



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월07일
(11) 등록번호 10-2776187
(24) 등록일자 2025년02월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/11 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C07K 5/113 (2006.01)
C07K 5/117 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 5/1019 (2013.01)
A61K 39/0007 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7015908
- (22) 출원일자(국제) 2016년11월09일
심사청구일자 2021년09월23일
- (85) 번역문제출일자 2018년06월04일
- (65) 공개번호 10-2018-0088828
- (43) 공개일자 2018년08월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2016/051300
- (87) 국제공개번호 WO 2017/079831
국제공개일자 2017년05월18일
- (30) 우선권주장
62/253,044 2015년11월09일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
W02013071267 A1
W02010002251 A1

- (73) 특허권자
더 유니버시티 오브 브리티쉬 콜롬비아
캐나다, 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 1제트3, 밴쿠버,
애그로노미 로드 넘버103-6190, 유니버시티
인더스트리 리에이중 오피스
- (72) 발명자
캐쉬맨, 닐 알.
캐나다 브이6에스 1업8 브리티쉬 콜롬비아 밴쿠버
웨스트 킹 에드워드 애비뉴 3793
플로트킨, 스티븐 에스.
캐나다 브이5지 1씨3 브리티쉬 콜롬비아 밴쿠버
웨스트 7번 애비뉴 #408-908
- (74) 대리인
특허법인에이아이피

전체 청구항 수 : 총 34 항

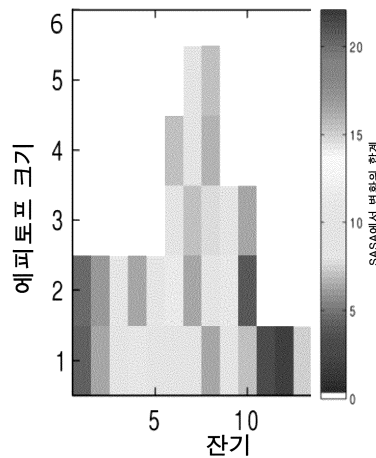
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 아밀로이드 베타에서의 N-말단 에피토프 및 이에 형태적으로-선택적인 항체

(57) 요약

본 개시내용은, 형태적 에피토프를 포함하는, A-베타에서 확인된 N-말단 에피토프, 이에 대한 항체, 및 이에 특이적인 면역원 및 항체의 제조 및 이용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/0008 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 5/1021 (2013.01)
C07K 5/1024 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)
C07K 7/64 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
G01N 2333/4709 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/331,925	2016년05월04일	미국(US)
62/365,634	2016년07월22일	미국(US)
62/393,615	2016년09월12일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

아미노산 서열 HDSG (서열 식별 번호 1)로 이루어진 A-베타 펩티드, 및 GCG의 아미노산 서열로 이루어진 링커로 이루어진 환형 화합물로,

상기 링커가 상기 A-베타 펩티드의 N-말단 잔기 및 상기 A-베타 펩티드 C-말단 잔기에 공유적으로 커플링된, 환형 화합물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 환형 화합물이 검출가능한 표지를 추가로 포함하는, 환형 화합물.

청구항 3

청구항 1의 환형 화합물을 포함하는, 면역원.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 환형 화합물이 소 혈청 알부민 (BSA)에 커플링된, 면역원.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 환형 화합물이 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 커플링된, 면역원.

청구항 6

청구항 1 또는 2의 환형 화합물, 또는 청구항 3 내지 5 중 어느 하나의 항에 따른 면역원을 포함하는, 알츠하이머 질환, 루이체 치매, 봉입체 근염, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 또는 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 리포다당류, 면역 조절제, 황산알루미늄, 사포닌, QS21, 면역자극 복합체, ISCOMATRIX™, 미네랄 오일을 갖는 플루론산 폴리머, 사멸된 마이코박테리아 및 광유, 프로인트 완전한 아주반트, 류라밀 펩티드, 지질 A, 및 리포솜을 포함하는, 아주반트를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 아주반트는 인산알루미늄 또는 수산화알루미늄인, 조성물.

청구항 9

HDSG의 서열로 이루어진 A-베타 펩티드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로, 상기 항체가 청구항 1의 환형 화합물 또는 상기 환형 화합물을 포함하는 면역원을 이용하여 제조된 것이고, 상기 항체가 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역이 상보성 결정 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역이 상보성 결정 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고, 그리고 상기 CDR의 아미노산 서열이 하기 서열을 포함하는, 단리된 항체:

- CDR-H1 GYTFTSYW (서열 식별 번호: 17)
- CDR-H2 IDPSDSQT (서열 식별 번호: 18)
- CDR-H3 SRGGY (서열 식별 번호: 19)
- CDR-L1 QDINNY (서열 식별 번호: 20)
- CDR-L2 YTS (서열 식별 번호: 21)

CDR-L3 LQYDNLWT (서열 식별 번호: 22).

청구항 10

청구항 9에 있어서, 항체가, 청구항 1의 환형 화합물로 제시된 HDSG 펩타이드에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는, 형태 특이적 또는 선택적 항체인, 단리된 항체.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 항체가, 하나 이상의 A-베타 모노머 및 A-베타 피브릴에 비해, A-베타 올리고머에 선택적으로 결합하는, 단리된 항체.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 선택성은 하나 이상의 A-베타 모노머 및 A-베타 피브릴보다 A-베타 올리고머에 대하여 적어도 2 배 더 선택적인, 단리된 항체.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 항체가, 서열 HDSG(서열 식별 번호 1)을 포함하는 선형 펩티드에 특이적 또는 선택적으로 결합하지 않고, 상기 선형 펩티드의 서열은 상기 항체를 제조하는 데 사용된 환형 화합물의 선형 버전(linear version)이고, 선형 펩티드는 서열 식별 번호 2에 나타난 것과 같은 서열을 갖는, 단리된 항체.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 항체는 동일계내 하나 이상의 A-베타 모노머 및 A-베타 피브릴 플라크에 대한 결합이 결여되거나 미소량을 갖는, 단리된 항체.

청구항 15

청구항 9에 있어서, 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체인, 단리된 항체.

청구항 16

청구항 9에 있어서, 항체는 인간화된 항체인, 단리된 항체.

청구항 17

청구항 9에 있어서, 항체는 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, 이량체, 나노바디, 미니바디, 디아바디, 및 이들의 다량체로부터 선택된 항체 결합 단편인, 단리된 항체.

청구항 18

청구항 9에 있어서, 상기 항체가 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체:

서열 식별 번호: 24에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열.

청구항 19

청구항 9에 있어서, 상기 항체가 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체:

서열 식별 번호: 26에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열.

청구항 20

청구항 9에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 아미노산 서열이 서열 식별 번호: 23에서 제시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는, 단리된 항체.

청구항 21

청구항 9에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역 아미노산 서열이 서열 식별 번호: 25에서 제시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는, 단리된 항체.

청구항 22

청구항 9에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역이 서열 식별 번호: 26에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 상기 중쇄 가변 영역이 서열 식별 번호: 24에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 단리된 항체.

청구항 23

청구항 9에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역이 서열 식별 번호: 25에서 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 상기 중쇄 가변 영역이 서열 식별 번호: 23에서 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 단리된 항체.

청구항 24

청구항 9 내지 23 중 어느 한 항에 따른 항체 및 검출가능한 표지를 포함하는, 면역접합체.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 검출가능한 표지가 양전자 방출 방사성핵종을 포함하는, 면역접합체.

청구항 26

청구항 9 내지 23 중 어느 하나의 항에 따른 항체 또는 상기 항체를 포함하는 면역접합체, 및 희석제를 포함하는, 알츠하이머 질환, 루이체 치매, 봉입체 근염, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 또는 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 조성물.

청구항 27

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 환형 화합물 또는 면역원의 단백질성 부분, 청구항 9 내지 23 중 어느 한 항의 항체 또는 상기 항체를 포함하는 단백질성 면역접합체를 암호화하는, 핵산 분자.

청구항 28

청구항 27의 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

청구항 29

청구항 9 내지 23 중 어느 하나의 항의 항체를 발현하는 세포로, 상기 세포는 벡터를 포함하는 하이브리도마인, 세포.

청구항 30

청구항 1 또는 2의 환형 화합물, 청구항 3 내지 5 중 어느 한 항의 면역원, 청구항 9 내지 23 중 어느 한 항의 항체, 상기 항체를 포함하는 면역접합체, 상기 항체 또는 상기 면역접합체를 포함하는 조성물, 상기 환형 화합물, 면역원, 항체 또는 면역접합체의 단백질성 부분을 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산을 포함하는 벡터 또는 상기 항체를 발현하는 세포를 포함하는, 알츠하이머 질환, 루이체 치매, 봉입체 근염, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 또는 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 키트.

청구항 31

서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열로 이루어진, 단리된 펩티드.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 검출가능한 표지를 포함하는, 단리된 펩티드.

청구항 33

청구항 31 또는 32의 단리된 펩티드를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 34

청구항 9 내지 23 중 어느 하나의 항에 따른 항체를 발현하는 하이브리도마.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원

[0002] 이것은 2015년 11월 9일 출원된, 미국 특허출원 시리얼 번호 62/253044; 2016년 5월 4일 출원된, 미국 특허출원 시리얼 번호 62/331,925; 2016년 7월 22일 출원된, 미국 특허출원 시리얼 번호 62/365,634; 및 2016년 9월 12일 출원된, 미국 특허출원 시리얼 번호 62/393,615의 우선권의 이점을 주장하는 PCT 출원이고, 이들 각각은 본

명세서에서 참고로 편입된다.

분야

본 개시내용은 N-말단 아밀로이드 베타 (A-베타 또는 A β) 에피토프 및 이에 항체 그리고 더욱 특이적으로 A-베타 올리고머에서 예를 들어 선택적으로 접근가능한 형태적 A-베타 에피토프, 및 관련된 항체 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

배경

36-43 아미노산 펩티드로서 존재하는, 아밀로이드-베타 (A-베타)는 효소 β 및 γ 세크레타제에 의해 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)로부터 방출된 생성물이다. 알츠하이머병 (AD) 환자에서, A-베타는 가용성 모노머, 불용성 피브릴 및 가용성 올리고머에서 존재할 수 있다. 모노머 형태에서, A-베타는 대개 비구조화된 폴리펩티드 쇠로서 존재한다. 피브릴 형태에서, A-베타는, 종종 균주로 지칭된, 구별되는 형태학으로 응집할 수 있다. 몇 개의 이들 구조는 고체상 NMR에 의해 계측되어 왔다.

예를 들어, 피브릴의 몇 개의 균주용 구조는, 3-배 대칭 A β 구조 (PDB 엔트리, 2M4J); A β -40 모노머의 2-배 대칭 구조 (PDB 엔트리 2LMN), 및 A β -42 모노머의 단일-쇄, 평행한 레지스터내 구조 (PDB 엔트리 2MXU)를 포함하는, 단백질 데이터 뱅크 (PDB), 원자 해상도 3차원 구조적 데이터의 결정학적 데이터베이스에서 이용가능하다.

2M4J의 구조는 Lu 등에서 보고되고 [8], 2MXU의 구조는 Xiao 등에서 보고된다 [9]. 2LMN의 구조는 Petkova 등에서 보고된다 [10].

A-베타 올리고머는, 뇌 슬라이스 배양액 및 살아있는 동물에서, 장기간 강화작용 (LTP)로 지칭된, 메모리를 보조하는 핵심 시냅스 활성을 차단하고 배양액에서 세포주 및 뉴런을 사멸시킨다고 밝혀졌다.

올리고머의 구조는 현재까지 계측되지 않았다. 또한, NMR 및 다른 증거는 올리고머가 단일 명확한 구조로 존재하지 않지만, 제한된 규칙성을 가진 형태적으로-플라스틱, 가단성 구조적 앙상블로 존재한다는 것을 나타낸다. 또한, 독성 올리고머 종의 농도는 (추정치가 다양하지만 1000-배 미만 또는 초과에 있는) 모노머 또는 피브릴의 어느 한쪽의 것에 훨씬 아래여서, 상기 목표를 달성하기 힘들게 한다.

A-베타에 결합하는 항체가 기재되어 있다.

미국 특허 7,780,963 항-ADDL 항체는 A-베타 유래된 확산성 리간드의 다차원 형태를 차별적으로 인식하는 항체에 관한 것이다

미국 특허 9,176,151은 선택적 항-A β 올리고머 항체, 환자의 생물학적 샘플에서 A β 올리고머 검출을 위하여 한 쌍의 항-A β 올리고머 항체를 이용하는 키트 및 면역검정 방법을 기재한다.

항-아밀로이드 베타 항체 및 이의 용도라는 제목의 WO2003070760은 β -A4 펩티드의 2 영역을 특이적으로 인식할 수 있는 항체 분자에 관한 것으로, 여기서 상기 제1 영역은 아미노산 서열 AEFRHDSGY 또는 이들의 단편을 포함하고 여기서 상기 제2 영역은 아미노산 서열 VHHQKLVFFAEDVG 또는 이들의 단편을 포함한다.

인지 개선에서 사용을 위한 인간화된 아밀로이드 베타 항체라는 제목의 WO2006066089는, A β 펩티드에 특이적으로 결합하고 아밀로이드형성 장애 (예를 들면, AD)와 관련된 플라크 부하 감소에 효과적인, 베타 아밀로이드와 관련된 질환의 치료를 위한 개선된 제제 및 방법 그리고 특히 단클론성 항체, 12A11의 확인 및 특성규명에 관한 것이다.

가변 영역에서 당화된 것으로 아밀로이드 베타 4에 대한 항체라는 제목의 WO2007068429는 적어도 1개의 항원 결합 부위가 중쇄 (V_H)의 가변 영역에서 당화된 아스파라긴 (Asn)을 포함하는 것을 특징으로 하는 정제된 항체 분자 제조에 관한 것이다.

Yu 등은 PADRE 또는 독소-유래된 담체 단백질에 융합된 6가 폴딩가능한 A β 1-15 (6A β 15)를 기재한다. Wang 등 2016은 상기 항체의 주변 투여가 알츠하이머병 유사 병리학 그리고 에이징된 알츠하이머 질환의 유전자도입 동물 모델에서 인지력 감퇴를 완화시키는 것을 보고한다 [11], [12].

모노머보다 또는 피브릴보다 또는 양쪽 모노머 및 피브릴보다 A-베타 올리고머에 우선적으로 또는 선택적으로

결합하는 항체가 바람직하다.

발명의 내용

요약

- [0019] **요약**
- [0020] 잔기 HDSG (서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프를 포함하고/하거나 상기로 구성되는 A-베타에서, 에피토프 및 더 상세하게는 형태적 에피토프, 및 상기 에피토프에 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 결합하는 항체는 본 명세서에서 기재된다. 에피토프는 모노머 및/또는 피브릴에서의 것과 올리고머성 종을 식별하는 형태로, A-베타의 올리고머성 종에서 선택적으로 노출될 수 있다.
- [0021] 한 측면은 환형 화합물, 바람직하게는 하기를 포함하는 환형 화합물을 포함한다: A-베타 펩티드 상기 펩티드는 HDS 및 최대 6 A-베타 연속 잔기를 포함함, 그리고 링커, 여기서 상기 링커는 A-베타 펩티드 N-말단 잔기 및 A-베타 C-말단 잔기에 공유적으로 커플링됨.
- [0022] 한 구현예에서, A-베타 펩티드는 서열 식별 번호: 1-16의 어느 하나의 서열로부터 선택되고, 임의로 HDSG (서열 식별 번호: 1), HDSGY (서열 식별 번호: 4), HDSGYE (서열 식별 번호: 11), RHDSGY (서열 식별 번호: 13), RHDSG (서열 식별 번호: 5), RHDS (서열 식별 번호: 6) 및 DSGY (서열 식별 번호: 14)로부터 선택된다.
- [0023] 또 다른 구현예에서, 환형 화합물은 환형 펩티드이다.
- [0024] 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 환형 화합물은 하기를 포함한다: i) 상응하는 선형 화합물의 맥락에서 D 또는 S에 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 또는 적어도 30%의 화합물에서 D 및/또는 S의 곡률 증가; ii) H, D 및 S로부터 선택된 적어도 1개의 잔기로서, 상기 잔기의 적어도 1개의 이면 각은 상응하는 선형 화합물의 맥락에서 상응하는 이면 각에 비교하여 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도, 적어도 60 도, 적어도 70 도, 또는 적어도 80 도만큼 상이한, 잔기; iii) 상응하는 선형 화합물의 맥락에서 상응하는 이면 각에 비교하여 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도, 적어도 60 도, 적어도 70 도 또는 적어도 80 도만큼 상이한 D에서 O-C-C α -C β 이면 각; 및/또는 iv) 상응하는 선형 화합물에 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40% 더 제한되는 엔트로피에 의해 측정된 경우 H 및/또는 D에 대한 형태.
- [0025] 또 다른 구현예에서, A-베타 펩티드는 HDSG (서열 식별 번호: 1), HDSGY (서열 식별 번호: 4) 및 RHDSG (서열 식별 번호: 5)로부터 선택된다.
- [0026] 또 다른 구현예에서, 화합물은 추가로 검출가능한 표지를 포함한다.
- [0027] 또 다른 구현예에서, 링커는 1-8 아미노산 및/또는 동등하게 기능하는 분자 및/또는 하나 이상의 기능화가능한 모이어티를 포함하거나 상기로 구성된다.
- [0028] 또 다른 구현예에서, 링커 아미노산은 A 및 G로부터 선택되고/되거나, 여기서 상기 기능화가능한 모이어티는 C이다.
- [0029] 또 다른 구현예에서, 링커는 아미노산 GCG 또는 CGC를 포함하거나 상기로 구성된다.
- [0030] 또 다른 구현예에서, 링커는 PEG 분자를 포함한다.
- [0031] 또 다른 구현예에서, 환형 화합물은 도 11B에서 보여준 구조로부터 선택된다.
- [0032] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 환형 화합물을 포함하는 면역원을 포함한다.
- [0033] 한 구현예에서, 화합물은 담체 단백질 또는 면역원성 증강제에 커플링된다.
- [0034] 또 다른 구현예에서, 담체 단백질은 소 혈청 알부민 (BSA)이거나 면역원성-증강제는 키홀 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)이다.
- [0035] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 화합물 또는 본 명세서에서 기재된 면역원을 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0036] 한 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 조성물을 포함하는 면역원은 아췌반트를 포함한다.
- [0037] 또 다른 구현예에서, 아췌반트는 인산알루미늄 또는 수산화알루미늄이다.
- [0038] 한 측면은, 서열 식별 번호: 1-16의 어느 하나에서 임의로 제시된 바와 같은, HDSG (서열 식별 번호: 1)의 서열 또는 관련된 에피토프 서열을 갖는 A-베타 펩티드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 포함한다.

- [0039] 한 구현예에서, 항체는 A-베타 상의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 여기서 에피토프는 항체로의 결합에 주로 관여된 적어도 2개의 연속 아미노산 잔기를 포함하거나, 여기서 적어도 2개의 연속 아미노산은 HDS 안에서 내장된 DS이거나, 여기서 적어도 2개의 연속 아미노산은 HDS 안에서 내장된 HD이다.
- [0040] 또 다른 구현예에서, 에피토프는 HDS, DSG, HDSG (서열 식별 번호: 1), HDSGY (서열 식별 번호: 4), HDSGYE (서열 식별 번호: 11), RHDSGY (서열 식별 번호: 13), RHDSG (서열 식별 번호: 5), RHDS (서열 식별 번호: 6) 및 DSGY (서열 식별 번호: 14)를 포함하거나 상기로 구성된다.
- [0041] 또 다른 구현예에서, 항체는 환형 화합물, 임의로 본 명세서에서 기재된 환형 화합물, 바람직하게는 서열 식별 번호: 2 또는 12에서 제시된 바와 같은 서열을 갖는 환형 펩티드에서 나타났던 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프 펩티드에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 형태 특이적 및/또는 선택적 항체이다.
- [0042] 또 다른 구현예에서, 항체는 A-베타 모노머 및/또는 A-베타 피브릴보다 A-베타 올리고머에 선택적으로 결합한다.
- [0043] 또 다른 구현예에서, 선택성은 A-베타 모노머 및/또는 A-베타 피브릴보다 A-베타 올리고머에 대하여 적어도 2 배, 적어도 3 배, 적어도 5 배, 적어도 10 배, 적어도 20 배, 적어도 30 배, 적어도 40 배, 적어도 50 배, 적어도 100 배, 적어도 500 배, 적어도 1000 배 더 선택적이다.
- [0044] 또 다른 구현예에서, 항체는 서열 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프를 포함하는 선형 펩티드에 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 결합하지 않고, 임의로 여기서 선형 펩티드의 서열은 항체를 상승시키는데 사용된 환형 화합물의 선형 버전, 임의로 서열 식별 번호: 2 또는 12에서 제시된 바와 같은 서열을 갖는 선형 펩티드이다.
- [0045] 또 다른 구현예에서, 항체는 동일계내 A-베타 모노머 및/또는 A-베타 피브릴 플라크에 대한 결합이 결여되거나 미소량을 갖는다.
- [0046] 또 다른 구현예에서, 항체는 단클론성 항체 또는 다클론성 항체이다.
- [0047] 또 다른 구현예에서, 항체는 인간화된 항체이다.
- [0048] 또 다른 구현예에서, 항체는 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, 이량체, 나노바디, 미니바디, 디아바디, 및 이들의 다량체로부터 선택된 항체 결합 단편이다.
- [0049] 또 다른 구현예는, 임의로 융합된, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 상보성 결정 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 상보성 결정 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고 상기 CDRs의 아미노산 서열은 하기 서열을 포함한다:
- [0050] CDR-H1 GYTFTSYW (서열 식별 번호: 17)
- [0051] CDR-H2 IDPSDSQT (서열 식별 번호: 18)
- [0052] CDR-H3 SRGGY (서열 식별 번호: 19)
- [0053] CDR-L1 QDINNY (서열 식별 번호: 20)
- [0054] CDR-L2 YTS (서열 식별 번호: 21)
- [0055] CDR-L3 LQYDNLWT (서열 식별 번호: 22)
- [0056] 또 다른 구현예에서, 항체는 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다: i) 서열 식별 번호: 24에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열; ii) 서열 식별 번호: 24에 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열로서, CDR 서열이 서열 식별 번호: 17, 18 및 19에서 제시된 바와 같은, 서열, 또는 iii) 보존적으로 치환된 아미노산 서열 i).
- [0057] 또 다른 구현예에서, 항체는 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다: i) 서열 식별 번호: 26에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열, ii) 서열 식별 번호: 26에 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열로서, CDR 서열이 서열 식별 번호: 20, 21 및 22에서 제시된 바와 같은, 서열, 또는 iii) i)의 보존적으로 치환된 아미노산 서열.
- [0058] 또 다른 구현예에서, 중쇄 가변 영역 아미노산 서열은 서열 식별 번호: 23에서 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열 또는 코돈 축퇴 또는 이의 최적화된 버전에 의해 암호화되고/거나; 항체는 서열 식별 번호: 25에서 제시된

바와 같은 뉴클레오티드 서열 또는 코돈 축퇴 또는 이의 최적화된 버전에 의해 암호화된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

- [0059] 또 다른 구현예에서, 중쇄 가변 영역은 서열 식별 번호: 24에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 상기로 구성되고/거나 경쇄 가변 영역은 서열 식별 번호: 26에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 구성된다.
- [0060] 또 다른 구현예에서, 항체는 표 10에서 인용된 바와 같이 CDR 서열을 포함하는 항체와 인간 A-베타에 대한 결합에 대하여 경쟁한다.
- [0061] 한 구현예에서, 항체는 본 명세서에서 기재된 환형 화합물 또는 면역원을 이용하여 제조된다.
- [0062] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 항체 및 검출가능한 표지 또는 세포독성제를 포함하는 면역접합체를 포함한다.
- [0063] 한 구현예에서, 검출가능한 표지는, 임의로 대상체 이미지형성 예컨대 PET 이미지형성에서 사용을 위하여, 양전자 방출 방사성핵종을 포함한다.
- [0064] 한 측면은, 임의로 희석제와, 본 명세서에서 기재된 항체, 또는 본 명세서에서 기재된 면역접합체를 포함한다.
- [0065] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 화합물 또는 면역원의 단백질성 부분, 본 명세서에서 기재된 항체 또는 본 명세서에서 기재된 단백질성 면역접합체를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다.
- [0066] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 벡터를 포함한다.
- [0067] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 항체를 발현시키는 세포를 포함하고, 임의로 여기서 상기 세포는 벡터를 포함하는 하이브리도마이다.
- [0068] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 키트, 본 명세서에서 기재된 면역원, 본 명세서에서 기재된 항체, 본 명세서에서 기재된 면역접합체, 본 명세서에서 기재된 핵산 분자, 본 명세서에서 기재된 벡터 또는 본 명세서에서 기재된 세포를 포함한다.
- [0069] 한 측면은, 본 명세서에서 기재된 화합물 또는 면역원 혹은 상기 화합물 또는 면역원을 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계 및, 임의로, A-베타 펩티드를 포함하는 선형 펩티드에 대한 결합이 결여되거나 미소량을 갖고/갖거나 플라크 결합이 결여되거나 미소량을 갖는, 투여된 화합물 또는 면역원 및/또는 A-베타 올리고머에 대하여 특이적 또는 선택적인 항체 및/또는 항체를 발현시키는 세포를 단리시키는 단계를 포함하는, 본 명세서에서 기재된 항체의 제조 방법을 포함한다.
- [0070] 한 측면은 생물학적 샘플이 A-베타를 포함하는지의 측정 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법을 포함한다:
- [0071] a. 본 명세서에서 기재된 항체 또는 본 명세서에서 기재된 면역접합체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계; 및
- [0072] b. 임의의 항체 복합체의 존재를 검출하는 단계.
- [0073] 한 구현예에서, 방법은 생물학적 샘플이 A-베타 올리고머를 함유하는지의 측정을 위하여 본 명세서에서 기재하였고 하기 단계를 포함하는 방법을 포함한다:
- [0074] a. 항체:A-베타 올리고머 복합체 형성을 위하여 허용된 조건 하에 A-베타 올리고머에 대하여 특이적 및/또는 선택적인 본 명세서에서 기재된 면역접합체 또는 본 명세서에서 기재된 항체와 샘플을 접촉시키는 단계; 및
- [0075] b. 임의의 복합체의 존재를 검출하는 단계;
- [0076] 여기서 검출가능한 복합체의 존재는 샘플이 A-베타 올리고머를 함유할 수 있다는 것을 나타냄.
- [0077] 또 다른 구현예에서, 복합체의 양은 측정된다.
- [0078] 또 다른 구현예에서, 샘플은 뇌 조직 또는 이의 추출물, 전혈, 혈장, 혈청 및/또는 CSF를 포함한다.
- [0079] 또 다른 구현예에서, 샘플은 인간 샘플이다.
- [0080] 또 다른 구현예에서, 샘플은 대조군, 임의로 이전의 샘플에 비교된다.
- [0081] 또 다른 구현예에서, A-베타의 수준은 SPR에 의해 검출된다.
- [0082] 한 측면은 대상체에서 A-베타의 수준 측정 방법을 포함하고, 상기 방법은 AD를 갖는 위험에 처한 또는 상기를 갖는 것으로 의심되거나 상기를 갖는 대상체에, 본 명세서에서 기재된 항체를 포함하는 면역접합체로서, 여기서

상기 항체가 검출가능한 표지에 콘주게이션되는, 면역접합체를 투여하는 단계; 및 표지를 검출하는, 임의로 표지를 정량적으로 검출하는 단계를 포함한다.

- [0083] 한 구현예에서 표지는 양전자 방출 방사성핵종이다.
- [0084] 한 측면은, 대상체에 본 명세서에서 기재된 화합물 또는 화합물의 조합, 임의로 HDSG (서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프 펩티드 서열을 포함하는 환형 화합물, 면역원 및/또는 상기 화합물 또는 상기 면역원을 포함하는 조성물을 투여하는 단계; 및 투여된 화합물 또는 면역원에서 A-베타 펩티드에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 세포 및/또는 항체를 임의로 단리시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응의 유도 방법을 포함한다.
- [0085] 한 측면은 A-베타 올리고머 증식의 억제 방법을 포함하고, 상기 방법은, A-베타 응집 및/또는 올리고머 증식을 억제시키기 위해, 본 명세서에서 기재된 A-베타 올리고머 특이적 또는 선택적 항체 또는 면역접합체의 유효량을 필요로 하는 대상체에 투여 또는 상기와 A-베타를 발현시키는 세포 또는 조직과 접촉을 포함한다.
- [0086] 한 측면은 AD 및/또는 다른 A-베타 아밀로이드 관련된 질환의 치료 방법을 포함하고, 상기 방법은 필요로 하는 대상체에 i) 본 명세서에서 기재된 항체 또는 면역접합체, 임의로 A-베타 올리고머 특이적 또는 선택적 항체, 또는 상기 항체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량; 2) HDSG (서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프 서열을 포함하는 단리된 환형 화합물 또는 면역원 또는 상기 환형 화합물을 포함하는 약제학적 조성물 투여, 또는 3) 1의 항체 또는 2의 면역원을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 핵산을 필요로 하는 대상체에 투여를 포함한다.
- [0087] 한 구현예에서, 치료받는 대상체 유래의 생물학적 샘플은 본 명세서에서 기재된 항체를 이용하여 A-베타의 존재 또는 수준에 대하여 평가된다.
- [0088] 한 구현예에서, 1 초과 항체 또는 면역원은 투여된다.
- [0089] 한 구현예에서, 항체, 면역접합체, 면역원, 조성물 또는 핵산 또는 벡터는 뇌 또는 CNS의 다른 부분에 직접적으로 투여된다.
- [0090] 한 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용가능한, 희석제 또는 담체와 혼합된 화합물 또는 면역원을 포함하는 약제학적 조성물이다.
- [0091] 한 측면은 서열 식별 번호: 1-16에서 제시된 서열의 어느 하나의 서열로 구성되는 A 베타 펩티드를 포함하는 단리된 펩티드를 포함한다.
- [0092] 한 구현예에서, 단리된 펩티드는 링커를 포함하는 환형 펩티드이고 여기서 상기 링커는 A-베타 펩티드 N-말단 잔기 및/또는 A-베타 C-말단 잔기에 공유적으로 커플링된다.
- [0093] 한 구현예에서, 단리된 환형 펩티드는 검출가능한 표지를 포함한다.
- [0094] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 단리된 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0095] 한 측면은 본 명세서에서 기재된 항체를 발현시키는 하이브리도마를 포함한다.
- [0096] 본 개시내용의 다른 특징 및 이점은 다음과 같은 상세한 설명에서 분명해질 것이다. 그러나, 본 개시내용의 바람직한 구현예를 나타내는 동안 상세한 설명 및 구체적 실시예가 단지 예시로서 주어진 것은, 본 개시내용의 사상 및 범위 안에서 다양한 변화 및 변형이 상기 상세한 설명으로부터 당해 분야의 숙련가에 분명해질 것이기 때문이다.

도면의 간단한 설명

- [0097] 본 개시내용의 구현예는 하기 도면과 관련하여 이제 기재될 것이다:
 - 도 1: 집단 좌표법에 의해 계측된 바와 같이, 서열의 기능으로서 노출의 가능성.
 - 도 2: 잔기 지수의 기능으로서 곡률. 환형 펩티드 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2)에 대하여 평형 앙상블에서 평균 곡률은, 선형 펩티드용 곡률 (고체 어두운 회색), 및 피브릴에서 다양한 모노머의 곡률 (점선)과 함께, 보여진다 (고체 밝은 회색).
 - 도 3: H6의 측쇄 중 원자용 이면 각 분포. 잔기 H6의 도식은 삼도에서 보여지고; 이면 각이 취해진 상응하는 결

합은 다른 결합보다 더 어렵게 되고, 이면 각을 한정하는 4 원자는 더 밝은 회색으로 보여진다. 전체 3 종-선형 펩티드, 환형 펩티드, 및 (2M4J) 피브릴 앙상블에 대하여 이면 분포의 피크 값에 상응하는 각은 표 1에서 제공된다. 피크 값 사이 차이는 표 1에서 또한 제공된다. 피브릴 앙상블용 이면 각 분포는 피브릴의 PDB 구조에서 A-베타42의 전체 9 채 위에 실시되어, 관측된 이면 분포는 일반적으로 구조 2M4J로부터 실시된 임의의 단일 채용 분포보다 더 넓다.

도 4: 잔기 D7의 측쇄 중 원자를 포함하는 각 O-C-C α -C β 용 이면 각 분포. D7의 도식은 삽도에서 보여지고; 이면 각이 실시되는 상응하는 결합은 다른 결합보다 더 어렵게 된다. 값은 표 1에서 제공된다.

도 5: S8의 측쇄 중 원자를 포함하는 각용 이면 각 분포. S8의 도식은 삽도에서 보여지고; 이면 각이 실시되는 상응하는 결합은 다른 결합보다 더 어렵게 된다. 값은 표 1에서 제공된다.

도 6: 최상부 패널 (A): 각각의 잔기 H, D, 및 S에 대하여 플롯팅된, 피브릴에서 엔트로피에 대하여 선형 및 환형 펩티드의 측쇄 엔트로피 변화. (B) 최상부 패널로부터 두번째: H6에서 개별 이면 각의 엔트로피. CA-CB-CG-ND1이, 도 3에서 상기 특정한 이면에 대하여 더욱 빈틈없이 피크된 이면 각 분포에 의해 또한 보여질 수 있는, 어느 한쪽 피브릴 또는 선형 펩티드보다 실질적으로 덜한 엔트로피를 갖는 예에 대하여 주목한다. (C) 최하부 패널로부터 두번째: D7에서 개별 이면 각의 엔트로피. (D) 최하부 패널: S8에서 개별 이면 각의 엔트로피.

도 7: 피브릴 2M4J의 맥락에서 잔기 H, D, S, 및 G에 대하여 골격 라마찬드란 각을 따라, 펩티드 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2)의 양쪽 선형 및 환형 형태로, 잔기 H, D, S, 및 G용 평형 골격 라마찬드란 각.

도 8: A-베타42 펩티드에 대하여 용해도 대 잔기 지수. HDSG (서열 식별 번호: 1)은 +1.1, +0.14, +1.2, 및 +0.30 각각의 값을 갖는다.

도 9: 용매 접근가능한 표면적 (SASA), 칭량된 SASA, $((s_i - \langle s \rangle) / \delta s) \cdot SASA_i$, 및 $((s_i - \langle s \rangle) / \delta s) \cdot SASA_i - (((s_i - \langle s \rangle) / \delta s) \cdot SASA_i)_{\text{피브릴}}$ 의 플롯.

도 10: 선형 펩티드 앙상블의 3 최대 클러스터의 도심에 대한 평균 제곱근 편차 (RMSD) 값의 2개의 분리도. 각각의 포인트는 선형 펩티드, 환형 펩티드, 또는 피브릴 평형 앙상블로부터 실시된 주어진 형태에 상응한다.

도 11a: 측쇄의 배향이 보여질 수 있도록 라이코라이스 표현에서 만들어진, 환형 펩티드 구조 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2)의 2개의 도. 밝은 회색 착색된 형태는, 도 10에 대하여 상기 기재된 바와 같이, 최대 클러스터의 도심이고, 최상은 환형 펩티드의 전형적인 형태를 나타낸다. 흑색 측쇄는 선형 펩티드의 아마도 이면 각에 가까운 이면 각을 갖는 선형 형태에 대하여 만들어지고; 상기 선형 펩티드 형태에 대한 측쇄는, 상이한 이면 각이 선형 및 환형 펩티드에 바람직한 경향이 있는 것을 보여주기 위해, 환형 펩티드에서 겹쳐진다.

도 11b: 원형 펩티드 결합을 가진 환형 펩티드를 포함하는, HDSG (서열 식별 번호: 1)의 환형 펩티드, G와 C 잔기 사이 PEG2 링커를 가진 환형 펩티드, 및 C와 H 잔기 사이 PEG2 링커를 가진 환형 펩티드를 포함하는 도식적 표현.

도 12: 평균제곱근 편차 (RMSD)에 의한 클러스터링 플롯; 축은, 도 10에서와 같이, 선형 펩티드 앙상블의 3 최대 클러스터의 도심에 재차 상응한다.

도 13: 패널 A에서 환형 펩티드 및 선형 펩티드, 및 패널 B에서 A-베타 올리고머 및 A-베타 모노머에 항체의 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 직접 결합 검정.

도 14: ELISA 및 SPR 직접 결합 검정을 이용하는 조직 배양 상청액으로부터 클론의 1차 스크리닝. SPR 직접 결합 검정 대 ELISA에서 mAb 결합을 비교하는 플롯.

도 15: 환형 펩티드 (구조화된 펩티드: 원형), 선형 펩티드 (비구조화된 펩티드, 정사각형), A-베타 모노머 (상향 포인팅 삼각형), 및 A-베타 올리고머 (하향 포인팅 삼각형)에 선택 클론의 SPR 직접 결합 검정. 별표는 대조 목적을 위하여 비구조화된 선형 펩티드에 대한 클론 반응성을 나타낸다.

도 16: 6E10 양성 대조군 항체 (A) 및 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호:2)에 대해 상승된 항체 (303-25-1B4) (B)를 이용하는 사체 AD 뇌로부터 플라크의 면역조직화학 염색.

도 17: SPR 간접 (포착) 결합 검정을 이용하는 선택된 및 정제된 항체의 2차 스크리닝. 포착된 항체에 대한 A-베타 올리고머의 SPR 결합 반응 마이너스 포착된 항체에 대한 A-베타 모노머의 결합 반응 (원형); 포착된 항체에 대한 AD 환자로부터 풀링된 가용성 뇌 추출물의 SPR 결합 반응 마이너스 포착된 항체에 대한 비-AD 대조군에

로부터 풀링된 뇌 추출물의 결합 반응 (삼각형); 포착된 항체에 대한 AD 환자로부터 풀링된 뇌척수액 (CSF)의 SPR 결합 반응 마이너스 포착된 항체에 대한 비-AD 대조군으로부터 풀링된 CSF의 결합 반응 (정사각형).

도 18: A-베타 올리고머에 결합하는 항체의 입증. 고정된 항체에 결합하는 상업적으로-제조된 안정적인 A-베타 올리고머의 가변 농도의 결합 반응 플롯 및 SPR 센서그램. 패널 A는 양성 대조군 mAb6E10으로 결과를 보여주고, 패널 B는 음성 아이소타입 대조군으로 그리고 패널 C는 사이클로 (CGHDSGG) (서열 식별 번호:2)에 대해 상승된 항체로 결과를 보여준다. 패널 D는, 1 마이크로몰의 농도에서 A-베타 올리고머로, HDSG (서열 식별 번호:1)을 포함하는 환형 펩티드에 대해 상승된 몇 개의 항체 클론의 결합을 플롯팅한다.

도 19: HDSG (서열 식별 번호:1)을 포함하는 환형 펩티드를 이용하여 상승된 대표적인 항체의 존재 또는 부재 하에 시험관내 A-베타 응집의 증식을 보여주는 플롯.

표 1은 분포가 환형 펩티드와 다른 중 사이 유의차를 보여주는 그 이면 각에 대하여 이면 각 분포의 피크 값을 보여준다.

표 2는 라마찬드란 골격 phi/psi 각 분포의 피크 값을 보여준다.

표 3은 최대 형태적 클러스터의 도심 형태인 환형 펩티드에 대하여, 그리고 선형 펩티드 앙상블로부터 실시된 최대 클러스터의 도심 형태를 위하여, 라마찬드란 골격 이면 각 뿐만 아니라 측쇄 이면 각을 제공한다.

표 4는 환형, 선형, 및 2M4J 피브릴 앙상블에서 각각의 잔기에 대하여 평균 곡률 값의 표이다.

표 5는 선택된 항체의 결합 특성을 보여준다.

표 6은 선택된 항체에 대하여 결합 특성 요약을 보여준다.

표 7은 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호:2)에 대해 상승된 항체에 대하여 올리고머 결합 - 모노머 결합을 열거한다.

표 8은 포르말린 고정된 조직에서 시험된 항체의 특성을 열거한다.

표 9는 예시적인 독성 검정이다.

표 10은 CDR 서열을 열거한다.

표 11은 중쇄 및 경쇄 가변 서열을 열거한다.

표 12는 링커를 가진 선택 서열 및 A-베타 에피토프 서열의 표이다.

표 13은 전체 A-베타 1-42 인간 폴리펩티드 서열을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0098] 본 개시내용의 상세한 설명

[0099] 알츠하이머병과 관련된 올리고머성 중을 포함하는, A-베타의 독성 올리고머성 중에서 우선적으로 접근가능한 에피토프를 표적할 수 있는 항체, 면역치료적 조성물 및 방법이 본 명세서에서 제공된다. A-베타의 올리고머성 중에서 결합하는 항체에 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 접근가능할 수 있는 A-베타내 영역은 확인되었다.

[0100] 본 명세서에서 실증된 바와 같이, 올리고머-특이적 또는 올리고머 선택적 항체의 생성은, 어느 한쪽 모노머 및/또는 피브릴에서, 존재하지 않는, 또는 더 낮은 정도로 존재하는 A-베타 펩티드에서 표적의 확인을 통해 달성되었다. 올리고머-특이적 에피토프는 모노머 또는 피브릴에서 상응하는 분절로부터 1차 서열에서 상이할 필요가 없지만, 이들은 올리고머의 맥락에서 형태적으로 구별될 것이다. 즉, 이들은 모노머 및/또는 피브릴에서 존재하지 않을 (또는 바람직하지 않을) 올리고머에서 골격 및/또는 측쇄 배향에 관하여 구별되는 형태를 나타낼 것이다.

[0101] 선형 펩티드 영역으로 상승된 항체는 올리고머에 대하여 선택적일 수 없고, 따라서 모노머 또는 A-베타 플라크에 또한 결합할 수 있다.

[0102] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, A-베타의 올리고머성 형태에 대하여 선택적일 수 있는 항체를 개발하기 위해, 본 발명자들은 피브릴의 맥락에서 파괴하기 쉬운, 그리고 올리고머의 표면에서 노출될 수 있는 A-베타 서열의 영역을 확인하기 위해 노력하였다.

