



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년08월24일
 (11) 등록번호 10-1058482
 (24) 등록일자 2011년08월16일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2001-7015232

(22) 출원일자(국제출원일자) 2000년05월26일

심사청구일자 2004년08월19일

(85) 번역문제출일자 2001년11월27일

(65) 공개번호 10-2002-0038585

(43) 공개일자 2002년05월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2000/014810

(87) 국제공개번호 WO 2000/72880

국제공개일자 2000년12월07일

(30) 우선권주장

09/322,289 1999년05월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO199927944 A1*

WO199844955 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

안센 알츠하이머 이뮤노테라피

아일랜드 카운트 코크 리틀 아일랜드 리틀 아일랜드 인더스트리얼 이스테이트

(72) 발명자

솅크테일비

미국캘리포니아주94010버링게임로스알토스드라이브1542

바드프레데리크

미국캘리포니아주94404퍼시피카파크퍼시피카애비뉴1111

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 김윤경

(54) 아밀로이드증 질환의 예방 및 치료

(57) 요 약

본 발명은 환자의 뇌에 있는 A β 의 아밀로이드 침착물과 관련된 질환의 치료를 위한 개선된 치료제 및 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 아밀로이드 침착물침착물 유리한 면역원성 반응을 유도하는 제제를 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법은 알츠하이머 질환의 예방 및 치료에 유용하다. A β 의 N-말단 단편 및 이에 결합하는 항체를 포함하는 제제가 바람직하다.

(72) 발명자

바스퀘즈니키제이

미국캘리포니아주94114
샌프란시스코산체츠스트리트310

예드녹테드

미국캘리포니아주94933포리스트놀스애로요로드184

(81) 지정국

AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA,
CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE,
HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
NO, NZ, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US,
UZ, VN, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, AE, AG,
CR, DM, DZ, MA, ZA, MZ, GD, GH, HR, IN, ZW,
YU, ID, GM, SL, TZ, AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG,
SL, GH, GM, ZW, TZ, MZ), EA(AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, DE, DK,
ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE,
FI, CY), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
ML, MR, NE, SN, TD, TG, GW),

특허청구의 범위

청구항 1

활성성분으로

β -아밀로이드 웨터드($A\beta$)의 잔기 1-7 내;

$A\beta$ 의 잔기 1-6 내;

$A\beta$ 의 잔기 1-4 내;

$A\beta$ 의 잔기 1-3 내;

$A\beta$ 의 잔기 3-7 내; 또는

$A\beta$ 의 잔기 3-6 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 사람 항체, 키메릭 항체 또는 사람화 항체(humanized antibody)와 약학적 허용 담체를 포함하는 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체의 이소타입이 사람 IgG1 또는 IgG4인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 항체의 이소타입이 사람 IgG1인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체의 이소타입이 IgG2 또는 IgG3인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

활성성분으로

β -아밀로이드 웨터드($A\beta$)의 잔기 1-7 내;

$A\beta$ 의 잔기 1-6 내;

$A\beta$ 의 잔기 1-4 내;

$A\beta$ 의 잔기 1-3 내;

$A\beta$ 의 잔기 3-7 내; 또는

$A\beta$ 의 잔기 3-6 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 약학적 허용 담체를 포함하고, 상기 항체의 이소타입이 사람 IgG1인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체가 $A\beta$ 의 자유 N-말단 잔기를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체가 폴리클로널 사람 항체 또는 모노클로널 사람 항체인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체가 동일한 경쇄 및 중쇄 쌍 2 카피를 포함하는 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체가 A β 의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 경쇄 및 중쇄 쌍, 및 소교세포 상의 Fc 수용체에 특이적으로 결합하는 제2 경쇄 및 중쇄 쌍을 포함하는 이중 특이적 항체인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체의 연쇄가 이종구조의 폴리펩티드에 융합된 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체가 전장 아밀로이드 전구체 단백질(APP)에 결합하지 않고 A β 펩티드에 특이적으로 결합하는 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제2 활성성분으로 A β 의 잔기 1-10 내의 에피토프가 아닌 A β 의 상이한 에피토프에 결합하는 1종 이상의 다른 항체를 추가로 포함하는 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 담체는 비경구 투여용 생리학적 허용 희석제인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 16

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 복강, 경구, 비측, 피하, 근육내, 국소 또는 정맥으로 투여되는 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 17

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 6개월 내지 사망시 까지의 기간 동안 다중 투여로 투여되는 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 18

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서방성 조성물로 투여되는 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 19

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체의 투여량이 환자 체중 1 kg당 1 mg 내지 10 mg 범위인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 항체의 투여량이 환자 체중 1 kg당 1mg 인 것인 알츠하이머 질환 또는 경증 인식장애의 예방

또는 치료용 약학조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

명세서

[0001] 관련 출원의 참조

[0002] 본 출원은 본 명세서에서 참고로 인용하는 1999년 5월 28일자로 출원된 미국 특허 출원 제09/322,289호의 일부 계속출원이다.

기술 분야

[0003] 본 발명은 면역학 및 의약 기술 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 알츠하이머 질환(AD)은 노인성 치매로 진행되는 진행성 질환이다. 참고 문헌[Selkoe, *TINS* 16, 403-409(1993); Hardy 등, WO92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 438-447(1994); Duff 등, *Nature* 373, 476-477(1995); Games 등, *Nature* 373, 523(1995)]. 보다 광범위하게는, 이러한 질환은 2개의 범주, 즉 고령(65세 이상)에서 발생하는 후기 발병 및, 노인기 이전, 즉 35세에서 60세 사이에 발생하기 쉬운 초기 발병으로 나눌 수 있다. 이러한 2가지 유형의 질환에 있어서, 병리학적인 면에서는 동일하나, 이상 정도가 초년기에 발생하는 경우에는 더욱 심각하고 또한 더 널리 퍼지는 경향이 있다. 이러한 질환은 뇌에서 2종 이상의 병소 유형, 즉 노인성 플라크 및 신경섬유 농축을 특징으로 한다. 노인성 플라크는 뇌조직 단면의 현미경 분석에 의해 나타나는, 중앙에 세포외 아밀로이드 침착을 갖는 $150 \mu\text{m}$ 이하의 파괴된 신경망 부위를 말한다. 신경섬유 농축은 2개의 필라멘트가 한쌍을 이루어 서로에 대하여 꼬여있는 것으로 이루어진 타우 단백질과 관련된 미소관의 세포내 침착물을 말한다.

[0005] 이러한 플라크의 주성분은 $\text{A}\beta$ 또는 β -아밀로이드 펩티드로 불리우는 펩티드이다. $\text{A}\beta$ 펩티드는 아밀로이드 전구

체 단백질(APP)로 불리우는 전구체 단백질의 39-43 아미노산의 내부 단편이다. APP 단백질 내에서의 수화의 변이는 알츠하이머 질환의 존재와 연관성이 있었다. 참고 문헌[Goate 등, *Nature* 349, 704(1991) (발린⁷¹⁷ 내지 이소루신); Chartier Harlan 등, *Nature* 353, 844(1991)(발린⁷¹⁷ 내지 글리신); Murrell 등, *Science* 254, 97(1991) (발린⁷¹⁷ 내지 폐닐알라닌); Mullan 등, *Nature Genet.*, 1, 345(1992)(리신⁵⁹⁵-메티오닌⁵⁹⁶에서 아스파라긴⁵⁹⁵-루신⁵⁹⁶으로 변화되는 이중 변이)]. 이러한 변이는 APP를 Aβ로의 증가되거나 또는 변형된 처리에 의해, 특히 APP에서 Aβ의 장쇄형(즉, Aβ 1-42 및 Aβ 1-43) 증분으로의 처리에 의해 알츠하이머 질환이 유발되는 것으로 알려졌다. 기타의 유전자, 예컨대 프레세닐린 유전자 PS1 및 PS2에서의 변이는 Aβ의 장쇄형의 증분을 생성하기 위해 APP 처리에 영향을 간접적으로 미치는 것으로 알려졌다. 참고 문헌[Hardy, *TINS* 20, 154(1997)]. 이러한 고찰은 Aβ 및, 특히 이의 장쇄형이 알츠하이머 질환의 원인이 되는 성분이 되는 것으로 나타났다.

[0006] McMichael의 EP 526,511호에는 사전설정된 AD를 앓고 있는 환자에게 동종요법의 투여량(10^{-2} mg/일)의 Aβ를 투여하는 것이 제안되어 있다. 약 5 ℓ 정도의 혈장을 지닌 통상의 사람에게서, 이러한 투여량의 상한치는 2 pg/ml 이하의 농도를 생성하는 것으로 예상되기도 한다. 사람 혈장에 있어서의 Aβ의 정상적인 농도는 통상적으로 50 ~200 pg/ml 범위 내가 된다[문헌: Seubert 등, *Nature* 359, 325-327(1992)]. EP 제526,511호에는 이러한 투여량이 내인성 순환 Aβ의 농도를 거의 변화시키지 않는 것으로 제안되어 있으며, EP 제526,511호에는 면역자극제로서 보조제의 사용이 권장되지 않았기 때문에, 어떠한 치료적 잇점을 창출할 지에 대하여서는 의문점이 있다.

[0007] 반대로, 본 발명은 특히 환자에게서 이로운 면역 반응을 생성하는 조건하에서 환자에게 Aβ 내의 특정한 에피토프에 항체 또는 Aβ의 단편을 투여함으로써 알츠하이머 질환 및 기타의 아밀로이드증 질환을 치료하는 것에 관한 것이다. 그래서, 본 발명은 신경병리학 및, 특정의 환자에게서는 알츠하이머 질환과 관련된 인식 손상을 예방 또는 완화시키기 위한 치료법에 대한 숙원을 이루고자 하는 것이다.

[0008] 본 출원은 본 명세서에서 참고로 인용하는 1998년 11월 30일 출원된 WO99/27944, 1997년 12월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 제60/067,740호, 1998년 4월 7일자로 출원된 미국 특허 출원 제60/080,970호 및 1998년 11월 30일자로 출원된 미국 특허 출원 제09/201,430호에 관한 것이다.

청구된 발명의 개요

[0010] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명은 환자의 뇌에서 Aβ의 아밀로이드 침착물과 관련된 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하고자 한다. 이러한 질환은 알츠하이머 질환, 다운증후군 및 인식 손상 등이 있다. 인식 손상의 경우에는 아밀로이드증 질환의 기타의 특징의 존재하에 또는 이러한 특징의 부재하에서도 발생할 수 있다. 본 발명의 특정의 방법은 환자에게 아밀로이드 침착물 성분에 특이적으로 결합되는 유효량의 항체를 투여하여야 한다. 이 방법은 사람인 환자에게서 알츠하이머 질환을 예방 또는 치료하기에 매우 유용하다. 이 방법은 Aβ에 결합되는 유효량의 항체를 투여하여야만 한다. 이 방법은 Aβ의 잔기 1~10에 에피토프를 특이적으로 결합시키는 유효량의 항체를 투여하여야만 한다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 잔기 1~6 내의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 잔기 1~5 내의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 잔기 1~7 내의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 잔기 3~7 내의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 잔기 1~3 내의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 잔기 1~4 내의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 자유 N-말단 잔기를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체는 Aβ의 1~10의 잔기 내의 에피토프에 결합되며, 여기서 Aβ의 잔기 1 및/또는 잔기 7은 아스파르트산이다. 이 방법에서 항체는 전장 아밀로이드 전구체 단백질(APP)에 결합되지 않고 Aβ 웹티드에 특이적으로 결합된다. 이 방법에서, 항체의 이소타입은 사람 IgG1이다.

[0011] 이 방법에서, 항체는 환자의 아밀로이드 침착물에 결합하며, 아밀로이드 침착물에 대한 제거 반응을 유발하게 된다. 예를 들면, 이러한 제거 반응은 Fc 수용체 매개된 식균작용에 의해 수행될 수 있다.

[0012] 이러한 방법은 무증후성 환자 및 질환의 증후를 현재 나타내고 있는 환자 모두에 사용될 수 있다. 이러한 방법에 사용되는 항체는 사람, 사람화, 키메릭 또는 비-사람 항체가 될 수 있으며, 이는 모노클로날 또는 폴리클로날이 될 수 있다. 이러한 방법에서, 항체는 Aβ 웹티드로 면역화된 사람으로부터 생성되며, 사람은 항체로 치료하고자 하는 환자가 될 수 있다.

[0013] 이 방법에서, 항체는 약학적 조성물로서 약학적 담체와 함께 투여된다. 이 방법에서, 항체는 체중 1 kg당 0.0001~100 mg, 바람직하게는 1 mg 이상의 항체의 투여량으로 투여한다. 이 방법에서, 항체는 장시간에 걸쳐,

예를 들면 6개월 이상 동안 다수의 투여량으로 투여한다. 이 방법에서, 항체는 지연 방출형 조성물로서 투여된다. 항체는 예를 들면 복강내, 경구, 피하, 골내, 근육내, 국소, 비강내 또는 정맥내 투여될 수 있다.

[0014] 이 방법에서, 항체는 환자에게 1 이상의 항체 양을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 투여함으로써 투여된다. 상기 폴리뉴클레오티드는 환자에서 발현되어 항체 양을 생성한다. 임의로 폴리뉴클레오티드는 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화한다. 이 폴리뉴클레오티드는 환자에서 발현되어 중쇄 및 경쇄를 생성한다. 이 방법에서, 환자의 혈액 중의 투여된 항체의 농도를 알기 위해 환자를 모니터링한다.

[0015] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명은 환자의 뇌에서 A β 의 아밀로이드 침착물과 관련된 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하고자 한다. 예를 들면, 이러한 방법은 알츠하이머 질환 또는 다운증후군 또는 인식 손상을 치료하는데 이용될 수 있다. 이러한 방법은 A β 내의 특정 에피토프에 대한 면역원성 반응을 규명하는 A β 분절 또는 이의 유사체를 투여하여야 한다. 이 방법은 A β 의 제1 잔기는 폴리펩티드의 N-말단 잔기이고, 이 폴리펩티드는 A β 의 C-말단 분절이 없는 것인 A β 의 적어도 잔기 1~5의 N-말단 잔기를 포함하는 유효량의 폴리펩티드를 환자에게 투여하여야 한다. 이 방법은, 분절이 A β 의 잔기 1~3에서 시작하여 A β 의 잔기 7~11에서 종결되는 A β 의 N-말단 분절을 포함하는 유효량의 폴리펩티드를 환자에게 투여하여야 한다. 이 방법은, A β 43의 잔기 12~43 내의 에피토프에 대한 면역원성 반응을 유발하지 않으면서 분절이 A β 의 잔기 1~3에서 시작하여 A β 의 잔기 7~11에서 종결되는 A β 의 N-말단 분절을 포함하는 유효량의 폴리펩티드를 환자에게 투여하여야 한다.

[0016] 상기의 방법에서, A β 의 N-말단 분절은 C-말단에서 이종구조의 폴리펩티드에 연결된다. 상기의 방법에서, A β 의 N-말단 분절은 이것의 N-말단에서 이종구조의 폴리펩티드에 연결된다. 상기 방법에서, A β 의 N-말단 분절은 이것의 N-말단에서 제1 및 제2의 이종구조의 폴리펩티드에 연결된다. 상기 방법에서, A β 의 N-말단 분절은 이것의 N-말단에서 이종구조의 폴리펩티드에 연결되고, 이것의 C-말단에서 N-말단 분절의 1 이상의 추가의 카페에 연결된다. 상기 방법에서 이종구조의 폴리펩티드 및 그로 인한 B-세포는 N-말단 분절에 반응한다. 상기의 방법에서, 폴리펩티드는 추가로 N-말단 분절의 1 이상의 추가의 카페를 포함한다. 상기의 방법에서, 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 A β 의 N-말단 분절, N-말단 분절의 다수의 추가의 카페 및 이종구조의 아미노산 분절을 포함한다. 상기의 방법에서, N-말단 분절은 A β 1~7로 이루어진다. 상기의 방법에서 N-말단 분절은 A β 3~7로 이루어진다.

[0017] 이 방법에서, 단편은 A β 43에서 적어도 5개의 C-말단 아미노산이 없다. 이 방법에서, 분절은 A β 로부터 10 이하의 인접한 아미노산을 포함한다. 분절은 통상적으로 환자당 매투여시 10 μ g 이상으로 투여한다.

[0018] 이 방법에서, 단편은 A β 웨프티드에 대한 면역 반응을 개선시키는 보조제와 함께 투여된다. 보조제 및 단편은 차례대로 또는 함께 조성물로서 투여될 수 있다. 보조제는, 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, MPLTM, QS-21(StimulonTM) 또는 불완전 프로인트 보조제가 될 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한, 전술한 바와 같은 A β 의 동일한 에피토프 및 보조제에 대한 면역원성 반응을 규명하는 A β 의 단편 및 기타의 제제를 포함하는 약학 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 전술한 임의의 항체 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공하고자 한다.

[0020] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명은 환자(예, 알츠하이머 질환)의 뇌에서 A β 의 침착과 관련된 질환을 치료하는데 있어서 작용하는 항체를 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다. 이러한 방법은, 폴리펩티드가 A β 의 C-말단 분절이 없는, A β 의 1 및 3 사이의 잔기에서 시작하는 A β 의 N-말단 분절의 5 이상의 인접 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 항체와 접촉시켜야 한다. 그후, 항체가 폴리펩티드에 특이적으로 결합되었는지를 측정하는데, 이러한 특이적 결합은 질환의 치료에 있어서 항체가 활성을 지닌다는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명은 항원 관련 생물학적 부분을 제거하는 데 있어서의 활성을 대한 항체를 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다. 이러한 방법은 배지 중에서 항원 관련 생물학적 부분을 항원 및 식균작용 세포 함유 Fc 수용체와 합하여야 한다. 배지 내에 보유된 항원 관련 생물학적 부분의 양을 모니터링한다. 항원 관련 생물학적 부분의 함량 감소는 항체가 항원 관련 생물학적 부분에 대한 활성을 제거하였다는 것을 의미한다. 항원은 조직 시료로서 또는 분리된 형태로 제공될 수 있다. 예를 들면, 항원은 알츠하이머 질환 환자 또는 알츠하이머 병리를 갖는 포유 동물의 뇌로부터 조직 시료로서 제공될 수 있다. 제거 활성을 대하여 항체를 테스트할 수 있는 기타의 조직 시료는 암 조직 시료, 바이러스 감염된 조직 시료, 염증 세포를 포함하는 조직 시료, 비-약성 비정상 세포 성장, 또는 비정상 세포의 기질을 포함하는 조직 시료 등이 있다.

[0022] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명은 환자의 아밀로이드 침착을 검출하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 A β

의 아미노산 1~10 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여하고, 환자의 뇌에서 항체의 존재를 검출하여야 한다. 이 방법에서, 항체는 A β 의 잔기 4~10 내의 에피토프에 결합한다. 이 방법에서, 항체는 상자성 표지물에 의해 표지되고, 핵자기 공명 단층촬영술에 의해 검출된다.

[0023] 또한, 본 발명은 전술한 방법에 사용하기에 적절한 진단 키트를 제공하고자 한다. 이러한 키트는 A β 의 잔기 1~10를 갖는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 키트는 알츠하이머 질환을 생체내 진단 또는 모니터링하기 위한 항체의 용도를 기재하는 라벨을 포함한다.

발명의 상세한 설명

1. 개론

[0063] 몇몇 아밀로이드증 질환 및 상태는 환자의 뇌에서 불용성 덩어리로 응집된 A β 펩티드의 침착물의 존재를 특징으로 한다. 이러한 질환은 알츠하이머 질환, 다운증후군 및 인식 손상 등이 있다. 인식 손상은 알츠하이머 질환 및 다운증후군의 징후이나, 이 또한 이들 질환의 기타의 특징을 갖지 않을 수도 있다. 예를 들면, 경증 인식 손상 또는 노화 관련 기억 상실은 아직 이러한 증상이 진전되지는 않았거나 또는 알츠하이머 질환이 완전히 전개되지 않을 수도 있는 환자에게서 발생한다. 경증 인식 손상은 협약에 의한 Mini-Mental State Exam에서의 점수로 정의할 수 있다. 이러한 질환은 콩고 레드 염료를 사용한 염색 및 β -폴리트 사이트 구조를 갖는 A β 의 응집물을 특징으로 한다. 환자에서의 아밀로이드 침착물의 성분에 대한 면역원성 반응을 생성함으로써 알츠하이머 질환 또는 기타의 아밀로이드증 질환을 예방 또는 치치하는 기본적인 접근법은 본 명세서에서 참고로 인용하는 WO99/27944에 기재되어 있다. 본 출원은 이러한 기본적인 접근법의 효과를 재연 및 확인하고자 한다. 그러나, 본 출원은 기본적으로는 개선된 제제 및 방법에 관한 것이다. 이러한 개선은 부분적으로는 면역원성 반응이 지향하여야만 하는 것에 대한 A β 내에 바람직한 에피토프를 국소화시키는 것을 전제로 한다. A β 내에 바람직한 에피토프를 식별하는 것으로 인하여 효능이 증가되고, 부작용이 발생할 가능성이 감소되고 및/또는 제조, 배합 및 투여의 용이성이 큰 제제 및 방법을 얻게 된다.

II. 치료제

[0065] 면역원성 반응은 면역원을 투여시 환자에 있어서 항체가 A β 와 반응성을 갖는 경우 활성이 될 수 있거나 또는 항체 투여시 그 자체가 환자의 A β 에 결합되는 경우 수동이 될 수 있다.

1. 활성 면역 반응을 유발하는 제제

[0066] 치료제는 A β 펩티드 내에서 특정의 에피토프를 특이적으로 지향하는 면역원성 반응을 유발한다. 바람직한 제제는 그 자체의 A β 펩티드 및 이의 분孑이다. 이러한 A β 펩티드의 바람직한 에피토프에 대한 항체를 유발하거나 또는 교차 반응하는 천연 A β 펩티드의 분孑의 변이체, 유사체 및 모방체를 사용할 수도 있다.

[0067] 또한, β -아밀로이드 펩티드 또는 A4 펩티드(미국 특허 제4,666,829호; Glenner & Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1131(1984)]로 공지되어 있는 A β 는 39~43 아미노산의 펩티드이고, 이는 알츠하이머 질환의 특징적인 플라크의 주요 성분이 된다. A β 는 β 및 γ 분비효소로 칭하는 2개의 효소에 의해 거대 단백질 APP의 처리에 의해 생성된다[문헌: Hardy, *TINS* 20, 154(1997)]. 알츠하이머 질환과 관련된 APP에서의 기지의 변이는 β 또는 γ 분비효소 부위에 인접한 곳에서 발생하거나 또는 A β 내에서 발생한다. 예를 들면 위치 717은 A β 의 처리에서 APP의 γ -분비효소 분孑 부위에 인접하며, 위치 670/671은 β -분비효소 분孑의 부위에 인접한다. 변이는 생성된 A β 의 42/43 아미노산 형태의 양을 증가시키도록 A β 를 형성함으로써 분孑 반응과 상호작용하여 AD가 유발되는 것으로 알려졌다.

[0068] A β 는 전통적인 그리고 대체의 보충 다단계 모두를 정착 및 활성화시킬 수 있는 특유의 특성을 갖는다. 특히, 이는 C1q 및 최종적으로는 C3bi에 결합된다. 이러한 관련성은 B 세포의 활성화를 일으키는 대식세포로의 결합을 촉진시킨다. 또한, C3bi는 추가로 분해되며, 이들 세포의 활성화에서 10,000 증가를 유발하는 T 세포 의존성 방식에서 B 세포상에서 CR2에 결합된다. 이러한 메카니즘은 A β 가 과량의 기타의 항원의 것에서 면역 반응을 생성하는 것을 야기한다.

[0069] A β 는 수개의 천연 발생 형태를 갖는다. A β 의 사람 형태를 A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 및 A β 43으로 지칭한다. 이러한 펩티드의 서열 및 APP 전구체에 관한 관계는 문헌[Hardy 등, *TINS* 20, 155-158(1997)]의 도 1에 예시되어 있다. 예를 들면, A β 42는 서열 H2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-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-OH(서열 번호 42)을 갖는다.

- [0072] A β 41, A β 40 및 A β 39는 C-말단으로부터 Ala, Ala-Ile 및 Ala-Ile-Val을 각각 제거하여 A β 42와 상이하였다. A β 43은 C-말단에서 트레오닌 잔기의 존재로 인하여 A β 42와 상이하였다.
- [0073] A β 의 면역원성 단편은 여러 이유로 인해서 본 발명의 방법에서의 무손상 분자에 비하여 이롭다. 우선, A β 내의 특정 에피토프가 알츠하이머 질환의 처치에 대한 유용한 면역원성 반응을 유도하기 때문에, 에피토프를 함유하는 단편의 동일 투여량의 매스는 무손상 A β 투여량보다 높은 몰 농도의 유용한 면역원성 에피토프를 제공한다. 두번째로, 특정의 A β 의 면역원성 단편은 A β 가 유도하는 APP 단백질에 대한 중요한 면역원성 반응을 생성하지 않고 아밀로이드 침착물에 대한 면역원성 반응을 생성한다. 세번째로, A β 의 단편은 이의 더 짧은 크기로 인하여 무손상 A β 보다 더 간단히 제조된다. 네번째로, A β 의 단편은 무손상 A β 와 동일한 방법으로 응집되지 않는 데, 이로 인해서 약학 조성물의 제조 및 이의 투여가 간단해진다.
- [0074] A β 의 특정의 면역원성 단편은 천연 웨티드로부터의 적어도 2, 3, 5, 6, 10 또는 20의 인접 아미노산의 서열을 갖는다. 특정의 면역원성 단편은 A β 로부터의 10, 9, 8, 7, 5 또는 3 이하의 인접 잔기를 갖는다. A β 의 N-말단 절반으로부터의 분절이 바람직하다. 면역원성 단편의 예로는 A β 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3 및 1-4가 바람직하다. A β 1-5의 표시는 예를 들면 A β 의 잔기 1-5를 포함하고 A β 의 기타의 잔기는 결실되어 있는 단편을 나타낸다. A β 의 잔기 1-3에서 개시되고, A β 의 잔기 7-11에서 종료되는 단편이 특히 바람직하다. 또한, 단편 A β 1-12를 사용할 수도 있으나, 이는 덜 바람직하다. 몇몇의 방법에서, 단편은 A β 1-10 이외의 N-말단 잔기가 된다. 기타의 덜 바람직한 단편에는 A β 13-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 및 35-42 등이 있다. 이러한 단편은 사용 전에 실시예에 기재된 바와 같이 아밀로이드 침착물을 제거 또는 방지하는 활성에 대하여 스크리닝하여야만 한다. A β 의 천연 발생 형태에 존재하는 1 이상, 5 또는 10 이상의 C-말단 아미노산이 결실된 단편을 특정의 방법에 사용한다. 예를 들면, A β 43의 C-말단 단부로부터의 5개의 아미노산이 결실된 단편은 A β 의 N-말단 단부로부터의 처음 38개의 아미노산을 포함한다. 아밀로이드 플라크의 기타의 성분, 예를 들면 사이누클레인 및 이의 에피토프 단편을 사용하여 면역원성 반응을 유발시킬 수 있다.
- [0075] 특별한 언급이 없는 한, A β 에 대한 기준은 전술한 바와 같은 천연의 사람 아미노산 서열 뿐 아니라, 대립, 종 및 유도된 변이체 등을 비롯한 유사체를 포함한다. 유사체는 통상적으로 주로 보존적 치환에 의해 1, 2 또는 수개의 위치에서 천연 발생 웨티드와는 상이하다. 유사체는 통상적으로 천연 웨티드와 80% 또는 90% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 또한, 특정의 유사체는 비천연 아미노산 또는, 1, 2 또는 수개의 부위에서의 N 또는 C-말단 아미노산의 변형을 포함한다. 예를 들면 A β 의 1, 및/또는 7 위치에서의 천연 아스파르트산 잔기는 이소아스파르트산으로 대체될 수 있다. 비천연 아미노산의 예로는 D-아미노산, α , α -이중치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산, 4-히드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트, ϵ -N,N,N-트리메틸리신, ϵ -N-아세틸리신, 0-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-히드록시리신, ω -N-메틸아르기닌 및 이소아스파르트산 등이 있다. 단편 및 유사체는 전술한 바와 같은 미처리 또는 위약 대조군과 비교하여 형질전환 동물 모델에서의 예방 또는 치료 효능에 대하여 스크리닝할 수 있다.
- [0076] A β , 이의 단편 및 유사체는 고상 웨티드 합성 또는 재조합 발현에 의해 합성될 수 있거나 또는, 천연 공급원으로부터 얻을 수 있다. 자동 웨티드 합성기는, 예컨대 미국 캘리포니아주 포스터 시티에 소재하는 애플라이드 바이오시스템즈와 같은 여러 제조업자로부터 통상적으로 입수 가능하다. 재조합 발현은 박테리아, 예컨대 이. 콜리, 효모, 곤충세포 또는 포유동물 세포중에서 발생할 수도 있다. 재조합 발현에 대한 절차는 문헌[Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(C.S.H.P. 프레스, 뉴욕 2판, 1989)]에 기재되어 있다. 또한, A β 웨티드의 특정의 형태는 예를 들면 미국 캘리포니아주 씨니베일에 소재하는 어메리칸 웨티즈 컴퍼니, 인코포레이티드 및 미국 캘리포니아주 나파에 소재하는 캘리포니아 웨티드 리서치, 인코포레이티드로부터 통상적으로 입수 가능하다.
- [0077] 또한, 치료제는 장쇄 폴리웨티드, 예컨대 기타의 아미노산과 함께 A β 웨티드의 활성 단편 등을 들 수 있다. 예를 들면, 이러한 제제는 이종 아미노산 서열에 대한 헬퍼 T-세포 반응을 유발하고, 그리하여 A β 단편에 대한 B-세포 반응을 유발하는 이종 아미노산 서열에 융합된 A β 의 단편을 포함하는 융합 단백질이 바람직하다. 이러한 폴리웨티드는 후술하는 바와 같이 미처리 또는 위약 대조군과 비교하여 동물 모델에서의 예방 또는 치료 효능에 대하여 스크리닝할 수 있다. A β 웨티드, 유사체, 활성 단편 또는 기타의 폴리웨티드는 결합 또는 중합체 형태로 또는 분리된 형태로 투여될 수 있다. 또한, 치료제는 단량체 면역원성 제제의 다량체도 포함한다.
- [0078] 추가의 변형예에서, A β 의 단편과 같은 면역원성 웨티드는 면역원성 조성물의 일부로서 바이러스 또는 박테리아에 의해 나타날 수도 있다. 면역원성 웨티드를 암호화하는 핵산을 바이러스 또는 박테리아의 에피赘 또는 게놈에 첨가한다. 임의로, 웨티드가 나타나도록 박테리아의 경막 단백질 또는 바이러스의 외표면 단백질과의 융합

단백질로서 또는 분비된 단백질로서 발현되도록 핵산을 첨가한다. 이러한 방법에 사용되는 바이러스 또는 박테리아는 비병원성이거나 또는 약화되어야 한다. 바이러스로는 아데노바이러스, HSV, 베네주엘란 마뇌염 바이러스 및 기타의 알파 바이러스, 수포성 구내염 및 기타의 랍도스 바이러스, 종두증 및 수두 등이 적절하다. 박테리아로는 살모넬라 및 시겔라 등이 적절하다. HBV의 HBsAg로의 면역원성 펩티드의 융합이 특이 적절하다. 또한, 치료제로는 A β 와의 아미노산 서열 유사성이 반드시 크지는 않으나, 그럼에도 불구하고 A β 의 모방체로서 작용하며 유사한 면역 반응을 유발하는 펩티드 및 기타의 화합물 등을 포함한다. 예를 들면, β -플리트 사이트를 형성하는 임의의 펩티드 및 단백질을 적합성에 대하여 스크리닝할 수 있다. A β 에 대한 모노클로널 항체에 대한 항개별특이형 항체 또는 기타의 아밀로이드증 펩티드를 사용할 수 있다. 이러한 항-Id 항체는 항원을 모방하며, 이에 대한 면역 반응을 생성한다[문헌: *Essential Immunology*, Roit 편저, 블랙웰 사이언티픽 퍼블리케이션즈, 팔로 알토, 6판), p. 181]. A β 펩티드 이외의 제제는 전술한 A β 의 바람직한 분절(예, 1-10, 1-7, 1-3 및 3-7) 1 이상에 대한 면역원성 반응을 유발하여야 한다. 이러한 제제는 A β 의 기타의 단편에 대해 지향하지 않고 이들 분절 중 하나에 특이적으로 지향된 면역원성 반응을 유발하는 것이 바람직하다.

[0079] 또한, 펩티드 또는 기타의 화합물의 램덤 라이브러리를 적합성에 대하여 모니터할 수 있다. 조합 라이브러리는 단계별 유형으로 합성될 수 있는 각종 유형의 화합물에 대하여 생성될 수 있다. 이러한 화합물로는 폴리펩티드, 베타-턴 모방체, 다당류, 인지질, 호르몬, 프로스타글란딘, 스테로이드, 방향족 화합물, 복소환 화합물, 벤조디아제핀, 소중합체 N-치환된 글리신 및 올리고카르바메이트 등이 있다. 화합물의 거대 조합 라이브러리는 본 명세서에서 참고로 인용하는 Affymax의 W095/12608, Affymax의 W093/06121, 컬럼비아 유니버시티의 W094/08051, 파마코피아이아의 W095/35503 및 Scripps의 W095/30642호에 기재된 암호화된 합성 라이브러리(ESL)에 의해 구성될 수 있다. 또한, 펩티드 라이브러리는 파지 디스플레이법에 의해 생성될 수도 있다. 예를 들면 Devlin의 W091/18980을 참조한다.

[0080] 조합 라이브러리 및 기타의 화합물은 A β 또는 기타의 아밀로이드증 펩티드에 대해 특이성을 갖는 것으로 알려진 항체 또는 럼프세포(B 또는 T)에 결합되는 능력을 측정함으로써 적합성에 대해 초기에 스크리닝하였다. 예를 들면, 초기 스크리닝은 A β 에 대한 임의의 폴리클로널 혈청 또는 모노클로널 항체 또는 이의 단편을 사용하여 수행될 수 있다. 그후, 화합물을 A β 내의 특정 에피토프(예, 1-10, 1-7, 1-3, 1-4, 1-5 및 3-7)로의 결합에 대하여 스크리닝할 수 있다. 화합물은 항체 에피토프 특이성에 대한 지도 작성에 대해 기재된 것과 동일한 절차로 테스트할 수 있다. 이러한 스크리닝에 의해 식별된 화합물을 A β 또는 이의 단편에 대한 항체 또는 반응성 럼프세포를 유발하는 능력에 대하여 추가로 분석하였다. 예를 들면, 혈청의 다수 희석물을 A β 또는 이의 단편으로 코팅된 미량역가 평판상에서 테스트할 수 있거나, 또는 A β 또는 단편에 대한 반응성 항체에 대하여 표준의 ELISA를 수행할 수 있다. 그후, 화합물을 실시예에서 후술하는 바와 같은 아밀로이드증 질환에 대해 조치된 형질전환 동물에서의 예방 및 치료 효능에 대하여 테스트할 수 있다. 이러한 동물의 예로는 참고 문헌[Games 등, 상동]에 기재된 바와 같은 APP의 717 변이를 갖는 마우스 및, 문헌[McConlogue 등, 미국 특허 제5,612,486호 및 Hsiao 등, *Science* 274, 99(1996); Staufenbiel 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292(1997); Sturchler-Pierrat 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292(1997); Borchelt 등, *Neuron* 19, 939-945(1997)]에 기재된 바와 같은 APP의 670/671 스웨덴 변이를 갖는 마우스 등이 있다. 동일한 스트리닝 접근법은 전술한 바와 같은 A β 의 기타의 잠재적 제제 유사체 및 A β 의 단편을 포함하는 더 긴 펩티드 등에 사용할 수 있다.

2. 수동 면역 반응을 유발하는 제제

[0081] 또한, 본 발명의 치료제는 A β 및 아밀로이드 플라크의 기타 성분에 특이적으로 결합되는 항체를 포함한다. 이러한 항체는 모노클로널 또는 폴리클로널이 될 수 있다. 이러한 특정의 항체는 분리형에 결합하지 않으면서 A β 의 합체형에 특이적으로 결합한다. 몇몇은 합체형에 결합하지 않고, 분리형에 특이적으로 결합한다. 몇몇은 합체형 및 분리형 모두에 결합된다. 이러한 특정의 항체는 A β 의 천연 발생 장쇄형(즉, A β 42 및 A β 43)에 결합하지 않고, A β 의 천연 단쇄형(즉, A β 39, 40 또는 41)에 결합한다. 이러한 항체는 단쇄형에 결합하지 않고, 장쇄형에 결합된다. 몇몇의 항체는 전장 아밀로이드 전구체 단백질에 결합하지 않고, A β 에 결합된다. 통상적으로 치료법에 사용되는 항체는 무손상 불변 부위를 갖거나 또는 적어도 Fc 수용체와 반응하기에 적어도 충분한 불변 범위를 갖는다. 사람 이소타입 IgG1은 식균작용 세포상에 FcRI 수용체에 대한 사람 이소타입의 친화도가 가장 높기 때문에 바람직하다. 또한, 이중특이성 Fab 분절을 사용할 수도 있는데, 항체의 하나의 아암은 A β 에 대하여 특이성을 갖고, 다른 아암은 Fc 수용체에 대하여 특이성을 갖는다. 몇몇의 항체는 약 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 또는 10^{10} M⁻¹ 이상의 결합 친화도로 A β 에 결합한다.

[0083]

폴리클로널 혈청은 통상적으로 $\text{A}\beta$ 의 길이를 따라 수개의 에피토프에 결합하는 항체의 혼합 모집단을 포함한다. 그러나, 폴리클로널 혈청은 $\text{A}\beta 1\text{-}10$ 과 같은 $\text{A}\beta$ 의 특정 단편에 특이성을 지닐 수 있다. 모노클로널 항체는 입체 형태적 또는 비입체형태적 에피토프가 될 수 있는 $\text{A}\beta$ 내에서 특이성 에피토프에 결합된다. 항체의 예방 및 치료 효능은 실시예에서 후술되는 형질전환 동물 모델 절차를 사용하여 테스트할 수 있다. 바람직한 모노클로널 항체는 $\text{A}\beta$ 의 잔기 1-10 내에서 에피토프에 결합된다(천연 $\text{A}\beta$ 의 제1의 N-말단 잔기를 1로 지칭함). 몇몇의 바람직한 모노클로널 항체는 아미노산 1-5 내에서의 에피토프에 결합되며, 몇몇은 아미노산 5-10 내의 에피토프에 결합된다. 몇몇의 바람직한 항체는 아미노산 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 또는 3-7 내의 에피토프에 결합된다. 몇몇의 바람직한 항체는 $\text{A}\beta$ 의 잔기 1-3에서 개시되고, $\text{A}\beta$ 의 잔기 7-11에서 종료되는 에피토프에 결합된다. 항체는 $\text{A}\beta$ 의 10-15, 15-20, 25-30, 10-20, 20, 30 또는 10-25를 갖는 에피토프에 결합되는 것이 덜 바람직하다. 항체는 사용 전에 실시예에 기재된 마우스 모델에서 활성에 대하여 스크리닝할 것을 권장한다. 예를 들면, 특정의 항체는 잔기 10-18, 16-24, 18-21 및 33-42 내에서의 에피토프에 특정한 항체가 활성이 결여되어 있는 것으로 밝혀졌다. 특정의 방법에서, 각종의 에피토프에 대해 특이적으로 결합되는 다수의 모노클로널 항체를 사용한다. 이러한 항체는 순차적으로 또는 동시에 투여할 수 있다. $\text{A}\beta$ 이외의 아밀로이드 성분에 대한 항체를 사용할 수도 있다. 예를 들면, 항체는 아밀로이드 관련 단백질 시뉴클린을 저항할 수도 있다.

[0084]

항체는 예를 들면 $\text{A}\beta 1\text{-}5$ 와 같은 특정의 잔기 내의 에피토프에 결합되는 것으로 할 경우, 이는 항체가 특정의 잔기를 포함하는 폴리펩티드(즉, 예로서 여기에서는 $\text{A}\beta 1\text{-}5$)에 특이적으로 결합된다는 것을 의미한다. 이러한 항체는 $\text{A}\beta 1\text{-}5$ 에서 모든 잔기와 반드시 접촉하는 것은 아니다. $\text{A}\beta 1\text{-}5$ 에서의 모든 단일의 아미노산 치환 또는 결실이 결합 친화도에 상당한 영향을 반드시 미치는 것도 아니다. 항체의 에피토프 특이성은, 각종의 성분이 예를 들면 $\text{A}\beta$ 의 각종 하부서열을 디스플레이하는 파지 디스플레이 라이브러리를 형성함으로써 측정될 수도 있다. 파지 디스플레이 라이브러리는 테스트시에 항체에 특이적으로 결합되는 성분에 대해 선택된다. 서열군을 분리한다. 통상적으로 이러한 군은 통상의 코어 서열을 함유할 수 있으며, 각종 성분에서의 측부 서열의 길이가 변화된다. 항체에 특이적으로 결합되는 최단 코어 서열은 항체에 의해 결합되는 에피토프로 정의된다. 또한, 항체는 에피토프 특이성을 이미 설정한 항체와의 경쟁적 분석에서의 에피토프 특이성에 대하여 테스트할 수도 있다. 예를 들면, $\text{A}\beta$ 에 결합하기 위한 3D6 항체와 경쟁하는 항체는 3D6, 즉 잔기 $\text{A}\beta 1\text{-}5$ 와 같이 동일하거나 또는 유사한 에피토프에 결합된다. 마찬가지로, 10D5 항체와 경쟁하는 항체는 잔기 $\text{A}\beta 3\text{-}6$ 내에서 동일하거나 또는 유사한 에피토프에 결합된다. 에피토프 특이성에 대한 항체 스크리닝은 치료 효능의 유용한 표시가 된다. 예를 들면, $\text{A}\beta$ 의 잔기 1-7 내의 에피토프에 결합되는 것을 측정하는 항체는 알츠하이머 질환의 예방 및 치료에 있어서 유효할 것 같다.

