



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월04일

(11) 등록번호 10-1831459

(24) 등록일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7025471
(22) 출원일자(국제) 2011년03월03일
심사청구일자 2016년03월03일
(85) 번역문제출일자 2012년09월27일
(65) 공개번호 10-2013-0045850
(43) 공개일자 2013년05월06일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2011/000238
(87) 국제공개번호 WO 2011/106885
국제공개일자 2011년09월09일
(30) 우선권주장
61/310,167 2010년03월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W01997037228 A1*
W02010011947 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 유니버시티 오브 브리티시 콜롬비아
캐나다 브이6티 1제트3 브리티시 콜롬비아 밴쿠버
어그라너미 로드 #103-6190
(72) 발명자
캐시맨 네일 알.
캐나다 브리티시 콜롬비아 브이6에스 1엠8 밴쿠버
웨스트 킹 에드워드 애비뉴 3793
(74) 대리인
김진희

전체 청구항 수 : 총 21 항

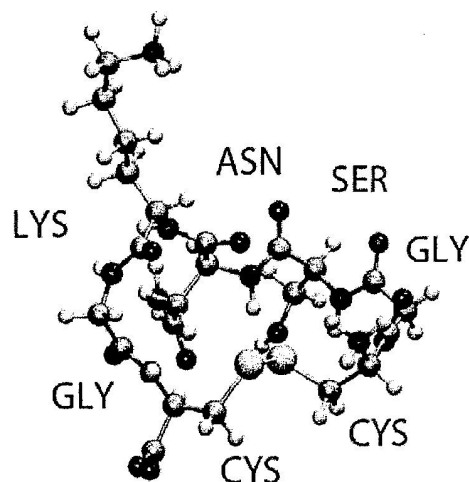
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **올리고머 특이적 아밀로이드 베타 에피토프 및 항체**

(57) 요약

A β 로부터 유래된, 신규한 구속된 펩티드 에피토프로서, 여기서, 에피토프는 아미노산 서열 SNK를 포함하는 것인 펩티드 에피토프, 관련된 항체 조성물 및 사용 방법. 입체형태적 에피토프를 포함하는 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 여기서, 에피토프는 아미노산 서열 SNK를 포함하고, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 것인 단리된 항체를 기술한다. 구속된 환형 구조를 가지는 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드로서, 여기서, 에피토프는 아미노산 서열 SNK를 포함하고, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 것인, 항원성 펩티드 또한 기술한다. 알츠하이머병을 치료, 예방 및 진단하는 방법 또한 기술한다.

대표도 - 도4



명세서

청구범위

청구항 1

환형 펩티드 상에 존재하는 입체형태적(conformational) 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 에피토프가 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며, K(리신)가 용매에 노출되고, 항체가 아밀로이드 베타(A β)에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 단리된 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 항체가 비올리고머 형태의 A β 보다 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 특이적으로 결합하는 것인 단리된 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체가 단일클론인 단리된 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 항체가 인간화된 것인 단리된 항체.

청구항 6

구속된(constrained) 환형 구조를 가진 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드로서, 에피토프가 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며, K(리신)가 용매에 노출되는 것인 항원성 펩티드.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서, 에피토프가 올리고머 A β (1-40) 또는 올리고머 A β (1-42)의 잔기 25 내지 29에 상응하는 올리고머 A β 의 용매에 노출되는, 항체 접근성 너클(knuckle) 영역에 상응하는 것인 항원성 펩티드.

청구항 9

검출가능한 표지와 접합된 제1항의 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 10

치료학적 유효량의 제1항의 단리된 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 알츠하이머병을 치료 또는 예방하기 위한 조성물.

청구항 11

제6항의 항원성 펩티드 및 약학적으로 허용가능한 보조제를 포함하는 항올리고머 백신 조성물.

청구항 12

약학적 유효량의 제1항의 단리된 항체를 포함하는, 알츠하이머병을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물.

청구항 13

제11항의 상기 백신을 포함하는, 알츠하이머병을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물.

청구항 14

알츠하이머병을 진단하기 위하여 필요한 정보를 제공하기 위하여, 알츠하이머병을 갖는 것으로 의심되는 환자에서 알츠하이머병을 분석하는 방법으로서,

- a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료를, 상기 시료 중에서 항원/항체 복합체가 형성될 수 있도록 하는 충분한 시간 동안 및 그러한 조건하에서 제1항의 분리된 항체와 접촉시키는 단계; 및
- b) 시료 중 항원/항체 복합체의 존재를 검출하는 단계로서, 복합체의 존재가 환자에게서 알츠하이머병의 진단을 나타내는 것인 단계

를 포함하는 분석하는 방법.

청구항 15

제1항의 분리된 항체; 및

신호 발생 화합물에 부착된 항원을 포함하는 집합체

를 포함하는, 알츠하이머병을 진단하기 위한 키트.

청구항 16

제15항에 있어서, 하나 이상의 검출 시약을 포함하는 키트.

청구항 17

제1항의 분리된 항체;

신호 발생 화합물에 부착된 항원을 포함하는 집합체; 및

알츠하이머병을 진단하는 데 사용하기 위한 설명서

를 포함하는 상업적 패키지.

청구항 18

제1항의 분리된 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 19

제1항에 있어서, 에피토프가 올리고머 Aβ의 용매에 노출되는, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 것인 항체.

청구항 20

제9항에 있어서, 검출가능한 표지가 방사선 비투과 화합물, 방사성 동위원소, 형광단, 발색단, 효소, 금속 이온, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 면역집합체.

청구항 21

제1항에 있어서, 반감기 연장용 비히클에 연결되는 항체.

청구항 22

제21항에 있어서, 반감기 연장용 비히클이 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 텍스트란, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 항체.

청구항 23

약학적 유효량의 제9항의 면역집합체를 포함하는, 알츠하이머병을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2010년 3월 3일에 출원된 미국 가특허 출원 제61/310,167호를 우선권 주장하며, 이 가특허 출원은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 A베타 올리고머 중의 신규한 입체형태적 에피토프, 관련 항체 조성물 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 알츠하이머병(AD: Alzheimer's disease)은 주로 A베타(1-40), A β (1-42) 및 A β (1-43) 펩티드(이는 또한 아밀로이드 β 또는 A β 로도 지칭된다)(이들은 모두 아밀로이드 전구체 단백질(APP: amyloid precursor protein)의 단백질분해 생성물이다)로 구성된 세포외 플라크의 뇌 축적과 관련된 일반 치매성(기억 및 인지 장애성) 신경변성 질환이다. 추가로, 주로 비정상적으로 인산화된 타우 단백질(신경세포 미세소관 결합 단백질)로 구성된 신경섬유매듭은 사멸 뉴런의 세포내에 축적된다. A β (1-42)는 AD 환자의 아밀로이드 플라크에서 우점종이다.

[0006] 가족성 형태의 AD는 APP 유전자에서의, 또는 프리세닐린 1 또는 2 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발될 수 있는데, 상기 유전자의 단백질 생성물이 APP에서 A β 로의 프로세싱에 연루되어 있다. 아포지단백질 E 대립유전자 변이체는 또한 산발성 형태의 AD 및 가족성 형태의 AD, 둘 모두의 발병시의 연령에 영향을 미친다. 보다 최근에는, 펩티드가 올리고머화된 특성의 A β 분자 종이 AD 및 상기 질환을 앓는 마우스 모델에서 관찰되는 신경독성의 주된 성분을 매개한다는 것이 밝혀졌다(문헌 [Walsh et al. 2002]). A β 올리고머 독성은 신경 세포 인슐린 수용체의 기능이상에 의해(문헌 [Zhao et al. 2008]), 및 정상적인 시냅스 기능 방해에 의해, 특히, 해마에서는 글루타메이트성 수용체의 이소성 활성화에 의해(문헌 ([De Felice et al. 2007]; [Nimmrich et al. 2008])) 나타날 수 있다. A β 올리고머와 프리온 단백질 PrPC의 정상적인 세포성 이소폼 사이에는 나노몰 크기의 친화성 결합 상호작용이 있는 것으로 보고되었다(문헌 [Lauren et al. 2009]). 추가로, 글루타메이트 수용체 서브유닛(문헌 [Khosravani et al. 2008])을 비롯한, 각종의 독성 신호 전달 경로(문헌 ([Solforosi et al. 2004]; [Lefebvre-Roque et al. 2007]))와 PrPC 사이의 상호작용이 A β 올리고머의 독성을 위한 통합형 기전을 유도할 수 있다.

[0007] A β 의 면역 인식이 인간 돌연변이체 아밀로이드 전구체 단백질을 발현하는 트랜스제닉 마우스의 병적 상태와 행동, 둘 모두를 개선시킬 수 있다는 것이 잘 인지되어 있다. 그러나, "비선택적" A β 면역요법을 이용하여 인간을 치료하는 데에는 위험이 내재되어 있다. 예를 들어, 비선택적 A β 면역원을 함유하는 알츠하이머 백신을 받은 환자 중 대략 10%에서는 자가면역 수막뇌염이 발생하였다(문헌 ([Gelinas et al. 2004]; [Robinson et al. 2004]; [Broytman and Malter 2004]; [Mathews and Nixon 2003])). 비록 수막뇌염이 A β 에 대한 세포성 면역 활성화로 인해 발생하였을 가능성이 있기는 하지만, 세포성 면역 반응과는 단절된, 수동적으로 주입된 A β 단일 클론 항체(mAb: monoclonal antibody)가 뇌 미세출혈과 연관이 있는 것으로도 밝혀졌다(문헌 [Goni and Sigurdsson 2005]). A β 를 이용한 비선택적 면역화의 또 다른 위험은 뇌 뉴런 및 순환 단백질 표면에 노출되는 모체 단백질 APP의 면역 인식이다(문헌 ([Jung et al. 1996]; [Jung et al. 1990])). 그러한 세포 표면 막 분자 인식은, 영양 활성을 포함할 수도 있는 APP 단백질의 세포외 도메인의 용해를 일으킬 수 있거나, 또는 그의 기능 방해를 일으킬 수 있다(문헌 ([Morimoto et al. 1998]; [Mileusnic et al. 2005]; [Mileusnic et al. 2,000])).

[0008] A β 펩티드의 "비특이적" 인식이 가진 또 다른 문제점은 A β 펩티드가 독성 A β 분자 종인 A β 올리고머에 대한 유일한 전구체라는 점이다. A β 올리고머는 배양물 중 세포주 및 뉴런을 사멸시키고(문헌 ([Lambert et al. 2007]; [Lacor et al. 2007]; [Roncke et al. 2008])), 절편 배양물 및 살아있는 동물에서는 장기 강화 작용(LTP: long term potentiation)이라고 지칭되는, 기억에 도움이 되는 중요한 시냅스 활성을 차단하는 것으로 밝혀졌다(문헌 ([Balducci et al. 2010; Shankar et al. 2008]; [Selkoe 2008]; [Klyubin et al. 2005]; [Walsh et al. 2002]; [Wang et al. 2002])). 마우스에서 기억 결함의 발병과 상관 관계가 있으며, 정제되고, 정상적인 어린 래트에 주입되었을 때에는 마우스에서 관찰되는 부정적인 행동상의 결함을 재현시키는 특이적인 A β 올리고머가 확인되었다(문헌 [Lesne et al. 2006]). PrPC가 A β 올리고머에 대한 수용체로서의 역할을 할 수 있고, 시냅스 LTP 파괴시 그의 독성 효과를 변환시킬 수 있다는 것이 유사 연구를 통해 입증되었다(문헌 [Lauren et al. 2009])).

[0009] 과거에 A β 펩티드에 대한 A β 백신 및 단일클론 항체가 제기된 바 있지만, 현재까지는 그 어느 것도 동물 및/또는 인간에서 심각한 부작용도 유발하지 않으면서 원하는 치료학적 효과를 발휘할 수 있는 것으로 입증된 것은 없다. 인체에 부정적이며, 잠재적으로 치명적인 효과를 유도하지 않으면서 질환 진행을 정지시키거나, 저속화시키는 생물 물질의 개발이 치료학적으로 요구되고 있다. 이러한 요구는 특히 일반 대중의 수명 증가, 및 수명이 증가함에 따라 그와 관련하여 해마다 알츠하이머병으로 진단받는 환자수가 상승한다는 관점에서 볼 때 분명히 드러난다. 질환 특이 에피토프(DSE: disease specific epitope)인 면역학적 에피토프를 확인하고, 독성 A β 올리고머 분자 종을 특이적으로 표적화하는 면역요법을 개발하는 것이 바람직할 수 있다. 독성 A β 올리고머 분자 종을 표적화하고, 세포 표면에서 APP의 자가면역 인식을 회피하는 면역요법을 개발하는 것 또한 바람직할 수 있다. 그러한 DSE 에피토프는 표적 단백질의 독성을 특이적으로 중화시키는 면역요법 및 예방학적 백신의 표적이 될 것이다. AD가 발병될 위험이 있는 군집임을 나타낼 수 있고, 다른 치매성 증상으로부터 AD를 구별하는 감별 진단을 위한 것이며, AD 요법에 대한 바이오마커 반응을 모니터링하기 위한 진단 도구를 개발하는 것 또한 바람직할 수 있다.

[0010] 그러므로, 독성 A β 올리고머 분자 종에 독특한 질환 특이 에피토프를 제공하는 것이 바람직할 수 있다.

발명의 내용

[0011] 요약

[0012] 알츠하이머병 진단, 치료 및 예방을 위한 종래의 에피토프, 항체, 조성물 및 방법이 가진 단점들 중 1 이상을 제거하거나 완화시키는 것이 본 개시내용의 목적이다.

[0013] 제1 측면에서, 본 개시내용은 부분적으로는 선택적인 항체 결합에 대한 이로온 특성을 가진 A β 종의 신규한 구조적 에피토프에 대한 놀라운 발견을 토대로 한다.

[0014] 한 실시양태에서, A β 로부터 유래되고, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 "너클(knuckle) 영역"에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 환형(cyclic) 펩티드를 제공한다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 구속된 환형 구조를 가진 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드로서, 여기서, 에피토프는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가지는 것인, 항원성 펩티드를 제공한다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 구속된 환형 구조를 가진 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드로서, 여기서, 에피토프는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 서열 번호: 1에 상응하는 아미노산 서열을 가지는 것인, 항원성 펩티드를 제공한다.

[0017] 한 측면에서, 항원성 펩티드의 에피토프는 올리고머 A β (1-40) 또는 올리고머 A β (1-42)의 잔기 25 내지 29에 상응한다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적(conformational) 에피토프를 포함하는 것인, 단리된 항체를 제공한다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 서열 번호: 1에 상응하는 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하는 것인, 단리된 항체를 제공한다.

[0020] 한 측면에서, 단리된 항체는 비올리고머 형태의 A β 보다는 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 특이적으로 결합한다.

[0021] 또 다른 측면에서, 단리된 항체는 단일클론 항체이다.

[0022] 또 다른 측면에서, 단리된 항체는 인간화된 항체이다.

[0023] 또 다른 실시양태에서, 검출가능한 표지와 접합된, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 포함하는 면역접합체(immunoconjugate)로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하는 것인, 면역접합체를 제공한다.

- [0024] 또 다른 측면에서, 단리된 항체를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0025] 또 다른 실시양태에서, 치료학적 유효량의 A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하는 것인 단리된 항체; 및 약학적으로 허용가능한 보조제(adjuvant)를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0026] 또 다른 실시양태에서, 구축된 환형 구조를 가지는 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드로서, 여기서, 에피토프는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가지는 것인 항원성 펩티드; 및 약학적으로 허용가능한 보조제를 포함하는 항올리고머 백신 조성물을 제공한다.
- [0027] 또 다른 측면에서, 약학적 유효량의 단리된 항체 또는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 치료를 필요로 하는 환자에서 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 상기 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 치료를 필요로 하는 환자에서 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0029] 또 다른 측면에서, a) 알츠하이머병을 앓는 것으로 의심되는 환자로부터 생물학적 시료를 단리하는 단계; b) 시료 중에서 항원/항체 복합체가 형성될 수 있도록 하는 충분한 시간 동안 및 그러한 조건하에서 생물학적 시료를 단리된 항체와 접촉시키는 단계; 및 c) 시료 중 항원/항체 복합체의 존재 여부를 검출하고, 여기서 복합체의 존재는 환자에게서 알츠하이머병의 진단을 나타내는 것인 단계를 포함하는, 알츠하이머병을 앓는 것으로 의심되는 환자에서 알츠하이머병을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0030] 또 다른 실시양태에서, 단리된 항체, 및 신호 발생 화합물에 부착된 항원을 포함하는 접합체를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0031] 추가 측면에서, 키트는 하나 이상의 검출 시약을 포함한다.
- [0032] 또 다른 실시양태에서, 단리된 항체; 신호 발생 화합물에 부착된 항원을 포함하는 접합체; 및 알츠하이머병을 진단하는 데 사용하기 위한 설명서를 포함하는 제조 물품을 제공한다.
- [0033] 또 다른 측면에서, 알츠하이머병의 치료 또는 예방을 위한 항체 또는 면역접합체의 용도를 제공한다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 알츠하이머병의 치료 또는 예방을 위한 백신의 용도를 제공한다.
- [0035] 또 다른 실시양태에서, A β 로부터 유래되고, 올리고머 A β 의 용매에 노출된 너클 영역에 상응하는 SNK의 아미노산 서열을 가진 환형 펩티드에 결합할 수 있는 단리된 항체를 제공한다. 한 측면에서, 상기 항체는 비올리고머 형태의 A β 보다 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 결합한다.
- [0036] 또 다른 실시양태에서, 피험체에게 치료학적 유효량의, A β 로부터 유래되고, 서열 SNK를 포함하는 아미노산 조성물을 가진 환형 펩티드에 결합할 수 있는 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병을 앓거나, 앓는 것으로 의심되는 피험체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 항체는 비올리고머 형태의 A β 보다 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 결합한다.
- [0037] 또 다른 실시양태에서, 피험체에게 치료학적 유효량의, 올리고머 A β 의 너클 영역에 상응하는 SNK의 아미노산 서열을 가진 구축된 환형 구조를 가진 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드를 투여하는 단계를 포함하는, 피험체에서 AD의 발병 또는 진행을 예방하는 방법을 제공한다. 투여시, 항원성 펩티드는 올리고머 A β 에 대한 면역 반응을 일으킨다. 생성된 항체는 올리고머 A β 에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 비올리고머 형태의 A β 보다 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 결합한다.
- [0038] 본 개시내용의 다른 측면과 특징들은 첨부된 도면과 함께 하기의 구체적인 실시양태에 관한 설명을 검토함으로써 당업계의 숙련자에게 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 이에 본 개시내용의 실시양태는 첨부된 도면을 참고로 하여 단지 일례로서만 기술될 것이다.

