



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0052906
(43) 공개일자 2012년05월24일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/385</i> (2006.01) <i>A61K 47/48</i> (2006.01)
 <i>A61P 25/28</i> (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-7031061
 (22) 출원일자(국제) 2010년05월26일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2011년12월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/057235
 (87) 국제공개번호 WO 2010/136487
 국제공개일자 2010년12월02일
 (30) 우선권주장
 09382078.5 2009년05월26일
 유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
 아라클론 바이오테크, 에스.엘.
 스페인 50008 사라고사 17 2이스꾸다 빠세오 사
 가스파
 (72) 발명자
 사라사 바리오 제이. 마뉴엘
 스페인 자라고자 이-50005 10 - 프랄 디씨에이치
 에이 발타사르 그라시아
 (74) 대리인
 박장원</p> |
|---|--|

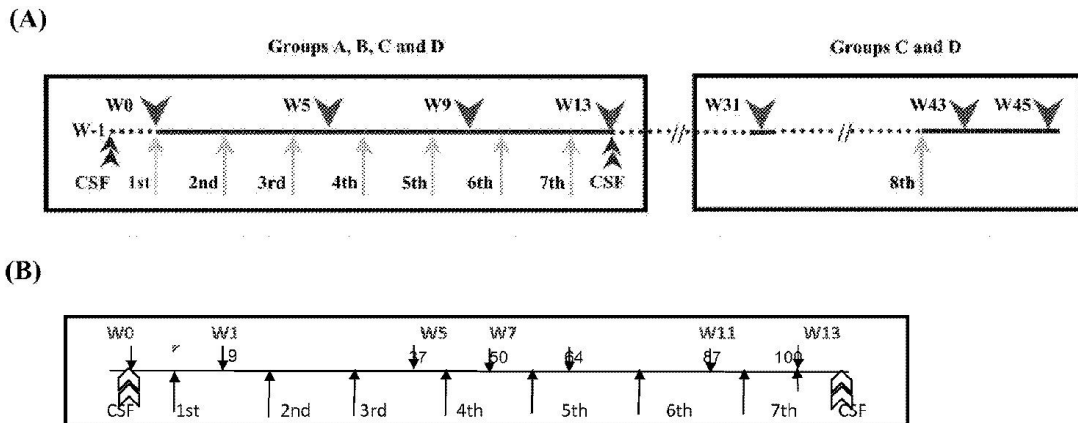
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 알부민-아밀로이드 펩타이드 컨주게이트 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 아밀로이드 베타 펩타이드의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민을 포함하는 컨주게이트 뿐만 아니라, 아밀로이드 단백질의 축적을 특징으로 하는 질병의 치료, 특히 알치하이머 병의 치료를 위한 그것의 용도를 제공한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래하는 적어도 한 개의 면역성 펩타이드와 알부민을 포함하는, 의약에 사용하기 위한 컨주게이트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적어도 한 개의 면역성 펩타이드와 알부민이 링커 영역에 의하여 연결되는 경우, 상기 링커 영역은 그것에 부착되는 한 개 이하의 면역성 펩타이드를 함유하는 것인 컨주게이트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 적어도 한 개의 면역성 펩타이드는 시스테인을 포함하는 링커 영역에 의하여 알부민 분자에 연결되는 것인 컨주게이트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 시스테인은 면역성 펩타이드의 N-말단에 위치하는 것인 컨주게이트.

청구항 5

제1항 내지 제4항에 있어서, 상기 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래하는 펩타이드는 한 개 이상의 A β (35-42)(SEQ ID NO: 2), A β (33-42)(SEQ ID NO: 3) 및 A β (33-40)(SEQ ID NO: 4)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 컨주게이트.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 알부민은 소 혈청 알부민인 것인 컨주게이트.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 컨주게이트 및 어주번트를 포함하는, 의약에 사용하기 위한 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 어주번트는 Th1형 어주번트, Th2형 어주번트 및 혼합형 Th1/Th2형 어주번트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 9

아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병의 치료 또는 예방에 사용되기 위한, A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래하는 적어도 한 개의 면역성 펩타이드 및 알부민을 포함하는 컨주게이트 또는 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래하는 적어도 한 개의 면역성 펩타이드와 알부민 및 어주번트를 포함하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 컨주게이트 또는 조성물은 격주로 투여되는 것인 제9항에 따른 용도의 컨주게이트 또는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 적어도 한 개의 면역성 펩타이드와 알부민이 링커 영역에 의하여 연결되는 경우, 상기 링커 영역은 그것에 부착되는 한 개 이하의 면역성 펩타이드를 함유하는 것인, 제10항에 따른 용도의 컨주게이트 또는 조성물.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래하는 펩타이드는 A β (35-42)(SEQ ID NO: 2), A β (33-42)(SEQ ID NO: 3) 및 A β (33-40)(SEQ ID NO: 4)로부터 선택되는 것인, 제9항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 용도의 컨주게이트 또는 조성물.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병은 알츠하이머병, 크로이츠펔트야코브병, 대뇌 아밀로이드 맥관병증 및 프리온 단백질 관련 질환으로부터 선택되는 것인, 제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 따른 용도의 컨주게이트 또는 조성물.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 알부민은 소 혈청 알부민인 것인, 제9항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 용도의 컨주게이트 또는 조성물.

청구항 15

제9항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 어주번트를 더 포함하는 것인, 제9항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 따른 용도의 컨주게이트.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 어주번트는 Th1형 어주번트, Th2형 어주번트 및 혼합형 Th1/Th2 형 어주번트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 제15항에 따른 용도의 컨주게이트.

청구항 17

제9항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 컨주게이트 또는 조성물은 격주로 투여되는 것인, 제9항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 따른 용도의 컨주게이트 또는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알부민-아밀로이드 펩타이드 컨주게이트를 포함하는 치료용 조성물 및 그의 용도에 관한 것이고, 보다 구체적으로는 알츠하이머병과 같이 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병의 치료를 위한 그의 사용에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아밀로이드 질병 또는 유전분증(amyloidoses)은 매우 다양한 외부 증상을 갖는 다수의 질병상태를 포함한다. 이러한 질병은 통상적으로 직경이 약 10-100 nm이고 특정 기관 또는 조직 영역에 집적되는 "아밀로이드 섬유", "아밀로이드 축적물"

[0003] 또는 "아밀로이드 플라그"로 알려진 단백질 섬유의 비정상적인 세포 외 축적의 발현을 공통적으로 갖는다. 이러한 플라그는 천연의 가용성 단백질 또는 펩타이드로 주로 구성된다. 이러한 불용성 침전물은 일반적으로 직경이 대략 10-15 nm인 섬유의 측면 집적물로 구성된다. 그 발생의 다양함에도 불구하고, 모든 아밀로이드 축적물은 공통적인 형태학적 성질을 가지고, 특정 염료(예컨대, 티오프라빈 T, 콩고 레드)로 착색되고, 염색 후 편광 빛에서 특징적인 적녹색 양굴절성(birefringent) 외관을 갖는다.

[0004] 아밀로이드-관련 질병은 축적물 중 존재하는 단백질의 종류에 의해 특징지어진다. 예를 들어 스크래피, 소의 스폰지 형태 뇌염, 크로이츠펔트야코브병 등과 같은 신경퇴행성 질환은 중추 신경계 중의 프리온 단백질의 프로테아제-저항성 형태(AScr 또는 PrP-27로서 언급됨)의 발현 및 축적에 의해 특징 지워진다. 유사하게 또 다른 신경퇴행성 질환인 알츠하이머병은 아밀로이드 플라그의 축적 및 신경미소섬유의 엉킴에 의해 특징 지워진다. 이 경우, 플라그 및 혈관 아밀로이드는 미소섬유 아밀로이드 베타 단백질의 축적에 의하여 형성된다. 성인성 발병 당뇨병(제2형 당뇨병)과 같은 다른 질병들은 췌장 중의 아밀로이드 집적화된 축적에 의해 특징 지워진다.

- [0005] 각각의 아밀로이드형성 단백질은 베타-쉬트로 폴딩되고 불용성의 미소섬유를 형성하는 능력을 가지는데, 이는 세포외적 또는 세포 내적으로 축적된다. 각각의 아밀로이드형성 단백질은, 아미노산 서열에서의 차이에도 불구하고, 미소섬유를 형성하고 프로테오글리칸, 아밀로이드 P 및 보충 성분과 같은 다른 요소에 결합하는 동일한 성질을 가진다. 게다가, 각각의 아밀로이드형성 단백질은, 비록 상이하지만, 베타 쉬트 세포의 형성을 촉진할 수 있는 아미노산 서열을 가진다. 예로서, 아밀로이드 베타 미소섬유는 알츠하이머 병에 걸린 환자에 있어서 죽은 신경 세포 및 마이크로글리오시스와 관련된다. 인 비트로 시험한 경우, 아밀로이드 베타 펩타이드는 소교세포(microglia)(뇌 대식세포)의 활성화 과정을 촉발하는 능력이 있는 것으로 나타났는데, 이는 알츠하이머 병을 가진 환자의 뇌 중에서 발견되는 마이크로글리오시스 및 뇌 염증의 존재를 설명할 수 있을 것이다.
- [0006] 제2형 당뇨병 환자에서 나타나는 아밀로이드의 또 다른 종류에 있어서, 아밀로이드형성 단백질 IAPP는 인 비트로에서 베타-아일릿(beta-islet) 세포 독성을 유도하는 것으로 나타났다. 그러므로, 제2형 당뇨병 환자의 췌장 중의 IAPP 미소섬유의 발현은 베타-아일릿 세포(Langerhans)의 상실 및 기관 기능장애에 기여할 수 있다.
- [0007] 가장 흔저한 아밀로이드 질병 중의 하나가 알츠하이머 병인데, 이는 서방 세계에서 전체 인구의 약 0.5-1%에 영향을 미치는 진행성의 신경퇴행성 질병이다. 알츠하이머 병은 뇌 중에 다수의 아밀로이드 플라그의 축적에 의해 특징지어진다. 이 침전은 질병의 병리를 야기하는 것으로 추정되고 알츠하이머 병을 예방하기 위한 대부분의 접근은 아밀로이드 플라그의 형성을 감소, 제거 또는 예방하는 것을 목적으로 한다. 아밀로이드 플라그의 주된 성분은 아밀로이드 베타 펩타이드(A β)인데, 이는 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 절단을 통해 생산되는 40-42개 아미노산 단백질이다.
- [0008] 특허출원 US20070172496는 A β (33-42) 펩타이드를 포함하는 컨주게이트를 개시하는데, 이는 A β (1-42) 펩타이드로부터 유래한 상이한 펩타이드들과 소위 리간드-제시 LPA 어셈블리에 의하여 형성되는 복합체에 의하여 면역화된 환자로부터 유래한 시료 중의 항-A β 항체의 존재를 결정하기 위한 ELISA 분석법에 있어서, 포획 항원으로서 사용되는 단일클론 항체 및 알부민에 의하여 인식되는 펩타이드이다.
- [0009] 따라서, 혈장 아밀로이드 레벨에 있어 효과적이고 지속적인 감소를 유도할 수 있는 추가적인 면역성 조성물 및 아밀로이드 축적물의 수를 줄이는 것에 대한 요구가 당업계에 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 첫 번째 관점에 있어서, 본 발명은 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민을 포함하는, 의약에 사용되기 위한 컨주게이트에 관한 것이다.
- [0011] 다른 관점에 있어서, 본 발명은 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민 및 어주번트를 포함하는, 의약에 사용되기 위한 컨주게이트에 관한 것이다.
- [0012] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 아밀로이드 단백질 축적과 관련된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 적어도 하나의 면역성 펩타이드 및 알부민을 포함하는 컨주게이트 또는 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 적어도 하나의 면역성 펩타이드 및 알부민 및 어주번트를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 의약에 사용하기 위한 본 발명의 컨주게이트
- [0014] 본 발명의 저자는 아밀로이드 베타 단백질 (1-42) [A β (1-42)] 영역의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민을 포함하는 컨주게이트의 투여가 놀랍게도 상기 펩타이드에 대한 항체의 존재에 상승을 가져오고, 알츠하이머 병에 있어서 아밀로이드 플라그의 주된 구성요소인 단백질 A β (1-40) 및 A β (1-42)의 혈청 레벨 감소를 가져온다는 것을 발견하였다. 이러한 결과는 아밀로이드 단백질 침전과 관련된 질병의 치료, 예방 및/또는 개선에 대한 새로운 치료적 창구를 연다.

- [0015] 따라서 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 면역성 펩타이드 및 알부민을 포함하는, 의약에 사용하기 위한 컨주게이트에 관한 것이다.
- [0016] A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 면역성 펩타이드
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역성(immunogenic) 펩타이드"란 대립형질-특이적 모티프, 에피토프 또는 다른 서열을 포함하여, 그 결과 폴리펩타이드 또는 단편이 MHC 분자에 결합하여 세포독성 T 림프구("CTL") 반응, 및/또는 B 세포 반응(예컨대, 항체 생산), 및/또는 T-헬퍼 림프구 반응, 및/또는 면역성 펩타이드가 유래된 항원, 즉 아밀로이드 베타 펩타이드에 대한 DTH(delayed type hypersensitivity) 반응을 유도하는 펩타이드를 일컫는다. 주어진 펩타이드가 면역성인지 여부를 결정하는 적절한 방법은 예를 들어 본 발명의 실시예 중에 보여진다. 이러한 방법은 상기 면역성 펩타이드가 상기 펩타이드의 투여 후에 동물 중에서 항-아밀로이드 베타 항체를 발생시키는 능력에 기초한다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아밀로이드 베타 펩타이드"는 A베타, 아밀로이드 베타 단백질, "A 베타," "베타 AP," "A 베타 펩타이드," 또는 "A β 펩타이드"와 상호교환적으로 사용되고, 알츠하이머병(AD), 다운증후군 및 HCHWA-D(Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis of the Dutch-Type)의 환자의 뇌 중에서 발견되는 고령 플라그 및 혈관 아밀로이드 침전물(아밀로이드 맥관병)의 주요 화학적 구성성분인 펩타이드 군을 의미한다. 그 어떠한 형태에 대하여, 아밀로이드 베타 펩타이드는 다양한 수의 아미노산, 전형적으로 39-43 아미노산을 포함하는 베타-아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 단편이다. 본 명세서에서 사용되는 "A β (1-42)"는 APP의 아미노산 672 내지 713에 해당하는 42개 아미노산 펩타이드와 관련되며, β - 및 γ -세크레타제에 의한 아밀로이드 전구체 단백질의 일련의 단백질 분해적 절단에 의하여 생산된다.
- [0019] 아밀로이드 베타 단백질은 보통 "A β (x-y)"으로 표현되는데, 여기에서 x는 아밀로이드 베타 펩타이드의 아미노 말단의 아미노산 숫자를 나타내고, y는 카복시 말단의 아미노산 숫자를 나타낸다. 예를 들어, A β (1-40)는 아미노 말단이 아미노산 숫자 1로부터 시작하고, 카복시 말단이 아미노산 숫자 40에서 끝나는, 그 서열이 SEQ ID NO:1에 의하여 주어지는, 아밀로이드 베타 펩타이드이다.
- [0020] 본 발명의 문맥에서 "A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드"란 A β (1-42)의 C-말단 영역의 일부 또는 전부를 포함하는 2 내지 40 아미노산 잔기를 가지는 펩타이드를 의미하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 또한 구조적 변이체와 같이, A β (1-42) C-말단 영역과 실질적 유사성을 갖는 영역을 포함하는 펩타이드를 포괄한다.
- [0021] 용어 "실질적 유사성"이란 두 개의 펩타이드 서열이 최적으로 배열된 때, 적어도 50 퍼센트의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 60 퍼센트의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 70퍼센트의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 80퍼센트의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 90퍼센트의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 95퍼센트의 서열 동일성 또는 그 이상(예컨대, 99 퍼센트 서열 동일성)을 공유하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의하여 달라진다. 보존적 아미노산 치환이란 유사한 사이드 체인을 가지는 잔기의 상호 교환 가능성을 말한다. 예를 들어, 지방족 사이드 체인을 가지는 아미노산 군은 글리신, 알라닌, 발린, 루이신 및 이소루이신; 지방족-하이드록실 사이드 체인을 가지는 아미노산 군은 세린 및 트레오닌; 아미드-포함 사이드 체인을 갖는 아미노산 군은 아스파라긴 및 글루타민; 방향족 사이드 체인을 가지는 아미노산 군은 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판; 염기성 사이드 체인을 가지는 아미노산 군은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; 그리고, 황-포함 사이드 체인을 가지는 아미노산 군은 시스테인 및 메티오닌이다.
- [0022] 동일하지 않은 잔기의 위치는 또한 인공의 아미노산 또는 그와 같은 유도체를 포함하는 펩타이드 유사체로 구성될 수도 있다. 유사체는 종종 보존적 치환의 이점에 의하여, 전형적으로 하나, 둘 또는 수개의 위치에서, 천연의 펩타이드와 다르다.
- [0023] 몇몇 유사체들은 또한 인공의 아미노산 또는 아미노산의 하나, 둘 또는 수개의 위치에서의 N 또는 C 말단의 변형을 포함한다. 인공 아미노산의 예로는, 이에 제한됨이 없이 D-아미노산, 알파, 알파-2중치환 아미노산, N-알킬 아미노산, 유산, 4-하이드록시프롤린, γ -카복시글루타메이트, 엡실론-N,N,N-트리 메틸라이신, 엡실론-N-아세틸라이신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신, 오메가-N-메틸아르기닌 및 이소아스파르트산이 있다.
- [0024] 본 발명의 컨주게이션의 특정 구현예에 있어서, A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래되는 펩타이드는 A β

(35-42)(SEQ ID NO: 2), A β (33-42)(SEQ ID NO: 3)와 A β (33-40)(SEQ ID NO: 4)로부터 선택된다.

[0025] 본 명세서에 사용되는 "A β (35-42)"는 A β (1-42)의 마지막 8개 아미노산에 상응하는 8개 아미노산 펩타이드에 관한 것이다.

[0026] 본 명세서에 사용되는 "A β (33-42)"는 A β (1-42)의 마지막 10개 아미노산에 상응하는 10개 아미노산 펩타이드에 관한 것이다.

[0027] 본 명세서에 사용되는 "A β (33-40)"은 A β (1-42)의 33번부터 40번까지의 아미노산에 상응하는 8개 아미노산 펩타이드에 관한 것이다.

[0028] A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래하는 펩타이드 링커 그룹을 포함하는 펩타이드는 고상 또는 용액상 펩타이드 화학의 표준 기법에 의하여 합성될 수 있다. 고상 기술의 요약은 문헌들(Stewart and Young (1963) Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco) 및 Meienhofer (1973) Hormonal Proteins and Peptides, Academic Press (New York))에서 발견되어 질 수 있다. 전통적인 용액 합성에 대해서는 슈뢰더 및 루프케, 펩타이드 제1권, 뉴욕 아카데미 프레스(Schroder and Lupke, The Peptides, Vol. 1, Academic Press (New York))를 참고하라.

[0029] 일반적으로 이러한 기법들은 일 이상의 아미노산 또는 적절하게 보호된 아미노산의, 성장하는 펩타이드 체인으로의 순차적인 첨가를 포함한다. 보통, 첫번째 아미노산의 아미노 또는 카복시기는 적당한 보호기에 의하여 보호된다. 보호된 아미노산은 그 다음 불활성의 고체 지지체에 부착되거나 또는 적당하게 보호된 보충적인(아미노 또는 카복시) 그룹을 가지는 서열 중의 다음 아미노산을 아미노 결합을 형성하기에 적당한 조건하에서 첨가하는 것에 의하여 용액 중에서 이용가능하게 된다. 그 다음, 보호된 그룹은 이 새롭게 첨가된 아미노산 잔기로부터 제거되고, 그 다음 아미노산(적절하게 보호된 것)이 첨가되고, 등등이다. 모든 희망하는 아미노산이 적절한 서열로 연결된 후에, 남아있는 보호기(및 고체 지지체)는 최종 펩타이드를 산출할 수 있도록 순차적으로 또는 동시에 제거된다. 이 일반적 절차의 단순한 변형에 의하여, 일 이상의 아미노산을 동시에 성장하는 체인에 첨가하는 것이 가능한데, 예컨대, 탈보호 이후에 펜타펩타이드를 형성하기 위하여, 보호된 트리펩타이드를 적절하게 보호된 디펩타이드와 커플링(키랄 중심을 라세미화하지 않는 조건 하)시키는 것에 의할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 시스테인의 설피드티올기와 반응할 수 있는 이중 기능적 시약을 사용하여 상기 펩타이드의 캐리어로의 커플링을 촉진하기 위하여, 상기 면역성 펩타이드의 N-말단에 시스테인 잔기를 첨가한다.

