(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0003067
(43) 공개일자 2020년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7035140
(22) 출원일자(국제) 2018년05월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년11월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/030931
(87) 국제공개번호 WO 2018/204679
국제공개일자 2018년11월08일
(30) 우선권주장
62/501,424 2017년05월04일 미국(US)
62/610,003 2017년12월22일 미국(US)

(71) 출원인
시와 코퍼레이션
미국, 일리노이 60601, 시카고 400 이스트 랜돌프 #3913
(72) 발명자
그루버, 루이스, 에스.
미국 일리노이주 60601 시카고 #3911 이스트 랜돌프 400
(74) 대리인
특허법인 무한

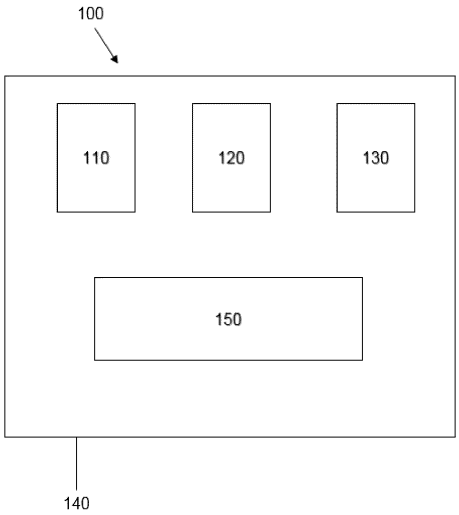
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **진단용 최종 당화 산물 항체**

(57) 요 약

환자에서 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 진단하는 방법으로서, 상기 방법은 환자로부터 샘플을 수득하는 단계; 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계; 및 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수가 대조군 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수보다 큰 경우, 상기 환자를 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 단계; 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 2800/7042 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 환자에서 세포노화(cellular senescence)와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태(pathological condition)를 진단하는 방법:

샘플을 환자로부터 수득하는 단계;

상기 샘플 중 세포-표면 AGE(cell-surface AGE)를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계; 및

상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수가 대조군 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수보다 큰 경우, 상기 환자를 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 단계.

청구항 2

하기 단계를 포함하는, 환자의 생물학적 연령을 결정하는 방법:

환자로부터 세포와 비-세포성 물질(non-cellular material)을 함유하는 샘플을 수득하는 단계;

상기 비-세포성 물질로부터 상기 세포를 분리하는 단계;

상기 세포와 항-AGE 항체를 접촉시키고 세포-표면 AGE와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계;

상기 비-세포성 물질과 항-AGE 항체를 접촉시키고 비-결합 AGE(unbound AGE)와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 비-결합 AGE의 수를 측정하는 단계; 및

상기 샘플 중 세포-표면 AGE 대 비-결합 AGE의 비율을 비교하는 단계.

청구항 3

하기 단계를 포함하는, 환자에서 세포노화로 인한 진행성 생물학적 노화(advanced biological aging)와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 진단하는 방법:

환자로부터 세포와 비-세포성 물질을 함유하는 샘플을 수득하는 단계;

상기 세포를 상기 비-세포성 물질로부터 분리하는 단계;

상기 세포와 항-AGE 항체를 접촉시키고 세포-표면 AGE와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계;

상기 비-세포성 물질과 항-AGE 항체를 접촉시키고 비-결합 AGE와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 비-결합 AGE의 수를 측정하는 단계;

상기 샘플 중 세포-표면 AGE 대 비-결합 AGE의 비율을 비교하여, 상기 환자의 생물학적 연령을 결정하는 단계; 및

상기 환자의 생물학적 연령이 상기 환자의 역연령(chronological age)을 초과하는 경우에, 상기 환자를 세포 노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 단계.

청구항 4

하기 단계를 포함하는, 환자에서 세포노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상

태를 진단하는 방법:

샘플을 환자로부터 수득하는 단계;

상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계;

상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 연령이 일치하는 대조군(age-matched control) 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수와 비교함으로써, 상기 환자의 생물학적 연령을 결정하는 단계; 및

상기 환자의 생물학적 연령이 상기 환자의 역연령(chronological age)보다 큰 경우, 상기 환자를 세포 노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 단계.

청구항 5

검출가능한 표지로 표지된 항-AGE 항체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, *생체내에서* 대상체의 AGE-변형 세포를 검출하는 방법.

청구항 6

하기를 포함하는, 세포-표면 최종 당화 산물(cell-surface advanced glycation end-product)을 발현하는 세포를 검출하기 위한 키트:

항-AGE 항체;

대조군 샘플; 및

임의적으로, 상기 항-AGE 항체에 결합하는 시약.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 샘플은 타액샘플, 협측 면봉(buccal swab), 혈액샘플, 피부샘플, 및 소변샘플로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 T-세포, 적혈구(erythrocyte), 섬유아세포(fibroblast) 및 상피세포(epithelial cell)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 측정하는 단계는 ELISA, 세포분리(cell sorting), 또는 세포계수(cell counting)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 진단하는 단계는 상기 샘플 중 적어도 5%의 세포가 세포-표면 AGE를 나타내는 경우, 상기 환자를 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 진단하는 단계는 상기 샘플 중 적어도 25%의 세포가 세포-표면 AGE를 나타내는 경우, 상기 환자를 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 포함하는 것인, 방법: 알츠하이머병, 근위축 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 만성 폐쇄성 폐질병(chronic obstructive pulmonary disease), 헌팅턴 무도병(Huntington's chorea), 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 근이영양증(muscular dystrophy), 황반변성(macular degeneration), 백내장(cataract), 당뇨 망막병증(diabetic retinopathy), 파킨슨병, 조로증(progeria), 백반증(vitiligo), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 아토피 피부염(atopic dermatitis), 습진(eczema), 관절염(arthritis), 죽상경화증(atherosclerosis), 암 및 전이성 암(metastatic cancer), 암치료-관련 장애(cancer therapy-related disability) 또는 암치료 부작용, 고혈압, 녹내장(glaucoma), 골다공증(osteoporosis), 근감소증(sarcopenia), 악액질(cachexia), 뇌졸중, 심근경색(myocardial infarction), 심방세동(atrial fibrillation), 이식거부(transplantation rejection), 제I형-당뇨병(diabetes mellitus - Type I), 제II형-당뇨병(diabetes mellitus - Type II), 방사선 노출(radiation exposure), HIV 치료 부작용, 화학무기 노출(chemical weapons exposure), 중독(poisoning), 염증, 신장병(nephropathy), 루이소체 치매(Lewy body dementia), 프리온병(prion disease), 척추 전후만증(lordokyphosis), 자가-면역질환(auto-immune disorder), 지방조직의 손실(loss of adipose tissue), 건선(psoriasis), 크론병(Crohn's disease), 천식(asthma), 노화의 생리학적 효과(physiological effects of aging), 특발성 근육병(idiopathic myopathy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 시신경 척수염(neuromyelitis optica), 뇌전증(epilepsy) 및 부신백질 이영양증(adrenoleukodystrophy).

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-AGE 항체는 FFI, 피랄린(pyrraline), AFGP, ALI, 카르복시메틸리신(carboxymethyllysine), 카르복시에틸리신(carboxyethyllysine) 및 펜토시딘(pentosidine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 AGE 변형을 나타내는 세포-표면 단백질 또는 펩티드에 결합하는 것인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-AGE 항체는 카르복시메틸리신-변형 단백질 또는 펩티드에 결합하는 것인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-AGE 항체는 카르복시에틸리신-변형 단백질 또는 펩티드에 결합하는 것인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-AGE 항체는,

중쇄; 및

경쇄;를 포함하고,

상기 중쇄는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 90%의 서열 일치도(sequence identity), 바람직하게는 적어도 95%의 서열 일치도, 더욱 바람직하게는 적어도 98%의 서열 일치도를 갖는 아미노산 서열을 포함하고,

상기 경쇄는 서열번호 3의 아미노산 서열과 적어도 90%의 서열 일치도, 바람직하게는 적어도 95%의 서열 일치도, 더욱 바람직하게는 적어도 98%의 서열 일치도를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 환자는 인간, 마우스, 랫트, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 개, 및 고양이로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 환자는 인간인 것인, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표지를 검출할 수 있는 장치에 상기 대상체를 노출시키는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 AGE-변형 세포는 노화세포(senescent cell)인 것인, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 AGE-변형 세포는 전이성 암세포인 것인, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표지는 방사성 표지(radiolabel), 형광표지(fluorescent label), 금 나노입자(gold nanoparticle), 가돌리늄 나노입자(gadolinium nanoparticle), 양전자 방출체(positron emitter), 근적외선(near infrared)에서 방출하는 염료, 퀀텀닷(quantum dot), 초상자성 산화철(superparamagnetic iron oxide), 탄소 나노튜브, 및 마이

크로 버블(microbubble)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 표지를 포함하는 것인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-AGE 항체에 결합하는 시약을 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 시약은 2차 항체를 포함하는 것인, 키트.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-AGE 항체, 상기 대조군 샘플, 및 상기 시약은 멸균한 것인, 키트.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

용기를 더 포함하고, 상기 항-AGE 항체, 상기 대조군 샘플, 및 상기 시약은 상기 용기내에 있는 것인, 키트.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-AGE 항체 및/또는 상기 시약은 표지되는 것인, 키트.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표지는 형광표지, 방사성 표지, 및 금 입자로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 표지를 포함하는 것인, 키트.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

노화세포 제거제(senescent cell removal agent)의 유효량을 진단된 환자에 투여하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 노화세포 제거제는 치료학적 항-AGE 항체, 독소에 컨쥬게이트된 항-AGE 항체, 세놀리틱 제제(senolytic

agent), 및 이들의 배합물을 포함하는 것인, 방법.

청구항 31

환자에서 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태의 치료에 이용하기 위한 노화세포 제거제로서, 상기 환자의 생물학적 연령은 상기 환자의 역연령을 초과하는 것인, 노화세포 제거제.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 환자의 생물학적 연령은 상기 기재된 방법을 이용하여 결정되는 것인, 노화세포 제거제.

청구항 33

환자에서 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은,

노화세포 제거제의 치료학적 유효량을 이러한 치료를 필요로 하는 환자에 투여하는 단계를 포함하고,

상기 환자의 생물학적 연령은 상기 환자의 역연령을 초과하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 노화세포는 부분적으로 기능성 또는 비-기능성이고 증식 정지(proliferative arrest) 상태인 세포이다. 노화(Senescence)는 세포의 분명한 상태(distinct state)이고, 바이오마커인 $p16^{Ink4a}$의 활성 및 β-갈락토시다아제(β-galactosidase)의 발현과 같은 바이오마커와 관련 있다. 노화는 세포의 손상 또는 스트레스[성장인자에 의한 과자극(overstimulation)과 같은]로 시작한다.

배 경 기 술

[0002] 최종 당화 산물 [Advanced glycation end-product, AGE; 또한, AGE-변형 단백질(AGE-modified protein) 또는 당화 최종산물(glycation end-product)이라고도 함]은 당(sugar)과 단백질 측쇄의 비-효소적 반응(non-enzymatic reaction)으로부터 발생한다(Ando, K. *외*, Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 258, 123, 125 (1999)). 이 과정은 시프 염기(Schiff base)를 형성하는 환원당과 아미노기 사이의 가역적인 반응으로 시작하고, 계속해서 공유결합 아마도리 전위 생성물(covalently-bonded Amadori rearrangement product)을 형성한다. 아마도리 생성물이 형성되면, 이 생성물은 추가의 전위를 겪어 AGE를 생성한다. 고혈당(Hyperglycemia) 및 산화 스트레스는 막 단백질의 이러한 번역-후 변형 (post-translational modification)을 촉진한다(Lindsey JB, *외*, "Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications," *Diabetes Vascular Disease Research*, Vol. 6(1), 7-14, (2009)).

또한, AGE는 다른 과정으로부터 형성될 수 있다. 예를 들어, 최종 당화 산물인, N^{ε}-(카르복시메틸)리신은 지질 과산화(lipid peroxidation)와 당산화(glycoxidation) 반응 모두의 생성물이다. AGE는 염증, 망막병증(retinopathy), 신장병(nephropathy), 죽상경화증(atherosclerosis), 뇌졸중, 내피세포 기능장애(endothelial cell dysfunction), 및 신경퇴행성 질환을 포함하는 몇몇 병리학적 상태들과 관련 있다(Bierhaus A, "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept," Cardiovasc Res, Vol. 37(3), 586-600 (1998)).

[0003] 또한, AGE-변형 단백질도 노화세포의 마커이다. 당화 최종산물과 노화 사이의 이러한 연관성은 당해분야에 주지되어 있다. 예를 들어, Gruber, L. (2009년 11월 26일자, 국제특허공보 WO 제2009/143411호), Ando, K. *외* (Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 258, 123, 125 (1999)), Ahmed, E.K. *외* ("Protein

Modification and Replicative Senescence of WI-38 Human Embryonic Fibroblasts" *Aging Cells*, vol. 9, 252, 260 (2010)), Vlassara, H. *외* (Advanced Glycosylation Endproducts on Erythrocyte Cell Surface Induce Receptor-Mediated Phagocytosis by Macrophages, *J. Exp. Med.*, Vol. 166, 539, 545 (1987)) 및 Vlassara *외* ("High-affinity-receptor-mediated Uptake and Degradation of Glucose-modified Proteins: A Potential Mechanism for the Removal of Senescent Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USAI*, Vol. 82, 5588, 5591 (1985))를 참고한다. 이에 더하여, Ahmed, E.K. *외*는 당화 최종산물이 "세포 단백질 및 세포외 단백질에 대한 자발적 손상의 주요한 원인 중 하나"라고 나타낸다 (Ahmed, E.K. *외*, 상기 참고, page 353). 따라서, 당화 최종산물의 축적은 노화 및 기능의 상실과 관련 있다.

[0004] 또한, 세포노화를 야기하는 손상 또는 스트레스는 세포 내 미토콘드리아 DNA에 부정적으로 영향을 끼쳐, 이들이 자유 라디칼 (free radical)을 생성하도록 야기하고, 이 라디칼은 세포에서 당과 반응하여 메틸 글리옥살(methyl glyoxal, MG)을 형성한다. 결국, MG는 단백질 또는 지질과 반응하여 최종 당화 산물을 생성한다. 단백질 성분인 리신의 경우, MG는 반응하여 AGE인 카르복시에틸리신(carboxyethyllysine)을 형성한다 (Al-Abed, Y. *외*, "N^{ε}-Carboxymethyllysine formation by direct addition of glyoxal to lysine during the Maillard reaction", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 5, No. 18, pp. 2161-2162 (1995)).

[0005] 또한, 미토콘드리아 DNA에 대한 손상 또는 스트레스는 세포가 세포주기 억제 단백질(cell cycle blocking protein)을 생성하도록 유도하는 DNA 손상 반응을 유발시킨다. 이들 억제 단백질은 세포가 분열하는 것을 막는다. 지속적인 손상 또는 스트레스는 mTOR 생성을 야기하고, 이는 결국 단백질 합성을 활성화하고, 단백질 분해를 불활성화한다. 세포의 추가의 자극은 프로그래밍된 세포 사멸(세포예정사)를 초래한다.