도 1은 단량체 A β 의 동적 특성을 보여주는 동적 광 산란법의 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 2는 올리고머 A β 의 동적 특성을 보여주는 동적 광 산란법의 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 3은 올리고머 Aβ의 동적 특성을 보여주는 동적 광 산란법의 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 4는 SNK 에피토프를 포함하는 디설파이드 폐환화된(disulfide-cyclized) 펩티드의 3차원 모델이고;

도 5는 SNK를 포함하는 입체형태적 펩티드에 결합하는 항SNK 단일클론 항체의 스크리닝을 위한 대표적인 분석 사이클 비아코어(Biacore)TM 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 6은 SNK 에피토프를 포함하는 BSA에 접합된 선형 또는 환형 펩티드의 선형(3F5, 3G2), 환형(5E3, 5D8) 및 중간 특이(4D11, 4D12) 단일클론 항체에의 결합, 및 이들 항체의 합성 Aβ 1-42 올리고머에 대한 반응성을 보여주는 비아코어TM 센서그램 오버레이 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 7은 SNK 에피토프를 포함하는 BSA에 접합된 선형 또는 환형 펩티드의 선형(3F5, 3G2), 환형(5E3, 5D8) 및 중간 특이(4D11, 4D12) 단일클론 항체에의 결합, 및 이들 항체의 합성 Aβ 1-42 올리고머에 대한 반응성을 보여주는 비아코어TM 센서그램 오버레이 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 8은 다양한 농도에서 환형 단일클론 항체 5E3의 합성 Aβ 1-42 올리고머에의 결합을 보여주는 비아코어TM 분석 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 9는 표지된 6E10 항체 및 음성 대조군이 세포 표면에 위치하는 APP에 결합한 것인 세포를 비교한 결과를 보여주는 유세포 측정 트레이스이고;

도 10은 표지된 5E3 항체 및 음성 대조군이 세포 표면에 위치하는 APP에 결합한 것인 세포를 비교한 결과를 보여주는 유세포 측정 트레이스이고;

도 11은 5E3 항체의 부재하에, 및 상이한 농도의 5E3 항체의 존재하에 모의 대조군, 가용성 단량체 및 올리고머 Aβ 1-40과 함께 인큐베이션된 세포에 대한 세포 생존 정도를 보여주는 신경 세포 독성 분석 결과를 그래프를 통해 도시한 것이고;

도 12는 TBS 중에서 균질화되고, 트리스-트리신(Tris-Tricine) 겔 중에서 분획화되고, pan-Aβ 6E10 항체를 사용하여 면역블롯팅된 뇌 조직을 보여주는 면역블롯의 결과를 도시한 것이고;

도 13은 TBS 중에서 균질화되고, 트리스-트리신 겔 중에서 분획화되고, 5E3 항체를 사용하여 면역블롯팅된 뇌 조직을 보여주는 면역블롯의 결과를 도시한 것이고;

도 14는 항체 5E3의 존재("5E3")하에 또는 부재("C")하에 Aβ 중합화를 테스트하는 정적 광 산란 실험 결과를 도시한 것이고;

도 15는 항체 5E3의 중쇄 및 경쇄(둘 모두 5' 및 3' 리드)에 대한 뉴클레오타이드 서열을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 일반적으로, 본 개시내용은 Aβ로부터 유래된 신규의 구속된 펩티드 에피토프(본원에서는 "신규한 에피토프" 또는 "신규한 입체형태적 에피토프"로서 언급된다), 및 관련 항체 조성물을 제공한다. 신규한 입체형태적 에피토프에 결합할 수 있는 항체는 알츠하이머병 치료에서 진단제 및 치료제, 둘 모두로서 유용하다. Aβ로부터 유래된 신규의 구속된 펩티드 에피토프는 AD 및 관련된 치매 예방을 위한 백신에서 유용하다. 신규한 입체형태적 에피토프에 결합할 수 있는 항체는 또한 알츠하이머 관련 치매의 진단, 치료, 및 예방에서 유용하다.

[0041] 본원에서 직접적으로 정의되지 않은 임의의 용어는 본 발명의 분야에서 이해되고 있는 것과 같이, 통상적으로 그와 관련된 의미를 가지는 것으로 이해되어야 한다.

[0042] 본원에서 사용되는 바, "단리된 항체"라는 용어는 신규한 입체형태적 에피토프에 결합할 수 있는 항체로서, 본질적으로 순수하고, 항원 특이성이 상이한 다른 항체 및 항체 단편을 비롯한 외래 세포성 물질이 없는 항체를 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 그러나, 신규한 입체형태적 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원과 교차 반응성을 가질 수 있다. 임의의 주어진 항체가 특이적인 결합을 최대화할 수 있도록 실험 조건을 최적화시켜야 할 필요가 있을 수 있음을 당업자는 쉽게 이해할 것이다. 항체라는 용어는 본 발명에 따른 신규한 입체형태적 에피토프와 특이적으로 반응도 또한 하는 그의 단편을 포함하는 것으로 한다. 항체는 종래 기법을 사용함으로써 단편화될 수 있고, 그 단편은 상기 기술된 것과 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 단편은 항체를 펩신으로 처리함으로써 생성될 수 있다. 생성된 단편은 디설파이드 브릿지를 환원시키기 위해 추가로 처리될 수 있다.

- [0043] 본원에서 사용되는 바, "피험체"라는 용어는 동물, 예를 들어, 조류 또는 포류동물을 의미한다. 구체적 동물로는 래트, 마우스, 개, 고양이, 소, 양, 말, 돼지, 또는 영장류를 포함한다. 피험체는 추가로 인간일 수 있고, 별법으로 환자로서 지칭될 수도 있다. 피험체는 추가로 트랜스제닉 동물일 수 있다. 피험체는 추가로 설치류, 예를 들어, 마우스, 또는 래트일 수 있다.
- [0044] 본원에서 사용되는 바, "에피토프"라는 용어는 특이 항체에 의해 인식될 수 있거나, 특이 항체의 형성을 유도할 수 있는 분자내 영역을 의미한다.
- [0045] 본원에서 사용되는 바, "입체형태적 에피토프"라는 용어는 아미노산 서열이 특정의 3차원 구조를 가지는 에피토프를 의미한다. 입체형태 특이 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 상기 입체형태 특이 에피토프의 아미노산의 공간 배열을 인식한다.
- [0046] 본원에서 사용되는 바, 'A β '라는 용어는 별법으로는 '아밀로이드 베타', '아밀로이드 β ', 또는 'A β '로도 지칭될 수 있다. 아밀로이드 베타는 알츠하이머병 환자의 뇌에서는 아밀로이드 플라크의 주된 성분으로 보여지는 39-43개의 아미노산으로 구성된 펩티드이다. 본 출원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, A β 올리고머화가 알츠하이머병의 신경독소의 핵심 부분인 것으로 밝혀졌다.
- [0047] 본원에서 사용되는 바, 본원에서 "더 높은 친화도"라는 용어는 항체 X가 표적 Z보다는 더욱 강력하게, 및 더 작은 해리 상수로 표적 Y에 결합하고, 이와 관련하여 항체 X가 Z에 대해서보다는 표적 Y에 대해 더 높은 친화도를 가진다고 하는 항체 결합도를 의미하는 것이다. 유사하게, 본원에서 "더 낮은 친화도"라는 용어는 항체 X가 표적 Z보다는 덜 강력하게, 및 더 큰 해리 상수로 표적 Y에 결합하고, 이와 관련하여 항체 X가 Z에 대해서보다는 표적 Y에 대해 더 낮은 친화도를 가진다고 하는 항체 결합도를 의미하는 것이다.
- [0048] 본원에서 사용되는 바, 본원에서 "A β 단량체"라는 용어는 단리된 선형 형태의 A β (X-Y) 펩티드, 바람직하게, 본질적으로 비공유적인 다른 A β 펩티드와의 상호작용에 관여하지 않는 형태의 A β (X-Y) 펩티드를 의미하는 것이다.
- [0049] 본원에서 사용되는 바, 본원에서 "A β 올리고머"라는 용어는 전구체 A β 단량체가 약 50개 미만의 단량체들로 이루어진 정돈된 3차원 구조로 비공유적으로 응집되어 있는 단리된 형태의 A β 펩티드를 의미하는 것이다.
- [0050] 본원에서 사용되는 바, 본원에서 "A β 피브릴"라는 용어는 전자 현미경하에 원섬유성 구조를 보이는, 비공유적으로 회합되어 있는 개별 A β (X-Y) 펩티드들로 이루어진 조립체를 포함하는 분자 구조를 의미하는 것이다. 원섬유성 구조는 전형적으로 "크로스 베타" 구조인데; 다량체 크기에 대한 이론상의 상한은 없고, 피브릴은 수천개의 단량체를 포함할 수 있다.
- [0051] 본원에서 사용되는 바, 본원에서 "항원"이라는 용어는 숙주의 면역계를 자극하여 체액성 및/또는 세포성 항원 특이 반응을 유도하는, 하나 이상의 에피토프를 함유하는 분자, 예를 들어, 단백질, 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 의미하는 것이다. 상기 용어는 "면역원"이라는 용어와 상호교환적으로 사용된다. 항체, 예를 들어, 항이디오타입 항체, 또는 그의 단편, 및 항원 또는 항원 결정기를 모방할 수 있는 것인 합성 펩티드 미모토프 또한 본원에서 사용되는 항원의 정의에 포함된다. 유사하게, 예를 들어, DNA 면역화 적용에 있어 생체내에서 항원 또는 항원 결정기를 발현하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 또한 본원에서의 항원 정의에 포함된다.
- [0052] 본 발명의 펩티드를 기술하는 데 사용되는 명명법은, 아미노기가 각 아미노산 잔기의 좌측에, 및 카르복시기는 우측에 제시되는 관례를 따른다. 본 발명의 선택되는 구체적인 실시양태를 나타내는 서열에서, 비록 구체적으로 제시되지는 않았지만, 아미노 말단기 및 카르복시 말단기는 달리 언급되지 않는 한, 그가 생리학적 pH 값에서 취하게 되는 형태로 존재하는 것으로 이해될 것이다.
- [0053] 본 명세서에서는 실시양태를 완벽하게 이해시키기 위한 설명 목적으로 다수의 상세한 설명이 기술되어 있다. 그러나, 이러한 구체적인 상세한 설명이 필요하지 않다는 것이 당업자에게는 자명할 것이다.
- [0054] 용액 및 고체 상태의 패러다임에서는 결정학적 방법 및 NMR이 제한되기 때문에 원자 수준의 A β 올리고머 구조는 결론적으로 원자 수준에서는 풀리지 않은 상태이다. 생화학적, 생물물리학적, 및 면역화학적 데이터를 통해 A β 단량체가 광범위한 β 헤어핀 입체 지퍼 구조에 패키징되어 있는 피브릴/올리고머 모델을 제안한다(문헌 (Luhers et al. 2005]; [Sawaya et al. 2007]; [Rauk 2009])). 천연적으로 발생된 단량체 A β 펩티드는 응집시에 폴딩을 통해 헤어핀 입체 지퍼 올리고머 A β 구조 결과물을 형성하게 되는 입체형태적 변화를 겪게 된다. A β (1-42)는 β 시트 응집 성향이 더 크다. 올리고머 A β 의 상세한 구조는 알려져 있지 않지만; 분자 동역학 시뮬레이션, 원자 힘 현미경, 및 아미드 수소 교환 측정의 조합을 사용하여 A β 올리고머의 구조의 특징을 규명하

였다. 상기 언급한 방법들을 사용하여 A β (1-42) 및 A β (1-40) 올리고머의 구조를 분석하였다. A β 올리고머의 β 가닥의 배향은 잔기 D23과 K28 사이에 분자간 염 브릿지를 포함한다고 당업자에게 알려져 있다. 이러한 구조에서 K28 잔기는 실질적으로는 안쪽으로 배향되어 있으며, 이를 통해 D23과 K28 사이에 상기와 같은 염 브릿지를 형성하고, 헤어핀 회전을 안정화시킨다(문헌 ([Lurs et al. 2005] 및 [Rauk 2008])).

[0055] 그에 대한 면역 반응을 특이적으로 유도할 수 있고, 그에 대한 A β 올리고머 특이 항체가 발생될 수 있는 것인 영역을 확인하기 위해 당업계에 공지되어 있는 제안된 A β 올리고머 구조에 대해 조사하였다. A β 올리고머 모델을 조사함으로써 결합에 이용될 수 있는 용매에 노출된, 잠재적으로 항체 접근성 잔기를 가진 3개의 영역이 밝혀졌다: A β 펩티드의 mAb 6E10(잔기 4-9)에 의해 인식되는 A β 올리고머 N 말단(서열 번호: 2로서 확인됨: FRHDSG); mAb 4G8(잔기 17-24)에 의해 인식되는 A β 올리고머 펩티드의 N 말단의 3번째에 있는 혼합형의 극성 소수성 도메인(서열 번호: 3으로서 확인됨: LVFFAEDV); 및 잔기 25-29(GSNKG)로 구성된 A β 올리고머 펩티드의 구속된 회전 도메인. SNK 잔기 26-28을 포함하는 구속된 회전 도메인 에피토프는 입체형태적으로 구속되어 있으며, 선형 A β 또는 APP에는 존재하지 않을 것이라는 것을 발견하게 되었다. 이러한 입체형태적으로 구속된 에피토프에 대한 항체는 선형 A β 또는 APP에는 결합할 것이라고는 기대되지 않으며, 이는 A β 올리고머 특이 항체가 될 것이다.

[0056] 잔기 25-29(CGSNKG: 서열 번호: 8)를 포함하는 디설피드 연결된 환형 펩티드의 분자 동역학 모델링에 대하여 영상을 포착하였다; 디설피드 결합을 위해 비천연 시스테인을 부가하였다. 참조 문헌 ([Lurs et al. (2005)] 및 [Rauk (2008)])에서의, 리신 28 측쇄가 안쪽으로 배향되어 있다는 예측과는 달리, 도 4에 제시되어 있는 바와 같이, 리신 28 측쇄는 바깥쪽으로 배향되어 있다는 것이 상기 모델링을 통해 밝혀졌다. 리신 28 잔기가 바깥쪽으로 배향되어 있다는 놀라운 발견은, 용매에 노출되고, 크기가 크며, ϵ 아미노기를 통해 하전된 리신의 측쇄인 잔기 25-29(CGSNKG)를 포함하는 상기 환형 펩티드의 높은 면역원성과도 일치한다. 하기 실시예에서는 적어도 SNK 잔기를 포함하는 입체형태적 환형 에피토프에 대한 항체가 A β 올리고머의 독성을 효과적으로 중화시킨다고 밝혀졌다(예를 들어, 도 11 참조). 리신 28 잔기가 바깥쪽으로 배향되어 있다는 놀라운 발견은 또한 항체에 접근가능한 방식으로 용매로의 유사한 리신 측쇄 배향을 보이기도 하는 진정한 A β 올리고머와도 일치한다. A β 올리고머의 너클 영역에 위치하는 세린 26, 아스파라긴 27 및 리신 28 잔기, SNK는 모두 전하를 띠거나 또는 극성을 띠며, 작은 비극성 아미노산보다 더 큰 면역원성을 가진다. A β 올리고머의 너클 영역에 위치하는 SNK 잔기의 환형 입체형태가 용매에 노출되고, 항체 결합에 이용가능한 신규한 입체형태적 에피토프를 형성한다. 하기 기술하는 하기 실시예를 통해 결합을 위한 A β 올리고머의 입체형태적으로 구속된 SNK 에피토프의 이용가능성에 관한 발견을 확인할 수 있다. A β 올리고머의 표면에서 이러한 구조적으로 구속된 신규한 에피토프에 대한 발견은 선택적 항체 결합을 위해 이로인 특성을 가진다.

[0057] 신규한 입체형태적 에피토프는 추가로 SNK 에피토프 서열의 양측 말단에 위치하는 천연 글리신을 포함할 수 있다. 신규한 입체형태적 에피토프는 추가로 에피토프 서열의 양측 말단 모두에 천연 글리신을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 천연 글리신 잔기는 신규한 입체형태적 에피토프의 면역원성에 대해 제한적으로 기여하거나, 전혀 기여하지 않지만, 글리신 잔기는 펩티드의 폐환화에서 고유하게 나타나는 일부 입체 장력을 완화시킬 수 있다. 아미노산 구조식에서, 각 잔기는 하기 표 1에 따라, 아미노산의 일반명에 상응하는 1문자 또는 3문자 명명법에 의해 일반적으로 나타낼 수 있다.

