



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월03일
(11) 등록번호 10-1414847
(24) 등록일자 2014년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7003094(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년01월09일
심사청구일자 2013년01월09일
(85) 번역문제출일자 2012년02월03일
(65) 공개번호 10-2014-0015123
(43) 공개일자 2014년02월06일
(62) 원출원 특허 10-2009-7015076
원출원일자(국제) 2008년01월09일
심사청구일자 2009년07월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/050554
(87) 국제공개번호 WO 2008/088983
국제공개일자 2008년07월24일
(30) 우선권주장
60/885,439 2007년01월18일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02004071408 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
일라이 릴리 앤드 캄파니
미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포
레이트 센터
(72) 발명자
베일스, 켈리, 레니
미국 46121 인디애나주 코어츠빌 사우스 카운티
로드 800 웨스트 4055
부물, 토마스, 프랭크
미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 스위트 200
캠퍼스 포인트 드라이브 10300 릴리 바이오테크놀
로지 센터
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 양영준

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **폐결핵된 Aβ FAB**

(57) 요약

Aβ 펩티드 활성과 관련된 병태를 예방학적 및 치료학적 둘 모두로 치료하는 방법을 기술한다. 본 방법은 인간 Aβ 펩티드의 아미노산 위치 13-28번 사이에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 단편을 사용하는데, 여기서, 상기 항체 단편은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자에 공유 결합되어 있다.

(72) 발명자

차우, 치-킨

미국 46237 인디애나주 인디애나폴리스 윈저 레이
크스 드라이브 7348

데마토스, 로날드, 브래들리

미국 46038 인디애나주 피셔스 링테일 플레이스
10474

한센, 라이언, 존

미국 46033 인디애나주 카멜 메이들라인 레인 3852

쿠치보틀라, 움마

미국 46236 인디애나주 인디애나폴리스 벤트 오크
레인 12604

류, 지룡

미국 46032 인디애나주 카멜 스톤 드라이브 13793

맥도넬, 피터, 콜론

미국 46220 인디애나주 인디애나폴리스 발 월 درا
이브 6855

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호: 1의 경쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역을 갖는 항체 Fab 단편을 포함하며, 여기서 상기 항체 Fab 단편은 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역의 56번 아미노산 위치에서 폴리에틸렌 글리콜 분자에 공유 결합되어 있는 것인 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜이 0.5 kD의 분자량을 갖는 것인 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜이 5 kD의 분자량을 갖는 것인 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜이 10 kD의 분자량을 갖는 것인 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜이 30 kD의 분자량을 갖는 것인 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜이 100 kD의 분자량을 갖는 것인 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 분자를 포함하는, 알츠하이머병, 다운증후군, 대뇌 아밀로이드 혈관병증(CAA), 전구 알츠하이머병(prodromal Alzheimer's disease), 및 경증 인지기능 장애(MCI)로 이루어진 군으로부터 선택되는 병태를 치료 또는 예방하기 위한 제약 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서, 병태가 알츠하이머병인 제약 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 병태가 전구 알츠하이머병인 제약 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아밀로이드 베타(A β) 펩티드에 결합하고, 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자에 공유 결합되어 있는 항체 단편에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 순환 형태의 A β 펩티드는 전구체 단백질인 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 절단으로부터 형성되어지는 39-43개의 아미노산 (대개는 40개 또는 42개의 아미노산)으로 구성되어 있다. A β 가 가용성 형태로부터, β -쉬트 함량이 높은 불용성 형태로 전환되는 것과, 이것이 뇌의 신경반 및 뇌혈관반으로서 침착되는 것은 알츠하이머병, 다운증후군, 및 대뇌 아밀로이드 혈관병증(CAA)을 비롯한 다수의 병태 및 질환과 관련이 있는 것으로 보인다.

A β 침착을 예방 및/또는 역전시킴으로써 A β 펩티드와 관련된 병태를 치료할 수 있다.

- [0003] A β 침착에 영향을 주는 치료제로는 A β 펩티드에 대한 항체, 예로서, WO 2001/62801, WO2004/071408 및 문헌 [Tamura, Y., et al, *Neurobiol. of Dis.* (2005) 20:541-545]에 기재되어 있는 인간화된 항체 및 단편을 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 많은 항체 및 그의 유도체가 진단 및 요법에 있어 유용할 수 있지만, 특별한 적용에 있어서는 종종 항체의 이상적인 약동학이 이루어지지 않는다. A β 펩티드와 관련된 다양한 병태 및 질환을 퇴치하는 것을 목적으로 하는 치료학적 항체는 일반적으로 무손상 Fc 영역을 갖는 면역글로불린이다. Fc 영역이 혈장내 항체 반감기를 연장시키는 것을 담당한다. 그러나, 이러한 연장은, 표적 펩티드에 결합하고 있는 항체가 효과적으로 제거되는 것을 방해함으로써 항원 항체 복합체가 장기간 동안 혈장 순환에 존재할 수 있도록 하기 때문에 단점이 될 수 있다. 순차적으로 항체를 투여하는 것은 혈장내 원치않는 복합체가 추가적으로 축적되도록 한다. 항체의 Fc 부위는 특정의 원치않는 효과기 기능을 가질 수 있고, 그러한 기능을 제거하기 위해서는 변형시켜야 할 필요가 있을 수 있다. 추가로, Fc 부위는 실질적인 크기를 종종 전달 경로, 전달 장치, 및 대규모 제조 공정과 관련된 문제를 일으키는 전반적인 치료제로 증대시킨다.

- [0005] Fab는 포함하나, Fc 부위는 포함하지 않는 항체 단편이 효능있는 치료제가 될 수 있는지 여부에 관해 결정하기 위하여 상기와 같은 단편이 생체내에서 연구되어 왔다. 그러나, 제거 속도가 빠르고 반감기가 짧기 때문에 예를 들면, Fab와 같은 단편이 관여하는 요법의 유용성은 제한되어 있다는 것이 연구를 통해서 제안되었다. 그러므로, 혈장내에서의 복합체 형성에 의해 유발될 수 있는 잠재적인 부작용과 잠재적인 효과기 기능은 방지하면서, 투약 요법을 개선시킬 수 있는 약동학 및 약역학을 갖는, 활성의 치료학적 항-A β 펩티드 항체 분자에 대해 요구되고 있다.

- [0006] 본 발명은 A β 펩티드에 대해 표적화될 수 있는 치료학적 항체 또는 항체 단편과 관련된 다수의 문제들을 해소시켰다. 본 발명의 화합물은 A β 에 결합하고, 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자에 공유 결합되어 있는 항체 단편을 포함한다. 이러한 화합물은 포유동물 세포주에서의 항체 생산과 관련된 다양한 문제들, 예를 들면, 비용 문제, 정제 문제, 및 내인적으로 생산된 항원의 오염과 관련된 문제를 고려할 필요가 없는 세균 또는 효소 세포 시스템에서 생산될 수 있다. 추가로, 본 발명의 화합물은 피하로 투여될 수 있으며, 이상적인 약동학(PK) 및 약역학(PD) 프로파일을 가짐과 동시에 A β 에 대한 항체 단편의 친화성 및 선택성을 유지한다.

- [0007] 참으로 예측치 못하게, 그리고 예상외로, 출원인들은 또한 항체 단편의 상보성 결정 영역(CDR)에 PEG 분자를 공유 결합시키는 것이 A β 에 대한 항체 단편의 활성, 친화성 및 선택성을 변경시키지 않았다는 것을 발견하게 되었다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 인간 A β 펩티드의 아미노산 위치 13-28번 사이에 특이적으로 결합하는 항체 단편을 포함하는 분자로서, 여기서, 항체 단편은 PEG 분자에 공유 결합되어 있는 것인 분자를 제공한다. 바람직하게, 항체 단편은 Fab 단편이다.

- [0009] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 단편을 포함하는 분자로서, 여기서, 경쇄 가변 영역은 하기 아미노산 서열: CDRL1: **SSQSLIYSDGNAYLH** (서열 번호: 6), CDRL2: **KVSNRFS** (서열 번호: 7) 및 CDRL3: **TQSTHSPWT** (서열 번호: 8)를 갖는 CDR 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 가변 영역은 하기 아미노산 서열: CDRH1: **GYTFSRYSMS** (서열 번호: 9), CDRH2: **QINIRGCNTYYPDVTVGK** (서열 번호: 10) 또는 **QINIRGNNTYYPDVTVGK** (서열 번호: 11), 및 CDRH3: **GDF** (서열 번호: 12)를 갖는 CDR 영역을 포함하는 것인 분자를 제공한다. 바람직하게, 그러한 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 더욱 바람직하게, 그러한 분자는 CDR에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 더욱더 바람직하게, 그러한 분자는 CDR내의 시스템인 잔기에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 가장 바람직하게, 그러한 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역의 CDRH2: **QINIRGCNTYYPDVTVGK** (서열 번호: 10)에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다.

- [0010] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호: 1의 경쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역을 갖는 항

체 단편을 포함하는 분자를 제공한다. 바람직하게, 그러한 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 더욱 바람직하게, 그러한 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역의 CDR에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 더욱더 바람직하게, 그러한 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역의 CDR내의 시스테인 잔기에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 가장 바람직하게, 그러한 분자는 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역 중 아미노산 위치 56번에 존재하는 시스테인 잔기에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다.

[0011] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 Fab 단편 또는 ScFv 단편을 포함하는 분자로서, 여기서, Fab 단편 또는 ScFv 단편은 PEG 분자에 공유 결합되어 있고, 서열 번호: 1의 경쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역을 갖는 것인 분자를 제공한다. 바람직하게, 그러한 분자는 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역 중 아미노산 위치 56번에 존재하는 시스테인 잔기에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 또한 바람직하게, 그러한 분자에서 PEG의 분자량은 약 0.5 kD 내지 약 30 kD, 더욱 바람직하게 20 kD이다.

[0012] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호: 1의 경쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역을 갖는 항체 단편을 포함하는 분자로서, 여기서, 상기 항체 단편은 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역 중 56번 위치에서 20 kD PEG 분자에 공유 결합되어 있는 것인 분자를 제공한다. 바람직하게, 그러한 분자에서, PEG 분자는 말레이미드 결합을 통해 공유 결합되어 있다.

[0013] 또다른 실시태양에서 본 발명은 인간 A β 펩티드의 아미노산 위치 13-28번 사이에 특이적으로 결합하는 항체 단편을 포함하는 분자로서, 여기서, 항체 단편은 PEG 분자에 공유 결합되어 있고, 서열 번호: 1의 경쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 3의 중쇄 가변 영역을 갖는 것인 분자를 제공한다. 바람직하게, 그러한 분자는 항체 단편의 힌지 영역에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 더욱 바람직하게, PEG 분자는 말레이미드 결합을 통해 힌지 영역에 공유 결합되어 있다.

