

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl.⁷
A61K 39/395(11) 공개번호 10-2005-0071564
(43) 공개일자 2005년07월07일(21) 출원번호 10-2005-7006180
(22) 출원일자 2005년04월08일
번역문 제출일자 2005년04월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/032080
국제출원일자 2003년10월09일(87) 국제공개번호 WO 2004/032868
국제공개일자 2004년04월22일(30) 우선권주장 60/417,232 2002년10월09일 미국(US)
60/447,611 2003년02월13일 미국(US)
60/464,754 2003년04월22일 미국(US)
60/480,353 2003년06월20일 미국(US)(71) 출원인 리나트 뉴로사이언스 코퍼레이션
미국 캘리포니아 94304 팔로 알토 포터 드라이브 3155(72) 발명자 로젠탈 아논
미국 캘리포니아 94062 우드사이드 노르망디 레인 150
레브코위츠 질
미국 캘리포니아 94401 산 마테오 #6 하이랜드 애비뉴 328(74) 대리인 정진상
박종혁

심사청구 : 없음

(54) 아밀로이드 베타 펩티드에 대한 항체를 사용하여알츠하이머병을 치료하는 방법 및 그의 조성물

명세서

참고 출원

본 출원인 그것의 전체 내용이 참고로 인용된, 2002년 10월 9일 출원된 미국 가 출원 번호 제60/417,232, 2003년 2월 13일 출원된 제60/447,611, 2003년 4월 22일 출원된 제60/464,754, 및 2003년 6월 20일 출원된 60/480,353의 이익을 주장한다.

기술분야

본 발명은 일반적으로 알츠하이머병 및 다운증후군과 같은 아밀로이드-베타 펩티드(A β)의 발현과 관련한 질병의 발견 및 치료에 관한 것이다. 본 발명은 더 구체적으로는 A β 및 그것의 전구체인, β APP에 대하여 지정된 항체에 관한 것이다. 따라서 본 발명은 A β 및 β APP의 과잉-발현(또는 축적)과 관련한 질병의 발견 및 치료에 유용한 면역요법 조성물 및 방법을 제공한다.

배경기술

알츠하이머병(AD)은 진행성 기억 상실, 착란, 점진적 신체의 퇴보, 및 궁극에는, 사망에 이르는 임상적 특징을 갖는 퇴행성 뇌질환이다. 전세계적으로 대략 15,000,000 명이 알츠하이머병에 걸려있고, 그 수는 수명 연장에 따라서 극적으로 증가되는 것으로 예상된다. 조직학적으로, 상기 질병은 주로 연합 피질, 변연계 및 기저핵에서 발견되는 신경원 플라크를 특징으로 한다. 이들 플라크의 주요한 성분은 베타 아밀로이드 전구체 단백질(β APP 또는 APP)의 분할 생산물인 아밀로이드 베타 펩티드(A β)이다. APP는 큰 이소성 N-말단 도메인, 막횡단 도메인, 및 작은 세포질성 C-말단 꼬리를 함유하는 타입 I 막횡단 당단백질이다. 염색체 21 상 하나의 APP 유전자의 전사의 선택적 스플라이싱은 아미노산 갯수가 다른 몇몇 이소폼(isoforms)을 결과로 가져온다.

A β 는 알츠하이머병의 신경병리학에 있어서 충추적 역할을 하는 것으로 보인다. 상기 질병의 가족성 형태는 APP 및 프레세닐린(presenilin) 유전자의 변이와 연관되었다(Tanzi et al., 1996, Neurobiol. Dis.3:159-168; Hardy, 1996,

Ann.Med.28:255-258). 이들 유전자에 있어서 질병-연관 변이의 결과로써 아밀로이드 플라크에 있어서 발견된 우세한 형태인, A β 의 42-아미노산 형태의 증가된 생산을 야기한다. 또한, 사람의 A β 를 갖는 APP의 질병-연관 변이 형태를 과잉 발현시킨 트랜스제닉(transgenic) 생쥐(mice)의 면역화는 플라크 부하 및 관련 병변을 감소시키고(Schenk et al., 1999, Nature 400:173-177), A β 에 대항하여 지정된 항체의 말초적 투여 또한 뇌에 있어서 플라크 부하를 감소시킨다(Bard et al., 2000, Nature Medicine 6(8):916-919).

따라서 항체 요법은 알츠하이머병의 치료 및 예방에 진도유망한 접근법을 제공한다. 개선된 효능을 가지며, 사람 환자의 사용에 적합한 A β 에 대항하여 지정된 항체 및 다른 면역치료요법적 항원에 대한 필요성이 여전하다.

본 출원서 전체에 걸쳐서 다양한 문헌(특허 및 특허 출원을 포함)들이 참조로 인용된다. 전체에 있어서 이들 문헌의 공지가 참고로써 본원에 인용된다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명은 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)(표 6)에 결합한 분리된 단일클론 항체를 제공한다. 더 구체적으로, 항체가 A β 펩티드의 아미노산 1-16, 16-28 또는 28-40에 결합하는 것을 제공한다. 바람직하게는, 항체는 SEQ ID NO:4, 6, 8 또는 10(표 9 및 11)에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 단일클론 항체의 결합, 또는 8A1.2A1, 3C6.1F9 또는 10B10.2E6으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다. 일부 구체예에서, 단일클론 항체는 약 200nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 바람직하게는 약 30 nM 이하, 더 바람직하게는 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 및 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 단일클론 항체의 Fab 단편은 약 200nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 및 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드에 결합한다. 바람직한 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:4, 6, 8 또는 10에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1, 3C6.1F9, 또는 10B10.2E6으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체가 결합하는 동일한 A β 에피토프에 결합한다. 본 발명은 또한 8A1.2A1, 3C6.1F9, 또는 10B10.2E6으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체를 제공한다. 본원에서 개시된 단일클론 항체는 선택적으로 체료 체제에 결합되고/되거나 검출가능한 마커로 라벨링될 수 있다.

다른 양태에 있어서, 본 발명은 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)(표 6)의 아미노산 28-40에 우위적으로 결합하는 분리된 항체를 제공한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 결합하지만 A β ₁₋₄₂ 및/또는 A β ₁₋₄₃ 펩티드와 현저한 교차반응성을 보이지는 않는다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 결합하지만, A β ₁₋₄₂ 및 A β ₁₋₄₃ 펩티드와 현저한 교차반응성을 보이지는 않는다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 결합하지만, A β ₁₋₄₂ 및 A β ₁₋₄₃ 펩티드와 현저한 교차반응성을 보이지는 않는다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 A β ₁₋₄₀ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체가 결합하는 에피토프에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 사람의 항체이다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하거나, 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된다.

다른 양태에 있어서, 본 발명은 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체로부터 유래된 인간화 항체이다. 일부 구체예에 있어서, 인간화 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 하나 이상의 CDRs를 포함한다. 다른 양태에 있어서, 본 발명은 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체와 같이 동일한 에피토프(들)에 결합하는 인간화 항체를 제공한다. 일반적으로, 본 발명의 인간화 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 CDR(s)과 동일하고/동일하거나 유래된 하나 이상(하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯)의 CDRs를 포함한다.

다른 양태에 있어서, 본 발명은 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변부위로부터 유래된 가변 부위 및 사람의 항체의 중쇄 및 경쇄의 불변 부위로부터 유래된 불변 부위를 포함하는 키메라 항체이다.

일부 구체예에 있어서, 본원에서 개시된 항체의 결합 친화력은 약 100 pM 이하, 약 50 pM 이하, 약 25 pM 이하, 약 15 pM 이하, 약 10 pM 이하, 약 5 pM 이하, 또는 약 2 pM 이하이다.

또한, 본 발명은 β APP(SEQ ID NO:2)(표 7)에 결합하고 25E12.1F9.1H8(BP26), 24H4.2E10.1F5(BP27), 1F10.8E6.2A2(BP80), 13E12.1C5(BP81), 또는 14D9.1G8(BP82)으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 분리 단일클론 항체를 제공한다.

본 발명의 하나 이상의 항체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 일부 구체예에 있어서, 조성물은 적어도 두개의 항체, A β 펩티드의 아미노산 16-28에 대하여 지정된 제 1 항체 및 A β 펩티드의 아미노산 28-40에 대하여 지정된 제 2 항체를 포함한다. 선택적으로, 조성물은 생리학적으로 허용가능한 담체를 더 포함한다.

본 발명은 본원에서 개시된 바와 같이 단일클론 항체를 코딩하는 분리 폴리뉴클레오타이드뿐 아니라, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 함유하는 숙주 세포를 더 제공한다. 이러한 발현 시스템은 본 발명의 항체와 같은 면역반응성 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용될 수 있는데, 여기서 숙주 세포는 배양되고 배양된 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드가 회복된다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터는 SEQ ID NO:3 및/또는 5(표 8)에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터는 SEQ ID NO:7 및/또는 9(표 10)에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명은 또한 본원에 개시된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 다른 양태에 있어서, 본 발명은 또한 본원에 개시된 숙주 세포를 배양하고 폴리펩티드를 회복하여 생산하는 것을 포함하는 면역반응성 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에서 개시된 숙주 세포를 배양하고 폴리펩티드를 회복하여 생산되는 것에 의하여 생산된 면역반응성 폴리펩티드를 제공한다.

본 발명은 또한 임의의 폴리펩티드(임의의 항체를 포함) 또는 폴리뉴클레오타이드의 유효량 및 약학적 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일부 구체예에 있어서, 약학적 조성물은 A β 펩티드의 아미노산 16-28에 우위적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 약학적 조성물은 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 우위적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 단일클론 항체이다. 일부 구체예에 있어서, 약학적 조성물은 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 결합하지만 A β_{1-42} 및/또는 A β_{1-43} 펩티드와 현저한 교차 반응성을 보이지는 않는다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 결합하지만 A β_{1-42} 및/또는 A β_{1-43} 펩티드와 현저한 교차 반응성을 보이지는 않는다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체의 Fab 단편은 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체가 결합하는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1) 상 에피토프에 결합한다. 다른 구체예에 있어서, 약학적 조성물은 본원에 개시된 임의의 항체로부터 유래된 인간 항체, 인간화된 또는 키메라 항체를 포함한다.

본 발명은 또한 8A1.2A1, 3C6.1F9, 또는 10B10.2E6으로 표시된 하이브리도마를 제공한다.

본 발명은 또한 알츠하이머병 및 변형된 A β 또는 β APP 발현, 또는 예로써, 다운증후군, 파킨슨병, 다발-경색 치매와 같은 A β 펩티드의 축적과 연관된 기타 질병의 진행을 예방, 치료, 억제, 또는 연기시키기 위한 방법을 제공한다. 방법은 피험체에 본 발명의 항체(폴리펩티드 포함) 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약학적 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 약학적 조성물은 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 16-28에 우위적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 결합하지만 A β_{1-42} 및/또는 A β_{1-43} 과 현저한 교차 반응성을 보이지 않는다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 결합한 항체는 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 39 및/또는 아미노산 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다. 상기 항체는 키메라, 인간의 또는 인간화 항체일 수 있고, 항체의 조각일 수 있다. 항체 단편의 예는 이에 한정되지는 않지만, Fab, F(ab)₂ 및 Fv 단편을 포함한다. 항체는 또한 하나 이상의 항체 단편을 포함할 수 있는 단일 사슬, 이중특이적 또는 다중특이적 항체일 수 있다. 항체는 또한 치료제에 연결되거나, 치료제와 함께 투여될 수 있다.

본 발명은 또한 피험체에 본 발명의 항체(폴리펩티드 포함) 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 알츠하이머병 또는 피험체에 있어서 A β 펩티드의 축적에 관련된 기타 질병과 연관된 증상의 진행을 연기하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 피험체에 본 발명의 항체(폴리펩티드 포함) 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 피험체에 있어서 아밀로이드 플라크의 형성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에 있어서, 아밀로이드 플라크는 피험체의 뇌에 존재한다.

본 발명은 또한 피험체에 본 발명의 항체(폴리펩티드 포함) 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 피험체내에 아밀로이드 플라크를 제거 또는 청소하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에 있어서, 아밀로이드 플라크는 피험체의 뇌에 존재한다.

또한, 본 발명은 조직과 본 발명의 단일클론 항체가 접촉하는 것을 포함하는 조직 내 A β 펩티드의 축적을 억제하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 본 발명의 항체의 유효량을 피험체에 투여하는 것을 포함하는 피험체의 뇌에 있어서 A β 펩티드(가용성 및 증착 형태를 포함)를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에 있어서, A β 펩티드의 축적이 뇌 속에서 억제되고/억제되거나 감소된다. 일부 구체예에 있어서, A β 펩티드의 독성 효과가 억제되고/억제되거나 감소된다. 따라서, 본 발명의 방법은 예를 들어, 알츠하이머병, 다운증후군, 파킨슨병, 및 다발 경색 치매와 같이, A β 펩티드의 축적이 존재하거나 의심되는 어떤 질병을 치료하는데 사용될 수 있다.

본원에 개시된 방법의 일부 구체예에 있어서, 조성물은 전신 주사로써 투여된다. 일부 구체예에 있어서, 조성물은 복막내 주사에 의해 투여된다.

상기 개시된 본 발명의 방법에서 투여될 수 있는 조성물은 또한 A β_{1-43} (SEQ ID NO:12)의 아미노산 42 및/또는 43을 포함하는 에피토프에 결합하는 항체, A β_{1-43} (SEQ ID NO:12)의 C-종말단에 결합하지만 A β_{1-42} (SEQ ID NO:11) 및/또는 A β_{1-40} (SEQ ID NO:1)과 현저한 교차 반응성을 나타내지는 않는 항체, A β_{1-42} (SEQ ID NO:11)의 아미노산 41 및/또는 42 을 포함하는 에피토프에 결합하는 항체, 또는 A β_{1-42} (SEQ ID NO:11)의 C-종말단에 결합하지만 A β_{1-43} (SEQ ID NO:12) 및/또는 A β_{1-40} (SEQ ID NO:1)과 현저한 교차 반응성을 나타내지는 않는 항체,를 포함하는 조성물을 포함한다.

본 발명의 항체는 또한 알츠하이머병 및 예를 들어 다운증후군과 같은 변경된 A β 또는 BAPP 발현과 관련된 기타 질병의 발견, 진단 및 모니터링에 사용될 수 있다. 방법은 변경된 A β 또는 BAPP 발현을 갖는 것으로 의심되는 환자의 표본을 본 발명의 항체와 접촉시키는 단계 및 A β 또는 BAPP의 수준이 대조 또는 비교 표본과 다른지 여부를 검출하는 단계를 포함한다.

추가적 구체예에 있어서, 본 발명은 예를 들어, 알츠하이머병 또는 변경된 A β 또는 BAPP 발현과 관련된 기타 질병에 있어서 병적 상태를 치료하거나 A β 또는 BAPP를 검출 또는 정제하기에 유용한 물질을 함유하는 제작 물품 및 키트를 제공한다. 제작 물품은 라벨링 된 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어, 보틀, 바이알, 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리나 플라스틱 같은 다양한 재료로 만들 수 있다. 용기는 병적 상태를 치료하거나 A β 또는 BAPP를 검출 또는 정제하는데 효과적인 활성제를 함유하는 조성물을 담는다. 조성물에 있어서 활성제는 항체이고, 바람직하게는 A β 또는 BAPP 또는 본 발명의 임의의 다른 조성물에 특이적인 단일클론 항체를 포함한다. 용기 위 라벨은 조성물이 예를 들어 알츠하이머병과 같은 병적 상태를 치료하거나 A β 또는 BAPP를 검출 또는 정제하는데 사용됨을 나타내고, 또한 상기 개시된 바와 같이, 생체 내 또는 생체 외 사용에 대한 지시를 나타낼 수도 있다.

본 발명의 키트는 상기 개시된 용기 및 완충액을 포함하는 2차 용기를 포함한다. 그것은 시중구매가능하고 사용자 견지에서 바람직한 기타 물질들을 더 포함하는데, 이는 기타 완충액, 희석액, 필터, 침, 주사기, 및 본원에 개시된 임의의 방법에 있어서 사용을 위한 지시를 갖는 포장 삽입을 포함한다.

본 발명은 또한 의약으로서 사용 및/또는 의약의 제작을 위한 사용에 있어서 본원에 개시된 임의의 사용을 위하여 개시된 (예를 들어 항체) 임의의 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 A β 에 대항하여 지정된 단일클론 항체가 BAPP와 교차 반응하지 않는 것을 도시하는 막대 그래프이다.

도 2는 A β 에 대항하여 지정된 모든 단일클론 항체가 가용성 A β 를 포획하는 것을 도시하는 막대 그래프이다.

도 3은 하이브리도마 8A1.2A1에 의해 생산된 항체가 A β_{1-40} 의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 것을 도시하는 막대 그래프이다.

도 4는 항체 2286, 2324, 2289, 또는 대조 항체 항-기억상실증의 두개내 주사 후 이마 피질 및 해마내에서 총 A-베타, 티오플라빈-S, 및 MHC-II염색의 정량화를 도시한다.

도 5는 항-A β 2286 F_(ab)2 단편이 미세아교세포포와 반응하지 않고, 또한 그들이 완전한 항-A β 2286 IgG 만큼 효과적으로 뺀 아밀로이드 부착을 제거하지도 않음을 도시한다. 패널 A-D는 해마내에서 CD45 면역조직화학을 나타낸다. 패널 E-H는 해마내에서 총 A β 면역조직화학을 나타낸다. 패널 I-L은 해마내에서 티오플라빈-S 염색을 나타낸다. 생쥐는 무손상 항 A β 2286 IgG(A, E 및 I), 항-A β 2286 F_(ab)2 단편(B, F 및 J), 대조(항-기억상실증) IgG(C, G 및 K), 또는 대조(항-기억상실증)F_(ab)2 단편(D, H 및 L)로 주사되었다.

확대=40배. 축적 막대(Scale bar)=120μm.

도 6은 항-Aβ 2286 항체 및 항-Aβ 2286 F_{(ab')2} 단편의 두개내 주사 후 CD45 및 총 Aβ 면역조직화학 및 티오플라빈-S 염색의 정량화를 도시한다. 패널 A는 CD45 면역조직화학에 대한 오른쪽 대 왼쪽 면의 비를 나타낸다. 패널 B는 총 Aβ 면역조직화학에 대한 오른쪽 대 왼쪽 면의 비를 나타낸다. 패널 C는 티오플라빈-S 염색에 대한 오른쪽 대 왼쪽 면의 비를 나타낸다. 속이 찬 막대는 이마 피질에 대한 수치를 나타내고, 비어있는 막대는 해마에 대한 수치를 나타낸다. x-축 상에서, IgG-Cont는 대조(항-기억상실증) 무손상 IgG를 나타내고, F_{(ab')2}-Cont는 대조(항-기억상실증)F_{(ab')2} 단편을 나타내고, IgG-Aβ는 항-Aβ 무손상 IgG를 나타내고, F_{(ab')2}-Aβ는 항-Aβ F_{(ab')2} 단편을 나타낸다. 양쪽 대조 항체 그룹에 비교하여, ***는 P<0.001을 나타내고, *는 P<0.05를 나타낸다. 막대 위의 선은 지시된 그룹들의 특정 짝사이의 비교에 대한 P 수치를 나타낸다.

도 7은 항체 2286의 전신 주사 후 Aβ 혈청 수준(상단 그래프) 및 혈청내에서 항-Aβ 항체 농도(하단 그래프)를 도시한다. 그래프에서 각각의 점은 지시된 바와 같은 조건하에서 처리된 한마리 생쥐의 Aβ 혈청 수준 또는 항-Aβ 항체 농도를 나타낸다. 그래프에서 선은 지시된 바와 같은 조건하에서 처리된 생쥐들의 Aβ 혈청 수준 또는 항-Aβ 항체 농도를 나타낸다.

도 8은 여러가지 Aβ 펩티드 변이체에 항체 2286 및 항체 2324의 결합을 도시한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 Aβ 펩티드 및 βAPP에 특이적인 단일클론 항체를 제공한다. 본원에서 개시된 항-Aβ 항체는 βAPP와 높은 친화력으로 그리고 교차 반응하지 않고 결합하여, 알츠하이머병 및 예를 들어 다운증후군과 같은 변경된 Aβ 발현과 관련된 기타 질병을 발견하고 치료하는 방법의 사용에 특히 그들을 적합하게 한다. 한 구체예에 있어서, 본 발명은 Aβ 펩티드의 C 말단 부분에 대항하여 지정된 항체를 제공한다. 한 구체예에 있어서, 항체가 지정된 Aβ 펩티드의 C 말단 부분은 아미노산 28-40을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 Aβ₁₋₄₀의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 Aβ₁₋₄₀의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 C 말단 부분 Aβ₁₋₄₀에 약 200 nM 이하, 약 150 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 약 200 nM 이하, 약 150 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 Aβ₁₋₄₀의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 약 200 nM 이하, 약 150 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 약 1 nM 이하의 친화력으로 Aβ₁₋₄₀의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. Aβ 펩티드의 C 말단 부분에 대항하여 지정된 항체의 치료상 용도는 항체가 알츠하이머병에 대한 동물 모델의 뇌조직내에서 Aβ 부착 및 티오플라빈-S 부착(부착의 독성 미소섬유 형태를 나타냄)을 제거가능한 그러한 놀라운 발견에 기초한다.

Aβ의 아미노산 28-40(일부 구체예에 있어서, Aβ(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40, 또는 Aβ(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프)에 지정된 항체가 알츠하이머병의 동물 모델내에서 미소섬유 부착을 제거하기에 효과적이라는 발견은 다른이들의 보고서와 대립된다. Schenk(2002년 10월, Nat.Rev.Neurosci.3(10):824-8)에 의해 보고되는 바와 같이, 모든 항-Aβ 항체가 뇌속에서 병변을 효과적으로 감소시킬 수는 없고, 병변을 감소시킬 수 있는 항체는 Aβ의 1차 아미노산 16(Bacsikai et al., 2002, J. Neurosci.22(18):7873-8; Bard et al., 2000, Nature Med.6:916-919), 또는 아미노산 16-28(DeMattos et al., 2001, Proc. Nat'l Acad. Sci. 98(15):8850-55; DeMattos et al., 2002, Science 295(5562):2264-7; Dodart et al., 2002 Nat. Neuroscience 5(5):452-7)에 대항하여 지정된 항체에 한한다. 이와는 반대로, 카르복시 말단(예를 들어, 아미노산 33-42)에 지정된 항체는 뇌에서 아미로이드 부하를 감소시키지 못한다.

정의

본 출원서에 사용된 모든 과학적 기술적 용어는 달리 명기하지 않는다면 당업계에서 일반적으로 사용되는 의미를 가진다. 본 출원서에 사용되는 바와 같이, 다음의 단어 및 어구는 명기된 의미를 가진다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "항체"는 그들이 본원에 개시된 임의의 소망하는 특이적 결합 특성을 보여주는 한, 무손상 면역글로불린 또는 항체 분자, 폴리클론 항체, 복합특이적 항체(예를 들어, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 이(二)특이적 항체) 및 면역글로불린 단편(예를 들어, Fab, F_{(as)2}, 또는 Fv)을 포함한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "단일클론 항체"는 실질적으로 균일한, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체는 적은 양으로 존재할 수 있는 가능한 자연-발생 변이를 제외하고는 동일한 항체의 집단으로부터 얻은 항체를 나타낸다. 단일클론 항체는 하나의 항원 부위에 대항하여 지정되도록 고도로 특이적이다. 또한, 상이한 결정인자(에피토프)에 대항하여 지정된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는, 폴리클론 항체 제작과는 반대로, 각 단일클론 항체는 항원상에서 하나의 결정인자에 대항하여 지정된다. 조절인자 "단일클론"은 항체의 실질적으로 균일한 집단으로부터 얻는 것과 같은 항체의 특성을 나타내며, 어떤 특정한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용되는 단일클론 항체는 문헌[Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495]에 의해 처음 개시된 하이브리도마 방법에 의해 제작될 수 있거나, 미국 특허 제4,816,567호에 개시된 바와 같이 재조합 DNA 방법에 의해 제작될 수 있다. 단일클론 항체는 또한 예를 들어, 문헌[McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554]에 개시된 기술을 사용하여 생산된 파지 도서관으로부터 분리될 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "인간화된" 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 특이적 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬, 또는 그것의 단편(예로써, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 항원 결합 서열)인 비-인간(예를 들어, 쥐과(murine)) 항체의 형태를 나타낸다. 대부분, 인간화 항체는 인간 면역글로불린(수여자 항체)으로

서 수여자의 상보성 결정 부위(CDR)로부터의 잔류물은 원하는 특이성, 친화력, 및 수용력을 갖는 예를 들어, 생쥐, 래트(rat) 또는 집토끼와 같은 비-인간 종(제공사 항체)의 CDR로부터의 잔류물에 의해 대체된다. 일부 예에 있어서, 인간 면역글로불린의 Fv 구조 부위(FR) 잔류물은 대응하는 비-인간 잔류물에 의해 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체나 외래 CDR이나 구조 서열 어느곳에서도 발견되지 않지만, 항체 성능을 더 정련하고 최적화하는 것을 포함하는 잔류물을 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 모든 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함할 것이며, 이 때 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 부위는 비-인간 면역글로불린의 가변 도메인에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 부위는 인간 면역글로불린 공통 서열의 가변 도메인이다. 인간화 항체는 선택적으로 또한 적어도 한 부분의 면역글루볼린 불변 부위 또는 도메인(Fc)을 포함할 것이며, 전형적으로 그것은 인간 면역글로불린이다. WO 99/58572에 개시된 바와 같이 조절된 Fc 부위를 갖는 항체가 바람직하다. 인간화 항체의 다른 형태는 원래의 항체에 대하여 변경된 하나 이상의 CDR(1,2,3,4,5,6)을 가지며, 이것은 또한 원래의 항체로부터의 하나 이상의 CDR"로부터 유래된" 하나 이상의 CDR을 이룬다.

