법을 포함한다. 상기는 특히 웨스턴블롯팅, 오버레이-분석, RIA(방사면역 분석) 및 IRMA(면역 방사면역미터 분석), EIA(효소 면역 분석), ELISA(효소 연결 면역 흡착제 분석), FIA(형광 면역 분석) 및 CLIA(화학발광 면역 분석)를 포함한다.
- [0345] 또한 본 발명은 아밀로이드 생성 및/또는 아밀로이드-플라크 형성과 관련된 질병의 예방, 치료 및/또는 진단을 위한 약학적 또는 진단학적 조성물의 제조에 본 발명의 글리코실화 항체 분자, 또는 본 발명의 방법으로 제조된 항체 분자, 또는 여기서 제공하는 모노- 및 이중-글리코실화 항체의 혼합물의 용도를 제공한다. 여기서 기재하는 화합물, 특히 본 발명의 항체 분자는 변형 또는 비정상 APP-진행 및/또는 아밀로이드 생성과 관련된 신경병리학의 예방 및/또는 치료에 이용하는 것이 또한 바람직하다. 항체 분자, 예를 들어 (조작된)면역글로불린 형, 예컨대 IgG 프레임워크의 항체, 특히 IgG1-프레임워크의 항체, 또는 키메라 항체의 형(특히 완전한 인간형 항체 또는 완전 항체), 이중특이성 항체, 단일 사슬 Fvs(scFvs) 또는 이중특이성 scFvs 등을 여기서 제공하는 약학적 조성물의 조제에 이용한다. 게다가 여기서 제공하는 항체 분자 및 혼합물은 또한 첨부된 실시예에서 설명하는 것과 같이 진단 셋팅에 유용하며, 이것은 본 발명의 항체 분자가 A $\beta$ 4 및/또는 아밀로이드 침착/플라크를 검출/상호작용하는데 특이적이기 때문이다.
- [0346] 따라서 본 발명의 화합물의 독창적인 용도는  $\beta$ -아밀로이드 플라크의 분해, 아밀로이드 (플라크) 제거, 또는  $\beta$ -아밀로이드 플라크 형성에 대항하는 수동 면역화에 의한 개량이라고 하는 신경 질환에 있어서의 약학적 조성물의 조제에 있어서의 용도이다. 첨부된 실시예에서 설명하고 있는 것과 같이 독창적인 항체 분자는 A $\beta$  응집을 예방하고, 및 이미 형성된 아밀로이드 응집의 단량체화에 특히 유용하다. 따라서 본 발명의 글리코실화 항체 또는 여기서 기재하는 모노- 및 이중-글리코실화 항체의 혼합물은 신경 보호뿐만 아니라 아밀로이드 플라크/플라크 전구물질의 제거, 병리학적 아밀로이드 침착/플라크의 감소에 이용하기 위한 것이다. 본 발명의 항체 분자는 아밀로이드 플라크의 생체내 예방뿐만 아니라 이전에 존재하는 아밀로이드 플라크/침착의 생체내 제거에도 이용된다는 것을 특히 알 수 있다. 또한 본 발명의 항체 분자 또는 혼합물은 A $\beta$  펩티드 및 A $\beta$ 의 응집체, 즉 아밀로이드- $\beta$  플라크에 대항하는 수동 면역화 접근 방법에 이용할 수 있다. A $\beta$ 4/A $\beta$ 4 침착의 제거는 특히 Fc-부분을 포함하는 본 발명의 항체를 의학적으로 이용하여 획득할 수 있다. 항체의 상기 Fc-부분은 특히 예를 들어 대식세포(식세포 및/또는 소신경계세포) 및/또는 보조 세포의 유인과 같은 Fc-수용체 중재 면역 반응에 유용하다. Fc-부분-관련 면역반응의 중재에 있어서 본 발명의 항체 분자는 (인간) IgG1-프레임워크인 것이 바람직하다. 여기서 기재한 것과 같이 본 발명의 항체 분자 또는 항체 혼합물로 치료하는 바람직한 피험체는 인간 피험체이다. 본 발명의 항체 분자의 기타 프레임워크, 예컨대 IgG2a- 또는 IgG2b-프레임워크도 또한 있다. IgG2a 및 IgG2b 형의 면역글로불린 프레임워크가 예를 들어 본 발명의 항체 분자의 과학적 이용, 예를 들어 (인간) 와일드 타입 또는 변형된 APP, APP-단편 및/또는 A $\beta$ 4를 발현시키는 형질변환 마우스의 시험에서 마우스 셋팅에 이용된다.
- [0347] 상기에서 인용한 아밀로이드 생성 및/또는 아밀로이드-플라크 형성과 관련된 질병은 이에 제한하지는 않지만 치매, 알츠하이머병, 운동신경병증, 파킨슨병, ALS(근위축성 측색경화증), 스크래피, HIV-관련 치매뿐만 아니라 크로이츠펠트 야콥병, 네덜란드형 아밀로이드증이 있는 유전성 뇌출혈, 다운 증후군 및 노화와 관련된 신경 질환을 포함한다. 본 발명의 항체 분자 및 여기서 제공하는 조성물은 아밀로이드 생성 및/또는 아밀로이드 플라

크 형성과 관련된 염증성 진행의 예방 및/또는 개선에 유용할 수 있다.

- [0348] 따라서 본 발명은 또한 상기 신경성 및/또는 신경퇴행성 질환으로 고통받는 피험체 및/또는 상기 신경성 및/또는 신경퇴행성 질환의 영향을 받기 쉬운 피험체에게 항 A $\beta$  항체 분자 또는 여기서 제공하는 독창적인 모노- 및/또는 이중-글리코실화 A-베타 항체의 혼합물, 및/또는 상기에서 규정하는 조성물을 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함하는 신경성 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료, 예방 및/또는 지연시키는 방법을 제공한다. 여기서 제공하는 치료 방법은 보조-치료적 치료의 형태, 즉 기타 약제 또는 의약품과 결합하여, 또는 본 발명의 화합물/조성물을 단독으로 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서 신경성 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료, 예방 및/또는 지연 방법은 A $\beta$ 에 직접 대항하는 모노- 및 이중-글리코실화 항체 및 여기서 제공하는 것을 포함하는 항체 혼합물을 상응하는 의학적 조정의 필요에 따라 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 제공된다.
- [0349] 여기서 사용하는 "치료(treatment)"라는 용어는 필요한 환자에게 여기서 기재한 모노- 및/또는 이중-글리코실화 항체(또는 이의 혼합물)의 투여를 포함한다. 상기 환자는 하나의 실시양태에서 병리학적 APP 프로세싱과 관련된 질환으로 고통받거나 또는 민감한 사람인 인간 환자일 수 있다. 따라서 여기서 사용하는 "치료"라는 용어는 여기서 제공하는 화합물 또는 화합물 혼합물의 예방 뿐만 아니라 치유력이 있는 투여를 포함한다.
- [0350] 여기서 제공하는 화합물 및 조성물로 치료하는 질환은 알츠하이머병이다. 거의 확실한 알츠하이머병의 진단을 받은 환자는 1984 Mckhann 등의 이러한 진단용의 National Institute of Neurological and Communicative Disorders 및 Stroke/Alzheimer's Disease 및 Related Disorders Association 크리테리아(NINCDS/ADRDA 크리테리아)를 기초로 한다.
- [0351] 또한 본 발명의 내용에 관해서 알츠하이머병과 같은 APP-관련 질환에서의 "보조-치료(co-therapy)" 셋팅에서 여기서 제공하는 화합물 및/또는 조성물의 의학적 용도가 있다. 이러한 경우에 메만틴, 도네프레질, 리바스티그민 또는 갈란타민과 같은 입증된 약제의 보조-치료가 있다.
- [0352] 또 다른 실시양태에서 본 발명은 여기서 규정하는 1개 이상의 글리코실화 항체 또는 여기서 제공하는 독창적인 모노- 및/또는 이중-글리코실화 방법의 혼합물을 포함하는 키트를 제공한다. 유리하게 본 발명의 키트는 선택적으로 완충제(들), 저장 용액 및/또는 잔류 시약 또는 의학적, 과학적 또는 진단학적 분석 및 목적의 실행을 위해 필요한 물질을 추가로 포함한다. 또한 본 발명의 키트는 개별적으로 바이알 또는 병, 또는 컨테이너 또는 멀티컨테이너 유닛에 결합하여 포장할 수 있다.
- [0353] 본 발명의 키트는 특히 본 발명의 방법을 실행하기 위해 사용하는 것이 유리하며, 여기서 나타내는 다양한 응용, 예를 들어 진단 키트, 연구 수단 또는 의학적 수단으로서 이용할 수 있다. 또한 본 발명의 키트는 과학적, 의학적 및/또는 진단학적 목적에 적합한 검출 수단을 함유할 수 있다. 키트의 제조는 당업에 통상의 지식을 가진 자들에게 공지되어 있는 표준 절차를 따르는 것이 바람직하다.

### 발명의 효과

- [0354] 본 발명은 아밀로이드 질환의 의학적 치료에 효과적인 수단 및 방법, 특히 (상응하는) 의학적 중재의 필요에 따라 환자에게 해로운 아밀로이드 플라크를 감소시키는 방법 및 수단을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0355] **도 1:** 중쇄 및 경쇄 서열의 삽입 자리를 나타내는 플라스미드 맵.
- 도 2:** 분석용 크로마토그램의 예.
- 도 3:** 본문에서 기재한 CMT 컬럼의 크로마토그램. 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 이성질체는 이중 피크 1에서 용출되며, 비-글리코실화 이성질체는 피크 2에서 용출됨.
- 도 4:** 항체 A 이성질체의 전체 IgG ESI-MS 분석. 주 피크의 분자 질량은 Da으로 나타냄. A: 비-글리코실화 항체 A; B: 모노-글리코실화 항체 A; C: 이중-글리코실화 항체 A.
- 도 5:** 추론된 항체 N-글리코실화 패턴의 도식. 단지 부분적으로 발생하는 구조는 괄호로 나타냄. A: 복합체 타입; B: 하이브리드 타입; C: 올리고만노스 타입; GlcNAc=N-아세틸-글루코사민, Man=만노스; Gal=갈락토스; Fuc=푸코스; NeuAc=N-아세틸-뉴라민산.
- 도 6:** MS 및 HPAEC-PAD 분석으로 추론되는 항체 A의 Asn306의 카보하이드레이트 구조의 도식 제시. 단지 부분

적으로 발생하는 구조는 괄호로 나타냄. GlcNAc=N-아세틸-글루코사민, Man=만노스; Gal=갈락토스; Fuc=푸코스; NeuAc=N-아세틸-뉴라민산.

**도 7:** 고정된 섬유성 A $\beta$ 40(Biacore 센서 칩)에 항체 A 이성질체의 결합. 항체 농도 60 nM. 즉 정제 전의 모든 이성질체 혼합물의 결합 곡선은 지시한 것과 같이 나타남.

**도 8:** 펩스팟 분석에 의한 항체 A 조성물의 에피토프 맵핑. A) 나타낸 단일 중복 데카펩타이드 스팟의 펩스팟 신호; B) 단일 중복 데카펩타이드 스팟의 신호 강도의 밀도계측 분석.

**도 9:** 단량체화 분석. 항체 A 조성물 및 항체 A 이성질체는 응집 A $\beta$ 로부터 비오틴화 A $\beta$ 의 방출을 유도함.

**도 10:** 항체 A 조성물 및 항체 A 이성질체를 포함하는 항체 A 조성물은 인간 뇌척수액(CSF)으로부터의 가용성 A $\beta$ 를 포획함. 알츠하이머병 환자로부터의 4 CSF 시료 평균은 2개를 합동으로 분석함. 2개의 면역침강 후에 웨스턴 블롯의 밀도계측에 의해 포획된 A $\beta$ 의 정량으로 풀 당 웨스턴 블롯을 실행함. 주어진 일련의 웨스턴 블롯에서 가장 높은 A $\beta$  값은 100 %임.

**도 11:** 실험실내에서 항체 A 이성질체로 인간 아밀로이드 플라크의 간접 면역발광 염색. 10 ng/ml 항체 A 농도로 염색한 후 순수한 생체의 인간  $\beta$ -아밀로이드 플라크의 높은 민감성과 특이적 검출. 결합된 항체 A는 (A) 항체 A 조성물; (B) 이중-글리코실화 항체 A; (C) 모노-글리코실화 항체 A; 및 (D) 비-글리코실화 항체 A에 있어서의 염소 항-인간 (H+L)-Cy3에 의해 밝혀짐. 스케일 바=80  $\mu$ m.

**도 12:** 글리코실화 항체 A 이성질체로 PS2APP 형질전환 마우스 플라크의 생체내 면역-데코레이션을 공초점 현미경으로 밝힘. 면역데코레이션으로 1 mg 항체 A 이성질체를 단일 투여하고 3일 후에 항체 A 이성질체의 생체내 결합을 밝힘. 항체 A 이성질체의 분포의 대표적인 이미지는 이중- (A), 모노- (B) 및 비-글리코실화 (C) 항체 A 이성질체를 나타냄. 스케일 바=80  $\mu$ m.

**도 13:** 세포 표면 APP에 항-A $\beta$  항체의 결합 분석. 인간 APP-감염 HEK293 세포 및 비-감염 대조군 세포에 결합한 항체를 유세포분류기로 분석함.

**도 14:** 항체 A 비-, 모노- 및 이중-글리코실화 항체 분자(면역글로불린)의 도식.

**도 15:** 항체 A 조성물(모노- 및 이중-글리코실화 항체 A 포함), 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 항체 A 이성질체(주당 20 mg/kg 정맥내 주입) 또는 매체로 5개월 치료한 후 시상 부위의 총 플라크 표면 (A), 총 플라크 수 (B) 및 플라크 수와 크기 분포 (C).

**도 16:** 항체 A 조성물(모노- 및 이중-글리코실화 항체 A 포함), 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 항체 A 이성질체(주당 20 mg/kg 정맥내 주입) 또는 매체로 5개월 치료한 후 피질 및 뇌량 부위의 총 플라크 표면 (A), 총 플라크 수 (B) 및 플라크 수와 크기 분포 (C).

**도 17:** 항체 A 조성물(모노- 및 이중-글리코실화 항체 A 포함), 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 항체 A 이성질체(주당 20 mg/kg 정맥내 주입) 또는 매체로 5개월 치료한 후 해마 부위의 총 플라크 표면 (A), 총 플라크 수 (B) 및 플라크 수와 크기 분포 (C).

**도 18:** 항체 A 조성물(모노- 및 이중-글리코실화 항체 A 포함), 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 항체 A 이성질체(주당 20 mg/kg 정맥내 주입) 또는 매체로 5개월 치료한 후 해마이행부 부위의 총 플라크 표면 (A), 총 플라크 수 (B) 및 플라크 수와 크기 분포 (C).

**도 19:** PS2APP 마우스에 1, 2 및 4 정맥내 주입으로 0.1 mg/kg을 격주로 투여한 후에 아밀로이드- $\beta$  플라크에 결합하는 면역염색 항체 A 조성물의 형광 강도의 측정. 분석은 마지막 주입 2 주 후에 실행함.

**도 20:** PS2APP 마우스에 2 및 3 정맥내 주입으로 0.15 mg/kg을 매달 투여한 후에 아밀로이드- $\beta$  플라크에 결합하는 면역염색 항체 A 조성물의 형광 강도의 측정. 분석은 마지막 주입 2 주 후에 실행함.

**도 21:** PS2APP 마우스에 0.05, 0.1 및 0.30 mg/kg을 4회 격주로 투여한 후에 아밀로이드- $\beta$  플라크에 결합하는 면역염색 항체 A 조성물의 형광 강도의 측정. 분석은 마지막 주입 2 주 후에 실행함.

**도 22:** PS2APP 마우스에 0.075, 0.15 및 0.45 mg/kg을 매달 3회 투여한 후에 아밀로이드- $\beta$  플라크에 결합하는 면역염색 항체 A 조성물의 형광 강도의 측정. 분석은 마지막 주입 2 주 후에 실행함.

**도 23:** 살아있는 분화된 제1 인간 대식세포(0.8 밀리언 세포/ml)와 함께 지시한 농도에서 항체 A 조성물로 40 시간 배양한 후 항-A $\beta$  뮤린 단일클론 항체(BAP-2)로 A $\beta$ 에 대하여 염색된 인간 AD 뇌 섹션. 결과로 아밀로



이드- $\beta$  플라크상에 항체 A 조성물의 항원-의존 세포 탐식작용 효과를 나타내는 아밀로이드 로드가 감소한 것을 알 수 있음. 스케일 바=300  $\mu$ m.

**도 24:** 0.8 밀리언 세포/ml로 배양하는 경우 인간 AD 뇌 섹션으로부터 아밀로이드- $\beta$  플라크 상의 항체 A 조성물의 용량 반응. (A)는 총 플라크 영역이며, (B)는 염색 강도를 나타냄.

**도 25:** 0, 0.1, 1 및 10  $\mu$ g/ml의 항체 A 조성물(A 내지 D 각각)로 배양한 P388D1 세포의 형광 현미경.

**도 26:** A $\beta$  콘주게이트화 플루오로비드 및 P388D1 세포를 사용한 항체 A 조성물의 용량 반응의 정량적 측정(상대적 형광 단위, RFU로 나타냄). 2개의 독립적 실험은 항체 A 조성물에 있어서의 효능의 상당한 범위를 나타냄.

**도 27:** 중쇄의 불변 부위(Asn 306; 첫번째 2개 컬럼) 및 중쇄의 가변 부위(Asn 52; 세번째 및 네번째 컬럼)에서 항체 A의 상이한 글리칸 구조를 나타내는 표.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[실시예]

하기의 비-제한적인 실시예는 본 발명을 설명한다.

#### 실시예 1: 클로닝 기술에 의한 항체 A의 생성

본 발명에 따라 IgG1 분자를 통상적인 클로닝 기술을 사용하여 생성하였다. 이의 암호화 서열 및 이의 발현 아미노산 서열에서 항체 A는 중쇄(V<sub>H</sub>)의 가변 부위에 의해 특징화된다. 중쇄의 상응하는 예는 하기와 같은 DNA 서열로 암호화되며:

```
cagggtggaattggaggaaaggcgcgcgccctgggtgcaaccggcgcgagcctgcgtctgagctgcgcggcctccggattacccttag
cagctatgcgatgagctgggtgcccagccctgggaagggtctcgaagtgggtgagcgcgtattaatgcttctggtactcgtacttattatgc
tgattctgttaagggtcgtttaccatttcacgtgataatcgaacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgcgtgcggaagatacggcc
gtgtattatgcgcgcgtggtaagggttaatactcataagccttatgggtatgttcgttatgttggggccaaggcaccctgggtgacggtt
agctcagcctccaccaagggtccatcgggtctccctcctggcaccctcctccaagagcaccctggggggcacagcggccctgggctgcctg
gtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacag
tcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgacgtgcccctcagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagc
ccagcaacaccaagggtggacaagaagtgtgagccagatcgtgcgatatcgtgcaatcttggacaaaactcacatgccaccgtgc
ccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacccttgagggtca
catcgtggtggtgacgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
aagccgcgggaggagcagtagacaacagcagcgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagt
acaagtgcgaaggtctccaacaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaagcgaaggcagccccgagaaccacaggt
gtacacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctgctcaaaaggttctatccagcgacatcgc
cgtggagtgggagagcaatgggcagcgggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctcttaca
gcaagctcaccgtggacagaagcaggtggcagcagggaacgtcttctcgtcctggtgatgatgaggtctgcacaaccactacag
cagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (서열 번호 : 5)
```

및 하기 번역글로불린 H-사슬의 유전암호를 지정한다:

```
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRT
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDV
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호 : 6)
```

[0363] 동일한 중쇄는 또한 하기 서열로 나타내는 추가의 "선도 서열"을 포함하는 서열에 의해 암호화될 수도 있다:

```
atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtctctgtcc
cagggtggaattggtgaaagcggcggcgcctggtgcaaccggcggcagcctgcgtctgagctcgcgccctccggaattacatttag
cagctatcgcatgagctgggtgcgccaagccccgggaaagggtctcagtgagggtgagcgctattaatgcttctggtactcgtacttattatgc
tgattctgtaagggtctgtttaccatttcacgtgataatcgaacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatacggcc
gtgtattattgcgcgcgtggaaggtaatactcataagcccttatggttatgttcgttatttgatgtttggggccaaagcaccctgggtgacggtt
agctcagcctccaccaagggtccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctg
gtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggctgtcctacag
tcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagc
ccagcaacaccaagggtggacaagaagttagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgg
ggggaccgtcagcttctcttccccccaaaacccaagacacccctcatgatctcccggaccctgaggctcacatgcgtggtggtgacgt
gagccacgaagccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccggggaggagca
gtacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca
acaagccctcccagcccccatcgagaaacctcctcaaaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatc
ccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctggtcaaggcttctatcccagcgacatgccgtggagtgaggagagca
atgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgctccttctctctacagcaagctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcagctccgtgatgcagagcctctgcacaaccactacacgcagaagagcctcctcctgt
ctccgggtaatga (서열 번호 : 25)
```

[0364]

[0365] 상응하는 아미노산 서열은 하기와 같다:

```
MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRT
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDV
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호 : 26)
```

[0366]

[0367] 유사하게 항체 A의 경쇄는 하기의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되며;

```
gatactgtgctgaccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagccagagcgtga
gcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaccagggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagccgtgcaactgggggtcc
cggcgcgttttagcggcctggtaccggcagggattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgcgacttatttgccttca
gattataatatgcctattacctttggccaggggtacgaaagtgaattaaacgtacgggtgctgcaccatctgtcttcttccccgccatctga
tgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagcgaaggtacagtggaaggtggataacg
ccctccaatcgggtaactcccaggagaggtgtcacagagcagcagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
caaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcggcgtcacaaagagcgttcaacaggg
gagagtgtag (서열 번호 : 7)
```

[0368]

[0369] 및 하기 아미노산 서열(L-사슬)의 유전암호를 지정한다:

```
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 : 8)
```

[0370]

[0371] 또한 여기서 "선도 서열"을 이용할 수 있으며, 상응하는 서열은 하기와 같다:

```
atgggtgtgcagaccagggtcttctctgttgctctggatcctggtgcctacggg
gatacgtgctgacccagagcccgccgacccctgagcctgtctccggcgaaacgtgcgacccctgagctgcagagcagccagagcgtga
gcagcagctatctggcgtggtagcagcagaaccagggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagccgtgcaactggggtcc
cggcgcggttttagcgggctctggatccggcagggatcttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgcgactattattgcctca
gattataatatgcctattacctttggccaggggtacgaaagtgaataaacgtacgggtgctgcaccatctgtctcatcttcccgccatctga
tgagcaggtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacg
ccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagcagcaggaagacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
caaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcctgcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgttag (서열 번호 : 27)
```

[0372]

[0373] 상기 서열은 하기 아미노산 서열을 암호화한다:

```
MVLQTQVFISLLWISGAYG
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 : 28)
```

[0374]

[0375] 이러한 상기 서열은 WO 03/070760에 기재되어 있는 것과 같이 MAB31에서 공지되어 있다.



