

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2022-0029653
(43) 공개일자 2022년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7000512

(22) 출원일자(국제) 2020년06월25일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년01월06일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/067890

(87) 국제공개번호 WO 2020/260491
국제공개일자 2020년12월30일

(30) 우선권주장
19183405.0 2019년06월28일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
바이오약탁 에이비
스웨덴 스톡홀름 112 51 왈프빈게스 벡 35

(72) 발명자
살린, 샬롯
스웨덴, 스톡홀름 에스이-0112 51, 왈프빈게스 벡 35, 씨/오 바이오약탁 에이비

펠팅, 조안나
스웨덴, 스톡홀름 에스이-0112 51, 왈프빈게스 벡 35, 씨/오 바이오약탁 에이비
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 12 KDA의 APOE 아미노-말단 단편에 대항하여 유도된 항체**(57) 요약**

본 개시는 아포지질단백질 E의 C-말단 단편의 네오-에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 생산하는 방법, 및 이의 치료 및 진단 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/30 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

(72) 발명자

에릭손, 마리아

스웨덴, 스톡홀름 에스이-0112 51, 왈프빈게스 벡
35, 씨/오 바이오약터 에이비

필러, 크리스터

스웨덴, 스톡홀름 에스이-0112 51, 왈프빈게스 벡
35, 씨/오 바이오약터 에이비

명세서

청구범위

청구항 1

아포지질단백질 E(apolipoprotein E; ApoE)의 단편에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위로서, 단편은

- SDS-PAGE에 의해 측정하는 경우 12 kDa의 겔보기 분자량, 및
- 아미노산 L198, A199 및 G200으로 이루어진 균으로부터 선택된 전장 아포지질단백질 E 내 아미노산에 상응하는 N-말단을 갖고; 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 2

제1항에 있어서, ApoE 단편에 선택적으로 결합하고, 전장 아포지질단백질 E에 결합하지 않는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 단편은

- i) SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 단편; 및
- ii) SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3 중 어느 하나에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 단편으로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는

- (i) 전장 ApoE 내 200 번 내지 205 번 아미노산 잔기(GQPLQE);
- (ii) 전장 ApoE 내 199 번 내지 204 번 아미노산 잔기(AGQPLQ);
- (iii) 전장 ApoE 내 199 번 내지 205 번 아미노산 잔기(AGQPLQE);
- (iv) 전장 ApoE 내 198 번 내지 203 번 아미노산 잔기(LAQQPL);
- (v) 전장 ApoE 내 198 번 내지 204 번 아미노산 잔기(LAQQPLQ); 및
- (vi) 전장 ApoE 내 198 번 내지 205 번 아미노산 잔기(LAQQPLQE)로부터 선택된 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 단편은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 선택적으로 에피토프는 전장 아포지질단백질 E 내 200 번 내지 205 번 아미노산 잔기를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 6

항체 또는 이의 항원 결합 부위를 생산하는 방법으로서, LAQQPL(SEQ ID NO: 4), AGQPLQ(SEQ ID NO: 5), GQPLQE(SEQ ID NO: 6), LAQQPLQ(SEQ ID NO: 7), AGQPLQE(SEQ ID NO: 8) 및 LAQQPLQE(SEQ ID NO: 9)로 이루어진 균으로부터 선택된 N-말단 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 면역원으로 숙주 포유동물을 면역화시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 N-말단 아미노산 서열은 GQPLQE(SEQ ID NO: 6)인, 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 따른 방법에 의해 수득 가능한, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 9

제1항 내지 제5항 또는 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열 (CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로

- SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 및 SEQ ID NO: 21로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H1;
- SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 22로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 및 SEQ ID NO: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 10

제1항 내지 제5항, 제8항 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로

- SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 및 SEQ ID NO: 32로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- SEQ ID NO: 25인 CDR-L2; 및
- SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 및 SEQ ID NO: 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 11

제1항 내지 제5항 및 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는

- i) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 및 SEQ ID NO: 43으로 이루어진 군; 및
- ii) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 및 SEQ ID NO: 43 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 12

제1항 내지 제5항 및 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는

- i) SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, 및 SEQ ID NO: 44로 이루어진 군; 및
- ii) SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, 및 SEQ ID NO: 44 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 13

제1항 내지 제5항 또는 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열 (CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로

- SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62 및 SEQ ID NO: 65로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 및 SEQ ID NO: 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, 및 SEQ ID NO: 69로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터

터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 14

제1항 내지 제5항, 제8항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로

- SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79 및 SEQ ID NO: 80으로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- SEQ ID NO: 72 및 SEQ ID NO: 77로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L2; 및
- SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 78 및 SEQ ID NO: 81로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 15

제1항 내지 제5항, 제8항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는

- i) SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, 및 SEQ ID NO: 90으로 이루어진 군; 및
- ii) SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, 및 SEQ ID NO: 90 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 16

제1항 내지 제5항, 제8항 및 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는

- i) SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 91로 이루어진 군; 및
- ii) SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 91 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 17

제1항 내지 제5항 또는 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로

- SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 94 및 SEQ ID NO: 97로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 95 및 SEQ ID NO: 98로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96 및 SEQ ID NO: 99로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 18

제1항 내지 제5항, 제8항 및 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로

- SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 및 SEQ ID NO: 108로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 104 및 SEQ ID NO: 106으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L2; 및
- SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 102 및 SEQ ID NO: 107로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 19

제1항 내지 제5항, 제8항, 제17항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는

- i) SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113 및 SEQ ID NO: 115로 이루어진 군; 및
- ii) SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113 및 SEQ ID NO: 115 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 20

제1항 내지 제5항, 제8항 및 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는

- i) SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 및 SEQ ID NO: 116으로 이루어진 군; 및
- ii) SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 및 SEQ ID NO: 116 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

청구항 21

제1항 내지 제5항 및 제8항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 22

치료법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 및 제8항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 제21항에 따른 약학적 조성물.

청구항 23

대상체에서 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 장애를 감지하거나 진단하는 방법으로서, 제1항 내지 제5항 및 제8항 및 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위와 대상체로부터 수득된 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아포지질단백질 E(apolipoprotein E)의 C-말단 단편의 네오-에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 생산하는 방법, 및 이의 치료 및 진단 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)은 보다 흔한 후기 발병 형태(late-onset form)와 조기 발병 가족 형태(early-onset familial form)로 존재하는 진행성 신경퇴행성 치매 장애이다. AD는 기억 및 인지 기능의 점진적 상실을 특징으로 한다. 현재, AD 치료는 증상 관리로 한정되며, AD 환자의 경우 예후가 좋지 않다. 전 세계적으로 약 1,800만 명의 사람들이 현재 AD를 앓고 있는 것으로 추정되며, 인구 고령화로 인해 AD를 앓는 사람의 수는 증가할 것으로 예상된다. AD의 유병률은 65 세 인구의 10%에서부터 85 세 이상 인구의 50%까지, 60 세부터 약 5 년마다 두 배로 증가한다(Solomon, Expert Opin. Investig. Drugs (2007) 16(6): 819-828).

[0003] 후기 발병 AD에 대한 알려진 유전적 위험 요인이 APOE ε4 대립유전자이기 는 하지만, 질병에서 이의 정확한 역할은 여전히 불분명하다. APOE 유전자는 뇌에서 고수준으로 발견되는 35 kDa의 당단백질인 아포지질단백질 E(ApoE)를 인코딩한다. ApoE는 ApoE2, ApoE3 및 ApoE4의 세 가지 상이한 아이소타입으로 존재하며, 이 중 ApoE3가 가장 흔하고, ApoE2는 AD의 위험을 감소시키는 것으로 밝혀졌고, ApoE4는 이를 증가시킨다. ApoE가 어떻게 AD의 발병 및 진행에 원인이 되는 지 분명하지 않지만, 여러 연구에서 단백질은 인간의 뇌에서 단편화를 거치는 것으로 밝혀졌다. ApoE 단편의 특정 기능 및 AD와의 이들의 가능한 연관성은 Muñoz 등에 의해 문헌 [Neurochem Res (2019) 44(6): 1297-1305]에서 검토된 바 있다. ApoE 단편의 신경독성과 관련하여, Muñoz

등은, 기존 연구로 밝혀진 바에 따라, ApoE의 N-말단 LDL-결합 도메인과 C-말단 지질-결합 도메인 둘 모두가 신경독성 효과에 필요하다는 결론을 내렸다(예를 들어, 1300 쪽 4 줄 내지 8 줄 참조). C-말단의 지질-결합 도메인으로부터의 ApoE 단편과 관련하여, Muñoz 등의 문헌에서 표 2 및 도 2는 이러한 하나의 단편이 이전에 연구되었으며 아밀로이드 베타(Aβ) 펩티드의 육량체에 대하여 안정화 효과를 갖는 것으로 나타났다는 것을 지시한다. 논의된 연구는 Wellnitz 등에 의한 문헌[J Neurochem (2005) 94: 1351-1360]에 보고되었으며, ApoE의 187번 아미노산 위치에서 N-말단으로 시작하여 ApoE의 13 kDa 단편이 개시되어 있다. 이러한 단편에 특이적인 항체는 개시되어 있지 않지만, 이는 3H1로 지정된 항체를 사용하여 연구되었다. 항체 3H1은 243번 내지 273번 아미노산 잔기에 의해 형성된 ApoE의 C-말단 부분에서 에피토프에 결합하는 것으로 개시되어 있다.

[0004] Mahley 및 Huang에 의한 문헌[Neuron (2012) 76: 871-885]의 이전 검토에서는 ApoE 단편의 신경독성에 관한 유사한 결론에 도달했다. 이 논문은 주로 특정 아이소타입 ApoE4의 단편의 잠재적인 신경독성에 초점을 맞추고 있다. 여기에는 12 kDa의 ApoE4 단편이 생성된다는 것이 나타나 있지만(예를 들어, 도 6 참조), 신경독성 ApoE 단편은 LDL 수용체 결합 영역(aa 136번 내지 150번)과 지질 결합 영역(aa 240번 내지 270번) 둘 모두를 포함한다는 결론이 도출된다(예를 들어, 도 7 및 876 쪽, 우측 열, 13행 내지 21행 참조). Mahley 및 Huang은 검토된 ApoE4 단편에 특이적인 임의의 항체를 개시하지 않았다.

[0005] 마지막으로, Mouchard 등에 의한 문헌[Sci. Rep. (2019) 9(1): 3989]에서의 연구는 ApoE의 단편과 상이한 크기의 아밀로이드 베타(Aβ) 펩티드 사이의 연관성을 조사하였다. 12 kDa의 ApoE 단편이 식별되었지만, Aβ와 상호작용하지 않는 것으로 밝혀졌다. Mouchard 등의 연구에 사용된 항체는 보충 표 2에 열거되어 있으며, 12 kDa ApoE 단편에 특이적인 어떠한 항체도 포함하지 않는다.

[0006] 알츠하이머병을 감지하고 치료하기 위한 신규한 치료 및/또는 진단 도구가 당분야에 여전히 필요하다. 또한, 신경퇴행성 질병의 발병 및 진행에 있어서 ApoE 단편의 역할을 추가로 설명하고 특성화할 필요가 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 아포지질단백질 E(ApoE)에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 부위에 관한 것이다. 본원에 보고된 바와 같이, 본 발명의 항체 및 항원 결합 부위는 ApoE의 C-말단 단편 내에 존재하는 네오-에피토프에 결합한다.

[0008] 따라서, 첫 번째 양태에서, 본 발명은 아포지질단백질 E(ApoE)의 단편에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위로서, 단편은

[0009] - SDS-PAGE에 의해 측정하는 경우 12 kDa의 겔보기 분자량, 및

[0010] - 아미노산 L198, A199 및 G200으로 이루어진 균으로부터 선택된 전장 아포지질단백질 E 내 아미노산에 상응하는 N-말단을 갖고; 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 제공한다. 소정의 구현예에서, ApoE 단편은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 또는 SEQ ID NO: 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0011] 추가의 양태에서, 본 발명은 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 생산하는 방법으로서, LAGQPL(SEQ ID NO: 4), AGQPLQ(SEQ ID NO: 5), GQPLQE(SEQ ID NO: 6), LAGQPLQ(SEQ ID NO: 7), AGQPLQE(SEQ ID NO: 8) 및 LAGQPLQE(SEQ ID NO: 9)로 이루어진 균으로부터 선택된 N-말단 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 면역원으로 숙주 포유동물을 면역화시키는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다. 상기 방법에 의해 수득 가능한 항체 및 이의 항원 결합 부위는 본 발명의 세 번째 양태에 의해 포괄된다.

[0012] 또 다른 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 추가의 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 치료 방법에 사용하기 위한 또는 감지 또는 진단 방법에 사용하기 위한 항체, 이의 항원 결합 부위 및/또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 추가로 하기 예시적인 구현예를 참조하여 이해될 수 있다.

[0015] 1. 아포지질단백질 E(ApoE)의 단편에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위로서, 단편은

[0016] - SDS-PAGE에 의해 측정하는 경우 12 kDa의 겔보기 분자량, 및

[0017] - 아미노산 L198, A199 및 G200으로 이루어진 균으로부터 선택된 전장 아포지질단백질 E 내 아미노산에 상응하는 N-말단을 갖고; 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는

는 이의 항원 결합 부위.

- [0018] 2. (1)에 있어서, ApoE 단편에 선택적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0019] 3. (1) 또는 (2)에 있어서, 전장 아포지질단백질 E에 결합하지 않는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0020] 4. (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은 전장 아포지질단백질 E 내 아미노산 G200에 상응하는 N-말단을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0021] 5. (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은 전장 아포지질단백질 E 내 아미노산 A199에 상응하는 N-말단을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0022] 6. (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은 전장 아포지질단백질 E 내 아미노산 L198에 상응하는 N-말단을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0023] 7. (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 있어서, 전장 아포지질단백질 E 내 200 번 내지 250 번 아미노산 잔기(GQPLQ E)를 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0024] 8. (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은
- [0025] i) SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 단편; 및
- [0026] ii) SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3 중 어느 하나에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 단편으로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0027] 9. (8)에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 및 SEQ ID NO: 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 단편으로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0028] 10. (8)에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 이루어지는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0029] 11. (8)에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열로 이루어지는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0030] 12. (11)에 있어서, 전장 아포지질단백질 E 내 199 번 내지 204 번 아미노산 잔기(AGQPLQ) 또는 전장 아포지질단백질 E 내 199 번 내지 205 번 아미노산 잔기(AGQPLQE) 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0031] 13. (8)에 있어서, 아포지질단백질 E의 단편은 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열로 이루어지는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0032] 14. (13)에 있어서,
- [0033] - 전장 아포지질단백질 E 내 198 번 내지 203 번 아미노산 잔기(LAQQL);
- [0034] - 전장 아포지질단백질 E 내 198 번 내지 204 번 아미노산 잔기(LAQQLQ); 또는
- [0035] - 전장 아포지질단백질 E 내 198 번 내지 205 번 아미노산 잔기(LAQQLQE)를 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0036] 15. 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 생산하는 방법으로서, LAQQL(SEQ ID NO: 4), AGQPLQ(SEQ ID NO: 5), GQPLQE(SEQ ID NO: 6), LAQQLQ(SEQ ID NO: 7), AGQPLQE(SEQ ID NO: 8) 및 LAQQLQE(SEQ ID NO: 9)로 이루어진 군으로부터 선택된 N-말단 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 면역원으로 적합한 숙주 포유동물을 면역화시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0037] 16. (15)에 있어서, 상기 N-말단 아미노산 서열은 GQPLQE(SEQ ID NO: 6)인, 방법.
- [0038] 17. (15)에 있어서, 상기 N-말단 아미노산 서열은 LAQQL(SEQ ID NO: 4), LAQQLQ(SEQ ID NO: 7) 및 LAQQLQE(SEQ ID NO: 9)로부터 선택되는, 방법.
- [0039] 18. (15)에 있어서, 상기 N-말단 아미노산 서열은 AGQPLQ(SEQ ID NO: 5) 및 AGQPLQE(SEQ ID NO: 8)로부터 선택되는, 방법.
- [0040] 19. (15) 내지 (18) 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 수득 가능한, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

- [0041] 20. (1) 내지 (14) 또는 (19) 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로
- [0042] - SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 및 SEQ ID NO: 21로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H1;
- [0043] - SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 22로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0044] - SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 및 SEQ ID NO: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0045] 21. (1) 내지 (14), (19) 또는 (20) 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로
- [0046] - SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 및 SEQ ID NO: 32로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0047] - SEQ ID NO: 25인 CDR-L2; 및
- [0048] - SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 및 SEQ ID NO: 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0049] 22. 아포지질단백질 E(ApoE)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위로서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로
- [0050] - SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 및 SEQ ID NO: 21로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H1;
- [0051] - SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 22로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0052] - SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 및 SEQ ID NO: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0053] 23. (22)에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 추가로 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로
- [0054] - SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 및 SEQ ID NO: 32로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0055] - SEQ ID NO: 25인 CDR-L2; 및
- [0056] - SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 및 SEQ ID NO: 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0057] 24. (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0058] SEQ ID NO: 10(SYAMS)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0059] SEQ ID NO: 11(EISGSGSRDHYTDSVTG)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0060] SEQ ID NO: 12(QLTGTDYGYTDY)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0061] SEQ ID NO: 24(RSSQSIIVYSNGNTYLE)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0062] SEQ ID NO: 25(KVSNRFS)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0063] SEQ ID NO: 26(FQGSHPYTY)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0064] 25. (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0065] SEQ ID NO: 10(SYAMS)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0066] SEQ ID NO: 13(EISSGGGSTINYLDIVTG)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;

- [0067] SEQ ID NO: 14(QLVGTIDYGTIDY)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0068] SEQ ID NO: 27(RSSQNVIVSNGNTYLE)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0069] SEQ ID NO: 25(KVSNRFS)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0070] SEQ ID NO: 28(FQGSHPVPT)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0071] 26. (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0072] SEQ ID NO: 15(SFAMS)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0073] SEQ ID NO: 16(EISRGGGYAFYSDTVGTG)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0074] SEQ ID NO: 17(QLTGTIDYAMDY)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0075] SEQ ID NO: 29(RSSQSIVYTINGNTYLE)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0076] SEQ ID NO: 25(KVSNRFS)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0077] SEQ ID NO: 30(FQGSQVPYT)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0078] 27. (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0079] SEQ ID NO: 18(RYAMS)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0080] SEQ ID NO: 19(EINSGGSYSFYSDTVGTG)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0081] SEQ ID NO: 12(QLTGTIDYGTIDY)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0082] SEQ ID NO: 31(RSSQSLLYSNGNTYLE)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0083] SEQ ID NO: 25(KVSNRFS)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0084] SEQ ID NO: 28(FQGSHPVPT)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0085] 28. (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0086] SEQ ID NO: 18(RYAMS)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0087] SEQ ID NO: 19(EINSGGSYSFYSDTVGTG)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0088] SEQ ID NO: 20(QLSGTDYGTIDY)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0089] SEQ ID NO: 31(RSSQSLLYSNGNTYLE)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0090] SEQ ID NO: 25(KVSNRFS)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0091] SEQ ID NO: 28(FQGSHPVPT)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0092] 29. (20) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0093] SEQ ID NO: 21(NYAMH)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0094] SEQ ID NO: 22(WINTYTGEPTFADDFKG)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0095] SEQ ID NO: 23(EGYDRSHYFDY)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0096] SEQ ID NO: 32(RSSLSLVHGDGNTYLE)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0097] SEQ ID NO: 25(KVSNRFS)를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0098] SEQ ID NO: 33(LQGSHPFT)을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0099] 30. (1) 내지 (14) 및 (19) 내지 (23) 중 어느 하나에 있어서,
- [0100] i) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 및 SEQ ID NO: 43으로 이루어진 군; 및
- [0101] ii) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 및 SEQ ID NO: 43 중 어느

하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.

- [0102] 31. (1) 내지 (14), (19) 내지 (23) 또는 (30) 중 어느 하나에 있어서,
- [0103] i) SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, 및 SEQ ID NO: 44로 이루어진 군; 및
- [0104] ii) SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, 및 SEQ ID NO: 44 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0105] 32. (30) 또는 (31)에 있어서,
- [0106] (i) SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0107] (ii) SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0108] (iii) SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0109] (iv) SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0110] (v) SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인; 및
- [0111] (vi) SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 도메인(VH) 및 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0112] 33. (32)에 있어서,
- [0113] (i) SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0114] (ii) SEQ ID NO: 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 37의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0115] (iii) SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0116] (iv) SEQ ID NO: 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0117] (v) SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 41의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인; 및
- [0118] (vi) SEQ ID NO: 43의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 도메인(VH) 및 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0119] 34. (1) 내지 (14) 또는 (19) 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-

H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로

- [0120] - SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62 및 SEQ ID NO: 65로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- [0121] - SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 및 SEQ ID NO: 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0122] - SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, 및 SEQ ID NO: 69로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0123] 35. (1) 내지 (14), (19) 또는 (34) 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로
- [0124] - SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79 및 SEQ ID NO: 80으로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0125] - SEQ ID NO: 72 및 SEQ ID NO: 77로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L2; 및
- [0126] - SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 78 및 SEQ ID NO: 81로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0127] 36. 아포지질단백질 E(ApoE)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위로서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로
- [0128] - SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62 및 SEQ ID NO: 65로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- [0129] - SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 및 SEQ ID NO: 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0130] - SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, 및 SEQ ID NO: 69로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0131] 37. (36)에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 추가로 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로
- [0132] - SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79 및 SEQ ID NO: 80으로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0133] - SEQ ID NO: 72 및 SEQ ID NO: 77로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L2; 및
- [0134] - SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 78 및 SEQ ID NO: 81로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0135] 38. (34) 내지 (37) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0136] SEQ ID NO: 59를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0137] SEQ ID NO: 60을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0138] SEQ ID NO: 61을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0139] SEQ ID NO: 71을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0140] SEQ ID NO: 72를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0141] SEQ ID NO: 73을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0142] 39. (34) 내지 (37) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0143] SEQ ID NO: 62를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0144] SEQ ID NO: 63을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0145] SEQ ID NO: 64를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;

- [0146] SEQ ID NO: 74를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0147] SEQ ID NO: 72를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0148] SEQ ID NO: 75를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0149] 40. (34) 내지 (37) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0150] SEQ ID NO: 65를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0151] SEQ ID NO: 66을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0152] SEQ ID NO: 67을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0153] SEQ ID NO: 76을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0154] SEQ ID NO: 77을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0155] SEQ ID NO: 78을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0156] 41. (34) 내지 (37) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0157] SEQ ID NO: 62를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0158] SEQ ID NO: 68을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0159] SEQ ID NO: 69를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0160] SEQ ID NO: 79를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0161] SEQ ID NO: 72를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0162] SEQ ID NO: 78을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0163] 42. (34) 내지 (37) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0164] SEQ ID NO: 62를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0165] SEQ ID NO: 70을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0166] SEQ ID NO: 67을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0167] SEQ ID NO: 80을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0168] SEQ ID NO: 77을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0169] SEQ ID NO: 81을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0170] 43. (1) 내지 (14), (19) 및 (34) 내지 (37) 중 어느 하나에 있어서,
- [0171] i) SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, 및 SEQ ID NO: 90으로 이루어진 군; 및
- [0172] ii) SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, 및 SEQ ID NO: 90 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0173] 44. (1) 내지 (14), (19), (34) 내지 (37) 및 (43) 중 어느 하나에 있어서,
- [0174] i) SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 91로 이루어진 군; 및
- [0175] ii) SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 91 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0176] 45. (43) 또는 (44)에 있어서,
- [0177] (i) SEQ ID NO: 82의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 83의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도

80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;

- [0178] (ii) SEQ ID NO: 84의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 85의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0179] (iii) SEQ ID NO: 86의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0180] (iv) SEQ ID NO: 88의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 89의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인; 및
- [0181] (v) SEQ ID NO: 90의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인으로 이루어진 균으로부터 선택된 가변 중쇄 도메인(VH) 및 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0182] 46. (45)에 있어서,
- [0183] (i) SEQ ID NO: 82의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 83의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0184] (ii) SEQ ID NO: 84의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 85의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0185] (iii) SEQ ID NO: 86의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0186] (iv) SEQ ID NO: 88의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 89의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인; 및
- [0187] (v) SEQ ID NO: 90의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인으로 이루어진 균으로부터 선택된 가변 중쇄 도메인(VH) 및 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0188] 47. (1) 내지 (14) 또는 (19) 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR 서열은 독립적으로
- [0189] - SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 94 및 SEQ ID NO: 97로 이루어진 균으로 선택된 CDR-H1;
- [0190] - SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 95 및 SEQ ID NO: 98로 이루어진 균으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0191] - SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96 및 SEQ ID NO: 99로 이루어진 균으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0192] 48. (1) 내지 (14), (19) 또는 (47) 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로
- [0193] - SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 및 SEQ ID NO: 108로 이루어진 균으로부터 선택된 CDR-L1;
- [0194] - SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 104 및 SEQ ID NO: 106으로 이루어진 균으로부터 선택된 CDR-L2;
- [0195] - SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 102 및 SEQ ID NO: 107로 이루어진 균으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0196] 49. 아포지질단백질 E(ApoE)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위로서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 포함하는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하고, 세 개의 VH CDR

서열은 독립적으로

- [0197] - SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 94 및 SEQ ID NO: 97로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- [0198] - SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 95 및 SEQ ID NO: 98로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0199] - SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96 및 SEQ ID NO: 99로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0200] 50. (49)에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR 서열(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함하는 가변 경쇄 도메인(VL)을 추가로 포함하고, 세 개의 VL CDR 서열은 독립적으로
- [0201] - SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 및 SEQ ID NO: 108로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0202] - SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 104 및 SEQ ID NO: 106으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L2; 및
- [0203] - SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 102 및 SEQ ID NO: 107로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0204] 51. (47) 내지 (50) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0205] SEQ ID NO: 62를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0206] SEQ ID NO: 92를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0207] SEQ ID NO: 93을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0208] SEQ ID NO: 100을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0209] SEQ ID NO: 101을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0210] SEQ ID NO: 102를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0211] 52. (47) 내지 (50) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0212] SEQ ID NO: 62를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0213] SEQ ID NO: 92를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0214] SEQ ID NO: 93을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0215] SEQ ID NO: 103을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0216] SEQ ID NO: 104를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0217] SEQ ID NO: 102를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0218] 53. (47) 내지 (50) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0219] SEQ ID NO: 94를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0220] SEQ ID NO: 95를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0221] SEQ ID NO: 96을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;
- [0222] SEQ ID NO: 105를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0223] SEQ ID NO: 106을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0224] SEQ ID NO: 107을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0225] 54. (47) 내지 (50) 중 어느 하나에 있어서, 하기 CDR 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위:
- [0226] SEQ ID NO: 97을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H1;
- [0227] SEQ ID NO: 98을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H2;
- [0228] SEQ ID NO: 99를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-H3;

- [0229] SEQ ID NO: 108을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L1;
- [0230] SEQ ID NO: 25를 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L2; 및
- [0231] SEQ ID NO: 28을 포함하거나 이로 이루어진 CDR-L3.
- [0232] 55. (1) 내지 (14), (19) 및 (47) 내지 (50) 중 어느 하나에 있어서,
- [0233] i) SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113 및 SEQ ID NO: 115로 이루어진 군; 및
- [0234] ii) SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113 및 SEQ ID NO: 115 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0235] 56. (1) 내지 (14), (19), (47) 내지 (50) 또는 (55) 중 어느 하나에 있어서,
- [0236] i) SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 및 SEQ ID NO: 116으로 이루어진 군; 및
- [0237] ii) SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 및 SEQ ID NO: 116 중 어느 하나에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0238] 57. (55) 또는 (56)에 있어서,
- [0239] (i) SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 110의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0240] (ii) SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 112의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0241] (iii) SEQ ID NO: 113의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인; 및
- [0242] (iv) SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 116의 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 도메인(VH) 및 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0243] 58. (57)에 있어서,
- [0244] (i) SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 110의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0245] (ii) SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 112의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인;
- [0246] (iii) SEQ ID NO: 113의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인; 및
- [0247] (iv) SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 116의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 도메인(VH) 및 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위.
- [0248] 59. (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는, 약학적 조성물.
- [0249] 60. (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나, 또는 (59)에 있어서, 치료제, 예후제 또는 진단제로서 사용하기 위한, 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 약학적 조성물.

- [0250] 61. (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나, 또는 (59)에 있어서, 치료제로서 사용하기 위한, 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 약학적 조성물.
- [0251] 62. 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 장애의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 장애를 예방하거나 치료하는 방법으로서, (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 (59)에 따른 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0252] 63. (62)에 있어서, 장애는 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드 증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병, 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장으로부터 선택되는, 방법.
- [0253] 64. (63)에 있어서, 장애는 알츠하이머병인, 방법.
- [0254] 65. (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나, 또는 (59)에 있어서, 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한, 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 약학적 조성물.
- [0255] 66. (65)에 있어서, 장애는 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드 증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병, 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장으로부터 선택되는, 항체, 이의 항원 결합 부위 또는 약학적 조성물.
- [0256] 67. (66)에 있어서, 장애는 알츠하이머병인, 항체, 이의 항원 결합 부위 또는 약학적 조성물.
- [0257] 68. (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나, 또는 (59)에 있어서, 진단제로서 사용하기 위한, 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 약학적 조성물.
- [0258] 69. 대상체에서 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 장애를 감지하거나 진단하는 방법으로서, (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위와 대상체로부터 취득된 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0259] 70. (69)에 있어서, 장애는 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드 증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병, 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장으로부터 선택되는, 방법.
- [0260] 71. (70)에 있어서, 장애는 알츠하이머병인, 방법.
- [0261] 72. (1) 내지 (14) 또는 (19) 내지 (58) 중 어느 하나, 또는 (59)에 있어서, 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 장애의 진단에 사용하기 위한, 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 약학적 조성물.
- [0262] 73. (72)에 있어서, 장애는 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드 증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병, 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장으로부터 선택되는, 항체, 이의 항원 결합 부위 또는 약학적 조성물.
- [0263] 74. (73)에 있어서, 장애는 알츠하이머병인, 항체, 이의 항원 결합 부위 또는 약학적 조성물.

도면의 간단한 설명

- [0264] 도 1은 실시예 1에 기재된 바와 같은 인간 뇌 추출물의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 실시예 1에 기재된 바와 같은 개별적인 저분자량 ApoE 단편을 나타내기에 충분히 높은 분해능에서 유전자형 APOE ε4/ε4의 AD 뇌로부터의 인간 뇌 추출물의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 1에 기재된 바와 같이 정량화된, AD(채워진 원) 및 대조군(빈 사각형)에서 전장 ApoE에 대한 12 kDa ApoE 단편의 비율을 나타내는 다이어그램이다.
- 도 4는 실시예 1에 기재된 바와 같이 정량화된, APOE E4 유전자형이 없는(-E4; 채워진 원) 또는 있는(+E4; 빈 사각형) AD에서 전장 ApoE에 대한 12 kDa ApoE 단편의 비율을 나타내는 다이어그램이다.
- 도 5는 실시예 2에 기재된 면역침강 실험에 대한 작업흐름의 개략적 개요이다.
- 도 6은 실시예 2에 기재된 바와 같은 면역침강된 샘플의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 2에 기재된 바와 같은 면역침강된 샘플의 은 염색 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 3에 기재된 바와 같은 지시된 12 kDa, 15 kDa 및 rhApoE4 겔의 트립신 분해물의 LC-MS/MS 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 4에 기재된 바와 같은 ApoE 서열의 LysC 절단 부위 분석의 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 5에 기재된 바와 같은 이론적 ApoE 절단 부위의 추출-이온 크로마토그램(XIC)에 의한 조사 결과를 나타낸 것이다. 좌측: 5 ppm 질량 정확도로 가능한 펩티드(200 번 내지 233 번) 중 하나의 세 가지 전하 상태의 이론적 값에서의 추출 이온 크로마토그램(피크는 세 가지 모두에 대해 동일한 보유 시간에 관찰됨). 우측: 추출된 각 피크로부터의 질량 스펙트럼.

도 11은 실시예 5에 기재된 바와 같은 절단 부위 주변의 펩티드 검출을 위한 산탄층 단백질체학 방법(shotgun proteomic method)으로의 nanoLC-MS/MS 결과를 나타낸 것이다. 동일한 공여체로부터의 샘플에 대한 반복 분석에서(APOE $\epsilon 3/\epsilon 4$, A 및 B), L198, A199 또는 G200에 N 말단 및 ApoE의 온전한 C 말단을 갖는 펩티드가 검출되었다.

도 12는 실시예 6에 기재된 바와 같은 지시된 APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$ 및 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 운반체로부터의 샘플에서 L198, A199 또는 G200에 N 말단을 갖는 펩티드에 대한 MS 세기를 나타내는 다이어그램이다.

도 13에서는 도 13a) Neuro2A 세포 및 도 13b) 랫트 일차 해마 뉴런에서 실시예 7에 기재된 실험에 따라 인간 ApoE4 및 ApoE C-말단 단편에 의해 유도된 미토콘드리아 손상; 뿐만 아니라 도 13c) 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정하는 경우 인간 ApoE4 또는 ApoE C-말단 단편의 단백질 발현을 나타낸 것이다.

도 14는 실시예 10에 기재된 바와 같은 G200 네오-에피토프를 사용하여 생성된 하이브리도마 항체에 대한 농도-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 15는 (A) 실시예 10에 기재된 바와 같은 알츠하이머병 환자의 뇌 추출물에 대한 G200 네오-에피토프를 사용하여 생성된 하이브리도마 항체의 결합, 및 (B) 전장 ApoE의 염색에 대한 다클론성 항-ApoE 항체로의 웨스턴 블롯 막의 재-염색을 나타낸 것이다.

도 16은 실시예 12에 기재된 바와 같은 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체에 대한 농도-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 17은 실시예 12에 기재된 바와 같은 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체에 대한 억제-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 18은 실시예 12에 기재된 바와 같은 생물층 간섭계를 통해 특성화된 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체에 대한 결합 상호작용의 샘플을 나타낸 것이다.

도 19는 실시예 12에 기재된 바와 같은 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체에 대한 농도-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 20은 실시예 12에 기재된 바와 같은 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체에 대한 억제-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 21은 실시예 12에 기재된 바와 같은 표면 플라즈몬 공명을 통해 특성화된 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체에 대한 결합 상호작용의 샘플을 나타낸 것이다.

도 22는 실시예 12에 기재된 바와 같은, (A) 직접 웨스턴 블롯에 따른 또는 (C) IP/웨스턴 블롯에 따른 알츠하이머병 환자의 뇌 추출물에 대한 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체의 결합을 나타낸 것이고; (B)는 전장 ApoE의 염색을 보여주는 다클론성 항-ApoE 항체로의 웨스턴 블롯 막의 재염색을 나타낸 것이다.

도 23은 실시예 12에 기재된 바와 같은 면역조직화학에 따른 인간 뇌에 대한 G200 네오-에피토프에 대항하는 재조합 항체의 결합을 나타낸 것이다.

도 24는 실시예 16에 기재된 바와 같은 L198 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체에 대한 농도-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 25는 실시예 15에 기재된 바와 같은 L198 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체에 대한 억제-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 26은 실시예 15에 기재된 바와 같은 표면 플라즈몬 공명을 통해 특성화된 L198 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체에 대한 결합 상호작용의 샘플을 나타낸 것이다.

도 27은 실시예 15에 기재된 바와 같은, (A) 직접 웨스턴 블롯에 따른 또는 (C) IP/웨스턴 블롯에 따른 알츠하이머병 환자의 뇌 추출물에 대한 L198 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체의 결합을 나타낸 것이고; (B)는 전장 ApoE의 염색을 보여주는 다클론성 항-ApoE 항체로의 웨스턴 블롯 막의 재염색을 나타낸 것이다.

도 28은 실시예 18에 기재된 바와 같은 A199 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체에 대한 농도-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 29는 실시예 18에 기재된 바와 같은 A199 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체에 대한 억제-반응 곡선을 나타낸 것이다.

도 30은 실시예 18에 기재된 바와 같은 표면 플라즈몬 공명을 통해 특성화된 A199 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체에 대한 결합 상호작용의 샘플을 나타낸 것이다.

도 31은 실시예 18에 기재된 바와 같은, (A) 직접 웨스턴 블롯에 따른 알츠하이머병 환자의 뇌 추출물에 대한 A199 네오-에피토프에 대항하는 정제된 단클론성 항체의 결합을 나타낸 것이고; (B)는 전장 ApoE의 염색을 보여주는 다클론성 항-ApoE 항체로의 웨스턴 블롯 막의 재염색을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0265] 본 발명의 한 가지 목적은 AD 환자의 뇌 내 ApoE 단편의 구조를 추가로 설명하는 것이다.
- [0266] 또 다른 목적은 ApoE 단편이 질병의 발생에서 갖는 기능에 대한 새로운 통찰을 제공하는 것이다.
- [0267] 본 발명의 또 다른 목적은 이러한 ApoE 단편에서 신생 에피토프의 표적화를 통해 치료적 개입을 가능하게 하는 것이다.
- [0268] 본 발명의 또 다른 목적은 질병 형성 및/또는 진행에 연루되는 ApoE 단편의 검출을 통해 AD 및 다른 신경퇴행성 장애의 진단을 가능하게 하는 것이다.
- [0269] 본 발명의 또 다른 목적은 신규하고 유용한 결합 특이성을 갖는 항체, 또는 이의 항원 결합 부위를 제공하는 것이다.
- [0270] 본원의 전체 개시 내용을 읽음으로써 당업자에게 명백해지는 이러한 및 다른 목적들 중 하나 이상은 개시된 다양한 양태에 의해 충족된다.
- [0271] 항-ApoE 항체 및 생산 방법
- [0272] 따라서, 첫 번째 양태에서, 본 개시는 아포지질단백질 E(ApoE)의 단편에 결합하는 항체 또는 항원 결합 부위로서, 단편은
- [0273] - SDS-PAGE에 의해 측정하는 경우 12 kDa의 겔보기 분자량, 및
- [0274] - 아미노산 L198, A199 및 G200으로 이루어진 균으로부터 선택된 전장 아포지질단백질 E 내 아미노산에 상응하는 N-말단을 갖고; 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 제공한다. 단편이 유래되는 전장 아포지질단백질 E는 전형적으로 인간 ApoE이다.
- [0275] 본 발명은 하기 실시예 1 내지 실시예 7에서 구체화되는 바와 같이, 알츠하이머병 환자의 뇌로부터 단리된 추정 신경독성 ApoE 단편의 구조에 대한 상세한 통찰에 기초한다. 이들 단편의 정확한 서열의 식별은 ApoE 단편화 시 형성된 N-말단 네오-에피토프에 특이적인 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합 부위의 생성을 가능하게 한다. 이러한 예시적인 항체의 생성 및 특성화는 실시예 8 내지 실시예 18에서 구체화된다.
- [0276] 이론으로 국한시키려는 것은 아니지만, 이러한 신규한 항체, 또는 이의 항원 결합 부위는 추정 신경독성 ApoE 단편에 대한 특이적 결합을 통해 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질병의 진단, 예후 및/또는 치료에 유용한 것으로 상정된다.
- [0277] 소정의 구현예에서, 첫 번째 양태의 항체 및 이의 항원 결합 부위는 본원에 기재된 ApoE 단편에 선택적으로 결합한다. 본원에서 사용되는 용어 "선택적으로 결합하는"은 ApoE 단편 표적에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 부

위의 우선적 결합을 지칭한다. 소정의 구현예에서, 첫 번째 양태의 항체 및 이의 항원 결합 부위는 전장 아포지질단백질 E, 구체적으로 전장 인간 아포지질단백질 E에 결합하지 않는다.

