



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월15일
 (11) 등록번호 10-0829447
 (24) 등록일자 2008년05월07일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7015692

(22) 출원일자 2002년11월21일

심사청구일자 2006년05월12일

번역문제출일자 2002년11월21일

(65) 공개번호 10-2003-0014234

(43) 공개일자 2003년02월15일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2001/001666

국제출원일자 2001년05월15일

(87) 국제공개번호 WO 2001/90191

국제공개일자 2001년11월29일

(30) 우선권주장

00111108.7 2000년05월23일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

W01993011155 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

블러드 트랜스퓨전 센터 오브 슬로베니아

슬로베니아 류블랴나 1000 슬라야메르예바 6

(72) 발명자

큐린-세르벡, 블라드카

슬로베니아 류블랴나 1000 포란스코바 44

(74) 대리인

신동준

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김지윤

(54) 프리온 단백질의 진전병 동형체들을 선택적으로 검출할 수 있는 항체

(57) 요약

본 발명은 프리온 PrP^{Sc} 동형체의 C-말단부로 지향되는 신규한 항체들에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 소의 스폰지형 뇌질환(BSE) 및 크로이츠펠트-야콥병의 신규한 변종(vCJD)의 진단에서 상기한 항체들을 사용하는 방법에 관한 것이다. 거기에 더해, 본 발명은 상기 항체들에 의해 인지된 펩티드 및 이를 BSE, CJD, vCJD 및 다른 TSE 관련 질병들의 면역화 및/또는 치료에 사용하는 것에 관한 것이다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 리투아니아, 리베이라, 레소토, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 콜롬비아, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

특허청구의 범위

청구항 1

PrP^C 형태에는 결합하지 않는 한편, 프리온 단백질 또는 그의 일부의 PrP^{Sc} 동형체의 C-말단 단부가 -Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-으로 구성되는 단백질 서열로 표시되는 3차원 구조를 갖는 에피토프와 선택적으로 결합하고, 아미노산 서열 -Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr- 또는 -Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-으로 표시되는 펩타이드로 동물을 면역화시키는 단계를 포함하는 방법으로 얻어지는 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,
폴리클로날 또는 모노클로날 항체 또는 그의 조각인 상기 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,
표지에 연결되는 상기 항체.

청구항 6

제1항에 있어서,
하이브리도마 세포주 CNCM I-2476으로부터 파생된 상기 항체.

청구항 7

소의 스폰지형 뇌질환, 크로이츠펠트-야콥병 또는 크로이츠펠트-야콥병의 신규한 변종, 또는 TSE 관련 질병들을 치료하기 위한 상기 제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 진단용 및/또는 치료용 항체.

청구항 8

BSE 및/또는 CJD 및/또는 vCJD 또는 TSE 관련 질병들에 대한 치료용 약물을 생산하기 위한 상기 제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 약물 생산용 항체.

청구항 9

BSE, CJD, vCJD 또는 TSE 관련 질병들에 대한 능동적 및/또는 수동적 백신을 생산하기 위한 상기 제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 백신 생산용 항체.

청구항 10

하기의 시퀀스 즉,

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

또는

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

를 갖는 펩티드 또는 그의 3차원 구조가 근본적으로 유지된다는 전제 하에, 면역 응답을 유발하기에 충분한 양으로 동물들을 면역화시키는 단계를 포함하는 상기 제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 항체의

제조방법.

청구항 11

상기 제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 BSE 및/또는 CJD 및/또는 vCJD 또는 TSE 관련 질병들에 대한 치료용 키트.

청구항 12

삭제

청구항 13

상기 제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포주.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

CNCM I-2476 세포주인 상기 하이브리도마 세포주.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 프리온 PrP^{Sc} 동형체의 C-말단부로 지향되는 신규한 항체들에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 소의 스폰지형 뇌질환(BSE ; Bovine spongiform encephalopathy ; 이하 'BSE'라 칭한다), 크로이츠펠트-야콥병의 신규한 변종(vCJD ; variant form of CJD(Creutzfeldt Jacobs Disease ; 이하 'CJD'라 칭한다)), 산발성 CJD 및 진전병(scrapie)의 진단용 항체들에 관한 것이다.

배경기술

<2> 1986년부터 영국에서 만성 퇴행성 질병(chronic degenerative disease)이 진단되었다. 이 질병에 감염된 소는 신경계의 진행성 퇴행을 경험하고, 신경과민증 (nervousness) 또는 공격성 등과 같은 기질의 변화들, 비정상적 자세, 협동운동실조(incoordination) 및 기상의 곤란, 지속적인 식욕에도 불구하고 우유 생산의 감소 또는 체중의 감소 등을 나타내었다. 감염된 소는 마침내 폐사하였다.

<3> 이 질병은 소의 스폰지형 뇌질환으로 정의되었으며, 현재는 "광우병"으로 널리 언급되고 있다. 그 다음의 10년 동안에 대략 160,000건의 이 새로이 인식된 소의 질병들이 영국에서 확인되었으며, 또한 다른 유럽국가들 및 예를 들면 캐나다, 포클랜드 군도 및 오만 회교국가 등과 같은 해외국들에서도 상기한 질병들로부터 고통받는 동물들이 보고되었다.