- [0103] 실시예에서 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 피브릴의 맥락에서 파괴하기 쉬운 것으로 예측된 영역을 확인하였다. 본 발명자들은 대안적 형태의 기준 예컨대 더 높은 곡률, 더 높은 노출된 표면적, 대안적인 이면 각 분포를 만족시키기 위해 확인된 표적 영역을 포함하는 환형 화합물을 설계하였고/하였거나, 어느 한쪽 선형 또는 피브릴 앙상블에 평균 제곱근 편차 (RMSD)에 의해 쉽게 정렬시키지 않았다.
- [0104] 동일한 서열 (예를 들면 상응하는 선형 서열)의 선형 펩티드에 비교된 환형 펩티드를 선택적으로 결합하였던 항체는 상기 표적 영역을 포함하는 환형 펩티드를 이용하여 상승될 수 있다. 실험적 결과는 기재되고, 합성 모노머와 비교하여, 선택적으로 합성 올리고머에 결합하는, 대조군 CSF보다 우선적으로 AD 환자로부터 CSF에 결합하는, 그리고/또는 대조군 가용성 뇌 추출물보다 우선적으로 AD 환자로부터 가용성 뇌 추출물에 결합하는 에피토프-특이적 및 형태적으로 선택적 항체를 확인한다. AD 뇌 조직의 추가 염색은 없거나 미소량의 플라크 결합을 보여주는 항체를 확인하였고 시험관내 연구는 항체가 A β 올리고머 증식 및 응집을 억제시켰다는 것을 알아내었다.
- [0105] I. 정의
- [0106] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 'A-베타'는 대안적으로 '아밀로이드 베타', '아밀로이드 β ', A베타, A-베타 또는 'A β '로서 지칭될 수 있다. 아밀로이드 베타는 36-43 아미노산의 펩티드이고 모든 종의 모든 야생형 및 돌연변이체 형태, 특히 인간 A-베타를 포함한다. A-베타40은 40 아미노산 형태를 지칭하고; A-베타42는 42 아미노산 형태, 등을 지칭한다. 인간 야생형 A-베타42의 아미노산 서열은 서열 식별 번호: 3에서 보여진다.
- [0107] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 본 명세서에서 용어 "A-베타 모노머"는 A-베타 (예를 들면 1-40, 1-42, 1-43) 펩티드의 임의의 개별 서브유닛 형태를 지칭한다.
- [0108] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 본 명세서에서 용어 "A-베타 올리고머"는 몇 개의 (예를 들면 적어도 2개의) A-베타 모노머가 약 100 미만, 또는 더욱 전형적으로 약 50 미만 모노머의 형태적으로-가용성, 부분적으로-정렬된, 3차원 구상체에서 비-공유적으로 응집되는 복수의 임의의 A-베타 서브유닛을 지칭한다. 예를 들어, 올리고머는 3 또는 4 또는 5 또는 초과 모노머를 함유할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "A-베타 올리고머"는 양쪽 합성 A-베타 올리고머 및/또는 원상태 A-베타 올리고머를 포함한다. "원상태 A-베타 올리고머"는 생체내, 예를 들어 AD를 가진 대상체의 뇌 및 CSF에서 형성된 A-베타 올리고머를 지칭한다.
- [0109] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "A-베타 피브릴"은 전자현미경하에 원섬유성 구조를 보여주는 비-공유적으로 관련된, 개별 A-베타 펩티드의 어셈블리를 포함하는 분자 구조를 지칭한다. 원섬유성 구조는 전형적으로 "크로스 베타" 구조이고; 다량체의 크기에서 이론적 상한은 없고, 피브릴은 수 천의 또는 많은 수 천의 모노머를 포함할 수 있다. 피브릴은, AD의 1차 병리적 형태학 진단 중 하나인, 노인성 플라크를 형성하기 위해 수 천에 의해 응집할 수 있다.
- [0110] 용어 "HDSG"는 서열 식별 번호: 1에서 나타난 바와 같이 아미노산 서열 히스티딘, 아스파르트산, 세린, 및 글리신을 의미한다. 유사하게 DSG, DSGG (서열 식별 번호:3), HDSGYE (서열 식별 번호:11), HDSGY (서열 식별 번호:4), RHDSG (서열 식별 번호:5), RHDS (서열 식별 번호:6)은 1-문자 아미노산 코드에 의해 확인된 아미노산 서열을 지칭한다. 맥락에 의존하여, 아미노산 서열의 언급은 A-베타 또는 단리된 펩티드내 서열, 예컨대 환형 화합물의 아미노산 서열을 지칭할 수 있다.
- [0111] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "선형 화합물, 모노머 및/또는 피브릴에서 아미노산 잔기 (예를 들면 H, D, S 및/또는 G)에 의해 점유된 이외의 대안적 형태"는 용매 접근성, 엔트로피, (예를 들면 실시예에서 기재된 환형 펩티드에서 예를 들어 비교된 경우 펩티드 HDSG (서열 식별 번호:1)의 맥락에서) 곡률, RMSD 구조적 정렬, 및 상황에 따라 잔기를 A-베타 선형 화합물에서 H, D 및/또는 S에 대하여 상기 특성에 비교된 측쇄 이면 각 또는 하나 이상의 골격의 이면 각, 예를 들어 PDBs 2M4J, 2MXU, 2LMN, 또는 2LMP에서 보여진 및 도 1-12에서 및/또는 표에서 보여진 경우 A-베타 모노머 및/또는 A-베타 피브릴 구조로부터 선택된 하나 이상의 상이한 형태적 특성을 갖는 것을 의미한다. 예를 들어, 도 2 및 표 4는 환형 펩티드 앙상블에 대하여 HDSG (서열 식별 번호:1)의 곡률이 피브릴 형태의 앙상블에서 HDSG (서열 식별 번호:1)의 곡률보다 상당히 더 크다는 것을 보여준다. 이것은 D7, S8, 및 G9에 대하여 특히 분명하다. 더욱이 D7 및 S8에 대하여, 환형 펩티드 앙상블에서 곡률은 선형 펩티드 앙상블에서의 것보다 실질적으로 더 높다. 이것은 형태적 선택성이 잔기 D7 및 S8에 의해 특히 부여될 수 있다는 것을 암시한다. 도 3의 마지막 2 패널은 환형 펩티드 앙상블에서 H6을 위한 각 (N-CA-CB-CG) 및 (C-CA-CB-CG)에 대하여 이면 각 분포가 중첩하지 않지만, 선형 펩티드 및 피브릴 앙상블에서 가장 흔한 각이 아니라는 것을 보여준다 (가능성은 선형 및 피브릴에서 N-CA-CB-CG에 대하여 36% 및 13% 각각이고 선형 및 피브릴에서 C-

CA-CB-CG에 대하여 36% 및 13% 각각이다). 도 4의 마지막 패널은 잔기 D7의 측쇄를 포함하는 각 (O-C-CA-CB)에 대하여 어떤 각 분포가 어느 한쪽 모노머 또는 피브릴에 비교된 대안적 형태적 분포를 반영한다는 것을 보여준다. 도 5는 잔기 S8의 측쇄를 포함하는 각 (N-CA-CB-OG), (C-CA-CB-OG), 및 (O-C-CA-CB)에 대하여 어떤 각 분포가 어느 한쪽 모노머 또는 피브릴에 비교된 대안적 형태적 분포를 반영한다는 것을 보여준다. 대안적 형태는 비교측정기 형태보다 유사하게, 덜 또는 더 "제한"될 수 있다. 예를 들어, 도 6은 H6이 환형 펩티드에서 더 제한되어 어느 한쪽 피브릴 또는 모노머에서인 것을 입증한다. 잔기 D7은 환형 펩티드 앙상블에서 더 제한되어 모노머에서이지만, 덜하여 피브릴에서이다. 잔기 S8은 환형 펩티드 앙상블에서 덜 제한되어 피브릴에서이고 또한 미미하게 덜하여 모노머에서이다. 도 7은 환형 펩티드의 골격에 대하여 라마찬드란 어떤 각의 분포가 잔기 D7 및 S8을 위한 어느 한쪽 모노머 또는 피브릴에 대한 것보다 실질적으로 상이하다는 것을 입증한다. 도 8은 잔기 HDSG (서열 식별 번호:1)이, 형태의 올리고머성 앙상블에서 이들 잔기의 노출의 가능성을 나타내는, A-베타 펩티드에서 존재하는 평균 용해도보다 더 큰 용해도를 갖는 것을 보여준다. 도 9는 잔기 HDSG (서열 식별 번호:1)이, 피브릴에 비교된, 증가된 용매 접근가능한 표면적, SASA를 갖는다는 것, 그리고 용해도에 의해 칭량된 경우, 환형 펩티드 앙상블에서 전체 잔기가 피브릴에서의 것에 대해 중량 증가된 SASA를 보여준다는 것을 보여주고, 잔기 S8은 피브릴에 대해 실질적인 중량 증가된 SASA를 보여준다. 도 10은 HDSG (서열 식별 번호:1)의 환형 펩티드 평형 구조가 피브릴에서 어느 한쪽 선형 펩티드 또는 상응하는 서열의 평형 구조보다 상이하게 클러스터링하고, 한편 선형 및 피브릴 앙상블이 명확히 분화되지 않는 것을 보여준다.

- [0112] 용어 "아미노산"은 모든 자연 발생 아미노산 뿐만 아니라 변형된 L-아미노산을 포함한다. 아미노산의 원자는 상이한 동위원소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 아미노산은 수소에 대하여 치환된 중수소 질소-14에 대하여 치환된 질소-15, 및 탄소-12에 대하여 치환된 탄소-13 그리고 다른 유사한 변화를 포함할 수 있다.
- [0113] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "항체"는, 단클론성 항체, 다클론성 항체, 단일쇄, 베니어드, 인간화된 및 다른 키메라성 항체 그리고, 예를 들어 단일쇄 Fab 단편, Fab'2 단편 또는 단일쇄 Fv 단편을 포함하는, 이들의 결합 단편을 포함하도록 의도된다. 항체는 동물 예컨대 토끼, 라마, 상어 등에서 생산되고/되거나 재조합 공급원으로부터일 수 있다. 생화학적 기술을 이용하여 또는 유전자도입 동물에서 생산될 수 있는 또는 라이브러리 예컨대 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있는 인간 항체가 또한 포함된다. 인간화된 또는 다른 키메라성 항체는 하나 또는 하나 초과와 아이소타입 또는 부류 또는 종으로부터 서열을 포함할 수 있다.
- [0114] 어구 "단리된 항체"는 항체를 생산하였던 공급원, 예를 들어, 동물, 하이브리도마 또는 다른 세포주 (예컨대 항체를 생산하는 재조합 곤충, 효모 또는 박테리아 세포)로부터 제거된 생체내 또는 시험관내 생산된 항체를 지칭한다. 단리된 항체는 임의로 "정제되어", 적어도 하기를 의미한다: 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 순도.
- [0115] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "결합 단편"은 온전한 또는 완전한 항체 또는 항체쇄보다 더 적은 아미노산 잔기를 포함하는 그리고 항원에 결합하거나 온전한 항체와 경쟁하는 항체 또는 항체쇄의 일부 또는 부분을. 예시적인 결합 단편은 제한 없이 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, 이량체, 나노바디, 미니바디, 디아바디, 및 이들의 다량체를 포함한다. 단편은 온전한 또는 완전한 항체 또는 항체쇄의 화학적 또는 효소적 치료를 통해 획득될 수 있다. 단편은 또한 재조합 수단에 의해 획득될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 펩신으로 항체를 처리함으로써 생성될 수 있다. 획득한 F(ab')₂ 단편은 디설파이드 브릿지를 환원시켜 Fab' 단편을 생산한다. 파파인 소화는 Fab 단편의 형성으로 이어질 수 있다. Fab, Fab' 및 F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, 이량체, 미니바디, 디아바디, 이중특이적 항체 단편 및 다른 단편은 또한 재조합 발현 기술에 의해 작제될 수 있다.
- [0116] 당해 분야에서 인식되는, 용어 "IMGT 넘버링" 또는 "면역유전학 데이터베이스 넘버링"은 항체, 또는 이의 항원 결합 부분의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 다른 아미노산 잔기보다 더욱 가변성 (즉 초가변성)인 아미노산 잔기 넘버링의 시스템을 지칭한다.
- [0117] 항체가 에피토프 예컨대 HDSG(서열 식별 번호:1)에 특이적으로 결합한다고 언급되는 경우, 의미되는 것은, 최소 친화성으로, 항체가 지정된 잔기 또는 이의 일부 예를 들어 HDSG의 적어도 2 잔기를 함유하는 펩티드에 특이적으로 결합하고, 예를 들어 아이소타입 대조군 항체보다 더 큰, 관련없는 서열 또는 관련없는 서열 공간적 배향에 결합하지 않는 것이다. 그와 같은 항체는 HDSG (서열 식별 번호:1)의 각각의 잔기를 필연적으로 접촉시키지 않고 상기 에피토프 안에서 모든 단일 아미노산 치환 또는 결실은 결합 친화성에 필연적으로 상당히 영향을 주지 않고/않거나 동등하게 영향을 주지 않는다.
- [0118] 항체가 에피토프 예컨대 형태적 에피토프, 예컨대 HDSG(서열 식별 번호:1)을 선택적으로 결합한다고 언급되는 경우, 의미되는 것은 또 다른 형태로 상기 잔기에 결합하는 것보다 더 큰 친화성으로 항체가 지정된 잔기 또는

이의 일부를 함유하는 하나 이상의 특정한 형태에 우선적으로 결합하는 것이다. 예를 들어, 항체가 상응하는 선형 펩티드에 비하여 HDSG 또는 관련된 에피토프를 포함하는 사이클로펩티드를 선택적으로 결합한다고 언급되는 경우, 항체는 선형 펩티드에 결합하는 것보다 적어도 2 배 더 큰 친화성으로 사이클로펩티드에 결합한다.

[0119] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "형태적 에피토프"는 상응하는 선형 펩티드에서 존재하지 않는 또는 덜 존재할 것 같은 3차원 구조의 적어도 한 측면이 동족 항체에 의해 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 인식되는 특정한 3차원 구조를 에피토프 아미노산 서열이 갖는 에피토프를 지칭한다. 에피토프 예를 들면 HDSG (서열 식별 번호: 1)은 올리고머성 A-베타의 분자 표면에서 부분적으로 또는 완전히 노출될 수 있고 모노머성 또는 피브릴성 플라크 A-베타내 항체 인식으로부터 부분적으로 또는 완전히 불명확할 수 있다. 형태-특이적 에피토프에 특이적으로 및/또는 선택적으로 결합하는 항체는 그 형태-특이적/선택적 에피토프의 아미노산의 하나 이상의 공간적 배열을 인식한다. 예를 들어 HDSG (서열 식별 번호: 1) 형태적 에피토프는, 예를 들어 적어도 2 배, 3 배, 5 배, 10 배, 50 배, 100 배, 250 배, 500 배 또는 1000 배 또는 초과만큼 특이적으로 그리고/또는 선택적으로, 선형 HDSG(서열 식별 번호: 1)에 비교된 경우 더욱 선택적으로, 항체에 의해 인식되는 HDSG (서열 식별 번호: 1)의 에피토프를 지칭한다.

[0120] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "관련된 에피토프"는 항원성인 HDSG (서열 식별 번호:1)의 적어도 2개의 잔기 및/또는 HDSG (서열 식별 번호: 1)의 적어도 2개의 잔기에 A-베타 어느 한쪽 N-말단 또는 C-말단에서 1 또는 2 아미노산 잔기를 포함하는 서열을 의미한다. 예를 들어 HDSG (서열 식별 번호:1), HDSGY (서열 식별 번호:4) 및 RHDSG (서열 식별 번호:5)가 A-베타 피브릴에서 장애의 경향이 있는 영역으로서 확인되었던 것이 본 명세서에서 보여진다. HDSGY (서열 식별 번호:4) 및 RHDSG (서열 식별 번호:5)는 따라서 관련된 에피토프이다. 추가로 잔기 D7 및 S8이 상응하는 선형 서열에 비교된 환형 화합물에서 차이를 특히 나타내는 모델링을 통해 실증되고, 따라서 DS, HDS, DSG, DSGY (서열 식별 번호: 13) 및 RHDS (서열 식별 번호:6)은 관련된 에피토프이다. 예시적인 관련된 에피토프는 표 12에서 포함된 A-베타 서열을 포함할 수 있다.

[0121] 아미노산의 서열 (예를 들면 HDSG (서열 식별 번호: 1)에서 H 또는 D) 안에서, 아미노산 또는 이의 측쇄에 관하여, 또는 더 큰 폴리펩티드에서 아미노산의 서열에 관하여 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "제한된 형태"는, 상응하는 선형 펩티드 서열, 또는 허용되는 형태의 수에서 감소를 초래하는, 서열 또는 더 큰 폴리펩티드에 비하여, 아미노산 이면 각의 감소된 회전성 이동도를 의미한다. 이것은 예를 들어 자유의 측쇄 이면 각도의 앙상블에 대하여 엔트로피 감소를 찾음으로써 정량화될 수 있고, H, D 및 S에 대하여 도 6에서 플롯팅된다. 예를 들어, 서열에서 측쇄가 선형 펩티드보다 덜 형태적 자유를 갖는다면, 엔트로피는 감소될 것이다. 그와 같은 형태적 제한은 상기 항원에 특이적으로 상승된 항체의 형태적 선택성을 향상시킬 것이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "더 제한된 형태"는 하나 이상의 이면 각의 이면 각 분포 (허용가능한 이면 각의 앙상블)이, 예를 들어 아미노산, 예를 들어 H, 및/또는 D의 엔트로피에 의해 예측된 경우, 비교측정기 형태에서보다 적어도 10% 더 제한되는 것을 의미한다 (예를 들면 더 제한된 형태는 더 낮은 엔트로피를 갖는다). 특이적으로, 선형 펩티드에서 엔트로피에 비하여 평균 엔트로피, 전반적인 더 제한된 환형 형태적 앙상블에서 HDS의, S(환형) - S(선형)은 평균적으로 10% 초과만큼 감소되거나 20% 초과만큼 감소되거나 30% 초과만큼 감소되거나 40% 초과만큼 감소되고, 예를 들면 선형 펩티드용 양 S(선형) - S(피브릴)/[평균(S(선형) + S(피브릴))]의 제한 받지 않은 형태적 앙상블로부터 H6에 대하여 대략 81.7% 엔트로피 감소, D7에 대하여 49.8% 엔트로피 감소, 및 S8에 대하여 -8.83% (S8이 선형 펩티드보다 환형 펩티드에 대하여 더 큰 엔트로피를 갖는다는 것을 암시하는 음수) 엔트로피 감소이다.

[0122] 항체에 관하여 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "없거나 미소량의 플라크 결합" 또는 "플라크 결합이 결여되거나 미소량을 갖는"은 항체가 면역조직화학 (예를 들면 원위치)에서 전형적인 플라크 형태학 염색을 보여주지 않고 염색의 수준이 IgG 음성 (예를 들면 무관한) 아이소타입 대조군으로 보여진 수준에 비교할만한 또는 2 배 이하인 것을 의미한다.

[0123] 용어 "단리된 펩티드"는, 예를 들어, 제조함 또는 합성 기술에 의해 생산된, 그리고 펩티드, 예컨대 제조함 세포 또는 잔류 펩티드 합성 반응물을 생산하였던 공급원으로부터 제거된 펩티드를 지칭한다. 단리된 펩티드는 임의로 "정제되고", 적어도 하기를 의미한다: 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 순도 및 임의로 약제학적 등급 순도.

[0124] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "검출가능한 표지"는 모이어티 예컨대 펩티드 서열 (그와 같은 myc 태그, HA-태그, V5-태그 또는 NE-태그), 본 명세서에서 기재된 펩티드 또는 화합물 속에 첨부 또는 도입될 수 있는 그리고, 어느 한쪽 직접적으로 또는 간접적으로, 검출가능한 신호를 생산할 수 있는 형광 단백질을 지칭한다. 예

를 들어, 표지는 하기일 수 있다: (예를 들어 PET 이미지형성에서 사용을 위하여) 방사선-불투명한, 양전자-방출 방사성핵종, 또는 방사선동위원소, 예컨대 ^3H , ^{13}N , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; 형광 (형광단) 또는 화학발광 (발색단) 화합물, 예컨대 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민 또는 루시페린; 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다아제 또는 홀스래디쉬 페록시다아제; 조영제; 또는 금속 이온. 검출가능한 표지는 예를 들어 2차 항체를 이용하여 간접적으로 또한 검출가능할 수 있다.

[0125] 통상적으로 사용된 바와 같이 용어 "에피토프"는, 항체에 의해 특이적으로 인식되는 항원에서, 항체 결합 부위, 전형적으로 폴리펩티드 분절을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "에피토프"는 기재된 집단 좌표법을 이용하여 A-베타에서 확인된 아미노산 서열 또는 이들의 일부를 또한 지칭할 수 있다. 예를 들어 확인된 표적 영역 HDSG 서열 식별 번호:1)을 포함하는 환형 화합물에 상응하는 단리된 펩티드에 대해 생성된 항체는 상기 에피토프 서열의 일부 또는 전부를 인식한다. 에피토프는 항체에 의한 결합에 접근가능한 경우 본 명세서의 맥락에서 "접근가능"하다.

[0126] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "더 큰 친화성"은 항체 X가 표적 Y에 더욱 강하게 (K_{on}) 및/또는 표적 Z에 서보다 더 작은 해리 상수 (K_{off})로 결합하는 항체 결합의 상대 정도를 지칭하고, 상기 맥락에서 항체 X는 Z보다 표적 Y에 대하여 더 큰 친화성을 갖는다. 마찬가지로, 본 명세서에서 용어 "더 적은 친화성"은 항체 X가 표적 Y에 덜 강하게 및/또는 표적 Z보다 더 큰 해리 상수로 결합하는 항체 결합의 정도를 지칭하고, 상기 맥락에서 항체 X는 Z보다 표적 Y에 대하여 더 적은 친화성을 갖는다. 항체와 그것의 표적 항원 사이 결합의 친화성은 $1/K_D$ 과 같은 K_A 로서 표현될 수 있고 여기에서 K_D 는 k_{on}/k_{off} 와 같다. k_{on} 및 k_{off} 값은 표면 플라즈몬 공명 기술을 이용하여, 예를 들어 분자 친화성 스크리닝 시스템 (Molecular Affinity Screening System: MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany)를 이용하여 측정될 수 있다. 환형 화합물 선택적인 환형 펩티드에서 나타났던 형태에 대하여 선택적인 항체는 예를 들어 선형 형태로 상응하는 서열 (예를 들면 비-고리화된 서열)에 비교된 환형 화합물 (예를 들면 환형 펩티드)에 대하여 더 큰 친화성을 갖는다.

[0127] 또한 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역원성"은 항체의 생산을 유도하는, 면역원의 항원성 부분에 관한 다른 반응성 면역 세포 및 T-세포를 활성화시키는 서브스틴스를 지칭한다.

[0128] 환형 화합물에 관하여 용어 "상응하는 선형 화합물"은 예를 들어 선형 펩티드의 용액에서 존재할 바와 같이 특성을 갖는 환형 화합물로서 그러나 선형 (즉 비-고리화된) 형태로 동일한 서열 또는 화학적 모이어티를 포함하거나 상기로 구성되는, 화합물, 임의로 선형 펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 상응하는 선형 화합물은 고리화되지 않는 합성된 펩티드일 수 있다.

[0129] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 항체와 관련하여 "특이적으로 결합한다"는 항체가 에피토프 서열을 인식하고 그것의 표적 항원에 최소 친화성으로 결합하는 것을 의미한다. 예를 들어 다가 항체는 그것의 표적에 적어도 $1e-6$, 적어도 $1e-7$, 적어도 $1e-8$, 적어도 $1e-9$, 또는 적어도 $1e-10$ 의 K_D 로 결합한다. 적어도 $1e-8$ 초과 친화성이 바람직할 수 있다. 하나의 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 단편 예컨대 Fab 단편은 비-단편화된 항체와 다가 상호작용보다 10 배 또는 100 배 덜 친화성으로 그것의 표적에 결합할 수 있다.

[0130] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 A-베타 (예를 들면 피브릴, 모노머 또는 올리고머) 또는 환형 화합물의 형태에 선택적으로 결합하는 항체에 관하여 용어 "선택적으로 결합한다"는 항체가 적어도 2 배, 적어도 3 배, 또는 적어도 5 배, 적어도 10 배, 적어도 100 배, 적어도 250 배, 적어도 500 배 또는 적어도 1000 배 또는 초과 더 큰 친화성으로 그 형태에 결합한다는 것을 의미한다. 따라서 특정한 형태 (예를 들면 올리고머)에 대하여 더욱 선택적인 항체는 또 다른 형태 및/또는 선형 펩티드에 비교하여 적어도 2 배 등 더 큰 친화성으로 A-베타의 특정한 형태에 우선적으로 결합한다.

[0131] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "링커"는, 환형 화합물을 생산하기 위해 HDSG (서열 식별 번호: 1) 펩티드 N- 및 C- 말단에 임의로 연결된, HDSG (서열 식별 번호: 1) 에피토프 펩티드를 포함하는 펩티드에 공유결합될 수 있는 화학적 모이어티를 의미한다. 링커는 스페이서 및/또는 하나 이상의 기능화가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 기능화가능한 모이어티를 통한 링커는 담체 단백질 또는 면역원 증강제 예컨대 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 연결될 수 있다.

[0132] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "스페이서"는 임의의 바람직하게는 펩티드 자체보다 더 긴 길이의 환형 화합물을 생산하기 위해 펩티드 N- 및 C- 말단에 직접적으로 또는 간접적으로 공유적으로-연결될 수 있는 비-면역원성 또는 저조하게 면역원성 화학적 모이어티를 의미하고, 예를 들어 스페이서는 HDSG (서열 식별 번호: 1)

서열 자체보다 더 긴 골격 길이의 환형 화합물을 생산하기 위해 HDSG (서열 식별 번호: 1)로 구성되는 펩티드의 N- 및 C- 말단에 연결될 수 있다. 즉, 고리화된 경우, 스페이서를 가진 (예를 들어 3 아미노산 잔기의) 펩티드는 스페이서 없는 펩티드보다 더 큰 폐쇄된 원형을 만든다. 스페이서는, 비제한적으로, 모이어티 예컨대 G, A, 또는 PEG 반복부, 예를 들면 GHDSG (서열 식별 번호:7) GHDSGG (서열 식별 번호:8), GGHDSGG (서열 식별 번호:9), GHDSGGG (서열 식별 번호:10), 등을 포함한다. 스페이서는, 스페이서 안에서 산재될 수 있거나 스페이서의 한쪽 또는 양쪽 단부에 공유결합될 수 있는, 하나 이상의 기능화 모이어티, 예컨대 하나 이상의 시스테인 (C) 잔기를 포함할 수 있거나 상기에 커플링될 수 있다. 기능화가능한 모이어티 예컨대 C 잔기가 스페이서의 하나 이상의 말단에 공유결합되는 경우, 스페이서는 펩티드에 간접적으로 공유결합된다. 스페이서는 또한 바이오 틴 분자가 아미노산 잔기 속에 도입되는 경우에서와 같이 스페이서 잔기에서 기능화가능한 모이어티를 포함할 수 있다.

[0133] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "기능화가능한 모이어티"는 2개의 기 또는 원자 사이 화학적 상호작용을 형성하기 위해 원자의 또 다른 그룹 또는 단일 원자 (소위 "상보적 작용기")와 반응할 원자의 그룹 또는 단일 원자를 본 명세서에서 사용된 바와 같이 지칭하는 "작용기"를 가진 화학적 독립체를 지칭한다. 시스테인의 경우에서, 작용기는 디설파이드 결합을 형성하기 위해 반응될 수 있는 -SH일 수 있다. 따라서 링커는 예를 들어 CCC 일 수 있다. 원자의 또 다른 그룹과 반응은, $K_d \sim 1e-14$ 를 가질 수 있는, 바이오틴-스트렙타비딘 결합의 경우에서와 같이 예를 들어, 공유 또는 강한 비-공유결합일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 강한 비-공유결합은 적어도 $1e-9$, 적어도 $1e-10$, 적어도 $1e-11$, 적어도 $1e-12$, 적어도 $1e-13$ 또는 적어도 $1e-14$ 의 K_d 를 가진 상호작용을 의미한다.

[0134] 단백질 및/또는 다른 제제는, 어느 한쪽으로 면역원성을 돕기 위해, 또는 시험관내 연구에서 탐침으로서 작용하기 위해, 환형 화합물에 작용화될 수 있다 (예를 들면 커플링될 수 있다). 이러한 목적을 위해, 반응 (예를 들면 공유 또는 비-공유 그러나 강한 결합을 제조)할 수 있는 임의의 기능화가능한 모이어티는 사용될 수 있다. 하나의 특이적 구현예에서, 기능화가능한 모이어티는, 예를 들어, 면역원성 증강제 예컨대 킨셀린 헴포시아닌 (KLH)일 수 있는, 관심 단백질, 또는 담체 단백질 예컨대 시험관내 면역블랏 또는 면역조직화학 검정에 사용된 소 혈청 알부민 (BSA)에서 비결합 시스테인과 디설파이드 결합을 형성하도록 반응되는 시스테인 잔기이다.

[0135] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "와 반응한다"는 일반적으로 화학적 상호작용의 형성을 초래하는 정전 전하의 전이 또는 전자의 유동이 있다는 것을 의미한다.

[0136] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "동물" 또는 "대상체"는, 임의로 인간을 포함하거나 배제하는, 포유동물을 포함하는 동물 계의 전체 구성원을 포함한다.

[0137] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산 잔기가 단백질의 요망된 특성 폐지 없이 또 다른 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 적합한 보존적 아미노산 치환은 서로에 대하여 유사한 소수성, 극성, 및 R-쇄 길이를 가진 아미노산 치환에 의해 실시될 수 있다. 보존적 아미노산 치환의 예는 하기를 포함한다:

보존적 치환	
아미노산의 유형	치환가능한 아미노산
친수성	Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr
설프하이드릴	Cys
지방족	Val, Ile, Leu, Met
염기성	Lys, Arg, His
방향족	Phe, Tyr, Trp

[0138]

[0139] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "서열 동일성"은 2 폴리펩티드 서열 또는 2 핵산 서열 사이 서열 동일성의 백분율을 지칭한다. 2 아미노산 서열의 또는 2 핵산 서열의 퍼센트 동일성을 계측하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적으로 정렬된다 (예를 들면, 겹은 제2 아미노산 또는 핵산 서열과 최적의 정렬을 위하여 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열에서 도입될 수 있다). 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드는 그 다음 비교된다. 제1 서열에서 위치가 제2 서열에서 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 2 서열 사이 퍼센트 동일성은 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 동일성=동일한 중첩 위치의 수/위치의 총 수.배수.100%). 하나의 구현예에서, 2 서열은 동일한 길이이다. 2 서열 사이 퍼센트 동일성의 계측은 수학적 알고리즘을 이용하여 또한 달성될 수 있다. 2 서열의 비교에 이용된 수학적 알고리즘의 바람직한, 비-제한적인 예는

하기의 알고리즘이다: Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877에서처럼 변형된, Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268. 그와 같은 알고리즘은 Altschul 등, 1990, J. Mol. Biol. 215:403의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 속에 편입된다. BLAST 뉴클레오티드 검사는 본원의 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 수득하기 위해, 예를 들면, 스코어=100, 단어길이=12로 설정된 NBLAST 뉴클레오티드 프로그램 파라미터로 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검사는 본 명세서에서 기재된 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 수득하기 위해, 예를 들면, 스코어=50, 단어길이=3으로 설정된 XBLAST 프로그램 파라미터로 수행될 수 있다. 비교 목적으로 갱핑된 정렬을 수득하기 위해, 갱핑된 BLAST는 Altschul 등, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 대안적으로, PSI-BLAST는 분자 (Id.) 사이 원연 관계를 검출하는 반복된 검사를 수행하는데 사용될 수 있다. BLAST, 갱핑된 BLAST, 및 PSI-Blast 프로그램을 이용하는 경우, 각각의 프로그램의 (예를 들면, XBLAST 및 NBLAST의) 디폴트 파라미터는 사용될 수 있다 (참조, 예를 들면, NCBI 웹사이트). 서열의 비교를 위하여 이용된 수학적 알고리즘의 또 다른 바람직한 비-제한적인 예는 Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17의 알고리즘이다. 그와 같은 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에서 편입된다. 아미노산 서열 비교를 위하여 ALIGN 프로그램을 이용하는 경우, PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티, 및 4의 갭 페널티는 사용될 수 있다. 2 서열 사이 퍼센트 동일성은, 갭 허용과 무관하게, 상기에 기재된 것들에 유사한 기술을 이용하여 계측될 수 있다. 퍼센트 동일성 계산에서, 전형적으로 단지 정확한 매치가 카운트된다.

[0140] 항체에 대하여, 백분율 서열 동일성은 항체 서열이 IMGT 또는 다른 것 (예를 들면 카뎀 넘버링 전환)에 의해 최초로 정렬한 경우 계측될 수 있다. 정렬후, 대상체 항체 영역 (예를 들면, 중쇄 또는 경쇄의 전체 성숙한 가변 영역)이 참조 항체의 동일한 영역과 비교되는 중이면, 대상체와 참조 항체 영역 사이 백분율 서열 동일성은, 백분율로 전환시키기 위해 100 곱하기 된, 카운트되지 않은 갭으로, 2 영역의 정렬된 위치의 총 수로 분할된 양쪽 대상체 및 참조 항체 영역에서 동일한 아미노산에 의해 점유된 위치의 수이다.

[0141] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "핵산 서열"은 자연 발생 염기, 당류 및 당간 (골격) 연결기로 구성되는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 모노머의 서열을 지칭한다. 용어는 또한 비-자연 발생 모노머 또는 이들의 부분을 포함하는 변형된 또는 치환된 서열을 포함한다. 본원의 핵산 서열은 데옥시리보핵산 서열 (DNA) 또는 리보핵산 서열 (RNA)일 수 있고, 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘 및 우라실을 포함하는 자연 발생 염기를 포함할 수 있다. 서열은 또한 변형된 염기를 함유할 수 있다. 상기 변형된 염기의 예는 아자 및 데아자 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘 및 우라실; 및 잔틴 및 하이포잔틴을 포함한다. 핵산은 어느 한쪽 이중가닥 또는 단일 가닥일 수 있고, 센스 또는 안티센스 가닥을 나타낸다. 추가로, 용어 "핵산"은 상보적 핵산 서열 뿐만 아니라 코돈 최적화된 또는 동의성 코돈 등가물을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "단리된 핵산 서열"은 재조합 DNA 기법에 의해 생산된 경우 세포 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없는 핵산, 또는 화학적 전구체, 또는 화학적으로 합성된 경우 다른 화학물질을 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산이 유래되는 것으로부터 핵산을 자연적으로 추출하는 서열 (즉 핵산의 5' 및 3' 단부에 위치한 서열)이 또한 실질적으로 없다.

[0142] "작동가능하게 연결된"은 핵산의 발현을 허용하는 방식으로 핵산이 조절 서열에 연결되는 것을 의미하도록 의도된다. 적합한 조절 서열은, 박테리아, 진균, 바이러스성, 포유동물, 또는 곤충 유전자를 포함하는, 다양한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 적절한 조절 서열의 선택은 선택된 숙주 세포에 의존적이고 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 달성될 수 있다. 상기 조절 서열의 예는 하기를 포함한다: 번역 개시 신호를 포함하는, 전사 프로모터 및 인핸서 또는 RNA 폴리머라제 결합 서열, 리보솜 결합 서열. 추가로, 선택된 숙주 세포 및 이용된 벡터에 의존하여, 다른 서열, 예컨대 복제의 기원, 추가의 DNA 제한 부위, 인핸서, 및 전사의 유도성을 부여하는 서열은 발현 벡터 속에 편입될 수 있다.

[0143] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "벡터"는 상기 핵산 분자가, 예를 들어, 원핵 및/또는 진핵 세포 속에 도입되도록 하고/하거나 계놈 속에 통합되도록 하고, 플라스미드, 파아지미드, 박테리오파지 또는 바이러스성 벡터 예컨대 레트로바이러스 기반 벡터, 아데노 관련된 바이러스성 벡터 및 기타 동종을 포함하도록 하는 핵산 분자용 임의의 중개 비히클을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "플라스미드"는 일반적으로 염색체의 유전 물질의 작제물, 염색체 DNA와 독립적으로 복제할 수 있는, 일반적으로 원형 DNA 듀플렉스를 지칭한다.

[0144] "적어도 중간 정도로 엄격한 하이브리드화 조건"은 용액에서 2 상보적 핵산 분자 사이 선택적 하이브리드화를 촉진시키는 조건이 선택되는 것을 의미한다. 하이브리드화는 핵산 서열 분자의 전체 또는 한 부분에 발생할 수 있다. 하이브리드화 부분은 전형적으로 적어도 15 (예를 들면 20, 25, 30, 40 또는 50) 뉴클레오티드 길이이다. 당해 분야의 숙련가는 핵산 듀플렉스, 또는 하이브리드의 안정성이, 나트륨 함유 완충액에서 나트륨 이온 농도

및 온도의 함수 ($T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\%(\text{G}+\text{C}) - 600/1)$, 또는 유사한 방정식)인, T_m 에 의해 예측되는 것을 인식할 것이다. 따라서, 하이브리드 안정성을 예측하는 세정 조건에서 파라미터는 나트륨 이온 농도 및 온도이다. 공지된 핵산 분자에 유사하지만, 동일하지 않은 분자를 확인하기 위해, 1% 미스매치는 T_m 에서 약 1°C 감소를 초래한다고 추정될 수 있고, 예를 들어 >95% 동일성을 갖는 핵산 분자가 구해지면, 최종 세정 온도는 약 5°C 만큼 감소될 것이다. 이들 고려사항들에 기반하여 당해 분야의 숙련가는 적절한 하이브리드화 조건을 쉽게 선택할 수 있을 것이다. 바람직한 구현예에서, 엄격한 하이브리드화 조건은 선택된다. 예로써 다음과 같은 조건은 엄격한 하이브리드화를 달성하는데 이용될 수 있다: 상기 방정식에 기반하여 $T_m - 5^\circ\text{C}$ 에서 5x 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC)/5x 덴하르트 용액/1.0% SDS로 하이브리드화, 이어서 60°C 에서 0.2x SSC/0.1% SDS의 세정. 중간 정도로 엄격한 하이브리드화 조건은 42°C 에서 3x SSC내 세정 단계를 포함한다. 그러나, 동등한 엄격성은 대안적인 완충액, 염 및 온도를 이용하여 달성될 수 있다는 것이 이해된다. 하이브리드화 조건에 관한 추가의 안내는 아래에 발견될 수 있다: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002, 및 : Sambrook 등, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

- [0145] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 그리고 당해 분야에서 양호하게 이해되는 바와 같이 용어 "치료하는" 또는 "치료"는, 임상 결과를 포함하는, 유의한 또는 요망된 결과 수득용 접근법을 의미한다. 유의한 또는 요망된 임상 결과는, 비제한적으로, 하나 이상의 증상 또는 병태의 경감 또는 완화, 질환 정도의 약화, 질환의 안정화된 (즉 악화되지 않는) 상태, 질환의 확산 예방, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 완화 또는 일시적 처방, 질환의 재발의 약화, 및 (부분적 또는 전체적이든) 차도를, 검출가능 또는 검출불가능하든, 포함한다. "치료하는" 및 "치료"는 또한 치료를 받지 않으면 기대된 생존에 비교된 경우 지속적 생존을 의미할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "치료하는" 및 "치료"는 또한 예방적 치료를 포함한다. 예를 들어, 초기 단계 AD를 가진 대상체는 진행을 예방하기 위해 치료될 수 있다. 진행을 예방하기 위해 본 명세서에서 기재된 화합물, 항체, 면역원, 핵산 또는 조성물로 치료될 수 있다.
- [0146] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "투여된"은 세포 또는 대상체에 본 개시내용의 화합물 또는 조성물의 치료적으로 효과적인 용량의 투여를 의미한다.
- [0147] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "유효량"은 요망된 결과를 달성하는데 필요한 기간 동안 그리고 투약량으로 효과적인 양을 의미한다. 대상체에 투여된 경우 유효량은 인자 예컨대 대상체의 질환 상태, 연령, 성별, 중량에 따라 다양할 수 있다. 투약량 레짐은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다.
- [0148] 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 담체, 희석제, 또는 부형제가 제형의 다른 성분과 양립가능하고 이들의 수령체에 실질적으로 유해하지 않다는 것을 의미한다.
- [0149] 하나 이상의 인용된 요소를 "포함하는" 또는 "포괄하는" 조성물 또는 방법은 구체적으로 인용되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체를 "포함하는" 또는 "포괄하는" 조성물은 항체를 단독으로 또는 다른 성분과 조합으로 함유할 수 있다.
- [0150] 본 개시내용의 범위 이해에서, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "구성되는" 및 그것의 파생어는 언급된 특징, 요소, 성분, 그룹, 정수, 및/또는 단계의 존재를 명시하는, 그리고 또한 다른 언급되지 않은 특징, 요소, 성분, 그룹, 정수 및/또는 단계의 존재를 배제하는 폐쇄형 용어들이다.
- [0151] 본 명세서에서 종점에 의한 수치 범위의 인용은 전체 수 및 그 범위 안에서 포함된 분수를 포함한다 (예를 들면 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.90, 4, 및 5를 포함한다). 모든 수 및 이들의 분수가 용어 "약"에 의해 수정되도록 추정되는 것이 또한 이해되어야 한다. 추가로, "한", "하나", 및 "그"가 내용이 달리 명확히 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함하는 것이 이해되어야 한다. 용어 "약"은 참조되는 수의 플러스 또는 마이너스 0.1 내지 50%, 5-50%, 또는 10-40%, 바람직하게는 10-20%, 더 바람직하게는 10% 또는 15%를 의미한다.
- [0152] 추가로, 특정 섹션에서 기재된 정의 및 구현예는 이들이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 바와 같이 적합한 것으로 기재된 본 명세서에서 다른 구현예에 적용가능하도록 의도된다. 예를 들어, 다음과 같은 구절에서, 본 발명의 상이한 측면은 더 상세히 정의된다. 상기 정의된 각각의 측면은 반대로 명확히 지시하지 않는 한 임의의 다른 측면 또는 측면들과 조합될 수 있다. 특히, 바람직한 또는 유리한 것으로서 나타난 임의의 특성은 바람직한 또는 유리한 것으로서 나타난 임의의 다른 특성 또는 특징과 조합될 수 있다.
- [0153] 관사 "한", "하나", 및 "그"의 단수 형태는 맥락이 명확히 달리 지시하지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 예를 들어, 용어 "화합물" 또는 "적어도 1개의 화합물"은, 이들의 혼합물을 포함하는, 복수의 화합물을 포함할 수

있다.

