



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월04일

(11) 등록번호 10-2020072

(24) 등록일자 2019년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7023118

(22) 출원일자(국제) 2012년03월16일

심사청구일자 2017년03월13일

(85) 번역문제출일자 2013년08월30일

(65) 공개번호 10-2014-0006019

(43) 공개일자 2014년01월15일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/054629

(87) 국제공개번호 WO 2012/123562

국제공개일자 2012년09월20일

(30) 우선권주장

61/453,449 2011년03월16일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20100021478 A1*

WO2010128139 A1*

Neuroscience Letters. Vol. 215, No. 3, pp.
173-176 (1996)

WO2009149485 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

프로비오드룩 아게

독일 데-06120 할레 바인베르그백 22

(72) 발명자

클라인슈미트, 마틴

독일, 06114 할레 / 잘레, 쉴러슈트라쎄 25

쉴링, 슈테판

독일, 06130 할레 / 잘레, 글로켄베그 4

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 진단 항체 시험

(57) 요약

본 발명은 아밀로이드증, 특히 알츠하이머병의 진단을 위한 신규한 진단 시험, 및 관련된 관점에 관한 것이다. 특히, 모노클로날 항체 및 항체 시험이 제공된다.

(72) 발명자

라펠트, 옌스-울리히

독일, 06317 게마인데 시게비에트 만스펠더 란트,
오티 뢰브링겐 에이. 시, 그라스만베그 4

데무스, 한스-울리히

독일, 06120 할레 / 잘레, 암 발드란트 13에이

에버만, 크리스틴

독일, 02763 치타우, 키슬러슈트라쎄 6

명세서

청구범위

청구항 1

AβpGlu(11) 펩타이드에 높은 친화성으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체로서, 상기 높은 친화성이 10^{-7} M 또는 그보다 우수한 해리 상수 (K_D) 값을 의미하고, 상기 항체의 경쇄의 가변 부분이 서열번호 52의 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 중쇄의 가변 부분이 서열번호 54의 아미노산 서열을 갖는 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체의 경쇄의 가변 부분이 서열번호 51의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되거나, 또는 서열번호 52의 아미노산 서열을 갖는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체의 중쇄의 가변 부분이 서열번호 53의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되거나, 또는 서열번호 54의 아미노산 서열을 갖는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체의 경쇄의 가변 부분이 서열번호 51의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되고, 상기 항체의 중쇄의 가변 부분이 서열번호 53의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 항체.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체가 Aβ 13-11-6 (기탁번호 DSM ACC 3100)인 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체, 또는 높은 친화성을 보유하는 항체 단편이고, 상기 높은 친화성이 10^{-7} M 또는 그보다 우수한 해리 상수 (K_D) 값을 의미하는 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, AβpGlu(11) 펩타이드를 검출하는데 사용하기 위한 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 AβpGlu(11) 펩타이드가 pGlu-Aβ₁₁₋₃₈, pGlu-Aβ₁₁₋₄₀, pGlu-Aβ₁₁₋₄₂, 및 pGlu-Aβ_{11-x} 변이체 (여기에서, x는 18 내지 42 사이의 정수이다)의 그룹으로부터 선택되는 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항에 있어서, 높은 친화성을 보유하는 디아바디 또는 단일쇄 항체이고, 상기 높은 친화성이 10^{-7} M 또는 그보다 우수한 해리 상수 (K_D) 값을 의미하는 항체.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제1항에 있어서, 표지된 항체.

청구항 19

제1항에 있어서, 고체상 위에 고정화된 항체.

청구항 20

하이브리도마 세포주 DSM ACC 3100으로부터 수득할 수 있는 항체.

청구항 21

제1항, 제3항 내지 제6항, 제8항 내지 제11항, 제13항 및 제18항 내지 제20항 중의 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 항체를 포함하는 아밀로이드증의 치료, 예방 또는 지연을 위한 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 아밀로이드증이 경도 인지 장애, 알츠하이머병, 및 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환인 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 아밀로이드증이 산재성 알츠하이머병 또는 가족형 알츠하이머 치매인 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 가족형 알츠하이머 치매가 가족형 영국 치매 또는 가족형 덴마크 치매인 조성물.

청구항 26

하이브리도마 세포주 DSM ACC 3100.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

하기 단계를 포함하는 아밀로이드증을 진단하기 위한 시험관 내 정보 제공 방법:

제1항, 제3항 내지 제6항, 제8항 내지 제11항, 제13항 및 제18항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 따르는 항체를 아밀로이드증을 앓을 것으로 예상되는 대상체로부터의 샘플과 접촉시키는 단계, 및

샘플로부터 AβpGlu(11) 단백질에 대한 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함하는, 단계.

청구항 33

제1항, 제3항 내지 제6항, 제8항 내지 제11항, 제13항 및 제18항 내지 제20항 중의 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 항체, 및 사용 설명서, 및 임의로, 추가의 생물학적 활성물질(들)을 포함하는 아밀로이드증의 진단을 위한 진단 키트.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 추가의 생물학적 물질이 글루타미닐 사이클라제의 억제제인 진단 키트.

청구항 35

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아밀로이드증 (amyloidosis), 알츠하이머병과 같은 아밀로이드 단백질과 연관된 장애 및 이상의 그룹 및 관련된 관점들의 진단을 위한 신규한 진단 시험에 관한 것이다. 특히, 항체 시험(antibody assay)이 제공된다.

배경 기술

[0002] 아밀로이드증은 단일 질환 실체가 아니며, 오히려 하나 이상의 기관 또는 신체 시스템에 축적하는 왁스상의 전분-유사 단백질의 세포외 조직 침착물을 특징으로 하는 진행성 질환 과정의 다양한 그룹이다. 아밀로이드 침착물이 축적함에 따라서, 이들은 기관 또는 신체 시스템의 정상 기능을 저해하기 시작한다. 아밀로이드증은 적어도 15 개의 상이한 타입이 있다. 주된 형태는 알려진 선행상태가 없는 원발성 아밀로이드증, 일부의 다른 상태가 따르는 이차 아밀로이드증, 및 유전적 아밀로이드증이다.

[0003] 이차 아밀로이드증은 결핵, 가족형 지중해열 (familial Mediterranean fever)로 불리는 박테리아 감염, 골 감염 (골수염), 류마티스 관절염, 소장염 (육아종성 회장염), 호지킨병 및 나병과 같은 만성 감염 또는 염증성 질환 중에 일어난다.

[0004] 아밀로이드 침착물은 아밀로이드 P (오각형) 성분 (AP), 정상 혈청 아밀로이드 P (SAP)와 관련된 당단백질, 및 설페이트화 글리코사미노글리칸 (GAG), 결합조직의 복잡한 탄수화물을 포함한다. 아밀로이드 물질의 약 90%를

차지하는 아밀로이드 단백질 원섬유 (fibrils)는 단백질의 몇 개의 상이한 타입 중의 하나를 포함한다. 이들 단백질은 콩고 레드 (Congo red)에 대한 결합부위를 나타내어 아밀로이드 단백질의 독특한 염색 특성을 제공하는 독특한 단백질 배열인 소위 "베타-병풍 (beta-pleated)" 시트 원섬유로 접힐 수 있다.

- [0005] 노화의 다수의 질환은 아밀로이드-유사 단백질에 근거하거나 그와 연관되며, 부분적으로는 발병뿐만 아니라 질병의 진행에 기여하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 물질의 세포외 침착물의 축적을 특징으로 한다. 이들 질환에는 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD) 또는 가족형 영국 치매 (Familial British Dementia; FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (Familial Danish Dementia; FDD)와 같은 가족형 알츠하이머병 (FAD), 다운 증후군 (Down Syndrome)에서의 신경변성, 루이체 (Lewy body) 치매, 아밀로이드증이 있는 유전적 뇌일혈 (네덜란드 타입), 괌 (Guam) 파킨슨-치매 복합체와 같은 신경적 장애가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 아밀로이드-유사 단백질에 근거하거나 그와 연관된 그 밖의 다른 질환은 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥병 (Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS (근위축성 측삭 경화증), 성인기 발증형 당뇨병, 노년기 심장 아밀로이드증 (senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 다른 질환이다.
- [0006] 이들 질환의 병인론은 다양할 수 있지만, 이들의 특징적 침착물은 종종 다수의 공유된 분자 구성성분을 함유한다. 이것은 상당한 정도까지 전-염증성 경로의 국소적 활성화에 기인할 수 있으며, 이에 의해서 활성화된 보체 성분, 급성기 반응물, 면역 조절제, 및 그 밖의 다른 염증 조절제의 동시 침착을 유도할 수 있다 [McGeer et al., Tohoku J Exp Med. 174(3):269-277 (1994)].
- [0007] 최근에, 축적된 증거는 알츠하이머병에서의 N-말단 변형된 A β 펩타이드의 연루를 입증한다. 조준형 생검 (aiming biopsies)은 알츠하이머병 환자의 뇌에서만 아니라 병에 걸리지 않은 개체의 노인성 플라크에서도 A β 1-40 및 A β 1-42의 존재를 나타낸다. 그러나, N-말단 절단 및 pyroGlu 변형된 A β N3pE-40/A β N3pE-42는 알츠하이머병 환자의 플라크 내에 거의 독점적으로 자리잡음으로써 이 A β 변이체를 적격의 진단 마커 및 약물 개발을 위한 잠재적 표적으로 만든다.
- [0008] 현재, 몇 개의 상업적 제조자들이 낮은 피코그램 (pg) 범위에서 A β 1-40/1-42 및 A β N3pE-40/A β N3pE-42의 검출을 허용하는 ELISA 키트를 제공한다.
- [0009] 알츠하이머병 (AD) 환자의 뇌는 형태학적으로 신경원섬유 엉킴의 존재, 및 신경피질 뇌구조 내에서 A β 펩타이드의 침착물을 특징으로 한다 [Selkoe, D.J. & Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43, 545-584 (2003)]. A β 펩타이드는 β - 및 γ -세크리타제에 의한 순차적 분해 후에 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)로부터 유리된다. γ -세크리타제 분해는 그들의 C-말단이 상이하고, 응집, 원섬유 형성 및 신경독성의 상이한 잠재력을 나타내는 A β 1-40 및 A β 1-42 펩타이드의 생성을 야기한다 [Shin, R.W. et al. Amyloid beta-protein (Abeta) 1-40 but not Abeta 1-42 contributes to the experimental formation of Alzheimer disease amyloid fibrils in rat brain. J. Neurosci. 17, 8187-8193 (1997); Iwatsubo, T. et al. Visualization of Abeta 42(43) and Abeta 40 in senile plaques with end-specific Abeta monoclonals: evidence that an initially deposited species is Abeta 42(43). Neuron 13, 45-53 (1994); Iwatsubo, T., Mann, D.M., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. Amyloid beta protein (Abeta) deposition: Abeta 42(43) precedes Abeta 40 in Down syndrome. Ann. Neurol. 37, 294-299 (1995); Hardy, J.A. & Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256, 184-185 (1992); Roßner, S., Ueberham, U., Schliebs, R., Perez-Polo, J.R. & Bigl, V. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. Prog. Neurobiol. 56, 541-569 (1998)].
- [0010] 분배 플라크 내에 침착된 A β 펩타이드의 대부분은 N-말단 절단되거나 변형된다. 피시니 (Piccini)와 사이도 (Saido)의 연구는 노인성 플라크 및 혈관 침착물이 코어 구조가 50% 피로글루타메이트 (pyroGlu) 변형된 펩타이드로 구성된다고 나타내었다 [Piccini et al., J Biol Chem. 2005 Oct 7; 280(40): 34186-92; Saido et al., Neuron. 1995 Feb; 14(2): 457-66]. PyroGlu 변형된 펩타이드는 다른 A β 종들보다 더 강력한 세포독성이 있으며, 아미노펩티다제에 대해서 안정하다 [Russo et al., J Neurochem. 2002 Sep; 82(6): 1480-9]. 따라서, pyroGlu A β 종들은 더 긴 반감기를 가지며, 이에 의해서 이들 종의 축적 및 신경독성 올리고머뿐만 아니라 응집체의 형성이 유익하다 [Saido, Neurobiol Aging. 1998 Jan-Feb; 19(1 Suppl): S69-75]. 글루타메이트의 pyroGlu로의 폐환에 기인하여, 펩타이드의 가용성을 강하게 감소시키고, 증가된 응집 경향을 야기하는 하전된 아미노산이 상실될 것이다. 시험관내 연구는, 예를 들어, A β 3(pE)의 초기 올리고머화가 비-변형된 펩타이드에

비해서 훨씬 더 빠른 것을 나타내었다 [Schilling et al., Biochemistry. 2006 Oct 17; 45(41): 12393-9].

- [0011] 본 발명자들에 의해서 수행된 연구는 A β 11(pE)가 A β 3(pE)보다 더 큰 응집 경향 및 훨씬 더 낮은 용해도를 갖는 것을 나타내었다. 내스룬드 제이. (Naslund J.) 등의 그룹 [Proc. Natl. Acad. Sci. Neurobiology, Vol. 91 pp. 8378-8382]은 질량분석에 의해 산재성 AD의 뇌에서 가장 탁월한 절단된 변이체 A β pE (11-42)를 검출하였다. 현재까지, 내스룬드 제이. 등의 연구는 플라크 내의 A β 11(pE)의 침착을 시험한 몇 가지 연구 중의 하나이다.
- [0012] 모든 사실은, pyroGlu A β 가 원섬유 형성의 초기화를 위한 배아 (germ)의 종류임을 시사한다. 새로운 연구 [Piccini et al., 2005, supra]에서, 플라크 침착은 있지만 AD 특이적 병리학은 없는 지원자는 A β -종의 특징적인 양에 기인하여 AD 환자로부터 구분될 수 있었다. 이에 의해서, N-말단 절단된 pyroGlu 변형 펩타이드의 양은 AD 환자의 뇌에서 상당히 더 많았다.
- [0013] A β -펩타이드의 위치 3 또는 11에서 pyroGlu의 해독 후 형성은 N-말단 글루타메이트 잔기의 폐환을 포함한다. 글루타미닐 사이클라제 (QC)는 pyroGlu 펩타이드의 생성에 중요한 역할을 한다. QC는 식물 및 동물계에 광범하게 분포되며, 특히 펩타이드 호르몬의 성숙에 포함된다. 암모니아의 방출에 의한 글루타민의 폐환 및 물의 방출에 의한 글루타메이트의 pyroGlu로의 폐환은 둘 다 QC에 의해서 수행된다. 글루타민 폐환과는 대조적으로, 글루타메이트 폐환은 자연적으로 일어나지 않는다. QC는 글루타메이트로부터 pyroGlu로의 효율적인 (원치 않는) 부반응을 촉진시킨다. 생성된 pyroGlu 잔기는 단백분해적 분해로부터 단백질을 보호한다. QC가 pyroGlu A β 의 생성에 중요한 역할을 하는 것을 나타내는 몇 가지 문헌이 있다:
- [0014] 1. 몇 가지 연구에서, QC는 A β 의 N-말단에서 글루타메이트로부터 pyroGlu 잔기의 형성을 촉진시키는 것으로 나타났다 [Cynis et al., Biochim Biophys Acta. 2006 Oct; 1764(10): 1618-25; Schilling et al., FEBS Lett. 2004 Apr 9; 563(1-3): 191-6];
- [0015] 2. A β 펩타이드 및 QC는 둘 다 해마 및 피질에서 대량으로 발현된다. 이들 뇌 영역은 특히 AD에 위험이 있다 [Pohl et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 15; 88(22): 10059-63, Selkoe, Physiol Rev. 2001 Apr; 81(2): 741-66];
- [0016] 3. APP는 원형질막으로의 수송 중에 β -세크리타제에 의해서 분해됨으로써 유리 글루타메이트 잔기를 갖는 A β 의 N-말단이 생성될 수 있다 [Greenfield et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 19; 96(2): 742-7]. 분비 소포에서, 처리된 APP와 QC의 공동-국소화 (co-localisation)가 결정되었다. 따라서, 소포의 약산 환경에서는 글루타메이트 잔기의 피로글루타메이트로의 가속화된 변형이 일어날 수 있다.
- [0017] 4. 또한, 그 밖의 다른 신경변성 질환 (가족형 덴마크 (FDD) 또는 영국 치매 (FBD))은 N-말단 pyroGlu 변형된 펩타이드, 예를 들어, Bri2와 관련되지만, 그에 반해서 이들은 이들의 일차 구조의 면에서 A β 와 관련되지 않는다 [Vidal R. et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 4920-4925].
- [0018] 아마도 pyroGlu A β 의 QC-촉진된 형성이 신경변성 질환의 발생 및 진행에 포함된다. N-말단 변형된 아밀로이드 펩타이드의 형성은 확실히 A β 응집의 과정에서의 근본 요인을 나타내며, 질환의 시작일 수 있다. QC의 억제에 의한 pyroGlu A β 형성의 억제는 치료학적 접근방법이 될 수 있다. QC 억제제는 pyroGlu A β 의 형성을 방지하고, 뇌에서의 피로글루타메이트 A β 의 농도를 감소시키며, 따라서 A β -펩타이드의 올리고머화를 지연시킬 수 있을 것이다. 쉐링 (Schilling) 등은 QC 발현이 AD 환자의 피질에서 상향조절되었고, pyroGlu-변형된 A β -펩타이드의 출현과 상호관련되었음을 나타내었다. QC 억제제의 경구 적용은 AD의 두 가지 상이한 유전자이식 마우스 모델에서, 및 새로운 드로소필라 (Drosophila) 모델에서 감소된 피로글루타메이트 변형된 A β pE(3-42) 수준을 야기하였다 [Schilling et al., 2008 Biol. Chem. (389), 983-991].
- [0019] 루이체 치매 (LBD)는 65 세 이상의 사람에게서 일어날 수 있는 신경변성 장애이며, 전형적으로 인지 (생각) 장애 및 비정상적인 행동 변화의 증상을 야기한다. 증상에는 인지 장애, 신경적 징후, 수면 장애, 및 자율신경계 부전이 포함될 수 있다. 인지 장애는 대부분의 증례에서 LBD의 제시되는 특징이다. 환자들은 점진적으로 악화하는 혼란의 재발 에피소드를 갖는다. 인지 능력에 있어서의 변동은 종종 관심과 경계의 바뀌는 정도와 연관된다. 인지 장애 및 생각의 변동은 분, 시간, 또는 일에 걸쳐서 달라질 수 있다. 루이체는 포스포릴화 및 비포스포릴화된 신경필라멘트 단백질로부터 형성되며; 이들은 시냅스 단백질 알파-시누클레인 뿐만 아니라 손상되거나 비정상적인 단백질의 제거에 수반되는 유비퀴틴을 함유한다. 루이체 이외에, 신경세포의 세포 과정에서의 붕괴체인 루이 신경돌기가 또한 존재할 수도 있다. 아밀로이드 플라크는 DLB로 고생하는 환자의 뇌에서 형성될 수 있지만, 이들은 알츠하이머병을 갖는 환자에게서 나타나는 것보다 수적으로 더 적은 경향이 있다. AD의 다른 현미

병리학적 홀마크인 신경원섬유 엉킴은 LBD의 주된 특징이 아니지만, 아밀로이드 플라크 이외에도 빈번하게 나타난다.

- [0020] 근위축성 측삭 경화증 (ALS)은 상위 및 하위 운동 뉴런의 변성을 특징으로 한다. 일부의 ALS 환자에게서는, 치매 또는 실어증이 존재할 수 있다 (ALS-D). 치매는 가장 통상적으로는 전측두엽 치매 (FTD)이며, 이들 증례의 대부분은 전두엽 및 측두엽의 치상회(dentate gyrus) 및 표재층의 뉴런에서 유비퀴틴-양성, 타우 (tau)-음성 봉입을 갖는다.
- [0021] 봉입체 근염 (IBM)은 50 세 이상의 사람에게서 통상적으로 발견되는 장애를 초래하는 질병이며, 여기에서는 근육 섬유가 염증을 일으키고, 위축하기 시작하지만, 뇌는 그대로 남아있고 환자는 그들의 완전한 지적 능력을 유지한다. 아밀로이드- β 단백질의 생산에 연루된 2 개의 효소는 아밀로이드- β 가 또한 증가된 노인 환자의 가장 통상적인 이러한 진행성 근육 질환을 갖는 환자의 근육 세포 내부에서 증가하는 것으로 발견되었다.
- [0022] 아밀로이드-유사 단백질의 축적 및 침착에 근거하거나 이와 연관된 또 다른 질환은 황반 변성이다. 황반 변성은 망막 (눈의 후면에 있는 종이처럼 얇은 조직으로 여기에서 감광성 세포는 시각 시그널을 뇌에 보낸다)의 중앙 영역인 황반 (macula)의 변패를 야기하는 통상적인 안질환이다. 선명하고 뚜렷한 "직진으로 나가는 (straight ahead)" 시각이 황반에 의해서 처리된다. 황반에 대한 손상은 맹점 및 흐릿하거나 왜곡된 시각의 발생을 야기한다. 노화-관련된 황반 변성 (AMD)은 미국에서 시간 장애의 주된 원인이며, 65세 이상의 사람의 경우에 이것은 코카서스 인종들 사이에서 법적맹 (legal blindness)의 선도 원인이다. 40세 이상인 대략 180만 명의 미국인이 진전된 AMD를 가지며, 중간 단계 AMD가 있는 또 다른 730만 명의 사람은 시력상실에 대한 실질적인 위험이 있다. 정부는 2020년까지 290만 명이 진전된 AMD를 가질 것으로 추정하고 있다. AMD의 피해자들은 종종, 이러한 실명 조건의 원인 및 치료에 대해서 얼마나 잘 모르는지를 발견하고 놀라고 좌절한다.
- [0023] 황반 변성에는 두 가지 형태, 즉 건성 황반 변성 및 습성 황반 변성이 있다. 황반의 세포가 서서히 붕괴하기 시작하는 건성 형태는 황반 변성 증례의 85%에서 진단된다. 통상적으로 양안이 건성 AMD에 의해서 영향을 받지만, 한눈은 시력을 상실할 수 있는 반면에 다른 눈은 영향을 받지 않고 남아있을 수 있다. 망막 아래의 황색 침착물인 결정강 (drusen)은 건성 AMD의 통상적인 초기 징후이다. 진전된 건성 AMD 또는 습성 AMD를 발생시킬 위험은 결정강의 수 또는 크기가 증가함에 따라서 증가한다. 건성 AMD는 질환의 습성 형태로 전환되지 않으면서 진전되고 시력의 상실을 야기할 수 있다; 그러나, 또한 초기-단계 건성 AMD는 갑자기 습성 형태로 변화할 수도 있다.
- [0024] 습성 형태는 비록 이것이 단지 증례의 15%를 차지하지만 실명의 90%를 야기하며, 진전된 AMD로 생각된다 (습성 AMD는 초기 또는 중간 단계가 없다). 습성 AMD에 앞서서는 항상 질환의 건성 형태가 수반된다. 건성 형태가 악화됨에 따라서, 일부의 사람은 황반의 뒤에 이상 혈관 성장이 일어나기 시작한다. 이들 혈관은 매우 약하며, 체액 및 혈액을 누출할 수 있어서 (따라서 '습성' 황반 변성이다) 황반에 대한 빠른 손상을 야기한다.
- [0025] AMD의 건성 형태는 처음에는 종종 약간 흐릿한 시각을 야기할 것이다. 그 후, 특히 시각의 중앙이 흐릿하게 될 수 있고, 이 부분은 질환이 진행함에 따라서 더 크게 성장한다. 단지 하나의 눈이 영향을 받았다면 증상은 알아챌 수 없을 수 있다. 습성 AMD에서는 직선이 물결 모양으로 나타날 수 있고, 중앙 시력상실이 빠르게 일어날 수 있다.
- [0026] 황반 변성의 진단은 전형적으로 확장된 안구 검사, 시력 검사, 및 AMD의 진단을 돕기 위한 안저검사 (fundoscopy)로 불리는 절차를 사용한 눈의 후면의 조망을 수반하며, 습성 AMD가 의심된다면 플루오레세인 혈관 촬영법이 또한 수행될 수도 있다. 건성 AMD가 진전된 단계에 도달하면, 시력상실을 예방하는 치료법은 현재 없다. 그러나, 항산화제와 아연의 특정한 고용량 제제는 중간 단계 AMD가 진전된 단계로 진행되는 것을 지연시키거나 예방할 수 있다. 마큐겐 (Macugen®) (페갑타니브 (pegaptanib) 나트륨 주사), 레이저 광응고법 및 광역학 치료법이 황반에서의 이상 혈관 성장 및 출혈을 제어할 수 있으며, 이것은 습성 AMD가 있는 일부의 사람에게도 도움이 된다; 그러나, 이미 상실된 시력은 이들 기술에 의해서 회복될 수 없을 것이다. 시력이 이미 상실되었다면, 생활의 질을 개선시키는데 도움을 줄 수 있는 저시력 보조기 (low vision aids)가 존재한다.
- [0027] 노화-관련된 황반 변성 (AMD)의 초기 징후 중의 하나는 망막 색소 상피 (RPE)의 기저판과 브루크막 (Bruch's membrane; BM) 사이의 결정강으로 알려진 세포의 침착물의 축적이다. 앤더슨 (Anderson) 등에 의해서 수행된 최근의 연구는 결정강이 아밀로이드 베타를 함유하는 것을 확인하였다 [Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256].

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0028] 본 발명의 목적은 생물학적 샘플, 예를 들어, 체액 또는 혈청 샘플, 바람직하게는 혈청 샘플 내의 A β 변이체, 특히 A β pGlu(11-x) 펩타이드의 정량적 측정을 허용하는 매우 민감하고 부수적으로 탄탄한 검출기술을 정립하기 위한 것이다. 이것은 혈액 내의 A β 펩타이드의 낮은 풍부성을 고려하면 엄청난 도전이다. 그러나, 이러한 검출 기술을 이용하게 되는 것은 약물 스크리닝 프로그램에서 소분자 억제제의 효능을 연구하기 위한 전제조건이다.
- [0029] 본 발명은 모노머, 다이머, 트라이머 등으로, 또는 폴리머 형태로, 응집체, 섬유, 필라멘트의 형태로, 또는 플라크의 응축된 형태로 항체에 제시될 수 있는 광범한 β -아밀로이드 항원, 특히 A β pGlu(11-x) 펩타이드로부터의 특이적 에피토프를 특이적으로 인식하고 그에 결합하는 능력을 갖는, 부분적으로 또는 완전히 인간화된 항체 및 그의 단편을 포함한 키메라 항체 및 그의 단편을 포함한 매우 특이적이며 매우 효과적인 항체를 포함하는 신규의 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 교시에 의해서 이용할 수 있는 항체는 특히 아밀로이드증, 알츠하이머병 (AD), 루이체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증이 있는 유전적 뇌일혈 (네덜란드 타입)과 같은 신경적 장애; 광 파킨슨-치매 복합체를 포함한 (단, 이들로 제한되지 않는다) 이차 아밀로이드증 및 노화-관련된 아밀로이드증을 포함한 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질환 및 장애의 그룹뿐만 아니라, 단지 몇 가지를 열거하면 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펔트 야콥병, 네덜란드 타입 아밀로이드증이 있는 유전적 뇌일혈, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS (근위축성 측삭 경화증), 성인기 발증형 당뇨병, 노년기 심장 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함한 그 밖의 다른 것과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 근거하거나 그와 연관된 그 밖의 다른 질환의 진단에 유용하다.

과제의 해결 수단

- [0030] **발명의 요약**
- [0031] 본 발명은 특히, 높은 친화성으로 A β pGlu(11-x)에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 변이체에 관한 것이다. 상기의 높은 친화성은 본 발명과 관련하여 10^{-7} M 또는 그보다 우수한 K_D 값, 바람직하게는 10^{-8} M 또는 그보다 우수한 K_D 값, 더 더욱 바람직하게는 10^{-9} M - 10^{-12} M의 K_D 값의 친화성을 의미한다.
- [0032] 특히, 항체는 바람직하게는 모노클로날 항체이며, 이하에서 클론 13으로 칭하는 A β 13-11-6으로부터 선택된다.
- [0033] 본 발명에 따르는 항체는 아밀로이드증, 특히 알츠하이머병을 검출하는 진단방법에서 특히 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0034] **도 1: 항 A β 11(pE) 항체의 스크리닝**

세포 융합 및 HAT 배지 선택 이후의 26 개의 하이브리도마 세포 상등액을 분석하였다. mAb는 부분적으로 서열 EVHH를 함유하는 다양한 변형된 A β 펩타이드에 대해 시험하였다. 회색 표지된 펩타이드 A β pE(11-23) (스포츠 10 참조)은 N-말단에 피코글루타메이트를 갖는 표적 서열을 함유한다 (pEVHH). 각각의 막은 펩타이드 1-16에 의해서 스포팅되었다. 프레임이 있는 막의 하이브리도마 세포 (n= 9)가 재클로닝을 위해서 선택되었다. 단지 실선으로 된 프레임이 있는 막의 세포만이 재클로닝 후에 안정하였다.

도 2: A β (pE11-30)에 의한 CM5 칩 (chip)의 코팅

센서칩 표면은 EDC/NHS에 의해서 8 분 동안 $10 \mu\text{l}/\text{분}$ 으로 활성화되었다. 아민 커플링에 의한 리간드 고정화는 A) $10 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 6 중의 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ A β (pE11-30), 및 B) 10 mM 나트륨 아세테이트, pH 5 중의 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ A β (pE11-30) 중에서 수행되었다. 펩타이드는 $10 \mu\text{l}/\text{분}$ 으로 5 분 (A) 및 20 분 (B) 동안 주입하였다. 그 후, 반응성 그룹 (유리 에스테르)을 1 M 에탄올아민 pH 8.5에 의해서 $10 \mu\text{l}/\text{분}$ 으로 10 분 동안 불활성화시켰다. 비-고정화된 펩타이드를 0.1 M HCl ($3 \times 10 \mu\text{l}$)을 주입함으로써 제거한 다음에, 칩을 밤새 주행 완충액 (running buffer)으로 세정하였다. 마지막으로, 시그널은 1000 RU 였다. 리간드 고정화는 비아코어 (Biacore) 3000에서 수행되었다.

도 3: 항 A β 11(pE) 항체의 SPR 측정

비아코어 3000에 의한 클론 13으로부터의 하이브리도마 세포 배양 상등액의 분석. 1000 RU 에 의해, 고정화된 A β (pE11-30)을 갖는 CM5 칩의 사용 (유동 세포 4). 예시된 것은 시간의 경과에 따른 A β (pE11-30)에서의 결합의

실시간 플롯이다. 샘플 희석도는 주행 완충액 중에서 1:100이고, 주입은 300 s에 걸쳐 30 μl /분이었으며, 300 해리 시간의 기록을 하였다. 비-코팅된 유동 세포로부터의 시그널은 고정화된 A β 를 갖는 유동 세포 4에서의 측정된 시그널로부터 제외시켰다.

도 4: 항 A β (pE11-30) 항체의 곡선

0.04-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 갖는 정제된 항체를 비아코어 3000에서 SPR에 의해 측정하였다. 곡선의 선형 범위는 0.040 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로부터 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 항체였다. 주행 완충액 중에서의 항체 희석 및 300 s에 걸쳐 30 μl /분으로 주입. 각각의 SPR 시그널은 해리상의 종료 시로부터 선택되었다. 비-코팅된 유동 세포로부터의 시그널은 고정화된 A β 를 갖는 유동 세포에서의 측정된 시그널로부터 제외시켰다.

도 5: 항 A β 11(pE) 항체의 표준 곡선

가지 농도를 갖는 정제된 항체를 비아코어 3000에서 SPR에 의해서 측정하였다. 농도는 0.040부터 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체의 범위이다. 선형회귀의 식: $y=3033.7x+50.099$ ($R^2=0.991$). 각각의 SPR 시그널은 해리상의 종료 시부터 선택되었다. 비-코팅된 유동 세포로부터의 시그널은 고정화된 A β 를 갖는 유동 세포에서의 측정된 시그널로부터 제외시켰다.

도 6: 세포 수 및 생성된 항 A β 11(pE) 항체 농도의 비교

클론 13 (세포 계대 19)의 하이브리도마 세포를 사용하기 직전에, 2 mM L-글루타민 및 50 μM β -머캅토에탄올이 보충된 혈청-함유 배지 및 무-혈청 배지 (Hybridoma SFM) 내에서 37°C 및 5% CO₂ 하에 배양하였다. 세포를 진탕 플라스크 내에서 약 10일 동안 배양하였으며, 정기적으로 샘플을 채취하여 세포 성장 (A) 및 항체 농도 (B)를 SPR에 의해서 결정하였다.

도 7: 배양시간에 따른 특이적 성장률 (specific growth rate) μ

클론 13 (세포 계대 19)의 하이브리도마 세포를 사용하기 직전에, 2 mM L-글루타민 및 50 μM β -머캅토에탄올이 보충된 혈청-함유 배지 및 무-혈청 배지 (Hybridoma SFM) 내에서 37°C 및 5% CO₂ 하에 배양하였다. 데이터는 10일에 걸친 진탕 플라스크 내에서의 성장곡선을 근거로 한다.

도 8: 항 A β 11(pE)의 농도는 생존세포의 적분에 대해서 플롯팅되었다.

클론 13 (세포 계대 19)의 하이브리도마 세포를 2 mM L-글루타민 및 50 μM β -머캅토에탄올이 보충된 혈청-함유 배지 및 무-혈청 배지 (Hybridoma SFM) 내에서 37°C 및 5% CO₂ 하에 배양하였다. 데이터는 10일에 걸친 진탕 플라스크 내에서의 성장곡선을 근거로 한다. 생존세포의 적분은 시간에 따른 세포 수의 플롯으로부터 수득하였으며, 이에 의해서 5, 24, 48, 72 시간에서의 측정점이 적분되었다. 항체 생산율은 곡선의 기울기로부터 수득되었다 (참조: 일차 함수). R^2 = 결정 계수.