[0376] 그러나 대표적인 항체 A의 중쇄 및 경쇄는 하기로 나타내는 서열에 의해서도 암호화될 수 있다:

a) 중쇄

```
atggagtttgggctgagctgggtttccctgttgccttttaagaggtgattcatggagaaatagagagactgagtgtagtg
aacatgagtgagaaaaactggatttgtgtgcattttctgataacgggtgtccttctgtttgcaggtgtccagtgtaggtggag
ctggtggagctctgggggagggcctggccagccctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcacctcagt
agctatgccatgagctgggtccggcaggctccaggcaaggggctcagtggtgtccgccataaacgccagcggtagc
cgcacctactatgcagactccgtgaagggtcattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatg
aacgcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagggcaagggggaacacccacaagccctacggctac
gtacgtactttgacgtgtggggccaagggaacctgggtaccgtctcctcagtgagtcctcacaacctctcctcctgggc
cgcagcttgaagtctgagcagaactgttcagggtctatcggactctgtgagaattaggggctgacagttgagtgtagc
aatttcagggtcagtgactgtctgtgttctctgaggtgagactggaatatagttcacctgaagactaaagaggggtccagg
ggcttttctgcacagcagggaacagaatgtggaacaatgacttgaatgggtgattctgtgtgacaccagaatggcata
atgtctgagttgcccaagggtgatcttagctagactctgggtttttgtcgggtacagaggaacccactattgtgattact
atgtctgagactactgggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctcaggtaagaatggcctctccaggtcttttttaacct
ttgttatggagttttctgagcattgcagactaatcttgatatttggcctgaggagagccggctgagagaaagttgggaataaa
tctgtctaggatctcagagccttttaggacagattatctccacatcttgaaaaactaagaatctgtgtgagtggtgttgga
gtccctggatgatgggatagggtcttggaggtcatttgaggagatgctaaacaatcctatggctggaggatagttg
gggtgtagttggagattttcagattttagaatgaagtattagctgcaatacttcaaggaccacctctgtgacaaccattttata
cagtatccaggcatagggacaaaaagtggagtggggcactttctttgatttgtgaggaaatgttccacactagattgtttaa
acttcattttgtggaaggagctgtcttagtgattgagtcaggagagaaagcactctagcctcggctcctcaaaagggtagtgct
gtctagagagggtctgggtgagcctgcaaaagtcagctttcaaaggaaacacagaagtatgtgtatggaatattagaagatg
ttgcttttactcttaagtgggtcctaggaaaaatagttaaactgtgactttaaaatgtgagagggttttcaagtactcatttttt
aaatgtccaaaattttgtcaatcaatttgagggtctgtttgtgtaactgacattactaaagttaaccgaggaatgggagtg
aggctctctacaccctatcagaactgacttttaacaataataaattagtttaaaatatttttaaatgaattgagcaatgttgagt
tgagtcagataggccgatcagaaccggaacacctgcagcagctggcaggaaagcaggtcatgtggcaaggctatttggg
gaagggaataaaaccactaggttaaactgtagctgtggtttgaagaagtgttttgaacactctgtccagcccaccaa
accgaaagtccaggctgagcaaaacaccacctgggtaatgtgcatttctaaaaataagttgaggatcagccgaaactggag
aggctcctcttttaactattgagttcaaccttttaatttagcttgagtagtctagtttcccaacttaagttatcgaacttctaaaa
tgtattagaattcagctcgggtacagcttttggggcaggccaggcctgaccttggctttggggcaggaggggggctaa
ggtgaggcaggtggcggcagcaggtgcacaccaatgcccagagccagacactggagcgtgaacctcgcggacag
ttaagaaccaggggctctgtgcctggggcagcctgtgtccacaccgggtcacatggcaccacctcttgcagcct
```

[0377]



ccaccaaggcccatcgggtcttccccctggcacccctccccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcct  
 ggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccg  
 gctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctac  
 atctgcaacgtgaatcacaaagccagcaaccaaggtggacaagaaagtgggtgagagggcagcacaggaggaggag  
 ggtgtctgtggaaggcaggctcagcgctctgcctggacgcacccggctatgacgcccagtcaggggcagcaagg  
 caggccccgtctgctcttaccggagcctctgcccggccactcatgctcaggagaggggttcttggcttttccag  
 gctctgggcaggcacaggctagggtgcccctaacccaggccctgcacacaaagggcaggtgctgggctcagacctgc  
 caagagccataccgggaggaccctgcccctgacctaaagccaccccaaggccaaactctccactccctcagctcgga  
 caccttctctctccagattccagtaactcccaatcttctctctcagagcccaaatcttggacaaaactcacacatgccca  
 ccgtgccaggtgaagccagccagcctgcctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatccag  
 ggacaggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagct  
 tctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggtgggtgacgtgagc  
 cacgaagacctgaggtcaagttcaactgttacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccggggag  
 gagcagtacaacagcacgtaccgtgtgtgacgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaca  
 agtgaagggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacccgtgggg  
 tgcgaggggccacatggacagaggccggctcggccaccctctgcccctgagagtgaccgtgtaccaacctctgtcccta  
 cagggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgccccateccgggatgagctgaccaagaaccaggctagcctg  
 acctgcctgggtcaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactac  
 aagaccacgctccccgtgtggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca  
 gcagggggaacgtcttctcatgctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtcccc  
 gggcaaatga (서열 번호 : 23)

[0378]

b) 경쇄

atggacatgagggctcctgctcagctcctggggctcctgctgctctgttcccaggtaaggatggagaacactagcagttta  
ctcagccaggggtgctcagctactgctttactattcagggaattctcttacaacatgattaatgtgtggacattgttttatgttt  
ccaatctcaggcgccagatgtgatactgtgtgacgagctcctcagccaccctgtcttctcagggggaaagagccacc  
ctctcctgccgggcccagcagagtgtagcagcagctacttagcctggtaccagcagaacctggccaggcgccagggc  
tctcatctatggcgatccagcagggccactggcgtgccagccaggttcagtgagcagtggtgctgggacagacttact  
ctcaccatcagcagcctggagcctgaagatttcgcgacattactgtctgcagattacaacatgcctatcacgttcggcca  
agggaccaaggtggaaatcaaacgtgagtagaatttaaactttgcggccgctagacgttlaagtgaggagatttgagggg  
gatgaggaaatgaaggaaactcaggatagaaaagggtgaagcaagttcagctcctaaaatgatgtgggagcaacttt  
gaagataaactgaatgaccagagagatgaacagcgagatcaaaaggggcctggagctctgagaagagaaggaga  
ctcatcctgtgtgagtttccacaagtactgtctgtgatttgaataaaaagggtagacagagttgagtgagccgtaggctg  
agttctctcttctgctcctaaagttttactacaaaaatcagtagtatgtcctgaaataatcattaagctgtttgaaagtatgac  
tgcttgccatgtagataccatgtctgtgaatgatcagaagggtgtgactcttattctaaaattgtcacaaaatgtcaaat  
gagagactctgtgaaagagctctgacagacagctcaagggttttttcttctgtctatttctacatgaaagtaaatga  
aatgatctttttattataagatgagaataacagttgggtttgaactatatttttaagccacggtttgtaagacatttgctct  
ttgtttccagttattactgattgaattttatcgcagcaatggactgaaacgggtccgaacctcttctttacaactgggt  
gacctcgcggtgtgccagccatttggcgttcacctgcccgttaaggccatgtgaacccccggttagcatccctgtct  
cgcggtgaccactttctgaggcacagttagaggaacagaccactaatctgaagagaacagagatgtgacagactaca  
ctaagtggagaaaacaaggaaagggtgacttattggagattcagaataaaatgcatttattattatcccttattttaattt  
ctattagggaattagaaaggccataaactgctttatccagtgttatataaaagcttaagtataatcttttagaggtaaatct  
acagccagcaaaagtcaggttaaatattcttgactgaactctcactaaactcctctaaattatgtcatattaaactggttaaat  
aataaaatttggatgacatgaccttaactggttaggttaggatattttctcatgcaaaaatagactaataaatttagcacaaaa  
atatttcccaactttaattctgtgatagaaaaatgttaactcagctactataatccataatttgaactatttttagcttttg  
tgttgaccttccctagccaaaggcaactatttaaggacctttaaactcttgaactactttagagtcattaagtatttaac  
cacttttaattactttaaaatgatgcaattcccttttaactattatttttaagggggaaaggctgctcataattctattgtttt  
cttgtaaagaactctcagtttctgtttactacctctgtcacccaaggagttggcatctcaacagagggaactttccgagagg  
ccatctggcagttgttaagatcagaagtgaaagctgccagttcctccagggcaggtggccagattacagttgacctgtct  
gggtgggctaaaaattgtccatgtggttacaaccattagaccagggtctgatgaattgctcagaataattctggacacca  
aatacagaccctggcttaaggccctgtccatacagtaggttttagcttggtacaccaagggaaggccatacagaggctaata

[0379]

tcagagtattcttggagagacaggagaaaaatgaaagccagtttctgctcttaccttatgtgcttggttcagactcccaaca  
tcaggagtgtagataaactggtctgaatctctgtctgaagcatgggaactgaaaagaatgagtttcagggaagaaaggca  
atagaaggaaagcctgagaatacggatcaattcctaactctgagggggtcggatgacgtggccattcittgcttaagcatt  
gagtttactgcaaggtcagaaaaagatgcaaaagccctcagaatggctgcaaaagagctccaacaaaacatttagaacttta  
ttaaggaaatagggggaagctaggaagaactcaaacatcaagattttaatacgtcttggctccttgcataattatctg  
ggataagcatgctgttttctgtctgccttaacatgccctgtgattatccgcaacaacacaccaaggcgagaactttgtac  
ttaaacaccatctgtttgcttcttcctcaggaactgtgggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcattga  
aatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaagggtgataacgc  
cctccaatcggtaactcccagagagtggtcacagagcagcagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacct  
gacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaggtctacgcctgcgaagtcacccatcaggccctgagctcggcgt  
cacaagagctcaacaggggagagtgtag (서열 번호 : 24)

[0380]

[0381]

# 실시예 1.1 벡터 조성

[0382]

항체 A의 서열은 합성 파아지 전사 라이브러리인 MorphoSys HuCAL 라이브러리의 제1 스크리닝 후에 2차 성숙 분  
열 순환으로부터 고안하였다. 항체 A에 있어서의 DNA는 원래 독일의 MorphoSys에서의 벡터 pMorph로 제공되며,  
부속 페이지 6/43, WO 03/070760의 도 2에서의 Fab 발현 벡터에 상응한다. 본 발명의 목적을 위한 벡터 조성  
에서 벡터 pEE6.1 및 pEE 14.4(둘 다 Lonza Biologics에서 시판함)를 암호화하여 하나의 벡터에 두개의 사슬을  
가지는 조성체를 수득하였다; 첨부된 도 1 참조; WO 87/04462 또는 WO 89/01036 참조. 하기의 클로닝 전략을  
이용하였다:

[0383]

Ig 카파 사슬은 프라이머 ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGGTGTTCAG(센스, HindIII; 서열 번호 29) 및 프라이머

ACGTGAATTCCTAACAACCTCTCCCTGTT(안티센스, EcoRI; 서열 번호 30)로 PCR을 이용하여 pCR 2.1 Topo TA에 삽입하여 벡터 MS-Roche #7.9.H7\_Ig\_카파 사슬(WO 03/070760에 기재되어 있음)로부터 분리하였으며, 삽입물은 완벽한 서열이다. Ig 카파 사슬 삽입물을 HindIII/EcoRI 분해에 의해 pCR Topo 2.1에서 제거하고, HindIII/EcoRI 삽입물로서 벡터 pEE14.4에 라이게이션하였다.

[0384] Ig 감마 1 중쇄는 프라이머 ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGAAACACCTG(센스, HindIII; 서열 번호: 31) 및 프라이머 ACGTGAATTCCTATTACCCGGAGACAG(안티센스, EcoRI; 서열 번호: 32)로 PCR을 행하여 벡터 pMorph MS-Roche #7.9.H7\_IgG1에서 클론화하여 pCR 2.1 Topo TA에 삽입하였으며, 삽입물은 완전한 서열이다. Ig 감마 중쇄 삽입물을 HindIII/EcoRI 분해로 pCR Topo 2.1에서 제거하고, HindIII/EcoRI 삽입물로서 벡터 pEE 6.4에 라이게이션하였다. 중쇄 발현 카세트를 NotI/SalI 분해로 pEE 6.4 IgG1으로부터 제거하고, 분리된 단편을 SalI/NotI 분해된 pEE14.4 카파에 삽입시켜, 최종 이중-유전자 조성체 pEE 14.4 mAb-31를 제조하였다.

# [0385] 실시예 1.2: CHO 세포의 트랜스펙션 및 항체 A의 발현

[0386] 트랜스펙션은 기본적 방법에 따라 실행하였다. 숙주 세포주 CHO K1은 Lonza Biologics 워킹 세포 은행(WCB) #028-W2(Lonza, 2002, 1-179)에서 수득하였으며, 숙주 세포주 CHO K1 SV는 Lonza Biologics 마스터 세포 은행(MCB) #269-M(Lonza, 2003, 1-87)에서 수득하였다.

[0387] WCB #028-W2에서 수득한 부착하는 CHO K1 세포를 리포솜 트랜스펙션에 의해 중쇄 및 카파 경쇄 유전자를 둘 다 함유하는 벡터 pEE 14.4 MAb31로 트랜스펙션시켰다(Fugene, Roche Diagnostics). 트랜스펙션 분리물은 DMEM, GS 보충(둘 다 JRH Biosciences), 10 % 투석 FCS(PAA Laboratories, CoS#R0-CEP 2001-083-Rev00) 및 50 uM 메티오닌 선폴시민(Sigma사의 MSX)에서 선별하였다. 2 주 후 콜로니를 선택해 96 웰 플레이트에 옮겨 항체 생성을 위한 ELISA로 시험하였다. 항체 A가 가장 높게 발현된 4개의 콜로니를 일렬로 제한한 희석으로 클론화하여 82개의 클론이 1주 후에 유도되고 확장된 단일-세포 유도 배양을 수득하였다.

[0388] 상기 클론 중 1개를 부착 상태로 48 pg/세포/날의 가장 높은 특이적 제조 비율을 갖는 1개로서 선별하였다. 추가로 희석을 제한함으로써 서브클론화하여 높은 안정성의 항체 A가 발현되는 양호한 발생자를 수득하였다(Pu, (1998) Mol Biotechnol, 10, 17-25). 추가로 MCB #269-M으로부터의 CHO K1 SV 세포, CHO K1 세포의 현탁 변이형을 전기천공(electroporation)에 의해 벡터 pEE 14.4 MAb31로 트랜스펙션시킨다. 이입세포들(transfectants)을 전에 선별하고, 수득된 클론을 항체 A의 몇가지 높은 발생 클론으로 수득하기 위해 희석을 제한하여 단일 세포 클로닝을 실행하였다.

# [0389] 실시예 1.3 현탁 배양에서 항체 A를 발현하는 클론의 적응

[0390] CHO K1 클론의 가장 좋은 성장 특성은 상이한 단백질 가수분해물로 DHI 배지에서 결정하였다: 세포는 DHI 배지 w/o 글루타민(Invitrogen)에 결국 적응하며, 상기 배지는 하기의 변형이 있는 DMEM, Ham's F12 및 IMDM(각각의 비율은 1:1:2(v:v:v), Schlaeger 및 Schumpp, 1992, J Immunol Methods, 146, 111-20)의 혼합물이다: 대두 및 쌀 가수분해물: 0.2 % soy HyPep 1510 및 0.2 % rice HyPep 5603(Kerry Bioscience), 0.03 % 플로닉 F 68(Invitrogen), 25 uM MSX(Sigma) 및 5 % 투석 FCS(PAA Laboratories). FCS 농도는 세포가 혈청이 없는 배지 DHI 배지에서 실질적으로 성장할 때까지 점차적으로 감소시킨다. 혈청이 없는 DHI 배지에서 제1 종자 은행을 몇가지의 재조합 세포 클론을 목적으로 냉동시켰다.

[0391] CHO K1 SV 클론을 10 % 투석 FCS를 함유하는 DMEM에서 2 단계 절차(Lonza)의 25 uM MSX가 있는 화학적으로 규정된 CD-CHO 배지(Gibco-Invitrogen)에서의 현탁 배양에 적응시켰다. 세포 은행을 CD-CHO에서 야기시켰다. 선택적으로 CHO 세포를 위한 임의의 기타 혈청이 없는 및 단백질이 없는 배지를 항체를 발현시키기 위한 기본으로서 현탁 배양을 위해 사용할 수 있다.

# [0392] 실시예 2: 항체 A의 제조

## [0393] (유가식 발효에 의한) 항체 A의 제조

[0394] CHO 클론을 하기와 같은 회전 배양(spinner cultures) 또는 진탕 플라스크(shake flasks)에서 보존 배양(stock cultures)을 발효하여 제조하였다.

[0395] 각각의 클론의 냉동바이알(cryo vial)을 50-75 ml의 아주 적은 부피로 회전 또는 진탕 플라스크 100 ml에 25 uM MSX를 함유하는 각각의 배양 배지에서 해동시켰다.

[0396] 그 다음에 세포를 1:5로 연속적으로 나누어 진탕 플라스크 또는 회전하면서 400-500 ml 부피의 보존 배양이 될

때까지 퍼지도록하였다. 발효조의 접종에 사용하는 세포는 해동 후 90일까지의 상기 보존 배양에서 얻을 수 있다. 이러한 시드 트라인을 2L 진탕 플라스크 또는 회전식 2x 1000 ml 단계로 구성되며, 이후에 추가의 용기로서 10L 발효조에 접종한다. 대안적으로 10L 발효조는 유가식 용기 그자체로서 기능하거나, 또는 100L 유가식 발효조에 접종함으로써 기능할 수 있다. MSX는 차단되는 10L 발효조의 접종까지 선별을 위해 배양 배지에 존재한다.

[0397] 발효 과정:

[0398] 0 일:  $3-4 \times 10^5$ /ml 세포로 개시(시드 배양에서 1:4-1:5로 나눔)

[0399] 2-3 일: 영양분 공급 개시, 세포 밀도는  $1.5 \times 10^6$ /ml 이상이어야 함.

[0400] 영양분 공급: 1 일 당 2 %로 연속적으로 또는 큰 덩어리로 공급.

[0401] 항체 A의 이성질체 조성물은 이온 교환 크로마토그래피로 발효하는 내내 확인한다(하기 참조).

[0402] 14-18 일: 세포의 생존력이 (50 %)로 떨어지기 시작하고, 기대 역가에 도달하면 세포 현탁액을 원심분리 및/또는 여과로 수집하고, 필터멸균(filter-sterilized)한다. 무균상태로 보관하고 추가로 다음에 기재하는 것과 같이 진행시킨다.

[0403] 발효는 표준 절차에 따라서 실행하였으며, 예를 들어 Werner, (1993), Arzneimittelforschung, 43, 1242-9 또는 Rendall, (2003), Proceeding of the 18th ESACT meeting, May 11-14, 2003, 1, 701-704를 참조하였다.

[0404] 실시예 3: 항체 A의 정제

[0405] 정제 절차는 3개의 크로마토그래피 단계와 정용여과 단계를 기본으로 하였다: 단백질 A 친화도 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 100 kD 막을 이용한 정용여과. 겔 타입 및 컬럼 크기는 11 MabSelect(GE Healthcare, Art. 17-5199, 컬럼 직경 9 cm, 배드 길이 18 +/-2 cm), 0.4 l CM-Toyopearl 650M(Toso Bioscience, Art. 007972, 작은 이온 용량=85 microequivalents/ml, 직경 5.0 cm, 배드 길이 20 +/-2 cm), 1.3 l Q-Sepharose FF(GE Healthcare, Art. 17-0510-04), 직경 9 cm, 배드 길이 20 +/-2 cm이다. 컬럼은 상온에서 작동시켰다. 분획물은 2-8 °C에서 보관하였다. 검출은 280 nm에서 실행하였다. 0.1 m<sup>2</sup> 영역을 갖는 Biomax 100 초여과 모듈(Millipore Corp. Art. P2B100A01)을 농축과 정용여과를 위해 사용하였다.

[0406] 단백질 A 크로마토그래피

[0407] 하기 용액을 정제수를 사용하여 제조하였다:

[0408] 용액 A(평형 완충액): 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA, HCl로 pH를 7.1 +/-0.1로 조정

[0409] 용액 B(세척 완충액 1): NaOH로 pH를 4.5 +/- 0.1로 조정한 100 mM 아세트산

[0410] 용액 C(용출 완충액): NaOH로 pH를 3.2 +/- 0.1로 조정한 100 mM 아세트산

[0411] 용액 D(세척 완충액 2): 100 mM 아세트산, 75 mM NaCl, pH 3 +/- 0.1

[0412] 용액 E:(재생 완충액): 2 M 염산 구아니딘, 100 mM Tris, pH는 HCl로 7.5 +/-0.1로 조정

[0413] 용액 F(저장 완충액): 200 mM 벤질 알콜, 100 mM 아세트산, 수산화나트륨으로 pH를 5.0 +/-0.1로 조정

[0414] 컬럼을 우선 3 배드 부피의 용액 A로 평형화하였다.

[0415] 이후에는 깨끗한 세포 배양 현탁액(45 l, 386 mg/l 항체)으로 충전하고,

[0416] 5 배드 부피의 용액 A로 세척하고,

[0417] 3 배드 부피의 용액 B로 세척하고,

[0418] 3.5 배드 부피의 용액 C로 용출시키고, 용출액을 수집하고,

[0419] 3 컬럼 부피의 용액 D로 세척하고, 및

[0420] 2 컬럼 부피의 용액 E로 재생하고,



- [0421] 3 배드 부피의 완충액 A로 평형화시키고,
- [0422] 및 저장을 위해 배드 부피의 완충액 F로 세척하였다.
- [0423] 직선 유속 100 cm/h를 모든 크로마토그래피 단계에 사용하였다.
- [0424] 컬럼 로드는 17.4 g 항체/1 Mabselect 겔이고, 이성질체의 총 혼합물에 대한 수율은 96 %이다.
- [0425] 바이러스 불활성화
- [0426] 하기 용액을 정제수를 사용하여 제조하였다:
- [0427] 용액 G(조정 용액): 2 M 아세트산나트륨
- [0428] 단백질 A 용출액의 pH를 농축된 아세트산 또는 2 M 아세트산나트륨(용액 G)을 첨가하여 3.5 내지 3.7로 적정하였다. 15 분 동안 교반한 후 2 M 아세트산나트륨(용액 G)을 첨가하여 pH를 4 +/-0.1로 조정하였다.
- [0429] 양이온 교환 크로마토그래피
- [0430] 하기 용액을 정제수를 사용하여 제조하였다:
- [0431] 용액 H(평형화 완충액): 100 mM 아세트산, NaOH를 사용하여 pH를 4.0 +/-0.1로 조정
- [0432] 용액 I(용출 완충액 1): pH를 조정하지 않은 250 mM 아세트산나트륨, pH 7.8-8.5
- [0433] 용액 J(용출 완충액 2): pH를 조정하지 않은 500 mM 아세트산나트륨, pH 7.8-8.5
- [0434] 용액 K(재생 용액): 0.5 M 수산화나트륨
- [0435] 용액 L(저장 완충액): 0.01 M 수산화나트륨
- [0436] 컬럼을 우선 2 배드 부피의 용액 K로 재생시킨 후 5 배드 부피의 용액 H로 평형화시킨다.
- [0437] 이후에 단백질 A 용출액의 1개 분취량을 충전하고 1 배드 부피의 용액 H로 세척하였다.
- [0438] 6 배드 부피의 용액 I로 용출시킨다. 이 단계에서 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 이성질체 혼합물이 용출된다. 다음 단계에서 3 배드 부피의 용액 J를 사용하여 비-글리코실화 이성질체를 용출시킨다.
- [0439] 사용한 후 컬럼은 2 배드 부피의 용액 K로 재생시키고, 상기 완충액에서 24 시간 보관한 다음에 2 배드 부피의 용액 K로 다시 세척한다. 저장을 위해서 3 배드 부피의 용액 L로 세척한다.
- [0440] 시료 크로마토그램을 도 3에 나타내었다.
- [0441] 크로마토그래프 분획물은 하기에 기재한 분석 IEX로 분석하였다.
- [0442] 직선 유속 100 cm/h를 모든 크로마토그래프 단계에 사용하였다.
- [0443] 컬럼 로드는 14.3 g 항체/1 CM-Toyopearl 650 M이고, 수율은 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 이성질체 혼합물에 있어서 79 %이고, 비-글리코실화 이성질체는 6.2 %이다.
- [0444] Q-Sepharose FF를 이용한 크로마토그래프를 통한 흐름
- [0445] 하기 용액을 정제수를 사용하여 제조하였다:
- [0446] 용액 M(회석 완충액): 37.5 mM Tris, 아세트산으로 pH를 7.9 +/-0.1로 조정
- [0447] 용액 N(조정 용액): 2 M Tris
- [0448] 용액 O(평형화 완충액): 83 mM 아세트산나트륨, 25 mM Tris, pH 7.5 +/-0.1
- [0449] 용액 P(재생 완충액 1): 0.5 M NaOH/1 M NaCl
- [0450] 용액 Q(재생 완충액 2): 0.2 M 아세트산/1 M NaCl
- [0451] 용액 R(저장 완충액): 0.01 M NaOH
- [0452] CMT 컬럼으로부터의 용출액(산성)은 우선 용액 M으로 1:3 회석한 다음 용액 N으로 pH를 7.5로 조정하였다.
- [0453] 첫째로 컬럼을 2 배드 부피의 용액 O로 평형화시키고, 이후에는 CMT 컬럼에서의 회석한 용출액을 컬럼상에 통과

시키고 유통액(flow through)을 수집하였다. 생성물을 280 nm에서 흡수가 0.1 이하가 될 때까지 용액 0로 용액이 있는 컬럼에서 세척 제거하였다(수집한 유통액).

[0454] 컬럼을 1.5 배드 부피의 용액 P로 재생하고 1 시간 동안 보관한 다음 또 다른 1.5 배드 부피의 용액 P로 재생하였다. 그 다음에 컬럼을 2 배드 부피의 용액 Q로 재생하고 3 배드 부피의 용액 R로 세척한 다음 보관하였다.

[0455] 직선 유속 100 cm/h을 모든 크로마토그래프 단계에서 사용하였다.

[0456] 컬럼 로드는 3.5 g 항체/1 Q Sepharose FF이고, 이중-글리코실화 및 모노-글리코실화 이성질체 혼합물의 수율은 91 %이다.

[0457] 정용여과

[0458] 하기 용액을 정제수를 사용하여 제조하였다:

[0459] 용액 S(정용여과 완충액): 20 mM 히스티딘, HCl로 pH를 5.5로 조정

[0460] 필터 홀더 펠리콘 2(filter holder Pellicon 2, Millipore Corp.)에 1 초여과 모듈 타입 Biomax 100(Millipore Corp., 면적=0.1 m<sup>2</sup>, Art.P2B100A01)을 장착했다. 실리콘 튜빙이 장착된 WATSON-MARLOW 501 U 펌프를 펌핑용으로 사용하였다. 시스템을 완충액 0로 닦아낸 후 QS 크로마토그래피(농축된 아세트산으로 pH를 5.5로 조정함)로부터의 유통액 3.8 리터(1.1 g 항체/l)를 4-11 °C에서 1 시간 내에 250-300 ml로 농축하였다. 이후에 완충액 S(약 10 부피) 3 리터로 정용여과(V=const.)를 실행하였다(4-11°). 마지막으로 생성물을 Millipac 20 필터(Millipore Corp.)를 사용하여 멸균 여과하였다. 초여과/정용여과 단계의 수율은 91 %이다. 생성물의 농도는 15 mg/ml이다. 생성물은 -70 °C에서 냉각할 수 있다.

[0461] 분획물 분석을 위한 분석 IEX 방법

[0462] 컬럼: Mono-S HR 5/5(GE Healthcare, Art. 17-0547-01)

[0463] 완충액 1: 50 mM 몰포리노에탄설폰산, 수산화나트륨으로 pH를 5.8로 조정

[0464] 완충액 2: 50 mM 몰포리노에탄설폰산, 수산화나트륨으로 pH를 5.8로 조정한 1 M NaCl

[0465] 유속: 1 ml/분

[0466] 검출: 280 nm

[0467] 시료 로드: 36-72 u

[0468] 그래디언트: 시간 % 완충액 2

[0469] 0 분 0

[0470] 1 0

[0471] 25 63

[0472] 27 63

[0473] 28 0

[0474] 35 0

[0475] 대표적인 크로마토그램을 도 2에 나타내었다.

[0476] 수율

# 표 1

단계	이성질체	단계 수율
MabSelect(단백질 A)	모든 이성질체의 혼합물	96 %
CM-Toyopearl 650 M	모노-글리코실화 항체 A 및 이중-글리코실화 항체 A의 혼합물 비-글리코실화 항체 A의 함량 < 0.5 %	79%
	비-글리코실화 항체 A	6.2 %

Q-Sepharose FF	모노-글리코실화 항체 A와 이중-글리코실화 항체 A의 혼합물 비-글리코실화 항체 A의 함량 < 0.5 %	91 %
농축과 정용여과	모노-글리코실화 항체 A와 이중-글리코실화 항체 A의 혼합물 비-글리코실화 항체 A의 함량 < 0.5 %	91 %

[0478] **실시예 4: SDS-PAGE에 의한 항체 A 이성질체의 특성 확인**

[0479] SDS-PAGE 분석은 4-12 % NuPage 그라디언트 Bis-Tris 겔(Invitrogen) 및 대조군으로서 마커 MARK12(Invitrogen)를 가지고 표준 방법을 사용하여 실행하였다. 발효(Prod 01, 02, 03) 또는 회전 배양(모든 다른 라인)으로부터의 단백질 A 정제 현탁액 1-3 ug을 각 웰에 로딩하였다. 환원 조건하에서의 분석으로 중쇄의 분자량 범위내의 피크 1에 있어서의 단일 밴드(이중-글리코실화 항체 A), 피크 2에 있어서의 이중 밴드(모노-글리코실화 항체 A) 및 피크 3에 있어서의 단일 밴드(비-글리코실화 항체 A)가 수득되었다. 피크 2의 2개 밴드의 분자량은 각각 피크 1 및 피크 2의 분자량에 상응한다.