[0085]

$\text{A}\beta$ 의 기타의 부위에 결합하지 않은채 $\text{A}\beta$ 의 바람직한 단편에 특이적으로 결합하는 모노클로널 또는 폴리클로널 항체는 기타 부위에 결합하는 모노클로널 항체 또는 무손상 $\text{A}\beta$ 에 결합하는 폴리클로널 혈청에 비하여 다수의 잇점을 갖는다. 우선, 동일한 매스 투여량에 대하여, 바람직한 단편에 특이적으로 결합하는 항체의 투여량은 아밀로이드 플라크를 제거하는 데 유효한 항체의 높은 몰 투여량을 함유한다. 두번째로, 바람직한 단편에 특이적으로 결합하는 항체는 무손상 APP 폴리펩티드에 대한 제거 반응을 유발하지 않으면서 아밀로이드 침착에 대한 제거 반응을 유발함으로써 부작용에 대한 가능성을 감소시킬 수 있다.

[0086]

i. 면역글로불린의 일반적인 특징

[0087]

기본적인 항체 구조 단위는 서브유닛의 사랑체를 포함하는 것으로 알려졌다. 각각의 사랑체는 각 쌍이 하나의 "경"쇄(약 25 kDa) 및 하나의 "중"쇄(약 50~70 kDa)를 갖는 폴리펩티드쇄의 2개의 동일한 쌍으로 이루어진다. 각 쌍의 아미노 말단 부위는 항원 인식에 대해 주로 관련되는 약 100~110 이상의 아미노산의 가변 부위를 포함한다. 각 쌍의 카르복시 말단 부분은 효과기 작용에 주로 관여하는 불변 부위를 정의한다.

[0088]

경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 엘타 또는 업실론으로서 분류되며, 항체의 이소타입은 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로서 정의된다. 경쇄 및 중쇄에서, 가변 및 불변 부위는 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 부위에 의해 연결되며, 중쇄는 또한 약 10 이상의 아미노산의 "D" 부위를 포함한다. 문헌 [Fundamental Immunology, Paul W. 편저, 래번 프레스 뉴욕, 1989, Ch. 7(이는 본 명세서에서 참고로 인용함)].

[0089]

각각의 경/중 쌍의 가변 부위는 항체 결합 부위를 형성한다. 그리하여, 무손상 항체는 2개의 결합 부위를 갖는다. 이중작용성 또는 이중특이성 항체는 제외하고, 2개의 결합 부위는 동일하다. 쌍은 상보성 결정 부위 또는 CDR로 칭하는 3개의 과가변 부위에 의해 연결되는 상대적 보존 골격 부위(FR)의 동일한 일반 구조를 나타낸다. 각 쌍의 2개의 쌍로부터의 CDRs은 골격 부위에 의해 정렬되며, 이는 특이성 에피토프에 결합 가능하다. N-말단으로부터 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄 모두는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각

도메인으로의 아미노산의 배열은 문헌[Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*(National Institutes of Health Bethesda, MD, 1987 및 1991, 또는 Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987); Chothia 등, *Nature* 342:878-883(1989)]의 정의에 의한다.

[0090] ii. 비-사람 항체의 생성

쥐, 기니 피그, 영장류, 토끼 또는 래트와 같은 비-사람 모노클로널 항체의 생성은 예를 들면 동물을 A β 로 면역화시킴으로써 수행될 수 있다. A β 를 포함하는 더 긴 폴리펩티드 또는 A β 의 면역원성 단편 또는 A β 에 대한 항체에 대한 항개별특이형 항체를 사용할 수도 있다. 문헌[Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*(CSHP NY, 1988)](본 명세서에서 참고로 인용함). 이러한 면역원은 웨პ티드 합성에 의해 또는 재조합 발현에 의해 천연 공급원으로부터 얻을 수 있다. 임의로 면역원은 투여되어 후술하는 바와 같이 융합되거나 또는 담체 단백질과 결합할 수 있다. 임의로, 면역원은 보조제와 함께 투여될 수 있다. 수종의 보조제를 후술하는 바와 같이 사용할 수 있다. 완전 프로인트 보조제에 이어서 불완전 보조제를 사용하는 것이 실험실 동물의 면역화에 바람직하다. 토끼 또는 기니 피그가 폴리클로널 항체를 생성하는 데 사용된다. 마우스는 통상적으로 모노클로널 항체를 생성하는 데 사용된다. 항체는 A β 에 대한 특이성 결합에 대해 스크리닝한다. 임의로 항체는 A β 의 특이성 부위에 대한 결합에 대해 스크리닝한다. 이 스크리닝은 A β 웨პ티드의 결실 돌연변이의 수집에 대한 항체의 결합을 측정하고, 결실 돌연변이가 항체에 결합하는지를 결정함으로써 이루어질 수 있다. 결합은 예를 들면 웨스턴 블로트 또는 ELISA에 의해 평가될 수 있다. 항체에 대한 특이적 결합을 나타내는 최소의 단편은 항체의 에피토프를 형성한다. 또는, 에피토프 특이성은 테스트 및 기준 항체가 A β 에 대한 결합에 대해 경쟁하는 것인 경쟁 분석에 의해 결정될 수 있다. 테스트 및 기준 항체가 완료될 경우, 이들은 한 항체의 결합이 다른 항체의 결합을 방해하는 충분히 근접하는 동일한 에피토프(들)에 결합한다. 이러한 항체에 대한 바람직한 이소타입은 기타의 종에서의 마우스 이소타입 IgG2a 또는 균등 이소타입이 된다. 마우스 이소타입 IgG2a는 사람 이소타입 IgG1의 균등물이다.

[0092] iii. 키메라 및 사람화된 항체

키메라 및 사람화된 항체는 키메라 또는 사람화된 항체의 구성에 대한 출발 물질을 제공하는 마우스 또는 기타의 비-사람 항체로서 동일하거나 또는 유사한 결합 특이성 및 친화성을 갖는다. 키메라 항체는 경쇄 및 중쇄가, 통상적으로 상이한 종에 속하는 면역글로불린 유전자 분절로부터 유전공학 기법으로 처리하여 구성하였다. 예를 들면, 마우스 모노클로널 항체로부터 유전자의 가변(V) 분절은 IgG1 및 IgG4와 같은 사람 불변(C) 분절에 결합될 수 있다. 사람 이소타입 IgG1이 바람직하다. 통상의 키메라 항체는 마우스 항체로부터의 V 또는 항원 결합 도메인 또는 사람 항체로부터의 C 또는 효과기 도메인으로 이루어진 혼성 단백질이 된다.

사람화 항체는 실질적으로 사람 항체로부터의 가변 부위 골격 잔기(이를 수용체 항체로 칭함) 및, 실질적으로 마우스 항체로부터의 부위를 결정하는 상보성(이를 공여체 면역글로불린으로 칭함)을 갖는다. 문헌[Queen 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033(1989) 및 WO90/07861, 미국 특허 제5,693,762호, 동제5,693,761호, 동제5,585,089호, 동제5,530,101호 및 Winter의 미국 특허 제5,225,539호(모두 본 명세서에서 참고로 인용함)]. 불변 부위(들)가 존재할 경우, 이는 또한 실질적으로 또는 거의 사람 면역글로불린으로부터 유래한다. 사람 가변 도메인은 일반적으로 CDRs가 유도되는 쥐 가변 부위 도메인과 서열 동일성이 높은 것으로 나타난다. 중쇄 및 경쇄 가변 부위 골격 잔기는 동일하거나 또는 상이한 사람 항체 서열로부터 유도될 수 있다. 사람 항체 서열은 천연의 사람 항체의 서열이 될 수 있거나 또는 수개의 사람 항체의 일치 서열이 될 수 있다. 문헌[Carter 등, WO92/22653]. 사람 가변 부위 골격 잔기로부터의 특정의 아미노산은 CDR 입체형태상에서의 가능한 영향 및/또는 항원에 대한 결합을 기준으로 하여 치환에 대해 선택한다. 이러한 가능한 효과에 대한 조사는 특정 위치에서의 아미노산의 특정의 조사 또는, 특정 아미노산의 치환 또는 돌연변이의 효과의 실험적 관찰을 모델링함으로써 이루어진다.

예를 들면, 아미노산이 쥐 가변 부위 골격 잔기와, 선택된 사람의 가변 부위 골격 잔기 사이에서 상이할 경우, 아미노산이

[0096] (1) 직접 항원에 비공유 결합을 형성하며,

[0097] (2) CDR 부위에 이웃하고,

[0098] (3) CDR 부위와 상호작용하거나(즉, CDR 부위의 약 6 A 이내이고) 또는,

[0099] (4) VL-VH 계면에서 참여하는 경우, 마우스 항체로부터 균등 골격 아미노산에 의해 치환되어야만 한다.

[0100] 치환에 대한 기타의 것에는 그 위치에서 사람 면역글로불린에 대하여 비정상적인 수용체 사람 골격 아미노산이 있다. 이러한 아미노산은 마우스 공여체 항체의 균등 위치로부터 또는, 보다 통상적인 사람 면역글로불린의 균등 위치로부터 아미노산으로 치환될 수 있다. 치환에 대한 기타의 예로는 그 위치에서 사람 면역글로불린에 대해 비정상적인 수용체 사람 골격 아미노산 등이 있다. 사람화된 면역글로불린 가변 부위 골격은 통상적으로 사람 가변 부위 골격 서열 또는 이러한 서열의 일치에 대해 서열 동일성 85% 이상을 나타낸다.

[0101] iv. 사람 항체

[0102] A β 에 대한 사람 항체는 후술하는 각종의 기법에 의해 제공된다. 몇몇의 사람 항체는 경쟁적 결합 실험에 의해 선택되거나 또는, 실시예 XI에 기재된 마우스 모노클로널 중 하나와 같이 특정의 마우스 항체와 동일한 에피토프 특이성을 갖도록 선택된다. 사람 항체는 또한 면역원으로서 A β 의 분절만을 사용하거나 및/또는, A β 의 결실 돌연변이의 수집에 대한 항체를 스크리닝함으로써 특정의 에피토프 특이성에 대해 스크리닝할 수 있다. 사람 항체는 이소타입 특이성 사람 IgG1을 갖는 것이 바람직하다.

[0103] (1) 트리오마(trioma) 방법론

[0104] 이 접근법에 사용하기 위한 기본적인 접근법 및 예시적인 세포 융합 파트너 SPAZ-4는 문헌[Oestberg 등, *Hybridoma* 2:361-367(1983); Oestberg, 미국 특허 제4,634,664호 및 Engleman 등, 미국 특허 제4,634,666호; 모두 본 명세서에 참고로 인용함]에 기재되어 있다. 이러한 방법에 의해 얻은 항체 생성 세포주를 트리오마로 지칭하는데, 이는 3개의 세포, 즉 2개의 사람 및 1개의 마우스로부터 유래한 것이기 때문이다. 초기에, 마우스 골수종주는 문헌[Oestberg, 상동]에 기재된 SPAZ-4 세포주와 같은 비-항체 생성 xenogeneic 혼성 세포를 얻기 위해 사람 B-림프세포와 융합된다. 트리오마는 사람 세포로 생성된 통상의 하이브리도마보다 더 안정한 항체를 생성하는 것으로 밝혀졌다.

[0105] 면역화된 B-림프세포는 사람 공여체의 혈액, 비장, 림프절 또는 골수로부터 얻는다. 특이성 항원 또는 에피토프에 대한 항체를 원할 경우, 면역화를 위해 항원 또는 이의 에피토프를 사용하는 것이 바람직하다. 면역화는 생체내 또는 시험관내에서 수행할 수 있다. 생체내 면역화의 경우, B 세포는 통상적으로 A β , 이의 단편, 또는 A β 또는 단편을 함유하는 커다란 폴리펩티드 또는, A β 에 대한 항체에 대한 항개별특이형 항체로 면역화된 사람으로부터 분리한다. 몇몇의 방법에서, B 세포는 최종적으로 항체 치료를 투여하고자 하는 동일한 환자로부터 분리한다. 시험관내 면역화의 경우, B-림프세포는 통상적으로 10% 사람 혈장이 보충된 RPMI-1640(문헌: Engleman, 상동)와 같은 배지 내에서 7~14 일간 항원에 노출시킨다.

[0106] 면역화된 B-림프세포는, 주지의 방법에 의해 SPAZ-4와 같은 xenogeneic 혼성 세포에 융합된다. 예를 들면, 이들 세포는 분자량 1000~4000, 약 37°C, 약 5~10 분간 40~50%의 폴리에틸렌 글리콜로 처리한다. 세포를 융합 혼합물로부터 분리하고, 소정의 하이브리드(예, HAT 또는 AH)에 대해 선택성을 갖는 배지 내에서 증식시킨다. 필수 결합 특이성을 갖는 클론 분비 항체는 A β 또는 이의 단편에 결합하는 능력에 대한 트리오마 배양 배지를 분석함으로써 식별된다. 소정의 특이성을 갖는 트리오마 생성 사람 항체는 제한 회색 기법에 의해 서브클로닝시키고, 배양 배지 내에서 시험관내에서 성장시킨다. 얻은 트리오마 세포주를 A β 또는 이의 단편을 결합시키는 능력에 대하여 테스트한다.

[0107] 트리오마가 유전적으로 안정하기는 하나, 이는 고농도에서는 항체를 생성하지 않는다. 발현도는, 트리오마로부터의 항체 유전자를 1 이상의 발현 벡터로 클로닝시키고, 벡터를 표준 포유동물, 박테리아 또는 효모 세포주로 변형시킴으로써 증가될 수도 있다.

[0108] (2) 형질전환 비-사람 포유동물

[0109] 또한, A β 에 대한 사람 항체는 사람 면역글로불린 위치의 적어도 하나의 분절을 암호화하는 돌연변이를 갖는 비-사람 형질전환 포유동물로부터 생성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 형질전환 포유동물의 내인성 면역글로불린 위치는 작용이 불활성된다. 사람 면역글로불린 위치의 분절은 중쇄 및 경쇄 성분의 비정렬 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 내인성 면역글로불린 유전자의 불활성화 및 외인성 면역글로불린 유전자의 도입은 표적화된 상동성 재조합에 의해 또는 YAC 염색체 도입에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 방법으로부터 생성된 형질전환 포유동물은 면역글로불린 성분 서열을 작용적으로 정렬시킬 수 있으며, 내인성 면역글로불린 유전자를 발현시키지 않으면서 사람 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 각종 이소타입 항체의 반복부를 발현시킬 수 있다. 이러한 특징을 갖는 포유동물의 생성 및 특성은 참고 문헌[Lonberg 등, WO93/12227(1993), 미국 특허 제5,877,397호, 동제5,874,299호, 동제5,814,318호, 동제5,789,650호, 동제5,770,429호, 동제5,661,016호, 동제5,633,425호, 동제5,625,126호, 동제5,569,825호, 동제5,545,806호, *Nature* 148, 1547-1553(1994), *Nature Biotechnology*

14, 826(1996), Kucherlapati, WO91/10741(1991)(모두 본 명세서에서 참고로 인용함)]에 상세히 기재되어 있다. 형질전환 마우스가 특히 적절하다. 항-A β 항체는 문헌[kucherlapati, 상동]에 기재된 바와 같이 형질전환 비-사람 포유동물을 A β 또는 이의 단편으로 면역화함으로써 얻는다. 모노클로널 항체는, 예컨대 B-세포를, 통상의 Kohler-Milstein 기법을 사용하여 포유동물로부터 적절한 골수종 세포주로 융합시킴으로써 생성된다. 또한, 사람 폴리클로널 항체는 면역화제로 면역화된 사람으로부터의 혈청의 형태로 제공될 수 있다. 임의로, 이러한 폴리클로널 항체는 친화성 제제로서 A β 또는 기타의 아밀로이드 웹티드를 사용하여 친화도 정제에 의해 농축될 수 있다.

[0110] (3) 파지 디스플레이 방법

사람 항-A β 항체를 얻기 위한 추가의 방법은 문헌[Huse 등, *Science* 246: 1275-1281(1989)]에 개략된 일반적인 프로토콜에 의해 사람 B 세포로부터 DNA 라이브러리를 스크리닝하고자 한다. 트리오마 기법에서 상술된 바와 같이, 이러한 B 세포는 A β , 단편, A β 또는 단편을 포함하는 더 긴 폴리펩티드 또는 항개별특이형 항체로 면역화된 사람으로부터 얻을 수 있다. 임의로 이러한 B 세포는 최종적으로 항체 처리를 수용하고자 하는 환자로부터 얻는다. A β 또는 이의 단편에 결합된 항체를 선택한다. 이러한 항체를 암호화하는 서열(또는 결합 단편)을 클로닝하고 증폭시킨다. Huse의 문헌에 기재된 프로토콜은 파지 디스플레이 기법과 조합하면 더욱 효과적이다. 문헌 [Dower 등, WO91/17271 및 McCafferty 등등/01047, 미국 특허 제5,877,218호, 동제5,871,907호, 동제5,858,657호, 동제5,837,242호, 동제5,733,743호 및 동제5,565,332호(모두 본 명세서에서 참고로 인용함)]. 이러한 방법에서, 성분이 이의 외부면에서 각종 항체를 디스플레이하는 파지 라이브러리를 생성한다. 항체는 일반적으로 Fv 또는 Fab 단편으로서 디스플레이된다. 소정의 특이성을 갖는 파지 디스플레이 항체는 A β 웹티드 또는 이의 단편에 대한 친화도 농축에 의해 선택된다.

파지 디스플레이 방법의 변형예에서, 선택된 쥐 항체의 결합 특이성을 갖는 사람 항체가 생성될 수 있다. 문헌 [Winter, WO92/20791]. 이러한 방법에서, 선택된 쥐 항체의 경쇄 또는 중쇄 가변 부위는 출발 물질로서 사용된다. 예를 들면, 경쇄 가변 부위를 출발 물질로서 사용할 경우, 성분이 동일한 경쇄 가변 부위(즉, 쥐의 출발 물질) 및 각종 중쇄 가변 부위를 디스플레이하는 파지 라이브러리를 구성한다. 중쇄 가변 부위는 정렬된 사람 중쇄 가변 부위의 라이브러리로부터 얻는다. A β 에 대한 강한 특이성 결합성을 나타내는(즉, 10^8 M^{-1} 이상, 바람직 하게는 10^9 M^{-1} 이상) 파지를 선택한다. 이러한 파지로부터의 사람 중쇄 가변 부위는 추가의 파지 라이브러리를 구성하기 위한 출발 물질로서 작용한다. 이러한 라이브러리에서, 각각의 파지는 동일한 중쇄 가변 부위(즉, 제1 디스플레이 라이브러리로부터 식별되는 부위) 및 상이한 경쇄 가변 부위를 디스플레이한다. 경쇄 가변 부위는 정렬된 사람 가변 경쇄 부위의 라이브러리로부터 얻는다. 다시, A β 에 대한 강한 특이성 결합을 나타내는 파지를 선택한다. 이러한 파지는 완전히 사람 항-A β 항체의 가변 부위를 디스플레이한다. 이러한 항체는 일반적으로 쥐 출발 물질과 동일하거나 또는 유사한 에피토프 특이성을 갖는다.

v. 불변 부위의 선택

키메라, 사람화 또는 사람 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 부위는 사람 불변 부위의 적어도 일부에 결합될 수 있다. 불변 부위의 선택은 부분적으로는 항체 의존성 보체 및/또는 세포 매개된 독성을 원하는지에 따라 결정된다. 예를 들면 이소타입 IgG1 및 IgG3는 상보성 활성을 지니나, 이소타입 IgG2 및 IgG4는 이러한 활성을 갖지 않는다. 이소타입의 선택은 또한 항체가 뇌로 통과되는 것에 영향을 미친다. 사람 이소타입 IgG1이 바람직하다. 경쇄 불변 부위는 람다 또는 카파가 될 수 있다. 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하는 사량체로서, 별도의 중쇄, 경쇄로서, Fab, Fab' F(ab')2 및 Fv로서, 중쇄와 경쇄 가변 도메인이 스페이서를 통해 결합되는 단일쇄 항체로서 발현될 수 있다.

vi. 재조합 항체의 발현

키메라, 사람화 및 사람 항체는 재조합 발현에 의해 통상적으로 생성된다. 재조합 폴리뉴클레오티드 구성물은 통상적으로 천연 결합 또는 이종형 프로모터 부위를 비롯하여 항체 연쇄의 암호 서열에 작용 가능하게 결합된 발현 제어 서열을 포함한다. 발현 제어 서열은 진핵 숙주 세포를 형질변형시키거나 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 내에서의 진핵 프로모터 시스템이 되는 것이 바람직하다. 일단 벡터가 적절한 숙주로 혼입되는 경우, 숙주는 뉴클레오티드 서열의 높은 발현, 교차 반응되는 항체의 수집 및 정제에 적절한 조건하에서 유지된다.

[0117] 이들 발현 벡터는 통상적으로 에피ぞ으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 내재부로서 숙주 유기체에서 복제가능하다. 일반적으로, 발현 벡터는 선별 마커, 예컨대 앰피실린 내성 또는 히그로마이신 내성을 포함하여 소정의 DNA 서

열로 형질전환된 이들 세포를 검출할 수 있다.

[0118] E.콜리는 본 발명의 DNA 서열을 클로닝하는 데 특히 유용한 하나의 원핵세포 숙주이다. 효모 등의 미생물도 발현에 유용하다. 사카로마이세스는 바람직한 효모 숙주로서, 적절한 벡터는 필요에 따라 발현 제어 서열, 복제기점, 종결 서열 등을 포함한다. 통상적인 프로모터로는 3-포스포글리세레이트 키나아제 및 기타 해당성 효소 등이 있다. 유도성 효모 프로모터로는, 알코올 디히드로게나제, 이소시토크롬 C 및 말토스와 갈락토스 이용에 관여하는 효소 등이 있다.

[0119] 포유류 세포는 면역글로불린을 암호화하는 뉴클레오티드 분절 또는 이의 단편을 발현하는 바람직한 숙주이다. Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987) 참조. 온전한 이종구조의 단백질을 분비할 수 있는 다수의 적절한 숙주 세포주가 해당 분야에서 개발되어 왔으며, 그 예로는 CHO 세포주, 각종 COS 세포주, HeLa 세포, L 세포 및 골수종 세포주 등이 있다. 세포는 인간이 아닌 것이 바람직하다. 이들 세포용 발현 벡터는 발현 제어 서열, 예컨대 복제 기점, 프로모터, 인핸서(Queen 등, Immunol. Rev. 89:49(1986))와, 필요한 처리 정보 부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 발현 제어 서열은 내인성 유전자, 시토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 파필로마바이러스 등으로부터 유도된 프로모터이다. Co 등, J. Immunol. 148:1149(1992) 참조.

[0120] 대안적으로, 항체를 암호화하는 서열을 유전자이식 동물의 게놈에 도입하기 위한 이식유전자(transgene)로 통합시킨 다음 유전자이식 동물의 젖에서 이 서열을 발현시킬 수 있다(예컨대 미국 특허 제5,741,957호, 미국 특허 제5,304,489호 및 미국 특허 제5,849,992호 참조). 적절한 이식유자는, 카제인 또는 베타 갈락토글로불린 등의 유선 특이적 유전자에서 유래한 프로모터 및 인핸서와 작동가능하게 연결한 경쇄 및/또는 중쇄용 암호화 서열을 포함한다.

[0121] 해당 DNA 분절을 함유하는 벡터는, 세포 숙주의 유형에 따라서 공지된 방법으로 숙주 세포 내로 전달할 수 있다. 예를 들어, 염화칼슘 형질감염은 통상 원핵세포에 이용되는 반면, 인산칼슘 처리, 일렉트로포레이션, 리포펙션, 바이오리스틱스(biolistics) 또는 바이러스계 형질감염은 기타 숙주 세포에 사용할 수 있다. 포유류 세포를 형질전환시키는데 사용되는 기타 방법은 폴리브렌, 원형질 융합, 리포좀, 일렉트로포레이션 및 미세주입법(일반적으로, Sambrook 등의 상기 문헌 참조) 등의 사용을 포함한다. 유전자이식 동물의 생성을 위해서, 이식유전자를 수정된 난모세포에 미세주입하거나, 또는 배아 간세포의 게놈 내로 통합시킬 수 있으며, 이러한 세포의 핵은 핵을 제거한 난모세포에 전달된다.

[0122] 일단 발현되면, HPLC 정제, 컬럼 크로마토그래피, 젤 전기영동법 등을 비롯하여 당업계의 표준 절차에 따라 항체를 정제할 수 있다(일반적으로, Scopes, Protein Purification(Springer-Verlag, NY, 1982)).

3. 캐리어 단백질

[0124] 면역 반응을 유도하기 위한 일부 제제는 아밀로이드 침착에 대한 면역 반응을 유도하는 적절한 에피토프를 포함하지만, 너무 작아 면역원성을 나타내지 못한다. 이러한 상황하에서, 웨티드 면역원을 적절한 캐리어에 연결하여 면역 반응의 유도를 보조할 수 있다. 적절한 캐리어로는 혈청 알부민, 키홀 립랫 헤모시아닌, 면역글로불린분자, 티로글로불린, 난알부민, 파상풍 톡소이드 또는 다른 병원성 박테리아(예, 디프테리아, E. 콜리, 콜레라 또는 H.파이로리)로부터 유래한 톡소이드, 또는 감독형 독소 유도체 등이 있다. 기타 캐리어로는 복수개의 MHC 대립유전자, 예컨대 모든 인간 MHC 대립 유전자의 75% 이상에 결합하는 T-세포 에피토프를 포함한다. 이러한 캐리어는 종종 당업계에 "보편적 T-세포 에피토프"로서 알려져 있다. 보편적 T-세포 에피토프의 예는 다음과 같다.

[0125] 인플루엔자 적혈구 응집소: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT (서열 번호 43)

[0126] PADRE(공통 잔기는 굵은 글씨체로): AKXVAAWTLKAAA (서열 번호 44)

[0127] 말라리아 CS: T3 에피토프 EKKIAKMEKASSVFNV (서열 번호 45)

[0128] B형 간염 표면 항원: HBsAg₁₉₋₂₈ FFLTRILTTI (서열 번호 46)

[0129] 열 충격 단백질 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKGNEG (서열 번호 47)

[0130] BCG(bacille Calmette-Guerin): QVHFQPLPPAVVKL (서열 번호 48)

[0131] 과상풍 특소이드: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL (서열 번호 49)

[0132] 과상풍 특소이드: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (서열 번호 50)

[0133] HIV gp120 T1: KQIINMWQEVGKAMYA (서열 번호 51)

[0134] 면역 반응을 자극 또는 증강시키는 다른 캐리어는 IL-1, IL-1 α 및 β 웨티드, IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF 등의 시토킨과 MIP1 α 및 β 와 RANTES 등의 케모탄 등을 포함한다. 면역원성 제제는, O'Mahony 등의 WO 97/17613 호 및 WO97/17614호에 개시된 바와 같이 조직을 통한 수송을 증가시키는 웨티드에 연결할 수 있다.

[0135] 면역원성 제제는 화학적 가교에 의해 캐리어에 연결할 수 있다. 캐리어에 면역원을 연결시키는 기법은 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜-티오)프로파이오네이트(SPDP) 및 숙신이미딜 4-(말레이이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)를 이용한 이황화 결합의 형성을 포함한다(만약 웨티드에 설피히드릴 기가 부족하다면 시스테인 잔기를 첨가하여 이를 제공할 수 있음). 이들 시약은 그 자체와, 하나의 단백질 상의 웨티드 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합 및 리신 상의 ϵ -아미노 또는 기타 아미노산에서의 다른 자유 아미노기를 통한 아미드 결합을 형성한다. 각종 이황화/아미드 형성 시약은 Immun. Rev. 62, 185(1982)에 개시되어 있다. 기타 이작용성 커플링제는 이황화 결합보다는 티오-에테르를 형성한다. 이들 티오-에테르-형성제 중 다수는 시판되고 있으며, 이의 예로는 6-말레이이미도카프로산, 2-브로모아세트산 및 2-요오도아세트산, 4-(N-말레이이미도-메틸)시클로헥산-1-카르복실산의 반응성 에스테르를 포함한다. 카르복실기는, 이들을 숙신이미드 또는 1-히드록실-2-니트로-4-술폰산, 나트륨염과 결합시켜 활성시킬 수 있다.

[0136] 면역원성 웨티드는 캐리어(즉, 이종구조의 웨티드)를 보유한 융합 단백질로서 발현시킬 수 있다. 면역원성 웨티드는 아미노 말단, 카르복시 말단 또는 양 말단에서 캐리어에 결합할 수 있다. 경우에 따라, 면역원성 웨티드의 여러 반복부가 융합 단백질 내에 존재할 수 있다. 경우에 따라, 면역원성 웨티드는, 예컨대 웨티드의 N 및 C의 양 말단에서 이종구조의 웨티드의 여러 카페에 결합시킬 수 있다. 일부 캐리어 웨티드는 캐리어 웨티드에 대한 헬퍼 T-세포 반응을 유도하는 작용을 한다. 유도된 헬퍼 T-세포는 차례로 캐리어 웨티드에 결합된 면역원성 웨티드에 대해 B-세포 반응을 유도한다.

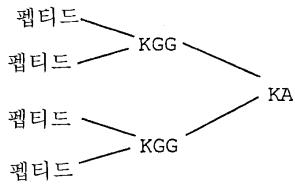
[0137] 본 발명의 일부 제제는 A β 의 N-말단 단편이 캐리어 웨티드에 C-말단에서 연결되는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 제제에서, A β 의 단편의 N-말단 잔기는 융합 단백질의 N-말단 잔기를 구성한다. 따라서, 그러한 융합 단백질은 A β 의 N-말단 잔기를 자유 형태로 요하는 애피토프에 결합하는 항체를 유도하는 데 효과적이다. 본 발명의 일부 제제는 C-말단에서 캐리어 웨티드의 하나 이상의 카페에 연결된 A β 의 N-말단 분절의 다수의 반복부를 포함한다. 그러한 융합 단백질로 통합된 A β 의 N-말단 단편은 종종 A β 1-3에서 개시하여 A β 7-11에서 끝난다. A β 1-7, A β 1-3, 1-4, 1-5 및 3-7은 A β 의 바람직한 N-말단 단편이다. 일부 융합 단백질은 직렬로 A β 의 상이한 N-말단 분절을 포함한다. 예를 들어, 융합 단백질은 A β 1-7, A β 1-3, 이종구조의 웨티드를 차례로 포함할 수 있다.

[0138] 일부 융합 단백질에서, A β 의 N-말단 분절을 N-말단에서 이종구조의 캐리어 웨티드에 융합시킨다. C-말단 융합에서와 마찬가지로 A β 의 동일한 종류의 N-말단 분절을 사용할 수 있다. 일부 융합 단백질은 A β 의 N-말단 분절의 N-말단에 연결된 이종구조의 웨티드를 포함하며, 이는 직렬로 A β 의 하나 이상의 부가 N-말단 분절에 연결되어 있다.

[0139] 본 발명에 사용하기 적절한 융합 단백질의 일부 예는 하기에 제시되어 있다. 이들 융합 단백질 중 일부는 US 5,196,512호, EP 378,881호 및 EP 427,347호에 개시된 바와 같이 과상풍 특소이드 애피토프에 연결된 A β 의 분절을 포함한다. 일부 융합 단백질은 US 5,736,142호에 개시된 바와 같이 캐리어 웨티드에 연결된 A β 의 분절을 포함한다. 일부 이종구조의 웨티드는 보편적 T-세포 애피토프이다. 일부 방법에서, 투여용 제제는 단순히 선형 구조로 이종구조의 분절에 연결된 A β 분절을 갖는 단일 융합 단백질이다. 일부 방법에서, 제제는 수학식 2^x[여기서 x는 1~5의 정수임]로 표시되는 융합 단백질의 다양체이다. x는 1, 2 또는 3인 것이 바람직하고, 2인 것이 가장 바람직하다. x가 2인 경우, 그러한 다양체는 MAP4로서 언급되는 바람직한 구조로 연결된 4개의 융합 단백질을 보유한다(US 5,229,490호 참조). A β 의 애피토프는 밀줄로 표시되어 있다.

[0140] MAP4 구조는 이하 제시되어 있다. 분지 구조는 리신의 측쇄 아민과 N-말단 두 곳에서 웨티드 합성을 개시하여 제조한다. 리신을 서열 내로 통합시켜 분지시킨 횟수에 따라서, 생성 구조는 복수개의 N-말단을 제공한다. 이 예에서, 4개의 동일한 N-말단을 분지된 리신 함유 코어에서 생성하였다. 그러한 다중도는 동족 B 세포의 반응도

를 상당히 증가시킨다.



[0141]

AN90549(MAP4 구조의 A β 1-7/파상풍 톡소이드 830-844):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL (서열 번호 52)

[0144]

AN90550(MAP4 구조의 A β 1-7/파상풍 톡소이드 947-967):

DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (서열 번호 53)

[0146]

AN90542(선형 구조의 A β 1-7/파상풍 톡소이드 830-844 + 947-967)

DAEFRHDQYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (서열 번호 54)

[0148]

AN90576(MAP4 구조의 A β 3-9/파상풍 톡소이드 830-844)

[0149]

EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL (서열 번호 55)

[0150]

미국 특허 제5,736,142호에 개시된 펩티드(모두 선형 구조임)

[0151]

AN90562 (A β 1-7 펩티드): AKVAAWTLKAAA DAEFRHD (서열 번호 56)

[0152]

AN90543 (A β 1-7 x 3 펩티드): DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHDAKXVAAWTLKAAA (서열 번호 57)

[0153]

융합 단백질(A β 의 면역원성 에피토프는 굵은 글씨로 표시되어 있음)의 또 다른 예는 다음과 같다.

[0154]

AKVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (서열 번호 58)

[0155]

DAEFRHD-AKVAAWTLKAAA (서열 번호 59)

[0156]

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (서열 번호 60)

[0157]

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (서열 번호 61)

[0158]

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (서열 번호 62)

[0159]

PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (서열 번호 63)

[0160]

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (서열 번호 64)

[0161]

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (서열 번호 65)

[0162]

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (서열 번호 66)

[0163]

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-**DAEFRHD** (서열 번호 67)

[0164]

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (서열 번호 68)

[0165]

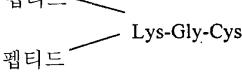
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (서열 번호 69)

[0166]

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-**DAEFRHD** (서열 번호 70)

[0167]

2개의 분자 수지 상에 **DAEFRHD**- QYIKANSKFIGITEL (서열 번호 52)



[0168]

[0169] EQVTNVGGAIQAVHAAHAEINEAGR(서열 번호 71)(MAP-4 구조의 시누클레인 응합 단백질)

[0170] 수동 면역화에 사용하기 위한 A β 에 대한 항체의 형성에 사용되는 면역원을 형성하기 위해서 동일 또는 유사한 캐리어 단백질 및 연결 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 캐리어에 연결된 A β 또는 단편을 A β 에 대한 모노클론 항체 제조시 실험실 동물에 투여할 수 있다.

4. 치료제를 암호화하는 핵산

[0172] 아밀로이드 침착에 대한 면역 반응은 A β 펩티드의 분절 및 이의 단편, 기타 펩티드 면역원, 또는 수동 면역화용으로 사용되는 항체 및 이의 성분을 암호화하는 핵산의 투여로 유도할 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 면역원을 암호화하는 핵산 분절은 통상적으로 환자의 의도하는 표적 세포 중 DNA 분절을 발현시키는 프로모터 및 인핸서 등의 조절 서열에 연결된다. 면역 반응의 유도에 바람직한 혈액 세포에서의 발현의 경우, 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 유전자로부터 유래한 프로모터 및 인핸서 성분 또는 CMV 주요 직초기 프로모터 및 인핸서는 직접 발현에 적절하다. 연결된 조절 성분 및 암호화 서열은 종종 벡터 내로 클로닝된다. 이본쇄 항체의 투여를 위해, 2개의 사슬을 동일 또는 별도 벡터에서 클로닝시킬 수 있다.

[0173] 다수의 바이러스 벡터계, 예컨대 레트로바이러스계(예컨대 Lawrie 및 Tumin, Cur.Opin.Genet.Develop. 3, 102-109(1993) 참조); 아데노바이러스 벡터(예, Bett 등, J.Viro. 67, 5911(1993) 참조); 아데노 연관 바이러스 벡터(예, Zhou 등, J.Exp.Med. 179, 1867(1994) 참조), 백시니아 바이러스 및 조류 폭스 바이러스를 비롯한 폭스 계열 유래의 바이러스 벡터, 신드비스(Sindbis) 및 SFV(Semliki Forest Virus)(예, Dubensky 등, J.Viro. 70, 508-519(1996) 참조)로부터 유도된 것과 같은 알파 바이러스 종, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스(미국 특허 제5,643,576호 참조) 및 랍도바이러스(rhabdovirus), 예컨대 수포성 구내염 바이러스(WO 96/34625호) 및 파필로마바이러스(Ohe 등, Human Gene Therapy 6, 325-333(1995); Woo 등, WO 94/12629 및 Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622(1996)) 유래의 바이러스 벡터 등을 이용할 수 있다.

[0174] 면역원을 암호화하는 DNA, 또는 이를 함유하는 벡터를 리포좀 내로 패키징할 수 있다. 적절한 지질 및 관련 유사체는 미국 특허 제5,208,036호, 제5,264,618호, 제5,279,833호 및 제5,283,185호에 개시되어 있다. 면역원을 암호화하는 DNA 및 벡터를 미립자 캐리어에 흡착시키거나 또는 이와 회합시킬 수 있으며, 미립자 캐리어의 예로는 폴리메틸 메타크릴레이트 폴리머와 폴리락티드 및 폴리(락티드-코-글리콜리드) 등이 있다. 예컨대 McGee 등, J. Micro Encap.(1996) 참조.

[0175] 유전자 요법 벡터 또는 나출 DNA는, 통상적으로 전신 투여(예, 정맥내, 복강내, 비강, 위, 피내, 근육내, 피하 또는 두개내 주입) 또는 국소 적용(예컨대 미국 특허 제5,399,346호 참조)으로 개개 환자에게 투여하여 생체내 전달할 수 있다. 이러한 벡터는 부피백신(bupivaccine)(미국 특허 제5,593,970호)와 같은 촉진제를 추가로 포함한다. 또한, 유전자 총을 사용하여 DNA를 투여할 수 있다. Xiao & Brandsma, 상기 문헌 참조. 면역원을 암호화하는 DNA는 미세한 금속 비드의 표면에 침착시킨다. 미세발사체를 충격과 또는 팽창 헬륨 기체로 가속화시켜 일부 세포층의 심부에 조직을 침투시킨다. 예를 들어, 위스콘신주 미들레톤에 소재하는 아가세투스 인코포레이티드가 제조한 Accel™ 유전자 전달 장치가 적절하다. 대안적으로, 화학적 또는 기계적 자극으로 피부 상에 DNA를 단순히 스포팅함으로써 나출 DNA를 피부를 통해 혈류로 통과시킬 수 있다(WO 95/05853호 참조).

[0176] 또 다른 변형예에서, 면역원을 암호화하는 벡터를 개개 환자로부터 체외 배양된 세포(예, 림프구, 골수 흡입, 조직 생검) 또는 보편 공여자 조혈 간세포를 생체외에서 세포에 전달한 다음, 일반적으로 벡터에 통합된 세포를 선별한 후 환자에게 세포를 재이식할 수 있다.

III. 제거 활성에 대한 항체 스크리닝

[0177] 본 발명은 제거 활성이 바람직한 아밀로이드 침착 또는 임의의 다른 항원, 또는 관련 생물학적 독립체를 제거하는 활성에 대해 항체를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 아밀로이드 침착에 대한 활성을 스크리닝하기 위해서, 알츠하이머 질환 환자의 뇌 또는 특징적 알츠하이머 질환리를 보유한 동물 모델에서 얻은 조직 샘플을, 시험관내 배지에서 Fc 수용체를 보유하는 식세포(예컨대 소신경교세포) 및 테스트하고자하는 항체와 접촉시킨다. 식세포는 BV-2, C8-B4 또는 THP-1 등의 세포주 또는 1차 배양물일 수 있다. 일부 방법에서, 성분을 현미경 슬라이드에 결합시켜 현미경 모니터링을 용이하게 한다. 일부 방법에서, 미량 역가 접시의 웰에서 유사하게 수회 반응을 실시한다. 이러한 형식에서, 별도의 소형 현미경 슬라이드를 별도의 웰에 설치할 수 있거나, 또는 A β 의 ELISA 검출과 같은 비현미경 검출 형식을 사용할 수 있다. 반응을 진행하기 전에 기준 값으로부터 시작하여 시험관내 반응 혼합물에서의 아밀로이드 침착량과 반응 중의 하나 이상의 테스트 값의 일련의 측정을 실시하는 것이 좋다. 항원은, 예컨대 A β 또는 아밀로이드 플라크의 기타 성분에 대한 형광 표지된 항체로 염색하여 검출할

수 있다. 염색에 사용된 항체는 제거 활성에 대해 테스트 중인 항체와 동일할 수도, 동일하지 않을 수도 있다. 아밀로이드 침착 반응 과정에서 기준선과 비교하여 나타난 감소는, 테스트 중인 항체가 제거 활성을 보유함을 제시하는 것이다. 그러한 항체는 알츠하이머 및 기타 아밀로이드 형성 질병을 예방 또는 치료하는 데 유용할 것 같다.