II. 에피토프 및 결합 단백질

- [0154] **II. 에피토프 및 결합 단백질**
- [0155] 본 발명자들은 A-베타의 아미노산 잔기 6 내지 9에서 A-베타HDSG (서열 식별 번호: 1)내 "에피토프 영역"을 확인하였다. 이들은 에피토프 영역이 형태적 에피토프일 수 있거나 상기를 포함할 수 있다는 것, 그리고 HDSG (서열 식별 번호: 1)이 A-베타의 올리고머성 중에서 결합하는 항체에 선택적으로 접근가능할 수 있다는 것을 추가로 확인하였다.
- [0156] 이론에 의해 제한되기를 바라지 않으면서, 피브릴은 올리고머화를 촉매화시키는 경향을 갖는 상호작용 부위를 나타낼 수 있다. 이것은 정상 개체에서 존재하지 않는 선택적 피브릴 표면이 노출된 그리고 A-베타 모노머와 비정상적인 상호작용을 갖는 경우 단지 발생할 수 있다. 환경 과제 예컨대 저 pH, 염증 동안 존재하는 삼투조절물질, 또는 산화적 손상은 더욱 약하게 안정적인 영역의 노출로 이어질 수 있는 피브릴에서 파괴를 유도할 수 있다. 그 다음, 이들 약하게-안정적인 영역을 예측하는 것, 그리고 이들을 표적할 수 있는 항체를 합리적으로 설계하기 위해 상기 예측을 이용하는 것이 관심이다. 피브릴에서 파괴될 것 같은 영역은 또한 올리고머성 중에서 노출된 영역에 대하여 양호한 후보일 수 있다.
- [0157] 장애의 경향이 있는 연속 단백질 영역을 예측하는 컴퓨터 기반 시스템 및 방법은, 그 전문이 본 명세서에 참고로 편입되어 있는 2015년 11월 9일 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 62/253044, **집단 좌표 바이어싱에 의한 미스폴딩 단백질 에피토프 예측용 시스템 및 방법**에서 기재된다. 실시예에서 기재된 바와 같이, 방법은 A-베타에 적용되었고 본 명세서에서 실증된 바와 같이 A-베타 올리고머에서 특이적으로 또는 선택적으로 더욱 접근가능한 에피토프를 확인하였다.
- [0158] 실시예에서 기재된 바와 같이 환형 펩티드 사이클로(CGHDSSG) (서열 식별 번호:2)는 모노머 및/또는 피브릴 중에 비하여 올리고머에서 HDSG (서열 식별 번호:1) 에피토프의 형태적 차이의 하나 이상을 포착할 수 있다. 예를 들어, 용매 접근가능한 표면적, 곡률, RMSD 구조적 정렬, 및 몇 개의 아미노산에 대하여 어떤 각 분포 그리고 환형 7-mer 사이클로 (CGHDSSG) (서열 식별 번호:2)에서 어떤 각의 차이는 어느 한쪽 모노머 및/또는 피브릴보다 실질적으로 상이한 것으로 알려졌고, 환형 펩티드가 선형 에피토프와 구별되는 형태적 에피토프를 제공한다는 것을 시사하였다. 항체는 모노머성 A-베타 및 A-베타 피브릴 플라크에 비교된 선형 CGHDSSG (서열 식별 번호:2) 및 선택적으로 결합된 합성 및/또는 원상태 올리고머성 A-베타 종보다 사이클로(CGHDSSG) (서열 식별 번호:2) 선택적으로 결합된 사이클로(CGHDSSG) (서열 식별 번호:2)를 포함하는 면역원을 이용하여 상승하였다. 사이클로(CGHDSSG)로 상승된 추가 항체는 A-베타 응집의 시험관내 증식을 억제시킬 수 있었다.
- [0159] **II. HDSG (서열 식별 번호: 1) "에피토프" 화합물**
- [0160] 따라서, 본 개시내용은 아미노산 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 이들의 일부로 구성되는 A-베타 상의 에피토프를 확인하고, HDSG (서열 식별 번호: 1)은 A-베타에서 아미노산 잔기 6-9에 상응한다. 실시예에서 실증된 바와 같이, ("HDSG 및 관련된 에피토프"로서 본 명세서에서 집합적으로 지칭된 에피토프에서 포함된) 에피토프 HDSG (서열 식별 번호:1), HDSGY (서열 식별 번호:4) 및 RHDSG (서열 식별 번호:5)는 A-베타 피브릴에서 장애 경향이 있는 영역으로서 확인되었다. 잔기 HDSG (서열 식별 번호: 1)은 집단 좌표법을 이용하는 2 예측에서 부각하였고, 한편 상기 에피토프의 측점하는 잔기, R5 및 Y10, 각각은 하나의 예측에서 발생하였다.
- [0161] 한 측면은 관련된 에피토프의 서열 및/또는 전술한 것 중 임의의 것의 일부인, HDSG(서열 식별 번호:1)을 포함하거나 상기로 구성되는 단리된 A-베타 펩티드를 포함하는 화합물을 포함한다.
- [0162] 한 구현예에서, A-베타 펩티드는 HDSG(서열 식별 번호:1), HDSGY(서열 식별 번호:4) 또는 RHDSG(서열 식별 번호:5)를 포함하거나 상기로 구성되는 아미노산 서열로부터 선택된다. 한 구현예에서 A-베타 펩티드는 표 12에서 에피토프의 어느 하나에서 제시된 바와 같은 A-베타 펩티드의 서열을 갖는다. 한 구현예에서, 화합물은 임의의 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호:2, 28 및 29에서 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.
- [0163] 한 구현예에서, 화합물은 환형 화합물, 예컨대 사이클로펩티드이다. 용어 사이클로펩티드 및 환형 펩티드는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0164] 일부 구현예에서, HDSG (서열 식별 번호: 1) (또는 이의 일부)를 포함하는 A-베타 펩티드는 HDSG (서열 식별 번호: 1) (또는 이의 일부)의 A-베타, N- 및/또는 C- 말단에서 존재하는 1, 2 또는 3 추가의 잔기를 포함할 수 있고, 예를 들어 A-베타 펩티드는 1 잔기 N-말단을 포함할 수 있고 RHDSG(서열 식별 번호:5)일 수 있다. 예를 들어 서열 식별 번호: 3의 A-베타 서열에서 보여진 바와 같이, A-베타에서 HDSG(서열 식별 번호:1)에 3 아미노산

N-말단은 EFR이고 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 3 아미노산 C-말단은 YEV이다. 구현예에서, A-베타 펩티드를 포함하는 화합물이 고리화되는 경우, A-베타 펩티드는 8, A-베타 잔기, 7 A-베타 잔기 또는 6 A-베타 잔기의 최대이다 또는 이다. 한 구현예에서, A-베타 펩티드는 5 A-베타 잔기의 최대이다 또는 이다. 예를 들어, A-베타 펩티드가 6 아미노산인 경우 아미노산 서열 RHDSGY (서열 식별 번호:13), HDSGYE(서열 식별 번호:11), DSGYEV(서열 식별 번호:15) 또는 FRHDSG(서열 식별 번호:16)을 포함할 수 있거나 상기로 구성될 수 있다.

- [0165] 한 구현예에서, 화합물은 추가로 링커를 포함한다. 링커는 스페이서 및/또는 하나 이상의 기능화가능한 모이어티를 포함한다. 링커는 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 아미노산 및/또는 동등하게 기능하는 분자 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티, 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 스페이서 아미노산은 비-면역원성 또는 저조하게 면역원성 아미노산 잔기 예컨대 G 및 A로부터 선택되고, 예를 들어 스페이서는 GGG, GAG, G(PEG)G, PEG-PEG-GG 및 기타 동종일 수 있다. 하나 이상의 기능화가능한 모이어티 예를 들면 작용기를 가진 아미노산은 예를 들어 제제 또는 검출가능한 표지 또는 담체 예컨대 BSA 또는 면역원성 증강제 예컨대 KLH에 화합물 커플링을 위하여 포함될 수 있다.
- [0166] 한 구현예에서 링커는 GC-PEG, PEG-GC, GCG 또는 PEG-C-PEG를 포함한다.
- [0167] 한 구현예에서, 링커는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 아미노산을 포함한다.
- [0168] HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 이의 일부를 포함하는 A-베타 펩티드가 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 N- 및/또는 C- 말단인 A-베타에서 발견된 1, 2 또는 3 추가의 잔기를 포함하는 구현예에서 링커는 A-베타 잔기의 N- 및/또는 C- 말단에 공유결합된다 (예를 들면 펩티드가 RHDSG(서열 식별 번호:5)인 경우, 링커는 R 및 G 잔기에 공유결합된다). 유사하게, A-베타 펩티드가 HDSG(서열 식별 번호:1)인 경우, 링커는 잔기 H 및 G에 공유결합되고 A-베타 펩티드가 HDSGY(서열 식별 번호:4)인 경우, 링커는 잔기 H 및 Y에 공유결합된다.
- [0169] 화합물 (또는 상기 링커가 또한 단백질성인 화합물)의 단백질성 부분은 단백질의 화학에서 잘 알려진 기술 예컨대 고상 합성 또는 균질한 용액내 합성을 이용하는 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다.
- [0170] 언급된 바와 같이, 화합물은 환형 화합물일 수 있다. 본 명세서에서 "환형 펩티드" 언급은 (예를 들면 링커가 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 아미노산인) 완전히 단백질성 화합물을 지칭할 수 있다. 실시예에서 계측된 환형 펩티드에 대하여 기재된 특성이 비-아미노산 링커 분자를 포함하는 다른 화합물 (예를 들면 다른 환형 화합물)에서 편입될 수 있다는 것이 이해된다. 용어 "사이클로펩티드" 및 "환형 펩티드"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0171] 한 측면은 따라서 펩티드 HDSG (서열 식별 번호: 1) (또는 이의 일부 예컨대 DSG) 및 링커를 포함하는 환형 화합물을 제공하고, 여기서 상기 링커는 HDSG (서열 식별 번호: 1) (예를 들면 펩티드가 HDSG (서열 식별 번호: 1)로 구성되는 경우 H 및 G 잔기)를 포함하는 펩티드에 직접적으로 또는 간접적으로 공유적으로 커플링된다. 환형 화합물에서 예를 들어, 적어도 H, D 및/또는 S는 상응하는 선형 펩티드로, 임의로 더욱 제한된 형태로 H,D 및/또는 S 이외 대안적 형태이다.
- [0172] 한 구현예에서, 환형 화합물은 HDSG (서열 식별 번호:1) 및 최대 6 A-베타 잔기 (예를 들면 HDSG(서열 식별 번호:1)에 1 또는 2 아미노산 N 및/또는 C 말단)을 포함하는 A-베타 펩티드 및 링커를 포함하고, 여기서 상기 링커는 A-베타 펩티드의 펩티드 N-말단 잔기 및 C-말단 잔기에 직접적으로 또는 간접적으로 공유적으로 커플링된다. 환형 화합물에서 예를 들어 적어도 D는 상응하는 선형 펩티드에서 D 이외 대안적 형태이거나, 적어도 S는 상응하는 선형 펩티드에서 S 이외 대안적 형태이고 임의로 여기서 적어도 H, 또는 적어도 D는 포함하는 상응하는 선형 펩티드에서 점유된 형태 이외 더욱 제한된 형태이다.
- [0173] 환형 화합물은, 고리화에 앞서, A-베타 펩티드, 임의로 HDSG(서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프를 포함하는 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 공유결합된 링커와 선형 분자로서 합성될 수 있다. 대안적으로 링커의 일부는 N-말단에 공유결합되고 일부는 고리화에 앞서 C-말단에 공유결합된다. 어느 경우이나, 선형 화합물은 예를 들어 헤드 투 테일 고리화 (예를 들면 아미드 결합 고리화)에서 고리화된다.
- [0174] 한 구현예에서 환형 화합물은 HDSG(서열 식별 번호:1)을 포함하거나 상기로 구성되는 A-베타 펩티드 및 링커를 포함하고, 여기서 상기 링커는 펩티드의 N- 및 C- 말단 (예를 들면 펩티드가 HDSG(서열 식별 번호:1)로 구성되는 경우 H 및 G 잔기.)에 커플링된다. 한 구현예에서, 적어도 H, D 및/또는 S는 HDSG (서열 식별 번호: 1)을 포함하는 선형 화합물, (예를 들면 선형 펩티드)에서 H, D 및/또는 S에 의해 점유된 것 이외 환형 화합물에서 대안적 형태이다.

- [0175] A-베타 서열을 포함하는 선형 펩티드는 선형 화합물에서 포함될 수 있다. 선형 화합물 또는 HDSG(서열 식별 번호: 1)을 포함하는 선형 펩티드는 한 구현예에서 상응하는 선형 펩티드이다. 또 다른 구현예에서, 선형 펩티드는, 예를 들어 A-베타 잔기 1-35를 포함하는 선형 펩티드, 또는 이의 더 작은 부분 예컨대 A-베타 잔기 1-20, 2-20, 3-20, 1-15, 3-15, 3-12 및 기타 동중 등을 포함하여, HDSG(서열 식별 번호: 1)을 포함하는 A-베타 펩티드의 임의의 길이이다. 선형 펩티드는 일부 구현예에서 또한 전장 A-베타 펩티드일 수 있다.
- [0176] 한 구현예에서, 적어도 H, D 및/또는 S는, 모노머 및/또는 피브릴에서, 잔기에 의해, 임의로 H 및/또는 D에 의해 점유된 것 이외 환형 화합물에서 대안적 형태이다.
- [0177] 한 구현예에서, 적어도 D, S 및/또는 H는, 모노머 및/또는 피브릴에서, 잔기에 의해, 임의로 D 및/또는 S에 의해 점유된 것 이외 환형 화합물에서 대안적 형태이다.
- [0178] 한 구현예에서, 대안적 형태는 제한된 형태이다.
- [0179] 한 구현예에서, 적어도 H는, 임의로 단독으로 또는 적어도 D와 조합으로, HDSG(서열 식별 번호: 1)을 포함하는 선형 펩티드에서 점유된 형태 이외 더 제한된 형태이다.
- [0180] 한 구현예에서, 하나 이상의 D 및/또는 S와 조합으로 H 및/또는 H의 형태는 대안적 형태로, 임의로 더 제한된 형태로 화합물에서 포함된다.
- [0181] 도 6에서 나타낸 바와 같이, 잔기 H 및 D는 선형 펩티드에서 존재하는 형태적 앙상블에 비교된 환형 화합물에서 더 제한된 형태이다. 도는 H에 대하여 대략 81.7% 엔트로피 감소 및 D에 대하여 대략 49.8% 엔트로피 감소가 있다는 것을 보여준다. 한 구현예에서, 환형 화합물은, 엔트로피에서 그 잔기의 감소에 의해 정량화된 경우, 상응하는 선형 화합물에 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35% 또는 적어도 40% 더 제한되는 형태 H 및/또는 D를 갖는다.
- [0182] 예를 들어, 대안적 형태는 피브릴의 맥락에서 선형 펩티드 및/또는 펩티드에서 어떤 각과 상이한 임의로 D 및/또는 S에서 그리고, 잔기 H, 및/또는 D, 및/또는 S에서 하나 이상의 상이한 어떤 각을 포함할 수 있다.
- [0183] 도 4에서 나타낸 바와 같이, D7의 어떤 각 분포는 피브릴의 맥락에서 선형 펩티드 또는 잔기에 비교된 환형 펩티드에서 실질적으로 상이하다. 한 구현예에서, 환형 화합물은, 선형 펩티드 및/또는 피브릴의 맥락에서 상응하는 어떤 각 이외 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도, 적어도 60 도, 적어도 70 도, 적어도 80 도, 적어도 90 도, 적어도 100 도, 적어도 110 도, 적어도 120 도, 적어도 130 도, 또는 적어도 140 도 상이한 (또한 O-C-CA-CB로서 지칭된) O-C-C α -C β 어떤 각을 포함하는 D를 포함한다. 예를 들어, 표 1은, 모의실험된 선형 펩티드, 환형 펩티드, 및 피브릴에 대하여, 상기 어떤 각에서 차이가 환형과 선형 사이 약 160 도이고, 환형과 피브릴 사이 약 195 도인 것을 나타낸다. 따라서 한 구현예에서, 환형 화합물은, 피브릴의 맥락에서 상응하는 어떤 각 이외 적어도 140 도 상이한, 적어도 150 도 상이한, 적어도 160 도 상이한, 적어도 170 도 상이한 (또한 O-C-CA-CB로서 지칭된) O-C-C α -C β 어떤 각을 포함하는 D를 포함한다.
- [0184] 표 1은 또한, 예를 들어 잔기 H, D 및 S에서의 것을 포함하는, 다른 각에 대하여 어떤 각 분포에서 차이를 확인한다.
- [0185] 따라서 한 구현예에서 환형 화합물은 H, D 및 S로부터 선택된 A-베타 펩티드 잔기를 포함하고, 여기서 적어도 1개의 어떤 각은 선형 화합물의 맥락에서 상응하는 어떤 각 이외 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도, 적어도 60 도, 적어도 70 도, 적어도 80 도, 적어도 90 도, 적어도 100 도, 적어도 110 도, 적어도 120 도, 적어도 130 도 또는 적어도 140 도 상이하다.
- [0186] 한 구현예에서, 환형 화합물은 환형 화합물과 선형 펩티드 사이 최소 평균 측쇄/골격 어떤 각 차이를 포함한다. 예를 들어, 환형과 선형 펩티드 사이 평균 측쇄/골격 어떤 각 차이가 아래와 같다는 것이 표 3에서 열거된 도심 형태에 대하여 실증된다: H: 28.5 도, D: 133 도, S: 129 도, G: 13 도. 환형과 피브릴 사이 상응하는 수는 H: 51 도, D: 103 도, S: 114 도, G: 73 도이다.
- [0187] 따라서, 한 구현예에서, 환형 화합물은 적어도 하기의 선형 펩티드에 비교된 평균 측쇄 차이를 포함한다: H에 대하여, 적어도 20 도; D 및/또는 S에 대하여 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도, 적어도 60 도, 적어도 70 도, 적어도 80 도, 적어도 90 도, 적어도 100 도, 적어도 110 도 또는 적어도 120 도; 및/또는 G에 대하여, 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도 또는 적어도 60 도.
- [0188] 각 차이는 예를 들어 양성 또는 음성, (+) 또는 (-)일 수 있다.

- [0189] 대안적 형태는 대안적 골격 배향을 포함할 수 있다. 예를 들어, 환형 에피토프가 항체에 대하여 노출시키는 골격 배향은 선형 또는 피브릴 형태에 비교하여 상이하다.
- [0190] 도 7은 PDB 2M4J로부터 초기 조건을 이용하는 평형화된 피브릴 구조의 맥락에서 서열 CGHSGG, 뿐만 아니라 HDSG (서열 식별 번호: 1)로 구성되는 양쪽 선형 및 환형 펩티드에서 잔기 H6, D7, S8, 및 G9에 대하여, 평형 모의실험에서 샘플링된 ϕ 및 ψ 각을 플롯팅한다. 도 7로부터 환형 펩티드에서 골격 이면 각 (라마찬드란 ϕ/ψ 각)의 분포가 피브릴 구조 2M4J 맥락에서 어느 한쪽 선형 펩티드에 대하여, 또는 A-베타 펩티드 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여, 특히 잔기 D7 및 S8에 대하여 샘플링된 라마찬드란 각의 분포와 상이하다는 것이 보여진다. 표 2는 골격 ϕ/ψ 각의 분포의 피크 값에 대하여 차이를 열거한다. 유사하게 표 3은 (도 10에서 플롯팅된) 도심 구조에 대하여 차이 및 골격 ϕ/ψ 각을 보여준다. 예를 들어, 이면 각이 표 3에서 열거되는, 최대 선형 클러스터 및 최대 피브릴 클러스터의 도심 형태에 대하여, 환형과 선형 펩티드 사이 평균 골격 라마찬드란 각 차이 ($\Delta\phi, \Delta\psi$)는 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 아래와 같이 주어지고: (-3.0, -1.1) 도, (72.6, 164.1) 도, (67.8, 195.1) 도, (-38.8, 13.4) 도; 환형과 피브릴 펩티드 사이 평균 골격 라마찬드란 각 차이 ($\Delta\phi, \Delta\psi$)는 아래와 같이 주어진다: (-53.7, 29.7) 도, (4.7, -154.5) 도, (86.5, 129) 도, (127, -163.8) 도.
- [0191] 따라서, 한 구현예에서, 환형 화합물은 골격 ϕ/ψ 각이 피브릴 PDB 구조에서 또는 상응하는 선형 펩티드에 비교하여 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도, 적어도 60 도, 적어도 70 도, 적어도 80 도 상이한, 적어도 90 도, 적어도 100 도, 적어도 110 도, 적어도 120 도, 적어도 130 도, 적어도 140 도, 적어도 150 도, 적어도 160 도, 적어도 170 도 또는 적어도 180 도인 적어도 1개의 잔기를 가진 A-베타 펩티드를 포함한다.
- [0192] 대안적 형태는 또한 상응하는 선형 펩티드 및/또는 A-베타 피브릴에 비하여 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프를 포함하는 환형 화합물의 또는 아미노산 주변 중심에 있는 곡률에서 증가를 포함할 수 있다.
- [0193] 한 구현예에서, 대안적 형태 HDSG (서열 식별 번호: 1)은 선형 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 비하여 증가된 곡률을 갖는다. 실시예에서 나타낸 바와 같이, 환형 화합물에서 D7 및 S8의 위치에서 골격의 곡률은 실시예 2에 기재된 바와 같이 피브릴 (도 2)의 맥락에서 펩티드 또는, 선형 펩티드에서 그들 위치에서 곡률에 비하여 증가된다.
- [0194] 곡률의 값은 피브릴의 맥락에서 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2), 선형 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2), 및 HDSG (서열 식별 번호: 1)에서 H, D, S, G에 대하여 측정되었고 실시예 2에 기재된다.
- [0195] 따라서, 화합물은 대안적 형태에서 D 및/또는 S의 곡률이 피브릴의 맥락에서 상응하는 선형 펩티드, 또는 D7 또는 S8에 비교하여 적어도 0.1, 0.2, 0.3 또는 초과 라디안만큼 증가되는 A-베타 펩티드를 포함한다.
- [0196] 한 구현예에서, HD, DS, SG, HDS, DSG, 및/또는 HDSG (서열 식별 번호: 1)은, 예를 들어 비-올리고머성 형태, 예컨대 선형 펩티드 및/또는 피브릴에서 이들 잔기에 의해 점유되는 것에 비교된 경우, 대안적 형태이다.
- [0197] 추가로 측쇄의 엔트로피는 선형 펩티드에 비하여 환형 펩티드에서 감소되어, 측쇄를 선형 펩티드보다 더욱 구조화된 형태로 만든다.
- [0198] 본 명세서에서 실증된 바와 같이, 환형 화합물의 곡률은 선형 펩티드에서 또는 피브릴의 맥락에서 펩티드에 대한 것보다 상이한 일부 아미노산에 대한 것이다 (도 2). 예를 들어 상응하는 선형 펩티드에 비교된 환형 화합물 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2)의 맥락에서 D7의 곡률은 증가된다.
- [0199] 따라서 하나의 구현예에서, 환형 화합물에서 D 및/또는 S의 곡률은 상응하는 선형 화합물에 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 또는 적어도 30%만큼 증가된다.
- [0200] 잔기 H, 및/또는 D, 및/또는 S 내 이면 각의 하나 이상이 피브릴의 맥락에서 선형 펩티드 또는 펩티드에서 이면 각과 상당히 상이한 경향이 있다는 것이 또한 실증된다. 이들 아미노산에 대하여, 용매 접근가능한 표면적 (SASA)이 용해도에 의해 칭량되는 경우, 잔기 S8을 더욱 강조한다. H6의 측쇄의 엔트로피는 선형 펩티드 및 심지어 피브릴에 비하여 환형 펩티드에서 감소되어, 상기 잔기에 대하여 제한된 자세를 갖는 경향을 암시한다.
- [0201] 유사한 변화를 보여주는 환형 화합물이 또한 포함된다.
- [0202] 일부 구현예에서 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프를 포함하는 펩티드를 포함하는 환형 화합물은 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프의 직접적으로 업스트림 및/또는 다운스트림으로 A-베타에서 1, 2, 3 또는 초과 잔기를 포함할 수 있다. 그와 같은 경우에 스페이서는 A-베타 서열의 상응하는 잔기의 단부의

N- 및 C- 말단에 공유결합된다.

- [0203] 일부 구현예에서, 링커 또는 스페이서는 A-베타 펩티드의 N- 및 C-말단 잔기에 간접적으로 커플링된다.
- [0204] 한 구현예에서, 환형 화합물은 도 11B에서 보여진 화합물이다.
- [0205] 고리화된 펩티드 제조 방법은 당해 기술에 공지되어 있고 SS-고리화 또는 아미드 고리화 (헤드-투-테일, 또는 골격 고리화)를 포함한다. 방법은 실시예 3에 추가로 기재된다. 예를 들어, 그것의 N- 및 C-말단에서 "C" 잔기, 예를 들면 CGHDSGGC (서열 식별 번호: 2)를 가진 펩티드는 SS-고리화에 의해 반응되어 환형 펩티드를 생산할 수 있다.
- [0206] 실시예 2에 기재된 바와 같이, 도 11B의 환형 화합물은 확인된 형태적 에피토프에 그것의 관련성에 대하여 평가되었다. HDSG (서열 식별 번호: 1) 펩티드를 예를 들어 포함하는 환형 화합물은 하나 이상의 형태적 특징에 대하여 선택적 항체를 상승시키는데 사용될 수 있다.
- [0207] 에피토프 HDSG (서열 식별 번호: 1) 및/또는 이의 일부는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 A-베타에 관여된 A-베타의 미스폴딩된 증식 균주에서 잠재 표적, 및 형태적 에피토프가 예를 들어 상기 증식 균주 검출에서 유용할 수 있다는 것을 인식하는 항체일 수 있다.
- [0208] 또 다른 측면에서 또한 제공된 것은, 선형 펩티드 및 환형 펩티드를 포함하는, 본 명세서에서 기재된 A-베타 펩티드 서열을 포함하는 단리된 펩티드이다. 선형 펩티드는 예를 들어 이에 결합의 결여를 위하여 항체 선택에 사용될 수 있다. 단리된 펩티드는 본 명세서에서 기재된 링커 서열을 포함할 수 있다. 링커는 N 또는 C 말단에 공유적으로 커플링될 수 있거나 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2) 선형 펩티드에서처럼 N 말단에 부분적으로 커플링될 수 있고 C 말단에 부분적으로 커플링될 수 있다. 환형 펩티드에서, 링커는 C-말단 및 N-말단에 직접적으로 또는 간접적으로 커플링된다.
- [0209] 또 다른 측면은 화합물, 임의로 본 명세서에서 기재된 환형 화합물을 포함하는 면역원을 포함한다. 면역원은 또한 예를 들어 HDS, DSG 또는 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 추가의 A-베타 서열을 포함할 수 있다. 아미노산은 HDS, DSG 또는 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프 서열의 직접적으로 업스트림 및/또는 다운스트림 (즉 N-말단 및/또는 C-말단)일 수 있다. 상기 면역원에 대한 상승된 항체는 예를 들어 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프를 포함하는 사이클로펩티드에 결합을 위하여 선택될 수 있다.
- [0210] 면역원은 대상체에 투여를 위하여 적합하게 제조되거나 제형화되고, 예를 들어, 면역원은 멸균될 수 있거나, 정제될 수 있다.
- [0211] 한 구현예에서, 면역원은 HDSG 또는 관련된 에피토프를 포함하는 환형 펩티드이다.
- [0212] 한 구현예에서, 면역원은 면역원성 증강제 예컨대 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 또는 MAP 항원을 포함한다. 면역원성 증강제는 직접적으로, 예컨대 결합된 아미드를 통해, 또는 간접적으로 링커에서 기능화가능한 모이어티를 통해 화합물에 커플링될 수 있다. 링커가 (예를 들어 환형 화합물에서 A-베타 펩티드로 6 아미노산 잔기인) 단일 아미노산 잔기인 경우 링커는 기능화가능한 모이어티 (예를 들면 시스테인 잔기)일 수 있다.
- [0213] 면역원은, 본 명세서에서 참고로 편입된, Lateef 등 2007에 기재된 방법을 예를 들어 이용하여 면역원성 증강제 예컨대 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) 또는 담체 상기 소 혈청 알부민 (BSA)에 제한된 에피토프 펩티드를 함유하는 환형 화합물을 콘주게이션시킴으로써 생산될 수 있다. 한 구현예에서, 실시예 3 또는 4에 기재된 방법이 사용된다.
- [0214] 추가 측면은 본 명세서에서 기재된 화합물 또는 면역원의 단백질성 부분을 암호화하는 단리된 핵산 분자이다.
- [0215] 구현예에서, 핵산 분자는 서열 식별 번호: 1-16에서 제시된 아미노산 서열의 어느 하나를 암호화한다.
- [0216] 한 구현예에서, 핵산 분자는 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프 및 임의로 본 명세서에서 기재된 링커를 암호화한다.
- [0217] 추가 측면은 상기 핵산을 포함하는 벡터이다. 적합한 벡터는 본 명세서에서 다른 곳에 기재된다.
- [0218] **III. 항체, 세포 및 핵산**
- [0219] 화합물 및 특히 상기 기재된 환형 화합물은 A-베타 (예를 들면 잔기 6-7, 6-8 또는 6-9)에서 DS, HDS 또는 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 특이적으로 결합하는 및/또는 A-베타의 중, 예를 들어 A-베타의 올리고머성 중에서 DS, HDSV 또는 HDSG (서열 식별 번호: 1)의 특이적 형태를 인식하는 항체를 상승시키는데 사용될 수 있다. 유사하게

예를 들어 본 명세서에서 기재된 RHDSG (서열 식별 번호: 5), HDSGY(서열 식별 번호: 4), HDSG (서열 식별 번호: 1) 및/또는 다른 관련된 에피토프 서열을 포함하는 환형 화합물은 HDSG (서열 식별 번호: 1) 등 및/또는 이들의 특이적 형태적 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 상승시키는데 사용될 수 있다. 본 명세서에서 실증된 바와 같이, 항체는 선형 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2)보다 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)에 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 결합하였던, 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)로 상승되었다.

- [0220] 따라서 측면으로서 예를 들어 서열 식별 번호: 1 내지 16의 어느 하나에서 제시된 바와 같은, 서열 HDSG (서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프 서열을 갖는 A-베타 펩티드에 특이적으로 결합하는 (이의 결합 단편을 포함하는) 항체를 포함한다.
- [0221] 한 구현예에서, A-베타 펩티드는 환형 펩티드에서 포함되고 항체는 환형 화합물에서 제시된 A-베타에 대하여 특이적 또는 선택적이다.
- [0222] 한 구현예에서, 항체는 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 환형 화합물의 A-베타 펩티드에 결합하고, 여기서 상기 A-베타는 서열 식별 번호: 1 내지 16의 어느 하나에서 제시된 바와 같은 서열을 갖는다.
- [0223] 한 구현예에서, 환형 화합물은 환형 펩티드이다. 한 구현예에서, 환형 펩티드내 A-베타 펩티드는 서열 식별 번호: 1-16의 어느 하나이다. 추가 구현예에서, 환형 펩티드는 서열 식별 번호: 2, 12, 28 또는 29에서 제시된 바와 같은 서열을 갖는다.
- [0224] 실시예에서 기재된 바와 같이, 하나 또는 특성을 갖는 항체는 실시예에서 기재된 검정을 이용하여 선택될 수 있다.
- [0225] 한 구현예에서, 항체는 서열 HDSG (서열 식별 번호: 1)을 포함하는 선형 펩티드에 결합하지 않고, 임의로 여기서 선형 펩티드의 상기 서열은, 임의로 서열 식별 번호: 2, 12, 28 또는 29에서 제시된 바와 같이, 항체를 상승시키는데 사용된 환형 서열의 선형 버전이다.
- [0226] 한 구현예에서, 항체는 A-베타 펩티드를 포함하는 상응하는 선형 화합물에 비하여 환형 화합물에서 나타낸 바와 같이 A-베타 펩티드에 대하여 선택적이다.
- [0227] 한 구현예에서, 항체는 A-베타 상의 에피토프, HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 이의 관련된 에피토프를 포함하는 또는 구성되는 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0228] 한 구현예에서, A-베타에서 항체에 의해 특이적으로 또는 선택적으로 인식된 에피토프는 형태적 에피토프이다.
- [0229] 한 구현예에서, 항체는 단리된다.
- [0230] 한 구현예에서, 항체는 외인성 항체이다
- [0231] 실시예에서 기재된 바와 같이, 환형 화합물에서 H, D, 및/또는 S는 상응하는 선형 펩티드, 모노머 및/또는 피브릴 형태와 구별되는 A-베타의 형태로 노출될 수 있거나 대개 접근가능할 수 있다.
- [0232] 따라서 추가 측면은 A-베타 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체이고, 여기서 상기 에피토프는 항체로의 결합에 주로 관여된 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하거나 상기로 구성되고, 여기서 상기 적어도 1개의 아미노산은 서열 HDSG (서열 식별 번호:1) 안에서 내장된 H, D 또는 S이다. 한 구현예에서, 에피토프는 항체로의 결합에 주로 관여된 적어도 2개의 연속 아미노산 잔기를 포함하거나 상기로 구성되고, 여기서 상기 적어도 2개의 연속 아미노산은 HDSG (서열 식별 번호:1) 안에서 내장된 HD 또는 DS 또는 SG이다.
- [0233] 또 다른 구현예에서, 에피토프는 HDSG (서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프로 구성된다.
- [0234] 한 구현예에서, 항체는 형태 선택적 항체이다. 한 구현예에서, 항체는 상응하는 선형 서열에 비교된 본 명세서에서 기재된 에피토프 펩티드 서열을 포함하는 환형 화합물에 선택적으로 결합한다. 예를 들어 특정한 에피토프 형태에 결합하는 항체는 형태 특이적 항체로서 지칭될 수 있다. 그와 같은 항체는 본 명세서에서 기재된 방법을 이용하여 선택될 수 있다. 형태 선택적 항체는 특정한 A-베타 종 또는 관련된 종 (예를 들면 이량체, 삼량체, 및 다른 올리고머성 종)의 그룹을 차별적으로 인식할 수 있고 또 다른 것에 (예를 들면 어느 한쪽 모노머 또는 피브릴 종에) 비교된 하나의 종 또는 종의 그룹에 대하여 더 높은 친화성을 가질 수 있다.
- [0235] 한 구현예에서, 항체는 모노머성 A-베타에 특이적으로 결합하지 않는다. 한 구현예에서, 항체는, 예를 들어 AD 뇌 조직에서 동일계내, A-베타 노인성 플라크에 특이적으로 결합하지 않는다.
- [0236] 또 다른 구현예에서, 항체는 원상태- 또는 합성- 올리고머성 A-베타에 비교된 모노머성 A-베타에 선택적으로 결

합하지 않는다.

- [0237] 예를 들어, 항체는 H, D 및 S로부터 선택된 잔기를 포함하는 환형 화합물에 특이적으로 결합할 수 있고, 여기서 적어도 1개의 이면 각은, 선형 화합물의 맥락에서 상응하는 이면 각 이외, 환형 화합물에서 적어도 30 도, 적어도 40 도, 적어도 50 도, 적어도 60 도, 적어도 70 도, 적어도 80 도, 적어도 90 도, 적어도 100 도, 적어도 110 도, 적어도 120 도, 적어도 130 도 또는 적어도 140 도 상이하다.
- [0238] 한 구현예에서, 항체는, HDSG (서열 식별 번호: 1), 예컨대 상응하는 서열을 포함하는 선형 펩티드에 비하여, 환형 화합물에서 A-베타 펩티드, HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 이의 일부를 포함하는 A-베타에 선택적으로 결합한다. 예를 들어, 한 구현예에서 항체는 환형 형태에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 선택적으로 결합하고, 예를 들어 ELISA, 또는 임의로 본 명세서에서 기재된 방법에 의해 측정된 경우, 선형 펩티드에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 비교된 환형 형태에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 적어도 2 배, 적어도 3 배, 적어도 5 배, 적어도 10 배 적어도 20 배, 적어도 30 배, 적어도 40 배, 적어도 50 배, 적어도 100 배, 적어도 500 배, 적어도 1000 배 더 큰 선택성 (예를 들면 더 큰 결합 친화성)을 갖는다.
- [0239] 한 구현예에서, 환형 화합물은 서열 식별 번호: 12, 28 또는 29에서 제시된 바와 같은 서열을 가진 환형 화합물 또는 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)이다.
- [0240] 한 구현예에서, 항체는 환형 화합물 및/또는 올리고머성 A-베타에서 A-베타 펩티드에 선택적으로 결합한다. 한 구현예에서, 선택성은 상응하는 선형 펩티드를 포함하는 화합물 및/또는 A-베타 피브릴 및/또는 A-베타 모노머로부터 선택된 A-베타의 종에 대해 환형 화합물 및/또는 A-베타 올리고머에서 A-베타 펩티드에 대하여 적어도 2 배, 적어도 3 배, 적어도 5 배, 적어도 10 배, 적어도 20 배, 적어도 30 배, 적어도 40 배, 적어도 50 배, 적어도 100 배, 적어도 500 배, 적어도 1000 배 더 선택적이다.
- [0241] 한 구현예에서, 항체는 (노인성 플라크로서도 지칭된) A-베타 피브릴 플라크 염색이 결여되어 있다. 플라크 염색의 부재는 양성 대조군 예컨대 A-베타-특이적 항체 6E10 및 4G8 (Biolegend, San Diego, CA), 또는 2C8 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) 및 아이소타입 대조군에 비교에 의해 평가될 수 있다. 본 명세서에서 기재된 항체는 항체가 전형적인 플라크 형태학 염색을 보여주지 못하면 그리고 염색의 수준이 IgG 음성 아이소타입 대조군으로 보여진 수준의 2 배 이하이거나 수준에 비교할만하면 A-베타 피브릴 플라크 염색이 결여되거나 미소량을 갖는다. 척도는 예를 들어 1에서 아이소타입 대조군으로 그리고 10에서 6E10으로 염색의 수준을 셋팅할 수 있다. 항체는 그와 같은 척도로 염색의 수준이 2 이하이면 A-베타 피브릴 플라크 염색이 결여되어 있다. 구현예에서, 항체는, 예를 들어 약 또는 3 미만으로 채집된 전술한 척도, 수준에서 최소 A-베타 피브릴 플라크 염색을 보여준다.
- [0242] 한 구현예에서, 항체는 단클론성 항체이다.
- [0243] 단클론성 항체를 생산하기 위해, 항체 생산 세포 (B 림프구)는 본 명세서에서 기재된 면역원으로 면역화된 대상체로부터 수확될 수 있고, 따라서 이들 세포를 불멸화하고 하이브리도마 세포를 산출하는 표준 체세포 세포 융합 절차에 의해 골수종 세포와 융합될 수 있다. 상기 기술은 당해 분야, (예를 들면 Kohler and Milstein (Nature 256:495-497 (1975))에 의해 본래 개발된 하이브리도마 기술) 뿐만 아니라 다른 기술 예컨대 인간 B-세포 하이브리도마 기술 (Kozbor 등, Immunol.Today 4:72 (1983)), 인간 단클론성 항체를 생산하기 위한 EBV-하이브리도마 기술 (Cole 등, Methods Enzymol, 121 : 140-67 (1986)), 및 조합성 항체 라이브러리의 스크리닝 (Huse 등, Science 246:1275 (1989))에서 잘 알려진다. 하이브리도마 세포는 본 명세서에서 기재된 에피토프 서열과 특이적으로 반응성인 항체의 생산을 위하여 면역화학적으로 스크리닝될 수 있고 단클론성 항체는 단리될 수 있다.
- [0244] 특정한 항원 또는 분자에 대한 반응성인, 특이적 항체, 또는 항체 단편은 또한, 세포 표면 성분을 가진 박테리아에서 발현된, 면역글로불린 유전자, 또는 이의 부분을 암호화하는 발현 라이브러리 스크리닝에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 완전한 Fab 단편, VH 영역 및 FV 영역은 파아지 발현 라이브러리를 이용하여 박테리아에서 발현될 수 있다 (참조 예를 들어 Ward 등, Nature 41:544-546 (1989); Huse 등, Science 246:1275-1281 (1989); 및 McCafferty 등, Nature 348:552-554 (1990)).
- [0245] 한 구현예에서, 항체는 인간화된 항체이다.
- [0246] 비-인간 종으로부터 항체의 인간화는 문헌에서 양호하게 기재되어 왔다. 참조 예를 들어 EP-B1 0 239400 및 Carter & Merchant 1997 (Curr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997 그 전문이 본 명세서에서 참고로 편입됨). 인간화된 항체는 상업적으로 또한 쉽게 수득된다 (예를 들면 Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham,

Middlesex, Great Britain.).

- [0247] 설치류 항체의 인간화된 형태는 CDR 이식 (Riechmann 등 Nature, 332:323-327, 1988)에 의해 쉽게 생성된다. 상기 접근법에서 설치류 단클론성 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 6 CDR 루프는 상응하는 인간 프레임워크 영역에 연결된다. 프레임워크 영역의 아미노산이 항원 인식에 영향을 미칠 수 있음에 따라 CDR 이식은 종종 감소된 친화성을 가진 항체를 산출한다 (Foote & Winter. J MolBiol, 224: 487-499, 1992). 항체의 친화성을 유지시키기 위해, 부위 지향된 돌연변이유발 또는 다른 재조합 기술에 의해 특정 프레임워크 잔기를 대체하는 것이 종종 필요하고 항원 결합 부위의 컴퓨터 모델링에 의해 촉진될 수 있다 (Co 등 J Immunol, 152: 2968-2976, 1994).
- [0248] 항체의 인간화된 형태는 재표면화에 의해 임의로 수득된다 (Pedersen 등 J MolBiol, 235: 959-973, 1994). 상기 접근법에서 설치류 항체의 표면 잔기만이 인간화된다.
- [0249] 특정한 항원에 특이적인 인간 항체는 파아지 디스플레이 전략 (Jespers 등 Bio/Technology, 12: 899-903, 1994)에 의해 확인될 수 있다. 하나의 접근법에서, 특이적 항원에 관한 설치류 항체의 중쇄는 클로닝되고 섬유상 파아지에서 Fab 단편으로서 디스플레이를 위하여 인간 경쇄의 레퍼토리로 쌍형성된다. 파아지는 항원에 결합에 의해 선택된다. 선택된 인간 경쇄는 그 뒤에 파아지에서 디스플레이를 위하여 인간 중쇄의 레퍼토리로 쌍형성되고, 파아지는 항원에 결합에 의해 재차 선택된다. 결과는 특정한 항원에 특이적인 인간 항체 Fab 단편이다. 또 다른 접근법에서, 파아지의 라이브러리는 생산된다 구성원이 그것의 외면에서 상이한 인간 항체 단편 (Fab 또는 Fv)를 디스플레이한다 (Dower 등, WO 91/17271 및 McCafferty 등, WO 92/01047). 요망된 특이성을 가진 항체를 디스플레이하는 파아지는 특이적 항원에 친화성 풍부에 의해 선택된다. 어느 한쪽 접근법으로부터 확인된 인간 Fab 또는 Fv 단편은 포유동물 세포내 인간 항체로서 발현을 위하여 재클로닝될 수 있다.
- [0250] 인간 항체는 유전자도입 동물로부터 임의로 수득된다 (미국 특허 번호 6,150,584; 6,114,598; 및 5,770,429). 상기 접근법에서 키메라성 또는 생식계열 돌연변이체 마우스에서 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자는 결실된다. 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이는 상기 돌연변이체 마우스에 그 뒤에 전달된다. 수득한 유전자도입 마우스는 그 다음 항원 공격시 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있다.
- [0251] 인간화된 항체는 항원 결합 단편 예컨대 Fab, Fab' F(ab')₂, Fd, Fv 및 단일 도메인 항체 단편으로서, 또는 중쇄 및 경쇄가 스페이서에 의해 연결되는 단일 쇠 항체로서 전형적으로 생산된다. 또한, 인간 또는 인간화된 항체는 모노머성 또는 폴리머성 형태로 존재할 수 있다. 인간화된 항체는 임의로 하나의 비-인간 쇠 및 하나의 인간화된 쇠 (즉 하나의 인간화된 중쇄 또는 경쇄)를 포함한다.
- [0252] 인간화된 또는 인간 항체를 포함하는, 항체는 하기의 임의의 부류로부터 선택된다: 하기를 포함하는 면역글로불린: IgM, IgG, IgD, IgA 또는 IgE; 및 하기를 포함하는 임의의 아이소타입: IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4. 키메라성, 인간화된 또는 인간 항체는 하나 또는 하나 초과 아이소타입 또는 부류로부터 서열을 포함할 수 있다.
- [0253] 추가로, 본 명세서에서 기재된 에피토프에 특이적인 항체는 항체 파아지 디스플레이 라이브러리 스크리닝에 의해 쉽게 단리된다. 예를 들어, 항체 파아지 라이브러리는 형태 특이적 항체에 특이적인 항체 단편을 확인하기 위해 본 명세서에서 개시된 에피토프에 상응하는 펩티드를 포함하는 환형 화합물 이용에 의해 임의로 스크리닝된다. 확인된 항체 단편은 본 명세서에서 기재된 상이한 구현예와 유용한 다양한 재조합 항체를 생산하는데 임의로 사용된다. 항체 파아지 디스플레이 라이브러리는, 예를 들어, Xoma (Berkeley, California)를 통해 상업적으로 입수가능하다 항체 파아지 라이브러리의 스크리닝 방법은 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0254] 추가 측면은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체 및/또는 이의 결합 단편이고, 중쇄 가변 영역은 상보성 결정 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 상보성 결정 영역CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고 상기 CDRs의 아미노산 서열은 아래에 제시된 서열을 포함한다:

CDR-H1	GYTFTSYW	서열 식별 번호: 17
CDR-H2	IDPSDSQT	서열 식별 번호: 18
CDR-H3	SRGGY	서열 식별 번호: 19
CDR-L1	QDINNY	서열 식별 번호: 20
CDR-L2	YTS	서열 식별 번호: 21
CDR-L3	LQYDNLWT	서열 식별 번호: 22

- [0255]
- [0256] 한 구현예에서, 항체는 단클론성 항체이다. 한 구현예에서, 항체는 키메라성 항체 예컨대 표 10에서 인용된 바와 같은 CDR 서열을 포함하는 인간화된 항체이다.