[0030] 알부민

[0031] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명의 하나의 관점은 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드와 알부민을 포함하는 의약에 사용하기 위한 컨주게이트에 관한 것이다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 "알부민"은 기원된 종에 따라 그 모노머 형태에 있어서 대략 65 및 67 킬로 달톤 사이의 분자량을 가지는, 혈액 혈장 중에 가장 풍부한 단백질을 의미한다. 용어 "알부민"은 "혈청 알부민"과 교환적으로 사용되고, 본 발명의 변형된 펩타이드와 컨주게이트를 형성하는 알부민의 출처를 정의하기 위한 것이 아니다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 용어 "알부민"은 혈액 또는 장액(serous fluid)과 같은 천연 공급원으로부터 정제된 알부민을 언급하거나 또는 화학적으로 합성되거나 재조합적으로 생산된 알부민을 의미할 수도 있다. 다양한 구현예에서, 천연 알부민의 알부민 변이체 또는 유도체를 본 발명의 컨주게이트 형성에 사용할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 알부민은 포유동물 알부민 또는 그것의 변이체 또는 유도체이다. 사용할 수 있는 포유동물 알부민의 비제한적 예는 인간, 소, 양, 염소, 토끼, 고양이, 개, 돼지, 영장류 또는 설치류 알부민을 포함한다. 바람직한 구현예에서 포유동물 알부민은 인간 알부민이다.

[0033] 일 구현예에서, 인간 알부민은 혈액 또는 장액으로부터 정제된다. 예를 들어, 알부민은 개인의 또는 실험 동물의 혈청 또는 혈장 시료로부터 정제될 수 있고, 보다 많이 사용되는 소 알부민일 수 있지만, 그것은 또한 표준 방법을 사용하여 다른 동물(닭, 돼지, 토끼 등)로부터 온 혈청으로부터 추출될 수도 있는데, 상기 표준 방법으로는 콘의 방법(Cohn EJ et al., *J Am Chem Soc* 1946; 68:459-75) 또는 키슬러 및 닛슈만 방법(Kistler P and Nitschmann HS., *Vox Sang* 1962; 7:414-24)에 의한 냉 에탄올 분획법, 또는 크로마토그래피 정제법에 의한 것(Bergloff JH. et al. In: Curling JM, ed. *Separation of Plasma Proteins*. Uppsala: Pharmacia, 1983; 51-8) 또는 냉 에탄올 분획법 및 크로마토그래피 정제법의 조합과 같은 것이 있다. 알부민은 또한 달걀 흰자위(오브알부민)에서 얻을 수도 있다. 다른 종류의 알부민인 저장 알부민은 몇몇 식물의 씨앗(예컨대,

콩)에서 추출될 수도 있다.

[0034] 다른 구현예에서, 알부민은 재조합 알부민이다. 특정 구현예에서, 알부민은 재조합 인간 알부민(본 명세서에서 "rHA"로서 언급됨)이다. 다양한 구현예에서 rHA는 포유동물 또는 비포유동물 유기체로부터 생산될 수 있다. 일 구현예에서, rHA는 비 포유동물 유기체로부터 생산된다. rHA의 생산을 위하여 사용될 수 있는 비 포유동물 유기체의 예로는 이스트, 박테리아, 식물, 균류 및 곤충을 제한 없이 포함한다. 일 구현예에서, rHA는 완전 식물(whole plant) 또는 완전 균류(whole fungus) 중에서 생산된다. 다른 구현예에서, rHA는 배양된 식물 세포, 배양된 균류 세포 또는 배양된 곤충 세포 중에서 생산된다. 다른 구현예에서, rHA는 비인간 포유동물 또는 비인간 포유동물의 세포 중에서 생산된다. rHA 생산을 위해 사용될 수 있는 비인간 포유동물로는 다음 중 하나에 속하는 것을 제한 없이 포함한다: 소과(family Bovidae), 개과(family Canidae), 돼지과(family Suidae), 설치목(order Rodentia), 토끼목(order Lagomorpha) 및 영장목(order Primates)(인간 제외). 특정 구현예에서, rHA 생산에 사용될 수 있는 비인간 포유동물은 소, 개, 돼지, 양, 염소, 래트, 마우스, 토끼, 침팬지 및 고릴라로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다. 다른 구현예에서, rHA 생산에 사용될 수 있는 비인간 포유동물 세포는 소, 개, 돼지, 양, 염소, 설치류, 토끼 또는 비인간 영장류 세포를 제한 없이 포함한다. 인간 혈액 또는 장액으로부터 정제한 알부민과 비교하여 비인간 유기체 중에서 생산된 rHA의 주요 장점은 rHA의 제조 과정 중에 인간-유래 산물이 없다는 것이다. 이같이 통제된 생산 방법의 사용은 더 적은 구조적 이질성을 가지고 더 순수한 산물로 이어진다. 종전 연구들은, 인 비트로 및 인 비보에서의 생화학적 특성, 방사능 표지 효능 및 생물학적 행동의 견지에서 가용성 rHA와 혈액 또는 장액으로부터 정제한 인간 알부민 사이에 중요한 차이가 없다는 것을 지적하였다(참조: Dodsworth et al., 1996, Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 171-176). 특정 구현예에서, 알부민은 상표명 RECOMBUMIN(R)(Novozymes Inc., Nottingham, UK)으로 명명된 rHA이다. RECOMBUMIN(R)는 재조합 이스트 기술을 사용하여 인 비트로 생산된 재조합 인간 알부민인데, 여기에서 유전적으로 변형된 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*)는 바이올로지(biologies)의 제조를 위한 부형제 또는 의료장치를 위한 피복제로서의 사용을 위하여 순차적으로 수확, 정제 및 제제화된다.

[0035] 아니면, 본 발명의 컨주게이트 형성에 사용되기 위한 알부민, 알부민 변이체 또는 유도체는 상업적 공급원으로부터, 예컨대 RECOMBUMIN(R)(Novozymes Inc., Nottingham, UK); PLASBUMIN(R)(Talecris Biotherapeutics, Research Triangle Park, NC); ALBAGEN(R)(New Century Pharmaceuticals, Huntsville, AL); 인간 알부민(Cortex-Biochem, San Leandro, CA), 인간 혈청 알부민, ZLB Behring(King of Prussia, PA), 또는 ALBREC(R)(Mistubishi Pharma, Japan)로서 취득될 수도 있다.

[0036] 본 발명의 문맥에서, "알부민"은 농축된 염 용액 중에 적당히 가용성이고 열 응집(단백질 변성)을 겪는, 수용성인 임의의 단백질을 의미한다. 이는 인간 알부민을 포함하는 대부분의 종에서 609개로부터, 닭 알부민과 같은 615개 아미노산까지 이르는 다양한 개수의 아미노산으로 구성되면서 약 65,000의 분자량을 가진다. 그들은 모두 이황화 결합을 통하여 면역성 펩타이드의 컨주게이션에 사용될 수 있는 35개 시스테인 잔기를 포함한다. 본 발명에 따른 컨주게이트를 취득하기 위한 적당한 알부민 단백질은 인간 알부민(SEQ ID NO:5) 또는 그것의 성숙한 부분(SEQ ID NO:5의 아미노산 25 내지 609) 및 소 알부민(SEQ ID NO:6) 또는 그것의 성숙한 부분(SEQ ID NO:6의 아미노산 25 내지 607)을 제한 없이 포함한다. 본 발명에 사용되는 알부민은 또한, Aβ(1-42) C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드에 대하여 앞서 설명한 바와 같은 보존적 아미노산 치환으로부터 오는 알부민 구조적 변이체를 망라한다.

[0037] 특정 구현예에서 본 발명의 컨주게이트는, 예컨대 참조에 의하여 그 내용이 전체로서 본 명세서에 혼입되는 WO 2005/058958에 기술된 것과 같은, 알부민 분자 변이체를 포함한다. 재조합 인간 혈청 알부민 변이체는 AlbagenTM 라는 명칭 하 뉴 센트리 제약사(Huntsville, 앨라배마)로부터 상업적으로 구입가능하다. 본 발명에 따른 컨주게이트를 형성하기 위해 사용되는 알부민은 당업계에서 숙련된 자에게 알려진 방법 또는 재료를 사용하여 취득될 수 있다. 예를 들어, 알부민은 상업적 공급원, 예컨대 노보자임사(Novozymes Inc., Davis, CA; recombinant human albumin derived from *Saccharomyces cerevisiae*); 코텍스-바이오캠(Cortex-Biochem, San Leandro, Calif: serum albumin), 탈레크리스 바이오테라퓨틱스(Talecris Biotherapeutics, Research Triangle Park, North Carolina; ->erum albumin), ZLB 베링(ZLB Behring, King of Prussia, PA) 또는 뉴 센트리 제약사((New Century Pharmaceuticals ille, Ala.): *Pichia pastupsilonris*로부터 유래한 재조합 인간 알부민)으로부터 취득될 수 있다.

[0038] 알부민 변이체는 인간 군집 중에서 알부민의 다형성으로부터 발생한 천연 변이체를 포함한다. 인간 혈청 알부민의 30개보다 많은 명백하게 다른 유전적 변이체가 다양한 조건 하 전기 영동적 분석법에 의하여 동정되었다. 예컨대, 문헌들(Weitkamp et al, Ann. Hum. Genet., 36(4):381-92 (1973); Weitkamp, Isr. J.

Med. Sci., 9(9):1238-48 (1973); Fine et al, Biomedicine, 25(8):291-4 (1976); Fine et al, Rev. Fr. Transfus. immunohematol., 25(2): 149-63. (1982); Rochu et al, Rev. Fr. Transfus. Immunohematol. 31(5):725-33 (1988); Arai et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 86(2): 434-8 (1989))을 참조하는데, 이의 내용은 참조에 의하여 그 전체로서 본 명세서에 혼입된다. 특정 구현예에서, 본 발명은 알부민의 분자 변이체와 형성되는 컨주게이트를 제공한다.

[0039] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 컨주게이트는 알부민과 실질적인 상동성을 공유하는 알부민 변이체를 포함한다. 예를 들어, 컨주게이트는 알부민의 아미노산 서열과 적어도 75 퍼센트, 적어도 80 퍼센트, 적어도 85 퍼센트, 보다 전형적으로 적어도 90 퍼센트 및 가장 전형적으로 적어도 95 퍼센트 동일한 알부민 동족체를 사용하여 형성될 수 있다. 특정 구현예에서, 알부민 동족체는 자유 시스테인을 포함한다.

[0040] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 컨주게이트는 알부민의 구조적 유도체를 포함한다. 알부민의 구조적 유도체는 알부민-타입 활성을 보유하는 단백질 또는 펩타이드를 포함할 수 있는데, 예컨대 알부민의 기능적 단편이 있다. 몇몇 구현예에서, 유도체는 알부민의 항원성 결정자, 즉 항-알부민 항체에 의하여 인식될 수 있는 폴리펩타이드 부분이다. 몇몇 구현예에서, 재조합 알부민은 인간 혈청 알부민을 인코딩하는 유전자의 변형에 의하여 취득될 수 있는 높은 혈장 반감기를 가지는 임의의 단백질일 수 있다. 제한이 아닌 예시의 방법에 의하여, 재조합 알부민은 알부민의 추적자 금속 결합 영역의 삽입 또는 결여를 포함할 수 있는데, 그 결과 참조에 의하여 그 내용이 전체로서 본 명세서에 혼입되는 미국 특허 제6,787,636호에 기술된 바와 같이, 추적 금속, 예컨대 니켈 및/또는 구리의 결합은 감소되거나 제거된다. 알부민에 의한 추적 금속의 감소된 결합은 알부민 조성물로 처리되는 대상체 중의 추적자 금속에 대한 알레르기 반응의 가능성을 줄이는 데 유익할 수 있다.

[0041] 특정 구현예에서, 알부민 유도체는 알부민 단백질의 인 비트로 변형에 의해 얻어지는 높은 혈장 반감기를 가지는 임의의 거대 분자를 포함한다. 몇몇 구현예에서 알부민은 지방산으로 변형된다. 몇몇 구현예에서 알부민은 금속 이온으로 변형된다. 몇몇 구현예에서, 알부민은 알부민에 대해 높은 친화성을 가지는 소분자에 의해 변형된다. 몇몇 구현예에서 알부민은 글루코스, 락토스, 만노스 및 갈락토스를 포함하나 이에 제한되지 아니하는 당류에 의하여 변형된다.

[0042] 알부민의 구조적 유도체는, 올리고뉴클레오타이드-매개된(위치-지정) 돌연변이생성법, 알라닌 스캐닝 및 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 돌연변이생성법을 제한 없이 포함하는, 당업계에서 숙련된 자에게 알려진 임의의 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 위치-지정 돌연변이생성법(see Cotter, Biochem J 237 1-7 (1986), Zoller and Smith, Methods Enzymol 154 329-50 (1987)), 카세트 돌연변이생성법, 제한 선별 돌연변이생성법(Wells et al, Gene 34 315-323 (1985)) 또는 다른 알려진 기술을 클론된 알부민-인코딩 DNA 상에 수행하여, 알부민의 구조적 변이체를 인코딩하는 알부민 변이체 DNA 또는 서열을 생산할 수 있다(Ausubel et al, Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (current edition), Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3d ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001), 이들의 내용은 참조에 의해 그 전체로서 본 명세서에 혼입됨).

[0043] 특정 구현예에서, 알부민 유도체는 천연 알부민보다 더 긴 혈장 반감기를 가지는 알부민 단백질의 인 비트로 변형에 의한 임의의 거대분자를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 알부민은 일 이상의 지방산으로 변형된다. 몇몇 구현예에서, 알부민은 일 이상의 금속이온으로 변형된다. 몇몇 구현예에서, 알부민은 알부민에 높은 친화력을 가지는 일 이상의 소분자로 변형된다. 몇몇 구현예에서, 알부민은 글루코스, 락토스, 만노스 및 갈락토스를 포함하나 이에 제한되지 아니하는 일 이상의 당분에 의하여 변형된다.

[0044] 인간 혈청 알부민의 조함물은, 혈청 유래이든지 또는 재조합적으로 생산되었든지 간에, 비-머캅탈알부민(non-mercaptopalbumin), 즉 "캡핑된" 알부민 및 머캅탈알부민(mercaptopalbumin), 즉 "캡핑 안된" 알부민의 이중 혼합물을 포함할 수 있다. 인간 알부민 폴리펩타이드는 35개의 시스테인 잔기를 함유하는데, 이것의 34개는 17개의 안정화 이황화 다리를 형성한다. 머캅탈알부민의 34 위치의 시스테인 잔기가 자유 SH기를 포함하는 반면, 비머캅탈알부민의 동일한 잔기는 예컨대 시스테인 또는 글루타티온의 혼합된 이황화물을 포함하거나, 또는 금속 이온 또는 다른 부가물에 의한 산화를 겪어서 티올기가 덜 반응적이며 이용 불가능하게 된다. 전형적으로, 산화된 알부민-Cys34을 DTT(dithiothreitol), TGA(thioglycolic acid) 또는 BME(beta-mercaptoethanol)와 같은 환원된 알부민-Cys34로 변환시킬 수 있는 제제와 재조합 알부민을 접촉시켜 머캅탈알부민에 대한 농축을 달성한다.

[0045] 본 발명의 특정 구현예에서, 컨주게이션 반응의 진행에 앞서 재조합 알부민을 탈당화(deglycated)시킬 수 있다. 알부민, 특히 이스트에서 생산된 재조합 알부민의 탈당화는 그것과 함께 형성되는 컨주게이트와 관련해서

인내성 및 안정성의 이점을 가지는 알부민을 산출하는 것으로 믿어진다. 일반적으로 알부민의 탈당화는 미크 시크 등(Miksik et al., J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 1997, 699:311-345)에 의하여 기술된 바와 같이, 비 효소적으로 당화된 단백질의 환원에 유용한 것으로 당업계의 숙련된 자에게 알려진 임의의 기술 및 임의의 조건 하에서 수행될 수 있다. 아니면, 알부민은 효소적 방법을 사용하여 탈당화 될 수 있다. 예를 들어, 탈당화는 엔도글리코시다제 H를 사용하거나 또는 다른 엔도글리코시다제 혼합물과 함께 사용하여 수행될 수 있다.

[0046] 다른 구현예에서, 컨주게이션의 바람직한 특이성을 위하여, 즉 비-Cys34 컨주게이트 형성의 가능성을 감소시키기 위하여 재조합 알부민을 더 처리할 수 있다. 예를 들어, 인간 혈청 알부민 상에서 공유적 부가 형성이 일어나는 것으로 알려진 잔기를 화학적으로 차단하는 제제와 재조합 알부민을 접촉시킬 수 있다. Cys34을 제외하고 알부민 상의 반응 부위를 차단할 수 있는 당업계에 알려진 그 어떠한 제제라도 사용할 수 있다. 몇몇 구현예에서, 제제는 라이신 잔기를 차단한다. 알부민은 다양한 수의 라이신 잔기(예컨대, 인간 알부민에서 60 개 및 소 알부민에서 61개)를 포함하는데, 그 중 25-30개는 알부민 표면 상에 위치하며, 컨주게이션을 위해 접근가능할 수 있다. 이에 따라 몇몇 구현예에서, 제제는 알부민의 Lys71, Lys199, Lys351, Lys525, Lys541와 같이 공유적 부가를 형성할 잠재력을 가지는 것으로서 당업계의 숙련된 자에게 알려진 알부민의 임의의 라이신 잔기를 차단한다.

[0047] 링커 영역

[0048] A베타(1-42)의 C-말단으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민은 직접적으로 부착되거나, 아니면 일 이상의 연결기(linker group)(이하 또한 개입 분자 또는 스페이서 부분으로서 언급됨)를 경유하여 연결될 수도 있다.

[0049] 본 발명의 컨주게이션의 특정 구현예에서, 적어도 한 개의 면역성 펩타이드 및 알부민이 링커 영역에 의하여 연결되는 경우, 상기 링커 영역은 그에 부착하는 한 개 이하의 면역성 펩타이드를 함유한다.

[0050] 본 발명의 컨주게이션의 다른 특정 구현예에서, 적어도 한 개의 면역성 펩타이드와 알부민을 연결하는 링커 영역은 시스테인을 포함하고, 더 좋기로는 시스테인이 면역성 펩타이드의 N-말단에 위치한다.

[0051] 특정 구현예에서, 연결기(linker group)는 생체 적합성 폴리머, 예컨대 펩타이드 또는 알킬 또는 알콕시 포함 폴리머이다. 특정 구현예에서, 연결기는 효소에 의하여 절단 가능하거나, 또는 특정 화학적 조건 예컨대 산성 조건 하에서 절단되는 불안정한 화학결합을 가지는 펩타이드이다. 일 구현예에서, 변형된 펩타이드는 일 이상의 연결기(linker group)를 통하여 펩타이드에 공유적으로 부착되는 반응성기를 포함한다. 특정 구현예에서, 연결기는 일 이상의 반응성기, 전형적으로 하나의 연결기를 포함한다. 특정 구현예에서, 연결기는 1 내지 100 원자의 길이를 가진다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 연결기(linker group)의 길이는 연결기에 의하여 연결되는 그룹 사이에 가장 짧은 원자의 사슬 중의 원자의 개수에 의하여 표현된다. 특정 구현예에서, 연결기는 1 내지 100 원자, 1 내지 80 원자, 1 내지 60 원자, 1 내지 50 원자, 1 내지 40 원자, 1 내지 30 원자, 1 내지 20 원자, 10 내지 20 원자 또는 5 내지 15 원자를 가진다. 한 개 이상의 연결기(linker group)가 존재하는 곳에서, 연결기는 동일하거나 또는 상이한 연결기일 수 있다. 연결기는 당업계의 숙련된 자에게 알려진 임의의 방법 또는 기술에 의하여 A베타(1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드에 부착될 수 있다. 예시적 방법 또는 기술은 미국 특허 제6849714호에 기술되어 있으며, 그 내용은 참조에 의하여 전체로서 본 명세서에 혼입된다.

[0052] 연결기(linker group)는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등의 기와 같은 일 이상의 알킬기, 알콕시기, 알케닐기, 알키닐기 또는 알킬기로 치환된 아미노기, 사이클로알킬기, 폴리사이클기, 아릴기, 폴리아릴기, 치환된 아릴기, 헤테로사이클기 및 치환된 헤테로사이클기를 포함할 수 있다.

[0053] 특정 구현예에서, 연결기(linker group)는 AEA, AEEA 및 OA를 포함하지만 이에 제한되지 아니하는 카복시기 및 아미노기를 포함하는 연결기들로부터 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 연결기는 1 내지 100 원자 길이를 가지는 AEA의 폴리머일 수 있다. 특정 구현예에서, 연결기는 1 내지 100 원자 길이를 가지는 AEEA 폴리머일 수 있다. 특정 구현예에서, 연결기는 1 내지 100 원자 길이를 가지는 OA 폴리머일 수 있다. 연결기의 설명적인 예는 글리신, 라이신, 글루타메이트, 이소루이신 또는 아르기닌 잔기의 모노머, 다이머, 트라이머, 테트라머, 펜타머, 식스머, 셉타머, 옥타머, 노나머, 데카머, 운데카머, 도데카머, AEA, AEEA 또는 OA (예컨대, OA 다이머(-OA-OA-) 또는 OA 트리머(-OA-OA-OA-), 또는 이들의 조합(예컨대, GIy_n , LyS_n , OA, AEA 또는 AEEA의 임의의 조합, 여기에서 $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, \text{ or } 12$)를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 연결기는

단일의 라이신을 가진다. 단일의 라이신은 반응기에 직접, 또는 일 이상의 연결기를 통하여 연결되도록 변형될 수 있다. 예컨대, K 그룹은 반응기 또는 일 이상의 추가적인 링커에, 예를 들어 사이드체인의 엡실론(epsilon) 아미노기를 통하여 연결될 수 있다. 단일의 라이신을 함유하는 이러한 링커의 예들은, 예컨대 (모노머)_aK(모노머)_b, K(모노머)_c 및 (모노머)_dK의 서열을 가지는데, 여기에서 a, b, c 및 d 각각은 1과 동일하거나 더 큰 정수, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 그 이상이다. 몇몇 예 중에서, a 및 b는 동일한 반면에, 다른 예 중에서 a 및 b는 동일하지 않다. 예를 들어 다음의 서열을 가지는 연결기를 제공하면서 a는 3이고 b는 4일 수 있다: (OA)_nK(OA)_n, (OA)_nK(AEA)_n, (G)_nK(OA)_n, (OA)_nK(G)_n, 여기에서 n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12. 반응기가 두 개의 TMP 사이의 링커 상에 위치하는 경우, 두 개의 TMP 사이의 총 길이는 전형적으로 100 원자를 초과하지 않을 것이다. 연결기에의 부착물은 두 개의 TMP 사이 링커의 일부로 고려되지 않는다.