[0179]

유사 방법을 사용하여 기타 유형의 생물학적 독립체의 제거 활성에 대해 항체를 스크리닝할 수 있다. 이 분석을 이용하여 결국 어떤 종류의 생물학적 독립체에 대한 제거 활성도 검출할 수 있다. 통상적으로, 생물학적 독립체는 인간 또는 동물 질병에서 약간의 역할을 한다. 생물학적 독립체는 조직 샘플로서 또는 분리형으로서 제공할 수 있다. 조직 샘플로서 제공되는 경우, 조직 샘플의 성분에 용이하게 접근하고 고정에 수반되는 성분 구조의 교란을 피하기 위해서 조직 샘플을 고정하지 않는 것이 바람직하다. 이 분석법에서 테스트할 수 있는 조직 샘플의 예로는 암조직, 전암(precancerous) 조직, 혹 또는 사마귀 같은 양성 증식을 포함하는 조직, 병원성 미생물로 감염된 조직, 염증성 세포가 침투된 조직, 세포 간에 병리학적 간질을 보유하는 조직(예, 섬유소 심막염), 변종 항원을 보유하는 조직, 및 반흔 조직 등이 있다. 사용할 수 있는 분리형 생물학적 독립체의 예로는 A β , 바이러스 항원 또는 바이러스, 프로테오글리칸, 기타 병원성 미생물의 항원, 종양 항원 및 유착 분자 등이 있다. 이들 항원은 여러 수단 중 천연원, 재조합 발현 또는 화학적 합성으로부터 얻을 수 있다. 조직 샘플 또는 분리형 생물학적 독립체를 및 배지에서 Fc 수용체 보유 식세포(예, 단핵구 또는 소신경세포) 및 시험하고자 하는 항체와 접촉시킨다. 항체는 테스트 중인 생물학적 독립체에 대해 유도하거나, 또는 독립체와 관련된 항체에 대해 유도할 수 있다. 후자의 경우, 생물학적 독립체가 항원을 이용하여 대상성으로 식균 작용을 하는지를 시험하는 것이 목적이다. 일반적으로, 반드시 필요한 것은 아니지만, 항체 및 생물학적 독립체(종종 관련 항원을 보유)를 서로 접촉시킨 다음 식세포를 첨가한다. 배지 내에 남아 있는 생물학적 독립체 및/또는 관련 항원이 존재하는 경우, 이의 농도를 모니터링한다. 배지 중 항원 또는 관련 생물학적 독립체의 양 또는 농도의 감소는, 항체가 식세포와 함께 항원 및/또는 관련 생물학적 독립체에 대한 제거 반응을 보유함을 제시한다(예컨대 실시예 14 참조).

[0180]

IV 치료 가능한 환자

[0181]

치료 가능한 환자는 질병 위험이 있으나 증상을 나타내지 않는 개체와, 현재 증상을 나타내고 있는 환자를 포함한다. 알츠하이머 질병의 경우, 남녀가 충분히 오래 산다면 결국 어떤 사람도 알츠하이머 질병에 걸릴 위험이 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 대상 환자의 위험을 평가할 필요 없이 일반적인 개체군에 예방학적으로 시행될 수 있다. 본 발명의 방법은 공지된 알츠하이머 질환의 유전적 위험을 보유한 개체에 특히 유용하다. 그러한 개체는 이 질병을 경험한 친척이 있는 개체들 및 유전적 또는 생화학적 마커의 분석으로 위험이 측정된 개체들을 포함한다. 알츠하이머 질병에 대한 위험의 유전적 마커는 APP 유전자의 돌연변이, 특히 각각 하디 및 스웨디시 돌연변이라고 불리우는 위치 717과 위치 670 및 671에서의 돌연변이를 포함한다(Hardy, TINS, 상기 참조). 기타 위험 마커는 AD, 고콜레스테롤혈증 또는 아테롬성 경화증의 가족력인 프리세닐린(presenilin) 유전자, PS1 및 PS2와 ApoE의 돌연변이가 있다. 현재 알츠하이머 질환을 앓고 있는 개체를, 특징적 치매와 전술한 위험 인자의 존재로부터 알아낼 수 있다. 또한, AD에 걸린 개체를 확인하는 여러 진단 테스트가 이용가능하다. 이들은 CSF tau 및 A β 42 수준의 측정을 포함한다. 상승된 tau 및 감소된 A β 42의 수준은 AD의 존재를 알려준다. 알츠하이머 질환을 앓고 있는 개체는 실시예 부분에 논의된 바와 같은 ADRDA 기준으로 진단할 수 있다.

[0182]

무증상 환자에서, 치료는 임의의 연령(예, 10, 20, 30)에 개시할 수 있다. 그러나, 일반적으로 환자가 40, 50, 60 또는 70세에 도달할 때, 치료를 개시할 필요는 없다. 치료는 통상적으로 일정 기간 동안 수회 용량을 수반한다. 항체, 또는 일정 기간 동안 치료제(예, A β 펩티드)에 반응하는 활성화된 T-세포 또는 B-세포를 분석하여 치료를 모니터링할 수 있다. 반응이 저하되면, 추가 항원 투여한다. 잠재적 다운증후군 환자의 경우, 모체에게 또는 출생 직후 치료제를 투여하여 출생전에 치료를 개시할 수 있다.

[0183]

V 치료법

[0184]

예방용으로, 알츠하이머 질환에 감수성인 환자 또는 위험이 있는 환자에게, 질병의 생화학, 조직학 및/또는 행동 증상, 질병의 형성 과정에서 제공되는 이의 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 비롯한 질병의 위험을 제거 또는 감소시키거나, 병의 심각도를 줄이거나, 또는 질병의 개시를 지연시키는 유효량으로 약학 조성물 및 약제를 투여한다. 치료용으로, 질병에 걸렸을 것으로 의심되거나 또는 이미 병에 걸린 환자에게, 질병의 형성 과정에서 제공되는 이의 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 비롯한 질병의(생화학, 조직학 및/또는 행동의) 증상을 치료, 또는 적어도 부분적으로 병의 진행을 정지시키는 유효량으로 약학 조성물 및 약제를 투여한다. 일부 방법에서, 제제의 투여는 특징적 알츠하이머 질환리학이 아직 발병하지 않은 환자에서 근인식(myocognitive) 손상을

감소 또는 제거한다. 처치 또는 예방 치료를 달성하기에 적당한 양은 치료 또는 예방 유효량으로서 정의한다. 예방 및 치료법에서, 제제는 일반적으로 충분한 면역 반응이 얻어질 때까지 수회 용량으로 투여한다. 통상적으로, 면역반응을 모니터링하고, 면역 반응이 약해지기 시작하면 반복 용량을 제공한다.

[0185]

전술한 증상을 치료하기 위한 본 발명의 조성물의 유효량은 여러 상이한 인자, 예컨대 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리 상태, 환자가 인간인지 또는 동물인지의 여부, 투여되는 기타 약물, 및 치료가 예방용인지 또는 치료용인지 여부 등에 따라서 달라진다. 일반적으로, 환자는 인간이지만 유전자이식 포유류를 비롯한 인간이 아닌 포유류도 치료할 수 있다. 치료 용량은 안전성 및 효능을 최적화하도록 적정해야 한다. 면역원의 양은 보조제의 투여 여부에 따라 달라지며, 보조제의 부재하에서의 용량은 더 높아야 한다. 투여용 면역원의 양은 때로는 환자 당 1~500 μg , 더욱 일반적으로는 인간 투여의 경우 주사 1회당 5~500 μg 이다. 경우에 따라서, 주사 1회당 1~2 mg의 고용량을 사용한다. 통상적으로 인간의 경우 주사 1회당 약 10, 20, 50 또는 100 μg 이 사용된다. 면역원의 질량은 전체로서 면역원의 질량에 대한 면역원 내의 면역원성 에피토프의 질량비에 따라서 다르다. 통상, 면역원 1 μg 당 면역원성 에피토프 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ μmol 이 사용된다. 주사 시기는 1일 1회 내지 1년 1회, 내지는 10년에 1회로 상당히 다양할 수 있다. 면역원을 투여한 당일에, 용량은 보조제의 존재하에 환자당 1 μg 이상, 일반적으로 10 μg 이상이고, 보조제의 부재하에 10 μg 이상, 일반적으로 100 μg 이상이다. 통상적인 방법은 면역화 후에, 시간 간격(예, 6주 간격)을 두고 추가 항원 주사를 실시하는 것으로 구성된다. 또 다른 방법은 면역화 후 1, 2 및 12개월이 경과한 다음 추가 항원 주사하는 것으로 구성된다. 또 다른 방법은 평생 매2개월 마다 1회씩 주사한다. 또는, 추가 항원 주사는 면역 반응을 모니터링하여 제시되는 대로 불규칙하게 실시할 수 있다.

[0186]

항체를 이용한 수동 면역화의 경우, 용량은 숙주 체중 1 kg당 0.0001~100 mg, 더욱 일반적으로는 0.01~5 mg 범위이다. 예를 들어, 용량은 체중 1 kg당 1 mg 또는 10 mg, 또는 1~10 mg의 범위 내에 있을 수 있다. 예시적 치료법에서는 2주에 1회 또는 매월 1회 또는 3~6개월마다 1회 투여한다. 일부 방법에서는 상이한 결합 특이성을 보유한 2 이상의 단일클론 항체를 동시에 투여하며, 이 경우 투여되는 각 항체의 용량은 지정된 범위내에 속한다. 항체는 일반적으로 수회 투여한다. 단일 용량 사이의 간격은 주 단위, 월 단위 또는 년 단위일 수 있다. 간격은 환자의 A β 에 대한 항체의 혈중 농도를 측정하여 제시된 대로 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 혈장 항체 농도 1~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 달성할 수 있도록 용량을 조정하며, 일부 방법에서는 25~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다. 대안적으로, 서방형 제제로서 항체를 투여할 수 있으며, 이 경우 투여 빈도수를 줄인다. 용량 및 빈도수는 환자내 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체가 최장 반감기를 나타내고, 그 다음은 인간화된 항체, 키메라 항체 및 비인간 항체의 순이다. 투여 용량 및 빈도는 치료가 예방용인지 치료용인지 여부에 따라 달라질 수 있다. 예방용으로, 장기간에 걸쳐 비교적 간격을 크게 하여 비교적 낮은 용량을 투여한다. 일부 환자는 남은 일생 동안 계속 치료받는다. 치료용에서는, 질병의 진행이 감소되거나 또는 종결될 때까지, 바람직하게는 환자가 질병 증상의 부분적 또는 완전한 호전을 나타낼 때까지, 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 용량을 필요로 한다. 이후, 환자에게 예방법을 실시할 수 있다.

[0187]

면역원을 암호화하는 핵산에 대한 용량은 환자당 약 10 ng~1 g, 100 ng~100 mg, 1 μg ~10 mg, 또는 30~300 μg DNA 범위이다. 감염성 바이러스 벡터에 대한 용량은 1회 용량당 10~100 이상의 비리온으로 다양하다.

[0188]

면역 반응을 유도하는 제제는 예방 및/또는 처치 치료를 위해 비경구, 국소, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 복강내, 비강내 또는 근육내 수단으로 투여할 수 있다. 기타 투여 경로도 유사하게 유효할 수 있지만, 면역원성 제제의 가장 통상적인 투여 경로는 피하 경로이다. 그 다음 가장 일반적인 경로는 근육내 주사이다. 이러한 종류의 주사는 가장 통상적으로는 팔 또는 다리 근육에서 실시된다. 일부 방법에서, 침착물이 축적되는 특정 조직에 제제를 직접 주사, 예컨대 두개내 주사한다. 정맥내 주입시 근육내 주사는 항체 투여용으로 바람직하다. 일부 방법에서, 특정 치료 항체를 두개 내로 직접 주사한다. 일부 방법에서, 항체는 서방형 조성물 또는 장치(예, MedipadTM 장치)로서 투여한다.

[0189]

본 발명의 제제는 임의로 아밀로이드 형성 질병의 치료에 적어도 부분적으로 효과적인 기타 제제와 함께 투여할 수 있다. 아밀로이드 침착이 뇌에서 발생하는 알츠하이머 및 다운증후군의 경우, 혈액뇌 장벽을 통과하는 본 발명의 제제의 통과를 증가시키는 기타 제제와 함께 본 발명의 제제를 투여할 수 있다.

[0190]

펩티드와 같은 본 발명의 면역원성 제제는 때로는 보조제와 함께 투여한다. A β 와 같은 펩티드와 함께 각종 보조제를 사용하여 면역 반응을 유발할 수 있다. 바람직한 보조제는 반응의 성질 형태에 영향을 주는 면역원의 구조 변화를 유발하지 않고 면역원에 대한 내재 반응을 증대시킨다. 바람직한 보조제의 예로는 수산화알루미늄 및 인산알루미늄, 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 리피드 A(MPLTM)(GB 2220211(RIBI ImmunoChem Research Inc.,

Hamilton, Montana, 지금은 Corixa의 일부) 등이 있다. Stimulon™ QS-21은 사우스 아메리카에서 발견되는 Quillaja Saponaria Molina 나무의 수피로부터 분리된 트리터펜 글리코시드 또는 사포닌이다(Vaccine Design; The Subunit and Adjuvant Approach(eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); 미국 특허 제5,057,540 호 참조)(Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). 다른 보조제는, 경우에 따라서 모노포스포릴 리피드 A 와 같은 면역자극제와 함께 수중유 에멀젼(예, 스쿠알렌 또는 땅콩유)이다(Stoute 등, N Engl J Med. 336, 86-91(1997)). 또 다른 보조제는 CpG이다(WO 98/40100). 대안적으로, A β 를 보조제에 커플링시킬 수 있다. 그러나, 그러한 커플링은 면역 반응의 특성에 영향을 주도록 A β 의 구조를 실질적으로 변화시켜서는 안된다. 보조제는 활성제와 함께 치료 조성물의 성분으로서 투여할 수 있다. 또는 치료제의 투여와는 별도로 투여하거나, 또는 치료제의 투여 전, 동시에 또는 후에 투여할 수 있다.

[0191]

바람직한 부류의 보조제는 알루미늄염(명반), 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄이다. 그러한 보조제는 다른 특이적 면역자극제, 예컨대 MPL 또는 3-DMP, QS-21 또는 폴리글루탐산이나 폴리리신 등의 중합체 또는 단량체 아미노산의 유무 하에 사용할 수 있다. 또 다른 부류의 보조제는 수중유 에멀젼 제제이다. 그러한 보조제는 다른 특정 면역자극제, 예컨대 무라밀 웨티드(예, N-아세틸무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(nor-MDP), N-아세틸무라밀-L-알라닐-D-이소글루타밀-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세롤-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민(MTP-PE), N-아세틸글루코사미닐-N-아세틸무라밀-L-Al-D-이소글루-L-Ala-디팔미톡시프로필아미드(DTP-DPP) 테라미드 TM), 또는 기타 박테리아 세포벽 성분의 유무 하에 사용할 수 있다. 수중유 에멀젼은 (a) 모델 110Y 미세유동화제(미국 매사추세츠주 뉴턴에 소재하는 마이크로플루이딕스) 등의 미세유동화제를 사용하여 미크론 이하 크기의 입자로 제형화한 5% 스쿠알렌, 0.5% 트윈 80 및 0.5% Span 85(임의로 다양한 양의 MTP-PE를 함유함)를 함유하는 MF59(WO 90/14837); (b) 미크론 이하 크기의 에멀젼으로 미세 유동화되거나 또는 와동되어 더 큰 입자 크기 에멀젼을 형성하는 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉 블록형 중합체 L121 및 thr-MDP를 함유하는 SAF, 및 (c) 2% 스쿠알렌, 0.2% 트윈 80과, 모노포스포릴 리피드 A(MPL), 트레할로스 디미콜레이트(TDM) 및 세포벽 골격(CWS), 바람직하게는 MPL+CSW(Detox™)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 박테리아 세포벽 성분을 함유하는 Ribi™ 보강제(RAS)(미국 몬타나주 해밀톤에 소재하는 리비 이뮤노켐)을 포함한다. 또 다른 부류의 바람직한 보조제는 사포닌 보조제, 예컨대 Stimulon™(QS-21, 미국 매사추세츠주 프라밍햄 소재의 아퀼라) 또는 ISCOM(면역자극 복합체) 및 ISCOMATRIX 등의 이로부터 형성된 입자이다. 다른 보조제는 완전 프로인트 보조제(CFA) 및 불완전 프로인트 보조제(IFA)를 포함한다. 다른 보조제로는 시토킨, 예컨대 인터루킨(IL-1, IL-2 및 IL-12), 대식 세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 종양 피사 인자(TNF) 등이 있다.

[0192]

보조제는 단일 조성물로서 면역원과 함께 투여할 수 있다. 또는 보조제는 면역원의 투여 전, 동시 또는 후에 투여할 수 있다. 면역원 및 보조제를 포장하여 동일한 병에 공급하거나, 또는 별도의 병에 포장하여 사용전에 혼합할 수 있다. 면역원 및 보조제는 통상적으로 목적하는 치료 용도를 제시하는 표지와 함께 포장한다. 면역원 및 보조제가 별도로 포장되는 경우, 포장은 통상적으로 사용전에 혼합에 대한 설명서를 포함한다. 보조제 및/또는 캐리어의 선택은 보조제를 함유하는 면역원성 제제의 안정성, 투여 경로, 투여 계획, 예방 접종하고자 하는 종에 대한 보조제의 효능에 따라 달라지며, 인간에서 약학적 허용 보조제는 적절한 조절체에 의한 인간 투여용으로 허가되거나 허가될 수 있는 것이다. 예를 들어, 완전 프로인트 보조제는 인간 투여용으로 적절하지 않다. 명반, MPL 및 QS-21이 바람직하다. 임의로, 2 이상의 상이한 보조제를 동시에 사용할 수 있다. 바람직한 조합은 명반과 MPL, 명반과 QS-21, MPL과 QS-21, 명반, QS-21 및 MPL을 함께 포함한다. 또한, 불완전 프로인트 보조제를, 경우에 따라 명반, QS-21과 MPL 및 이의 모든 조합과 함께 사용할 수 있다(Chang 등, Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186(1998)).

[0193]

본 발명의 제제는 종종 활성 치료제와 각종 기타 약학적 허용 성분을 포함하는 약학 조성물로서 투여된다. Remington's Pharmaceutical Science(15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). 바람직한 형태는 목적하는 투여 방식 및 치료 용도에 따라 다르다. 조성물은, 목적하는 제형에 따라서, 약학적으로 허용가능한 비독성 캐리어 또는 희석제(이는 동물 또는 인간 투여용 약학 조성물을 배합하는 데 통상 사용되는 부형제로서 정의되어 있음)를 포함할 수 있다. 희석제는 조합시 생물학적 활성에 영향을 주지 않도록 선택한다. 이 희석제의 예로는 중류수, 생리학적 인산염 완충 염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 헹크스 용액 등이 있다. 또한 약학 조성물 또는 배합물은 기타 캐리어, 보조제, 또는 비독성, 비치료용, 비면역원성 안정화제 등을 포함할 수 있다.

[0194]

약학 조성물은 크고 서서히 대사되는 거대 분자, 예컨대 단백질, 키토산 등의 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜

산 및 공중합체(예, 라텍스 작용화된 세파로스(TM), 아가로스, 셀룰로스 등), 아미노산 중합체, 아미노산 공중합체 및 지질 응집체(예, 오일 점적제 또는 리포좀) 등을 포함할 수 있다. 또한, 이들 캐리어는 면역자극제(즉, 보조제)로서 작용할 수 있다.

[0195] 비경구 투여용으로서, 본 발명의 제제는 물, 오일, 염수, 글리세롤 또는 에탄올 등의 멸균액일 수 있는 약학적 캐리어와 생리적 허용 희석제에서 물질의 용액 또는 혼탁액의 주사가능 용량으로 투여할 수 있다. 또한, 보조물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 계면 활성제, pH 완충 물질 등이 조성물 내에 존재할 수 있다. 약학 조성물의 기타 성분은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유 및 미네랄유의 것들이 있다. 일반적으로, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜 등의 글리콜이 특히 주사용 용액으로 바람직한 액체 캐리어이다. 활성 성분의 방출을 지속하는 방식으로 제형화할 수 있는 데포우 주사 또는 이식 제제의 형태로 항체를 투여할 수 있다. 예시적 조성물은 50 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl로 구성되고 HCl로 pH6.0으로 조정한 수성 완충액에서 배합한 모노클론 항체 5 mg/ml를 포함한다.

[0196] 통상적으로, 조성물은 액체 용액 또는 혼탁액으로 주사가능하게 제조한다. 주사 전에 액체 부형제 중 용액 또는 혼탁액으로 적절한 고체 형태로 제조할 수 있다. 제제는, 전술한 바와 같이, 애멸전화하거나, 또는 리포좀 또는 폴리락티드, 폴리글리콜리드 또는 보조제 효과 증강용 공중합체 등의 미세입자에 캡슐화할 수 있다(Langer, Science 249, 1527(1990) 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119(1997) 참조). 본 발명의 제제는 활성 성분의 지속적 또는 맥박 방출(pulsatile release)을 허용하는 방식으로 제형화할 수 있는 데포우 주사 또는 이식 제제의 형태로 투여할 수 있다.

[0197] 기타 투여 방식에 적절한 부가의 제제는 경구, 비강내, 폐용 제제, 좌약 및 경피용 제제가 있다.

[0198] 좌약의 경우, 결합제 및 캐리어는, 예컨대 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세라이드를 포함한다. 이러한 좌약은 0.5~10%, 바람직하게는 1~2% 범위의 활성 성분을 함유하는 혼합물로부터 형성할 수 있다. 경구용 제제는 부형제, 예컨대 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로스 및 탄산마그네슘을 포함한다. 이들 조성물은 용제, 혼탁액, 정제, 환약, 캡슐, 자연 방출형 제제 또는 분말의 형태를 취할 수 있으며, 활성 성분 10~95%, 바람직하게는 25~70%를 포함한다.

[0199] 국소 투여로 경피 또는 피내 전달할 수 있다. 콜레라 독소 또는 독을 제거한 유도체 또는 이의 서브 유닛이나 기타 유사한 박테리아 독소와 상기 제제를 동시투여하여 용이하게 국소 투여할 수 있다(Glenn 등, Nature 391, 851(1998)). 화학적 가교 또는 융합 단백질로서의 발현에 의해 얻은 혼합물 또는 결합형 분자로서 성분을 사용하여 동시 투여할 수 있다.

[0200] 대안적으로, 경피 전달은 피부 패치 또는 트랜스퍼로좀(transfersomes)을 사용하여 달성할 수 있다(Paul 등, Eur. J. Immunol. 25, 3521-24(1995); Cevc 등, Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15(1998)).

VI. 진단 방법

[0202] 본 발명은 알츠 하이머병을 앓고 있거나 또는 이에 감수성이 환자에서 A β 웨비드에 대한 면역 반응을 검출하는 방법을 제공한다. 본 방법은 환자에게 투여하는 치료 과정을 모니터링하는 데 특히 유용하다. 이 방법을 사용하여 증상이 있는 환자에서의 처치 치료와 무증상 환자에서의 예방 치료를 모두 모니터링할 수 있다. 이 방법은 능동 면역화(예, 면역원의 투여에 반응하여 생성된 항체) 및 수동 면역화(예, 투여된 항체의 수준 측정)를 모니터링하는 데 유용하다.

1. 능동 면역화

[0204] 일부 방법은 제제의 용량을 투여하기 전에 환자의 면역 반응의 기준값을 측정하고, 치료 후에 면역 반응 값을 상기 기준값과 비교하는 것을 포함한다. 면역 반응값의 유의적인 증가(즉, 동일한 샘플의 반복 측정에서의 실험 오차의 통상적인 한계보다 큼, 이러한 측정의 평균으로부터 구한 하나의 표준 편차로 표현함)는 양성 치료 결과(즉, 제제의 투여가 면역 반응을 달성 또는 증대시킴)를 나타낸다. 면역 반응에 대한 값이 유의적으로 변화하지 않거나 감소한 경우, 음성 치료 대조군이다. 일반적으로, 면역원성 제제로 초기 치료 과정을 진행한 환자는 연속적인 투여에 대해 면역 반응의 증가를 나타낼 것으로 예상되며, 이는 결국 편평기에 도달한다. 제제의 투여는 일반적으로 면역 반응이 증가하는 동안 계속된다. 편평기 도달은 실시된 치료가 용량 및 빈도 측면에서 중단되거나 감소될 수 있음을 나타내는 지표이다.

[0205] 다른 방법에서, 면역 반응의 대조값(즉, 평균 및 표준 편차)을 대조군에 대해 측정한다. 통상적으로 대조 개체군에서의 개체는 미리 치료를 받지 않았다. 치료제를 투여한 후에 환자의 면역 반응의 측정값을 대조값과 비교

한다. 대조값에 비하여 상당한 증가(예컨대, 평균에서 얻은 표준 편차를 능가하는 증가)는 양성 치료 결과를 나타낸다. 상당한 증가의 결여 또는 감소는 음성 치료 결과를 나타낸다. 제제의 투여는 일반적으로 면역 반응이 대조값에 비하여 증가하는 동안 계속된다. 전술한 바와 같이, 대조값에 대한 편평기 도달은 치료 실시가 용량 및 빈도 측면에서 중단되거나 감소될 수 있음을 나타내는 지표이다.

[0206] 다른 방법에서, 면역 반응의 대조값(예, 평균 및 평균 편차)은 치료제로 치료하고 면역 반응이 치료에 반응하여 편평기에 도달한 개체의 대조군으로부터 결정한다. 환자에서 측정된 면역 반응의 값은 대조값과 비교한다. 환자의 측정 수치가 대조값과 상당히 다르지 않으면(예컨대 하나의 표준 편차를 능가함) 치료는 중단된다. 환자의 수치가 대조값보다 유의적으로 낮으면, 제제의 연속 투여가 허용된다. 환자의 수치가 대조값 이하의 값으로 지속되면, 예컨대 다른 보조제의 사용과 같이 치료법에 변화를 줄 수 있다.

[0207] 다른 방법에서, 현재 치료를 받지 않지만 이전에 치료 과정을 진행한 환자를, 치료 재개가 필요한지 여부를 결정하기 위해 면역 반응에 대해 모니터링한다. 환자의 면역 반응의 측정 값은 이전의 치료 과정 후에 환자에게서 전에 얻은 면역 반응의 값과 비교할 수 있다. 이전의 측정과 비교하여 상당한 감소(즉, 동일한 샘플의 반복 측정시 오차의 통상적인 한계를 능가하는 감소량)는 치료를 재개할 수 있다는 지표이다. 대안적으로, 환자에게서 측정한 값은 치료 과정을 경험한 후에 환자의 개체군에서 측정된 대조값(평균 + 표준편차)과 비교할 수 있다. 대안적으로, 환자의 측정된 값은, 질병의 증상이 남아있지 않은 예방학적으로 치료된 환자의 개체군에서의 대조값, 또는 질병 특성의 개선을 나타내는 치료학적으로 치료된 환자의 개체군의 대조값과 비교할 수 있다. 이들 모든 경우에, 대조 수치와 비교하여 상당한 감소(즉, 표준 편차 이상)는 환자의 치료를 재개해야 함을 나타내는 지표이다.

[0208] 분석용 조직 샘플은 통상적으로 환자에게서 얻은 혈액, 혈장, 혈청, 점막 또는 뇌척수액이다. 이 샘플은 A β 웨티드의 임의의 형태, 통상적으로 A β 42에 대한 면역 반응의 지표에 대해 분석한다. 면역 반응은, 예컨대 A β 웨티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 T 세포의 존재로부터 결정할 수 있다. A β 에 특이적인 항체를 검출하는 ELISA 방법은 실시예 부분에 개시되어 있다. 반응성 T-세포를 검출하는 방법은 전술되어 있다(정의 부분 참조). 일부 방법에서, 상기 섹션 III에 개시된 바와 같이 제거 분석을 이용하여 면역 반응을 결정한다. 이러한 방법에서, 시험될 환자 유래의 조직 샘플을 아밀로이드 침착물(예, PDAPP 마우스 유래) 및 Fc 수용체 보유 식세포와 접촉시킨다. 그 다음 아밀로이드 침착물의 제거를 모니터링한다. 제거 반응의 존재 및 범위는 테스트 중인 환자의 조직 샘플의 A β 를 제거하는 데 효과적인 항체의 존재 및 수준의 지표를 제공한다.

2. 수동 면역화

[0209] 일반적으로 수동 면역화를 모니터링하는 절차는 전술한 능동 면역화를 모니터링하는 데 선택된 것과 유사하다. 그러나, 수동 면역화 후에 항체 프로필은 통상적으로 항체 농도의 즉각적인 피크와 그 뒤의 지수형 감쇠를 나타낸다. 추가의 투여량 없이, 감쇠는 투여된 항체의 반감기에 따라서 수일 내지 수개월 내에 전처리 수준에 균접 한다. 예를 들어, 일부 인간 항체의 반감기는 20일 범위내이다.

[0210] 일부 방법에서, 환자의 A β 에 대한 항체의 기준선 측정을 투여 전에 실시하고, 제2측정은 피크 항체 수준을 측정한 직후에 실시하며, 1회 이상의 추가의 측정은 항체 수준의 감쇠를 모니터링하는 간격으로 실시한다. 항체의 수준은 기준선 또는 기준선 아래의 피크의 소정 비율(예, 50%, 25% 또는 10%)로 낮아지는 경우, 추가 용량의 항체를 투여한다. 일부 방법에서, 피크 또는 후속 측정된 배경 미만의 수준을 이미 측정된 기준 수준과 비교하여 다른 환자의 유리한 예방 또는 치치 치료법을 구성한다. 측정된 항체 수준이 기준 수준보다 상당히 낮은 경우(예컨대 치료가 유익했던 환자의 개체군의 기준값의 평균에서 표준편차를 제한 값보다 낮은 경우), 항체의 추가 투여가 지시된다.

3. 진단 키트

[0211] 본 발명은 전술한 진단 방법을 수행하는 진단 키트를 추가로 제공한다. 통상적으로, 이러한 키트는 A β 에 대한 항체에 특이적으로 결합하는 제제를 함유한다. 키트는 표지를 포함할 수도 있다. A β 에 대한 항체의 검출을 위해서, 표지는 통상적으로 표지된 항-아이오도타입 항체의 형태로 존재한다. 항체의 검출을 위해서, 제제는 미량 역가 접시의 웰과 같은 고상에 미리 결합된 상태로 공급할 수 있다. 또한 키트는 통상적으로 키트의 사용 설명서를 제공하는 표지를 포함한다. 표지는 A β 에 대한 항체의 수준과 측정된 표지 수준의 상관 관계를 나타내는 차트나 다른 해당 방법을 포함할 수 있다. 표지란 제조, 수송, 판매 또는 사용 과정의 임의의 시점에서 키트에 부착되어 있거나, 또는 그렇지 않으면 키트에 포함되는 임의의 쓰여지거나 또는 기록된 재료를 의미한다. 예를 들어, 표지는 광고용 전단 및 팜플렛, 포장 재료, 설명서, 오디오나 비디오 카세트, 컴퓨터 디스크 뿐 아니라

키트에 직접 각인된 문서를 포함한다.

[0214] 본 발명은 생체내 영상화를 실시하기 위한 진단 키트도 제공한다. 이러한 키트는 통상적으로 A β 의 에피토프, 바람직하게는 잔기 1-10에 결합하는 항체를 포함한다. 바람직하게는, 항체는 표지되거나, 또는 2차 표지 시약이 키트 내에 포함되어 있다. 키트는 생체내 영상화 분석을 실시하기 위한 설명서로 표지되어 있는 것이 좋다.

VII. 생체내 영상화

[0216] 본 발명은 환자의 아밀로이드 침착물을 생체내 영상화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 알츠하이머 질환 또는 이에 대한 감수성을 진단하거나 또는 진단을 확인하는 데 유용하다. 예를 들어, 이 방법은 치매 증상을 나타내는 환자에게 사용할 수 있다. 환자가 비정상적인 아밀로이드 침착을 나타내면, 환자는 알츠하이머 질환을 앓고 있을 확률이 높다. 이 방법은 무증상 환자에게도 사용할 수 있다. 아밀로이드의 비정상 침착물의 존재는 추후 증상을 나타내는 질병에 대한 감수성을 제시하는 것이다. 또한 이 방법은 알츠하이머 질환으로 이미 진단된 환자의 치료에 대한 질병 진행 및/또는 반응을 모니터링하는 데 유용하다.

[0217] 본 방법은 A β 에 결합하는 항체 등의 시약을 환자에게 투여한 다음 그 시약이 결합한 후에 제제를 검출하는 단계로 실시된다. 바람직한 항체는 전길이 APP 폴리펩티드에 결합하지 않고 환자의 A β 침착물에 결합한다. 아미노산 1-10 내의 A β 의 에피토프에 결합하는 항체가 특히 바람직하다. 일부 방법에서, 항체는 A β 의 아미노산 7-10 내의 에피토프에 결합한다. 그러한 항체는 통상적으로 실질적인 제거 반응을 유도하지 않고 결합한다. 또 다른 방법에서, 항체는 A β 의 아미노산 1-7 내의 에피토프에 결합한다. 그러한 항체는 통상적으로 A β 에 결합하여 제거 반응을 유도한다. 그러나, Fab와 같은 전길이 불변부가 결여된 항체 단편을 이용하여 제거 반응을 피할 수 있다. 일부 방법에서, 동일한 항체는 치료 및 진단 시약으로서 작용할 수 있다. 일반적으로, A β 의 잔기 10의 에피토프 C-말단에 결합하는 항체는 잔기 1-10 내의 에피토프에 결합하는 항체와 같은 강한 신호를 나타내지 않는데, 아마도 그 이유는 C-말단 에피토프가 아밀로이드 침착물에 접근하기 어렵기 때문인 것 같다. 따라서, 그러한 항체는 덜 바람직하다.

[0218] 진단 시약은 환자의 체내로 정맥내 주사하거나, 또는 두개내 주사로 또는 두개골에 구멍을 뚫어 뇌에 직접 투여 할 수 있다. 시약의 용량은 치료 방법에서와 동일한 범위내여야 한다. 일부 방법에서 A β 에 대한 친화도를 갖는 1차 시약이 표지되어 있지 않고 2차 표지제를 사용하여 1차 시약에 결합시킬 수 있지만, 통상적으로 시약은 표지되어 있다. 표지의 선택은 검출 수단에 따라 좌우된다. 예를 들어, 형광 표지는 광학 검출에 적절하다. 상자성 표지의 사용은 수술이 개재되지 않은 단층 X선 사진 검출에 적절하다. 방사성 표지는 PET 또는 SPECT를 사용하여 검출할 수 있다.

[0219] 해당 기준선 값에 대한 표지된 위치의 수, 크기 및/또는 강도를 비교하여 진단을 실시한다. 기준선 값은 질병이 없는 개체군에서의 평균 수치를 나타낼 수 있다. 또한 기준선 값은 동일한 환자에서 이전에 측정된 수치일 수 있다. 예를 들어, 기준선 값은 치료 개시 전에 환자에서 측정하고, 이후에 측정된 값을 기준선 값과 비교할 수 있다. 기준선과 비교하여 값의 감소는 치료에 대한 양성 반응을 나타낸다.

실시예

I. AD에 대한 A β 의 예방 효과

[0221] 이들 실시예는 알츠하이머 유사 신경병리학을 형성하기 쉽게 하는 위치 717에서의 돌연변이를 갖는 APP(APP_{717V→F})를 과발현하는 유전자이식 마우스로의 A β 42 펩티드의 투여를 개시하고 있다. 이들 마우스(PDAPP 마우스)의 제조 및 특성은 Games 등의 문헌[Natsume, 상기 문헌 참조]에 개시되어 있다. 이형접합형의 이들 동물은 이후 6개월령에서 A β 를 침착시키기 시작한다. 15개월령까지 알츠하이머 질환에서 관찰되는 것과 동일한 A β 침착 수준을 나타낸다. PDAPP 마우스에게 응집형 A β ₄₂(응집형 A β ₄₂) 또는 인산 완충 염수를 주사하였다. 응집형 A β ₄₂는 A β 의 복수 에피토프에 대한 항체를 유도하는 능력 때문에 선택하였다.

A. 방법

1. 마우스 공급원

[0224] 30 마리의 PDAPP 이종구조의 암컷 마우스를 무작위적으로 다음 군으로 나누었다: 응집형 A β 42를 주사할 10 마리의 마우스(한마리는 운송 중 죽었음), PBS/보조제 또는 PBS를 주사할 5 마리의 마우스, 및 10 마리의 주사하지 않을 대조군. 5마리의 마우스에게 혈청 아밀로이드 단백질(SAP)의 서열로부터 유래한 펩티드를 주사하였다.

2. 면역원 제조

[0226] 응집형 A β 42의 제조: A β 42(유에스 웨티드 인코포레이티드, 로트 K42-12) 2 mg을 0.9 mL의 물에 용해시키고, 0.1 mL 10×PBS를 첨가하여 1 mL로 만들었다. 이를 와동시키고 37°C에서 밤새 항온배양하였다. 이 조건하에서 웨티드가 응집되었다. 사용하지 않은 임의의 A β 는 다음 주사시까지 -20°C에서 동결 건조 분말로서 저장하였다.

3. 주사제 제조

[0228] 각 주사를 위해서, 마우스당 응집형 A β 42 100 μ g을 1차 면역화를 위해서 최종 부피 400 μ L 에멀젼으로 완전 프로인트 보조제(CFA)를 이용하여 1:1 에멀젼화한 다음, 2주째에 불완전 프로인트 보조제(IFA)에서 동량의 면역원으로 추가항원을 제공하였다. IFA의 2회의 추가 용량을 매월 간격으로 제공하였다. 후속의 면역화는 PBS 500 μ L에서 1개월 간격으로 실시하였다. 주사는 복강내(i.p.) 전달하였다.

[0229] PBS 주사는 동일한 계획을 따르고, 마우스 1 마리당 PBS/보조제 1:1 혼합물 400 μ L, 또는 PBS 500 μ L를 마우스에게 투여하였다. 유사하게 SAP 주사도 주사 1회당 100 μ L의 용량을 사용하여 동일한 계획에 따라 실시하였다.

4. 마우스 혈액, 조직 제제 및 면역화학 역가 측정

[0231] 상기 방법은 하기 일반적인 재료 및 방법에 개시되어 있다.

B. 결과

[0233] PDAPP 마우스에게 응집형 A β 42(응집형 A β 42), SAP 웨티드 또는 인산염 완충 염수를 주사하였다. PDAPP 마우스 한 군을 주사하지 않은 양성 대조군으로서 남겨두었다. 응집형 A β 42에 대한 마우스의 역가는, 마우스가 1년령이 될때까지 제4회 추가 항원 투여 이후 격월로 모니터링하였다. 마우스를 13개월령에 죽였다. 검사한 모든 시점에서, 9 마리중 8마리의 응집형 A β 42 마우스가 고 항체 역가를 나타내었는데, 이는 일련의 주사를 통해 높게 유지되었다(1/10000 이상의 역가). 9번째 마우스의 역가는 낮았지만, 대략 1/1000의 측정가능한 역가이다(도 1, 표 1). SAPP를 주사한 마우스의 면역원에 대한 역가는 1:1,000 내지 1:30,000이었으며, 하나의 마우스 만이 1:10,000을 초과하였다.

[0234] PBS-처리 마우스에서 6개월, 10개월, 12개월째에 응집형 A β 42에 대한 역가를 측정하였다. 1/100 희석에서, 응집형 A β 42에 대해 역가를 측정한 경우 PBS 마우스는 한 데이터점에서 배경보다 4배만을 초과하였으며, 그 밖에는 모든 데이터 점에서 배경보다 4배 이하였다(표 1). 모든 역가가 300 미만인 이들 점들에서 SAP 특이적 반응은 무시할 만하였다.

[0235] A β 1-42 처리군의 9마리 마우스 중 7마리는 뇌에서 검출가능한 아밀로이드가 없었다. 대조적으로, SAP 및 PBS 군의 마우스 유래의 뇌 조직은 해마와 전측(frontal) 및 대상(cingulate) 피질에서 다수의 아밀로이드 침착물을 함유하였다. 해마 치상 뇌회의 외부 문자층과 같이 손상되기 쉬운 서브영역이 특징적으로 연루되는 침착 패턴은 미처리 대조군의 것과 유사하였다. A β 1-42를 주사한 군으로부터 한 마리 마우스는 해마에 한정되는, 상당히 감소된 아밀로이드 적재량을 보유하였다. 분리된 플라크는 또 다른 A β 1-42 처리 마우스에서 확인하였다.