- [0278] 일 구현예에서, 첫 번째 양태의 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 단편이 전장 ApoE 내 아미노산 G200에 상응하는 N-말단을 갖는 아포지질단백질 E의 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 선택적 결합이 가능하다.
- [0279] 또 다른 구현예에서, 첫 번째 양태의 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 단편이 전장 ApoE 내 아미노산 A199에 상응하는 N-말단을 갖는 아포지질단백질 E의 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 선택적 결합이 가능하다.
- [0280] 또 다른 구현예에서, 첫 번째 양태의 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 단편이 전장 ApoE 내 아미노산 L198에 상응하는 N-말단을 갖는 아포지질단백질 E의 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 선택적 결합이 가능하다.
- [0281] 또 다른 구현예에서, 첫 번째 양태의 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 아포지질단백질 E의 단편의 N-말단을 포함하는 에피토프에 선택적 결합이 가능하고, 여기서 단편은
 - [0282] i) SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3으로 이루어진 군; 및
 - [0283] ii) SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3 중 어느 하나에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 서열로부터 선택된다.
- [0284] 보다 구체적인 구현예에서, 이러한 정의에서 i)는 SEQ ID NO: 1이다. 대안적인 구현예에서, 이러한 정의에서 i)는 SEQ ID NO: 2이다. 또 다른 구현예에서, 이러한 정의에서 i)는 SEQ ID NO: 3이다.
- [0285] 이러한 구현예들의 그룹에서 정의되는 바와 같이, 관심 에피토프를 갖는 ApoE 단편은 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 서열을 가질 수 있다. 일 구현예에서, 상기 서열은 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3으로부터 선택된 서열에 대해 적어도 85%, 예컨대, 적어도 90%, 예컨대, 적어도 95%, 예컨대, 100% 동일성을 가질 수 있다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위가 결합하는 표적 서열에서 이러한 변이는 단편의 N-말단 네오-에피토프가 존재하는 것을 보장하기 위해 단편이 N-말단으로부터 시작하여 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3으로부터 선택된 서열의 처음 3 개, 예컨대, 처음 4 개, 예컨대, 처음 5 개, 예컨대, 처음 6 개의 아미노산을 보유하는 조건에 주어진다.
- [0286] ii)가 i)에 대해 100% 동일성을 갖는 구현예에서, ApoE의 단편은 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진다. 보다 구체적인 구현예에서, 단편은 SEQ ID NO: 1로 이루어진다. 대안적인 구현예에서, 단편은 SEQ ID NO: 2로 이루어진다. 또 다른 대안적인 구현예에서, 단편은 SEQ ID NO: 3으로 이루어진다.
- [0287] 첫 번째 양태의 항체 및 항원 결합 부위는 본원에 기재된 ApoE 단편의 N-말단에서 네오-에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 아포지질단백질 E 내 200 번 내지 205 번 아미노산 잔기(GQPLQE)를 포함하는 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 아포지질단백질 E 내 199 번 내지 204 번 아미노산 잔기(AGQPLQ)를 포함하는 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 아포지질단백질 E 내 199 번 내지 205 번 아미노산 잔기(AGQPLQE)를 포함하는 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 아포지질단백질 E 내 198 번 내지 203 번 아미노산 잔기(LAQQPL)를 포함하는 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 아포지질단백질 E 내 198 번 내지 204 번 아미노산 잔기(LAQQPLQ)를 포함하는 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 아포지질단백질 E 내 198 번 내지 205 번 아미노산 잔기(LAQQPLQE)를 포함하는 에피토프에 결합한다.
- [0288] 본 개시의 두 번째 양태에서, 본원에 개시된 추정 신경독성 ApoE 단편의 식별된 네오-에피토프 중 하나를 포함하는 면역원으로 적합한 숙주 포유동물을 면역화시키는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 생산 방법이 제공된다. 이와 같이, 이러한 방법은 LAQQPL(SEQ ID NO: 4), AGQPLQ(SEQ ID NO: 5), GQPLQE(SEQ ID NO: 6), LAQQPLQ(SEQ ID NO: 7), AGQPLQE(SEQ ID NO: 8) 및 LAQQPLQE(SEQ ID NO: 9)로 이루어진 군으로부터 선택된 N-말단 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 면역원으로 숙주를 면역화시키는 단계를 포함한다. 숙주 포유동물은 바람직하게는 비-인간 포유동물이다.
- [0289] 두 번째 양태의 일 구현예에서, 펩티드 면역원은 GQPLQE(SEQ ID NO: 6)인 N-말단 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 펩티드 면역원의 N-말단 아미노산 서열은 LAQQPL(SEQ ID NO: 4), LAQQPLQ(SEQ ID NO: 7) 및 LAQQPLQE(SEQ ID NO: 9)로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, N-말단 아미노산 서열은 AGQPLQ(SEQ ID NO: 5) 및 AGQPLQE(SEQ ID NO: 8)로부터 선택된다.

- [0290] 적합한 숙주를 면역화시키는 단계 외에, 본 개시의 두 번째 양태의 방법은 적합하게는 면역화된 동물로부터 항체의 생성에 대한 표준 특성분석의 추가 단계, 예컨대, 반응성 항체에 대한 혈장 스크리닝, 비장의 세포의 단리, 하이브리도마의 생성, 및 항체 생성 분야의 당업자에게 공지된 다른 수단을 포함할 수 있다.
- [0291] 본 개시의 세 번째 양태에서, 두 번째 양태에 따른 방법에 의해 수득 가능한 항체 또는 이의 항원 결합 부위가 제공된다. 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 첫 번째 양태의 항체, 또는 이의 항원 결합 부위에 의해 나타나는 요망되는 선택성을 나타내고, 신경퇴행성 질병의 진단, 예후 및 치료의 동일한 맥락에서 유용할 가능성이 있다.
- [0292] 첫 번째 양태 및 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fc 단편, Fv 단편, 단쇄 Fv 단편, (scFv)₂ 및 도메인 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 상기 적어도 하나 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 전장 항체, Fab 단편 및 scFv 단편으로부터 선택된다. 한 가지 특정 구현예에서, 항체는 전장 항체이다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 단클론성 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 및 이의 항원 결합 부위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 이는 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부위이다.
- [0293] 이러한 보다 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 적어도 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.
- [0294] 당업자가 인식할 바와 같이, 본 개시의 첫 번째 양태 및 세 번째 양태의 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 구현예는 이의 결합 능력을 결정하는 영역, 예컨대, 가변 경쇄 및 가변 중쇄의 CDR, 또는 실제로 전체 가변 경쇄 및/또는 중쇄 도메인 또는 영역에서 특정 아미노산 서열을 특징으로 할 수 있다. 이러한 특정 아미노산 서열의 비-제한적 예는 실시예 9 내지 실시예 18에 기재된 바와 같이 생성된 특정 항체에 대하여 본원에 제공된다. 생성된 항체에 대하여 제공된 특정 서열 정보를 통해 당업자는 본 발명의 범위 내에서 이들 서열의 조합 및 변이를 정할 수 있는 것으로 상정된다.
- [0295] 따라서, 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 예를 들어, 존재 시 중쇄 가변 영역에 CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3의 임의의 조합으로 하기 세 개의 CDR을 포함한다:
- [0296] - SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 및 SEQ ID NO: 21로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- [0297] - SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 및 SEQ ID NO: 22로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0298] - SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 및 SEQ ID NO: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3.
- [0299] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 예를 들어, 경쇄 가변 영역에서 존재 시 CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3의 임의의 조합으로 하기 세 개의 CDR을 포함한다:
- [0300] - SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 및 SEQ ID NO: 32로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0301] - SEQ ID NO: 25인 CDR-L2; 및
- [0302] - SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 및 SEQ ID NO: 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3.
- [0303] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 상기 열거된 서열들로부터 선택된 6 개의 CDR인 CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3/CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3를 이들의 임의의 조합으로 포함한다.
- [0304] 상기 첫 번째 모이어티의 구체적인 구현예에서, CDR의 조합은 실시예 9 내지 실시예 12에서 예시된 항체에 존재하는 것들이다(표 4 참조).
- [0305] 본 개시의 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 또 다른 보다 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 및 SEQ ID NO: 43으로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역(VH) 서열, 및 이에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0306] 본 개시의 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 또 다른 보다 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41,

및 SEQ ID NO: 44로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역(VL) 서열, 및 이에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

- [0307] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 예를 들어, 중쇄 가변 영역에서 존재 시 CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3의 임의의 조합으로 하기 세 개의 CDR을 포함한다:
- [0308] - SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62 및 SEQ ID NO: 65로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- [0309] - SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 및 SEQ ID NO: 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0310] - SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, 및 SEQ ID NO: 69로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3.
- [0311] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 예를 들어, 경쇄 가변 영역에서 존재 시 CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3의 임의의 조합으로 하기 세 개의 CDR을 포함한다:
- [0312] - SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79 및 SEQ ID NO: 80으로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0313] - SEQ ID NO: 72 및 SEQ ID NO: 77로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L2; 및
- [0314] - SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 78 및 SEQ ID NO: 81로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3.
- [0315] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 상기 열거된 서열들로부터 선택된 6 개의 CDR인 CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3/CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3를 이들의 임의의 조합으로 포함한다.
- [0316] 상기 첫 번째 모이어티의 구체적인 구현예에서, CDR의 조합은 실시예 13 내지 실시예 15에서 예시된 항체에 존재하는 것들이다(표 8 참조).
- [0317] 본 개시의 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 또 다른 보다 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, 및 SEQ ID NO: 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역(VH) 서열, 및 이에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0318] 본 개시의 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 또 다른 보다 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, 및 SEQ ID NO: 91로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역(VL) 서열, 및 이에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0319] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 예를 들어, 중쇄 가변 영역에서 존재 시 CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3의 임의의 조합으로 하기 세 개의 CDR을 포함한다:
- [0320] - SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 94 및 SEQ ID NO: 97로 이루어진 군으로 선택된 CDR-H1;
- [0321] - SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 95 및 SEQ ID NO: 98로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H2; 및
- [0322] - SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96 및 SEQ ID NO: 99로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-H3.
- [0323] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는, 예를 들어, 경쇄 가변 영역에서 존재 시 CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3의 임의의 조합으로 하기 세 개의 CDR을 포함한다:
- [0324] - SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 및 SEQ ID NO: 108로 이루어진 군으로 선택된 CDR-L1;
- [0325] - SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 104 및 SEQ ID NO: 106으로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L2; 및
- [0326] - SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 102 및 SEQ ID NO: 107로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR-L3.
- [0327] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 상기 열거된 서열들로부터 선택된 6 개의 CDR인 CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3/CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3를 이들의 임의의 조합으로 포함한다.
- [0328] 상기 첫 번째 모이어티의 구체적인 구현예에서, CDR의 조합은 실시예 16 내지 실시예 18에서 예시된 항체에 존재하는 것들이다(표 13 참조).

- [0329] 본 개시의 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 또 다른 보다 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, 및 SEQ ID NO: 115로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역(VH) 서열, 및 이에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0330] 본 개시의 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 또 다른 보다 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 및 SEQ ID NO: 116으로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역(VL) 서열, 및 이에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0331] 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 VH 서열 및 VL 서열의 정의는 열거된 서열들 중 어느 하나 및 이에 대해 적어도 75%, 예컨대, 적어도 80%, 예컨대, 적어도 85%, 예컨대, 적어도 90%, 예컨대, 적어도 95%, 예컨대, 적어도 98%, 예컨대, 적어도 100% 동일성을 갖는 서열로 제한된다.
- [0332] 구체적인 구현예에서, VH/VL의 조합은 실시예 9 내지 실시예 18에 예시된 항체에 존재하는 것들이다(특히 표 3, 표 7 및 표 12 참조).
- [0333] 항체 또는 항원 결합 단편의 가변 도메인이 참조 서열에 대한 특정 서열 동일성 백분율에 의해 정의되는 구현예에서, VH 도메인 및/또는 VL 도메인은 변이가 프레임워크 영역 내에만 존재하도록 참조 서열에 존재하는 것들에 대해 동일한 CDR 서열을 보유할 수 있다.
- [0334] 본원에서 사용되는 용어 "X에 대한 선택적 결합" 및 "X에 대한 친화성"(여기서, X는 항원 또는 에피토프임)은, 예를 들어, ELISA에 의해, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해, 동역학 배제 검정(KinExA®)에 의해 또는 생물층 간섭계(BLI)에 의해 시험될 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 성질을 지칭한다. 당업자는 이러한 방법들 및 기타 방법들을 알고 있다.
- [0335] 예를 들어, 항원 또는 에피토프 X에 대한 결합 친화성은 시험하고자 하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위를, 항원 X 또는 에피토프 X를 나타내는 항원으로 코팅된 ELISA 플레이트 상에서 포획하고, 비오틴화된 검출 항체, 그리고 이어서 스트렙타비딘-접합 HRP를 첨가하는 실험에서 시험될 것이다. 대안적으로, 상기 검출 항체는 HRP와 직접적으로 접합될 수 있다. TMB 기질을 첨가하고, ELISA 다중-웰 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정한다. 당업자는 이후 X에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 결합 친화도의 적어도 하나의 정성적 척도를 확립하기 위해 이러한 실험에 의해 얻어진 결과를 해석할 수 있다. 예를 들어, 상호작용에 대한 EC50 값(최대 유효 농도의 절반)을 결정하기 위해 정량적 척도가 요망되는 경우, ELISA가 또한 사용될 수 있다. X의 희석 시리즈에 대항하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 반응은 상술된 바와 같이 ELISA를 사용하여 측정될 수 있다. 당업자는 이후 이러한 실험들에 의해 얻어진 결과를 해석할 수 있고, EC50 값은, 예를 들어, GraphPad Prism 8 및 비-선형 회귀를 이용하여 결과로부터 계산될 수 있다.
- [0336] 본원에서 사용되는 용어 "EC50"은 특정 노출 시간 후 기준선과 최대 값 사이의 중간에 반응을 유도하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 최대 유효 농도의 절반을 지칭한다.
- [0337] 추가로, 억제 ELISA는 "IC50"(최대 억제 농도의 절반)의 결정에 의해 상호작용의 정량적 척도를 얻기 위해 사용될 수 있다. 억제 ELISA에서, 유체 샘플 중 항원 또는 에피토프 X의 농도를 예상 신호 출력에서 간섭을 검출함으로써 측정한다. 원칙적으로, 공지된 항원 또는 에피토프-함유 물질은 다중웰 플레이트를 코팅하기 위해 사용된다. 병행하여, 항원 또는 에피토프에 대한 추정 친화성을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 첨가하고 다양한 농도의 항원을 함유하는 용액과 함께 인큐베이션한다. 표준 차단 및 세척 단계 후에, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위와 항원 또는 에피토프의 혼합물을 함유하는 샘플을 웰에 첨가한다. 이어서, 항원- 또는 에피토프-결합 항체 또는 이의 항원 결합 부위에 대한 친화성을 갖는 표지된 검출 항체를 이후 관련 기질(예를 들어, TMB)을 사용하여 검출을 위해 적용한다. 원칙적으로, 유체 샘플에 고농도의 항원 또는 에피토프가 있는 경우, 신호 출력의 상당한 감소가 관찰될 것이다. 대조적으로, 유체 샘플에 매우 적은 항원 또는 에피토프가 존재하는 경우, 예상 신호 출력의 감소가 거의 없을 것이다. 당업자는 신호 출력이 또한 상기 항원 또는 에피토프에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 친화성에 의존한다는 것을 인지한다.
- [0338] 본원에서 사용되는 용어 "IC50"은 특정 노출 시간 후 기준선과 최대 억제 사이의 중간에 반응을 유도하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 최대 억제 농도의 절반을 지칭한다. 여기서, 더 낮은 IC50 값은, 더 높은 IC50 값과 비교하여, 플레이트 상에 코팅된 공지된 항원 또는 에피토프에 대한 검출 항체의 결합과 상호작용하는 데 더 낮은 농도의 항원 또는 에피토프가 필요하다는 것을 지시한다. 따라서, 더 낮은 IC50 값은 전형적으로 더 높은

친화성에 상응한다.

- [0339] 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 결합 친화성은 또한 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 시험될 수 있다. 예를 들어, 상기 결합 친화성은 항원 또는 에피토프 X를 기기의 센서 칩 상에 고정하고, 시험하고자 하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 함유하는 샘플을 칩 위로 통과시키는 실험에서 시험될 수 있다. 대안적으로, 시험하고자 하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 기기의 센서 칩 상에 고정할 수 있고, X를 함유하는 샘플을 칩 위로 통과시킨다. 당업자는 이후 X에 대한 모이어티의 결합 친화도의 적어도 하나의 정성적 척도를 확립하기 위해 이러한 실험들에 의해 얻어진 결과를 해석할 수 있다. 정량적 척도가 요망되는 경우, 예를 들어, 상호작용에 대한 K_D 값을 결정하기 위해, SPR이 또한 사용될 수 있다. 결합 값은, 예를 들어, Biacore(GE Healthcare) 또는 ProteOn XPR 36(Bio-Rad) 기기에서 정해질 수 있다. 항원 또는 에피토프를 기기의 센서 칩 상에 적합하게 고정하고, 친화도를 결정하고자 하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 샘플을 연속 희석에 의해 제조하고, 주입한다. 그 후에, K_D 값은, 예를 들어, Biacore 인사이트 평가 소프트웨어 2.0 또는 전형적으로 기기 제조업체에 의해 제공되는 기타 적합한 소프트웨어의 1:1 랭뮤어 결합 모델을 이용한 결과로부터 계산될 수 있다.
- [0340] 항원 또는 에피토프 X에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 결합 친화도를 결정하기 위한 또 다른 방법은 용액에서 변형되지 않은 분자들 사이의 평형 결합 친화도 및 동역학의 측정을 위한 동역학 배제 검정이다 (KinExA; Sapidyn Instruments Inc; Darling and Brault, Assay and Drug Dev Tech (2004) 2(6):647-657). KinExA K_D 분석은, 이후 평형에 도달하면 용액에 없는 다른 상호작용 파트너(예를 들어, 일정한 결합 파트너)를 포획하기 위한 프로브로서 사용되는 고체상에 대한 하나의 상호작용 파트너(예를 들어, 적정된 결합 파트너)의 고정을 필요로 한다.
- [0341] 결합 친화도는 또한 상호작용체 내에서 생체분자 상호작용을 측정하기 위한 무표지 기술인 생물층 간섭계(BLI)에 의해 측정될 수 있다. 이는 두 개의 표면, 즉, 바이오센서 팁 상에 고정된 단백질 층과 내부 기준 층으로부터 반사된 백색광의 간섭 패턴을 분석하는 광학 분석 기술이다. 용액에서 바이오센서 팁 표면 상에 고정된 리간드(항원 또는 에피토프 X)와 분석물(예컨대, X에 대한 친화성을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 부위) 사이의 결합은 바이오센서 팁에서 광학 두께의 증가를 야기하여 파장 이동($\Delta\lambda$)을 생성하는데, 이는 생물학적 층의 두께 변화의 직접적인 척도이다. 상호작용은 결합 특이성, 결합 및 해리 속도, 또는 농도를 정밀하고 정확하게 모니터링하는 능력을 제공하도록 실시간으로 측정된다.
- [0342] 당업자는 항원 또는 에피토프 X에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 친화도를 정성적으로 또는 정량적으로 또는 이 둘 모두로 측정하기 위한 상기 언급된 방법 및 기타 방법들을 알고 있다.
- [0343] 본원에서 사용되는 용어 "항체 또는 이의 항원 결합 부위"는 전장 또는 온전한 다클론성 또는 단클론성 항체뿐만 아니라, 이의 항원 결합 부위, 예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab₃, Fv 및 이의 변이체, 하나 이상의 항체 부위를 포함하는 융합 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 미니바디, 디아바디, 트리야바디, 테트라바디, 선형 항체, 단쇄 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 및 항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체 및 공유결합으로 변형된 항체를 비롯한, 특이성이 요구되는 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포괄한다. 변형된 항체 및 이의 항원 결합 부위의 추가 예는 나노바디, AlbuAb, DART(이중 친화성 재-표적화), BiTE(이중특이적 T-세포 인계이저(bispecific T-cell engager)), TandAb(탠덤 디아바디), DAF(이중 작용 Fab), 투-인-원 항체, SMIP(소형 모듈 면역 제제(small modular immunopharmaceutical)), FynomAb(항체에 융합된 피노머(fynomer)), DVD-Ig(이중 가변 도메인 면역글로불린), CovX-바디(펩티드 변형된 항체), 듀오바디 및 triomAb를 포함한다. 이러한 항체의 변이체 및 이의 항원 결합 부위의 목록은 제한적인 것으로 간주되지 않으며, 당업자는 기타 적합한 변이체를 알고 있다.
- [0344] 전장 항체는 2 개의 중쇄 및 2 개의 경쇄를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH) 및 제1, 제2 및 제3 불변 영역(CH1, CH2 및 CH3)을 함유한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)을 함유한다. 이의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 좌우하여, 항체는 상이한 클래스로 할당된다. 6 개의 주요 항체 클래스인 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 및 IgY가 존재하며, 이들 중 수 개는 서브클래스, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더 나뉘어질 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "전장 항체"는 임의의 항체 클래스, 예컨대, IgD, IgE, IgG, IgA, IgM 또는 IgY(또는 이의 임의의 서브-클래스)를 지칭한다. 상이한 클래스의 항체의 아단위 구조 및 3차원 구성은 널리 공지되어 있다.
- [0345] 용어 "항원 결합 부위"는 상응하는 전장 항체의 항원 결합의 전부 또는 이의 유의한 부분을 보유하는, 항체 분자 또는 이의 유도체의 부위 또는 영역을 지칭한다. 항원 결합 부위는 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역

(VL), 또는 이 둘 모두를 포함할 수 있다. 각각의 VH 및 VL 영역 또는 도메인은 전형적으로 세 개의 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 함유하고, 이들은 VH 도메인으로부터의 CDR의 경우 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 표기되고, VL 도메인으로부터의 CDR의 경우 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 표기된다. VH 또는 VL에서 세 개의 CDR은 프레임워크 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)에 의해 측정된다. 상기 간략히 열거된 바와 같이, 항원 결합 부위의 예는 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: (1) VL-CL 쇠 및 VH-CH1 쇠를 갖는 일가 단편인 Fab 단편; (2) 중쇄 힌지 영역을 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편; (3) 중쇄 힌지 영역에 의해 결합된, 예를 들어, 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된, Fab' 단편의 이량체인 F(ab')₂ 단편; (4) Fc 단편; (5) 항체의 단일 아암(arm)의 VL 도메인 및 VH 도메인을 갖는 최소 항체 단편인 Fv 단편; (6) scFv의 VH 도메인 및 VL 도메인이 펩티드 링커에 의해 연결되는 단일 폴리펩티드 쇠인 단쇄 Fv(scFv) 단편; (7) 두 개의 VH 도메인 및 두 개의 VL 도메인을 포함하며, 디설파이드 브릿지를 통해 두 개의 VH 도메인을 통해 결합되는, (scFv)₂ 및 (8) 항원을 특이적으로 결합하는 항체 단일 가변 도메인(VH 또는 VL) 폴리펩티드일 수 있는 도메인 항체. 항원 결합 부위는 일상적인 방법을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 전장 항체 분자의 펩신 분해에 의해 생성될 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 생성될 수 있다. 대안적으로, 부위는 적합한 숙주 세포(예를 들어, *이. 콜라이*, 효모, 포유동물, 식물 또는 곤충 세포) 내 중쇄 및 경쇄 부위를 발현시키고, 이들을 생체내 또는 시험관내에서 요망되는 항원 결합 부위를 형성하도록 조립시킴으로써 제조합 기술을 통해 제조될 수 있다. 단쇄 항체는 중쇄 가변 영역에 대해 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 경쇄 가변 영역에 대해 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 연결함으로써 제조합 기술을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어, 가요성 링커는 두 개의 가변 영역 사이에 도입될 수 있다.

[0346] 또한, 당업자는 용어 다클론성 항체 및 단클론성 항체의 의미를 알고 있다. 다클론성 항체는 일반적으로 동물에게 항원을 투여함으로써 생성된다. 상기 항원은 다클론성 항체를 발생시키는 면역 반응을 유발할 것이다. 단클론성 항체는 일반적으로 마우스와 같은 동물을 항원으로 면역화시키고, 후속하여 상기 동물로부터 비장을 단리함으로써 제조된다. 단리된 비장 세포는 골수종 세포와의 융합에 의해 불멸화되어 하이브리도마 세포를 생성한다. 각 하이브리도마 세포는 고유한 단클론성 항체를 생산한다. 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간 대상체로부터 수득된 항체에 상응하거나 이로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "키메라 항체"는, 예를 들어, 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 마우스 기원 및 인간 불변 영역(Fc)의 가변 영역(VH 및 VL)을 갖는 항체와 같이 제조합 또는 유전적으로 조작된 항체를 지칭한다. 용어 "인간화 항체"는 전장 항체 자체의 면역원성을 감소시키기 위해 단백질 서열이 인간에서 자연적으로 생성된 항체 변이체에 대한 이들의 유사성을 증가시키도록 변형된 비-인간 종으로부터의 항체를 지칭한다.

[0347] 추가의 또 다른 구현예에서, 본 개시의 첫 번째 양태 및 세 번째 양태의 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 인간 항체, 인간화 항체 및 이의 항원 결합 부위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 가지 특정 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 부위이다.

[0348] 약학적 조성물

[0349] 네 번째 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 부위 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0350] 인간 치료 용도를 위한 항체를 제형화하는 기술은 당분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Wang et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pp1-26, 2007]에서 검토된다.

[0351] 조성물을 제형화하는 데 사용될 수 있는 약학적으로 허용되는 부형제는 이온 교환제, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대, 인간 혈청 알부민, 완충 물질, 예컨대, 포스페이트, 글리신, 소르브산, 포타슘 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대, 프 로타민 설페이트, 디소듐 하이드로젠 포스페이트, 포타슘 하이드로젠 포스페이트, 소듐 클로라이드, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스-기반 물질(예를 들어, 소듐 카복시 메틸셀룰로스), 폴리에틸렌 글리콜, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리 에틸렌 글리콜 및 양모지를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0352] 소정의 구현예에서, 약학적 조성물은 근육내, 정맥내, 피내, 복강내 주사, 피하, 경막외, 비강, 경구, 직장, 국 소, 흡입, 협측(예를 들어, 설하) 및 경피 투여 포함하지만, 이로 제한되지 않는 임의의 적합한 투여 경로를 통 해 대상체에게 투여하도록 제형화된다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 정맥내 또는 피하 투여용으로 제형화된

다.

[0353] 예방, 치료, 감지 및 진단 방법

- [0354] 본 개시에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 치료제 및/또는 진단제로서 유용할 수 있다.
- [0355] 따라서, 본 개시의 다섯 번째 양태에서, 의약으로서 사용하기 위한 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 네 번째 양태에 따른 약학적 조성물이 제공된다.
- [0356] 본 개시의 여섯 번째 양태에서, 진단제로서 사용하기 위한 첫 번째 양태 또는 세 번째 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 네 번째 양태에 따른 약학적 조성물이 제공된다.
- [0357] 또한, 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 부위가 대상체, 전형적으로 인간 대상체에게 투여되는, 질병을 예방, 치료, 또는 진단하거나 질병 예후를 평가하는 방법이 제공된다.
- [0358] 또한, 열거된 질병들 중 어느 하나의 예방, 치료, 진단 및/또는 예후에 사용하기 위한 조성물(예컨대, 의약)의 제조를 위한 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 용도가 제공된다.
- [0359] 또한, 대상체에서 질병을 감지하거나 진단하는 방법으로서, 대상체로부터 취득된 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 부위와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 이들 방법은 전형적으로 시험관내 방법이다.
- [0360] 따라서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 질환으로부터 선택된 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용하다. 이러한 질병 또는 질환은 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형); 뿐만 아니라 아밀로겐 단백질을 기반으로 하거나 이와 관련된 기타 질병들, 예컨대, 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병, 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.
- [0361] 따라서, 일 구현예에서, A β 펩티드-연관 질환, 예컨대, 아밀로이드증의 치료, 예방 및/또는 진단에 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일 구현예에서, 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장으로 이루어진 군으로부터 선택된 A β 펩티드-연관 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 한 가지 구체적인 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 알츠하이머병의 치료, 예방 및/또는 진단에 사용하기 위해 제공된다.
- [0362] 일곱 번째 양태에서, 상기 장애를 갖거나 상기 장애로 진행될 위험이 있는 포유동물에서 A β 펩티드-연관 질환의 치료, 예방 및/또는 진단 방법으로서, 상기 포유동물에게 소정량, 예컨대, 치료적 유효량의 항체 또는 이의 항원 결합 부위, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0363] 일 구현예에서, 예를 들어, 상기 A β 펩티드-연관 질환은, 예를 들어, 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형)과 같은 신경학적 장애 또는 인지 기억력 상실을 특징으로 하는 질환; 뿐만 아니라 아밀로겐 단백질을 기반으로 하거나 이와 관련된 기타 질병, 예컨대, 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병, 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 이차 아밀로이드증 및 나이-연관 아밀로이드증을 포함하는 아밀로이드반 형성과 관련된 질병 및 장애의 군을 지칭하는, 아밀로이드증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0364] 보다 구체적인 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 A β 펩티드-연관 질환의 치료, 예방 및/또는 진단을 위한 방법으로서, 상기 A β 펩티드-연관 질환은 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 루이소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증을 동반한 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 파킨슨병 및 아밀로이드 베타 침착으로 인한 백내장으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법이 제공된다. 한 가지 특정 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료, 예방 및/또는 진단을 위한 방법으로서, 상기 A β 펩티드-연관 질환은 알츠하이머병인, 방법이 제공된다.
- [0365] 신경퇴행성 질병의 치료를 위한 개시된 항체, 또는 이의 항원 결합 부위의 치료적 또는 예방적 용도와 관련하여, 몇 가지 추정 작용 기전이 존재한다. 이론으로 국한시키려는 것은 아니지만, 비-제한적이고 독립적으로 가능한 작용 기전은, 예를 들어, i) 추정 신경독성 ApoE 단편 및 이의 응집된 형태의 중화; ii) 정상 콜레스

테롤/지질 수송을 방해하고, 이에 의해 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 처리에 영향을 미쳐 A β 의 생산 증가를 초래하는 C-말단 ApoE 단편의 제거에 의한 A β 대사의 회복; iii) 이들 단편에 함유된 지질 결합 영역을 거쳐 A β 의 결합을 통해 C-말단 ApoE 단편으로 인해 초래된 A β 응집의 감소; 및 iv) C-말단 ApoE 단편이 그 자체로 아밀로이드 응집체의 일부를 형성하는 상황에서 증가된 A β 제거.

[0366] 신경퇴행성 질병에서, 개시된 항체, 또는 이의 항원 결합 부위의 진단적 또는 예측적 용도와 관련하여, 추정 신경독성 ApoE 단편은 질병의 위험이 있거나 초기 질병의 징후를 보이는 환자에서 검출되고 측정될 수 있다. 이러한 한 가지 방법은 본 개시 내용의 방사선-표지 항체를 사용하는 PET 스캔이다. 진단 및 예후를 위한 또 다른 방법은 ELISA/MSD를 사용하여 혈액/혈장에서 신경독성 ApoE 단편의 수준을 분석하는 생화학적 분석이다.

[0367] 본 발명은 다양한 예시적인 양태 및 구현예를 참조로 기재되었으나, 본 발명의 범위로부터 벗어남 없이 다양한 변화가 이루어질 수 있고 이의 요소에 대해 등가물이 대체될 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 또한, 본 발명의 본질적인 범위로부터 벗어남 없이 특정 상황 또는 분자를 본 발명의 교시에 적용하기 위해 많은 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 본 발명은 임의의 특정 구현예로 제한되지 않고, 본 발명은 첨부된 청구항의 범위 내에 속하는 모든 구현예를 포함할 것으로 의도된다. 본 발명은 하기 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 예시될 것이다.

[0368] 인용에 의한 포함

[0369] 다양한 간행물이 본 출원에서 인용되며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0370] 실시예

[0371] 실시예 1

[0372] 알츠하이머병 환자 및 대조군으로부터의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 단편의 분석

[0373] 본 실시예는 인간 뇌 조직의 균질화 및 2% 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 갖는 방사선-면역침강 검정(RIPA) 완충액에서 뇌 추출물로부터의 ApoE 단편의 다음 웨스턴 블롯 분석을 기술한다.

[0374] 재료 및 방법

[0375] 뇌 조직 균질화 및 샘플 제조: 다양한 APOE 유전자형을 갖는, 알츠하이머병(AD) 환자(n = 24) 및 대조군(n = 14)으로부터의 신선한 냉동된 인간 뇌 조직을 RIPA 2% SDS 추출 완충액 중에 1:5 중량:부피로 균질화하고, 이어서 1시간 동안 16000 x g 원심분리를 수행하였다. 생성된 상청액을 분석할 때까지 -80°C에서 냉동시켰다.

[0376] 인간 뇌 추출물 내 ApoE 단편의 분석: 10 μ g의 총 단백질을 함유하는 RIPA 2% SDS 뇌 추출물을 2x Laemmli 샘플 완충액과 혼합하고, 95°C에서 5분 동안 비등시키고, SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher) 상에 로딩하였다. 겔을 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시키고, 그 후에 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(BioRad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 1시간 동안 Odyssey® 차단 완충액에서 차단한 다음, 0.1% Tween® 20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에 1:2000 희석된 다클론성 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. No. 178479)와 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween® 20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-염소-800CW(LI-COR, cat. No 925-32214)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다. Image Studio 소프트웨어(버전 5.2)를 사용하여 획득한 웨스턴 블롯 이미지에서 전장 ApoE의 양에 대한 비율로 ApoE 단편의 상대량을 정량화하였다.

[0377] 결과

[0378] 전장 ApoE뿐만 아니라 여러 저분자량(LMW) ApoE 단편을 인간 뇌 RIPA 2% SDS 추출물(n = 38)의 웨스턴 블롯 분석에 의해 식별하였다. 도 1은 웨스턴 블롯 분석으로부터의 대표적인 막을 나타낸 것이다. LMW ApoE 단편은 크기가 10 kDa, 12 kDa, 14 kDa 내지 15 kDa 및 17 kDa인 것으로 추정되었다(도 2).

[0379] 전장(FL) ApoE에 대한 비율로 ApoE 단편의 분석은 12 kDa ApoE 단편이 대조군(n = 14)에 비해 AD 군(n = 24)에서 유의하게 증가했다는 것을 입증해 주었다(도 3). 또한, AD 군의 APOE ϵ 4 운반체에서 12 kDa ApoE 단편의 유의한 증가가 관찰되었다(도 4).

[0380] 실시예 2

- [0381] 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물로부터 ApoE 단편의 추출 및 단리
- [0382] 본 실시예는 아미노산 서열 분석에 충분한 단백질 농도를 갖는 순수한 ApoE 샘플을 제조하기 위한 인간 뇌 추출물로부터의 전장 ApoE 및 12 kDa 및 15 kDa ApoE 단편의 단리 및 농축에 대한 절차를 기술한다.
- [0383] 재료 및 방법
- [0384] 다양한 APOE 유전자형을 갖는 AD 환자의 인간 뇌 추출물로부터 ApoE의 단리: 인간 뇌 추출물로부터 ApoE의 면역침강(IP)을 위한 프로토콜을 확립하였다. 프로토콜 최적화에 의해 아미노산 서열 분석에 충분한 단백질 농도를 갖는 순수한 ApoE 샘플을 얻었다. 작업흐름의 개략적인 개요는 도 5를 참조한다. 총 단백질 함량이 1.5 mg인 인간 뇌 RIPA 2% SDS 추출물을 IP 완충액(1xPBS, 0.05% Tween® 20, 0.1% Triton X-100, 프로테아제 억제제 콕테일)과 혼합하고, 237 번 내지 299 번 아미노산(Thermo Scientific, cat. No PA5-27088) 내에 결합 에피토프와, 200 µg의 항-ApoE C-말단 항체를 첨가함으로써 ApoE를 면역침강시켰다. 뇌 추출물에서 IP 항체와 ApoE 사이의 복합체는 헤드-오버-테일 회전과 함께 실온에서 2 h의 인큐베이션 동안 형성이 가능했다. 500 µl의 단백질 A 다이아비드(Dynal, Thermo Scientific, cat. No 10002D)를 IP 혼합물에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 헤드-오버-테일 회전으로 인큐베이션한 후, 단백질 A 다이아비드를 세척하여 비드에 대한 비특이적 결합을 제거하였다. 단백질 A 다이아비드에 결합된(IP 항체를 통해) ApoE 단백질을 250 µl의 용리 완충액(1.25 mM Tris pH 6.8, 0.005% SDS)에서 용리시키고, 900 rpm에서 진탕시키면서 95°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 고속 회전 후, 샘플을 DynaMag™-2 자석 위에 놓고, 액체를 새로운 튜브로 옮겼다.
- [0385] 단리된 ApoE의 농축 그리고 이어서 SDS-PAGE에 의한 분석: ApoE 단백질을 농축하기 위해, 용리된 IP 샘플을 40°C에서 약 2시간 동안 1300 rpm으로 회전식 진공 농축기에서 원심분리하여 부피를 250 µl에서 약 15 µl까지 감소시켰다. 2x Laemmli 완충액을 농축된 샘플에 첨가하고, 샘플을 900 rpm으로 95°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 고속 회전 후, 샘플을 SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher, cat. No NW04120BOX) 상에 로딩하였다. 겔을 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시킨 후, 하나의 겔을 웨스턴 블롯 분석에 의해 ApoE 단편의 확인에 사용하고, 하나의 겔을 은 염색하고, ApoE의 절제에 사용하였다.
- [0386] SDS-PAGE 겔의 웨스턴 블롯 분석: 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(BioRad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 1시간 동안 Odyssey® 차단 완충액에서 차단한 다음, 0.1% Tween® 20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에 1:2000 희석된 항-ApoE C-말단 항체(Thermo Scientific, cat. No PA5-27088)와 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween® 20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-토끼-800CW(LI-COR, cat. No 925-32211)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.
- [0387] SDS-PAGE 겔의 은 염색: 겔을 고정하고, 제조업체의 지침에 따라 은 염색으로 염색하였다(질량 분광기용 Pierce 은 염색, Thermo Scientific, cat. No 24600). 은 염색을 완료한 후, 정지 완충액을 Milli-Q H₂O로 교환하고, 2x 10분으로 세정하였다. 겔에서 전장 ApoE, 및 12 kDa 및 15 kDa ApoE 밴드를 절제하고, 깨끗한 에펜도르프 튜브에 Milli-Q H₂O 중에 넣었다.
- [0388] 결과
- [0389] 확립된 IP 프로토콜(도 5)을 사용하여, 다양한 APOE 유전자형($\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ 및 $\epsilon 4/\epsilon 4$)을 갖는 인간 AD 뇌로부터 ApoE를 단리하고, 용리된 단백질을 SDS-PAGE에서 작동시켰다.
- [0390] ApoE의 추출을 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하였다. 도 6은 ApoE 단편뿐만 아니라 전장 ApoE를 갖는 여러 밴드를 나타내는 대표적인 웨스턴 블롯 막을 보여주는 것이다. 또한, 단리되고 농축된 ApoE 단백질을 도 7에 도시된 바와 같이 SDS-PAGE 겔의 은 염색에 의해 염색하였다. 크기가 대략 12 kDa 및 15 kDa인 ApoE 단편을 가시화하고, 은 염색된 겔로부터 절제하였다. 참조 샘플로서, 인간 뇌 IP 샘플로부터의 제조한 전장 ApoE 단백질 및 전장 ApoE를 또한 은 염색된 겔로부터 절제하였다.
- [0391] 실시예 3
- [0392] 12 kDa ApoE 단편에서 트립신 절단 부위의 확인
- [0393] 샘플 제조
- [0394] 제조한 인간 전장 ApoE4(rhApoE4) 및/또는 면역침강으로부터의 34 kDa의 밴드, 면역침강으로부터의 15 kDa의 밴드, 및 면역침강으로부터의 12 kDa의 밴드를 포함하는, 1.5 ml PP-튜브에서 실시예 2로부터의 은-염색된 겔 스

트립을 충분한 물로 세척하고, 이어서 500 μl 의 아세트니트릴(ACN; Wako)을 사용하여 탈수시켰다. 각각의 겔이 백색으로 변한 후, 임의의 용매를 제거하고, 이어서 500 μl 의 물을 첨가하여 각 겔이 팽윤되게 하였다. 물의 제거 후, 500 μl 의 Silver Quest 탈색제(Invitrogen)를 각 겔에 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 임의의 탈색제 용매의 제거 후, 1000 μl 의 물을 첨가한 다음, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 물의 제거 후, 1000 μl 의 물을 다시 첨가하여 각 겔을 세척한 다음, 튜브에서 임의의 용매를 제거하였다. 500 μl 의 ACN을 각 겔에 첨가한 다음, 각 겔이 백색으로 변한 후 과량의 ACN을 제거하였다.