[0054] 연결기는 앞서 언급한 생체 적합성 폴리머들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리글리신 링커는 AEA, AEEA 또는 OA의 모노머 일 이상과 임의의 배열(configuration)로 조합될 수 있다. 일 구현예에서, 폴리글리신 링커는 폴리글리신링커 중에 첫 번째 또는 마지막 글리신 잔기의 N- 또는 C-말단에서, 일 이상의 AEA, AEEA 또는 OA 모노머에 부착된다. 아니면, 일 이상의 AEA, AEEA 또는 OA 모노머가 폴리글리신 링커 중 글리신 잔기 사이에 삽입된다. 특정 구현예에서, 반응기(예컨대, MPA, GMBA, NHS, 설폰-NHS, MBS 또는 GMBS)는 일 이상의 연결기를 통하여 펩타이드에 부착되는데, 연결기는 예컨대 폴리글리신 링커, 폴리글리신-라이신 링커, AEEA, AEA 또는 OA, 또는 이들의 조합을 포함한다. 반응기가 일 이상의 연결기를 통하여 펩타이드에 부착되는 특정 구현예에서, 각각의 연결기는 전형적으로 폴리글리신, 폴리라이신, AEA, AEEA 및 OA로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 구현예에서, 연결기의 개수(예컨대, 모노머릭 폴리머 단위)는 1 내지 2, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 1 내지 6, 1 내지 7, 1 내지 8, 1 내지 9, 1 내지 10, 1 내지 11, 1 내지 12이다. 일 이상의 연결기가 있는 곳에서, 연결기는 동일하거나 또는 상이한 연결기일 수 있다. 예를 들어 폴리글리신, 폴리라이신, AEA, AEEA, 및/또는 OA 중 하나의 임의의 조합을 임의의 순서로 사용할 수 있다. 일 구현예에서, 반응기, 전형적으로 MPA는 직렬로 정렬된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 폴리글리신, 폴리라이신, AEA, AEEA 또는 OA 연결기를 통하여, 펩타이드에 부착된다. 다른 구현예에서, 반응기, 전형적으로 MPA는 분기된(branched) 형태로 배열된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 폴리글리신, 폴리라이신, AEA, AEEA 또는 OA 연결기를 통하여 펩타이드에 부착된다.

[0055] 다른 구현예에서, 연결기는 Aβ(1-42) C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드와 알부민 사이에서 힌지 영역으로서 작용할 능력이 있는 펩타이드 부분(moiety)인데, 이는 그들 자신의 개별적 3차원 형태를 유지하면서 그들이 서로 독립적으로 움직이는 것을 허용한다. 이러한 관점에서, 본 발명에 따른 바람직한 비 자연적인 중간체 아미노산 서열은 이러한 움직임을 허용하는 구조적 유연성을 특징으로 하는 힌지 영역, 또는 비 자연적인 유연한 링커일 것이다. 유연한 링커는 20개 아미노산 또는 그 이하의 길이를 가지는 유연한 링커 펩타이드일 수 있다. 보다 바람직한 구현예에서, 링커 펩타이드는 글리신, 세린, 알라닌 및 트레오닌으로 구성되는 군으로부터 선택되는 2개 아미노산 또는 그 이상을 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 유연한 링커는 폴리글리신, 폴리글루타메이트, 폴리이소루이신, 폴리알라닌 또는 2 이상의 아미노산을 포함하는 다른 적합한 연결기에 제한되지 아니하는 폴리글리신 링커이다. 몇몇 예에서, 아미노산 연결기는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 아미노산 잔기, 예컨대 글리신 또는 라이신 잔기를 함유할 수 있다. 폴리글리신 링커는 임의의 형태로, 예컨대 N- 또는 C-말단 부근 또는 글리신 잔기 신장(stretch)의 중간에, 삽입되는 일 이상의 다른 잔기(예컨대, 라이신 잔기)를 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, 폴리글리신 링커는 일 이상의 AEA, AEEA 또는 OA 모노머와 임의의 형태로 조합된다. 일 구현예에서, 폴리글리신 링커는 폴리글리신 링커 중의 첫 번째 또는 마지막 글리신 잔기의 N-말단 또는 C-말단에서, 일 이상의 AEA, AEEA 또는 OA 모노머에 부착된다. 아니면, 일 이상의 AEA, AEEA 또는 OA 모노머는 폴리라이신 링커 중의 글리신 잔기들 사이에 삽입된다. 예를 들어, 폴리글리신이 링커로서 사용되는 곳에서, 폴리글리신은 다른 링커 또는 단백질과 반응할 능력이 있는 자유 엡실론(epsilon) 아미노기를 제공하기 위하여 단일의 라이신을 함유할 수도 있다. 아미노산, 예컨대 단일의 라이신을 함유하는 이와 같은 폴리글리신의 예는, 예를 들어 (G)_aK(G)_b, K(G)_c, 및 (G)_dK의 아미노산 서열을 가지는데, 여기에서 a, b, c 및 d는 각각 1과 같거나 그보다 큰 정수이며, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 그 이상이다. 몇몇 예에서, a 및 b는 동일할 수 있는 반면에, 다른 예에서 a 및 b는 동일하지 아니하다. 예를 들어 a는 3일 수 있고, b는 4일 수 있다. 몇몇 예에서, 폴리글리신 링커 내의 단일 라이신은 그 자체가 부가적인 부분, 예를 들어 연결기, 반응기 또는 반응기의 잔기에 연결될 수 있다. 예를 들어 라이신 잔기는 예컨대 사이드 체인의 엡실론 아미노기를 통하여 일 이상의 부가적 링커에 연

결될 수 있다.

- [0056] 링커/스페이서 서열의 가능한 예는 SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO:7), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO:8) 또는 GGSGGAP (SEQ ID NO:9) 및 GGGKGGGG (SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 이러한 서열들은 다른 단백질 도메인에 디자인된 코일드 헬릭스를 결합시키기 위하여 사용되어 왔다(Muller, K.M., Arndt, K.M. and Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328: 261-281). 상기 링커는 종기로는 GGGVEGGG (SEQ ID NO: 11)의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함한다.
- [0057] 링커 영역의 효과는 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래된 펩타이드와 알부민 사이에 공간을 제공하는 것이다. 그래서, A β (1-42) C-말단 영역으로부터 유래된 펩타이드의 제2차 구조가 알부민의 존재에 의하여 영향을 받지 않는 것 및 그의 역(vice versa)을 확실히 한다. 스페이서는 종기로는 펩타이드 성질을 가진다. 링커 펩타이드는 종기로는 적어도 2개의 아미노산, 적어도 3개의 아미노산, 적어도 5개의 아미노산, 적어도 10개의 아미노산, 적어도 15개의 아미노산, 적어도 20개의 아미노산, 적어도 30개의 아미노산, 적어도 40개의 아미노산, 적어도 50개의 아미노산, 적어도 60개의 아미노산, 적어도 70개의 아미노산, 적어도 80개의 아미노산, 적어도 90개의 아미노산 또는 대략 100개의 아미노산을 포함한다.
- [0058] 추가적으로, 링커는 공유결합 수단에 의하여 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민의 측면에 위치하는 성분에 결합할 수 있으며, 스페이서는 종기로는 필수적으로 비 면역성이고 및/또는 그 어떠한 시스템인 잔기도 포함하지 않는다. 유사한 방법으로, 스페이서의 3차원 구조는 바람직하게 선형 또는 실질적인 선형이다.
- [0059] 링커는 테트라넥틴 중에 β 시트를 형성하는, 테트라넥틴의 53-56 잔기 및 테트라넥틴 중에서 턴을 형성하는 57-59 잔기를 포함할 수 있다(Nielsen, B.B. et al., FEBS Lett. 412: 388-396, 1997). 단편의 서열은 GTKVHMK (SEQ ID NO:12)이다. 이 링커는 그것이 천연 테트라넥틴 중에 존재할 때, CRD 도메인과 함께 삼량화(trimerization) 도메인에 결합하는 장점을 가지며, 그러므로 삼량화 도메인을 또 다른 도메인에 일반적으로 연결하는데 적합하다. 더욱이, 얻어진 컨스트럭트는 링커가 없는 컨스트럭트 보다 더 면역성인 것으로 기대되지 않는다.
- [0060] 아니면, 아미노산 1992-2102(SWISSPROT numbering, entry P02751)에 해당하는, 인간 피브로넥틴으로부터의 연결 스트랜드 3으로부터 유래한 서열을 링커로서 선택할 수 있다. 아미노산 넘버 2037-2049에 해당하는 서열 PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 13)이 바람직하게 사용되고, 그 서열 내부의 아미노산 2038-2042에 해당하는 단편 GTSGQ (SEQ ID NO: 14)가 더욱 바람직하다. 이 컨스트럭트는 단백질 분해적(proteolytic) 절단이 잘 되지 않는 경향이 있고, 피브로넥틴이 혈장 중에 높은 농도로 존재하므로 많이 면역성이지 않다는 장점을 갖는다.
- [0061] 아니면, 적합한 단백질 링커는 무린 IgG3의 상부 힌지 영역의 10개 아미노산 잔기 서열에 근거할 수 있다. 이 펩타이드(PKPSTPPGSS, SEQ ID NO: 15)는 코일드 헬릭스 수단에 의해 이량화된 항체를 생산하기 위하여 사용되어 왔으며((Pack P. and Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584), 본 발명에 따른 스페이서 펩타이드로서 유용할 수 있다. 인간 IgG3의 상부 힌지 영역의 상응하는 서열은 훨씬 더 바람직할 수 있다. 인간 IgG3 서열은 인간에 있어 면역성인 것으로 기대되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 링커 펩타이드는 서열 APAETKAEPMT(SEQ ID NO: 16)의 펩타이드 및 서열 GAP의 펩타이드의 군으로부터 선택된다.
- [0062] 특정 구현예에서, 링커 영역은 다음의 기를 포함하지 않는다:
- [0063] $-N(CH_2)_2$, $-NHCH<$ 또는 $-NHCH(CH_2)_2$.
- [0064] 특정 구현예에서, 본 발명의 컨주게이트는 다음의 구조를 가지지 않는다:
- $$X-L_A-R < \begin{matrix} CO-L_B-NH-P-CO-Y \\ CO-L_B-NH-P-CO-Y \end{matrix}$$
- [0065] 및 그의 약학적으로 허용가능한 염,
- [0066] 여기에서,
- [0067] R은 $-N(CH_2)_2$, $-NHCH<$ 또는 $-NHCH(CH_2)_2$ 을 나타내고,
- [0068] X는 수소 또는 펩타이드 그룹을 나타내고,
- [0069] L_A는 임의로 존재하고, 아미노산 또는 적어도 2개 아미노산 잔기를 포함하는 펩타이드이고,

- [0070] L_B 는 임의로 존재하고, 아미노산 또는 적어도 2개 아미노산 잔기를 포함하는 펩타이드이고,
- [0071] P는 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드 단백질에 실질적인 유사성을 가지는 단백질의 전장 또는 단편으로부터 선택되는 펩타이드이고,
- [0072] Y는 OH 또는 NH_2 이다.
- [0073] $A\beta(1-42)$ 의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드와 알부민의 컨주게이션
- [0074] 일단 $A\beta(1-42)$ 의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드와 알부민의 충분한 양이 이용가능하면, 이들 사이의 공유 복합체 형성에 적합한 조건하에서 두 성분을 접촉시켜 본 발명의 컨주게이트를 형성시킨다.
- [0075] 면역성 펩타이드 및 알부민이 연결기에 의하여 직접적으로 연결 또는 결합되어 있는지 여부와 관계없이, 본 발명은 펩타이드가 그것의 N-말단을 통하여(C-말단적으로 제시됨) 결합되는 또는 그것의 C-말단을 통하여(N-말단적으로 제시됨) 알부민 분자에 결합되는 두 가능성 모두를 의도한다. 바람직한 구현예에서, 면역성 펩타이드는 알부민 분자 중에서 C-말단적으로 제시된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "C-말단적으로 제시"란 N-말단 영역을 통하여 캐리어 단백질(알부민)에 연결되어 C-말단이 면역 시스템에 의한 인식에 이용가능한 채로 남아 있는 펩타이드를 의미한다.
- [0076] 펩타이드 및 알부민 분자가 링커를 경유하여 연결되는 경우, 이는 N-말단의 자유 α -아미노기 및 라이신기로부터 유래한, 펩타이드의 N-말단의 자유 α -아미노기 또는 알부민 분자 중의 일차 아미노기와 반응할 수 있는 균일 이중 기능적(homobifunctional) 시약의 사용에 의하여 일반적으로 달성되어 왔다. 면역성 펩타이드의 일차 아미노기와 알부민을 결합시키기 위한 적당한 균일 이중 기능적 시약은 글루타알데히드(glutaraldehyde), 글리옥살(glyoxal), 숙신알데히드(succinaldehyde), 에틸 숙신알데히드(ethyl succinaldehyde), 2-메틸글루타알데히드(2-methylglutaraldehyde), 3-메틸글루타알데히드(3-methylglutaraldehyde), 아디팔데히드(adipaldehyde) 등과 같은 디알데히드를 제한없이 포함한다.
- [0077] 펩타이드의 알부민에 대한 최종 몰 비율 약 0.1: 1 내지 약 10,000: 1을 포함하는 용액 중에서, $A\beta(1-42)$ 의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드와 알부민을 접촉시킨다. 몇몇 구현예에서, 최종 몰 비율은 약 7500: 1, 5000: 1, 약 2500: 1, 약 1000: 1, 약 750: 1, 약 500: 1, 약 250: 1, 약 100: 1, 약 75: 1, 약 50: 1, 약 25: 1, 약 10: 1, 약 7.5: 1, 약 5: 1, 약 2.5: 1 또는 약 1: 1이다. 몇몇 구현예에서, 최종 몰 농도는 약 0.1: 1 내지 1: 1 사이이다. 몇몇 구현예에서, 최종 몰 농도는 약 0.1: 1, 0.2: 1, 0.3: 1, 0.4: 1, 0.5: 1, 0.6: 1, 0.7: 1, 0.8: 1, 0.9: 1이다.
- [0078] 컨주게이트의 제1 및 제2 성분의 커플링은 $A\beta(1-42)$ 의 C-말단 도메인으로부터 유래한 펩타이드의 임의의 부위에 커플링 되는 반응기 수단에 의하여 일어난다. 반응기는, 예컨대 알부민 상의 일 이상의 아미노기, 하이드록시기 또는 티올기와 반응하여, 알부민과 안정된 공유 결합을 형성할 수 있는 능력을 위하여 선별된다. 종기로는, 반응기는 알부민 상의 오직 하나의 아미노기, 하이드록시기 또는 티올기와 반응한다. 이에 따라, 반응기는 펩타이드의 임의의 부위 또는 당업계에서 숙련된자에 의할 때 적합한 것으로 여겨지는 연결기에 연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 반응기는 펩타이드 또는 유도체의 백본(backbone)에 연결된다. 특정 구현예에서, 반응기는 펩타이드 또는 유도체의 N-말단, 예컨대 N-말단 아민에 연결된다. 특정 구현예에서, 반응기는 펩타이드 또는 유도체의 C-말단, 예컨대, C-말단 카복시에 연결된다. 특정 구현예에서, 반응기는 펩타이드 또는 유도체의 사이드 체인, 예컨대, 펩타이드 또는 유도체의 사이드 체인 하이드록시, 티올, 아미노 또는 카복시에 연결된다. 특정 구현예에서, 반응기는 펩타이드 또는 유도체의 라이신 사이드 체인의 엡실론 아미노기에 연결된다. 특정 구현예에서, 반응기는 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단 내에서 발견되는 시스테인 잔기에 연결된다.
- [0079] 단백질 상의 작용기와 공유 결합을 형성하기 위하여, 다양한 종류의 활성 카복시기, 특히 에스테르를 화학 반응기로서 사용할 수도 있다. 카복시기는 일반적으로 단백질 상의 아민, 티올 및 하이드록시 기능성에 의한 공격에 민감한, N-하이드록시 숙신이미드(NHS) 또는 말레이미드와 같은 반응성 중간체로 변환된다. 펩타이드 상의 NHS 및 말레이미드 반응기의 도입은 MBS(maleimide-benzoyl-succinimide), GMBBS(gamma-maleimido-butryloxy succinimide ester), DTSP(dithiobis-N-succinimidyl propionate), SPDP(N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)), SMCC(succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl)-cyclohexane-1-carboxylate), SATA(succinimidyl 1 acetylthioacetate), 벤조페논 4-말레이미드, PEAS; AET(Lambda-((2-py

ridyldifhio)ethyl)-4- azidosalicylamide)와 같은 이중 기능적 연결 시약의 사용에 의하여 수행될 수 있다. 이와 같은 이중 기능적 링커는, 보호기의 선택에 기초하여, 펩타이드 상의 카복시 또는 아미노기를 활성화할 것이다.

[0080] 또는, 펩타이드에 말레이미드의 부가는 말레이미도프로피온산(maleimidopropionic acid), [2-[2-[2-말레이미도프로피온아미도(에톡시)에톡시] 아세트산과 같은 유도체를 활성화시키기 위하여, DCC(N,N, dicyclohexylcarbodiimide), EDAC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride) 등과 같은 커플링 시약의 사용을 통하여 수행될 수 있으며, 뒤이어 펩타이드 상의 아민과 반응한다. 펩타이드 상의 카복시 부분에 말레이미도알킬 아민과 같은 유도체를 첨가하기 위하여, DCC 및 EDAC와 같은 유사한 시약을 또한 사용할 수 있다.

[0081] 일차 아민이 NHS 에스테르의 주요 타겟이다. 단백질의 N-말단 상에 존재하는 접근 가능한 엡실론-아민기는 NHS 에스테르와 반응한다. 그러나, 단백질 상의 엡실론-아미노기는 NHS 커플링을 위해 바람직하지 않거나 또는 이용가능하지 않을 수 있다. 5개 아미노산이 그들의 사이드 체인에 질소를 가지는 반면, 오직 라이신의 엡실론-아민 만이 NHS 에스테르와 현저하게 반응한다. NHS 에스테르 컨주게이션 반응이 N-하이드로숙신이미드(N-hydroxysuccinimide)를 방출하면서 일차 아민과 반응할 때 아미드 결합이 형성될 수 있다. 이러한 숙신이미드-포함 반응기를 본 명세서에서 숙신이미드기로서 언급된다.

[0082] 특정 구현예에서, 알부민 상의 작용기는 아미노산 잔기 34(Cys34)에 위치하는 단일의 프리 티올기이고, 화학적 반응성기는 MPA와 같은 말레이미도-함유 기이다. MPA는 말레이미도 프로피온산 또는 말레이미도프로피오네이트를 나타낸다. 이와 같은 말레이미도-함유 기는 본 명세서에서 말레이미도(maleimido)기로서 언급된다.

[0083] 몇몇 구현예에서, 본 명세서에서 기술된 과정에 의하여 형성되는 컨주게이트는 약제학적 펩타이드 상의 숙신이미딜기 또는 말레이미도기에 공유적으로 연결되는 알부민을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 알부민 아미노, 하이드록시 또는 티올기는 약제학적 펩타이드 상의 숙신이미딜 또는 말레이미도 기에 공유적으로 결합된다. 몇몇 구현예에서, 알부민 시스테인 34 티올은 약제학적 펩타이드의 라이신의 엡실론 아미노 상에 있는 [2-[2-[2-말레이미도프로피온아미도(에톡시)에톡시]아세트아미드 링커에 공유적으로 결합된다.

[0084] 특정 구현예에서, 반응기는 단일의 정의된 아미노산에 임의적으로 연결기를 통하여 펩타이드에 부착된 단일의 MPA 반응기이고, MPA는 알부민의 단일 아미노산 잔기에서, 바람직하게는 시스테인 34에서 알부민에 공유적으로 부착된다. 바람직한 구현예에서, 알부민은 재조합 인간 알부민이다.