[0236] 해마에서의 아밀로이드 적재량의 정량적 화상 분석은 A β 42(AN1792)-처리 동물에서 달성된 급격한 감소를 입증하였다(도 2). PBS 군(2.22%) 및 미처리 대조군(2.65%)에 대한 아밀로이드 적재량의 중간값은 AN1792로 면역화시킨 것보다 상당히 컸다(0.00%, p=0.0005). 대조적으로, SAP 웨티드(SAPP)로 면역화시킨 군에 대한 중간값은 5.74%였다. 미처리 대조군 마우스 유래의 뇌조직은, 팽대후부(retrosplenial) 피질에서 뿐 아니라 해마에서 A β 특이적 단일 클론 항체(mAb) 3D6으로 가시화된 다수의 A β 아밀로이드 침착물을 포함하였다. 유사한 패턴의 아밀로이드 침착이 SAPP 또는 PBS로 면역화시킨 마우스에서 관찰되었다(도 2). 또한, 이들 나중의 3개 군의 경우, 해마 치상 뇌회의 외부 문자층과 같이 AD에서 고전적으로 관찰되는 뇌의 손상되기 쉬운 서브 영역이 관련되었다는 특징이 이들 3개의 군 모두에서 존재하였다.

[0237] 또한, A β 침착물을 함유하지 않는 뇌에는 인간 APP 항체 8E5를 이용하여 PDAPP 마우스에서 통상적으로 가시화한 신경반이 없다. 남은 군(SAP 주사 마우스, PBS 마우스 및 미처리 마우스) 유래의 모든 뇌는 미처리 PDAPP 마우스에서 통상적인 다수의 신경반을 보유하였다. 소수의 신경반은 AN1792로 치료한 하나의 마우스에서 존재하였으며, 이영양증 신경돌기의 단일 클러스터는 AN1792로 치료한 제2 마우스에서 발견하였다. 해마의 화상 분석과 도 3의 도면은 PBS 수용체(중간값 0.28%, p=0.0005)와 비교하여 AN1792 처리 마우스(중간값 0.00%)에서의 이영양증 신경돌기의 실질상의 제거를 입증하였다.

[0238] 플라크 관련 염증의 성상세포증 특성은 A β 1-42 주사 군의 뇌에는 없었다. 다른 군의 마우스 유래의 뇌는 A β 플

라크 관련 신경교증의 전형적인 풍부하고 클러스터를 형성한 GFAP 양성 성상 세포를 포함하였다. GFAP-관련 슬라이드의 서브세트은 티오플라빈 S로 대조 염색하여 A β 침착물을 배치하였다. GFAP 양성 성상 세포는 SAP, PBS 및 미처리 대조군과 연관이 있었다. 플라크 음성 A β 1-42 처리 마우스에서는 이러한 연관이 관찰되지 않았지만, AN1792로 치료한 한 마리의 마우스에서는 최소 플라크 관련 신경교증이 확인되었다.

[0239] 팽대후부피질에 대한 도 4에 도시된 화상 분석은, 성상세포증에서의 감소는 유의적인 것으로서, SAS 웨პ티드, PBS로 면역화한 군 또는 또는 미처리 군의 경우 6% 이상의 중간값에 대하여 AN1792로 처리한 경우 1.56%의 중간 값을 나타내었다 ($p=0.0017$).

[0240] A β 1-42를 주사한 마우스 및 PBS를 주사한 마우스의 서브세트 유래의 증거는, 플라크 관련 MHC II 면역반응성이 A β 1-42 주사한 마우스에서는 없었음을 제시하는데, 이는 A β 관련 염증 반응의 결핍과 일치하는 결과이다.

[0241] 마우스 뇌의 절편을, MAC-1(세포 표면 단백질)에 대해 특이적인 모노클론 항체(mAb)와 반응시켰다. MAC-1(CD11b)은 인테그린군의 구성원이며, CD18과 이량체로서 존재한다. CD11b/CD18 복합체는 단백구, 대식세포, 호중구 및 천연 킬러 세포에 존재한다(Mak 및 Simard). 뇌의 내재성 MAC-1 반응성 세포 유형은 MAC-1 면역반응된 절편에서 유사한 표현형 행태를 기초로 한 소신경교세포가 될 것 같다. 플라크 관련 MAC-1 표지화는 PBS 대조군과 비교하여 AN1792로 처리된 마우스의 뇌에서 더 낮았으며, 이는 A β 유도된 염증성 반응의 결여와 일치하는 발견이다.

C. 결론

[0243] A β 1-42 주사한 마우스의 뇌에서 A β 플라크의 결핍 및 반응성 뉴런 및 신경교 변화는, 뇌에서 아밀로이드가 전혀 또는 거의 침착되지 않으며, 신경교증 및 신경돌기 병리학 등의 병리학적 결과가 부재함을 제시한다. A β 1-42로 처리한 PDAPP 마우스는 유전자이식하지 않은 대조 마우스와 실질적으로 동일한 병리학 결핍을 나타낸다. 따라서, A β 1-42 주사는 뇌 조직 유래의 인간 A β 의 침착 또는 제거의 예방과, 후속 뉴런 및 염증성 퇴행성 변화의 제거에 매우 효과적이다. 따라서, A β 웨პ티드의 투여는 AD 방지에 있어서 예방적 및 치료적 이익을 보유할 수 있다.

II. 용량 반응 실험

[0245] 5주령의 암컷 스위스 웨스터 마우스 군(군당 6마리)에게 CFA/IFA 내에 제제화된 A β 300, 100, 33, 11, 3.7, 1.2, 0.4 또는 0.13 μ g를 복강 주사하여 면역화시켰다. 3회 투여량을 2주 간격으로 접종하고, 한달 후에 4차 접종을 하였다. 1차 투여량은 CFA로 유화시켰고, 나머지 투여량은 IFA로 유화시켰다. 항체 역가를 측정하기 위해 2차 접종 후를 시작으로 매 접종 후 4 ~ 7일에 채혈하였고, 2차 접종 후 항체 역가를 측정하였다. 항원 11, 33 또는 300 μ g을 접종한 동물인 3군의 서브세트의 동물에서 4차 접종 후 4달 동안 거의 매달 간격으로 추가 채혈을 하여 면역원성 제제의 용량 범위에 걸친 항체 반응의 감쇠를 모니터링하였다. 이 동물들에게 실험 개시 후 7개월에 최종 5차 접종을 하였다. 1주 후 이 동물들을 죽이고 AN1792에 대한 항체 반응을 측정하고 독성 분석을 수행하였다.

[0246] 감쇠하는 용량 반응은 두개의 가장 적은 용량에서는 반응을 나타내지 않으면서 300 ~ 3.7 μ g에서 관찰되었다. 평균 항체 역가는 항원 11 ~ 300 μ g을 3회 접종 후 약 1:1000이었고, 4회 접종 후 1:10,000이었다(도 5 참조).

[0247] 항체 역가는 3차 접종 후 가장 낮은 용량 군을 제외하고 급격히 증가하였고, GMT의 증가 범위는 5 ~ 25배였다. 그 후, 0.4 μ g 수용체에서도 낮은 항체 반응을 검출할 수 있었다. 1.2 및 3.7 μ g 군은 GMT가 약 1000으로 유사한 역가를 나타내었고, 가장 높은 용량의 4개의 투여군은 GMT가 약 25,000이었으며, 단 33 μ g 용량 군은 더 낮은 GMT 3000이었다. 4차 접종 후, 역가는 대부분의 군에서 보다 완만하게 증가하였다. 더 적은 항원 투여량 군인 0.14 ~ 11 μ g 군에 걸쳐 분명한 용량 반응이 나타났는데, 0.14 μ g 수용체의 경우 항체가 검출되지 않았고, 11 μ g의 수용체의 경우 GMT가 36,000이었다. 또한, 11 ~ 300 μ g의 4개의 가장 높은 용량 군에 대한 역가는 밀집되었다. 따라서, 2회의 접종 후, 항체 역가는 0.4 ~ 300 μ g의 넓은 범위에 걸쳐 항원 용량에 의존적이었다. 3차 접종에 의해, 가장 높은 4개의 용량 군의 역가는 모두 유사하였고, 이 역가는 추가 접종 후 일정하게 유지되었다.

[0248] 4차 접종한지 1개월 후, 역가는 접종한지 5일 후에 채혈한 혈액에서 측정한 것보다 300 μ g 군에서 2 ~ 3배 더 높았다(도 6). 이러한 관찰은 피크 병력 항체 반응이 접종 후 5일이 지나서 발생한다는 것을 제시한다. 33 μ g 군에서는 이 시점에 보다 완만한(50%) 증가가 관찰되었다. 300 μ g 투여 군에서는 마지막 투여한지 2개월 후에 GMT가 약 70% 급격히 감소하였다. 또 한달 후, 감소는 45%(100 μ g)로 덜 급격하였고, 33 μ g 및 11 μ g 투여의 경우 약 14%였다. 따라서, 접종을 중단한 후 순환 항체 역가의 감소율은 피크 반응 후 처음 한달은 급격히 감소하

고 그 후로는 보다 완만한 속도로 감소하는 이중양상인 것으로 나타난다.

[0249] 이러한 스위스 웨스터 마우스의 항체 역가 및 반응 역학은 동일한 방식으로 접종한 어린 이형접합성 PDAPP 형질 전환 마우스의 것과 유사하다. 사람에서 면역 반응을 유도하는 데 효과적인 용량은 일반적으로 마우스에서 효과적인 용량과 유사하다.

III. 확립된 AD에 대한 치료적 효능의 스크리닝

[0251] 이 분석은 늙은 동물에서 AD의 신경병리적 특성을 지연 또는 역행시키는 활성에 대해 면역원성 제제를 테스트하도록 고안된 것이다. 아밀로이드 플라크가 PDAPP 마우스의 뇌에 이미 존재하는 임의의 시점에서 42 아미노산 길이의 A β (AN1792)의 접종을 시작하였다.

[0252] 이 실험에 이용된 시간의 경과에 걸쳐, 미처리 PDPA 마우스는 AD에서 관찰되는 것과 유사한 많은 신경퇴화성 변화를 나타내었다(Games 등의 문헌, 상동 및 Johnson-Wood 등의 문헌[Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94, 1550-1555(1997)]). A β 의 아밀로이드 플라크로의 침착물은 비정상적인 축삭 및 수상돌기 성분으로 이루어진, 이영양증 신경돌기라 불리는 퇴행성 신경 반응과 관련이 있다. 이영양증 신경돌기에 의해 둘러싸여지고 이를 포함하는 아밀로이드 침착물은 신경염성 플라크라 불린다. AD 및 PDAPP 마우스 모두에서 이영양증 신경돌기는 독특한 구형 구조를 지니고, APP 및 세포골격 성분을 인식하는 항체의 패널과 면역반응성이며, 초미세구조 레벨에서 복잡한 세포억제 퇴행성 변화를 나타낸다. 이러한 특성으로 인해 PDAPP 뇌에서 신경염 플라크의 형성의 질병 관련적 측정, 선별적 측정 및 재현적 측정이 가능하다. PDAPP 신경염 플라크의 이영양증 신경 성분은 사람 APP에 특이적인 항체(모노클로날 항체 8E5)로 쉽게 시작화할 수 있고, 컴퓨터 보조 화상 분석으로 쉽게 측정할 수 있다. 그러므로, AN1792가 아밀로이드 플라크 형성에 미치는 영향을 측정하는 것 외에도, 본 발명자들은 이 치료가 신경염성 이영양증의 발달에 미치는 영향을 모니터링하였다.

[0253] 성상세포 및 소교세포는 신경 손상 정도에 반응하고 이를 반영하는 비신경 세포이다. CFAP-양성 성상세포 및 MHC II-양성 소교세포는 AD에서 흔히 관찰되며, 이들의 활성화는 질병의 심각도에 따라 증가한다. 따라서, 본 발명자들은 AN1792-처리 마우스에서의 반응성 성상세포증 및 소교세포증의 발달 역시 모니터링하였다.

A. 재료 및 방법

[0255] 찰스 리버에서 입수한 11 ~ 11.5 월령의 이형접합성 암컷 PDAPP 마우스 48마리를 무작위적으로 2개의 군으로 나누었다: 24마리는 프로인트 보조제와 배합한 AN1792 100 μ g을 접종하였고, 나머지 24마리에는 프로인트 보조제와 배합한 PBS를 접종하였다. 마우스가 ~15월령이 되었을 때, AN1792군 및 PBS군을 다시 나누었다. 15월령에 AN1792 및 PBS 처리 동물들의 각 군의 약 반수를 안락사시키고(각각 n=10 및 9), 나머지는 ~18주의 종료 시까지 계속 접종을 하였다(각각 n=9 및 12). 총 8마리의 동물(AN1792 5마리, PBS 3마리)이 실험 도중에 죽었다. 면역화한 동물 외에도, 1연령(n=10), 15월령(n=10) 및 18월령(n=10)된 미처리 PDPA 마우스를 뇌의 A β 및 APP 레벨을 측정하기 위한 ELISA를 이용한 비교에 포함시켰고, 1연령 동물은 면역조직학 분석에도 포함시켰다.

[0256] 다른 언급이 없다면 방법은 실시예 1에서와 동일하였다. AN1792의 UA 웨პ티드 로트 12 및 캘리포니아 웨პ티드 로트 ME0339를 15개월 시점 전의 6회 접종을 위한 항원을 제조하는 데 사용하였다. 캘리포니아 웨პ티드 로트 ME0339 및 ME0439는 15 ~ 18주 사이의 3회의 추가 접종에 사용하였다.

[0257] 면역화를 위해, 200 μ l PBS 중의 AN1792 100 μ g 또는 PBS만을 완전 프로인트 보조제(CFA) 또는 불완전 프로인트 보조제(IFC) 또는 PBS에 1:1(부피:부피)로 유풀어져서 최종 부피가 400 μ l가 되게 하였다. 1차 접종에서는 보조제로 CFA를 사용하였고, 그 후의 4회의 접종은 IFA를 사용하였으며, 마지막 4회의 접종은 보조제를 첨가하지 않고 PBS만을 사용하였다. 총 9회의 접종을 7개월에 걸쳐 수행하였는데, 처음 3회의 접종은 2주 간격으로, 나머지 접종은 4주 간격을 하였다. 처음 6회 접종만을 한 4개월 처리군은 15월령에 안락사시켰다.

B. 결과

1. AN1792 처리가 아밀로이드 침착물에 미치는 영향

[0259] 정량적 화상 분석으로 측정한 AN1792 처리가 피질 아밀로이드 침착물에 미치는 영향의 결과는 도 7에 도시한다. 피질 아밀로이드 침착의 중간값은 미처리 12월령 PDAPP 마우스의 군에서 0.28%였고, 이 값은 실험 시작시 마우스의 플라크 침착을 나타내는 값이었다. 18개월에, 아밀로이드 침착이 PBS 처리 마우스에서 4.87%로 17배 이상 증가한 반면, AN1792 처리 마우스에서는 12월령 미처리군과 15 및 18월령 PBS 처리군보다 현저히 적은 단지 0.01%의 현저히 감소된 아밀로이드 침착을 나타내었다. 아밀로이드 침착은 15개월(96% 감소; p=0.003) 및 18개

월(>99% 감소; p=0.0002) 모두에서 AN1792 수용체에서 현저히 감소되었다.

[0261] 일반적으로, PDAPP 마우스에서의 피질 아밀로이드 침착은 전두 및 역판상 (retrosplenial) 피질(RSC)에서 시작되어 복측-외측 방향으로 진행되어 관자놀이 엔토하닐(entorhinal) 피질(EC)에 영향을 미친다. AN1792가 처음 투여된 시기와 거의 유사한 나이인 12월령 마우스의 EC에서는 아밀로이드가 거의 또는 전혀 발견되지 않았다. AN1792를 4개월 처리한 후, RSC에서의 아밀로이드 침착은 현저히 감소되었으며, EC의 진행성 연루도 AN1792 치료에 의해 완전히 제거되었다. 이후의 관찰은 AN1792가 통상 관자놀이 및 복측 피질을 침투하는 아밀로이드의 진행을 완전히 중단시킴은 물론, RSC 내의 침착을 지연 또는 역행시킬 수 있다는 것을 보여주었다.

[0262] PDAPP 마우스에서의 진행중인 피질 아밀로이드 침착에 미치는 AN1792의 지대한 영향은 7개월간 처리한 18월령 군에서 추가로 증명되었다. AN1792 처리 마우스에서는 피질 아밀로이드가 거의 발견되지 않았는데, 확산 플라크가 완전히 사라졌음을 물론, 밀집된 침착도 감소되었다.

2. AN1792 처리와 관련된 세포 변화 및 형태 변화

[0264] A β -양성 세포의 군집은 일반적으로 아밀로이드 침착을 포함하는 뇌 영역에서 관찰되었다. 놀랍게도, AN1792 수용체로부터의 몇몇 뇌에서, 세포외 피질 아밀로이드 플라크가 거의 또는 전혀 발견되지 않았다. A β 면역반응성의 대부분은 대형 소엽 세포체 또는 응집 세포체를 갖는 세포 내에 포함된 것으로 나타났다. 표현형질을 보면 이들 세포는 활성화된 소교세포 또는 단핵구와 유사하였다. 이들은 활성화된 단핵구 및 소교세포에 의해 발현된 리간드(MHC II 및 CD11b)를 인식하는 항체와 면역반응성이었고, 때로는 혈관의 벽 또는 루멘에 결합되었다. A β 및 MHC II 특이적 항체로 표지된 인접한 절편들의 비교는 이러한 세포들의 유사한 패턴이 두 항체류에 의해 인식됨음을 보여주었다. AN1792 처리된 뇌의 상세한 관찰을 통해 MHC II-양성 세포가 이러한 동물들에 잔류하는 제한된 아밀로이드의 근처로 한정되었음을 알게 되었다. 이용된 고정 조건 하에서, 세포들은 T 세포(CD3, CD3e) 또는 B 세포(CD45RA, CD45RB) 리간드 또는 백혈구 공통 항원(CD45)을 인식하는 항체와 면역반응성을 보이지 않았으나, 단핵구와 교차 반응하는 루코시알린(CD43)을 인식하는 항체와 반응성이었다. 이러한 세포는 PBS 처리 마우스 중에서는 발견되지 않았다.

[0265] PDAPP 마우스는 항상 해마 치상 회(dentate gyrus)의 외부 분자 층 내에 많은 아밀로이드 침착을 발생시킨다. 침착은 관통 경로 내에 독특한 줄무늬, 즉 일반적으로 AD 내에 아밀로이드 플라크를 포함하는 하부영역을 형성한다. PBS 처리 마우스에서의 이러한 침착의 특징적인 양상은 미처리 PDAPP 마우스에서 이전에 규명된 것과 유사하였다. 아밀로이드 침착은 연속 밴드 형태로 확산 및 밀집 플라크 둘다로 이루어졌다. 대조적으로, AN1792 처리 마우스 유래의 많은 뇌에서 이러한 패턴은 급격히 변화되었다. 해마 아밀로이드 침착은 더 이상 확산 아밀로이드를 포함하지 않았고, 밴드 패턴은 완전히 붕괴되었다. 대신에, 항-A β 항체와 반응성인 다수의 이상한 천공 구조가 존재하였고, 이를 중 몇몇은 아밀로이드 포함 혜포인 것으로 나타났다.

[0266] MHC-II 양성 세포는 AN1792 처리 동물의 세포외 아밀로이드 부근에서 종종 관찰되었다. A β -양성 세포와 아밀로이드의 관련성 패턴은 AN1792 처리 마우스로부터의 몇몇 뇌에서 매우 유사하였다. 이러한 단핵구의 분포는 침착된 아밀로이드의 부근으로 한정되었고, A β 플라크가 없는 다른 뇌 영역에는 전혀 존재하지 않았다. MHCII- 및 A β -표지된 절편의 공초점 현미경 관찰은 플라크 물질이 많은 단핵구 내에 포함되어 있다는 것을 보여주었다.

[0267] MHC II 및 MAC I 표지된 절편의 정량적 화상 분석은 PBS 군과 비교하여 AN1792 처리 마우스의 RSC 및 해마에서 증가된 면역반응성을 향한 경향이 있음을 보여주었으며, 해마에서의 MAC I 반응성의 크기에서는 유의성이 있었다.

[0268] 이러한 결과는 플라크 보유 뇌 영역에 아밀로이드의 활성, 세포 매개 제거가 있음을 나타내는 것이다.

3. AN1792가 A β 수준에 미치는 영향: ELISA 측정

(a) 피질 수준

[0269] 미처리 PDAPP 마우스에서, 12개월에 피질 내의 총 A β 의 중간 수준은 1,600 ng/g이었고, 이는 15개월까지 8,700 ng/g으로 증가하였다(표 2). 18개월에, 이 값은 22,000 ng/g이었으며, 실험 진행 동안 10배 이상 증가한 것이다. PBS 처리 동물들은 15개월에 총 A β 가 8,600 ng/g이었고, 이 값은 18개월에 19,000 ng/g으로 증가하였다. 대조적으로, AN1792 처리 동물들은 15개월에 총 A β 가 PBS 접종 군보다 81% 적었다(1,600 ng/g). AN1792와 PBS 군을 비교할 때 18개월에 총 A β (5,200 ng/g)는 현저히 적었으며(p=0.0001), 이는 처리하지 않을 경우 존재하는 A β 의 72% 감소를 나타낸다. A β 42의 피질 수준을 비교할 때, 유사한 결과를 얻었는데, 즉 AN1792 처리군은 월 씬 적은 A β 42를 포함하였으나, 이 경우 AN1792와 PBS 군 사이의 차이는 15개월(p=0.04)과 18개월(p=0.0001),

표2) 둘다에서 현저하였다.

표 2

[0272] 피질 내의 중간 A β 수준(ng/g)

월령	미처리			PBS			AN1792		
	총	A β 42	(n)	총	A β 42	(n)	총	A β 42	(n)
12	1,600	1,300	(10)						
15	8,700	8,300	(10)	8,600	7,200	(9)	1,600	1,300*	(10)
18	22,200	18,500	(10)	19,000	15,900	(12)	5,200**	4,000**	(9)
*p=0.0412									
**P=0.0001									

[0273] (b) 해마 수준

[0274] 미처리 PDAPP 마우스에서, 12월령에서 총 A β 의 중간 해마 수준은 15,000 ng/g이었고, 이는 15개월에 51,000 ng/g으로, 18개월에 81,000 ng/g으로 증가하였다(표 3). 유사하게, PBS 접종한 마우스는 15개월에 40,000 ng/g, 18개월에 65,000 ng/g이었다. AN1792 접종한 동물들은 더 적은 총 A β 42를 나타내었는데, 구체적으로 15개월에 25,000 ng/g, 18개월에 51,000 ng/g이었다. 18개월 AN1792 처리군의 값은 PBS 처리군 값보다 훨씬 더 적었다(p=0.0105; 표 3). 18개월 평가시 A β 42의 측정은 동일한 양상의 결과를 나타내었는데, 즉 AN1792 처리군의 수준이 PBS 군에서보다 훨씬 적었다(각각 39,000 ng/g 대 57,000 ng/g; p=0.002)(표 3).

표 3

[0275] 해마 내의 중간 A β 수준(ng/g)

월령	미처리			PBS			AN1792		
	총	A β 42	(n)	총	A β 42	(n)	총	A β 42	(n)
12	15,500	11,100	(10)						
15	51,500	44,400	(10)	40,100	3,570	(9)	2,450	22,100	(10)
18	80,800	64,200	(10)	65,4000	5,710	(12)	5,090	38,900**	(9)
*p=0.0105									
**P=0.0022									

[0276] (c) 소뇌 수준

[0277] 12월령 미처리 PDAPP 마우스에서, 총 A β 의 중간 뇌 수준은 15 ng/g이었다(표 4). 15개월에, 이 중간값은 28 ng/g으로 증가하였고, 18개월까지 35 ng/g으로 증가하였다. PBS 처리 동물들은 중간 총 A β 수준이 15개월에 21 ng/g, 18개월에 43 ng/g이었다. AN1792 처리 동물들은 15개월에 총 A β 수준이 22 ng/g인 것으로 확인되었고, 이는 대응하는 PBS 군보다 18개월에 총 A β 가 현저히 적은 것이었다(25 ng/g)(p=0.002)(표 4).

표 4

[0278] 소뇌의 중간 A β 수준(ng/g)

월령	미처리		PBS		AN1792	
	총 A β	(n)	총 A β	(n)	총 A β	(n)
12	15.6	(10)				
15	27.7	(10)	20.8	(9)	21.7	(10)
18	35.0	(10)	43.1	(12)	24.8*	(9)
*p=0.0018						

[0279] 4. AN1792 처리가 APP 레벨에 미치는 영향

[0280] APP- α 및 전장 APP 분자 모두 A β 서열의 전부 또는 일부를 포함하기 때문에, AN1792 지령 면역 반응의 형성에 의해 잠재적으로 영향을 받을 수 있다. 지금까지의 연구에서, APP 레벨이 약간 증가하는 것은 PDAPP 마우스에서 신경병리가 증가하는 것이라고 확인된 바 있다. 피질에서, APP- α /FL(전장) 또는 APP- α 레벨은 APP- α 가 PBS 처리군과 비교하였을 때 AN1792 처리군의 경우 18개월 시점에서 19% 감소되었다는 것을 제외하고는 처리에 의해 실질적으로 변화되지 않았다. 18개월 AN1792 처리 APP 값은 12개월 및 15개월 미처리, 및 15개월 PBS 군의 값과 크게 다르지 않았다. 모든 경우에서, APP 값은 PDAPP 마우스에서 일반적으로 관찰되는 범위 내에서 변화되지 않았다.

[0281] 5. AN1792 처리가 신경변성 및 신경교 병리에 미치는 영향

[0282] 신경염 플라크 침착은 PBS 군과 비교하였을 때 AN1792 처리 마우스의 전두 피질의 경우 15월령(84%; p=0.03) 및 18월령(55%; p=0.01)에서 현저히 감소되었다(도 8). 신경염 플라크 침착의 중간값은 15월령 및 18월령 사이에서 PBS 군의 경우 0.32%에서 0.49%로 증가하였다. 이는 AN1792 군에서의 신경염 플라크의 발달이 현저히 감소된 것과는 대조적이었으며, 중간 신경염 플라크 침착값은 15월령 및 18월령 군에서 각각 0.05% 및 0.02%였다.

[0283] AN1792로의 면역화는 내성이 우수한 것으로 나타났고, 반응성 성상세포증 역시 PBS 군과 비교하였을 때 AN1792 처리 마우스의 RSC에서 15월령(56%; p=0.011) 및 18월령(39%; p=0.028) 모두에서 현저히 감소되었다(도 9). PBS 군에서의 성상세포증의 비율의 중간값은 15월령과 18월령 사이에서 4.26%에서 5.21%로 증가하였다. AN1792 처리는 두 시점에서 성상세포증을 각각 1.89% 및 3.2%로 억제하였다. 이는 신경망이 제거 과정에 의해 손상되지 않았음을 제시한다.

[0284] 6. 항체 반응

[0285] 전술한 바와 같이, 11월령의 이형접합성 PDAPP 마우스(N=24)에게 프로인트 보조제와 유화시킨 AN1792 100 μ g을 5회 연속, 0, 2, 4, 8 및 12주에 복강 주사하였고, 6차 접종은 16주에 PBS만으로(프로인트 보조제 사용하지 않음) 수행하였다. 음성 대조군으로서, 24마리의 월령이 같은 동일한 세트의 형질전환 마우스에게 동일한 보조제와 유화시킨 PBS를 동일한 스케줄에 따라 접종하였다. 2차 접종 후를 시작으로 하여 매 접종 후 3 ~ 7일 이내에 채혈을 하였다. AN1792에 대한 항체는 ELISA로 측정하였다. AN1792를 접종한 동물들의 경우, 각각 2차, 3차 및 최종(6차) 접종을 수행한 후의 기하 평균 역가(GMT)는 약 1,900, 7,600 및 45,000이었다. 6차 접종 후 대조군 동물에서는 A β -특이적 항체가 검출되지 않았다.

[0286] 동물들 중 약 반수에게 3달 더 처리하였는데, 약 10, 24 및 27주에 접종하였다. 이들 용량 각각은 프로인트 보조제를 첨가하지 않고 PBS 부형제만으로 투여하였다. 평균 항체 역가는 이 기간에 걸쳐 변화되지 않았다. 사실상, 항체 역가는 5차에서 9차 접종에 걸친 기간에 해당하는 4차에서 8차 채혈 때부터 안정하게 유지되는 것으로 나타났다.

[0287] AN1792 처리 마우스의 혈청에서 검출되는 면역화에 의해 생성된 A β -특이적 항체가 침착된 뇌 아밀로이드와도 연관이 있는지를 결정하기 위해, AN1792- 및 PBS 처리 마우스로부터의 절편들의 1 서브세트를 마우스 IgG에 특이적인 항체와 반응시켰다. PBS 군과는 대조적으로, AN1792 처리된 뇌의 A β 플라크는 내인성 IgG로 코팅되었다. 이 두군에서의 이러한 차이는 15월령 및 18월령 군에서 모두 관찰되었다. 특히 놀라운 것은 이들 마우스에 많은 아밀로이드 침착이 존재함에도 불구하고 PBS 군에서는 표지화되지 않았다는 것이었다. 이러한 결과는 합성 A β 단백질로의 면역화는 아밀로이드 플라크 내의 A β 를 생체내에서 인식하고 이에 결합하는 항체를 생성한다는 것을 보여준다.

[0288] 7. 세포 매개 면역 반응

[0289] 18월령의 AN1792를 접종한 PDAPP 마우스 9마리와 PBS를 접종한 PDAPP 마우스 12마리로부터 9차 접종 후 비장을 제거하였다. 비장세포를 분리하고 A β 40, A β 42, 또는 A β 40-1(역 순서 단백질)의 존재하에 72시간 동안 배양하였다. 미토젠 Con A를 양성 대조군으로 사용하였다. > 1.7 μ M 단백질에서 최적 반응이 얻어졌다. AN1792 처리 마우스 9마리 모두에서 얻은 세포를 A β 1-40 또는 A β 1-42 단백질을 동일한 레벨로 삽입시켜 반응하도록 하여 증식시켰다(도 10, 위쪽 패널). A β 40-1 역행 단백질에 대해서는 반응하지 않았다. 대조군 동물로부터 얻은 세

포들은 A β 단백질 중 어떤 것에도 반응하지 않았다(도 10, 아랫쪽 패널).

[0290] C. 결론

[0291] 이 실험의 결과는 기존의 아밀로이드 침착물을 가공하는 PDAPP 마우스의 AN1792 면역화가 진행성 아밀로이드 침착을 완화 및 방지하고, 늙은 PDAPP 마우스 뇌에서 결과적인 신경병리적 변화를 지연시킨다는 것을 보여준다. AN1792로의 면역화는 일반적으로 아밀로이드중에 굴복하는 구조에서의 아밀로이드 발달을 실질적으로 중단시켰다. 따라서, A β 웹티드의 접종은 AD의 치료에 치료적 이점을 제공한다.

[0292] IV. A β 단편들의 스크리닝

[0293] 유효 반응을 부여하는 에피토프를 결정하기 위해, 9 ~ 11월령의 PDAPP 마우스 100마리에게 9종의 상이한 APP 및 A β 영역을 접종하였다. 9종의 상이한 면역원과 1종의 대조군을 전술한 바와 같이 복강주사하였다. 면역원은 4개의 사람 A β 웹티드 접합체 1-12, 13-28, 32-42, 1-5(이들 모두는 시스테인 링크를 매개로 양 항-마우스 IgG에 결합된 것임), APP 폴리웹티드 아미노산 592-695, 응집된 사람 A β 1-40 및 응집된 사람 A β 25-35 및 응집된 설치류 A β 42였다. 응집된 A β 42 및 PBS는 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다. 처리군 당 10마리의 마우스를 사용하였다. 역가는 전술한 바와 같이 모니터링하였고, 접종 4개월 후반부에 마우스를 안락사시켰다. 조직화학적 분석, A β 레벨 분석 및 독성 분석은 사후에 측정하였다.

[0294] A. 재료 및 방법

[0295] 1. 면역원의 제조

[0296] 커플링된 A β 웹티드의 제조: 4개의 사람 A β 웹티드 접합체(아미노산 잔기 1-5, 1-12, 13-28 및 32-42, 각각 양 항-마우스 IgG에 접합됨)를 가교제 설포-EMCS를 이용하여 A β 웹티드에 부가된 인공 시스테인을 통해 커플링시켜서 제조하였다. A β 웹티드 유도체는 아래의 최종 아미노산 서열로 합성하였다. 각 경우, 삽입된 시스테인 잔기의 위치는 밑줄로 표시하였다. A β 13-28 웹티드 유도체 역시 표시한 바와 같이 카복실 말단 시스테인 앞에 두개의 글리신 잔기가 첨가되었다.

[0297] A β 1-12 웹티드 NH2-DAEFRHDSGYEV-COOH (서열 번호 72)

[0298] A β 1-5 웹티드 NH2-DAEFRC-COOH (서열 번호 73)

[0299] A β 33-42 웹티드 NH2-C-아미노-헵타논산-GLMVGGVIA-COOH (서열 번호 74)

[0300] A β 13-28 웹티드 Ac-NH-HHQKLVFFAEDVGSNKGGC-COOH (서열 번호 75)

[0301] 커플링 반응을 준비하기 위해, 양 항-마우스 IgG(잭슨 이뮤노리서치 래보리토리즈) 10 mg을 10 mM 브산나트륨 완충액(pH 8.5)에 대해 밤새 투석시켰다. 그 후, 투석된 항체를 아미콘 센트리프렙 튜브를 이용하여 2 mL의 부피로 농축시켰다. 10 mg의 설포-EMCS[N(ε-말레이미도큐프로일옥시)숙신이미드](몰리큘러 사이언시즈 컴퍼니)를 1 mL의 탈이온수에 용해시켰다. 40배 몰 과량의 설포-EMCS를 양 항-마우스 IgG에 교반하면서 적가한 다음, 이 용액을 10분간 추가 교반하였다. 활성화된 양 항-마우스 IgG를 0.1 M NaPO₄, 5 mM EDTA, pH 6.5으로 평형화시킨 10 mL의 젤 여과 컬럼(피어스 프레스토 컬럼, 피어스 케미칼스 제품)을 통과시키면서 정제하고 완충액 교환을 하였다. 280 nm에서의 흡광도로 확인한 항체를 포함하는 분획을 모아서 OD당 1.4 mg을 흡광 계수로 이용하여 약 1 mg/mL의 농도로 희석시켰다. 40배 몰 과량의 A β 웹티드를 10 mM NaPO₄(pH 8.0) 20 mL에 용해시켰으며, 단 A β 33-42 웹티드의 경우는 10 mg을 DMSO 0.5 mL에 먼저 용해시킨 다음, 10 mM NaPO₄ 완충액으로 20 mL이 되게 희석시켰다. 웹티드 용액은 각각 활성화된 양 항-마우스 IgG 10 mL에 첨가하고, 실온에서 4시간 동안 진탕시켰다. 이렇게 얻은 접합체를 아미콘 센트리프렙 튜브를 이용하여 10 mL 미만의 최종 부피로 농축시킨 다음, 완충액을 교환하고 자유 웹티드를 제거하기 위해 PBS에 대해 투석시켰다. 멸균을 위해 접합체를 0.22 μm 구경의 필터에 통과시킨 다음, 1 mg 분획으로 분배하고 -20°C에서 동결시켜 보관하였다. 접합체의 농도는 BCA 단백질 분석(피어스 케미칼스)을 이용하고, 표준 곡선용으로 말 IgG를 이용하여 측정하였다. 접합은 활성화된 양 항-마우스 IgG의 분자량에 의해 접합된 웹티드의 분자량 증가로 기록하였다. A β 1-5 양 항-마우스 접합체는 두가지의 접합체 풀이었고, 나머지는 단일 제제에 유래된 것이었다.

[0302] 2. 응집된 A β 웹티드의 제조

[0303] -20°C에서 방습 보관하였던 동결건조 분말로부터 각 주사제 세트를 제조하기 위해 사람 1-40(AN1528; 캘리포니아 웹티드즈 인코포레이티드, 로트 ME0541), 사람 1-42(AN1792; 캘리포니아 웹티드즈 인코포레이티드, 로트

ME0339 및 ME0439), 사람 25-35 및 설치류 1-42(캘리포니아 펩티드즈 인코포레이티드, 로트 ME0218) 펩티드를 새로이 가용화시켰다. 이러한 목적을 위해, 펩티드 2 mg을 탈이온수 0.9 ml에 첨가하고, 이 혼합물을 진탕시켜서 비교적 균일한 용액 또는 혼탁액을 형성하였다. 4개 중에서, AN1528이 이 단계에서 유일한 가용성 펩티드였다. 그 다음, 10 x PBS(1 x PBS: 0.15 N NaCl, 0.01 M 인산나트륨, pH 7.5) 100 μ l를 AN1528이 침전되기 시작하는 시점에 첨가하였다. 이 혼탁액을 다시 진탕시켜서 그 다음날 사용을 위해 37°C에서 밤새 항온처리하였다.

[0304] pBx6 단백질의 제조: 100개의 아미노산 박테리오파아지 MS-2 폴리머라아제 N-말단 리더 서열과 그 뒤의 APP의 아미노산 592-695(β APP)로 구성된 융합 단백질 pBx6을 암호화하는 발현 플라스미드를 Oltersdorf 등의 문헌 [J.Biol.Chem. 265, 4492-4497(1990)]에 기술된 대로 구성하였다. 이 플라스미드를 E.콜리로 형질감염시키고, 프로모터를 유도시킨 후 단백질을 발현시켰다. 박테리아를 8M 우레아에서 용해시키고, pBx6를 예비 SDS PAGE로 부분 정제하였다. pBx6을 포함하는 분획은 토끼 항-pBx 폴리클로널 항체를 이용한 웨스턴 블롯으로 확인한다음, 이를 모아서 아미콘 센트리프렙 듀브를 이용하여 농축시키고, PBS에 대해 투석시켰다. 코마시 블루로 염색한 SDS PAGE로 평가한 제제의 순도는 약 5 ~ 10%였다.

B. 결과 및 고찰

1. 실험 디자인

9 ~ 11월령의 이형접합성 PDAPP 형질전환 마우스 수컷 및 암컷 100마리를 찰스 리버 래보러토리 및 타코닉 래보러토리에서 입수하였다. 마우스를 10 군으로 나누어서 프로인트 보조제와 배합한 상이한 영역의 A β 또는 APP를 접종하였다. 군 내의 동물들이 성별, 월령, 혈통 및 입수원이 가능한 한 가깝게 일치하도록 분포시켰다. 면역원은 각각 양 항-마우스 IgG에 접합시킨 사람 서열 1-5, 1-12, 13-28 및 33-42 유래의 4가지 A β 펩티드; 4종의 융집된 A β 펩티드, 사람 1-40(AN1528), 사람 1-42(AN1792), 사람 25-35 및 설치류 1-42; 및 APP 아미노산 잔기 592-695를 포함하는 pBx6으로 표시되는 융합 폴리펩티드를 포함하였다. 10번째 군은 대조군으로서 보조제와 배합된 PBS를 접종하였다.

[0308] 매회 접종에서, 200 μ l PBS 중의 각 A β 펩티드 100 μ g 또는 동일 부피의 PBS 중의 APP 유도체 pBx6 200 μ g 또는 PBS 단독을 최종 부피 400 μ l로 하여 완전 프로인트 보조제(CFA)와 1:1(부피:부피)로 유화시켜서 1차 접종한 다음, 불완전 프로인트 보조제(IFA) 중의 동일한 양의 면역원으로 4회 추가 접종하고, 마지막에는 PBS를 접종하였다. 처음 3회 동안은 2주 간격으로, 그 후로는 매달 복강 주사하였다. 2차 접종 후를 시작으로 하여 매 접종 후 4 ~ 7일 경에 채혈을 하여 항체 역가를 측정하였다. 마지막 접종한지 약 1주 후에 동물들을 안락사시켰다.

2. 뇌에서의 A β 및 APP 레벨

[0310] 다양한 A β 펩티드 또는 APP 유도체로 약 4개월간 면역화한 후, 염수 판류된 동물로부터 뇌를 꺼내었다. 한쪽 반구는 면역조직학 분석을 위해 준비하였고, 나머지 반쪽은 A β 및 APP 레벨의 정량을 위해 사용하였다. 다양한 형태의 베타 아밀로이드 펩티드 및 아밀로이드 전구체 단백질의 농도를 측정하기 위해, 반구를 절단하고, 5 M 구 아니딘에서 해마, 피질 및 소뇌 영역의 균질물을 제조하였다. 이들을 희석시키고, ELISA 포맷에서 알려진 농도의 A β 펩티드 또는 APP의 표준물의 연속 희석물과 비교하여 아밀로이드 또는 APP 레벨을 정량하였다.

[0311] PBS를 접종한 대조군의 경우 총 A β 의 중간 농도는 해마에서 피질보다 5.8배 더 높았다(해마 조직의 중간값 24,318 ng/g, 피질의 중간값 4,221 ng/g). 대조군의 소뇌의 중간 레벨(23.4 ng/g)은 해마에서보다 약 1,000배 낮았다. 이러한 레벨은 이 월령의 이형접합성 PDAPP 형질전환 마우스에 대해 이전에 본 발명자들이 보고한 것과 유사한 것이다(상기 Johnson-Woods 등의 문헌(1997)).