4개의 구조 부위(FR)로 각각 구성된 중쇄 및 경쇄의 가변 부위는 고도 가변 부위로서 또한 알려진 3개의 상보성 결정 부위로 연결된다. 각각 사슬에서 CDR은 FR에 근접하여 함께 유지되는데, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께, 항체의 항원 결합 자리의 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 적어도 2가지 기술이 있다:(1) 교차-중 서열 변이성에 기초한 접근법(즉, 문헌 [Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)]; 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법(문헌 [Chothia et al. (1989) Nature 342:877]). 본원에서 사용되는 바와 같이, CDR은 접근법 중 하나 또는 2개의 접근법 모두의 조합에 의해 정의된 CDR을 나타낼 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/생산되거나 당업계 공지된 또는 본원에 개시된 인간 항체를 제작용 임의의 기술을 사용하여 제작된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체의 이러한 정의는 적어도 하나의 인간 중쇄 폴리펩티드 또는 적어도 하나의 인간 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다. 그러한 하나의 예는 쥐와 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체이다. 인간 항체는 당업계 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 한 구체예에 있어서, 인간 항체는 파지 도서관으로부터 선택할 수 있는데, 여기서 파지 도서관은 인간 항체를 발현시킨다(문헌 [Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, PNAS(USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581]). 인간 항체는 또한 인간 면역글로불린 유전자좌를 예를 들어 생쥐와 같은 트랜스제닉 동물에 도입함으로써 제작될 수 있고 이때 내인성 면역글로불린 유전자는 부분적 또는 전체적으로 활성화되었다. 이러한 접근법은 미국 특허 제 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 개시된다. 또한, 인간 항체는 표적 항원에 대항하여 지정된 항체를 생산하는 인간 B 림프구를 분별화하여 제조될 수 있다(이 B 림프구는 피험체로부터 회복될 수 있거나 생체외적으로 면역화될 수 있음). 예컨대, 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147(1):86-95] 및 미국 특허 제 5,750,373호 참조.

"키메라 항체"는 중쇄 및 경쇄의 각각의 아미노산 서열의 한 부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 강(class)에 속하는 항체에 있어서 대응 서열에 동일하고, 반면 사슬의 나머지 구획은 다른 것에 있어서 대응 서열에 동일한 그러한 항체를 나타낸다. 전형적으로, 이들 키메라 항체에 있어서, 경쇄 및 중쇄 모두의 가변 부위는 한 종의 동물로부터 유래된 항체의 가변 부위를 모방하고, 반면 불변 부분은 다른 것으로부터 유래된 항체에 있어서 서열에 동일하다. 이 키메라 형태의 분명한 한가지 이점은 예를 들어, 쉽게 이용가능한 하이브리도마 또는 비인간 숙주 생물체로부터의 B 세포를 사용하는 현재 공지된 공급원으로부터 인간 세포 제조로부터 유래된 불변 부위와의 조합으로 용이하게 유래될 수 있다는 것이다. 가변 부위가 제조의 용이함이라는 장점을 갖고, 특이성은 그것의 공급원에 의해 영향받지 않는 반면, 불변 부위가 인간일 때 비-인간 공급원으로부터의 불변 부위 보다 항체가 주입될 때 인간 피험체로부터의 면역 반응을 덜 유도하는 것 같다. 그러나, 본 정의는 이 특정 예에 한하지 않는다.

"기능적 Fc 부위"는 본래의 서열 Fc 부위의 적어도 하나의 작동자 기능을 가진다. 대표적인 "작동자 기능"은 C1q 결합, 보체의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 식균작용, 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 감소-조절 등을 포함한다. 이러한 작동자 기능은 일반적으로 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합되는 Fc 부위를 필요로 하며 이러한 항체 작동자 기능을 평가하기 위한 당업계 공지된 각종 분석법을 사용하여 평가될 수 있다.

"원래의 서열 Fc 부위"는 자연상태에서 발견되는 Fc 부위의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. "변형 Fc 부위"는 적어도 하나의 아미노산 수정에 의해 본래의 서열 Fc 부위의 아미노산과 다르지만, 본래의 서열 Fc 부위의 적어도 하나의 작동자 기능을 보유하고 있는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변형 Fc 부위는 본래의 서열 Fc 부위 또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위에 비하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는데, 예를 들어, 본래의 서열 Fc 부위 또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위에 있어서 약 1 내지 10의 아미노산 치환, 및 바람직하게는 약 1 내지 5 아미노산 치환이다. 여기서 변형 Fc 부위는 본래의 서열 Fc 부위 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위와 바람직하게는 적어도 약 80% 서열 동일성, 가장 바람직하게는 그들과 적어도 약 90% 서열 동일성, 더 바람직하게는 그들과 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는다.

본원에서 사용되는 바와 같이 "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 세포-매개 반응을 이르는데, Fc 수용체(FcRs)(예를 들어, 자연 살생(NK) 세포, 중성백혈구, 및 대식세포)를 발현시키는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상 결합된 항체를 인지하고 후속적으로 표적 세포의 분해를 야기한다. 흥미있는 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 미국 특허 제 5,500,362 또는 5,821,337에 개시된 바와 같이 생체 외 ADCC 분석법을 사용하여 평가될 수 있다. 그러한 분석법에 있어서 유용한 작동자 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 NK 세포를 포함한다. 선택적으로, 또는 추가적으로, 흥미있는 분자의 ADCC 활성은 문헌 [Clynes et al., 1998, PNAS(USA), 95:652-656]에 개시된 바와 같이 예를 들어 동물 모델에 있어서 생체내에서 평가될 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "인간 작동자 세포"는 하나 이상의 FcRc를 발현시키고 작동자 기능을 수행하는 백혈구를 의미한다. 바람직하게는, 세포는 최소한 FcγRIIIc를 발현시키고 ADCC 작동자 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 다핵 세포(PBMC), 자연 살생(NK) 세포, 단핵세포, 세포독성 T 세포 및 중성백혈구를 포함하고, 바람직하게는 PBMC 및 NK 세포이다. 작동자 세포는 예를 들어 혈액 또는 PBMC과 같은 본래의 공급원으로부터 분리될 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "Fc 수용체" 및 "FcR"은 항체의 Fc 부위에 결합하는 수용체를 의미한다. 바람직한 FcR은 본래의 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)를 결합하는 것이고 이들 수용체의 대립 유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함하는, FcγRI, FcγRII, 및 FcγRIII 아강(subclass)의 수용체를 포함한다. FcγRII 수용체는 FcγRII("활성화 수용체") 및 FcγRIIB("억제 수용체")를 포함하며, 이는 그의 세포질 도메인 내에서 가장 다른 유사한 아미노산 서열을 가진다. FcRs는 문헌[Ravetch and Kinet, 1991, Ann.Rev.Immunol.,9:457-92;Capel et al.,1994, Immunomethods,4:25-34; and de Haas et al., 1995,J.Lab.Clin.Med.,126:330-41]에서 개관된다. "FcR"은 또한 태아에 모체의 IgG를 전달할 책임이 있는 신생아 수용체인, FcRn을 포함한다(문헌[Guyer et al.,1976,J.Immunol.,117:587;and Kim et al.,1994,J.Immunol.,24:249]).

"보체 의존성 세포독성" 및 "CDC"는 보체의 존재하에 표적의 세포 용해를 나타낸다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제 1 보체(C1q)가 동족 항원과 함께 복합체화된 분자(예를 들어, 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성을 평가하기 위해, 예를 들어 문헌[Gazzano-Dantoro et al.,Immunol.Methods,202:163(1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석법,이 수행될 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "친화력이 발달된" 항체는 그것의 하나 이상의 CDR에 있어서 하나 이상의 변화가 있어 변화(들)를 함유하지 않는 모 항체에 비하여 항원에 대한 항체의 친화력에 있어서 개선을 결과로 가져오는 것을 의미한다. 바람직한 친화력 발달된 항체는 표적 항원에 대하여 나노몰 또는 한층 더 피코몰까지의 친화력을 가질 것이다. 친화력이 발달된 항체는 당업계 공지된 방법에 의해 제조된다(문헌[Marks et al.,1992,Bio/Technology,10:779-783;Barbas et al.,1994,Proc Nat.Acad.Sci,USA 91:3809-3813;Schier et al.,1995,Genes,169:147-155;Yelton et al.,1995,J.Immunol.,155:1994-2004;Jackson et al.,1995,J.Immunol.,154(7):3310-9;Hawkins et al.,1992,J.Mol.Biol.,226:889-896]).

본원에서 사용되는 바와 같이, 항체의 "면역특이적" 결합은 항체의 항원-결합 자리와 항체의 의해 인지된 특이적 항원 사이에 일어나는 항원 특이적 결합 상호작용을 나타낸다(즉, 항체는 ELISA 또는 다른 면역분석에서 단백질과 반응하고, 관련없는 단백질과 검출가능하게 작용하지 않는다).

항체 또는 폴리펩티드에 "특이적으로 결합", 또는 "우위적으로 결합"(여기에서 호환성있게 사용됨)하는 에피토프는 당업계에서 잘 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 또는 우위적 결합을 결정하는 방법은 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 분자는 그것이 다른 세포 또는 물질과 더 긴 기간 동안 및/또는 더 큰 친화력으로, 더 빈번히, 더 신속하게 반응하거나 연관될 경우 "특이적 결합" 또는 "우위적 결합"을 보이는 것으로 일컬어진다. 항체는 그것이 다른 물질에 결합하는 것 보다 더 큰 친화력으로, 더 맹렬히, 더 용이하게, 및/또는 더 긴 기간 동안 결합할 경우 표적에 "특이적으로 결합" 또는 "우위적으로 결합"한다. 예를 들어, Aβ₁₋₄₀ 에피토프에 특이적으로 또는 우위적으로 결합하는 항체는 그것이 다른 Aβ₁₋₄₀ 에피토프 또는 비-Aβ₁₋₄₀ 에피토프에 결합하는 것 보다 더 큰 친화력으로, 더 맹렬히, 더 용이하게, 및/또는 더 긴 기간 동안 이 에피토프에 결합하는 항체이다. 예를 들어, 제 1 표적에 특이적으로 또는 우위적으로 결합하는 항체(또는 부분 또는 에피토프)는 제 2 표적에 결합한다는 것이 또한 본 정의의 읽으면 이해된다. 이와 같이, "특이적 결합" 또는 "우위적 결합"이 반드시 배타적인 결합을 필요로하는 것은 아니다(그것이 포함될 수는 있음). 일반적으로, 그러나 필수적이지는 않게, 결합에 대한 언급은 우위적 결합을 의미한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리펩티드"는 천연 공급원으로부터 분리되거나, 재조합 기술에 의해 생산되거나 또는 화학적으로 합성된 단백질, 단백질의 단편, 및 펩티드를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드는 전형적으로 적어도 약 6개의 아미노산을 포함한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "벡터"는 숙주세포 내 흥미있는 하나 이상의 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달 가능하고, 바람직하게는 발현가능한 구조를 의미한다. 벡터의 예는, 이에 한정되지는 않으나, 바이러스성 벡터, 나출된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온 응축 인자와 결합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜 내에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 예를 들어, 프로듀서(producer) 세포와 같은 특정 진핵 세포를 포함한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "발현 억제 서열"은 핵산의 전사를 지정하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 억제 서열은 예를 들어 구조 또는 유도 프로모터와 같은 프로모터(promoter), 또는 인핸서(enhancer)일 수 있다. 발현 억제 서열은 핵산 서열에 작동적으로 연결되어 전사된다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 폴리머를 나타내고, 달리 한정하지 않는다면, 천연의 뉴클레오티드에 유사한 방식으로 핵산에 하이브리드하는 자연의 뉴클레오티드의 알려진 유사체를 포함한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분과 결합할 때, 상기 성분이 생물학적 활성을 유지하도록 하고고 피험체의 면역계와 반응하지 않는 임의의 물질을 포함한다. 예는, 이에 한정되지는 않지만, 예를 들어 인산염 완충 식염수, 물과 같은 임의의 표준 약학적 담체, 예를 들어 오일/물 에멀전(emulsion)과 같은 에멀전, 및 각종 유형의 습윤제를 포함한다. 에어로졸 또는 비경구적 투여를 위한 바람직한 희석액은 인산염 완충 식염수 또는 보통의(0.9%) 식염수이다.

그러한 담체를 포함하는 조성물은 잘 알려진 종래의 방법(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 18th edition,A.Gennaro,ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1990;and Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.Mack Publishing,2000]참조)에 의해 제조된다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "에주번트"는 면역 반응을 촉진하는데 당업계에서 일반적으로 사용되는 그러한 에주번트를 포함한다. 에주번트의 예는, 이에 한정되지는 않지만, 헬퍼 펩티드; 수산화 알루미늄 겔(alum) 또는 인산 알루미늄과 같은 알루미늄; 프로인트 불완전 에주번트 및 완전 에주번트(Difco Laboratories,Detroit,MI); 메르크 에주번트 65(Merck

and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2(Smith-Kline Beecham); QS-21(Aquilla Biopharmaceuticals); MPL 또는 3d-MPL(Corixa Corporation, Hamilton, MT); LEIF; 칼슘, 철 또는 아연의 염; 아실화 티로신의 불용성 현탁액; 아실화 당; 양이온 또는 음이온으로 유도된 다당류; 폴리포스파젠; 생분해가능한 마이크로스피어; 모노포스포릴 리피드 A 및 쉼 A; 유라밀 트리펩티드 포스포타일 에탄올아민 또는 시토카인(예를 들어, GM-CSF 또는 인터루킨-2, -7 또는 -12) 및 면역자극성 DNA 서열을 포함하는 면역자극 복합체를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 백신의 사용과 함께, 헬퍼 펩티드 또는 시토카인과 같은 애주버트는 애주버트를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 통하여 제공될 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "효과적인 투여량" 또는 "유효량"의 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물은 이롭거나 소망한 결과를 달성하기에 충분한 양이다. 예방적 사용에 있어서, 이롭거나 소망한 결과는 위험을 제거하거나 감소시키거나, 심각성을 줄이거나, 또는 질병, 그것의 합병증 및 질병의 진행 중에 존재하는 중간 병리적 표현형의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동학적 징후를 포함하는 질병의 발병을 지연시키는 결과를 가져온다. 치료적 사용에 있어서, 이롭거나 소망한 결과는 예를 들어, 아밀로이드 플라크의 형성을 억제하거나 막고, 아밀로이드 플라크를 감소, 제거, 또는 청소하고, 인지력을 개선하거나 인지 감퇴를 역전시키고, 생물학적 유체 내에 순환하는 가용성 A β 펩티드를 분리하고, 그것의 합병증 및 질병의 진행 중에 존재하는 중간 병리적 표현형을 포함하여, 질병(생화학적, 구조학적 및/또는 행동학적)으로부터 온 하나 이상의 증상을 감소시키고, 질병으로 고통받는 환자의 생명의 질을 향상시키고, 질병을 치료하기 위해 필요한 기타 의학의 투여량을 감소시키고, 다른 의학의 효과를 증강시키고, 질병의 진행을 지연시키고, 그리고/또는 환자의 생존을 연장시키는 것과 같은 임상적 결과를 포함한다. 유효 투여량은 하나 이상의 투여에서 투여될 수 있다. 본 발명의 목적에 있어서, 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물의 유효 투여량은 직접 또는 간접적으로 예방상 또는 치료요법상의 치료를 달성하기에 충분한 양이다. 임상적 문맥에서 이해되는 바와 같이, 유효 투여량의 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물은 다른 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물과 함께 이루어질 수도 또는 그러하지 않을 수도 있다. 따라서, "유효 투여량"은 하나 이상의 치료상 제제를 투여하는 문맥에 있어서 고려될 수 있고, 만일, 하나 이상의 기타 제제와 함께, 바람직한 결과가 달성될 수 있거나 달성된다면 단일 제제는 유효량인 것으로 여겨질 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는 것"은 임상적 결과를 포함하여 이롭거나 바람직한 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적에 있어서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 이에 한정되지는 않으나, 다음을 하나 이상 포함하는데: 아밀로이드 플라크의 형성을 억제하거나 막고, 아밀로이드 플라크를 감소, 제거, 또는 청소하고, 인지력을 개선하거나 인지 감퇴를 역전시키고, 생물학적 유체 내에 순환하는 가용성 A β 펩티드를 분리하고, 조직(예를 들어, 뇌) 내 A β 펩티드(가용성 및 부착된 형태를 포함)를 감소시키고, 뇌에서 A β 펩티드의 축적을 억제하고/억제하거나 감소시키고, 조직(예를 들어, 뇌) 내 A β 펩티드의 독성 효과를 억제하고/억제하거나 감소시키고, 질병으로부터 온 증상을 감소시키고, 질병으로 고통받는 환자의 생명의 질을 향상시키고, 질병을 치료하기 위해 필요한 기타 의학의 투여량을 감소시키고, 그리고/또는 환자의 생존을 연장시키는 것이다.

본원에서 사용되는 바와 같이, 알츠하이머병의 진행을 "지연시키는 것"은 질병의 진행을 미루고, 지체시키고, 늦추고, 저지하고, 안정화하고, 그리고/또는 연기하는 것이다. 이러한 지연은 질병의 이력 및/또는 치료될 피험체에 따라서, 시간의 길이를 변화시킬 수 있다. 당업계 숙련자에게 자명한 바와 같이, 충분한 또는 현저한 지연은 사실상 피험체가 질병을 진행시키지 않는다는 면에서, 예방을 포함할 수 있다. 알츠하이머병의 진행을 "연기"하는 방법은 상기 방법을 사용하지 않는 것에 비교할 때, 주어진 시간 틀에 있어서 질병 진행의 가능성을 감소시키고/감소시키거나 주어진 시간 틀에 있어서 질병의 범위를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는 전형적으로, 피험체의 통계적으로 의미있는 수를 사용하는, 임상적 연구에 기초한다.

알츠하이머병의 "진행"은 개체 내에서 알츠하이머병의 발병 및/또는 발달을 의미한다. 알츠하이머병 진행은 본원에서 기재되는 바와 같이 표준 임상 기술을 사용하여 검출가능하다. 그러나, 진행은 또한 처음에 검출불가능할 수도 있는 질병 발달을 나타낸다. 본 발명의 목적에 있어서, 발달은 이 경우에, 표준 신경학상 검사 또는 환자 인터뷰에 의해 결정되거나 더 세밀화된 테스트에 의해 결정될 수 있는 질병 상태의 생물학적 경로를 나타낸다. 다양한 이들 진단상의 테스트는 이에 한정되지는 않지만, 뇌영상, 혈청 또는 뇌척수액(예를 들어, 아밀로이드 펩티드 및 타우) 내 특이 단백질의 수준의 변경을 검출하는 것, 컴퓨터 단층촬영술(CT), 및 자기 공명 영상(MRI)을 포함한다. "진행"은 발병, 재발, 및 발현을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 알츠하이머병의 "발병" 또는 "발생"은 시초의 발병 및/또는 재발을 포함한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "위험 상태의" 피험체는 알츠하이머병의 진행의 위험 상태에 있는 피험체이다. "위험 상태의" 피험체는 발견가능한 질병을 가지거나 그렇지 않을 수 있으며, 본원에 기재된 치료 방법 전에 발견가능한 질병을 나타낼 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. "위험 상태의"는 피험체가 알츠하이머병의 진행과 상호연관있는 측정가능한 파라미터인, 이른바 하나 이상의 위험 인자를 가짐을 의미한다. 하나 이상의 이들 위험 인자를 갖는 피험체는 이들 위험 인자(들)가 없는 피험체 보다 알츠하이머병의 더 높은 가능성을 가진다. 이들 위험 인자는 이에 한정되지는 않지만, 연령, 성별, 인종, 이전의 병력, 전조 질병의 존재, 유전적(즉, 타고난) 고려 사항, 및 환경적 노출을 포함한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "하나(a 또는 an)"는 달리 명시되지 않는다면, 적어도 하나를 의미한다.

항체

본 발명은 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 분리된 단일클론 항체(인간, 인간화 또는 본 발명의 키메라 항체를 포함)를 제공한다. 더 구체적으로, 항체는 A β 펩티드의 아미노산 1-16, 16-28 또는 28-40에 결합하는 것이 제공된다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. SEQ ID NO:1의 아미노산 1-40을 함유하는 A β 펩티드에 결합하지만, SEQ ID NO:1의 아미노산 1-38을 함유하는 A β 펩티드에 결합하지는 않는(당업계 숙련자에게 의해 이해되는 바와 같이, 두드러지게 결합하지 않음) 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 항체이다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 36-40을 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 약 200 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 3 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 약 60 nM 이하, 약 30 nM 이하, 또는 약 3 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 일부 구체예에 있어서, 항체는 약 3 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합한다. 바람직하게는, 항체는 SEQ ID NO:4, 6, 8, 및/또는 10에 나타난 단일클론 항체의 결합, 또는

8A1,2A1,3C6,1F9 또는 10B10,2E6으로 표시된 하이브리도마에 의해 생성된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다. 일부 구체예에 있어서, 단일클론 항체는 약 60 nM 이하, 바람직하게는 약 30 nM 이하, 그리고 더 바람직하게는 약 3 nM 이하의 친화력으로 Aβ 펩티드에 결합한다. 바람직한 구체예에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4,6,8, 및/또는 10에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단일클론 항체, 또는 8A1,2A1,3C6,1F9 또는 10B10,2E6으로 표시된 하이브리도마에 의해 생성된 단일클론 항체가 결합하는 동일한 Aβ 에피토프에 결합한다. 단일클론 항체는 임의로 치료상 제제와 결합 되고/되거나 검출가능 마커로 라벨링될 수 있다.

일부 구체예에 있어서 그리고 본원에서 기재되는 바와 같이(및 당업계 공지됨), 친화력은 항체의 대응 Fab 단편을 사용하여 측정한다.

또한, 본 발명은 BAPP(SEQ ID NO:2)에 결합하고 25E12,1F9,1H8(BP26),24H4,2E10,1F5(BP27),1F10,8E6,2A2(BP80),13E12,1C5(BP81), 또는 14D9,1G8(BP82)로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 분리된 단일클론 항체를 제공한다.

다른 양태에 있어서, 본 발명은 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단일클론 항체, 또는 8A1,2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체로부터 유도된 인간화 항체를 제공한다. 항체의 인간화 형태는 유도된 단일클론 항체와 동일한 CDR을 가질 수도 또는 가지지 않을 수도 있다. CDR 부위의 결정은 당업계 기술 내에서 충분하다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 유도된 적어도 1의 CDR, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5개의 CDR의 단일클론 항체(또는, 일부 구체예에 있어서 단일클론 항체의 모든 6 CDR에 실질적으로 동일하거나, 또는 단일클론 항체로부터 유도됨에 실질적으로 동일한 적어도 하나의 CDR을 포함하는 항체를 제공한다. 다른 구체예는 단일클론 항체의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6 CDR에 실질적으로 동일하거나 단일클론 항체로부터 유도된 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6 CDR(들)을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 목적에 있어서, 비록 활성의 정도는 8A1,2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체에 비하여 변할 수 있더라도, 결합 특이성 및/또는 전체적 활성(Aβ 부작을 청소하는 것에 관하여 존재할 수 있음)은 일반적으로 유지되는 것으로 이해된다. 본 발명은 또한 임의의 이들 항체를 제작하는 방법을 제공한다. 항체를 제작하는 방법은 당업계 공지되어 있고 본원에 개시된다.

경쟁 분석법은 2개의 항체가 동일하거나 입체적으로 겹쳐진 에피토프를 인지함으로써 동일한 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 항체는 멀티-웰 플레이트 상에 고정되고 라벨링된 항체의 결합을 막는 라벨링되지 않은 항체의 능력이 측정된다. 이러한 경쟁 분석법에 대한 일반적 라벨은 방사성 라벨 또는 효소 라벨이다.