도 9: 항 A β 11(pE) 정제의 크로마토그램

1800 ml의 하이브리도마 (클론 13) 세포 배양 상등액을 악타 정제화기 (Akta™ Purifier)에서 단백질 G HP 칼럼 (V= 5 ml)에 의해 정제하였다. 칼럼을 4°C에서 냉각시키고, 1 x 결합 완충액 (20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0)으로 평형화시켰다. 세포 배양 상등액을 4°C에서 30 분 동안 38400 x g으로 원심분리시키고, 2 x 결합 완충액과 1:1 혼합시켰다. Akta™ 정제화기 P-950 펌프를 사용하였다. 배양 상등액 (빙냉)을 1.5 ml/분으로 적용하였다. A) 정제 과정 중에서 280 nm에서의 흡광도 및 전도성에 의한 크로마토그램. 5 칼럼 용적에 걸쳐 0-2 M NaCl-구배로 세척한 다음에 1 x 결합 완충액으로 다시 세척하였다. 5 칼럼 용적에 걸쳐 0-2 M KSCN-구배 (pH 7.0)로 2.5 ml/분의 역류로 용출시켰다. B) 0-2 M KSCN-구배의 더 큰 확대 및 용출 분회 V= 20 ml. 지시된 용적은 실제 용적이 아닌 기술적인 시스템 유동이다.

도 10: 항 A β 11(pE) 항체 (클론 13) 정제의 SDS-겔-전기영동도 (Electropherogram)

전-염색된 단백질 래더 (ladder): 10-250 kDa, 퍼멘타스 (Fermentas). 분석된 정제 분획: 슬롯 1; 6: 단백질 G 정제 전, 슬롯 2; 7: 통과액, 슬롯 3; 8: 세척 분획, 슬롯 4; 9: KSCN에 의한 용출, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체가 적용되었다, 슬롯 5: 비-환원성 샘플 완충액. 항체 정제는 단백질 G HP 칼럼을 사용하여 수행되었으며, 용출은 0-2 M KSCN pH 7.0으로 수행되었다. 환원된 샘플을 β -머캅토에탄올을 갖는 SDS 완충액 (Roti®-Load 1, BioRad) 중에서 1:3 희석하고, 95°C에서 10분 배양하였다. 비-환원 샘플을 β -머캅토에탄올이 없는 샘플 완충액 중에 1:4

로 희석시키고, 30℃에서 30분 동안 진탕하였다. SDS-PAGE (12%, 1 mm SDS-겔)의 분리 시간: 100 V에서 10분, 200 V에서 35분. 겔을 쿠마시 브릴리언트 (Coomassie Brilliant) 블루-G250으로 염색하고, 10% 아세트산으로 탈색시켰다.

도 11: 항 Aβ11(pE) 항체의 UV-스펙트럼

하이브리도마 세포 배양 상등액 (클론 13)으로부터 단백질 G 칼럼 정제된 항체의 사용. 스펙트럼은 240 nm와 339 nm 사이에서 측정되었다. 희석은 투석 완충액 (D-PBS, 2 mM EDTA, pH 7.13) 중에서 1:20으로 이루어졌다. 프로브의 두께는 1 cm였으며, 240 nm와 339 nm 사이의 UV-스펙트럼이 UV-분광계 UV1에 의해서 측정되었다.

도 12: 항 Aβ11(pE) 항체의 UV-스펙트럼

항체 희석: D-PBS, 2 mM EDTA 중에서 1:10. 240 nm와 339 nm 사이에서의 UV-스펙트럼이 비오틴화 전 및 후에 UV-분광계 UV1에 의해서 측정되었다. 프로브의 두께는 1 cm였다.

도 13: 항 Aβ11(pE) 항체의 CD-스펙트럼

비오틴화 및 비-비오틴화된 항체의 스펙트럼은 190 nm와 260 nm 사이에서 자스코 (Jasco) J-710 분광-편광계에 의해 20℃에서 측정되었다. 항체 농도는 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.1) 중의 0.13 mg/ml였다. 측정은 20개의 누적치, 1 s 통합 및 1 mm 두께의 프로브를 사용하였다.

도 14: 항 Aβ11(pE) 항체의 열안정성

CD-스펙트럼은 190 nm와 260 nm 사이에서 자스코 J-710 분광-편광계에 의해 20℃부터 80℃까지에서 측정하였다. 항체 농도는 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.14) 중에서 0.13 mg/ml였다. 측정은 30 K/h의 열비율, 1 s 통합, 및 1 mm의 프로브 두께로 5℃ 간격으로 10회 누적하였다. 온도는 각각의 측정 전에 180 s 평형화시켰다.

도 15: 비오틴화된 항 Aβ11(pE) 항체의 열안정성

CD-스펙트럼은 190 nm와 260 nm 사이에서 자스코 J-710 분광-편광계에 의해 20℃부터 80℃까지에서 측정하였다. 항체 농도는 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.14) 중에서 0.13 mg/ml였다. 측정은 30 K/h의 열비율, 10회 누적, 1 s 통합, 및 1 mm의 프로브 두께로 5℃ 간격으로 이루어졌으며, 온도는 각각의 측정 전에 180 s 평형화시켰다.

도 16: 항 Aβ11(pE) 항체 (클론 13)에서 Aβ(pE11-18)-PEG의 ITC 적정곡선

ITC 마이크로칼로리미터 (MicroCalorimeter) (MicroCal)의 사용. 실험은 후속 주입 (블랙 선)과 4-분 간격을 두고, 20℃에서 각각 ITC 완충액 pH 7.1 중의 81.78 μM Aβ(pE11-18)-PEG를 30 회 주입 (1 x 2 μl 및 29 x 10 μl)하는 것으로 구성되었다. 상부 트레이스는 Aβ(pE11-18)-PEG의 ITC 완충액 내로 희석 시의 열을 예시한다. 하부 트레이스는 ITC 완충액 pH 7.1 내에 5.13 μM 항체를 함유하는 샘플 셀 (용적 = 1.405 ml) 내로의 Aβ(pE11-18)-PEG의 주입을 예시한다. 적색 선은 기준선이다.

도 17: 항 Aβ11(pE) 항체 (클론 13)에서 Aβ(pE11-18)-PEG의 ITC 결합곡선

항체는 단백질 G 세파로스로 정제하고, KSCN-구배 (pH 7.0)로 용출시켰다. 실험은 후속 주입과 4-분 간격을 두고, 20℃에서 각각 ITC 완충액 pH 7.1 중의 81.78 μM Aβ(pE11-18)-PEG를 30 회 주입 (1 x 2 μl 및 29 x 10 μl)하는 것으로 구성되었다. 샘플 셀 (용적 = 1.405 ml)은 ITC 완충액 pH 7.1 중의 5.13 μM 항체를 함유한다. Aβ(pE11-18)-PEG의 ITC 완충액 내로의 희석의 열은 모든 리간드 주입으로부터 감하였다. ITC 마이크로칼로리미터 (MicroCal)의 사용. 열역학적 파라미터 반응 화학량론 (N), 해리 상수 (K), 결합 엔탈피 (enthalpy) (ΔH) 뿐만 아니라 엔트로피 (entropy) (ΔS)는 오리진 (Origin) 7.0에 의해서 결정되었다.

도 18: 항 Aβ11(pE) 항체 (클론 13)에서 Aβ(pE11-18)-PEG의 ITC 결합곡선

항체는 단백질 G 세파로스로 정제하고, 0.1 M 글리신-HCl 용액 (pH 2.7)으로 용출시켰다. 실험은 후속 주입과 4-분 간격을 두고, 20℃에서 각각 ITC 완충액 pH 7.1 중의 686.31 μM Aβ(pE11-18)-PEG를 30 회 주입 (1 x 2 μl 및 29 x 10 μl)하는 것으로 구성되었다. 샘플 셀 (용적 = 1.405 ml)은 ITC 완충액 pH 7.1 중의 32.85 μM 항체를 함유한다. Aβ(pE11-18)-PEG의 ITC 완충액 내로의 희석의 열은 모든 리간드 주입으로부터 감하였다. ITC 마이크로칼로리미터 (MicroCal)의 사용. 열역학적 파라미터 반응 화학량론 (N), 해리 상수 (K), 결합 엔탈피 (ΔH)뿐만 아니라 엔트로피 (ΔS)는 오리진 7.0에 의해서 결정되었다.

도 19: 비오틴화된 항 Aβ11(pE) 항체 (클론 13)에서 Aβ(pE11-18)-PEG의 ITC 결합곡선

실험은 후속 주입과 4-분 간격을 두고, 20℃에서 각각 ITC 완충액 pH 7.1 중의 101.8 μM A β (pE11-18)-PEG를 30 회 주입 (1 x 2 μl 및 29 x 10 μl)하는 것으로 구성되었다. 샘플 셀 (용적 = 1.405 ml)은 ITC 완충액 pH 7.1 중의 5.12 μM 비오틴화된 항체를 함유한다. A β (pE11-18)-PEG의 ITC 완충액 내로의 희석의 열은 모든 리간드 주입으로부터 감하였다. ITC 마이크로칼로리메터 (MicroCal)의 사용. 열역학적 파라미터 반응 화학량론 (N), 해리 상수 (K), 결합 엔탈피 (ΔH)뿐만 아니라 엔트로피 (ΔS)는 오리진 7.0에 의해서 결정되었다.

도 20: 항 A β 11(pE) 및 항 A β 3(pE) 항체의 교차 반응성

비아코어 3000에서 SPR을 통한 A β pE(11-30) 및 A β pE(3-40) 펩타이드에 대한 항 A β 11(pE) 항체(클론 13)의 교차반응성의 결정. 대략 1000 RU를 갖는 고정화된 A β pE(11-30) 및 1830 RU를 갖는 A β pE(3-40)과 함께 CM5 칩의 사용. 300 s에 걸쳐 30 μl /분으로 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체의 주입 및 300 s 해리시간의 기록 및 주행 완충액 중에서의 희석. 고정화된 A β 를 갖는 유동 세포에서 측정된 시그널은 비-코팅된 유동 세포로부터의 시그널과 함께 감하였다.

도 21: 자가 (auto)-Ig-ELISA에서 항 A β 11(pE) 항체 (클론 13)의 표준 곡선

스트렙타비딘 코팅된 마이크로플레이트에서 200 ng/ml A β (pE11-20)-비오틴의 고정화 (RT에서 2 h). RT에서 1 시간 동안 200 μl ELISA-차단제 (-T)로 차단하고, 이어서 세척 사이클 (3 x 300 μl /웰 세척 완충액). 표준 항 A β 11(pE) 항체 (클론 13)를 3500 pg/ml로부터 55 pg/ml에 이르기까지의 기수 계산 (radix division)으로 ELISA-차단제 (+T)에 희석시키고, 2 시간 동안 4℃에서 배양하였다. 세척 사이클을 수행하고, 4℃에서 1 시간 동안 폴리클로날 토끼 항-마우스 Ig's HRP로 검출하였다. 세척 사이클 후에 TMB/H₂O₂를 첨가하고, RT (암소)에서 30 분 동안 배양하고, 효소 반응을 1 M H₂SO₄에 의해서 중지시켰다. 흡수는 TECAN 선라이즈 (Sunrise)에서 450/540 nm로 측정하였다.

도 22: 직접 A β 11(pE) ELISA (클론 13)

다양한 농도를 갖는 A β pE(11-30) 펩타이드를 4℃에서 밤새 코팅한 다음에 RT에서 2 시간 동안 ELISA-차단제 (-T)로 차단하였다. 비오틴화된 항 A β 11(pE) 항체 (클론 13)를 RT에서 10 분 동안 스트렙타비딘-HRP 컨주게이트와 전-배양하고, ELISA-차단제 (+T) 중에서의 희석을 수행하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체 (클론 13)의 첨가. 6 x 300 μl /웰 TBS-T 완충액에 의한 배양 중간의 세척 사이클 (펩타이드 코팅 후는 제외). TMB/H₂O₂를 첨가하고, RT (암소)에서 30 분 동안 배양하고, 효소 반응을 1 M H₂SO₄에 의해서 중지시켰다. 흡수는 TECAN 선라이즈에서 450/540 nm로 측정하였다.

도 23: 직접 A β 11(pE) ELISA (4G8)

다양한 농도를 갖는 A β pE(11-30) 펩타이드를 4℃에서 밤새 코팅한 다음에 RT에서 2 시간 동안 ELISA-차단제 (-T)로 차단하였다. 비오틴화된 4G8을 RT에서 10 분 동안 스트렙타비딘-HRP 컨주게이트와 전-배양하고, ELISA-차단제 (+T) 중에서의 기수 2 희석을 수행하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4G8 항체의 첨가. 6 x 300 μl /웰 TBS-T 완충액에 의한 배양 중간의 세척 사이클 (펩타이드 코팅 후는 제외). TMB/H₂O₂를 첨가하고, RT (암소)에서 30 분 동안 배양하고, 효소 반응을 1 M H₂SO₄에 의해서 중지시켰다. 흡수는 TECAN 선라이즈에서 450/540 nm로 측정하였다.

도 24: 인간 AD 뇌의 베타 아밀로이드 염색

면역염색은 항 A β 11(pE) (클론 13) 항체를 사용하여 수행되었다. AD 뇌 절편을 파라핀-매립시켰다. 세포 핵을 헤마톡실린으로 염색하였다. AD 증례 1; 3의 해마로부터, 및 AD 증례 2의 전두 피질로부터의 계열 절단물을 영상화시킨다. AD 증례 1 및 2는 A β 11(pE)의 침착이 있는 세포외의 큰 플라크를 나타내었다 (좁은 확대 사각형 참조). AD 증례 2에서는 세포내 A β 11(pE) 침착 (우측 아래의 확대 사각형 참조) 및 AD 증례 3에서는 A β 11(pE) 침착 (좁은 사각형 참조)을 나타내었다. 좌측 및 우측 영상에 대한 확대는 유사하다. 영상은 시. 레메르 (C. Lemere; Harvard Medical School, Boston)의 실험실에 의해서 친절하게 제공되었다.

도 25: APP/PS1 마우스 뇌의 베타 아밀로이드 염색

포르말린 고정되고 파라핀 매립된 AD 뇌 절편의 항 A β 11(pE) 항체의 면역염색. 세포 핵을 헤마톡실린으로 염색하였다. 유전자이식 마우스의 해마로부터의 계열 절단물. 계열 절단물은 A β 11(pE)의 혈관 침착을 나타내었다. 갈색 염색이 뇌의 혈관에서 나타난다. 영상은 시. 레메르 (C. Lemere; Harvard Medical School, Boston)의 실험실에 의해서 친절하게 제공되었다.

도 26: 자가-Ig-ELISA에서 항 Aβ 11(pE) IgG 및 Ig's 수준

알츠하이머병 (AD) 및 대조군 (13 AD; 30 대조군)의 EDTA-혈장을 항 Aβ 11(pE) 자가항체 ELISA에서 총 면역글로불린 및 IgG에 관해서 분석하였다. 예시된 것은 대조군 및 AD군의 평균과 표준편차이다. 이중 측정의 결과로서, 샘플은 표준 곡선 내에서 측정되었다.

도 27: 자가-Ig-ELISA에서 항 Aβ 11(pE) IgG2, IgG3, IgM 및 IgA 수준

알츠하이머병 (AD) 및 대조군 (13 AD; 30 대조군)의 EDTA-혈장을 항 Aβ 11(pE) 자가항체 ELISA에서 IgG2, IgG3, IgM 및 IgA에 관해서 분석하였다. 예시된 것은 대조군 및 AD군의 평균과 표준편차이다. 이중 측정의 결과로서, 샘플은 표준 곡선 내에서 측정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

용어 "항체"는 가장 넓은 개념으로 사용되며, 구체적으로는 온전한 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2 개의 온전한 항체로부터 형성된 다중특이성 항체 (예를 들어, 이중특이성 항체), 및 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 경우의 항체 단편을 포함한다. 항체는 예를 들어, IgM, IgG (예를 들어, IgG₁, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgD, IgA 또는 IgE일 수 있다. 그러나, 바람직하게는 항체는 IgM 항체가 아니다.

"항체 단편"은 온전한 항체의 일부분, 일반적으로는 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 부분을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디 (diabodies); 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체가 포함된다.

본 명세서에서 사용된 것으로서 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균일한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 나타내며, 즉 집단을 구성하는 개개 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 존재하는 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 매우 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해서 지시된다. 또한, 전형적으로 상이한 결정인자 (에피토프)에 대해서 지시된 상이한 항체를 포함하는 "폴리클로날 항체" 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항체 상의 단일 결정인자에 대해서 지시된다. 그들의 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 흔히, 다른 면역글로불린에 의해서 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해서 합성된다는 점에서 유리할 수 있다. "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균일한 집단으로부터 수득된 것으로서의 항체의 특성을 나타내며, 어떤 특별한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 이해되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 쾨러 (Kohler) 등에 의해서 최초로 기술된 하이브리도마 방법 [Nature, 256:495 (1975)]에 의해서 제조될 수 있거나, 일반적으로 잘 알려진 재조합 DNA 방법에 의해서 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한, 문헌 [예를 들어, Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기술된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수도 있다.

본 발명에서 모노클로날 항체에는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특별한 종으로부터 유도되거나 특별한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이지만,쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유도되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 키메라 항체 (면역글로불린)뿐만 아니라 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러한 항체의 단편을 포함한다.

비-인간 (예를 들어, 쥐) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린쇄 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 그 밖의 다른 항원-결합 서열)이다. 대부분의 경우에, 인간화된 항체는 수용주의 상보성-결정 부분 (CDR)으로부터의 잔기가 바람직한 특이성, 친화성 및 수용능 (capacity)을 갖는 마우스, 랫트 또는 토끼와 같은 비-인간 종 (공여체 항체)의 CDR로부터의 잔기에 의해서 대체된 인간 면역글로불린 (수용주 항체)이다. 일부의 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 부분 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해서 대체된다. 또한, 인간화된 항체는 수용주 항체에서도 이입된 CDR 또는 골격 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다.

이들 변형은 항체 성능을 더 개선시키고 최적화하기 위해서 만들어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로는 2 개의 가변 영역의 실질적으로 모두를 포함할 것이며, 여기에서 CDR 부분의 전부 또는 실질적으로 전부가 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하고, FR 부분의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 면역글로불린의 서열의 것들이다. 인간화된 항체는 또한, 최적으로 면역글로불린 불변 부분 (Fc)의 적어도

일부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 포함할 수 있다. 더 상세한 것은 문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., Nature. 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]을 참고로 한다. 인간화된 항체에는 항체의 항원-결합 부분이 마카크 (macaque) 원숭이를 관심이 있는 항원으로 면역시킴으로써 생산된 항체로부터 유도된 프리마타이즈드 (Primatized™) 항체가 포함된다.

[0042] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 영역을 포함하며, 여기에서 이들 영역은 단일 폴리펩타이드쇄에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 sFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성하게 할 수 있는 V_H 와 V_L 영역 사이의 폴리펩타이드 링커를 더 포함한다. sFv의 검토에 관해서는 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참고로 한다.

[0043] 용어 "디아바디"는 2 개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내며, 이 단편은 동일한 폴리펩타이드쇄 (V_H - V_D) 내에서 경쇄 가변 영역 (V_D)에 연결된 중쇄 가변 영역 (V_H)을 포함한다. 동일한쇄 상의 2 개의 영역 사이에서 짝을 이루도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 영역들은 또 다른쇄의 상보성 영역과 짝을 이루고, 2 개의 항원-결합 부위를 생성시키도록 강요당한다. 디아바디는 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 더 상세하게 기술되어 있다.

[0044] "분리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인되고, 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료학적 용도를 저해할 수 있는 물질이며, 효소, 호르몬 및 그 밖의 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 항체는 (1) 로우리 방법 (Lowry method)에 의해 측정된 것으로서 항체의 95 중량% 이상까지, 가장 바람직하게는 99 중량% 이상까지, (2) 회전컵 시퀀터 (spinning cup sequenator)를 사용함으로써 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 개의 잔기를 획득하기에 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의한 균질성까지 정제할 수 있다. 분리된 항체에는 재조합 세포 내의 원위치의 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 분리된 항체는 적어도 하나의 정제단계에 의해서 제조될 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 것으로서 발현 "세포", "세포주", 및 "세포 배양액"은 상호 교환하여 사용되며, 이러한 지칭은 모두 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 일차 대상 세포, 및 전이의 수와는 무관하게 그로부터 유도된 배양물을 포함한다. 또한, 모든 자손은 의도적이거나 우연한 돌연변이에 기인하여 DNA 함량이 정확하게 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 원래의 형질전환된 세포에 대해 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 포함된다. 뚜렷한 지칭이 의도된 경우에, 이것은 문맥으로부터 분명할 것이다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 것으로서 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 상호 교환적이며, 펩타이드 결합에 의해서 연결된 아미노산으로 구성된 생물분자를 의미하는 것으로 정의된다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 것으로서 용어 "하나", "일" 및 "상기"는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 정의되며, 문맥이 부적절하지 않은 한은 복수를 포함한다.

[0048] 표현 "아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질에 의해서 야기되거나 그와 연관된 질환 및 장애"에는 모노머, 원섬유 또는 폴리머 상태의 아밀로이드-유사 단백질, 또는 이들 3 가지의 모든 조합의 존재 또는 활성에 의해서 야기된 질환 및 장애가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 질환 및 장애에는 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성이 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0049] 용어 "아밀로이드증"은 예를 들어, 경도 인지 장애 (MCI), 산재성 알츠하이머병, 루이체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증이 있는 유전적 뇌일혈 (네덜란드 타입)과 같은 인지 기억능의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 상태를 포함한 알츠하이머병 (AD)과 같은 신경적 장애; 광 파킨슨-치매 복합체, 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 알츠하이머병의 가족형 형태뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS (근위축성 측삭 경화증), 봉입체 근염 (IBM), 성인기 발증형 당뇨병, 및 노년기 심장 아밀로이드증과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 근거하거나 그와 연관된 그 밖의 다른 질환; 및 황반 변성, 결정강-관련된 시신경병증, 및 베타-아밀로이드 침착에 기인한 백내장을 포함하는 다양한 안질환을 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 이차 아밀로이드증 및 노화-관련된 아밀로이드증을 포함한

(단, 이들로 제한되지 않는다) 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질환 및 장애의 그룹을 나타낸다.

- [0050] "아밀로이드 β , A β 또는 / β -아밀로이드"는 본 기술분야에서 인지된 용어이며, 아밀로이드 β 단백질 및 펩타이드, 아밀로이드 β 전구체 단백질 (APP)뿐만 아니라 이들의 변형체, 단편, 및 모든 기능적 등가물을 나타낸다. 특히, 본 명세서에서 사용된 것으로서 아밀로이드 β 는 APP의 단백질분해적 분해에 의해서 생산된 모든 단편을 의미하지만, 특히 A β_{1-38} , A β_{1-40} , A β_{1-42} 를 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다) 아밀로이드 병리학에 포함되거나 그와 연관된 단편을 의미한다. 이들 A β 펩타이드의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0051] A β_{1-42} (서열번호 1):
- [0052] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala
- [0053] A β_{1-40} (서열번호 2):
- [0054] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
- [0055] A β_{1-38} (서열번호 3):
- [0056] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly
- [0057] "pGlu-A β " 또는 "A β N3pE"는 A β 의 아미노산 서열 내의 위치 3의 글루탐산 잔기에서 시작하며, 상기 글루탐산 잔기가 폐환되어 피로글루탐산 잔기를 형성한 A β 의 N-말단적으로 절단된 형태를 나타낸다. 특히, 본 명세서에서 사용된 것으로서 pGlu-A β 는 pGlu-A β_{3-38} , pGlu-A β_{3-40} , pGlu-A β_{3-42} 을 포함하는, 아밀로이드 병리학에 포함되거나 그와 연관된 단편을 의미한다.
- [0058] A β 의 N-말단적으로 절단된 형태인 A β_{3-38} , A β_{3-40} , A β_{3-42} 의 서열은 다음과 같다:
- [0059] A β_{3-42} (서열번호 4):
- [0060] Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala
- [0061] A β_{3-40} (서열번호 5):
- [0062] Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
- [0063] A β_{3-38} (서열번호 6):
- [0064] Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly
- [0065] "A β pGlu(11)", "A β (pE11)" 또는 "A β 11(pE)"는 A β 의 아미노산 서열 내의 위치 11의 글루탐산 잔기에서 시작하며, 상기 글루탐산 잔기가 폐환되어 피로글루탐산 잔기를 형성한 A β 의 N-말단적으로 절단된 형태를 나타낸다. 특히, 본 명세서에서 사용된 것으로서 A β pGlu(11-x)는 pGlu-A β_{11-38} , pGlu-A β_{11-40} , pGlu-A β_{11-42} 을 포함하는, 아밀로이드 병리학에 포함되거나 그와 연관된 단편을 의미한다.
- [0066] A β 의 N-말단적으로 절단된 형태인 A β_{11-38} , A β_{11-40} , A β_{11-42} 의 서열은 다음과 같다:
- [0067] A β_{11-42} (서열번호 7):
- [0068] Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala
- [0069] A β_{11-40} (서열번호 8):
- [0070] Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

- [0071] Aβ₁₁₋₃₈ (서열번호 9):
- [0072] Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly
- [0073] 특히, 본 발명은 다음의 항목에 관한 것이다:
- [0074] 1. AβpGlu(11) 펩타이드 또는 그의 변이체에, 바람직하게는 높은 친화성으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [0075] 2. 상기의 높은 친화성이 10^{-7} M 또는 그보다 우수한 해리 상수 (K_D) 값을 의미하는 제1항에 따르는 항체.
- [0076] 3. 상기 항체가 모노클로날 항체인 제1항 또는 제2항에 따르는 항체.
- [0077] 4. 상기 항체의 경쇄의 가변 부분이 서열번호 51의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 52의 아미노산 서열을 갖는 제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0078] 5. 상기 항체의 중쇄의 가변 부분이 서열번호 53의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 54의 아미노산 서열을 갖는 제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0079] 6. 상기 항체의 경쇄의 가변 부분이 서열번호 51의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 52의 아미노산 서열을 갖고, 상기 항체의 중쇄의 가변 부분이 서열번호 53의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 54의 아미노산 서열을 갖는 제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0080] 7. 상기 항체가 Aβ₁₃₋₁₁₋₆ (기탁번호 DSM ACC 3100) 또는 그의 기능적 변이체인 제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0081] 8. 상기 항체가 Aβ₁₃₋₁₁₋₆ (기탁번호 DSM ACC 3100)인 제7항에 따르는 항체.
- [0082] 9. 상기 항체가 인간화된 또는 키메라 항체, 또는 높은 친화성을 보유하는 항체 단편인 제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0083] 10. AβpGlu(11) 펩타이드 또는 그의 변이체를 검출하는데 사용하기 위한 제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0084] 11. 상기 변이체가 pGlu-Aβ₁₁₋₃₈, pGlu-Aβ₁₁₋₄₀, pGlu-Aβ₁₁₋₄₂, 및 pGlu-Aβ_{11-x} 변이체 (여기에서, x는 18 내지 42, 더욱 바람직하게는 30 내지 42 사이의 정수이다)의 그룹으로부터 선택되는 제10항에 따르는 항체.
- [0085] 12. 인간인 제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0086] 13. 높은 친화성을 보유하는 디아바디 또는 단일쇄 항체인 제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0087] 14. 제11항에 정의된 항체에 의해서 결합된 에피토프에 결합하는 제1항 내지 제13항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0088] 15. 제11항에 정의된 바와 같은 항체의 상보성 결정 부위를 갖는 제1항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0089] 16. 상기 항체의 경쇄의 가변 부분이 서열번호 51의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 52의 아미노산 서열을 갖는 경쇄의 가변 부분을 갖는 항체의 1, 2 또는 3개와 같은 하나 이상의 상보성 결정 부위와 동일한 1, 2 또는 3개와 같은 하나 이상의 상보성 결정 부위를 갖는 제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0090] 17. 상기 항체의 중쇄의 가변 부분이 서열번호 53의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 54의 아미노산 서열을 갖는 중쇄의 가변 부분을 갖는 항체의 1, 2 또는 3개와 같은 하나 이상의 상보성 결정 부위와 동일한 1, 2 또는 3개와 같은 하나 이상의 상보성 결정 부위를 갖는 제1항 내지 제16항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0091] 18. 표지된 제1항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0092] 19. 고체상 위에 고정화된 제1항 내지 제18항 중의 어느 한 항에 따르는 항체.
- [0093] 20. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 3100으로부터 수득할 수 있는 항체.
- [0094] 21. 제1항 내지 제20항 중의 한 항에서 정의된 바와 같은 항체를 포함하는 조성물.

- [0095] 22. 아밀로이드증의 치료, 예방 또는 지연을 위한 제21항에 따르는 조성물.
- [0096] 23. 상기 아밀로이드증이 경도 인지 장애, 알츠하이머병, 및 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환인 제21항 또는 제22항에 따르는 조성물.
- [0097] 24. 상기 아밀로이드증이 산재성 알츠하이머병 또는 가족형 알츠하이머 치매인 제21항 또는 제22항에 따르는 조성물.
- [0098] 25. 상기 가족형 알츠하이머 치매가 가족형 영국 치매 또는 가족형 덴마크 치매인 제24항에 따르는 조성물.
- [0099] 26. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 3100.
- [0100] 27. 진단 또는 치료 방법에 있어서의, 제1항 내지 제20항 중의 한 항에서 정의된 바와 같은 항체 또는 제21항 내지 제25항 중의 한 항에서 정의된 바와 같은 조성물의 용도.
- [0101] 28. 아밀로이드-연관된 질환 또는 상태의 진단을 위한 제27항에 따르는 용도.
- [0102] 29. 상기 아밀로이드증이 경도 인지 장애, 알츠하이머병, 및 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환인 제28항에 따르는 용도.
- [0103] 30. 상기 아밀로이드증이 산재성 알츠하이머병 또는 가족형 알츠하이머 치매인 제28항에 따르는 용도.
- [0104] 31. 상기 가족형 알츠하이머 치매가 가족형 영국 치매 또는 가족형 덴마크 치매인 제28항에 따르는 용도.
- [0105] 32. 제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 따르는 항체를 아밀로이드-연관된 질환 또는 상태를 앓을 것으로 예상되는 대상체로부터의 샘플과 접촉시키는 단계,
- [0106] 샘플로부터 A β pGlu(11) 단백질에 대한 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함하는,
- [0107] 아밀로이드-연관된 질환 또는 상태, 특히 알츠하이머병을 진단하는 시험관내 진단방법.
- [0108] 33. 제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 항체, 및 사용 설명서, 및 -임의로- 추가의 생물학적 활성물질(들)을 포함하는 진단 키트.
- [0109] 34. 상기 추가의 생물학적 물질이 글루타미닐 사이클라제의 억제제인 제33항의 진단 키트.
- [0110] 35. 서열번호 26 내지 50으로 구성된 그룹으로부터 선택된 올리고뉴클레오타이드.
- [0111] 본 발명의 항체는 아밀로이드증의 진단에 유용할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 항체는 친화성 정제제로 사용될 수 있다. 이 방법에서, 항체는 본 기술분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 세파덱스 (Sephadex) 수지 또는 여과지와 같은 고체상 위에 고정화된다. 고정화된 항체를 정제될 A β pGlu(11) 펩타이드를 함유하는 샘플과 접촉시키고, 그 후에 지지체를 고정화된 항체에 결합된 A β pGlu(11)-펩타이드를 제외한 샘플 내의 실질적으로 모든 물질을 제거할 수 있는 적합한 용매로 세척한다. 마지막으로, 지지체를 항체로부터 A β pGlu(11)-펩타이드를 방출시킬 수 있는 글리신 완충액, pH 5.0와 같은 또 다른 적합한 용매로 세척한다.
- [0113] 항-A β pGlu(11)-펩타이드 항체는 또한, A β pGlu(11)-펩타이드에 대한 진단시험에서, 예를 들어, 특정한 세포, 조직 또는 혈청에서 그의 존재를 검출하는데 유용할 수 있다. 따라서, 항체는 아밀로이드증, 특히 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 및 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환, 바람직하게는 알츠하이머병의 진단에 사용될 수 있다.
- [0114] 진단 적용을 위해서, 항체는 전형적으로 검출가능한 부분으로 표지될 수 있다. 일반적으로 다음의 카테고리에 속할 수 있는 다수의 표지물이 이용될 수 있다:
- [0115] (a) ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, 및 ¹³¹I와 같은 방사성 동위원소. 항체는 문헌 [예를 들어, Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Gutigen et al., Ed., Wiley-Interscience. New York, New York. Pubs., (1991)]에 기술된 기술을 사용하여 방사성 동위원소로 표지될 수 있으며, 방사성은 섬광 계수를 사용하여 측정될 수 있다.
- [0116] (b) 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트) 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 댄실

(dansyl), 리사민 (Lissamine), 피코에리트린 및 텍사스 레드 (Texas Red)와 같은 형광성 표지물을 이용할 수 있다. 형광성 표지물은 문헌 [예를 들어, Current Protocols in Immunology, supra]에 개시된 기술을 사용하여 항체에 컨주게이트시킬 수 있다. 형광은 형광계를 사용하여 정량화할 수 있다.