[0312] 피질의 경우, 처리군의 한 서브세트는 대조군의 것과 상당히 다른 평균 총 A β 및 A β 1-42 레벨을 나타냈는데 ($p<0.05$), 처리군 동물에게는 도 11에서 도시하는 바와 같이 AN1792, 설치류 A β 1-42 또는 A β 1-펩티드 접합체를 투여하였다. 이러한 처리군의 경우 대조군과 비교하여 총 A β 의 중간 레벨이 각각 75%, 79% 및 61% 감소되었다. 임의의 군에 대한 A β -특이적 항체 역가와 뇌의 피질 영역 내의 A β 레벨 사이의 특징적인 연관성이 없었다.

[0313] 해마에서, AN1792 처리와 관련된 총 A β 의 중간 감소(46%, $p=0.0543$)는 피질에서 관찰되는 것(75%, $p=0.0021$) 만큼 크지 않았다. 그러나, 감소의 정도는 피질에서보다 해마에서 훨씬 더 컸으며, 해마에서의 순수한 감소는 조직(g)당 11,186 ng이고, 피질에서는 조직(g)당 3,171 ng이었다. 설치류 A β 1-42 또는 A β 1-5를 투여받은 동물 군의 경우, 총 A β 레벨의 중간값은 각각 36% 및 26% 감소되었다. 그러나, 작은 규모의 군 크기 및 두 군내의 동물들 사이의 아밀로이드 펩티드 레벨의 높은 변화성을 감안할 때, 이러한 감소는 유의적인 것이 아니었다. 해마에서 A β 1-42의 레벨을 측정할 때, 처리에 의해 발생된 감소 중 어떠한 것도 유의적인 수준이 아니었다. 따라서, 피질 내의 더 적은 A β 침착으로 인해, 이 영역 내의 변화는 치료 효과의 보다 민감한 척도가 된다.

ELISA로 측정한 피질 내의 A β 레벨의 변화는 면역조직학 분석 결과와 유사하였으나 동일하지는 않았다(하기 참조).

[0314] 총 A β 는 AD 병리에 의해 일반적으로 가장 적게 영향을 받는 영역인 소뇌에서도 측정하였다. 다양한 A β 웨티드 또는 APP 유도체를 접종한 임의의 군의 중간 A β 농도 중 어떤 것도 뇌의 이 영역에서의 대조군의 농도와는 상이하였다. 이러한 결과는 A β 의 비병리성 레벨이 치료에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 제시한다.

[0315] 처리군 및 대조군 마우스의 피질 및 소뇌에서도 APP 농도를 ELISA를 이용하여 측정하였다. 2종의 상이한 APP 분석을 이용하였다. APP- α /FL이라고 불리는 제1 분석은 APP-알파(α , A β 서열 내에서 절단되는 APP의 분비형)와 APP의 전장형(FL) 둘다를 인식하는 반면, 제2 분석은 APP- α 만을 인식한다. 처리군의 서브세트에서의 처리와 관련된 A β 감소와는 대조적으로, APP 레벨은 대조군 동물과 비교하였을 때 모든 처리군에서 변화되지 않았다. 이러한 결과는 A β 웨티드로의 면역화가 APP를 고갈시키지 않고, 오히려 치료 효과가 A β 에 특이적임을 나타낸다.

[0316] 요약하면, 총 A β 및 A β 1-42 레벨은 AN1792, 설치류 A β 1-42 또는 A β 1-5 접합체를 이용한 처리에 의해 현저히 감소되었다. 해마에서, 총 A β 는 AN1792 처리에 의해서만 감소되었다. 해마, 피질 또는 소뇌 영역에서는 A β 또는 APP 레벨의 다른 어떠한 처리 관련 변화도 유의적이지 않았다.

2. 면역조직학 분석

[0318] 6개의 군의 한 서브세트로부터 면역조직학 분석을 위해 뇌를 준비하였는데, 이 군들은 A β 웨티드 접합체 A β 1-5, A β 1-12 및 A β 13-28을 접종한 3개의 군; 전장 A β 응집물 AN1792 및 AN1528을 접종한 2개의 군 및 PBS 처리 대조군이었다. 이러한 군들에서 얻은 뇌 절편의 아밀로이드 침착의 화상 분석 결과는 도 12에 도시되어 있다. 대조군 동물과 비교하였을 때 3개의 처리군 동물의 피질 영역에는 아밀로이드 침착의 감소가 유의적이었다. 아밀로이드 침착의 가장 큰 감소는 AN1792를 투여받은 군에서 관찰되었고, 이때 중간값은 97% 감소되었다 ($p=0.001$). AN1528 (95%, $p=0.005$)과 A β 1-5 웨티드 접합체(67%, $p=0.02$)를 처리한 동물의 경우에도 유의적인 감소가 나타났다.

[0319] ELISA로 총 A β 또는 A β 1-42를 정량하여 얻은 결과와 화상 분석에 의한 아밀로이드 침착은 어느 정도 상이하였다. AN1528을 처리한 것은 정량적 화상 분석으로 측정하였을 때 피질 아밀로이드 침착 레벨에 심각한 영향을 미쳤지만, ELISA로 측정하였을 때 같은 영역에서 총 A β 의 농도에 영향을 주지 않았다. 이러한 두 결과간의 차이는 분석의 특수성에 기인한 것으로 생각된다. 화상 분석은 플라크로 응집된 불용성 A β 만을 측정한다. 대조적으로, ELISA는 A β 의 모든 형태, 즉 불용성 및 가용성, 단량체 및 응집체 모두를 측정한다. 질병 병리가 A β 의 불용성 플라크 관련형과 연관이 있는 것으로 생각되기 때문에, 화상 분석 기술은 치료 효과를 나타내는 데 보다 큰 민감도를 가질 수 있다. ELISA는 보다 빠르고 보다 쉬운 분석이므로, 스크리닝 목적용으로 아주 유용하다. 뿐만 아니라, A β 의 처리 관련 감소는 총 A β 보다 플라크 관련형의 경우 더 크다.

[0320] 처리된 동물들에서 면역화에 의해 생성된 A β -특이적 항체가 침착된 뇌 아밀로이드와 반응하는지를 측정하기 위해, 처리된 동물과 대조군 마우스로부터의 절편들의 한 서브세트와 마우스 IgG에 특이적인 항체를 반응시켰다. PBS 군과는 대조적으로, A β 함유 플라크는 A β 웨티드 접합체 A β 1-5, A β 1-12 및 A β 13-28; 및 전장 A β 응집체 AN1792 및 AN1528로 접종한 동물의 경우 내인성 IgG로 코팅되었다. 다른 A β 웨티드 또는 APP 웨티드 pBx6로 면역화시킨 동물로부터 얻은 뇌로는 이 분석을 수행하지 않았다.

3. 항체 역가의 측정

[0322] 2차 접종 후를 시작으로 하여 매 접종 후 4 ~ 7일 경에 마우스로부터 총 5회 채혈을 하였다. 항체 역가는 A β 1-42로 코팅된 플라스틱 멀티 웰 플레이트를 이용한 샌드위치 ELISA를 이용하여 A β 1-42 결합 항체로서 측정하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 피크 항체 역가는 가장 높은 역가의 AN1792 특이적 항체를 생성시킨 4개의 면역원성 조성물의 경우 4차 접종 후에 생성되었다: AN1792(피크 GMT: 94,647), AN1528(피크 GMT: 88,231), A β 1-12 접합체(피크 GMT: 47,216) 및 설치류 A β 1-42(피크 GMT: 10,766). 이러한 군들의 경우 역가는 5차 및 6차 접종 후에 다소 감소하였다. 남아있는 5회 용량의 면역원의 경우, 5차 또는 6차 접종 후에 피크 역가에 도달하였고, 이들은 4개의 가장 높은 역가 군의 것보다 훨씬 적은 정도였다: A β 1-5 접합체(피크 GMT: 2,356), pBx6(피크 GMT: 1,986), A β 13-28 접합체(피크 GMT: 1,183), A β 33-42 접합체(피크 GMT: 658), A β 25-35(피크 GMT: 125). 항체 역가는 면역원의 한 서브세트에 대해 동일한 ELISA 샌드위치 포맷을 이용하여 상동성 웨티드에 대해서도 측정하였으며, 이들 군은 A β 1-5, A β 13-28, A β 25-35, A β 33-42 또는 설치류 A β 1-42를 접종한 것이었다. 이러한 역가는 설치류 A β 1-42 면역원의 경우 상동성 면역원에 대한 항체 역가가 약 2배 이상인 것을 제외하고는 A β 1-42에 대해 측정한 것과 동일하였다. 개개의 동물들의 AN1792 특이적 항체 역가의 크기 또는 처리군의

평균값은 피질내의 A β 의 감소로서 측정된 효능과는 관련성이 없었다.

4. 림프구증식성 반응

[0323] A β 의존성 림프구증식성 반응은 최종 6차 접종한지 약 1주일 후에 회수한 비장 세포를 이용하여 측정하였다. 새로이 회수한 세포(웰당 105)를 자극을 위해 5 μ M 농도의 A β 1-40의 존재하에 5일간 배양하였다. 10개의 군 중 7개의 군의 서브세트로부터 얻은 세포는 또한 역행 펩티드 A β 40-1의 존재하에 배양하였다. 양성 대조군으로서, 또 다른 세포를 T 세포 미토젠인 PHA와 배양하였고, 음성 대조군으로서 펩티드를 추가하지 않은 세포를 배양하였다.

[0325] 대부분의 동물로부터 얻은 림프는 PHA에 반응하여 증식하였다. A β 40-1 역행 펩티드에 대한 유의적인 반응은 없었다. 더 큰 응집형 A β 펩티드, AN1792, 설치류 A β 1-42 및 AN1528을 접종한 동물로부터 얻은 세포는 AN1792의 수용체에서 가장 큰 cpm으로 A β 1-40으로 자극할 때, 강력히 증식하였다. A β 1-12 접합체, A β 13-28 접합체 및 A β 25-35를 접종한 각 군 중 1마리는 A β 1-40에 반응하여 증식하였다. A β 1-5 접합체, A β 33-42 접합체, pBx6 또는 PBS를 투여받은 나머지 군들에는 A β 자극 반응을 나타내는 동물이 없었다. 이러한 결과는 하기 표 5에 요약한다.

표 5

면역원	접합체	A β 아미노산	반응하는 동물
A β 1-5	유	5-mer	0/7
A β 1-12	유	12-mer	1/8
A β 13-28	유	16-mer	1/9
A β 25-35		11-mer	1/9
A β 33-42	유	10-mer	0/10
A β 1-40		40-mer	5/8
A β 1-42		42-mer	9/9
rA β 1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

[0327] 이러한 결과는 AN1792 및 AN1528이 CD4+ 표현형과 가장 유사한 강력한 T 세포 반응을 자극한다는 것을 나타낸다. A β 1-5를 접종한 동물에서의 A β -특이적 T 세포의 부재는 더 짧은 펩티드가 때로는 더 적은 효율로 작용한다고 할지라도 CD4+ T 세포에 의해 인식되는 펩티드 에피토프가 통상적으로 약 15 아미노산 길이이므로 놀라운 것이 아니다. 따라서, 4개의 접합체 펩티드의 경우 헬퍼 T 세포 에피토프의 대부분은 A β 영역이 아니라 IgG 접합체 파트너에 위치하는 것으로 보인다. 이러한 가정은 이러한 처리군 각각의 동물들에 대한 매우 낮은 증식성 반응 발생율에 의해 지지된다. A β 1-5 접합체는 A β 특이적 T 세포가 분명히 없어도 뇌의 A β 레벨을 상당히 감소시키면서 효과적이기 때문에, 이러한 펩티드를 이용한 면역화에 의해 유도된 주요 이펙터 면역 반응은 항체인 것으로 보인다.

[0328] T-세포의 부족 및 A β 잔기의 모든 부분을 포함하는 APP 아미노산 592-695를 포함하는 융합 단백질 pBx6으로부터의 낮은 항체 반응은 이러한 특수한 제제의 낮은 면역원성에 의한 것일 수 있다. A β 25-35 응집물의 낮은 면역원성은 펩티드가 너무 작아서 항체 반응의 유도를 돋기 위한 우수한 T 세포 에피토프를 포함할 수 없기 때문인 것으로 생각된다. 이 펩티드가 캐리어 단백질에 접합될 경우, 이것의 면역원성이 더 커질 수 있을 것이다.

V. 수동적 보호를 위한 폴리클로널 항체의 제조

[0330] 비형질전환 마우스 125마리에게 A β 1-42 100 μ g과 CFA/IFA 보조제를 접종하고 4 ~ 5개월 경과 후 안락사시켰다. 면역화된 마우스에서 혈액을 채취하였다. 다른 혈액 성분으로부터 IgG를 분리하였다. 면역원에 특이적인 항체는 친화성 크로마토그래피를 통해 부분적으로 정제하였다. 마우스당 평균 약 0.5 ~ 1 mg의 면역원 특이적 항체를 얻었고, 이는 총 60 ~ 120 mg이었다.

VI. A β 에 대한 항체를 이용한 수동 면역화

[0332] 7 ~ 9월령의 PDAPP 마우스 군 각각에 후술하는 바와 같이 PBS 중의 폴리클로널 항 A β 또는 특이적 항 A β 모노클로널 0.5 mg을 주사하였다. 모든 항체 제제는 내독소 레벨이 낮도록 정제하였다. A β 의 단편 또는 더 긴 형태

를 마우스에 주사하고, 하이브리도마를 제조하고, A β 의 다른 중첩 단편에 결합하지 않고 A β 의 원하는 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 위한 하이브리도마를 스크리닝함으로써 일정 단편에 대한 모노클로널 항체를 제조 할 수 있다.

표 6

[0333]

항체	에피토프
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
마우스 폴리클로널 항-사람 A β 42	항-응집형 A β 42

[0334]

필요에 따라 4개월에 걸쳐 마우스에게 복강 주사하여 ELISA에 의해 측정된 순환 항체 농도가 A β 42 또는 다른 면역원에 대해 ELISA에 의해 정의된 1/1000보다 큰 역가를 유지하게 하였다. 역가는 전술한 바와 같이 모니터링 하였고, 접종 6개월 후반부에 안락사시켰다. 면역조직학 분석, A β 레벨 분석 및 독성 테스트는 사후에 수행하였다. 군 당 10마리를 이용하였다. 수동 면역화의 추가 실험은 하기 실시예 XI 및 XII에서 기술한다.

[0335]

VII. 상이한 보조제의 비교

[0336]

이 실시예는 면역 반응을 자극하는 CFA, 명반, 수중유 유화액 및 MPL의 능력을 비교한 것이다.

[0337]

A. 재료 및 방법

[0338]

1. 실험 디자인

[0339]

엘름 힐에서 입수한 6주령의 하틀리 종 기니 피그 암컷 100마리를 10군으로 나누어 다양한 보조제와 배합한 AN1792 또는 이의 팔미토일화된 유도체로 면역화시켰다. 7개의 군에는 a) PBS, b) 프로인트 보조제, c) MPL, d) 스쿠알렌, e) MPL/스쿠알렌, f) 저용량의 명반, 또는 g) 고용량의 명반과 배합된 AN1792(다른 언급이 없다면 33 μ g)를 주사하였다. 2개의 군에는 a) PBS 또는 b) 스쿠알렌과 배합된 AN1792의 팔미토일화된 유도체(33 μ g)을 주사하였다. 마지막 10번째 군에는 항원이나 부가적인 보조제없이 PBS만을 주사하였다. 프로인트 보조제를 주사한 군의 경우, 1차 투여량은 CFA로 유화시키고, 나머지 4회 투여량은 IFA로 유화시켰다. 항원은 모든 군에 대해 33 μ g의 용량으로 투여하였으며, 단 고용량 명반 군은 AN1792 300 μ g을 투여하였다. 주사는 CFA/IFA의 경우 복강 주사하였고, 다른 모든 군의 경우 좌우 측면의 뒷다리 사두근에 근육 주사하였다. 처음 3회 투여는 2주 간격으로 하였고, 그 후 한달 간격으로 2회 접종하였다. 2차 접종 후를 시작으로 하여 매 접종 후 6 ~ 7일에 채혈하여 항체 역가를 측정하였다.

[0340]

2. 면역원의 제조

[0341]

2 mg의 A β 42(캘리포니아 웨티드, 로트 ME0339)를 0.9 ml의 탈이온수에 첨가하고, 이 혼합물이 비교적 균일한 혼탁액을 형성하도록 진탕하였다. 여기에 10 x PBS(1 x PBS, 0.15 M NaCl, 0.01 M 인산나트륨, pH 7.5)의 분취량 100 μ l를 첨가하였다. 이 혼탁액을 다시 진탕하고 그 다음날 사용을 위해 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 사용하지 않은 A β 1-42는 동결건조 분말 형태로 -20°C에 방습제와 함께 보관하였다.

[0342]

AN1792의 팔미토일화된 유도체는 디메틸 포름아미드에 용해된 팔미틴산무수물을 AN1792의 아미노 말단 잔기에 결합시킨 다음, 불화수소산을 처리하여 수지로부터 초기 웨티드를 제거하여 제조하였다.

[0343]

완전 프로인트 보조제(CFA)를 포함하는 투여 제제(2군)를 제조하기 위해, 1차 접종을 위해서는 PBS 200 μ l중의 AN1792 33 μ g을 최종 부피 400 μ l가 되게 CFA와 1:1(부피:부피)로 유화시켰다. 후속 접종의 경우, 불완전 프로인트 보조제(IFА)로 유사하게 유화시켰다.

[0344]

5군 및 8군의 경우 MPL을 포함하는 투여 제제를 제조하기 위해, 동결건조된 분말(리비 이뮤노캡 리서치, 인코포레이티드, 해밀顿, MT)을 0.2% 수성 트리에틸아민에 첨가하여 최종 농도가 1 mg/ml이 되게 하고 진탕하였다. 이 혼합물을 65 ~ 70°C에서 30초간 가열하여 약간 불투명한 균일한 마이셀 혼탁액이 되게 하였다. 이 용액은 각 주사제 세트마다 새로 제조하였다. 5군의 각 주사제의 경우, 16.5 μ l PBS 중의 AN1792 33 μ g, MPL(50 μ l) 50 μ g 및 PBS 162 μ l를 사용하기 바로 직전에 봉규산튜브에서 혼합하였다.

[0345] 적은 수중유 혼탁액을 포함하는 투여 제제를 제조하기 위해, PBS 중의 AN1792를 PBS 중의 5% 스쿠알렌, 0.5% Tween 80, 0.5% Span 85에 첨가하여 최종 단일 투여량 농도가 250 μl 중에 33 μg AN1792가 되게 하였다(6군). 이 혼합물을 두개의 챔버로 된 핸드-헬드 고정 장치에 통과시켜서 혼미경으로 관찰할 때 유화액 소적의 직경이 1.0 μm 직경의 표준 라텍스 비드와 거의 같게 보일 때까지 15 ~ 20회 유화시켰다. 이렇게 얻은 혼탁액은 유백광을 내는 우유빛 백색이었다. 유화액은 매 일련의 주사시마다 새로 제조하였다. 8군의 경우, 0.2% 트리에틸아민 중의 MPL을 전술한 바와 같이 유화를 위해 스쿠알렌 및 세제 혼합물에 용량당 50 μg 의 농도로 첨가하였다. 팔미토일 유도체(7군)의 경우, 팔미토일-NH-A β 1-42 용량당 33 μg 을 스쿠알렌에 첨가하고 진탕하였다. 그 후 Tween 80 및 Span 85를 진탕하면서 첨가하였다. 이 혼합물을 PBS에 첨가하여 최종 농도가 5% 스쿠알렌, 0.5% Tween 80, 0.5% Span 85가 되게 하였고, 이 혼합물을 전술한 바와 같이 유화시켰다.

[0346] 명반을 포함하는 투여 제제(9군 및 10군)를 제조하기 위해, PBS 중의 AN1792를 알히드로겔(수산화알루미늄 겔, 애큐리트, 웨스트베리, NY)에 첨가하여 최종 투여량 부피 250 μl 중의 명반 5 mg 당 AN1792의 농도가 33 μg (저용량, 9군) 또는 300 μg (고용량, 10군)이 되게 하였다. 이 혼탁액은 실온에서 4시간 동안 가볍게 혼합하였다.

3. 항체 역가의 측정

[0348] 2차 접종 후를 시작으로 하여 접종한지 6 ~ 7일 경에 기니 피그로부터 총 4회 채혈하였다. A β 42에 대한 항체 역가는 전반적인 재료 및 방법에서 기술한 대로 ELISA에 의해 측정하였다.

4. 조직 준비

[0350] 약 14주 후, 모든 기니 피그에 CO_2 를 투여하여 안락사시켰다. 뇌척수액을 수집하고 뇌를 꺼내어 3개의 뇌 영역(해마, 피질 및 소뇌)을 절개하고 이를 ELISA를 이용하여 총 A β 단백질의 농도를 측정하는 데 사용하였다.

B. 결과

1. 항체 반응

[0353] 접종 후 AN1792에 대한 항체 반응으로서 측정하였을 때 여러 보조제의 효능의 범위가 다양하였다. 도 14에서 도시하는 바와 같이, AN1792를 PBS 중에서 접종하였을 때, 2차 또는 3차 접종 후에 항체가 검출되지 않았고, 4차 및 5차 접종시 기하 평균 역가(GMT)가 약 45에 불과한 무시할 수 있을 정도의 반응이 검출되었다. 수중유 유화액은 3차 접종 후에 적당한 역가를 유도하였고(GMT 255), 이는 4차 접종 후에 유지되었으며(GMT 301), 5차 접종에서는 감소하였다(GMT 54). 명반에 결합된 AN1792 300 μg 에 대해서는 분명한 항원 투여 반응이 나타났으며, 이는 모든 시점에서 33 μg 보다 더욱 면역원성이 커졌다. 4차 접종 후 항체 반응의 피크에서, 2가지 투여량에서의 차이는 GMT가 약 1940(33 μg)과 3400(300 μg)으로 43%였다. 33 μg AN1792 + MPL에 대한 항체 반응은 명반에 결합된 거의 10배 높은 용량의 항원(300 μg)에 의해 생성된 정도와 유사하였다. MPL을 수중유 유화액에 첨가하는 것은 단독 보조제로서 MPL을 사용한 것과 비교하여 75% 정도 제제 효능을 감소시켰다. AN1792의 팔미토일화된 유도체는 PBS 중에서 투여될 때 완전히 비면역원성이었고, 수중유 유화액 중에서 투여되었을 때 3차 및 4차 채혈의 경우 GMT 340 및 105로 적당한 역가를 나타내었다. 가장 높은 항체 역가는 프로인트 보조제와 함께 투여하였을 때 나타났으며, 피크 GMT가 약 87,000으로, 이 값은 그 다음의 두개의 가장 강력한 제제인 MPL과 고용량 AN1792/명반의 GMT보다 거의 30배 높은 값이었다.

[0354] 이 실험에서 확인된 가장 유력한 보조제는 MPL과 명반이었다. 이를 두개 중에서, MPL이 보다 바람직한데, MPL의 경우 명반에 의해 얻어지는 동일한 항체 반응을 생성하기 위해 요구되는 항체의 용량이 10배 더 적기 때문이다. 반응은 항원의 용량 및/또는 보조제의 용량을 증가시키고, 접종 스케줄을 최적화시킴으로써 증가시킬 수 있다. 수중유 유화액은 AN1792에 대해 매우 약한 보조제였고, 수중유 유화액을 MPL 보조제에 첨가하면 MPL 단독의 고유의 보조제 활성을 감소시켰다.

2. 뇌에서의 A β 레벨

[0356] 약 14주에 기니 피그를 짚어 마취시키고, 뇌척수액(CSF)를 꺼내고, 군들의 한 서브세트의 동물로부터 뇌를 절개하였는데, 이 군들은 프로인트 보조제 접종군(2군), MPL 접종군(5군), 고용량 명반 접종군, AN1792 300 μg 접종군(10군) 및 PBS 접종 대조군(3군)이었다. A β 웹티드 레벨을 측정하기 위해, 한개의 반구를 절개하고, 5 M 구 아니딘 중의 해마, 피질 및 소뇌 영역의 균질물을 제조하였다. 이들을 희석하고, ELISA 포맷에서 알려진 농도의 A β 표준 단백질의 연속 희석물과 비교하여 정량하였다. 이러한 제제에 의해 유도되는 A β 에 대한 항체 반응은 광범위하였지만, 해마, 피질 및 소뇌의 A β 단백질 레벨은 4군 모두에서 매우 유사하였다. 평균 A β 레벨은 해마에서 조직(g)당 약 25 ng, 피질에서 21 ng/g, 그리고 소뇌에서 12 ng/g이었다. 따라서, 이러한 동물들 중 일부

에서 거의 3개월 동안의 A β 에 대한 높은 순환 항체 역가의 존재는 이들의뇌에서의 총 A β 레벨을 변화시키지 않았다. CSF에서의 A β 의 레벨은 군들 사이에서 역시 매우 유사하였다. 내인성 A β 에 AN1792 면역화가 큰 효과를 미치지 못하는 것은 면역 반응이 A β 의 병리 형성에 집중된다는 것을 나타낸다.

[0357] VIII. 마우스에서의 상이한 보조제에 대한 면역 반응

[0358] 이 실험에서는 6주령 암컷 스위스 웨스터 마우스를 군당 10 ~ 13마리로 하여 사용하였다. 0, 14, 28, 60, 90 및 20일째 투여 부피를 200 μ l로 하여 피하 주사하였다. 2차 접종 후를 시작으로 하여 매 접종 7일 후에 이들 동물로부터 채혈하여 ELISA를 이용하여 항체 역가를 분석하였다. 각 군의 처리법은 표 7에 요약한다.

표 7

실험 디자인					
군	N ^a	보조제 ^b	1회 투여량	항원	1회 투여량 (μ g)
1	10	MPL	12.5 μ g	AN1792	33
2	10	MPL	25 μ g	AN1792	33
3	10	MPL	50 μ g	AN1792	33
4	13	MPL	125 μ g	AN1792	33
5	13	MPL	50 μ g	AN1792	150
6	13	MPL	50 μ g	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		무	
9	10	유화된 스쿠알렌	5%	AN1792	33
10	10	혼합된 스쿠알렌	5%	AN1792	33
11	10	명반	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + 명반	50 μ g/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5 μ g	AN1792	33
14	10	QS-21	10 μ g	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21 + MPL	25 μ g/50 μ g	AN1792	33
19	13	QS-21 + 명반	25 μ g/2 mg	AN1792	33

[0359]

[0360] 주:

[0361] ^a 실험 시작시의 각 군의 마우스의 수

[0362] ^b 보조제를 표시한 것이다. 이러한 모든 제제에 사용된 완충액은 PBS였다. 8군의 경우, 보조제와 항원을 사용하지 않았다.

[0363] 각 군의 A β 42에 대한 항체의 ELISA 역가는 하기 표 8에 제시하였다.

표 8

기하적 평균 항체 역가					
체혈한 주					
치료군	2.9	5.0	8.7	12.9	16.7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

[0364]

[0365] 상기 표는 4군, 5군 및 18군의 경우 가장 높은 역가가 얻어졌고, 이 경우 보조제는 125 μg MPL, 50 μg MPL 및 QS-21 + MPL이었다.

[0366]

IX. 상이한 보조제의 치료 효능

[0367]

[0367] 치료 효능 실험은 사람에 사용하기에 적합한 1 세트의 보조제를 이용하여 PDAPP 형질전환 마우스에서 수행하여, 이들이 A β 에 대한 면역 반응을 강화시키는지와 뇌에서의 아밀로이드 침착의 면역 매개 제거를 유도하는지를 측정하였다.

[0368]

[0368] 7.5 ~ 8.5 월령의 이형접합성 PDAPP 형질전환 마우스 수컷 및 암컷 180마리를 찰스 리버 래보러토리즈에서 입수하였다. 마우스를 군당 15 ~ 23마리가 되게 하여 9군으로 나누어서, 다양한 보조제와 배합된 AN1792 또는 AN1528을 접종하였다. 동물들을 군 내에서 성별, 월령, 가계가 가능한 가깝게 되도록 분류하였다. 보조제는 명반, MPL 및 QS-21을 포함하였고, 각각 두 항원과 배합하였으며, AN1792만은 프로인트 보조제(FA)와 배합하였다. 또 다른 군은 PBS 완충액 중에 제조된 AN1792 + 방부제 티메로살을 보조제 없이 접종하였다. 9번째 군에는 음성 대조군으로서 PBS만을 접종하였다.

[0369]

[0369] **옹집된 A β 웹티드의 제조:** 사람 A β 1-40(AN1528; 캘리포니아 웹티드즈 인코포레이티드, 나파, CA; 로트 ME0541) 및 사람 A β 1-42(AN1792; 캘리포니아 웹티드즈 인코포레이티드, 로트 ME0439) 웹티드를 동결건조된 분말로부터 각 주사제 세트의 제조를 위해 새로 가용화시키고 이를 -20°C에 방습 보관하였다. 이 목적을 위해, 웹티드 2 mg을 탈이온수 0.9 mL에 첨가하고, 이 혼합물을 진탕하여 비교적 균일한 용액 또는 혼탁액을 형성하였다. AN1528은 AN1792와는 달리 이 단계에서 가용성이었다. 그 다음, 10 x PBS(1 x PBS: 0.15 M NaCl, 0.01 M 인산나트륨, pH 7.5)의 100 μl 분취량을 첨가하였고, 이때 AN1528은 침전되기 시작하였다. 혼탁액을 다시 진탕하여 그 다음 날 사용하기 위해 37°C에서 밤새 항온처리하였다.

[0370]

[0370] 명반을 포함하는 투여 제제(1군 및 5군)를 제조하기 위해, PBS 중의 A 웹티드를 알히드로겔(2% 수산화알루미늄겔, 사지언트 인코포레이티드, 클리프톤, NJ)에 첨가하여 농도가 명반 1 mg당 A 웹티드 100 μg 이 되게 하였다. 10 x PBS를 최종 용량 부피가 1 x PBS 중의 200 μl 이 되도록 첨가하였다. 10 x PBS를 첨가하여 최종 투여량 부피가 1 x PBS 중의 200 μl 가 되게 하였다. 그 다음, 이 혼탁액을 주사하기 전에 실온에서 약 4시간 동안 부드럽게 혼합하였다.

[0371]

[0371] MPL을 포함하는 투여 제제(2군 및 6군)를 제조하기 위해, 동결건조된 분말(리비 이뮤노캡 리서치, 인코포레이티드, 해밀頓, MT; 로트 67039-E0896B)을 0.2% 수성 트리에틸아민에 첨가하여 최종 농도가 1 mg/mL이 되게 하고

진탕하였다. 이 혼합물을 65 ~ 70°C에서 30초간 가열하여 약간 불투명한 균일한 마이셀 혼탁액이 되게 하였다. 이 용액은 4°C에서 보관하였다. 각 주사제 세트의 경우, 50 μl PBS 중의 용량당 웨티드 100 μg , 용량(50 μl)당 MPL 50 μg 및 용량당 PBS 100 μl 를 사용하기 바로 직전에 봉규산 튜브에서 혼합하였다.

[0372] QS-21을 포함하는 투여 제제(3군 및 7군)를 제조하기 위해, 동결건조 분말(아퀼리아, 프라밍엄, MA; 로트 A7018R)을 PBS(pH 6.6 ~ 6.7)에 첨가하여 최종 농도가 1 mg/ml이 되게 하고 진탕하였다. 이 용액을 -20°C에서 보관하였다. 각 주사액 세트의 경우, 용량당 PBS 50 μl 중의 웨티드 100 μg , PBS 25 μl 중의 용량당 QS-21 25 μg 및 용량당 PBS 125 μl 를 사용하기 바로 직전에 봉규산 튜브에서 혼합하였다.

[0373] 프로인트 보조제를 포함하는 투여 제제(4군)를 제조하기 위해, 200 μl PBS 중의 AN1792 100 μg 을 완전 프로인트 보조제(CFA)와 1:1(부피:부피)로 유화시켜서 1차 접종용으로 최종 부피가 400 μl 가 되게 하였다. 후속 접종의 경우, 불완전 프로인트 보조제(IFA)로 유사하게 유화시켰다. 보조제 명반, MPL 또는 QS-21을 포함하는 제제의 경우, AN1792 또는 AN1528의 용량당 100 μg 을 최종 부피 200 μl PBS 중의 명반(용량당 1 mg), MPL(용량당 50 μg) 또는 QS-21(용량당 25 μg)와 배합하여 어깨선 사이의 등에 피하 주사하였다. FA를 투여한 군의 경우, AN1792 100 μg 을 최종 부피 400 μl 가 되도록 완전 프로인트 보조제(CFA)와 1:1(부피:부피)로 유화시켜서 1차 접종의 경우 복강 주사하였고, 이어서 후속 5회 접종의 경우 불완전 프로인트 보조제(IFA) 중의 동일한 양의 면역원으로 추가 접종하였다. 보조제 없이 AN1792를 접종한 군의 경우, AN1792 10 μg 을 최종 부피 50 μl PBS 중의 5 μg 티메로살과 배합하여 피하 주사하였다. 9번째 대조군에는 PBS 200 μl 만을 피하 주사하였다. 처음 3회 투여는 2주 간격으로 하였고, 그 후 한달 간격으로 0, 16, 28, 56, 85 및 112일에 접종하였다. 2차 접종 후를 시작으로 하여 매 접종 후 6 ~ 7일에 채혈하여 항체 역가를 측정하였다. 마지막 접종하고 약 1주일 후 동물들을 안락사시켰다. 결과는 뇌에서의 A β 및 APP 레벨의 ELISA 분석 및 뇌 절편에서의 아밀로이드 플라크의 존재의 조직면역학적 평가로 측정하였다. 또한, A β 특이적 항체 역가 및 A β 의존적 증식성 및 시토킨 반응을 측정하였다.

[0374] 표 9는 A β 1-42에 대한 가장 높은 항체 역가가 FA 및 AN1792에 의해 유발되었고, 이 역가는 4차 접종 후에 절정(피크 GMT: 75,386)에 도달한 다음, 마지막 6차 접종 후에 59% 감소되었음을 보여준다. AN1792와 MPL에 의해 유발된 피크 평균은 FA로 생성된 것(피크 GMT: 28,867)보다 62% 더 낮았으며, 역시 접종 계획에서 초기에, 즉 3회 접종 후 도달하였고, 이어서 6차 접종 후에 피크 값의 28%로 감소되었다. AN1792와 배합된 QS-21에 의해 생성된 피크 평균 역가는 MPL에서 얻은 것보다 약 5배 낮았다(GMT: 1,511). 또한, 반응의 속도는 더 느렸는데, 이는 추가 접종이 피크 반응에 도달하는 데 요구되기 때문이다. 명반 결합된 AN1792에 의해 형성된 역가는 QS-21에 의해 얻어진 역가보다 조금 더 높았으며, 반응 속도는 보다 빨랐다. 티메로살과 함께 PBS 중에서 전달된 AN1792의 경우, 빈도 및 역가의 크기가 PBS만을 사용한 경우보다 약간 더 커졌다. MPL 및 AN1528에 의해 생성된 피크 역가는 AN1792에 의해 생성된 역가보다 약 9배 더 낮았다. 명반 결합된 AN1528은 동물들의 일부에서만 생성된 낮은 역가를 나타내면서 면역원성이 매우 낮았다. PBS만을 접종한 대조군 등물에서는 항체 반응이 관찰되지 않았다.

표 9

기하적 평균 항체 역가 ^a					
체 혈 한 주					
처리	3.3	5.0	9.0	13.0	17.0
명반/ AN1792	102 (12/21) ^b	1,081 (17/20)	2,366 (21/21)	1,083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28,867 (21/21)	1,1242 (21/21)	5,665 (20/20)	8,204 (20/20)
QS-21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1,511 (17/18)	1,188 (14/18)
CFA/ AN1792	10,076 (15/15)	61,279 (15/15)	75,386 (15/15)	41,628 (15/15)	30,574 (15/15)
명반/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2,591 (20/21)	1,653 (21/21)	1,156 (20/20)	3,099 (20/20)
QS-21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS + 티메로살	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)

[0375]

주:

[0377]

^a A β 1-42에 대해 측정한 기하 평균 항체 역가

[0378]

^b 군당 반응하는 동물의 수

[0379]

다양한 보조제, 또는 티메로살과 함께 AN1792 또는 AN1528을 처리하는 것이 12월령 마우스의 피질 아밀로이드 침착에 미치는 영향을 ELISA로 측정한 결과는 도 15에 도시한다. PBS 대조군 PDAPP 마우스에서는, 12개월에 피질 내의 총 A β 의 중간 레벨은 1,817 ng/g이었다. AN1792 + CFA/IFA, AN1792 + 명반, AN1792 + MPL 및 QS-21 + AN1792를 처리한 마우스에서 현저히 감소된 레벨의 A β 가 관찰되었다. AN1792 + CFA/IFA의 경우에만 감소가 통계적으로 유의적인 수준에 도달하였다 ($p<0.05$). 그러나, 실시예 I 및 III에 나타낸 바와 같이, A β 레벨을 감소시키는 데 있어서의 면역화의 효과는 15월령 및 18월령의 마우스에서 실질적으로 더 증가되었다. 따라서, 적어도 AN1792 + 명반, AN1792 + MPL 및 AN1792 + QS-21 조성물은 더 늙은 마우스의 처리에 있어서 통계적으로 유의적인 수준에 도달할 것으로 추측된다. 대조적으로, AN1792 + 방부제 티메로살은 PBS 처리 마우스에서와 거의 동일한 수준의 A β 평균 레벨을 나타내었다. A β 42의 피질 레벨을 비교하였을 때 유사한 결과를 얻었다. PBS 대조군에서의 A β 42의 중간 레벨은 1624 ng/g이었다. 현저히 감소된 중간 레벨인 403, 1149, 620 및 714는 각각 AN1792 + CFA/IFA, AN1792 + 명반, AN1792 + MPL 및 AN1792 + QS-21로 처리한 마우스에서 관찰되었고, AN1792 CFA/IFA 처리군의 경우 감소가 통계적으로 유의적인 수준($p=0.05$)에 도달하였다. AN1792 티메로살 처리 마우스에서의 중간 레벨은 1619 ng/g A β 42이었다.

[0380]

또 다른 치료 보조제/면역원 효능 실험은 9 ~ 10.5 월령의 암컷 및 수컷의 이형접합성 PDAPP 형질전환 마우스에서 수행하였다. 실험 기간은 처리군당 29 ~ 40마리로 하여 25주였으므로, 종료시에는 동물들이 15 ~ 16.5

월령이 되었다. 처리군은 하기 표 10에서 확인할 수 있다.

표 10

	보조제	면역원	희석 완충액	투여
1군	MPL-SE	AN1792-GCS(75 µg)	PBS	SC(250 µl)
2군	ISA51	AN1792-GCS(75 µg)	PBS	IP(400 µl)
3군	QS21	AN1792-GCS(75 µg)	PBS	SC(250 µl)
4군	QS21 단축	AN1792-GCS(75 µg)	PBS	SC(250 µl)
5군	PBS	-----	-----	SC(250 µl)

[0382] 표 10 약어: MAP - 다중 항원성 웨პ티드; TT - 파상풍 특소이드 t-세포 에피토프(830-844); SQ - 피하; IP - 복강; PBS - 포스페이트 완충 염수; ISA-51은 IFA와 유사한 시판되는 보조제이다; GCS는 글리신/시트레이트/수크로오스 제제, MPL-SE는 안정화된 물과 오일의 유화액 중의 MPL이다.

[0383] 4군, QS21/AN1792 단축 스케줄 군을 제외한 모든 처리군의 면역화 스케줄은 동일하였다. 마우스에 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24주에 주사하고, 3, 5, 9, 13, 17, 21 및 25주에 채혈하였다. 25주의 실험 기간 동안 1군 및 2군에는 8회 주사하였고, 3군에는 4회 주사하였다. 4군인 QS21/AN1792 단축 스케줄 군에는 0, 2, 4 및 8주에만 주사하였다. 이 군은 실험 나머지 기간 동안 주사하지 않았지만, 역가 감쇠를 추적하기 위해 남은 실험 기간에 동일한 채혈 스케줄에 따라 채혈을 하였다. 각각 3군 및 5군인 QS21/AN1792 및 PBS 군은 이 실험을 위한 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다.

[0384] 역가는 항 Aβ 항체 역가 분석으로 측정하였다.

[0385] 1군: MPL-SE/AN1792 군, 9주에 피크 기하 평균 역가(GMT)가 17,100으로 상승하였고, 25주에 GMT가 10,000으로 떨어졌다. 초기에는, MPL-SE 역가가 QS21/AN1792 대조군(4군)보다 다소 더 높은 속도로 증가하였다.

[0386] 2군: ISA 51/AN1792 군, 실험 마지막 9주 동안 GMT가 100,000 이상에 도달하면서 실험 전반에 걸쳐 높은 역가를 생성하였다.