- <4> BSE는 전염체와 관련이 있으며, 이 전염체의 속성은 아직 완전히 이해되고 있지 않다. 상기 전염체는 소의 뇌와 척수에 영향을 주며, 손상들은 현미경으로 볼 수 있는 스폰지형의 변화로 특징되었다. 상기 전염체는 매우 안정하고, 그리고 냉동 및 건조와 마찬가지로 통상의 조리온도에서의 가열 및 심지어 살균, 멸균을 위해 사용된 것과 같은 보다 높은 온도에서의 가열에서조차도 견딘다.
- <5> 자연적으로 BSE로 감염된 소에서, 상기 BSE 감염체는 단지 뇌조직 내에서, 척수 내에서 및 망막 내에서 발견되었다. BSE-감염된 동물들로부터 나온 뇌물질을 급여한 소들의 말단 확장(distal ileum), 골수(bone marrow), 배근 신경절(dorsal root ganglion) 및 삼차 신경절(trigeminal ganglion) 내에서 BSE 감염성이 별도의 연구들에서 확인되었다.
- <6> 인간의 경우에서 유사한 퇴행성 증후군이 알려졌으며, 이는 크로이츠펠트-야곱병 (CJD)로 정의되었다. CJD는 명백한 기능장애, 진행성 치매(progressive dementia) 및 뇌의 공포성퇴행변성(vacuolar degeneration)을 수반하는 중추신경계의 서행 퇴행성 인간 질병이다. CJD는 연간 1만명 당 1건의 비율로 산발적으로 전세계적으로 일어난다. 게르스트만-스트라우슬러 증후군, 구루병(Kuru) 및 치명적 가족성 불면증(fatal familial insomnia) 등의 유관 TSE(전염성 스폰지형 뇌질환) 질병들은 보다 희박하다.
- <7> 1996년에, 영국 스폰지형 뇌질환 감시 위원회(SEAC ; Spongiform Encephalopathy Advisory Committee)는 10건의 CJD의 신규한 변종CJD(vCJD)들의 동정을 발표하였다. 환자들 모두는 1994년 또는 1995년에 발병 초기가 나타났다. 그러나, 상기한 10건들은 CJD의 산발적 형태로부터 광범위하게 다르게 보고되었다. 상기 감염된 개체들은 전통적인 CJD 환자보다 훨씬 어렸다. 전형적으로, CJD 환자들은 63세 이상 이었다. 이에 비해, 변종CJD의 초기에 대한 평균 환자 나이는 대략 28세이었다. vCJD에서의 질병의 경과는 6개월 평균인 전통적인 CJD 경우들과는 다른 13개월이 평균이었다. 변종의 경우들에서, 뇌내의 뇌전도도성(EEG ; electroencephalographic) 전기적 활성은 산발성 CJD의 전형은 아니었다. 비록 뇌병리학이 CJD로 인식되기는 하였으나, 그 패턴은 프리온 단백질 반점(prion protein plaques)들의 보다 큰 집합체(aggregate)들로 산발성 CJD와는 다르다.
- <8> 상기 스폰지형 뇌질환 감시 위원회에 따르면, 희생자들은 10년 이내에 소고기 또는 소고기제품을 섭취하였으며 이는 vCJD 및 BSE 사이의 인과관계를 보여주고 있는 것이다. 1997년에 공표된 2개의 연구들에서는 상기 BSE 감염체가 가장 vCJD의 원인이 될 것이라는 가정을 확인하고 있다. 이 목적을 위하여, 일단의 연구자들은 3개 그룹의 순계 생쥐(inbred mice)들 및 1개 그룹의 잡종계 생쥐(crossbred mice)들을 각각 BSE, vCJD 및 산발성 CJD로 감염시켰다. 중간 결과들은 BSE로 접종된 생쥐들이 vCJD를 갖는 환자들로부터 얻어진 조직들로 접종된 생쥐들과 동일한 패턴의 배양 시간(incubation time), 임상적 징후(clinical sign)들 및 뇌손상을 보여주고 있으며, 이는 BSE와 vCJD가 동일한 징후(signature)를 갖거나 동일한 "스트레인 (strain)"이라는 결론을 나타내고 있다. 더욱이, 산발성 CJD 및 공지의 진전병 균주들은 vCJD 또는 BSE와 유사하지 않았다. 이들 결과들은 다른 연구자들에 의해서 확인되었으며, 따라서 BSE가 인간에게 전염되어 vCJD의 전개의 결과를 가져올 수 있다고 믿어지고 있다.
- <9> 감염된 소로부터 파생된 제품들의 소비의 결과로 BSE가 인간에게 전염될 수 있다는 가능성에 대한 대중적 및 과학적 관심의 증가로 인하여, BSE를 앓고 있는 소는 도축되어야 하며, 이들의 사체가 인간의 음식 유통 경로 내로 도입되지 않도록 하여야 한다는 것이 제안되었다. 그러나, BSE의 감염이 감염된 동물의 행동의 결과로 분명하게 나타나는 데에는 전형적으로 5년 또는 그 이상이 걸리며, 도살된 동물의 뇌를 검사하는 것 이외에는 어느 특정의 소가 BSE를 앓고 있는지의 여부를 확인할 수 있는 신속한 방법이 없다는 사실 때문에, 소고기 제품들의 안전성에 관한 대중적 공포를 진정시키기 위해 적용할 수 있는 유일한 안전한 접근방법은 광범위한 도살이다. 이러한 정책이 BSE로 감염되지 않은 수천 마리의 소들을 도살시키는 결과를 가져온다는 것은 거의 피할 수 없다. 따라서, 당해 기술분야에서는 BSE에 대한 신속한 진단방법이 요구되어지고 있다.
- <10> 조직 내의 상기 BSE 전염체의 존재를 결정하는 데 유용한 하나의 방법은 BSE로 감염된 것으로 여겨지는 물질로 동물들, 주로 생쥐들을 접종시키는 것이다. 그러나, 생쥐 접종 연구는 700일 이상의 긴 시간이 걸리며, 조직 내의 BSE의 동정의 실패가 전염체의 진정한 부존재를 나타내거나 또는 단순히 이러한 접근법의 제한된 감도일 수 있다는 것이다.
- <11> BSE 및 vCJD 등과 같은 다른 TSE들의 전개의 원인이 되는 상기 전염체는 가장 작은 공지의 바이러스 보다 더 작으며, 아직 완전히 특정되지 않았다. 상기 전염체의 속성에 대해서는 3가지 주요 이론들이 있다. (1) 상기 전염체는 비정상적인 특성들을 갖는 바이러스이다. (2) 상기 전염체는 감염 후, 부분적으로 프로테아제-저항형(protease-resistant form)으로 변성되는 배타적으로 숙주-암호화 단백질(host-coded protein)("프리온(prion)")이다. (3) 상기 감염체는 숙주-파생 보호성 단백질로 피복된, 작은, 비-암호화 조절 핵산(non-coding

regulatory nucleic acid)이다. 상기 BSE 감염체는 열 및 통상의 살균 공정들에 대해 극히 저항성이다. 이는 또한 숙주 동물 내에서 어떠한 감지할 만한 면역 반응이나 염증성 반응을 일으키지도 않는다.

<12> 최근에, 상기 질병의 원인이 되는 상기 전염체가 바이러스와는 동떨어진 것이라는 것이 밝혀졌다. 상기 감염체는 다중의 분자성 형태로 존재할 수 있음에 비하여, 바이러스들은 분명한 초미세구조상의 형태의 단일 형상으로 존재한다. 둘째로, 이들 전염체들은 거의 항상 면역 응답을 일으키는 바이러스와는 대조적으로 비-면역성이다. 셋째로, 감염성 입자 내에 필수 핵산의 증거가 없음에 비하여 바이러스들은 후손 바이러스의 합성을 위한 주형으로서 기능하는 핵산 유전자를 갖는다. 따라서, 프리온들은 퇴행성 질병의 원인이고, 그의 유일하게 알려진 성분이 상기 프리온이며, 이는 그 자체 각 개체의 염색체성 유전자(chromosomal gene)에 의해 암호화되는 것으로 종국적으로 결론지어졌다.

<13> 줄여서 PrP^{Sc}로 표현되는, 감염성 프리온들은 기본적으로는 상기 프리온 단백질의 "진전병 동형체"로 정의된 단백질로 구성된다. 아직 정의되지 않은 것으로서, 후-전사 공정은 분명히 편재성 세포상 프리온 단백질 PrP^C로부터 PrP^{Sc}가 발생한다. PrP^{Sc}와 PrP^C 두가지 모두는 하나의 사본 염색체성 유전자에 의해 암호화되며, 상기 접종된 프리온은 통상의 숙주 PrP^C 폴리펩티드로부터 PrP^{Sc}의 생산을 개시한다는 것이 밝혀졌다. 주로 세포 표면 상에서 발견된 통상의 형태에 비하여, 상기 동형체들은 세포들 내에서 소포(vesicle)들 내에 축적된다. 상기 동형체들은 또한 통상의 형태의 PrP^C에 대해 PrP^{Sc} 동형체의 증가된 프로테아제 저항성의 원인으로 여겨지는 증가된 β-시트 함량(β-sheet content)으로 표현되는 형태학적 구조에서 다르다.

<14> 현재 상기 질병을 예방하기 위하여 유용한 어떠한 처치법이나 백신도 없다. 이는 상기 PrP^{Sc} 동형체를 특별히 인지하는 한편 동시에 "통상의" 동형체 PrP^C와의 교차-반응성을 회피하는 항체들의 생산을 억제하는 상기 PrP^{Sc} 동형체의 명백하게 낮은 면역 유전성에 주로 기인하는 것으로 여겨진다.

