



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0098683
(43) 공개일자 2015년08월28일

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7021618(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2006년12월08일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-7030095
원출원일자(국제) 2006년12월08일
심사청구일자 2014년11월26일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년08월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/011862</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/068412
국제공개일자 2007년06월21일</p> <p>(30) 우선권주장
05027092.5 2005년12월12일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
에이씨 이문 에스.에이.
스위스, 체하-1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프
엘 이노베이션 파크</p> <p>(72) 발명자
그레페라트, 루트
독일, 77694 케할, 암 지젤호프 2
힉맨, 데이비드
스위스, 체하-1635 라 푸르 드 트렘, 시테 생 미
셸 12
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
한양특허법인</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 1 항

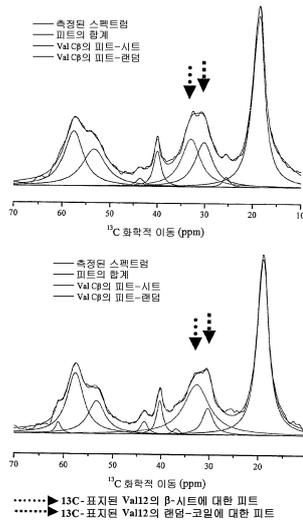
(54) 발명의 명칭 **치료적 특성을 갖는 베타 1-42 특이적인 단일클론성 항체**

(57) 요약

본 발명은, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease; AD)과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 이상(abnormality) 및 장애 그룹인 아밀로이드증(amyloidosis)을 포함하는, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질과 관련되거나 또는 이에 기인되는 장애 및 질병의 치료에서의 치료적 및 진단적 용도를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



발명은 β -아밀로이드 단백질의 범위로부터의 특정 에피토프(epitope)를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 고도로 특이적이고 또한 고도로 유효한 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 가르침에 의해 가능해진 항체는, 상세하게는 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련(age-related) 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크(amyloid plaque) 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이에 관련된 질환 및 장애의 치료에 유용하다.

(72) 발명자

무스, 안드레아스

스위스, 체하-1009 폴리, 에비뉴 데스 세리시에르 39비

파이퍼, 안드레아

스위스, 체하-1806 세인트-레기에르, 로이트 드 페닐 16에이

니콜라우, 끌로드

미국, 메사츄세츠 02459, 뉴튼, 그린우드 스트리트 166

(30) 우선권주장

06014729.5 2006년07월14일

유럽특허청(EPO)(EP)

06020766.9 2006년10월02일

유럽특허청(EPO)(EP)

특허청구의 범위

청구항 1

작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체로서, 상기 항체가 β -아밀로이드("A β ")의 에피토프를 인식 및 결합하고, 항체 : 펩타이드 1:100의 몰 비율로, A β 모노머성 펩타이드 1-42와 공동-인큐베이션(co-incubation)하면, A β 모노머가 고분자 폴리머성 원섬유(fibril) 또는 미세섬유(filament)로 결집(aggregation)되는 것을 억제하고 또한, 추가로, 항체 : 미리 형성된 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유 1:100의 몰 비율로, A β 모노머성 펩타이드 1-42의 결집에 의해 형성된 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 공동-인큐베이션하면, 상기 미리 형성된 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유를 해체시킬 수 있는 것인, 항체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알츠하이머병(Alzheimer's Disease)과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 이상(abnormality) 및 장애 그룹인 아밀로이드증(amyloidosis)을 포함하는, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인되는 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 치료에서의 치료적 및 진단적 용도를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아밀로이드증(amyloidosis)은 단일 질환(single disease entity)이 아니라 오히려, 하나 이상의 기관 또는 신체에 축적되는, 아밀로이드로 불리는 밀랍상(waxy), 전분-유사 단백질의 세포외 조직 침착물(deposit)을 특징으로 하는 다양한 진행성 질환 과정의 그룹이다. 상기 아밀로이드 침착물이 쌓여 올려짐에 따라, 이는 상기 기관 또는 신체의 정상 기능을 방해하기 시작한다. 적어도 15개의 상이한 유형의 아밀로이드증이 있다. 주된 형태는 공지된 선행물질(antecedent)이 없는 원발성 아밀로이드증(primary amyloidosis), 일부 다른 병태(condition)에 따르는 속발성 아밀로이드증(secondary amyloidosis), 및 유전성 아밀로이드증이다.

[0003] 속발성 아밀로이드증은 결핵(tuberculosis), 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever)로 불리는 세균 감염, 뼈 감염(골수염(osteomyelitis)), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 소장염(육아종회장염(granulomatous ileitis)), 호지킨병(Hodgkin's disease), 및 나병(leprosy)과 같은 만성 감염 또는 염증 질환을 가진 사람에게서 발생한다.

[0004] 아밀로이드 침착물은 일반적으로 세 가지 성분을 함유한다. 아밀로이드 물질의 약 90%를 차지하는 아밀로이드 단백질 원섬유(fibril)는 여러 상이한 유형의 단백질 중 하나를 포함한다. 이들 단백질은 아밀로이드 단백질의 독특한 염색 특성을 야기하는 콩고 레드(Congo red)에 대한 결합 부위를 나타내는 독특한 단백질 배열(configuration)인, 소위 "베타-플리트된(beta-pleated)" 시트 원섬유로 접힐 수 있다. 또한, 아밀로이드 침착물은 아밀로이드 P (오각형) 성분(AP), 정상 혈청 아밀로이드 P (SAP)에 관계되는 당단백질과, 황산화 글리코사미노글리칸(sulfated glycosaminoglycan; GAG), 연결 조직의 복합 탄수화물과 밀접하게 관련된다.

[0005] 많은 노화 질환은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 이와 관련되고, 질환의 진행뿐만 아니라 발병 이전에 기여하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 물질의 세포외 침착물의 축적을 일부 특징으로 한다.

[0006] 이들 질환은, 예를 들어, 경증 인지 장애(mild cognitive impairment; MCI), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down's syndrome), 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type)); 괄 파킨슨-치매 복합증(Guam Parkinson-Dementia complex)과 같은 인지 기억 능력(cognitive memory capacity)의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환으로는 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis); 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, 근육위축기쪽경화증(ALS; amyotrophic lateral sclerosis), 봉입체 근염(inclusion-body myositis; IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis); 내분비 종양, 및 황반 변성(macular degeneration)을 포함하는 그 밖의 질환이 있다.

- [0007] 비록 이들 질환의 발병기전은 다양할 수 있지만, 이들의 특징적인 침착물은 종종 많은 공동(shared) 분자적 성분을 함유한다. 이는 전염증성 경로의 상당한 정도로의 국부적 활성화에 기여할 수 있어, 활성화된 보체 성분(complement component), 급성기 반응물질(acute phase reactant), 면역 조절물질(immune modulator), 및 다른 염증 매개체(inflammatory mediator)가 동시 침착될 수 있다(McGeer 등, 1994).
- [0008] 알츠하이머병(AD)은 뇌 내 단백질의 이상 침착물의 축적물인 아밀로이드 플라크에 기인하는 것으로 주로 생각되는 신경계 장애이다. 병에 걸린 개인의 뇌에서 발견되는 가장 흔한 아밀로이드의 유형은 주로 A β 원섬유로 구성된다. 과학적 증거는, 플라크에서의 베타-아밀로이드 단백질의 생산 및 축적의 증가가, AD의 발생 및 진행에 기여하는 신경 세포 사멸의 원인이 되는 것을 증명한다. 이번에는, 중요한(strategic) 뇌 구역에서의 신경세포의 상실은 신경 전달 물질의 감소와 기억 장애를 유발한다. 플라크 축적에 주로 필수적인 단백질은 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 및 두 프레세닐린(presenilin)(프레세닐린 I 및 프레세닐린 II)을 포함한다. 효소 β 및 γ 세크레타아제(secretase)에 의한, 대부분의 세포에서 구성적으로 발현되고 이화되는(catabolized) 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 순차적 분할(cleavage)은 39 내지 43 아미노산 A β 펩타이드를 방출시킨다. APP의 분해는 그들의 플라크로 결합하려는 경향을 증가시키는 듯 하다. A β (1-42) 절편(fragment)은 특히 그의 C-말단에서의 2개의 극소수성(very hydrophobic) 아미노산 잔기로 인한 높은 결합물 축적 경향을 갖는다. 따라서, 상기 A β (1-42) 절편은 AD에서 신경 플라크(neuritic plaque) 형성의 개시에 주로 관여하고 또한 필수적이라고 여겨지며, 따라서 높은 병리적 가능성을 갖는 것으로 여겨진다. 따라서 아밀로이드 플라크 형성을 흐트러뜨리고 이를 표적으로 할 수 있는 특정 항체가 필요하다.
- [0009] AD의 증상은 더디게 나타나며, 제1 증상은 가벼운 건망증뿐일 것이다. 이 단계에서, 개인은 최근의 사건, 활동, 잘 아는 사람들 또는 사물들의 이름을 잊어버릴 수 있으며, 간단한 수학 문제를 풀 수 없을지도 모른다. 질환이 진행함에 따라, 증상은 보다 쉽게 인지되고 AD에 걸린 사람 또는 그의 가족 구성원이 의학적 도움을 찾을만큼 심각해진다. 중간 단계의 AD의 증상은 몸치장(grooming)과 같은 간단한 일을 하는 법을 잊어버리는 것을 포함하고, 문제점은 말하기, 이해하기, 읽기 또는 쓰기에서도 발생한다. 후반 단계의 AD 환자는 불안해하거나 또는 공격적이 될 수 있고, 집을 잃어버릴 수 있으며 결국 종합 간병을 필요로 한다.
- [0010] 현재, AD를 진단하기 위한 유일한 방법은 개체의 사망 후 부검하여 뇌 조직의 플라크 및 매듭(tangle)을 확인하는 것이다. 따라서, 아직 사람이 살아있는 동안, 의사는 "가능한(possible)" 또는 "충분히 확실한(probable)" AD의 진단만을 수행할 수 있다. 통상의 방법을 사용하여, 내과의사는 "충분히 확실한" AD를 진단하기 위한 여러 도구를 이용하여 90 퍼센트 이하의 정확도로 AD를 진단할 수 있다. 내과의사는 사람의 일반적인 건강, 과거의 의료 문제, 및 일상 활동을 수행하며 갖는 모든 어려움의 히스토리(history)에 대해 질문한다. 기억력, 문제 해결, 집중력, 계산, 및 언어의 행동 테스트는 인지 퇴행의 정보를 제공하며, 혈액, 소변, 또는 척수액의 테스트 및 뇌 스캔과 같은 의학적 테스트는 일부 추가적 정보를 제공할 수 있다.
- [0012] *AD의 관리는 투약-기반 및 비투약 기반 치료로 구성된다. 질환의 근원적 과정의 변화(진행의 지연 또는 역행)를 목표로 한 치료는 그동안 대부분 실패해왔다. 신경 세포의 화학적 전달자(신경전달물질), 특히 타크린(tacrine) 및 리바스티그민(rivastigmine)과 같은 콜린에스테라제 억제제(ChEIs)의 결핍(결손), 또는 기능부전(malfunction)을 회복시키는 약은 증상의 개선을 나타내어 왔다. ChEIs는 신경전달물질의 효소적 분해를 방해하여 뇌에서의 신경 신호를 전달할 수 있는 화학적 전달자의 양을 증가시킨다.
- [0013] 질환 초기 및 중기 단계의 일부 사람들을 위한 약물들인, 타크린 (COGNEX[®], Morris Plains, NJ), 도네페질(donepezil) (ARICEPT[®] Tokyo, JP), 리바스티그민 (EXELON[®], East Hanover, NJ), 또는 갈란타민(galantamine) (REMINYL[®], New Brunswick, NJ)은 제한된 시간 동안 일부 증상이 악화되는 것을 예방하는 것을 도울 수 있을 것이다. 다른 약물인, 메만틴(memantine) (NAMENDA[®], New York, NY)은 중등도 내지 중증 알츠하이머병의 치료를 위해 승인되었다. 투약은 또한 AD의 정신병적 표시(manifestation)를 처리(address)할 수 있다. 또한, 일부 약은 불면, 초조, 방랑(wandering), 불안 및 우울증과 같은 AD의 행동 증상의 제어를 도울 수 있다. 이들 증상의 치료는 종종 환자를 보다 편안하게 만들고 또한 간병인에게는 간병이 보다 수월해지도록 한다. 불행히도, 현저한 치료 진보는 이 클래스의 작용제가 위약(placebo)보다 일관적으로 나온 것으로 나타나지만, 질환은 계속 진행되고, 정신 기능의 평균 효과는 그다지 크지 않다. 많은 약물이 AD 투약에 사용되며, 예를 들어, ChEIs는 또한 위장관 기능장애, 간 독성 및 체중 감소를 포함하는 부작용도 갖는다.

- [0014] 아밀로이드-유사 단백질의 침착물 및 축적물에 기인하거나 또는 이와 관련되는 그 밖의 질환은 경증 인지 장애(mild cognitive impairment), 루이 소체 치매(LBD), 근육위축가쪽경화증(ALS), 붕입체 근염 및 황반 변성, 특히 연령-관련 황반 변성(age-related macular degeneration; AMD)이다.
- [0015] 경증 인지 장애(MCI)는 포착하기 어렵지만 측정가능한 기억 장애로서 가장 일반적으로 정의되는 일반 용어이다. MCI를 갖는 사람은 노화에 의해 일반적으로 기대되는 것보다 큰 기억 문제를 경험하지만, 판단(judgment) 또는 추론(reasoning) 부전과 같은 치매의 다른 증상을 나타내지는 않는다. MCI는 AD의 전임상적 단계를 종종 반영하는 병태이다.
- [0016] 내후각뇌피질(entorhinal cortex; EC) 내 β -아밀로이드의 침착은 중장년층에서 경증 인지 장애(MCI)의 발생에 주요 역할을 할 것으로 여겨진다. 이는, AD가 임상적으로 나타난 후 CSF-A β (1-42) 수치가 현저히 감소된다는 관찰과 일치한다. MCI 시기에서, CSF-A β (1-42)에 반하여 CSF-tau 수치는 현저하게 증가하고, 이들 값은 그 후 계속 상승될 것이며, CSF-tau의 증가된 수치를 지시하는 것은 AD가 발생할 것으로 예상되는 MCI 대상을 검출하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.
- [0017] 루이 소체 치매(LBD)는 65세를 넘은 사람에게서 일어날 수 있는 신경퇴행성 장애로, 일반적으로 인지(사고) 장애 및 비정상적 행동 변화의 증상을 유발한다. 증상은 인지 장애, 신경계 징후, 수면 장애, 및 자율신경 기능 상실(autonomic failure)을 포함할 수 있다. 인지 장애는 대개의 경우의 LBD가 나타내는 특성이다. 환자는 점진적으로 악화되는 혼돈의 재발성 삽화(recurrent episode)를 갖는다. 인지 능력에서의 기복(fluctuation)은 종종 집중력 및 각성도(alertness)의 이동 정도(shifting degree)와 관련된다. 인지 장애 및 사고의 기복은 분, 시간, 또는 하루 동안 다양할 수 있다.
- [0018] 루이 소체는 인산화된 및 비인산화된 신경미세섬유(neurofilament) 단백질로 형성된다; 이들은 손상된 또는 비정상적 단백질의 제거에 관여하는 유비퀴틴(ubiquitin)뿐만 아니라 시냅스 단백질 알파-시누클레인(alpha-synuclein)을 함유한다. 루이 소체에 추가로, 신경 세포의 세포 돌기(cell process)에서의 붕입체인 루이 신경 돌기(Lewy neurite)도 존재할 수 있다. 아밀로이드 플라크는 DLB로 고생하는 환자의 뇌 내에 형성될 수 있으나, 이들은 알츠하이머병에 걸린 환자에서 나타나는 수 보다 적은 경향이 있다. AD의 다른 미세병리학적 특징인, 신경섬유매듭(neurofibrillary tangle)은 DLB의 주요 특성은 아니지만 아밀로이드 플라크에 추가하여 종종 나타난다.
- [0019] 근육위축가쪽경화증(ALS)은 상부 및 하부 운동 뉴런(neuron)의 퇴행을 특징으로 한다. 일부 ALS 환자에서, 치매 또는 실어증(aphasia)이 나타날 수 있다(ALS-D). 치매는 대부분 일반적으로 전측두엽 치매(frontotemporal dementia; FTD)이고, 이들 경우의 대부분은 전두엽 및 측두엽의 표면층(superficial layer) 및 치아 이랑(dentate gyrus)의 뉴런 내에 유비퀴틴-양성(ubiquitin-positive), 타우-음성(tau-negative) 붕입체(inclusion)를 갖는다.
- [0020] 붕입체 근염(IBM)은 50세를 넘은 사람들에게서 일반적으로 발견되는 심각한(crippling) 질환으로, 여기서 근육 섬유는 염증을 발생시키고, 위축되기 시작한다 - 그러나 뇌는 이를 면하여 환자는 그들의 전체적 기능을 유지한다. 아밀로이드- β 단백질의 생성에 관여하는 두 효소는, 노인에서 가장 흔한, 진행성인 근육 질환에 걸린 환자의 근육 세포 내부에서 증가되는 것으로 밝혀졌으며, 여기서 아밀로이드- β 또한 증가된다.
- [0021] 아밀로이드-유사 단백질의 축적물 및 침착물과 관련되거나 또는 이에 기인하는 다른 질환은 황반 변성이다.
- [0022] 황반 변성은 흔한 안질환으로, 망막 (감광(light-sensitive) 세포가 뇌로 시각 신호를 보내는 눈 뒤쪽의 종이처럼 얇은 조직)의 중앙 구역인 황반의 악화(deterioration)를 유발한다. 선명한, 맑은, '거짓없는(straight ahead)' 시력은 황반에 의해 처리된다. 황반에의 손상은 맹점(blind spot) 및 흐려보임 또는 난시를 야기한다. 연령-관련 황반 변성(AMD)은 미국 내의 65세가 넘는 사람들에게서 시각 장애의 주된 원인이며, 백인 중 법적 맹인의 주요 원인이다. 약 180만명의 40세 이상의 미국인들이 진행된(advanced) AMD에 걸려 있으며, 중간(intermediate) AMD에 걸린 다른 730만명의 사람들은 시력 상실에 대한 실질적 위협에 처해 있다. 정부는 2020년까지 290만명의 사람이 진행된 AMD에 걸릴 것으로 추정한다. AMD의 희생자는 종종, 이 눈을 멀게 하는 병태의 치료 및 원인에 대해 알려진 바가 매우 적다는 것을 발견하고 놀라고 좌절한다.
- [0023] 황반 변성은, 건성 황반 변성(dry macular degeneration) 및 습성 황반 변성(wet macular degeneration)의 두 형태가 있다. 황반의 세포가 천천히 파괴되기 시작하는 건성 형태는, 황반 변성 사례의 85 퍼센트에서 진단된다. 한쪽 눈이 시력을 상실하고, 다른쪽 눈이 걸리지 않은 상태로 잔류할 수 있지만, 통상적으로 양쪽 눈 모두 AMD에 걸린다. 망막 아래의 황색 침착물인 드루젠(drusen)은, 건성 AMD의 통상적인 초기 징후이다. 진행된 건

성 AMD 또는 습성 AMD의 발전 위험은 드루젠의 크기 또는 수가 증가할수록 증가한다. 건성 AMD는 진행하여, 질환의 습성 형태로 변하지 않고 시력 상실을 유발하는 것이 가능하다; 그러나, 초기 건성 AMD가 갑자기 습성 형태로 변화하는 것 또한 가능하다.

[0025] *습성 형태는, 비록 사례의 15 퍼센트만을 차지하지만, 실명의 90퍼센트를 야기하고, 진행된 AMD로 여겨진다 (습성 AMD의 초기 또는 중기는 없다). 습성 AMD는 언제나 질환의 건성 형태를 앞세운다. 건성 형태가 악화되면, 일부 사람들은 황반 뒤에 자라는 비정상적인 혈관을 갖기 시작한다. 이들 혈관들은 매우 연약하여 유체와 혈액이 새 것이고 (따라서, '습성' 황반 변성), 황반에 대한 급속한 손상을 유발한다.

[0026] AMD의 건성 형태는 처음에 종종 약간 흐려보이는 것을 유발할 것이다. 그 후 특히 시야의 중심이 흐려지고, 질환이 진행될수록 이 영역은 더욱 커진다. 한쪽 눈만 걸렸다면 어떠한 증상도 인지하지 못할 수 있다. 습성 AMD에서는, 직선이 물결모양인 것 같이 보일 수 있고, 중심 시력 상실이 급속히 발생할 수 있다.

[0027] 황반 변성의 진단은 일반적으로 확장된 눈 검사(dilated eye exam), 시력 테스트(visual acuity test), 및 AMD의 진단을 돕기 위한 안저검사(fundoscopy)로 불리는 절차를 이용하여 눈의 뒤쪽을 보는 것을 포함하고, 또한 - 만약 습성 AMD가 의심된다면 - 형광 혈관조영술(fluorescein angiography)도 수행될 수 있다. 만약 건성 AMD가 진행 단계에 도달했다면, 시력 상실을 예방할 수 있는 통용되는 치료는 존재하지 않는다. 그러나, 항산화제 및 아연의 특정 고용량 제형은, 중간 AMD의 진행된 단계로의 진행을 지연시키거나 또는 예방할 수 있다. 마큐젠(Macugen)®(페갓타닙 나트륨 주사액(pegaptanib sodium injection)), 레이저 광응고(laser photocoagulation) 및 광선역학요법(photodynamic therapy)은 황반에서의 비정상적인 혈관 성장 및 출혈을 제어할 수 있으며, 이는 습성 AMD에 걸린 일부 사람들에게 도움이 된다; 그러나, 이미 상실한 시력은 이들 기술에 의해 회복되지 않을 것이다. 시력이 이미 상실되었다면, 존재하는 저시력 보조기(low vision aid)가 삶의 질을 향상시키는데 도움될 수 있다.

[0028] 연령-관련 황반 변성(AMD)의 최초의 징후 중 하나는 브루크막(Bruch's membrane; BM)과 망막색소상피(retinal pigmented epithelium; RPE)의 바닥판(basal lamina) 사이에 드루젠으로 알려진 세포외 침착물의 축적이다. Anderson 등에 의해 수행된 최근의 연구는 드루젠이 아밀로이드 베타를 함유하는 것을 확인하였다. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

[0029] 환경적, 유전적, 및 식이적(dietary) 요인들을 탐구하는 연구와 함께 지속하는 진행중인 연구는 AMD에 기여할 것이다. 각막 세포 이식, 질환의 진행을 예방할 또는 감속시킬 약물, 방사선 요법, 유전자 요법, 시력을 강화시키는 것을 도울 수 있는 망막에 삽입되는 컴퓨터 칩 및 황반 아래의 새로운 혈관의 성장을 예방할 작용제를 포함하는 새로운 치료 전략 또한 탐구될 것이다.

[0030] 새로운 약물의 개발 시 고려되어야 할 중요한 인자는 표적 단백질에 대한 사용의 용이성이다. 경구 약물 전달 - 구체적으로는 정제, 캡슐 및 소프트겔 -은 환자의 편의상 소비되는 모든 투여 형태의 70%를 차지한다. 약물 개발자는 환자가 주사를 맞는 것 또는 약의 투여에서의 보다 침습적인 형태인 그 밖의 것에 비해 경구 전달을 선호하는 것에 동의한다. 낮은 투약 간격(즉, 일일 일회 또는 지속적 방출(sustained release))을 초래하는 제형 또한 바람직하다. 경구 투여 형태로 투여하는 항생제의 용이성은 치료 동안 환자 순응도를 증가시킨다.

[0031] 필요한 것은, 고도로 특이적이고 또한 고도로 효과적인 항체의 발생(generation)을 위한 효과적인 방법 및 조성물이며, 이는 항체가 경구 투여 형태로 제공되기 위한 필요 조건이다. 바람직하게는 상기 항체는 아밀로이드 단백질과 같은 다양한 항원 상의 특이적 에피토프를 인식할 것이다.

[0032] 따라서 또한 필요한 것은, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축기쪽경화증, 봉입체 근염(IBM), 성인발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질과 관련되거나 또는 이에 기인하는 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질과 관련되는 또는 이에 기인하는 질환 및 장애와 관련된 합병증을 처리하기 위한 효과적인 조성물 및 방법이다. 특히 필요한 것은, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 펩타이드의 섬유(fiber)의 결집과 관련된 플라크의 형성과 같은 질환의 생리적 표지에 반대작용할 수 있는, 특수화되고 또한 고

도로 효과적인 항체이다.

- [0033] 프로인트 완전 또는 불완전 보조제와 혼합된 $A\beta_{1-42}$ 의 집중에 의해 유발된 항-아밀로이드 항체는 인간 알츠하이머병에 대한 유전자전이 마우스에서 아밀로이드 burden을 감소시킬 수 있는 것으로 입증되었다 (Schenk 등, 1999).
- [0034] 리포솜 내에서 재구성된 테트라팔미토일화된 $A\beta_{1-16}$ 을 NORBA 유전자전이 마우스에게 복막내 접종하면 현저한 역가의 항-아밀로이드 항체를 유발하며, 이는 또한 인 비트로 및 인 비보 상에서 아밀로이드 섬유 및 플라크를 가용화할 수 있는 것이 입증되었다 (Nicolau 등, 2002).
- [0035] 아밀로이드 플라크 및 섬유의 분해가 일어나는 가능한 메카니즘은, 항체가 미세아교세포의 포식세포에 의해 실질적으로 파괴된 플라크를 흡수분해하는 그들의 테이터를 기초로 결론을 내린 Bard 등 (2000)에 의해 최초로 제안되었다. De Mattos 등, (2001)은 β -아밀로이드의 중앙 도메인에 대해 유도된 MAb가 혈장 아밀로이드에 결합하여 완전히 격리시킬 수 있었음을 나타내었다. 이들은 순환 내에서의, 뇌 내에서의 침착 대신 말초 제거(peripheral clearing) 및 이화작용(catabolism)을 선호하는 이들 mAb의 존재가 뇌와 혈장 사이에서 $A\beta$ 의 평형을 시프트(shift)시켰음을 주장하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0036] (특허문헌 0001) WO 2004/058258
 (특허문헌 0002) W096/1359
 (특허문헌 0003) W096/29605

비특허문헌

- [0037] (비특허문헌 0001) Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000). Nature Med. 6, 916-919.
- (비특허문헌 0002) Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. J Neurochem 95:834-847.
- (비특허문헌 0003) Baschong W, Wrigley NG (1990) Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview. J Electron Microscop Tech 14:313-323.
- (비특허문헌 0004) Blond and Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84 | no. 5 | 1147-1151
- (비특허문헌 0005) Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. (1999) J.Biomol.NMR; 13: 289-302.
- (비특허문헌 0006) Burdick.D. 등 Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. J. Biol. Chem. 267, 546-554 (1992).
- (비특허문헌 0007) DeMattos, Bales, KR, Cummins, DJ, Dodart, JC, Paul, SM, Holtzman, D.M (2001).Proc Natl Acad Sci U S A 98, 8850-8855.
- (비특허문헌 0008) Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF (2000) Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilini . J Neurosci 20:6452-6458.
- (비특허문헌 0009) *Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K,

- Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22:3445-3453.
- (비특허문헌 0010) Glenner 및 Wong, *Biochem Biophys Res Comm*129, 885-890 (1984)
- (비특허문헌 0011) Harlow 및 Lane (*Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))
- (비특허문헌 0012) *Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22.
- (비특허문헌 0013) Hodgson 등, *Bio/Technology*, 9:421 (1991)
- (비특허문헌 0014) Iwadate M, Asakura T, Williamson MP. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 199-211.
- (비특허문헌 0015) Kirschner.D.A., Abraham, C., & Selkoe.D.J. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 503-507 (1986).
- (비특허문헌 0016) Khaw, B. A. 등 *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)
- (비특허문헌 0017) Kennedy, J. H., 등, 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31)
- (비특허문헌 0018) Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.
- (비특허문헌 0019) Kohler 및 Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975))
- (비특허문헌 0020) LeVine, H. III, (2002). *Arch Biochem Biophys* 404, 106-115.
- (비특허문헌 0021) Luca 등, 2001
- (비특허문헌 0022) McGeer 등, 1994
- (비특허문헌 0023) Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.
- (비특허문헌 0024) Nelson, R. & Eisenberg.D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.*(2006).
- (비특허문헌 0025) Nicolau, C, Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., 및 Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.
- (비특허문헌 0026) Queen 등, *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989)
- (비특허문헌 0027) Pearson W.R. (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98
- (비특허문헌 0028) Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. *J.Mol.Biol.* 2004; 335: 247-260.
- (비특허문헌 0029) Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002) *Proc.Nat..Acad.Sci.U.S.A*; 99: 16742-16747.
- (비특허문헌 0030) Rousseaux 등 *Methods Enzymology*, 121 :663-69, Academic Press, 1986
- (비특허문헌 0031) Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadnard, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader.T. 및 Riesner, D. (2004). *J Biol Chem* 279, 47497-47505.
- (비특허문헌 0032) Sambrook 등 *loc. cit.*
- (비특허문헌 0033) Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K1 Huang J, Smith, S.

O., 및 Bormann, B. J. (1995). Proc Natl Acad Sci U S A 92, 488-491.

(비특허문헌 0034) Schenk 등, 1999

(비특허문헌 0035) Schurs, A. H. W. M., 등 1977 (Clin. Chim Acta 81 :1-40

(비특허문헌 0036) Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Eur J Cell Biol 38:87-93.

(비특허문헌 0037) *Smith 및 Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489

(비특허문헌 0038) Van dA, I, Wera S, Van LF, Henderson ST (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. Nutr Metab (Lond) 2:28.

(비특허문헌 0039) Wagner 등 (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 - 270

(비특허문헌 0040) Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., 및 Brown, M. S. (2000). Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5123-5128.