[0006] p16은 S기 (S phase, synthesis phase)를 억제함으로써 세포주기의 조절에 관여하는 단백질이다. 이는 노화하는 동안에 또는 DNA 손상, 산화 스트레스 또는 약물에 대한 노출과 같은 다양한 스트레스에 대한 반응으로 활성화될 수 있다. p16은 일반적으로 종양 억제 단백질로 여겨지며, 이는 세포가 DNA 손상에 대한 반응으로 노화를 시작하도록 야기하고, 세포가 과증식 상태(hyperproliferative state)로 진입하는 것으로부터 비가역적으로 막는다. 그러나, 일부 종양이 p16의 과발현을 보이는 반면, 다른 종양은 하향조절된 발현(downregulated expression)을 보이기 때문에, 이에 관해서 몇몇 불명료함이 존재한다. 근거는 일부 종양에서의 p16의 과발현이 결함 있는 망막모세포종 단백질(retinoblastoma protein, "Rb")로부터 야기된다는 것을 제시한다. p16은 Rb에 대해서 작용하여 S기를 억제하고, Rb는 p16을 하향조절하여, 음성 피드백(negative feedback)을 형성한다. 결함 있는 Rb는 S기의 억제와 p16의 하향조절 모두에 실패하므로, 과증식성 세포(hyperproliferating cell)에서 p16의 과발현을 야기한다 (Romagosa, C. *외*, $p16^{Ink4a}$ overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors, *Oncogene*, Vol. 30, 2087-2097 (2011)).

[0007] 노화세포는 전-염증성 인자를 포함하는 세포내 신호전달에 관여하는 많은 인자들의 분비와 관련 있고, 이들 인자의 분비는 노화-관련 분비 표현형(senescence-associated secretory phenotype) 또는 SASP라고 한다 (Freund, A. "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences" Trends Mol Med. 2010 May;16(5):238-46). 크론병 및 류마티스 관절염과 같은 자가면역 질병은 만성 염증과 관련 있다 (Ferraccioli, G. *외*, "Interleukin-1β and Interleukin-6 in Arthritis Animal Models: Roles in the Early Phase of Transition from Acute to Chronic Inflammation and Relevance for Human Rheumatoid Arthritis" Mol Med. 2010 Nov-Dec; 16(11-12): 552-557). 만성 염증은 병변 부위(site of pathology) 주변의 기초선보다 높은 수준이되, 급성 염증에서 발견되는 것보다는 낮은 수준인 전-염증성 인자의 존재를 특징으로 할 수 있다. 이들 인자의 예시는 TNF, IL-1α IL-1β, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, CD2, CD3, CD20, CD22, CD52, CD80, CD86, C5 보체 단백질(C5 complement protein), BAFF, APRIL, IgE, α4β1 인테그린 및 α4β7 인테그린을 포함한다. 또한, 노화세포는 IL-1β, IL-8, ICAM1, TNFAP3, ESM1 및 CCL2를 포함하는 염증에서 역할을 갖는 유전자를 상향조절한다 (Burton, D.G.A. *외*, "Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification", Experimental Gerontology, Vol. 44, No. 10, pp. 659-665 (October 2009)). 노화세포가 전-염증성 인자를 생성하기 때문에, 이들 세포의 제거만으로 염증 및 전-염증성 인자의 양 및 농도의 완전한 감소를 초래한다.

[0008] 노화세포는 SASP의 일환으로서 활성 산소종(reactive oxygen species, "ROS")을 분비한다. ROS는 세포의 노화를 유지하는 것에 있어, 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. ROS의 분비는 노화세포가 주변세포(neighboring cell)에서 노화를 유도하는 방관자 효과(bystander effect)를 형성한다: ROS는 p16 발현을 활성화하는 것으로 알려진 바로 그 세포손상을 야기하며, 이는 노화를 초래한다 (Nelson, G., A senescent cell bystander

effect: senescence-induced senescence, *Aging Cell*, Vo. 11, 345-349 (2012)). p16/Rb 경로는 ROS의 유도를 초래하여, 결국 ROS를 추가로 강화하는 양성 피드백 루프(positive feedback loop)를 형성해, 비가역적인 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 유지하도록 돕는 단백질 인산화효소 C 델타(protein kinase C delta)를 활성화시킨다; 심지어, 암세포를 ROS에 노출시키는 것이 과증식성 세포에서 세포기 정지(cell phase arrest)를 유도함으로써 암을 치료하는 것에 효과적일 수도 있다는 것이 제안되었다 (Rayess, H. *외*, Cellular senescence and tumor suppressor gene p16, *Int J Cancer*, Vol. 130, 1715-1725 (2012)).

[0009] 노화세포의 상대적인 수준(relative level)은 질병과 특이적인 상관관계를 가진다. 노화세포는 암 및 전이성 암과 오랫동안 관련 있었고, 10%의 노화 섬유아세포와의 세포배양이 성장 자극(growth stimulation)을 입증했다 (Krtolica, A. *외*, "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging", Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 98, No. 21, pp. 12072-12077 (2001)). 생물학적 노화의 척도인 유산소성 체력(Aerobic fitness)은 37% 미만의 노화 CD4+ 및 CD8+ T-세포와 관련 있다 (Spielmann, G. *외*, "Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man", Brain, Behavior and Immunity, Vol. 25, No. 8, pp. 1521-1529 (2011)). 또한, 철인 3종경기(Ironman triathlon)를 위한 6개월의 훈련 기간 2주 후에, 철인 3종경기 선수(triathlete)에서 노화 CD4+ T-세포가 192% 증가했다 (Cosgrove, C. *외*, "The impact of 6-month training preparation for an Ironman triathlon on the proportions of naïve, memory and senescent T cells in resting blood", European Journal of Applied Physiology, Vol. 112, No. 8, pp. 2989-2998 (2012)).

[0010] 노화세포의 표면상에 발현된 최종 당화 산물의 증가된 수준은 다양한 질병, 질환 및 병리학적 상태의 마커로 인식되고 있다. 카르복시메틸리신 (carboxymethyllysine, CML)의 증가된 수준이 섬유근육통 환자(fibromyalgia patient)의 혈청 및 근육 조직에서 발견된다 (Rüster, M. *외*, "Detection of elevated N^{ε}-carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia", Scandinavian Journal of Rheumatology, Vol. 34, No. 6, pp. 460-463 (2005)). 더 얇아진 피부(thinner skin) 또는 주름진 피부(wrinkled skin)와 같은 가속화된 피부 노화는 당뇨병에서 쉽게 두드러진다 (Schmid, D. *외*, "Collage glycation and skin aging", Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide). 마찬가지로, 당뇨병에서 피부 자가형광(skin autofluorescence)이 펜토시딘 및 CML의 조직 수준과 상관관계를 갖고, 관상동맥 심장병(coronary heart disease) 및 예측 사망률(predicted mortality)과 강력하게 관련되어 있다 (Meerwaldt, R. *외*, "Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes", Diabetes Care, Vol. 30, No. 1, pp. 107-112 (2007)). 따라서, 상승된 AGE 수준은 세포노화와 관련된 질병, 질환 및 병리학적 상태의 용인된 마커이다.

[0011] 샘플 중 AGE의 절댓값은 질병과 특이적인 상관관계를 가진다. 혈장 CML의 수준은 대조군에 비해서 전립선암을 앓고 있는 환자에서 30 μg/mL 더 높았다 (Yang, S. *외*, "Impact of oxidative stress biomarkers and carboxymethyllysine (an advanced glycation end product) on prostate cancer: a prospective study", Clinical Genitourinary Cancer, Vol. 13, No. 5, pp. e347-e351 (2015)).

[0012] 마찬가지로, 국제특허공보 WO 제2009/143411호에 기재된 노화세포와 노화 또는 노화-관련 질환 사이의 상관관계는 노화-관련 마커가 진단용 표적(diagnostic target)이 되도록 했다. 텔로미어(Telomere)는 생물학적 노화와 오랫동안 관련 있어 왔고, 짧은 텔로미어 길이는 당뇨병, 심혈관 질병 및 암을 비롯한 노화-관련 질병의 조기-발병의 지표로서 이용된다 ("Telomere Testing White Paper", Titanovo). 텔로미어 길이는 DNA 샘플에 대해서 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 분석을 이용하여 측정될 수 있다. 텔로미어 길이를 노화 및 노화-관련 질환의 검출에 대해서 이용하는 것의 중요한 한계점은 모든 노화가 텔로미어와 관련된 것은 아니라는 점이다.

발명의 내용

[0013] 제1 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 환자에서 세포노화(cellular senescence)와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태(pathological condition)를 진단하는 방법이다: 샘플을 환자로부터 수득하는 단계; 상기 샘플 중 세포-표면 AGE(cell-surface AGE)를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계; 및 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수가 대조군 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수보다 큰 경우, 상기 환자를 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 단계.

[0014] 제2 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 환자의 생물학적 연령을 결정하는 방법이다: 환자로부터 세포

와 비-세포성 물질(non-cellular material)을 함유하는 샘플을 수득하는 단계; 상기 비-세포성 물질로부터 상기 세포를 분리하는 단계; 상기 세포와 항-AGE 항체를 접촉시키고 세포-표면 AGE와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계; 상기 비-세포성 물질과 항-AGE 항체를 접촉시키고 비-결합 AGE(unbound AGE)와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 비-결합 AGE의 수를 측정하는 단계; 및 상기 샘플 중 세포-표면 AGE 대 비-결합 AGE의 비율을 비교하는 단계.

[0015] 제3 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 환자에서 세포노화로 인한 진행성 생물학적 노화(advanced biological aging)와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 진단하는 방법이다: 환자로부터 세포와 비-세포성 물질을 함유하는 샘플을 수득하는 단계; 상기 세포를 상기 비-세포성 물질로부터 분리하는 단계; 상기 세포와 항-AGE 항체를 접촉시키고 세포-표면 AGE와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계; 상기 비-세포성 물질과 항-AGE 항체를 접촉시키고 비-결합 AGE와 상기 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 샘플 중 비-결합 AGE의 수를 측정하는 단계; 상기 샘플 중 세포-표면 AGE 대 비-결합 AGE의 비율을 비교하여, 상기 환자의 생물학적 연령을 결정하는 단계; 및 상기 환자의 생물학적 연령이 상기 환자의 역연령(chronological age)을 초과하는 경우에, 상기 환자를 세포 노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 단계.

[0016] 제4 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 환자에서 세포노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 진단하는 방법이다: 샘플을 환자로부터 수득하는 단계; 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 측정하는 단계; 상기 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 연령이 일치하는 대조군(age-matched control) 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수와 비교함으로써, 상기 환자의 생물학적 연령을 결정하는 단계; 및 상기 환자의 생물학적 연령이 상기 환자의 역연령(chronological age)보다 큰 경우, 상기 환자를 세포 노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 단계.

[0017] 제5 측면에서, 본 발명은 검출가능한 표지로 표지된 항-AGE 항체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, *생체내에서* 대상체의 AGE-변형 세포를 검출하는 방법이다.

[0018] 제6 측면에서, 본 발명은 항-AGE 항체; 대조군 샘플; 및 임의적으로, 상기 항-AGE 항체에 결합하는 시약;을 포함하는 세포-표면 최종 당화 산물(cell-surface advanced glycation end-product)을 발현하는 세포를 검출하기 위한 키트이다.

[0019] 제7 측면에서, 본 발명은 환자에서 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 치료하는 방법이고, 상기 방법은 노화세포 제거제의 치료학적 유효량을 이러한 치료를 필요로 하는 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 환자의 생물학적 연령은 상기 환자의 역연령을 초과한다.

[0020] **정의**

[0021] 용어 "펩티드"는 2-50개의 아미노산으로 이루어진 분자를 의미한다.

[0022] 용어 "단백질"은 50개를 초과하는 아미노산으로 이루어진 분자를 의미한다.

[0023] 용어 "최종 당화 산물", "AGE", "AGE-변형 단백질 또는 펩티드" 및 "당화 최종산물"은 추가로 전위되어 비가역적인 가교(irreversible cross-link)를 형성하는 당과 단백질 측쇄의 반응의 결과물로서 형성되는, 변형된 단백질 또는 펩티드를 의미한다. 이 과정은 시프 염기(Schiff base)를 형성하는 환원당과 아미노기 사이의 가역적인 반응으로 시작하고, 계속해서 공유결합 아마도리 전위 생성물(covalently-bonded Amadori rearrangement product)을 형성한다. 아마도리 생성물이 형성되면, 이 생성물은 추가의 전위를 겪어 AGE를 생성한다. AGE-변형 단백질 및 AGE-변형 단백질에 대한 항체는 Bucala의 US 제5,702,704호 ("Bucala") 및 Al-Abed *외*의 US 제6,380,165호 ("Al-Abed")에 기재되어 있다. 당화 알부민에서 발견되는 N-데옥시프럭토실리신(N-deoxyfructosyllysine)과 같은, AGE를 형성하기 위한 필수적인 전위를 겪지 않은 당화 단백질 또는 펩티드는 AGE가 아니다. AGE는 2-(2-푸로일)-4(5)-(2-푸라닐)-1H-이미다졸 [2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole]("FFI"); 5-히드록시메틸-1-알킬피롤-2-카르브알데히드[5-hydroxymethyl-1-alkylpyrrole-2-carbaldehyde] ("피랄린"); 비-형광 모델 AGE(non-fluorescent model AGE)인, 1-알킬-2-포르밀-3,4-디글리코실 피롤 [1-alkyl-2-formyl-3,4-diglycosyl pyrrole]("AFGP"); 카르복시메틸리신; 카르복시에틸리신; 및 펜토시딘과 같은 AGE 변형(또한, AGE 에피토프 또는 AGE 모이어티라고도 함)의 존재에 의해 확인될 수 있다. 다른 AGE인 ALI는 상기 Al-Abed에 기재되어 있다.

[0024] "항-AGE 항체" 또는 "AGE 항체는" 항체, 항체 단편, 또는 AGE-변형 단백질 또는 펩티드에 결합하고 바람직하게는 항체의 불변영역을 포함하는 기타 단백질 또는 펩티드를 의미한다. AGE-변형 단백질 또는 펩티드는 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 더욱 바람직하게는 인간, 고양이, 개, 말, 낙타과 동물(camelid) (예를 들어, 낙타 또는 알파카), 소, 양, 또는 염소 세포의 표면에서 결합된 채로 보통 발견되는 단백질 또는 펩티드일 수 있다. 대안적으로, AGE-변형 단백질 또는 펩티드는 세포의 표면에 결합되지 않는 단백질 또는 펩티드 [또한, 유리(free), 비-결합(unbound) 또는 순환(circulating) 단백질 또는 펩티드라고 함]일 수 있다. "항-AGE 항체" 또는 "AGE 항체"는 AGE-변형 단백질 또는 펩티드, 및 동일한 비-AGE-변형 단백질 또는 펩티드 모두에 대해서 동일한 특이도(specificity) 및 선택성(selectivity)으로 결합하는 항체 또는 기타 단백질을 포함하지 않는다 (즉, AGE 변형의 존재가 결합을 증가시키지 않는다). "항-AGE 항체" 또는 "AGE 항체"는 예를 들어, 독소, 약물 또는 다른 화학물질 또는 입자에 컨쥬게이트된 항체를 포함한다. 바람직하게는, 항체는 단일클론 항체이나, 다중클론 항체도 또한 가능하다.