[0480] 유사한 결과가 하기와 같은 몇가지의 발현 시스템을 이용하여 수득되었다: HEK 293 EBNA 세포의 일시적 트랜스펙션, CHO 세포의 일시적 트랜스펙션 및 CHO 세포의 안정한 발현.

[0481] **실시예 5: 질량 분석기(MS) 분석에 의한 항체 A 이성질체의 특성 확인**

[0482] 모든 항체 A 이성질체의 완전한 항체 질량 프로파일은 전자 분무 이온화 질량 분석기(ESI-MS)로 측정하였다.

[0483] 상기에 있어서 항체 A의 시료를 비-환원 조건하에서 준비하였다. 시료를 G25 겔 여과에 의해 2 % 포름산 및 40 % 아세트니트릴로 탈염화하고, Waters사의 LCT-질량 분석기 장치 또는 Q-Tof2에서 ESI-MS 분석에 사용하였다.

[0484] 분자 질량에 의한 분리에 의해 비-글리코실화 항체 A 및 모노-글리코실화 항체 A 사이의 1623 차이가 수득되었다. 아미노산 서열로부터의 비-글리코실화 항체 A의 기대 질량은 145,979 Da의 실험으로 결정한 질량에 일치하게 145,987 Da이다. 유사하게 모노- 및 이중-글리코실화 항체 A 이성질체는 도 4에서 지적인 것과 같이 1624 Da 차이가 났다. 분자 질량에서의 확인된 차이는 하기에 보다 상세하게 설명하는 N-글리코실화 패턴과 모순이 없다.

[0485] **실시예 6: 항체 A의 Asn-52 글리코실화 구조**

[0486] Asn52는 N-글리코실화 일치 서열 Asn-aaa-Ser/Thr에 상응하는 중쇄의 가변 부분의 서열 aaa-aaa-Asn-Ala-Ser-aaa-aaa의 일부이다. Asn52의 N-연결형 글리코실화는 항체 A 이성질체의 트립틱 펩티드 맵핑과 Asn52 함유 펩티드 HC/T4의 질량 분석 평가에 의해서 실행하였다. 비-글리코실화 항체 A의 트립틱 펩티드 맵에서 독점적으로 비-글리코실화 HC/T4 펩티드에 질량에 상응하는 펩티드는 Asn52가 글리코실화되지 않은 것으로 나타나는 반면에 모노- 또는 이중 글리코실화 항체 A에서는 펩티드가 HC/T4 함유 N-연결형 당 구조에 질량에 상응하도록 검출되었다.

[0487] 중쇄의 트립틱 펩티드 HC/T4에서 일치 서열의 글리코실화를 추가로 확인하기 위해서 글리코실화 HC/T4 펩티드를 글리코실화 항체 A 이성질체의 펩티드 맵에서 분리하고, N-글리코시다아제 F로 배양하기 전 및 후에 MALDI-질량 분석기로 분석하였다. N-글리코시다아제 F 처리 이전에 HC/T4 펩티드 함유 N-연결형 당 구조에 상응하는 질량들이 수득되었다. 그러나 N-글리코시다아제 F로 처리한 HC/T4의 질량은 당 사슬이 N-글리코시다아제 F에 의해 아스파라긴에서 제거된다고 기대한 것과 같이(Asn에서 Asp로-전환) 비-글리코실화 HC/T4 +1Da에 일치하였다.

[0488] Asn52에 부착된 당 구조에 N-아세틸-뉴라민산이 존재하면 또한 N-연결형 복합체 및 하이브리드 타입 당 구조의 존재를 나타낸다. 상기에 있어서 글리코실화 항체 A 이성질체는 Asn306에서 N-당을 제거하고, Asn52에서는 제거하지 않고, 뉴라미니다아제를 가지고 또는 가지지 않고, N-글리코시다아제 F로 처리하여 변성 및 환원 및 탈염화에 의해 HC 및 LC의 분리 후에 분석하였다. 두개의 접근법에서 HC에 있어서 수득된 질량은 1개 또는 2개 시알산에 상응하는 약 291 Da 또는 582 Da 차이가 났다. 상기에서 또한 복합체 및/또는 하이브리드 타입의 N-연결형 당이 Asn52에 부착되어 있다는 결론이 나왔다.

[0489] 상기 Asn-52 글리코실화, N-글리코실화는 코어 푸코실화없이 바이안테나 복합체 타입( $\geq 75$  %; 주로 80-90 %)의 당 구조로 주로 구성되며, N-아세틸-뉴라민산 함유 복합체 타입 안테나 80 %까지 높게 시알산화된다. 작은 당

구조는 각각 바이안테나 하이브리드와 올리고만노스 타입( $\leq 25\%$ )에 속한다(도 5 또는 도 27). 모든 Asn52 글리코실화 구조에 일반적인 것은 온전한 항체 A에서 N-글리코시다아제 F에 의한 분리에 내성이 있다.

[0490] **실시예 7: 항체 A의 Asn306 글리코실화 구조**

[0491] 상기에서 지정한 것과 같이 함유된 항체 A는 복합체 바이안테나 올리고사카라이드 사슬로 구성되는 항체 타입 글리코실화가 중쇄(HC)의 Fc-부분의 아스파라긴 306(Asn306)에 부착되어 있다. 항체는 말단 글리코실화, 시알 산화 및 코어 푸코실화 정도가 다양한 상기 복합체 바이-안테나 올리고사카라이드 사슬의 상이한 이성질체를 함유한다고 잘 공지되어 있다. 또한 Fc-위치 당 사슬에 코어 푸코실화가 없는 정도는 코어 푸코실화의 정도가 항체의 효과기 기능을 제어한다는 것을 잘 알고 있는 것과 같이 항체의 생체내 효율성에 중요하다는 것이 알려져 있다.

[0492] 항체 A에 있어서 Asn306에 부착된 Fc-위치 당 사슬에 주요한 항체의 통상적인 변이체(Routier(1997), Glycoconjugate 14(2), 201-207; Raju(2003), BioProcess International, 44-52)는 말단 갈락토실화 및 코어 푸코실화에 따라서 발견된다.

[0493] 말단 갈락토실화의 정도의 이질성( $G0 : G1 : G2$  구조)은 약 35-40 %  $G0$ -구조, 약 45 %  $G1$ -구조 및 약 15-20 %  $G2$ -구조로 결정되었다(구조의 도식 설명은 도 6 또는 도 27 참조).

[0494] 코어 푸코실화가 없는, 즉 코어 당 구조의 가장 내부의 N-아세틸-글루코사민에 부착된 푸코스 단위가 없는 Fc-당 구조의 함량은 아마도 상기 푸코스 단위의 존재 또는 부재가 효과기 세포의 Fc-수용체에 항체를 결합시키는 것을 중재할 수 있어 상기 세포의 활성화에 영향을 주므로 항체에 중요할 것이다.

[0495] 항체 A에 있어서 Asn306에 코어 푸코실화가 없는 당 사슬 이성질체의 상대적 함량은 하기에 설명하는 2개의 상이한 방법으로 결정하였다:

[0496] A) 완전한 글리코실화 HC의 질량 분석:

[0497] 항체 A의 시료를 변성시키고, 경쇄(LC)로 환원시키고, 6 M 구아니딘-염산염 및 250 mM TCEP의 존재하에 HC 글리코실화하였다. 환원 시료를 2 % 포름산 및 40 % 아세트오니트릴로 탈염시키고, Waters사의 LCT-질량 분석기 장치 또는 Q-Tof2에서 ESI-MS 분석에 사용하였다. 수득된  $m/z$  스펙트라에서 각각의 올리고사카라이드 이성질체의 상대 함량을 선택된 단일  $m/z$  상태에서 각각의 올리고사카라이드 이성질체를 함유하는 글리코실화 HCs의 피크 높이에 의해 계산하였다. 코어 푸코실화가 없는 당 구조의 상대 함량을 계산하는 것에 있어서 코어 푸코스( $G0$ -Fuc)가 없는  $G0$ -구조의 피크 높이는  $G0 + (G0\text{-Fuc})$ 의 합계를 나타낸다.

[0498] 각각의 카보하이드레이트 구조는 올리고사카라이드 구조가 대조군 실험에서 NS-분석 전에 N-글리코시다아제 F로 배양하여 제거되는 글리코실화 HC 및 HC에 있어서 수득된 질량의 차이에 따라서 정해진다.

[0499] B) HPAEC-PAD에 의한 방출 올리고사카라이드의 크로마토그래피 분석

[0500] 항체 A의 시료를 Asn306에서 올리고사카라이드 사슬을 방출시키기 위해서(Asn52의 당 구조는 사용한 조건하에서 온전한, 변성되지 않은 항체에서 제거되지 않음) pH 7.2의 인산나트륨 완충액에서 N-글리코시다아제 F로 배양하였다. 방출된 당 사슬을 원심분리 여과에 의해서 항체 A 단백질에서 분리하고, 강 알칼리 pH(pH 13)에서 아세트산나트륨 그래디언트를 사용하여 BioLC 시스템의 Dionex에서 Carbo Pac PA200 상에서 분석하였다. 사용한 컬럼은 푸코실화 올리고사카라이드 사슬에서 비-푸코실화된 것을 분석할 수 있다. 각각의 카보하이드레이트 구조에서 수득된 각각의 피크의 할당은 각각 MALDI 질량 분석기에 의해 분리되고 수집된 피크의 몰 질량을 결정하여, Carbo Pac PA200 컬럼 상에서 분석된 적당한 올리고사카라이드 표준 중 하나에 보유 시간을 비교하여 실행한다. 코어 푸코실화가 없는 당 구조의 상대적 함량의 계산에 있어서 코어 푸코스가 없는 모든 구조 중 총 면적-%를 구하였다.

[0501] 각각 몇가지 배치(이중- 및 모노-글리코실화 항체 A 이성질체의 결합물) 및 정제된 항체 A 이성질체의 분석으로 비-푸코실화 Asn306 연결형 올리고사카라이드 사슬의 함량은 각각 ~14 % - 27 %(MS로 측정) 및 6 % - 26 %(HPAEC-PAD로 측정) 범위내이다.

[0502] **실시예 8: 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 생체외의  $A\beta$  1-40 및  $A\beta$  1-42 섬유에 결합하는 항체 A 조성물 및 이성질체(예를 들어 본 발명의 비-, 모노- 또는 이중-글리코실화 항체)의  $K_D$  값의 측정**

[0503] 섬유성  $A\beta$ 에 항체 A의 결합은 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 온라인으로 측정하고, 분자 상호작용의 친화도는 하기와 같이 측정하였다: Biacore2000 및 Biacore3000 장치를 상기 측정에 사용하였다.  $A\beta$  1-40과  $A\beta$  1-42



섬유는 37 °C에서 3일 동안 10 mM Na-아세테이트 완충액(pH 4.0)에서 200 ug/ml 농도에서 합성 펩티드의 배양으로 생체외에서 생성된다. 전자 현미경 분석으로 두개의 펩티드, 즉 우세하게 짧은(< 1 마이크로) 섬유를 나타내는 Aβ 1-40 및 우세하게 긴(> 1 마이크로) 섬유를 나타내는 Aβ 1-42의 섬유성 구조를 확인하였다. 상기 섬유는 비결정질 응집체 및 비구조적 침전물의 불명확한 혼합물 보다 더 밀접하게 인간 AD 뇌에서 응집된 Aβ 펩티드를 나타내는 것으로 확인되었다. 섬유를 1:10으로 희석하고, 제조업자의 지시서에 기재된 것과 같이 CM5와 직접 결합시켰다(BIAApplication Handbook, version AB, Biacore AB, Uppsala, 1998).

[0504] 상기 결합 방법에는 표면의 카르복실산기를 N-히드록시숙신이미드 및 1-에틸-3-(3-디아미노프로필)-카르보디이미드 하이드로클로라이드의 수성 혼합물과 표면을 접촉시킴으로써 화학적으로 반응성 숙신이미드 에스테르기로 옮기는 중에 활성화 단계를 포함하고, 활성화된 표면을 200-350 공명 유닛(1 공명 유닛(RU)은 대략적으로 표면 로딩 1 피코그램/mm<sup>2</sup>에 상응함)에서 10 mM 아세테이트 완충액(pH 4.5)에 용해된 섬유와 접촉시키는 중에 고정화 단계를 포함한다. 섬유 로딩된 표면은 그 다음에 200 nM  $\geq C \geq 0.15$  nM 범위 농도로 항체 용액과 접촉시킨다. (완충액과 접촉 중의) 회합 상(association phase)과 (다음의 완충액과 접촉 중의) 분리 상(dissociation phase) 중에 기록한 통상적인 시간 의존 반응 곡선(=센소그램)을 도 7에 나타내었다.

[0505] 항체 A 이성질체의 Aβ 1-40과 Aβ 1-42 섬유에의 결합에 있어서의 K<sub>D</sub> 값은 하기 표에 나타내었다. 간단하게 K<sub>D</sub> 값은 농도 의존 평형화 결합 반응을 사용하여 스캐차드(Scatchard) 타입 분석으로 계산하였다. 상기 평형화 결합 상수는 두가지 방법으로 수득할 수 있다.

[0506] 낮은 항체 농도에서의 매우 느린 회합 과정때문에 평형화에 도달하는 접촉 간격은 매우 길다(도 7). 그럼에도 불구하고 상기 접촉 간격은 Biacore 장치에서 확인할 수 있으며, 실험적인 평형화 반응으로 스캐차드 분석을 할 수 있다.

[0507] 평형화 결합 결과도 또한 무한대의 더 짧은 시간 의존 회합 곡선을 외삽법에 의해 추정함으로써 수득할 수 있다. 상기의 이론적으로 수득된 평형화 결합 수준을 다시 K<sub>D</sub> 값을 결정하기 위해 사용하였다.

[0508] 평형화 센서 반응을 결정하는 방법과는 독립적으로 곡선 스캐차드 플롯트를 수득하였다. 곡선 스캐차드 플롯트에서 더 높은 (1가) 및 더 낮은 (1가) 친화도 상호작용이 제2 친화도 성숙 사이클에서 유도된 항체 A 이성질체에서 유도되었다. 이러한 두가지 친화도는 하기 표에서 나타낸 범위의 더 낮은 및 더 높은 K<sub>D</sub> 값을 나타낸다:

표 2

		1-40	1-40
		높은 친화도 K <sub>D</sub> 값(nM)	낮은 친화도 K <sub>D</sub> 값(nM)
항체 A 조성물 (모노- 및 이중-글리코실화 항체 A의 혼합물)	외삽법	0.49	27.25
	표준편차	0.10	8.40
	평형	0.41	21.00
이중-글리코실화 항체 A	외삽법	1.43	18.51
	표준편차	0.02	22.33
	평형	1.54	29.00
모노-글리코실화 항체 A	외삽법	0.25	7.55
	표준편차	0.02	2.06
	평형	0.12	11.10
비-글리코실화 항체 A	외삽법	0.19	1.99
	표준편차	0.03	0.15
	평형	0.42	2.82

[0510] 상기 표는 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 항체 A 이성질체와 Aβ 1-40 섬유의 상호작용으로 형성된 낮은 친화도 복합체(1가) 및 높은 친화도 복합체(2가)의 K<sub>D</sub> 값을 나타낸다. 외삽법의 평형 반응("외삽법(extrapolation)"이라고 표시됨)을 사용하여 측정된 K<sub>D</sub>와 실험적으로 결정한 평형 반응("평형(equilibrium)"이라고 표시됨)을 사용하여 측정된 K<sub>D</sub>가 나타나 있다. 외삽법 값은 적어도 6번 측정하였고, 표준편차를 나타냈다. 실험적 및 외삽법 평형 센서 반응을 기본으로 한 K<sub>D</sub>는 상기 표준편차에 의해 나타낸 한도내에서 동일하다.

[0511] 실시예 9: 데카펩티드를 가지고 펩스팟 분석에 의해 항체 A 조성물과 이성질체(예를 들어 본 발명의 비-, 모노-

**또는 이중-글리코실화 항체)의 에피통 맵핑**

- [0512] 에피통(항원 결정기)은 직선 또는 배좌형일 수 있다. 여기서 기재한 이중 에피통 특이성은 2개의 비-연속 직선형 펩티드와 항체의 반응성으로 규정하였다.
- [0513] 특이 에피통 인식을 규정하기 위해 사용하는 에피통 맵핑 접근법은 마이크로플레이트상에 코팅된 헥사펩티드 콘쥬게이트와 ELISA 기술 또는 펄스팟 기술을 기초로하였다. 후자 기술은 일반적으로 PVDF 막에 단백질의 웨스턴 블롯팅으로 공지되어 있는 방법에 의해 항체를 검출하고 정량화하는 것이다.
- [0514] 사용하는 에피통 맵핑 기술은 직선형 에피통을 특이적으로 검출하기 위해 도안된 반면에 불연속 또는 배좌 에피통과 같은 보다 공간적인 복합체 에피통을 맵핑하는데 사용할 수 없다. 배좌 또는 불연속 에피통 맵핑에 이용 가능한 기술, 예컨대 도메인 스캐닝과 조합 펩티드 배열은 36개 이하의 아미노산(도메인) 길이 또는 각 12개 아미노산으로 구성된 결합된 펩티드가 필요하다.
- [0515] 따라서 사용하는 기술은 불연속 또는 불연속적으로 분산된 에피통인 배좌 에피통은 제외하고 직선형 에피통에 특이적인 것이다.
- [0516] 결론적으로 현재의 결과는 여기서 규정하는 A $\beta$  펩티드내의 2개 부위가 단일 헥사머 또는 데카머 A $\beta$ -펩티드 상에서 관찰된 항체의 독특한 이중 에피통 특이성을 기초로 동시에 인식되는 독립적인 직선형 에피통과 닮았다는 것을 보여준다.
- [0517] A $\beta$  (1-42)를 포함하는 하기의 아미노산 서열은 1개의 아미노산 프레임시프트가 있는 43 오버랩핑 데카펩티드로 나누어진다. 수는 항체의 최적 결합을 위한 데카펩티드내에 존재해야 하는 A $\beta$  1-40 서열의 필수적인 아미노산을 나타낸다.
- [0518] ISEVKM<sup>1</sup>DAEF RHDSGYEVHH QKLFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVI<sup>42</sup>ATV IV(서열 번호: 4). 따라서 DAEF RHDSGYEVHH QKLFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVI(서열 번호: 3)은 A $\beta$  4/ $\beta$ -A4 펩티드의 1 내지 42의 아미노산을 나타낸다.
- [0519] 43 데카펩티드는 상업적 제조업자(Jerini BioTools, Berlin)에 의한 셀룰로스 시트("펄스팟")에 C-말단 공유적 부착 및 N-말단 아세틸화로 합성하였다. 셀룰로스 시트는 블로킹 완충액(50 mM TrisHCl, 140 mM NaCl, 5 mM NaEDTA, 0.05 % NP40(Fluka), 0.25 % 젤라틴(Sigma), 1 % 소 혈청 알부민 분획물 V(Sigma), pH 7.4)에서 단클론 항체로 록킹 플랫폼 상에서 2 시간 동안 배양시킨다. 상기 시트를 TBS(10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)로 록킹 플랫폼 상에서 3 분 3회 세척하였다. 그 다음에 여과지상에 압착시키고, 캐소드 완충액(25 mM Tris 염기, 40 mM 6-아미노헥산산, 0.01 % SDS, 20 % 메탄올)으로 습윤시키고, 동일한 크기의 PVDF 막(Biorad)과 면하는 펩티드 사이드를 가진 반-건조 블롯팅 스택에 옮긴다.
- [0520] 반-건조 블롯팅 스택은 펩티드 시트보다 약간 더 큰 바로 습윤시킨 여과지(Whatman 번호 3)로 구성된다:
- [0521] 캐소드 완충액으로 습윤된 페이지 3장
- [0522] 펩티드 시트
- [0523] 메탄올로 습윤된 PVDF 막 시트
- [0524] 애노드 완충액 1(30 mM Tris 염기, 20 % 메탄올)로 습윤된 페이지 3장
- [0525] 애노드 완충액 2(0.3 mM Tris 염기, 20 % 메탄올)로 습윤된 페이지 3장
- [0526] PVDF 막 상에 옮겨지고 셀룰로스 시트로부터 완전하게 항체가 용출되기에 충분한 시간인 1 시간 동안 캐소드와 애노드 0.8 mA/cm<sup>2</sup> 사이의 전류 밀도에서 옮긴다. PVDF 막은 10 분 동안 블로킹 완충액에 침지시킨다. 형광물질 IRdye800(Rockland code# 609-132-123)으로 표지한 염소 항-인간 IgG(H+L)를 오디세이 블로킹 완충액(Li-Cor)에 1:10,000 희석하여 첨가하고 추가로 PBS, 0.05 % 트윈20에 희석하였다. 막을 1 시간 동안 록킹 플랫폼 상에서 배양하였다. 상기를 TBST(0.005 % 트윈20이 있는 TBS)로 3×10 분 세척하였다. 막을 건조시키고 도 8에서 나타난 것과 같이 긴 파장 형광 스캐너(오디세이)를 사용하여 800 nm 형광에서 스캔하였다.
- [0527] 항체-반응성 스팟을 정확하게 확인하기 위해서 바늘 구멍으로 PVDF 막을 표지하였다. 본 항체의 에피통을 반응성 펩티드의 최소 아미노산 서열로서 규정하였다. 형광 강도가 각 스팟 상에 합쳐지면, 반응성 형광 유닛(RFU)으로 기록하였다. 비교를 위해 N-말단 도메인에 있어서의 특이성을 갖는 (항체 6E10(Kim (1998))에 상응하는 BAP-1인) 2개의 마우스 단일클론 항체와 (중간 도메인에 특이성이 있는 항체 4G8(Kim (1998)))에 상응하는 BAP-

44를 검출을 위해 항-인간 Ig 대신에 항-마우스 Ig를 사용하는 것을 제외하고 동일한 방법으로 분석하였다.

[0528] 1가 Fab 단편의 완전한 길이 IgG1 항체로의 전환 및 친화도 성숙으로 펩스파와 ELISA 분석에 의해 나타내는 에피토프 인식 서열이 일반적으로 어느정도 넓어지는 것을 알아야 한다. 상기는 친화도 성숙의 결과로서 항체-항원 상호작용 영역에 보다 더 접촉 시점을 보충하거나, 또는 최소의 에피토프와 강하게 결합하여 인접한 아미노산을 갖는 약한 상호작용이 검출될 수 있다는 것과 관련이 있다. 후자는 Aβ-유도 펩티드가 완전한 길이의 IgG 항체로 탐침되는 경우일 수 있다. 하기의 표에 설명하는 것과 같이 N-말단 및 중간 에피토프의 인지 서열은 원래 Fabs와 상응하는 완전한 성숙 IgG 항체를 비교하면 3개까지 아미노산에 의해 확장하였다. 그러나 데카펩티드는 C-말단 아미노산에 공유적으로 부착되어 변형되며, 상기 아미노산은 따라서 입체 장애때문에 완전한 길이의 항체에 보다 용이하게 접근하지 못할 수 있다는 것을 알아야 한다. 상기와 같다면 마지막 C-말단 아미노산은 에피토프 인지 서열에 현저하게 기여하지 못하며, C-말단에서 1개의 아미노산에 의해 최소 인지의 잠재적인 환원은 본 발명에 사용하는 것과 같이 펩스파 분석을 해야 한다.

표 3

[0529]

항체	아미노산 위치	아미노산 위치
이중-글리코실화 항체 A	3-4(1-10)	18-24(17-26)
모노-글리코실화 항체 A	4-5(3-11)	20-26
비-글리코실화 항체 A	3-4	20-24
항체 A 조성물 (모노- 및 이중-글리코실화 항체 A 이성질체(1:1)의 혼합물)	3-5(3-11)	19-26
BAP-44(마우스 단일클론)		19-21
BAP-1(마우스 단일클론)	4-6	

[0530] 상기 표는 셀룰로스 시트 상의 데카펩티드에 완전한 길이의 IgG 항체를 결합시키는 펩스파 분석에 관한 것이다. 숫자는 항체 결합에 있어서 데카펩티드가 존재해야 하는 Aβ 1-40 서열에 아미노산 위치를 나타낸다. 에피토프의 추가 확장은 최대 결합을 획득하기 위해서 필요한 인접 아미노산을 나타내기 위해서 브라켓(bracket)에 나타난다.

[0531] **실시예 10: 응집된 Aβ로부터의 비오틴화 Aβ의 방출을 유도하는 항체 A 이성질체(예를 들어 본 발명의 비-, 모노- 또는 이중-글리코실화 항체)를 이용하는 단량체화 분석**

[0532] 응집된 Aβ의 분리를 유도하기 위한 항체 A 이성질체의 잠재성 테스트용으로 설정한 실험은 하기와 같다:

[0533] 비오틴화 Aβ 1-40을 우선 항체 A 이성질체로 처리하기 이전에 미리형성한 Aβ 1-40/Aβ 1-42 섬유에 혼입시켰다. 비오틴화 Aβ의 유리는 하기에 기재한 것과 같이 스트렙타비딘-POD 콘주게이트를 이용하는 분석을 사용하여 측정하였다.

[0534] 몇일 동안 수성 완충액에서 배양하는 경우의 합성 Aβ는 자발적으로 응집하고, 알츠하이머병 환자의 뇌에 아밀로이드 침착을 보이는 것과 유사한 섬유성 구조를 형성한다. 이후의 생체의 분석은 항-Aβ 항체 및 기타 Aβ-결합 단백질, 예컨대 알부민의 Aβ-중화 잠재성을 분석하기 위해서 미리형성된 Aβ 응집체로 비오틴화 Aβ의 유리 또는 혼입을 측정하기에 적당하다(Bohrmann(1999), J. Biol. Chem. 274, 15990-15995). 항체 A 이성질체는 혼입된 비오틴화 Aβ 1-40의 방출에 의해서 측정하는 응집 Aβ의 단량체화를 유도한다.

