



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월14일
(11) 등록번호 10-1706789
(24) 등록일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7003879
(22) 출원일자(국제) 2009년07월10일
심사청구일자 2014년06월18일
(85) 번역문제출일자 2011년02월18일
(65) 공개번호 10-2011-0031989
(43) 공개일자 2011년03월29일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/058803
(87) 국제공개번호 WO 2010/009987
국제공개일자 2010년01월28일
(30) 우선권주장
61/082,309 2008년07월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US07122374 B1*
W02003070760 A2
US20050009150 A1
EP01911765 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
프로비오드록 아게
독일 데-06120 할레 바인베르그백 22
(72) 발명자
데무트, 한스-올리히
독일, 06120 할레/잘레, 암 발트란트 13 에이
쉴링, 슈테판
독일, 06130 할레/잘레, 글로켄백 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 27 항

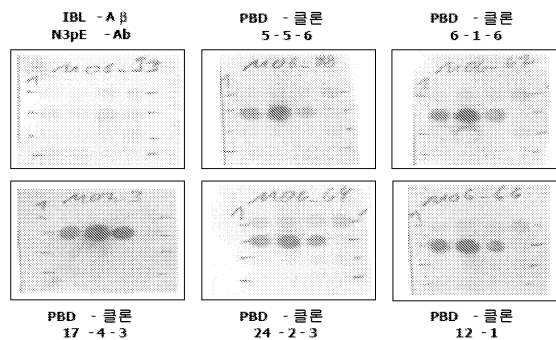
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 진단용 항체 검사법

(57) 요약

본 발명은 유전분증의 진단 특허, 알츠하이머 질병 및 관련된 양태를 위한 새로운 진단 검사에 관한 것이다. 특히, 단일 클론 항체 및 항체 검사가 제공된다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

클라인슈미트, 마틴

독일 06120 할레/잘레 루드비히-부허러-슈트라쎄 13

간스, 카스린

독일 06114 할레/잘레 쉬레이프웨그 29

레이센나우어-샤웁, 아니타

독일, 88255 바이엔퍼트, 모첸완거 슈트라쎄 3

라펠트, 얀스-울리히

독일, 06120 리스카우, 미텔-슈트라쎄 23

캄퍼, 손자

독일, 82110 저머링, 푸르에링슈트라쎄 44

명세서

청구범위

청구항 1

하기 가변구역을 포함하는 경사슬 및 하기 가변구역을 포함하는 중사슬을 포함하는 항체로서,

상기 항체의 경사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 49의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 가지며, 상기 항체의 중사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 51의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 52의 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 경사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 53의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 가지며, 상기 항체의 중사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 55의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 56의 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 경사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 57의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 가지며, 상기 항체의 중사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 59의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 갖거나;

상기 항체의 경사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 61의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열을 가지며, 상기 항체의 중사슬의 가변구역은 SEQ ID NO: 63의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 64의 아미노산 서열을 갖는, 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가 A β 펩티드 또는 이의 변형체에 결합하고, 상기 변형체가 하기 군으로부터 선택되는 것인 항체:

pGlu-A β ₃₋₃₈,

pGlu-A β ₃₋₄₀,

pGlu-A β ₃₋₄₂, 및

pGlu-A β _{3-x} (x는 10 내지 42 사이의 정수임).

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체인 항체.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 항체가 10^{-7} M 또는 그 이상의 해리상수(K_D)의 친화도를 갖고 A β 펩티드 또는 이의 변형체에 결합하는 것인 항체.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항체는 하기 군으로부터 선택되는 항체:

A β 5-5-6 (기탁 번호. DSM ACC 2923),

A β 6-1-6 (기탁 번호. DSM ACC 2924),

A β 17-4-3 (기탁 번호. DSM ACC 2925), 및

A β 24-2-3 (기탁 번호. DSM ACC 2926).

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항체는 A β 6-1-6 (기탁 번호 DSM ACC 2924)인 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 항체는 A β 24-2-3 (기탁 번호 DSM ACC 2926)인 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항체는 인간화 또는 키메라 항체, 또는 10^{-7} M 또는 그 이상의 해리상수(K_D)의 친화도를 갖는 항체 단편인 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, A β 펩티드 또는 그의 변형체의 감지를 위해 사용되고, 상기 변형체가 하기 군으로부터 선택되는 것인 항체:

pGlu-A β ₃₋₃₈,

pGlu-A β ₃₋₄₀,

pGlu-A β ₃₋₄₂, 및

pGlu-A β _{3-x} (x는 10 내지 42 사이의 정수임).

청구항 15

삭제

청구항 16

제1항에 있어서, 인간인 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, 다이아보디(diabody) 또는 10^{-7} M 또는 그 이상의 해리상수(K_D)의 친화도를 갖는 단일 사슬 항체인 항체.

청구항 18

제1항에 있어서, 제14항에서 정의된 항체에 의해 결합된 에피토프에 결합하는 항체.

청구항 19

제1항에 있어서, 제14항에서 정의된 항체의 상보성 결정 구역을 갖는 항체.

청구항 20

제1항에 있어서, 라벨되어 있는 항체.

청구항 21

제1항에 있어서, 고체상에 고정되어 있는 항체.

청구항 22

하이브리도마 세포주인 DSM ACC 2923, DSM ACC 2924, DSM ACC 2925, 및 DSM ACC 2926의 어느 하나로부터 얻을 수 있는 항체.

청구항 23

제1항 또는 제22항에 정의된 항체를 포함하는, 유전분증(amyloidosis)의 치료, 예방 또는 지연을 위한 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 유전분증이 경증 인지 장애, 알츠하이머 질환 및 다운증후군에서의 신경퇴행증으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 신경퇴행성 질환인 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 유전분증이 특발성 알츠하이머 질환 또는 가족성 알츠하이머 치매인 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 가족성 알츠하이머 치매가 가족성 영국민 치매 또는 가족성 덴마크민 치매인 조성물.

청구항 27

하이브리도마 세포주 DSM ACC 2923.

청구항 28

하이브리도마 세포주 DSM ACC 2924.

청구항 29

하이브리도마 세포주 DSM ACC 2925.

청구항 30

하이브리도마 세포주 DSM ACC 2926.

청구항 31

제1항 또는 제22항에 따른 항체를 포함하는, 알츠하이머 질환의 진단을 위한 조성물.

청구항 32

제1항 또는 제22항에 정의된 항체 및 사용자 매뉴얼을 포함하고, 추가의 생물학적 활성 물질을 포함하는 알츠하이머 질환의 진단을 위한 진단 키트.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 추가의 생물학적 활성 물질이 글루타미닐 사이클라아제(glutaminy cyclase)의 저해제인 진단 키트.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알츠하이머 질병 및 관련된 양태와 같은 아밀로이드 단백질과 연관된 질환과 비정상의 군인 유전분증 진단을 위한 새로운 진단 검사법에 관한 것이다. 특히, 항체 검사법이 제공된다.

배경 기술

[0002] 유전분증(amyloidosis)은 단일 질병이 아니라 다소 하나 또는 그 이상의 기관 또는 신체계에 축적하는 아밀로이드라 불리는 왁스상, 전분-유사 단백질의 세포와 조직 침전을 특징으로 하는 진행성 질병 프로세스의 다양한 군이다. 상기 아밀로이드 침전물이 축적되면, 그들은 기관 또는 신체계의 정상적인 기능을 방해하기 시작한다. 적어도 15개의 다른 타입의 유전분증이 존재한다. 주요 형태는 공지의 선행이 없는 1차 유전분증이고, 2차 유전분증은 몇 가지 다른 상태를 뒤따른다. 그리고 유전성 유전분증이 존재한다.

[0003] 2차 유전분증은 폐렴, 가족성 지중해열로 불리는 박테리아 감염, 골 감염(골수염), 류마티스 관절염, 소장의 염증(육아종성 회장염), 호킨스 질병 및 문둥병과 같은 만성 감염 또는 염증 질병 중에 일어난다.

[0004] 아밀로이드 침전물은 아밀로이드 P(5변형) 구성분 (AP), 정상 혈청 아밀로이드 P(SAP)에 관여하는 당단백질, 및 설페이트화 당아미노글라이칸(GAG), 연결조직의 복합 탄수화물을 포함한다. 아밀로이드 물질의 약 90%를 차지하는 아밀로이드 단백질 파이버릴(fibrils)은 몇몇 다른 타입의 단백질중 하나를 포함한다. 이들 단백질은 소위 콩고 레드에 대한 결합 부위를 제공하여 상기 아밀로이드 단백질에 대해 독특한 착색 성질을 부여하는 독특한 단백질 구조인 "베타-폴리티드" 시트 파이버릴(beta-pleated sheet fibrils)로 접혀질 수 있다.

[0005] 노화의 수많은 질병들은 아밀로이드-유사 단백질에 기초하거나 또는 이와 연관하고 부분적으로 병리현상 뿐만 아니라 질병의 진행에 기여하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 물질의 세포와 침전물의 축적에 의하여 특징 지워 진다. 이들 질병은 약한 인지 장애(MCI), 알츠하이머 질병(AD) 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병(SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBA) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매, 다운 증후군에서 신경퇴행증, 루이보디 치매(Lewy body dementia), 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈 (네델란드 타입); 구암 파킨슨-치매 복합증과 같은 신경 퇴행 질환을 포함하나 여기에 국한되지는 않는다. 아밀로이드-유사 단백질에 기

초하거나 또는 이와 연관된 다른 질병은 진행성 핵성 마비(progressive supranuclear palsy) 다발성 경화증(multiple sclerosis); 광우병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨스 질병, HIV-연관 치매, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 성인기 발병 당뇨병(Adult Onset Diabetes); 노년 심장 유전분증(senile cardiac amyloidosis); 내분비선 종양 및 황반변성을 포함하는 다른 질병들이다

[0006] 이들 질병의 병인은 다양할 수 있음에도 불구하고, 그의 특징적인 침전물은 흔히 수없이 공유된 분자 구성성분을 갖는다. 상당한 정도로, 이것은 염증전 경로의 국부적인 활성화에 기인할 수 있다. 그리하여, 활성화된 보체구성분, 급성 상의 반응물, 면역 조절자, 및 다른 염증 매개체의 동시적인 침전을 유도한다(McGeer et al., Tohoku J Exp Med. 174(3): 269-277 (1994)).

[0007] 최근들어, 축적되는 결과가 알츠하이머 질병에서 N-말단 변형된 A β 펩티드 변형체의 관여를 증명하였다. 표준 생체 검사법은 알츠하이머 환자의 뇌에서 뿐만 아니라 감염되지 않은 개체의 노화 플라크(plaques)에서도 A β 1-40 및 A β 1-42의 존재를 보여 주었다. 그러나 N-말단부위가 절단되고 pyroGlu로 변형된 A β N3pE-40/A β N3pE-42는 거의 배타적으로 알츠하이머 환자의 플라크내에 배어 있어 이들 A β 변형체를 적합한 진단마커 및 약물 개발의 잠재적 타겟으로 만들었다.

[0008] 현재, 몇몇 상업적 제조사들은 A β 1-40 / 1-42 및 A β N3pE-40/A β N3pE-42를 피코그램(pg) 범위까지 감지할 수 있게 해주는 ELISA 키트를 제공한다.

[0009] 알츠하이머 질병 (AD) 환자의 뇌는 형태학적으로 신경피질 뇌구조에서 신경섬유원 농축의 존재와 A β 펩티드 침전에 의해 특징지워진다(Selkoe, D.J. &Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43, 545-584 (2003)). A β 펩티드는 β - 및 γ -시크리타아제에 의한 순차적 절단 후 아밀로이드 전구 단백질(APP)로 부터 유리된다. γ -시크리타아제 절단은 A β 1-40 및 A β 1-42 펩티드를 생성하고 그들은 C-말단이 다르고, 결집 파이버릴(fibril) 형성 및 신경 독성에서 다른 잠재능력을 보여준다(Shin, R. W. et al. Amyloid beta-protein (Abeta) 1-40 but not Abeta 1-42 contributes to the experimental formation of Alzheimer disease amyloid fibrils in rat brain. J. Neurosci. 17, 8187-8193 (1997); Iwatsubo, T. et al. Visualization of Abeta 42 (43) and Abeta 40 in senile plaques with end-specific Abeta monoclonals: evidence that an initially deposited species is Abeta 42(43). Neuron 13, 45-53 (1994); Iwatsubo, T., Mann, D. M., Odaka, A., Suzuki, N. &Ihara, Y. Amyloid beta protein (Abeta) deposition: Abeta 42(43) precedes Abeta 40 in Down syndrome. Ann. Neurol. 37, 294-299 (1995); Hardy, J. A. &Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256, 184-185 (1992); Roßner, S., Ueberham, U., Schliebs, R., Perez-Polo, J. R. & Bigl, V. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. Prog. Neurobiol. 56, 541-569 (1998)).

[0010] C-말단의 다양성 뿐만 아니라, N-말단 변형 A β 펩티드도 많다(Saido, T. C. et al. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3 (pE), in senile plaques. Neuron 14, 457-466 (1995); Russo, C. et al. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. Nature 405, 531-532 (2000); Saido, T. C, Yamao, H., Iwatsubo, T. &Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. Neurosci. Lett. 215, 173-176 (1996)). 상기 A β 펩티드의 주요 부분은 2개의 아미노산을 N-말단에서 절단하여 글루타메이트 잔기를 노출시키며 이들은 순차적으로 고리화하여 파이로글루타메이트(pE)를 만들어 결과적으로 A β 3(pE)-42 펩티드를 형성한다(Saido, T. C. et al. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. Neuron 14, 457-466 (1995); Saido, T. C, Yamao, H., Iwatsubo, T. &Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. Neurosci. Lett. 215, 173-176 (1996)). 이와는 달리, pE는 BACE1에 의한 β' -절단을 따라 형성되어 A β N11(pE)-42를 만든다(Naslund, J. et al. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 8378-8382 (1994); Liu, K. et al. Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 112, 163-174 (2006)). 특히, A β N3 (pE)-42는 특발성 및 가족성 알츠하이머 질병(FAD)에 있어서 A β 침전물의 주요 구성성분을 보여주었다(Saido, T. C. et al. Dominant and

differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3 (pE) , in senile plaques. Neuron 14, 457-466 (1995) ; Miravalle, L. et al . Amino-terminally truncated Abeta peptide species are the main component of cotton wool plaques. Biochemistry 44, 10810-10821 (2005)).

[0011] 상기 Aβ N3pE-42 펩티드는 Aβ 1-40/1-42 펩티드와 공존하고(Saido, T. C. et al . Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Abeta N3pE, in senile plaques. Neuron 14, 457-466 (1995) ; Saido, T. C, Yamao, H., Iwatsubo, T. &Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. Neurosci. Lett. 215, 173-176 (1996)), 수많은 관찰에 기초하여, AD 병인에 있어서 두드러진 역할을 할 수 있다. 예를 들면, Aβ N3pE-42의 특정 신경독성이 개괄적으로 설명되어 있고(Russo, C. et al . Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3 (pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. J. Neurochem. 82, 1480- 1489 (2002)), 상기 N-절단된 Aβ 펩티드의 pE 변형은 대다수의 아미노펩티다아제 뿐만 아니라 Aβ-분해 엔도펩티다아제에 의한 분해에 대해 저항성을 부여한다(Russo, C. et al. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3 (pE) -- strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. J. Neurochem. 82, 1480-1489 (2002); Saido, T. C. Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta- amyloid. Neurobiol. Aging 19, S69-S75 (1998)). 글루타민 산의 pE로의 상기 고리화는 N-말단 전위의 소실을 유도하여 변형되지 않은 Aβ 펩티드에 반하여 Aβ N3pE의 가속된 결집을 야기시킨다(He, W. &Barrow, CJ. The Abeta 3- pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. Biochemistry 38, 10871-10877 (1999); Schilling, S. et al. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro) . Biochemistry 45, 12393- 12399 (2006)). 그리하여, Aβ N3pE-42 형성의 변형은 그들을 분해에 더 쉽게 노출시켜 상기 펩티드를 불안정화하고, 더 높은 분자량의 Aβ 결집체의 형성을 방해하고 신경세포 생존을 향상시킨다.

[0012] 그러나, 오랫동안 Aβ 펩티드가 어떻게 pE-변형되는지 알려져 있지 않았다. 최근에, 순환 산성 조건에서 글루타미닐 사이클라아제(QC)가 Aβ N3pE-42 형성을 촉매함과 특정 QC 저해제가 시험관내에서 Aβ N3pE-42 생성을 저해함이 발견되었다(Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M. & Demuth, H. -U. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. FEBS Lett. 563, 191-196 (2004) ; Cynis, H. et al . Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. Biochim. Biophys . Acta 1764, 1618- 1625 (2006)).

[0013] 루이보디 치매(Lewy body dementia; LBD)는 65세 이상의 사람에서 일어나는 신경퇴행성 질환이고, 통상적으로 인지(사고) 장애 증후군과 비정상적인 행동 변화를 야기시킨다. 증후군은 인지 장애, 신경학적 기미, 수면 질환, 및 자율신경부전증을 포함할 수 있다. 인지 장애는 대다수에서 LBD의 주요 특징이다. 환자는 점차적으로 악화되는 혼란의 반복적인 에피소드를 갖는다. 인지 능력의 변동은 주의와 경계의 변동 정도와 종종 연관된다. 인지 장애와 사고의 변동은 분, 시간, 또는 하루에 걸쳐 변경될 수 있다. 루이보디는 인산화 및 비인산화된 신경필라멘트(neurofilament) 단백질로부터 형성된다; 그들은 시냅틱 단백질 알파-시뉴클레인 뿐만 아니라 상해받거나 비정상적인 단백질의 제거에 관여하는 유비퀴틴을 포함한다. 루이보디 뿐만 아니라, 신경세포의 세포 프로세스에서 봉입체(inclusion bodies)인 루이 뉴라이트(Lewy neurites)도 또한 존재한다. 아밀로이드 플라크(plaques)는 DLB를 앓는 환자의 뇌에서 형성될 수 있으나, 그들은 알츠하이머 환자보다 수치면에서 더 적은 경향이 있다. AD의 다른 미세병인(micropathological) 특징인 신경섬유원 농축은 LBD의 주요 특징은 아니나 아밀로이드 플라크 뿐만아니라 흔히 존재한다.

[0014] 근위축성 측삭 경화증(ALS)는 상위 및 하위 운동 뉴런의 퇴화에 의하여 특징지워진다. 몇몇 ALS 환자에서, 치매 또는 실어증이 존재한다(ALS-D). 상기 치매는 가장 흔한 전측두엽 치매(FTD)이고, 이들 경우의 대다수는 치아양(dentate gyrus) 그리고 전두엽 및 측두엽의 표면층의 뉴런에서 유비퀴틴-양성, 타우-음성 함유물을 가지고 있다.

[0015] 포함체 근육염(IBM)은 50세 이상의 사람에서 일반적으로 발견되는 심각한 질병이고 골격근 섬유가 염증을 발생시키며 위축을 시작하지만 뇌는 면제되어 환자는 완전한 지력을 보유한다. 아밀로이드-β 단백질의 생성에 관여하는 2개의 효소가 가장 흔한 아밀로이드-β가 증가된 장년층의 진행성 근육 질병을 가진 환자의 근육세포 안에서 증가함이 발견되었다.