[0395] 500 μl 의 10 mM 디티오프레이톨(DTT; Wako)을 겔에 첨가하고, 이어서 56°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. DTT 용액의 제거 후, 500 μl 의 ACN을 첨가하여 실온에서 10분 동안 약한 혼합 인큐베이션으로 각 겔을 수축시켰다. ACN의 제거 후, 55 mM 아이오도아세트아미드(IAA; Wako)를 각 튜브에 첨가한 다음, 30분 동안 암흑 하에 실온에서 인큐베이션하였다. IAA 용액의 제거 후, 수축된 겔을 얻기 위해 10분 동안 간헐적 볼텍스 혼합과 함께 각 튜브에 500 μl 의 ACN을 다시 첨가하였다. ACN의 제거 후, 10% ACN을 갖는 10 mM 암모늄 바이카보네이트 중 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 트립신 300 μl 을 겔에 첨가한 다음, 5°C에서 6 시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 겔을 37°C 챔버에 넣어 각 겔에서 단백질의 분해를 촉진하고, 이어서 하룻밤 인큐베이션하였다.

[0396] 1/2(v/v) 용액으로 600 μl 의 물/ACN 중 5% 포름산을 각 튜브에 첨가하고, 볼텍스로 잘 혼합하였다. 그 후에, 약한 회전과 함께 37°C에서의 인큐베이션을 실시하여 각 겔로부터 트립신분해 펩티드를 포함하는 용액을 수득하였다. 수득된 용액을 SpeedVac 시스템(Thermo Fisher Scientific)에 의해 건조시키고, 이어서 300 μl 의 0.1% TFA-물 중 5% 메탄올을 사용하여 재구성하였다. 용액을 공급업체의 지침 매뉴얼에 따라 Monospin C18 고체 추출 컬럼(GL Sciences)에 의해 탈염시키고, 그 후에 용리액을 SpeedVac 시스템에 의해 건조시켰다. 30 μl 의 0.1% TFA-물 중 5% 메탄올을 각 튜브에 첨가하여 최종 재구성된 용액을 수득하였다. 용액이 LC-MS 분석에 주어지게 하였다.

[0397] LC/MS 분석

[0398] 수득된 샘플을 온라인 UltiMate 3000 급속 분리 LC(Dionex) 및 20 cm 미만의 ReproSil C18-AQ 3 μm 비드(Dr. Maisch GmbH)로 패키징하고 통합 전기분무 이미터 팁(P-2000 레이저-기반 풀러, Sutter Instruments)을 구비한 미세관 컬럼(360 nm 외경(OD) \times 100 μm ID)이 장착된 HTC PAL 샘플 주입기(CTC Analytics)와 결합된 Q Exactive HF 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 나노-플로우 LC-MS/MS 시스템에서 분석하였다. 각 샘플을 4 μl 풀-루프 모드 주입에 의해 모세관 컬럼 상에 로딩하였다. LC 분리를 위해, 4% ACN 및 0.5% 아세트산(Wako)의 이동상 A 및 80% 아세트니트릴 및 0.5% 아세트산의 이동상 B를 60분에 걸쳐 B의 1-40%, 10분에 걸쳐 B의 40-70%, 및 5분에 걸쳐 B의 70-99%, 및 이후 500 nL/분으로 10분 동안 B의 99% 유지로 다중 선형 구배 용리에 사용하였다. 각 샘플에 대한 총 분석 시간은 120분이었다.

[0399] 각 샘플을 데이터 의존적 분석(DDA) 모드를 이용하여 분석하였고, 여기에는 3×10^6 개 이온의 풀-스캔 MS 이온 표적 및 2×10^5 개 이온의 MS/MS 이온 표적으로 m/z 300에서 3000까지 각 풀-스캔 MS(분해능 60000)의 상위 15 개의 가장 풍부한 이온에 대해 더 높은 에너지 충돌 해리(HCD) MS/MS 스캔(분해능 30000)이 이용되었다. MS/MS 스캔에 대한 최대 이온 주입 시간은 100 ms였다. HCD 정규화된 충돌 에너지를 27로 설정하고, 동역학 배제 시간을 20 s로 설정하고, 펩티드 일치 및 동위원소 배제 기능을 활성화시켰다.

[0400] 데이터 분석

[0401] 인간 ApoE4 FASTA 파일(SEQ ID NO: 45)을 사용하여 Proteome Discoverer ver. 2.1(Thermo Fisher Scientific)로 모든 DDA 질량 스펙트럼을 분석하였다. SEQUEST-HT 알고리즘을 다음 매개변수로 데이터 설정의 MS/MS 검색에 사용하였다: 가변 변형으로서의 메티오닌의 산화, 고정 변형으로서의 시스테인의 카바미도메틸화, 및 분해 효소로서의 트립신. 펩티드 당 두 개의 절단 누락을 허용하였다. 전구체 이온에 대한 질량 허용치를 10 ppm로 설정하고, 생성 이온에 대한 질량 허용치를 20 mDa로 설정하였다. 펩티드 식별에 1%의 최대 위발견율(FDR)을 적용하였다. 단백질 식별에는 단백질 당 2 개 초과 펩티드가 필요했다. 이후, ApoE4에만 초점을 맞춘 상세한 분석을 수행하여 12 kDa 밴드(ApoE4 단편)의 절단 부위를 확인하였다.

[0402] 결과

[0403] 12 kDa ApoE 단편을 트립신 분해로 처리하여 펩티드 기준으로 ApoE의 절단 부위를 조사하였다. rhApoE4 및 15 kDa 밴드를 참조로서 분석하였다. 결과(도 8)는 ApoE의 192 번 내지 206 번 아미노산 잔기에 상응하는 펩티드와 207 번 내지 213 번 아미노산 잔기에 상응하는 펩티드 사이에 12 kDa 밴드로부터의 트립신분해 펩티드의 "존재

비 급락"이 있다는 것을 보여주었다. 이는 "207 번 내지 213 번 펩티드"가 높은 MS 세기로 명확하게 검출되었기 때문에, 190 번 아미노산 잔기와 206 번 아미노산 잔기 사이의 영역에 적어도 하나의 절단 부위가 있다는 것을 의미한다. 짧은 펩티드(5 개 미만의 아미노산 잔기)가 분석에서 제거되었으므로, 예를 들어, 190 번 위치와 191 번 위치 사이에 VR 디펩티드는 관찰되지 않았다.

[0404] 실시예 4

[0405] 12 kDa ApoE 단편에서 LysC 절단 부위의 확인

[0406] 재료 및 방법

[0407] 샘플 제조, LC/MS 분석 및 데이터 분석을 실시예 3에 대해 상술된 바와 같이 수행하였다.

[0408] 결과

[0409] 아미노산 기준으로 12 kDa ApoE 단편의 절단 부위를 줄이기 위해, 또 다른 효소인 리실 엔도펩티다제(LysC)에 의한 분해를 수행하였다. 12 kDa 밴드(리신 C-말단에 고정된 절단)의 표준 LysC 단백질체 분석 결과, 검출된 유일한 펩티드는 ApoE의 234 번 내지 299 번 아미노산 잔기에 상응하는 펩티드였다(도 9). 이는 실시예 3의 결과로서, 190 번 위치와 206 번 위치 사이에 적어도 하나의 절단 부위가 존재한다는 사실을 확인시켜 준다. 특히, ApoE의 158 번 내지 233 번 아미노산 잔기에 상응하는 펩티드가 rhApoE4의 절단 시 검출되었지만(미도시), 12 kDa 밴드를 절단할 때에는 검출되지 않았는데, 이는 190 번 위치와 206 번 위치 사이에 적어도 하나의 절단 부위의 존재를 더욱 뒷받침해준다.

[0410] 실시예 5

[0411] 12 kDa ApoE 단편에서 LysC 절단 부위의 추가 특성화

[0412] 재료 및 방법

[0413] 샘플 제조 및 LC/MS 분석을 실시예 4에 대해 상술된 바와 같이 수행하였다. 추출-이온 크로마토그램(XIC)으로부터의 표적 분석(피크 및 통합을 나타냄)을 예상치 못한 영역에서 절단된 특정 펩티드에 대해 수행한 것을 제외하고, 실시예 4에 대해 상술된 바와 같이 데이터 분석을 수행하였다. 이러한 피크 정성 분석을 Xcalibur 4.0 소프트웨어(Thermo Fisher Scientific)에서 Qual Browser에 의해 실시하였다.

[0414] 결과

[0415] 식별된 12 kDa 단편을 발생시키는 가능한 절단 부위의 상세한 분석 전에, LysC 분해에 의해 수득된 ApoE(SEQ ID NO: 46)의 158 번 내지 233 번 아미노산 잔기에 상응하는 펩티드가 임의의 rhApoE4 밴드, 면역침강으로부터의 34 kDa 밴드, 및 면역침강으로부터의 12 kDa 밴드에서 검출되었는지 조사하였다. 각 XIC를 이론적 m/z(z = 10 내지 15, 5 ppm 질량 허용치)로 나타냄으로써 이를 수행하였다. 결과는 rhApoE4 및 34 kDa 밴드로부터의 용액에서 158 번 내지 233 번 펩티드가 명확하게 검출되었다는 것을 보여주었는데, 이는 샘플 제조 단계에 인공산물 절단이 없다는 것을 의미한다. 다른 한 편으로, 12 kDa 밴드로부터의 샘플 용액에서는 158 번 내지 233 번 펩티드가 관찰되지 않았다. 이는 12 kDa ApoE4 단편에서 aa 158 번과 aa 233 번 사이에 적어도 하나의 절단 부위가 있다는 것을 나타냈다. 요약하면, 실시예 3에 기재된 트립신분해 공정으로부터의 LC/MS 결과로 190 번 위치와 205 번 위치 사이에 예비 절단 부위가 설명된 다음, 그 부위가 실시예 4 및 상기에 기재된 바와 같은 LysC 공정에 의해 확인되었다. 아미노산 기준으로 190 번과 205 번 사이에 가능한 절단 부위를 줄이기 위해, 12 kDa 밴드의 LysC 분해에 의해 제공된 모든 이론적 "비-기준" 펩티드(즉, 190 번 내지 233 번, 191 번 내지 233 번, 192 번 내지 233 번, 193 번 내지 233 번, 194 번 내지 233 번, 195 번 내지 233 번, 196 번 내지 233 번, 197 번 내지 233 번, 198 번 내지 233 번, 199 번 내지 233 번, 200 번 내지 233 번, 201 번 내지 233 번, 202 번 내지 233 번, 203 번 내지 233 번, 204 번 내지 233 번, 205 번 내지 233 번, 및 206 번 내지 233 번)를 각 XIC를 나타냄으로써 조사하여 단편 피크가 검출되었는지의 여부를 확인하였다. 도 10은 ApoE의 200 번 내지 233 번 아미노산 잔기에 상응하는 "비-기준 LysC 펩티드"를 찾을 때의 결과의 예를 나타낸 것이다(SEQ ID NO: 47; [M]=4054.04490). 200 번 내지 233 번 펩티드에 대한 이론적 단일 동위원소 m/z 값(전하 6, 전하 7 및 전하 8)은 각각 676.68143, 580.15655 및 507.76289였다. 각 m/z 값에 대해 추출된 크로마토그램은 동일한 보유 시간에 단일 피크를 제공하며, 관찰된 질량은 각 경우 2 ppm 미만의 질량 정확도로 이론치와 일치한다. 이들 결과는 12 kDa ApoE 단편을 생성하는 특정 절단 부위의 양성 식별으로 이어지는 비-기준 LysC 펩티드가 식별되었다는 것을 강력하게 뒷받침했다(도 11의 A). 또 다른 샘플(ApoE e3/e4 대립유전자)에 대한 중복 실험은 절단 부위의 결정

을 확인시켜 주는 재현 가능한 결과를 나타냈다(도 11의 B).

[0416] 결론적으로, 3 개의 개별 공여체(ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$)로부터의 뇌 샘플에 대한 nanoLC-MS/MS 분석은 12 kDa ApoE 단편을 생성하는 주요 절단 부위가 L198, A199 및 G200의 N-말단에 있었다는 것을 입증해 주었다(도 11).

[0417] 실시예 6

[0418] $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$ 및 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 대립유전자를 갖는 인간 뇌의 12 kDa ApoE 단편에서 절단 부위의 확인

[0419] 재료 및 방법

[0420] 샘플 제조, LC/MS 분석 및 데이터 분석을 실시예 3 내지 실시예 5에 대해 상술된 바와 같이 수행하였다.

[0421] 결과

[0422] N-말단 L198, A199 및 G200은 ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$ 로부터 12 kDa ApoE 단편을 수득하기 위한 주요 절단 부위로서 확인되었다. 이들 절단 부위가 $\epsilon 2$ 또는 $\epsilon 3$ 대립 유전자가 아닌 $\epsilon 4$ 대립 유전자에만 특이적인지를 명확히 하기 위해, ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$ 및 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 운반체의 뇌로부터의 12 kDa 밴드를 이전 섹션과 동일한 방식에 의해 분석하였다.

[0423] 결과는 도 12에 제시되어 있으며, $\epsilon 4/\epsilon 4$ 운반체가 L198, A199 및 G200(주로 A199 및 G200)의 N-말단에서 예상된 절단을 나타낸 반면, $\epsilon 2/\epsilon 3$ 및 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 운반체가 $\epsilon 4/\epsilon 4$ 운반체보다 상당히 부위 절단 신호를 더 낮게 나타냈다는 것을 보여주었다. 결과는 L198, A199 및 G200의 N-말단에서의 절단이 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 및 $\epsilon 4/\epsilon 4$ 대립 유전자 운반체에서 더 풍부하다는 것을 나타냈다.

[0424] 실시예 7

[0425] 식별된 ApoE 단편의 신경학적 독성

[0426] 재료 및 방법

[0427] 세포 배양: Neuro2A 세포(ATCC)를 24 웰 플레이트(Falcon)에 5.0×10^4 개 세포/웰로 시딩하고, 10% 소 태아 혈청을 함유하는 D-MEM 고 포도당(WAKO)에서 배양하였다. 인간 ApoE4(전장, SEQ ID NO: 45) 또는 식별된 ApoE 단편(aa 198 번 내지 299 번, SEQ ID NO: 3; aa 199 번 내지 299 번, SEQ ID NO: 2; aa 200 번 내지 299 번, SEQ ID NO: 1)을 인코딩하는 pAAV-CMV 벡터의 형질감염을 시딩 후 1 일차에 리포펙타민 LTX 및 Plus 시약(Invitrogen)을 사용하여 수행하였다. 2 일 후, 벡터-형질감염 세포를 웨스턴 블롯 분석을 위해 수집하거나 미토콘드리아 호흡 측정 4 시간 전에 Seahorse XF96 세포 배양 마이크로플레이트(Agilent Technologies)에 2.0×10^4 개 세포/웰로 다시 시딩하였다.

[0428] 랫트 해마 뉴런을 이용한 검정을 위해, 시한적 임신 Wistar 랫트(Charles River Laboratories)로부터 배아일(E) 18 일에 수득된 태아로부터 해부된 해마를 트립신화 및 기계적 해리를 이용하여 분해하였다. 해리된 뉴런을 미토콘드리아 호흡 측정을 위해 Seahorse XF96 세포 배양 마이크로플레이트(Agilent Technologies)에서 1.5×10^4 개 세포/웰로, 또는 웨스턴 블롯 분석을 위해 24-웰 플레이트(Falcon)에서 1.0×10^5 개 세포/웰로 시딩하였다. 전장 인간 ApoE4 또는 식별된 ApoE 단편(198 번 내지 299 번, 199 번 내지 299 번, 200 번 내지 299 번)으로의 AAV6 감염을 시험관내에서 7 일에 수행하였다(DIV). 미토콘드리아 호흡의 측정 또는 웨스턴 블롯 분석을 위한 샘플 수집을 감염 7 일 후에 수행하였다(14 DIV).

[0429] 웨스턴 블롯 분석: 완전(EDTA-비함유) 프로테아제 억제제 콕테일(Roche) 및 PhosSTOP 단백질 포스파타제 억제제(Sigma)를 함유하는 RIPA 완충액(50 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP40, 0.25% 소듐 데옥시콜레이트, 0.1 M NaCl, 0.5 mM PMSF)에 의해 세포를 용해시키고, 소니케이션하였다. SDS-PAGE 전에 환원 시약(6x)(Nacalai Tesque)이 있는 샘플 완충 용액을 첨가하였다. SDS-PAGE를 위해, XV PANTERA MP Gel(DRC) 15%를 사용하였다. 전달을 위해, 트랜스-블롯 터보(BIO-RAD)를 사용하였다. 면역블롯팅을 위해, iBind 웨스턴 시스템(ThermoFisher Scientific)을 다음 항체와 함께 사용하였다: 항-ApoE PA5-27088(ThermoFisher Scientific); 178479(Calbiochem).

[0430] 미토콘드리아 호흡 측정: 산소 소비율(OCR)의 실시간 측정을 세포의 플럭스 분석기 XF96(Agilent Technologies)을 사용하여 수행하였다. 측정 전에, 배양 배지를 10 mM 소듐 피루베이트(Sigma), 10 mM D-글루코스(Sigma), 2 mM 글루타민(Sigma)을 함유하는 37°C 예열된 XF 기본 배지(Agilent Technologies)로 교체하였

다. 측정 배지의 pH를 7.4로 조절하였다. 배양 플레이트를 검정 전 60분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 미토콘드리아 기능의 분석을 위해, XF 세포 미토콘드리아 스트레스 검사 키트(XF Cell Mito Stress Test Kit)(Agilent Technologies)를 사용하였다. 기초 OCR의 측정 후, 미토콘드리아 복합 억제제를 각 세포에 순차적으로 주입하였다. 억제제를 다음 농도로 사용하였다: 올리고마이신 1 μM ; 카보닐 시아나이드 4-(트리플루오로메톡시) 페닐히드라존(FCCP), Neuro2A 세포의 경우 0.25 μM , 랫트 해마 뉴런의 경우 2 μM ; 로테논/안티마이신 A 0.5 μM . OCR 값을 XFe96 소프트웨어에 의해 자동으로 계산하고, 기록하고, 플롯팅하였다. 예비 호흡 용량을 (FCCP 호흡 -기초 호흡)으로 측정하였다.

[0431] 결과

[0432] Neuro2A 세포와 랫트 일차 해마 뉴런 둘 모두에서, 식별된 ApoE 단편(198 번 내지 299 번, 199 번 내지 299 번, 200 번 내지 299 번) 중 하나를 발현하는 균은 예비 호흡 용량(도 13의 A 및 B)의 감소를 나타냈는데, 이는 이들 단편이 미토콘드리아 손상을 초래한다는 것을 지시한다. 또한, 단편은 전장 ApoE4보다 훨씬 낮은 발현 수준으로 미토콘드리아 기능 장애를 일으켰다(도 13의 A 내지 C). 결과는 인간 뇌로부터 식별된 ApoE의 C-말단 단편이 신경독성이라는 것을 보여주었다.

[0433] 실시예 8

[0434] 플라스미드 제조 및 항원 생산

[0435] 본 실시예는 하기 표 1에 열거된 항원을 생산하기 위한 Expi293 세포의 일시적 형질감염 및 후속 정제를 통한 플라스미드 제조 및 생산을 기술한다.

[0436] [표 1]

생산된 항원			
항원 (약칭)	정보/태그	정제	SEQ ID NO:
ApoE4-1-272-HIS	10xHIS-ApoE4(1-272)	IMAC, 탈염	56
L198-HIS	ApoE-L198-H299-10xHIS	IMAC, 탈염	57
A199-HIS	ApoE-A199-H299-10xHIS	IMAC, 탈염	58
G200-HIS	ApoE-G200-H299-10xHIS	IMAC, 탈염	48
ApoE4-FL-HIS	10xHIS-ApoE4(1-299)	IMAC, 탈염	49

[0437]

[0438] 플라스미드 제조: 관심 서브-클로닝된 맞춤형 삽입물을 갖는 pcDNA3.4-TOPO 플라스미드를 GeneArt(Thermo Fisher Scientific)로부터 주문하였다. 분취량의 플라스미드 DNA를 클로닝 서비스와 함께 주문하지 않았다면, 세포 형질감염에 충분한 물질을 생산하도록 DH5 α *이. 콜라이*로 플라스미드를 형질전환시켰다.

[0439] 확립된 프로토콜을 이용하여 형질전환 및 플라스미드 제조를 수행하였다. 간략히, 50 μl 의 신선하게 해동된 적격 DH5 α *이. 콜라이*를 10 ng 내지 100 ng의 플라스미드를 첨가함으로써 형질전환시키고, 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하고, 이어서 42°C에서 45초간 열 충격을 수행하고, 5분 동안 얼음 위에서 회수하고, 그 후에 250 μl 의 SOC 배지(Invitrogen)를 첨가하고, 세균을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 25 μl 내지 100 μl 의 배양물을 암피실린-함유 한천 플레이트 상에서 스트리킹하는 데 사용하고, 이로부터 콜로니를 37°C에서 인큐베이션한 다음 날에 선택하였다. 콜로니 재스트리킹으로부터 클론을 선택하였다.

[0440] 암피실린이 있는 LB 배지의 예비 배양물에 클론을 접종하고, 하룻밤 37°C에서 확장시킨 후, 세균을 펠렛화하였다. 세균 펠렛을 사용하여 HiSpeed Maxi 키트(Qiagen)를 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하고, 플라스미드 DNA를 얻기 위한 절차 전반에 걸쳐 공급업체의 지침에 따랐다.

[0441] 일시적 형질감염에 의한 항원 발현: 요망되는 항원을 Expi293 시스템(Expi293 세포 및 ExpiFectamine™ 293 시약; Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 일시적으로 발현시키고, 상청액으로 분비되도록 설계하였다.

[0442] 간략히, Expi293 세포를 Expi293™ 발현 배지(37°C, 8% CO₂, 85% 습도 및 125 rpm)에서 유지시켰다. 형질감염 1일 전 2 × 10⁶ 개/ml로 시딩된 세포를, 공급업체의 지침에 따라, ExpiFectamine™ 293 시약 키트를 사용하여 제조된 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 플라스미드 DNA 복합체로 형질감염시켰다(전형적으로 0 일에 95% 초과 생존 및 개수 34 × 10⁶ 개/ml). 인핸서 I+II를 프로토콜에 따라 형질감염 후 1 일차에 첨가하였다. 세포 생존율을 정기적으로 모니터

터링하고(AO/PI 염색, Nexcelom K2 셀로미터), 생존율이 50% 미만으로 떨어지면 배양물을 수확하였다. 수확을 위해, 상청액을 원심분리(2000 g, 15분, 4℃)에 의해 제거한 후, 0.22 μm 바틀 탑 필터(Millipore)를 사용하여 멸균 여과하였다. 정제에 바로 사용되지 않은 여과된 상청액은 추후 처리를 위해 -80℃에서 저장하였다.

[0443] 고정된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)에 의한 HIS-태깅된 항원의 정제: 표 1에 열거된 폴리히스티딘-태깅된 재조합 표적 단백질을 수정된 프로토콜에 따라 니켈-기반 IMAC에 의해 정제하였다.

[0444] 간략히, 투입된 상청액을 사전-평형된(완충액 A: 20 mM Tris + 0.5 M NaCl, pH 8) IMAC 컬럼(HisTrap Excel, GE Healthcare, cat. no. 17-3712-06) 상에 로딩하기 전에 재여과하였다. 샘플 농도, 순도 및 수집에 최적화된 용리 구배를 적용하기 전에 비결합 단백질을 세척하였다(완충액 B: 20 mM Tris + 0.5 M NaCl + 500 mM 이미다졸, pH 8). 분획을 분석하고, 완충액 교환 전에 관련 분획을 모았다.

[0445] 정제된 샘플을 HiPrep™ 26/10 탈염 컬럼(GE Healthcare, cat. no. 17-5087-01)을 사용하여 멸균 PBS(pH 7.4)로 완충액 교환하고, Amicon® 초원심 여과기(Millipore)를 사용하여 농축시켰다. 표준물로서, 최종 생성물을 0.2 μm 시린지 필터(Pall)를 사용하여 멸균 여과하였다.

[0446] 실시예 9

[0447] N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 G200에 대한 항체의 생성 및 스크리닝

[0448] 본 실시예는 BALB/c 마우스의 면역화와 그에 뒤이은 하이브리도마 세포주의 생성 및 스크리닝을 기술한다.

[0449] 재료 및 방법

[0450] 펩티드 합성: 본 실험에 사용된 면역원을 이전 실시예에서 식별된 신경독성 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프 중 하나를 도입하도록 설계하였다. 이의 N-말단 서열로서, 면역원은 전장 ApoE 내 200 번 내지 205 번 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하였다. 이러한 N-말단 서열을 6-아미노카프로산 링커(Acp; 아미노핵산산 링커(Ahx)로도 표기됨), 및 이어서 예를 들어 지시된 바와 같은 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 또는 소 혈청 알부민(BSA)에 대한 접합 용도의 시스테인 잔기에 C-말단으로 커플링시켰다. 사용된 전체 면역원 서열은 GQPLQE-Acp-C(SEQ ID NO: 50)였다. SEQ ID NO: 50은 Innovagen AB에 의해 제조되고, 95.5% 순도로 전달되었다.

[0451] 추가로, 신경독성 ApoE 단편의 식별된 다른 두 개의 추정 N-말단 네오-에피토프를 도입한 ApoE-유래 네오-에피토프뿐만 아니라 어떠한 식별된 네오-에피토프도 없는 음성 대조군 펩티드를 제조하였다. 이들 펩티드를 마찬가지로 6-아미노카프로산 및 시스테인 잔기에 커플링시켰다. 제1 네오-에피토프 펩티드는 이의 N-말단 서열로서 전장 ApoE 내 199 번 내지 204 번 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하였다. 따라서, 전체 서열은 AGQPLQ-Acp-C(SEQ ID NO: 51)였다. SEQ ID NO: 51은 Innovagen AB에 의해 제조되고, 96.7% 순도로 전달되었다. 제2 네오-에피토프 펩티드는 이의 N-말단 서열로서 전장 ApoE 내 198 번 내지 203 번 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하였다. 따라서, 전체 서열은 LAGQPL-Acp-C(SEQ ID NO: 52)였다. SEQ ID NO: 52는 Innovagen AB에 의해 제조되고, 95.2% 순도로 전달되었다. 음성 대조군 펩티드의 전체 서열은 AATVGLAGQPLQER-Acp-C(SEQ ID NO: 53)였다. SEQ ID NO: 53은 Innovagen AB에 의해 제조되고, 97.1% 순도로 전달되었다.

[0452] 면역화: 10 주령 내지 12 주령 Balb/c 마우스를 KLH에 접합된 SEQ ID NO: 50으로 면역화시켰다. 첫 주사 시(피하, s.c.), 면역원을 프로인드 완전 애주번트와 함께 제공하였다. 마지막 하나를 제외한 후속 주사 시(s.c.), 면역원을 프로인드 불완전 애주번트에 제공하였다. 각 면역화 3 주 후에 혈장 샘플을 수집하였다. 모든 마우스는 최대 10 회의 주사를 받을 수 있지만, 모든 마우스에 면역화를 더 적게 이용하였다. 마지막 면역화(추가 용량)를 애주번트 없이 복강내(i.p.)로 투여하였다.

[0453] 직접 ELISA에 의한 혈장 스크리닝: 혈장 샘플을 소 혈청 알부민, BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 50, 및 재조합 ApoE 단편 G200-HIS(SEQ ID NO: 48)에 대항하는 반응성에 대하여 ELISA에 의해 분석하여, 면역화를 중지하고 하이브리도마 생성을 개시할 시기를 결정하였다. 간략히, 96-웰 반 면적 플레이트(Corning)를 4℃에서 하룻밤 50 μl/웰의 PBS 중에 1 μg/ml의 항원, 즉, BSA에 커플링된 G200 N-말단 네오-에피토프 펩티드(SEQ ID NO: 50)에 도입된 200 번 내지 205 번 ApoE 서열) 또는 정제된 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS(SEQ ID NO: 48)로 코팅하였다. 플레이트를 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 1시간 동안 150 μl/웰의 단백질-비함유 차단 용액(Pierce)으로 차단하였다. 플레이트를 0.28 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다. 1/450의 시작 희석으로 3 배 연속 희석된 혈장 샘플을 플레이트에 첨가하고(희석 완충액: 0.1% BSA 및 0.05% TWEEN®-20이 있는 PBS), 실온에서 2시간 동

안 인큐베이션하였다. 플레이트를 이전과 같이 4 회 세척하였다. 검출 항체(HRP-접합 항-마우스 IgG, Southern Biotech, cat. no. 1030-05, 희석 완충액에서 1/10000 희석)를 50 μ l/웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 추가 세척 후(상기와 같이), 50 μ l/웰의 K-Blue® 수성 기질(Neogen)을 첨가하고, 50 μ l/웰의 0.5 M 내지 2 M H₂SO₄로 10분 내지 15분 후에 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 광학 밀도를 ELISA 판독기(Tecan)를 사용하여 판독하였다. 종점 역가는 블랭크 웰의 평균(배경)과 블랭크 웰의 3 개 표준 편차의 합을 초과하는 희석으로 규정되었다. 1/100,000의 종점 역가는 충분히 높은 것으로 간주되었고, 이에 도달한 이후에는 하이브리도마가 생성될 때까지 더 이상 면역화를 수행하지 않았다.

[0454] 하이브리도마의 생성: 마우스는 하이브리도마 생성 3 일 전에 마지막 추가 용량의 면역원 i.p.(애주번트 없음)를 받았다. 희생된 마우스로부터 단리된 비장세포를 Sp2/0 세포와 3:1 비로 융합하고, 선별을 위해 HAT를 함유하는 ClonaCell™-HY 하이브리도마 선별 배지 D(StemCell Technologies)의 존재 하에 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다.

[0455] 바람직하게는 G200-HIS 재조합 ApoE 단편에 대한 반응성에 대해 웰을 다음 2 주 동안 2 회 스크리닝하고, 가지적 클론을 함유하는 양성 웰을 추가로 처리하였다. 식별된 클론을 확장하고, 단클론성을 보장하도록 적어도 두 차례의 제한 희석 검정에 주어지게 하였다. 관심 클론을 동결보존하고, 항체 생산을 위해 확장하고, 시퀀싱하였다(Absolute Antibodies, UK).

[0456] 직접 ELISA에 의한 하이브리도마 스크리닝: 표적 에피토프에 대항하는 반응성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 식별하기 위한 ELISA 실험을 섹션 "직접 ELISA에 의한 혈장 스크리닝"에서 상술된 바와 같이 ELISA 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 하이브리도마의 스크리닝 동안, 그리고 단클론성에 도달하기 위해, 3 개의 상이한 항원을 1 μ g/ml 항원의 농도로 사용하였다. 이들은 BSA에 커플링된 G200 N-말단 네오-에피토프 펩티드(SEQ ID NO: 50에 도입된 200 번 내지 205 번 ApoE 서열), 정제된 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS(SEQ ID NO: 48) 및 재조합 전장 ApoE4(SEQ ID NO: 45)였다. 하이브리도마 상청액을 2 배 희석하고(희석 완충액: 0.1% BSA 및 0.05% TWEEN-20이 있는 PBS), G200-HIS 단편에 대한 결합에 대하여 스크리닝하였다. 하이브리도마 스크리닝 ELISA를 위해, 2 초과 OD-값 및 클론/들의 존재에 기초하여 "양성" 웰을 선별하였다. 그 후에, 식별된 양성 클론에서 플레이트를 위한 코트로서 G200-HIS 단편(SEQ ID NO: 48), BSA에 커플링된 G200-펩티드(SEQ ID NO: 50), 및 ApoE4 전장 단백질(SEQ ID NO: 45)로 동일한 ELISA 프로토콜을 이용하여 양성 및 음성 스크리닝을 수행하였다. 음성 스크리닝에서 실질적인 결합을 나타내지 않은 클론을 단클론성을 보장하도록 두 차례의 제한 희석 검정에 주어지게 하고, G200-HIS 단편에 대한 결합에 대하여 스크리닝하였다. 전장 ApoE4가 아니라 G200-HIS 단편에 여전히 결합하고 계속 성장한 단클론성 클론을 추가 특성화에 특히 관심 대상으로 삼았다.

[0457] 결과

[0458] 하이브리도마 기법에 의한 단클론성 항체의 생성: ApoE 단백질의 아미노산 G200에서 시작하는 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체를 200 번 내지 299 번 ApoE 단편에서 N-말단을 따라 처음 6 개 아미노산으로 이루어진 ApoE 특이적 서열을 이용하여 면역화에 의해 생성하였다. 면역화 펩티드의 축소는 전장 ApoE 단백질에서 확인되는 선형 에피토프에 대한 어떠한 결합 없이 ApoE 단백질의 아미노산 G200에서 시작하는 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체의 생성을 가능하게 하는 데 필수적인 것으로 여겨졌다. Acp 링커 및 시스템인 잔기를 통해 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)에 접합된 200 번 내지 205 번 ApoE-특이적 서열 펩티드를 면역화에 사용하였다. 혈장 샘플을 BSA에 접합된 상응하는 펩티드(KLH에 대하여 생성되는 반응성의 검출을 막기 위해), 및 재조합 ApoE 단편에 대항하는 반응성에 대하여 ELISA에 의해 분석하였다. 역가가 적어도 1/100,000 초과일 때, 마우스를 희생시키고, 비장을 수집하고, 하이브리도마 생성에 사용하였다.

[0459] G200에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체에 대한 ELISA 스크리닝: 생성된 하이브리도마 클론을 재조합 ApoE 단편 G200-HIS에 대한 반응성, 뿐만 아니라 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 50에 대항하는 반응성에 대하여 스크리닝하였다. 또한, 재조합 전장 ApoE4에 대한 반응성의 결여를 평가하였다. 7 개의 클론을 아미노산 G200에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 항체로서 식별하고, 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 21C3, 23D5 및 28F2로 표기하였다.

[0460] 실시예 10

[0461] N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 G200에 대해 단클론성 항체를 함유하는 비정제 하이브리도마 상청액의 특성화

[0462] 본 실시예는 힌지 영역(아미노산 G200에서 시작)에서의 절단으로 생성되는 C-말단 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체의 직접 ELISA에 의한 특성화를 기술한다. 또한, 알츠하이머병 뇌

추출물 내의 아미노산 G200에서 시작하는 N-말단 네오-에피토프를 갖는 ApoE 단편(12 kDa 이하)에, 전장 ApoE에 대한 임의의 결합 없이 선택적으로 결합하는 단클론성 항체의 능력을 웨스턴 블롯을 이용하여 평가하였다.

[0463]

재료 및 방법

[0464]

직접 ELISA에 의한 선택성 평가: 후술되는 직접 ELISA를 이용하여 아미노산 G200에서 시작하는 C-말단 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 생성된 단클론성 항-ApoE 항체의 결합 선택성을 평가하였다. N-말단 네오-에피토프 펩티드(ApoE 서열 aa 200 번 내지 205 번, SEQ ID NO: 6, 실험 용도로 SEQ ID NO: 50에 도입됨) 및 힌지 영역에서의 절단으로 생성된 재조합 C-말단 ApoE 단편(ApoE 서열 aa 200 번 내지 299 번, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 48로서 실험 용도로 His-태깅됨)에 선택적으로 결합하는 능력을 재조합 전장 ApoE(ApoE4 서열 aa 1 번 내지 299 번, SEQ ID NO: 45)에 대한 결합과 비교하였다.