[0535] **실험 절차:**

[0536] NUNC Maxisorb 마이크로타이터 플레이트(MTP)에 3 일 동안 Aβ 1-40 및 Aβ 1-42(웰 당 100 ul, 각 2 uM) 1:1 혼합물로 코팅하였다. 상기 조건하에서 높게 응집된 섬유성 Aβ가 웰 표면에 흡수 및 고정된다. 그 다음에 코팅 용액을 제거하고 플레이트를 상온에서 2-4 시간 건조시킨다. 건조된 플레이트는 -20 °C에서 저장할 수 있다. 비오틴화 Aβ의 혼입에 있어서 코팅된 플레이트를 37 °C에서 밤새 0.05 % NaN<sub>3</sub>를 함유하는 TBS에서 200 ul/웰 20 nM 비오틴화 Aβ 1-40으로 배양하였다. 3 × 300 ul/웰 T-PBS로 플레이트를 세척한 후에 항체를 0.05 % NaN<sub>3</sub>를 함유하는 TBS로 연속적 희석한 항체를 첨가하고 3 시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 플레이트를 세척하고 비오틴화 Aβ 1-40의 존재에 대해 분석하였다. 300 ul T-TBS로 3× 세척한 후 1 % BSA를 함유하는 T-PBS에 1:1000으로 희석된 스트렙타비딘-POD 콘주게이트(Roche Molecular Biochemicals)를 첨가하고(100 ul/웰), 2 시간 동안 상온에서 배양하였다. 웰을 T-PBS로 3× 세척하고, 바로 제조한 테트라메틸벤지딘(TMB) 용액 100 ul/

웰을 첨가하였다[TMB 용액의 제조: 10 ml 30 mM 시트르산 pH 4.1(KOH로 조정) + 0.5 ml TMB(1 ml 아세톤 + 9 ml 메탄올에 12 mg TMB) + 0.01 ml 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. 반응은 100 ul/웰의 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 정지시키고, 흡광도는 마이크로타이터 플레이트 리더에서 450 nm에서 판독하였다.

- [0537] 첨부된 도 9에서 설명하는 것과 같이 항체 A 이성질체는 혼입된 비오틴화 Aβ 1-40의 방출에 의해 측정되는 응집 Aβ의 분리를 유도한다. 항체 A 이성질체 및 마우스 단일클론 항체 BAP-1은 유사하게 활성이 있지만(도 9), BAP-2, BAP-17 및 4G8 항체는 고정화 Aβ의 벌크에서 비오틴화 Aβ를 유리하는데 덜 효과적인 것이 확실하다(결과는 나타내지 않음). BAP-1은 세포 표면 완전한 길이의 APP와의 이의 반응성에 의해 글리코실화 항체 A 이성질체로부터 분화할 수 있는 것이 명백하다. 상기 특성을 갖는 BAP-1과 같은 항체는 잠재적 자가면역학적 반응이 유도될 수 있기 때문에 치료학적 응용에는 유용하지 않다. 응집 Aβ에 노출된 아미노산 잔기 4-6에 있어서의 이의 특이성에도 불구하고 BAP-2는 모든 N-말단 특이 항체가 선형적으로 미리형성된 응집체에서 Aβ를 방출시키는 효율성이 동일하지 않은 것을 나타내는 상기 분석에서의 활성이 아주 낮다. 이러한 분석에서 BAP-17(C-말단-특이적) 및 4G8(아미노산 잔기 16-24-특이적)의 비교적 낮은 효율성은 응집 Aβ에서 상기 2개의 에피토프의 이유를 알 수 없는 특성 때문이다. 여기서 사용하는 농도에서의 BSA는 응집 Aβ에 효과가 없다.
- [0538] 모노-글리코실화 이성질체는 생체내에서도 적절할 수도 있는 생체의 응집 Aβ 펩티드를 단량체화하기 위해 이중-글리코실화 이성질체와 비교해서 더 높은 용량을 발휘한다.
- [0539] **실시예 11: 인간 뇌척수액(CSF)에서 가용성 Aβ를 포획한 이성질체(본 발명의 모노- 및 이중-글리코실화 항체)를 포함하는 항체 A 조성물**
- [0540] 인간 CSF 시료에서 가용성 Aβ를 포획하는 용량은 면역침강법(IP) 및 반-정량적 웨스턴 블롯(WB) 분석으로 측정하였다. 실험 절차:
- [0541] 인간 CSF 시료의 면역침강법은 하기 절차에 따라서 실행하였다:
- [0542] 70 ul 인간 CSF
- [0543] 20 ul 배양 완충액(50 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA,
- [0544] 0.05 % NP-40, 1 % BSA, 0.25 % 젤라틴, 0.25 % 우유분말, pH 7.2
- [0545] 10 ul 보존 용액에서의 항체 A 이성질체(1000 - 10 ug/ml)
- [0546] 100 ul
- [0547] 상기 용액을 4 °C에서 1 시간 동안 유지하였다. 40 ul 단백질 G 세파로스 비드(Amersham Biosciences #17-0618-01; PBS로 세척, 50 % 슬러리)를 첨가하고 회전기, 4 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. 4 °C에서 3 분 동안 500 g에서 원심분리한 후 현탁액을 제거하고 200 ul PBS를 비드에 첨가하고 밀리포어 필터 튜브 0.45 um(Millipore #UFC30HVN)에 옮기고, 4 °C에서 3 분 동안 500 g에서 원심분리하였다. 추가로 200 ul PBS를 비드에 첨가하고, 볼텍스하고 4 °C에서 3 분 동안 2000 g에서 원심분리하였다. DTT가 있는 45 ul 시료 완충액 1×NuPage를 첨가하고, 70 °C에서 10 분 동안 유지한 다음에 4 °C에서 3 분 동안 2000 g에서 원심분리하였다.
- [0548] SDS-PAGE를 위해 18 ul 단백질 G 용출액을 대조군으로서 시료 완충액을 직접 내부 대조군으로서 Aβ<sub>1-42</sub>(Bachem)와 함께 NuPage 겔 10 % Bis-Tris 겔에 적용시키고 MES 완충액 시스템으로 진행시켰다.
- [0549] 겔을 상온에서 3' 건조한 막 하이본드 C 엑스트라 막(반-건조 시스템 Novex)에 옮긴다. 막을 미리 예열한 PBS에 옮기고, 600 W에서 3 분 동안 전자렌지에서 가열하였다. 블로킹은 SuperBlock 용액(Pierce)으로 1 시간 동안 실행하고, T-PBS(PBS에 0.1 % 트윈20)에서 5 % 우유 분말(Bio Rad)로 1 시간 동안 추가 블로킹을 실행하였다.
- [0550] 배양은 4 °C 회전기에서 항 Aβ 항체 W02 항체(스위스 Zuerich, Genetics, Inc. 사의 1:1500-1:2000)로 밤새 실행한 후 5 분 동안 T-PBS로 3× 세척하고 T-PBS에서 항-마우스 IgG-HRP(Dako) 1:5000으로 RT에서 2 시간 동안 배양하였다. 또 다시 5 분 동안 T-PBS로 3× 세척한 후 RT에서 5 분 동안 LumiLight Plus로 배양하였다. 웨스턴 블롯은 디지털화하고 Alpha Innotech Digital Camera System으로 밀도측정하여 분석하였다.
- [0551] 도 10에서 설명하는 것과 같이 항체 A 조성물(모노- 및 이중- 글리코실화 항체 A 이성질체를 포함함)은 웨스턴 블롯팅 실험 및 면역침강법으로 나타내는 것과 같이 인간 CSF에서 가용성 Aβ에 효과적으로 결합한다. 특히 상기 분석에서 모노-글리코실화 항체 A는 이중-글리코실화 항체 A보다 가용성 Aβ를 포획하는데 보다 효과적이다



(도 10).

- [0552] **실시예 12: 항체 A 조성물 및 이성질체(예를 들어 본 발명의 비-, 모노- 또는 이중-글리코실화 항체)에 의한 인간 아밀로이드 플라크의 생체외 면역염색법**
- [0553] 글리코실화 항체 A 이성질체는 간접 면역형광을 사용하는 면역조직화학적 분석에 의해 심각한 알츠하이머병 환자의 뇌 섹션에서 수득된 순수한 인간  $\beta$ -아밀로이드 플라크를 염색하는 능력으로 시험하였다. 순수한 인간  $\beta$ -아밀로이드 플라크에 특이적이고 민감한 염색을 실시하였다.
- [0554] 알츠하이머병으로 명확하게 진단된 환자에서 사후에 수득한 측두 피질의 고정하지 않은 조직의 냉동 섹션을 간접 면역형광법으로 표지하였다. 연속적인 2-단계 배양을 사용하여 친화도-정제 염소 항-인간(GAH) IgG(H+L)를 Cy3(#109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research)에 콘쥬게이트하여 밝혀진 결합 항체 A 이성질체를 검출하였다. 대조군은 관련 없는 인간 IgG1 항체(Sigma)와 모든 음성 결과를 보이는 2차 항체를 단독으로 포함한다.
- [0555]  $\beta$ -아밀로이드 플라크의 모든 타입이 항체 A 농도 10 ng/ml에서 민감하며 특이적으로 검출 및 일관되게 나타났다(도 11).
- [0556] 순수한 인간 아밀로이드- $\beta$  플라크의 특이적이고 민감한 염색으로 1 ug/ml 이하의 농도에서 글리코실화 항체 A 이성질체가 나타났다.
- [0557] 10 ug/ml의 농도에서 배경 염색으로 비-글리코실화 항체 A 이성질체가 가장 우세하게 관찰되었다. 상당한 비특이적 고착도(stickiness)에 영향을 미치는 비-글리코실화 이성질체는 생체외의 섹션화 과정 이후에 노출되는 거의 모든 조직 성분 및 유리 슬라이드의 표면에서 관찰된다. 상기는 이온 및/또는 소수성 상호작용과 관련된 비특이적 결합때문인 것 같다.
- [0558] **실시예 13: 알츠하이머병의 마우스 모델에서 항체 A에 의한 생체내  $\beta$ -아밀로이드 플라크 테코레이션**
- [0559] 글리코실화 항체 A 이성질체로 생체내에서  $\beta$ -아밀로이드 플라크를 면역테코레이션하는 이들의 능력에 대해 PS2APP 이중 형질전환 마우스(Richards (2003), J. Neuroscience, 23, 8989-9003)에서 단회 투여 연구를 시험하였다. 글리코실화 항체 A 이성질체를 1 mg/마우스의 투여량으로 투여하였고, 3일 후에 인산-완충 식염수로 동물을 관류하고, 뇌를 드라이아이스에서 냉동시키고 냉동 섹션을 위해 준비하였다.
- [0560] 두개의 글리코실화 이성질체는 생체내에서 개선되고 매우 효과적으로 뇌를 투과하였다(비-글리코실화 형태와 비교해서). 효과적인 뇌 투과 및 아밀로이드- $\beta$  플라크로의 특이적 결합은 AD-관련 아밀로이드증에 대한 마우스 모델인 PS2APP 마우스에서 확인하였다.
- [0561]  $\beta$ -아밀로이드 플라크와 결합된 항체의 존재는 조직에 존재하는 모든  $\beta$ -아밀로이드 플라크 타입의 위치 및 분포를 가시화하기 위해, 도 12에서 나타내는 Cy3(#109-165-003, Jackson Immuno Research)에 콘쥬게이트된 염소 항-인간 IgG(H+L)로 단일-표지된 간접 면역형광법과, 이후에는 BAP-2-Alexa488 면역콘쥬게이트를 착색시킴으로써 고정하지 않은 냉동 섹션을 사용하여 평가하였다.
- [0562] 면역-형광 염색 접근법은 결합된 항체 A를 검출하기 위해 사용하였다. 미리냉각한 유리 슬라이드에 부착시킨 후에 섹션을 PBS로 수화하고 2 분 동안  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 미리냉각한 100 % 아세톤으로 처리하였다. PBS로의 세척은 2 분 동안 두차례 실행하였다. 비특이적 결합 자리의 블로킹은 1 % BSA 함유 PBS 또는 5 분 동안 울트라 V 블록(LabVision)에서 연속 배양한 후 PBS로 세척하고 20 분 동안 10 % 통상적인 양 혈청의 분말 블럭 용액(BioGenex)에서 배양하여 실행하였다. PBS로 세척한 후에 10 % 통상적인 양 혈청 슬라이드를 상온에서 1 시간 동안 15 ug/ml의 농도로 Cy3(#109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research)에 콘쥬게이트된 친화도-정제 염소 항-인간(GAH) IgG(H+L)로 배양하였다. 아밀로이드 플라크의 착색은 상온에서 1 시간 동안 0.5 ug/ml 농도의 Alexa 488에 콘쥬게이트된 Ab에 대한 마우스 단일클론 항체인 BAP-2로 배양하여 실행하였다. 지방갈색소의 자가형광법은 50 mM 암모늄 아세테이트에 4 mM  $\text{CuSO}_4$ 에서 배양하여 퀀칭하였다. 이중류수로 슬라이드를 헹구고  $2 \times 500 \text{ ul}$ /슬라이드 PBS로 세척한 후 슬라이드를 형광 마운팅 배지(S3023 Dako)에 박았다.
- [0563] 이미지화는 IMARIS 및 COLOCALIZATION 소프트웨어(Bitplane, Switzerland)로 코로컬라이제이션의 정량 분석을 위한 이미지 프로세싱과 공초점 레이저 현미경으로 실행하였다.
- [0564] 마우스 당 1 mg을 단독 투여한 후 글리코실화 항체 A 이성질체가 혈액 뇌 장벽을 가로질러 투과하고, 생체내에서 3일 후에 모든  $\beta$ -아밀로이드 플라크의 효과적인 면역-테코레이션/결합이 확인되었다. 대표적인 이미지는

도 12에 나타내었다. 상기는 아밀로이드 플라크에서 검출가능하지 않은 비-글리코실화 형태와는 명확하게 대조적이다.

[0565] **실시예 14: HEK293 세포 표면 상에 발현되는 아밀로이드 전구물질 단백질(APP)에 항체 A 이성질체 결합의 연구:**

[0566] 유세포분류기 방법은 당업에 잘 공지되어 있다. 유세포분류기에 의해 측정된 형광의 상대 유닛(예를 들어 FL1-H)으로 각각의 항체의 세포 표면 결합을 확인하였다. 비트랜스펙션된 HEK293 세포와 비교해서 트랜스펙션된 HEK293의 APP 상의 형광 시프트는 세포 표면 APP와의 원하지 않는 반응을 나타낸다. 예로서 N-말단 도메인에 대한 항체 BAP-1 및 BAP-2는 비트랜스펙션된 HEK293 세포(도 13, 점선, 오른쪽 패널)와 비교해서 HEK293/APP(도 13, 굵은선, 오른쪽 패널)의 FL-1 신호의 현저한 시프트를 보여준다. 유사하게 BAP-44 항체(중간 A-베타 에피통에 특이적임)는 유사한 크기의 시프트를 보여준다. 대조적으로 모든 항체 A 이성질체(도 13, 왼쪽 패널)(N-말단과 중간 A-베타 에피통에 특이적임)는 형광에서 현저한 시프트가 나타나지 않았다. 비트랜스펙션된 HEK293 세포는 상이한 세포 크기 및 표면 특성으로 APP 트랜스펙션된 세포 보다 더 높은 기본 형광을 가진다. FACScan 장치는 Cellquest Pro Software 패키지와 결합하여 사용한다(둘 다 Becton Dickinson).

[0567] 항체 A 이성질체는 세포 표면 APP를 향한 반응성이 없다(도 13).

[0568] **실시예 15: 알츠하이머병의 마우스 모델에서의 Aβ 플라크 침착의 형태계측학적 분석**

[0569] 생체내에서 항체 A 조성물 또는 항체 A 이성질체의 아밀로이드증을 저하시키는 능력은 항체 A 조성물 또는 항체 A 이성질체로 5개월 처리한 PS2APP 마우스의 뇌를 정량 컴퓨터-보조 이미지 분석을 이용하여 다양한 뇌 부위(시상, 신피질, 해마 및 해마이행부)에서 연구하였다.

[0570] 따라서 PS2APP 형질전환 수컷 마우스에 항체 A 조성물 또는 항체 A 이성질체 및 매체(vehicle)를 주입하였다. 75 마리의 5-6-개월의 PS2APP 마우스를 각각 15 마리로 구성되는 5개 군(A-E)으로 나누었다. 0일을 시작으로 각 마우스에게 매체(0 mg/kg) 또는 항체 A 조성물(20 mg/kg) 0.1 mL를 큰 덩어리, 즉 꼬리정맥을 통해 주입하였다. PS2APP 마우스의 A, B, C, D 및 E 그룹에게 각각 매체(히스티딘-완충 식염수), 모노-글리코실화 항체 A 및 이중-글리코실화 항체 A를 포함하고, 상기에서 규정한 비-글리코실화 항체 A는 없는 항체 A 조성물, 이중-글리코실화 항체 A, 모노-글리코실화 항체 A 및 비-글리코실화 항체 A를 투여한다.

[0571] 투여된 인간 항-Aβ 항체에 대한 면역저항성은 항-CD-4 항체(ATCC에서 시판하는 하이브리도마 클론 GK 1.5) 주입 시에 유도된다. 항-약제 항체의 모니터링으로 항체를 처리한 동물에서 처리 16 주 이상 후에 알맞은 면역-반응이 생성된다는 것과 검출 가능한 항체는 낮은 친화도가 나타나거나 또는 소량에서만 생성(결과를 나타내고 있지 않음)된다는 것을 알 수 있다.

[0572] 5개월 처리 후 마우스를 희생시켰다. 고정하지 않은 뇌를 시상, 해마 형성체 및 피질 영역을 포함하여 섹션화하였다. 각 뇌에서 대뇌 반구 50 섹션을 하기와 같이 준비하였다: 측면 레벨 ~1.92에서 시작, 5×10 μm 및 5×20 μm의 5개 연속적 시리즈를 수득하였다. 연속 섹션 사이에는 차이가 없어서 총 조직 사용량은 750 μm이다. 따라서 섹션 시리즈는 대략 측면 레벨이 1.20 상에서 끝난다(Paxinos 및 Franklin, 2003). 정량적 형태계측학적 분석에서 매 10회 섹션을 사용하였다.

[0573] 섹션을 5 μg/ml 농도에서 이중-글리코실화 항체 A 이성질체로 아밀로이드 침착을 위해 염색하였다. 5 μg/ml에서 Alexa-488 형광발색단에 콘쥬게이트된 마우스 단일클론 항체(BAP-2)를 사용하는 Aβ에 대한 염색으로 하기에 기재된 이미지 프로세싱의 일상적인 절차를 방해하는 뉴런의 배경 염색 및 현저한 세포내 염색임에도 불구하고 유사한 결과를 나타낸다. 검출을 위해서 상온에서 1 시간 동안 15 μg/ml 농도에서 Cy3(#109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research)에 콘쥬게이트된 친화도-정제 염소 항-인간(GAH) IgG(H+L)을 이용하였다. 2×500 μl PBS/슬라이드를 이용하여 세척한 후 슬라이드를 형광 마운팅 배지(S3023, Dako)에 박았다.

[0574] 이미지는 GenePix Personal 4100A 마이크로어레이 스캐너(Axon Instruments, 현재 Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 수득하였다. 아밀로이드-β 플라크 로드와 수는 이미지 분석을 돕는 컴퓨터를 이용하는 편파적이지 않은 형태계측학적 방법을 사용하여 아밀로이드-β 플라크의 수와 아밀로이드-β 플라크에 의해 덮힌 영역의 퍼센트인 두개의 파라미터를 사용하여 측정하였다. 플라크 로드와 수의 정량은 MCID M7 Elite 소프트웨어(Imaging Research Inc., St. Catharines/Ontario, Canada)로 실행하였다. 스캔된 이미지는 세밀한 추출기 필터(detail extractor filter), 이후에는 표적 악센트 필터(target accent filter)로 강화시켰다. 수득된 이미지를 그 다음에 이진화하여 염색 강도에 따라서 경계를 조정하였다. 인공물, 혈관 및 면적 효과를 원래 참조 이미지 상에서 규명한 다음에 이진화 이미지로부터 제거하였다. 원하는 부위는 참조 이미지 상에서 외형선을 그렸다. 최종 정량을 위해서 그 다음에 상기 부위의 영역 및 플라크가 채워진 영역뿐만 아니라 플라크 수를 이

진화 이미지에서 측정하였다. 단일 화소는 무시하였다. 통상적인 스프레드시트 소프트웨어(Microsoft Excel, Redmond/WA, U.S.A.)로 계산하였다. 플라크 크기는 <100 내지 >1000  $\mu\text{m}^2$  범위로 11개 그룹으로 분리하였다. 통계학적 평가는 두개 꼬리의 이분산성 t-테스트를 사용하여 실행하였다.

- [0575] 비교 및 통계학적 평가를 위해서 아밀로이드증(아밀로이드- $\beta$  플라크 병리학)의 베이스라인을 처리하지 않은 6개월의 PS2APP 마우스의 코호트(15 동물)로 시작하여 연구해서 결정하였다. 현저한 레벨을 갖는 결과를 도 15 내지 18에 나타내었다(\*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ).
- [0576] 아밀로이드 플라크 감소는 시상 부위에서 가장 현저하였다(도 15). 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 표면의 평균 감소는 항체 처리 그룹에서 측정되었다: 항체 A 조성물에 있어서는 64 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 70 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 81 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 44 %. 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 수의 평균 감소는 항체 A 조성물에 있어서는 70 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 78 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 82 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 36 %로 확인되었다. 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 현저함이 낮았으며, 관찰된 변이체가 상당했다.
- [0577] 뇌량과 함께 신피질 부위에서의 아밀로이드 플라크 감소는 도 16에 나타내었다. 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 표면의 평균 감소는 항체 처리 그룹에서 결정하였다: 항체 A 조성물에 있어서는 19 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 27 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 30 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 10 %. 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 수의 평균 감소는 항체 A 조성물에 있어서는 40 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 46 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 42 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 11 %로 확인되었다.
- [0578] 전체 해마 부위에서의 아밀로이드 플라크 감소는 도 17에 나타내었다. 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 표면의 평균 감소는 항체 처리 그룹에서 결정하였다: 항체 A 조성물에 있어서는 12 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 24 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 24 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 6 %. 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 수의 평균 감소는 항체 A 조성물에 있어서는 36 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 46 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 37 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 3 %로 확인되었다.
- [0579] 아밀로이드증에 있어서 높은 민감성 부위인 해마이행부에서의 아밀로이드 플라크 감소는 도 18에 나타냈다. 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 표면의 평균 감소는 항체 처리 그룹에서 결정하였다: 항체 A 조성물에 있어서는 2 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 12 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 5 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 1 %. 총 아밀로이드- $\beta$  플라크 수의 평균 감소는 항체 A 조성물에 있어서는 22 %, 이중-글리코실화 항체 A에 있어서는 36 %, 모노-글리코실화 항체 A에 있어서는 13 % 및 비-글리코실화 항체 A에 있어서는 1 %로 확인되었다. 항체 A 조성물 및 주요 N-글리코실화 이성질체(이중-글리코실화 항체 A 및 모노-글리코실화 항체 A)는 아밀로이드- $\beta$  플라크 로드와 플라크 수를 감소시키는데 상당한 효율성을 나타냈다. 플라크 로드의 감소는 낮거나 또는 적당한 아밀로이드증이 있는 부위에서 통계학적으로 현저하고 가장 컸다.
- [0580] 전반적으로 아밀로이드- $\beta$  플라크 수의 감소는 모든 측정된 뇌 부위에서 항체 A의 Asn52 글리코실화 이성질체를 포함하는 둘 다의 항체 A 조성물로 처리한 후에 통계학적으로 현저하게 발견되었다. 이것과 대조적으로 본 발명에서 상세하게 설명한 정제 단계 이후의 항체 A 조성물을 배제한 항체 A의 비-글리코실화 이성질체를 처리한 후에는 기타 관찰한 뇌 부위에서의 아밀로이드- $\beta$  플라크 수에 현저한 영향을 주지 않는 것으로 확인되었으며, 시상에서 아밀로이드- $\beta$  플라크 수에 아주 약한 영향을 미치는 것으로 확인되었다.
- [0581] 우리는 또한 플라크 크기에 관해서 플라크 제거의 가능성을 관찰하였다. 통상적으로 시험한 항-A $\beta$  항체의 유효성은 작은 아밀로이드- $\beta$  플라크의 제거에서 가장 현저하게 발견되었다. 상기는 모든 뇌 부위에서 관찰되었다(도 15C, 16C, 17C 및 18C). 대조적으로 항체 A의 비-글리코실화 이성질체에 있어서는 단지 최소 또는 거의 나타나지 않은 경향을 보였다.
- [0582] 항체 A 및 주요한 Asn52 글리코실화 이성질체의 비교 분석에서 플라크 로드를 낮추는 유사한 용량이 나타난 반면에 비-글리코실화 이성질체에서는 플라크의 제거에 현저한 효과가 없었다.
- [0583] **실시예 16: 아밀로이드- $\beta$  플라크에 항체 A 조성물의 생체내 결합의 약동학**
- [0584] 두개의 투여량 빈도수를 모노-글리코실화 항체 A 및 이중-글리코실화 항체 A를 포함하고, 상기에서 규정한 비-글리코실화 항체 A는 없는 항체 A 조성물의 결합 동역학을 관찰하기 위해서 비교하였다.
- [0585] 따라서 PS2APP 형질전환 숫컷 마우스에 0.05, 0.1 및 0.3 mg/kg으로 주 간격으로 4회, 또는 0.075, 0.15 및 0.45 mg/kg으로 달 간격으로 3회 꼬리 정맥을 통해 항체 A 조성물을 주입하였다. 비교를 위해서 0.1 mg/kg을

한번에 및 두번으로 주 간격으로 투여하고, 달 간격으로는 0.15 mg/kg을 2회 투여하였다. 투여 이후에 모든 마우스는 마지막 투여 2 주 후에 희생시켰다. 고정하지 않은 PS2APP 뇌조직을 시상, 해마 형성 및 피질 영역을 포함하여, Paxinos 및 Franklin에 따라서 마지막 ~1.92 내지 1.2 mm 사이를 시상 봉합 섹션화를 위해 준비하였다. 뇌는 저온유지장치를 사용해서 40  $\mu$ m로 섹션화하였다.

[0586] 면역-형광 생체의 면역-염색 접근법을 사용하여 결합한 항체 A 조성물 항체를 검출하였다. 따라서 뇌를 섹션화하고, 상온에서 1 시간 동안 15  $\mu$ g/ml 농도에서 Cy3(#109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research)에 콘주게이트된 검출 항체, 친화도-정제 염소 항-인간(GAH) IgG(H+L)으로 배양하였다. 아밀로이드- $\beta$  플라크의 착색은 상온에서 1 시간 동안 0.5  $\mu$ g/ml 농도에서 Alexa488 형광발색단에 콘주게이트된 A $\beta$ 에 대한 마우스 단일 클론 항체인 BAP-2로 배양하여 실행하였다.