- [0016] 아밀로이드-유사 단백질의 축적과 침전에 기초하거나 또는 이와 연관된 다른 질병은 황반변성이다. 황반변성은 망막(빛-감응 세포가 시각 신호를 뇌로 보내는 안구 뒤의 얇은 조직)의 중앙부위인 황반의 악화를 야기시키는 흔한 안구질환이다. 날카롭고 선명한 앞으로 보이는 시각은 황반에서 처리된다. 상기 황반의 손상은 맹점과 흐릿하고 왜곡된 시각을 만들어낸다. 연령-연계 황막변성(AMD)은 미국에서 시각장애의 주요 원인이고 65세 이상의 사람에 대하여 코카시안(Caucasians)중에 법적맹(legal blindness)의 주요 원인이다. 나이 40이거나 더 높은 약 1백 80만의 미국인들이 진행된 AMD를 가지며, 중간단계의 AMD를 가진 다른 7백 30만 사람들은 시각 상실이라는 중대한 위험에 놓여 있다. 정부는 2020년까지 2백 90만 명이 진행된 AMD를 가질 것으로 추산한다. AMD의 희생자들은 이렇게 눈을 멀게하는 상태의 원인과 치료에 대해 알려진 것이 없다는 것에 흔히 놀라고 좌절한다. 2가지 형태의 황반변성이 존재한다: 건성 황반변성과 습성 황반변성. 상기 황반의 세포가 천천히 파괴되는 건성 형태는 황반변성 케이스의 85%에서 진단된다. 한쪽 안구가 시각을 잃고 다른 한쪽 안구가 정상임에도 불구하고, 2개의 안구는 일반적으로 건성 AMD에 의해 영향을 받는다. 망막아래 노란 침전물인 드러센(Drusen)은 건성 AMD의 흔한 초기 증상이다. 진행성 건조 AMD 또는 습성 AMD의 위험은 상기 드러센의 숫자와 크기가 증가할수록 증가한다. 습성 질병 형태로의 전환이 없이 건성 AMD는 진행하여 시각 상실의 원인이 된다; 그러나, 초기상태의 건성 AMD가 습성으로 갑자기 변할 수 있는 가능성도 또한 있다.
- [0017] 상기의 습성형태는 상기 케이스의 15%임이 해당함에도 불구하고 실명의 90%를 야기하고, 진행성 AMD로 간주된다(습성 AMD는 초기 또는 중간 단계가 없다). 습성 AMD는 건성 형태의 질병에 의해 항상 선행되어진다. 건성 형태가 악화되면, 몇몇 사람들은 황반 뒤에서 성장하는 비정상적인 혈관을 갖기 시작한다. 이러한 혈관은 매우 깨지기 쉽고 수액과 혈액을 흘려(이렇게해서 습성 황반변성) 상기 황반에 급작스런 손상을 야기한다.
- [0018] 건성형태의 AMD는 초기에 흔히 약간의 흐릿한 시각을 야기한다. 특히 시각의 중심이 그 다음에 흐릿해지고 상기 질병이 진행됨에 따라 이 부위가 점차 크게 성장한다. 오직 한쪽 안구가 영향을 받는다면 어떠한 증상도 나타나지 않을 수 있다. 습성 AMD에서, 직선은 곡선같이 나타나고 중앙 시각 상실이 급격히 일어날 수 있다.
- [0019] 황막변성의 진단은 AMD 진단을 돕기 위해 통상적으로 팽창된 안구 시험(dilated eye exam), 시각 예민 검사(visual acuity test), 및 안저 검사(fundoscopy)라 불리는 절차를 사용한 안구 뒤 보기에 관한 것이고, 습성 AMD가 의심될 경우 플루오레세인 혈관 조영법(fluorescein angiography)이 또한 실시되었다. 건성 AMD가 진행상태에 도달했다면, 시각 상실을 막기 위한 어떠한 현재 치료법이 존재하지 않는다. 그러나, 항산화제와 아연의 특이하게 높은 조제량이 진행에서 진행된 상태로의 중간단계의 AMD를 지연 또는 예방할 수 있다. 습성 AMD를 갖는 사람들에게 도움이 되는 마쿠젠(pegaptanib sodium injection), 국소 레이저 치료, 및 광역학 치료법은 황반에서 비정상 혈관 성장 및 출혈을 조절할 수 있다; 그러나 이미 상실된 시각은 이들 테크닉으로 복원될 수 없다. 시각이 이미 상실되었다면, 삶의 질을 향상시키는데 도움이 될수 있는 저시력 기구(low vision aids)가 존재한다.
- [0020] 노인성 황반변성(AMD)이 초기 증상 중 하나는 망막색소상피(RPE)의 기저막 및 브러쉬 막(Bruch's membrane; B M)사이의 드러센으로 알려진 세포의 침전물의 축적이다. Anderson등에 의해 실시된 최근 연구는 드러센이 아밀로이드 베타를 포함한다고 확인하였다(Experimental Eye Research 78 (2004) 243 - 256).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 본 발명의 목적은 생물 시료, 예를 들어 분비액 또는 혈청 시료, 바람직하게는 혈청 시료에서 A β 변형체, 특히 pGlu-A β 펩티드의 정량적 결정을 가능하게 하는 매우 민감하고 동시에 강력한 감지 기술을 확립하는 것이다. 혈액내에 A β 펩티드의 낮은 양을 고려하면 이것은 엄청난 도전이다. 그러나, 그러한 감지기술을 이용할 수 있게 하는 것이 약물 스크리닝 절차에서 저분자 저해제의 효능을 연구하기 위한 선행조건이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 본 발명은 β -아밀로이드 항원, 특히 결집체, 섬유, 필라멘트의 형태 또는 플라크의 압축된 형태로 단량체, 이량체, 삼량체 등, 또는 다량체의 형태로 항체에 주어지는 pGlu-A β 펩티드의 범위로부터의 특정 에피토프를 특

별히 인식하고 결합하는 능력을 갖는 키메라 항체 및 그의 단편, 부분적 또는 완전하게 인간화된 항체 및 그의 단편을 포함하는 상당히 특이하고 상당히 효과적인 항체를 포함하는 새로운 방법과 조성물을 제공한다. 본 발명의 교육으로부터 가능한 상기 항체는 몇가지 예를 들자면, 알츠하이머 질병(AD), 루이보디 치매, 다운 증후군, 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈(네델란드 타입); 구암 파킨슨-치매 복합증; 뿐만 아니라 아밀로이드-유사 단백질에 기초하거나 또는 이와 연관된 진행성 핵성 마비, 다발성 경화증; 광우병, 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈(네델란드 타입), 파킨슨스 질병, HIV-연관 치매, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 성인기 발병 당뇨병; 노인성 심장 유전분증; 내분비선 종양 및 황반변성을 포함하는 다른질병과 같은 다른 질병과 같은 신경 질환을 포함하나 여기에 국한적이지 않은 2차 유전분증 및 노인성 유전분증을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질병과 질환의 군인 유전분증 진단에 특히 유용하다.

[0023] 상기에 언급된 모든 요구조건을 충족시키기 위해서, ELISA 기반 기술이 특히 바람직하다. 이들 A β 변형체에 대해 ELISA 시스템이 이미 상용화되어 입수가능(Human Amyloid β (N3pE) Assay Kit-IBL, Code No. 27716)하기 때문에 상기 작업은 A β N3pE ELISA를 가지고 시작하고, 이들은 레퍼런스 및 내부 퀄리티 대조군으로 사용된다. A β N3pE-40 펩티드의 캡처는 TGC(The Genetics Company, Inc., Wagistrasse 23, 8952 Schlieren, Zurich area Switzerland)로 부터의 hA β (x-40) ELISA (HS)를 가지고 이루어지며 이들은 개발 과정을 용이하게 하고 진척시킨다.

[0024] 발명의 요약

[0025] 본 발명은 A β -펩티드에 높은 친화도를 가지고 결합하는 것을 특징으로하는 항체 또는 그의 변형체에 특히 관한 것이다. 상기의 높은 친화도는 본 발명의 문맥상 10^{-7} M의 해리상수(K_D) 또는 그 이상, 바람직하게는 10^{-8} M의 해리상수 또는 그 이상, 심지어 더욱 바람직하게는 10^{-9} M - 10^{-12} M의 해리상수를 의미한다.

[0026] 특히 상기의 항체는 바람직하게는 단일 클론 항체이고 하기 군으로부터 선택된다

[0027] A β 5-5-6

[0028] A β 6-1-6

[0029] A β 17-4-3

[0030] A β 24-2-3

[0031] 본 발명에 따른 상기 항체는 유전분증, 특히 알츠하이머 질병을 감지하는 진단방법에 특별히 유용하다.

[0032] 상기 용어 "항체"는 광범위한 의미로 쓰이며, 구체적으로는 순수한 단일클론항체, 다중클론항체, 적어도 2개의 온전한 항체로부터 형성된 다중특이적 항체(예, 이중특이성 항체)들, 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 경우 항체 단편을 포함한다. 상기 항체는 예를 들면 IgM, IgG (예, IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4), IgD, IgA 또는 IgE일 수 있다. 그러나 바람직하게는, 상기 항체는 IgM 항체가 아니다.

[0033] "항체단편"은 온전한 항체의 부분, 일반적으로 상기 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 구역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 즉: 다이아보디(diabodies); 단일 사슬 항체 분자; 그리고 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0034] 여기에 사용된 상기 용어 "단일 클론 항체"는 실질적으로 균일한 항체 군으로부터 얻어진 항체, 즉, 소량으로 존재하는 자연적으로 일어나는 돌연변이를 제외하고 집단이 동일한 것을 포함하는 개개의 항체를 지칭한다. 단일 클론 항체는 단일 항원 부위에 향하도록 상당히 특이적이다. 더우기 다른 결정부위(에피토프)에 향하는 다른

항체를 통상적으로 포함하는 "다중 클론 항체" 제형과 대조적으로, 각 단일 클론 항체는 상기 항원의 단일 결정 부위에 향하도록 되어 있다. 그의 특이성 뿐만 아니라, 상기 단일 클론 항체는 다른 면역 글로불린 항체에 의해 오염되지 않고 흔히 하리브리도마 배양에 의해 생성될 수 있다는 이점도 가질 수 있다. 상기의 "단일 클론"이라는 용어는 실제로서 균일한 항체의 집단으로 얻을 수 있는 항체의 특성을 지칭하고, 어떠한 특정한 방법에 의해 항체를 필요로하는 생산으로서 파악되지는 않는다. 예를 들면, 상기 본 발명에 따라 사용된 상기 단일 클론 항체는 Kohler 등(Nature, 256:495 (1975))에 처음으로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 일반적으로 잘 알려진 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기의 "단일 클론 항체"는 예를 들면, Clackson 등(Nature, 352:624-628 (1991))과 Marks 등(J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))에 기술된 기술을 사용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 또한 분리될 수 있다.

[0035]

[0036]

여기에 언급된 상기 단일 클론 항체는 구체적으로 키메릭 항체(면역글로불린 항체)를 포함하는데, 여기서 중 및/또는 경 사슬 부위는 특정한 종으로부터 유도된 항체의 해당 서열에 동일하거나 상동성이거나 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하며, 남은 사슬은 다른 종으로부터의 항체에서의 해당서열과 동일하거나 상동성이거나 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하며, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 그런 항체의 단편을 포함한다.

[0037]

비인간(예, 설치류) 항체의 "인간화"된 폼은 키메릭 면역 글로불린 항체, 면역 글로불린 항체 사슬, 비인간 면역 글로불린 항체로부터 유도된 최소한의 서열을 포함하는 그 자신의 단편(Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 다른 항체의 항원결합 서열과 같은)이다. 무엇보다도, 인간화된 항체는 수령자 항체의 상보성-결정 구역(CDR)으로부터의 잔기는 원하는 특이성, 친화성, 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼와 같은 비인간 종(공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체되는 인간 면역 글로불린 항체(수령자 항체)이다. 몇 가지 예에서, 인간 면역 글로불린 항체의 Fv 프레임워크(framework) 구역(FR)은 상응하는 비인간 잔기에 의해 대체된다. 더우기, 인간화된 항체는 수령자 항체도 발견되지 않으며 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체의 효능을 제련하고 최적화하기 위해 만들어 진다. 일반적으로 인간화된 항체는 상기 CDR 구역의 모든 또는 실질적으로 모든 구역이 비인간 면역 글로불린 항체의 구역에 해당하고 FR 구역의 모든 또는 실질적인 모든 구역은 인간 면역 글로불린 항체 서열인 실질적으로 적어도 하나, 그리고 통상적으로 2개의 가변 도메인을 포함할 것이다. 상기 인간화된 항체는 최적적으로 또한 적어도 하나의 통상적으로 인간 면역 글로불린 항체의 면역 글로불린 컨스턴트 구역(Fc)를 포함할 것이다. 더욱 자세한 것은 Jones 등(Nature, 321:522-525 (1986)), Reichmann 등(Nature, 332:323-329 (1988)): Presta(Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992))를 참조하시오. 상기 인간화된 항체는 Primatized™ 항체를 포함하고 여기서 상기 항체의 항원 결합 부위는 관심있는 항원으로 짧은 꼬리 원숭이를 면역화하여 생산된 항체로부터 유도된다.

[0038]

"단일 사슬 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의 V_H and V_L 도메인을 포함하고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, 상기의 Fv 폴리펩티드는 더우기 sFv로 하여금 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성하게 끄는 V_H 와 V_L 사이의 폴리펩티드 링커를 포함한다. sFv 리뷰를 위해 Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113 과 Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)를 참조하시오.

[0039]

상기 용어 "다이아보디(diabody)"는 2개의 항원 결합부위를 갖고 같은 폴리펩티드 사슬(V_H - V_D)에서 경사슬 가변 도메인(V_D)에 연결된 중사슬 가변 도메인(V_H)을 포함하는 작은 항체 단편을 지칭한다. 너무 짧아 같은 사슬상에서 두 도메인간의 짝짓기를 허용하지 않는 링커를 사용하여, 상기 도메인들은 다른 사슬의 상보적 도메인과 짝지어지도록 되어져 2개의 항원 결합 부위를 생성한다. 다이아보디는 Hollinger 등(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993))에 보다 완벽하게 기술되어 있다.

[0040]

"분리된" 항체는 동정되고 분리 및/또는 그 자신의 자연 환경 성분으로부터 수거된 것이다. 그 자신의 자연환경의 오염 성분은 상기 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질 또는 비단백질 용매를 포함할 수 있다. 바람직한 양태로서, 상기 항체는 Lowry 방법에 의해 결정되어항체의 (1)

95 중량%이상으로 정제될 것이고, 가장 바람직하게는 99 중량% 이상으로 정제될 것이다. (2) 스핀닝 컵 시퀀네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열으로 적어도 15개 잔기를 얻을 수 있기에 충분한 양으로 정제된다. (3) 또는 코오마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 실버 스테인(silver stain)을 사용하는 환원 또는 비환원 조건상에서 SDS-PAGE에 의해 균일하게 정제된다. 분리된 항체는 상기 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 구성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 안 그 위치에 상기 항체를 포함한다. 그러나 일반적으로, 분리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0041] 여기서 사용되는 "세포", "세포주", "세포배양"이라는 표현은 서로 바꾸어 사용될 수 있고 그러한 모든 명시는 자손을 포함한다. 따라서, "형질전환자" 및 "형질전환된 세포"는 유전자 전달의 숫자와 상관없이 그들로부터 유도된 프라이머리 서브젝트 세포 및 배양을 포함한다. 또한 모든 자손은 고의적 또는 우연한 돌연변이에 기인하여 DNA 양에서 정확하게 동일할 수 없다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것 처럼 같은 기능 또는 생물 활성을 갖는 돌연변이 자손이 포함되어 있다. 독특한 표시가 필요한데서는 이것은 문맥상으로부터 명확할 것이다.

[0042] 여기서 사용되는 상기 용어 "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 서로 바꾸어 사용될 수 있고 펩티드 결합으로 연결된 아미노산으로 이루어진 생체분자를 의미하도록 의된다.

[0043] 여기서 사용되는 상기 용어 "a", "an", 및 "the"는 "하나 또는 그 이상"을 의미하도록 정의되고 문맥상이 부정당하지 않으면 복수를 포함한다.

[0044] 상기 용어 "아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 기인된 또는 이와 연관된 질병 및 질환"은 단량체, 파이버릴(fibril), 또는 다량체 상태 또는 상기 세가지의 어떠한 조합의 아밀로이드-유사 단백질의 존재 및 활성에 기인한 질병 및 질환을 포함하나 여기에 국한되지는 않는다. 그러한 질병 및 질환은 유전분증(amyloidosis), 내분비선 종양(endocrine tumors), 및 황반변성(macular degeneration)을 포함하나, 여기에 국한되지는 않는다.

[0045] 상기 용어 "유전분증"은 예를 들어, 약한 인지 장애(MCI), 특발성 알츠하이머 질병, 루이소체(Lewy body) 치매, 다운 증후군, 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis; Dutch type)과 같은 인지 기억능력의 상실을 특징으로하는 질병 또는 상태를 포함하는 예를 들어, 약한 인지 장애(MCI), 특발성 알츠하이머 질병, 루이소체(Lewy body) 치매, 다운 증후군, 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis; Dutch type); 구암 파킨슨 치매 복합증(the Guam Parkinson-Dementia complex), 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 알츠하이머 질병의 가족성 형태; 뿐만 아니라 진행성 핵성 마비(progressive supranuclear palsy) 다발성 경화증(multiple sclerosis); 광우병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨 질병, HIV-연관 치매, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 포함체 근육염(inclusion-body myositis), 성인기 발병 당뇨병(Adult Onset Diabetes), 및 노년 심장 유전분증(senile cardiac amyloidosis); 및 황반변성, 드러센-연관 시신경 장애(drusen-related optic neuropathy), 및 베타-아밀로이드 축적에 기인한 백내장을 포함하는 다양한 안과 질환과 같은 알츠하이머 질병(AD)의 신경학적 질환을 포함하나 여기에 국한되지 않는 질병과 같은 2차 유전분증 및 노인성 유전분증을 포함하나 여기에 국한하지 않은 아밀로이드 플라크(plaque) 형성과 연관된 질병 또는 질환의 군을 칭한다.

[0046] "아밀로이드 β , A β 또는 β -아밀로이드"라는 용어는 당업자에게 알려진 용어이고 아밀로이드 β 단백질 및 펩티드, 아밀로이드 β 전구체 단백질 (APP), 뿐만 아니라 변형체, 단편, 및 그의 어떠한 기능적 동등체를 지칭한다. 특히, 여기서 사용된 아밀로이드 β 는 APP의 가수분해로 생성되는 어떠한 단편을 의미하지만 특히 A β_{1-38} , A β_{1-40} , A β_{1-42} 을 포함하나 여기에 국한되지 않는 아밀로이드 병상과 관련되거나 또는 연관된 단편을 의미한다. 이들 A β 펩티드의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0047] A β_{1-42} (SEQ ID NO. 1) :

[0048] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys- Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-

Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile- Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala

- [0049] A β 1-40 (SEQ ID NO. 2) :
- [0050] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys- Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile- Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
- [0051] A β 1-38 (SEQ ID NO. 3) :
- [0052] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys- Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile- Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly
- [0053] "pGlu-A β " 또는 "A β N3pE"는 A β 의 아미노산 서열에서 3번째 위치에서 글루타민산 잔기에서 시작하는 A β 의 N-말단이 잘라진 형태를 지칭하고, 여기서 상기의 글루타민산 잔기는 고리를 형성하여 파이로글루타민산 잔기를 형성한다. 특히 여기서 사용되는 pGlu-A β 는 pGlu-A β ₃₋₃₈, pGlu-A β ₃₋₄₀, p-Glu-A β ₃₋₄₂를 포함하나 여기에 국한되지 않는 아밀로이드 병상과 관련 또는 연관되는 단편을 의미한다.
- [0054] A β ₃₋₃₈, A β ₃₋₄₀, A β ₃₋₄₂의 N-말단이 잘라진 형태의 서열은 하기와 같다:
- [0055] A β 3-42 (SEQ ID NO. 4) :
- [0056] Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val- Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu- Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala
- [0057] A β 3-40 (SEQ ID NO. 5) :
- [0058] Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val- Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu- Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
- [0059] A β 3-38 (SEQ ID NO. 6) :
- [0060] Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val- Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu- Met-Val-Gly-Gly
- [0061] 특히 본 발명은 하기 항목에 속한다:
- [0062] 1. A β 펩티드 또는 변형체에 결합하고, 바람직하게는 높은 친화도로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [0063] 2. 제 1항에 있어서, 상기 높은 친화도가 10^{-7} M 또는 그 이상의 해리 상수 (K_D)값을 의미하는 것인 항체.
- [0064] 3. 제 1 또는 2항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체인 항체.

- [0065] 4. 상기 선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 상기 경사슬의 상기 가변구역이 SEQ ID NOs: 49, 53, 57 및 61로부터 선택된 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NOs: 50, 54, 58, and 62로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 항체.
- [0066] 5. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 상기 중사슬의 가변구역이 SEQ ID NOs: 51, 55, 59 및 63으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NOs: 52, 56, 60 및 64로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 항체.
- [0067] 6. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 상기 경사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 49의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 50의 아미노산 서열을 가지며 여기서 상기 항체의 상기 중사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 51의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 52의 상기 아미노산 서열을 갖는 항체.
- [0068] 7. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 상기 경사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 53의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 가지며 여기서 상기 항체의 상기 중사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 55의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 56의 상기 아미노산 서열을 갖는 항체.
- [0069] 8. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 상기 경사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 57의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 가지며 여기서 상기 항체의 상기 중사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 59의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 60의 상기 아미노산 서열을 갖는 항체.
- [0070] 9. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 상기 경사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 61의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열을 가지며 여기서 상기 항체의 상기 중사슬의 상기 가변구역은 SEQ ID NO: 63의 상기 뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 64의 상기 아미노산 서열을 갖는 항체.
- [0071] 10. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 하기 군으로부터 선택되는 항체 또는 그의 기능적 변형체.
- [0072] A β 5-5-6 (기탁 번호. DSM ACC 2923)
- [0073] A β 6-1-6 (기탁 번호. DSM ACC 2924)
- [0074] A β 17-4-3 (기탁 번호. DSM ACC 2925)
- [0075] A β 24-2-3 (기탁 번호. DSM ACC 2926)
- [0076] 11. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 A β 6-1-6 (기탁 번호. DSM ACC 2924)인 항체 .
- [0077] 12. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 A β 24-2-3 (기탁 번호. DSM ACC 2926)인 항체.
- [0078] 13. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간화 또는 키메라 항체 또는 상기의 높은 친화성을 갖는 항체 단편인 항체.