[0014] 본 발명은 또한 PEG 분자가 항체 단편에 공유 결합되어 있음으로써 주 1회로 투약하는 요법을 허용하는 약동학 및 약역학을 갖는 활성의 치료학적 분자를 생산하고, 동시에 혈장내에서의 복합체 형성에 의해 유발될 수 있는 잠재적인 부작용은 최소화하면서 A β 에 대한 항체 단편의 활성, 친화성 및 선택성을 보존 또는 개선시키는 것인, 항체 단편, 바람직하게, 인간화된 항체 단편을 포함하는 분자를 포함한다.

[0015] 본 발명은 또한 임상전 및 임상 알츠하이머병 둘 모두, 다온증후군, 및 임상전 및 임상 대뇌 아밀로이드 혈관병증(CAA) 둘 모두, 인지적 결손, 뇌졸중, 뇌출혈, 및 일반적 정신 쇠약을 비롯한, A β 펩티드와 관련된 병태 및 질환을 치료, 예방 또는 역전시키는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 유효량의, 본원에 기술되어 있고 본원에서 청구하는 분자를 대상자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0016] 본 발명은 인간 A β 펩티드의 아미노산 위치 13-28번 사이에 특이적으로 결합하는 항체 단편을 포함하는 분자로서, 여기서, 항체 단편은 PEG 분자에 공유 결합되어 있는 것인 분자를 제공한다. 본 발명자들은 A β 에 결합하는 항체 단편에 PEG 분자를 공유 결합시키는 것이 A β 에 대한 항체 단편의 활성, 친화성 및 선택성을 음성적으로 변경시키지 않았다는 것을 발견하게 되었다. 더욱 놀랍게도, 본 발명자들은 A β 에 결합하는 항체 단편의 CDR에 분자량이 20 kD 이하인 PEG 분자를 공유 결합시키는 것이 A β 펩티드에 대한 항체 단편의 활성, 친화성 및 선택성을 음성적으로 변경시키지 않았다는 것을 발견하게 되었다. 이들 항체 단편은 피하로 투여될 수 있으며, 유연적인 투약 요법을 지지하는 치료학적 용도에 대하여 개선적인 PK/PD 프로파일을 갖는다. 게다가, 이들 항체 단편은 포유동물 세포에서의 전장의 항체 생산과 관련된 다양한 문제들을 고려할 필요가 없는 세균 또는 효모 세포 시스템에서 생산될 수 있다. 본 발명의 폐결화된 항체 단편은 인간에서 A β 펩티드와 관련 병태를 예방학적 및 치료학적, 둘 모두로 예방하고 치료할 수 있는 기회를 제공한다.

[0017] 천연에 존재하는 바와 같이 전장의 항체는, 2개의 중쇄(H) (전장일 경우, 약 50-70 kDa)와 2개의 경쇄(L) (전장일 경우, 약 25 kDa) 이황화 결합에 의해 상호 연결되어 있는 4개의 펩티드 쇄로 구성된 면역글로불린 분자이다. 각 쇄의 아미노 말단 부위는 주로 항원 인식을 담당하고 있는 약 100-110개 이상의 아미노산으로 이루어진 가변 영역을 포함한다. 각 쇄의 카르복시 말단 부위는 주로 효과기 기능을 담당하는 불변 영역을 규정한다.

[0018] 경쇄는 카파 또는 람다로 분류되고, 특정 불변 영역을 특징으로 한다. 각각의 경쇄는 N-말단 경쇄 가변 영역 (본원에서 "LCVR")으로 이루어지고, 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, 즉 CL로 이루어진다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 항체의 이소형을 각각 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE로 규정하고, 이들 중 여러 이소형은 다시 서브클래스 (이소형), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 분류될 수 있다. 각각의 중쇄 타입은 특정 불변 영역을 특징으로 한다. 각각의 중쇄는 N-말단 중쇄 가변 영역 (본원에서

"HCVR") 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 IgG, IgD 및 IgA의 경우 3개의 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3)으로 이루어지고, IgM 및 IgE의 경우에는 4개의 도메인 (CH1, CH2, CH3, 및 CH4)으로 이루어진다.

[0019] HCVR 및 LCVR 영역은 보다 더 보존된, 프레임워크 영역("FR")으로 불리는 영역이 산재하는, 상보성 결정 영역("CDR")으로 불리는 추가변 영역으로 다시 세분될 수 있다. 각각의 HCVR 및 LCVR은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되고, 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 다음 순서로 정렬된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본원에서 중쇄의 3개의 CDR은 "CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3"으로 언급되고, 경쇄의 3개의 CDR은 "CDRL1, CDRL2 및 CDRL3"으로 언급된다. CDR은 항원과 특이적인 상호작용을 형성하는 대부분의 잔기를 포함한다. HCVR 및 LCVR 영역 내의 CDR 아미노산 잔기의 넘버링 및 위치는 공지된 카바트(Kabat) 넘버링 규정에 따른다.

[0020] 각각의 경쇄-중쇄쌍의 가변 영역은 항체의 항원-결합 부위를 형성한다. 본원에서 사용하는 바, "항원-결합 부위" 또는 "항원-결합 영역" 또는 "항원-결합 도메인" 또는 "항원 결합 부위"는 상호교환적으로 항원과 상호작용하고 항원에 대한 그의 특이성 및 친화성을 항체에 부여하는 아미노산 잔기를 함유하는 항체 분자의 부위를 지칭한다. 이러한 항체 부위는 항원-결합 잔기의 적절한 입체형태를 유지하기 위해 필요한 "프레임워크" 아미노산 잔기를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체의 프레임워크 영역은 인간 기원 또는 실질적으로 인간 기원 (적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 인간 기원)의 것이며, 카바트 넘버링을 따른다. 별법으로, 항원-결합 영역은 인간 서열로부터 유래될 수 있다.

[0021] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체 단편"은 항원 (예로서, A β)에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 유지하는 하나 이상의 항체의 단편을 지칭한다. 항체의 "항체 단편"이라는 용어에 포함되는 분자의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm) 중 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, 및 (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편 (문헌 [Ward, et al, (1989) *Nature* 341:544-546])을 포함한다. 추가로, 비록 Fv 단편의 2개의 도메인인 VL 및 VH가 별개의 유전자의 의해 코딩되기는 하지만, 이는 재조합 방법의 사용으로 상기 VL 및 VH가 VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하고 있는 단일 단백질 쇄 (단일 쇄 Fv(scFv)로서 공지됨)로서 제조될 수 있도록 하는 합성 링커에 의해 결합될 수 있다 (예로서, 문헌 ([Bird et al (1988) *Science* 242:423-426]: 및 [Huston et al (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]) 참조). 그러한 단일 쇄 항체 또한 용어 "항체 단편"에 포함시키고자 한다. 다른 형태의 단일 쇄 항체, 예로서, 디아바디 또한 용어 "항체 단편"에 포함된다. 디아바디는 2가의 이특이적인 결합 단백질로서, VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄 상에 발현되지만, 너무 짧은 링커가 사용되어 2개의 도메인이 동일한 쇄에서 쌍을 형성할 수 없어, 도메인이 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원 결합 부위가 생성된다 (예로서, 문헌 ([Holliger, P., et al (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448]; [Poljak, R. J., et al (1994) *Structure* 2: 1121-1123]) 참조).

[0022] 또한, 항체 또는 그의 항체 단편은 항체 또는 항체 단편과 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드와의 공유 결합 또는 비공유 결합에 의해 생성된 더 큰 면역부착 분자의 일부분일 수 있다. 이러한 면역부착 분자의 예로는 스트렙타비딘 코어 영역을 사용하여 제조된 사랑체 scFv 분자 (문헌 [Kipriyanov, S.M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101]) 및 시스테인 잔기, 마커 펩티드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그를 사용하여 제조된 2가 및 비오틴화된 scFv 분자 (문헌 [Kipriyanov, S.M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058])를 포함한다. 예로서, Fab 및 F(ab')₂ 단편과 같은 항체 단편은 각각 전체 항체의 파파인 또는 펩신 분해와 같은 통상적인 기법을 사용하여 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 게다가, 항체, 항체 단편 및 면역부착 분자는 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 수득할 수 있다. 항체, 항체 단편 및 면역부착 분자는 당화되거나, 당화되지 않을 수 있고, 이 역시 본 발명의 범위내에 포함된다. 바람직하게, 항체 단편은 Fab 단편이다.

[0023] 용어 "인간화된 항체"는 인간 항체 생식계열로부터 유래된 아미노산 서열 또는 재배열된 서열로 부분적으로 또는 전체적으로 구성되고, 비-인간 CDR을 갖는 항체의 서열을 변경하여 제조된 항체를 지칭한다. 가변 영역의 프레임워크 영역은 상응하는 인간 프레임워크 영역에 의해 치환될 수 있다. 인간 프레임워크 영역은 게놈 프레임워크 영역 뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것도 포함한다. 특히, 그러한 치환으로는 인간 프레임워크 중 특정 위치에 있는 아미노산이 비-인간 CDR에 대한 천연 프레임워크의 상응하는 위치에 있는 것으로부터의 아미노산으로 대체된 돌연변이를 포함한다. 예를 들면, 마우스 CDR을 갖는 인간화된 항체는 특성의 인간 프레임워크 아미노산이 상응하는 마우스 프레임워크 아미노산으로 대체되어 있는, 하나 이상의 치환을

함유할 수 있다. 사용될 수 있는 마우스 항체를 인간화시키는 것에 관한 방법을 추가로 기술하는 참고로는 예로서, 문헌 [Queen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869, 1991]; 미국 특허 번호 제5,693,761호; 미국 특허 번호 제4,816,397호; 미국 특허 번호 제5,225,539호; 문헌 [Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168:595-620, 1983]에 기재되어 컴퓨터 프로그램 ABMOD 및 ENCAD이 있고; 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법에 따라 실시할 수 있다 (문헌 ([Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327, 1988]; [Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536, 1988])). 바람직하게, 본 발명의 항체는 인간화된 항체 단편이다. 더욱 바람직하게, 본 발명의 항체는 인간화된 항체 fab 단편이다.

[0024] 본 발명은 또한 하나 이상의 PEG 분자에 공유 결합되어 있는 항체 단편을 포함한다. 용어 "폴리에틸렌 글리콜" 및 "PEG"가 상호교환적으로 사용될 수 있고, 당업계에 공지되어 있는 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜 또는 그의 유도체를 지칭하는 것으로 한다 (예로서, 미국 특허 번호 제5,445,090호; 제5,900,461호; 제5,932,462호; 제6,436,386호; 제6,448,369호; 제6,437,025호; 제6,448,369호; 제6,495,659호; 제6,515,100호; 및 제6,514,491호 참조). 바람직하게, PEG는 항체 단편의 하나 이상의 리신 또는 시스테인 잔기에 공유 결합되어 있다. 더욱 바람직하게, PEG는 항체 단편의 중쇄 가변 영역 중 하나 이상의 리신 또는 시스테인 잔기에 공유 결합되어 있다. 더욱더 바람직하게, PEG는 항체 단편의 CDR내의 하나 이상의 리신 또는 시스테인 잔기에 공유 결합되어 있다. 가장 바람직하게, PEG는 상기 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 위치 56번에 있는 시스테인 잔기에 공유 결합되어 있다. 별법으로, PEG 분자는 항체 단편의 힌지 영역에 링커 또는 스페이서 분자를 통해서 항체 단편에 결합될 수 있다. 링커 및 스페이서 분자를 힌지 영역에 첨가하는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 추가로, PEG는 당업계에 잘 알려져 있는 기법에 의해 항체 단편의 변형된 비천연 아미노산에 공유 결합될 수 있다.