[0025] 용어 "노화세포"는 증식정지 상태(state of proliferative arrest)에 있고, $p16^{Ink4a}$의 활성 또는 노화-관련 β-갈락토시다아제의 발현과 같은 하나 이상의 노화의 바이오마커를 발현하는 세포를 의미한다. 또한, 하나 이상의 노화의 바이오마커를 발현하고, *생체내에서* 증식을 하지 않지만, 특정 조건하에서 *시험관내* 증식은 할 수 있는 세포가 포함되고, 그 예로는 ALS 환자의 근육에서 발견되는 일부 위성세포(satellite cell)가 있다.

[0026] 용어 "세놀리틱 제제(senolytic agent)"는 노화세포를 파괴하는 900 달톤(dalton) 미만의 분자량을 갖는 소분자를 의미한다. 용어 "세놀리틱 제제"는 항체, 항체 컨쥬게이트(antibody conjugate), 단백질, 펩티드 또는 생물학적 요법을 포함하지 않는다.

[0027] 용어 "노화세포 제거제(senescent cell removal agent)"는 노화세포를 파괴하는 물질을 의미한다. 노화세포 제거제는 미국 특허 US 제9,161,810호에 기재된 것과 같은 치료학적 항-AGE 항체 및 세놀리틱 제제를 포함한다.

[0028] 용어 "변이"는 특정하게 확인된 서열과 상이한 뉴클레오티드, 단백질 또는 아미노산 서열을 의미하고, 이들 서열은 하나 이상의 뉴클레오티드, 단백질 또는 아미노산 잔기가 결실, 치환 또는 첨가된 것이다. 변이는 자연-발생 대립형질 변이(allelic variant), 또는 비-자연 발생 변이일 수 있다. 확인된 서열의 변이는, 이 확인된 서열의 기능적 특징의 일부 또는 전부를 유지할 수 있다.

[0029] 용어 "서열 일치도 백분율(%)"은 임의의 보존적 치환(any conservative substitution)을 서열 일치도의 일부로 고려하지 않고, 서열과 도입된 갭(introducing gap) - 최대 서열 일치도 백분율을 달성하기 위해 필요한 경우 - 을 정렬한 후에, 참조 폴리펩티드 서열(reference polypeptide sequence)에 존재하는 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에 존재하는 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 일치도 백분율을 결정하는 목적을 위한 정렬은 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 바람직하게는, 서열 일치도% 값이 서열 비교 컴퓨터 프로그램인 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 프로그램은 Genentech, Inc. (캘리포니아 주, 사우스 샌프란시스코 소재)로부터 공개적으로 입수가능하거나, 또는 미국 저작권청(U.S. Copyright Office)에 사용자 문서(user documentation)로 제출되었고, 미국 저작권 등록번호 제TXU510087호 하에 등록된 소스 코드로부터 컴파일(compile)될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하는 UNIX 운영체제(UNIX operating system) 상에서 사용하기 위해 컴파일되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.

[0030] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 이용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, B와의, 또는 B와 비교하는 주어진 아미노산 서열 A의 서열 일치도 %를 (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, B와의, 또는 B와 비교하는 어떤 아미노산 서열 일치도 %를 갖거나 또는 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음) 다음과 같이 계산한다: "(100) X (분수 X/Y)". 이 식에서, X는 A와 B의 프로그램의 정렬에서, 서열 정렬 프로그램인 ALIGN-2에 의해 동일한 매치(identical match)로 점수를 받은(scoring) 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에 존재하는 아미노산 잔기의 전체 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에, B에 대한 A의 아미노산 서열 일치도 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 일치도 %와 동일하지 않을 것이다. 달리 특정히 명시되지 않는 한, 본원에서 이용된 모든 아미노산 서열 일치도 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 획득된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 세포-표면 최종 당화 산물을 발현하는 세포를 검출하기 위한 키트를 도시한다.

도 2는 항체 결합 실험에서, 시간에 따른 반응의 그래프이다.

도 3a는 붉은색(어두운 회색)으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색(밝은 회색)으로 염색된 인산화된 타우(phosphorylated tau)를 나타내는 알츠하이머병 샘플의 세포 사진이다.

도 3b는 붉은색(어두운 회색)으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색(밝은 회색)으로 염색된 아밀로이드 전구체 단백질(precursor protein)을 나타내는 알츠하이머병 샘플의 세포 사진이다.

도 3c는 붉은색(어두운 회색)으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색(밝은 회색)으로 염색된 알파 시누클레인(alpha synuclein)을 나타내는 흑질(substantia nigra)로부터 수득된 파킨슨병 샘플의 세포 사진이다.

도 3d는 붉은색(어두운 회색)으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색(밝은 회색)으로 염색된 알파 시누클레인을 나타내는 복측 피개영역(ventral tegmental area)으로부터 수득된 파킨슨병 샘플의 세포 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 세포노화와 다양한 질병, 질환 및 병리학적 상태 사이의 정량가능한 연관성(quantifiable association)의 인지는 노화세포가 진단용 표적이 되도록 야기했다. 예를 들어, CD57은 자연 살해(natural killer, NK) 세포 및 T-세포와 같은 면역세포를 포함하는 노화세포의 공지된 마커이다 (Kared, H. *외*, "CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes", Cancer Immunology, Immunotherapy, Vol. 65, No. 4, pp. 441-452 (2016)). Miltenyi Biotec (독일, 베르기슈글라트바흐 소재)로부터의 CD8+CD57+ T 세포 분리 키트와 같은, CD57 분리 키트가 시판중이나, 이러한 정량적인 측정 도구(quantitative measurement tool)는 연구용으로만 의도되었다. Miltenyi Biotec T 세포 분리 키트에 대한 데이터 시트(data sheet)는 키트가 진단학적 또는 치료학적 용도를 위한 것이 아님을 분명히 명시한다.

[0033] 최종 당화 산물의 검출 및 정량은 질량 분석법 및 고-성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography)와 같은, 단백질을 검출할 수 있는 분석기법으로 수행된다. 그러나, 이러한 기법은 번거롭고, 복잡한 실험실 기법에 보통 의존한다. 면역학적 검정(immunoassay)과 같은, 항-AGE 항체를 이용하는 최종 당화 산물의 측정을 위한 습식 실험실 기법(Wet lab technique)은 이용이 상당히 용이하다. Kamiya Biomedical Company (미국, 워싱턴 주, 시애틀 소재)로부터의 카르복시메틸 리신 (CML) ELISA 카탈로그 번호 KT-32428과 같은 항-AGE 검정이 시판중이다. 노화세포 검출 도구와 거의 마찬가지로, 이러한 정량적인 측정 도구는 연구용으로만 의도되었다. Kamiya Biomedical Company CML ELISA (카탈로그 번호 KT-32428)에 대한 데이터 시트는 제품이 진단학적 절차에서 이용하기 위한 것이 아님을 분명히 명시한다. 따라서, 진단학적 목적에 대한 항-AGE 항체의 이용은 일반적이지 않거나 또는 통상적이지 않다.

[0034] 본 발명은 최종 당화 산물-변형 단백질 및 펩티드에 결합하는 항체를 이용하여, 노화-관련 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 진단 및 모니터링한다. AGE-변형 단백질 및 펩티드, 특히, 부분적으로 기능성 및 비-기능성 세포의 표면에 존재하는 AGE-변형 단백질 및 펩티드는 효소-결합 면역흡착 검정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 세포분리 및 세포계수를 포함하는 항체-기반 진단법을 위한 고유한 표적이다. 예를 들어, 주지된 최종 당화 산물인, 세포-결합 카르복시메틸리신(CML)의 검출은 샘플 중 노화세포의 전체 수, 농도, 또는 비율의 결정에 이용될 수 있다. 대조군 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수에 비교된 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수에 기초하거나, 또는 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수가 임상 역치(clinical threshold)를 초과하는 경우에, 환자는 치료를 필요로 하는 것으로 확인될 수 있다. 대안적으로, 또는 이에 더하여, 세포-결합 AGE 대 유리 (비-결합) AGE의 비율을 비교하는 것은 샘플 중 노화세포 수의 정규화(normalization) 및 질병진행 또는 생물학적 노화의 모니터링에 이용될 수 있다. 세포-결합 AGE의 더 큰 비율은 내부적인 원인(internal source) 및 세포 기능장애로 인한 더 많은 양의 세포노화를 나타낸다. 항-AGE 항체-기반 진단법은 최소한으로 침습적이고 수행하기 용이하다는 이점을 제공하며, 이는 이러한 테스트가 의원 또는 클리닉에서 수행되는 것을 허용한다.

[0035] 노화세포가 세포-표면 최종 당화 산물을 발현하기 때문에, 항-AGE 항체는 샘플 중 노화세포의 존재를 검출하는데 이용될 수 있다. 한 양태에서, 샘플이 제시된다. 이 샘플은 인간 환자로부터 수득될 수 있다. 다음에, 샘플 중 세포-표면 AGE의 존재가 이 샘플을 항-AGE 항체와 접촉시키고 세포-표면 AGE와 이 항-AGE 항체 사이의 결합을 검출함으로써 결정 또는 측정될 수 있다. 임의적으로, 대조군 샘플은 비교를 위한 기초선으로서 환자 또는 건강한 대상체로부터 수득될 수 있다. 또한, 비교를 위한 기초선은 건강한 대조군의 집단으로부터 수득된

AGE-변형을 나타내는 세포의 평균 수로서 획득될 수 있다. 바람직하게는, 대조군 샘플은 역연령이, 샘플이 수득되는 환자의 역연령과 동일한 건강한 대상체로부터 수득된다 (또한, "연령이 일치하는(age-matched)" 또는 "연령이 지수화된(age-indexed)" 대조군으로 알려짐).

[0036] 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수는 정성적 또는 정량적 측정을 이용하여 결정될 수 있다. 측정은 건강한 대조군에 대한 비교에 유용한 정보를 제공하도록 의도된다. 정량적인 측정의 예시는 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 전체 수, 평균 수, 농도, 비율 또는 백분율의 측정을 포함한다. 정성적인 측정의 예시는 면역조직화학적(immunohistochemical) 또는 면역세포화학적(immunocytochemical) 기법을 이용한 조직샘플을 분석하는 것을 포함한다. 예를 들어, 세포 내 당화의 위치가 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 나타낼 수 있다.

[0037] 샘플 중 노화세포의 측정은 환자를 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단하는 데 이용될 수 있거나, 또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 데 이용될 수 있다. 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 전체 수, 평균 수, 농도, 비율 또는 백분율이 대조군 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 전체 수, 평균 수, 농도, 비율 또는 백분율을 초과하는 경우에, 상승된 수준의 세포 기능장애가 나타날 수 있다. 예를 들어, 5%를 초과하는 노화세포를 함유하는 샘플은 상승된 수준의 세포 기능장애를 나타낸다. 환자는 증상을 설명하거나 또는 전문 의료진(health care professional)으로부터 임상적 진단을 받기 전에, 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단될 수 있거나, 또는 치료를 필요로 하는 것으로 확인될 수 있다. 바람직하게는, 환자는 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태의 확인을 돕기 위해 테스트하기 전에, 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태의 적어도 하나의 증상을 이미 나타낸다. 또한, 샘플 중 노화세포의 측정이 감별 진단(differential diagnosis)에 이용되어, 중복되거나 또는 유사한 증상을 갖는 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 구별할 수 있다.

[0038] 또한, 샘플 중 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수가 임상 역치를 초과하는 경우에, 상승된 수준의 세포 기능장애가 나타날 수 있다. 예를 들어, 샘플이 적어도 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 30%, 35%, 40% 및 45%의 노화세포를 비롯한, 5% - 50%의 노화세포를 함유하는 경우에, 환자는 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단되거나 또는 치료를 필요로 하는 것으로 확인될 수 있다. 임상 역치는 건강한 환자로부터 수득된 샘플의 수집물에서 발견된 AGE-변형 세포의 가장 높은 수 또는 평균 수에 기초할 수 있다.

[0039] 또한, 샘플 중 노화세포의 측정은 환자의 생물학적 연령의 결정에 이용될 수 있다. 노화세포는 노화될수록 축적되기 때문에, 연령이 일치하는 대조군에 비해, 샘플 중 노화세포의 더 큰 수는 진행성 생물학적 노화를 나타낸다. 환자의 생물학적 연령이 그 환자의 역연령보다 큰 경우에, 환자는 치료를 필요로 하는 것으로 확인될 수 있다. 예를 들어, 환자의 생물학적 연령이 환자의 역연령보다 10% - 50% 큰 경우에 (환자의 역연령보다 적어도 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 및 45% 큰 경우를 포함), 환자는 진행성 생물학적 노화로 진단될 수 있다. 마찬가지로, 환자의 생물학적 연령이 환자의 역연령보다 5-50세 많은 경우에 (적어도 환자의 역연령보다 10세, 15세, 20세, 25세, 30세, 35세, 40세 및 45세 많은 경우를 포함), 환자는 진행성 생물학적 노화로 진단될 수 있다.

[0040] 또한, 항-AGE 항체는 샘플 중 유리 (비-결합) AGE 및 AGE-변형 단백질 또는 펩티드의 검출에 이용될 수 있다. 유리 AGE는 세포노화와 관련되지 않은 최종 당화 산물의 척도로서 작용할 수 있다. 샘플 중 세포-표면 AGE의 수는 유리 AGE의 수에 비교되어, 샘플 중 노화세포의 수를 정규화할 수 있다. 예를 들어, 세포-표면 AGE 대 유리 AGE의 비율은 세포표면에 축적된 AGE 백분율의 결정에 이용될 수 있고, 높은 비율은 세포노화의 증가를 나타낸다. 또한, 샘플 중 노화세포의 백분율은 환자의 생물학적 연령의 척도로서 이용될 수 있다.

[0041] 샘플은 노화상태일 수 있는 세포를 함유하는 환자로부터 수득된 임의의 물질일 수 있다. 적합한 샘플의 예시는 타액, 협측 면봉(buccal swab), 혈액샘플, 소변샘플, 피부샘플 및 생검(biopsy)을 포함한다. 샘플은 임의적으로, 예를 들어 원심분리에 의해 물리적으로 처리될 수 있거나, 또는 예를 들어 트립신 처리법(trypsinization)에 의해 화학적으로 처리될 수 있다. 샘플 처리는 샘플의 특정 부분을 분리하는 데 이용될 수 있고, 그 예로는 혈액샘플을 혈청과 혈장으로 분리하는 것이 있다.

[0042] 세포-표면 최종 당화 산물의 존재에 대해서 테스트되는 샘플 내 세포는 세포노화를 겪을 수 있는 임의의 세포일 수 있다. 테스트될 적합한 세포의 예시는 T-세포, 적혈구, 섬유아세포 및 상피세포를 포함한다. T-세포는 테스트에 대해서 바람직한 세포이다.