- [0257] 또 다른 구현예에서 또한 제공된 것은, 임의로 단일쇄 항체의 맥락에서, 표 10에서 CDRs 그리고 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다.
- [0258] 더욱 또 다른 측면에서, 항체는 중쇄 가변 영역을 포함한다 하기를 포함한다: i) 서열 식별 번호: 24에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열; ii) 서열 식별 번호: 24에 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열로, 여기서 상기 CDR 서열이 서열 식별 번호: 17, 18 및 19에서 제시된 바와 같은, 서열, 또는 iii) 보존적으로 치환된 아미노산 서열 i). 또 다른 측면에서 항체는 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다: i) 서열 식별 번호: 26에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열, ii) 서열 식별 번호: 26에 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열로, 여기서 상기 CDR 서열이 서열 식별 번호: 20, 21 및 22에서 제시된 바와 같은, 서열, 또는 iii) i)의 보존적으로 치환된 아미노산 서열. 또 다른 구현예에서, 중쇄 가변 영역 아미노산 서열은 서열 식별 번호: 23에서 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열 또는 이의 코돈 축퇴 최적화된 버전에 의해 암호화된다. 또 다른 구현예에서, 항체는 서열 식별 번호: 25에서 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열 또는 이의 코돈 축퇴 또는 최적화된 버전에 의해 암호화된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 한 구현예에서, 중쇄 가변 영역은 서열 식별 번호: 24에서 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.
- [0259] 또 다른 측면은 표 10에서 인용된 바와 같이 CDR 서열을 가진 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체이다.
- [0260] 또 다른 측면은 표 10에서 인용된 바와 같이 CDR 서열을 포함하는 항체를 가진 인간 A-베타에 대한 결합에 대하여 경쟁하는 항체를 포함한다.
- [0261] 항체 사이 경쟁은 예를 들어 시험중 항체가 공통 항원에 참조 항체의 특이적 결합을 억제시키는 그것의 능력에 대하여 평가되는 검정을 이용하여 예측될 수 있다. 시험 항체는 과잉의 (예를 들면, 적어도 2 배, 5 배, 10 배 또는 20 배) 시험 항체가 경쟁적 결합 검정에서 측정된 경우 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%만큼 참조 항체의 결합을 억제시킨다면 참조 항체와 경쟁한다.
- [0262] 한 구현예에서, 항체는, 본 명세서에서 기재된 환형 화합물, 임의로 환형 펩티드를 이용하여 생산된다.
- [0263] 추가 측면은 치료제, 검출가능한 표지 또는 세포독성제에 콘주게이션된 항체이다. 한 구현예에서, 검출가능한 표지는 양전자-방출 방사성핵종이다. 양전자-방출 방사성핵종은 예를 들어 PET 이미징형성에서 사용될 수 있다.
- [0264] 추가 측면은 본 명세서에서 기재된 항체 및/또는 이의 결합 단편 및 올리고머성 A-베타를 포함하는 항체 복합체에 관한 것이다.
- [0265] 추가 측면은 본 명세서에서 기재된 항체 또는 이의 일부를 암호화하는 단리된 핵산이다.
- [0266] 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는, 예를 들어 본 명세서에서 기재된 CDR-H1, CDR-H2 및/또는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄를 암호화하는 또는 본 명세서에서 기재된 CDR-L1, CDR-L2 및/또는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄를 암호화하는 핵산은 또한 제공된다.
- [0267] 본 개시내용은 또한 본 명세서에서 개시된 항체 및/또는 이의 결합 단편에 대하여 암호화하는 핵산 서열의 변이체를 제공한다. 예를 들어, 변이체는 적어도 중간 정도로 엄격한 하이브리드화 조건 하에 본 명세서에서 개시된 항체 및/또는 이의 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열에 하이브리드화하는 뉴클레오티드 서열 또는 코돈 축퇴 또는 최적화된 서열을 포함한다 또 다른 구현예에서, 변이체 핵산 서열은 서열 식별 번호: 24 및 26을 암호화하는 핵산 서열에 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 가장 바람직하게는 적어도 80%, 더욱더 바람직하게는 적어도 90% 및 심지어 가장 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0268] 한 구현예에서, 핵산은 단리된 핵산이다.
- [0269] 또 다른 측면은 본 명세서에서 개시된 핵산을 포함하는 벡터 또는 발현 카세트이다. 한 구현예에서, 벡터는 단리된 벡터이다.
- [0270] 벡터는, 항체 및/또는 이의 결합 단편 생산에 적합한 벡터를 포함하거나 본 명세서에서 기재된 펩티드 서열을 발현시키는, 임의의 벡터일 수 있다.
- [0271] 핵산 분자는 단백질의 발현을 보장하는 적절한 발현 벡터 속에 공지된 방식으로 편입될 수 있다. 가능한 발현 벡터는 비제한적으로 코스미드, 플라스미드, 또는 변형된 바이러스 (예를 들면 복제 불량성 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련된 바이러스)를 포함한다. 벡터는 사용된 숙주 세포와 양립가능할 수 있다. 발현

백터는, 발현 백터가 본 명세서에서 기재된 에피토프 또는 항체에 상응하는 펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 함유하는 것을 의미하는, "숙주 세포의 전환에 적합"하다.

- [0272] 한 구현예에서, 백터는 예를 들어 유전자 요법에 의한 단일쇄 항체 발현에 적합하다. 백터는, 예를 들어 신경 특이적 프로모터 및 기타 동종을 이용하여, 신경 조직에서 특이적 발현에 적합할 수 있다. 한 구현예에서, 백터는 IRES를 포함하고 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역의 발현을 허용한다. 그와 같은 백터는 생체내 항체를 전달하는데 사용될 수 있다.
- [0273] 적합한 조절 서열은, 박테리아, 진균, 바이러스성, 포유동물, 또는 곤충 유전자를 포함하는, 다양한 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0274] 상기 조절 서열의 예는 하기를 포함한다: 번역 개시 신호를 포함하는, 전사 프로모터 및 증강제 또는 RNA 폴리머라제 결합 서열, 리보솜 결합 서열. 추가로, 선택된 숙주 세포 및 이용된 백터에 의존하여, 다른 서열, 예컨대 복제의 기원, 추가의 DNA 제한 부위, 인헨서, 및 전사의 유도성을 부여하는 서열은 발현 백터 속에 편입될 수 있다.
- [0275] 한 구현예에서, 조절 서열은 신경 조직 및/또는 세포에서 발현을 유도 또는 증가시킨다.
- [0276] 한 구현예에서, 백터는 바이러스성 백터이다.
- [0277] 재조합 발현 백터는 또한 본 명세서에서 기재된 항체 또는 에피토프 펩티드 발현용 백터로 형질전환된, 감염된 또는 형질감염된 숙주 세포의 선택을 용이하게 하는 마커 유전자를 함유할 수 있다.
- [0278] 재조합 발현 백터는 또한 재조합 펩티드의 증가된 발현 또는 안정성; 재조합 펩티드의 증가된 용해도; 및 예를 들어 본 명세서에서 기재된 태그 및 표지를 포함하는, 친화성 정제에서 리간드로서 작용함으로써 상기 표적 재조합 펩티드의 정제에 일조를 제공하는 융합 모이어티 (즉 "융합 단백질")을 암호화하는 발현 카세트를 함유할 수 있다. 추가로, 단백질 분해 절단 부위는 상기 표적 재조합 단백질에 첨가되어 융합 모이어티로부터 재조합 단백질의 분리 후의 융합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 전형적인 융합 발현 백터는 재조합 단백질에 글루타미온 S-전달효소 (GST), 말토오스 E 결합 단백질, 또는 단백질 A, 각각을 융합시키는 pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) 및 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ)를 포함한다.
- [0279] 양쪽 시험관내 및 생체내 예를 들어 뉴런 및 신경 조직 속에 유전자의 도입용 시스템은 바이러스, 가장 현저히 단순 포진 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스 (AAV) 및 렌티바이러스를 포함하는 레트로바이러스에 기반된 백터를 포함한다. 유전자 전달에 대하여 대안적인 접근법은 네이키드, 플라스미드 DNA 뿐만 아니라 리포솜-DNA 복합체의 용도를 포함한다. 또 다른 접근법은 DNA가 다중양이온-응축되고 지질 포획되고 뇌내 유전자 전달에 의해 뇌 속에 도입되는 AAV 플라스미드의 용도이다 (Leone 등 미국 출원 번호 2002076394).
- [0280] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 명세서에서 기재된 화합물, 면역원, 핵산, 백터 및 항체는, 예를 들어 본 명세서에서 기재된 항체, 화합물, 면역원 및 핵산의 전달을 위하여 소포 예컨대 리포솜, 나노입자, 및 바이러스성 단백질 입자에서 제형화될 수 있다. 폴리머솜을 포함하는, 특히 합성 폴리머 소포는 항체를 투여하는데 사용될 수 있다.
- [0281] 또 다른 측면에서 또한 제공된 것은 본 명세서에서 기재된 항체를 발현시키는 또는 본 명세서에서 개시된 백터를 포함하는, 세포, 임의로 단리된 및/또는 재조합 세포이다.
- [0282] 재조합 세포는, 예를 들어 항체 및/또는 이의 결합 단편 생산에 적합한 폴리펩티드 생산에 적합한 임의의 세포를 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어 핵산 (예를 들면 백터)을 세포 속에 도입시키기 위해, 세포는 이용된 백터에 의존하여 형질감염, 형질전환 또는 감염될 수 있다.
- [0283] 적합한 숙주 세포는 다양한 원핵 및 진핵생물 숙주 세포를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에서 기재된 단백질은 박테리아 세포 예컨대 E. 콜리, (배칼로바이러스를 이용하는) 곤충 세포, 효모 세포 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다.
- [0284] 한 구현예에서, 세포는 효모, 식물, 벌레, 곤충, 조류, 어류, 파충류 및 포유동물 세포로부터 선택된 진핵 세포이다.
- [0285] 또 다른 구현예에서, 포유동물 세포는 골수종 세포, 비장 세포, 또는 하이브리도마 세포이다.

- [0286] 한 구현예에서, 세포는 신경 세포이다.
- [0287] 항체 또는 펩티드 발현에 적합한 효모 및 진균 숙주 세포는, 비제한적으로 사카로마이세스 세레비지에, 쉬조사 카로마이세스폼베, 속 피치아 또는 클루이베로마이세스 및 다양한 종의 속 아스페르길루스를 포함한다. 효모 S. 세리비시아에에서 발현용 벡터의 예는 pYepSec1, pMFa, pJRY88, 및 pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)를 포함한다. 효모 및 진균의 전환용 프로토콜은 당해 분야의 숙련가에 잘 알려진다.
- [0288] 적합할 수 있는 포유동물 세포는, 그 중에서도 하기를 포함한다: COS (예를 들면, ATCC 번호 CRL 1650 또는 1651), BHK (예를 들면 ATCC 번호 CRL 6281), CHO (ATCC 번호 CCL 61), HeLa (예를 들면, ATCC 번호 CCL 2), 293 (ATCC 번호 1573) 및 NS-1 세포. 포유동물 세포에서 발현 유도에 적합한 발현 벡터는 일반적으로 (예를 들면, 바이러스성 물질 예컨대 폴리오마, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스 및 유인원 바이러스 40으로부터 유래된) 프로모터, 뿐만 아니라 다른 전사 및 번역 대조군 서열을 포함한다. 포유동물 발현 벡터의 예는 pCDM8 및 pMT2PC를 포함한다.
- [0289] 추가 측면은 본 명세서에서 기재된 에피토프에 대하여 특이적인 항체를 생산하는 하이브리도마이다.
- [0290] **IV. 조성물**
- [0291] 추가 측면은 본 명세서에서 기재된 화합물, 면역원, 핵산, 벡터 또는 항체를 포함하는 조성물이다.
- [0292] 한 구현예에서, 조성물은 희석제를 포함한다.
- [0293] 핵산에 대하여 적합한 희석제는 비제한적으로 물, 염수 용액 및 에탄올을 포함한다.
- [0294] 항체 또는 이의 단편 및/또는 세포를 포함하는, 폴리펩티드에 대하여 적합한 희석제는 비제한적으로 염수 용액, pH 완충 용액 및 글리세롤 용액 또는 폴리펩티드 및/또는 세포 냉동에 적합한 다른 용액을 포함한다.
- [0295] 한 구현예에서, 조성물은 본 명세서에서 개시된 임의의 펩티드, 면역원, 항체, 핵산 또는 벡터를 포함하는, 및 임의로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.
- [0296] 본 명세서에서 기재된 조성물은, 활성 서브스틴스의 효과적인 양이 약제학적으로 허용가능한 비히클과 혼합물에서 조합되도록, 임의로 백신으로서, 대상체에 투여될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 조성물의 제조를 위하여 자체 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0297] 약제학적 조성물은, 조성물을 의도된 수령체의 조직 또는 혈액과 실질적으로 양립가능하게 만드는 산화방지제, 완충제, 정균제 및 용질을 추가로 함유할 수 있는, 비제한적으로, 동결건조된 분말 또는 수성 또는 비-수성 멸균된 주사가능 용액 또는 현탁액을 포함한다. 상기 조성물에서 존재할 수 있는 다른 성분은 물, 계면활성제 (예컨대 Tween), 알코올, 폴리올, 글리세린 및 식물성 오일을, 예를 들어 포함한다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 멸균된 분말, 과립, 정제, 또는 농축된 용액 또는 현탁액으로부터 제조될 수 있다. 조성물은, 예를 들어 비제한으로써, 환자에 투여에 앞서 멸균수 또는 염수로 재구성되는 동결건조된 분말로서 공급될 수 있다.
- [0298] 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체는 약제학적 조성물의 생물학적 활성의 유효성을 방해하지 않는 본질적으로 화학적으로 불활성 및 비독성 조성물을 포함한다. 적합한 약제학적 담체의 예는, 비제한적으로, 물, 염수 용액, 글리세롤 용액, 에탄올, N-(1(2,3-디올 레일옥시)프로필)N,N,N-트리메틸염화암모늄 (DOTMA), 디올레실포스포티딜-에탄올아민 (DOPE), 및 리포솜을 포함한다. 상기 조성물은, 환자에 직접적인 투여용 형태를 제공하기 위해 담체의 적합한 양과 함께, 화합물의 치료적 유효량을 함유해야 한다.
- [0299] 조성물은, 비제한적으로, 자유 아미노 기로 형성된 것 예컨대 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 등으로부터 유래된 것 그리고 자유 카복실 기로 형성된 것 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 페릭 하이드록사이드, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아르니노 에탄올, 히스티딘, 프로카인, 등으로부터 유래된 것을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다.
- [0300] 본 명세서에서 기재된 화합물 또는 면역원을 포함하는 한 구현예에서, 조성물은 아췌반트를 포함한다.
- [0301] 예를 들어 사용될 수 있는 아췌반트는 정상적으로 백신으로서 사용된 사멸된 또는 약화된 박테리아의 성분인 고유 아췌반트 (예컨대 리포폴리사카라이드)를 포함한다. 외적 아췌반트는 항원에 전형적으로 비-공유결합되는 그리고 제형화되어 숙주 면역 반응을 증강시키는 면역조절물질이다. 수산화알루미늄, 황산알루미늄 및 인산알루미늄 (집합적으로 통상적으로 명반으로 칭함)은 아췌반트로서 일상적으로 사용된다. 광범위한 외적 아췌반트는 면

역원에 강력한 면역 반응을 유발시킬 수 있다. 이들은 사포닌 예컨대 Stimulons (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) 또는 그로부터 생성된 입자 예컨대 ISCOMs 및 (면역자극 복합체) 및, 막 단백질 항원 (면역 자극 복합체)에 복합체화된, ISCOMATRIX, 광유를 가진 플루론산 폴리머, 사멸된 마이코박테리아 및 광유, 프로인트 완전한 아췌반트, 박테리아 생성물 예컨대 뮤라밀 디펩티드 (MDP) 및 리포폴리사카라이드 (LPS), 뿐만 아니라 지질 A, 및 리포솜을 포함한다.

- [0302] 한 구현예에서, 아췌반트는 수산화알루미늄이다. 또 다른 구현예에서, 아췌반트는 인산알루미늄이다. 수중유 에멀전은 하기를 포함한다: 스쿠알렌; 땅콩 오일; MF59 (WO 90/14387); SAF (Syntex Laboratories, Palo Alto, Calif.); 및 Ribi™ (RibiImmunochem, Hamilton, Mont.). 수중유 에멀전은 면역자극 제제 예컨대 뮤라밀 펩티드 (예를 들어, N-아세틸뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), -아세틸-노르뮤라닐-L-알라닐-D-이소글루타민 (노르-MDP), N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타민-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE), N-아세틸글루시사미닐-N-아세틸뮤라밀-L-Ala-D-이소글루-L-Ala-디팔미톡시 프로필아미드 (DTP-DPP) 테라마이드(TM)), 또는 다른 박테리아 세포 벽 성분과 함께 사용될 수 있다.
- [0303] 아췌반트는 단일 조성물로서 면역원과 함께 투여될 수 있다. 대안적으로, 아췌반트는 면역원의 투여 이전, 동반 및/또는 이후 투여될 수 있다.
- [0304] 통상적으로, 아췌반트는 포스페이트 - 완충 식염수내 0.05 내지 1.0 퍼센트 용액으로서 사용된다. 아췌반트는 면역원의 면역원성을 증강시키지만 필연적으로 면역원성 자체는 아니다. 아췌반트는 면역 시스템의 세포에 면역원의 느린, 지속 방출을 용이하게 하는 데포 효과를 생산하기 위해 투여 부위 근처 국소적으로 면역원 보유에 의해 작용할 수 있다. 아췌반트는 또한 면역원 데포에 면역 시스템의 세포를 유인할 수 있고 상기 세포를 자극시켜 면역 반응을 유도시킬 수 있다. 이와 같이, 구현예는 아췌반트를 추가로 포함하는 조성물을 포함할 수 있다.
- [0305] 비경구 면역화용 아췌반트는 알루미늄 화합물 (예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 및 알루미늄 하이드록시 포스페이트)를 포함한다. 항원은 표준 프로토콜에 따라 알루미늄 화합물로 침전될 수 있거나, 상기에 흡착될 수 있다. 다른 아췌반트 예컨대 RIBI (ImmunoChem, Hamilton, MT)는 또한 비경구 투여에서 사용될 수 있다.
- [0306] 점막 면역화용 아췌반트는 박테리아 독소 (예를 들면, 콜레라 독소 (CT), E. 콜리 열-불안정성 독소 (LT), 클로스트리듐 디피실레 독소 A 및 백일해 독소 (PT), 또는 이들의 조합, 서브유닛, 변성독소, 또는 돌연변이체)를 포함한다. 예를 들어, 원상태 콜레라 독소 서브유닛 B (CTB)의 정제된 제제는 사용될 수 있다. 단편, 동족체, 유도체, 및 임의의 이들 독소에 융합은 또한 적합하고, 단, 이들은 아췌반트 활성을 보유한다. 바람직하게는, 감소된 독성을 갖는 돌연변이체는 사용된다. 적합한 돌연변이체는 (예를 들면, WO 95/17211 (Arg-7-Lys CT 돌연변이체), WO 96/6627 (Arg-192-Gly LT 돌연변이체), 및 WO 95/34323 (Arg-9-Lys 및 Glu-129-Gly PT 돌연변이체)에서) 기재되어 있다. 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 추가의 LT 돌연변이체는, 예를 들어 Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp, 및 Glu-112-Asp 돌연변이체를 포함한다. 다른 아췌반트 (예컨대 다양한 공급원 (예를 들면, E. 콜리, 살모넬라 민네소타, 살모넬라 타이피유리움, 또는 시겔라플렉스네리, 사포닌, 또는 폴리락타이드글라이콜라이드 (PLGA) 마이크로구형체의 박테리아 모노포스포릴 지질 A (MPLA))는 또한 점막 투여에서 사용될 수 있다.
- [0307] 다른 아췌반트는 사이토카인 예컨대 인터류킨 예를 들어 IL-1, IL-2 및 IL-12, 케모카인, 예를 들어 CXCL10 및 CCL5, 대식세포 자극 인자, 및/또는 중앙 괴사 인자를 포함한다. 사용될 수 있는 다른 아췌반트는 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다 (Davis. Curr Top MicrobiolImmunol., 247:171-183, 2000).
- [0308] 수중유 에멀전은 하기를 포함한다: 스쿠알렌; 땅콩 오일; MF59 (WO 90/14387); SAF (Syntex Laboratories, Palo Alto, Calif.); 및 Ribi™ (RibiImmunochem, Hamilton, Mont.). 수중유 에멀전은 면역자극 제제 예컨대 뮤라밀 펩티드 (예를 들어, N-아세틸뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), -아세틸-노르뮤라닐-L-알라닐-D-이소글루타민 (노르-MDP), N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타민-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE), N-아세틸글루시사미닐-N-아세틸뮤라밀-L-Ala-D-이소글루-L-Ala-디팔미톡시 프로필아미드 (DTP-DPP) 테라마이드(TM)), 또는 다른 박테리아 세포 벽 성분과 함께 사용될 수 있다.
- [0309] 양쪽 점막 및 비경구 면역화에 유용한 아췌반트는 폴리포스파젠 (예를 들어, WO 95/2415), DC-cho1 (3 b-(N-(N',N'-디메틸 아미노메탄)-카바모일) 콜레스테롤 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,283,185 및 WO 96/14831) 및

QS-21 (예를 들어, WO 88/9336)을 포함한다.

[0310] 아주반트는 투여를 위하여 면역원에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 지질 예컨대 팔미트산은 면역원을 포함하는 펩티드의 형태내 변화가 면역원에 대한 면역 반응의 성질에 영향을 주지 않도록 하나 이상의 펩티드에 직접적으로 커플링될 수 있다.

[0311] 한 구현예에서, 조성물은 본 명세서에서 기재된 항체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 본 명세서에서 기재된 항체 및 희석제를 포함한다. 한 구현예에서, 조성물은 멸균된 조성물이다.

[0312] **V. 키트**

[0313] 추가 측면은, 바이알 예컨대 멸균된 바이알 또는 다른 하우징에 포함된, 본 명세서에서 기재된 i) 항체 및/또는 이의 결합 단편, ii) 핵산, iii) 펩티드 또는 면역원, iv) 조성물 또는 v) 제조할 세포 그리고 임의로 참조 제제 및/또는 이의 사용 지침을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0314] 한 구현예에서, 키트는 추가로 하나 이상의 수집 바이알, 표준 완충액 및 검출 시약을 포함한다.

[0315] **VI. 방법**

[0316] 본 명세서에서 기재된 화합물, 면역원 및 항체의 제조 및 이용 방법은 포함된다.

[0317] 특히, 대상체, 임의로 비-인간 대상체에, 본 명세서에서 기재된 에피토프 서열을 포함하는 형태적으로 제한된 화합물, 임의로 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 에피토프를 포함하는 환형 화합물을 투여하는 단계, 및 환형 화합물에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하고 임의로 i) 합성 및/또는 원상태 올리고머에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 및/또는 원 위치 조직 샘플에서 없거나 미소량의 노인성 플라크 결합 또는 상응하는 선형 펩티드에 없거나 미소량의 결합을 갖는 항체 또는 세포를 생산하는 항체를 단리시키는 단계를 포함하는 HDSG (서열 식별 번호: 1)의 형태적 에피토프 또는 관련된 에피토프에 대하여 특이적 및/또는 선택적인 항체의 제조 방법은 제공된다. 환형 화합물은 예를 들어 본 명세서에서 기재된 환형 화합물을 함유하는 본 명세서에서 기재된 임의의 "에피토프"를 포함할 수 있다.

[0318] 한 구현예에서, 방법은 예를 들어 본 명세서에서 기재된 바와 같은 방법을 이용하는 단클론성 항체 제조용이다.

[0319] 한 구현예에서, 방법은 예를 들어 본 명세서에서 기재된 방법을 이용하는 인간화된 항체 제조용이다.

[0320] 환형 화합물을 이용하여 생산된 항체는 본 명세서에서 그리고 실시예에서 기재된 바와 같이 선택된다. 한 구현예에서, 방법은 선형 펩티드보다 환형 펩티드에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는, 에피토프 서열에 특이적인, 올리고머에 특이적으로 결합하는 및/또는 임의로 본 명세서에서 기재된 방법을 이용하여, 동일계내 플라크 및/또는 상응하는 선형 펩티드에 대한 결합이 결여되어 있거나 미소량을 갖는 항체를 단리시키는 단계를 포함한다.

[0321] 추가 측면은 생물학적 샘플이 A-베타를 포함하는지의 검출 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 명세서에서 기재된 항체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계 및 임의의 항체 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서, 방법은 적어도 H, D 및/또는 S가 비-올리고머성 형태에서 H,D 및/또는 S에 의해 점유된 이의 대안적 형태에 있는 A-베타를 생물학적 샘플이 포함하는지의 검출용이다.

[0322] 한 구현예에서 방법은 생물학적 샘플이 올리고머성 A-베타를 포함하는지의 검출용이다.

[0323] 한 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0324] a. 항체:A-베타 올리고머 복합체를 생산하기 위해 허용된 조건 하에 본 명세서에서 A-베타 올리고머에 대하여 특이적 및/또는 선택적인 본 명세서에서 기재된 항체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계; 및

[0325] b. 임의의 복합체의 존재를 검출하는 단계;

[0326] 여기서 검출가능한 복합체의 존재는 샘플이 A-베타 올리고머를 함유할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0327] 한 구현예에서, 형성된 복합체의 수준은 시험 항체 예컨대 적합한 Ig 대조군 또는 무관한 항체에 비교된다.

[0328] 한 구현예에서, 검출은 정량화되고 생산된 복합체의 양은 측정된다. 측정은 예를 들어 표준에 상대적일 수 있다.

[0329] 한 구현예에서, 측정된 양은 대조군에 비교된다.

- [0330] 또 다른 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0331] (a) 항체-항원 복합체를 생산하기 위해 허용된 조건 하에, 본 명세서에서 기재된 항체와 상기 대상체의 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계;
- [0332] (b) 시험 샘플에서 항체-항원 복합체의 양을 측정하는 단계; 및
- [0333] (c) 시험 샘플에서 항체-항원 복합체의 양을 대조군과 비교하는 단계;
- [0334] 여기서 대조군에 비교된 경우 생물학적 샘플에서 항체-항원 복합체 검출은 샘플이 A-베타를 포함하는 것을 나타낸다.
- [0335] 대조군은 (예를 들면 AD가 없는 대상체로부터, 또는 경도, 중간 또는 진전된, 특정한 형태의 AD를 가진 대상체로부터) 샘플 대조군, 또는 대상체에서 A-베타 올리고머 수준내 변화 모니터링을 위하여 동일한 대상체로부터 이전의 샘플일 수 있다.
- [0336] 한 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 항체는 사용된다.
- [0337] 한 구현예에서, 항체는 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 형태적 에피토프를 포함하는 A-베타의 형태를 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 인식하고, 생물학적 샘플에서 항체 항원 복합체 검출은 샘플이 A-베타 올리고머를 포함하는 것을 나타낸다.
- [0338] 한 구현예에서, 샘플은 생물학적 샘플이다. 한 구현예에서, 샘플은 뇌 조직 또는 이의 추출물 및/또는 CSF를 포함한다. 한 구현예에서, 샘플은 전혈, 혈장 또는 혈청을 포함한다. 한 구현예에서, 샘플은 인간 대상체로부터 취득된다. 한 구현예에서, 대상체는 AD가 의심되거나, 상기의 위험에 처하거나 상기를 갖는다.
- [0339] 수많은 방법은 A-베타: 항체 복합체를 검출하는데 사용될 수 있고 이로써 HDSG (서열 식별 번호: 1) 또는 관련된 형태적 에피토프를 포함하는 A-베타 및/또는 A-베타 올리고머가, 면역검정 예컨대 유세포측정, 면역블랏, ELISA, 및 면역침강 이어서 SDS-PAGE, 및 면역세포화학을 포함하는, 본 명세서에서 기재된 항체를 이용하여 생물학적 샘플에서 존재하는지를 검출한다.
- [0340] 실시예에서 기재된 바와 같이 표면 플라즈몬 공명 기술은 형태 특이적 결합을 평가하는데 사용될 수 있다. 항체가 표지되거나 또는 복합체 항체에 특이적인 검출가능하게 표지된 2차 항체가 사용되면, 표지는 검출될 수 있다. 통상적으로 사용된 시약은 형광 방출 및 HRP 표지된 항체를 포함한다. 정량적 방법에서, 생산된 신호의 양은 표준 또는 대조군에 비교에 의해 측정될 수 있다. 측정은 또한 상대적일 수 있다.
- [0341] 추가 측면은, 임의로 측정된 또는 이미지화된 A-베타가 올리고머성 A-베타인, 대상체 또는 조직에서 - 또는 이미지형성 A-베타의 수준 측정 방법을 포함한다. 한 구현예에서, 방법은 AD를 갖는 위험에 처한 또는 상기를 갖는 것으로 의심되거나 상기를 갖는 대상체에, 검출가능한 표지에 콘주게이션된 항체를 투여하는 단계; 및 표지를 검출하는, 임의로 표지를 정량적으로 검출하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서 표지는 예를 들어 PET 이미지형성에서 사용될 수 있는 양전자 방출 방사성핵종이다.
- [0342] 추가 측면은, 대상체에 본 명세서에서 기재된 화합물, 임의로 HDSG (서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프 펩티드 서열을 포함하는 환형 화합물, 상기 화합물을 포함하는 면역원 및/또는 조성물 또는 상기 면역원을 투여하는 단계; 및 임의로 투여된 화합물 또는 면역원에서 A-베타 펩티드에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 세포 및/또는 항체를 단리시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응의 유도 방법을 포함한다. 한 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용가능한, 희석제 또는 담체와 혼합물내 화합물 또는 면역원을 포함하는 약제학적 조성물이다.
- [0343] 한 구현예에서, 대상체는 비-인간 대상체 예컨대 설치류이다. 생성된 항체 생산 세포는 하이브리도마 세포주를 생산하기 위해 한 구현예에서 사용된다.
- [0344] 한 구현예에서, 투여된 면역원은 도 11B에서 설명된 화합물을 포함한다.
- [0345] 사이클로(CGHDSSG)에 대해 상승된 항체가 A-베타 올리고머에 특이적으로 그리고/또는 선택적으로 결합할 수 있고 A-베타 플라크 염색이 결여될 수 있다는 것이 본 명세서에서 실증된다. 올리고머성 A-베타 종은 AD에서 독성 증식 중인 것으로 여겨진다. 추가로 도 19에서 나타난 바와 같이, 사이클로(CGHDSSG) (서열 식별 번호: 2)를 이용하여 상승된 그리고 올리고머에 대하여 특이적인 항체는 A-베타 응집 및 A-베타 올리고머 증식을 억제시켰다. 따라서, 또한 제공된 것은 A-베타 올리고머 증식의 억제 방법이고, 상기 방법은 A-베타 응집 및/또는 올리고머

증식을 억제시키기 위해 본 명세서에서 기재된 A-베타 올리고머 특이적 또는 선택적 항체의 유효량을 필요로 하는 대상체에 투여 또는 상기와 A-베타를 발현시키는 세포 또는 조직의 접촉을 포함한다. 시험관내 검정은 실시 예 10에서 기재된 바와 같이 모니터링될 수 있다.

- [0346] 항체는 또한 AD 및/또는 다른 A-베타 아밀로이드 관련된 질환 치료에 유용할 수 있다. 예를 들어, 루이체 치매의 그리고 붕입체 근염 (근육 질환)에서 변이체는 뇌 및 근육 각각에서 AD와 유사한 플라크를 나타내고, A-베타는 또한 뇌 아밀로이드 혈관병증에서 연루된 응집물로 형성할 수 있다. 또한, (파킨슨병 및 전두측두 치매를 포함하는) 신경퇴행성 질환에서 "혼합형" 병리학은 AD 병리학의 특징이 명백한 AD 임상 증후군 없이 관측될 수 있는 것으로 인식된다. 언급된 바와 같이, 사이클로(CGHDSGG)(서열 식별 번호: 2)로 상승된 항체는 AD에서 A-베타의 독소발생 종인 것으로 여겨지는 올리고머성 A-베타에 결합하고 독소발생 A-베타 올리고머의 형성을 억제시킨다.
- [0347] 따라서 추가 측면은 AD 및/또는 다른 A-베타 아밀로이드 관련된 질환의 치료 방법이고, 상기 방법은 필요로 하는 대상체에 i) 본 명세서에서 기재된 항체, A-베타 올리고머 특이적 또는 선택적 또는 임의로 상기 항체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량 투여; 또는 2) HDSG (서열 식별 번호:1) 또는 관련된 에피토프 서열을 포함하는 단리된 환형 화합물 또는 면역원 또는 상기 환형 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 필요로 하는 대상체에 투여를 포함하다.
- [0348] 한 구현예에서, 치료받는 대상체 유래의 생물학적 샘플은 본 명세서에서 기재된 항체를 이용하여 A-베타의 존재 또는 수준에 대하여 평가된다. 한 구현예에서, 검출가능한 A-베타 수준 (예를 들면 이미지형성에 의해 측정된 또는 시험관내 측정된 A-베타 항체 복합체)를 가진 대상체는 항체로 치료된다.
- [0349] 항체 및 면역원은 예를 들어 본 명세서에서 기재된 바와 같이 약제학적 조성물에서 포함될 수 있고, 예를 들어 전달 개선을 위하여 소포로 제형화될 수 있다.
- [0350] HDSG (서열 식별 번호:1)을 표적하는 하나 이상의 항체 및/또는 관련된 항체는 조합으로 투여될 수 있다. 또한 본 명세서에서 개시된 항체는 하나 이상의 다른 치료 예컨대 베타-세크레타제 억제제 또는 콜린에스테라아제 억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [0351] 한 구현예에서, 항체는, 임의로 A-베타 올리고머에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는, 형태 특이적/선택적 항체이다.
- [0352] 또한 제공된 것은 AD 치료용 조성물, 항체, 단리된 펩티드, 면역원 및 핵산의 용도이다.
- [0353] 본 명세서에서 기재된 조성물, 화합물, 항체, 단리된 펩티드, 면역원 및 핵산, 벡터 등은 예를 들어, 비경구, 정맥내, 피하, 근육내, 두개내, 심실내, 척추강내, 안와내, 안과, 척수내, 낭내, 복강내, 비강내, 에어로졸 또는 경구 투여에 의해 투여될 수 있다.
- [0354] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 진신으로 투여된다.
- [0355] 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 뇌 또는 CNS의 다른 부분에 직접적으로 투여된다. 예를 들어 상기 방법은, 주입 부위에 카테터를 통해 사전-결정된 용량을 방출시키는 역할을 할, 이식가능 카테터 및 펌프의 용도를 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 추가로 카테터가 요망된 투여 부위에 인접한 카테터 위치 또는 뇌에서 주입에 관하여 카테터의 가시화를 허용하는 외과적 기술에 의해 이식될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 그와 같은 기술은, 본 명세서에서 참고로 편입된, Elsberry 등 미국 특허 5,814,014 "뇌 주입에 의한 신경퇴행성 장애의 치료 기법"에서 기재된다. 또한 고려된 것은 방법 예컨대 미국 특허 출원 20060129126 (Kaplitt 및 During "환자의 뇌 속에 물질 주입 방법 및 주입 디바이스"에서 기재된 것이다. 뇌 및 CNS의 다른 일부에 약물 전달용 디바이스는 상업적으로 입수가능하다 (예를 들면 SynchroMed[®] EL Infusion System; Medtronic, Minneapolis, Minnesota).
- [0356] 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 혈액 뇌 장벽을 거쳐 수용체-매개된 수송을 허용하기 위해 투여된 화합물 변형 같은 방법을 이용하여 뇌에 투여된다.
- [0357] 다른 구현예는 혈액 뇌 장벽을 거쳐 수송을 용이하게 하기 위해 공지된 생물학적 활성 분자와 본 명세서에서 기재된 조성물, 화합물, 항체, 단리된 펩티드, 면역원 및 핵산의 공동-투여를 고려한다.
- [0358] 특정 구현예에서 또한 고려된 것은, 혈액 뇌 장벽을 거쳐 본 명세서에서 기재된 조성물, 화합물, 항체, 단리된 펩티드, 면역원 및 핵산의 투여 방법 예컨대 본 명세서에서 참고로 편입된, 미국 특허 7012061 "혈액 뇌 장벽의

투과도 증가 방법"에서 기재된 바와 같이 혈액 뇌 장벽의 투과도의 일시적으로 증가에 관한 것이다.

[0359] 당해 분야의 숙련가는 뇌에 직접적으로 또는 혈액 뇌 장벽을 거쳐 본 명세서에서 기재된 조성물, 화합물, 항체, 단리된 펩티드, 면역원 및 핵산의 다양한 적합한 투여 방법을 인식할 것이고 본 명세서에서 기재된 생성물을 안전하게 투여하기 위해 이들 방법을 변형시킬 수 있을 것이다.

[0360] 상기 개시내용은 일반적으로 본원을 기재한다. 더욱 완전한 이해는 다음과 같은 특정 실시예를 참고로 수득될 수 있다. 이들 실시예는 실례의 목적으로 단독으로 기재되고 적용의 범위를 제한하도록 의도되지 않는다. 형태 변화 및 등가물의 치환은 상황이 방편을 시사 또는 제공함에 따라 고려된다. 특정 용어들이 본 명세서에서 이용되어도, 상기 용어들은 서술적인 의미에서 의도되고 제한의 목적을 위한 것은 아니다.

[0361] 다음과 같은 비-제한적인 실시예는 본 개시내용을 설명한다:

[0362] **실시예**

[0363] **실시예 1**

[0364] **집단 좌표 예측**

[0365] 미스폴딩된 에피토프 예측 방법은, 2015년 11월 9일 출원된, 및 본 명세서에서 참고로 편집된 미국 특허 출원 일련 번호 62/253044, **집단 좌표 바이어싱에 의한 미스폴딩된 단백질 에피토프 예측용 시스템 및 방법**에서 기재되는 "집단 좌표 바이어싱"으로서 지칭되는 방법에 의해 제공된다. 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 방법은 단백질 (또는 펩티드-응집물)에 전반적인 좌표 바이어싱을 도입시켜 단백질 (또는 펩티드-응집물)을 강제로 미스폴딩시키고 그 다음 부분적으로 비구조화된 단백질 (또는 펩티드 응집물)의 아마도 미스폴딩된 영역을 예측하는 분자-동역학-기반된 모의실험을 이용한다. 바이어싱 모의실험은 수행되었고 (고려 중 단백질의 초기 구조의 것에 비교된) 각각의 잔기 지수에 상응하는 용매 접근가능한 표면적 (SASA). SASA는 H2O에 접근가능한 표면적을 나타낸다. (고려 중 단백질의 초기 구조의 것에 비교된) SASA에서 긍정적인 변화는 관련된 잔기 지수의 영역에서 언폴딩을 나타내는 것으로 고려될 수 있다. 방법은 각각 그 자체의 형태학을 가진, 3개의 A-베타 균주에 적용되었다: Aβ-40 펩티드 (또는 모노머) (PDB 엔트리 2M4J)의 3-배 대칭 구조, Aβ-40 모노머 (PDB 엔트리 2LMN)의 2-배 대칭 구조, 및 Aβ-42 모노머 (PDB 엔트리 2MXU)의 단일-쇄, 평행한 레지스터내 (예를 들면 1 쇠로부터 잔기가 인접하는 쇠로부터 동일한 잔기와 상호작용하는 반복된 베타 시트) 구조.

[0366] 모의실험은 미국 특허 출원 일련 번호 62/253044에서 기재된 바와 같은 집단 좌표법 및 하기에서 기재된 CHARMM 힘의 장 파라미터를 이용하여 각각의 초기 구조에 대하여 수행되었다: K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C.Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, 및 A.D. Mackerell. Charmm force field: A force field for drug-like molecules compatible with the charmm all-atom additive biological force field. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4):671-690, 2010; 및 P. Bjelkmar, P. Larsson, M. A. Cuendet, B. Hess, and E. Lindahl. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: analysis of proteein stability effects from correlation maps, virtual interaction sites, and water models. *J. Chem.Theo. Comp.*, 6:459-466, 2010 (이들 모두는 이로써 본 명세서에서 참고로 편집된다), TIP3P 물과 함께.

[0367] 상기 방법을 이용하여 예상된 에피토프는 실시예 2에서 기재된다.

[0368] **실시예 2**

[0369] **I. 집단 좌표 예측**

[0370] 에피토프 HDSG (서열 식별 번호:1)은 실시예 1에서 기재된 집단 좌표 접근법에서 균주 2M4J로부터 예상된 에피토프로서 출현한다. 피브릴의 몇 개의 다른 균주에서, 상기 영역은 여전히 무질서하고 그래서 PDB 엔트리에서 구조가 없다. 예를 들어 2LMN에서, HDS는 비구조화되고 그래서 이들 잔기용 좌표는 PDB 구조에서 나타나지 않고, 2LMP에서 HDS는 PDB에서 비구조화되고, 2MXU에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)은 PDB에서 비구조화된다. 예상된 에피토프를 보여주는 상응하는 도는 도 1이다. 피브릴 구조 2M4J에 대하여, 좌측 및 우측으로부터 HDSG (서열 식별 번호: 1)을 괄호로 묶는 2 서열, RHDSG(서열 식별 번호: 5) 및 HDSGY(서열 식별 번호: 4)는 예상되고; 잔기 R5 및 Y10 각각은 하나의 예측으로부터 출현하고, 한편 잔기 HDSG (서열 식별 번호: 1)은 2 예측으로부터 출현하고, 그래서 이들 2 예측 사이 추정 공통 서열로서 처리된다.