[0117] (c) 다양한 효소-기질 표지물을 이용할 수 있다. 효소는 일반적으로 다양한 기술을 사용하여 측정될 수 있는 발색성 기질의 화학적 변화를 촉진시킨다. 예를 들어, 효소는 분광광도법으로 측정될 수 있는 기질에서의 색상 변화를 촉진시킬 수 있다. 대신으로, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변화시킬 수 있다. 형광의 변화를 정량화하는 기술은 상술하였다. 화학발광 기질은 화학반응에 의해서 전자적으로 여기된 다음에, 측정될 수 있거나 (예를 들어, 화학발광계를 사용하여), 형광 수용체에 에너지를 기부할 수 있는 광자를 방출할 수 있다. 효소 표지물의 예로는 루시페라제 (예를 들어, 파이어플라이 (firefly) 루시페라제 및 박테리아 루시페라제; 미국 특허 제4,737,456호), 루시페린, 2,3-디하이드로프탈라진디온, 말레이트 데하이드로게나제, 우레아제, 호스래디쉬 (horseradish) 퍼옥시다제 (HRPO)와 같은 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 0-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 (예를 들어, 글루코즈 옥시다제, 갈락토즈 옥시다제, 및 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제), 헤테로사이클릭 옥시다제 (예를 들어, 유리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등이 포함된다. 효소를 항체에 컨주게이트시키는 기술은 문헌 [O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym (ed Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73: 147-166 (1981)]에 기술되어 있다.

[0118] 효소-기질 조합의 예로는 예를 들어, 다음의 것들이 포함된다:

[0119] (i) 기질로서 하이드로젠 퍼옥시다제와 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRPO) (여기에서, 하이드로젠 퍼옥시다제는 염료 전구체 (예를 들어, 오르토펜일렌디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 하이드로클로라이드 (TMB))를 산화시킨다);

[0120] (ii) 발색성 기질로서 파라-니트로페닐 포스페이트와 알칼리성 포스파타제 (AP); 및

[0121] (iii) 발색성 기질 (예를 들어, p-니트로페닐-β-D-갈락토시다제) 또는 형광원성 기질 4-메틸움베리페릴-β-D-갈락토시다제와 β-D-갈락토시다제 (β-D-Gal).

[0122] 다수의 다른 효소-기질 조합이 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 이용될 수 있다.

[0123] 때때로, 표지물은 간접적으로 항체와 컨주게이트된다. 숙련된 전문가가 이것을 달성하는 다양한 기술을 알 것이다. 예를 들어, 항체는 비오틴과 컨주게이트될 수 있으며, 상기 언급된 표지물의 3 가지 광범한 카테고리 중의 어떤 것이라도 아비딘과 컨주게이트될 수 있거나, 그 반대로도 될 수 있다. 비오틴은 아비딘에 선택적으로 결합하며, 따라서 표지물은 이러한 간접 방식으로 항체와 컨주게이트될 수 있다. 대신으로, 표지물과 항체의 간접 컨주게이션을 달성하기 위해서는 항체를 작은 합텐 (예를 들어, 디곡신)과 컨주게이트시키고, 상기 언급된 표지물의 상이한 타입 중의 하나를 항-합텐 항체 (예를 들어, 항-디곡신-항체)와 컨주게이트시킨다. 따라서, 항체와 표지물의 간접 컨주게이션이 달성될 수 있다.

[0124] AβpGlu(11)-항체는 표지될 필요가 없으며, 그의 존재는 AβpGlu(11)-항체에 결합하는 표지된 항체를 사용하여 검출할 수 있다.

[0125] 본 발명의 항체는 경쟁적 결합시험, 직접 및 간접 샌드위치 시험, 및 면역침강 시험과 같은 공지된 어떤 시험방법에서라도 사용될 수 있다 [Zola, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)].

[0126] 경쟁적 결합시험은 제한된 양의 항체와 결합하는데 관해서 시험 샘플 분석물질 (analyte)과 경쟁하는 표지된 표준물질의 능력에 의존한다. 시험 샘플 내의 AβpGlu(11)의 양은 항체에 결합하게 되는 표준물질의 양에 반비례한다. 결합되는 표준물질의 양을 결정하는 것을 용이하게 하기 위해서, 항체에 결합된 표준물질 및 분석물질이 결합되지 않고 남아 있는 표준물질 및 분석물질로부터 편리하게 분리될 수 있도록 항체는 일반적으로 경쟁 전 또는 후에 불용화된다.

[0127] 샌드위치 시험은 각각 검출될 단백질의 상이한 면역원성 부분 또는 에피토프에 결합할 수 있는 2 개의 항체의 사용을 포함한다. 샌드위치 시험에서, 시험 샘플 분석물질은 고체 지지체 위에 고정화된 제1 항체에 의해서 결합되며, 그 후에 제2 항체가 분석물질에 결합함으로써 불용성 3-부분 복합체를 형성한다. 제2 항체는 그 자체가 검출가능한 부분으로 표지될 수 있거나 (직접 샌드위치 시험), 또는 검출가능한 부분으로 표지되는 항면역글로불린 항체를 사용하여 측정될 수 있다 (간접 샌드위치 시험). 예를 들어, 샌드위치 시험의 한가지 바람직한 타

입은 ELISA 시험이며, 이 경우에는 검출가능한 부분이 효소이다.

- [0128] 면역조직화학의 경우에는, 조직 샘플이 신선하거나 동결될 수 있거나, 파라핀에 매립되고, 예를 들어, 포르말린과 같은 보존제로 고정시킬 수 있다.
- [0129] 진단 키트
- [0130] 편의상, 본 발명의 항체는 키트, 즉 예정된 양의 시약과 진단시험을 수행하기 위한 설명서의 포장된 조합으로 제공될 수 있다. 항체가 효소로 표지된 경우에, 키트는 효소가 필요로 하는 기질 및 보조인자 (예를 들어, 검출 가능한 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구체)를 포함할 것이다. 또한, 안정화제, 완충제 (예를 들어, 차단 완충제 또는 용해 완충제) 등과 같은 그 밖의 다른 첨가제가 포함될 수 있다. 다양한 시약들의 상대적 양은 시험의 민감도를 실질적으로 최적화하는 시약의 용액 중 농도를 제공하도록 광범하게 변화할 수 있다. 특히, 시약은 용해시키면 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공할 수 있는 것으로서, 부형제를 포함하며 통상적으로 동결건조된 건조 분말로 제공될 수 있다.
- [0131] 본 발명에 따르는 진단 키트는 이하에 기술하는 바와 같은 추가의 생물학적 활성물질을 함유할 수 있다. 진단 키트에서 사용하기에 특히 바람직한 것은 글루타미닐 사이클라제의 억제제이다.
- [0132] 본 발명의 진단 키트는 아밀로이드-연관된 질환 및 상태, 특히 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환; 바람직하게는 알츠하이머병의 검출 및 진단에 특히 유용하다.
- [0133] 본 발명은 특히, 높은 친화성을 가지고 AβpGlu(11)-펩타이드에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 높은 친화성을 가지고 AβpGlu(11)-펩타이드 또는 그의 변이체에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체에 관한 것이다. 상기의 높은 친화성은 본 발명과 관련하여 10^{-7} M 또는 그보다 우수한 K_D 값, 바람직하게는 10^{-8} M 또는 그보다 우수한 K_D 값, 더 더욱 바람직하게는 10^{-9} M 내지 10^{-12} M의 K_D 값의 친화성을 의미한다. 이에 의해서, 각각의 항체는 이전에 공지된 항체보다 더 높은 친화성으로 AβpGlu(11)-펩타이드에 결합한다.
- [0134] 특히, 항체는 바람직하게는 모노클로날 항체이며, Aβ 13-11-6 (DSM ACC 3100)이다.
- [0135] 본 발명에 따르는 항체는 특히 아밀로이드증, 특히 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환; 바람직하게는 알츠하이머병을 검출하기 위한 진단방법에서 유용하다.
- [0136] 바람직한 구체예에 따르면, 항체는 인간화될 수 있거나, 키메라 항체이거나 인간 항체이다.
- [0137] 추가로, 상기 언급된 그룹으로부터 선택된 항체는 또한 상기 그룹의 기능적 변이체일 수도 있다.
- [0138] 본 발명과 관련하여, AβpGlu(11) 펩타이드의 변이체는 특히 pGlu-Aβ₁₁₋₃₈, pGlu-Aβ₁₁₋₄₀, pGlu-Aβ₁₁₋₄₂이다.
- [0139] AβpGlu(11) 펩타이드의 추가의 변이체는 알츠하이머병 또는 선행하는 알츠하이머병의 결과로서 뇌에 축적하는 것으로 나타난 모든 pGlu-Aβ_{11-x} 변이체이다. X는 18 내지 42의 정수로 정의되며, 예를 들어, 상기 pGlu-Aβ₁₁₋₄₂에서 "42"는 "x"에 대한 정수일 것이다.
- [0140] 본 발명과 관련하여, 본 발명의 항체의 "기능적 변이체"는 결합능, 특히 pGlu-Aβ_{11-x} 펩타이드 또는 그의 기능적 변이체에 대한 높은 친화성의 결합능을 보유하는 항체이다. 이러한 기능적 변이체의 규정은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 항체 및 그의 단편의 정의 하에서 표시된 상기-언급된 가능성들을 포함한다.
- [0141] 바람직한 구체예에서, 항체는 상기 정의된 바와 같은 항체 단편이다.
- [0142] 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 상기 정의된 바와 같은 항체, 특히 항체 13-11-6에 의해서 결합되는 에피토프에 결합하는 항체이다.
- [0143] 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 상기 정의된 항체의 상보성 결정 부위 (CDRs)을 갖는 항체이다.

바람직하게는, 항체는 표지될 수 있으며; 가능한 표지물은 상기 언급된 바와 같은 것 및 특히 항체의 진단적 사용의 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 모든 것이다.

- [0144] 바람직하게는, 항체는 고체상 위에 고정화된다.
- [0145] 본 발명은 또한, 하이브리도마 세포주 13-11-6 (DSM ACC 3100)으로부터 수득할 수 있는 항체에 관한 것이다.
- [0146] 본 발명은 또한, 상기 정의된 바와 같은 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 특히, 상기 조성물은 특히 생물학적 샘플 내에서 AβpGlu(11) 펩타이드 또는 그의 변이체를 검출함으로써, 진단적으로 사용하기 위한, 특히 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환; 바람직하게는 알츠하이머병을 진단하기 위한 조성물이다.
- [0147] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따르면 전술한 바와 같은 항체 또는 그의 단편은 AβpGlu(11) 모노머에 대한 결합 친화성보다 적어도 2 배, 특히 적어도 4 배, 특히 적어도 10 배, 특히 적어도 15 배, 더욱 특히 적어도 20 배, 특히 적어도 25 배 더 큰 AβpGlu(11) 올리고머, 섬유, 원섬유 또는 필라멘트에 대한 결합 친화성을 나타낸다.
- [0148] 또 다른 구체예에서는 전술한 바와 같은 항체 또는 그의 단편 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 그의 단편이 제공되며, 이들 항체는 실질적으로 포유동물, 특히 인간 뇌에서 Aβ 플라크를 포함한 응집된 Aβ에 결합하지만, 바람직하게는 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)과 어떤 상당한 교차-반응성도 나타내지 않는다.
- [0149] 본 발명의 또 다른 관점에서는 전술한 바와 같은 항체 또는 그의 단편 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 인간화된 항체 또는 그의 단편이 제공되며, 이들 항체는 실질적으로 포유동물, 특히 인간 뇌에서 Aβ 모노머를 포함한 가용성 폴리머 아밀로이드, 특히 아밀로이드β (Aβ)에 결합하지만, 바람직하게는 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)과 어떤 상당한 교차-반응성도 나타내지 않는다.
- [0150] 본 발명은 또한, 상기 정의된 바와 같은 항체의 인간화된 형태, 상기의 인간화된 항체를 포함하는 조성물, 및 포유동물, 특히 인간에게서 아밀로이드증의 치료, 특히 신경변성 질환의 치료를 위한 상기 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기 신경변성 질환은 특히 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 신경변성 질환은 알츠하이머병이다.
- [0151] 본 발명은 또한 하이브리도마 세포주 13-11-6에 관한 것이다.
- [0152] 본 발명은 또한, 시험관내 진단방법에서 사용하기 위한, 둘 다 상기 정의된 바와 같은 항체 또는 항체를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 특히, 이 진단방법은 특히 생물학적 샘플 내의 AβpGlu(11) 펩타이드 또는 그의 변이체를 검출함으로써 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환; 바람직하게는 알츠하이머병을 진단하는데 관한 것이다.
- [0153] 바람직하게는, 상기 샘플은 혈청 샘플이다.
- [0154] 또 다른 바람직한 구체예에 따르면, 상기 샘플은 체액 또는 뇌척수액 (CSF) 샘플이다.
- [0155] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명은 다음의 방법에 관한 것이다:
- [0156] 본 발명에 따르는 항체를 샘플, 바람직하게는 혈청, 체액 또는 CSF 샘플로부터 선택된 샘플, 가장 바람직하게는 혈청 샘플; 또는 상기 상태 또는 질환을 앓는 것으로 의심되는 대상체의 특정한 신체 부분 또는 신체 영역과 접촉시키고;
- [0157] 샘플로부터의 AβpGlu(11) 펩타이드에 대한 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함하여,
- [0158] 아밀로이드-연관된 질환 또는 상태, 바람직하게는 알츠하이머병을 진단하기 위한 시험관내 또는 원위치 진단방법.
- [0159] 더욱 특히, 본 발명은

- [0160] (a) 아밀로이드 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플 또는 특정한 신체 부분 또는 신체 영역을 AβpGlu(11) 펩타이드에 결합하는 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 전술한 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편, 및/또는 그의 기능적 부분과 접촉하도록 유도하고;
- [0161] (b) 항체 및/또는 그의 기능적 부분이 AβpGlu(11) 펩타이드에 결합하여 면역학적 복합체를 형성하도록 하고;
- [0162] (c) 면역학적 복합체의 형성을 검출하고;
- [0163] (d) 면역학적 복합체의 존재 또는 부재를 샘플 또는 특정한 신체 부분 또는 영역 내의 AβpGlu(11) 펩타이드의 존재 또는 부재와 서로 관련시키는 단계를 포함하는 것으로서,
- [0164] 샘플 내에서 또는 원위치에서 항체 또는 그의 활성 단편의 AβpGlu(11) 펩타이드에 대한 면역특이적 결합을 검출하는 것을 포함하여 아밀로이드-연관된 질환 또는 상태, 바람직하게는 알츠하이머병을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [0165] 또한,
- [0166] (a) 연구 중인 조직 및/또는 체액의 대표적인 샘플을 수득하고;
- [0167] (b) 상기 샘플을 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 전술한 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편, 및/또는 그의 기능적 부분에 의해 아밀로이드 단백질의 존재에 관해 시험하고;
- [0168] (c) 단백질에 결합된 항체의 양을 측정하고;
- [0169] (d) 조직 및/또는 체액 내에 부담된 플라크를 계산하는 것을 포함하여,
- [0170] 조직 및/또는 체액 내에 부담된 아밀로이드 형성 플라크의 정도를 측정하는 방법이 포함된다.
- [0171] 특히, 본 발명은 단계 c)에서 면역학적 복합체의 형성이 면역학적 복합체의 존재 또는 부재가 아밀로이드 단백질, 특히 AβpGlu(11) 펩타이드의 존재 또는 부재와 서로 관련되도록 결정되는, 조직 및/또는 체액 내에 부담된 아밀로이드 형성 플라크의 정도를 측정하는 방법에 관한 것이다.
- [0172] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료학적 유효량으로, 모든 기능적으로 동등한 항체 또는 그의 모든 유도체 또는 기능적 부분을 포함한 본 발명에 따르는 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 전술한 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편을 포함하는 조성물, 특히 임의로 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약제학적 조성물인 조성물에 관한 것이다.
- [0173] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 조성물은 치료학적 유효량의 항체를 포함한다. 추가로, 본 발명에 포함되는 것은 치료학적 유효량으로, 모든 기능적으로 동등한 항체 또는 그의 모든 유도체 또는 기능적 부분을 포함한 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 전술한 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편, 및 임의로, 추가의 생물학적 활성물질 및/또는 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 혼합물이다.
- [0174] 특히, 본 발명은 추가의 생물학적 활성물질이 아밀로이드증, 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 신경변성 질환에 연루된 AβpGlu(11) 단백질과 같은 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 단백질과 연관된 질환 및 장애의 그룹; 바람직하게는 알츠하이머병의 약물 치료에 사용되는 화합물인 혼합물에 관한 것이다.
- [0175] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 그 밖의 다른 생물학적 활성물질 또는 화합물은 또한, AβpGlu(11)에 의해서 야기된 아밀로이드증의 치료에 사용될 수 있거나, 그 밖의 다른 신경학적 장애의 약물 치료에 사용될 수 있는 치료제일 수 있다.
- [0176] 그 밖의 다른 생물학적 활성물질 또는 화합물은 본 발명에 따르는 항체와 동일 또는 유사한 기전에 의해서, 또는 무관한 작용기전에 의해서, 또는 관련되고/되거나 무관한 작용기전의 다양성에 의해서 그의 생물학적 효과를 나타낼 수 있다.
- [0177] 일반적으로, 그 밖의 다른 생물학적 활성 화합물에는 뉴론-전달 증진제, 정신치료 약물, 아세틸콜린 에스테라제

억제제, 칼슘-채널 차단제, 생체 아민, 벤조디아제핀 정온제, 아세틸콜린 합성, 저장 또는 방출 증진제, 아세틸콜린 후시냅스 수용체 작용제, 모노아민 옥시다제-A 또는 -B 억제제, N-메틸-D-아스파르테이트 글루타메이트 수용체 길항제, 비-스테로이드성 소염성 약물, 항산화제, 및 세로토닌성 수용체 길항제가 포함될 수 있다.

- [0178] 더욱 특히, 본 발명은 본 발명에 따르는 항체, 및 임의로, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께 산화적 스트레스에 대해 효과적인 화합물, 항-세포소멸 화합물, 금속 킬레이터, 피렌제핀 및 대사산물과 같은 DNA 수복의 억제제, 3-아미노-1-프로판설폰산 (3APS), 1,3-프로판디설폰에이트 (1,3PDS), α -세크리타제 활성화제, β - 및 γ -세크리타제 억제제, 타우 (tau) 단백질, 신경전달물질, /3-시트 파괴제 (sheet breakers), 아밀로이드 베타 청소/고갈성 세포 성분에 대한 유인제, 글루타미닐 사이클라제의 억제제와 같은 피로글루타메이트화 아밀로이드 베타 3-42를 포함하는 N-말단 절단된 아밀로이드 베타의 억제제, 소염성 분자, 또는 타크린, 리바스티그민, 도네페질 및/또는 갈란타민과 같은 콜린에스테라제 억제제 (ChEIs), M1 작용제 및 모든 아밀로이드 또는 타우 변형 약물 및 영양적 보충물을 포함하는 그 밖의 다른 약물, 및 영양적 보충물로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물을 포함하는 혼합물에 관한 것이다.
- [0179] 본 발명은 추가로, 화합물이 콜린에스테라제 억제제 (ChEIs)인 혼합물, 특히 화합물이 타크린, 리바스티그민, 도네페질, 갈란타민, 니아신 및 메만틴으로 구성된 그룹으로부터 선택된 화합물인 혼합물에 관한 것이다.
- [0180] 추가의 구체예에서, 본 발명에 따르는 혼합물은 본 발명에 따르는 항체, 및 임의로, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께 니아신 또는 메만틴을 포함할 수 있다.
- [0181] 추가의 구체예에서, 본 발명에 따르는 혼합물은 본 발명에 따르는 항체, 및 임의로, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께 글루타미닐 사이클라제 억제제를 포함할 수 있다.
- [0182] 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2005/075436, 특히 31-40 페이지에 나타낸 바와 같은 실시예 1-141에 기술되어 있다. 실시예 1-141의 합성은 WO 2005/075436의 40-48 페이지에 나타낸다. 실시예 1-141, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2005/075436의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0183] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/055945, 특히 46-155 페이지에 나타낸 바와 같은 실시예 1-473에 기술되어 있다. 실시예 1-473의 합성은 WO 2008/055945의 156-192 페이지에 나타낸다. 실시예 1-473, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/055945의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0184] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/055947, 특히 53-118 페이지에 나타낸 바와 같은 실시예 1-345에 기술되어 있다. 실시예 1-345의 합성은 WO 2008/055947의 119-133 페이지에 나타낸다. 실시예 1-345, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/055947의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0185] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/055950, 특히 57-120 페이지에 나타낸 바와 같은 실시예 1-212에 기술되어 있다. 실시예 1-212의 합성은 WO 2008/055950의 121-128 페이지에 나타낸다. 실시예 1-212, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/055950의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0186] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/065141, 특히 56-59 페이지에 나타낸 바와 같은 실시예 1-25에 기술되어 있다. 실시예 1-25의 합성은 WO 2008/065141의 60-67 페이지에 나타낸다. 실시예 1-25, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/065141의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0187] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/110523, 특히 55-59 페이지에 나타낸 바와 같은 실시예 1-27에 기술되어 있다. 실시예 1-27의 합성은 WO 2008/110523의 59-71 페이지에 나타낸다. 실시예 1-27, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/110523의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0188] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/128981, 특히 62-65 페이지에 나타낸 바와 같은 실시예 1-18에 기술되어 있다. 실시예 1-18의 합성은 WO 2008/128981의 65-74 페이지에 나타낸다. 실시예 1-18, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/128981의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.

- [0189] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/128982, 특히 61-67 페이지에 나타난 바와 같은 실시예 1-44에 기술되어 있다. 실시예 1-44의 합성은 WO 2008/128982의 68-83 페이지에 나타난다. 실시예 1-44, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/128982의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0190] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/128983, 특히 64-68 페이지에 나타난 바와 같은 실시예 1-30에 기술되어 있다. 실시예 1-30의 합성은 WO 2008/128983의 68-80 페이지에 나타난다. 실시예 1-30, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/128983의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0191] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/128984, 특히 63-69 페이지에 나타난 바와 같은 실시예 1-36에 기술되어 있다. 실시예 1-36의 합성은 WO 2008/128984의 69-81 페이지에 나타난다. 실시예 1-36, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/128984의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0192] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/128985, 특히 66-76 페이지에 나타난 바와 같은 실시예 1-71에 기술되어 있다. 실시예 1-71의 합성은 WO 2008/128985의 76-98 페이지에 나타난다. 실시예 1-71, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/128985의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0193] 추가의 바람직한 글루타미닐 사이클라제의 억제제는 WO 2008/128986, 특히 65-66 페이지에 나타난 바와 같은 실시예 1-7에 기술되어 있다. 실시예 1-7의 합성은 WO 2008/128986의 66-73 페이지에 나타난다. 실시예 1-7, 그들의 합성 및 글루타미닐 사이클라제 억제제로서의 그들의 용도에 관한 WO 2008/128986의 개시내용은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0194] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 특히 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 본 명세서에 기술된 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편, 및 임의로, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께, 예를 들어, 환각, 망상, 사고 장애 (뚜렷한 사고 산란, 탈선, 사고이탈로 인해 명백해짐), 및 기이하거나 체계적이지 않은 행동을 포함한 양성 및 음성 정신병 증상뿐만 아니라 쾌감 상실, 정서적 둔감 (flattened affect), 무감정 및 사회적 위축의 치료를 위한 클로자핀, 지프라스돈, 리스페리돈, 아리피프라졸 또는 올란자핀과 같은 "이례적인 항정신병제"를 포함하는 혼합물이 제공된다.
- [0195] 본 발명의 특정한 구체예에서, 본 발명에 따르며 전술한 바와 같은 조성물 및 혼합물은 각각 치료학적 유효량으로 항체 및 생물학적 활성물질을 포함한다.
- [0196] 본 발명에 따르는 항체와 함께 혼합물로 적합하게 사용될 수 있는 그 밖의 다른 화합물은 PEP-억제제 (pp. 43/44), LiCl, 디펩티딜 아미노펩티다제의 억제제, 바람직하게는 DP IV 또는 DP IV-유사 효소의 억제제 (참조 pp. 48/49); 아세틸콜린에스테라제 (ACE) 억제제 (참조 p. 47), PIMT 증진제, 베타 세크리타제의 억제제 (참조 p. 41), 감마 세크리타제의 억제제 (참조 pp. 41/42), 중성 엔도펩티다제의 억제제, 포스포디에스테라제-4 (PDE-4)의 억제제 (참조 pp. 42/43), TNF알파 억제제, 무스카린성 M1 수용체 길항제 (참조 p. 46), NMDA 수용체 길항제 (참조 pp. 47/48), 시그마-1 수용체 억제제, 히스타민 H3 길항제 (참조 p. 43), 면역조절제, 면역억제제, 또는 안테크린 (나탈리주맙), 뉴텔란 (팜프리딘-SR), 캄팩스 (알렘투주맙), IR 208, NBI 5788/MSP 771 (티폴리모티드), 파클리탁셀, 애너지스 (Anergix).MS (AG 284), SH636, 디페린 (CD 271, 아다팔렌), BAY 361677 (인터류킨-4), 매트릭스-메탈로프로테이나제-억제제 (예를 들어, BB 76163), 인터페론-타우 (트로포블라스틴) 및 SAIK-MS로 구성된 그룹으로부터 선택된 약제; 베타-아밀로이드 항체 (참조 p. 44), 시스테인 프로테아제 억제제 (참조 p. 44); MCP-1 길항제 (참조 pp. 44/45), 아밀로이드 단백질 침착 억제제 (참조 p. 42) 및 베타 아밀로이드 합성 억제제 (참조 p. 42)를 포함하여 WO 2008/065141 (특히 37/38 페이지 참조)에 기술되어 있으며, 이 문헌은 본 발명에 참고로 포함된다.
- [0197] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료학적 유효량으로 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 또는 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 본 명세서에 전술한 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편 및/또는 생물학적 활성물질을 포함하는 혼합물에 관한 것이다.
- [0198] 본 발명은 추가로, 아밀로이드증, 알츠하이머병 (AD), 루이체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증이 있는 유전적 뇌일혈 (네덜란드 타입)과 같은 신경적 장애; 광 파킨슨-치매 복합체를 포함하는 (단, 이들로 제한되지 않는다)

질환과 같은 이차 아밀로이드증 및 노화-관련된 아밀로이드증을 포함한 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질환 및 장애의 그룹뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS (근위축성 측삭 경화증), 성인기 발증형 당뇨병, 노년기 심장 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 다른 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 근거하거나 그와 연관된 그 밖의 다른 질환의 영향을 치료하거나 완화시키기 위한 약제의 제조를 위한 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 특히 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 본 명세서에 기술한 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편 및/또는 그의 기능적 부분 및/또는 상기 항체를 포함하는 약제학적 조성물 또는 혼합물의 용도에 관한 것이다.

[0199] 또한, 본 발명에는 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 특히 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르는 인간화된 항체 또는 그의 단편을 약제학적으로 허용되는 형태로 제제화하는 것을 포함하여, 아밀로이드증, 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성과 같은 신경변성 질환; 루이체 치매, 아밀로이드증이 있는 유전적 뇌일혈 (네덜란드 타입); 광 파킨슨-치매 복합체를 포함하는 (단 이들로 제한되지 않는다) 질환과 같은 이차 아밀로이드증 및 노화-관련된 아밀로이드증을 포함한 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질환 및 장애의 그룹뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS (근위축성 측삭 경화증), 성인기 발증형 당뇨병, 노년기 심장 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 다른 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 근거하거나 그와 연관된 그 밖의 다른 질환의 영향을 예방, 치료 또는 완화시키는 방법에서 사용하기 위한 항체, 특히 본 발명에 따르는 모노클로날 항체, 특히 키메라 항체 또는 그의 단편, 또는 본 발명에 따르며 본 명세서에 기술한 바와 같은 인간화된 항체 또는 그의 단편 및/또는 그의 기능적 부분 및/또는 상기 항체 및/또는 그의 기능적 부분을 포함하는 약제학적 조성물 또는 혼합물을 제조하는 방법이 포함된다.

[0200] 또한, 본 발명에는 치료학적 유효량으로 항체를 투여하는 것을 포함하여 항체 및/또는 그의 기능적 부분, 특히 인간화된 항체 및/또는 그의 기능적 부분, 또는 이러한 항체 및/또는 그의 기능적 부분을 포함하는 조성물 또는 혼합물을 장애를 앓고 있는 동물 또는 인간에게 투여함으로써, 아밀로이드증, 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성과 같은 신경적 장애; 루이체 치매, 아밀로이드증이 있는 유전적 뇌일혈 (네덜란드 타입); 광 파킨슨-치매 복합체를 포함하는 (단 이들로 제한되지 않는다) 질환과 같은 이차 아밀로이드증 및 노화-관련된 아밀로이드증을 포함한 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질환 및 장애의 그룹뿐만 아니라 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS (근위축성 측삭 경화증), 성인기 발증형 당뇨병, 노년기 심장 아밀로이드증, 내분비 종양, 및 황반 변성을 포함하는 그 밖의 다른 질환과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 근거하거나 그와 연관된 그 밖의 다른 질환의 영향을 예방, 치료 또는 완화시키는 방법이 포함된다.

[0201] 또한, 본 발명의 목적은 동물, 특히 포유동물 또는 인간에게 항체, 특히 본 발명에 따르며 본 명세서에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여함으로써 아밀로이드증, 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성과 같은 신경변성 질환을 포함하는 (단 이들로 제한되지 않는다) 이차 아밀로이드증 및 노화-관련된 아밀로이드증을 포함한 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질환 및 장애의 그룹; 특히 인지 기억능의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0202] 특정한 구체예에서, 본 발명은 동물, 특히 포유동물 또는 인간에게 항체, 특히 본 발명에 따르며 본 명세서에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 투여함으로써 기억 장애를 앓고 있는 동물, 특히 포유동물 또는 인간의 인지 기억능을 유지 또는 증가시키지만, 특히 인지 기억능을 회복시키는 방법을 제공한다.

[0203] 본 발명의 추가의 목적은 본 발명에 따르며 본 명세서에서 기술한 바와 같은 항체를 사용하여, 아밀로이드증, 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병 (AD), 예를 들어, 산재성 알츠하이머병 (SAD), 또는 가족형 영국 치매 (FBD) 및 가족형 덴마크 치매 (FDD)와 같은 가족형 알츠하이머 치매 (FAD), 다운 증후군에서의 신경변성과 같은 신경변성 질환을 포함하는 (단 이들로 제한되지 않는다) 이차 아밀로이드증 및 노화-관련된 아밀로이드증을 포함한 아밀로이드 플라크 형성과 연관된 질환 및 장애의 그룹; 특히 인지 기억능의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 상태의 치료를 위한 방법뿐만 아니라 치료학적 조성물 및 이러한 조성물을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

- [0204] 특히, 본 발명은 인지 기억능의 상실을 특징으로 하는 아밀로이드-연관된 상태를 앓고 있는 동물, 특히 포유동물 또는 인간을 치료하여 인지 기억능의 유지를 유도하는데 관한 것이다.
- [0205] 실시예
- [0206] 1. 재료 및 방법
- [0207] 1.1. 세포 배양기술
- [0208] 1.1.1. 하이브리도마 세포 및 항체 스크리닝
- [0209] A β 종에 대한 모노클로날 항체 (mAb)를 생산하는 쥐 하이브리도마 세포는 Biogenes GmbH (Berlin)로부터 제공되었다. 암컷 BALB/c 마우스를 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin; KLH) 단백질과 C-말단 시스테인 잔기에서 결합된 화학적 합성 항원 A β (pE 11-14)로 면역시켰다. KLH 단백질은 강력하게 면역원성이며, 백신 담체 단백질로 적용되었다.
- [0210] 세포 융합은 면역된 마우스의 비장 세포 및 쥐 골수종 세포주 SP2/0-Ag14에 의해서 수행되었다. 세포 융합 후에, 하이브리도마 세포를 하이포크산틴 아미노프테린 티미딘 배지 (HAT)를 사용하여 선택하였다. 따라서, HAT 배지는 B 세포로부터의 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT) 유전자 및 골수종 세포로부터의 종양형성 특성을 유전하는 하이브리도마 세포의 선택을 허용한다. 그 후에, 하이브리도마 상등액을 A β (pE 11-14)에 대한 특이적 mAb의 존재에 관해서 스크리닝하였다. mAb를 다양한 변형된 A β -펩타이드에서 결합하는 그들의 능력에 관해서 검사하였다. 따라서, A β -펩타이드를 하이드록시-셀룰로즈-막에 스포팅하고, 세포 배양 상등액으로부터의 mAb와 배양하고, 표지된 항체에 의해서 검출하였다. N-말단 변형된 A β 11(pE) 펩타이드에 대한 특이적 mAb를 생산하며, 다른 변형된 A β -펩타이드와의 상당한 교차-반응을 나타내지 않는 하이브리도마 세포 (참조 표 1)가 재클로닝을 위해서 선택되었다. 제한된 희석기술을 통해서 하이브리도마 세포를 클로닝하여 하나의 분리된 클론을 달성하였다.
- [0211] 이하의 하이브리도마 클론이 재클로닝 후에 안정하였으며, BioGenes로부터 제공되었다:
- [0212] pEVHH-59025 13-11-6 (클론 13)
- [0213] 본 연구는 세포 배양 상등액 내에서 mAb의 생산을 위한 하이브리도마 세포를 성공적으로 배양하고자 하는 것이었다. 클론의 세포 배양 상등액 내의 mAb 농도는 표면 플라즈몬 공명 (Surface Plasmon Resonance; SPR)에 의해서 결정되어야 한다. 추가의 목적은 배양의 최적화였으며, 이에 의해서 무혈청 배지를 함유하는 혈청으로부터의 하이브리도마 세포의 적응이 mAb의 정제를 단순화시키기 위해서 수행되어야 한다. 또한, mAb는 정제되고, 생물물리화학적으로 특정화되고, 시험에 적용되거나 면역염색에 사용되어야 한다.
- [0214] 표 1. A β 11(pE) 및 변형된 A β -펩타이드의 아미노산 서열

[0215] 회색으로 표지된 펩타이드 AβpE (11-23)은 N-말단에서 피로글루타메이트에 의한 표적 서열을 함유한다

서열번호	펩타이드	서열	서열번호	펩타이드	서열
10	Aβ (2 - 10)	KMDAEFRHDSGYE	18	Aβ (11 - 23)	EVHH QKLVFFAED
11	Aβ (1 - 13)	DAEFRHDSGYEVH	19	Aβ (p11 - 23)	pEVHH QKLVFFAED
12	Aβ (iso 1 - 13)	iDAEFRHDSGYEVH	20	Aβ (12 - 24)	VHHQKLVFFAEDV
13	Aβ (2 - 14)	AEFRHDSGY EVHH	21	Aβ (iso D7 1 - 13)	DAEFRHisoDSGYEVH
14	Aβ (3 - 15)	EFRHDSGY EVHH Q	22	Aβ (iso 7 - 19)	iDSGYEVHHQKLVF
15	Aβ (p3 - 15)	pEFRHDSGY EVHH Q	23	Aβ (17 - 29)	LVFFAEDVGSNKG
16	Aβ (4 - 16)	FRHDSGY EVHH QK	24	Aβ (25 - 37)	GSNKGAIIGLMVG
17	Aβ (9 - 21)	GY EVHH QKLVFFA	25	Aβ (30 - 42)	AIIGLMVGGVVIA

[0216]

[0217] 1.1.2. 하이브리도마 세포의 배양

[0218] 하이브리도마 세포는 37℃ 및 5% CO₂의 가습 대기 하에 세포 배양 플라스크 내에서 배양하였다. 배양 D-MEM 배지 (L-글루타민, 나트륨 피루베이트, 4.5 g/ℓ 글루코즈, Invitrogen)에는 15% FBS 및 1% MEM-NEA (비-필수 아미노산, Invitrogen)을 보충하였다. 배양 배지의 사용 직전에, 50 mM β-머캅토에탄올의 저장 용액 및 200 mM L-글루타민의 신선한 해동 저장 용액을 적어도 50 μM β-머캅토에탄올 및 2 mM L-글루타민의 최종 농도로 사용하였다. 세포의 계대배양은 세포 밀도에 따라, 주 2회 일상적으로 수행되었다. 세포 밀도는 1 x 10⁶ 내지 2 x 10⁶ 생존 세포/мл이어야 한다. 하이브리도마 세포의 계대를 위해서, 부분적 부착 세포는 세포 현탁액을 주의해서 아래 위로 피펫팅함으로써 병 바닥으로부터 떼어내고, 팔콘 튜브 (falcon tubes) 내로 전이시키고, 5 분 동안 300x g으로 원심분리시켰다. 그 후에, mAb를 함유하는 세포 배양 상등액을 흡인한 다음에, 저장소 내에 수거하고, 4℃에서 저장하였다. SPR 측정을 위해서, 샘플 (100 μℓ)을 세포 배양 상등액으로부터 취하였다. 세포 펠릿을 신선한 배양 배지로 재현탁시킨 후에, 캐시 세포 계수기 (Casy® Cell Counter; Scharfe System GmbH, Reutlingen)를 사용하여 세포 밀도를 측정하였다. 따라서, 세포 현탁액을 캐시톤 (Casy®ton; 생리학적 식염수 용액)에 10-배 희석한 다음에, 100 μℓ의 세포 희석액을 9900 μℓ 캐시톤 내로 전이시켰다. 장치는 생존 및 사멸 세포의 양뿐만 아니라 샘플 내의 ml당 총 세포량을 전류 배제 (electric current exclusion)에 의해서 측정하였다. 온전한 세포막을 갖는 생존 세포는 전류를 배제하는 반면에 결함이 있는 세포막을 갖는 사멸 세포는 전기전도성이다. 그 후, 세포를 세포 성장에 따라, T-플라스크 (필요에 따라 25 cm² - 175 cm²) 내에 1 x 10⁵ 내지 5 x 10⁵ 생존 세포/мл의 밀도로 접종하였다.