[0587] 이미지는 상기에서 기재한 Leica TCS SP2 AOBS 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 사용하여 소뇌에 근접한 후두 피질에서 기록하였다. 컴퓨터-보완된 이미지 프로세싱은 IMARIS 소프트웨어(Bitplane, Switzerland)를 사용하여 실행하였다. 플라크 이미지는 우선 직선 신호 기록을 위해 셋팅된 여러 홈이 필요한 0.3 및 0.45 mg/kg의 2개의 가장 높은 투여량을 제외한 가장 낮은 투여량을 위한 소프트웨어의 불필요한 부분을 잘라내는 기능을 사용하여 선택하였다. SURPASS 기능을 사용하여 아밀로이드- $\beta$  플라크 위치에 결합된 GAH-Cy3를 위한 판독으로서 임계값화(T) 후에 양의 3D 화소를 선별하였다. 임계값 설정은 각각 낮거나 및 높은 투여량 그룹에 있어서 19 및 12이다. 아밀로이드- $\beta$  플라크 특이성의 대조군으로서 GAH-Cy3 염색의 이미지를 Alexa488에 콘주게이트된 마우스 단일클론 BAP2에 의해 염색된 플라크의 이미지로 이중 표지한 후에 비교하여 여러 채널에 기록하였다.

[0588] 모든 이미지를 정량적으로 설명하기 위한 서술적인 통계는 IMARIS MeasurementPro 소프트웨어로 실행하였다. 평균 3D 화소 형광 강도(MVI) 값을 높은 투여량 그룹의 이미지로부터 총 신호 또는 낮은 투여량 그룹의 선별된 아밀로이드- $\beta$  플라크에서 결정하였다. 베이스라인 MVI(B)는 장치 소음, 조직 확산 신호 및 지방갈색소의 자가 형광 때문이다. 배경 보정을 위해서 아밀로이드- $\beta$  플라크에서 떨어진 영역에서 평균 신호 강도를 측정하고 이후에 모든 측정된 이미지의 MVI에서 감수하여 B를 결정하였다(MVI-B=S). 플라크 상의 평균 강도와 낮은 신호 강도(S) 값은 마우스 및 투여 그룹 당 각 1개의 뇌 섹션에서의 3개 내지 4개의 이미지에서 획득하였다. 비교가능성을 위해서 신호 강도를 이전의 연구에서 획득한 참조 시료로 표준화하였다. 참조로서 우리는 0.25 mg/kg의 단독 투여량 투여 후에 PS2APP 마우스 뇌 섹션을 사용하였다. 측정 종료점은 투여 후 1 주이다.

[0589] 모든 측정된 강도 값은 투여한 후 1 주에 측정된 0.25 mg/kg에서 항체 A 조성물의 단독 투여량 투여 후에 획득된 아밀로이드- $\beta$  플라크에서의 평균 강도로 표준화하였다(하기 표 참조). 면역양성 아밀로이드- $\beta$  플라크의 평균 상대적 형광 강도에 있어서의 표준화 값을 투여 그룹 당 3 마리 동물을 면역염색하고, 평균한 신호 강도를 측정된 후에 CLSM으로 획득하였다. 항체 A에서 유도된 검출가능한 항체 A 조성물이 없는 플라크는 주로 섹션화 공정 중에 손실될 수 있는 플라크 표면에 항체 A로부터 유도된 항체 A 조성물의 제한되거나 또는 부분적인 점유 기간때문에 낮은 투여량 그룹에서만 관찰되었다. 따라서 단지 면역양성 플라크만 비교 분석에 포함하였다.

[0590] PS2APP 형질전환 마우스에서 항체 A 조성물의 멀티플 즉, (큰 덩어리) 투여 후에 투여량 그룹 당 평균 상대적 형광 강도를 하기 표에 나타내었다:

표 4

투여량- 간격/주입	면역양성 항체 A 조성물 아밀로이드- $\beta$ 플라크의 표준화 평균 형광 강도		항체 A 조성물 면역음성 아밀로이드- $\beta$ 플라크의 퍼센트
	%	SD	%
0.25 mg-단독 <sup>1</sup>	100	6	0
0.05mg-격주/4×	53	2	58
0.075mg-매달/3×	57	6	39
0.15mg-매달/2×	106	6	19
0.1mg-격주/1×	59	8	45
0.1mg-격주/2×	83	26	21
0.1mg-격주/4×	88	12	2
0.15mg-매달/3×	93	19	1
0.3mg-격주/4×	148	24	0
0.45mg-매달/3×	184	20	0

[0591]



- [0592] <sup>1</sup> 실험적 값은 1 주 후 0.25 mg/kg의 단독 투여량으로부터 수득된 값을 표준화한 강도 값을 나타냄.
- [0593] 도 19는 0.1 mg/kg에서 연속적으로 격주로 투여한 수에 관한 항체 A 조성물의 결합을 나타낸다. 두 번 응용 후 평균 강도는 면역염색 정도가 아주 다양하고, 이에 따라 두드러지지 않았는데도 불구하고 증가하는 것으로 나타났다. 4 주입 후 아밀로이드-β 플라크는 보다 균질하게 면역염색되었지만 평균 강도는 단지 약하게 증가하였다. 전체적으로 격주 응용에 의한 결과는 응용 수와 관련된 증가된 플라크 결합 경향을 명확하게 나타냈다.
- [0594] 도 20은 0.15 mg/kg에서 연속적으로 매달로 투여한 수에 관한 항체 A 조성물의 결합을 나타낸다. 흥미롭게도 비교 레벨은 2 및 3 응용 후에 수득되었다. 상기는 물론 기대했던 것은 아니며, 지연된 소신경교세포 활성화 같은 제거 기작에서 시간에 따라 달라지는 차이가 발생하는 이런 효과의 개시를 나타낼 수 있다.
- [0595] 투여량과 관련이 있는 항체 A 조성물의 결합 효능은 도 21과 22에 나타났다. 0.05, 0.1 및 0.3 mg/kg(도 21)의 격주 투여량 및 0.075, 0.15 및 0.45 mg/kg의 매달 투여량(도 22)은 명확하게 투여량 관계를 보여준다. 또한 반응은 선형이 아니며, 소신경교세포의 지연된 활성화 같은 추가 인자에 의해 관찰된 비-선형성이 된다는 것이 확인된다.
- [0596] 따라서 마우스 Aβ 플라크에 결합하는 항체 A 조성물은 다수의 투여량이 축적되는 것을 나타내는 투여량과 관련이 있다는 것이 결론이 될 수 있다.
- [0597] **실시예 17: 항원-의존 세포 탐식 작용의 분석**
- [0598] 항체 A 조성물-중재 탐식작용 효과를 측정하기 위해서 AD 뇌 슬라이스로부터의 순수한 Aβ 플라크를 모노-글리코실화 항체 A 및 이중-글리코실화 항체 A를 포함하고, 상기에서 규정한 것과 같은 비-글리코실화 항체 A가 없는 항체 A 조성물의 여러 농도와 미리 배양하고, 살아있는 인간 제1 단핵 세포에 노출시킨다.
- [0599] 후두 피질 부위에서 분리된 고정하지 않은 인간 AD 뇌 조직을 심각한 AD 경우(Braak stage IV)에서 준비하였다. 첨가하기 이전에 살아있는 세포 섹션을 5 분 동안 PBS로 재수화하였다. 항체 A 조성물 항체를 1 시간 동안 PBS에서 규정한 농도로 배양하여 이용하였다. PBS로 세척한 후 살아있는 세포를 첨가했다. 미리축진시킨 인간 제1 단핵세포를 10,000 U/ml 페니실린과 10,000 mg/ml의 스트렙토마이신(Gibco #15140-122)을 함유하는 보관 용액에서 1 % 항생물질 용액의 RPMI 1640(Gibco #61870-044) 배지에 0.8 및  $1.5 \times 10^6$ /ml로 사용하고, 2 내지 4일 동안 5 % 이산화탄소로 37 °C에서 배양하였다. 미리축진한 인간 제1 단핵 세포의 제조 방법은 예를 들어 대식 세포 콜로니-축진 인자(M-CSF)와 같은 축진 인자를 사용하는 것과 같이 당업에 잘 공지되어 있다.
- [0600] 배양 후에 배양 배지를 부드럽게 제거하고 섹션은 10 분 동안 PBS에서 2 % 포르말데하이드로 화학적 고정시켜 보존하였다. 잔류 Aβ 플라크 로드의 염색은 상온에서 1 시간 동안 10 mg/ml 농도에서 Alexa488 형광발색단(분자 프로브: A-20181, 단일클론 항체 표지 키트)에 콘쥬게이트된 Aβ에 대한 마우스 단일클론 항체인 BAP-2로 배양하여 실행하였다.
- [0601] 플라크 제거의 정량은 잔류 염색된 Aβ 플라크의 면역형광법으로 측정하여 결정하였다. 이미지는 Leica TCS SP2 AOBs 공초점 레이저 스캐닝 현미경 상에 기록하였다. 1개의 광계층이 3의 핀홀 셋팅에서 HCPL Fluotar 10 ×/0.30 목표물을 대신 사용한 하나의 실험을 제외하고 HCX PL FL 20×/0.40 보정 목표물을 사용하여 4 Airy의 핀홀 셋팅에서 488 nm의 여기 파장에서 기록하였다. 장치 셋팅은 관계있는 정량적 비교를 위해서 모든 이미지에 있어서 일정하게 유지하였다. 특히 레이저 파워, 게인 및 오프셋을 동적 범위내에서 신호 강도를 기록하기 위해 조정하였다. 각 항체 A 조성물 농도에 있어서 그레이 물질 부위를 플라크 로드와 해부학적 차이로부터 나오는 가능한 변동을 최소화하기 위해서 연속적인 섹션에서 동등한 위치에서 기록되었다. 항체 A 조성물의 가능한 경쟁적 결합 및 항체 BAP-2 검출은 모든 항체 A 조성물 농도에서 세포의 부재하에 측정하였다. 관련이 없는 인간 IgG1(Serotec, PHP010) 항체를 추가 대조군으로서 사용하였다. 이미지 분석은 IMARIS 소프트웨어(Bitplane, Switzerland)를 사용하여 실행하였다. 플라크에 결합하는 BAP-2들의 목표물을 나타내는 BAP-2 양성 화소의 이소설페이스를 강도 임계화에 의해서 만들었다. 표면 영역과 총 형광 강도 값은 SurpassPro 소프트웨어 모듈의 "이소 설페이스 작용(iso surface function)"을 이용하여 계산하였다. 결과는 1개의 뇌 섹션의 5개 그레이 성분 부위로부터 수득된 총 염색 감도 값과 평균 염색 영역으로서 나타났다. 신호 베이스라인은 장치 소음으로 구성되며, 조직 확산 신호는 무시해도 괜찮을 만큼 확인되었으므로 총 강도 신호에서 뺐다.
- [0602] 항체 A 조성물의 정량적 효과는 도 23에서 나타난 것과 같이 인간 AD 뇌 섹션에서 Aβ 플라크의 탐식 작용이 증

가한 것으로 나타나는 A $\beta$  플라크 염색의 감소에 의해 가시화하였다. 면역조직화학염색으로 40 시간 후에 이미 100 ng/ml 항체 A 조성물로 미리 배양한 후 명확하게 가시화된 염색가능 A $\beta$  플라크의 감소를 확인하였다. 상기 효과는 1 및 5 mg/ml의 항체 A 조성물 농도에서 매우 두드러진다. A $\beta$  플라크는 5 mg/ml에서 잔존하는 아주 적은 큰 A $\beta$  플라크가 있는 세포 탐식작용에 의해서 실질적 및 확실하게 명확해진다. 동일한 실험의 강도 및 영역에서 발현되는 면역반응성 신호를 기본으로하는 정량적 측정을 도 24에 나타냈다.

[0603] 대안적으로 항체 A 조성물-중재 탐식 작용 효과는 A $\beta$  콘쥬게이트된 형광 폴리스티렌 비드를 사용하여 측정하였다. 따라서 형광 비드(3 mm, Fluoresbrite carboxy YG, Polysciences Inc.)는 A $\beta$ 와 결합시켰다. 간단하게 비드는 커플링 완충액(50 mM MES 완충액, pH 5.2, 1 % DMSO)에서 현탁 및 원심분리에 의해서 2 $\times$  세척하였다. 펠릿(대략 10 ul)을 200 ul 커플링 완충액으로 현탁시키고, 커플링 완충액에서 EDC(에틸-디아미노프로필-카르보디이미드, Pierce) 20 % 용액 20 ul를 첨가하여 활성화시켰다. 20 ug A $\beta$ (1-40) 또는 A $\beta$ (1-42)(0.1 % 수산화암모늄, Bachem)의 즉각적인 첨가로 커플링 반응을 개시하였다. 하룻 밤 배양 후에 비드를 3 $\times$ 0.5 ml 10 mM Tris.HCl pH 8.0 및 3 $\times$ 0.5 ml 보관 완충액(10 mM Tris.HCl pH 8.0, 0.05 % BSA, 0.05 % Na<sub>3</sub>N)으로 세척하였다. 1 % 현탁액을 사용전까지 4  $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 음성 대조군으로서 Fluoresbrite 카르복시 NYO (붉은 형광) 비드와 모든- D 아미노산 A $\beta$ (1-40)(0.1 % 수산화암모늄, Bachem)을 결합시켰다.

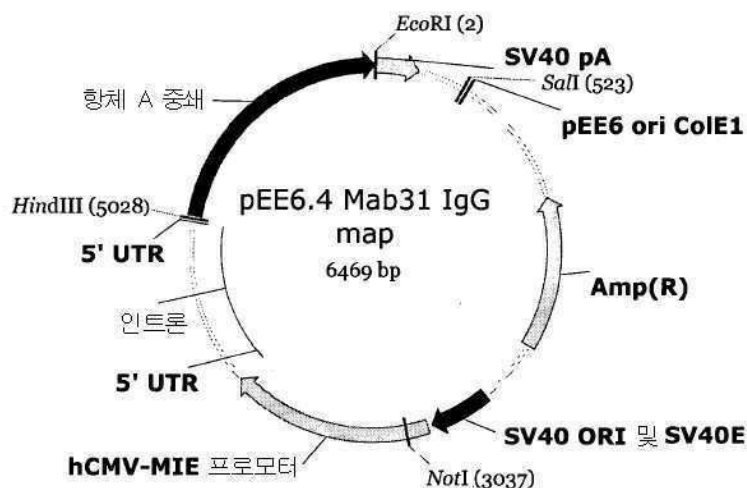
[0604] 쥐의 단핵세포/대식세포(세포주 P388D1)를 대략 50 % 균중에서 C96 블랙 마이크로플레이트 또는 C24 투명한 조직 배양 클러스터에서 성장시켰다. 배양 배지는 5 % FBS, 글루타민 및 항생물질이 있는 IMEM이다. 비특이적 스캐빈저 수용체를 차단하기 위해서 10 ml 푸코이단(Fluka, 수 중에 10 mg/ml)을 200 ml 배양 부피에 첨가하고 2 시간 동안 배양하였다. 항체 A 조성물을 일련의 희석으로 첨가하고 30 분 동안 미리 배양하였다. 형광 A $\beta$  비드 현탁액(20 ul)을 첨가하고 탐식작용이 일어나도록 3 시간 동안 배양하였다. 부착 세포를 차가운 얼음 EDTA로 1 $\times$  및 PBS로 2 $\times$  강하게 세척하여 세포 표면에서 부착된 응집체를 제거하였다. 잔류 비드는 Zeiss Axiovert 405에서 시각으로 검사하여 모니터링하거나, 또는 444 nm(Exc)와 485 nm(Em) 필터 셋팅으로 마이크로플레이트 형광계(Fluoroscanner, Labsystems)를 사용해서 정량하였다.

[0605] P388D1 세포에 의해 형광발색 형광비드와 결합한 합성 A $\beta$  응집체의 탐식작용에서 항체 A 조성물의 정량적 영향은 도 25에 나타내었다. 항체 A 조성물의 투여량 반응의 정량적 측정은 도 26에 나타내었다. 두가지의 독립적 실험으로 EC<sub>50</sub>에 있어서는 30 내지 200 ng/ml 범위 및 MEC에 있어서는 10 내지 60 ng/ml의 범위가 확인되었다. 관찰된 다양성은 배양 화학량론의 차이, 즉 비드 대 세포의 비율의 차이에 의한 것으로 생각한다. > 200 ng/ml 농도 이상의 비드 탐식 작용의 관찰된 하락은 제한된 항원과 1가 항체의 상호작용에 의한 것이다.

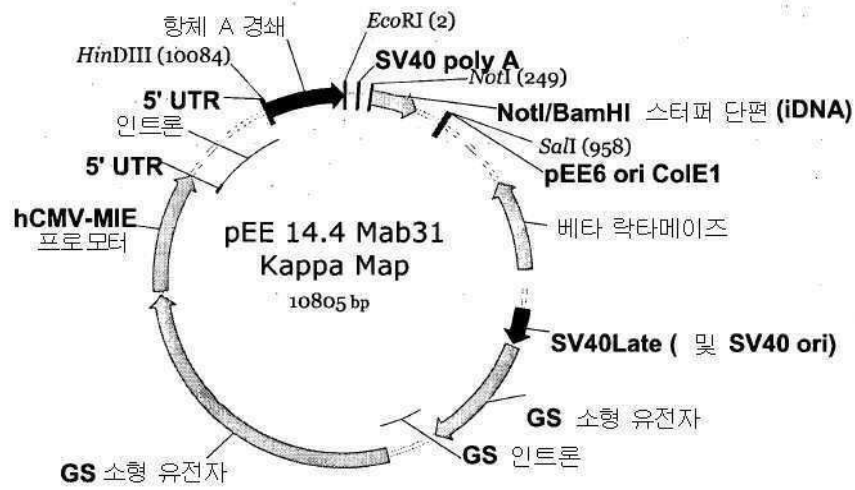
[0606] 따라서 결론은 항체 A 조성물은 투여량 관련 방법으로 AD 뇌 조직 섹션의 A $\beta$  플라크의 탐식 작용을 효과적으로 유도한다는 것이다.