[0371] **II. 형태 특이적 에피토프**

- [0372] 본 명세서에서 언급된 및 도 1에서 보여진 바와 같이, HDSG (서열 식별 번호: 1) 에피토프는 피브릴 PDB 구조 2M4J에 변성 스트레스 부가시 예측으로서 출현한다. HDSGY (서열 식별 번호: 4) 및 RHSDG (서열 식별 번호: 5) 는 또한 예상된다.
- [0373] A β 는 감마 세크레타제에 의해 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)의 절단에서 비롯하는 길이 36-43 아미노산의 펩티드이다. AD 환자에서, 다중 형태 모노머, 불용성 피브릴, 및 가용성 올리고머에서 존재한다. A β 피브릴은 AD 환자의 뇌에서 발견된 노인성 플라크의 주요 구성요소이다.
- [0374] 모노머 형태에서, A β 는 비구조화된 폴리펩티드 쇄로서 존재한다. 피브릴 형태에서, A β 는, 종종 균주로서 지칭된, 구별되는 형태학으로 응집할 수 있다. 몇 개의 이들 구조는 고체상 NMR에 의해 계측되었고 - 일부 피브릴 구조는 시험관내 연구로부터 수득되었고, 다른 것은 AD 환자로부터 채집된 아밀로이드 플라크를 이용하여 피브릴 씨딩에 의해 수득되었다.
- [0375] 올리고머는 펩티드의 독성 및 증식성 종인 것으로 제안된다.
- [0376] 올리고머-특이적 항체의 생성에 필요조건은 어느 한쪽 모노머 또는 피브릴 형태에서 덜 양호한 또는 상기에서 존재하지 않는 A β 펩티드에서 표적의 확인이다. 이들 올리고머-특이적 에피토프는 모노머 또는 피브릴내 상응하는 분절로부터 1차 서열에서 상이하지 않을 것이지만, 이들은 올리고머의 맥락에서 형태적으로 구별될 것이다. 즉, 이들은 모노머 또는 피브릴에서 존재하지 않을 올리고머에서 구별되는 형태를 나타낼 것이다.
- [0377] 올리고머의 구조는 현재까지 계측되지 않았고, 또한, NMR 증거는 올리고머가 단일 명확한 구조가 아닌, 제한된 규칙성을 가진 형태적으로-플라스틱, 가단성 구조적 앙상블로 존재한다는 것을 나타낸다. 또한, 올리고머 종의 농도는 모노머 또는 피브릴의 어느 한쪽 것 훨씬 아래이어서 (추정치는 다양하지만 1000-배 위 아래 정도이다), 상기 표적을 달성하기 힘들게 한다.
- [0378] 어느 한쪽 1차 서열 (예를 들면, 선형 서열)의 연속 가닥에 대한, 또는 피브릴 구조에 대한 항체는 그것의 효능을 제한하는 몇 개의 문제로 고생할 수 있다. 선형 펩티드 영역으로 상승된 항체는 올리고머에 대하여 선택적이지 않은 경향이 있고, 따라서 모노머에 또한 결합한다. 모노머의 농도가 올리고머의 것보다 실질적으로 더 높기 때문에, 상기 항체 치료제는, 올리고머성 종의 선택적으로 표적화 및 클리어링 보다는, 모노머에 주로 결합하고 기능성 A β 의 청소능을 촉진시키는, "표적 혼란"으로 고생할 수 있다. 아밀로이드 내포물로 상승된 항체는 피브릴에 주로 결합하고, 혈관성 부종 및/또는 미세출혈을 나타낸다고 생각되는 신호 변화를 포함하는, 아밀로이드 관련된 이미지형성 비정상 (ARIA)을 초래하였다.
- [0379] A β 의 올리고머성 형태에 대하여 선택적인 항체를 개발하기 위해, 피브릴에서 파괴될 수 있는 영역은 확인되었다. 이론에 의해 제한되기를 바라지 않으면서, 피브릴의 맥락에서 파괴가 올리고머의 표면에서 노출될 수 있다는 가설이 제기되었다. 올리고머에서 그러나, 이들 서열 영역은 어느 한쪽 모노머의 것 및/또는 피브릴의 것과 구별되는 형태로 노출될 수 있다. 예를 들어, 표면에 있으면, 상응하는 양이 어느 한쪽 피브릴 또는 모노머에서 나타내는 것보다 더 높은 곡률, 더 높은 노출된 표면적, 및 상이한 이면 각 분포를 갖는 영역에서 이들은 차례로 노출될 수 있다.
- [0380] HDSG (서열 식별 번호: 1)을 포함하는 환형 화합물은 본 명세서에서 기재되고 도 11B에서 보여진다. 환형 화합물은 더 높은 곡률, 더 높은 노출된 표면적, 및 대안적인 이면 각 분포의 상기 기준의 하나 이상을 만족시키도록 설계되었다.
- [0381] 피브릴에서 파괴의 경향이 있는 영역 확인의 잠재적인 이점은 피브릴이 모노머로부터 올리고머를 핵화하기 위해 촉매적 기질로서 작용할 수 있는 2차 핵생성 공정에서 관여된 영역을 확인할 수 있다는 점이다 [3]. 노출된 측쇄를 가진 피브릴의 영역은, 모노머의 부착을 용이하게 하는, 인근 모노머와 비정상적 상호작용에 더욱 참여할 것 같을 수 있고; 상기 부착된 모노머는 그 다음 피브릴의 표면에서 또는 그 근처에서 효과적으로 증가된 농도의 환경을 경험할 것이고, 따라서 올리고머를 포함하는 다량체 응집물을 더욱 형성할 것 같을 것이다. A β 의 노출된 영역을 가진 에이징된 또는 손상된 피브릴은 독성 올리고머의 생산을 향상시킬 수 있고, 피브릴에서 이들 무질서한 영역에 대한 항체는 상기 증식성 기전 차단에서 효과적일 수 있다.
- [0382] **III. 환형 펩티드의 곡률**
- [0383] 환형 펩티드 CGHDSGG (서열 식별 번호:2)의 곡률 프로파일은 환형HDSG (서열 식별 번호:1)을 어느 한쪽 선형 펩티드 또는 피브릴로부터 분화시킨다. 곡률 프로파일은 도 2에서 보여진다. 위치 6에서 히스티딘 잔기는 어느 한쪽 선형 펩티드 또는 피브릴보다 더 낮은 곡률을 갖는다. 선형 펩티드는 어느 한쪽 환형 펩티드 또는 피브릴에

의해 탐구된 형태에 비교된 골격을 회계 하는 경향이 있다. 다른 한편으로, 아스파르트산 잔기 D7 및 세린 잔기 S8은 어느 한쪽 선형 펩티드 또는 피브릴에서 그들 잔기의 골격에 비교하여 환형 펩티드에서 더 높은 골격을 갖는다. 환형 펩티드에서 글리신 잔기 (G)는 피브릴에서보다 어느 정도 더 높은 골격 그러나 선형 펩티드에서보다 어느 정도 더 낮은 골격을 갖는다. 이들 결과는 환형 펩티드에 대한 항체가 어느 한쪽 모노머 또는 피브릴의 것보다 상이한 형태적 앙상블을 나타내는 중에 대하여 선택성을 보여줄 수 있다는 것을 암시한다.

[0384] 본 명세서에서 논의된 이면 각 분포 및, 골격의 플롯을 위하여, 데이터는 Charmm27을 이용하여 명백한 용매 (TIP3P)내 평형 모의실험으로부터 취득된다. 모의실험 시간 및 각각의 앙상블에 대하여 배치구성의 수는 아래와 같다. 환형 펩티드 앙상블: 모의실험 시간 10ns, 1001 프레임 함유; 선형 펩티드 앙상블: 모의실험 시간 10ns, 1001 프레임 함유; 2M4J 앙상블: 680ps, 69 프레임 함유.

[0385] 환형 에피토프의 골격이 어느 한쪽 선형 펩티드 또는 피브릴보다 상이한 프로파일을 갖기 때문에, 이들 잔기를 함유하는 올리고머에서 아미노산의 상응하는 스트레치가 피브릴 또는 모노머에서의 것과 구별되는 골격 배향을 가질 것으로 기대된다. 그러나 골격의 정도는 반물리적이지 않을 것이고- 환형 펩티드를 특징으로 하는 골격의 낮은 피브릴의 몇 개의 위치에서 취득된다.

[0386] 잔기 H, D, S 및 G에 대하여 골격의 수치 값은 표 4에서 주어진다. 전반적인 피브릴에서 골격보다 상당히 더 크지 않아도, 양쪽 선형 및 환형 펩티드에 대하여 골격이 피브릴에서 그들 잔기의 골격보다 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 일반적으로 더 크다는 것을 주목한다. 이것은 주로 HDSG (서열 식별 번호: 1)이 피브릴 구조 2M4J에서 상대적으로 연장된 베타 가닥 형태라는 사실에 기인하고, 어느 한쪽 환형 또는 선형 펩티드로 상승된 항체가 피브릴에 대해 형태적으로 선택적, 즉 피브릴에 낮은 친화성을 가질 수 있다는 것을 시사한다.

[0387] **IV. 이면 각 분포**

[0388] 올리고머-선택적 에피토프의 확인을 위하여 추가로 컴퓨터를 이용한 뒷받침은 양쪽 측쇄 이면 각 분포에 의해 제공되고, 올리고머-에서 노출된 에피토프에 대하여 대리 환형 펩티드에서 골격 이면 각용 라마찬드란 ϕ 및 ψ 분포는 어느 한쪽 피브릴 또는 모노머에서 상응하는 분포와 실질적으로 상이한 많은 각에 대한 것이다.

[0389] 측쇄 이면 분포는 잔기 H, D, 및 S에 대하여 검사되었다. H6에 대하여 C-C_α-C_β-C_γ 및 N-C_α-C_β-C_γ 이면 각의 분포는 어느 한쪽 모노머 또는 피브릴 분포에 대한 것보다 환형 펩티드에 대하여 상이하다 (도 3). 선형 펩티드가 환형 펩티드 이면 각의 거의 전체의 범위 (90%) 내에 이면을 차지하는 확률은 2개의 상이 이면 중 어느 한쪽에 대하여 36%이고, 한편 피브릴의 맥락에서 펩티드가 환형 펩티드 이면 각의 거의 전체의 범위 (90%) 내에 이면을 차지하는 확률은 2개의 상이 이면의 어느 한쪽에 대하여 단지 13%이다. 다른 이면 각은 어느 한쪽 피브릴 또는 모노머 앙상블에 대하여 대략 30% 이상의 상응하는 확률을 갖는다. 다음과 같은 설명 및 도에서 CA, Ca, 또는 C_α는 C-알파 원자를 기재하는데 대안적으로 사용되고, CB, Cb, 및 C_β, 및 기타 동종에 대하여 유사하다.

[0390] 이면 분포는 도 4에서 D7에서 대하여 보여진다. 선형 펩티드가 환형 펩티드 이면 각의 거의 전체의 범위 (90%) 내에 이면을 차지하는 확률은 D7의 이면 각에 대하여 아래와 같다:

[0391] C-CA-CB-CG: 12%

[0392] N-CA-CB-CG: 19%

[0393] O-C-CA-CB: 15%

[0394] 피브릴의 맥락에서 펩티드가 환형 펩티드 이면 각의 거의 전체의 범위 (90%) 내에 이면을 차지하는 확률은 D7의 이면 각에 대하여 아래와 같다:

[0395] C-CA-CB-CG: 30%

[0396] N-CA-CB-CG: 49%

[0397] O-C-CA-CB: 6%

[0398] 이면 분포는 도 5에서 S8에 대하여 보여진다. 이면 각 분포가 환형 형태적 앙상블에서 이면 각에 대하여 실질적으로 상이하고 따라서 이들은 어느 한쪽 선형 또는 피브릴 앙상블인 것을 볼 수 있다. 선형 펩티드가 환형 펩티드 이면 각의 거의 전체의 범위 (90%) 내에 이면을 차지하는 확률은 S8의 이면 각에 대하여 아래와 같다:

[0399] C-CA-CB-OG: 92% (이것은 실질적인 중첩을 나타내지만, 도 5에서 중첩을 갖는 피크의 중량은, 도 5에서 보여질

수 있는 바와 같이, 실질적으로 상이하고, 바람직한 이면 각이 여전히 상이할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0400] N-CA-CB-OG: 84% (상기 C-CA-CB-OG에 대하여 하는 바와 같이 상기 이면 각에 유사한 주석이 적용한다)

[0401] O-C-CA-CB: 19%

[0402] 피브릴의 맥락에서 펩티드가 환형 펩티드 이면 각의 거의 전체의 범위 (90%) 내에 이면을 차지하는 확률은 S8의 이면 각에 대하여 아래와 같다:

[0403] C-CA-CB-OG: 30%

[0404] N-CA-CB-OG: 28%

[0405] O-C-CA-CB: 25%

[0406] 측쇄 이면 각 분포의 상기 분석에 따라, 7D 및 8S는 선형 펩티드 및 피브릴 앙상블로부터 최대 차이를 보여주는 잔기이다. 7D 및/또는 8S는 형태적 선택성을 부여하는 에피토프에서 핵심 잔기일 수 있다.

[0407] 도 3-5에서 보여진 데이터에 기반하여, 표 1은 환형 펩티드와 다른 종 사이 유의차를 보여주는 분포의 그들 이면 각에 대하여, 이면 각 분포의 피크 값을 열거한다. 표 1내 칼럼 1은 고려된 특이적 이면이고, 칼럼 2는 선형 펩티드 CGHDSGG(서열 식별 번호: 2)의 맥락에서 그 각에 대하여 이면 분포의 피크 값이고, 칼럼 3은 환형 펩티드 CGHDSGG(서열 식별 번호: 2)의 맥락에서 그 각에 대하여 이면 분포의 피크 값이고, 칼럼 4는 선형 및 환형 펩티드에 대하여 이면 분포의 피크 값의 차이이고, 칼럼 5는 피브릴 구조 2M4J의 맥락에서 펩티드 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 이면 분포의 피크 값이다.

[0408] 표 1: 이면 각 분포의 피크 값

이면 각	선형	환형	차이 (선형-환형)	피브릴
6H: O-C-CA-CB	-57.5, 97.5	107.5	-165, -10	97.5
6H: CA-CB-CG-CD2	-107.5, 97.5	-82.5	-25, 180	-107.5
6H: CA-CB-CG-ND1	77.5, -72.5	102.5	-25, -175	77.5, -77.5
6H: N-CA-CB-CG	-67.5, 67.5, 180	-62.5	-5, 130, -117.5	67.5, 180
6H: C-CA-CB-CG	62.5, -57.5, 180	-57.5	120, 0, -122.5	-57.5, 180
7D: C-CA-CB-CG	-77.5, 72.5, 172.5	172.5	97.5, -100, 0	72.5, -77.5, 180
7D: N-CA-CB-CG	57.5, -62.5, -162.5	-62.5	120, 0, -100	-62.5, 52.5
7D: O-C-CA-CB	102.5	-97.5	-160	97.5
8S: N-CA-CB-OG	-172.5	-62.5	-110	62.5
8S: C-CA-CB-OG	67.5	180, 62.5	-112.5, 5	-72.5, 67.5
8S: O-C-CA-CB	82.5	-102.5	-175	117.5

[0409]

[0410] **V. 측쇄의 엔트로피**

[0411] 잔기의 측쇄 엔트로피는 하기로부터 대략 계산될 수 있다:

[0412]
$$S/k_B = - \sum_i \int d\phi_i p(\phi_i) \ln p(\phi_i).$$

[0413] 여기에서 합계는 특정한 잔기의 측쇄에서 전체 이면 각에 대한 것이고, $p(\phi_i)$ 는, 상기 분석된 바와 같이, 이면 각 분포이다.

[0414] 피브릴의 엔트로피에 대해, 환형 펩티드 앙상블내 잔기 엔트로피에서 증가의 플롯은 도 6에서 보여진다. H6의 엔트로피는 선형 및 피브릴에 비교하여 감소되어, H6에 대하여 더욱 제한된 자세를 나타낸다. 유사하게, S8의 엔트로피는 어느 한쪽 선형 또는 환형 펩티드에 대하여 피브릴보다 단지 미미하게 더 크다. D7의 엔트로피는 모노머에 비해 감소되지만 피브릴에 비해 증가된다.

[0415] **잔기 측쇄 모이어티의 엔트로피의 해체**

[0416] 각각의 이면 각의 엔트로피는 H, D, 및 S의 각각의 측쇄에서 조사되었다. H6, D7, 및 S8에 대하여 이면 각의 엔트로피는 도 6에서 플롯팅된다. H, D 및 S의 몇 개의 이면용 엔트로피는 피브릴에 비해 감소되어, 어느 한쪽 피브릴 또는 선형 모노머와 구별되는 경향이 있는 형태에서 그들 각에 대하여 제한된 자세를 나타낸다.

[0417] 환형 펩티드는, 특히 H6에 대하여, 선형 펩티드보다 일반적으로 더욱 강성이다. 또한, 잔기 H6은 피브릴 형태보다 환형 펩티드에서 더욱 강성이다. 이것은 특히 H6 주위 명확한 항원 프로파일이 있을 수 있다는 것을 시사한다. 프로파일은 그러나 선형 및 피브릴 앙상블과 중첩을 갖는다: H6 분포의 최상부 90% 내이도록 하는 이들 앙상블의 확률은 아래와 같다: 환형-선형 앙상블 및 환형-피브릴 앙상블 각각에서 C-CA-CB-CG, N-CA-CB-CG, CA-CB-CG-ND1, CB-CG-ND1-CE1, 및 O-C-CA-CB에 대하여 (36%, 36%, 36%, 35%, 33%) 및 (13%, 13%, 30%, 34%, 65%) 환형 펩티드에서 낮은 측쇄 형태적 엔트로피는 선택성 부여에 일조할 수 있는 명확한 형태적 자세를 지지한다.

[0418] **VI. 라마찬드란 각**

[0419] 에피토프가 항체에 노출하는 골격 배향은 펩티드가 선형, 환형, 또는 피브릴 형태인지 여부에 의존하여 상이하다. 상기 차이는, 양쪽 선형 및 환형 펩티드에서 잔기 H, D, S, G에 대하여, 골격을 따라, 라마찬드란 각 phi 및 psi (또는 ϕ 및 ψ) 플롯팅에 의해 정량화될 수 있다. 도 7은 피브릴 구조 2M4J의 맥락에서 서열 CGHDSGG (서열 식별 번호: 2), 뿐만 아니라 HDSG (서열 식별 번호: 1)로 구성되는 양쪽 선형 및 환형 펩티드에서 잔기 H6, D7, S8, 및 G9에 대하여, 평형 모의실험에서 샘플링된 phi 및 psi 각을 플롯팅한다. 도 7로부터 환형 펩티드에서 골격 이면 각의 분포가, 잔기 D7 및 S8의 BB 이면 각에 대하여, 피브릴 구조 2M4J 맥락에서 어느 한쪽 선형 펩티드, 또는 펩티드 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 샘플링된 이면 각의 분포와 가장 상이하다는 것을 알 수 있다.

[0420] 특이적 예로서, 잔기 D7에 대하여, 도 7은 환형 펩티드에 대하여 (ϕ, ψ) = ((-65.9°, -44.5°)에서 피크 값 (유리한 값)을 갖는 라마찬드란 ϕ, ψ 각의 분포를 보여준다. 선형 펩티드에 대하여, 이들 유리한 값은 (ϕ, ψ) = (-153°, 165°), 및 (-66°, 143°) (2 피크가 있다)이고 피브릴 구조 2M4J에 대하여, 이들 유리한 값은 (ϕ, ψ) = (-60°, 143°) 및 (-150°, 143°)이다. 피크 이면 각 값에서 실질적인 차이는 환형 에피토프 형태를 위하여 선택된 항체가 유사하게 선형 및 피브릴 에피토프에 대하여 더 낮은 친화성을 가질 것임을 암시한다.

[0421] H6, D7, S8, 및 G9에 대하여 라마찬드란 골격 ϕ, ψ 분포의 피크 값 (유리한 값)은 표 2에서 주어진다. 표 2내 제1 칼럼은, 괄호로 표시된, 2개의 각, phi 및 psi를 명시하는, 고려된 잔기를 제공한다. 제2 칼럼은 선형 펩티드 CGHDSGG(서열 식별 번호: 2)의 맥락에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 라마찬드란 phi/psi 각의 피크 값을 나타내고, 한편 제3 칼럼은 환형 펩티드 CGHDSGG(서열 식별 번호: 2)의 맥락에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 라마찬드란 phi/psi 각의 피크 값을 나타내고, 마지막 칼럼은 피브릴 구조 2M4J의 맥락에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 라마찬드란 phi/psi 각의 피크 값을 나타낸다. 참조 도 7. 골격 라마찬드란 각은 H6에 대하여 전체 3 종 사이 매우 유사하다. D7에 대하여, 환형 앙상블에서 지점과 중첩하는 선형 및 피브릴 앙상블에서 지점의 소수가 있다. 환형 앙상블의 지점의 90%를 둘러싸는 타원이 고려되면, 선형 앙상블의 단지 약 16%는 상기 타원 내부이고, 피브릴 앙상블의 단지 약 10%는 상기 선체 내부이다. H6에 대하여 유사한 측정을 위하여, 상응하는 수는 선형 앙상블에 대하여 27%이고 피브릴 앙상블에 대하여 32%이다. S8에 대하여, 환형 앙상블의 지점의 90%를 둘러싸는 최소 볼록한 선체는 선형 및 피브릴 앙상블 각각의 37% 및 15%를 함유한다. G9에 대하여, 90% 볼록한 선체는 지점의 90%를 함유하는 2개의 볼록한 선체로 최상 분할된다. 이들 선체에 함유된 지점의 분획은 선형 앙상블로부터 79%이고, 피브릴 앙상블로부터 11%이다.

[0422] 표 2. 골격 phi/psi 각의 분포의 피크 값

골격 phi/psi 각의 분포의 피크 값	선형	환형	피브릴
H6: (phi, psi)	(-98.5, 0) (-77.2, -43.3) (-162.8, 157.4)	(-164.6, 157.9)	(-147.5, 150) (-85, 150)
D7: (phi, psi)	(-153, 165) (-66, 143.4)	(-65.9, -44.5)	(-60.5, 143.5) (-149.5, 143.5)
S8: (phi, psi)	(-66.2, 144) (-158.3, 151.1)	(-70.5, -50)	(-156, 174) (-156, 12) (-66.5, -48)
G9: (phi, psi)	(85.9, 7) (86.1, -7)	(-114.3, -14.6)	(77.5, 0) (77.5, 158) (-62.3, 158)

[0423]

[0424] VII. 예상된 에피토프 서열의 용해도 및 항원성

[0425] CamSol 예측 반응식 [4]에 따른 A-베타 42의 잔기의 용해도는 도 8에서 보여진다. 잔기 H6-G9는 수직선에 의해 표시된다.

[0426] 잔기가 더욱 가용성일수록, 올리고머의 표면에서 더욱 마주칠 것 같다. 잔기 i에 대하여 상대 용해도 인자 σ_i 는 하기처럼 도입된다:

[0427]
$$\sigma_i = \frac{s_i - s_{ave}}{\delta s}$$

[0428] 여기에서 s_i 는 잔기 i의 용해도이고, s_{ave} 는 42-잔기 A-베타 펩티드의 평균 용해도이고, δs 는, 상기 제공된 바와 같이, 42 잔기 A-베타펩티드의 용해도의 표준 편차이다.

[0429] 양성 용해도는 잔기가 용매에 더욱 노출될 것 같고 항체에 접근가능할 것 같다는 것을 나타내고; 상기 척도로 A-베타42에서 전체 잔기 1 내지 42에 대해 평균 용해도는 -0.39이다. 추가 구조적 정보의 부재 하에, 상기 영역의 증가된 용해도는 매장되기 보다는 용매에 노출될 것 같다는 것을 암시한다. 따라서 후보 올리고머의 앙상블에서, 상기 영역은 평균보다 더욱 노출되는 경향일 수 있다. CamSol 방법 [4]는, 인접하는 잔기의 효과를 설명하기 위해 7 잔기의 윈도우에 대해 연결화되는, 소수성, 중성 pH에서 잔기의 정전 전하, α -나선 경향, 및 β -가닥 경향을 포함하는, 아미노산의 특이적 물리화학 특성의 선형 조합을 사용한다. 용해도 스코어는 무차원 수 (A.U. 또는 AU)로서 계산되고, 용해도 프로파일은 재설정되어 이로써 랜덤 폴리펩티드가 평균 0 및 표준 편차 1을 가진 프로파일을 산출한다. 따라서, -1보다 더 작은 용해도 스코어를 가진 아미노산은 저조하게 가용성으로서 간주되고 단백질의 용해도에서 부정적 영향을 갖고, 한편 1보다 더 큰 스코어는 고도로 가용성 영역을 표시하여, 전반적인 용해도에 양성 기여를 산출한다.

[0430] 도 9는 용매 접근가능한 표면적 (SASA)를 플롯팅하고, SASA는 각각의 잔기에 대하여 용해도 인자, $\sigma_i \cdot SASA_i$, 및 $\sigma_i \cdot SASA_i$ 마이너스 피브릴에서 값, 즉 피브릴에 대해 모노머 및 환형 펩티드에서 상기 양에서 증가, $\sigma_i \cdot SASA_i$ 에 의해 칭량된다. 여기에서 s_i 는 도 8에서 취득된 잔기 i의 용해도이고, $\langle s \rangle$ 는 A-베타의 전체 42 잔기에

$$\delta s = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{42} (s_i - \langle s \rangle)^2}$$

대해 평균 용해도이고, $\langle s \rangle = -0.39$, 및 δs 는 Ab의 전체 42 잔기를 거쳐 용해도의 표준 편차이다. SASA 대 잔기 지수의 플롯은 N-말단을 향한 잔기가 전체 형태에서 더욱 항체-접근가능한 표면을 표시하는 경향이 있다는 것을 나타낸다. 제공된 잔기가 명백하게 예측되지 않은 맥락에서 용매에 표면을 노출시킬 가능성의 측정치를 나타내기 위해 용해도에 의해 칭량된 경우, 잔기 H6 및 S8은 환형 펩티드 앙상블에서 비교할만하다. SASA가 상기에서와 같이 용해도에 의해 칭량되는 경우, 그리고 그 다음 피브릴에 상대적 값을 나타내기 위해 상응하는 피브릴 값에 의해 공제되는 경우, 잔기 S8은 환형 펩티드에서 가장 노출되고 가용성으로서 출현한다. 상기 분석은 결합에 잠재적으로 특히 중요한 것으로서 상기 펩티드내 잔기 S8 및 H6를 강조한다.

[0431] 환형 및 선형 펩티드의 SASA는 비교할만하고, 양쪽은 피브릴에서 SASA보다 더 크다.

- [0432] 용해도에 의한 칭량은, 피브릴 구조에서 HDSG (서열 식별 번호: 1)의 형태에 비교된 경우, 항체 결합에 대하여 이용가능성 및 차별적인 노출의 최대 가능성을 갖는 잔기 S8을 초래한다.
- [0433] **VIII. 환형 펩티드 형태의 앙상블이 선형 또는 피브릴 형태의 앙상블보다 상이하게 클러스터링한다**
- [0434] 서열 HDSG (서열 식별 번호: 1)이 선형 펩티드에서 보다 환형 펩티드의 맥락에서 상이한 형태를 표시하는 최종적인 증거는 형태 사이 표준 구조적 정렬 매트릭스 이용, 및 그 다음 클러스터링 분석 시행에 의해 보여질 수 있다. 형태의 평형 앙상블은 선형 및 환형 펩티드 CGHDSGG(서열 식별 번호: 2), 뿐만 아니라 PDB ID 2M4J에 상응하는 3-배 대칭 구조에서 전장 피브릴에 대하여 수득된다. 잔기 HDSG (서열 식별 번호: 1)에 대하여 이들 앙상블로부터 형태의 스냅샷은 수집되고 그 다음 선형 펩티드 앙상블의 3 최대 클러스터의 도심에 구조적으로 정렬되고, 평균 제곱근 편차 (RMSD)는 기록된다. 클러스터링은 여기에서 맥스클러스터 알고리즘 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/maxcluster>)에 의해 수행된다. 선형, 환형, 및 피브릴 앙상블에 대하여 3 상응하는 RMSD 값은 도 10에서 3-차원 산포도로써 플롯팅된다.
- [0435] 다크써클로서 보여진, 환형 펩티드 앙상블은 어느 한쪽 회색 십자형으로서 보여진 선형 펩티드 또는 회색 역진된 삼각형으로서 보여진 피브릴 앙상블로부터 형태적으로 구별된다. 도 10의 최상부 플롯은 선형 펩티드가 아닌, 환형 펩티드가 피브릴에 의해 나타난 형태로부터 분화되는 것을 보여준다. 이것은 환형 펩티드로 상승된 항체가 형태적으로 선택적일 수 있고 피브릴 또는 모노머에 우선적으로 결합할 수 있다는 것, 그러나 모노머로 상승된 항체가 피브릴에 여전히 결합할 수 있다는 것을 암시한다. 따라서, 이론에 의해 제한되기 바랍 없이, 환형 펩티드가 올리고머의 모방체로서 사용되면, 그 모방체로 상승된 항체가 모노머 또는 피브릴을 결합할 것 같지 않을 수 있다.
- [0436] 3 앙상블이 서로 상이하게 클러스터링하는 것이 도 10으로부터 분명하다. 특히 환형 펩티드 구조적 앙상블은 어느 한쪽 선형 또는 피브릴 앙상블과 구별되어, 환형 펩티드 에피토프에 특이적인 항체가 선형 또는 피브릴 앙상블에서 나타난 형태에 낮은 친화성을 가질 것 같음을 암시한다.
- [0437] 구조의 환형 펩티드 앙상블로부터 최대 클러스터의 도심을 구성하는, 대표적인 스냅샷의 2개 도는 도 11A에서 보여진다. 또한, 선형 펩티드 앙상블에 대하여 이면 각 분포의 피크 근처 이면 각을 갖는, 선형 펩티드 앙상블에서 대표적인 형태로 존재하는 측쇄 배향은, 명백한 그것의 상이한 배향을 만들기 위해, 환형 펩티드에서 겹쳐진, 도 11A에서 흑색으로 보여진다. 상기 논의된 이면 각 차이에 기반하여 잔기 D7, 및 다소 더 적은 정도까지 잔기 S8은 차별적으로 노출될 것이다.
- [0438] 도 12는 평균 제곱근 편차 (RMSD)에 의한 일련의 클러스터링 플롯이고 축은, 도 10에서처럼, 선형 펩티드 앙상블의 3 최대 클러스터의 도심에 상응한다.
- [0439] 각각의 지점은, PDB IDs 2LMN, 2MXU, 및 2LMP로부터, 어느 한쪽 환형 펩티드, 또는 피브릴 평형 앙상블의 다양한 "균주"로부터 취득된 주어진 형태에 상응한다. 다크써클로서 보여진, 환형 펩티드 앙상블은 전체 피브릴 앙상블과 형태적으로 구별된다. 이들 피브릴 전체는 무질서한 N-말단의 다양한 정도를 갖고, 이로써 피브릴 앙상블은 어느 정도까지 선형 앙상블을 반복한다. 이것은 환형 펩티드로 상승된 항체가 A-베타의 다중 균주에 대하여 피브릴 형태에 결합하지 않기 위해 형태적으로 선택적일 수 있다는 것을 암시한다.
- [0440] 표 3은 도 10에서 취득된 클러스터 도심 환형 펩티드 형태에 대하여, 그리고 선형 펩티드 및 피브릴 앙상블로부터 상응하는 도심 형태에 대하여 착수된 라마찬드란 골격 및 측쇄 이면 각의 값을 열거한다. 평형 피브릴 앙상블에서 최대 클러스터에 대하여 도심 형태는 또한 여기에서 취득된다. 환형과 선형 형태 사이, 그리고 환형과 피브릴 형태 사이 상응하는 이면 각의 차이는 또한 주어진다. 상기 표에서 이면 각의 큰 다수는, 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 상당히 상이하다.
- [0441] **표 3:** 도 10에서 플롯팅된 최대 형태적 클러스터의 도심인 환형 펩티드 형태에 대하여, 그리고 도 10에서 또한 플롯팅되는 선형 및 피브릴 앙상블의 최대 형태적 클러스터의 도심에 대하여 보여진 라마찬드란 골격 및 측쇄 이면 각의 표.

	환형	선형	2m4j	환형-선형	환형-2m4j
Rama-6H	(-137.5, 154.4)	(-134.5, 155.5)	(-83.8, 124.7)	(-3.0, -1.1)	(-53.7, 29.7)
Rama-7D	(-75.2, -26.4)	(-147.8, 137.7)	(-79.9, 128.1)	(72.6, 164.1)	(4.7, -154.5)
Rama-8S	(-73.5, -50.8)	(-141.3, 144.3)	(-160.0, -179.8)	(67.8, 195.1)	(86.5, 129)
Rama-9G	(-123.6, 10.3)	(-84.8, -3.1)	(109.4, 174.1)	(-38.8, 13.4)	(127, -163.8)
6H:O-C-CA-CB	103.2	100.4	65.9	2.8	37.3
6H:C-CA-CB-CG	-68.9	48.9	57.2	-117.8	-126.1
6H: N-CA-CB-CG	54.9	178.3	-177.8	-123.4	-127.3
6H: CA-CB-CG-ND1	93.4	58.2	65.8	35.2	27.6
6H:CA-CB-CG-CD2	-100.3	-127.6	-108.3	27.3	8
6H:CD2-CG-ND1-CE1	170.3	-0.1	-6.23	170.4	176.53
6H: CB-CG-ND1-CE1	1.62	175	178.8	-173.38	-177.18
6H: NE2-CE1-ND1-CG	-0.45	0.2	8.22	-0.65	-8.67
6H: NE2-CD2-CG-ND1	-2.12	0	2.58	-2.12	-4.7
6H: NE2-CD2-CG-CB	-169.6	-174.5	177.2	4.9	13.2
6H: ND1-CE1-NE2-CD2	-0.85	-0.25	-7.06	-0.6	6.21
6H: CG-CD2-NE2-CE1	1.8	0.16	2.36	1.64	-0.56

[0442]

7D:O-C-CA-CB	-94.9	87.9	68.9	177.2	-163.8
7D: C-CA-CB-CG	176.3	-51.2	-180	-132.5	-3.6
7D: N-CA-CB-CG	-63.3	63.3	-60.9	-126.6	-2.4
7D: CA-CB-CG-OD2	-33.8	113.3	149.6	-147.1	176.6
7D: CA-CB-CG-OD1	131.6	-70.8	-37.3	-157.6	168.9
8S: N-CA-CB-OG	-46.7	-163.2	-164	116.5	117.3
8S: C-CA-CB-OG	-170.5	76.4	69.2	95.1	120.3
8S: O-C-CA-CB	-109.7	84.1	125.8	166.2	124.5

[0443]

[0444]

표 4: 환형, 선형, 및 2M4J 피브릴 앙상블에서 각각의 잔기에 대하여 평균 곡률 값. 곡률 대 잔기 지수는 도 2에서 플롯팅된다.

곡률	선형	환형	2M4J
6H	1.19	0.781	1.01
7D	0.99	1.41	1.03
8S	0.95	1.36	0.93
9G	1.40	1.31	0.86

[0445]

[0446]

실시예 3

[0447]

형태적으로 제한된 에피토프를 포함하는 환형 화합물 작제

[0448]

HDSG (서열 식별 번호: 1) 예컨대 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)를 포함하는 펩티드는 헤드 투 테일 고리화될 수 있다.

[0449]

HDSG (서열 식별 번호: 1) 및 링커를 포함하는, 바람직하게는 2, 3, 또는 4 아미노산 및/또는 PEG 유닛을 포함하는 선형 펩티드는 공지된 방법 예컨대 Fmoc 기반 고상 펩티드 합성을 단독으로 또는 다른 방법과 조합으로 이용하여 합성될 수 있다. PEG 분자는, 본 명세서에서 참고로 각각 편입된, Hamley 2014 [6] 및 Roberts 등 2012 [7]에서 기재된 커플링 화학을 예를 들어 이용하여 N 말단에서 아민기에 커플링될 수 있다. 선형 펩티드 화합물은 1) 펩티드 결합 (예를 들면 골격 고리화)를 형성하기 위해 펩티드+링커의 카복시 말단 및 아미노 말단, 2)

펩티드+링커에서 측쇄를 가진 아미노 또는 카복시 말단 또는 3) 펩티드+링커에서 2 측쇄에 공유적으로 결합함으로써 고리화될 수 있다.

- [0450] 환형 화합물에서 결합은 전체 규칙적 펩티드 결합 (호모데틱 환형 펩티드)일 수 있거나 결합의 다른 유형 예컨대 에스테르, 에테르, 아마이드 또는 디설파이드 연결기 (헤테로데틱 환형 펩티드)를 포함할 수 있다.
- [0451] 펩티드는, 예를 들어 시스테인 및 호모시스테인을 포함하는, 펩티드 내부 또는, N-말단 또는 C-말단에서 티올-또는 메르캡탄-함유 잔기의 산화에 의해 고리화될 수 있다. 예를 들어 펩티드를 측정하는 2 시스테인 잔기는 디설파이드 결합을 형성하기 위해 산화될 수 있다. 사용될 수 있는 산화적 시약은, 예를 들어, 산소 (공기), 디메틸 설피드, 산화된 글루타티온, 시스틴, 구리 (II) 클로라이드, 칼륨 페리시아나이드, 탈륨(III) 트리플루로아세테이트를 포함하거나, 또는 다른 산화적 시약은 예컨대 당해 분야의 숙련가에 공지될 수 있고 당해 분야의 숙련가에 공지되는 바와 같이 상기 방법으로 사용될 수 있다.
- [0452] 환형 펩티드 합성에 관련된 방법 및 조성물은 미국 특허 공보 2009/0215172에서 기재된다. 미국 특허 공보 2010/0240865, 미국 특허 공보 2010/0137559, 및 미국 특허 7,569,541은 다양한 고리화 방법을 기재한다. 다른 예는 PCT 공개 W001/92466, 및 Andreu 등, 1994. *Methods in Molecular Biology* 35:91-169에서 기재된다.
- [0453] 더욱 특이적으로, HDSG (서열 식별 번호: 1) 에피토프를 포함하는 환형 펩티드는 스페이서에서 측정하는 및/또는 삽입된 시스테인 잔기를 가진 스페이서를 포함하는 링커 첨가에 의해 삭제될 수 있다. 펩티드는 펩티드의 N- 및 C-말단에 첨가된 비-원상태 시스테인 잔기 사이 디설파이드 연결 창출에 의해 환형 형태 속에 구조화될 수 있다. N- 및 C-말단 아미노산 사이 펩티드 결합 형성 (예를 들면 헤드 투 테일 고리화)에 의해 환형 화합물로 또한 합성될 수 있다.
- [0454] 펩티드 합성은 표준 제조 절차를 따라 CPC Scientific Inc. (Sunnyvale CA, USA)에 의해 수행된다.
- [0455] 예를 들어 형태적 에피토프 HDSG (서열 식별 번호: 1)을 포함하는 사이클로(CGHSFG)(서열 식별 번호:12) 환형 펩티드는 HDSG (서열 식별 번호: 1)을 포함하는 펩티드의 N- 및 C- 말단에 첨가된 시스테인 잔기 사이 디설파이드 연결을 이용하여 제한된 환형 형태에서 삭제된다. 2개의 비-원상태 시스테인 잔기는 C-말단에서 CGHSFG(서열 식별 번호: 7) 하나 및 N-말단에서 하나에 첨가되었다. 2개의 시스테인은 제어된 조건 하에 산화되어 디설파이드 브릿지를 형성하거나 헤드 투 테일 반응되어 펩티드 결합을 생산한다.
- [0456] 상기 기재된 바와 같이, 환형 펩티드의 구조는 A-베타 올리고머내 HDSG (서열 식별 번호: 1)의 아미노산 측 변위의 배향 및 형태를 모방하도록 설계되었다.
- [0457] **사이클로(CGHSFG) (서열 식별 번호: 2)**
- [0458] 사이클로(CGHSFG) (서열 식별 번호: 2)는 다음과 같은 방법 (CPC Scientific Inc, Sunnyvale CA)를 이용하여 합성되었다. 보호된 선형 펩티드는 2-클로로트리틸 클로라이드 수지에서 표준 협약 Fmoc-기반된 고체상 펩티드 합성, 이어서 30% HFIP/DCM를 가진 수지로부터 절단에 의해 합성되었다. 보호된 선형 펩티드는 저 농도로 DMF내 EDC.HCl/HOBt/DIEA 이용에 의해 상응하는 보호된 환형 펩티드로 고리화되었다. 보호된 환형 펩티드는 TFA에 의해 탈보호되어 조물질 환형 펩티드를 제공하였고 조물질 펩티드는 RP HPLC에 의해 정제되어 동결건조후 순수한 환형 펩티드를 제공하였다.
- [0459] 사이클로(CGHSFG) (서열 식별 번호: 2)는 선형 펩티드 CGHSFG(서열 식별 번호: 2)의 아마이드 측합에 의해 제조될 수 있다.
- [0460] 사이클로(C-PEG2-HDSFG)는 선형 화합물 C-PEG2-HDSFG (서열 식별 번호: 28)의 아마이드 측합에 의해 제조될 수 있다.
- [0461] 선형(CGHSFG)는 제조되었다 (CPC Scientific Inc, Sunnyvale CA) 보호된 선형 펩티드는 Fmoc-Gly-Wang 수지에서 표준 협약 Fmoc-기반된 고체상 펩티드 합성에 의해 합성되었고, 그 다음 보호된 펩티드는 TFA에 의해 절단되어 조물질 펩티드를 제공하였고 조물질 펩티드는 RP HPLC에 의해 정제되어 동결건조후 순수한 펩티드를 제공하였고, 이는 BSA를 콘주게이션하는데 사용되었다.
- [0462] **면역원 작제**
- [0463] 환형 화합물 사이클로(CGHSFG) (서열 식별 번호: 2)는 상기 기재된 바와 같이 합성되었고 그 다음 BSA 및/또는 KLH (CPC Scientific Inc, Sunnyvale CA)에 콘주게이션되었다. BSA 또는 KLH는 PBS 완충액내 SMCC에 의해 재활성화되었고, 그 다음 PBS 완충액내 순수한 펩티드의 용액은 콘주게이션 혼합물에 첨가되었고, 콘주게이션 혼합

물은 실온에서 (RT) 2시간 동안 교반되었다. 그 다음 콘주게이션 혼합물은 투석후 동결건조되어 콘주게이션 생성물을 제공하였다.

[0464] **실시예 4**

[0465] **항체 생성 및 선택**

[0466] 형태적 제한된 화합물 임의로 환형 화합물 예컨대 HDSG (서열 식별 번호: 1) 예컨대 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2) 펩티드를 포함하는 환형 펩티드는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 연결된다. 사이클로펩티드는, 캐나다 동물 관리 협회 (Canadian Council on Animal Care)에 의해 승인된 프로토콜에 따라, 마우스 단클론성 항체 생산 (ImmunoPrecise Antibodies LTD(Victoria BC, Canada)을 위하여 보내진다. 마우스 혈청은, BSA에 연결된, 항체 생산을 위하여 사용된 형태적 펩티드 또는 관련된 펩티드 예를 들면 사이클로(CGHDSGG)(서열 식별 번호: 2)펩티드 어느 한쪽을 이용하여 스크리닝된다.

[0467] 하이브리도마는 실시예 6에서 추가로 기재된 바와 같이 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)를 포함하는 면역원을 이용하여 제조되었다. 하이브리도마 상형액은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2) 펩티드 대 선형 (비구조화된) 펩티드에 우선적인 결합을 위하여 ELISA 및 SPR에 의해 스크리닝되었다. 양성 IgG-분비 클론은 단백질 G를 이용하여 추가 정제 및 대규모 생산에 적용된다.

[0468] **실시예 5**

[0469] **플라크/피브릴에 대한 이의 결합 또는 결여 평가**

[0470] 면역조직화학은, 10% 포르말린에서 고정된 후에, 신선한 냉동된 인간 뇌 섹션, 또는 냉동된 인간 뇌 섹션에서 수행될 수 있다. 내인성 페록시다아제 활성은 20 분 동안 메탄올내 0.5% 과산화수소를 이용하여 켄칭될 수 있다. 항원 회수는 나트륨 시트레이트 pH 6.0 및 25 분 동안 증기 가열 이어서 실온에서 (RT) 30 분 동안 냉각을 이용하여 달성될 수 있다. TBS에서 5-7 분 동안 안정화후, 섹션은 70% 포르산에 의해 15분 동안 RT에서 처리되고, 그 다음 TBS에서 3 x 15 분 세정된다. 가습된 챔버에서, 비-특이적 염색은 무혈청 단백질 차단 시약 (Dako Canada Inc., Mississauga, ON, Canada)으로 1시간 동안 인큐베이션에 의해 차단된다.

[0471] 면역염색을 위하여, 본 명세서에서 기재된 항체, 양성 대조군 6E10 (1 mg/ml) 및 아이소타입 대조군 IgG1, 2a 및 2b (1 µg/ml, Abcam)은 1차 항체로서 사용된다. 섹션은 밤새 4 °C에서 인큐베이션되고, TBS-T에서 3 x 5 분 세정된다. 콘주게이션된 항-마우스 IgG 홀스래디쉬 페록시다아제 (1:1000, ECL)은 섹션에 적용되고 45 분 인큐베이션된 다음, TBS-T에서 3 x 5 분 세정된다. DAB 색원체 시약 (Vector Laboratories, Burlington ON, Canada)는 적용되고 섹션은 배경 염색에 표적의 요망된 수준이 달성되는 경우 증류수로 린스된다. 섹션은 메이어 하에마톡실린으로 대조염색되고, 탈수되고 커버 슬립은 적용되었다. 슬라이드는 광학 현미경 (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss Canada, Toronto ON, Canada) 하에 검사되고 대표적인 이미지는 Leica DC300 디지털 카메라 및 소프트웨어 (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON)를 이용하여 50, 200 및 400X 배율에서 포착된다.