- [0079] 14. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, A β 펩티드 또는 그의 변형체의 감지를 위해 사용하는 항체.
- [0080] 15. 제 14항에 있어서, 상기 변형체는 하기 군으로부터 선택되어지는 항체:
- [0081] pGlu-A β_{3-38}
- [0082] pGlu-A β_{3-40}
- [0083] pGlu-A β_{3-42} , 및
- [0084] pGlu-A β_{3-x} 변이체,
- [0085] 여기서 x 는 10 내지 42 사이의 정수이고; 바람직하게는 18 내지 42 사이의 정수, 더욱 바람직하게는 30 과 42 사이의 정수이다.
- [0086] 16. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 인간인 항체.
- [0087] 17. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 다이아보디 또는 상기의 높은 친화성을 갖는 단일 사슬 항체인 항체.
- [0088] 18. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 15항에서 정의된 항체에 의해 결합된 에피토프에 결합하는 항체.
- [0089] 19. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 15항에서 정의된 항체의 상보성 결정 구역을 가지고 있는 항체.
- [0090] 20. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 라벨되어 있는 항체.
- [0091] 21. 전술한 항 중 어느 한 항에 있어서, 고체상에 고정되어 있는 항체.
- [0092] 22. 하이브리도마 세포주인 DSM ACC 2923, DSM ACC 2924, DSM ACC 2925, DSM ACC 2926의 어느 하나로부터 얻을 수 있는 항체.
- [0093] 23. 전술한 항 중 어느 한 항에 정의된 상기 항체를 포함하는 조성물.
- [0094] 24. 제 23항에 있어서, 유전분증(amyloidosis)의 치료, 예방 또는 지연을 위한 조성물.
- [0095] 25. 제 23항 또는 제 24항에 있어서, 상기 유전분증이 약한 인지 장애, 알츠하이머 질환 및 다운증후군에서의 신경퇴행증으로 이루어진 상기 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질환인 조성물.
- [0096] 26. 제 23항 또는 제 24항에 있어서, 상기 유전분증이 특발성 알츠하이머 질병 또는 가족성 알츠하이머 치매인 조성물.
- [0097] 27. 제 26항에 있어서, 상기 가족성 알츠하이머 치매가 가족성 영국민 치매 또는 가족성 덴마크민 치매인 조성

물.

- [0098] 28. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2923.
- [0099] 29. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2924.
- [0100] 30. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2925.
- [0101] 31. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2926.
- [0102] 32. 진단 또는 치료 방법에서 제 1항 내지 제 22항의 어느 하나에 정의된 상기 항체 또는 제 23항 내지 제 27항의 어느 하나에 정의된 상기 조성물의 용도.
- [0103] 33. 제 32항에 있어서, 아밀로이드-연관 질병 또는 상태의 상기 진단을 위한 상기의 용도.
- [0104] 34. 제 33항에 있어서, 상기 유전분증이 약한 인지 장애, 알츠하이머 질병 및 다운증후군에서의 신경퇴행증으로 이루어진 상기 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질환인 상기의 용도.
- [0105] 35. 제 33항에 있어서, 상기 유전분증이 특발성 알츠하이머 질환 또는 가족성 알츠하이머 치매인 용도.
- [0106] 36. 제 35항에 있어서, 상기 가족성 알츠하이머 치매가 가족성 영국민 치매 또는 가족성 덴마크민 치매인 용도.
- [0107] 37. 제 1항 내지 제 22항의 어느 하나에 따른 아밀로이드 연관 질환 또는 상태, 특히 알츠하이머 질병 또는 상태 앓은 것으로 의심되는 대상으로부터의 시료와 접촉시키는 단계, 및 상기 시료로부터 pGlu-아밀로이드 단백질, 바람직하게는 pGlu-A β 펩티드로 결합 탐지하는 단계를 포함하는, 아밀로이드 연관 질환 또는 상태, 특히 알츠하이머 질환의 진단을 위한 시험관 내 진단 방법.
- [0108] 38. 제 1항 내지 제 22항 중 어느 하나의 항에 정의된 상기 항체 및 사용자 매뉴얼 을 포함하며 임의로 (a) 추가의 생물학적 활성 물질을 포함하는 진단용 키트.
- [0109] 39. 제 32항에 있어서, 상기의 추가의 생물학적 활성 물질이 글루타미니 사이클라아제(glutaminy cyclase)의 저해제인 진단 키트.
- [0110] 40. SEQ ID Nos: 23 내지 48로 이루어진 γ 군으로부터 선택된 올리고뉴클레오타이드.
- [0111] 본 발명의 상기 항체는 유전분증의 진단에 유용할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 상기 항체는 친화성 정제 시료로써 사용될 수 있다. 이 과정에서, 상기 항체는 당업자에 알려진 방법

을 사용하여 Sephadex 레진이나 필터 페이퍼와 같은 고체상에 고정된다. 상기의 고정된 항체는 정제된 A β -펩티드(또는 그의 단편)를 포함하는 시료와 접촉한 후, 지지체가 고정된 항체에 결합되어 있는 A β -펩티드를 제외한 시료상의 모든 물질들을 실질적으로 제거하는 적당한 용매로 세척된다. 마지막으로 상기 지지체가 pH 5.0의 상기 항체로부터 상기 A β -펩티드를 여기하는 글라이신 완충용액과 같은 다른 적당한 용매로 세척된다.

- [0113] 항-A β -펩티드 항체는 예를 들어, 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서의 감지가 있듯이 A β -펩티드 진단 검사법에 또한 유용할 수 있다. 따라서, 상기 항체는 유전분증의 진단에 사용될 수 있고 특히, 약한 인지 장애(MCT), 가족성 알츠하이머 치매(FAD) 예를 들어, 특발성 알츠하이머 질병(SAD), 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크인 치매(FDD)와 같은 알츠하이머 질병(AD), 및 다운 증후군의 신경 퇴행성으로 이루어진 상기 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질병에 사용된다; 바람직하게는 알츠하이머 질병에 사용된다.
- [0114] 진단 적용을 위해, 상기 항체는 통상적으로 탐지가능한 물질로 라벨되어 진다. 다양한 라벨이 입수 가능하며, 일반적으로 하기의 카타고리로 그룹화되어 질 수 있다:
- [0115] (a) ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , and ^{131}I 와 같은 방사성 동위 원소. 상기 항체는 예를 들어 Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Gutigen et al., Ed., Wiley-Interscience, New York, New York. Pubs., (1991)에 기술된 테크닉을 사용하여 방사성 동위 원소로 라벨될 수 있고 방사능은 신틸레이션 카운팅(scintillation counting)을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0116] (b) 형광 토양 킬레이트 (유로피움 킬레이트) 또는 플루오레신 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 덴실, 리사민, 파이크오이리스틴 및 텍사스 레드와 같은 형광 물질도 입수 가능하다. 형광 라벨은 예를 들어 Current Protocols in Immunology에 게시된 테크닉을 사용하여 항체에 결합될 수 있다. 형광은 플루오로미터를 사용하여 정량화될 수 있다.
- [0117] (c) 다양한 효소-기질 라벨도 입수 가능하다. 효소는 다양한 테크닉으로 측정될 수 있는 색원체 기질의 화학적 변형을 촉매한다. 예를 들어, 효소는 스펙트로포토미터로 측정할 수 있는 기질의 색깔 변화를 촉매할 수 있다. 이와는 달리, 상기 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변형시킬 수 있다. 형광에서의 변화를 정량하는 방법은 상기에 기술되어 있다. 화학발광 기질은 화학반응에 의해 전자적으로 여기된 후 측정되거나 (예를 들어, 케미루미노미터를 사용) 또는 에너지를 형광 수용체에 전달할 수 있는 빛을 발산할 수 있다. 효소 라벨의 예는 루시페라아제(예, 반딧불 루시페라아제 및 박테리아 루시페라아제; 미국 특허 제 4,737,456호), 루시페린, 2,3-디하이드로프살라진디온, 말레이트 디하이드로지나아제, 우레아제, 홀스레디쉬 페록시다아제(HRPO)와 같은 페록시다아제, 알카라인 포스퍼타아제, 0-갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 리소자임, 사카라이드 옥시다아제(예, 글루코스 옥시다아제, 갈락토스 옥시다아제, 및 글루코스 6-포스페이트 디하이드로지나아제), 헤테로사이클릭 옥시다아제(우리카아제, 젠신 옥시다아제와 같은), 락토펜옥시다아제, 마이크로페록시다아제 등을 포함한다. 효소를 항체에 결합시키는 테크닉은 O'Sullivan 등의 Methods for the Preparation of enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym (ed. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73: 147-166 (1981)에 기술되어 있다.
- [0118] 효소-기질 조합의 예는 예를 들어 하기를 포함한다.
- [0119] (i) 하이드로젠 페록시다아제가 염료 전구체(예, 오르토펜렌 다이아민(OPD) 또는 3,3', 5,5'-테트라메틸 벤지딘 하이드로클로라이드(TMB))를 산화하는 하이드로젠 페록시다아제를 기질로 가진 홀스레디쉬 페록시다아제(HRPO);
- [0120] (ii) 파라-니트로페닐 포스페이트를 색원체 기질로 갖는 알카라인 포스퍼타아제; 및

- [0121] (iii) 색원체 기질(예, p-니트로페닐 β -D-갈락토시다아제) 또는 형광 발산 기질 4-메틸룸벨리페릴- β -D-갈락토시다아제를 갖는 β -D-갈락토시다아제(β -D-Gal)
- [0122] 다양한 다른 효소-기질 조합이 당업자들에게 입수 가능하다.
- [0123] 때로는, 상기 라벨은 항체와 간접적으로 결합되어진다. 당업자들은 이것을 이루기 위한 다양한 테크닉을 인지하고 있다. 예를 들어, 상기 항체는 바이오틴에 결합되어 질 수 있고 상기에서 언급된 라벨의 3가지 광대한 카타고리의 어느 하나도 아비딘과 결합될 수 있거나 그 반대도 결합을 이룰 수 있다. 바이오틴은 선택적으로 아비딘(avidin)에 결합하여 라벨이 간접적인 방식으로 상기 항체에 결합할 수 있다. 대안적으로, 상기 항체와 라벨간의 간접적인 결합을 이루기 위해 상기 항체는 작은 햅텐(hapten; 예, 디곡신)과 결합되고 상기에서 언급된 다른 타입의 라벨 중 하나가 항-햅텐 항체(예, 항-디곡신 항체)와 결합된다. 따라서, 라벨과 항체간의 간접적인 결합은 이루어질 수 있다.
- [0124] 상기 A β -항체는 라벨될 필요가 없고, 이들 자신의 존재는 A β -항체에 결합하는 라벨된 항체를 사용하여 감지될 수 있다.
- [0125] 본 발명의 상기 항체는 경쟁 결합 검사법, 직접 및 간접 샌드위치 검사법, 및 면역 침전 검사법과 같은 어떠한 종류의 알려진 검사법에 이용할 수 있다. Zola, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press. Inc., 1987)
- [0126] 경쟁적 결합 검사법은 제한된 양의 항체와 결합하는데 있어서 라벨된 표준물의 검사 시료 분석물과 경쟁하는 능력에 의존한다. 검사 시료에서 A β 펩티드의 양은 상기 항체에 결합된 표준물의 양에 반비례한다. 결합된 표준물 양 결정을 용이하게 하기 위해 상기 항체는 일반적으로 경쟁 전후에 불용화되어, 상기 항체에 결합되어 있는 표준물과 분석물은 결합되지 않은 표준물과 분석물들로부터 편리하게 분리되어 질 수 있다.
- [0127] 샌드위치 검사법은 각각이 탐지될 단백질의 다른 면역성 부위 또는 에피토프 결합할 수 있는 2개의 항체 사용에 관한 것이다. 샌드위치 검사법에서 검사 시료 분석물은 고체상에 고정된 첫번째 항체에 결합된 후, 두번째 항체가 분석물에 결합하여, 불용성의 3가지 부분 복합체를 형성한다. 상기의 두번째 항체는 그 자체가 감지될 수 있는 부분에 라벨될 수 있거나(직접 샌드위치 검사법) 또는 감지될수 있는 부분으로 라벨되어진 항면역글로불린 항체를 사용하여 측정될 수 있다(간접 샌드위치 검사법). 예를 들면, 샌드위치 검사법의 바람직한 한가지 타입은 감지될 수 있는 부분이 효소인 ELISA 검사법이다.
- [0128] 면역조직화학법에 있어서 예를 들어, 상기 조직 시료는 신선하거나 또는 얼려져 있거나 또는 파라핀에 묻혀있을 수 있고 포르말린과 같은 보존제로 고정될 수 있다.
- [0129] 진단 키트
- [0130] 편의상, 본 발명의 상기 항체는 곧, 진단 검사법 진행을 위해 매뉴얼이 주어지고 미리 결정된 양의 시약들의 패키징화된 조합인 키트로 제공될 수 있다. 상기 항체가 효소로 라벨되어진 곳에서, 상기 키트는 기질과 효소(예, 탐지 가능한 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구체)에 의해 필요한 보조인자를 포함할 것이다. 뿐만 아니라, 안정제, 완충용액(예, 블록 완충용액, 또는 용해 완충용액) 등과 같은 다른 첨가제가 포함될 수 있다. 상기 다양한 시약의 상대적 양은 상기 검사법의 민감도를 실질적으로 최적화하는 시약 용액상에 농도를 제공할 수 있도록 광범위하게 달라질 수 있다. 특히, 상기 시약은 용액상에서 적정 농도를 갖는 시약 용액을 제공하는 첨가

제를 포함하는 일반적으로 감압 동결건조 분말가루로서 제공된다.

- [0131] 본 발명에 따른 상기 진단 키트는 하기에 기술된 바와 같이 추가의 생물학적 활성 물질을 포함할 수 있다. 상기 진단 키트 용도에 특히 바람직한 것은 글루타미닐 사이클라아제 저해제이다.
- [0132] 본 발명의 진단 키트는 아밀로이드-연관 질병 및 상태, 특히 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병 (SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서 신경퇴행증과 같은 알츠하이머 질병(AD)으로 이루어진 상기 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질병의 감지 및 진단을 위해 특히 유용하다; 바람직하게는 알츠하이머 질병에 유용하다.
- [0133] 본 발명은 특히 높은 친화도로 A β -펩티드에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체에 적합하다. 본 발명은 또한 높은 친화도로 A β -펩티드 또는 그의 변형체에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체에 또한 적합하다. 상기의 높은 친화도는 본 발명의 문맥적으로 10^{-7} M의 해리상수 값 또는 그 이상, 바람직하게는 10^{-8} M의 해리상수 값 또는 그 이상, 및 심지어 더욱 바람직하게는 10^{-9} M - 10^{-12} M의 해리상수의 친화도를 의미한다. 그리하여, 본 발명의 항체는 이전에 알려진 항체보다 보다 더 높은 친화도를 가지고 A β -펩티드에 결합한다.
- [0134] 특히, 상기 항체는 바람직하게는 단일 클론 항체이고 하기 군으로부터 선택된다
- [0135] A β 5-5-6 (DSM ACC 2923)
- [0136] A β 6-1-6 (DSM ACC 2924)
- [0137] A β 17-4-3 (DSM ACC 2925)
- [0138] A β 24-2-3 (DSM ACC 2926)
- [0139] 본 발명에 따른 상기 항체는 특히 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병 (SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군에서 신경퇴행증과 같은 알츠하이머 질병(AD)으로 이루어진 상기 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질병 곤, 유전분증을 감지 하기 위한 방법에서 특히 유용하다; 바람직하게는 알츠하이머 질병에 유용하다.
- [0140] 바람직한 양태에 따라서, 상기 항체는 인간화 될수 있거나 또는 키메라 항체이거나 또는 인간 항체이다.
- [0141] 더우기, 상기에서 언급된 군으로부터 선택된 상기 항체는 또한 상기 군의 기능적 변형체일 수 있다.
- [0142] 본 발명의 문맥상, p-Glu-A β 펩티드의 변형체는 특히,
- [0143] pGlu-A β ₃₋₃₈,
- [0144] pGlu-A β ₃₋₄₀,
- [0145] pGlu-A β ₃₋₄₂
- [0146] 이다.
- [0147] A β 펩티드의 추가의 변형체는 모두가 알츠하이머 질병이나 또는 선행된 알츠하이머 질병의 결과로서 뇌속에 축

적되는 것으로 보인 pGlu-A β_{3-x} 변형체이다. X는 10과 42사이의 정수로서 정의된다. 예를 들어, 상기의 pGlu-A β_{3-42} ,에서 "42"는 "x"에 대한 정수이다.

- [0148] 본 발명의 문맥에서, 본 발명 항체의 "기능적 변형체"는 결합능력, 특히, pGlu-A β_{3-x} 펩티드 또는 그의 기능적 변형체에 높은 친화도를 가지고 결합능력을 을 보유한 항체이다. 그러한 기능적 변형체의 제공은 당업자에게 알려져 있으며 항체와 그의 단편의 정의하에 주어진 상기에 언급된 가능성을 포함한다.
- [0149] 바람직한 양태로서, 상기 항체는 상기에 정의된 바와 같이 항체 단편이다.
- [0150] 보다 더 바람직한 양태로서, 상기 발명 항체는 상기에 정의된 바와 같이 특히, 항체 5-5-6, 항체 6-1-6, 항체 17-4-3 및 항체 24-2-3인 항체에 의해 결합된 에피토프에 결합하는 항체이다.
- [0151] 보다 더 바람직한 양태로서, 본 발명의 상기 항체는 상기에서 정의된 항체의 상보성 결정 구역(CDRs)을 지닌 항체이다. 바람직하게는, 상기 항체는 라벨될 수 있다; 가능한 라벨은 상기에 언급된 것이고 특히 항체를 진단용으로 사용하는 당업자들에게는 그들 모두는 다 알려져 있다.
- [0152] 바람직하게는, 상기 항체는 교체상에 고정되어 있다.
- [0153] 본 발명은 하이브리도마 세포주 6-1-6 (DSM ACC 2924)로 부터 얻을 수 있는 항체에 또한 관여한다.
- [0154] 본 발명은 상기에 정의된 상기 항체를 포함하는 조성물에 또한 관여한다. 특히, 상기 조성물은 진단 용도, 특히 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병 (SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크인 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군에서 신경퇴행증과 같은 알츠하이머 질병(AD)으로 이루어진 상기 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질병의 진단의 조성물이다; 바람직하게는 알츠하이머 질병의 진단 조성물이다; 특히 생물 시료에 있는 A β 펩티드 또는 그의 변형체의 감지에 의한 진단 조성물이다.
- [0155] 다른 양태에서는, 여기에서 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 상기 항체 또는 그의 단편은 A β 올리고머, 파이버(fiber), 파이프릴(fibril), 필라멘트(filament)로의 적어도 2배, 특히 적어도 4배, 특히 적어도 10배, 특히 적어도 15배, 더욱 특히 적어도 20배의 결합 친화도를 나타내지만, A β 단량체에 대해서는 특히 적어도 25배 이상의 결합 친화도를 나타낸다.
- [0156] 또 다른 양태로서, 항체 또는 그의 단편 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 그의 단편은 전에 여기에서 전술한 바와 같이 제공되며, 항체는 실질적으로 포유동물, 특히 인간뇌에서 A β 플라크(plaques)를 포함하는 결집된 A β 에 결합한다.
- [0157] 본 발명의 다른 양태에서는, 상기 항체 또는 그의 단편 또는 상기 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 그의 단편은 여기에서 전술한 바와 같이 제공되며, 항체는 실질적으로 포유동물, 특히 인간뇌에서 A β 단량체를 포함한 가용한 다량체 아밀로이드, 특히 아밀로이드 β (A β)에 결합한다. 그러나, 바람직하게는 아밀로이드 전구 단백질(APP)과 어떠한 상당량의 교차반응을 보여주지 않는다.
- [0158] 본 발명은 또한 여기에서 전술한 바와 같은 상기 항체의 인간화된 형태, 상기 인간화된 항체를 포함하는

조성물, 및 유전분증 치료를 위한 포유동물 특히 인간에서 신경퇴행성 질병의 치료를 위한 상기 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기 신경퇴행성 질병은 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병 (SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군에서 신경퇴행증과 같은 알츠하이머 질병(AD)으로 이루어진 군으로부터 특히 선택된다. 바람직하게는 상기 신경퇴행성 질병은 알츠하이머 질병이다.

[0159] 본 발명은 하기의 하이브리도마 세포주 5-5-6, 6-1-6, 17-4-3 및 24-2-3에도 또한 관한 것이다.

[0160] 본 발명은 시험관내 진단방법에 사용하기 위해 상기에서 정의된 바와 같은 항체 또는 상기 항체를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 특히 이러한 진단 방법은 특발성 알츠하이머 질병 (SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군에서 신경퇴행증과 같은 알츠하이머 질병(AD)으로 이루어진 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질병의 진단에 관한 것이다; 바람직하게는 알츠하이머 질병의 진단에 관한 것이다; 특히 생물학적 시료에 있는 A β 펩티드 또는 그의 변형체의 감지에 의한 진단에 관한 것이다.

[0161] 바람직하게는, 상기 시료은 혈청 시료이다.

[0162] 다른 바람직한 양태에 따라서, 상기 시료는 분비액 또는 뇌척수액(CSF) 시료이다.

[0163] 특히 바람직한 양태에 따라서, 본 발명은 하기의 방법에 관한 것이다:

[0164] 아밀로이드-연관 질병 또는 상태, 바람직하게는 알츠하이머 질병의 시험관 또는 인시투(in situ) 진단방법은 다음 단계를 포함한다:

[0165] 본 발명에 따른 항체를 시료, 바람직하게는 혈청, 분비액, CSF 시료, 보다 바람직하게는 혈청 시료; 또는 특정 한 신체 부분 또는 상기 상태 또는 질병을 앓는 것으로 의심되는 자의 신체 부위와 접촉시키는 단계, 및

[0166] 상기 항체가 시료로부터의 pGlu-아밀로이드 단백질, 바람직하게는 pGlu-A β 펩티드에 결합함을 감지하는 단계.