[0465]

표준 ELISA 프로토콜에 따라 스크리닝을 수행하였다. 간략히, BSA에 접합된 N-말단 네오-에피토프 펩티드(SEQ ID NO: 50), 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS(SEQ ID NO: 48) 및 재조합 전장 ApoE4(SEQ ID NO: 45; Abcam; cat. no. ab50243)의 1 µg/ml 용액을 PBS에서의 희석에 의해 제조하였다. 50 µl/웰을 ELISA 반-면적 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 첨가하였다. 그 후에, 플레이트를 접착성 실러로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 플레이트를 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 1시간 동안 150 µl/웰의 단백질-비함유 차단 용액(Pierce)으로 차단하였다. 플레이트를 0.28 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다. 관심 항체를 1 µg/ml의 시작 희석으로 3 배 연속 희석하고(희석 완충액(0.1% BSA 및 0.05% TWEEN®-20이 있는 PBS)과 1:1 혼합), 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 이전과 같이 4 회 세척하였다. 검출 항체(HRP-접합 항-마우스 IgG, Southern Biotech, cat. no. 1030-05, 희석 완충액에서 1/10000 희석)를 50 µl/웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 추가 세척 후(상기와 같이), 50 µl/웰의 K-Blue® 수성 기질(Neogen)을 첨가하고, 50 µl/웰의 0.5 M H₂SO₄로 5분 내지 15분 후에 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 광학 밀도를 ELISA 관독기(Tecan)를 사용하여 관독하였다. 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 항체 농도에 대해 광학 밀도를 플롯팅하였다(도 14).

[0466]

아이소타입화: 각 항체 클론의 아이소타입을 제조업체의 지침에 따라 마우스 단클론성 항체 아이소타입화 키트(Roche)를 사용하여 결정하였다.

[0467]

웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 후술되는 웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합 없이 G200에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체의 선택적 결합을 평가하였다. 알츠하이머병 환자의 신선한 냉동된 뇌 조직을 RIPA 2% SDS 추출 완충액에서 균질화하고, 이어서 16000 x g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 후속 상청액에서 표준 단백질 농도 결정을 수행하였다.

[0468]

80 µg의 총 단백질을 함유하는 RIPA 2% SDS 뇌 추출물을 2x Laemmli 샘플 완충액과 혼합하고, 95°C에서 5분 동안 비등시키고, SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher, cat. no. NW00120BOX) 상에 로딩하였다. 겔을 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시키고, 그 후에 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 1시간 동안 Odyssey® 차단 완충액에서 차단하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에 1:1 희석된 하이브리도마 상청액과 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-마우스-800CW(LI-COR, cat. no. 925-32210)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0469]

웨스턴 블롯 막에서 수득된 밴드가 ApoE 기원이었는지를 확인하기 위해, 막을 0.1% TWEEN®-20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에서 1:2000 희석된 다클론성 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. no. 178479; 면역원 ApoE aa 1 번 내지 299 번)로 하룻밤 재염색하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Odyssey® 차단 완충액에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-염소-680RD(LI-COR, cat. no. 925-68074)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0470]

결과

[0471]

선택성 평가: 아미노산 G200에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 7 개의 하이브리도마 클론(4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 21C3, 23D5 및 28F2)은 G200-BSA 펩티드(BSA에 접합된 SEQ ID NO: 50) 및 재

조합 G200-HIS 단편(SEQ ID NO: 48)에 대한 결합을 나타낸 반면, 재조합 ApoE4 전장 단백질(aa 1 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 45)에 대한 결합은 나타나지 않았다(도 14). 참조 항체 ApoE Ab(Santa Cruz, cat. no. SC-393302, 에피토프 ApoE aa 274 번 내지 299 번)는 재조합 G200-HIS 단편 및 재조합 ApoE4 전장 단백질에 동등하게 잘 결합한다. 그러나, 참조 항체에 대한 에피토프가 ApoE aa 274 번 내지 299 번이기 때문에, 예상된 바와 같이 G200-BSA 펩티드에 대한 결합이 나타나지 않았다. 도 14에 나타난 실험은 단클론성 하이브리도마 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 21C3, 23D5 및 28F2로부터의 비정제 세포 상청액을 사용하여 수행된 것이었다.

[0472] 아이소타입화: 마우스 단클론성 항체 아이소타입화 키트(Roche)를 사용하여 결정하는 경우 항체 클론의 아이소타입은 표 2에 나타나 있다.

[0473] [표 2]

이소형화 결과

클론	서브-클래스	경쇄
4E6	IgG1	K
7B10	IgG1	K
7C7	IgG2b	K
17G4	IgG1	K
21C3	IgG2b	K
23D5	IgG1	K
28F2	IgG1	K

[0474]

[0475] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 아미노산 G200에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 하이브리도마 클론(4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 21C3, 23D5 및 28F2)을 전장 ApoE에 대한 어떠한 결합 없이 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물에서 12 kDa 이하의 ApoE 단편에 선택적으로 결합하는 이들의 능력에 대하여 시험하였다. 웨스턴 블롯 분석은, 단클론성 하이브리도마가, 전장 ApoE에 대한 어떠한 가지적 결합도 없이 크기가 약 12 kDa 및 10 kDa인 두 개의 ApoE 단편에 결합한다는 것을 입증하였다(도 15의 A; 21C3은 이의 서열이 4E6의 서열과 동일한 것으로 판명되었기 때문에 데이터 미도시, 추가로 하기 참조). 다클론성 항-ApoE 항체를 이용한 웨스턴 블롯 막의 재염색은 전장 ApoE, 고분자량(HMW) ApoE 단편(약 20 kDa 내지 25 kDa) 및 별개의 12 kDa ApoE 단편의 염색을 보여주었다(도 15의 B).

[0476] 실시예 11

[0477] 하이브리도마 시퀀싱 및 재조합 항체의 생산

[0478] 재료 및 방법

[0479] 하이브리도마 시퀀싱: 알츠하이머병 뇌 추출물 내 아미노산 G200에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 선택성이 입증되고 인간 표적 결합이 증명된, 실시예 8 내지 실시예 10에서 생성되고 특성화된 바와 같은 단클론성 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 시퀀싱을 위해 Absolute Antibody로 보냈다. 간략히, 전체 전사체 산탄층 시퀀싱에 의해 하이브리도마 시퀀싱을 수행하였다. 성숙한 VH 영역 및 VL 영역의 DNA 및 단백질 서열을 식별하였다.

[0480] Absolute Antibody에서 재조합 항체의 발현, 생산 및 정제: 가변 도메인을 합성하기 전에 포유동물 세포(HEK293)에서의 발현을 위해 설계하고 최적화시켰다. 이어서, 서열을 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 적절한 아이소타입 및 아형에 대한 Absolute Antibody 클로닝 및 발현 벡터로 서브클로닝하였다.

[0481] HEK293 세포를 일시적인 형질 감염을 위한 최적의 단계로 계대배양하였다. 세포를 중쇄 및 경쇄 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시키고, 추가 6 일 내지 14 일 동안 배양하였다. 2 mg의 정제된 항체를 수득하려는 목적으로 적절한 부피의 세포를 형질감염시켰다.

[0482] 배양물을 수확하고, 친화성 크로마토그래피를 사용하여 1-단계 정제를 수행한 후, 정제된 항체를 PBS로 완충액 교환하였다. 항체를 SDS-PAGE에 의해 순도에 대하여 분석하고, UV 분광기에 의해 농도를 결정하였다.

[0483] 결과

[0484] 하이브리도마 시퀀싱 및 재조합 항체 생산: 알츠하이머병 뇌 추출물에서 인간 표적에 대한 결합이 입증된 것에 더하여, 아미노산 G200에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 선택성이 증명된 하이브리도마 클론을 시퀀싱하였다.

[0485] 다음 하이브리도마 클론을 시퀀싱하였다: 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 21C3, 23D5 및 28F2. 시퀀싱에 의해 항체 4E6 및 21C3은 일차 VH와 VL 둘 모두에서 동일한 서열을 갖는 것으로 밝혀졌다. 전체 항체의 아미노산 서열을 얻었다. 각각의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)에 대하여 얻어진 아미노산 서열은 하기 표 3에서 제공된다.

[0486] [표 3]

가변 영역 서열

영역	항체	SEQ ID NO:
4E6 / 21C3		
VH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQSPPEKRL WVAEISGSGSRDHYTDSVTGRFTVSRDPAKNTLYLEMSSLRSEDTAIY YCARQLTGTDYYGTDYWGQGTSTVTVSS	34
VL	DVLMTQIPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQRPQG PKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQG SHLPYTFGGGTKLEIK	35
7B10		
VH	AVQLVESGGGLVKPGRSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQFPDKRLD WVAEISSGGGSTNYLDTVTGRFTISRDNKNTLYLEMNSLRSEDTAMY YCARQLVGTDYGTDYWGQGTSTVTVSS	36
VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQIVYSNGNTYLEWYLQKPGQS PKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQG SHVPTYFGGGTKLEIK	37
7C7		
VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSASGFTFSSFAMSWVRQSPERRLE WVAEISRGGGYAFYSDTVTGRFTISRDNARNTLFLEMGLRSEDTAMY YCSRQLTGTDYYAMDYWGQGTSTVTVSS	38
VL	DVLLTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQIVYTNNGNTYLEWYLQKPGQS PKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQG SQVPTYFGGGTKLEIK	39
17G4		
VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSASGFTFSRYAMSWVRQSPPEKRL WVAEINSGGSYSFYSDTVTGRFTISRDNKNTLFLEMSSLRSEDTAIY CARQLTGTDYYGTDYWGQGTSTVTVSS	40
VL	DVLMTQTPLSLPVSHGDAQASISCRSSQSLLYSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPTYFGGGTKLEIK	41
23D5		
VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSASGFTFSRYAMSWVRQSPPEKRL WVAEINSGGSYSFYSDTVTGRFTISRDNKNTLFLEMSSLRSEDTAIY CARQLSGTDYYGTDYWGQGTSTVTVSS	42
VL	DVLMTQTPLSLPVSHGDAQASISCRSSQSLLYSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPTYFGGGTKLEIK	41
28F2		
VH	QIQLVQSGPDLKPKGETVKISCKASGYTFTNYAMHWMKQAPGKALKW MGWINTYTGEPTFADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINSLKNEEDMATYF CAREGYYDRSHYFDYWGQGTTLTVSS	43
VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSLSLVHGDGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQ GSHIPFTFGSGTKLEIK	44

[0487]

[0488] 상보성 결정 영역(CDR)은 일차 VH 서열 및 VL 서열에 대한 카바트(Kabat) 정의를 이용하여 식별되었고, 하기 표 4에서 제공된다.

[0489] [표 4]

CDR 영역 서열

항체	CDR H1	CDR H2	CDR H3
4E6/21C3	SYAMS (SEQ ID NO:10)	EISGSGSRDHYTDSVTG (SEQ ID NO:11)	QLTGTDDYYGTDY (SEQ ID NO:12)
7B10	SYAMS (SEQ ID NO:10)	EISSGGGSTNYLDTVTG (SEQ ID NO:13)	QLVGTDDYYGTDY (SEQ ID NO:14)
7C7	SFAMS (SEQ ID NO:15)	EISRGGGYAFYSDTVGTG (SEQ ID NO:16)	QLTGTDDYYAMDY (SEQ ID NO:17)
17G4	RYAMS (SEQ ID NO:18)	EINSGGSYSFYSDTVGTG (SEQ ID NO:19)	QLTGTDDYYGTDY (SEQ ID NO:12)
23D5	RYAMS (SEQ ID NO:18)	EINSGGSYSFYSDTVGTG (SEQ ID NO:19)	QLSGTDDYYGTDY (SEQ ID NO:20)
28F2	NYAMH (SEQ ID NO:21)	WINTYTGTEPTFADDFKG (SEQ ID NO:22)	EGYYDRSHYFDY (SEQ ID NO:23)
	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4E6/21C3	RSSQSIVYSNGNTYLE (SEQ ID NO:24)	KVSNRFS (SEQ ID NO:25)	FQGSHPYPT (SEQ ID NO:26)
7B10	RSSQNIVYSNGNTYLE (SEQ ID NO:27)	KVSNRFS (SEQ ID NO:25)	FQGSHPYPT (SEQ ID NO:28)
7C7	RSSQSIVYTNNGNTYLE (SEQ ID NO:29)	KVSNRFS (SEQ ID NO:25)	FQGSQVPYPT (SEQ ID NO:30)
17G4	RSSQSLLYSNGNTYLE (SEQ ID NO:31)	KVSNRFS (SEQ ID NO:25)	FQGSHPYPT (SEQ ID NO:28)
23D5	RSSQSLLYSNGNTYLE (SEQ ID NO:31)	KVSNRFS (SEQ ID NO:25)	FQGSHPYPT (SEQ ID NO:28)
28F2	RSSLSLVHGDGNTYLE (SEQ ID NO:32)	KVSNRFS (SEQ ID NO:25)	LQGSHPYPT (SEQ ID NO:33)

[0490]

[0491]

단클론성 항체 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 23D5 및 28F2가 재조합 IgG2c 항체로서 생산을 위해 선택되었고, 반면에 21C3은 생산되지 않았다(4E6과의 서열 중복성 때문에). 모든 재조합 항체가 성공적으로 생산되었고, 1 mg/ml의 최종 농도로 정제하였다. SDS-PAGE에 의해 규정하는 경우 항체 순도는 모든 항체에 대해 98% 초과였다.

[0492]

실시에 12

[0493]

재조합 항체의 특성화

[0494]

본 실시예는 직접 ELISA, 억제 ELISA, 생물층 간섭계, 표면 플라즈몬 공명, 인간 뇌 추출물에 대한 면역침강 및 인간 뇌 절편에 대한 면역조직화학을 포함하여 다양한 방법에 의해 실시예 11에서 생산된 재조합 항체의 특성화를 기술한다.

[0495]

재료 및 방법

[0496]

직접 ELISA에 의한 재조합 항체의 선택성 평가: 후술되는 직접 ELISA를 사용하여 실시예 11에서 생산된 재조합 항체의 결합 선택성을 평가하였다. G200 N-말단 네오-에피토프 ApoE 펩티드(BSA-접합 SEQ ID NO: 50) 및 힌지 영역에서의 절단으로 생성된 재조합 G200-HIS C-말단 ApoE 단편(SEQ ID NO: 48)에 선택적으로 결합하는 능력을 L198, A199 및 음성 대조군 펩티드(각각 BSA-접합 SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 및 SEQ ID NO: 53)에 대한, 및 His-태깅된 재조합 전장 ApoE4(ApoE 서열 aa 1 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 49)에 대한 결합과 비교하였다.

[0497]

표준 ELISA 프로토콜에 따라 스크리닝을 수행하였다. 간략히, BSA-접합 네오-에피토프 펩티드, 재조합 C-말단 ApoE 단편, 음성 대조군 펩티드 및 전장 ApoE의 1 µg/ml 용액을 PBS에서의 희석에 의해 제조하였다. 50 µl/웰을 ELISA 반-면적 96 웰 마이크로타이타 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 접착성 실러로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 용액을 폐기한 후, 플레이트를 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 1시간 동안 150 µl/웰의 단 백질-비함유 차단 용액(Pierce)으로 차단하였다. 플레이트를 0.28 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다. 생성된 관심 재조합 항체를 0.5 µg/ml의 시작 희석으로 3 배 연속 희석하였다(희석 완충액(0.1% BSA 및 0.05% TWEEN®-20이 있는 PBS)과 1:1 혼합). 항-ApoE C-말단 항체를 참조 항체(ApoE E-8 마우스 단클론성, cat. no. sc-393302; Santa Cruz Biotechnology)로서 사용하였다. 50 µl/웰을 ELISA 플레이트에 첨가하고, 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 앞서 기재된 바와 같이 4 회 세척하였다. 검출 항체(HRP-접합 항-마우스 IgG, Southern Biotech, cat. no. 1030-05, 희석 완충액에서 1/10000 희석)를 50 µl/웰에 첨가하고, 플레이트를 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 추가 세척 후(앞서 기재된 바와 같이), 50 µl/

웰의 K-Blue® 수성 기질(Neogen)을 첨가하고, 50 μl /웰의 0.5 M H_2SO_4 로 5분 내지 15분 후에 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 광학 밀도를 ELISA 판독기(Tecan)를 사용하여 판독하였다. 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 항체 농도에 대해 광학 밀도를 플롯팅하였다(도 16).

[0498] 또한, 플레이트를 i) 힌지 영역에서의 절단으로 인한 재조합 G200-HIS C-말단 ApoE 단편(SEQ ID NO: 48)과 ii) 재조합 전장 ApoE4(ApoE 서열 aa 1 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 45; Abcam; cat. no. ab50243) 둘 모두로 코팅하는, 두 번째 ELISA 실험을 수행하였다. 이들을 항체에 의한 결합에 이용 가능한 동일한 수의 분자를 제공하기 위해 동일한 몰농도(0.1 μM)로 첨가하였다(BSA-커플링된 펩티드를 이전과 같이 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 코팅하였다). 항체 농도를 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 증가시키고, EC50 값을 로그 작용제 농도 반응 곡선으로부터 결정하였다(도 19).

[0499] 억제 ELISA에 의한 재조합 항체의 선택성 평가 및 IC50 결정: 후술되는 억제 ELISA를 이용하여 실시예 11에서 생산된 재조합 항체에 대한 결합 강도 및 선택성을 평가하였다. 아미노산 G200에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드의 N-말단 네오-에피토프 및 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS에 결합하는 재조합 항체의 능력을 용액 중에 아미노산 L198 및 A199에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드뿐만 아니라 전장 ApoE4(aa 1 번 내지 299 번)에 결합하는 이들의 능력과 비교하여 평가하였다.

[0500] 간략히, 시험하고자 하는 재조합 항체가 용액 중에 아미노산 L198(SEQ ID NO: 52), A199(SEQ ID NO: 51) 또는 G200(SEQ ID NO: 50)에서 시작하는 BSA에 접합된 합성 ApoE 펩티드의 N-말단 네오-에피토프, 또는 BSA-접합 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53), 또는 His-태깅된 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS(SEQ ID NO: 48), 또는 His-태깅된 재조합 전장 ApoE4(SEQ ID NO: 49)와 상호작용할 수 있게 하였다. 그 후에, 혼합물을 BSA-커플링된 G200 합성 ApoE 펩티드로 코팅된 마이크로타이터 플레이트에 첨가하였다. 재조합 항체가 사전-인큐베이션 단계(합성 ApoE 펩티드, 재조합 C-말단 ApoE 단편 또는 전장 ApoE4)에서 임의의 항원에 결합하는 경우, 항체는 마이크로타이터 플레이트에 고정된 합성 G200 ApoE 펩티드에 결합하지 못하게 된다. 이는 ELISA 검출 신호의 억제로 이어진다.

[0501] BSA에 접합된 N-말단 네오-에피토프 펩티드 G200(SEQ ID NO: 50)의 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용액을 PBS에서의 희석에 의해 제조하였다. 50 μl /웰을 ELISA 반-면적 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 접착성 실러로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 상기 용액을 폐기한 후, 플레이트를 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 적어도 1시간 동안 PBS-Tween 20(0.05%)(150 μl /웰)으로 차단하였다. 차단된 플레이트를 0.28 mM NaH_2PO_4 , 2.5 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다.

[0502] 각각의 합성 ApoE 펩티드, 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS 및 전장 ApoE4의 3 배 연속 희석액을 96 웰 저장 플레이트에서 1000 ng/ml부터 시작하여 4 배 희석에 의해 제조하였다(30 μl 최종 부피). 시험하고자 하는 각각의 재조합 항체를 웰 당 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 각각의 합성 ApoE 펩티드, G200-HIS 또는 전장 ApoE4의 연속 희석액에 첨가하였다(30 μl). 샘플을 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 45분 동안 사전-인큐베이션하였다.

[0503] 사전-인큐베이션된 샘플을 차단된 ELISA 플레이트로 옮기고(50 μl /웰), 플레이트를 진탕 없이 실온에서 25분 동안 인큐베이션하였다. 상술된 바와 같이 플레이트를 세척하였다. 알칼리성 포스파타제 접합 항-마우스 IgG 검출 항체(Mabtech, cat. no. 3310-4)를 1:1000 희석하고, 각 플레이트에 첨가하였다(50 μl /웰). 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 45분 동안 진탕하면서(900 rpm) 인큐베이션하고, 후속적으로 상술된 바와 같이 세척하였다. 알칼리성 포스파타제 기질(50 μl /웰)을 플레이트에 첨가하고, 광학 밀도를 최대 120분 동안 405 nm의 파장에서 15분마다 판독하였다. IC50 값을 로그 억제제 농도 반응 곡선으로부터 결정하였다(도 17).

[0504] 또한, BSA에 접합된 ApoE 펩티드로 두 번째 억제 ELISA를 실행하였고, 여기서 용액 중 항원의 출발 농도를 10 배 증가시켰다. 즉, 아미노산 L198(SEQ ID NO: 52), A199(SEQ ID NO: 51) 또는 G200(SEQ ID NO: 50)에서 시작하는 BSA에 접합된 합성 ApoE 펩티드의 N-말단 네오-에피토프, 또는 BSA-접합 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53)의 출발 농도는 10000 ng/ml였다. 또한, 항원의 4 배 연속 희석액을 사용하고, 플레이트를 90분 동안 단백질-비함유 차단 용액(Pierce)으로 차단하고, 사전-인큐베이션된 샘플을 코팅된 플레이트에서 10분 동안(25분 대신) 인큐베이션하고, 광학 밀도를 10분마다(15분마다 대신) 판독하였다. IC50 값을 로그 억제제 농도 반응 곡선으로부터 결정하였다(도 20).

[0505] 생물층 간섭계에 의한 재조합 항체의 선택성 평가 및 K_D 결정: BSA(리간드)에 접합된 N-말단 네오-에피토프 펩티드 G200(SEQ ID NO: 50)과 실시예 11에서 생산된 재조합 항체(분석물) 사이의 결합 상호작용을 Octet RED384

기기(ForteBio)를 사용하여 평가하였다. 분석된 모든 단백질을 1x Kinetics 완충액(ForteBio)에 희석하였다.

- [0506] 항체-표적 상호작용을 분석하고 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS(SEQ ID NO: 48)에 대한 재조합 항체의 결합 친화도를 결정하기 위해, 항-HIS 포획 바이오센서(HIS1K)를 사용하였다. 첫 번째 단계(로딩 단계)에서, HIS-태깅된 재조합 C-말단 ApoE 단편을 바이오센서의 표면 상에서 포획하였다. 다음으로, 2 배 연속 희석하여 150 nM 내지 2.5 nM 범위로 농도 구배의 순수한 항체를 제조하였다. 이어서, 리간드가 있는 HIS1K 바이오센서를 희석된 항체를 함유하는 웰에 침지시키고, 해리 단계를 600초 동안 모니터링하였다. 해리 단계를 모니터링하기 위해, 리간드가 있는 HIS1K 바이오센서를 1x 동역학 완충액을 함유하는 웰로 이동시키고, 해리를 1000초 동안 모니터링하였다. 동역학 실험의 평가를 위해, Octet 데이터 분석 소프트웨어를 사용하였다. 상호작용 분석으로부터 수집된 모든 값을 블랭크 제거하고, 1:2 결합 동역학 글로벌 피트 모델(이가 분석물)을 평가에 사용하였다.
- [0507] 표면 플라즈몬 공명에 의한 재조합 항체의 선택성 평가 및 K_D 결정: 항원과 항체 사이의 결합 상호작용을 표준 절차에 따라 Biacore 8K 기기(GE Healthcare)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 평가하였다.
- [0508] 전장 ApoE에 비해 N-말단 네오-에피토프에 대한 단클론성 항체의 결합 친화도를 결정하기 위해, 단일-사이클 동역학 실험을 실시하였다. 제조업체의 지침에 따라 아민 커플링 키트(GE Healthcare, cat. no. BR100050)를 사용하여 CM5 센서 칩(GE Healthcare, cat. no. 29104988) 상에 재조합 단편을 고정하였다. 참조(고정된 항원 없음) 및 활성 표면을 각각 플로우 셀 1(Fc1) 및 플로우 셀 2(Fc2)에서 아민 커플링 시약을 사용하여 동일한 조건으로 처리하였다. 활성 표면에 대한 고정 수준을 약 150 내지 200 반응 단위(RU)로 유지하였다. 동일한 프로토콜 설정을 이용하여 전장 ApoE를 CM5 칩 표면 상에 고정하였다.
- [0509] 정제된 항체를 14 nM에서 0.3 nM까지 2-배 연속 희석하여 제조하였다(5 단계 내지 7 단계로). 다음으로, 제조된 정제 항체의 연속 희석액을 센서 칩의 두 플로우 셀 모두에 걸쳐 주입하였다(30 μ l/min, 접촉 시간 360초, 해리 시간 2500초). 상호작용 시리즈를 삼중으로 수행하였다. 값을 블랭크 제거하고, 이가 분석물 결합 동역학 피트 모델을 평가에 사용하였다.
- [0510] 모든 SPR 실험에서, 1xPBS-P+(GE Healthcare, cat. no. 28995084)를 사용하여 항체 및 표적 항원을 희석하였다. 25°C에서 실험을 수행하였다.
- [0511] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 후술되는 웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합 없이 G200에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 재조합 항체의 선택적 결합을 평가하였다. 알츠하이머병 환자의 신선한 냉동된 뇌 조직을 RIPA 2% SDS 추출 완충액에서 균질화하고, 이어서 16000 x g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 후속 상청액에서 표준 단백질 농도 결정을 수행하였다.
- [0512] 약 60 μ g의 총 단백질을 함유하는 RIPA 2% SDS 뇌 추출물을 2x Laemmli 샘플 완충액과 혼합하고, 95°C에서 5분 동안 비등시키고, SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher, cat. no. NW00120BOX) 상에 로딩하였다. 겔을 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시키고, 그 후에 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1 시간 동안 차단하고, G200에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 재조합 항체(0.1% TWEEN®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR) 중에 2 μ g/ml)와 함께 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-마우스-800CW(LI-COR, cat. no. 925-32210)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.
- [0513] 웨스턴 블롯 막에서 수득된 밴드가 ApoE 기원이었는지를 확인하기 위해, 막을 0.1% TWEEN®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에 1:2000 희석된 다클론성 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. no. 178479; 면역원 ApoE aa 1 번 내지 299 번)로 하룻밤 재염색하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-염소-680RD(LI-COR, cat. no. 925-68074)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.
- [0514] 면역침강 및 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 후술되는 면역침강/웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합

없이 G200에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 재조합 항체의 선택적 결합을 평가하였다. 알츠하이머병 환자의 신선한 냉동된 뇌 조직을 RIPA 2% SDS 추출 완충액에서 균질화하고, 이어서 16000 x g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 후속 상청액에서 표준 단백질 농도 결정을 수행하였다.

[0515] 약 75 μ g의 총 단백질을 함유하는 RIPA 2% SDS 뇌 추출물을 IP 완충액(PBS, 0.05% TWEEN®-20, 1% Triton X-100 및 cOmplete™ 프로테아제 억제제 각테일) 중에 G200에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 재조합 항체와 혼합하고, 2시간 동안 인큐베이션하였다(헤드-투-테일 회전과 함께 실온에서). Dynabeads™ 단백질 A 비드(Invitrogen)를 첨가하고, 추출물-항체-다이나비드 혼합물을 1시간 동안 인큐베이션하였다(헤드-투-테일 회전과 함께 실온). 상청액을 제거하고, 마그네틱 비드를 세척하였다. 2x Laemmli 샘플 완충액을 첨가하고 95°C에서 5분 동안 비등시킴으로써 면역침강물을 비드로부터 용리시켰다. 용출액을 SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher, cat. no. NW00120BOX) 상에 로딩하고, 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시키고, 그 후에 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1시간 동안 차단하고, 0.1% TWEEN®-20가 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에 1:1000 희석된 항-ApoE C-말단 항체(Sigma, cat. no. sab2701946)와 함께 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-토끼-800CW(LI-COR, cat. no. 925-32211)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0516] 면역조직화학(IHC)에 의한 알츠하이머병 뇌에서의 인간 표적 관여: 알츠하이머병(ApoE ϵ 3/ ϵ 3 및 APOE ϵ 4/ ϵ 4)이 있는 개체로부터 파라인 포매된 조직을 네덜란드 뇌 은행(Netherlands Brain Bank)으로부터 입수하였다. 절편을 4 μ m로 절단하였다.

[0517] Discovery XT Robot(Ventana Medical Systems)을 이용하여 재조합 항체 7C7(실시예 11 참조) 및 항-ApoE C-말단 항체(Sigma, cat. no. sab2701946; 면역원 ApoE aa 237 번 내지 299 번) 및 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. no. 178479; 면역원 ApoE aa 1 번 내지 299 번)로 IHC 염색을 수행하였다. 또한, 아밀로이드반의 염색을 위해 항-A β 항체 6E10(Covance, cat. no. SIG-39320) 및 4G8(Covance, cat. no. SIG-39220)을 사용하여 뇌 절편을 염색하였다.

[0518] 간략히, 아밀로이드 베타 또는 ApoE의 단일 형광 또는 명시야 IHC 염색을 위해, 자동 염색 로봇 및 HQ 합텐 기술을 이용하였다. Ventana Medical Systems(F. Hoffmann-La Roche, Ltd)로부터의 검출 시스템 Discovery XT 및 키트를 사용하였다. Amp HQ 키트는 1) 항-HQ HRP, DISCOVERY(Roche, cat. no. 760-48202), 항-토끼 HQ, DISCOVERY(Roche, cat. no. 760-4815); 2) 단클론성 항 마우스 IgG 브릿지 항체를 갖는 OmniMap 또는 UltraMap HRP 멀티머(Abcam, cat. no. [M204-3] ab133469); 및 3) 색변화 DISCOVERY ChromoMap DAB 키트(Roche, cat. no. 760-159) 또는 형광 검출 키트 Cy5 키트, DISCOVERY(Roche, cat. no. 760-238)와 함께 표준 IHC에서 발색 또는 형광 신호의 향상을 가능하게 한다. 파라인 절편을 60°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 2x 자일렌에서 15분 동안 탈파라핀처리하고, 이어서 1x PBS에서 재수화하기 전에 구배 에탄올 세척을 수행하였다. 항체의 적용 전, 절편을 24분 동안 슬라이드에 가해지는 자동 가열 공정(95°C에서 Ventana의 표준 CCI 프로토콜, 또는 프로테아제(Ventana 프로테아제 2, cat. no. 780-4148)에 의한 전처리) 동안 항원 복구 용액에 노출시켰다.

[0519] 염색된 슬라이드를 Panoramic 250 FLASH II 슬라이드 스캐너(3D Histech)를 사용하여 명시야 또는 형광 채널 Dapi(핵 대비염색), 3,3'-디아미노벤지딘(DAB) 또는 CY5(일차 항체) 및 자가형광 채널 44DCC에서 스캐닝하였다. 얻어진 이미지 파일을 뷰어 소프트웨어(Panoramic CaseViewer)에 업로드하고, 염색 결과의 수동 평가를 위해 최적의 밝기 및 대비로 조정했다.

[0520] 결과

[0521] 직접 ELISA에 의한 재조합 항체의 선택성 평가: 6 개의 생산된 재조합 항체 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 23D5 및 28F2를 198 번 내지 203 번, 199 번 내지 204 번 또는 200 번 내지 205 번 BSA-접합 펩티드 및 ApoE 재조합 단편 aa 200 번 내지 299 번에 대한 반응성에 대해 스크리닝하였다. 또한, 재조합 전장 ApoE(1 번 내지 299 번 ApoE4) 및 BSA에 접합된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53)에 대한 반응성의 부재를 연구하였다.

[0522] 모든 재조합 항체는 N-말단 네오-에피토프 펩티드 G200(SEQ ID NO: 50) 및 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-

HIS(aa 200 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 48)에 대한 강한 결합을 나타낸 반면, 재조합 ApoE4 전장 단백질(SEQ ID NO: 49) 또는 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53)에 대한 결합은 나타나지 않았다(도 16). 또한, 재조합 항-G200 항체를 사용하여 198 번 내지 203 번 또는 199 번 내지 204 번 BSA-접합 펩티드(SEQ ID NO: 51 및 SEQ ID NO: 52)에 대한 결합은 관찰되지 않았다. 다른 한 편으로, ApoE C-말단과 관련된 참조 항체는 재조합 G200 단편(aa 200 번 내지 299 번) 및 재조합 ApoE4 전장 단백질(aa 1 번 내지 299 번)을 동등하게 잘 검출하고 결합할 수 있었다. 참조 항체에 대한 에피토프가 ApoE aa 274 번 내지 299 번이기 때문에, 예상된 바와 같이 G200-BSA 펩티드에 대한 결합이 나타나지 않았다(도 16).

[0523] 코트가 동일한 물농도(0.1 μM)로 첨가된 재조합 G200-HIS C-말단 ApoE 단편(SEQ ID NO: 48) 및 재조합 전장 ApoE4(SEQ ID NO: 45)로 이루어진 두 번째 직접 ELISA에서는 차이가 발견되지 않았다(도 19). 계산된 EC50 값은 하기 표 5에 나타나 있다.

[0524] 억제 ELISA에 의한 재조합 항체의 선택성 평가 및 IC50 결정: 6 개의 생산된 재조합 항체 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 23D5 및 28F2를 N-말단 네오-에피토프 펩티드 G200-BSA(aa 200 번 내지 205 번) 및 재조합 C-말단 ApoE 단편 G200-HIS(aa 200 번 내지 299 번)에 대한 결합 강도 및 결합 선택성에 대해 스크리닝하였다. 또한, 항체를 198 번 내지 203 번 및 199 번 내지 204 번 BSA-접합 펩티드, 및 재조합 전장 ApoE4에 대한 반응성의 결여에 대해 스크리닝하였다.

[0525] 모든 재조합 항체는 G200-BSA 펩티드(aa 200 번 내지 205 번) 및 재조합 G200 단편(aa 200 번 내지 299 번)에 대해 강한 결합 및 선택성을 나타낸 반면, 재조합 ApoE4 전장 단백질(aa 1 번 내지 299 번)에 대한 결합은 나타나지 않았다(도 17). 또한, 198 번 내지 203 번 또는 199 번 내지 204 번 BSA-접합 펩티드에 대한 결합은 나타나지 않았다. 항원의 농도를 10000 ng/ml의 출발 농도로 10 배 증가시키는 것은 198 번 내지 203 번, 199 번 내지 204 번 및 192 번 내지 206 번 BSA-접합 펩티드 모두에 어떠한 결합도 나타내지 않았다(도 20). 계산된 IC50 값(ng/ml 및 nM 값)은 하기 표 5에 나타나 있다.

[0526] [표 5]

재조합 항-G200 항체의 직접 및 억제 ELISA 분석으로부터의 결과 요약

클론	EC50 (ng/ml)		IC50		
	G200-BSA 펩티드	G200-HIS 단편	G200-BSA 펩티드 (ng/ml)	G200-HIS 단편 (nM)	G200-BSA 펩티드 (ng/ml) 2 nd 프로토타입
4E6	6.9	9.5	2.9	4.0	11.5
7B10	7.3	10.7	2.2	2.8	5.8
7C7	13.0	18.1	3.1	2.8	6.3
17G4	5.1	7.9	2.9	3.0	5.8
23D5	11.6	10.1	2.8	2.4	3.8
28F2	7.2	21.5	3.2	2.4	3.7

[0527]

[0528] 생물층 간섭계에 의한 재조합 항체의 선택성 평가 및 K_D 결정: 재조합 G200 C-말단 ApoE 단편(리간드)과 재조합 항체(분석물) 사이의 결합 상호작용을 Octet RED384 기기(ForteBio)를 사용함으로써 평가하였다. Octet 실험으로부터의 결과는 도 18에 개략되어 있고, 하기 표 6에 요약되어 있다.

[0529] 표면 플라즈몬 공명에 의한 재조합 항체의 선택성 평가 및 K_D 결정: 6 개의 재조합 항체 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 23D5, 및 28F2를 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 선택성 및 이들의 K_D 값에 대하여 평가하였다.

[0530] 모든 재조합 항체는 G200-HIS 단편에 대한 결합을 나타냈고(도 21), 반면에 재조합 전장 ApoE에 대한 결합은 나타나지 않았다. 계산된 ka1, kd1 및 K_D1 값은 하기 표 6에 나타나 있다.

[0531] [표 6]

제조합 항-G200 항체의 생물층 간섭계 분석 및 표면 플라즈몬 공명으로부터의 결과 요약

클론	Octet: 바이오센서 상 G200-HIS 단편 K _D (nM)	Biacore: G200-HIS 단편		
		이차 분석물 k _a (x 10 ⁵ 1/Ms)	k _d (x 10 ⁻³ 1/s)	K _D (nM)
4E6	0.9	815	6.0	1030
7B10	0.8	12.0	3.8	330
7C7	1.9	28.8	2.9	417
17G4	0.8	87.3	2.4	141
23D5	5.2	2.6	10.5	299
28F2	9.7	49.8	3.5	9830

[0532]

[0533]

웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 제조합 항체 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 23D5 및 28F2를 전장 ApoE에 결합하지 않으면서 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물에서 12 kDa 이하의 ApoE 단편에 선택적으로 결합하는 이들의 능력에 대하여 시험하였다. 웨스턴 블롯 분석은 전장 ApoE에 대한 어떠한 가지적 결합 없이 크기가 약 12 kDa 및 10 kDa인 두 개의 ApoE 단편에 대한 제조합 항체의 결합을 입증하였다(도 22의 A). 다클론성 항-ApoE 항체로 웨스턴 블롯 막의 재염색은 전장 ApoE, 고분자량(HMW) ApoE 단편(약 20 kDa 내지 25 kDa) 및 별개의 12 kDa 및 10 kDa ApoE 단편의 염색을 보여주었다(도 22의 B).

[0534]

면역침강/웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 제조합 항체 4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 23D5 및 28F2를 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물에서 용액 중에 12 kDa 이하의 ApoE 단편을 확인하고 이에 선택적으로 결합하는 이들의 능력에 대하여 시험하였다. 제조합 항-G200 항체를 사용한 알츠하이머병 환자의 뇌 추출물의 면역침강(IP), 그리고 이어서 항-ApoE C-말단 항체를 사용한 웨스턴 블롯은 4 개의 제조합 항-G200 항체, 즉, 4B10, 7C7, 17G4 및 28F2에 의한 12 kDa ApoE 단편의 면역침강을 나타냈다. 뇌 추출물로부터 전장 ApoE는 면역침강되지 않았다. 웨스턴 블롯으로부터의 결과는 또한 IP 항체 중쇄 및 경쇄에 대한 강렬한 밴드를 나타냈다(도 22의 C).

[0535]

면역조직화학에 의한 알츠하이머병 뇌에서의 인간 표적 관여: 알츠하이머병(ApoE ε3/ε3 및 ε4/ε4) 개체로부터의 뇌 절편의 면역조직화학 염색은 전체 Aβ IHC 및 ApoE 참조 항체와 비교할 때 아밀로이드반에 대한 7C7의 약한 결합을 나타냈다(도 23).

[0536]

실시예 13

[0537]

N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 L198에 대한 항체의 생성 및 스크리닝

[0538]

본 실시예는 BALB/c 및 C57B1/6 마우스의 면역화와 그에 뒤이은 하이브리도마 세포주의 생성 및 스크리닝을 기술한다.