[0472] **실시예 6**

[0473] **방법 및 물질**

[0474] **면역원**

[0475] 환형 및 선형 펩티드는 CPC Scientific, Sunnyvale, CA, USA에서 생성되었다. 펩티드는 트리플루오로아세테이트 반대 이온 프로토콜을 이용하여 KLH (면역용) 및 BSA (스크리닝용)에 콘주게이션되었다. 펩티드는 탈염되었고 MS 및 HPLC에 의해 체크되었고 95% 순수한 것으로 간주되었다. 펩티드는 마우스내 단클론성 항체의 생산에서 사용을 위하여 IPA에 출하되었다.

[0476] **항체**

[0477] 수많은 하이브리도마 및 단클론성 항체는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 연결된 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)에 생성되었다.

[0478] 50 일령 암컷 BALB/c 마우스 (Charles River Laboratories, Quebec)은 면역화되었다. 아주반트 없이 항원을 함유하는 일련의 피하 주사는 19 일의 기간 동안 제공되었다. 마우스는 환형 펩티드-KLH의 멸균된 염수내 0.5mg/mL 용액의 주사당 마우스당 100 µg의 펩티드로 면역화되었다. 마우스는 Lab Products로부터 환기된 랙 시

시스템에서 하우징되었다. 전체 4 마우스는 19 일째에 안락사되었고 림프구는 하이브리도마 세포주 생성을 위하여 수확되었다.

[0479] **융합 / 하이브리도마 개발**

[0480] 림프구는 단리되었고 폴리-에틸렌 글리콜 (PEG 1500)의 존재 하에 컷과 SP2/0 골수종 세포와 융합되었다. 융합된 세포는 HAT 선택을 이용하여 배양되었다. 상기 방법은 반-고체 메틸셀룰로오스-기반된 HAT 선택적 배지를 이용하여 하이브리도마 선택 및 클로닝을 1 단계로 조합시킨다. 단일 세포-유래된 하이브리도마는 성장하여 단클론성 콜로니를 반-고체 배지에서 형성한다. 융합 이벤트 10 일후, 수득한 하이브리도마 클론은 96-웰 조직 배양 플레이트에 전달되었고 중간-로그 성장이 도달된 (5 일) 때까지 배지를 함유하는 HT에서 성장되었다.

[0481] **하이브리도마 분석 (스크리닝)**

[0482] 하이브리도마로부터 조직 배양 상청액은 스크리닝 항원 (환형 펩티드-BSA) (1차 스크리닝)에서 간접 ELISA에 의해 시험되었고 염소 항-IgG/IgM(H&L)-HRP 2차를 이용하여 양쪽 IgG 및 IgM 항체에 대하여 탐색되었고 TMB 기질로 현상되었다. 상기 검정에서 클론 >0.2 OD는 시험의 다음 라운드로 넘겨졌다. 양성 배양물은 스크리닝 항원에서 재시험되어 분비를 확인하였고 무관한 항원 (인간 트랜스페린)에서 재시험되어 비-특이적 mAbs를 제거하였고 거짓 양성을 제외시켰다. 전체 관심 클론은 항체 포착 ELISA에 의해 아이소타입화되어 이들이 IgG 또는 IgM 아이소타입인지를 측정하였다. 전체 관심 클론은 다른 환형 펩티드-BSA 콘주게이트 뿐만 아니라 선형 펩티드-BSA 콘주게이트에서 간접 ELISA에 의해 또한 시험되어 교차-반응성을 평가하였다.

[0483] 마우스 하이브리도마 항체는 BSA에 콘주게이션된 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)를 이용하여 간접 ELISA에 의해 스크리닝되었다.

[0484] **ELISA 항체 스크리닝**

[0485] 간단히, ELISA 플레이트는 4C에서 카보네이트 코팅 완충액 (pH 9.6) 0/N내 100uL/웰로 0.1ug/웰 사이클로(CGHDSGG) -콘주게이션된 -BSA (서열 식별 번호: 2)로 코팅되었고 PBS내 3% 탈지분유로 1시간 동안 실온에서 차단되었다. 1차 항체: 진탕하면서 37C에서 1시간 동안 인큐베이션된 100 uL/웰로 하이브리도마 상청액. 2차 항체 진탕하면서 37C에서 1시간 동안 PBS-Tween내 100uL/웰로 1:10,000 염소 항-마우스 IgG/IgM(H+L)-HRP. 전체 세정 단계는 PBS-Tween으로 30 분 동안 수행되었다. 기질 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)는 50uL/웰로 첨가되었고, 암실에서 현상되었고 동등 용적 1M HCl로 중단되었다.

[0486] 양성 클론은 추가 시험을 위하여 선택되었다. 마우스 하이브리도마의 양성 클론은 간접 ELISA에 의해 인간 트랜스페린 (HT) 및 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2) 콘주게이션된 BSA에 반응성에 대하여 시험되었다. 플레이트는 4C에서 카보네이트 코팅 완충액 (pH 9.6) 0/N내 100uL/웰로 1) 0.1ug/웰 사이클로(CGHDSGG) -콘주게이션된 -BSA (서열 식별 번호: 2); 또는 2) 37C에서 dH2O 0/N내 50 uL/웰로 0.25ug/웰 HT 항원으로 코팅되었다. 1차 항체: 진탕하면서 37C에서 1시간 동안 인큐베이션된 100 uL/웰로 하이브리도마 상청액. 2차 항체 진탕하면서 37C에서 1시간 동안 PBS-Tween내 100uL/웰로 1:10,000 염소 항-마우스 IgG/IgM(H+L)-HRP. 전체 세정 단계는 30 분 동안 PBS-Tween으로 수행되었다. 기질 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)는 50uL/웰로 첨가되었고, 암실에서 현상되었고 동등 용적 1M HCl로 중단되었다.

[0487] **ELISA 사이클로 대 선형 CGHDSGG(서열 식별 번호: 2) 화합물 선택성**

[0488] ELISA 플레이트는 1) 4C에서 카보네이트 코팅 완충액 (pH 9.6) 0/N내 100uL/웰로 0.1ug/웰 사이클로(CGHDSGG) -콘주게이션된 -BSA (서열 식별 번호:2); 2)) 4C에서 카보네이트 코팅 완충액 (pH 9.6) 0/N내 100uL/웰로 0.1ug/웰 선형 CGHDSGG -콘주게이션된 -BSA (서열 식별 번호:2); 또는 3) 4C에서 카보네이트 코팅 완충액 (pH 9.6) 0/N내 100uL/웰로 0.1ug/웰 음성-펩티드로 코팅되었다. 1차 항체: 진탕하면서 37C에서 1시간 동안 인큐베이션된 100 uL/웰로 하이브리도마 상청액. 2차 항체 진탕하면서 37C에서 1시간 동안 PBS-Tween내 100uL/웰로 1:10,000 염소 항-마우스 IgG/IgM(H+L)-HRP. 전체 세정 단계는 30 분 동안 PBS-Tween으로 수행되었다. 기질 TMB는 50uL/웰로 첨가되었고, 암실에서 현상되었고 동등 용적 1M HCl로 중단되었다.

[0489] **아이소타입화**

[0490] 하이브리도마 항체는 항체 트랩 실험을 이용하여 아이소타입화되었다. 트랩 플레이트는 4C에서 밤새 100uL/웰 카보네이트 코팅 완충액 pH9.6으로 1:10,000 염소 항-마우스 IgG/IgM(H&L) 항체로 코팅되었다. 차단 단계는 사용되지 않았다. 1차 항체 (하이브리도마 상청액)은 첨가되었다 (100 ug/mL). 2차 항체 진탕하면서 37C에서 1시간 동안 PBS-Tween내 100uL/웰로 1:5,000 염소 항-마우스 IgG γ-HRP 또는 1:10,000 염소 항-마우스 IgM μ-HRP.

전체 세정 단계는 30 분 동안 PBS-Tween으로 수행되었다. 기질 TMB는 50 μ L/웰로 첨가되었고, 암실에서 현상되었고 동등 용적 1M HCl로 중단되었다.

[0491] **SPR 결합 검정 - 1차 및 2차 스크린**

[0492] **A-베타 모노머 및 올리고머에 항체 결합의 SPR 분석**

[0493] **A-베타 모노머 및 올리고머 제조** 재조합 A-베타40 및 42 펩티드 (California Peptide, Salt Lake City UT, USA)는 빙랭 핵사플루오로이소프로판올 (HFIP)에 용해되었다. HFIP는 밤새 증발에 의해 제거되었고 SpeedVac 원심분리기에서 건조되었다. 모노머를 제조하기 위해, 펩티드 필름은 DMSO에서 5mM로 재구성되었고, dH₂O내 100 μ M로 추가로 희석되었고 즉시 사용되었다. 올리고머는 100 μ M의 최종 농도로 페놀 레드 없는 F12 배지 (Life Technologies Inc., Burlington ON, Canada)에서 5mM DMSO 펩티드 용액 희석에 의해 제조되었고 24시간 내지 7일 동안 4°C에서 인큐베이션되었다.

[0494] **SPR 분석** 전체 SPR 측정은, 실시간으로 결합 상호작용을 모니터링하기 위해 고 강도 레이저광 및 고속 광학 스캐닝을 사용하는 분석 바이오센서인, 분자 친화성 스크리닝 시스템 (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany)를 이용하여 수행되었다. 조직 배양 상청액의 1차 스크리닝은 SPR 직접 결합 검정을 이용하여 수행되었고, 이로써 BSA-접합된 펩티드, A-베타42 모노머 및 A-베타42 올리고머는 고 아민 수용력 (HAC) 센서칩(Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany)의 개별 유동 세포 및 표면 위에서 유동된 항체에서 공유적으로 고정된다. 단백질 G 정제된 mAbs는 SPR 간접 (포착) 결합 검정을 이용하여 2차 스크린에서 분석되었고, 이로써 항체는 단백질 A-유도된 센서칩 (XanTec Bioanalytics GmbH, Duesseldorf, Germany) 및 A-베타40 모노머, A-베타42 올리고머, 가용성 뇌 추출물 및 표면 위에서 유동된 뇌척수액에서 포착되었다. 항체의 특이성은 HAC 센서칩 및 유동 정제된 mAbs의 개별 유동 세포에서 A-베타42 모노머 및 A-베타42 올리고머를 공유적으로 고정화시킴으로써 SPR 직접 결합 검정에서 확인되었다.

[0495] **가용성 뇌 추출물 및 CSF 샘플의 SPR 분석**

[0496] **가용성 뇌 추출물 및 CSF 제조** 인간 뇌 조직 및 CSFs는 UBC 알츠하이머 및 관련된 장애 임상에서 평가된 환자로부터 획득되었다. 정황적 AD의 임상 진단은 NINCDS-ADRDA 기준에 기반된다 [5]. CSFs는 폴리프로필렌 튜브에서 수집되고, 가공되고, 100 μ L 폴리프로필렌 바이알에 분주되고, -80°C에서 1 시간 이내 요추 천자후 저장된다.

[0497] **균질화:** 인간 뇌 조직 샘플은 칭량되었고 그 뒤에 뇌 조직의 최종 농도가 20% (w/v)이도록 (Roche Diagnostics, Laval QC, Canada)로부터 무 EDTA 프로테아제 억제제 각테일로 보충된) 신선한, 빙랭된 TBS의 용적으로 침지되었다. 조직은 기계적 탐침 균질기 (그 사이 30 초 휴지를 가진 3 x 30 초 펄스, 모두 빙상에서 수행됨)을 이용하여 상기 완충액에서 균질화된다. TBS 균질화된 샘플은 그 다음 초원심분리 (90 분 동안 70,000xg)에 적용된다. 상청액은 수집되고, 분주되고 -80°C에서 저장된다. TBS 균질물의 단백질 농도는 BCA 단백질 검정 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford IL, USA)를 이용하여 계측된다.

[0498] **SPR 분석** 4 AD 환자 및 4 연령-매칭된 대조군으로부터 뇌 추출물, 및 9 AD 환자 및 9 연령-매칭된 대조군으로부터 CSF 샘플은 풀링 및 분석되었다. 정제된 mAbs는 180 초 동안 표면 위에 주사된 희석된 샘플 및 단백질 A-유도된 센서 칩의 별도의 유동 세포에서 포착되었고, 이어서 완충액 및 표면 재생에서 120 초 해리되었다. 결합 반응은 마우스 대조군 IgG 참조 표면 결합 및 검정 완충액의 삭감에 의해 이중-참조되었고, 샘플의 상이한 그룹은 비교되었다

[0499] **A-베타 모노머에 대한 이의 결합 또는 결여 평가**

[0500] 조직 배양 상청액의 1차 스크린에서, A-베타42 모노머 및 A-베타42 올리고머는 직접 결합 검정에서 사용되었다. 2차 스크린에서, A-베타40 모노머 및 A-베타42 올리고머, 가용성 뇌 추출물 및 CSF 샘플은 간접 (포착) 결합 검정에서 사용되었다.

[0501] **1차 스크린**

[0502] 조직 배양 상청액은 그것의 동족 환형 펩티드에 대한 항체 결합의 존재에 대하여 스크리닝되었다. 각각의 샘플은 희석되었고 120 초 동안 고정된 펩티드 및 BSA 참조 표면 위에 반복하여 주사되었고, 이어서 300초 해리기간 동안만 작동 완충제가 주사되었다. 모든 분석 사이클후, 센서 칩 표면은 재생되었다. 센서그램은 BSA 참조 표면 및 블랭크 작동 완충제 주사로부터 결합 삭감에 의해 이중-참조되었고, 결합 반응 보고 지점은 해리기에서 수집되었다.

[0503] **올리고머 결합 검정**

[0504] 다음 합성 A-베타 42 올리고머는 생성되었고 상기에서와 같이 고정되었고, 항체 결합 반응은 분석되었다. A-베타 42 올리고머에 항체 결합 반응은 환형에 결합 반응과 비교되었다.

[0505] **A-베타 올리고머에 결합 검증.**

[0506] A-베타42 올리고머 결합을 추가로 검증 및 입증하기 위해, 항체는 공유적으로 고정되었고, 이어서 상업적으로-제조된 안정적인 A-베타42 올리고머 (SynAging SAS, Vandoeuvre-les-Nancy, France)의 표면 위에 주사되었다.

[0507] **결과**

[0508] ELISA 시험은 다수의 하이브리도마 클론이 사이클로펩티드에 결합하였다는 것을 알아내었다.

[0509] 다음 클론은 사이클로- 및 선형- CGHDSGG (서열 식별 번호: 2) 화합물을 위한 그것의 결합 선택성에 대하여 ELISA에 의해 시험되었다. 수많은 클론은 선형 CGHDSGG -콘주게이션된 -BSA (서열 식별 번호: 2)에 비교하여 사이클로(CGHDSGG) -콘주게이션된 -BSA (서열 식별 번호: 2)에 우선적으로 결합하였다.

[0510] 아이소타입화는 다수의 클론이 IgG1, IgG2a 및 IgG3 클론을 포함하는 IgG인 것을 드러냈다. 몇 개의 IgM 및 IgA 클론은 또한 확인되었지만, 추가로 추구되지 않았다.

[0511] 표면 플라즈몬 공명을 이용하는 직접 결합 분석은 서열 식별 번호: 2의 환형 펩티드에 결합하는 조직 배양 상청액에서 항체에 대하여 스크리닝하기 위해 수행되었다.

[0512] 도 14는 직접 결합 검정의 결과 및 ELISA 결과를 플롯팅하고 직접 결합과 ELISA 결과 사이 상관관계가 있다는 것을 보여준다.

[0513] 클론은 상기 기재된 바와 같이 제조된 환형 펩티드, 선형 펩티드, A-베타 1-42 모노머 및 A-베타 1-42 올리고머에 결합하는 그것의 능력에 대하여 재시험되었다. 결합 검정은 상기 기재된 바와 같이 SPR (직접 결합 검정)을 이용하여 수행되었다. 수많은 클론은 표 5에서 나타난 바와 같이 수행된 결합 검정에 기반하여 선택되었다.

[0514] 선택된 클론은 IgG mAb이었다. 1차 스크린에서 음수는 결합 없음을 나타낸다 (예를 들면 아이소타입 대조군 미만).

[0515] **표 5**

	환식-펩타이드 (RU)	선형-펩타이드 (RU)	A β 42 모노머 (RU)	A β 42 올리고머 (RU)
1B4	136.2	-0.1	56.5	109
2B10	171.9	-6.5	-4.1	69.8
3C2	74.9	-2.9	1.9	116.2
3C5	790.4	795.2	7.8	59
5E10	1334.9	35.7	8.2	60.2
6F1	23.4	-8.7	-11.6	77.9
8B2	310.1	7.6	-2.9	49.4
8E7	386.1	-4.2	-25.1	54.2
9E5	253.5	-3.9	-20.1	50.8
10B9	17	-1.5	-23.2	61.9
10B10	235.2	-4.6	-40.8	45.8
10G2	397.6	-0.7	61	109.8
11F10	148.8	-1.5	8.9	66.9

[0516]

[0517] **ELISA 프리스크린**

[0518] 하이브리도마 상청액의 ELISA 프리스크린은 선형 펩티드에 비교하여 환형 펩티드에 증가된 결합을 보여주었던 클론을 확인하였다. 클론의 분율은 KLH-에피토프 링커 펩티드에 반응성이었다. 이들은 추가 조사로부터 제외되었다. 다수의 클론은 본 명세서에서 기재된 아이소타입화 절차를 이용하여 IgG 아이소타입이도록 계측되었다.

[0519] **표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 직접 결합 - 1차 스크린**

[0520] 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 항체 클론을 함유하는 조직 배양 상청액은 환형 펩티드, 선형 펩티드, A-베타 올리고머 및 A-베타 모노머에 직접 결합에 대하여 시험되었다.

[0521] 1차 스크린용 결과는 도 13에서 보여진다. 패널 A는 환형 펩티드 및 선형 펩티드에 결합을 보여준다. 패널 B는 A-베타 올리고머 및 A-베타 모노머에 결합을 보여준다. 수많은 클론은 환형 펩티드에 상승된 반응성을 갖고 전체 클론은 선형 펩티드에 최소 또는 무 반응성을 갖는다. A-베타 올리고머 결합에 대하여 일반 선택성이 있다.

모노머 반응성은 대부분의 에피토프 및 대부분의 클론에 대하여 0 근처 또는 미만이다.

[0522] 선택 클론을 위하여 비교 결합 프로파일은 도 15에서 보여진다. 각각의 클론은 (구조화된) 환형 펩티드, (비구조화된) 선형 펩티드, A-베타 모노머, 및 A-베타 올리고머의 맥락에서 특이적 에피토프에 대한 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 직접 결합에 대하여 평가된다. 비구조화된 에피토프 (예를 들면 선형 에피토프)에 우선적으로 반응성인 클론은, 별도로 나타낸 바와 같이, 대조군으로서 선택되었다.

[0523] **실시예 7**

[0524] **2차 스크린**

[0525] **면역조직화학**

[0526] 면역조직화학은, 고착 또는 항원 회수 없이, 냉동된 인간 뇌 섹션에서 수행되었다. 가슴된 챔버에서, 비-특이적 염색은 1시간 동안 무혈청 단백질 차단 시약 (Dako Canada Inc., Mississauga, ON, Canada)로 인큐베이션에 의해 차단되었다. 다음과 같은 1차 항체는 면역염색에 사용되었다: 마우스 단클론성 아이소타입 대조군 IgG1, IgG2a, 및 IgG2b, 및 항-아밀로이드b 6E10, 모두 Biolegend로부터 구매됨, 및 사이클로펩티드에 반응성인 선택된 정제된 클론. 전체 항체는 1 mg/mL로 사용되었다. 섹션은 실온에서 1시간 동안 인큐베이션되었고, TBS-T에서 3 x 5 분 세정되었다. 콘주게이션된 항-마우스 IgG 홀스래디쉬 페록시다아제 (1:1000, ECL)은 섹션에 적용되었고 45 분 인큐베이션되었고, 그 다음 TBS-T에서 3 x 5 분 세정되었다. DAB 색원체 시약 (Vector Laboratories, Burlington ON, Canada)는 적용되었고 배경 염색에 표적의 요망된 수준이 달성된 때까지 증류수로 린스되었다. 섹션은 메이어 하에마톡실린으로 대조염색되었고, 탈수되었고 커버 슬립은 적용되었다. 슬라이드는 광학 현미경 (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss Canada, Toronto ON, Canada) 하에 검사되었고 대표적인 이미지는 Leica DC300 디지털 카메라 및 소프트웨어 (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON)을 이용하여 20 및 40X 배율에서 포착되었다. 이미지는 Levels Auto Correction을 이용하여 어도비 포토샵으로 최적화되었다.

[0527] **CSF 및 뇌 추출물**

[0528] 인간 뇌 조직은 UBC 임상 연구 윤리 위원회 (C04-0595)로부터 승인서 머틸랜드 대학 뇌 및 조직 은행으로부터 취득되었다. CSFs는 알츠하이머병 및 관련된 장애에 대하여 UBC 병원 임상에서 평가된 환자로부터 취득되었다. 연구는 UBC 임상 연구 윤리 위원회에 의해 승인되었고, 참가자 또는 법적 최근친자로부터 서면 동의는 CSF 샘플의 수집에 앞서 취득되었다. 정황적 AD의 임상 진단은 NINCDS-ADRDA 기준에 기반되었다. CSFs는 폴리프로필렌 튜브에서 수집되었고, 가공되었고, 100 µL 폴리프로필렌 바이알 속에 분주되었고, 요추 천자후 1 시간 이내 -80°C에서 저장되었다.

[0529] **균질화:** 인간 뇌 조직 샘플은 칭량되었고 그 뒤에 뇌 조직의 최종 농도가 20% (w/v)이도록 Roche Diagnostics (Laval QC, Canada)로부터 신선한, 병행된 TBS 및 무 EDTA 프로테아제 억제제 각테일의 용적에서 침지되었다. 조직은 기계적 탐침 균질기 (그 사이 30 초 휴지를 가진 3 x 30 초 펄스, 모두 병상에서 수행됨)을 이용하여 상기 완충액에서 균질화되었다. TBS 균질화된 샘플은 그 다음 초원심분리 (90 분 동안 70,000xg)에 적용되었다. 상청액은 수집되었고, 분주되었고 -80°C에서 저장되었다. TBS 균질물의 단백질 농도는 BCA 단백질 검정 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford IL, USA)를 이용하여 계측되었다.

[0530] CSF: CSF는 AD가 있는 9 공여체 및 AD가 없는 9 공여체로부터 풀링되었다. 샘플은 전체 항체에 대하여 30 마이크로그램/ml의 농도에서 정제된 IgG를 이용하여 SPR에 의해 분석되었다. 마우스 IgG는 항체 대조군으로서 사용되었고, 전체 실험은 적어도 2회 반복되었다.

[0531] CSF 및 뇌 추출물에서 양성 결합은 항체 6E10을 이용하여 확인되었다.

[0532] **SPR 분석:** AD 환자로부터 4 뇌 추출물 및 연령-매칭된 대조군으로부터 4 뇌 추출물은 풀링 및 분석되었다. TBS에서 균질화된, 뇌 샘플은 정면 피질 브로드만 영역 9를 포함하였다. 전체 실험은, 실시예 6에서 기재된 바와 같이 실시간으로 결합 상호작용을 모니터링하기 위해 고 강도 레이저광 및 고속 광학 스캐닝을 사용하는 분석 바이오센서인, 분자 친화성 스크리닝 시스템 (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany)를 이용하여 수행되었다. 본 명세서에서 기재된 사이클로펩티드에 대하여 생성된 정제된 항체는 180 초 동안 표면 위에 주사된 희석된 샘플 및 단백질 A-유도된 센서 칩의 별도의 유동 세포에서 포착되었고, 이어서 완충액 및 표면 재생에서 120 초 해리되었다. 결합 반응은 마우스 대조군 IgG 참조 표면 결합 및 검정 완충액의 삭감에 의해 이중-참조되었고, 샘플의 상이한 그룹은 비교되었다.

[0533]

결과

[0534]

CSF 뇌 추출물 및 면역조직화학

[0535]

몇 개의 클론은 CSF에서 A-베타에 결합하는 그것의 능력에 대하여 시험되었고, 사체 AD 뇌의 조직 샘플 및 가용성 뇌 추출물은 표 6에서 보여진다. 표 6에서 양성율의 강도는 번호 플러스 징후에 의해 보여진다.

[0536]

표 6 및 표 7은 SPR에 의해 본 명세서에서 기재된 바와 같이 측정된 모노머보다 올리고머를 위하여 선택된 클론의 결합 선택성에 대하여 데이터를 제공한다.

[0537]

IHC 결과는 또한 "+/-"가 분명한 플라크 형태학 없이 아이소타입 대조군과 구별되는 또는 유사한 염색을 나타내는 경우 표 6에서 요약된다.

[0538]

도 16은 6E10 항체로 보여진 양성 플라크 염색에 비교하여 클론 25-1B4로 신선한 냉동 섹션에서 플라크 염색의 결여의 예를 보여준다.

[0539]

도 17은, HDSG (서열 식별 번호: 1)을 포함하는 사이클로펩티드로 상승된 항체가 모노머보다 우선적으로 A-베타 올리고머에 결합하였고 AD 환자의 뇌 추출물 및/ 또는 CSF에서 A-베타에 또한 우선적으로 결합하였다는 것을 보여준다.

[0540]

표 6, 7 및 도 16 및 17에서 나타낸 바와 같이, HDSG (서열 식별 번호: 1)을 포함하는 사이클로펩티드로 상승된 항체가 뇌 추출물 및/ 또는 CSF에서 A-베타에 결합하였지만, SPR에서 모노머에 현저히 결합하지 않았고, IHC에 의해 플라크 피브릴에 현저히 결합하지 않았다.

[0541]

표 6: 결합 특징의 요약

표 6					
	클론 #	올리고머/ 모노머	CSF AD/비-AD	뇌 추출물 AD/비-AD	IHC - 플라크 염색
사이클로(CGHDSSG) (서열 식별 번호: 2)	25 (1B4)	+++	+++	+	-
	28 (3C5)	+	-	++	+
	26	++	-	++	-
	30	+	-	++	N/A

[0542]

* 채점은 동일한 샘플 범주에서 다른 클론에 상대적이다.

[0543]

표 7. 모노머 결합에 대하여 공제된 A-베타 올리고머 결합 RU 값

시험된 클론	303-3C5
RU	227.7

[0544]

실시예 8

[0545]

합성 올리고머 결합

[0546]

상업적으로-제조된 합성 아밀로이드 베타 올리고머 (SynAging SAS, Vandoeuvre-les-Nancy의 연속 2-배 희석액 (7.8 nM 내지 2000nM)는 공유적으로 고정된 항체로의 결합에 대하여 시험되었다. 대조군 항체 mAb6E10에 대한 결과는 도 18A에서 보여지고 마우스 대조군 IgG에 대한 결과는 도 18B에서 보여진다. 도 18 C는 사이클로 (CGHDSSG) (서열 식별 번호:2)에 대해 상승된 항체를 이용한 결과를 보여준다.

[0547]

실시예 9

[0548]

포르말린 고정된 조직에서 면역조직화학

[0549]

인간 뇌 조직은 사이클로(CGHDSSG) (서열 식별 번호: 2)로 상승된 항체를 이용하여 평가되었다. 환자는 3분체 접근법으로 알츠하이머병으로 이전에 특성구명 및 진단되었다: (i) 노인성 플라크 및 신경섬유 엉킴을 입증하기 위한 빌쇼스키는 방법, (ii) 아밀로이드를 입증하기 위한 콩고 레드 및 (iii) 엉킴을 입증하기 위한 그리고 노인성 플라크가 "신경증성"인 것을 확인하기 위한 타우 면역조직화학. 상기 조직은 선택된 단클론성 항체 클론의 플라크 반응성을 시험하는데 사용되었다. 뇌 조직은 며칠 동안 10% 완충된 포르말린에서 고정되었고 Sakura VIP

조직 프로세서에서 파라핀 가공되었다. 조직 섹션은 마이크로웨이브 항원 회수 (AR)과 무관하게 1 µg/ml의 항체로 탐색되었다. 퀴-아밀로이드 베타 반응성 항체 6E10은 양성 대조군으로서 선택된 항체 클론과 함께 포함되었다. 항체는 Antibody Diluent (Ventana)에서 희석되었고, 색상은 OptiView DAB (Ventana)로 현상되었다. 염색은 Ventana 기준점 XT IHC 염색기에서 수행되었다. 이미지는 Olympus BX45 현미경으로 취득되었다. 이미지는 신경병리학에서 전문지식을 가진 전문 병리학자에 의해 맹검 분석되었다.

[0552] 아래 표 8에서 나타낸 바와 같이, 고정된 조직을 이용하여, 시험된 항체는 항원 회수와 무관하게 노인성 플라크 아밀로이드의 특이적 염색에 대하여 음성이었다. 6E10은 양성 대조군으로서 사용되었다.

[0553] **표 8**

에피토프	시험 항체	노인성 플라크 아밀로이드의 특이적 염색의 유력한 증거	
		AR 없음	플러스 AR
303	25	음성	음성
	28	음성	음성
양성 대조군	6E10	강력히 양성	강력히 양성

[0554]

[0555] **실시예 10**

[0556] **올리고머 증식의 억제**

[0557] 항체의 생물학적 기능성은 Thioflavin T (ThT) 결합 검정을 이용하여 아밀로이드 베타 (Aβ) 응집의 증식에서 그것의 효과를 조사함으로써 시험관내 시험되었다. Aβ 응집은 사전형성된 작은 Aβ 올리고머의 핵에 의해 유도되고 상기를 통해 증식되고, 모노머성 Aβ로부터 가용성 올리고머 내지 불용성 피브릴까지 완전한 공정은 베타 시트 형성을 수반하여 증가시킴으로써 동반된다. 이것은, 베타 시트-풍부 구조에 결합된 및 증가된 형광을 초래하는 경우 여기 및 방출 최대치가 385 내지 450nm 및 445 내지 482nm 각각 이동하는, 벤조티아졸 염, ThT로 모니터링될 수 있다. 간단히, Aβ 1-42 (Bachem Americas Inc., Torrance, CA)는 가용화되었고, 초음파처리되었고, 트리스-EDTA 완충액 (pH7.4)에서 희석되었고, Aβ 1-42 펩티드 대 항체의 1:5 몰비를 초래하는, 사이클로펩티드 상승된 항체 또는 무관한 마우스 IgG 항체 아이소타입 대조군의 동등 용적이 첨가되었던 흑색 96-웰 미세적정 플레이트의 웰들 (Greiner Bio-One, Monroe, NC)에 첨가되었다. ThT는 첨가되었고 플레이트는, Wallac Victor3v 1420 다표지 계수기 (PerkinElmer, Waltham, MA)를 이용하여 한 시간마다 기록된 ThT 형광 측정 (440nm에서 여기, 486nm에서 방출)으로, 실온에서 24시간 동안 인큐베이션되었다. 배경 완충액으로부터 형광 판독은 전체 웰들로부터 공제되었고, 항체 단독 웰들로부터 판독은 상응하는 웰들로부터 추가로 공제되었다.

[0558] 도 19에서 나타낸 바와 같이, Aβ 42 응집은, ThT 형광으로 모니터링된 경우, 최소 형광을 가진 초기 지연기, 형광에서 급속 증가를 가진 대수증식기 및 마지막으로 Aβ 분자 종이 평형인 동안 그리고 형광에서 증가가 없는 동안 안정기를 특징으로 하는 에스자형 형상을 실증하였다. 무관한 마우스 항체와 Aβ 42의 공동-인큐베이션은 응집 공정에서 임의의 상당한 효과를 갖지 않았다. 그에 반해서, 시험 항체와 Aβ 42의 공동-인큐베이션은 응집 공정의 전체 기를 완전히 억제시켰다. 항체 클론 25 (1B4; IgG2a 아이소타입)으로 취득된 결과는 도 19에서 보여진다. ThT 응집 검정이 AD 발병에서 중추적인 노노머, 올리고머, 프로토피브릴 및 피브릴로부터 Aβ 증식 및 응집의 생체내 생체물리학적 / 생화학적 단계를 모방함에 따라, 사이클로 CGHDSGG로 상승된 항체는 상기 공정을 완전히 폐지하는 잠재력을 입증한다. IgG2a를 이용하여 수행된 아이소타입 대조군은 억제를 보여주지 못했다.

[0559] **실시예 11**

[0560] 알츠하이머 면역요법에 대하여 최적의 프로파일 달성: 독성 A-베타 올리고머에 특이적인 항체의 합리적인 생성.

[0561] 목적: 독성 아밀로이드-β 올리고머 (AβO)에 특이적인 항체 생성

[0562] 배경: 현행 증거는, 모노머 및 피브릴과는 대조적으로, AβO의 프리온-유사 균주 증식이 뉴런에 우선적으로 독성이고 알츠하이머병 (AD)에서 타우 병리학을 유발시킨다는 것을 시사한다. 또한, 용량-제한 역효과는 임상시험에서 Aβ 피브릴 인식과 관련되어 왔다. 이들 관찰은 독성 AβOs의 특이적 중화가 안전성 및 효능에 바람직할 수 있다는 것을 시사한다.

[0563] 디자인/방법: 컴퓨터를 이용한 모의실험은, 단백질 데이터 베이스에서 비축된 Aβ 피브릴의 원자-수준 구조를 교란시키기 위해 표준화된 힘의 장을 가진 분자 동력학을 이용하여, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 이용되었다. 약하게-안정적인 영역이 발생기 프로토피브릴 또는 올리고머에서 노출될 가능성이 있다는 것이 가정되었다.

클러스터링 분석, 곡률, 용매에 노출, 용해도, 이면 각 분포, 및 라마찬드란 각 분포는, 올리고머 대 모노머 또는 피브릴의 맥락에서 나타난 경우 항원 프로파일에서 차이를 정량화하는, 예상된 에피토프의 형태적 특성을 특성규명하는데 모두 사용되었다. 후보 펩티드 에피토프는 영역 Aβ0 형태를 모방할 수 있는 환형 포맷으로 합성되었고, 담체 단백질에 콘주게이션되었고, 마우스에서 단클론성 항체를 생성하는데 사용되었다. 정제된 항체는 SPR 및 면역조직화학에 의해 스크리닝되었다.

[0564] 결과:

[0565] 5 예상된 에피토프에 대한 66 IgG 클론은, 비구조화된 펩티드, 링커 펩티드, 또는 Aβ 모노머에 거의 없는 결합으로, 동족 구조화된 펩티드 및 합성 Aβ0를 인식하는 그것의 능력에 기반하여 정제를 위하여 선택되었다. 추가의 스크리닝은 대조군에 비교된 AD 환자의 CSF 및 뇌 추출물에서 원상태 가용성 Aβ0에 우선적으로 결합하였던 항체를 확인하였다. AD 뇌의 면역조직화학 분석은 플라크와 반응하지 않는 항체 클론의 선택을 허용하였다.

[0566] 결론: 컴퓨터를 이용하여 확인된 AbO 에피토프는 모노머 또는 피브릴에 상당한 교차-반응성 없이 원상태 AD Aβ0s에 선택적 결합의 요망된 표적 프로파일을 가진 항체의 생성을 허용하였다.

[0567] 실시예 12

[0568] 독성 억제 검정

[0569] 사이클로펩티드로 상승된 항체에 의한 A-베타42 올리고머의 독성의 억제는 랫트 1차 피질 뉴런 검정에서 시험될 수 있다.

[0570] 항체 및 대조군 IgG는 농도 예컨대 2 mg/mL로 각각 조정된다. A-베타 올리고머 및 항체의 다양한 몰비는 비히클 대조군, A-베타 올리고머 단독 및 양성 대조군 예컨대 신경보호성 펩티드 휴마닌(HNG)와 함께 시험된다.

[0571] 예시적인 셋업은 표 9에서 보여진다.

[0572] 10분 동안 실온에서 사전인큐베이션후, 용적은 배양 배지로 840 마이크로리터로 조정된다. 용액은 5분 동안 37C에서 인큐베이션된다. 용액은 그 다음 1차 피질 뉴런에 직접적으로 첨가되고 세포는 24시간 동안 인큐베이션된다. 세포 생존력은 MTT 검정을 이용하여 측정될 수 있다.

[0573] 표 9

Aβ0 / AB 몰비	Aβ0 (μL)	Aβ0 (μM)	AB (μM)	AB (μL)	배지 (μL)	최종 용적 (μL)
5/1	1.68	4.2	0.84	12.73	185.6	200
1/1	1.68	4.2	4.20	63.64	134.7	200
1/2	1.68	4.2	8.4	127.27	71.1	200

Aβ0 작업 용액: 2.2 mg/mL - 500 μM

CTRL 비히클:	1,68 μL의 올리고머 완충제 + 127,3 μL PBS + 711 μL 배양 배지
CTRL Aβ0:	1,68 μL의 Aβ0 + 127,3 μL PBS + 711 μL 배양 배지
	1,68 μL의 Aβ0 + 8,4 μL HNG (100 nM 최종) + 127,3 μL PBS + 702,6 μL
CTRL HNG:	배양 배지

[0574]

[0575] 상기 시험은 실시예 1에서 기재된 집단 좌표법에 의해 예상된 다른 에피토프를 포함하는 다른 사이클로펩티드에 대해 상승된 다른 항체를 이용하여 수행되었다. A-베타 올리고머 독성의 억제는 이들 다른 에피토프에 대하여 관측되었다. 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)에 대해 상승된 항체는 시험될 것이다.

[0576] 실시예 13

[0577] 생체내 독성 억제 검정

[0578] 사이클로펩티드로 상승된 항체에 의한 A-베타42 올리고머의 독성의 억제는 마우스 행동 검정에서 생체내 시험될

수 있다.

- [0579] 항체 및 아이소타입 대조군은 마우스에 뇌심실내 (ICV) 주사에 앞서 2 이상의 상이한 물비로 A-베타42 올리고머와 각각 사전-혼합되었다. 대조군 그룹은 비히클 단독, 올리고머 단독, 항체 단독, 및 양성 대조군 예컨대 신경보호성 펩티드 휴마닌으로 주사된 마우스를 포함한다. 대안적으로, 항체는 올리고머의 ICV 주사 이전, 동안, 및/또는 이후 전신으로 투여될 수 있다. 올리고머의 ICV 주사 대략 4-7 일후 시작하여, 인지는 학습 및 기억의 행동 검정 예컨대 마우스 공간적 인식 시험 (SRT), Y 미로 검정, 모리스 수중 미로 모델 및 신규한 물체 인식 모델 (NOR)에서 평가된다.
- [0580] 마우스 공간적 인식 시험 (SRT)는 지형학 기억, 해마 기능의 측정 (SynAging)을 평가한다. 모델은 2-챔버 장치를 이용하고, 여기에서 챔버는 형상, 패턴 및 색상 (즉 지형학 차이)에서 상이하다. 챔버는 깨끗한 플랫폼글라스 회랑에 의해 연결된다. 개별 마우스는 챔버의 단 하나에 접근이 허용되는 5 분 탐구기용 장치에서 먼저 배치된다. 마우스는 그 다음 30분 동안 그들의 집우리로 돌아오고 이들이 양쪽 챔버에 접근하는 동안 5 분 "선택"기용 장치에서 역 배치된다. 정상 인지 기능을 가진 마우스는 이전에 탐구된 챔버를 기억하고 신규한 챔버에서 더 많은 시간을 소비한다. 식별력 지수 (DI)는 아래와 같이 계산된다: $DI = (TN - TF)/(TN + TF)$, 여기에서 TN은 신규한 챔버에서 소비된 시간의 양이고 TF는 익숙한 챔버에서 소비된 시간의 양이다. 독성 A-베타 올리고머는 휴마닌 양성 대조군에 의해 부분적으로 구조될 수 있는 DI에서 감소를 유발시킨다. ICV 주사후 상이한 시점에서 상기 검정의 성능은 생체내 A-베타 올리고머 독성을 억제시키기 위해 사이클로펩티드로 상승된 항체의 잠재력을 평가하는데 사용될 수 있다.
- [0581] Y 미로 검정 (SynAging)은 전전두엽 피질 (작업 기억) 및 해마 (공간적 구성요소)에 의해 주로 매개되는 공간적 작업 기억의 시험이다. 마우스는 이들이 2 아암을 탐구할 수 있는 Y-형상화된 미로에서 배치된다. 온전한 단기 메모리를 가진 마우스는 연속 시도에서 2 아암 사이를 교번할 것이다. 독성 A-베타 올리고머로 ICV 주사된 마우스는 인지적으로 손상되고 50% (대 정상 동물에서 ~70%)의 랜덤 값에 가까운 교번으로 랜덤 행동을 보여준다. 상기 손상은 콜린에스테라아제 억제제 도네페질 (Aricept) 또는 휴마닌, 각각에 의해 부분적으로 또는 완전히 역전된다. 상기 검정은 A-베타 올리고머 독성에 대해 시험 항체의 보호성 활성의 또 다른 생체내 평가를 제공한다.
- [0582] 모리스 수중 미로는, 해마 기능 (SynAging)에 크게 의존적인, 공간적 학습 및 장기간 지형학 메모리를 조사하는, 또 다른 널리 허용된 인지 모델이다. 마우스는 다중 시도에서 불투명한 물 표면하에 숨겨진 플랫폼을 찾는데 숙련된다. 플랫폼 위치 상지에서 그것의 학습 성능은 시각적 단서 및 기록된 영상에 기반된다. 플랫폼 찾기까지 물 속에 그것의 방출로부터 꾸준히 감소된 시간인, 그것의 학습 속도는 며칠 동안 측정되고, 인지적으로 정상 마우스는 연속 일에서 플랫폼을 찾는 시간을 점점 덜 요구한다 (학습). 장기 기억 분석을 위하여, 시험은 훈련후 며칠 반복된다: 플랫폼은 제거되고 전자 플랫폼 위치 위에 교차의 수, 또는 최초 교차의 시간은 장기 기억을 평가하기 위한 측정기준으로서 사용된다. 독성 A-베타 올리고머로 ICV 주사된 마우스는 양쪽 학습 및 장기 기억에서 결손을 보여주고 시험 항체의 보호성 활성 평가용 모델을 제공한다.
- [0583] 신규한 물체 인식 (NOR) 모델은, 주변후 피질 기능 (SynAging)에 크게 의존적인, 공지된 물체보다 상당히 더 오랜 시간 동안 신규한 물체를 조사하기 위해 설치류의 정상 거동을 사용한다. 마우스 또는 랫트는 획득 시도에서 2개의 동일한 물체를 탐구하도록 허용된다. 짧은 시도간 간격 이후, 물체 중 하나는 신규한 물체로 대체된다. 동물은 무대로 되돌아오고 각각의 물체를 활동적으로 탐구에 소비된 시간은 기록된다. 정상 설치류는 익숙한 물체를 상기하고 신규한 물체 탐구에 상당히 더 많은 시간을 소비할 것이다. 그에 반해서, A-베타 올리고머-처리된 설치류는 분명한 인지 손상을 나타내고 양쪽 '익숙한' 및 '신규한' 물체 조사에 유사한 시간의 양을 소비할 것이다. 이것은 공지된 임상 인지 증진제 (예를 들면 도네페질)로 일시적으로 역전될 수 있다. NOR 검정은 시험 항체의 잠재적인 인지 이점을 사정하기 위해 중방향 연구에서 여러 번 수행될 수 있다.
- [0584] 행동 검정에 더하여, 뇌 조직은 수집될 수 있고 시냅스 마커 (PSD95, SNAP25, synaptophysin) 및 염증 마커 (IL-1-베타)의 수준에 대하여 분석될 수 있다. 마우스는 올리고머의 ICV 주사후 ~14 일에서 희생되었고 염수로 관류되었다. 해마는 수집되고, 스냅 냉동되고 분석되는 때까지 -80°C에서 저장된다. 균질화된 샘플의 단백질 농도는 BCA에 의해 측정된다. 시냅스 마커의 농도는 ELISA 키트 (Cloud-Clone Corp, USA)를 이용하여 측정된다. 전형적으로, 시냅스 마커는 A-베타 올리고머로 주사된 마우스에서 25-30%만큼 감소되고 휴마닌 양성 대조군에 의해 90-100%까지 회복된다. IL-1-베타 염증성 마커의 농도는 A-베타 올리고머로 주사된 마우스에서 대략 3-배 증가되고 상기 증가는 휴마닌에 의해 크게 예방된다. 이들 검정은 분자 수준에서 시험 항체의 보호성 활성의 또 다른 측정기준을 제공한다.