[0387] 3군: QS21/AN1792 대조군, 17주에 피크 역가인 GMT 16,000에 도달하였다. 그 후 역가는 다음 8주에 걸쳐 감소하여 GMT 8,700으로 종결되었다. 이 군 내의 1마리는 실험 전체 기간에 걸쳐 역가가 상승되지 않았다.

[0388] 4군: QS21/AN1792 단축 주사 스케줄 군, 최종 접종 후 13주, 5주에 피크 역가 7,300에 도달하였다. 그 후 마지막 채혈(25주)에 GMT는 2,100이었다. 대조군에서와 마찬가지로, 1마리는 검출가능한 역가로 상승시키지 못하였고, 또 다른 동물은 감쇠 기간 후반부에 이르러 모든 역가를 상실하였다.

[0389] 5군: PBS 단독 군, 역가를 나타내지 않았다.

[0390] 피질 Aβ 레벨을 평가하기 위해, 총 Aβ 및 Aβ 1-42를 ELISA로 측정하였다. 요약하면, 1개의 뇌 반구를 피질, 해마 및 소뇌 조직으로 절개한 다음, 5 M 구아닌 완충액에서 균질화하여 뇌 Aβ에 대해 분석하였다. 피질 총 Aβ 및 Aβ 42 결과는 유사하다. 맨-휘트니(Mann-Whitney) 통계 분석을 수행하여 Aβ의 유의적인 변화를 나타내는 p 값 0.05로 하여 군 사이의 유의성을 측정하였다.

[0391] 모든 처리군은 PBS 대조군과 비교하여 총 Aβ 레벨이 현저히 감소되었다(표 11 참조). MPL-SE/AN1792 군은 Aβ에 가장 큰 변화를 나타내었으며, 이는 다른 처리군보다 현저히 향상된 것이다. QS21/AN1792 단축 군은 모두 8회의 접종을 한 QS21 대조군과 Aβ의 전체적인 변화가 유사하였다. ISA 51/AN1792 군에서의 Aβ 레벨은 CFA/IFA:MAP(Aβ 1-7) 군과 비교하였을 때 유사하게 감소되었다.

표 11

피질 A 레벨

	PBS	MPL-SE	ISA	QS-21	QS-21(4)
평균 (ng/조직(g))	7,335	1,236	3,026	2,389	2,996

범위 (ng/조직(g))	550-18,358	70-3,977	23-9,777	210-11,167	24-16,834
p <	---	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
N	38	29	36	34	40

[0393] 결과적으로, AN1792와 배합된 MPL-SE, ISA-51 및 QS21 보조제는 피질 내의 A β 침착을 지연시키는 충분한 면역 반응을 유의적으로 유도하는 데 효과적이다.

X. 독성 분석

[0395] 실시예 2, 3 및 7에 기술된 실험의 종반부에 조직병리 검사를 위해 조직을 회수하였다. 또한, 실시예 3 및 7의 최종 혈액 시료에 대해 혈액학 분석 및 임상 화학 분석을 수행하였다. 뇌, 폐, 임파구, 위장관, 간, 신장, 부신 및 생식선을 비롯한 주요 기관의 대부분을 평가하였다. 실험 동물에서 산발성 병변이 관찰되었지만, AN1792 처리 동물과 미처리 동물 사이에서 손상된 조직이나 병변 심각성에서 분명한 차이가 없었다. PBS 처리 또는 미처리 동물과 비교하여 AN-1528 면역화 동물에서 특이한 조직병리적 병변이 관찰되지 않았다. 실시예 7에서 보조제 군과 PBS 처리 동물 사이의 임상적 화학 프로파일에서도 차이가 없었다. 실시예 7에서 PBS 처리 동물에 비해 AN1792와 프로인트 보조제를 처리한 동물들 사이에서 혈액학 매개변수 중 몇가지에서 현저한 증가가 있었지만, 이러한 종류의 효과는 프로인트 보조제 처리와 수반되는 복막염으로부터 예상할 수 있는 것이며, AN1792 처리로부터 발생한 어떠한 불리한 영향도 나타내지 않는다. 독성 평가의 일부가 아니라도, PDAPP 마우스 뇌 병리는 효능 중점의 일부로서 널리 관찰되었다. 치료와 관련된 뇌 형태에 미치는 불리한 영향의 신호는 실험 중 어디에서 나타나지 않았다. 이러한 결과는 AN1792 처리가 내성이 우수하며, 적어도 실질적으로 부작용이 없음을 나타낸다.

XI. 항 A β 항체를 이용한 치료적 처리

[0397] 이 실시예는 이형접합성 형질전환 마우스의 뇌에서의 A β 의 축적을 억제하는 다양한 모노클로널 및 폴리클로널 항체의 능력을 테스트한 것이다.

1. 실험 디자인

[0399] 8.5 ~ 10.5 월령의 60마리의 수컷 및 암컷 이형접합성 PDAPP 형질전환 마우스를 찰스 리버 래보리토리에서 입수하였다. 마우스를 6군으로 분류하여 A β 에 대한 다양한 항체로 처리하였다. 동물들을 군 내에서 성별, 월령, 가계 및 입수원이 가능한 가깝게 되도록 분포시켰다. 표 10에 나타나 있듯이, 항체는 4개의 쥐과 A β -특이적 모노클로널 항체, 2H3(A β 잔기 1-12에 대한 것), 10D5(A β 잔기 1-16에 대한 것), 266(A β 잔기 13-28에 대한 것으로, 응집형 AN1792가 아니라 단량체 AN1792에 결합함), 21F12(A β 잔기 33-42에 대한 것)를 포함하였다. 5번 군은 A β -특이적 폴리클로널 항체 분획(응집형 AN1792를 접종하여 얻은 것)로 처리하였다. 음성 대조군에는 항체 없이 희석제 PBS만을 접종하였다.

[0400] 모노클로널 항체는 약 10 mg/kg의 용량으로 주사하였다(마우스의 체중은 50 g으로 가정). 평균 매 7일마다 복강 주사로 접종하여 항 A β 역자가 1000 이상을 유지하도록 하였다. mAb266의 경우 분석에서 캡쳐 항원으로 사용된 응집형 AN1792에 잘 결합하지 못하기 때문에 더 낮은 역자가 측정되었지만, 동일한 접종 스케줄을 이 군에 유지하였다. 모노클로널 항체 2H3을 투여받은 군은 항체가 생체내에서 너무 빨리 제거되므로 처음 3주 내에 중단하였다. 항체 역가의 측정을 위해 매 접종 전에 동물들로부터 채혈을 하였다. 처리는 총 196일 동안 6달에 걸쳐 계속하였다. 마지막 접종한지 1주일 후에 동물들을 안락사시켰다.

표 12

실험 디자인				
처리군	Na	처리 항체	항체 특이성	항체 이소타입
1	9	무(PBS 단독)	NA ^b	NA
2	10	폴리클로널	A β 1-42	혼합
3	0	mAb ^c 2H3	A1 β -12	IgG1
4	8	mAb10D5	A1 β -16	IgG1

5	6	mAb266	A β 13-28	IgG1
6	8	mAb21F12	A β 33-42	IgG2 ^a

[0402] 주

[0403] a. 실험 종료시의 군 내의 마우스 수. 모든 군은 군당 10마리로 시작하였다.

[0404] b. NA: 적용되지 않음.

[0405] c. mAb: 모노클로널 항체

[0406] 2. 재료 및 방법

[0407] a. 항체의 제조

두 군의 동물들로부터 채취한 혈액으로부터 항 A β 폴리클로널 항체를 준비하였다. 제1군은 6 ~ 8주령의 암컷 스위스 웨스터 마우스 100마리로 구성되었다. 이 동물들을 0, 15 및 29일에 CFA/IFA와 배합된 AN1792 100 μ g을 접종하였다. 4차 접종은 1/2 용량의 AN1792를 36일 째 접종하였다. 42일에 동물들을 희생시킨 후 방혈하여 혈청을 얻었고, 이 혈청을 모아서 총 64 ml이 되게 하였다. 제2군은 6 ~ 9주령의 사람 APP 유전자에 대한 비형질전환 마우스를 제외하면 PDAPP 마우스와 동유전형질의 암컷 마우스 24마리로 구성되었다. 이 동물들에게 0, 14, 28 및 56일 째 CFA/IFA와 배합된 AN1792 100 μ g으로 접종하였다. 이 동물들 역시 63일 째 희생시키고 방혈하여 혈청을 준비하고 총 14 ml이 되게 모았다. 2 로트의 혈청을 모았다. 항체 분획은 50% 포화 황산암모늄을 이용한 2종의 연속 침전으로 정제하였다. 최종 침전물은 PBS에 대해 투석하고 내독소에 대해 테스트하였다. 내독소의 레벨은 1 EU/mg 미만이었다.

[0409] 복수액으로부터 항 A β 모노클로널 항체를 준비하였다. 빙냉 복수액에 먼저 농축 나트륨 텍스트란 설페이트를 첨가하여 얼음 위에서 교반함으로써 지질을 제거하여 최종 농도가 0.238%가 되게 하였다. 농축된 CaCl₂를 10,000 x g에서 원심분리하고, 펠렛을 버렸다. 이 용액을 10,000 x g에서 원심분리하고 펠렛을 제거하였다. 동부피의 포화 황산암모늄을 적가하면서 상청액을 얼음 위에서 교반하였다. 이 용액을 다시 10,000 x g에서 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 펠렛을 재현탁시켜서 20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.5에 대해 투석하였다. 이 분획을 파마시아 FPLC 세파로오스 Q 컬럼에 적용하여 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 중의 0.4 M에서 0.275M NaCl의 역 농도 구배로 용출시켰다.

[0410] 280 nm에서의 흡광도로 항체 피크를 확인하고 적절한 분획을 모았다. 정제된 항체 제제를 BCA 방법을 이용하여 단백질 농도를 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 순도를 측정하여 특징을 규명하였다. 이 풀 역시 내독소에 대해 테스트하였다. 내독소의 레벨은 1 EU/mg 미만이었다. 100 미만의 역가는 임의로 역가 값 25를 할당하였다.

[0411] 3. 뇌에서의 A β 및 APP 레벨

[0412] 다양한 항 A β 항체 제제를 이용한 약 6개월의 처리 후에 염수 관류를 하고 동물로부터 뇌를 제거하였다. 한쪽 반구는 면역조직학 분석을 위해 준비하였고, 다른쪽은 A β 및 APP 레벨의 정량을 위해 사용하였다. 다양한 형태의 베타 아밀로이드 웨პ티드 및 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 농도를 측정하기 위해, 반구를 전개하고 해마, 피질 및 소뇌 영역의 균질물을 5 M 구아니딘 중에서 제조하였다. 이들을 연속 희석시키고, ELISA 포맷에서 알려진 농도의 A β 웨პ티드 또는 APP의 표준물의 연속 희석물과 비교하여 아밀로이드 웨პ티드 또는 APP 레벨을 정량하였다.

[0413] ELISA에 의해 측정한 피질 및 해마의 균질물 내의 총 A β 및 A β 1-12의 레벨, 소뇌에서의 총 A β 의 레벨은 표 11, 12 및 13에 각각 제시되어 있다. PBS를 접종한 대조군의 경우 총 A β 의 중간 농도는 해마에서 피질보다 3.6 배 더 높았다(해마 조직의 중간값 63,389 ng/g, 피질의 중간값 17,818 ng/g). 대조군의 소뇌의 중간 레벨(30.6 ng/조직(g))은 해마에서보다 약 2,000배 낮았다. 이러한 레벨은 이 월령의 이형접합성 PDAPP 형질전환 마우스에 대해 이전에 본 발명자들이 보고한 것과 유사한 것이다(상기 Johnson-Woods 등의 문헌(1997)).

[0414] 피질의 경우, 한 처리군은 A β 1-42로 측정하였을 때 대조군의 것과 상당히 다른($p<0.05$), 중간 A β 레벨을 나타냈는데, 이러한 동물들은 도 13에서 도시하는 바와 같이 폴리클로널 항 A β 항체를 투여받은 것이었다. A β 1-42의 중간 레벨은 이 처리군의 경우 대조군과 비교하여 65% 감소되었다. A β 1-42의 중간 레벨 역시 한 또 다른

처리군(mAb 10D5를 투여한 동물들)에서 대조군과 비교하여 현저히 55% 감소되었다($p=0.0433$).

표 13

피질								
처리군	N ^a	중간값					평균	
		총 Aβ			Aβ42		총 Aβ	Aβ42
		ELISA 값 ^b	P 값 ^c	변화율(%)	ELISA 값 ^d	P 값	변화율(%)	ELISA 값
PBS	9	17818	NA ^e	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456*
폴리클로널 항-Aβ42	10	6160	0.0055	-65	4892	0.0071	-65	5912+/-4492
mAb 10D5	8	7915	0.1019	-56	6214	0.0433	-55	9695+/-6929
mAb 266	6	9144	0.1255	-49	8481	0.1255	-39	9204+/-9293
mAb 21F12	8	15158	0.2898	-15	13578	0.7003	-2	12481+/-7082
								11005+/-6324

[0416]

주:

[0417]

a. 실험 종반부에서의 군당 동물의 수

[0419]

b. ng/조직(g)

[0420]

c. 맨 휘트니 분석

[0421]

d. NA: 적용되지 않음

[0422]

e. 표준 편차

[0423]

해마에서, 폴리클로널 항 Aβ 항체 처리와 관련된 총 Aβ의 중간 비율 감소(50%, $p=0.0055$)는 피질에서 관찰되는 것(65%)만큼 크지 않았다. 그러나, 감소의 절대적 크기는 피질에서보다 해마에서 거의 3배 더 컸으며, 해마에서의 순수한 감소는 조직(g)당 31,683 ng이었고, 피질에서는 조직(g) 당 11,658 ng이었다. 총 Aβ가 아니라 Aβ, 아밀로이드증이 더 큰 Aβ 형태인 Aβ 1-42의 레벨로서 측정할 경우, 폴리클로널 항체에 의해 이루어지는 감소는 유의적이었다($p=0.0025$). mAbs 10D5 및 266을 처리한 군의 중간 레벨은 각각 33% 및 21% 감소되었다.

표 14

해마								
처리군	N ^a	중간값					평균	
		총 Aβ			Aβ42		총 Aβ	Aβ42
		ELISA 값 ^b	P 값 ^c	변화율(%)	ELISA 값 ^d	P 값	변화율(%)	ELISA 값
PBS	9	63389	NA ^e	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308*
폴리클로널 항-Aβ42	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30058+/-22454
mAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/-18632
mAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/-27304
mAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/-28927
								50305+/-23927

[0424]

주:

[0426]

a. 실험 종반부에서의 군당 동물의 수

[0427]

b. ng/조직(g)

[0428]

c. 맨 휘트니 분석

[0429]

d. NA: 적용되지 않음

[0430] e. 표준 편차

[0431] 총 A β 는 소뇌에서도 측정하였다(표 15). 폴리클로널 항 A β 및 266 항체를 투여한 군에서는 총 A β 의 레벨에 유의적인 감소를 나타내었고(43% 및 46%, 각각 p=0.0033 및 p=0.0184), 10D5를 처리한 군은 유의적인 수준에 가까운 감소를 나타내었다(29%, p=0.0675).

표 15

<u>소뇌</u>					
처리군	N ^a	중간값			평균
		총 A β			
		ELISA 값 ^b	P 값 ^c	변화율(%)	ELISA 값
PBS	9	30.64	NA ^d	NA	40.00+/-31.89 ^e
폴리클로널 항-A β 42	10	17.61	0.0033	-43	18.15+/-4.36
mAb 10D5	8	21.68	0.0675	-29	27.29+/-19.43
mAb 266	6	16.59	0.0184	-46	19.59+/-6.59
mAb 21F12	8	29.80	>0.9999	-3	32.88+/-9.90

[0432]

주:

[0433] a. 실험 종반부에서의 군당 동물의 수

[0434] b. ng/조직(g)

[0435] c. 맨 휘트니 분석

[0436] d. NA: 적용되지 않음

[0437] e. 표준 편차

[0438] 항체 처리군, 대조군, PBS 처리군 마우스에서 얻은 피질 및 소뇌에서도 ELISA를 이용하여 APP 농도를 측정하였다. 2종의 상이한 APP 분석을 이용하였다. APP- α /FL이라고 지칭되는 제1 분석은 APP-알파(α , A β 서열 내에서 절단되는 APP의 분비형)과 APP의 전장형(FL) 둘다를 인식하는 반면, 제2 분석은 APP- α 만을 인식한다. 처리군의 서브세트에서의 처리와 관련된 A β 감소와는 대조적으로, APP 레벨은 대조군 동물과 비교하였을 때 모든 처리군에서 변화되지 않았다. 이러한 결과는 A β 항체로의 면역화가 APP를 고갈시키지 않고, 오히려 A β 를 고갈시켰음을 나타낸다.

[0439] 요약하면, AN1792에 대한 폴리클로널 항체로 처리한 동물에서의 피질, 해마 및 소뇌에서 총 A β 는 현저히 감소되었다. A β 1-42의 아미노 말단 영역, 특히 아미노산 1-16 및 13-28에 대한 모노클로널 항체 역시 더 적은 정도로 유의적인 치료 효과를 나타내었다.

4. 면역조직학 분석

[0440] PBS, 폴리클로널 A β 42, 21F12, 266 및 10D5 처리군의 마우스로부터 얻은 뇌의 서브세트에서의 A β 면역반응성 플라크의 형태를 A β 42를 이용한 표준 면역화 절차를 수행한 이전 실험의 결과 정량적으로 비교하였다.

[0441] 아밀로이드 플라크의 정도와 의견 둘다에서의 가장 큰 변화는 폴리클로널 A β 42 항체를 접종한 동물에서 발생하였다. 아밀로이드 침착, 부식된 플라크 형태 및 세포 매개 A β 면역반응성은 표준 면역 절차에 의해 생성된 효과와 아주 유사하였다. 이러한 관찰은 총 A β 및 A β 42 모두의 현저한 감소가 폴리클로널 A42 항체의 접종에 의해 이루어진다는 ELISA 결과를 지지한다.

[0442] 유사한 정량 평가에서, 10D5 군의 아밀로이드 플라크 역시 세포 매개 A β 면역반응성을 일부 증명하면서 수와 의견에서 감소하였다. 대조군 처리 동물들에 비해, A β 에 대한 폴리클로널 Ig 분획 및 모노클로널 항체(10D5)의

하나는 플라크 침착을 각각 93% 및 81% 감소시켰다($p<0.005$). 21F12는 플라크 침착에 비교적 약한 영향을 미치는 것으로 나타났다. pabA β ₁₋₄₂를 처리한 후 뇌의 현미경 사진은 확산성 침착을 보여주었고, 대조군 처리 동물에 비해 pabA β ₁₋₄ 처리군에서 보다 큰 밀집형 플라크의 많은 부분이 없다는 것을 보여주었다.

[0445] 5. 항체 역가의 측정

각 군에서 무작위적으로 선택한 마우스 3마리의 서브세트를 매 복강 주사 직전에 총 30회로 하여 채혈하였다. 항체 역가는 전반적인 재료 및 방법에서 기술하는 바와 같이 A β 1-42로 코팅된 플라스틱 멀티-웰로 샌드위치 ELISA를 이용하여 A β 1-42 결합 항체로서 측정하였다. 매 채혈에 대한 평균 역가는 각각 폴리클로널 항체 및 모노클로널 10D5 및 21F12에 대해 도 16 ~ 18에 도시한다. 역가는 폴리클로널 항체 제제의 경우 이 기간 동안에 걸쳐 평균이 약 1000 이상이었고, 10D15 및 21F12 처리 동물들의 경우 이 레벨보다 약간 더 높았다.

[0447] 6. 림프구증식성 반응

A β 의존성 림프구증식성 반응은 최종 항체 접종 8일 후 회수한 비장 세포를 이용하여 측정하였다. 새로이 회수한 세포(웰당 10⁵)를 자극을 위해 5 μ M 농도의 A β 1-40의 존재하에 5일간 배양하였다. 양성 대조군으로서, 또 다른 세포를 T 세포 미토젠, PHA와 배양하였고, 음성 대조군으로서 웨პ티드를 추가하지 않고 배양하였다.

다양한 A β 항체로 수동적으로 면역화시킨 늙은 PDAPP 마우스로부터 얻은 비장세포를 AN1792로 시험관내에서 자극하고, 증식 반응 및 시토kin 반응을 측정하였다. 이들 분석의 목적은 수동 면역화가 항체 제시를 용이하게 하여, 이로써 AN1792에 특이적인 T 세포 반응을 개시시키는지를 결정하는 것이었다. 항 A β 항체로 수동적으로 면역화시킨 어떠한 마우스에서도 AN1792 특이적 증식 반응 또는 시토kin 반응이 관찰되지 않았다.

[0450] XII. 수동 면역화의 추가 실험

[0451] 제2 실험에서, 10D5의 처리를 반복하고, 2종의 또 다른 항 A β 항체인 모노클로널 3D6(A β ₁₋₅) 및 16C1(A β ₁₋₅)를 테스트하였다. 대조군에는 PBS 또는 무관한 이소타입 쌍의 항체(TM2a)를 투여하였다. 마우스는 이전 실험에서보다 더 늙었으며(11.5 ~ 12 월령 이형접합성), 그 외의 나머지 실험 디자인은 동일하였다. 다시 한번, 처리 6주 후, 10D5는 PBS 또는 이소타입 매치 항체 대조군에 비해 80% 이상 플라크 침착이 감소되었다($p=0.003$). A β , 3D6에 대한 다른 항체 중 하나는 동일하게 효력을 나타내어서 86% 감소시켰다($p=0.003$). 대조적으로, 웨პ티드, 16C11에 대한 제3 항체는 플라크 침착에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 유사한 결과가 A β 42 ELISA 측정에서도 얻어졌다. 이러한 결과들은 A β 웨პ티드에 대한 항체 반응이 T 세포 면역의 부재하에 PDAPP 마우스에서의 아밀로이드 침착을 감소시키기에 충분하지만, 모든 항 A β 항체가 효능이 있는 것은 아니라는 것을 나타낸다. A β 의 아미노산 1-5 또는 3-7을 포함하는 에피토프에 대한 항체가 특히 효과적이었다.

[0452] 요약하면, 본 발명자들은 수동적으로 투여한 A β 에 대한 항체가 알츠하이머 질환의 마우스 모델에서 플라크 침착 정도를 감소시켰음을 보여주었다. 적당한 혈청 농도(25 ~ 70 μ g/ml)로 유지할 경우, 항체는 아밀로이드 플라크를 장식하기에 충분한 정도로 CNS에 접근할 수 있었다. CNS로의 항체의 접근은 PDAPP 마우스에서 예반스 블루에 의해 측정하였을 때 혈관 침투성이 증가되지 않았으므로, 혈류-뇌 장벽의 비정상적인 유출에 의한 것이 아니었다. 또한, 고령의 PDAPP 마우스의 뇌 실질에서의 항체 농도는 비형질전환 마우스에서와 동일하였고, 혈청에서의 항체의 농도가 0.1%였다(이소타입에 관계없음).

[0453] XIII: 항체 결합의 모니터링

[0454] A β 에 대한 항체가 CNS 내에서 직접적으로 작용할 수 있는지를 측정하기 위해, 실시예 XII 후반부에 염수 판류된 마우스로부터 꺼낸 뇌로 전신 투여된 항체의 존재에 대해 관찰하였다. 비교정 저온장치 뇌 절편을 마우스 면역글로불린(염소 항-마우스 IgG-Cy3)에 대한 형광 물질에 노출시켰다. 10D5 및 3D6 군의 뇌 내에서의 플라크는 항체로 심하게 장식되었지만, 16C11 군에서는 염색되지 않았다. 플라크 침착의 전체적인 정도를 알기 위해, 각 뇌의 연속 절편을 먼저 항 A β 항체와 면역반응시키고, 그 후 2차 물질과 면역반응시켰다. 전신 투여 후 10D5 및 3D6는 CNS 내의 대부분의 플라크에 접근할 수 있었다. 플라크 침착은 16C11 군과 비교하여 이들 처리군에서 상당히 감소되었다. 이러한 데이터는 전신 투여된 항체가 이들이 아밀로이드 제거를 직접적으로 개시시킬 수 있는 CNS에 침입할 수 있다는 것을 나타낸다. 16C11 역시 플라크에 접근할 수 있으나 결합할 수 없는 것으로 보인다.

[0455] XIV: 아밀로이드 침착에 대한 항체의 활성을 대한 생체외 스크리닝 분석

[0456] 항체가 플라크 제거에 미치는 영향을 조사하기 위해, 본 발명자들은 근원 소교세포 세포를 PDAPP 마우스 또는 사람 AD 뇌의 비교정 저온장치 절편과 배양하는 생체외 분석을 수행하였다. 소교세포 세포는 신생 DBA/2N 마우

스(1 ~ 3 일)의 대뇌 피질로부터 얻었다. 피질을 HBSS⁻(Hanks' Balanced Salt Solution, 시그마)에서 50 µg/ml의 DNaseI(시그마)을 이용하여 기계적으로 분리하였다. 분리된 세포들을 100 µm 세포 스퍼레이너(팰콘)로 여과하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 펠렛을 성장 배지(고농도 포도당 DMEM, 10% FBS, 25 ng/ml rmGM-CSF)에 재현탁시키고, 이 세포들을 T-75 플라스틱 배양 플라스크 당 2 뇌의 밀도로 풀레이팅하였다. 7 ~ 9일 후, 플라스크를 오비탈 진탕기에서 200 rpm으로 37°C에서 2시간 동안 진탕하였다. 세포 혼탁액을 1000 rpm에서 원심분리하고 분석 배지에 재현탁시켰다.

[0457] PDAPP 마우스 또는 사람 AD 뇌(사후 간격 < 3시간)의 10 µm 저온장치 절편을 폴리 리신 코팅된 등근 유리 커버슬립 위에 녹여서 마운팅하고, 24 웨 조직 배양 플레이트의 웨에 배치하였다. 커버슬립을 1% FBS, 글루타민, 폐니실린/스트렙토마이신 및 5 ng/ml rmGM-CSF(R&D)를 포함하는 H-SFM(히브리도마-혈청이 없는 배지, 핍코 BRL)로 구성된 분석 배지로 2회 세정하였다. 대조군 또는 항 Aβ 항체를 1시간 동안 2 x 농도(최종 5 µg/ml)로 첨가하였다. 그 후, 소교 세포를 분석 배지 ml당 0.8×10^6 세포의 밀도로 접종하였다. 배양물을 함습 항온기(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 이상 동안 유지시켰다. 항온처리 후반부에, 배양물을 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 0.1% Triton-X 100으로 침투시켰다. 절편들을 비오티닐화된 3D6으로 염색한 다음, 스트렙타비딘/Cy3 접합체(잭슨 이뮤노리서치)로 염색하였다. 외인성 소교세포 세포는 핵 착색제(DAPI)로 시각화하였다. 배양물은 역상 형광 현미경(니콘, TE300)으로 관찰하였고, SPOT 소프트웨어(다이애그노스틱 인스트러먼츠)를 이용하여 SPOT 디지털 카메라로 현미경 사진을 찍었다. 웨스턴 블롯 분석을 위해서, 배양물을 8M 우레아에서 추출하고, 환원성 트리신 시료 완충액에 1:1로 희석시켜서 16% 트리신 겔(노벡스)에 로딩하였다. 임모빌론에 이전한 후, 블롯을 5 µg/ml의 pabAβ 42에 노출시킨 다음, HRP-접합 항-마우스 항체에 노출시키고 ECL(아머샴)로 발색시켰다.

[0458] 16C11(생체내에서 효능이 없었던 Aβ에 대한 항체 중 하나)의 존재하에 PDAPP 뇌 절편으로 분석을 수행하였을 때, β-아밀로이드 플라크는 손상되지 않은 상태로 보존되었고, 식균작용도 관찰되지 않았다. 이와는 대조적으로, 인접한 절편을 10D5의 존재하에 배양할 경우, 아밀로이드 침착물은 대개 사라졌고, 소교세포 세포는 Aβ를 포함하는 많은 식균작용성 소낭을 보여주었다. AD 뇌 절편에서도 동일한 결과를 얻었다; 10D5는 AD 플라크의 식균작용을 유도한 반면, 16C11은 비효과적이었다. 또한, Aβ에 대한 마우스나 사람 소교세포 세포, 및 마우스, 토끼, 또는 영장류 항체로 분석을 수행하였을 때 유사한 결과를 나타내었다.

[0459] 표 16은 몇 가지 상이한 항체 결합 특이성에 대해 결합 및/또는 식균작용 중 어떤 것이 나타나지는 지에 대해 보여준다. aa 1-7내의 에피토프에 결합하는 항체는 아밀로이드 침착물에 결합하고 이를 제거하는 반면, 아미노산 4-10 내의 에피토프에 결합하는 항체는 아밀로이드 침착물을 제거하지 않고 결합하는 것을 알 수 있다. 잔기 10에 대한 에피토프 C-말단에 결합하는 항체는 아밀로이드 침착물에 결합하지도 않고 이를 제거하지도 않는다.

표 16

에피토프 특이성의 분석

	항체		염색	식균작용
	에피토프	이소타입		
N-말단				
mab				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-6	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	래트 IgG1	+	-
13-28				
18G11	10-18	래트 IgG1	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
C-말단				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
면역 혈청				
토끼(CFA)	1-6		+	+

마우스(CFA)	3-7		+	+
마우스(QS-21)	3-7		+	+
원숭이(QS-21)	1-5		+	+
마우스(MAP1-7)			+	+

[0461] 표 17은 생체외 분석에서의 식균작용을 유도하는 능력과 수동적 전달 실험에서의 생체내 플라크 침착을 감소시키는 능력을 비교하면서 A β 에 대한 여러 항체에 대해 얻은 결과를 보여준다. 16C11 및 21F12가 큰 결합력으로 응집형 합성 A β 웹티드에 결합함에도 불구하고, 이들 항체는 비고정 뇌 절편 내의 β -아밀로이드 플라크와 반응할 수 없었고, 생체외 분석에서 식균작용을 일으키지 않았으며, 생체내에서 효능이 없었다. 10D5, 3D6, 및 A β 에 대한 폴리클로널 항체는 모든 3종의 측정에서 활성을 나타내었다. 22C8 항체는 위치 1 및 7의 아스파르트산이 이소 아스파르트산으로 대체된 천연 A β 의 유사 형태에 보다 강력하게 결합한다. 이러한 결과들은 생체내 효능이 CNS 내의 플라크의 직접적인 항체 매개 제거에 의한 것이고, 생체외 분석이 생체내 효능을 예측할 수 있는 것임을 나타낸다.

[0462] NAC라고 불리는 시뉴클린의 단편에 대한 항체의 제거를 테스트하기 위해 동일한 분석을 이용하였다. 시뉴클린은 아밀로이드 플라크 관련 단백질인 것으로 알려져 있다. NAC에 대한 항체는 전술한 바와 같이 아밀로이드 플라크를 포함하는 뇌 조직 시료, 소교세포와 접촉하였다. 토끼 혈청을 대조군으로 사용하였다. 후속 모니터링은 항체의 제거 활성을 나타내는 플라크의 수와 크기가 현저히 감소되었음을 보여주었다.

표 17

[0463] 생체내 효능을 예측할 수 있는 생체외 분석

항체	이소타입	응집형 A β 에 대한 결합력(pM)	β -아밀로이드 플라크에의 결합	생체외 효능	생체내 효능
모노클로널					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
폴리클로널					
1-42	혼합물	600	+	+	+

[0464] 공초점 현미경을 이용하여 생체외 분석을 수행하는 동안 A β 가 흡수되었는지를 확인하였다. 대조군 항체의 존재하에, 외인성 소교세포는 상기 조직의 공초점 플레인에 잔류하였고, A β 를 포함하는 식균작용성 소낭은 없었으며, 플라크는 절편 내에 무결한 상태로 보존되었다. 10D5의 존재하에, 거의 모든 플라크 물질이 외인성 소교세포 내에 있는 소낭에 포함되었다. 내부화된 웹티드의 운명을 결정하기 위해, 10D5 처리된 배양물을 다양한 시점에서 8 M 우레아로 추출하였고, 웨스턴 블롯 분석으로 관찰하였다. 1시간 시점에, 아직 식균작용은 발생하지 않았을 때, A β 에 대한 폴리클로널 항체의 반응은 진한 4 kD 밴드(A β 웹티드에 해당함)를 나타내었다. A β 면역 반응성은 1일째 감소되었고, 3일에 이르러서는 사라졌다. 따라서, A β 의 항체 매개 식균작용은 A β 의 분해를 유발시킨다.

[0465] 생체외 분석에서의 식균작용이 Fc-매개된 것인지를 결정하기 위해, 항-A β 항체 3D6의 F(ab')2 단편들을 제조하였다. F(ab')2 단편들이 플라크와 반응하기 위한 완전한 능력을 보유할지라도, 이들은 소교세포에 의한 식균작용을 유발시킬 수 없었다. 또한, 전체 항체를 이용하는 식균작용은 쥐과 Fc 수용체(항-CD16/32)에 대한 제제에 의해 차단될 수 있었다. 이러한 데이터는 A β 의 생체내 제거가 Fc-매개 식균작용을 통해 일어난다는 것을 나타낸다.

XV: 항체의 혈액 뇌 장벽의 통과

[0467] 이 실시예에서는 정상 마우스 또는 PDAPP 마우스의 말초 조직에 정맥 주사한 후 뇌에 전달된 항체의 농도를 측

정한다. PDAPP 또는 대조군 정상 마우스를 0.9% NaCl로 관류하였다. 뇌 영역(해마 또는 피질)을 절개하고 급속 동결시켰다. 뇌를 0.1% 트리톤 + 프로테아제 억제제 중에서 균질화하였다. ELISA를 이용하여 추출물 중의 면역 글로불린을 검출하였다. Fab'2 염소 항-마우스 IgG를 캡쳐 시약으로서 RIA 플레이트 위에 코팅하였다. 혈청 또는 뇌 추출물을 1시간 동안 항온처리하였다. 이소타입을 항-마우스 IgG-HRP 또는 IgG2a-HRP 또는 IgG2b-HRP(칼 테그)를 이용하여 검출하였다. 이소타입에 관계없이, 항체는 혈액에서 발견되었을 때의 농도가 1:1000으로 CNS에 존재하였다. 예를 들면, IgG1의 농도가 혈액에서 IgG2a의 농도의 3배일 경우, 뇌에서 역시 3배의 IgG2a가 존재하였고, 이를 둘다 혈액에서의 각각의 레벨이 0.1%였다. 이 결과는 형질전환 및 비형질전환 마우스 둘다에서 관찰되었으므로, PDAPP는 특이한 유출 혈액 뇌 장벽을 지니지 않는다.

[0468] XVI: MAP 형태의 A β 펩티드의 치료 효능

[0469] 치료적 보조제/면역원 효능 실험은 9 ~ 10.5 월령의 이형접합성 PDAPP 형질전환 마우스 암컷 및 수컷으로 수행하여 전술한 바와 같이 삼량체 MAP 형태의 A β 1-7을 포함하는 융합 단백질의 효능을 테스트하였다. 처리군당 29 ~ 40마리로 하여 실험 기간은 25주로 하였으므로, 동물들은 실험 종료시에 15 ~ 16.5월령이 되었다. 이 실험에서 이용된 방법은 전술한 실시예 VIII에서의 상이한 보조제의 치료 실험에서와 동일한 것이다. 치료군은 하기 표 18에 기재하였다.

표 18

	보조제	면역원	회석 완충액	투여
1군	CFA/IFA	MAP(A β 1-7: TT)(100 μ g)	PBS	IP(400 μ l)
2군	QS21	AN1792-GCS(75 μ g)	PBS	SC(250 μ l)
3군	PBS	-----	-----	SC(250 μ l)

[0471] 표 약어: MAP - 다중 항원성 펩티드; TT - 파상풍 톡소이드 t-세포 에피토프 (830-844); SC - 피하; IP - 복강; PBS - 포스페이트 완충 염수; GCS는 글리신/시트레이트/수크로오스 조성물이다.

[0472] 면역화 스케줄은 모든 처리군에서 동일하였다. 마우스에 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24주에 주사하였고, 3, 5, 9, 13, 17, 21 및 25주에 채혈하였다. 1, 2, 3, 4 및 6군에는 8회의 접종을 하였으며, 2군 및 3군에는 각각 QS21/AN1792와 PBS를 주사하여 본 실험을 위한 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다.

[0473] 역가는 항 A β 항체 역가 분석으로 측정하였다.

[0474] 1군: CFA/IFA:MAP(A β 1-7:TT) 군, 역가 레벨이 낮았다. 피크 GMT는 13주에 1,200에 불과하였고, 25주에 이르러 600으로 떨어졌다. 30마리의 마우스 중 3마리에서는 역가가 증가되지 않았고, 또 다른 7마리 마우스는 실험 후 반부에 이르러 역가가 400을 초과하지 않았다.

[0475] 2군: QS21/AN1792 대조군, 17주에 GMT가 16,000이 되면서 피크 역가에 도달하였다. 그 후, 다음 8주에 걸쳐 역가가 감소되어 GMT가 8,700으로 종료되었다. 이 군 중 1마리는 실험 전반에 걸쳐서 역가를 증가시키지 못했다.

[0476] 3군: PBS 단독 군, 역가를 나타내지 않았다.

[0477] 처리군 둘다는 PBS 대조군에 비해 피질 A β 레벨이 유의적으로 감소되었음을 보여주었다(표 9 참조). CFA/IFA:MAP(A β 1-7) 군은 비교적 낮은 항 A β 항체 역가에도 불구하고 PBS 대조군과 비교하여 A β 를 현저히 감소시켰다.

표 19

[0478] 피질 A β 레벨

	PBS	MAP	QS-21
중간(ng/조직(g))	7,335	3,692	2,389
범위(ng/조직(g))	550-18,358	240-10,782	210-11,167
p 값	---	0.0003	<0.0001
N	38	30	34

[0479] 결론적으로, A β 1-7 MAP 면역원은 피질 내의 A β 침착을 지연시키기에 충분한 면역 반응을 유의적으로 유도하는데 효과적이다.

XVII. 원숭이에서의 A β 에 대한 면역원성 반응의 에피토프 지도화

[0480] 이 실시예에서는 AN1792(즉, A β 1-42)를 이용한 면역화에 대한 영장류의 반응을 분석한다. 원숭이 11군(4마리/성별/군)을 QS-21 보조제(50 또는 100 μ g/용량) 또는 물 중의 5% 멸균 텍스트로스(D5W, 대조군)와 배합한 AN1792(75 또는 300 μ g/용량)로 면역화시켰다. 표 20에 기재한 바와 같이, 모든 동물들에게 3가지 주사 스케줄 중 하나로 IM 주사하였고, 총 4, 5 또는 8회 접종하였다. 실험 175일째 회수한 혈청 시료(4마리 원숭이/성별/군으로부터) 및 176일째 회수한 CSF 시료(3마리 원숭이/성별/군으로부터부) A β 1-40 및 APP에 결합하는 능력을 평가하였다.

표 20

군 할당 및 투여량 레벨

군 번호	스케줄 ^a	원숭이 수(M/F)	AN1792 투여량 (μ g/투여량)	QS-21 투여량 (μ g/투여량)	투여 경로
1 ^a	1	4/4	0	0	IM
2	1	4/4	부형제 ^c	50	IM
3	1	4/4	부형제	100	IM
4	1	4/4	75	50	IM
5	1	4/4	300	50	IM
6	1	4/4	75	100	IM
7	1	4/4	300	100	IM
8	2	4/4	75	100	IM
9	2	4/4	300	100	IM
10	3	4/4	75	100	IM
11	3	4/4	300	100	IM

[0483] a. 스케줄 1, 투여 일 1, 15, 29, 57, 85, 113, 141, 169; 스케줄 2, 투여 일 1, 29, 57, 113, 169; 스케줄 3, 투여 일 1, 43, 85, 169

[0484] b. D5W 주사 대조군

[0485] c. 부형제는 AN1792에 대한 부형제인 글리신/시트레이트/수크로오스 완충액으로 구성된다.