[0539]

재료 및 방법

[0540]

펩티드 합성: 본 실험에 사용된 면역원을 실시예 1 내지 실시예 7에서 확인된 신경독성 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프 중 하나를 도입하도록 설계하였다. 이의 N-말단 서열로서, 면역원은 전장 ApoE 내 198 번 내지 205 번 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하였다. 이러한 N-말단 서열을 6-아미노카프로산 링커(Acp; 아미노핵산산 링커(Ahx)로도 표기됨), 및 이어서 예를 들어 지시된 바와 같은 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 또는 소 혈청 알부민(BSA)에 대한 접합 용도의 시스테인 잔기에 C-말단으로 커플링시켰다. 사용된 전체 면역원 서열은 LAGQLQE-Acp-C(SEQ ID NO: 54)였다. SEQ ID NO: 54는 Innovagen AB에 의해 제조되고, 95.9% 순도로 전달되었다. 또한, 198 번 내지 203 번 아미노산에 상응하는 더 짧은 펩티드 LAGQL-Acp-C(SEQ ID NO: 52)를 사용하여 네오-에피토프에 대항하는 양성 클론에 대해 스크리닝하였다. SEQ ID NO: 52는 Innovagen AB에 의해 제조되고, 95.2% 순도로 전달되었다.

[0541]

추가로, 실시예 9에서와 같이, 신경독성 ApoE 단편의 식별된 다른 두 개의 추정 N-말단 네오-에피토프를 도입한 ApoE-유래 펩티드뿐만 아니라 어떠한 식별된 네오-에피토프도 없는 음성 대조군 펩티드를 제조하였다. 이들 펩티드는 AGQLQ-Acp-C(SEQ ID NO: 51, Innovagen AB에 의해 제조되고, 96.7% 순도로 전달됨), GQLQE-Acp-C(SEQ ID NO: 50, Innovagen AB에 의해 제조되고, 95.5% 순도로 전달됨) 및 음성 대조군 펩티드 AATVGLAGQLQER-

Acp-C(SEQ ID NO: 53, Innovagen AB에 의해 제조되고, 97.8% 순도로 전달됨)였다.

- [0542] 면역화: 6 주령 내지 8 주령 BALB/c 또는 C57B1/6 마우스를 KLH에 접합된 SEQ ID NO: 54로 면역화시켰다. 첫 주사 시(s.c.), 면역원을 프로인드 완전 애주번트와 함께 제공하였다. 마지막 하나를 제외한 후속 주사 시(s.c.), 면역원을 프로인드 불완전 애주번트에 제공하였다. 첫 면역화 3 주 및 5 주 후에 혈장 샘플을 수집하였다. 모든 마우스는 2 회 내지 3 회 주사를 받았다. 마지막 면역화(추가 용량)를 애주번트 없이 복강내(i.p.)로 투여하였다.
- [0543] 직접 ELISA에 의한 혈장 스크리닝: 혈장 샘플을 소 혈청 알부민, BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 54, 및 재조합 ApoE 단편 L198-HIS(SEQ ID NO: 57)에 대항하는 반응성에 대하여 ELISA에 의해 분석하여, 면역화를 중지하고 하이브리도마 생성을 개시할 시기를 결정하였다. 추가로, 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53) 및 1 번 내지 272 번 ApoE(SEQ ID NO: 56)를 반응성에 대하여 시험하였다. 간략히, 1 $\mu\text{g/ml}$ 항원, 즉, BSA에 커플링된 L198 N-말단 네오-에피토프 펩티드(SEQ ID NO: 54에 도입된 198 번 내지 205 번 ApoE 서열), BSA에 커플링된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53에 도입된 192 번 내지 206 번 ApoE 서열), 또는 정제된 재조합 C-말단 ApoE 단편 L198-HIS(SEQ ID NO: 57) 또는 1 번 내지 272 번 ApoE-HIS(SEQ ID NO: 56)로 96-웰 전면적 플레이트를 코팅하였다. ELISA를 표준 프로토콜에 따라 실행하고, 퍼옥시다제-접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 검출 항체로서 사용하였다. 면역화에 잘 반응하고 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 54 및 재조합 ApoE 단편 L198-HIS(SEQ ID NO: 57)에 대해 양성 반응, 그리고 1 번 내지 272 번 ApoE(SEQ ID NO: 56)에 음성 반응을 제공하는 마우스만을 하이브리도마에 대한 융합에 관심 대상으로 삼았다.
- [0544] 하이브리도마의 생성: 선택된 마우스는 하이브리도마 생성 4 일 전에 마지막 추가 용량의 면역원 i.p.(애주번트 없음)을 받았다. Sp2/0 세포와의 융합에 의해 하이브리도마의 생성을 수행하고, 융합된 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. BSA-접합 펩티드 및 ApoE 단편을 사용하여 ELISA에 의해 일차 스크리닝을 수행하고, 양성 클론을 음성 대조군 펩티드 및 1 번 내지 272 번 ApoE 단편에 대하여 스크리닝하였다. 단클론성을 보장하도록 제한 희석 검정으로 처리될 클론의 선택을 위해 가장 우수한 반응체로부터의 상청액(20 개 클론)을 추가로 특성화하였다. 제한 희석 검정 후, 비정제 상청액에서 추가 특성화를 수행하였다. 관심 클론을 동결보존하고, 항체 (Innovagen AB)의 생산 및 정제를 위해 확장하고, 시퀀싱을 수행하였다(Absolute Antibodies).
- [0545] 직접 ELISA에 의한 하이브리도마 스크리닝: 표적 에피토프에 대항하는 반응성을 갖는 항체를 생산한 하이브리도마 클론을 식별하기 위한 ELISA 실험을 "직접 ELISA에 의한 혈장 스크리닝" 및 실시예 9의 상응하는 섹션 하에 상술된 바와 같이 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 하이브리도마의 스크리닝 동안, 그리고 단클론성에 도달하기 위해, 6 개의 상이한 항원을 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 사용하였다. 이들은 BSA에 커플링된 두 개의 L198 N-말단 네오-에피토프 펩티드(SEQ ID NO: 54에 도입된 198 번 내지 205 번 ApoE 서열 및 SEQ ID NO: 52에 도입된 198 번 내지 203 번 ApoE 서열), BSA에 커플링된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53), 재조합 C-말단 ApoE 단편 L198-HIS(SEQ ID NO: 57), 1 번 내지 272 번 재조합 ApoE4 단편(SEQ ID NO: 56), 및 재조합 전장 ApoE4(SEQ ID NO: 45, Abcam, cat. no. ab50243)였다.
- [0546] 하이브리도마 스크리닝 ELISA를 위해, BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 54 및 재조합 ApoE 단편 L198-HIS(SEQ ID NO: 57)에 대한 양성 반응 및 클론(들)의 존재에 기초하여 "양성" 웰을 선별하였다. 그 후에, 식별된 양성 클론에서 플레이트를 위한 코트로서 BSA에 커플링된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53), 및 1 번 내지 272 번 ApoE 단편(SEQ ID NO: 56)으로 동일한 ELISA 프로토콜을 이용하여 음성 스크리닝을 수행하였다. 음성 스크리닝에서 결합을 나타내지 않은 상위 20 개 클론으로부터의 상청액을 추가로 BSA에 커플링된 L198 N-말단 네오-에피토프 펩티드, 재조합 ApoE 단편 L198-HIS 및 ApoE4 전장 단백질에 대한 농도-반응 곡선을 확립함으로써 IgG 농도의 결정에 의해(실시예 9에서와 같이 수행됨), 그리고 웨스턴 블롯에 의해 인간 표적 관여를 연구함으로써 특성화하였다.
- [0547] 직접 ELISA에 의한 IgG 농도의 결정: 표준 ELISA 프로토콜을 이용하여 하이브리도마 상청액에서 IgG 농도를 결정하였다. IgG 농도를 측정할 수 있도록, 플레이트를 α -마우스 IgG, F(ab')₂ 특이적 항체의 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 용액으로 코팅하고, 공지된 IgG 농도를 갖는 참조 항체를 표준물로서 사용하였다. 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 항체 농도에 대해 450 nm에서의 광학 밀도를 플롯팅하였다. 곡선 피트로부터 하이브리도마 상청액에 대한 IgG 농도를 계산하였다.
- [0548] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합 없이 L198에서 시작하는 12 kdA 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체의 선택적 결합을 평가하였

다. RIPA 2% SDS 뇌 추출물에서 60 μg 의 총 단백질 함량을 2x Laemmli 샘플 완충액과 혼합한 것을 제외하고, 실시예 10에서와 동일한 프로토콜을 이용하였다.

[0549] IgG 농도, ELISA 및 웨스턴 블롯으로부터의 결과에 기초하여, 상위 5 개의 후보 클론에서 단클론성을 보장하도록 적어도 두 차례의 제한 희석 검정을 수행하고, L198-HIS 단편(SEQ ID NO: 57) 및 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 54에 대한 결합에 대하여 스크리닝하였다. 또한, IgG 농도를 결정하고, 재조합 ApoE 단편 L198-HIS, BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 54, 및 ApoE4 전장 단백질에 대한 농도-반응 곡선을 실시예 10에 기재된 바와 같이 수행하였다. 전장 ApoE4가 아니라 L198-HIS 단편에 여전히 결합하고 계속 성장한 클론을 추가 특성화에 특히 관심 대상으로 삼았다. 이들 클론으로부터 항체를 생산하고, 정제하여, 정제된 단클론성 항체(Innovagen AB)를 생성하고, 클론을 시퀀싱을 위해 보냈다(Absolute Antibodies).

[0550] 결과

[0551] 하이브리도마 기법에 의한 단클론성 항체의 생성: ApoE 단백질의 아미노산 L198에서 시작하는 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체를 198 번 내지 299 번 ApoE 단편에서 N-말단을 따라 처음 8 개 아미노산으로 이루어진 ApoE 특이적 서열을 이용하여 면역화에 의해 생성하였다. 면역화 펩티드의 축소는 전장 ApoE 단백질에서 확인되는 선형 에피토프에 대한 어떠한 결합 없이 ApoE 단백질의 아미노산 L198에서 시작하는 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체의 생성을 가능하게 하는 데 필수적인 것으로 여겨졌다. Acp 링커 및 시스템인 잔기를 통해 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)에 접합된 198 번 내지 205 번 ApoE-특이적 서열 펩티드를 면역화에 사용하였다. 혈장 샘플을 BSA에 접합된 상응하는 펩티드(KLH에 대한 반응성의 검출을 막기 위해), 및 재조합 ApoE 단편에 대항하는 반응성에 대하여 ELISA에 의해 분석하였다. 면역화된 마우스(C57BL/6 마우스)의 가장 우수한 반응체를 하이브리도마 생성을 위해 선택하였다.

[0552] L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체에 대한 ELISA 스크리닝: 생성된 하이브리도마 클론을 재조합 ApoE 단편 L198-HIS에 대한 반응성, 뿐만 아니라 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 54에 대한 반응성에 대해 스크리닝하였다. 또한, 재조합 전장 ApoE4, 1 번 내지 272 번 재조합 ApoE 단편-HIS, 및 BSA에 접합된 음성 대조군 펩티드 SEQ ID NO: 53에 대한 반응성의 결과를 평가하였다. 20 개의 클론을 아미노산 L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 항체로서 식별하고, 추가로 평가하였다.

[0553] IgG 농도의 결정: IgG 농도의 범위는 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 11.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 항체 농도를 ELISA 실험에서 시작 농도가 동일하도록 세포 배지에서 정규화하였다.

[0554] L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 상위 20 개의 항체에 대한 ELISA 스크리닝: 모든 항체는 재조합 전장 ApoE4가 아니라 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 52 및 재조합 ApoE 단편 L198-HIS에 대하여 반응성이었다. 상위 10 개의 반응체를 웨스턴 블롯에 의해 추가로 평가하였다.

[0555] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 모든 항체는 인간 뇌 추출물에서 단편에 결합된, 10 개 중 9 개만이긴 하지만, 재조합 ApoE 단편 L198-HIS에 결합할 수 있었다.

[0556] 20 개의 상위 반응체 중 5 개를 IgG 농도, 직접 ELISA, 및 인간 표적에 대한 결합에 기초하여 선택하였다. 이들 클론은 단클론성을 보장하도록 제한 희석 검정에 주어졌고, 재조합 전장 ApoE4가 아니라, 재조합 ApoE 단편 L198-HIS, 및 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 54 및 SEQ ID NO: 52에 대해 계속 반응성이었다. 5 개의 클론 모두를 아미노산 L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 항체로서 식별하고, 6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11로 표기하였다. 모두 단클론성 항체로서 생산하고 정제하였으며, 클론을 시퀀싱을 위해 보냈다.

[0557] 실시예 14

[0558] N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 L198에 대한 항체의 하이브리도마 시퀀싱 및 아이소타입 결정

[0559] 재료 및 방법

[0560] 하이브리도마 시퀀싱: 아미노산 L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 선택성을 입증하고 알츠하이머병 뇌 추출물에서 인간 표적 결합을 입증한, 실시예 13에서 생성되고 특성화된 단클론성 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 시퀀싱을 위해 Absolute Antibody로 보냈다. 간략히, 전체 전사체 산탄충 시퀀싱에 의해 하이브리도마 시퀀싱을 수행하였다. 성숙한 VH 영역 및 VL 영역의 DNA 및 단백질 서열을 식별하였다.

[0561] **결과**

[0562] **하이브리도마 시퀀싱:** 알츠하이머병 뇌 추출물에서 인간 표적에 대한 결합이 입증된 것에 더하여, 아미노산 L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 선택성이 입증된 하이브리도마 클론을 시퀀싱하였다.

[0563] 다음 하이브리도마 클론을 시퀀싱하였다: 6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11. 전체 항체의 아미노산 서열을 얻었다. 각각의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)에 대하여 얻어진 아미노산 서열은 하기 표 7에서 제공된다.

[0564] [표 7]

가변 영역 서열

영역	항체	SEQ ID NO:
6F4		
VH	EVNLEESGGDLVQPGRSLKLSVCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLE WVAQIRLKSDNYVTHYVESLKGRFTISRDDSRSCVYLQMNNLRAEDTG IYYCTGHILLRRRYFDVWGTGTTVTSS	82
VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCEASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKG LIYSASYRYSQVDPDRFTGSGSGTDFTLTISTVQSEDLAEYFCHQFNTP YTFGGGTLEII	83
8B3		
VH	EVKVEESGGGVVQPGGSMKLSCLASGFTFRNYWMNWVRQSPEKGL EWVAQIRLKSDNYATRYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDT GTYCYCSGHILLRYYALDFWQGTSTVTSS	84
VL	DIVLTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVYTDVAWYQQKPGQSPKG MIYSASYRYSQVDPDRFTGSGSGTDFTLKISNVQSEDLAEYFCQQYNSF PYTFGGGKLEIK	85
12B1		
VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCVASGITFSKYWMNWVRQCPEKGLE WVAQIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLTLEADTG IYYCTHHYYGSSGYVDVWGTGTTVTSS	86
VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQCPKG MILSASQRYSGVDPDRFTGSGFGTEFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSY PYTFGGGKLERK	87
15F8		
VH	EVKLEESGGGLVHPGGSMKLSCVGSGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLE WVAQIKLRSDNYATHYAESVKGKFTISRDDAKSSVYLQMDNLRAEDTG IYYCSHHYLDSSGYFDVWGTGTSVTSS	88
VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGINVAWYQDKPGQSPKGL ILSASYRYSQVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYP YTFGGGKLEIK	89
15H11		
VH	EVKLEESGGGLVQPGGAMKLSVCVASGITFSNYWMNWVRQCPEKGLE WVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLTLEADTG IYYCTHHYYGSSGYVDVWGTGTTVTSS	90
VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGNVAWYQKKPGQCPKG MILSASQRYSGVDPDRFTGSGFGTEFTLIISNVQSEDLAEYFCHQYNSYP YTFGGGKLERK	91

[0565]

[0566] 상보성 결정 영역(CDR)은 일차 VH 서열 및 VL 서열에 대한 카바트 정의를 이용하여 식별되었고, 하기 표 8에서 제공된다.

[0567] [표 8]

CDR 영역 서열

항체	CDR H1	CDR H2	CDR H3
6F4	DYWMN (SEQ ID NO:59)	QIRLKSDNYVTHYVESLKG (SEQ ID NO:60)	HILLRRRYFDV (SEQ ID NO:61)
8B3	NYWMN (SEQ ID NO:62)	QIRLKSDNYATRYAESVKG (SEQ ID NO:63)	HILLRYALDF (SEQ ID NO:64)
12B1	KYWMN (SEQ ID NO:65)	QIRLRSDNYATHYAESVKG (SEQ ID NO:66)	HYYGSSGYVDV (SEQ ID NO:67)
15F8	NYWMN (SEQ ID NO:62)	QIKLRSDNYATHYAESVKG (SEQ ID NO:68)	HYLDSSGGYFDV (SEQ ID NO:69)
15H11	NYWMN (SEQ ID NO:62)	QIRLKSDNYATHYAESVKG (SEQ ID NO:70)	HYYGSSGYVDV (SEQ ID NO:67)
	CDR L1	CDR L2	CDR L3
6F4	EASQNVGTNVA (SEQ ID NO:71)	SASYRYS (SEQ ID NO:72)	HQFNTYPYT (SEQ ID NO:73)
8B3	KASQNVYTDVA (SEQ ID NO:74)	SASYRYS (SEQ ID NO:72)	QQYNSFPYT (SEQ ID NO:75)
12B1	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:76)	SASQRYS (SEQ ID NO:77)	QQYNSYPYT (SEQ ID NO:78)
15F8	KASQNVGINVA (SEQ ID NO:79)	SASYRYS (SEQ ID NO:72)	QQYNSYPYT (SEQ ID NO:78)
15H11	KASQNVGNVA (SEQ ID NO:80)	SASQRYS (SEQ ID NO:77)	HQYNSYPYT (SEQ ID NO:81)

[0568]

[0569] 항체를 이들의 서열에 기초하여 아이소타입화하였고, 이들 각각의 서브-클래스 및 경쇄는 하기 표 9에 요약되어 있다.

[0570] [표 9]

이소형화 결과

클론	서브-클래스	경쇄
6F4	IgG1	K
8B3	IgG2b	K
12B1	IgG2c	K
15F8	IgG2c	K
15H11	IgG1	K

[0571]

[0572] 실시예 15

[0573] N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 L198에 대한 정제된 단클론성 항체의 특성화

[0574] 본 실시예는 직접 ELISA, 억제 ELISA, 표면 플라즈몬 공명, 인간 뇌 추출물에 대한 웨스턴 블롯 및 인간 뇌 추출물에 대한 면역침강을 포함하여 다양한 방법에 의해 실시예 13 및 실시예 14에 기재되어 있는 정제된 단클론성 항체의 특성화를 기술한다.

[0575] 재료 및 방법

[0576] 직접 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가: 후술되는 직접 ELISA를 사용하여 실시예 14에서 생산된 정제된 단클론성 항체의 결합 선택성을 평가하였다. L198 N-말단 네오-에피토프 ApoE 펩티드(BSA-접합 SEQ ID NO: 52) 및 인지 영역에서의 절단으로 생성된 재조합 L198-HIS C-말단 ApoE 단편(SEQ ID NO: 57)에 선택적으로 결합하는 능력을 A199, G200 및 음성 대조군 펩티드(각각 BSA-접합 SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 50 및 SEQ ID NO: 53), 및 재조합 전장 ApoE4(ApoE 서열 aa 1 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 45)에 대한 결합과 비교하였다.

[0577] 표준 ELISA 프로토콜에 따라 스크리닝을 수행하였다. 간략히, BSA-접합 네오-에피토프 펩티드 및 음성 대조군 펩티드, 및 0.1 μM 재조합 C-말단 ApoE 단편 및 전장 ApoE(Abcam, cat. no. ab50243)의 1 μg/ml 용액을 PBS에서의 희석에 의해 제조하였다. 50 μl/웰을 ELISA 반-면적 96 웰 마이크로타이타 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 접착성 실러로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 용액을 폐기한 후, 플레이트를 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 1시간 동안 150 μl/웰의 단백질-비함유 차단 용액(Pierce)으로 차단하였다. 플레이트를 0.28 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다. 관심의 정제된 단클론성 항체를 3 μg/ml의 시작 희석으로 3 배 연속 희석하였다

(희석 완충액(0.1% BSA 및 0.05% TWEEN®-20이 있는 PBS)과 1:2 혼합). 항-ApoE C-말단 항체를 참조 항체(ApoE E-8 마우스 단클론성, Santa Cruz Biotechnology, cat. no. sc-393302)로서 사용하였다. 50 μ l/웰을 ELISA 플레이트에 첨가하고, 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 앞서 기재된 바와 같이 4 회 세척하였다. 검출 항체(HRP-접합 항-마우스 IgG, Southern Biotech, cat. no. 1030-05, 희석 완충액에서 1/10000 희석)를 50 μ l/웰에 첨가하고, 플레이트를 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 추가 세척 후(앞서 기재된 바와 같이), 50 μ l/웰의 K-Blue® 수성 기질(Neogen)을 첨가하고, 50 μ l/웰의 0.5 M H₂SO₄로 5분 내지 15분 후에 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 광학 밀도를 ELISA 판독기(Tecan)를 사용하여 판독하였다. 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 항체 농도에 대해 광학 밀도를 플롯팅하고(도 24), EC50 값을 로그 작용제 농도 반응 곡선으로부터 결정하였다.

[0578] 억제 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가 및 IC50 결정: 후술되는 억제 ELISA를 이용하여 실시예 13 및 실시예 14에 기재되어 있는 정제된 단클론성 항체에 대한 결합 강도 및 선택성을 평가하였다. 아미노산 L198에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드의 N-말단 네오-에피토프에 결합하는 정제된 단클론성 항체의 능력을 용액 중에 아미노산 A199 및 G200에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드뿐만 아니라 음성 대조군 펩티드(aa 192 번 내지 206 번)에 결합하는 이들의 능력과 비교하여 평가하였다.

[0579] 간략히, 시험하고자 하는 정제된 단클론성 항체가 BSA에 접합되고 아미노산 L198, A199 또는 G200에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드의 N-말단 네오-에피토프, 또는 BSA-접합 음성 대조군 펩티드(각각 SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 50 및 SEQ ID NO: 53)와 상호작용할 수 있게 하였다. 그 후에, 혼합물을 BSA-커플링된 L198 합성 ApoE 펩티드로 코팅된 마이크로타이터 플레이트에 첨가하였다. 정제된 단클론성 항체가 사전-인큐베이션 단계(합성 ApoE 펩티드)에서 임의의 항원에 결합하는 경우, 항체는 마이크로타이터 플레이트에 고정된 합성 L198 ApoE 펩티드에 결합하지 못하게 된다. 이는 ELISA 검출 신호의 억제로 이어진다.

[0580] BSA에 접합된 N-말단 네오-에피토프 펩티드 L198(SEQ ID NO: 52)의 0.5 μ g/ml 용액을 PBS에서의 희석에 의해 제조하였다. 50 μ l/웰을 ELISA 반-면적 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 접착성 실러로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 용액을 폐기한 후, 플레이트를 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 90분 동안 단백질-비함유 차단 용액(Pierce)(150 μ l/웰)으로 차단하였다. 차단된 플레이트를 0.28 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다.

[0581] 각각의 합성 ApoE 펩티드의 연속 희석액을 96 웰 저장 플레이트에서 10000 ng/ml부터 시작하여 4 배 희석에 의해 제조하였다(30 μ l 최종 부피). 시험하고자 하는 각각의 제조항체를 웰 당 0.05 μ g/ml의 최종 농도로 각각의 합성 ApoE 펩티드의 연속 희석액에 첨가하였다(30 μ l). 샘플을 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 45분 동안 사전-인큐베이션하였다.

[0582] 사전-인큐베이션된 샘플을 차단된 ELISA 플레이트로 옮기고(50 μ l/웰), 플레이트를 진탕 없이 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 상술된 바와 같이 플레이트를 세척하였다. 알칼리성 포스파타제 접합 항-마우스 IgG 검출 항체(Mabtech, cat. no. 3310-4)를 1:1000 희석하고, 각 플레이트에 첨가하였다(50 μ l/웰). 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 45분 동안 진탕하면서(900 rpm) 인큐베이션하고, 후속적으로 상술된 바와 같이 세척하였다. 알칼리성 포스파타제 기질(50 μ l/웰)을 플레이트에 첨가하고, 광학 밀도를 최대 120분 동안 405 nm의 파장에서 10분 마다 판독하였다. IC50 값을 로그 억제제 농도 반응 곡선으로부터 결정하였다(도 25).

[0583] 표면 플라즈몬 공명에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가 및 K_d 결정: 항원과 항체 사이의 결합 상호작용을 표준 절차에 따라 Biacore 8K 기기(GE Healthcare)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 평가하였다.

[0584] 전장 ApoE와 비교하여 N-말단 네오-에피토프에 대한 단클론성 항체의 결합 친화도를 결정하기 위해, 단일-사이클 동역학 실험을 실시하였다. 제조업체의 지침에 따라 아민 커플링 키트(GE Healthcare, cat. no. BR100050)를 사용하여 CM5 센서 칩(GE Healthcare, cat. no. 29104988) 상에 제조항 단편을 고정하였다. 참조(고정된 항원 없음) 및 활성 표면을 각각 플로우 셀 1(Fc1) 및 플로우 셀 2(Fc2)에서 아민 커플링 시약을 사용하여 동일한 조건으로 처리하였다. 활성 표면에 대한 고정 수준을 약 150 내지 200 반응 단위(RU)로 유지하였다. 동일한 프로토콜 설정을 이용하여 전장 ApoE를 CM5 칩 표면 상에 고정하였다.

[0585] 정제된 항체를 14 nM에서 0.3 nM까지 2-배 연속 희석하여 제조하였다(5 단계 내지 7 단계로). 다음으로, 제조된 정제 항체의 연속 희석액을 센서 칩의 두 플로우 셀 모두에 걸쳐 주입하였다(30 μ l/min, 접촉 시간 360초, 해리

시간 2500초). 상호작용 시리즈를 삼중으로 수행하였다. 값을 블랭크 제거하고, 이가 분석물 결합 동역학 피트 모델을 평가에 사용하였다.

[0586] 모든 SPR 실험에서, 1xPBS-P+(GE Healthcare, cat. no. 28995084)를 사용하여 항체 및 표적 항원을 희석하였다. 25°C에서 실험을 수행하였다.

[0587] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 후술되는 웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합 없이 L198에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체의 선택적 결합을 평가하였다. 알츠하이머병 환자의 신선한 냉동된 뇌 조직을 RIPA 2% SDS 추출 완충액에서 균질화하고, 이어서 16000 x g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 후속 상청액에서 표준 단백질 농도 결정을 수행하였다.

[0588] 약 60 µg의 총 단백질을 함유하는 RIPA 2% SDS 뇌 추출물을 2x Laemmli 샘플 완충액과 혼합하고, 95°C에서 5분 동안 비등시키고, SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher, cat. no. NW00120BOX) 상에 로딩하였다. 겔을 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시키고, 그 후에 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1시간 동안 차단하고, L198(0.1% TWEEN®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR) 중에 2 µg/ml)에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체와 함께 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-마우스-800CW(LI-COR, cat. no. 925-32210)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0589] 웨스턴 블롯 막에서 수득된 밴드가 ApoE 기원이었는지를 확인하기 위해, 막을 0.1% TWEEN®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에 1:2000 희석된 다클론성 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. no. 178479; 면역원 ApoE aa 1 번 내지 299 번)로 하룻밤 재염색하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-염소-680RD(LI-COR, cat. no. 925-68074)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0590] 면역침강 및 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 후술되는 면역침강/웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합 없이 L198에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체의 선택적 결합을 평가하였다. 알츠하이머병 환자의 신선한 냉동된 뇌 조직을 RIPA 2% SDS 추출 완충액에서 균질화하고, 이어서 16000 x g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 후속 상청액에서 표준 단백질 농도 결정을 수행하였다.

[0591] 약 75 µg의 총 단백질을 함유하는 RIPA 2% SDS 뇌 추출물을 IP 완충액(PBS, 0.05% TWEEN®-20, 1% Triton X-100 및 cOmplete™ 프로테아제 억제제 카테일) 중에 L198에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체와 혼합하고, 2시간 동안 인큐베이션하였다(헤드-투-테일 회전과 함께 실온에서). Dynabeads™ 단백질 A 비드(Invitrogen)를 첨가하고, 추출물-항체-다이나비드 혼합물을 1시간 동안 인큐베이션하였다(헤드-투-테일 회전과 함께 실온). 상청액을 제거하고, 마그네틱 비드를 세척하였다. 2x Laemmli 샘플 완충액을 첨가하고 95°C에서 5분 동안 비등시킴으로써 면역침강물을 비드로부터 용리시켰다. 용출액을 SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher, cat. no. NW00120BOX) 상에 로딩하고, 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시키고, 그 후에 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1시간 동안 차단하고, 0.1% TWEEN®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에 1:1000 희석된 항-ApoE C-말단 항체(Sigma, cat. no. sab2701946)와 함께 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-토끼-800CW(LI-COR, cat. no. 925-32211)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0592]

결과

[0593]

직접 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가: 5 개의 정제된 단클론성 항체 6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11을 198 번 내지 203 번, 199 번 내지 204 번 또는 200 번 내지 205 번 BSA-접합 펩티드 및 ApoE 제조합 단편 aa 198 번 내지 299 번에 대한 반응성에 대해 스크리닝하였다. 또한, 제조합 전장 ApoE(1 번 내지 299 번 ApoE4) 및 BSA에 접합된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53)에 대한 반응성의 부재를 연구하였다.

[0594]

모든 정제된 단클론성 항체는 N-말단 네오-에피토프 펩티드 L198(SEQ ID NO: 52) 및 제조합 C-말단 ApoE 단편 L198-HIS(aa 198 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 57)에 대한 강한 결합을 나타냈다. 최고 항체 농도에서, 5 개 항체 중 4 개(6F4를 제외한 모두)는 제조합 ApoE4 전장 단백질(SEQ ID NO: 49), 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53), 및 198 번 내지 203 번 또는 199 번 내지 204 번 BSA-접합 펩티드(각각 SEQ ID NO: 51 및 SEQ ID NO: 52)에 약간의 결합을 나타냈다(도 24). 계산된 EC50 값은 하기 표 10에 나타나 있다.

[0595]

예상된 바와 같이, ApoE C-말단과 관련된 참조 항체는 제조합 L198 단편(aa 198 번 내지 299 번)과 제조합 ApoE4 전장 단백질(aa 1 번 내지 299 번) 둘 모두를 검출하고 결합할 수 있었다. 또한, 예상된 바와 같이, 참조 항체에 대한 에피토프가 ApoE aa 274 번 내지 299 번이기 때문에, L198-BSA 펩티드에 대한 결합이 나타나지 않았다(도 24).

[0596]

역제 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가 및 IC50 결정: 5 개의 정제된 단클론성 항체 6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11을 N-말단 네오-에피토프 펩티드 L198-BSA 펩티드(aa 198 번 내지 203 번)에 대한 결합 강도 및 결합 선택성에 대해 스크리닝하였다. 또한, 항체를 199 번 내지 204 번, 200 번 내지 205 번 BSA-접합 펩티드, 및 192 번 내지 206번 음성 대조군 펩티드에 대한 반응성의 결여에 대해 스크리닝하였다.

[0597]

모든 정제된 단클론성 항체는 L198-BSA 펩티드(aa 198 번 내지 203 번)에 대해 강한 결합 및 선택성을 나타낸 반면, 199 번 내지 204 번, 200 번 내지 205 번 또는 음성 대조군 BSA-접합 펩티드에 대한 결합은 없었다(도 25). 계산된 IC50 값은 하기 표 10에 나타나 있다.

[0598]

[표 10]

정제된 단클론성 항-L198 항체의 직접 ELISA 및 역제 ELISA 로부터의 결과 요약

클론	EC50 (ng/ml)		IC50 (ng/ml)
	L198-BSA 펩티드	L198-HIS 단편	L198-BSA 펩티드
6F4	13.5	18.5	8.2
8B3	8.4	1.3	3.1
12B1	15.2	8.7	4.8
15F8	24.7	15.0	6.5
15H11	3.2	3.6	4.5

[0599]

[0600]

표면 플라즈몬 공명에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가 및 K_D 결정: 5 개의 정제된 단클론성 항체 6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11을 선택성에 대하여 평가하고, 표적 항원에 대한 K_D 값을 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정하였다. 모든 정제된 단클론성 항체는 L198-HIS 단편에 대한 결합을 나타냈고(도 26), 반면에 제조합 전장 ApoE에 대한 결합은 나타나지 않았다. 계산된 ka1, kd1 및 K_D 값은 하기 표 11에 나타나 있다.

[0601]

[표 11]

정제된 단클론성 항-L198 항체의 표면 플라즈몬 공명으로부터의 결과 요약

클론	Biacore: L198-HIS 단편		
	ka (x 10 ⁴ 1/Ms)	kd (x 10 ⁻⁶ 1/s)	K _D (nM)
6F4	51	7.1	2.2
8B3	4.2	302	12
12B1	77	128	20
15F8	74	205	40
15H11	61	7.2	1.6

[0602]

- [0603] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 아미노산 L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 단클론성 항체(6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11)를 전장 ApoE에 대한 어떠한 결합 없이 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물에서 12 kDa 이하의 ApoE 단편에 선택적으로 결합하는 이들의 능력에 대하여 시험하였다. 웨스턴 블롯 분석은 전장 ApoE에 대한 어떠한 가시적 결합 없이 크기가 약 12 kDa 및 10 kDa인 두 개의 ApoE 단편에 대한 세 개의 단클론성 항체(6F4, 8B3 및 12B1)의 결합을 입증하였다(도 27의 A). 다클론성 항-ApoE 항체로의 웨스턴 블롯 막의 재염색은 전장 ApoE, 고분자량(HMW) ApoE 단편(약 20 kDa 내지 25 kDa) 및 별개의 12 kDa 및 10 kDa ApoE 단편의 염색을 보여주었다(도 27의 B).
- [0604] 면역침강/웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 아미노산 L198에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 단클론성 항체(6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11)를 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물에서 용액 중의 12 kDa 이하의 ApoE 단편을 확인하고 이에 선택적으로 결합하는 이들의 능력에 대하여 시험하였다.
- [0605] 단클론성 항-L198 항체를 사용한 알츠하이머병 환자의 뇌 추출물의 면역침강(IP), 그리고 이어서 항-ApoE C-말단 항체를 사용한 웨스턴 블롯은 두 개의 단클론성 항-L198 항체; 12B1 및 15F8에 의한 12 kDa ApoE 단편의 면역침강을 나타냈다(도 27의 C). 뇌 추출물로부터 전장 ApoE는 면역침강되지 않았다. 웨스턴 블롯으로부터의 결과는 또한 IP 항체 중쇄 및 경쇄에 대한 강렬한 밴드를 나타냈다.
- [0606] 실시예 16
- [0607] N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 A199에 대한 항체의 생성 및 스크리닝
- [0608] 본 실시예는 BALB/c 및 C57B1/6 마우스의 면역화와 그에 뒤이은 하이브리도마 세포주의 생성 및 스크리닝을 기술한다.
- [0609] 재료 및 방법
- [0610] 펩티드 합성: 본 실험에 사용된 면역원을 실시예 1 내지 실시예 7에서 식별된 신경독성 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프 중 하나를 도입하도록 설계하였다. 이의 N-말단 서열로서, 면역원은 전장 ApoE 내 199 번 내지 205 번 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하였다. 이러한 N-말단 서열을 6-아미노카프로산 링커(Acp; 아미노헥산산 링커(Ahx)로도 표기됨), 및 이어서 예를 들어 지시된 바와 같은 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 또는 소 혈청 알부민(BSA)에 대한 접합 용도의 시스테인 잔기에 C-말단으로 커플링시켰다. 사용된 전체 면역원 서열은 AGQPLQE-Acp-C(SEQ ID NO: 55)였다. SEQ ID NO: 55는 Innovagen AB에 의해 제조되고, 96.9% 순도로 전달되었다. 또한, 199 번 내지 204 번 아미노산에 상응하는 더 짧은 펩티드 AGQPLQ-Acp-C(SEQ ID NO: 51)를 사용하여 네오-에피토프에 대항하는 양성 클론에 대해 스크리닝하였다. SEQ ID NO: 51은 Innovagen AB에 의해 제조되고, 96.7% 순도로 전달되었다.
- [0611] 추가로, 실시예 9 및 실예 13에서와 같이, 신경독성 ApoE 단편의 식별된 다른 두 개의 추정 N-말단 네오-에피토프를 도입한 ApoE-유래 펩티드뿐만 아니라 어떠한 식별된 네오-에피토프도 없는 음성 대조군 펩티드를 제조하였다. 이들 펩티드는 LAGQPL-Acp-C(SEQ ID NO: 52, Innovagen AB에 의해 제조되고, 95.2% 순도로 전달됨), GQPLQE-Acp-C(SEQ ID NO: 50, Innovagen AB에 의해 제조되고, 95.5% 순도로 전달됨) 및 음성 대조군 펩티드 AATVGS LAGQPLQER-Acp-C(SEQ ID NO: 53, Innovagen AB에 의해 제조되고, 97.8% 순도로 전달됨)였다.
- [0612] 면역화: 6 주령 내지 8 주령 BALB/c 또는 C57B1/6 마우스를 KLH에 접합된 SEQ ID NO: 55로 면역화시켰다. 첫 주사 시(s.c.), 면역원을 프로인드 완전 애주번트와 함께 제공하였다. 마지막 하나를 제외한 후속 주사 시(s.c.), 면역원을 프로인드 불완전 애주번트에 제공하였다. 첫 면역화 3 주 및 5 주 후에 혈장 샘플을 수집하였다. 모든 마우스는 2 회 내지 3 회 주사를 받았다. 마지막 면역화(추가 용량)를 애주번트 없이 복강내(i.p.)로 투여하였다.
- [0613] 직접 ELISA에 의한 혈장 스크리닝: 혈장 샘플을 소 혈청 알부민, BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 55, 및 제조항 ApoE 단편 A199-HIS(SEQ ID NO: 58)에 대항하는 반응성에 대하여 ELISA에 의해 분석하여, 면역화를 중지하고 하이브리도마 생성을 개시할 시기를 결정하였다. 추가로, 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53) 및 1 번 내지 272 번 ApoE(SEQ ID NO: 56)를 반응성에 대하여 시험하였다. 간략히, 1 µg/ml 항원, 즉, BSA에 커플링된 A199 N-말단 네오-에피토프 펩티드(SEQ ID NO: 55에 도입된 199 번 내지 206 번 ApoE 서열), BSA에 커플링된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53에 도입된 192 번 내지 206 번 ApoE 서열), 또는 정제된 제조항 C-말단 ApoE

단편 A199-HIS(SEQ ID NO: 58) 또는 1 번 내지 272 번 ApoE-HIS(SEQ ID NO: 56)로 96-웰 전면적 플레이트를 코팅하였다. ELISA를 표준 프로토콜에 따라 실행하고, 퍼옥시다제-접합 염소 항-마우스 IgG 항체를 검출 항체로서 사용하였다. 면역화에 잘 반응하고 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 55 및 재조합 ApoE 단편 A199-HIS(SEQ ID NO: 58)에 대해 양성 반응, 및 1 번 내지 272 번 ApoE(SEQ ID NO: 56)에 대해 음성 반응을 제공한 마우스만을 하이브리도마에 대한 융합에 관심 대상으로 삼았다.

