



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월14일
(11) 등록번호 10-2717599
(24) 등록일자 2024년10월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7025729
- (22) 출원일자(국제) 2019년02월07일
심사청구일자 2022년02월03일
- (85) 번역문제출일자 2020년09월07일
- (65) 공개번호 10-2020-0135947
- (43) 공개일자 2020년12월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/052982
- (87) 국제공개번호 WO 2019/154900
국제공개일자 2019년08월15일
- (30) 우선권주장
18155682.0 2018년02월08일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
US20100062463 A1*
US20110039343 A1*
KR1020140102676 A
US20140322824 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
스펩고텍 게엠베하
독일 16761 헤니히스도르프 노이엔도르프슈트라세 15아
- (72) 발명자
멜란테르, 올레
스웨덴 216 11 립함 빌라베겐 3비
- (74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 13 항

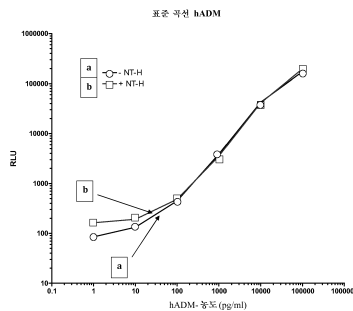
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 치매의 진단 및/또는 예측을 위한 아드레노메들린 (ADM) 및 치매의 요법 또는 예방에 사용하
기 위한 항-아드레노메들린 결합체

(57) 요약

본 발명의 대상은 치매를 진단하기 위해, 또는 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위해, 또는 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해, 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하는 방법이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 16/22 (2013.01)

G01N 33/74 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2800/2814 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한

방법으로서,

여기서 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 대상체의 체액 샘플에서 결정되며, 여기서 상기 성숙 ADM-NH₂의 수준은 임계치 수준과 비교되고,

여기서

- a) 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- b) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- c) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이고/거나, 여기서 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 초과로 증가하면 개입은 계속될 수 있는 것이며,

여기서 상기 대상체의 체액 샘플은 혈액 샘플인 것인

방법.

청구항 2

- a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한

방법으로서,

여기서 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된, 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아닌 프로-아드레노메들린 또는 그의 단편의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율인 마커 비율이 결정되고;

여기서 상기 프로-아드레노메들린의 단편은 PAMP: 서열식별번호: 2, MR-프로ADM: 서열식별번호: 3, ADM-Gly: 서열식별번호: 5 및 CT-프로ADM: 서열식별번호: 6을 포함하는 군으로부터 선택되고;

여기서 상기 마커 비율은 임계치 비율과 비교되고,

여기서

- a) 성숙 ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 임계치 비율 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- b) 성숙 ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 임계치 비율 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- c) 상기 마커 비율이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이거나

또는 상기 마커 비율에 대한적으로, 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정되고, 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아닌 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 수준이 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정되며, 이와 같이 결정된 두 수준은 수학적 알고리즘으로 조합되며, 여기서 상기 수학적 알고리즘의 결과는 치매를 진단하기 위해, 또는 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위해, 또는 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해, 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해 사용되는 것이며,

여기서 상기 대상체의 체액 샘플은 혈액 샘플인 것인

방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 임계치 수준이 15 pg/ml 이하, 10 pg/ml 이하, 또는 5 pg/ml 이하인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 임계치 비율이 0.2 내지 0.75, 0.3 내지 0.6, 또는 0.4 내지 0.5의 범위 내인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플이 전혈, 혈청, 및 혈장의 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 체액 샘플이 샘플 채취 당시에 치매 또는 MCI 진단을 받은 적이 없는 대상체로부터 채취되는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 방법이 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위하여 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드를 이용한 치료를 위한 환자를 선택하기 위한 환자 계층화에 사용되며, 여기서 상기 항-ADM 항체 또는 항-ADM 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 하기 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 결합하는 것인 방법:

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (서열식별번호: 21).

청구항 8

대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드로서, 하기 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 결합하며:

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (서열식별번호: 21),

여기서 상기 대상체가 임계치 수준 미만의, 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준을 갖고/거나 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율인 마커 비율을

가지며, 상기 마커 비율이 임계치 비율 미만이며,

여기서 상기 대상체의 체액 샘플은 혈액 샘플인 것인

항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 프로-아드레노메둘린의 단편이 PAMP (서열식별번호: 2), MR-프로ADM (서열식별번호: 3), ADM-Gly (서열식별번호: 5) 및 CT-프로ADM (서열식별번호: 6)을 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 대상체가 제7항에 따른 방법에 의해 선택되는 것인, 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

청구항 11

제8항 또는 제9항에 있어서, 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 임계치 수준이 15 pg/ml 이하, 10 pg/ml 이하, 또는 5 pg/ml 이하인, 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

청구항 12

제8항 또는 제9항에 있어서, 마커 비율이 0.2 내지 0.75, 0.3 내지 0.6, 또는 0.4 내지 0.5의 범위 내인, 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

청구항 13

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 대상체가 제7항의 방법에 따라 선택되고, 체액 샘플이 전혈, 혈청, 및 혈장의 군으로부터 선택되는 것인, 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명의 대상은
- [0002] a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- [0003] b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- [0004] c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- [0005] d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한
- [0006] 방법으로서,
- [0007] 여기서 서열식별번호(SEQ ID NO): 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 대상체의 체액 샘플에서 결정되며, 여기서 상기 성숙 ADM-NH₂의 수준은 임계치 수준과 비교되고,

- [0008] 여기서
- [0009] a) 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- [0010] b) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- [0011] c) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이고/거나, 여기서 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 수준 임계치 초과로 증가하면 개입은 계속될 수 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 대상은
- [0013] a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- [0014] b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- [0015] c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- [0016] d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한
- [0017] 방법으로서,
- [0018] 여기서 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율일 수 있는 마커 비율이 결정되며, 여기서 상기 마커 비율은 임계치 비율과 비교되고,
- [0019] 여기서
- [0020] a) ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 비율 임계치 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- [0021] b) ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 비율 임계치 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- [0022] c) 상기 마커 비율이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이고, 여기서 상기 마커 비율의 수준이 상기 비율 임계치 초과로 증가하면 개입은 계속될 수 있다.
- [0023] 대안적으로, 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준 및 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준은 수학적 알고리즘에 의해 조합될 것이며, 여기서 이러한 알고리즘의 결과는 치매를 진단하기 위해, 또는 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위해, 또는 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해, 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해 사용된다.
- [0024] 치매는 기억력 장애, 언어 장애, 심리적 및 정신적 변화, 및 일상 생활 활동 장애로 나타나는 증상 및 징후의 군집을 특징으로 하는 임상 증후군이다. 치매 증후군의 상이한 원인 (중증 서브타이핑으로서 지칭됨)은 하기와 같다: 알츠하이머병 (증례의 약 50%), 혈관성 치매 (약 25%), 혼합 알츠하이머병 및 혈관성 치매 (상기에 포함됨, 25%), 루이 소체 치매 (15%); 및 전측두엽 치매, 국소 치매 (예컨대 진행성 실어증), 피질하 치매 (예컨대 파킨슨병 치매), 및 치매 증후군의 이차 원인 (예컨대 두개내 병변)을 포함한 다른 것 (합산하여 약 5%).
- [0025] 알츠하이머병 (AD)은 치매의 가장 흔한 형태이다. AD는 세계 인구가 고령화되고 더 많은 사람들이 이러한 연령 관련 장애의 주요 위험 기간에 접어 들면서 그 빈도가 빠르게 증가하고 있다. 현재 이환된 530만명의 미국 시민 중에서, 피해자 수는 2050년까지 1300만명 이상으로 증가할 것이며; 전 세계적으로 이환된 개체의 총 수는 충격적으로 1억명으로 증가할 것이다 (*Alzheimer's Association, 2015 Alzheimer's disease facts and*

figures. Alzheimers Dement 2015;11:332-84). AD 뇌 내에서의 주요 분자 메카니즘 및 조직병리학적 특징은 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)의 병리학적 아밀로이드생성 절단, 아밀로이드-베타 펩티드 ($A\beta_{1-42}$), 이량체, 삼량체, 올리고머 및 플라크에서의 후속 아밀로이드 응집 및 침착을 포함한 다양한 베타-아밀로이드 종의 생성, 타우 단백질의 비정상적인 과인산화 및 응집, 진행성 세포내 신경섬유 변성, 선천 면역 체계 내에서의 변화 및 염증을 포함한 생화학적 사건의 동적 캐스케이드를 포함한다.

[0026] 환자의 약 5%는 65세 이전에 증상이 나타나며 "조기 발병 알츠하이머병" (EOAD) 환자로서 특징지을 수 있다. 이들 환자의 대부분은 상기 질환의 산발적 형태를 가지고 있지만, 10-15%는 일반적으로 상염색체 우성 방식으로 유전되는 유전적 형태를 가지고 있다. 3종의 유전자, 즉 프레세닐린 1 및 2 및 아밀로이드 전구체 단백질 (APP) 유전자가 EOAD의 발병에 관여하는 것으로 제안되었다. 다른 후보 유전자도 조사 중이다. 유전적 형태는 30 또는 40세에 시작되는 경향이 있고 공격적인 과정을 보이는 반면, 산발성 EOAD는 50세 이후에 시작되는 경향이 있으며, 일반적으로 "후기 발병 알츠하이머병" (LOAD)과 유사한 시간적 프로파일을 가지고 있다.

[0027] 정신 상태 테스트는 기억력, 간단한 문제를 해결할 수 있는 능력 및 다른 사고 능력을 평가한다. 이러한 테스트는 환자가 증상을 인지하고 있는지의 여부, 현재의 날짜, 시간 및 위치를 알고 있는지의 여부, 짧은 단어 목록을 기억할 수 있는지의 여부, 지침을 따르고 간단한 계산을 수행할 수 있는지의 여부에 대한 전반적인 감각을 제공한다. 미니-정신 상태 검사 (MMSE)와 미니-코그(mini-cog) 테스트가 흔히 사용되고 있는 2종의 테스트이다. MMSE 또는 폴슈타인(Folstein) 테스트는 인지 장애를 측정하기 위해 임상 및 연구 환경에서 광범위하게 사용되고 있는 30점 설문지이다 (*Pangman, et al. 2000. Applied Nursing Research 13 (4): 209-213; Folstein et al. 1975. Journal of Psychiatric Research. 12 (3): 189-98*). MMSE 동안, 의료 전문가는 환자에게 다양한 일상 정신 기술을 테스트하기 위해 고안된 일련의 질문을 한다. 최대 MMSE 점수는 30점이다. 20 내지 24점의 점수는 경증 치매를 암시하고, 13 내지 20점은 중등도 치매를 암시하며, 12점 미만은 중증 치매를 나타낸다. 평균적으로 알츠하이머 환자의 MMSE 점수는 매년 약 2 내지 4점 감소한다. MMSE의 장점은 투여를 위한 특수 장비 또는 훈련이 필요하지 않은 것을 포함하며, 알츠하이머병의 진단 및 종단 평가를 위한 타당성과 신뢰성을 모두 갖추고 있다는 것이다. 미니-코그 동안, 사람은 두 가지 작업을 완료하도록 요청받는데, 즉 3가지 공통 물체의 이름을 기억하고 몇 분 후에 이를 반복하며, 검사관이 지정한 시간과 올바른 위치에 12개의 숫자를 모두 보여주는 시계의 얼굴을 그리게 한다. 이러한 간단한 테스트의 결과는 의사가 추가 평가가 필요한지를 결정하는데 도움이 될 수 있다. 다른 테스트, 예컨대 호드킨슨(Hodkinson) 약식 정신 테스트 점수 (*Hodkinson 1972. Age and ageing. 1 (4): 233-8*) 또는 일반의의 인지 평가 (General Practitioner Assessment of Cognition), 컴퓨터화 테스트, 예컨대 CoP 및 정신 속성 프로파일링 시스템 뿐만 아니라 특이적 결합에 대한 심층 분석을 위한 더 긴 공식 테스트가 또한 사용된다.

[0028] 경도 인지 장애 (MCI)는 몇 가지 근본적인 원인이 있는 이질적인 임상 병태이다. 그러나, MCI의 많은 부분은 건장한 노화와 매우 경증의 AD 사이의 과도기 상태를 나타낸다 (*DeCarli 2003. Lancet Neurol. 2:15-21*). 따라서, 연구에 따르면 MCI 대상체는 연간 대략 10%-15%의 비율로 임상적으로 가능한 AD로 진행되는 경향이 있다 (*Markesbery 2010. J Alzheimers Dis. 19:221-228*).

[0029] 알츠하이머병은 통상적으로, 환자의 병력, 친척의 병력 및 행동 관찰을 기반으로 진단된다. 특징적인 신경학적 및 신경 심리학적 특징의 존재와 대체 조건의 부재는 지지적이다. 컴퓨터 단층 촬영 (CT) 또는 자기 공명 영상화 (MRI)와, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영 (SPECT) 또는 양전자 방출 단층 촬영 (PET)을 사용하는 고급 의료 영상화는 다른 뇌 병리학 또는 치매의 하위 유형을 배제하는데 도움을 주기 위해 사용될 수 있다. 더욱이, 전구기 (경도 인지 장애)로부터 알츠하이머병으로의 전환을 예측할 수 있다. 기억력 테스트를 포함한 지적 기능의 평가는 상기 질환의 상태를 추가로 명확히 규명할 수 있다. 의료 기관은 의사 진료를 위한 진단 프로세스를 용이하게 하고 표준화하기 위해 진단 기준을 만들었다. 진단은 뇌 물질이 이용가능할 때 매우 높은 정확도의 사후로 확증될 수 있으며 조직학적으로 검사될 수 있다.

[0030] 현재까지, 이러한 질환에 대한 증상 치료만이 존재하며, 모두 신경 전달 물질 장애를 상쇄시키려고 노력하고 있다. 3가지 콜린에스테라제 억제제가 현재 이용가능하며 경증 내지 중등도 AD 치료용으로 승인되었다. 중등도 내지 중증 AD에 이용할 수 있는 추가 치료 옵션은 N-메틸-D-아스파르테이트 수용체 비경쟁적 길항제인 메만틴이다. '질환-완화' 약물로서 지칭된, AD의 과정을 중지시키거나 또는 적어도 효과적으로 완화시킬 수 있는 치료법은 아직 광범위한 연구 중에 있다.

[0031] 이환된 환자를 치료하고 AD의 증상을 예방하거나, 지연시키거나, 하락을 늦추거나 또는 개선하기 위한 새로운 요법이 시급히 필요하다. 상기 질환의 발병이 5년 만큼 지연될 수 있다면, 이러한 질환의 전체 빈도는 거의

50% 만큼 감소될 것으로 추정되었다. 증상 치료는 인지 증진 또는 신경정신과 증상의 제어를 목적으로 하는 약물이며 전형적으로 신경 전달 물질 메카니즘을 통해 작동하며; 질환-완화 요법 또는 치료 (DMT)는 진행을 예방, 지연 또는 늦추고 AD의 근본적인 병리 생리학적 메카니즘을 표적으로 하는 작용제이다. 현재 AD 치료 개발 파이프라인에는 100종 초과 의 작용제가 있다 (*Cummings et al. 2017. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions 3: 367-384*).

[0032] 루이 소체 치매 (DLB)는 시간이 지남에 따라 악화되는 유형의 치매이다. 부가적인 증상은 주의력 변동, 시각적 환각, 움직임 둔화, 보행 장애, 및 경직을 포함할 수 있다. DLB는 알츠하이머병 및 혈관성 치매 이후의 치매의 가장 흔한 원인이다. 이는 전형적으로 50세 이후에 시작된다. 65세 이상 인구의 약 0.1%가 이환된다. 남성이 여성보다 더 흔하게 이환되는 것으로 보인다. 근본적인 메카니즘은 알파-시누클레인 단백질로 이루어진 뉴런에서 루이 소체의 형성을 포함한다. 다른 가능한 원인을 배제하기 위해 혈액 테스트와 의료 영상화를 실시하여, 증상을 기반으로 하여 진단을 의심할 수 있다. 현재 DLB에 대한 치유법은 없다. 치료는 지지적이며 상기 질환과 관련된 운동 및 심리적 증상의 일부를 완화하려고 시도한다. 아세틸콜린에스테라제 억제제, 예컨대 도네페질이 약간의 혜택을 제공할 수 있다. 일부 운동 문제는 레보도파로 개선될 수 있다. 검토를 위해 문헌 [*McKeith et al. 2017. Neurology 89: 88-100*]을 참조할 수 있다.

[0033] 다발-경색 치매 (MID) 및 혈관 인지 장애 (VCI)로도 공지된 혈관성 치매 (VaD)는 뇌의 혈액 공급 문제, 전형적으로 일련의 경미한 뇌졸중으로 인한 치매로, 단계적으로 발생하는 인지 기능 저하 악화를 초래한다. 상기 용어는 뇌졸중과 병변으로 인한 뇌 구조의 변화로 이어지는 뇌 혈관 질환과 위험 인자의 복잡한 상호작용으로 이루어지고 인지 상의 변화를 초래하는 증후군을 지칭한다. 뇌졸중과 인지 장애 사이의 시간적 관계가 진단을 내리는데 필요하다. 상이한 치매 증후군을 구별하는 것은 빈번하게 중복되는 임상적 특징과 관련 기저 병리로 인해 어려울 수 있다. 특히, 알츠하이머 치매는 종종 혈관성 치매와 함께 발생한다. 혈관성 치매 환자는 경도 인지 장애에서와 같이 급성 또는 아급성으로 진행성 인지 장애가 있으며, 여러 번의 뇌 혈관 사건 (뇌졸중) 후 단계적으로 진행된다. 검토를 위해, 문헌 [*Venkat et al. 2015. Exp Neurol 272: 97-108*]을 참조할 수 있다.

[0034] 전측두엽 치매 (FTD)는 전측두엽 변성의 임상 증상으로, 주로 전두엽 또는 측두엽을 포함하는 진행성 뉴런 손실과 70% 이상의 방추 뉴런의 전형적인 손실을 특징으로 하는 반면, 다른 뉴런 유형은 무손상인 채로 있다. FTD는 젊은이들에게서 발병하는 치매 증례의 20%를 차지한다. 징후와 증상은 전형적으로, 후기 성인에 나타나며, 보다 통상적으로 55세 내지 65세 사이에 나타나며 남성과 여성에게 거의 동일하게 침범한다. 통상의 징후 및 증상은 사회적 및 개인적 행동에 있어서의 유의한 변화, 무관심, 감정 둔화, 및 표현 및 수용 언어 모두의 결함을 포함한다. 현재 FTD에 대한 치유법은 없지만, 증상 완화에 도움이 되는 치료법이 있다. 검토를 위해, 문헌 [*Bott et al. 2014. Neurodegener Dis Manag 4(6): 439-454*]을 참조할 수 있다.

[0035] 펩티드 아드레노메둘린 (ADM)은 기타무라(Kitamura) 등의 문헌에서, 인간 크롬 친화성 세포종으로부터 단리된 52개 아미노산을 포함하는 새로운 혈압강하 펩티드로서 처음 기재되었다 (*Kitamura et al. 1993. Biochemical and Biophysical Research Communications 192 (2): 553-560*). 같은 해에, 185개의 아미노산을 포함하는 전구체 펩티드를 코딩하는 cDNA 및 이러한 전구체 펩티드의 완전한 아미노산 서열이 또한 기재되었다. 특히 N-말단에 21개 아미노산의 시그널 서열을 포함하는 전구체 펩티드가 "프리프로아드레노메둘린" (프리-프로ADM)으로서 지칭된다. 프리-프로ADM은 185개의 아미노산을 포함한다 (서열식별번호: 1). 성숙 ADM-NH₂는 서열식별번호: 4에 나타내어지고 ADM-Gly는 서열식별번호: 5에 나타내어진다.