[0486] AN1792를 접종한 동물로부터 얻은 혈청 시료의 항체에 의해 인식되는 선형 웹티드의 정확한 배열은 전체 A β 1-42 서열을 포함하는 중첩 웹티드에 대한 항체의 결합을 측정하는 ELISA를 이용하여 측정하였다. AN1792의 부분 서열을 포함하는 비오티닐화된 웹티드는 키론 테크놀로지스에서 입수하였으며, 웹티드당 9 잔기의 중첩과 1 잔기의 스텝이 있는 10 아미노산 웹티드였다(합성 번호: 5366, 5311 및 5814). 제1의 32 웹티드(AN1792의 N-말단의 상류 8번 아미노산 위치에서 하류 방향으로 AN1792의 24번째 아미노산까지)를 GGK의 링커로 C-말단 상에 비오티닐화시켰다. 마지막 10개의 웹티드(이전 시리즈로부터 32번째 웹티드를 반복함)는 EGEG(서열 번호 76)로 구성된 링커에 의해 N-말단 상에 비오티닐화되어 있다. 동결건조된 비오티닐화된 웹티드를 DMSO 중에 5 mM의 농도로 용해시켰다. 이를 웹티드 스톡을 TTBS(0.05% Tween 20, 25 mM Tris HCl, 137 mM NaCl, 5.1 mM KC1, pH=7.5) 중에 5 μ M으로 회석시켰다. 이 5 μ M 용액의 100 μ l 분취량을 이중으로 스트렙타비딘 예비 코팅된 96 웰 플레이트(피어스)에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리한 다음, TTBS로 4회 세척하였다. 혈청 시료를 아지드 없이 표본 회석액에서 회석하여 역가를 표준화시키고, 웰당 100 μ l를 첨가하였다. 상기 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리한 다음, TTBS로 4회 세척하였다. HRP-접합 염소 항-사람 항체(잭슨 이뮤노리서치)를 아지드 없이 표본 회석액에서 회석하여 역가를 표준화시키고, 웰당 100 μ l를 첨가하였다. 이 플레이트를 다시 항온처리하고 세척하였다. 발색 반응을 전개시키기 위해, TMB(피어스)를 웰당 100 μ l씩 첨가하고 15분

간 항온처리한 다음, 2 N H₂SO₄ 30 μl를 첨가하여 반응을 중단시켰다. Vmax 또는 Spectramax 색측정 플레이트 판독기 상에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0487] AN1792를 이용한 면역화는 175일까지 모든 투여 군에서 동물들의 100%에서 항체의 생성을 유도하였다. 상기 군들에서의 평균 역가의 범위는 14596 ~ 56084였다. 더 많은 항원 및/또는 더 높은 농도의 보조제의 존재하에 면역 스케줄내에서 역가는 더 높아지는 경향을 보였으나, 면역화에 대한 개개 동물들의 반응이 매우 다양하기 때문에 통계적으로 유의적인 차이는 확인할 수 없었다.

[0488] AN1792에 대한 항체에 대해서 양성인 혈청 역시 Aβ1-40에 대한 항체에 양성 반응을 보였다. 상기 군들에서의 평균 역가의 범위는 36867 ~ 165991이었고, AN1792 역가에 대해서는, 175일에 군들 사이에서 통계적으로 유의적인 어떠한 차이도 보이지 않았다. AN1792에의 결합은 Aβ1-40에 결합하면서 높은 양의 관련성을 나타내었다 (Spearman r = 0.8671).

[0489] AN1792를 이용한 다양한 스케줄로 면역화시킨 48마리의 원숭이 중에서, 33마리가 분석을 위해 적절한 부피 및 특질의 CSF 시료를 생성하였다. 이 원숭이들 중 32마리(97%)는 AN1792에 대해 양의 역가를 나타내었다. 역가의 범위는 2 ~ 246이었고, 평균은 49.44 ± 21.34였다. CSF 항-AN1792 레벨은 혈청에서 측정한 값의 0.18 ± 0.11%였고, 혈청 역가와 매우 양의 관계(Spearman r = 0.7840)에 있었다. 군이나 성별 사이에서는 CSF에서의 항체의 비율에 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. CSF에서의 항체 레벨은 전신에서 생성된 항체가 혈액 뇌 장벽을 통하여 중추신경계로 수동적으로 전달된 것과 일치한다.

[0490] 항 AN1792 양성 CSF 시료의 한 서브세트의 테스트는 혈청 시료의 항체와 마찬가지로 CSF의 항체가 Aβ1-40과 교차반응한다는 것을 증명한다. Aβ1-40에 대한 역가는 이들의 개개의 AN1792 역가에 대해 높은 양의 관계 (Spearman r = 0.9634)에 있다는 것을 보여주었다. AN1792에 대한 가장 높은 역가를 갖는 CSF 시료의 서브세트를 테스트한 것은 혈청 항체의 경우 APP에 결합하지 않는다는 것을 보여주었다.

[0491] 175일째의 항체로 일련의 중첩 10-mer 웨티드에 대해 테스트할 경우, 모든 원숭이에서 얻은 항체는 AN1792 웨티드(APP의 아미노산 653-672)의 아미노산 1-10을 포함하는 서열을 갖는 웨티드에 결합하였다. 일부 동물에서는 이것이 측정가능하게 결합하는 유일한 웨티드였다(도 19 참조).

[0492] 다른 동물에서는 다른 반응성이 측정될 수 있으나, 모든 경우에 N-말단 웨티드 서열에 대한 반응성은 우세한 것이었다. 또 다른 반응성을 2군으로 나누었다. 제1군은 가장 일반적인 것으로, N-말단 1-10 AN1792 웨티드 둘레를 중심으로 하는 웨티드에 결합하는 것이었다(도 20). 이러한 유형의 결합은 AN1792 웨티드의 아미노산 -1-8, -1-9 및 2-11을 포함하는 웨티드에 대한 것이었다. 1-10 웨티드에 대한 것과 결합하였을 때 이러한 반응성은 모든 동물에서 주도적인 주요 반응성을 대표한다. 시간에 따른 개개 동물들의 에피토프 지도화는 1-10 웨티드에 대한 항체 반응성이 인접한 웨티드에 확산된다는 것을 나타낸다. 이는 면역 반응의 강력한 바이어성이 자유 말단 아스파르트산 잔기를 갖는 AN1792 웨티드의 N-말단에 반응한다는 것을 증명한다. 일부 동물에서의 제2의 소수의 검출가능한 활성은 주요 영역 및 AN1792 웨티드의 아미노산 7-16, 11-20 및 16-25를 포함하는 웨티드를 중심으로 하는 영역에 C-말단에 위치된 웨티드에 결합하였다. 이러한 반응성은 원숭이의 단 10 ~ 30%만 관찰되었다.

[0493] 상이한 동물들 사이의 반응의 변화도(예컨대, 아미노산 1-10이 독점적 또는 우세한 반응성 에피토프인지)는 항원/보조제 용량, 투여 스케줄, 또는 항체 역가와는 관련이 없었으며, 아마도 개개 동물의 유전적 구성을 반영하는 것 같다.

XVIII. 사람 피험체의 예방 및 치료

[0495] 단일 투여 단계 I 시도는 사람에서의 안정성을 측정하기 위해 수행한다. 치료제는 예상 효능 레벨인 약 0.01에서 시작하여 마우스 유효량에 도달하는 약 10배의 레벨까지 3의 비율로 증가시키면서 상이한 환자에게 용량을 증가시키면서 투여한다.

[0496] 단계 II 시도는 치료 효능을 측정하기 위해 수행한다. 가능한 AD에 대한 알츠하이머 질환 및 관련 장애 조합 (ADRDA) 기준을 이용하여 정의된 초기 내지 중기의 알츠하이머 질환 환자를 선별한다. 적절한 환자에게 Mini-Mental State Exam(MMSE) 상의 12 ~ 26 범위로 점수를 매겼다. 다른 선별 기준은 환자가 실험 기간 동안 생존하고, 간섭할 수 있는 병용 약제의 사용과 같은 복합적인 문제가 없는 것이다. 환자 기능의 기저선 평가는 MMSE 및 ADAS와 같은 고전적인 심리측정법을 이용하여 수행하였고, 이는 알츠하이머 상태 및 작용을 갖는 환자를 평가하기 위한 전반적인 스케일이다. 이러한 심리측정 척도는 알츠하이머 상태의 진행의 척도이다. 적절한 정량적 수명 스케일은 치료를 모니터링하는 데 이용될 수도 있다. 질병 진행은 MRI에 의해 모니터링할 수도 있다. 면역

원 특이적 항체 및 T-세포 반응의 분석을 비롯한 환자의 혈액 프로필 역시 모니터링할 수 있다.

[0497] 기저선 측정 후에 환자에게 치료를 시작한다. 환자들을 무작위적으로 나누어 치료제 또는 위약을 맹검 방식으로 처치한다. 환자들은 최소한 매 6주마다 모니터링한다. 효능은 위약 군에 비해 치료군의 진행이 현저히 감소된 것으로 결정한다.

[0498] 제2 단계 II 시도는 종종 노화 관련 기억 장애(AAMI) 또는 중기 경증 인식 장애(MCI)로도 불리는 비알츠하이머 질환 초기 기억 상실을 앓는 환자에서, ADRDA 기준에 의해 정의되는 가능한 알츠하이머 질환으로의 전환을 평가하기 위해 수행된다. 기억 상실 초기 징후 또는 사전 알츠하이머 증후군과 관련된 다른 어려움, 알츠하이머 질환의 가족력, 유전적 위험 인자, 나이, 성별 및 알츠하이머 질환의 높은 위험율을 예측하는 데 발견되는 기타 특징들에 대해 대조군을 스크리닝함으로써 알츠하이머 질환으로의 전환에 대해 위험률이 큰 환자를 선별한다. 보다 정상적인 집단을 평가하기 위해 고안된 기타의 매트릭스와 함께 MMSE 및 ADAS를 비롯한 적절한 매트릭스 상의 기저선 점수를 수집한다. 이러한 환자 집단을 제제의 투여 대안에 대한 위약 비교군을 갖도록 적절한 군으로 나눈다. 이러한 환자 집단으로 약 6개월 간격으로 수행하여, 각 환자의 종점에서 이들이 ADRDA 기준에 의해 정의되는 가능한 알츠하이머 질환을 관찰 말기에 전환시키는지를 결정한다.

XIX. 전반적인 재료 및 방법

1. 항체 역가의 측정

[0501] 마우스의 꼬리 정맥에 작은 흡집을 내어 채혈하여 약 200 μl 의 혈액을 마이크로퓨지 튜브에 모았다. 먼저 뒷다리 비절 영역의 털을 깎은 다음, 18 게이지 바늘을 이용하여 중족 정맥에 찔러 기니 피그의 혈액을 마이크로퓨지 튜브에 모았다. 혈액을 실온에 1시간 동안 두어 응고하게 하고 진탕한 후 14,000 x g에서 10분간 원심분리하여 혈청으로부터 응고물을 분리하였다. 그 후, 혈청을 깨끗한 마이크로퓨지 튜브에 옮기고 역가를 측정할 때까지 4°C에서 보관하였다.

[0502] 항체 역가는 ELISA로 측정하였다. 96웰 마이크로역가 플레이트(코스타 EIA 플레이트)를 웰 코팅 완충액(0.1 M 인산나트륨, pH 8.5, 0.1% 나트륨 아지드) 중에서 A β 42 또는 SAPP 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 다른 항원(개개의 보고서 각각에서 언급한 바와 같은 양)을 포함하는 100 μl 의 용액으로 코팅하고 실온에서 밤새 두었다. 웰을 흡입하고 혈청을 표본 희석액(0.014 M 인산나트륨, pH 7.4, 0.15 NaCl, 0.6% 소 혈청 알부민, 0.05% 티메로살) 중의 1/100 희석을 시작으로 하여 웰에 첨가하였다. 7가지의 연속 희석 시료를 3 단계로 플레이트에서 직접 희석시켜서 최종적으로 1/218,700으로 희석되게 하였다. 희석액을 실온에서 1시간 동안 코팅된 플레이트 웰에서 항온처리하였다. 그 다음, 플레이트를 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS로 4회 세척하였다. 2차 항체인 호오스래디쉬 퍼옥시다아제에 접합된 염소 항-마우스 IgG(비링거 만하임 제품)를 표본 완충액 중의 1/3000 희석의 100 μl 로 웰에 첨가하여 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 다시 PBS, Tween 20으로 4회 세정하였다. 색소원을 발색시키기 위해, 슬로우 TMB(피어스 케미칼스 제품인 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘)를 각 웰이 첨가하고 실온에서 15분간 항온처리하였다. 반응은 2 M H₂SO₄ 25 μl 를 첨가하여 중단시켰다. 그 후, 색 농도를 몰리큘러 디바이스 Vmax에서 450 ~ 650 nm로 판독하였다.

[0503] 역가는 최대 OD의 1/2을 나타내는 혈청의 희석의 역수로서 정의하였다. 최대 OD는 아주 높은 역가를 갖는 경우를 제외하고는 일반적으로 최초 1/100 희석액에서 취하였는데, 아주 높은 역가를 갖는 경우에는 최대 OD를 확립하기 위해 보다 높은 초기 희석액이 요구되었다. 50% 지점이 두개의 희석액 사이에 위치한다면, 직선 추정선을 그어 최종 역가를 계산하였다. 기하 평균 항체 역가를 계산하기 위해, 100 미만의 역가를 역가값 25로 임의로 설정하였다.

2. 입파구 증식 분석

[0505] 마우스를 이소플루란으로 마취시켰다. 비장을 제거하고, 10% 열 불활성 태아 소 혈청을 함유하는 PBS(PBS-FBS) 5 ml로 2회 세정한 다음, 이를 메디머신(다코) 중의 50° 센트리콘 유닛(다코 A/S, 덴마크)에서 PBS-FBS 1.5 ml 중에서 100 rpm으로 10초간 균질화한 다음, 100 미크론 구경의 나일론 메쉬를 통과시켜서 여과하였다. 비장세포를 15 ml의 PBS-FBS로 1회 세척한 후, 200 x g에서 5분간 원심분리하여 펠렛을 만들었다. 적혈구를 0.15 M NH₄Cl, 1M KHCO₃, 0.1 M NaEDTA, pH 7.4를 포함하는 완충액 5 ml 중에서 실온에서 5분간 펠렛을 재현탁시켜 용해시켰다. 그 후, 전술한 대로 백혈구를 세척하였다. 새로이 분리한 비장 세포(웰당 10⁵ 세포)를 2.05 mM L 글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10% 열 불활성 FBS가 보충된 RPMI 1640 배지(JHR 바이오사이언시즈, 레넥사, KS) 중에서 3중으로 하여 96웰 U 바닥 조직 배양 처리 마이크로타이터 플레이트(코닝, 캠브리지, MA)에서

37°C에서 96시간 동안 배양하였다. 다양한 A β 웨프티드, A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 또는 A β 40-1 역행 서열 단백질 역시 4 단계로 5 ~ 0.18 마이크로몰의 용량 범위로 첨가하였다. 대조군 웰의 세포를 콘카나발린 A(ConA)(시그마, 카탈로그 번호 C-5275, 1 μ g/ml)와 함께 단백질을 첨가하지 않고 배양하였다. 세포를 3H-티미딘(1 μ Ci/웰, 아머샴 코포레이티드, 알링تون 하이츠, IL)과 함께 마지막 24시간 동안 펄싱하였다. 그 후, 세포를 유니필터 플레이트에 회수하고, 텁 카운트 마이크로플레이트 신틸레이션 카운터(페어드 인스트러먼츠, 다우너스 그로브, IL)에서 계측하였다. 결과는 불용성 거대분자로 흡입된 방사능의 카운트/분(cpm)으로 나타내었다.

[0506] 4. 뇌 조직 준비

마취 후, 뇌를 꺼내어 한개의 반구는 면역조직학 분석을 위해 준비하였고, 다른 반구로부터 3개의 뇌 영역(해마, 피질 및 소뇌 영역)을 절개하고, 특수한 ELISA(상기 Johnson-Wood 등의 문현)를 이용하여 다양한 A β 단백질 및 APP 형태의 농도를 측정하는 데 이용하였다.

[0508] ELISA를 위한 조직은 10배 부피의 빙냉 구아니딘 완충액(5.0 M 구아니딘-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)에서 균질화하였다. 균질물은 아담스 뉴테이터(피셔)를 이용하여 실온에서 3 ~ 4시간 동안 부드럽게 진탕하면서 혼합한 다음, A β 및 APP를 정량하기 전에 -20°C에서 보관하였다. 예비 실험은 분석물이 이 보관 조건하에서 안정하였고, 합성 A β 단백질(Bachem)이 한배에서 난 마우스로부터의 대조군 뇌 조직의 균질물로 스파이킹 할 때 정량적으로 회수될 수 있다는 것을 보여주었다(상기 Johnson-Wood 등의 문현).

[0509] 5. A β 레벨의 측정

[0510] 뇌 균질물을 빙냉 카세인 희석액(0.25% 카세인, PBS, 0.05% 나트륨 아지드, 20 μ g/ml 아프로티닌, 5 mM EDTA pH 8.0, 10 μ g/ml 루펩틴)으로 1:10으로 희석시킨 다음, 16,000 x g로 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 합성 A β 단백질 표준시료(1-42 아미노산) 및 APP 표준시료가 최종 조성물에서 0.5 M 구아니딘 및 0.1% 소 혈청 알부민(BSA)을 포함하도록 제조하였다. "총" A β 샌드위치 ELISA는 A β 의 아미노산 13-28에 특이적인 모노클로널 항체 모노클로널 항체 266(Seubert 등)를 캡쳐 항체로서 사용하고, A β 의 아미노산 1-5에 특이적인 비오티닐화 모노클로널 항체 3D6을 리포터 항체로서 사용하였다. 3D6 모노클로널 항체는 분비형 APP 또는 전장 APP를 인식하지 않지만, 아미노 말단 아스파르트산을 보유하는 A β 종만 탐지한다. 이 분석의 민감도 하한선은 ~50 ng/ml(11 nM)이고, 1 ng/ml 이하의 농도에서 내인성 쥐과 A β 단백질에 교차 반응성을 나타내지 않는다(Johnson-Wood 등의 문현).

[0511] A β 1-42 특이적 샌드위치 ELISA는 A β 의 아미노산 33-42에 특이적인 mA β 21F12를 캡쳐 항체로서 이용한다(상기 Johnson-Wood 등의 문현). 비오티닐화된 mA β 3D6 역시 이 분석에서 리포터 항체이며, 이 분석의 민감도 하한선은 약 125 μ g/ml(28 μ M, Johnson-Wood 등의 문현)이다. A β ELISA의 경우, mA β 266(10 μ g/ml) 또는 mA β 21F12(5 μ g/ml) 100 μ l를 96웰 면역분석 플레이트(코스타)에 코팅하여 실온에서 밤새 항온처리하였다. 이 용액을 흡입으로 제거하고, 웰에 PBS 완충액 중의 0.25% 사람 혈청 알부민 200 μ l을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 두어 블로킹시켰다. 블로킹 용액을 제거하고, 플레이트를 사용할 때까지 4°C에서 방습 보관하였다. 플레이트를 사용하기 전에 세척 완충액[Tris 완충 염수(0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5) + 0.05% Tween 20]으로 재수화시켰다. 시료 및 표준 시료를 웰당 100 μ l의 3중 분취량으로 첨가한 다음, 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 플레이트는 매 분석 단계마다 세척 완충액으로 3회 이상 세척하였다. 카세인 분석 완충액(0.25% 카세인, PBS, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 중에서 0.5 μ g/ml로 희석시킨 비오티닐화된 mA β 3D6를 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 카세인 분석 완충액에 1:4000으로 희석시킨 아비딘-호오스래디쉬 피옥시다아제 접합체(아비딘-HRP, 벡터, 버링게임, CA)를 웰에 첨가하여 실온에서 1시간 동안 두었다. 발색 기질인 슬로우 TMB-ELISA(피어스)를 첨가하고 실온에서 15분간 반응하도록 둔 다음, 2 N H₂SO₄ 25 μ l를 첨가하여 효소 반응을 중단시켰다. 반응 생성물을 몰리큘러 디바이시즈 Vmax를 이용하여 450 nm와 650 nm에서의 흡광도 차이를 측정하여 정량하였다.

[0512] 6. APP 레벨의 측정

[0513] 2종의 상이한 APP 분석을 이용하였다. APP- α /FL이라고 지칭되는 제1 분석은 APP-알파(α)와 APP의 전장(FL)형 둘다를 인식한다. 제2 분석은 APP- α 에만 특이적이다. APP- α /FL 분석은 A β 의 처음 12개의 아미노산을 비롯한 분비형 APP를 인식한다. 리포터 항체(2H3)는 APP695의 아미노산 612-613 사이에서 발생하는 α -클립-부위에 특이적이지 않으므로(Esch 등의 문현[Science 248, 1122-1124(1990)]), 이 분석은 전장 APP(APP-FL) 역시 인식한다. APP-FL의 뇌 균질물을 고갈시키기 위한 APP-FL의 세포질 테일에 대한 고정화된 APP 항체를 이용한 예비 실험은 APP- α /FL APP의 약 30 ~ 40%가 FL임을 나타낸다(데이터는 제시하지 않음). APP- α /FL 및 APP- α 분석 둘

다를 위한 캡처 항체는 APP695 형태의 444-592에 대해 생성된 mAb 8E5이다(상기 Games 등의 문헌). APP- α /FL 분석을 위한 리포터 mAb는 APP695의 아미노산 597-608에 특이적인 mAb 2H3이고(상기 Johnson-Wood 등의 문헌), APP- α 분석에 대한 리포터 항체는 APP의 아미노산 605-611에 대해 생성된 비오티닐화된 mAb 16H9의 유도체이다. APP- α FL 분석의 민감도의 하한선은 약 11 ng/ml(150 pM)이고(Johnson-Wood 등의 문헌), APP- α 특이적 분석의 민감도의 하한선은 22 ng/ml(0.3 nM)이다. 두 APP 분석에서, mAb 8E5를 mAb 2H3에 대해 전술한 바와 같이 96 웰 EIA 플레이트의 웰에 코팅하였다. 정제된 재조합의 분비된 APP- α 를 APP- α 분석 및 APP- α /FL 분석의 기준으로 사용하였다(상기 Esch 등의 문헌). 5 M 구아니딘 중의 뇌 균질물 시료를 ELISA 표본 희석액(0.014 M 인산나트륨, pH 7.4, 0.6% 소 혈청 알부민, 0.05% 티메로살, 0.5 M NaCl, 0.1% NP40)에 1:10으로 희석시켰다. 그 후, 이들을 0.5 M 구아니딘을 포함하는 표본 완충액에 1:4로 희석시켰다. 그 후, 희석된 균질물을 실온에서 16,000 x g로 15초간 원심분리하였다. APP 표준물 및 시료를 2중 분취량으로 플레이트에 첨가하고 실온에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. 비오티닐화된 리포터 항체 2H3 또는 16H9를 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 표본 희석액에 1:1000으로 희석시킨 스트렙타비딘-알칼라인 포스파타아제(브링거 만하임)를 웰에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 형광 기질 4-메틸-움벨리페릴-포스페이트를 실온에서 30분간 항온처리하고, 이 플레이트를 사이토플루오르 tm 2350 형광계측기(밀리포어) 상에서 365 nm 예기 및 450 nm 방출로 판독하였다.

[0514] 7. 면역조직화학 분석

뇌를 PBS 중의 4% 파라포름알데히드에서 40°C에서 3일간 고정한 다음, 1% 파라포름알데히드, PBS에서 절단할 때 까지 4°C에서 1 ~ 7일간 보관하였다. 40 μ m 두께의 두정 부분을 실온에서 비브라톱에서 절단하고, 면역조직화학 분석 전에 -20°C에서 저온유지장치(포스페이트 완충액 중의 30% 글리세롤, 30% 에틸렌 글리콜)에서 보관하였다. 각 뇌의 경우, 각각 연속적인 240 μ m 간격으로 분리되어 있는 등 해마 레벨에 있는 6개의 절편을 다음의 항체 중 하나와 함께 밤새 항온처리하였다: (1) PBS와 1% 말 혈청 중의 2 μ g/ml 농도로 희석된 비오티닐화된 항 A β (mAb, 3D6, 사람 A β 에 특이적임); 또는 (2) PBS 및 1.0% 말 혈청 중에 3 μ g/ml 농도로 희석된 사람 APP, 8E5에 특이적인 비오티닐화된 mAb; 또는 (3) Tris 완충 염수(pH 7.4)(TBS) 중의 0.25% Triton X-100 및 1% 말 혈청으로 1:500으로 희석시킨 신경교 원섬유산단백질에 특이적인 mAb(GFAP; 시그마 케미칼 컴퍼니); (4) TBS 중의 0.25% Triton X-100 및 1% 토끼 혈청으로 1:100으로 희석시킨 CD11b, MAC-1 항원에 특이적인 mAb(케미콘 인터내셔널); 또는 (5) TBS 중의 0.25% Triton X-100 및 1% 토끼 혈청에 1:100으로 희석시킨 MHC II 항원에 특이적인 mAb(파밍엔); 또는 (6) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:100으로 희석시킨 CD43에 특이적인 래트 mAb(파밍엔); 또는 (7) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:100으로 희석시킨 CD45RA에 특이적인 래트 mAb(파밍엔); 또는 (8) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:100으로 희석시킨 CD45RB에 특이적인 래트 모노클로널 A β (파밍엔); 또는 (9) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:100으로 희석시킨 CD45에 특이적인 래트 모노클로널 A β (파밍엔); 또는 (10) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:100으로 희석시킨 CD3e에 특이적인 비오티닐화된 폴리클로널 햄스터 A β (파밍엔); 또는 (11) PBS 중의 1% 토끼 혈청으로 1:200으로 희석시킨 CD3에 특이적인 래트 mAb(세로텍); 또는 1% 정상 말 혈청을 포함하는 1차 항체가 없는 PBS 용액.

상기 1, 2 및 6-12에 기재한 항체 용액으로 반응시킨 절편들을 PBS 중의 1.0% Triton X-100, 0.4% 과산화수소로 실온에서 20분간 예비처리하여 내인성 페옥시다아제를 블로킹하였다. 이후, 이들을 4°C에서 1차 항체와 밤새 항온처리하였다. 그 다음, 3D6 또는 8E5 또는 CD3e mAb와 반응시킨 절편을 PBS 중에 1:75로 희석시킨 키트 성분 "A" 및 "B"와 호오스래디쉬 페옥시다아제-아비딘-비오티-복합체(벡터 엘리트 스텐다드 키트, 벡터 랩스, 베링게임, CA)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3에 특이적인 항체와 반응시킨 절편들 및 1차 항체가 없는 PBS 용액을 각각 PBS 중에 1:75로 희석시킨 항-래트 IgG(벡터) 또는 PBS 중에 1:75로 희석시킨 비오티닐화된 항-마우스 IgG(벡터)와 실온에서 1시간 동안 희석시켰다. 그 다음, 절편들을 PBS 중에 1:75로 희석시킨 키트 성분 "A" 및 "B"와 호오스래디쉬 페옥시다아제-아비딘-비오티-복합체(벡터 엘리트 스텐다드 키트, 벡터 랩스, 베링게임, CA)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다.

절편들을 0.01% 과산화수소, 0.05% 3,3'-디아미노벤자린(DAB) 중에서 실온에서 발색시켰다. GFAP-, MAC-1- 및 HMC II-특이적 항체와 항온처리하기 위한 절편들을 실온에서 0.6% 과산화수소로 예비처리하여 내인성 페옥시다아제를 블로킹 한 다음, 4°C에서 1차 항체와 밤새 항온처리하였다. GFAP 항체와 반응시킨 절편들을 TBS에 1:200으로 희석시킨 말에서 생성된 비오티닐화된 항-마우스 IgG(벡터 래보러토리즈; 벡터스타인 엘리트 ABC 키트)와 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 그 다음, 절편들을 TBS에 1:1000으로 희석시킨 아비딘-비오티-페옥시다아제 복합체(벡터 래보러토리즈; 벡터스타인 엘리트 ABC 키트)와 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체로서의 MAC-1 또는 MHC II-특이적 모노클로널 항체와 항온처리한 절편들을 TBS 중에 1:200으로 희석된 토끼에서 생성한 비오

티닐화된 항-래트 IgG와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, TBS로 1:1000으로 희석시킨 아비딘-비오틴-페옥시다아제 복합체와 1시간 동안 항온처리하였다. 그 다음, GFAP-, MAC-1- 및 MHC II-특이적 항체와 항온처리된 절편들을 각각 실온에서 0.05% DAB, 0.01% 과산화수소, 0.04% 염화니켈로 처리한 다음, TBS와 4°C에서 11분간 처리하여 시각화시켰다.

[0518] 면역표지된 절편들을 유리 슬라이드(VWR, 수퍼프로스트 슬라이드) 위에 마운팅하고, 밤새 공기 중에서 건조시키고, 프로파르(아나텍)에 침지시켜서 마운팅 매질로서 퍼마운트(피셔)를 이용하여 커버슬립을 덮었다.

[0519] A β 플라크를 역염색하기 위해, GFAP-양성 절편의 서브세트를 수퍼프로스트 슬라이드 위에 마운팅하고 수성 1% 티오플라빈 S(시그마)에서 7분간 항온처리한 다음, 면역조직화학 분석을 수행하였다. 그 다음, 절편들을 탈수화시키고 프로파르를 제거한 다음, 퍼마운트로 마운팅된 커버슬립으로 덮었다.

8. 화상 분석

[0521] CCD 비디오 카메라와 소니 트리니트론 모니터를 통해 니콘 마이크로포트-FX 혼미경에 연결된 비디오메트릭 150 화상 분석 시스템(온코 인코포레이티드, 게이터스버그, MD)을 면역반응성 슬라이드의 정량에 이용하였다. 절편의 영상을 비디오 버퍼에 저장하고, 색상 및 포화도를 기준으로 한 한계치를 측정하여 면역표지된 구조에 의해 차지되는 총 픽셀을 선별 및 계산하였다. 각 절편의 경우, 해마는 수작업으로 윤곽을 그려서, 해마에 의해 차지되는 총 픽셀 영역을 계산하였다. 아밀로이드 침착 비율(%)은 (mAb 3D6와 면역반응성인 A β 침착물을 포함하는 해마 영역의 부분) x 100으로서 측정하였다. 유사하게, 신경염 침착물 비율(%)은 (모노클로널 항체 8E5와 반응성인 이영양증 신경을 포함하는 해마 영역의 부분) x 100으로 측정하였다. 심플 32 소프트웨어 애플리케이션 시스템 프로그램을 작동시키는 C-영상화 시스템(컴팩스 인코포레이티드, 캔버리 타운쉽, PA)을 옵트로닉스 카메라를 통해 니콘 마이크로포트-FX 혼미경에 연결시켜서, GFAP-양성 성상세포, 및 MAC-1- 및 MHC II-양성 소교세포에 의해 차지되는 역판상 피질의 비율을 정량하는 데 이용하였다. 면역반응된 절편의 영상을 비디오 버퍼에 저장하고, 면역표지된 세포에 의해 차지되는 총 픽셀 영역을 선별 및 계산하기 위해 단색계 한계치를 결정하였다. 각 절편에 대해서, 역판상 피질(RSC)을 수작업으로 윤곽을 그리고, RSC에 의해 차지되는 총 픽셀 영역을 계산하였다. 성상세포증 비율(%)은 (GFAP 반응성 성상세포에 의해 차지되는 RSC의 부분) x 100으로 정의하였다. 유사하게, 소교세포증 비율(%)은 MAC-1- 또는 MHC II 반응성 소교세포에 의해 차지되는 RSC의 부분) x 100으로 정의하였다. 모든 화상 분석의 경우, 각각 연속적인 240 μm 간격으로 분리되어 있는 등 해마의 레벨에 있는 6개의 절편을 각 동물에 대해 정량하였다. 모든 경우에서, 동물들의 처리 상태는 관찰자에게 알려주지 않았다.

[0522] 전술한 발명이 분명한 이해를 목적으로 상세히 설명되었지만, 첨부되는 청구범위의 범위 내에서 특정 변형이 실시될 수 있음이 명백할 것이다. 본원에서 인용하는 모든 공보 및 특히 문헌은 마치 각각이 개별적으로 표시되는 것과 같은 정도로 모든 목적을 위해 그 전체를 참고문헌으로서 본원에서 포함하고 있다.

[0523] 전술한 설명으로부터 본 발명이 수많은 용도를 제공한다는 것을 알 수 있을 것이다. 예를 들면, 본 발명은 전술한 A β 에 대한 항체 중 어느 것의 아밀로이드형성성 질병의 치료, 예방 및 진단의 용도, 또는 상기 용도를 위한 약제 또는 진단 조성물의 제조에 있어서의 용도를 제공한다. 이와 유사하게, 본 발명은 전술한 A β 의 에피토프 단편 중 임의의 것의 아밀로이드증 질병의 치료 또는 예방을 위한 용도, 또는 상기 용도를 위한 약제의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.

표 1

PDAPP의 월령	50% 최대 O.D.에서의 역가									
	응집형 A β 를 주사한 마우스									
	마우스 100	마우스 101	마우스 102	마우스 103	마우스 104	마우스 105	마우스 106	마우스 107	마우스 108	
4	70000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	80000	100000	
6	15000	65000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000	
8	20000	55000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000	
10	40000	20000	60000	50000	900	15000	50000	20000	40000	
12	25000	30000	60000	40000	2700	20000	70000	25000	20000	
PBS 주사한 마우스의 두 면역원(1/100)에 대한 반응										
		PDAPP의 월령	마우스 113	마우스 114	마우스 115	마우스 116	마우스 117			

		6	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg		
		10	5xbkg	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg		
		12	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg	<4xbkg		

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 형질전환 마우스에게 A β 1-42를 주사한 후의 항체 역가를 나타낸다.
- [0025] 도 2는 해마에서의 아밀로이드 축적량을 나타낸다. A β -특이성 모노클로널 항체 3D6와의 반응도로서 정의되는, 아밀로이드 플라크가 차지하는 해마 영역의 면적율은 면역반응된 뇌 부위의 정량적 화상 분석을 컴퓨터로 수행하여 측정하였다. 각각의 마우스에 대한 값을 처리군으로 분류하여 도시하였다. 각각의 군에 대한 수평선은 분포의 중간값을 나타낸다.
- [0026] 도 3은 해마에서의 신경염 이영양증을 나타낸다. 사람 APP 특이성 모노클로널 8E5와의 반응도로서 정의되는 이 영양성 신경염이 차지하는 해마 부위의 면적율은 면역반응된 뇌 부위의 정량적 화상 분석을 컴퓨터로 수행하여 측정하였다. 각각의 마우스에 대한 값은 AN1792 처리군과 PBS 처리 대조군에 대해 나타낸다. 각각의 군에 대한 수평선은 분포의 중간값을 나타낸다.
- [0027] 도 4는 역판상 피질에서의 성상세포증을 나타낸다. 신경교원섬유산단백질 (GFAP) 양성 성상세포가 차지하는 피질 부위의 면적율은 면역반응된 뇌 부위의 정량적 화상 분석을 컴퓨터로 수행하여 측정하였다. 각각의 마우스에 대한 값을 처리군으로 분류하여 도시하고, 중간군 값은 수평선으로 나타내었다.
- [0028] 도 5는 0.14, 0.4, 1.2, 3.7, 11, 33, 100 또는 300 μg 을 함유하는 AN1792의 8종의 투여량 범위로 면역화시킨 후의 A β 1-42에 대한 기하 평균 항체 역가를 나타낸다.
- [0029] 도 6은 AN1792 면역화에 대한 항체 반응의 역학을 나타낸다. 역가는 각 군에서 동물 6 마리에 대한 값의 기하 평균값으로 나타낸다.
- [0030] 도 7은 PBS 및 AN1792 처리된 마우스에서의 피질 아밀로이드 축적량의 정량적 화상 분석을 나타낸다.
- [0031] 도 8은 PBS 및 AN1792 처리된 마우스에서의 신경염 플라크의 정량적 화상 분석을 나타낸다.
- [0032] 도 9는 PBS 및 AN1792 처리된 마우스에서의 성상세포가 차지하는 역판상 피질 비율의 정량적 화상 분석을 나타낸다.
- [0033] 도 10은 AN1792 처리된(상부 패널) 또는 PBS 처리된(하부 패널)로부터의 비장 세포에서의 림프세포 증식 분석을 나타낸다.
- [0034] 도 11은 피질에서의 A β 총 농도를 나타낸다. 프로인트 보조제와 혼합된 A β 또는 APP 유도체로 면역화된 마우스에서의 각각의 A β 프로파일의 스캐터플롯이다.
- [0035] 도 12는 피질에서의 아밀로이드 축적을 A β 웨პ티드 접합체 A β 1-5, A β 1-12 및 A β 13-28로 면역화된 마우스에 대한 면역반응된 뇌 부위의 정량적 화상 분석으로 측정하였으며, 전장 A β 는 AN1792(A β 1-42) 및 AN1528(A β 1-40) 및 PBS 처리 대조군을 모은다.
- [0036] 도 13은 프로인트 보조제와 혼합된 A β 또는 APP 유도체로 면역화된 마우스의 군에 대한 A β 특이성 항체의 기하 평균 역가를 나타낸다.
- [0037] 도 14는 각종 보조제와 혼합된 AN1792 또는 이의 팔미토일화 유도체로 면역화된 기니 피그의 군에 대한 A β 특이성 항체의 기하 평균 역가를 나타낸다.
- [0038] 도 15(A-E)는 각종 보조제를 사용한 AN1792 또는 AN1528로 처리한 12 월령의 PDAPP 마우스의 피질에서의 A β 농도를 나타낸다.
- [0039] 도 16은 A β 에 대한 폴리클로널 항체로 처리된 마우스의 평균 역가를 나타낸다.
- [0040] 도 17은 A β 에 대한 모노클로널 항체 10D5로 처리된 마우스의 평균 역가를 나타낸다.
- [0041] 도 18은 A β 에 대한 모노클로널 항체 2F12로 처리된 마우스의 평균 역가를 나타낸다.
- [0042] 도 19는 애피토프 지도: 제한 N-말단 반응을 나타낸다. 사이노몰구스 원숭이로부터 얻은 175일째 혈청을 완전

AN1792 서열을 커버하는 일련의 10-mer 중첩 웨티드(서열 번호 1-41)에 대하여 ELISA로 테스트하였다. 동물 번호 F10920M은 면역화 항원으로서 사용되는 AN1792 웨티드의 아미노산 1~10을 커버하는 웨티드 DAEFRHDSGY(서열 번호 9)에 대한 대표적인 N-말단 제한된 반응을 나타낸다.

[0043] 도 20은 에피토프 지도: 비제한 N-말단 반응을 나타낸다. 사이노몰구스 원숭이로부터 얻은 175일째 혈청을 완전 AN1792 서열을 커버하는 일련의 10-mer 중첩 웨티드(서열 번호 1-41)에 대하여 ELISA로 테스트하였다. 동물 번호 F10975F는 AN1792 웨티드의 아미노산 1~10을 커버하는 웨티드 DAEFRHDSGY(서열 번호 9)에 대한 2개의 웨티드 N-말단 및 하나의 웨티드 C-말단에 대한 반응도를 나타낸다.

용어 정의

[0045] 용어 "실질적인 동일성"이라는 것은 디폴트 캡 중량을 이용한 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의한 것과 같이 최적으로 정렬되는 경우, 2개의 웨티드 서열은 65% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 80 또는 90%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성(예, 99% 이상의 서열 동일성)을 공유한다. 동일하지 않은 잔기 위치는 보존성 아미노산 치환에 의해 상이하게 되는 것이 바람직하다.

[0046] 서열 비교를 위해, 통상적으로 하나의 서열은 테스트 서열을 비교하게 되는 기준 서열로서 작용하게 된다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 테스트 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요할 경우 부분서열을 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 변수를 지정한다. 그후, 서열 비교 알고리즘으로 지정된 프로그램 변수를 기준으로 하여 기준 서열에 대한 테스트 서열(들)에 대한 서열 동일성 비율(%)을 계산한다.

[0047] 비교용 서열의 최적의 배열은, 예컨대 문헌[Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970)]의 상동성 배열 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444(1988)]의 유사성 방법에 대한 조사에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행(미국 위스콘신주 매더슨 사이언스 드라이브 575에 소재하는 지네틱스 컴퓨터 그룹의 위스콘신 지네틱스 소프트웨어 팩키지의 TFASTA, FASTA, BESTFIT 및 GAP)에 의해 또는, 시각 조사(일반적으로 Ausubel 등 상동을 참조함)에 의해 수행될 수 있다. 서열 동일성 비율 및 서열 유사성 비율을 측정하는 데 적절한 알고리즘의 일례로는 BLAST 알고리즘이 있는데, 이는 문헌[Altschul 등, *J. Mol. Biol.* 215:403-410(1990)]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립생명공학 정보센터 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 공개적으로 입수 가능하다. 통상적으로, 주문형 변수를 사용할 수도 있으나, 폴트 프로그램 변수를 사용하여 서열 비교를 수행할 수 있다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 글자 길이(W) 3, 기대값(E) 10 및 BLOSUM62 작성 매트릭스를 사용한다[문헌: Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915(1989)].

[0048] 아미노산을 분류하기 위한 목적으로, 보존적 및 비보존적 아미노산으로서의 치환의 예로는 I군(소수성 측쇄): 노르루신, met, ala, val, leu, ile; II군(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; III군(산성 측쇄): asp, glu; IV군(염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; V군(쇄 배향에 영향을 미치는 잔기): gly, pro; 및 VI군(방향족 측쇄): trp, tyr, phe 등으로 나눌 수 있다. 보존적 치환은 동일한 부류에서의 아미노산 사이에서의 치환을 포함한다. 비보존적 치환은 기타원에 대한 이들 부류 중 하나의 원을 교환하는 것으로 이루어진다.

[0049] 본 발명의 치료제는 통상적으로 원치 않는 오염물로부터 실질적으로 순수하게 된다. 이는 제제가 통상적으로 단백질 및 오염원을 실질적으로 간섭하지 않도록 할 뿐 아니라, 순도가 약 50% w/w(중량/중량) 이상인 것을 의미한다. 종종 이러한 제제는 순도가 약 80% w/w 이상, 바람직하게는 90% 이상 또는 약 95% w/w이다. 그러나, 통상의 단백질 정제 기법을 사용하여 99% w/w 이상의 균질한 웨티드를 얻을 수 있다.

[0050] 2개의 단위 사이의 특이성 결합은 친화도가 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} 또는 10^{10} M^{-1} 이상인 것을 의미한다. 친화도는 10^8 M^{-1} 보다 큰 것이 바람직하다.