<15> 더욱이, 살아있는 동물 내의 상기 질병을 검출할 수 있는 적절한 시험방법 역시 없다. 가축 병리학자들은 뇌조직의 사후 현미경검사에 의해 BSE를 확인할 수 있을 것이다. 그러나, 조직들 내에서의 BSE 전염체의 존재를 검출할 수 있게 되는 경우에는 이는 동물들, 대개 생쥐들을 BSE로 감염되었으리라고 여겨지는 물질로 집중시키는 것에 의해 확인할 수 있다. 따라서, 진전병 및 다른 것들과 같이 BSE, CJD, vCJD 또는 TSE 관련 질병 등과 같은 신경계의 퇴행성 질병들의 전개의 원인이 되는 상기 전염체들을 제공하는 수단이 당해 기술분야에서는 여전히 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

<16> 따라서, 본 발명의 목적은 수의사 및/또는 의사들이 특히 BSE, CJD, vCJD 및/또는 TSE 관련 질병들을 일으키는 전염체들의 존재를 감지할 수 있는 수단을 제공함에 있다.

<17> 본 발명으로 향하는 집중된 연구들의 과정에서, 본 발명자들은 형태학적 변화들의 하나 즉, PrP^{Sc}로의 그의 변형을 수행하는 상기 PrP^C는 PrP^C의 C-말단 영역의 3차구조의 변형에 있다는 것을 발견하였다.

도면들의 간단한 설명

<19> 도면들에서,

<20> 도 1은 항체 CNCM I-2476으로 처치된, 산발성 CJD를 앓는 개체로부터 파생된 인간 뇌조직 샘플의 사진(10배 확대)을 나타낸다.

<21> 도 2는 항체 CNCM I-2476으로 처치된, 산발성 CJD를 앓는 개체로부터 파생된 인간 뇌조직 샘플의 사진(60배 확대)을 나타낸다.

<22> 도 3은 항체 CNCM I-2476으로 처치된, 신규한 변종CJD를 앓는 개체로부터 파생된 인간 뇌조직 샘플의 사진(60배 확대)을 나타낸다.

<23> 도 4는 항체 CNCM I-2476으로 처치된, 신규한 변종CJD를 앓는 개체로부터 파생된 인간 뇌조직 샘플의 사진(20배 확대)을 나타낸다.

<24> 도 5는 항체 CNCM I-2476으로 처치된, BSE의 징후들을 나타내는 동물로부터 파생된 소의 뇌조직의 사진(20배 확대)을 나타낸다.

대)을 나타낸다.

<25> 도 6은 항체 CNCM I-2476으로 처리된, 진전병을 앓는 염소로부터 파생된 뇌조직 샘플의 사진(10배 확대)을 나타낸다.

<26> 도 7은 돛트블릿법 실험의 결과들을 나타내며, 여기에서 정상 뇌조직들의 여러 샘플들을 항체 CNCM I-2476에 노출시켰다. 대조군으로서 시퀀스 ID No. 2의 펩티드 및 상기 펩티드와 KLH의 결합체(conjugate)가 사용되었다.

<27> 발명의 상세한 설명

<28> 따라서, 하나의 구체적인 실시예에 따르면 본 발명은 상기 PrP^{Sc} 동형체의 C-말단 부분 또는 그의 일부 즉, "잘못 중첩된" 형태로 나타난 상기 프리온 폴리펩티드의 3차원 구조에 지향하는 항체를 제공한다. 상기 PrP^C 형태는 상기 부분에서 PrP^{Sc}와 명백하게 다른 상기 프리온 폴리펩티드의 3차원 구조를 나타내기 때문에, 상기한 항체들은 상기 PrP^C 형태에는 결합하지 않는 한편으로 상기 PrP^{Sc} 동형체에 선택적으로 결합될 수 있다. 따라서, 상기 항체들은 이들 동형체들 사이를 구분할 수 있다. 상기 항체들은 바람직하게는 PrP^{Sc}의 아미노산 No. 190 내지 214들 또는 그의 일부로 이루어지는 영역들로, 보다 바람직하게는 PrP^{Sc}의 시퀀스 약 202 내지 214들 또는 그의 일부에, 또는 상기 PrP^{Sc} 동형체에 의해 표현된 바와 같이 상기 영역의 상기 구조적 특이성이 근본적으로 유지된다는 전제 하에, 하나 또는 그 이상의 아미노산들을 치환하거나 또는 생략하는 것에 의해 수득된 변종들로 지향한다. 바람직한 구체예에 따르면, 상기 아미노산 시퀀스는

<29> -Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

<30> 또는

<31> -Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

<32> 이다.

<33> 시퀀스 ID No. 1은 본 발명에서 동정된 바와 같이 아미노산 No. 180 내지 219인 상기 소의 프리온 폴리펩티드의 아미노산 시퀀스의 C-말단 영역의 일부를 나타낸다.

<34> Thr-Thr-Lys-Gly-Glu-Asn-Phe-Thr-Glu-Thr-Asp-Ile-Lys-Met-Met-Glu-

<35> 180 185 190 195

<36> Arg-Val-Val-Glu-Gln-Met-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-

<37> 200 205 210

<38> Ala-Tyr-Tyr-Gln-Arg-Gly-Ala-Ser

<39> 215

<40> 본 발명에서 정의된 바와 같은 항체는 PrP^C 형태에서는 나타나지 않는 PrP^{Sc} 동형체의 C-말단 부분에 의해 제공된 3차원 구조에 선택적으로 결합되는 것에 의해 PrP^{Sc}와 PrP^C를 서로 구별할 수 있다.

<41> 상기 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날이 될 수 있는 한편, 교차-반응성의 이유로 인하여, 모노클로날 항체들이 바람직하다. 더욱이, 상기 항체들의 조각들, 특히 이들 중 F_{ab} 영역들 또는 그의 일부들 등과 같은 목표에 결합하는 조각이 또한 상기 항체들의 의미 내에 포함된다. 개별적인 요구에 기초하여 당해 기술분야에서 숙련된 자는 대응하는 단편들을 설계할 수 있다.

<42> 상기 항체들이라는 용어는 또한 인간화된 항체들 등과 같은 혼성 항체들을 포함하는 것을 의미하며, 여기에서 상기 변형가능한 영역은 생쥐들과 같은 동물원(animal source)으로부터 파생되어 상기 전염체로 처리된 개체들의 반응을 줄일 수 있도록 한다. 이중특이성 항체(bispecific antibodies)들이 본 발명에서 마찬가지로 고려된다. 이중특이성 항체들은 두 F_{ab} 조각들이 각각 서로 다른 목표들을 지향하는 면역글로블린들 또는 그의 조각들이다. 따라서, 하나의 F_{ab} 조각이 PrP^{Sc}의 C-말단 부분으로 지향하는 한편 다른 F_{ab} 조각은 분석에 사용된 목표와

같은 임의의 목표에로 지향할 수 있다.