[0219] 1.1.3. 하이브리도마 세포의 냉동보존

[0220] 대수 성장기에 있으며 85% 이상의 생존도를 갖는 하이브리도마 세포를 냉동보존하였다. 세포의 동결은 낮은 계대수로 가능한 한 일찍 수행되어야 한다. 하이브리도마 세포를 5 분 동안 300x g으로 원심분리시키고, 45% 배양 배지 (D-MEM, 1% MEM-NEA, 15% FBS), 45% 열-불활성화된 소 태아 혈청 (FBS) 및 10% 디메틸 설폭사이드 (DMSO)에 7 x 10⁶ 생존 세포/мл의 농도로 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 1 ml 분취액으로 빠르게 크리오 바이알 (cryo vial) 내에 전이시켰다. 크리오 바이알은 분당 1℃의 느린 냉각율을 보장하도록 QUALIFREEZE의 이소프로필 알콜로 충전된 동결 용기의 내부에 배치하였다. 동결 용기는 -80℃에서 최대 48 시간 동안 저장하였다. 그 후에, 크리오 바이알을 -196℃에서 액체 질소에 전이시켰다.

[0221] 1.1.4. 하이브리도마 세포의 해동

[0222] 액체 질소 중에 저장된 하이브리도마 세포를 얼음의 작은 조각이 내부에 남아있을 때까지 37℃의 수욕 중에서 빠르게 해동시켰다. 사용된 동결 매질은 4℃ 이상의 온도에서 세포 독성효과를 갖는 DMSO를 함유하였다. 따라서, 세포 배양 배지는 4℃로 냉각되어야 한다. 세포 현탁액을 팔콘 튜브 내로 전이시키고, 5 ml의 4℃ 배양 배지에 의해 적가 희석하였다. 세포를 즉시 5 분 동안 300x g에서 원심분리시키고, 세포 독성 항-동결제 DMSO를 갖는 상등액을 흡인하였다. 세포 펠렛을 37℃로 가열된 세포 배양 배지에 재현탁시키고, 25 cm² T-플라스크 내에 ml당 5-7 x 10⁵ 생존 세포의 세포 밀도로 접종하였다.

[0223] 1.1.5. 오염에 대한 스크리닝

[0224] 하이브리도마 세포는 매 2 개월마다 마이코플라즈마 오염에 대해서 검사하였다. 따라서, Lonza로부터의 마이코엘리트 (MycoAlert®) 마이코플라즈마 검출 키트를 사용하여 세포 배양 상등액을 시험하였다. 시험은 특정의 마이코플라즈마 효소의 활성을 이용하는 선택적 생화학 시험이다. 생존 마이코플라즈마를 용해시키고, 효소를 ADP의 ATP로의 전환을 촉진시키는 마이코엘리트 (MycoAlert™) 기질을 반응시킨다. 방출된 광 강도가 ATP 농도와 상관관계가 있기 때문에, ATP 수준의 증가는 생물발광 반응을 사용하여 검출될 수 있다.

[0225] 따라서, 세포 배양 상등액의 샘플을 5 분 동안 200x g에서 원심분리시킨 다음에, 100 µl의 하이브리도마 상등액을 96-웰 플레이트 내에서 100 µl의 마이코엘리트 (MycoAlert™) 시약과 혼합시키고, 실온에서 5 분 동안 배양하였다. 발광은 발광측정기 (luminometer) 제니오스프로 (GeniosPro; Tecan)로 측정하였으며, 그 다음에 100 µl의 마이코엘리트 (MycoAlert™) 기질을 첨가하고, 실온에서 10 분 동안 배양하고, 발광을 다시 측정하였다. 첫 번째 측정치에 대한 두 번째 발광 측정치의 비가 1 미만인 경우에, 세포는 오염되지 않았다.

[0226] 1.1.6. 진탕 플라스크 내에서 하이브리도마 세포 배양

[0227] 하이브리도마 세포를 정지상 현탁 배양 (예를 들어, T-플라스크)으로, 및 교반 현탁 배양 (예를 들어, 진탕 플라스크)으로 성장시켰다. 항체 생산을 위해서, 하이브리도마 세포를 T-플라스크 내에서의 정지상 배양과 병행하여 진탕 플라스크 내에서 약 7일 동안 배양하였다. 세포를 진탕 플라스크 내에 3 x 10⁵ 내지 5 x 10⁵ 세포/ml의 세포 밀도로 접종하였다. 세포 배양 배지 (D-MEM, 1% MEM-NEA, 15% FBS 또는 초저 IgG FBS)를 0.5% 겐타마이신, 50 µM β-머캅토에탄올 및 2 mM L-글루타민으로 보충하였다. 최적 가스 교환을 용이하게 하기 위해서 단지 약 30%의 진탕 플라스크 용적을 배지로 충전시켰다. 진탕 플라스크 내의 현탁 배양액을 37℃, 5% CO₂ 하에서 배양하고, 80 rpm으로 회전시켰다. 7일 배양 후에, 세포 현탁액을 피펫으로 팔콘 튜브 내로 전이시키고, 10 분 동안 500x g으로 원심분리시켰다. 그 후에, 항체를 함유하는 세포 배양 상등액을 저장소에 수거하고, 4℃에서 저장하였다. SPR 측정을 위해서, 세포 배양 상등액의 샘플을 취하였다. 세포 펠렛은 버렸다.

[0228] 1.1.7. 무-혈청 배지에 대한 하이브리도마 세포의 적응

[0229] 무-혈청 배지의 적용은 혈청-보충된 배지와는 대조적으로 생산된 mAb의 정제를 단순화시킨다. 무-혈청 배지는 BSA 및 소 면역글로불린 (예를 들어, IgG)을 함유하지 않아 mAb의 정제를 용이하게 한다. 세포는 높은 세포 활력도 (vitality) 및 항체 생산율을 보장하기 위해 혈청 농도를 단계적으로 감소시킴으로써 반드시 혈청-함유 배지 (D-MEM, 15% FBS, 1% MEM-NEA)로부터 무-혈청 조건으로 적응되어야 한다. 따라서, 세포는 적응 전에 90% 이상의 활력도로 온화한-대수 성장기에 있어야 한다. 이어서, 상이한 무-혈청 배지 및 무-단백질 배지를 시험하였다 (참조: 표 2).

[0230] 표 2. 하이브리도마 세포 배양을 위한, 시험한 무-혈청 배지 및 무-단백질 배지

배지	설명	단백질 함량	회사
하이브리도마 익스프레스 (Hybridoma Express)	무-혈청 (serum-free)	낮음, 11 µg/ml	PAA
하이브리도마 익스프레스 플러스	무-혈청	낮음 (명시되지 않음)	
CD 하이브리도마 배지	무-단백질 (protein-free)	단백질 또는 펩타이드가 없음	GIBCO
하이브리도마-SFM	무-혈청	낮음, 20 µg/ml	

[0231] [0232] 시험한 모든 배지는 0.5% 겐타마이신이 보충되었다. 배양 배지의 사용 직전에, 50 µM β-머캅토에탄올 및 2 mM

L-글루타민을 첨가하였다. 무-혈청 배지 적응과 평행하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 IgG를 함유하는 15% 초저 IgG-FBS (Invitrogen)를 갖는 배양 배지 (D-MEM, 1% MEM-NEA)를 또한 시험하였다. FBS의 존재에 기인하여 세포는 배양 배지에 직접 적응되었다. 따라서, 세포는 4×10^5 생존 세포/ ml 의 접종 밀도로 15% 초저 IgG-FBS를 갖는 배양 배지에 계대배양하였다. 세포의 추가의 계대배양은 세포 밀도에 따라 주당 2 회 일상적으로 수행되었다.

[0233] 하이브리도마 세포는 37°C 및 5% CO₂의 가습 대기 하에 175 cm² T-플라스크 내에서 배양하였다.

[0234] 1.1.8. 성장곡선의 작성

[0235] 무-혈청 및 혈청-함유 배지 내에서의 하이브리도마 세포 성장의 장기간 분석에 대한 7일에 걸친 성장곡선을 생성시켰다. 하이브리도마 세포는 진탕 플라스크 내에서 배양하였다. 따라서, 125 ml-진탕 플라스크를 37°C, 5% CO₂ 하에서 작업 용적 30 ml의 세포 현탁액으로 접종하고, 80 rpm으로 진탕하였다. 규칙적으로, 세포 배양 상등액 내의 세포 수 및 항체 농도의 측정을 위해 300 μl 의 샘플을 진탕 플라스크로부터 수득하였다. 배지 최적화를 위해서, 15% FBS 또는 15% 초저 IgG-FBS (Invitrogen)를 갖는 혈청-함유 배지, 및 회사 PAA 및 GIBCO로부터의 무-혈청 배지뿐만 아니라 무-단백질 배지를 시험하였다.

[0236] 1.2. 항체 정제

[0237] 1.2.1. 친화성 크로마토그래피

[0238] 하이브리도마 세포 배양 상등액 내에 풍부한 mAb를 친화성-크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 따라서, 6% 교차-결합된 텍스트란 지지체 물질 (GE Healthcare, Uppsala)에 커플링된 재조합 단백질 G를 갖는 하이트랩 (HiTrap) 단백질 G HP (5 ml) 칼럼이 사용되었다. 단백질 G, 즉 그룹 G 스트렙토코사이 박테리아의 세포 표면 단백질은 비-면역 기전에 의해서 포유동물 IgG의 Fc 부분에 결합하는 타입 III Fc 수용체이다. Fc 수용체는 또한, 알부민에 대한 결합 부분을 갖는다. 그러나, 알부민 결합 부위는 단백질 G의 재조합체 형태로부터 유전적으로 결실되며, 이에 의해서 알부민과의 원치 않는 교차-반응을 피하고, 따라서 FBS를 함유하는 세포 배양 상등액으로부터의 항체의 정제가 가능하다. 그러나, 단백질 G는 마우스-IgG와 동등하게 또한 소-IgG에 결합한다. 이러한 이유로, 하이브리도마 세포의 배양을 위해서 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 IgG를 함유하는 초저 IgG-FBS (Invitrogen)가 사용되었으며, 또한 무-혈청 및 무-단백질 배지를 하이브리도마 배양에 대해 시험하였다.

[0239] 친화성 크로마토그래피는 악타퓨리화이어 (AktaTMPurifier; GE Healthcare)에서 수행되었다. 처음에, 칼럼을 탈기된 이중-증류수로 세정하여 보존제 에탄올을 제거하였다. 전체 칼럼을 4°C에서 냉각시켰다. 그 후, 단백질 G 칼럼을 1 x 결합 완충액 (20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0)로 평형화시켜 항체 결합을 위한 최적 pH 7 및 적합한 이온 강도를 보장하였다. 세포 배양 상등액을 4°C에서 30 분 동안 38400x g (Avanti J-30I, BECKMAN COULTER)으로 원심분리하여 나머지 세포 단편을 제거하였다. 크로마토그래피를 위해서, 세포 배양 상등액을 2 x 결합 완충액 (40 mM Na₂HPO₄, pH 7.0)과 1:1 혼합시켰다. 칼럼에서의 프로브의 적용은 밤새 1.5 ml/분의 유속으로 악타퓨리화이어 (AktaTMPurifiers) P-950의 샘플 적용 펌프를 사용하여 수행하였으며, 이에 의해서 상등액을 얼음 냉각시켰다. 그에 의해, 과도한 압력은 지지체 물질의 겔 베드를 파괴시킬 수 있기 때문에, 최대 허용 총 압력은 0.3 MPa를 초과하지 않아야 한다. 이에 따라, 과도한 비특이적 성분들을 결합 완충액, 및 이어서 5 칼럼 용적에 걸친 0 내지 2 M NaCl의 구배에 의해서 칼럼으로부터 세척하였다. 그 후에, 칼럼을 다시 1 x 결합 완충액으로 세척하였다. 칼럼으로부터 항체를 용출시키기 위해서 2 가지 상이한 방법을 시험하였다. 단백질을 2.5 ml/분의 역류로 용출시키고, 280 nm에서 흡수가 증가하는 분획을 수거하였다. 제1 용출방법은 완충 스위치 (buffer switch)에 의해 산성 0.1 M 글리신-HCl 용액 (pH 2.7)을 사용하여 수행되었다. pH 변화에 기인하여, 결합된 면역글로불린을 단백질 G로부터 방출시킨 다음에 수거하였다. 용출 후에, 용출 분획에서의 pH는 1 M 트리스-HCl, pH 9.0으로 적정함으로써 즉시 중화시켰다. 칼럼을 1 x 결합 완충액으로 세정하여 칼럼을 pH 7.0로 평형화시켰다. 제2 방법은 5 칼럼 용적에 걸쳐서 0 내지 2 M 칼륨 티오시아나이드 (KSCN)의 구배를 사용하여 수행함으로써 pH는 항상 7.0으로 유지시킨다. 항체와 단백질 G 사이의 상호작용은 KSCN에 의해서 느슨하게 되었다. 용출 후에, 칼럼을 1 x 결합 완충액으로 세정하였다.

[0240] 그 후에, 항체 용액을 즉시 투석하여 완충액을 교환하였다.

[0241] 1.2.2. SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)

[0242] SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 사용하여 전기장에서 그들의 분자량에 따라 단백질들을 분리시킨다. 계면활성제 SDS (나트륨 도데실 설페이트)에 의해, 폴리펩타이드의 고유 전하는 폴리펩타이드 (1.6 아미노산당 대략

1 분자)에서의 SDS의 축적을 통해서 덮어 씌워진다. 이에 의해, 전기영동 이동성은 광범하게 단백질의 분자량에 따라 결정된다. 단백질의 환원을 위해서, 프로브를 SDS 샘플 완충액 (로티-로드 (Roti®-Load) 1, BioRad)으로 1:3 (v/v)의 비율로 희석하고, 95℃에서 10 분 동안 배양하였다. SDS 샘플 완충액은 단백질의 디설파이드 결합을 환원시키는 β-머캅토에탄올을 함유하며, 항체의 중쇄와 경쇄의 분리를 야기한다. 환원되지 않아야 하는 샘플은 β-머캅토에탄올을 함유하지 않는 샘플 완충액 (250 mM 트리스-HCl pH 8.0, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) 글리세린, 0.005% (w/v) 브로모페놀 블루)으로 희석하였다. 완충액은 샘플에 의해 1:4 (v/v)의 비율로 희석되었다. 샘플을 폴리아크릴아미드 겔에 적용하기 전에, 프로브를 30℃에서 30 분 동안 약하게 진탕하였다. 본 작업에서, 친화성 크로마토그래피 (1.2.1.장 참조)의 분획들을 분석되는 항체의 존재 및 순도의 시험을 위해서 SDS-PAGE에서 검사하였다. 단백질의 분리는 12% 폴리아크릴아미드 겔에서 수행되었다 (조성은 표 3 참조). 전기영동은 1 x 주행 완충액 (30.3 g/ℓ 트리스, 10 g/ℓ SDS, 144 g/ℓ 글리신)으로 충진되고, 10 분 동안 100 V로 시작한 다음에 200의 정전압으로 증가시키는 수직 커팅 챔버 (vertical cutting chamber) 내에서 수행되었다. 프로브 외에도, 전-염색된 단백질 래더 (ladder) (10-250 kDa, Fermentas)를 분자량 기준으로 적용하였다.

[0243] 단백질을 30 분 동안 쿠마시 브릴리언트 블루 (Coomassie Brilliant Blue)-G250으로 염색하였다. 이에 따라, 겔을 몇 시간에 걸쳐 10% 아세트산으로 염색을 제거하였다.

[0244] 표 3. SDS-PAGE를 위한 적층 (stacking)- 및 분리 겔의 조성

성분	사용량	
	적층 겔 (3%)	분리 겔 (12%)
H ₂ O	4.85 ml	3.95 ml
적층 겔 완충액 (500 mM 트리스/HCl, pH 6.8)	1.85 ml	-
분리 겔 완충액 (1.5 M 트리스/HCl, pH 8.8)	-	2.8 ml
아크릴아미드	0.75 ml	4.5 ml
10% APS	40 μl	60 μl
10% SDS	150 μl	225 μl
TEMED	12 μl	18 μl

[0245]

[0246] 1.2.3. 단백질의 투석 및 상향농축 (upconcentration)

[0247] 투석은 투석막의 반투과 특성을 사용함으로써 저장 완충액 (2 mM EDTA를 함유하는 D-PBS (pH 7.13)) 내의 항체 용액의 형질전환을 위해서 사용되었다. 친화성 크로마토그래피에 의한 항체 정제 후에, 항체를 함유하는 용출 분획을 투석하였다. 처음에는, 투석 튜브를 증류수 내에 담가서 튜브의 반투과성, 유연성을 달성하고, 보존제를 제거하였다. 6-8 kDa의 컷-오프 역치 (cut-off threshold)를 갖는 투석 튜브를 항체 용액으로 충전시키고, 저장 완충액에 현탁시켰다. 이에 따라, 항체 용액을 일정한 교반 하에 4℃에서 밤새 100-배 용적의 샘플에 대해서 투석하였다. 그 후에, 농도를 UV/VIS 분광법에 의해서 결정하였다. 항체 용액을 5 kDa의 컷-오프 역치를 갖는 VIVASCIENCE사의 비바스핀 (VIVASPIN) 20 ml 컨센트레이터 (CONCENTRATOR)-튜브를 사용하여 적어도 2 mg/ml로 상향-농축시켰다. 항체 용액을 4℃에서 Sigma의 스윙-아웃-로토 (Swing-Out-Rotor) 내에서 3500x g으로 원심분리시켰다. 마지막으로, 항체를 2 mM EDTA (pH 7.13)를 함유하는 D-PBS에 대해서 투석하였다.

[0248] 1.2.3.1. 항체의 비오틴닐화

[0249] mAb 마우스 항 Aβ 11(pE) (클론 13)의 비오틴닐화는 생물학적 샘플 내의 Aβ (pE11-x) 펩타이드를 특이적으로 검출하기 위한 항체로서 Aβ 11(pE) ELISA에 적용하는데 필요하였다. 검출을 위해서, 스트렙타비딘-퍼옥시다제 폴리머를 비오틴닐화 항체에 첨가함으로써 스트렙타비딘과 비오틴 사이에 강력한 비-공유적 상호작용을 형성시켰다.

[0250] 비오틴닐화는 농축된 항체 (1.2.3항 참조)를 사용하여 수행되었다. 처음으로, 정제 및 농축된 mAb를 4℃에서 밤새 비오틴닐화 완충액 (100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.2)에 대해 투석하였다. 그 후에, 단백질 농도는 UV-스펙트럼에 의해서 결정하였다 (1.3.1항 참조). 비오틴닐화제 (NHS-PEO₄-비오틴)를 증류수에 용해시켜 20 mM 용액을 제조하였다. 반응을 1:6의 항체:비오틴 물비로 수행하였으며, 4℃에서 4 시간 동안 배양하였다. 항체와 활성화된 비오틴 사이의 반응을 반응 혼합물의 양에 관해서 50-배 과량으로 1 M 트리스 완충액 pH 9.0을 첨가함으로써 중지시킨 다음에, 4℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 항체-비오틴 용액을 4℃에서 2일에 걸쳐서 투석 완충

액 (D-PBS, 2 mM EDTA)에 대해 2회 투석하고, 단백질 농도를 UV-스펙트럼에 의해서 결정하였다 (1.3.1항 참조). 혼입된 비오틴 수준의 평가를 위해서, 100 μ l HABA-아비딘 용액을 800 μ l 투석 완충액에 첨가하고, 측량 큐벳 (measuring cuvette) 내에서 10 분 동안 배양한 다음에, UV-분광계 UV1에 의한 A_{500} 을 측정하였다. 그 후에, 100 μ l 항체-비오틴 용액을 큐벳 내의 용액에 첨가하여, 혼합시키고, 값이 적어도 15 초 동안 일정하게 유지될 때 흡수 A_{500} 을 다시 측정하였다. 비오틴은 아비딘과 복합체를 형성하여 500 nm에서 흡수의 감소를 야기한다. 그 후, 비오틴 혼입의 수준 (단백질의 몰당 비오틴의 몰)을 계산하였다.

[0251] 1.3. 항체의 생물물리학적 특정화를 위한 방법

[0252] 1.3.1. UV/VIS-분광법

[0253] 항 $A\beta$ 11(pE) 항체의 정제 후에, UV/VIS 스펙트럼을 측정하였다. 단백질 농도의 결정을 위해서, 280 nm에서의 흡수 및 또한, 240 nm 내지 339 nm 사이에서의 UV-스펙트럼을 Thermo Scientific의 UV-분광계 UV1로 측정하였다. 단백질 농도는 흡수 A_{280} 및 흡광 계수 (extinction coefficient)에 의해서 결정되었다. 항 $A\beta$ 11(pE) 항체에 대해서 $\epsilon = 1.5$ 의 흡광 계수가 추정되었다.

[0254] 1.3.2. CD-분광법에 의한 열역학적 단백질 안정성의 결정

[0255] 정제된 항 $A\beta$ 11(pE) 항체를 10 mM NaH_2PO_4 (pH 7.14)에 대해서 투석하였다. 농도는 UV/VIS 분광법에 의해서 결정되었다 (1.3.1항 참조). CD-분광법을 위해서는 항체를 0.13 mg/ml의 농도로 희석하고, 석영 유리 큐벳 (d=0.1 cm) 내에 충전하였다. CD-스펙트럼은 190 내지 260 nm에서 자스코 J-710 분광-편광계 (Jasco GmbH, Groß-Umstadt)를 사용하여 측정하였다. 20°C의 온도에서의 스펙트럼은 20 회의 축적에 의해서 측정되었다. 그 후, 온도를 20°C로부터 80°C까지 증가시키으로써 타원율 (ellipticity)은 10 회 축적으로 5°C 간격으로 측정하였다. 열비율은 30 K/h였으며, 온도는 각각의 측정 전에 180 초 평형화시켰다.

[0256] 1.3.3. 표면 플라즈몬 공명 (SPR)

[0257] 1.3.3.1. CM5 칩 상에서 리간드의 고정화

[0258] -80°C에서 헥사플루오로이소프로판올 (HFIP) 중에 저장된 합성 $A\beta$ (pE11-30) 펩타이드를 실온에서 해동시켰다. 펩타이드를 함유하는 튜브를 밤새 흡 후드 (fume hood) 아래에 개방된 채로 두어 용매 HFIP를 증발시켰다. 10 mM 나트륨 아세테이트 pH 5로 펩타이드를 1 mg/ml의 농도로 희석하였다.

[0259] 사용된 CM5 칩은 카복실화된 텍스트란 매트릭스를 갖는다. 펩타이드 $A\beta$ (pE11-30)의 커플링을 위해서 아민 커플링 방법이 사용되었다. 이것은 펩타이드 커플링 전에 센서 칩 표면을 활성화시키는 것을 필요로 하였다. 따라서, 활성화 시약 0.4 M 1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필)-카보디이미드 (EDC) 및 0.1 M N-하이드록시석신이미드 (NHS)를 1:1의 비율로 혼합시키고, CM5 칩에서 8 분 동안 10 μ l/분으로 주입하였다. 그 후, 펩타이드의 커플링을 수행하였다. 처음으로, 10 mM 칼륨 디하이드로젠 오르토포스페이트 pH 6 중의 10 μ g/ml 펩타이드 $A\beta$ (pE11-30)을 5 분 동안 10 μ l/분의 유속으로 주입하였다. 낮은 시그널 발생으로 인하여, pH 5의 용액에 희석된 더 고농도의 펩타이드를 다시 적용하였다. 10 mM 나트륨 아세테이트 pH 5 중의 50 μ g/ml 펩타이드 $A\beta$ (pE11-30)을 20 분 동안 10 μ l/분의 유속으로 주입하였다. 커플링을 위해서 약산 pH를 선택하여 정전기적 인력에 의해 센서 표면 (카복실 그룹 음성 순전하)에서 펩타이드 (양성 순전하)의 전-농축을 제공하였다. 펩타이드의 공유결합은 칩 표면에서 2 개의 아미노산 리신 (펩타이드 위치 16 및 28에서)과 활성화된 카복실 그룹의 반응에 의해서 형성되었다. 과다한 반응성 에스테르 그룹을 10 μ l/분의 유속의 1 M 에탄올아민 pH 8.5로 10 분 동안 불활성화시켰다. 비-고정화된 펩타이드를 0.1 M HCl (3 x 10 μ l)의 주입에 의해서 제거하고, 이어서 칩을 밤새 주행 완충액으로 세정하였다. 마지막으로, 시그널은 약 1000 반응 단위 (Response Units; RU)였으며, 이에 의해서 칩 표면은 펩타이드로 포화되었다. 따라서, 코팅된 칩이 세포 배양 상등액 외부의 항 $A\beta$ 11(pE)의 항체 함량의 결정을 위해서 사용되었다.

[0260] 1.3.3.2. 항 $A\beta$ 11(pE) 항체의 정량화

[0261] 항 $A\beta$ 11(pE) 항체 농도의 측정을 위해서, $A\beta$ (pE11-30)으로 코팅된 CM5 칩이 사용되었다. 칩 표면은 펩타이드로 포화되었으며, 시그널은 약 1000 반응 단위 (RU)였다 (1.3.3.1항 참조). 세포 배양 상등액에 함유된 mAb를 항체 분석을 위해서 주행 완충액 (HEPES EDTA 완충액 (HBS-EP), Biacore)에 적절하게 희석하였다. 처음으로, 센서 칩의 유동 세포를 주행 완충액으로 세정하였다. 그 후에, 항 $A\beta$ 11(pE)를 갖는 항체 용액을 300 s에 걸쳐 30 μ l/분의 유속으로 주입하여 항원에서의 항체의 결합을 특정화하였다. 비변형된 유동 세포가 매트릭스와 항체의

비특이적 상호작용만을 나타내야 하는 기준으로 사용되었다. 그 후에, 주행 완충액을 스위치-오버 밸브 (switch-over valve)에 의해 다시 자동으로 주입하여 항체의 해리를 유도하였다. 마지막으로, 칩은 0.1 M HCl (10 μ l)의 주입에 의해서 재생시켰으며, 이에 의해서 나머지 항체를 센서 표면으로부터 제거하였다. 결합의 평가는 프로그램 BIAevaluation (Biacore, Freiburg)에 의해서 수행되었다.

[0262] 세포 배양 상등액의 샘플 내의 항체 농도의 정량화를 위해서, 하이브리도마 클론 13으로부터의 정제 및 투석된 mAb의 UV/VIS 분광법에 의해서 결정된 공지의 농도를 갖는 표준 곡선을 측정하였다. mAb는 1.2.1항에 기술된 바와 같이 정제하였다. 최고의 표준 농도를 위해서는, 10 μ g/ml mAb를 적용하고, 기수 2 제산 (radix two division)을 수행함으로써 주행 완충액 중에서 0.04 μ g/ml의 최저 농도로 하향 희석하였다.

[0263] 1.3.3.3. SPR에 의한 교차 반응성의 결정

[0264] 피로글루타메이트-펩타이드 A β 3(pE), A β 11(pE), CCL2 (MCP-1로 공지됨), CCL8 (MCP-2로 공지됨), 빅 (big) 가스트린, 고나도리베린, 뉴로텐신, 오렉신 A, 피브로넥틴, 콜라겐 1 및 TRH (티로트로핀-방출 호르몬)에 대한 항 A β 11(pE) 항체 (클론 13)의 교차 반응성을 SPR에 의해서 시험하였다. 따라서, 고농도의 고정화된 피로글루타메이트 펩타이드를 갖는 CM5 칩을 사용하였다. 항체 클론 13을 주행 완충액으로 희석하고, 300 s에 걸쳐 30 μ l/분의 유속으로 1 μ g/ml로 주입하였다.

[0265] 1.3.4. 등온 적정 열량측정법 (Isothermal Titration Calorimetry; ITC)

[0266] 1.3.4.1. 열역학적 파라미터의 결정

[0267] ITC에 의해서, 항원 A β 11(pE)에서의 클론 13으로부터의 항 A β 11(pE) 항체의 결합의 열역학적 파라미터를 결정하였다. ITC 실험을 위해서는 펩타이드 A β (pE11-18)-PEG가 사용되었는데, 이는 친수성 PEG 그룹이 친수 특성을 부여하며, 따라서 펩타이드를 ITC 완충액에 직접 용해시킬 수 있었기 때문이다. A β (pE11-20)을 사용한 이전의 실험은, 펩타이드의 강력한 소수성으로 인하여 이것을 ITC 결합 특성에 영향을 미칠 수 있는 DMSO에 의해서 용해시키는 것이 필요하였기 때문에 단지 1-2% DMSO를 사용하여 수행될 수 있었다. 처음으로, 항체를 4℃에서 밤새 ITC 완충액 (150 mM NaCl, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH=7.1)에 대해서 투석하였다. -20℃에서 저장된 동결건조 펩타이드를 항체 투석을 위해서 사용된 것과 동일한 ITC 완충액 pH= 7.1에 용해시켰다. 항체 및 항원 둘 다 동일한 용액으로 존재하여야 하며, 그렇지 않으면 대량의 희석열이 원하는 관찰조건을 차폐할 것이다. ITC 실험 전에, 항체의 농도를 UV/VIS 분광법에 의해서 결정하였다 (1.3.1항 참조). 처음으로, 예를 들어, 5.13 μ M의 항체 (표 4 참조)를 샘플 셀에 첨가하고, 기준 셀을 증류수로 충전시켰다. 그 후, 항원을 샘플 셀에 예를 들어, 81.78 μ M로 주입하였다 (표 4 참조). 항체가 2 개의 결합 부위를 가지며, 항원은 셀 내에서 항체에 대해 적어도 4 배 과량이어야 한다는 것을 유념하여, 항원은 일반적으로 항체에 대해 2배 과량이어야 한다. 30 회의 주입 (1 x 2 μ l 및 29 x 10 μ l)은 후속 주입과 4-분 간격으로 이루어졌다. 반응열의 측정은 20℃에서 수행되었다. 뿐만 아니라, 단지 ITC 완충액 (pH= 7.1) 내로의 적정을 통한 항원의 희석에 의해서만 생성된 반응열을 결정하였다. 따라서, 항원을 ITC 완충액으로 충전된 샘플 셀 내로 주입하였다. 항체에 대한 항원의 적정 중에 생성된 반응열은 이 값에 관해서 보정되었다. 원 데이터의 분석 및 회합상수 (K_A), 반응 화학량론 (n), 결합 엔탈피 (ΔH) 및 엔트로피 (ΔS)의 결정은 MicroCal의 Origin Software에 의해 수행되었다.