[0036] 성숙한 아드레노메둘린 펩티드는 아미드화 펩티드 (ADM-NH₂)로, 52개의 아미노산을 포함하고 (서열식별번호: 4), 단백질 분해 절단에 의해 형성되는 프리-프로ADM의 아미노산 95 내지 146을 포함한다. 현재까지, 프리-프로ADM의 절단에서 형성된 펩티드 단편의 실질적으로 소수의 단편, 특히 생리학적으로 활성인 펩티드 아드레노메둘린 (ADM), 및 20개의 아미노산 (22-41) (서열식별번호: 2)에 이어 프리-프로ADM에서의 시그널 펩티드의 21개 아미노산을 포함하는 펩티드인 "PAMP" 만이 보다 정확하게 특징 규명되었다. 더욱이, ADM 및 PAMP 모두에 대해 생리학적으로 활성인 하위 단편이 발견되었고 보다 상세히 조사되었다. 1993년에 ADM를 발견하고 그 특징을 규명한 것이 집중적인 연구 활동과 많은 출판물을 촉발시켰고, 그 결과는 최근 다양한 리뷰 문헌에 요약되었으며, 본 발명의 설명의 맥락에서, 특히 문헌 [*Takahashi 2001. Peptides 22: 1691; Eto et al. 2001. Peptides 22: 1693-1711 and Hinson et al. 2000 Endocrine Reviews 21(2):138-167*]에 대한 참조가 이루어졌다.

[0037] 지금까지의 과학적 조사에서, 특히 ADM이 다기능 조절 펩티드로서 간주될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이는 글리신에 의해 연장된 불활성 형태로 부분적으로 순환계로 방출된다 (*Kitamura et al. 1998. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244(2): 551-555*). ADM에 특이적이고 아마도 마찬가지로 ADM의 효과를 조정하는 결합 단백질

(문헌 [*Pio et al. 2001. The Journal of Biological Chemistry 276(15): 12292-12300*])이 또한 있다.

- [0038] 현재까지의 조사에서 가장 중요한, ADM 뿐만 아니라 PAMP의 생리학적 효과는 혈압에 영향을 미치는 효과였다. 따라서, ADM은 효과적인 혈관확장제이다.
- [0039] 더욱이, 프리-프로ADM으로부터 형성된 상기 언급된 추가의 생리학적으로 활성인 펩티드 PAMP는, ADM과는 상이한 작용 메카니즘을 갖는 것으로 보일지라도 마찬가지로 혈압강하 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다 (*Eto et al. 2001. Peptides 22: 1693-1711; Hinson et al. 2000 Endocrine Reviews 21(2):138-167; Kuwasako et al. 1997. FEBS Lett 414(1): 105-110; Kuwasaki et al. 1999. Ann. Clin. Biochem. 36: 622-628; Tsuruda et al. 2001. Life Sci. 69(2): 239-245; Kangawa et al. EP 0 622 458*).
- [0040] 더욱이, 순환계 및 다른 생물학적 유체에서 측정될 수 있는 ADM의 농도는 건강한 대조군 사람에게서 발견되는 농도보다 유의하게 높은 수많은 병리학적 상태에 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 울혈성 심부전, 심근 경색, 신장 질환, 고혈압 장애, 당뇨병, 급성 쇼크 단계 및 패혈증 및 패혈성 쇼크 환자에서의 ADM 수준은 그 정도는 다르지만 유의하게 증가한다. PAMP 농도는 또한, 상기 병리학적 상태 중 일부에서 증가하지만, 혈장 수준은 ADM에 비해 감소한다 (*Eto et al. 2001. Peptides 22: 1693-1711*).
- [0041] 더욱이, 패혈증 또는 패혈성 쇼크에서 비정상적으로 높은 농도의 ADM이 관찰되는 것으로 공지되어 있다 (*Eto et al. 2001. Peptides 22: 1693-1711; Hirata et al. 1996. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81(4): 1449-1453; Ehlenz et al. 1997. Exp Clin Endocrinol Diabetes 105: 156-162; Tomoda et al. 2001. Peptides 22: 1783-1794; Ueda et al. 1999 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160: 132-136; Wang et al. 2001. Peptides 22: 1835-1840*). 연구결과는 패혈증 및 다른 중증 증후군, 예컨대, 예를 들어, SIRS 환자에서 질환의 과정의 전형적인 현상으로서 공지된 전형적인 혈액학적 변화와 관련이 있다. 아드레노메둘린은 패혈증 발생 동안 (*Wang, Shock 1998, 10(5):383-384; Wang et al. 1998. Archives of surgery 133(12): 1298-1304*) 및 수많은 급성 및 만성 질환에서 중추적인 역할을 한다 (*Parlapiano et al. 1999. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 3:53-61; Hinson et al. 2000 Endocrine Reviews 21(2):138-167*).
- [0042] ADM의 순환 수준을 측정하는 몇 가지 방법이 기재되었다: ADM의 동족 전구체 펩티드의 보다 안정적인 단편을 결합함으로써 ADM 직접 또는 간접적으로 측정한다. 최근에, 순환하는 성숙 ADM을 측정하는 검정을 설명하는 방법이 공개되었다 (*Weber et al. 2017. Journal of applied Laboratory Medicine, 2(2): 222-233*).
- [0043] ADM 전구체로부터 유래된 단편을 정량화하는 다른 방법, 예를 들어, MR-프로ADM (*Morgenthaler et al. 2005. Clin Chem 51(10):1823-9*), PAMP (*Washimine et al. 1994. Biochem Biophys Res Commun 202(2):1081-7*) 및 CT-프로ADM (*EP 2 111 552*)의 측정법이 기재된 바 있다. 완전 자동화 시스템 상에서 혈장에서의 MR-프로ADM을 측정하기 위한 상업적 균질 시간-분해 형광면역검정이 이용가능하다 (브람스 MR-프로ADM 크립터(BRAHMS MR-proADM KRYPTOR); 브람스 게엠베하(BRAHMS GmbH); 독일 헤니그스도르프) (*Caruhel et al. 2009. Clin Biochem 42(7-8):725-8*). 이러한 펩티드는 동일한 전구체로부터 화학량론적 비율로 생성되기 때문에, 그들의 혈장 수준은 어느 정도 상관관계가 있다.
- [0044] 치매 및 AD에서의 MR-프로ADM의 역할은 몇 가지 연구에서 조사되었다. AD 가능성이 있는 환자에서 측정된 MR-프로ADM의 혈장 수준은 노인의 인지적으로 정상인 건강한 대조군과 비교해서 증가하였다 (*Buerger et al. 2009. Biological Psychiatry 2009; 65:979-984*). MR-프로ADM 단독의 혈중 농도는 81%의 특이도에서 47%의 감도로 분류 정확도를 보였으며 MR-프로ADM과 또 다른 바이오마커인 CT-프로ET-1과의 비율은 AD의 검출을 위한 81%의 특이도에서 66%의 민감도를 나타냈다. 더욱이, MR-프로ADM의 혈장 농도는 치매 전 MCI로부터 임상 AD로의 진행에 있어 예측 가치가 있다 (*Buerger et al. 2010. J Clin Psychiatry 72(4): 556-563*). MR-프로ADM은 또한, 유병 치매가 없는 5000명 초과 개체의 인구-기반 코호트에서 측정되었으며, 이는 치매가 발생한 참가자에서 상승되는 것으로 나타났지만, 전통적인 위험 요인을 조정한 후 위험이 증가하지 않았다는 것을 나타낸다 (*Holm et al. 2017. Journal of Internal Medicine 282: 94-101*). 동맥경화증에 대한 중단적 연구에 참여한 환자에서는, MR-프로ADM 수준이 대뇌 심부 백질 병변 (DWML) 악성도 진행과 함께 유의하게 증가하였다 (*Kuriyama et al. 2017. Journal of Alzheimer's Disease 56: 1253-1262*). 더욱이, MR-프로ADM 수준과 인지 테스트 점수 사이에는 유의한 역 상관관계가 관찰되었다.
- [0045] 아드레노메둘린은 연령 일치 대조군과 비교할 때 AD 환자로부터의 전두엽 피질에서 증가하는 것으로 나타났다 (*Ferrero et al. 2017. Mol Neurobiol. doi: 10.1007/s12035-017-0700-6, E-Pub ahead of print*). 그러나, 치매 환자, 특히 알츠하이머병 환자에서의 혈장 ADM에 관해서는 공지된 것이 없다.

- [0046] 피질하 혈관성 치매의 모델은 총 경동맥에 양측으로 마이크로코일을 배치함으로써 마우스에서 재현되었다. 순환성 ADM을 과다발현하는 마우스를 사용하여, ADM의 효과를 뇌 관류, 뇌 혈관 구조, 산화 스트레스, 백질 변화, 인지 기능, 및 cAMP, 혈관 내피 성장 인자 및 염기성 섬유모세포 성장 인자의 뇌 수준에 대해 평가하였다. 이들 데이터는 ADM이 동맥형성 및 혈관형성을 촉진하고, 산화 스트레스를 억제하고, 백질 무결성을 보존하고, 만성 대뇌 관류 저하 후 인지 저하를 방지한다는 것을 나타낸다. 따라서, ADM은 피질하 혈관성 치매에 대처하기 위한 전략으로서 작용할 수 있다 (*Maki et al. 2011. Stroke 42:1122-1128*).
- [0047] 성숙 ADM의 수준이 나중에 치매, 특히 AD를 발병하는 건강한 환자에서 유의하게 감소한다는 것은 본 발명의 놀라운 발견이었다. 더욱이, 놀랍게도, 대상체가 치매, 특히 알츠하이머 치매를 앓는 경우, 성숙 ADM의 수준이 유의하게 감소하는 것으로 밝혀졌다. 아드레노메둘린, 특히 서열식별번호: 4에 따른 ADM-NH₂의 기준선 수준이 치매, 특히 알츠하이머 치매의 존재를 독립적으로 예측한다는 것을 본 실시예로부터 알 수 있다.
- [0048] 더욱이, 놀랍게도, ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 특정 마커 수준 비율 미만이면 대상체는 치매, 특히 AD로 진단되는 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 놀랍게도, ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 수준 비율이 특정 마커 수준 비율 임계치 미만이면 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖는 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 놀랍게도, 상기 마커 수준 비율이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매, 특히 AD가 있거나 또는 치매, 특히 AD에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이고, 여기서 상기 마커 비율의 수준이 상기 비율 임계치 초과로 증가하면 개입은 계속될 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0049] 대안적으로, 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준 및 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준은 수학적 공식 또는 알고리즘에 의해 조합될 것이며, 여기서 이러한 공식 또는 알고리즘의 결과는 치매를 진단하기 위해, 또는 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위해, 또는 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해, 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해 사용된다.
- [0050] 따라서, 본 발명의 놀라운 발견은 순환계 내에서의 성숙 ADM (서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂)의 수준이 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 감소한다는 것이다. 더욱이, 순환계 내에서의 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준은 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 증가한다. 성숙 ADM (서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂)은 혈관 무결성 및 혈관 내피의 기능에 대해 책임이 있는 호르몬인 것으로 공지되어 있다. 혈관 내피의 기능장애는 가장 무서운 인간 질환, 예컨대 말초 혈관 질환, 뇌졸중, 심장 질환, 당뇨병, 만성 신부전, 및 전이 및 치매의 광범위한 스펙트럼과 관련이 있는 것으로 추가로 공지되어 있다 (*Rajendran et al. 2013. Int. J. Biol. Sci. 9(19): 1057-1069*).
- [0051] 순환계 내에서의 높은 수준의 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)은 신체의 혈관 내피의 기능을 복구할 필요가 있고 혈관 무결성을 지원할 필요가 있는 것으로 보인다. 그러나, 낮은 수준의 성숙 ADM (서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂)은, 높은 수준의 프로-ADM에도 불구하고 ADM-Gly에서 성숙 ADM (서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂)으로의 전환이 방해되는 것 같다는 것을 나타낸다.
- [0052] 알츠하이머병 환자, MCI 환자 또는 AD가 발병할 대상체의 순환계 내에서의 MR-프로ADM 농도는 상승되는 것으로 공지되어 있다 (*Buerger et al. 2009. Biological Psychiatry 2009; 65:979-984; Buerger et al. 2010. J Clin Psychiatry 72(4): 556-563; Holm et al. 2017. Journal of Internal Medicine 282: 94-101*). 이것은 ADM 합성의 경로가 활성화되었음을 보여준다. 그러나, 생물학적으로 활성인 ADM의 농도에 관해서는 언급되지 않았다. 순환계 내에서의 활성 ADM (바이오-ADM)의 농도가 AD 환자 및 AD가 발병할 환자에서 놀랍도록 더 낮다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다 (실시예 6). 더욱이, 대뇌 미세 혈관의 손상이 알츠하이머병의 병리생리학에 기여하는 요인이라는 증거가 증가하고 있다 (*Iadecola 2013. The pathobiology of vascular dementia. Neuron 2013;80(4):844-866*). 조직학적 평가 및 알부민 샘플링 연구의 결과는 혈액-뇌 장벽 (BBB)의 증가된 투과성이 핵심 메카니즘일 가능성이 있다는 것을 보여준다 (*Benarroch 2007. Neurovascular unit dysfunction: a*

vascular component of Alzheimer disease? Neurology 68(20):1730-1732). 최근 연구에서는, 조기 AD 환자의 포괄적인 BBB 누출이 인지 저하와 연관이 있는 것으로 입증되었다 (*Nation et al. 2019. Nature Medicine <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-v>; van de Haar et al. 2016 Radiology 281(2): 527-535*). N-말단 항-ADM-항체는 아드레노메둘린을 안정화시키고 순환 활성 ADM의 증가를 유도하는 것으로 나타났다 (*Geven et al. 2018. Effects of humanized anti-adrenomedullin antibody Adrecizumab (HAM8101) on vascular barrier function and survival in rodent models of systemic inflammation and sepsis. Shock 50(6):648-654; Geven et al. 2018. Vascular effects of adrenomedullin and the anti-adrenomedullin antibody Adrecizumab in sepsis. Shock50(2):132-140*). 건강한 환자의 혈액 내에서의 바이오-ADM의 급격한 증가를 유도하는 효과는 실시예 7 및 도 8에 제시된다. 순환계 내에서의 ADM의 증가는 내피 세포에 유익한 효과를 초래하는데, 예를 들어 모세관 누출을 감소시킨다. 예를 들어, N-말단 항-ADM 항체 (HAM8101, 아드레시주맵)가 전신 염증 및 패혈증의 실험 모델에서 내피 장벽 기능을 증진시키는 것으로 나타났다 (*Geven et al. 2018. Effects of humanized anti-adrenomedullin antibody Adrecizumab (HAM8101) on vascular barrier function and survival in rodent models of systemic inflammation and sepsis. Shock 50(6):648-654*). 따라서, N-말단 ADM-결합제, 보다 구체적으로 N-말단 항-ADM 항체를 적용하여 치매 환자 또는 치매 발병 위험이 있는 환자, 특히 알츠하이머 치매 환자의 혈액 내에서의 바이오-ADM 농도를 증가시킬 수 있다.

[0053] 따라서, 요약하면, 신체의 혈관 내피의 기능을 복구할 필요가 있고 혈관 무결성을 지원할 필요가 있는 환자에서, 순환계 내에서의 낮은 수준의 ADM, 특히 생체-활성 ADM은, ADM의 프로세싱이 상기 환자에서 방해가 된다는 것을 나타낼 수 있다. 신체의 혈관 내피의 기능을 복구할 필요가 있고 혈관 무결성을 지원할 필요가 있는 환자는 대상체의 체액 샘플 중의 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준을 결정하거나 (여기서, 상기 성숙 ADM-NH₂의 수준은 본 발명의 방법에서 요약된 바와 같이 임계치 수준과 비교됨), 또는 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율일 수 있는 마커 비율을 결정함으로써 (여기서, 상기 마커 비율은 본 발명의 방법에서 요약된 바와 같이 임계치 비율과 비교됨) 특징 규명 및 확인될 수 있다.

[0054] 부가적으로 또는 대안적으로, 신체의 혈관 내피의 기능을 복구할 필요가 있고 혈관 무결성을 지원할 필요가 있는 환자는 포괄적인 BBB 누출 또는 BBB 붕괴가 있는 환자일 수 있다. 포괄적인 BBB 누출 또는 BBB 붕괴는 하기와 같이 결정될 수 있다: 뇌척수액 (CSF)/알부민 또는 이뮤노글로불린 G (IgG)의 혈청 비율의 측정 (*Akaishi et al. 2015. Neurology and Clinical Neuroscience 3: 94-100*) 또는 영상화 기술, 예를 들어 동적 감수성 조영 증강 자기 공명 영상화 (DSC-MRI) 또는 동적 조영 증강 MRI (DCE-MRI) (*Raja et al. 2018. Neuropharmacology 134: 259-271*).

[0055] 따라서, 인간 인지 기능장애의 진행을 예방 또는 치료하기 위해 또는 치매를 예방 또는 치료하기 위해 바이오-ADM의 수준을 증대시킬 필요가 있는 환자의 계층화 및 확인은 상기 기재된 바와 같은 방법 중 임의의 것에 의해 수행된다.

[0056] N-말단 항-ADM 항체를 투여하면 건강한 환자의 혈액 중의 바이오-ADM이 급격히 증가한다는 것이 실시예 7 및 도 8에 제시되어 있으며, 이는 누출되거나 손상된 혈액 뇌 장벽을 복구하는데 도움이 될 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, N-말단 항-ADM 항체의 투여가, 상기 기재된 바와 같이 확인되고/거나 계층화되는 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 도움이 된다는 것은 타당해 보인다.

[0057] 따라서, 성숙 ADM (서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂)의 감소된 수준을 갖고/거나 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 감소된 비율을 갖는 대상체에서 요법을 제공하는 것이 또 다른 목표이다. 상기 환자 군은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드로 치료할 수 있으며, 여기서 상기 항-ADM 항체 또는 항-ADM 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 하기 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 결합한다:

[0058] YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (서열식별번호: 21).

[0059] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 치료될 상기 대상체는 상기 언급된 기준에 부가하여, 경도 인지 장애의 징후

또는 치매의 징후를 나타낸다.

- [0060] 대상체에 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드를 투여하면, 대상체의 순환계 내에서의 성숙 ADM (서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂)의 농도를 증대시키므로, 치매가 있거나 또는 치매 위험이 있는 대상체의 상태를 개선시키는 것으로 공지되어 있다.
- [0061] 본 발명의 대상은
- [0062] a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- [0063] b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- [0064] c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- [0065] d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한
- [0066] 방법으로서,
- [0067] 여기서 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 대상체의 체액 샘플에서 결정되며, 여기서 상기 성숙 ADM-NH₂의 수준은 임계치 수준과 비교되고,
- [0068] 여기서
- [0069] a) 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- [0070] b) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- [0071] c) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이고/거나, 여기서 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 수준 임계치 초과로 증가하면 개입은 계속될 수 있다.
- [0072] 한 실시양태에서 본 발명의 대상은
- [0073] a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- [0074] b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- [0075] c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- [0076] d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한
- [0077] 방법으로서,
- [0078] 여기서 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율일 수 있는 마커 비율이 결정되며, 여기서 상기 마커 비율은 임계치 비율과 비교되고,
- [0079] 여기서
- [0080] a) ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 비율 임계치 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- [0081] b) ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 비율 임계치 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- [0082] c) 상기 마커 비율이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이고, 여기서 상기 마커 비율의 수준이 상기 비율 임계치 초

과로 증가하면 개입은 계속될 수 있다.