표 1

천연적으로 발생된 펩티드에서 공통적으로 발견되는 20가지의 표준 L 아미노산에 대한 명명법 및 약어

아미노산 명칭	3문자 약어	1문자 약어
알라닌	Ala	A
시스테인	Cys	C
아스파르트산	Asp	D
글루탐산	Glu	E
페닐알라닌	Phe	F
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
리신	Lys	K
류신	Leu	L
메티오닌	Met	M
아스파라긴	Asp	N
프롤린	Pro	P
글루타민	Gln	Q
아르기닌	Arg	R
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
발린	Val	V
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	T

[0058]

[0059]

에피토프는 A β 올리고머의 표면에 용매에 노출되고, 구조적으로 구속된, 강력한 극성/전하를 띠는 잔기로 구성되어 있다. 에피토프는 환형의 구속된 구조로 적어도 잔기 26-28, SNK로 구성되어 있다. 또 다른 측면에서, 에피토프는 환형의 구속된 구조로 잔기 25-28, GSNK로 구성되어 있다. 추가 측면에서, 에피토프는 환형의 구속된 구조로 잔기 26-29, SNKG로 구성되어 있다. 또 다른 측면에서, 에피토프는 환형의 구속된 구조로 잔기 25-29, GSNKG(서열 번호: 1)로 구성되어 있다.

[0060]

한 측면에서, 신규한 입체형태 특이 에피토프의 구조는 아미노산 잔기의 상대적으로 강성인 공간 배열에 의존한다.

[0061]

A β 올리고머의 용매에 노출된 표면 상에서, 및 모체 단백질 APP의 발현을 입증하는 세포(뉴런 및 단핵구)의 표면에서 발현되며, 각각 공지의 항체 6E10 및 4G8에 결합하는 것으로서, 서열 번호: 2 및 서열 번호: 3으로서 확인된, 공지된 에피토프와는 달리, 구속된 환형 구조를 가진 신규한 입체형태적 에피토프는 APP의 분자 표면 상에는 존재하지 않고, 따라서, APP의 자가면역 인식을 제한한다. 뉴런 및 단핵구의 세포 표면에 위치하는 APP의 GSNKG 모티프는 대개 비구조형이다. 하기 실시예에 제시되어 있는 바와 같이, 구속된 환형 구조를 가진 신규한 입체형태적 에피토프에 대한 입체형태 특이 항체 결합은 세포 표면 APP 상의 비구조형의 GSNKG 모티프를 제한적으로 인식하거나, 전혀 인식하지 못한다. 신규한 입체형태적 에피토프를 인식하는 항체는 단량체 A β 와는 거의 반응하지 않거나, 전혀 반응하지 않는 것으로 보인다. 또 다른 측면에서, 신규한 입체형태적 에피토프를 인식하는 항체는 에피토프의 입체적인 밀집 및/또는 다른 바람직하지 못한 양상에 기인하여 피브릴 A β 와는 거의 반응하지 않거나, 전혀 반응하지 않는 것으로 보인다.

[0062]

본 개시내용의 또 다른 측면에서, 신규한 입체형태적 에피토프에 대한 항체를 제공한다. 구속된 환형 구조를 가진 신규한 입체형태적 에피토프에 대한 항체 결합은 A β 올리고머의 아미노산 25-29 영역에서 서브유닛 사이 중간에 있는 비선형 에피토프 올리고머를 인식한다는 것이 분석을 통해 나타났다. 신규한 입체형태적 에피토프에 대한 항체의 특이성에 기인하여 항체는 올리고머 형태의 A β 를 특이적으로 표적화할 수 있고, 따라서, 신경 세포 및 면역 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 단량체 A β 및 APP 표적화를 피할 수 있고, 단량체 A β 가

올리고머 A β 보다 훨씬 더 많은 정량으로 존재하는 바, 결합에 대해 항체의 이용가능성을 증가시킬 수 있다.

- [0063] 신규한 입체형태적 에피토프에 결합할 수 있는 항체는 알츠하이머병 치료에서 진단제 및 치료제, 둘 모두로서 유용하고, AD 예방을 위한 백신이 본 발명의 또 다른 측면에서 제공된다.
- [0064] 본원에 기술된 바와 같이 A β 로부터 유래된 신규한 입체형태적 에피토프를 포함하는 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체는 신규한 입체형태적 에피토프를 포함하는 디설피드 환형 펩티드로부터 합성된 항체를 포함한다.
- [0065] 치료제로서 사용하기 위한 항체인 경우, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하는 것인 항체는 잘 확립된 표준 항체 제조 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 치료학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 보조제와 함께, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 에피토프를 포함하는 것인 항체를 포함한다. 그러한 치료제는 알츠하이머병 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다. 한 측면에서, 그러한 치료제는 알츠하이머병 발병을 지연시킬 수 있다.
- [0066] "약학적으로 허용가능한"이라는 표현은 제약 및 수의학 분야에서 사용이 허용된다는 의미, 즉, 허용할 수 없을 정도로 독성이거나 다르게는 부적합한 것은 아니라는 의미를 가진다. 약학적으로 허용가능한 보조제의 예로는 통상적으로 펩티드 기반 약물과 함께 사용되는 것, 예를 들어, 희석제, 부형제 등이 있다. 일반적으로 약물 제제화에 대한 가이드를 위해 문헌 ["Remington's: The Science and Practice of Pharmacy", 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005]를 참조할 수 있다. 의도하는 조성물의 투여 모드에 따라 보조제 선택이 달라질 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본 화합물은 주입에 의해, 또는 피하, 근육내 또는 정맥내로의 주사에 의해 투여하기 위한 것으로 제제화되고, 따라서, 멸균성이고, 발열원이 없는 형태의 수성 액체로서 사용되며, 임의로 완충처리되거나 등장화될 수 있다. 따라서, 증류수 중 또는 더욱 바람직하게, 염수, 포스페이트 완충처리된 염수 또는 5% 텍스트로스 용액 중에서 화합물은 투여될 수 있다. 정제, 캡슐제, 또는 현탁제를 통해 투여하는 경구 투여용 조성물은 당, 예를 들어, 락토스, 글루코스, 및 수크로스; 전분, 예를 들어, 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그의 유도체(나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트 포함); 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 스테아르산; 스테아르산 마그네슘; 황산칼슘; 식물성 오일, 예를 들어, 팜공유, 면실유, 참기름, 올리브 오일 및 옥수수유; 폴리올, 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 아가; 알긴산; 물; 등장성 염수 및 포스페이트 완충 용액을 비롯한 보조제를 사용하여 제조된다. 습윤제, 윤활제, 예를 들어, 라우릴 황산나트륨, 안정화제, 정제화제, 황산화제, 보존제, 착색제, 및 향미제 또한 존재할 수 있다. 국소 적용을 위해 적절한 베이스, 예를 들어, 트리글리세리드 베이스를 사용하여 크림제, 로션제 및 연고제로 제조될 수 있다. 상기 크림제, 로션제 및 연고제는 또한 계면활성제도 함유할 수 있다. 예를 들어, 적합한 분사제가 사용되는 비내 전달용의 에어로졸 제형으로도 또한 제조될 수 있다. 투여되는 방식에 상관없이 다른 보조제들도 또한 조성물에 첨가될 수 있으며, 예를 들어, 장기간의 보관 기간에 걸쳐 미생물의 성장을 막기 위해 항미생물제가 조성물에 첨가될 수 있다. 치료학적 조성물은 전형적으로는 제조 및 보관 조건하에서 멸균성이고, 안정성이어야 한다.
- [0067] 백신으로서 사용하기 위한 항체인 경우, 약학적으로 허용가능한 보조제와 함께, 올리고머 A β 의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 구속된 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드는 투여되었을 때에 올리고머 A β 를 특이적으로 표적하는 항체를 생성한다. 이러한 항체는 올리고머 A β 의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 에피토프에 특이적으로 결합한다. 백신은 약학적으로 허용가능한 보조제와 함께, 올리고머 A β 의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 구속된 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드를 포함한다. 백신은 올리고머 A β 를 중화시킴으로써 뇌 아밀로이드증의 발병을 차단하고, AD 발병을 예방하는 작용을 한다. 올리고머 A β 가 차단되면, 그와 관련된 독성도 차단된다. 그러한 독성으로는 예를 들어, 시냅스 기능이상 및 신경 세포 세포 사멸을 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, 상기 기술된 백신을 투여하였을 때 생성된 항체는 올리고머 A β 의 전파를 지연시키며, 따라서, 항체는 단량체 A β 가 독성 올리고머 A β 형태로 응집되는 것을 지연시킨다. 추가 측면에서, 상기 기술된 백신을 투여하였을 때 생성된 항체는 올리고머 A β 의 전파를 차단시키며, 따라서, 항체는 단량체 A β 가 독성 올리고머 A β 형태로 응집되는 것을 차단시킨다.
- [0068] 약학적으로 허용가능한 보조제의 예로는 수산화알루미늄, 알럼, 알히드로겔(Alhydrogel)TM(알루미늄 삼수화물) 또는 다른 알루미늄을 포함하는 염, 비로즘, CpG 모티프를 포함하는 핵산, 스쿠알렌, 오일, MF59, QS21, 각종 사포닌, 바이러스 유사 입자, 모노포스포릴 리피드A/트레할로스 디코리노미콜레이트, 톨 유사 수용체 효현제,

공중합체, 예를 들어, 폴리옥시프로필렌 및 폴리옥시에틸렌 등을 포함할 수 있다.

[0069] 백신은 알츠하이머병이 발병될 위험이 있는 환자 군집, 예를 들어, 고령 군집, 공지된 AD 촉진 돌연변이를 보유하는, "위험이 있는" 개체로 이루어진 공지된 군집에게 투여될 수 있다.

[0070] 한 실시양태에서, 백신을 사용하여 치료하는 경우, 피험체는 매일 한번에서부터 매일 한번, 매년 한번, 10년에 한번까지로 달라질 수 있는 스케줄로 면역화된다. 전형적인 요법으로는 면역화한 후, 6주 간격으로 추가 접종하는 것을 포함한다. 또 다른 요법은 면역화한 후, 1, 2 및 12개월 후에 추가 접종하는 것으로 구성된다. 별법으로, 추가 접종은 면역 반응 및 피험체의 생리학적 상태에 따라 달라질 것이다. 면역화를 위해 항올리고머 백신을 각 치료당 약 0.0001 μg 내지 10 g, 약 0.01 μg 내지 약 1 g, 약 1 μg 내지 약 1 mg, 및 약 100 내지 250 μg 범위인 용량으로 투여할 수 있다. 한 실시양태에서, 치료를 실시하는 시점은 하기: 0개월째, 2개월째, 6개월째, 9개월째, 및/또는 12개월째 중 하나 이상의 시점이다. 한 요법에서는 1차 면역화 후 2, 6, 9, 및 12개월째에 투약한다. 또 다른 요법에서는 1차 면역화 후 2 및 4주째에 투약한 후에, 그 후로는 매달 투약한다. 대체 요법에서는 피험체의 생리학적 상태 및/또는 사전 면역화에 대한 피험체의 반응에 따라 투약을 달리할 수 있다. 투여 경로는 임의로는 근육내 및 복강내 주사를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 조성물은 삼각근 내로 주사된다.

[0071] 진단제 또는 치료 반응성 바이오마커로서 사용하기 위한 항체인 경우, 적합한 생물학적 시료를 환자로부터 분리시키고; 항원/항체 복합체가 형성될 수 있도록 하는 데 적합한 조건하에서 일정 기간 동안 상기 시료를, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 에피토프를 포함하는 것인 항체와 접촉시키고; 복합체의 존재 여부를 검출한다. 여기서, 복합체가 검출되었다면, 이는 환자가 AD라고 진단하는 것을 나타낸다. 이러한 목적에 적합한 생물학적 시료로는 조직, 세포, 및 예를 들어, 뇌척수액(CSF: cerebrospinal fluid) 및 혈액을 비롯한 바이오유체를 포함한다.

[0072] 용도에 있어 신규한 입체형태적 에피토프에 결합하는 항체는 AD에서 진단학상 그 가치가 매우 크다. 본 발명의 항체 또는 백신 조성물로 치료될 수 있는 후보자인 피험체 확인을 돕기 위해, 본 발명은 추가로 시험관내 또는 생체내 진단 방법에 의해 에피토프를 검출하는 것을 제공한다.

[0073] 임의의 주어진 시료 중 올리고머 A β 의 존재 여부를 검출하기 위해, 본 발명은, 단량체 A β 및 APP와 비교하여 독특하게 올리고머 A β 에 존재하는 신규한 입체형태적 에피토프에 선택적으로 결합하는 항체 또는 결합 단편으로 올리고머 A β 를 함유하는 것으로 의심되는 시료를 처리하고; 항원:항체 복합체 형성 여부를 측정하고, 그가 형성되었다면, 이는 올리고머 A β 가 시료 중에 존재하는 것임을 시사하는 것인, 검출 방법을 제공한다. 항원:항체 복합체의 존재는 추가로 환자가 AD라고 진단하는 것을 나타낸다.

[0074] 시험관내에서 적용될 경우, 본 검출 방법은 피험체, 보통은 AD를 앓는 것으로 의심되는 피험체로부터 유래된 체액 또는 조직 또는 기관 시료인 생물학적 시료를 분석하는 것을 포함한다. 예를 들어, 고형 또는 반고형 조직 또는 기관으로부터 수득된 것인 조직 또는 기관 시료는 분해, 추출될 수 있거나, 또는 다르게는 액상 형태가 되게 만들 수 있다. 생물학적 시료 또는 시료들은 피험체가 AD 또는 관련된 치매로 진단받기 이전인 시점, 또는 그를 앓는 것으로 의심받기 전인 시점, 상기 질환 또는 장애의 증상을 치료 또는 호전시키기 위한 치료학적 요법을 받는 중인 시점, (사망 원인, 또는 의심되는 사망 원인과는 상관없이) 피험체가 사망한 후인 시점을 비롯한 임의의 적절한 시점에서 피험체로부터 채취될 수 있다. 별법으로, 생물학적 시료로는 중앙 혈액원 또는 단체 관리하에 있는 기증된 체액 또는 조직, 예를 들어, 혈액, 혈장, 또는 혈소판을 포함할 수 있다.

[0075] 항체가 검출가능한 항원:항체 복합체를 형성하였는지 여부를 통해 시료 중에 올리고머 A β 가 존재하는지를 확인할 수 있다. 그러한 복합체 형성은 ELISA, RIA, 유세포 측정, 웨스턴 블롯, 면역조직화학법 등을 포함하는 매우 다양한 프로토콜을 사용함으로써 측정할 수 있다. 복합체를 밝혀내고, 이를 통해 시료 중에 신규한 입체형태적 에피토프가 존재하는지 여부를 밝혀내기 위해, 항체를 시각적으로 또는 기기 장치의 도움을 통해 검출가능한 시약에 접합시키거나 커플링시킴으로써 표지된 항체로서 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 시약, 또는 표지는 검출가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 표지는 방사선비투과 또는 방사성 동위원소, 예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , 형광성(형광단) 또는 화학 발광성(발색단) 화합물, 예를 들어, 플루오레세인이소티오시아네이트, 로다민 또는 루시페린; 효소, 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 베타 갈락토시다제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다제; 염색제; 또는 금속 이온일 수 있다. 별법으로, 신규한 입체형태적 에피토프는 에피토프의 존재를 간접적으로 밝혀내기 위해 에피토프 항체에 결합하는 표지된 2차 시약, 예를 들어, 에피토프 항체에 결합하는 표지된 항체를 사용함으로써 밝혀낼 수 있다. 항체:항원 복합체의 존재 여부는

2가지 시약이 용액 중에 포함되도록 할 필요가 없는 간접적인 수단에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 항체가 무손상 세포의 표면 상에 제시되는 에피토프에 결합하고, 그와 항체:항원 복합체를 형성하는 것인 유세포 측정법을 사용함으로써 복합체는 간접적으로 검출가능하다. 항원:항체 복합체는 또한 예를 들어, 전기영동, 크로마토그래피, 질량 분석법 등과 같이 크기, 전하, 및 이동성에 기초하여 단백질을 분류하는 방법을 비롯한, 비항체 기반 방법에 의해 확인할 수 있다는 것도 이해할 수 있을 것이다.

[0076] 관련된 실시양태에서, 표지된 본 발명의 항체, 또는 표지된 형태의 그의 결합 단편은 생체내에서 항체가 결합하는 올리고머 Aβ의 존재를 영상화하는 데 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 본 발명은 생체내 영상화에 유용한 시약, 예를 들어, 테크네튬, 가돌리늄 등의 동위원소에 커플링된 형태의 항체 또는 단편을 제공한다.

[0077] 또 다른 측면에서, 포장재 및 제약 조성물을 포함하는 제조 물품(이는 또한 상업적 패키지로도 지칭된다)을 제공한다. 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 보조제, 및 치료학적 유효량의, Aβ로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 입체형태적으로 고감도인 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 Aβ의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 에피토프를 포함하는 것인 항체를 포함한다. 포장재는 상기 조성물이 알츠하이머병을 치료하는 데 유용하다는 것을 표시하는 라벨을 붙일 수 있다. 포장재는 예를 들어, 유리, 플라스틱, 호일 및 판지를 비롯한 제약 제제를 패키징하는 데 일반적으로 사용되는 임의의 적합한 재료일 수 있다.