[0025] 그의 전형적인 형태인 "PEG"는 말단에 하이드록실기를 갖는 선형 중합체로서, 화학식 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ (여기서, n 은 약 8 내지 약 4000이다)를 갖는다. 말단에 있는 수소는 보호기, 예로서, 알킬기, 알카놀이 (M-PEG)로 치환될 수 있다. 바람직하게, PEG는 적어도 하나의 하이드록시기를 가지며, 더욱 바람직하게 상기는 말단에 있는 말단 하이드록시기이다. 바람직하게 이러한 하이드록시기는 활성화되어 펩티드와 반응한다. 다양한 화학적 변형을 사용하여 관능기, 예로서, 활성 탄산염, 활성 에스테르, 알데히드, 트레실레이트를 갖는 활성 PEG 유도체를 제조하거나, 주어진 표적 분자에 커플링시키기에 적합한 PEG-프로피온알데히드를 사용하여 제조한다. 이어서, 활성화된 PEG 유도체를 폴리펩티드 약물 상의 반응기에 공유적으로 연결시킨다. 본 발명에 유용한 PEG 형태가 다수 존재한다. 다수의 PEG 유도체가 당업계에 존재하며, 이는 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 항체 단편에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 특정 유형이나 크기로 제한하고자 하는 것은 아니다. PEG의 분자량은 바람직하게 약 0.5 킬로달톤(kD) 내지 약 100 kD 및 더욱 바람직하게 약 5 kD 내지 약 30 kD 및 가장 바람직하게 약 1 kD 내지 약 20 kD이다. PEG는 선형 또는 분지형일 수 있고, 본 발명의 항- $\text{A}\beta$ 펩티드 항체 단편은 펩티드에 결합되어 있는 PEG 분자를 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 가질 수 있다. 1개의 PEG 분자 항체 단편이 존재하는 것이 가장 바람직할 수 있지만; 펩티드 분자 1개당 1 초과개의 PEG 분자가 존재하는 경우에는 6개 이하인 것이 바람직하다. PEG 분자의 양쪽 말단은 2개 이상의 항- $\text{A}\beta$ 펩티드 항체 단편 분자에 함께 가교결합할 수 있도록 적합화될 수 있다는 것을 추가로 생각할 수 있다. 단백질, 항체 및 그의 단편에 PEG 분자를 결합시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0026] 본원에서 사용되는 바, 용어 " K_D "는 특정 항체-항원 상호 작용의 해리 상수를 지칭하고자 한다. 이는 하기 식:

[0027] $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (M 으로 측정됨)으로써 계산된다.

[0028] 본원에서 사용되는 바, 용어 " k_{on} "은 $M^{-1} \text{sec}^{-1}$ 단위로 측정된, 결합 속도 상수, 또는 정향, 또는 복합체-형성 반응의 특이적 반응 속도를 지칭한다. 본원에 사용되는 바, " k_{off} "는 sec^{-1} 단위로 측정된, 해리 또는 이탈 속도 상수, 또는 항체/항원 복합체로부터의 항체를 해리시키기 위한 특이적 반응 속도를 지칭한다.

[0029] 본원에서 사용되는 바, "특이적으로 결합하는"이라는 용어는 특이적 결합 쌍의 한 구성원이 그의 특이적 결합 파트너(들) 이외의 다른 분자에는 유의적으로 결합하지 않는 상황을 지칭한다. 이 용어는 예를 들어, 본 발명의 항체의 항원-결합 도메인이 다수의 항원이 지닌 특정 에피토프에 특이적인 경우에도 적용가능하고, 이 경우에 항원-결합 도메인을 지닌 특이적 항체는 이 에피토프를 지닌 다양한 항원에 결합할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 분자는 APP에 특이적으로 결합하지 않으면서 $\text{A}\beta$ 펩티드에 특이적으로 결합한다. 추가로, 본 발명의 분자는 아미노산 HHQKLFFAEDVGSNK (13-28) (서열 번호: 4)를 포함하는 선형, 비-선형 또는 입체형태

적 Aβ 에피토프 사이에 특이적으로 결합한다.

[0030] 본 발명의 분자와 관련하여 "활성"이라는 용어는 에피토프/항원 친화성 및 특이성, 생체내 또는 시험관내에서 Aβ 펩티드의 활성을 무력화 또는 길항시킬 수 있는 능력, IC₅₀, 항체의 시험관내 안정성 및 항체의 면역원성 성질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 당업계에서 인지되는 항체의 다른 식별가능한 생물학적 성질 또는 특징으로는 예를 들면, 교차 반응성 (즉, 일반적으로 표적화된 펩티드와 비-인간 상동체와의 교차 반응성, 또는 다른 단백질 또는 조직과의 교차 반응성), 및 포유동물 세포에서 높은 단백질 발현 수준을 유지할 수 있는 능력을 포함한다. 상기 언급한 성질 또는 특징들은 ELISA, 경쟁 ELISA, 비아코어 또는 KinExA 표면 플라즈몬 공명 분석법, 제한없이 시험관내 또는 생체내 중화 분석법, 수용체 결합, 사이토카인 또는 성장 인자 생산 및/또는 분비, 신호 전달 및 인간, 영장류, 또는 임의의 다른 공급원을 비롯한 상이한 공급원으로부터 얻은 조직 절편을 사용한 면역조직화학법을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업계에서 인정받은 기법을 사용하여 관찰, 측정, 또는 평가받을 수 있다.

[0031] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "개체," "대상자," 및 "환자"는 포유동물, 바람직하게 인간을 지칭한다. 특정 실시태양에서, 대상자는 추가로 Aβ 펩티드의 활성이 감소되는 것이 유익한 질환 또는 질병 또는 병태를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0032] 본원에서 사용되는 바, 표현 "숙주 세포," "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호 교환가능하게 사용되고, 본 발명의 임의의 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 HCVR, LCVR 또는 모노클로날 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 임의의 재조합 벡터(들)의 수혜자인 개별적인 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손체를 포함한다. 형태학 또는 전체 DNA 상보체의 관점에서 자손체는 자연적인, 우연한 또는 계획적인 돌연변이 및/또는 변화로 인해 원래의 모체 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있다. 숙주 세포는 본 발명의 항체 단편 또는 그의 경쇄 또는 중쇄를 발현하는 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오티드로 형질 전환, 형질도입 또는 감염된 세포를 포함한다. 숙주 염색체 내로 안정하게 혼입되었는지 여부와 상관없이, 본 발명의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포를 "재조합 숙주 세포"로 또한 지칭할 수 있다. 본 발명의 숙주 세포를 생성하기에 바람직한 세포는 CHO 세포 (예를 들어, ATCC CRL-9096), NSO 세포, SP2/0 세포 및 COS 세포 (예를 들어, ATCC CRL-1650, ATCC CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2)이다. 본 발명에 사용하기 위한 추가의 숙주 세포로는 식물 세포, 효모 세포, 기타 포유동물 세포 및 원핵 세포를 포함한다. 더욱 바람직하게, 본 발명에 사용하기 위한 세포는 효모 또는 원핵 세포이다.

[0033] 용어 "Aβ 펩티드와 관련된 병태 또는 질환" 또는 "Aβ 활성과 관련된 병태 또는 질환"은 1) 뇌내 β-아밀로이드판 발생, 2) 비정상적인 형태의 Aβ 합성, 3) 특히 독성 형태의 Aβ 형성, 또는 4) Aβ의 비정상적인 합성, 분해, 또는 제거 속도와 관련된 모든 병태, 질병, 및 질환을 의미한다. 예로서, 알츠하이머병, 다운증후군, 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 특정 혈관 치매, 및 경증 인지기능 장애와 같은 병태 및 질환은 Aβ와 관계가 있다가 알려져 있거나, 그러한 것으로 추측된다.

[0034] 본 발명은 Aβ 펩티드의 아미노산 위치 13-28번 사이에 특이적으로 결합하는 항체 단편을 포함하는 분자로서, 여기서, 항체 단편은 PEG 분자에 공유 결합되어 있는 것인 분자를 제공한다. 항체 단편은 바람직하게 인간화된 항체 단편, 예로서, Fab 단편 및/또는 scFv 단편이다. 가장 바람직하게 항체 단편은 Fab 단편이다. 본 발명의 분자가 Aβ 펩티드에 특이적으로 결합하게 됨으로써 상기 분자는 Aβ 펩티드 관련 질환 및 질병, 즉, Aβ 펩티드의 생물학적 활성을 저해하는 것이 유익한 병태, 질환, 또는 질병을 위한 치료제로서 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 항체 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지며, 여기서, 경쇄 가변 영역은 하기 아미노산 서열: CDRL1: **SSSQSLIYSDGNAYLH** (서열 번호: 6), CDRL2: **KVSNRFS** (서열 번호: 7) 및 CDRL3: **TQSTHSPWT** (서열 번호: 8)를 갖는 CDR 영역을 포함하고/거나, 여기서, 중쇄 가변 영역은 하기 아미노산 서열: CDRH1: **GYTFSRYSMS** (서열 번호: 9), CDRH2: **QINIRGCNTYYPDTVKG** (서열 번호: 10) 또는 **QINIRGNNTYYPDTVKG** (서열 번호: 11), 및 CDRH3: **GDF** (서열 번호: 12)를 갖는 CDR 영역을 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 항체 단편의 6개의 CDR은 함께 존재한다. 본 발명의 CDR을 포함하는 조성물은 일반적으로 항체 중쇄 또는 경쇄 서열 또는 그의 실질적인 부위일 것이며, 여기서, CDR은 카바트 넘버링에 따른 위치에 위치한다. 각각의 중쇄 및 경쇄에 대한 3개의 CDR 영역은 하기 식: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4으로 표시되는 인접 서열로서 프레임워크 영역 중에 제공된다. 중쇄 또는 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4는 CDR과 함께 인접 서열로서 언급된 순서대로 배열되었을 때 조합하여 항체 단편의 완전한 프레임워크 영역을 형성한다. 바람직하게, 본 발명의 항체의 프레임워크 영역은 인간 기원이거나, 실질적으로 인간 기원 (즉, 약 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97% 초과)의 것이다.