[0268] ITC에 의해서, 0.1 M 글리신-HCl (pH 2.7)을 갖는 KSCN-구배 (pH 7.0)에 의해 단백질 G 칼럼으로부터 용출된 항 A β 11(pE) 항체 및 또한 비오틴화 항체의 결합 파라미터를 분석하였다. 표 4에는 사용된 항원 및 항체를 열거하였다.

[0269] 표 4. ITC에서 A β (pE11-18)-PEG 펩타이드 및 항 A β 11(pE) 항체의 농도

[0270] 각각 단백질 G 칼럼으로부터 KSCN-구배 (pH 7.0) 및 0.1 M 글리신-HCl (pH 2.7)에 의해서 용출된 항체, 및 비오틴화 항 A β 11(pE) 항체의 사용된 농도 (A β (pE11-18)-PEG 펩타이드와 3 가지 항체의 상호작용을 ITC에서 분석하였다.

	ITC에서의 농도 (μM)		
	1차 ITC 실험	2차 ITC 실험	3차 ITC 실험
항 A β 11(pE) 항체	5.13 (KSCN 용출)	686.31 (글리신-HCl 용출)	101.8 (비오틴닐화)
A β (pE11-18)-PEG 캡타이드	81.78	32.85	5.12

[0271]

[0272] 항체가 산성 용출에 의해 부분적으로 불활성화되었다는 추정으로 인하여, 글리신-용출된 항 A β 11(pE) 항체는 KSCN 용출된 항체보다 더 고농도로 적용되었다.

[0273]

1.4. 모노클로날 항 A β 11(pE) 항체의 적용

[0274]

1.4.1. PBD-0316 연구

[0275]

AD 환자 (n = 13) 및 30 명의 건강한 대조군으로부터의 혈장 및 혈청 샘플을 본 연구에서 분석하였다. 43개의 분석된 샘플은 초기 연구로부터 유래하였으며, CRO (GALMED GmbH)를 통해서 동원되었다. 샘플은 AD로 임상적으로 진단된 환자로부터, 및 대조군으로부터 유래하였다. 연구-전 검사에서, 연구의 모든 참여자들의 신경심리학적 기능은 몇 가지 심리시험 (DemTect, 미니-정신-상태 (Mini-Mental-State) 시험, 시계-드로잉 (Clock-drawing) 시험)에 의해서 시험하였다. DemTect 스케일은 5개의 짧은 하위검사 (10-어휘 목록 반복, 수 트랜스코딩 (transcoding), 의미적 어휘 능변 작업 (semantic word fluency task), 중심 실행 기능 (backward digit span), 지연된 어휘 목록 리콜 (delayed word list recall))를 포함하는 치매에 대한 간단한 스크리닝 검사이다 [Kessler et al., 2000, Psycho 26 343-347]. 미니-정신-상태 검사 (MMSE) 또는 폴스타인 (Folstein) 시험은 인식을 평가하기 위해서 사용된 간단한 30-점 설문지 시험이다. 이것은 통상적으로 치매에 대한 스크리닝을 위한 의약에서 사용된다. 약 10 분의 기간에서, 이것은 산수, 기억 및 배향을 포함하는 다양한 기능의 샘플이 된다. 이 시험은 다수의 영역에서의 간단한 질문 및 문제를 포함한다: 시험 시간 및 장소, 어휘의 반복 목록, 산수, 언어 사용 및 이해, 및 기본 운동 능력.

[0276]

시계의 스코어링 (시계-드로잉 시험)은 문헌 [Shulmann et al., 1986]에서 사용된 스케일의 변형을 기초로 하였다. 모든 원은 미리 작도되었으며, 대상체에 대한 지시는 "시간 11 다음에 10을 설정하라"는 것이었다.

[0277]

연구-전 검사 후에, 연구는 시점 0으로 정의되는 모든 참여자들로부터의 혈액 채혈에 의해서 2 주일 후에 시작하였다. AD 바이오마커의 결정을 위한 모든 혈액 샘플은 EDTA 혈장에 대해 칼륨-EDTA 및 혈청에 대해 블랭크 (blank)를 함유하는 폴리프로필렌 튜브 (Sarstedt Monovette) 내로 수집한다. 모든 샘플은 정맥 천자에 의해서, 또는 삽입된 전완 정맥 유치 카놀라 밖으로의 반복된 배출에 의해서 수거하고, 4°C에서 10 분 동안 1550 g (3000 rpm)으로 원심분리하여 혈장을 제공하였다. 샘플은 혈액 배출 후 1 시간 이내에 원심분리하였다. 각각의 별개의 샘플의 혈장 또는 혈청을 피펫으로 빼내어 하나의 5 ml 폴리프로필렌 크리오-튜브 내에 충전시키고, -80 °C에서 동결 저장하였다. 3, 6 및 12 개월 후에 혈액을 다시 모든 참여자들로부터 배출시켜 상술한 바와 같이 취급하였다.

[0278]

1.4.2. 자가-Ig ELISA

[0279]

1.4.2.1. 자가-Ig-ELISA의 실행 및 설정

[0280]

자가-Ig-ELISA는 알츠하이머병 (AD) 환자 및 건강한 대조군으로부터의 혈장 샘플 내의 자가-면역글로불린의 분석을 위해서 실행 및 설정하였다. 특히, A β 캡타이드 및 Bri2 캡타이드의 pE-N-말단에 대한 자가-면역글로불린을 시험하여야 한다. 자가-Ig-ELISA는 직접 샌드위치-ELISA의 원리에 따라 구성한다. 따라서, 스트렙타비딘 코팅된 마이크로플레이트 (Thermo Scientific)가 C-말단에서 비오틴닐화된 캡타이드 A β (pE3-12), A β (pE11-20) 및 Bri2(1-23)의 고정화를 위해서 사용되었다. 우선, 스트렙타비딘 플레이트를 300 μl 의 세척 완충액 (25 mM 트리스, 150 mM NaCl, 0.05% 트윈, 0.1% BSA)으로 3 회 세척하여 플레이트를 깨끗하게 하고, 보존제를 제거하였다. 그 후에, 200 ng/ml의 캡타이드 용액 100 μl 를 첨가하고, 실온 (RT)에서 2 시간 동안 배양하였다. 마이크로플레이트 (MTP)를 커버 시트로 차폐하여 배양시간 중의 증발을 방지하였다. MTP를 트윈 20이 없는 200 μl /웰 ELISA-차단제 (ELISA-차단제 (-T))로 차단하고, RT에서 1 시간 동안 배양하였다. 그 후에, 비결합 캡타이드는 300 μl 세척 완충액으로 3 회 세척함으로써 제거하였다. EDTA-혈장 샘플을 ELISA-차단제 + 트윈 20 (ELISA-차단제 (+T)) 중에서 적절하게 희석하였다. 검정곡선을 위해서, mAb는 기수 2 제산을 수행함으로써 ELISA-차단제 (+T) 또는 세척 완충액에 희석시켰다. 희석된 표준 및 EDTA-혈장 샘플을 웰당 100 μl 로 MTP에 전

이시켰다. 결정의 양에 따라 샘플 및 칼리브레이터 (calibrators)를 몇 개의 웰 내로 피펫팅하였다. 4℃에서 2 시간의 배양시간 후에, 새로운 세척 사이클을 수행하였다 (300 μ l/웰의 세척 완충액으로 3 회). 호스 래디쉬 퍼 옥시다제 (HRP)와 컨주게이트된 폴리클로날 토끼 항-마우스 Ig가 칼리브레이터의 검출을 위해서 사용되었다. HRP와 컨주게이트된 폴리클로날 항-인간 Ig's, IgG, IgG2, IgG3, IgM 또는 IgA가 EDTA-혈장 밖의 자가-면역글로불린의 검출을 위한 효소-컨주게이트 용액으로 사용되었다. 효소 컨주게이트 용액을 ELISA-차단제 (+T)에 의해서 1 μ g/ml의 농도로 희석하였다. 각각의 웰에 100 μ l의 효소-컨주게이트 용액을 피펫팅하고, 4℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 세척 사이클 (300 μ l/웰의 세척 완충액으로 3 회)을 수행하였다. 퍼옥시다제 기질 용액인 테트라메틸벤지딘 (TMB, 색원체) 및 과산화수소 (기질)를 함유하는 슈어 블루 (Sure Blue; company KLP)를 100 μ l/웰로 첨가하였다. HRP는 2 개의 과산화수소 분자의 물 및 산소로의 분해를 촉진시킴으로써 색원체 TMB의 아미노 그룹으로부터 2 개의 전자를 기질에서 전이시킨다. TMB로부터의 전자의 방출 (산화)은 다이머화를 통해서 안정화되며 전형적인 청색 색상을 나타내는 래디칼 양이온을 유도한다. 따라서 색원체의 색상은 전자 전이를 통해서 무색으로부터 청색으로 변화된다. 용액의 색상 강도는 분석물질 농도에 비례한다. RT에서 30 분의 배양 후에, 효소 반응은 1 M H₂SO₄ 용액으로 퍼옥시다제를 불활성화시킴으로써 중지시키고, TMB의 다이머화를 폐지시킨다. 불균형화 후에, 강력한 황색 착색된 2가 양이온이 형성되었다. 흡수는 540 nm에서의 흡광도에 의해서 보정된 450 nm의 파장에서 측정되었다. 450 nm 및 540 nm에서의 흡수는 테칸 선라이즈 플레이트 판독기 (TECAN Sunrise plate reader)에 의해서 측정하였다.

[0281] 항 A β 3(pE), 항 A β 11(pE) 및 항 Bri2(1-23) ELISA는 기술된 프로토콜에 따라 완전하게 설정되었다 (표 5 참조). ELISA의 설정을 위해서, 제조자 (Thermo Fisher Scientific)의 표준 프로토콜이 모델로 사용되었다. 고정화된 항원의 농도, 검출 항체 및 배양 시간 및 온도뿐만 아니라 세척 사이클과 같은 다양한 파라미터의 최적화 후에, 다음의 프로토콜이 작성되었다.

[0282] 표 5.자가-Ig-ELISA의 실행

자가-Ig-ELISA	항 A β 3(pE)	항 A β 11(pE)	항 Bri2(1-23)
마이크로플레이트	맥시소프 (Maxisorp) 스트랩타비딘		
세척 사이클	3 x 300 μ l/웰 세척 완충액		
고정화된 항원	A β (pE3-12) 비오틴 200 ng/ml, 100 μ l	A β (pE11-20) 비오틴 200 ng/ml, 100 μ l	Bri2(1-23) 비오틴 200 ng/ml, 100 μ l
	세척 완충액에 희석됨		
배양	2 시간, RT		
차단	200 μ l ELISA-차단제 (-T)		
배양	1 시간, RT		
세척 사이클	3 x 300 μ l/웰 세척 완충액		
분석물질	인간 항 A β 3(pE), 100 μ l	인간 항 A β 11(pE), 100 μ l	인간 항 Bri2, 100 μ l
표준	mAb 마우스 항 A β 3(pE) (클론 6), 100 μ l	mAb 마우스 항 A β 11(pE) (클론 13), 100 μ l	mAb 이용할 수 없음
희석 분석물질, 표준	ELISA-차단제 (+T)		
배양	2 시간, 4℃		
세척 사이클	3 x 300 μ l/웰 세척 완충액		
검출	표준을 위한 폴리클로날 토끼 항-마우스 Ig's (HRP), 100 μ l 혈장 샘플을 위한 폴리클로날 항-인간 Ig's, IgG, IgG2, IgG3, IgM 또는 IgA (HRP), 100 μ l		
배양	1 시간, 4℃		
세척 사이클	3 x 300 μ l/웰 세척 완충액		
기질/색원체	H ₂ O ₂ /TMB (슈어 블루), 100 μ l, 암소에서 RT로 30 분		
정지 용액	1 M H ₂ SO ₄ , 100 μ l		
테칸 선라이즈에서 450/540 nm로 OD의 측정.			

[0283]

[0284] 자가-Ig-ELISA의 설정 후에, AD 환자 및 건강한 대조군으로부터의 혈장 샘플을 시험하였다. 따라서, AD 환자로부터의 13개의 혈장 샘플 및 30 명의 건강한 대조군을 분석하였다. 혈장 샘플은 AD/MCI의 임상적 진단을 갖는 환자 및 건강한 대조군으로부터 유래하였다. 43개의 혈장 샘플은 GalMed Medical Research Company와 협력하여 수행된 연구 PBD-0316으로부터 유래한다. 6 개월 후에 수거된 혈장 샘플 (T0+6)이 사용되었다. 혈장 샘플에 프로테아제 억제제 및 EDTA를 첨가하여 단백질 분해를 방지하고, 샘플을 보존하였다. 따라서, 1 ml 혈장에 25 μ l의 프로테아제 억제제 용액을 첨가하였다. 프로테아제 억제제 용액의 경우에는, 프로테아제 억제제의 정제인 컵

플리트 미니 (Complete Mini)를 1 ml PBS에 용해시켰다. 그 후에, 샘플을 분취하여 -80℃에서 저장하여 분석된 샘플의 일정한 품질을 보장하였다.

[0285] 1.4.3. Aβ (pE11-x) ELISA의 설정

[0286] Aβ (pE11-x) ELISA는 예를 들어, 마우스 모델의 대뇌에서의 Aβ (pE11-x) 펩타이드의 분석을 위해서 설정되어야 한다. 혈장 또는 CSF에서 pyroGlu Aβ 펩타이드의 검출은 혈액-뇌-장벽을 통한 올리고머의 통과가 손상되는 높은 응집 경향으로 인하여 불가능하였다.

[0287] Aβ 11(pE) ELISA는 샌드위치 ELISA의 원리에 따라 구성되었으며, 모델로는 Aβ 3(pE) ELISA의 고전적인 프로토콜이 적용되었다. 상업적으로 이용할 수 있는 모노클로날 마우스 항 Aβ (17-24) 항체 (클론 4G8, Covance)가 마이크로플레이트의 표면에 흡착된 포획 항체 (capture antibody)로 사용되었다. 포획된 Aβ (pE11-x)에 결합된 모노클로날 비오틴화 항 Aβ 11(pE) 항체를 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP) 컨주게이트의 첨가에 의해서 검출하였다. 설정은 합성된 Aβ (pE11-30) 및 Aβ (pE11-40) 펩타이드를 사용하여 수행되었다. -80℃에서 핵사플루오로이소프로판올 (HFIP) 내에 저장된 Aβ 펩타이드를 실온에서 해동시켰다. 펩타이드를 함유하는 튜브를 흡 후드 아래에 개방된 채로 두어 용매 HFIP를 증발시켰다. 펩타이드를 100 mM NaOH에 용해시키고, RT에서 10 분 동안 배양하고, 0.05% 트윈 및 1% BSA를 함유하는 EIA-완충액에 희석시켰다. Aβ (pE11-x) ELISA를 표 6에 기술된 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0288] 표 6. 샌드위치 Aβ (pE11-x) ELISA의 실행

	샌드위치 Aβ (pE11-x) ELISA
마이크로플레이트	맥시썬
포획 항체	마우스 항 Aβ (17-24) 클론 4G8, D-PBS pH 7.4 중의 2 μg/ml 100 μl/웰
배양	밤새, 4℃
차단	ELISA-차단제 (-T), 200 μl/웰
배양	2 시간, RT
세척 사이클	6 x 300 μl/웰 무-단백질 차단용액 (TBS) + 0.05% 트윈 20 (PIERCE) TBS-T
분석물질 제조	용매 HFIP를 증발시킨다. 펩타이드를 100 mM NaOH에 용해시키고 (RT에서 10 분 배양), EIA-완충액에 희석시킨다.
분석물질	Aβ (pE11-30) 또는 Aβ (pE11-40) 농도 범위 800 pg/ml 내지 12.5 pg/ml, 100 μl/웰
배양	2 시간, RT
세척 사이클	6 x 300 μl/웰 TBS-T
전-배양 mAb 및 SA-HRP	검출 항체를 SA-HRP 컨주게이트와 혼합시키고, RT에서 10 분 동안 배양하고, ELISA-차단제 (+T)로 최종 농도로 희석시킨다.
검출	1 μg/ml mAb 마우스 항 Aβ 11(pE)-비오틴, 2 μg/ml SA-HRP, 100 μl/웰
배양	1 시간, 4℃
세척 사이클	6 x 300 μl/웰 TBS-T
기질/색원체	H ₂ O ₂ /TMB (슈어 블루), 100 μl, 암소에서 RT로 30 분
정지 용액	1 M H ₂ SO ₄ , 100 μl
테칸 선라이즈에서	450/540 nm로 OD의 측정.

[0289]

[0290] 샌드위치 ELISA 이외에도, 마이크로플레이트에서 흡착된 항원 Aβ (pE11-30)을 사용한 직접 ELISA를 수행하여 모노클로날 항 Aβ (17-24)-비오틴 항체 (클론 4G8) 및 모노클로날 항 Aβ 11(pE)-비오틴 항체 (클론 13)를 직접 시험하였다. 비오틴화 항체는 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP) 컨주게이트의 첨가에 의해서 검출하였다. 직접 ELISA의 설정된 프로토콜은 표 7에 나타내었다.

[0291] 표 7. 직접 Aβ (pE11-x) ELISA의 실행

	직접 Aβ (pE11-x) ELISA
마이크로플레이트	맥시썩
항원 제조	용매 HFIP를 밤새 증발시킨다. 펩타이드를 100 mM NaOH에 용해시키고 (RT에서 10 분 배양), MTP에서 직접 PBS에 희석시킨다.
항원	Aβ (pE11-30) 농도 범위 500; 250; 100 ng/ml 200 μl/웰
배양	밤새, 4℃
차단	ELISA-차단제 (-T), 250 μl/웰
배양	2 시간, RT
세척 사이클	6 x 300 μl/웰 무-단백질 차단용액 (TBS) + 0.05% 트윈 20 (PIERCE) TBS-T
배양	2 시간, RT
세척 사이클	6 x 300 μl/웰 TBS-T
전-배양 mAb 및 SA-HRP	검출 항체를 SA-HRP 컨주게이트와 혼합시키고, RT에서 10 분 동안 배양하고, ELISA-차단제 (+T)로 최종 농도로 희석시킨다.
검출	1 μg/ml mAb 마우스 항 Aβ 11(pE)-비오틴, 2 μg/ml SA-HRP, 100 μl/웰
배양	1 시간, 4℃
세척 사이클	6 x 300 μl/웰 TBS-T
기질/색원체	H ₂ O ₂ /TMB (슈어 블루), 100 μl, 암소에서 RT로 30 분
정지 용액	1 M H ₂ SO ₄ , 100 μl
테칸 선라이즈에서	450/540 nm로 OD의 측정.

[0292]

[0293]

1.4.4. 면역조직화학

[0294]

면역조직화학 (IHC) 영상은 보스턴에 있는 Harvard Medical School의 Qiaoqiao Shi (lab of C. Lemere)로부터 친절하게 제공되었다.

[0295]

IHC에 의해서 항원 Aβ (pE11-x) 및 Aβ (pE3-x)를 뇌조직 절편에 국소화시켰다. 따라서, 항 Aβ 11(pE) 항체 (클론 13)를 pyroGlu Aβ 펩타이드의 검출에 사용하였다.

[0296]

IHC를 위해서는, AD 환자로부터의 해마 및 전두 피질의 인간 뇌조직 절편, 및 또한 APP/PS1 유전자이식 마우스로부터의 해마의 뇌조직 절편을 사용하였다. APP/PS1 마우스는 현재 아밀로이드 침착의 기전에 대한 연구를 위해 몇 개의 실험실에 의해 사용된다. 마우스 모델은 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)의 샌드위치 돌연변이를 발현하며, 증가된 뇌 Aβ 수준에 이어서 신경염성 플라크의 발생을 나타낸다. 돌연변이체 프레세닐린 (presenilin) 1 (PS1)의 공동 발현은 Aβ (1-42) 생성을 증가시킨다. 조직 절편을 파라핀-매립시키고, 연속적으로 절단하였다. 절편들을 헤마톡실린으로 염색하여 세포의 핵을 착색시킨 다음에, 항 Aβ 11(pE) 항체로 면역염색하였다. 조직 절편 제조 및 염색은 표준 방법에 따라 수행하였다.

[0297]

1.5. 항체 가변 부분의 서열결정

[0298]

하이브리도마 세포의 배양:

[0299]

하이브리도마 세포를 37℃ 및 5% CO₂ 하에, 15% FBS, 1% MEM-NEA (비-필수 아미노산, Gibco), 50 μg/ml 겐타마이신 (Gibco) 및 50 μM β-머캅토에탄올을 첨가한 D-MEM (+ L-글루타민, + Na-피루베이트, 4,5 g/l 글루코즈, Gibco) 중에서 성장시켰다. 계대배양은 세포 밀도에 따라 3-4일 후에 일어났다. 세포를 0.5 x 10⁶ 세포/ml의 농도로 접종하였으며, 분열은 2-5 x 10⁶ 세포/ml의 세포 밀도에서 일어났다.

[0300]

cDNA 합성 및 역전사:

[0301]

전체 RNA를 뉴클레오스핀RNA 분리 키트 (NucleospinRNA Isolation Kit; Macherey-Nagel)의 매뉴얼에 따라 2 x 10⁶ 세포로부터 분리시켰다. 100 ng RNA를 올리고 (dT)₁₅ 프라이머 (Promega) 및 슈퍼스크립트 (SuperScript) III 역전사효소 (Invitrogen)를 사용함으로써 cDNA 합성에 적용하였다.

[0302]

중쇄 및 경쇄 가변 부분의 PCR-증폭:

[0303] 중쇄 가변 부분은 프라이머 MHV1 내지 MHV12와 함께 주형 MHCG1과 퓨전 고성능 (Phusion™ High-Fidelity) DNA 폴리머라제 (NEW ENGLAND BioLabs)를 사용함으로써 주형 cDNA로부터 증폭시켰다. 경쇄 가변 부분의 증폭을 위해서는 프라이머 MKV1 내지 MKV11과의 프라이머 조합 MKC가 사용되었다 (표 8 참조).

[0304] pJET1.2에서 PCR 생성물의 클로닝:

[0305] PCR에 의해서 증폭된 중쇄 및 경쇄 가변 부분을 클론제트 (CloneJET™) PCR 클로닝 키트 (Fermentas)의 프로토콜에 따라 pJET1.2/blunt 벡터 내로 클로닝하였다. 서열결정은 pJET1.2 서열결정 프라이머를 사용함으로써 수행되었다.

[0306] 표 8. 중쇄 및 경쇄 가변 부분의 PCR-증폭을 위한 프라이머 서열

명칭	서열	서열번호
MKV1	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	26
MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG	27
MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGSGTTC	28
MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTTGTGGMWTCCTG	29
MKV5	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC	30
MKV6	ATGAGGTKCYTGYTSAGYTYCTGRGG	31
MKV7	ATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWGG	32
MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTTTCMMTTTTTCAATTG	33
MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	34
MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	35
MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	36
MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	37
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC	38
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	39
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTTT	40
MHV4	ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRTT	41
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT	42
MHV6	ATGGCTTGTCYTRGSGCTRCTTCTGTC	43
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT	44
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTC	45
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG	46
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCTG	47
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	48
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG	49
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	50

[0307]

[0308] 2. 결과

[0309] 2.1. 항체 스크리닝

[0310] 세포 융합 및 하이브리도마 세포와 HAT 배지의 선택 후에, 하이브리도마 세포 (몇 개의 상이한 단일 세포로부터 유래)를 스크리닝하여 표적 항원 Aβ11(pE)에 대한 특이적 mAb를 분리하는 세포를 확인하였다. mAb를 다양한 변형된 Aβ 펩타이드에서 결합하는 그들의 능력에 관하여 검사하였다. 따라서, 다른 변형된 Aβ 펩타이드와 mAb의 가능한 교차-반응을 결정하였다. 하이드록시-셀룰로즈-막에 스포팅된 상이한 서열을 갖는 Aβ 펩타이드를 도 1에 나타내었다. 스크리닝은 16 개의 상이한 Aβ 펩타이드에 대해서 시험한 26 개의 하이브리도마 세포 상등액을 사용하여 수행되었다.

[0311] 도 1은 막 위에 예시된 16 개의 펩타이드가 스포팅된 26 개의 막 (P1-P53으로 표지됨)을 나타낸다. 스크리닝 분

석은, 프레임이 있는 막 (P7, P10, P11, P12, P13, P15, P22, P24, P27)의 하이브리도마 세포로부터의 mAb가 표적 에피토프 Aβ 11(pE)를 갖는 N-말단 변형된 Aβ (pE11-23) (pEVHHQKLVFFAED) 펩타이드 (서열번호 19)에 대한 중간 내지 강력한 시그널을 나타냄을 시사한다. 또한, 이들은 다른 변형된 Aβ-펩타이드와의 상당한 교차-반응을 나타내지 않았다. 프레임이 있는 막 상에서 시험한 mAb는 또한, 위치 11에서 비-폐환된 N-말단 글루타메이트에 결합하지 않았으며 (스포츠 9 참조), N-말단에서 완전한 Aβ 서열 pEVHH가 없이는 스포트 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13에서 결합 시그널이 검출되지 않았다. 또한, 위치 3 (스포츠 6 참조)에서 N-말단 피로글루타메이트에서의 결합 시그널은 프레임이 있는 막에서 검출되지 않았다. 요약하면, 프레임이 있는 막 사진 상에서 시험한 하이브리도마 세포로부터의 mAb는 N-말단 Aβ 11(pE) 펩타이드에 대해 특이적이었고, Aβ (1-42) 펩타이드의 다른 서열과 상당한 교차-반응을 나타내지 않았다고 말할 수 있다. 이러한 이유로, 기술된 9 개의 하이브리도마 클론이 재클로닝을 위해서 선택되었다. 실선으로 도 1에서 표시된 5 개의 하이브리도마 클론이 재클로닝 후에 안정하였으며, 추가의 재클로닝을 위해서 선택되었다. 제한된 희석 기술을 사용하여, 선택된 하이브리도마 세포를 클로닝하여 한 개의 분리된 클론을 달성하였다. 본 작업에서, 클론 13으로 불리는 이들 5 개의 선택된 하이브리도마 클론 중의 하나를 배양하고 (이하의 2.2항 참조), 세포 배양 상등액 내의 항체 농도를 결정하였다.

[0312] 막 P4, P5, P16, P25에서 시험한 하이브리도마 세포는 재클로닝을 위해서 선택되지 않았으며, 이는 mAb가 표적 항원 Aβ 11(pE)에 대해서, 및 또한 다양한 Aβ 펩타이드에 대해서 약한 시그널을 나타내거나 시그널을 나타내지 않았기 때문이다. 또한, 막 P1, P17, P26, P29, P31, P32, P35, P36, P38, P42, P47, P49 및 P53의 하이브리도마 세포는 재클로닝을 위해서 선택되지 않았으며, 이는 mAb가 표적 항원 Aβ (pE11-14)에서뿐만 아니라 다른 스포팅된 Aβ 펩타이드에서도 강력한 시그널을 나타내고, 따라서 이들은 항원 Aβ (pE11-14)에 대한 선택성을 나타내지 않았기 때문이다.

[0313] 2.2. 하이브리도마 세포의 배양 및 세포 배양 배지의 최적화

[0314] 항 Aβ 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 사용하여 예비시험을 수행하였다. 시험 중에, Aβ 3(pE)에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포에 대한 최적 배양조건이 결정되었다. 15% FBS, 1% MEM-NEAA, 2 mM L-글루타민 및 50 μM β-머캅토에탄올이 보충된 배지 DMEM을 사용하여 배양된 하이브리도마 세포는 높은 증식뿐만 아니라 항체 생산을 갖는 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서는 선택된 하이브리도마 클론 (클론 13)을 최적화된 조건에 따라 배양하였다.

[0315] 하이브리도마 클론은 성공적으로 배양될 수 있었던 것으로 나타났다. 하이브리도마 세포를 해동시킨 후 4 내지 6 계대 이내에 세포 수는 12-배 또는 20-배 증가할 수 있었다. 세포는 부분적으로 현탁액 내에서 세포 응집체를 형성하였으며, 또한 부착성 세포가 관찰될 수 있었다. 생존 세포는 둥근 세포 형태를 나타내었으며, 비-생존 세포에 비해서 더 컸다. 세포는 마이코앨러트 (MycoAlert®) 마이코플라즈마 검출 키트에 의해서 마이코플라즈마 오염에 관해 규칙적으로 시험하였다. 모든 시험한 하이브리도마 세포는 마이코플라즈마가 존재하지 않았다. 하이브리도마 세포의 배양시간 중에, 세포 배양 상등액 내의 항 Aβ 11(pE) 항체의 농도는 SPR에 의해서 측정하였다 (2.2.1항 참조). 본 연구의 추가의 목적은 생산된 mAb의 정제를 단순화시키기 위한 혈청-함유 조건으로부터 무-혈청 조건으로의 하이브리도마 세포의 적응이었다. 이것은 단계적으로 수행되었다. 최적 무-혈청 배지는 10 일에 걸친 배지 적응 후에 성장곡선을 작성함으로써 확인되었다. 이에 의해서 세포 성장 및 항체 생산율이 배양 기간 중에 측정되었다.

[0316] 2.2.1. 세포 배양 상등액 내의 항체 농도의 결정

[0317] 세포 배양 상등액 밖의 항 Aβ 11(pE) 항체의 농도는 비아코어 (Biacore) 3000에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR)의 원리에 따라 결정하였다. 따라서, 펩타이드 Aβ (pE11-30)을 CM5 칩의 센서 표면에서 고정화시켰다 (방법 항 1.3.3.1 참조). 도 2에서, Aβ (pE11-30)의 고정화는 시간의 경과에 따른 실시간 플롯으로 나타낸다. 우선, 커플링을 10 μg/ml의 Aβ (pE11-30)을 사용하여 수행하였다. 시그널은 펩타이드 커플링 중에 상승하였다 (참조 도 2, A로 표시됨).

[0318] 낮은 시그널로 인하여 펩타이드는 50 μg/ml의 더 고농도로 다시 적용하였다 (참조 도 2, B로 표시됨). 요약하면, 고농도의 펩타이드를 칩 표면에서 고정화시켰다. 세포 배양 상등액으로부터의 항체 함량을 결정하기 위해서는, 고농도의 고정화된 펩타이드가 필요하였다. 이에 의해서, 낮은 항체 농도조차도 검출이 가능하며, 또한 표준 곡선의 선형 범위는 고정화된 펩타이드의 더 낮은 농도에 의한 것보다 더 높다. 칩의 과부하 (overload)는 결합 연구, 및 해리율 k_d 및 회합율 k_a 와 같은 결합율의 결정에 적합하지 않았다. 높은 항원 농도로 인하여, 틀린 결합율 및 인공적으로 낮은 오프율 (off rate)을 초래하는 항체의 다수의 결합 상호작용이 가

능하다 (친화력 (avidity)의 효과).

[0319] 배양된 하이브리도마 클론의 각각의 세포 계대로부터, 세포 배양 상등액을 비아코어 3000에서 항 Aβ 11(pE) 항체에 대해 시험하였다. 하이브리도마 클론 13의 결과는 도 3에 나타낸다. 클론 13은 항 Aβ 11(pE) 항체를 생산한 유일한 클론이었다. 하이브리도마 클론 13으로부터 항체의 높은 측정 시그널 (RU)의 곡선을 결정하였으며, 이것은 항 Aβ 11(pE) 항체가 고수율로 생산되었다는 결론을 초래한다. 클론 15, 22 및 24와는 대조적으로, 특성의 측정 (RU) 시그널이 전체 배양기간 중에 수득되지 않았다. 이러한 이유로, 단지 클론 13의 하이브리도마 세포만을 더 배양하고, 본 연구에서 모든 설명된 실험을 위해 사용하였다.

[0320] 세포 배양 상등액 내의 항체 농도의 정량화를 위해서, 클론 13으로부터의 정제된 항 Aβ 11(pE) 항체의 기지 농도를 갖는 표준 곡선 (1.2항 참조)을 측정하였다. 비아코어 3000에 의한 측정 시그널 (RU)은 항체 농도에 대비하여 플롯팅하였다. 표준 곡선은 도 4에 나타내었다.

[0321] 표준은 0.040 μg/ml 내지 1.25 μg/ml의 항체 농도 사이에서 선형 과정을 나타낸다 (도 5 참조). 1.25 μg/ml의 농도 이상에서, 곡선 기울기는 강하하였다. 높은 항체 농도에 기인하여, 항원에서의 항체의 결합 중에 입체 장애가 일어날 수 있다. 선형 회귀식 $y=3033.7x+50.099$ ($r^2=0.991$)이 세포 배양 상등액으로부터의 항체 농도의 계산을 위해서 사용되었다. 표준 곡선의 선형 범위 내에서 측정된 세포 배양 상등액의 추가의 측정된 샘플을 회석하였다.

[0322] 2.2.2. 무-혈청 조건에 대한 하이브리도마 세포의 적응

[0323] 세포 배양 상등액으로부터의 쥐 항 Aβ 11(pE) mAb의 단백질 G 친화성 정제를 단순화시키기 위해서 하이브리도마 세포 (클론 13)를 혈청-함유 배지 (SCM)로부터 무-혈청 (SFM) 및 무-단백질 배지로 적응시켰다. 단백질 G는 쥐 면역글로불린 G-분자에 특이적으로 높은 친화성을 가지고 결합한다. FBS 내에 함유된 소 IgG는 또한 단백질 G로부터 강력하게 결합되며, 원치 않는 교차-반응이 가능하다. 따라서, 소 IgG가 정제된 항체 용출 분획 내에 함유되는 것을 배제하기 위해, 하이브리도마 세포의 배양을 위해서는 무-혈청 배지 또는 무-단백질 배지가 사용되어야 한다.