- <43> 상기 항체는 방사성 표지, 형광성 표지 또는 염료 등과 같이 목표들을 검출하는 데 통상적으로 사용되는 표지들에 연결될 수 있다. 바람직한 구체예에 따르면, 상기 항체는 부다페스트 조약에 따라 2000년 5월 10일자로 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소(Pasteur Institute)에 기탁된 하이브리도마 세포주 CNCM I-2476에 의해 생산된 항체이다.
- <44> 상기한 항체들은 예를 들어 유제류 또는 인간 등과 같은 포유동물들에서의 소의 스폰지형 뇌질환 또는 크로이츠펠트-야콥병 또는 그의 변종형 또는 TSE 관련 질병들의 진단 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예를 들면, 인간, 소, 양 등과 같은 서로 다른 종들에서 상기 항체들을 사용할 수 있는 이러한 특징은 상기한 항체들의 신규하고도 흥미로운 특징이며, 모든 개체들의 조사에 단지 하나의 항체가 요구되는 것과 같이 결정 방법을 완화시킨다.
- <45> 개체가 상기 대응하는 질병에 의해 감염되었는지의 여부를 결정하기 위해서는, 조직(균질화물(homogenisate) 또는 절편) 또는 혈액, 타액, 뇨 또는 뇌척수액 등과 같은 체액 등과 같은 시험할 개체로부터 취하여지고, 그리고 적절한 조건 하에서 상기 시료를 상기 항체와 접촉시키는 것에 의해 상기 PrP^{Sc} 동형체의 존재를 검사한다.
- <46> 상기 시료와 상기 항체를 접촉시키는 방법은 어떠한 특성의 제한에 구속되지 않으며, 단지 획득할 수 있는 수단들 및 상기 시료 자체에 따를 수 있다. 따라서, 상기 항체들은 예를 들면 엘리사법(ELISA), 닷트 블롯법(Dot Blot), 웨스턴 블롯법(Western Blot), 면역이력화학법(immunohistochemistry methods) 및 다른 방법들에서 사용될 수 있으며, 이들 모두는 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 잘 알려진 것이다.
- <47> 프리온 관련 질병의 존재에 대한 신속한 시험을 가능하게 하기 위하여, 본 발명은 또한 키트(kit)를 제공하며, 이는 본 발명에 따른 적어도 하나의 항체를 포함한다. 거기에 더해, 상기 키트는 또한 완충제, 지지제 및 수행되는 개별 분석법들에 적용될 수 있는 표지 시약들을 포함할 수 있다.
- <48> 더욱이, 본 발명의 상기 항체들은 또한 선택적으로 적절한 부형제들 및 담체들과 함께 본 발명의 항체의 유효량을 감염된 개체에 투여하는 것에 의한 프리온 관련 질병들의 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 적어도 하나의 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.
- <49> 더욱이, 본 발명은 또한 상기 PrP^{Sc} 동형체에 대해 개체를 면역화시키는 방법을 제공하는 것이다. 이에 관하여, 상기 통상의 형태(PrP^C)와는 다른 것으로 발견된 상기 C-말단의 펩티드들은 개체에서의 면역 응답을 유발하는데 사용될 수 있으며, 이 펩티드들은 바람직하게는 상기 프리온 시퀀스 아미노산 No. 190 내지 215들 또는 그의 일부로부터, 보다 바람직하게는 상기 폴리펩티드의 약 202 내지 약 214들의 시퀀스 또는 그의 일부로부터, 또는 상기 PrP^{Sc} 동형체에 의해 표현된 바와 같이 상기 영역의 상기 구조적 특이성이 근본적으로 유지된다는 전제 하에, 하나 또는 그 이상의 아미노산들을 치환하거나 또는 생략하는 것에 의해 수득된 변종들로부터 파생된다. 가장 바람직한 구체예에 따르면, 상기 아미노산 시퀀스는
- <50> -Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-
- <51> 또는
- <52> -Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-
- <53> 이다.
- <54> 게다가, 상기 항체들 자체는 항유전형 항체들을 생산하는데 사용될 수 있으며, 이는 면역화에 사용될 수 있다. 면역화에 대해서는 당해 기술분야에서 숙련된 자는 촉진단계들 사이의 적절한 시간을 선택하고, 그리고 필요하다면 여겨지는 경우 적절한 부형제를 선택할 수 있다.
- <55> 상기 항체들은 또한 항유전형 즉, 본 발명의 항체들의 결합영역으로 지향하는 항체들을 증식시키는 데 사용될 수 있다. 이들 항유전형 항체들은 본 발명의 상기 항체들의 거울상으로 나타나며, 상기에서 언급한 질병들의 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 상기 항유전형 항체들 또한 본 발명의 범주 내에 포함되며, 당해 기술분야에서 잘 알려진 방법 즉, 예를 들면 본 발명의 상기 항체들의 상기 고변이 영역(hypervariable region)들로 동물들을 면역화시키고, 그리고 그에 대응하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체들을 생산하는 것에 의해 생산될 수 있다. 다음 단계에서, 수득된 상기 항체들은 상기 본 발명의 항체의 상기 항유전형 항체들의 결합에 따라 선택될 수 있다.

<56> 본 발명의 상기 항체들을 획득하는 방법은 예를 들면, 생쥐들 또는 토끼를 상기 프리온 폴리펩티드의 상기 C-말단 부위의 상기 아미노산들, 바람직하게는 하기의 시퀀스 즉,

<57>
$$\text{-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-}$$

<58> 를 갖는 펩티드의 면역화량으로 면역화시키는 단계를 포함한다.

<59> 보다 바람직하게, 상기 면역화 단계를 위하여 상기 프리온 폴리펩티드의 207번 위치의 Gln 잔기를 Glu로 치환하여 하기의 아미노산 시퀀스를 획득하는 것에 의해 상기한 시퀀스로부터 파생된 펩티드가 사용된다:

<60>
$$\text{-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-}$$

<61> 놀랍게도 이 시퀀스는 특히 PrP^{Sc}에 대한 항체를 쉽게 일으킬 수 있을 정도로 충분히 강한 면역 응답을 유발시키는 것으로 밝혀졌다. 어떠한 이론에 기초함이 없이, 상기 펩티드에 대해 획득된 상기한 놀라운 결과는 수소결합들을 형성할 수 있고, 또한 상기 펩티드의 불용성의 원인이 될 수 있는 원래의 Gln 잔기 내에 존재할 수 있으며, 이는 에피토프(epitope) 부분이 되는 경우는 바람직하지 않다. 한편, Gln이 소의 PrP의 1차 구조 내의 동일한 위치에 존재하는데 비해, 인간 PrP의 상기 시퀀스 내에 존재하는 Glu는 이러한 결합들을 형성하지 않는 것으로 여겨진다.

<62> 면역화를 위한 상기 펩티드들의 사용은 전체 프리온 폴리펩티드를 사용하는 경우와 같은, 이전에서 준비되었을 폐사된 생쥐들이 없다는 장점을 제공한다. 면역화를 위하여는, 바람직하게는 상기 펩티드와 담체의 결합이 사용되며, 여기에서 상기 펩티드는 그의 N-말단을 경유하여 상기 담체에 결합된다. 이러한 측정 결과는 명백하게 C-말단을 경유한 담체에의 상기 펩티드의 결합과 비교하여 보다 나은 면역 응답을 제공한다는 것으로 나타난다.

<63> 동물들을 상기 항원으로 면역화시킨 후, 비세포(spleenocyte)들을 분리시키고, 당해 기술분야에서 잘 알려진 방법들에 따라 골수종 세포(myeloma cell)들과 융합시켰다. 융합된 세포들의 선택은 HAT 배지(HAT medium) 등과 같이 융합되지 않은 세포들을 성장시키지 않는 적절한 배지를 사용하여 수행한다. 상기 선택 배지에서 성장하는 융합된 골수종 세포들은 상기한 면역화 단계에서 사용된 상기 펩티드에 결합할 수 있는 항체들의 생산을 위해 선별된다.