[0078] 또 다른 측면에서, 포장재 및 제약 조성물을 포함하는 제조 물품을 제공한다. 상기 조성물은 본원에서 제공하는 바와 같이, 약학적으로 허용가능한 보조제와 함께, 올리고머 Aβ의 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적으로 구속된 에피토프를 포함하는 펩티드를 포함한다. 조성물은 생리학상 또는 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있고, 포장재는 조성물의 활성 성분(예를 들어, 펩티드)을 표시하는 라벨을 포함할 수 있다. 라벨은 추가로 본원에 기술된 키트와 함께 사용하고자 하는 본 조성물의 사용 목적, 예를 들어, 치료제 또는 예방제로서의, 또는 올리고머 Aβ에 특이적인 항혈청 또는 항체를 생산하기 위해 피험체에서 면역 반응을 유도하기 위한 조성물로서의 사용 목적을 포함할 수 있다.

[0079] 추가의 실시양태에서, 올리고머 Aβ를 확인하기 위해 입체형태적으로 고감도인 항체를 생산 또는 스크리닝하는 데 사용되는 화합물 또는 조성물에 관한 사용 설명서와 함께, 본원에서 제공하는 것과 같은 펩티드를 포함하는 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 올리고머 Aβ 특이 항체 또는 항혈청의 생산 및/또는 확인에 유용할 수 있고, 상기 설명서는 예를 들어, 투여 농도, 투여 간격, 바람직한 투여 방법, 면역학적 스크리닝 또는 시험 방법 등을 포함할 수 있다.

[0080] 또 다른 실시양태에서, 그의 사용 설명서와 함께, 본원에서 제공하는 것과 같은 하나 이상의 펩티드를 포함하는 조성물을 포함하는, 약제 제제용 키트를 제공한다. 상기 설명서는 그를 투여받는 피험체에서 치료학적 또는 예방학적 면역 반응을 유도하는 데 유용한 것인 약제 제제를 위한 일련의 단계를 포함할 수 있다. 키트는 추가로 AD 또는 관련된 치매의 증상들 중 하나 이상을 치료, 예방, 또는 호전시키기 위한 치료에서의 약제 사용에 관한 사용 설명서를 포함할 수 있고, 예를 들어, 투여 농도, 투여 간격, 바람직한 투여 방법 등을 포함할 수 있다.

[0081] 또 다른 실시양태에서, AD 또는 관련된 치매 진단을 위한 키트를 제공한다. 키트는 그의 사용 설명서와 함께, 본원에 기술된 것과 같은 하나 이상의 입체형태적으로 고감도인 선택성 항체 또는 항혈청을 포함한다. 항체는 추가로 검출 시약에 커플링될 수 있다. 검출 시약의 예로는 2차 항체, 예를 들어, 항마우스 항체, 항래빗 항체 등을 포함한다. 그러한 2차 항체는 적합한 기질과 함께 제공되었을 때에는 검출가능한 비색 또는 화학 발광 반응을 나타내는 효소와 커플링될 수 있다. 키트는 추가로 효소, 예를 들어, 프로테이나제 K, 차단용 완충액, 균질화용 완충액, 추출용 완충액, 희석용 완충액 등을 비롯한, 검출 반응 수행을 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0082] 또 다른 실시양태에서, 생물학적 시료 중 올리고머 Aβ의 존재 여부를 검출하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 그의 사용 설명서와 함께, 올리고머 Aβ에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 입체형태적으로 고감도인 항체 또는 항혈청을 포함한다. 항체는 추가로 검출 시약에 커플링될 수 있다. 검출 시약의 예로는 2차 항체, 예를 들어, 항마우스 항체, 항래빗 항체 등을 포함한다. 그러한 2차 항체는 적합한 기질과 함께 제공되었을 때에는 검출가능한 비색 또는 화학 발광 반응을 나타내는 효소와 커플링될 수 있다. 키트는 추가로 효소, 예를 들어, 프로테이나제 K, 차단용 완충액, 균질화용 완충액, 추출용 완충액, 희석용 완충액 등을 비롯한, 검출 반응 수행을 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0083] 종래 방법을 사용하여 다중클론 항혈청 또는 단일클론 항체를 비롯한 입체형태적으로 고감도인 항체를 제조할 수 있다. 다중클론 항체 생산을 위해, 포유동물(예를 들어, 마우스, 햄스터, 또는 래빗)을 포유동물에서 항체

반응을 유도하는 면역원성 형태의 신규한 입체형태적 에피토프로 면역화시킬 수 있다. 예를 들어, 신규한 입체 형태적 에피토프 서열을 포함하는, 디설파이드 연결 폐환화된 펩티드는 상기 펩티드의 N 및 C 말단에 있는 시스템 인 사이의 디설파이드 결합을 사용하여 루프 입체형태에 구속될 수 있다. 디설파이드 연결 폐환화된 펩티드는 종래 기법을 사용하여 합성될 수 있고, 포유동물 내로 도입될 수 있다.

[0084] 펩티드에 면역원성을 부여하는 기법은 당업계에 주지되어 있고, 그러한 기법으로는 캐리어에의 컨쥬게이트화를 포함한다. 보조제 존재하에 펩티드를 투여할 수 있다. 혈장 또는 혈청 중 항체 역가를 검출함으로써 면역화 진행 상태를 모니터링할 수 있다. 항체 수준을 평가하기 위해 항원으로서 면역원을 사용하면서 표준 ELISA 또는 다른 면역검정 방법을 사용할 수 있다. 면역화한 후, 항혈청을 수득할 수 있고, 원하는 경우, 다중클론 항체를 혈청으로부터 분리시킬 수 있다.

[0085] 단일클론 항체를 생산하기 위해, 항체 생산 세포(B 림프구)를 면역화된 동물로부터 수거하고, 표준 체세포 융합 방법에 의해 골수종 세포와 융합시킨다. 상기와 같은 기법(예를 들어, (Kohler and Milstein)에 의해 최초로 개발된 하이브리도마 기법(문헌 [Kohler and Milstein (Nature 256, 495-497(1975))]) 뿐만 아니라, 다른 기법, 예를 들어, 인간 B 세포 하이브리도마 기법(문헌 [Kozbor et al., Immunol. Today 4, 72 (1983)]), 인간 단일 클론 항체를 생산하는 EBV-하이브리도마 기법(문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96]), 및 조합 항체 라이브러리의 스크리닝(문헌 [Huse et al., Science 246, 1275 (1989)])도 당업계에 주지되어 있다. 선택된 신규한 입체형태적 에피토프와 특이적으로 반응성인 항체 생산을 위해 하이브리도마 세포를 면역화학적으로 스크리닝하고, 단일클론 항체를 분리시킬 수 있다.

[0086] 전형적인 항체는 2개의 면역글로불린(Ig: immunoglobulin) "중쇄" 및 2개의 Ig "경쇄"로 구성되며, 이는 일반 Y 자형 구조를 취하는 것으로서 생각될 수 있다. 항체 부류 또는 이소형을 정의하는 여러 유형의 상이한 중쇄가 존재한다. 포유동물의 면역글로불린 중쇄에는 5가지 유형: ν , δ , α , μ , 및 ϵ 가 있으며, 이는 각각 면역글로불린 부류: IgG, IgD, IgA, IgM 및 IgE로 정의된다. 포유동물에는 2가지 유형의 경쇄: 카파(κ) 쇄, 및 람다(λ) 쇄가 존재한다.

[0087] 각 중쇄는 하기 2개의 영역을 가진다: 같은 부류의 모든 면역글로불린에 대해서는 동일하지만, 부류 간에는 차이를 보이는 것인 불변 영역(중쇄 ν , α 및 δ 는 3개의 텐덤 면역글로불린 도메인(CH1, CH2, CH3)으로 구성된 불변 영역을 가질 뿐만 아니라, 가요성 추가를 위해 힌지 영역도 가지며; 중쇄 μ 및 ϵ 는 4개의 도메인으로 구성된 불변 영역을 가진다); 및 다른 B 세포 간에는 차이를 보이지만, 같은 B 세포 또는 B 세포 클론에 의해 생산된 모든 면역글로불린에 대해서는 동일한 것인 가변 영역(VH). 임의의 중쇄의 가변 도메인은 단일 면역글로불린 도메인으로 구성되어 있다. 이들 도메인은 약 110개의 아미노산 길이이다.

[0088] 각각 경쇄는 하나의 불변(CL) 도메인; 및 항원 결합에 중요한 것인 하나의 가변 도메인(VL), 이 2개의 텐덤 면역글로불린 도메인으로 구성된다.

[0089] 항체의 일부분은 독특한 기능을 가진다. 예를 들어, "Y"의 아암은 (일반적으로는 동일한) 2개의 항원에 결합할 수 있는 부위를 포함하는 바, 따라서, 특이적인 외래 물질을 인식할 수 있다. 항체의 이 영역은 "Fab"(단편, 항원 결합) 영역이라 명명된다. 이는 항체의 각 중쇄 및 경쇄로부터의 하나의 불변 영역과 하나의 가변 영역으로 구성된다. "파라토프"는 중쇄 및 경쇄로부터의 가변 도메인에 의해 항체 단량체의 아미노 말단 단부에서 형성된다. 가변 도메인은 또한 FV 영역이라고도 지칭되며, 이는 항원과의 결합에 있어 가장 중요한 영역이다. 더욱 구체적으로, 각각 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 상에 3개씩 존재하는 β 가닥의 가변 루프는 항원과의 결합을 담당한다. 이들 루프는 상보성 결정 영역("CDR": complementarity determining region)으로도 지칭된다.

[0090] 상보성 결정 영역("CDR")은 이들 단백질이 항원 형상을 보완하는, 항체내 영역이다. 따라서, CDR이 특이 항원에 대한 단백질의 친화성 및 특이성을 결정한다. CDR은 분자에서 가변성이 가능 큰 부분이고, 항체가 굉장히 많은 항원 레퍼토리를 인식할 수 있도록 하며 이들 분자의 다양성에 기여한다.

[0091] 항원 수용체의 가변 도메인의 아미노산 서열에는 비연속적으로 배열된 3개의 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)이 존재한다. 항원 수용체는 전형적으로는 (상이한 두 폴리펩티드, 중쇄 및 경쇄 상에) 2개의 가변 도메인으로 구성되어 있기 때문에, 종합해서 각 항원 수용체의 경우 6개의 CDR이 항원과 접촉할 수 있다. 단일 항체 분자는 2개의 항원 수용체를 가지는 바, 이에 상기 항체 분자는 12개의 CDR를 포함한다.

[0092] 일반 "Y"형 항체의 맨 아래 부분은 면역 세포 활성을 조정하는 데 중요한 역할을 한다. 이 영역은 Fc(단편, 결정가능) 영역이라 불리며, 이는 항체 부류에 따라 2 또는 3개의 불변 도메인을 제공하는 2개의 중쇄로 구성되어 있다. Fc 영역은 특정 부류의 Fc 수용체, 및 다른 면역 분자, 예를 들어, 보체 단백질과의 결합에 의해 각 항체

가 주어진 항원에 대하여 적절한 면역 반응을 확실히 일으킬 수 있도록 한다. 이를 수행함으로써 옅소닌화된 입자 인식, 세포 용해, 또는 비만 세포, 호중구 또는 호산구 탈과립을 비롯한 상이한 생리학적 효과를 매개한다.

[0093] 아미노산 서열 중 CDR을 지정하는 방법은 다수 존재한다. "카바트(Kabat)" 정의는 서열 가변성에 기초하는 것으로서 가장 보편적으로 사용된다. "코티아(Chothia)" 정의는 구조적 루프 영역의 위치에 기초하는 것이다. "AbM" 정의는 옥스퍼드 몰레큘라 AbM 항체 모델링 소프트웨어(Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)에 의해 사용되는 상기 두 정의 간의 절충안이다. "콘택트" 정의는 이용가능한 복합체 결정 구조 분석에 기초한 것이다.

[0094] 당업자는 공지된 패턴 및 서열 정렬 방법을 사용하여 CDR을 포함하는 임의의 주어진 서열 중의 CDR을 쉽게 확인할 수 있다. 또 다른 측면에서, 모델링 또는 당업자에게 공지된 다른 방법 또한 CDR을 확인하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 하기 웹사이트 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)에 기술되어 있는 것과 같이, 당업계에서 항체 서열 중의 CDR을 확인하는 데 당업자에게 도움을 수 있는 주지된 가이드라인이 존재한다.

[0095] 5E3 항체의 중쇄 및 경쇄를 서열 분석하였다. 중쇄 서열 및 경쇄 서열은 도 15에서 확인된 서열과 일치한다. 항원 결합의 결정기인, 상기 서열의 일부가 또 다른 항체 골격으로 전달될 수 있으며, 이를 통해, 예를 들어 "키메라" 또는 "인간화된" 항체가 생성될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0096] 당업자는 도 15에 도시된 5' 및 3' 서열 리드를 쉽게 정렬함으로써 (예를 들어, 이용가능한 소프트웨어 패키지, 예를 들어, GCG 또는 시퀀서(Sequencher)를 사용하여) 컨센서스 서열을 생성할 수 있으며, 불일치를 해결하는 데 필요한 서열 트레이스를 조사할 수 있다. 남은 임의의 불일치는 재서열 분석을 통해 해결될 수 있다. 불일치, 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열에 위치하는 중간의 종결 코돈은 분명한 뉴클레오타이드 미스리드인 것으로 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 아미노산 및 뉴클레오타이드를 서열 분석할 때, 서열 분석 방법이 하나 이상의 염기를 부정확하게 호출할 경우, 서열 분석 오류 또는 잘못 호출이 발생할 수 있고, 이는 오류가 있는 리드를 유도한다는 것이 당업계에 주지되어 있다. 분자 생물학적으로 예측불가능하게 변화하기 때문에, 실험실 기반의 DNA 서열 분석 방법 중 완벽하게 정확한 것은 없다; 간혹 기계에서 염기를 잘못 호출한다는 점은 잘 알려져 있다. 그러한 잘못 호출은 서열 리드를 다른 리드에 대해 또는 참조에 대해 정렬시켰을 때에 명백해지게 된다.

[0097] "키메라" 항체 또한 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 고려된다. 키메라 항체는 상이한 두 항체로부터의 서열을 포함할 수 있다. 이는 상이한 2가지 종으로부터 유래된 항체로부터의 서열을 포함할 수 있다. 키메라 항체 분자는 예를 들어, 인간 펩티드 불변 영역과 함께 마우스, 래트, 또는 다른 종의 항체로부터의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 종래 방법을 사용하여 본 발명의 신규한 입체형태적 에피토프를 인식하는 면역글로불린 가변 영역을 함유하는 키메라 항체를 제조할 수 있다(예를 들어, 문헌 ([Morrison et al., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 81,6851 (1985)]; [Takeda et al., Nature 314, 452(1985)], 미국 특허 번호 제4,816,567호 (Cabilly et al.); 미국 특허 번호 제4,816,397호(Boss et al.); 유럽 특허 공개 번호 EP171496(Tanaguchi et al.); 유럽 특허 공개 번호 0173494, 영국 특허 GB 2177096B) 참조).

[0098] "인간화된 항체"는 인간에서 천연적으로 생산된 항체 변이체체의 그의 유사성을 증가시키기 위해 그의 단백질 서열이 변형된 비인간 종으로부터의 항체 서열을 포함할 수 있다. 이는 일부 경우에는 키메라 항체의 구체적인 서브세트로서 간주될 수 있다. 그러나, "인간화"는 보통 단순한 키메라 생성과는 다른 것으로 여겨진다. 그렇긴 해도, 인간화 과정은 초기 단계에서 마우스-인간 키메라를 생성하는 것을 포함할 수 있다(예를 들어, 마우스 Fab를 인간 Fc에 스플라이싱시킬 수 있다). 이후, 상기 분자의 Fab 부분에서 아미노산 서열을 선택적으로 변경시킴으로써 키메라를 추가로 인간화시킬 수 있다. 이 과정은 보통 항체가 원래 그에 대해 발생된 것인 특이성을 보유하기 위해 "선택성"을 띤다. 예를 들어, CDR 세그먼트를 제외하고, 적절한 개별 아미노산을 교체함으로써 인간의 것과는 다른 Fab 서열의 부분들을 돌연변이화시킬 수 있다. 이는 돌연변이 유발법을 사용하여 DNA 수준에서 달성된다. 키메라 중간체를 생성하지 않고도 인간화된 항체를 생산할 수 있다. (원하는 결합 특성을 담당하는) 적절한 CDR 코딩 세그먼트를 인간 항체 "스캐폴드" 내로 삽입함으로써 인간화된 항체를 "직접" 생성할 수 있다. 상기에서 논의된 바와 같이, 이는 포유동물 세포에서 적절한 벡터 및 발현을 사용하여 재조합 DNA 방법을 통해 달성된다. 즉, (예를 들어) 원하는 특성을 보이는 항체를 마우스에서 발생시킨 후, 그 항체를 코딩하는 DNA를 분리시키고, 벡터로 클로닝시키고, 서열을 분석할 수 있다. 이어서, 항체 CDR에 상응하는 DNA 서열을 결정할 수 있다. 일단 원하는 CDR에 대한 정확한 서열이 알려졌다면, 이들 서열을, 인간 항체 변이체를 위한 DNA를 함유하는 구조체 내로 적절하게 삽입하기 위한 전략법을 고안할 수 있다. 상기 전략법은 또한 CDR 서열 관독에 기초하여 선형 DNA 단편을 합성하는 데 사용될 수 있다. 합성의 다양성 함유 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 다양성 라이브러리를 생성할 수 있다. 생성된 클론 풀을 추가로 스크리닝하여 공지 방법을 사용

함으로써 최적화된 인간화된 항체 클론을 확인할 수 있다.