## 도면

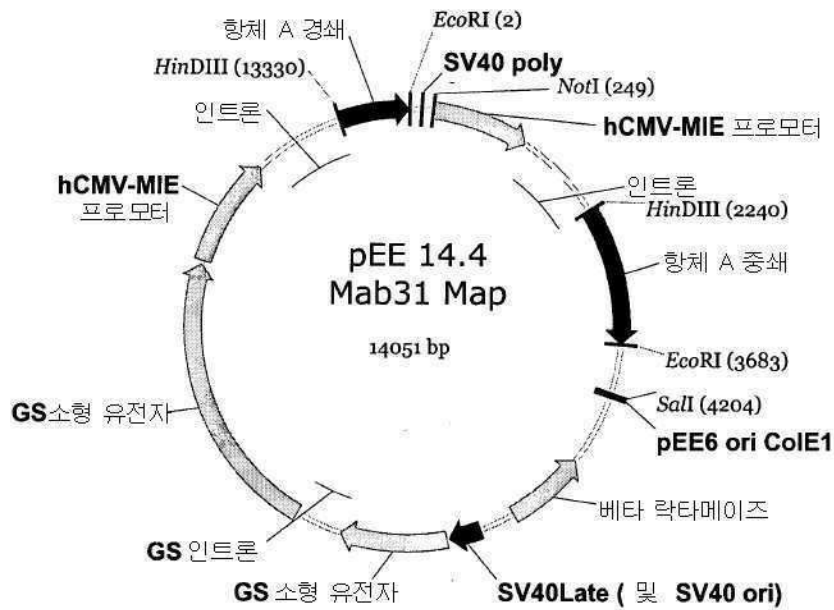
### 도면1a



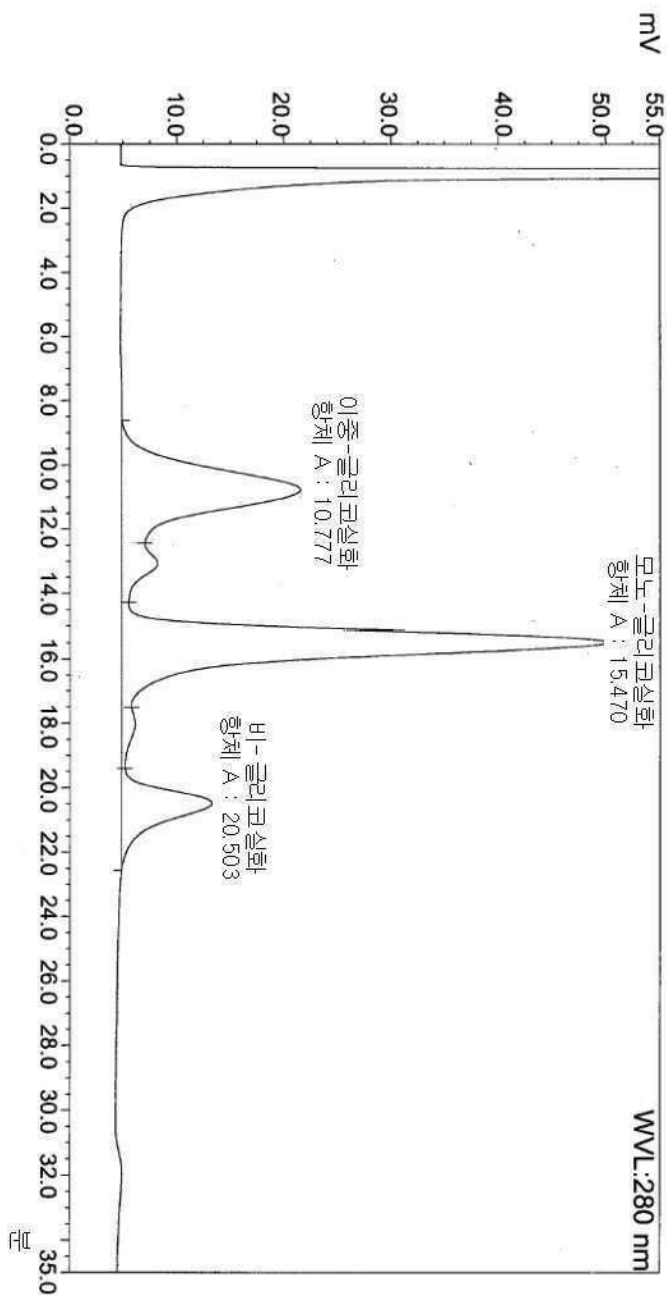
도면1b



도면1c

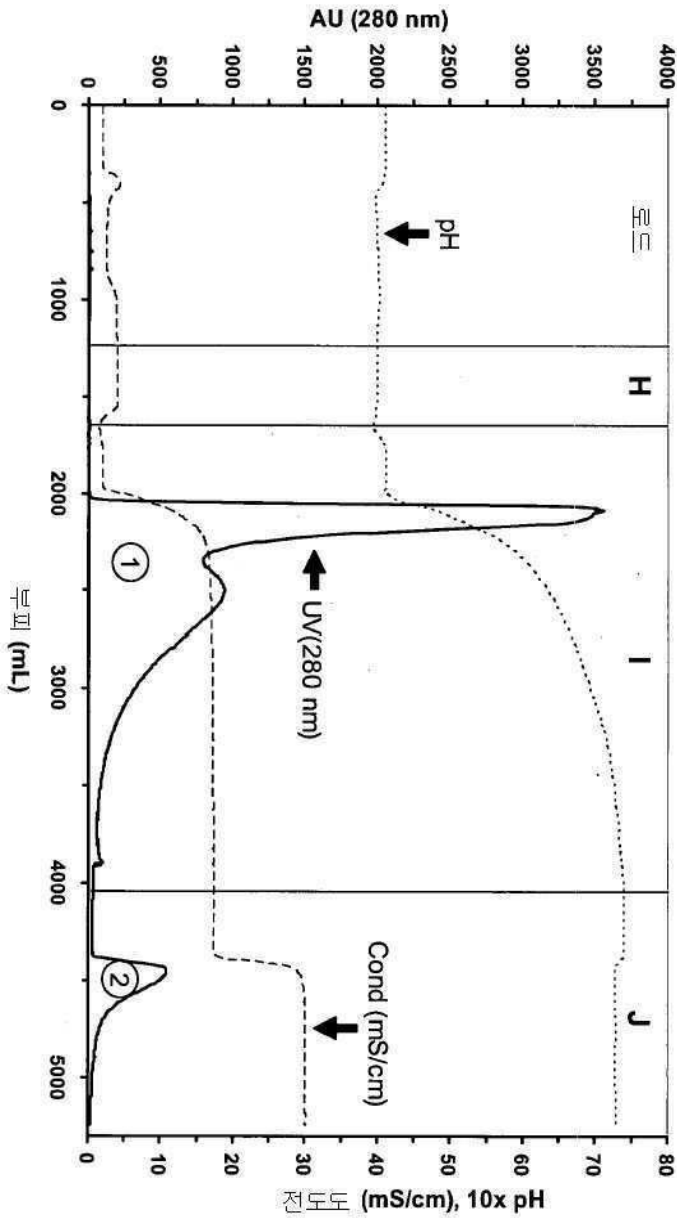


도면2

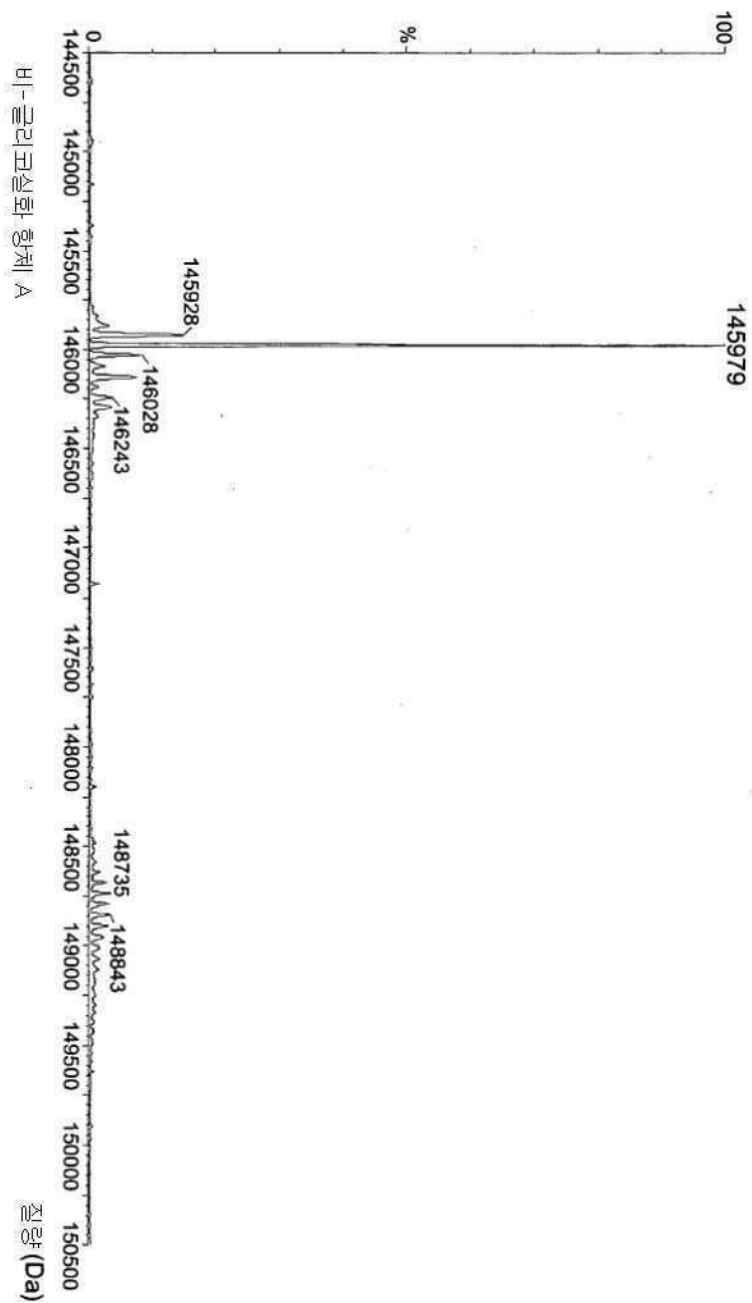




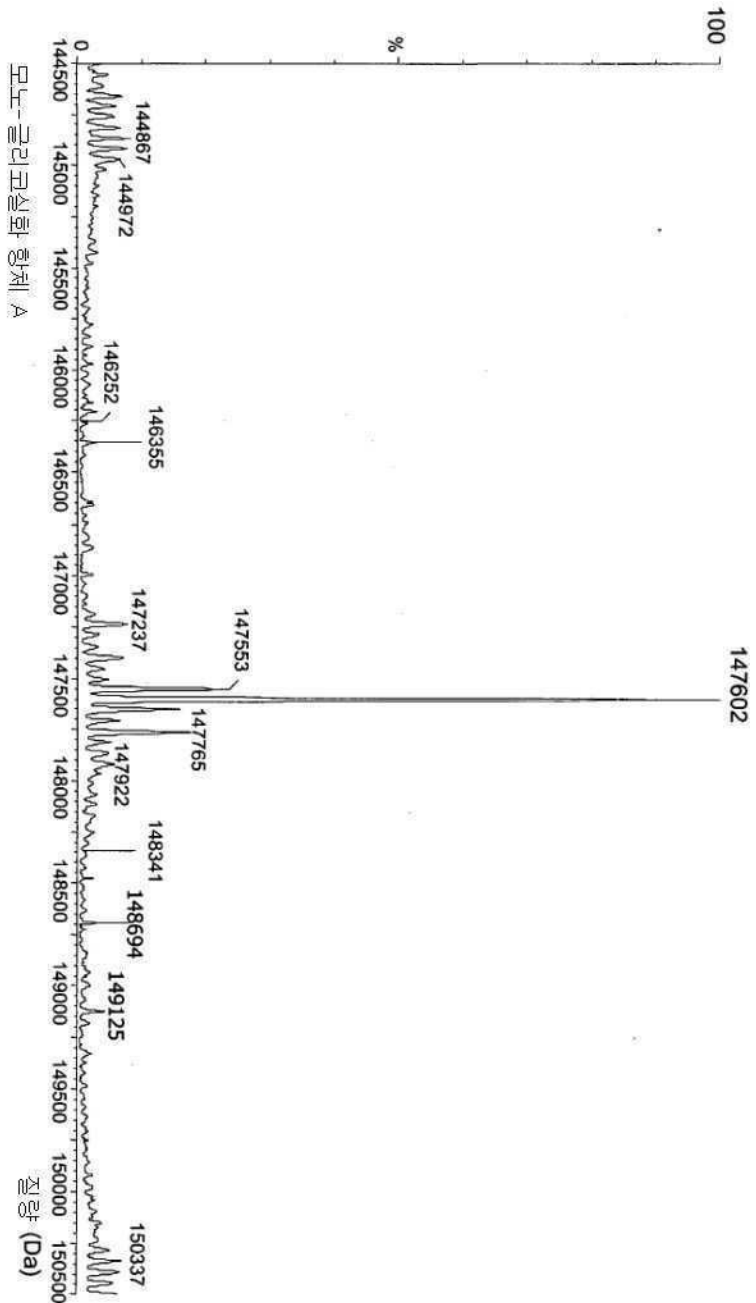
도면3



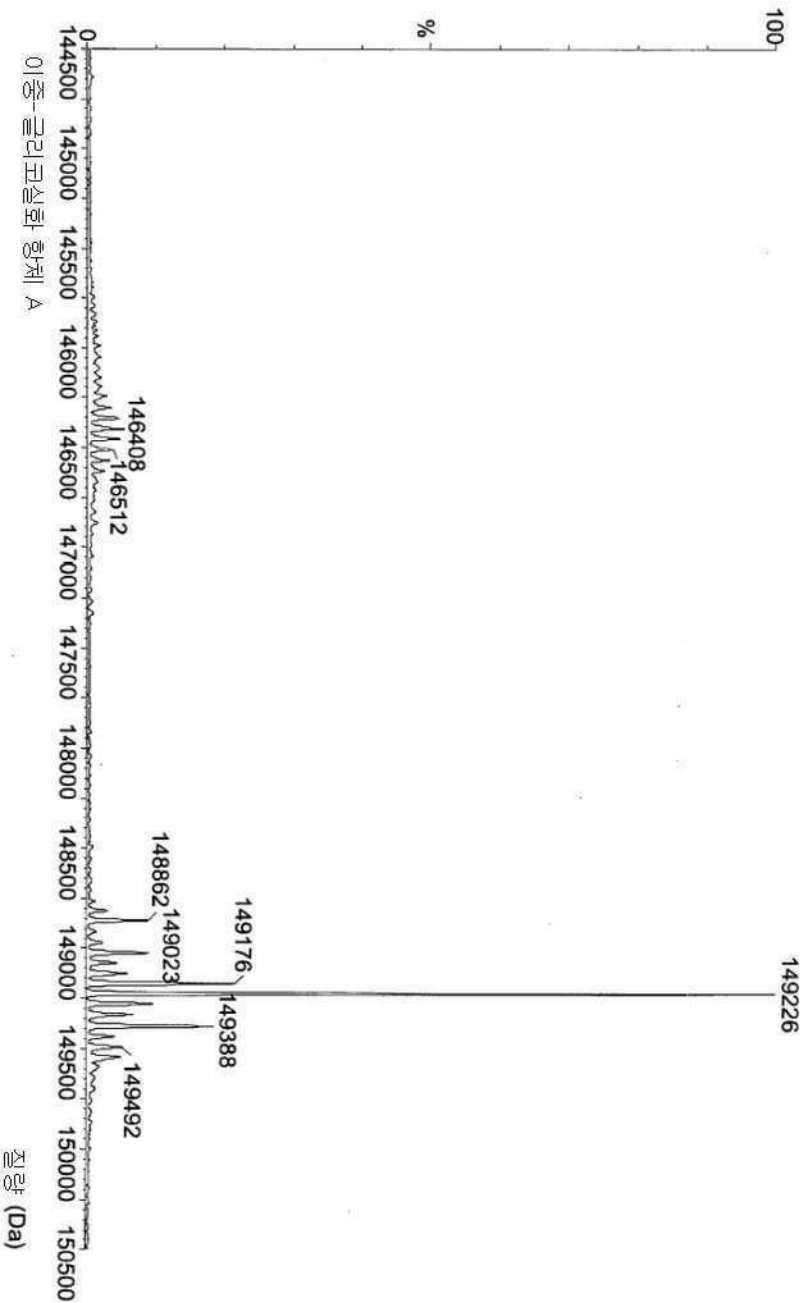
도면4a



도면4b



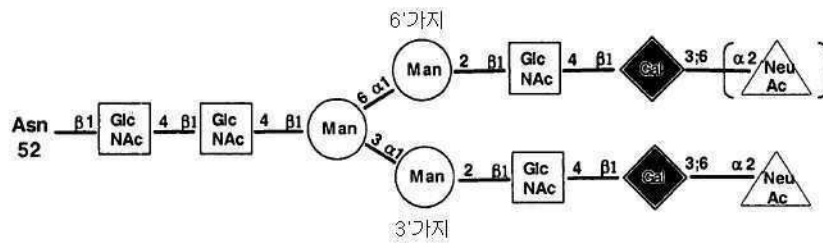
도면4c



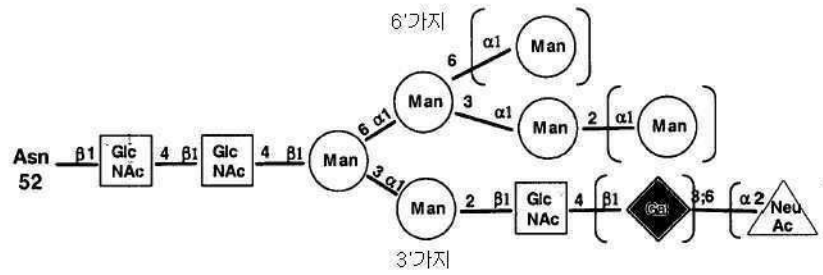


도면5

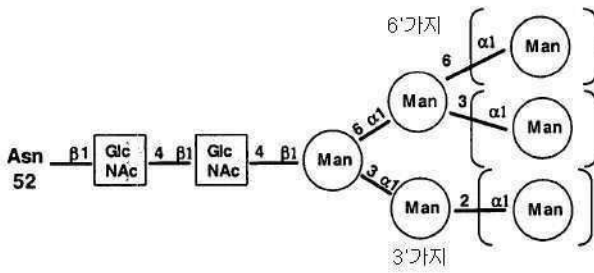
A



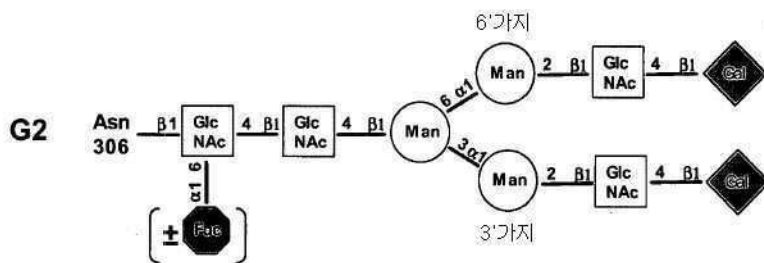
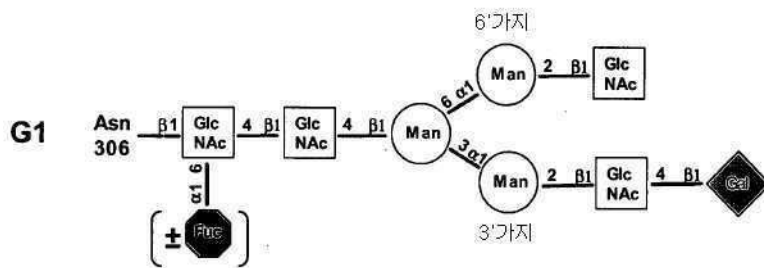
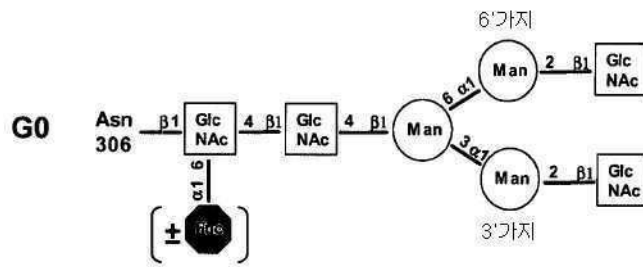
B



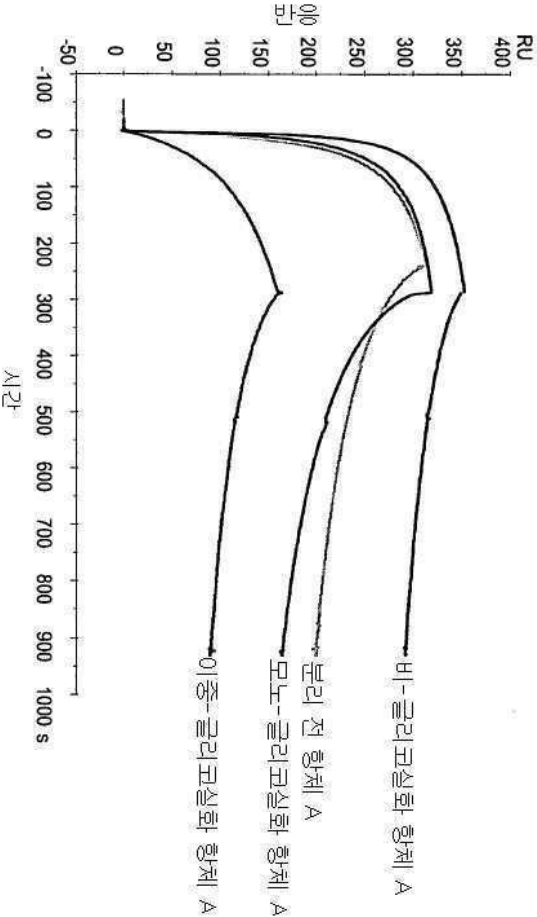
C



도면6



도면7



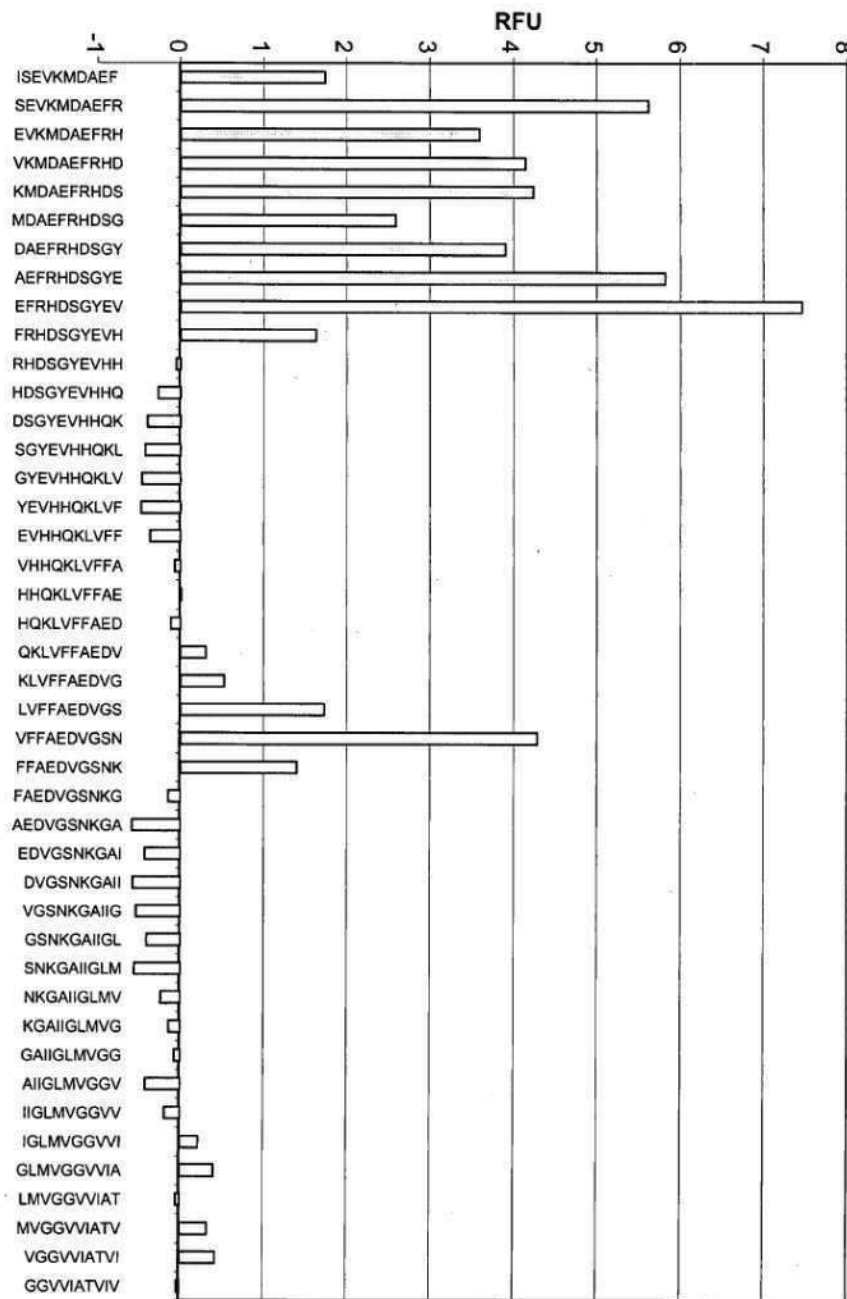
도면8a



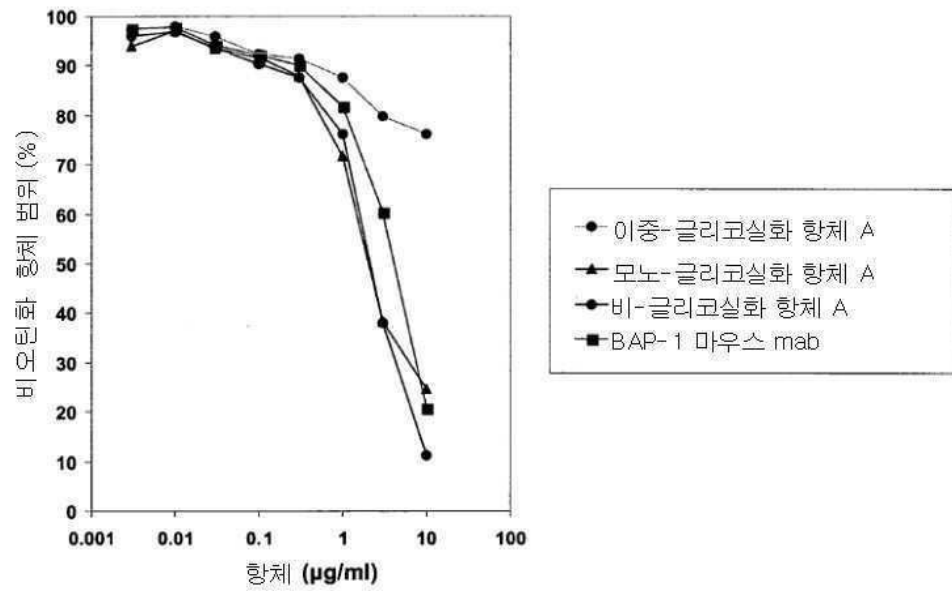
1	ISEVKMDAEF	21	OKLVFFAEDV
2	SEVKMDAEFR	22	KLVFFAEDVG
3	EVKMDAEFRH	23	LVFFAEDVGS
4	VKMDAEFRHD	24	<b>VFFAEDVGSN</b>
5	KMDAEFRHDS	25	FFAEDVGSNK
6	MDAEFRHDS	26	FAEDVGSNK
7	DAEFRHDSGY		
8	AEFRHDSGYE		
9	<b>EFRHDSGYEV</b>		
10	FRHDSGYEVH		