[0085] 특정 구현예에서, 반응기는 그와 같은 반응기의 부착에 적합한 약제학적 펩타이드의 임의의 잔기에 부착될 수 있다. 잔기는 펩타이드의 말단 또는 내부의 잔기일 수 있다. 특정 구현예에서, 반응기는 펩타이드의 카복시-말단 또는 아미노-말단에 부착될 수 있다. 유익한 구현예에서, 반응기는 펩타이드의 단일 부위에 결합한다. 이는 당업계에서 숙련된 자에게 알려진 보호기를 사용하여 달성될 수 있다. 특정 구현예에서, 약제학적 펩타이드의 유도체는 반응기의 부착을 위해 합체된 잔기를 포함할 수 있다. 부착을 위한 유용한 잔기는 시스테인, 라이신, 아스파테이트 및 글루타메이트 잔기를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 잔기는 펩타이드의 말단에 또는 내부적으로, 예컨대 N-말단 아미노산 잔기 위에 자유 알파-아미노 말단을 통하여 합체될 수 있다. 특정 구현예에서, 반응기는 내부 라이신 잔기에 부착된다. 특정 구현예에서, 반응기는 말단 라이신 잔기에 부착된다. 특정 구현예에서, 반응기는 아미노-말단의 라이신 잔기에 부착된다. 특정 구현예에서, 반응기는 카복시-말단의 라이신 잔기, 예컨대 약제학적 펩타이드의 카복시-말단에 있는 라이신 잔기에 부착된다.

[0086] 다른 구현예에서, 활성화된 이황화 결합기는, 선택적인 티올 활성화 계획에 근거한 분자내부적 이황화 결합의 바람직한 형성을 위한 방법을 통하여, 약제학적 펩타이드 시스테인 또는 시스테인 유사체에 결합될 수도 있다. 단백질 또는 펩타이드 사이에 비대칭적 이황화 결합을 선택적으로 형성하기 위한 제2의 자유 티올과의 반응이 따라오는, 활성화기를 이용한 하나의 티올의 선택적인 활성화에 근거한 방법이, 대칭적 이황화 결합 형성으로 인한 감소된 수율의 문제를 완화시키기 위하여 기술되어 왔다(참고 D. Lambdandreu et al., "Methods in Molecular Biology" (M. W. Pennington and B. M. Dunn, eds.). Vol. 35, p. 91. Humana Press. Totowa. N. J., (1994)). 바람직하게 그와 같은 활성화기는 피리딘-설페닐(pyridine-sulfonyl) 그룹에 근거한 것들이 다(M. S. Bernatowicz et al., Int.J. Pept. Protein Res. 28: 107(1986)). 바람직하게 2,2'-디티오디피리딘(dithiodipyridine, DTDP) (Carlsson et al., Diupsilonchem. J. 173: 723(1978); L. H. Kondejewski et al., Bioconjugate Chem. 5:602(1994) 또는 2,2'-디티오비스(5-니트로피리딘) (NPYS) (J. Org. Chem. 56: 6477(1991)) 또는 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오) (SPDP)가 채택된다. 또한, 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(5,5'-difthiois(2-nitrobenzoic acid, Ellman's reagent) 또는 6,6'-디티오디니코틴산이 활성화기로서 사

용될 수도 있다.

- [0087] 이러한 방법에 따라, 이황화 결합 활성화기를 활성화기 과다의 조건하에서 시스테인 또는 시스테인 유사체를 함유하는 약제학적 펩타이드와 우선 반응시킨다. 이러한 조건은 필수적으로 이황화 결합된 펩타이드 호모다imer의 생산 없이, 활성화된 이황화기와 결합된 약제학적 펩타이드를 함유하는 약제학적 화합물의 형성을 강하게 선호한다. 커플링 반응을 따라 생산된 펩타이드 화합물을, 예컨대 역상-HPLC에 의하여 정제한다. 두번째 티올과의 반응은 펩타이드 화합물이 알부민과 반응할 때 발생하여 약제학적 화합물과 혈청 알부민 사이에 컨주게이트를 형성한다.
- [0088] 약제학적 펩타이드 시스테인 또는 시스테인 유사체는 설피토라이시스(sulfitolysis) 반응 계획을 통하여 S-설포네이트를 가지도록 변환된다. 이 계획에서, 약제학적 펩타이드는 우선 합성적으로 또는 재조합적으로 합성된다. 그 다음, 시스테인 또는 시스테인 유사체 티올을 통하여 S-설포네이트를 약제학적 펩타이드에 부착하기 위하여 설피토라이시스(sulfitolysis) 반응을 사용하고, 설피토라이시스 반응을 따라 구배 컬럼 크로마토그래피와 같은 것에 의하여 약제학적 펩타이드 화합물을 정제한다. 그 다음, S-설포네이트 화합물을 사용하여 약제학적 펩타이드 화합물과 혈액 성분, 바람직하게는 혈청 알부민과의 사이에 컨주게이트를 형성시킨다.
- [0089] 알부민에의 컨주게이션을 위하여 반응기로 약제학적 펩타이드를 변형하는 방법은, 약제학적 펩타이드를 포함하는 다양한 요소의 성질에 의존하여, 매우 다양할 것이다. 합성 절차는 간단하고, 높은 수율을 제공하고, 고순도의 생산물을 허용하기 위하여 선택되어질 것이다. 일반적으로, 화학적으로 반응성인 기는 펩타이드 합성의 마지막 단계, 예컨대 활성 에스테르를 형성하기 위한 에스테르화에서 카복실기를 가지고 생성될 것이다. 변형된 인슐리노트로픽(insulinotropic) 펩타이드의 생산을 위한 특정한 방법들은 미국특허 제6,329,336호, 제6,849,714호 또는 제6,887,849호에 기술되어 있다.
- [0090] 본 발명의 컨주게이트의 제1 및 제2의 성분의 컨주게이션은 다양한 방법에 의하여 수행되어 질 수 있다. 하나의 가능성은 성분의 활성을 간섭하지 않는 위치에서 작용기를 직접적으로 약제학적으로 활성인 성분에 컨주게이션시키는 것이다. 본 발명에서 이해되는 바와 같이, 작용기는 분자의 특징적인 화학반응에 책임이 있는, 분자 중의 특정 원자의 그룹과 관련이 있다. 작용기의 예는 하이드록시, α -아알데히드, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아마이드, 카복사아미드(carboxamide), 일차, 이차, 삼차 및 사차 아민, 아민옥시, 아자이드, 아조(디이미드), 벤질, 카보네이트, 에스테르, 에테르, 글릴옥실릴(glyoxylyl), 할로알킬, 할로포닐, 이민, 이미드, 케톤, 말레이미드, 이소시아나이드, 이소시아네이트, 카보닐, 니트레이트, 니트라이트, 니트로, 니트로소, 페록사이드, 페닐, 포스핀, 포스페이트, 포스포노, 피리딜, 설파이드, 설포닐, 설피닐, 티오에스테르, 티올 및 산화된 3,4-디하이드록시페닐알라닌(DOPA) 기를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 다른 가능성은 호모- 또는 헤테로 이중기능기(bifunctional group)의 사용이라는 수단에 의하여 제1 및 제2의 성분을 컨주게이트 하는 것이다. 이중기능기는 우선 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드에 컨주게이트 될 수 있고, 그 다음 알부민에 컨주게이트 될 수 있으며, 또는 아니면, 이중기능기를 알부민에 컨주게이트하고 그 다음 그것을 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드에 컨주게이트 하는 것도 가능하다. 이러한 타입의 컨주게이트의 설명적인 예는 케톤-옥심으로 알려진 컨주게이트(US20050255042에 기술됨)을 포함하는데, 여기에서 컨주게이트의 제1 성분은 헤테로 이중기능기 중에 존재하는 케톤기에 결합하는 아민옥시기(aminoxy group)를 포함하며, 헤테로 이중기능기는 그 다음으로 컨주게이트의 제2 성분 중 아미노기에 결합하는 것이다.
- [0092] 다른 구현예에서, 본 발명의 컨주게이트의 제1 및 제2 성분을 컨주게이트하는데 사용되는 시약은 광분해적으로, 화학적으로, 열적으로 또는 효소적으로 처리될 수 있다. 이는 목표 세포 중에 존재하는 효소에 의하여 가수분해될 수 있는 연결시약(linking agent)을 사용하여, 약제학적으로 활성인 화합물이 오직 세포 내에서만 방출되게 하는 점에서 특히 흥미롭다. 세포 내적으로 처리될 수 있는 연결시약 종류의 예시는 W004054622, W006107617, W007046893 및 W007112193에 기술되어 있다.
- [0093] 본 발명의 컨주게이트의 성분들은 두 성분 모두의 기능 및 이차 구조가 변경되지 않고 유지되는 것을 조건으로 하여 화학적으로 변형될 수 있다. 펩타이드 체인의 화학적 변형 방법은 당업계에서 숙련된 자에게 널리 알려져 있으며, 시스테인 부분(moieties) 중에 존재하는 티올기를 통한 컨주게이션에 기반한 방법, 라이신 부분 중에 존재하는 일차 아미노기를 통한 컨주게이션이 기반한 방법(US6809186), N- 및 C-말단 부분을 통한 컨주게이션에 기반한 방법을 포함한다. 다른 화합물들의 커플링을 허용하는, 펩타이드 변형을 위한 적합한 시약은 다음을 포함한다: 글루타알데히드(이는 폴리펩타이드의 N-말단에의 화합물의 결합을 허용함), 카보디이미드(carbodiimide, 이는 폴리펩타이드의 C-말단에의 화합물의 결합을 허용함), N-말단 및 시스테인 부분의 활성

화를 허용하는 숙신이미드 에스테르(예컨대 MBS, SMCC), 타이로신 부분의 활성화를 허용하는 벤지딘(benzidine, BDB), 글리코실화된 단백질 중 탄수화물 부분의 활성화를 허용하는 페리오데이트(periodate).

[0094] 특정 구현예에서, A β (1-42) C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드는 추가적인 N-말단 Cys를 더 포함한다.

[0095] 다른 구현예에서, 혈청 단백질을 포함하는 변형된 펩타이드는, 변형된 펩타이드를 인 비트로 혈청 단백질에 공유적으로 부착하여 펩타이드의 반응기의 잔기가 혈청 단백질과 공유결합을 형성하도록 하는 것에 의하여 인 비트로(엑스 비트로) 합성될 수 있다. 일 구현예에서, 혈청 단백질은 대상체로부터 자가 유래(autologous)한 것이다. 특정 구현예에서, 혈청 단백질은 대상체로부터 분리된다. 특정 구현예에서, 대상체로부터 분리된 혈청 단백질은 그것이 변형된 단백질에 공유적으로 부착되기 전에, 혈액 중 및/또는 혈액 세포로부터 존재하는 다른 단백질로부터 정제된다. 이 구현예에서 따라 얻어진 컨주게이트는 혈청 단백질이 분리된 대상체, 또는 자가 유래(autologous) 대상체에 투여된다. 다른 구현예에서, 혈청 단백질은 재조합 혈청 단백질이다. 전형적으로 혈청 단백질은 재조합 알부민이다: 가장 전형적으로 혈청 단백질은 재조합 인간 알부민이다. 바람직한 구현예에서, 6.5 및 7.4 사이의 pH를 포함하는 조건 하에서 말레이미도기를 포함하는 변형된 펩타이드를 티올-함유 혈청 단백질, 전형적으로 알부민과 접촉시키고, 이에 의해 생리학적 조건 하에서 절단될 수 없는 안정한 티오에테르 결합을 전형적으로 형성하는 것에 의하여 본 발명의 컨주게이트를 형성시킨다. 특정 바람직한 구현예에서, 혈청 단백질은 재조합 인간 알부민 또는 재조합 소 알부민이다.

[0096] 일 구현예에서, 변형된 펩타이드는 그 C-말단이 아미드화(amidated) 된다. 다른 구현예에서, 변형된 펩타이드는 그 C-말단이 아미드화되지 않는다. 또한, 본 발명의 변형된 펩타이드, 컨주게이트 또는 화합물은 그와 같은 아미드화된 펩타이드를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 변형된 펩타이드는 그 N-말단이 아크릴화(acylated) 된다. 다른 구현예에서, 변형된 펩타이드는 그 N-말단이 아크릴화(acylated)되지 않는다. 또한, 본 발명의 변형된 펩타이드, 컨주게이트, 화합물은 그와 같은 아크릴화된 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0097] 펩타이드 N-말단의 시스테인 잔기 수단에 의한 면역성 펩타이드의 알부민에의 커플링은, 시스테인 잔기가 알부민 분자 중에서 발견되는 것과 같이 많은 수의 펩타이드 분자가 단일 알부민 분자에 커플링하는 것을 허용한다. 예를 들어, 소 혈청 알부민(BSA)은 35개 시스테인 잔기를 포함하는데, 이는 35개 만큼의 N-말단적으로 Cys-변형된 펩타이드에 의하여 점령될 수 있으며, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 펩타이드 분자를 가지는 컨주게이트를 획득하도록 한다.

[0098] 아니면, 면역성 펩타이드의 알부민에의 커플링은 일차 아미노기와 반응할 수 있는 호모 이중기능성 시약을 사용하여 수행되는데, 컨주게이트는 알부민 분자 중에서 발견되는 라이신 잔기 수 만큼의 펩타이드 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 소 혈청 알부민(BSA)은 58개의 라이신 잔기를 포함하는데, 이는 58개 만큼의 면역성 펩타이드에 의하여 점거될 수 있으며, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 또는 58개의 펩타이드 분자를 가지는 컨주게이트를 획득하게 한다.

[0099] 의약에 사용하기 위한 본 발명의 조성물

[0100] 본 발명의 컨주게이트는 A β (1-42)에 대하여 특이적인 항체의 양의 증가 및 혈청 내 아밀로이드 양의 감소를 이끌면서 대상체 중의 면역 반응을 유도하는 능력이 있다. 그러나, 숙련된 자에게 알려진 바와 같이, 컨주게이트의 항원성을 증가시키기 위한 어주버트 사용에 의하여 면역 반응이 증가될 수 있다. 따라서, 다른 관점에서 본 발명은, 본 발명의 컨주게이트와 어주버트를 포함하는 의약에 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

[0101] 본 명세서에서 사용되는 용어 "어주버트"는 대상체에 대한 해로운 효과 없이 대상체 중의 면역 반응을 증진, 개선 또는 다르게 조절하기 위하여 본 발명의 컨주게이트와 조합될 수 있는 면역조절성 물질을 언급한다.

[0102] 어주버트는 임파상 세포 조달 및 사이토카인 유도과 같은 몇몇 메카니즘을 통하여 그들의 면역 조절적 성질을 행사한다. 사이토카인 어주버트는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자, 인터루킨-12, GM-CSF, 합성의 뮤라밀(muramyl) 디펩타이드 유사체 또는 모노포스포릴 리피드 A를 제한없이 포함한다. 어주버트의 추가적인 예는 완전 프로이드 어주버트, 불완전 프로이드 어주버트, QS21, 알루미늄 하이드록사이드 겔, MF59, 칼슘 포스페이트, 리포신(liposyn), 사포닌, 스쿠알렌, L121, MPL(emulsigen monophosphoryl lipid A), 폴리소베이트(polysorbate) 80, CT(cholera toxin), LTK 및 LTK63를 포함하는 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 어주버

트는 인간에의 투여를 위하여 승인된 것과 같은, 알루미늄 하이드록사이드 겔, 칼슘 포스페이트 및 MF59와 같은 것이다.

- [0103] 더 특정한 구현예에서, 어주번트는 예컨대 알루미늄 하이드록사이드 겔 및 CT와 같이 Th2 타입 면역 반응을 자극하는 타입의 것이다. Th2 타입 반응 유도에 의하여, IgG₁ 및 IgG_{2b} 항체 클래스의 생산뿐만 아니라, IL-4, IL-10 및 TGF-베타와 같은 항-염증성 사이토카인 생산이 선호된다. TH2-타입 반응을 우세하게 일으키는데 사용하기 위한 바람직한 어주번트는 예를 들어 포스포폴리머(Guy et al. 1998, Vaccine 16:850-856) 및 알루미늄(예컨대, aluminium hydroxide, aluminium phosphate)를 포함한다.
- [0104] 본 발명은 어주번트로서 일반적으로 사용되는 "하이드록사이드" 또는 "포스페이트" 어주번트 중 임의의 것을 사용할 수 있다. "수산화알루미늄"으로 알려져있는 어주번트는 전형적으로 알루미늄 옥시하이드록사이드 염인데, 보통 적어도 부분적으로는 결정형이다. "알루미늄 포스페이트"로서 알려져 있는 어주번트는 전형적으로 알루미늄 하이드록시포스페이트인데, 이는 종종 적은 양의 설페이트(즉, 알루미늄 하이드록시포스페이트 설페이트)를 포함한다. 이들은 침전에 의하여 얻어질 수 있으며, 침전 중의 반응 조건 및 농도가 염 중 하이드록시기에 대한 포스페이트의 치환 정도에 영향을 미친다.
- [0105] 섬유상 형태(예컨대, 현미경투과전자현미경에서 보여지는 바와 같이)는 수산화알루미늄 어주번트에 대해 전형적이다. 수산화알루미늄 어주번트의 pI는 전형적으로 11에 관한 것인데, 즉 어주번트 그 자체는 생리학적 pH에서 양성적인 표면 전하를 가진다. pH 7.4에서 Al³⁺ mg 당 1.8-2.6 mg 사이의 단백질 흡착 능력이 수산화알루미늄 어주번트에 대하여 보고되어 왔다.
- [0106] 알루미늄 포스페이트 어주번트는 일반적으로 0.3 및 1.2 사이, 바람직하게는 0.8 및 1.2 사이, 보다 바람직하게는 0.95±0.1의 PO₄/Al 몰비를 가진다. 알루미늄 포스페이트는, 특히 하이드록시포스페이트 염에 대하여 일반적으로 무정형일 것이다. 전형적인 어주번트는 0.6mg Al³⁺/ml에서 포함되는 0.84 및 0.92 사이의 PO₄/Al 몰비를 가지는 무정형의 알루미늄 하이드록시포스페이트이다. 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 미립자(예컨대, 현미경투과전자현미경에서 보여지는 바와 같은 평판-유사 형태)일 것이다. 미립자의 전형적인 직경은 임의의 항원 흡착 이후에 0.5-20 μm(예컨대, 약 5-10 μm)이다. pH 7.4에서의 Al³⁺ mg 당 0.7-1.5 mg 사이의 단백질 흡착능력이 알루미늄 포스페이트 어주번트에 대하여 보고되어 왔다.
- [0107] 알루미늄 포스페이트의 전하 영점(PZC)은 하이드록시에 대한 포스페이트 치환의 정도와 반비례로 관련되는데, 이러한 치환의 정도는 침전에 의한 염 생성을 위하여 사용되는 반응물의 농도 및 반응 조건에 의존하여 변할 수 있다. PZC는 또한 용액 중의 자유 포스페이트 이온 농도의 변화에 의하여(보다 많은 포스페이트 = 보다 산성인 PZC) 또는 히스티딘 완충액(PZC를 보다 염기성으로 만듦)와 같은 완충액의 첨가에 의하여 또한 변경된다. 본 발명에 따라 사용되는 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 4.0 and 7.0사이, 보다 바람직하게는 5.0 and 6.5사이, 예컨대 약 5.7의 PZC를 가진다. 본 발명의 조성물을 만들기 위하여 사용되는 알루미늄 염의 현탁액은 완충액(예컨대, 포스페이트 또는 히스티딘 또는 트리스 완충액)을 함유할 수 있는데, 그러나 이것이 언제나 필수적인 것은 아니다. 현탁액은 바람직하게는 살균된 무발열원(pyrogen-free)이다. 현탁액은 예컨대 1.0 및 20 mM 사이, 바람직하게는 5 및 15 mM 사이, 보다 바람직하게는 약 10 mM의 농도에서 존재하는 자유 수용성 포스페이트 이온을 포함할 수 있다. 현탁액은 또한 염화나트륨을 포함할 수 있다.
- [0108] 본 발명은 수산화알루미늄 및 알루미늄 포스페이트 둘 모두의 혼합물을 사용할 수 있다. 이 경우, 하이드록사이드보다 더 많은 알루미늄 포스페이트가, 예컨대 적어도 2:1의 중량비로, 예컨대 >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, 등의 중량비로 존재할 수 있다.
- [0109] 환자에게 투여되기 위한 조성물 중 Al⁴⁺의 농도는 바람직하게는 10mg/ml 미만, 예컨대 <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml 등이다. 바람직한 범위는 0.3 및 1 mg/ml 사이이다. 최대 0.85mg/투여량이 선호된다.
- [0110] 반면에, 어주번트는 면역 반응의 Th1 타입을 자극하는 형태의 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 타입 1 어주번트 또는 Th1 어주번트는, Th1 (타입 1) 반응(또는 상대적으로 약한 Th2 (타입 2) 반응과 함께, type 1 반응을 향해 치우치거나 또는 빗겨진 반응)을 자극하는 어주번트를 정의하기 위해 의도된 것이다. Th1 면역 반응(감마 인터페론(IFN-γ)의 생산을 특징으로 하고, 바이러스 및 세포 내 박테리아에 대한 보호적 면역성과 관련됨)은 바람직할 수 있고, 그러므로 또 다른 특정 구현예에서, 어주번트는 면역 반응의 Th1 타입을 자극하

는 형태의 것이다. Th1-타입 반응을 우세하게 일으키는데 사용하기 위한 바람직한 어주번트는 완전 프로이드 어주번트, 모노포스포릴 리피드 A, 3-데-O-아크릴레이티드 모노포스포릴 리피드 A (3D-MPL), 알루미늄 염, CpG-함유 올리고뉴클레오타이드, 면역자극성 DNA 서열, 사포닌, 몬타나이드(Montanide) ISA 720 (Seppic, France), SAF, ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), SBAS-3, SB로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수도 있다. 다른 바람직한 Th1 어주번트는 SAF(Chiron, Calif., United States), SBAS 어주번트 시리즈(예컨대, SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium로부터 이용가능한 SBAS-2 또는 SBAS-4), Detox(Corixa, Hamilton, Mont.), RC-529(Corixa, Hamilton, Mont.) 및 미국 특허 제6,113,918호 및 제6,355,257호에 기술된 것들과 같은 다른 아미노알킬 글루코사아미나이드(glucosaminide) 4-포스페이트(AGPs)를 포함하는데, 그 개시는 참조에 의하여 그 전체로서 본 명세서에 혼입된다.