[0036] 바람직하게, 본 발명의 항체 단편은 하기 서열의 펩티드를 포함하는 LCVR:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCSSSSQSLIYSDGNAYLHWYLQKP
 GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
 VYYCTQSTHSPWTFGGGTKVEIK (서열 번호: 1)

[0037] 및

[0038] 하기 서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 펩티드를 포함하는 HCVR:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSRYSMSWVRQAPG
 KGLEWVGQINIRGCNTYYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS
 LKTEDTAVYYCTTGDFWGQGLTVTVSS (서열 번호: 2)

[0039] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSRYSMSWVRQAPG
 KGLEWVGQINIRGNNTYYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS
 LKTEDTAVYYCTTGDFWGQGLTVTVSS (서열 번호: 3)

[0040] 을 포함한다.

[0041] 별법으로, 항체 단편은 서열 번호: 1로 구성된 서열을 갖는 펩티드를 포함하는 LCVR 및 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 펩티드를 포함하는 HCVR을 포함하되, 여기서, HCVR 및 LCVR은 항체 단편 중에 함께 존재한다. 당업자는 본 발명의 항체 단편이 HCVR 및 LCVR의 특정 서열로 제한되는 것은 아니지만, 본 발명의 분자에 존재할 때, 항원 결합 능력 및 모체 항체의 적어도 하나의 다른 기능적 성질, 예로서, 에피토프 특이성, A β 펩티드에 대한 결합에 대하여 모체 항체와 경쟁할 수 있는 능력, A β 펩티드 결합에 대한 IC₅₀ 및/또는 K_D 또는 k_{off} 값을 유지하거나 개선시키는 이들 서열의 변이체도 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0042] 본 발명의 또다른 실시태양에서, 가변 영역 모두 또는 그의 일부는 서열 번호: 1에 제시된 특정 LCVR 서열, 및 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 3에 제시된 특정 HCVR 서열로 한정되고, 이는 추가로 생체내 또는 시험관내에서의 적어도 하나의 A β 펩티드 활성을 길항 또는 무력화시키는 것을 특징으로 한다. 가변 영역 모두 또는 그의 일부가 본원에서 LCVR 서열 번호: 1 및 HCVR 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 3으로 제시된 특정 서열로 한정되는 본 발명의 항체는 추가로 인간 A β 펩티드에는 특이적으로 결합하지만, 인간 APP에는 결합하지 않는 것을 특징으로 한다.

[0043] 본 발명의 하나의 측면에서, PEG (또는 그의 유도체)는 항체 단편의 하나 이상의 리신, 시스테인 또는 비-천연의 변형된 아미노산 잔기에 공유 결합되어 있다. 바람직하게, PEG 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역에 공유 결합되어 있다. 더욱 바람직하게, 그러한 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역의 CDR에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 가장 바람직하게, 그러한 분자는 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 위치 56번에 있는 시스테인에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 갖는다. 별법으로, PEG 분자는 항체 단편의 힌지 영역에 링커 또는 스페이서 분자를 통해 항-A β 펩티드 Fab 항체 단편에 결합할 수 있다.

[0044] 본 발명의 또다른 측면에서, PEG 분자는 A β 에 대한 항체 단편의 친화성 및 선택성에는 유의적으로 영향을 주지 않으면서 항체 분자 상에 존재하는 당화를 대체하기 위하여 본 발명의 항체의 조작된 하나 이상의 리신, 시스테인 또는 비-천연 변형된 아미노산 잔기에 공유 결합되어 있다. 바람직하게, PEG 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역 상에 존재하는 당화 신호를 대체한다. 더욱 바람직하게, PEG 분자는 항체 단편의 중쇄 가변 영역의 CDR 상에 존재하는 당화 신호를 대체한다. 가장 바람직하게, PEG 분자는 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역의 56번 위치에 있는 당화 신호를 대체한다.

[0045] 본 발명의 항체에 공유 결합되어 있는 PEG 분자를 특정 유형이나 크기로 제한하고자 하는 것은 아니다. PEG의 분자량은 바람직하게 약 0.5 kD 내지 약 100 kD, 및 더욱 바람직하게 약 0.5 kD 내지 약 30 kD, 및 가장 바람직하게 약 1 kD 내지 약 20 kD이다. 별법으로, PEG의 분자량은 약 0.5 kD, 약 1 kD, 약 5 kD, 약 10 kD 및 약 20 kD로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. PEG는 선형 또는 분지형일 수 있고, 본 발명의 폐결화된 항-A β 펩티드 항체는 펩티드에 결합되어 있는 PEG 분자를 1개 초과로 가질 수 있다. 바람직하게, 폐결화된 항-A β 펩티드 항체당 1개의 PEG 분자가 존재한다.

- [0046] 가장 바람직하게, 본 발명의 항체 분자는 서열 번호: 1의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역을 갖는 항체 단편을 포함하되, 여기서, 상기 항체 단편은 서열 번호: 2의 중쇄 가변 영역의 56번 위치에서 20 kD PEG 분자에 공유 결합되어 있다.
- [0047] 본 발명의 항체가 결합하게 되는 항원성 A β 펩티드 에피토프는 아미노산 HHQKLFFAEDVGSNK (13-28) (서열 번호: 4)를 포함하는 선형, 비-선형 또는 입체형태적 에피토프이다. 상기 에피토프에 결합하는 항체는 그가 APP에 결합하는 것과 비교하여 A β 펩티드에 특이적이고 우선적으로 결합한다. 본 발명의 모노클로날 항체는 그가 인간 APP와 결합하는 것보다 적어도 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 초과로 (예로서, 보다 큰 친화도 또는 보다 큰 특이성으로); 더욱 바람직하게, 그가 APP와 결합하는 것보다 적어도 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 또는 600배 초과로 A β 펩티드에 결합하고, 더욱더 바람직하게, 본 발명의 모노클로날 항체는 예로서, ELISA 분석법, 경쟁 ELISA 분석법에 의해, 또는 비아코어 또는 KinExA 분석법에서의 K_D 값으로 측정된 바와 같이 배경 수준보다 더 큰 수준으로는 APP에는 결합하지 않는다.
- [0048] 본 발명의 항체 단편은 아미노산 HQKLFFAEDVGSNK (서열 번호: 5)을 포함하지 않는 에피토프보다는 아미노산 HQKLFFAEDVGSNK (서열 번호: 5) 사이의 에피토프에 적어도 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 초과로 (예로서, 보다 큰 친화도 또는 보다 큰 특이성으로) 결합한다. 더욱 바람직하게는, 아미노산 HQKLFFAEDVGSNK (서열 번호: 5)을 포함하지 않는 에피토프보다는 적어도 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 또는 600배 초과로 결합하며, 더욱더 바람직하게, 본 발명의 항체 단편은 예로서, ELISA 분석법, 경쟁 ELISA 분석법에 의해, 또는 비아코어 또는 KinExA 분석법에서의 K_D 값으로 측정된 바와 같이 배경 수준보다 더 큰 수준으로는 아미노산 HQKLFFAEDVGSNK (서열 번호: 5)을 포함하지 않는 에피토프에는 결합하지 않는다.
- [0049] 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 A β 펩티드에 대하여 강한 결합 친화성을 갖는, 즉, 서열 HQKLFFAEDVGSNK (서열 번호: 5)을 포함하는 A β 펩티드, 또는 그의 일부에 결합하는 항체 단편을 제공하는데 [즉, 항체는 HQKLFFAEDVGSNK 폴리펩티드와 접촉하게 된다], 인간 A β 펩티드의 결합 친화도 (K_D)는 KinExA 방법에 의해 측정된 바, 약 200 pM, 100 pM, 50 pM, 40 pM 또는 30 pM 미만, 바람직하게, 20 pM 미만이다. 별법으로, 인간 A β 펩티드에 대한 결합 친화도 (K_D)는 0.1 pM-200 pM 사이이다. 항체 친화도는 본원 하기의 실시예에 기재되어 있는 바와 같이, 또는 당업계에서 이용가능한 다른 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 항체의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입에 의해, 또는 국소 투여일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 비경구 투여에 적합한 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 비경구는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질, 또는 복강내 투여를 포함한다. 정맥내 또는 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달이 바람직하다. 더욱 바람직하게, 본 발명의 항체의 투여 경로는 피하 주사를 통한 것이다. 상기 주사를 위해 적합한 비히클은 당업계에서 용이하게 이용할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 항체 단편은 상응하는 전장의 항-A β 펩티드 항체보다 혈장 중에서 더욱 짧은 반감기를 갖고, 상응하는 전장의 항-A β 펩티드 항체보다 혈장으로부터 더욱 신속하게 제거된다. 별법으로, 본 발명의 항체는 PEG 분자에 공유 결합되어 있지 않은 상응하는 항-A β 펩티드 Fab 단편보다 더욱 긴 혈장 반감기를 갖고, PEG 분자에 공유 결합되어 있지 않은 상응하는 항-A β 펩티드 Fab 단편보다 혈장으로부터 덜 신속하게 제거된다 (실시예 1, 2 및 3). 본원에서 사용되는 바, 항체와 관련하여 사용되는 "상응하는"이라는 용어는 동일한 LCVR 및 HCVR을 갖는 항체를 지칭한다. 예를 들면, 서열 번호: 1의 LCVR 및 서열 번호: 2의 HCVR을 갖는 항체 Fab 단편에 관해 상응하는 전장의 항체는 무손상 Fc 도메인과 함께, 서열 번호: 1의 동일한 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 HCVR을 가질 것이다.
- [0052] 또다른 측면에서, 본 발명은 발현되었을 때, 서열 번호: 1의 LCVR 및 서열 번호: 2의 HCVR을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 코돈 동위성에 기인하여 상기 서열이 다른 폴리뉴클레오티드 서열로 쉽게 치환될 수 있다. 특히 바람직한 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 발현되었을 때, 서열 번호: 6-8의 경쇄 CDR, 및 서열 번호: 9, 10 또는 11 및 12의 중쇄 CDR, 또는 서열 번호: 1-서열 번호: 3의 가변 영역 중 어느 것을 포함하는 항체를 코딩한다. 서열 번호: 1의 LCVR 및 서열 번호: 2의 HCVR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 예는 각각 서열 번호: 13 (LCVR) 및 서열 번호: 14 (HCVR)로 나타낸다.
- [0053] 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 천연-관련된 프로모터 영역 또는 이중 프로모터 영역을 비롯한, 인간화된 면역글로불린 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 폴리뉴클레오티드 서열을 더 포함할 것이다. 바람직하게, 발현 제어 서열은 진핵 세포를 형질전환시킬 수 있거나, 형질감염시킬 수 있는 벡터내 진핵 프로모터 시스템일 수 있지만, 원핵 세포에 대한 제어 서열 또한 사용될 수 있다. 일단 벡터가 적절한 숙주 세포주내

로 혼입되고 나면 숙주 세포는 뉴클레오티드 서열을 발현시키기에 적합한 조건하에서 증식하게 되고, 원하는 경우, 경쇄, 중쇄, 경쇄/중쇄 이량체 또는 무손상 항체, 결합 단편 또는 다른 면역글로불린 형태의 수집 및 정제가 후속하여 이루어질 수 있다.