[0585] 실시예 14

[0586] 생체내 증식 억제 검정

[0587] A-베타 독성 올리고머의 생체내 증식 및 관련된 병리학은 알츠하이머병 (AD)의 다양한 설치류 모델에서 연구될 수 있다. 예를 들어, 인간 APP (예를 들면 APP23 마우스) 또는 인간 APP 및 PSEN1 (APPS1 마우스)에 대하여 유전자도입 마우스는 A-베타의 상승된 수준을 나타내고 염증 및 뉴런의 손상에 의해 동반된 연령과 함께 점진적인 아밀로이드 침착을 나타낸다. 올리고머-함유 뇌 추출물의 뇌내 접종은 상기 공정을 상당히 촉진시킬 수 있다 (13, 14). 이들 모델은 뇌내로 또는 전신으로 투여된 시험 항체에 의한 A-베타 올리고머 증식의 억제 연구에 시스템을 제공한다.

[0588] 실시예 15

[0589] CDR 서열분석

[0590] IgG2A 중쇄 및 카파 경쇄를 갖도록 계측되었던 클론 25 (303-25)는 중쇄 및 경쇄의 CDR 및 가변 영역에 대하여 선택되었다.

[0591] RT-PCR은 적절한 마우스 면역글로불린 중쇄 (IgG1/IgG3/IgG2A) 및 경쇄 (카파) 가변 영역 서열을 증폭시키는 유전자 특이적 역방향 프라이머 및 5' RACE를 이용하여 수행되었다.

[0592] 특이적 밴드는 절제되었고 서열분석을 위하여 pCR-Blunt II-TOPO 벡터 속에 클로닝되었고, 작제물은 *E. 콜리*로 전환되었다.

[0593] 각각의 쇠의 적어도 8 콜로니는 채집되었고 & PCR은 서열분석에 앞서 증폭된 영역의 존재에 대하여 스크리닝되었다. 선택된 PCR 양성 클론은 서열분석되었다.

[0594] CDR 서열은 표 10에 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 부분의 공통 DNA 서열 및 단백질 서열은 표 11에서 제공된다

[0595] 표 10

쇄	CDR	서열	서열 식별 번호
중쇄	CDR-H1	GYTFTSYW	17
	CDR-H2	IDPSDSQT	18
	CDR-H3	SRGGY	19
경쇄	CDR-L1	QDINNY	20
	CDR-L2	YTS	21
	CDR-L3	LQYDNLWT	22

[0596]

[0597] 표 11

[0598] 가변 영역의 공통 DNA 서열 및 번역된 단백질 서열. 상보성 결정 영역 (CDRs)는 IMTG/LIGM-DB에 따라 밑줄쳐진다.

아이소타입	공통 DNA 서열	단백질 서열
IgG2a 서열 식별 번호:23,24	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACA GGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTG GTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGCCTGCAAGGCTTCT GGC TACACCTTCACCAGCTACTGG ATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT GGACAAGGCCTTGAATGGATTGGTAT GATTGATCCTTCAGACAGT CAA ACTCACTACAATCAAATGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACT GTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT TCAAGAGGGGGCTAC TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	MGWSCIIILFLVATATG VHSQVQLQQPGAELVR PGASVKLSCKAS GYTF TSY WMNWKQRPQGGL EWIGM IDPSDSQ THYN QMFKDKATLTVDKSSS TAYLQLSLSTSEDSAV YYC SRGGY WGQGTLLT VSS
카파 서열 식별 번호:25, 26	ATGAGACCGTCTATTCAGTTCCTGGGGCTCTTGTGTTCTGGCTT CATGGTGCCTCAGTGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCA CTGTCTGCATCTCTGGGAGGCAAAGTCAACATCACTTGAAGGCA AGC CAAGACATTAACA ACTATATAGCTTGGTACCAACACAAGCCT GGAAAAGGTCCTAGGCAGCTCATATAT TACACATCT ACATTGCAG CCAGGCATCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGGTCTGGGAGAGAT TATTCCTTCAACATCAGCGACCTGGAGCCTGAAGATATTGCAACT TATTATTGT CTACAGTATGATAATCTGTGGACG TTCGGTGGAGGC ACCAAGCTGGAAATCAAA	MR 프사이 QFLGLLLF WLHGAQCIDIQMTQSPS SLASLGGKVTITCKA S QDINNY LAWYQHKPG KGPRQLI YTS TLQPG IPSRFSGSGSGRDYSF TISDLEPEDIATYY CL QYDNLWT FGGGTKLEI K

[0599]

[0600] 표 12 링커를 가진 선택 A-베타 서열 및 A-베타 "에피토프" 서열

[0601] HDSG (서열 식별 번호: 1)

[0602] CGHDSGG, 사이클로(CGHDSGG) (서열 식별 번호: 2)

[0603] HDSGY (서열 식별 번호: 4)

[0604] RHDSG (서열 식별 번호: 5)

[0605] RHDS (서열 식별 번호:6)

[0606] GHDSG (서열 식별 번호:7)

[0607] GHDSGG (서열 식별 번호:8)

[0608] GGHDSGG (서열 식별 번호:9)

[0609] GHDSGGG (서열 식별 번호:10)

[0610] HDSGYE (서열 식별 번호:11)

[0611] CGHDSGGC (서열 식별 번호: 12)

[0612] RHDSGY (서열 식별 번호: 13)

[0613] DSGY (서열 식별 번호: 14)

[0614] DSGYEV (서열 식별 번호: 15)

[0615] FRHDSG (서열 식별 번호: 16)

[0616] 사이클로(CGHDSG-PEG2); CGHDSG-PEG2(서열 식별 번호: 27)

[0617] 사이클로(C-PEG2-HDSGG); C-PEG2-HDSGG (서열 식별 번호: 28)

[0618] 표 13

[0619] DAEFRHDSGYEVHHKQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (서열 식별 번호: 3)

[0620] 본원이 바람직한 예인 것으로 현재 고려되는 것과 관련하여 기재되어 있는 한편, 본원이 개시된 예에 제한되지 않는 것이 이해되어야 한다. 반대로, 본원은 첨부된 청구항들의 사상 및 범위 안에서 포함된 다양한 변형 및 동등한 배치를 포함하도록 의도된다.

[0621] 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공보, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 그 전문

이 참고로 편입되도록 지시되는 것처럼 동일한 정도로 그 전문이 참고로 본 명세서에서 편입된다. 구체적으로, 표 또는 다른 곳에서 제공된 예를 들어 수탁 번호를 포함하는 본 명세서에서 제공된 각각의 수탁 번호와 관련된 서열 및/또는 바이오마커 서열 (예를 들면 단백질 및/또는 핵산)은 그 전문이 참고로 편입된다.

[0622] 청구항의 범위는 바람직한 구현예 및 실시예에 의해 제한되지 않아야 하지만, 전체적으로 설명과 일치하는 가장 넓은 해석으로 주어져야 한다.

[0623] 명세서에서 언급된 참조용 인용문헌

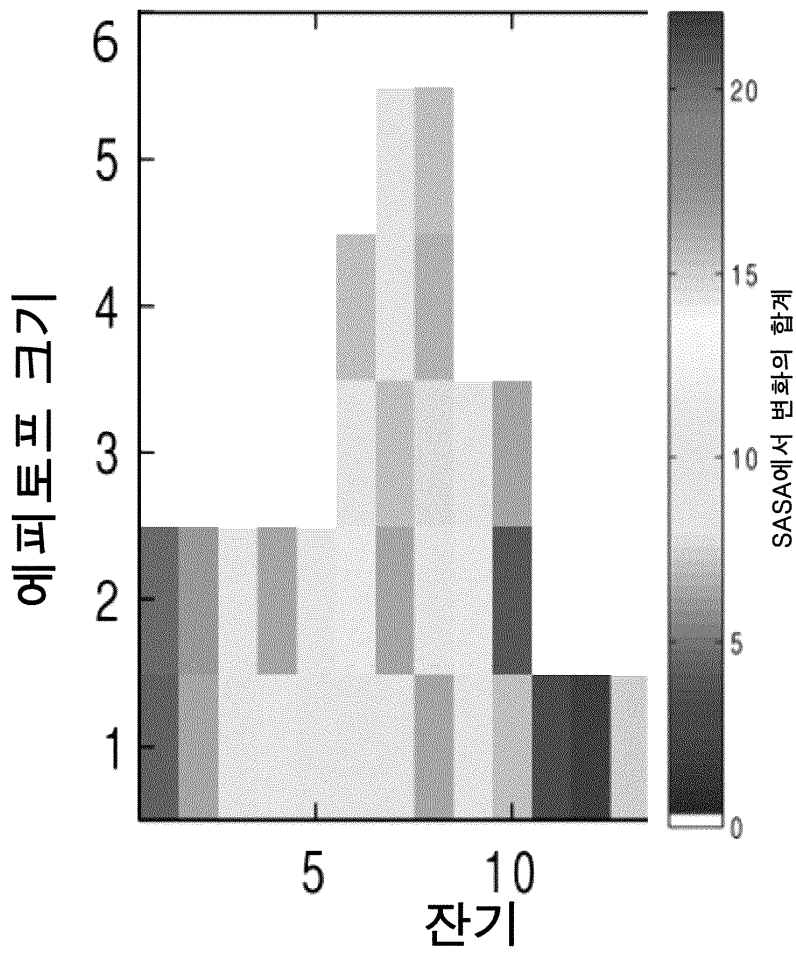
- [1] Gabriela A. N. Crespi, Stefan J. Hermans, Michael W. Parker, and Luke A. Miles. Molecular basis for mid-region amyloid- β capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies *SCIENTIFIC REPORTS* | 5 : 9649, 2015| DOI: 10.1038/srep09649
- [2] Vincent J. Hilser and Ernesto Freire. Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. correlation with hydrogen exchange protection factors. *J. Mol. Biol.*,262:756-772, 1996. The COREX approach.
- [3] Samuel I. A. Cohen, Sara Linse, Leila M. Luheshi, Erik Hellstrand, Duncan A. White, Luke Rajah, Daniel E. Otzen, Michele Vendruscolo, Christopher M. Dobson, and Tuomas P. J. Knowles. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(24):9758-9763, 2013.
- [4] Pietro Sormanni, Francesco A. Aprile, and Michele Vendruscolo. The camsol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. *Journal of Molecular Biology*, 427(2):478-490, 2015.
- [5] Deborah Blacker, MD, ScD; Marilyn S. Albert, PhD; Susan S. Bassett, PhD; Rodney C. P. Go, PhD; Lindy E. Harrell, MD, PhD; Marshai F. Folstein, MD Reliability and Validity of NINCDS-ADRDA Criteria for Alzheimer's Disease The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 1994;51(12):1198-1204. doi:10.1001/archneur.1994.00540240042014.
- [6] Hamley, I.W. PEG-Peptide Conjugates 2014; 15, 1543-1559; dx.doi.org/10.1021/bm500246w
- [7] Roberts, MJ et al Chemistry for peptide and protein PEGylation 64: 116-127.
- [8] J.X.Lu, W.Qiang, W.M.Yau, C.D.Schwieters, S.C.Meredith, R.Tycko, MOLECULAR STRUCTURE OF BETA-AMYLOID FIBRILS IN ALZHEIMER'S DISEASE BRAIN TISSUE. *CELL* Vol. 154 p.1257 (2013)
- [9] Y.Xiao, B.MA, D.McElheny, S.Parthasarathy, F.Long, M.Hoshi, R.Nussinov, Y.Ishii, A BETA (1-42) FIBRIL STRUCTURE ILLUMINATES SELF-RECOGNITION AND REPLICATION OF AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE. *NAT.STRUCT.MOL.BIOL.* Vol. 22 p.499 (2015).
- [10] A.Petkova,W.Yau,R.Tycko EXPERIMENTAL CONSTRAINTS ON QUATERNARY STRUCTURE IN ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID FIBRILS *BIOCHEMISTRY* V. 45 498 2006.
- [11] Yu YZ, Wang WB, Chao A, Chang Q, Liu S, Zhao M, et al. Strikingly reduced amyloid burden and improved behavioral performance in Alzheimer's disease mice immunized with recombinant chimeric vaccines by hexavalent foldable A₁₋₁₅ fused to toxin-derived carrier proteins. *J Alzheimers Dis* 2014;41:243-60.
- [12]Wang, HC; Yu, YZ; Liu, S; Zhao, M and Q Xu, Peripherally administered sera antibodies recognizing amyloid-beta oligomers mitigate Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3 \times Tg-AD mice, *Vaccine* 2016.
- [13] Franziska Langer, Yvonne S Eisele, Sarah K Fritschi, Matthias Staufenbiel, Lary C Walker, Mathias Jucker (2011) Soluble A β Seeds Are Potent Inducers of Cerebral β -Amyloid Deposition. *J Neurosci* 31: 41. 14488-14495 Oct.

[0624] [14] Sarah K. Fritschi, Franziska Langer, Stephan A. Kaeser, Luis F. Maia, Erik Portelius, Dorothea Pinotsi, Clemens F. Kaminski, David T. Winkler, Walter Maetzler, Kathy Keyvani, Philipp Spitzer, Jens Wiltfang, Gabriele S. Kaminski Schierle, Henrik Zetterberg, Matthias Staufenbiel, Mathias Jucker (2014) Highly potent soluble amyloid- β seeds in human Alzheimer brain but not cerebrospinal fluid. *Brain: a journal of neurology* 137: Pt 11. 2909-2915 Nov.

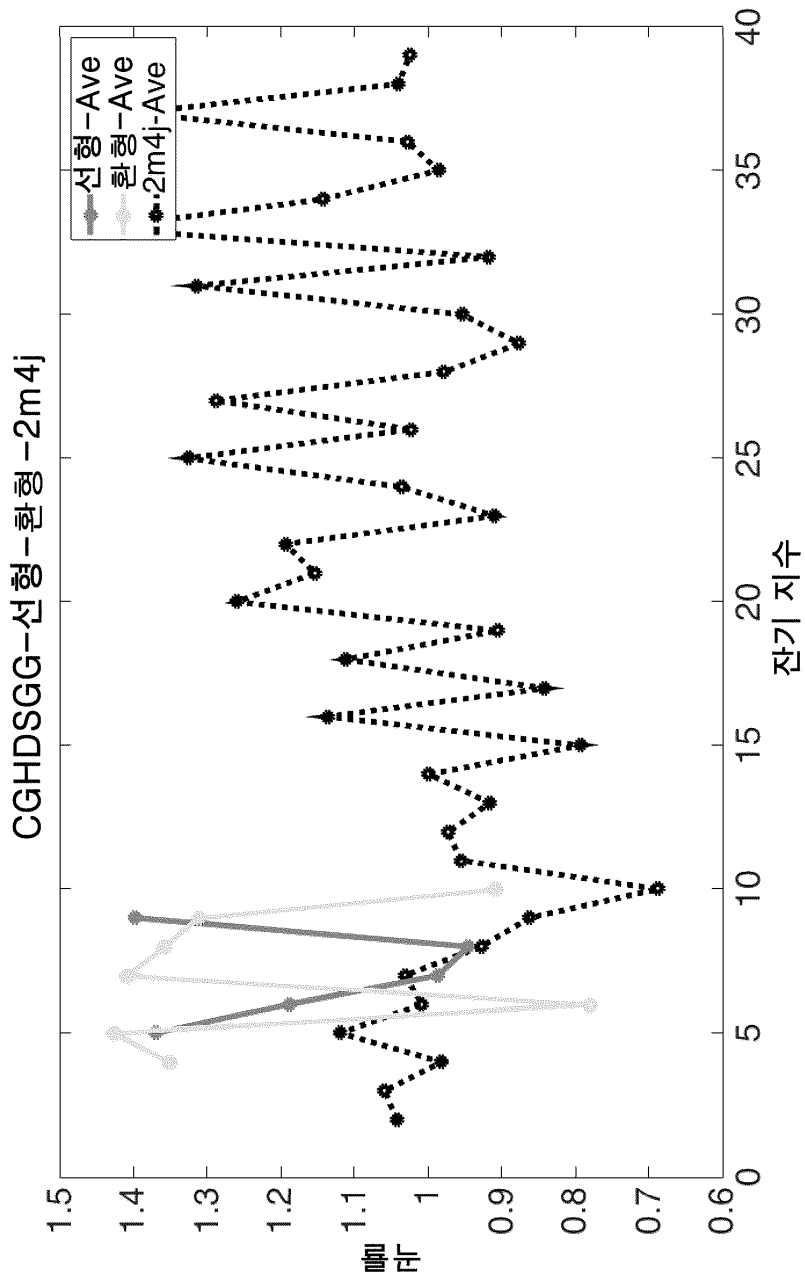
[0625]

도면

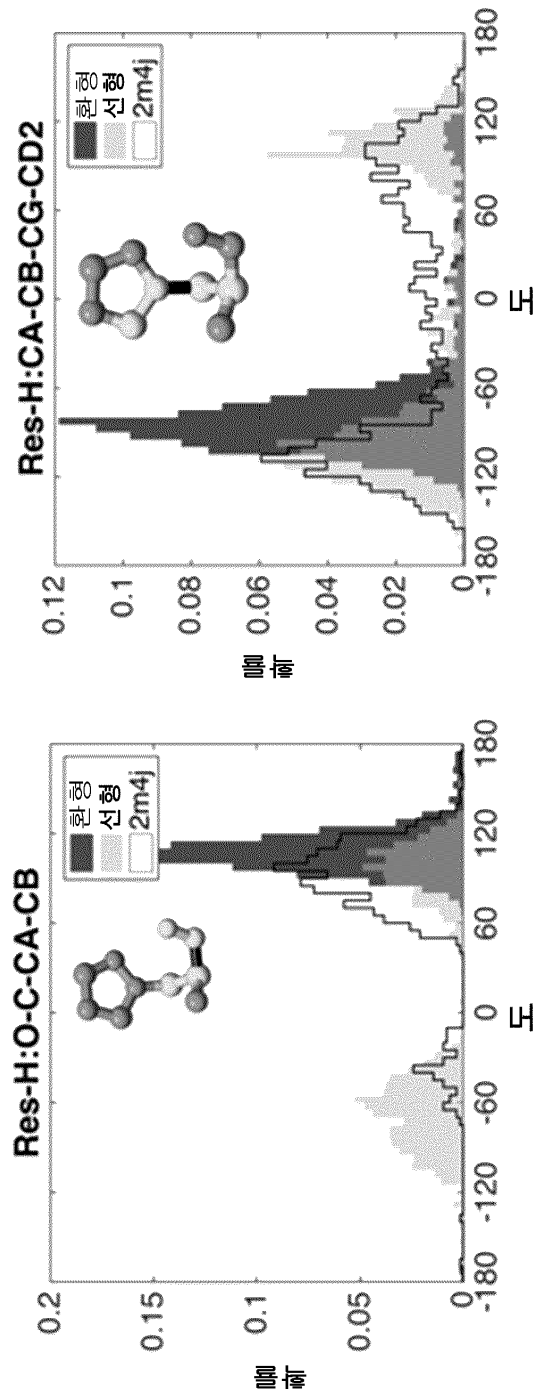
도면1



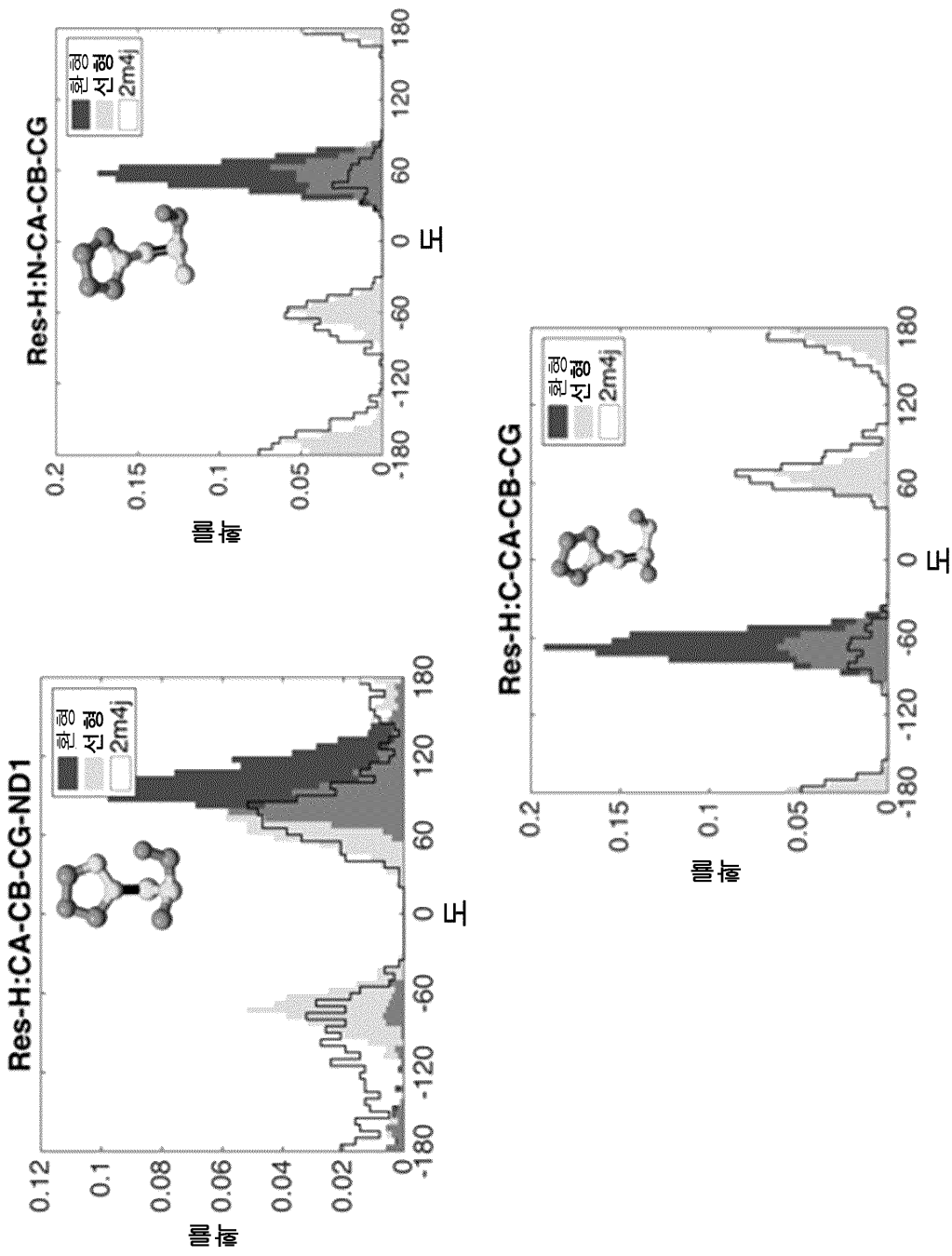
도면2



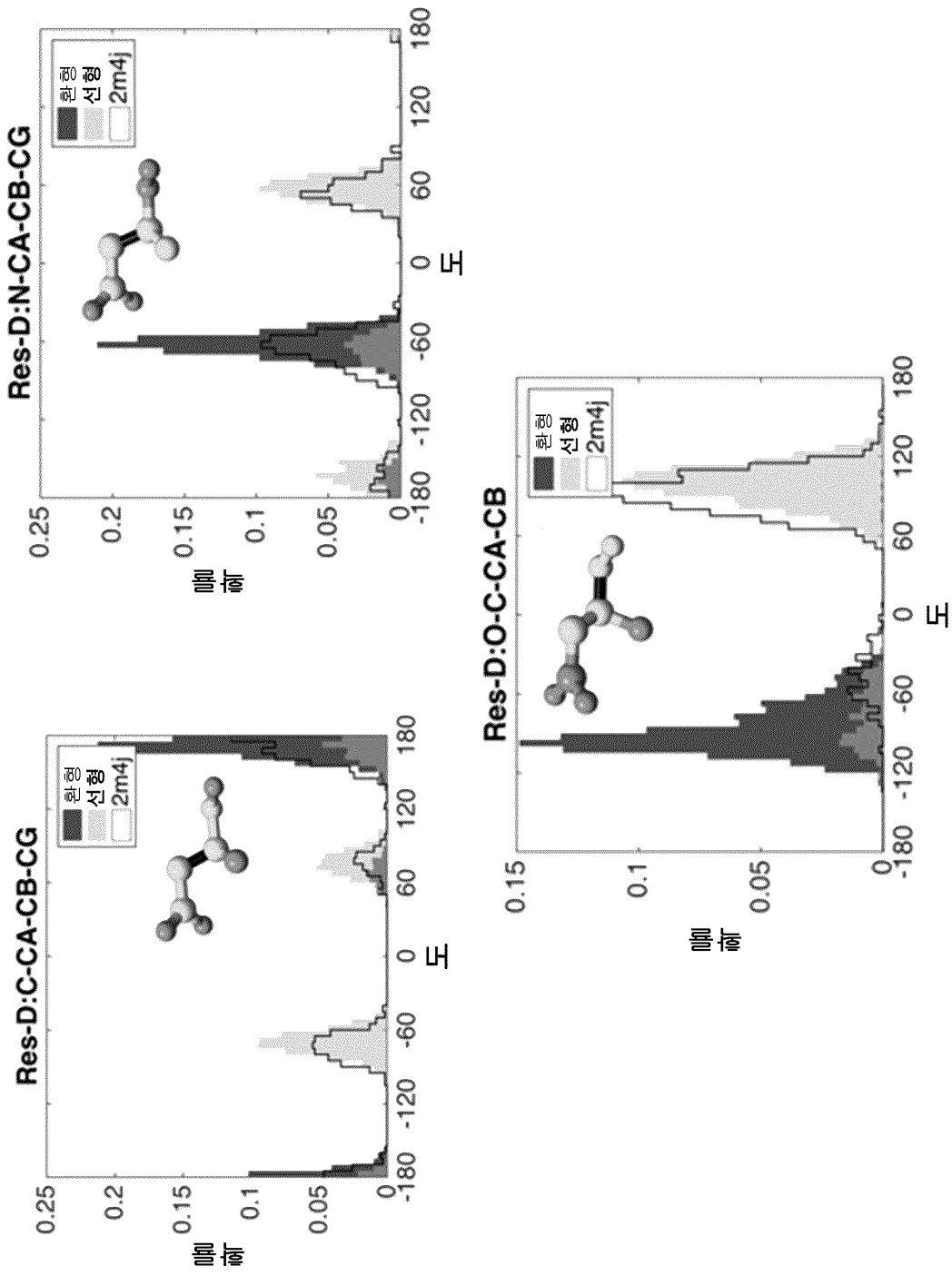
도면3a



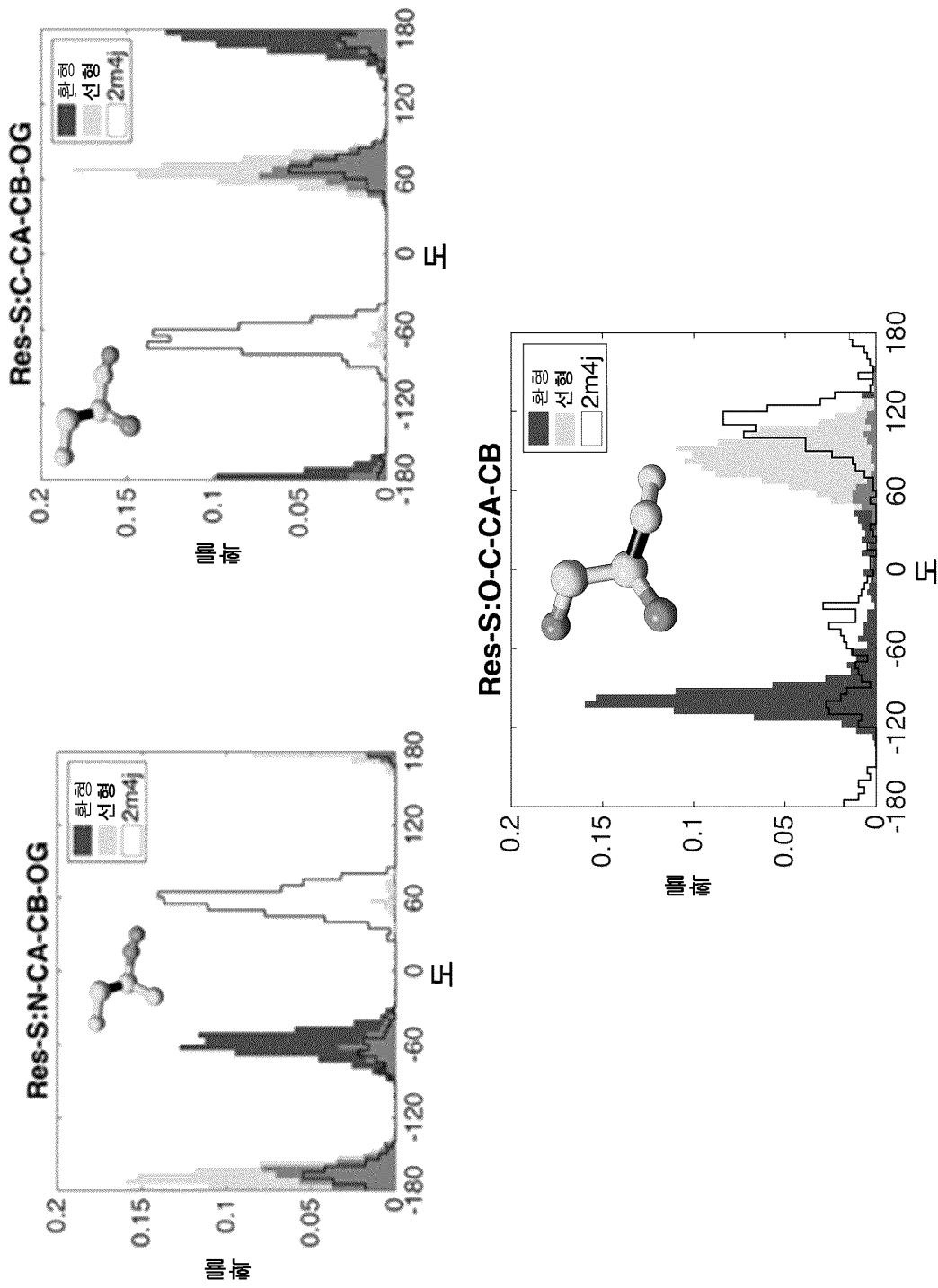
도면3b



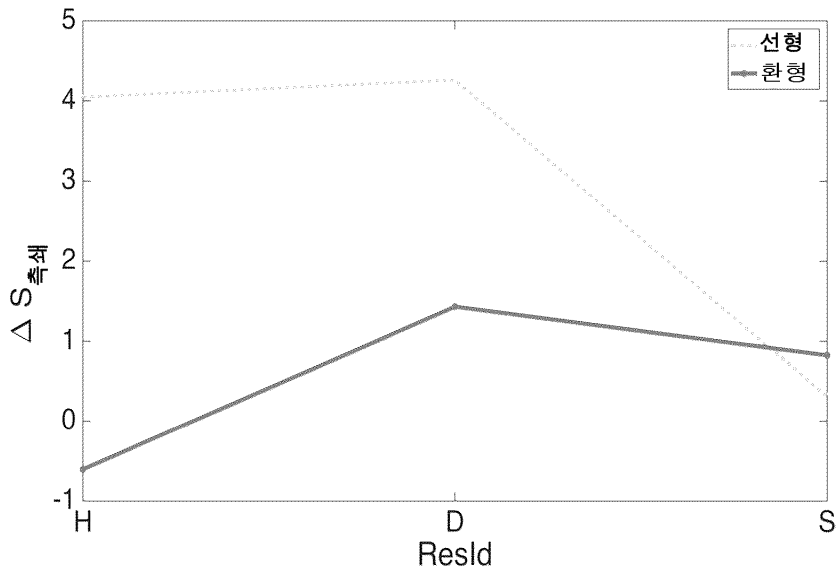
도면4



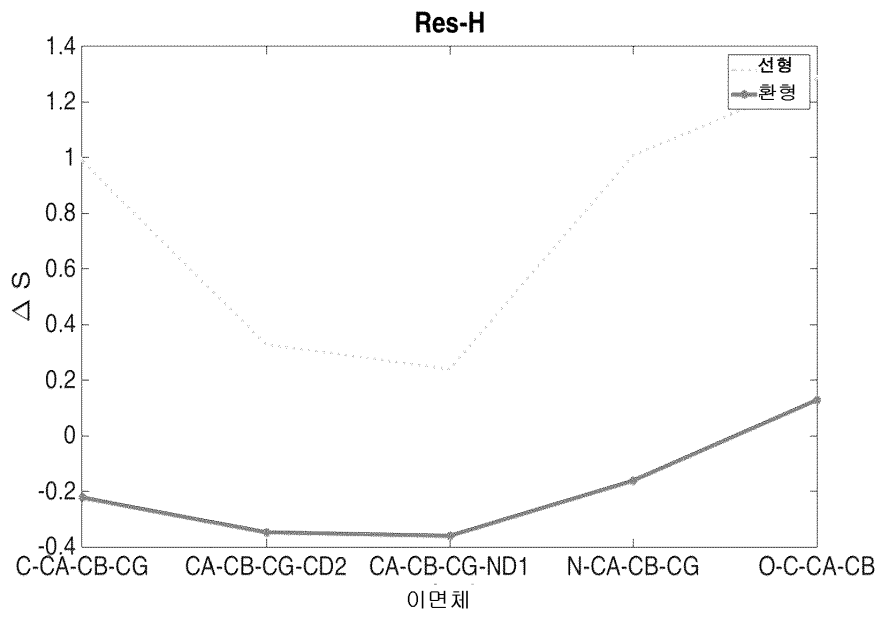
도면5



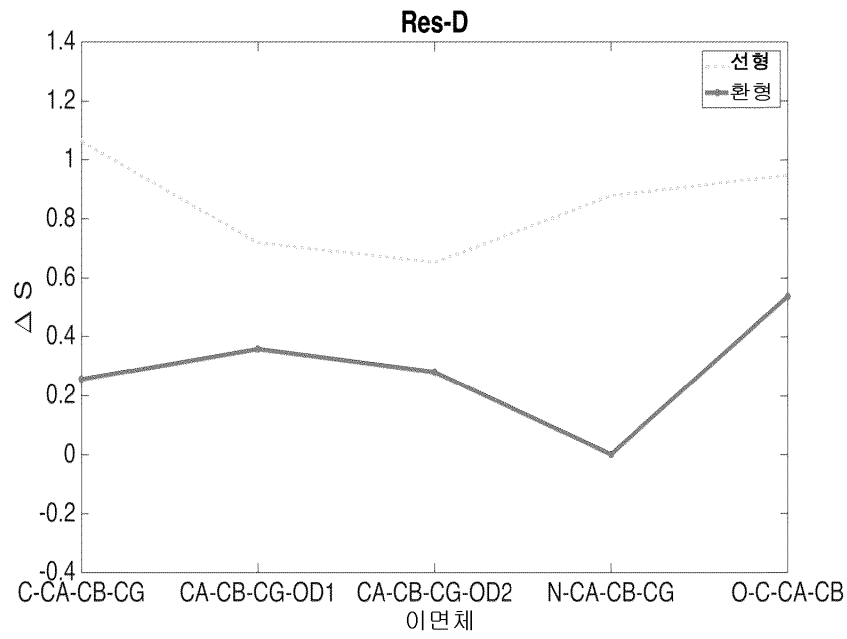
도면6a



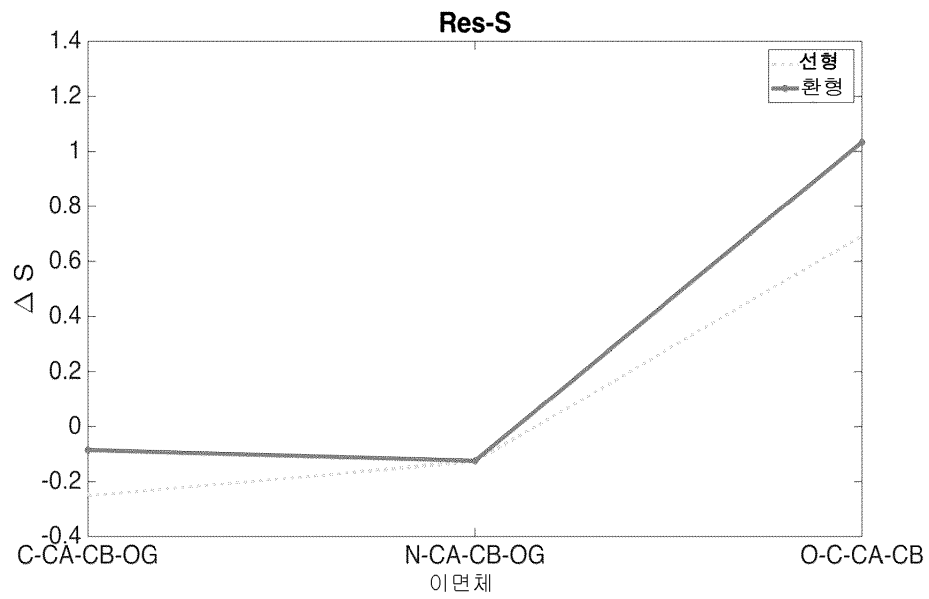
도면6b



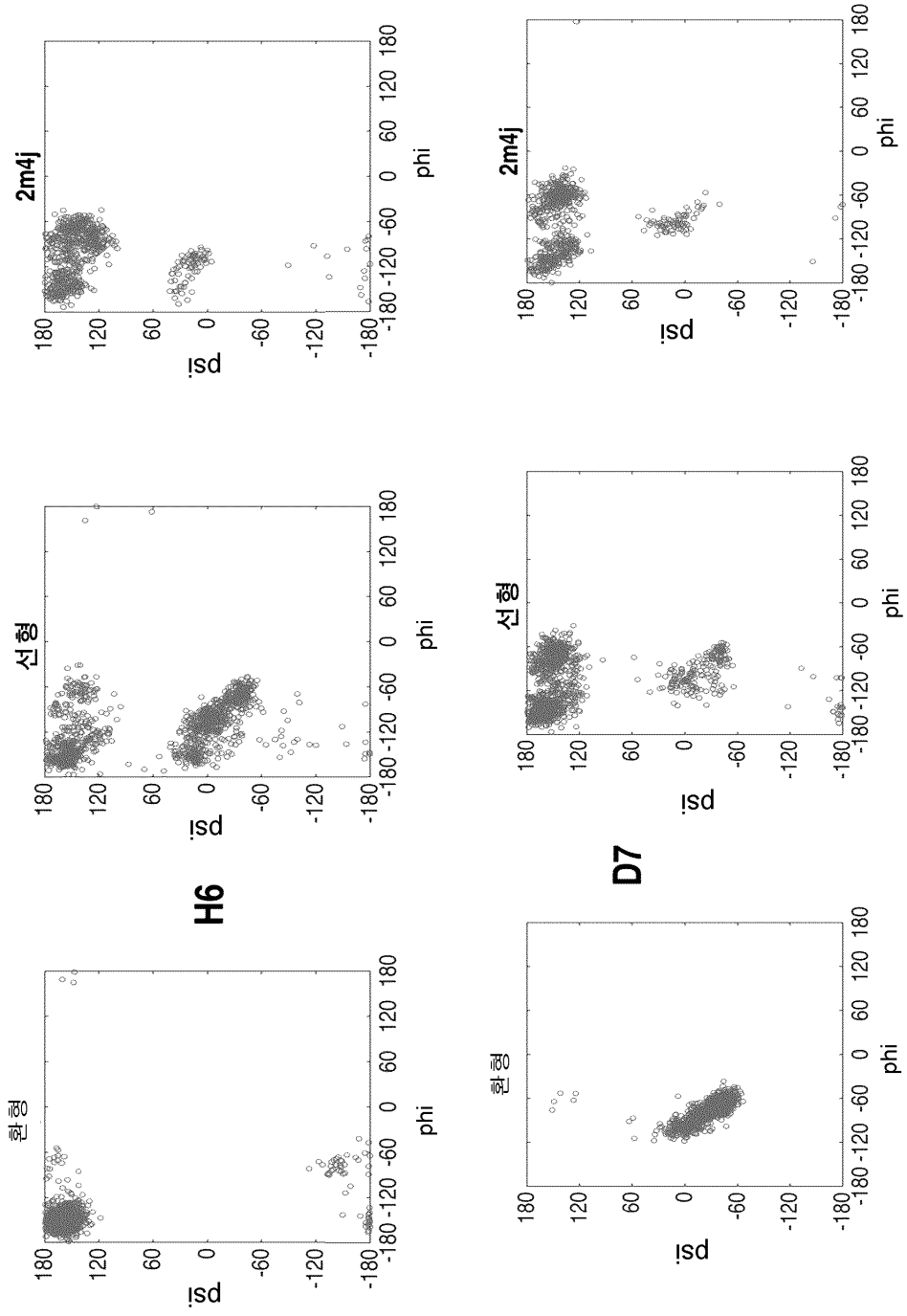
도면6c



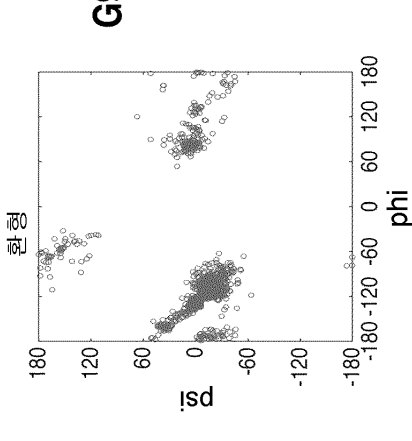
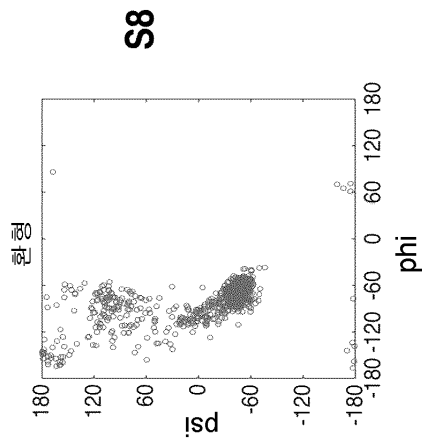
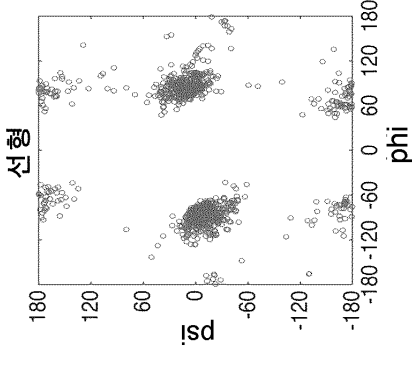
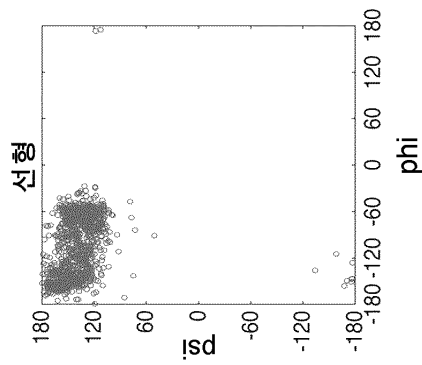
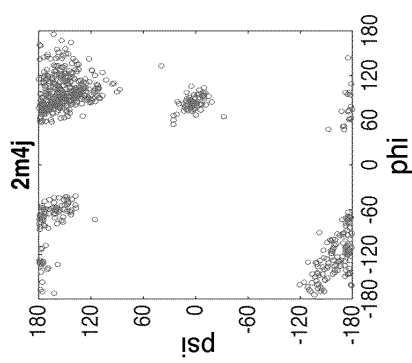
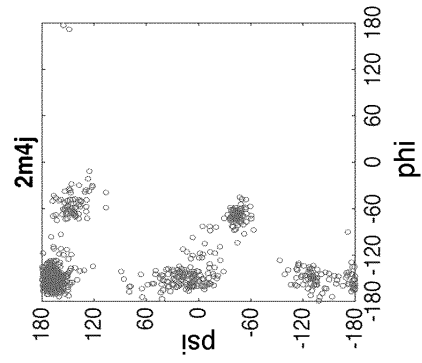
도면6d