[0111] 본 발명은 또한 Th1 및 Th2 타입 양자 모두를 자극하는 어주번트 조합의 사용을 의도한다. 바람직한 구현예에서 Th1 및 Th2 타입 양자 모두를 자극하는 어주번트는 사포닌이다. 사포닌은 넓은 범위의 식물 종의 수피, 잎, 줄기, 뿌리 및 심지어 꽃 중에서 발견되는 스테롤 글리코사이드 및 트리테르페노이드 글리코사이드의 혼성의 그룹이다. 켈라야(Quillaia saponaria Molina) 나무의 수피로부터 온 사포닌은 어주번트로서 널리 연구되어 왔다. 사포닌은 또한 스밀락스 오르나타(Smilax ornata (sarsapilla)), 집소필리아 파니쿨라타(Gypsophilla paniculata (brides veil)) 및 사포나리아 오피시날리스(Saponaria officinalis (soap root))로부터 상업적으로 얻어질 수 있다. 사포닌 어주번트 제제는 ISCOM과 같은 리피드 제제뿐만 아니라, QS21와 같은 정제된 제제를 포함한다. 사포닌 조성물은 HPLC 및 RP-HPLC를 사용하여 정제되어 왔다. QS7, QS 17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B 및 QH-C를 포함하는, 이러한 기술을 사용하여 특이적으로 정제된 분획이 동정되어져 왔다. 바람직하게는 사포닌은 QS21이다. 사포닌 제제는 또는 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함할 수도 있다. 사포닌 및 콜레스테롤의 조합은 면역 자극 복합체(ISCOMs)라고 불리우는 독특한 입자를 형성하기 위하여 사용될 수 있다. ISCOM는 전형적으로 포스페티딜에탄올아민 또는 포스페티딜콜린과 같은 인지질을 또한 함유한다. 알려진 임의의 사포닌을 ISCOM 중에 사용할 수 있다. 바람직하게는 ISCOM는 일 이상의 Quila, QHA 및 QHC를 함유한다. ISCOM는 참조번호(refs.) 45-47 중에 더 기술된다. 임의로, ISCOMS는 추가적인 세제를 포함하지 않을 수 있다. 어주번트에 근거한 사포닌의 발전의 검토는 문헌(Barr et al. (Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 32:247-271) 및 Sjolander et al. (Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 32:321-338) 중에서 찾을 수 있다.

[0112] 본 발명에 따른 컨주게이트는 컨주게이트되지 않은 펩타이드와 비교하여 향상된 약물동태학적 성질을 가질 수 있다. 펩타이드의 약물동태학적 성질은, 예컨대 그것의 흡수 및 배설 비율, 그것의 조직 분배 동태, 그것의 대사 비율 및 그것의 독성을 포함한다. 전형적으로 본 발명의 컨주게이트는, 컨주게이트되지 않은 펩타이드와 비교하여, 감소된 배설 비율 및/또는 증가된 인 비보 순환 반감기를 가진다.

[0113] 본 발명 중의 사용을 위한 바람직한 컨주게이트는 다음을 포함한다:

펩타이드	캐리어	어주번트
NH ₂ -MVGGVVIA-COOH (A β 35-42)	알부민	재수화젤 HPA
NH ₂ -GLMVGGVVIA-COOH (A β 33-42)	알부민	재수화젤 HPA
NH ₂ -MVGGVVIA-COOH (A β 35-42)	알부민	아비스코(Abisco)
NH ₂ -GLMVGGVVIA-COOH (A β 33-42)	알부민	아비스코(Abisco)
NH ₂ -CMVGGVVIA-COOH (A β 35-42Cys)	알부민	재수화젤 HPA
NH ₂ -CGLMVGGVVIA-COOH (A β 33-42Cys)	알부민	재수화젤 HPA
NH ₂ -CMVGGVVIA-COOH (A β 35-42Cys)	알부민	아비스코(Abisco)
NH ₂ -CGLMVGGVVIA-COOH (A β 33-42Cys)	알부민	아비스코(Abisco)
NH ₂ -CGLMVGGVV-COOH (A β 33-40Cys)	알부민	재수화젤 HPA
NH ₂ -CGLMVGGVV-COOH (A β 33-40Cys)	알부민	아비스코(Abisco)

[0114]

[0115] 본 발명의 약제학적 방법

[0116] 설명의 시작부분에서 이미 언급한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병의 치료에 유용한 것으로 입증되었다. 그러므로, 다른 관점에서, 본 발명은 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병의 치료를 위한, Aβ (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민을 포함하는 컨주게이트 또는 Aβ (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민 및 어주번트를 포함하는 조성물과 관련된다.

- [0117] 다른 관점에서, 본 발명은 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병의 치료를 위한 의약의 제조를 위한, A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민을 포함하는 컨주게이트 또는 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민 및 어주번트를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0118] 다른 관점에서, 본 발명은 그에 대한 요구가 있는 대상체에게 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민을 포함하는 컨주게이트 또는 A β (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드 및 알부민 및 어주번트를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0119] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 약제학적 유효량의 본 발명의 조성물 또는 이를 포함하는 약제학적 조제물을 상기 치료의 필요가 있는 대상체에게 투여하여 얻어지는, 질병과 관련된 일 이상의 증상의 개선을 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 사용되는 "치료"란 포유동물, 특히 인간의 질병, 질환 또는 상태의 임의의 치료를 포괄하며, 다음을 포함한다: (a) 질병 또는 상태에 대한 소인이 있을 수 있으나 아직 그것을 가진 것으로 진단되지 아니한 대상체 중에서 발생하는 질병 또는 상태의 예방; (b) 질병 또는 상태를 억제, 즉 그것의 발전을 저지; 또는 (c) 질병 또는 상태를 경감, 즉 질병 또는 상태의 쇠퇴 또는 질병 또는 상태의 일 이상의 증상의 완화를 일으킴. 상기 방법에 의하여 치료되는 대상체의 군집은 질병 또는 상태의 발전의 위험이 있는 대상체 뿐만 아니라, 바람직하지 않은 상태 또는 질병으로부터 고통받는 대상체를 포함한다. 따라서, 당업계에서 숙련된 자는 치료가 환자의 상태를 개선할 수도 있지만, 그러나 질병의 완전한 치유는 아닐 수도 있다는 것을 이해한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "질환" 및 "질병"은 신체의 기능을 손상시키며 치명적일 수도 있는 비정상적인 또는 병리학적인 상태를 언급하기 위하여 상호교환적으로 사용된다.
- [0120] 문구 "약제학적 유효량"이란 병리학의 특징에 있어서 임상적으로 중요한 변화를 예방하고, 바람직하게는 적어도 약 25 퍼센트, 보다 바람직하게는 적어도 50 퍼센트, 가장 바람직하게는 적어도 90 퍼센트 감소시키기 위한 충분한 양을 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용된다. 본 발명과 관련된 바와 같이, 상기 용어는 알츠하이머 병과 같이 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병의 일 이상의 증상을 완화시키거나 또는 역전시키는 데 충분한 양을 또한 의미할 수도 있다. 특히, 치료의 "약제학적 유효량"은 다음의 증상 중의 적어도 하나의 완화, 감소 또는 제거를 야기할 수도 있다: 기억 손상, 지속적인 슬픔 또는 화, 공허한 느낌, 무희망, 비판, 죄의식, 무가치함, 무력함, 한때 즐겨왔던 취미 및 활동에 대한 흥미 및 기쁨의 상실감소된 에너지, 또는 피곤, 집중, 기억 또는 결단의 곤란함, 불면증, 이른 아침 깨어남, 또는 과다수면, 식욕 및/또는 체중 상실 또는 과식 및 체중 증가, 죽음 또는 자살 생각 및 자살 시도, 섬없음, 화를 잘 냄, 및 두통, 소화불량 및 만성적 통증과 같은 치료에 반응하지 아니하는 지속적인 물리적 증상. 단독으로 투여되는, 개별 활성 성분과 관련하여 적용되는 경우, 상기 용어는 그 성분 단독을 의미한다. 조합에 적용되는 경우, 상기 용어는 조합으로, 순차적으로 또는 동시에 투여되는지 간에, 약제학적 효과를 야기하는 활성 성분의 조합된 양을 의미한다.
- [0121] 용어 "대상체"란 동물, 바람직하게는 비영장류를 포함하는 포유동물(예컨대, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 또는 마우스) 및 영장류(예컨대, 원숭이 또는 인간)를 의미한다. 바람직한 구현예에서, 대상체는 개이다. 보다 바람직한 구현예에서, 대상체는 영장류인데, 보다 더 바람직한 구현예에서 상기 영장류는 인간이다.
- [0122] 본 발명의 문맥에서, "아밀로이드 단백질의 침전과 관련된 질병"은 하나의 기관에 제한될 수도 있는 즉, "국지화된 유전분증"일 수도 있고 또는 "조직적인 유전분증"으로 표시되는 수개의 기관으로 퍼지는 것일 수도 있는 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병을 포함한다. 본 발명에 따른 조성물을 가지고 치료될 수 있는 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병은 표 1에 나타난 질병을 제한 없이 포함한다.

【표 1】

질병	특징적인 단백질
알츠하이머 병	베타 아밀로이드
IBM(Inclusion body myositis)	베타 아밀로이드
제2형 당뇨병	IAPP(Amylin)
파킨슨병	알파-시누클레인 (Alpha-synuclein)
유전성 스폰지형태 뇌질환(Transmissible spongiform encephalopathy, Mad Cow Disease)	프리온
헌팅톤 병	헌팅톤
갑상선의 골수암(Medullary carcinoma of the thyroid)	칼시토닌(Calcitonin)
심장 부정맥(Cardiac arrhythmias)	심방나트륨 배설인자(Atrial natriuretic factor)
아테롬성 동맥경화증	아포리포단백질 AI
류마티스성 관절염	혈청 아밀로이드 A
대동맥 중앙 아밀로이드(Aortic medial amyloid)	메딘(Medin)
프로락틴선종(Prolactinomas)	프로락틴(Prolactin)
가족 아밀로이드 다신경장애(Familial amyloid polyneuropathy)	트랜스티레틴(Transthyretin)
유전성 비신경병성 조직적 유전분증(Hereditary non-neuropathic systemic amyloidosis)	리소자임(Lysozyme)
투석 관련 유전분증(Dialysis related amyloidosis)	β 2-마이크로글로불린
핀란드 유전분증(Finnish amyloidosis)	겔솔린(Gelsolin)
격자형 각막 이영양증(Lattice corneal dystrophy)	케라토에피텔린(Keratopithelin)
아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy)	베타 아밀로이드
아밀로이드 맥관병증(아이슬랜드 타입)	시스타틴(Cystatin)
조직적 AL 유전분증(Systemic AL amyloidosis)	면역 글로불린 경쇄 AL

[0123]

[0124]

제2차 유전분증은, FMF(Familial Mediterranean Fever)에서 또한 나타나는 제2차 유전분증의 잘 알려진 형태 및 장기 혈액투석 환자에서 발견되는 조직적인 유전분증의 다른 형태를 포함하는, 만성적 감염(결핵과 같은 것) 또는 만성적 염증(관절염과 같은 것)과 관련될 수도 있다. 유전분증의 국지적 형태는 당뇨병 제II형 및 그것의 임의의 관련 질환, 스크레피와 같은 신경퇴행성 질병, 소 스폰지형태 뇌염, 크로이츠펠트야코브병, 알츠하이머병, 대뇌 아밀로이드 맥관병증 및 프리온 단백질 관련 질환을 제한 없이 포함한다. 아밀로이드 질환의 특징은 주로 미소섬유로 구성된 아밀로이드 플라그의 기관 내 축적인데, 미소섬유는 또한 특징적인 미소섬유 단백질 또는 펩타이드로 구성된다.

[0125]

그러므로, 특정 구현예에서, 아밀로이드의 축적과 관련된 질병은 알츠하이머병, 크로이츠펠트야코브병, 대뇌 아밀로이드 맥관병증 및 프리온 단백질 관련 질환 및 근육 퇴화로부터 선택된다.

[0126]

숙련된 자가 이해할 것과 같이, 의약에 사용하기 위한 본 발명의 조성물 또는 키트에 관한 특정 구현예는, 상기 조성물 또는 키트가 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병의 치료를 위하여 사용되는 경우에 또한 적용 가능하다. 그러므로, 컨주게이트 또는 조성물을 사용하는 본 발명의 약제학적 방법에 관한 특정 구현예는:

[0127]

* $A\beta$ (1-42)의 C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드는 $A\beta$ (35-42) (SEQ ID NO: 2), $A\beta$ (33-42) (SEQ ID NO: 3), $A\beta$ (33-40) (SEQ ID NO: 4)으로부터 선택된다;

[0128]

* $A\beta$ (1-42) C-말단 영역으로부터 유래한 펩타이드는 추가적인 N-말단 Cys를 더 포함한다;

[0129]

* 알부민은 소 혈청 알부민이다.

[0130]

* 어주번트는 바람직하게 Th1 또는 Th2 타입 어주번트이다, 그리고

[0131]

* 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 키트로부터 온 활성 성분은 격주로 투여된다.

- [0132] 이들 특정 구현예의 상세한 설명은 이전 문단들 중에서 발견될 수 있다.
- [0133] 다른 특정 구현예에서, 아밀로이드 단백질의 축적과 관련된 질병은 알츠하이머병, 크로이츠펔츠야코브병, 대뇌 아밀로이드 맥관병증 및 프리온 단백질 관련 질환으로부터 선택된다.
- [0134] 본 발명의 컨주게이트 또는 본 발명의 조성물은 다양한 방법, 예컨대 국지적으로, 전체적으로 또는 목표 부위로 직접(국지화된 방법) 뿐만 아니라, 정맥 내, 복막 내, 피하, 근육 내, 국소적, 피부 내, 구강적, 코 내부 또는 기관지 내부로 투여될 수 있다. 활성 성분을 투여하는 다양한 방법들, 사용할 수 있는 부형제, 그들을 제조하는 방법에 관한 검토는 문헌(Tratado de Farmacia Galenica, C. Fauli Trillo, Luzan 5, S.A. de Ediciones, 1993 and in Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000)) 중에서 발견될 수 있다.
- [0135] 본 발명에 있어서 "국소화된 방법"이란 인간 또는 동물의 신체의 특정 장소에의 본 발명의 컨주게이트를 국소 투여하는 것으로서 이해된다. 바람직하게, 투여는 빠른 혈액 흐름이 있는 곳, 예컨대, 정맥 내, 말초 또는 중추 혈관에서 일어날 것이다. 다른 방법은 투여가 서방성 방출 기술 또는 보호적인 매트릭스와 결합되는 사용을 발견할 것이다. 또한, 코 투여를 통한 점막 면역화는 그와 같은 투여 경로가 Th2 타입 반응을 선호한다는 것이 알려져 있기 때문에 적합한 방법이다.
- [0136] 투여량 처방계획은 의사 및 임상적 인자에 의하여 결정될 것이다. 의약에서 잘 알려져 있듯이, 투여량은 환자의 물리적 특징(연령, 크기, 성별), 사용되는 투여 방법, 질병의 심각성, 사용되는 특정 화합물 및 개인의 약동학적 성질을 포함하는 많은 인자에 의존한다.
- [0137] 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 키트로부터 온 활성 성분은 격주로 투여된다.
- [0138] 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 키트로부터 온 활성 성분은 의약 중 그들의 사용을 위하여 유용함이 입증되었다.
- [0139] 의약 중 사용을 위하여, 본 발명의 조성물은, 정제된 형태 또는 부가적인 활성 약제와의 조합으로, 프로드럭, 염, 용매화물 또는 격자(clathrate)의 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 약제학적 관점에서 허용가능한 부형제와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에 있어서 사용을 위한 바람직한 부형제는 당류, 전분, 셀룰로오스, 검 및 단백질을 포함한다.
- [0140] 숙련된 자가 이해할 것과 같이 본 발명의 조성물은 기술의 상태에서 알려진 통상적인 과정에 의하여 고체(예컨대, 정제, 캡슐, 당-코팅 정제, 과립, 좌약, 액체 형태를 제공하도록 재구성될 수 있는 결정형 또는 무정형 살균 고체 등), 액체(예컨대, 용액, 현탁액, 유제, 엘릭서제(elixir), 로션, 연고 등) 또는 반고체(젤, 연고, 크림 등)의 약제학적 투약 형태로 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체가 기술 상태에서 알려져 있으며, 포스페이트 완충된 염수 용액, 물, 오일/물 유화제와 같은 유제, 다른 종류의 습윤제, 살균 용액 등을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0141] **도 1**은 A β 펩타이드의 면역 주입의 계획(하단의 화살표)을 나타내는 그림인데, 선 아래의 면역화의 번호, 혈액 시료 채집(상단의 화살표)을 나타내고, 각 시료 채집에 대한 주(week)에 있어서 상응하는 시점(W)을 나타내고, CFS 시료 채집은 주 0과 주 13 중에 있다(이중 화살표). **(A)**는 A β (x-42) 펩타이드의 **(B)**는 A β (x-40) 펩타이드의 면역화 주입 계획이다. (A)에서, 왼쪽 프레임은 모든 동물에 의하여 따라진 계획을 나타내고, 오른쪽 프레임은 오직 그룹 C 및 D에게만 영향을 미친 추가적인 간섭을 나타낸다.
- 도 2:** (A - C). 혈장 항-A β 항체 역가의 전개. A) 혈장 시료의 항-A β 항체 역가를 단일클론 항체 6E10의 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 당량(equivalent)으로서 표시한다. B) 혈장 시료의 항-A β 항체 역가를 그들의 EC50으로 표시한다. D) 혈장 시료의 항-A β 항체 역가를, 블랭크 웰의 평균 흡광도보다 흡광도가 3배 더 큰 최대 혈장 희석액의 역에 의하여 표현한다. 상이한 시점(in weeks)을 수평선 축 중에 표시한다. 각 선은 설명에서 표시된 바와 같이 하나의 동물을 나타낸다. 동물의 각 그룹에 투여된 제제는 합성 펩타이드-블루 캐리어 플러스 재수화겔 HPA (A), 합성 펩타이드-블루 캐리어 플러스 아비스코-300 (B), 합성 펩타이드-BSA 플러스 재수화겔 HPA (C), 및 합성 펩타이드-BSA 플러스 아비스코-300 (D)이다. 더 짧은 연속 선들은 13번째 주에서 치료가 멈춰진 비 반응자 동물(그룹 A 및 B)에 해당한다. 그룹 C 중의 동물들은 파선 및 상응하는 개별 기호에 의해 표시된다. 그룹

D 중의 것들은 점선 및 상응하는 개별 기호에 의해 표시된다.

도 3 (A-B). 혈장 A β -펩타이드 농도의 전개. A)는 다른 시점에서 A β 1-42 펩타이드의 혈장 농도의 전개를 나타낸다. B)는 A β 1-40 펩타이드의 혈장 농도의 다른 시점에서의 전개를 나타낸다. 수평선 축은 3.125 pg / ml에서 Y 축을 가로지른다. 3.125 아래의 값은 그래프에서의 명확성을 위하여 -5 pg / ml로 나타내었다. 상이한 시점(in weeks)을 수평선 축 위에 나타내었다. 각각의 선은 설명에서 표시된 바와 같이 하나의 동물을 나타낸다. 4개 그룹(A, B, C, 및 D) 각각은 다른 백신 제제를 투여받았다. 더 짧은 연속선은 치료가 13번째 주에서 멈춰진 비 반응자 동물(그룹 A 및 B)에 해당한다. 그룹 C의 동물은 파선 및 상응하는 개별 기호로서 표시된다. 그룹 D 중의 것들은 점선 및 상응하는 개별 기호로 표시된다.

도 4. 각각의 실험 그룹에 대한 면역-이전 상태에 관한 펩타이드 농도 및 혈장 항체 역가 변화 비율의 전개. 시점(in weeks)을 수평선 축 위에 나타낸다. 파선은 면역-이전 상태(WO)와 관련하여 상이한 시점에서의 A β 1-42 펩타이드의 혈장 농도의 비율의 전개를 나타낸다. 점선은 면역-이전 상태(WO)와 관련하여 상이한 시점에서의 A β 1-40 펩타이드의 혈장 농도의 비율의 전개를 나타낸다. 연속선은 점선은 면역-이전 상태(WO)와 관련하여 상이한 시점에서의 혈장 항-A β 항체 역가의 비율의 전개를 나타낸다. 모든 비율에 대하여 수직축 상의 값은 그룹 중 3개 동물의 합산을 나타낸다. 혈장 항-A β 항체 역가의 비율의 값은 그래프의 명확성을 위하여 20으로 나누었다.