[0043] 샘플 중 AGE-변형 펩티드 또는 단백질의 존재는 임의의 항체-기반 확인기법(antibody-based identification technique)에 의해 결정될 수 있다. 적합한 항체 확인기법의 예시는 효소-결합 면역흡착 검정법(ELISA), 방사선면역검정법(radioimmunoassay, RIA) 및 실시간 면역정량 PCR (real-time immunoquantitative PCR, real-time iqPCR)과 같은 면역학적 검정; 형광 활성화 세포분리(fluorescent activated cell sorting, FACS), 유세포 분석법(flow cytometry) 및 자기 세포분리(magnetic cell sorting)와 같은 세포분리; 세포계수; 웨스턴 블랏; 면역조직화학 (immunohistochemistry, IHC); 면역세포화학(immunocytochemistry, ICC); 면역침강법(immunoprecipitation); 및 효소 결합 면역점법(enzyme linked immunospot, ELISPOT);을 포함한다. 바람직하게는, 항체 확인기법은 면역학적 검정이다.

[0044] 조직샘플에서 노화세포를 검출하는 바람직한 기법은 면역조직화학 (IHC) 염색법이다. 조직샘플의 조직학적 분석은 조직샘플 중 특정한 단백질의 확인을 위한 잘-입증된 기법이다. 예를 들어, AGE는 죽상동맥경화증 병변(atherosclerotic lesion) 및 췌장암의 조직샘플에서 검출된다 (Wendel, U. *외*, "A novel monoclonal antibody targeting carboxymethyllysine, an advanced glycation end product in atherosclerosis and pancreatic cancer", PLoS One, Vol. 13, No. 2, e0191872 (2018)). 면역조직화학적 염색법은 특정한 부위의 당화를 검출하는 것을 허용한다.

[0045] 진단 기법은 샘플이 수득되는 현장(on-site)에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 샘플은 실험실과 같은 현장 밖의 테스트 시설(off-site testing facility)에 발송될 수 있다.

[0046] 항-AGE 항체는 노화세포의 표면상에서 발현되는 AGE-변형 단백질 또는 펩티드를 포함하는 AGE-변형 단백질 또는 펩티드에 결합하는 임의의 항체일 수 있다. 항-AGE 항체는 당해분야에 공지되어 있고, 시판중이다. 예시는 US 제5,702,704호 (Bucala) 및 US 제6,380,165호 (Al-Abed *외*)에서 기재되어 있는 것을 포함한다. 항체는 FFI, 피랄린, AFGP, ALI, 카르복시메틸리신 (CML), 카르복시에틸리신 (CEL) 및 펜토시딘과 같은 AGE 변형을 갖는 하나 이상의 AGE-변형 단백질 또는 펩티드, 및 이러한 항체의 혼합물에 결합할 수 있다. 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체일 수 있다. 바람직하게는, 항체는 단일클론 항체이다.

[0047] 바람직한 항-AGE 항체는 카르복시메틸리신 또는 카르복시에틸리신 AGE 변형을 나타내는 단백질 또는 펩티드에 결합하는 항체를 포함한다. 카르복시메틸리신 [또한, N(엡실론)-(카르복시메틸)리신, N(6)-카르복시메틸리신, 또는 2-아미노-6-(카르복시메틸아미노)헥산 산으로 알려짐] 및 카르복시에틸리신 [또한, N-엡실론-(카르복시에틸)리신으로 알려짐]은 산화적 스트레스 및 화학적 당화의 결과로서 단백질 또는 펩티드 및 지질에서 발견된다. CML- 및 CEL-변형 단백질 또는 펩티드는 다양한 세포상에서 발현되는 수용체 RAGE에 의해 인식된다. CML과 CEL은 잘-연구되어왔고, CML- 및 CEL-관련 산물이 시판중이다. 예를 들어, Cell Biolabs, Inc는 CML-BSA 항원, CML 다중클론 항원, CML 면역블롯 키트, 및 CML 경쟁적 ELISA 키트 (www.cellbiolabs.com/cml-assays); 및 CEL-BSA 항원 및 CEL 경쟁적 ELISA 키트 (www.cellbiolabs.com/cel-n-epsilon-carboxyethyl-lysine-assays-and-reagents)를 판매한다. 바람직한 시판중인 항-AGE 항체는 R&D Systems, Inc. (미네소타 주, 미니애폴리스 소재; 카탈로그 번호 MAB3247)로부터 입수가능한 키홀 림펫 헤모시아닌 (클론 318003)[keyhole limpet hemocyanin (Clone 318003)]이 컨쥬게이트된 카르복시메틸 리신에 대해서 발생된(raising) 마우스 항-당화 최종산물 항체이다.

[0048] 항-AGE 항체는 서열번호 1의 단백질 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 3의 단백질 서열을 갖는 경쇄를 갖거나 포함할 수 있다. 상기 중쇄와 경쇄의 가변 도메인은 서열번호 2와 서열번호 4에서 각각 제시된다. 추가의 항-AGE 항체의 DNA 및 단백질 서열은 국제특허출원 번호 PCT/US2017/18185의 공보인, 국제특허공보 WO 제2017/143073호에서 찾을 수 있으며, 이는 본원에 참고로 포함된다.

[0049] 항-AGE 항체는 임의적으로, 두 개의 상이한 에피토프로 향하는(directing) 이중-특이적 항체(bi-specific antibody)일 수 있다. 이러한 항체는 하나의 항-AGE 항체로부터 비롯된 가변영역 (또는, 상보성 결정영역)과 상이한 항체로부터 비롯된 가변영역(또는 상보성 결정영역)을 포함한다.

[0050] 항체 단편은 전체 항체를 대신해서 이용될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 G는 효소를 이용한 절단에 의해 더 작은 단편으로 분해될 수 있다. 파파인 절단(Papain digestion)은 내부-중쇄 이황화물 다리(inter-heaby chain disulfide bridge)의 N-말단을 절단하여 Fab 단편을 생성한다. Fab 단편은 경쇄 및 중쇄의 두 개의 N-말단 도메인(또한, Fd 단편으로 알려짐) 중 하나를 포함한다. 펩신 절단은 내부-중쇄 이황화 다리의 C-말단 부위를 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다. $F(ab')_2$ 단편은 이황화물 다리에 의해 연결된 두 개의 N-말단 도메인 및 두 경쇄를 포함한다. 또한, 펩신 절단은 Fv 단편[가변 단편(fragment variable)]과 Fc 단편[결정화가능 단

편(fragment crystallizable)]을 형성한다. Fv 단편은 두 개의 N-말단 가변 도메인을 함유한다. Fc 단편은 세포상에 존재하는 면역글로불린 수용체 및 보체 연쇄반응(complement cascade)의 초기 인자(initial element)와 상호작용하는 도메인을 함유한다. 또한, 펩신은 중쇄의 세 번째 불변 도메인(C_H3) 전에서, 면역글로불린 G를 절단하여 큰 단편 F(abc)와 작은 단편 pFc'를 생성한다. 대안적으로, 항체 단편은 재조합적으로 생성될 수 있다.

[0051] 항체는 주지된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 다중클론 항체 (polyclonal antibody, pAb)는 면역원 및 필요한 경우에 아쥬반트의 1회 이상의 주입에 의해 포유동물 숙주에서 발생될 수 있다. 통상적으로, 면역원 (및 아쥬바트)은 피하 또는 복강내 주입에 의해 포유동물에 주입된다. 면역원은 다음과 같은 세포의 AGE-변형 단백질 또는 펩티드일 수 있다: AGE-항트롬빈 III; AGE-칼모듈린; AGE-인슐린; AGE-세룰로플라스민; AGE-콜라겐; AGE-카텝신 B; AGE-소 혈청 알부민 (AGE-BSA), AGE-인간 혈청 알부민 및 난백 알부민(ovalbumin)과 같은 AGE-알부민; AGE-크리스탈린; AGE-플라스미노겐 활성화인자; AGE-내피 혈장 막단백질; AGE-알데히드 환원효소; AGE-트랜스페린; AGE-피브린; AGE-구리/아연 SOD; AGE-아포 B; AGE-피브로넥틴; AGE-췌장 리보오스 (AGE-pancreatic ribose); AGE-아포 A-I 및 II; AGE-헤모글로빈; AGE-Na^+/K^+-ATP 가수분해 효소; AGE-플라스미노겐; AGE-미엘린; AGE-라이소자임; AGE-면역글로불린; AGE-적혈구 Glu 수송 단백질; AGE-β-N-아세틸 헥소미나제; AGE-아포 E; AGE-적혈구 막단백질; AGE-알도오스 환원효소; AGE-페리틴; AGE-적혈구 스펙트린; AGE-알코올 탈수소효소; AGE-합토글로빈; AGE-튜불린; AGE-갑상선 호르몬; AGE-피브리노겐; AGE-β_2-마이크로글로불린; AGE-솔비톨 탈수소효소; AGE-α_1-항트립신; AGE-탄산 탈수소효소; AGE-RNA 가수분해효소; AGE-저밀도 지질단백질; AGE-헥소키나아제; AGE-아포 C-I; AGE-RNA 가수분해효소; AGE-인간 헤모글로빈과 같은 AGE-헤모글로빈; AGE-저밀도 지질단백질 (AGE-LDL); 및 AGE-콜라겐 IV. 또한, AGE-변형 적혈구(전체, 용해된, 또는 부분적으로 절단된)와 같은 AGE-변형 세포가 AGE 항원으로서 이용될 수 있다. 아쥬반트의 예시는 프로인트 완전 아쥬반트 (Freund's complete adjuvant), 모노포스포릴 지질 A 합성-트레할로오스 디코리노마이콜레이트 (monophosphoryl Lipid A synthetic-trehalose dicorynomycolate), 수산화 알루미늄 (알룸), 열충격 단백질 HSP 70 또는 HSP96; 오일 에멀젼, 플루로닉 폴리올(pleuronic polyol), 폴리 음이온(polyanion) 및 디니트로페놀을 포함하는, 모노포스포릴 지질 A, α2-마크로글로불린 및 표면 활성 물질을 함유하는 스쿠알렌 에멀젼 (squalene emulsion)을 포함한다. 면역반응을 개선시키기 위해, 면역원이 숙주에서 면역원성인 폴리펩티드에 컨쥬게이트될 수 있고, 이러한 폴리펩티드는 다음과 같다: 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린(bovine thyroglobulin), 콜레라 독소, 불안정한 엔테로톡신(labile enterotoxin), 실리카 입자 또는 대두 트립신 억제제 (soybean trypsin inhibitor). 바람직한 면역원 컨쥬게이트는 AGE-KLH이다. 대안적으로는, pAb는 IgY 분자를 생성하는 닭에서 만들어질 수 있다.

[0052] 단일클론 항체(Monoclonal antibody, mAb)는 숙주 또는 숙주로부터의 림프구를 면역화시키고(immunizing), mAb-분비 (또는 잠재적으로 분비하는) 림프구를 수확하며, 이러한 림프구를 불멸화된 세포(예를 들어, 골수종 세포)에 융합시키고, 목적하는 mAb를 분비하는 세포를 선택함으로써 만들어질 수 있다. EBV-하이브리도마 기법 (EBV-hybridoma technique)과 같은 다른 기법이 이용될 수 있다. 필요한 경우에, mAb는 단백질 A-세파로오스, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(hydroxyapatite chromatography), 겔 전기영동, 투석, 황산 암모늄 침전법 (ammonium sulfate precipitation) 또는 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography)와 같은 통상적인 절차에 의해, 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 정제될 수 있다.

[0053] 항-AGE 항체는 세포노화를 특징으로 하는 임의의 질병, 질환 또는 병리학적 상태의 발병을 진단하거나 또는 이의 진행을 측정하는 데 이용될 수 있다. 세포노화와 관련된 질병, 질환 및 병리학적 상태의 예시는 다음을 포함한다: 알츠하이머병, 근위축 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) (ALS 또는 루게릭병), 만성 폐쇄성 폐질병 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), 헌팅턴 무도병, 특발성 폐섬유증, 근이영양증(muscular dystrophy) (베커, 뒤센, 지대 및 야마모토 근이영양증을 포함), 황반변성(macular degeneration), 백내장(cataracts), 당뇨 망막병증(diabetic retinopathy), 파킨슨병, 조로증(progeria) [베르너 증후군(Werner Syndrome) 및 허친슨 길포드 조로증(Hutchinson Gilford progeria)을 포함], 백반증(vitiligo), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 아토피 피부염(atopic dermatitis), 습진(eczema), 관절염(arthritis) [퇴행성 관절염(osteoarthritis), 류마티스 관절염 및 소아 류마티스 관절염(and juvenile rheumatoid)을 포함], 죽상경화증(atherosclerosis), 암 및 전이성 암 [예를 들어, 유방암, 삼중음성 유방암(triple negative breast cancer), 폐암, 흑색종, 결장암, 신장세포 암종(renal cell carcinoma), 전립선암, 자궁경부암, 방광암, 직장암, 식도암, 간암, 구강 및 인후암(mouth and throat cancer), 다발성 골수종(multiple myeloma), 난소암

(ovarian cancer), 위암, 췌장암 및 망막 모세포종암(retinal blastoma cancer)을 포함], 암치료-관련 장애 또는 암치료 부작용, 고혈압, 녹내장(glaucoma), 골다공증(osteoporosis), 근감소증(sarcopenia), 악액질(cachexia), 뇌졸중, 심근경색(myocardial infarction), 심방세동(atrial fibrillation), 이식거부, 제I형-당뇨병, 제II형-당뇨병, 방사선 노출, HIV 치료 부작용, 화학무기 노출, 중독(poisoning), 염증, 신장병, 루이소체 치매, 프리온병 [소 해면상 뇌병증(bovine spongiform encephalopathy), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 스크래피(scrapie), 만성 소모성 질병(chronic wasting disease), 쿠루(kuru), 및 치명적 가족성 불면증(fatal familial insomnia)을 포함], 척추 전후만증(lordokyphosis), 자가면역 질환, 지방조직 손실(loss of adipose tissue), 건선(psoriasis), 크론병, 천식, 노화의 생리학적 효과 [주름, 검버섯(age spot), 탈모, 피하 지방조직의 감소(reduction in subcutaneous adipose tissue) 및 피부 얇아짐과 같은 "미용적(cosmetic)" 효과를 포함], 특발성 근육병(idiopathic myopathy) [예를 들어, 특발성 염증성 근육병증(idiopathic inflammatory myopathy), 특발성 염증성 근염(idiopathic inflammatory myositis), 다발성 근염(polymyositis), 피부근염(dermatomyositis), 산발성 봉입체 근염(sporadic inclusion body myositis)및 소아 근염(juvenile myositis)을 포함], 다발성 경화증, 시신경 척수염(neuromyelitis optica) [NMO, 데빅병(Devic's disease) 또는 데빅 증후군(Devic's syndrome)], 뇌전증(epilepsy) 및 부신백질 이영양증(adrenoleukodystrophy) (ALD, X 염색체 연관-부신백질 이영양증, X-ALD, 대뇌 ALD 또는 cALD).

[0054] 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태를 발달시킬 수 있는 임의의 대상체는 본원에 기재된 방법에 의해 진단될 수 있다. 상기 대상체는 포유동물일 수 있다. 인간은 진단하기에 바람직한 대상체이다. 진단될 수 있는 다른 대상체는 마우스, 랫트, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 및 개 또는 고양이와 같은 반려동물(companion animal)을 포함한다.