- [0083] 대안적으로, 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준 및 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준은 수학적 공식 또는 알고리즘에 의해 조합될 것이며, 여기서 이러한 공식 또는 알고리즘의 결과는 치매를 진단하기 위해, 또는 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위해, 또는 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해, 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해 사용된다.
- [0084] 본 발명의 한 실시양태에서 임의의 경우에, 하기 두 마커의 수준이 결정된다: 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준 및 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준. 두 마커 수준은 두 마커의 비율 (예를 들어, 성숙 ADM-NH₂와 프로-ADM 또는 그의 단편 사이의 비율 또는 프로ADM 또는 그의 단편과 성숙 ADM-NH₂ 사이의 비율), 또는 두 마커가 도입되는 수학적 공식 또는 두 마커가 도입되는 수학적 알고리즘일 수 있는 계산을 시행하는데 사용된다. 이러한 비율 또는 수학적 공식 또는 수학적 알고리즘의 성과는 미리 결정된 임계치 값과 비교되는 값일 수 있으며, 이어서 이러한 비교는 치매를 진단하기 위해, 또는 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위해, 또는 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해, 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해 사용된다.
- [0085] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서, 상기 프로-아드레노메둘린의 단편은 PAMP (서열식별번호: 2), MR-프로ADM (서열식별번호: 3), ADM-Gly (서열식별번호: 5) 및 CT-프로ADM (서열식별번호: 6)을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0086] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 임계치 수준은 15 pg/ml 이하, 바람직하게는 10 pg/ml 이하, 바람직하게는 5 pg/mL 이하이다.
- [0087] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서, 마커 수준 비율 임계치는 0.2 내지 0.75, 바람직하게는 0.3 내지 0.6, 바람직하게는 0.4 내지 0.5의 범위 내이다.
- [0088] 비율의 계산을 위해, 두 마커의 농도는 바람직하게는 동일한 단위 (예를 들어 pmol/L)로 표현되어야 한다.
- [0089] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서, 체액 샘플은 경도 인지 장애 (MCI), 알츠하이머병, 혈관성 치매, 혼합 알츠하이머병 및 혈관성 치매, 루이 소체 치매, 전측두엽 치매, 국소 치매 (예컨대 진행성 실어증), 피질하 치매 (예컨대 파킨슨병 치매), 및 치매 증후군의 이차 원인 (예컨대 두개내 병변)이 있는 환자의 군으로부터 선택된다.
- [0090] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서 체액 샘플은 샘플 채취 당시에 치매 또는 MCI 진단을 받은 적이 없는 대상체로부터 채취된다.
- [0091] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서, 적어도 하나의 부가적인 임상 파라미터는 연령, 인종, 정신 상태 테스트 (예를 들어, 미니-정신 상태 검사 (MMSE)), 신경영상화 (CT, MRT, PET, SPECT), 가족력, ApoE4 유전자형, 아밀로이드β 1-42 (Aβ₁₋₄₂), 아밀로이드β 1-40 (Aβ₁₋₄₀), 총 타우-단백질, 인산화된 타우-단백질 (p-타우 181, p-타우 199, p-타우 231)을 포함하는 군으로부터 선택 결정된다.
- [0092] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서, 상기 마커의 수준은 면역검정에 의해 결정된다.
- [0093] 본 발명의 대상의 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위하여 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드를 이용한 치료를 위한 환자를 선택하기 위한 환자 계층화에 사용되며, 여기서 상기 항-ADM 항체 또는 항-ADM 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 하기 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 결합한다:
- [0094] YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (서열식별번호: 21).
- [0095] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 상기 항-ADM 항체 또는 항-ADM 단편 또는

항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 하기 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 결합한다:

- [0096] YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (서열식별번호: 21).
- [0097] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 상기 대상체는 임계치 수준 미만의, 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준을 갖고/거나 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율인 마커 비율을 가지며, 여기서 상기 마커 수준 비율은 비율 임계치 미만이다.
- [0098] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 상기 프로-아드레노메둘린의 단편은 PAMP (서열식별번호: 2), MR-프로ADM (서열식별번호: 3), ADM-Gly (서열식별번호: 5) 및 CT-프로ADM (서열식별번호: 6)을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0099] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 상기 대상체는 상기 설명된 바와 같은 방법에 의해 선택된다.
- [0100] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 임계치 수준은 15 pg/ml 이하, 바람직하게는 10 pg/ml 이하, 바람직하게는 5 pg/ml 이하이다.
- [0101] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 마커 수준 비율은 0.2 내지 0.75, 바람직하게는 0.3 내지 0.6, 바람직하게는 0.4 내지 0.5의 범위 내이다.
- [0102] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 상기 대상체는 상기 설명된 바와 같은 방법에 따라 선택되고, 체액 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 뇌척수액 (CSF), 및 타액의 군으로부터 선택된다.
- [0103] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 적어도 하나의 추가적인 임상 파라미터는 연령, 인종, 정신 상태 테스트 (예를 들어, 미니-정신 상태 검사 (MMSE)), 신경영상화 (CT, MRT, PET, SPECT), 가족력, ApoE4 유전자형, 아밀로이드β 1-42 (Aβ₁₋₄₂), 아밀로이드β 1-40 (Aβ₁₋₄₀), 총 타우-단백질, 인산화된 타우-단백질 (p-타우 181, p-타우 199, p-타우 231)을 포함하는 군으로부터 선택 결정된다.
- [0104] 본 발명의 대상은 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이며, 여기서 상기 마커의 수준은 면역검정에 의해 결정된다.
- [0105] 성숙 ADM, 바이오-ADM 및 ADM-NH₂는 본 출원 전반에 걸쳐 동의어로 사용되며 서열식별번호: 4에 따른 분자이다.
- [0106] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "PAMP"는 순환 형태의 PAMP, 즉 생물학적으로 불활성인 C-말단적으로 글리신-연장된 PAMP (PAMP-Gly) 및 생물학적으로 활성인 C-말단적으로 아미드화된 PAMP (PAMP-아미드)를 둘 다 포함한다.
- [0107] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 적어도 5개의 아미노산을 갖는 상기 프로ADM 및/또는 그의 단편 및 성숙 ADM은 하기를 포함하는 군으로부터 선택된다:
- [0108] 서열식별번호: 1 (프리-프로-아드레노메둘린 (프리-프로ADM)): 아미노산 1-185
 MKLVSVALMYLGLSLAFLGADTARLDVASEFRKKWKNWALSRGKRELRMSSSYPTG
 LADVKAGPAQTLIRPQDMKGASRSPEDSSPDAARIRVKRYRQSMNMFQGLRSFGCRF
 GTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGYGRRRRRSLPEAGPRTLVS SPKQ
 AHGAPAPPSGSAPHFL
- [0109]

- [0110] 서열식별번호: 2 (프로아드레노메둘린 N-20 말단 펩티드, PAMP): 프로프로ADM의 아미노산 22 - 41
- [0111] ARLDVASEF RKKWKNKALS R
- [0112] 서열식별번호: 3 (중간 영역 프로아드레노메둘린, MR-프로ADM): 프로프로ADM의 아미노산 45 - 92
- [0113] ELRMSS SYPTGLADVK AGPAQLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RV
- [0114] 서열식별번호: 4 (성숙한 아드레노메둘린 (성숙 ADM); 아미드화 ADM; 바이오-ADM; hADM): 아미노산 95 - 146 -CONH₂
- [0115] YRQSMN NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGY - CONH₂
- [0116] 서열식별번호: 5 (아드레노메둘린 1-52-Gly (ADM 1-52-Gly)): 프로프로ADM의 아미노산 95 - 147
- [0117] YRQSMN NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGYG
- [0118] 서열식별번호: 6 (C-말단 프로아드레노메둘린, CT-프로ADM): 프로프로ADM의 아미노산 148 - 185
- [0119] RRR RRSLEAGPG RTLVSCKPQA HGAPAPPSGS APHFL
- [0120] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 대상체의 체액에서의 성숙 ADM-NH₂ (서열식별번호: 4) 면역반응성의 수준은 임계치 미만이다.
- [0121] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 대상체의 체액에서의 PAMP (서열식별번호: 2) 면역반응성의 수준 또는 MR-프로ADM (서열식별번호: 3) 면역반응성의 수준 또는 CT-프로ADM (서열식별번호: 6) 면역반응성의 수준 또는 ADM 1-52-Gly (서열식별번호: 5) 면역반응성의 수준은 임계치 초과이다.
- [0122] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 대상체의 체액에서의 성숙 ADM-NH₂ (서열식별번호: 4) 면역반응성의 수준과 MR-프로ADM (서열식별번호: 3) 면역반응성의 수준의 비율은 임계치 미만이다.
- [0123] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 성숙 ADM-NH₂의 수준은 하기 군으로부터 선택된 적어도 하나의 결합제를 사용함으로써 결정된다: 성숙 ADM-NH₂ (서열식별번호: 4)의 그 다음 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 결합제 및 성숙 ADM-NH₂ (서열식별번호: 4)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 제2 결합제.
- [0124] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 프로ADM 및/또는 그의 단편의 수준은 하기 군으로부터 선택된 적어도 하나의 결합제를 사용함으로써 결정된다: MR-프로ADM (서열식별번호: 3)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 결합제 및 MR-프로ADM (서열식별번호: 3)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 제2 결합제.
- [0125] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 프로ADM 및/또는 그의 단편의 수준은 하기 군으로부터 선택된 적어도 하나의 결합제를 사용함으로써 결정된다: CT-프로ADM (서열식별번호: 6)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 결합제 및 CT-프로ADM (서열식별번호: 6)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 제2 결합제.
- [0126] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 프로ADM 및/또는 그의 단편의 수준은 하기 군으로부터 선택된 적어도 하나의 결합제를 사용함으로써 결정된다: PAMP (서열식별번호: 2)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 결합제 및 PAMP (서열식별번호: 2)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 제2 결합제.
- [0127] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 프로ADM 및/또는 그의 단편의 수준은 하기 군으로부터 선택된 적어도 하나의 결합제를 사용함으로써 결정된다: ADM 1-52-Gly (서열식별번호: 5)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 결합제 및 ADM 1-52-Gly (서열식별번호: 5)의 서열 내에 포함된 영역에 결합하는 제2 결합제.
- [0128] 본 발명의 대상은 결합제가 적어도 5개 아미노산의 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 비-Ig-스캐폴드를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, 본 발명에 따른 방법이다.
- [0129] 본 출원의 또 다른 실시양태는 진술한 실시양태에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 상기 체액은 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 뇌척수액 (CSF), 및 타액을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 보다 구체적 실시양태에서, 상기 체액은 혈액 샘플이다. 혈액 샘플은 전혈, 혈청 및 혈장을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 샘플은 인간 시트레이트 혈장, 헤파린 혈장 및 EDTA 혈장을 포함하는 군으로부터 선택된다.

- [0130] 본 발명의 대상은 적어도 5개 아미노산의 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 결정이 1명의 환자에서 2회 이상 수행되는 것인, 본 발명에 따른 방법이다.
- [0131] 본 발명의 대상은 상기 모니터링이, 취해진 예방적 및/또는 치료적 조치에 대한 상기 대상체의 반응을 평가하기 위해 수행되는 것인, 본 발명에 따른 방법이다.
- [0132] 본 발명의 대상은 본 발명에 따른 방법으로서, 여기서 상기 방법은 상기 대상체를 위험 군으로 계층화하기 위해 사용된다.
- [0133] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "위험"은 바람직하지 않은 사건 또는 영향 (예를 들어 질환)을 겪을 개연성에 관한 것이다.
- [0134] 본 출원의 또 다른 실시양태는 성숙 ADM-NH₂의 수준의 감소가 치매에 걸릴 증대된 위험을 예측하는 것인, 전술한 실시양태에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0135] 본 출원의 또 다른 실시양태는 성숙 ADM-NH₂와, MR-프로ADM, CT-프로ADM, ADM-Gly 및/또는 PAMP를 포함하는 군으로부터 선택된 프로ADM 또는 그의 단편 사이의 비율의 감소가 치매에 걸릴 증대된 위험을 예측하는 것인, 전술한 실시양태에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0136] 본 발명의 대상은 또한 전술한 단락 중 임의의 것에서 정의된 바와 같이 치매에 걸릴 위험을 결정하는 방법이며, 여기서 상기 방법은 상기 대상체를 아래에 추가로 정의된 바와 같이 위험 군으로 계층화하기 위해 수행된다. 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 방법은 대상체를 위험 군, 예를 들어 치매 장애에 걸릴 위험이 낮은 군, 위험이 중간인 군, 또는 위험이 높은 군으로 계층화하기 위해 사용된다. 치매에 걸릴 위험이 낮다는 것은 성숙 ADM-NH₂의 값이 치매에 걸리지 않은 건강한 대상체에서의 미리 결정된 값과 비교해서 실질적으로 감소하지 않는다는 것을 의미한다. 성숙 ADM-NH₂의 수준이 치매 장애에 걸리지 않은 건강한 대상체에서의 미리 결정된 값과 비교해서 감소할 때, 중간 위험이 존재하고, 성숙 ADM-NH₂의 수준이 기준선 측정에서 유의하게 감소하고 후속 분석에서 계속 감소할 때, 높은 위험이 존재한다.
- [0137] 치매의 위험은 특정 기간 내에 치매 장애에 걸릴 위험을 의미한다. 구체적 실시양태에서 상기 기간은 10년 이내, 또는 7년 이내, 또는 5년 이내 또는 2.5년 이내이다.
- [0138] 용어 "증대된 수준"은 특정 임계치 수준 초과를 의미한다.
- [0139] 용어 "감소된 수준"은 특정 임계치 수준 미만을 의미한다.
- [0140] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 성숙 ADM-NH₂의 수준을 결정하기 위한 검정이 사용되며, 여기서 상기 검정의 검정 감도는 < 15 pg/ml, 바람직하게는 < 10 pg/ml, 보다 바람직하게는 < 5 pg/ml이다.
- [0141] 본 발명의 구체적 실시양태에서, MR-프로ADM의 수준을 결정하기 위한 검정이 사용되며, 여기서 상기 검정의 검정 감도는 건강한 대상체의 MR-프로ADM을 정량화할 수 있고 < 0.5 nmol/L, 바람직하게는 < 0.4 nmol/L 및 보다 바람직하게는 < 0.2 nmol/L이다.
- [0142] 본 발명의 구체적 실시양태에서, CT-프로ADM의 수준을 결정하기 위한 검정이 사용되며, 여기서 상기 검정의 검정 감도는 건강한 대상체의 CT-프로ADM을 정량화할 수 있고 < 100 pmol/L, 바람직하게는 < 75 pmol/L 및 보다 바람직하게는 < 50 pmol/L이다.
- [0143] 본 출원의 또 다른 실시양태는 전술한 실시양태에 따른 방법에 관한 것이며, 여기서 PAMP-아미드의 수준을 결정하기 위한 검정이 사용되며, 여기서 상기 검정의 검정 감도는 건강한 대상체의 PAMP-아미드를 정량화할 수 있고 < 0.3 pmol/L, 바람직하게는 < 0.2 pmol/L 및 보다 바람직하게는 < 0.1 pmol/L이다.
- [0144] 본 출원의 또 다른 실시양태는 전술한 실시양태에 따른 방법에 관한 것이며, 여기서 PAMP-글리신의 수준을 결정하기 위한 검정이 사용되며, 여기서 상기 검정의 검정 감도는 건강한 대상체의 PAMP-글리신을 정량화할 수 있고 < 0.5 pmol/L, 바람직하게는 < 0.25 pmol/L 및 보다 바람직하게는 < 0.1 pmol/L이다.
- [0145] 본 출원의 또 다른 실시양태는 전술한 실시양태에 따른 방법에 관한 것이며, 여기서 ADM-Gly의 수준을 결정하기 위한 검정이 사용되며, 여기서 상기 검정의 검정 감도는 건강한 대상체의 ADM-Gly를 정량화할 수 있고 60 pmol/L, 바람직하게는 10 pmol/L 및 보다 바람직하게는 2 pmol/L이다.

- [0146] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 결합체는 성숙 ADM-NH₂ 또는 프로ADM 및/또는 그의 단편에 대해 적어도 10⁷ M⁻¹, 바람직하게는 10⁸ M⁻¹의 결합 친화도를 나타내며, 바람직한 친화도는 10⁹ M⁻¹ 초과이고, 가장 바람직하게는 10¹⁰ M⁻¹ 초과이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 더 높은 용량의 화합물을 적용함으로써 더 낮은 친화도를 보상하는 것으로 간주될 수 있고 이러한 측정이 본 발명의 범위를 벗어나지 않을 것이라는 것을 알고 있다.
- [0147] 아드레노메둘린에 대한 항체의 친화도를 결정하기 위해, 비아코어(Biacore) 2000 시스템 (지이 헬스케어 유럽 게엠베하(GE Healthcare Europe GmbH; 독일 프라이부르크))을 사용하여 표지 없는 표면 플라즈몬 공명에 의해, 고정화 항체에 대한 아드레노메둘린의 결합 역학을 결정하였다. 제조업체의 지침에 따라 CM5 센서 표면에 고 밀도로 공유 커플링된 항-마우스 Fc 항체를 사용하여 항체의 가역적 고정화를 수행하였다 (마우스 항체 포획 키트; 지이 헬스케어) (*Lorenz et al. 2011. Antimicrob Agents Chemother. 55 (1): 165-173*).
- [0148] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 결합체는 성숙 ADM-NH₂ 또는 프로ADM 및/또는 그의 단편에 결합하는 항체 또는 항체 단편 또는 비-Ig 스캐폴드를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0149] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 성숙 ADM-NH₂ 및/또는 적어도 5개 아미노산을 갖는 프로ADM 또는 그의 단편의 수준을 결정하기 위한 검정이 사용되며, 여기서 이러한 검정은 샌드위치 검정, 바람직하게는 완전 자동화 검정이다.
- [0150] 본 발명의 한 실시양태에서 완전 자동화 검정 시스템의 요구 없이 환자 근처에서 1시간 미만 내에 테스트를 수행할 수 있게 하는 테스트 기술인 소위 POC-테스트 (현장 진료)일 수 있다. 이러한 기술의 한 가지 예는 이뮤노크로마토그래피 테스트 기술이다.
- [0151] 본 발명의 한 실시양태에서 이러한 검정은 효소 표지, 화학발광 표지, 전기화학발광 표지, 바람직하게는 완전 자동화 검정을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 종류의 검출 기술을 사용하는 샌드위치 면역검정이다. 본 발명의 한 실시양태에서 이러한 검정은 효소 표지된 샌드위치 검정이다. 자동화 또는 완전 자동화 검정의 예는 하기 시스템 중 하나에 사용될 수 있는 검정을 포함한다: 로슈 엘렉시스(Roche Elecsys)®, 애보트 아키텍트(Abbott Architect)®, 지멘스 센타우어(Siemens Centaur)®, 브람스 크립터(Brahms Kryptor)®, 바이오메리룩스비다스(BiomerieuxVidas)®, 알레르 트리아지(Alere Triage)®, 오르토 클리니칼 디아그노스틱스 비트로스(Ortho Clinical Diagnostics Vitros)®.
- [0152] 다양한 면역검정이 공지되어 있으며 본 발명의 검정 및 방법에 사용될 수 있고, 이들은 하기를 포함한다: 방사성면역검정 ("RIA"), 동종 효소-배가 면역검정 ("EMIT"), 효소 결합 면역흡착 검정 ("ELISA"), 아포엔자임 재 활성화 면역검정 ("ARIS"), 덩스틱 면역검정 및 이뮤노-크로마토그래피 검정.
- [0153] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 상기 2종의 결합체 중 적어도 하나는 검출되기 위해 표지된다.
- [0154] 바람직한 검출 방법은 다양한 포맷의 면역검정, 예컨대 예를 들어, 방사성면역검정 (RIA), 화학발광- 및 형광-면역검정, 효소-결합 면역검정 (ELISA), 루미넥스(Luminex)-기반 비드 어레이, 단백질 마이크로어레이 검정 및 신속한 테스트 포맷, 예컨대 예를 들어, 이뮤노크로마토그래피 스트립 테스트를 포함한다.
- [0155] 바람직한 실시양태에서, 상기 표지는 화학발광 표지, 효소 표지, 형광 표지, 방사성 아이오딘 표지를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0156] 검정은 동종 또는 이종 검정, 경쟁적 및 비-경쟁적 검정일 수 있다. 한 실시양태에서, 검정은 비-경쟁적 면역검정인 샌드위치 검정의 형태이며, 여기서 검출 및/또는 정량화될 분자는 제1 항체 및 제2 항체에 결합된다. 제1 항체는 고체 상, 예를 들어, 비드, 웰 또는 다른 용기의 표면, 칩 또는 스트립에 결합될 수 있고, 제2 항체는, 예를 들어, 염료, 방사성 동위원소, 또는 반응성이거나 촉매적으로 활성인 모이어티로 표지되는 항체이다. 이어서, 분석물에 결합된 표지된 항체의 양은 적절한 방법에 의해 측정된다. "샌드위치 검정"과 관련된 일반적인 조성 및 절차는 널리 확립되어 있고 통상의 기술자에게 공지되어 있다 (*The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3rd ed. (May 2005); Hultschig et al. 2006. Curr Opin Chem Biol. 10 (1):4-10*).
- [0157] 또 다른 실시양태에서, 상기 검정은 2개의 포획 분자, 바람직하게는 둘 다 액체 반응 혼합물에 분산액으로서 존재하는 항체를 포함하며, 여기서 제1 표지화 성분은 제1 포획 분자에 부착되고, 상기 제1 표지화 성분은 형광- 또는 화학발광-센칭 또는 증폭에 기반한 표지화 시스템의 일부이고, 상기 마킹 시스템의 제2 표지화 성분은 제2

포획 분자에 부착되어, 두 포획 분자가 분석물에 결합할 때, 샘플을 포함하는 용액 중의 상기 형성된 샌드위치 복합체의 검출을 허용하는 측정가능한 시그널이 생성된다.