[0167] 더욱 특히, 본 발명은 시료 또는 인시투에서의 항체 또는 그의 활성 단편의 pGlu-단백질, 바람직하게는 pGlu-A β 펩티드로의 면역 특이적 결합 감지를 포함하는 아밀로이드-연관 질병 또는 상태, 바람직하게는 알츠하이머 질병의 진단 방법에 관한 것이고, 이 방법은

[0168] (a) 상기 시료 또는 아밀로이드 단백질을 포함하리라 의심되는 특정 신체 부분, 또는 신체 부위를 항체, 특히 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 여기에서 전술된 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편 또는/및 항체가 pGlu-A β 펩티드에 결합하는 그의 기능적 부분과 접촉하는 단계,

[0169] (b) 상기 항체 및/또는 그의 기능적 부분을 pGlu-A β 와 결합시켜 면역 복합체를 형성시키는 단계;

[0170] (c) 면역 복합체의 형성을 감지하는 단계; 및

[0171] (d) 상기 시료 또는 특정 신체 부분 또는 부위에서 면역 복합체 유무를 pGlu-A β 펩티드 유무와 연관

[0172] 하는 단계를 포함한다.

[0173] 또한 조직 및/또는 체액 상의 아밀로이드 플라크 양을 결정하는 방법도

- [0174] (a) 조사중인 조직 및/또는 체액의 대표적인 시료를 얻는 단계;
- [0175] (b) 아밀로이드 단백질 존재하에서 항체, 특히 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 여기에서 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편 또는/및 그의 기능적 부분을 가지고 상기 시료를 조사하는 단계;
- [0176] (c) 단백질에 결합된 항체의 양을 결정하는 단계; 및
- [0177] (d) 조직 및/또는 체액에서 플라크 양을 계산
- [0178] 하는 단계를 포함한다.
- [0179] 특히, 본 발명은 조직 및/또는 체액에서 아밀로이드 형성 플라크 양을 결정하는 방법에 관한 것이다. 여기서, 스텝 (c)에서 면역 복합체의 형성이 결정되어 면역 복합체의 유무가 아밀로이드 단백질, 특히 특정 pGlu-A β 펩티드의 유무와 연관된다.
- [0180] 보다 다른 양태에서는, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 항체 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 치료학적으로 유효한 양으로, 기능적으로 동일한 임의의 항체 또는 임의의 유도체 또는 그의 기능적 부분을 포함하고 여기에 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편을 포함하는 조성물, 특히 약학적으로 허용가능한 담체를 선택적으로 추가로 포함하는 약학 조성물인 조성물에 관한 것이다.
- [0181] 본 발명의 다른 양태에서는, 상기 조성물은 치료학적으로 유효한 양으로 상기 항체를 포함한다. 본 발명에 따르면, 항체, 특히 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 기능적으로 동일한 임의의 항체 또는 어떠한 유도체 또는 그의 기능적 부분을 포함하고 여기에 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편을 치료학적으로 유효한 양으로 포함하며, 또한 선택적으로 추가의 생물학적 활성 물질 및/또는 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석액 및/또는 부형제를 포함하는 혼합물이 포함된다.
- [0182] 특히 본 발명은 추가의 생물학적 활성 물질이 약한 인지 장애(MCI), 알츠하이머 질병(AD) 예를 들어, 특발성 알츠하이머 질병 (SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군에서 신경퇴행증으로 이루어진 군으로부터 선택된 신경퇴행성 질병, 바람직하게는 알츠하이머 질병에 포함하는 A β 단백질 등의 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질과 연관된 질병 및 질환의 군인 유전분증의 약제에 사용되는 화합물인 혼합물에 관한 것이다.
- [0183] 본 발명의 다른 양태에서는, 상기의 다른 생물학적 활성 물질 또는 화합물이 또한 아밀로이드 β 에 의해 기인한 유전분증 치료에 사용될 수 있거나 또는 다른 신경 질환의 약제로 사용될 수 있는 치료제일 수 있다.
- [0184] 상기의 다른 생물학적 활성 물질 또는 화합물은 본 발명에 따른 항체와 동일 또는 유사한 기작에 의해 또는 비관련 작용 기작에 의해 또는 관련 및/또는 비관련된 작용 기작의 다양성에 의해 그의 생물학적 효과를 발휘할 수 있다.
- [0185] 일반적으로, 상기의 다른 생물학적 활성 화합물은 중성자-전달 인핸서(enhancer), 정신과 치료용 약물, 아세틸콜린 에스테라아제 저해제, 칼슘 채널 차단제, 바이오제닉(biogenic) 아민, 벤조디아제핀 안정제, 아세틸콜린 합성, 저장, 또는 방출 인핸서, 아세틸콜린 포스트시냅틱 수용체 작용제, 모노아민 옥시다아제-A, 또는 -B 저해제, N-메틸-D-아스파테이트 글루타메이트 수용체 길항제, 비-스테로이드 항-염증 약물, 항산화제, 및 세로토닌 수용체 길항제를 포함할 수 있다. 더욱 특히, 본 발명은 산화 스트레스에 효과적인 화합물, 항-세포사멸 화합물, 금속 켈레이터, 피렌제핀 및 대사물 등의 DNA 수선 저해제, 3-아미노-1-프로판설포닉산(3APS), 1,3-프로판다이설포네이트(1,3 PDS), α -시크리타아제 활성제, β - 및 γ -시크리타아제 저해제, 타우 단백질, 신경전달물질, 3-시트 블레이커(sheet breakers), 아밀로이드 베타를 제거/고갈시키는 세포 구성분에 대한 유인제, 글루타

미닐 사이클라아제 저해제등의 파이로글루타메이트 아밀로이드 베타 3-42를 포함하는 N-말단에서 절단된 아밀로이드 베타, 항-염증 분자, 또는 타크린, 리바스티그민, 돈페질, 및/또는 갈란타민과 같은 콜린에스터라아제 저해제(ChEIs), M1 작용제 및 임의의 아밀로이드 또는 타우 변형 약물 및 영양 첨가제를 포함하는 다른 약물, 및 영양첨가제, 뿐만 아니라 본 발명에 따른 항체, 및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물을 포함하는 혼합물에 관한 것이다.

[0186] 본 발명은 또한 상기 화합물이 콜린에스터라아제 저해제(ChEIs)이고, 특히 상기 화합물인 타크린, 리바스티그민, 돈페질, 갈란타민, 니아신 및 메만틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물인 혼합물에 관한 것이다.

[0187] 추가의 양태에서는, 본 발명에 따른 상기 혼합물은 본 발명에 따른 항체와 함께 니아신 또는 메만틴, 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0188] 추가의 구체적인 양태에서는, 본 발명에 따른 상기 혼합물은 본 발명에 따른 항체와 함께 글루타미닐 사이클라아제 저해제, 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0189] 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2005/075436호, 특히 pp 31-40의 실시예 1-141에 기술되어 있다. 실시예 1-141의 합성은 국제 공개 WO 2005/075436호의 pp40-48에 나타나 있다. 실시예 1-141, 그의 합성 및 그의 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 번호 WO 2005/075436호의 개시 내용은 여기에 참고로 포함되어 있다.

[0190] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/055945호, 특히 pp 46-155의 실시예 1-473에 기술되어 있다. 실시예 1-473의 합성은 국제 공개 WO 2008/055945호의 pp156-192에 나타나 있다. 실시예 1-473, 그의 합성 및 그의 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 번호 WO 2008/055945호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.

[0191] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/055947 호, 특히 pp 53-118의 실시예 1-345에 기술되어 있다. 실시예 1-345의 합성은 국제 공개 WO 2008/055947호의 pp119-133에 나타나 있다. 실시예 1-345, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/055947호의 개시는 참고문헌에 의해 여기에 참고로 포함되어 있다.

[0192] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/055950 호, 특히 pp 57-120의 실시예 1-212에 기술되어 있다. 실시예 1-212의 합성은 국제 공개 WO 2008/055950호의 pp121-128에 나타나 있다. 실시예 1-212, , 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/055950호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.

[0193] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/065141 호, 특히 pp 56-59의 실시예 1-25에 기술되어 있다. 실시예 1-25의 합성은 국제 공개 WO 2008/065141호의 pp60-67에 나타나 있다. 실시예 1-25, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/065141호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.

[0194] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/110523 호, 특히 pp 55-59의 실시예 1-27에 기술되어 있다. 실시예 1-27의 합성은 국제 공개 WO 2008/110523호의 pp59-71에 나타나 있다. 실시예 1-

27, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/110523호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.

- [0195] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/128981 호, 특히 pp 62-65의 실시예 1-18에 기술되어 있다. 실시예 1-18의 합성은 국제 공개 WO 2008/128981호의 pp65-74에 나타나 있다. 실시예 1-18, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/128981호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.
- [0196] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/128982 호, 특히 pp 61-67의 실시예 1-44에 기술되어 있다. 실시예 1-44의 합성은 국제 공개 WO 2008/128982호의 pp68-83에 나타나 있다. 실시예 1-44, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/128982의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.
- [0197] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/128983 호, 특히 pp 64-68의 실시예 1-30에 기술되어 있다. 실시예 1-30의 합성은 국제 공개 WO 2008/128983의 pp68-80에 나타나 있다. 실시예 1-30, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/128983의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.
- [0198] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/128984 호, 특히 pp 63-69의 실시예 1-36에 기술되어 있다. 실시예 1-36의 합성은 국제 공개 WO 2008/128984의 pp69-81에 나타나 있다. 실시예 1-36, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/128984호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.
- [0199] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/128985 호, 특히 pp 66-76의 실시예 1-71에 기술되어 있다. 실시예 1-71의 합성은 국제 공개 WO 2008/128985호의 pp76-98에 나타나 있다. 실시예 1-71, 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/128985호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.
- [0200] 더욱 바람직한 글루타미닐 사이클라아제 저해제는 국제 공개 WO 2008/128986 호, 특히 pp 65-66의 실시예 1-7에 기술되어 있다. 실시예 1-7의 합성은 국제 공개 WO 2008/128986호의 pp66-73에 나타나 있다. 실시예 1-7에 관한 그의 합성 및 글루타미닐 사이클라아제 저해제로서 그의 용도에 관한 국제 공개 WO 2008/128986호의 개시는 여기에 참고로 포함되어 있다.
- [0201] 본 발명의 또 다른 양태에서는 환상, 망상, 사고증(현저한 지리멸렬, 이탈, 사고이탈), 기괴 또는 지리멸렬한 행동은 물론, 쾌감 상실, 플래튼드 어펙트(flattened affect), 무관심 및 사회적 허탈을 포함하는 양성 및 음성 정신병 증후군의 치료를 위한 예를 들어, 클로자핀, 지프라시돈, 리스페리돈, 아리피프라졸, 또는 올란자핀 등의 "비전형 항정신병약"을, 항체 특히, 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 하지만 특히 키메릭 항체 또는 그의 단편, 또는 여기에서 진술한 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편, 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석액 및/또는 부형제와 함께 포함하는 혼합물이 제공된다.
- [0202] 본 발명의 구체적인 양태로서, 여기에서 진술한 바와 같은 본 발명에 따른 상기 조성물 및 혼합물은 각각 치료학적으로 유효한 양으로 상기 항체와 상기 생물학적 활성 물질을 포함한다.

[0203] 본 발명에 따른 항체와 조합되어 혼합물로 적절하게 사용될 수 있는 다른 화합물은 국제 공개 WO2008/065141호에 기술되어 있다(특히 37/38 페이지를 참조), 이들 화합물은 PEP-저해제(43/44 페이지), LiCl, 다이펩티딜 아미노펩티다아제 저해제, 바람직하게는 DP IV 저해제, DP IV-유사 효소(48/49 페이지 참조); 아세틸콜린 에스터라아제 (ACE) 저해제 (47 페이지 참조), PIMT 인핸서, 베타 시크리타아제 저해제 (41 페이지 참조), 감마 시크리타아제 저해제(41/42 페이지 참조), 중성 엔도펩티다아제 저해제, 포스포다이에스터라아제-4 저해제 (PDE-4) (42/43 페이지 참조), TNF 알파 저해제, 머스카리닉 M1 수용체 길항제 (46페이지 참조), NMDA 수용체 길항제 (47/48 페이지 참조), 시그마-1 수용체 저해제, 히스타민 H3 길항제 (43페이지 참조), 면역조절제, 면역 억제제 또는 안테그렌(나탈리주맙), 뉴렐란(팜프리딘-SR), 캠페스(알렘트주맙), IR 208, NBI 5788/MSP 771(팁리모티드), 파크리타셀, Anergix. MS(AG 284), SH636, 디페린(CD 271, 아다팔렌), BAY 361677 (인터루킨-4), 매트릭스-메탈로프로틴나아제-저해제(예, BB 76163), 인터페론-타우(트로포블라스틴) 및 SAIK-MS로 이루어진 군으로부터 선택된 약제; 베타-아밀로이드 항체 (44 페이지 참조), 시스테인 프로티아제 저해제(44 페이지 참조); MCP-I 길항제(44/45 페이지 참조), 아밀로이드 단백질 축적 저해제(42 참조), 및 베타 아밀로이드 합성 저해제(42 페이지 참조)를 포함하며, 상기 문헌은 여기에 참고로 포함되어 있다.

[0204] 다른 양태에서는, 본 발명은 상기 항체, 특히 치료학적으로 유효한 양으로 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 여기에 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편 및/또는 상기 생물학적 활성 물질을 포함하는 혼합물에 관한 것이다.

[0205] 본 발명은 추가로 2차 유전분증 및 알츠하이머 질병(AD), 루이보디 치매(Lewy body dementia), 다운신드롬, 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈(네델란드 타입); 구암 파킨슨-치매 복합증; 뿐만 아니라 진행성 핵성 마비, 다발성 경화증; 광우병, 파킨슨스 질병, HIV-연관 치매, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 성년개시 당뇨병; 노인 심장 유전분증; 내분비선 종양, 및 황반변성을 포함하는 다른 질병과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기초된 또는 이와 연관된 다른 질병과 같은 신경학적 질환을 포함하거나 여기에 국한되지 않는 연령-연계 유전분증 을 포함하는 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질병과 질환의 군인 유전분증 효과를 치료하거나 또는 경감시키는 약제 제조를 위한 항체, 특히 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 그러나 특히 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 여기에 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편 및/또는 그의 기능적 부분, 및/또는 약제학적 조성물, 또는 상기 항체를 포함하는 혼합물의 용도에 관한 것이다.

[0206] 또한 본 발명은 2차 유전분증 및 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병(SAD) 또는 가족성 영국인 치매(FBD) 및 가족성 덴마크인 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군의 신경퇴행증; 루이보디 치매(Lewy body dementia), 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈 (네델란드 타입); 구암 파킨슨-치매 복합증; 뿐만 아니라 진행성 핵성마비, 다발성 경화증, 광우병, 파킨슨스 질병, HIV-연관 치매, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 성년 개시 당뇨병; 노인 심장 유전분증; 내분비선 종양, 및 황반변성을 포함하는 다른 질병과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기초하거나 또는 이와 연관된 다른 질병등의 알츠하이머 질병(AD)와 같은 신경퇴행성 질병을 포함하거나 그것에 국한되지 않는 질병과 같은 연령-연계 유전분증을 포함하는 아밀로리드 플라크 형성과 연관된 질병과 질환의 군인 유전분증을 예방, 치료, 경감하는 방법에 사용하기 위한 항체, 특히 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 하지만 특히 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 여기에서 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편 및/또는 그의 기능적 부분, 및/또는 약학적 조성물, 또는 상기 항체 및/또한 그의 기능적 부분을 특히 약제학적으로 유효한 양으로 포함하는 혼합물을 제조하는 방법을 포함하며, 항체 특히, 약제학적으로 허용가능한 형태로 본 발명에 따른 단일 클론 항체, 그러나 특히 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따른 인간화된 항체 또는 그의 단편을 제형화시키는 단계를 포함한다.

[0207] 더우기 본 발명은 2차 유전분증 및 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병(SAD) 또는 가족성 영국인 치매(FBD) 및 가족성 덴마크인 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군의 신경퇴행증; 루이보디 치매(Lewy body dementia), 유전분증을 갖는 유전적 대뇌 출혈 (네델란드 타입); 구암 파킨슨-치매 복합증; 뿐만 아니라 진행성 핵성마비, 다발성 경화증과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기초하거나 또는 이와 연관된 다른 질병; 광우병, 파킨슨스 질병, HIV-연관 치매, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 성년 개시 당뇨병;

노인 심장 유전분증; 내분비선 종양, 및 항반변성을 포함하는 다른 질병과 같은 신경질환을 포함하나 여기에 국한적이지 않는 질병과 같은 노인성 유전분증을 포함하는 아밀로리드 플라크 형성과 연관된 질병과 질환의 군인 유전분증 효과를 예방, 치료, 또는 경감을 위한 방법을 포함하며, 이 방법은 상기 질환을 앓는 동물 또는 인간에게 항체 및/또는 그의 기능적 부분, 그러나 특히 인간화된 항체 및/또는 그의 기능적 부분, 또는 항체 및/또는 그의 기능적 부분을 포함하는 조성물 또는 혼합물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여함을 포함한다.

[0208] 또한 본 발명의 목적은 동물 특히, 포유동물, 또는 인간에 항체, 특히 여기에서 전술된 바와 같은 본 발명에 따른 약학적 조성물을 투여함으로써, 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병(SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD), 다운 증후군의 신경 퇴행증; 특히, 인지 기억 능력의 소실로 특징지어지는 질병 또는 상태와 같은 신경퇴행성 질병을 포함하나 여기에 국한적이지 않는 2차 유전분증 및 노인성 유전분증을 포함하는 아밀로리드 플라크 형성과 연관된 질병 및 질환의 군인 유전분증을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0209] 구체적인 양태로서, 본 발명은 동물, 특히 포유동물, 또는 인간에 항체, 특히 여기에서 전에 기술한 바와 같은 본 발명에 따른 약학적 조성물을 투여함으로써 인지 기억 능력을 보유 또는 증가시키며, 특히, 기억 장애를 앓는 동물, 특히 포유동물, 또는 인간의 인지 기억 능력을 회복시키는 방법을 제공한다.

[0210] 본 발명의 추가의 목적은 치료학적 및 조성물과 이러한 조성물을 생산하는 방법 뿐만 아니라, 여기에서 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 항체를 사용하여, 약한 인지 장애(MCI), 예를 들어 특발성 알츠하이머 질병(SAD) 또는 가족성 영국민 치매(FBD) 및 가족성 덴마크민 치매(FDD)와 같은 가족성 알츠하이머 치매(FAD)등의 알츠하이머 질병(AD), 다운 증후군의 신경퇴행증; 특히, 인지 기억 능력의 소실로 특징지어지는 질병 또는 상태와 같은 신경퇴행성 질병을 포함하나 여기에 국한적이지 않는 2차 유전분증 및 노인성 유전분증을 포함하는 아밀로리드 플라크 형성과 연관된 질병 및 질환의 군인 유전분증을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0211] 특히, 본 발명은 인지 기억 능력의 보유를 유도하는 인지기억 능력의 소실에 의해 특징지어지는 아밀로이드-연관 상태로 고통하는 동물, 특히 포유동물, 또는 인간의 치료에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0212] 도 1

- A) pGlu-6166 항체(클론 12-1)의 농도를 증가시킴으로써 10 ng/ml 아밀로이드 β N3pE-40의 감지.
B) 10 ng/ml 아밀로이드 β N3pE-40의 감지에 필요한 pGlu-6166 항체 (클론 12-1)의 최고 농도의 결정.

도 2

개개의 IgG 생산 클론의 하이브리도마 세포 배양 상등액의 도트 블롯(Dot Blot) 분석.

도 3

pGlu-6166 하이브리도마 세포 클론 및 IBL-A β N3pE 항체의 PepSpot 분석.

도 4

20 μ g pGlu-6166 항체 및 하이브리도마 세포 배양 상등액의 12% SDS-PAGE.

도 5

하이브리도마 세포 배양 상등액의 Biacore 분석. 모니터링된 결합 경로의 오버레이(overlay)는 그래프로 예시되어 있다.

도 6

항-A β N3pE 항체 클론 6-1-6과 A β pE3-40의 상호작용의 센서그램.

도 7

항-A β N3pE 항체 클론 24-2-3과 A β pE3-40의 상호작용의 센서그램.

도 8

클론 6-1-6를 위한 N3pE-ELISA, A β pE3-40의 표준커브.

도 9

N3pE 항체 클론 6-1-6의 센서그램.

도 10

EIA 완충용액에서 1:20 희석에 의한 중화방법을 사용한 A β pE3-42의 정량화, 860 μ l 3.5 M Tris를 가지고 pH 적정.

도 11

알츠하이머 질병 (AD) 환자로부터의 염색 뇌 절편.

(A) 전체 A β 를 인식하는 항-A β 항체 6E10를 가지고 염색된 특발성 AD (SAD) 환자의 뇌,

(B) A β pE3-x를 인식하는 N3pE 항체 클론 24-2-3를 가지고 염색된 특발성 AD (SAD) 환자의 뇌,

(C) A β pE3-x를 인식하는 N3pE 항체 클론 24-2-3를 가지고 염색된 가족성 AD (FAD) 환자의 뇌.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0213]

실시예

[0214]

1. 재료와 방법

[0215]

1.1 항체 생산

[0216]

마우스

[0217]

하이브리도마 생산을 위해 8주령의 암컷 BALB/C 마우스(Charles River)를 사용하였다.