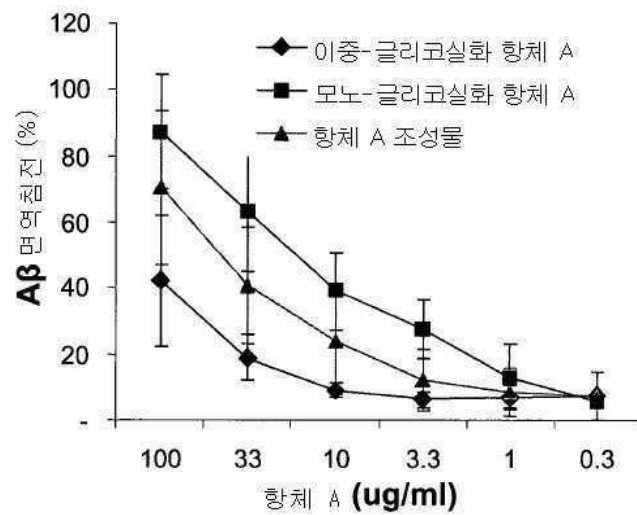
도면8b



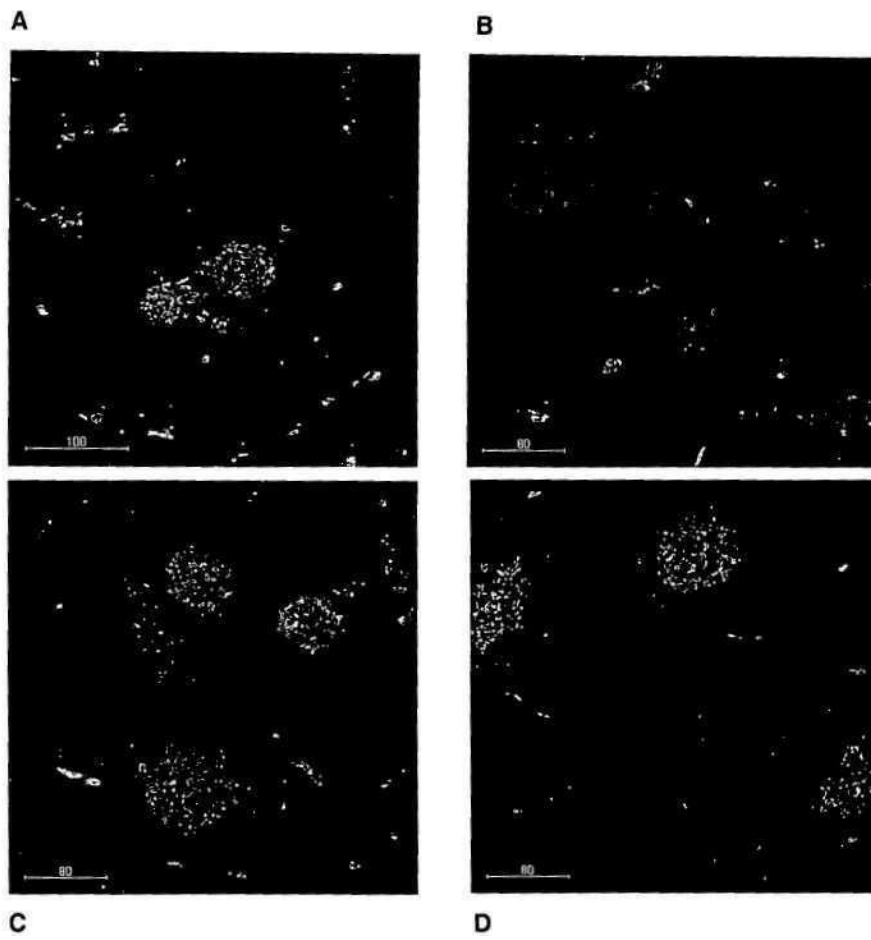
도면9



도면10



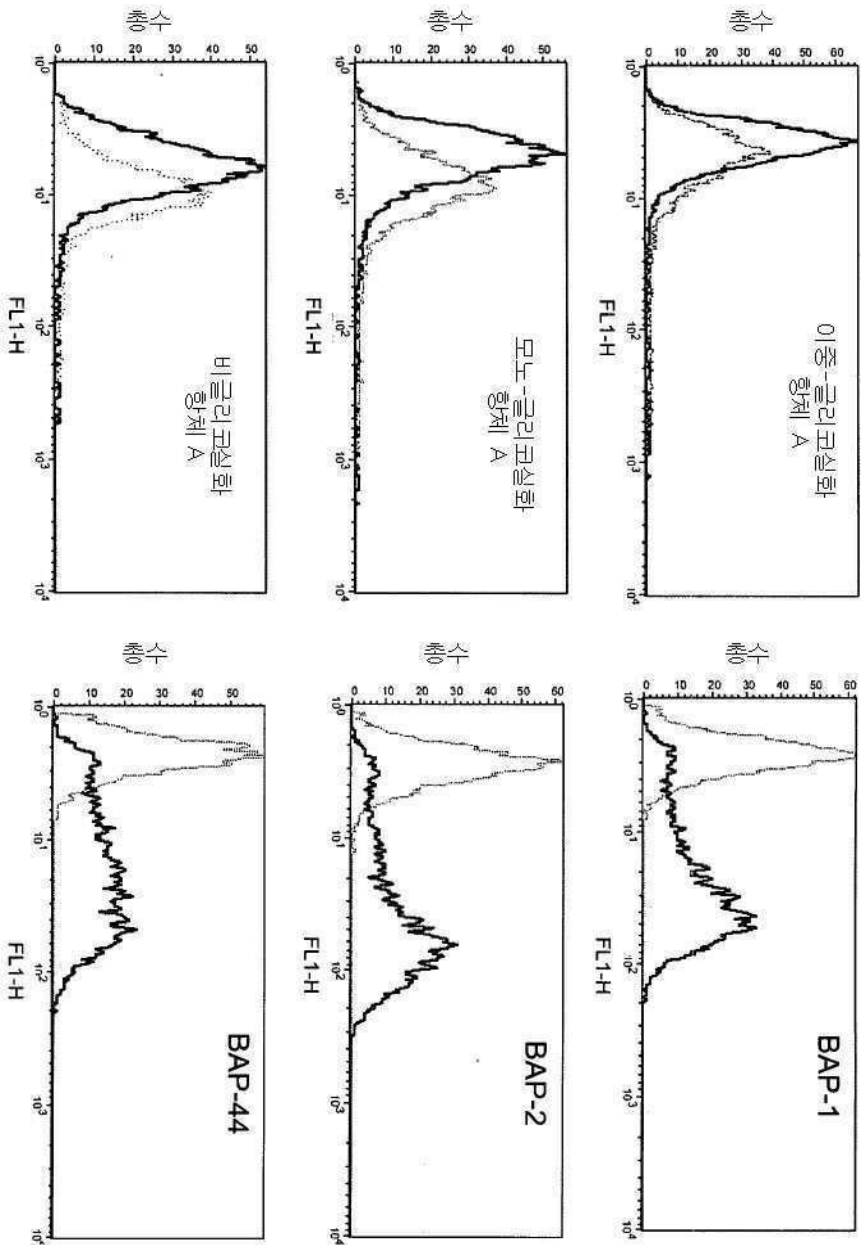
도면11



도면12



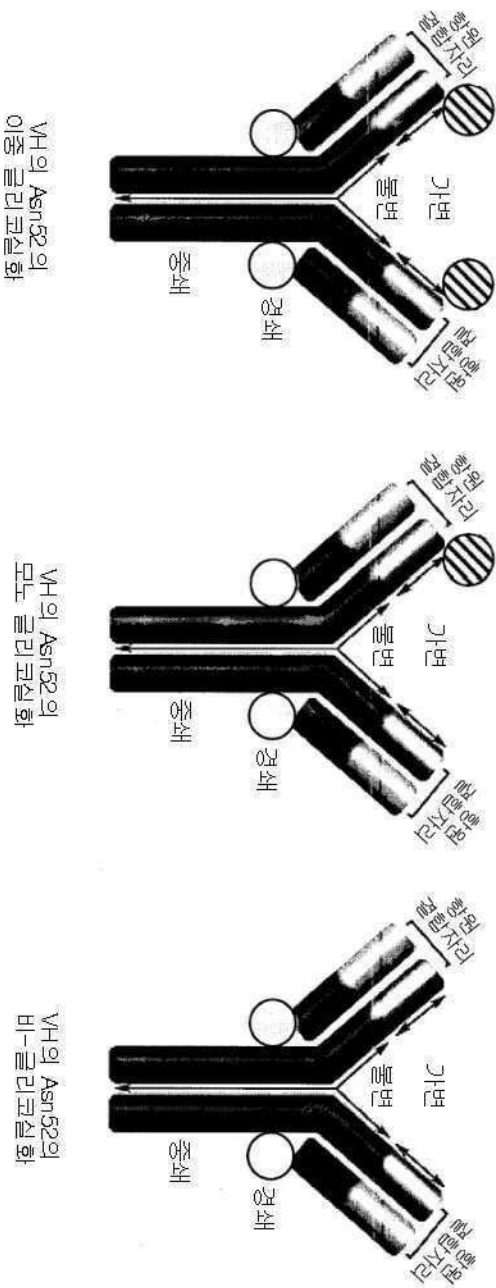
도면13



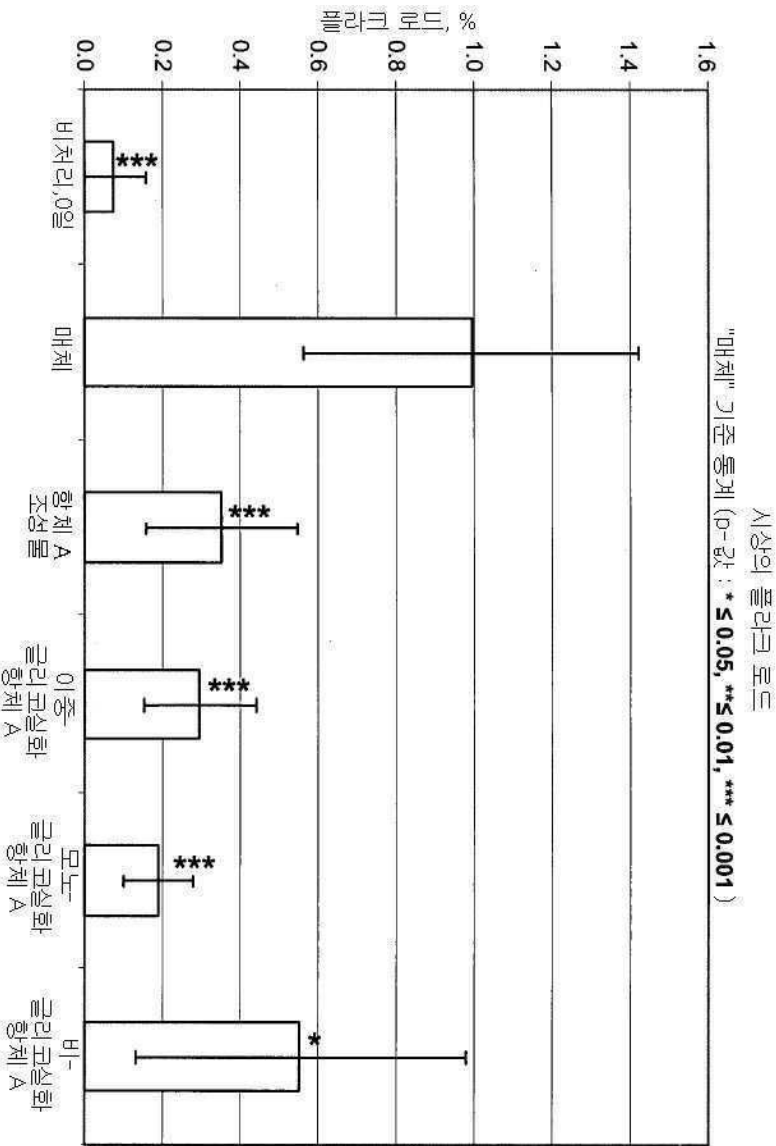


도면14

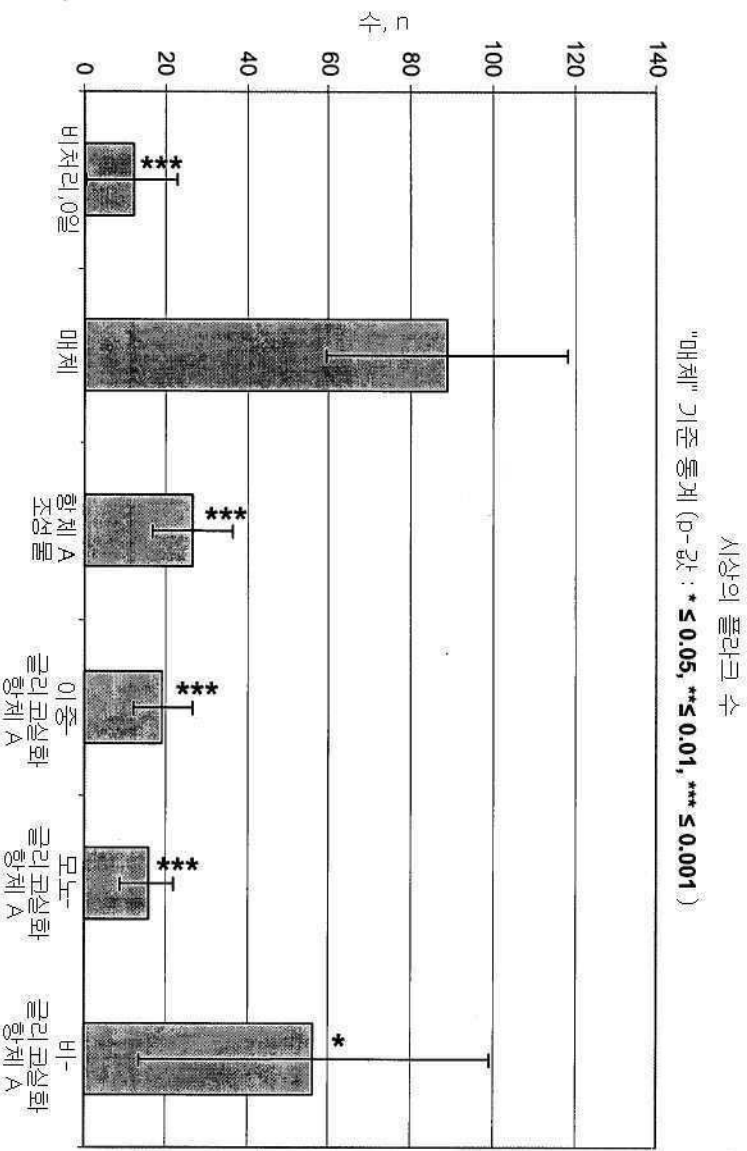
- 가변성 중쇄 Asn52의 N-글리코실화 자리
- Asn306의 경첩 부위의 N-글리코실화