[0324] 다양한 SFM (하이브리도마 익스프레스 (Hybridoma Express), 하이브리도마 익스프레스 플러스, 하이브리도마 SFM) 및 무-단백질 배지 (CD 하이브리도마 배지)에 대한 배지 적응은 T-플라스크 내에서 수행되었으며, 각각의 계대 후에 세포 수 및 항체 농도가 측정되었다. 표 9에는 배지 적응 후의 세포 성장 및 항체 생산을 나타내었다.

[0325] 표 9. SFM 및 무-단백질 배지에 대한 적응 후의 세포 성장 및 항체 생산

[0326] 하이브리도마 세포 (클론 13)는 순차적으로 T-플라스크 (37℃, 5% CO₂) 내에 적응시켰다. 적응과정 후에, 세포를 2 계대 배양하고, 세포 성장 및 항 Aβ 11(pE) 항체 생산의 결과 (SPR에 의함)를 결정하였다 (+... 세포 증식, -... 각각 세포 증식 및 항체 생산 없음).

배지	설명	세포 성장	항체 생산
하이브리도마 익스프레스	무-혈청	+	매우 낮음
하이브리도마 익스프레스 플러스	무-혈청	-	-
CD 하이브리도마 배지	무-단백질	+	-
하이브리도마 SFM	무-혈청	+	높음

[0327]

[0328] 표 9에서의 결과는 하이브리도마 SFM 내의 세포만이 증식하고, 또한 고수율로 항체를 생산하였음을 나타내었다. 따라서, 하이브리도마 SFM에 대한 세포의 적응만이 성공적이었다. SCM (DMEM, 15% FBS, 1% NEAA 및 DMEM, 15% 저 IgG FBS, 1% NEAA) 내에서 및 하이브리도마 SFM 내에서 배양된 세포의 비교를 위해서, 10일에 걸친 성장곡선이 결정되었다. 따라서, 세포를 진탕 플라스크 내에서 배양하고, 세포 배양 상등액 내에서 세포 수 및 항체 농도를 결정하기 위해서 샘플을 규칙적으로 수득하였다 (도 6 참조).

[0329] 결과는 하이브리도마 SFM 내에서 배양된 세포가 SCM 내의 세포에 비해서 상당한, 2 배 이상 더 큰 성장을 나타내었음을 증명하였다. 하이브리도마 SFM 내에서 세포의 지수기 (exponential phase)는 24 시간째에 시작하였으며, 그 반면에 SCM 내의 세포는 48 시간 후에 시작하였다. 따라서, 하이브리도마 SFM은 SCM에 비해서 하이브리

도마 세포의 더 짧은 유도기 (lag phase)를 가지고 더 빠른 지수기 성장을 개시하였다. 유사하게, SFM 및 SCM 내에서 배양된 세포는 72 시간 후에 최고 세포 수에 도달하였다. SFM 내에서 배양된 세포가 72 시간 및 144 시간 이내에, SCM-배양된 세포의 성장곡선에서는 관찰되지 않은 사망기 (dying phase)를 나타내었다는 것은 주목할 만하다. 세포 수의 측정 이외에, 항 Aβ11(pE) 항체 농도를 측정하였다. SFM에서 배양된 세포는 SCM 내의 세포보다 상당히 더 큰 항체 수율을 나타내었다. 일반적으로, 항체 농도는 지수기에서 세포 수가 증가함에 따라 증가하였지만, SCM에서 배양된 세포는 72 시간째에 정지기의 시작과 함께 항체 생산을 중지하였다. 그러나, SFM-배양된 세포의 항체 생산은 72 시간 후에 감소된 세포 수와는 무관하게 약간 증가한다.

[0330] 성장곡선의 분석을 위한 특성의 파라미터를 결정하기 위해서, 특이적 성장률 μ 및 생산율 q_p 를 계산하였다. 이 데이터는 성장 및 항체 생산을 더 잘 이해하기 위해서 제공되어야 한다. 도 7에서는, 특이적 성장률을 배양시간에 대비하여 플롯팅하였다.

[0331] 배양을 시작할 때에는 높은 특이적 성장률이 결정되었으며, 이것은 72 시간 전에 지수 성장기 후에 크게 감소하였다. 특이적 성장률 μ 는 96 시간 직전까지 양성이었으며, 이것은 세포가 성장하였음을 시사한다. 에너지원이 96 시간 후에 소비되었기 때문에 세포의 쇠퇴기 (decline phase)는 음의 성장률을 특징으로 하였다. 하이브리도마 SFM 내의 세포가 매우 높은 세포 농도로 인하여 72 시간 후에 성장률의 강력한 감소를 나타내었다는 것은 주목할 만하다.

[0332] 또한, 생존 세포 밀도의 정수 (integral of viable cell density; IVCD)로 불리는 배양 시간에 따른 생존 농도의 정수를 계산하였다. IVCD는 시간을 통합시킴으로써 얼마나 많은 세포가 배양 시간에 걸친 항체 생산에 기여하는지를 의미한다. 상기 정수는 도 6 (A)에 예시된 곡선으로부터 결정되었다. 배양 시간 5 h, 24 h, 48 h 및 72 h에서 측정된 생존 세포 수의 측정점은 지수 함수 $f(t) = a \cdot e^{ct}$ 에 의해서 적합하였으며, 이에 의해서 a 및 c는 상수이고, t는 시간이다. 그 후에, 지수 함수를 적분하였다. IVCD는 5 h, 24 h, 48 h 및 72 h에서 각각의 시점에 대해 계산하였다. 항체 생산율 q_p 의 결정을 위해서는, 항체 농도를 IVCD에 대해서 플롯팅하였으며 (도 8 참조), 이들 곡선의 기울기로부터 q_p 를 수득하였다 [Renard et al., Biotechnol. Lett. 1988, 10, 91-96; Ozturk et al., J. Biotechnol. 1990, 16, 259-278].

[0333] 도 8에는 5, 24, 48, 72 h에서의 데이터 포인트 (data point)만이 포함되었는데, 이는 항체 생산율이 쇠퇴기에서 강력하게 감소되었고, 직선은 쇠퇴기 및 지수기의 데이터 포인트를 연관시키지 않았기 때문이다. 특이적 항체 생산율은 지수기에서 정지기에서보다 상당히 더 높았다. 이들 데이터는, 항체 생산율이 본 연구에서 사용하는 하이브리도마 세포주에 관해 성장 의존적이었음을 시사한다. 그에 반해서, 오즈투르크 에스. (Ozturk S.)는 특이적 항체 생산율이 지수 성장기 및 쇠퇴기 둘 다에서 일정하였으며, 따라서 마우스 하이브리도마 세포의 항체 생산은 성장과 연관되지 않았다고 기술하였다 [Ozturk S. et al. supra].

[0334] 표 10에서는 수득된 특이적 항체 생산율을 나타낸다.

[0335] 표 10. 진탕 플라스크 내에서 SCM 및 SFM에 의해 배양된 하이브리도마 세포의 특이적 생산율 q_p

배지	항체 생산율 q_p (pg Ab/(세포 · h))
DMEM, 15% FBS, 1% NEAA	0.2717
DMEM, 15% 저 IgG FBS, 1% NEAA	0.2277
하이브리도마 SFM (무-혈청)	0.5121

[0336]

[0337] 하이브리도마 SFM에서 배양된 세포는 0.5121 pg/(세포 · h)의 최고 항체 생산율을 나타내었다. 따라서, 하이브리도마 SFM의 q_p 는 SFM 내에서의 2 배 더 큰 세포 증식으로 인하여, SCM 내에서 배양된 세포에 비해 대략 2 배 더 컸다.

[0338] SCM 내에서 배양된 하이브리도마 세포는 몇 계대를 계대배양하였으며, 계대 수 18로부터 항체 농도는 계속해서 감소하였다 (데이터는 나타내지 않음). 계대 수 27에서 세포의 항체 생산은 전체적으로 중지하였지만, 세포는 감소된 항체 생산과는 무관하게 정상적인 세포 성장을 나타내었으며, 이것은 또한 항 Aβ3(pE) 항체를 생산하는 하이브리도마 세포에 대해서도 인지되었다. 문헌에는 이미, 하이브리도마 세포가 종종 불안정하고, 항체 생산을 중지할 수 있다고 기술되었다. 하이브리도마 세포는 종종 항체-생산 및 비-생산 세포의 혼합물로 존재하는 것으로 결정되었다 [Heath et al., J Biotechnol. 1990, Vol. 15, S. 71-89]. 항체를 생산하지 않는 하이브리도마

세포는 증쇄 및 경쇄에 대한 서열에 관한 유전적 완전성 (genetical integrity)을 결여할 수 있다. 비-생산 세포는 생산 세포보다 더 큰 증식률을 나타내며, 일부의 계대 후에 하이브리도마 배양을 지배할 수 있었다 [Kromenaker et al., Biotechnol Prog 1994, Vol. 10, S. 299-307]. 이와는 대조적으로, 하이브리도마 SFM에서 배양된 세포는 계대 27을 넘어서서는 여전히 높은 항체 생산율을 나타내었다. 이것은 SFM에서 배양된 세포가 연속적인 세포 성장뿐만 아니라 세포 계대 수와는 무관하게 항체 생산을 나타내었음을 시사한다. 더 높은 계대 수까지 SFM 내에서의 세포의 배양은 한번 수행하였다. 명확한 설명을 위해서, 실험은 다시 반복하여야 한다.

[0339] 요약하면, 하이브리도마 SFM에서 배양된 세포는 최대 성장률로 탁월한 세포 성장을 나타내었으며, SCM에서 배양된 세포와 비교하여 전체 배양시간에 걸쳐 높은 특이적 생산율로 유의적인 최고의 항체 생산 수율을 나타낸다. 사용된 하이브리도마 세포는 SCM으로부터 하이브리도마 SFM으로의 단지 미세한 순차적 적응을 필요로 한다. 하이브리도마 SFM을 사용함으로써, 하이브리도마 배양의 비용은 저 IgG FBS를 갖는 DMEM의 대체 사용과 비교하여 18%만큼 감소될 수 있었다. 추가로, 세포 배양 상등액으로부터 mAb의 정제는 소 IgG 및 프로테아제와 같은 다른 혈청 성분을 함유하는 혈청의 부재로 인하여 단순화되었다.

[0340] 시험한 모든 배지의 성장곡선은 L-글루타민의 완전한 소비로 인하여 72 시간째에 지수 성장기 후에 강력한 감소를 나타내었다. 밀러 (Miller) 등은, 세포 성장의 제한 인자가 에너지원으로 주로 사용되고, 세포 성장 및 항체 생산을 용이하게 하는 L-글루타민이기 때문에 L-글루타민이 소비되면 최대 세포 수가 풍부해진다고 기술하였다 [Miller et al., 1989, Biotech Bioeng. Vol. 32, S. 947-965]. 이들 사실로 인하여, SCM 및 또한, SFM에는 2 mM L-글루타민을 보충하였다. 그러나, 세포 성장 및 항체 생산은 SCM에서보다 하이브리도마 SFM에서의 세포에 대해서 상당히 더 컸다.

[0341] 하이브리도마 SFM은 하이브리도마 세포 배양에 최적화된 매우 저-단백질의 배지 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이다. 배지는 L-글루타민, 미량 원소, 무기질, 및 소량 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 규정된 단백질 (인슐린 및 트랜스페린)을 함유한다. SFM 내의 어떤 물질이 높은 세포 증식 및 항체 수율에 결정적인지 여부는 검사하지 않았지만, 이하에서 추론될 수 있었다. 하이브리도마 세포의 항체 효율을 증가시키는 데는 몇 가지 가능성이 있다. 문헌에는, 지질 구성 및 원형질막의 유동성이 세포 기능에 영향을 미치기 때문에, 콜레스테롤, 인지질 및 지방산을 함유하는 지질 믹스의 첨가가 하이브리도마 세포의 항체 생산을 증진시켰다고 기술되어 있다 [Savonniere et al., Biotechnol. 1996 Jul 18; 48 (1-2): 161-73]. 또한, 성장 인자, 예를 들어, 표피 성장 인자 (EGF), 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 인터류킨-2 (IL-2), IL-6 (B-세포 자극 인자), 트랜스페린, 인슐린 및 에탄올아민은 항체 생산율을 증가시킬 수 있었다 [Murakami et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Feb; 79(4): 1158- 62; Dandulakis et al., Biotechnol Prog. 1995 Sep-Oct ; 11(5): 518-24].

[0342] 2.3. 항체 정제

[0343] 클론 13으로부터의 항체 항 A β 11(pE)는 ELISA 및 추가의 실험에 사용되도록 세포 배양 상등액 밖에서 균질하게 정제되어야 한다. 항체는 단백질 G 세파로즈 칼럼에 의해서 정제되었다 (1.2.1항 참조). 결합된 항체는 2 가지 상이한 방법에 따라 용출시켰다. 우선, 산성 0.1 M 글리신-HCl 용액 (pH 2.7)을 사용하였으며, 용출된 분획은 즉시 1 M 트리스-HCl, pH 9.0으로 적정함으로써 중화시켰다. 중화과정 중에, 항체는 산성 용출 중의 항체의 가능한 구조 변화로 인하여 강하게 침전하였다.

[0344] 이러한 이유로, pH 중성 용출방법은 칼륨 티오시아네이트의 구배를 사용하여 수행하였다. KSCN으로 인하여 항체와 단백질 G 사이의 상호작용은 완화되었다. 이 기술에 의해서 항체를 용출시켰으며, 항체의 침전은 일어나지 않았다. 도 9에서는 정제과정의 크로마토그램을 나타낸다.

[0345] 증가된 KSCN-구배에 의해서 항체가 용출되었다. 용출 피크는 한가지 항체 종에 의한 동종의 용출을 나타내는 가우시안 함수 (gaussian function)와 같이 거의 대칭적이었다. 용출은 단백질-단백질 상호작용을 폐지하는 무질서 이온 SCN⁻에 의해서 유도되었다. KSCN의 너무 높은 농도는 단백질을 변성시킬 수 있었으며, 따라서 항체 용출은 구배로 수행하고, 이어서 즉시 투석을 수행하였다.

[0346] 친화성 크로마토그래피 후에, SDS-PAGE를 수행하여 단백질 G 칼럼 정제의 다양한 분획 내의 항체의 함량을 검사하였다 (도 10 참조). 이에 의해서 항 A β 11(pE) 항체를 갖는 용출 분획의 순도를 결정할 수 있었다. 단백질 G 칼럼의 비정제된 세포 배양 상등액, 통과 (flow through) 분획, 세척 분획 및 용출 분획의 샘플을 분석하였다.

[0347] SDS-겔은 단백질 G 정제 중에 특이적 결합 항체가 비특이적 결합 단백질로부터 분리되었음을 나타낸다. 비정제된 세포 배양 상등액 (슬롯 1; 6) 및 통과 분획 (2; 7)에서는 약 66 kDa의 BSA-밴드 (소 혈청 알부민)가 명확하게 확인되었지만, 용출 분획 (슬롯 4; 9)은 BSA를 함유하지 않았다. 세척 사이클 중에, 작은 부분의 결합된 항

체는 칼럼 밖으로 세척되었다 (슬롯 3). 슬롯 4에서의 용출 분획은 특이적 결합 항체만이 용출되었음을 나타낸다. SDS-PAGE에서, 항체는 환원 조건을 기준으로 하여 약 50 kDa를 갖는 중쇄 및 약 25 kDa를 갖는 경쇄로 분리되었다 (슬롯 4 참조). 온전한 디설파이드-결합을 갖는 전체 항체를 나타내기 위해서, 용출 분획은 비-환원 조건 하에 적용하였다 (슬롯 9 참조). 항체는 약 150 kDa에서의 밴드에 의해서 확인되었다. 또한, 어떤 BSA도 칼럼 내에서 저지되지 않았으며, 따라서 용출 분획 내의 정제된 항체로부터 제거되지 않은 것으로 나타났다. 단백질 G는 마우스 IgG에 결합하지만, 또한 FBS 내에 함유되는 소 IgG에도 결합한다. 소 IgG에 의한 불순물을 감소시키기 위해서, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 IgG를 함유하는 초저 IgG-FBS (Invitrogen)가 사용되었다. 이 정제방법에 의해서 항체는 균질하도록 정제되었으며, 세포 배양 상등액 내에 함유된 모든 다른 단백질로부터 분리되었다. 투석 후에, 항체 농도는 UV-분광계 및 SPR에 의해서 결정되었다.

[0348] 단백질 G 세파로즈 칼럼에 의한 항 A β 11(pE) 항체의 정제 중에, 단백질 G 칼럼에 적용하기 전의 세포 배양 상등액, 통과 분획, 세척 분획 및 용출 분획으로부터 샘플을 채취하였다. 이것은 이어서 SPR에 의해서 측정하였다. SPR에 의한 항 A β 11(pE) 항체의 정량화를 위해서 도 10에 예시된 표준 곡선을 사용하였다. 정제하기 전에 약 14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체가 세포 배양 상등액 내에 함유되었으며, 이것은 1800 ml 상등액 내의 26.7 mg 항체의 총량에 해당하는 것으로 결정되었다. 통과 분획은 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체 (총 2.4 mg)를 함유하였으며, 세척 분획은 8.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (총 0.2 mg) 항체를 함유하였다. 용출 분획 내의 21 mg 항체에 달하는 1.07 mg/ml의 농도가 SPR에 의해서 결정되었다. 그 결과로, 친화성 크로마토그래피의 수율은 80%였다. 항체의 정제, 농축 및 투석 후에, UV-스펙트럼의 측정을 수행하였다 (도 11 참조).

[0349] UV-스펙트럼으로부터, 정제 후에 4.09 mg/ml의 항체 농도가 결정되었다. 따라서, 1800 ml 세포 배양 상등액 밖의 약 21 mg 항체가 정제되었다. 따라서, UV/VIS 방법에 의해서 결정된 항체 농도는 SPR의 결과와 일치하였다. 그 후, 항체를 멸균 여과하고, 분취하고, 추가의 분석을 위해 4°C에서 저장하였다.

[0350] 항체 정제의 제시된 결과는 높은 계대 (계대 17-22)의 세포로부터의 세포 배양 상등액에 의해서 수행되었으며, 이에 의해서 계대 18 이상에서 감소된 항체 생산율이 관찰되었다 (2.2.2항 참조). 그러나, 더 낮은 계대 수의 세포의 세포 배양 상등액 내의 항체 농도는 약 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 달하였다.

[0351] 결론적으로, 더 낮은 계대 수의 세포의 항체 생산 수율은 사용된 높은 세포 계대에 의한 것보다 약 42 mg으로 두 배 더 높을 것이다.

[0352] 2.3.1. 항 A β 11(pE) 항체의 비오티닐화

[0353] 항 A β 11(pE) 항체는 A β (pE11-x) ELISA에서의 검출 항체로 적용하기 위해 비오티닐화시켰다. 항체-비오티닌 용액을 투석하여 비-컨주게이트된 비오티닌을 제거하였다. 1.88 mg/ml 비오티닐화 항체 (MW 150,000)의 농도는 UV-스펙트럼에 의해서 결정되었으며, 이어서 비오티닐화 수준은 HABA 시험에 의해서 결정되었다.

[0354] 결과는 약 2 개의 비오티닌 분자가 하나의 항체에 커플링되었음을 나타내었다. 도 12에는 비오티닐화 전 및 후의 항체의 UV/VIS 스펙트럼을 나타낸다. 두 개의 스펙트럼은 곡선의 동일한 추이를 나타내었으며, 이것은 비오티닐화 과정 중에 응집이 일어나지 않았음을 시사한다. 따라서, 비오티닐화는 성공적이었으며, 항체는 검출 항체로서 스트렙타비딘-HRP 폴리머와 함께 사용될 수 있다.

[0355] 2.4. 항 A β 11(pE) 항체의 특정화

[0356] 2.4.1. 항체 가변 부분의 서열결정

[0357] 이하의 서열이 확인되었다:

[0358] 2.4.1.1. 클론 13-11-6 (클론 13)

[0359] Aβ 클론 13 가변 부분 경쇄 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 51)

atggagtcacataccaggttcttatattgctgctgctatgggtatctggtacctgtggggaca
ttgtgatgtcacagctctccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggctcactatgagctg
caaatccagtcagagctctgttctacagtagaaccgaaagaactacttggttggtaccaacag
aaaccagggcagctctcctaaattgctgatctactgggcatccactagggaatctggggctccctg
atcgcttcacaggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtggtgcaggctga
agacctggcagtttattactgcaagcaatcttacaatctgtggtcggttcggtggaggcaccaag
ctggaaatcaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagt

[0360]

[0361] Aβ 클론 13 가변 부분 경쇄 단백질 서열 (서열번호 52)

MESHTQVLILLLLWVSGTCGDIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFYSTRKKNYLAWYQQ
KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWSFGGGTK
LEIKRADAAPTVSIFPPSS

[0362]

[0363] Aβ 클론 13 가변 부분 중쇄 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 53)

atgggatggagctgtatcatgttctttttggtagcaacagctacagatgtccactcccagggtcc
aactgcagcagcctgggactgaactggtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcctgcaaggc
ttctggcttcaccttcaccagctactggatgcactgggtgagacagaggcctggacaaggcctt
gagtggtattggagagattaatcctagtaacggtcgtactaactataatgagaagttcaagagca
aggccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatc
tgaggactctgaggctctattactgtgcgagaggggatcttgcctgggactggtctgcttactgg
ggccaagggactctgggtcactgtctctgcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactg

[0364]

[0365] Aβ 클론 13 가변 부분 중쇄 단백질 서열 (서열번호 54)

MGWSCIMXFLVATATDVHSQVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGFTFTSYWMHWVRQRPQGGL
EWIGEINPSNGRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSEVYYCARGDLAWDWSAYW
GQGTLLVTVSAAKTTPPSVYPL

[0366]

[0367] 2.4.2. 이차 구조의 결정

[0368] 비오틴화 및 비-비오틴화 항 Aβ 11(pE) 항체의 이차 구조를 CD-분광법에 의해서 조사하였다. 비오틴화 과정에 기인한 이차 구조의 가능한 변화를 분석할 수 있었다. CD-측정은 10 mM 나트륨 포스페이트 pH 7.1에 용해된 130 μg/ml 항체 (비오틴화 및 비-비오틴화)를 사용하여 수행되었다. 도 13에는 20℃에서의 항체의 원(far)-UV-CD-스펙트럼을 나타낸다. 비오틴화 및 비-비오틴화 항체의 스펙트럼은 거의 동일하였으며, 두 개의 항체는 모두 β-시트 단백질에 대해서 전형적인 것으로 218 nm에서 최소 및 200 nm에서 최대를 나타내었다. 결과는 비오틴화가 이차 구조에 영향을 미치지 않았음을 나타내었다. 동일한 CD-스펙트럼은 동일한 이차 구조를 나타내며, 따라서 결합 특성에 영향을 미치지 않지만, 이것은 ITC에서, 또는 ELISA에서의 결합 특성을 포함하지는 않는다.

[0369] 2.4.3. Aβ 11(pE) 항체의 온도 천이

[0370] 원편광 이색성 (circular dichroism)을 사용하여 이차 구조가 환경적 조건에 따라 어떻게 변화하는지 관찰할 수 있다. 단백질 열안정성은 온도가 증가함에 따른 스펙트럼에서의 변화를 추적함으로써 CD를 사용하여 평가한다. 도 14 및 도 15에는 20℃에서 80℃까지의 온도에서 비오틴화 및 비-비오틴화 항 Aβ 11(pE) 항체의 스펙트럼을 나타낸다. 60℃의 온도부터 스펙트럼의 추이가 변화되었다. β-시트 단백질에 대한 전형적인 시그널로서 약 201 nm에서의 최대치는 60℃의 온도에서 감소하였으며, 80℃에서 최소가 되었다. 결과는 비-비오틴화 항체뿐만 아니라 비오틴화 항체도 60℃에서 변성하기 시작하였음을 나타내었다 ($T_m \approx 65^\circ\text{C}$). 따라서, 항체의 온도 안정성은 60℃까지 제공되었다. 결과는 IgG's의 정상 범위 내였으며, 다른 연구와 일치하였는데, 예를 들어, 예

스. 프레이 (S. Frey)는 63℃로 모노클로날 IgG의 융점을 결정하였다 [S. Frey et al., 2008, Biol. Chem., Vol. 389, pp. 37-45]. 두 가지 항체는 모두 20℃부터 60℃까지의 범위에서, 약 218 nm에서 최소 및 201 nm에서 최대를 갖는 동일한 CD-스펙트럼을 나타내었으며, 이것은 비오틴화가 단백질 안정성에 영향을 미치지 않았음을 시사한다.

[0371] 2.4.4. Aβ 11(pE) 항체의 결합 특성

[0372] Aβ (pE11-18)-PEG 펩타이드에서의 항 Aβ 11(pE) 항체의 결합을 특정화시키기 위해서 등온 적정 열량측정법 (ITC)의 방법이 사용되었다 (1.3.4항 참조). 단백질 G 칼럼으로부터 KSCN-구배 (pH 7.0) 및 0.1 M 글리신-HCl (pH 2.7)에 의해서 용출된 항체를 분석하였다. ITC에 의해서 반응 화학량론 (N), 회합 상수 (K_A), 결합 엔탈피 (ΔH)뿐만 아니라 엔트로피 (ΔS)가 결정되었다. 펩타이드를 1.3.4.2항에 기술된 바와 같이 ITC 마이크로칼로리미터 내에서 항 Aβ 11(pE) 항체에 대해서 적정하였다. 적정 곡선은 시간의 함수로서 초당 열을 나타낸다 (도 16 참조). 반응 파트너는 상호작용하며, 열은 결합 이벤트의 영에 정비례하여 방출 또는 흡수된다. 항원의 각각의 주입은 온도의 변화를 초래한다. 샘플 셀과 기준 셀 사이의 온도 차이를 보상하기 위해서 샘플 셀에 대한 열의 첨가 또는 제거가 일어나며, 측정 시그널로서의 역할을 한다.

[0373] 우선, ITC 완충액 내에서의 Aβ (pE11-18)-PEG 희석의 열을 결정하였다 (도 16, 상부 트레이스 참조). 상부 트레이스는 측정 시그널에 비해서 일정한 낮은 시그널 (배경 시그널)을 나타낸다. 그 후에, 펩타이드 Aβ (pE11-18)-PEG를 샘플 셀 내의 항 Aβ 11(pE) 항체에 적정하였다 (도 16, 하부 트레이스 참조). 각각의 주입 후의 총 열 방출은 각각의 피크와 기준선 사이의 면적을 통합함으로써 결정되었다. 그 후에, 희석의 열 (도 16, 상부 트레이스 참조)을 각각의 주입의 총 열 방출로부터 공제하였다. 도 17은 항 Aβ 11(pE) 항체 (KSCN-구배로 용출됨)와 Aβ (pE11-18)-PEG에 의해서 수득된 결합 곡선을 나타내며, 이에 의해 각각의 주입에서의 총 열 방출이 항체 및 펩타이드의 몰 비에 대비해서 플롯팅된다. 결합 곡선으로부터, 열역학적 파라미터 상수는 프로그램 오리진 (Origin) 7.0에 의해서 결정되었다.

[0374] 표 11에는 Aβ (pE11-18)-PEG 펩타이드에서의 항 Aβ 11(pE) 항체의 결합에 대하여 결정된 파라미터 N, K_A , K_D , ΔH , 및 ΔS 뿐만 아니라 깁스 (Gibbs) 에너지를 나타낸다. $K_D=1/K_A$ 이고, $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ 임을 알아야 한다.

[0375] 표 11. 항 Aβ 11(pE) 항체에서 Aβ (pE11-18)-PEG 펩타이드의 열역학적 결합 파라미터

[0376] 항체는 각각 KSCN-구배 (pH 7.0) 및 0.1 M 글리신-HCl (pH 2.7)에 의해서 단백질 G 칼럼으로부터 용출시켰다. 파라미터는 20℃에서 ITC 마이크로칼로리미터에 의해 결정되었다.

결합 파라미터	항 Aβ 11(pE) 항체	
	KSCN 용출	글리신-HCl 용출
화학량론 (N)	1.88 ± 0.0087	1.01 ± 0.0015
회합 상수 (K_A), $10^6 M^{-1}$	12.7 ± 1.19	9.5 ± 0.52
해리 상수 (K_D), nM	78.74	105.26
결합 엔탈피 (ΔH), kcal/mol	-8.259 ± 0.058	-7.999 ± 0.026
결합 엔트로피 (ΔS), cal/mol x K^{-1}	4.33	4.64
-T ΔS , kcal/mol	-1.27	-1.36
깁스 에너지 (ΔG), kcal/mol	-9.53	-9.36

[0377] 우선, KSCN-구배 (pH 7.0)에 의해서 용출된 항 Aβ 11(pE) 항체의 결과를 검토하였다. 항원 및 항체 결합의 화학량론은 1.88이었다. 따라서, 화학량론은 거의 2였으며, 이것은 거의 모든 항체가 활성이었고, Aβ (pE11-18)-PEG 펩타이드의 2 개의 분자와 상호작용하였음을 의미한다. 화학량론 변동의 이유는 미지의 항체 흡수 계수에 기인한 부정확한 농도 측정이었다. 2 보다 상당히 더 적은 화학량론은 산성 용출된 항체의 경우에 해당하는 것으로, 항체 분자의 일부분이 불활성임을 나타낼 것이다.

[0379] 항체의 해리 상수는 78.74 nM이었다. 예를 들어, 항-hMCP1 N1pE(1-x) 항체 (데이터는 나타나지 않음)는 항 Aβ 11(pE) 항체보다 3배 더 큰 해리 상수를 나타내었다. 이것은 항 Aβ 11(pE)의 결합의 강도가 항-hMCP1 N1pE(1-x) 항체보다 더 컸음을 의미한다. 그러나, 항-hMCP1 N1pE(1-x)는 MCP1 ELISA에서 성공적으로 사용되었으며, 이것은 항 Aβ 11(pE) 항체가 또한 ELISA에서 우수한 결합 특성을 나타내어야 함을 시사한다. 항 Aβ 11(pE) 항체의

결정된 해리 상수는 문헌에 기술된 ITC 결과의 중간 범위였다. 예를 들어, D-PAM (단백질 A 모사체)과 모노클로날 항체 IgG의 상호작용은 10^{-5} M^{-1} 범위의 K_D 를 나타내었으며 [D'Agostino B. et al., J Immunol Methods. 2008 Apr 20; 333(1-2): 126-38], 가용성 모노머 A β (1-40)과 마우스 모노클로날 항체 사이의 상호작용의 K_D 는 10^{-7} 내지 10^{-8} M^{-1} 의 범위였다 [Brockhaus et al., J Phys Chem B. 2007 Feb 8; 111(5): 1238-43]. 항 A β 11(pE) 항체의 K_D 는 $7.8 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ 에 달하였으며, 문헌에 기술된 데이터와 동등하였다.

[0380] 일반적으로, 항체와 항원 상호작용은 대부분, 수소 결합에 의해서 구동되는 엔탈피적이며 (특이적 상호작용), 엔트로피 변화는 종종 배좌 정도 (conformational degrees)의 상실에 기인하여 음성이다 ($\Delta S < 0$). 그러나, 항 A β 11(pE) 항체에서의 A β (pE11-18)-PEG의 결합으로부터 $\Delta S = 4.33 \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$ 의 약한 엔트로피 증가, $\Delta H = -8.259 \text{ kcal/mol}$ 의 음성 엔탈피, 및 $\Delta G = -9.53 \text{ kcal/mol}$ 의 작은 깃스 에너지가 제공되었다. 따라서, 상호작용은 수소 결합의 형성에 기인하여 약한 엔탈피 ($\Delta H < 0$)로 구동되고, 또한 항체 및 항원 상호작용에 대해서는 통상적이지 않은 것으로, 약한 엔트로피 ($\Delta S > 0$)로 구동되었다. 결합은 강한 소수성 에피토프 A β (pE)에 기인한 소수성 상호작용을 특징으로 하였으며, 물 분자가 대체되어 배좌 자유도의 증가, 및 따라서 약한 엔트로피 증가를 제공하였다 [Ohtaka et al., 2002, Protein Sci. 11, 1908-1916]. 대조적으로, 대부분의 항원 및 항체 결합은 예를 들어, MCP1 N1pE(1-x) 항체와 같이 음성 엔탈피 및 적합하지 않은 엔트로피 상실에 의해서 구동된다.

[0381] 상술한 ITC 결과들은 단백질 G 세파로즈에 의해서 정제되고 KSCN-구배에 의해서 용출된 항체를 사용하여 실행되었다 (2.3항 참조). 또한, 항체 용출을 산성 0.1 M 글리신-HCl 용액 (pH 2.7)으로 시험하고, 이어서 1 M 트리스-HCl로 즉시 중화시켰으며, 항체는 침전되었다. 농도 결정 전에, 침전된 단백질은 원심분리에 의해서 제거하였으며, ITC 실험 내에서는 나타나지 않는다. 이 산성 용출된 항체의 결합 파라미터는 또한, ITC에 의해서 특정화되었다. 도 18은 A β (pE11-18)-PEG와 항 A β 11(pE) 항체 (글리신-HCl에 의해서 용출됨)의 수득된 결합 곡선을 나타내며, 이에 의해 각각의 주입에서의 총 열 방출이 항체 및 펩타이드의 몰비에 대비하여 플롯팅된다.