- [0099] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 신규한 입체형태적 에피토프와 특이적인 반응성을 띠는 단일클론 또는 키메라 항체는 추가로, 가변 영역의 일부, 특히, 항원 결합 도메인의 보존적 골격 영역이 인간 기원의 것이고, 단지 초가변영역만이 비인간 기원의 것인 인간 불변 영역 키메라 생산에 의해 인간화될 수 있다. 그러한 면역글로불린 분자는 당업계에 공지된 기법에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌 ([Teng et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 7308-7312 (1983)]; [Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279 (1983)]; [Olsson et al., Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982)]), 및 PCT 공개 공보 W092/06193 또는 EP 0239400). 인간화된 항체는 또한 상업적으로 생산될 수 있다(Scotgen Limited: 영국 미들섹스 트윅커넘 홀리 로드 2 소재).
- [0100] 한 측면에서, 5E3의 중쇄 및/또는 경쇄 서열, 또는 그의 일부 또는 일부들을 포함하는 키메라 또는 인간화된 항체를 제공한다. 상기 부분은 항원 결합 결정기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 결정기는 5E3의 CDR 서열을 포함할 수 있다. 상기 항체는 5E3과 동일한 에피토프에 결합한다. 이는 또한 5E3이 결합하는 것과 부분적으로 중복되는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 키메라 또는 인간화된 항체는 5E3의 CDR 서열과 실질적으로 동일한 CDR 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 5E3의 서열과 비교하여 보존적 서열 변이를 가질 수 있다.
- [0102] 일반 아미노산 중에서 "보존적 아미노산 치환"은 각각 하기 기들 내에서의 아미노산 간의 치환에 의해 예시된다: (1) 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신, (2) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판, (3) 세린 및 트레오닌, (4) 아스파르트레이트 및 글루타메이트, (5) 글루타미 및 아스파라긴, 및 (6) 리신, 아르기닌 및 히스티딘.
- [0103] 당업계에 주지되어 있는 BLOSUM62 표는 500개 초과와 관련 단백질 군의 고도로 보존되는 영역을 나타내는, 단백질 서열 세그먼트의 약 2,000개의 국소 다중 정렬로부터 도출된 아미노산 치환 매트릭스이다(문헌 [Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)]). 따라서, BLOSUM62 치환 빈도를 사용하여 본 발명의 아미노산 서열 내로 도입될 수 있는 보존적 아미노산 치환을 정의할 수 있다. (상기 논의된 바와 같이) 단지 화학적 특성에만 기초하여 아미노산 치환을 디자인할 수도 있지만, "보존적 아미노산 치환"이라는 말은 바람직하게는 BLOSUM62 값이 -1 초과인 값을 나타내는 치환을 의미한다. 예를 들어, 치환이, BLOSUM62 값이 0, 1, 2, 또는 3인 것을 특징으로 하는 경우, 아미노산 치환은 보존적인 것이다. 이러한 시스템에 따라, 바람직한 보존적 아미노산 치환은 BLOSUM62 값이 1 이상(예를 들어, 1, 2, 또는 3)인 것을 특징으로 하며, 동시에 더욱 바람직한 보존적 아미노산 치환은 BLOSUM62 값이 2 이상(예를 들어, 2 또는 3)인 것을 특징으로 한다.
- [0104] 일부 실시양태에서, 항체는 5E3의 CDR 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 또는 90% 이상 동일한 CDR 서열을 포함할 수 있다. 이는 또한 5E3의 CDR 서열과 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 99% 초과로 동일할 수 있다.
- [0105] 항체를 제조하는 데 사용되는 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기법은 당업계에 주지되어 있고, 문헌 [Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989](이하, ["Sambrook"])에 보다 상세하게 기술되어 있다.
- [0106] "재조합"이라는 용어는 예를 들어, 화학적 합성법에 의해, 또는 유전 공학 기법에 의한 단리된 핵산 세그먼트의 조작에 의해 2가지의 다른 분리된 서열 세그먼트를 조합하는 인공적 조합을 의미한다.
- [0107] 본 발명의 일부 실시양태의 조성물 또는 화합물의 투여량은 투여 경로(경구, 정맥내, 흡입 등) 및 조성물 또는 화합물이 투여되는 제형(액제, 방출 조절형 등)에 따라 달라질 수 있다. 적절한 투여량을 결정하는 것은 당업자의 능력 범위 내에 속한다.
- [0108] "약학적으로 허용가능한 담체"는 생리학상 적합성을 띠는, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는 물, 염수, 포스페이트 완충처리된 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등과, 그뿐만 아니라, 상기의 조합 중 하나 이상을 포함한다. 많은 경우에는 조성물 중에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 추가로 최소량의 보조 물질, 예를 들어, 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제를 포함할 수 있는데, 이는 항체 또는 항체 부분의 효능 또는 저장 수명을 증진시킬 수 있다.

- [0109] 본 발명의 제약 조성물은 "유효량", "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"의 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"이란 원하는 치료학적 결과를 달성하는 데 필요한 기간 동안 그러한 투여량에서 효과가 있는 양을 의미한다. 항체 또는 항체 부분의 치료학적 유효량은 당업자에 의해 결정될 수 있고, 인자, 예를 들어, 질환 상태, 개체의 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도할 수 있는 항체 또는 항체 부분의 능력에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 치료학상의 유익한 효과가 항체 또는 항체 부분의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 능가하는 양이다. "예방학적 유효량"이란 원하는 예방학적 결과를 달성하는 데 필요한 기간 동안 그러한 투여량에서 효과가 있는 양을 의미한다. 전형적으로 예방학적 용량은 질환의 초기 단계 이전에 또는 그 시기에 사용되기 때문에, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다는 적을 것이다. 유효량은 질량/질량 기준(예를 들어, 피험체 1 kg당 μg 또는 mg)으로 계산될 수 있거나, 또는 질량/부피 기준(예를 들어, 농도, 1 ml당 μg 또는 mg)으로 계산될 수 있다. 질량/부피 단위를 사용하여, 항체는 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 20 mg/ml 인 양, 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 존재할 수 있다.
- [0110] 정량 및/또는 농도는 질량/질량 기준(예를 들어, 피험체 1 kg당 μg 또는 mg)으로 계산될 수 있거나, 또는 질량/부피 기준(예를 들어, 농도, 1 ml당 μg 또는 mg)으로 계산될 수 있다. 질량/부피 단위를 사용하여, 항체 또는 펩티드는 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 20 mg/ml 인 양, 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 약 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 존재할 수 있다.
- [0111] 본 발명의 항체는 예를 들어, 비경구 투여에 적합한 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 바람직하게, 항체는 유효량의 항체를 함유하는 주사액으로서 제조될 것이다. 주사액은 플린트 또는 앰버 바이알, 앰플 또는 미리 충전된 시린지 중의 액상 또는 동결건조된 제형으로 구성될 수 있다. 임의의 적합한 완충액이 제약 조성물 제조에 사용될 수 있다. 그러한 완충액의 예로는 숙신산나트륨, 시트르산나트륨, 인산나트륨 또는 인산칼륨을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 동결 방지제 및 벌크화제가 동결건조된 제형을 위해 포함될 수 있다. 안정화제가 액상 및 동결건조된 제형, 둘 모두에 사용될 수 있다.
- [0112] 치료학적 조성물을 비롯한, 본 발명의 각종 실시양태에 따른 조성물은 항체 또는 펩티드의 유효량을 포함하는 용량으로 투여될 수 있다. 용량은 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 20 mg/kg (피험체 질량 기준), 예를 들어, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 또는 그 사이의 임의의 양; 또는 약 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 또는 그 사이의 임의의 양, 예를 들어, 30.0, 35.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 포함할 수 있다.

- [0113] 당업자는 피험체의 체중을 고려하여, 필요에 따라 제약 조성물, 개별 성분 또는 그의 조합의 농도, 또는 제약 조성물, 개별 성분 또는 그의 조합의 부피의 단위를 원하는 적용에 적합한 포맷으로 쉽게 호환시킬 수 있다.
- [0114] 본 발명의 제약 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 이는 예를 들어, 액상, 반고체, 및 고체 제형, 예를 들어, 액상 용액(예를 들어, 주사액 및 주입액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 환제, 분제, 리포솜 및 좌제를 포함한다. 바람직한 형태는 의도하는 투여 모드 및 치료학적 적용에 따라 달라질 수 있다. 전형적으로 바람직한 조성물은 주사액 및 주입액 형태로, 다른 항체를 사용하여 인간을 수동적으로 면역화시키는 데 사용되는 것과 유사한 조성물인 형태로 존재한다. 바람직한 투여 모드는 비경구(예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내) 투여이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.
- [0115] 본 발명의 항체는 비록 다수의 치료학적 적용에 있어서 바람직한 투여 경로/모드는 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이지만, 당업계에 공지된 각종 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 모드는 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 특정 실시양태에서, 예를 들어, 임플란트, 경피용 패취, 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 서방성 제형과 같이, 활성 화합물은 화합물이 신속하게 방출되지 못하도록 하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락타산과 같은 생체분해성, 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 상기 제형을 제조하는 다수의 방법들은 특허되었거나, 보통은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.
- [0116] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 예를 들어, 불활성 희석제 또는 동화가능한 식용 담체와 함께 경구적으로 투여될 수 있다. 화합물(및 원하는 경우, 다른 성분들)은 또한 경질 또는 연질 젤 젤라틴 캡슐제로 밀봉될 수 있거나, 정제로 압착될 수 있거나, 피험체 식사에 직접 혼입될 수 있다. 치료학적인 경구 투여를 위해, 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 섭취가능한 정제, 구강용 정제, 트로키, 캡슐제, 엘릭시르제, 현탁제, 시럽제, 와퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여 이외의 투여에 의해 본 발명의 화합물을 투여하기 위해서는 상기 화합물의 불활성화를 막는 물질로 화합물을 피복시키거나, 또는 그러한 물질과 함께 화합물을 공투여하는 것이 필요할 수 있다.
- [0117] 보충 활성 화합물 또한 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 AD 또는 관련된 치매를 치료하는 데 유용한 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 공동으로 제제화되고/거나, 그와 함께 공투여된다. 예를 들어, 본 대사 발명의 항체 중 하나 또는 그의 항체 부분은 다른 표적에 결합하는 하나 이상의 추가의 항체와 함께 제제화되고/거나, 그와 함께 공투여된다.
- [0118] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 당업계에 공지되어 있는 반감기 연장용 비히클에 연결될 수 있다. 그러한 비히클로는 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜(PEG: polyethylene glycol), 및 텍스트란을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 그러한 비히클은 예를 들어, 미국 출원 시리얼 번호 제09/428,082호, 및 공개된 PCR 출원 번호 WO 99/25044(이들은 임의의 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다)에 기술되어 있다.
- [0119] 본 발명의 한 실시양태에서, 구속된 환형 구조를 가진 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드로서, 여기서, 에피토프는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 포함하며, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 것인 항원성 펩티드를 제공한다.
- [0120] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 구속된 환형 구조를 가진 에피토프를 포함하는 항원성 펩티드로서, 여기서, 에피토프는 서열 번호: 1에 상응하는 아미노산 서열을 가지며, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 것인 항원성 펩티드를 제공한다.
- [0121] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 결합할 수 있는 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하며, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 것인 항체를 제공한다.
- [0122] 본 발명의 추가의 실시양태에서, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 결합할 수 있는 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 서열 번호: 1에 상응하는 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하며, 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 것인 항체를 제공한다.
- [0123] 특정 실시양태에서, 상기 항체는 비올리고머 형태의 A β 보다는 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 결합할

수 있다.

[0124] 또 다른 실시양태에서, 치료학적 유효량의, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 결합할 수 있는 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하는 것인 항체를 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병을 앓거나, 앓는 것으로 의심되는 피험체를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 비올리고머 형태의 A β 보다는 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 결합할 수 있다.

[0125] 또 다른 실시양태에서, 피험체에게 치료학적 유효량의, A β 로부터 유래된 환형 펩티드에 특이적으로 결합하는 펩티드에 결합할 수 있는 항체로서, 여기서, 환형 펩티드는 올리고머 A β 의 용매에 노출된, 항체 접근성 너클 영역에 상응하는 적어도 SNK의 아미노산 서열을 가진 입체형태적 에피토프를 포함하는 것인 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 피험체에서 AD의 발병 또는 진행을 예방하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 비올리고머 형태의 A β 보다는 올리고머 형태의 A β 에 더 높은 친화도로 결합할 수 있다.

[0126] 본 발명의 추가의 측면은 하기의 본 발명의 바람직한 실시양태에 관한 설명의 고찰로부터 자명해질 것이다. 본 발명의 다른 실시양태도 가능하며, 본 발명의 세부 사항은 모두 본 발명의 개념으로부터 벗어남 없이 여러 가지 측면에서 변형될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 도면, 상세한 설명 및 실시에는 사실상 예시적인 것이지, 제한적인 것이 아닌 것으로 간주되어야 한다.

[0127] 실시예

[0128] **실시예 1 : A β 정제 및 응집 및 올리고머 특징 규명**

[0129] 형질전환, 발현 및 정제

[0130] A β 1-40을 코딩하는 구조체로 E. 콜라이(*E. coli*) BL21 (DE3) pLysS 세포 및 E. 콜라이 DH5 α 세포를 형질전환시켰다. 25 mL 용해용 완충액(50 mM 트리스HCl(pH 8.0) + 1 mM 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid)) 중에 1 L 배양물로부터의 E. 콜라이 세포를 재현탁시켜 균질화된 현탁액을 수득하였다(어떤 프로테아제 억제제도 첨가하지 않았다). 현탁액을 40 mL 원심분리 튜브(JA-20)로 옮겨 놓고, 얼음 위에 올려놓고, 3 min 동안 강도 6 (즉, 소형 초음파 분해기 팁에 대해 최대로 설정) 및 50 HZ 간헐도에서 초음파 처리한 후, 4°C에서 18,000 g로 10 min 동안 원심분리 단계를 수행하였다. 이러한 초음파 처리 과정을 3회 반복하였다. 매회마다 가용성 분획을 회수하고, SDS-PAGE를 통해 분석하였다(이 경우, TCA 침전은 필요하지 않았다). 최종적으로, 8 M 우레아, 10 mM 트리스HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA를 함유하는 12.5 mL 완충액 중에 펠릿을 재현탁시킨 후, 추가로 한번 더 초음파 처리 단계 및 원심분리 단계(10 min 동안 18,000 rpm)를 수행하였다. 이어서, 10 mM 트리스(pH 8.0) + 1 mM EDTA를 사용하여 상기 용액을 4배로 희석하였다(37.5 mL 첨가). 이어서, 단백질을 최종적으로 정제용의 실제 완충액(25 mM 트리스(pH 8.0) + 1 mM EDTA)으로 평형화된 DEAE-셀룰로스(Whatman으로부터의 D52; 이를 먼저 15 min 동안 0.5 N NaOH로 재생시킨 후, 이어서 1회에 걸쳐 물로 세척하고 0.5 M HCl로 처리한 후, 수회에 걸쳐 물로 세척하고 최종적으로 진한 완충 용액(50 mM 트리스(pH 8.0) + 1 mM EDTA)으로 처리)와 함께 인큐베이션시켰다. 20 min 동안 완만하게 진탕되는 조건하에서 (즉, 자기 교반 플레이트 상에 배치된, 안쪽에 자기가 장착되어 있는 팔콘 튜브 중에서) 배치에서 펩티드가 수지에 결합할 수 있도록 하였다. 1 min 동안 1,200 rpm으로 원심분리하여 비드를 침전시킨 후, 유동 통과식으로 비결합 단백질을 수집하였다. 상기 비드를 피펫으로 제거하였다.

[0131] 수회에 걸쳐 세척하고, 매회마다 5 min 간의 인큐베이션 시간 및 짧은 원심분리 단계(1 min 동안 1,200 rpm)를 거쳐 분획을 제거하고; 각각 0, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 500 mM NaCl과 함께 25 mM 트리스 HCl(pH 8.0) + 1 mM EDTA를 사용하였다. 용리된 분획을 얼음 상에서 유지시켜 펩티드를 단량체 상태로 유지시켰다.

[0132] 본 접근법을 이용하여, 250 μ L의 수집된 분획을 TCA 침전 후에 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. TCA 침전을 위해, 시료를 얼음 상에서 30 min 이상 동안 20% 트리클로로아세트산(TCA: trichloroacetic acid) 중에서 인큐베이션시킨 후, 15 min 동안 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 펠릿을 750 μ L 빙냉 아세톤으로 세척한 후, 5 min 동안 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 아세톤을 제거하고, 잔유물은 그대로 두어 증발되도록 하였다. 단백질을 로딩 염료와 함께 펠릿을 다시 용해시키고, SDS-PAGE 상에서 8-10 μ L를 분석하였다.

[0133] A β 응집 프로토콜 및 A β 올리고머화

[0134] A β 를 단량체화시키기 위해, 정제된 A β 를 밀리Q 수(miliQ water)에 대해 투석하고, 동결건조시켰다. 동결건조

후, TCA 또는 포름산 중 하나 중에서 A β 를 회수한 후, 이를 증발시켜 유리판 상에서 단량체 분자를 수득하였다. 단량체 A β 를 PBS(5 mM)(pH 약 6.8) 중에 재현탁시켜 A β 를 단량체 형태로 유지시켰다.

[0135] A β 를 올리고머화시키기 위해, 단량체 A β 를 출발 물질로서 사용하고, 33°C에서 12시간 동안 초음파 처리하여 200 μ M로 인큐베이션시켰다. 상기 절차를 거쳐 A β 피브릴보다는 A β 올리고머가 형성되었다.