[0055] 세포노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단되거나, 또는 치료를 필요로 하는 것으로 확인된 환자는 노화세포를 표적 및 파괴하기 위한 노화세포 제거제로 투여될 수 있다. 노화세포 제거제의 예시는 다음을 포함한다: 치료학적 항-AGE 항체, 독소에 컨쥬게이트된 항-AGE 항체, 다사티닙(dasatinib) 및/또는 케르세틴(quercetin)과 같은 세놀리틱 제제, 및 이들의 병용물. 또한, 노화세포는 치료학적 초음파(therapeutic ultrasound)의 적용에 의해 파괴될 수 있다. 노화세포 파괴기법을 병용하여 목적하는 치료학적 결과를 달성할 수 있다. 예를 들어, 환자는 다사티닙과 케르세틴의 병용물의 투여 및 기능성 세포는 해를 입히지 않으면서, 노화세포를 선택적으로 파괴하는 고강도 집속 초음파(high intensity focused ultrasound)를 받을 수 있다. 노화세포 제거제의 치료학적 유효량은 이용되는 특정한 노화세포 제거제에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 항-AGE 항체의 적합한 용량 수준은 일반적으로, 환자의 체중 1 kg당 약 0.01 내지 500 mg 일 것이고, 이는 약 0.01 내지 250 mg/kg, 약 0.05 내지 100 mg/kg, 및 약 0.1 내지 50 mg/kg을 포함할 것이다. 마찬가지로, 다사티닙과 케르세틴의 병용 요법의 적합한 용량 수준은 일반적으로, 다사티닙은 환자의 체중 1 kg 당 약 5 mg일 것이고, 케르세틴은 환자의 체중 1 kg 당 약 50 mg일 것이다. 치료 효능은 세포-표면 AGE를 나타내는 세포의 수를 반복적으로 측정함으로써 모니터링될 수 있다.

[0056] 노화세포 제거제의 투여는 근감소증(sarcopenia), 죽상경화증 및 전이성 암의 치료에 효과적인 것으로 입증되었다. 노화세포 제거제의 투여에 의한 치료에 특히 적합한, 세포노화와 관련된 다른 질병, 질환 및 병리학적 상태는 염증, 자가면역 질병, 퇴행성 관절염, 알츠하이머병 및 파킨슨병을 포함한다.

[0057] 상기 기재된 *시험관내* 진단법에 더하여, 항-AGE 항체가 또한 *생체내* 진단법에 이용될 수 있다. *생체내* 진단 테스트는 AGE-변형 단백질 및 펩티드를 검출하는 비-침습적 방법을 제공한다. *생체내* 진단 테스트는 전이성 암세포와 같은 세포-표면 최종 당화 산물을 발현하는 노화세포의 검출에 특히 유용하다 (예를 들어, 국제특허공보 WO 제2017/143073호를 참고). 항-AGE 항체는 검출가능한 표지 또는 추적자(tracer)로 표지된 후에, 대상체에 투여될 수 있다. 표지된 항-AGE 항체는 AGE-변형 단백질 또는 펩티드에 특이적으로 결합해, AGE-변형 단백질 또는 펩티드가 표지를 검출할 수 있는 임의의 적합한 장치로 검출되도록 한다. *생체내* 진단법의 예시는 다음을 포함한다: 양전자 방출 단층촬영 (positron emission tomography, PET) 및 면역-PET(immuno-PET), 자기 공명 영상 촬영(magnetic resonance imaging, MRI), 단일광자 방출 컴퓨터 단층촬영 (single photon emission computed tomography, SPECT), 광학 영상촬영(optical imaging), 초음파, 방사선 면역 섬광조영술(radioimmunoscintigraphy) 및 이들의 병용. 제시된 진단기법에 적합한 임의의 표지가 이용될 수 있으며, 그 예는 다음과 같다: 항체에 컨쥬게이트된 방사성 표지, 형광표지, 양전자 방출체, 근적외선(near infrared, NIR)에서 방출하는 염료, 금 및 가돌리늄과 같은 나노입자, 퀀텀닷, 초상자성 산화철 (superparamagnetic iron oxide, SPIO), 탄소 나노튜브 또는 마이크로 버블.

[0058] 도 1은 세포-표면 최종 당화 산물을 발현하는 세포를 검출하는 키트(100)를 도시한다. 키트는 항-AGE 항체

(110), 대조군(120), 및 임의적으로 항-AGE 항체를 검출하기 위한 시약(130)을 포함할 수 있다. 항-AGE 항체, 대조군 및 임의적인 시약은 병, 앰플, 봉투(envelope), 테스트 튜브, 바이알, 플라스크, 또는 주사기와 같은 임의의 적합한 용기로 공급될 수 있다. 항-AGE 항체 및/또는 시약은 형광표지, 방사성 표지, 또는 금입자와 같은 것으로 임의적으로 표지될 수 있다. 대조군은 2차 항체가 생성된 동물로부터 수득된 정상 혈청(normal serum) - 알려진 양의 AGE-변형 단백질 또는 펩티드 또는 AGE 변형을 나타내는 고정되거나 보존된 세포를 함유하는 용액 - 일 수 있다. 항-AGE 항체를 검출하기 위한 시약의 예시는 당나귀(donkey)에서 만들어지고, 로다민(rhodamine)으로 표지된 항-인간 단일클론 항체와 같은 2차 항체를 포함한다. 키트는 임의적으로 용기(140)에 하우징될 수 있다. 키트는 임의적으로 인쇄된 설명서(150)를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 키트의 내용물은 멸균되고, 즉시 사용 가능한(ready for use) 것이다.

[0059] 키트는 임의적으로 키트 구성요소를 하우징할 수 있는 용기를 포함할 수 있다. 용기는 플라스틱과 같은 단단한, 내구성이 있는 재료로 형성될 수 있거나, 또는 가방 또는 측면이 부드러운 박스(soft-sided box)와 같이 유연할 수 있다.

[0060] 키트는 임의적으로 사용을 위한 설명서를 포함할 수 있다. 설명서는 인쇄된 설명서 또는 유니버설 시리얼 버스(universal serial bus, USB) 드라이브, 시큐어 디지털 (secure digital, SD) 카드와 같은 전자 형식으로 제공될 수 있거나, 또는 인터넷을 통해 호스팅(hosting)될 수 있고, 퀵 리스폰스 (quick response, QR) 코드를 통해 접속 가능할 수 있다.

[0061] 키트는 임의적으로, 버퍼, 고정액(fixative), 차단 용액(blocking solution), 단백질분해효소 억제제; 현미경 슬라이드 및/또는 커버 슬립, 마이크로 타이터 플레이트와 같은 분석용 기판(substrate); 및 세제 및 세제 용액과 같은 세포 추출 시약;과 같은 추가의 진단학적 물질 또는 장비를 포함할 수 있다.

[0062] **[실시예]**

[0063] **[실시예 1: 협측 상피세포(buccal epithelial cell)의 수집]**

[0064] 환자는 30초 동안 입에 식염수를 머금고 가글한다(swishing). 그런 다음에, 환자는 컵에 이 용액을 뱉는다. 그런 다음에, 1.5 mL의 식염수를 마이크로 피펫을 이용하여 컵에서 원심분리 튜브(centrifuge tube)로 옮긴다. 이 원심분리 튜브를 밸런스를 맞춘 원심분리기(balanced centrifuge)에 넣은 후에, 10,000 - 14,000 RPM에서 2분 동안 원심분리한다. 원심분리 튜브의 바닥에 펠렛이 보일때 까지, 원심분리를 반복할 수 있다. 그런 다음에, 마이크로 피펫으로 상등액을 옮기고/거나 제거함으로써, 상등액을 버린다. 펠렛은 분리된 협측 상피세포를 함유하는데, 이 세포를 세포-표면 AGE의 존재에 대해 테스트하여, 임의의 상피세포가 노화상태인지 결정한다.

[0065] **[실시예 2: 피부세포에 기초한 진단 및 치료]**

[0066] 표피세포(Epidermal cell)를 테이프 수확 프로세스(tape harvesting process)를 이용하여 수집한다. 접착성 테이프(펜실베니아, 글렌 록 소재, Adhesives Research)를 직경이 약 17 mm인 원형 디스크에 조립한다(fabricating). 이 테이프를 환자의 피부에 적용한 후에 제거하여, 각질층(stratum corneum)으로부터 표피세포를 수확한다. 테이프 수확을 3회 더 반복하여 총 4개의 표피 샘플을 수득한다. 그런 다음에, 표피세포를 세포-표면 AGE의 존재에 대해 테스트하여, 임의의 표피세포가 노화상태인지 결정한다.

[0067] 피부세포(Dermal cell)를 면도 생검(shave biopsy)을 이용하여 수집한다. 메스 날(scalpel blade)을 이용하여 충분한 피부를 제거해, 표피(epidermis)를 통과하고 진피(dermis)에 접근하여 샘플을 수득한다. 그런 다음에, 이 샘플 내 섬유아세포를 세포-표면 AGE의 존재에 대해서 테스트하여, 섬유아세포가 노화상태인지 결정한다. 면도 생검에서 적어도 5%의 노화세포의 존재는 피부 손상 및 노화 피부 세포의 수를 감소시키기 위한 치료에 대한 필요성을 나타낸다. 환자는 노화 피부세포를 표적 및 제거하기 위한 노화세포 제거제를 투여받는다.

[0068] **[실시예 3: 항-AGE 항체를 이용한 직접 결합 ELISA(Direct binding ELISA)]**

[0069] 쥐과 항-AGE 항체 및 키메라 항-AGE 항체의 결합을 직접 결합 ELISA에 의해 연구했다. 항-카르복시메틸 리신(carboxymethyl lysine, CML) 항체 (R&D Systems, MAB3247)를 대조군으로 이용했다. CML을 KLH에 컨쥬게이트했고(CML-KLH), CML과 CML-KLH를 ELISA 플레이트상에 밤새 코팅시켰다. HRP-염소 항-마우스 Fc를 이용하여, 대조군 및 쥐과 항-AGE 항체를 검출했다. HRP-염소 항-인간 Fc를 이용하여, 키메라 항-AGE 항체를 검출했다.

[0070] 항원을 pH 6.5의 1x 포스페이트 버퍼 중에 1 μg/mL으로 희석시켰다. 96-웰 마이크로 타이터 ELISA 플레이트를 100 μL/웰의 희석된 항원으로 코팅시켰고, 4℃에 밤새 두었다. 이 플레이트를 1x PBS, 2.5% BSA로 블로킹하여(blocking), 다음날 아침에 1-2시간 동안 실온에 두었다. 항체 샘플을 50 μg/mL의 시작 농도로, 1x PBS, 1%

BSA를 이용한 연속 희석법으로 제조했다. 2차 항체를 1:5,000으로 희석시켰다. 100 μL의 항체 희석액을 각 웰에 분주했다. 플레이트를 실온에서 0.5-1 시간 동안 마이크로플레이트 진탕기(microplate shaker)상에서 배양시켰다. 이 플레이트를 1x PBS로 3회 세척했다. 100 μL/웰의 희석된 HRP-컨쥬게이트 염소 항-인간 Fc 2차 항체를 웰에 분주했다. 이 플레이트를 마이크로플레이트 진탕기상에서 1시간 동안 배양시켰다. 그런 다음에, 이 플레이트를 1x PBS로 3회 세척했다. HRP 기질 TMB 100 μL를 각 웰에 추가하여, 플레이트를 전개시켰다. 3-5분이 지난 후에, 100 μL의 1N HCl을 추가함으로써 반응을 종결시켰다. 제2의 직접 결합 ELISA를 CML 코팅만 이용하여 수행했다. OD450에서의 흡광도를 마이크로타이터 리더기(microplate reader)를 이용하여 리딩했다.

[0071] CML 및 CML-KLH ELISA에 대한 OD450에서의 흡광도의 로 데이터가 아래의 플레이트 맵에 제시된다. 플레이트의 96개의 웰 중 48개를 이용했다. 플레이트 맵에서 비어있는 웰(blank well)은 이용하지 않은 웰을 나타낸다.

[0072] **CML 및 CML-KLH ELISA의 플레이트 맵:**

농도 (ug/mL)	1	2	3	4	5	6	7
50	0.462	0.092	0.42		1.199	0.142	1.852
16.67	0.312	0.067	0.185		0.31	0.13	0.383
5.56	0.165	0.063	0.123		0.19	0.115	0.425
1.85	0.092	0.063	0.088		0.146	0.099	0.414
0.62	0.083	0.072	0.066		0.108	0.085	0.248
0.21	0.075	0.066	0.09		0.096	0.096	0.12
0.07	0.086	0.086	0.082		0.098	0.096	0.098
0	0.09	0.085	0.12		0.111	0.083	0.582
	R&D 양성 대조군	모 항-AGE	키메라 항-AGE		R&D 양성 대조군	모 항-AGE	키메라 항-AGE
	CML-KHL 코팅				CML 코팅		

[0073]

[0074] CML-단독 ELISA에 대한 OD450에서의 흡광도의 로 데이터가 아래의 플레이트 맵에 제시된다. 플레이트의 96개의 웰 중 24개를 이용했다. 플레이트 맵에서 비어있는 웰은 이용하지 않은 웰을 나타낸다.

[0075] **CML-단독 ELISA의 플레이트 맵:**

농도 (ug/mL)	1	2	3	4	5	6	7
50	1.913	0.165	0.992				
16.66667	1.113	0.226	0.541				
5.555556	0.549	0.166	0.356				
1.851852	0.199	0.078	0.248				
0.617284	0.128	0.103	0.159				
0.205761	0.116	0.056	0.097				
0.068587	0.073	0.055	0.071				
0	0.053	0.057	0.06				
	R&D 양성 대조군	모 항-AGE	키메라 항-AGE				

[0076]

[0077] 대조군 및 키메라 항-AGE 항체는 CML과 CML-KLH 모두에 결합하는 것으로 나타났다. 쥐과 (모) 항-AGE 항체는 CML 또는 CML-KLH에 대해서 약한 결합 내지 결합하지 않는 것으로 나타났다. 반복된 ELISA로부터 획득된 데이터는 CML에 대한 대조군과 키메라 항-AGE 항체의 결합을 확인한다. 모든 버퍼 대조군은 음성 신호(negarive signal)를 보였다.

[0078] 이 데이터는 AGE 및 AGE-면역원 컨쥬게이트에 결합하는 항-AGE 항체의 능력을 확인한다. 주지된 AGE인 카르복시메틸리신에 대한 결합의 근거는 진단학적 적용에서 항-AGE 항체의 적합성을 지지한다.

[0079] **[실시예 4: 혈액 샘플에 기초한 진단 및 치료]**

[0080] 혈액샘플을 환자로부터 채취한다. 이 혈액샘플을 원심분리시켜, 혈청을 분리한다. CD57+ T-세포를 Miltenyi Biotec CD8+CD57+ T 세포 분리 키트 (독일, 베르기슈 글라트바흐 소재)를 이용하여 분리한다. CD57+ T-세포를

혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 계수한다. 그런 다음에, 혈청 및 분리된 CD57+ T-세포를 항-CML 항체로의 결합에 대해서 테스트한다. 분리된 CD57+ T-세포의 50% 이상이 표지된 항-CML 항체에 결합하고, 이와 함께 152 μg/mL 이하의 혈청 CML이 표지된 항-CML 항체에에 결합한 것은 환자가 노화세포 제거제를 이용한 치료를 필요로 한다는 것을 나타낸다. 환자는 노화세포를 표적하고 제거하는 항-AGE 항체를 투여받는다.