[0382] 글리신-HCl에 의해서 용출된 항 A β 11(pE) 항체의 결과는 $K_D = 105.26 \text{ nM}$ 의 해리 상수, $\Delta H = -7.99 \text{ kcal/mol}$ 의 음성 엔탈피, 및 $4.64 \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$ 의 엔트로피 증가를 나타내었다. 산성 및 KSCN 용출된 항체의 에너지 파라미터는 거의 동일하였지만, 그와는 대조적으로 산성 용출된 항체의 화학량론 값은 단지 1.01이었고, 따라서 2보다 상당히 더 낮았다. 이것은 항체의 대략 절반이 산성 용출에 기인하여 불활성화되었음을 의미한다. 결론적으로, 항체 용출은 산성 글리신-HCl을 사용하는 대신에 KSCN-구배에 의해서 더 수행되었다.

[0383] 추가로, 비오틴화 항 A β 11(pE) 항체 (1.2.3.1항 참조)를 또한 ITC에서 검사하였다. 표 12에는 측정된 열역학적 결합 파라미터를 나타낸다.

[0384] 표 12. 비오틴화 항 A β 11(pE) 항체에서의 A β (pE11-18)-PEG 펩타이드의 열역학적 결합 파라미터

[0385] 항체를 비오틴화시킴으로써 2 개의 비오틴 분자를 하나의 항체에서 커플링시켰다. 파라미터는 20°C에서 ITC 마이크로칼로리메터에 의해 결정되었다.

	비오틴화 항 A β 11(pE) 항체
화학량론 (N)	1.66 ± 0.0092
회합 상수 (K_A), 10^6 M^{-1}	8.0 ± 0.69
해리 상수 (K_D), nM	125.00
결합 엔탈피 (ΔH), kcal/mol	-8.276 ± 0.066
결합 엔트로피 (ΔS), cal/mol x K^{-1}	3.36
$-T\Delta S$, kcal/mol	-0.98
깃스 에너지 (ΔG), kcal/mol	-9.26

[0386]

[0387] 도 19에는 비오틴화 항 A β 11(pE) 항체와 A β (pE11-18)-PEG의 수득된 결합 곡선을 나타낸다.

[0388] 비오틴화 항 A β 11(pE) 항체의 결과는 비-비오틴화 항체와 거의 동일한 엔탈피 및 엔트로피 값을 나타내지만, 그보다 약간 더 높은 해리 상수 ($K_D = 125 \text{ nM}$)를 나타낸다. 이것은 비오틴화 항 A β 11(pE) 항체의 결합 강도가 비-비오틴화 항체의 결합 강도보다 약간 더 작은 것을 의미한다. 또한, 1.66의 화학량론은 비-비오틴

닐화 항체의 화학량론 이하였으며, 이것은 아마도 항체 분자의 적은 부분이 불활성임을 나타내었다. 결론적으로, 아마도 비오틴닐화 과정에 의한 항체 활성의 약간의 상실이 측정되었다.

[0389] 2.4.5. 교차 반응성의 결정

[0390] 피로글루타메이트-펩타이드 CCL2 (MCP-1로 공지됨), CCL8 (MCP-2로 공지됨), 빅 가스트린, 고나도리베린, 뉴로 텐신, 오렉신 A, 피브로넥틴, 콜라겐 1 및 TRH (티로트로핀-방출 호르몬)에 대한 항 Aβ 11(pE) 항체 (클론 13)의 교차 반응성을 SPR에 의해서 시험하였다 (데이터는 나타내지 않음). 시험한 항체는 몇 가지 피로글루타메이트-펩타이드와 교차 반응성을 나타내지 않았다. 추가로, Aβ pE(3-40) 및 Aβ pE(11-30)에 대한 항체 클론 13의 교차 반응성을 SPR에서 시험하였으며, 이에 의해 항체는 그의 반응성에 관해 비교하였다. 도 20에는 시간의 경과에 따른 Aβ pE(11-30) 및 Aβ pE(3-40) 펩타이드에 대한 클론 13의 실시간 플롯을 예시한다.

[0391] SPR 결과는 클론 13이 Aβ pE(3-40)에 대해 약한 교차 반응성을 나타내었지만, Aβ pE(11-30)에 대한 것보다 4 규모(magnitude) 더 작았음을 나타낸다. ITC 결과 (2.4.3항 참조)는 Aβ 11pE와 클론 13 사이의 결합이 소수성 상호작용에 기인하여 약한 엔트로피로 구동되었음을 나타낸다. 이것은 일반적으로, 클론 13이 소수성 펩타이드, 예를 들어, Aβ 3(pE)와 비특이적으로 상호작용할 수 있었음을 의미하며, 이것은 SPR의 상기 나타낸 결과에 의해서 확인되었다. 요약하면, 항 Aβ 11(pE) 항체는 높은 친화성 (ITC 결과 참조) 및 우수한 특이성을 나타내었다.

[0392] 2.5. 샌드위치 ELISA에서 항 Aβ 11(pE) 항체의 적용

[0393] 2.5.1. 자가-Ig-ELISA의 설정

[0394] AD 환자 및 건강한 대조군으로부터의 혈장 샘플 내의 자가-면역글로불린의 분석을 위해서 항 Aβ 11(pE), 항 Aβ 3(pE) 및 항 Bri-2(pE1) 자가항체 ELISA's를 설정하였다 (표 5 참조). ELISA's는 다양한 항체 클래스 IgG, IgM, IgA, 서브클래스 (IgG2, IgG3) 및 총 면역글로불린 Ig's의 분석을 위해서 개발되었다. 최적화 과정을 시작할 때에, 너무 큰 배경 시그널이 측정되었으며, 이에 의해서 펩타이드 (200 ng/ml)의 고정화 후에 차단이 수행되지 않았다. 따라서, ELISA-차단제 (-T) 및 PBS/10% FBS/0.05% 트윈을 차단뿐만 아니라 샘플 및 컨주게이트의 희석에 대해서 시험하였다. ELISA-차단제 (-T)는 모든 자가-Ig-ELISA's에서 가장 낮은 배경 시그널 및 가장 높은 시그널-대-잡음 비를 나타내었다.

[0395] 또한, 항 Aβ 11(pE) 자가-Ig-ELISA에서 샘플의 정량화를 위한 표준을 설정하였다. 따라서, 정제 및 투석한 mAb (클론 13) (2.2장 참조)를 표준으로 시험하였다. mAb는 Aβ (pE11-x)의 N-말단에 대해서 유도되며, 마우스 IgG 클래스에 속한다. 도 21에는 mAb 클론 13의 표준 곡선을 나타낸다. 표준 항체 (클론 13)의 검출을 위해서는 토끼 항-마우스 Ig's (HRP), 및 그에 반해 인간 혈장 샘플의 경우에는 항-인간 Ig's, IgG, IgG2, IgG3, IgM 또는 IgA가 사용되었다. 각각의 자가항체 클래스 및 서브클래스에 대한 표준을 이용할 수 없었지만, 샘플은 동일한 조건 하에서 시험 및 정량화하였기 때문에 각각의 항체 클래스/서브클래스 내에서 AD 환자 및 대조군에서의 자가항체 수준의 비교는 가능하였다. 그러나, 클래스/서브클래스 사이에서만 아니라 자가-Ig-ELISA's 사이에서의 자가항체 농도의 비교는 클래스 IgG의 표준에 의한 정량화에 기인하여 허용될 수 없었다.

[0396] Aβ 11(pE) 자가-항체 ELISA의 LOQ는 1.65의 S/N으로 55 pg/ml였으며, Aβ 3(pE) 자가-항체 ELISA의 LOQ는 1.88의 S/N 비로 48.8 pg/ml였다. 요약하면, 하이브리도마 클론 13으로부터의 mAb는 표준으로 적합하였으며, 항 Aβ 11(pE) 자가-Ig-ELISA에서 더 사용되었다.

[0397] 2.5.2. Aβ (pE11-x) ELISA의 개발

[0398] 4G8 포획 항체 및 비오틴닐화 항 Aβ 11(pE) 검출 항체를 사용한 샌드위치 ELISA에 따른 Aβ 11(pE) ELISA의 성능은 약하거나 모순된 시그널을 나타내었다 (결과는 나타내지 않음). 펩타이드 Aβ (pE11-30)뿐만 아니라 Aβ (pE11-40)의 검출은 단지 약한 시그널을 나타내었다. 두 가지 Aβ 펩타이드는 모두 매우 소수성이며, 저장 중에 혈관 벽에서 펩타이드의 부착을 피하기 위해 ELISA에서 사용하기 직전에 펩타이드 용액을 제조 (HFIP를 증발시키고, 알칼리성 용해시켰다)하였지만 역시 시그널은 검출되지 않았다. 가능한 문제는 포획 4G8 항체와 에피토프 Aβ (17-24) 및 검출 항체와 에피토프 Aβ (pE11-15) 사이의 입체 장애에 의해서 야기될 수 있었다. 4G8과 항 Aβ 11(pE) 항체의 항체 반응성을 직접 시험하기 위해, 흡착된 Aβ 펩타이드를 사용한 직접 ELISA가 수행되었다. 사용하기 직전에 HFIP를 증발시킨 다음에 Aβ 펩타이드를 NaOH에 용해시켰다 (RT에서 10 분). 강한 소수성 Aβ (pE11-30) 펩타이드는 마이크로플레이트에서 직접 PBS 내에 희석시켜 펩타이드가 희석 중에 폴리프로필렌 바이알에 부착하지 않도록 보장하여야 한다. 도 22 및 23에는 비오틴닐화 항 Aβ 11(pE) 항체 및 4G8의 사용에 의한 ELISA 시그널을 나타낸다. 항 Aβ 11(pE) 항체는 Aβ (pE11-30) 농도 의존적 방식으로 강한 ELISA 시그널을 나타내었으며, 나노 그램의 범위로 Aβ 펩타이드를 검출하였다. 결론적으로, 비오틴닐화 항 Aβ 11(pE) 항체는 펩타

이드를 인식하였으며, 검출 항체로서의 적용에 적합하였다.

[0399] 대조적으로, 비오틴화 4G8 항체는 Aβ (pE11-30) 농도 의존적 방식으로 단지 약한 ELISA 시그널을 나타내었다.

[0400] 클론 13과 비교하여, 4G8의 시그널은 동일한 조건 하에서 5 배 더 작았다. 통상적으로, 상업적으로 이용할 수 있는 4G8은 Aβ 단백질에 대해서 우수한 결합 특성을 나타낸다 [Schupf et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 16; 105(37): 14052-7]. 그러나, Aβ (pE11-30)의 경우에 4G8은 단지 약한 결합 시그널을 나타내었다. 항체 4G8은 Aβ 펩타이드의 처음 24 개의 아미노산에 상응하는 합성 펩타이드에 의한 면역에 의해서 생성되었으며, 독점적으로 Aβ 펩타이드의 서열 17-24를 인식한다 [Kim et al., 1988]. 따라서, 4G8은 Aβ (pE11-30) 펩타이드의 구조가 아닌 다른 구조를 인식하였다. 따라서, 낮은 시그널 검출의 이유는 사용된 펩타이드의 구조였다. 이 결과로부터 4G8 항체는 단지 낮거나 모순된 시그널이 검출되었음을 설명하는 Aβ 11(pE) ELISA에서 포획 항체로서 적합하지 않은 것으로 결론을 내릴 수 있었다. 미래에는, IBL사로부터의 항-인간 Aβ (35-40) 마우스 IgG mAb에 의해 전코팅된 플레이트를 포획 항체로서 시험함으로써 표준 펩타이드 Aβ (pE11-40)이 사용되어야 한다.

[0401] 2.5.3. Aβ 11(pE) 항체에 의한 면역염색

[0402] AD 환자 및 유전자이식 APP/PS1 마우스로부터의 뇌 절편의 면역염색은 항 Aβ 11(pE) 항체 (클론 13)를 사용하여 수행되었다. 인간 AD 증례 1 내지 3의 IHC 영상은 도 24에 나타내었다.

[0403] AD 증례 1, 2 및 3의 염색 절편은 Aβ 11(pE)가 세포외 침착되었음을 나타내며, 이에 의해 AD 증례 1의 플라크 코어 부분에서 주로 Aβ 11(pE)가 염색되었다. 결론적으로, Aβ 11(pE)는 플라크의 코어 부분에서만 아니라 말초 부분에서도 염색될 수 있었다. 또한, 세포내 침착물은 AD 증례 3에서 뚜렷하게 볼 수 있었다. AD 증례 3에서의 확대도 (우측 아래의 사각형)는 Aβ 11(pE) 침착물이 반원 형상으로 볼 수 있는 세포 핵의 겉에서 직접 염색되었음을 나타내었다. Aβ 3(pE)보다 더 많은 세포내 Aβ 11(pE) 염색이 검출되었음을 주목할 만한 것이었다.

[0404] 결과는 모노클로날 항체 클론 13이 세포내 및 세포외 Aβ 11(pE) 침착물 둘 다를 특이적으로 인식하는 것을 나타낸다.

[0405] 인간 뇌 절편과 동등하게, 또한 APP/PS1 유전자이식 마우스 뇌의 절편도 Aβ 11(pE) 침착물에 대해서 검사하였다 (도 25 참조).

[0406] 마우스 뇌의 IHC 영상은 Aβ 11(pE) 펩타이드의 혈관 침착을 나타낸다. 마우스 뇌에서 혈관을 따라 뚜렷하게 볼 수 있는 갈색 염색 이외에도 세포내 Aβ 11(pE) 침착물을 또한 볼 수 있었다. 대조적으로, 인간 뇌의 절편에서는 혈관 침착물이 나타나지 않았다.

[0407] 요약하면, 결과는 Aβ 11(pE) 침착물이 뉴론내, 뉴론외 및 또한 혈관적으로 검출될 수 있었음을 나타낸다. 클론 13은 pyroGlu 펩타이드에 대해 탁월한 반응성을 나타내었으며, 면역염색을 위해 사용될 수 있었다. 지금까지, 인간 AD 뇌에서 Aβ 11(pE)의 세포내 및 세포간 침착이 일어나는 것을 보여주는 근거는 알려지지 않았다. 플라크로서의 Aβ 펩타이드의 침착은 AD의 가장 두드러진 병리학적 특징 중의 하나이며, AD에서의 치매의 병인론과 밀접하게 관련되는 것으로 생각된다. 플라크의 조성은 지금까지 완전히 이해되지 않고 있다.

[0408] 2.6. AD 환자 및 건강한 대조군에서 자가항체 수준

[0409] 본 연구에서는, Aβ (pE11-x) 에피토프에 대해 지시된 클래스 및 서브클래스 IgG, IgM, IgA, 총 면역글로불린 Ig's, IgG2 및 IgG3의 자가항체의 수준을 연구하였다. 목적은 잠재적인 진단용 AD 바이오마커를 확인함으로써 AD 환자의 Aβ 자가항체 프로파일 사이의 가능한 상관관계를 분석하는 것이었다. 따라서, AD의 임상적 진단을 갖는 환자로부터, 및 건강한 대조군으로부터 유래하는 혈장 샘플을 연구하였다. AD 환자로부터의 13개의 혈장 샘플 및 30 개의 건강한 대조군을 연구 PBD-0316 (T0+6 개월)으로부터 획득하였다. 이 분석을 위해, 본 연구에서 설정된 자가-Ig-ELISA's (1.4.2.1항 참조)가 사용되었다. 결과는 도 26 및 27에 제시된다.

[0410] 도 26 및 도 27에는 Ig's (총 면역글로불린), IgG, IgG2, IgG3, IgM 및 IgA의 항 Aβ 11(pE) 자가항체의 농도를 나타낸다. IgG2를 제외한 모든 분석된 항 Aβ 11(pE) 항체 클래스 및 서브클래스의 평균 수준은 대조군에 비해 AD 환자에서 증가하였다. 항 Aβ 11(pE) 자가항체의 결과는 AD와 건강한 대조군 사이에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 혈장 대조군 및 AD 환자에서 자가항체 수준의 큰 변동을 나타내었다.

[0411] 3. 기탁

[0412] Aβ N11pE-x를 특이적으로 인식하는 모노클로날 항체를 생성시켰다. 현재, 하이브리도마 세포주 13-11-6을 발현하는 상응하는 모노클로날 항체는 부다페스트 조약에 따라 기탁되었으며, DSMZ (독일생물자원센터: Deutsche

Sammlung fiir Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DE)에서 2010년 12월 14일의 기탁일 및 각각 이하의 기탁 번호로 이용할 수 있다:

[0413] (클론 13-11-6) : DSM ACC 3100.

[0414] 그들의 각각의 표적 서열에 대한 이 항체의 특이성이 확인되었다. Aβ N11pE-x의 경우에는, 낮은 pg 범위에서 예상된 검출 한계로 설정된 ELISA에서 강한 시그널을 제공하는 높은 친화성 항체 클론이 확인될 수 있었다.

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시사항(PCT 규칙 13의 2) 0-1-1 우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.	PCT 온라인 파일링 버전 3.5.000.225 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	국제출원번호	pct/ep2012/054629
0-3	출원인 또는 대리인의 서류참조기호	PBD 00084/WO
1	아래와 같은 표시는 발명의 상세한 설명 중에 기재된 미생물 또는 생물학적 물질에 관련된 것이다.	99
1-1	페이지	28
1-2	라인	
1-3	기탁표시	독일 생물 자원 센터
1-3-1	기탁기관명	독일, D-38124 브라운슈바이크,
1-3-2	기탁기관 주소	인호펜스트르.78
1-3-3	기탁 일자	2010년 12월 14일
1-3-4	기탁 번호	DSMZ DSM ACC3100
1-5	표시 사항이 적용될 지정국	모든 지정된 곳

수리관청 전용

0-4	국제 출원서와 함께 이 서식을 수리하였다. 네 또는 아니오	네
0-4-1	승인 사무관	데 중-데 코스터, 메리온

국제 사무국 전용

0-5	국제 사무국(IB)이 이 서식을 수리하였다.	
0-5-1	승인 사무관	

[0415]

수탁번호

[0416]

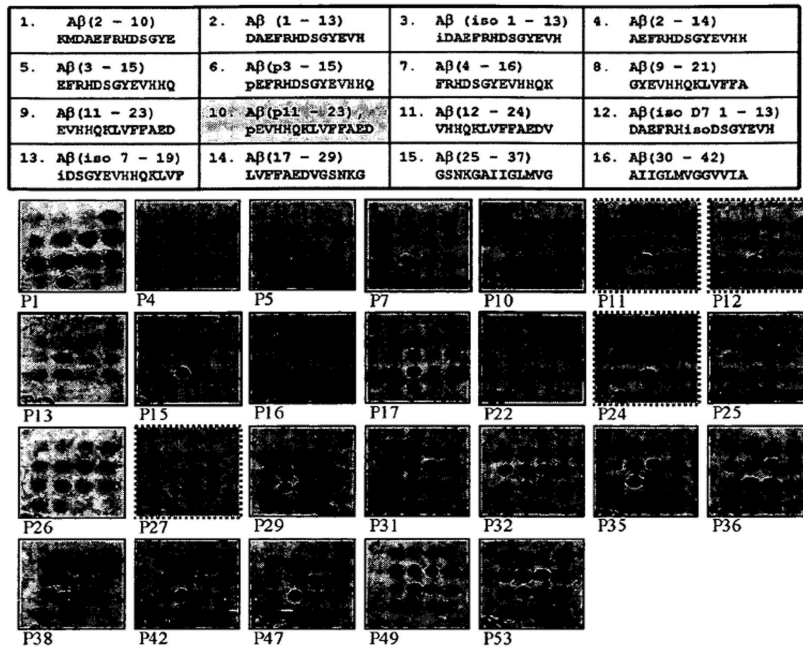
기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSMACC3100