[0614] 하이브리도마의 생성: 두 마리의 선택된 마우스는 하이브리도마 생성 4 일 전에 마지막 추가 용량의 면역원 i.p.(애주번트 없음)을 받았다. Sp2/0 세포와의 융합에 의해 하이브리도마의 생성을 수행하고, 융합된 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. BSA-접합 펩티드 및 ApoE 단편을 사용하여 ELISA에 의해 일차 스크리닝을 수행한 후, 양성 클론을 음성 대조군 펩티드 및 1 번 내지 272 번 ApoE 단편에 대하여 스크리닝하였다. 단클론성을 보장하도록 제한 희석 검정으로 처리될 클론의 선택을 위해 가장 우수한 반응체로부터의 상청액(20 개 클론)을 추가로 특성화하였다. 제한 희석 검정 후, 비정제 상청액에서 추가 특성화를 수행하였다. 관심 클론을 동결보존하고, 항체(Innovagen AB)의 생산 및 정제를 위해 확장하고, 시퀀싱을 수행하였다(Absolute Antibodies).

[0615] 직접 ELISA에 의한 하이브리도마 스크리닝: 표적 에피토프에 대항하는 반응성을 갖는 항체를 생산한 하이브리도마 클론을 식별하기 위한 ELISA 실험을 "직접 ELISA에 의한 혈장 스크리닝" 하에 및 실시예 9 및 실시예 13의 상응하는 색선에 상술된 바와 같이 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 하이브리도마의 스크리닝 동안, 그리고 단클론성에 도달하기 위해, 6 개의 상이한 항원을 1 µg/ml의 농도로 사용하였다. 이들은 BSA에 커플링된 두 개의 A199 N-말단 네오-에피토프 펩티드(SEQ ID NO: 55에 도입된 199 번 내지 205 번 ApoE 서열 및 SEQ ID NO: 51에 도입된 199 번 내지 204 번 ApoE 서열), BSA에 커플링된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53), 재조합 C-말단 ApoE 단편 A199-HIS(SEQ ID NO: 58), 1 번 내지 272 번 재조합 ApoE4 단편(SEQ ID NO: 56), 및 재조합 전장 ApoE4(SEQ ID NO: 45, Abcam, cat. no. ab50243)였다.

[0616] 하이브리도마 스크리닝 ELISA를 위해, BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 55 및 재조합 ApoE 단편 A199-HIS(SEQ ID NO: 58)에 대한 양성 반응 및 클론(들)의 존재에 기초하여 "양성" 웰을 선별하였다. 식별된 양성 클론에서 이후 플레이트를 위한 코트로서 BSA에 커플링된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53), 및 1 번 내지 272 번 ApoE 단편(SEQ ID NO: 56)으로 동일한 ELISA 프로토콜을 이용하여 음성 스크리닝을 수행하였다. 음성 스크리닝에서 결합을 나타내지 않은 상위 20 개 클론으로부터의 상청액을 추가로 BSA에 커플링된 A199 N-말단 네오-에피토프 펩티드, 재조합 ApoE 단편 A199-HIS 및 ApoE4 전장 단백질에 대한 농도-반응 곡선을 확립함으로써 IgG 농도의 결정에 의해(실시예 9 및 실시예 13에서와 같이 수행됨), 그리고 웨스턴 블롯에 의해 인간 표적 관여를 연구함으로써 특성화하였다.

[0617] 직접 ELISA에 의한 IgG 농도의 결정: 표준 ELISA 프로토콜을 이용하여 하이브리도마 상청액에서 IgG 농도를 결정하였다. IgG 농도를 측정할 수 있도록, 플레이트를 α-마우스 IgG, F(ab')₂ 특이적 항체의 0.5 µg/ml 용액으로 코팅하고, 공지된 IgG 농도를 갖는 참조 항체를 표준물로서 사용하였다. 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 항체 농도에 대해 450 nm에서의 광학 밀도를 플롯팅하였다. 곡선 피트로부터 하이브리도마 상청액에 대한 IgG 농도를 계산하였다.

[0618] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합 없이 A199에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체의 선택적 결합을 평가하였다. 실시예 10 및 실시예 13에서와 동일한 프로토콜을 이용하고, RIPA 2% SDS 뇌 추출물에서 60 µg의 총 단백질 함량을 2x Laemmli 샘플 완충액과 혼합하였다.

[0619] IgG 농도, ELISA 및 웨스턴 블롯의 결과에 기초하여, 상위 4 개의 후보 클론에서 단클론성을 보장하도록 적어도 두 차례의 제한 희석 검정을 수행하고, A199-HIS 단편(SEQ ID NO: 58) 및 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 55에 대한 결합에 대하여 스크리닝하였다. A199-HIS 단편에 여전히 결합하고 계속 성장한 클론을 추가 특성화에 특히 관심 대상으로 삼았다. 이들 클론으로부터 항체를 생산하고, 정제하여, 정제된 단클론성 항체(Innovagen AB)를 생성하고, 클론을 시퀀싱을 위해 보냈다(Absolute Antibody).

[0620] 결과

[0621] 하이브리도마 기법에 의한 단클론성 항체의 생성: ApoE 단백질의 아미노산 A199에서 시작하는 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체를 199 번 내지 299 번 ApoE 단편에서 N-말단을 따라 처음 7 개 아미노산으로

이루어진 ApoE 특이적 서열을 이용하여 면역화에 의해 생성하였다. 면역화 펩티드의 축소는 전장 ApoE 단백질에서 확인되는 선형 에피토프에 대한 어떠한 결합 없이 ApoE 단백질의 아미노산 A199에서 시작하는 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체의 생성을 가능하게 하는 데 필수적인 것으로 여겨졌다. Acp 링커 및 시스템인 잔기를 통해 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)에 접합된 199 번 내지 205 번 ApoE-특이적 서열 펩티드를 면역화에 사용하였다. 혈장 샘플을 BSA에 접합된 상응하는 펩티드(KLH에 대한 반응성의 검출을 막기 위해), 및 제조합 ApoE 단편에 대항하는 반응성에 대하여 ELISA에 의해 분석하였다. 면역화된 마우스(한 마리의 C57BL/6 마우스 및 한 마리의 BALB/c 마우스)의 가장 우수한 반응체를 하이브리도마 생성을 위해 선택하였다.

[0622] A199에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 항체에 대한 ELISA 스크리닝: 생성된 하이브리도마 클론을 제조합 ApoE 단편 A199-HIS에 대한 반응성, 뿐만 아니라 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 55에 대한 반응성에 대해 스크리닝하였다. 또한, 제조합 전장 ApoE4, 1 번 내지 272 번 제조합 ApoE 단편-HIS, 및 BSA에 접합된 음성 대조군 펩티드 SEQ ID NO: 53에 대한 반응성의 결여를 평가하였다. 20 개의 클론을 아미노산 A199에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 항체로서 식별하고, 추가로 평가하였다.

[0623] IgG 농도의 결정: IgG 농도의 범위는 2.9 $\mu\text{g/ml}$ 내지 26.6 $\mu\text{g/ml}$ 였다. 항체 농도를 ELISA 실험에서 시작 농도가 동일하도록 세포 배지에서 정규화하였다.

[0624] A199에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 선택적으로 결합하는 상위 20 개의 항체에 대한 ELISA 스크리닝: 모든 항체는, 제조합 전장 ApoE4가 아니라, BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 51 및 제조합 ApoE 단편 A199-HIS에 대하여 반응성이었다. ELISA 및 IgG 농도에 기초하여 상위 8 개의 반응체를 웨스턴 블롯에 의해 추가로 평가하였다.

[0625] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 모든 항체는 인간 뇌 추출물에서 적절한 단편에 결합할 수 있었다. 상위 20 개의 반응체 중 4 개를 IgG 농도, 직접 ELISA, 및 인간 표적에 대한 결합에 기초하여 선택하였다. 이들 클론은 단클론성을 보장하도록 제한 희석 검정에 주어졌고, 제조합 전장 ApoE4가 아니라, 제조합 ApoE 단편 A199-HIS, 및 BSA에 접합된 표적 펩티드 SEQ ID NO: 55에 대해 계속 반응성이었다. 네 개의 클론 모두를 아미노산 A199에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 항체로서 식별하고, 36A12, 38G9, 63F6 및 67G3으로 표기하였다. 모두 단클론성 항체로서 생산하고 정제하였으며, 클론을 시퀀싱을 위해 보냈다.

[0626] 실시예 17

[0627] N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 A199에 대한 항체의 하이브리도마 시퀀싱 및 아이소타입 결정

[0628] 재료 및 방법

[0629] 하이브리도마 시퀀싱: 아미노산 A199에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 선택성이 입증되고 알츠하이머병 뇌 추출물에서 인간 표적 결합이 입증된, 실시예 16에서 생성되고 특성화된 단클론성 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 시퀀싱을 위해 Absolute Antibody로 보냈다. 간략히, 전체 전사체 산탄충 시퀀싱에 의해 하이브리도마 시퀀싱을 수행하였다. 성숙한 VH 영역 및 VL 영역의 DNA 및 단백질 서열을 식별하였다.

[0630] 결과

[0631] 하이브리도마 시퀀싱: 알츠하이머병 뇌 추출물에서 인간 표적에 대한 결합이 입증된 것에 더하여, 아미노산 A199에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 선택성이 입증된 하이브리도마 클론을 시퀀싱하였다.

[0632] 다음 하이브리도마 클론을 시퀀싱하였다: 36A12, 38G9, 63F6 및 67G3. 전체 항체의 아미노산 서열을 얻었다. 각각의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)에 대하여 얻어진 아미노산 서열은 하기 표 12에서 제공된다.

[0633] [표 12]

가변 영역 서열

영역	항체	SEQ ID NO:
36A12		
VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCVSGFTFSNYWMNWRQSPKGLWIGEIKLKSNNYGTHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRADTGIYYCTRDTEVVAGAHWGQGLTVTSA	109
VL	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVRAEDLAVYFCQQYLSSLTFGAGTKLELK	110
38G9		
VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCVSGFTFSNYWMNWRQSPKGLWVGEIKLKSNNYGTHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRADTGIYYCTRDTEVVAGAHWGQGLTVTSA	111
VL	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFCQQYLSSLTFGAGTKLELK	112
63F6		
VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWKQRPQGGLWIGNINPRNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTDYMLSSLTSEDSAVY YCARGLYDYDFDYWGQGTTLTVSS	113
VL	DVLTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSVIVHGNGNTYLQWFLQKPGQSPKLLIYKVSSRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGVIYCFQ GSHVPFTFGSGTKLEIK	114
67G3		
VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTRYWLHWKQRPQGGLWIGNINPTNGGANYNEKFKNKATLTVDKSSSTAYMLSSLTSEDSAVY YCSRDAYDYDCDYWGQGTTLTVSS	115
VL	DVLTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSVIVHSNGNIYLQWYLLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGVIYCFQ GSHVPYTFGGGTKLEIK	116

[0634]

[0635] 상보성 결정 영역(CDR)은 일차 VH 서열 및 VL 서열에 대한 카바트 정의를 이용하여 식별되었고, 하기 표 13에서 제공된다.

[0636] [표 13]

CDR 영역 서열

항체	CDR H1	CDR H2	CDR H3
36A12	NYWMN (SEQ ID NO:62)	EIKLKSNNYGTHYAESVKG (SEQ ID NO:92)	DTEVVAGAH (SEQ ID NO:93)
38G9	NYWMN (SEQ ID NO:62)	EIKLKSNNYGTHYAESVKG (SEQ ID NO:92)	DTEVVAGAH (SEQ ID NO:93)
63F6	NYWMH (SEQ ID NO:94)	NINPRNGGTNYNEKFKS (SEQ ID NO:95)	GLYDYDFDY (SEQ ID NO:96)
67G3	RYWLH (SEQ ID NO:97)	NINPTNGGANYNEKFKN (SEQ ID NO:98)	GAYDYDCDY (SEQ ID NO:99)
	CDR L1	CDR L2	CDR L3
36A12	KSSQSVLYNSNQKNYLA (SEQ ID NO:100)	WASTRDS (SEQ ID NO:101)	QQYLSSLT (SEQ ID NO:102)
38G9	KSSQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO:103)	WASTRES (SEQ ID NO:104)	QQYLSSLT (SEQ ID NO:102)
63F6	RSSQSVIVHGNGNTYLQ (SEQ ID NO:105)	KVSSRFS (SEQ ID NO:106)	FQGSHVPFT (SEQ ID NO:107)
67G3	RSSQRIVHSNGNIYLQ (SEQ ID NO:108)	KVSNRFS (SEQ ID NO:25)	FQGSHVPYT (SEQ ID NO:28)

[0637]

[0638] 항체를 이들의 서열에 기초하여 아이소타입화하였고, 이들 각각의 서브-클래스 및 경쇄는 하기 표 14에 요약되

어 있다.

[표 14]

이소형화 결과

클론	서브-클래스	경쇄
36A12	IgG1	K
38G9	IgG1	K
63F6	IgG2b	K
67G3	IgG2b	K

실시예 18

N-말단 ApoE 단편 네오-에피토프 A199에 대한 정제된 단클론성 항체의 특성화

본 실시예는 직접 ELISA, 억제 ELISA, 표면 플라즈몬 공명, 인간 뇌 추출물에 대한 웨스턴 블롯을 포함하여 다양한 방법에 의해 실시예 16 및 실시예 17에 기재되어 있는 정제된 단클론성 항체의 특성화를 기술한다.

재료 및 방법

직접 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가: 후술되는 직접 ELISA를 이용하여 실시예 17에서 생산된 정제된 단클론성 항체의 결합 선택성을 평가하였다. A199 N-말단 네오-에피토프 ApoE 펩티드(BSA-접합 SEQ ID NO: 51) 및 힌지 영역에서의 절단으로 생성된 재조합 A199-HIS C-말단 ApoE 단편(SEQ ID NO: 58)에 선택적으로 결합하는 능력을 L198, G200 및 음성 대조군 펩티드(각각 BSA-접합 SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 50 및 SEQ ID NO: 53), 및 재조합 전장 ApoE4(ApoE 서열 aa 1 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 45)에 대한 결합과 비교하였다.

표준 ELISA 프로토콜에 따라 스크리닝을 수행하였다. 간략히, BSA-접합 네오-에피토프 펩티드 및 음성 대조군 펩티드, 및 0.1 μM 재조합 C-말단 ApoE 단편 및 전장 ApoE(Abcam, cat. no. ab50243)의 1 μg/ml 용액을 PBS에서의 희석에 의해 제조하였다. 50 μl/웰을 ELISA 반-면적 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 접착성 실러로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 용액을 폐기한 후, 플레이트를 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 1시간 동안 150 μl/웰의 단백질-비함유 차단 용액(Pierce)으로 차단하였다. 플레이트를 0.28 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다. 관심의 정제된 재조합 항체를 3 μg/ml의 시작 희석으로 3 배 연속 희석하였다(희석 완충액(0.1% BSA 및 0.05% TWEEN®-20이 있는 PBS)과 1:2 혼합). 항-ApoE C-말단 항체를 참조 항체(ApoE E-8 마우스 단클론성, Santa Cruz Biotechnology, cat. no. sc-393302)로서 사용하였다. 50 μl/웰을 ELISA 플레이트에 첨가하고, 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 앞서 기재된 바와 같이 4 회 세척하였다. 검출 항체(HRP-접합 항-마우스 IgG, Southern Biotech, cat. no. 1030-05, 희석 완충액에서 1/10000 희석)를 50 μl/웰에 첨가하고, 플레이트를 진탕하면서(600 rpm 내지 900 rpm) 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 추가 세척 후(앞서 기재된 바와 같이), 50 μl/웰의 K-Blue® 수성 기질(Neogen)을 첨가하고, 50 μl/웰의 0.5 M H₂SO₄로 5분 내지 15분 후에 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 광학 밀도를 ELISA 판독기(Tecan)를 사용하여 판독하였다. 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 항체 농도에 대해 광학 밀도를 플롯팅하고(도 28), EC50 값을 로그 작용제 농도 반응 곡선으로부터 결정하였다.

억제 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가 및 IC50 결정: 후술되는 억제 ELISA를 이용하여 실시예 16 및 실시예 17에 기재되어 있는 정제된 단클론성 항체에 대한 결합 강도 및 선택성을 평가하였다. 아미노산 A199에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드의 N-말단 네오-에피토프에 결합하는 정제된 단클론성 항체의 능력을 용액 중에 아미노산 L198 및 G200에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드뿐만 아니라 음성 대조군 펩티드(aa 192 번 내지 206 번)에 결합하는 이들의 능력과 비교하여 평가하였다.

간략히, 시험하고자 하는 정제된 단클론성 항체가 BSA에 접합되고 아미노산 A199, L198 또는 G200에서 시작하는 합성 ApoE 펩티드의 N-말단 네오-에피토프, 또는 BSA-접합 음성 대조군 펩티드(각각 SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 50 및 SEQ ID NO: 53)와 상호작용할 수 있게 하였다. 그 후에, 혼합물을 BSA-커플링된 A199 합성 ApoE 펩티드로 코팅된 마이크로타이터 플레이트에 첨가하였다. 정제된 단클론성 항체가 사전-인큐베이션 단계에서 임의의 항원에 결합하는 경우(합성 ApoE 펩티드), 항체는 마이크로타이터 플레이트에 고정된 합성 A199 ApoE 펩티드에 결합하지 못하게 된다. 이는 ELISA 검출 신호의 억제로 이어진다.

- [0649] BSA에 접합된 N-말단 네오-에피토프 펩티드 A199(SEQ ID NO: 51)의 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용액을 PBS에서의 희석에 의해 제조하였다. 50 μl /웰을 ELISA 반-면적 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 접착성 실러로 밀봉하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 용액을 폐기한 후, 플레이트를 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 90분 동안 단백질-비함유 차단 용액(Pierce)(150 μl /웰)으로 차단하였다. 차단된 플레이트를 0.28 mM NaH_2PO_4 , 2.5 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20 및 0.0075% Kathon CG를 함유하는 세척 완충액으로 4 회 세척하였다.
- [0650] 각각의 합성 ApoE 펩티드의 연속 희석액을 96 웰 저장 플레이트에서 10000 ng/ml부터 시작하여 4 배 희석에 의해 제조하였다(30 μl 최종 부피). 시험하고자 하는 각각의 정제된 단클론성 항체를 웰 당 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 각각의 합성 ApoE 펩티드의 연속 희석액에 첨가하였다(30 μl). 샘플을 진탕하면서(900 rpm) 실온에서 45분 동안 사전-인큐베이션하였다.
- [0651] 사전-인큐베이션된 샘플을 차단된 ELISA 플레이트로 옮기고(50 μl /웰), 플레이트를 진탕 없이 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 상술된 바와 같이 세척하였다. 알칼리성 포스파타제 접합 항-마우스 IgG 검출 항체(Mabtech, cat. no. 3310-4)를 1:1000 희석하고, 각 플레이트에 첨가하였다(50 μl /웰). 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 45분 동안 진탕하면서(900 rpm) 인큐베이션하고, 후속적으로 상술된 바와 같이 세척하였다. 알칼리성 포스파타제 기질(50 μl /웰)을 플레이트에 첨가하고, 광학 밀도를 최대 120분 동안 405 nm의 파장에서 10분마다 판독하였다. IC50 값을 로그 억제제 농도 반응 곡선으로부터 결정하였다(도 29).
- [0652] 표면 플라즈몬 공명에 의한 항체의 선택성 평가 및 K_D 결정: 항원과 항체 사이의 결합 상호작용을 표준 절차에 따라 Biacore 8K 기기(GE Healthcare)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 평가하였다.
- [0653] 전장 ApoE와 비교하여 N-말단 네오-에피토프에 대한 단클론성 항체의 결합 친화도를 결정하기 위해, 단일-사이클 동역학 실험을 실시하였다. 제조업체의 지침에 따라 아민 커플링 키트(GE Healthcare, cat. no. BR100050)를 사용하여 CM5 센서 칩(GE Healthcare, cat. no. 29104988) 상에 재조합 단편을 고정하였다. 참조(고정된 항원 없음) 및 활성 표면을 각각 플로우 셀 1(Fc1) 및 플로우 셀 2(Fc2)에서 아민 커플링 시약을 사용하여 동일한 조건으로 처리하였다. 활성 표면에 대한 고정 수준을 약 150 내지 200 반응 단위(RU)로 유지하였다. 동일한 프로토콜 설정을 이용하여 전장 ApoE를 CM5 칩 표면 상에 고정하였다.
- [0654] 정제된 항체를 14 nM에서 0.3 nM까지 2-배 연속 희석하여 제조하였다(5 단계 내지 7 단계로). 다음으로, 제조된 정제 항체의 연속 희석액을 센서 칩의 두 플로우 셀 모두에 걸쳐 주입하였다(30 $\mu\text{l}/\text{min}$, 접촉 시간 360초, 해리 시간 2500초). 상호작용 시리즈를 삼중으로 수행하였다. 값을 블랭크 제거하고, 이가 분석물 결합 동역학 피트 모델을 평가에 사용하였다.
- [0655] 모든 SPR 실험에서, 1xPBS-P+(GE Healthcare, cat. no. 28995084)를 사용하여 항체 및 표적 항원을 희석하였다. 25°C에서 실험을 수행하였다.
- [0656] 웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 후술되는 웨스턴 블롯 분석을 이용하여, 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물 내 ApoE 전장 단백질에 대한 결합 없이 A199에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체의 선택적 결합을 평가하였다. 알츠하이머병 환자의 신선한 냉동된 뇌 조직을 RIPA 2% SDS 추출 완충액에서 균질화하고, 이어서 16000 x g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 후속 상청액에서 표준 단백질 농도 결정을 수행하였다.
- [0657] 약 60 μg 의 총 단백질을 함유하는 RIPA 2% SDS 뇌 추출물을 2x Laemmli 샘플 완충액과 혼합하고, 95°C에서 5분 동안 비등시키고, SDS-PAGE 겔(Bolt™ 12% Bis-Tris Plus 10 웰, Thermo Fisher, cat. no. NW00120BOX) 상에 로딩하였다. 겔을 180 V에서 30분 내지 40분 동안 작동시키고, 그 후에 겔에서 니트로셀룰로스 막으로 Trans-Blot® Turbo™ 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 단백질을 옮겼다. 막을 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1시간 동안 차단하고, A199에서 시작하는 12 kDa 이하의 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대한 친화성을 갖는 단클론성 항체(0.1% TWEEN®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR) 중에 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 함께 실온에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-마우스-800CW(LI-COR, cat. no. 925-32210)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.
- [0658] 웨스턴 블롯 막에서 수득된 밴드가 ApoE 기원이었는지를 확인하기 위해, 막을 0.1% TWEEN®-20이 있는

Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에 1:2000 희석된 다클론성 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. no. 178479; 번역원 ApoE aa 1 번 내지 299 번)로 하룻밤 재염색하였다. 막을 세척하고, 0.1% Tween®-20이 있는 Intercept® PBS 차단 완충액(LI-COR)에서 1:25000 희석된 검출 항체 항-염소-680RD(LI-COR, cat. no. 925-68074)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, Odyssey® FC(LI-COR)를 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0659] 결과

[0660] 직접 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가: 4 개의 정제된 단클론성 항체 36A12, 38G9, 63F6 및 67G3을 198 번 내지 203 번, 199 번 내지 204 번 또는 200 번 내지 205 번 BSA-접합 펩티드 및 ApoE 재조합 단편 aa 199 번 내지 299 번에 대한 반응성에 대해 스크리닝하였다. 또한, 재조합 전장 ApoE(1 번 내지 299 번 ApoE4) 및 BSA에 접합된 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53)에 대한 반응성의 부재를 연구하였다.

[0661] 모든 정제된 단클론성 항체는 N-말단 네오-에피토프 펩티드 A199(SEQ ID NO: 51) 및 재조합 C-말단 ApoE 단편 A199-HIS(aa 199 번 내지 299 번; SEQ ID NO: 58)에 대한 강한 결합을 나타냈다. 최고 항체 농도에서, 항체 63F6 및 항체 67G3은 음성 대조군 펩티드(SEQ ID NO: 53), 및 200 번 내지 205 번 BSA-접합 펩티드(SEQ ID NO: 50)에 약간의 결합을 나타냈다(도 28). 계산된 EC50 값은 하기 표 15에 나타나 있다.

[0662] 예상된 바와 같이, ApoE C-말단과 관련된 참조 항체는 재조합 A199 단편(aa 199 번 내지 299 번)과 재조합 ApoE4 전장 단백질(aa 1 번 내지 299 번) 둘 모두를 검출하고 결합할 수 있었다. 또한, 예상된 바와 같이, 참조 항체에 대한 에피토프가 ApoE aa 274 번 내지 299 번이기 때문에, A199-BSA 펩티드에 대한 결합이 나타나지 않았다(도 28).

[0663] 억제 ELISA에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가 및 IC50 결정: 4 개의 정제된 단클론성 항체 36A12, 38G9, 63F6 및 67G3을 N-말단 네오-에피토프 펩티드 A199-BSA(aa 199 번 내지 204 번)에 대한 결합 강도 및 결합 선택성에 대하여 스크리닝하였다. 또한, 항체를 198 번 내지 203 번, 200 번 내지 205 번 BSA-접합 펩티드, 및 192 번 내지 206번 음성 대조군 펩티드에 대한 반응성의 결여에 대하여 스크리닝하였다.

[0664] 모든 정제된 단클론성 항체는 A199-BSA(aa 199 번 내지 204 번)에 대해 강한 결합 및 선택성을 나타낸 반면, 198 번 내지 203 번, 200 번 내지 205 번 또는 음성 대조군 BSA-접합 펩티드에 대한 결합은 없었다(도 29). 계산된 IC50 값은 하기 표 15에 나타나 있다.

[0665] [표 15]

정제된 단클론성 항-A199 항체의 직접 ELISA 및 억제 ELISA로부터의 결과 요약

클론	EC50 (ng/ml)		IC50 (ng/ml)
	A199-BSA 펩티드	A199-HIS 단편	A199-BSA 펩티드
36A12	5.1	20.2	27.7
38G9	4.6	39.7	52.6
63F6	3.8	1.8	2.5
67G3	4.4	3.5	2.9

[0666] 표면 플라즈몬 공명에 의한 정제된 단클론성 항체의 선택성 평가 및 K_D 결정: 4 개의 정제된 단클론성 항체 36A12, 38G9, 63F6 및 67G3을 선택성에 대하여 평가하고, 표적 항원에 대한 K_D 값을 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정하였다.

[0668] 모든 정제된 단클론성 항체는 A199-HIS 단편에 대한 결합을 나타냈고(도 30), 반면에 재조합 전장 ApoE에 대한 결합은 나타나지 않았다. 계산된 ka1, kd1 및 K_D1 값은 하기 표 16에 나타나 있다.

[0669] [표 16]

정제된 단클론성 항-A199 항체의 표면 플라즈몬 공명으로부터의
결과 요약

클론	Biacore: A199-HIS 단편		
	k_a ($\times 10^5$ 1/Ms)	k_d ($\times 10^{-4}$ 1/s)	K_D (nM)
36A12	34.0	3.4	10
38G9	944	25	1450
63F6	1.5	207	137
67G3	1.8	172	83

[0670]

[0671]

웨스턴 블롯 분석에 의한 알츠하이머병 뇌 추출물에서의 선택성 평가 및 인간 표적 결합: 아미노산 A199에서 시작하는 ApoE 단편의 N-말단 네오-에피토프에 대해 선택적인 단클론성 항체(36A12, 38G9, 63F6 및 67G3)를 전장 ApoE에 대한 어떠한 결합 없이 알츠하이머병 환자의 인간 뇌 추출물에서 12 kDa 이하의 ApoE 단편에 선택적으로 결합하는 이들의 능력에 대하여 시험하였다. 웨스턴 블롯 분석은 전장 ApoE에 대한 어떠한 가시적 결합 없이 크기가 약 12 kDa 및 10 kDa인 두 개의 ApoE 단편에 대한 모든 단클론성 항체의 결합을 입증하였다(도 31의 A). 단클론성 항-ApoE 항체로 웨스턴 블롯 막의 재염색은 전장 ApoE, 고분자량(HMW) ApoE 단편(약 20 kDa 내지 25 kDa) 및 별개의 12 kDa 및 10 kDa ApoE 단편의 염색을 보여주었다(도 31의 B).

[0672]

서열 목록

[0673]

하기 표 17은 본 출원에 언급된 서열들을 열거한 것이다.

[0674] [표 17]

SEQ ID NO:	설명/ 발생	서열
1	ApoE 200-299	GQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEV KEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH
2	ApoE 199-299	AGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDE VKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWF EPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDN H
3	ApoE 198-299	LAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLD EVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSW FEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDN H
4	육량체 ag 198	LAGQPL
5	육량체 ag 199	AGQPLQ
6	육량체 ag 200	GQPLQE
7	칠량체 ag 198	LAGQPLQ
8	칠량체 ag 199	AGQPLQE
9	팔량체 ag 198	LAGQPLQE
10-23	G200 HC CDR	표 4
24-33	G200/A199 LC CDR	표 4 및 표 13
34-44	G200 VH 및 VL	표 3
45	인간 ApoE4	KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRF WDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDET MKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQA RLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRV RLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAVYQAGAREG AERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQ ERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVA EVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVED MQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH
46	FL ApoE 의 158-233	RLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVR AATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSR TRDRLDEVK
47	FL ApoE 의 200-233	GQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEV K
48	200-299-10xHIS	GQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEV KEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH HHHHHHHHHH
49	10xHIS-ApoE4-FL	HHHHHHHHHHKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSG QRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVT QELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRAR LSKELQAAQARLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAML GQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAV YQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATV GSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDR LDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKS

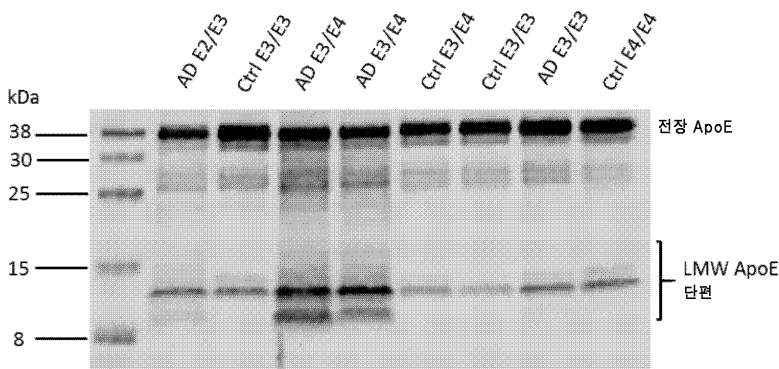
[0675]

		WFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPS DNH
50	G200 면역원	GQPLQE-Acp-C
51	A199 면역원	AGQPLQ-Acp-C
52	L198 면역원	LAGQPL-Acp-C
53	Neg ctrl 펩티드	AATVGS LAGQPLQER-Acp-C
54	L198 신생 면역원	LAGQPLQE-Acp-C
55	A199 신생 면역원	AGQPLQE-Acp-C
56	10xHIS-ApoE4- 1-272	HHHHHHHHHHKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSG QRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVT QELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRAR LSKELQAAQARLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAML GQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAV YQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATV GSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDR LDEVKEQVAEVRKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKS WFEPLVEDM
57	198-299-10xHIS	LAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDRDL EVKEQVAEVRKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKS WFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDN HHHHHHHHHHH
58	199-299-10xHIS	AGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDRDL EVEQVAEVRKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKS WF EPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDN HHHHHHHHHHH
59-70	L198/A199 HC CDR	표 8 및 표 13
71-81	L198 LC CDR	표 8
82-91	L198 VH 및 VL	표 7
92-99	A199 HC CDR	표 13
100- 108	A199 LC CDR	표 13
109- 116	A199 VH 및 VL	표 12

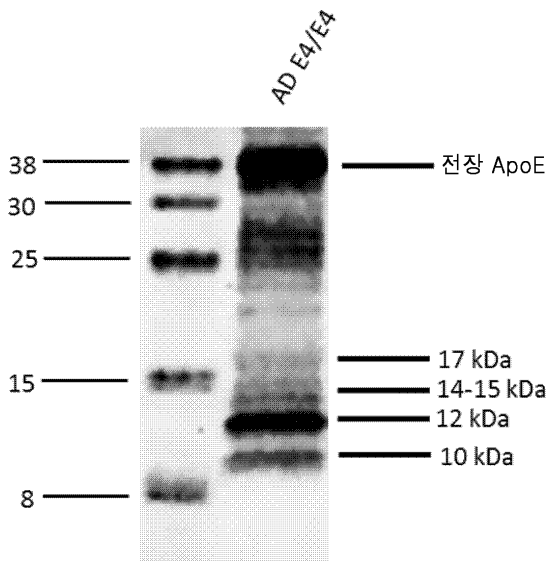
[0676]