<64> 본 발명은 또한 본 발명의 상기 항체들을 생산할 수 있고, 또한 상기한 방법에 따라 획득할 수 있는 하이브리도마 세포주(hybridoma cell line)들에 관한 것이다. 상기 획득된 세포주들은 대략 8시간의 2배 증식시간을 갖는, 극히 빠르게 성장하는 것으로 밝혀졌다. 또한 통상의 하이브리도마 항체 분비에 비하여 항체들의 분비가 매우 높은 것으로 밝혀졌다. 바람직한 구체예에 따르면, 상기 하이브리도마는 부다페스트 조약에 따라 2000년 5월 10일자로 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소에 기탁된 CNCM I-2476이다.

<65> 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 하기의 아미노산 시퀀스들 즉,

<66>
$$\text{-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-}$$

<67> 또는

<68>
$$\text{-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-}$$

<69> 로 표시되고, 펩티드 시퀀스 또는 그 3가지 형태적 구조가 근본적으로 유지된다는 전제 하에, 하나 또는 그 이상의 아미노산들을 치환하거나 또는 생략하는 것에 의해 이들 시퀀스들로부터 파생된 펩티드들에 관한 것이다.

<70> 이들 펩티드들은 명백하게 상기 PrP^C 형태로부터가 아닌, 전적으로 상기 PrP^{Sc} 동형체에 의해 발현된 3차원 구조를 제공한다. 따라서, 앞서 언급한 바와 같이 이 펩티드는 인간 및 동물들의 면역화에 사용될 수 있으며, 상기 면역화된 개체는 상기 프리온 폴리펩티드의 "잘못 중첩된 형태"에 대한 면역 응답을 생산하고, 그리고 이를 자연적인 방법으로 개체의 몸체로부터 제거할 수 있도록 한다. 거기에 더해, 상기 폴리펩티드는 또한 상기 언급한 프리온 관련 질병들에 대한 약제들을 생산하는데 사용될 수 있다.

<71> 하기의 실시예들은 본 발명을 예증하는 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<72> 실시예 1

<73> 합성 펩티드의 제조

<74> 면역화를 위하여, 인간 PrP(인간 프리온 단백질)의 1차 구조로부터 13-아미노산 길이의 펩티드를 선택하였다.

상기 펩티드는 아미노산 202 내지 214인 상기 프리온 단백질의 C-말단 부분에 근접하게 위치한다. 상기 펩티드는 207에 위치하는 Gln을 Glu잔기로 교환하여 하기의 아미노산 시퀀스 즉,

<75> H-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-OH

<76> 로 변형시켰다.

<77> 통상적으로 상기 펩티드가 C-말단을 경유하여 상기 담체에 결합되기 때문에, 상기 펩티드는 그 N-말단 부분을 경유하여 상기 담체 단백질 KLH, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)에 결합되며, 이는 잠재적으로 면역유전성 펩티드(immunogenic peptide)들의 담체에의 결합의 신규한 특징을 나타낸다.

<78> 실시예 2

<79> 동물들의 면역화

<80> 생쥐 1마리당 프룬드 완전 부형제(Freund's complete adjuvant(CFA)(200 μ l/생쥐) 내의 0.2mg KLH-펩티드 결합물(실시예 1에 따라 제조된 것)의 피하 주사로 BAL B/c 생쥐들을 면역화시켰다. 14일 후, 생쥐 1마리당 프룬드 불완전 부형제(Freund's incomplete adjuvant(IFA)(200 μ l/생쥐) 내의 0.1mg KLH-펩티드(실시예 1에 따라 제조된 것)의 복강내 주사로 BAC B/c 생쥐들을 다시 면역화시켰다. 2주 후, 생쥐 1마리당 프룬드 불완전 부형제 내의 0.2mg KLH-펩티드의 복강내 주사로 한번 더 접종시켰다. 최종 접종 10일 후, 혈액을 미정맥으로부터 취하고, 그리고 상기 결합물에 대한 항체들의 존재를 간접 ELISA법으로 확인하였다. 플레이트들을 KLH, KLH-펩티드 및 유리 펩티드로 코팅하였다. 생쥐 항체들의 결합을 HRP와 결합된 염소의 항-생쥐 항체들로 검출하였다. 놀랍게도 모든 생쥐들의 면역 응답이 매우 높았다.

<81> 생리적 용액 내의 최종 촉진제(boost)를 정맥 내로 주사하였다(100 μ l내의 0.1mg/생쥐).

<82> 실시예 3

<83> 하이브리도마의 생산

<84> 상기 촉진제 주사 4일 후에 생쥐들을 살처분시키고, 그들의 비장을 적출해냈다. 비세포들을 단리시키고, 표준 기술(Liddel, J. E., Cryer, A., A Practical guide to monoclonal antibodies. John Wiley & Sons, New York, 1991)들에 따라 3분간 50% PEG를 사용하여 생쥐 골수종 세포 NS1으로 융합시켰다(10 : 4의 비율로). 세포들을 세척하고, 96-웰 마이크로타이터 플레이트(96-well microtiter plates) 내에서 13%의 FCS(미합중국 소재 HyClone사) 및 생쥐의 흥선세포의 피더층(feeder layer)으로 보충시킨 DMEM(영국 소재 Flow사 ; 이하에서는 단지 DMEM이라고 표시한다) 내에 재현탁시켰다. 그 다음날, HAT DMEM을 모든 웰들 내에 가하였다. 10 내지 14일 후, 상층액에 대해 특성의 항체들의 존재를 간접 ELISA법으로 시험하였다. 이를 위하여, 마이크로타이터 플레이트(덴마크 소재 Nunc사)들을 50mM 탄산염/중탄산염 완충용액 pH 9.6 중에서 -4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 5 μ g/ml 펩티드 또는 KLH-펩티드 결합물 또는 KLH 단독(스위스 소재 Bachem사)으로 코팅시켰다. 플레이트들을 PBS/Tween 20(미합중국 소재 Sigma사)로 3회 세척하고, 30분간 1% BSA(미합중국 소재 Sigma사)로 블로킹시켰다. PBS/Tween 20으로 세척하고 난 후, 상층액을 상기 웰들 내로 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양시켰다. 플레이트들을 PBS/Tween 20으로 3회 세척하고, HRP(미합중국 소재 Sigma사)로 결합시킨 염소의 항-생쥐 면역글로불린을 1% BSA 내에 1 : 5000으로 희석시켜 웰들 내에 가하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양시킨 후, 플레이트들을 PBS/Tween 20으로 세척하고, 서브스트레이트(substrate)를 상기 웰들 내로 가하였다 (ABTS/H₂O₂ ; 미합중국 소재 Sigma사). 플레이트들을 410nm에서 판독하였다. 총 용적은 50 μ l이었다.

<85> 하이브리도마들을 양성의 웰들로부터 보다 큰 용적 내의 HT DMEM 배지 내로 옮겼다. 특성의 항체들의 존재를 간접 ELISA법으로 다시 확인하고, 선택된 세포주들을 조직 배양 플라스크 내의 DMEM 내로 옮겼다. 마지막으로, 선택된 하이브리도마들을 제한희석법(limiting dilution method)으로 2회 복제시키고, 액체 질소 내에서 냉동시켰다.

<86> 상기 선택된 세포주들은 DMEM 내에서 즉, HT를 필요로 하지 않고, 약 8시간의 2배 증식시간으로 극히 빠르게 성장하였다. 또한, 항체들의 분비는 매우 높은 것으로 나타났다. 수득된 복제물들 중의 하나는 파스퇴르 연구소(Pasteur Institute)에 기탁되었으며, CNCM I-2476의 수탁번호를 부여받았다.