[0054] 궁극적으로 원하는 항체 또는 항체 단편을 발현시킬 수 있는 본 발명의 핵산 서열은 잘 알려져 있는 다양한 기법들 중 어느 것을 사용하여 각종의 상이한 폴리뉴클레오티드 (게놈 또는 cDNA, RNA, 합성 올리고뉴클레오티드 등) 및 성분들 (예로서, V, J, D, 및 C 영역)로부터 형성될 수 있다. 적절한 게놈 및 합성 서열을 연결시키는 것이 공통된 생산 방법이지만, cDNA 서열 또한 사용될 수 있다.

[0055] 인간 불변 영역 DNA 서열은 잘 알려져 있는 방법에 따라 다양한 인간 세포로부터 단리될 수 있지만, 무한증식 B-세포로부터 단리되는 것이 바람직할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 적합한 공급원 세포 및 면역글로불린 발현 및 분비를 위한 숙주 세포는 당업계에 잘 알려져 있는 다수의 공급원으로부터 획득될 수 있다.

[0056] 본원에서 구체적으로 기술된 인간화된 항체 또는 항체 단편 이외에도, 다른 "실질적으로 상동성인" 변형된 항체는 당업자에게 잘 알려져 있는 다양한 재조합 DNA 기법을 사용함으로써 용이하게 디자인되고 제조될 수 있다. 예를 들면, 프레임워크 영역은 수개의 아미노산 치환, 말단 및 중간 부가 및 결실 등에 의해 1차 구조 수준에 있어서 천연 서열과는 상이할 수 있다. 게다가, 각종의 상이한 인간 프레임워크 영역은 본 발명의 인간화된 항체에 대한 기초로서 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 일반적으로, 유전자 변형은 예로서, 부위-지정 돌연변이 유발법과 같이 잘 알려져 있는 각종 기법에 의해 쉽게 이루어질 수 있다.

[0057] 앞서 언급한 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는, 서열이 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 후 (즉, 발현 제어 서열이 확실하게 작용할 수 있도록 배치된 후) 숙주에서 발현될 것이다. 이러한 발현 벡터는 전형적으로 에피솜으로서, 또는 숙주 염색체 DNA의 통합부로서 숙주 세포에서 복제가능할 수 있다. 통상, 발현 벡터는 원하는 DNA 서열로 형질전환된 숙주 세포를 검출할 수 있도록 하는 선별 마커, 예로서, 테트라사이클린 또는 네오마신을 함유할 것이다. 세포에 대한 발현 벡터는 발현 제어 서열, 예로서, 복제 기점, 프로모터, 인핸서, 및 필요한 프로세싱 정보 부위, 예로서, 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 발현 제어 서열은 면역글로불린 유전자, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스, 사이토메갈로바이러스 등으로부터 유래된 프로모터이다.

[0058] 관심의 대상이 되는 폴리뉴클레오티드 서열 (예로서, 중쇄 및 경쇄 코딩 서열 및 발현 제어 서열)을 함유하는 벡터는 잘 알려져 있는 방법에 의해 숙주 세포내로 전달될 수 있으며, 이는 세포 유형에 따라 달라질 수 있다. 당업계에 잘 알려져 있는 기법을 사용하여 본 발명의 항체를 발현시키는데 다양한 숙주가 사용될 수 있다. 바람직한 세포주로는 COS, CHO, SP2/0, NSO (공개 저장소, 예로서, 버지니아주 마나싸스 소재의 ATCC, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)으로부터 이용가능) 및 효모 세포주를 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 숙주 세포는 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 하나 이상의 벡터 또는 작제물을 포함한다. 본 발명의 숙주 세포는 본 발명의 벡터가 도입된 세포이며, 여기서, 상기 벡터는 본 발명의 LCVR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 HCVR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 2개의 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공하는데; 1개의 벡터는 본 발명의 항체의 LCVR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 1개의 벡터는 본 발명의 항체에 존재하는 HCVR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 이들 각각은 프로모터 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 세포 유형으로는 포유동물, 세균, 식물 및 효모 세포를 포함한다. 바람직하게, 세포는 CHO 세포, COS 세포, SP2/0 세포, NSO 세포, 효모 세포 또는 유도체 또는 임의의 바람직한 세포 유형의 자손체이다.

[0059] 일단 발현되면, 무손상 항체, 그의 이량체, 개별적인 경쇄 및 중쇄, 또는 본 발명의 기타 면역글로불린 형태를 황산암모늄 침전, 이온 교환, 친화, 역상, 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 비롯한 당업계의 표준 절차에 따라 정제할 수 있다. 제약 용도를 위해, 적어도 약 90%, 92%, 94% 또는 96% 균질성의 실질적으로 순수한 면역글로불린이 바람직하고, 98 내지 99% 이상의 균질성이 가장 바람직하다. 부분적으로 또는 원하는 균질성으로 일단 정제한 후, 펩티드를 본원에 지시된 바와 같이 치료학적 또는 예방학적으로 사용할 수 있다.

[0060] 인지적 결손, 뇌졸중, 뇌출혈, 및 일반적 정신 쇠약을 일으키는 다수의 증상은 A β 펩티드를 함유하는 뇌의 신경반 및 뇌혈관반과 관련되어 있는 것으로 보인다. 이러한 병태 중에는 임상전 및 임상 알츠하이머병 둘 모두, 다운증후군, 및 임상전 및 임상 대뇌 아밀로이드 혈관병증(CAA)이 있다. 아밀로이드판은 A β 펩티드로부터 형성된다. 이들 펩티드는 전형적으로는 지질단백질과 복합체를 형성한 형태로 혈액 중에서 및 뇌척수액(CSF) 중에서 순환한다. 순환 형태의 A β 펩티드는 일반 전구체 단백질인 아밀로이드 전구체 단백질 (주로 APP로 표시

됨)의 절단으로부터 형성되어지는 39-43개의 아미노산 (대개는 40개 또는 42개의 아미노산)으로 구성되어 있다. 가용성 AP 중 일부 형태는 그 자체가 신경독성이고, 신경퇴행 및/또는 인지 저하의 중증도를 결정할 수 있다 (문헌 ([McLean, C. A., et al, *Ann. Neurol.* (1999) 46:860-866]; [Lambert, M. P., et al. (1998) 95:6448-6453]; [Naslund, J., *J. Am. Med. Assoc.* (2000) 283:1571])).

[0061] 그러므로, 본 발명의 분자를 포함하는 제약 조성물은, A β 펩티드의 존재가 바람직하지 못한 병적 효과를 유발하거나, 그에 원인이 되거나, A β 펩티드 활성의 감소가 포유동물, 바람직하게 인간에서 치료학적으로 유익한 것인 병태 (A β 펩티드를 함유하는 뇌의 신경반 및 뇌혈관반과 관련되어 있는 것으로 보이는 임상 또는 임상전 알츠하이머병, 다운증후군, 임상 또는 임상전 아밀로이드 혈관병증(CAA), 전구 알츠하이머, 경증 인지기능 장애 (MCI) 및 인지적 결손, 뇌졸중, 뇌출혈, 및 일반적 정신 쇠약을 포함하나, 이에 한정되지 않음)의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. A β 펩티드 활성이 유해한 것이거나, 생체활성의 A β 펩티드의 수준을 감소시키는 것이 유익한 것인 상기 언급한 질병들 중 적어도 하나를 치료하거나 예방하기 위한 본 발명의 분자의 용도가 본원에서 주시된다. 추가로, 상기 언급한 질병들 중 적어도 하나를 치료하기 위한 의약의 제조에서 사용하기 위한 본 발명의 분자의 용도가 본원에서 주시된다.

[0062] 본원에서 사용되는 바, 용어 "치료," "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적인 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 효과는 질환 및/또는 상기 질환의 진행 과정에서 기인하는 부작용에 대한 부분적인 또는 완전한 치유일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "치료"는 특히 인간에게 화합물을 투여하는 것을 포함하고, (a) 질환을 억제하는 것, 즉 그의 발달을 정지시키는 것; 또는 (b) 질환을 경감시키는 것, 즉 질환 또는 질병의 퇴행을 야기하거나 그의 증상 또는 합병증을 완화시키는 것을 포함한다. 투여 요법은 최적의 원하는 반응 (예를 들어, 치료학적 또는 예방학적 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 볼러스가 투여될 수 있거나, 여러 개로 분할된 투여량이 장기간에 걸쳐 투여될 수 있거나, 또는 치료 상황의 요건에 의해 지시되는 대로 투여량이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다.

[0063] 본 발명의 분자는 대상자에게 투여하기에 적합한 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 본 발명의 분자는 단독으로 또는 제약상 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제와 조합되어 단일 또는 다중 투여량으로 투여될 수 있다. 투여용 제약 조성물은 선택된 투여 방식에 적절하도록 디자인되고, 제약상 허용되는 희석제, 담체 및/또는 부형제, 예로서, 봉쇄제, 완충제, 계면활성제, 보존제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등이 적절하게 사용된다 (예로서, 본원의 실시예 14 참조). 상기 조성물은 예를 들어 의사에게 일반적으로 공지된 제제화 기법의 개요를 제공하는 문헌 예로서, [Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995] 에서와 같은 통상적인 기법에 따라 디자인된다.

[0064] 본 발명의 분자를 포함하는 제약 조성물을 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 구강, 설하, 또는 좌약 투여를 비롯한, 표준 투여 기법을 사용하여 본원에 기술된 바와 같은 병상의 위험이 있거나 이러한 병상을 나타내는 대상자에게 투여될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 분자는 피하 투여에 의해 본원에 기술된 바와 같은 병상의 위험이 있거나 이러한 병상을 나타내는 대상자에게 투여될 수 있다.

[0065] 본 발명의 제약 조성물은 바람직하게 "치료상 유효량" 또는 "예방상 유효량"의 본 발명의 분자이다. "치료상 유효량"은 투여량에서 및 필요한 기간 동안 목적하는 치료 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 분자의 치료상 유효량은 예로서, 질병 상태, 개체의 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 목적하는 반응을 유도해내는 분자의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료상 유효량은 치료상 유익한 효과가 분자의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 능가하는 것이다. "예방상 유효량"은 투여량에서 및 필요한 기간 동안 원하는 예방학적 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 전형적으로, 예방 투여량은 질환 발생 전에 또는 질환의 초기 단계에 대상자에서 사용되기 때문에, 예방상 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다.