[0218]

골수종 세포주

[0219]

하이브리도마 형성을 위해서, Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen로부터 입수한 골수종 세포주 SP2/0-Ag14를 사용하였다.

[0220]

항원

[0221]

pGlu-6166 펩티드(서열 pGlu-FRHDSGC, SEQ ID NO: 65)를 사용하였다.

[0222]

전략

[0223]

면역원으로서, 상기 펩티드를 3개의 다른 링커로부터의 말레이미드 군을 통해 소 티로글루볼린(BTG, SIGMA)에 연결하였다. 다른 길이의 상기 3개의 링커는 N-[e-말레이미도카프로이록시] 숙신이미드 에스테르(EMCS), 숙신이 니딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트)(LCSMCC) 및 N-[b-말레이미도프로 피록시] 숙신이미드 에스테르(BMPS)로 부터 사용하였다.

[0224]

상기의 생성된 항체의 감지를 위해서, 같은 펩티드를 숙신이미딜-6-[(b-말레이미도-프로피온아미도) 헥사노에이

트] (SMPH)로 부터의 말레이미드 그룹을 통해 소 혈청 알부민(BSA, SIGMA)에 연결하였다.

[0225] 방법

[0226] 면역을 위한 펩티드의 결합

[0227] 결합은 상기 펩티드의 시스테인 잔기로부터의 SH-그룹을 통해 두 단계로 수행하였다.

[0228] 1. 담체 단백질의 말레오일화(maleoylation)

[0229] 상기 각각의 링커(N-메틸피롤리돈(NMP) 중 50 mg/ml)의 2 내지 5 mg을 담체 단백질 용액(0.1 mM NaHCO₃중 10 mg/ml, pH 8.0) 2ml에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온(RT)에서 1시간동안 배양하였다. 그 후 상기 반응 혼합물을 50 mM 소듐 포스페이트, 250 mM NaCl, pH 6.8.를 가지고 평형화된 Sephadex G-50 컬럼(1.5 x 14 cm)을 사용하여 탈염하였다.

[0230] 2. 말레오일화된 BTG를 상기 펩티드와 연결

[0231] 상기 펩티드 용액(아쿠아 비디스트에서 10 mg/ml) 250 μ l은 50 mM 소듐 포스페이트, 250 mM NaCl, pH 6.8으로 말레오일화된 담체 단백질(2.5 mg/ml)을 함유하는 용액 2 ml와 혼합하였고 4 °C에서 2시간 배양한 다음 실온에서 4시간 더 배양하였다. 반응하지 않은 말레이미드 그룹은 2-머캅토에탄올을 10 mM의 농도까지 첨가하고, 4 °C에서 하룻밤 배양하여 블록킹하였다. 수득된 결합체를 4 °C에서 10 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.5에 대해 투석하였다(3번 완충용액을 갈아줌, MW cut-off 10.000).

[0232] ELISA를 위한 펩티드 결합

[0233] 결합은 상기 펩티드의 시스테인 잔기로부터의 SH-그룹을 통해 두 단계로 수행하였다.

[0234] 1. 담체 단백질의 말레오일화

[0235] SMPH(N-메틸피롤리돈(NMP) 중 50 mg/ml)의 2mg을 담체 단백질 용액(BSA, 0.1 mM NaHCO₃에서 10 mg/ml, pH 8.0) 2ml에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온(RT)에서 1시간동안 배양하였다. 그 후 상기 반응 혼합물은 50 mM 소듐 포스페이트, 250 mM NaCl, pH 6.8으로 평형화된 Sephadex G-50 칼럼(1.5 x 14 cm)을 사용하여 탈염하였다.

[0236] 2. 말레오일화된 BTG를 상기 펩티드와 연결

[0237] 상기 펩티드 용액(50 mM 소듐 포스페이트(10 mg/ml) 중 250 mM NaCl, pH 6.8) 100 μ l을 50 mM 소듐 포스페이트, 250 mM NaCl, pH 6.8으로 말레오일화된 담체 단백질(2.5 mg/ml)을 함유하는 용액 1 ml와 혼합하였고 4 °C에서 2시간 배양한 다음 실온에서 4시간 동안 더 배양하였다. 반응하지 않은 말레이미드 그룹은 2-머캅토에탄올을 10 mM의 농도까지 처리, 4 °C에서 하룻밤 배양하여 블록킹하였다. 수득된 결합체를 4 °C에서 10 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.5에 대해 투석하였다(3번 완충용액을 갈아줌, MW cut-off 10.000).

[0238] 면역

[0239] 5마리의 마우스를 39일동안 복강주사로 면역하였다. 면역을 위해, 항원 용액(3개의 다른 펩티드-BTG-결합체의 동일한 부분으로 이루어짐)의 동일한 부분으로 이루어진 유중수형 에멀전(water-in-oil emulsion)은 완전 또는 불완전 Freundt의 항원보강제를 사용하였다.

- [0240] 융합
- [0241] 면역된 마우스 3마리를 CO₂로 질식사시켰다. 비장을 취하여 멸균조건하에서 균일화하였다. 비장세포와 골수종 세포 SP2/0를 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, SIGMA)으로 몇 차례 세척하여 폴리에틸렌글라이콜 3350 (1 ml 50 % (w/v))을 사용하여 2,3 비장세포 : 1 SP2/0 세포의 비율로 융합하였다. 융합된 하이브리도마의 추가 조작은 표준 방법에 따라 시행하였다.
- [0242] ELISA
- [0243] IgG로 유도된 ELISA를 사용하여 세포 배양 상등액을 스크링하였다. 검사는 96-웰
- [0244] 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트에서 실시하였다(Greiner, Cat. No. 655061). 상기 플레이트를 BSA-pGlu-6166 펩티드로 코팅하였다. 희석되지 않은 세포 배양 상등액 100 μ l를 각 웰에 첨가하여 실온에서 1시간동안 배양하였다. SP2/0 세포로부터의 상등액은 음성 대조군으로 사용하였다. 비장 세포로부터의 상등액은 양성 대조군으로 사용하였다.
- [0245] 알카라인 포스퍼타아제와 연결된 염소-항-마우스 IgG를 사용하여 양성 웰을 감지하였다. 광학밀도(OD)는 405 nm 에서 Dynex Opsys MR Microplate Reader로 측정하였다.
- [0246] 안정된 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 선별
- [0247] 양성 웰로부터의 세포를 24-웰 플레이트에 전달하여 몇 일간 배양하였다. 세포를 다시 전달하여 BSA-pGlu6199 결합과 ELISA에서 교차반응을 검사를 하였다. 양성 웰은 하이브리도마 세포주의 동결보존을 위해 사용하였다.
- [0248] 제한된 희석을 통한 클로닝
- [0249] 2개의 연속적인 클로닝 절차를 수행하여 비생성 세포로부터 항체 생성 세포를 분리하였고 선별된 세포가 단일 클론인지 확인하였다. 제한된 희석방법에 따라 2 단계의 클로닝 절차를 수행하였다.
- [0250] 동결보존
- [0251] 선별된 하이브리도마를 DMSO와 표준방법을 사용하여 동결보존하였다.
- [0252] **1.2. ELISA 검사법**
- [0253] TGC (The GENETICS Company; 스위스)로 부터의 hA β (x-40) ELISA (HS)를 사용하여, 기본적으로 제조사의 지침서에 따라, A β N3pE-40의 캡처를 수행하였다.
- [0254] A β N3pE (pGlu-6166)에 대한 바이오티닐화된 감지 항체를 제조하였다. 적용되는 경우 IBL HRP-결합 A β N3pE 항체를 양성 대조군으로 사용하였다(IBM ELISA 인간 아밀로이드 β (N3pE) 검사 키트와 조합으로만 입수가능). 해당 A β N3pE-40 펩티드(-80℃에서 저장된 헥사플루오로이소프로판올중의 50 μ g 분획)를 합성하였다. 사용 직전에, HFIP를 증발시켜 상기 펩티드를 100 mM 트리스/HCl pH 10,4 내지 1 μ g/ μ l로 희석하였다. 이 저장 용액을 TGC 항체 희석액으로 더욱 희석하였다. 제조사의 지침서에 따라 그후 캡처링과 감지를 수행하였다.
- [0255] **1.3. PepSpot™ 분석**
- [0256] A β N3pE 항체와 세포배양 상등액의 특이성 및 생물학적 완전성은 JPT 펩티드 테크놀로지 GmbH, Volmerstrasse 5 (UTZ), 12489 Berlin, Germany의 PepSpot™ 테크놀로지를 사용하여 결정하였다.
- [0257] 해당 PepSpot™ 멤브레인을 JPT에서 준비하였다. 이 방법의 규칙은 Kramer 등 1997 Cell 91, 799-809에 의해

소개되고 기술되어 있다.

[0258] 분석을 위해, 멤브레인을 TBST-M(10mM 트리스-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.005% Tween20 + 5% 저지방 우유)를 가지고 실온에서 약간 흔들면서 블로킹하였다. 멤브레인을 동일 부피의 TBST-M으로 희석된 개개의 세포 배양 상등액을 가지고 록킹 플랫폼(rocking platform)상에서 4℃에서 하룻밤 배양하였다. 알카라인 포스퍼타아제에 연결된 2차 항-마우스 항체는 표준 절차에 따라 신호 감지를 위해 사용하였다.

[0259] 1.4. 도트 블롯팅 분석

[0260] 단순한 DotBlot 프로토콜을 수행하여 Aβ N3pE 항체 및 세포 배양 상등액의 각각의 순수한 펩티드에 대한 민감도에 관한 정보를 얻었다. 이러한 목적으로, Aβ N3pE-40 펩티드를 감소하는 농도로 작은 조각의 니트로셀룰로오스 멤브레인에 스폿팅(spotting)하였고, 이 후의 실험 절차는 PepSpot™ 멤브레인에 대한 것 같이 수행하였다.

[0261] 1.5. SDS PAGE

[0262] 표준 프로토콜에 따라 12% SDS 폴리아크릴아미드를 캐스트(cast)였다. 세포 배양 상등액 15 μl 및 바이오티닐화 항체 10 μg을 12% SDS 폴리아크릴아미드 겔에서 분리하였다. 전기영동은 100V 고정에서 2시간동안 실시하였다.

[0263] 1.6. BIACORE 분석

[0264] Aβ N3pE-40 펩티드(양성 대조군)와 Aβ N3E-40 펩티드(음성 대조군)를 Biacore CM5 Chip상에서 연결하였다. 변형되지 않은 칩을 사용하여 블랭크 값을 결정하였다. TGC 희석액으로 20 μg/ml 내지 1 μg/ml로 희석된 바이오티닐화된 항체의 결합 및 분리를 모니터링하여 각각의 해리 상수의 후속 결정을 가능하게 하였다. 이러한 방식으로 각 세포 배양 상등액의 결합 특성을 결정하였다.

[0265] 1.6.1 AβN3pE 특이 항체 클론 6-1-6 and 24-2-3의 친화도

[0266] 정제된 항체 클론 6-1-6을 HBS-EP 완충용액(Biacore)으로 100, 50, 30, 20, 15, 10, 7, 4, 2, 1 nM까지 희석하였다. AβpE3-40가 고정화된 CM5-Chip이 달린 Biacore 3000를 사용하여 친화도를 결정하였다. 상기 시스템을 분당 30 μl를 가지고 실행하였다. 측정된 벌크 효과와 칩에 대한 비특이적 결합을 AβpE3-40이 고정화된 flow cell 4의 신호 및 비어있는 flow cell 3의 신호를 차감하여 보정하였다. 상기 결합(10 min)을 각 농도의 300 μl를 주사하여 얻었다. 분리는 10분에 걸쳐 관찰하였다. 남아있는 항체 분자는 5 μl 0.1 M HCL를 주사하여 제거하였다. 모든 항체의 농도에 대해서 결합과 분리를 기록하였다. 상기 결합 및 분리 속도 그리고 분리 상수의 결정은 "Bivalent analyte" 모델을 사용하여 모든 기록된 항체 농도에 대한 결합 및 분리상의 전역적 동시 적합도(global simultaneously fit)에 의해 수행하였다.

[0267] 1.7. 항체 가변구역의 서열 결정

[0268] 하이브리도마 세포의 배양:

[0269] 하이브리도마 세포를 37℃ 및 5% CO₂하에서 15% FBS, 1% MEM-NEA (비필수 아미노산, Gibco), 50 μg/ml 젠타마이신 (Gibco) 및 50 μM β-머캅토에탄올을 첨가하여 D-MEM (+ L-글루타민, + Na-피루바트, 4.5g/l 글루코스, Gibco)에서 배양하였다. 부배양은 세포 밀도에 따라 3-4일 후에 시행하였다. 세포들을 0.5 x 10⁶ 세포/ml의 농도로 시딩(seed)하고 2-5 x 10⁶ 세포/ml의 세포 밀도로 스플리팅(split)하였다.

[0270] cDNA 합성 및 역전사:

[0271] 전체 RNA를 NucleospinRNA 단리 키트(Macherey-Nagel) 매뉴얼에 따라 2 x 10 세포로부터 분리하였다. 올리고 (dT)₁₅ 프라이머(Promega)와 Superscript III Reverse Transcriptase(Invitrogen)를 사용하여 cDNA 합성을 위해 100 ng RNA를 적용하였다.

[0272] 중사슬 및 경사슬 가변구역의 PCR-증폭:

[0273] 템플레이트 cDNA로 부터 프라이머 MHV1-12와의 조합으로 프라이머 MHCG1 (5-5-6 and 6-1-6 클론의 경우) 및 MHCG2b (17-4-3 and 24-2-3 클론)를 갖는 Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEW ENGLAND BioLabs)를 사용하여 중사슬 가변 구역을 증폭하였다. 경사슬 가변 구역 증폭을 위해, 프라이머 MKV1- MKV11와 조합된 프라이머 MKC를 사용하였다. 프라이머 서열은 표 1에 나타낸다.

[0274] PCR 산물의 pJET1.2로의 크로닝:

[0275] PCR에 의해 증폭된 중사슬 및 경사슬 가변 구역이 CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas)의 프로토콜에 따라 pJET1.2/blunt 벡터로 클로닝되었다. 서열결정은 pJET1.2 서열 프라이머를 가지고 수행하였다.

[0276] 표 1: 중사슬 및 경사슬 가변 구역의 PCR-증폭을 위한 프라이머 서열

이름	서열	SEQ ID NO.
MKV1	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	23
MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG	24
MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGSGTTG	25
MKV4	ATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWCTTG	26
MKV5	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC	27
MKV6	ATGAGGTKCYTYGYTSAGYTYCTGRGG	28
MKV7	ATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWGG	29
MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAATTG	30
MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	31
MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	32
MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	33
MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	34
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC	35
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	36
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTTT	37
MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT	38
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT	39
MHV6	ATGGCTTGTCYTRGSGCTRCTTCTCTGC	40
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRCTTTTMTCTT	41
MHV8	ATGAGAGTGTGATTCTTTTGTG	42
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCTG	43
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCTG	44
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	45
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG	46
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	47
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG	48

[0277]

[0278] 1.8 N3pE ELISA를 위한 항체 클론 6-1-6의 적용

[0279] 96-웰 maxisorb plate (Nunc)를 4℃하에서 밤을 세워 D-PBS로 희석된 2 µg/ml 항-Aβ 항체 4G8의 웰당 100 µl를 배양함으로써 캡쳐 항체를 가지고 코팅하였다. 상기 플레이트는 밀봉하였다. 코팅 용액을 제거하고 상기 플레이트의 표면을 실온에서 2 시간동안 웰당 200 µl의 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker (Tween-20 없음)를 가지고 블로킹하였다. 그 후, 상기 플레이트를 TBS+0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는

세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. AβpE3-40 표준 펩티드를 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker(Tween-20 포함)에서 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 pg/ml까지 희석하였다. 모든 농도의 100 μl와 희석 완충용액(블랭크) 100 μl를 상기 플레이트에 피펫팅하였다. 상기 플레이트를 밀봉해 4℃에서 2 시간 동안 배양하였다. 그 후, 플레이트를 TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. 1 μg/ml AβN3pE 특이 항체 클론 6-1-6과 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker(Tween-20 포함)에 녹아있는 2 μg/ml Streptavidin-HRP 결합체(Sigma)를 포함하는 감지 항체-효소 결합 용액 100 μl를 각 웰에 피펫팅하였다. 상기 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 그 후, 플레이트를 TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. 모든 웰에 SureBlue[™] 기질 용액(KPL) 100 μl를 피펫팅하여 플레이트를 암실 실온에서 30분간 배양하였다. 웰당 100 μl의 1 M H₂SO₄를 첨가하여 상기 반응을 중단시켰다. 540 nm에서의 흡광도로 보정된 450 nm에서 TECAN Sunrise를 사용하여 상기 흡광도를 측정하였다.

[0280] 1.9 ELISA 및 표면공명분광기(Surface-Plasmon-Resonance; SPR)를 통해 분석된 교차반응의 조사

[0281] ELISA:

[0282] 96-웰 maxisorb plate (Nunc)를 4℃하에서 밤을 세워 D-PBS로 희석된 2 μg/ml 항-Aβ 항체 4G8의 웰당 100 μl를 배양함으로써 캡처 항체를 가지고 코팅하였다. 상기 플레이트는 밀봉하였다. 코팅 용액을 제거하고 상기 플레이트의 표면을 실온에서 2 시간동안 웰당 200 μl의 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker (Tween-20 없음)를 가지고 블로킹하였다. 그 후, 상기 플레이트를 TBS+0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. AβpE3-40 표준 펩티드와 다른 Aβ-펩티드(2-40, 3-40, 4-40, 1-42, 3-42 및 pE11-40)를 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker(Tween-20 포함)에서 모든 농도의 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5. 100 μl까지 희석하였고 희석 완충용액(블랭크) 100 μl를 상기 플레이트에 피펫팅하였다. 상기 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 2 시간동안 배양하였다. 그 후, 플레이트를 TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. 1 μg/ml AβN3pE 특이 항체 클론 6-1-6과 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker(Tween-20 포함)에 희석되어있는 2 μg/ml Streptavidin-HRP 결합체(Sigma)를 포함하는 감지 항체-효소 결합 용액 100 μl를 각 웰에 피펫팅하였다. 상기 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 1 시간동안 배양하였다. 그 후, 플레이트를 TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. 모든 웰에 SureBlue 기질 용액(KPL) 100 μl를 피펫팅하여 플레이트를 암실 실온하에서 30분간 배양하였다. 웰당 100 μl의 1 M H₂SO₄를 첨가하여 상기 반응을 중단시켰다. 540 nm에서의 흡광도로 보정된 450 nm에서 TECAN Sunrise를 사용하여 상기 흡광도를 측정하였다.

[0283] SPR:

[0284] 다른 Aβ 종외에도, 인체에서 일어나는 다른 pGlu-펩티드로의 교차반응성을 결정하였다. 이것은 표면공명분광기에 의해 수행하였다. 이후의 펩티드 또는 그의 N-말단 부위를 CM5-칩의 표면에 고정하였다:

[0285] MCP1, MCP2, 거대 가스트린, 고나도리베린, 뉴로텐신, 오렉신 A, 파이브로넥틴, 콜라겐 1 및 TRH. AβpE3-40에 결합하는 양성 대조군도 분석하였다. 상기 N3pE 항체 클론 6-1-6 및 24-2-3을 HBS-EP(Biacore)에서 25 μg/ml까지 희석하였다. flow cell 2, 3 및 4위에 각 펩티드가 고정된 몇몇 CM5-칩을 갖는 Biacore 3000을 사용하여 상기 결합을 관찰하였다. 상기 시스템을 분당 20 μl를 가지고 실행하였다. 측정된 대부분의 효과와 칩 표면에 대한 비특이적 결합을 검사된 펩티드가 고정화된 flow cell 2, 3, 4의 신호 및 비어있는 flow cell 1의 신호를 차감하여 보정하였다. 상기 결합(9 min)을 각 항체 클론 6-1-6 및 24-2-3의 180 μl를 주사하여 얻었다. 분리는 9분에 걸쳐 관찰하였다. 남아있는 항체 분자는 5 μl 0.1 M HCL를 주사하여 제거하였다. 다른 펩티드를 갖는 상기 항체의 모든 작용에 대한 결합과 분리를 기록되었다. 끝부분의 속도와 신호에 관여하는 결합상을 계산함으로써 상기 교차반응성을 결정하였다. 모든 pGlu-펩티드에 대한 값을 AβpE3-40에 대한 신호와 비교하였다.