도 5. 혈장 항-A β 33-40 항체 역가의 전개. **A)** 혈장 시료의 항-A β 항체 역가는 항-A β 40 (SAR 22) 항체의 ng/ μ l에 대한 당량으로서 표시한다. **B)** 혈장 시료의 항-A β 역가는 그들의 EC50으로 표시한다. 상이한 시점(in weeks)은 수평선 축 중에 나타낸다. 각각의 선은 설명에 표시된 바와 같이 하나의 동물을 나타낸다(검은 색 중에 A1-A3 및 흰색 중에 B1-B3). 두 그룹(A 및 B) 각각은 다른 백신 제제를 투여받았다.

도 6는 대조군과 비교하여 백신화의 2개의 그룹 중 가용성 형태 또는 비가용성 형태의 펩타이드 농도를 보여주는 그래프이다. Vacc.1은 A β X-42 + BSA + Th2-타입 어주번트에 해당하고, Vacc.2는 A β X-42 + BSA + 혼합된 Th1 / Th2-타입 어주번트에 해당한다. 컬럼 (1)은 A β 1-40 가용성 형태에; (2)는 A β 1-42 가용성 형태에; (3)은 A β 1-40 비가용성 형태에, 그리고 (4)는 A β 1-42 비가용성 형태에 해당한다.

도 7은 대조군과 비교하여 백신화된 그룹의 가용성 형태 중의 펩타이드의 농도를 보여주는 그래프이다. (A)는 가용성 A β 1-40 펩타이드에, 그리고 (B)는 가용성 A β 1-42 펩타이드에 해당하는 반면에, (1)은 소뇌 시료를; (2)는 전두부를; (3)은 내후각뇌(entorhinal)를 그리고 (4)는 관자놀이 뇌 영역을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

다음의 방법 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라 설명적인 것으로 해석되기 위한 것이다.

실시예

베타-아밀로이드 단백질의 C-말단 서열을 이용한 개의 면역화는 안전하며 혈액으로부터 단백질을 제거한다.

실시예 1 : A β (x-42) 펩타이드로 면역화

I. 재료 및 방법

1. 동물의 특징

각 성별의 12살의 비글 개를 본 발명에 사용하였다. 상기 동물의 특징들은 표 1에 요약하였다. 이들은 상업적 공급원으로부터 온 것이고 사육용 산티아고 대학 켄넬에서 사육되어 온 것이었다. 실험 동안 동물들은 실내/실외 접근이 자유로운 3개의 집단 켄넬에서 사육되었고 임의의 조제 개 사료 및 물을 공급받았다. 동물들은 물리적 및 신경학적 실험, 혈액 생화학 값 및 헤모그램을 포함하는 실험의 시작 직전에 철저히 승인되었고 건강한 것으로 선언되었다.

동물들은 각 그룹에게 궁극적으로 할당된 처리에 대해 알지 못하는 수의학 임상의로 하여 4가지 그룹(A, B, C 및 D; n = 3)으로 배정되었다. 동물들은 백신에 대한 반응의 임상적 신호 발현에 대하여 매주 검사되었다. 세 번째 면역화 후에 혈액 생화학 및 헤모그램을 다시 포함하는 추가적인 완벽한 승인을 수행하였다.

동물들은 동물 취급에 관한 유럽 및 스페인 법률(86/609/EU, Real Decreto 1201/2005)에 따라 취급되었으며 동물의 고통을 최소화하기 위한 모든 노력을 행하였다. 본 연구는 산티아고 대학 윤리 위원회의 승인을 받았다.

2. 면역원의 준비

4가지 다른 백신 제제 중으로 혼입된, 항원으로서 합성의 Aβ(35-42) 펩타이드 (SPDP 통해 컨주게이트될 때 추가적인 N-말단 Cys이 추가됨)(0.4 mg/주입)를 동물의 면역화를 위해 사용하였다. 이 제제의 각각은 블루 캐리어(BC; Pierce, Rockford, IL; 그룹 A 및 B) 또는 보바인 혈청 알부민(BSA; 시그마, 마드리드, 스페인; 그룹 C 및 D)인 단백질 담체; 및 재수화겔 HPA(RH; Quimibios (제조사는 Reheis), 바르셀로나, 스페인; 그룹 A 및 C) 또는 아비스코-300(AB; Isconova AB, 옘살라 사이언스 파크, SE-751 83 옘살라, 스웨덴; 그룹 B 및 D)인 어주번트를 함께 구비하였다.

2.1. SPDP를 이용한 합성 펩타이드의 BSA로의 커플링:

첫째로, 20 mM의 SPDP(*N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate; 50 mg/8 ml DMSO) 스톡 용액을 준비하였다. 그 다음, 5 mg의 BSA를 1 ml의 PBS/5mM EDTA pH 8에 용해시키고, 20 mM SPDP 용액 50 μl를 BSA에 첨가하였다. 용액을 상온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 이후, 반응 부산물 및 과다한 비반응 SPDP 시약을 제거하기 위하여 SPDP-변형된 BSA에 대한 PBS/EDTA 및 완충액 교환으로 탈염 컬럼을 평형화시켰다.

이후, 다음의 프로토콜을 사용하여 SPDP-변형의 레벨을 측정하였다:

- PBS를 사용하여 SPDP-변형 및 탈염된 BSA 100 μl를 1 ml로 희석.
- 343 nm에서의 단백질 심플의 흡광도를 PBS/EDTA 블랭크와 비교하여 측정 및 기록(3회 실험).
- 15 mg/ml DTT 10 μl를 SPDP-변형된 단백질 시료 1 ml에 가하고, 혼합.
- 정확히 15분 후, 343 nm에서 감소된 시료의 흡광도를 측정 및 기록.
- 다음의 수식을 사용:

$$\frac{(Ave. A_{343} \text{ after DTT}) - (Ave. A_{343} \text{ before DTT})}{8080} \times \frac{MW \text{ BSA}}{mg \text{ of BSA}} = X$$

만일 X 가 5 및 6.5의 사이라면, 합성의 펩타이드 2 mg를 SPDP-변형된 BSA 5 mg에 첨가한다.

SPDP-변형의 레벨이 결정된 후에, 반응 혼합물을 18-24시간 동안 밤새 교반하면서 인큐베이션하고, 반응 혼합물을 동결-건조시켰다.

2.2. 글루타알데히드를 사용한 합성 펩타이드의 블루 캐리어로의 커플링:

반응 바이알에 pH 10 붕산염 완충액 2 ml 및 블루캐리어 66 μl(200 mg/ml)를 첨가하고 부드럽게 혼합하였다. 그 다음, 합성 펩타이드 12 mg을 반응 바이알에 첨가하였다. 동시에, pH 10 붕산염 완충액을 첨가하여 글루타알데히드를 0.3%로 희석시켰다.

그 다음, 신선하게 준비된 0.3% 글루타알데히드 용액 1 ml를 상온에서 혼합하면서 반응 바이알에 천천히 첨가하여, 어둠 속 상온에서 2시간 동안 반응하도록 하였다(용액이 황색으로 변하였다). 반응하지 않은 글루타알데히드를 차단하기 위하여, 추가 30분 동안 상온에서 인큐베이션하면서, 1M 글리신 250 μl를 반응 바이알에 첨가하고 부드럽게 혼합하였다. 그 이후, 반응 혼합물을 PBS로 평형화시킨 탈염 컬럼으로 이전시켰다. 반응 혼합물을 동결 건조하고 적당한 농도로 용해시켰다.

이와 같이, 본 발명에서 사용된 4가지 다른 제제는 다음과 같았다:

- 재수화겔 HPA 200 마이크로리터 및 블루캐리어에 컨주게이션된 A베타35-42 400 마이크로그램.
- Abisco-300 200 마이크로리터 및 블루캐리어에 컨주게이션된 A베타35-42 400 마이크로그램.
- 재수화겔 HPA 200 마이크로리터 및 BSA에 컨주게이션된 A베타35-42 400 마이크로그램.
- Abisco-300 37 마이크로리터 및 BSA에 컨주게이션된 A베타35-42 400 마이크로그램.

- [0173] 사용된 합성 펩타이드는 다음과 같았다:
- [0174] • 글루타알데히드로 블루캐리이에 컨주게이션된 경우:
- [0175] 1. 개 (및 마우스: 아래 참조)에 있어서, A β (35-42) (NH₂-MVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 2)
- [0176] 2. 토끼(아래 참조)에 있어서, A β (33-42) (NH₂-GLMVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 3)
- [0177] • SPDP를 사용하여 BSA에 컨주게이션된 경우:
- [0178] 1. 개 (및 마우스: 아래 참조)에 있어서, A β cys-(35-42) (NH₂-CMVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 17)
- [0179] 2. 토끼(아래 참조)에 있어서, A β cys-(33-42) (NH₂-CGLMVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 18)

[0180] **3. 면역화 프로토콜 및 혈액 샘플링**

- [0181] 동물(개)을 4개의 그룹으로 분리하고 4개의 백신 제제 중 임의의 것을 할당하였다. A베타 35-42를 등에 피하 주입하여 동물을 면역화하고 부작용을 관찰하였다. 면역화 및 샘플링의 계획을 도 1(A)에 나타내었다. 간단히 말해, 격주로 7회 동안 동물에 주입하였다. 그룹 C 및 D의 개는 7회째 주입 7개월 후에 추가적인 8회째의 면역화를 받았다.
- [0182] 첫번째 면역화 직전(W0) 및 세번째(5주째: W5), 다섯번째(W9), 및 7번째(W13) 면역화 일주일 후에, 경정맥으로부터 EDTA 및 프로테아제 억제제(완전히 적은 mg/10 ml, Roche)가 들어있는 폴리프로필렌 바이알 속으로 혈액시료를 채집하였다(도 1). 7번째 면역 4개월 후(W31) 및 증폭 면역화 후 첫째 및 셋째주(각각 W43 및 W45)에 그룹 C 및 D의 동물로부터 추가적인 혈액 시료를 획득하였다.
- [0183] 10분 동안 4000 g에서 원심분리하기에 앞서, 시료를 천천히 혼합하고 최대 2시간 동안 4℃에서 보존하였다. 그 다음, 혈장을 등분하고 사용될 때까지 -80℃에서 동결시켰다. 추가적으로, 각각의 추출에 대하여, 혈청을 얻기 위하여, 각각의 동물로부터 ~1 ml의 혈액을 EDTA가 없는 폴리프로필렌 바이알 속으로 채집하였다. 이 시료를 상온에서 1시간 동안 엉기게 둔 후, 4000 g에서 10분 동안 원심분리하고, 혈청을 수집하고 혈액 생화학 측정을 위해 분석되어질 때까지 -80℃에서 보관하였다.
- [0184] 첫번째 면역화 1주 전 및 7번째 면역화 후 13번째 주에, 일반적인 마취 및 무균 조건하에서 뇌척수액(CSF) 시료를 수집하였다(도 1). 이러한 CSF 시료를 등분하고 사용될 때까지 -80℃에서 보관하였다.

[0185] **4. 혈장 및 CSF 중의 항-A β 항체 분석**

- [0186] 직접 ELISA에 의해 폴리프로필렌 96 웰 플레이트 중에서 항 A β -항체를 측정하였다. 100 mM 중탄산나트륨 및 2M 구아니딘 염화수소 완충액(pH 9.6) 중의 인간 A β (1-42) 펩타이드(# 24224 AnaSpec. San Jose, CA, USA) 2.5 μ l/ml로 마이크로티터 웰을 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 세정 완충액(0.5 M Tris, 1.5 M 염화나트륨, 0.5% Tween20; pH 8) 300 μ l로 플레이트를 3회 세정하고; 차단 완충액(0.05 M Tris, 0.2% Tween20, 0.5% BSA; pH 8) 300 μ l로 37℃에서 두 시간 동안 차단시키고, 또 다시 3회 세정하였다. 첫번째 웰 속 혈장의 1:30 희석으로부터 시작되는 10개 웰의 일렬 중에서, 부형 완충액(0.05 M Tris, 0.5 M 염화나트륨, 0.05% BSA, 0.05% Tween20; pH 8) 중의 개 혈장 3배 일련 희석물 100 μ l와 함께, 코팅된 플레이트를 37℃에서 한 시간 동안 인큐베이션하였다. 분석된 최대 혈장 희석은 1/10 x 3¹⁰이었다. 각 플레이트 중의 11번째 및 12번째 컬럼은 블랭크 대조군을 위하여 혈장 없이 부형 완충액으로 채웠다. 그 다음 플레이트를 세정하고 호스 래티스 페록시다제-콘주게이트 래빗 항-도그 IgG(Jackson ImmunoResearch. Suffolk, UK)의 부형 완충액 중 1:1000 희석물 100 μ l로 37℃에서 한 시간 동안 인큐베이션하고, 3회 세정하고 ABTS용 완충액(Roche. Barcelona, Spain) 중의 ABTS(Roche, Barcelona, Spain) 0.0375%와 함께 인큐베이션시켰다. 405 nm에서의 흡광도는 자동화된 플레이트 리더(Synergy 4, Biotek. Winooski, Vermont, USA) 상에서 판독하였다.
- [0187] 동일한 ELISA 플레이트 상에서 표준으로서 단일클론 6E10 항체를 사용하여 혈장 항-A β 항체 농도를 계산하고 μ g/ μ l로 나타내었다. 각 혈장 시료의 EC50은 각 웰 중 희석물의 대수(logarithm)에 대한 흡광도의 비선형 회귀분석에 의하여 측정하였다(GraphPad Prism 3.02). 또한, 혈장 종말점 역가는 블랭크 웰의 평균 흡광도보

다 3배 더 높은 흡광도를 나타내는 최대 혈장 희석으로서 정의하였다.

[0189] 혈장 중 자유 Aβ 펩타이드의 측정

[0190] 아라클론 바이오테크(Araclon Biotech, 사라고사, 스페인)로부터의 AB테스트-40 및 AB테스트-42 ELISA 키트를 구비한 간접 샌드위치 ELISA를 사용하여, 제조사 지시에 따라 개의 혈장 및 CSF 중 Aβ 1-42 및 Aβ 1-40의 레벨을 측정하였다.

[0191] II. 결과

[0192] 동물은 실험의 전체 시간에 걸쳐 건강하고 활동적으로 남아있었다. 특히 백신에 대한 그 어떠한 반응의 신호도 감지되지 않았다. 0부터 13번째 주까지의 평균 체중 증가는 1 ± 1.7 Kg이었다(표 1). 오직 두 마리의 동물만이 그 기간 중에 체중을 잃었다(각각 1 Kg씩, 이는 0주 시점에서의 그들 무게의 각각 4% 및 7%를 나타낸다).

표 1

표 1. 동물들의 특징						
그룹/개	성별	나이(년)	W0에서의 체중(Kg)	W13에서의 체중(Kg)	체중 증가 (Kg)	체중 변동 %
A1	암컷	11	16	18	2	12.50
A2	수컷	6	23	22	-1	-4.35
A3	수컷	8	22	23.45	1.45	6.59
B1	암컷	10	13	13	0	0.00
B2	수컷	6	21	23	2	9.52
B3	수컷	12	24.45	26.7	2.25	9.20
C1	암컷	6	18	18	0	0.00
C2	수컷	6	16	16	0	0.00
C3	수컷	10	24.5	29	4.5	18.37
D1	수컷	6	14	13	-1	-7.14
D2	수컷	6	15	15	0	0.00
D3	수컷	10	18.7	21.5	2.8	14.97
		평균	18.80	19.89	1.08	4.97
		SD	4.10	5.22	1.68	8.03

[0194] 1. 항-Aβ(1-42)항체 역가

[0195] 그룹 A 및 B

[0196] 6E10 표준에 대한 그룹 A 및 B에 속하는 동물의 혈장 흡광도의 가필(interpolation)은 면역 전 시료와 W5, W9 및 W13에서 수집된 시료 간에 일관된 상이함을 발견하지 못하였다(표 2A 및 도 2A). 6E10의 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에 대한 등가로서 측정되는, 3회 및 7회의 면역화 후(각각 W5 및 W13)의 혈장 항체 역가에 있어 증가의 인자는 매우 낮았다(그룹 A에 대하여 각각 0.8 ± 0.2 및 0.8 ± 0.2 ; 및 그룹 B에 대하여 각각 1.2 ± 0.1 및 1.3 ± 0.3 , 표 3). 그룹 A 및 B에 속하는 동물 중의 특이적 항체(항-Aβ42)에 대한 혈장 EC_{50} 값은 0주부터 13주까지 매우 낮았다. 참으로, 이 시점에서 배타적으로 미미한 증가를 나타낸 B2 개를 제외하고는, 모든 개에 있어서 혈장 EC_{50} 값은 W0로부터 W5까지 감소하였다(표 2B 및 도 2A-C). 또한, 면역화 후의 이러한 개들의 심지어 가장 농축된 혈장 희석조차도 면역 전 혈장 시료 중에서 측정되는 것보다 3배 더 높은 흡광도를 나타내지 못하였다(표 2C). 따라서, 이 두 그룹의 개들은 그들의 상응하는 백신 제제에 대한 비-반응자로 여겨졌다(A 및 B).

표 2

표 2. 다른 시점에서 특이적 항-Aβ42 항체의 혈장 역가
패널 A: 단일클론 항체 6E10의 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에 대한 당량.

그룹/개	W 0	W 5	W 9	W 13	W 31	W 43	W 45
A1	0,0028	0,0016	0,0015	0,0016			
A2	0,0024	0,0023	0,0018	0,0023			
A3	0,0027	0,0022	0,0028	0,0021			
B1	0,0019	0,0023	0,0070	0,0033			
B2	0,0025	0,0031	0,0022	0,0028			
B3	0,0027	0,0028	0,0029	0,0032			
C1	0,0016	0,0205	0,0147	0,0084	0,0008	0,0017	0,0019
C2	0,0010	0,0113	0,0083	0,0093	0,0007	0,0040	0,0041
C3	0,0022	0,0276	0,0214	0,0206	0,0021	0,0089	0,0102
D1	0,0025	0,1075	0,0933	0,1048	0,0076	0,0716	0,0520
D2	0,0017	0,0529	0,0406	0,0294	0,0028	0,0229	0,0164
D3	0,0019	0,0321	0,0138	0,0256	0,0024	0,0088	0,0071

패널 B: 특이적 항체(항-Aβ42)에 대한 혈장 EC50의 값

그룹/개	W 0	W 5	W 9	W 13	W 31	W 43	W 45
A1	49	42	35	29			
A2	170	85	158	133			
A3	155	111	132	115			
B1	51	47	235	66			
B2	186	253	123	93			
B3	79	60	41	59			
C1	45	773	722	385	68	46	49
C2	147	473	350	385	70	114	129
C3	123	1349	994	853	70	336	460
D1	51	6759	5738	6302	319	4202	2733
D2	53	2956	2021	1378	66	1122	790
D3	57	1550	752	1169	61	365	267

패널 C: 블랭크 웰보다 3X 더 높은 흡광도를 가지는 혈장의 최대 희석의 역수

그룹/개	W 0	W 5	W 9	W 13	W 31	W 43	W 45
A1	270	270	90	270			
A2	270	270	270	270			
A3	270	270	270	270			
B1	270	270	810	810			
B2	270	810	270	270			
B3	270	270	270	270			
C1	90	2430	2430	2430	270	270	270
C2	90	2430	2430	2430	90	810	810
C3	270	2430	2430	2430	810	2430	2430
D1	270	21870	21870	21870	2430	21870	7290
D2	270	7290	7290	7290	810	7290	2430
D3	270	7290	2430	7290	810	2430	810

표 3

[0198]

표 3. 면역 전 혈장에 대한 증가 인자(6E10의 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에 대한 당량)							
그룹/개	W0/W0	W5/W0	W9/W0	W13/W0	W31/W0	W43/W0	W45/W0
A1	1,0	0,6	0,5	0,6			
A2	1,0	1,0	0,8	1,0			
A3	1,0	0,8	1,0	0,8			
mean±SD	1,0±0,0	0,8±0,2	0,8±0,3	0,8±0,2			
B1	1,0	1,2	3,6	1,7			
B2	1,0	1,2	0,9	1,1			
B3	1,0	1,1	1,1	1,2			

mean±SD	1,0±0,0	1,2±0,1	1,9±1,5	1,3±0,3			
C1	1,0	12,5	8,9	5,1	0,5	1,0	1,1
C2	1,0	11,8	8,6	9,7	0,7	4,2	4,2
C3	1,0	12,6	9,7	9,4	1,0	4,1	4,6
mean±SD	1,0±0,0	12,3±0,4	9,1±0,6	8,1±2,6	0,7±0,2	3,1±1,8	3,3±1,9
D1	1,0	42,8	37,2	41,7	3,0	28,5	20,7
D2	1,0	30,6	23,5	17,0	1,6	13,2	9,5
D3	1,0	17,1	7,4	13,7	1,3	4,7	3,8
mean±SD	1,0±0,0	30,2±12,8	22,7±14,9	24,1±15,3	2,0±0,9	15,5±12,1	11,3±8,6

[0199] 그룹 C 및 D

[0200] 그룹 A 및 B에서 관찰된 것과 대조적으로 백신 제제 C 및 D로 처리된 개는 그들의 혈장 항체 역가에 있어 실질적인 변화를 나타내었다. 6E10 표준, EC₅₀ 또는 종말점 회석에 의하여 측정되는 이들 두 그룹 중의 모든 개의 반응은, 인터- 및 인트라-그룹 둘 모두에서 정량적인 상이함이 관찰되었음에도 불구하고, 동일한 패턴을 따랐다(표 2A-C). 일반적인 패턴은 W5부터 W13까지 오직 미미한 변화만을 가지고 유지되었던 3회의 면역화 후의 역가의 실질적인 증가에 의하여 특징지어졌다(도 2A-C). 따라서, 항체 역가는 3회의 면역화 후에 실질적으로 증가했지만, 그 이후 4회의 격주 백신 주입 후에는 실질적으로 증가하지 않았다(또는 심지어 약간 감소하였다). 실질적으로, 6E10의 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에 대한 등가로서 측정되는 3회 및 7회 면역화(각각 W5 및 W13) 후의 역가는 그룹 C에 대해 각각 12.3 ± 0.4 및 8.1 ± 2.6 및 그룹 D에 대해 각각 30.2 ± 12.8 및 24.1 ± 15.3 의 인자에 의하여 증대되었다(표 3).