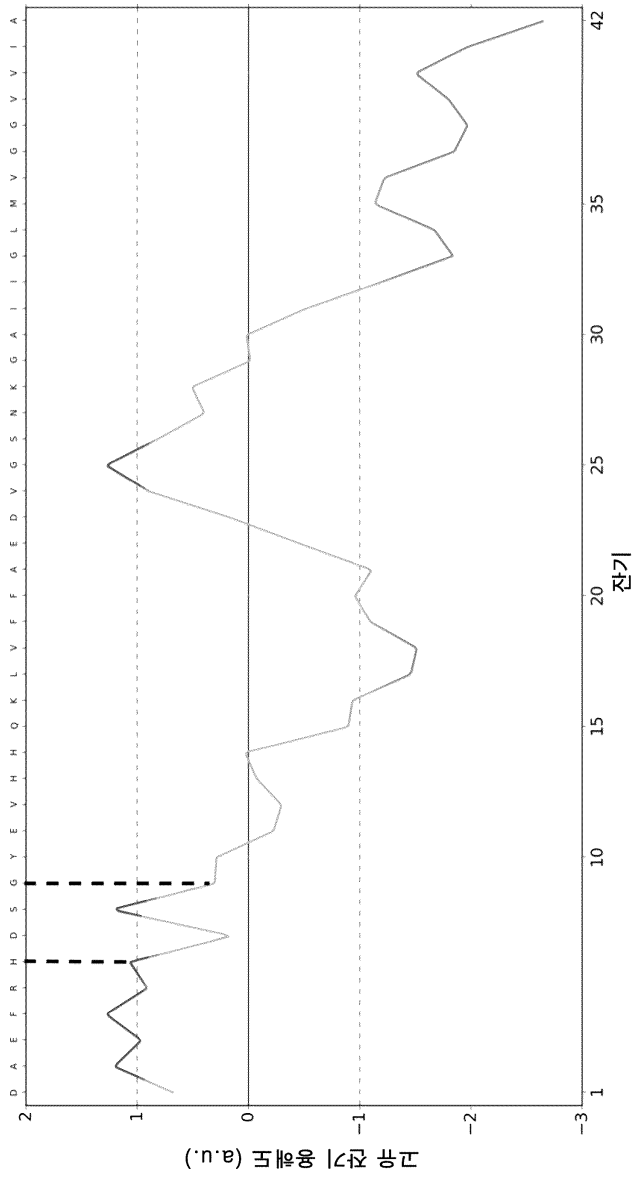
도면7a



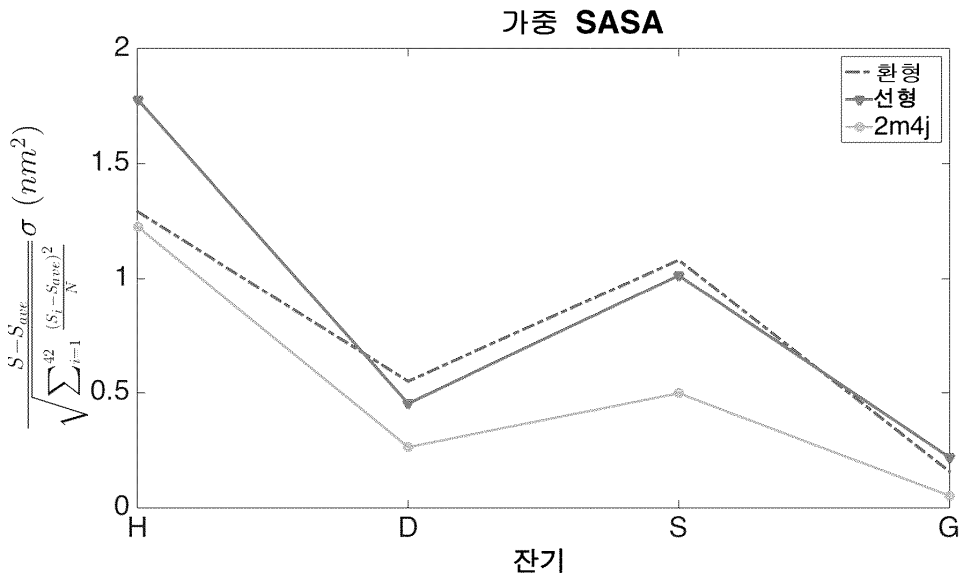
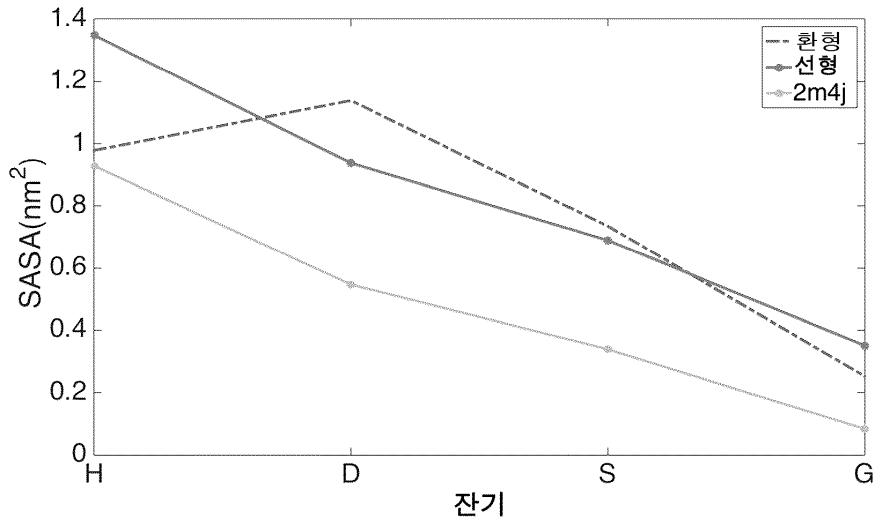
도면7b



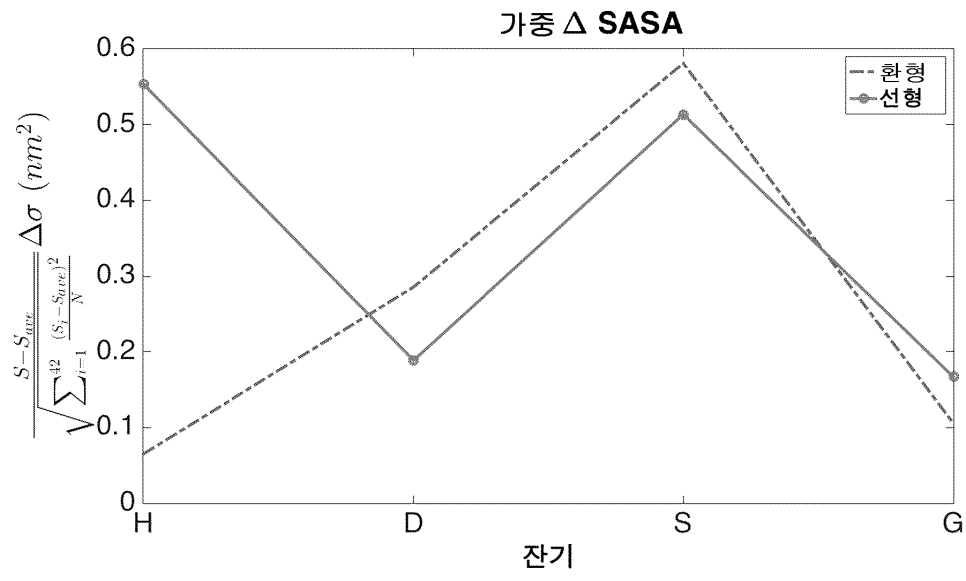
도면8



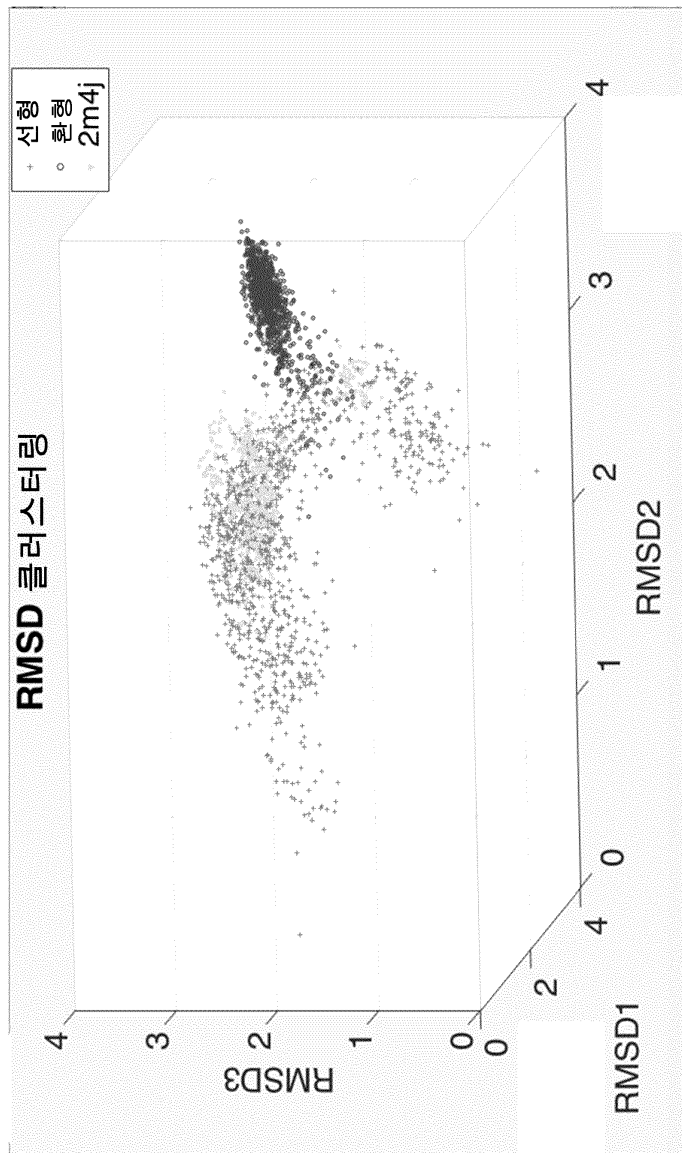
도면9a



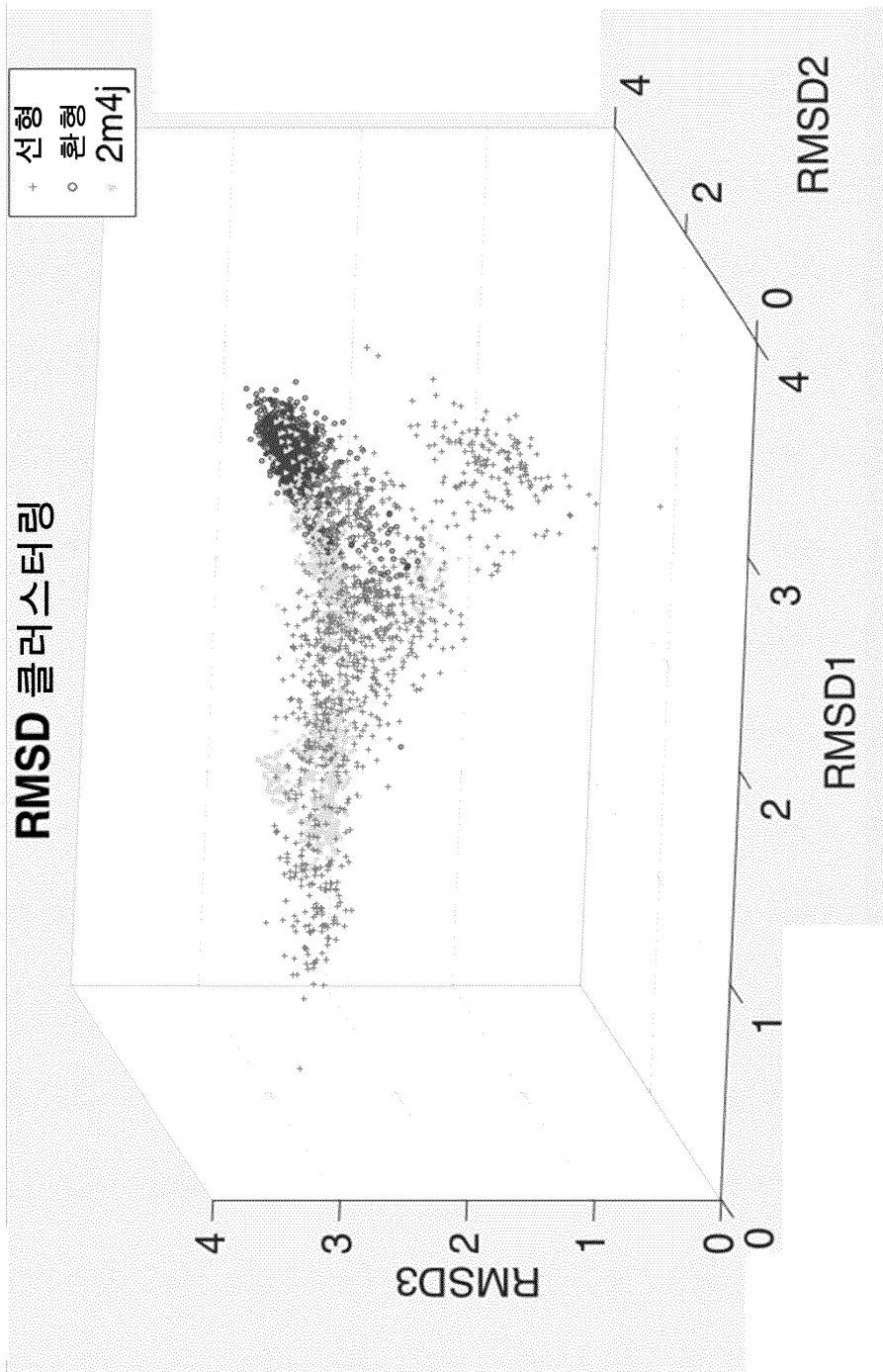
도면9b



도면10a

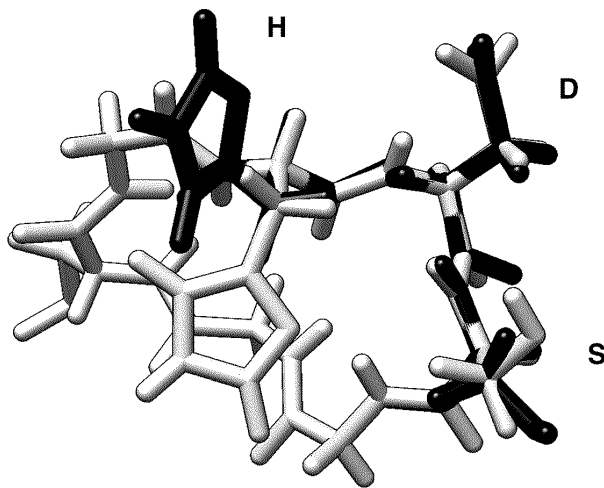
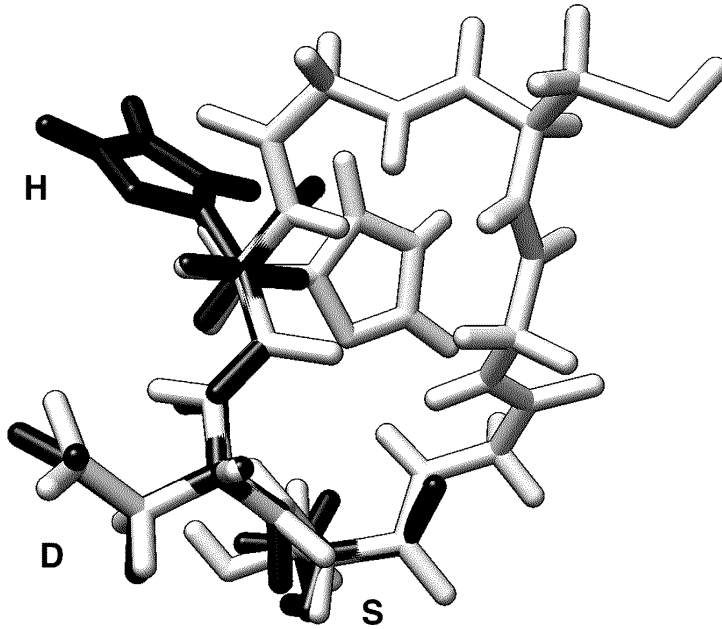


도면10b



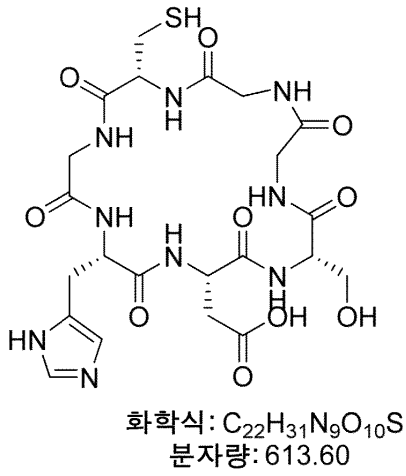
도면11a

선형 펩타이드 (흑색) 및 환식 펩타이드 (밝은 회색)에 대하여
 겹쳐진 측쇄 배향의 2 도

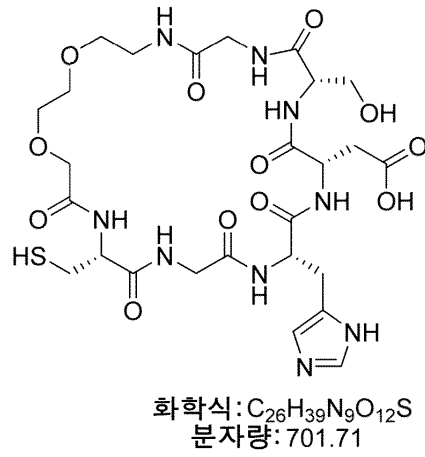


도면11b

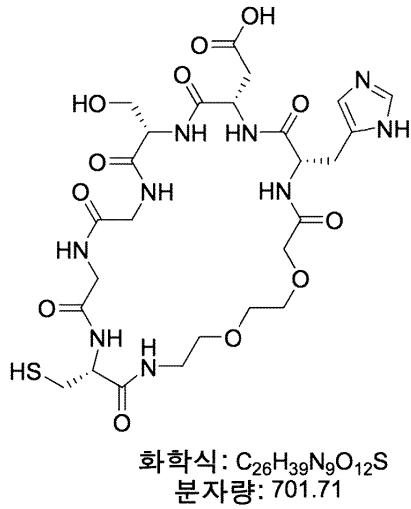
사이클로(CGHDSSG)



사이클로(CGHDSSG-PEG2)

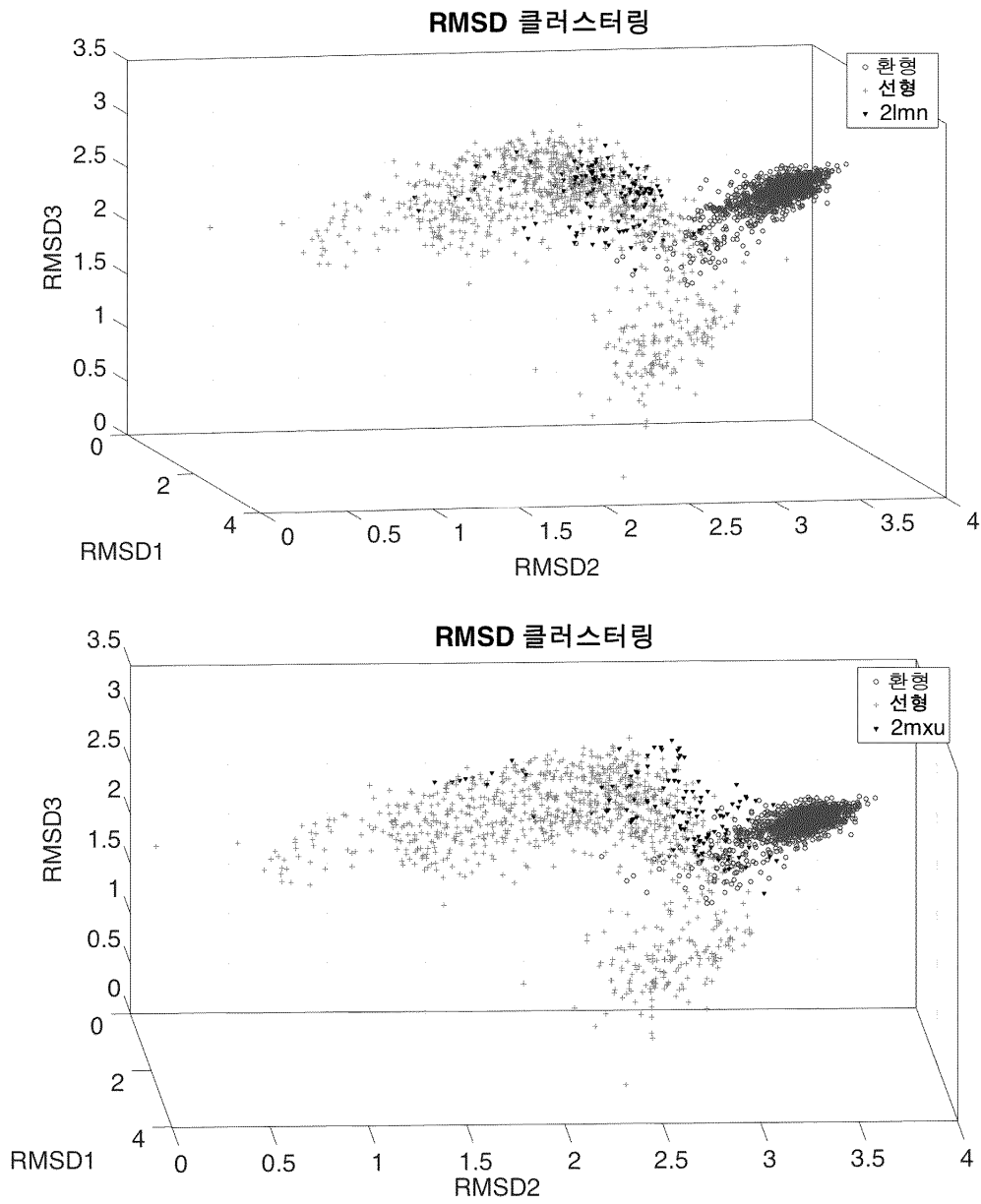


사이클로(C-PEG2-HDSSG)

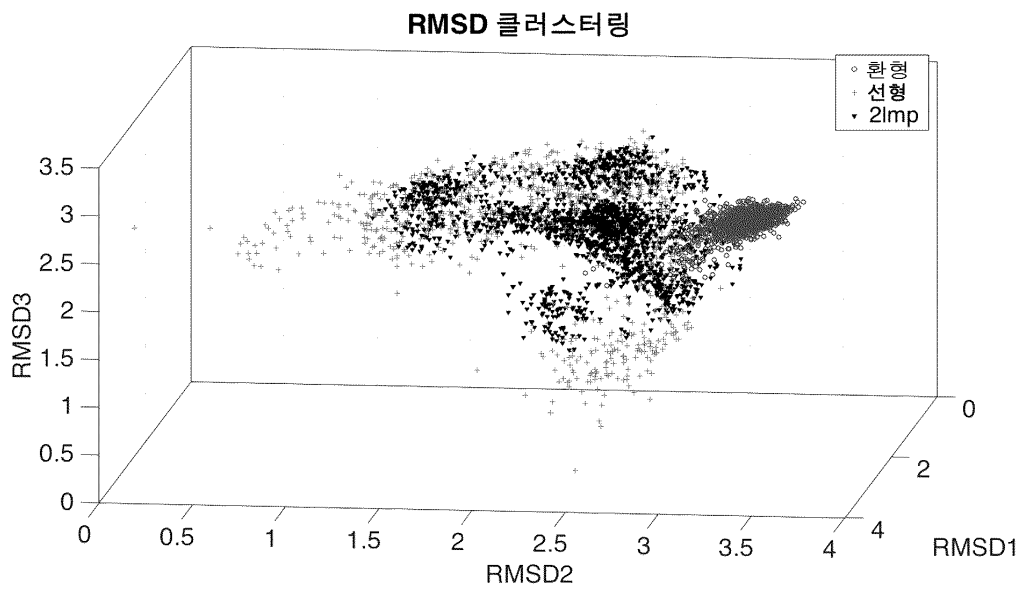


도면12a

다른 균주 피브릴 모델과 함께 환식 펩타이드 앙상블의 클러스터링

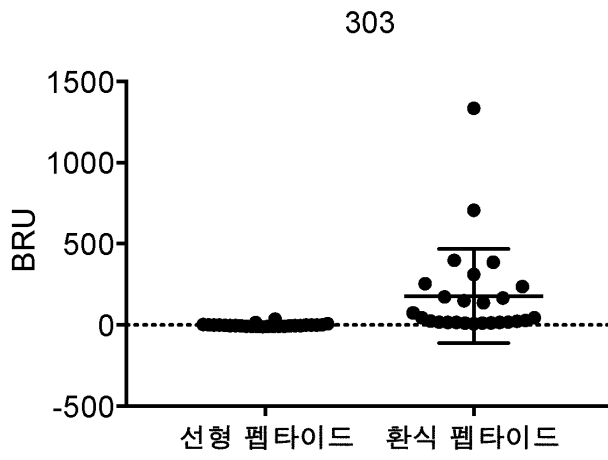


도면12b

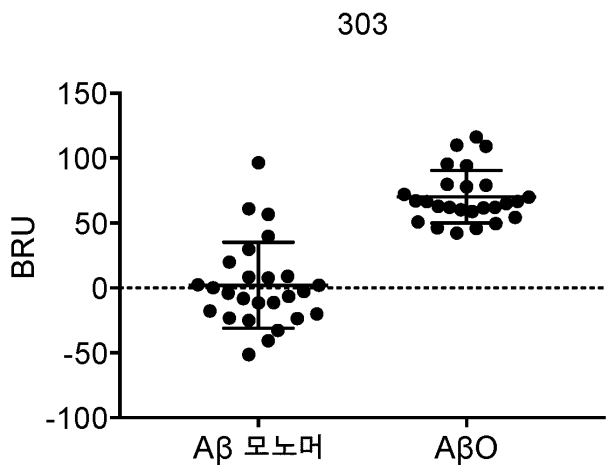


도면13

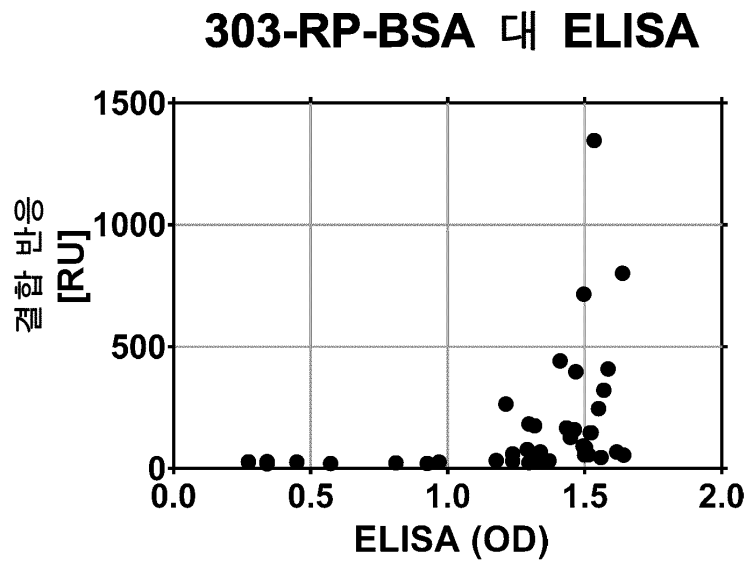
A.



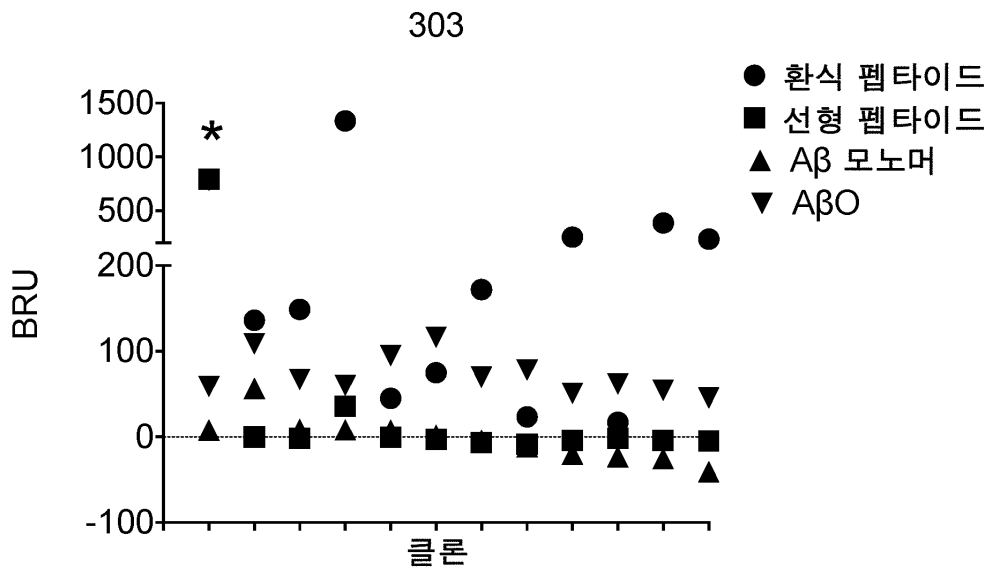
B.



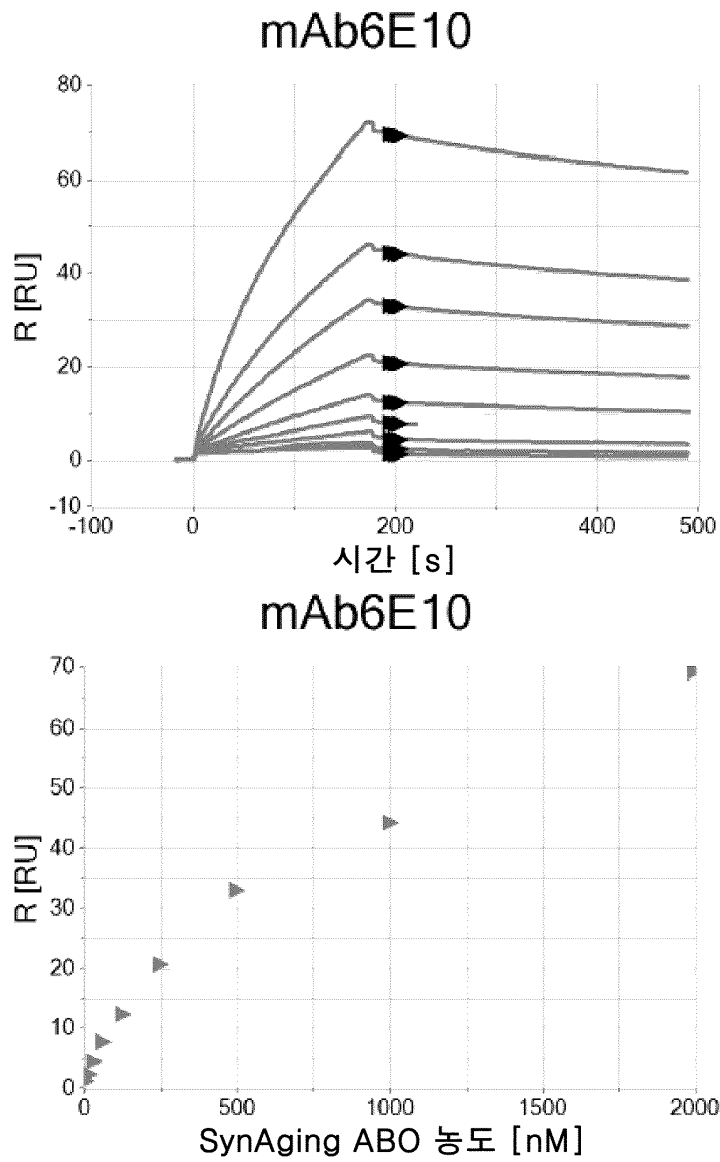
도면14



도면15

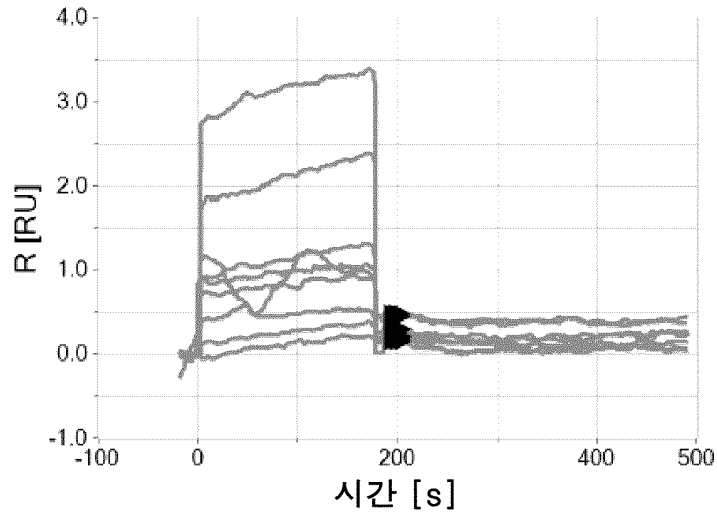


도면18a

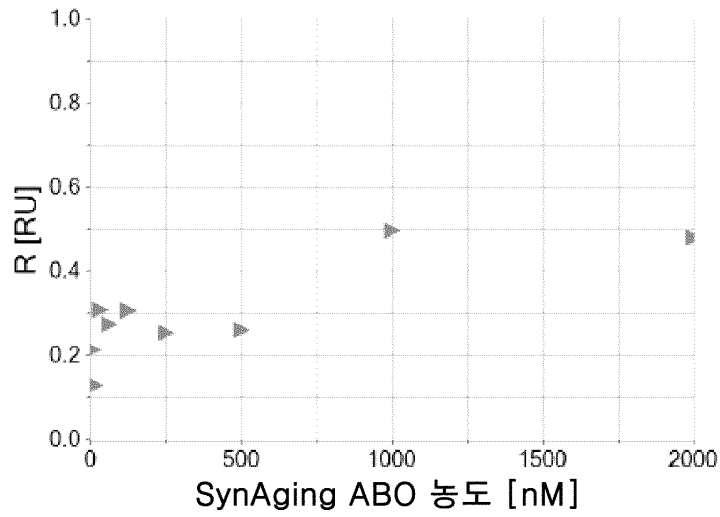


도면18b

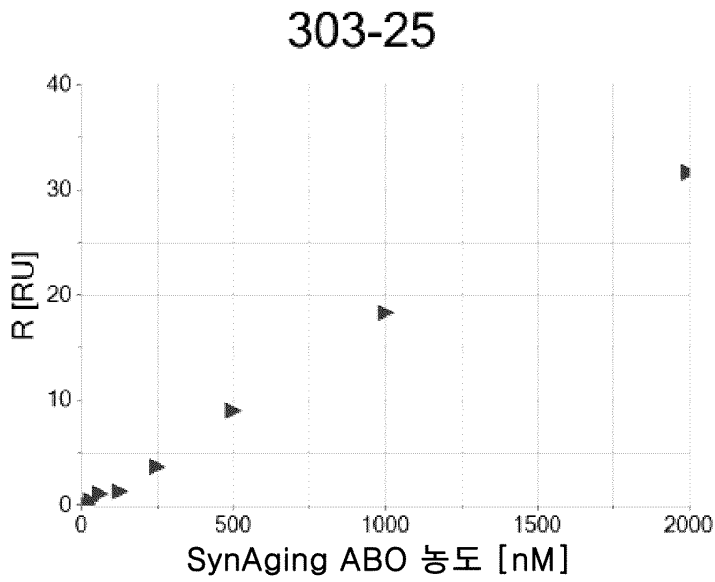
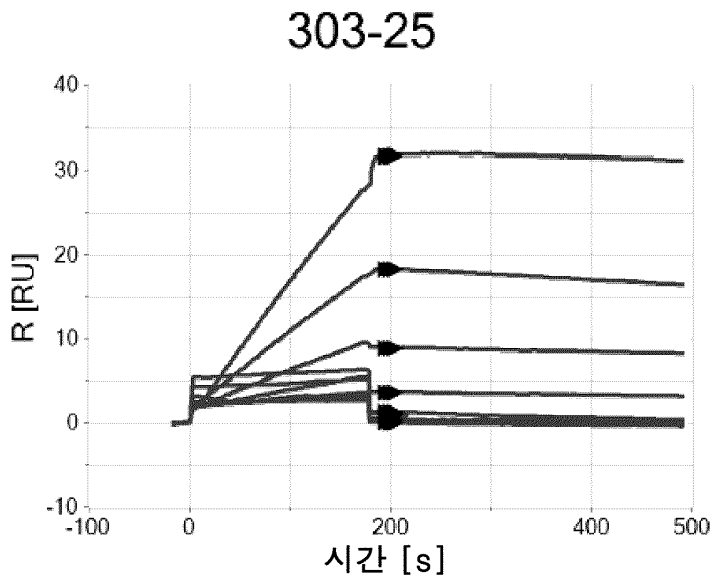
마우스 IgG1 대조군



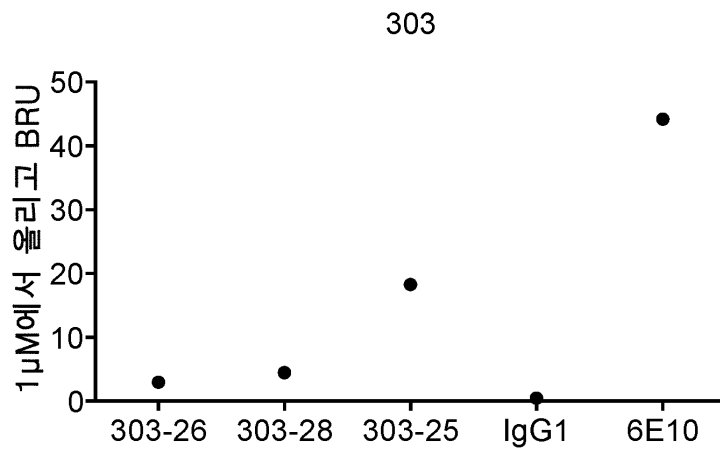
마우스 IgG1 대조군



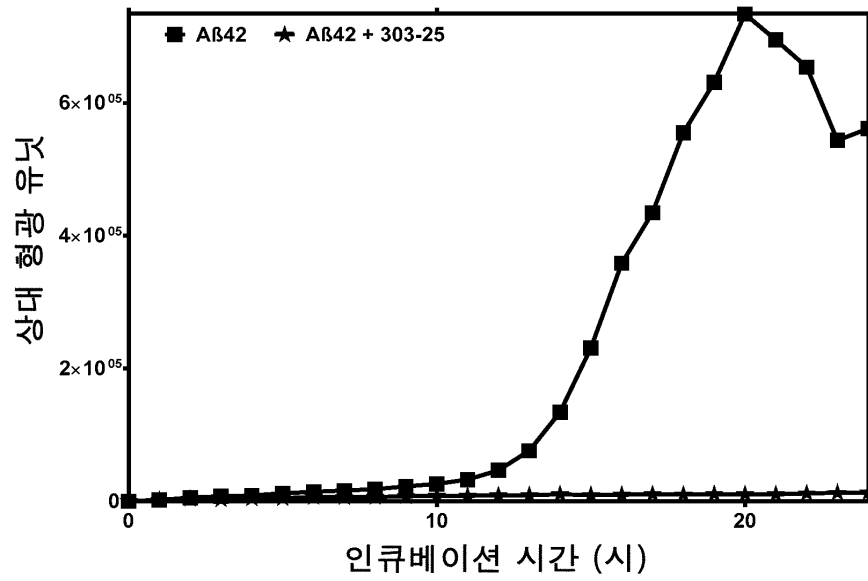
도면18c



도면18d



도면19



서열 목록

- <110> THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
 - <120> N-terminal epitopes in Amyloid beta and conformationally-selective antibodies thereto
 - <130> 7685-P50440PC00
 - <150> 62/253,044
 - <151> 2015-11-09
 - <150> 62/331,925
 - <151> 2016-05-04
 - <150> 62/365,634
 - <151> 2016-07-22
 - <150> 62/393,615
 - <151> 2016-09-12
 - <160> 28
 - <170> KoPatent In 3.0
 - <210> 1
 - <211> 4
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1
- His Asp Ser Gly

1

<210

> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Cys Gly His Asp Ser Gly Gly

1 5

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Asp Ser Gly Tyr

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg His Asp Ser Gly

1 5

<210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Arg His Asp Ser
 1
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400>
 7
 Gly His Asp Ser Gly
 1 5
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 8
 Gly His Asp Ser Gly Gly
 1 5
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 9
 Gly Gly His Asp Ser Gly Gly
 1 5
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

Gly His Asp Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

His Asp Ser Gly Tyr Glu

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

Cys Gly His Asp Ser Gly Gly Cys

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg His Asp Ser Gly Tyr

1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ser Gly Tyr

1
 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 1 5
 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Phe Arg His Asp Ser Gly
 1 5
 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 17
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5
 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18
 Ile Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr
 1 5
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 19

Ser Arg Gly Gly Tyr

1 5
 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 20

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

1 5
 <210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 21

Tyr Thr Ser

1
 <
 210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr

1 5
 <210> 23
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 23

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt cactcccag 60
 gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccage tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 180
 ggacaaggcc ttgaatggat tggtagtatt gatccttcag acagtcaaac tactacaat 240

 caaatgttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacctg 300

cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgttcaag agggggctac 360

tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 393

- <210> 24
- <211> 131
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 24

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr His Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

115 120 125

Val Ser Ser

130

- <210> 25
- <211> 378
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <400> 25

atgagaccgt ctattcagtt cctggggctc ttgtttgtct ggcttcatgg tgctcagtg 60

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120

atcacttgca aggcaagcca agacattaac aactatatag cttggtacca acacaagcct 180
 ggaaaaggtc ctaggcagct catatattac acatctacat tgcagccagg catcccatca 240
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca ccatcagcga cctggagcct 300
 gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgataatc tgtggacgtt cggaggagc 360
 accaagctgg aatcaaa 378

<210> 26
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 26

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Ile Asn Asn Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
 50 55 60

Arg Gln Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Thr Ile Ser
 85 90 95

Asp Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
 100 105 110

Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 27

Cys Gly His Asp Ser Gly

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Cys His Asp Ser Gly Gly

1 5