[0286] 1.10 뇌분석을 위한 N3pE ELISA의 최적화와 밸리데이션

[0287] 본 발명자가 개발한 N3pE ELISA는 형질전환 마우스의 뇌에서의 AβpE3-42 농도 분석을 위해 사용하였다. 일반적

으로, 뇌반구 및 뇌간을 AβpE3-42 양에 대하여 독립적으로 분석하였다. 마우스 뇌를 세라믹 비드를 사용한 Precelly (Peglab) 균질기에서 프로티아제 저해제를 갖는 500 μl 2 %SDS 용액에서 균일화하였다. 상기의 현탁액을 상기 비드로 부터 피펫팅하여 원심분리 튜브에 옮겼다. 프로티아제 저해제를 갖는 2 %SDS 용액 250 μl를 가지고 비드를 세척하고 용액을 원심분리 튜브에 옮겼다. 상기 SDS 외 현탁액 750 μl를 깨진 얼음에서 20분간 음과분쇄하였다. 상기 시료를 4℃에서 1 시간 동안 75000xg로 원심분리하였다. 그 후 상기 상등액을 제거, 분획, 그리고 ELISA 분석때까지 -80℃에서 보관하였다. 나머지 SDS에 불용성인 펠렛(pellet)을 70 % 포름산 150 μl와 혼합하여 깨진 얼음에서 20초간 음과분쇄하였다. 음과분쇄 후 곧바로 상기 용액을 오래된 방법인 2850 μl 1 M 트리스 또는 새로운 방법인 2850 μl EIA 완충용액 (PBS+10 mg/ml BSA + 0.05 % Tween-20) + 860 μl 3.5 M 트리스를 가지고 중화하였다. 포름산 분획 시료는 ELISA까지 -80℃에서 보관하였다. The N3pE ELISA는 하기 프로토콜에 따라 실시하였다: 96-웰 maxisorb plate (Nunc)를 4℃에서 하룻밤 D-PBS로 희석된 2 μg/ml 항-Aβ 항체 4G8의 웰당 100 μl를 배양함으로써 캡처 항체를 가지고 코팅하였다. 상기 플레이트는 밀봉하였다. 코팅 용액을 제거하고 상기 플레이트의 표면을 실온에서 2 시간동안 웰당 200 μl의 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker (Tween-20 없음)를 가지고 블로킹하였다. 그 후, 상기 플레이트를 TBS+0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. AβpE3-42 표준 펩티드를 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker(Tween-20 포함) (종래의 방법) 또는 EIA 완충용액 (새로운 방법)으로 1029.2, 514.6, 257.3, 128.65, 64.32, 31.16, 16.08 pg/ml 까지 희석하였다. 모든 농도의 100 μl와 희석 완충용액(블랭크) 100 μl를 상기 플레이트에 피펫팅하였다. 상기 SDS 시료를 녹여 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker (Tween-20 포함) (종래의 방법) or EIA 완충용액 (새로운 방법)에서 각각 1:25 및 1:100로 희석하여 ELISA 플레이트에 피펫팅하였다. 상기 포름산 시료(종래의 방법: 포름산 / 트리스; 새로운 방법: 포름산 / EIA 완충용액 / 트리스)는 녹여 희석하지 않고 ELISA 플레이트에 피펫팅하였다. 상기 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 2 시간 동안 배양하였다. 그 후, 플레이트를 TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다. 1 μg/ml AβN3pE 특이 항체 클론 6-1-6과 PIERCE Protein-free ELISA-Blocker(Tween-20 포함)에 녹아있는 2 μg/ml Streptavidin-HRP 결합체(Sigma)를 포함하는 감지 항체-효소 결합 용액 100 μl를 각 웰에 피펫팅하였다. 상기 플레이트를 밀봉하여 4℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 그 후, 플레이트를 TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20를 가지고 6번 세척하였다. 남아있는 세척 용액은 플레이트를 태핑(tapping)하여 제거하였다.

[0288] 모든 웰에 SureBlue 기질 용액(KPL) 100 μl를 파이펫팅하여 플레이트를 암실 실온하에서 30분간 배양하였다. 웰당 100 μl의 1 M H₂SO₄를 첨가하여 상기 반응을 중단시켰다. 540 nm에서의 흡광도로 보정된 450 nm에서 TECAN Sunrise를 사용하여 상기 흡광도를 측정하였다.

[0289] 1.11 면역조직화학법을 위한 N3pE 항체 클론의 적용

[0290] 인간 뇌(피질)의 포르말린-고정 및 파라핀-포매 절편을 하기와 같이 처리하였다:

[0291] 1. 절편의 파라핀 제거 및 재수화 (슬라이드에 고정):

[0292] a. 3분 동안 히스토클리어(Histoclear) 또는 자이렌에서 슬라이드를 향온처리

[0293] b. 클리닝 용액 제거

[0294] c. 3분 동안 히스토클리어(Histoclear) 또는 크실렌에서 다시 슬라이드를 향온처리

[0295] d. 3분 동안 100 % 에탄올과 1:1로 히스토클리어(Histoclear) 또는 크실렌에서 슬라이드를 향온처리

[0296] e. 3분 동안 100 % 에탄올에서 슬라이드를 향온처리, 용액 제거

[0297] f . 3분 동안 100 % 에탄올에서 다시 슬라이드를 향온처리

[0298] g. 3분 동안 95 % 에탄올에서 슬라이드를 향온처리

[0299] h. 3분 동안 70 % 에탄올에서 슬라이드를 향온처리

- [0300] i. 3분 동안 50 % 에탄올에서 슬라이드를 항온처리
- [0301] j. 3분 동안 증류수에서 슬라이드를 항온처리
- [0302] 2. 내생적 퍼옥시다제 활성의 캔칭(Quenching):
- [0303] 10 분간 실온에서 99 ml 메탄올 + 1 ml 30 % 하이드로젠 퍼옥사이드를 가지고 슬라이드를 항온처리
- [0304] 3. 물로 슬라이드 세척: 2x 5 분
- [0305] 4. 각 슬라이드에서 물 제거 및 절편이 건조되는 것을 막고자 항습기의 슬라이드 랙에 슬라이드 위치시킴. 흡 후드(fume hood)하에서 10분간 실온에서 절편을 88% 포름산으로 커버. 물로 몇 차례 린스 및 10분 동안 물이 찬 염색 접시에서 흔들어줌.
- [0306] 5. 실온에서 20분간 10% 말 혈청에서 블로킹.
- [0307] 6. 블로킹 용액 제거(또는 아스피레이션) 및 4℃에서 밤새도록 1차 항체(N3pE 항체 클론 6 또는 24) 적용.
- [0308] 7. 슬라이드간의 끌림을 피하고자 10분 동안 TBS로 슬라이드 세척.
- [0309] 8. 바이오티닐화된 2차 항체(Vector Laboratories로 부터 염소-항-마우스: 9 ml TBS, 1 ml 염소 혈청, 45 μ l 2차 항체) 첨가. 실온에서 30분간 항온 처리.
- [0310] 9. 슬라이드간의 끌림을 피하고자 10분 동안 TBS로 슬라이드 세척.
- [0311] 10. ABC-용액(10 ml TBS, 100 μ l 말 혈청, 90 μ l 구성분 A, 90 μ l 구성분 B) 첨가. 실온에서 30분간 항온 처리
- [0312] 11. 50 mM Tris를 가지고 슬라이드 세척: 2x 10 분
- [0313] 12. 컬러 반응: 절편을 DAB 용액(100 ml 50 mM 트리스에서의 20 mg DAB(Sigma), 필터됨, 및 33 μ l 33 % 하이드로젠 페록시드 첨가) 으로 항온처리. 컬러반응을 관찰하고자 현미경 사용. 상기 반응 산물은 암색. 슬라이드를 물이 포함된 염색 접시에 놓음으로써 반응 종료.
- [0314] 13. 10분 동안 물로 슬라이드 세척
- [0315] 14. 물로 세척하며, 헤마토자이린으로 대비 염색.

- [0316] 15. 탈수 및 클리어링: 역순으로 절차 1을 따름(예, 물, 에탄올에서 100 % 히스토크린)
- [0317] 16. 퍼마운트(permount)를 갖는 커버슬립(Fisher Scientific). 공기에서 슬라이드 건조. 면도날 및 에탄올을 가지고 슬라이드 깨끗이함.
- [0318] **2. 결과**
- [0319] **2.1 항체 생산**
- [0320] pGlu-6166-BSA 펩티드에 대한 항체를 안정적으로 생산하는 6개의 클론이 분리되었다: 클론 1-8-12, 5-5-6, 6-1-6, 12-1-8, 17-4-3 및 24-2-3. 이들 클론은 더 조사된다.
- [0321] **2.2. 필요로되는 항체 농도의 결정:**
- [0322] ELISA 검사에서 신호의 강도는 분석물/A β 변형체의 농도에 연관할 뿐만 아니라 전개된 항체의 농도에 강력히 의존적이다. A β 변형체는 혈청 시료에서 낮은 농도로 주어지기 때문에 상기 해당 A β 변형체의 낮은 농도를 감지할 수 있는 항체의 농도를 결정할 필요가 있다. 상용적으로 입수 가능한 A β ELISA 키트는 낮은 pg 범위에서 A β 에 대하여 명시된 감지 한계를 가지고 있다. 표준 커브에서 가장 높은 농도가 일반적으로 500 pg/ml이다. 전개된 항체 농도에 관한 일반 정보는 데이터 시트/ 사용자 매뉴얼에서 부족하다. 그러나 일반 문헌으로부터 유도된 상세 정보에 기인하여 1 μ g/ml 항체가 디폴트로 사용된다.
- [0323] 첫번째 일련의 실험에서, 상기 해당 pGlu-6166 12-1 바이오틴-결합 항체를 가지고 500 pg/ml A β N3pE-40를 감지하는 것은 불가능하다. 사실, 상대적으로 높은 A β N3pE 농도(10 ng/ml)는 1 μ g/ml 항체를 갖는 신호를 얻는데 필요하다(도 1A 참조: 중간 바). 이들 신호의 강도는 항체농도를 10 μ g/ml까지 증가시킴으로써 상당히 향상된다(도 1A 참조: 왼쪽 바). 20 μ g/ml 항체까지 신호의 강도는 더욱 증가될 수 있다(도 1B 참조). 이 농도를 넘어서는 신호 강도에 있어 어떠한 증가도 이루어질 수 없다. 그러므로, 20 μ g/ml 항체가 상기 pGlu-6166 항체에 대한 감지 한계를 결정하는데 사용된다.
- [0324] **2.3. 도트 블롯팅 분석**
- [0325] 상기 최초의 세포 클론(12-1-8)이 면역화를 위해 취한 펩티드에 대한 강한 결합 및 매우 낮은 교차 반응을 나타내기 때문에 A β N3pE-x 항체 pGlu-6166이 스크리닝 프로세스에서 선택되었다(표 2 참조).
- [0326] 표 2: 스크리닝 결과가 몇몇 하이브리도마 세포 클론 상등액을 가지고 얻어진 ELISA 검사에서의 신호를 증명하였다.

클론	N3pE-BSA	isoDAE-BSA	N3E-BSA	N11E-BSA	N11pE-BSA
1-8-12	1.787	0.012	0.142	0.011	0.005
5-5-6	1.649	0.015	0.126	0.004	0.006
6-1-6	1.377	0.013	0.125	0.007	0.014
12-1-8	2.123	0.005	0.009	0.001	0.005
17-4-3	1.915	0.007	0.320	0.003	0.004
24-2-3	1.768	0.014	0.218	0.003	0.002
positive control	1.824	1.227	1.596	1.243	1.346
negative control	0.045	0.005	0.008	0.001	0.003

[0327]

[0328] 완전한 길이의 순수한 A β N3pE-40 펩티드를 다루는 스크리닝 절차는 지금까지 포함되지 않았다. 그러므로, 순수한 A β N3pE-40 펩티드에 대해 높은 친화도를 보여주는 항체를 발현하는 클론에 대해서 입수 가능한 pGlu6166 하이브리도마 세포 클론이 집단을 스크리닝하였다.

[0329] 도 2에 나타난 바와 같이, 완전한 길이이고 순수한 A β N3pE-40 펩티드에 대해 높은 민감도를 보여주는 세포 클론을 동정할 수 있다. pGlu-6166 항체 클론 12-1은 오직 1 μ g 펩티드를 감지하는 반면, 클론 6-1-6 및 24-2-3는 8 ng 펩티드를 갖는 신호를 또한 제공한다. 따라서, 클론 6-1-6 and 24-2-3은 125배 더욱 민감하다. 이들 클론을 가지고, 해당 ELISA에서 8 pg/ml A β N3pE-40 펩티드의 감지 한계에 이를 수 있다.

[0330] 2.4. PepSpot 분석

[0331] 바이오티닐화된 A β N3pE-x 항체 pGlu-6166를 하이브리도마 세포 클론과 비교하기 위해 PepSpot 분석에 의하여 특이성을 체크하였다. 표 3에서, PepSpot 멤브레인상의 스폿(spot)에 해당하는 모든 펩티드가 리스트되어 있다. 도 3에 나타난 바와 같이 pGlu-6166 클론 6-1-6 및 24-2-3는 pGlu-6166 항체 클론 12-1보다 더 많은 교차 신호를 생성하지 않는다. 조사된 모든 클론은 주되게 스폿 넘버 6- 특정 A β N3pE-x 스폿(pEFRHD..., 곧, SEQ ID No: 12), 다음 스폿 넘버 5(EFRHD...SEQ ID No: 11) 및 7(FRHD... SEQ ID No: 13)을 인식한다. 희미한 신호는 스폿 넘버 4(AEFRHD... SEQ ID No: 10)에서도 또한 잡힌다.

[0332] 표 3: PepSpot™ 멤브레인(JPT Peptide Technologies GmbH)에 스폿팅된 A β 펩티드의 서열 및 pGlu-6166 하이브리도마 세포 클론에 의한 감지

No.	펩티드 서열 Aβ 1-40 (SEQ ID No:2) DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	IBL- AK	5- 5-6	6- 1-6	17- 4-3	24- 2-3	12- 4	SEQ ID No.
1	KMDAEFRHDSGYE	-	-	-	-	+/-	-	7
2	DAEFRHDSGYEVH	-	-	-	-	+/-	-	8
3	iDAEFRHDSGYEVH	-	-	-	-	+/-	-	9
4	AEFRHDSGYEVHH	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	10
5	EFRHDSGYEVHHQ	-	+	+	+	+	+	11
6	pEFRHDSGYEVHHQ	-	+++	+++	+++	+++	+++	12
7	FRHDSGYEVHHQK	+	+	+	+	+	+	13
8	GYEVHHQKLVFFA	-	-	-	-	-	-	14
9	EVHHQKLVFFAED	-	-	-	-	-	-	15
10	pEVHHQKLVFFAED	-	-	-	-	-	-	16
11	VHHQKLVFFAEDV	-	-	-	-	-	-	17
12	DAEFRHDSGYEVH	-	-	-	-	-	-	18
13	iDSGYEVHHQKLVF	-	-	-	-	-	-	19
14	LVFFAEDVGSNKG	-	-	-	-	-	-	20
15	GSNKGAIIGLMVG	-	-	-	-	-	-	21
16	AIIGLMVGGVV	-	-	-	-	-	-	22

[0333]

[0334] 표 3에서의 pE는 pGlu, 파이로글루타메이트를 의미한다. .

[0335] 표 3에서의 iD는 isoAsp, 이소아스파테이트를 의미한다.

[0336] 2.5. SDS-PAGE 분석

[0337] Aβ-N3pE 항체 및 하이브리도마 세포 배양 상등액의 생물학적 무결성을 SDS-PAGE로 개략적으로 결정하였다(상세한 것은 앞의 재료 및 방법을 참조).

[0338] 도 4에 나타난 바와 같이, 겔에 로딩된 모든 시료는 pGlu-6166 12-1 항체 및 하이브리도마 세포 배양 상등액의 무결성을 나타내며, 스미어(smears) 없이 날카로운 밴드를 보여주었다.

[0339] 2.6. BIACORE 분석

[0340] DotBlot 분석을 가지고 바이오티닐화된 pGlu-6166 항체와 비교하여 하이브리도마 세포 배양 상등액의 Aβ N3pE-40 펩티드에 대한 민감도에 있어서 상당한 차이를 진단하였다. 그러나, 이 방법으로는 오직 끝의 결과만이 모니터링되었다. 반면 Biacore 분석은 주어진 항체의 결합 경로의 타임와이즈(timewise) 해상능을 가능하게한다. pGlu-6166 12-1 항체의 약한 결합이 Aβ N3pE-40 펩티드에 대한 낮은 결합의 결과인지를 체크하기 위해 앞의 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 Biacore 분석을 수행하였다.

[0341] pGlu-6166 항체의 증가된 농도의 결합 경로의 모니터링은 30nM의 해리상수(KD) 값의 계산을 가능하게한다. 하이브리도마 세포 배양 상등액 12-1과 세포 클론 상등액 6-1-6의 비교는 결합 특성에서 상당한 차이를 나타낸다. 클론 6-1-6의 결합은 클론 12-1에서 관찰되는 것보다 약 5배 이상 더 높다. 그러나, 분리 행동에서의 차이는 더욱 두드러진다. 클론 6-1-6은 Aβ N3pE-40 펩티드로부터 분리되지 않으나, 12-1은 몇 분안에 쉽게 분리된다. 그리하여, 클론 12-1의 약한 결합은 관찰된 "오프 레이트(off-rate)"의 결과일 가능성이 높다. 이러한 가정은 DotBlot 분석에서 특히 유리한 결과를 주는 클론 24-3-2이 Aβ N3pE-40 펩티드에 대해 느린 결합을 보여주나 클

론 12-1과는 대조적으로 "off-rate"이 관찰 안된다는 결과에 의해 더욱 뒷받침된다(도 5 참조).

2.6.1 AβN3pE 특이 항체 클론 6-1-6 및 24-2-3의 친화도

N3pE 항체 클론 6-1-6에 대해 결합 속도, 분리 속도, 분리 상수를 도 6에 나타낸 모든 센서그램(sensograms)의 글로벌 피트(global fit)에 의해 계산하였다.

상기 결합속도는 $1.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{S}^{-1}$ 를 가지고 계산하였고, 상기 분리 속도는 $2.63 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 를 가지고, 분리 상수는 1.57 nM 를 가지고 계산하였다.

N3pE 항체 클론 24-2-3에 대해 결합 속도, 분리 속도, 분리 상수를 도 7에서의 모든 센서그램(sensograms)의 글로벌 피트(global fit)에 의해 계산하였다.

상기 결합속도는 $3.25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{S}^{-1}$ 를 가지고 계산하였고, 상기 분리 속도는 $3.29 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 를 가지고, 분리 상수는 101 nM 를 가지고 계산하였다.