[0201] 마지막 면역화 4개월 후(W31)에 역가는 매우 낮은 레벨로 떨어졌다(표 2). 그러나, 그룹 D의 개에 있어서 그들은 여전히 면역 전 혈장 중에서도 2배 더 높았다(표 3). 그 다음, 그룹 C 및 D의 개들은 추가적인 8번째 면역화를 받았는데, 이는 7번째의 7개월 후에 상응하는 백신 제제를 가지고 수행된 것이었다. 이 증폭 주입 이후에, 그룹 D에서 항체 역가의 실질적인 증가(면역 전 혈장과 관련하여, 15.5 ± 12.1 배 증가했음, 표 3) 및 그룹 C에서의 보다 적은 정도의 증가(면역 전 혈장과 관련하여, 3.1 ± 1.8 배 증가했음, 표 3)가 일어났다(도 2A-C). 일반적으로 임의의 시점에서 그룹 D의 동물 중 항체 역가는 그룹 C의 것보다 항상 더 높았다. 그럼에도 불구하고, 그룹 D에서 더 적은 반응을 가지는 개(D3 케이스)의 역가에 있어서의 증가는 그룹 C의 개의 역가에 있어 증가와 매우 유사하였다(표 3, 도 2, 3).

[0202] 2. Aβ 펩타이드 역가

[0203] 샌드위치 ELISA는 면역 전 혈장과 비-반응자 그룹(A 및 B)의 동물 중에서 W5, W9 및 W13에 채취된 시료 간의 Aβ 1-42 또는 Aβ 1-40의 농도에 있어서 일관된 차이점을 탐지하지 못하였다(표 4A-B, 도 3A-B). 3회 및 7회 면역화(각각 W5 및 W13) 후의 플라스마 Aβ 1-42 농도에 있어 변화 인자는 매우 낮았다(그룹 A에 대하여 각각 1.2 ± 0.7 및 1.0 ± 0.0 ; 및 그룹 B에 대하여 각각 0.9 ± 0.0 및 1.0 ± 0.1 . 표 5A). 유사하게 3회 및 7회 면역화(각각 W5 및 W13) 후의 플라스마 Aβ 1-40 농도에 있어 변화 인자는 매우 낮았다(두 그룹 및 두 주 모두에 대하여 0.9 ± 0.1 . 표 5B).

표 4

[0204] 표 4A. Aβ 1-42 펩타이드의 농도 pg/ml.

그룹/개	W 0	W 5	W 9	W 13	W 31	W 43	W 45	CSF W 0	CSF W 13
A1	4,16	7,50	2,76	4,31				556,85	509,70
A2	32,92	32,92	32,92	32,71				253,06	322,77
A3	19,98	20,07	20,24	19,62				421,88	300,12
B1	47,00	46,40	47,00	47,00				299,86	420,84
B2	20,33	20,33	21,83	22,01				283,94	367,18
B3	33,33	33,33	32,82	32,71				314,82	228,06
C1	5,20	< 3,125	< 3,125	< 3,125	4,70	< 3,125	< 3,125	718,84	532,56

C2	26.46	15.00	< 3,125	< 3,125	17.53	< 3,125	< 3,125	519.74	581.28
C3	16.35	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	671.03	649.07
D1	74.76	30.58	23.33	28.60	41.96	42.62	29.10	677.44	731.28
D2	17.56	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	783.95	888.61
D3	16.85	15.51	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	488.97	762.05

표 4B. Aβ1--40 펩타이드의 농도 pg/ml.

그룹/개	W 0	W 5	W 9	W 13	W 31	W 43	W 45	CSF W 0	CSF W 13
A1	61.29	52.55	52.55	55.19				3633.96	3831.76
A2	58.67	52.76	55.21	60.84				2269.62	2719.62
A3	60.26	64.88	63.00	54.64				2534.52	2822.02
B1	104.31	38.70	39.86	< 3,125				2890.55	3586.15
B2	68.77	58.67	63.87	65.16				2371.54	2610.96
B3	79.30	80.89	93.87	84.78				2449.42	2273.46
C1	27.47	< 3,125	21.72	< 3,125	24.44	< 3,125	< 3,125	3503.87	2711.61
C2	56.89	33.03	29.62	35.53	39.39	28.49	21.67	2632.58	3416.45
C3	41.67	< 3,125	< 3,125	< 3,125	27.80	< 3,125	< 3,125	3121.29	2945.81
D1	106.94	59.06	48.69	46.14	70.71	46.78	55.07	3139.03	3206.77
D2	59.70	< 3,125	< 3,125	22.04	24.92	< 3,125	25.55	3737.74	3426.45
D3	51.67	38.71	26.44	< 3,125	33.26	< 3,125	35.30	2955.16	3214.84

표 5

표 5A. 면역 전 혈장과 관련하여 펩타이드 A베타 1-42에 있어 증가 인자

그룹/개	W0/W0	W5/W0	W9/W0	W13/W0	W31/W0	W43/W0	W45/W0
A1	1.0	1.8	0.7	1.0			
A2	1.0	1.0	1.0	1.0			
A3	1.0	1.0	1.0	1.0			
평균±SD	1.0±0.0	1.2±0.5	0.8±0.2	1.0±0.0			
B1	1.0	1.0	1.0	1.0			
B2	1.0	1.0	1.1	1.1			
B3	1.0	1.0	1.0	1.0			
평균±SD	1.0±0.0	0.9±0.0	1.0±0.0	1.0±0.1			
C1	1.0	0.2	0.2	0.2	0.9	0.2	0.2
C2	1.0	0.6	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
C3	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
평균±SD	1.0±0.0	0.2±0.3	0.0±0.1	0.0±0.1	0.5±0.1	0.0±0.1	0.0±0.1
D1	1.0	0.4	0.3	0.4	0.6	0.6	0.4
D2	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
D3	1.0	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
평균±SD	1.0±0.0	0.4±0.4	0.1±0.1	0.1 v 0.2	0.2±0.3	0.2±0.3	0.1±0.2

Table 5B. 면역 전 혈장과 관련하여 펩타이드 A베타 1-40에 있어 증가 인자

그룹/개	W0/W0	W5/W0	W9/W0	W13/W0	W31/W0	W43/W0	W45/W0
A1	1.0	0.9	0.9	0.9			
A2	1.0	0.9	0.9	1.0			
A3	1.0	1.1	1.0	0.9			
평균±SD	1.0±0.0	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1			
B1	1.0	1.0	1.0	1.0			
B2	1.0	0.9	0.9	0.9			
B3	1.0	1.0	1.2	1.1			
평균±SD	1.0±0.0	0.9±0.1	1.0 v 0.1	0.9 v 0.1			
C1	1.0	0.0	0.8	0.0	0.9	0.0	0.0
C2	1.0	0.6	0.5	0.6	0.7	0.5	0.4
C3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0

평균±SD	1,0±0,0	0,2±0,3	0,4±0,4	0,2±0,3	0,7±0,1	0,1±0,3	0,1±0,2
D1	1,0	0,6	0,5	0,4	0,7	0,4	0,5
D2	1,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,4
D3	1,0	0,7	0,5	0,0	0,6	0,0	0,7
평균±SD	1,0±0,0	0,4±0,4	0,3±0,3	0,2±0,2	0,5±0,1	0,1±0,2	0,5±0,1

[0206] 그룹 A 및 B에서 관찰된 것과 대조적으로, 백신 제제 C 및 D로 처리된 개들은 그들의 혈장 Aβ(1-42) 농도에 있어 실질적인 변화를 나타내었다. 이러한 변화는 3회 면역화 이후 W5에서, 6마리 개중 5마리에서 그 펩타이드가 탐지 불가능하게 되는 지점(<3.125 pg/ml; 표 4A; 도 3A)으로의 Aβ(1-42)의 실질적인 감소를 특징으로 하는 패턴을 따랐다. 상기 펩타이드 농도는 W13까지 탐지 불가능하게 유지되었고; 항체 역가가 면역 전 레벨에 가까와지는, 7번째 면역화 4달 이후인 W31에 증가가 시험되었고; 그리고 그 다음 W42에서의 증폭(8번째) 주입 이후에 다시 감소되었다(도 1). 이러한 변화의 크기를 표 5A에 반영하였다. 조금 놀랍게도, Aβ 1-40의 혈장 농도는 Aβ(1-42)와 매우 유사한 변화의 패턴을 따르는 것으로 나타났다(표 4B 및 5B, 도 3B). 임의의 시점에서 항체 역가 및 펩타이드 농도 간의 상관관계를 도 4에 나타내었다.

[0207] 실험 동안 임의의 시점에서 혈장 항체 역가에 관한 그룹 C 및 D간의 실질적인 차이에도 불구하고, Aβ 펩타이드 농도의 변동은 유사한 시간 코스를 따랐다. 이는 심지어 높은 항체 역가도 순환계로부터 Aβ 펩타이드의 제거를 달성하기에 충분하지 않았다는 것을 제시한다.

[0208] 실시예 2: Aβ(x-40) 펩타이드로 면역화

[0209] I. 재료 및 방법

[0210] 1. 동물의 특징

[0211] 각 성별의 6살의 비글 개를 본 발명에 사용하였다. 이들은 상업적 공급원으로부터 온 것이고 사육용 산티아고 대학 켄넬에서 사육되어 온 것이었다. 실험 동안 동물들은 실내/실외 접근이 자유로운 3개의 집단 켄넬에서 사육되었고 조제 개 사료 및 물을 임의로 공급받았다. 동물들은 물리적 및 신경학적 실험, 혈액 생화학 값 및 헤모그램을 포함하는 실험의 시작 직전에 철저히 승인되었고 건강한 것으로 선언되었다.

[0212] 동물들은 각 그룹에게 궁극적으로 할당된 처리에 대해 알지 못하는 수의학 임상의로 하여 2개 그룹(A 및 B; n = 3)으로 배정되었다. 동물들은 백신에 대한 반응의 임상적 신호 발현에 대하여 매주 검사되었다. 세 번째 면역화 후에 혈액 생화학 및 헤모그램을 다시 포함하는 추가적인 완벽한 승인을 수행하였다.

[0213] 동물들은 동물 취급에 관한 유럽 및 스페인 법률(86/609/EU, Real Decreto 1201/2005)에 따라 취급되었으며 동물의 고통을 최소화하기 위한 모든 노력을 행하였다. 본 연구는 산티아고 대학 윤리 위원회의 승인을 받았다.

[0214] 2. 면역원의 준비

[0215] 2가지 다른 백신 제제 중으로 혼합된, 항원으로서 합성의 Aβ(33-40) 펩타이드 (SPDP 통해 컨주게이트될 때 추가적인 N-말단 Cys이 추가됨)(0.4 mg/주입)를 동물의 면역화를 위해 사용하였다. 이 제제의 각각은 블루 캐리어(BC; Pierce, Rockford, IL; 그룹 A) 또는 보바인 혈청 알부민(BSA; 시그마, 마드리드, 스페인; 그룹 B)인 단백질 담체; 및 어주번트 아비스코-300(AB; Isconova AB, 읍살라 사이언스 파크, SE-751 83 읍살라, 스웨덴)를 함께 구비하였다.

[0216] N-말단 시스테인을 포함하는 펩타이드의 블루 캐리어 및 알부민으로의 SPDP을 이용한 컨주게이션을 위하여 실시예 1에서와 동일한 절차(아이템 2.1의 재료 및 방법 참조)를 사용하였다.

[0217] 본 발명에 사용된 2개의 다른 제제는 다음과 같았다:

[0218] (A) Abisco-300의 200 마이크로리터 및 블루캐리어에 컨주게이션된 합성 펩타이드 400 마이크로그램.

[0219] (B) Abisco-300의 37 마이크로리터 및 BSA에 컨주게이션된 합성 펩타이드 400 마이크로그램.

[0220] 사용된 합성 펩타이드는 다음과 같았다:

[0221] * SPDP로 컨주게이션된 경우:

[0222] 래빗(아래 참조)에 있어서 A β cys-(33-40)(NH₂-CGLMVGGVV-COOH)(SEQ ID NO:19)

[0223] 3. 면역화 프로토콜 및 혈액 샘플링

[0224] 동물을 2개의 그룹으로 분리하고 2개의 백신 제제(상기 (A) 및 (B) 참조) 중 임의의 것을 할당하였다. 등을 통해 동물을 피하적으로 면역화시키고 부작용을 관찰하였다. 면역화 및 샘플링의 계획을 도 1(B)에 나타내었다. 간단히 말해, 격주로 7회 동안 동물에 주입하였다.

[0225] 첫번째 면역화 직전(W0) 및 첫번째 면역화 후의 일주일 후(W1), 5주(W5), 7주(W7), 9주(W9), 11주(W11) 및 13주(W13) 후에, 경정맥으로부터 EDTA 및 프로테아제 억제제(완전히 적은 mg/10 ml, Roche)가 들어있는 폴리프로필렌 바이알 속으로 혈액시료를 채집하였다(도 1(B)).

[0226] 10분 동안 4000 g에서 원심분리하기에 앞서, 시료를 부드럽게 혼합하고 최대 2시간 동안 4°C에서 보존하였다. 그 다음, 혈장을 등분하고 사용될 때까지 -80°C에서 동결시켰다. 추가적으로, 각각의 추출에 대하여, 혈청을 얻기 위하여, 각각의 동물로부터 ~1 ml의 혈액을 EDTA가 없는 폴리프로필렌 바이알 속으로 채집하였다. 이 시료를 상온에서 1시간 동안 엉기게 둔 후, 4000 g에서 10분 동안 원심분리하고, 혈청을 수집하고 혈액 생화학 측정을 위해 분석되어질 때까지 -80°C에서 보관하였다.

[0227] 첫번째 면역화 1주 전(W0) 및 7번째 면역화 후 13번째 주(W13)에, 일반적인 마취 및 무균 조건하에서 뇌척수액(CSF) 시료를 수집하였다(도 1(B)). 이러한 CSF 시료를 등분하고 사용될 때까지 -80°C에서 보관하였다.

[0228] 4. 혈장 및 CSF 중의 항-A β 항체 분석

[0229] 직접 ELISA에 의해 96 웰 폴리프로필렌 플레이트 중에서 항 A β -항체를 측정하였다. 100 mM 중탄산나트륨 및 2M 구아니딘 염화수소 완충액(pH 9.6) 중의 인간 A β (1-40) 펩타이드(# 24224 AnaSpec. San Jose, CA, USA) 2.5 μ l/ml로 마이크로티터 웰을 4°C에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 세정 완충액(0.5 M Tris, 1.5 M 염화나트륨, 0.5% Tween20; pH 8) 300 μ l로 플레이트를 3회 세정하고; 차단 완충액(0.05 M Tris, 0.2% Tween20, 0.5% BSA; pH 8) 300 μ l로 37°C에서 두 시간 동안 차단시키고, 또 다시 3회 세정하였다. 첫번째 웰 속 혈장의 1:30 희석으로부터 시작되는 10개 웰의 일렬 중에서, 부형 완충액(0.05 M Tris, 0.5 M 염화나트륨, 0.05% BSA, 0.05% Tween20; pH 8) 중의 개 혈장 3배 일련 희석물 100 μ l와 함께, 코팅된 플레이트를 37°C에서 한 시간 동안 인큐베이션하였다. 분석된 최대 혈장 희석은 1/10 x 3¹⁰이었다. 각 플레이트 중의 11번째 및 12번째 컬럼은 블랭크 대조군을 위하여 혈장 없이 부형 완충액으로 채웠다. 그 다음 플레이트를 세정하고 호스 래티스 페록시다제-콘주게이트 래빗 항-도그 IgG(Jackson ImmunoResearch. Suffolk, UK)의 부형 완충액 중 1:1000 희석물 100 μ l로 37°C에서 한 시간 동안 인큐베이션하고, 3회 세정하고 ABTS용 완충액(Roche. Barcelona, Spain) 중의 ABTS(Roche, Barcelona, Spain) 0.0375%와 함께 인큐베이션시켰다. 405 nm에서의 흡광도는 자동화된 플레이트 리더(Synergy 4, Biotek. Winooski, Vermont, USA) 상에서 판독하였다.

[0230] 동일한 ELISA 플레이트 상에서 표준으로서 단일클론 6E10 항체를 사용하여 혈장 항-A β 항체 농도를 계산하고 μ g/ μ l로 나타내었다. 각 혈장 시료의 EC50은 각 웰 중 희석물의 대수(logarithm)에 대한 흡광도의 비선형 회귀분석에 의하여 측정하였다(GraphPad Prism 3.02). 또한, 혈장 종말점 역가는 블랭크 웰의 평균 흡광도보다 3배 더 높은 흡광도를 나타내는 최대 혈장 희석으로서 정의하였다.

[0231] 혈장 중 자유 A β 펩타이드의 측정

[0232] 아라클론 바이오테크(Araclon Biotech, 사라고사, 스페인)로부터의 AB테스트-40 및 AB테스트-42 ELISA 키트를 구비한 간접 샌드위치 ELISA를 사용하여, 제조사 지시에 따라 개의 혈장 및 CSF 중 A β 1-42 및 A β 1-40의 레벨을 측정하였다.

[0233] II. 결과

[0234] 동물은 실험의 전체 시간에 걸쳐 건강하고 활동적으로 남아있었다. 특히 백신에 대한 그 어떠한 반응의 신호도 감지되지 않았다.

[0235] 1. 항-Aβ(1-40) 항체 역가

[0236] 백신 제제 B로 처리한 개가 그들의 혈장 항 Aβ40 항체 역가에 있어 실질적인 변화를 나타내면서 더 효과적이었다. 항 Aβ40 항체의 농도 및 EC₅₀ 또는 종말점 희석에 의하여 측정되는 것과 같이, 이 그룹 중의 모든 개의 반응은, 인터- 및 인트라-그룹 둘 모두에서 정량적인 상이함이 관찰되었음에도 불구하고, 동일한 패턴을 따랐다(표 6, 패널 A-B). B제제로 처리한 개들 중의 일반적인 패턴은 W5부터 W9까지 오직 미미한 변화만을 가지고 유지되었던 2회의 면역화 후(W5)의 역가의 실질적인 증가를 특징으로 하였다(도 5A). 따라서, 항체 역가는 2회의 면역화 후에 실질적으로 증가했지만, 그 이후의 백신 주입 후에는 증가하지 않았고 심지어 약간 감소하였으며, 특히 그룹 B에 있어서 7번째 면역화 후(W13)에 역가는 W5 값보다 더 낮은 레벨로 약간 감소되었다.(표 6 및 도 5A)

표 6

[0237] 표 6. 다른 시점에서 특이적 항-Aβ40 항체의 혈장 역가

패널 A: 항-Aβ40 항체의 μg/μl에 대한 당량				
그룹/개	W0	W5	W9	W13
A1	0,3483	0,4705	0,7251	0,8830
A2	0,4196	0,5876	0,6284	0,4501
A3	0,5214	0,4450	0,5214	0,4603
B1	0,3585	10,1860	11,6729	8,0932
B2	0,7913	7,1359	9,9314	6,0361
B3	1,6111	2,2272	2,2629	2,5175
패널 B: 특이적 항체(항-Aβ40)에 대한 혈장 EC50의 값				
그룹/개	W0	W5	W9	W13
A1	49,47	26,92	38,54	31,01
A2	n.d.	n.d.	n.d.	14,97
A3	25,2	29,84	24,14	46,67
B1	31,44	1328	1593	831,1
B2	66,85	906,8	1031	571,9
B3	42,15	150,9	154	129,1

[0238] n.d.: 탐지불가

[0239] 2. Aβ 펩타이드 역가

[0240] 백신 제제 B로 처리된 개들은 그들의 혈장 Aβ(1-42) 농도에 있어 실질적인 변화를 나타내었다. 이러한 변화는 2회 면역화 이후 W5에서, 펩타이드가 탐지 불가능하게 되는 지점(<3.125 pg/ml; 표 7A(표 7))으로의 Aβ(1-42)의 실질적인 감소를 특징으로 하는 패턴을 따랐다. 펩타이드 농도는 W13까지 탐지 불가능하게 유지되었다. 그러나, 백신 제제 A로 처리된 개들은 그들의 혈장 Aβ(1-42)의 농도에 있어 그 어떠한 변화도 나타내지 않았다. Aβ1-40 펩타이드의 혈장 농도는 Aβ(1-42)와 매우 유사한 변화의 패턴을 따르는 것을 나타냈다(표 7B(표 8)).