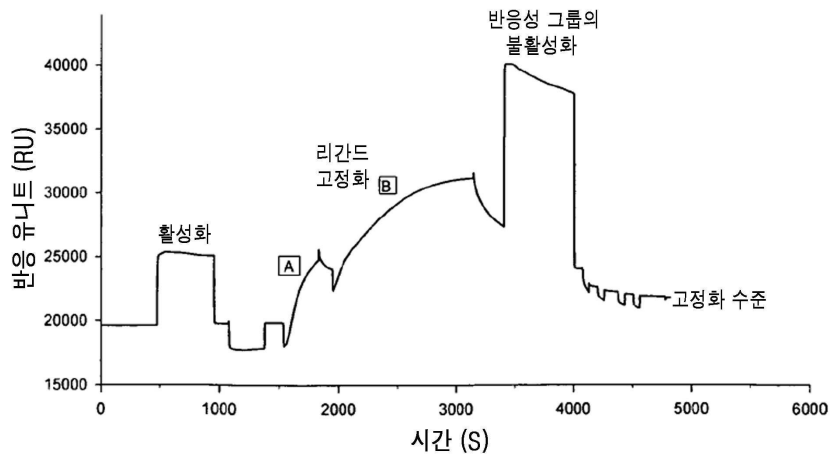
수탁일자 : 20101214

도면

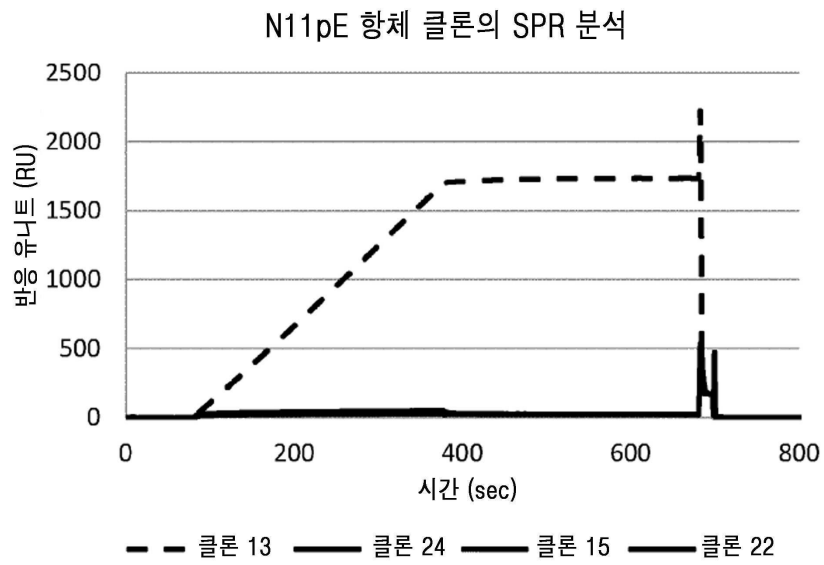
도면1



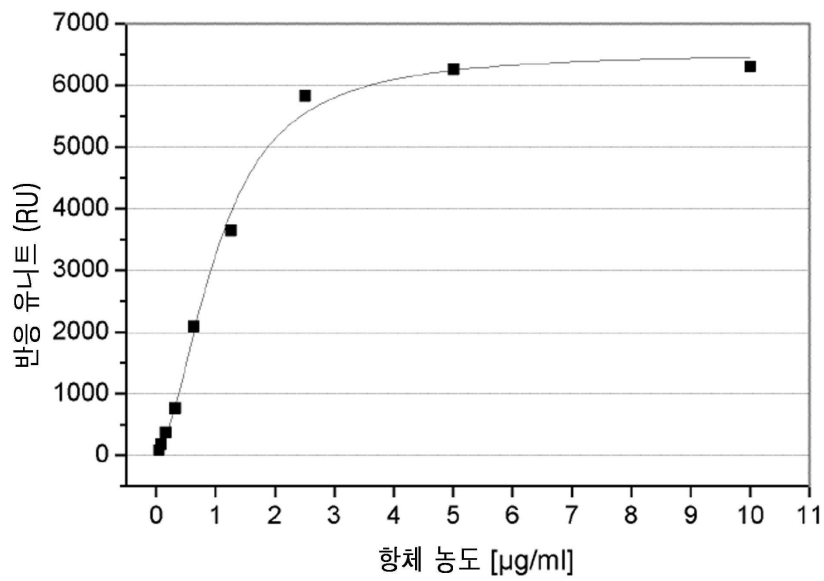
도면2



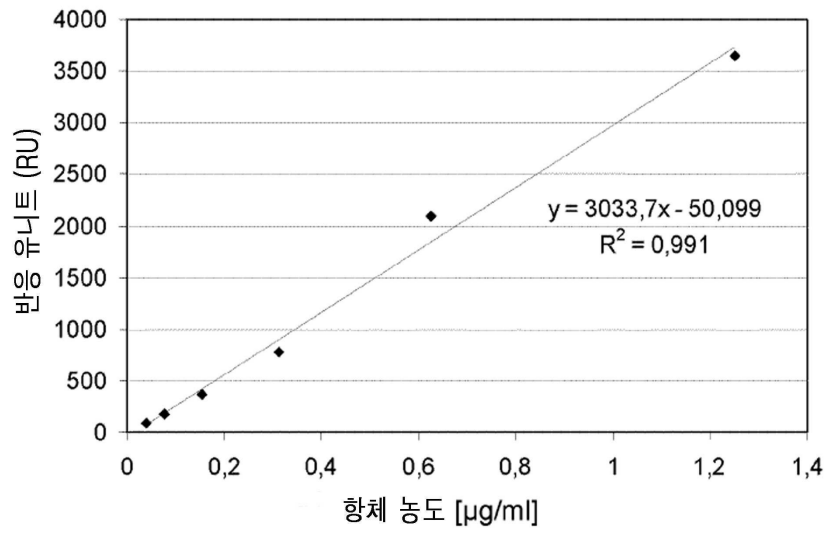
도면3



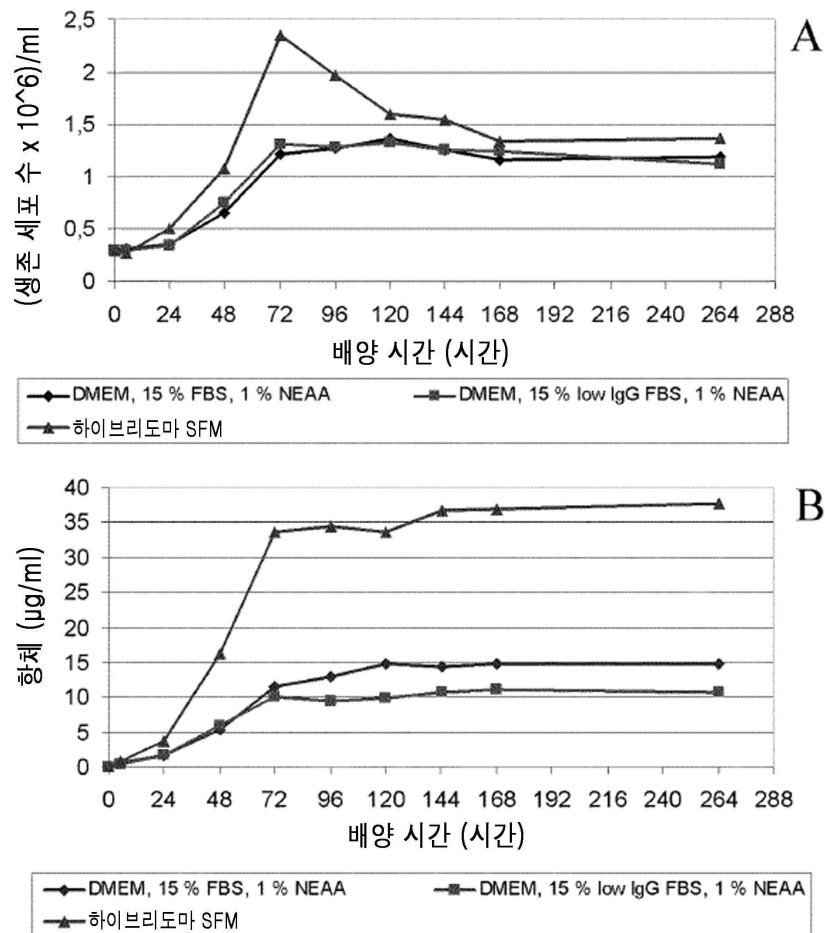
도면4



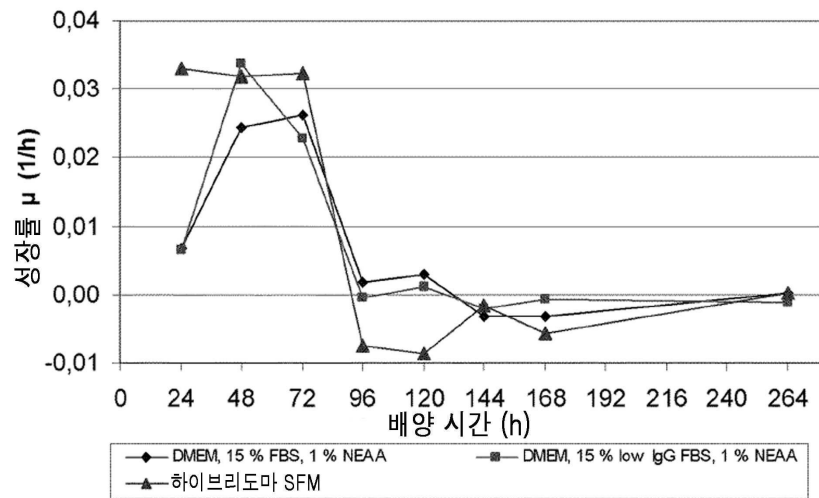
도면5



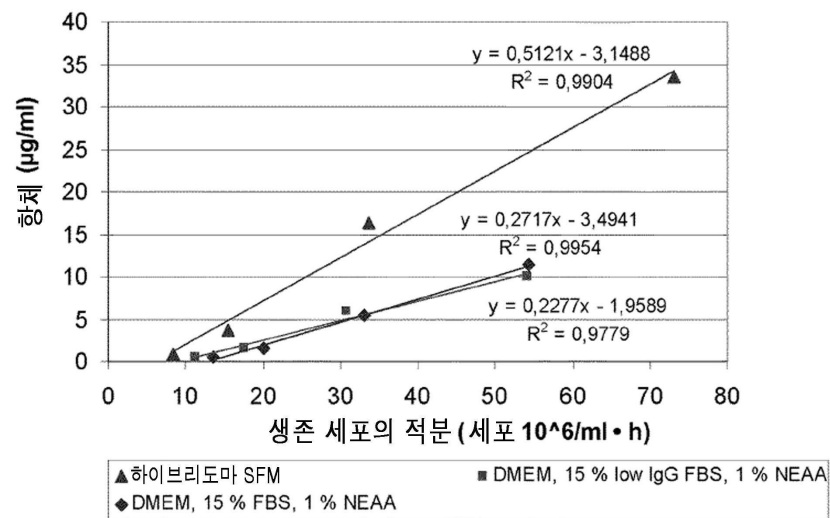
도면6



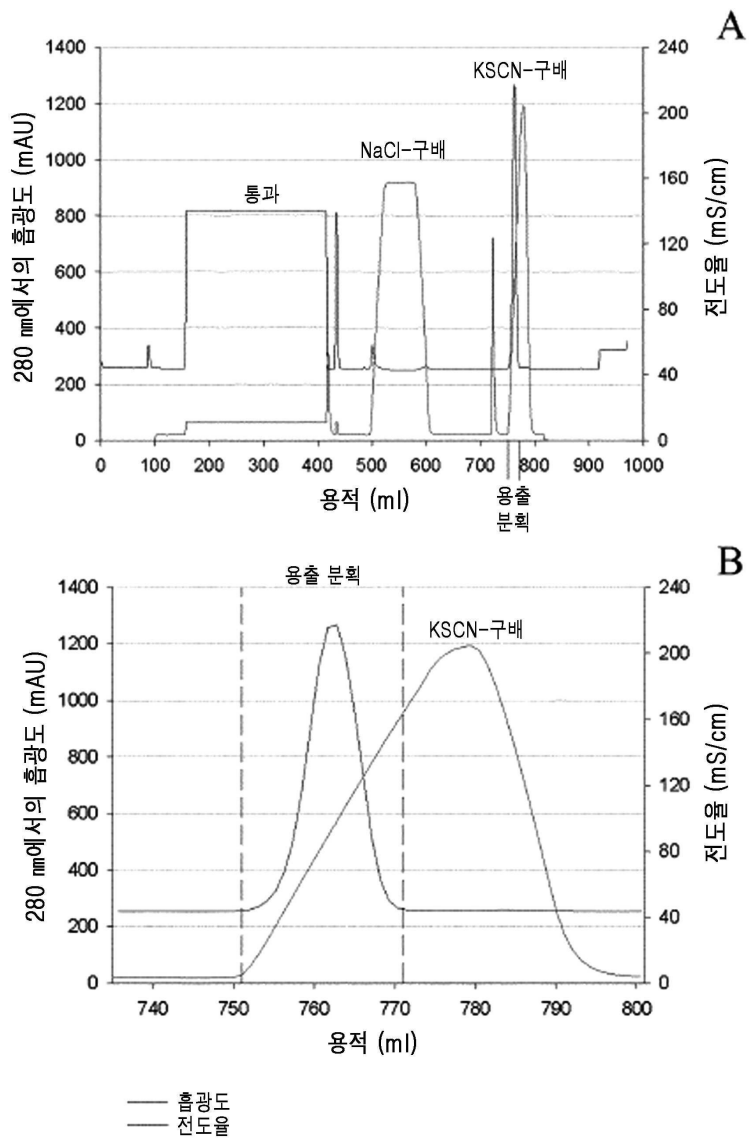
도면7



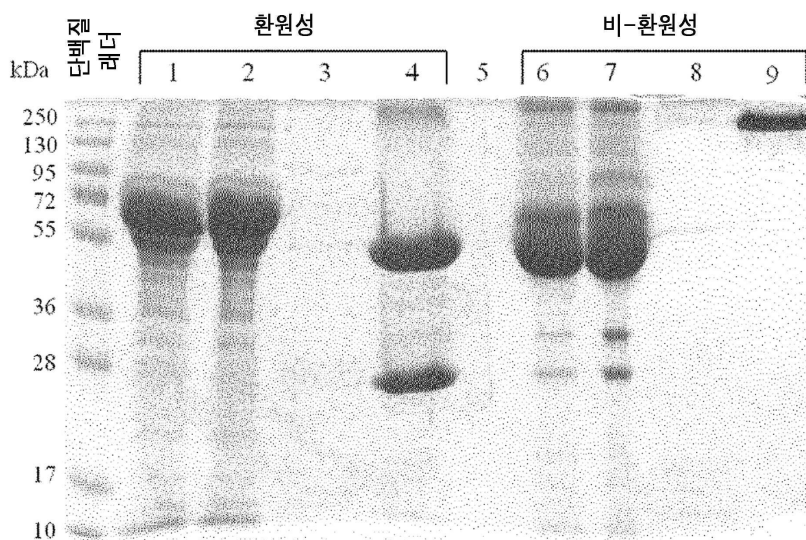
도면8



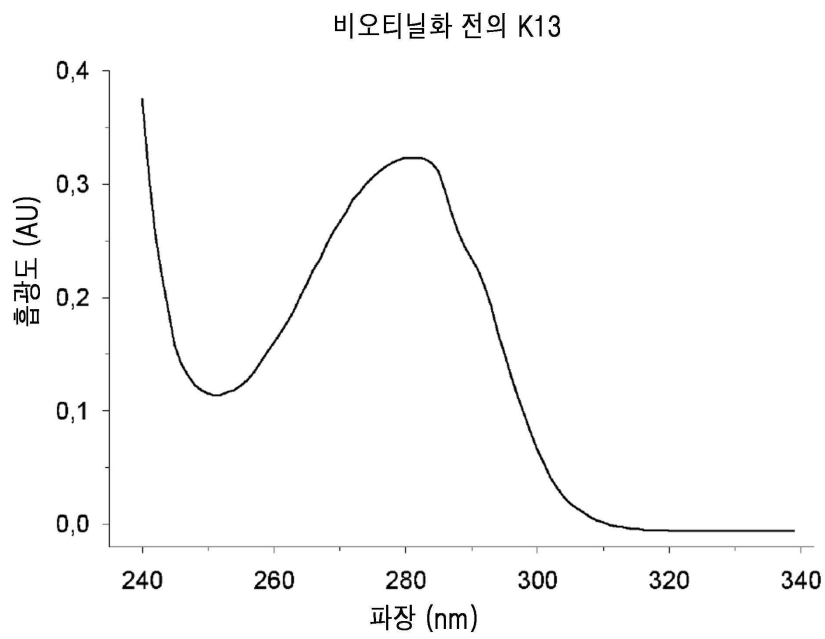
도면9



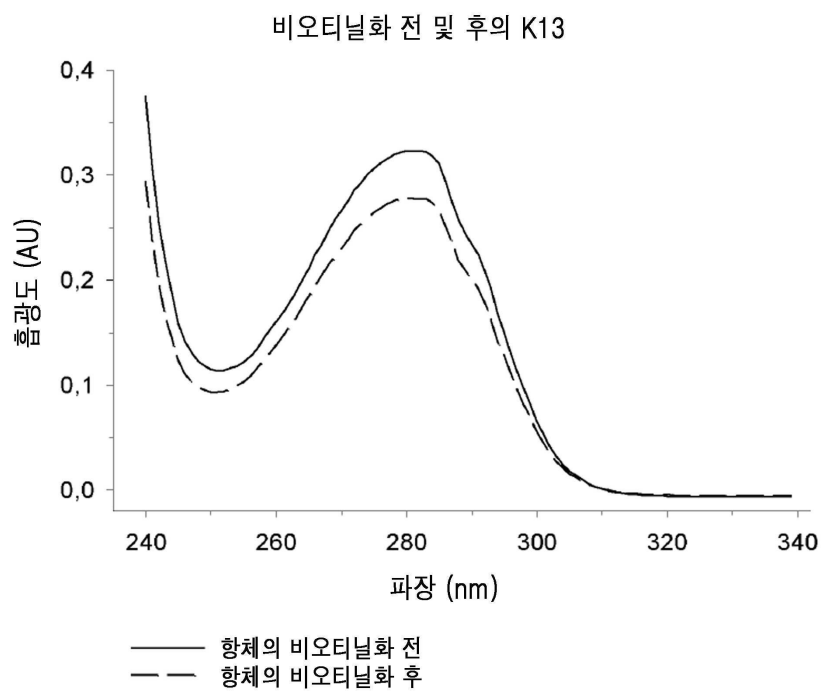
도면10



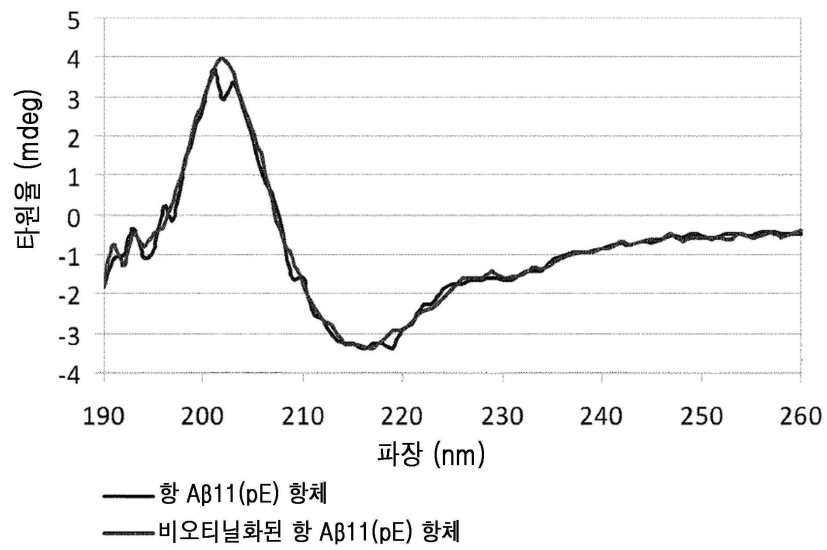
도면11



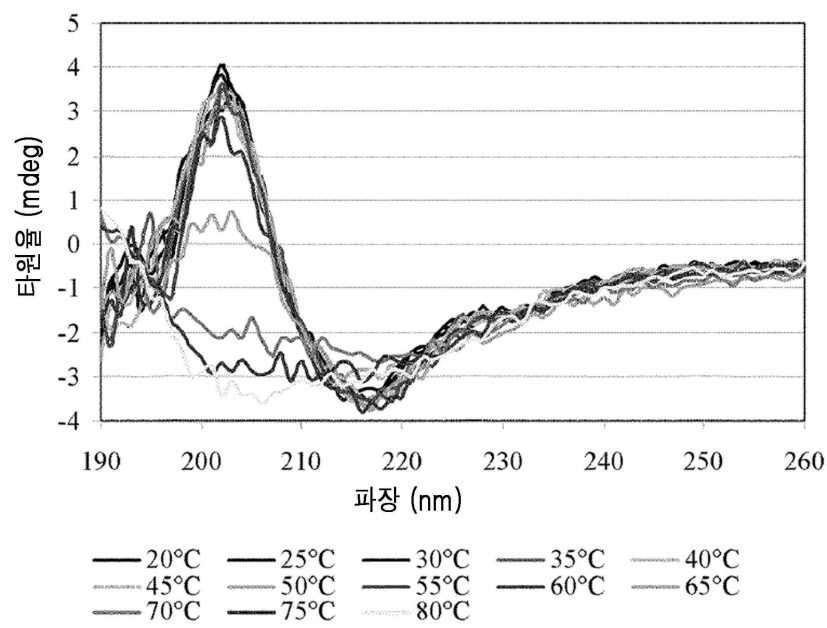
도면12



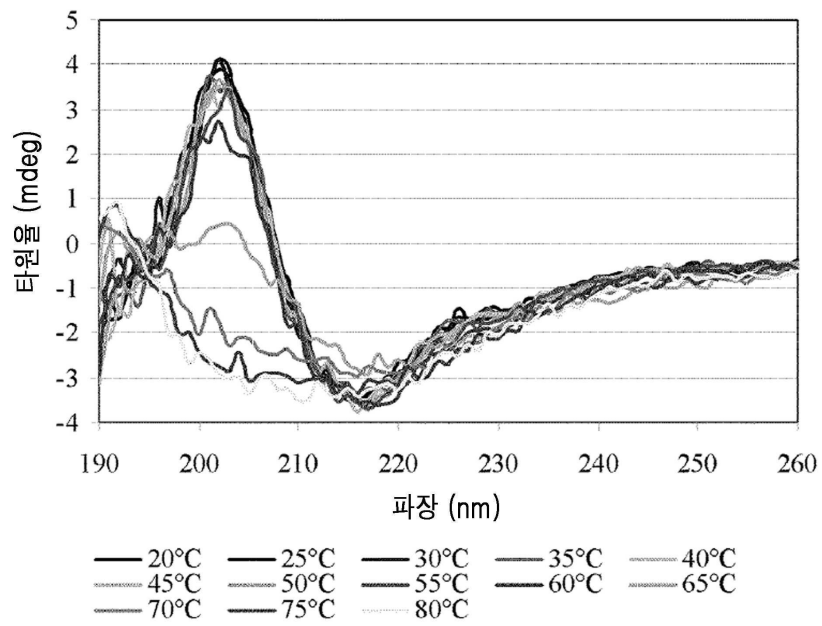
도면13



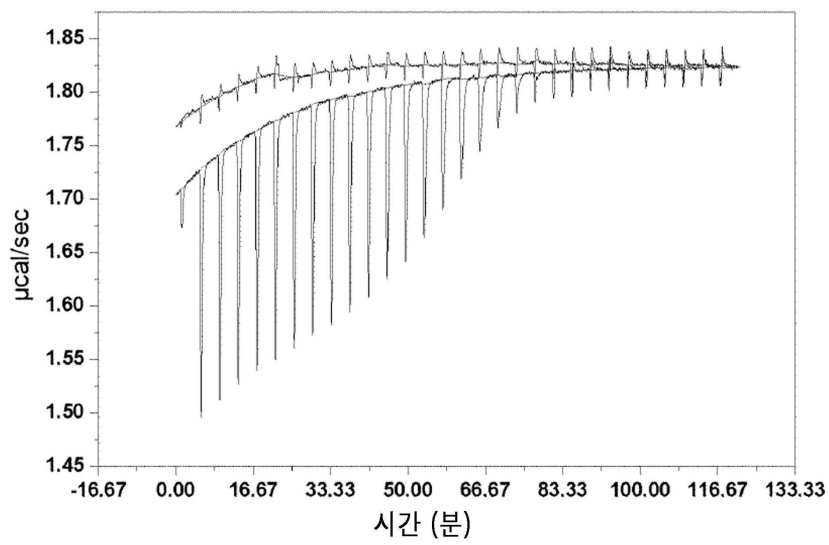
도면14



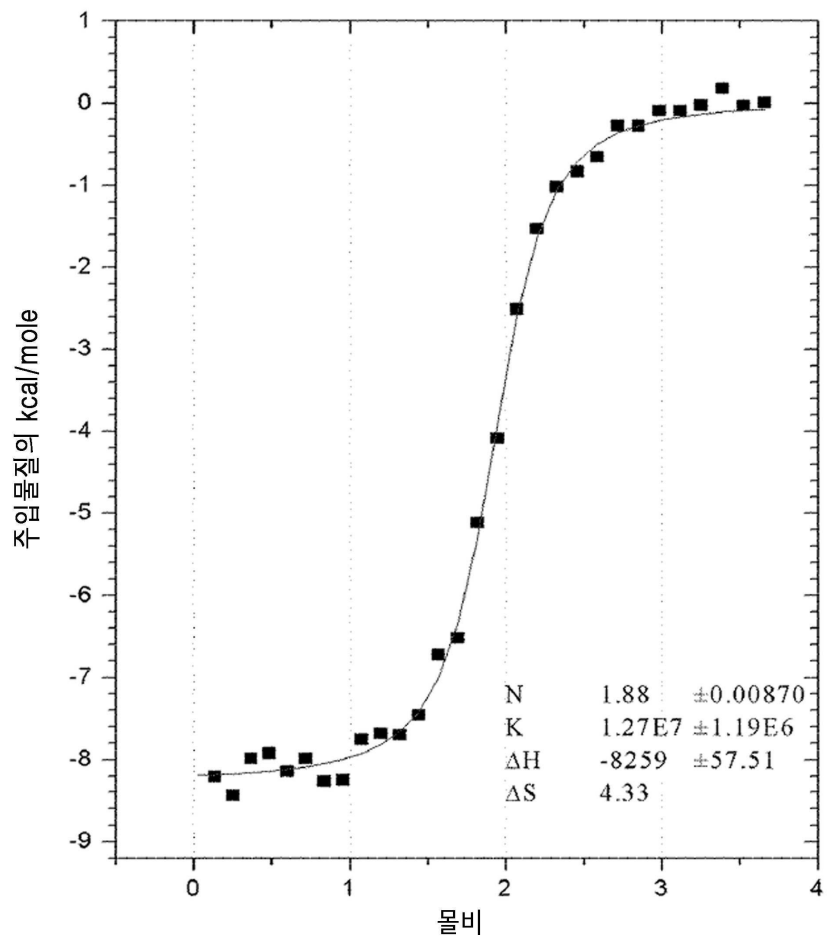
도면15



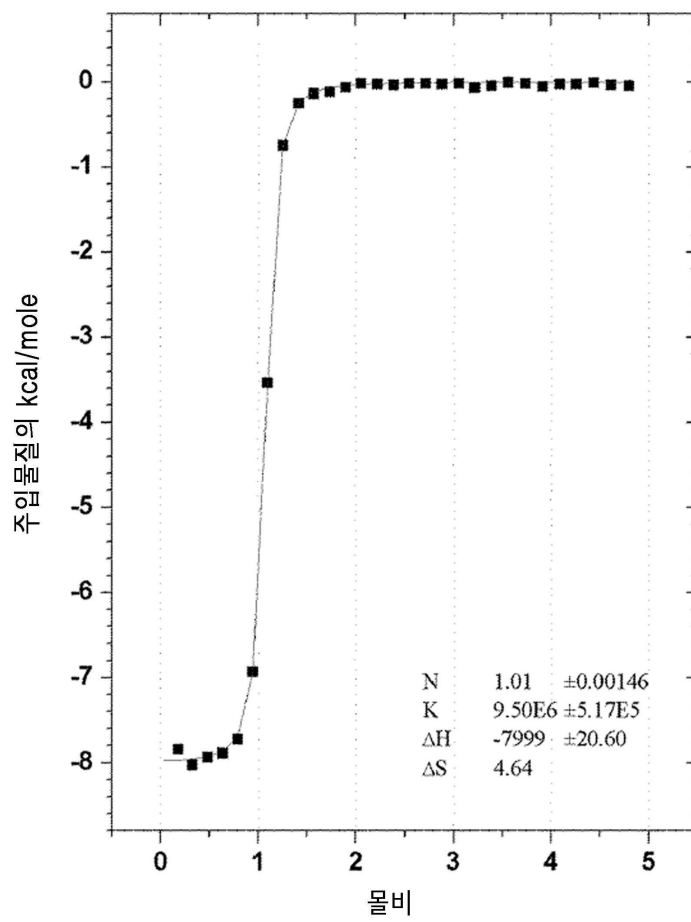
도면16



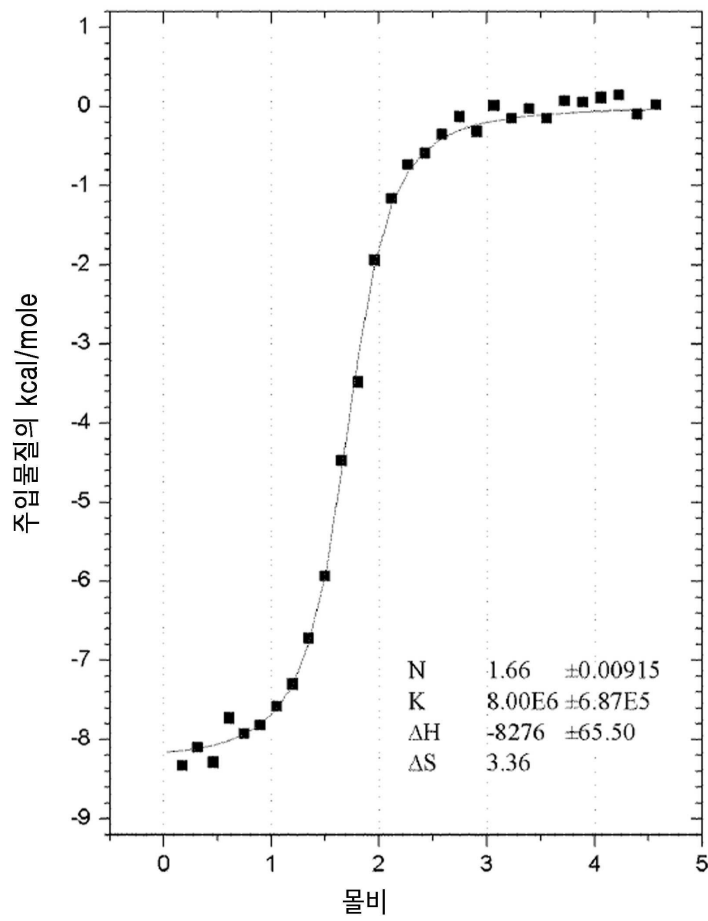
도면17



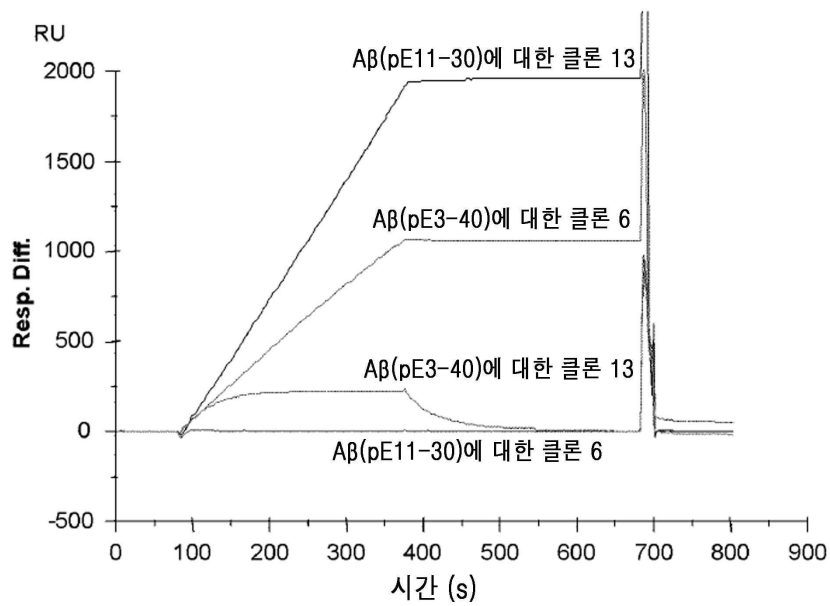
도면18



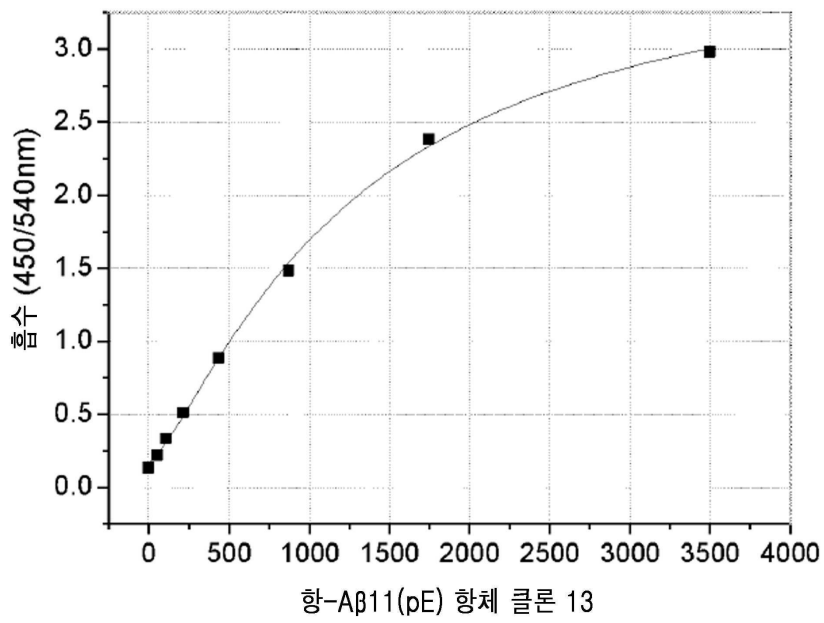
도면19



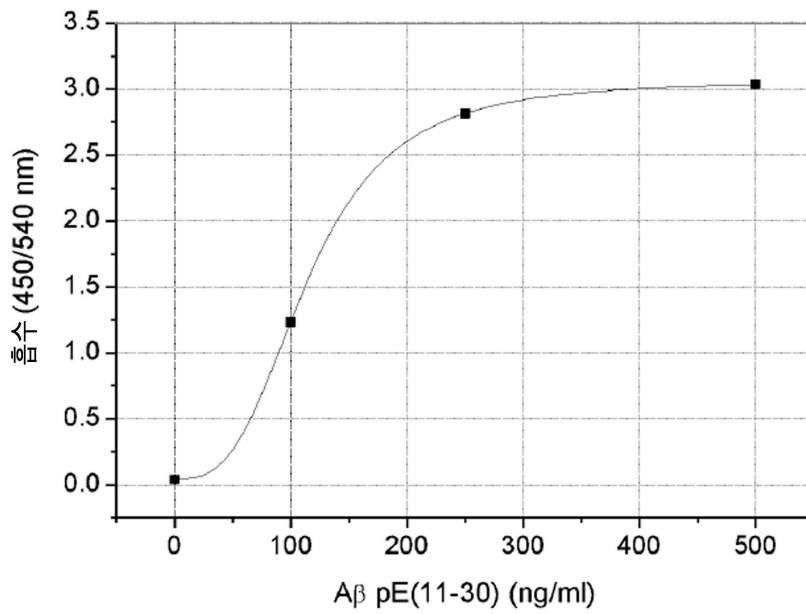
도면20



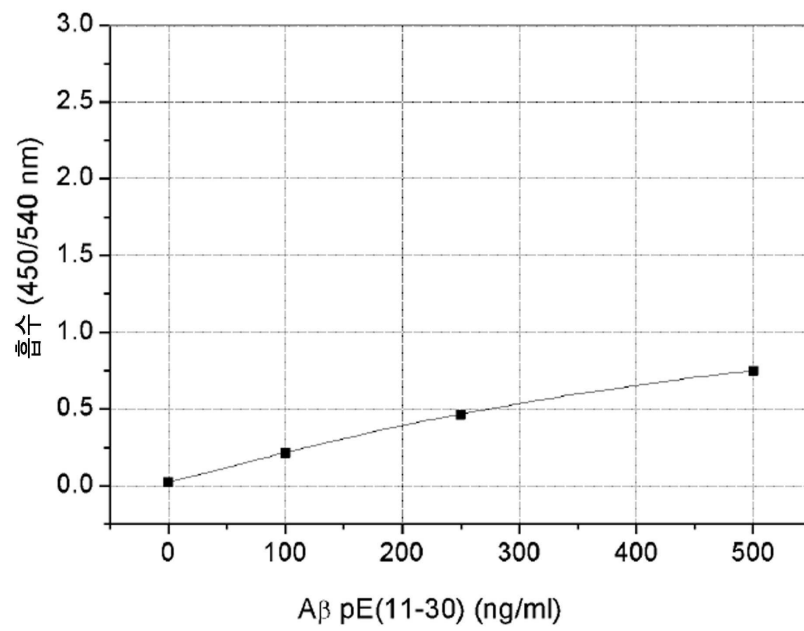
도면21



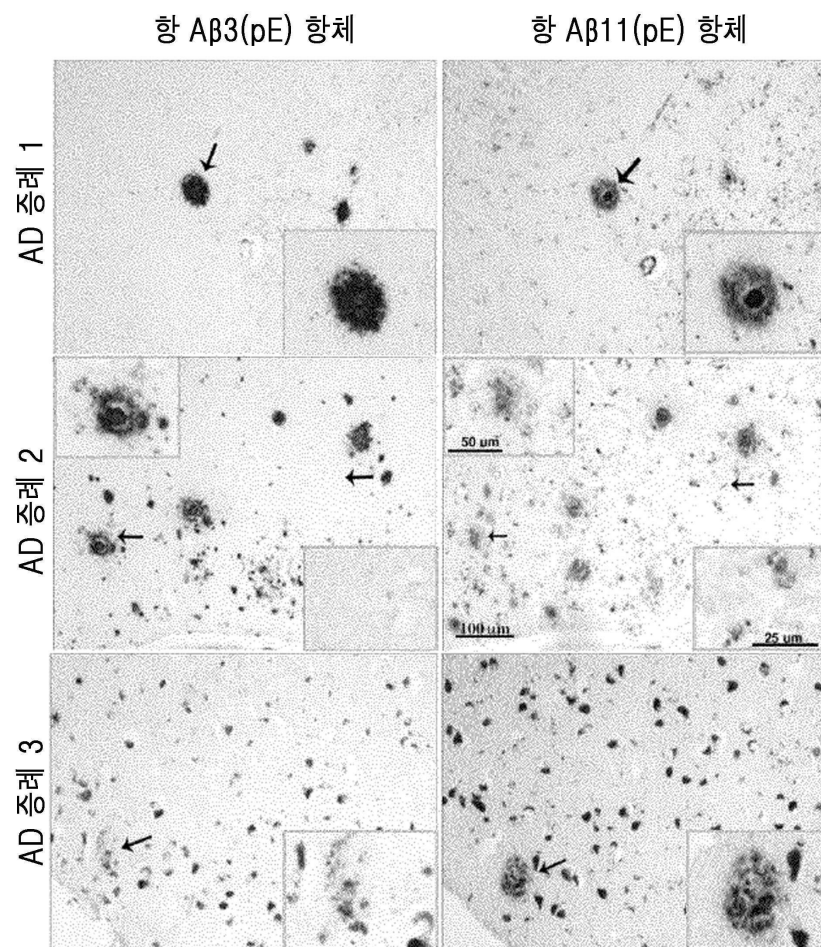
도면22



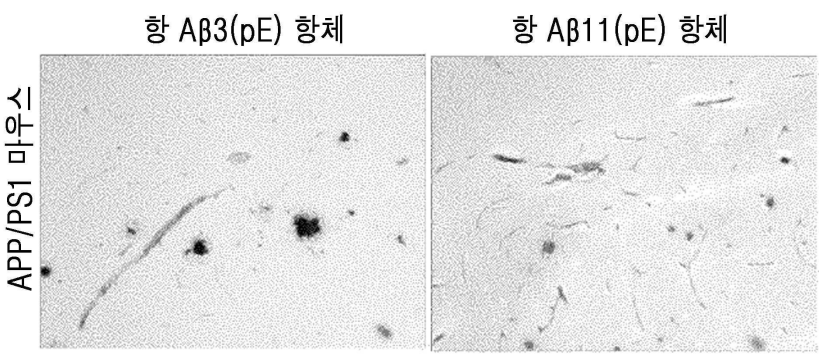
도면23



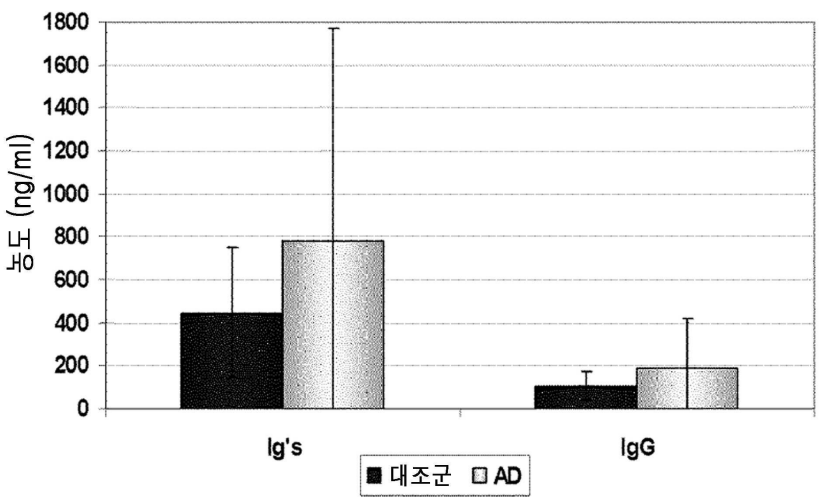
도면24



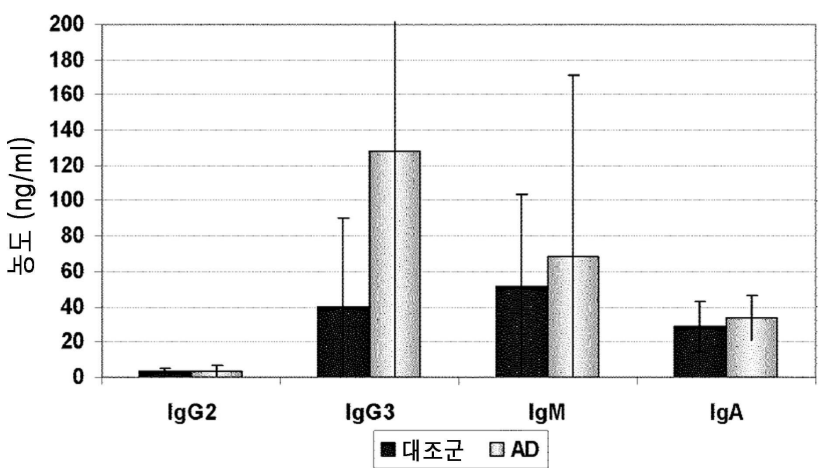
도면25



도면26



도면27



서열 목록

<110> PROBIODRUG AG

<120> DIAGNOSTIC ANTIBODY ASSAY

<130> IPA130760

<150> US 61/453,449

<151> 2011-03-16

<160> 54

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

35 40

<210> 3

<211> 38

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

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

1 5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly

35

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val

35

<210> 6

<211> 36

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

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

1 5 10 15
Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
 20 25 30

Met Val Gly Gly
 35

<210> 7
<211> 32
<212> PRT
<213> Human
<400> 7

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

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 20 25 30

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Human
<400> 8

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

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 20 25 30

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
<213> Human
<400> 9

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser

1 5 10 15
Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly
 20 25

<210> 10

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10
 Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> isoaspartate
 <222> (1)..(1)
 <400> 12
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 13
 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 14

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

1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> pyroglutamate

<222> (1)..(1)

<400> 15

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

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5 10

<210> 19

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> pyroglutamate
 <222> (1)..(1)
 <400> 19
 Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10

<210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 20
 Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
 1 5 10

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> isoaspartate
 <222> (7)..(7)
 <400> 21
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
 1 5 10

<210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> isoaspartate
 <222> (1)..(1)
 <400>
 > 22
 Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe
 1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

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

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

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

1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 26

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 27

30

atggagwcag acacactcct gytatgggtg	30
<210> 28	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 28	
atgagtgtgc tcactcaggt cctgsgttg	30
<210> 29	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 29	
atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg	33
<210> 30	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 30	
atggatttwc aggtgcagat twtcagcttc	30
<210> 31	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 31	
atgaggtkcy ytgysagyt yctgrgg	27
<210> 32	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> PCR Primer
 <400> 32
 atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g 31
 <210> 33
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 33
 atgtggggay ctktttymmm tttttcaatt g 31
 <210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 34
 atggtrtccw casctcagtt ccttg 25
 <210> 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 35
 atgtatatat gtttgttgc tatttct 27
 <210> 36
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 36
 atggaagccc cagctcagct tctcttcc 28
 <210> 37
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 37
 actggatggt gggaagatgg 20
 <210> 38
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 38
 atgaaatgca gctggggcat sttcttc 27
 <210> 39
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 39
 atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

 <210> 40
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 40
 atgaagwtgt ggtaaactg ggttttt 27
 <210> 41
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 41
 atgractttg ggytcagctt grttt 25
 <210> 42

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 42
 atggactcca ggc tcaattt agttttcctt 30

<210> 43
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 43
 atggcttgtc ytrgsgctrc tcttctgc 28

<210> 44
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 44
 atggratgga gckggrtctt tmtctt 26

<210> 45
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 45
 atgagagtgc tgattctttt gtg 23

<210> 46
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR Primer
 <400> 46

atggmttggg tgtggamctt gctattcctg	30
<210> 47	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 47	
atgggcagac ttacattctc attcctg	27
<210> 48	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 48	
atggattttg ggctgatttt ttttattg	28
<210> 49	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 49	
atgatggtgt taagtcttct gtacctg	27
<210> 50	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 50	
cagtggatag acagatgggg g	21
<210> 51	
<211> 441	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 51	

atggagtcac ataccaggt tcttatattg ctgctgctat gggatcttgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120

atgagctgca aatccagtc gagtctgttc tacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 180
tggtaccaac agaaaccagg gcagctcctt aaattgctga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttacaatctg 360
tggctgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420
tccatcttcc caccatccag t 441

<210> 52
<211> 147
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52
Met Glu Ser His Thr Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30
Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Phe Tyr Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

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

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

Pro Ser Ser

145

<210> 53

<211> 447

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 53

atgggatgga gctgtatcat gttctttttg gtagcaacag ctacagatgt ccaactcccag 60
gtccaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggttcagtg gaagctgtcc 120
tgcaaggctt ctggcttcac cttcaccagc tactggatgc actgggtgag acagaggcct 180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagta acggtcgtac taactataat 240

gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gaggtctatt actgtgcgag aggggatctt 360
gcctgggact ggtctgttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagccaaa 420
acgacacccc catctgtcta tccactg 447

<210> 54

<211> 149

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 54

Met Gly Trp Ser Cys Ile Met Xaa Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp

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