2.7 항체 가변 구역의 서열 결정

하기 서열을 동정하였다:

2.7.1 Clone 5-5-6

가변 부분 경사슬, 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 49)
 ATGGTGCTCAGCTCAGTTCCTGTTTCTGTAGTGCTCTGGATTCAGGAAACCAACGGT
 GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATGGACAACCAGCCTCT
 ATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTGATGGAAAAACCTATTGAATTGG
 TTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAATGCGCCTAATCTATCTGGTGCTAAACTGGAC
 TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATC
 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCA
 TTCACGTTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA
 TCCATCTTCCACCAT

가변 부분 경사슬, 단백질 서열 (SEQ ID NO: 50)
 MVSSAQFLFLVLWIQETNGDVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNV
 LLQRPQGSPMRLIYLVSKLDSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCVQGTHTFP FTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPP

가변구역 중사슬, 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 51)

ATGGGATGGAGCGGGGTCTTTCTCTCCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAG

GTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCC

TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTATACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCAT

[0356] GGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAGTGGTGTACTAGGTACAAC
CAGAAATTCAGGGCAAGGCCACATTAATTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG
GAGCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTACAAGAGAGGCTAAA
CGGGAGTGGGACGAGACTTACTGGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAA ACGACACCCCATCTGTCTA

[0357] 가변구역 중사슬, 단백질 서열 (SEQ ID NO: 52)

[0358] MGWSGVFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSH
GKNLEWIGLINPYSGVTRYNQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTREAK REWDETYWGQGLVTVSAAKTPPSV

[0359] **2.7.2 클론 6-1-6**

[0360] 가변구역 경사슬 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 53)

[0361] ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCAAGGAAACCAACGGT
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTGTGCGTTACCATTGGACAACCAGCCTCT
ATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTGACGAAAAACCTATTGAATTGG
TTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAATGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAACTGGAC
TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCA
TTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA TCCATCTTCCCACCATCCAG

[0362] 가변부분 경사슬, 단백질 서열 (SEQ ID NO: 54)

[0363] MVSTAQFLFLLVLWVQETNGDVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNW
LLQRPQGSPMRLIYLVSKLDSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEADLVVYVCVQGTHTP FTFGSGTKLEIKRADAAPTVISIFPPS

[0364] 가변부분 중사슬, 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 55)

ATGGGATGGAGCGGGTCTTTATCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCACTCTGAGGTCC
AGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGC

[0365] TTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTT
GAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGTACTAGGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCA
AGGCCACATTAATTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGTCTCAGTCTGACATC
TGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTACAAGAGAGGCTAAACGGGAGTGGGACGAGACTTACTGG
GGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTG

[0366] 가변부분 중사슬 단백질 서열 (SEQ ID NO: 56)

[0367] MGWSGVFI FLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSH
GKNLEWIGLINPYNGVTRYNQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTREAK REWDETYWGQGLVTVSAAKTPPSVYPL

[0368] **2.7.3 클론 17-4-3**

[0369] 가변부분 경사슬, 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 57)

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTCTGGATTCTGTTTCCAGCAGTGATGTTG
TGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGACG

ATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTGATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCA
GGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGAGGCTGAGGATCT
GGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCCGACGTTCCGGTGAGGCACCAAGCTG
GAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT

[0370] 가변 부분 경사슬 단백질 서열 (SEQ ID NO: 58)

[0371] MKLPVRLVLVFWIPVSSDVMTQTPLSLPVLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWY
LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSS

[0372] 가변 부분 중사슬 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 59)

ATGGACTTTGGGCTCAGCTTACTTATTTTGTCTTATTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAG
GTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACGGAATGGCGTGGGTTTCGACAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGAGTGGGTAGCATTATTAGTAATTTGGCATATAGTATCTACTATGCA
GACACTGTGACGGGCGATTACCATCTCTAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTGTACCTG
GAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCATGTACTACTGTGCAAGGTATGACTAC
GATAATATCTTGGACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC TCAGCCAAAACAACACCCCATCAGTCTATCCACTG

[0373] 가변 부분 중사슬 단백질 서열 (SEQ ID NO: 60)

MDFGLSLLIFVLILKGVQCEVKLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSDYGMWVRQAP
GKGPEWVAFISNLAYSIIYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARYDY DNILDYVMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPL

[0374] **2.7.4 클론 24-2-3**

[0375] 가변 부분 경사슬 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 61)

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTCTGGATTCAGGAAACCAAGGTGATGTTGTGCTGA
CCCAGACTCCACTCACTTGTGCGTTACCATTTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAG
TCAGAGCCTCTTATATAGTAATGAAAAACCTATTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAG
TCTCAAAGCGCCTAATCTATGTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTG

[0376] GCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGAGGCTGAGGATTGGGAGT
TTATTATTGCGTGAAGGTACACATTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAATA
AAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT

[0377] 가변 부분 경사슬 단백질 서열 (SEQ ID NO: 62)

MKLPVRLVLWIQETKGDVLTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLYSNGKTYLNWLLQ
RPGQSPKRLIYVVSKLDSGVPRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYVCVQGFHPFTF GSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSS

[0378] 가변 부분 중사슬 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 63)

[0379] ATGGGATGGAGCGGGTCTTTCTCTTCTCCTGTCAGTAACTGAAGGTGTCCACTCCCAGGTTC
AGCTGCAGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGC
TTCTGGCTATATATTCAATAACTACTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGTCAGGGTCTT
GAGTGGATTGGACAGATTATCTCGAGATGGTGATACTAACTACAATGGGAAGTTCAAGGGTA
AAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTAACATC

TGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGAGGGATATATTGTTTATTGGGGCCAAGGGACT
CTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTG

[0380] 가변부분 중사슬 단백질 서열 (SEQ ID NO : 64) MGWSGVFLFLSVTEGVHSQVQLQQSGAELVRPGSSVKI
SCKASGYIFNNYWVWVKQRP GQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGY
IVYWGQGTLLVTVSAAKTPPSVYPL

[0381] 2.8 N3pE ELISA를 위한 항체 클론 6-1-6의 적용

[0382] 정량화의 한계(limit of quantification ;LOQ) 및 신호 대 노이즈 비율(signal-to-noise ratio; S/N)에 관여하
여 마지막 N3pE ELISA 프로토콜을 검사하였다. 상기 ELISA의 표준 곡선은 도 8에 나타나 있다. 표준 곡선의 형
태는 흡광도의 선형 의존성을 보여주는 낮은 농도 범위에서 특히 매우 양호하다. 이 표준 곡선에 기초하여 LOQ
를 3.125 pg/ml, S/N = 1.3를 가지고 결정하였다.

[0383] 2.9 ELISA 및 SPR을 통해 분석된 교차반응의 조사

[0384] ELISA:

[0385] N3pE-ELISA를 사용하여 다른 Aβ 변형체에 대한 교차반응을 결정하였다. 원자료는 표 4에 주어져 있다.

[0386] 표 4: 클론 6-1-6을 갖는 N3pE-ELISA의 원자료: 교차 반응의 검사

농도 (pg/ml)	pE3-40 (28.04.)	pE3-40(21.04.)	2-40	3-40	4-40	1-42	3-42	pE11-40
800	1.8280	1.806	0.048	0.090	0.055	0.053	0.052	0.047
400	0.8750	0.912	0.045	0.065	0.044	0.048	0.052	0.044
200	0.4350	0.484	0.044	0.057	0.046	0.048	0.049	0.048
100	0.2290	0.248	0.045	0.052	0.045	0.047	0.050	0.048
50	0.1330	0.143	0.044	0.048	0.044	0.050	0.045	0.045
25	0.0820	0.086	0.044	0.046	0.044	0.048	0.047	0.048
12.5	0.0570	0.063	0.039	0.042	0.040	0.043	0.042	0.046
0	0.0410	0.040	0.038	0.065	0.061	0.059	0.063	0.066

[0387]

[0388] 오직 Aβ pE3-40에 대해서 농도로부터의 흡광도 의존성을 관찰하였다. 모든 검사된 Aβ 변형체는 Aβ 3-40을 제외
하고 1% 아래의 교차 반응을 보여주었다. 800 pg/ml에 대한 신호(블랭크에 의해 보정)는 Aβ pE3-40에 대한 신호
의 약 2.7 %였다. 두 펩티드의 N-말단이 같은 아미노산을 갖는다는 것을 고려하면 이것은 매우 양호한
수치이다. 첫번째를 제외하고 이것은 Aβ pE3-40 경우에 고리화된다. 전체적으로, ELISA를 위해 사용된 Aβ N3pE
항체 클론 6는 위치 3에서 pGlu로 시작하는 Aβ-펩티드의 N-말단에 매우 높게 특이하다.

[0389] SPR:

[0390] 클론 6-1-6 및 24-2-3의 다른 비-Aβ pGlu 펩티드에 대한 교차 반응은 표면공명분광기를 사용하여 분석하였다.
전형적인 결합 센서그램을 보여주는 Aβ pE3-40 대신에, 모든 다른 검사된 pGlu 펩티드는 각각 클론 6-1-6 및
24-2-3와 어떠한 작용도 보여주지 않았다. 도 9 참조(클론 6-1-6에 대해서만 나타난 데이터). pGlu 펩티드의 센
서그램을 Aβ pE3-40의 센서그램과 비교하였다. 추산된 교차 반응성은 모두 1% 아래였다. 분석된 모든 펩티드의
요약이 표 5에 나타난다.

[0391] 표 5: 클론 6-1-6 및 24-2-3의 다른 pGlu-펩티드로의 추산된 교차 반응

pGlu 펩티드	% 교차 반응
MCP-1	<1
MCP-2	<1
빅 가스트린	<1
고나도리베린	<1
뉴로텐신	<1
오렉신 A	<1
파이브로넥틴	<1
콜라겐 1	<1
TRH	<1

[0392]

[0393] 모든 실험은 N3pE 항체 클론 6-1-6 및 24-2-3가 AβpE3-x의 N-말단 에피토프에 특이하다는 것을 확인하였다. 다른 pGlu N-말단이 인지되지도 않았으며, N-말단 pE 잔기를 갖지 않는 다른 Aβ 펩티드 변형체도 인지되지 않았다.

[0394] 2.10 뇌분석을 위한 N3pE ELISA의 최적화 및 벨리데이션

[0395] 마우스 뇌간의 AβpE3-42 농도를 상기의 사용된 방법에 의존하여 분석하였다. 상기 시료는 뇌에서 QC에 의해 AβpE3-42로 고리화하는 인간 AβQ3-42를 과잉발현하는 형질전환 마우스(tg)로부터 얻었다. 시료들을 이형 형질전환 마우스(tg het) 및 동형 형질전환 마우스(tg hom) 및 야생형인 비-형질전환 마우스(wt)로부터 비교하였다. 시료 생성을 위해 사용된 상기 마우스는 국제 공개 W02009034158호에 기술된 것과 같이 생산되었다.

[0396] 모든 심화된 실험을 위해 시료와 표준물을 EIA 완충용액에 희석하였다. 다음 단계에서, 포름산 분획 분리를 위한 중화(neutralization) 방법을 최적화하였다. 즉, 중화는 N3pE ELISA였다. 여기서 개발되어 수득된 N3pE ELISA는 작동을 잘 하였고, tg hom 마우스의 뇌에서 상당한 수준의 인간 AβpE3-42를 감지하였고, tg het 마우스의 뇌에서 상당한 낮은 수준의 인간 AβpE3-42를 감지하였고, wt 마우스의 뇌에서는 어떠한 인간 AβpE3-42도 감지하지 않았다(도 10 참조). 본 발명에 따른 상기 ELISA는 높은 신호와 그리하여 수용가능한 LOQ를 전달하며 포름산 시료 분석, 특히 포름산 뇌 시료에 적합하다.

[0397] 2.11 면역조직화화법을 위한 N3pE 항체 클론의 적용

[0398] 본 발명의 N3pE 항체를 가지고, 특발성 알츠하이머 질병(SAD) 및 알츠하이머 질병의 가족성 형태(FAD)의 마지막 단계의 환자, 곧, 프리세틸린 1 (PS1) 유전자에 돌연변이를 갖는 환자 뇌 절편에서 AβpE3-x를 염색하였다. 염색된 뇌 절편은 도 11에 주어져 있다. 도 11은 본 발명의 N3pE 항체가 면역조직화화법에 적합하다는 것을 보여준다. 상기 항체는 SAD 및 FAD 환자의 뇌에서 pGlu-Aβ를 특별히 감지한다. N3pE 항체는 상기 이미지상에서 어떠한 백그라운드 신호를 보여주지 않으며, 이것은 ELISA 및 SPR 분석에 의하여 보여진 특이한 결합을 입증한다.

[0399] 3. 기탁

[0400] Aβ N3pE-x를 특히 인식하는 단일 클론 항체를 생산하였다. 현재 모든 해당 단일클론 항체를 발현하는 하이브리도마 세포주 5-5-6, 6-1-6, 17-4-3, 및 24-2-3은 부다페스트 조약에 따라 기탁되어 있고 2008년 6월 17일의 기탁일과 각각의 기탁번호를 가지고 the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, DE에서 입수가 가능하다.

- [0401] (클론 5-5-6) : DSM ACC2923
- [0402] (클론 6-1-6) : DSM ACC2924
- [0403] (클론 17-4-3) : DSM ACC2925
- [0404] (클론 24-2-3) : DSM ACC2926.
- [0405] 그들 각각의 타겟 서열에 대한 항체의 특이성을 확인하였다. A β N3pE-x에 대해, ELISA 셋업에서 강한 신호를 주고 낮은 pg 범위에서 예상된 감지 한계를 갖는 높은 친화도 항체 클론을 동정하였다.
- [0406] **4. 요약**
- [0407] 본 발명의 주요 목적은 생물 시료에서 A β 변형체의 정량적 결정을 가능하게 하는 매우 민감하고 강력한 감지 기술의 확립이었다.
- [0408] 바람직하게는, ELISA 기반 기술이 추구되어야 한다. 상기 작업은 이 A β 변형체에 대해 알맞은 ELISA 시스템이 이미 상용적으로 입수가능(ABL)하기 때문에 A β N3pE ELISA를 가지고 시작하였다. 이 시스템은 레퍼런스 및 내부 웰리티 대조군으로 상용하였다.
- [0409] 선택된 ELISA 검사 셋업에서 상기 pGlu-6166 항체의 적용을 조사하였다. 보다 명확한 측정 신호를 얻기 위하여, 높은 항체 농도가 전개하는데 필요했다(20 μ g/ml). 높은 친화도 A β N3pE-x 항체 클론을 동정하였다. 이들 클론을 가지고 낮은 pg 범위에서의 감지 한계를 이루었다.

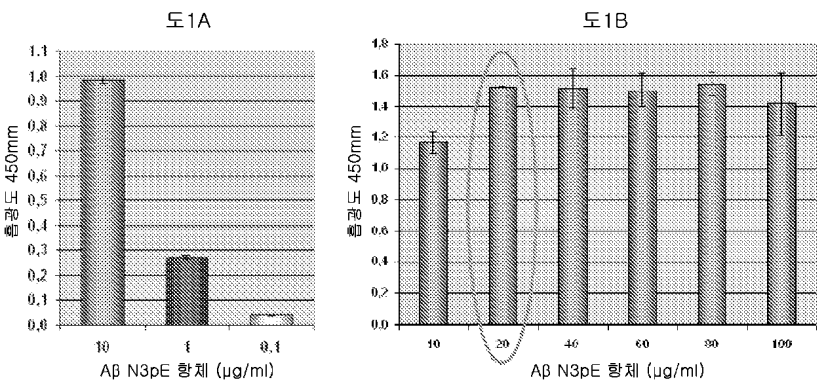
수탁번호

- [0410]
- 기탁기관명 : 미생물과 세포 문화의 독일 수집 DSMZ
- 수탁번호 : DSMACC2924
- 수탁일자 : 20080617
- 기탁기관명 : 미생물과 세포 문화의 독일 수집 DSMZ
- 수탁번호 : DSMACC2926
- 수탁일자 : 20080617
- 기탁기관명 : 미생물과 세포 문화의 독일 수집 DSMZ
- 수탁번호 : DSMACC2923
- 수탁일자 : 20080617
- 기탁기관명 : 미생물과 세포 문화의 독일 수집 DSMZ
- 수탁번호 : DSMACC2925