[0241] ELISA에서 면역 전(W0) 및 W13에서의 CSF 레벨을 비교한 후에, Aβ1-40 및 Aβ(1-42) 펩타이드 레벨이 백신으로 처리 후 두 그룹(A 및 B) 모두의 동물 중에서 감소하였다. 놀랍게도 그 레벨은, 비록 그룹 A로부터의 개가 비록 면역성 반응을 나타내지 않았지만, 그룹 B로부터의 개에서보다 그룹 A로부터의 개에서 훨씬 낮았다.

표 7

[0242] 표 7A. 펩타이드 Aβ1-42의 농도 pg/ml.

그룹/개	W0	W1	W5	W7	W9	W11	W13	CSF W0	CSF W13
A1	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	13,28	12,00	13,60	464,35	441,77

A2	10,64	11,49	13,19	10,08	15,17	12,62	15,17	349,84	160,32
A3	17,15	14,60	14,04	14,60	15,17	18,85	15,74	345,00	196,61
B1	17,43	23,81	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	403,06	237,74
B2	30,19	18,38	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	263,55	195,81
B3	< 3,125	12,34	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	261,13	200,65

표 8

표 7B. 펩타이드 Aβ 1-40의 농도 pg/ml.									
그룹/개	W0	W1	W5	W7	W9	W11	W13	CSF W0	CSF W13
A1	47,89	47,70	49,95	49,01	50,14	52,01	54,64	2576,97	2053,48
A2	48,56	47,36	40,16	40,76	42,36	45,56	48,36	2734,55	1414,09
A3	37,76	44,96	40,36	45,36	50,76	42,76	49,16	2616,36	1393,64
B1	59,33	51,08	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	2752,73	2363,33
B2	67,20	52,20	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	1665,61	1042,88
B3	46,36	44,56	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	1831,52	1676,97

실시예 3: 뇌 중에서 면역화의 영향

I. 재료 및 방법

뇌 중에서 면역화의 영향을 연구하기 위하여 급성 실험을 수행하였는데, 여기에서 다음의 제제로 3회 면역화 한 후에 동물들이 희생되었다:

- (1) AβX-42 + BSA+ Th2-타입 어주번트(재수화겔).
- (2) AβX-42 + BSA+ 혼합된 Th1 / Th2-타입 어주번트(Abisco).
- (3) 대조군: 알부민 + Th2-타입 어주번트.

전두부, 귀 내부, 관자놀이 및 소뇌의 뇌 영역의 시료를 프로테아제 억제제 각테일을 포함하는 pH 7.4 TBS 중에 균일화하고, 베크만 MLA-55 회전자 중에서 4℃에서 30분 동안 175000 g에서 원심분리하였다. 얻어진 상청액은 각각의 가용성 분획으로 여겨지었다. 그 다음 펠렛을 프로테아제 억제제 각테일을 포함하는 pH 7.4 TBS-TX 중에 재-균일화하고, 이전과 동일한 조건에서 다시 원심분리하였다. 다시, 얻어진 펠렛을 TBS-구아니디늄 크로라이드 중에 재-균일화하고, 회전 교반기 내 실온에서 밤새 배양하고, 그 다음 베크만 MLA-55 회전자 중에서 1시간 30분 동안 4℃, 13000 g에서 원심분리하였다. 펠렛은 폐기하고, 얻어진 상청액을 TBS-구아니디늄 크로라이드 중에 재현탁하였고, 불용성 분획으로 여겨진다. 그 다음 펩타이드 농도를 ELISA로 정량화하였다.

II. 결과

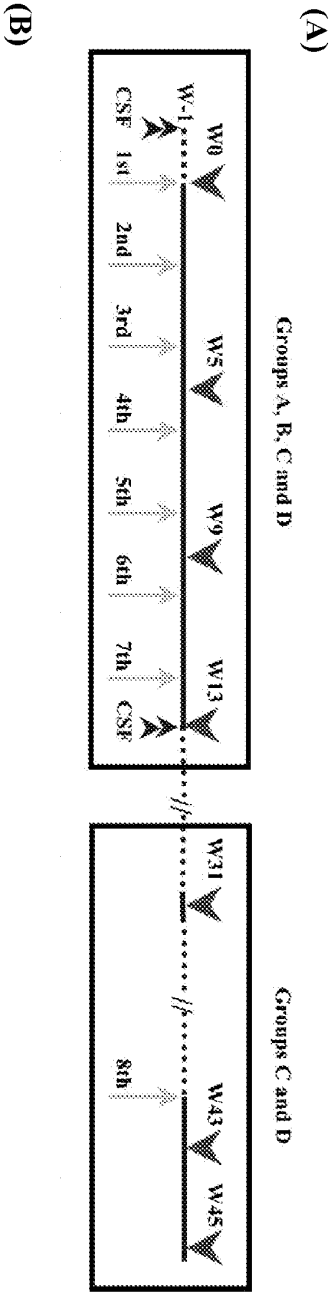
BSA와 콘주게이션된 AβX-42으로의 면역화는, 대조군과 관련하여 각각의 처리군 중에서 50%가 넘는 농도의 감소와 함께, 펩타이드의 가용성 형태에 강한 영향을 미친다. 불용성 형태의 농도는 현저하게 감소되지 않았다(도 6). 다른 뇌 구역에 대해서는, Aβ 40 및 Aβ 42 펩타이드의 가용성 형태에 대하여 미미한 차이를 가지고 모든 영역 중에서 감소가 유사하였다(도 7).

실시예 2 및 3에서 일어난 것과 같이 기저 선과 처리 후 시점을 비교하여 CSF 중 펩타이드 농도에는 차이가 없었다.

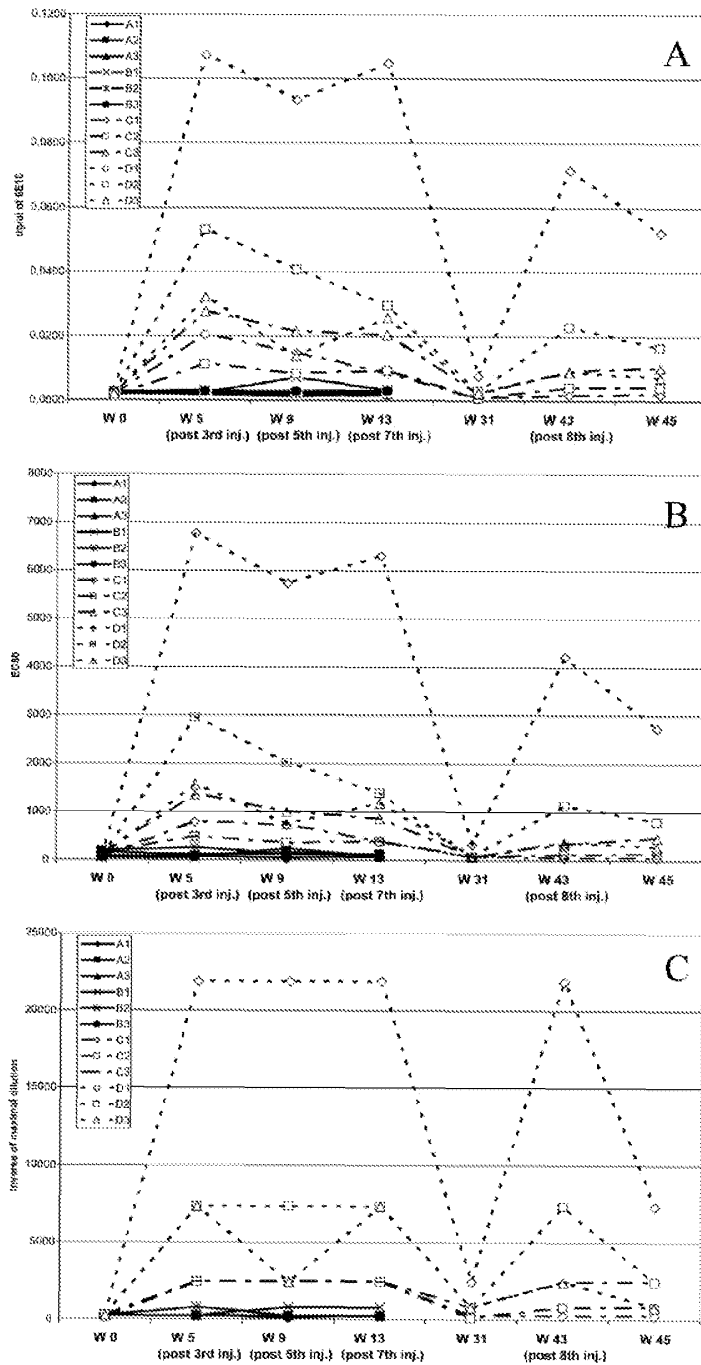
본 발명에서 얻어진 결과는 만일 Aβ의 집괴가 발생하기 전에 투여된다면 Aβ 면역화가 더 효과적일 수 있을 것이라는 확장된 아니디어와 일치한다.

도면

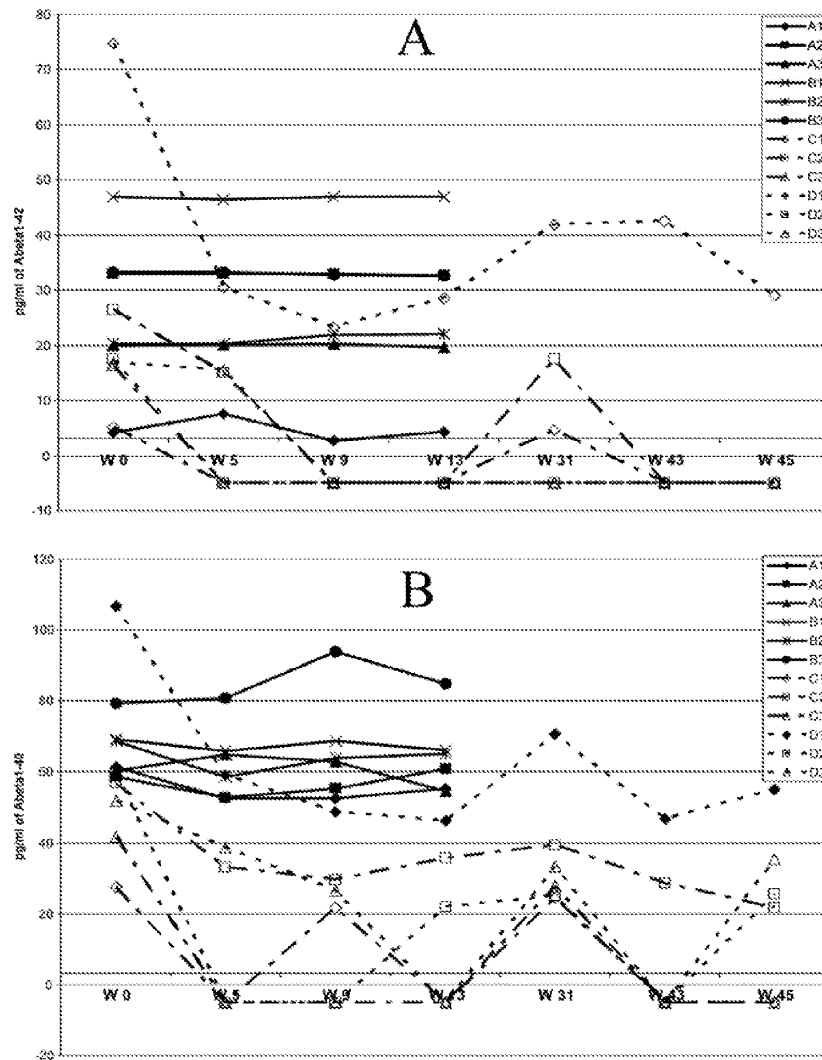
도면1



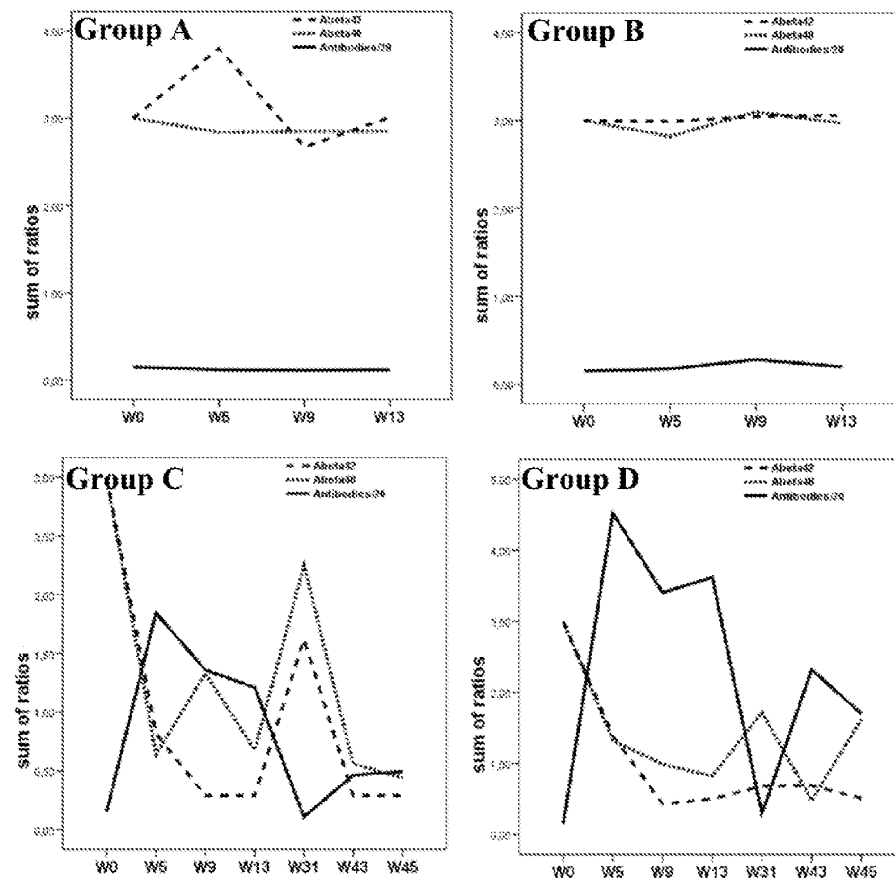
도면2



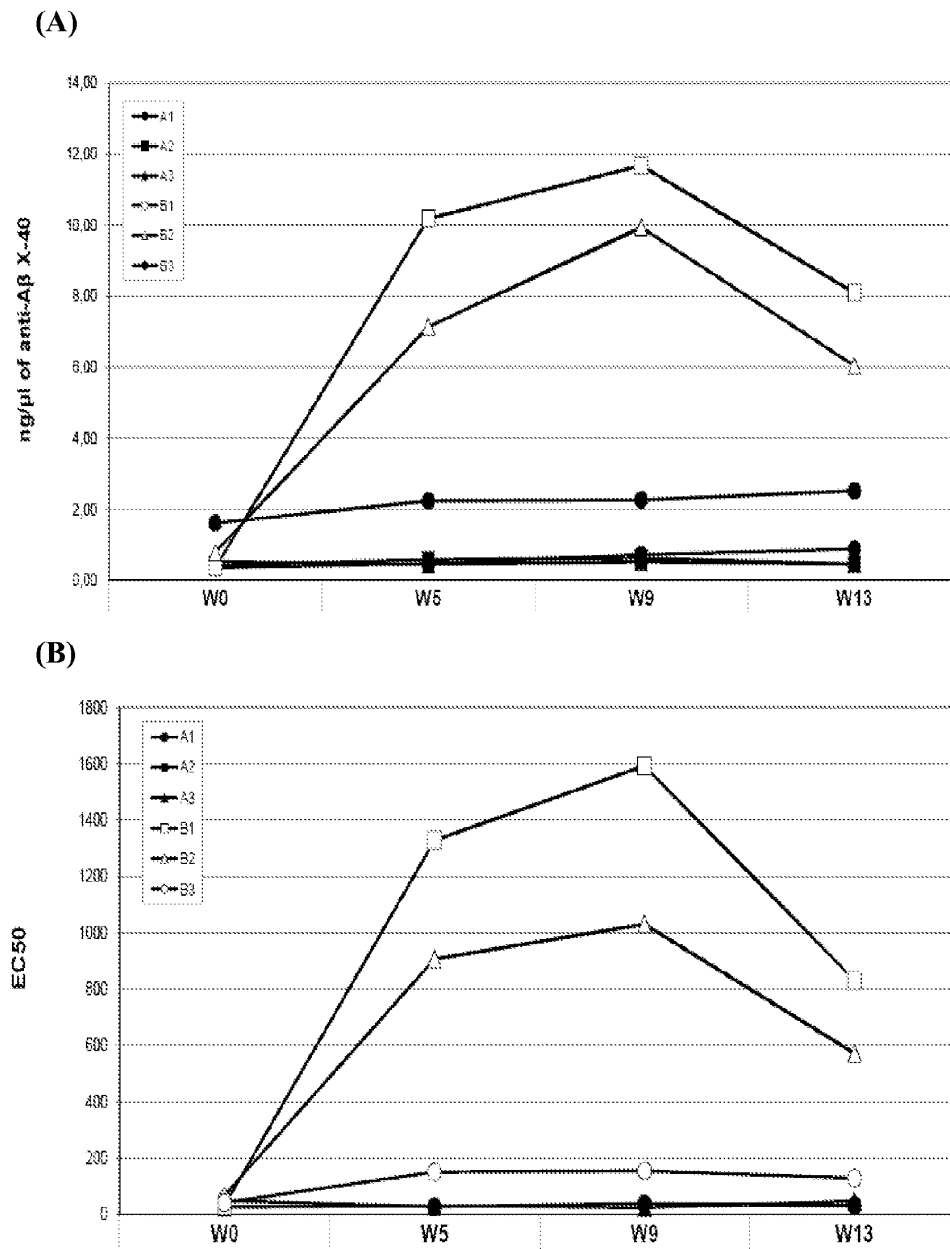
도면3



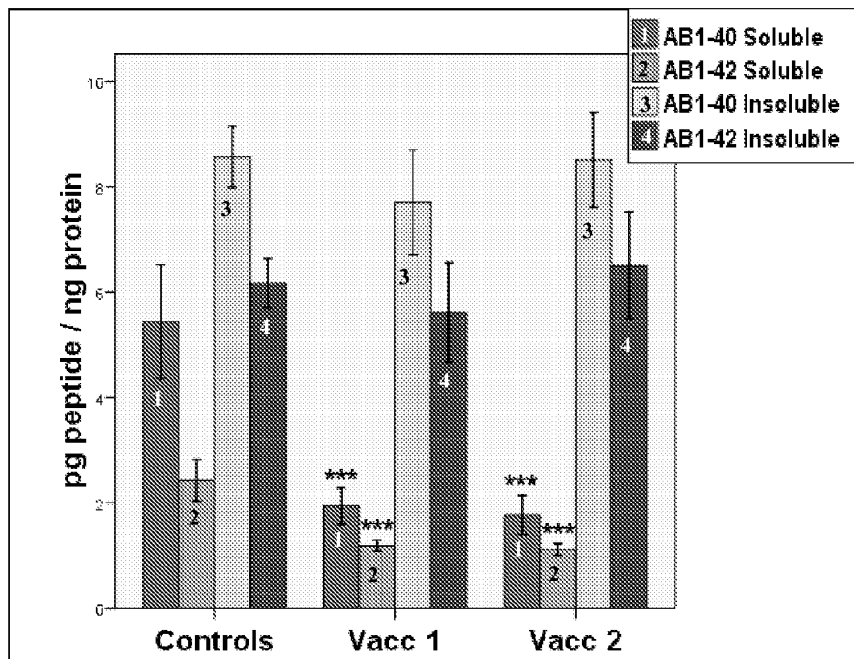
도면4



도면5

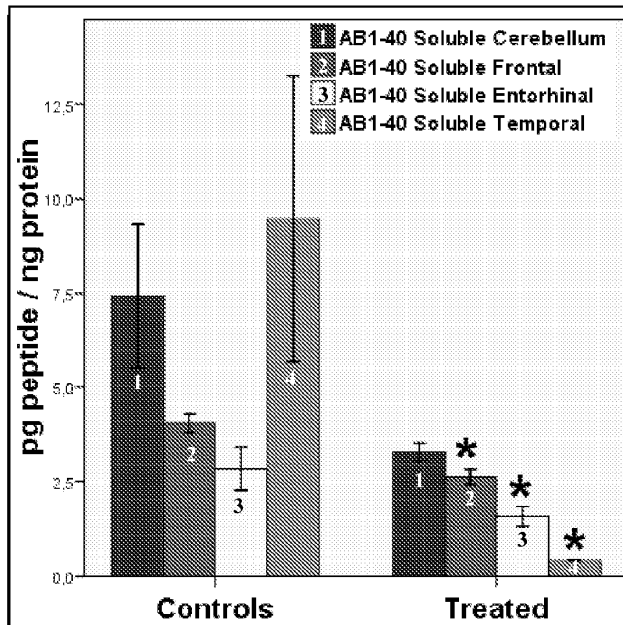


도면6



도면7

(A)



(B)