(비특허문헌 0041) *Zrein 등 (1998), Cincinal and Diagnostic Laboratory Immunology, 5(1): 45-49. Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256

발명의 내용

해결하려는 과제

[0038]

본 발명은 β -아밀로이드 항원의 범위로부터의 특정 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 고도로 특이적이고 또한 고도로 효과적인 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0039]

본 발명은 β -아밀로이드 항원의 범위로부터의 특정 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 고도로 특이적이고 또한 고도로 효과적인 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0040]

본 발명의 가르침에 의해 가능해진 항체는, 상세하게는 일부 지명하자면 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 팜 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축기쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 또는 장애의 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0041]

도 1: A β 서열 1-15, 1-16 및 1-16(Δ 14), 22-35 및 29-40로부터 유래된 펩타이드

도 2: 웨스턴 블롯 및 도트 블롯에서, 아밀로이드 종예의 mACI-01-Ab7 C2 단일클론성 항체의 결합

도 3: 투과 전자 현미경(transmission electronic microscopy)에 의한 아밀로이드 섬유에 대한 mACI-01-Ab7 C2 단일클론성 항체의 결합

도 4: U-¹³C Tyr10 및 Val12-표지된 β -아밀로이드 1-42 펩타이드의 Th-T 형광 어세이와 고체-상태 NMR 간의 헤드-투-헤드-실험(head-to-head-experiment)의 결과

서열 식별 번호: 1: 항원성 펩타이드 A β ₁₋₁₅

- 서열 식별 번호: 2: 항원성 펩타이드 A β ₁₋₁₆
- 서열 식별 번호: 3: 항원성 펩타이드 A β _{1-16(Δ 14)}
- 서열 식별 번호: 4: 항원성 펩타이드 A β ₂₂₋₃₅
- 서열 식별 번호: 5: 항원성 펩타이드 A β ₂₉₋₄₀
- 서열 식별 번호: 6: 항원성 펩타이드 A β ₁₋₁₇
- 서열 식별 번호: 7: 마우스 C2 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열
- 서열 식별 번호: 8: 마우스 C2 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열
- 서열 식별 번호: 9: 마우스 C2 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
- 서열 식별 번호: 10: 신호 서열을 포함하는 마우스 C2 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
- 서열 식별 번호: 11: 마우스 C2 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
- 서열 식별 번호: 12: 신호 서열을 포함하는 마우스 C2 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
- 서열 식별 번호: 13-20: A β 펩타이드 상의 에피토프 영역의 아미노산 서열 변이체
- 서열 식별 번호: 21: 마우스 C2 경쇄의 아미노산 서열
- 서열 식별 번호: 22: 마우스 C2 중쇄의 아미노산 서열

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 본 발명은 β -아밀로이드 항원의 범위로부터의 특정 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 고도로 특이적이고 또한 고도로 효과적인 항체를 포함하는 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 가르침에 의해 가능해진 항체는, 상세하게는 일부 지명하자면 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 또는 장애의 치료에 유용하다.
- [0043] 게다가, 본 발명은 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 동물, 상세하게는 포유류, 보다 상세하게는 인간에게 치료적 유효량의 본 발명의 단일클론성 항체를 투여하는 것을 포함하는, 아밀로이드-관련 질환 또는 병태를 나타내는 포유류에서 인지 기억 능력을 유지시키거나 또는 증가시키기 위한 신규한 방법 및 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명은 바람직한 항원 배좌의 개선된 노출 및 안정화를 야기하는 항원 제시(antigen presentation)를 이용하여, 독특한 특성을 갖는 항체의 발생시킨다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예에서는, 예를 들어, 팔미트산과 같은 소수성 모이어티 또는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)와 같은 소수성 모이어티 또는 이들의 조합으로 변형된 β -아밀로이드 펩타이드, 상세하게는 β -아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₁₅, A β ₁₋₁₆ 및 A β _{1-16(Δ 14)}의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩타이드를 포함하는 초분자 항원성 구조체에 대해 생성된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 또는, 보다 상세하게는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체가 제공되며, 여기서 상기 소수성 및 친수성 모이어티 각각은 예를 들어, 라이신, 글루타민산 및 시스테인 또는 상기 펩타이드 절편에 상기 소수성 및 친수성 모이어티를 커플링하기 위한 연결 장치로서 작용할 수 있는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 아미노산 유사체와 같은, 적어도 하나, 상세하게는 1 또는 2개의 아미노산을 통해 상기 항원성 펩타이드의 각 말단에 공유적으로 결합한다. PEG가 친수성 모이어티로 사용될 때, 자유 PEG 말단은, 예를 들어, 리포좀 이

중층 내에 항원성 구조체를 파묻기(embed) 위해, 포스포타일레탄올아민 또는 앵커링 요소로서 작용하기에 적합한 임의의 다른 화합물에 공유적으로 결합한다.

- [0046] 본 발명의 다른 구체예에서는, 아밀로이드 올리고머 및 섬유에 특이적으로 결합하나, 선형화되지 않은 아밀로이드 종(linearized amyloid species)에는 특이적으로 결합하지 않는 점에서 아밀로이드의 고유 배좌를 인식하는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체가 제공된다.
- [0047] 본 발명의 추가의 구체예에서는, 본원에 전술한 바와 같은 본 발명의, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체가 제공되며, 상기 항체 또는 절편은 적어도 약 1×10^{-6} 내지 적어도 약 1×10^{-8} 의, 상세하게는 적어도 약 1×10^{-6} 내지 적어도 약 1×10^{-7} 의, 보다 상세하게는 적어도 약 1×10^{-7} 내지 적어도 약 1×10^{-8} 의, 보다 더 상세하게는 적어도 약 1×10^{-7} 내지 적어도 약 4×10^{-7} 의, 바람직하게는, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성을 나타내지 않는 결합 친화도로 A β 모노머에 결합한다.
- [0048] 본 발명의 다른 구체예에서는, 본원에 전술한 바와 같은 본 발명의, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체가 제공되며, 상기 항체 또는 절편은 A β 섬유, 원섬유 또는 미세섬유에 적어도 약 1×10^{-7} 내지 적어도 약 1×10^{-9} 의, 상세하게는 적어도 약 1×10^{-7} 내지 적어도 약 1×10^{-8} 의, 보다 상세하게는 적어도 약 1×10^{-8} 내지 적어도 약 1×10^{-9} 의, 보다 더 상세하게는 적어도 약 1×10^{-8} 내지 적어도 약 5×10^{-8} 의, 특히, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 어떠한 유의한 교차반응성을 나타내지 않는 결합 친화도로 결합한다.
- [0049] 다른 구체예에서, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체는 A β 섬유, 원섬유 또는 미세섬유에 대해, A β 모노머에 대한 결합 친화도보다 5배 이상, 상세하게는 10배 이상, 보다 상세하게는 15배 이상 더 높은 결합 친화도를 나타낸다.
- [0050] 본 발명의 항체는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β_{1-42} 모노머성 펩타이드의 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유로의 결집을, *인 비트로* 및 *인 비보*, 억제할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 특정 구체예에서, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β_{1-42} 모노머성 펩타이드와 공동-인큐베이션(co-incubation)하면, A β 모노머성 펩타이드의 고분자 폴리머성 원섬유로의 결집을 억제한다.
- [0052] 본 발명의 추가의 구체예에서는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β_{1-42} 모노머성 펩타이드와 공동-인큐베이션하면, 상세하게는 1:100 이하의 물농도비로, 보다 상세하게는 1:30 내지 1:100의 물농도비로, 특히 1:100의 물농도비로 공동-인큐베이션하면, A β 모노머의 고분자 폴리머성 원섬유로의 결집을 억제하는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체가 제공된다. 특히, 상기 억제는 완충액 내에서 인큐베이트된 각각의 아밀로이드 펩타이드 모노머(대조군)와 비교하여 50% 이상, 상세하게는 65% 이상, 보다 상세하게는 75% 이상, 보다 더 상세하게는 80% 이상, 특히 85%-90%, 또는 초과하는 정도에 달한다.
- [0053] 특히, 본 발명의 항체와 아밀로이드 모노머성 펩타이드와의 공동-인큐베이션은 28 $^{\circ}$ C 내지 40 $^{\circ}$ C, 상세하게는 32 $^{\circ}$ C 내지 38 $^{\circ}$ C, 보다 상세하게는 37 $^{\circ}$ C의 온도에서 24시간 내지 60시간, 상세하게는 30시간 내지 50시간, 보다 상세하게는 48시간 동안 수행된다.
- [0054] 본 발명의 다른 구체예에서는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β_{1-42} 모노머성 펩타이드와 1:100의 물농도비로 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 공동-인큐베이션하면, 아밀로이드 모노머의 결집, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β_{1-42} 모노머성 펩타이드의 고분자 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유로의 결집을, 완충액에서 인큐베이트된 각각의

아밀로이드 펩타이드 모노머(대조군)에 비교하여 85% 이상, 상세하게는 89% 이상, 상세하게는 95% 이상 억제할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체를 제공한다.

[0055] 특정 구체예에서, 본 발명은 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드에 대해 고도의 특이성을 나타내지만, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$ 및/또는 $A\beta_{1-41}$ 모노머성 펩타이드에 대해서는 단지 작은(minor) 교차-반응성(cross-reactivity)만을 보이거나 또는 전혀 보이지 않는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체, 상세하게는 아밀로이드 펩타이드 $A\beta_{1-42}$ 에 대해 $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ 에 비하여 100배 이하, 상세하게는 50 내지 100배, 보다 상세하게는 80배 내지 100배, 특히 100배 더욱 민감하고, 아밀로이드 펩타이드 $A\beta_{1-42}$ 에 대해 $A\beta_{1-38}$ 에 비하여 1000배 이하, 상세하게는 500 내지 1000배, 보다 상세하게는 800 내지 1000배, 특히 1000배 더욱 민감하고, 따라서 아밀로이드 형성 모노머성 펩타이드, 특히 아밀로이드 펩타이드 $A\beta_{1-42}$ 의 결집을, 인 비트로 및 인 비보, 억제할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체를 제공한다.

[0056] 다른 특정 구체예에서, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체는 아밀로이드 펩타이드 $A\beta_{1-42}$ 에 대해 높은 결합 민감도를 가지고, 적어도 0.001 μg 하한인 농도, 상세하게는 0.5 μg 내지 0.001 μg 의 농도 범위, 보다 상세하게는 0.1 μg 내지 0.001 μg , 특히 0.001 μg 의 농도의 $A\beta_{1-42}$ 섬유를 검출할 수 있다.

[0057] 본 발명의 그 특정 구체예에서, 최소 농도 0.001 μg 까지의 $A\beta_{1-42}$ 섬유 및 최소 농도 0.1 μg 까지의 $A\beta_{1-40}$ 섬유 및 최소 농도 1 μg 까지의 $A\beta_{1-38}$ 섬유를 검출할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체가 제공된다.

[0058] 아밀로이드 형성 모노머성 펩타이드에의, 특히 아밀로이드 형태(1-42)에의 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체의 결합은 고분자 원섬유 또는 미세섬유에 대한 모노머성 아밀로이드 형성 펩타이드의 결집을 억제시킨다. 본 발명의 항체는 아밀로이드 형성 모노머성 펩타이드의 결집의 억제를 통해 아밀로이드 플라크, 상세하게는 이차 배좌의 변화에 의해 가용성이 되고, 질환에 걸린 동물 또는 인간의 뇌에서의 아밀로이드 플라크의 대부분이 되는 것으로 알려져 있는 아밀로이드 형태(1-42)의 형성을 예방하거나 또는 감속시킨다.

[0059] 본 발명의 항체의 결집 억제 잠재성은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법, 상세하게는 농도-구배 초원심분리에 따르는 미리형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석 및/또는 티오플라빈 T(Th-T) 형광 어세이에 의해 측정될 수 있다.

[0060] 본 발명은 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 공동-인큐베이션하면, 상기 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유를 해체시킬 수 있는 항체를 추가로 제공한다.

[0061] 본 발명의 다른 구체예에서는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 특히 단일클론성 항체가 제공되며, 상기 항체는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 1:100 이하의 물농도비로, 보다 상세하게는 1:30 내지 1:100의 물농도비로, 특히 1:100의 물농도비로 공동-인큐베이션하면, 미리형성된 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유를 35% 이상, 상세하게는 40% 이상, 보다 상세하게는 50% 이상, 보다 더 상세하게는 60% 이상, 특히 70% 이상 해체시킬 수 있다.

[0062] 특히, 본 발명의 항체는 아밀로이드 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와, 28 $^{\circ}\text{C}$ 내지 40 $^{\circ}\text{C}$, 상세하게는 32 $^{\circ}\text{C}$ 내지 38 $^{\circ}\text{C}$, 보다 상세하게는 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서, 12시간 내지 36시간 동안, 상세하게는 18시간 내지 30시간 동안, 보다 상세하게는 24시간 동안 공동-인큐베이트된다.

[0063] 특정 구체예에서, 본 발명은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 특히 단일클론성 항체를 제공하고, 상기 항체는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드

1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 1:100의 몰농도비로 37°C에서 24시간 동안 공동-인큐베이션하면, 상기 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유를, 대조군 비히클(vehicle)(아밀로이드 단독)(대조군)과 인큐베이트된 각각의 미리형성된 아밀로이드 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유에 비해 35% 이상, 상세하게는 40% 이상, 보다 상세하게는 50% 이상, 보다 더 상세하게는 60% 이상, 특히 70% 이상 해체시킬 수 있다.

[0064] 본 발명의 항체의 해체 잠재성은 당업계에 공지된 임의의 적절한 방법, 상세하게는 농도-구배 초원심분리에 따르는 미리형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석 및/또는 티오플라빈 T(Th-T) 형광 어세이에 의해 측정될 수 있다.

[0065] 본 발명은 배좌적으로 민감한(conformationally sensitive) 항체 또는 이의 작용부를 추가로 제공한다.

[0066] 본 발명의 추가의 구체예에서, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 특히 단일클론성 항체가 제공되고, 상기 항체는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 공동-인큐베이션하면, β -시트 배좌의 α -나선 및/또는 랜덤 코일 배좌로의, 특히 랜덤 코일 배좌로의, 보다 더 상세하게는 분자 내 주어진 위치에서, 특히 $A\beta$ 단백질의 Va112의 환경에서 랜덤 코일 배좌로의 전이를 유도시킬 수 있고, 이는 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유의 개선된 가용화를 이끌고 또한 β -시트 배좌를 손실시켜 랜덤 코일 배좌를 증가시킨다. 특히 상기 β -시트 배좌의 감소는 완충액 내에서 인큐베이트된 각각의 미리형성된 아밀로이드 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유(대조군)에 비교하여 30% 이상, 상세하게는 35% 이상, 또한 보다 상세하게는 40% 이상에 달한다.

[0067] 특히, 본 발명의 항체는 아밀로이드 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와, 28°C 내지 40°C, 상세하게는 32°C 내지 38°C, 보다 상세하게는 37°C의 온도에서, 12시간 내지 36시간 동안, 상세하게는 18시간 내지 30시간 동안, 보다 상세하게는 24시간 동안 공동-인큐베이트된다.

[0068] 특히, 본 발명은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 특히 단일클론성 항체를 제공하고, 상기 항체는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 1:100의 몰농도비로 37°C에서 24시간 동안 공동-인큐베이션하면, β -시트 배좌의 α -나선 및/또는 랜덤 코일 배좌로의, 특히 랜덤 코일 배좌로의, 보다 더 상세하게는 분자 내 주어진 위치에서, 특히 $A\beta$ 단백질의 Va112의 환경에서 랜덤 코일 배좌로의 전이를 유도시킬 수 있고, 이는 β -시트 배좌가, 완충액 내에서 인큐베이트된 각각의 미리형성된 아밀로이드 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유(대조군)에 비해 30% 이상, 상세하게는 35% 이상, 또한 보다 상세하게는 40% 이상 감소되도록, β -시트 배좌를 손실시켜 랜덤 코일 배좌를 증가시킨다.

[0069] 상기 항체의 배좌 전이를 유도시키는 잠재성은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법, 상세하게는 고체 NMR 분광학(solid state NMR spectroscopy)에 의해, 특히 $A\beta$ 펩타이드, 상세하게는 $A\beta$ 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, 또는 1-43, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드 내 Va112 C β 의 배좌의 적분 강도(integral intensity)를 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0070] 본 발명의 항체는, 아밀로이드 형성 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유의 해체를 통해 아밀로이드 플라크의 형성을 예방 또는 감소시킬 수 있으며, 이는 상기 질환과 관련된 증상을 완화시키고, 그의 진행을 지연 또는 역행시킨다.

[0071] 따라서, 본 발명의 추가 구체예는 본원에서 진술된 바와 같은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체를 제공하고, 상기 항체는, 뇌 내 $A\beta$ 의 농도를 증가시키는 질환 또는 병태에 걸린 동물, 상세하게는 포유류, 특히 인간의 뇌 내 $A\beta$ 의 총량을 감소시킬 수 있다.

[0072] 본 발명의 다른 구체예에서는, 본원에서 진술된 바와 같은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체가 제공되고, 상기 항체는 플라크를 붕괴시킬 수 있어, 뇌 내 플라크 부하(load)를 증가시키는 질환 또는 병태에 걸린 동물, 상세하게는 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크 부하를 감소시킬 수 있다. 본 발명의 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체는 뇌 내 $A\beta$ 의

농도를 증가시키는 질환 또는 병태에 걸린 동물, 상세하게는 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크 부하를 20% 이상, 상세하게는 25% 이상, 보다 상세하게는 30% 이상, 보다 더 상세하게는 30%를 초과하여 감소시킨다.

[0073] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 본원에서 전술된 바와 같은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체가 제공되고, 상기 항체는 뇌 내의 플라크 양을 증가시키는 질환 또는 병태에 걸린 동물, 상세하게는 포유류, 특히 인간의 뇌 내에서 플라크 양을 감소시키는, 플라크의 가용화가 가능하다. 본 발명의 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체는 뇌 내의 플라크 양을 10% 이상, 상세하게는 15% 이상, 보다 상세하게는 20% 이상 감소시킨다.

[0074] 본 발명의 항체는 본원에서 전술한 다양한 조합의 특이적인 특성을 하나, 둘 이상 나타낼 수 있는 것으로 이해된다.

[0075] 예를 들어, 일 구체예에서, 본 발명은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체를 제공하고, 상기 항체는, 그들이 본원에서 이전에 한정된 바와 같은, 상세하게는 고도의 배좌 민감성과 짝지어진 결집 억제 특성뿐만 아니라 해체 특성 모두를 나타내는 점에서 이작용성(bifunctional)이다.

[0076] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 이작용성 항체, 특히 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 이작용성 단일클론성 항체가 제공되고, 상기 항체는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드와 공동-인큐베이션(co-incubation)하면, A β 모노머의 고분자 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유로의 결집을 억제하고 또한, 추가로, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 공동-인큐베이션하면, 상기 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유를 해체시킬 수 있다.

[0077] 본 발명의 특정 구체예에서는, 본 발명의 이작용성 항체, 특히 본 발명의 이작용성 단일클론성 항체와, 아밀로이드 모노머성 펩타이드 및 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와의 공동-인큐베이션은, 각각, 1:100 이하의 몰농도비, 상세하게는 1:30 내지 1:100의 비로, 및 보다 상세하게는 1:100의 비로 일어난다.

[0078] 특히, 본 발명의 항체와 아밀로이드 모노머성 펩타이드와의 공동-인큐베이션은 28 $^{\circ}$ C 내지 40 $^{\circ}$ C, 상세하게는 32 $^{\circ}$ C 내지 38 $^{\circ}$ C, 보다 상세하게는 37 $^{\circ}$ C의 온도에서 24시간 내지 60시간 동안, 상세하게는 30시간 내지 50시간 동안, 보다 상세하게는 48시간 동안 수행되고, 반면 아밀로이드 미리 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와의 공동-인큐베이션은 28 $^{\circ}$ C 내지 40 $^{\circ}$ C, 상세하게는 32 $^{\circ}$ C 내지 38 $^{\circ}$ C, 보다 상세하게는 37 $^{\circ}$ C의 온도에서 12시간 내지 36시간 동안, 상세하게는 18시간 내지 30시간 동안, 보다 상세하게는 24시간 동안 수행된다.

[0079] 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 본 발명의 이작용성 항체, 상세하게는 본 발명의 이작용성 단일클론성 항체는 상기 미리형성된 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유를 10% 이상, 상세하게는 25% 이상, 보다 상세하게는 35% 이상, 보다 더 상세하게는 50% 이상, 특히 60-70% 이상 또는 그 이상 해체시킬 수 있다.

[0080] 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 본 발명의 이작용성 항체, 상세하게는 본 발명의 이작용성 단일클론성 항체는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 결집을, 완충액에서 인큐베이트된 각각의 아밀로이드 펩타이드 모노머(대조군)에 비교하여 50% 이상, 상세하게는 65% 이상, 보다 상세하게는 75% 이상, 보다 더 상세하게는 80% 이상, 특히 85%-90%, 또는 초과하여 억제한다.

[0081] 특히, 본 발명은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체를 제공하고, 상기 항체는, A β 섬유에 대한 상기 항체의 특이적인 및 직접적인 결합을 통해, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타

이드의 중합(polymerization)의 억제를 매개하고, 및/또는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유의 가용화를 유도하고, 이는 이차 배좌를 전이시킨다.

[0082]

본 발명은 β -아밀로이드 단백질의 에피토프 영역, 상세하게는 n은 2 내지 16, 상세하게는 5 내지 16, 보다 상세하게는 8 내지 16, 보다 더 상세하게는 10 내지 16의 정수이고, m은 3 내지 25, 상세하게는 3 내지 23, 상세하게는 3 내지 20, 상세하게는 3 내지 17, 상세하게는 6 내지 17, 보다 상세하게는 9 내지 17, 보다 더 상세하게는 11 내지 17의 정수이고, 여기서 n과 m은 동일한 수가 될 수 없으며, n은 항상 m보다 작아야하고, n과 m 사이의 차 \geq 2인 아미노산 잔기 aa_n-aa_m로 제한되는 A β 폴리펩타이드의 에피토프 영역 내의 에피토프에 표적화(targeting)하고 특이적으로 결합함으로써, 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43을 포함하는 섬유와 같은 β -아밀로이드 섬유, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드를 포함하는 섬유에 직접적으로 또한 특이적으로 결합하고, 및/또는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유의 가용화를 유도하는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체를 추가로 제공한다.

[0083]

본 발명의 특정 구체예에서, n은 13 내지 15의 정수, 특히 14이고 또한 m은 22 내지 24의 정수, 특히 23이다.

[0084]

본 발명의 항체의 결합은, 상기 단백질 내에서 배좌 전이, 상세하게는 β -시트 배좌의, α -나선 및/또는 랜덤 코일 배좌, 특히 랜덤 코일 배좌, 보다 더 상세하게는 분자 내 주어진 위치에서, 상세하게는 A β 단백질의 Val12의 환경에서, 랜덤 코일 배좌로의 전이를 유도할 수 있다.

[0085]

추가 구체예에서, 본 발명은 결집 억제, 해체, 배좌 전이의 유도, 에피토프, 상세하게는 14-23 내의, 상세하게는 14-20 영역 내의 배좌적 불연속 에피토프(conformational discontinuous epitope)의 인식 및 이에 직접 결합하는 것, 아밀로이드 플라크의 형성을 예방하는 것 또는 늦추는 것, 뇌 내의 가용성 A β 의 총량을 감소시키는 것, 뇌 내의 플라크 부하를 줄이는 것, 뇌 내의 플라크의 양을 감소시키는 것, 인지 기억 능력을 유지시키는 것 또는 증가시키는 것으로 구성되는 균으로부터 선택되고, 또한 본원에서 전술된 바와 같은 특성의 하나 이상, 특히 상기 특성의 둘 이상의 조합을 구체화시키는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체를 제공한다.

[0086]

특정 구체예에서, 본 발명은 상기 언급된 특성의 2 이상, 상세하게는 3 이상, 보다 상세하게는 4 이상, 보다 더 상세하게는 5, 6, 7 또는 8 이상, 특히 전부를 구체화시키는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체에 관한 것이다.

[0087]

특정 구체예에서, 본 발명은 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드에 대해 높은 특이성을 나타내지만, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀ 및/또는 A β ₁₋₄₁ 모노머성 펩타이드에 대해서는 단지 작은 교차-반응성만을 보이거나 또는 전혀 보이지 않는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체, 상세하게는 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂에 대해 A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁에 비하여 100배 이하, 상세하게는 50 내지 100배, 보다 상세하게는 80배 내지 100배, 특히 100배 더욱 민감하고, 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂에 대해 A β ₁₋₃₈에 비하여 1000배 이하, 상세하게는 500 내지 1000배, 보다 상세하게는 800 내지 1000배, 특히 1000배 더욱 민감하고, 따라서 아밀로이드 형성 모노머성 펩타이드, 특히 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂의 결집을, 인 비트로 및 인 비보, 억제할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 특히 단일클론성 항체를 제공한다.

[0088]

본 발명의 다른 특정 구체예에서, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체는, 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂에 대해 높은 결합 민감도를 가지고, 적어도 0.001 μ g 하한인 농도, 특히 0.5 μ g 내지 0.001 μ g의 농도 범위, 보다 상세하게는 0.1 μ g 내지 0.001 μ g, 특히 0.001 μ g의 농도의 A β ₁₋₄₂ 섬유를 검출할 수 있다.

[0089]

본 발명의 그 특정 구체예에서, 최소 농도 0.001 μ g까지의 A β ₁₋₄₂ 섬유 및 최소 농도 0.1 μ g까지의 A β ₁₋₄₀ 섬유

및 최소 농도 1 μg 량까지의 $\text{A}\beta_{1-38}$ 섭취를 검출할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체가 제공된다.

[0090] 일 특정 양상에서, 본 발명은 β -아밀로이드 단백질 상의 하나 이상의 독특한 결합 사이트(distinct binding site), 상세하게는 둘 이상의 독특한 결합 사이트를 인식하고 또한 결합하는 항체 또는 이의 절편에 관한 것이다.

[0091] 특정 구체예에서, 본 발명은 β -아밀로이드 단백질 상의 하나 이상의 독특한 결합 사이트, 상세하게는 둘 이상의 결합 사이트를 인식하고 또한 결합하는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체에 관한 것으로서, 여기서 상기 하나 이상의 또는 상기 둘 이상의 독특한 결합 사이트는 항체의 결합에 주로 관여하는, 하나 이상의 아미노산 잔기 및 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함하고, 여기서, 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 제1 독특한 결합 사이트를 포함하는 하나 이상의 잔기는 Leu이고, 상기 제2 독특한 결합 사이트를 포함하는, 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기는 이하의 코어(core) 서열 내에 끼워진 -Phe-Phe-이다:

[0092] - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -

[0093] 여기서

[0094] Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys, 및 Arg을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0095] Xaa₂는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0096] Xaa₃은 Lys, His, Asn, Gln 및 Arg를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0097] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신(norleucine), Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0098] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0099] Xaa₆는 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0100] Xaa₇은 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이다.

[0101] 특히, β -아밀로이드 단백질 상의 하나 이상의 독특한 결합 사이트, 상세하게는 둘 이상의 독특한 결합 사이트를 인식하고 결합하는 항체 또는 이의 절편이 제공되며, 여기서 상기 하나 이상 또는 상기 둘 이상의 독특한 결합 사이트는, 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 하나 이상의 아미노산 잔기 및 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함하고, 여기서, 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 제1 독특한 결합 사이트를 구성하는 하나 이상의 잔기는 Leu이고, 상기 제2 독특한 결합 사이트를 구성하는, 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기는 이하의 코어 서열 내에 끼워진 -Phe-Phe-이다:

[0102] - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -

[0103] 여기서

[0104] Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys, 및 Arg을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0105] Xaa₂는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0106] Xaa₃은 Lys, His, Asn, Gln 및 Arg를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0107] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

[0108] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

[0109] Xaa₆는 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

- [0110] Xaa₇은 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이다.
- [0111] 본 발명의 다른 구체예에서, 항체 또는 이의 절편이 제공되고,
- [0112] 여기서
- [0113] Xaa₁은 His 또는 Asn, 특히 His이며;
- [0114] Xaa₂는 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이며;
- [0115] Xaa₃은 Lys 또는 Arg, 특히 Lys이고;
- [0116] Xaa₄는 Val 또는 Leu, 특히 Val이며;
- [0117] Xaa₅는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이고;
- [0118] Xaa₆는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이며; 또한
- [0119] Xaa₇은 Asp 또는 Glu, 특히 Asp이다.
- [0120] 다른 양상에서, 본 발명은 β-아밀로이드 단백질 상의 하나 이상의 독특한 결합 사이트, 상세하게는 둘 이상의 독특한 결합 사이트, 보다 상세하게는 셋 이상의 독특한 결합 사이트를 인식하고 결합하는 항체 또는 이의 절편에 관한 것으로, 여기서 상기 하나 또는 둘 이상 또는 셋 이상의 독특한 결합 사이트는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 하나 이상, 상세하게는 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함한다.
- [0121] 특히, 본 발명의 항체 또는 이의 절편은 β-아밀로이드 단백질 상의 둘 이상의 독특한 결합 사이트에 결합하고, 여기서 둘 이상의 독특한 결합 사이트는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함하고, 여기서 상기 둘 이상의 독특한 결합 사이트는 항원 상에 상호 근접하게 위치되고, 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기에 비하여 상당히 더 적은 정도로 관여하는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 분리되어, 배좌적 불연속 에피토프를 형성한다.
- [0122] 본 발명의 다른 구체예에서, β-아밀로이드 단백질 상의 하나 이상의 독특한 결합 사이트, 상세하게는 둘 이상의 독특한 결합 사이트, 보다 상세하게는 셋 이상의 독특한 결합 사이트를 인식하고 결합하는 본 발명의 항체 또는 이의 절편이 제공되고, 여기서 상기 독특한 결합 사이트는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 하나 이상 및 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함하며, 여기서 상기 항체의 결합에 관여하지 않거나 또는 항체의 결합에 주로 관여하는 아미노산 잔기에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여하는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 분리된 하나 이상 및 둘 이상의 연속적인 아미노산은, 각각, 이하의 코어 서열 내에 끼워진 -His- 및 -Lys-Leu-이다:
- [0123] - His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃- Xaa₄- Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ - Xaa₈ - 여기서
- [0124] Xaa₂는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0125] Xaa₃는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0126] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고
- [0127] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며
- [0128] Xaa₆는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0129] Xaa₇은 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며,
- [0130] Xaa₈은 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,
- [0131] 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -His- 및 -Lys-Leu- 결합 사이트에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0132] 다른 구체예에서, β-아밀로이드 단백질 상의 하나 이상의 독특한 결합 사이트, 상세하게는 둘 이상의 독특한

결합 사이트, 보다 상세하게는 셋 이상의 독특한 결합 사이트를 인식하고 결합하는 본 발명의 항체 또는 이의 절편이 제공되고, 여기서 상기 독특한 결합 사이트는 상기 항체의 결합에 주로 관여하는 하나 이상 및 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함하며, 여기서 이하의 코어 서열 내에 끼워진, 제1 결합 사이트를 대표하는 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기는 -Phe-Phe-이고, 또한 하나 이상의 아미노산 잔기는 -His-이다:

- [0133] - Xaa₁ - His - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Phe - Phe - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉ -,
- [0134] 여기서
- [0135] Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys 및 Arg을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고
- [0136] Xaa₃는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며
- [0137] Xaa₄는 His, Asn, Gln, Lys 및 Arg을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고
- [0138] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0139] Xaa₆는 Ala, Val, Leu 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고
- [0140] Xaa₇은 Ala, Val, Leu 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며
- [0141] Xaa₈은 Glu 및 Asp을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,
- [0142] Xaa₉은 Glu 및 Asp을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며, 또한
- [0143] 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ 및 Xaa₉은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 His 및 -Phe-Phe- 결합 사이트에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0144] 본 발명의 특정 구체예에서, 이하의 코어 서열에 끼워진, 항체의 결합에 주로 관여된 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기 중 첫번째는 -Lys- 및 -Leu-을 포함하고, 또한 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기의 두번째는 -Phe-Phe-를 포함한다:
- [0145] - Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -
- [0146] 여기서
- [0147] Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys, 및 Arg을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0149] *Xaa₂는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0150] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0151] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0152] Xaa₆는 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,
- [0153] Xaa₇은 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고,,
- [0154] 또한, 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -Lys-Leu 및 -Phe-Phe- 결합 사이트에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0155] 본 발명의 다른 구체예에서, 항체 또는 이의 절편이 제공되며,
- [0156] 여기서
- [0157] Xaa₁은 His 또는 Asn, 특히 His이며;
- [0158] Xaa₂는 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이며;