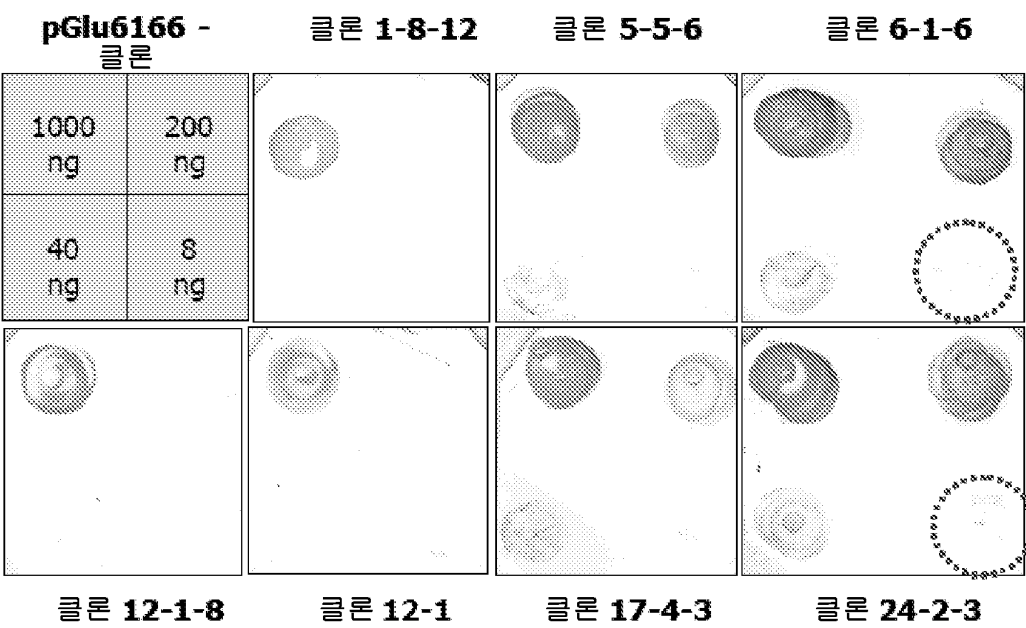
수탁일자 : 20080617

도면

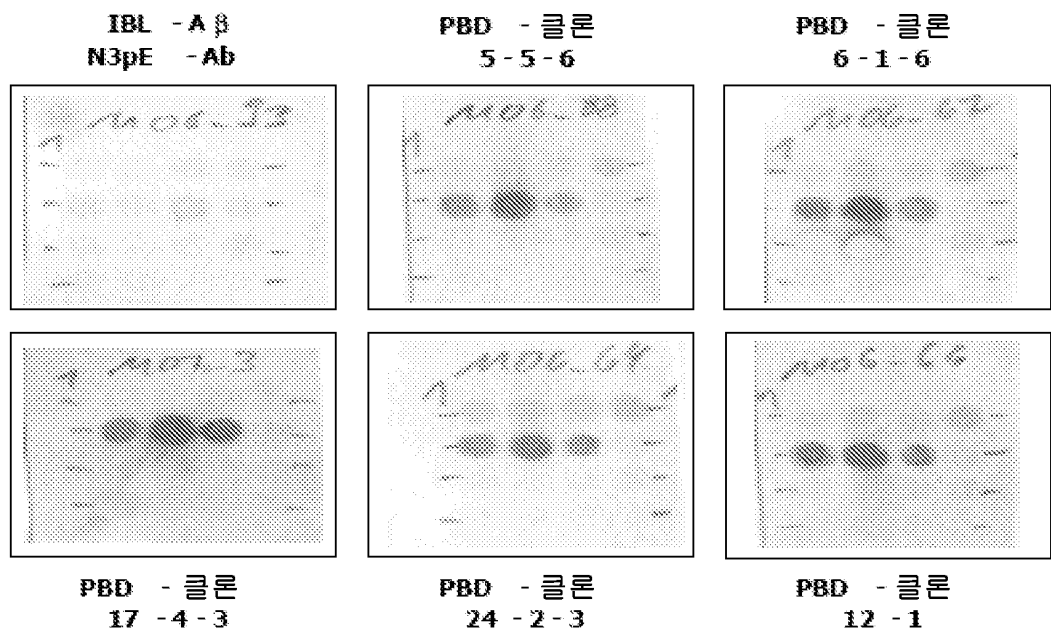
도면1



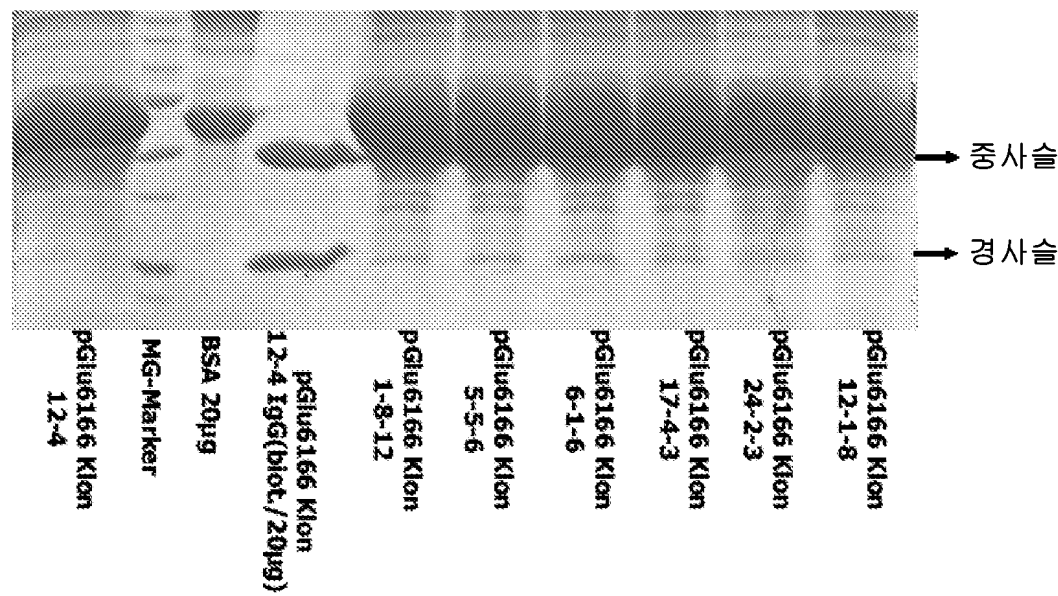
도면2



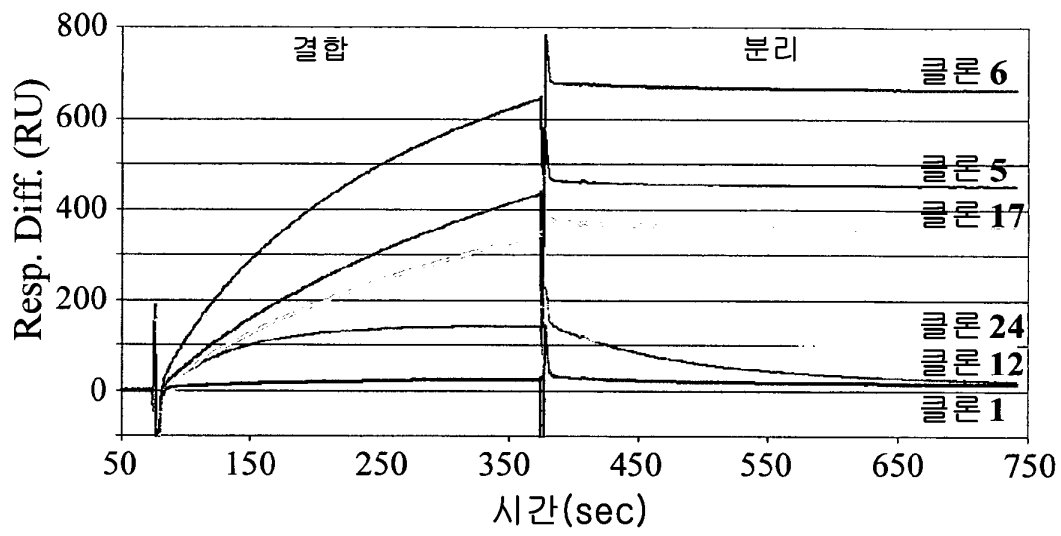
도면3



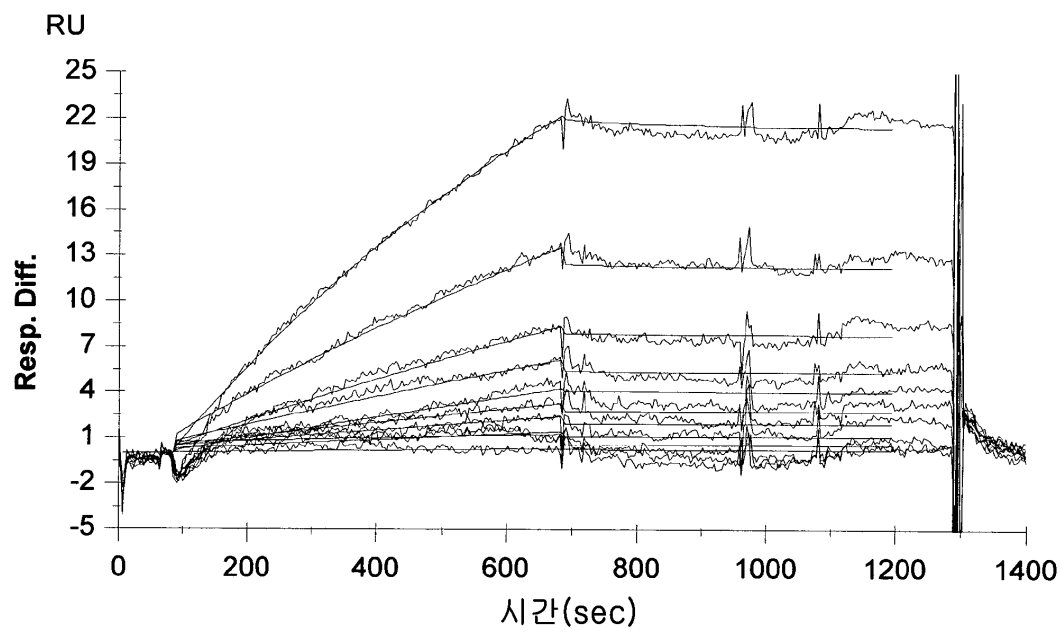
도면4



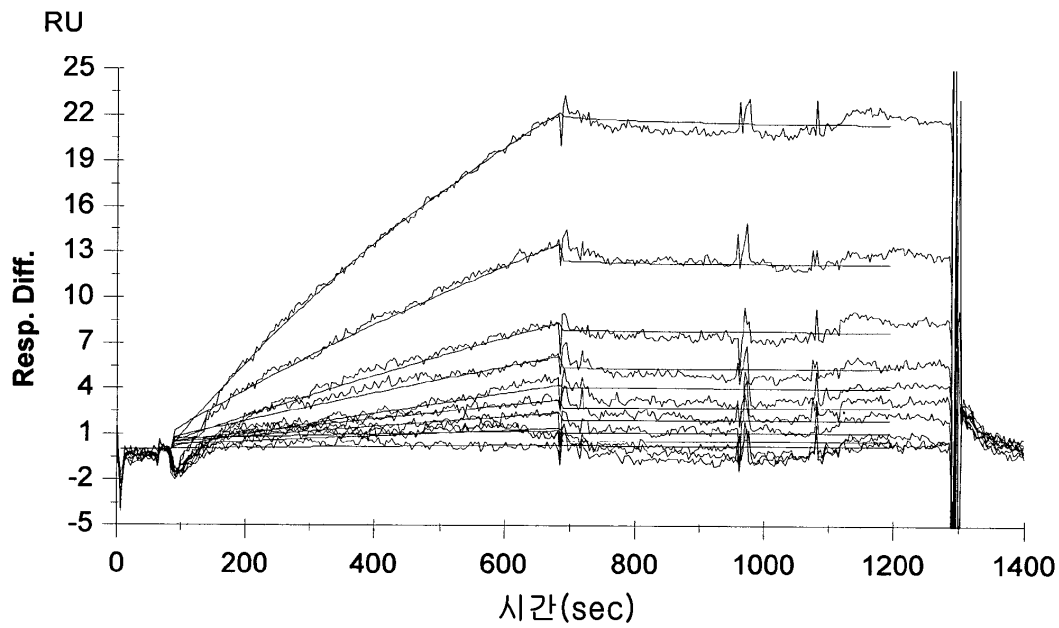
도면5



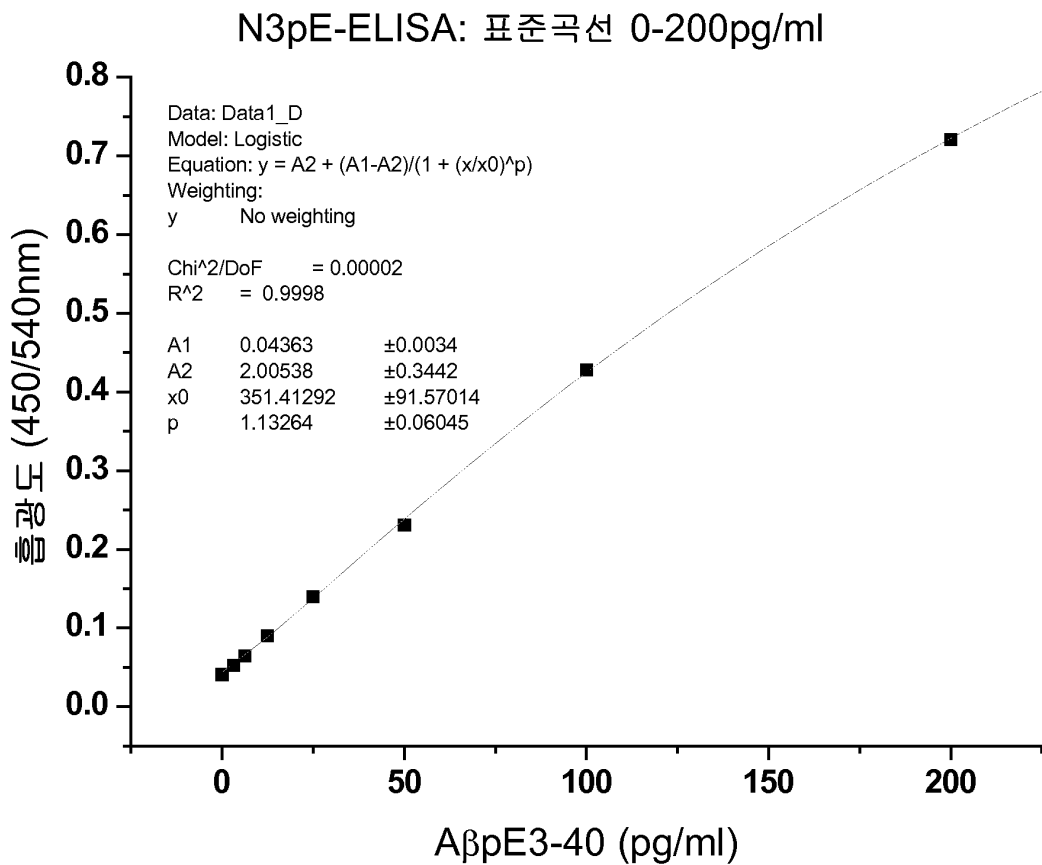
도면6



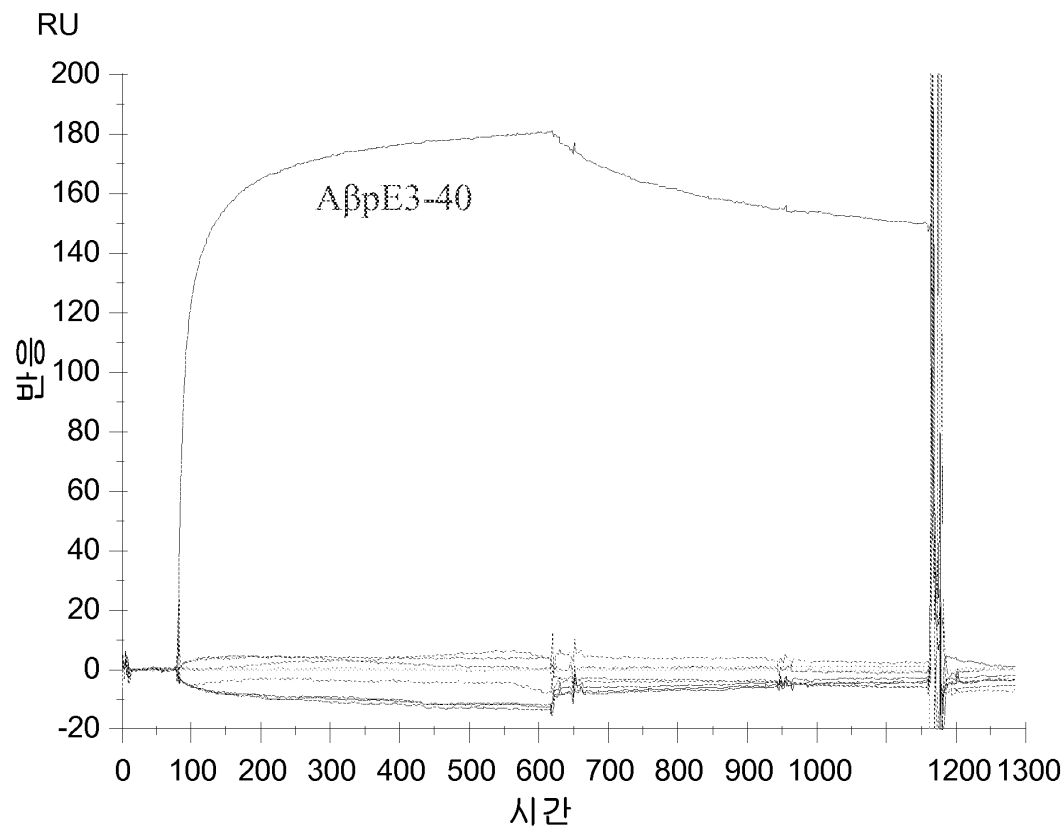
도면7



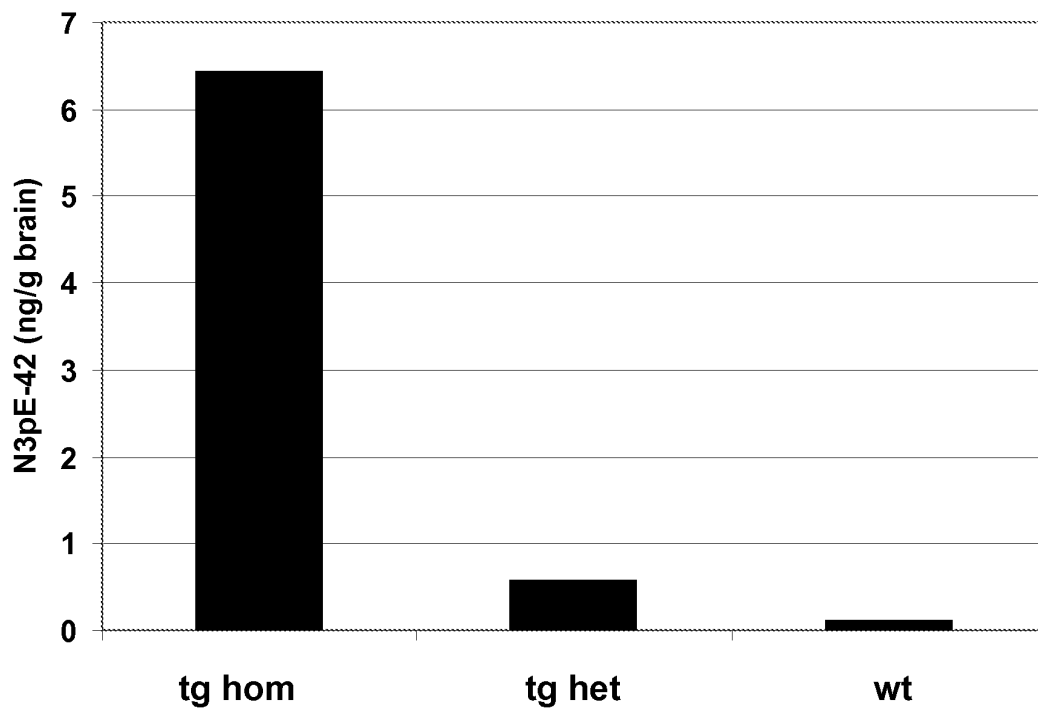
도면8



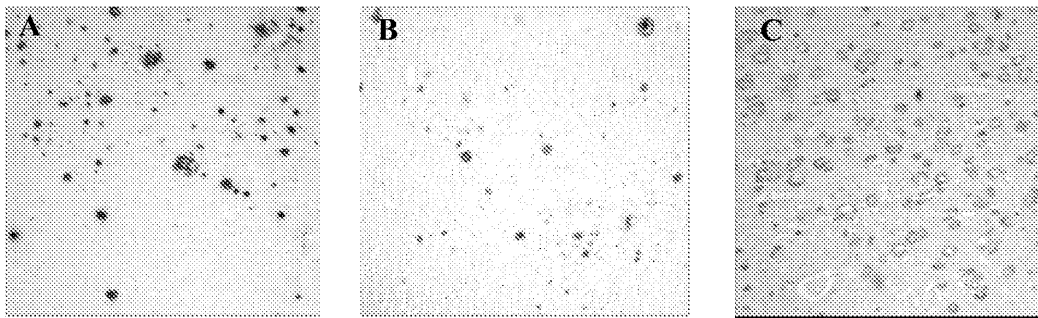
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> Probiobdrug AG

<120> Diagnostic Antibody Assay

<130> IPA110017

<150> US 61/082,309

<151> 2008-07-21

<160> 65

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40
 <210> 3
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly
 35
 <210> 4
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
 1 5 10 15
 Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
 20 25 30
 Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40
 <210> 5
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
 1 5 10 15

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

20

25

30

Met Val Gly Gly Val Val

35

<210

> 6

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Met Val Gly Gly

35

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu

1

5

10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His

<400> 8

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

1

5

10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 23

atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgctg	30
<210> 24	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 24	
atggagwcag acacactcct gytatgggtg	30
<210> 25	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 25	
atgagtgtgc tcactcaggt cctggsgttg	30
<210> 26	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 26	
atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg	33
<210> 27	
<211> 30	
<212>	
> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 27	
atggatttwc aggtgcagat twtcagcttc	30
<210> 28	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	PCR primer	
<400>	28	
atgaggtkcy ytgysagyt yctgrgg		27
<210>	29	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	29	
atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g		31
<210>	30	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	30	
atgtggggay ctktttymmm tttttcaatt g		31
<210>	31	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	31	
atggtrtccw casctcagtt ccttg		25
<210>	32	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	32	
atgtatatat gttgtgtgtc tatttct		27
<210>	33	
<211>	28	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 33
 atggaagccc cagctcagct tctcttcc 28
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 34
 actggatggt gggaagatgg 20
 <210> 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 35
 atgaaatgca gctggggcat sttcttc 27

 <210> 36
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 36
 atgggatgga gctrtatcat sytctt 26
 <210> 37
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 37
 atgaagwtgt ggtaaactg gggtttt 27
 <210> 38

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 38
 atgractttg ggytcagctt grttt 25

<210> 39
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 39
 atggactcca ggctcaattt agttttcctt 30

<210> 40
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 40
 atggcttgtc ytrgsgctrc tcttctgc 28

<210> 41
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 41
 atggratgga gckggrtctt tmtctt 26

<210> 42
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 42

atgagagtgc tgattctttt gtg	23
<210> 43	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 43	
atggmttggg tgtggamctt gctattcctg	30
<210> 44	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 44	
atgggcagac ttacattctc attcctg	27
<210> 45	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 45	
atggattttg ggctgatttt ttttattg	28
<210> 46	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 46	
atgatggtgt taagtcttct gtacctg	27
<210> 47	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	

<400> 47
cagtggatag acagatgggg g 21

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR primer

<400> 48
cagtggatag actgatgggg g 21

<210> 49
<211> 436
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 49

atggtgtcct cagctcagtt cctgtttctg ttagtgctct ggattcagga aaccaacggt 60
gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca accagcctct 120
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtgatg gaaaaaccta ttigaattgg 180

ttattacaga ggccaggcca gtctccaatg cgcctaactct atctggtgtc taaactggac 240
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga ttggggagtt tattactgcg tgcaaggtac acattttcca 360
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420
tccatcttcc caccat 436

<210> 50
<211> 145
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 50

Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln

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

35 40 45
 Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Met Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Val Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro

145

<210> 51

<211> 440

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 51

atgggatgga gcggggtctt tctcttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
 gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tataccatga actgggtgaa gcagagccat 180
 ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca gtggtgttac taggtacaac 240
 cagaaattca agggcaaggc cacattaatt gtagacaagt catccagcac agcctacatg 300
 gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt attgtacaag agaggctaaa 360

cgggagtggg acgagactta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagccaaa 420
 acgacacccc catctgtcta 440

<210> 52

<211> 146

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Val Thr Arg Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Ala Lys Arg Glu Trp Asp Glu Thr Tyr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Val

145

<210> 53

<211> 440

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 53

atggtgtcca cagctcagtt cctgtttctg ttagtgctct ggattcagga aaccaacggt 60

gatgttgtga tgaccagac tccactcaact ttgtcggta ccattggaca accagcctct 120

atctcttgca agtcaagta gacgctctta tatagtgcg gaaaaaccta ttgaattgg 180

ttattacaga ggccaggcca gtctccaatg cgcctaactc atctggtgtc taaactggac 240

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagatcttac actgaaaatc 300

agcagagtgg aggctgagga ttggggagtt tattactgcg tgcaaggtac acattttcca 360

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420

tccatcttcc caccatccag 440

<210> 54

<211> 146

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln

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

20 25 30
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45
Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg

50 55 60
Pro Gly Gln Ser Pro Met Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Val Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser

145

<210>

55

<211> 447

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 55

atgggatgga gcggggtctt tatcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacaccatga actgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atggtgttac taggtacaac 240
cagaagttca agggcaaggc cacattaatt gtagacaagt catccagcac agcctacatg 300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtacaag agaggctaaa 360

cgggagtgagg acgagactta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgcagccaaa 420
acgacacccc catctgtcta tccactg 447

<210> 56

<211> 149

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Val Thr Arg Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Ala Lys Arg Glu Trp Asp Glu Thr Tyr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Val Tyr Pro Leu

145

<210> 57

<211> 438

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 57

atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgctg gtgttctgga ttcctgtttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccagactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtacagag ccttgtacac agtcatggaa acacctatit acattggtac 180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

gggggtccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tctgtctctc aaagtacaca tgttcctccg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420

atcttccac catccagt 438

<210> 58

<211> 146

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Val Phe Trp Ile Pro Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

100 105 110
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

 130 135 140
 Ser Ser
 145
 <210> 59
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 59
 atggactttg ggctcagctt acttattttt gtccttattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgaagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaggggccg gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtgcac tacggaatgg cgtgggttcg acaggctcca 180
 gggaaggggc ctgagtgggt agcattcatt agtaatttgg catatagtat ctactatgca 240
 gacactgtga cgggccgatt caccatctct agagagaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

 gaaatgagca gtctgaggtc tgaggacaca gccatgtact actgtgcaag gtatgactac 360
 gataatatct tggactatgt tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420
 tcagccaaaa caacaccccc atcagtctat ccactg 456
 <210> 60
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 60
 Met Asp Phe Gly Leu Ser Leu Leu Ile Phe Val Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro

50	55	60	
Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Tyr Tyr Ala			
65	70	75	80
Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn			
	85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met			
	100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Asp Asn Ile Leu Asp Tyr Val Met			
	115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr			
	130	135	140
Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu			
145	150		
<210>	61		
<211>	432		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	61		
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctc tggattcagg aaaccaaggg tgatgttgtg		60	
ctgaccaga ctccactcac tttgtcgggt accattggac aaccagcctc tatctcttgc		120	
aagtcaagtc agagcctctt atataagtaat ggaaaaacct atttgaattg gttattacag		180	
aggccaggcc agtctccaaa ggcctaatac tatgttgtgt ctaaactgga ctctggagtc		240	
cctgacaggt tcaactggcag tggatcagga acagatttta cactgaaaat cagcagagtg		300	
gaggctgagg atttgggagt ttattattgc gtcaaggta cacattttcc attcacgttc		360	
ggctcgggga caaagttgga aataaaacgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc		420	
ccaccatcca gt		432	
<210>	62		
<211>	144		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<400>	62		
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln Glu Thr Lys			

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

50 55 60
 Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Val Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 85 90 95
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln
 100 105 110
 Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140

<210> 63
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 63

atgggatgga gcggggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgaaggtgt ccaactcccag 60
 gttcagctgc agcagctctgg ggctgagctg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc 120
 tgcaaggctt ctggctatat attcaataac tactggataa actgggtgaa gcagaggcct 180
 ggtcagggtc ttgagtggat tggacagatt tctcctggag atggtgatac taactacaat 240

gggaagtcca agggtaaagc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcaag agagggatat 360
 attgtttatt ggggccaagg gactctggtc actgtctctg cagccaaaac gacaccccca 420
 tctgtctatc cactg 435

<210> 64
 <211> 145

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 64

Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Glu Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

Asn Asn Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro

130 135 140
 Leu

145

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)

<223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID,

<400> 65

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Cys

1

5