[0081] **[실시예 5: 협측 면봉에 기초한 진단 및 치료]**

[0082] 샘플을 환자로부터 협측 면봉에 의해 수득한다. 협측 상피세포와 타액을 이 면봉으로부터 분리한다. 협측세포를 트립신으로 처리하고(trypsinizing), 항-CML 단일클론 항체와 혼합시킨다. 그런 다음에, 혼합물을 혈구계수기를 통과시켜 노화 협측세포를 계수한다. 유리 CML(free CML)을 타액의 ELISA에 의해 측정한다. 협측세포의 50% 이상이 항-CML 항체와 결합하고, 이와 함께 3 μg/mL 이하의 타액 CML이 항-CML 항체와 결합하는 것은 환자가 노화세포 제거제를 이용한 치료를 필요로 한다는 것을 나타낸다. 환자는 노화세포를 표적 및 제거하는 독소에 컨쥬게이트된 항-AGE 항체를 투여받는다.

[0083] **[실시예 6: 생물학적 연령의 결정]**

[0084] 샘플을 50세의 환자로부터 협측 면봉에 의해 수득한다. 협측 상피세포와 타액을 이 면봉으로부터 분리한다. 협측세포를 트립신처리하고, 항-CML 단일클론 항체와 혼합한다. 그런 다음에, 혼합물을 혈구계수기에 통과시켜, 노화 협측세포를 계수한다. 유리 CML을 타액의 ELISA에 의해 측정한다. 세포-표면 CML을 발현하는 협측 세포 대 타액 중 유리 CML의 비율은 5:1이다. 이 비율은 건강한 50세에 기대되는 비율보다 크며, 이는 환자가 이 환자의 역연령보다 큰 생물학적 연령을 갖는 다는 것을 입증한다. 이 결과는 환자가 세포노화로 인한 노화 및 노화-관련 질병, 질환 또는 병리학적 상태의 조기 발병을 나타낸다는 것을 시사한다. 또한, 이러한 결과는 환자가 노화세포 제거제를 이용한 치료를 필요로 한다는 것을 나타낸다.

[0085] **[실시예 7: 세포노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태 오더(order)의 진단 및 치료]**

[0086] 혈액샘플을 45세의 환자로부터 수득한다. 이 혈액샘플을 원심분리하여 혈청을 분리한다. CD57+ T-세포를 Miltenyi Biotec 사의 CD8+CD57+ T 세포 분리 키트 (독일, 베르기슈 글라트바흐 소재)를 이용하여 분리한다. CD57+ T-세포를 혈구계수기를 이용하여 계수한다. 그런 다음에, 혈청 및 분리된 CD57+ T-세포를 항-CML 항체로의 결합에 대해서 테스트한다. 세포-표면 CML을 발현하는 세포 대 혈청 중 유리 CML의 비율은 10:1이다. 이 비율은 환자가 65세의 생물학적 연령을 갖는다는 것을 나타낸다. 환자의 생물학적 연령이 이 환자의 역연령을 초과하기 때문에, 이 환자는 세포노화로 인한 진행성 생물학적 노화와 관련된 질병, 질환 또는 병리학적 상태로 진단된다. 이 환자는 노화세포를 표적 및 제거하는 항-AGE 항체를 투여받는다.

[0087] **[실시예 8: 항-당화 최종산물 항체 투여의 *생체내* 연구]**

[0088] 항-당화 최종산물 항체의 효과를 조사하기 위해, 항체를 노화 CD1(ICR) 마우스(Charles River Laboratories)에, 3주 동안, 일주일에 한번 (1일, 8일 및 15일), 1일 2회 정맥내 주입으로 투여한 후에, 10주의 휴약기간(treatment-free period)을 가졌다. 테스트 항체는 키홀 림펫 헤모시아닌이 컨쥬게이트된 카르복시메틸 리신 - R&D Systems, Inc. (미네소타 주, 미니애폴리스 소재; 카탈로그 번호 MAB3247)로부터 입수가능한 카르복시메틸 리신 MAb (클론 318003) - 에 대해서 발생된(raising), 시판중인 마우스 항-당화 최종산물 항체였다. 생리 식염수의 대조 참조(control reference)를 대조군 동물에 이용했다.

[0089] "젊음"으로 나타낸 마우스는 8주령이었고, "늙음"으로 나타낸 마우스는 88주(±2 일)령이었다. 항체의 투여로 인한 부작용은 언급되지 않았다. 연구에 이용된 동물의 상이한 군이 표 1에 제시된다.

[0090] [표 1: 연구에 이용된 동물의 상이한 군]

군 번호	테스트 물질	마우스	용량 수준 (μg/gm/BID/ 주)	동물의 수	
				주연구 (Main Study)	휴약
				암컷	암컷
1	생리 식염수	젊음	0	20	-
2	생리 식염수	늙음	0	20	20
3	항체	늙음	2.5	20	20
4	없음	늙음	0	20	pre
5	항체	늙음	5.0	20	20

[0091] - = 해당 없음, Pre = 지방조직의 수집을 위해 치료 시작 전에 안락사된 동물의 하위집단

[0092] 노화세포에 대한 마커인 $P16^{INK4a}$ mRNA를 군(group)들의 지방조직에서 실시간-qPCR에 의해 정량했다. 이 결과를 표 2에 나타낸다. 표에서, ΔΔCt = ΔCt 평균 대조군 (2) - ΔCt 평균 실험군 (1 또는 3 또는 5)이고; 배수 발현(Fold Expression)= $2^{-\Delta\Delta Ct}$이다.

[0093] [표 2: 지방조직에서 정량된 $P16^{INK4a}$ mRNA]

계산 (군 4 에 대해서 비-조정: 5.59)	군 2 vs 군 1		군 2 vs 군 3		군 2 vs 군 5	
	군 2	군 1	군 2	군 3	군 2	군 5
평균 ΔCt	5.79	7.14	5.79	6.09	5.79	7.39
ΔΔCt	-1.35		-0.30		-1.60	
배수 발현	**2.55**		**1.23**		**3.03**	

[0094]

[0095] 상기 표 2는 예상대로, 비-처리 늙은 마우스(대조군 2)가 $p16^{Ink4a}$ mRNA을 비-처리 젊은 마우스(대조군 1)보다 2.55배 더 발현한다는 것을 나타낸다. 이는 회복일(recovery day) 85일차의 종료에서 안락사된 비-처리 늙은 마우스인 군 2를 실험일(treatment day) 22일차의 종료에서 안락사된 비-처리 젊은 마우스인 군 1에 비교하는 경우에 관찰되었다. 비-처리 늙은 마우스인 군 2로부터 획득된 결과를 85일차에 안락사된 처리-늙은 마우스인 군 3으로부터 획득된 결과와 비교하는 경우에, $p16^{Ink4a}$ mRNA가 군 3에서보다 군 2에서 1.23배 높았다는 것이 관찰되었다. 그러므로, $p16^{Ink4a}$ mRNA 발현의 수준은 늙은 마우스가 2.5 μg/gram/BID/주(week)의 항체로 처리되는 경우에 더 낮았다.

[0096] 비-처리 늙은 마우스인 군 2 (대조군)으로부터 획득된 결과를 22일차에 안락사된 처리-늙은 마우스인 군 5 (5 μg/gram)로부터 획득된 결과와 비교한 경우에, $p16^{Ink4a}$ mRNA가 군5 (5 μg/gram)에서보다 군 2 (대조군)에서 3.03배 더 높았다는 것이 관찰되었다. 이 비교는 군 5의 동물이 5.0 μg/gram/BID/주로 처리되는 경우에, 이들이 더 낮은 수준의 $p16^{Ink4a}$ mRNA 발현을 가졌다는 것을 나타냈고, 이는 $p16^{Ink4a}$ mRNA 발현 주순이 젊은 비-처리 마우스 (즉, 군 1)의 발현 수준과 비슷하다는 것을 제시한다. 회복일 85일차의 종료에서 안락사된 군 3 (2.5 μg/gram) 마우스와 달리, 군 5의 마우스는 치료일(treatment day) 22일차의 종료에서 안락사되었다.

[0097] 이러한 결과는 항-AGE 항체의 투여가 노화세포의 사멸을 야기했다는 것을 입증한다.

[0098] 또한, 비복근(gastrocnemius muscle)의 질량을 측정하여 근감소증에 대한 항체 투여의 효과를 결정하였다. 이 결과를 표 3에 제시한다. 이 결과는 항체의 투여가 대조군에 비해서 근육 질량을 증가시켰으나, 5.0 μg/gm/BID/주의 보다 높은 용량에서만 증가시켰다는 것을 나타낸다.

[0099] **[표 3: 비복근의 질량에 때한 항체 투여의 효과]**

군	요약 정보	비복근의 절대 질량	비복근의 체질량에 상대적인 중량
1	평균	0.3291	1.1037
	SD	0.0412	0.1473
	N	20	20
2	평균	0.3304	0.7671
	SD	0.0371	0.1246
	N	20	20
3	평균	0.3410	0.7706
	SD	0.0439	0.0971
	N	19	19
5	평균	0.4074	0.9480
	SD	0.0508	0.2049
	N	9	9

[0100]

[0101] 이러한 결과는 세포의 AGE에 결합하는 항체의 투여가 노화의 바이오마커인 $p16^{Ink4a}$를 발현하는 세포의 감소를 야기했다는 것을 입증한다. 데이터는 감소하는 노화세포가 노화된 마우스에서 근육 질량의 증가를 직접적으로 초래한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 근감소증의 전형적인 징후인 근육 질량의 손실이 세포의 AGE에 결합하는 항체와 같은 노화세포 제거제의 투여에 의해 치료될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0102] 이러한 데이터는 항-AGE 항체가 세포-표면 AGE-변형 단백질 또는 AGE-변형 펩티드를 발현하는 세포에 선택적으로 결합할 수 있다는 것을 확인한다. 선택적 결합의 근거는 진단학적 적용에서 항-AGE 항체의 적합성을 지지한다. 또한, 이 데이터는 항-AGE 항체가 *생체내* 이용에 안전하다는 것을 입증한다.

[0103] **[실시예 9: 테스트 항체의 친화도 및 동역학(kinetics)]**

[0104] 실시예 8에서 이용된 테스트 항체의 친화도 및 동역학을 Nα,Nα-비스(카르복시메틸)-L-리신 트리플루오로아세테이트 염 (미주리 주, 세인트 루이스 소재, Sigma-Aldrich)을 세포의 AGE-변형 단백질에 대한 모델 기질로 이용하여 분석했다. 무-표지 상호작용 분석(Label-free interaction analysis)을 BIACORE™ T200 (펜실베니아 주, 피츠버그 소재, GE Healthcare)상에서, 시리즈 S 센서 칩 CM5 (펜실베니아 주, 피츠버그 소재, GE Healthcare)와 블랭크로 설정된 Fc1 및 테스트 항체로 고정된 Fc2 (150,000 Da의 분자량)를 이용하여 수행했다. 러닝 버퍼는 25 ° C 온도의 HBS-EP 버퍼 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.05% P-20, pH 7.4)였다. 소프트웨어는 BIACORE™ T200 평가 소프트 웨어, 버전 2.0이었다. 이중 참조(double reference) (Fc2-1 주입 및 버퍼만 주입)를 분석에 이용했고, 데이터를 랭뮤어 1:1 결합 모델(Langmuir 1:1 binding model)에 피팅했다 (fitting).

[0105] **[표 4: 친화도 및 동역학 분석의 실험 설정]**

결합 및 해리	
유로 (Flow path)	Fc1 및 Fc2
유량 (μl/min.)	30
결합 시간 (s)	300
해리 시간 (s)	300
샘플 농도(μM)	20 – 5 – 1.25 (x2) – 0.3125 – 0.078 - 0

[0106]

[0107] 시간에 따른 반응의 그래프가 도 2에 도시된다. 다음의 값이 분석으로부터 결정되었다: k_a (1/Ms) = 1.857 x 10^3; k_d (1/s) = 6.781 x 10^{-3}; K_D (M) = 3.651 x 10^{-6}; R_{max} (RU) = 19.52; 및 Chi^2 = 0.114. 피팅의 Chi^2 값이 R_{max}의 10% 미만이기 때문에, 피팅을 신뢰할 수 있다.

[0108] **[실시예 10: 카르복시메틸 리신 단일클론 항체 투여의 *생체내* 연구]**

[0109] 종양 성장, 전이 가능성 및 악액질에 대한 카르복시메틸 리신 항체의 효과를 연구했다. *생체내* 연구를 쥐과 유방암 종양 모델을 이용하여 마우스에서 수행했다. 암컷 BALB/c 마우스 (BALB/cAnNCrl, Charles River 사)는 연구의 1일차에서 11주령이었다.

[0110] 4T1 쥐과 유방 종양세포 (ATCC CRL-2539)를 10% 소태아 혈청, 2 mM 글루타민, 25 μg/mL 겐타마이신, 100 유닛/mL 페니실린 G Na, 및 100 μg/mL 스트렙토마이신 설페이트(streptomycin sulfate)를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양시켰다. 종양 세포를 5% CO_2 및 95% 대기(air)의 분위기에서, 37 ° C의 습식 배양기에서 조직 배양 플라스크(tissue culture flask)에 유지시켰다.

[0111] 그런 다음에, 배양된 유방암 세포를 마우스에 이식했다. 4T1 세포를 대수 증식기 성장(log phase growth) 동안에 수확하여, 포스페이트 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS) 중에 1 x 10^6 세포/mL의 농도로 이식 일자에 재-현탁시켰다. 1 x 10^5의 4T1 세포 (0.1 mL 현탁액)을 각 테스트 동물의 우측 측복부(right flank)에 피하로 이식함으로써, 종양을 개시했다. 종양은, 이들의 부피가 80-120 mm^3의 표적 범위(target range)에 접근한 것으로 모니터링되었다. 종양 부피를 다음의 식을 이용해 결정했다: "종양 부피 = (종양 너비)^2(종양 길이)/2". 1 mm^3의 종양 부피가 1 mg의 중량을 갖는다는 가정을 이용하여, 종양 중량을 근사치로 계산했다. 이식 13일 후에 - 연구 1일차로 지정함 - 마우스를 4개의 군(n=15/군)으로 분류했고, 개별적인 종양 부피는 108 내지 126 mm^3의 범위였으며, 군 평균 종양 부피는 112 mm^3였다. 4개의 처리군은 아래의 표 5에 제시된다:

[0112] **[표 5: 처리군]**

군	설명	제제	투약 (μg/g)
1	대조군	포스페이트 완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS)	N/A
2	저-용량군	카르복시메틸 리신 단일클론 항체	5
3	고-용량군	카르복시메틸 리신 단일클론 항체	10
4	관찰-단독군 (Observation only)	없음	N/A

[0113]

[0114] 항-카르복시메틸 리신 단일클론 항체를 치료제로 이용했다. 250 mg의 카르복시메틸 리신 단일클론 항체를 R&D Systems (미네소타 주, 미니애폴리스 소재)로부터 획득했다. 카르복시메틸 리신 단일클론 항체의 투약 용액을 비히클(PBS) 중 1 및 0.5 mg/mL로 제조하여, 10 mL/kg의 투약 부피 중 각각 10 μg/g 및 5 μg/g의 활성 투여(active dosage)를 제공했다. 투약 용액은 빛을 비해, 4 ° C에 저장했다.