- [0159] Xaa₄는 Val 또는 Leu, 특히 Val이고;
- [0160] Xaa₅는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이며;
- [0161] Xaa₆는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이고; 또한
- [0162] Xaa₇은 Asp 또는 Glu, 특히 Asp이다.
- [0163] 본 발명의 추가의 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 절편은 β-아밀로이드 단백질 상의 셋 이상의 독특한 결합 사이트에 결합하고, 상기 셋 이상의 독특한 결합 사이트는 항체의 결합에 주로 관여되는 하나 이상의 아미노산 잔기 및 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함하며, 여기서 상기 셋 이상의 독특한 결합 사이트는 항원 상에 상호 근접하게 위치되고, 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 하나 이상의 아미노산 잔기 및 상기 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기 각각에 비하여 상당히 더 적은 정도로 관여하는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 분리되어, 배좌적 불연속 에피토프를 형성한다.
- [0164] 본 발명의 특정 구체예에서, 이하의 코어 서열에 끼워진, 항체의 결합에 주로 관여된 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기 중 첫번째는 -Lys-Leu-을 포함하고, 또한 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기의 두번째는 -Phe-Phe-를 포함하며, 또한 하나 이상의 아미노산 잔기인 세번째는 -His-를 포함한다:
- [0166] *- His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄- Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -
- [0167] 여기서
- [0169] *Xaa₂는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0170] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0172] *Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며
- [0173] Xaa₆는 Glu 및 Asp을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0174] Xaa₇은 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며, 또한
- [0175] 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -His-, -Lys-Leu-, -Phe-Phe- 결합 사이트에 비교하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0176] 본 발명의 다른 구체예에서, 항체 또는 이의 절편이 제공되고,
- [0177] 여기서
- [0178] Xaa₂는 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이고;
- [0179] Xaa₄는 Val 또는 Leu, 특히 Val이며;
- [0180] Xaa₅는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이고;
- [0181] Xaa₆는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이며; 또한
- [0182] Xaa₇은 Asp 또는 Glu, 특히 Asp이다;
- [0183] 본 발명의 특정 구체예에서, 이하의 코어 서열에 끼워진, 항체의 결합에 주로 관여된 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기 중 첫번째는 -Lys-Leu-을 포함하고, 또한 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기의 두번째는 -Phe-Phe-를 포함하며, 또한 하나 이상의 아미노산 잔기인 세번째는 -Asp-를 포함한다:

- [0184] - Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Asp -
- [0185] 여기서
- [0186] Xaa₁은 His, Asn, Gln, Lys, 및 Arg을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0187] Xaa₂는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0188] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0189] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0190] Xaa₆는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고, 또한
- [0191] 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇은 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -Asp-, -Lys-Leu 및 -Phe-Phe- 결합 사이트에 비해 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0192] 본 발명의 다른 구체예에서, 항체 또는 이의 절편이 제공되고,
- [0193] 여기서
- [0194] Xaa₁은 His 또는 Arg, 특히 His이며;
- [0195] Xaa₂는 Gln 또는 Asn, 특히 Gln이며;
- [0196] Xaa₄는 Val 또는 Leu, 특히 Val이며;
- [0197] Xaa₅는 Ala 또는 Val, 특히 Ala이고; 또한
- [0198] Xaa₆는 Glu 또는 Asp, 특히 Glu이다.
- [0199] 본 발명의 추가의 특정 구체예에서, β-아밀로이드 단백질 상의 4개의 독특한 결합 사이트에 결합하는 본 발명의 항체 또는 이의 절편이 제공되고, 여기서 상기 4개의 독특한 결합 사이트는 항체의 결합에 주로 관여하는 하나의 아미노산 잔기 및 두개의 연속적인 아미노산 잔기를 각각 포함하며, 여기서 상기 4개의 독특한 결합 사이트는 항원 상에 상호 근접하게 위치되고, 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 상기 4개의 독특한 결합 사이트의 하나의 아미노산 잔기 및 상기 두개의 연속적인 아미노산 잔기에 비하여 상당히 더 적은 정도로 관여하는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 분리되어, 배좌적 불연속 에피토프를 형성한다.
- [0201] *특히, 이하의 코어 서열에 끼워진, 항체의 결합에 주로 관여된 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기 중 첫번째는 -Lys-Leu-을 포함하고, 또한 둘 이상의 연속적인 아미노산 잔기의 두번째는 -Phe-Phe-를 이며, 단일 아미노산 잔기의 첫번째는 -His-이고, 단일 아미노산 잔기의 두번째는 -Asp-이다:
- [0202] - His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Asp. -
- [0203] 여기서
- [0204] Xaa₂는 Asn 및 Gln을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0205] Xaa₄는 Ala, Val, Leu, 노르류신, Met, Phe, 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0206] Xaa₅는 Ala, Val, Leu, Ser 및 Ile을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0207] Xaa₆는 Glu 및 Asp를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며, 또한
- [0208] 여기서 상기 아미노산 잔기 Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇는 항체 결합에 관여하지 않거나 또는 -His-, -Asp-, -Lys-Leu, 및 -Phe-Phe- 결합 사이트에 비하여 상당히 더 적은 정도로 관여한다.
- [0209] 본 발명의 특정 구체예에서, 본원의 전술에서 한정된 바와 같은 인식 및 결합 사이트는 아미노산 잔기 12 내지

24 사이의, 상세하게는 잔기 14 내지 23 사이, 보다 상세하게는 아미노산 잔기 14 내지 20 사이의 β -아밀로이드 단백질의 영역 내에 위치한 배좌적 불연속 에피토프를 형성하고, 여기서 상기 세개의 특수 인식 및 결합 사이트는 위치 16, 17, 및 위치 19 및 20, 및 위치 14에 각각 위치한 1개 및 2개 아미노산 잔기를 각각 포함하고, 상기 잔기는 β -아밀로이드 단백질의 결합에 주로 관여하며, 또한 여기서 상기 세 특수 인식 및 결합 사이트는 위치 15 및 18에 각각 위치한 하나의 아미노산 잔기에 의해 분리되고, 상기 아미노산은 항원의 결합에 관여하지 않거나 또는, 적어도, 실질적으로 더 적은 정도로 관여한다.

[0210] 특정 구체예에서, 상기 연속적인 아미노산 잔기, 상세하게는 β -아밀로이드의 결합에 주로 관여하는 위치 16 및 17의 -Lys-Leu-, 및 위치 19 및 20의 -Phe- Phe-는 이하의 코어 영역 내에 끼워진다:

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

[0211]

[0212] 추가의 특정 구체예에서, 상기 연속적인 아미노산 잔기, 상세하게는 β -아밀로이드의 결합에 주로 관여하는 위치 16의 -Lys-, 위치 17의 -Leu- 및 위치 19 및 20의 -Phe- Phe-, 및 위치 14의 -His-는 이하의 코어 영역 내에 끼워진다:

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

[0213]

[0214] 본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 항체는 상기 독특한 결합 사이트를 함유하지 않는 항원 절편에 대해 생성된다.

[0215] 이 에피토프 영역에서의 시프트는 적어도 부분적으로, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)와 같은 소수성 모이어티로 변형된, β -아밀로이드 펩타이드의, 상세하게는 β -아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₁₆의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩타이드를 포함하는 초분자적 항원성 구조체의 사용에 기인할 수 있었으며, 여기서 변역화 과정에서 본원의 이하에 설명된 바와 같이, 상기 소수성 모이어티는 예를 들어, 라이신, 글루타민산 및 시스테인 또는 친수성 모이어티를 상기 펩타이드 절편에 커플링하기 위한 연결 장치로서 사용할 수 있는 다른 적절한 아미노산 또는 아미노산 유사체와 같은 하나 이상의, 상세하게는 하나 또는 두 아미노산을 통해 상기 항원성 펩타이드의 각 말단에 공유적으로 결합된다. PEG가 상기 친수성 모이어티로 사용될 때, 자유 PEG 말단은 포스파티딜에탄올아민 또는 예를 들어, 본원에서 기술한 바와 같이 리포솜 이중층 내에 항원성 구조체를 끼워넣기 위한 앵커링 요소로서 작용하기에 적합한 임의의 다른 화합물에 공유적으로 결합된다.

[0216] 또한, 변역화 프로토콜의 일부로서 지질 A의 사용은 에피토프 영역 내 시프트(shift)에 기여할 수 있다.

[0217] 본 발명의 특정 구체예에서, 서열 식별 번호: 7의 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는 항체가 제공된다.

[0218] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 7의 경쇄 가변 영역(LCVR)에 관한 것이다.

[0219] 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 서열 식별 번호: 8의 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 항체가 제공된다.

[0220] 추가의 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 8의 중쇄 가변 영역(HCVR)에 관한 것이다.

[0221] 일 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 8의 중쇄 가변 영역 및 서열 식별 번호: 7의 경쇄 가변 영역 모두를 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0222] 또한, 경쇄 가변 영역 (LCVR) 또는 중쇄 가변 영역 (HCVR) 또는 둘 모두를 포함하는 항체, 서열 식별 번호: 7 및 8로 각각 제공되는 펩타이드 중 어느 것에 상동인 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 중쇄 가변 영역(HCVR)은 본 발명의 일부이다.

[0223] 특히, 본 발명은, 경쇄 가변 영역(LCVR)이 서열 식별 번호: 7에 주어진 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체 또는 이의 절편에 관한 것이다.

[0224] 또한, 본 발명은, 중쇄 가변 영역(HCVR)이 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체 또는 이의 절편에 관한 것이다.

- [0225] 또한, 본 발명은, 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 중쇄 가변 영역(HCVR)이 함께 서열 식별 번호: 7 및 8에 주어진 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체 또는 이의 절편에 관한 것이다.
- [0226] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 7에 주어진 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 관한 것이다.
- [0227] 추가의 특정 구체예에서, 본 발명은 서열 식별 번호: 8에 주어진 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 관한 것이다.
- [0228] 본 발명의 다른 구체예에서, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체를 인코딩하는(encoding) 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0229] 특히, 본 발명은
- [0230] a) 적어도 서열 식별 번호: 9의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
- [0231] b) 유전 코드의 축퇴(degeneracy)에 기인하는 코돈 서열의, 상기 (a)의 뉴클레오티드 서열과 다른 뉴클레오티드 서열
- [0232] c) (a) 및 (b)에 대한 상보적 서열 또는
- [0233] d) 20개 이상의 인접 뉴클레오티드, 25개 이상의 인접 뉴클레오티드, 30개 이상의 인접 뉴클레오티드, 35개 이상의 인접 뉴클레오티드, 40개 이상의 인접 뉴클레오티드, 45개 이상의 인접 뉴클레오티드, 및 50개 이상의 인접 뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드의 인접 스트레치를 포함하는 (a), (b) 또는 (c)의 뉴클레오티드 서열의 절편
- [0234] 을 포함하는, 본 발명의 항체를 인코딩하는(encoding) 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0235] 다른 구체예에서, 본 발명은
- [0236] a) 적어도 서열 식별 번호: 10의 경쇄의 뉴클레오티드 서열
- [0237] b) 유전 코드의 축퇴에 기인하는 코돈 서열의, 상기 (a)의 뉴클레오티드 서열과 다른 뉴클레오티드 서열
- [0238] c) (a) 및 (b)에 대한 상보적 서열 또는
- [0239] d) 20개 이상의 인접 뉴클레오티드, 25개 이상의 인접 뉴클레오티드, 30개 이상의 인접 뉴클레오티드, 35개 이상의 인접 뉴클레오티드, 40개 이상의 인접 뉴클레오티드, 45개 이상의 인접 뉴클레오티드, 및 50개 이상의 인접 뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드의 인접 스트레치를 포함하는 (a), (b) 또는 (c)의 뉴클레오티드 서열의 절편
- [0240] 을 포함하는 본 발명의 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0241] 또 다른 구체예에서, 본 발명은
- [0242] a) 적어도 서열 식별 번호: 11의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열
- [0243] b) 유전 코드의 축퇴에 기인하는 코돈 서열의, 상기 (a)의 뉴클레오티드 서열과 다른 뉴클레오티드 서열
- [0244] c) (a) 및 (b)에 대한 상보적 서열 또는
- [0245] d) 20개 이상의 인접 뉴클레오티드, 25개 이상의 인접 뉴클레오티드, 30개 이상의 인접 뉴클레오티드, 35개 이상의 인접 뉴클레오티드, 40개 이상의 인접 뉴클레오티드, 45개 이상의 인접 뉴클레오티드, 및 50개 이상의 인접 뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드의 인접 스트레치를 포함하는 (a), (b) 또는 (c)의 뉴클레오티드 서열의 절편
- [0246] 을 포함하는 본 발명의 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0247] 또 다른 구체예에서, 본 발명은
- [0248] a) 적어도 서열 식별 번호: 12의 중쇄의 뉴클레오티드 서열 또는 이에 대한 상보적 서열

접 뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 뉴클레오티드의 인접 스트레치를 포함하는 (a), (b) 또는 (c)의 뉴클레오티드 서열의 절편

[0276] 을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0277] 추가의 구체예에서, 본 발명은

[0278] a. 서열 식별 번호: 9, 10, 11 및 12 각각에 주어진 바와 같은 본 발명의 뉴클레오티드 서열

[0279] b. 유전 코드의 축퇴에 기인하는 코돈 서열의, 상기 (a)의 뉴클레오티드 서열과 다른 뉴클레오티드 서열

[0280] c. (a) 및 (b)에 대한 상보적 서열 또는

[0281] d. 20개 이상의 인접 뉴클레오티드, 25개 이상의 인접 뉴클레오티드, 30개 이상의 인접 뉴클레오티드, 35개 이상의 인접 뉴클레오티드, 40개 이상의 인접 뉴클레오티드, 45개 이상의 인접 뉴클레오티드, 및 50개 이상의 인접 뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 뉴클레오티드의 인접 스트레치를 포함하는 (a), (b) 또는 (c)의 뉴클레오티드 서열의 절편

[0282] 에 혼성화시키는 임의의 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다

[0283] 특히, 본 발명은 통상적인 혼성화 조건 하에서, 상세하게는 엄격한 혼성화 조건 하에서 서열 식별 번호: 9, 10, 11 및 12 각각에 주어진 바와 같은 본 발명의 뉴클레오티드 서열에, 상세하게는 이의 상보적 스트랜드(strand)에 혼성화시키는 임의의 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다.

[0284] 추가의 구체예에서, 본 발명은 5xSSPE, 1% SDS, 1x 덴하르트(Denhardt's) 용액이 용액으로서 사용되는 및/또는 혼성화 온도는 35°C 내지 70°C, 바람직하게는 65°C인 통상적인 혼성화 조건 하에서, 서열 식별 번호: 9, 10, 11 및 12 각각에 주어진 바와 같은 본 발명의 뉴클레오티드 서열에, 상세하게는 이의 상보적 스트랜드에 혼성화시키는 임의의 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 혼성화 후, 세척은 바람직하게는 35°C 내지 70°C, 바람직하게는 65°C의 온도에서 처음에는 2xSSC, 1% SDS로, 그리고 이어서 0.2xSSC로 수행된다 (SSPE, SSC 및 덴하르트 용액의 정의에 대해 Sambrook 등 인용된 곳에서 참조).

[0285] 특히, 본 발명은, 예를 들면 앞의 Sambrook 등에 기술된 바와 같은 엄격한 혼성화 조건 하에서, 보다 상세하게는 이전에 나타낸 바와 같이 65°C에서 혼성화 및 세척이 일어나는 엄격한 혼성화 조건 하에서, 서열 식별 번호: 9, 10, 11 및 12 각각에 주어진 바와 같은 본 발명의 뉴클레오티드 서열에, 상세하게는 이의 상보적 스트랜드에 혼성화시키는 임의의 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다.

[0286] 특정 구체예에서, 본 발명은, 2005년 12월 01일 및 2005년 12월 09일에 각각, DSM ACC2752, DSM ACC 2750 및 DSM ACC2751 각각으로 기탁된, FP 12H3, FP 12H3-C2, 및 FP 12H3-G2로 구성되는 균으로부터 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 특질을 갖는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체를 제공한다.

[0287] 보다 상세하게는, 본 발명은 2005년 12월 1일 및 2005년 12월 9일에 각각 DSM ACC2752로 기탁된 하이브리도마 세포주 FP 12H3에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0288] 보다 상세하게는, 본 발명은 2005년 12월 1일 및 2005년 12월 9일에 각각 DSM ACC2750으로 기탁된 하이브리도마 세포주 FP 12H3-C2에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체에 관한 것이다.

[0289] 보다 상세하게는, 본 발명은 2005년 12월 1일 및 2005년 12월 9일에 각각 DSM ACC2751로 기탁된 하이브리도마 세포주 FP 12H3-G2에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체에 관한 것이다.

[0290] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 2005년 12월 8일에 DSM ACC2755로 기탁된 하이브리도마 세포주 ET 7E3에 의해 생산된 항체의 특성을 갖는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체를 제공한다.

[0291] 보다 상세하게는, 본 발명은 2005년 12월 8일에 DSM ACC2755로 기탁된 하이브리도마 세포주 ET 7E3에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체에 관한 것이다.

[0292] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 2005년 12월 8일에 DSM ACC2756으로 기탁된 하이브리도마 세포주 EJ 7H3에 의

해 생산된 항체의 특성을 갖는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체를 제공한다.

[0293] 보다 상세하게는, 본 발명은 2005년 12월 8일에 DSM ACC2756으로 기탁된 하이브리도마 세포주 EJ 7H3에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체에 관한 것이다.

[0294] 본 발명의 다른 목적은, 예를 들어, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체로 인간 또는 동물을 수동 면역 화시킵에 의한, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI)와 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하는 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 예방 및/또는 요법적 치료 및/또는 완화를 위한 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체를 포함하는 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.

[0295] 본 발명의 다른 목적은, 예를 들면, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI)와 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인되거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애를 진단하는 것 및 이의 치료적 시술을 위해 본 발명의 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 및 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 사용하는 방법을 제공하는 것이다.

[0296] 특히, 본 발명의 목적은, 알츠하이머병을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 신경계 장애의 발생을 감소시키고 또한 예방하기 위해, 본 발명의 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 및 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체, 상세하게는 이중특이성(bispecific) 또는 이중-효과성(bi-effective) 항체, 특히 이중특이성 또는 이중효과성 단일클론성 항체를 포함하는 조성물을 사용하는 방법을 제공하는 것이다.

[0297] 본 발명의 조성물은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체, 상세하게는 이중특이성 또는 이중효과성 항체, 특히 이중특이성 또는 이중-효과성 단일클론성 항체를, 상세하게는 치료적 유효량으로 또는, 보다 상세하게는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는, 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 단일클론성 항체, 특히 이중특이성 또는 이중-효과성 단일클론성 항체를, 상세하게는 치료적 유효량으로 또한, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함한다.

[0298] 상세하게는, 본 발명의 조성물은 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유로의 결집을 억제할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함한다.

[0299] 본 발명의 추가의 구체예에서는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드와 공동-인큐베이션하면, 상세하게는 1:100 이하의 물농도비로, 보다 상세하게는 1:30 내지 1:100의 물농도비로, 특히 1:100의 물농도비로 공동-인큐베이션하면, A β 모노머의 고분자 폴리머성 원섬유로의 결집을 억제하는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 및, 선택적으로,

약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다. 특히, 상기 약제는 완충액 내에서 인큐베이트된 각각의 아밀로이드 펩타이드 모노머(대조군)와 비교하여 50% 이상, 상세하게는 65% 이상, 보다 상세하게는 75% 이상, 보다 더 상세하게는 80% 이상, 특히 85%-90%, 또는 초과하는 정도에 달한다.

- [0300] 특히, 아밀로이드 모노머성 펩타이드와 본 발명의 항체의 공동-인큐베이션은 37°C의 온도에서 48시간 동안 수행된다
- [0301] 본 발명의 항체의 결집 억제 잠재성은 농도-구배 초원심분리에 따르는 미리형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석 및/또는 티오플라빈 T(Th-T) 형광 어세이에 의해 측정될 수 있다.
- [0302] 본 발명은 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유를 해체시킬 수 있는 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.
- [0303] 본 발명의 항체는 아밀로이드 형성 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유의 해체를 통해 아밀로이드 플라크의 형성을 예방 또는 감소시킬 수 있으며, 이는 상기 질환과 관련된 증상을 완화시키고, 그의 진행을 지연 또는 역행시킨다.
- [0304] 본 발명의 다른 구체예에서, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 1:30 내지 1:100의 물농도비, 상세하게는 1:100의 물농도비로 공동-인큐베이션하면, 상세하게는 37°C에서 24시간 동안 공동-인큐베이션하면, 상기 미리형성된 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유를 35% 이상, 상세하게는 40% 이상, 보다 상세하게는 50% 이상, 보다 더 상세하게는 60% 이상, 특히 70% 이상 해체시킬 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0305] 본 발명의 항체의 해체 잠재성은 농도-구배 초원심분리에 따르는 미리형성된 구배 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석 및/또는 티오플라빈 T(Th-T) 형광 어세이에 의해 측정될 수 있다.
- [0306] 본 발명은 배좌적으로 민감한, 상세하게는 유효량의, 보다 상세하게는 치료적으로 유효량의 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.
- [0307] 본 발명의 추가의 구체예에서는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 공동-인큐베이션하면, 상세하게는 37°C의 온도에서 24시간 동안 공동-인큐베이션하면, β -시트 배좌의 α -나선 및/또는 랜덤 코일 배좌로의, 특히 랜덤 코일 배좌로의, 보다 더 상세하게는 분자 내 주어진 위치에서의 랜덤 코일 배좌로의, 특히 A β 단백질의 Val12의 환경에서 랜덤 코일 배좌로의 전이를 유도시킬 수 있고, 이는 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유의 개선된 가용화를 이끌고 또한 β -시트 배좌를 손실시켜 랜덤 코일 배좌를 증가시키는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 특히 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다. 특히 β -시트 배좌의 감소는, 완충액 내에서 인큐베이트된 각각의 미리형성된 아밀로이드 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유(대조군)에 비해 30% 이상, 상세하게는 35% 이상, 또한 보다 상세하게는 40% 이상에 달한다.
- [0308] 상기 항체의 이차 구조에서의 전이를 유도하는 잠재성은 고체 NMR 분광학(solid state NMR spectroscopy)에 의해, 특히, A β ₁₋₄₂ 펩타이드 내 Val 12 C β 의 배좌의 적분 강도를 측정함으로써 측정된다.
- [0309] 본 발명은, 본원에서 전술된 바와 같이 결집 억제 특성뿐만 아니라 해체 특성 모두를 나타내는 점에서 이작용성(bifunctional)인, 바람직하게는 고도의 배좌 민감성과 짝지어진, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체를 상세하게는 치료적 유효량으로 포함하고 또한, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.
- [0310] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, A β 모노머성 펩타이드

드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드와 공동-인큐베이션하면, $A\beta$ 모노머의 고분자 폴리머성 원섬유로의 결집을 억제하고 또한, 추가로, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와 공동-인큐베이션하면, 상기 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유를 해체시킬 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 이작용성 항체, 특히 이작용성 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0311] 본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 이작용성 항체, 특히 본 발명의 이작용성 단일클론성 항체와, 아밀로이드 모노머성 펩타이드 및 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와의 공동-인큐베이션은, 각각, 1:100 이하의 물농도비, 상세하게는 1:30 내지 1:100의 비로, 및 보다 상세하게는 1:100의 비로 일어난다.

[0312] 본 발명의 추가의 특정 구체예에서, 아밀로이드 모노머성 펩타이드와 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유와의 공동-인큐베이션은 37°C의 온도에서 각각 48시간 및 24시간동안 수행된다.

[0313] 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 상기 미리형성된 폴리머성 원섬유 또는 미세섬유를 10% 이상, 상세하게는 25% 이상, 보다 상세하게는 35% 이상, 보다 더 상세하게는 50% 이상, 특히 60-70% 이상 또는 그 이상 해체시킬 수 있는, 본 발명의 이작용성 항체, 특히 본 발명의 이작용성 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0314] 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집을, 완충액에서 인큐베이트된 각각의 아밀로이드 펩타이드 모노머(대조군)에 비교하여 50% 이상, 상세하게는 65% 이상, 보다 상세하게는 75% 이상, 보다 더 상세하게는 80% 이상, 특히 85-90%, 또는 초과하여 억제하는, 본 발명의 이작용성 항체, 특히 본 발명의 이작용성 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0315] 특히, 본 발명은 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 항체는 $A\beta$ 섬유에 대한 상기 항체의 특이적인 및 직접적인 결합을 통해, 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 중합의 억제를 매개하고, 및/또는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유의 가용화를 유도하고, 이는 이차 배좌를 전이시킨다.

[0316] 본 발명은 β -아밀로이드 단백질의 에피토프 영역, 상세하게는 n은 2 내지 15, 상세하게는 5 내지 15, 보다 상세하게는 8 내지 15, 보다 더 상세하게는 10 내지 15의 정수이고, m은 3 내지 17, 상세하게는 6 내지 17, 보다 상세하게는 9 내지 17, 보다 더 상세하게는 11 내지 17의 정수이고, 여기서 n과 m은 동일한 수가 될 수 없으며, n은 항상 m보다 작아야하고, n과 m 사이의 차 ≥ 2 인 아미노산 잔기 aa_n-aa_m 로 제한되는 $A\beta$ 폴리펩타이드의 에피토프 영역에 표적화하고 특이적으로 결합함으로써, 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43을 포함하는 섬유와 같은 β -아밀로이드 섬유, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드를 포함하는 섬유에 직접적으로 또한 특이적으로 결합하고, 및/또는 아밀로이드 모노머성 펩타이드, 상세하게는 예를 들어, $A\beta$ 모노머성 펩타이드 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 또는 1-43와 같은 β -아밀로이드 모노머성 펩타이드, 특히 $A\beta_{1-42}$ 모노머성 펩타이드의 결집에 의해 형성된, 미리형성된 고분자 폴리머성 아밀로이드 원섬유 또는 미세섬유의 가용화를 유도하는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.

[0317] 본 발명의 항체의 결합은 상기 단백질에서 배좌 전이, 상세하게는 β -시트 배좌의 α -나선 및/또는 랜덤 코일

배좌로의, 특히 랜덤 코일 배좌로의, 보다 더 상세하게는 분자 내 주어진 위치에서의 랜덤 코일 배좌로의, 특히 A β 단백질의 Val112의 환경에서 랜덤 코일 배좌로의 전이를 유도할 수 있다.

[0318] 추가의 구체예에서, 본 발명은 본원에 전술한 특성, 결집 억제, 해체, 배좌 전이의 유도, 4-16 및/또는 14 내지 23, 상세하게는 14 내지 20 에피토프 영역의 인식 및 이에 직접 결합하는 것 중 하나 이상, 특히 상기 특성의 둘 이상의 조합을 구체화시키는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0319] 특정 구체예에서, 본 발명은 A β ₁₋₄₂ 모노머성 펩타이드에 대해 높은 특이성을 나타내지만, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀ 및/또는 A β ₁₋₄₁ 모노머성 펩타이드에 대해서는 단지 작은 교차-반응성만을 보이거나 또는 전혀 보이지 않는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체, 상세하게는 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂에 대해 A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁에 비하여 100배 이하, 상세하게는 50 내지 100배, 보다 상세하게는 80배 내지 100배, 특히 100배 더욱 민감하고, 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂에 대해 A β ₁₋₃₈에 비하여 1000배 이하, 상세하게는 500 내지 1000배, 보다 상세하게는 800 내지 1000배, 특히 1000배 더욱 민감하고, 따라서 아밀로이드 형성 모노머성 펩타이드, 특히 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂의 결집을, 인 비트로 및 인 비보, 억제할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 특히 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0320] 본 발명의 다른 특정 구체예에서는, 아밀로이드 펩타이드 A β ₁₋₄₂에 대해 높은 결합 민감도를 가지고, 적어도 0.001 μ g 하한인 농도, 특히 0.5 μ g 내지 0.001 μ g의 농도 범위, 보다 상세하게는 0.1 μ g 내지 0.001 μ g, 특히 0.001 μ g의 농도의 A β ₁₋₄₂ 섬유를 검출할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0321] 본 발명의 그 특정 구체예에서는 최소 농도 0.001 μ g까지의 A β ₁₋₄₂ 섬유 및 최소 농도 0.1 μ g까지의 A β ₁₋₄₀ 섬유 및 최소 농도 1 μ g량까지의 A β ₁₋₃₈ 섬유를 검출할 수 있는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 이작용성 항체, 특히 단일클론성 항체, 상세하게는 이작용성 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0322] 특정 구체예에서 본 발명은 2005년 12월 01일 및 2005년 12월 09일에 각각 DSM ACC2752, DSM ACC2750 및 DSM ACC2751로 기탁된 FP 12H3, FP 12H3-C2, 및 FP 12H3-G2로 구성되는 그룹으로부터 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체의 특성을 갖는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체, 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0323] 보다 상세하게는, 본 발명은 2005년 12월 1일 및 2005년 12월 9일에 각각 DSM ACC2751로 기탁된 하이브리도마 세포주 FP 12H3-G2에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0324] 보다 상세하게는, 본 발명은 2005년 12월 1일 및 2005년 12월 9일에 각각 DSM ACC2750으로 기탁된 하이브리도마 세포주 FP 12H3-C2에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0325] 또한, 본 발명은 2005년 12월 1일 및 2005년 12월 9일에 각각 DSM ACC2751로 기탁된 하이브리도마 세포주 FP 12H3-G2에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0326] 다른 특정 구체예에서 본 발명은 2005년 12월 8일에 DSM ACC2755로 기탁된 하이브리도마 세포주 ET 7E3에 의해 생산된 항체의 특성을 갖는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체 및,

선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

- [0327] 본 발명은 또한 2005년 12월 8일에 DSM ACC2755로 기탁된 하이브리도마 세포주 ET 7E3에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0328] 다른 특정 구체예에서 본 발명은 2005년 12월 8일에 DSM ACC2756으로 기탁된 하이브리도마 세포주 EJ 7H3에 의해 생산된 항체의 특성을 갖는, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0329] 본 발명은 또한 2005년 12월 8일에 DSM ACC2756으로 기탁된 하이브리도마 세포주 EJ 7H3에 의해 생산된, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0330] 본 발명의 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체는 다른 생물학적 활성 물질 및 질환의 치료를 위한 과정과 조합되어 투여될 수 있다. 상기 다른 생물학적 활성 물질은 혼합물의 형태인 본 발명의 항체를 이미 포함하는 동일한 조성물의 일부일 수 있다. 여기서 상기 항체 및 다른 생물학적 활성 물질은 동일한 약제학적으로 허용가능한 용매 및/또는 담체와 또는 이에 혼합(intermix)되고, 및/또는 분리 조성물의 일부로서 개별적으로 제공될 수 있으며, 이는 구성물(part)의 키트의 형태로 개별적으로 또는 함께 제공될 수 있다.
- [0331] 본 발명의 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 항체, 상세하게는 단일클론성 항체는 다른 생물학적 활성 물질 또는 물질들과 동시에, 간헐적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체는 제1 추가적 생물학적 활성 물질과 동시에 또는 상기 항체의 투여 전 또는 그 후 순차적으로 투여될 수 있다. 하나 이상의 추가적 생물학적 활성 물질이 하나 이상의 본 발명의 항체와 함께 투여되는 적용 계획이 선택된다면, 여러 조합의 화합물 또는 물질은 부분적으로 동시에, 부분적으로 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0332] 본 발명의 다른 목적은, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI)와 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태를 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 제한되는 것은 아닌 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하는 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 예방 및/또는 요법적 치료 및/또는 완화를 위한, 하나 이상의 본 발명의 항체 및, 선택적으로, 하나 이상의 추가의 생물학적 활성 물질을 포함하는 항체의 혼합물뿐만 아니라 개개의 항체, 또는 상기 항체 또는 이의 혼합물을 포함하는 조성물을 포함하는 이의 혼합물의 사용 방법을 제공하는 것이다.
- [0333] 본 발명의 혼합물은 본 발명의 항체에 추가로, 예를 들어, 알츠하이머병에 관여하는 A β 단백질과 같은 아밀로이드-유사 단백질 또는 아밀로이드와 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 투약(medication)에 사용되는 공지된 화합물과 같은 생물학적 활성 물질을 포함할 수 있다.
- [0334] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 다른 생물학적 활성 물질 또는 화합물은 또한 아밀로이드 β 에 기인하는 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 치료에 사용될 수 있거나 또는 다른 신경계 장애의 약제로 사용될 수 있는 치료제가 될 수 있다.
- [0335] 상기 다른 생물학적 활성 물질 또는 화합물은 본 발명의 항체와 동일한 또는 유사한 메카니즘에 의해 또는 언급되지 않은 작용 메카니즘에 의해 또는 언급된 및/또는 언급되지 않은 작용 메카니즘의 다양성(multiplicity)에 의해 그의 생물학적 효과를 발휘할 수 있다.
- [0336] 일반적으로, 상기 다른 생물학적 활성 화합물은 중성자-전달 증강제(neutron-transmission enhancer), 정신치료제(psychotherapeutic drug), 아세틸콜린 에스테라아제 억제제, 칼슘-채널 차단제(blocker), 생원성(biogenic)

아민, 벤조디아제핀 진정제(tranquillizer), 아세틸콜린 합성, 저장 또는 방출 증강제, 아세틸콜린 시냅스 후부의 수용체 작용제, 모노아민 옥시다아제-A 또는 -B 억제제, N-메틸-D-아스파르테이트 글루타메이트 수용체 길항제, 비스테로이드성 항염증제, 항산화제, 및 세로토닌 수용체(serotonergic receptor) 길항제를 포함할 수 있다.

[0337] 특히, 본 발명의 혼합물은 산화적 스트레스에 대한 화합물, 항-자가사멸 화합물, 금속 킬레이터(chelator), 피렌제핀(pirenzepin) 및 대사물과 같은 DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술포산(3APS), 1,3-프로판디술포네이트(1,3PDS), 세크레타아제 활성화제(secretase activator), β - 및 γ -세크레타아제 억제제, 타우 단백질(tau protein), 신경전달물질(neurotransmitter), β -시트 파괴제(sheet breaker), 항-염증 분자, 또는 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 도네페질(donepezil), 및/또는 갈란타민(galantamine)과 같은 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs) 및 다른 약물 및 영양 보조제로 구성되는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 다른 생물학적 활성 화합물과, 본 발명의 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 함께 포함할 수 있다.

[0338] 추가의 구체예에서, 본 발명의 혼합물은 본 발명의 항체와 함께 니아신(niacin) 또는 메만틴(memantine) 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0339] 본 발명의 또 다른 구체예에서 제공되는 혼합물은, 환각(hallucination), 망상(delusion), (두드러진 사고산란(marked incoherence), 탈선(derailment), 사고이탈(tangentiality)로 표시되는) 사고 장애(thought disorder), 및 기묘한 또는 혼란된 행동, 뿐만 아니라 무쾌감증(anhedonia), 정서둔마(flattened affect), 무감동(apathy), 및 사회적 위축(social withdrawal)을 포함하는 양성 및 음성 정신병 증상의 치료를 위해, 예를 들어, 클로자핀(clozapine), 지프라시돈(ziprasidone), 리스페리돈(risperidone), 아리피프라졸(aripiprazole) 또는 올란자핀(olanzapine)과 같은 "비전형적 항정신병약(atypical antipsychotics)"을, 본 발명의 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께 포함한다.

[0340] 본 발명의 특정 구체예에서, 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 조성물 및 혼합물은 치료적 유효량의 본 발명의 항체 및 생물학적 활성 물질을 각각 포함한다.

[0341] 본 발명의 항원과 조합되어 혼합물에 적절하게 사용될 수 있는 다른 화합물은, 치료 약물 표적(36-39페이지), 알칸술포산 및 알칸올황산(39-51페이지), 콜린에스테라아제 억제제(51-56페이지), NMDA 수용체 길항제(56-58페이지), 에스트로겐(58-59페이지), 비스테로이드성 항-염증제(60-61페이지), 항산화제(61-62페이지), 퍼옥시좀 증식체-활성화된 수용체(peroxisome proliferators-activated receptor; PPAR) 작용제(63-67페이지), 콜레스테롤-저하 작용제(68-75페이지); 아밀로이드 억제제(75-77페이지), 아밀로이드 형성 억제제(77-78페이지), 금속 킬레이터(78-79페이지), 항-정신병약 및 항-우울제(80-82페이지), 영양 보충제(83-89페이지) 및 뇌 내 생물학적 활성 물질의 유용성을 증가시키는 화합물(89-93페이지 참조) 및 전구약물(prodrug)(93 및 94페이지)로, 본원에 참조로서 삽입된 문헌인 WO 2004/058258 (특히 16 및 17페이지 참조)에 설명된다.

[0342] 예를 들어, 팔미트산과 같은 소수성 모이어티 또는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 친수성 모이어티 또는 둘의 조합으로 변형된 β -아밀로이드 펩타이드, 상세하게는 β -아밀로이드 펩타이드 $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ 및 $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ 의 아미노산 서열에 상응하는 항원성 펩타이드를 포함하는 초분자 항원성 구조체에 대한 항체, 상세하게는 단일클론성 항체를 생성시키는 것을 포함하는 항체를 생산하기 위한 방법, 상세하게는 본 발명의 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체를 생산하기 위한 방법이 추가로 제공되고, 여기서 상기 소수성 및 친수성 모이어티 각각은, 하나 이상, 상세하게는 하나 또는 두개의, 예를 들어, 라이신과 같은 아미노산 또는 예를 들어, 글루타민산 또는 시스테인과 같은 상기 소수성 및 친수성 모이어티의 커플링 장치 또는 링커 분자로서 사용할 수 있는 임의의 다른 적합한 아미노산 또는 아미노산 유사체(analogue)을 통해 각 말단에 공유적으로 결합한다.

[0343] 또한, 본 발명의 일부는 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽 경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환 및 알츠하이머 병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 제한되는 것은 아닌 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로

이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 영향을 처리 또는 완화하기 위한 약제의 조제를 위한 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 및/또는 약제학적 조성물, 또는 상기 항체를 포함하는 혼합물의 용도이다.

[0344] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 항체를 약제학적으로 허용되는 형태로 제형화하는 것을 포함하는, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 판 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환 및 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 제한되는 것은 아닌 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 영향을 치료 또는 완화시키는데 사용하기 위한, 본 발명의 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체를 사용하는 약제학적 조성물의 조제를 위한 방법이 제공된다.

[0345] 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체 및 상기 본 발명의 항체를 포함하는 조성물 및 혼합물은, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 판 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 영향을 예방, 치료 또는 완화시키기 위한 약제의 조제에 사용될 수 있다.

[0346] 본 발명의 추가의 구체예에서, 상기 치료를 필요로 하는 동물, 상세하게는 포유류, 보다 상세하게는 인간에게 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체, 또는 상기 항체를 포함하는 혼합물 또는 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 뇌 내의 플라크 부하가 증가되도록 하는 질환 또는 병태에 걸린 동물, 상세하게는 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크 부하를 감소시키기 위한 방법이 제공된다.

[0347] 특히, 상기 플라크 부하는 20% 이상, 상세하게는 25% 이상, 보다 상세하게는 30% 이상, 보다 더 상세하게는 30%를 초과하여 감소시킨다.

[0348] 본 발명의 추가의 구체예에서, 상기 치료를 필요로 하는 동물, 상세하게는 포유류, 보다 상세하게는 인간에게 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체, 또는 상기 항체를 포함하는 혼합물 또는 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 뇌 내의 플라크 부하가 증가되도록 하는 질환 또는 병태에 걸린 동물, 상세하게는 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 플라크의 양을 감소시키기 위한 방법이 제공된다.

[0349] 특히, 뇌 내 플라크의 양은 10% 이상, 상세하게는 15% 이상, 보다 상세하게는 15%를 초과하여 감소된다.

[0350] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 치료를 필요로 하는 동물, 상세하게는 포유류, 보다 상세하게는 인간에게 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체, 또는 상기 항체를 포함하는 조성물 또는 혼합물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 뇌 내의 가용성 A β 의 농도를 증가시키는 질환 및 병태에 걸린 동물, 상세하게는 포유류, 특히 인간의 뇌 내의 가용성 A β 의 총량을 줄이기 위한 방법이 제공된다.

[0351] 본 발명의 목적은, 상기 치료를 필요로 하는 동물, 상세하게는 포유류, 보다 상세하게는 인간에게 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체, 또는 상기 항체를 포함하는 조성물 또는 혼합물을 투여하는 것을 포함하는, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 판 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성

경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 영향을 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 또는 본 발명의 상기 항체를 포함하는 조성물 또는 혼합물을 상기 질환에 걸린 동물 또는 인간에게 투여함으로써 예방, 치료 또는 완화시키기 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0352] 특정 구체예에서 본 발명은, 상기 치료를 필요로 하는 동물, 상세하게는 포유류 또는 인간에게 본 발명의 항체, 특히 단일클론성 항체 또는 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 상기 항체를 포함하는 조성물 또는 혼합물을 투여하는 것에 의해, 기억 장애에 걸린 동물, 상세하게는 포유류 또는 인간의 인지 기억 능력을 유지 또는 증가시키기 위한 방법을 제공한다.

[0353] 본 발명의 다른 구체예에서, 예를 들어, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인 발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련된 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 장애를 포함하나 제한되는 것은 아닌 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애의 영향을 예방, 치료 또는 완화시키기 위한, 본 발명의 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체를 사용하는 약제학적 조성물의 조제를 위한 방법이 제공된다.

[0354] 특정 구체예에서 본 발명은, 동물, 상세하게는 포유류 또는 인간에게 항체, 상세하게는 단일클론성 항체 또는 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 상기 항체를 포함하는 조성물 또는 혼합물을 투여함으로써 기억 장애에 걸린 동물, 상세하게는 포유류 또는 인간의 인지 기억 능력을 유지시키거나 또는 증가시키기 위한, 본 발명의 항체 및/또는 이의 작용부, 특히 단일클론성 항체 및/또는 이의 작용부 또는 작용적으로 균등한 항체를 사용하는 약제학적 조성물의 조제 방법을 제공한다.

[0355] 본 발명의 이들 및 다른 목적, 특성 및 이점은 이하에 개시된 구체예의 상세한 설명 및 첨부된 청구항의 검토 후 명백해질 것이다.

[0356] 본원에서 사용된 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 펩타이드 결합에 의해 링크된 아미노산으로 구성된 생체분자를 의미하는 것으로 정의된다.

[0357] 본원에서 사용된 용어 "a", "an" 및 "the"는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 정의되며, 문맥이 어울리지 않아도 복수를 포함한다.

[0358] 본원에서 사용된 용어 "검출하는(detecting)" 또는 "검출된(detected)"은, 면역화학적 또는 조직학적(histological) 방법과 같은 생물학적 분자의 검출을 위한 공지 기술을 사용하는 것을 의미하고, 조사중인 생체분자의 존재 또는 농도를 정성적으로 또는 정량적으로 측정하는 것을 나타낸다.

[0359] "아밀로이드 β , A β 또는 β -아밀로이드"는 기술 공인 용어이며, 아밀로이드 β 단백질 및 펩타이드, 아밀로이드 β 전구체 단백질(APP), 뿐만 아니라 변형물, 절편 및 이의 모든 작용적 균등물을 나타낸다. 특히, 본원에서 사용된 바와 같은 아밀로이드 β 는 APP의 단백질 가수분해의 분할에 의해 생산된 모든 절편, 특히 A β_{1-38} , A β_{1-39} , A β_{1-40} , A β_{1-41} , A β_{1-42} 및 A β_{1-43} 를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 아밀로이드 병리에 관여하거나 이와 관련되는 이들 절편을 의미한다.

[0360] 아밀로이드 β 펩타이드의 구조 및 서열은 당업자에게 공지되어 있으며, 상기 펩타이드를 생산하는 방법 또는 뇌 및 다른 조직으로부터 상기 펩타이드를 추출하는 방법은 예를 들어, Glenner 및 Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984) 내에 기술되어 있다. 게다가, 다양한 형태의 아밀로이드 β 펩타이드는 상업적으로도 입수 가능하다.

[0361] "A β 원섬유" 또는 "A β 미세섬유" 또는 "아밀로이드 원섬유"는 수용성 매체 내에서 불용성이고, 그들의 코어에

는 다량의 교차-구조를 함유하고; 대부분 원섬유축 1,2,3에 대해 수직인 베타-스트랜드인) 일정한 섬유 직경으로 개별적인 또는 묶여진 섬유를 형성하는 모노머성 단백질의 폴리머성 형태이다.

[0362] "모노머성 Aβ" 또는 "Aβ 모노머"는 수용성 매체 내에 결집된 복합체가 없이 완전히 용해된 아밀로이드 β 단백질이다.

[0363] "폴리머성 가용성 아밀로이드" 및 "올리고머성 Aβ" 및 "Aβ 올리고머"는 수용성 매체 내인 인 비트로 및 포유류 또는 인체 내, 보다 상세하게는 뇌 내인 인 비트로 모두에서 가용성인 올리고머성 또는 폴리머성 구조를 형성하는, 아밀로이드 펩타이드 또는 아밀로이드-유사 펩타이드, 또는 변형된 또는 잘린(truncated) 아밀로이드 펩타이드 또는 아밀로이드 펩타이드의 다른 유도체의 다중의 결집된 모노머, 특히 포유류 또는 인체 내, 보다 상세하게는 뇌 내에서 각각 가용성인, 아밀로이드 β(Aβ) 또는 변형된 또는 잘린(truncated) 아밀로이드 β(Aβ) 또는 이의 유도체의 다중의 결집된 모노머를 나타낸다.

[0364] "단리된(isolated)"은 자연적으로 발생했을 때 가졌던 성분의 적어도 일부가 없는 생물학적 분자를 의미한다.

[0365] 본원에서 사용된 용어 "항체" 또는 "항체들"은 기술 공인 용어이고, 공지된 항원에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 절편, 상세하게는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역적으로 활성인 부분, 즉 항원에 면역특이적으로 결합하는 결합 사이트를 함유하는 분자를 나타내는 것으로 이해된다. 본 발명의 면역글로불린은 임의의 타입(IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY) 또는 클래스(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 서브클래스일 수 있다.

[0366] 본 발명의 범위 내의 "항체들"은 단일클론성 항체, 다클론성, 키메라(chimeric), 단일 사슬, 이중특이성 또는 이중-효과성, 유인원화된(simianized), 인간 및 인간화된 항체뿐만 아니라 이들의 활성 절편을 포함하는 것을 의도한다. 공지된 항원에 결합하는 분자의 활성 절편의 예는, Fab 면역글로불린 발현 라이브러리의 산물 및 모든 항체의 에피토프-결합 절편 및 상기 언급된 절편들을 포함하는, Fab 및 F(ab')₂ 절편을 포함한다.

[0367] 이들 활성 절편은 다수의 기술에 의해 본 발명의 항체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 정제된 단일클론성 항체는 펩신(pepsin)과 같은 효소로 절단(cleave)될 수 있고, 또한 HPLC 겔 여과될 수 있다. 그 후 Fab 절편을 함유하는 적절한 분획이 수합되어 막 여과 등에 의해 농축될 수 있다. 항체의 활성 절편의 단리를 위한 일반적 기술의 추가적 설명은 예를 들어, Khaw, B. A. 등 J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux 등 Methods Enzymology, 121 :663-69, Academic Press, 1986를 참조한다.

[0368] "인간화된 항체"는 비-인간 도너(donor) 면역글로불린으로부터 유래된 CDRs, 하나(또는 그 이상)의 인간 면역글로불린(들)로부터 유래되는 분자의 면역글로불린-유래된 일부인 나머지를 갖는, 가공된(engineered) 항체의 유형을 나타낸다. 추가로, 프레임워크 지지 잔기/framework support residue)는 결합 친화도를 보존하기 위해 변경될 수 있다. "인간화된 항체"를 수득하는 방법은 당업자들에게 공지되어 있다 (예를 들어, Queen 등, Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson 등, Bio/Technology, 9:421 (1991) 참조).

[0369] "인간화된 항체"는 또한 예를 들어, 토끼와 같은 큰 동물에서 친화도-발달된(affinity-matured) 인간유사 다클론성 항체를 생산할 수 있는 신규한 유전공학 수단에 의해 또한 수득될 수 있다 (<http://www.rcitech.com/bioventures/therapeutic.php>).

[0370] 용어 "단일클론성 항체"는 또한 당업계에서 잘 인지될 수 있으며, 또한 실험실에서 단일 클론으로부터 대량 생산된, 하나의 항원만을 인식하는 항체를 나타낸다. 단일클론성 항체는 일반적으로, 정상적으로 단명하는, 항체-생산 B 세포를 (때때로 "무한증식(immortal)" 세포로 나타내어지는) 암세포와 같은 빨리-성장하는 세포와 융합하여 제조된다. 결과물인, 대량의 항체를 생산(create)하는 클론(clone)을 생성하는 하이브리드(hybrid) 세포, 또는 하이브리도마는 빠르게 증식한다.

[0371] 본 발명의 목적을 위해, "단일클론성 항체"는 완전한 단일클론성(full monoclonality)에 미처 도달하지 않은 모클론(mother clone)에 의해 생산된 항체를 포함하는 것으로도 이해된다.

[0372] "작용적으로 균등한 항체"는, β-아밀로이드 단백질, 상세하게는 Aβ₁₋₄₂ 단백질, 또한 보다 상세하게는 Aβ₁₋₄₂ 단백질의 4-16 에피토프 영역에 대한 결합 특이성, 인 비트로 면역반응성, Aβ₁₋₄₂ 모노머의 고분자 폴리머성 원섬유로의 결집의 억제 및/또는 미리형성된 Aβ₁₋₄₂ 폴리머성 원섬유의 해체, 및/또는 β-시트 파괴 특성 및 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 때, 예를 들면, 경증 인지 장애(MCI), 루이 소체 치매, 다온증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 알 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또

는 병태; 뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, 근육 위축가쪽경화증(ALS), 봉입체 근염(IBM), 성인발병형 당뇨병; 노인성 심아밀로이드증; 내분비 종양과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 다른 질환, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 질환을 포함하는, 알츠하이머병(AD)과 같은 신경계 질환을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는, 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인되거나 또는 이와 관련된 질환 또는 장애의 영향을 완화시키는 것을 포함하는 본원에 기재된 및 상기에 언급된 항체와 적어도 하나의 주요 작용 특성을 실질적으로 공유하는 항체를 나타내는 것으로 본 발명의 범위 내에서 이해된다. 상기 항체는 IgG, IgM, 또는 IgA 등과 같은 임의의 클래스 또는 IgG1, IgG2a 등과 같은 임의의 서브클래스 및 당업계에 알려지거나 또는 본원의 상기에 언급된 다른 서브클래스일 수 있으며, 특히 IgG2 클래스의 항체일 수 있다. 또한, 상기 항체는 파아지 디스플레이(phage display)와 같은 임의의 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 인간화된 항체와 같은, 원하는 특색을 갖는 항체를 생산하는 세균의, 곤충의, 포유류의 또는 다른 유형의 세포 또는 세포주를 포함하는 임의의 유기체 또는 세포주에서 생산된다. 상기 항체는 상이한 중으로부터의 Fab부분 및 Fc 영역을 조합함으로써 형성될 수도 있다.

[0373] 용어 "이중특이성(bispecific)" 또는 "이작용성(bifunctional)" 및 "이중-효과성(bi-effective)"은 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 섬유 형성에 대한 억제 특성뿐만 아니라 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 섬유의 해결 특성 모두를 나타내는 항체의 특성을 기술하기 위해 본 출원의 범위 내에서 동의어로 사용된다...

[0374] 용어 "항원"은 유기체, 상세하게는 동물, 보다 상세하게는 인간을 포함하는 포유류 내에서 면역 반응을 유도할 수 있는 실체(entity) 또는 이의 절편을 나타낸다. 상기 용어는 항원성 또는 항원결정기의 원인인 영역 및 면역원을 포함한다.

[0375] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "가용성"은 수용액에 부분적으로 또는 완전히 용해되는 것을 의미한다.

[0376] 또한 본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역원성"은 면역원성 작용제에 대해 유도된 항체, T-세포 및 다른 반응성 면역 세포의 생산을 향상시키거나 또는 이끌어내고, 또한 인간 또는 동물에서의 면역 반응에 기여하는 물질을 나타낸다.

[0377] 면역 반응은 치료될 장애를 절제시키거나 또는 완화시키기 위해, 투여된 본 발명의 면역원성 조성물에 대해, 개체가 충분한 항체, T-세포 및 다른 반응성 면역 세포를 생산할 때 일어난다.

[0378] "폴리머성 가용성 아밀로이드"는 포유류 또는 인체 내, 보다 상세하게는 뇌 내에서 가용성인 올리고머성 또는 폴리머성 구조를 형성하는, 아밀로이드 펩타이드, 또는 아밀로이드-유사 펩타이드, 또는 변형된 또는 잘린 아밀로이드 펩타이드 또는 아밀로이드 펩타이드의 다른 유도체의 다중의 결합된 모노머, 특히 포유류 또는 인체 내, 보다 상세하게는 뇌 내에서 가용성인, 아밀로이드 β(Aβ) 또는 변형된 또는 잘린 아밀로이드 β(Aβ) 또는 이의 유도체의 다중의 결합된 모노머를 나타낸다.

[0379] 용어 "하이브리도마"는 항체-생산 세포와 무한증식 세포, 예를 들어 다발골수종(multiple myeloma cell) 세포의 융합에 의해 생산된 세포를 나타내는 것으로 당업계의 보통의 기술자에 의해 인식되고 이해된다. 상기 하이브리드 세포는 항체의 지속적인 공급을 일으킬 수 있다. "단일클론성 항체"의 정의는 융합 방법의 보다 상세한 설명을 위한 상기 및 이하의 실시예를 참조한다.

[0380] 본원에서 사용된 용어 "담체"는 항원성 펩타이드 또는 초분자 구조체가 이의 내부로 혼입될 수 있거나 또는 이와 결합되어 인간 또는 동물의 면역 시스템에 항원성 펩타이드 또는 상기 펩타이드의 일부를 제시하거나 또는 노출시킬 수 있는 구조를 의미한다. 예를 들면, 소포, 입자 또는 미립자체와 같은 동물 또는 인간 치료에 적합하게 사용될 수 있는 모든 입자가 본 발명의 문맥 내의 담체로서 사용될 수 있다.

[0381] 용어 "담체"는 항원성 펩타이드를 포함하는 초분자 항원성 구조체 조성물이 인도(delivery) 메커니즘에 의해 원하는 사이트에 수송될 수 있는 인도 방법을 또한 포함한다. 상기 인도 시스템의 한 예는 콜로이드 금과 같은 콜로이드 금속을 이용한다.

[0382] 또한, 상기 "담체"는 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin; KLH), 소 혈청 알부민(BSA) 및 다른 보조제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 당업계에 공지된 인도 메커니즘을 추가로 포함한다.

[0383] 본 발명의 초분자 항원성 구조체에서, 리포솜은 본원에서 전술된 바와 같은 초분자 구조체를 포함하는 담체로서 사용될 수 있고, 동시에, 본 발명의 치료 백신으로 치료될 표적 동물 또는 인간 내에서 면역 반응을 증가시키거

나 또는 자극하기 위한 보조제로서 작용하는 이중 작용을 가질 수 있다. 이는 본 발명의 초분자 항원성 구조체 조성물이 예를 들어, 지질 A, 명반, 인산칼슘, 인터루킨 1, 및/또는 다당류 및 단백질의 마이크로캡슐, 상세하게는 예를 들어 모노포스포릴 또는 디포스포릴 지질 A와 같은 무독화된 지질 A, 또는 명반과 같은 추가적 보조제, 추가의 방부제, 희석제, 유화제, 안정제, 및 종래 기술의 백신에 사용되고 알려진 다른 성분을 더 포함할 수 있는 것으로도 이해된다. 또한, 당업계에 공지된 보조제 시스템은 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 상기 보조제는 프로인트 불완전 보조제, 프로인트 완전 보조제, 다분산된 β -(1,4) 링크된 아세틸화 만난 (polydispersed β -(1,4) linked acetylated mannan)("Acemannan"), TITERMAX[®] (CytRx Corporation의 폴리옥시 에틸렌-폴리옥시프로필렌 코폴리머 보조제), Chiron Corporation의 변형된 지질 보조제, Cambridge Biotech의 사포닌 유도체 보조제, 사멸된 *Bordetella pertussis*, 그람-음성 세균의 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide; LPS), 텍스트란 설페이트와 같은 큰 폴리머성 음이온, 및 명반, 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄과 같은 무기질을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0384] 본 발명의 초분자 항원성 구조체 조성물에 사용될 수 있는 담체 단백질은 말토오스 결합 단백질 "MBP"; 소 혈청 알부민 "BSA"; 키홀 림펫 헤모시아닌 "KLH"; 오브알부민; 플라젤린(flagellin); 티로글로불린(thyroglobulin); 모든 종의 혈청 알부민; 모든 종의 감마 글로불린; 동계 세포(syngeneic cell); Ia 항원을 함유하는 동계 세포; 및 D- 및/또는 L-아미노산의 폴리머를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0385] 또한, 용어 "유효량"은, 인간 또는 동물에게 투여되었을 때, 상기 인간 또는 동물에서의 치료적 효과를 가져오기에 충분한 면역 반응을 이끌어내는 항원의 양을 나타낸다. 상기 유효량은 일상적인 절차를 따라 당업자에 의해 쉽게 결정된다.

[0386] 두 종간의 "상동성(homology)"은 서열 동일성에 의해 결정된다. 만약 상호 길이 면에서 상이한 두 서열이 비교된다면, 서열 동일성은 바람직하게는 더 긴 서열의 뉴클레오티드 잔기와 동일한 더 짧은 서열의 뉴클레오티드 잔기의 백분율과 관련된다. 서열 동일성은 Bestfit 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix를 위한 Version 8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711)과 같은 통상적으로 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. Bestfit은, 두 서열간 가장 높은 서열 동일성을 갖는 세그먼트를 찾기 위해, Smith 및 Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489의 로컬 상동성 알고리즘을 사용한다. 예를 들어 특정 서열이 본 발명의 참조 서열과 95% 동일성을 가지는지를 결정하기 위해 Bestfit 또는 다른 서열 정렬 프로그램을 사용할 때, 파라미터는 바람직하게는 동일성의 백분율이 참조 서열의 전체 길이 전체로 나누어 계산하도록, 또한 참조 서열 내 뉴클레오티드의 총 수의 5%이하의 상동성 갭(gap)으로 보정된다. Bestfit을 사용할 때, 소위 선택가능한(optional) 파라미터는 바람직하게는 그들의 미리세트된 ("디폴트") 값을 버린다. 본 발명의 상기 서열과 주어진 서열 사이의 비교에서 나타나는 편차는 예를 들어 첨가, 결실, 치환, 삽입 또는 재조합에 기인할 수 있다. 상기 서열 비교는 바람직하게는 프로그램 "fasta20u66"로도 수행될 수 있다 (version 2.0u66, William R. Pearson 및 버지니아 대학에 의해 1998년 9월; W. R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, 첨부된 실시예 및 <http://workbench.sdsc.edu/> 또한 참조). 이 목적을 위해, 상기 "디폴트" 파라미터 세팅이 사용될 것이다.

[0387] 사용된 용어 "혼성화하다(hybridize)"는 통상적인 혼성화 조건, 바람직하게는 5xSSPE, 1% SDS, 1x 덴하르트 용액이 용액으로서 사용되는 및/또는 혼성화 온도는 35°C 내지 70°C, 바람직하게는 65°C인 혼성화 조건을 나타낸다. 혼성화 후, 세척은 바람직하게는 35°C 내지 70°C, 바람직하게는 65°C의 온도에서 처음에는 2xSSC, 1% SDS로, 그리고 이어서 0.2xSSC로 수행된다 (SSPE, SSC 및 덴하르트 용액의 정의에 대해 Sambrook 등 인용된 곳에서 참조). 예를 들면 앞의 Sambrook 등에 기술된 바와 같은 엄격한 혼성화 조건이 특히 바람직하다. 특히 바람직한 엄격한 혼성화 조건은 예를 들어 상술하여 나타낸 바와 같이 혼성화 및 세척이 65°C에서 일어나는 것이다. 예를 들어 혼성화 및 세척이 45°C에서 수행되는 엄격하지 않은 혼성화 조건은, 보다 덜 바람직하며, 35°C에서의 수행되는 혼성화 조건은 바람직하지 않다.

[0388] 본 발명은 이하의 본원에 포함된 특정 구체예의 상세한 설명에 대한 참조로서 보다 쉽게 이해될 것이다. 비록 본 발명은 어떤 구체예의 특정 상세한 설명에 대한 참조로서 기술되었지만, 이에 대해, 상기 상세한 설명은 본 발명의 범위에 대한 제한으로서 간주되어야 하는 것으로 의도하는 것은 아니다.

[0389] 본 발명은 배좌적으로 민감한 항체인, 항체 및 이의 작용부를 제공한다. 이들 항체는 아밀로이드 단백질 항원 상의 폭넓고 다양한 특정 에피토프를 인식한다. 상기 항체는 알츠하이머병에 관련된 AB 단백질과 같은 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질과 관련된 질환 및 장애 그룹인 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 질환 및 장애 및 질환의 진단적 및 치료적 시술에

유용하다.

- [0390] 항체는 개체에 투여되어, 알츠하이머병과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 질환을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 다양한 질환 또는 장애에 대해 그들을 수동적으로 면역화시킨다.
- [0391] 본원에서 제공된 항체는 예를 들어, 알츠하이머병과 같은 아밀로이드 단백질과 관련된 다양한 장애를 대표하는 항원성 펩타이드에 대해 결합 특이성을 갖는 단일클론성 또는 다클론성 항체이다.
- [0392] 본 발명의 항체는 초분자 항원성 구조체 조성물로 인간 항체를 생산할 수 있는 마우스, 랫트, 토끼 또는 고유 (native) 또는 다른 동물종과 같은 동물을 면역화시킴으로써 생산된다.
- [0393] 본원에 개시된 초분자 항원성 구조체는 일반적으로 항원성 효과를 향상시키도록 변형된 펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 펩타이드는 (폴리에틸렌 글리콜 또는 변형된 폴리에틸렌 글리콜을 사용하는) peg화를 통해 변형되고, 또는 팔미트산, 폴리-아미노산 (예를 들어 폴리-글리신, 폴리-히스티딘), 다당류(예를 들어 폴리갈락투론산 (polygalacturonic acid), 폴리락트산(poly-lactic acid), 폴리글리콜리드(polyglycolide), 키틴, 키토산), 합성 폴리머 (폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리에스테르) 또는 코폴리머 (예를 들어 폴리(메타크릴산) 및 N-(2-히드록시)프로필메타크릴아미드) 등과 같은 다른 방법을 통해 변형될 수 있다.
- [0394] C_{16:0} 지방산 모이어티의 상대적으로 감소된 길이에 기인한 팔미트산에 의한 변형(팔미토일화)은, 리포솜 이중층 내에서 펩타이드에 대한 앵커를 제공하는 동시에, 상기 펩타이드가 상기 리포솜 표면에 놓이도록 한다. 따라서, 항원을 처리하는 세포는 펩타이드를 갖는 전체 리포솜을 섭취해야 할 것이고, 이는 대다수의 경우에서 상대적 기간 동안 더욱 느린 면역 반응을 야기한다.
- [0395] 본 발명의 일 구체예에서, 변형된 아밀로이드 1-15 펩타이드는 항체, 상세하게는 본 발명의 단일클론성 항체의 조제를 위해 사용된다. 상기 변형된 아밀로이드 1-15 펩타이드는 Nicolau 등에서 보고된 방법을 따라 합성될 수 있다. 상당히 높은 순도의 생산물을 내는 상기 Nicolau 등에서 보고된 수법은 항원성 펩타이드를 친지성 또는 소수성 모이어티의 수지상 그래프팅에 의해 미리형성된 펩타이드의 말단 아미노산 잔기로 변형시키는 것을 포함한다. 특히, 보호된 아미노산, 상세하게는 Fmoc-보호된 아미노산은 공지된 커플링 케미스트리를 사용하여 수지에 부착된다. 상기 보호기는 제거되고, 두번째 보호된 아미노산 잔기가 커플된다. 공지된 보호 케미스트리, 상세하게는 Fmoc/tBu 케미스트리, 및 표준 측쇄 보호기를 사용하는 표준의 자동화된 펩타이드 합성은 그 후 서열 식별 번호: 1에 주어진 서열을 갖는 펩타이드 절편을 생산하기 위해 아밀로이드 단백질 Aβ₁₋₄₂의 아미노산 1 내지 15 상의 커플링에 의한 Aβ₁₋₁₅ 항원성 펩타이드의 합성에 사용된다. 최종 단계에서 두 개의 추가적 보호된 아미노산이 상기 자라는 펩타이드 절편에 커플된다. Mtt기는 그 후 선택적으로 분할될 수 있고, 팔미트산에 커플될 수 있다. 수지의 세척 후, 상기 보호기는 제거되고, 동시에 수지는 분할되고, 표준 방법론을 이용하는 측쇄 탈보호가 수행된다. 그 후 높은 순도의 최종 생산물이 수득될 수 있으며, 이의 동일성은 예를 들어, 전기분무 질량 분석과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 확인된다.
- [0396] 본 발명의 친지성 또는 소수성 모이어티는 지방산, 트리글리세리드(triglyceride) 또는 인지질이고, 여기서 상기 지방산 탄소 백본은 적어도 10개의 탄소 원자를 갖는다. 상세하게는, 상기 친지성 또는 소수성 모이어티는, 적어도 약 14개의 탄소 원자 내지 약 24개 이하의 탄소 원자를 가지고, 탄소 원자의 각각의 개별적 수는 본 발명의 일부가 되는 범위 내에 있는, 탄소 백본을 갖는 지방산이다. 보다 상세하게는, 상기 친지성 또는 소수성 모이어티는 적어도 14 탄소 원자의 탄소 백본을 갖는다. 소수성 모이어티의 예는 팔미트산, 스테아르산, 미리스트산, 라우르산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산 및 콜레스테롤 또는 DSPE를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 친지성 또는 소수성 모이어티는 팔미트산이다.
- [0397] 면역 반응을 개선시키기 위해, 다른 앵커/스페이서, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 리포솜 내에 상기 펩타이드를 재구성하기 위해 적합하게 적용될 수 있다.
- [0398] PEG는 펩타이드의 양 말단에 결합된 아미노산 잔기, 특히 Glu, Cys 또는 Lys 아미노산 잔기 또는 PEG를 펩타이드에 공유적으로 결합시키기 위해 적합하게 사용될 수 있는 임의의 다른 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된다. 리포솜 이중층 내에서 앵커링 요소로서 작용하기 위해 사슬의 다른 단부에 소수성 모이어티, 예를 들어, 포스포티딜 에탄올 아민(PEA)이 공유적으로 결합될 수 있다. 따라서, 리포솜은 보조제로서 작용하고, 이중층으로부터 충분히 멀리 떨어진 펩타이드는 단독으로 처리될 수 있어, 그의 면역원성은 팔미토일화된 항원에 비교하여 증가한다.
- [0399] 특정 구체예에서, 본 발명의 범위 내에서 사용된 초분자 항원성 구조체는 각 말단의 하나 peg화된 라이신-에 공

유적으로 부착된 펩타이드 서열을 포함한다. 폴리에틸렌글리콜(PEG) 사슬의 길이는 $n = 8$ 내지 $n = 150.000$ 이상, 상세하게는 $n = 10$ 내지 $n = 80.000$, 보다 상세하게는 $n = 20$ 내지 $n = 10.000$ 로 다양할 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서 PEG 사슬의 길이는 $n = 45$ 를 초과하지 않고, 상세하게는 $n = 5$ 내지 $n = 40$, 보다 상세하게는 $n = 10$ 내지 $n = 30$, 그리고 보다 더 상세하게는 $n=10$ 이다.

- [0400] 본원에 기술된 초분자 구조체는 자동화된 펩타이드 합성법 및 공지의 보호 케미스트리, 상세하게는 Fmoc/tBu 케미스트리 및 표준의 측쇄 보호기에 의해 합성될 수 있다. 일반적으로, 펩타이드의 peg화는 위치이성질체(regioisomer)의 혼합물을 야기한다.
- [0401] A β 의 C- 및 N- 말단 모두에의 PEG-지질 컨주게이트의 사이트-특이적 부착을 달성하기 위해, 부분적으로 보호된 펩타이드가 사용될 수 있다. 내부 Lys 또는 His 잔기를 함유하는 이들 펩타이드 서열에 대해 직교하여(orthogonally) 보호된 Lys(ivDde)가 각 말단에 첨가된다. 합성을 용이하게 하기 위해 추가적 Gly가 C-말단부에 첨가될 수 있다. 보호기는 제거되고, 아세트산 무수물을 이용하여 N-아세틸화되고, 상기 ivDde기의 선택적 분할이 이어진다.
- [0402] 수지, 상세하게는 산에 민감하여 보호된 펩타이드의 단리를 가능하게 하는 2-클로로트리틸 수지가 선호된다.
- [0403] 본 발명의 특정 구체예에서, 커플링 반응은 용액상에서 수행된다. 그 후 온화한 조건하에서 수지로부터의 선택적 분할은 내부적으로 보호된 펩타이드를 방출시킨다.
- [0404] 예를 들어, DSPE와 같은 지방산 - 포스파티딜콜린으로 변형된 PEG 분자로서의 예를 들어, A β_{1-16} 과 같은 β -아밀로이드 단백질 서열(서열 식별 번호: 2)로부터 유래된 펩타이드로서의 용액상(solution-phase) 커플링은 성공적으로 달성되었다. 최종 측쇄 탈보호 이전에 모노- 및 디-커플된 생산물의 분리는 양이온-교환 크로마토그래피를 이용하여 달성될 수 있다. 이후의 펩타이드 측쇄 탈보호는 만족스러운 순도를 갖는 바라는 컨주게이트를 단리시킨다. 정제는 예를 들어, HPLC 등과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다.
- [0405] N- 및 C-말단 지질-PEG β 아밀로이드 항원의 합성을 위한 보호된 펩타이드를 사용하는 이 방법은 폭넓은 다양한 펩타이드 서열에 적용가능하다.
- [0406] 그 후 본 발명의 리포솜 항원은 Nicolau 등 (2002)에 기술된 바와 같이 조제될 수 있다. 변형된 아밀로이드 A β 항원성 펩타이드, 상세하게는 변형된 PEG- 및 팔미토일화된 PEG-A β_{1-15} , A β_{1-16} , A $\beta_{1-16}(\Delta_{14})$, A β_{22-35} 및 A β_{29-40} 항원성 펩타이드는 선택적으로 모노포스포릴 지질 A를 함유하는 리포솜, 상세하게는 디미리스토일 포스파티딜 콜린(DMPC), 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPEA), 디미리스토일 포스파티딜 글리세롤(DMPG) 및 콜레스테롤로 제조되는 리포솜으로 구성되는 구조체 내에서 재구성될 수 있다.
- [0407] 본 발명의 특정 구체예에서, 지질 A를 갖는 리포솜은 항-아밀로이드 백신을 조제하는데 보조제로서 사용된다. 디미리스토일포스파티딜-콜린, -글리세롤 및 콜레스테롤은, 상세하게는 0.9:1.0:0.7의 몰비로 혼합된다. 그 후 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A와 같은 강한 면역조절물질이 적합한 농도, 상세하게는 인지질 mmol당 30 내지 50 mg, 보다 상세하게는 인지질 mmol당 40 mg의 농도로 첨가된다. 그 후 변형된 항원성 A β 펩타이드가 1 :30 내지 1 :200인 펩타이드 대 인지질의 몰비, 상세하게는 1:50 내지 1:120, 보다 상세하게는 1:100의 몰비로 첨가된다. 용매는 예를 들어, 증발법을 통해 제거되고, 결과물인 필름은 예를 들어 PBS와 같은 멸균된 완충용액으로 수화된다.
- [0408] 리포솜은 또한 예를 들어, Wagner 등((2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 - 270)에 설명된 바와 같이 크로스플로우 주입 기술(crossflow injection technique)에 의해 조제될 수 있다. 지질 용액을 수용성 완충액 시스템 내로 주입하는 동안, 지질은 "침전물(precipitates)"의 형태가 되는 경향이 있고, 그 후 소포 내에서 자가 배열된다. 수득된 소포 크기는 지질 농도, 교반 속도, 주입 속도 및 지질의 선택과 같은 요소에 의존한다. 조제 시스템은 크로스플로우 주입 모듈, 극성상(polar phase)(예를 들어, PBS 완충용액)을 위한 용기, 에탄올/지질 용액 용기 및 가압 장치, 특히 질소 가압 장치로 구성될 수 있다. 수용액 또는 극성 용액이 크로스플로우 주입 모듈을 통해 펌프되는 동안 에탄올/지질 용액은 변화하는 압력이 가해진 극성상으로 주입된다.
- [0409] 상기 리포솜은 보조제로서 작용하고, 이중층으로부터 충분히 멀리 떨어진 펩타이드는 단독으로 처리될 수 있어, 그의 면역원성은 팔미토일화된 항원에 비교하여 증가한다.
- [0410] 자유 PEG 말단은 앵커링 요소로서 작용하기 위해 포스파티딜-에탄올아민 분자에 공유적으로 부착된다 (지방산은

미리스탄산, 팔미트산, 스테아르산, 올레산 등 또는 이의 조합일 수 있다). 이 초분자 구조는 인지질 및 콜레스테롤(여러 몰비의 포스파티딜에탄올 아민, 포스파티딜 글리세롤, 콜레스테롤)로 구성되는 리포솜 내에서 재구성될 수 있다. 다른 인지질이 사용될 수 있다. 지질 A는 인지질의 약 40 $\mu\text{g}/\text{pmole}$ 농도로 사용된다.

[0411] 어떤 구체예에서, 팔미토일화된 또는 peg화된 초분자 항원성 구조체는 β -아밀로이드의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 포함한다. 상기 펩타이드는 또한 전체 아밀로이드 베타 펩타이드 및 이의 활성 절편을 포함할 수 있거나 상응한다. 추가적으로, 본 발명에 유용한 펩타이드는 $A\beta_{1-16}$ (서열 식별 번호: 2); $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ (서열 식별 번호: 3); $A\beta_{1-15}$ (서열 식별 번호: 1); 및 이의 활성 절편을 추가로 포함한다.

[0412] 항체를 유발하고 조제하기 위해, 또한 변형된 $A\beta$ 항원성 구조체의 면역원성을 측정하기 위해, 마우스, 랫트, 토끼, 돼지, 새 등, 특히 마우스, 특히 C57BL/6 마우스로 구성된 그룹으로부터 선택된 적절한 동물이 면역화되었다. 상기 항원성 구조체의 면역원성은 예를 들어, ELISA 어세이와 같은 면역어세이를 사용하여 면역화 후 적절한 시간 간격에서 혈청 샘플을 탐구하여 측정된다.

[0413] 본 발명의 단일클론성 항체는 당업계에서 공지된 고전적인 클로닝 및 세포 융합 기술을 사용하여 조제될 수 있다. 관심있는 면역원(항원)은 일반적으로 고유의 또는 인간 항체를 생산할 수 있는 야생형 또는 근교배(inbred) 마우스(예를 들어, BALB/c 또는 특히 C57BL/6 마우스), 랫트, 토끼 또는 다른 동물종 또는 유전자전이 마우스에게 투여된다(예를 들어, 복막내 주입). 상기 면역원은 면역 반응을 유도하기 위해 단독으로, 또는 보조제와 함께 혼합되어, 또는 벡터(VEE 레플리콘 벡터(replicon vector), 백시니아(vaccinia))로부터 발현되어, 또는 DNA로서, 또는 융합 단백질로서 투여될 수 있다. 융합 단백질은, 예를 들어, 베타-갈락토시다아제, 글루타티온 S-트랜스퍼라아제, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 및 소 혈청 알부민과 같은 담체 단백질과 커플링되는 것이 희망되는 면역반응에 대한 펩타이드를 포함한다. 이들 경우에서, 상기 펩타이드는 담체 단백질을 갖는 합텐(hapten)으로서 사용된다. 상기 동물에게 예를 들어, 2회 이상 추가접종한 후, 면역화된 동물로부터 비장 세포를 수확하였으며, Kohler와 Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) 및 Harlow와 Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))의 공지된 과정을 이용하여 감작된 비장 세포를 쥐과(murine) SP2/0 골수종 세포 (ATCC, Manassas, VA)와 같은 골수종(myeloma) 세포주와 융합함으로써 하이브리도마를 생성하였다.

[0414] 본 발명의 특정 구체예에서 약제학적으로 허용가능한 형태의 본 발명의 항원성 구조체, 상세하게는 상기 항원성 구조체를 포함하는 백신 조성물은 반복 용량, 특히 1 내지 15 용량, 보다 상세하게는 2 내지 10 용량, 보다 더 상세하게는 3 내지 7 용량, 특히 4 내지 6 용량으로, 1 내지 10주의 시간 간격, 상세하게는 1 내지 6주의 시간 간격, 보다 상세하게는 1 내지 4주의 시간 간격, 또한 보다 더 상세하게는 2 내지 3주의 시간 간격으로 투여된다. 면역 반응은 추가접종 후, 상세하게는 추가접종하고 3 내지 10일 후, 보다 상세하게는 추가접종하고 4 내지 8일 후, 및 보다 상세하게는 추가접종하고 5 내지 6일 후 적절한 시간에 혈청 샘플을 취하고, 공지된 방법론, 상세하게는 예를 들어 ELISA 어세이와 같은 통상적으로 이용되는 면역어세이 중 하나를 이용하여 항원성 구조체의 면역원성을 측정함으로써 모니터링된다.

[0415] 본 발명의 항원성 구조체, 특히 약제학적으로 허용가능한 형태의 본 발명의 항원성 구조체를 포함하는 백신 조성물로의 면역화는, 치료된 동물에서 유의한 면역 반응을 일으킨다. 치료적 역가의 동물, 특히 마우스는 항체 생산 세포, 상세하게는 B-림프구의, 골수종 세포주와 같은, 계속 자라거나 또는 무한증식하는(immortal) 세포주와의 융합을 위해 선별된다. 상기 세포는 폴리에틸렌 글리콜의 첨가에 의해 융합되도록 유도된다. 치료적 역가는 1:4000 내지 1:6000, 상세하게는 1:4500 내지 1:5500, 보다 상세하게는 1:5000의 희석에서의 ELISA 어세이에서 양성을 나타낸다.

[0416] 결과물인 하이브리드 세포는 그 후 통상적인 방식, 예를 들어 제한 희석으로 클론되고, 또한 그 결과물인 희망하는 단일클론성 항체를 생산하는 클론은 배양된다.

[0417] 이렇게 수득된 하이브리도마는, 하이포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)을 함유하는 선택 배지(HAT) 내에 세포를 플레이트링(plating)함으로써 화학적으로 선택된다.

[0418] 하이브리도마는 특정 아밀로이드-관련 질환 또는 장애에 대한 단일클론성 항체를 생산하는 능력에 대해 스크린된다. 관심있는 항체를 생산하는 하이브리도마는 클론되고, 갯수가 늘려지고 또한 이후의 생산을 위해 동결하여 보관된다. 바람직한 하이브리도마는 IgG 이소타입, 보다 바람직하게는 IgG2 이소타입을 갖는 단일클론성 항체를 생산한다.

- [0419] 다클론성 항체는 전술된 본 발명의 초분자 항원성 구조체 조성물을 갖는 면역화된 동물, 마우스 또는 토끼, 또는 임의의 다른 적절한 동물에 의해 조제된다. 그 후 상기 동물로부터 혈액 혈청이 수확되고, 상기 혈청 내의 항체는 아밀로이드 항원에 대한 결합 반응성에 대해 스크린된다.
- [0420] 본 발명의 항체는 생리학적으로 허용가능한 제형으로 조제될 수 있고, 공지된 기술을 사용하여 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 본원에서 전술된 바와 같은 본 발명의 항체, 특히, 작용적으로 균등한 모든 항체 또는 이의 작용부를 포함하는 단일클론성 항체는 치료적 조성물을 형성하기 위해 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 조합된다. 적절한 약제학적 담체, 희석제 및/또는 부형제는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 인산염 완충 염수 용액, 물, 유/수 에멀션과 같은 에멀션, 다양한 형태의 습윤제, 멸균 용액 등을 포함한다.
- [0421] 본 발명의 약제학적 조성물의 제형화는 당업자에게 공지된 규격 방법론에 따라 달성될 수 있다.
- [0422] 본 발명의 조성물은 적절한, 약제학적 유효량의 고체, 액체 또는 에어로졸의 형태로 대상에게 투여될 수 있다. 고체 조성물의 예는 정제, 크림 및 삽입가능한 투여량 유닛(implantable dosage unit)을 포함한다. 정제는 경구로 투여될 수 있다. 치료 크림은 국소적으로 투여될 수 있다. 삽입가능한 투여량 단위는 국부적으로 (locally), 예를 들어, 중앙 사이트에 투여될 수 있고, 또는 상기 치료 조성물의 조직적 방출을 위해, 예를 들어, 피하적으로 삽입될 수 있다. 액체 조성물의 예는 근육내, 피하, 정맥내, 동맥내 주입을 위해 적응(adapt)된 제형, 및 국소 및 안내(intraocular) 투여를 위한 제형을 포함한다. 에어로졸 제형의 예는 폐에 대한 투여를 위한 흡입기 제형을 포함한다.
- [0423] 상기 조성물은 표준 투여 루트(route)에 의해 투여될 수 있다. 일반적으로, 상기 조성물은 국소, 경구, 직장, 비강, interdermal, 복막내, 또는 비경구적(예를 들어, 정맥내, 피하, 또는 근육내) 루트로 투여될 수 있다. 추가로, 상기 조성물은 생분해성 폴리머와 같은 서방성(sustained release) 매트릭스 내로 함침될 수 있고, 상기 폴리머는 인도가 희망되는 곳의, 예를 들어, 중앙 사이트 부근에 삽입(implant)될 수 있다. 상기 방법은 단일 용량의 투여, 미리결정된 시간 간격에서의 반복 용량의 투여, 및 미리결정된 시기에 대한 지속 투여(sustained administration)를 포함한다.
- [0424] 본원에서 사용된 서방성 매트릭스는 재료, 일반적으로 효소적 또는 산/염기 가수분해 또는 용해(dissolution)에 의해 분해가능한 폴리머로 제조된 매트릭스이다. 체내에 삽입되면, 상기 매트릭스는 효소 및 체액에 의해 작용한다. 상기 서방성 매트릭스는 리포솜, 폴리락티드(폴리락티드산), 폴리글리콜리드(글리콜산의 폴리머), 폴리락티드 코-글리콜리드(락트산과 글리콜산의 코폴리머), 폴리안하이드라이드(polyanhydride), 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩타이드, 히알루론산, 콜라겐, 황산콘드로이틴, 카르복실산, 지방산, 인지질, 다당류, 핵산, 폴리아미노산, 페닐알라닌, 타이로신, 이소류신과 같은 아미노산, 폴리뉴클레오티드, 폴리비닐 프로피렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘과 같은 생체적합한 재료에 의해 바람직하게 선택된다. 바람직한 생분해성 매트릭스는 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 폴리락티드 코-글리콜리드(락트산 및 글리콜릭산의 코폴리머)의 어느 하나인 매트릭스이다.
- [0425] 상기 조성물의 투여량이 예를 들어, 처리될 대상의 상태, 사용되는 특정 조성물, 및 환자의 체중, 키, 성별 및 일반적 건강 상태와 같은 다른 임상적 요소, 체표면적, 투여될 특정 화합물 또는 조성물, 동시에 투여될 다른 약물, 및 투여 경로와 같은 여러 요소에 의존적일 것임은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0426] 상기 조성물은 생물학적 활성 화합물 또는 화합물, 상세하게는 산화적 스트레스에 대한 화합물, 항-자가사멸 화합물, 금속 킬레이터, 피렌제핀 및 대사물과 같은 DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술폰산(3APS), 1,3-프로판디술폰에이트(1,3PDS), 세크레타아제 활성화제, β - 및 γ -세크레타아제 억제제, 타우 단백질, 신경전달물질, β -시트 파괴제, 항-염증 분자, 예를 들어, 클로자핀, 지프라시돈, 리스페리돈, 아리피프라졸 또는 올란자핀과 같은 "비전형적 항정신병약" 또는 타크린, 리바스티그민, 도네페질, 및/또는 갈란타민과 같은 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs) 및 다른 약물 및 예를 들어, 비타민 B12, 시스테인, 아세틸콜린의 전구체, 레시틴, 콜린, 은행(Ginkgo biloba), 아세틸-L-카르니틴, 이데베논(idibenone), 프로펜토피린(propentofylline) 또는 크산틴 유도체와 같은 영양 보조제로 구성되는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 화합물과, 본 발명의 항체 및, 선택적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제 및 질환의 치료를 위한 과정을 함께 포함할 수 있다.
- [0427] 단백질성(Proteinaceous) 약제학적 활성 물질은 용량당 1 ng 내지 10 mg의 양으로 존재할 수 있다.

일반적으로, 투여의 투약 계획(regime)은 본 발명의 항체의 0.1 μ g 내지 10mg의 범위 내, 상세하게는 1.0 μ g 내지 1.0mg 내에, 보다 상세하게는 1.0 μ g 내지 100 μ g 내에 있어야 하며, 각각의 개별적 수는 본 발명의 일부가 되는 범위 내에 있어야 한다. 만약 투약이 지속 주입을 통해 일어난다면, 보다 바람직한 투여량은 시간당 킬로그램 체중당 0.01 μ g 내지 10 mg의 범위 내에 있을 수 있으며, 각각의 개별적 수는 본 발명의 일부가 되는 범위 내에 있어야 한다.

[0428] 투여는 일반적으로 비경구적으로 예를 들어, 정맥내로일 것이다. 비경구적 투여를 위한 제제는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 에멀션을 포함한다. 비수성 용매는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올리에이트(ethyl oleate)와 같은 주사가 가능한 유기 에스테르를 포함하나 제한되는 것은 아니다. 수성 용매는 염수 및 완충 매체를 포함하는 물, 알코올/수성 용액, 에멀션 또는 현탁액으로 구성되는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 비경구적 비히클(vehicle)은 염화나트륨 용액, 링거의 텍스트로오스(Ringer's dextrose), 텍스트로오스 및 염화나트륨, 락테이트가 첨가된 링거(lactated Ringer's), 또는 고정유(fixed oil)를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제(nutrient replenisher), (링거의 텍스트로오스에 기재한 것들과 같은) 전해질 보충제 및 그 외를 포함한다. 예를 들어, 항균제(antimicrobial), 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스(inert gas) 등과 같은 방부제도 존재할 수 있다.

[0429] 약제학적 조성물은 예를 들어, 혈청 알부민 또는 면역글로불린, 상세하게는 인간 기원의 혈청 알부민 또는 면역글로불린과 같은 단백질성 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물 내에는 의도된 용도에 따라 추가의 생물학적 활성제가 존재할 수 있다.

[0430] 추가의 구체예에서 본 발명은, 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 검출 및 진단을 위한, 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 소인(predisposition)을 진단하기 위한, 또는 환자에서의 최소 잔류 질환(minimal residual disease)을 모니터링 하기 위한 또는 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체 또는 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위한 방법 및 키트를 제공한다. 이들 방법은 생물학적 샘플 내에서 또는 인 시투 조건에서 물질을 검출 또는 정량하기 위해 일반적으로 사용되는 공지의 면역학적 방법을 포함한다.

[0431] 환자에서의 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 진단, 또는 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 소인의 진단은 샘플 내 또는 인 시투의 아밀로이드 단백질의 에피토프에의 단일클론성 항체 또는 이의 활성 절편의 면역특이적 결합을 검출함으로써 달성될 수 있으며, 이는 아밀로이드 항원을 함유하는 것으로 추측되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 영역을 아밀로이드 단백질의 에피토프에 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 상기 항체가 상기 아밀로이드 항원에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 것, 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 것, 및 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 영역 내의 아밀로이드 항원의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 것, 선택적으로 상기 면역복합체의 양을 정상 대조군 값과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 정상 대조군 값과 비교되는 상기 결집물(aggregate)의 양의 증가는 상기 환자가 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 걸렸거나 또는 상기 질환으로 발전할 위험이 있는 것을 나타낸다.

[0432] 본 발명의 항체 또는 백신 조성물로 치료 후 환자에서 최소 잔류 질환을 모니터링 하는 것은 샘플 내 또는 인 시투 아밀로이드 단백질의 에피토프에의 단일클론성 항체 또는 이의 활성 절편의 면역특이적 결합을 검출함으로써 달성될 수 있고, 이는 아밀로이드 항원을 함유하는 것으로 추측되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 영역을 아밀로이드 단백질의 에피토프에 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 상기 항체가 상기 아밀로이드 항원에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 것, 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 것, 및 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 영역 내의 아밀로이드 항원의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 것, 선택적으로 상기 면역복합체의 양을 정상 대조군 값과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 정상 대조군 값과 비교되는 상기 결집물의 양의 증가는 상기 환자가 여전히 최소 잔류 질환에 걸려 있음을 나타낸다.

[0433] 본 발명의 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하는 것은 샘플 내 또는 인 시투 아밀로이드 단백질의 에피토프에의 단일클론성 항체 또는 이의 활성 절편의 면역특이적 결합을 검출함으로써 달성될 수 있고, 이는 아밀로이드 항원을 함유하는 것으로 추측되는 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 신체 영역을 아밀로이드 단백질의 에피토프에 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 상기 항체가 상기 아밀로이드 항원에 결합하여 면역복합체를 형성하도록 하는 것, 상기 면역복합체의 형성을 검출하는 것, 및 상기 면역복합체의 존재 또는 부재를, 샘플 또는 특정 신체 부분 또는 영역 내의 아밀로이드 항원의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 것, 선택적으로 상기 치료의 착수 전과 후의 상기 면역복합체의 양을 비교하는 것을 포함하며, 여기서 상기 결집물의 양의 감소는 상기 환자가 치료에 대한 반응할 높은 잠재성을 가짐을 나타낸다.

[0434] 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 검출에서, 아밀로이드-관련 질환 또는 병태의 소인을 진단하기 위해, 또는

환자에서의 최소 잔류 질환을 모니터링 하기 위해 또는 본원에서 전술한 바와 같은 본 발명의 항체 또는 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위해 사용될 수 있는 생물학적 샘플은 예를 들어, 혈청, 혈장, 타액, 소화분비물, 점액, 적수액, 림프액 등과 같은 유체, 또는 신경, 뇌, 심장 또는 혈관 조직과 같은 유기체로부터 수득한 조직 또는 세포 샘플이다. 샘플 내의 아밀로이드 항원의 존재 또는 부재를 측정하기 위해, 예를 들어, 검출을 위한 이차 시약을 사용하는 간접적 검출 방법을 사용하는 어세이, ELISA's 및 면역침강 및 응집(agglutination) 어세이와 같은 당업계의 보통의 기술자에게 알려진 임의의 면역어세이 (Harlow 및 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612) 참조)가 사용될 수 있다. 이들 어세이의 상세한 설명은 예를 들어, Maertens 및 Stuyver의 W096/13590, Zrein 등 (1998), 및 W096/29605에 주어진다.

[0435] 인 시투 진단을 위해, 항체 또는 이의 모든 활성 및 작용부는 예를 들어, 정맥내, 비강내, 복막내, 뇌내, 동맥내 주사와 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 진단될 유기체에 투여될 수 있으며, 이로서 본 발명의 항체와 아밀로이드 항원 사이의 특이적 결합이 발생할 수 있다. 항체/항원 복합체는 표지를 상기 항체 또는 이의 작용적 절편에 부착하는 것을 통해 검출될 수 있다.

[0436] 면역어세이는 진단적 적용에 또는 아밀로이드-관련 질환 또는 병태에 대한 소인을 진단하기 위한 적용 또는 환자에서 최소 잔류 질환을 모니터링하기 위한 적용 또는 본원에서 전술된 본 발명의 항체 또는 백신 조성물로의 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하기 위한 적용에 사용된다. 일반적으로 검출을 위한 표지된 항원, 항체, 또는 이차 시약에 의존한다. 이들 단백질 또는 시약은 효소, 방사능동위원소, 및 형광물질, 발광물질 및 콜로이드 금 및 라텍스 비드와 같은 착색 입자를 포함하는 발색성(chromogenic) 물질을 포함하는 일반적으로 당업자에게 알려진 화합물로 표지될 수 있다. 이들 중, 방사능 표지는 대부분의 모든 유형의 어세이를 위해 또한 대부분의 변형물과 사용될 수 있다. 효소-컨쥬게이트된 표지는 방사능활성이 회피되어야 할 때 또는 빠른 결과가 필요할 때 특히 유용하다. 그들의 사용에 값비싼 장비가 요구되지만, 형광 색소(fluorochrome)은 매우 민감한 검출 방법을 제공한다. 이들 어세이에 유용한 항체는 단일클론성 항체, 다클론성 항체, 및 친화도 정제된 다클론성 항체를 포함한다.

[0437] 또는, 상기 항체는 단백질 A 또는 G와 같은 면역글로불린 또는 이차 항체에 대한 친화도를 갖는 표지된 물질과의 작용에 의해 간접적으로 표지될 수 있다. 상기 항체는 이차 물질과 컨쥬게이트될 수 있고, 상기 항체에 컨쥬게이트된 상기 이차 물질에 대한 친화도를 갖는 표지된 삼차 물질(third substance)로 검출될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 비오틴에 컨쥬게이트될 수 있고, 상기 항체-비오틴 컨쥬게이트는 표지된 아비딘 또는 스트렙트아비딘을 사용하여 검출될 수 있다. 유사하게, 상기 항체는 합텐에 컨쥬게이트 될 수 있고, 상기 항체-합텐 컨쥬게이트는 표지된 항-합텐 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0438] 당업자는 이들 및 다른 적절함 표지가 본 발명에 따라 사용될 수 있음을 알 것이다. 이들 표지의 항체 또는 이의 절편에의 결합은 당업자에게 일반적으로 알려진 표준 기술을 이용하여 달성될 수 있다. 일반적인 기술은 Kennedy, J. H., 등, 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31), 및 Schurs, A. H. W. M., 등 1977 (*Clin. Chim Acta* 81 :1-40)에 의해 기재되었다. latter에 언급된 커플링 기술은 글루타르알데하이드 방법, 과요오드산염 (periodate) 방법, 디말레이미드 방법, 및 그 외이고, 이들 모두는 본원에 참조로서 삽입되었다.

[0439] 통용되는 면역어세이는 분석물의 존재를 검출하기 위해 이중 항체 방법을 사용하고, 여기서, 상기 항체는 검출 가능한 표지로 표지된 이차 항체와의 반응성에 의해 간접적으로 표지된다. 상기 이차 항체는 바람직하게는 단일클론성 항체가 유래된 동물의 항체에 결합하는 것이다. 바꿔 말하면, 만약 상기 단일클론성 항체가 마우스 항체라면, 표지된 이차 항체는 항-마우스 항체이다. 이하에 기재된 어세이에서 사용되는 단일클론성 항체에 대해, 이 표지는 바람직하게는 항체-코팅된 비드, 상세하게는 자성 비드이다. 본원에 기재된 면역어세이에서 사용되는 다클론성 항체에 대해, 상기 표지는 바람직하게는 방사성(radioactive), 형광 또는 전기화학발광 물질과 같은 검출가능한 분자이다.

[0440] 분석물의 존재의 빠른 측정에 유연하게 변경되는 것에서 종종 빠른 포맷 시스템으로 언급되는, 선택적인 이중 항체 시스템(alternative double antibody system)은 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있다. 상기 시스템은 항체와 분석물 간에 높은 친화도를 요구한다. 본 발명의 일 구체예에 따라, 아밀로이드 항원의 존재는 각각 아밀로이드 항원에 특이적인 한쌍의 항체를 사용하여 측정된다. 상기 한쌍의 항체 중 하나는 "검출자 항체 (detector antibody)"로서 본원에서 언급되고, 상기 한쌍의 항체 중 다른 하나는 "포획 항체(capture antibody)"로서 본원에서 언급된다. 본 발명의 단일클론성 항체는 포획 항체 또는 검출자 항체 중 어느 것으로든 사용될 수 있다. 본 발명의 단일클론성 항체는 단일 어세이에서 함께, 포획 및 검출자 항체 모두로서 사용

될 수 있다. 따라서 본 발명의 일 구체에는 생물학적 유체인 샘플 내에서 아밀로이드 항원을 검출하기 위해 이중 항체 샌드위치 방법을 사용한다. 이 방법에서, 상기 분석물(아밀로이드 항원)은 검출자 항체와 포획 항체 사이에 샌드위치되고, 상기 포획 항체는 고체 지지체 상에 불가역적으로 고정된다. 상기 검출자 항체는 항체-분석물 샌드위치의 존재를 확인하여 상기 분석물의 존재를 확인하기 위해 검출가능한 표지를 함유한다.

[0441] 폴리스티렌의 마이크로타이터(microtiter) 플레이트, 테스트 튜브, 자성, 플라스틱 또는 유리 비드 및 슬라이드를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 대표적인 고체상 물질(solid phase substance)은 방사면역어세이(radioimmunoassay) 및 효소 면역어세이 분야에 공지되어 있다. 항체를 고체상에 커플링시키기 위한 방법 또한 당업자에게 공지되어 있다. 보다 최근에, 나일론, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 유리섬유 및 다른 다공성 폴리머와 같은 몇 가지의 다공성 물질이 고체 지지체로서 사용되어왔다.

[0442] 본 발명은 또한 생물학적 샘플 내의 아밀로이드 항원을 검출하기 위한, 상기에 정의된 바와 같은 조성물을 포함하는 진단 키트에 관한 것이다. 게다가, 본 발명은 상기에 정의된 바와 같은 조성물에 추가로, 상기에 정의된 바와 같은 검출 시약도 포함하는 후자(latter)의 진단 키트에 관한 것이다. 용어 "진단 키트"는 일반적으로 당업계에 공지된 모든 진단 키트를 나타낸다. 보다 명확하게, 후자의 용어는 Zrein 등 (1998)에 기술된 바와 같은 진단 키트를 나타낸다.

[0443] 본 발명의 또 다른 목적은 아밀로이드-관련 질환 및 병태의 검출 및 진단을 위한 본 발명의 항체를 포함하는 면역프로브(immunoprobe) 및 테스트 키트를 제공하는 것이다. 면역프로브를 위해, 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 적절한 리포터 분자, 예를 들어 효소 또는 방사성 핵종(radionuclide)에 부착된다. 테스트 키트는, 본 발명의 하나 이상의 항체를 유지하는 용기, 및 아밀로이드 항원에의 결합하여 면역복합체를 형성하기 위해 상기 항체를 사용하고, 또한 상기 면역복합체의 존재 또는 부재(absence)가 아밀로이드 항원의 존재 또는 부재와 서로 관련이 있으므로, 상기 면역복합체의 형성을 검출하기 위한 설명서를 포함한다.

[0445] (실시예)

[0446] 항원은 마우스 단일클론성 항체를 생성하기 위해 사용되었다.

마우스 mAb	항원/서열	링커	앵커	보조제
mACI-01-Ab7	Aβ ₁₋₁₆	PEG	DSPE	지질 A
mACI-02-Ab6	Aβ ₁₋₁₆ (Δ14)	PEG	DSPE	지질 A
mACI-11-Ab9	Aβ ₂₂₋₃₅	PEG	DSPE	지질 A
mACI-12-Ab11	Aβ ₂₉₋₄₀	PEG	DSPE	지질 A
mACI-24-Ab4	Aβ ₁₋₁₅	-	팔미트산	지질 A

[0447] [0448] 표 1. 항체 및 상기 항체를 생성하기 위해 사용된 항원성 구조체

[0450] 실시예 1: 팔미토일화된 Aβ₁₋₁₅ 초분자 항원성 구조체의 제조하기 위한 방법

[0451] 테트라(팔미토일 라이신)-Aβ₁₋₁₅ 펩타이드 항원의 합성

[0452] 팔미토일화된 아밀로이드 1-15 펩타이드는 개선된, 이전에 보고된 방법에 따라 합성되었다 (Nicolau 등 2002). 이 새로운 방법은 변형된 아미노산 9-플루오레닐메톡시카르보닐 Fmoc-Lys(Pal)-OH를 혼입시키는 순차적인 고체상 합성보다는 오히려 미리-형성된 펩타이드의 말단 Lys 잔기에의 팔미트산의 수지상 그래프팅을 포함한다. 이 신규한 방법은 커플링 효율을 개선시키고, 상당히 더욱 높은 순도의 생산물을 제공한다. 따라서, 직교하여(orthogonally) 보호된 아미노산 Fmoc-Lys(Mtt)-OH는 [2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트] (HBTU) 커플링 케미스트리를 이용하여 왕 수지(Wang resin)에 부착시켰다. Fmoc기는 DMF에 녹인 20% 피페리딘을 이용하여 제거하였으며, 두번째 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 잔기를 커플링시켰다. 그 후 서열 식별 번호: 1에 주어진 바와 같은 펩타이드 서열을 산출하기 위해, Fmoc/tBu 케미스트리를 이용하는 표준의 자동화된 펩타이드 합성 및 표준의 측쇄 보호기를 그 다음의 15 아미노산에 커플링하기 위해 사용하였다. 마지막으로, 커플링된 마지막 두 아미노산은 Fmoc-Lys(Mtt)-OH였다. 그 후 Mtt기는 디클로로메탄에 녹인 1% 트리

플루오로아세트산(TFA)을 이용하여 선택적으로 분할시킨 후, HBTU를 이용하여 팔미트산에 커플링시켰다. 수지를 세척한 후, Fmoc기는 디메틸포름아미드(DMF)에 녹인 20% 피페리딘으로 제거하였으며, 마지막으로 동시 수지 분할 및 측쇄 탈보호(deprotection)를 표준 조건 하에 TFA를 이용하여 수행하였다. 차가운 디에틸 에테르로 분쇄하여 흰 고체인 생산물을 수득하였다.

[0453] 전기분무 질량 분광분석법으로, 어떠한 다른 트리-,디- 또는 모노-팔미토일화된 펩타이드는 검출되지 않은, 상기 생산물의 동일성을 확인하였다 (m/z 기대값: 1097.9 ([M]3+); 측정값: 1096.8 ([M-3H]3+).

[0455] **실시예 2: 초분자 항원성 구조체를 제조하기 위한 방법**

[0456] *Peg화된 β-아밀로이드 펩타이드 항원의 합성*

[0457] 면역 반응을 향상시키기 위해, 다른 앵커/스페이서, 그 예로서, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 리포솜 내에서 펩타이드를 재구성하기 위해 적용되어왔다. PEG는 펩타이드의 양 말단 모두에 결합된 라이신 잔기에 공유적으로 부착되었다. 사슬(PEGn=70)의 다른 단부에서 포스포티딜 에탄올 아민(PEA)은 공유적으로 결합되어 리포솜 이중층 내에서 앵커링 요소로서 작용한다. 따라서, 리포솜은 보조제로서 작용하고, 이중층으로부터 충분히 멀리 떨어진 펩타이드는 단독으로 처리될 수 있어, 그의 면역원성은 팔미토일화된 항원에 비교하여 증가한다.

[0458] 본원에서 기술된 초분자 구조체는 표준 Fmoc/tBu 아미노산 측쇄 보호를 이용하여 독특하게 합성하였다. 일반적으로, 펩타이드의 위치이성질체의 혼합물을 야기한다. 본원에서 Aβ의 C- 및 N-말단 모두에의 PEG-지질 컨쥬게이트의 사이트-특이적인 부착을 위한 편리한 방법은 부분적으로 보호된 펩타이드를 사용하는 것으로 증명된다.

[0459] 내부 Lys 또는 His 잔기 (1-16, 1-16Δ14, 22-35)를 함유하는 이들 펩타이드 서열을 위해, 직교하여 보호된 Lys(ivDde)를 각 말단에 추가하였다. 합성을 용이하게 하기 위해 추가적 Gly를 C-말단에 추가하였다. Fmoc기는 DMF에 녹인 20% 피페리딘으로 제거하였으며, 아세트산 무수물을 이용하여 N-아세틸화시켰다. DMF에 녹인 3% 히드라진 수화물을 1시간 동안 처리하여 ivDde기의 선택적 분할을 달성하였다. 2-클로로트리틸 수지는 히드라진분해(hydrazinolysis)에 보다 저항성이 좋은 것으로 입증되어 보다 널리 사용된 왕 수지에 비해 선호된다. 또한, 상기 2-클로로트리틸 수지는, 왕 수지와는 달리, 매우 산 민감성이므로, 보호된 펩타이드의 단리가 가능하다. 실제로, 이는 액체상에서의 어떠한 커플링 생산물도 생성시키지 않는 미리-활성화된 peg화된 지질 시약 DSPE-PEG-SPA에의 수지-결합 펩타이드의 커플링인 커플링 반응을 수행하기 위해 필요하였다. 따라서 온화한 조건(아세트산 / 트리플루오로에탄올 / 디클로로메탄, 1:1:8, 1시간, rt) 하에서 수지로부터의 선택적인 분할은 내부적으로 보호된 펩타이드를 산출하였다.

[0460] DMSO에 녹인 DSPE-PGE-SPA에의 액체상 커플링이 서열 Aβ₁₋₁₆ (서열 식별 번호: 2)로부터 유도된 펩타이드 및 과량의 염기로 성공적으로 달성되었다. 그 후 상기 반응은 과량의 에탄올아민을 2시간 동안 첨가하여 퀴치시켰으며, 용액은 동결건조하였다.

[0461] 서열 29-40에 대해서는, 어떠한 특별한 보호 전략도 요구되지 않는다.

[0462] HPLC (반-분취(semi-preparative) 역상 C₄ 컬럼)에 의한 정제는, 그의 동일성이 매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화(matrix assisted laser desorption ionization; MALDI)에 의해 확인된, 50-70% 순도의 N- 및 C-말단 PEG-지질 컨쥬게이트(conjugate)를 제공한다. 각 서열은 커플링 반응의 용이면에서 상당한 변화를 나타내었으며, 조건은 (온도, 몰 당량 DSPE-PEG-SPA의 수, 시간)에 따라 조정하였다. 원하는 생산물로부터 과량의 DSPE-PEG-SPA의 분리를 위해 HPLC 정제를 적용하였다. 최종 측쇄 탈보호 이전의 모노- 및 디-커플된 생산물의 분리는 양이온-교환 크로마토그래피를 사용함으로써 달성될 수 있다. 그 후 펩타이드 측쇄 탈보호 및 과량의 퀴치된 DSPE-PEG-SPA의 분리는 허용가능한 순도의, 원하는 컨쥬게이트가 단리되도록 한다.

[0463] 이 보호된 펩타이드를 사용하는 N- 및 C-말단 지질-PEG β-아밀로이드 항원의 합성을 위한 수법은 펩타이드 서열의 폭넓은 다양성에 적용할 수 있다.

[0465] **실시예 3: 초분자 항원성 구조체에 의해 유발된 항체**

[0466] 3.1 팔미토일화된 Aβ₁₋₁₅ 초분자 항원성 구조체에 대해 생성된 mAbs의 제조

- [0467] PEG화된 항원 (ACI-24, A β ₁₋₁₅)은 C57BL/6 마우스에서의 면역화를 위해 2주 간격으로 사용하였다. 10-12마리의 동물들을 각 항원으로 면역화시켰다 (8 nmole 펩타이드를 함유하는 주사 부피: 200 μ l). 마지막 주사는 동물을 희생시키기 4일 전에 수행하였다. 5회 추가접종한 후 치료적 역가(ELISA에서 혈청을 1:5,000 희석했을 때 양성)를 갖는 마우스를 융합을 위해 선별하였다. 면역화된 동물로부터 비장 세포를 수합하였으며, 감각된 비장 세포를 골수종(myeloma) 세포주와 융합함으로써 하이브리도마를 생성하였다. 마우스의 비장으로부터의 B-림프구와 골수종 세포주 SP2-0. (ATCC, Manassas, VA)의 세포의 융합은 Kohler와 Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) 및 Harlow와 Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))의 공지된 과정을 이용하여 수행하였다.
- [0468] 폴리에틸렌 글리콜을 첨가하여 상기 세포가 융합되도록 유도하였다. 결과물인 하이브리드 세포는 그 후 클론의 성장시키기 위한 통상적인 방법으로 10 \pm 14일 동안 배양하였다. 최초 클론 선별은 한계 희석(limiting dilution)이용하여 수행하였다. IgG를 생산하는 하이브리도마 클론을 선별하였으며, ELISA로 A β ₁₋₄₂ 펩타이드에의 특이적 결합에 대해 테스트하였고, 상기 결과물인 희망하는 단일클론성 항체를 생산하는 클론을 배양하였다.
- [0469] 이렇게 수득된 하이브리도마는 하이포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)을 함유하는 선별 배지(HAT)에 세포를 플레이팅하여 화학적으로 선별하였다.
- [0470] 하이브리도마는 그 후 특정 아밀로이드-관련 질환 또는 장애에 대한 단일클론성 항체를 생산하는 능력에 대해 스크린하였다. 모클론은 확인한 후, 이는 단일클론성을 확인하기 위해 4번 서브클론(subclone)하였으며, 상기 하이브리드는 안정화시켰다.
- [0471] 본 발명의 목적을 위해, "단일클론성 항체"는 완전한 단일클론성(full monoclonality)에 미치지 도달하지 않은 모클론(mother clone)에 의해 생산된 항체를 포함하는 것으로도 이해된다
- [0472] 관심있는 항체를 생산하는 하이브리도마는 클론하고, 수를 늘리고 또한 이후의 생산을 위해 동결하여 보관하였다.
- [0473] 상기 항체는 상업적으로 입수 가능한 마우스 단일클론성 이소타이핑(isotyping) 키트로 이소타이핑하였으며, 안정적인 클론은 무혈청 배지에 순응시키고, 항체 생산을 위한 생물반응기(bioreactor)에 두었다.
- [0474] 바람직한 하이브리도마는 IgG 이소타입, 보다 바람직하게는 IgG1 이소타입을 갖는 단일클론성 항체를 생산한다.
- [0475] 3.2Peg화된 PEG-A β ₁₋₁₆, A β ₄₋₁₁, A β ₂₂₋₃₅ 초분자 항원성 구조체에 대해 생성된 mAbs의 제조
- [0476] 리포솜 항원은 기술된 바와 같이 준비하였다 (Nicolau 등, 2002, PNAS, 99, 2332-37). 서열 PEG-A β ₁₋₁₆, A β ₄₋₁₁, A β ₂₂₋₃₅ 및 A β ₂₉₋₄₀(도 1)은 모노포스포릴 지질 A(40mg/mM 인지질)를 함유하는, 디미리스토일 포스파티딜 콜린(dimyristoyl phosphatidyl choline; DMPC), 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(dimyristoyl phosphatidyl ethanolamine; DMPEA), 디미리스토일 포스파티딜 글리세롤(dimyristoyl phosphatidyl glycerol; DMPG) 및 콜레스테롤(0.9: 0.1: 0.1: 0.7 몰비)로 제조된 리포솜으로 구성된 구조체 내에서 재구성되었다. 이들 항원 및 peg화된 A β ₁₋₁₆은 C57BL/6 마우스에서의 면역화를 위해 2주 간격으로 사용하였다. 10-12마리의 동물들을 각 항원으로 면역화시켰다. 3 내지 6회 추가접종(boosting)하고, 치료적 역가(ELISA에서 혈청을 1:5,000 희석했을 때 양성)를 갖는 마우스를 융합을 위해 선별하였다. 면역화된 동물로부터 비장 세포를 수합하였으며, 감각된 비장 세포를 골수종(myeloma) 세포주와 융합함으로써 하이브리도마를 생성하였다. 마우스의 비장으로부터의 B-림프구와 골수종 세포주 SP2-0. (ATCC, Manassas, VA)의 세포의 융합은 Kohler와 Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) 및 Harlow와 Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))의 공지된 과정을 이용하여 수행하였다.
- [0478] *폴리에틸렌 글리콜을 첨가하여 상기 세포가 융합되도록 유도하였다. 결과물인 하이브리드 세포는 그 후 통상적인 방법으로, 예를 들어, 한계 희석(limiting dilution)을 이용하여 클론(clone)하였다. IgG를 생산하는 하이브리도마 클론을 선별하였으며, ELISA로 A β ₁₋₄₂ 펩타이드에의 특이적 결합에 대해 테스트하였고, 상기 결과물인 희망하는 단일클론성 항체를 생산하는 클론을 배양하였다.
- [0479] 이렇게 수득된 하이브리도마는 하이포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘

(thymidine)을 함유하는 선별 배지(HAT)에 세포를 플레이트하여 화학적으로 선별하였다.

[0480] 하이브리도마는 그 후 특정 아밀로이드-관련 질환 또는 장애에 대한 단일클론성 항체를 생산하는 능력에 대해 스크린하였다. 관심있는 항체를 생산하는 하이브리도마는 클론하고, 수를 늘리고 또한 이후의 생산을 위해 동결하여 보관하였다. 바람직한 하이브리도마는 IgG 이소타입, 보다 바람직하게는 IgG1 이소타입을 갖는 단일클론성 항체를 생산한다.

[0482] **실시예 4: 항체 mACI-24-Ab4에 대한 특이성 측정**

[0483] 항체 ACI-24-Ab4의 특이성을 분석하기 위해, 상이한 농도의, 미리 형성된 아밀로이드 1-42, 1-40 및 1-38 원섬유를 Hybond ECL 니트로셀룰로오스 막(Amersham Biosciences) 상에 블롯(blot)하였다. 10% 건조 밀크 및 0.7% 트윈 20으로의 블로킹 후, 막은 20 µg/ml의 일차 항체와 RT에서 2h동안 인큐베이트하였다. 세척 후, 막은 서양 고추냉이 페록시다아제가 컨쥬게이트된 양(sheep) 항-마우스 IgG 항체(Amersham Biosciences)와 RT에서 1 h동안 인큐베이트하였으며, 세척하고 화학발광 용액과 인큐베이트한 후, 상기 막을 X-선 필름에 노출시켰다.

[0484] mAb mACI-24-Ab4의 아밀로이드 β 1-42 섬유로의 결합을 측정하기 위해, Aβ 1-42, 1-40 및 1-38 섬유는 7일간 37°C에서 미리-형성시켰으며, 막 상에 블롯하였다. 20 µg/ml 항체는 결합 능력을 측정하기 위해 사용하였으며, 결합된 항체는 서양 고추냉이 페록시다아제가 컨쥬게이트된 양 항-마우스 IgG 항체로 20분간 방치하여 검출하였다.

[0485] 도트 블롯(Dot Blot) 분석에 의해 증명할 수 있던 바와 같이, 항체 mACI-24-Ab4는 상이한 미리-형성된 Aβ 섬유에 상이한 민감도로 결합한다. 상기 항체는 Aβ₁₋₄₀ 또는 Aβ₁₋₃₈보다 Aβ₁₋₄₂ 섬유에 대해 가장 높은 결합 민감도를 나타낸다. 이는 적어도 0.001µg의 Aβ₁₋₄₂ 섬유를 검출할 수 있으나 반면 Aβ₁₋₄₀ 섬유에 대한 항체의 검출 한계는 적어도 0.1µg이고, Aβ₁₋₃₈ 섬유에 대해서는 1µg으로, 이는 아밀로이드 섬유의 이들 유형에 대한 민감도가 100배 내지 1000배 더 낮다는 것을 의미한다. 이 데이터는 상기 항체 ACI-24-Ab4가 이차 배좌의 변화에 의해 불용성이 되어 AD 환자의 뇌 내 아밀로이드 플라크의 주요부가 되는 것으로 알려진 아밀로이드 형태 (1-42)에 적어도 100배 더 민감한 것을 증명한다.

[0487] **실시예 5: 웨스턴 블롯 및 도트 블롯에서, 에이씨 이문의 단일클론성 항체 mACI-01-Ab7 C2의 아밀로이드 종에 대한 결합**

[0488] 마우스 항체 mACI-01-Ab7 C2의 결합이 Aβ의 고유 배좌에 의존적인지를 측정하기 위해, 웨스턴 블롯에 의한 선형화된 아밀로이드 결합 또는 도트 블롯 상의 고유 아밀로이드에 대한 비교를 수행하였다 (도 2a 및 2b).

[0489] 아밀로이드 모노머는 Aβ 1-42 펩타이드를 HFIP에 용해시키고, 용매를 아르곤 하에서 증발시켜 생성하였다. 건조된 펩타이드 필름은 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다. 모노머의 조제를 위해, 상기 펩타이드 필름을 DMSO에 2.75µg/µl의 농도로 재현탁시키고, PBS에서 1µg/µl로 희석시켰다. 올리고머의 조제를 위해, 건조된 펩타이드 필름은 DMSO에 5mM로 재현탁시키고, 초음파처리하였으며(sonicate), 400uM 아밀로이드가 되도록 PBS를 첨가하고, 이어서 최종 농도 0.2%가 되도록 SDS를 첨가하였다. 37°C에서 인큐베이션하고 6시간 후, 아밀로이드는 물에서 최종 농도 100 µM로 희석시키고, 다시 37°C에서 18시간 동안 인큐베이트하였다. 아밀로이드 올리고머는 빙냉한(ice-cold) 33% 메탄올, 4% 아세트산 용액으로 4°C에서 1시간 동안 침전시켰으며, 16200g에서 10분간 스피ن 다운하였으며, 펠렛은 5mM Na2H2PO4, 35mM NaCl pH 7.4에서 최종 농도 1 µg/µl로 재현탁시켰다. 섬유의 조제를 위해, 펩타이드 필름은 Tris-HCl 50mM 완충액에서 1mg/ml 농도의 아밀로이드를 수득하기 위해 희석시켰으며, 37°C에서 5시간 동안 인큐베이트하였다. 튜브는 10000g에서 5분간 회전시켰으며, 펠렛은 0.1 M 카보네이트 완충액 (pH 9.6)에서 1 µg/µl이 되도록 재현탁시켰다.

[0490] 1 또는 5µg의 모노머, 올리고머 또는 섬유는 PBS에 및 로딩 완충액(loading buffer)에 희석시켰으며, 12% SDS-PAGE에 적용하고, 겔은 니트로셀룰로오스 막에 옮겨졌다. 또는, 3 또는 1 µg 또는 100 및 10ng의 아밀로이드 종은 PBS에 희석시켰으며, 니트로셀룰로오스 막 상에 직접적으로 도트시키고, 상기 막은 RT에서 1시간동안 건조시켰다. 카제인 용액(Vector)으로 30분간 블로킹 후, 상기 막은 카제인 용액에 1µg/ml로 희석된 mACI-01-Ab7 C2 또는 6E10 (Chemicon) 항체와 30분간 인큐베이트하였다. 카제인 용액으로 3회 세척한 후, 상기 막은 카제인 용액에 희석된 HRP-표지된 염소 항-마우스 IgG (Dako Cytomation)와 RT에서 30분간 인큐베이트하였으며, 3회 세

척하고, DAB 기질(Dako Cytomation)로 현상하였다.

- [0491] 도트 블롯 어세이에서, 포지티브 대조군 항체 6E10가 결합한 바와 같이 단일클론성 마우스 항체 mACI-01-Ab7 C2는 모노머, 올리고머 및 섬유에 특이적으로 결합하였다. 대조적으로, 웨스턴 블롯에서, 모든 선형화된 펩타이드를 명확히 인식한 6E10 항체와 대조적으로 상기 mACI-01-Ab7C2 항체는 선형화된 아밀로이드 종은 검출하지 않았다. 이 결과는 아밀로이드에의 mACI-01-Ab7 C2의 결합이 아밀로이드의 고유 구조에 의존적임을 증명한다.
- [0493] **실시예 6: mACI-01Ab7 C2- $A\beta_{1-42}$ 상호 작용**
- [0494] 에이씨 이문 사의 리드(lead) 항체 mACI-01-Ab7 C2 (mC2)와 아밀로이드 펩타이드 간의 상호작용은 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 이용하여 연구하였다. $A\beta_{1-42}$ 의 모노머 또는 섬유 어느 것의 마우스 항체 mACI-01-Ab7 C2의 결합을 측정하였다.
- [0495] 모든 SPR 실험은 Biacore X 기기(Biacore AB) 상에서 수행하였다. 고정화(immobilization)를 위한 시약(EDC, NHS 및 에탄올아민), 센서 칩 CM5 및 SA뿐만 아니라 러닝(running) 및 샘플 완충액 HBS-EP는 Biacore AB로부터 구입하였다. 초산나트륨(sodium acetate)(10 mM, pH 5.0)은 커플링 수율을 증가시키기 위한 커플링 완충액으로서 사용되었다. 원섬유성 $A\beta_{1-42}$ (Bachem)은 $A\beta_{1-42}$ 에 PBS를 최종 농도 3 mg/ml가 되도록 첨가하고, 유리병(vial)을 37°C에 7일간 두어 준비하였다. 원섬유성 $A\beta_{1-42}$ 는 표면-결합 카르복시메틸 텍스트란 매트릭스를 함유하는 CM5 센서 칩에 커플링시켰다. 비오틴화된 모노머성 $A\beta_{1-42}$ (Bachem)는 공유적으로 부착된 스트렙타비딘을 갖는 카르복시메틸 텍스트란 매트릭스로 구성되는 센서 칩 SA에 커플링시켰다. 일반적으로 러닝 완충액을 이용하는 연속 회색에 의한 mAb의 네개 또는 다섯개 농도를 어세이하였다. 주입은 30 μ L/분의 유동 속도에서 3분 동안 가장 낮은 농도로부터 출발하여 fc 1 및 2 모두를 지나가도록 수행하였다. 유동 셀 2는 디리버타이즈(derivatise)되었으며, 응답은 기기 노이즈 및 용적 굴절 변화(bulk refractive change)에 대한 교정을 위해 fc 1로부터 뺐다. 주입을 마친 후, 표면은 즉시 러닝 완충액으로 5분간 세척하였다. $A\beta_{1-42}$ 원섬유로부터 잔류하는 결합 항체를 제거하기 위해, 10 mM NaOH의 주입 펄스에 의한 표면 재형성을 수행하였다. 수치 적분을 위한 알고리즘을 이용하는 동역학적 분석 및 BIAevaluation 3.0을 이용하는 포괄적 분석(global analysis)을 수행하였다. 상이한 농도의 분석물의 주입에 대해 수득한 곡선은 오버레이(overlay)하였으며, 기준선은 제로로 조정하였다. 곡선 피팅을 위해, 모든 데이터는 1:1 균질 복합체에 대해 동시에 피트하였다.
- [0496] 아밀로이드에의 마우스 mACI-01-Ab7 C2 항체의 결합은 상대적으로 강하게 측정되었다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 상기 마우스 항체 mACI-01-Ab7 C2는 3.8×10^{-4} M/s의 평균 회합 상수 (k_a), $1.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 해리 상수 (k_d)를 가져 3.5×10^{-8} M의 결과적인 평균 KD를 갖는 고정화된 $A\beta_{1-42}$ 섬유에 특이적으로 결합하였다. $A\beta$ 모노머에의 mACI-01-Ab7 C2의 회합은 1.6×10^{-4} M/s의 평균 k_a 와 유사하거나 또는 약간 빠르나, 해리는 2.5×10^{-7} M의 KD를 주며 보다 빠르다.

[0498]

표 2

	모노머			섬유		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD (M)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD (M)
mACI-01-Ab7 C2 실험.1	1.8E+04	2.7E-03	1.5E-07	2.4E+04	9.9E-04	4.1E-08
mACI-01-Ab7 C2 실험.2	1.5E+04	5.3E-03	3.5E-07	5.60E+04	9.66E-04	1.73E-08
mACI-01-Ab7 C2 실험.3				3.26E+04	1.49E-03	4.58E-08
평균 mACI-01- Ab7 C2	1.6E+04 ±0.21	4.0E-03 1.84	2.5E-07 1.41	3.8E+04 1.66	1.1E-03 0.3	3.5E-08 1.53

[0499]

[0501]

실시예 7: mACI-01-Ab7 C2 단일클론성 항체의 아밀로이드 섬유에의 결합

[0502]

미리형성된 섬유 상의 항체의 분자 결합면(molecular binding side)을 분석하기 위해, 네가티브 명암의 (negative contrasted) 투과 전자 현미경(TEM)을 수행하였다 (도 3a 및 3b).

[0503]

항체, mACI-01-Ab7 C2는 ^{4, 5}에 따라 8 nm 콜로이드 금과 커플시켰다. 아밀로이드 1-42 ($A\beta_{1-42}$) 섬유의 공동-인큐베이션을 위해 6.65 μ M 섬유는 금-표지된 항체와 1:100의 몰비로 RT에서 24시간 동안 인큐베이트하였다. 이어서, 5 μ l의 샘플을 팔로듐/C 필름으로 덮여진 새로운 글로-방전된 Cu 그리드 (메쉬 200)상에서 45초동안 인큐베이트하고, 물로 3회 및 2% 새로 희석하고 여과된 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 1회 세척하였다. 샘플은 2% 우라닐 아세테이트에서 15-20초간 염색하였다. 그리드 상의 과량의 염색액은 흡입시켰으며, 공기 건조시켰다. 각 샘플당 세 그리드를 준비하였다. 상기 그리드는 투과 전자 현미경 히타치 7000(Hitachi 7000)으로 분석하였다.

[0504]

상기 단일클론성 항체, mACI-01-Ab7 C2,는 $A\beta_{1-42}$ 섬유에 직접적으로 결합한다. 흥미롭게도, 상기 항체는 단일 섬유의 축에 대해서는 어떠한 대칭 결합은 나타내지 않지만, 섬유 네트워크의 끝가지의 모든 구역이 아닌 특정 구역에 결합하는 것으로 나타났다. 상기 항체는 끝가지(side branch) 내의 특정 영역을 표적으로 하는 것으로 보인다. 가능한 해석은 특정 이차 구조가 이 특정 끝가지에서만 발생한다는 것이다. 이 가설은 상기 항체가 배좌 상의 전이를 유도하고, 따라서 이의 결합은 β -시트 구조를 포함하는 아밀로이드 섬유의 배좌에 의존적일 것임을 증명하는 NMR 데이터에 의해 지지된다.

[0506]

실시예 8: 농도-구배 초원심분리에 의한 분획화(Fractionation)

[0507]

$A\beta_{1-42}$ 섬유 중합(polymerization)을 억제하고 $A\beta_{1-42}$ -섬유를 해체시키는 단일클론성 항체의 특성은, 항체와 함께 및 항체 없이 인큐베이트한 후 미리 형성된 구배(OptiPrep™) 상에서의 SDS-PAGE 침강 분석의 결과물인 상이한 크기의 펩타이드 섬유 사이의 분포에 대한 원리를 기초로 하는 농도-구배 초원심분리(Rzepecki 등, 2004)에 의해 연구되었다. 미리형성된 $A\beta$ -섬유 개체수의 동시 분석, 공동-인큐베이트된 항체의 결합 특성의 억제 및 해체, 및 상기 섬유에 대한 항체의 결합은 이 방법의 분명한 이점이다.

[0508]

$A\beta_{1-16}$ 에 대해 생성된 단일클론성 항체(mACI-01-Ab7 C2), $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ 에 대해 생성된 단일클론성 항체(mACI-02-Ab6), $A\beta_{1-15}$ 에 대해 생성된 단일클론성 항체(mACI-24-Ab4), $A\beta_{22-35}$ 에 대해 생성된 단일클론성 항체(mACI-11-Ab9), 및 $A\beta_{29-40}$ 에 대해 생성된 단일클론성 항체(mACI-12-Ab11)는 해체 어세이로 모두 분석되었으나, 결합 특성의 억제는 단일클론성 항체 mACI-02-Ab6, mACI-24-Ab4, and mACI-01-Ab7 C2에 대해서만 연구하였다.

- [0509] $A\beta_{1-42}$ 결집의 억제에 대해, $A\beta_{1-42}$ 모노머는 상이한 두 몰비(MAb보다 30배 또는 100배 더 높은 모노머 $A\beta_{1-42}$ 의 몰비)의 mAb와, 최종 농도 50 μM 의 $A\beta$ 와 함께 인큐베이트하였다. 37°C에서 24 hr 인큐베이트한 후, 샘플은 Optiprep™의 불연속 구배 상에 오버레이(overlay)하고 튜브를 4°C에서 3 hr동안 259 000 g에서 회전시켰다. 15개 분획물을 획득하였으며(각 140 μl), 분획물 1은 구배의 상부(top)로부터의 가장 농도 낮은 분획물이었으며, 분획물 15는 구배의 저부(bottom)로부터의 가장 농도 높은 분획물이었다. 펠렛도 수득하였다. 수합된 분획물은 은 염색(silver staining)을 한 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 억제 어세이를 위한 $A\beta_{1-42}$ 농도는 해체 어세이를 위한 농도의 5배 미만으로, 이는 아밀로이드 결집 동역학을 감소시키고 선상(linear phase) 내에서의 측정을 보장한다.
- [0510] (MAb + $A\beta$ 최종 농도 246 μM 의 모노머 $A\beta_{1-42}$, 상이한 두 몰비 1:30 및 1:100인) MAb와의 공동-인큐베이션에 의한, 미리형성된 $A\beta_{1-42}$ 원섬유의 해체를 위해, 샘플은 37°C에서 24hr동안 인큐베이트하였다. 24 hr 후 샘플은 초원심분리로 분획시키고, 상기한 및 전술한 바와 같이 SDS-PAGE로 분리하였다 (Rzepecki 등, 2004).
- [0511] 8.1 $A\beta_{1-42}$ 결집의 억제 어세이
- [0512] mAb의 첨가 없이 $A\beta$ 펩타이드는 24시간 인큐베이션 시간 후 결집되는 것이 증명될 것이고, 대부분의 단백질은 분획물 13-15에서 발견되며, 이는 $A\beta$ 펩타이드 모노머의 완전한 중합을 증명하는 것이다. 결집의 성공적이고도 유의한 억제는, 더 낮은 농도의 분획물 (10-13) 내에서 발견되어야 하는, 섬유 또는 폴리머성 가용성 아밀로이드 β ($A\beta$) 단백질을 더 적게 야기한다. 정확하게는, 이 밴드에서의 이동은 분획물 11, 12 및 13에 걸친 $A\beta$ 펩타이드의 분포를 나타내는 mACI-01-Ab7 C2를 함유하는 결집 어세이에서 증명될 수 있을 것이다
- [0513] 이는 mACI-01-Ab7 C2가 14에서 13으로 대다수에 대한 밴드(가장 진한 밴드)의 이동 및 분획물 14 내지 펠렛에서 러닝한 밴드의 상당한 가용화를 다시 유발하는 2nd 실험에서 확인되었다. 이는 mACI-01-Ab7 C2가 $A\beta$ 펩타이드 모노머의 섬유로의 중합을 억제하는 강한 능력을 나타내는 것, (분획물 13에서의) $A\beta$ 섬유에 대한 특이적 결합을 나타냄을 의미한다.
- [0514] 항체 mACI-24-Ab4 및 mACI-02-Ab6를 사용할 때 유사한 관찰이 수립되었다. mAb의 첨가 없이, $A\beta$ 펩타이드는 인큐베이트 시간 24 hr 후 결집되고, 대부분의 단백질은 분획물 13 내지 펠렛(12에서 매우 적은 펠렛)에서 발견되며, 이는 $A\beta$ 펩타이드 모노머의 완전한 중합을 증명한다. 결집의 성공적이고도 현저한 억제는, 더 낮은 농도의 분획물에서 발견되어야 하는, 섬유 또는 폴리머 가용성 아밀로이드 β ($A\beta$) 단백질을 더 적게 해야한다. 결집의 억제 어세이에서, mACI-24-Ab4는 대다수에 대한 밴드(가장 강한 밴드)에서의 13에서 11 및 12로의 이동 및 분획물 13 내지 펠렛에서 런(run)한 밴드의 현저한 가용화를 야기하나, 한편 mACI-02-Ab6는 밴드에서의 13에서 10으로의 이동을 유발하고, 더 큰 섬유(13내지 펠렛에서 분획됨) 형성의 완전한 억제를 유발한다. 이들 데이터는, mACI-24-Ab4 및 mACI-02-Ab6 모두가 $A\beta$ 펩타이드 모노머의 섬유로의 중합을 억제하는 강한 능력을 나타내고, 또한 (분획물 11 및 12 내의) $A\beta$ 섬유에 대한 특이적 결합이 밝혀졌음을 의미한다.
- [0515] 대조적으로, mACI-11-Ab9를 1:30 몰비로 함유하는 결집 어세이는 분획 12-15 및 펠렛 사이에 퍼진 더 큰 결집물 (aggregate)을 나타낸다. 1:30 몰비로의 mACI-12- Ab11의 존재하에, 결집물은 분획물 11-15 및 펠렛에서 발견되지만, 분획 11 및 12에서 가장 강한 신호를 갖는다. 이는 mACI-01-Ab7 C2 및 mACI-24-Ab4가 $A\beta$ 펩타이드 모노머의 섬유로의 중합을 억제하기 위한 가장 강한 능력을 나타냄을 의미한다. mACI-12-Ab11은 mACI-01-Ab7 C2보다 현저히 더 적은 억제 특성을 가지며, 이 약한 억제 활성을 수득하기 위해 3배 이상의 몰비가 요구된다. 또한, $A\beta$ 펩타이드 섬유 결집을 억제할 수 없었던 mACI-11-Ab9에 비교할 때 작은(minor) 억제를 관찰할 수 있다. 모든 mAb는 $A\beta$ 섬유에 대한 특이적 결합을 드러낸다 (분획물 11 + 12 내에서 mACI-01-Ab7 C2에 대해; 분획물 12에서는 mACI-11-Ab9에 대해 및 13에서는 약함; 분획물 11 및 12에서 mACI-12-Ab11에 대해).
- [0516] 모든 억제 어세이에서, 펩타이드는 저부 분획물에서 검출된다. 결합되지 않은 mAb (37 kDa, 95 kDa 및 120 kDa 보다 큼)가 구배의 절반의 상부에서 나타났다 (각각, 분획물 3-9 및 4-8).
- [0517] 8.2 $A\beta_{1-42}$ 섬유의 해체 어세이
- [0518] 불완전한 섬유 중합에 기인하는 $A\beta_{1-42}$ 원섬유 단독의 분포는 분획의 보다 폭 넓은 범위(11-15)를 증명한다. 따라서 미리형성된 섬유와의 공동-인큐베이트 시 항체의 성공적이고도 상당한 해체 특성의 증명은 결집 분석에서 보다 더 어렵다. 아밀로이드 단독 분획물 범위 내에서의 더 낮은 농도의 분획물로의 대다수의 섬유의 이동만이 해체 활성을 나타낸다; 아밀로이드 단독에 대한 주요 밴드는 분획물 12이다. 1:100 몰비로의 mACI-01-Ab7 C2의

첨가는, 아밀로이드 단독에 비교하여, 더 낮은 농도의 분획물(still 분획물 11-15 사이)로의 아밀로이드 섬유의 어떠한 이동도 나타내지 않으나, 분획물 범위 내에서 12에서 11로의 보다 강한 신호의 이동을 나타내었다. 불완전 섬유 형성의 비최적 환경임에도 불구하고, mACI-01-Ab7 C2는 낮지만 검출가능한 해체 활성을 나타낸다.

[0519] 대조적으로, 미리형성된 $A\beta_{1-42}$ 원섬유의 mACI-02-Ab6와의 공동-인큐베이션은 동일한 아밀로이드 펩타이드 : mACI-01-Ab7 C2와 같은 항체 몰비로의 인큐베이트 시 보다 낮은 농도 분획물로의 밴드가 이동하지 않음을 증명하였다. 1:30의 3배 이상 높은 몰비가 사용될 때만이 아밀로이드 섬유가 12-15(항체 공동-인큐베이션 없이 아밀로이드 단독)로부터 11-15로 이동하였다. 따라서 mACI-01-Ab7 C2는 mACI-02-Ab6에 비해 보다 높은 해체 특성을 가지는 것으로 보인다.

[0520] 구배의 절반보다 더 낮은 분획물에서의 mAb에 상응하는 밴드의 검출은 $A\beta_{1-42}$ 원섬유의 mACI-02-Ab6 및 mACI-01-Ab7 C2의 결합을 증명한다 (두 mAb에 대해 분획물 11 내지 15).

[0521] mACI-01-Ab7 C2의 해체 특성은, 완전한 섬유 중합이 분획물 13 내지 P(펠렛)에서 항체의 부재 시 $A\beta_{1-42}$ 원섬유의 분포에 의해 증명될 수 있는, 추가의 실험에서 확인될 수 있다. 여기서 미리-형성된 섬유에 공동-인큐베이트될 때 더 낮은 농도의 분획물로의 섬유의 이동은 항체의 해체 활성을 지시한다. 몰비 1:100의 mACI-01-Ab7 C2의 첨가는 아밀로이드 섬유의 대다수의 13에서 12로의 이동을 나타내고, 추가적으로 가장 낮은 농도를 갖는 밴드의 13으로부터 11로의 이동을 나타낸다. 따라서 mACI-01-Ab7 C2는 강한 해체 활성 또한 나타낸다.

[0522] 구배의 절반보다 더 낮은 분획물에서의 mAbdp 상응하는 밴드의 검출은 $A\beta_{1-42}$ 원섬유의 mACI-01-Ab7 C2의 결합을 증명하나 (분획물 11 내지 P), 한편 분획물 4 내지 7의 mAb에 상응하는 밴드는 결합되지 않은 항체를 지시한다.

[0523] 이들 결과를 요약하면, 아밀로이드 $A\beta$ 펩타이드를 표적화하는 단일클론성 항체 mACI-01-Ab7 C2는 미리형성된 섬유에 결합하고, 모노머성 $A\beta$ 펩타이드로부터 섬유로의 인 비트로 결집을 억제할 수 있고, 미리형성된 섬유를 해체시킬 수 있음을 성공적으로 증명할 수 있었다.

[0524] mACI-24-Ab4를 이용하여 유사한 관찰이 수립되었다. 결집 어세이와 유사하게, 완전한 섬유 중합은 분획물 12 내지 P(펠렛)에의 $A\beta_{1-42}$ 섬유 단독의 분포에 의해 증명될 수 있었다. 여기서 미리-형성된 섬유에 공동-인큐베이트될 때 더 낮은 농도의 분획물로의 섬유의 이동은 항체의 해체 활성을 지시한다. 몰비 1:100의 mACI-24-Ab4의 첨가는 아밀로이드 섬유의 대다수의 12에서 11로의 이동을 나타낸다. 따라서 mACI-24-Ab4는 강한 해체 활성 또한 나타낸다.

[0526] *실시에 9: mAb와의 공동-인큐베이션에 의한 $A\beta_{1-42}$ 미세섬유 결집의 억제 및 미리 형성된 $A\beta_{1-42}$ 미세섬유의 해체를 평가하기 위한 형광 어세이

[0528] *BIS-ANS 형광 어세이

[0529] mAb의 억제 특성을 평가하기 위해 $A\beta_{1-42}$ 미세섬유의 비-원섬유성 개체 또는 모노머를 특이적으로 검출하는 BIS-ANS (LeVine, 2002) 형광 어세이를 사용하였다. 형광 측정 전에, $A\beta_{1-42}$ 모노머는 대조군으로 사용하는 완충액, 또는 mAb (몰비 1:100, mAb 대 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드) 중 어느 것과 37°C에서 14시간 동안 미리-인큐베이트시켰다. 상대적 형광 단위는 자동적으로 기록되었으며, 결과는 대조군에 대한 변화로서 백분율로 나타내었다.

[0530] mACI-02-Ab6는 대조군과 비교할 때 유의한 억제능을 나타낸다 ($125.8 \pm 28.5\%$ 대 $100 \pm 29.5\%$). mACI-01-Ab7 C2는 약한 활성($108.0 \pm 30.0\%$)을 갖는 것처럼 보이고, mAb mACI-11-Ab9 및 mACI-12-Ab11로는 대조군과 비교하여 어떠한 개선도 관찰될 수 없었다 ($93.5 \pm 21.9\%$ 및 $73.2 \pm 47.7\%$). 이 결과는 mACI-01-Ab7 C2가 mACI-11-Ab9 및 mACI-12-Ab11보다 더 큰 억제능을 나타내는 초원심분리 데이터를 확증한다.

[0532] 실시예 10: 티오플라빈 T (Th-T) 형광 어세이

[0533] mAb의 결집의 억제뿐만 아니라 해체 특성을 측정하기 위해, 원섬유성 $A\beta_{1-42}$ 분자에 대해 특이적으로 결합하는

티오플라빈 T (Th-T) 형광 어세이가 사용되었으며, 그 결과 상기 형광 방사 강도는 용액 내에 존재하는 A β ₁₋₄₂ 미세섬유의 양과 상관된다.

[0534] 형광 측정 전에, A β ₁₋₄₂ 모노머는 완충액(대조군), 또는 mAb (몰비 1:100, mAb 대 A β ₁₋₄₂ 펩타이드) 중 어느 것과 37°C에서 48시간 동안 미리-인큐베이트시켰다. 상대적 형광 단위는 자동적으로 기록되었으며, 결과는 대조군에 대한 변화로서 백분율로 나타내었다.

[0535] mACI-01-Ab7 C2는 대조군과 비교할 때 유의한 억제능을 나타낸다 (11.03 ± 20.7% 대 100 ± 40.5%). 이 결과는 mACI-01-Ab7 C2가 억제능을 나타내는 초원심분리 데이터를 확증한다.

[0536] mAb의 해체 특성을 측정하기 위해 원섬유성 A β ₁₋₄₂ 분자에 대해 특이적으로 결합하는 티오플라빈 T (ThT) 형광 어세이를 사용되었으며, 그 결과 상기 형광 방사 강도는 용액 내에 존재하는 A β ₁₋₄₂ 미세섬유의 양과 상관된다. 측정 전, 섬유는 7일 동안 (37°C에서 PBS (pH 7.1) 내에서) 미리 형성시켰으며, 이어서 mAb 또는 완충액(음성 대조군)과 1 : 100 (mAb 대 A β ₁₋₄₂)의 몰비로 37°C에서 24시간 동안 공동-인큐베이트하였다. 상대적 형광 단위는 ELISA 마이크로타이타 플레이트 리더(microtiter plate reader)에 의해 자동적으로 기록되었으며, 결과는 대조군에 대한 변화로서 백분율로 나타내었다.

[0537] 초원심분리 데이터에 따르면, mACI-01-Ab7 C2는 두 독립적 실험에서의 Th-T 해체 테스트에서, 대조군에 비해 각각, 35 ± 11 % 및 64.57 ± 13.58% (대 100.0 ± 15.37%) 해체 능력의 최상의 특성 또한 나타내었다.

[0538] mACI-24-Ab4 또한 Th-T 어세이에서 현저한 해체 특성을 나타내었다 (62.99 ± 10.34% 대 100.0 ± 10.03%; p<0.0001).

[0539] mACI-11-Ab9는 28 ± 14%로 얼마간 덜 활성이었으나, 한편 ACI-02-Ab6 및 ACI-12-Ab11는 현저한 해체 특성을 나타내지 않았다 (각각 17 ± 12% 및 13 ± 11%).

[0540] 초원심분리 및 형광 어세이를 요약하면, mACI-01-Ab7 C2, mACI-01-Ab6 및 mACI-24-Ab4는 원심분리 실험에서 섬유 결집을 억제하기 위한 및 미리 형성된 것을 짧게하기 위한 이작용성(bi-functionality) 능력을 나타내었으며, 이는 형광 어세이에 의해 확인될 수 있다. 추가적으로, 원심분리 실험은 아밀로이드 섬유에의 mAb의 결합을 증명하였다.

[0541] mACI-11-Ab9는, 3배 이상 농축된 mACI-01-Ab7 C2에 비교할 때, 초원심분리에서 현저히 더 낮은 억제능을 나타내며, 이는 BIS-ANS 어세이에 의해 확인될 수 있었다. 해체 분석에 있어서 mACI-01-Ab7 C2가 미리형성된 A β ₁₋₄₂ 미세섬유를 짧아지도록 함이 원심분리 분석 및 ThT 어세이 특성 모두에서 증명된다. 원심분리 실험에서 3배 이상 농축된 mACI-02-Ab6는 또한 모든 어세이에서 양성이었으나 원심분리 실험에서 보다 강했다.

[0542] 상기 결과로부터 mACI-01-Ab7 C2 및 mACI-02-Ab6는 A β ₁₋₄₂ 미세섬유와의 상호작용에서 미리형성된 섬유의 결집의 억제 및 해체의 이작용성의 관점의 활성을 나타내는 유일한 항체임이 명백하다.

[0544] **실시예 11 : mACI- 01-Ab7 C2 단일클론성 항체와 ¹³C-표지된 β -아밀로이드 1-42 펩타이드의 상호작용의 NMR 및 형광 특성화**

[0545] mAb가 미리형성된 섬유를 가용화하거나 또는 섬유 형성을 억제하는 잠재적 메커니즘을 평가하기 위해, Th-T 형광 어세이와 U-¹³C Tyr10 및 Val12-표지된 β -아밀로이드 1-42 펩타이드의 고체 NMR 간의 헤드-투-헤드 실험을 수행하였다 (도 4). 따라서 이 조사의 목적은 단일클론성 항체의 존재 하에서의 β -아밀로이드 펩타이드에서의 고체 NMR 분광학에 의한 β -시트 전이를 이해하기 위함이고, 또한 이를 Th-T 형광 어세이에 의해 측정된 해체 능력과 직접적으로 비교하기 위함이다.

[0546] 고체 NMR 분광학은 이차 구조에서의 전이를 검출할 뿐만 아니라, 구조 전이를 좌우하는 A β ₁₋₄₂-펩타이드의 도메인을 배치시키도록 한다. 고체 NMR은 A β ₁₋₄₂-섬유의 구조 결정에 기여한 바와 같은 상기 문제점에 대한 그의 적용성(applicability)이 증명되었다 (Petkova 등, 2004, Petkova 등, 2002). 특히 ¹³Ca 및 ¹³C β 화학적 이동과 이차 구조의 상관 (Cornilescu 등, 1999, Luca 등, 2001, Iwadate 등, 1999)은 펩타이드 내 이차 구조의 변화를 테스트하기 위한 유용한 도구이다.

[0547] 위치 12의 ¹³C 미리-표지된 발린(¹²Val) 및 위치 10의 ¹³C 미리-표지된 타이로신(¹⁰Tyr)을 포함하는 표지된 펩타이드의 합성은 Fmoc 합성 프로토콜에 의해 수행하였다. 상기 펩타이드의 동일성 및 순도는 MALDI 질량 분광분석기로 확인하였다. 표지된 β-아밀로이드 펩타이드(1-42)는 37°C에서 1주 동안 PBS 완충액 내에서 펩타이드 용액을 인큐베이션함으로써 섬유를 생성하기 위해 사용하였다. 주요 문제점인 PBS 완충액 내에서의 아밀로이드 β-펩타이드의 낮은 용해도는 이하의 방식으로 해결될 수 있다: PBS 완충액의 pH값은 아밀로이드 β-펩타이드를 용해시키기 위해 소량의 암모니아를 첨가하여 일시적으로 증가시켰다. PBS 완충액의 최초의 pH값은 암모니아의 휘발 특성을 이용하여 더 큰 PBS 욕(bath)의 존재 하에서 샘플을 인큐베이션함으로써 재수득하였다.

[0548] β-시트 파괴 항체의 효과를 측정하기 위해, NMR 및 Th-T 어세이 모두를 위해 섬유 용액은 항체와 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 실시간(real-time) 비교를 위해 동일 용액의 분취물(aliquot)을 Th-T 형광 어세이에 사용하였으며, 남은 용액은 NMR 측정을 위해 동결건조하였다.

[0549] 먼저 Th-T 형광 어세이를 이용하여 미리형성된 ¹³C-표지된 아밀로이드 β-섬유와의 공동-인큐베이션에 의해 mACI-01-Ab7 C2의 해체능을 분석한 후, 상기 mAb 는 상기 섬유를 38% 해체시킨 것으로 나타낼 수 있었다. 그 후, NMR 스펙트럼 분석을 수행하였다.

[0550] PBS (대조군)과 mAb 인큐베이션 사이의 차이를 조사하기 위해, 각 스펙트럼은 PeakFit (<http://www.systat.com/~products/PeakFit>)을 이용하여 디콘볼루트(deconvolute)하였다. 선들은 혼합된 Lorentzian/Gaussian 피팅 과정을 이용하여 잘 매치하였으며, 이의 결과물을 도 4에 나타내었다. 상기 결과는 표 3에 요약하였으며, 매우 분명한 차이는 두 개체군의 적분 강도로 30-33 ppm 주변의 이중 피크(peak)는 피트될 필요가 있다. 섬유 베타 시트 배좌에 상응하는 c33 ppm에서의 피크이고, 한편 30 ppm에서의 피크는 랜덤 코일 배좌의 결과이다. 베타 시트 배좌 내의 표지의 대부분을 나타낸 PBS에서 인큐베이션된 샘플(81.7%)(도 2 상부)은, 샘플이 mACI-01-Ab7 C2와 함께 인큐베이션될 때 감소된다 (53.5%)(도 4 하부). Val 12 Cβ의 연구에 의해 측정된 바와 같은 랜덤 코일 배좌에 대한 베타 시트 배좌의 개체의 감소는 약 35%로, 형광을 이용하여 측정된 값과 매우 일치한다.

공명	PBS			mACI-01-Ab7-C2			
	δ (ppm)	ISO	FWHH (Hz)	δ (ppm)	ISO	FWHH (Hz)	% 적분 강도
Val Cβ - 시트	32.60		479	33.09		366	53.5
Val Cβ - 랜덤	30.27		200	30.27		340	46.5

[0551]

[0552] **표 3.** Val 12 Cβ의 두 배좌에 대한 피트된(fitted) 파라미터의 비교.

[0553] 상기 두 배좌에 대한 피트된 화학적 이동은 매우 유사하나, 적분 강도는 매우 상이하고, 이는 최초의 베타 세트 배좌의 약 35% 감소를 반영하는 것이다 (1-(53.5/81.7)). 이는 형광 측정으로부터 수득된 값과 매우 일치한다.

[0555] 이들 결과를 요약하면, 농도 구배 초원심분리 실험 및 Th-T 형광 어세이로 증명된 바와 같이, 아밀로이드 Aβ 펩타이드의 N-말단 1-16 영역을 표적으로 하는 단일클론성 항체 mACI-01-Ab7 C2가 미리형성된 섬유에 결합하여, 모노머성 Aβ 펩타이드로부터 섬유로의 인 비트로 결집을 억제할 수 있고, 또한 미리형성된 섬유를 해체시킬 수 있음을 성공적으로 증명할 수 있었다. 또한, 미리형성된 섬유에의 이 항체의 결합에 의해, 베타 시트 대부분의 Val12의 랜덤 코일 이차 배좌 환경으로의 전이가 유도될 수 있었다. 이는 형광 데이터와 매우 일치하는 (38%), Val12 Cβ 피크의 상세한 분석 또한 베타 시트 성분의 35% 감소를 밝혔으므로, 섬유가 상기 단일클론성 mACI-01-Ab7 C2 항체의 결합에 의해 가용화될 수 있는 잠재적 메커니즘일 것이다.

[0557] **실시예 12: 아밀로이드 섬유 상에서의 mACI-01-Ab7 C2의 기능성**

- [0558] 12.1Aβ₁₋₄₂ 섬유 형태의 형성의 변형 및 mACI-01-Ab7 C2 항체의 결합 후 해체의 개시
- [0559] 항체가 미리형성된 베타-아밀로이드(Aβ₁₋₄₂) 섬유를 해체시킬 수 있는 메커니즘을 평가하기 위해, 이차 배좌를 분석하는 U-¹³C 타이로신10(Tyrosine10) 및 발린12(Valine12)-표지된 Aβ₁₋₄₂ 펩타이드의 고체(solid-state) 핵자기 공명(Nuclear Magnetic Resonance; NMR) 및 해체를 측정하는 티오플라빈-Th-T 형광 어세이의 헤드-투-헤드 비교가 수행되었다. 상기 항체는 미리형성된 Aβ₁₋₄₂ 섬유의 35.4 %를 가용화시켰으며, 이어서 베타 시트로부터 랜덤 코일로의 이차 배좌의 이동을 유도하였다. 랜덤 코일에 대한 베타 시트 배좌의 개체의 감소는 약 35%이고, 따라서 형광 Th-T 어세이를 이용하여 측정된 값과 매우 유사하다. 이들 데이터는, 상기 항체의 결합이 잠재적으로 늘어난 섬유의 더 작은 절편으로의 파괴에 영향을 미치는 베타 시트의 평행의(parallel) 분자내 배열의 불안정화를 야기하는 이차 구조의 전이를 개시함을 지시한다.
- [0560] 12.2mACI-01-Ab7 C2 항체의 배좌-의존적 결합 친화도
- [0561] 항체-항원 결합 에너지의 비율은 항원의 배좌의 에너지-의존적 변형에 사용될 수 있음이 과학적 문헌에서 잘 알려져 있기 때문에⁶, 전체 단백질 Aβ₁₋₄₂ 및 더 작은, 아홉개의 아미노산 길이의, 항체의 에피토프를 포함하는 펩타이드에 대한 mACI-01-Ab7 C2 항체의 결합 친화도의 비교 실험을 수행하였다. 이 비교를 위해, 상기 항체 mACI-01-Ab7 C2의 친화도는 mACI-01-Ab7 C2의 에피토프의 완전한 아미노산 서열을 커버하는 비오틴화된 펩타이드(Aβ₁₋₄₂서열의 아미노산 13-21, Mimotopes에 의해 생산되고 ANAWA Trading SA로부터 구입) 및 비오틴화된 완전한 Aβ₁₋₄₂ 펩타이드(Bachem)를 사용하는 ELISA에 의해 분석하였다. 이 분석은 제조사(Mimotopes)의 설명서에 따라 수행하였다. 항체는 전체 Aβ₁₋₄₂ 단백질에 대한 것 보다 그의 특이적 에피토프를 포함하는 펩타이드(Aβ₁₋₄₂서열의 아미노산 13-21)에 38.40% 더 높은 친화도로 결합하였다. 따라서 이는 결합 친화도 에너지에서의 차이가 항체 상호작용을 위해 보다 접근가능한 위치에 항원을 제시하기 위해 아밀로이드 단백질의 이차 배좌의 에너지-소비 전이를 위해 사용되었음을 제시한다. 이는 왜 단리된 서브유닛에 대한 항체의 친화도에 비해 고유(전체 아밀로이드 단백질)에 대한 항체의 친화도가 더 낮은가에 대해 설명할 수 있을 것이다.
- [0563] 실시예 13: 아밀로이드 단백질의 상이한 클래스에 대한 mACI-01-Ab7 C2의 배좌-특이적 결합
- [0564] 중합된 아밀로이드 단백질의 상이한 단계에 대한 mACI-01-Ab7 C2의 특이성을 평가하기 위해, 모노머성 및 폴리머성 가용성 아밀로이드, 상세하게는 아밀로이드 β(Aβ) 단백질, 및 원섬유성 아밀로이드, 이들 상이한 단계의 폴리머성 베타-아밀로이드로 코팅된 ELISA를 수행하였다. 모노머는 변형된⁷에 공개된 방법에 따라 준비되었으며, 폴리머성 가용성 아밀로이드, 상세하게는, 아밀로이드 β(Aβ) 단백질은⁸에 따라 준비되었으며, 반면 섬유는 Tris/HCl (pH 7.4)에 최종 농도 1 μg/μl로 녹인 아밀로이드(Bachem, Switzerland)의 37°C에서 5일간 인큐베이션한 후 이어지는 원심분리 단계(5분간 10,000 rpm)으로 수행되었다. 그 후 아밀로이드 폴리머는 55 μg/ml의 최종 농도로 ELISA 플레이트 상에 코팅하였으며, 알칼리 포스파타아제가 표지된 항-마우스 IgG 단일클론성 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)를 사용하는 결합 친화도 ELISA를 수행하였다. 항체는 섬유(IC50 = 5.27nM)보다 더 높은 친화도로 폴리머성 가용성 아밀로이드 β(Aβ) 단백질(IC50 = 2.53nM)에 결합하고, 모노머(IC50 = 8.3nM)에 대해서는 가장 낮은 결합 친화도로 결합한다. 이들 데이터는, 상기 항체의 결합은 에피토프뿐만 아니라 상이한 아밀로이드 결집체의 배좌에 의해 영향받음을 나타낸다.
- [0566] 실시예 14: 단일클론성 항체 mACI-01-Ab7 C2의 에피토프 매핑
- [0567] 단일클론성 항체 mACI-01-Ab7 C2의 에피토프 매핑은 3개의 상이한 펩타이드 라이브러리를 사용하는 ELISA에 의해 수행하였다. 한 라이브러리는 Aβ₁₋₄₂의 완전한 아미노산(aa) 서열을 덮는(covering) 총 33개의 비오틴화된 펩타이드(Mimotopes에 의해 생산 및 ANAWA Trading SA로부터 구입)를 포함하고, 두번째 라이브러리는 첫번째 펩타이드 라이브러리로부터 펩타이드 12(Aβ의 aa12-20)를 사용하고 또한 서열 내 각 아미노산을 알라닌으로 치환하는 비오틴화된 펩타이드를 함유하며(이하의 표 41 참조), 또한 세번째 라이브러리는 각각의 경우에서 마지막 아미노산을 알라닌 또는 이미 알라닌인 aa21에 있어서는 글리신으로 치환하는, 비오틴화된 펩타이드13, 14, 또는 15(Aβ의 aa13-21, 14-22 또는 15-23)를 함유한다(이하의 표 5 참조). 비오틴화된 완전한 Aβ₁₋₄₂ 펩타이드는 양성 대조군으로 사용되었다(Bachem). 에피토프 매핑은 제조사의(Mimotopes) 설명서에 따라 수행되

었다. 간단히 말해, 스트렙타아비딘 코팅된 플레이트 (NUNC)는 4°C에서 PBS에 녹인 0.1% BSA로 밤새 블로킹하였다. PBS-0.05% 트윈(Tween) 20으로 세척한 후, 플레이트는 PBS에 녹인 0.1% BSA, 0.1% 소듐 아자이드 (Sodium Azide)에 최종 농도 10 μM로 희석된 상기 라이브러리로부터의 상이한 펩타이드로 RT에서 1시간 동안 코팅하였다. 세척 후, 플레이트는 PBS에 녹인 2% BSA, 0.1% 소듐 아자이드에 10 μg/ml로 희석된 mACI-01-Ab7 C2 항체 또는 이소타입 대조군 마우스 IgG2b 항체와 RT에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. 플레이트는 다시 세척하였으며, 알칼리 포스파타아제 컨쥬게이트된 염소 항 마우스 IgG와 RT에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. 최종 세척 후, 플레이트는 포스파타아제 기질 (pNPP)과 인큐베이트하고, ELISA 플레이트 리더를 사용하여 405 nm에서 리드(read)하였다.

[0568] 상기 단일클론성 항체 mACI-01-Ab7 C2는 첫번째 펩타이드 라이브러리의 펩타이드 12, 13, 14 및 15에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다. 이들 4 펩타이드는 Aβ1-42의 aa 12-20 (VHHQKLVFF), 13-21 (HHQKLVFFA), 14-22 (HQKLVFFAE) 및 15-23 (QKLVFFAED)을 포함하며, 에피토프가 Aβ의 영역 12-23 내에 놓이는 것을 제시한다.

[0569] 알라닌으로 치환된 두번째 라이브러리는 펩타이드 12-20 (VHHQKLVFF)에의 결합에 대해 결정적인 aa를 결정하기 위해 사용하였다. mACI-01-Ab7 C2 항체의 결합은 aa 16, 17, 19 또는 20이 알라닌으로 치환되었을 때 완전히 상실되었으며, 이들 aa가 Aβ에의 항체의 결합에 절대적으로 결정적임을 지시한다. mACI-01-Ab7 C2 항체의 결합은 aa 15 및 18가 치환되었을 때 부분적으로 상실된다.

[0570] 상기 결합은 또한 aa 14가 알라닌으로 치환되었을 때 거의 완전히 상실되었고, aa 14 또한 결합에 매우 중요한 것임을 지시한다.

[0571] 마지막으로, 세번째 라이브러리는 aa 21, 22 또는 23가 에피토프에의 결합에 결정적인지 측정하기 위해 사용하였다. aa 15-23에의 항체의 결합은 aa 23가 알라닌으로 치환되었을 때 감소하였으며, aa 23가 결합에 또한 중요함을 지시한다. 상기 결합은 aa 21이 글리신으로 치환되었을 때 부분적으로 상실되었으며, aa 22가 알라닌으로 치환되었을 때 약간 상실되었다.

[0573] 표 4. 두번째 라이브러리에 사용된 펩타이드의 요약. 결합에 중요한 aa는 이탤릭체 및 밑줄로 마크되며, 결합에 절대적으로 결정적인 aa는 이탤릭체 및 볼드체 및 밑줄로 마크된다.

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

[0574]

[0576] 표 5. 세번째 라이브러리에 사용된 펩타이드의 요약. 결합에 중요한 aa는 이탤릭체 및 밑줄로 마크되며, 결합에 절대적으로 결정적인 aa는 이탤릭체 및 볼드체 및 밑줄로 마크된다.

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

[0577]

[0579] 실시예 15: 단일 유전자전이 hAPP 마우스에서의 뇌 아밀로이드 부하에 대한 mACI-01-Ab7 C2로의 수동 백신접종의 영향

[0580] mACI-01-Ab7 C2 단일클론성 항체가 뇌의 가용성 아밀로이드에 결합하여 이를 없애는 인 비보 능력을 평가하기 위해, 성별 및 연령이 일치된, 6개월령의 단일 hAPP 마우스가 상이한 용량으로의 수동 면역화를 위해 사용하였다. 가용성 아밀로이드 부하는 상기 동물의 뇌를 수습하고, Aβ 1-40 및 Aβ 1-42 특이적 ELISA(TGC, Germany)를 수행함으로써 연구의 끝에 분석하였다.

[0581] 그룹 당 8-13마리의 동물은 200μl PBS 내의 100, 300 및 1000μg 단일클론성 항체를 일주일 간격으로 두 번 주사하였으며, 반면 PBS 단독의 주사는 대조군으로서 사용하였다. 두번째 주사 하루 후 가용성 아밀로이드 분획물의 생화학적 분석을 위해 동물을 희생시켰다. 뇌 균질물 및/또는 척수액(CSF) 내의 가용성 분획물 내의 인간 Aβ 1-40 및 인간 Aβ 1-42의 양을 정량하기 위해, 상업적으로 입수가능한 효소면역어세이(Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay; ELISA) 키트를 사용하였다 (h 아밀로이드 β40 또는 β42 ELISA 높은 민감도, TGC, Switzerland). 상기 ELISA는 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 요약하면, 표준 (합성 Aβ 1-40 또는 Aβ 1-42의 회석물) 및 샘플을 단백질 결합 능력이 없는 96-웰 폴리프로필렌 플레이트 내에 준비하였다 (Greiner, Germany). 최종 농도 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3 및 15.6 pg/ml의 표준 회석물 및 샘플을 ELISA 키트와 함께 제공된 샘플 희석제로 최종 부피 60μl로 준비하였다. 아밀로이드 수치가 마우스의 연령에 따라 증가하고, 실제의 평가는 표준 곡선의 직선부 내에 있는 샘플의 리딩을 요구하므로, Aβ40 분석을 위한 샘플은 2:3으로 희석하고, Aβ42 분석을 위한 샘플은 희석하지 않았다.

[0582] 샘플, 표준 및 블랭크(blank)(50μl)를 선택적 항-Aβ-항체 컨쥬게이트 (비오틴화된 검출 항체)와 함께 항-Aβ-코팅된 폴리스티렌 플레이트 (항원의 C-말단을 선택적으로 인식하는 포획 항체)에 첨가하고, 항-아밀로이드-항체-복합체를 형성시키기 위해 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이트하였다.

[0583] 이튿날, 스트렙타아비딘-퍼옥시다아제-컨쥬게이트를 첨가하고, 30분 후 TMB/퍼옥시이드 혼합물을 첨가하여, 기질을 유색의(colored) 생산물로 전환시켰으며, 색의 농도는 광도 측정(photometry)의 수단으로 450 nm 필터를 갖는 ELISA-리더를 이용하여 측정하였다. 샘플의 Aβ 함량의 정량은, 합성 Aβ 1-40 또는 Aβ 1-42로 작성된 표준 곡선에 대해 흡광도를 비교함으로써 획득하였다. 데이터는 평균 대조군 값에 대한 개별적 변화로서 (대조군에 대한 백분율로) 표현하였다 .

[0584] 단일 hAPP 마우스가 300μg 용량의 단일클론성 항체 ACI-01-Ab7 C2로의 두 번의 복막내 주사로서 수동 면역화되었을 때, 뇌 균질물 내의 Aβ40의 총량은 현저하게 감소되었을 수 있고, Aβ42에 대해서는 개략적으로 유의하지 않을 수 있고 (Aβ40: -27.3 ± 13.9%, p<0.05; Aβ42: -8.6 ± 22.4, p=0.56; unpaired Student's T test), 반면 100 및 1,000μg은 유의(significance)에 도달하지 못하였다. 100μg으로의 면역화는 뇌 균질물 내의 Aβ40 및 Aβ42를 증가시키고 (Aβ40: 32.3 ± 36.8%; Aβ42: 38.3 ± 51.4%), 한편 1,000μg로의 치료는 아밀로이드 존재량(burden) 저하의 정상적인(right) 경향을 유발하고, 그룹 당 증가된 수의 동물에서 잠재적으로 효과적이었다 (Aβ40: -2.2 ± 26.0%; Aβ42: -9.3 ± 15.9%). 이들 데이터는 급성 면역 프로토콜에서 상기 항체 mACI-01-Ab7 C2가 이 쥐과 AD 모델의 뇌 내 가용성 Aβ의 총량을 감소시킬 수 있음을 증명한다. 흥미롭게도, 용량-관계는 일시적인 것이며, 유의한 데이터를 얻기 위해 더 큰 그룹으로의 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다.

[0586] 실시예 16: 이중 유전자전이 hAPPxPSI 마우스에서의 플라크 부하에 대한 만성 수동 투여의 영향

- [0587] 뇌 내 아밀로이드 플라크에 결합하고 감소시키기 위한 mACI-01-Ab7 C2 단일클론성 항체의 인 비보 능력을 평가하기 위해, 성별 및 연령이 일치된, 3.5개월령의 이중 유전자전이 hAPPxPS1 마우스가 4개월동안 만성 수동 면역 연구를 위해 사용되었다. 아밀로이드 플라크는 연구의 끝에 티오플라빈 S(Thioflavin S)의 결합에 의한 상기 동물의 뇌의 조직화학에 의해 분석되었다.
- [0588] 15마리의 유전자전이 동물은 16주간 PBS 내 500 μ g의 단일클론성 항체를 주사받았다. 15마리는 대조군으로서 사용되는 PBS 단독으로 주사되었다. 모든 주사는 복막내로 주사하였다. 희생 시, 마우스는 마취시켰으며, 뇌 혈관으로부터 혈액을 제거하기 위해 4 $^{\circ}$ C에서 생리적 혈청으로 trans- cardially 씻어냈다. 그 다음에, 상기 뇌는 두개골로부터 제거하여 관상면/전두면(coronal/frontal plane)으로 절단하여 후뇌(hindbrain) 및 전뇌(forebrain)를 분리하였다. 상기 전뇌는 중앙 시상 절단(midline sagittal cut)을 사용함으로써 좌 및 우 반구(hemisphere)로 고르게 분할된다. 하나의 반구는 조직학을 위해 4% 파라포름알데히드에서 하룻밤 동안 후-고정(post-fix)시켰다. 시상 진동절단기 단편(Sagittal vibratome sections)(40 μ m)은 부유 인큐베이션(floating incubation) 없이 절단하고, 0.1% 소듐 아자이드를 갖는 PBS 내에서 염색하기까지 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 상이한 수준에서의 5개의 단편을 티오플라빈 S로 조밀한 플라크를 염색하였다. 모든 동물의 단편은 염색 또는 블라인드 정량을 위해 랜덤화되었다. 소니 DXC-9100P 카메라가 장착된 라이카 DMR 현미경(Leica DMR microscope)으로 이미지를 획득하였으며, 라이카 Q-Win 소프트웨어를 사용하는 컴퓨터로 분석하였다. 현미경에 대한 광 농도 및 콘덴서 세팅은 이미지 획득 과정 내내 일정하게 유지하였다. 모든 획득된 이미지는 조사자의 성향을 최소화하기 위해 동일한 컴퓨터 서브루틴(subroutine)에서 작업하였다. 농도 조각 역치(Density slice thresholding)는 분석 내내 균일하게 적용하였다. 해마이행부(subiculum)의 구역은 티오플라빈 S 염색에서의 아밀로이드 부하의 자동화 정량을 위해 선택하였다.
- [0589] 해마이행부의 구역 내 총 플라크 부하 및 플라크의 수는 이중 hAPP/PS1 마우스가 상기한 바와 같이 4달간 수동 면역화되었을 때 상당히 감소할 수 있었다. 플라크 부하는 31%의 상당히 줄었고 (mACI-01- Ab7 C2: 1.11 \pm 0.21 % 및 대조군: 1.61 \pm 0.35%; p=0.003, 맨-휘트니 U-테스트(Mann-Whitney U-Test), 한편 만성 수동 면역은 플라크의 양을 19% 상당히 감소시켰으며 (mACI-01-Ab7 C2: 8.73 \pm 1.36 및 대조군: 10.78 \pm 1.36; p=0.006, 맨-휘트니 U-테스트), 플라크 붕괴에 비해 플라크 가용화가 약간 더 낮은 정도로 발생했음을 나타낸다.
- [0591] **실시예 17: 단일 유전자전이 hAPP 마우스의 기억 능력에 대한 mACI-01-Ab7 C2로의 수동 백신접종의 영향**
- [0592] 인지 작용성을 변형시키거나 또는 증가시키기 위한 mACI-01-Ab7 C2 항체의 인 비보 능력을 분석하기 위해 성별 및 연령이 일치된, 9개월령의 단일 hAPP 마우스가 수동 면역 연구를 위해 사용되었다. 비공간적 인지(Non-spatial cognition)는 새로운 물체 인식 과제(Object Recognition Task; ORT)에 의해 면역화 기간의 끝에 측정되었다.
- [0593] 그룹 당 12마리의 동물은 200 μ l PBS 내의 400 μ g의 단일클론성 항체를 두번 복막내 주사를 맞았으며, 반면 PBS 단독의 주사는 대조군으로서 사용하였다. 두번째 주사 하루 후 새로운 물체 인식 과제(Object Recognition Task; ORT)에서 인지 능력이 연구되었다^{12, 13}. ORT 등록 마우스는 행동계(behavioral arena)에 10분간, 새로운 미지의 물체와 마주하도록 두었다. 탐구 시간은 기록하였다. 세 시간 후 동일한 동물을 동일한 계 내에, 2nd 세션동안에는 이미 탐구한 낯은 물체, 및 추가적으로 새로운 물체와 마주하도록 다시 두었다. 다시, 두 물체에 대한 탐구 시간은 기록하였으며, 결과적인 인지 지수는 총 탐구 시간에 대한 새로운 물체에 대한 탐구 시간의 비율로서 계산하였으며, 대조군에 대한 비례적 변화로서 나타내었다.
- [0594] mACI-01-Ab7 C2로의 수동 백신접종은 단일 유전자전이 AD 마우스에서 인지 기억 능력을 현저히 증가시킨다 (mACI-01-Ab7 C2: 131.6 \pm 9.1% 및 대조군: 100.0 \pm 9.2%, p<0.05; unpaired Student's T test 및 각 그룹 당 n=12).
- [0595] **기탁:**
- [0596] 이하의 하이브리도마 세포주는 부다페스트 조약의 규정 하에, 브라운슈바이그 38124 , 마쉴로데르 베그 1 비, 브라운슈바이그(Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig) 소재 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)"에 기탁되었다:

하이브리도마 주 명칭	항체 명칭	기탁일	수납 번호
FP 12H3	mACI-01-Ab7	2005년 12월 01일	DSM ACC2752
FP 12H3-C2	mACI-01-Ab7C2	2005년 12월 01일	DSM ACC2750
FP 12H3-G2	mACI-01-Ab7G2	2005년 12월 01일	DSM ACC2751
ET 7E3	mACI-02-Ab6	2005년 12월 08일	DSM ACC2755
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	2005년 12월 08일	DSM ACC2756

[0597]

수탁번호

[0598]

기탁기관명 : 테에스엠제-도이체 잠룽 폰 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하
 수탁번호 : DSMACC2750
 수탁일자 : 20051201

기탁기관명 : 테에스엠제-도이체 잠룽 폰 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하
 수탁번호 : DSMACC2751
 수탁일자 : 20051201

기탁기관명 : 테에스엠제-도이체 잠룽 폰 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하
 수탁번호 : DSMACC2752
 수탁일자 : 20051201

기탁기관명 : 테에스엠제-도이체 잠룽 폰 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하
 수탁번호 : DSMACC2755
 수탁일자 : 20051208

기탁기관명 : 테에스엠제-도이체 잠룽 폰 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하
 수탁번호 : DSMACC2756
 수탁일자 : 20051208

도면

도면1

A β ₁₋₁₅ (ACI-24)

H₂N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-
Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys-Lys-OH

A β ₁₋₁₆ (ACI-01)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-
Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β _{1-16(Δ14)} (ACI-02)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-
Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

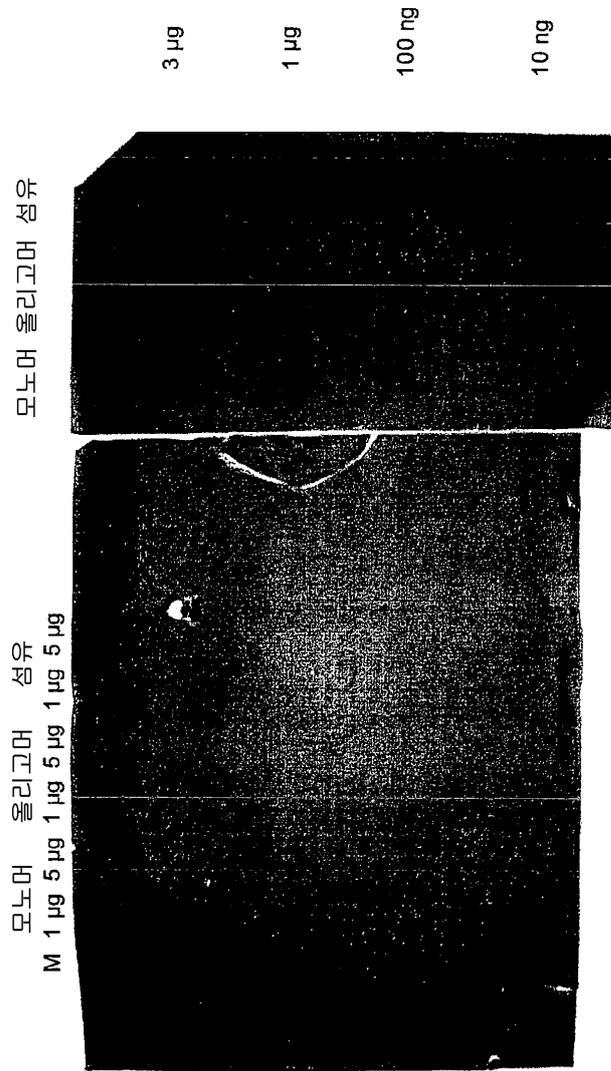
A β ₂₂₋₃₅ (ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

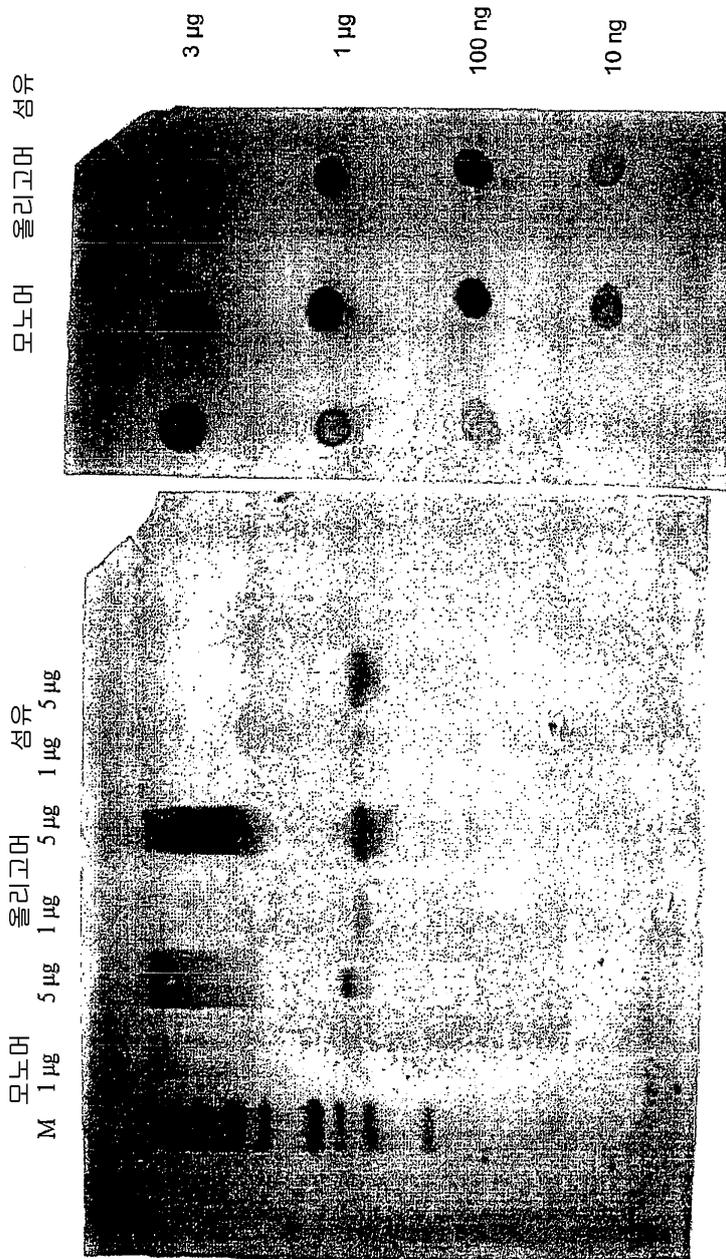
A β ₂₉₋₄₀ (ACI-12)

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

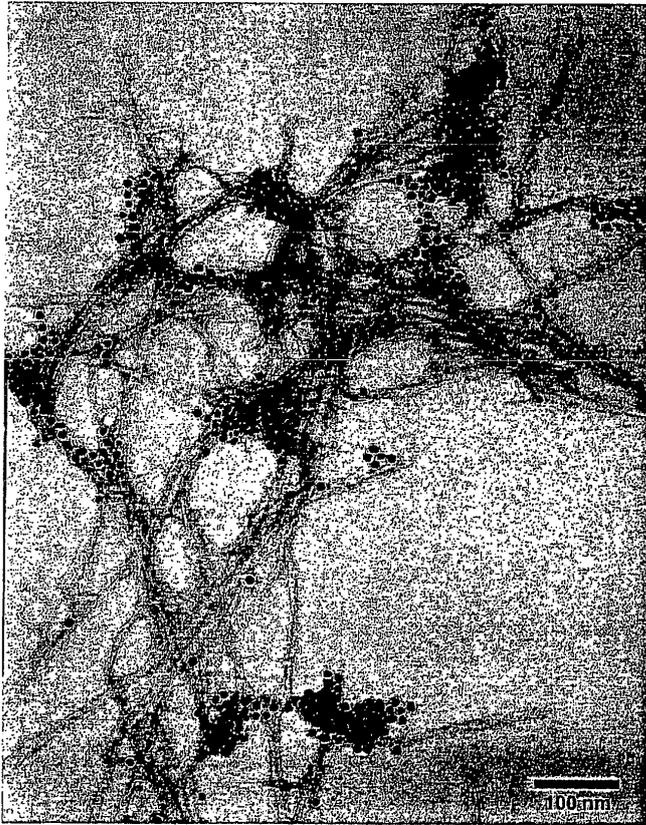
도면2a



도면2b



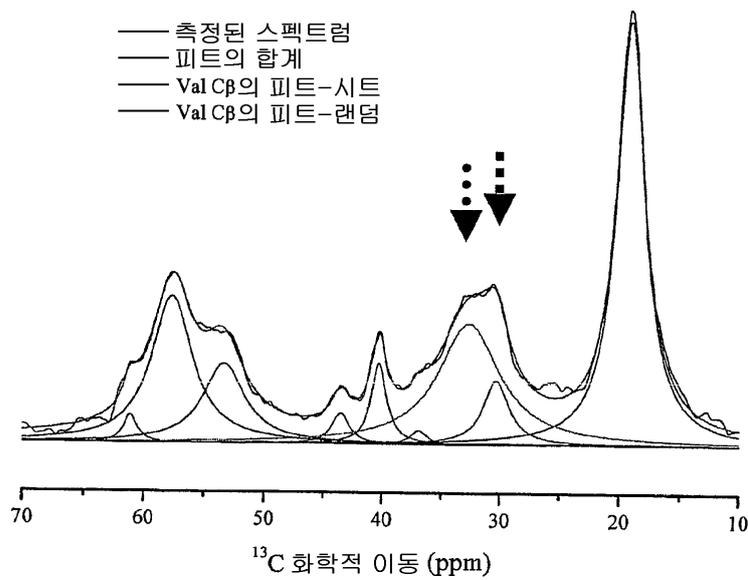
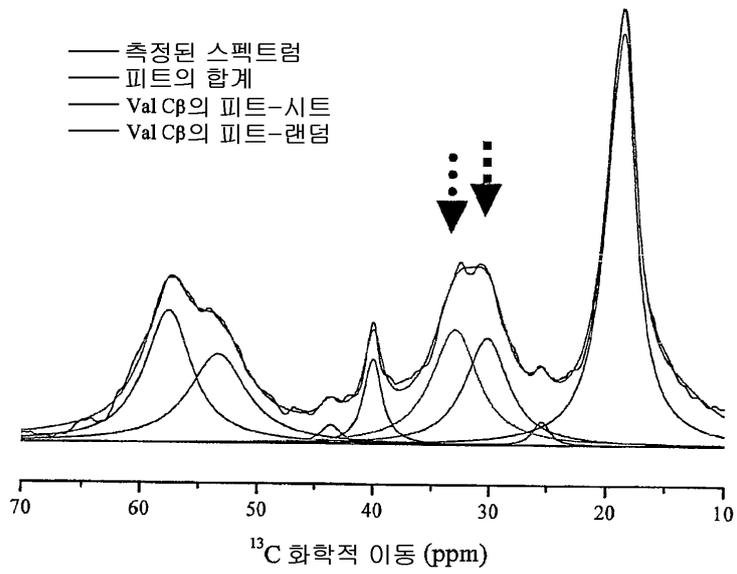
도면3a



도면3b



도면4



.....▶ ^{13}C -표지된 Val12의 β -시트에 대한 피트
▶ ^{13}C -표지된 Val12의 랜덤-코일에 대한 피트

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GREFERATH, RUTH
 HICKMAN, DAVID
 MUHS, ANDREAS
 PFEIFER, ANDREA
 NICOLAU, CLAUDE

<120> A BETA 1-42 SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES WITH THERAPEUTIC PROPERTIES

<130> PL08284FRDDD

<140> 2008/04916

<141> 2006-12-08

<150> EP 05027092.5

<151> 2005-12-12

<150> EP 06014729.5

<151> 2006-07-14

<150> EP 06020766.9

<151> 2006-10-02

<160> 45

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213>

Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

Leu

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

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

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 9

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttctc 300
 ttgacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 10

<211> 417

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctctcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagttagag ccttgtatat agtaatggag acacctatctt acattggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacagc atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtatat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 11

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

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

<210> 12

<211> 408

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

```

atgrasttsg ggyicagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtg ccaatgtgag    60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc    120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca    180
gacaagagggc tggaaattggc cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca    240
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg    300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac    360
tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc                    408
    
```

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn or Gln

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu or Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Glu or Asp
 <400> 13
 His Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> His, Asn, Gln, Lys or Arg
 <220><221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Asn or Gln
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> His, Asn, Gln, Lys or Arg
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile
 <220><221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)

 <223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile
 <220><221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile
 <220><221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Glu or Asp
 <220><221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)

<223> Glu or Asp

<400> 14

Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> His, Asn, Gln, Lys or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn or Gln

<

220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu or Asp

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Glu or Asp

<400> 15

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn or Gln

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu or Asp

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Glu or Asp

<400> 16

His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> His, Asn, Gln, Lys or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn or Gln

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu or Asp

<400> 17

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn or Gln

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu or Asp

<400> 18

His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> His, Asn, Gln, Lys or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn or Gln

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Lys, His, Asn, Gln or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu or Asp

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Glu or Asp

<400> 19

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Val His His Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5 10

<210> 21

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

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

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 22

<211> 448

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
 115 120 125
 Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 145 150 155 160

 Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
 165 170 175
 Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 180 185 190
 Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

 Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 245 250 255

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
 290 295 300

Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
 340 345 350

Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser
 370 375 380

Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
 405 410 415

Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly
 420 425 430

Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400

> 27

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

1 5 10 15

<210> 28

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Gly Asp Tyr

1
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in second library
<400> 29
Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5
<210> 30
<211> 9
<212>
PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in second library
<400> 30
Ala His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in second library
<400> 31
Val Ala His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5
<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in second library

<400> 32

Val His Ala Gln Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in second library

<400> 33

Val His His Ala Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in second library

<400> 34

Val His His Gln Ala Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in second library

<400> 35

Val His His Gln Lys Ala Val Phe Phe

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in second library

<400> 36

Val His His Gln Lys Leu Ala Phe Phe

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in second library

<400> 37

Val His His Gln Lys Leu Val Ala Phe

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in second library

<400> 38

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Ala

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in third library

<400> 39

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala

1 5

<210> 40

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in third library
<400> 40
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Gly

1 5
<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in third library
<400> 41
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu

1 5
<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in third library
<400> 42
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Ala

1 5
<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> peptide used in third library

<400> 43

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide used in third library

<400> 44

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Ala

1 5

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

1 5 10