[0136] 올리고머 특징 규명

[0137] 현탁액 중 입자의 크기 분포 프로파일을 측정하는 데 사용될 수 있는 주지의 기법인 동적 광 산란법(DLS: dynamic light scattering)에 의해 올리고머의 크기에 대해 특징을 규명하였다. 광원이 레이저이고, 단색성이고 간섭성일 경우, 시간 의존성의 산란 강도 변동에 관하여 관찰하였다. 이러한 변동은 브라운 운동을 하는 용액 중의 소형 분자의 결과이며, 따라서, 용액 중 산란체 사이의 거리는 시간 경과에 따라 끊임없이 바뀐다. 빛이 소형 입자를 강타하면, 빛은 모든 방향으로 산란하게 되는데, 이것이 레일리 산란(Rayleigh scattering)으로 알려져 있다. 이어서, 주변 입자에 의해 그의 강도 변동 내에서 상기 산란된 빛의 보강 또는 상쇄 간섭 현상이 일어나게 되며, 산란체 이동의 시간 척도에 관한 정보를 포함한다. DLS를 사용하여 용액 중 A β 시료의 크기 분포를 측정하고, A β 가 단량체 또는 올리고머 형태인지 여부를 확인하였다.

[0138] 도 1은 DLS를 사용하여 분석된 A β 시료가 단량체 A β 라는 것을 도시하는 것이다. 상업적으로 이용가능한 A β (1-40)(50 μ M)을 10°C하에 5 mM PBS 중에서 인큐베이션시켰다. 수화 직경(Rh: hydration radius)이 1 nm 미만인 것으로 계산되었다. 이러한 결과는 당업자에게는 단량체 A β 의 전형인 것으로 알려져 있는, 단량체 A β 의 Rh 예측치가 약 1 nm 미만이라는 것과 일치한다.

[0139] 도 2는 DLS를 사용하여 분석된 A β 시료가 올리고머 A β 라는 것을 도시하는 것이다. 상업적으로 이용가능한 A β (1-40)(80 μ M)을 10°C하에 150 mM PBS 중에서 인큐베이션시켰다. 결과는 준 단분산 군집을 나타낸다. 수화 직경(Rh)은 200 nm인 것으로 계산되었다. 본 결과는 당업자에게는 올리고머 A β 의 전형인 것으로 알려져 있는, 올리고머 A β 의 Rh 예측치가 약 100 nm-200 nm이라는 것과 일치한다.

[0140] 도 3은 DLS를 사용하여 분석된 A β 시료가 올리고머 A β 라는 것을 도시하는 것이다. 상업적으로 이용가능한 A β (1-40)(50 μ M)을 10°C하에 150 mM PBS 중에서 인큐베이션시켰다. 결과는 준 단분산 군집을 나타낸다. 수화 직경(Rh)은 190 nm인 것으로 계산되었다. 본 결과는 올리고머 A β 의 전형적인 Rh와 일치한다.

[0141] **실시예 2: 입체형태적으로 구속된 에피토프를 포함하는 환형 펩티드 생산**

[0142] 본 펩티드의 N 및 C 말단에 위치하는 시스테인 잔기 간의 디설피드 결합을 사용하여 신규한 입체형태적 에피토프를 포함하는 환형 펩티드를 구속된 루프 구조로 구성하였다. C 말단에 하나 및 N 말단에 하나씩 하여 2개의 비천연 시스테인을 GSNKG 서열에 부가하였다. 디설피드 브릿지를 형성할 수 있도록 조절된 조건하에서 2개의 시스테인을 산화시켰다.

[0143] 신규한 입체형태적 에피토프를 포함하는 A β 올리고머 중 너클 영역의 "너클" 구조와 배향을 모방하도록 환형 펩티드의 구조를 구성하였다.

[0144] 도 4는 신규한 입체형태적 SNK 에피토프를 포함하는 디설피드 폐환화된 펩티드의 3차원 모델을 도시한 것이다.

[0145] 구속된 에피토프를 형성하는 다른 방법도 당 분야에 공지되어 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 펩티드의 두 잔기 간에 결합을 형성하여 폐쇄 루프로 만듦으로써 펩티드를 폐환화시킬 수 있다. 환형 펩티드는 (모든 결합이 펩티드 결합일 경우) 호모데틱으로서, 또는 (환형 펩티드 내에 펩티드 결합, 및 다른 유형의 결합, 예를 들어, 에스테르 결합, 에테르 결합, 아마이드 결합 또는 디설피드 결합, 둘 모두가 존재하는 경우) 헤테로데틱으로서 기술될 수 있다. 펩티드는 화학적 방법 또는 효소적 방법을 사용하여 폐환화될 수 있다. 미국 특허 공개 번호 2009/0215172에는 펩티드 서열과는 독립적인 방식으로 아마이드 결합을 통해 이루어지는 머리와 꼬리를 연결하는 방식의(head to tail) 펩티드 폐환화를 촉진시키는 재조합 단백질이 기술되어 있다. 관심의 대상이 되는 펩티드 주변의 프리펩티드 중의 인식 서열이 폐환화를 지시한다. 문헌 [Bourne et al. (Methods in Molecular Biology, 2005 298:151-166)]에는 선별 방법과 안전 캐치 링커를 사용함으로써 환형 펩티드를 제조하는 조합형 방법이 기술되어 있다. 미국 특허 공개 번호 2004/0014100에는 환형 펩티드의 생체내 생산 방법이 개시되어 있다. 미국 특허 공개 번호 2010/0240865, 미국 특허 공개 번호 2010/0137559, 및 미국 특허 7,569,541에는 펩티드를 폐환화시키는 각종 방법이 기술되어 있는데, 예를 들어, 펩티드는 N 말단 또는 C 말단, 펩티드 내부에서 티올 또는 머캡탄 함유 잔기의 산화를 통해 폐환화될 수 있다. 티올 함유 잔기의 예로는 시스테인, 호모시스테인, 페닐알라민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 티올 함유 잔기는 시스테인이고; 일부 실

시양태에서, 제1 및 제2 티올 함유 잔기, 둘 모두 시스테인이다. 펩티드내의 두 티올 함유 잔기는 산화를 통해 디설피드 결합에 의해 연결된 이량체 아미노산 시스테인을 형성할 수 있다. 상기와 같은 티올-디설피드 전환을 달성하는 데 다양한 산화제, 예를 들어, 산소(기체), 디메틸 술폭시드, 산화된 글루타티온, 페리시안산칼륨, 탈륨(III) 트피플루오로아세테이트가 사용될 수 있거나, 또는 예를 들어, 다른 산화제도 당업자에게 공지되어 있을 수 있으며, 당업자에게 공지된 바와 같이 그러한 방법과 함께 사용될 수 있다. 그러한 방법의 예는 (PCT 공개 공보 WO01/92466, 및 문헌 [Andreu et al., 1994. Methods in Molecular Biology 35:91-169])에 기술되어 있다.

[0146] **실시예 3: Aβ 올리고머 특이 단일클론 항체의 유도 및 스크리닝**

[0147] 실시예 2에 기술된 바와 같이 본 펩티드의 N 및 C 말단에서 시스테인 간의 디설피드 결합을 사용하여 루프 입체 형태로 구속된 에피토프에 대한 항체를 생산함으로써 Aβ 올리고머 특이 입체형태적 에피토프(서열 번호: 1)에 대한 단일클론 항체(mAb)를 생성하였다.

[0148] PrP 및 SOD1 미스폴딩 특이 에피토프에 대한 것으로서 사용되어 온 다중 항원 펩티드(MAP: multiple antigen peptide) 또는 키홀 림펫 헤모사이아닌(KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin)에 연결된 신규의 구속된 루프 에피토프(CLE: constrained loop epitope)(본원에서는 GSNKG-CLE로 지칭된다)를 사용하여 BALB/C 마우스를 면역화시켰다(문헌 ([Paramithiotis et al. 2003]; [Rakhit et al. 2007])). 소 혈청 알부민(BSA: bovine serum albumin)에 연결된 GSNKG-CLE 상에서 마우스 혈청을 스크리닝하고, 비구조형의 가용성 Aβ가 아닌 GSNKG-CLE와 특이적이고 강력한 상호작용을 하는 마우스에서 비장 융합 및 하이브리도마 스크리닝을 수행하였다. 양성 선별된 IG를 분비하는 클론을 대규모로 생산한 후, 환형 및 선형 GSNKG-BSA, 합성 Aβ 올리고머 및 AD 뇌로부터 유래된 Aβ 올리고머를 사용하여 면역학적 방법에 의해 특징을 규명하였다.

[0149] 환형 GSNKG 펩티드에 대한 단일클론 항체(mAb)를 생성하고, 펩티드 ELISA에 의해서 결합에 대해 사전 스크리닝을 실시하였다. GSNKG 환형 펩티드에 대해 생성된 일부 항체는 우선적으로 환형 펩티드를, 일부는 선형 펩티드를, 및 일부는 환형 및 선형 펩티드, 둘 모두를 인식하였다. 선형 및 환형 펩티드, 둘 모두를 인식할 수 있는 항체의 능력은 생체내에서 시스테인 브릿지의 환원에 의해 부분적으로 또는 완전하게 선형화된 환형 펩티드의 면역 인식과 관련이 있을 수 있다. 중간 GSNKG 펩티드에 대해 생성된 항체는 환형 및 선형 펩티드, 둘 모두를 인식하는 항체를 나타낸다. ELISA 결과에 기초하여, 추가 분석을 위해 2개의 환형 특이 항체(5D8, 5E3), 2개의 선형 특이 IgG 클론(3F5, 3G2), 및 2개의 중간 특이 IgG 클론(4D11, 4D12)을 선택하였다. 표지할 필요없이 실시 간으로 생체분자의 상호작용을 모니터링하기 위해 표면 플라즈몬 공명의 광학적 현상을 이용하는 기술인 비아코어™ 플랫폼을 추가 분석을 위해 사용하였다.

[0150] 도 5는 예시적인 비아코어™ 결과를 도시한 것이다. CM5 센서칩 상에 공유적으로 고정화된 래빗 항마우스 Fc 특이(RAMFc: rabbit anti-mouse Fc-specific) 항체를 사용하여 단일클론 항체를 조직 배양물 상청액으로부터 포획하였다. 이어서, BSA에 접합된 GSNKG 펩티드(선형 및 환형) 및 올리고머 Aβ(1-42)의 결합은 이들 피분석물을 포획된 mAb 상에 유도시킴으로써 조사하였다. 결합 반응은, 고정화된 RAMFc는 함유하지만 포획된 mAb는 함유하지 않는 유세포, 및 추가로 1 mg/ml 카르복시메틸 텍스트란을 함유하는 Hepes 완충처리된 염수(HBS: Hepes Buffered Saline)로 구성된 시료 희석제로 공백화된 유세포를 참조로 하였다. 추가로, 상이한 mAb 간의 정확한 비교를 위해 관찰된 반응을 mAb 포획량에 대해 정규화하였다.

[0151] 도 6 및 도 7은 비아코어™ 센서그램 결과를 도시한 것이며, 이는 비아코어 칩 상의 선형 또는 환형 BSA 커플링된 펩티드 어느 것에도 결합하지 않은, ELISA 선별된 선형 선호 클론(3F5, 3G2); 비아코어 칩 상의 환형 및 선형 펩티드, 둘 모두에 결합한, ELISA 선별된 중간 클론(4D11, 4D12); 및 주로 비아코어 칩 상의 환형 커플링된 BSA에 결합한, ELISA 선별된 환형 클론(5D8, 5E3)이 제시되어 있다. 환형 클론 5E3 및 5D8은 Aβ(1-42) 올리고머 및 환형 펩티드에 대해 가장 강력한 결합을 보인 반면, 이는 또한 중간 클론과 비교하여 선형 펩티드에는 거의 결합하지 않거나 전혀 결합하지 않는 결과를 보였다. 데이터는 비록 5E3 및 5D8, 둘 모두 환형 펩티드에 결합하기는 하였지만, 5E3 항체가 Aβ(1-42) 올리고머에 대해 가장 큰 결합을 한다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 실시예 2의 환형 펩티드를 사용하여 생산된 항체에 관한 스크리닝에서 환형 특이 항체의 서브세트가 Aβ 올리고머 에피토프에 대해 우선적인 항체 인식을 한다는 것을 시사한다.

[0152] 도 8은 환형 선호 클론인 mAb 5E3이 농도에 의존하는 방식으로 Aβ(1-42) 올리고머에 결합하였다는 것을 보여준다. 이러한 관찰 결과는 Aβ 올리고머 중의 적정이 가능한 것으로서, 접근가능하고 입체형태적으로 구속된 에피토프를 입증하며, 이는 진정한 면역성 항원-항체 상호작용과 일치한다. 따라서, 비아코어 분석을 통해 환형-GSNKG 펩티드와 전장의 올리고머 Aβ(1-42)가 입체형태적으로 고감도인 mAb 5E3에 의해 특이적으로 인식되는 공

통된 분자 시그너처인 입체형태적으로 구속된 에피토프를 공유한다는 것이 입증되었다.

[0153] AD의 세포 및 동물 모델에서의 치료학적 목적에 대해, 및 A β 올리고머에 의해 손상된 시냅스 기능에 대한 신경 생리학적 검정에서의 중화 활성화에 대해 A β (1-42) 올리고머 특이 mAb를 추가로 테스트하였다.

[0154] **실시예 4: 유세포 측정 분석**

[0155] 세포 표면에 있는 APP에의 항체 결합 정도를 측정하기 위해 유세포 측정 분석을 수행하였다.

[0156] 이산화탄소 챔버에서 건강한 블랙/6 마우스 성체를 안락사시켰다. 즉시 뇌를 제거하고, 포스페이트 완충처리된 염수(PBS: phosphate buffered saline)를 관류시킨 후, PBS + 1% 우태아 혈청(FBS: fetal bovine serum) 중에 침지시켰다. 해부용 가위를 사용하여 뇌를 잘게 다지고, 100 μ m 및 70 μ m 체를 통해 연속하여 계대 접종함으로써 단일 세포 현탁액을 생성하였다. 차단 단계로서 세포를 PBS +1% FBS 중에서 실온하에 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 각각 따로 10 μ g/mL 또는 1 μ g/mL의 6E10 및 5E3을 함유하는 100 μ l PBS + 1% FBS 중에서 세포를 인큐베이션시켰다(또는 인큐베이션시키지 않았다). 실온에서 1 h 후, 세포를 (5 min 동안 400xg로) 2회에 걸쳐 세척하고, PBS + 1% FBS 중에 재현탁시키고, 항마우스 항체를 알로피코시아닌(APC) 또는 플루오레세인(FITC)에 접합시켰다(이 둘 모두 1:1,000으로 희석). 비염색된 대조군 이외에, 일부 세포는 비특이 상호작용에 대해 제어하기 위해 오직 2차 항체하고만 단독으로 인큐베이션시켰다. 2차 항체를 시료와 함께 실온에서 30 min 동안 인큐베이션시킨 후, 세포를 세척하고, 즉시 분석하거나, 또는 4°C하에 밤새도록 4% 파라포름알데히드 중에서 고정시켰다. BD LSRII 플로우 사이토미터(BD LSRII Flow Cytometer)를 사용하여 데이터를 수집하고, 플로우조(FlowJo)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0157] **도 9 및 도 10**은 유세포 측정 분석 결과를 도시한 것이다. 도 9는 표지된 6E10 pan-A β 항체 및 2차 항체 음성 대조군이 세포 표면에 위치하는 APP에 결합한 것인 세포를 비교한 결과를 보여주는 유세포 측정 트레이스이다. 도 10은 표지된 5E3 항체 및 2차 항체 음성 대조군이 세포 표면에 위치하는 APP에 결합한 것인 세포를 비교한 결과를 보여준다. 도 9에 제시된 6E10 항체는 FITC 표지된 6E10이 세포 표면에 위치하는 APP에 결합하는 것인 세포의 비가 상당히 크다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 도 10에 제시된 5E3 항체는 대조군과 비교하여 FITC 표지된 5E3의 세포에의 결합이 거의 없었다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 FITC 표지된 5E3이 FITC 표지된 6E10과 비교하였을 때, 세포 표면에 위치하는 APP에 유의적으로 더 적게 결합하였다는 것을 명확하게 나타낸다. 이러한 분석 결과는 구조적으로 구속된 올리고머 특이의 신규한 입체형태적 에피토프가 천연의 APP 중 GSNKG 모티프의 선형의 비구조화된 성질과 연관되는 뉴런의 세포 표면에는 존재하지 않는다는 것을 시사한다. 세포 표면에 구조적으로 구속된 신규한 입체형태적 에피토프가 존재하지 않는다는 것은 알츠하이머병 치료에 사용되는 환형 에피토프에 대한 면역 반응은 천연 APP를 표적화하지 않는다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 올리고머 A β 의 환형-GSNKG 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체가 공지된 6E10 항체와 비교하였을 때 바람직한 안전성 프로파일을 가지고 있다는 것을 입증하는 것이다.

[0158] **실시예 5: 신경 세포 분석**

[0159] 상이한 농도의 5E3 항체의 존재하에, 및 그의 부재하에 모의(배지만 단독) 대조군, 가용성(선형), 및 올리고머 A β 1-40과 함께 인큐베이션된 세포에 대한 세포 생존 정도를 측정하기 위하여 신경 세포 독성 분석을 수행하였다. 모의 대조군은 배지만 단독으로 하여 처리하였다(항체 없음).

[0160] 웰당 10,000개의 래트 1차 뉴런을 함유하는 96 웰을 96 웰 플레이트의 폴라-L-리신(ScienCell #0403; 2 μ g/cm², 1 hr, 37°C, PBS로 3회 세척)으로 처리된 웰 중에서 성장시켰는데, 각 웰은 0.2ml 신경 세포 배지(ScienCell #1521)를 포함하였다. 7일 동안 매일 배양 배지를 교체하였다. 실온하에 회전식 장치에서 신경 세포 배지 중 상이한 농도의 5E3 항체의 존재하에, 및 그의 부재하에 가용성 및 올리고머 A β (1-40)를 4시간 동안 인큐베이션시켰다(도 11 참조). 배지를 제거한 후, 0.2 ml의 상기 혼합물을 뉴런에 첨가하였다. 24 hr 경과 후, 로슈 셀 프롤리퍼레이션 키트 II(Roche Cell Proliferation kit II)(#11465015001)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 세포 생존을 측정하였다. 플레이트 판독기를 사용하여 광학 밀도를 측정하였다.