[0115] 모든 치료제를 마우스를 하나의 용량으로 투여한 연구 1일차를 제외하고, 21일 동안 1일 2회 정맥내로(i.v.) 투여했다. 연구 19일차에, 꼬리 정맥 분해(tail vein degradation)로 인해 i.v.로 투약될 수 없는 동물에 대해서 i.v. 투약을 복강내(i.p.) 투약으로 바꿨다. 투약 부피는 체중 20 그람 당 0.200 mL (10 mL/kg)였고, 각각의 개별적인 동물의 체중에 대해서 조정되었다(scaling).

[0116] 본 연구는 23일 동안 지속되었다. 종양을 주당 2회 캘리퍼를 이용하여 측정했다. 동물의 체중은 1일-5일차에 매일 측정되었고, 이후 연구의 완료전까지 주당 2회 측정되었다. 또한, 마우스를 임의의 부작용에 대해서 관찰했다. 허용가능한 독성은 연구 동안의 20% 미만의 군 평균 체중 손실 및 10% 이하의 치료-관련 죽음으로 정의되었다. 치료 효능을 연구의 마지막 날(23일차)에 획득된 데이터를 이용하여 결정했다.

[0117] 종양 성장을 억제하는 항-카르복시메틸 리신 항체의 능력을 군 1-3에 대한 종양 부피 중앙값(median tumor volume, MTV)을 비교함으로써 결정했다. 종양 부피를 상기 기재된 대로 측정했다. 종양성장 저해 백분율(%TGI)을 대조군 (군 1)의 MTV와 약물-처리군의 MTV 사이의 차이로 정의했고, 이는 대조군의 MTV의 백분율로서 표현된다. %TGI는 다음의 식에 따라 계산될 수 있다: "%TGI = $(1-MTV_{처리군}/MTV_{대조군})$ x 100".

[0118] 암전이를 억제하는 항-카르복시메틸 리신 항체의 능력을 군 1-3에 대한 폐암 병소(lung cancer foci)를 비교함으로써 결정했다. 억제 백분율(%억제)는 대조군의 전이 병소의 평균 계수와 약물-처리군의 전이 병소의 평균 계수간의 차이로 정의했고, 이는 대조군의 전이 병소의 평균 계수의 백분율로 표현된다. %억제는 다음의 식에 따라 계산될 수 있다: "%억제 = (1-병소$_{처리군}$의 평균 계수/병소$_{대조군}$의 평균 계수) x 100".

[0119] 악액질을 억제하는 항-카르복시메틸 리신 항체의 능력을 군 1-3에 대한 폐와 비복근의 중량을 비교함으로써 결정했다. 또한, 조직 중량을 100 g의 체중으로 정규화했다(normalizing).

[0120] 또한, 치료효능을 연구 동안 관찰된 퇴행반응(regression response)의 발생률 및 등급(magnitude)에 의해 평가했다. 치료는 동물에서 종양의 부분적인 퇴행(partial regression, PR) 또는 완전한 퇴행(complete regression, CR)을 야기할 수 있다. PR 반응에서, 종양 부피는 연구과정 동안의 3회의 연속적인 측정에 대해서, 종양의 1일차 부피의 50% 이하였고, 이러한 3회의 측정 중 1회 이상에 대해서 13.5 mm^3 이상이었다. CR 반응에서, 종양 부피는 연구과정 동안의 3회의 연속적인 측정에 대해서 13.5 mm^3 미만이었다.

[0121] 통계학적 분석을 Windows 6.07용 Prism (GraphPad)을 이용하여 수행했다. 두 개 군의 23일차 평균 종양 부피(mean tumor volume, MTV)간 차이의 통계학적 분석을 맨-휘트니 *U* 검정(Mann-Whitney *U* test)을 이용하여 완수했다. 전이 병소의 비교를 ANOVA-던네트(ANOVA-Dunnett)에 의해 검정했다. 정규화된 조직 중량을 ANOVA에 의해 비교했다. 양측 통계학적 분석(Two-tailed statistical analysis)를 유의 수준 $P = 0.05$에서 수행했다. 결과를 통계학적으로 유의하거나, 또는 통계학적으로 유의하지지 않은 것으로 분류했다.

[0122] 연구의 결과는 아래 표 6에 제시된다:

[0123] **[표 6: 결과]**

[0124]

군	MTV (mm^3)	%TGI	폐 병소	%억제	PR	CR	비복근 중량/ 정규화 (mg)	폐 중량/ 정규화 (mg)
1	1800	N/A	70.4	N/A	0	0	353.4/19.68	2799.4/292.98
2	1568	13%	60.3	14%	0	0	330.4/21.62	2388.9/179.75
3	1688	6%	49.0	30%	0	0	398.6/24.91	2191.6/214.90

[0125] 모든 치료 요법은 치료-관련 죽음을 수반하지 않으며, 허용가능한 내약성이었다(acceptably tolerated). 유일한 동물의 죽음은 전이로 인한 치료와 관련없는 죽음이었다. %TGI는 5 μg/g 처리군 (군 2) 및 10 μg/g 처리군 (3 군)에 대한 유의성 ($P > 0.05$, 맨-위트니)으로 향하는 경향이 있었다. %억제는 5 μg/g 처리군에 대한 유의성 ($P > 0.05$, ANOVA-던네트)으로 향하는 경향이 있었다. %억제는 10 μg/g 처리군에 대해서 통계학적으로 유의했다 ($P \leq 0.01$, ANOVA-던네트). 악액질을 치료하는 카르복시메틸 리신 항체의 능력은 처리군과 대조군 사이의 폐와 비복근의 기관 중량(organ weight)의 비교에 기초한 유의성($P > 0.05$, ANOVA)으로 향하는 경향이 있었다. 결과는 항-카르복시메틸 리신 단일클론 항체의 투여가 암전이를 감소시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0126] 이러한 데이터는 항-AGE 항체가 세포-표면 AGE-변형 단백질 또는 AGE-변형 펩티드를 발현하는 세포에 선택적으로 결합할 수 있다는 것을 확인한다. 선택적인 결합의 근거는 진단학적 적용에서 항-AGE 항체의 적합성을 지지한다. 또한, 이 데이터는 항-AGE 항체가 *생체내* 이용에 안전하다는 것을 입증한다.

[0127] **[실시예 11: 항-AGE 항체는 *시험관내* 노화 연골세포(senescent chondrocyte)에 결합한다]**

[0128] 노화 연골세포를 퇴행성 관절염 관절(osteoarthritic joint)로부터 수득했다. 항-AGE 항체는 *시험관내* 노화 연골세포에 결합했다. 이러한 결과는 항-AGE 항체가 노화세포에 결합할 수 있다는 것을 확인한다. 또한, 이 결과는 진단학적 적용에서 항-AGE 항체의 적합성을 확인한다.

[0129] **[실시예 12: 면역조직화학적 연구]**

[0130] 조직샘플을 알츠하이머병 및 파킨슨병을 앓고 있는 환자로부터 수득했다. 2개의 알츠하이머병 샘플을 해마(hippocampus)로부터 채취했다. 하나의 파킨슨병 샘플을 흑질(substantia nigra)로부터 채취했고, 두 번째 파킨슨병 샘플은 복측 피개영역(the ventral tegmental area)으로부터 채취했다. 모든 세포를 상기 기재된 바와 같이 항-AGE 항체를 이용하여 카르복시메틸리신 (CML)에 대해 염색했다. 알츠하이머병 세포를 인산화된 타우(phospho tau) 또는 별도로 아밀로이드 전구체 단백질에 대해 염색했다. 파킨슨병 세포를 알파 시누클레인에 대해서 염색했다. 세포의 핵 염색을 DAPI 대조 염색을 이용하여 확인했다 (애리조나 주립대의 Diego Mastroeni 박사가 실험을 수행하여, 이미지를 제작했다).

[0131] 도 3a는 붉은색으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색으로 염색된 인산화된 타우(phosphorylated tau)를 나타내는 알츠하이머병 샘플의 세포 사진이다.

[0132] 도 3b는 붉은색으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색으로 염색된 아밀로이드 전구체 단백질(precursor protein)을 나타내는 알츠하이머병 샘플의 세포 사진이다.

[0133] 도 3c는 붉은색으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색으로 염색된 알파 시누클레인(alpha synuclein)을 나타내는 흑질(substantia nigra)로부터 수득된 파킨슨병 샘플의 세포 사진이다.

[0134] 도 3d는 붉은색으로 염색된 카르복시메틸리신 및 초록색으로 염색된 알파 시누클레인을 나타내는 복측 피개영역(ventral tegmental area)으로부터 수득된 파킨슨병 샘플의 세포 사진이다.

[0135] 주지된 AGE인 CML은 알츠하이머병과 파킨슨병에서 입증된 병리학으로 공동-정위(co-localizing)되지 않았다. 대신, CML은 신경 아교세포(glial cell)상에 나타났다. 알츠하이머병 샘플에서 CML 면역반응성(immunoreactivity)은 미세 아교세포(microglia)와 함께 존재했고, 파킨슨병 샘플에서 CML 면역반응성은 성상교세포(astrocyte)와 함께 존재했다고 추측되었다. 결과는 알츠하이머병과 파킨슨병에서 노화 신경 아교세포의 존재를 입증했다. 항-AGE 항체를 이용한 노화 신경 아교세포의 제거는 신경 줄기세포/전구세포에 의한 신경 아

교세포의 재생을 야기하는 것으로 예측될 것이다 (예를 들어, Leonard, B.W. *외*, "Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease", The Journal of Comparative Neurology, Vol. 515, pp. 269-294 (2009)를 참고).

[0136] 이 데이터는 다양한 신경퇴행성 질병을 앓고 있는 환자로부터 수득된 조직 샘플 중 세포상에 나타난 AGE에 결합하는 항-AGE 항체의 능력을 확인한다. 근거는 진단학적 적용에서 항-AGE 항체의 적합성을 추가로 확인한다.

[0137] **[참고문헌]**

1. Lowe, R. *et al.*, "Buccals are likely to be a more informative surrogate tissue than blood for epigenome-wide association studies", Epigenetics, Vol. 3, No. 4, pp. 445-454 (2013).

2. Kared, H. *et al.*, "CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes", Cancer Immunology, Immunotherapy, Vol. 65, No. 4, pp. 441-452 (2016).

3. Yoon, M-S. *et al.*, "Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus", Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 323, Issue 2, pp. 377-381 (2004).

4. Pearce, M.S. *et al*, "Childhood growth, IQ and education as predictors of white blood cell telomere length at age 49-51 years: the Newcastle Thousand Families Study", PLoS ONE, Vol. 7, Issue 7, e40116 (2012).

5. "Telomere Testing White Paper", Titanovo, available online at titanovo.com/telomere-length-testing/ (accessed on April 20, 2017).

6. "Carboxymethyl Lysine (CML) ELISA Cat. No. KT-32428", Kamiya Biomedical Company, available online at www.kamiyabiomedical.com/pdf/KT-32428.pdf (accessed on April 20, 2017).

7. "CD8+CD57+ T Cell Isolation Kit Data Sheet", Miltenyi Biotec, available online at www.miltenyibiotec.com/~/media/Images/Products/Import/0001600/IM0001652.ashx?force=1 (2008).

8. "CD8+CD57+ T Cell Isolation Kit, human", Miltenyi Biotec, available online at www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/cell-separation-reagents/t-cells/cd8-cd57-t-cell-isolation-kit-hurnan aspx (accessed on April 19, 2017).

[0138]

9. "Extraction of genomic DNA from buccal epithelial cells", available online at authors.fhcrc.org/591/1/Buccal%20Cell%20DNA%20Isol%20v2.pdf (accessed on April 19, 2017).

10. Severin, F.F. *et al.*, "Advanced glycation of cellular proteins as a possible basic component of the 'Master Biological Clock'", Biochemistry (Moscow), Vol. 78, No. 9, pp. 1331-1336 (2013).

11. Wong, R. et al., "Use of RT-PCR and DNA microarrays to characterize RNA recovered by non-invasive tape harvesting of normal and inflamed skin", The Journal of Investigative Dermatology, Vol. 123, pp. 159-167 (2004).

12. Yang, S. et *al.*, "Impact of oxidative stress biomarkers and carboxymethyllysine (an advanced glycation end product) on prostate cancer: a prospective study", Clinical Genitourinary Cancer, Vol. 13, No. 5, pp. e347-e351 (2015).

13. Meerwaldt, R. et al., "Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes", Diabetes Care, Vol. 30, No. 1, pp. 107-1 12 (2007).

14. Cosgrove, C. et al., "The impact of 6-month training preparation for an Ironman triathlon on the proportions of naive, memory and senescent T cells in resting blood", European Journal of Applied Physiology, Vol. 112, No. 8, pp. 2989-2998 (2012).

15. Krtolica, A. et *al.*, "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging", Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 98, No. 21, pp. 12072-12077 (2001).

16. Schmid, D. *et al.*, "Collage glycation and skin aging", Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide, available online at mibellebiochemistry.com/app/uploads/2015/03/GSP-T-for-Skin_Collagen-glycation-and-skin-aging-CT-2002.pdf (accessed on April 27, 2017).

[0139]

17. Spielmann, G. *et al.*, "Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man", Brain, Behavior and Immunity, Vol. 25, No. 8, pp. 1521-1529 (2011).

18. Pauwels, E.K.J. *et al.*, "Radiolabeled monoclonal antibodies: a new diagnostic tool in nuclear medicine", Radiotherapy and Oncology, Vol. 1, No. 4, pp. 333-338 (1984).

19. U.S. Pat. App. Pub. No. US 2016/0017033.

20. Khoja, L. *et al.*, "A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker", British Journal of Cancer, Vol. 106, No. 3, pp. 508-516 (2012).

21. Ruster, M. *et al.*, "Detection of elevated N^{ε}-carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia", Scandinavian Journal of Rheumatology, Vol. 34, No. 6, pp. 460-463 (2005).

22. Al-Abed, Y. *et al.*, "N^{ε}-Carboxymethyllysine formation by direct addition of glyoxal to lysine during the Maillard reaction", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 5, No. 18, pp. 2161-2162 (1995).