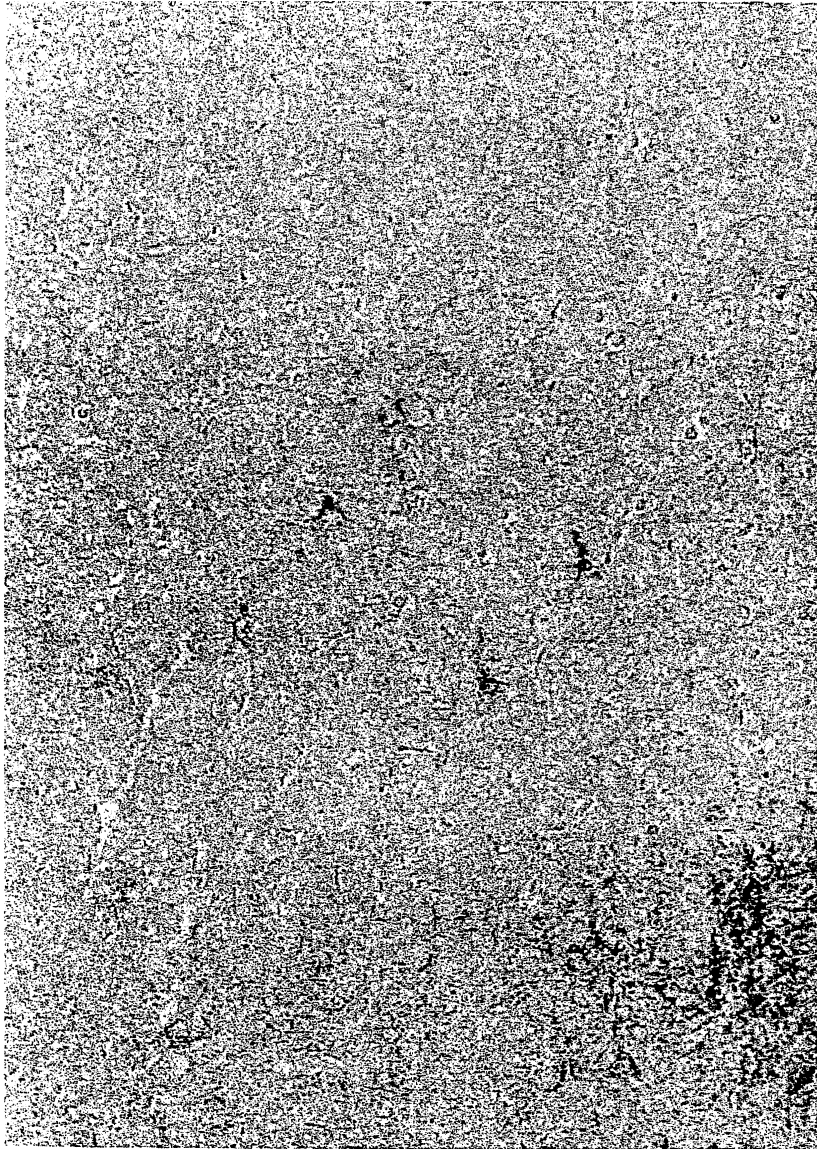
<87> 실시예 4

<88> 항체들의 시험

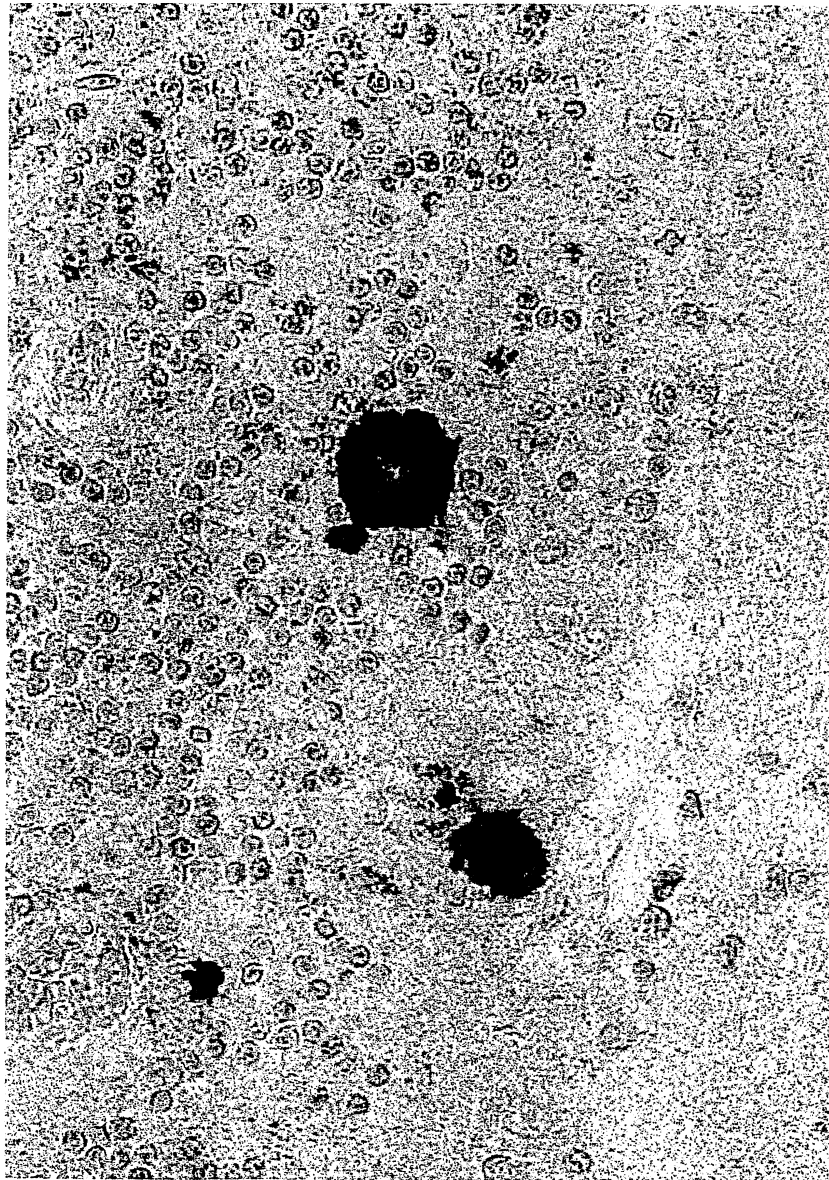
- <89> 모노클로날 항체들의 PrP와의 반응성을 상기 저장된 복제물들의 상층액을 사용하여 시험하였다. 상기 모노클로날 항체들을 면역이력화학법에 의해 CJD환자들, vCJD환자들로부터 수득한 뇌조직 및 BSE 양성 소 및 진전병에 감염된 양의 뇌들에 대해 시험하였다. 정상의 인간, 소 및 양의 뇌들을 대조군으로 사용하였다. 또한 웨스턴 블롯법 및 돛트 블롯법에 의해 선별작업을 수행하였다.
- <90> 이력화학법을 위한 샘플의 준비:
- <91> 서로 다른 원천(인간, 소 및 염소)들로부터 수득한 뇌조직들의 파라핀 절편들을 표준 기술(machine: Ventana)에 따라 준비하였으며, 여기에서 6 내지 8µm의 두께의 절편들을 수득하였다. 상기 샘플들을 포름산(HCOOH)으로 처리하거나(도 1, 도 5 및 도 6) 또는 전혀 처리하지 않았다(도 2 내지 도 4). 계속해서, 미합중국 소재 Ventana 사에 의해 제공된 키트를 사용하여 내인성 퍼옥시다아제를 블로킹시키고, 상기 항체들을 4µg/ml의 농도에서 적용시키고, 다코 에스-2022(Dako S-2022 ; 미합중국 소재 Dako사)로 희석시키고, 그리고 42°C에서 20분간 배양시켰다.
- <92> 계속해서, 비오틴화된(biotinylated) 염소의 항-생쥐+토끼 항체(미합중국 소재 Ventana사)를 가하고, 42°C에서 20분간 배양시키고, 그 후에 스트렙타비딘 HRP(Ventana)와 함께 42°C에서 20분간, 구리 및 다브(DAB ; 디아미노벤지딘)과 함께 4분간 배양시켰다.
- <93> 결과들:
- <94> 면역이력화학 반응들의 패턴은 mAb CNCM I-2476이 서로 다른 종들(인간, 소, 양)의 공지된 모든 TSE 형태들과 반응하고, 그리고 단지 병리학적 단백질과 반응한다는 것을 나타낸다. 건강한 개체들 및 알츠하이머 질병을 앓고 있는 환자들의 뇌조직에 대해서는 반응이 없었다.
- <95> 뇌 균질화물의 제조:
- <96> 뇌조직(시상 또는 골수 또는 척수)을 10% 슈크로스, 20mM HEPES pH 7.5, 2% 사르코실(sarcosyl) 및 5mM EDTA 중에서 호모게나이저(Potter사)로 균질화시켰다(5회, 1ml 중의 0.1g). 균질화물을 4°C, 14000rpm에서 45분간 원심분리시켰다. 상층액을 -20°C로 냉동시킨 한편 펠릿은 1M NaOH 내에 용해시켰다. 샘플들 중의 단백질 농도는 280 및 260nm에서의 흡수율 측정에 의해 결정하였다.
- <97> 돛트 블롯법:
- <98> 10배 희석한 상층액 또는 펠릿을 샘플들로 사용하였다. 이들을 원래대로 또는 프로테아제 케이(proteinase K)로 소화시켜서 사용하였다(10µg/ml 및 100µg/ml). 25mM 트리스(Tris), 0.32M 글리신, 0.16% SDS(w/v) pH 8.3과 함께 바이오 라드 셀(Bio Rad cell) 내에서 전기영동을 수행하였다. 영동은 25mM 트리스, 192mM 글리신, 20% 메탄올(v/v), pH 8.3으로 0.2mm PVDF 멤브레인 상에서 수행하였다. 영동은 100V에서 50분간 실시하였다. 계속해서, 상기 멤브레인을 5% 우유로 블로킹시키고, 1% 우유 내에서 모노클로날 항체(CNCM I-2476 40µg/ml에 대하여)와 함께 1 내지 2시간 동안 완만하게 교반시키면서 배양시켰다. 상기 멤브레인의 세척 후, 이를 1% 우유 내에서 1 : 5000으로 희석된, HRP(염소의 항-생쥐 항체 ; 미합중국 소재 Sigma사)와 결합시킨 2차 항체들과 함께 1 내지 2시간 동안 완만하게 교반시키면서 배양시켰다. 멤브레인들을 세척하고, 그리고 화학발광 키트(미합중국 소재 Amersham사, ECL)를 사용하여 면역 응답을 검출하였다.
- <99> 결과들:
- <100> 정상의 뇌 샘플들의 항체 V5B2(CNCM I-2476)과의 반응은 일어나지 않았다. 양성 대조군들로서 KLH-펩티드가 사용되었다.
- <101> 본 발명에 따라 제공된 상기 모노클로날 항체들은 PrP^{Sc}에 대해 높은 특이성을 나타낸다. 인지를 위하여서는, 선별작업에 앞서 PrP^C의 프로테아제 케이 소화의 사용은 필요치 않다. 동일한 조건들 하에서 정상의 뇌조직들과 상기 mAb 사이에서의 반응은 없었으며, 이는 상기 생산된 항체들이 PrP^{Sc}에 매우 특이적이고, 배타적으로 인지한다는 것을 나타낸다.
- 산업상 이용 가능성**
- <102> 따라서, 본 발명에 따르면 수의사 및/또는 의사들이 특히 BSE, CJD, vCJD 및/또는 TSE 관련 질병들을 일으키는 전염체들의 존재를 감지할 수 있는 수단을 제공하는 항체들을 제공하는 효과가 있다.