[0066] 치료상 유효량 또는 예방상 유효량은 대상자에게 치료 이점을 부여하기 위해 필요한 활성제의 적어도 최소의 투여량이지만 독성 투여량보다는 적다. 다시 말하면, 본 발명의 분자의 치료상 유효량은 포유동물, 바람직하게는 인간에서 A β 펩티드 활성, 예로서, A β 펩티드에 대한 결합을 감소시키는 양으로서, 여기서, A β 펩티드의 존재는 바람직하지 못한 병적 효과를 유발하거나, 그에 원인이 되거나, A β 펩티드 감소가 포유동물, 바람직하게 인간에서 치료상 유익한 효과를 가져온다.

[0067] 본 발명의 분자의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입에 의해, 또는 국소적일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 비경구 투여에 적합한 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 비경구는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질, 또는 복강내 투여를 포함한다. 정맥내 또는 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달이 바람직하다. 피하 주사가 가장 바람직하다. 상기 주사를 위해 적합한 비히클은 당업계에서

용이하게 이용할 수 있다.

[0068] 제약 조성물은 전형적으로 멸균성이어야 하고, 제조 및 보관 조건하에, 예를 들면, 밀봉 바이알 또는 주사기와 같은 제공된 용기 내에서 안정적이어야 한다. 따라서, 제약 조성물은 제제 제조 후에 멸균 여과될 수 있거나, 또는 다르게는 미생물학적으로 허용가능하게 제조될 수 있다. 전형적인 정맥내 주입용 조성물은 하기 열거한 전형적인 투여량을 전달하기 위해서는 예로서, 멸균 링거액, 생리식염수, 텍스트로스 용액 및 헥스 용액과 같은 250-1000 ml의 유체 부피 및 치료상 유효 투여량 (예로서, 1 내지 100 mg/ml 이상)의 치료제를 가질 수 있다. 투여량은 질환의 유형 및 중증도에 따라 달라질 수 있다. 의학업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, 임의의 한 대상자에 대한 투여량은 환자의 크기, 체표면적, 연령, 투여될 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 상태, 및 함께 투여되는 기타 약물을 비롯한, 많은 인자에 따라 좌우된다. 전형적인 투여량은 예를 들어 0.001 내지 1000 μ g일 수 있다; 그러나, 특히 상기 언급된 인자들을 고려하여, 이러한 예시적인 범위보다 낮은 또는 높은 투여량이 가능하다. 일일 비경구 투여 요법은 전체 체중 1 kg 당 하루에 약 0.1 μ g/kg 내지 약 100 mg/kg, 바람직하게는 약 0.3 μ g/kg 내지 약 10 mg/kg, 및 약 1 μ g/kg 내지 1 mg/kg, 더욱더 바람직하게 약 0.5 내지 10 mg/kg일 수 있다. 주기적인 평가에 의해 진행을 모니터링할 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 병태에 따라 질환 증상의 목적하는 억제에 일어날 때까지 치료를 반복할 수 있다. 그러나, 기타 투여 요법이 유용할 수 있고, 본 발명에서 배제되지 않는다. 목적하는 투여량은 진료의가 달성하기 바라는 약동학적 붕괴 패턴에 따라 단일 볼러스 투여, 다중 볼러스 투여, 또는 항체의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0069] 본 발명의 분자의 이러한 제안된 양은 많은 치료적 판단에 영향을 받기 쉽다. 적절한 투여량 및 스케줄의 선택 시에 중요한 요소는 수득된 결과이다. 이러한 상황에서 고려할 요소에는 치료될 특정 질병, 치료될 특정 포유 동물, 개별적인 환자의 임상 상태, 질병의 원인, 항체의 전달 부위, 항체의 특정 유형, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 진료의에게 공지된 기타 요소가 포함된다.

[0070] 본 발명의 치료제는 보관을 위해 동결 또는 동결건조되어, 사용 전에 적절한 멸균 담체 내에서 재구성될 수 있다. 동결건조 및 재구성으로 항체 활성이 상이한 정도로 손실될 수 있다. 이를 보상하도록 투여량을 조절할 필요가 있을 수 있다.

[0071] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위함이며, 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에서 하기 실시예는 그 중에서도 특히, 원래 인간 A β 펩티드의 잔기 13-28로 구성된 펩티드로 면역화하여 제조된 것으로서 "266"으로 명시되는 뮤린 모노클로날 항체 (m266), 및 266으로 명시되는 뮤린 모노클로날 항체의 Fab 단편 (m266-Fab)을 사용한다. 상기 펩티드와 면역반응하는 것으로 항체를 확인한다. 앞서 기술된 바와 같이 m266을 제조하였다. PEG 분자를 m266-Fab에 공유 결합시키기 위하여 Fab를 돌연변이화시켜 중쇄 가변 영역의 CDR2 (N56C)에 시스테인 잔기를 도입시킬 수 있고, 하기 나타난 바와 같은 방식으로 폐결화시킬 수 있다 (실시예 4). 본원 실시예는 뮤린 시스템에서 수행된 실험을 기술하고 있기 때문에 뮤린 모노클로날 항체를 사용하는 것은 충분하다. 그러나, 인간을 위해 사용할 것으로 목적으로 하는 본 발명의 치료 방법에서 본 발명의 인간화된 형태의 항체, 또는 그의 단편이 바람직하다. 하기 실시예에서 언급한 1A1-Fab는 서열 번호: 1의 LCVR 및 서열 번호: 2의 HCVR을 포함하는 인간화된 항체 Fab 단편이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 실시예 1

[0073] PDAPP 마우스에서의 m266-Fab PEG 피하 PK/PD 연구

[0074] 항체 및 항체-A β 복합체의 약동학/약역학 혈장 반응을 조사하기 위하여 어린 (생후 3개월) 트랜스제닉 PDAPP 마우스를 사용하였다. 마우스 266 Fab (m266-Fab), m266-Fab+5 KD PEG, m266-Fab+10 KD PEG, m266-Fab+20 KD PEG, 및 무손상 전장의 m266 IgG 항체를 비롯한 수개의 항체를 조사하였다. 1 mg/kg의 항체를 PDAPP+/- 마우스에 피하 주사한 후, 이어서, 혈장을 하기 시점에: 투여후 1, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 및 240시간째에 단리시켰다. m266-Fab 항체를 받은 동물은, 상기 부분이 빠르게 전환되기 때문에 추가의 이른 시점에 분석하였다. m266-Fab에 대한 시점은 하기와 같다: 투여후 1, 4, 8, 12, 16, 24, 및 48시간째. 각 시점마다 각 항체에 대하여 총 5마리의 동물을 분석하였다. 미리 0.5 M EDTA로 세정한 ICC 주사기에 연결되어 있는 23-게이지 바늘을 사용하여 심장 천자를 통해 전혈을 수득하였다. 단리 절차를 거치는 동안 혈액 샘플을 얼음상에서 인큐베이션시키고, 이어서, 15분 동안 4℃의 냉장 미세원심분리기 중 14,000 RPM에서 원심분리하였다. 생성된 혈장 샘플을 분취하고, -80℃에서 저장하였다.

[0075] A. Fab PK 분석

[0076] 혈장 Fab 농도는 항원 포획 ELISA를 사용하여 측정하였다. 간략하면, 플레이트를 4℃에서 밤새도록, 또는 37℃에서 1시간 동안 AB-BSA 접합체로 코팅한 후, 피어스(Pierce) 카제인 완충액으로 차단하였다. 표준, 대조군 샘플, 및 연구 샘플을 플레이트에 가한 후, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 검출용으로 염소 항 마우스 HRP를 사용하고, OPD 기질을 사용하여 비색 반응을 전개시켰다. 플레이트는 A700을 참고로 하여 A493에서의 흡광도를 판독하였다. 혈장 샘플로부터의 면역반응성의 농도는 4/5-파라미터 알고리즘을 사용하여 마우스 혈장 중 공지된 양의 m266 Fab로부터 작성된 표준 곡선으로부터 결정하였다. m266 Fab에 대한 분석 범위는 0.05 내지 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 폐길화된 Fab에 대한 범위는 0.075 내지 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 였다.

[0077] 혈장 샘플로부터의 면역반응성의 농도는 4/5-파라미터 알고리즘을 사용하여 마우스 혈장 중 공지된 양의 m266 Fab로부터 작성된 표준 곡선으로부터 결정하였다. 266 Fab에 대한 분석 범위는 0.05 내지 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 폐길화된 Fab에 대한 범위는 0.075 내지 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 그 결과, PEG 분자를 추가하고, PEG 분자의 크기를 증가시키는 것이 폐길화되지 않은 m266-Fab와 비교하였을 때 (8시간 경과 후 350 ng/ml) 혈장내 폐길화된 Fab의 잔류를 증가시킨다 (20 K 폐길화된 m266-Fab의 경우 8시간 경과 후 2545 ng/ml)라는 것이 명확하게 입증되었다.

[0078] B. m266 A β ELISA 분석법

[0079] 치료학적 항체 (전장 또는 Fab 단편)의 부재 또는 존재하에서 혈장 A β 의 양을 측정하기 위해 ELISA 분석법을 개발하고 사용하였다. 이들 분석법에서 측정된 A β 펩티드는 전장의 A β 1-40 또는 A β 1-42였다. 96 웰 이몰론 (Immulon) 4HBX 96 웰 ELISA 플레이트 (써모랩시스템즈(ThermoLabsystems))를 4℃에서 밤새도록 C-말단 포획 항체 (A β 40 플레이트의 경우 m2G3, 또는 A β 42 플레이트의 경우 m21F12)를 사용하여 PBS (100 $\mu\text{L}/\text{웰}$) 중 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 코팅하였다. 시험 플레이트를 봉인하여 밤새도록 인큐베이션시키는 동안 증발되지 못하도록 하였다. 다음날, 웰-용액을 제거하고, 랩시스템즈 96-웰 플레이트(Labsystems 96-Well Plate) 세척기를 사용하여 PBS (400 $\mu\text{L}/\text{웰}$)로 3회에 걸쳐 세척하였다. 차단 완충액 (360 μL 의 1% 밀크-PBS)을 가하고, 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 혈장을 샘플 희석제로 희석하여 샘플을 제조함으로써 하기를 수득하였다: 20% 혈장, 0.5 M 구아니딘, 5 mM 트리스 pH 8.0, 0.5 X 프로테아제 저해제 각테일, 25 $\mu\text{g/mL}$ m266, 및 PBS. 특정의 시점에서는 존재하는 A β 펩티드의 수준이 높기 때문에 본 분석법에 사용된 혈장의 부피가 감소되어야 할 필요가 있을 수 있으며, 이러한 경우, 남아있는 혈장의 부피는 래트 혈장으로 조정하였다 (최종 부피(%)는 20%로 유지시켰다). 250 pg/ml 내지 3.9 pg/ml로 농도를 달리하는 A β 표준을 표준 희석제 (20% 래트 혈장, 0.5 M 구아니딘, 5 mM 트리스 pH 8.0, 및 0.5 X 프로테아제 저해제 각테일 완전 EDTA 무함유 (로슈 다이어그노스틱스(Roche Diagnostics)), 25 $\mu\text{g/mL}$ m266, 및 PBS) 중에서 생성하였다. 본 분석법에서 가변적 수준의 중심 도메인 항체가 발휘할 수 있는 임의의 음성적인 간섭을 무력화시키기 위해서 샘플 및 표준 희석제 둘 모두에 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 무손상 m266을 혼입시켜야 했다. 차단시킨 후, 플레이트를 PBS로 4회에 걸쳐 세척하였다. 샘플 및 표준을 3회에 걸쳐 로딩하고 (100 $\mu\text{L}/\text{웰}$), 봉인하고, 4℃에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 다음날 아침, 플레이트를 PBS-T (PBS + 0.05% 트윈-20)로 4회에 걸쳐 세척하고, 웰을 실온에서 2시간 동안 비오틴화된 2차 항체 m3D6 (0.5% BSA/PBS-T 중에서 희석된 100 $\mu\text{L}/\text{웰}$)과 함께 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBS-T로 4회에 걸쳐 세척한 후, 실온에서 1.5시간 동안 스트렙타비딘-폴리HRP (0.5% BSA/PBS-T 중 1:5000)와 함께 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBS-T로 4회에 걸쳐 세척하고, 100 $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 TMB (시그마(Sigma)) 기질을 가하였다. 15, 30, 및 60분째에 650 nm에서 비색 진행을 모니터링하였다.