[0161] **도 11**은 신경 세포 독성 검정 결과를 도시한 것이다. 선형 A β 단량체 구조 및 올리고머 A β 구조, 2가지 A β 모두 뉴런에 대해 독성을 띤다. 입체형태적으로 구속된 A β 에피토프에 대한 항체 5E3이 올리고머 형태의 A β 에 대해 방어적인 것으로 나타났다. 항체 5E3은 선형 A β 에 대해서는 방어적인 것으로 보이지 않았다. 이러한 결과가 항체 5E3 결합의 입체형태적 특이성을 입증한다.

[0162] **실시예 6: 면역블롯 분석**

- [0163] APP, 단량체 A β 및 올리고머 A β 에의 6E10 항체 및 5E3 항체의 상대적인 결합을 특정하기 위해 면역블롯 분석을 수행하였다.
- [0164] 균질화
- [0165] 뇌 조직 시료의 중량을 측정한 후, 일정 부피의 (5 mM 에틸렌 글리콜 테트라아세트산 (EGTA), 5 mM EDTA 및 프로테아제 억제제 카테일로 보충된) 새 빙냉 TBS 중에 침지시켜 뇌 조직의 최종 농도가 20%가 되도록 만들었다. 하기와 같이 기계식 균질화기를 사용하여 상기 완충액 중에서 조직을 균질화시켰다: 조직을 30 sec씩 3회에 걸쳐 균질화기로 처리하였는데, 매 균질화 사이에 30 sec 동안 얼음상에 놓았다. 이어서, TBS로 균질화된 시료를 초원심분리시켰다(90 min 동안 70,000g). 상청액을 수집하고, -80°C에서 보관하였다.
- [0166] BCA 단백질 검정법을 사용하여 TBS 균질액의 단백질 농도를 측정하였다. 일부 경우에는, 트리스-트리신 샘플 버퍼(Tris-Tricine Sample Buffer)(Invitrogen) 중에서 비등시킨 후, 트리스-트리신 4-20% 겔을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 동량의 단백질을 분획화하고, 0.2 μ m 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막으로 옮겼다. 옮겨 놓은 후, 막을 PBS 중에 침지시키고, 매회 에피토프 열 회수를 위해 3 min 동안 2회에 걸쳐 비등시켰다. 1차 항체로서 6E10 또는 올리고머 특이 항체 5E3을 사용하여 막을 면역블롯팅시켰다. 2가지 모두 1 μ g/ml의 농도로 사용하였다.
- [0167] 도 12는 TBS 중에서 균질화되고, 트리스-트리신 겔 중에서 분획화되고, pan-A β 6E10 항체를 사용하여 면역블롯팅된 뇌 조직을 보여주는 면역블롯의 결과를 도시한 것이다. APP와의, 그리고 단량체 형태의 A β 와의 반응이 분명히 드러났고, 이뿐만 아니라, A β 올리고머 밴드와의 작은 반응성도 드러났다.
- [0168] 도 13은 항체 5E3에 대한 면역블롯의 결과를 도시한 것이다. 항체 5E3은 외관상 SDS 안정성인 약 45-55 kDa의 올리고머 종을 특이적으로 인식하였는데, 이는 올리고머 종 중에서의 A β 단량체들의 강한 비공유적 상호작용을 나타낸다. 블롯 막 상에서의 변성 및 부분적인 천연 및 비천연 복원과 연관이 있는 것으로 간주되는, 상기 면역블롯 상에서 APP와의 일부 제한적인 반응성이 보이기는 했지만, 단량체 형태의 A β 와의 반응은 관찰되지 않았다. pan-A β 항체 6E10은 올리고머 종에 대해 제한적인 인식을 나타내거나, 또는 어떤 인식도 나타내지 않았다. (비아코어™ 실험식에 기초하고, 5E3과 AB42 사이의 화학량론 값이 1이라고 가정할 때) 실시예 3에서 논의된 비아코어™ 데이터는 면역블롯과 일치하며, 이는 5E3에 결합하는 A β (1-42) 종은 데카머와 트리데카머 사이의 것임을 시사하고; 단량체 1개당 분자량이 4.0-4.3 kDa이라고 가정할 때, 비아코어 데이터를 통해 올리고머 종은 ~50 kDa이라고 예측할 수 있고, 이는 5E3 mAb에 의해 검출된 주요 밴드의 분자량과 일치하였다.
- [0169] **실시예 7: A β 올리고머 형성 억제 분석**
- [0170] 5E3 항체의 A β 올리고머 전파의 지연을 유도할 수 있는 능력을 측정하기 위해 A β 억제 분석을 수행하였다.
- [0171] 정적 광 산란법(SLS: static light scattering)은 중합체 또는 단백질과 같은 거대분자의 평균 분자량(Mw: molecular weight)을 측정하기 위해 산란광의 강도를 측정하는 물리화학적 기법이다. 다각도에서 산란 강도를 측정함으로써 회전 반경(Rg: radius of gyration)이라고도 명명되는 제곱 평균 제곱근의 반지름을 계산할 수 있었다. 다양한 농도의 시료 다수에 대한 산란 강도를 측정함으로써 2차 비리얼 계수 A2를 계산할 수 있었다. 정적 광 산란 실험을 위해, 거대분자를 함유하는 용액 중에서 고강도 단색광, 보통은 레이저를 발사하였다. 하나 또는 여러 검출기를 사용하여 주어진 파장(λ)에서 하나 또는 여러 각도(θ)로 산란 강도를 측정하였다.
- [0172] 보정없이 직접 광 산란 강도로부터 중량 평균 분자량을 측정하기 위해서는 레이저 강도, 검출기의 양자 효율 및 전체 산란 부피 및 검출기의 입체각은 알고 있어야 했다. 이는 실현불가능하기 때문에, 절대 광 산란 장치를 사용하여 톨루엔 대 소수의 다른 용매의 레일리 비가 측정되는 바, 모든 시판용 장치는 톨루엔과 같이 강한 공지의 산란체를 사용하여 보정하였다.
- [0173] 도 14는 단량체 A β 의 독성 올리고머 A β 형태로의 응집을 지연시킬 수 있는 5E3 항체의 능력을 도시한 것이다. 항체 5E3의 부재(도 14에서 "C")하에 또는 항체 5E3의 존재하에(도 14에서 "5E3") A β 올리고머 형성을 테스트 하였다. 상업적으로 입수한 A β (1-40)(23 μ M)를 항체 5E3(2.0 mM)과 함께 150 μ l의 반응 부피로 39°C에서 인큐베이션시켰다. 화살표로 표시된 SLS 강도 시프트는 5E3 항체가 산란 강도에 기여한 것에 상응하는 것이다. 도 14는 항체 5E3과 함께 인큐베이션시킨 결과, A β 올리고머 형성이 유의적으로 지연되었다는 결과를 도시하는 것이다.
- [0174] 중합화에 대한 이와 같은 억제 효과는 예를 들어, 백신 조성물 중에서 항체 5E3, 그와 관련된 인간화된 항체 및 키메라 항체, 및 신규한 입체형태의 에피토프 그 자체의 치료학적 역할을 지지한다.

[0175] **실시예 8: 생물학적 시료 중 A β 올리고머 검출**

[0176] 정제된 5E3 항체가 생물학적 시료, 예를 들어, 뇌를 비롯한 조직으로부터의 균질액 중 A β 올리고머를 검출하는 데 사용될 수 있다고 예상된다. 이러한 검출은 비아코어™ 플랫폼을 비롯한 다양한 검출 플랫폼을 사용하여 수행될 수 있고, 이는 진단 및/또는 예후적 가치를 가질 수 있다.

[0177] **실시예 9: 5E3 및 관련된 항체 & 백신을 사용한 치료**

[0178] 5E3 항체를 사용하는 치료법이 특이적으로 및/또는 선택적으로 독성 A β 올리고머를 제거할 수 있는 역할을 할 수 있고, A β 올리고머 독성과 관련된 질환, 예를 들어, 알츠하이머병의 발병 또는 진행을 치료 및/또는 예방하는 데 유용할 수 있다. 5E3의 것과 같은 에피토프에 대해 유도되는 인간 항체 또는 인간화된 항체가 알츠하이머병을 치료 및/또는 예방하는 데 유용할 것이다. 또 다른 측면에서, 5E3에 의해 인식되는 상기 에피토프와 중복되는 에피토프가 알츠하이머병을 치료 및/또는 예방하는 데 유용할 것이다.

[0179] 유사하게, 본원에 기술된 신규한 입체형태적 에피토프는 A β 올리고머에 대한 특이적인 면역 반응을 유도하는 데 유용할 수 있고, 이는 예를 들어, 알츠하이머병의 치료 또는 예방에도 유용할 것이다.

[0180] 상기 기술된 실시양태는 단지 예시적인 것이다. 본원에 첨부된 특허청구범위에 의해서만 정의되는 것인 본 범주로부터 벗어남 없이 당업자는 특정 실시양태를 변경, 수정, 및 변형시킬 수 있다.

[0181] **참조 문헌:**

- [0182] Gelinas, D.S., et al., Immunotherapy for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101 Suppl 2: p. 14657-62.
- Robinson, S.R., et al., Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. Neurobiol Aging, 2004. 25(5): p. 609-15.
- Broytman, O. and J.S. Malter, Anti-A β : The good, the bad, and the unforeseen. J Neurosci Res, 2004. 75(3): p. 301-6.
- Mathews, P.M. and R.A. Nixon, Setback for an Alzheimer's disease vaccine: lessons learned. Neurology, 2003. 61(1): p. 7-8.
- Goni, F. and E.M. Sigurdsson, New directions towards safer and effective vaccines for Alzheimer's disease. Curr Opin Mol Ther, 2005. 7(1): p. 17-23.

Jung, S.S., J. Nalbantoglu, and N.R. Cashman, Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res*, 1996. 46(3): p. 336-48.

Jung, S.S., S. Gauthier, and N.R. Cashman, Beta-amyloid precursor protein is detectable on monocytes and is increased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1999. 20(3): p. 249-57.

Morimoto, T., et al., Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 1998. 51(2): p. 185-95.

Mileusnic, R., C.L. Lancashire, and S.P. Rose, Amyloid precursor protein: from synaptic plasticity to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1048: p. 149-65.

Mileusnic, R., et al., APP is required during an early phase of memory formation. *Eur J Neurosci*, 2000. 12(12): p. 4487-95.

Lambert, M.P., et al., Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem*, 2007. 100(1): p. 23-35.

Lacor, P.N., et al., Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2007. 27(4): p. 796-807.

Ronick, R., et al., Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? *PLoS One*, 2008. 3(9): p. e3236.

Balducci, C., et al., Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(5): p. 2295-300.

Shankar, G.M., et al., Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 2008. 14(8): p. 837-42.

Selkoe, D.J., Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*, 2008. 192(1): p. 106-13.

Klyubin, I., et al., Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med*, 2005. 11(5): p. 556-61.

Walsh, D.M., et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 535-9.

Wang, H.W., et al., Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*, 2002. 924(2): p. 133-40.

Lesne, S., et al., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 2006. 440(7082): p. 352-7.

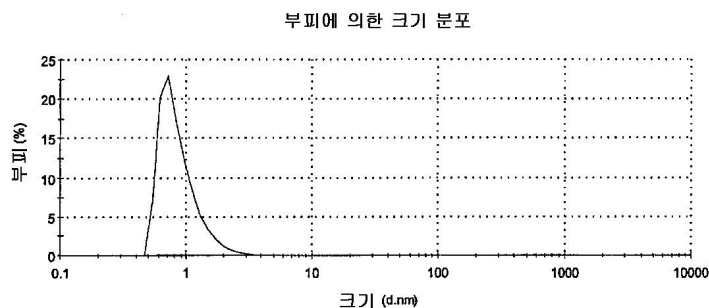
Lauren, J., et al., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 2009. 457(7233): p. 1128-32.

Luhrs, T., et al., 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(48): p. 17342-7.

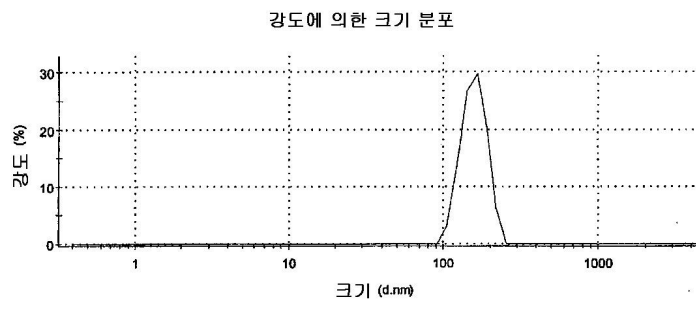
Rauk, A., Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Trans*, 2008(10): p. 1273-82.