Aβ 펩티드에 항체의 결합 친화력을 결정하는 한 방법은 항체의 단일기능적 Fab 단편의 친화력을 측정하는 것이다. 단일기능 Fab 단편을 얻기 위해, 항체, 예를 들어, IgG는 파파인으로 쪼개거나 재조합적으로 발현시킬 수 있다. 단일클론 항체의 항-Aβ Fab 단편의 친화력은 표면 플라즈몬 공명(SPR) 시스템(BIAcore 3000TM, BIAcore, Inc., Piscaway, NJ)에 의해 결정될 수 있다. SA 칩(스트렙타비딘)은 제조업자의 지시에 따라 사용된다. 비오틴화 Aβ 펩티드 1-40(SEQ ID NO:1)는 HBS-EP(100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20)중에서 희석될 수 있고 0.005 mg/ml의 농도로 칩 상에 주입될 수 있다. 각각의 칩 채널을 가로질러 가변성의 유동 시간을 이용하여, 항원 밀도의 두개의 분포가 달성된다: 상세한 역학적 연구에 관한 10-20 반응 유닛(RU) 및 농도에 관한 500-600 RU. 재생 연구는 피어스(Pierce) 용리 완충액 및 4 M NaCl(2:1)의 혼합이 200 주입 이상에 있어서 칩 위에서 Aβ 펩티드의 활성을 유지시킴과 동시에 결합된 Fab를 효과적으로 제거함을 보여준다. HBS-EP 완충액은 모든 BIAcore 분석법에 대하여 유동 버퍼로서 사용될 수 있다. 정제된 Fab 샘플의 일련의 희석액(0.1-10배 어림잡은 KD)이 2분 동안 100 μ l/분으로 주사되고 약 30h 분까지의 해리 시간이 허용된다. Fab 단백질의 농도는 알려진 농도(아미노산 분석법에 의해 결정됨)의 표준 Fab를 사용하여 ELISA 및/또는 SDS-PAGE 전기영동법에 의해 결정될 수 있다. 동역학적 연합율(kon) 및 해리율(koff)은 BIA평가 프로그램을 사용하여 1:1 랭뮤어 결합 모델(Lofas & Johnson, 1990)에 데이터를 맞춰서 동시에 얻는다. 평형 해리 상수(KD) 값은 koff/kon 으로서 구한다.

본 발명은 단량체, 이량체 및 다가의 형태의 항체를 제공한다. 예를 들어, 이특이적 항체인, 적어도 2개의 상이한 항원에 대하여 결합 특이성을 갖는 단일클론 항체는 본원에서 개시된 항체를 사용하여 제조될 수 있다. 이특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:120] 참조). 전통적으로, 이특이적 항체의 재조합체 생산은 상이한 특이성을 갖는 2개의 중쇄를 포함하는, 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현을 기초로 한다(Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

이특이적 항체를 제조하는 한가지 접근법에 따르면, 소망 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)은 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 상기 융합은 바람직하게는 적어도 일부의 경첩, CH2 및 CH3 부위를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인에서 존재한다. 경첩 결합을 위해 필요한 부위를 함유하고, 적어도 하나의 융합으로 존재하는 제 1 중쇄 불변 부위(CH1)을 갖는 것이 바람직하다. DNA 암호화 면역글로불린 중쇄 융합 및, 소망할 경우, 면역글로불린 경쇄는 분리된 발현 벡터 속으로 주입되고, 적합한 숙주 피험체 속으로 공동 형질주입된다. 이것은 구성에 있어서 사용된 3개의 폴리펩티드 사슬의 동일하지 않은 비율이 최상의 수율을 제공하는 경우 구체예에 있어서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호간 비율을 조정함에 있어서 커다란 유연성을 제공한다. 그러나, 같은 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬이 높은 수율을 얻거나 또는 상기 비율이 특별한 현저성을 갖지 않을 경우 하나의 발현 벡터에 2개의 또는 3개 모두의 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

한 접근법에 있어서, 이특이적 항체는 하나의 가지에 1차 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 가지에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(2차 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다.

이특이적 분자의 단지 1/2에 있어서 면역글로불린 경쇄를 갖는 이 비대칭 구조는 소망 이특이적 화합물의 원하지 않는 면역글로불린 사슬 조합으로부터의 분리를 촉진한다. 이 접근법은 1994년 3월 3일자 공개된 PCT 공개 공보 제 WO 94/04690에 개시된다.

2개의 공유결합으로 결합된 항체를 포함하는 이중결합 항체는 또한 본 발명의 범주내이다. 이러한 항체는 원치 않는 세포에 표적 면역계(미국 특허 제4,676,980호), 및 HIV 감염의 치료(PCT 출원 공개 공보 제 WO 91/00360 및 WO 92/200373; EP 03089)에 사용되었다. 이중결합 항체는 임의의 편리한 교차 연관 방법을 사용하여 제조되리 수 있다. 적합한 교차 연관 제제 및 기술은 당업계에 공지되어 있고, 미국 특허 제 4,676,980에 개시된다.

특정 구체예에 있어서, 면역반응 분자는 항체 단편이다. 항체 단편의 생산을 위한 각종 기술이 개발되었다. 이들 단편은 무손상 항체의 단백질 가수분해 소화를 통해 유도되거나(예를 들어, 문헌[Morimoto et al.,1992, J.Biocjem.Biophys,Methods 24:107-117 and Brennan et al., 1985, Science 229:81] 참조), 또는 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. 예를 들어, Fab'-SH 단편은 E.Coli로부터 직접 회복될 수 있고 화학적으로 커플링하여 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다(Carter et al.,1992,Bio/Technology 10:163-167). 다른 구체예에 있어서, F(ab')₂는 류신 지퍼 GCN4를 이용하여 형성되어 F(ab')₂ 분자의 모임을 증진한다. 다른 접근법에 따르면, Fv,Fab 또는 F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양으로부터 직접 분리될 수 있다.

본 발명의 단일클론 항체는 선택적으로 담체와 함께 약학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다.

항체는 또한 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노 캡슐), 또는 마크로에멀전 내에서, 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합반응(예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트), 마이크로캡슐)에 의해 마이크로캡슐 안으로 엔트랩핑되어 제조될 수 있다. 이러한 기술은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.Gennaro,ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1990; 및 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.Mack Publishing,2000]에서 개시된다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 한가지는 예를 들어, 미국 특허 제 5,739,277 에 기재된 바와 같이 구조(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체(특히 항체 단편)속으로 통합시킬 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "구조 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체 내 혈청 반감기 증가의 원인이 되는 IgG 분자(예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 부위의 에피토프를 나타낸다.

본원에서 개시된 항체는 면역리포솜으로서 또한 제조될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 예를 들어, 문헌[Epstein et al.,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688; Hwang et al., 1980,Proc.Natl Acad.Sci.USA 77:4030] 및 미국 특허 제 4,485,045 및 4,544,545호에 기재된 바와 같이, 당업계 공지된 방법에 의해 제조된다.

특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도성 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용한 역상 증발법에 의해 생산될 수 있다. 리포솜은 한정된 구멍 크기의 필터를 통하여 추출하여 원하는 직경을 갖는 리포솜을 수득한다. 또한, 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 문헌[Martin et al.,1982,J.Biol.Chem.257:286-288]에 개시된 바와 같이, 이황화물 교환 반응을 통하여 리포솜에 결합될 수 있다.

일부 구체예에 있어서, 본 발명의 항체는 단일 사슬(ScFv), 그것의 변이, 항체 일부를 포함하는 융합 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 다이어바디(diabodies) 선형 항체, 단일 사슬 항체, 및 면역글로불린 분자의 임의의 기타 수정된 구조이다.

항체의 생산

단일클론 항체는 예를 들어 문헌[Kohler and Milstein,1975,Nature 256:495]에 의해 개시되는 바와 같이, 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에 있어서, 생쥐, 햄스터, 또는 기타 적절한 숙주 세포는 전형적으로 면역화 인자에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도하는 면역화 제제를 이용하여 면역화된다. 선택적으로, 림프구는 생체 내에서 면역화될 수 있다.

단일클론 항체는 또한 예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호에 기재된 바와 같이, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. DNA 코딩 단일클론 항체는 예를 들어, 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합가능한 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써, 중쇄의 방법을 사용하여 분리하고 서열화한다. 한번 분리되면, DNA는 발현 벡터 속으로 위치될 수 있고, 그 후 면역글로불린 단백질을 달리 생산시키지 않는 예를 들어, E.Coli 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 속으로 형질감염되어 재조합 숙주 세포 내에서 단일클론 항체의 합성을 달성한다.

DNA는 예를 들어, 면역글로불린 코딩 서열을 모든 또는 일부의 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열에 공유결합적으로 결합시킴으로써 수정될 수 있다. 그러한 방식에 있어서, "키메라" 또는 "하이브리드" 항체는 본원에서 개시된 단일클론 항체의 결합 특이성을 갖도록 제조된다. 전형적으로 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드는 본 발명의 항체의 불변 도메인에 치환되고, 또는 그들은 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합 자리의 불변 도메인에 치환되어 AB(또는 BAPP)의 하나의 표면 에피토프에 대하여 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 자리 및 다른 항체에 대하여 특이성을 갖는 다른 항체-결합 자리를 포함하는 키메라 2가 항체를 생산한다.

본 발명은 또한 인간화 항체를 포함한다. 치료상 항체는 종종 부분적으로, 투여된 항체에 대항하여 지정된 면역 반응의 유발에 기인하여 역효과를 유도한다. 이것은 감소된 약물 효험, 표적 항원을 지니는 세포의 고갈, 및 바람직하지 않은 염증 반응을 야기한다. 상기를 피하기 위해, 재조합 항-AB 인간화 항체를 생산한다. 예를 들어, SEQ ID NO:3 및/또는 5와 같은 항체의 폴리뉴클레오타이드 서열은 유전적 조작에 사용되어 "인간화" 항체를 생산하거나, 또는 친화력, 또는 항체의 기타 특성을 개선시킬 수 있다. 항체를 인간화하는 일반적 원리는 인간 항체 서열을 갖는 항체의 비-인간 나머지 부분은 교환하는 반면, 항체의 항원-결합 부분의 염기 서열을 보유하는 것을 포함한다. 단일클론 항체를 인간화하는 4개의 일반적 단계가 있다. 이것은 (1)뉴클레오타이드 및 항체 경 및 중 가변 도메인을 개시하는 예정된 아미노산 서열을 결정하는 단계, (2)인간화된 항체를 설계하는 단계, 즉, 인간화 과정 동안 사용하기 위한 항체 틀 부위를 결정하는 단계, (3)사실상의 인간화 방법

론/기술, 및 (4)인간화 항체의 형질감염 및 발현이다. 예를 들어, 만일 항체가 임상적 실험 및 인간의 치료에 사용된다면, 불변 부위는 더 유사한 인간 불변 부위에 조작되어 면역 반응을 피할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,997,867 및 5,866,692호 참조.

제조함 인간화 항체에 있어서, Fc γ 부분은 수정되어 면역계에서 Fc γ 수용체 및 보체와 상호작용을 피할 수 있다. 이러한 유형의 수정은 Cambridge University, Department of Pathology의 Dr. Mike Clark에 의해 고안되었으며, 이러한 항체의 제조를 위한 기술은 1999년 11월 18일 공개된, WO 99/58572에 개시된다.

비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 항원-결합 자리를 포함하는 많은 "인간화된" 항체 분자는 설치류 V 부위 및 인간 불변 도메인에 융합된 그들의 연관된 상보성 결정 부위(CDR)를 갖는 키메라 항체를 포함하여, 기술되었다. 예를 들어, 문헌 [winter et al. Nature 349:293-299(1991); Lobuglio et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224(1989); Shaw et al. J. Immunol. 138:4534-4538(1987); 및 Brown et al. Cancer Res. 47:3577-3583(1987)] 참조. 이외 참고문헌은 설치류 CDR을 인간의 지지된 틀 구조(FR)로 이식한 후 적절한 인간 항체 불변 도메인과 함께 융합을 개시한다. 예를 들어, 문헌 [Riechmann et al. Nature 332:323-327(1998); Verhoeyen et al. Science 239:1534-1536(1988); 및 Jones et al. Nature 321:522-525(1986)] 참조. 다른 참고문헌은 재조합적으로 붙여진 설치류 틀 부위에 의해 지지된 설치류 CDR을 개시한다. 예를 들어, 유럽 특허 공개 공보 제519,596 참조. 이들 "인간화" 분자는 원치 않는 면역학적 반응을 축소하여 인간 레시피언트에 있어서 그들 부분의 치료상 적용의 기간 및 유효성을 제한하는 설치류 항인간 항체 분자를 향하도록 설계된다. 또한 이용될 수 있는 인간화 항체의 기타 방법은 문헌 [Daugherty et al., Nucl. Acids Res., 19:2471-2476(1991)] 및 미국 특허 제 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; 6,350,861 및 PCT 공개 공보 WO 01/27160에 의해 개시된다.

또 다른 대안에 있어서, 완전히 인간 항체는 특이적 인간 면역글로불린 단백질을 발현하도록 조작된 시중 구매 가능한 생쥐를 사용하여 얻을 수 있다. 더 바람직하거나(예를 들어, 완전히 인간 항체) 더 확고한 면역 반응을 생산하도록 설계된 트랜스제닉 동물은 또한 인간화된 또는 인간 항체의 생산에 이용될 수 있다. 그러한 기술의 예는 Abgenix, Inc. (Fremont, CA)로부터의 XenomouseTM 및 Medarex, Inc. (Princeton, NJ)로부터의 HuMAb-Mouse[®] 및 TC MouseTM이다.

다른 대안에 있어서, 항체는 파지 디스플레이 기술에 의해 재조합적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743 및 6,265,150호 및 문헌 [Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455(1994)] 참조. 선택적으로, 파지 디스플레이 기술(McCafferty et al., Nature 348:552-553(1990))은 면역화되지 않은 제공자로부터의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터, 생체 외에서 인간 항체 및 항체 단편을 생산하는데 사용될 수 있다. 이 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 예를 들어, M13 또는 fd과 같은 실모양의 박테리오파지의 주요한 또는 부수적인 코트 단백질 유전자 속으로 프레임 내로 복제되고, 파지 입자의 표면에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이된다. 실모양의 입자는 파지 게놈의 단일-가닥 DNA 사본을 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 또한 그들 특성을 나타내는 유전자 암호화 항체의 선택을 야기한다. 따라서, 파지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파지 디스플레이는 각종 형식으로 수행될 수 있으며, 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571(1993)]을 참조할 것. V-유전자 구획의 몇가지 공급원은 파지 디스플레이에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628(1991)]은 면역화된 생쥐의 비장으로부터 유도된 V 유전자의 작은 무작위적 조합의 도서관으로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 분리하였다. 면역화되지 않은 인간 제공자로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 구조될 수 있고 항원(자기 항원 포함)의 다양한 배열에 대한 항체는 문헌 [Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991), 또는 Griffith et al., EMBO J. 12:725-734(1993)]에 의해 설명되는 기술을 필수적으로 따라서 분리될 수 있다. 자연적 면역 반응에 있어서, 항체 유전자는 변이체를 고비용로 축적한다(개체 고도변이). 도입된 일부 변화는 더 높은 친화력을 수여할 것이고, 고-친화력 표면 면역글로불린을 디스플레이하는 B 세포는 후속하는 항체 공격 동안에 우위적으로 복제되고 분화된다. 이 자연적 과정은 "사슬 뒤섞기"로 알려진 기술을 사용하여 모방될 수 있다. 문헌 [Marks, et al., Bio/Technol. 10:779-783(1992)], 이 방법에 있어서, 파지 디스플레이에 의해 획득한 "제 1 의" 인간 항체의 친화력은 면역화되지 않은 제공자로부터 획득한 V 도메인 유전자의 자연 발생적 변이(레퍼토리)의 레퍼토리를 이용하여 중쇄 및 경쇄 V 부위 유전자를 순차적으로 대체함으로써 개선될 수 있다. 이 기술은 pM-nM 범위내에서 친화력을 갖는 항체 및 항체 단편의 생산을 가능케 한다. 매우 큰 파지 항체 레퍼토리(또한 "마더-어브-올 라이브러리"("mother-of-all libraries")로 알려짐)를 제작하는 전략은 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266(1993)]에 의해 개시되었다. 유전자 뒤섞기는 또한 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하는데 사용될 수 있는데, 이 인간 항체는 설치류 항체를 개시하기에 유사한 친화력과 특이성을 가진다. "에피토프 각인"으로서 또한 나타낼 수 있는 이러한 방법에 따르면, 파지 디스플레이 기술에 의해 얻은 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자는 설치류-인간 키메라를 생산하는 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리를 이용하여 대체된다. 항원 위 선택은 기능적 항원-결합 자리를 복구할 수 있는 인간 가변 부위의 분리를 야기하는데, 즉, 에피토프는 파트너의 선택을 결정한다(각인시킨다). 과정이 남아있는 설치류 V 도메인을 대체하기 위해 반복될 때, 인간 항체가 얻어진다(1993년 4월 1일자 공개된 PCT 특허 출원 PCT WO 9306213 참조). CDR 이식에 의한 설치류 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이 기술은 틀구조나 설치류 기원의 CDR 잔기를 갖지 않는 완전한 인간 항체를 제공한다. 비록 상기 논의가 인간화된 항체에 관련할지라도, 논의된 일반적인 원리는 예를 들어, 개, 고양이, 영장류, 말 및 소에 있어서 사용을 위한 항체를 주문 제작하기에 적합하다는 것이 명백하다.

키메라 또는 하이브리드 항체는 또한 교차 연고나 제제를 포함하는 그들을 포함하는 합성 단백질 화학의 공지된 방법을 사용하여 생체 외에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역독소는 이항화물 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 구조될 수 있다. 이러한 목적을 위한 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-1-4-메르캅토부티리미데이트를 포함한다.

단일 사슬 Fv 단편은 또한 예를 들어, 문헌 [Llades et al., 1997, FEBS Letters, 409:437-441]에 기재된 바와 같이 생산될 수 있다. 각종 링커를 사용하는 이러한 단일 사슬 단편의 커플링이 문헌 [Kortt et al., 1997, Protein Engineering, 10:423-433]에 기재된다.

변이체 및 수정된 면역반응 폴리펩티드 및 항체

본 발명은 또한 예를 들어, SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체와 같은 본 발명의 항체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 본원에 기재된 면역반응 폴리펩티드는 유용하고 조성물, 키드, 및 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 사용될 수 있다. 폴리펩티드는 본원에 기재된 결합 특성의 하나 이상을 가지며, 일부 구체예에 있어서, 본원에 기재된 임의의 하나 이상의 추가적 기능적 특성을 보여준다. 일부 구체예에 있어서, 폴리펩티드는 단일클론 항체의 하나 이상의 경쇄 및/또는 중쇄 가변 부위를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 폴리펩티드는 단일클론 항체의 하나 이상(1, 2, 3, 4, 5, 또는 6)의 경쇄 및/또는 중쇄 CDR을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 폴리펩티드는 단일클론 항체의 3개의 CDR의 경쇄 및/또는 중쇄를 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 폴리펩티드는 단일클론 항체의 적어도 5개의 인접 아미노산 서열, 적어도 8개의 인접 아미노산, 적어도 약 10 개의 인접 아미노산, 적어도 약 15 개의 인접 아미노산, 적어도 약 20개의 인접 아미노산, 적어도 약 25 개의 인접 아미노산, 적어도 약 30 개의 인접 아미노산 중 임의의 것을 가지는 단일클론 항체의 아미노산 서열을 포함하는 데, 이때 적어도 3개의 아미노산은 단일클론 항체의 가변 부위로부터이다. 한 구체예에 있어서, 가변 부위는 단일클론 항체의 경쇄로부터이다. 다른 구체예에 있어서, 가변 부위는 단일클론 항체의 중쇄로부터이다. 다른 구체예에 있어서, 5개 (또는 이상)의 인접 아미노산 서열은 단일클론 항체의 상보성 결정 부위(CDR)로부터이다.

본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드 "변이체"는 폴리펩티드의 면역반응이 사실상 감소되지 않은 하나 이상의 치환, 결손, 첨가 및/또는 삽입에 있어서 본래의 단백질과 다른 폴리펩티드이다. 다시 말하면, 특이적으로 항원에 결합하는 변이체의 능력은 본래의 단백질에 관련하여 증강되거나 변화시키지 않을 수 있고, 또는 본래의 단백질에 관련하여 50% 이하, 및 바람직하게는 20% 이하 만큼 감소될 수도 있다. 폴리펩티드 변이체는 바람직하게는 동일시된 폴리펩티드에 대하여 적어도 약 80%, 더 바람직하게는 적어도 약 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 95% 동일성(본원에서 기술되는 바와 같이 결정됨)을 보인다.

항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 DNA속으로 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 그러한 변이체는 본원에서 기재되는 아미노산 성령 SEQ ID NO:4, 6 또는 8의 아미노산 서열 내에서 잔기로부터 결손, 및/또는 잔기속으로의 주입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 결손, 주입, 및 치환의 임의의 조합은 최종 구성이 소망하는 특징을 갖는 다면, 최종 구성에 이르도록 제조된다. 아미노산 변화는 또한 예를 들어 당화 자리의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이, 항체의 후-번역 과정을 변경할 수도 있다.

변이유발을 위한 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 부위의 확인을 위한 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 변이유발"이라 불리고, 문헌[Cunningham and Wells, 1989, Science, 244:1081-1085]에 의해 기술된다. 잔기 또는 목적 잔기의 그룹은 중성 또는 음전하로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 확인되고(예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu와 같은 하전된 잔기) 대체되어 항원과 아미노산의 상호작용을 야기한다. 그 후 치환에 대하여 작용적 민감도를 보여주는 이들 아미노산 위치는 치환의 자리에서, 또는 치환의 자리에 대하여 추가적 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 자리가 결정되는 동안, 원래의 변이의 본성이 미리 결정될 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 자리에서 변이의 수행을 분석하기 위해서, 알라(ala) 스캐닝 또는 무작위 변이유발이 표적 코돈이나 부위에서 수행되고 발현된 항체 변이체는 소망하는 활성을 위해 스크리닝 된다.

아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 하나의 잔기로부터 100 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함할 뿐 아니라, 단일 또는 복합 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 함유하는 항체 또는 에피토프 태그에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 주입성 변이체는 효소의 항체의 N- 또는 C-말단 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드를 포함한다.

치환 변이체는 제거된 항체 분자 속에서 적어도 하나의 아미노산 잔기 및 그것 대신에 삽입된 잔기를 함유한다. 치환적 변이유발에 대하여 가장 흥미있는 자리는 고도가변 부위를 포함하지만, FR 변경이 또한 고려된다. 보존성 치환은 "바람직한 치환"이라는 표제 하에 표 1에 나타난다. 만일 그러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 야기한다면, 표 1에 표시된 "본보기 치환", 또는 아미노산 분류에 관하여 하기에 더 기술되는 바와 같이, 그 이상의 상당량의 치환이 도입될 수 있고 생산물이 스크리닝된다.

표 1.

보존적 치환

본래의 치환	바람직한 치환	본보기 치환
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

항체의 생물학적 특성에 있어서 상당한 수정이 치환기를 선택함으로써 수행되는데, 이 치환기는 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선의 형태로서, 치환기의 부위에 있어서 폴리펩티드 주(backbone)의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 용적을 유지함에 있어서 그들의 효과가 현저히 다르다. 자연 발생적 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로한 그룹으로 나뉜다:

- (1) 소수성 : Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) 중성 소수성 : Cys, Ser, Thr;
- (3) 산성 : Asp, Glu;
- (4) 염기성 : Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) 사슬 방향을 좌우하는 잔기 : Gly, Pro,; 및
- (6) 방향성 : Trp, Tyr, Phe.

비-보존성 치환은 다른 부류에 대한 이들 분류의 하나의 구성원을 교환함으로써 이루어진다.

항체의 적당한 구조를 유지하는데 연루되지 않은 임의의 시스테인 잔기는 또한 일반적으로 세린으로 치환되어서 분자의 산화 안정성을 향상시키고 이상한 교차 연관을 막을 수 있다. 역으로, 시스테인 결합(들)은 항체에 첨가되어 항체의 안정성을 향상시키고, 특히, 이러한 항체는 Fv 단편과 같은 항체 단편이다.

치환적 변이체의 특히 바람직한 유형은 모 항체의 하나 이상의 고도 가변 부위 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로 추가적 향상을 위해 선택된 결과의 변이(들)은 그것이 발생된 모 항체와 관련하여 향상된 생물학적 특성을 가질 것이다.

가장 바람직한 것은 1999년 11월 18일 공개된 WO 99/58572에 기재되는 바와 같이 수정된 항체이다. 이들 항체는 표적 분자에 지정된 결합 도메인에 추가하여, 인간 면역글로불린 중쇄의 모든 또는 일부 불변 도메인에 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 작동자 도메인을 포함한다. 이들 항체는 현저한 보체 의존성 용해, 또는 표적의 세포-매개 파괴에 의하지 않고 표적 세포에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 작동자 도메인은 특이적으로 FcRn 및/또는 FcγRIIb를 결합할 수 있다. 이들은 전형적으로 둘 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 C_H2 도메인으로부터 유래된 키메라 도메인을 기초로 한다. 이러한 방식에서 수정된 항체는 종래의 항체 치료요법에 염증 및 다른 불리한 반응을 막는 만성적 항체 치료요법의 사용에 있어서 바람직하다.

항체의 당화 변이체는 항체의 당화 패턴을 바꾸는 변이체이다. "변경"은 항체 내 발견된 하나 이상의 탄수화물 부분을 결손시키고, 항체에 하나 이상의 탄수화물 부분을 첨가하고, 당화의 구성(당화 패턴), 당화의 정도 등을 변화시키는 것을 의미한다. 당화 변이체는 예를 들어, 항체를 암호화하는 핵산 서열 내 하나 이상의 당화 자리를 제거, 변화 및/또는 첨가함으로써 제조될 수 있다.