표 1

약역학 결과: Aβ 40에 대한 평균 혈장 농도 (pg/ml)

시간(h)	m266 Fab	m266 Fab + 5KD PEG	m266 Fab + 10KD PEG	m266 Fab + 20KD PEG	m266 무손상
1	246.7	253.5	178.4	196.3	223.7
4	498.8	693.2	898.1	816.6	1110
8	576.7	997.8	1011	1259	1852
12	530.9				
18	344.1				
24	181.2	914.7	1728	2966	6919
48		200.1	789.6	2642	8557
96		79.1	104.8	329.3	10792
168		62.64	76.49	143.3	9923
240		50.14	98.24	101.2	6114

[0080]

[0081]

PEG 크기에 기초하여 조작될 수 있는, 보다 유연적인 투약 스케줄 이외에도, 결과는 폐길화된 Fab-항원 복합체가 무손상 항체 (m266 무손상)와 같이 장시간 동안 혈장 순환에서 축적되지 않는다는 것을 입증하였다. 무손상 항체는 혈장내 항체의 반감기를 연장시킴으로써, 항원:항체 복합체가 장시간 동안 (>240 시간) 혈장 순환에 존재하게 된다. 한편 천연 Fab (m266 Fab)는 제거 속도가 빠르고 반감기가 짧기 때문에 (<24 시간) 요법제로서 제한을 받는다. 반대로, 표 1에서 입증된 바와 같이, 폐길화된 Fab는 투약 요법을 개선시킬 수 있는 약동학 및 약역학을 갖는 항체 분자를 제공한다.

[0082]

실시예 2

[0083]

PDAPP 마우스에서의 1A1-Fab PEG 피하 PK/PD 연구

[0084]

항체 및 항체-Aβ 복합체의 약동학/약역학 혈장 반응을 조사하기 위하여 어린 (생후 3개월) 트랜스제닉 PDAPP 마우스에서 연구를 실시하였다. 인간화된 1A1-Fab, 1A1-Fab+5 KD PEG, 1A1-Fab+10 KD PEG, 및 1A1-Fab+20 KD PEG를 비롯한 수개의 항체를 조사하였다. 1 mg/kg의 항체를 PDAPP+/- 마우스에 피하 주사한 후, 이어서, 항체 주사군에 따라 다른 시점에 혈장을 분리시켰다. 각종 항체에 대하여 하기 시점을 사용하였다:

[0085]

1A1-Fab는 투약 후 1, 4, 8, 12, 18, 24, 및 48시간째에 출혈시키고,

[0086]

1A1-Fab+5 KD PEG는 투약 후 1, 4, 8, 24, 48, 96, 및 168시간째에 출혈시키고,

[0087]

1A1-Fab+10 KD PEG는 투약 후 1, 4, 8, 24, 48, 96, 및 168시간째에 출혈시키고,

[0088]

1A1-Fab+20 KD PEG는 투약 후 1, 8, 24, 48, 96, 168, 및 240시간째에 출혈시켰다.

[0089]

각 시점마다 각 항체에 대하여 총 5마리의 동물을 분석하였다. 생성된 혈장 샘플을 분취하고, -80℃에서 저장하였다.

[0090]

A. Fab PK 분석

[0091]

샌드위치 ELISA를 사용하여 1A1 Fab에 대한 혈장 1A1 Fab 농도를 측정하였다. 플레이트를 염소 항-인간 IgG 카파로 코팅하고, 표준, 대조군 샘플, 및 연구 샘플을 플레이트에 가한 후, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 검출용으로 염소 항 인간 IgG를 사용하고, 비색 반응을 위해 OPD를 사용하였다. 플레이트는 A700을 참고로 하여 A493에서의 흡광도를 판독하였다.

[0092]

혈장 샘플로부터의 농도는 4/5-파라미터 알고리즘을 사용하여 마우스 혈장 중 공지된 양의 1A1 Fab로 작성된 표준 곡선으로부터 결정하였다; Fab 및 Fab-5 K PEG 분석에 대한 범위는 0.003 내지 0.3 μg/mL이고; Fab-10 K PEG 분석에 대한 범위는 0.006 내지 0.2 및 0.04 내지 0.4 μg/mL이고; Fab 20 K PEG 분석에 대한 범위는 0.02-

0.4 및 0.04-0.4 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 그 결과, PEG 분자를 추가하고, PEG 분자의 크기를 증가시키는 것이 폐길화되지 않은 1A1 Fab와 비교하였을 때 (24시간 경과 후 검출불가) 혈장내 폐길화된 Fab의 잔류를 증가시킨다 (20 K 폐길화된 1A1 Fab의 경우 96시간 경과 후 77 ng/ml)라는 것이 명확하게 입증되었다.

[0093] B. 1A1 A β ELISA 분석법

[0094] ELISA는 본질적으로 m266에 대하여 상기에 기술된 것과 동일하였다. 혈장을 샘플 희석제로 희석하여 샘플을 제조함으로써 하기를 수득하였다: 20% 혈장, 0.5 M 구아니딘, 5 mM 트리스 pH 8.0, 0.5 X 프로테아제 저해제 각 테일, 20 $\mu\text{g/mL}$ 1A1, 및 PBS. 이들 분석법에서 측정된 A β 펩티드는 전장의 A β 1-40 또는 A β 1-42였다. 비색 진행은 15, 30, 및 60분째에 650 nm에서 모니터링하였다. 결과는 하기 표 2에 제시한다.

표 2

약역학 결과: A β 40에 대한 평균 혈장 농도 (pg/ml)

시간(h)	1A1 Fab	1A1 Fab + 5KD PEG	1A1 Fab + 10KD PEG	1A1 Fab + 20KD PEG
1	136.8	117.1	116.3	111.2
4	153.6	208.2	281.6	
8	96.65	198.4	406.3	529.2
12	131.9			
18	105.9			
24	114.7	133.6	585.1	1243
48	106.8	95.12	170.7	642
96		88.48	113.7	177.9
168		93.96	110.8	125.4
240				200

[0095]

[0096] 실시예 1에서 m266 Fab에 대한 것과 유사한 방식으로 표 2로부터 얻은 데이터는, PEG 분자에 공유 결합되어 있는 인간화된 Fab 또한 항체-항원 복합체가 장시간 동안 혈장 순환에서 축적되지 못하도록 함과 동시에, 유연적인 투약 스케줄을 허용하는 이상적인 PK/PD 프로파일을 제공한다는 것을 입증한다.

[0097] 실시예 3

[0098] 무린 266 및 인간화된 1A1 Fab 유사체의 정제

[0099] 양이온 교환 크로마토그래피에 이어서, 슈퍼덱스(Superdex) 75 수지 (GE 헬쓰케어(GE Healthcare))를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피로 이루어지는 2단계 크로마토그래피 전략법을 사용하여 마우스 266 Fab 또는 인간화된 1A1 Fab 및 유사체로 형질감염시킨 세포로부터 유래된 배양물 상등액을 정제하였다. 수거한 후, TFF를 사용하여 배양물 상등액을 농축시키고, 4°C에서 밤새도록 20배 과량 부피의 10 mM 아세트산 나트륨 pH 5에 대하여 투석시켰다. 원심분리하여 침전물을 제거하고, 10 mM 아세트산 나트륨 pH 5으로 충전된 SP 세파로스 충전상 (GE 헬쓰케어)에 상등액을 로딩하였다. Fab 단편이 용리될 때까지 대략 90 내지 110 mM NaCl로 연속적으로 더 많은 양의 NaCl을 함유하는 10 mM 아세트산 나트륨 pH 5를 사용하여 칼럼을 세척하였다. 활성 Fab를 함유하는 칼럼 분획을 확인하여 모았다. 원심분리 농축 장치 (밀리포어(Millipore))를 사용하여 부피를 감소시키고, 완충액 (PBS)을 교환하였다. 최종 부피를 13 ml로 조정하고, 슈퍼덱스 75의 크기별로 배열된 칼럼상에 로딩하였다. 추가로 특징화하고 PEG화하기 위해서 대략 50 kD에서 용리된 Fab 함유 분획을 확인하여 모았다.

[0100] 실시예 4

[0101] 시험관내 PEG화 및 특징화

[0102] PEG화를 위해 세포 배양물로부터 정제된 1A1-Fab 상의 N56C 시스테인을 차단하였다. 피어스즈 리듀스-IMM™ 임모빌라이즈드 디덕탄트(Pierce's Reduce-Imm™ Immobilized Reductant) 비드를 사용하여 N56C 시스테인을 선택적으로 환원시켰다. 제조사로부터 제공받고 배취 모드로 사용되는 칼럼으로부터 환원제 비드를 추출하였다.

30분 동안 리듀스-IMM 이퀄리브레이션 완충액(Reduce-IMM Equilibration Buffer) #1 (인산나트륨 EDTA, pH 8.0) 중 8 ml 10 mM DTT로 약 4 ml의 비드를 먼저 활성화시켰다. 이어서 비드를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. PBS pH 7.4 중 1.7 mg/ml로 18 ml의 1A1 N56C Fab를 비드에 가하고, 10 mM EDTA를 혼합물에 가하였다. 혼합물을 회전시키고, 4-5시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 한디(Handee)TM 수지 분리기를 사용하여 Fab를 비드로부터 분리하고, 비드를 PBS로 세척하였다. Fab 및 세척수를 배합시키고, 1시간 동안 5배 물 과량의 PEG-말레이미드 (20 k PEG (NOF로부터 입수); 10 k PEG (선비오(Sunbio)로부터 입수); 5 k PEG (넥타르(Nektar)로부터 입수)와 반응시켰다. 반응 혼합물을 4 L의 10 mM 아세트산 나트륨 완충액 pH 5.0에 대해 투석시켜 Fab 및 Fab-PEG가 10 mM 아세트산 나트륨 완충액 pH 5.0으로 평형화된 SP 세파로스 칼럼 상에 포획되도록 하였다. 반응하지 않은 Fab 및 Fab-PEG는 염 구배로 용리시켰다. 50 mM 내지 70 mM NaCl 사이에서 용리시켰다. 단백질을 추가로 이동상으로서 PBS를 사용하여 크기 배지 크로마토그래피(슈퍼텍스75 칼럼, GE 헬스케어)에 의해 정제하였다. 환원 반응은 크기를 확대 및 축소시킬 수 있었다. 유사한 방법을 사용하여 폐길화된 뮤린 266 Fab N56C를 제조할 수 있었다.