- [0158] 또 다른 실시양태에서, 상기 표지화 시스템은 형광 염료 또는 화학발광 염료, 특히 시아닌 유형의 염료와 조합되는 희토류 크립테이트 또는 희토류 킬레이트를 포함한다.
- [0159] 본 발명의 맥락에서, 형광 기반 검정은, 예를 들어, FAM (5- 또는 6-카르복시플루오레세인), VIC, NED, 플루오레세인, 플루오레세인이소티오시아네이트 (FITC), IRD-700/800, 시아닌 염료, 예컨대 CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, 크산텐, 6-카르복시-2',4',7',4,7-헥사클로로플루오레세인 (HEX), TET, 6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메토디플루오레세인 (JOE), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민 (TAMRA), 6-카르복시-X-로다민 (ROX), 5-카르복시로다민-6G (R6G5), 6-카르복시로다민-6G (RG6), 로다민, 로다민 그린, 로다민 레드, 로다민 110, BODIPY 염료, 예컨대 BODIPY TMR, 오레곤 그린, 쿠마린, 예컨대 움벨리페론, 벤즈이미드, 예컨대 퀵스트 (Hoechst) 33258; 페난트리딘, 예컨대 텍사스 레드, 야키마 옐로우(Yakima Yellow), 알렉사 플루오르, PET, 에티디움브로마이드, 아크리디늄 염료, 카르바졸 염료, 페녹사진 염료, 포르피린 염료, 폴리메틴 염료 등을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있는 염료의 사용을 포함한다.
- [0160] 본 발명의 맥락에서, 화학발광 기반 검정은 하기 문헌에서 화학발광 물질에 대해 기재된 물리적 원리에 기반한 염료의 사용을 포함한다 (*Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4th ed. 1993, John Wiley & Sons, Vol. 15: 518-562; 본원에 참조로 포함됨; pages 551-562 상의 인용을 포함함*). 바람직한 화학발광 염료는 아크리디늄 에스테르이다.
- [0161] 본원에 언급된 바와 같이, "검정" 또는 "진단 검정"은 진단 분야에 적용되는 임의의 유형일 수 있다. 이러한 검정은 특정 친화성을 가진 하나 이상의 포획 프로브에 대한 검출될 분석물의 결합을 기반으로 할 수 있다. 포획 분자와 표적 분자 또는 관심 분자 사이의 상호작용과 관련하여, 친화성 상수는 바람직하게는 10^8 M^{-1} 초과이다.
- [0162] 본 발명의 맥락에서, "결합제 분자"는 샘플로부터의 표적 분자 또는 관심 분자, 즉 분석물 (즉, 본 발명의 맥락에서 ADM-NH₂ 및/또는 프로ADM 및 그의 단편)에 결합하는데 사용될 수 있는 분자이다. 따라서, 결합제 분자는 표적 분자 또는 관심 분자와 특이적으로 결합하기 위해, 공간적으로 및 표면 특징, 예컨대 표면 전하, 소수성, 친수성, 루이스 공여체 및/또는 수용체의 존재 또는 부재의 관점에서 적절하게 성형되어야 한다. 이로써, 결합은, 예를 들어 이온성, 반데르발스, 파이-파이, 시그마-파이, 소수성 또는 수소 결합 상호작용, 또는 포획 분자와 표적 분자 또는 관심 분자 사이의 전술한 상호작용 중 둘 이상의 조합에 의해 매개될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 결합제 분자는, 예를 들어 핵산 분자, 탄수화물 분자, PNA 분자, 단백질, 항체, 펩티드 또는 당단백질을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 결합제 분자는 표적 또는 관심 분자에 대한 충분한 친화성을 갖는 그의 단편을 포함하고, 재조합 항체 또는 재조합 항체 단편 뿐만 아니라 그의 적어도 12개 아미노산의 길이를 갖는 가변 쇄로부터 유래된 상기 항체 또는 단편의 화학적으로 및/또는 생화학적으로 변형된 유도체를 포함한 항체이다.
- [0163] 화학발광 표지는 아크리디늄 에스테르 표지, 이소루미놀 표지를 수반하는 스테로이드 표지 등일 수 있다.
- [0164] 효소 표지는 락테이트 탈하이드로게나제 (LDH), 크레아틴 키나제 (CPK), 알칼리성 포스파타제, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 산 포스파타제, 글루코스-6-포스페이트 탈하이드로게나제 등일 수 있다.
- [0165] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 2종의 결합제 중 적어도 하나가 자성 입자 및 폴리스티렌 표면으로서 고체에 결합된다.
- [0166] 본 발명의 구체적 실시양태에서 상기 2종의 결합제 중 적어도 하나가 고체 상에 결합된다.
- [0167] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율의 임계치는 0.2 내지 0.75, 바람직하게는 0.3 내지 0.6, 바람직하게는 0.4 내지 0.5의 범위 내에 있다.
- [0168] 본 발명의 ADM-NH₂ 수준 또는 프로ADM 수준 또는 그의 단편은 각각, 본 실시예에 요약된 바와 같이, 상기 기재된 ADM-NH₂ 검정 (또는 프로ADM 또는 그의 단편 검정 각각)을 사용하여 결정되었다. 상기 언급된 임계치 값이 본 발명에 사용된 검정 시스템과 상이하게 보정된 경우에는, 이들 값이 다른 검정에서 상이할 수도 있다. 따라

서, 상기 언급된 컷오프 값은 보정에 있어서의 차이를 고려하여, 이러한 상이하게 보정된 검정에 적용되어야 한다. 보정에 있어서의 차이를 정량화할 수 있는 한 가지 가능성은 두 가지 방법을 모두 사용하여 샘플 중의 각각의 바이오마커 (예를 들어 바이오-ADM)를 측정함으로써 본 발명에 사용된 각각의 바이오마커 검정과 해당 검정을 비교 분석 (상관관계)하는 방법이다. 또 다른 가능성은 이러한 테스트가 충분한 분석 감도, 대표적인 정상 모집단의 중앙값 바이오마커 수준을 갖고 있다는 것을 고려하여 해당 검정을 이용하여 결정하고, 결과를 문헌에 기재된 바와 같은 중앙값 바이오마커 수준과 비교하며, 이러한 비교에 의해 수득된 차이를 기반으로 하여 보정을 다시 계산하는 것이다. 본 발명에 사용된 보정을 이용하여, 정상 (건강한) 대상체로부터의 샘플을 측정하였다: 중앙값 혈장 바이오-ADM (성숙 ADM-NH₂)은 13.7 pg/ml (사분위수 범위 [IQR] 9.6 - 18.7 pg/mL)이다 (Weber et al. 2017. *JALM*, 2(2): 222-233).

- [0169] 정상 (건강한) 대상체에서의 혈장 중앙값 MR-프로ADM 농도는 문헌 (Caruhel et al. 2009. *Clin Biochem* 42:725-8)에 기재된 바와 같이 MR-프로ADM의 검출을 위한 자동화 샌드위치 형광 검정을 사용하여 0.41 (사분위 범위 0.23 - 0.64) nmol/L였다 (Smith et al. 2009. *Clin Chem* 55:1593-1595).
- [0170] 정상적인 건강한 대상체 (n=200)에서의 CT-프로ADM의 혈장 중앙값 농도는 77.6 pmol/L (min 46.6 pmol/L, max 136.2 pmol/L)였고, 95% 백분위수는 113.8 pmol/L였다 (EP 2 111 552 B1).
- [0171] 정상적인 건강한 대상체 (n=51)에서의 PAMP-아미드의 혈장 농도는 0.51 ± 0.19 pmol/L (평균 ± SD)였다 (Hashida et al. 2004. *Clin Biochem* 37: 14-21).
- [0172] 정상적인 건강한 대상체 (n=51)에서의 PAMP-글리신의 혈장 농도는 1.15 ± 0.38 pmol/L (평균 ± SD)였다 (Hashida et al. 2004. *Clin Biochem* 37: 14-21).
- [0173] 한 실시양태에서 임계치는 하기와 같이 미리 결정될 수 있다:
- [0174] ● 상기 대상체로부터 수득된 체액 내의 마커의 농도를, 상기 대상체와 거의 동등한 기준선 조건을 갖는 무작위로 선택된 대상체 집단에서 미리 결정된 샘플의 양성분로부터 수득된 체액 내의 마커의 중앙값과 비교하고,
- [0175] ● 상기 대상체로부터 수득된 체액 내의 마커의 농도를, 상기 대상체와 거의 동등한 기준선 조건을 갖는 대상체 집단에서 미리 결정된 샘플의 양성분로부터 수득된 체액 내의 마커 및/또는 그의 단편의 수준의 분위수와 비교하며,
- [0176] ● 콕스(Cox) 비례 위험 분석을 기반으로 하거나 또는 위험 지수 계산, 예컨대 NRI (순 재분류 지수) 또는 IDI (통합 차별 지수)를 사용함으로써 계산한다.
- [0177] 또한, 적어도 하나의 임상 파라미터 또는 바이오마커는 연령, 인종, 정신 상태 테스트 (예를 들어, 미니-정신 상태 검사 (MMSE)), 신경영상화 (CT, MRT, PET, SPECT), 가족력, ApoE4 유전자형, 아밀로이드β 1-42 (Aβ₁₋₄₂), 아밀로이드β 1-40 (Aβ₁₋₄₀), 총 타우-단백질, 인산화된 타우-단백질 (p-타우 181, p-타우 199, p-타우 231)을 포함하는 군으로부터 선택 결정될 수 있다.
- [0178] 본 발명의 맥락에서 용어 "치매"는 알츠하이머병, 혈관성 치매, 혼합 알츠하이머병 및 혈관성 치매, 루이 소체 치매, 전측두엽 치매, 국소 치매 (예컨대 진행성 실어증), 피질하 치매 (예컨대 파킨슨병 치매), 및 치매 증후군의 이차 원인 (예컨대 두개내 병변)을 포함한다.
- [0179] 본 발명의 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 치매는 알츠하이머병, 혈관성 치매 및 혼합 알츠하이머병 및 혈관성 치매의 군으로부터 선택된다.
- [0180] 가장 바람직한 상기 치매는 알츠하이머병이다.
- [0181] 본 발명의 또 다른 대상은 치매의 예방 또는 치료에 사용하기 위한, 본원에 개시된 본 발명의 결합체를 포함하는, 구체적으로 항-ADM 항체 또는 항-ADM 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드를 포함하는 제약 조성물이다.
- [0182] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 용액, 바람직하게는 즉시 사용가능한 용액이다.
- [0183] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 용액, 바람직하게는 7.4의 pH 하의 PBS를 포함하는 즉시 사용가능한 용액이다.
- [0184] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 사용 전에 재구성되어야 하는 건조 상태에 있다.
- [0185] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 사용 전에 재구성되어야 하는 동결 건조된 상태에 있다.

- [0186] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 치매의 예방 및/또는 치료에 사용되는 상기 제약 조성물은 경구로, 피부 표면으로, 피하로, 피내로, 설하로, 근육내로, 동맥내로, 뇌내로, 뇌실내로, 척수강내로, 정맥내로, 또는 복강내 투여를 통해 투여된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 정맥내로 투여된다. 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 중추 신경계 (CNS)를 통해, 예를 들어 뇌내로, 뇌실내로 및 척수강내로 투여된다.
- [0187] 본 발명에 따른 항체는 항원과 특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린 유전자에 의해 실질적으로 코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함한 단백질이다. 인식되는 이뮤노글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파 (IgA), 감마 (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), 델타 (IgD), 엡실론 (IgE) 및 뮤 (IgM) 불변 영역 유전자 뿐만 아니라 무수한 이뮤노글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 완전한 길이의 이뮤노글로불린 경쇄는 일반적으로 약 25 Kd 또는 214 개 아미노산 길이이다. 완전한 길이의 이뮤노글로불린 중쇄는 일반적으로 약 50 Kd 또는 446개 아미노산 길이이다. 경쇄는 NH₂-말단에서의 가변 영역 유전자 (약 110개 아미노산 길이)와 COOH-말단에서의 카파 또는 람다 불변 영역 유전자에 의해 코딩된다. 중쇄는 가변 영역 유전자 (약 116개 아미노산 길이)와 다른 불변 영역 유전자 중 하나에 의해 유사하게 코딩된다.
- [0188] 항체의 기본 구조 단위는 일반적으로, 2개의 동일한 쌍의 이뮤노글로불린 쇄로 이루어진 사량체이며, 각각의 쌍은 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 갖는다. 각각의 쌍에서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 항원에 결합하고 불변 영역은 이펙터 기능을 매개한다. 이뮤노글로불린은 또한, 예를 들어, Fv, Fab 및 (Fab')₂ 뿐만 아니라 이중기능적 하이브리드 항체 및 단일 쇄를 포함한 다양한 다른 형태로 존재한다 (예를 들어, 문헌 [*Lanzavecchia et al. 1987. Eur. J. Immunol. 17:105; Huston et al. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883; Bird et al. 1988. Science 242:423-426; Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2nd ed., 1984; Hunkapiller and Hood 1986. Nature 323:15-16*]). 이뮤노글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)이라고도 하는 3개의 초가변 영역에 의해 중단된 프레임워크 영역을 포함한다 (문헌 [*Sequences of Proteins of Immunological Interest, E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, 1983*] 참조). 위에서 언급한 바와 같이, CDR은 항원의 에피토프에 대한 결합을 주로 담당한다. 면역 복합체는 항원과 특이적으로 결합된 항체, 예컨대 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체, 또는 기능적 항체 단편이다.
- [0189] 키메라 항체는 그의 경쇄 및 중쇄 유전자가 전형적으로 유전 공학에 의해, 상이한 종에 속하는 이뮤노글로불린 가변 및 불변 영역 유전자로부터 구축된 항체이다. 예를 들어, 마우스 모노클로날 항체로부터의 유전자의 가변 세그먼트는 인간 불변 세그먼트, 예컨대 카파 및 감마 1 또는 감마 3에 연결될 수 있다. 따라서 한 예에서, 치료용 키메라 항체는 마우스 항체로부터의 가변 또는 항원 결합 도메인 및 인간 항체로부터의 불변 또는 이펙터 도메인으로 구성된 하이브리드 단백질이지만, 다른 포유류 종이 사용할 수 있거나 또는 가변 영역이 분자 기술에 의해 생산될 수 있다. 키메라 항체의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, *미국 특허 번호 5,807,715* 참조). "인간화" 이뮤노글로불린은 인간 프레임워크 영역 및 비-인간 (예컨대, 마우스, 래트 또는 합성) 이뮤노글로불린으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함한 이뮤노글로불린이다. CDR을 제공하는 비-인간 이뮤노글로불린은 "공여자"로 지칭되고 프레임워크를 제공하는 인간 이뮤노글로불린은 "수용자"로 지칭된다. 한 실시양태에서, 모든 CDR은 인간화 이뮤노글로불린 내의 공여자 이뮤노글로불린으로부터의 것이다. 불변 영역이 존재할 필요는 없지만, 존재한다면 인간 이뮤노글로불린 불변 영역과 실질적으로 동일해야만 하는데, 즉 적어도 약 85-90%, 예컨대 약 95% 이상이 동일해야 한다. 따라서, 가능하게는 CDR을 제외한 인간화 이뮤노글로불린의 모든 부분은 자연 인간 이뮤노글로불린 서열의 상응하는 부분과 실질적으로 동일하다. "인간화 항체"는 인간화 경쇄 및 인간화 중쇄 이뮤노글로불린을 포함하는 항체이다. 인간화 항체는 CDR을 제공하는 공여자 항체와 동일한 항원에 결합한다. 인간화 이뮤노글로불린 또는 항체의 수용자 프레임워크는 공여자 프레임워크로부터 취한 아미노산에 의해 제한된 수의 치환을 가질 수 있다. 인간화 또는 다른 모노클로날 항체는 부가적인 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있으며, 이는 항원 결합 또는 다른 이뮤노글로불린 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는다. 예시적인 보존적 치환은 gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; 및 phe, tyr와 같은 것이다. 인간화 이뮤노글로불린은 유전 공학을 통해 구축될 수 있다 (예를 들어, *미국 특허 번호 5,585,089* 참조). 인간 항체는 경쇄 및 중쇄 유전자가 인간 기원인 항체이다. 인간 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 관심 항체를 분비하는 인간 B 세포를 불멸화 시킴으로써 생산될 수 있다. 불멸화는, 예를 들어, EBV 감염에 의해 또는 인간 B 세포를 골수종 또는 하이브리도마 세포와 융합하여 트리오마 세포를 생산함으로써 달성될 수 있다. 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 방법에 의해 생산될 수 있거나 (예를 들어, *Dower et al., PCT 공개 번호 W091/17271; McCafferty et al., PCT 공*

개 번호 W092/001047; 및 Winter, PCT 공개 번호 W092/20791 참조), 또는 인간 조합 모노클로날 항체 라이브리
리로부터 선택될 수 있다 (모르포시스(Morphosys) 웹사이트 참조). 인간 항체는 인간 이뮤노글로불린 유전자를
보유한 트랜스제닉 동물을 사용함으로써 제조될 수도 있다 (예를 들어, 문헌 [Lonberget al., PCT 공개 번호
W093/12227; 및 Kucherlapati, PCT 공개 번호 W091/10741] 참조).