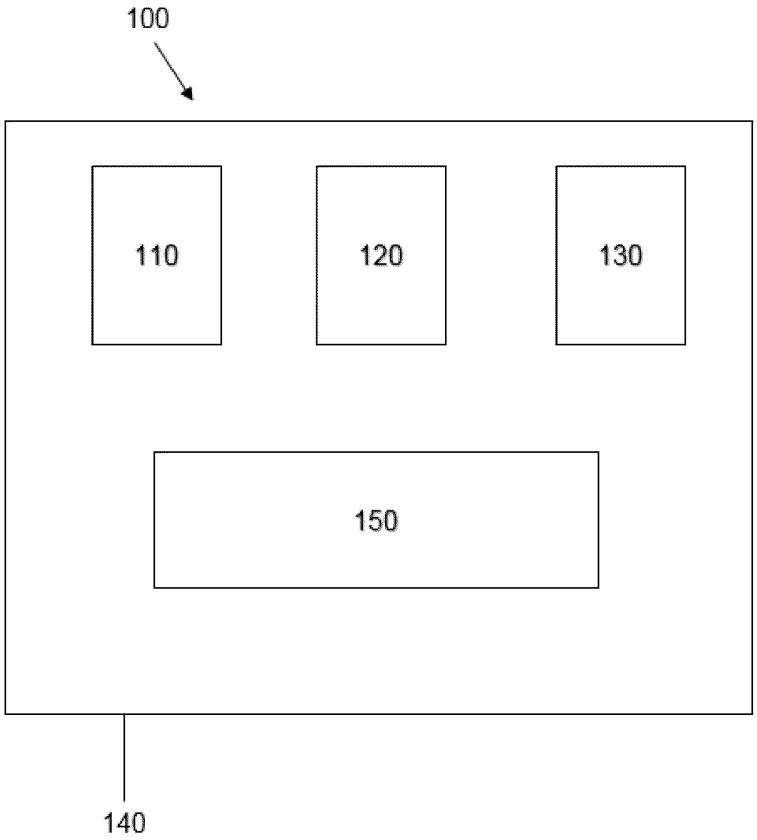
23. Freise, A.C. *et al.*, *"In vivo* imaging with antibodies and engineered fragments", Molecular Immunology, Vol. 67, No. 2, pp. 142-152 (2015).

24. Wendel, U. *et al.*, "A novel monoclonal antibody targeting carboxymethyllysine, an advanced glycation end product in atherosclerosis and pancreatic cancer", PLoS One, Vol. 13, No. 2, e0191872 (2018).

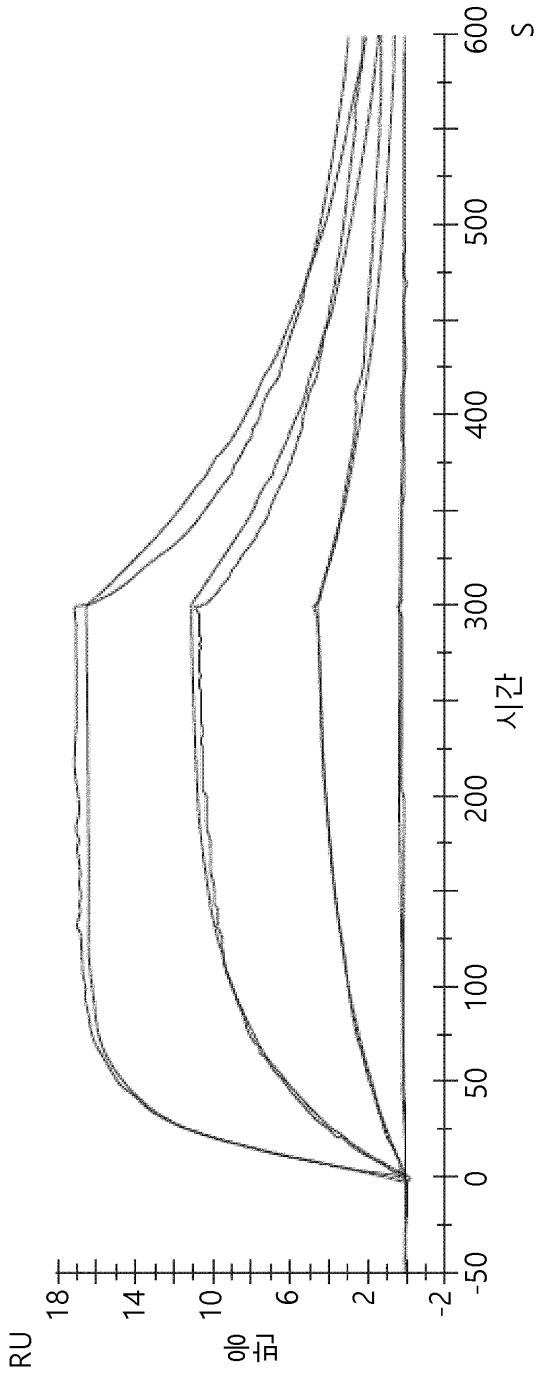
[0140]

도면

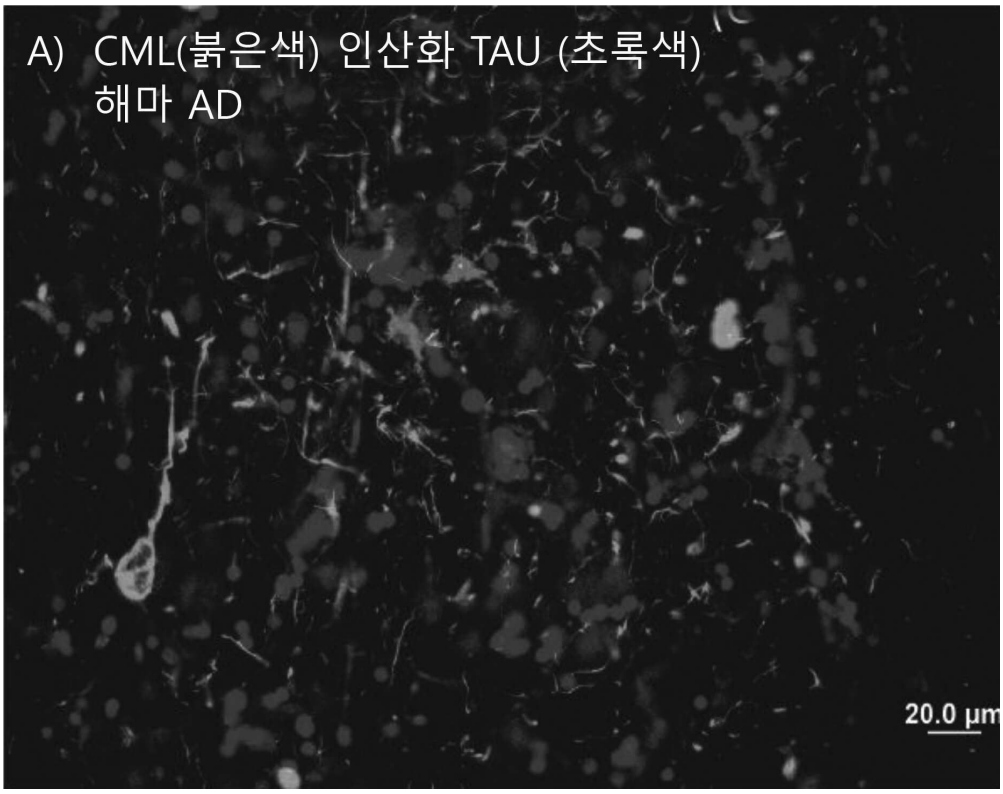
도면1



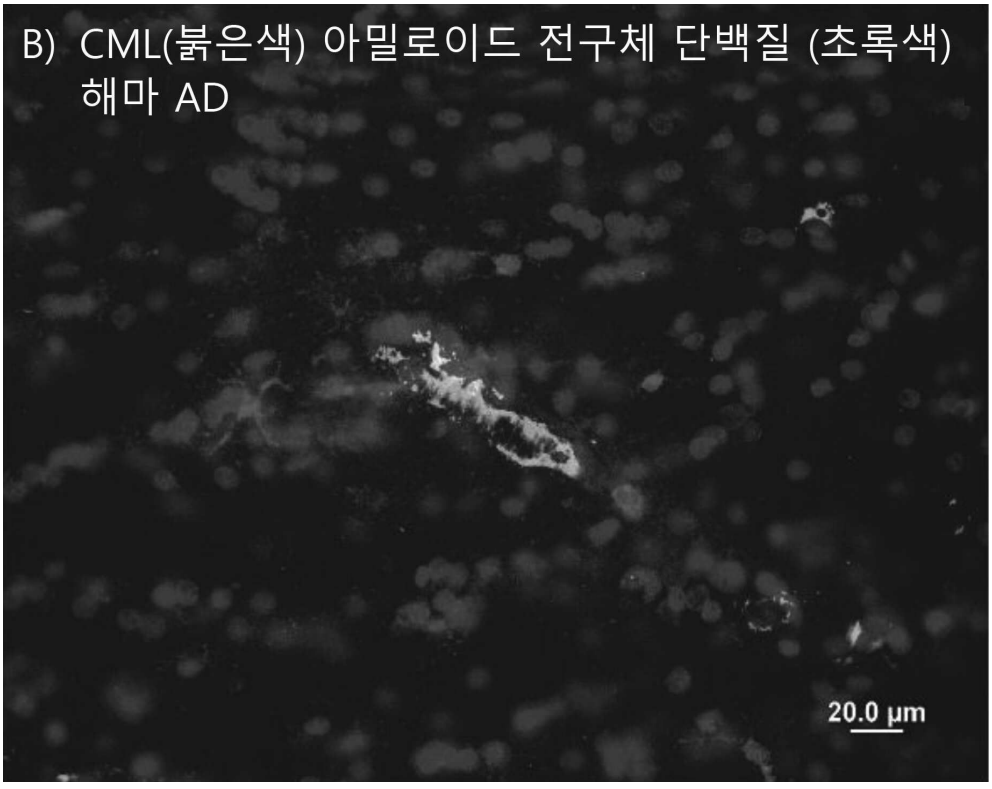
도면2



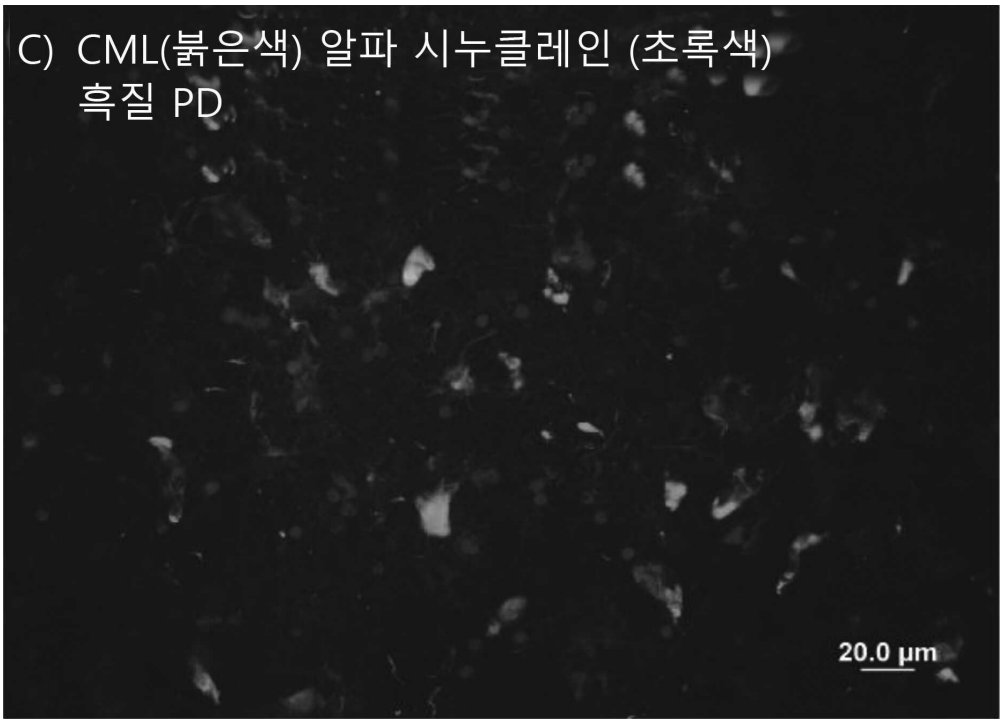
도면3a


A) CML(붉은색) 인산화 TAU (초록색)
해마 AD
20.0 µm

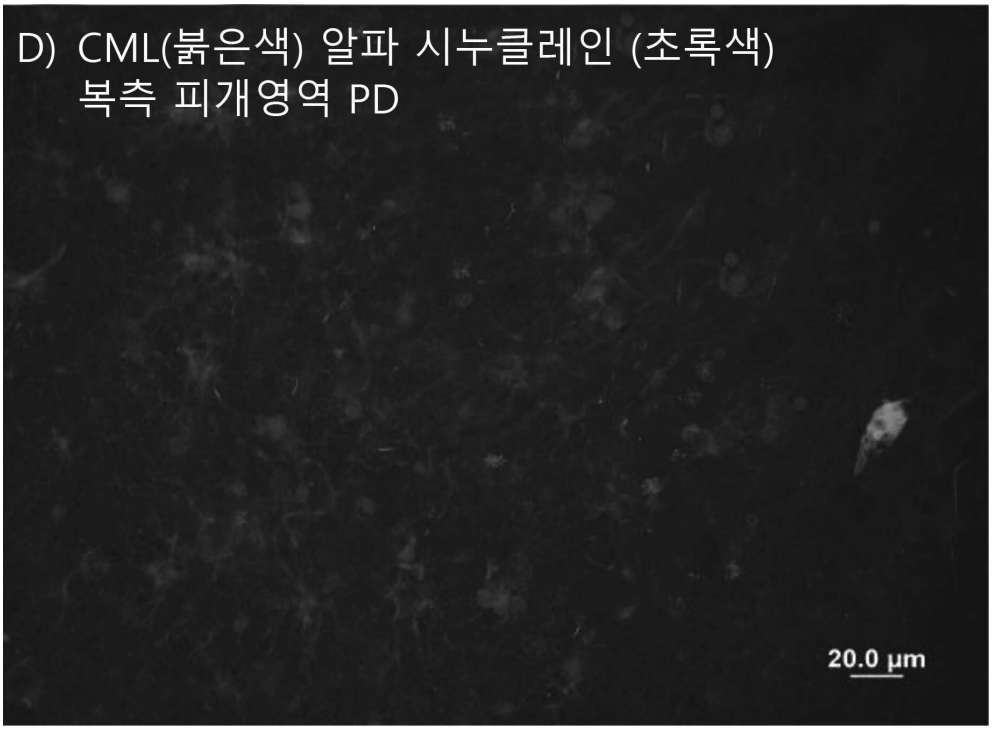
도면3b


B) CML(붉은색) 아밀로이드 전구체 단백질 (초록색)
해마 AD
20.0 µm

도면3c



도면3d



서 열 목 록

SEQUENCE Listing

<110> Lewis S. Gruber

<120> DIAGNOSTIC ADVANCED GLYCATION END-PRODUCT ANTIBODIES

<130> SIW01-025-WO

<160> 4

<210> 1

<211> 467

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Leu Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

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

Thr Thr Tyr Trp Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ser Pro Thr Asn Gly Arg Ala Tyr Tyr Asn
65 70 75 80

Ala Arg Phe Lys Ser Glu Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Ala Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Gly Asn Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Val Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

225 230 235 240
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

290 295 300
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

355 360 365
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

420 425 430
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ala Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Leu Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Thr Asn Gly Arg Ala Tyr Tyr Asn Ala Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Phe Gly Asn Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Val

115

<210> 3

<211> 239

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp

180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Leu Val Asn Ser

20 25 30
Asn Gly Asn Thr Phe Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Leu 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 Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110