[0103] 크기 배제 크로마토그래피로 샘플을 분석하여 PEG가 Fab에 첨가된 것을 확인하였다. TSK G3000PW XL (토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience)) 칼럼을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피를 실시하였다. 214 nm에서 작동하는 애질런트(Agilent) HP1100 시리즈 분석 HPLC를 사용하여 pH 7.4에서 PBS + 0.35 M NaCl를 사용하여 0.5 ml/분으로 칼럼을 러닝시켰다. 추가로, SDS-PAGE로 샘플을 분석하였다. 10 μ g의 정제된 물질을 4-12% 누페이 지(NuPage)[®] 비스-트리스 겔(Bis-Tris Gel) 상에 로딩하고, 심플리블루(SimplyBlue)TM 세이프스테인(SafeStain)로 염색하였다.

[0104] 실시예 5

[0105] 비아코어(Biacore)를 사용한 동력학적 상수 측정

[0106] 비아코어[®] 2000 기기 또한 사용하여 결합 역학을 측정하였다. 비아코어[®]는 표면 플라즈몬 공명의 광학 성질을 사용하여 텍스트란 바이오센서 매트릭스내 상호작용 분자 중 단백질 농도에 있어서의 변경을 검출한다. 명시한 것을 제외하면, 모든 시약과 물질은 비아코어[®] AB (스웨덴 옉살라 소재)로부터 구입하였다. 모든 측정은 25°C에서 실시하였다. 샘플을 HBS-EP 완충액 (150 mM 염화나트륨, 3 mM EDTA, 0.005% (w/v) 계면활성제 P-20, 및 10 mM HEPES, pH 7.4)에 용해시켰다. 아민 커플링 키트를 사용하여 8000 반응 단위(RU) 수준으로 CM5 센서 칩의 흐름 전지 1 내지 4 상에 염소 항 인간 카파 항체를 고정화시켰다.

[0107] 다중 분석 사이클을 사용하여 결합을 평가하였다. 각 사이클은 50 μ l/분의 유속으로 실시하였고, 이는 하기 단계로 구성되었다: 400-500 Rus 포획을 목표로 하여 약 20 μ l의 항체 결합 조성물을 10 μ g/mL로 주사, 250 μ l의 인간 A베타 (1-40) 주사 (200 nM에서 출발, 및 각 사이클마다 2배의 일련의 희석액 사용), 이어서, 20분 동안 해리, 및 약 30 μ l의 10 mM 글리신 하이드로클로라이드, pH 1.5를 사용한 재생. 비아이벨류에이션(BIAevaluation) 소프트웨어로 "1:1 (랭뮤어(Langmuir)) 결합" 모델을 사용하여 각 사이클에 대한 결합 및 해리 속도를 평가하였다. N56C 위치에서의 PEG화는 인간 A베타에 대한 결합에 있어서의 Fab 친화도에 영향을 거의 주지 않는다는 결과가 나왔다.

[0108] 실시예 6

[0109] KinExA를 사용한 평형 상수 측정

[0110] 항원 Fab 복합체의 해리 속도가 느리기 때문에 직교 접근법으로서 KinExA 분석을 사용하여 평형 결합 분석을 통한 결합 친화도를 측정하였다. KinExA 3000 기기 (사피다인 인스티튜트 인코포레이티드(Sapidyne Inst. Inc.))를 사용하여 결합 역학을 측정하였다. 간략하면, 항원을 세파로스 비드에 공유적으로 커플링시키고, 비드에 대한 유리 Fab/Fab-PEG의 결합을 상기 기기 상에서 검출하였다. Kd를 측정하기 위하여 Fab/Fab-PEG (1A1-Fab-20 k PEG의 경우, 20 pM 또는 500 pM, 1A1 Fab의 경우, 5 pM 또는 50 pM)를 함유하며, 일련의 희석된 항원 인간 가용성 A베타 (1-40) (0-10 nM)를 점점 감소하는 양으로 함유하고 있는 각각의 튜브를 30-50시간 동안 37°C에서 1 mg/ml BSA를 함유하는 PBS에서 인큐베이션시켜 확실하게 평형에 도달하도록 하였다. 인큐베이션시킨 후, 평형화된 각 샘플 중의 유리 Fab/Fab-PEG를 제조사의 설명서에 따라 KinExA 3000 상에서 측정하였다. K_d 값은 KinExA 3000 소프트웨어를 사용하여 n-커브 분석(n-Curve Analysis)에 의해 측정하였다. 그 결과, 1A1 Fab이 인간 A베타 (19 pM)에 단단히 결합하며, 친화도는 뮤린 266 Fab (240 pM)와 비교하였을 때 약 10배 더 높았다는 것이 입증되었다. 추가로, N56C 위치에서의 20 K PEG의 공유 결합은 1A1-Fab의 친화도 (12 pM)에는 어떤 영향을 주지 않았다.

- [0111] **실시예 7**
- [0112] **세포 기반 ELISA를 사용한 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 결합 분석**

[0113] A베타 전구체 APP와의 266 Fab/mAb의 교차 반응성을 평가하기 위하여 APP (aa 1-751)를 안정적으로 발현하는 HEK 293 세포를 사용하였다. 이들 세포는 네오마이신 내성 마커를 함유하는 플라스미드내로 APP (1-751) 유전자를 클로닝하여 생성하였다. 재조합 플라스미드를 HEK 293 세포로 형질감염시키고, 세포를 200 μ g/ml G418 중에서 선별하여 과다발현하는 안정적인 세포주를 생성하였다. 결합 분석을 위해 75,000 APP 751 세포를 PDL 코팅된 96-웰 플레이트의 각 웰에 플레이팅시켰다. 성장 배지 (DMEM F12, 5% FBS, 10 mM Hepes pH7.5, 200 μ g/ml G418)에서 2일 동안 인큐베이션시킨 후, 액체를 제거하고, 20 μ g/ml의 Fab 또는 mAb를, 10 mg/ml BSA를 함유하는 PBS (Ca/Mg 포함)에 첨가하였다. 4℃에서 2시간 동안 결합을 진행시키고, 세포를 10 mg/ml BSA를 사용하여 3회에 걸쳐 세척하였다. 인간 또는 마우스 경쇄에 특이적인 2차 항체 (양고추냉이 퍼옥시다제(hrp) 접합 항 카파 경쇄)를 PBS/BSA (써던 바이오테크(Southern Biotech))에 가하였다. 항 인간 경쇄에 대하여 PBS/BSA 중 1:5000의 희석액을 사용하고, 항 마우스 경쇄에 대하여 1:2000의 희석액을 사용하였다. 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 세포를 BSA/PBS로 5회에 걸쳐 세척하였다. APP에 대한 Fab/mAb 결합의 함수로서 hrp 활성은 10분 동안 기질 TMB를 첨가하여 측정하였다. 반응물을 깨끗한 96-웰 플레이트로 옮기고, 650 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 상기 데이터는 폐길화된 (5 kD, 10 kD, 및 20 kD) 1A1-Fab 및 m266-Fab가 APP보다는 A베타 펩티드에 대한 선택성을 부여한다는 것을 시사한다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Eli Lilly and Company
- Bales, Kelly R
- Bumol, Thomas F
- Chow, Chi-Kin
- Demattos, Ronald B
- Hansen, Ryan
- Kuchibholta, Uma
- Lu, Jirong
- McDonnell, Peter
- <120> PEGYLATED A Beta FAB
- <130> X17087
- <150> US 60/885439
- <151> 2007-01-18
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220><223> synthetic construct

<400> 1

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

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

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

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 2

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

1 5 10 15

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

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

85 90 95

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 6

Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 7

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 8

Thr Gln Ser Thr His Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser

1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 10

Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 11

Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 12

Gly Asp Phe

1

<210> 13

<211> 657

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 13

gacatcgta tgactcagac tccattgtcc ttgtctgtta ctccaggtca accagcttct 60

atttcctgtt cctcctccca atctttgatc tactccgacg gtaacgtta ctgacttg 120

tacttgcaaa agcctggta atccccacaa ttgttgatct acaaggttcc caacagattc 180

tctgggtgtc ctgacagatt ttctgggtcc gggtccggtta ctgacttcac ttgaagatc 240

tccagagttg aagctgagga tgttggtgtt tactactgta ctgactccac tcattcccca 300

tggacttttg gtggtgttac taagggtgag atcaagagaa ctgttgctgc tccatccgtt 360

ttcattttcc caccatccga cgaacaattg aagtctggta ctgcttccgt tgtttgtttg 420

ttgaacaact tctaccaag agaggctaag gttcagtga aggttgacaa cgctttgcaa 480

tccggttaact cccaagaatc cgttactgag caagactcta aggactccac ttactccttg 540

tcctccactt tgactttgtc caaggctgat tacgagaagc acaaggttta cgcttgtag 600

gttacacatc agggtttgct cccccagtt actaagtcct tcaacagagg agagtcc 657

<210> 14

<211> 657

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 14

gaggttcagt tgggtgaatc tgggtgtgga ttggttaagc ctggtggttc ttgagattg 60

tcctgtgctg ctcccggtta cactttctcc agatactcca tgtctgggt tagacaagct 120

ccaggaagg gattggagtg ggttggtcaa atcaacatca gaggttgtaa cacttactac 180

ccagacactg ttaagggaag attcactatc tccagagatg actccaagaa cactttgtac 240

ttgcagatga actccttgaa aactgaggac actgctgttt actactgtac tactggtgac 300

ttttggggac agggaaacttt gggtactgtt tctccgctt ctactaagg accatccgtt 360

tttcattgg ctccatctc taagtctact tccggtggtta ctgctgttt gggtatgttg 420

gttaaggact acttccaga gccagtact gtttcttga actccggtgc ttgacttct 480

gggtttcaca ctttccagc tgttttgcaa tcttccggtt tgtactcctt gtcctccgtt 540

gttactgttc catcctctc ctgggtact cagacttaca tctgtaacgt taaccacaag 600

ccatccaaca ctaagggtga caagaagggt gaaccaaagt cctctgacaa gactcac 657