도면

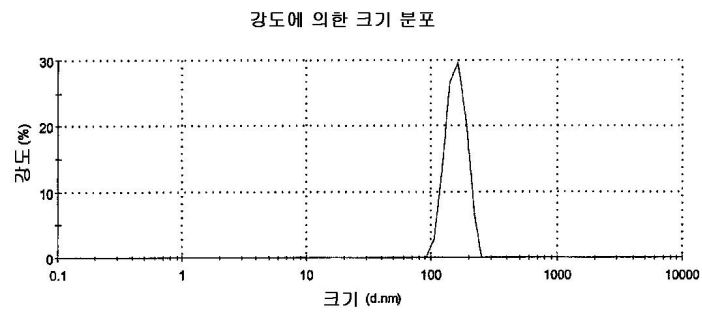
도면1



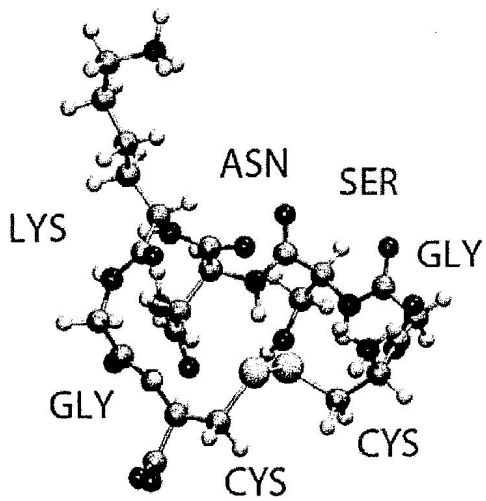
도면2



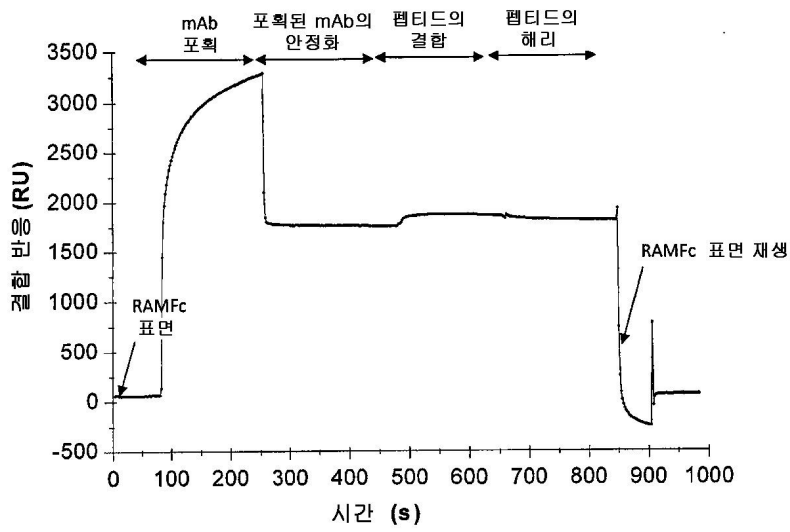
도면3



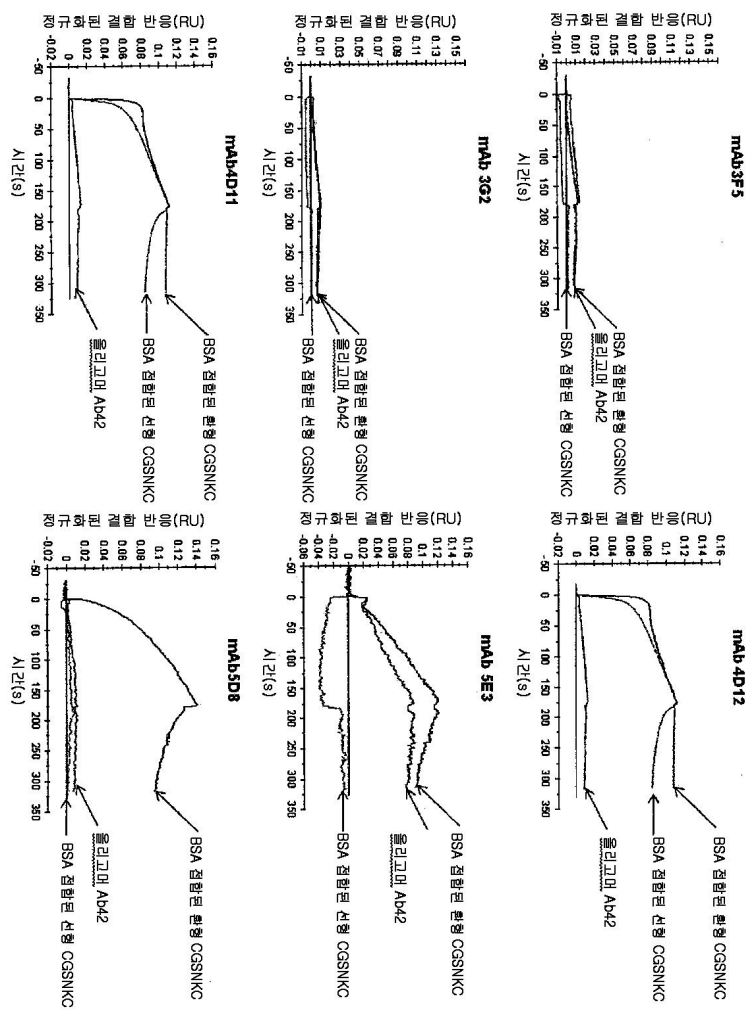
도면4



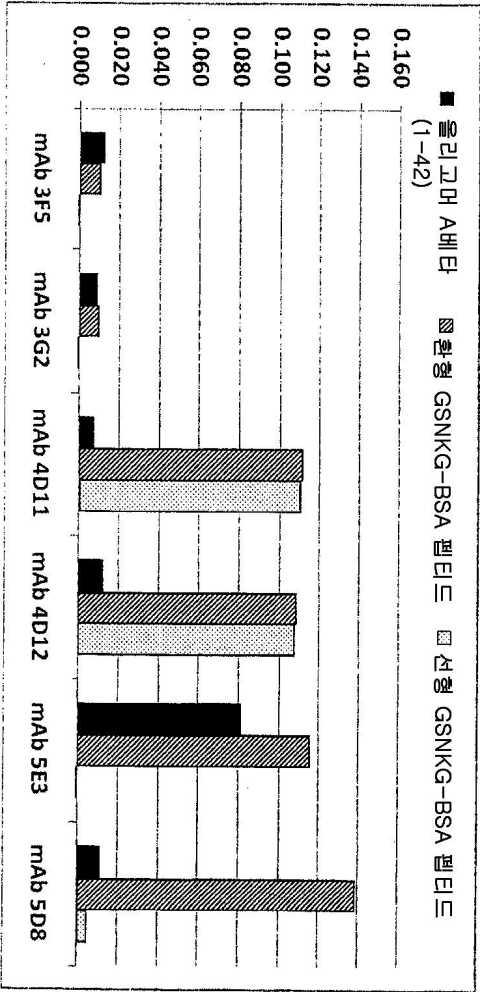
도면5



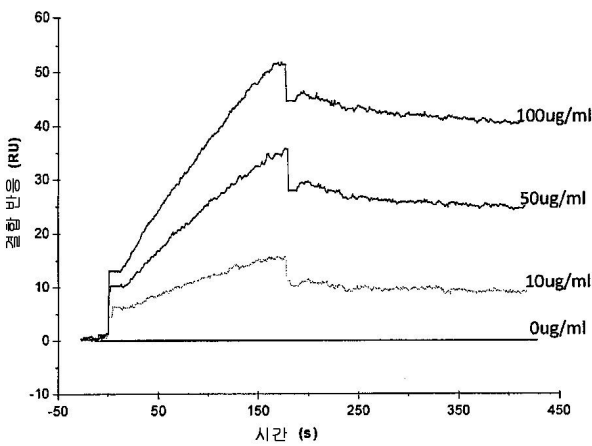
도면6



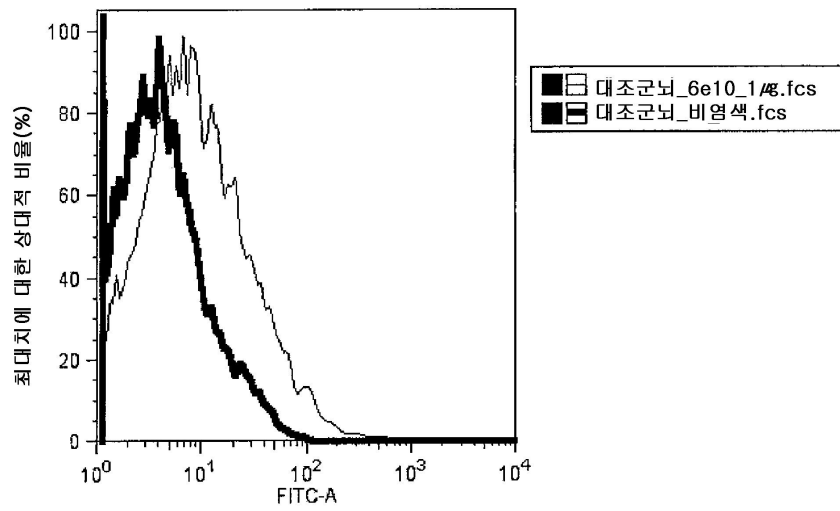
도면7



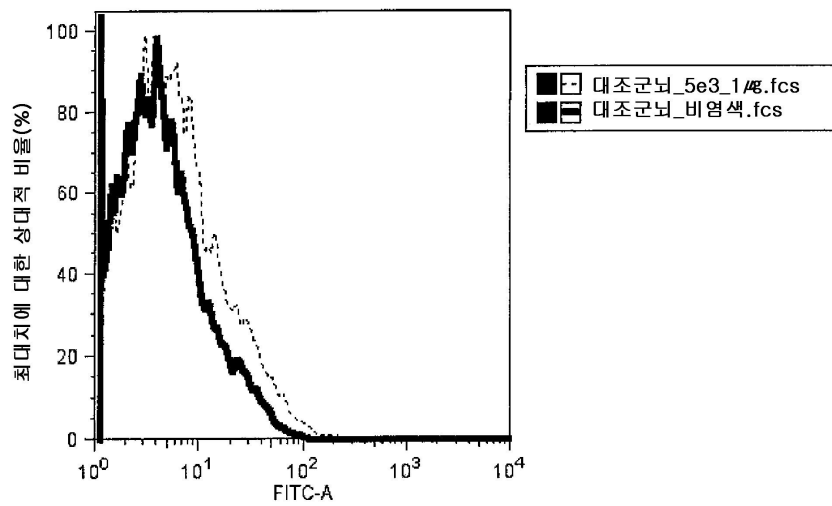
도면8



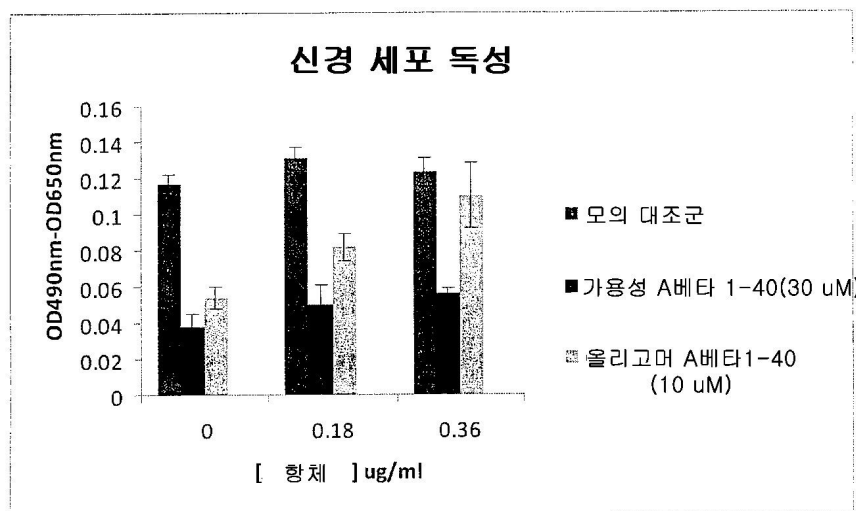
도면9



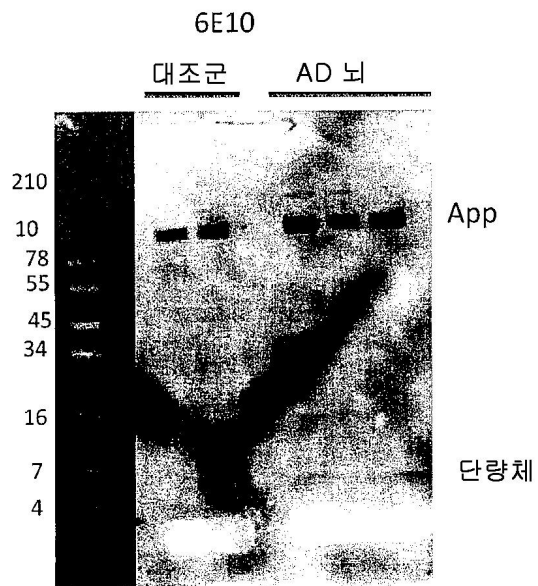
도면10



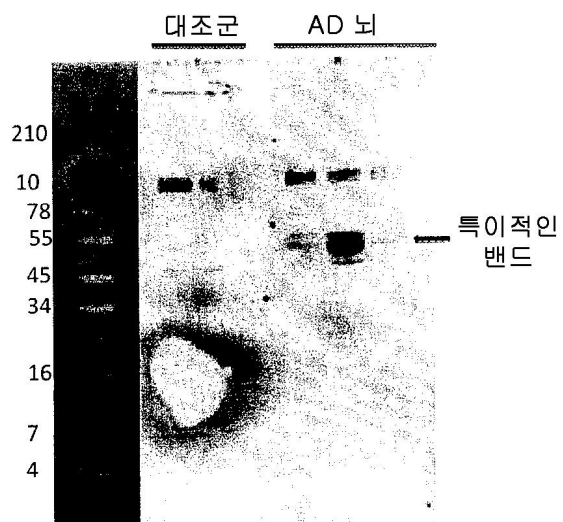
도면11



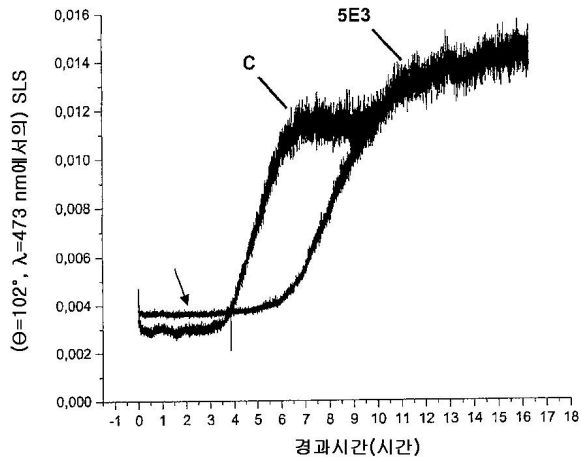
도면12



도면13



도면14



도면15

서열 번호 4

H-IgH1st3prime 489 48 426 0.05

NNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNATAGCCCTTGNNNNGCATCCAGGGTCACCAT
GGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGA
GACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTAGTGAGCCTCGTAATCCATCCTTGCACAGAAATAGACCGCA
GAGTCTCAGAGGTCAATCTGCTGAGCTGCATGTAGGCTGTGCTGGAGGATTTGTCTGCAGTCAGTGTGG
CCTTGCCTTGAATTTCTATTGTAAGTATTAACATTTCCAGGATAAATCCATCCAATCCACTCAAGTCC
CTGTCCAGGCCTGTGTATCACCAGCTGTATATAGTAGCTTGTGAATATGTAGCCAGAAGCCTTGCAAGGATA
TCCTCACTGAAGCCCCAGGCTTACCAGCTCAGGTCCAGACTCCTGCAGCTGCACCTCNAATTNNNNNN
N

서열 번호 5

H-IgH1st5prime 486 16 450 0.05

NNNNNNNTGGNGANCCTGGGGCTTCNGTGAGGANATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATATTCACAAGC
TACTATATACAGTGGGTGATACACAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTATCCTGGAA
ATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAC
AGCCTACATGCAGCTCAGCAGATTGACCTCTGAGGACTCTGCGTCTATTTCTGTGCAAGGATGGATTACG
AGGCTCACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT
CCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTT
CCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTNNNNAACCTTNNN

서열 번호 6

3prime Kappa

NNNNNNNNNNNGTTTATTNNNGCTTGGTGCTCCTCCGAACGTCCGAGGATAATTATGATATTGTAGA
CAGTTGTGCTGCACAATCTTCACTCAAGGGTGCTGATGGGGAGAGAATAATCTGACACCCACCTACT
GCCACTGAGCCTTTTGGGACACCTCAATCTTGAGTGGATGCGGCGTAAATCANGCGTTTAAATAGTTCCGT
CTGGTTTCTGCTGAAGCCAGGTTAAGTAACCACTAATTCCTGACTTGCCCGACGAGTGAGACTGACTCTTT
CTCCCTCAGAGGCAGATAANGAGGATGGANACTGGGTCACTGGATGTCACATCTGGTACCTGGNAACC
NGANNNCAAAAANCAGCAA

서열 번호 7

5prime Kappa

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNGTCNNNTCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAAAGTCCGTCTCAC
TTGTCGGGCAAGTCNAGAAATAGTGCTTACTTAACCTGGCTTCAGCAGAGACCCCATGGAACATTAGAC
GCCCGATCTAACCCCATCCTCTTTAGATTCTGGTGTCCTCAAAAAGGGTCCCTGCCAGGATGTCTGGGTCA
GATTATTCTATCAACATCACCATCCTTGAGTCTGAAGATTATGAAGACGATGCTGTCTACAATATGGTAAT
TATCCTCGGAAGTTCAGTGGAGGCAACGAGCTAGAAATCTAACAGGCTGATGCTGCAACAACTGTATCCA
TCTCCACCATCACACCATCA

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

<120> OLIGOMER-SPECIFIC AMYLOID BETA EPITOPE AND ANTIBODIES

<130> PAT 101373W-90

<140> PCT/CA2011/000238

<141> 2011-03-03

<150> US 61/310,167

<151> 2010-03-03

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide epitope

<400> 1

Gly Ser Asn Lys Gly

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide epitope

<400> 2

Phe Arg His Asp Ser Gly

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide epitope

<400> 3

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

1 5

<210> 4

<211> 489

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> monoclonal antibody 5E3, heavy chain, 3' read

<400> 4

nnnnnnnnnt nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn annatagccc ttgnnngca tcccagggtc	60
accatggagt tagtttgggc agcagatcca ggggccagtg gatagacaga tgggggtgtc	120
gttttggctg aggagactgt gagagtgggtg ccttggcccc agtagtgagc ctcgtaatcc	180
atccttgcac agaaatagac cgcagagtcc tcagaggtca atctgctgag ctgcatgtag	240
gctgtgctgg aggatttgtc tgcagtcagt gtggccttgc ccttgaactt ctcattgtac	300
ttagtattaa catttcagg ataaatccat ccaatccact caagtcctg tccaggcctg	360
tgtatcacc actgtatata gtagcttgtg aatatgtagc cagaagcctt gcaggatc	420
ctcactgaag cccaggtt caccagctca ggtccagact cctgcagctg cacctcnaa	480
ttnnnnnnn	489

<210> 5

<211> 486

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> monoclonal antibody 5E3, heavy chain, 5' read

<400> 5

nnnnnnnnntg gngancctgg ggcttcngtg agganatcct gcaaggcttc tggctacata	60
ttcacaagct actatataca gtgggtgata cacaggcctg gacagggact tgagtggatt	120
ggatggattt atcctggaaa tgttaatact aagtacaatg agaagttcaa gggcaaggcc	180
acactgactg cagacaaatc ctccagcaca gctacatgc agtcagcag attgacctct	240
gaggactctg cggctctattt ctgtgcaagg atggattacg aggtcacta ctggggccaa	300
ggcaccactc tcacagtctc ctacgcaaaa acgacacccc catctgtcta tccactgccc	360
cctggatctg ctgcccacac taactccatg gtgacctgg gatgcctggt caagggtat	420
ttccctgagc cagtgcagct gacctggaac tctggatccc tgtccagcgg tgnnnnaac	480
ctnnnn	486

<210> 6

<211> 373

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> monoclonal antibody 5E3, light chain, 3' read

<400> 6

nnnnnnnnnn ngtttnattn nngcttggtg cctcctccga acgtccgagg ataattatga	60
tattgtagac agttgtgtgc tgcacaatct tctcactcaa ggggtgctgat ggggagagaa	120
taatctgaca cccacctact gccactgagc ctttttggga cacctcaatc ttgagtggat	180
gcggcgtaaa tcangcgttt aatagtccg tctggtttct gctgaagcca ggttaagtaa	240
ccactaatth cctgacttgc ccgacgagtg agactgactc tttctccctc agaggcagat	300
aangaggatg ganactgggt catctggatg tcacatctgg tacctggnaa ccngannnc	360
aaaaaancag caa	373

<210> 7

<211> 374

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> monoclonal antibody 5E3, light chain, 5' read

<400> 7

nnnnnnnnnn nnnnnnnnng ngtcnnntcc tccttatctg cctctctggg agaaaaagtc	60
cgtctcactt gtcgggcaag tcnagaaatt agtgcctact taacctggct tcagcagaga	120
ccccatggaa ctattagacg cccgatctaa ccccatcct ctttagattc tgggtgccca	180
aaaagggtcc ctgccaggat gtctgggtca gattattcta tcaacatcac catccttgag	240
tctgaagatt atgaagacga tgccgtgcta caatatggta attatcctcg gaagttcagt	300
ggaggcaacg agctagaaat ctaacaggct gatgctgcaa caactgtatc catcttccca	360
ccatcacacc atca	374

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide epitope

<400>Cys Gly Ser Asn Lys Gly Cys

1

5

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 14, 8번째 줄

【변경전】

진단 방법

【변경후】

분석하는 방법