항체는 그들의 불변 도메인 내 보존적 위치에서 당화된다(Jefferis and Lund, 1997, Chem.Immunol.65:111-128;Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). 면역글로불린의 올리고당 측쇄는 단백질의 기능(Boyd et al.,1996,Mol.Immunol.32:1311-1318;Wittwe and Howard,1990, Biochem.29:4175-4180) 및 구성에 영향을 미치고 당단백질의 3 차원 표면을 제시할 수 있는(Hefferis and Lund,supra;Wyss and Wagner,1996, Current Opin.Biotech. 7:409-416) 당단백질의 부분들 사이의 분자내 상호작용에 영향을 준다. 올리고당은 또한 특이적 인지 구조를 기초로 한 특정 분자에 주어진 당단백질을 표적하도록 제공할 수 있다. 항체의 당화는 또한 항체-의존성 세포포의 세포독성(ADCC)에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 특히, 이등분 GlcNAc의 형성을 촉매작용하는 글리코실트랜스퍼라제인, β(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)의 테트라시클린-조절 발현을 하는 CHO 세포는 개선된 ADCC 활성을 가지는 것으로 보고되었다(Umana et al.,1999,Mature Biotech.17:176-180).

항체의 당화는 전형적으로 N-연관 또는 O-연관이다. N-연관은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 부분의 부착을 의미한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌은, 단 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이으로서, 아스파라긴 측쇄에 탄화수소 부분의 효소적 부착을 위한 인지 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에서 이들 트리펩티드 서열 중 어느 것의 존재는 장래의 당화 자리를 창출한다. O-연관 당화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 크실로스 중 하나를 비롯 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신이 또한 사용될 수는 있더라도, 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌의 부착을 말한다.

항체에 당화 자리의 첨가는 하나 이상의 상기된 트리펩티드 서열(N-연관 당화 자리)를 함유하는 아미노산 서열을 변경함으로써 용이하게 수행된다. 상기 변경은 본래의 항체의 서열(O-연관 당화 자리)에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 첨가함으로써, 또는 이들로 치환함으로써 이루어질 수 있다.

항체의 아미노산 서열 변이를 암호화하는 핵산 분자는 당업계 공지된 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 이들 방법은 이에 한정되지는 않으나, 천연 공급원(자연 발생 아미노산 서열 변이의 경우)으로부터의 분리 또는 올리고뉴클레오타이드-매개(또는 자리-지정된)변이유발에 의한 제조, PCR 변이유발, 및 초기 제조도니 변이체 또는 항체의 비-변이 버전의 카세트 변이유발을 포함한다.

항체의 당화 패턴은 또한 기초를 이루는 뉴클레오타이드 서열을 바꾸지 않고서 변경할 수 있다. 당화는 대체로 항체를 발현하는데 사용되는 숙주 세포에 의존적이다. 재조합 당단백질, 예를 들어 장래의 치료요법으로서 항체의 발현을 위해 사용된 세포 유형이 거의 본래의 세포가 아니기 때문에, 항체의 당화 패턴 중 변이가 기대될 수 있다(Hse et al.,1997,J.Biol.Chem.272:9062-9070 참조).

숙주 세포의 선택에 더하여, 항체의 재조합체 생산 동안 당화에 영향을 미치는 인자는 성장 방식, 배지 조성, 배양 농도, 산소화, pH, 정제 방법 등을 포함한다. 각종 방법이 올리고당 생산에 있어 연루된 특정 효소를 도입하거나 과잉발현하는 것을 포함하는 특정 숙주 괴형체에 달성된 당화 패턴을 변경하도록 제안되었다(미국 특허 제 5,047,335; 5,510,261 및 5,278,299). 당화, 또는 특정 유형의 당화는 예를 들어 엔도글리코시다제 H(Endo H)를 사용하여 당단백질로부터 효소를 이용하여 제거할 수 있다. 또한, 재조합 숙주 세포는 특정 유형의 다당류를 처리함에 있어서 결합이 있도록 유전공학적으로 조작될 수 있다. 이들 및 유사한 기술은 당업계에 잘 알려져 있다.

폴리펩티드는 단백질의 전달을 번역과 동시에 또는 번역 후에 지정하는 단백질의 N-종말단에서 신호(또는 유도자) 서열을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 또한 폴리펩티드(예를 들어, poly-FEs)의 합성, 정제 또는 확인의 용이성을 위해, 또는 고체 지지체에 폴리펩티드의 결합을 증강시키기 위해 링커 또는 기타 서열에 결합될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 면역글로불린 Fc 부위에 결합할 수 있다.

약 100 아미노산 이하, 및 일반적으로 약 50 아미노산 이하를 갖는 부분 및 다른 변이체는 당업계 보통의 기술에 잘 알려진 기술을 이용하여 합성적 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 그러한 폴리펩티드는 메리필드(Merrifield) 고체상 합성법과 같은 상업적으로 이용가능한 고체상 기술 중 임의의 것을 사용하여 합성될 수 있는데, 여기서 아미노산은 성장 아

미노산 사슬에 순차적으로 첨가된다. 문헌[Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2146, 1963]참조. 폴리펩티드의 자동화된 합성을 위한 장비는 Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA)과 같은 공급자로부터 상업적으로 이용가능하며, 제조업자의 지시에 따라서 운용될 수 있다.

폴리펩티드는 HPTU(O-벤조트리아졸N,N,N',N'-테트라메틸우로니움 헥사플루오로포스페이트)활성을 갖는 FMOC 화학을 사용하여 Perkin Elmer/Applied Biosystems Division 430A 펩티드 합성자 상에서 합성될 수 있다. Gly-Cys-Gly 서열은 펩티드의 아미노 말단에 부착되어 고정된 표면에 결합하거나, 또는 펩티드의 라벨링하는 결합 방법을 제공할 수 있다. 고체 지지체로부터 펩티드의 분할은 다음의 분할 혼합물을 사용하여 수행될 수 있다: 트리플루오로아세트산:에탄디올:티오니솔:페놀(40:1:2:2:3). 2 시간 동안 분할 후, 펩티드는 냉각 메틸-t-부틸-에테르속에서 침전될 수 있다. 그 후 펩티드 침전물은 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유하는 물에 용해시킬 수 있고 동결건조 후 C18 역상 HPLC에 의해 정제될 수 있다. 물 중 0%-60% 아세트니트릴(0.1% TFA 함유)의 성분은 펩티드를 녹여서 분리하는데 사용될 수 있다. 순수한 단편의 동결건조 이후, 펩티드는 전기분무 또는 다른 유형의 질량 스펙트럼을 사용하여 그리고 아미노산 분석에 의해 특성화될 수 있다.

융합 단백질

일부 구체예에 있어서, 폴리펩티드는 본원에서 기재되는 바와 같이 복합 폴리펩티드를 포함하거나, 본원에서 기재된 바와 같이 적어도 하나의 폴리펩티드 및 관련없는 서열을 포함하는 융합 단백질이다. 추가적 융합 파트너가 첨가될 수 있다.

예를 들어, 융합 파트너는 T 헬퍼 에피토프, 바람직하게는 인간에 의해 인지된 T 헬퍼 에피토프의 공급을 조력함으로써 면역학적 융합 파트너로서 역할을 할 수 있다. 다른 예에서와 같이, 융합 파트너는 본래의 재조합 단백질 보다 더 높은 수율로 단백질을 발현하는데 조력하는 발현 인핸서로서 역할을 할 수 있다. 특정한 바람직한 융합 파트너는 면역학적 및 발현 증강 융합 파트너이다. 다른 융합 파트너는 단백질의 용해성을 증가시키기 위해 또는 단백질이 원하는 세포내 구획에 표적되도록 하기 위해 선택될 수 있다. 더 추가적인 융합 파트너는 단백질의 정제를 촉진하는 친화력 태그를 포함한다.

융합 단백질은 일반적으로 화학 결합을 포함하는 표준 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 바람직하게는, 융합 단백질은 발현 시스템에 있어서, 비-융합 단백질과 비교하여 증가된 수준의 생산을 가능케하는 재조합 단백질로서 발현된다. 즉, 폴리펩티드 성분을 암호화하는 DNA 서열은 따로따로 조립될 수 있고, 적절한 발현 벡터 속으로 연결할 수 있다. 하나의 폴리펩티드 성분을 암호화하는 DNA 서열의 3' 말단은 펩티드 링커를 이용하여 또는 펩티드 링커 없이 2차 폴리펩티드 성분을 암호화하는 DNA 서열의 5' 말단에 연결하고 따라서 서열의 관독 틀이 동일하다. 이것은 양쪽 구성요소 폴리펩티드의 생물학적 활성을 보유하는 단일 융합 단백질 속으로 전사를 가능케 한다.

펩티드 링커 서열은 각각의 폴리펩티드가 그것의 2차 및 3차 구조 속으로 접히기에 충분한 거리를 확보함에 의해 1차 및 제 2차 폴리펩티드 구성요소를 분리하는데 사용될 수 있다. 이러한 펩티드 링커 서열은 당업계 공지된 표준 기술을 사용하여 융합 단백질 속으로 혼입된다. 적당함 펩티드 링커 서열은 다음의 인자들에 기초하여 선택될 수 있다:(1) 유연한 확장된 구조에 채택하는 그들의 능력; (2) 1 차 및 2 차 폴리펩티드 상 기능적 에피토프와 상호작용할 수 있는 2차 구조를 채택하는 그들의 무능력; 및 (3) 폴리펩티드 기능적 에피토프와 작용할 수 있는 소수성 또는 하전된 잔기의 부족. 바람직한 펩티드 링커 서열은 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 함유한다. 예를 들어, Thr 및 Ala와 같은 다른 인접한 중성 아미노산은 또한 링커 서열에 사용될 수 있다. 보통 링커로서 사용될 수 있는 아미노산 서열은 문헌[Maratea et al., Gene 40: 39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258-8262, 1986], 미국 특허 제 4,935, 233 및 미국 특허 제 4,751, 180에 기재된 것을 포함한다. 링커 서열은 길이가 일반적으로 1 내지 약 50 아미노산일 수 있다. 링커 서열은 1차 및 2차 폴리펩티드가 기능적 도메인을 분리하고 입체적 배치의 저축을 막는데 사용될 수 있는 비-필수 N-말단 아미노산 부위를 가질 때 불필요하다.

연결된 DNA 서열은 적당한 전사적 또는 번역적 조절 요소에 작동적으로 연결된다. DNA 발현을 야기하는 조절 요소는 1차 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열의 5'에 위치한다. 이와 유사하게, 번역 및 전사 말단 신호를 종결하기 위해 필요한 정지 코돈은 2차 또는 최종 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열의 3'에 존재한다.

융합 단백질은 또한 관련없는 면역성 단백질과 함께 본 발명의 폴리펩티드를 포함하여 제공된다. 바람직하게는 면역성 단백질은 기억 반응을 유도할 수 있다. 이러한 단백질의 예는 과상풍, 결핵 및 간염 단백질을 포함한다(예를 들어, Stoute et al., 1997, New Engl. J. Med. 336: 86-91 참조).

바람직한 구체예 속에서, 면역성 융합 파트너는 그램-음성균 헤모필루스 인플루엔자 B의 표면 단백질인, 단백질 P로부터 유도된다(WO 91/18926). 바람직하게는, 단백질 D 유도체는 대략 단백질의 처음 1/3(예를 들어, 제 1 N-말단 100-110 아미노산)을 포함하고, 단백질 D 유도체는 지질화될 수 있다. 특정 바람직한 구체예 속에서, 지단백질 D 융합 파트너의 1차 109 잔기는 N-말단 상에 포함되어 추가적 외인성 T-세포 에피토프를 갖는 폴리펩티드를 제공하고 E.Coli에 있어서 발현 수준을 증가시킨다(따라서 발현 인핸서로서 작용함). 지질 꼬리는 항원 제공 세포에 항원의 최적의 제공을 확실하게 한다. 다른 융합 파트너는 인플루엔자 바이러스, NSI(헤마글루티닌)로부터 비-구조적 단백질을 포함한다. 전형적으로, 비록 T-헬퍼 에피토프를 포함하는 다른 단편이 사용되더라도 N-말단 81 아미노산이 사용될 수 있다.

다른 구체예에 있어서, 면역성 융합 파트너는 LYTA로서 알려진 단백질, 또는 그것의 일부(바람직하게는 C-말단 일부)이다. LYTA는 Streptococcus pneumoniae로부터 유도되는데, 이것은 아미다제 LYTA (LytA 유전자에 의해 암호화 됨; Gene 43: 265-292, 1986)로 알려진 N-아세틸-L-알라닌 아미다제를 합성한다. LYTA는 펩티도글리칸 주에서 특정 결합을 특이적으로 붕괴시키는 자기분해제이다. LYTA 단백질의 C-말단 도메인은 예를 들어 DEAR과 같은 콜린 또는 몇몇 콜린 유사체에 친화력에 대한 원인이다. 이러한 특성은 융합 단백질의 발현에 유용한 E.Coli CLYTA 발현 플라스미드의 개발에 이용되었다. 아미노 말단에서 C-LYTA 단편을 함유하는 하이브리드 단백질의 정제가 기술되었다(Biotechnology 10:795-798, 1992 참조). 바람직한 구체예 속에서, LYTA의 반복 부분은 융합 단백질 속으로 혼입될 수 있다. 반복 부분은 잔기 178을 개시하는 C-말단 부위에서 발견된다. 특히 바람직한 반복 부분은 잔기 188-305를 혼입시킨다.

일반적으로, 본원에서 기술되는 바와 같이 폴리펩티드(융합 단백질 포함) 및 폴리뉴클레오티드는 분리된다. "분리된" 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 그것의 본래의 환경으로부터 제거된 것이다. 예를 들어, 자연 발생적 단백질은 그것이 자연계에서 동시에 존재하는 일부 또는 모든 물질로부터 분리된다면, 분리될 수 있다.

바람직하게는, 그러한 폴리펩티드는 적어도 약 90% 순도, 더 바람직하게는 적어도 약 95% 순도 및 가장 바람직하게는 적어도 약 99% 순도이다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 자연적 환경의 일부가 아닌 벡터 속으로 복제되는 경우, 분리되는 것으로 여겨진다.

폴리뉴클레오티드 및 벡터

본 발명은 본원에 기재된 단일클론 항체를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 벡터를 함유하는 숙주세포를 더 제공한다. 이러한 발현 시스템은 본원발명의 항체와 같은 면역반응성 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용될 수 있고, 이 방법에서 숙주 세포는 배양되고 배양된 숙주 세포에 의해서 생산된 폴리펩티드가 회수된다. 본원발명의 항체를 암호화하는 폴리펩티드는 또한 숙주 피험체에 송달되어서 숙주 피험체의 세포에 의해서 항체가 발현될 수 있다. 숙주 피험체의 중추신경계로의 폴리뉴클레오티드 송달 및 중추신경계에서의 항-세닐린 항체의 발현을 위한 전략에 관한 실시예들은 1998년 10월 15일 공개된 PCT 공개번호 WO98/44955 에 기재되어 있다.

이러한 어떤 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드가 또한 본원발명에 포함된다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥(코딩 또는 안티센스) 또는 이중-가닥일 수 있으며, DNA(게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다. RNA 분자는 인트론을 함유하고 1 대 1 방식으로 DNA 분자에 대응하는 HnRNA 분자, 및 인트론을 함유하지 않는 mRNA 분자를 포함한다. 추가의 코딩 또는 비코딩 서열이, 필요한 것은 아니지만, 본 발명의 폴리뉴클레오티드내에 존재할 수 있으며, 폴리뉴클레오티드는, 필요한 것은 아니지만, 다른 분자 및/또는 지지 물질에 연결될 수 있다.

폴리뉴클레오티드는 천연 서열(즉, 항체 또는 그것의 부분을 암호화하는 내재성 서열)을 포함할 수 있거나 이러한 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 하나 이상의 치환, 추가, 결실 및/또는 삽입을 포함하여 암호화된 폴리펩티드의 면역반응성이 천연 면역반응성 분자에 비하여 감소되지 않도록 한다. 암호화된 폴리펩티드의 면역반응성에 대한 효과는 일반적으로 본원에 기재된 바와 같이 평가될 수 있다. 변이체는 천연 항체 또는 그것의 부분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 바람직하게는 적어도 약 70% 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 80% 동일성 및 가장 바람직하게는 약 90% 동일성을 나타낸다.

하기에 기술된대로 최대치로 일치하도록 배열하였을 때, 2개의 서열중의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 동일한 경우에, 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 "동일성"으로 말하여진다. 2개의 서열들간의 비교는 전형적으로 서열 유사성을 갖는 국부 영역을 동정하고 비교하기 위한 비교 윈도우를 통해 서열들을 비교함으로써 수행된다. 본원에 사용될 때, "비교 윈도우"는 적어도 약 20 개의, 일반적으로는 30 내지 약 75, 40 내지 약 50개의 인접한 위치의 세그먼트를 말하며, 서열은, 2개의 서열을 최적으로 배열한 다음, 인접하는 위치의 동일한 수의 기준 서열에 비교될 수 있다.

비교를 위한 서열의 최적의 배열은 디폴프 매개변수를 사용하는 Lasergene suite of bioinformatics 소프트웨어의 Megalign 프로그램(DNASTAR, Inc., Madison, WI)을 사용하여 수행될 수 있다. 이 프로그램은 다음 문헌들 Dayhoff, M. O.(1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships 에 기술된 몇개의 배열 구성을 포함한다. Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl.3, pp.345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5: 151-153; Myers, E. W. and Muller W., 1988, CABIOS 4: 11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11: 105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P. H. A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

바람직하게는, "서열 동일성의 백분율"은 적어도 20개 위치의 비교 윈도우를 통해서 2개의 최적으로 배열된 서열을 비교함으로써 결정되며, 비교 윈도우중의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 부분은 2개의 서열이 최적으로 배열된 기준 서열(부가 또는 결실을 포함하지 않는다)과 비교할 때, 20% 또는 그 미만의, 일반적으로는 5 내지 15%, 또는 10 내지 12%의 부가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 서열 동일성의 백분율은 양 서열 모두에 존재하는 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기의 위치 수를 결정하여 매칭된 위치 수를 얻고, 매칭된 위치 수를 기준 서열(즉, 윈도우 크기)중의 총 위치수로 나눈 다음, 그 결과에 100을 곱함으로써 계산된다.

변이체는 또한, 또는 천연 유전자 또는 그것의 부분 또는 보체에 실질적으로 상동성일 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드 변이체는 온화한 스트린전트한 조건하에서 천연 항체(또는 상보 서열)를 암호화하는 자연 발생 DNA 서열에 혼성화할 수 있다.

"온화한 스트린전트한 조건"은 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0) 용액에서 예비세척하는 단계; 50°C-65°C, 5 X SSC 에서 하룻밤동안 혼성화하는 단계에 이어서, 각각 0.1 % SDS 를 함유하는 2X, 0.5X 및 0.2X SSC 로 20분동안 65°C에서 2번 세척하는 단계를 포함한다.

본원에 사용될 때, "매우 스트린전트한 조건" 또는 "고스트린전시 조건"은 (1) 세척용으로 예를 들어, 50°C에서 0.015M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산 나트륨/0.1% 도데실황산 나트륨과 같은 낮은 이온 강도와 고온을 사용하는 것; (2) 혼성화 동안에 42°C에서 포름아미드, 예를 들어, 0.1% 소혈청 알부민/0.1% Ficoll/0.1% 폴리비닐피롤리돈/750mM 염화나트륨을 갖는 pH 6.5의 50mM 인산나트륨 완충액을 갖는 50%(v/v)포름아미드, 75mM 시트르산나트륨과 같은 변성제를 사용하는 것; (3) 42°C 에서 50% 포름아미드, 5 X SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산 나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 X Denhardt 용액, 초음파처리된 연어정자 DNA(50µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 덱스트란 술

페이트를 사용하고, 42°C, 0.2 x SSC(염화나트륨/시트르산나트륨)에서 세척한 다음, 55°C에서 EDTA를 포함하는 0.1 x SSC로 이루어진 고스트린전기로 세척하는 것이다. 당업자는 프로브 길이 등과 같은 요소를 적합화하기에 필요한 온도, 이온 강도 등을 조절하는 방법을 인지하고 있다.

유전자 코드의 축중성의 결과로서 본원에 기술된 폴리펩티드를 암호화하는 다양한 뉴클레오티드 서열이 존재한다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 이들 폴리뉴클레오티드 중 어떤 것은 어떤 천연 유전자의 뉴클레오티드 서열과 최소한의 상동성을 가진다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용의 상이함에 기인한 다양한 폴리뉴클레오티드가 본 발명에 의해서 특히 기대된다. 더욱이, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자는 본 발명의 범위내이다. 대립유전자는 뉴클레오티드의 결실, 부가 및/또는 치환과 같은 하나 이상의 돌연변이의 결과로서 변형된 내재성 유전자이다. 결과의 mRNA 및 단백질은, 반드시 필요한 것은 아니지만, 변형된 구조 또는 기능을 가진다. 대립유전자는 표준 기술(혼성화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교)을 사용하여 동정될 수 있다.

폴리뉴클레오티드는 당업계에 알려진 다양한 기술 중 어떤 것을 사용하여 제조될 수 있다. 항체를 암호화하는 DNA는 조직 발현 항체 mRNA로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻어질 수 있다. 항체-암호화 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 올리고뉴클레오티드 합성에 의해서 얻어질 수 있다. 라이브러리는 관심의 유전자 또는 그것에 의해 암호화된 단백질을 동정하도록 설계된 프로브(예를 들어, 결합 파트너 또는 적어도 약 20-80 염기의 올리고뉴클레오티드)에 의해서 스크리닝될 수 있다. 대표적인 라이브러리는 사람 간 cDNA 라이브러리(사람 간 5' 스트레치 플러스 cDNA, Clontech Laboratories, Inc.) 및 마우스 신장 cDNA 라이브러리(마우스 신장 5'-스트레치 cDNA, Clontech Laboratories, Inc.)를 포함한다. 선택된 프로브로 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하는 것은 Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989에 기술된 것과 같은 표준 절차를 사용하여 수행될 수 있다. 대안으로, 당업자는 PCR 방법을 사용하여 항체 암호화 유전자를 분리할 수 있다(Sambrook 등, 상기참조; Dieffenbach 등, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

프로브로서 선택된 올리고뉴클레오티드 서열은 가양성이 최소화되도록 충분히 길어야만 하고 충분히 명백하여야만 한다. 올리고뉴클레오티드는 스크리닝되는 라이브러리중의 DNA와의 혼성화시에 검출될 수 있도록 바람직하게는 표지화될 수 있다. 표지화 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, ³²P-표지된 ATP와 같은 방사성동위원소, 비오틀화 또는 효소 표지화의 사용을 포함한다. 온화한 스트린전시 및 고스트린전시를 포함하는 혼성화 조건은 Sambrook 등, 상기참조에서 제공된다.

이러한 라이브러리 스크리닝 방법에서 확인된 서열은 GeneBank와 같은 공공 데이터베이스 또는 다른 민간 서열 데이터베이스에 기탁되어 있고 이용가능한 다른 공지된 서열과 비교되고 배열될 수 있다. 분자의 한정된 영역내 또는 전장 서열에 걸친(아미노산 또는 뉴클레오티드 수준에서의) 서열 동일성은 상동성을 측정하기 위해 다양한 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 사용하여 서열 배열을 통해 측정될 수 있다.

단백질 코딩 서열을 갖는 핵산 분자는 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하고, 필요하다면, 전구체를 검출하기 위해서 Sambrook 등, 상기참조에 기재된 종래의 프라이머 연장 절차를 사용하고, cDNA로 역전사될 필요가 없는 mRNA 중간체를 프로세싱함으로써 얻어질 수 있다.

폴리뉴클레오티드 변이체는 예를 들어, 고형상 포스포라미디트 화학 합성과 같은 화학 합성을 포함하는 당업계에 알려진 방법에 의해서 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열중의 변형은 올리고뉴클레오티드-지시성 부위 특이적 돌연변이 유발(Adelman 등, DNA 2:183, 1983)과 같은 표준 돌연변이유발 기술을 사용하여 도입될 수 있다. 대안으로, RNA 분자는 항체를 암호화하는 DNA 서열 또는 그것의 부분의 생체외 또는 생체내 DNA 전사에 의해서 생성될 수 있다. 단, DNA는 적합한 RNA 폴리머라제 프로모터(예를 들어, T7 또는 SP6)를 포함하는 벡터내에 통합된다. 암호화된 폴리펩티드를 제조하기 위해서 본원에 기재된 어떤 부분이 사용될 수 있다. 더욱이, 또는 대안으로, 암호화된 폴리펩티드가 생체내에서 생성되도록 일부분이 환자에게 투여될 수 있다(예를 들어, 수상돌기세포와 같은 항원-제시 세포를, 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA 구조체로 트랜스펙션시키는 단계, 및 환자에 트랜스펙션된 세포를 투여하는 단계에 의함).