[0051] 용어 "항체" 또는 "면역글로불린"은 무손상 항체 및 이의 결합 단편을 포함하는 것으로 사용한다. 통상적으로, 단편은 별도의 중쇄, 경쇄 Fab, Fab'F(ab')2, Fabc 및 Fv를 포함한 항원 단편에 대한 특이성 결합에 대해 유래하는 무손상 항체와 경쟁하게 된다. 단편은 재조합 DNA 기법에 의해 또는 무손상 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 분리에 의해 생성된다. 또한, 용어 "항체"는 다른 단백질에 대한 화학적 접합체를 생성하거나 또는 다른 단백질과의 융합 단백질로서 발현되는 1종 이상의 면역글로불린 연쇄를 포함한다. 또한, 용어 "항체"라는 것은 이중특이성 항체를 포함한다. 이중특이성 또는 이중작용성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄쌍, 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 혼성 항체이다. 이중특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab 단편의 결합을 비롯한

각종 방법에 의해 생성될 수 있다[문헌: Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321(1990); Kostelný 등, *J. Immunol.* 148, 1547-1553(1992)].

[0052] APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ 및 APP⁷⁷⁰는 각각 사람 APP 유전자에 의해 암호화된 695, 751 및 770 아미노산 잔기 장쇄 폴리펩티드를 지칭한다[문헌: Kang 등, *Nature* 325, 773(1987); Ponte 등, *Nature* 331, 525(1988); 및 Kitaguchi 등, *Nature* 331, 530(1988)]. 사람 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 내의 아미노산은 APP770 이소형의 서열에 의해 번호가 할당된다. 용어 Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 및 Aβ43은 아미노산 잔기 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 및 1-43을 포함하는 Aβ 웨비드를 지칭한다.

[0053] "항원"이라는 것은 항체가 특이적으로 결합되는 단위를 의미한다.

[0054] 용어 "에피토프" 또는 "항원성 결정인자"는 B 및/또는 T 세포가 반응하게 되는 항원 상에서의 부위를 지칭한다. B-세포 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 병렬배치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산으로부터 모두 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매에 노출시 유지되나, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 변성 용제를 사용한 처리시 상실된다. 통상적으로 에피토프는 3 이상, 바람직하게는 5 이상 또는 8~10의 아미노산을 특유의 입체형태에 포함한다. 에피토프의 공간 형태를 결정하는 방법의 예로는 X선 결정학 또는 2차원적 핵자기 공명 등이 있다. 문헌[*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris 편저(1996)]. 동일한 에피토프를 인식하는 항체는 표적 항원에 다른 항체가 결합되는 것을 방지하는 한 항체의 능력을 나타내는 단순 면역분석으로 식별될 수 있다. T-세포는 CD8에 대해 약 9개의 아미노산 또는 CD4 세포에 대한 약 13~15 아미노산의 연속 에피토프를 인식한다. 에피토프를 인식하는 T 세포는, 에피토프에 반응하는 초회항원자극된 T 세포에 의한 ³H-티미딘 혼입에 의해 측정되는 바와 같이 항원 의존성 증식을 측정하는 시험관내 분석[문헌: Burke 등, *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19(1994)]에 의해, 항원 의존성 사멸 [세포독성 T 림프 세포 분석, Tigges 등, *J. Immunol.* 156, 3901-3910]에 의해 또는 사이토카인 분비에 의해 식별될 수 있다.

[0055] 용어 "면역학적" 또는 "면역" 반응은 수용체 환자에게서의 아밀로이드 웨비드에 대한 이로운 체액성(항체 매개) 및/또는 세포성(항원 특이성 T 세포 또는 이들의 분비 산물에 의해 매개) 반응의 전개를 의미한다. 이러한 반응은 면역원의 투여에 의해 유발되는 활성 반응 또는, 항체 또는 초회항원자극된 T 세포의 투여에 의해 유발되는 수동 반응 등이 될 수 있다. 세포성 면역 반응은 항원 특이성 CD4⁺ T 헬퍼 세포 및/또는 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 활성화시키는 클래스 I 또는 클래스 II MHC 분자와 관련된 폴리펩티드 에피토프의 제시에 의하여 규명된다. 또한, 반응은 선천면역의 단핵구, 대식세포, NK 세포, 호염기 세포, 수지상 세포, 성상세포, 미세아교세포, 호산구 또는 기타의 성분의 활성화를 포함할 수 있다. 세포 매개 면역학적 반응의 존재는 증식 분석(CD4⁺ T 세포) 또는 CTL(세포독성 T 림프구) 분석[문헌: Burke, 상동; Tigges, 상동]에 의해 측정할 수 있다. 면역원의 예방 또는 치료 효과에 대한 체액성 및 세포성 반응의 상대적 기여는 면역화 유전적 동계 동물로부터의 항체 및 T 세포를 별도로 분리하고, 제2의 개체에서의 보호 또는 치료적 효능을 측정함으로써 식별할 수 있다.

[0056] 용어 "면역원성 제제" 또는 "면역원"은 임의로 보조제와 함께 포유동물에게 투여시 그 자체에 대한 면역학적 반응을 유발할 수 있는 것을 의미한다.

[0057] 용어 "나출 폴리뉴클레오티드"라는 것은 콜로이드 물질과 학체를 형성하지 않는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 나출 폴리뉴클레오티드는 종종 폴라스미드 벡터 내에서 클로닝된다.

[0058] 용어 "보조제"라는 것은 항원과 함께 투여시 항원에 대한 면역 반응을 증강시키나, 단독으로 투여시에는 항원에 대한 면역 반응을 생성시키지 않는 화합물을 의미한다. 보조제는 림프구 보충, B 및/또는 T 세포의 자극 및 대식세포의 자극을 비롯한 수종의 메카니즘에 의한 면역 반응을 증강시킬 수 있다.

[0059] 용어 "환자"는 예방 또는 치료적 처치를 받는 사람 및 기타의 포유동물을 포함한다.

[0060] 비응집 또는 단량체 Aβ라는 것은 Aβ의 가용성 단량체 웨비드 단위를 의미한다. 단량체 Aβ를 생성하는 한 방법은 초음파를 사용한 니트 DMSO 중에 동결건조 웨비드를 용해시키는 것이다, 그리하여 생성된 용액은 임의의 불용성 미립자를 제거하기 위해 원심분리한다. 응집된 Aβ는 단량체 단위가 비공유 결합에 의해 함께 유지되는 소중합체의 혼합물이다.

[0061] 항체간의 경쟁은, 테스트 중인 면역글로불린이 Aβ와 같은 공동의 항원으로의 기준 항체의 특이적 결합을 방지하는 분석에 의해 측정된다. 다수의 유형의 경쟁적 결합 분석은 예를 들면 고상 직접 또는 간접 방사선면역분석

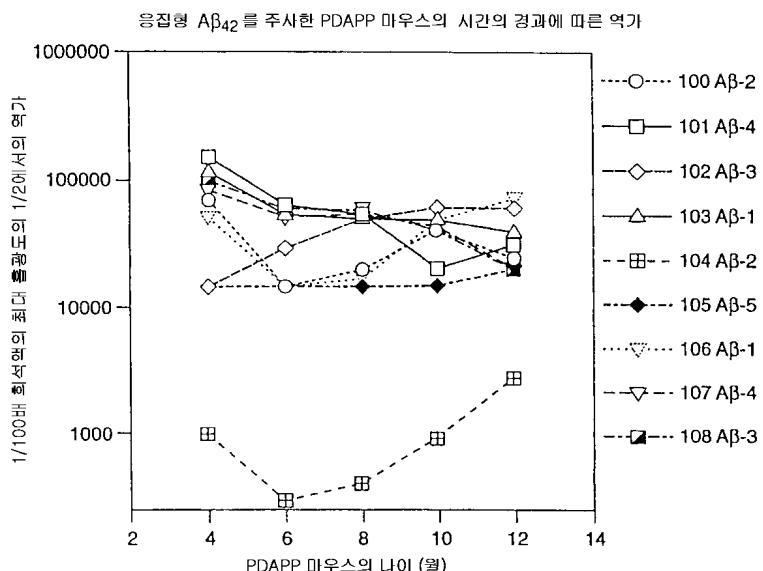
(RIA), 고상 직접 또는 간접 효소 면역 분석(EIA), 샌드위치 경쟁 분석[문헌: Stahli 등, *Methods in Enzymology* 9:242-253(1983)]; 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA[문헌: Kirkland 등, *J. Immunol.* 137:3614-3619(1986)]; 고상 직접 표지된 분석, 고상 직접 표지된 샌드위치 분석[문헌: Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", 콜드 스프링 하버 프레스(1988)]; I-125 표지를 사용한 고상 직접 표지 RIA[문헌: Morel 등, *Mol. Immunol.* 25(1): 7-15(1988)]; 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA[문헌: Cheung 등, *Virology* 176:546-552(1990)]; 및 직접 표지된 RIA[문헌: Moldenhauer 등, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82(1990)] 등이 있다. 통상적으로, 이러한 분석은 고형 표면에 결합된 정제된 항원 또는, 비표지된 테스트 면역글로불린 및 표지된 기준 면역글로불린 모두를 포함하는 세포의 사용을 포함한다. 경쟁적 억제는 테스트 면역글로불린의 존재하여 고형 표면 또는 세포에 결합된 표지량을 측정함으로써 결정된다. 일반적으로 테스트 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 경쟁적 분석(경쟁하는 항체)에 의해 식별되는 항체는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합되는 항체 및, 발생되는 입체 장애에 대한 기준 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 인접하는 이웃하는 에피토프에 결합된 항체를 포함한다. 일반적으로, 경쟁하는 항체가 과량으로 존재하는 경우, 공동의 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 50% 또는 75% 정도로 억제하게 된다.

[0062]

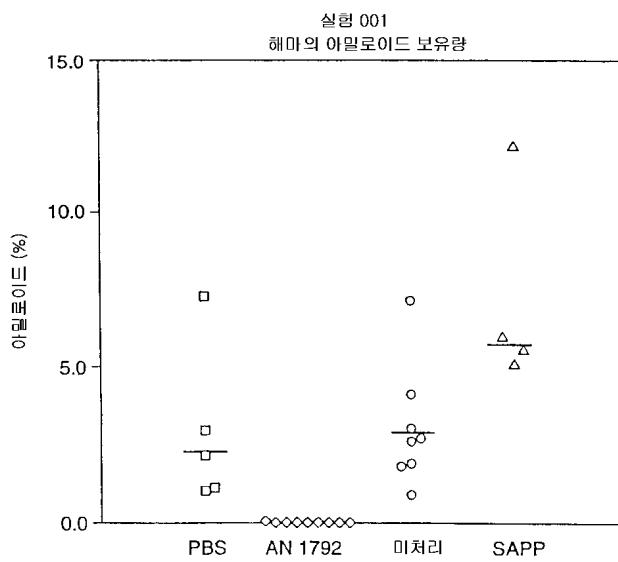
1종 이상의 인용된 원소를 "포함하는" 조성물 또는 방법은 특정하여 인용하지 않은 기타의 원소를 포함할 수 있다. 예를 들면, A β 웨პ티드를 포함하는 조성물은 거대 폴리웨პ티드 서열의 성분으로서의 A β 웨პ티드 및 분리된 A β 웨პ티드 모두를 포함한다.

도면

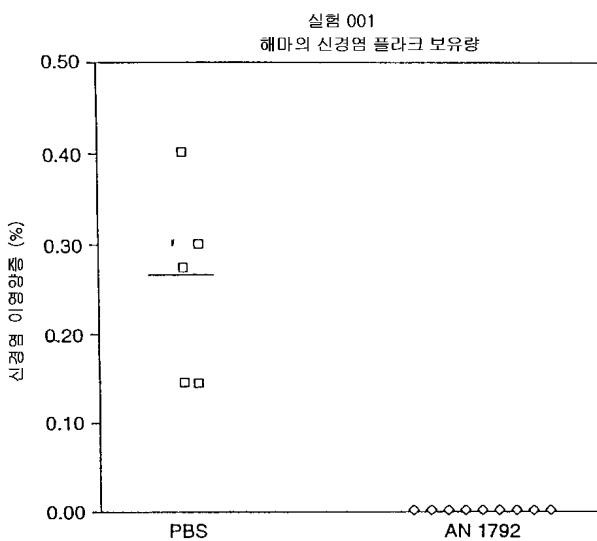
도면1



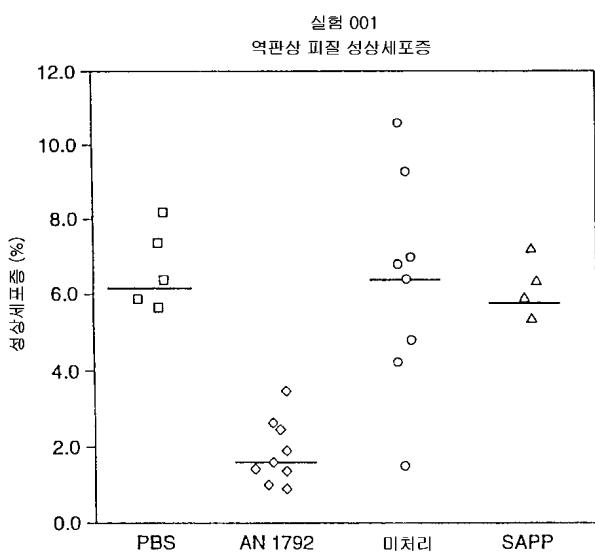
도면2



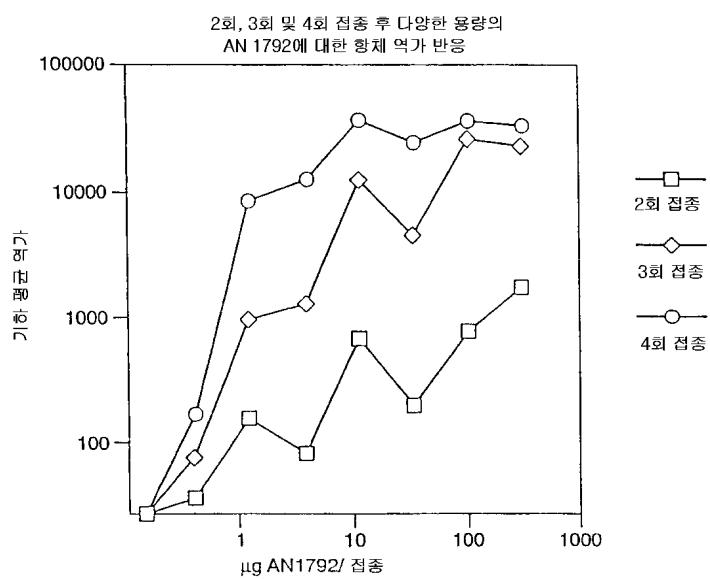
도면3



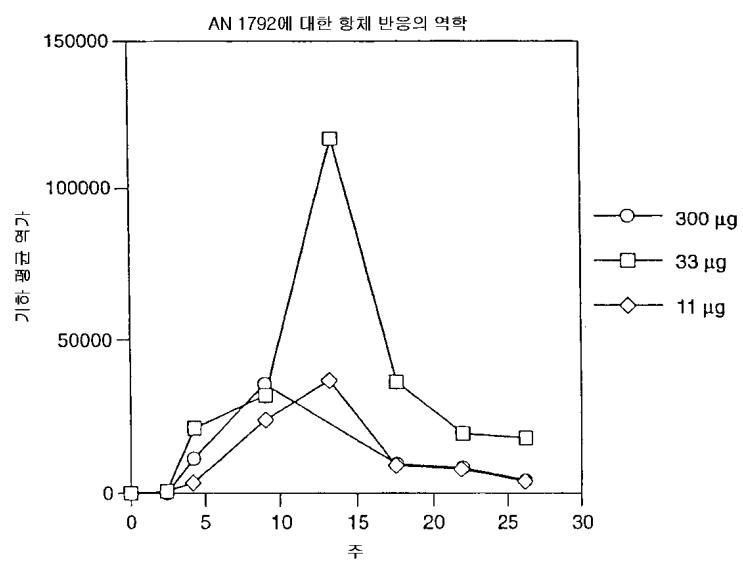
도면4



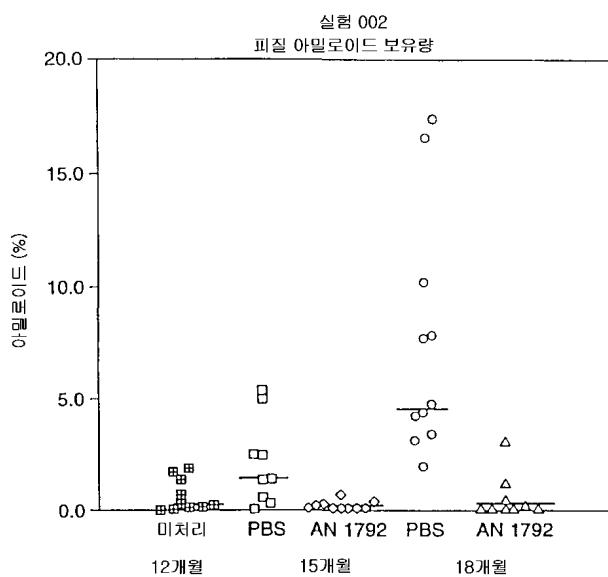
도면5



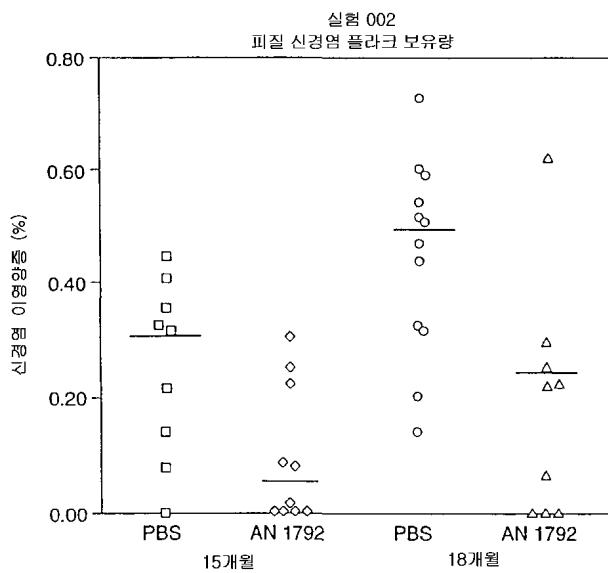
도면6



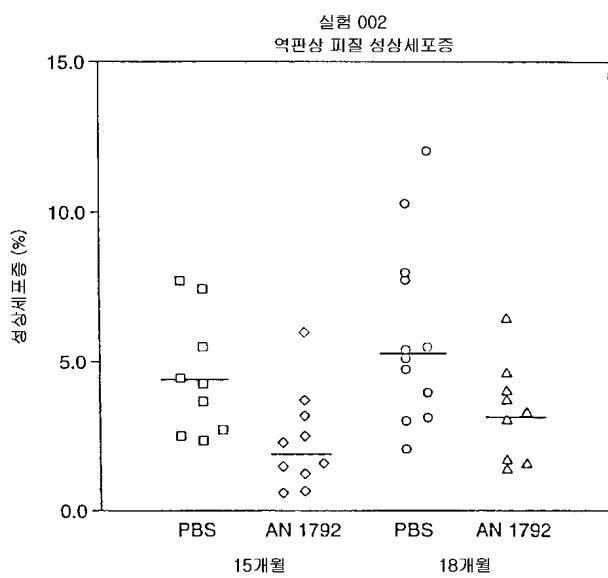
도면7



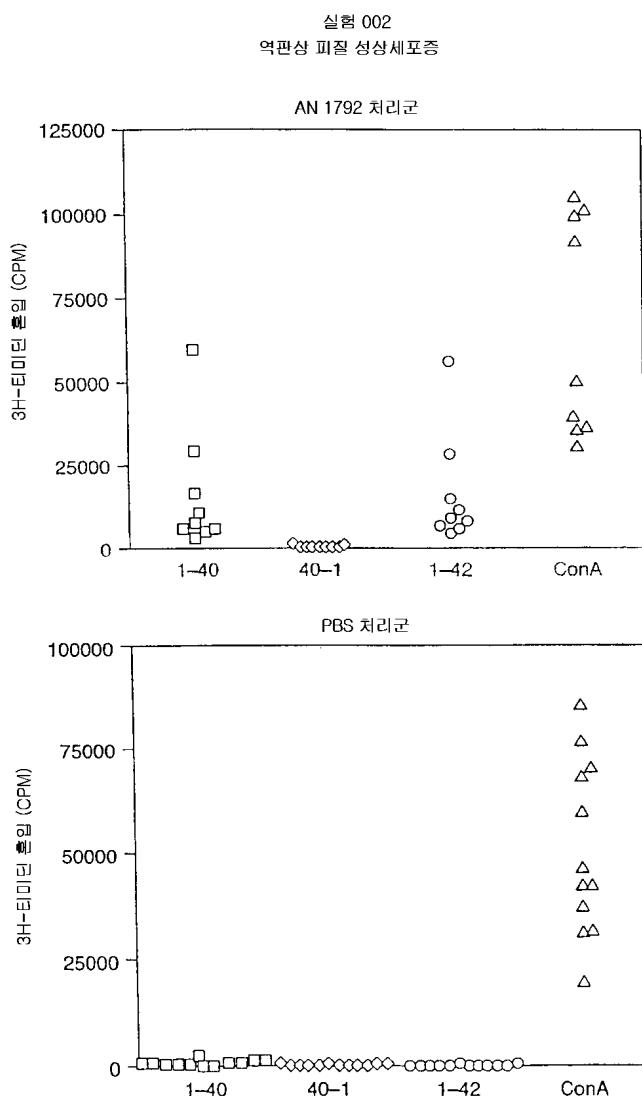
도면8



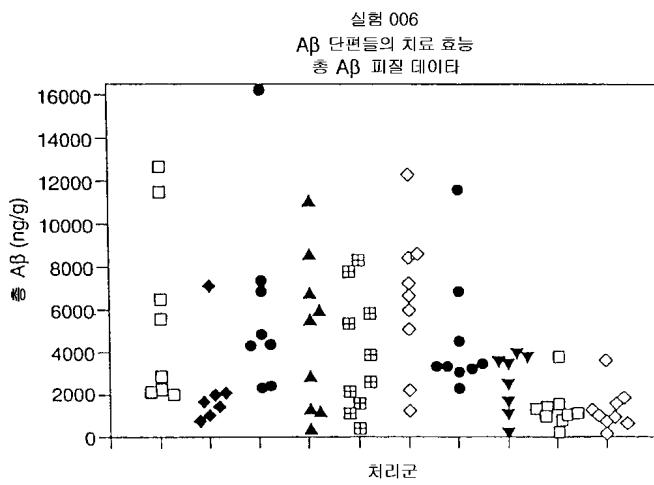
도면9



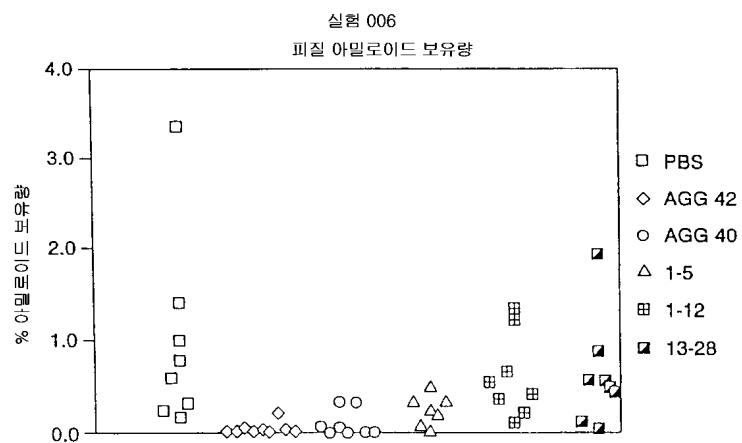
도면10



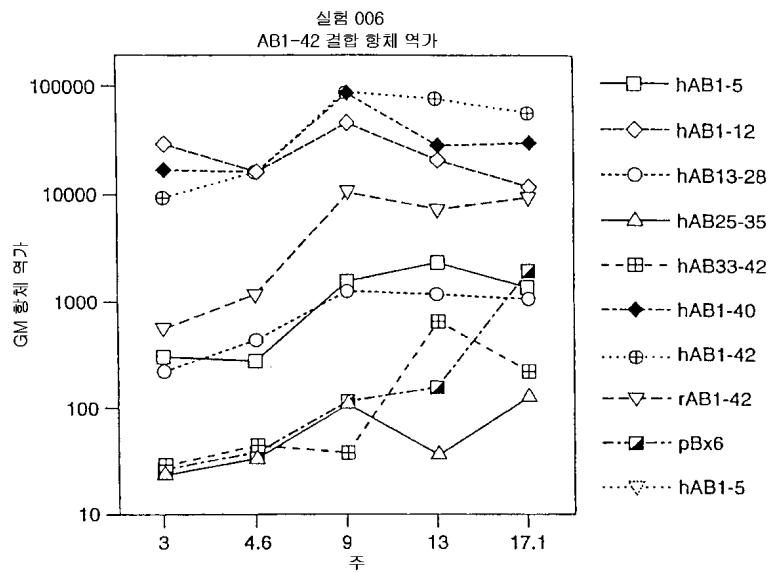
도면11



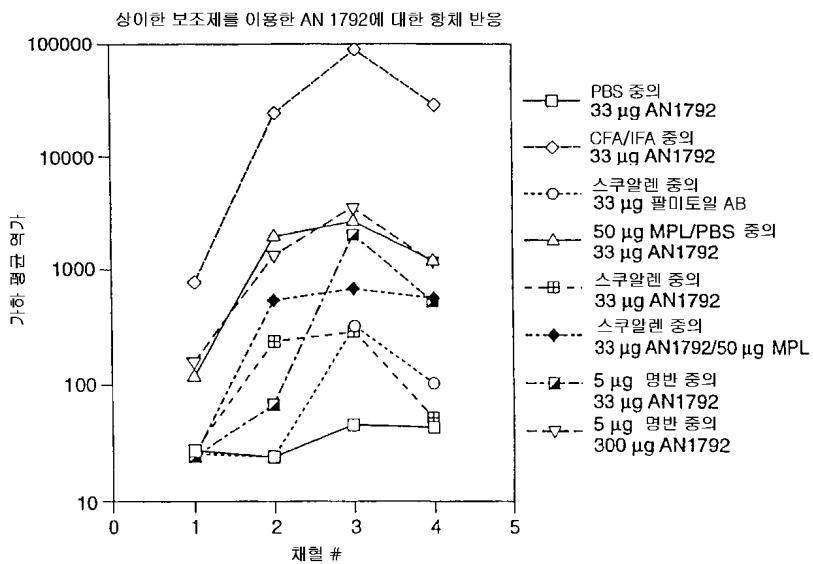
도면12



도면13



도면14



도면15a

표1			
PBS 대조군		미치리 대조군	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
829-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
중간 p 값 (M-W)	1817	중간 p 값 (M-W)	1153
평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트)	1931 1718 89 n=16	평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트)	1825 1769 97 n=15

도면15b

피질

2 mg 면반 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
663-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
총간 p 값 (M-W)	2051	총간 p 값 (M-W)	1741
평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=20	2407 1913 79 n=20	평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=21	2140 1659 78 n=21

도면15c

피질

25 µg QS21 100 µg AN1528		CEA/IFA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
총간 p 값 (M-W)	1199	총간 p 값 (M-W)	475 0.0481
평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=21	1552 1364 88 n=21	평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=15	637 655 103 0.0106 n=15

도면15d

피질

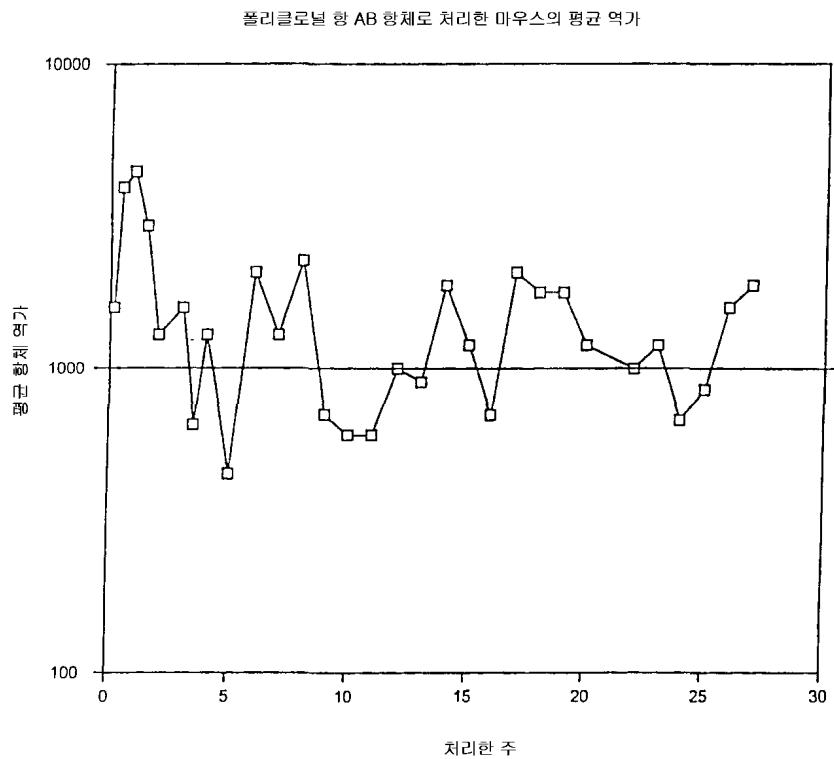
5 µg 티메로살 /PBS 10 µg AN1792		2 µg 멜반 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
증간 p 값 (M-W)	1687	증간 p 값 (M-W)	1375 0.5000
평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=15	2718 2685 99 n=15	평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=21	1394 1166 84 0.2650 n=21

도면15e

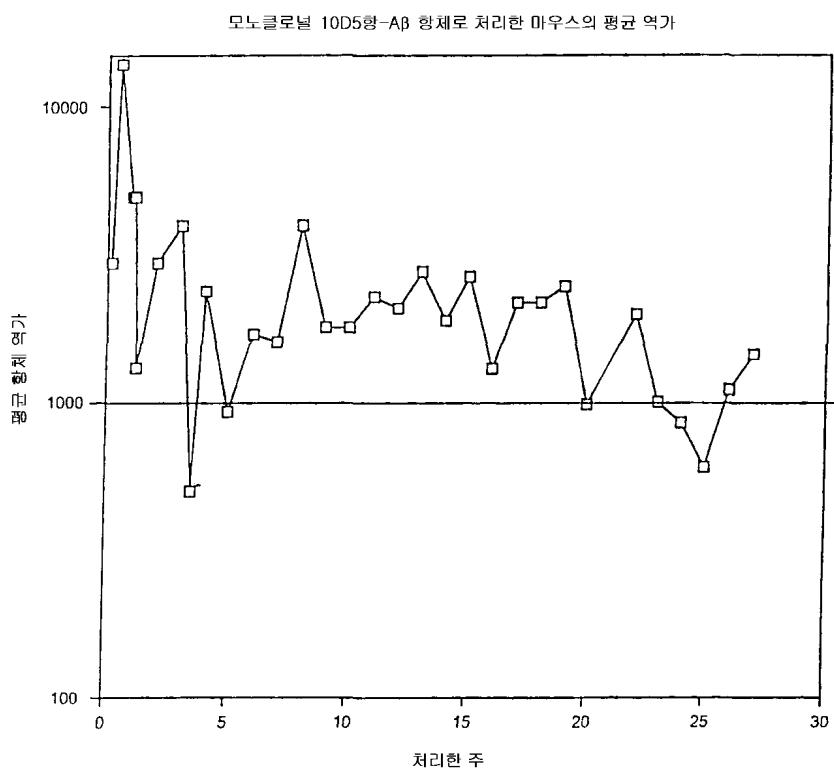
피질

50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
증간 p 값 (M-W)	774 0.1710	증간 p 값 (M-W)	950 0.4076
평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=21	1192 1299 109 0.1506 n=21	평균 표준 편차 % CV p 값 (t 테스트) n=18	2199 4187 190 0.8131 n=18

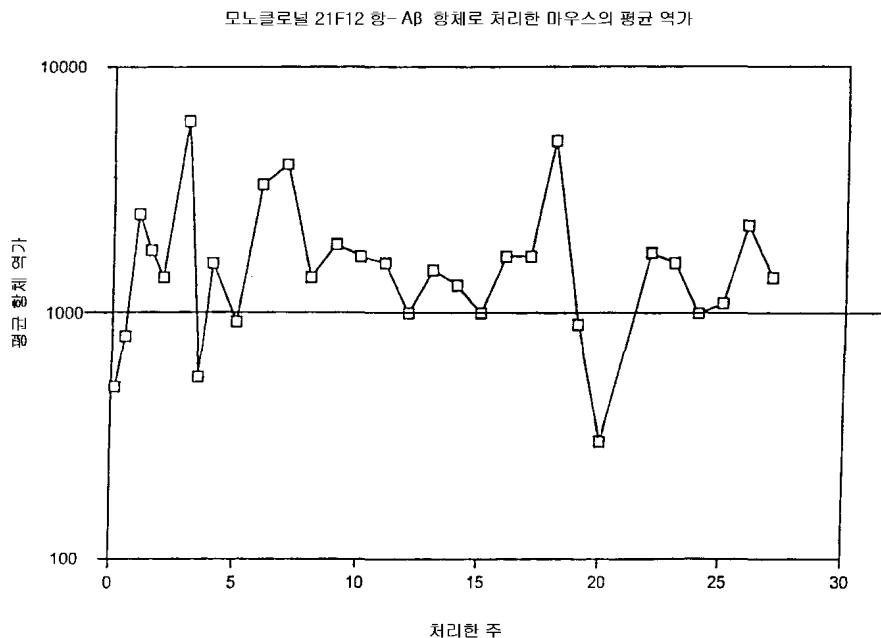
도면16



도면17

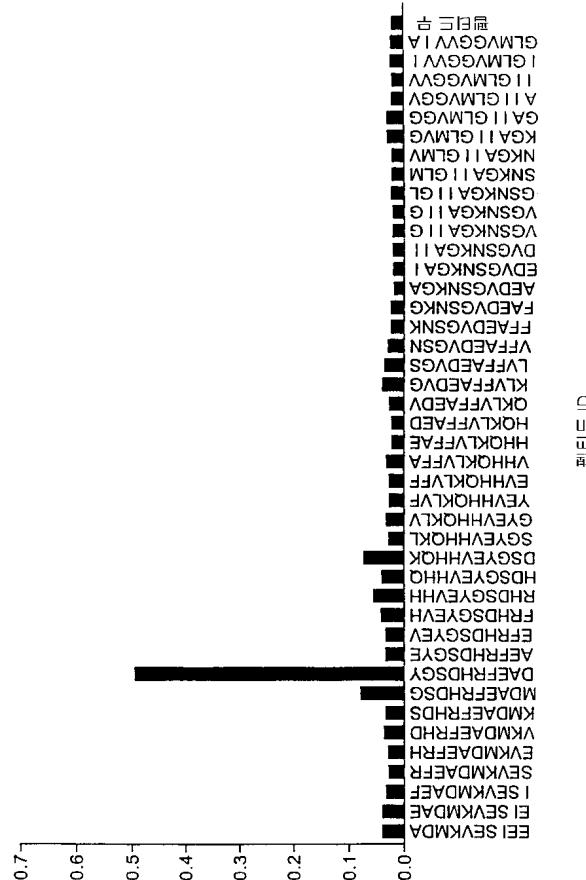


도면18



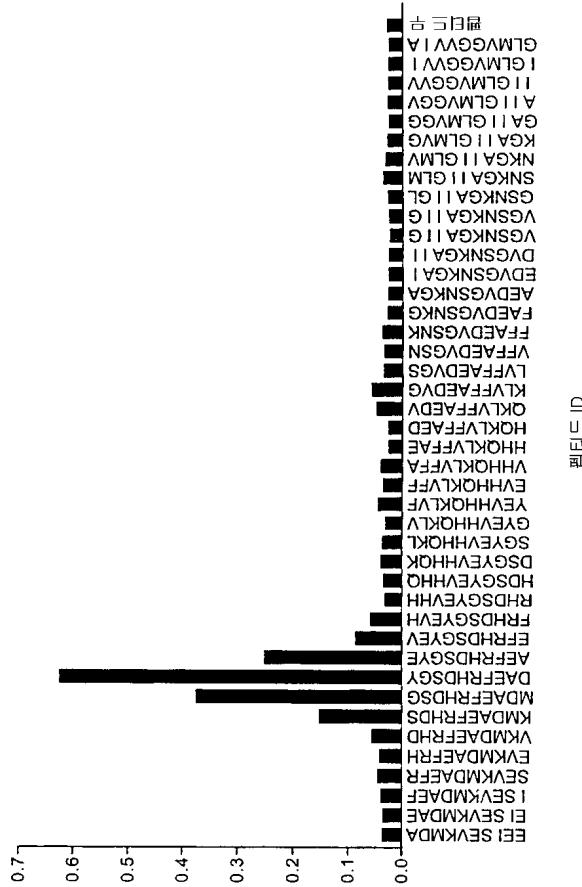
도면19

9군: F10920M, 300 μ g AN1792 + 100 μ g QS21
투여 스케줄 2 역가 = 84,484 (8로 표준화시킴)



도면20

11군 : F10975F, 300μg AN1792 + 100μg QS21
투여 스케줄 3, 역가 = 38,632 (8로 표준화시킴)



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Schenk, Dale B.
Bard, Frederique
Vasquez, Nicki
Yednock, Ted
Neuralab Limited

<120> Prevention and Treatment of Amyloidogenic Disease

<130> 15270J-004750KR

<140> KR 10-2001-7015232

<141> 2000-05-26

<150> US 09/322,289

<151> 1999-05-28

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> human Abeta42 beta-amyloid peptide

<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 Val Val Ile Ala
35 40

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:influenza
hemagglutinin HA-307-319 universal T-cell epitope

<400> 2
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PADRE universal
T-cell epitope

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 3

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:malaria CS, T3
epitope universal T-cell epitope

<400> 4

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:hepatitis B
surface antigen HBsAg-19-28 universal T-cell
epitope

<400> 5

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:heat shock
protein 65 hsp65-153-171 universal T-cell epitope

<400> 6

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15

Asn Glu Gly

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:bacille
Calmette-Guerin universal T-cell epitope

<400> 7

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
1 5 10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:tetanus toxoid
TT-830-844 universal T-cell epitope

<400> 8

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:tetanus toxoid
TT-947-967 universal T-cell epitope

<400> 9

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HIV gp120 T1
universal T-cell epitope

<400> 10

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:AN 90549 Abeta
1-7/tetanus toxoid 830-844

<400> 11

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu

20

<210> 12
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:AN 90550 Abeta
1-7/tetanus toxoid 947-967

<400> 12
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
1 5 10 15

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
20 25

<210> 13
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:AN90542 Abeta
1-7/tetanus toxoid 830-844 + 947-967

<400> 13
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
20 25 30

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
35 40

<210> 14
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:AN 90576 Abeta
3-9/tetanus toxoid 830-844

<400> 14

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:AN90562 Abeta
1-7/peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(20)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 15

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp
20

<210> 16

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:AN90543 Abeta
1-7 x 3/peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(34)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 16

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala			
1	5	10	15

Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala		
20	25	30

Ala Ala

<210> 17

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 17

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu			
1	5	10	15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg		
20	25	30

His Asp

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> Xaa = any amino acid

<400> 18
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu
1 5 10 15

Lys Ala Ala Ala
20

<210> 19
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 19
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 20
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 20
Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 21
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 21
Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 22
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 22
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

His Asp

<210> 23
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 23

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
20 25

<210> 24

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 24

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
20 25 30

Ala Thr

<210> 25

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 25

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys
1 5 10 15

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr

20

25

<210> 26

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 26

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu
1															

5

10

15

Lys	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Met	Glu	Lys	Ala	Ser	Ser

20

25

30

Val	Phe	Asn	Val	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile
35															

35

40

45

Thr	Glu	Leu	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg	Val	Pro
50															

50

55

60

Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp
65														

65

70

75

<210> 27

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
with Abeta epitope

<400> 27

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Asp	Ala
1															

5

10

15

Glu	Phe	Arg	His	Asp	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly
20															

25

30

Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val
 35 40 45

Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 50 55

<210> 28
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
 with Abeta epitope

<400> 28
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 35 40

<210> 29
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
 with Abeta epitope

<400> 29
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
 35 40 45

Arg His Asp
 50

<210> 30
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:fusion protein
 with Abeta epitope on a branched resin

<400> 30
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 20

<210> 31
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synuclein
 fusion protein

<400> 31
 Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Ile Ser Gln Ala Val His Ala
 1 5 10 15

Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
 20 25

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Abeta 1-12
peptide with inserted Cys residue

<400> 32

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Cys
1 5 10

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Abeta 1-5
peptide with inserted Cys residue

<400> 33

Asp Ala Glu Phe Arg Cys
1 5

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Abeta 33-42
peptide with inserted Cys residue

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)

<223> Xaa = amino-heptanoic acid

<400> 34

Cys Xaa Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Abeta 13-28
peptide with two Gly residues added and inserted
Cys residue

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> Xaa = N-acetyl His

<400> 35

Xaa His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
1 5 10 15

Gly Gly Cys