도면

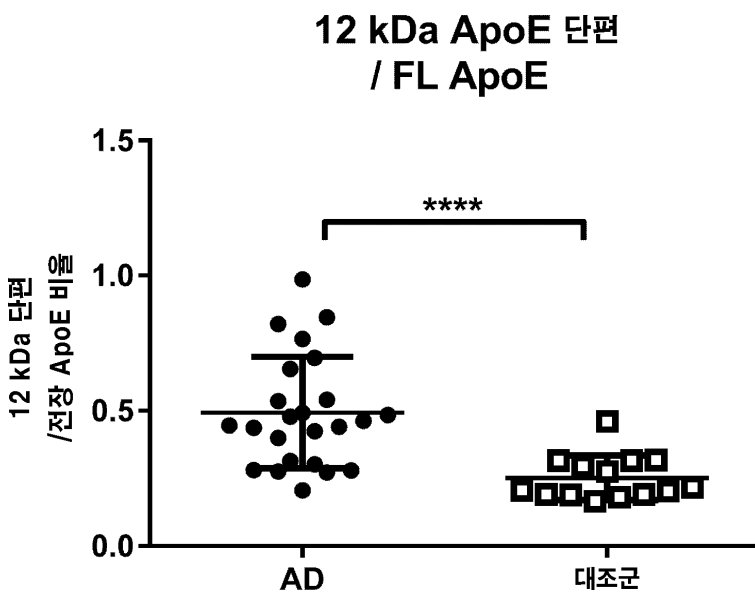
도면1



도면2

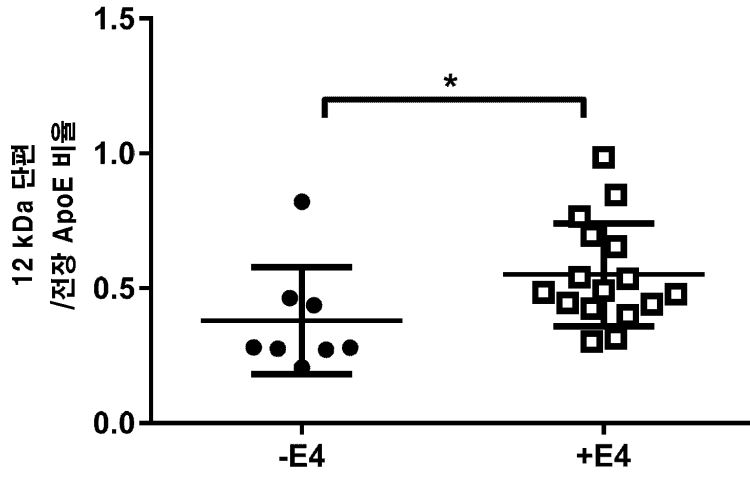


도면3

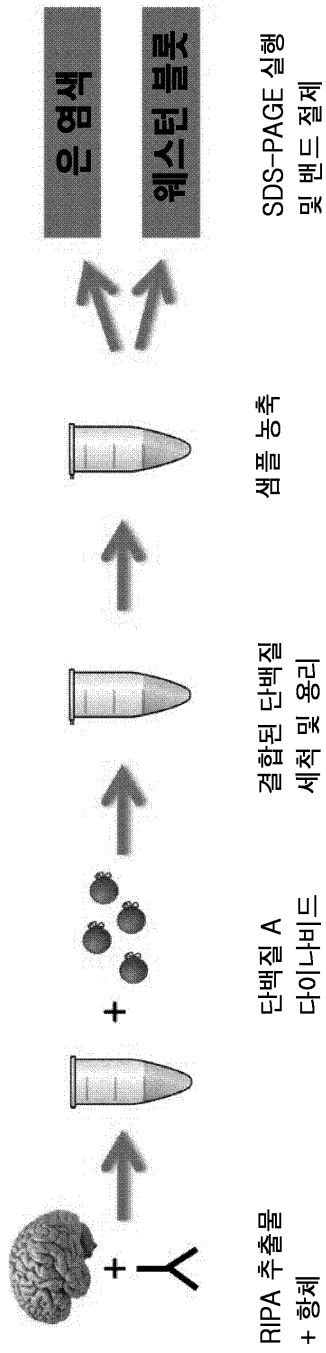


도면4

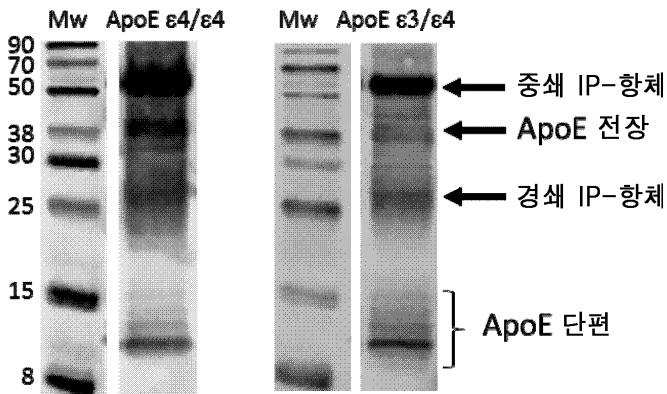
12 kDa ApoE 단편
/ FL ApoE
- AD 군만



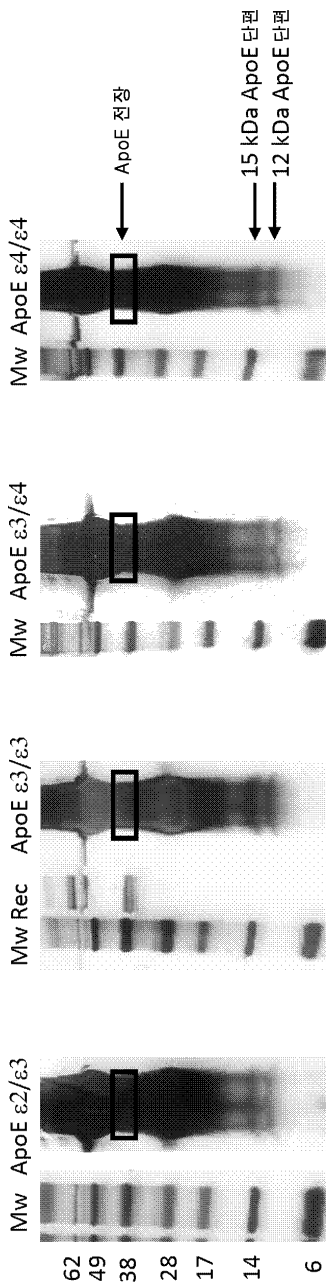
도면5



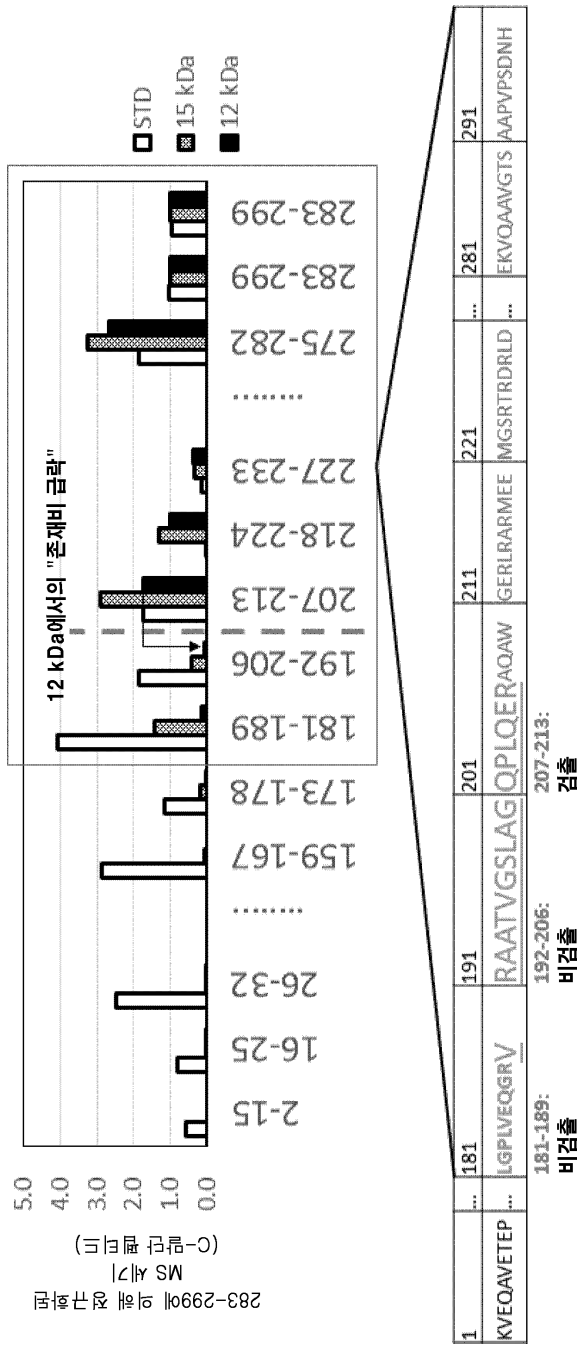
도면6



도면7



도면8



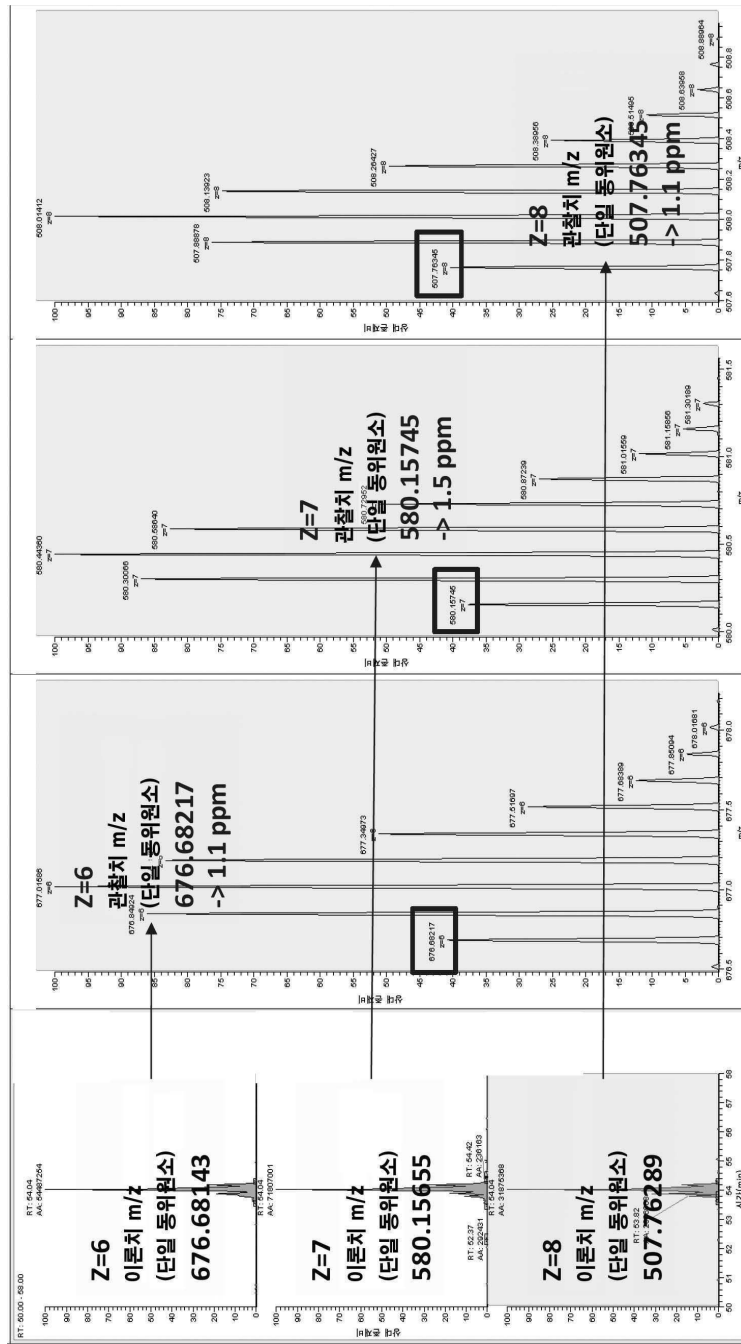
도면9

1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
1	KVEQAVETEP EPELRQQTETW QSCQRWELAL GRFDYLRWV QTLSEQVQEE LLSSQVTQEL RALMDEITMKE LKAVKSELEE QLTTPVAEETR ARLSKELQAA								
101	QARLGADMED VEGRLVQYEG EVQAMLGQST EELRVRLASH LRKLKRLLR DADDLQKDLA VYQAGAREGA ERGLSAIRER LGPLVEQSHV RAATVGSLAG								
201	QPLQERQAW GERLRARMEE MGRTRDRLD EVQAVAEVR AKLEEQAQCI KLOAEAFQAR LKSMFEPLVE DMQRMAGLV EKVDAAVGTG AAPVPSDNH								

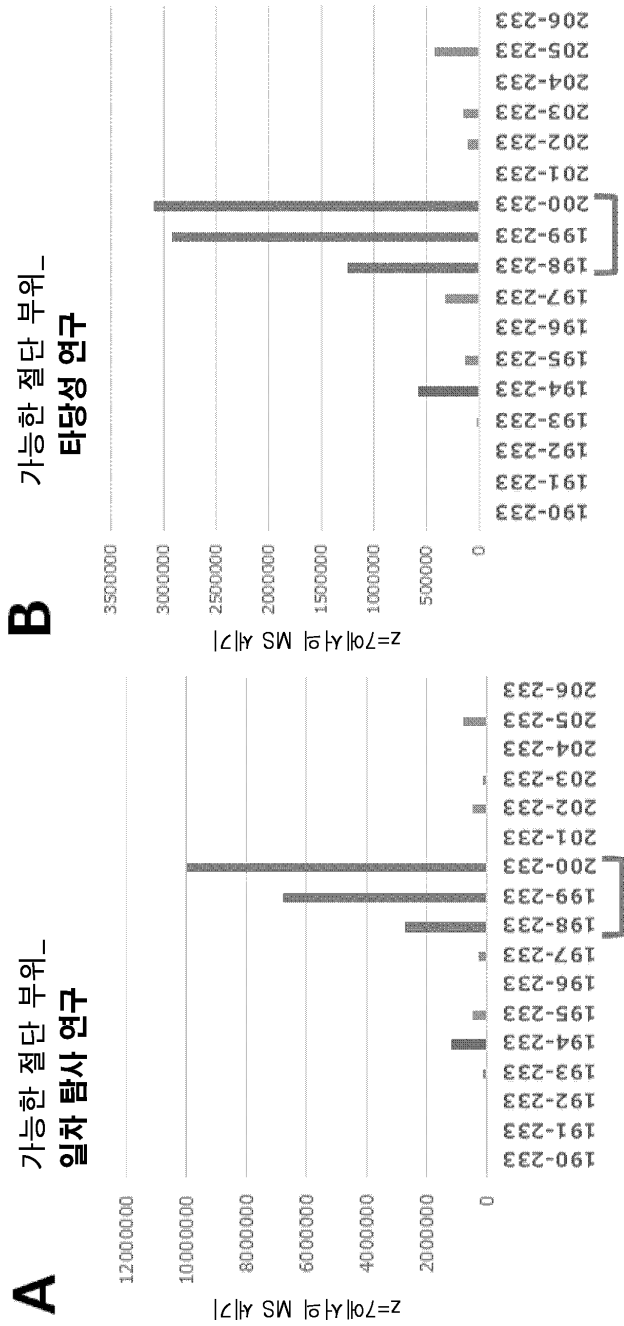
234 - 299: LysC 겔중 분해에 의해 12 kDa에서 식별된 펩티드

190 - 206:
가능한 절단 부위(트립신 실험 기준)

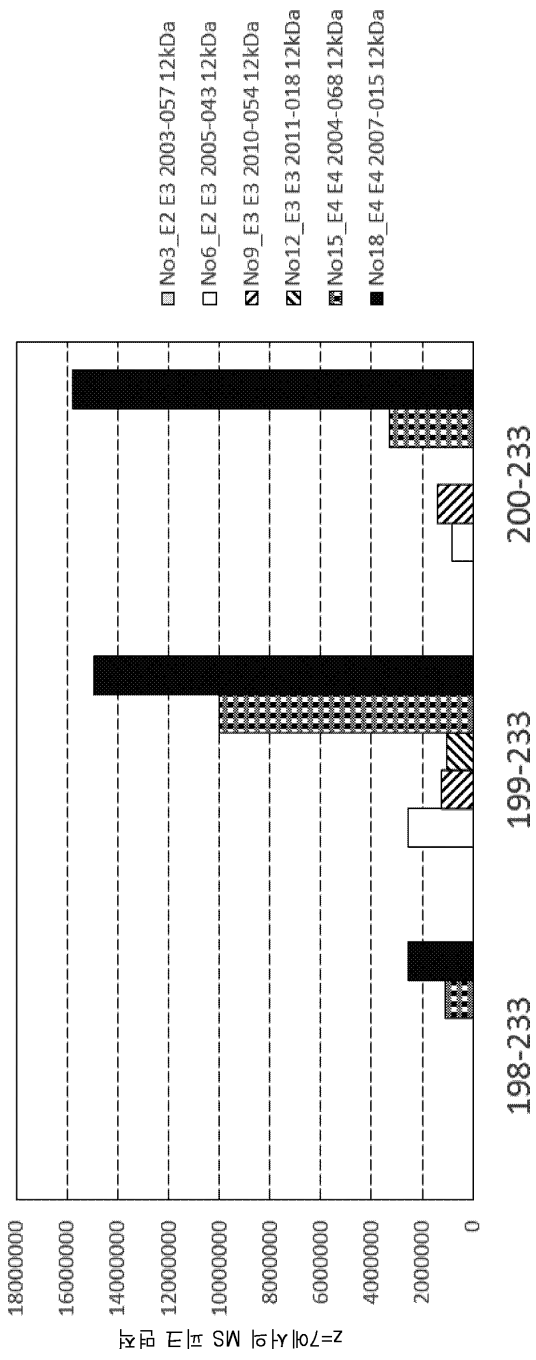
도면10



도면11



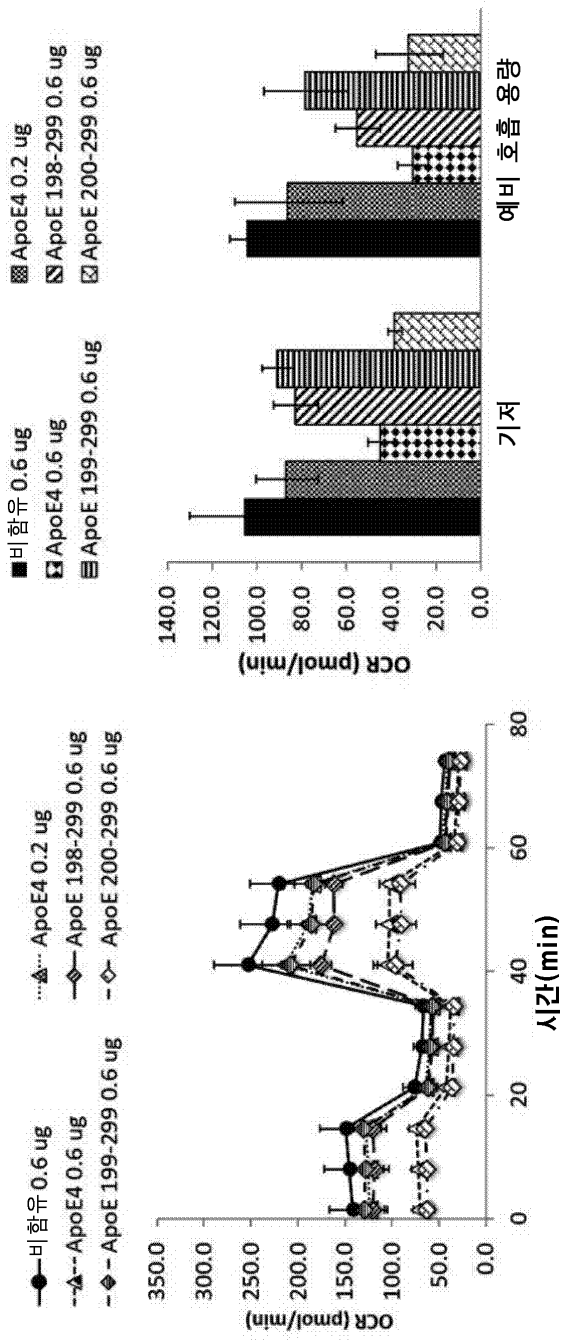
도면12



도면13a

A) Neuro2A

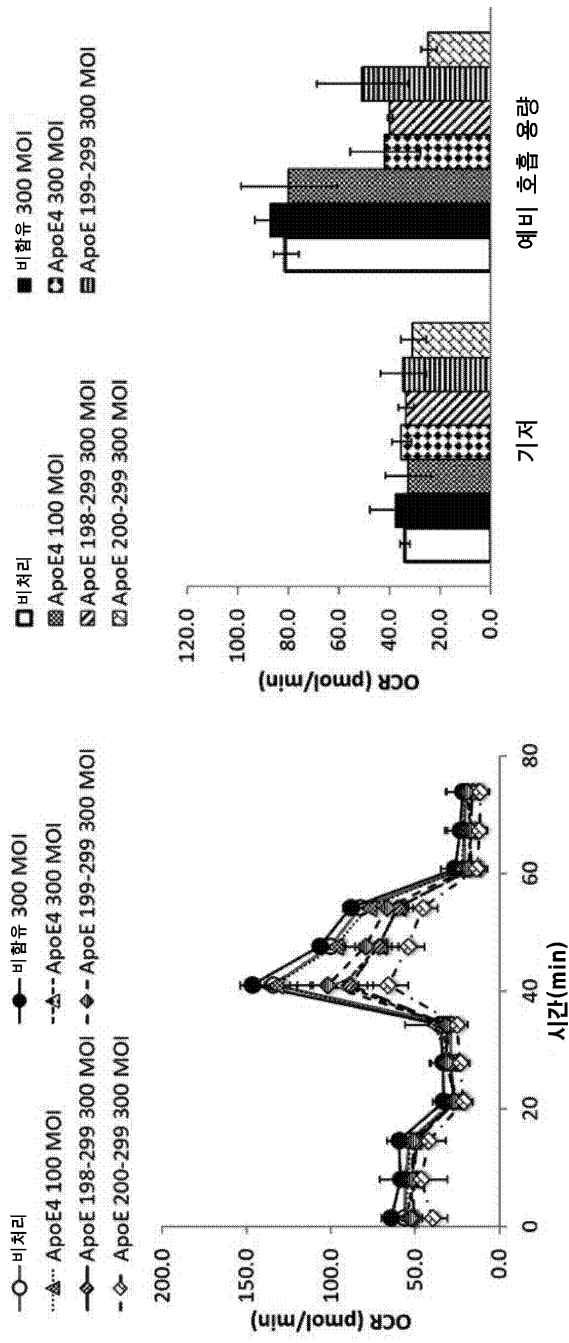
미토콘드리아 호흡



도면13b

B) 랫트 일차 해마 뉴런

미토콘드리아 호흡

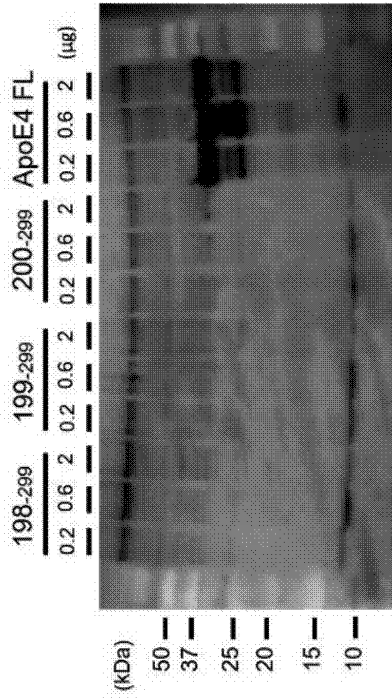
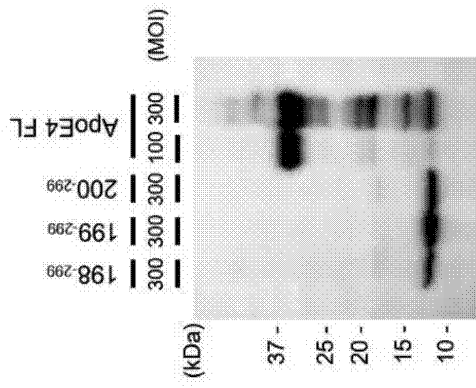


도면13c

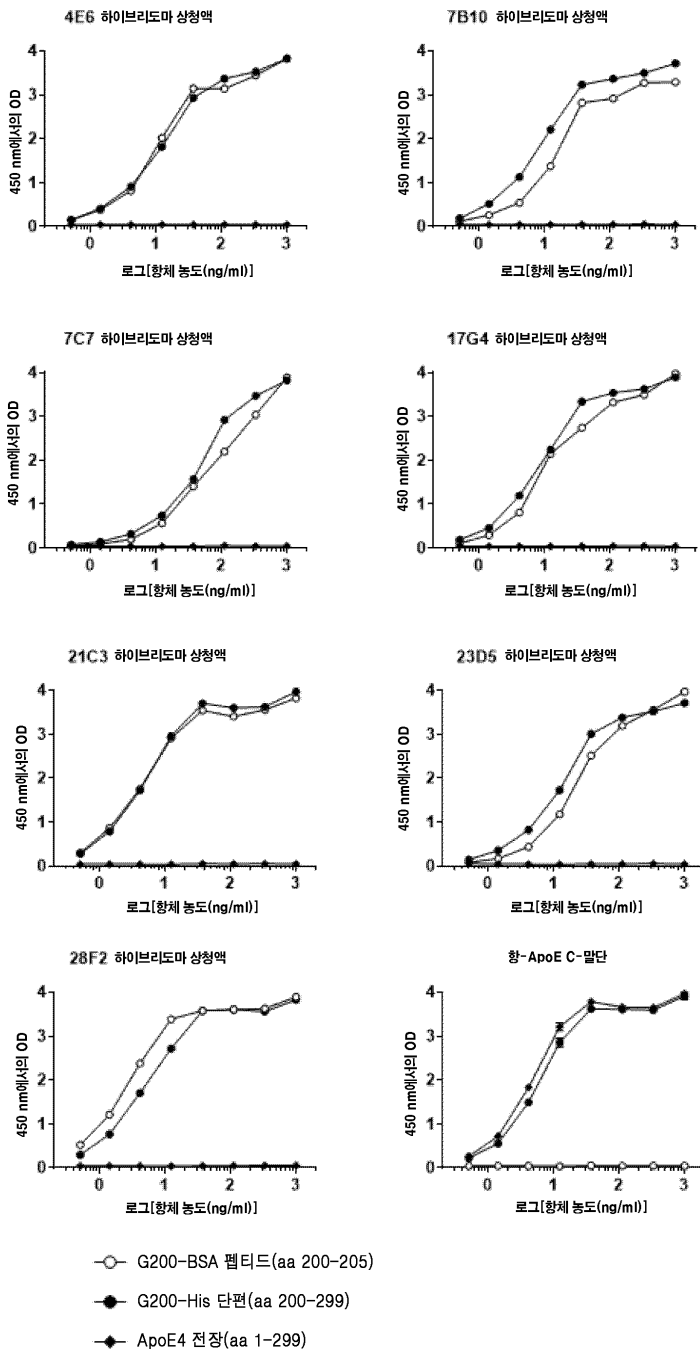
C) 발현 확인

<Neuro2A>

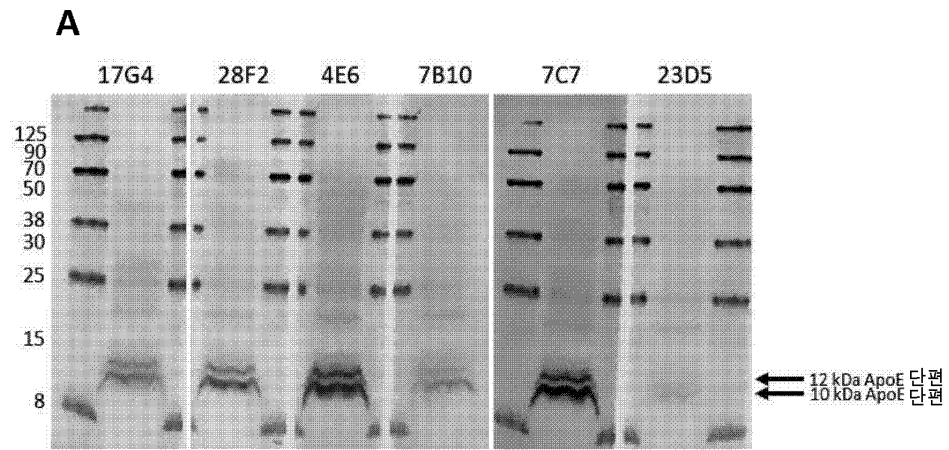
<랫트 일차 해마 뉴런>



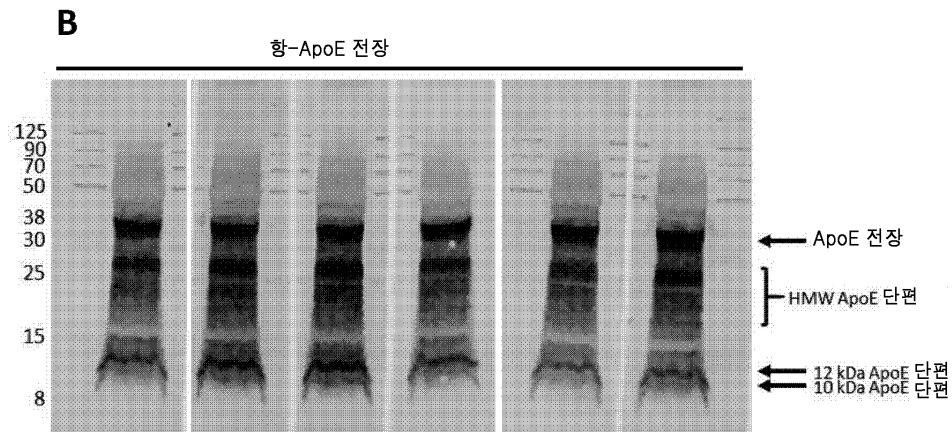
도면14



도면15

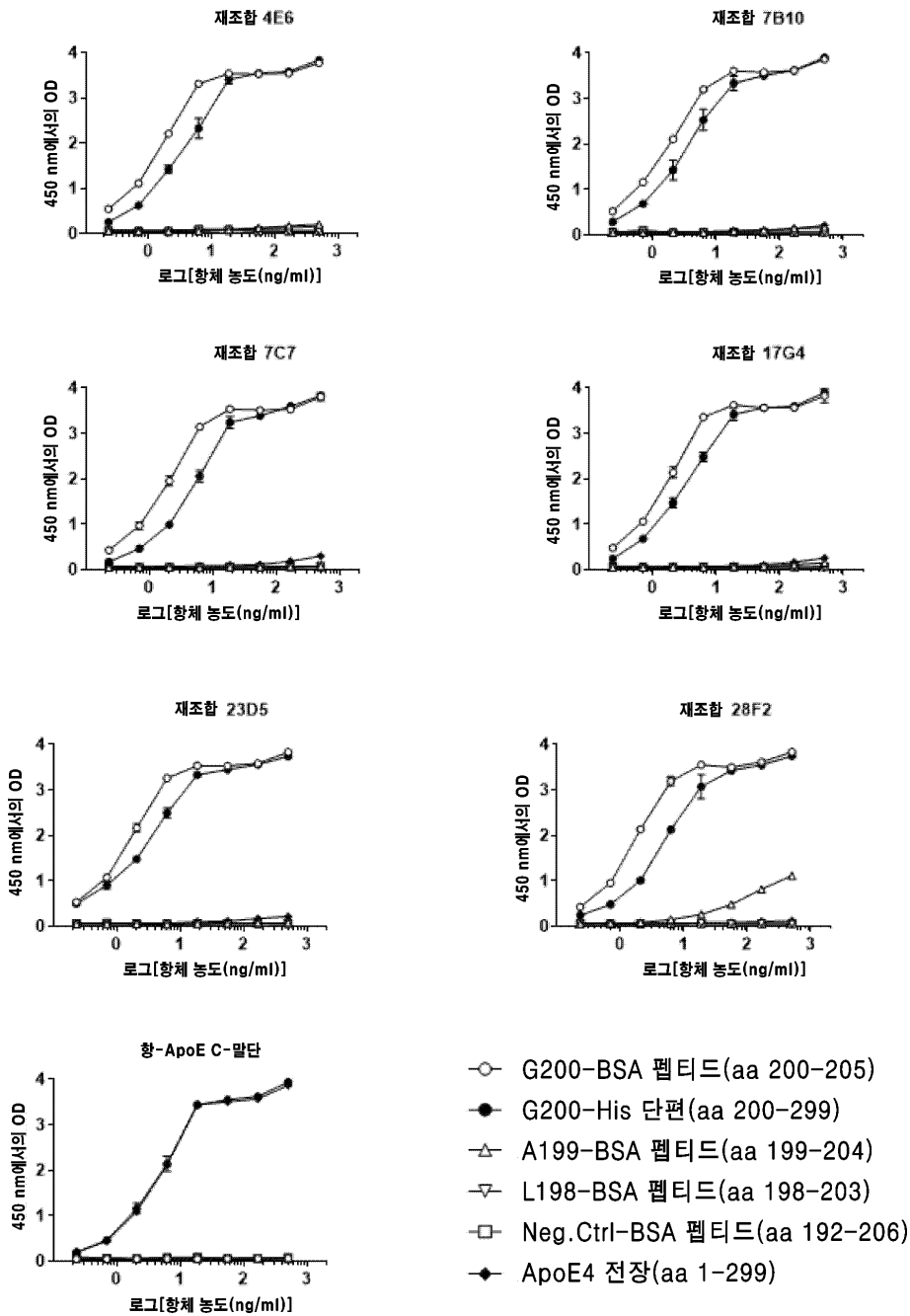


WB 일차 항체: 하이브리도마 클론으로부터의 상청액

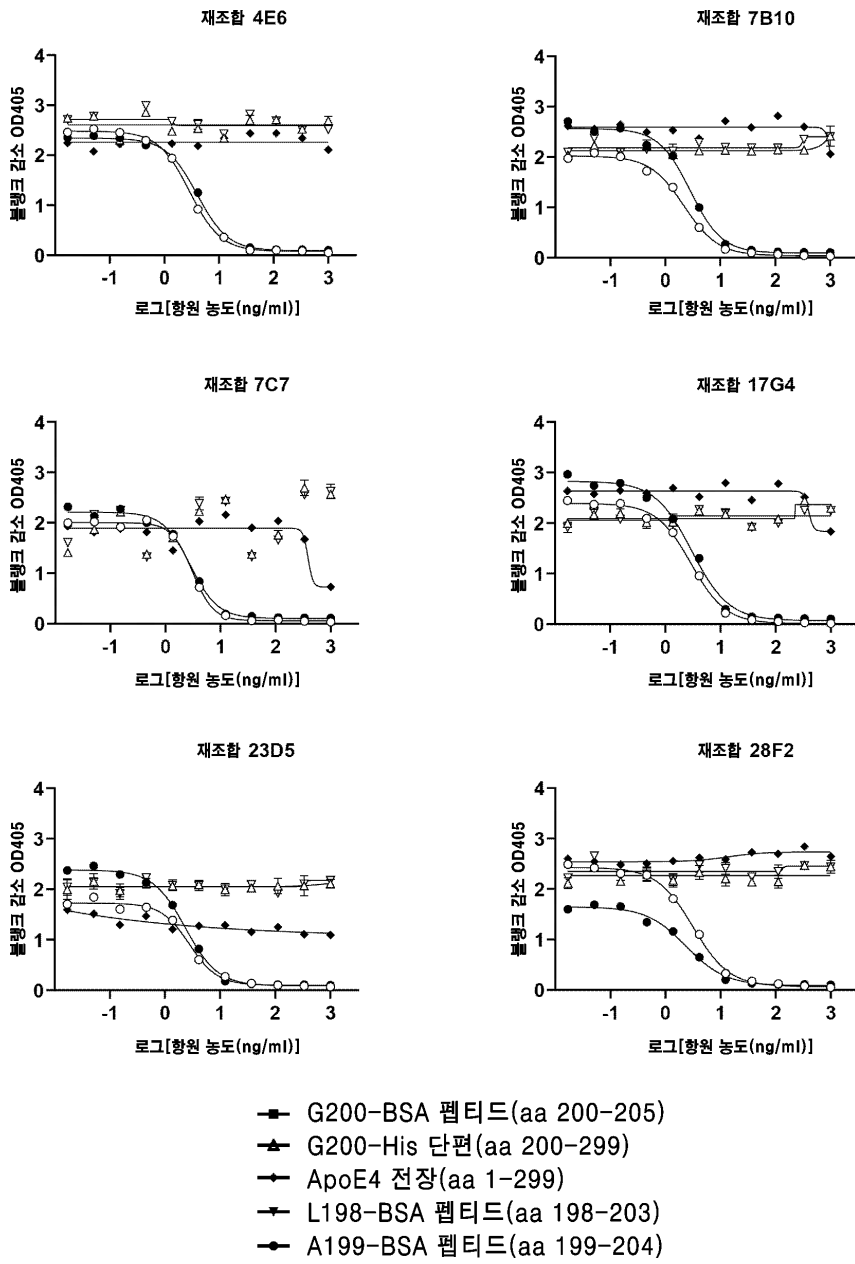


WB 일차 항체: 항-ApoE 항체 (Calbiochem, cat. no. 178479)