어떤 폴리뉴클레오티드는 생체내에서 안정성이 증가되도록 더욱 변형될 수 있다. 가능한 변형은 이에 제한되는 것은 아니지만, 5' 및/또는 3' 말단에서의 플랭킹 서열의 부가; 골격에서 포스포디에스테라제 연결보다는 포스포로티오에이트 또는 2' O-메틸의 사용; 및/또는 이노신, 케오신 및 위부토신과 같은 비전형적인 염기 및 아세틸-, 메틸-, 티오- 및 아데닌, 시티딘, 구아닌, 티민 및 유리딘의 다른 변형된 형태의 삽입을 포함한다.

뉴클레오티드 서열은 확립된 재조합 DNA 기술을 사용하여 다양한 다른 뉴클레오티드 서열에 연결될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 플라스미드, 파지미드, 람다 파지 유도체 및 코스미드를 포함하는 다양한 클로닝 벡터중 어떤 것에 클로닝될 수 있다. 특히 관심있는 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터를 포함한다. 일반적으로, 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 작용하는 복제 기점, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선택 마커를 포함할 것이다. 다른 요소는 목적으로 하는 사용에 의존적이고 이들은 당업자에게 자명한 것들이다.

어떤 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포로의 도입을 허용하도록 그리고 그 안에서의 발현을 허용하도록 조제될 수 있다. 이러한 체제는 하기에 기술된 치료 목적에 특히 유용하다. 당업자는 표적 세포에서 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 다양한 방법이 존재한다는 것을 이해하고 어떤 적합한 방법을 채용할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 이에 제한되는 것은 아니지만, 아데노바이러스, 아데노-결합 바이러스, 레트로바이러스, 또는 백시니아 또는 다른 폭스 바이러스(예를 들어, 아비딘 폭스 바이러스)와 같은 바이러스 벡터에 통합될 수 있다. DAN를 이러한 벡터에 통합시키는 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 레트로바이러스 벡터는 벡터가 표적에 특이적으로 되도록(형질전환된 세포의 동정 또는 선별을 돕기 위한) 선택 마커 및/또는 특정 표적 세포상의 리셉터에 대한 리간드를 암호화하는 유전자와 같은 표적화 부분에 대한 유전자를 추가적으로 전달하거나 통합할 수 있다. 표적화는 또한 당업계에 알려진 방법에 의해서 항체를 사용하여 수행될 수 있다.

치료 목적용 다른 제제는 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드, 및 수중 유형 에멀전을 포함하는 지질계 시스템, 교질입자, 혼합교질입자 및 리포솜과 같은 콜로이드성 분산 시스템을 포함한다. 생체외 및 생체내 송달 매체로서 사용하기 위한 바람직한 콜로이드성 시스템은 리포솜이다(즉, 인공막소포). 이러한 시스템의 제조와 사용은 당업계에 잘 알려져 있다.

약학적 조성물

본 발명은 약학적 조성물에 포함되는 항체, 폴리펩티드, 및/또는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 어떤 구체예에서, 약학적 조성물은 A β 펩티드의 아미노산 28-40(SEQ ID NO:1)에 우선적으로 결합하는 항체를 포함한다. 어떤 구체예에서, 항체는 단일클론 항체이다. 어떤 구체예에서, 약학적 조성물은 A β 펩티드의 아미노산 39 및/또는 40(SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 우선적으로 결합하는 단일클론 항체를 포함한다. 어떤 구체예에서, 약학적 조성물은 A β 펩티드의 아미노산 36-40(SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 우선적으로 결합하는 단일클론 항체를 포함한다. 어떤 구체예에서, 항체는 약 60nM 이하, 약 30nM 이하, 또는 약 3nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드의 아미노산 28-40(SEQ ID NO:1)에 결합한다. 어떤 구체예에서, 항체는 약 60nM 이하, 약 30nM 이하, 또는 약 3nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드의 아미노산 39 및/또는 40(SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 우선적으로 결합한다. 어떤 구체예에서, 항체는 약 60nM 이하, 약 30nM 이하, 또는 약 3nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드의 아미노산 36-40(SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 우선적으로 결합한다. 어떤 구체예에서, 상기에 기재된 항체는 A β ₁₋₄₁ 및/또는 A β ₁₋₄₂ 와 유사한 교차 반응을 나타내지 않는다. 어떤 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1 으로 표시된 하이브리도마에 의해서 생성된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 저해한다. 어떤 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:4 또는 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 항체와 A β 펩티드(SEQ ID NO:1)상의 동일한 에피토프에 결합하거나, 또는 8A1.2A1 으로 표시된 하이브리도마에 의해서 생성된 단일클론 항체가 결합하는 동일한 에피토프에 결합한다. 다른 구체예에서, 약학적 조성물은 사람 항체, 인간화 항체 또는 본원에 기재된 항체중 어떤 것으로부터 유래된 키메라 항체를 포함한다. 약학적 조성물은 하나 이상의 이러한 화합물 및, 선택적으로는, 생리적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본 발명의 범위내의 약학적 조성물은 또한 생물학적으로 활성이거나 비활성일 수 있는 다른 화합물을 또한 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 조성물은 적어도 2개의 항체, A β 펩티드의 아미노산 16-28 에 대해 유도된 제1의 항체, 및 A β 펩티드의 아미노산 28-40에 대해 유도된 제2의 항체를 포함한다.

약학적 조성물은 상기에 기재된 하나 이상의 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 를 포함하여 폴리펩티드가 제자리에서 생산되도록 한다. 상기에 언급된 바와 같이, DNA 는 핵산 발현 시스템, 박테리아 및 바이러스 발현 시스템을 포함하는 당업계에 알려진 다양한 송달 시스템 중 어떤 것에 존재할 수 있다. Rolland, 1998, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198에 기재된 것과 같은 수많은 유전자 송달 기술이 당업계에 알려져 있고, 이것은 본원에 참고문헌으로 인용된다. 적합한 핵산 발현 시스템은 환자에서의 발현에 필요한 DNA 서열(적당한 프로모터 및 종결 신호)을 포함한다.

바람직한 구체예에서, DNA 는 비병원성(결핍), 복제 적합 바이러스의 사용을 포함할 수 있는, 바이러스 발현 시스템(예를 들어, 벡시니아 또는 다른 폭스 바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데노바이러스)을 사용하여 도입될 수 있다. 적합한 시스템은 예를 들어, Fisher-Hoch 등, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 317-321; Flexner 등, 1989, Ann. N. Y. Acad. Sci. 569: 86-103; Flexner 등, 1990, Vaccine 8: 17-21; U.S. 특허번호 4,603,112, 4,769,330 및 5,017,487; WO 89/01973; U.S. 특허번호 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques 6: 616-627, 1988; Rosenfeld 등, 1991, Science 252: 431-434; Kolls 등, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215-219; Kass-Eisler 등, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11498-11502; Guzman 등, 1993, Circulation 88: 2838-2848; 및 Guzman 등, 1993, Cir. Res. 73: 1202-1207에 기재되어 있다. DMA 를 이러한 발현 시스템에 도입시키는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. DNA 는 또한, Ulmer 등, 1993, Science 259: 1745-1749 에 기재되고 Cohen, 1993, Science 259:1691-1692 에 개관된대로 "네이키드"되어 있다. 네이키드된 DNA 의 흡수는 세포내로 효율적으로 전송될 수 있는 생분해성 비드상에 DNA 를 코팅함으로써 증가될 수 있다.

당업계에 알려진 적합한 담체가 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 반면에, 담체의 형태는 투여 양식에 따라서 다양할 수 있다. 본 발명의 조성물은 예를 들어, 국소, 구강, 비강, 정맥내, 두개내, 복막내, 피하 또는 근육내 투여를 포함하는 어떤 적합한 방식의 투여용으로 조제될 수 있다. 피하 주사와 같은 비경구 투여용으로, 담체는 바람직하게는 물, 식염수, 알콜, 지방, 왁스 또는 완충액을 포함한다. 경구 투여용으로, 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 사카린나트륨, 황산, 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 및 탄산마그네슘과 같은 상기 담체 중 어떤 것 또는 고체 담체가 사용될 수 있다. 생분해성 마이크로스피어(예를 들어, 폴리락타이드 폴리글리콜레이트)는 본 발명의 약학적 조성물용 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 생분해성 마이크로스피어는 예를 들어, U.S. 특허번호 4,897,268 및 5,075,109 에 기재되어 있다.

이러한 조성물은 완충액(예를 들어, 중성 완충된 식염수 또는 인산염 완충된 식염수), 탄수화물(예를 들어, 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란), 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 클리신과 같은 아미노산, 산화방지제, EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이팅제, 에췌버트(예를 들어, 수산화암모늄) 및/또는 보존제를 포함한다. 또는, 본 발명의 조성물은 동결건조제로서 조제될 수 있다. 화합물은 잘 알려진 기술을 사용하여 리포솜내에 캡슐화될 수 있다.

본원에 기재된 조성물은 서방성 제제(즉, 투여후 화합물의 느린 방출에 영향을 주는 캡슐 또는 스폰지와 같은 제제)의 일부로서 투여될 수 있다. 이러한 제제는 일반적으로 잘 알려진 기술을 사용하여 제조될 수 있고, 예를 들어, 경구, 직장 또는 피하 주입에 의해서 또는 원하는 표적 부위에서의 주입에 의해 투여될 수 있다. 서방성 제제는 담체 매트릭스에 분산된 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 항체를 포함하고 및/또는 속도 제어 멤브레인에 의해 둘러싸인 저장소내에 보관된다. 이러한 제제에의 사용을 위한 담체는 생체적합성이고, 또한 생분해성일 수 있다. 바람직하게는, 제제는 상대적으로 일정한 수준의 활성 성분 방출을 제공한다. 서방성 제제내에 포함된 활성 화합물의 양은 주입 부위, 방출 속도 및 기대되는 방출 기간 및 치료 또는 예방될 상태에 따라 다르다.

치료법 및 예방법

본 발명의 (폴리펩티드를 포함하는) 항체, 폴리뉴클레오티드, 및 약학적 조성물은 알츠하이머 질환 및 다운 증후군, 파킨슨 질환, 및 다발 뇌경색성 치매와 같은 변형된 A β 또는 β APP 발현, 또는 A β 펩티드의 축적과 연관된 다른 질환을 치료, 예방 및 저해하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 면역반응성 분자, (폴리펩티드를 포함하는) 항체, 폴리뉴클레오티드 또는 약학적 조성물을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 예방적 이용에서, 약학적 조성물 또는 약물은 알츠하이머 질환에 감염되기 쉬운, 또는 다르게는 위험성이 있는 환자에게 위험성을 제거하거나 감소하고, 증상을 경감시키고, 생화학, 조직 및/또는 질환의 거동상 증후, 그것의 합병증 및 질환의 진행동안 나타나는 중간 병리적 표현형을 포함하는 질환의 개시를 지연시키기에 충분한 양으로 투여된다. 치료적 이용에서, 조성물 또는 약물은 이러한 질환의 가능성이 있거나, 또는 이미 이러한 질환을 앓는 환자에게 그것의 합병증 및 질환의 진행동안 나타나는 중간 병리적 표현형을 포함하는 (생화학, 조직학 및/또는 거동상) 질환의 징후를 치료하거나 또는 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로 투여된다.

본 발명은 또한 피험체에 (폴리펩티드를 포함하는) 항체 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 피험체에 알츠하이머 질환과 연관된 징후의 발생을 지연시키는 방법을 제공한다. 알츠하이머 질환과 연관된 징후는 이에 제한되는 것은 아니지만, 비정상적인 기억력, 문제해결, 언어, 계산, 공간·시간 지각력, 판단 및 거동상의 문제를 포함한다.

본 발명은 또한 피험체에 본 발명의 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 피험체에서 아말로이드 플라크의 형성을 저해 또는 억제하는 방법을 제공한다. 어떤 구체예에서, 아말로이드 플라크는 피험체의 뇌에 존재한다.

본 발명은 또한 피험체에 발명의 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 피험체에서 아말로이드 플라크를 감소시키는 방법을 제공한다. 어떤 구체예에서, 아말로이드 플라크는 피험체의 뇌에 존재한다.

본 발명은 또한 피험체에 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 피험체에서 아말로이드 플라크를 제거 또는 청소하는 방법을 제공한다. 어떤 구체예에서, 아말로이드 플라크는 피험체의 뇌에 존재한다.

본 발명은 또한 피험체에 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 피험체에서 (뇌와 같은) 조직중의 A β 펩티드를 감소시키는 방법, (뇌와 같은) 조직중의 A β 펩티드의 축적을 저해 및/또는 감소시키는 방법, 및 (뇌와 같은) 조직중의 A β 펩티드의 독성 효과를 감소시키는 방법을 제공한다.

(예방 또는 치료법을 포함하는) 본원에 기재된 방법은 하나의 또는 다수의 부위에 1회 시간 포인트 또는 수회 시간 포인트에서 1회 직접 주사에 의해서 이루어질 수 있다. 투여는 또한 다수의 부위에 거의 동시에 이루어질 수 있다. 투여 빈도는 요법 과정동안 결정되고 조정될 수 있으며, 원하는 결과의 달성에 의존한다. 어떤 경우에, (폴리펩티드를 포함하는) 항체, 폴리뉴클레오티드의 연속적인 서방성 제제, 및 본 발명의 약학적 조성물이 적당할 수 있다. 서방성을 달성하기 위한 다양한 제제 및 장치가 당업계에 공지되어 있다.

환자, 피험체, 또는 개체는 사람, 소, 말, 개, 고양이, 돼지, 및 양과 같은 포유동물을 포함한다. 피험체는 바람직하게는 사람이고, 질환에 감염되어 있거나 감염되어 있지 않을 수 있거나 현재 징후를 보일 수 있다. 알츠하이머 질환의 경우에, 그 또는 그녀가 노인이라면 실제로 누구든지 알츠하이머 질환을 겪을 위험이 존재한다. 따라서, 본 방법은 피험체 환자의 위험성에 대한 어떤 평가를 필요로 하지 않고 일반적인 집단에 예방적으로 투여될 수 있다. 본 방법은 알츠하이머 질환의 알려진 유전적 위험성을 갖는 개체에 유용하다. 이러한 개체는 이 질환을 앓은 친척이 있는 자, 그리고 유전적 또는 생화학적 마커의 분석에 의해서 그것의 위험성이 측정된 자를 포함한다. 알츠하이머 질환에 대한 위험성에 관한 유전적 마커는 APP 유전자에서의 돌연변이, 각각 Hardy 및 Swedish 돌연변이라고 말하여지는 특히 위치 717에서의 돌연변이 및 위치 670 및 671에서의 돌연변이를 포함한다(Hardy (1997) Trends Neurosci. 20: 154-9 참조). 위험성에 관한 다른 마커는 프레세닐린 유전자들, PS1 및 PS2, 및 ApoE4에서의 돌연변이, AD의 가족병력, 과콜레스테롤혈증 또는 아테롬성 동맥경화증이다. 현재 알츠하이머 질환을 앓는 개체는 특징적인 치매 및 상기에 기재된 위험 요소들의 존재로부터 인지될 수 있다. 더욱이, 많은 진단 시험은 AD를 갖는 개체를 확인하는데 유용하다. 이들은 CSF tau 및 A β 42 수준의 측정을 포함한다. 증가된 tau 및 감소된 A β 42 수준은 AD의 존재를 의미한다. 알츠하이머 질환을 앓는 개체는 또한 ADRDA(알츠하이머 질환 및 연관된 관련된 장애) 기준에 의해서 진단될 수 있다. 무증후성 환자에서, 치료는 어떤 나이(예를 들어, 10, 20, 30)에도 시작될 수 있다. 그러나, 일반적으로, 환자가 40, 50, 60 또는 70에 이르기 전에는 치료를 시작할 필요가 없다. 치료는 전형적으로 일정 시간동안 수회의 투여를 수반한다. 치료는 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해서 시간을 두고 모니터링될 수 있다. 잠재적인 다운증후군 환자의 경우에, 치료는 모체에 치료약제를 투여함으로써 출생전에 또는 출생직후에 개시될 수 있다.

상기 방법에 사용될 수 있는 약학적 조성물은 이에 제한되는 것은 아니지만, A β 펩티드의 아미노산 28-40 (SEQ ID NO:1)에 우선적으로 결합하는 항체, A β 펩티드의 아미노산 39 및/또는 40 (SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 우선적으로 결합하는 항체, 약 60 nM 이하, 약 30nM 이하, 또는 약 3 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드의 아미노산 28-40 (SEQ ID NO:1)에 결합하는 항체, 약 60 nM 이하, 약 30nM 이하, 또는 약 3 nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드의 아미노산 39 및/또는 40 (SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 우선적으로 결합하는 항체, 및 본원에 기재된 항체 및 폴리펩티드의 어떤 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 다음의 항체가 사용될 수 있다: A β 펩티드의 아미노산 39 및/또는 40 (SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 결합하지만, A β ₁₋₄₂ 및 A β ₁₋₄₃ 펩티드와의 유의한 교차반응성을 나타내지는 않는 항체; 약 200nM 이하, 약 1nM 이하의 친화력으로 A β ₁₋₄₀ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 항체의 Fab 단편; SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체의 A β ₁₋₄₀ 펩티드(SEQ ID NO:1)와의 결합을 경쟁적으로 저해하는 항체; SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체가 결합하는 동일한 에피토프에 결합하는 항체; 및 상기에 기재된 성질의 어떤 조합을 갖는 항체.

투여 및 투여량

항체는 바람직하게는 담체; 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체로 포유동물에 투여된다. 적합한 담체 및 그것의 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publing Co., Easton, PA,

1990; 및 *Remington, The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. Mack Publishing, 2000 에 기재되어 있다. 전형적으로, 제제에 사용된 약학적으로 허용가능한 염의 적합한 양은 제제를 등장성이 되도록 한다. 담체의 예는 식염수, 링거액 및 테스트로스 용액을 포함한다. 용액의 pH 는 바람직하게는 약 5 내지 약 8, 더욱 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5 이다. 더욱이, 담체는 항체를 포함하는 고형 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스와 같은 서방성 제제를 포함하고, 이 매트릭스는 예를 들어, 필름, 리포솜 또는 미세입자와 같은 형상화된 물품 형태이다. 어떤 담체는 더욱 바람직하게 예를 들어, 투여 경로 및 투여되는 항체의 농도에 의존적일 수 있다는 것이 당업자에게는 자명할 것이다.

항체는 주사(예를 들어, 전신, 정맥내, 복막내, 피하, 근육내, 간문맥내)에 의해서 또는 유효한 형태로 혈류에 그것의 송달을 보장하는 주입과 같은 다른 방법에 의해서 포유동물에 투여될 수 있다. 항체는 또한 단리된 조직 관류와 같은 단리된 관류 기술에 의해서 투여되어서 국부 치료 효과를 발휘할 수 있다. 정맥내 투여가 바람직하다.

유효한 투여량 및 항체 투여 스케줄은 임상적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정을 하는 것은 당업계의 기술범위내이다. 당업자는 투여되어야만 하는 항체의 투여량이 예를 들어, 항체를 수용하는 포유동물, 투여 경로, 사용된 항체의 특정 타입 및 포유동물에 투여되는 다른 약물에 따라 다양하다는 것을 이해할 것이다. 항체에 대한 적합한 투여량을 선택하는 기준은 예를 들어, *Handbook of Monoclonal Antibodies*, Ferrone 등, eds., Nokes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, ch.22 및 pp. 303-357; Smith 등, *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Haber 등, eds., Raven Press, New York, 1977, pp. 365-389 와 같은 항체의 치료적 사용에 관한 문헌에서 확인된다. 단독으로 사용된 항체의 전형적인 일일 투여량은 매일 약 1 μ g/kg(체중) 내지 100mg/kg(체중) 범위이지만, 상기 언급된 요소에 따라서 달라진다. 일반적으로, 다음 투여량 중 어떤 것이 사용될 수 있다: 적어도 약 50mg/kg 체중의 투여량; 적어도 약 10mg/kg 체중의 투여량; 적어도 약 3mg/kg 체중의 투여량; 적어도 약 1mg/kg 체중의 투여량; 적어도 약 750 μ g/kg 체중의 투여량; 적어도 약 500 μ g/kg 체중의 투여량; 적어도 약 250 μ g/kg 체중의 투여량; 적어도 약 100 μ g/kg 체중의 투여량; 적어도 약 50 μ g/kg 체중의 투여량; 적어도 약 10 μ g/kg 체중의 투여량; 적어도 약 1 μ g 이상/kg 체중의 투여량.

어떤 구체예에서, 하나 이상의 항체가 존재할 수 있다. 이러한 조성물은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개의 본 발명의 (폴리펩티드를 포함하는) 상이한 항체를 포함한다.

항체는 또한 하나 이상의 다른 치료제의 유효량과 조합하여 포유동물에 투여될 수 있다. 항체는 연속적으로 또는 하나 이상의 다른 치료제와 동시에 투여될 수 있다. 항체 및 치료제의 양은 예를 들어, 사용된 약물의 형태, 치료되는 병리상태, 및 투여 스케줄 및 경로에 따라 달라지지만, 일반적으로는 각각이 개별적으로 사용된 경우보다는 적을 것이다.

포유동물에 항체를 투여한 다음, 포유동물의 생리상태는 당업자에게 잘 알려진 다양한 방법으로 모니터될 수 있다.

상기 투여 및 투여량 기준은 본원에 기재된 폴리펩티드에 적합화될 수 있다.

본 발명의 (폴리펩티드를 포함하는) 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 또한 송달 및 원하는 세포에서 항체 또는 폴리펩티드의 발현에 사용될 수 있다. 발현 벡터가 항체의 발현을 지시하도록 사용될 수 있다는 것은 명백하다. 발현벡터는 전신에, 복막내, 정맥내, 근육내, 피하, 포막내, 심실내, 구강내, 장내, 비경구내, 비강내, 피부내, 또는 흡입에 의해서 투여될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터의 투여는 주사, 경구 투여, 입자충 또는 카테테르화 투여, 및 국부 투여를 포함하는 국부성 또는 전신성 투여를 포함한다. 당업자는 생체내에서 외인성 단백질을 발현시키기 위한 발현 벡터의 투여에 익숙하다. 예를 들어, U.S. 특허번호 6,436,908; 6,413,942; 및 6,376,471 참조.

본 발명의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 치료적 조성물의 표적화된 송달이 또한 사용된다. 리셉터-매개 DNA 송달 기술은 예를 들어, Findeis 등, *Trends Biotechnol.*(1993) 11:202; Chiou 등, *Gene Therapeutics: Methods And Applications of Direct Gene Transfer*(J.A.Wolff, ED.)(1994); Wu 등, *J. Biol. Chem.*(1988) 263:621; Wu 등, *J. Biol. Chem.* (1994)269:542; Zenke 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*(1990) 87: 3655; Wu 등, *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338 에 기재되어 있다. 폴리뉴클레오티드를 포함하는 치료 조성물은 유전자 요법 프로토콜에서 국부 투여용으로 약 100 ng 내지 약 200 mg DNA 범위로 투여될 수 있다. 약 500 ng 내지 약 50 mg, 약 1 μ g 내지 약 2mg, 약 5 μ g 내지 약 500 μ g, 및 약 20 μ g 내지 약 100 μ g 범위 농도의 DNA 가 유전자 요법 프로토콜동안 사용될 수 있다. 본 발명의 치료 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 유전자 송달 매체를 사용하여 송달될 수 있다. 유전자 송달 매체는 바이러스 또는 비바이러스 기원일 수 있다(일반적으로, Jolly, *Cancer Gene Therapy*(1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy*(1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy*(1995) 1:185; 및 Kaplitt, *Nature Genetics*(1994)6:148 참조). 이러한 코딩 서열의 발현은 내재성 포유동물 또는 이종성 프로모터를 사용하여 유도될 수 있다. 코딩 서열의 발현은 구성적이거나 조절될 수 있다.

원하는 폴리뉴클레오티드의 송달 및 원하는 세포에서의 발현을 위한 바이러스-기초 벡터는 당업계에 잘 알려져있다. 대표적인 바이러스 기초 매체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 재조합 레트로바이러스(예를 들어, PCT 공개번호 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; U.S. 특허번호 5,219,740; 4,777,127; GB 특허번호 2,200,651; 및 EP 0 345 242 참조), 알파바이러스-기초 벡터(예를 들어, 신드비스 바이러스 벡터, 켈리키 포레스트 바이러스(ATCC VR-67; ATCC VR-1247), 로스 리버 바이러스(ATCC VR-373; ATCC VR-1246) 및 베네뉴에란 말 뇌염 바이러스(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532), 및 아데노-회합 바이러스(AAV) 벡터(예를 들어, PCT 공개번호 WO94/12649, WO93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655)를 포함한다. Curiel, *Hum. Gene Ther.*(1992)에 기재된 대로 죽은 아데노바이러스에 연결된 DNA 의 투여가 사용될 수 있다.