도면

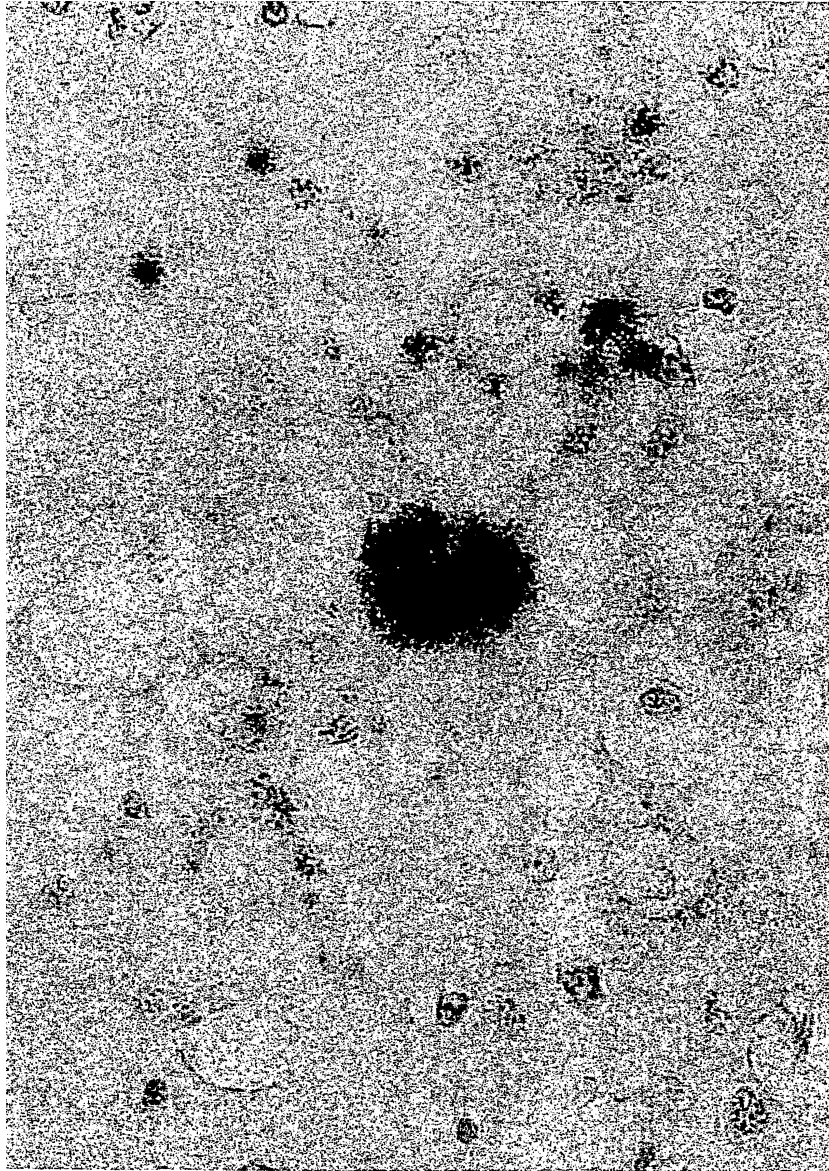
도면1



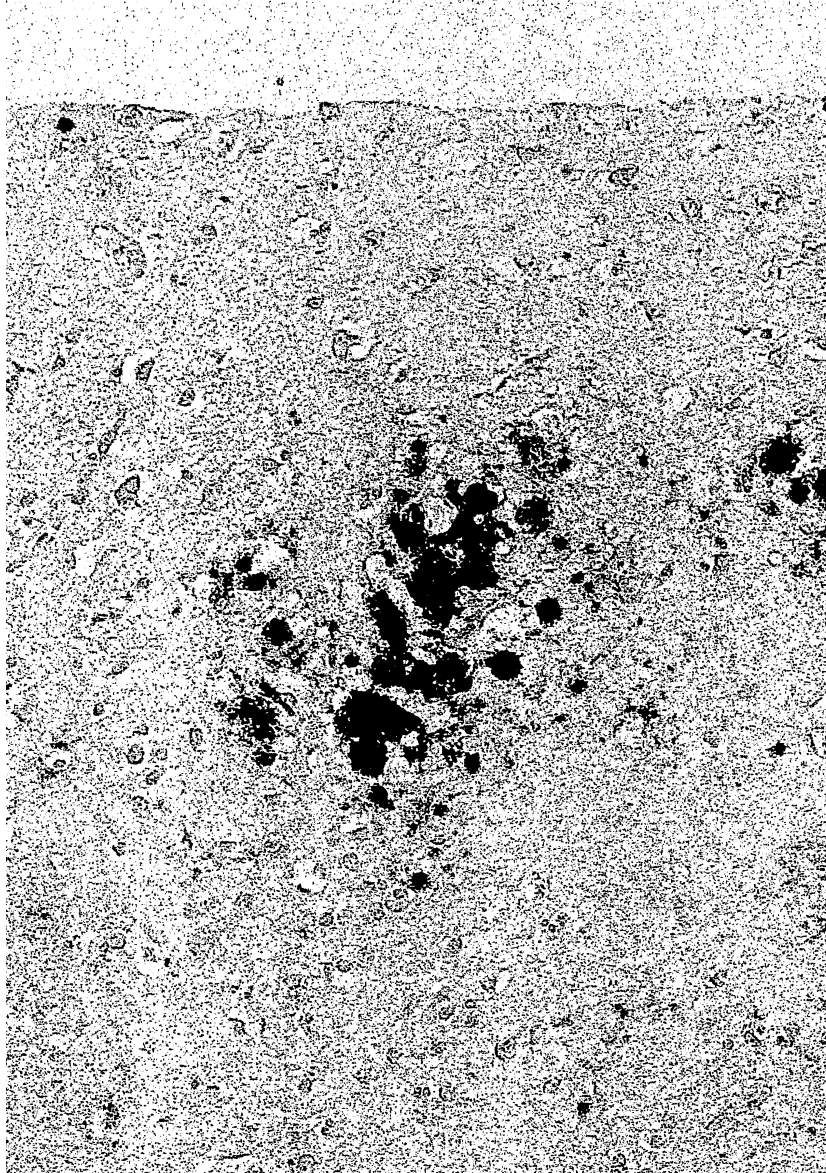
도면2



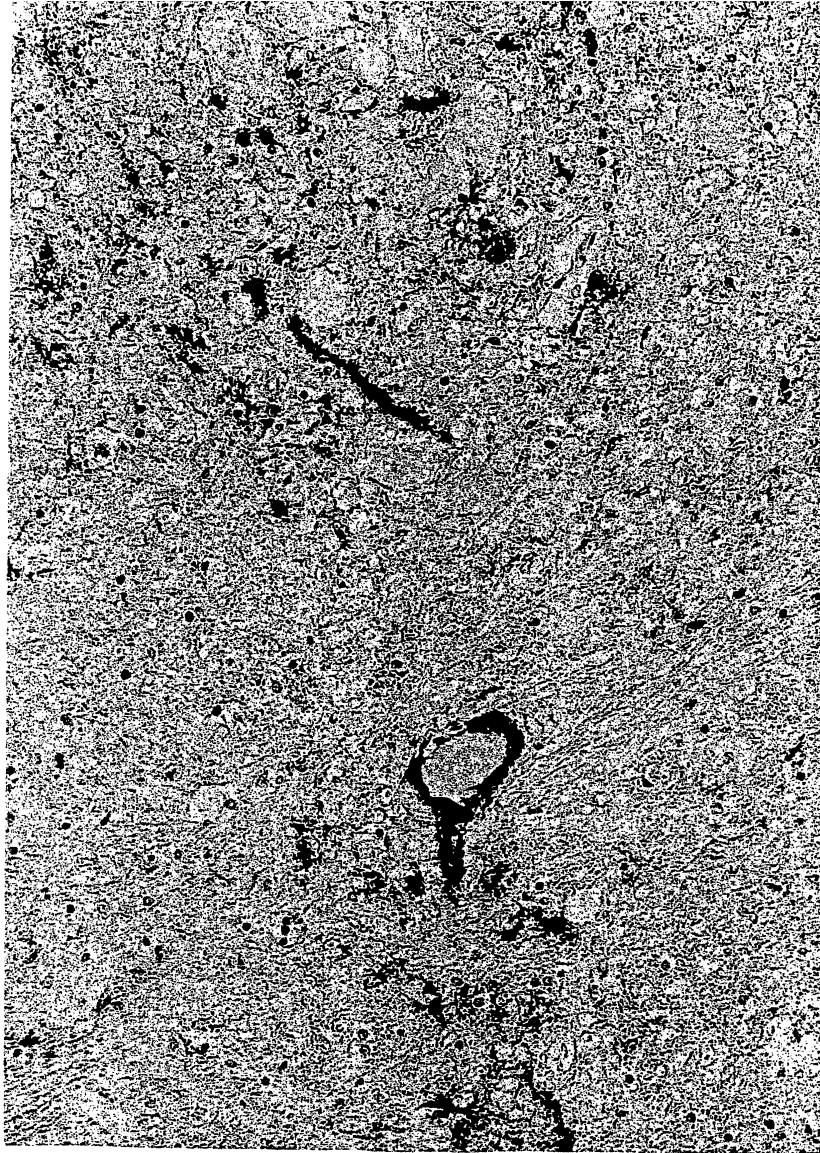
도면3



도면4



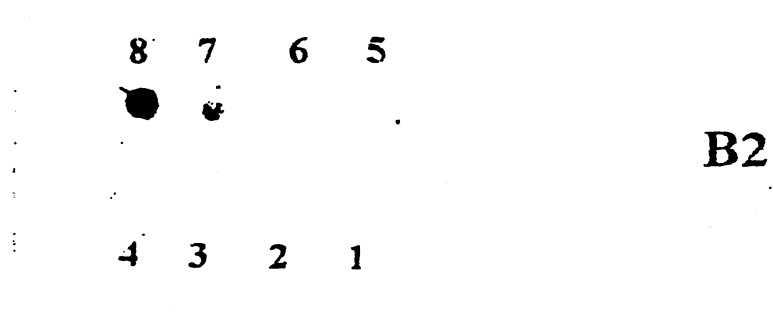
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> BLOOD TRANSFUSION CENTRE OF SLOVENIA

<120> Antibodies capable to selectively detect prion PrPSc isoforms

<150> EP 00111108.7

<151> 2000-05-23

<160> 3

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu
 1 5 10 15 Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln
 Tyr Gln Arg Glu Ser Gln
 20 25
 30

Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser
 35 40

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 2

Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 3

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr
 1 5 10