- [0190] 따라서, 항체는 관련 기술분야에 공지된 포맷을 가질 수 있다. 그 예는 인간 항체, 모노클로날 항체, 인간화
항체, 키메라 항체, CDR 이식된 항체이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는, 예를 들어 IgG와
같이 재조합적으로 생산된 항체, 전형적인 완전한 길이의 이뮤노글로불린, 또는 적어도 중쇄 및/또는 경쇄의 F-
가변 도메인을 함유하는 항체 단편, 예를 들어, Fab 미니바디, 단일 쇠 Fab 항체, 에피토프 태그가 있는 1가
Fab 항체, 예를 들어, Fab-V5Sx2; CH3 도메인과 이량체화된 2가 Fab (미니-항체); 예를 들어, 이중 도메인의 도
움으로 다중체화를 통해, 예를 들어, dHLX도메인의 이량체화를 통해 형성된 2가 Fab 또는 다가 Fab, 예를 들어
Fab-dHLX-FSx2; F(ab')₂-단편, scFv-단편, 다량체화된 다가 또는/및 다중특이적 scFv-단편, 2가 및/또는 이중
특이적 디아바디, BITE® (이중특이적 T-세포 인게이저), 삼중기능적 항체; 예를 들어, G와 상이한 클래스로부
터의 다가 항체; 단일 도메인 항체, 예를 들어 카멜리드 또는 어류 이뮤노글로불린으로부터 유래된 나노바디 및
수많은 다른 것을 포함한 Fab-단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 화학적으로 커플링된 항체 (단편 항원 결
합)이다.
- [0191] 항체 이외에, 다른 바이오폴리머 스캐폴드가 표적 분자와 복합체를 형성하는 것으로 관련 기술분야에 널리 공지
되어 있으며, 고도의 표적 특이적 바이오폴리머의 생성에 사용되어 왔다. 그 예는 앵타머, 스피겔머, 안티칼린
및 코노톡신이다.
- [0192] 바람직한 실시양태에서, 항체 포맷은 Fv 단편, scFv 단편, Fab 단편, scFab 단편, (Fab)₂ 단편 및 scFv-Fc 용
합 단백질을 포함하는 군으로부터 선택된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체 포맷은 scFab 단편, Fab 단
편, scFv 단편 및 그의 생체 이용률 최적화된 접합체, 예컨대 PEG화 단편을 포함하는 군으로부터 선택된다. 가
장 바람직한 포맷 중 하나가 scFab 포맷이다.
- [0193] 비-Ig 스캐폴드는 단백질 스캐폴드일 수 있으며 리간드 또는 항원에 결합할 수 있기 때문에 항체 모방체로서 사
용될 수 있다. 비-Ig 스캐폴드는 테트라넥틴-기반 비-Ig 스캐폴드 (예를 들어, US 2010/0028995에 기재됨), 피
브로넥틴 스캐폴드 (예를 들어, EP 1 266 025에 기재됨), 리포칼린-기반 스캐폴드 (예를 들어, WO 2011/154420
에 기재됨); 유비퀴틴 스캐폴드 (예를 들어, WO 2011/073214에 기재됨), 전달 스캐폴드 (예를 들어, US
2004/0023334에 기재됨), 단백질 A 스캐폴드 (예를 들어, EP 2 231 860에 기재됨), 안키린 반복부 기반 스캐폴
드 (예를 들어, WO 2010/060748에 기재됨), 마이크로단백질 스캐폴드 (바람직하게는 시스템 매듭을 형성하는 마
이크로단백질) (예를 들어, EP 2 314 308에 기재됨), Fyn SH3 도메인 기반 스캐폴드 (예를 들어, WO
2011/023685에 기재됨), EGFR-A-도메인 기반 스캐폴드 (예를 들어, WO 2005/040229에 기재됨) 및 쿠니츠
(Kunitz) 도메인 기반 스캐폴드 (예를 들어, EP 1941867에 기재됨)를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0194] 더욱이, 본 발명의 한 실시양태에서, 항-아드레노메들린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메들린 항체 단편 또는 항
-ADM 비-Ig 스캐폴드는 단일특이적이다.
- [0195] 단일특이적 항-아드레노메들린 (ADM) 항체 또는 단일특이적 항-아드레노메들린 항체 단편 또는 단일특이적 항-
ADM 비-Ig 스캐폴드는 상기 항체 또는 항체 단편 또는 비-Ig 스캐폴드가 표적 ADM 내의 적어도 5개의 아미노산
을 포함하는 하나의 특이적 영역에 결합한다는 것을 의미한다. 단일특이적 항-아드레노메들린 (ADM) 항체 또는
단일특이적 항-아드레노메들린 항체 단편 또는 단일특이적 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 모두 동일한 항원에 대한
친화성을 갖는 항-아드레노메들린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메들린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드이
다.
- [0196] 또 다른 구체적 및 바람직한 실시양태에서, ADM에 결합하는 항-ADM 항체 또는 항-ADM 항체 단편 또는 항-ADM 비
-Ig 스캐폴드는 각각, 단일특이적 항체, 항체 단편 또는 비-Ig 스캐폴드이며, 이로써 단일특이적은 상기 항체
또는 항체 단편 또는 비-Ig 스캐폴드가 표적 ADM 내의 적어도 4개의 아미노산을 포함하는 하나의 특이적 영역에
결합한다는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 단일특이적 항체 또는 단편 또는 비-Ig 스캐폴드는 모두 동일한 항
원에 대한 친화성을 갖는 항체 또는 단편 또는 비-Ig 스캐폴드이다. 모노클로날 항체는 단일특이적이지만, 단
일특이적 항체는 또한, 통상의 생식 세포로부터 그들을 생산하는 것 외의 다른 수단에 의해 생산될 수 있다.
- [0197] ADM에 결합하는 상기 항-ADM 항체 또는 항체 단편 또는 ADM에 결합하는 비-Ig 스캐폴드는 ADM에 결합하는 비-중
화 항-ADM 항체 또는 항체 단편 또는 ADM에 결합하는 비-Ig 스캐폴드일 수 있다.

- [0198] 구체적 실시양태에서, 상기 항-ADM 항체, 항-ADM 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 비-중화 항체, 단편 또는 비-Ig 스캐폴드이다. 중화 항-ADM 항체, 항-ADM 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 ADM의 생체활성을 거의 100%, 적어도 90% 초과, 바람직하게는 적어도 95% 초과로 차단할 것이다.
- [0199] 대조적으로, 비-중화 항-ADM 항체, 또는 항-ADM 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 ADM의 생체활성을 100% 미만, 바람직하게는 95% 미만, 바람직하게는 90% 미만, 보다 바람직하게는 80% 미만, 및 보다 더 바람직하게는 50% 미만으로 차단한다. 이는 ADM의 생체활성이 100% 미만, 95% 이하, 90% 이하, 80% 이하, 50% 이하로 감소한다는 것을 의미한다. 이는 비-중화 항-ADM 항체, 또는 항-ADM 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드에 결합된 ADM의 잔류 생체활성이 0% 초과, 바람직하게는 5% 초과, 바람직하게는 10% 초과, 보다 바람직하게는 20% 초과, 보다 바람직하게는 50% 초과일 것이란 것을 의미한다.
- [0200] 이러한 맥락에서 (a) 예를 들어, ADM의 생체활성을 80% 미만으로 차단하는, "비-중화 항-ADM 활성"을 갖는 항체, 또는 항체 단편 또는 비-Ig 스캐폴드이며, 본원에서 단순화하기 위해 집합적으로 "비-중화" 항-ADM 항체, 항체 단편, 또는 비-Ig 스캐폴드로 지칭되는 분자(들)는 하기와 같이 정의된다:
- [0201] - CRLR (칼시토닌 수용체 유사 수용체) 및 RAMP3 (수용체-활성 변형 단백질 3)으로 구성된 기능적 인간 재조합 ADM 수용체를 발현하는 진핵 세포주의 배양에 부가될 때, 병행 부가된 인간 합성 ADM 펩티드의 작용을 통해 상기 세포주에 의해 생산된 cAMP의 양을 감소시키는, ADM에 결합하는 분자(들)로서, 여기서 상기 부가된 인간 합성 ADM은 분석될 비-중화 항체의 부재하에 cAMP 합성의 최대 절반의 자극을 유도하는 양으로 부가되고, 여기서 ADM에 결합하는 상기 분자(들)에 의한 cAMP의 감소는, 분석될 ADM에 결합하는 비-중화 분자(들)가 분석될 비-중화 항체로 수득될 수 있는 cAMP 합성의 최대 감소를 수득하는데 필요한 양보다 10배 더 큰 양으로 부가되는 경우에서도, 80% 이하의 정도로 발생한다.
- [0202] 하기 다른 범위에도 동일한 정의가 적용된다: 95%, 90%, 50% 등.
- [0203] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 상기 항-ADM 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 위치하는 ADM의 영역 또는 에피토프에 결합한다.
- [0204] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 항-ADM-항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-14)을 의미하는 아드레노메둘린의 아미노산 1-14 (서열식별번호: 27) 내의 영역 또는 에피토프를 인식하고 그에 결합한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 항-ADM-항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-10)을 의미하는 아드레노메둘린의 아미노산 1-10 (서열식별번호: 28) 내의 영역 또는 에피토프를 인식하고 그에 결합한다.
- [0205] ADM의 aa 1-14
- [0206] YRQSMNMFQGLRSF (서열식별번호: 27)
- [0207] ADM의 aa 1-10
- [0208] YRQSMNMFQG (서열식별번호: 28)
- [0209] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 항-ADM 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-6)을 의미하는 아드레노메둘린의 아미노산 1-6 (서열식별번호: 29) 내의 영역 또는 에피토프를 인식하고 그에 결합한다. 상기 언급된 바와 같이, 상기 영역 또는 에피토프는 바람직하게는 적어도 4개 또는 적어도 5개 아미노산 길이를 포함한다.
- [0210] ADM의 aa 1-6
- [0211] YRQSMN (서열식별번호: 29)
- [0212] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 항-ADM 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 아드레노메둘린의 N-말단 단부 (aa1)를 인식하고 그에 결합한다. N-말단 단부는 아미노산 1, 즉 서열식별번호: 4, 5, 21, 27, 28 또는 29의 "Y"를 의미하고; 이는 항체 결합에 필수적이다. 상기 항체 또는 단편 또는 스캐폴드는 N-말단 연장된 또는 N-말단 변형된 아드레노메둘린에 결합하지 않거나 또는 N-말단 분해된 아드레노메둘린에 결합하지 않을 것이다. 이는 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 항-ADM-항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드가, ADM의 N-말단 단부가 자유로운 경우에는 성숙 ADM 서열 내의 영역하고만 결합한다는 것을 의미한다. 상기 실시양태에서, 항-ADM 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편

또는 비-Ig 스캐폴드는, 상기 서열이, 예를 들어, 프로-ADM 내에 포함되는 경우에는 성숙 ADM의 서열 내의 영역에 결합하지 않을 것이다.

- [0213] 명확성을 위해, "N-말단 부분 (aa 1-21)"과 같은 ADM의 특이적 영역에 대한 괄호 안의 숫자는 ADM의 N-말단 부분이 성숙 ADM 서열의 아미노산 1-21로 이루어진다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해한다.
- [0214] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 하기와 같이 생산될 수 있다:
- [0215] Balb/c 마우스를 제0일 및 제14일에 ADM-100 μg 펩티드-BSA-접합체 (100 μl 완전 프로인트 아주반트에 유화됨) 및 제21일 및 제28일에 50 μg (100 μl 불완전 프로인트 아주반트 중)으로 면역시켰다. 융합 실험을 수행하기 3일 전에, 동물에게 100 μl 식염수에 용해된 상기 접합체 50 μg을 1회 복강내 주사와 1회 정맥내 주사로서 투여하였다.
- [0216] 이와 같이 면역시킨 마우스로부터의 비장세포와 골수종 세포주 SP2/0의 세포를 37°C에서 30초 동안 1 ml 50% 폴리에틸렌 글리콜과 융합시켰다. 세척 후, 상기 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 시딩하였다. 하이브리드 클론은 HAT 배지 (20% 송아지 태아 혈청이 보충된 RPMI 1640 배양 배지 및 HAT-보충물)에서 성장시킴으로써 선별되었다. 2주 후, HAT 배지를 3회 계대 동안 HT 배지로 교체한 다음, 정상 세포 배양 배지로 복귀시켰다.
- [0217] 세포 배양 상청액은 융합 후 3주에 항원 특이적 IgG 항체에 대해 1차 스크리닝되었다. 양성 테스트된 미세 배양물은 증식을 위해 24-웰 플레이트로 옮겼다. 제시험 후, 상기 선별된 배양물을 제한 희석 기술을 사용하여 클로닝 및 재클로닝하였고, 이소타입을 결정하였다 (또한, 문헌 [*Lane 1985. J. Immunol. Meth. 81: 223-228; Ziegler, B. et al. 1996 Horm. Metab. Res. 28: 11-15*] 참조).
- [0218] 항체는 하기 절차에 따라 파지 디스플레이를 통해 생산될 수 있다:
- [0219] 인간 나이브 항체 유전자 라이브러리 HAL7/8은 아드레노메둘린 펩티드에 대항한 제조할 단일쇄 F-가변 도메인 (scFv)의 단리에 사용되었다. 항체 유전자 라이브러리는 2개의 상이한 스페이서를 통해 아드레노메둘린 펩티드 서열에 연결된 비오틴 태그를 함유하는 펩티드의 사용을 포함하는 패닝 전략으로 스크리닝되었다. 비-특이적으로 결합된 항원과 스트렙타비딘 결합된 항원을 사용하는 패닝 라운드의 혼합을 사용하여 비-특이적 결합체의 배경을 최소화하였다. 제3 라운드의 패닝으로부터 용출된 파지는 모노클로날 scFv 발현 이. 콜라이(*E. coli*) 균주의 생성에 사용되었다. 이러한 클로날 균주의 배양으로부터의 상청액은 항원 ELISA 테스트에 직접 사용되었다 (문헌 [*Hust et al. 2011. Journal of Biotechnology 152: 159-170; Schuette et al. 2009. PLoS One 4. e6625*] 참조).
- [0220] 무린 항체의 인간화는 하기 절차에 따라 시행될 수 있다:
- [0221] 무린 기원의 항체의 인간화를 위해, 항체 서열을 프레임워크 영역 (FR)과 상보적 결정 영역 (CDR) 및 항원의 구조적 상호작용에 대해 분석한다. 구조적 모델링에 기반하여, 인간 기원의 적절한 FR을 선택하고 무린 CDR 서열을 인간 FR에 이식한다. CDR 또는 FR의 아미노산 서열에 있어서의 변이가 도입되어, FR 서열에 대한 중 전환에 의해 폐지된 구조적 상호작용을 회복할 수 있다. 이러한 구조적 상호작용의 회복은 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하는 무작위 접근법에 의해 달성되거나 또는 분자 모델링에 의해 가이드되는 유도 접근법을 통해 달성될 수 있다 (*Almagro et al. 2008. Front Biosci. 2008; 13:1619-33*).
- [0222] 본 출원의 또 다른 실시양태는 아드레노메둘린의 N-말단 부분인 aa 1-21에 결합하는 대상체의 치료를 위한 항-ADM 항체가, ADM에 결합하는 인간 CDR 이식된 항체 또는 그의 항체 단편인 전술한 실시양태에 따른 방법에 관한 것이며, 여기서 인간 CDR 이식된 항체 또는 그의 항체 단편은 하기를 포함하는 항체 중쇄 (H 쇠)를 포함하고/거나:
- [0223] 서열식별번호: 7:
- [0224] GYTFSTRYW
- [0225] 서열식별번호: 8:
- [0226] ILPGSGST
- [0227] 및/또는
- [0228] 서열식별번호: 9:

- [0229] TEGYEYDGFYD;
- [0230] 하기를 포함하는 항체 경쇄 (L 쇠)를 추가로 포함한다:
- [0231] 서열식별번호: 10:
- [0232] QSIVYSNGNTY
- [0233] 서열식별번호: 11: (3개 아미노산 길이로 인해 서열 목록에 언급되지 않음)
- [0234] RVS
- [0235] 및/또는
- [0236] 서열식별번호: 12:
- [0237] FQGSHIPYT.
- [0238] 본 출원의 또 다른 구체적 실시양태에서, 대상체의 치료를 위한 항-ADM 항체는 ADM에 결합하는 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편이고, 여기서 중쇄는 하기를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 CDR을 포함하고:
- [0239] 서열식별번호: 7:
- [0240] GYTFSRYW
- [0241] 서열식별번호: 8:
- [0242] ILPGSGST
- [0243] 서열식별번호: 9:
- [0244] TEGYEYDGFYD;
- [0245] 경쇄는 하기를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 CDR을 포함한다:
- [0246] 서열식별번호: 10:
- [0247] QSIVYSNGNTY
- [0248] 서열식별번호: 11: (3개 아미노산 길이로 인해 서열 목록에 언급되지 않음)
- [0249] RVS
- [0250] 서열식별번호: 12:
- [0251] FQGSHIPYT.
- [0252] 본 출원의 또 다른 실시양태에서, 대상체의 치료를 위한 항-ADM 항체는 ADM에 결합하는 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편이며, 여기서 중쇄는 하기 서열을 포함하고:
- [0253] 서열식별번호: 7:
- [0254] GYTFSRYW
- [0255] 서열식별번호: 8:
- [0256] ILPGSGST
- [0257] 서열식별번호: 9:
- [0258] TEGYEYDGFYD
- [0259] 여기서 경쇄는 하기 서열을 포함한다:
- [0260] 서열식별번호: 10:
- [0261] QSIVYSNGNTY

- [0262] 서열식별번호: 11: (3개 아미노산 길이로 인해 서열 목록에 언급되지 않음)
- [0263] RVS
- [0264] 서열식별번호: 12:
- [0265] FQGSHIPYT.
- [0266] 본 출원의 또 다른 실시양태는 치료를 위한 상기 항체 또는 단편이 ADM에 결합하는 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편인 전술한 실시양태의 방법에 관한 것이며, 여기서 중쇄는 하기 서열을 포함하고:
- [0267] CDR1: 서열식별번호: 7:
- [0268] GYTFSTRYW
- [0269] CDR2: 서열식별번호: 8:
- [0270] ILPGSGST
- [0271] CDR3: 서열식별번호: 9:
- [0272] TEGYEYDGFYD
- [0273] 여기서 경쇄는 하기 서열을 포함한다:
- [0274] CDR1: 서열식별번호: 10:
- [0275] QSIVYSNGNTY
- [0276] CDR2: 서열식별번호: 11: (3개 아미노산 길이로 인해 서열 목록에 언급되지 않음.)
- [0277] RVS
- [0278] CDR3: 서열식별번호: 12:
- [0279] FQGSHIPYT.
- [0280] 본 출원의 또 다른 실시양태는 치료를 위한 상기 항체 또는 단편이 VH 영역으로서 하기 서열:
- [0281] 서열식별번호: 13 (AM-VH-C):
- QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILP
 GSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYD
 YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
 VEPKHHHHHH
- [0282]
- [0283] 서열식별번호: 14 (AM-VH1):
- QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSTRYWISWVRQAPGQGLEWMGRIL
 PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCTEGYEYDGFYD
 YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
 VEPKHHHHHH
- [0284]

[0285] 서열식별번호: 15 (AM-VH2-E40):
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRIL
 PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGF
 YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
 VEPKHHHHHHH

[0286]
 [0287] 서열식별번호: 16 (AM-VH3-T26-E55):
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEIL
 PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGF
 YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
 VEPKHHHHHHH

[0288]
 [0289] 서열식별번호: 17 (AM-VH4-T26-E40-E55):
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
 PGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGF
 YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
 VEPKHHHHHHH

[0290]
 [0291] 를 포함하고;
 [0292] VL 영역으로서 하기 서열:
 [0293] 서열식별번호: 18 (AM-VL-C):

DVLLSQTPLSLPVSLGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYR
 VSNRFSQVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLE
 IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE
 C

[0294]
 [0295] 서열식별번호: 19 (AM-VL1):
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYR
 VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGTKL
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG
 EC

[0296]
 [0297] 서열식별번호: 20 (AM-VL2-E40):
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYR
 VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0298]
 [0299] 를 포함하는 것인

- [0300] 진술한 실시양태의 방법에 관한 것이다.
- [0301] 하기 실시양태가 본 발명의 대상이다:
- [0302] 1) a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- [0303] b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- [0304] c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- [0305] d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한
- [0306] 방법으로서,
- [0307] 여기서 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 대상체의 체액 샘플에서 결정되며, 여기서 상기 성숙 ADM-NH₂의 수준은 임계치 수준과 비교되고,
- [0308] 여기서
- [0309] a) 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- [0310] b) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 수준 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- [0311] c) 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이고/거나, 여기서 상기 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 임계치 초과로 증가하면 개입은 계속될 수 있다.
- [0312] 2) a) 치매를 진단하기 위한, 또는
- [0313] b) 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정하기 위한, 또는
- [0314] c) 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한, 또는
- [0315] d) 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위한
- [0316] 방법으로서,
- [0317] 여기서 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율일 수 있는 마커 비율이 결정되며, 여기서 상기 마커 비율은 임계치 비율과 비교되고,
- [0318] 여기서
- [0319] a) 성숙 ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 비율 임계치 미만이면 상기 대상체는 치매로 진단되거나, 또는 여기서
- [0320] b) 성숙 ADM-NH₂/프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 마커 비율이 상기 비율 임계치 미만이면 상기 대상체는 치매에 걸릴 증대된 위험을 갖거나, 또는 여기서
- [0321] c) 상기 마커 비율이 요법 또는 개입의 과정 동안 증가하면 치매가 있거나 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체의 상태는 요법 또는 개입 하에 개선되고 있는 것이거나
- [0322] 또는 상기 마커 비율에 대한적으로, 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준이 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정되고, 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편 (이는 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂가 아님)의 수준이 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정되며, 이와 같이 결정된 두 수준은 수학적 알고리즘으로 조합되며, 여기서 상기 수학적 알고리즘의 결과는 치매를 진단하기 위해, 또는 치매가 없는 대상체에서 치매에 걸릴 위험을 결정

하기 위해, 또는 치매가 있는 대상체에서 요법을 모니터링하거나 또는 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해, 또는 치매에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 예방적 요법을 모니터링하거나 또는 예방적 개입을 모니터링 또는 가이드하기 위해 사용된다.