비바이러스 송달 매체 및 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하나의 죽은 아데노바이러스에 연결되거나 연결되지 않은 다가양이온 응축 DNA(예를 들어, Curiel, *Hum. Gene Ther.*(1992) 3: 147 참조); 리간드-연결된 DNA(예를 들어, Wu, *J. Biol. Chem.*(1989) 264: 16985 참조); 진행세포 송달매체 세포(예를 들어, U.S.특허번호5,814,482; PCT 공개번호 WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 및 WO 97/42338 참조) 및 핵충전 중성화 또는 세포막과의 융합을 포함한다. 네이키드 DNA 가 또한 사용될 수 있다. 대표적인 네이키드 DNA 도입 방법은 PCT 공개번호 WO 90/11092 및

U.S.특허번호 5,580,859에 기재되어 있다. 유전자 송달 매체로서 작용할 수 있는 리포솜은 U.S.특허번호 5,422,120; PCT 공개번호 WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; 및 EP 0 524 968에 기재되어 있다. 추가의 접근법이 Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14: 2411, 및 Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91: 1581에 기재되어 있다.

항체의 진단적 사용

본 발명의 항체는 알츠하이머 질환 및 다운 증후군과 같은 변형된 A β 또는 β APP 발현과 연관된 다른 질환의 검출, 진단 및 모니터링에 사용될 수 있다. 방법은 변형된 A β 또는 β APP 발현을 갖는 것으로 의심되는 환자 표본을 본 발명의 항체와 접촉시키는 단계 및 A β 또는 β APP의 수준이 대조표준 또는 비교 표본에서의 수준과 다른지를 결정하는 단계를 포함한다.

진단 이용을 위해, 항체는 전형적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 방사성 동위원소, 형광성 표지, 및 다양한 효소-기질 표지를 포함하는 검출가능한 부분으로 표지될 것이다. 항체에 표지를 접합시키는 방법은 당업계에 공지이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 표지될 필요가 없고, 그것의 존재는 본 발명의 항체에 결합하는 표지된 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

본 발명의 항체는 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석, 및 면역침전 분석과 같은 어떤 공지된 분석 방법에 사용될 수 있다. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

항체는 또한 생체내 영상진단과 같은 생체내 진단 분석에 사용될 수 있다. 일반적으로, 항체는 방사성핵종(^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , 또는 ^3H)으로 표지되어서, 관심의 세포 또는 조직은 면역신티오그래피를 사용하여 국부화될 수 있다.

항체는 당업계에 잘 알려진 기술에 따라 병리학에서 시약을 염색할 때 사용될 수 있다.

키트

더 이상의 구체예에서, 본 발명은 알츠하이머 질환, 다운 신드롬, 또는 변형된 A β 또는 β APP 발현과 연관된 다른 질환과 같은 병리 상태를 치료하거나 또는 A β 또는 β APP를 검출하거나 정제하는데 유용한 물질을 포함하는 제조 물품 및 키트를 제공한다. 제조 물품은 표지된 용기를 포함한다. 적당한 용기는 예를 들어, 병, 바이알 및 시험 튜브를 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 제조될 수 있다. 용기는 병리 상태를 치료하거나 A β 또는 β APP를 검출하거나 정제하기에 효과적인 활성제를 갖는 조성물을 함유한다. 조성물중의 활성제는 항체이고 바람직하게는, A β 또는 β APP에 특이적인 단일클론 항체를 포함한다. 어떤 구체예에서, 활성제는 A β 펩티드의 아미노산 28-40(SEQ ID NO:1) 내의 에피토프에 결합하는 항체이다. 어떤 구체예에서, 항체는 A β 펩티드의 아미노산 38-40에 분포하는 에피토프에 우선적으로 결합한다. 어떤 구체예에서, 항체는 약 60nM 이하, 약 30nM 이하, 또는 약 3nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드의 아미노산 28-40(SEQ ID NO:1)의 아미노산에 우선적으로 결합한다. 어떤 구체예에서, 항체는 약 60nM 이하, 약 30nM 이하, 또는 약 3nM 이하의 친화력으로 A β 펩티드의 아미노산 39 및/또는 40(SEQ ID NO:1)을 포함하는 에피토프에 우선적으로 결합한다. 어떤 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 도식된 아미노산을 포함하는 단일클론 항체, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해서 생산된 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 저해한다. 어떤 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:4 및/또는 6에 도식된 아미노산 서열을 포함하는 항체와 A β 펩티드상의 동일한 에피토프(SEQ ID NO:1)에 결합하거나, 또는 8A1.2A1으로 표시된 하이브리도마에 의해 생산된 단일클론 항체가 결합하는 동일한 에피토프에 결합한다. 어떤 구체예에서, 활성제는 인간화 항체, 본원에 기재된 키메라 항체 또는 인간화 항체중 어떤 것을 포함한다. 용기상의 표지는 알츠하이머 질환과 같은 병리 상태를 치료하거나, 또는 A β 또는 β APP를 검출하거나 정제하는데 사용되고, 또한 상기에 기재된 바와 같은 생체내 또는 생체의 사용을 위한 지침을 나타낼 수 있다.

어떤 구체예에서, 본 발명의 키트는 상기에 기재된 용기를 포함한다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 키트는 상기에 기재된 용기 및 완충액을 포함하는 제2의 용기를 포함한다. (알츠하이머 질환의 치료 방법, 및 뇌속의 A β 펩티드의 축적을 저해 또는 감소시키는 방법과 같은) 본원에 기재된 어떤 방법을 수행하기 위한 지침서와 함께, 다른 완충액, 희석제, 필터, 니들, 주사기, 및 패키지 삽입물을 포함하는 다른 물질을 더 포함할 수 있다. A β 또는 β APP를 검출하거나 정제하는데 사용되는 키트에서, 항체는 전형적으로 예를 들어, 방사성동위원소, 형광 화합물, 생발광 화합물, 화학발광 화합물, 금속 킬레이터 또는 효소와 같은 검출가능한 마커로 표지된다.

실시예

하기 실시예는 본 발명을 예증하고 그것을 만들고 사용하는데 있어서 당업자를 돕기 위해 제시된다. 실시예는 어떠한 식으로도 본 발명의 범위를 달리 제한하려는 의도가 아니다.

실시예 1: A β 에 대해 지시된 단일클론 항체의 제조 및 특성화

이 실시예에서 제시한 데이터는 A β 에 대해 지시된 높은-친화력, 특이성 항체가 생성될 수 있고 A β -관련 질환을 표적으로 하기 위한 유용한 치료제를 제공할 수 있다는 것을 보여준다. 마우스는 Geerligs HJ et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 124: 95-102; Kenney JS et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 121: 157-166; and Wicher K et al., 1989, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89:128-135에서 기술된 바와 같이 10 연속 매주 간격으로 Ribl 보조약 (마우스당 100 μ l 총계, 발바닥 당 50 μ l)중의 50-100 μ g의 A β_{1-40} 펩티드로 면역화되었다.

면역화 마우스로부터 비장세포를 얻었고 폴리에틸렌 글리콜 1500과 함께, 10: 1의 비율로 NSO 골수종 세포와 융합시켰다. 잡종을 DMEM 함유 20% 말 혈청 및 2-옥살로아세트이트/피루베이트/인슐린 (Sigma)을 함유하는 DMEM에서 96-웰

플레이트안으로 플레이트아웃하였고, 히포산틴/아미노테린/티미딘 선택이 시작되었다. 8일째에, 100 μ l의 DMEM 함유 20% 말 혈청을 모든 웰에 첨가하였다. 잡종의 상층액은 항체 포획 면역분석법을 사용함으로써 스크리닝되었다. 항체 부류의 결정은 부류-특이성 제 2 항체로 수행되었다.

단일클론 항체-생산 세포주의 패널이 특성화를 위해 선택되었다. 이들 세포주 및 대응하는 항체를 설명하는 정보가 표 2에 열거되어 있다.

표 2.

단일클론 항체 특성화

항체 A β	단일클론 제조 세포주	동형	에피토프	ELISA		친화력 Kd (nM)	교차 반응성
				지시	포획		
2286	8A1.2A1	IgG1	A β 28-40	있음	있음	2.7	No
2287	11A4.1E5	IgG2a	A β 16-28	있음	있음	59	No
2288	23E9.1A1	IgG2b	A β 1-16	있음	있음	ND	No
2289	3C6.1F9	IgG2b	A β 16-28	있음	있음	2.9	No
2290	14E10.1F3	IgG2a	A β 16-28	있음	있음	9.2	No
2294	13E11.1A12	IgG2b	A β 28-40	있음	있음	38	No
2324	10B10.2E6	IgG2b	A β 1-16	있음	ND	0.9	No

다양한 공급원으로부터 A β 에의 결합, 및 β -APP 및 대조군 펩티드로의 결합을 샌드위치 분석법으로 시험하였다. 시험된 펩티드는: 둘다 Calbiochem (San Diego, CA)로부터 얻은 β -아밀로이드 펩티드 1-42 및 1-40, 및 Bachem (Torrance, CA)로부터 얻은 β -아밀로이드 펩티드 1-43였다. 펩티드는 플레이트 위에 고정시키고, 항체를 첨가하고, GAMIgG (Fc) HRP를 사용하여 결합을 검출하였고 490nm에서 흡광도를 판독하였다. 도 1에 나타낸 표차-반응성 데이터는 A β 에 대해 지시된 mAbs 가 β -APP와 교차 반응하지 않는다는 것을 확인한다.

포획 분석법을 수행하여 항체가 가용성 A β 펩티드를 포획할 수 있다는 것을 확인하였다. 이 분석법에서, A β 펩티드는 분석 플레이트 위에 고정되었고, mAb를 직접 또는 10 μ g/ml A β 으로 미리배양후에 첨가하였고, 결합을 GAMIgG(Fc) HRP를 사용하여 검출하였고 490 nm에서 흡광도를 판독한다.

대조군은 마우스 항- β APP 및 6E10, 사람 β -아밀로이드 펩티드의 아미노산 잔기 1-17를 검출하는 단일클론 항체였다 (Signet, Dedham, MA). 가용성 A β 의 포획을 증명하는 데이터가 도 2에 나와있다.

후보 치료 항체는 Bard et al., 2000, Nature Medicine 6 (8): 916-919에서 기술된 바와 같이 생체내에서 중추 신경 계에서 플라크 부담을 효과적으로 줄이는 그들의 능력에 대해 생체외에서 분석될 수 있다.

실시에 2: A β 결합에 대해 항체가 지시된 A β 폴리펩티드에 대한 에피토프의 특성화

단일클론 항체에 의해 인식되는 A β 폴리펩티드에서 에피토프를 결정하기 위해서, 표면 플라즈몬 공명 (SPR, Biacore 3000) 결합 분석을 사용하였다. 비오틴 (Global Peptide Services, CO)에 커플링된 A β_{1-40} 폴리펩티드 (SEQ ID NO :1)는 스트렙타비딘-코팅된 칩위에 고정되었다. A β 펩티드의 다른 가용성 단편들의 부재 또는 존재하에서(1000 nM에서, American Peptide Company Inc., CA으로부터) A β 항체(100nM에서)의 고정된 A β_{1-40} 에 대한 결합. 단일클론 항체 2324, 2289, 및 2286(보다 정확하게는 그들의 각각의 하이브리도마 세포주 10B10. 2E6, 3C6.1F9, 및 8A1.2A1로부터 분리된 항체)의 A β_{1-40} 에의 결합을 변위시키는데 필요한 A β 펩티드는 A β_{1-16} , A β_{1-28} , 및 A β_{1-40} 였다(도면 3). A β_{1-40} 에의 모든 3개의 항체의 결합은 가용성 A β_{1-40} 에 의해 억제되었다. 그러나, A β_{1-38} 펩티드는 MAb 2324 및 2289로의 A β_{1-40} 의 결합을 억제하였지만, MAb 2286에의 결합은 억제하지 않고, MAb 2286가 결합하는 에피토프가 A β_{1-40} 펩티드의 아미노산 39 및/또는 40을 포함한다는 것을 암시한다(도면 3).

게다가, A β_{1-42} 와 A β_{1-43} 펩티드는 비록 그들이 MAb 2324 및 2289 모두에 대한 A β_{1-40} 결합을 쉽게 억제할 수 있지만 MAb 2286의 A β_{1-40} 로의 결합을 억제하지 않았다(도면 3). 이들 결과는 MAb 2286가 우선적으로 A β_{1-40} 에 결합하지만, A β_{1-42} 및 A β_{1-43} 에는 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

Mab 2286의 결합에서 β -아밀로이드 펩티드의 분리된 아미노산 잔기의 수반을 더욱 평가하기 위해서, 마지막 5 아미노산 (A β_{1-4} 아미노산 잔기 36-40)의 각각이 개별적으로 알라닌(알라닌 스캐닝 돌연변이유발)에 의해 치환된 다른 A β_{1-40} 변이체가 부위 지시된 돌연변이유발에 의해 발생되었다. 이들 A β_{1-40} 변이체(표 6에 나타낸 서열)는 Glutathione-S-Transferase (GST) 융합 단백질(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ USA)로서 E. coli에서 발현되었고 이어서 Glutathione-아가로스 비즈에서 친화력 정제되었다(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). 대조군으로서, A β_{1-41} (SEQ ID NO : 13)은 물론이고 야생형 (WT) A β_{1-40} (SEQ ID NO : 1)는 또한 GST 융합 단백질로서 발현되었다. 5

개의 다른 변이체(SEQ ID NOS: 14-18)는 물론이고 $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ 가 그후 분석 플레이트 위에 고정되었고(각각 웰당 0.25 μ g) Mab 2286 또는 Mab 2324 (각각 아미노산 28-40 또는 1-16 사이에 $A\beta_{1-40}$ 의 에피토프에 지시됨; 2 nM에서 각각의 항체)로 배양되었다. 10 연속 세척 후에, 분석 플레이트를 비오틴-접합된 염소-항-마우스(H+L) 항체(Vector Laboratories, Burlingame CA, USA)로 배양하고 이어서 HRP-접합된 스트렙타비딘 (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA)으로 배양했다. 플레이트의 흡광도는 450 nm에서 관독되었다.

도 8에서 나타난 바와 같이, $A\beta$ 의 N 종말 에피토프에 지시된 Mab 2324는, 동일한 강도를 갖는 모든 변이체를 인식했고 플레이트에서 단백질 농도 및 단백질 통합의 내부 양성 대조군으로서 역할을 했다. Mab 2286는 $A\beta_{1-41}$ (또는 도 3에서 나타난 바와 같이 $A\beta_{1-42}$)을 인식하지 않았지만 C-종말 V40의 Ala의 돌연변이는 결합에 영향을 주지 않았고, 이는 단백질의 아미노 카르복시 종말 부분은 Mab 2286 에피토프에 직접적으로 수반될 수 있었지만 V40의 측쇄는 덜 중요할 수 있다는 것을 암시한다. AP140 변이체V39A, G38A, G37A 및 V36A는 Mab 2286에의 감소된 결합을 나타냈고, 이는 Mab 2286 에피토프가 $A\beta_{1-40}$ 의 C 종말 단부에서 적어도 5개의 아미노산에 대해 연장되었다는 것을 증명한다. V 및 G의 A로의 돌연변이는 매우 보수적이고 단백질에서 중요한 형태적 변화를 생산하지 않을 것 같고, 따라서, Mab 2286 결합으로의 이들 돌연변이의 큰 영향은 AD의 문맥에서 언급된 아미노산 사이에서 분화하는 항체의 능력때문일 수 있고 이들 데이터는 이 항체에 대해서 매우 고도의 특이성을 증명하였다.

실시예 3: β APP에 대해 지시된 단일클론 항체의 제조 및 특성화

마우스는 실시예 1에서 기술된 바와 같이 APP로 면역화되었다. 단일클론 항체-생산 세포주의 패널은 특성화를 위해 선택되었다. 이들 세포주 및 대응하는 항체를 기술하는 정보가 표 3에 나열된다.

표 3.

단일클론 항체 특성화

항체 APP	단일클론 제조 세포주	동형	ELISA		Kd (nM)	교차 반응성
			지시	포획		
2312	25E12.1F9.1H8 (BP26)	IgG1	있음	ND	ND	없음
2313	24H4.2E10.1F5 (BP27)	IgG1	있음	ND	ND	없음
2334	1F10.8E6.2A2 (BP80)	IgG2b	있음	ND	ND	없음
2335	13E12.1C5 (BP81)	IgG2b	있음	ND	ND	없음
2336	14D9.1G8 (BP82)	IgG1	있음	ND	ND	없음

실시예 4: 단일클론 항체의 인간화

마우스 항체 2286은 중쇄 CDRs (Kabat 및/또는 Chothia)를 사람 생식계통 수용체 서열 VH3 및 VH4안으로 접목시킴으로써 인간화되었고; 경쇄 Kabat CDRs는 사람 생식계통 수용체 서열 08안으로 접목시켰다. 항체 2286의 인간화 중쇄 및 경쇄는 하기 표 4에 나와있다.

표 4.

인간화 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열

인간화 2286 경쇄 가변 도메인(생식계통 틀 O8)
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYYCQQYRKLPYTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 13)
인간화 2286 중쇄 가변 도메인(생식계통 틀 VH3)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASgfdfsrYWMNWVRQAPGKGLEWVSEINPD SSTINYTPSLKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWGQG TTLTVSS (SEQ ID NO:14)
인간화 2286 중쇄 가변 도메인(생식계통 틀 VH4)
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSgfdfsrYWMNWIRQPPGKGLEWIGEINPDSS TINYTPSLKDRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQMGYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:15)

*Kabat 와 Chothia (더 낮은 경우) 학명 모두가 CDR 경계를 한정하는데 사용되는 CDRH1를 제외하고 Kabat 학명 (밑줄로 표시됨)에 따라서 항체 무거운 및 경쇄에서 CDR 경계를 결정하였다.

단일클론 항체의 항-Ap Fab 단편들의 평형 해리 상수(K_D) 값은 BIAcore3000™ 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 시스템 (BIAcore, INC, Piscaway NJ)을 사용하여 '정상 상태' 방법에 의해 결정되었다. 데이터를 계산된 BIA평가 프로그램을 사용하여 1: 1 Langmuir 결합 모델(Lofas & Johnsson, 1990)로 맞춤으로써 동역학 연합율(kol) 및 해리율(k_{off})을 동시에 얻었다. 인간화항체 및 마우스 항체 2286의 친화력은 아래 표 5에 나타난다.

표 5.

인간화 항체의 결합 친화력

	$k_{off}(S^{-1})$	$k_{on}(M^{-1}, S^{-1})$	$K_D(nM)$
마우스 2286 Fab	0.044	5.8×10^4	76
인간화 2286 Fab (O8;VH3)	nd	nd	500
인간화 2286 Fab (O8;VH4)	nd	nd	500

실시예 5: 알츠하이머 질환의 동물 모델에서 Aβ 펩티드에 대해 지시된 항체 가 조직학적 증상을 줄인다

이 실시예는 본 발명의 단일클론 항체가 알츠하이머 질환의 치료와 예방을 위한 효과적인 치료제를 제공한다는 것을 증명한다. 놀랍게도, 이들 데이터는 Aβ의 C 종말(즉, aa 28-40)에서 지시된 항체가 Aβ, 티오플라빈-S를 제거하는데 효과적이고, 알츠하이머 질환의 이러한 마우스 모델에서 N 말단(aa 1-16)에서 지시된 항체로서 MHC-11 염색을 증가시킨다는 것을 보여준다. 전구체 및/또는 아밀로이드 부착물의 분열한 집합을 인지하는 능력의 증가로 인해 Aβ의 N 말단을 표적화하는 항체가 이로울것같기 때문에, 이들 결과는 알츠하이머 질환의 치료를 위한 새로운 치료 전략을 제공한다.

생체내 항 Aβ 항체, 단일클론 항체 2324, 2286, 및 2289의 치료 효과를 평가하기 위해서, 보다 정확하게는, 그들의 각각의 하이브리도마 세포주 10B10, 2E6, 8A1, 2A1, 및 3C6, 1F9로부터 분리된 항체를, 유전자도입 마우스 과도-발현 'Swedish' 돌연변이체 아밀로이드 전구체 단백질 (APP; Tg2576; K670N/M671L; Hsiao et al., 1996, Science 274: 99-102)로 주입하였다. 이들 마우스에 존재하는 알츠하이머형 페노타입은 잘 특성화되었다(Holcomb LA et al., 1998, Nat. Med. 4: 97-100; Holcomb LA et al., 1999, Behav. Gen. 29: 177-185; and McGowan E, 1999, Neurobiol. Dis. 6: 231-244).

본 발명을 설명하거나 가능하게 하는데 필요하지 않은 이어지는 실험 과정의 관점에서, 항체는 16개월령의 Tg2576 유전자도입 마우스에 두개내 주사되었다. 주사한 항체는 단일클론 항체 2324 (2μl의 부피에서 1.2 μg 에서), 2286 (2μl의 부피에서 2μg) 및 2289 (2μl의 부피에서 2 μg)였고 초파리 단백질 이름 "기억상실증" (2μl의 부피에서 2μg)에 대해 지시된 대조군 단일클론 항체, 보다 정확하게는, 그들의 각각의 하이브리도마 세포주 10B10, 2E6, 8A1, 2A1, 및 3C6, 1F9으로부터 분리된 항체가 두개내로 주입되었다. 마우스 전두골 피질 및 해마의 조직병리학은 주사후 3일째에 평가되었다. 또다른 항체와 함께 시간 과정 작업으로부터 3일시점이 선택되었고, 아밀로이드 제거는 그 간격에 의해 완성되었고 미세아교 활성화는 1 일 또는 7 일에 비해 최대였다는 것을 암시한다. 데이터는 Aβ, 티오플라빈-S 및 MHC-II 염색에 있어서 주입된 측의 비-주입 측에 대한 비로서 제시되었다.

연구에서 사용된 항체는 Aβ 펩티드 (각각 아미노산 1-16, 16-28, 및 28-40)의 다른 부분에 지시되지만, 대조군 (항-기억상실증 항체 및 부형제 주입된 그룹)과 비교할 때 모두 해마 및 피질에서 Aβ 부착물과 티오플라빈-S 부착물 모두(후자는 Aβ 부착물의 독성 원점유 형태)를 상당한 백분율에 의해 (도면 4, 40-80%에 의해) 제거하였다. 그들은 또한 MHC-II 염색에 의해 평가될 때, 미세아교세포를 활성화하였다(도면 4). 이들 마우스에서 3개의 Aβ 항체 사이에 그들이 Aβ, 티오

플라빈-S를 제거하는 능력 또는 MHC-II 염색을 증가시키는 능력에서 일관된 차이가 존재하지 않았다. N 종말에 (즉 aa 1-16)-그러나 C 종말에는 아니게(즉 aa 28-40)-지시된 항체가 Aβ 부착 제거에 대해 중요했다는 것을 나타낸 이전에 발행된 연구가 주어지면, 이들 결과는 예상되지 않았다. (Solomon, B. et al. , 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 452-455; Solomon, B. et al. , 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4109-4112.)

실시예 6: 미세아교 활성화 및 아밀로이드 제거에서 항체 2286의 Fc 도메인의 잠재적인 역할

미세아교 활성화 및 아밀로이드 제거에서 항-Aβ 항체 2286의 Fc 도메인의 잠재적인 역할을 연구하기 위해서, 항체 2286, 손상되지 않은 항체, 및 미세아교 활성화 및 아밀로이드 제거에서 초과리 단백질 기억상실증에 대해 지시된 대조군 단일클론 항체의 의 F_{(ab')2} 단편들의 영향이 실시예 6에서 기술된 동물 모델에서 비교되었고, 이때 항체는 두개내로 투여된다.

F_{(ab')2} 단편들의 제조 :

초과리 단백질 기억상실증에 대해 지시된 항-Aβ 단일클론 항체 2286, 및 대조군 단일클론 항체로부터 F_{(ab')2} 단편들을 Immunopure IgG1 F_{ab} 및 F_{(ab')2} 제조 키트 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)를 사용하여 제조하였다.

키트에 제공된 지시사항을 따랐다. 간단히, 0.5ml의 1 mg/ml IgG 를 0.5 ml 마우스 IgG1 온화 용리 완충액에 첨가하였다. 이것을 평형화 고정 피진 칼럼에 도포하였고, 칼럼안으로 들어가게 하고 37°C에서 20 시간동안 소화시켰다.

4 ml 용리를 얻었고 Fc 단편들 및 소화되지 않은 IgG로부터 F_{(ab')2}의 분리를 위해 평형화 고정 단백질 A 칼럼에 도포하였다. 4개의 1ml 분율의 생성물을 얻었다. 겔 이온영동 오직 2번째 및 3번째 용리를 작동함으로써 결정될 때 F_{(ab')2} 단편들을 함유하는 것으로 밝혀졌고 겔에서 유사한 강도를 나타냈다. 두개의 용리 함유 F_{(ab')2} 단편들을 모으고 농축시켜 Centricon 원심분리 필터 디바이스(Millipore Corp. Bedford, MA)를 사용하여 대략 200μl의 부피까지 농축시켰다. 예비 실험은 칼럼으로부터 직접 농축된 F_{(ab')2} 분율의 주입은 일부 마우스에게 주입될 때 발작을 유발하였다는 것을 발견하였다. 따라서 초기 농축액은 4 ml의 신선한 PBS에 희석되었고 재농축되어 발작을 유발할 수 있는 잔여 사유 용리 완충액 성분들을 희석시킨다. 어떠한 발작 또는 신경독성도 여기에 포함된 마우스에서 발견되지 않았다. 농축된 생성물은 SDS-폴리아크릴아미드-겔 이온영동(SDS-PAGE)에서 작동되었다. Bradford 분석법은 또한 Bradford 단백질 분석법 시약 농축액 (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 수행되어 F_{(ab')2} 단편들의 농도를 수립하였다.