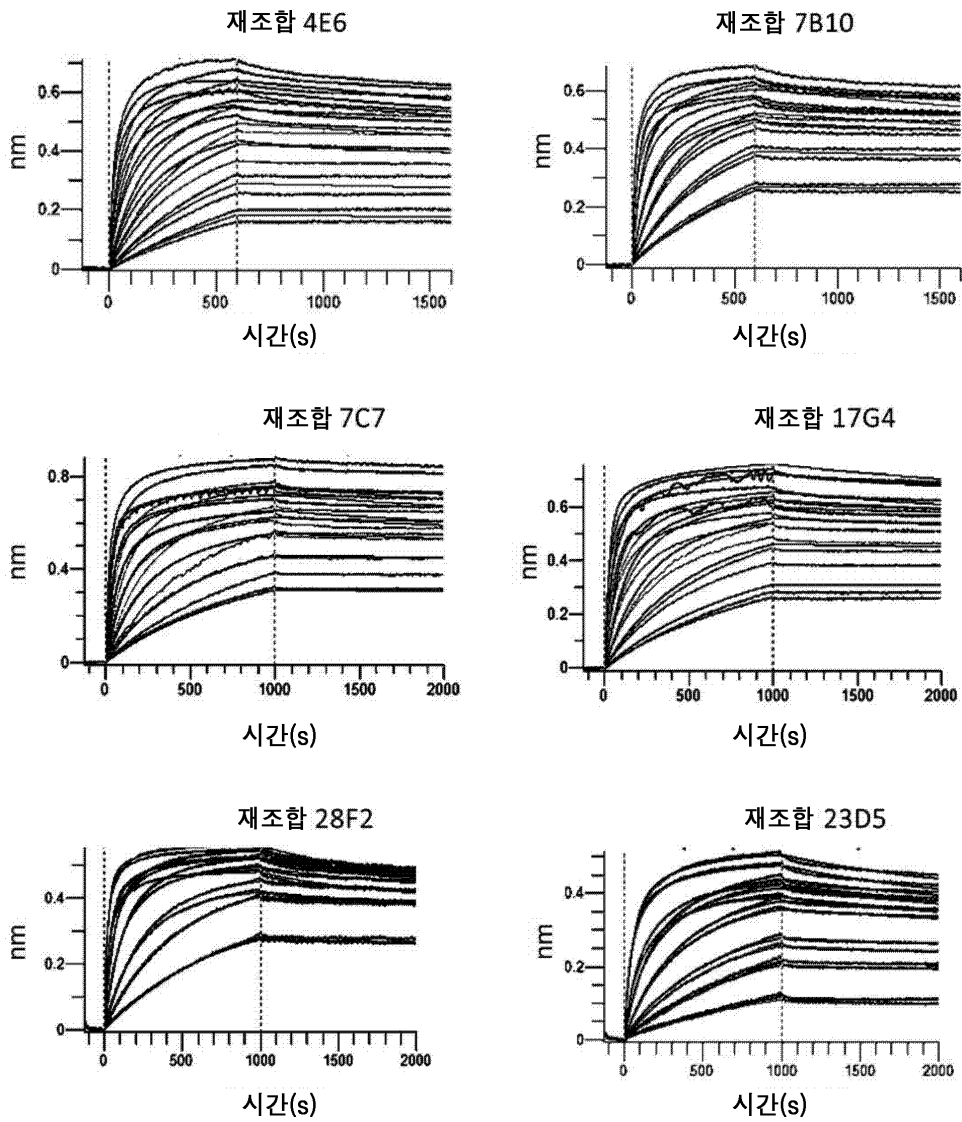
도면16



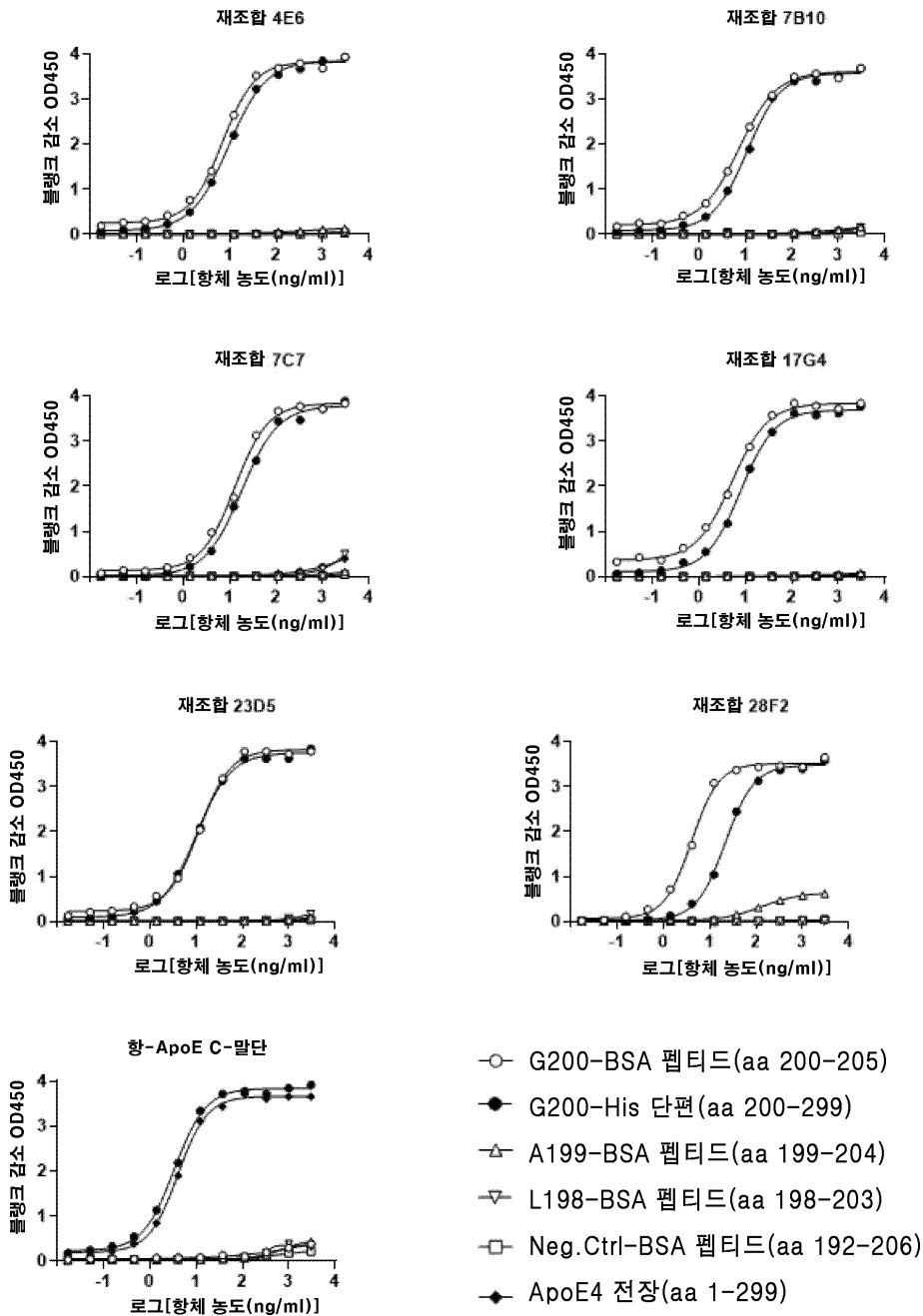
도면17



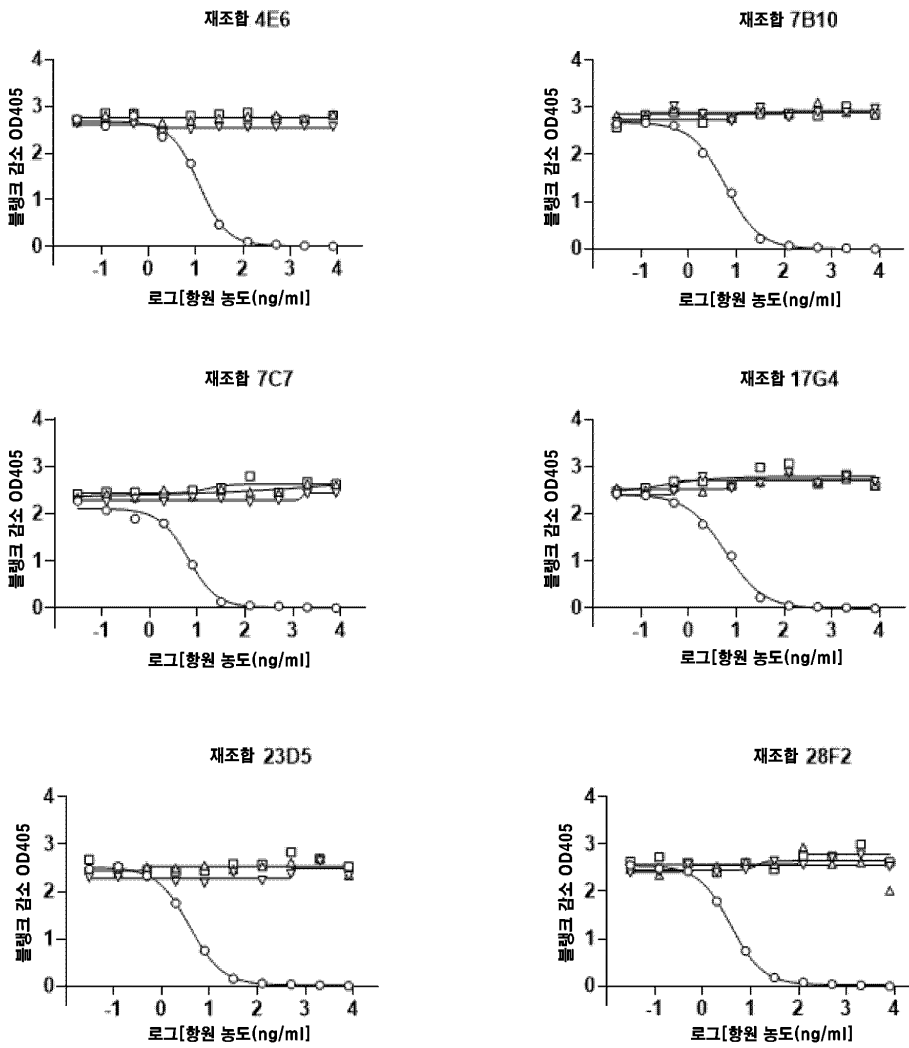
도면18



도면19



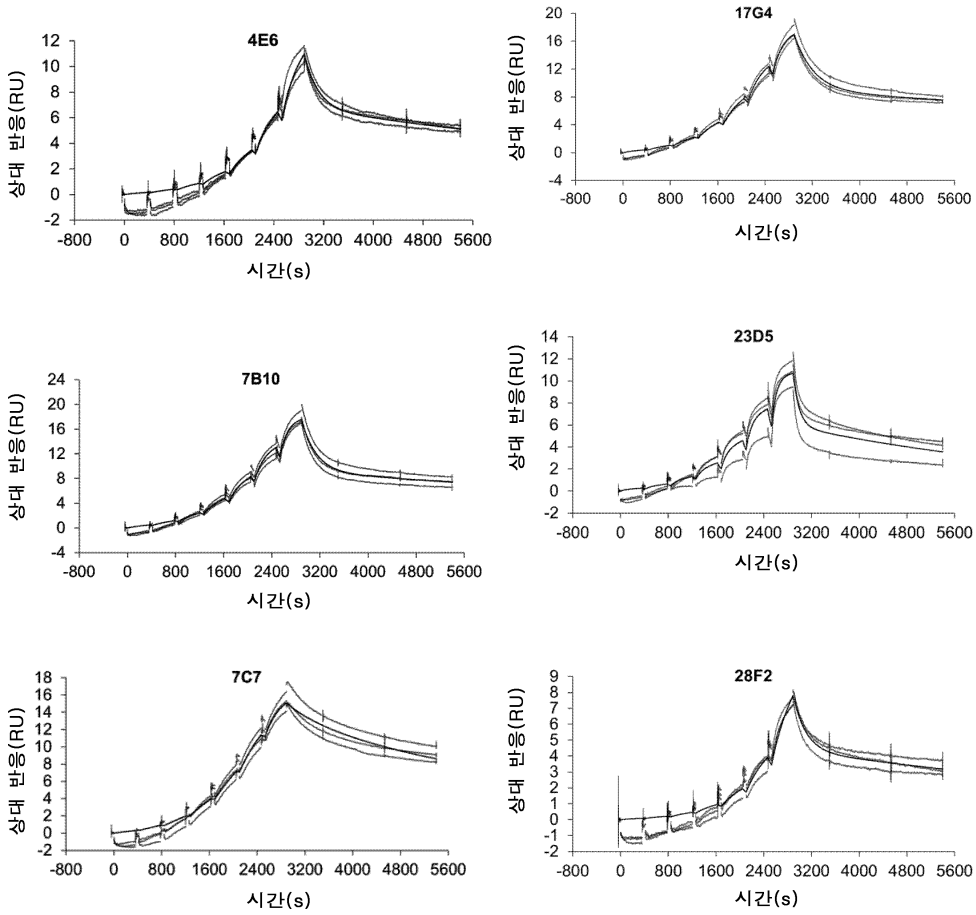
도면20



- G200-BSA 펩티드(aa 200-205)
- △ A199-BSA 펩티드(aa 199-204)
- ▽ L198-BSA 펩티드(aa 198-203)
- Neg.Ctrl-BSA 펩티드(aa 192-206)

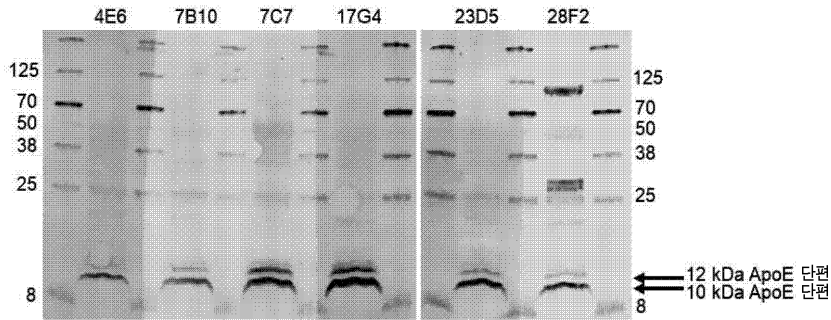
도면21

Biacore: 재조합 G200



도면22

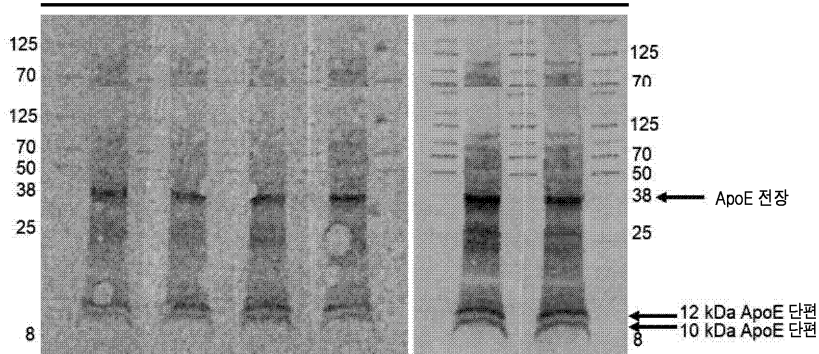
A



WB 일차 항체: 재조합 항-G200 항체(4E6, 7B10, 7C7, 17G4, 23D5 및 28F2)

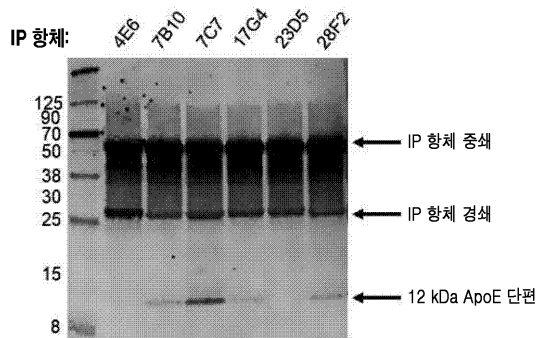
B

항-ApoE 전장



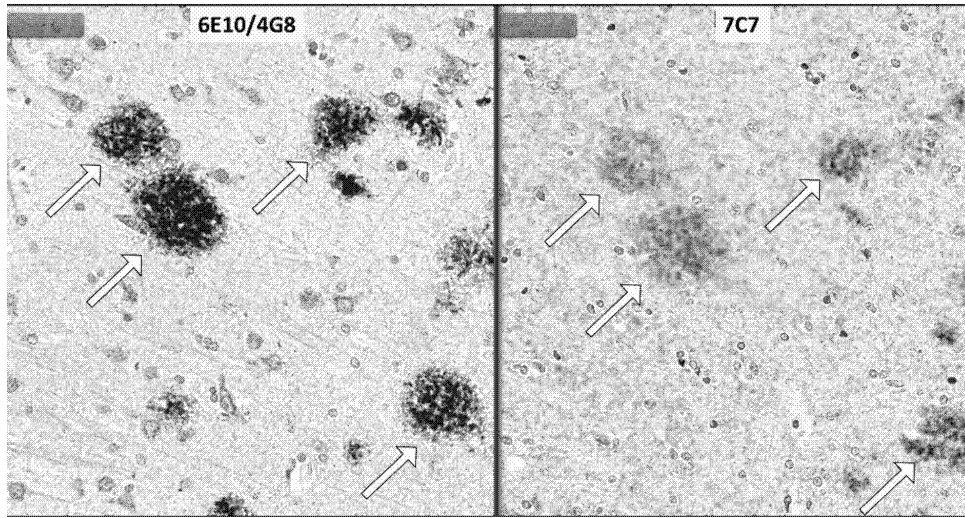
WB 일차 항체: 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. no. 178479)

C

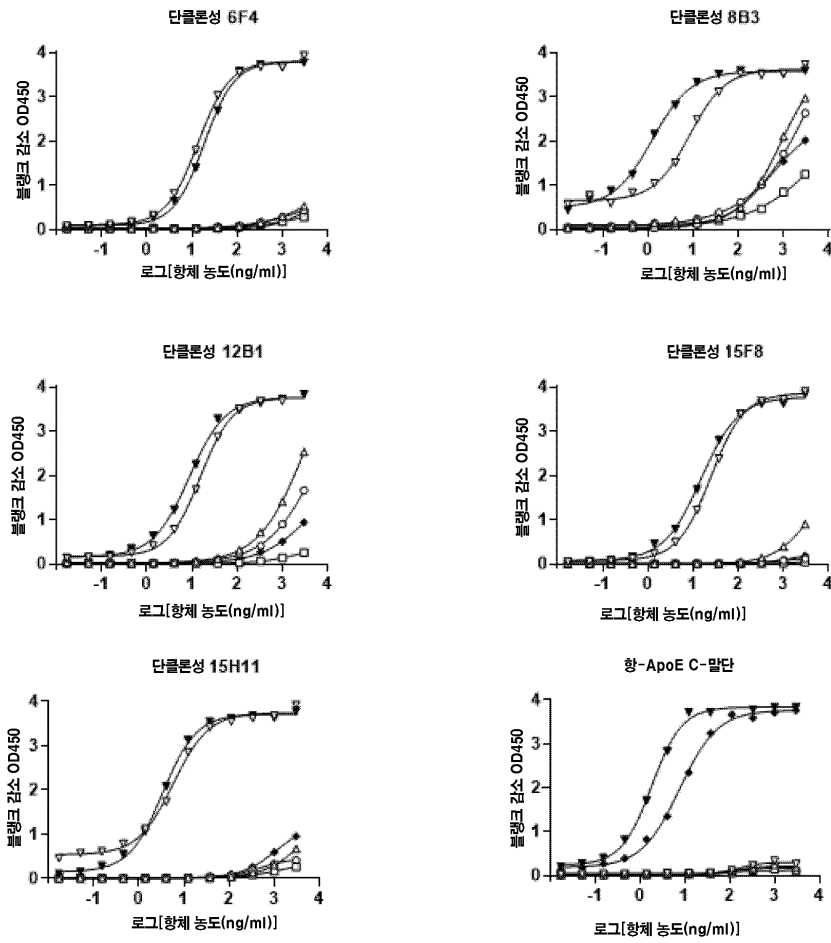


WB 일차 항체: 항-ApoE
C-말단 항체(Sigma, cat. no. sab2701946)

도면23

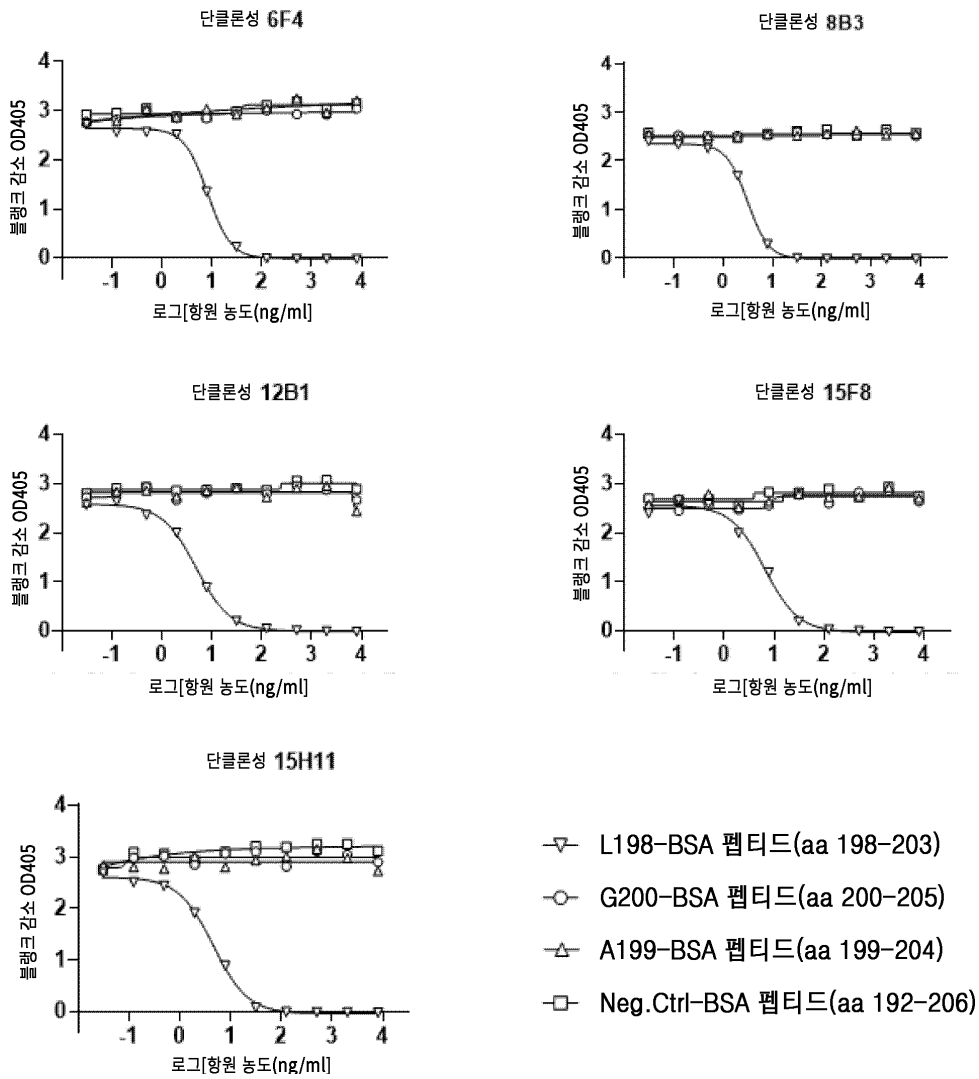


도면24

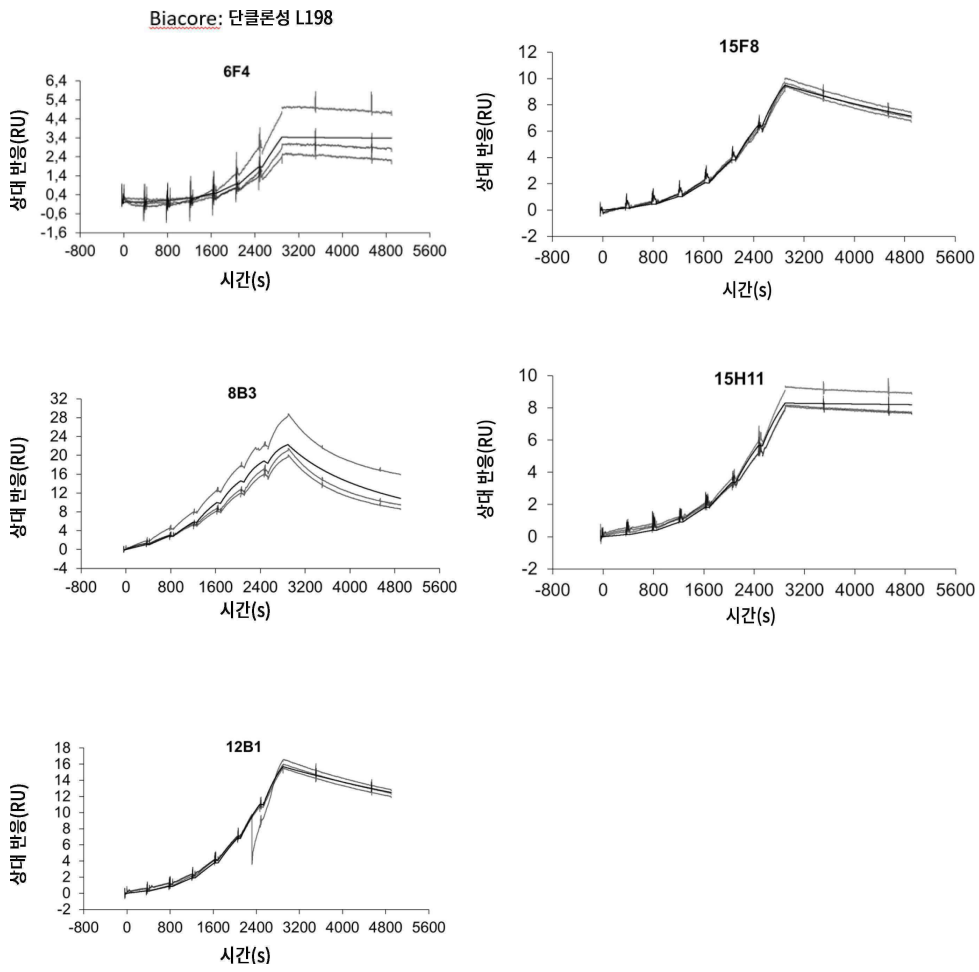


- ▽ L198-BSA 펩티드(aa 198-203)
- ▼ L198-His 단편(aa 198-299)
- G200-BSA 펩티드(aa 200-205)
- △ A199-BSA 펩티드(aa 199-204)
- Neg.Ctrl-BSA 펩티드(aa 192-206)
- ◆ ApoE4 전장(aa 1-299)

도면25

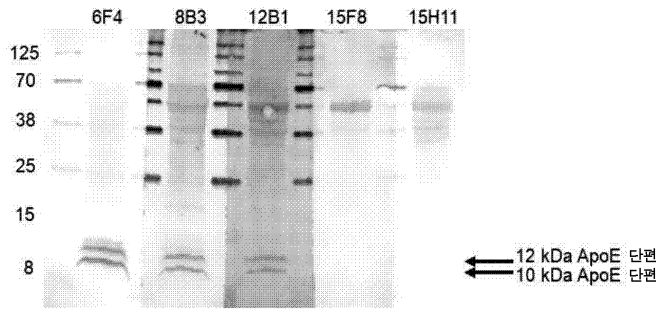


도면26



도면27

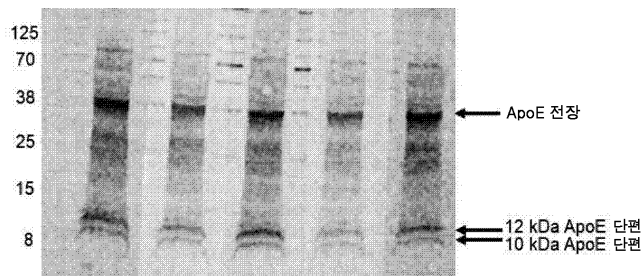
A



WB 일차 항체: 단클론성 항-L198
항체(6F4, 8B3, 12B1, 15F8 및 15H11)

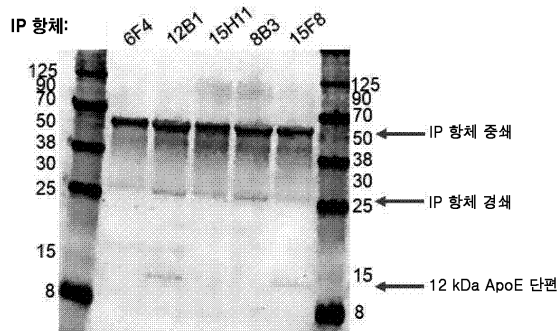
B

항-ApoE 전장



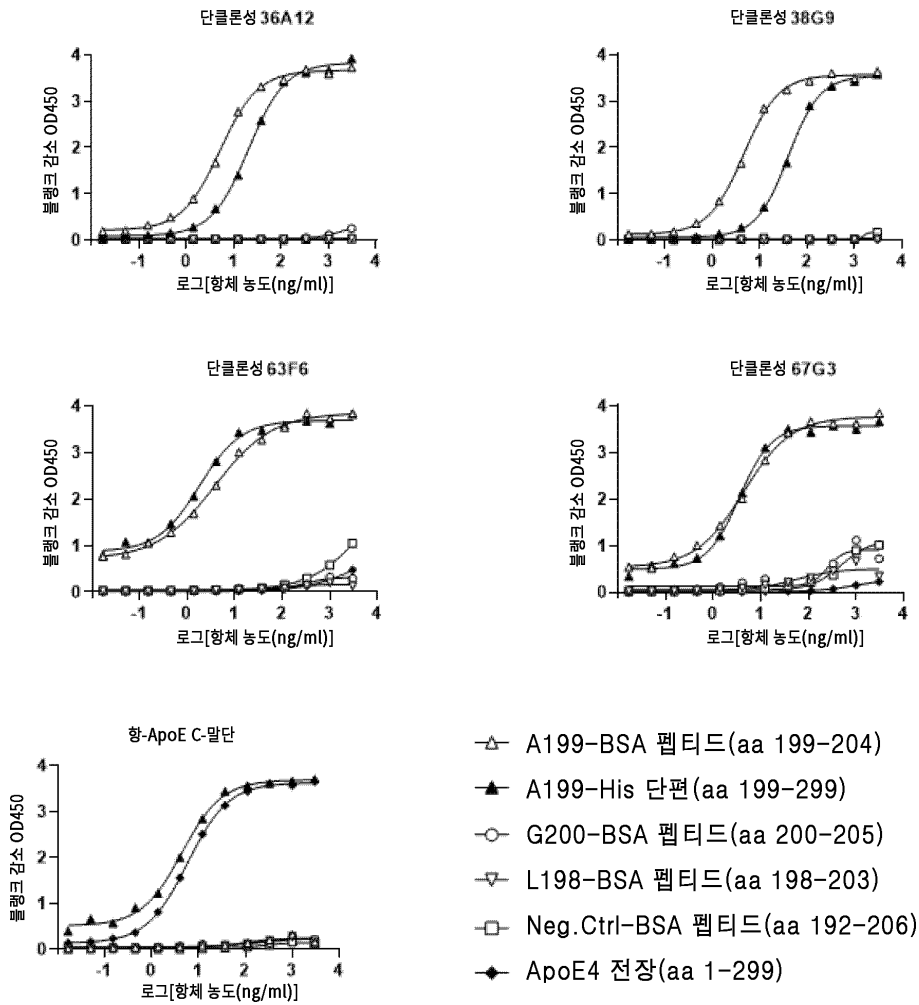
WB 일차 항체: 항-ApoE 항체
(Calbiochem, cat. no. 178479)

C

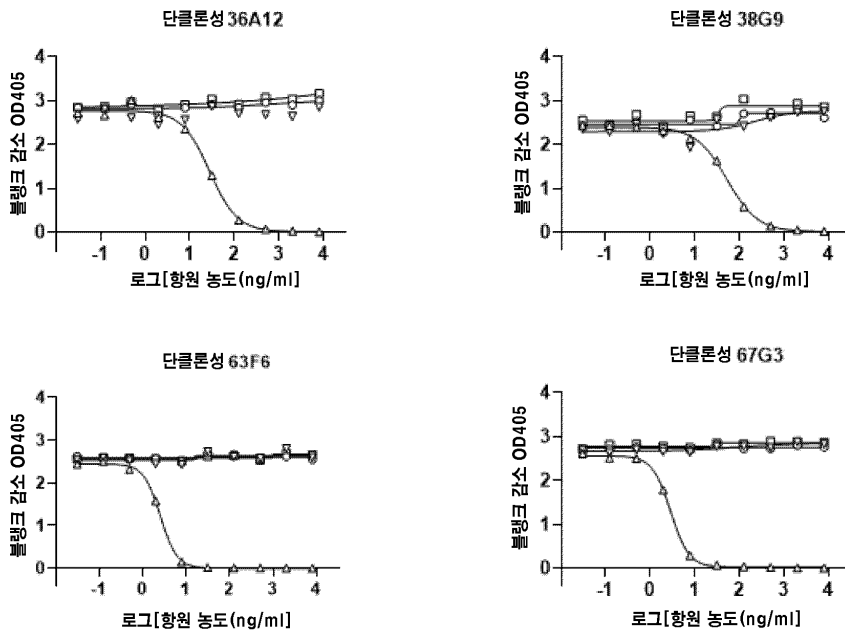


WB 일차 항체: 항-ApoE C-말단 항체(Sigma, cat. no. sab2701946)

도면28



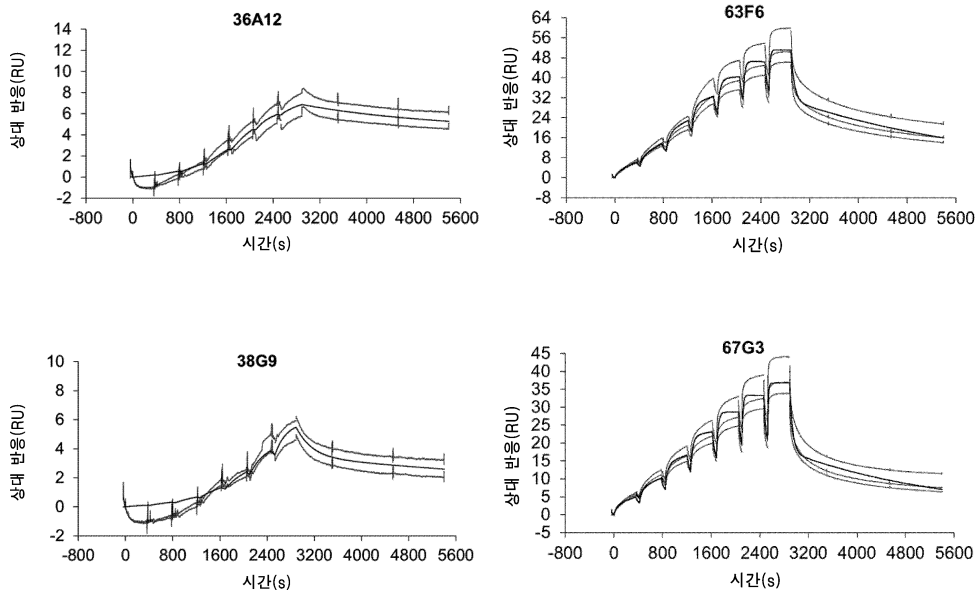
도면29



- △ A199-BSA 펩티드(aa 199-204)
- G200-BSA 펩티드(aa 200-205)
- ▽ L198-BSA 펩티드(aa 198-203)
- Neg.Ctrl-BSA 펩티드(aa 192-206)

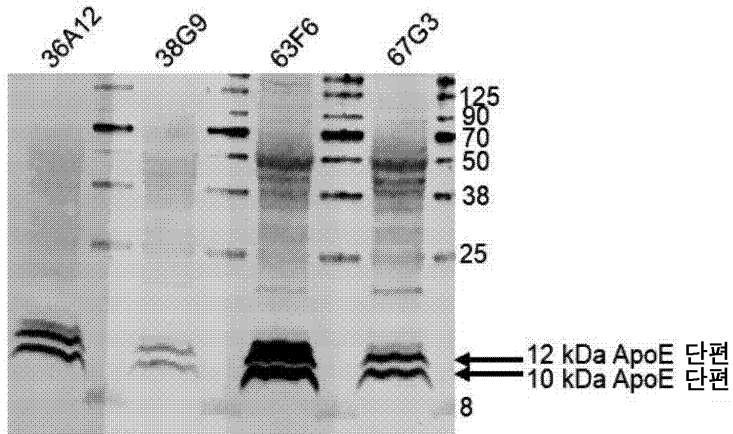
도면30

Biacore: 단클론성 A199



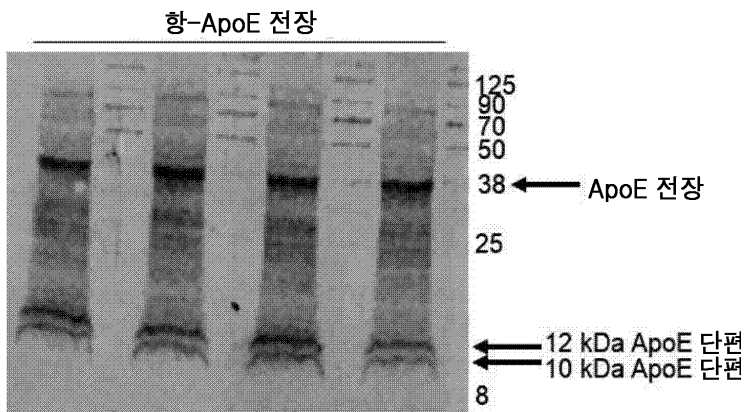
도면31

A



WB 일차 항체: 재조합 항-A199 항체(36A12, 38G9, 63F6 및 68G3)

B



WB 일차 항체: 항-ApoE 항체(Calbiochem, cat. no. 178479)

서열 목록

<110> BIOARCTIC AB

<120> Antibody directed against the apoE amino-terminal fragment of 12 kda

<130> NLW/P207695W000

<150> EP19183405

<151> 2019-06-28

<160> 116

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg
 1 5 10 15
 Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu
 20 25 30

 Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala
 35 40 45
 Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser
 50 55 60
 Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu
 65 70 75 80
 Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro
 85 90 95

Ser Asp Asn His

100

<210> 2

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu
 1 5 10 15
 Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp
 20 25 30
 Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln
 35 40 45
 Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys

 50 55 60
 Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly
 65 70 75 80
 Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val

85 90 95
 Pro Ser Asp Asn His
 100
 <210> 3
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg

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

65 70 75 80
 Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro
 85 90 95

Val Pro Ser Asp Asn His
 100

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Leu Ala Gly Gln Pro Leu

1 5
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Gly Gln Pro Leu Gln

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Gln Pro Leu Gln Glu

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Glu Ile Ser Gly Ser Gly Ser Arg Asp His Tyr Thr Asp Ser Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gln Leu Thr Gly Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Asp Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Glu Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Leu Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gln Leu Val Gly Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Asp Tyr

1 5 10

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Ser Phe Ala Met Ser

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Glu Ile Ser Arg Gly Gly Gly Tyr Ala Phe Tyr Ser Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gln Leu Thr Gly Thr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Arg Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 19

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 19

Glu Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Phe Tyr Ser Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 20

Gln Leu Ser Gly Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Asp Tyr
 1 5 10

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

Asn Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Phe Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 23
 <211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Glu Gly Tyr Tyr Asp Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Phe Gln Gly Ser Gln Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Arg Ser Ser Leu Ser Leu Val His Gly Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Leu Gln Gly Ser His Ile Pro Phe Thr

1 5

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Ser Gly Ser Gly Ser Arg Asp His Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gln Leu Thr Gly Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Val Leu

115 120

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

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

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

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

<210> 36

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

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

1 5 10 15

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

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Val Gly Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

85 90 95
 Ser Arg Gln Leu Thr Gly Thr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Phe Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Thr

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

85 90 95
 Ser Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 40

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Glu Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Phe Tyr Ser Asp Thr Val

 50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Gln Leu Thr Gly Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Asp Tyr Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 42

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ala Glu Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Phe Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Ser Gly Thr Asp Tyr Tyr Gly Thr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Met Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Phe Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Asp Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

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

165 170 175

Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val Arg Ala

180 185 190

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

195 200 205

Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg

210 215 220

Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg

225 230 235 240

Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala

245 250 255

Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met

260 265 270

Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly

275 280 285

Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His

290 295

<210> 46

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Arg Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met

50 55 60

Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys

65 70 75

<210> 47

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg

1 5 10 15

Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu

 20 25 30

Val Lys

<210> 48

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg

1 5 10 15

Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu

 20 25 30

Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala

 35 40 45

Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser

 50 55 60

Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu

65 70 75 80

Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro

 85 90 95

Ser Asp Asn His His His His His His His His His His His

 100 105 110

<210> 49

<211> 309

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

His His His His His His His His His His Lys Val Glu Gln Ala Val

1 5 10 15
 Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser

 20 25 30
 Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg

 35 40 45
 Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser

 50 55 60
 Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu

65 70 75 80
 Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala

 85 90 95
 Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala

 100 105 110
 Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp Val Arg Gly Arg Leu Val Gln Tyr

 115 120 125
 Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg

 130 135 140
 Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg

145 150 155 160
 Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala

 165 170 175
 Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly

 180 185 190
 Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu

 195 200 205
 Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu

 210 215 220

Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp
 225 230 235 240
 Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln
 245 250 255
 Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys

 260 265 270
 Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly
 275 280 285
 Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val
 290 295 300

Pro Ser Asp Asn His

305

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Acp

<400> 50

Gly Gln Pro Leu Gln Glu Xaa Cys

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Acp

<400> 51

Ala Gly Gln Pro Leu Gln Xaa Cys

1 5
 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Acp
 <400> 52
 Leu Ala Gly Gln Pro Leu Xaa Cys

1 5
 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Acp
 <400> 53
 Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys

<210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Acp
 <400> 54

Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Xaa Cys

1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Acp

<400> 55

Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Xaa Cys

1 5

<210> 56

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

His His His His His His His His His His Lys Val Glu Gln Ala Val

1 5 10 15

Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser

20 25 30

Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg

35 40 45

Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser

50 55 60

Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu

65 70 75 80

Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala

85 90 95

Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala

100 105 110

Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp Val Arg Gly Arg Leu Val Gln Tyr
 115 120 125

Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg
 130 135 140

Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg
 145 150 155 160

Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala
 165 170 175

Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly
 180 185 190

Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu
 195 200 205

Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu
 210 215 220

Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp
 225 230 235 240

Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln
 245 250 255

Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys
 260 265 270

Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met
 275 280

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg
 1 5 10 15

Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu
 20 25 30

Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu

35 40 45
 Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu

50 55 60
 Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala
 65 70 75 80

Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro
 85 90 95

Val Pro Ser Asp Asn His His His His His His His His His His His
 100 105 110

<210> 58

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp
 20 25 30

Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln
 35 40 45

Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys
 50 55 60

Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly
 65 70 75 80

Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val
 85 90 95

Pro Ser Asp Asn His His His His His His His His His His His
 100 105 110

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

Asp Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Val Thr His Tyr Val Glu Ser

1 5 10 15

Leu Lys Gly

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

His Ile Leu Leu Arg Arg Arg Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Asn Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 63

<

211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr Arg Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

His Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

Lys Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 66

<211>

> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

Gln Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

His Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Tyr Val Asp Val

1 5 10

<210> 68

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

Gln Ile Lys Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

His Tyr Leu Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Glu Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

His Gln Phe Asn Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Lys Ala Ser Gln Asn Val Tyr Thr Asp Val Ala

1 5 10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Ser Ala Ser Gln Arg Tyr Ser

1 5

<210> 78

<211> 9

<

212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn Val Ala

1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn Val Ala

1 5 10

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400

> 81

His Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 82

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Glu Val Asn Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Val Thr His Tyr Val Glu
 50 55 60
 Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Cys
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly His Ile Leu Leu Arg Arg Arg Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 83

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys His Gln Phe Asn Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Ile
 100 105

<210> 84

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ser Gly His Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 85

<211> 107

<212>

> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Tyr Thr Asp

 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Gly Met Ile

 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Tyr

 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105

<210> 86

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 86

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Lys Tyr

 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Cys Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45

Ala Gln Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95
 Tyr Cys Thr His His Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Tyr Val Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 87

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Cys Pro Lys Gly Met Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala Ser Gln Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Phe Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys
 100 105

<210> 88

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 88

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

100 105

<210> 90

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Cys Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr His His Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Tyr Val Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Cys Pro Lys Gly Met Ile

<211> 17

<212> PRT

<213>

Mus musculus

<400> 95

Asn Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

Gly Leu Tyr Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 97

Arg Tyr Trp Leu His

1 5

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 98

Asn Ile Asn Pro Thr Asn Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asn

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 99

Gly Ala Tyr Asp Tyr Asp Cys Asp Tyr

1 5

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 101

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser

1 5

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 102

Gln Gln Tyr Leu Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 103

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 104

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 105

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 105

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln

1 5 10 15

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 106

Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 107

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 108

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 108

Arg Ser Ser Gln Arg Ile Val His Ser Asn Gly Asn Ile Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

<210> 109

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Lys Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Thr Glu Val Val Ala Gly Ala His Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 110

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 110

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn
 20 25 30

 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95

 Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 <210> 111
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 111
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Lys Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Thr Glu Val Val Ala Gly Ala His Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 112

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 113

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Asp Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Tyr Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 114

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 114

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 115

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 115

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Thr Asn Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Ala Tyr Asp Tyr Asp Cys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 116

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 116

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