- [0323] 3. 상기 프로-아드레노메둘린의 단편이 PAMP (서열식별번호: 2), MR-프로ADM (서열식별번호: 3), ADM-Gly (서열식별번호: 5) 및 CT-프로ADM (서열식별번호: 6)을 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, 항목 2에 따른 방법.
- [0324] 4. 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 임계치 수준이 15 pg/ml 이하, 바람직하게는 10 pg/ml 이하, 바람직하게는 5 pg/ml 이하인, 항목 1에 따른 방법.
- [0325] 5. 비율 임계치가 0.2 내지 0.75, 바람직하게는 0.3 내지 0.6, 바람직하게는 0.4 내지 0.5의 범위 내인, 항목 2 또는 3에 따른 방법.
- [0326] 6. 상기 샘플이 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 뇌척수액 (CSF), 및 타액의 군으로부터 선택되는 것인, 전술한 항목 중 임의의 것에 따른 방법.
- [0327] 7. 체액 샘플이 샘플 채취 당시에 치매 또는 MCI 진단을 받은 적이 없는 대상체로부터 채취되는 것인, 항목 1 내지 6에 따른 방법.
- [0328] 8. 적어도 하나의 부가적인 임상 파라미터가 연령, 인종, 정신 상태 테스트 (예를 들어, 미니-정신 상태 검사 (MMSE)), 신경영상화 (CT, MRT, PET, SPECT), 가족력, ApoE4 유전자형, 아밀로이드β 1-42 (Aβ₁₋₄₂), 아밀로이드β 1-40 (Aβ₁₋₄₀), 총 타우-단백질, 인산화된 타우-단백질 (p-타우 181, p-타우 199, p-타우 231)을 포함하는 군으로부터 선택 결정되는 것인, 전술한 항목 중 임의의 것에 따른 방법.
- [0329] 9. 상기 마커의 수준이 면역검정에 의해 결정되는 것인, 전술한 항목 중 임의의 것에 따른 방법.
- [0330] 10. 상기 방법이 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위하여 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드를 이용한 치료를 위한 환자를 선택하기 위한 환자 계층화에 사용되며, 여기서 상기 항-ADM 항체 또는 항-ADM 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드는 하기 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 결합하는 것인, 전술한 항목 중 임의의 것에 따른 방법:
- [0331] YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (서열식별번호: 21).
- [0332] 11. 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드로서, 하기 아드레노메둘린의 N-말단 부분 (aa 1-21)에 결합하는 항-ADM 항체 또는 항-ADM 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드:
- [0333] YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (서열식별번호: 21).
- [0334] 12. 상기 대상체가 임계치 수준 미만의, 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준을 갖고/거나 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 프로-아드레노메둘린 또는 그의 단편의 수준에 대한 상기 대상체의 체액 샘플에서 결정된 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 수준의 비율인 마커 비율을 가지며, 상기 마커 수준 비율이 비율 임계치 미만인, 항목 11에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0335] 13. 상기 프로-아드레노메둘린의 단편이 PAMP (서열식별번호: 2), MR-프로ADM (서열식별번호: 3), ADM-Gly (서열식별번호: 5) 및 CT-프로ADM (서열식별번호: 6)을 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, 항목 12에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0336] 14. 상기 대상체가 항목 10에 따른 방법에 의해 선택되는 것인, 항목 11 내지 13에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0337] 15. 서열식별번호: 4에 따른 성숙 ADM-NH₂의 임계치 수준이 15 pg/ml 이하, 바람직하게는 10 pg/ml 이하, 바람직하게는 5 pg/ml 이하인, 항목 12 내지 14 중 임의의 것에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

- [0338] 16. 마커 수준 비율이 0.2 내지 0.75, 바람직하게는 0.3 내지 0.6, 바람직하게는 0.4 내지 0.5의 범위 내인, 항목 12 내지 14에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0339] 17. 상기 대상체가 항목 10의 방법에 따라 선택되고, 체액 샘플이 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 뇌척수액 (CSF), 및 타액의 군으로부터 선택되는 것인, 항목 11 내지 16에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0340] 18. 적어도 하나의 부가적인 임상 파라미터가 연령, 인종, 정신 상태 테스트 (예를 들어, 미니-정신 상태 검사 (MMSE)), 신경영상화 (CT, MRT, PET, SPECT), 가족력, ApoE4 유전자형, 아밀로이드 β 1-42 ($A\beta_{1-42}$), 아밀로이드 β 1-40 ($A\beta_{1-40}$), 총 타우-단백질, 인산화된 타우-단백질 (p-타우 181, p-타우 199, p-타우 231)을 포함하는 군으로부터 선택 결정되는 것인, 항목 11 내지 16에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0341] 19. 상기 마커의 수준이 면역검정에 의해 결정되는 것인, 항목 12 내지 18에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0342] 20. 항체 또는 단편 또는 스캐폴드가 적어도 10^{-7} M의 ADM에 대한 결합 친화도를 나타내는 것인, 항목 12 내지 19에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한, 아드레노메둘린에 결합하는 항-아드레노메둘린 (ADM) 항체 또는 항-ADM 항체 단편 또는 아드레노메둘린에 결합하는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0343] 21. 항체 또는 단편 또는 스캐폴드가 아드레노메둘린의 N-말단 단부 (aa 1)를 인식하고 그에 결합하는 것인, 항목 12 내지 20에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-ADM 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.
- [0344] 22. 항체 또는 단편 또는 스캐폴드가 ADM의 생체활성을 80% 이하, 바람직하게는 50% 이하 차단하는 것인, 항목 12 내지 21에 따른 대상체에서의 치매의 예방 및 요법에 사용하기 위한 항-ADM 항체 또는 항-아드레노메둘린 항체 단편 또는 항-ADM 비-Ig 스캐폴드.

도면의 간단한 설명

- [0345] 도 1:
 도 1은 100 μ g/mL 항체 NT-H의 존재 하에 전형적인 바이오-ADM 용량/시그널 곡선 및 바이오-ADM 용량 시그널 곡선을 제시한다.
- 도 2:
 도 2는 MPP 코호트 및 독립적 알츠하이머병 코호트에서의 바이오-ADM 농도를 제시한다.
- 도 3:
 도 3은 알츠하이머병의 예측을 위한 MPP 코호트에서의 바이오-ADM 농도의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯을 제시한다.
- 도 4:
 도 4는 알츠하이머병의 예측을 위한 MPP (증례 대조군) 코호트의 서브코호트 및 독립적 AD 코호트에서의 바이오-ADM 농도의 박스 플롯을 제시한다.
- 도 5:
 도 5는 알츠하이머병의 예측을 위한 MPP (증례 대조군) 코호트의 서브코호트에서의 MR-프로ADM 농도의 박스 플롯을 제시한다.
- 도 6:
 도 6은 알츠하이머병의 예측을 위한 MPP (증례 대조군) 코호트의 서브코호트에서의 바이오-ADM/MR-프로ADM 비율의 박스 플롯을 제시한다.

도 7:

도 7은 알츠하이머병의 예측을 위한 MPP (중례 대조군) 코호트의 서브코호트에서의 바이오-ADM의 ROC-플롯 (a) 및 바이오-ADM 및 MR-프로ADM의 비율 (b)를 제시한다.

도 8:

도 8은 NT-H 항체의 투여 후 건강한 인간 개체에서의 바이오-ADM-값을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

실시예 1

항체의 생성 및 그의 친화성 상수의 결정

몇 가지 인간 및 뮤린 항체가 생산되었고, 그들의 친화성 상수가 결정되었다 (표 1 참조).

면역화를 위한 펩티드/접합체:

면역화를 위한 펩티드를, 소 혈청 알부민 (BSA)에 펩티드를 접합시키기 위한 추가적인 N-말단 시스테인 (선택된 ADM-서열 내에 시스테인이 존재하지 않는 경우) 잔기로 합성하였다 (표 1 참조) (제이피티 테크놀로지스(JPT Technologies; 독일 베를린)). 술포링크-커플링 겔 (퍼바이오 사이언스(Perbio Science; 독일 본))을 사용함으로써 상기 펩티드를 BSA에 공유적으로 연결하였다. 커플링 절차는 퍼바이오의 매뉴얼에 따라 수행하였다.

뮤린 항체를 하기 방법에 따라 생성하였다:

Balb/c 마우스를 제0일 및 제14일에 100 µg 펩티드-BSA-접합체 (100 µl 완전 프로인트 아주반트에 유회됨) 및 제21일 및 제28일에 50 µg (100 µl 불완전 프로인트 아주반트 중)으로 면역시켰다. 융합 실험을 수행하기 3 일 전에, 동물에게 100 µl 식염수에 용해된 상기 접합체 50 µg을 1회 복강내 주사와 1회 정맥내 주사로서 투여하였다.

이와 같이 면역시킨 마우스로부터의 비장세포와 골수종 세포주 SP2/0의 세포를 37°C에서 30초 동안 1 ml 50% 폴리에틸렌 글리콜과 융합시켰다. 세척 후, 상기 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 시딩하였다. 하이브리드 클론은 HAT 배지 (20% 송아지 태아 혈청이 보충된 RPMI 1640 배양 배지 및 HAT-보충물)에서 성장시킴으로써 선별되었다. 2주 후, HAT 배지를 3회 계대 동안 HT 배지로 교체한 다음, 정상 세포 배양 배지로 복귀시켰다.

세포 배양 상청액은 융합 후 3주에 항원 특이적 IgG 항체에 대해 1차 스크리닝되었다. 양성 테스트된 미세 배양물은 증식을 위해 24-웰 플레이트로 옮겼다. 재시험 후, 상기 선별된 배양물을 제한 희석 기술을 사용하여 클로닝 및 재클로닝하였고, 이소타입을 결정하였다 (또한, 문헌 [*Lane, R.D. 1985. J. Immunol. Meth. 81: 223-228; Ziegler et al. 1996. Horm. Metab. Res. 28: 11-15*] 참조).

마우스 모노클로날 항체 생산:

항체를 표준 항체 생산 방법 (*Marx et al., 1997. Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121*)을 통해 생산하고 단백질 A를 통해 정제하였다. 항체 순도는 SDS 겔 전기영동 분석을 기반으로 하여 > 95%였다.

인간 항체:

인간 항체는 하기 절차에 따라 파지 디스플레이를 통해 생산되었다:

인간 나이브 항체 유전자 라이브러리 HAL7/8은 ADM 펩티드에 대한 재조합 단일쇄 F-가변 도메인 (scFv)의 단리에 사용되었다. 항체 유전자 라이브러리는 2개의 상이한 스페이서를 통해 ADM 펩티드 서열에 연결된 비오틴 태그를 함유하는 펩티드의 사용을 포함하는 패닝 전략으로 스크리닝되었다. 비-특이적으로 결합된 항원과 스트렙타비딘 결합된 항원을 사용하는 패닝 라운드의 혼합을 사용하여 비-특이적 결합체의 배경을 최소화하였다. 제3 라운드의 패닝으로부터 용출된 파지는 모노클로날 scFv 발현 이. 콜라이 균주의 생성에 사용되었다. 이들 클로날 균주의 배양으로부터의 상청액은 항원 ELISA 테스트에 직접 사용되었다 (문헌 [*Hust et al. 2011. Journal of Biotechnology 152, 159-170; Schuette et al. 2009. PLoS One 4, e6625*] 참조).

항원에 대한 양성 ELISA 시그널 및 스트렙타비딘 코팅된 마이크로 역가 플레이트에 대한 음성을 기반으로 하여 양성 클론을 선별하였다. 추가의 특징 규명을 위해, scFv 오픈 리딩 프레임 발현 플라스미드 pOPE107 내로

클로닝하고 (*Hust et al. 2011. Journal of Biotechnology 152, 159-170*), 고정화된 금속 이온 친화성 크로마토그래피를 통해 배양 상청액으로부터 포획하며, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0362] 친화성 상수:

[0363] ADM에 대한 항체의 친화도를 결정하기 위해, 비아코어 2000 시스템 (지이 헬스케어 유럽 게엠베하; 독일 프라이부르크)을 사용하여 표지 없는 표면 플라즈몬 공명에 의해, 고정화 항체에 대한 ADM의 결합 역학을 결정하였다. 제조업체의 지침에 따라 CM5 센서 표면에 고 밀도로 공유적으로 커플링된 항-마우스 Fc 항체를 사용하여 항체의 가역적 고정화를 수행하였다 (마우스 항체 포획 키트; 지이 헬스케어) (*Lorenz et al. 2011. Antimicrob Agents Chemother. 55(1): 165-173*).

[0364] 아래에 서술된 인간 및 무린 ADM 각각의 ADM 영역에 대항하여 모노클로날 항체가 생성되었다. 하기 표는 추가 실험에 사용되는 수득된 항체의 선택을 나타낸다. 표적 영역에 기반하여 선택되었다:

[0365] 표 1:

서열 번호	항원/면역원	ADM 영역	명칭	친화성 상수 Kd (M)
SEQ ID: 21	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC	1-21	NT-H	5.9 x 10 ⁻⁹
SEQ ID: 22	CTVQKLAHQIQ	21-32	MR-H	2 x 10 ⁻⁹
SEQ ID: 23	CAPRSKISPQGY-NH ₂	C-42-52	CT-H	1.1 x 10 ⁻⁹
SEQ ID: 24	YRQSMNQGSRSNGCRFGTC	1-19	NT-M	3.9 x 10 ⁻⁹
SEQ ID: 25	CTFQKLAHQIQ	19-31	MR-M	4.5 x 10 ⁻¹⁰
SEQ ID: 26	CAPRNKISPQGY-NH ₂	C-40-50	CT-M	9 x 10 ⁻⁹

[0366]

[0367] 효소 소화에 의한 항체 단편의 생성:

[0368] Fab 및 F(ab)₂ 단편의 생성은 무린 완전한 길이의 항체 NT-M의 효소 소화에 의해 수행되었다. 항체 NT-M은 a) 펩신-기반 F(ab)₂ 준비 키트 (피어스(Pierce) 44988) 및 b) 파파인-기반 Fab 제조 키트 (피어스 44985)를 사용하여 소화되었다. 단편화 절차는 공급자에 의해 제공된 지침에 따라 수행되었다. 소화는 F(ab)₂-단편화의 경우에 37°C에서 8시간 동안 수행되었다. Fab-단편화 소화는 각각 16시간 동안 수행되었다.

[0369] Fab 생성 및 정제에 대한 절차:

[0370] 고정화된 파파인은 수지를 0.5 ml의 소화 완충액으로 세척하고 칼럼을 5000 x g에서 1분 동안 원심분리함으로써 평형화시켰다. 상기 완충액은 나중에 폐기되었다. 탈염 칼럼은 저장 용액을 제거하고 이를 소화 완충액으로 세척한 후, 매번 1000 x g에서 2분 동안 원심분리함으로써 제조하였다. 이와 같이 제조된 IgG 샘플 0.5 ml를, 상기 평형화시킨 고정화된 파파인을 함유하는 스핀 칼럼 튜브에 부가하였다. 소화 반응의 인큐베이션 시간은 37°C의 탁상용 로커에서 16시간 동안 수행되었다. 상기 칼럼을 5000 x g에서 1분 동안 원심분리하여 고정화된 파파인으로부터 소화물을 분리하였다. 그 후, 수지를 0.5 ml PBS로 세척하고 5000 x g에서 1분 동안 원심분리하였다. 총 샘플 용적이 1.0 ml인 상기 소화된 항체에 세척 분획을 부가하였다. NAb 단백질 A 칼럼을 실온에서 PBS 및 IgG 용출 완충액으로 평형화시켰다. 상기 칼럼을 1분 동안 원심분리하여 저장 용액 (0.02% 소듐 아지드 함유함)을 제거하고, 2 ml의 PBS를 부가함으로써 평형화시켰으며, 다시 1분 동안 원심분리한 다음 관류물을 버렸다. 샘플을 상기 칼럼에 적용하고 역위시킴으로써 재현탁하였다. 10분 동안 빙글빙글 회전하여 혼합하면서 실온에서 인큐베이션을 수행하였다. 칼럼을 1분 동안 원심분리하여, Fab 단편을 수반한 관류물을 모아 두었다. (참고문헌: *Coulter and Harris 1983. J. Immunol. Meth. 59, 199-203.; Lindner et al. 2010. Cancer Res. 70, 277-87; Kaufmann et al. 2010. PNAS. 107, 18950-5.; Chen et al. 2010. PNAS. 107, 14727-32; Uysal et al. 2009 J. Exp. Med. 206, 449-62; Thomas et al. 2009. J. Exp. Med. 206, 1913-27; Kong et al. 2009 J. Cell Biol. 185, 1275-840*).

[0371] F(ab')₂ 단편의 생성 및 정제에 대한 절차:

[0372] 고정화된 펩신은 수지를 0.5 ml의 소화 완충액으로 세척하고 칼럼을 5000 x g에서 1분 동안 원심분리함으로써

평형화시켰다. 상기 완충액은 나중에 폐기되었다. 탈염 칼럼은 저장 용액을 제거하고 이를 소화 완충액으로 세척한 후, 매번 1000 x g에서 2분 동안 원심분리함으로써 제조하였다. 이와 같이 제조된 IgG 샘플 0.5 ml를, 상기 평형화시킨 고정화된 펩신을 함유하는 스핀 칼럼 튜브에 추가하였다. 소화 반응의 인큐베이션 시간은 37 °C의 탁상용 로커에서 16시간 동안 수행되었다. 상기 칼럼을 5000 x g에서 1분 동안 원심분리하여 고정화된 과 과인으로부터 소화물을 분리하였다. 그 후, 수지를 0.5 mL PBS로 세척하고 5000 x g에서 1분 동안 원심분리하였다. 총 샘플 용적이 1.0 ml인 상기 소화된 항체에 세척 분획을 추가하였다. NAb 단백질 A 칼럼을 실온에서 PBS 및 IgG 용출 완충액으로 평형화시켰다. 상기 칼럼을 1분 동안 원심분리하여 저장 용액 (0.02% 소듐 아지드를 함유함)을 제거하고, 2 mL의 PBS를 추가함으로써 평형화시켰으며, 다시 1분 동안 원심분리한 다음 관류물을 버렸다. 샘플을 상기 칼럼에 적용하고 역위시킴으로써 재현탁하였다. 10분 동안 빙글빙글 회전하여 혼합하면서 실온에서 인큐베이션을 수행하였다. 칼럼을 1분 동안 원심분리하여, Fab 단편을 수반한 관류물을 모아 두었다. (참고문헌: *Mariani et al. 1991. Mol. Immunol. 28: 69-77; Beale 1987. Exp Comp Immunol 11:287-96; Ellerson et al. 1972. FEBS Letters 24(3):318-22; Kerbel and Elliot 1983. Meth Enzymol 93:113-147; Kulkarni et al. 1985. Cancer Immunol Immunotherapy 19:211-4; Lamovi 1986. Meth Enzymol 121:652-663; Parham et al. 1982. J Immunol Meth 53:133-73; Raychaudhuri et al. 1985. Mol Immunol 22(9):1009-19; Rousseaux et al. 1980. Mol Immunol 17:469-82; Rousseaux et al. 1983. J Immunol Meth 64:141-6; Wilson et al. 1991. J Immunol Meth 138:111-9).*

[0373] NT-H-항체 단편 인간화:

[0374] 항체 단편은 CDR 이식 방법에 의해 인간화되었다 (*Jones et al. 1986. Nature 321, 522-525*).

[0375] 인간화 서열을 달성하기 위해 하기 단계가 실행되었다:

[0376] - 총 RNA 추출: 퀴아젠(Qiagen) 키트를 사용하여 NT-H 하이브리도마로부터 총 RNA를 추출하였다.

[0377] - 제1 라운드 RT-PCR: QIAGEN® 윈스텝 RT-PCR 키트 (Cat No. 210210)를 사용하였다. RT-PCR은 중쇄 및 경쇄에 특이적인 프라이머 세트로 수행되었다. 각각의 RNA 샘플에 대해, 12개의 개별 중쇄 및 11개의 경쇄 RT-PCR 반응이, 가변 영역의 리더 서열을 커버하는 축퇴성 정방향 프라이머 혼합물을 사용하여 설정되었다. 역방향 프라이머는 중쇄 및 경쇄의 불변 영역 내에 위치한다. 제한 부위는 프라이머로 조작되지 않았다.