항-Aβ 단일클론 항체 2286, 및 초과리 단백질 기억상실증에 대해 지시된 대조군 단일클론 항체으로부터 제조된 F_{(ab')2} 단편들을 SDS-폴리아크릴아미드-겔 이온영동 (PAGE)을 통해서 분석하였다. 겔은 소화되지 않은 IgG 또는 Fc 단편들에 의해 오염이 없는 매우 순수한 생성물을 나타냈고, 대략 105 kDa, F_{(ab')2} 단편들에 대한 분자량에서 단일 밴드를 가졌다. 손상되지 않은 IgG 분자는 대략 150 kDa, IgG 분자에 대한 정확한 분자량에서 하나의 강한 밴드를 생산하였고, 대략 110 kDa에서 덜 강한 밴드를 보였다. SDS-PAGE를 통한 순도를 확인한 후에 본 발명자들은 그후 Bradford 분석법을 수행하여 정제된 소부분에서 F_{(ab')2}의 회복을 평가하였다. 본 발명자는 출발 물질에서 사용된 것보다 작은 부피에서 항-A F_{(ab')2} 단편들을 용해했기 때문에, 완전항체 농도는 1μg/μl였지만, 두개내로 주사된 F_{(ab')2} 단편들의 농도는 1. 2μg/μl였고, 그 결과 F_{(ab')2} 용액에서 항-AB Fv 도메인의 발현을 초래한다.

항체 소부분 연구

19.5개월령의 20 Tg2576 APP 유전자도입 마우스를 4그룹중 하나로 할당하였고, 모든 그룹은 전두골 피질 및 해마 안으로 두개내 주사를 받았다. 첫번째 그룹은 항-Aβ 항체 2286을 각각의 도메인에서 2μg/2μl의 농도로 받았다. 두번째 그룹은 각각의 도메인에서 2.2 μg/2μl에서 항-Aβ 항체 2286로부터 제조된 항-F_{(ab')2} 단편들을 받았다. 세번째 그룹은 손상되지 않은 IgG 주사의 비특이성 양태에 대한 대조군으로서 초과리 기억상실증 단백질에 대해 지시된 IgG를 받았다. 마지막 그룹은 F_{(ab')2} 주사의 비특이성 효과를 위한 대조를 위해 초과리 기억상실증 단백질에 대해 지시된 IgG로부터 제조된 F_{(ab')2} 단편들을 받았다. 모든 마우스는 수술 후 72시간 생존하였다.

수술 과정:

수술하는날 마우스의 체중을 재고, 이소푸란으로 마취하고 정위방법 장치 (51603 이중 조작자 실험실 표준, Stoelting, Wood Dale, IL)에 놓았다. 중간시상봉합 절개를 만들어서 두개골을 노출시키고, 오른쪽 전두골 피질 및 해마 위에서 치과 용 드릴을 사용하여 다음의 배위를 따라 두개의 버(burr) 구멍을 뚫었다: 피질: AP + 1. 5 mm, L-2.0mm, 해마: AP-2.7 mm, L- 2.5mm, 모두 시상봉합으로부터 취해짐. 10μl Hamilton (Reno, NV) 주사기에 부착된 26 게이지 바늘을 시상봉합에서 3 mm 복부 낮추고 2분 기간에 걸쳐서 2 μl 주사를 놓았다. 절개는 식염수로 세척하고 수술 스테이플러로 밀폐하였다.

조직 제조:

희생시키는날 마우스를 측량하고, 100 mg/kg 펜토바르비탈 (Nembutal 나트륨 용액, Abbott Laboratories, North Chicago IL)로 과복용시키고 두개내 25ml 0.9% 염화나트륨으로 관류시키고 이어서 50 ml 신선하게 제조된 4% 파라포름 알데히드(pH=7.4)으로 관류시켰다. 뇌를 신속하게 제거하고 신선하게 제조된 4% 파라포름알데히드에 24 시간동안 담그

고 고정시켰다. 그후 뇌를 24시간동안 10,20 및 30% 수크로스에서 배양하고 그들을 순차적으로 사이로(cyrol)보호하였다. 25 μ m 두께의 수평 단면적을 그후 슬라이딩 마이크로톰을 사용하여 수집하였고 미생물 성장을 방지하기 위해 나트륨 아지드를 갖는 DPBS 완충액에서 4℃에서 저장하였다.

면역조직화학법:

대략 100 μ m 파로 6 내지 8 단면이 주입 부위에 이르러 선택되었고 이전에 기술된 바와 같이 (Gordon et al., 2002) 총 A β (A β 펩티드 1: 10000의 N-종말과 주로 반응하는 토끼 항혈청) 및 CD45 (Serotec, Raleigh NC, 1: 3000)에 대해서 자유-유동 면역조직화학법을 사용하여 염색하였다. 면역염색을 위해서, 일부 단면은 비-특이성 면역조직화학 반응을 평가하기 위해 1차 항체로부터 생략되었다. 인접 단면은 슬라이드 위에 올리고 4%티오플라빈-S(Sigma-Aldrich, St Louis MO)을 사용하여 10분동안 염색하였다. 주입 부위를 포함하는 제한된 수의 단면이 존재했다는 것을 주목해야 한다. 따른 과정은 더 적은 단면 각각을 갖는 더 큰 수의 마커라기 보다는 신뢰할 수 있게 몇개의 마커를 측정하는 것이었다.

데이터 분석:

모든 염색된 단면위의 면역조직화학 반응 생성물은 피질 및 해마의 주입된 면적과 뇌의 반대쪽 측위에 대응하는 도메인에서 비디오메트릭 V150 이미지 분석 시스템 (Oncor, San Diego, CA)을 사용하여 측정되었다. 데이터는 A β , 티오플라빈-S 및 CD45에 대해 주입된 측의 주입되지 않은 측에 대한 비율로서 표시되었다. 해당 대측성 부위에 대해 주사 부위를 정규화하면, 동물간 변이성의 영향을 줄이고, 더 소수의 동물에 대한 신뢰성있는 약물 효과를 측정할 수 있게 된다. 가능한 치료 관련 차이를 평가하기 위하여, 각각의 처치군에 대한 비율 값을 StatView 소프트웨어 버전 5.0.1(SAS 인스티튜트 인코포레이티드, 미국 노스 캐롤라이나 소재)을 사용하여 분석한 후, 피셔 LSD 평균 비교를 행하였다.

결과:

전두 피질 및 해마로의 두개내 주사 72 시간 후에 마이크로글리아를 활성화시킨 유일한 항체는 완전 항A β 항체 2286이었다. 전두 피질은 활성화도가 해마보다 더 크게 나타났지만, 두 도메인에서 활성화는 대조 항기억상실증 단백질 IgG, F_{(ab')2} 또는 항A β 2286 F_{(ab')2}를 수용하는 군에서 보다 유의적으로 더 컸다(도 5a, c 및 d, 도 6a; 모든 비교에서 P < 0.01 이상). 항A β 항체 2286 주사 후 해마 내 활성화 패턴은 베타-아밀로이드 아미노산 1-16에 결합된 모노클로날 항체인 A β 항체 44-352를 사용한 경우의 패턴과 유사하였다(바이오소스, 미국 캘리포니아주 카마릴로 소재). 훨씬 더 많은 확산 활성화가 치아이랑의 나머지 층을 충전하는 치아이랑의 과립 세포 층 내 활성화의 매우 강한 도메인이 있었다(도 5a). 흥미롭게도, 항A β F_{(ab')2} 단편은 전두 피질과 해마 내에서 마이크로글리아 활성화를 산출하지 않았다(도 5b, 도 6a).

두 항기억상실증 단백질 대조군 내 A β 면역조직화학은 19.5 개월에 APP 유전자 이식 마우스에서 관찰된 통사의 염색 패턴을 나타내었다(도 5g 및 h). 이 패턴은 16 개월째에 관찰된 것과 정성적으로 동일하였지만, 마수스가 3.5 개월 더 노화에 따라 정성적으로 더 컸다. 항A β 항체 및 항A β F_{(ab')2} 군은 전두 피질 및 해마로의 주사 72 시간 후와 유사한 정도로 총 A β 면역조직화학을 유의적으로 감소시켰다. 전두 피질에서, 대략 60% 감소가 있었다(도 6b). 해마에서, 감소는 대략 65%였다(도 5e 및 f, 도 6b).

티오플라빈-S 염색은 밀집한 세섬유 아밀로이드 침착물만을 검출한다. 대조 항기억상실증 단백질 IgG 또는 대조 F_{(ab')2}의 두개내 주사를 수용하는 마우스는 이 연령에서의 APP 유전자 이식 마우스에서 관찰되는 통사의 염색과 유사하였다. 해마에서, 대부분의 티오플라빈-S 양성 플라크는 아몬각의 외부 분자층 및 해마 열구 근방의 치아이랑에 위치하였다(도 5k 및 l). 항A β 항체 IgG는 전두 피질 및 해마에서 티오플라빈-S 양성 콤팩트 플라크를 대략 90%로 상당히 감소시켰다(도 6c). 해마 내에 티오플라빈-S 양성 침착물은 거의 남아있지 않았다(도 5i). 대조적으로, 항A β F_{(ab')2} 단편은 전체 IgG 분자만큼 효과적으로 콤팩트 아밀로이드 플라크를 제거하지않았다. 전두 피질에서, 대조 항체군과 비교하였을 때 유의적인 티오플라빈-S 염색 감소는 없었다(도 6c). 해마에서, 항A β F_{(ab')2} 군과 대조군 간의 유의적인 차가 있었지만(P < 0.05), 이 감소도 전체 IgG 분자로 관찰된 감소보다 유의적으로 적었다(도 5j, 도 6c; P < 0.02 이상).

예상된 바와 같이, 후속 처치와 무관하게 항A β IgG 또는 항A β F_{(ab')2}를 수용한 모든 군에 대한 CD45 및 티오플라빈-S 값을 단일 대형 회귀 분석에서 비교하였을 때, 로그 변환 CD45 값을 사용한 경우, CD45 면역조직화학에 의해 검출한 바의 고 레벨의 마이크로글리아 활성화와 티오플라빈-S 염색에 의해 검출한 바의 콤팩트 플라크 제거 간에 유의적인 상호관계가 있었다(P < 0.001, R = 0.57). 이 상호관계는 해마에서도 관찰되었다(P < 0.02, R = 0.427).

실시예 7: 항체 2286의 말초 주사 후 증가된 혈청 A β 농도

이 실험은 알츠하이머 병에 대한 유전자 이식 마우스 모델의 전신 잠복성 면역화 후 모노클로날 항체 2286의 효율을 테스트하기 위해 수행하였다. 19 개월령인 Tg2576 유전자 이식 마우스(Hsiao et al., 1996, Science 274: 99-102)에 모노클로날 항체 2286 또는 항기억상실증 항체(IgG1 대조)를 복강내(IP) 주사하였다. A β 혈청 농도뿐만 아니라 혈청 내 항A β 항체의 역가를 측정한 후 1, 2 또는 3 개월 동안 10 mg/kg 체중의 투여량으로 항체를 매주 1회 주사하였다.

A β 의 혈청 농도는 포획 분석법을 사용함으로써 결정되었고, 이때 항-A β 항체 (Clone6E10, Signet Laboratories Inc., Dedham, MA)를 분석 플레이트 위에 고정시키고 처리된 마우스로부터 유도된 희석된 혈청 샘플로 배양하였다. 10 연속 세척후에, 분석 플레이트를 제 2 비오틴-접합된 항-A β 항체 (Clone 4G8, Signet Laboratories Inc., Dedham MA, USA)으로 배양하고 이어서 HRP-접합된 스트렙타비딘 (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA)을 첨가하였다. 분석 플레이트의 450 nm에서의 흡광도를 결정하였고, 표준으로서 합성 A β ₁₋₄₀ (American Peptide Company Inc., Sunnyvale CA, USA)의 공지된 농도로 정상화함으로써 혈청 샘플에서 A β 의 농도를 결정하였다. 혈청 샘플에서 2286 항체 타이터를 측정하기 위해, 항체-A β 복합체를 낮은 pH에 의해 해리시키고 합성 A β ₁₋₄₀ (각각 웰 당 0.25 μ g)로 미리-코팅된 분석 플레이트로 배양하였다. 10 연속 세척후에, 분석 플레이트를 비오틴-접합된 염소-항-마우스 (H+L) 항체 (Vector

Laboratories, Burlingame CA, USA)로 배양하고 이어서 HRP-접합된 스트렙타비딘 (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA)으로 배양하고, 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. 항-A β 항체의 농도를 친화력 정제된 2286의 공지된 농도를 갖는 동일한 분석법을 수행함으로써 생성된 표준 곡선으로부터 계산하였다.

도 7에서 나타낸 바와 같이, 혈청 AD 농도에서의 신속한 증가가 2286의 말초 투여후에 관찰되었지만 Tg2576 마우스에 대한 항-기억상실증 항체는 아니었다. 혈청 샘플에서의 항-A β 항체의 역가는 처리된 유전자도입 마우스에서 혈청에서의 항체 농도와 혈청 A β 농도 사이에 유의한 포지티브 상호관계를 보여주었다($r^2=0.5125$, $F=26.28$, $P < 0.0001$, INSTAT PRISM v. 4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA에 의해 분석된 데이터). 이들 데이터는 단일클론 항체 2286가 CNS와 혈장 사이의 A β 평형을 변화할 수 있었고, 단일클론 항체 2286의 투여는 CNS의 바깥으로 A β 의 제거를 촉진할 수 있다는 것을 암시한다. 이러한 가능성을 시험하기 위해서, 뇌 아밀로이드 부담은 혈청에서의 A β 농도의 증가가 처리된 마우스에서 뇌 아밀로이드 부담의 증가와 상호관련있는지 여부를 결정하기 위해 측정될 것이다.

표 6.

베타 아밀로이드 펩티드 및 변이체의 아미노산 서열

1-40 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	(SEQ ID NO:1)
1-42 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA	(SEQ ID NO:11)
1-43 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIAT	(SEQ ID NO:12)
1-41 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVI	(SEQ ID NO:13)
V36A (1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMAGGVV	(SEQ ID NO:14)
G37A (1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVAGVV	(SEQ ID NO:15)
G38A (1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGA	(SEQ ID NO:16)
V39A (1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGA	(SEQ ID NO:17)
V40A (1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGA	(SEQ ID NO:18)

표 7.

호모 사피엔스 아밀로이드 베타(A4) 전구체 단백질(APP)(SEQ ID NO:2):

MLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRLNMHMNVQNGK
WSDPSGKTCTCIDTKEGILQYCQEVYPELQITNVVEANQPVTIQNWCKRGRKQ
CKTHPHFVIPYRCLVGEFVSDALLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVAKET
CSEKSTNLHDYGMLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDDSVDVW
WGGADTDYADGSEDKVVEVAEEEEVAEVEEEEADDDDEDDDEDGDEVEEEEAEPP
YEEATERTTSATTTTTTTTESVEEVVREVCSEQAETGPCRAMISRWFYFDVTEGKC
APFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMVCGSAMSQSLLKTTQEPLARDPVKLPPTAA
STPDAVDKYLETPGDENEHAHFQKAKERLEAKHRERMSQVMREWEAEERQA
KNLPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEAANERQQLVETHMARVEAMLNDRRLA
LENYITALQAVPPRPRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLKHFEHVRMVDPKKAA
QIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLLYNPAVAEEIQDEVDELLQKEQNYSDDLV
ANMISEPRISYGNDAIMPSLTETKTTVELLPVNGEFSLDDLQPWHSFGADSVPA
NTENEVEPVDARPAADRGLTTRPGSLTNIKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHH
QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKKQYTSIHGVEVD
AAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN

표 8.

단일클론 항체 2286 핵산 서열:

중쇄[가변 도메인 및 불변 도메인 1 (CH1)]; SEQ ID NO:3:

gagggtgaagctctcagctcgggtggcctgggtgcagcctggaggtccctgaaactctcctgtgcagcctcaggattcga
tttagtagatactggatgaattgggtccggcaggtccagggaagggttagaatggattggagaattaatccagatagca
gtacgataaactatagccatctctaaaggataaattcatctccagagacaacgcaaaaatacgtgtacctgcaaatga
gcaagtgagatctgaggacacagccctttattactgtgcaagacaatgggtactggggccaaggcaccactctcagct
ctctcagccaaaacgacaccccatctgtctatccactggccctggatctgtgccccaaactaactccatgggtgacctggg
atgctgggtcaagggtatftccctgagccagtgcagctgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgacacctccc
agctgtcctgcagctgacctctacactctgagcagctcagctgctccctccagcactggccagcgagacgtcacct
gcaacgttgcacccggccagcagcacaaggtggacaagaaattgtgccagggtatgt

경쇄; SEQ ID NO:5

gatatccagatgacacagactacatcctcctgtctgcctctctgggagacagatcacatcagttgcagtgcagtcagg
cattagcaattatitaaactggttcagcagaaccagatggaaactgttaactcctgatctattacacatcaagttacactcagg
agtcacatcaaggttcagtcagtcagtcgggtctgggacagattatctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccac
ttactattgtcagcagataggaagctccgtacacgttcggaggggggaccaaagctggaaataaaagggtgtgctgcac
caactgtatccatctccaccatccagtgagcagttacatctgggtgctcagctgtgtgctcttgacaacttctacccc
aaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgacgagacagca
aagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgagatgaacgacataacagctatacctgtgagg
ccactcacaagacatcaactcaccattgtcaaggttcaacaggaatgagttgt

표 9.

단일클론 항체 2286 아미노산 서열:

중쇄[가변 도메인 및 불변 도메인 1 (CH1)];SEQ ID NO:4:

EVKLES GGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSR YWMNVWRQAPGKGLEWIGEIN
PDSSTINYTPSLKDKFIISRDN AKNTLYLQMSKVRSED TALYYCARQMGYWGQ
GTTLTVSSAKITPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL
SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPR
DC

경쇄; SEQ ID NO:6:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYL NWFQKPDGTVKLLIYYTSSLH
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQYRKLPYTFGGGTKLEIKRAD
AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWT
DQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC

표 10.

단일클론 항체 2324 핵산 서열:

중쇄[가변 도메인 및 불변 도메인 1 (CH1)];SEQ ID NO:7:

gttactctgaagagctctggccctgggatattgaagccctcacagaccctcagctgactgttcttctctgggttttactgagc
actctgtatgggtgttagctggttcagctcttcagggagggtctggagtggctggcacacatttggtgggatgat
aagtactatacccatccctgaagagccagctcacaatctccaagatactccagaaccagggtattcctcaagatcaccagt
gtggacactgcagatactgccacttactctgtctcgaaggggggtacgacalagagactactttgactactggggccaagg
caccactctcagctcctcagccaaacacaccccatcagctatccactggccctgggtgtggagatacaactgggttc
ctccgtgactctggatgggtggtcaagggtacttccctcagtcagtgactgtgacttgggaactctggatccctgtccagcagt
gtgcacaccttccagctctctcagctctgactctacactatgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggccaagt
cagaccgtcacctgcagcgttctcaccagccagcagcaccacgggtggacaaaaaacttgagcccgaggccatttca
acaatcaacccc

경쇄; SEQ ID NO:9

gatgtttgatgacccaaactccactcctcctgcctgtcagctctggagatcaagcctccatctcttgagatctagtcagagcatt
gtacatagtaatggaaacacctatttagaatgttacctgcagaaccagccagctctccaaactccttactacaaagtttcca
accgattttctgggttccagacaggttcagtgagtgatgagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggct
gaggatctgggagtttattactctttcaaggttcacgtgttctctcaggttcgtgtgggaccaagctggagctgaacggg
ctgatgctgcaccaactgtatccatcttccaccatccagtgagcagttacatctggaggtgcctcagctgtgtcttctgaac
aacttctaccccaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactga
tcaggacagcaagacagacactacagcatgagcagcaccctcaggttgaccaaggacgagatgaacgacalaacagcta
tacctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg

표 11.

단일클론 항체 2324 아미노산 서열:

중쇄[가변 도메인 및 불변 도메인 1 (CH1)]; SEQ ID NO:8:

VTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQSSGKGLEWLAHIWW
DDDKYYNP SLKSLTISKDTSRNQVFLKITSVDATATYYCARRGVRHRDYF
DYWGQGTILTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVT
WNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSTVTPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVD
KKLEP3GPISTNP

경쇄; SEQ ID NO:10:

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSRVPLTFGAGTKL
ELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSRQNG
VLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTITKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSPNRRN
EC

생물학적 물질의 기탁

다음의 물질은 미국 버지니아주 20220-2209 마나싸스 보올레바르드 대학 10801의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)에 의해 기탁되었다:

물질 항체 번호 ATCC 승인 번호 기탁 날짜

8A1.2A1 2286 PAT-5199 2003년 5월 15일

이 기탁은 특허 절차 및 그 이하의 규정(부다페스트 조약)의 목적에 대하여 미생물 기탁의 국제 인식 위에서 부다페스트 조약의 조항 하에 이루어졌다. 이것은 기탁일로부터 30년 동안 기탁의 생존가능한 배양의 유지를 보증한다. 상기 기탁은 부다페스트 조약 하에서 ATCC 사에 의해 이용가능할 것이고, Rinat Neuroscience Corp. 및 ATCC 사이의 협정에 지배 받고, 이는 관련 미국 특허 또는 공중에 공개된 어떤 미국 또는 외국 특허 출원의 발행에 있어서 공중에 기탁의 배양의 결과물의 영구적이고 제한적이지 않은 이용가능성을 보증하며, 어느것이 먼저이든 간에, 그에 따르는 35 USC 122 및 청장의 규칙(특히 886 OG 638에 따르는 37 CFR 1.14 조항)에 따라서 그에 부여된 미국합중국 특허.상표청에 의해 결정되는 결과물의 이용가능성을 보증한다.

본 출원인은 기탁 상 물질의 배양이 적합한 조건하에서 배양될 때 죽거나 손실 또는 파괴될 경우, 물질을 동일한 다른 것의 공지로 신속히 대체할 것이다. 기탁된 물질의 이용가능성은 특허법에 따르는 어떤 정부의 인가하에 부여받은 권리를 위반하여 본 발명을 실행하는 인가로서 이해되지는 않는다.

선행하여 기술된 설명은 당업계 숙련자 본 발명을 실행을 가능케함에 충분한 것으로 여겨진다. 본 발명은 기탁된 구성에 의한 범위에 한정되지 않는데, 왜냐하면 기탁된 구체에는 본 발명의 특정 양태의 하나의 설명으로서 의도되고 기능적으로 균등한 임의의 구성은 본 발명의 범주 내에 있기 때문이다. 본원에서 물질의 기탁은 본원에서 포함된 기술된 설명이 그의 최상의 방식을 포함하여 본 발명의 임의의 양태의 실행을 가능케함에 있어서 부적합한 승인을 구성하지 않고, 또한 그것이 제시하는 구체적 예시에 청구항의 범위를 한정하는 것으로서 해석되지도 않는다. 게다가, 본원에서 보여지고 기술된 것보다 더하여 본 발명의 각종 수정은 선행하는 설명 및 첨부된 청구항의 범주 내에 해당하는 것으로부터 당업계 숙련자에 있어서 명백해질 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

$\text{A}\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 우위적으로 결합하는 항체 및 약학적 허용가능 담체를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 피험체에 투여하는 것을 포함하는 알츠하이머병을 치료하는 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 항체는 $\text{A}\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-42}$ 및 $A\beta_{1-43}$ 펩티드와 현저한 교차 반응성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 2 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 2 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체가 결합하는 동일한 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 1 항에 있어서, 항체는 인간화된 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 1 항에 있어서, 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

$A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 우위적으로 결합하는 항체 및 약학적 허용가능 담체를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 피험체에 투여하는 것을 포함하는 피험체에서 아밀로이드 플라크의 형성을 억제하는 방법.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 13 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-42}$ 및 $A\beta_{1-43}$ 펩티드와 현저한 교차 반응성을 보이지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 13 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 13 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 14 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 14 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 13 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제 13 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체가 결합하는 동일한 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 13 항에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제 13 항에 있어서, 항체는 인간화된 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제 13 항에 있어서, 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제 13 항에 있어서, 아밀로이드 플라크는 피험체의 뇌속에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

$A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 우위적으로 결합하는 항체 및 약학적 허용가능 담체를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 피험체에 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 피험체 내 아밀로이드 플라크를 감소시키는 방법.

청구항 27.

제 26 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제 26 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-42}$ 및 $A\beta_{1-43}$ 펩티드와 현저한 교차 반응성을 보이지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제 26 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

제 26 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.

제 26 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)을 결합시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제 27 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 nM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.

제 26 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.

제 26 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체가 결합하는 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.

제 26 항에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36.

제 26 항에 있어서, 항체는 인간화된 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37.

제 26 항에 있어서, 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38.