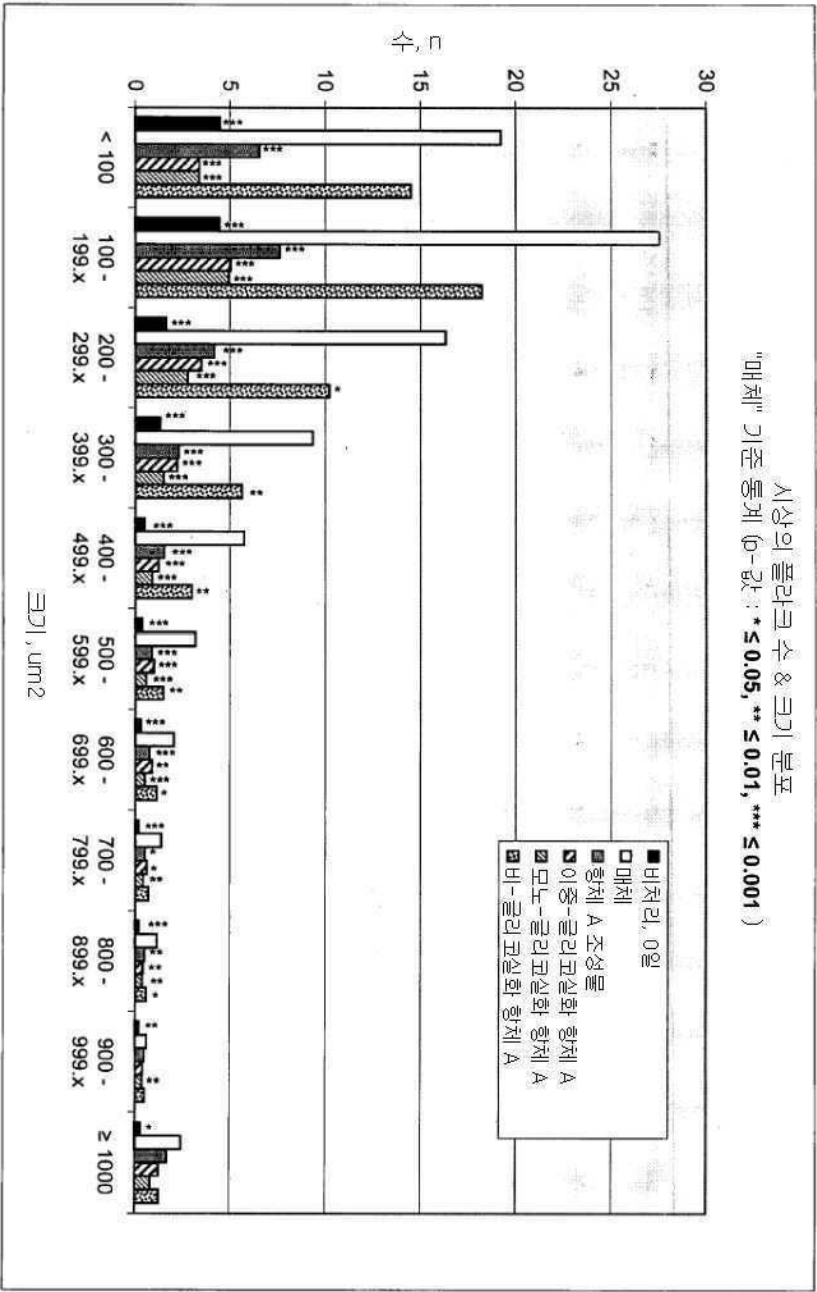
도면15a



도면15b

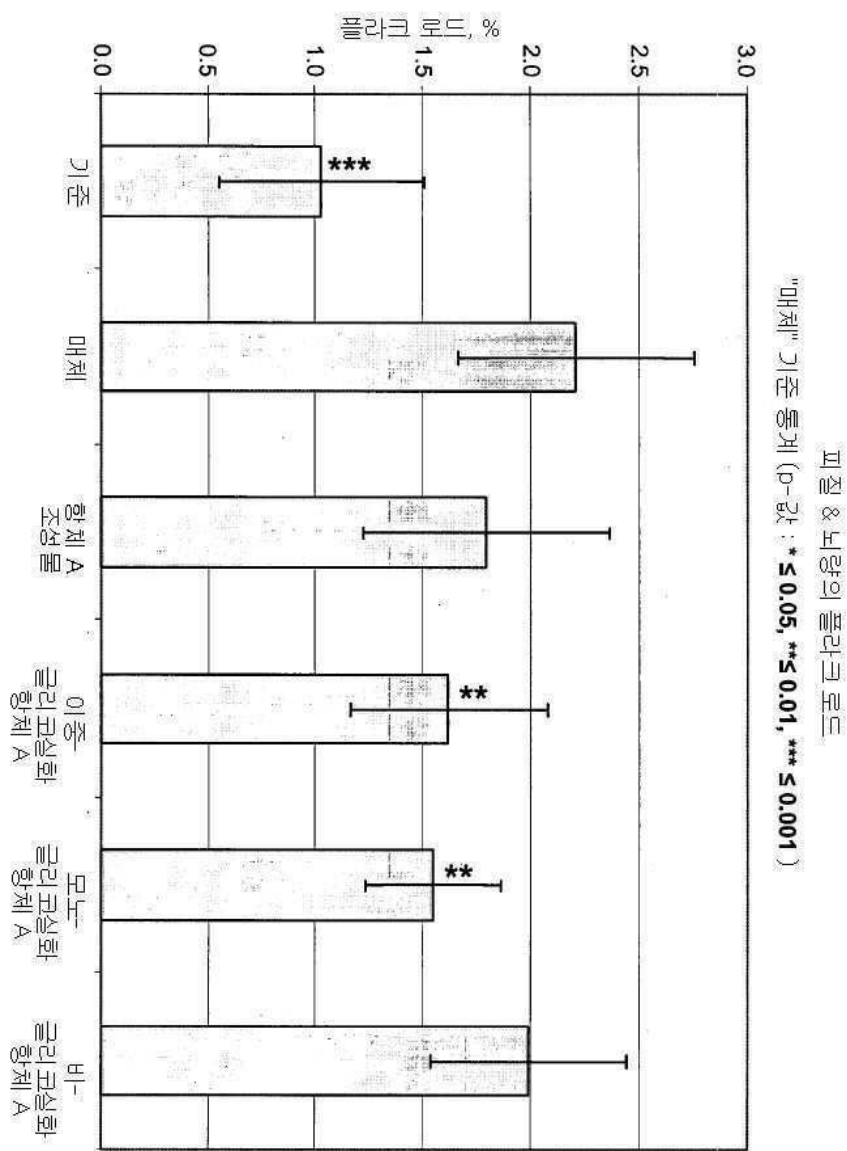


도면15c

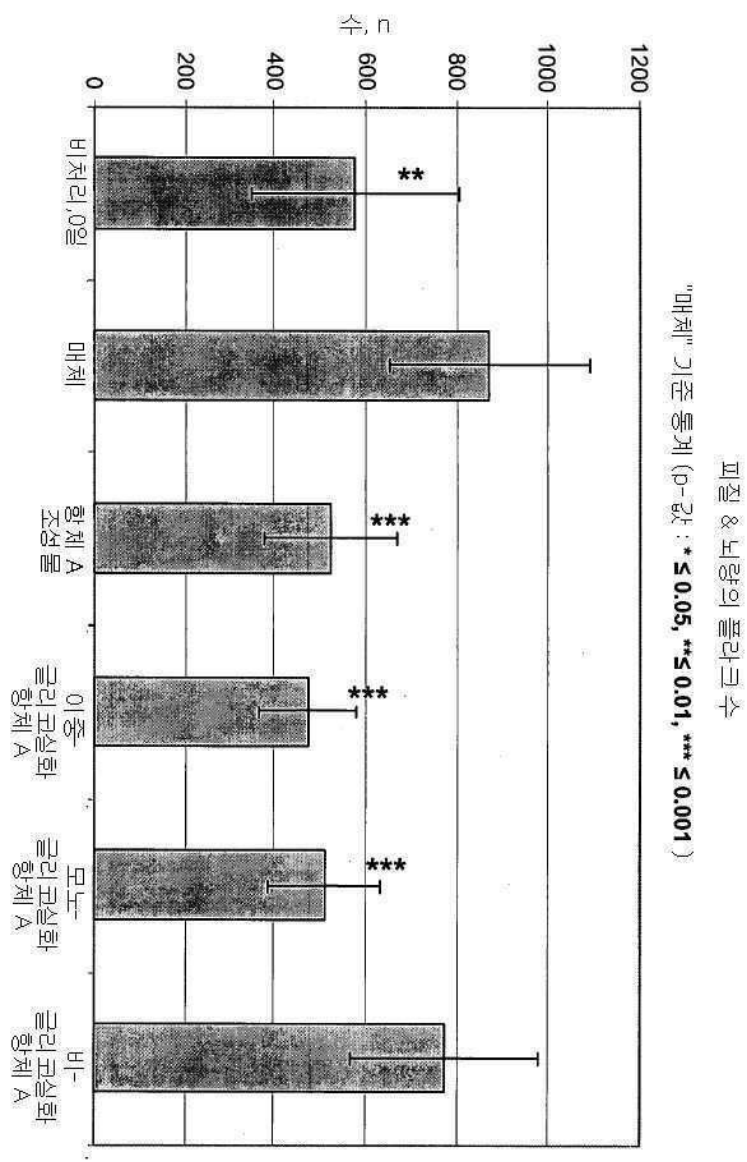




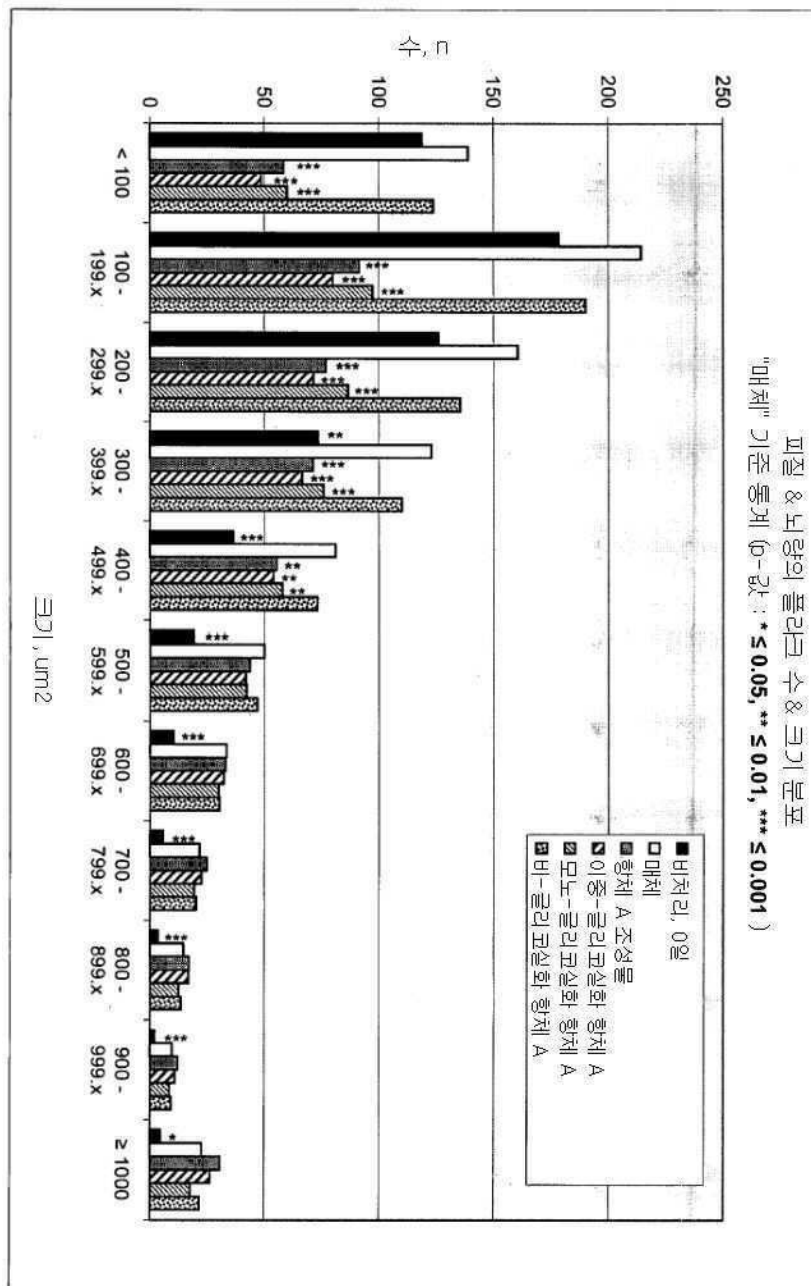
도면16a



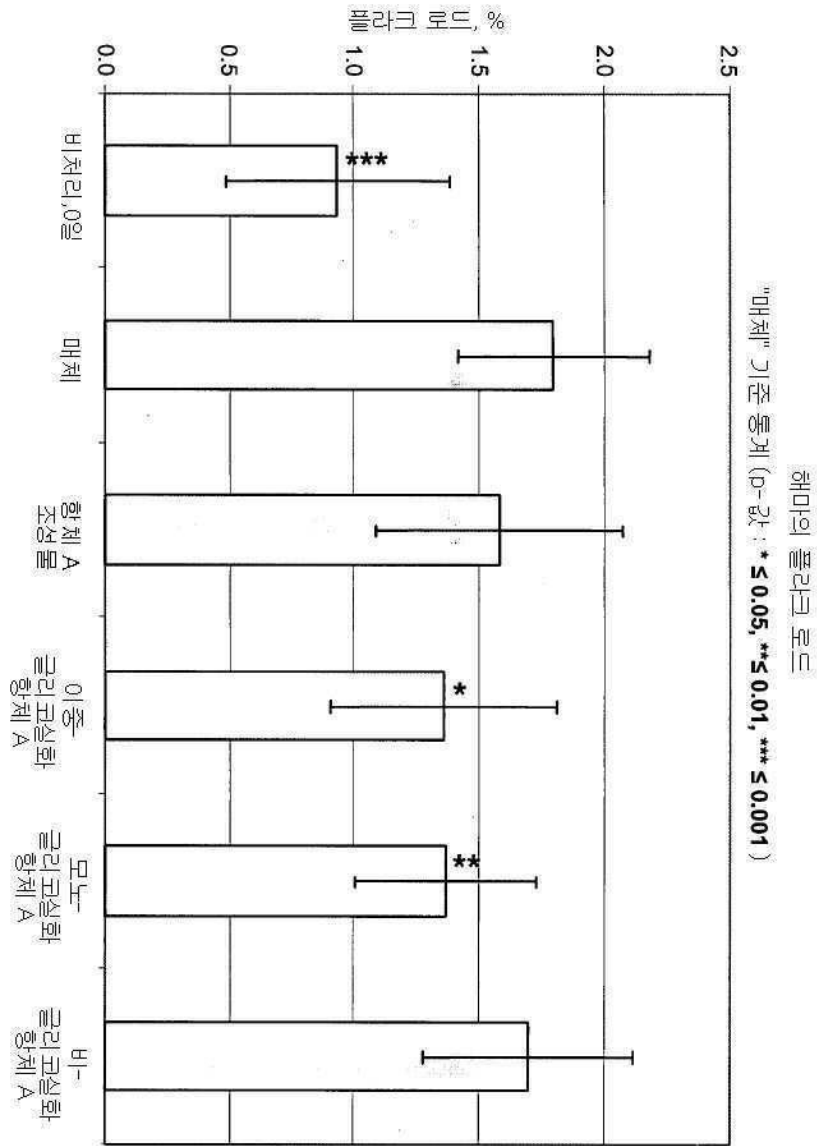
도면16b



도면16c

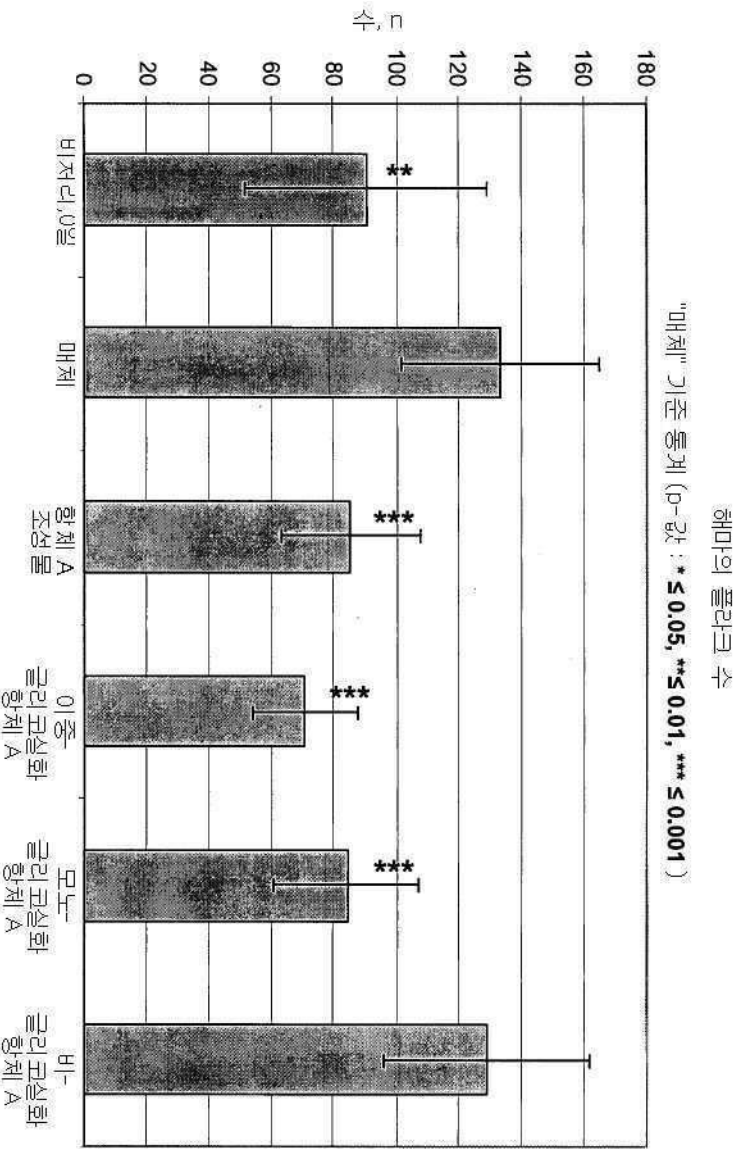


도면17a

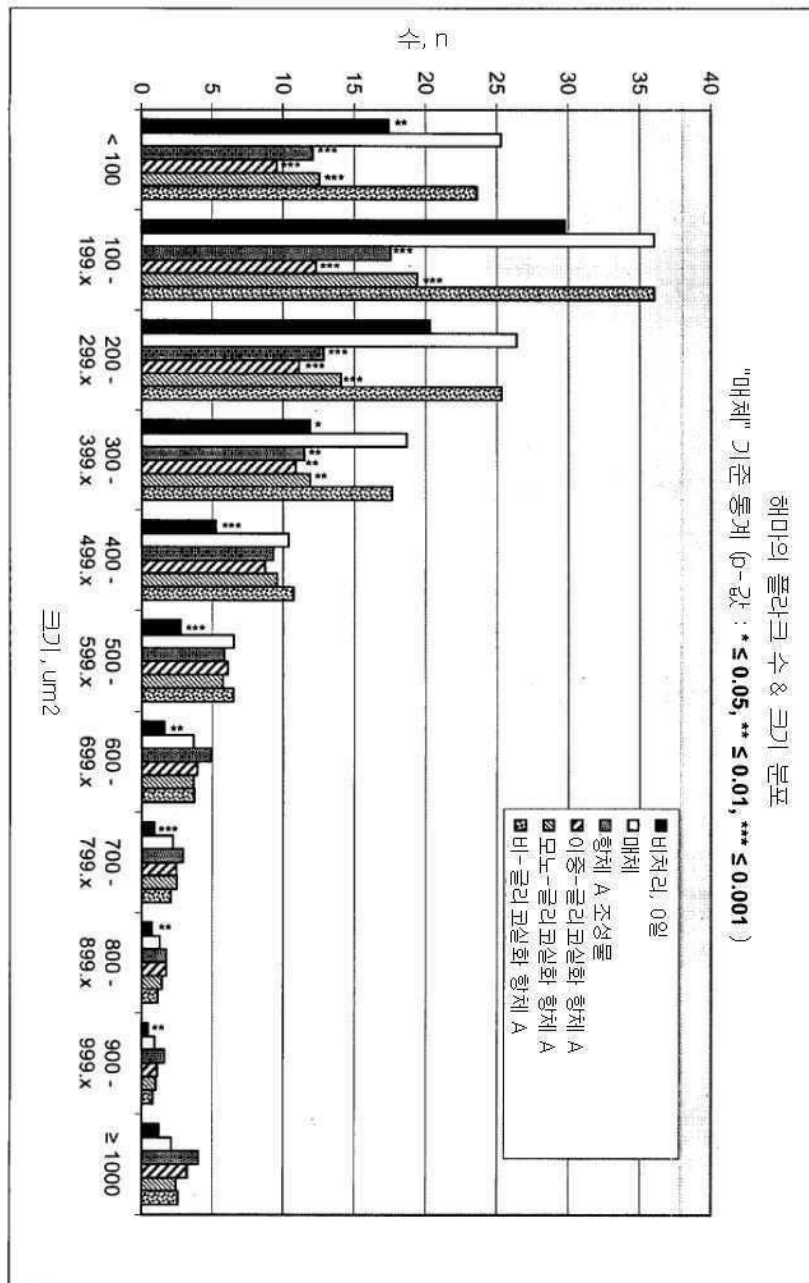




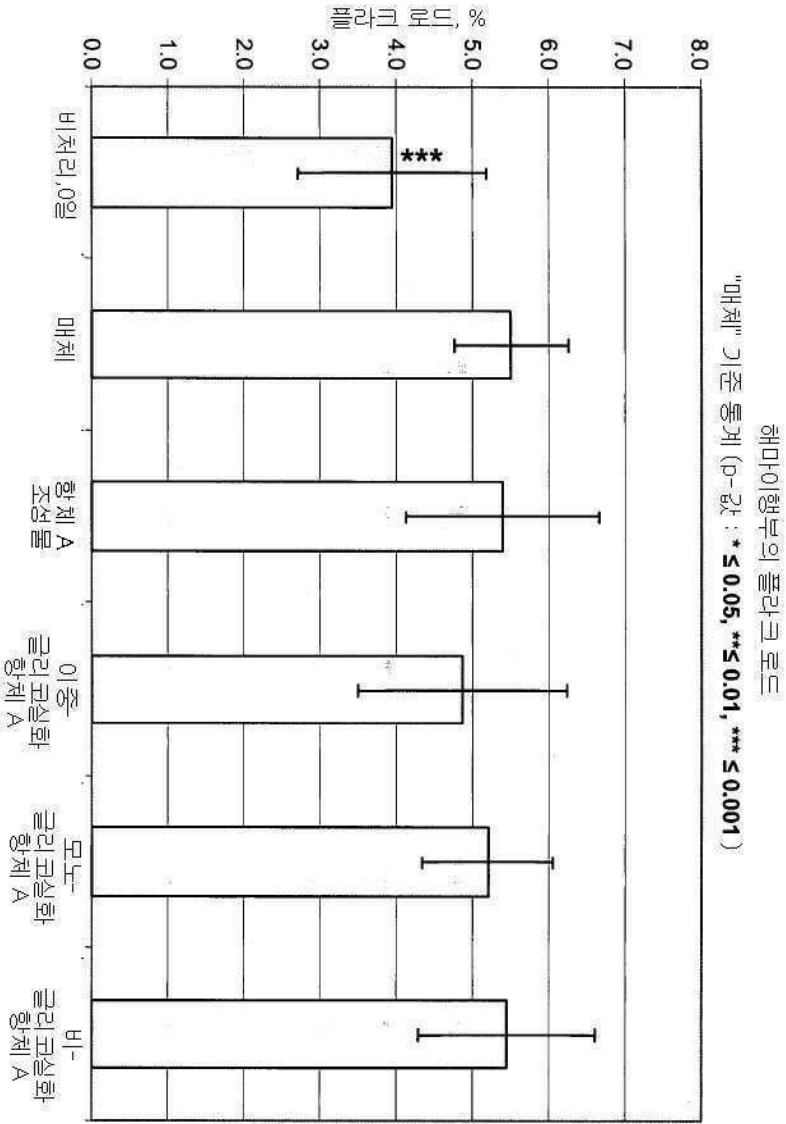
도면17b



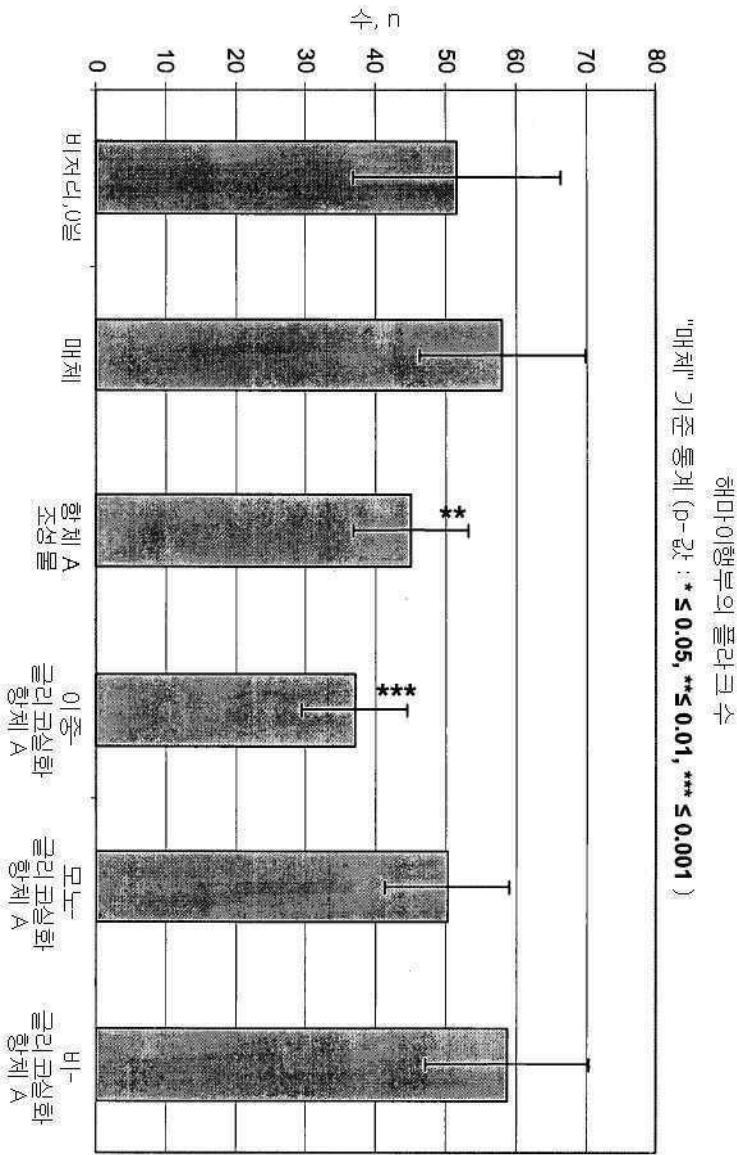
도면17c



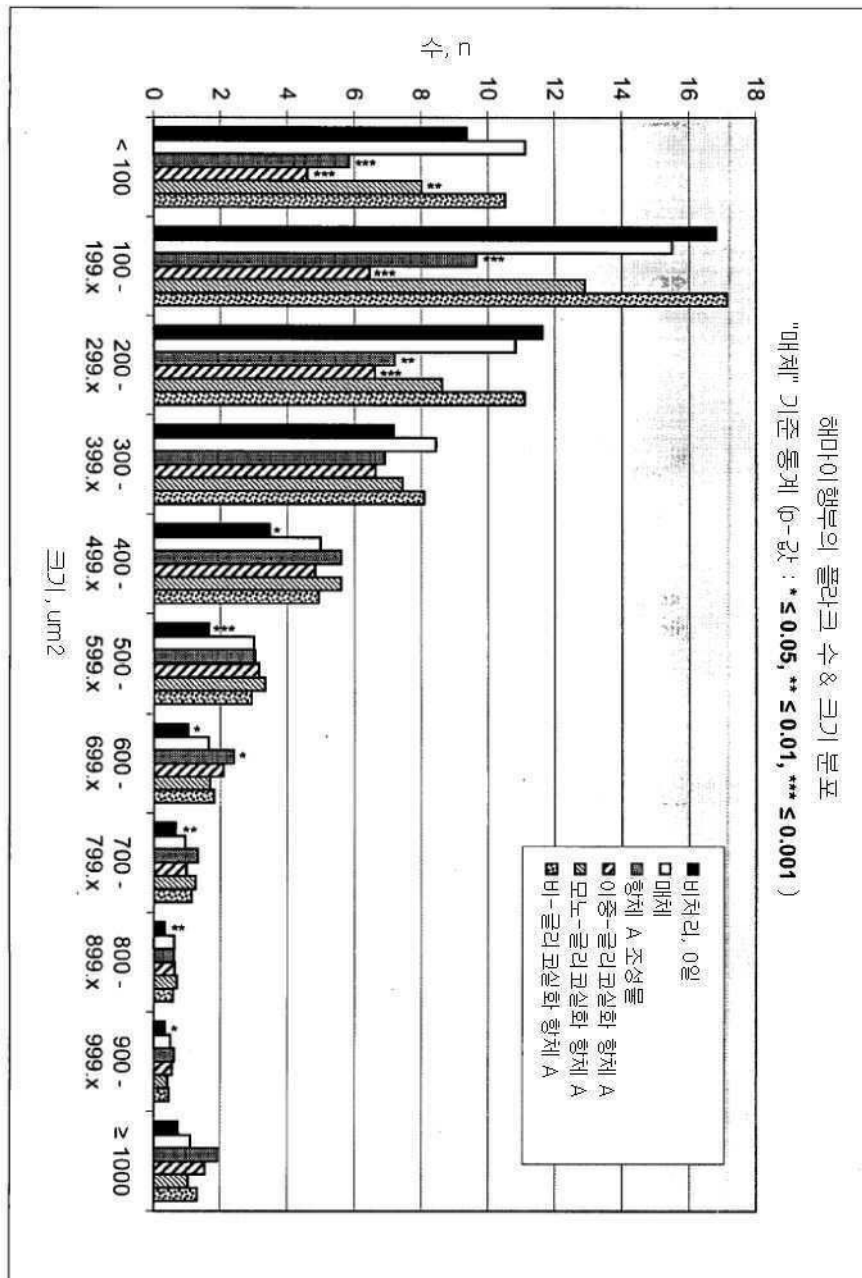
도면18a



도면18b

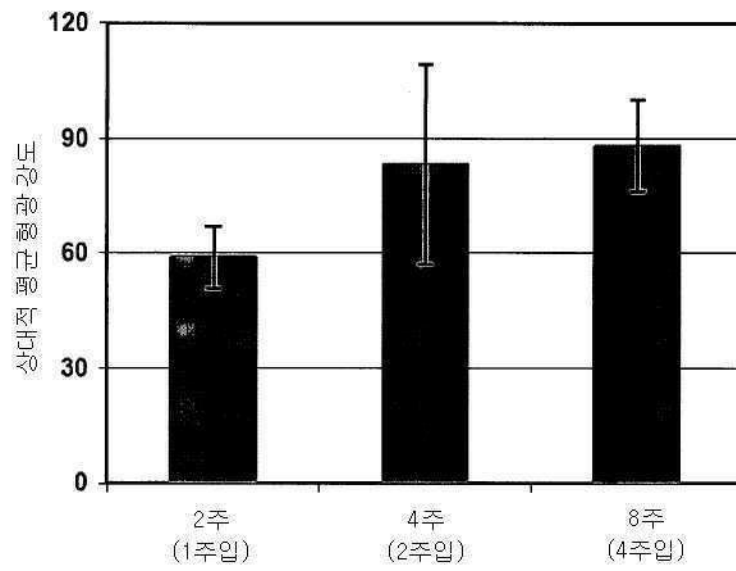


도면18c

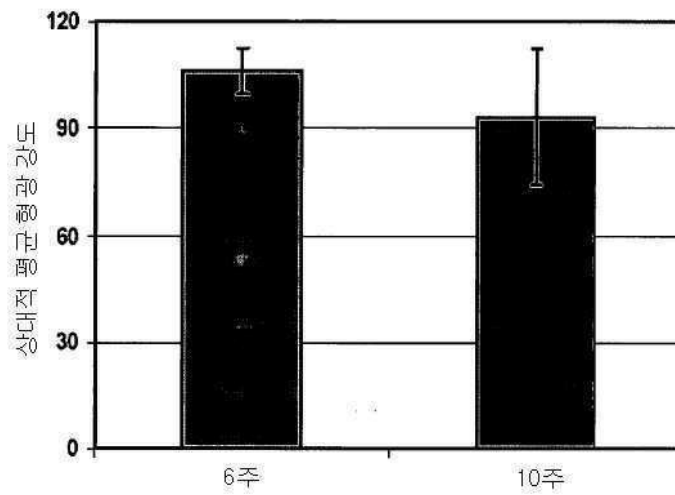




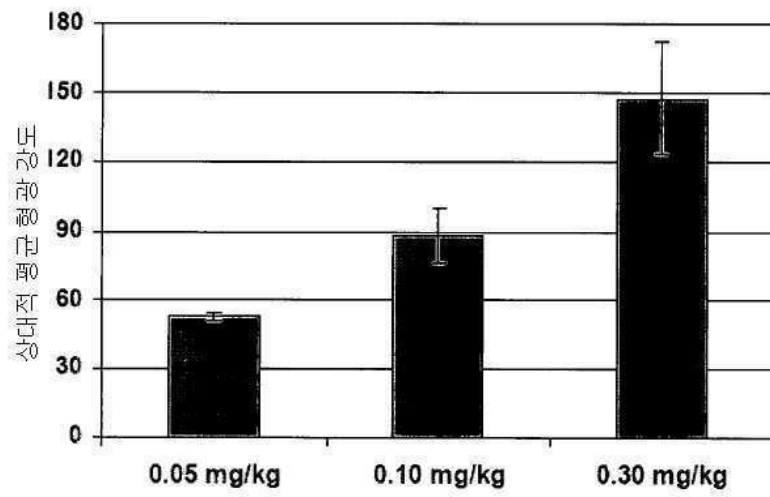
도면19



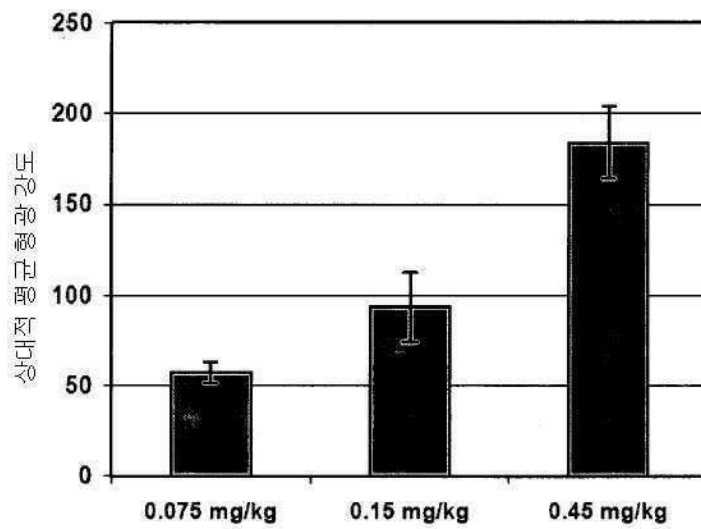
도면20



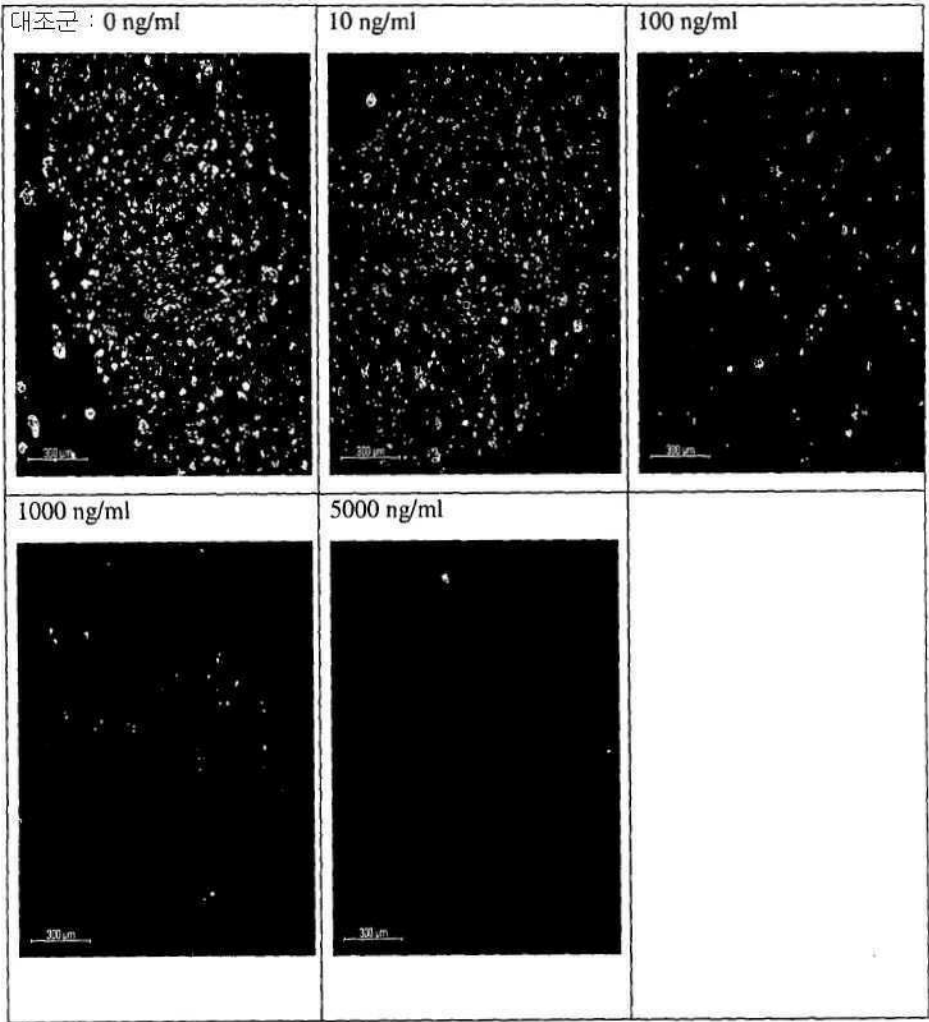
도면21



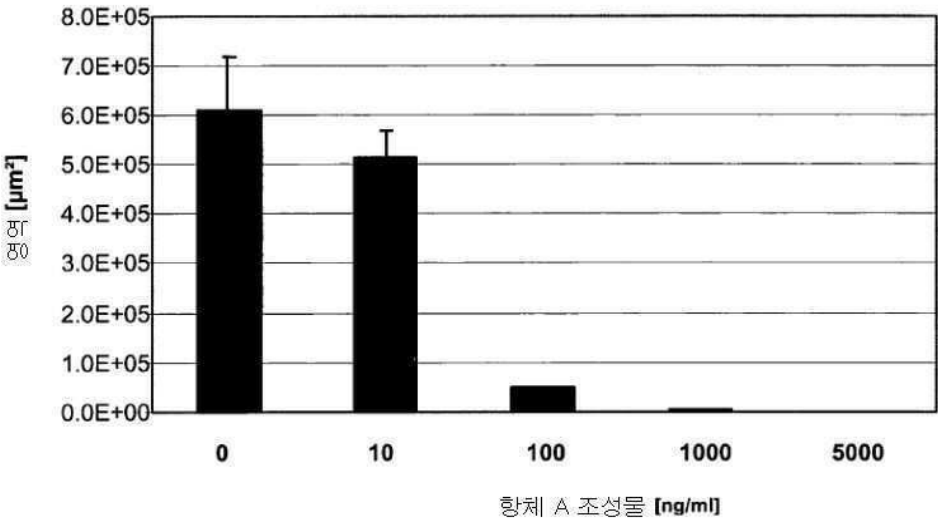
도면22



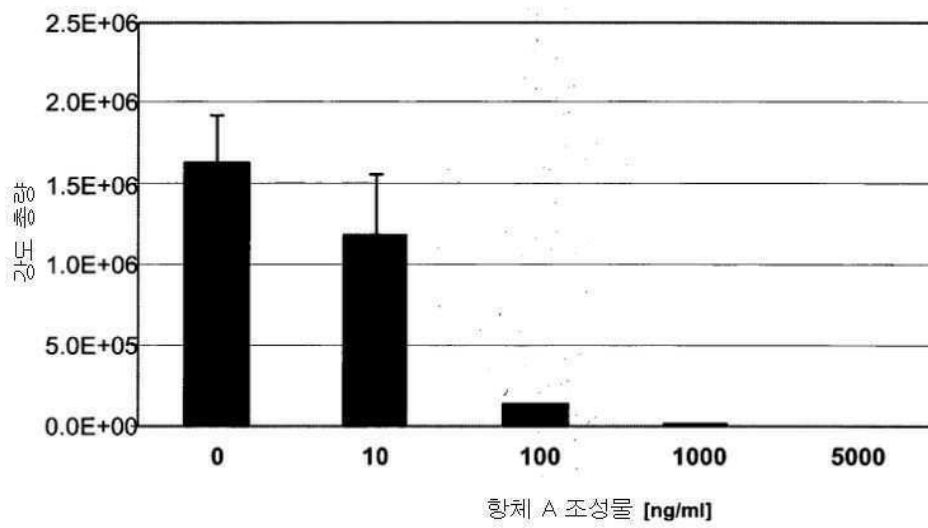
도면23



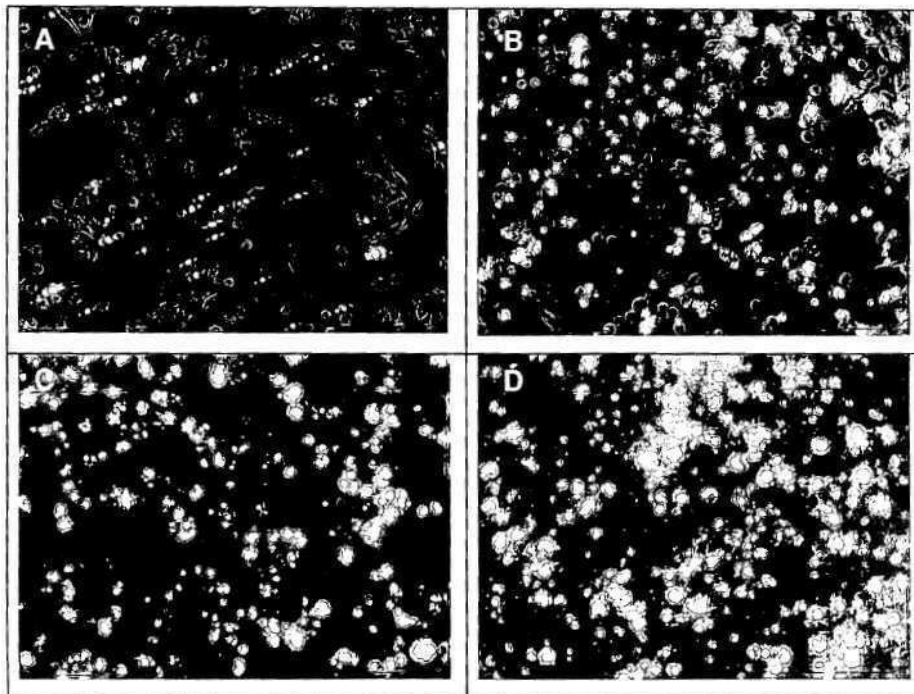
도면24a



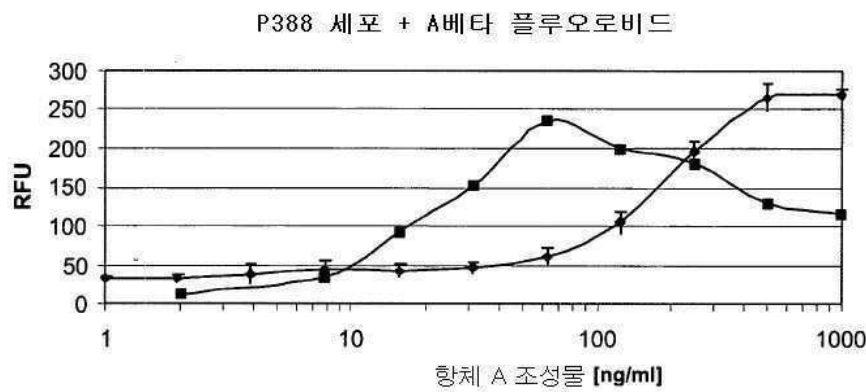
도면24b



도면25



도면26



도면27

이름	구조 <sup>1)</sup>	이름 <sup>2)</sup>	구조 <sup>1)</sup>
Asn 306_G0		Asn 52_G2_0NANA-F	
Asn 306_G0-GlcNac		Asn 52_G2_1NANA-F	
Asn 306_G1		Asn 52_G2_2NANA-F	
Asn 306_G2		Asn 52_hyb_Man5_1NANA	
Asn 306_G0-F		Asn 52_hyb_Man4_1NANA	
Asn 306_G1-F		Asn 52_hyb_Man3_1NANA	
Asn 306_G2-F		Asn 52_Man5	
Asn 306_Man5			

1) 푸코스 △, 만노스 ●, N-아세틸글루코사민 □, 갈락토스 ○, N-아세틸뉴라민산 ◇  
2) "hyb"는 하이브리드 구조를 나타냄

서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)