[0378] - 반응 설정: 5x QIAGEN® 윈스텝 RT-PCR 완충액 5.0 µl, dNTP 믹스 (각각의 dNTP 10 mM를 함유함) 0.8 µl, 프라이머 세트 0.5 µl, QIAGEN® 윈스텝 RT-PCR 효소 믹스 0.8 µl, 주형 RNA 2.0 µl, 20.0 µl까지의 RNase-유리 수, 총 용적 20.0 µl PCR 조건: 역전사: 50°C, 30분; 초기 PCR 활성화: 95°C, 15분 사이클링: 94°C, 25초의 20 사이클; 54°C, 30초; 72°C, 30초; 최종 연장: 72°C, 10분; 제2 라운드 반중첩 PCR: 제1 라운드 반응으로부터의 RT-PCR 산물을 제2 라운드 PCR에서 추가로 증폭시켰다. 항체 가변 영역에 특이적인 반중첩 프라이머 세트를 사용하여 12개의 개별 중쇄 및 11개의 경쇄 RT-PCR 반응을 설정하였다.

[0379] - 반응 설정: 2x PCR 믹스 10 µl; 프라이머 세트 2 µl; 제1 라운드 PCR 산물 8 µl; 총 용적 20 µl; 하이브리도마 항체 클로닝 리포트 PCR 조건: 95°C에서 5분의 초기 변성; 95°C에서 25초 동안, 57°C에서 30초 동안, 68°C에서 30초 동안의 25 사이클; 최종 연장은 68°C에서 10분이다.

[0380] - PCR이 완료된 후, PCR 반응 샘플을 아가로스 겔 상으로 실행하여, 증폭된 DNA 단편을 시각화한다. 증폭된 RT-PCR에 의해 증폭된 15개 초과 클로닝된 DNA 단편을 시퀀싱한 후, 여러 마우스 항체 중쇄 및 경쇄를 클로닝하였고 정확하게 나타났다. 단백질 서열 정렬 및 CDR 분석은 하나의 중쇄와 하나의 경쇄를 확인시켜 준다. 가변 중쇄 내의 위치 26, 40 및 55 상의 아미노산과 가변 경쇄 내의 위치 40 상의 아미노산이 결합 특성에 중요하기 때문에, 이들을 무린 오리지널로 되돌릴 수 있다. 이로써 생성된 후보는 하기에 서술된다 (*Padlan 1991. Mol. Immunol. 28, 489-498; Harris and Bajorath.1995. Protein Sci. 4, 306-310*).

[0381] 항체 단편 서열 (서열식별번호: 13 - 22)에 대한 주석: 볼드체와 밑줄은 연대순으로 배열된 CDR 1, 2, 3이고; 이탤릭체는 불변 영역이며; 힌지 영역은 볼드체로 강조 표시되고 히스티딘 태그는 볼드체 및 이탤릭체로 강조 표시된다.

- [0382] 서열식별번호: 13 (AM-VH-C)
 QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSG
STNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFFDYWGQTTLT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH
- [0383]
- [0384] 서열식별번호: 14 (AM-VH1)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFFDYWGQGTTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH
- [0385]
- [0386] 서열식별번호: 15 (AM-VH2-E40)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFFDYWGQGTTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH
- [0387]
- [0388] 서열식별번호: 16 (AM-VH3-T26-E55)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFFDYWGQGTTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH
- [0389]
- [0390] 서열식별번호: 17 (AM-VH4-T26-E40-E55)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS
GSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFFDYWGQGTTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH
- [0391]
- [0392] 서열식별번호: 18 (AM-VL-C)
 DVLLSQTPLSLPVSLGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSN
 RFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0393]
- [0394] 서열식별번호: 19 (AM-VL1)
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSN
 RDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0395]

[0396] 서열식별번호: 20 (AM-VL2-E40)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSN**
 RDSGVVDRFSGSGSGDTFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQGSHPYTFGQGTKLEIKRTVA**
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0397]

[0398] 실시예 2

[0399] 면역검정의 개발

[0400] 인간 ADM 펩티드 (NT-H, MR-H 및 CT-H; 표 1 참조)에 대하여 생성된 항체를 사용하는 면역검정이 개발되었다.

[0401] 표지화 절차 (트레이서): 100 µg (100 µl)의 항체 (PBS, pH 7.4 중 1 mg/ml)를 10 µl의 아크리디늄 NHS-에스테르 (아세토니트릴 중 1 mg/ml; 인벤트 게엠베하(InVent GmbH; 독일))와 혼합하고 (*EP 0 353 971*) 및 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 표지된 CT-H는 바이오-실(Bio-Sil)® SEC 400-5 (바이오-라드 레보러토리즈, 인크.(Bio-Rad Laboratories, Inc.; 미국)) 상에서 겔 여과 HPLC에 의해 정제되었다. 이와 같이 정제된 표지된 항체를 (300 mmol/L 인산칼륨, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Na-EDTA, 5 g/L 소 혈청 알부민, pH 7.0)에 희석하였다. 최종 농도는 200 µL 당 표지된 화합물 (대략 20 ng 표지된 항체)의 대략 800.000 상대 광 단위 (RLU)였다. 아크리디늄 에스테르 화학발광은 오토루마트(AutoLumat) LB 953 (베르톨트 테크놀로지스 게엠베하 운트 코 카게(Berthold Technologies GmbH & Co. KG))을 사용함으로써 측정되었다.

[0402] 고체 상: 폴리스티렌 튜브 (그라이너 바이오-원 인터내셔널 아게(Greiner Bio-One International AG; 오스트리아))를 항체 (1.5 µg 항체/0.3 mL 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L TRIS/HCl, pH 7.8)로 코팅하였다 (실온에서 18 시간). 5% 소 혈청 알부민으로 차단한 후, 튜브를 PBS (pH 7.4)로 세척하고 진공 건조시켰다.

[0403] 캘리브레이터: 합성 인간 ADM (hADM) (바켄(Bachem; 스위스))을 50 mM 트리스/HCl, 250 mM NaCl, 0.2% 트리톤 X-100, 0.5% BSA, 20 탭/L 프로테아제 완전 프로테아제 억제제 카테일 정제 (로슈 아게(Roche AG)); pH 7.8을 사용하여 선형으로 희석하였다. 사용하기 전에 캘리브레이터를 -20°C 하에 저장하였다.

[0404] ADM 면역검정: 50 µl의 샘플 (또는 캘리브레이터)을 코팅된 튜브 내로 피펫팅하고, 표지된 제2 항체 (200 µl)를 추가한 후, 상기 튜브를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 결합되지 않은 트레이서는 세척 용액 (20 mM PBS, pH 7.4, 0.1% 트리톤 X-100)으로 5회 (각각 1 ml) 세척함으로써 제거되었다. 튜브 결합된 화학발광은 LB 953 (베르톨트 테크놀로지스 게엠베하 운트 코 카게)을 사용함으로써 측정되었다. 항체는 코팅된 튜브 및 표지된 항체로서 샌드위치 면역검정에 사용되었고 하기 변동으로 조합되었다 (표 2 참조). hADM-면역검정 하에 기재된 바와 같이 인큐베이션을 수행하였다. 결과는 특이적 시그널 (10 ng/ml ADM에서)/배경 (ADM 없는 샘플) 시그널의 비율로 제공된다.

[0405] 표 2:

시그널/노이즈 비율	NT-ADM 트레이서	MR-ADM 트레이서	CT-ADM 트레이서
NT-ADM	/	195	241
MR-ADM	204	/	904
CT-ADM	260	871	/

[0406]

[0407] 놀랍게도, 본 발명자들은 최고의 시그널/노이즈 비율을 위한 조합으로서 MR-ADM과 CT-ADM의 조합을 밝혀내었다. 후속적으로, 본 발명자들은 바이오-ADM을 측정하기 위한 추가 조사를 위해 이러한 항체 조합을 사용하였다. 본 발명자들은 항-MR-ADM을 고체 상 항체로서 사용하였고, 항-CT-ADM을 표지된 항체로서 사용하였다. 전형적인 용량/시그널 곡선이 도 1에 제시되어 있다.

[0408] 실시예 3

[0409] 인간 아드레노메둘린의 안정성

[0410] 인간 ADM을 인간 시트레이트 혈장 (n=5, 최종 농도 10 ng ADM/ml)에 희석하고 24°C에서 인큐베이션하였다. 선택된 시점에서, 분취액은 -20°C에서 동결되었다. 해동 직후에, 샘플 hADM을 상기 기재된 hADM 면역검정을 사용

함으로써 정량화하였다.

[0411] 표 3은 24℃ 하에 인간 혈장에서의 hADM의 안정성을 보여준다.

시간 (h)	평균 ADM 회수율 (N=5)	면역 반응성의 상대적 손실	면역 반응성의 손실 %/ h
0	100	/	/
2	99.2	0.8	0.4
4	96.4	3.6	0.8
8	88.2	11.8	1.5
			평균: 0.9%/ h

[0412]

[0413] 놀랍게도, 샌드위치 면역 검정에서 항체 조합 MR-ADM과 CT-ADM을 사용하면, 분석물의 사전 분석 안정성이 높다 (면역 반응성의 평균 손실은 단지 0.9%/h임). 대조적으로, 다른 검정 방법을 사용하면, 단 22분의 혈장 반감기가 보고되었다 (*Hinson et al. 2000 Endocrine Reviews 21(2):138-167*). 병원 루틴에서 샘플 채취부터 분석까지의 시간이 2시간 미만이기 때문에, 사용되는 ADM 검출 방법은 일상적인 진단에 적합하다. 샘플에 대한 임의의 비-일상적인 부가제 (예컨대 아프로티닌) (*Ohta et al. 1999. Clin Chem 45 (2): 244-251*)는 허용되는 ADM-면역 반응성 안정성에 도달하는데 필요하지 않다는 것이 놀랍다.

[0414] **실시예 4**

[0415] 캘리브레이터-제조와 재현성 및 캘리브레이터의 제조간 변동

[0416] 본 발명자들은 ADM 검정을 위한 캘리브레이터를 제조하면서 결과의 큰 변동을 발견하였다 (평균 CV 8.5%; 표 4 참조). 이는 플라스틱 및 유리 표면에 대한 hADM의 높은 흡착 때문일 수 있다 (*Lewis et al. 1998. Clinical Chemistry 44 (3): 571-577*). 이러한 효과는 세제 (최대 1% 트리톤 X 100 또는 1% 트윈 20), 단백질 (최대 5% BSA) 및 높은 이온 강도 (최대 1 M NaCl) 또는 그의 조합을 부가함으로써 약간만 감소하였다. 놀랍게도, 과잉의 항-NT-ADM 항체 (10 µg/ml)가 캘리브레이터 희석 완충액에 부가되는 경우에는, ADM 검정 캘리브레이터 제조의 회수율 및 재현성이 실질적으로 제조간 CV의 < 1%으로 개선되었다 (표 4). 변동 계수는 5개의 독립적 제조 실행으로부터 제공된다. 캘리브레이터는 상기 기재된 ADM 검정을 사용하여 측정되었다 (s/n-r = 시그널 대 노이즈 비율). 이후의 모든 연구에 대해서, 본 발명자들은 트레이서 완충액에 보충제로서 10 µg/ml의 NT-ADM 항체 및 10 µg/ml의 NT-ADM 항체의 존재 하에 제조된 캘리브레이터를 기반으로 하는 ADM 검정을 사용하였다.

[0417] 다행히, N-말단 항체의 존재는 MR-말단 항체와 C-말단 항체의 조합에 의해 생성된 바이오-ADM-시그널에 영향을 미치지 않았다 (도 1).

[0418] 표 4:

	NT-ADM 항체 (10µg/ml)의 존재 하에	제조간 CV (%)	항체 없음	제조간 CV (%)
캘리브레이터				
100ng/ml	3453 s/n-r	0.9	2842 s/n-r	2.8
10ng/ml	1946 s/n-r	0.8	1050 s/n-r	7.9
1ng/ml	179 s/n-r	1.1	77 s/n-r	14.8
		평균: 0.93		평균: 8.5

[0419]

[0420] **실시예 5**

[0421] 감도

[0422] 검정 감도의 목표는 건강한 대상체의 ADM 농도와 상당히 더 낮은 농도를 완전히 커버하는 것이었다.

- [0423] 건강한 대상체에서의 바이오-ADM 농도
- [0424] 건강한 대상체 (n=88, 여성 57명, 남성 31명, 평균 연령: 42.2세)는 바이오-ADM 검정을 사용하여 측정되었다 (*Weber et al. 2017. JALM, 2(2): 222-233*). 중앙값 사분위수 범위 (IQR)는 13.7 (9.6 - 18.7) pg/mL이고 평균 (SD)은 15.6 (9.2) pg/mL였다. 검정 감도 (검출 한계)가 3 pg/mL이기 때문에, 상기 기재된 바이오-ADM 검정을 사용하여 건강한 대상체의 100%를 검출할 수 있었다.
- [0425] **실시예 6**
- [0426] 연구 설계 및 모집단 MPP
- [0427] 말피 예방 프로젝트 (MPP: Malmö Preventive Project)는 1970년대 중반 일반 모집단의 CV 위험 인자를 조사하기 위해 자금을 지원했으며, 말피에 거주하는 33,346명의 개체가 등록되었다 (*Fedorowski et al. 2010. Eur Heart J 31: 85-91*). 2002년과 2006년 사이에, 총 18,240명의 원래의 참가자가 초청에 반응하였고 (참여율, 70.5%), 종합적인 신체 검사와 혈액 샘플 수집을 포함하여 스크리닝되었다 (*Fava et al. 2013. Hypertension 2013; 61: 319-26*). MPP에서의 재검토가, 기준선으로서 간주되는 현재의 연구 중에 있다. 기준선에서 이전 CVD를 가진 대상체는 제외되었다. 바이오-ADM은 4,364명의 환자를 대상으로 기준선 평가 동안 수집된 혈장으로 부터 측정되었다. 34명의 환자는 혈액 샘플링 당시에 이미 알츠하이머병이 있는 것으로 진단받았다. 187명의 환자가 그 다음 7년 이내에 AD에 걸렸다 (발생 AD). 모든 참가자로부터 고지에 입각한 동의를 받았으며, 스웨덴 룬드에 있는 룬드 대학의 윤리 위원회가 연구 프로토콜을 승인하였다.
- [0428] 치매 진단에 관한 정보는 스웨덴 국립 환자 등록부 (SNPR)에 요청되었다. 등록부에서의 진단은 국제 질병 분류 (ICD) 코드 290, 293 (ICD-8), 290, 331 (ICD-9) 또는 F00, F01, F03, G30 (ICD-10)의 상이한 개정판에 따라 수집되었다. 1987년부터, SNPR은 스웨덴의 모든 입원 환자 진료를 포함하며, 또한 2000년 이후 기록된 개인 및 공공 간병인 둘 다의 주간 수술 및 정신과 진료를 포함한 외래 환자 방문에 대한 데이터를 함유한다. 모든 원인 치매는 정신 장애 진단 및 통계 매뉴얼 (DSM)-III 개정판의 기준에 따라 진단된 반면, DSM-IV 기준이 알츠하이머병 및 혈관성 치매 진단에 적용되었다. 진단은 의료 기록 뿐만 아니라 가능한 경우 신경영상화 데이터를 철저히 검토하여 검증되었다. 연구 의사는 각각의 환자에 대한 최종 진단을 할당하였고, 해결되지 않은 증례에는 인지 장애 전문인 노인의학 전문의와 상의하였다. 본 발명자들은 증례 대조군 연구를 위한 데이터 세트를 선택하였고, MR-프로ADM은 MPP의 서브-코호트에서 측정되었다 (n=250명 대조군 및 n=150명의 발생 AD가 있는 대상체). 더욱이, 바이오-ADM은 혈액 샘플링 당시에 이미 알츠하이머병이 있는 것으로 진단된 환자의 독립적 코호트에서 측정되었다 (= 유병 AD; n=150).
- [0429] 상업적 완전 자동화 균질 시간-분해 형광면역검정을 사용하여 혈장 중의 MR-프로ADM을 측정하였다 (BRAHMS MR-프로ADM KRYPTOR; BRAHMS GmbH; 독일 헤니그스도르프) (*Caruhel et al. 2009. Clin Biochem. 42 (7-8):725-8*).
- [0430] 통계 분석: 값은 평균 및 표준 편차, 중앙값 및 사분위수 범위 (IQR) 또는 계수 및 백분율로 적절하게 표현된다. 연속 변수의 군 비교는 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 테스트를 사용하여 수행되었다. 바이오마커 데이터는 로그-변환되었다. 콕스 비례 위험 회귀 분석을 사용하여 단 변수 및 다 변수 분석에서 생존에 대한 위험 인자의 영향을 분석하였다. 비례 위험의 가정은 모든 변수에 대해 테스트되었다. 연속 변수의 경우, 하나의 IQR의 바이오마커 변화에 대한 HR을 설명하기 위해 위험 비율 (HR)이 표준화되었다. 위험 인자에 대한 95% 신뢰 구간 (CI)과 카이 제곱에 대한 유의성 수준 (왈드(Wald) 테스트)이 제공된다. 각각의 모델의 예측 값은 모델 개연성 비율 카이 제곱 통계로써 평가되었다. 일치 지수 (C 지수)는 효과 척도로서 제공된다. 이는 이전 결과에 채택된 AUC의 개념과 동일하다. 다 변수 모델의 경우, C 지수의 부트스트랩 교정된 버전이 제공된다. 카플란 마이어 방법에 의해 플롯된 생존 곡선이 예시적 목적으로 사용되었다. 임상 변수로부터 바이오-ADM의 독립성을 테스트하기 위해, 본 발명자들은 중첩 모델에 대한 개연성 비율 카이 제곱 테스트를 사용하였다.
- [0431] 모든 통계 테스트는 양측이었고, 0.05의 양측 p-값이 유의성으로 간주되었다. 통계 분석은 R 버전 2.5.1 (<http://www.r-project.org>, library Design, Hmisc, ROCR) 및 사회 과학을 위한 통계 패키지 (SPSS) 버전 22.0 (SPSS 인크.(SPSS Inc.; 미국 일리노이주 시카고))를 사용하여 수행되었다.
- [0432] 결과:

[0433] 코호트의 기준선 특징이 표 5에 제시되어 있다.

변수	n=4364
연령	69.4 (6.2)
성별 남성	3008 (68.9%)
현재 흡연	835 (19.1%)
AHT	1476 (33.8%)
HDL	1.4 (0.4)
LDL	3.7 (1.0)
BMI	27.1 (6.2)
SBP	146.6 (20.3)
유병 당뇨병	466 (10.7%)
발생 AD	187 (4.3%)
유병 AD	34 (0.8%)

[0434]

[0435]

MPP 코호트와 독립적 알츠하이머병 코호트에서의 바이오-ADM 농도가 도 2에 제시되어 있다. 독립적 코호트에서 시간이 지남에 따라 AD가 발생하는 환자 (발생 AD)와 혈액 샘플링 당시에 AD가 있는 환자 (유병 AD)에서의 바이오-ADM 농도는 비-AD 군과 비교해서 유의하게 더 낮다 (각각 $p=0.01$ 및 <0.0001). MPP 코호트 ($n=34$)로부터의 유병 AD를 가진 군은 또한, 비-AD 군과 비교해서 더 낮은 바이오-ADM 농도를 나타냈지만, 작은 샘플 크기로 인해 통계적으로 유의하진 않았다.

[0436]

낮은 바이오-ADM 혈장 농도는 0.73의 위험 비율 (HR) (CI 0.6 - 0.87; $p<0.001$)을 나타내는 알츠하이머병을 강력하게 예측한다. 도 3은 바이오-ADM 농도를 이용하여 알츠하이머병을 예측하기 위한 카플란 마이어 플롯을 제시한다 (유병 AD 증례는 본 분석으로부터 배제되었음). 가장 낮은 사분위수는 AD에 걸릴 위험이 가장 높은 것과 연관이 있다.

[0437]

본 발명자들은 $n = AD$ 가 발생하지 않은 250명의 대상체 및 $n = 7$ 년의 추적 시간 내에 AD가 발생한 150명의 대상체를 수반하는, MPP 코호트 (이전 CVD 및 AD가 없음)로부터의 400명의 환자를 선택하여 증례 대조군에 대한 데이터 세트를 창출하였다. 다시 언급하면, 바이오-ADM 농도는 비-AD 군과 비교해서 발생 AD 환자와 유병 AD 환자 (독립적 코호트)에서 유의하게 더 낮았다 (모든 비교에 대해 $p<0.0001$) (도 4). 또한, MR-프로ADM은 MPP 증례 대조군 대상체에서 측정되었으며, 비-AD 군과 비교해서 발생 AD에서 약간 높았지만 유의하게 더 높지는 않았다 (도 5).

[0438]

그 다음 단계에서, 본 발명자들은 두 바이오마커인 바이오-ADM과 MR-프로ADM을 조합하였다. 비율을 계산하기 위해, 두 마커의 농도를 바람직하게는 동일한 단위 (예를 들어 pmol/L)로 표현해야 한다. 따라서, 비율을 계산하는 관점에서, 바이오-ADM에 대한 농도는 pmol/L로 계산되었다. 바이오-ADM과 MR-프로ADM의 비율은 비-AD 대상체와 비교할 때 발생 AD가 있는 대상체에서 유의하게 감소한다 ($p<0.0001$; 도 6). 바이오-ADM 단독으로도 오즈 비 (OR: Odds Ratio)가 0.44 (CI 0.33 - 0.58)인 알츠하이머병을 강력하게 예측한다. 그러나, 바이오-ADM과 MR-프로ADM의 비율은, OR이 0.32 (CI 0.23-0.44)인 바이오-ADM 단독 ($p<0.001$)보다 더 우수하다. 바이오-ADM에 대한 각각의 수신기 작동 곡선 (ROC 플롯) 및 바이오-ADM과 MR-프로ADM의 비율은 각각 도 7a 및 7b에 제시되어 있으며, 바이오-ADM에 대한 AUC가 0.67 (95% CI 0.61-0.72)인 것으로 밝혀졌고, 바이오-ADM과 MR-프로ADM 사이의 비율이 0.73 (95% CI 0.68-0.78)인 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 바이오-ADM과, 바이오-ADM과 MR-

프로ADM의 비율 둘 다는 연령과 성별에 독립적이다.

[0439] 실시예 7 - 건강한 인간에서의 NT-H의 투여

[0440] 본 연구는 건강한 남성 대상체 (n=6 활성, n = 각각의 군에 대해 2개의 위약)의 각각 8명의 건강한 남성 대상체로 구성된 3개의 순차적 군 (제1 군 0.5 mg/kg, 제2 군 2 mg/kg, 제3 군 8 mg/kg)에서 단일 단계적 상승 용량의 NT-H 항체를 정맥내 (i.v.) 주입으로서 투여한, 무작위화, 이중 맹검, 위약 대조 연구로서 건강한 남성 대상체를 대상으로 시행되었다.

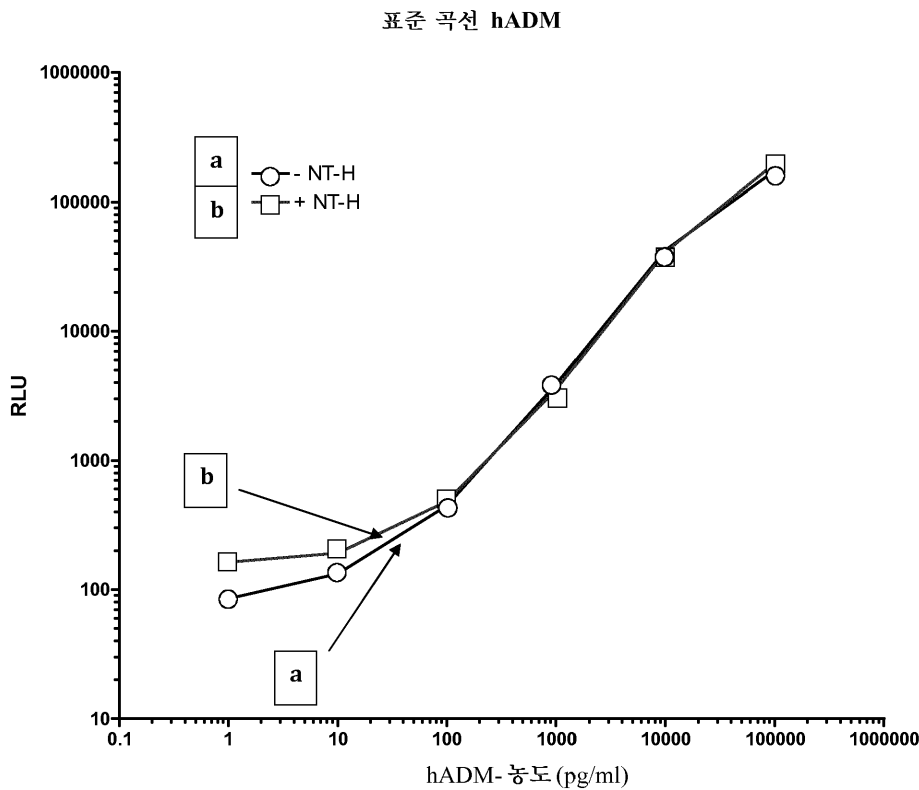
[0441] 주요 시험 대상 환자 기준은 고지에 입각한 서면 동의, 18세 - 35세 연령, 신뢰할 수 있는 피임 방법 사용에 대한 동의 및 18 내지 30 kg/m²의 BMI였다. 대상체는 단일 정맥내 용량의 NT-H 항체 (0.5 mg/kg; 2 mg/kg; 8 mg/kg) 또는 위약을 연구 유닛에서 1시간에 걸쳐 서서히 주입함으로써 투여 받았다.

[0442] 4개 군에서의 기준선 바이오-ADM-값은 상이하지 않았다. 중앙값 바이오-ADM 값은 위약 군에서 7.1 pg/mL이고, 제1 치료 군 (0.5 mg/kg)에서 6.8 pg/mL이며, 제2 치료 군 (2 mg/kg)에서 5.5 pg/mL이고, 제3 치료 군 (8 mg/kg)에서 7.1 pg/mL였다.

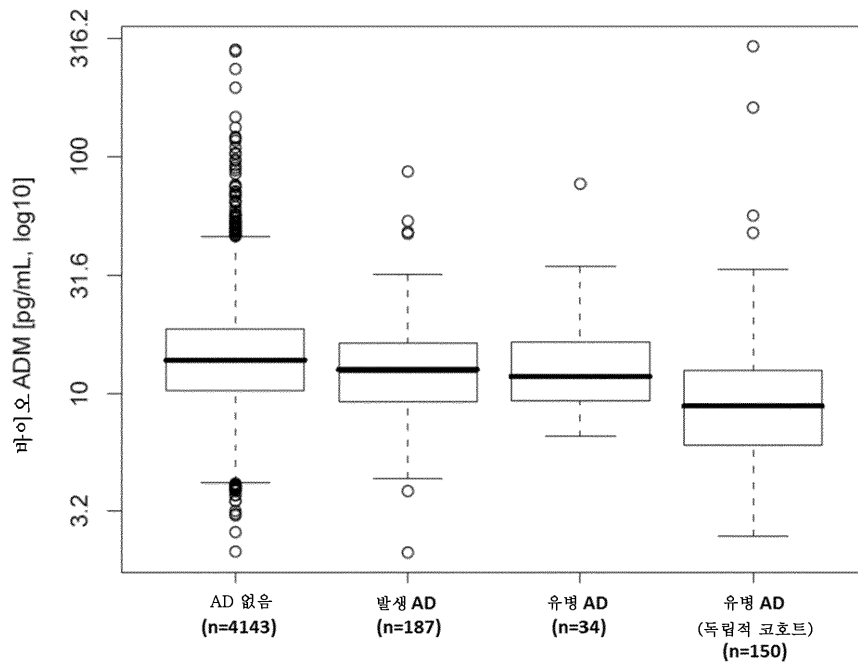
[0443] 그 결과는 건강한 인간 개체에서의 NT-H 항체의 투여 후 처음 1.5시간 내에 바이오-ADM-값이 급격하게 증가한 다음, 정점에 도달하고 서서히 감소한다는 것을 보여준다 (도 8).

도면

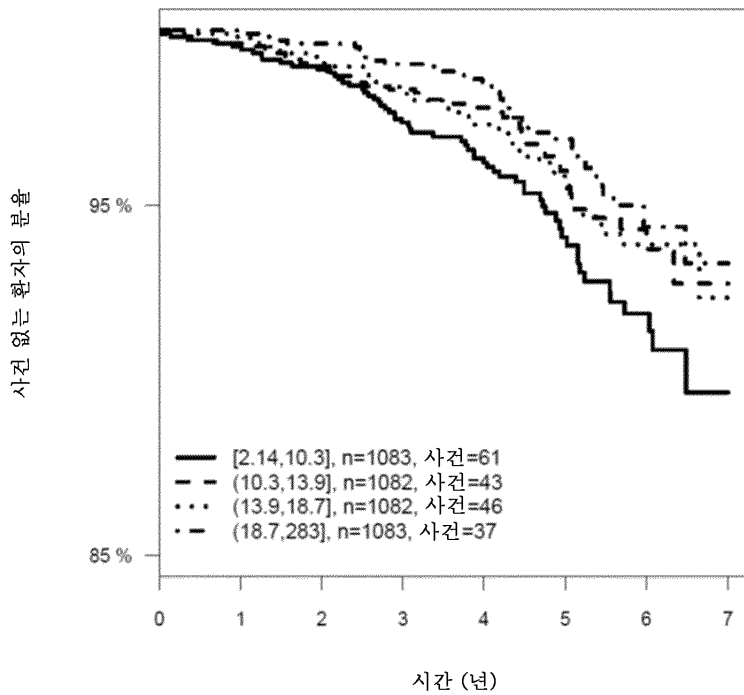
도면1



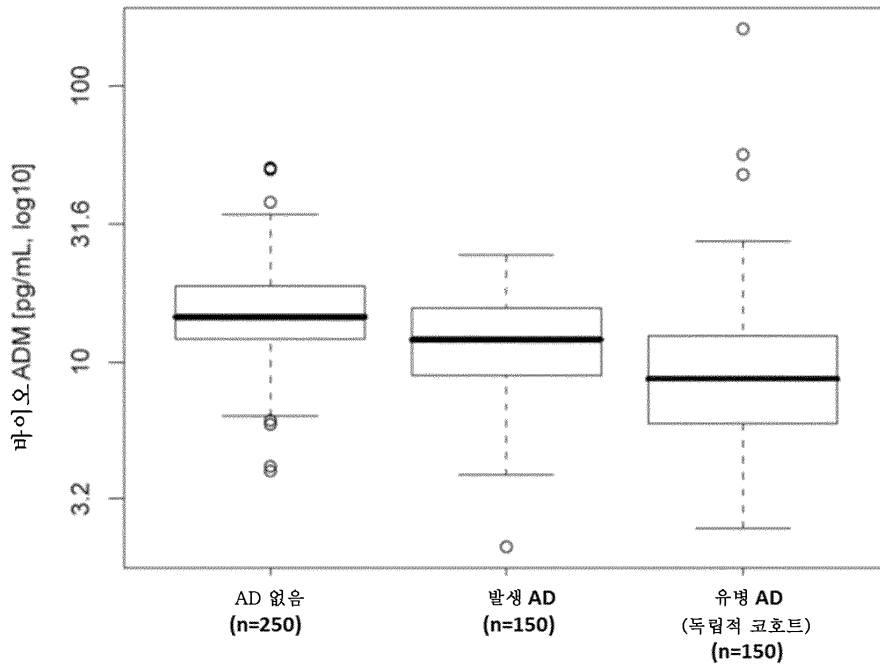
도면2



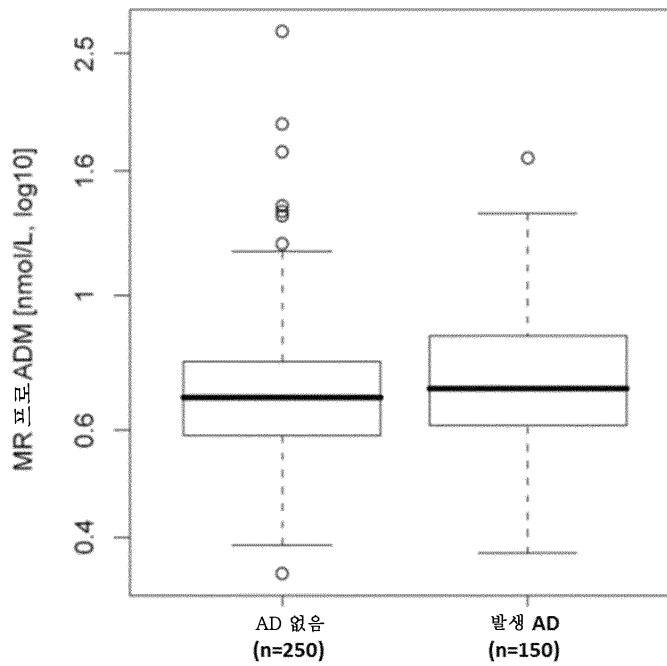
도면3



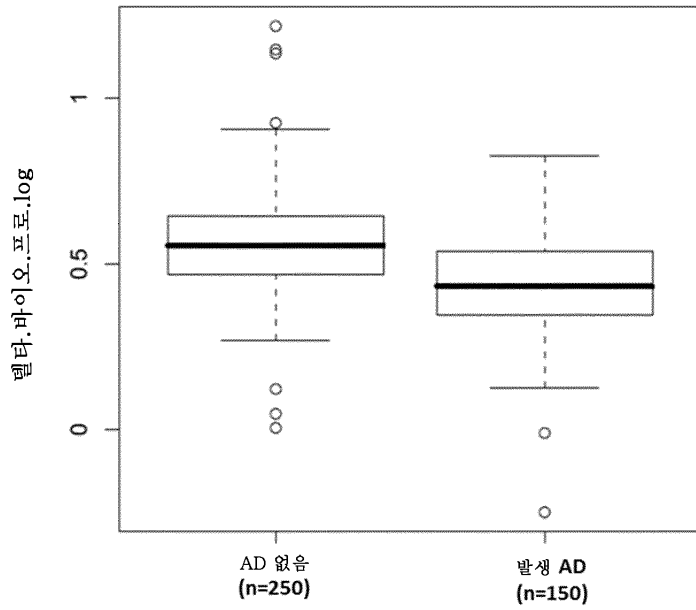
도면4



도면5

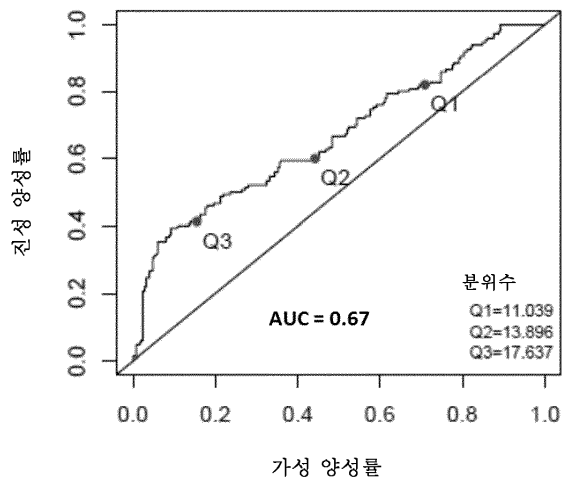


도면6



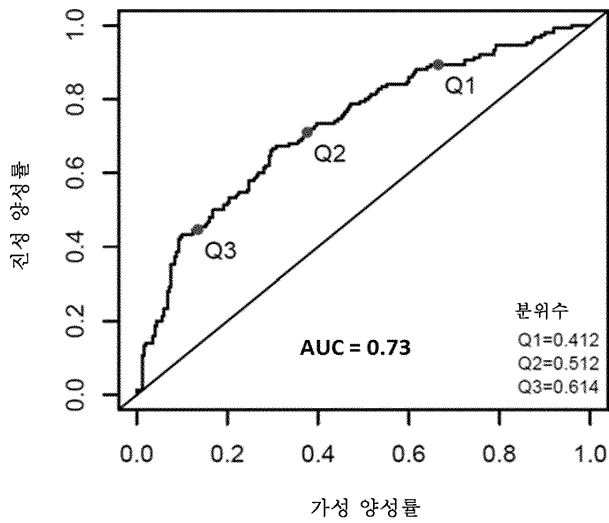
도면7a

바이오-ADM



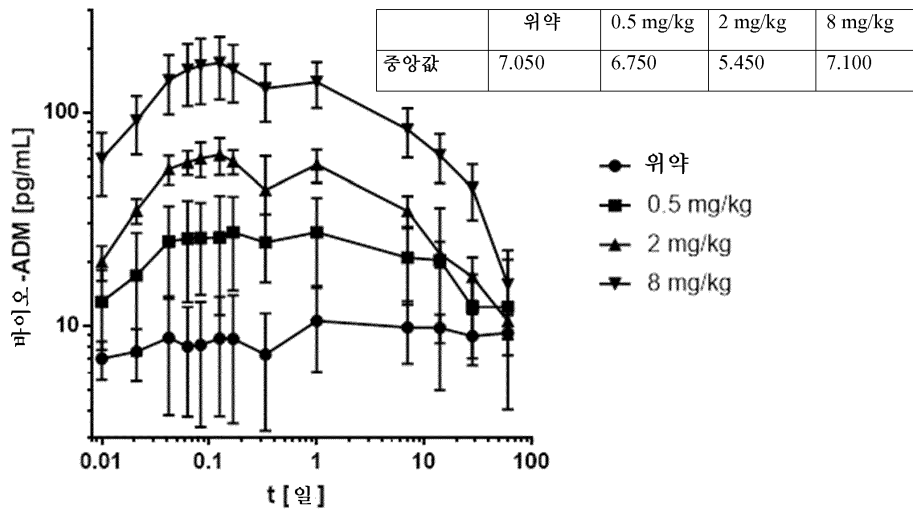
도면7b

MR- 프로 ADM



도면8

기준선 바이오-ADM [pg/mL]:



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> sphingotec GmbH

<120> Adrenomedullin for diagnosis and/ or prediction of dementia and

Anti-Adrenomedullin (ADM) Binder for use in therapy or prevention of dementia

<130> S75193W0

<150> EP18155682.0

<151> 2018-02-08

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 185

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala

50 55 60

Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg

85 90 95

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe

100 105 110

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr

115 120 125

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln

130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu

180 185

<210> 2

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Arg
 20

<210> 3
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys
 1 5 10 15
 Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala
 20 25 30
 Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val
 35 40 45

<210> 4
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
 20 25 30
 Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
 35 40 45
 Pro Gln Gly Tyr
 50

<210> 5

<211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

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

<210> 6
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly Arg Thr Leu
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly
 20 25 30
 Ser Ala Pro His Phe Leu
 35

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Adrezizumab
 <400> 7

Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Trp
 1 5
 <210> 8
 <211> 8

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 8

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 9

Thr Glu Gly Tyr Glu Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 10

Gln Ser Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 11

Arg Val Ser

1

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Glu Gly Tyr Glu Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys His His His His His
 210 215 220

His

225

<210> 15

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 15

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

Gly Arg Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Glu Gly Tyr Glu Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

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

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

 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys His His His His His
 210 215 220
 His
 225
 <210> 18
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Adrezizumab
 <400> 18

Asp Val Leu Leu Ser Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

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

 Ser His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 19
 <211> 219

 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 19

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser

 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro

 50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

 85 90 95

Ser His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

 115 120 125

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

 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

 210 215

<210> 20

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adrezizumab

<400> 20

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys

1

5

10

15

Arg Phe Gly Thr Cys

20

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln

1

5

10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Cys Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

1

5

10

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Gln Gly Ser Arg Ser Asn Gly Cys Arg Phe

1

5

10

15

Gly Thr Cys

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Cys Thr Phe Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln

1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Cys Ala Pro Arg Asn Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly

1 5 10

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Tyr Arg Gln Ser Met Asn

1

5