제 26 항에 있어서, 아밀로이드 플라크는 피험체의 뇌속에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39.

$A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 28-40에 우위적으로 결합하는 항체 및 약학적 허용가능 담체를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 피험체에 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 피험체 내 알츠하이머병과 관련된 증상의 전개를 지연시키는 방법.

청구항 40.

제 39 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)의 아미노산 39 및/또는 40을 포함하는 에피토프에 우위적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41.

제 39 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-42}$ 및 $A\beta_{1-43}$ 펩티드와 현저한 교차 반응성을 보이지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.

제 39 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 mM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.

제 39 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 mM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.

제 40 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 200 mM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45.

제 40 항에 있어서, 항체의 Fab 단편은 약 1 mM 이하의 친화력으로 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.

제 39 항에 있어서, 항체는 $A\beta_{1-40}$ 펩티드(SEQ ID NO:1)에 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.

제 39 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:4 및 6의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체가 결합하는 동일한 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.

제 39 항에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49.

제 39 항에 있어서, 항체는 인간화된 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

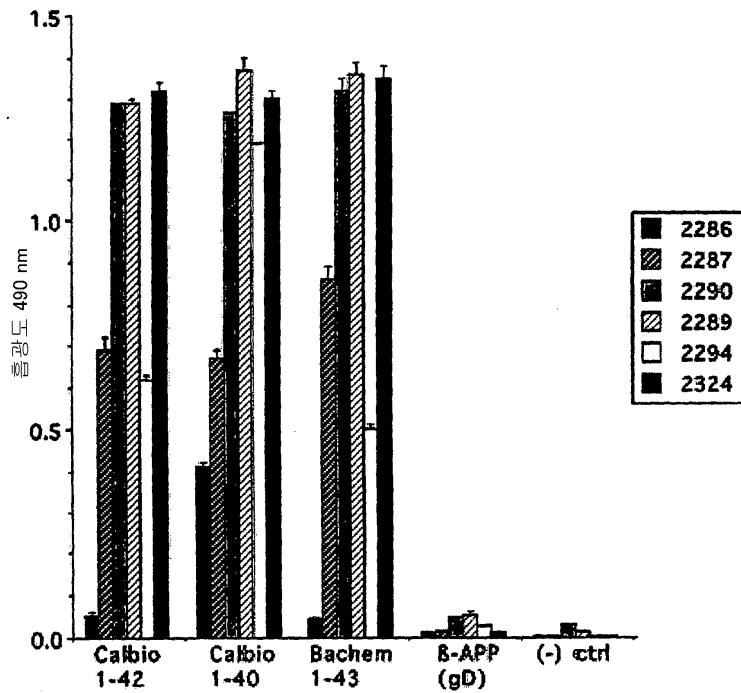
청구항 50.

제 39 항에 있어서, 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

요약

알츠하이머병 및 다운증후군의 치료 및 예방을 위한 아밀로이드 베타 펩티드에 대하여 지정된 단일클론 항체 및 그를 사용하는 방법을 개시한다.

대표도



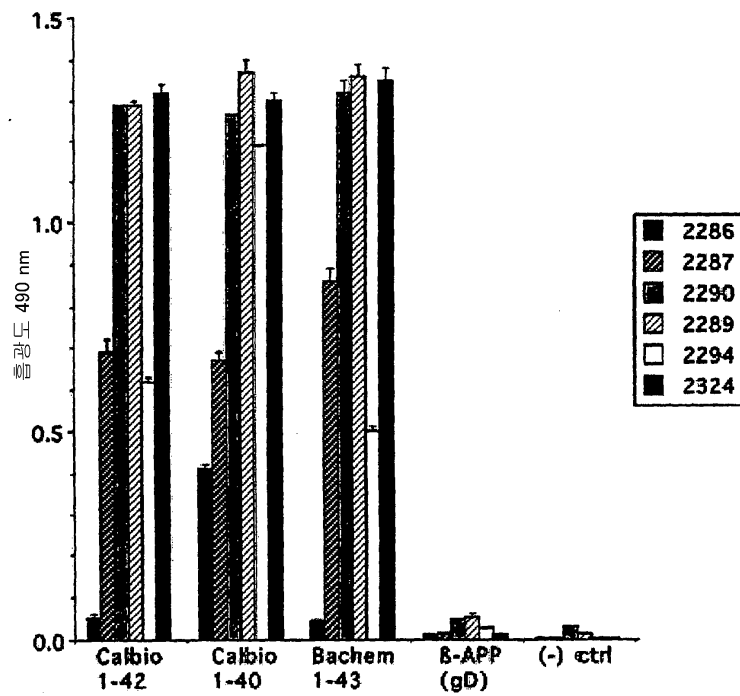
분석 형식 : peptide + Ab + GAMlgG(Fc)HRP

색인어

단일클론 항체, 인간화된 항체, 알츠하이머, 아밀로이드 베타 펩티드.

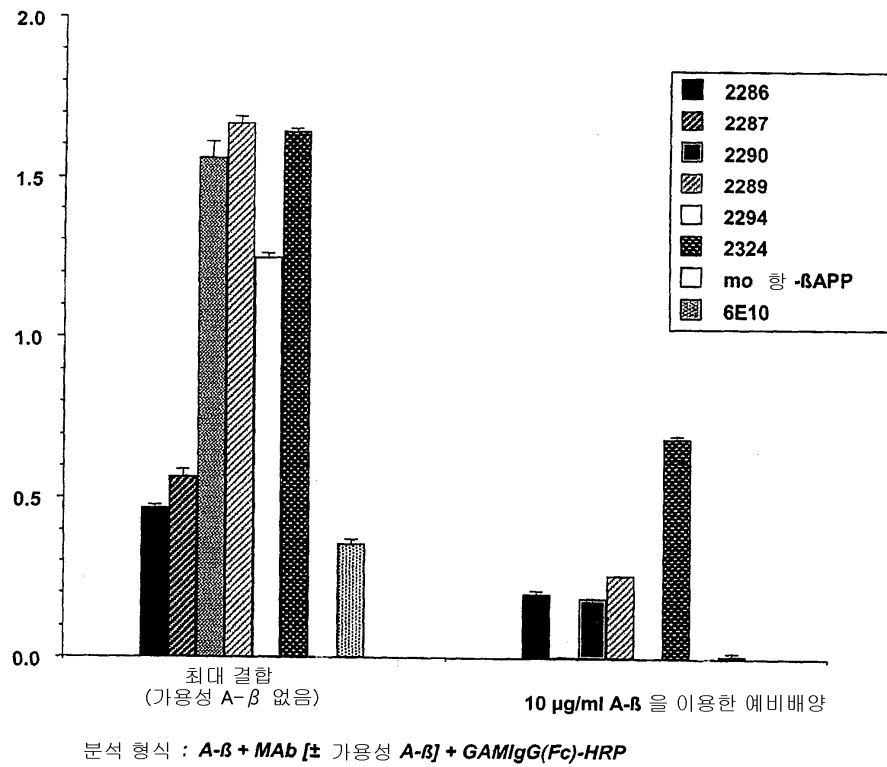
도면

도면1

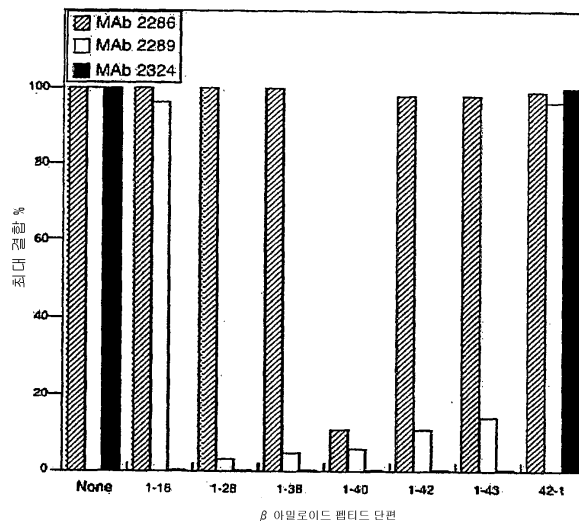


분석 형식 : peptide + Ab + GAMlgG(Fc)HRP

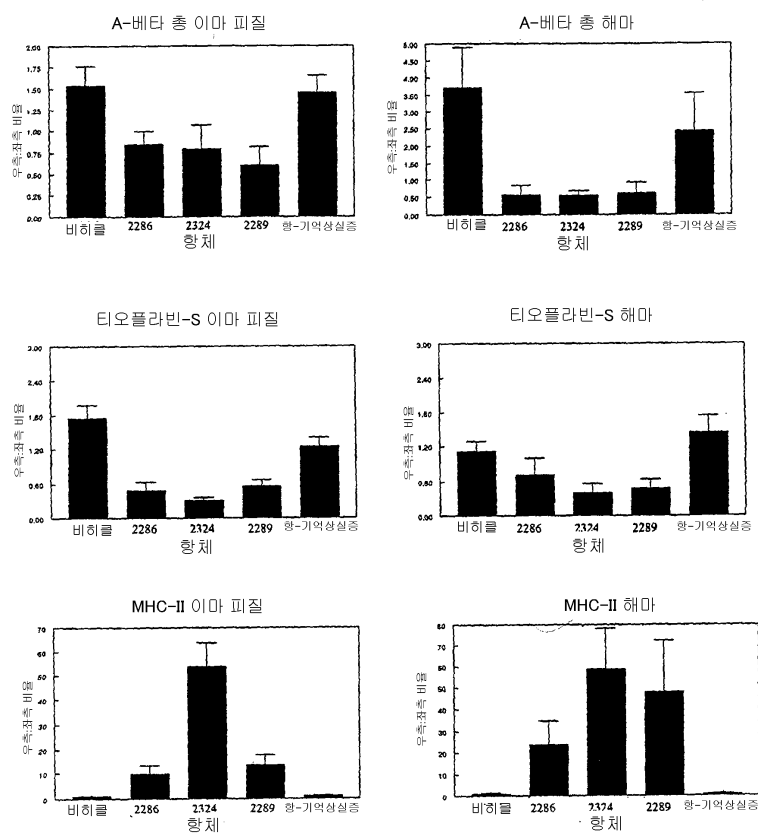
도면2



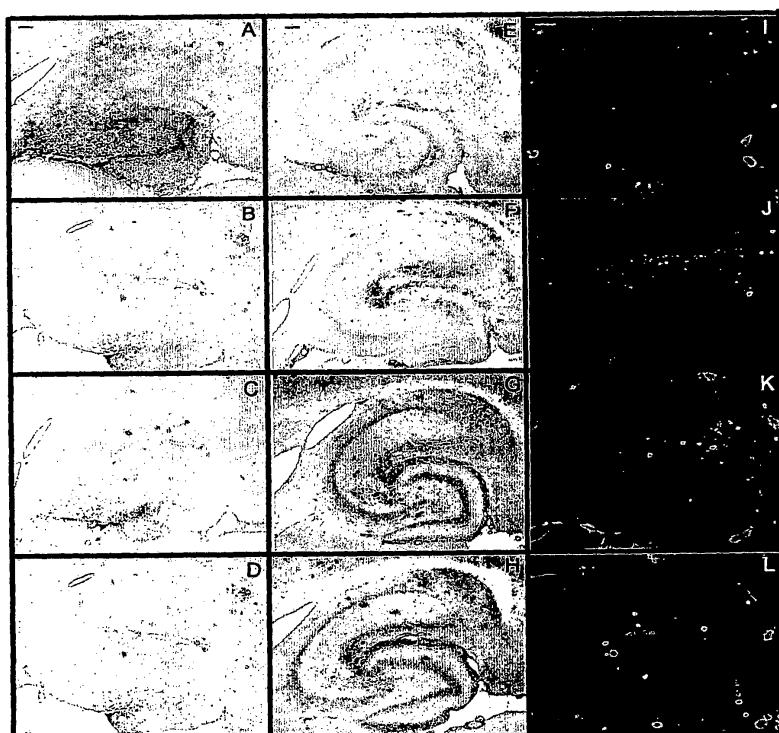
도면3



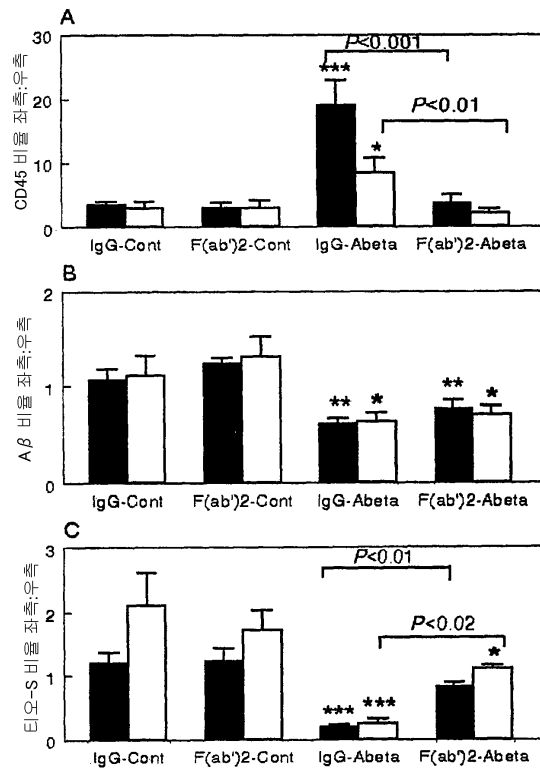
도면4



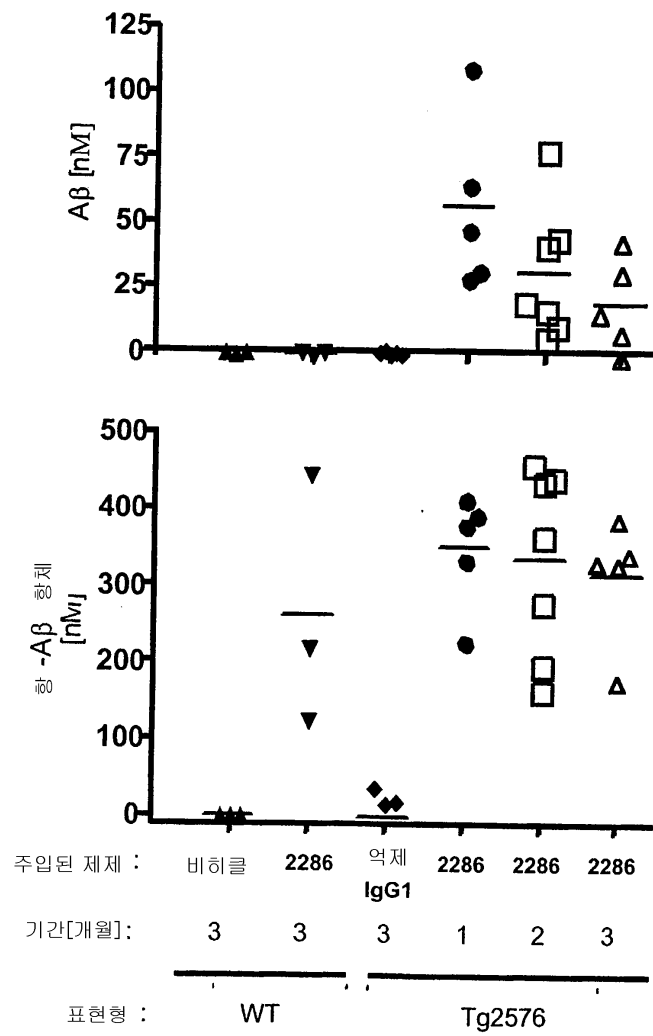
도면5



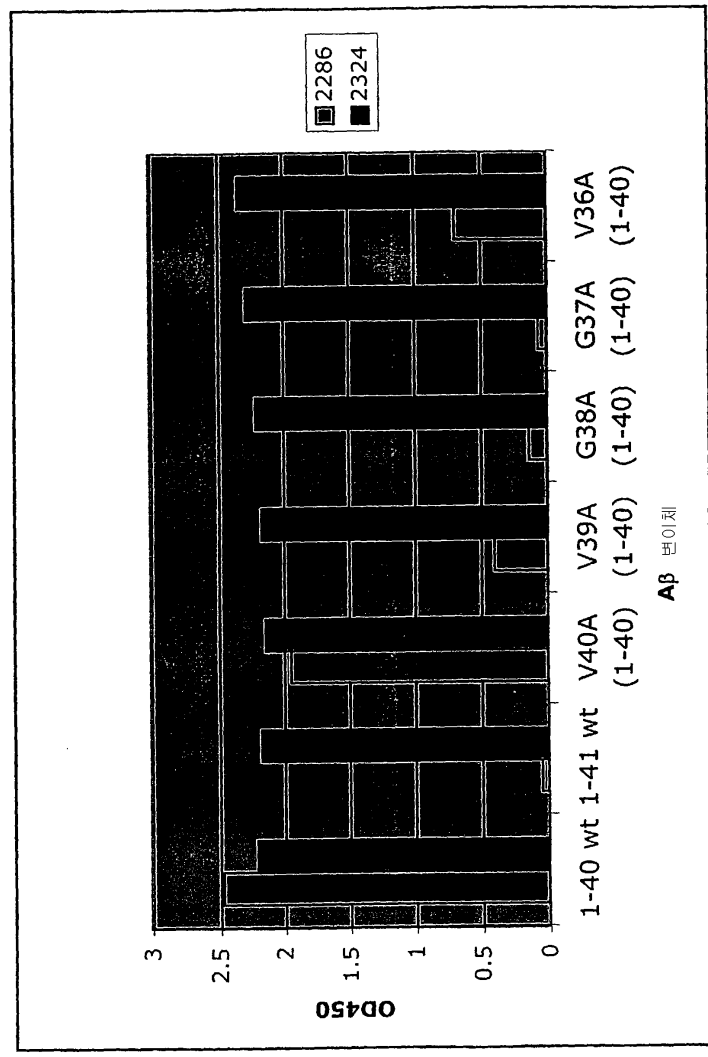
도면6



도면7



도면8



- <110> RINAT NEUROSCIENCE CORP.
- <120> METHODS OF TREATING ALZHEIMER'S DISEASE USING ANTIBODIES DIRECTED AGAINST AMYLOID BETA PEPTIDE AND COMPOSITIONS THEREOF
- <150> US60/417,232
- <151> 2002-10-09
- <150> US60/447,611
- <151> 2003-02-13
- <150> US60/464,754
- <151> 2003-04-22
- <150> US60/480,353
- <151> 2003-06-20
- <160> 21
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 2
 <211> 769
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15
 Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 20 25 30
 Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35 40 45
 Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 55 60
 Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Thr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190

Ser	Asp	Asn	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	195	200	205	
Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys	210	215	220	
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	225	230	235	240
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	245	250	255	
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ala	260	265	270	
Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg	Glu	275	280	285	
Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Met	Ile	Ser	290	295	300	
Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Phe	Phe	Tyr	305	310	315	320
Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Thr	Glu	Glu	Tyr	Cys	325	330	335	
Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Thr	340	345	350	
Gln	Glu	Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	355	360	365	
Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	Glu	370	375	380	
Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Lys	385	390	395	400
His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	405	410	415	
Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	420	425	430	
His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	435	440	445	
Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	Val	Glu	Ala	Met	Leu	450	455	460	
Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Gln	Asn	Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	465	470	475	480
Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	Asn	Met	Leu	Lys	Lys	Tyr	485	490	495	
Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Thr	Leu	Lys	His	Phe	Glu				

500						505						510					
His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ala	Gln	Ile	Arg	Ser	Gln		
515						520						525					
Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Ser	Leu		
530						535						540					
Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Glu		
545						550						555					
Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Glu	Gln	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asp	Val	Leu		
			565						570			575					
Ala	Asn	Met	Ile	Ser	Glu	Pro	Arg	Ile	Ser	Tyr	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu		
			580						585			590					
Met	Pro	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Val		
595						600						605					
Asn	Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Pro	Trp	His	Ser	Phe	Gly		
610						615						620					
Ala	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Val	Glu	Pro	Val	Asp		
625						630						635					
Ala	Arg	Pro	Ala	Ala	Asp	Arg	Gly	Leu	Thr	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	Gly		
			645						650			655					
Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met	Asp	Ala		
			660						665			670					
Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys	Leu	Val		
675						680						685					
Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu		
690						695						700					
Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Thr	Val	Ile	Val	Ile	Thr	Leu	Val		
705						710						715					
Met	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Tyr	Thr	Ser	Ile	His	His	Gly	Val	Val	Glu		
			725						730			735					
Val	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	His	Leu	Ser	Lys	Met	Gln		
			740						745			750					
Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Thr	Tyr	Lys	Phe	Phe	Glu	Gln	Met	Gln		
755						760						765					

Asn

<210>	3
<211>	645
<212>	DNA
<213>	Mus musculus

<400> 3
gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt cgatttttagt agatactgga tgaattgggt ccggcaggct 120
ccagggaaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac gataaactat 180
acgccatctc taaaggataa attcatcatc tccagagaca acgcaaaaaa tacgctgtac 240
ctgcaaatga gcaaagtgag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagacaaatg 300
ggctactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctctctcag ccaaaacgac acccccatct 360
gtctatccac tggcccctgg atctgtctgcc caaactaact ccatgggtgac cctgggatgc 420
ctggtcaagg gctattttccc tgagccagtg acagtgcact ggaactctgg atccctgtcc 480
agcgggtgtgc acaccttccc agctgtctctg cagtctgacc tctacactct gagcagctca 540
gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc gagaccgtca cctgcaacgt tgcccacccg 600
gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt gtgcccaggg attgt 645

<210> 4
<211> 215
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Glu Val Lys Leu Leu 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 Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser
115 120 125
Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser

145					150					155					160
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Thr	Thr
				165					170					175	
Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr
			180					185					190		
Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
		195					200					205			
Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys									
	210					215									

<210>	5
<211>	642
<212>	DNA
<213>	Mus musculus

<400>	5						
gatatccaga	tgacacagac	tacatcctcc	ctgtctgcct	ctctgggaga	cagagtcacc		60
atcagttgca	gtgcaagtca	gggcattagc	aattatttta	actggtttca	gcagaaacca		120
gatggaactg	ttaaactcct	gatctattac	acatcaagtt	tacactcagg	agtcccatca		180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagat	tattctctca	ccatcagcaa	cctggaacct		240
gaagatattg	ccacttacta	ttgtcagcag	tataggaagc	ttcCGTAcac	gttcggagggy		300
gggaccaagc	tggaataaaa	acgggctgat	gctgcaccaa	ctgtatccat	cttcccacca		360
tccagtgagc	agttaacatc	tggaggtgcc	tcagtcgtgt	gcttcttgaa	caacttctac		420
cccaaagaca	tcaatgtcaa	gtggaagatt	gatggcagtg	aacgacaaaa	tggcgtcctg		480
aacagttgga	ctgatcagga	cagcaaagac	agcacctaca	gcatgagcag	caccctcacg		540
ttgaccaagg	acgagtatga	acgacataac	agctatacct	gtgaggccac	tcacaagaca		600
tcaacttcac	ccattgtcaa	gagcttcaac	agqaatgaqt	gt			642

<210>	6
<211>	214
<212>	PRT
<213>	Mus musculus

```
<400>      6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
  1                      5                      10                      15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
          20                      25                      30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
          35                      40                      45
```

Thr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Gly Tyr Gly Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 7
<211> 684
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 7
gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgaagccct cacagaccct cagtctgact 60
tggtctttct ctgggttttc actgagcact tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag 120
tcttcaggga agggctctgga gtggctggca cacatttggt gggatgatga taagtactat 180
aaccatccc tgaagagcca gctcacaatc tccaaggata cctccagaaa ccaggtattc 240
ctcaagatca ccagtgtgga cactgcagat actgccactt actactgtgc tcgaaggggg 300
gtacgacata gagactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360
gcaaaaacaa ccccccatc agtctatcca ctggcccctg ggtgtggaga tacaactggc 420
tcctccgtga ctctgggatg cctggtcaag ggctacttcc ctgagtcagt gactgtgact 480
tggaactctg gatccctgtc cagcagtgtg cacaccttcc cagctctcct gcagtctgga 540

ctctacacta tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggccaag tcagaccgtc 600
acctgcagcg ttgctcaccc agccagcagc accacggtgg acaaaaaact tgagcccagc 660
gggcccattt caacaatcaa cccc 684

<210> 8
<211> 228
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln Thr
1 5 10 15
Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly
20 25 30
Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val Phe
65 70 75 80
Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Gly Val Arg His Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
115 120 125
Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu
165 170 175
Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala
195 200 205
Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser
210 215 220
Thr Ile Asn Pro
225

<210> 9
<211> 657
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 9
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaaa ctcttatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acgtgttcct 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480
caaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540
agcagcacc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600
gccactcaca agacatcaac ttcacccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgt 657

<210> 10
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Asp Val Leu 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 Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	165	170
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu		
	180	185
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser		
	195	200
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
210	215	

<210> 11
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 12
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

<210> 13
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile
 35 40

<210> 14
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 14
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Ala Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 15
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 15
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Ala Gly Val Val
 35 40

<210> 16
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 16
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Ala Val Val
 35 40

<210> 17
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 17
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Ala Val
 35 40

<210> 18
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 18
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Ala
 35 40

<210> 19
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Thr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Sequence

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 21
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser