



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월05일  
(11) 등록번호 10-2052571  
(24) 등록일자 2019년11월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7016918
- (22) 출원일자(국제) 2011년11월29일  
심사청구일자 2016년11월28일
- (85) 번역문제출일자 2013년06월28일
- (65) 공개번호 10-2013-0137654
- (43) 공개일자 2013년12월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/062445
- (87) 국제공개번호 WO 2012/075037  
국제공개일자 2012년06월07일
- (30) 우선권주장  
61/418,223 2010년11월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
Molecular Pharmaceutics. Vol. 7, No. 1, p. 234-244 (2010.02.)\*  
Brain Research. vol. 889, No. 1-2, pp. 49-56 (2001)  
Pharmacological Reviews. Vol. 54, No. 4, pp. 561-587 (2002)  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자  
데니스, 마크  
미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
왓츠, 라이언 제퍼슨  
미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이귀동, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 38 항

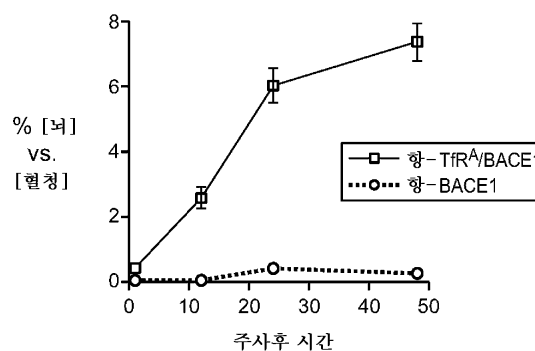
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 저친화도 혈액-뇌 장벽 수용체 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 결합하는 항체 및 그를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3f



(72) 발명자

**위, 원화 조이**

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디앤  
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

**장, 인**

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디앤  
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

화합물에 커플링되어 있고 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 20 nM 내지 10 μM의 친화도로 결합하는 항체를 포함하고, 항체는 그에 커플링된 화합물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하도록 하는 것이고, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR)인, 화합물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하기 위한 제약 조성물.

**청구항 2**

화합물에 커플링되어 있고 BBB-R에 20 nM 내지 10 μM의 친화도로 결합하는 항체를 포함하고, 항체는 화합물에 대한 CNS의 노출을 증가시키는 것이고, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR)인, 화합물에 대한 CNS의 노출을 증가시키기 위한 제약 조성물.

**청구항 3**

대상체에 투여되는 화합물에 커플링되어 있고 BBB-R에 20 nM 내지 10 μM의 친화도로 결합하는 항체를 포함하고, 항체는 화합물의 소실을 감소시키는 것이고, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR)인, 대상체에 투여되는 화합물의 소실을 감소시키기 위한 제약 조성물.

**청구항 4**

대상체에 투여되는 화합물에 커플링되어 있고 BBB-R에 20 nM 내지 10 μM의 친화도로 결합하는 항체를 포함하고, 항체는 화합물의 CNS 내 보유를 증가시키는 것이고, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR)인, 대상체에 투여되는 화합물의 CNS 내 보유를 증가시키기 위한 제약 조성물.

**청구항 5**

화합물에 커플링되어 있고 BBB-R에 20 nM 내지 10 μM의 친화도로 결합하는 항체를 포함하고, 화합물의 커플링 후 BBB-R에 대한 항체의 친화도가 화합물에 접합된 항체의 BBB를 가로지르는 일정량의 수송을 야기하여 CNS에서 화합물의 약동학 및/또는 약역학을 최적화하는 것이고, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR)인, 대상체의 CNS에서 효과적이라도 화합물의 약동학 및/또는 약역학을 최적화하기 위한 제약 조성물.

**청구항 6**

BBB-R에 결합하고 화합물에 커플링된 항체를 포함하고, 여기서 항체는 BBB-R에 대해 20 nM 내지 10 μM의 친화도를 갖도록 선택되어 항체 및 커플링된 화합물의 CNS 흡수를 개선하는 것이고, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR)인, 포유동물에서의 신경계 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 신경계 장애 약물 또는 영상화제인 제약 조성물.

**청구항 8**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는 것인 제약 조성물.

**청구항 9**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액-뇌 장벽이 포유동물에 존재하는 것인 제약 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 포유동물이 신경계 장애를 갖는 것인 제약 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 신경계 장애가 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근 위축 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 앤젤만 (Angelman) 증후군, 리들 (Liddle) 증후군, 파킨슨 (Parkinson) 질환, 피크 (Pick) 질환, 파제트 (Paget) 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 제약 조성물.

**청구항 12**

제9항에 있어서, 포유동물이 인간인 제약 조성물.

**청구항 13**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물에 커플링된 항체의 BBB-R에 대한 친화도가 30 nM 내지 1 μM 인 제약 조성물.

**청구항 14**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는 것인 제약 조성물.

**청구항 15**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물에 커플링된 항체가 치료 용량으로 투여되는 것인 제약 조성물.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 치료 용량이 BBB-R을 포화시키는 용량인 제약 조성물.

**청구항 17**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 다중특이적 항체이고, 화합물이 임의로 다중특이적 항체의 한 부분을 형성하는 것인 제약 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 다중특이적 항체가 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 것인 제약 조성물.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 뇌 항원이 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 제약 조성물.

**청구항 20**

제18항에 있어서, 다중특이적 항체가 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합하는 것인 제약 조성물.

**청구항 21**

제18항에 있어서, 다중특이적 항체가 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합하는 것인 제약 조성물.

**청구항 22**

혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 특이적인 항체가 BBB-R에 대해 20 nM 내지 10 μM의 친화도를 갖기 때문에 상기 항체를 선택하는 단계, 및

(i) 치료 화합물 또는 영상화제인 화합물과 항체를 커플링시키는 단계, 또는 (ii) BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체를 제작하는 단계

를 포함하고, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR)인, BBB를 가로질러 화합물을 수송하기에 유용한 항체의 제조 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 항체가 선택되는 항체의 친화도를 기초로 하여 일군의 항체로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 항체가 친화도를 갖도록 조작되는 것인 방법.

**청구항 25**

제22항에 있어서, 항체를 치료 화합물에 커플링시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 치료 화합물이 신경계 장애 약물인 방법.

**청구항 27**

제22항에 있어서, BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체의 제조를 포함하는 것인 방법.

**청구항 28**

제1 항원 결합 부위 및 제2 항원 결합 부위를 포함하는 항체이며, 제1 항원 결합 부위는 BBB-R에 결합하고, BBB-R에 대한 항체의 친화도는 20 nM 내지 10 μM이고, BBB-R은 TfR이고, 제2 항원 결합 부위는 뇌 항원에 결합하는 것인, 항체.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 친화도가 20 nM 내지 1 μM인 항체.

**청구항 30**

제28항에 있어서, BBB-R이 인간 BBB-R인 항체.

**청구항 31**

제28항에 있어서, 뇌 항원이 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 항체.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 뇌 항원이 BACE1인 항체.

**청구항 33**

제31항에 있어서, 뇌 항원이 A베타인 항체.

**청구항 34**

제28항의 항체의 TfR에 결합하는 항원 결합 영역 및 뇌 항원에 결합하는 항원 결합 영역을 포함하고, TfR에 대한 항체의 친화도는 20 nM 내지 10 μM인, 항체 단편.

**청구항 35**

제34항에 있어서,  $F(ab')_2$  단편인 항체 단편.

**청구항 36**

제28항에 있어서, 전장 항체인 항체.

**청구항 37**

BBB-R에 20 nM 내지 10  $\mu$ M의 친화도로 결합하는 항체를 포함하고, BBB-R은 TfR이고, 항체가 신경계 장애 약물에 커플링된 것인, 신경계 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 38**

제28항 내지 제33항 및 제36항 중 어느 한 항의 항체, 또는 제34항 또는 제35항의 항체 단편을 포함하는 신경계 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 그 전체가 본원에 참고로 포함된, 2010년 11월 30일 출원된 미국 가출원 일련번호 61/418,223의 이익을 주장한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 결합하는 항체 및 그를 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 대분자 약물의 뇌 투과는 주로 불투과성 혈액-뇌 장벽 (BBB)에 의해 크게 제한된다. 이 장애를 극복하기 위한 많은 전략 중에는, 뇌 모세혈관 내피에서 발견된 내인성 수용체의 트랜스시토시스 (transcytosis) 운송 (trafficking) 경로를 이용하는 것이 존재한다. 큰 분자의 뇌로의 수용체-매개 전달을 가능하게 하는 이들 수용체에 대한 재조합 단백질, 예컨대 모노클로날 항체가 설계되었다. 그러나, 혈액 내로의 역 트랜스시토시스를 최소화하면서 뇌 흡수 및 치료 투여 후의 축적도를 최대화하기 위한 전략은 계속 연구되지 않고 있다. 또한, BBB를 가로지르는 항체가 약역학상 기능성인지의 여부는 알려지지 않은 상태이다.

**발명의 내용**

[0006] **개요**

[0007] 모노클로날 항체는 신경계 또는 중추신경계 (CNS) 질환의 치료를 위한 큰 치료 잠재력을 갖지만, 그의 뇌 내로의 통과는 혈액-뇌 장벽 (BBB)에 의해 제한된다. 과거 연구는 혈류 내에서 순환하는 매우 작은 비율 (대략 0.1%)의 IgG가 BBB를 통해 CNS 내로 가로지름을 보여주었고 (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52: 1158-1164 (1974)), 여기서 항체의 CNS 농도는 강력한 효과를 허용하기에 불충분할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물은 CNS 내로 분배되어 CNS 내의 치료 항체 농도를 보다 쉽게 달성하는 항체의 비율을 개선하는 방법을 제공한다.

[0008] 마우스에서 단일 전신 주사 후에 미량 및 치료상 관련된 용량 둘 모두에서 BBB를 가로질러 항체 및 소분자를 포함하는 치료제를 전달할 수 있는, 트랜스페린 수용체 (TfR)에 대한 일군의 항체가 본원에서 설명된다. 항체의 분포는 주사 24시간 후에 혈관으로부터 뉴런까지 변화였고, 이것은 유의한 양의 항체가 뇌 내피 세포를 통해 트랜스시토시스되어 실질에 도달하였음을 나타낸다. CNS 내로의 항체 흡수의 규모 및 CNS 내의 분포는 연구된 항-TfR 변이체에 있어서 TfR에 대한 그의 결합 친화도에 반비례하였다. BBB 수송의 증거는 TfR 및 아밀로이드 전구체 단백질 (APP) 절단 효소인  $\beta$ -세크레타제 (BACE1) 둘 모두에 결합하는 이중특이적 항체를 사용하여 얻었다. 본 발명의 방법을 사용하여 조작된 이중특이적 항-TfR/BACE1 항체의 단일 전신 용량은 뇌에서 유의한 항체 흡수를 유도할 뿐만 아니라, 단일특이적 항-BACE1 단독에 비해 뇌  $A\beta_{1-40}$ 의 수준을 크게 감소시켰고, 이것은 BBB 투과가 항-BACE1의 효능에 영향을 줄을 시사한다. 이와 유사하게, TfR 및 아밀로이드 베타 (즉, 아밀로이드 플라크의 주요 성분 중의 하나인, APP의 BACE1 절단에 의해 생성되는 APP의 부분) 둘 모두에 결합하는 이중특이적 항체는 본 발명의 방법을 사용하여 뇌 내로 쉽게 흡수되는 것으로 밝혀졌다. 본원에 설명된 데이터 및 실험은 보다 낮은 친화도 항체 방법을 사용하여 항체의 CNS 내로의 흡수 증가의 몇몇의 원인이 되는 메커니즘을 강조한다. 먼저, 고친화도 항-BBB 수용체 (BBB-R) 항체 (예를 들어, 항-TfR<sup>A</sup>)는 뇌 혈관계 내의 BBB-R을 신속하게 포화시켜 뇌 내로 흡수되는 항체의 총량을 감소시키고 또한 혈관계로의 그의 분포를 제한함으로써 뇌 흡수를 제한한다. 놀랍게도, BBB-R에 대한 친화도 저하는 뇌 흡수 및 분포를 개선하고, 혈관계로부터 CNS 내에 분포된 뉴런 및 결합된 호중구로의 강력한 이동이 관찰되었다. 두 번째로, 항체의 BBB-R에 대한 보다 저친화도는 항체가 막의 CNS 측으로부터 BBB-R을 통해 혈관 측으로 복귀하는 능력을 손상시키는 것으로 제안되고, 그 이유는 BBB-R에 대한 항체의 총 친화도는 낮고 BBB의 CNS 측 상의 항체의 국소 농도는 항체의 CNS 구획 내로의 신속한 분산에 의해 비-포화성이기 때문이다. 세 번째로, 생체 내에서, 및 TfR 시스템에서 관찰된 바와 같이, BBB-R에 대해 보다 작은 친화도를 갖는 항체는 BBB-R에 대해 최대 친화도를 갖는 것만큼 효율적으로 시스템으로부터 소실되지 않고, 따라서 그의 보다 고친화도 대응물보다 더 높은 순환 농도를 유지한다. 이것은 보다 저친화도 항체의 순환 항체 수준이 보다 고친화도 항체보다 보다 긴 기간 동안 치료 수준에서 유지되고, 따라서 보다 긴 기간 동안 뇌에서 항체의 흡수를 개선하기 때문에 유리하다. 또한, 상기 혈장 및 뇌 노출 둘 모두의 개선은 임상에서 투여 빈도를 감소시킬 수 있고, 이것은 환자 순응성 및 편의성뿐만 아니라 항체의 및/또는 항체에 커플링된 치료 화합물의 임의의 잠재적인 부작용 또는 표적 이탈 (off-target) 효과를 완화하는 잠재적인 잇점을 가질 것이다. 항-TfR/BACE1 및 항-TfR/A베타는 각각 알츠하이머 (Alzheimer) 질환의 치료를 위한 유망한 새로운 치료 후보물질이다. 또한, 수용체 매개 수송 (RMT)-기반 이중특이적 표적화 기술은 CNS 질환에 대한 매우 광범위한 잠재적인 치료를 위한 기회를 제시한다. 본 발명은 치료제의 BBB를 가로지르는 수송 및 CNS 분포를 크게 개선하는 BBB-투과성 치료제의 조작 방법을 제공한다.

[0009] 따라서, 제1 실시양태에서, 본 발명은 화합물에 커플링되어 있으며 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 저친화도로 결합하는 항체를 혈액-뇌 장벽에 노출시켜, 항체가 그에 커플링된 화합물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하도록 하는 것을 포함하는, 화합물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다.



방식으로 TfR에 특이적으로 결합한다. 또 다른 측면에서, BBB는 포유동물에 존재하는 것이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 신경계 장애를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 앤젤만 (Angelman) 증후군, 리들 (Liddle) 증후군, 파킨슨 (Parkinson) 질환, 피크 (Pick) 질환, 파제트 (Paget) 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 측면에서, BBB는 인간에 존재하는 것이다.

[0010] 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100 μM의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 5 nM 내지 약 10 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 30 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스캐차드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 (BIACORE) 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.

[0011] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 TfR 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 치료 용량으로 투여된다. 하나의 그러한 측면에서, 치료 용량은 항체가 특이적으로 결합하는 BBB-R을 포화시키는 용량이다.

[0012] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중 특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우 (Tau), 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수송과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록 항체에 가역적으로 커플링된다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화합물을 BBB-R에 저친화도로 결합하는 항체에 커플링시켜 화합물에 대한 CNS의 노출을 증가시키는 것인, 화합물에 대한 CNS의 노출을 증가시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다.

방식으로 TfR에 특이적으로 결합한다. 또 다른 측면에서, 항체-커플링된 화합물은 포유동물에게 투여된다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 신경계 장애를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 남성 섬유증, 앤젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0014] 또 다른 측면에서, 화합물에 대한 CNS 노출의 증가는 BBB-R에 대해 저하된 친화도를 갖지 않는 일반적인 항체와 커플링된 화합물의 CNS 노출에 비교하여 측정된다. 또 다른 측면에서, 화합물에 대한 CNS 노출의 증가는 투여 후에 혈청에서 발견되는 양에 비해 CNS에서 발견된 화합물의 양의 비로서 측정된다. 또 다른 그러한 측면에서, CNS 노출의 증가는 0.1% 초과를 생성한다. 또 다른 측면에서, 화합물에 대한 CNS 노출의 증가는 커플링된 항체의 부재 하에서의 화합물의 CNS 노출에 비교하여 측정된다. 또 다른 측면에서, 화합물에 대한 CNS 노출의 증가는 영상화에 의해 측정된다. 또 다른 측면에서, 화합물에 대한 CNS 노출의 증가는 간접적인 관독치, 예컨대 하나 이상의 생리학적 증상의 변형에 의해 측정된다.

[0015] 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100 μM의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 5 nM 내지 약 10 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 30 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>B</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>B</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스캐차드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.

[0016] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 TfR 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 치료 용량으로 투여된다. 하나의 그러한 측면에서, 치료 용량은 항체가 특이적으로 결합하는 BBB-R을 포화시키는 용량이다.

[0017] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중 특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수송과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록

록 항체에 가역적으로 커플링된다.

- [0018] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 투여되는 화합물을 BBB-R에 저친화도로 결합하는 항체에 커플링시켜 화합물의 소실이 감소하도록 하는 것인, 대상체에게 투여되는 화합물의 소실을 감소시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는 방식으로 TfR에 특이적으로 결합한다. 또 다른 측면에서, 대상체는 포유동물이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 신경계 장애를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 앤젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0019] 또 다른 측면에서, 화합물의 소실의 감소는 BBB-R에 대해 저하된 친화도를 갖지 않는 일반적인 항체와 커플링된 화합물의 소실에 비교하여 측정된다. 또 다른 측면에서, 화합물의 소실의 감소는 커플링된 항체의 부재 하의 화합물의 소실에 비교하여 측정된다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 5 nM 내지 약 10  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 30 nM 내지 약 1  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스키타드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.
- [0021] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 TfR 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 치료 용량으로 투여된다. 하나의 그러한 측면에서, 치료 용량은 항체가 특이적으로 결합하는 BBB-R을 포화시키는 용량이다.
- [0022] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중 특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A $\beta$ , 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른

그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수송과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록 항체에 가역적으로 커플링된다.

[0023] 대상체에게 투여되는 화합물을 BBB-R에 저친화도로 결합하는 항체에 커플링시켜 화합물의 CNS 내 보유가 증가하도록 하는 것인, 대상체에게 투여되는 화합물의 CNS 내 보유를 증가시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는 방식으로 TfR에 특이적으로 결합한다. 또 다른 측면에서, 화합물은 포유동물에게 투여된다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 신경계 장애를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 앤젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0024] 또 다른 측면에서, 화합물의 CNS 보유의 증가는 BBB-R에 대해 저하된 친화도를 갖지 않는 일반적인 항체와 커플링된 화합물의 CNS 보유에 비교하여 측정된다. 또 다른 측면에서, 화합물의 CNS 보유의 증가는 투여 후 하나 이상의 시점에서 혈청에서 발견된 양에 비해 CNS에서 발견된 화합물의 양의 비로서 측정된다. 또 다른 그러한 측면에서, CNS 보유의 증가는 투여 후 하나 이상의 시점에서 0.1% 초과를 생성한다. 또 다른 측면에서, 화합물의 CNS 보유의 증가는 커플링된 항체의 부재 하에서의 화합물의 CNS 보유에 비교하여 측정된다. 또 다른 측면에서, 화합물의 CNS 보유의 증가는 영상화에 의해 측정된다. 또 다른 측면에서, 화합물의 CNS 보유의 증가는 간접적인 판독치, 예컨대 하나 이상의 생리학적 증상의 변형에 의해 측정된다.

[0025] 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100 μM의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 5 nM 내지 약 10 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 30 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스캐차드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.

[0026] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 TfR 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 치료 용량으로 투여된다. 하나의 그러한 측면에서, 치료 용량은 항체가 특이적으로 결합하는 BBB-R을 포화시키는 용량이다.

[0027] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항



체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 Tfr 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 Tfr 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수송과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록 항체에 가역적으로 커플링된다.

[0028] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화합물을 BBB-R에 저친화도로 결합하는 항체에 커플링시키고, 항체는 화합물 에의 커플링 후 BBB-R에 대한 그의 친화도가 화합물에 접합된 항체의 BBB를 가로지르는 일정량의 수송을 유도하여 CNS에서 화합물의 약동학 및/또는 약역학을 최적화하도록 선택되는 것인, 대상체의 CNS에서 효과적이라도 화합물의 약동학 및/또는 약역학을 최적화하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 Tfr의 결합을 억제하지 않는 방식으로 Tfr에 특이적으로 결합한다. 또 다른 측면에서, BBB는 포유동물에 존재하는 것이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 신경계 장애를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 남성성염증, 앤젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 측면에서, BBB는 인간에 존재하는 것이다.

[0029] 한 측면에서, 최적화는 각각의 항체가 BBB-R에 대해 상이한 친화도를 갖는 일련의 항체-화합물 복합체를 생성하고, CNS에서 각각의 약동학 및/또는 약역학을 평가하는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, 최적화는 CNS 내로 직접 도입될 때 또는 커플링된 항-BBB-R 항체의 부재 하에 대상체에 도입될 때 화합물의 약동학 및/또는 약역학을 포함하고 이로 제한되지 않는 공지의 표준에 대해 비교될 수 있다.

[0030] 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100 μM의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 5 nM 내지 약 10 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 30 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 Tfr에 특이적으로 결합하고, 항-Tfr<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-Tfr<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 Tfr에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 Tfr에 특이적으로 결합하고, 항-Tfr<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-Tfr<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 Tfr에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 Tfr에 특이적으로 결합하고, 항-Tfr<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-Tfr<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 Tfr에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 Tfr에 특이적으로 결합하고, 항-Tfr<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-Tfr<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 Tfr에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스캐차드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.

[0031] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (Tfr), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 Tfr이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 Tfr이고, 항체는 Tfr 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 Tfr이고, 항체는 트랜스페린에 대한 Tfr의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 치료 용량으로 투

여된다. 하나의 그러한 측면에서, 치료 용량은 항체가 특이적으로 결합하는 BBB-R을 포화시키는 용량이다.

[0032] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중 특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수송과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록 항체에 가역적으로 커플링된다.

[0033] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 BBB-R에 결합하고 화합물에 커플링된 항체로 포유동물을 치료하는 것을 포함하며, 여기서 항체는 BBB-R에 대해 저친화도를 갖도록 선택되어 항체 및 커플링된 화합물의 CNS 흡수를 개선하는 것인, 포유동물에서의 신경계 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는 방식으로 TfR에 특이적으로 결합한다. 한 측면에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 신경계 장애를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 남성 섬유증, 엔젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0034] 한 측면에서, 치료는 장애 증상의 완화 또는 제거를 유도한다. 또 다른 측면에서, 치료는 신경계 장애의 개선을 유도한다.

[0035] 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 5 nM 내지 약 10  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 30 nM 내지 약 1  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스캐차드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.

[0036] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 TfR 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 트

랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 치료 용량으로 투여된다. 하나의 그러한 측면에서, 치료 용량은 항체가 특이적으로 결합하는 BBB-R을 포화시키는 용량이다.

[0037] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결되지 않는다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수송과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록 항체에 가역적으로 커플링된다.

[0038] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 특이적인 항체가 BBB-R에 대해 바람직하게 낮은 친화도를 갖기 때문에 상기 항체를 선택하는 것을 포함하는, BBB를 가로질러 화합물을 수송하기에 유용한 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0039] 한 측면에서, 항체는 선택되는 항체의 친화도를 기초로 하여 일군의 항체로부터 선택된다. 또 다른 측면에서, 항체는 친화도를 갖도록 조작된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 파지 디스플레이, 효모 디스플레이, 무작위 돌연변이 유발, 및 부위 지정 돌연변이 유발을 포함하고 이로 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 단백질 조작 방법을 사용하여 조작된다.

[0040] 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는 방식으로 TfR에 특이적으로 결합한다. 또 다른 측면에서, BBB는 포유동물에 존재하는 것이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 그러한 측면에서, 포유동물은 신경계 장애를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 남성 섬유증, 앤젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 측면에서, BBB는 인간에 존재하는 것이다.

[0041] 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100 μM의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100 μM이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 5 nM 내지 약 10 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 30 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1 μM의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스캐차드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.

- [0042] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 TfR 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 치료 용량으로 투여된다. 하나의 그러한 측면에서, 치료 용량은 항체가 특이적으로 결합하는 BBB-R을 포화시키는 용량이다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중 특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 제2 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 제2 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수용과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록 항체에 가역적으로 커플링된다.
- [0044] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 저친화도로 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 결합하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항체의 친화도는 약 5 nM 내지 약 10  $\mu$ M이다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항체의 친화도는 약 20 nM 내지 약 1  $\mu$ M이다. 또 다른 측면에서, 항체는 약 1 nM 내지 약 100  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 5 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 50 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 그러한 측면에서, IC50은 약 100 nM 내지 약 100  $\mu$ M이다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 화합물에 커플링될 때 약 50 nM 내지 약 1  $\mu$ M의 BBB-R에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 친화도 사이의 TfR에 대한 친화도를 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물-커플링된 항체는 TfR에 특이적으로 결합하고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체와 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체에 대해 관찰된 IC50 사이의 TfR에 대한 IC50을 갖는다. 한 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 스캐차드 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 비아코어 분석을 사용하여 측정된다. 또 다른 측면에서, BBB-R에 대한 항-BBB-R 또는 항-BBB-R/화합물의 친화도는 경쟁 ELISA를 사용하여 측정된다.
- [0045] 또 다른 측면에서, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 하나의 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 TfR 활성을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 TfR이고, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, BBB-R은 인간 BBB-R이다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 항체는 화합물에 커플링된다. 한 측면에서, 화합물은 신경계 장애 약물이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 영상화제이다. 또 다른 측면에서, 화합물은 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 항체는 BBB-R의 하나 이상의 그의 천연 리간드에 대한 결합을 손상시키지 않는다. 또 다른 그러한 측면에서, 항체는 트랜스페린에 대한 TfR의 결합을 억제하지 않는 방식으로 TfR에 특이적으로 결합한다.



- [0047] 또 다른 측면에서, 화합물은 항체에 공유적으로 커플링된다. 하나의 그러한 측면에서, 화합물은 링커에 의해 항체에 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하다. 또 다른 그러한 측면에서, 링커는 절단가능하지 않다. 또 다른 그러한 측면에서, 화합물은 항체에 직접 연결된다. 하나의 그러한 측면에서, 항체는 다중특이적 항체이고, 화합물은 다중특이적 항체의 한 부분을 형성한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 또 다른 그러한 측면에서, 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), A베타, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 BACE1 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 TfR 및 A베타 둘 모두에 결합한다. 또 다른 그러한 측면에서, 다중특이적 항체는 표지된다. 또 다른 측면에서, 화합물은 BBB 수송과 동시에 또는 그 후에 화합물이 항체로부터 방출되도록 항체에 가역적으로 커플링된다.
- [0048] 또 다른 측면에서, 항체는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv를 포함하고 이로 제한되지 않는, BBB-R에 결합하는 항원-결합 영역을 갖는 항체 단편이다. 또 다른 측면에서, 항체는 전장 항체이다.
- [0049] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 신경계 장애 치료용 의약의 제조를 위한, BBB-R에 저친화도로 결합하는 항체의 용도를 제공한다. 임의의 상기 설명된 저친화도 항-BBB-R 항체 또는 본원의 다른 곳에서 설명된 임의의 저친화도 항-BBB-R 항체가 방법에 사용될 수 있다.
- [0050] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 신경계 장애의 치료에 사용하기 위한, BBB-R에 저친화도로 결합하는 항체를 제공한다. 임의의 상기 설명된 저친화도 항-BBB-R 항체 또는 본원의 다른 곳에서 설명된 임의의 저친화도 항-BBB-R 항체가 방법에 사용될 수 있다. 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 대한 항체의 친화도가 약 5 nM 내지 약 10 μM (예를 들어 약 20 nM 내지 약 1 μM)인, BBB-R에 결합하는 항체를 제공한다. 임의로, BBB-R은 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF 수용체), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8), 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 임의로, 항체는 치료 화합물, 예컨대 신경계 장애 약물과 커플링된다. 한 실시양태에서, 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체이고, 예를 들어 여기서 뇌 항원은 베타-세크레타제 1 (BACE1), 아밀로이드 베타 (A베타), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 A3 (ApoE3), 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 항체 (예를 들어 다중특이적 항체)는 항체 단편 및 전장 항체를 포함한다.
- [0051] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체가 그에 커플링된 신경계 장애 약물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하도록, 신경계 장애 약물에 커플링된 항-BBB-R 항체를 혈액-뇌 장벽에 노출시키는 것을 포함하는, 치료 화합물, 예컨대 신경계 장애 약물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하는 방법을 제공한다. 상기 방법에서 혈액-뇌 장벽은 포유동물, 예를 들어 알츠하이머 질환 (AD) (경도 인지 장애 및 전구기 (prodromal) AD를 포함하고 이로 제한되지 않음), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 남성 섬유증, 앤젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암 (예를 들어 CNS 또는 뇌에 침범하는 암), 및 외상성 뇌 손상을 포함하는 신경계 장애가 있는 포유동물에 존재할 수 있다.
- [0052] 본 발명은 추가로 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 대한 친화도가 약 5 nM 내지 약 10 μM인, BBB-R에 대한 항체를 선택하는 것을 포함하는, 치료 화합물, 예컨대 신경계 장애 약물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하기에 유용한 항체의 제조 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 항체는 목적하는 친화도를 갖는 일군의 항체로부터 선택된다. 별법으로, 또는 추가로, 항체는 목적하는 친화도를 갖도록 조작된다. 방법은 임의로 항체를 치료 화합물, 예컨대 신경계 장애 약물에 커플링시키는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 방법은 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체의 제조를 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명은 추가로 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R) 및 뇌 항원 둘 모두에 결합하는 다중특이적 항체로 포유동물을 처리하는 것을 포함하는, 포유동물에서 신경계 장애의 치료 방법을 제공하고, 여기서 항-BBB-R 항체는 BBB-R에

대한 저친화도를 갖도록 선택되어 항-뇌 항원 항체의 뇌 흡수를 개선한다. 임의로, 다중특이적 항체는 트랜스페린 수용체 (TfR) 및 BACE1 또는 A베타 둘 모두에 결합한다.

[0054] 본 발명의 임의의 상기한 방법 및 조성물이 서로 및/또는 본원의 명세서에서 설명되는 본 발명의 추가의 측면과 조합될 수 있음이 이해될 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0055] 도 1a-e는 전신 투여된 항-TfR 항체의 유의한 뇌 혈관 흡수를 도시한 것이다. 도 1a는 마우스에서 미량 용량 (약 50 µg/kg)의 [<sup>131</sup>I]항-TfR<sup>A</sup> 및 [<sup>125</sup>I]대조군 IgG의 IV 투여 후의 뇌 흡수를 보여주고, 이것은 IV 주사 5, 30 분, 1, 4, 24, 48, 및 72시간 후에 뇌 그램당 주사된 용량의 평균 비율로서 정량하였다 (n=6). [<sup>131</sup>I]항-TfR<sup>A</sup>의 흡수는 4 mg/kg 비표지된 항-TfR<sup>A</sup> (냉)의 주사에 의해 감소하였다. 도 1b는 대조군 IgG 또는 항-TfR<sup>A</sup>의 20 mg/kg IV 주사 1 및 24시간 후에 뇌에서 평균 항체 흡수의 정량을 보여준다 (\*\*p=0.0002, n=10). 도 1c는 뇌 대 혈청 농도의 평균 비율의 비를 보여준다 (\*\*p=0.003, n=10). 도 1d 및 1e는 항-TfR<sup>A</sup>의 IV-주사 후의 뇌 단면의 면역조직화학 염색을 도시한 것이고 (도 1d, 상부 패널), 혈관 마커인 항-콜라겐 IV의 공동 국재화 (co-localization)를 보여준다 (하부 패널). 대조군 IgG의 IV-주사 (도 1e, 상부 패널)는 단지 1시간 후에만 혈관 분포를 보이고, 24시간 후에는 항체의 부재를 보여준다. 규모 막대= 50 µm.

도 2a-f는 항-TfR 항체의 친화도 및 뇌 흡수 정도는 미량 용량 (약 50 µg/kg)에 비해 치료상 관련된 용량 (20 mg/kg)으로 투여될 때 반비례함을 보여준다. 도 2a는 TfR에 결합하기 위해 비오틴화된 TfR<sup>A</sup>에 대해 경쟁하기 위해 증가하는 농도의 항-TfR<sup>A,B,C,D,E</sup> 변이체 항체가 사용되는 경쟁적 결합 ELISA를 도시한 것이다. 항-TfR 경쟁 ELISA는 PBS 내의 2.5 µg/ml의 정제된 유리 TfR 세포의 도메인으로 4°C에서 철야 코팅된 맥시소프 (Maxisorp) 플레이트 (미국 뉴저지주 뉴튼)에서 수행하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 (Tween) 20으로 세척하고, PBS 내의 슈퍼블록 (Superblock) 차단 완충제 (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific, 미국 뉴햄프셔주 허드슨))를 사용하여 차단하였다. 항-TfR<sup>A</sup>, 항-TfR<sup>B</sup>, 항-TfR<sup>C</sup>, 또는 항-TfR<sup>D</sup> (1:3 연속 희석)의 적정액을 비오틴화된 항-TfR<sup>A</sup> (0.5 nM 최종 농도)와 조합하고, 플레이트에 1시간 동안 실온에서 첨가하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 세척하고, HRP-스트렙타비딘 (서던 바이오테크 (Southern Biotech, 버밍햄))을 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 세척하고, 플레이트에 결합된 비오틴화된 항-TfR<sup>A</sup>를 TMB 기질 (바이오에프엑스 래보러토리즈 (BioFX Laboratories, 미국 오링스 밀))을 사용하여 검출하였다. 도 2a의 결과는 모든 5개의 항-TfR 변이체가 별개로 평가된 단일 실험으로부터의 데이터를 제시한다. 상기 데이터로부터 결정된 IC50 값은 표 2에 제시한다. 도 2b는 미량 용량 (약 50 µg/kg)의 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>A,B,C,D,E</sup> 변이체의 IV-주사 5분, 1, 4, 6, 및 24시간 후의 평균 뇌 흡수의 정량화를 도시한 것이다 (n=3). 도 2b의 결과는 모든 5개의 항-TfR 변이체가 별개로 평가된 단일 실험으로부터의 데이터를 제시한다. 도 2c는 도 1b에 대해 설명된 방법을 사용하여 1 및 24시간에서 항-TfR 변이체의 20 mg/kg IV 주사 후의 평균 뇌 흡수의 정량화를 보여준다. 실험을 동일한 조건 하에 항-TfR<sup>E</sup>를 사용하여 반복하고, 모든 결과를 도 2c에 제시한다. 도 2d는 친화도와 뇌 흡수 사이의 반비례 관계를 보여주는 모델이다. 도 2e는 고친화도 항-TfR<sup>A</sup> 또는 보다 저친화도 항-TfR<sup>B,C,D</sup> 항체의 IV 주사 후의 뇌 절편의 면역조직화학 염색의 비교이고, 항체 분포의 차이 (좌측 패널의 염색은 항-TfR 단독에 대한 것이다) 및 NeuN의 공동 국재화 정도 (우측 패널의 염색은 항-TfR 및 NeuN 둘 모두에 대한 것이다)를 보여준다. 규모 막대= 50 µm. 도 2f는 뉴런 내의 항-TfR<sup>D</sup> 국재화의 대표적인 고배율 영상이고 (NeuN 염색으로 표시됨); 이 데이터는 항-TfR<sup>D</sup> 및 NeuN이 공동 국재화하고, 따라서 항-TfR<sup>D</sup>가 BBB를 가로지르고 뉴런과 상호작용하는 반면에, 항-TfR<sup>A</sup>는 뉴런과 달리 주로 혈관계에 국재화함을 보여준다. 규모 막대= 20 µm.

도 3a-g는 이중특이적 항-TfR/BACE1 항체가 시험관 내에서 Aβ를 억제하고 뇌 내에 축적됨을 보여준다. 도 3a는 TfR 및 β-세크레타제 (BACE1) 둘 모두에 결합하도록 조작된 이중특이적 항체의 모델의 모식도이다. 도 3b는 도 2a에 대해 상기 설명한 항-TfR 경쟁 ELISA 검정에 의해 측정된 항-TfR<sup>A</sup> 및 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1의 TfR에 대한 결합 친화도를 보여준다. 도 3c는 세포-기반 검정에서 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1, 항-BACE1, 및 대조군 IgG의 처리 후

에 APP를 안정하게 발현하는 HEK293 세포에 의해 생산된 A $\beta$  수준의 정량화를 보여준다. 야생형 인간 아밀로이드 전구체 단백질을 안정하게 발현하는 HEK293 세포에서 A $\beta$ 1-40 생산을 억제하는 항체의 능력은 다음과 같이 평가하였다. HEK293-APPWT 세포를  $3 \times 10^4$  세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트 내에 철야 접종하였다. 항-BACE1 항체 또는 대조군 IgG1 항체를 함유하는 50  $\mu$ l의 신선한 배지 (DMEM + 10% FBS)를 24시간 동안 37°C에서 세포와 함께 인큐베이션하였다. 세포 배지를 수거하고, A $\beta$ 1-40 HTRF<sup>®</sup> 검정 (시스바이오 (CisBio))을 제조자의 지시에 따라 사용하여 A $\beta$ 1-40의 존재에 대해 검정하였다. A $\beta$ 1-40 값을 CellTiter-Glo 발광 세포 생존력 검정 (Luminescent Cell Viability Assay) (프로메가 (Promega))을 사용하여 결정된 세포 생존력에 대해 표준화하였다. 실험을 적어도 3회 수행하고, 각각의 실험에서 각각의 지점을 이중으로 반복하였다. 도 3d는 마우스에서 IV-주사 미량 용량의 [<sup>125</sup>I]-표지된 항체 30분, 6, 24, 및 48시간 후에 평균 뇌 흡수의 정량화를 도시한 것이다 (n=4). 도 3e는 뇌에서 평균 항체 흡수의 정량화를 보여주고, 도 3f는 마우스에서 항체의 20 mg/kg IV 주사 1, 12, 24, 및 48시간 후에 평균 뇌 대 혈청 비율을 보여준다 (n=10). 도 3e 및 3f의 실험은 도 1b에 관하여 설명된 실험과 동일한 프로토콜을 이용하여 수행하였다. 도 3g는 항-TfR/BACE1 (좌측 패널) 또는 대조군 IgG (우측 패널)의 IV 주사 24시간 후에 마우스로부터의 뇌 절편의 면역조직화학 염색을 보여준다. NeuN와 항체의 공동-국재화는 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 처리 후에 관찰되지만 (NeuN 뉴런 염색이 널리 존재하는 항체 염색과 동시에 발생함), 대조군 IgG 처리한 마우스에는 존재하지 않는다 (NeuN 뉴런 염색 패턴만이 관찰되고, 항체 염색은 존재하지 않는다).

도 4a-e는 단일 전신 용량의 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1이 중추 및 말초 A $\beta$ 1-40을 유의하게 감소시킴을 보여준다. 도 4a-d는 대조군 IgG, 항-BACE1, 또는 항-TfR/BACE1의 25 mg/kg 또는 50 mg/kg IV-주사 후의 뇌 (A,B) 및 혈장 (C,D) A $\beta$ 1-40 수준의 정량화를 보여준다. 간단히 설명하면, A베타1-40 측정의 경우, 반뇌 (hemi-brain)를 5 M 구아닌딘 염산염 완충제 내에서 균질화하고, 샘플을 3시간 동안 실온에서 회전시킨 후, 새로 첨가된 아프로티닌 (20 mg/ml) 및 류펩틴 (10 mg/ml)을 함유하는 PBS 내의 0.25% 카제인, 5 mM EDTA (pH 8.0)에 희석하였다 (1:10). 희석한 균질액을 14,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하고, 상청액을 A베타1-40 측정을 위해 단리하였다. 항체 농도 측정을 위해, 각각의 마우스로부터의 상응하는 반뇌를 상기 설명된 바와 같이 1% NP-40 내에 균질화시켰다. 관류 전에 전체 혈액을 EDTA 마이크로테이너 튜브 (비디 다이아그노스틱스 (BD Diagnostics)) 내에 수집하고, 5,000 x g에서 15분 동안 원심분리하고, 혈장 마우스 A베타1-40 및 항-TfR/BACE1 농도를 측정하기 위해 상청액을 단리하였다. 혈장 및 뇌 내의 총 마우스 A베타1-40의 농도는 상기 설명한 바와 유사한 절차를 따른 샌드위치 ELISA를 이용하여 결정하였다. A베타1-40의 C-말단에 특이적인 토끼 폴리클로날 항체 (밀리포어, 미국 매사추세츠주 베드포드)를 플레이트 상에 코팅하고, 비오틴화된 항-마우스 A베타 모노클로날 항체 M3.2 (코번스 (Covance, 미국 매사추세츠주 데덤))를 검출을 위해 사용하였다. 검정의 정량 하한값은 혈장에서 1.96 pg/ml, 및 뇌에서 39.1 pg/g이었다. 실험군들 사이의 차이의 통계적 분석은 양측 (two-tailed) 언페어드 (unpaired) t-검정을 이용하여 수행하였다. \*는 대조군 IgG에 비교한 유의성을 나타내고, #은 항-BACE1에 비교한 유의성을 나타낸다. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001; n=10 (모든 군에 대해). 도 4e는 대조군 IgG-주사 마우스에 비해 A $\beta$ 1-40 수준의 백분율로서 계산된, (A-D)에서의 데이터로부터의 평균 A $\beta$ 1-40 감소를 보여준다.

도 5a-b는 천연 다양성 파지 디스플레이 라이브러리의 나이브 종류로부터 얻은 항-BACE1 클론 YW412.8 및 YW412.8의 친화도-성숙 형태의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 5a는 가변 경쇄 (VL) 서열 정렬 (서열 1-6)을 도시한 것이다. 도 5b는 가변 중쇄 (VH) 서열 정렬 (서열 7-8)을 도시한 것이다. 두 도면에서, 각각의 클론에 대한 HVR 서열은 박스로 표시된 영역으로 표시되고, 제1 박스는 HVR-L1 (도 5a) 또는 HVR-H1 (도 5b)을, 제2 박스는 HVR-L2 (도 5a) 또는 HVR-H2 (도 5b)를, 제3 박스는 HVR-L3 (도 5a) 또는 HVR-H3 (도 5b)을 나타낸다.

도 6a-b는 합성 다양성 파지 디스플레이 라이브러리의 나이브 종류로부터 얻은 클론 Fab 12 및 Fab 12의 친화도-성숙 형태의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 6a는 경쇄 서열 정렬 (서열 9-12)을 도시한 것이다. 도 6b는 중쇄 서열 정렬 (서열 13)을 도시한 것이다. 두 도면에서, 각각의 클론에 대한 HVR 서열은 박스로 표시된 영역으로 표시되고, 제1 박스는 HVR-L1 (도 6a) 또는 HVR-H1 (도 6b)을, 제2 박스는 HVR-L2 (도 6a) 또는 HVR-H2 (도 6b)를, 제3 박스는 HVR-L3 (도 6a) 또는 HVR-H3 (도 6b)을 나타낸다.

도 7a-b는 예시적인 항-A베타 항체의 중쇄 (도 7a; 서열 14) 및 경쇄 (도 7b; 서열 15)를 도시한 것이다.

도 8a-b는 마우스에서 단일 치료 용량 투여 후에 혈청 (도 8a) 및 뇌 (도 8b) 내의 항-TfR<sup>A,B,C,D,E</sup>의 정량화를 도시한 것이다. 6-8주령 야생형 암컷 C57B/6 마우스를 모든 연구에 사용하였다. 마우스에게 20 mg/kg의 항-TfR 변이체 또는 대조군 IgG를 정맥내 주사하였다. 뇌 및 혈청 내의 항체 수준을 주사 1 및 12시간 및 1, 2, 4, 5, 6, 및 8일 후에 측정하였다. 총 주사 부피는 260  $\mu$ l를 초과하지 않았고, 항체는 필요한 경우 D-PBS (인비트로젠 (Invitrogen)) 내에 희석하였다. 실험은 동일한 프로토콜을 이용하여 수행하였고, 그의 실험 결과를 도 1b에 제시한다.

도 9a-e는, 이중특이적 항-TfR<sup>A,D,E</sup>/BACE1 항체가 뇌 내에 축적되고 생체 내에서 A $\beta$  생산을 억제하는 상이한 정도를 보여준다. 도 9a는 도 2a에 설명된 바와 동일한 검정 절차를 따라 항-TfR<sup>A,D,E</sup>/BACE1을 사용한 항-TfR 경쟁 ELISA 검정의 결과를 도시한 것이다. 상기 데이터로부터 결정된 IC50 값을 표 3에 제시한다. 도 9b 및 9d는 마우스 (n=6)에서 항체의 50 mg/kg IV 주사 1, 2, 4, 6, 8 및 10일 후에 혈장 내에서 관찰된 항체의 양 (9b) 및 관찰된 A $\beta$ 1-40의 양 (9d)을 정량한 것이다. 도 9c는 처리 1, 2, 4, 6, 8 및 10일 후에 평균 뇌 흡수의 정량화를 도시한 것이고, 도 9e는 동일한 처리된 마우스의 뇌에서 관찰된 A $\beta$ 1-40의 양을 도시한 것이다. 6-8주령 야생형 암컷 C57B/6 마우스를 모든 연구에 사용하였다. 마우스에게 50 mg/kg 항-TfR/BACE1 변이체, 대조군 IgG, 또는 항-BACE1을 정맥내 주사하였다. 지시된 시간 후에, 마우스를 D-PBS로 관류시키고, 각각의 동물에 대한 뇌 및 혈장 항체 농도를 상기 설명된 바와 같이 측정하였다. 검정은 도 4 설명에 기재된 바와 같이 수행하였다.

도 10 및 11은, 이중특이적 항-TfR<sup>A,D,E</sup>/A $\beta$  항체가 PS2APP 마우스 (도 10) 및 야생형 마우스 (도 11)의 뇌 내에 축적되는 상이한 정도를 보여준다. 도 10a 및 11a는 마우스에서 항체의 50 mg/kg i.p. 주사 1일 후에 혈장 내에서 관찰된 항체의 정량화를 도시한 것이다 (n= 4-6). 도 10b 및 11b는 동일한 처리된 마우스에서 평균 뇌 흡수를 정량한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**I. 정의**

"혈액-뇌 장벽" 또는 "BBB"는 뇌 모세혈관 내피 혈장 막 내의 긴밀한 연결에 의해 형성되어, 분자, 심지어 매우 작은 분자, 예컨대 우레아 (60 달톤)의 뇌 내로의 수송을 제한하는 단단한 장벽을 생성하는, 말초 순환계와 뇌 및 척수 사이의 생리학적 장벽을 의미한다. 뇌 내의 혈액-뇌 장벽, 척수 내의 혈액-척수 장벽, 및 망막 내의 혈액-망막 장벽은 CNS 내의 인접하는 모세관 장벽이고, 본원에서 집합적으로 혈액-뇌 장벽 또는 BBB로 언급된다. BBB는 또한 장벽이 모세혈관 내피 세포보다 뇌실막 세포로 이루어진 혈액-CSF 장벽 (백락막층)을 포함한다.

"중추신경계" 또는 "CNS"는 신체 기능을 제어하는 신경 조직의 복합체를 의미하고, 뇌 및 척수를 포함한다.

"혈액-뇌 장벽 수용체" (본원에서 "BBB-R"로서 약칭함)는 분자를 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송할 수 있는 뇌 내피 세포 상에 발현된 막횡단 (transmembrane) 수용체 단백질이다. BBB-R의 예는 본원에서 다음을 포함한다: 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF-R), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1) 및 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 8 (LRP8)을 포함하고 이로 제한되지 않는 저밀도 지질단백질 수용체, 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF). 예시적인 BBB-R은 본원에서 트랜스페린 수용체 (TfR)이다.

"트랜스페린 수용체" ("TfR")는 척추동물에서 철 흡수에 관여하는 2개의 디설피드-결합 하위단위 (각각의 겔보기 분자량 약 90,000)로 이루어진 막횡단 당단백질 (분자량 약 180,000)이다. 한 실시양태에서, TfR은 예를 들어 본원에서 문헌 [Schneider et al. Nature 311: 675 - 678 (1984)]에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 인간 TfR이다.

"신경계 장애"는 본원에서 사용되는 바와 같이 CNS를 침범하고/하거나 CNS에 병인을 갖는 질환 또는 장애를 의미한다. 예시적인 CNS 질환 또는 장애는 신경병증, 아밀로이드증, 암, 눈 질환 또는 장애, 바이러스 또는 미생물 감염, 염증, 허혈, 신경변성 질환, 발작, 행동 장애, 및 리소좀 축적 질환을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본원의 목적을 위해, CNS는 정상적으로 혈액-망막 장벽에 의해 신체의 나머지에서 격리되는 눈을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 신경계 장애의 구체적인 예는 신경변성 질환 (루이소체 (Lewy body) 질환, 척수 회백질염후성 (postpoliomyelitis) 증후군, 샤이-드래거 (Shy-Draeger) 증후군, 올리브교소뇌 위축, 파킨슨 질환



환, 다계통 위축, 선조체흑질 변성, 타우병증 (tauopathy) (알츠하이머 질환 및 상기 핵상 마비를 포함하고 이로 제한되지 않음), 프리온 질환 (소 해면상 뇌병증, 면양털염병 (scrapie), 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob) 증후군, 쿠루병, 게르스트만-슈트라우슬러-샤인커 (Gerstmann-Straussler-Scheinker) 질환, 만성 소모성 질환, 및 치명적 가족성 불면증을 포함하고 이로 제한되지 않음), 연수 마비, 운동 뉴런 질환, 및 신경계 불균질변성 (heterodegenerative) 장애 (카나반 (Canavan) 질환, 헌팅턴 (Huntington) 질환, 뉴런 세로이드 지방 갈색소증, 알렉산더 (Alexander) 질환, 뚜렛 (Tourette) 증후군, 멘케 킨키 모 (Menkes kinky hair) 증후군, 코케이인 (Cockayne) 증후군, 할러포르덴-스파츠 (Halervorden-Spatz) 증후군, 라포라 (Lafora) 질환, 레트 (Rett) 증후군, 간렌즈핵 변성, 레쉬-니한 (Lesch-Nyhan) 증후군, 및 운베리히트-룬드보그 (Unverricht-Lundborg) 증후군을 포함하고 이로 제한되지 않음), 치매 (피크 질환, 및 척수소뇌성 실조증을 포함하고 이로 제한되지 않음), 암 (예를 들어, 신체의 다른 곳에서 발생한 암의 뇌 전이를 포함하는 CNS 및/또는 뇌의 암 포함)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0062] "신경계 장애 약물"은 하나 이상의 신경계 장애(들)를 치료하는 약물 또는 치료제이다. 본 발명의 신경계 장애 약물은 하나 이상의 CNS 표적(들)의 항체, 펩티드, 단백질, 천연 리간드, 하나 이상의 CNS 표적(들)의 천연 리간드의 변형된 버전, 앵타머 (aptamer), 억제성 핵산 (즉, 작은 억제성 RNA (siRNA) 및 짧은 헤어핀 (hairpin) RNA (shRNA)), 리보자임, 및 임의의 상기한 것의 소분자, 또는 활성 단편을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 예시적인 신경계 장애 약물은 본원에서 설명되며, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 그 자체가거나 또는 CNS 항원 또는 표적 분자, 예컨대, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 일부, 아밀로이드 베타, 베타-세크레타제, 감마-세크레타제, 타우, 알파-시누클레인, 파르킨, 헌팅틴, DR6, 프레세닐린, ApoE, 신경아교종 또는 다른 CNS 암 마커, 및 뉴로트로핀 (이로 제한되지 않음)을 특이적으로 인식하고/하거나 이에 대해 작용 (즉, 억제, 활성화, 또는 검출)하는 항체, 앵타머, 단백질, 펩티드, 억제성 핵산 및 임의의 상기한 것의 소분자 및 활성 단편. 이들이 치료를 위해 사용될 수 있는 신경계 장애 약물 및 장애의 비-제한적인 예는 다음 표 1에 제공된다:

표 1

신경계 장애 약물 및 이들이 치료를 위해 사용될 수 있는 상응하는 장애의 비-제한적인 예	
약물	신경계 장애
항-BACE1 항체	알츠하이머, 급성 및 만성 뇌 손상, 뇌졸중
항-A베타 항체	알츠하이머 질환
뉴로트로핀	뇌졸중, 급성 뇌 손상, 척수 손상
뇌-유도 신경영양 인자 (BDNF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2)	만성 뇌 손상 (신경발생)
항-표피 성장 인자 수용체 (EGFR)-항체	뇌암
아교 세포주 유도 신경 인자 (GDNF)	파킨슨 질환
뇌-유도 신경영양 인자 (BDNF)	근위축성 측삭 경화증, 우울증
리소좀 효소	뇌의 리소좀 축적 장애
섬모 신경영양 인자 (CNTF)	근위축성 측삭 경화증
뉴레굴린-1	정신분열병
항-HER2 항체 (예를 들어 트라스투주맙)	HER2-양성 암으로부터의 뇌 전이

[0064] "영상화제"는 그의 존재 및/또는 위치가 직접 또는 간접적으로 검출되도록 허용하는 하나 이상의 특성을 갖는 화합물이다. 상기 영상화제 예는 검출을 허용하는 표지된 모이어티 (moiety)를 포함하는 단백질 및 소분자 화합물을 포함한다.

[0065] "CNS 항원" 또는 "뇌 항원"은 뇌를 포함하는 CNS에서 발견되고, 항체 또는 소분자로 표적화될 수 있다. 상기 항원 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 베타-세크레타제 1 (BACE1), 아밀로이드 베타 (Aβ), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2), 타우, 아포지질단백질 E4 (ApoE4), 알파-시누클레인, CD20, 헌팅틴, 프리온 단백질 (PrP), 류신 풍부 반복 키나제 2 (LRRK2), 파르킨, 프레세닐린 1, 프레세닐린 2, 감마 세크레타제, 사멸 수용체 6 (DR6), 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), p75 뉴로트로핀 수용체 (p75NTR), 및 카스파제 6. 한 실시양태에서, 항원은 BACE1이다.

[0066] 용어 "BACE1"은 본원에서 사용되는 바와 같이, 달리 나타내지 않으면 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 베타

-세크레타제 1 ( $\beta$ -부위 아밀로이드 전구체 단백질 절단 효소 1, 막-결합된 아스파르트산 프로테아제 2, 메삼신 2, 아스파르트 프로테아제 2 또는 Asp2로도 불림)을 의미한다. 이 용어는 "전장" 비프로세싱된 BACE1 및 세포에서의 프로세싱에 의한 임의의 형태의 BACE1을 포함한다. 이 용어는 또한 BACE1의 천연 생성 변이체, 예를 들어, 스플라이스 (splice) 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 예시적인 BACE1 폴리펩티드의 아미노산 서열은 그 전체를 본원에 참고로 포함시킨 문헌 [Vassar et al., Science 286:735-741 (1999)]에 보고된 인간 BACE1, 이소형 A의 서열이다. 이소형 B, C 및 D를 포함하는 인간 BACE1의 몇몇의 다른 이소형이 존재한다. 그 전체를 본원에 참고로 포함시킨 [UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817]을 참조한다.

[0067] 용어 "항-베타-세크레타제 항체", "항-BACE1 항체", "베타-세크레타제에 결합하는 항체" 및 "BACE1에 결합하는 항체"는 항체가 BACE1의 표적화시에 진단 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 BACE1에 결합할 수 있는 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 비관련된 비-BACE1 단백질에 대한 항-BACE1 항체의 결합 정도는 예를 들어 방사성 면역결정 (RIA)에 의해 측정할 때 BACE1에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, BACE1에 결합하는 항체의 해리 상수 (Kd)는  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \mu\text{M}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0.1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0.01 \text{ nM}$ , 또는  $\leq 0.001 \text{ nM}$  (예를 들어  $10^{-8} \text{ M}$  이하, 예를 들어  $10^{-8} \text{ M}$  내지  $10^{-13} \text{ M}$ , 예를 들어,  $10^{-9} \text{ M}$  내지  $10^{-13} \text{ M}$ )이다. 특정 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 상이한 종 및 이소형으로부터의 BACE1 사이에서 보존된 BACE1의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 항-BACE1 항체 YW412.8.31에 의해 결합되는 BACE1 상의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 다른 실시양태에서, BACE1의 촉매 도메인에 위치하는 BACE1 내의 엑소사이트 (exosite)에 결합하는 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, BACE1에 대한 결합을 위해 그 전체를 본원에 참고로 포함시킨 문헌 [Kornacker et al., Biochem. 44: 11567-11573 (2005)]에서 확인된 펩티드 (즉, 펩티드 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, 스캐램블드 (scrambled), Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A 및 L11A)와 경쟁하는 항체가 제공된다. 예시적인 BACE1 항체 서열이 도 5a-b 및 도 6a-b에 도시된다. 한 예시적인 항체는 본원에서 항체 YW412.8.31의 가변 도메인을 포함한다 (예를 들어 도 5a-b에 도시된 바와 같이).

[0068] "천연 서열" 단백질은 본원에서 단백질의 천연 생성 변이체를 포함하여 자연에서 발견되는 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 의미한다. 이 용어는 본원에서 사용되는 바와 같이 그의 천연 공급원으로부터 단리되거나 또는 재조합 방식으로 생산된 단백질을 포함한다.

[0069] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 요구되는 생물학적 활성을 보이는 항체 단편을 포함한다.

[0070] "항체 단편"은 항원에 결합하는 능력을 보유하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편, 디아바디 (diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다.

[0071] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 말하는데, 즉 이러한 집단을 이루는 개개의 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 모노클로날 항체의 생산 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체를 제외하고는 동일하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 일반적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 그들의 특이성에 추가로, 모노클로날 항체는 이들이 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 변경 표현 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 설명된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조). 또한, "모노클로날 항체"는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 본원에서 모노클로날 항체의 구체적인 예는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 (chimeric) 항체, 인간화 항체, 및 인간 항체를 포함한다.

[0072] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 목적하는 생물학적 활성을 보이는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성이고 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종에서 유래하거나 또 다른 항체 종류 또는 하위클래스에 속하는 항체의 대

응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린) 및 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)] 참조). 본원에서 관심있는 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 예컨대 개코원숭이, 붉은털 또는 시노몰거스 원숭이)에서 유래한 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화 (primatized)" 항체를 포함한다 (미국 특허 번호 5,693,780).

[0073] 비-인간 (예를 들어 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 비-인간종 (공여자 항체), 예를 들어 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 상기 변형은 항체 성능을 더욱 개선하기 위한 것이다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 대개 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 초가변 영역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 상기한 FR 치환(들)을 제외하고 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 적어도 일부의 이뮤노글로불린 불변 영역, 대개 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)]을 참조한다.

[0074] "인간 항체"는 본원에서 인간 B-세포로부터 얻을 수 있는 항체의 아미노산 서열 구조에 대응하는 아미노산 서열 구조를 포함하는 것이고, 인간 항체의 항원-결합 단편을 포함한다. 상기 항체는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 기술에 의해 확인되거나 제조될 수 있다: 면역화시에, 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)에 의한 생산 (예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 5,591,669, 5,589,369 및 5,545,807 참조); 인간 항체 또는 인간 항체 단편을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 선택 (예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)]; [Johnson et al., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]; [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]; [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]; 미국 특허 번호 5,565,332 및 5,573,905 참조); 시험관 내에서 활성화된 B 세포의 생성 (미국 특허 5,567,610 및 5,229,275 참조); 및 인간 항체 생산 하이브리도마로부터의 단리.

[0075] "다중특이적 항체"는 본원에서 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 다중특이적 항체는 BBB-R 및 뇌 항원 둘 모두에 결합할 수 있다. 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어 F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 항체)으로서 제조할 수 있다. 또한, 2, 3개 이상의 (예를 들어 4개의) 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체도 고려된다 (예를 들어, 미국 특허 출원 번호 US 2002/0004587 A1 (Miller et al.) 참조). 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조할 수 있다.

[0076] 항체는 본원에서 변경된 항원-결합 또는 생물학적 활성을 갖는 "아미노산 서열 변이체"를 포함한다. 상기 아미노산 변경의 예는 항원에 대해 향상된 친화도를 갖는 항체 (예를 들어 "친화도 성숙" 항체), 및 존재할 경우, 변경된 Fc 영역을 갖는, 예를 들어 변경된 (증가된 또는 감소된) 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) (예를 들어, WO 00/42072 (Presta, L.) 및 WO 99/51642 (Iduosogie et al.) 참조); 및/또는 증가된 또는 감소된 혈청 반감기 (예를 들어, W000/42072 (Presta, L.) 참조)를 갖는 항체를 포함한다.

[0077] "친화도 변형된 변이체"는 친화도를 변경하는 (증가 또는 감소시키는) 모 항체의 (예를 들어, 모 키메라, 인간화, 또는 인간 항체의) 하나 이상의 치환된 초가변 영역 또는 프레임워크 잔기를 갖는다. 한 실시양태에서, 추가의 개발을 위해 선택된 생성되는 변이체(들)은 본 발명에 따라 BBB-R에 대해 감소된 친화도를 가질 것이다. 상기 치환 변이체를 생성하기 위한 편리한 방법은 파지 디스플레이를 이용한다. 간단히 설명하면, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어 6-7개 부위)는 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하기 위해 돌연변이된다. 이와 같이 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 섬유상 파지 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이된다. 파지-디스플레이된 변이체는 이어서 그의 생물학적 활성 (예를 들어 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알려진

스캐닝 돌연변이 유발이, 유의하게 항원 결합에 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 방법으로, 또는 추가로, 항체와 그의 표적 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 상기 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 본원에서 상세히 설명한 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 상기 변이체가 생성된 후, 일군의 변이체를 스크리닝에 적용하고, 변경된 친화도를 갖는 항체가 추가의 개발을 위해 선택될 수 있다.

[0078] 항체는 본원에서 예를 들어 반감기 또는 안정성을 증가시키거나 또는 다른 방식으로 항체를 개선하기 위해 "이종 분자"와 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체는 다양한 비-단백질 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중의 하나에 연결될 수 있다. 하나 이상의 PEG 분자에 연결된 항체 단편, 예컨대 Fab'는 본 발명의 예시적인 실시양태이다.

[0079] 본원에서 항체는 존재할 경우 Fc 영역에 부착된 임의의 탄수화물이 변경되도록 하는 "글리코실화 변이체"일 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결여된 성숙 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (교와 하꼬 고교 컴퍼니 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. Fc 영역에 부착된 탄수화물에 이등분하는 (bisecting) N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 WO 1997/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 그의 Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 대해서는 WO 1998/58964 (Raju, S.) 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)를 참조한다. 또한, 변형된 글리코실화를 갖는 항체를 설명하고 있는 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 참조한다.

[0080] 본원에서 사용되는 용어 "추가변 영역"은 항원 결합을 책임지는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 추가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3) [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 및/또는 "추가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정되는 추가변 영역 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.

[0081] "전장 항체"는 항원-결합 가변 영역 및 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0082] "네이키드 (naked) 항체"는 이종 분자, 예컨대 세포독성 모이어티, 중합체, 또는 방사성 표지에 접합되지 않은 (본원에서 규정된) 항체이다.

[0083] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 의미한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC) 등을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원의 항체는 본질적으로 이펙터 기능이 결여되어 있다.

[0084] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 전장 항체는 상이한 "클래스"로 지정될 수 있다. 전장 항체의 5개의 주요 클래스 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 "하위클래스" (이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다. 항체의 상이한 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 불린다. 이뮤노글로불린의 상이한 클래스의 하위 단위 구조 및 3차원 입체형태는 공지되어 있다.

[0085] 용어 "재조합 항체"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 숙주 세포에 의해 발현되는 항체 (예를 들어 키메라, 인간화, 또는 인간 항체 또는 그의 항원-결합 단편)를 의미한다. 재조합 항체의 생산을 위한 "숙주 세포"의 예는 다음을 포함한다: (1) 포유동물 세포, 예를 들어, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO), COS, 골수종 세포 (YO 및 NSO 세포 포함), 베이비 햄스터 신장 (BHK), 헬라 (Hela) 및 베로 (Vero) 세포; (2) 곤충 세포, 예를 들어, sf9, sf21 및 Tn5; (3) 식물 세포, 예를 들어 니코티아나 (*Nicotiana*) 속에 속하는 식물 (예를 들어 니코티아나 타바쿰 (*Nicotiana tabacum*)); (4) 효모 세포, 예를 들어 사카로마이세스



(*Saccharomyces*) 속 (예를 들어 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)) 또는 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 속 (예를 들어 아스페르길루스 니게르 (*Aspergillus niger*))에 속하는 세포; (5) 세균 세포, 예를 들어 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) 세포 또는 바실러스 썩틸리스 (*Bacillus subtilis*) 세포 등.

- [0086] 본원에서 사용되는 바와 같이, "특이적으로 결합하는" 또는 "에 특이적으로 결합하다"는 항체가 항원에 선택적으로 또는 우선적으로 결합함을 의미한다. 결합 친화도는 일반적으로 표준 검정, 예컨대 스캐차드 분석, 또는 표면 플라즈몬 공명 기술 (예를 들어 비아코어® 이용)을 사용하여 결정된다.
- [0087] 참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 그의 항원에 대한 참조 항체의 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 의미하고, 반대로, 참조 항체는 경쟁 검정에서 그의 항원에 대한 항체의 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 YW412.8.31에 의해 결합된 BACE1 에피토프에 결합한다.
- [0088] 용어 "세포독성제"는 본원에서 사용되는 바와 같이 세포의 기능을 억제 또는 제한하고/하거나 세포의 사멸 또는 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 세포독성제는 방사성 동위원소 (예를 들어 At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학치료제 또는 약물 (예를 들어, 메토크세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 펄판란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제 (intercalating agent)); 성장 억제제; 효소 및 그의 단편, 예를 들어 뉴클레오티드 분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0089] 작용제, 예를 들어, 제약 제제의 "유효량"은 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해, 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 효과적인 양을 의미한다.
- [0090] 용어 "Fc 영역"은 본원에서 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 규정하기 위해 사용된다. 이 용어는 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복실-말단에 걸친다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 구체화되지 않으면, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같은 EU 인덱스 (index)로도 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다.
- [0091] "프레임워크" 또는 "FR"은 추가 변 영역 (HVR) 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기를 의미한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 다음과 같은 4개의 FR 도메인으로 이루어진다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에 다음 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0092] "면역접합체"는 표지 또는 세포독성제를 포함하고 이로 제한되지 않는 하나 이상의 이종 분자(들)에 접합된 항체이다. 임의로, 상기 접합은 링커를 통해 이루어진다.
- [0093] "링커"는 본원에서 사용되는 바와 같이 항-BBB-R 항체를 이종 분자에 공유 또는 비-공유 연결하는 구조이다. 특정 실시양태에서, 링커는 펩티드이다. 다른 실시양태에서, 링커는 화학적 링커이다.
- [0094] "표지"는 본원에서 항체와 커플링된 마커이고, 검출 또는 영상화를 위해 사용된다. 상기 표지 예는 방사성 표지, 형광단, 발색단, 또는 친화도 태그를 포함한다. 한 실시양태에서, 표지는 의학적 영상화를 위해 사용되는 방사성 표지, 예를 들어 Tc<sup>99m</sup> 또는 I<sup>123</sup>, 또는 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 (spin) 표지, 예컨대 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간, 철 등이다.
- [0095] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼, 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0096] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정할 때 95% 또는 99% 초과로 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가를 위한 방법의 검토에 대해서는, 예를 들어, 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다.

- [0097] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 금기사항 및/또는 치료 제품의 사용과 관련한 경고에 대한 정보를 포함하는, 치료 제품의 상업적인 포장에 통상적으로 포함되는 설명서를 나타내기 위해 사용된다.
- [0098] 용어 "제약 제제"는 그 내부에 포함되는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과를 보이도록 하는 형태이고 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않을 정도로 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다.
- [0099] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 제약 제제 내의 활성 성분 이외의 다른 성분을 의미한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제, 또는 보존제를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0100] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료" (및 그의 문법적 변형 표현, 예컨대 "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 기술을 나타내고, 임상 질병의 예방을 위해 또는 질병 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발 억제, 증상 완화, 질환의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 억제, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 호전, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연하거나 질환의 진행을 늦추기 위해 사용된다.
- [0101] **II. 조성물 및 방법**
- [0102] **II. 항-BBB-R 항체 및 그의 접합체의 생산**
- [0103] 본 발명의 방법 및 제조품은 BBB-R에 결합하는 항체를 사용하거나 포함한다. 항체의 생산을 위해 또는 항체의 스크리닝을 위해 사용되는 BBB-R 항원은 예를 들어 목적하는 에피토프를 함유하는 가용성 형태 또는 그의 일부 (예를 들어 세포외 도메인)일 수 있다. 별법으로, 또는 추가로, 그의 세포 표면에 BBB-R을 발현하는 세포는 항체를 생성하거나 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 항체 생성에 유용한 다른 형태의 BBB-R은 당업자에게 명백할 것이다. 본원에서 BBB-R의 예는 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGF-R), 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 (LRP1) 및 LRP8 등, 및 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (HB-EGF)를 포함한다.
- [0104] 본 발명에 따르면, "저친화도" 항-BBB-R (예를 들어 항-TfR) 항체는 본원에서 상기 항체가 개선된 CNS (예를 들어, 뇌) 흡수를 보이는 것을 입증하는 데이터를 기초로 하여 선택된다. 상기 저친화도 항체를 확인하기 위해서, 스캐차드 검정 및 표면 플라즈몬 공명 기술 (예를 들어, 비아코어® 사용)을 포함하고 이로 제한되지 않는, 항체 친화도를 측정하기 위한 다양한 검정이 이용가능하다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 항체의 BBB-R 항원 (예를 들어 TfR)에 대한 친화도는 약 5 nM 또는 약 20 nM 또는 약 100 nM 내지 약 10  $\mu$ M 또는 약 1  $\mu$ M 또는 약 500 nM의 범위이다. 따라서, 친화도는 예를 들어 스캐차드 분석 또는 비아코어®에 의해 측정할 때 약 5 nM 내지 약 10  $\mu$ M, 또는 약 20 nM 내지 약 1  $\mu$ M, 또는 약 100 nM 내지 약 500 nM의 범위일 수 있다.
- [0105] 따라서, 본 발명은 혈액-뇌 장벽 수용체 (BBB-R)에 대한 일군의 항체로부터 BBB-R에 대한 친화도가 약 5 nM 또는 약 20 nM 또는 약 100 nM 내지 약 10  $\mu$ M 또는 약 1  $\mu$ M 또는 약 500 nM의 범위인 항체를 선택하는 것을 포함하는, 신경계 장애 약물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하기에 유용한 항체의 제조 방법을 제공한다. 따라서, 친화도는 예를 들어 스캐차드 분석 또는 비아코어®에 의해 측정할 때 약 5 nM 내지 약 10  $\mu$ M 또는 약 20 nM 내지 약 1  $\mu$ M, 또는 약 100 nM 내지 약 500 nM의 범위일 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이중 분자/화합물의 항체에 대한 접합은 예를 들어 입체 방해에 의해 또는 심지어 항체가 항체의 원래의 표적이 아니라 상이한 항원에 결합하는 하나 이상의 아암 (arm)을 가져서 다중특이적으로 된 경우에 한 결합 아암의 제거에 의해, 그의 표적에 대한 항체의 친화도를 종종 감소시킬 것이다. 한 실시태양에서, BACE1에 접합된 TfR에 특이적인 본 발명의 저친화도 항체는 비아코어에 의해 측정할 때 약 30 nM의 TfR에 대한 Kd를 보였다. 또 다른 실시태양에서, BACE1에 접합된 TfR에 특이적인 본 발명의 저친화도 항체는 비아코어에 의해 측정할 때 약 600 nM의 TfR에 대한 Kd를 보였다.
- [0106] 항체 친화도를 평가하기 위한 한 예시적인 검정은 스캐차드 분석이다. 예를 들어, 관심있는 항-BBB-R 항체는 락토퍼옥시다제 방법을 사용하여 아이오딘화될 수 있다 (Bennett and Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pg.134-148 (1997)). 방사성 표지된 항-BBB-R 항체는 NAP-5 컬럼을 사용한 겔 여과 및 측정된 그의 특이적인 활성에 의해 유리 <sup>125</sup>I-Na로부터 정제된다. 고정된 농도의 아이오딘화 항체 및 감소하는 농도의 연속 희석된 비표지된 항체를 함유하는 50  $\mu$ l의 경쟁 반응 혼합물을 96-웰 플레이트에 첨가한다. BBB-R을 일시적으로 발현하는 세포를 10% FBS, 2 mM L-글루타민 및 1x 페니실린-스트렙토마이신을 보충한 돌베코 (Dulbecco)의 변형된 이

글 (eagle) 배지 (DMEM) (제넨테크 (Genentech))로 이루어진 성장 배지에서 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 내에서 배양한다. 시그마 (Sigma) 세포 해리 용액을 사용하여 세포를 접시로부터 분리하고, 결합 완충제 (1% 소 혈청 알부민, 50 mM HEPES, pH 7.2, 및 0.2% 나트륨 아지드가 존재하는 DMEM)로 세척하였다. 세척된 세포를 0.2 mL의 결합 완충제 내의 대략 200,000개 세포의 밀도로 50 μL의 경쟁 반응 혼합물이 존재하는 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 세포와의 경쟁 반응에서 비표지된 항체의 최종 농도는 상이하고, 1000 nM에서 출발한 후, 10 농도에 대해 1:2 배수의 희석에 의해 감소시키고, 무첨가 완충제-단독 샘플을 포함한다. 각각의 농도의 비표지된 항체에 대한 세포와의 경쟁 반응은 3중으로 검정한다. 세포와의 경쟁 반응물을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션한다. 2시간 인큐베이션 후에, 경쟁 반응액을 필터 플레이트로 옮기고, 결합된 아이오딘화 항체로부터 유리 항체를 분리하기 위해 결합 완충제로 4회 세척한다. 필터를 감마 계수기로 계수하고, 결합 데이터를 항체의 결합 친화도를 결정하기 위해 문헌 [Munson and Rodbard (1980)]의 피팅 (fitting) 알고리즘을 사용하여 평가한다.

[0107] 본 발명의 조성물을 사용한 예시적인 스캐차드 분석은 다음과 같이 수행할 수 있다. 항-TfR<sup>A</sup>는 락토퍼옥시다제 방법을 사용하여 아이오딘화되었다 (Bennett and Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pg.134-148 (1997)). 방사성표지된 항-TfR<sup>A</sup>를 NAP-5 컬럼을 사용한 겔 여과에 의해 유리 <sup>125</sup>I-Na로부터 정제하였고; 정제된 항-TfR<sup>A</sup>는 19.82 μCi/μg의 특이적인 활성을 보였다. 고정된 농도의 아이오딘화 항체 및 감소하는 농도의 연속 희석된 비표지된 항체를 함유하는 50 μL의 경쟁 반응 혼합물을 96-웰 플레이트에 첨가한다. 무첨가 TfR을 일시적으로 발현하는 293 세포를 10% FBS, 2 mM L-글루타민 및 1x 페니실린-스트렙토마이신을 보충한 돌베코의 변형된 이글 배지 (DMEM) (제넨테크)로 이루어진 성장 배지에서 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 내에서 배양한다. 시그마 세포 해리 용액을 사용하여 세포를 접시로부터 분리하고, 결합 완충제 (1% 소 혈청 알부민, 50 mM HEPES, pH 7.2, 및 0.2% 나트륨 아지드가 존재하는 DMEM)로 세척하였다. 세척된 세포를 0.2 mL의 결합 완충제 내의 대략 200,000개 세포의 밀도로 50 μL의 경쟁 반응 혼합물이 존재하는 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 세포와의 각각의 경쟁 반응에서 아이오딘화 항체의 최종 농도는 100 pM (134,000 cpm/0.25 mL)이었다. 세포와의 경쟁 반응에서 비표지된 항체의 최종 농도는 상이하고, 1000 nM에서 출발한 후, 10 농도에 대해 1:2 배수의 희석에 의해 감소시키고, 무첨가 완충제-단독 샘플을 포함하였다. 각각의 농도의 비표지된 항체에 대한 세포와의 경쟁 반응은 3중으로 검정하였다. 세포와의 경쟁 반응물을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션한다. 2시간 인큐베이션 후에, 경쟁 반응액을 밀리포어 멀티스크린 (Millipore Multiscreen) 필터 플레이트로 옮기고, 결합된 아이오딘화 항체로부터 유리 항체를 분리하기 위해 결합 완충제로 4회 세척하였다. 필터를 월락 위저드 (Wallac Wizard) 1470 감마 계수기 (퍼킨 엘머 라이프 앤드 어널리티컬 사이언시스 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences; 미국 매사추세츠주 월담))로 계수하고, 결합 데이터를 항체의 결합 친화도를 결정하기 위해 문헌 [Munson and Rodbard (1980)]의 피팅 알고리즘을 사용하는 뉴 리간드 (New Ligand) 소프트웨어 (제넨테크)를 사용하여 평가하였다.

[0108] 본 발명의 조성물을 사용한 예시적인 비아코어® 분석은 다음과 같이 수행할 수 있다. 항-인간 Fc 키트 (비아코어, 인크. (BIAcore, Inc., 미국 뉴저지주 피츠카타웨이))를 사용하여 25°C에서 비아코어®-2000 (비아코어, 인크., 미국 뉴저지주 피츠카타웨이)를 사용한 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 Kd를 측정하였다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 제조사의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시켰다. 항-인간 Fc 항체를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.0)을 사용하여 50 μg/ml로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10000 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μL/분의 유량으로 주입하였다. 항체 주입 후에, 미반응 기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입하였다. 운동학 측정을 위해, 항-TfR 항체 변이체를 약 220 RU에 도달하도록 HBS-P 내에서 주입한 후, MuTfR-His의 2배 연속 희석액 (0.61 nM 내지 157 nM)을 약 30 μL/분의 유량으로 25°C에서 HBS-P 내에서 주입하였다. 회합률 (kon) 및 해리율 (koff)은 회합 및 해리 센소그램 (sensorgram)을 동시 피팅함으로써 단순 일대일 랭그뮤어 (Langmuir) 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비 koff/kon으로서 계산하였다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)] 참조).

[0109] 또 다른 실시양태에 따르면, 항-인간 Fc 키트 (비아코어, 인크., 미국 뉴저지주 피츠카타웨이)를 사용하여 25°C에서 비아코어®-2000 장치 (비아코어, 인크., 미국 뉴저지주 피츠카타웨이)를 사용한 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 Kd를 측정하였다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 제조사의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시켰다. 항-인간 Fc 항체를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.0)을 사용하여 50 μg/ml로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10000 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μL/분의 유량으로 주입하였다. 항체 주입 후



에, 미반응 기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입하였다. 운동학 측정을 위해, 항-BBB-R 항체 변이체를 약 220 RU에 도달하도록 HBS-P 내에서 주입한 후, BBB-R-His의 2배 연속 희석액 (0.61 nM 내지 157 nM)을 약 30  $\mu$ l/분의 유량으로 25°C에서 HBS-P 내에서 주입하였다. 회합률 (kon) 및 해리율 (koff)은 회합 및 해리 센소그램을 동시 피팅함으로써 단순 일대일 랭그뮐어 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비 koff/kon으로서 계산하였다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)] 참조).

[0110] 하나 이상의 항체의 BBB-R에 대한 친화도의 대리 측정은 BBB-R에 대한 공지의 BBB-R 리간드의 결합을 50% 억제하기 위해 얼마나 많은 항체가 필요한지의 척도인 그의 최대 억제 농도의 1/2 (IC50)이다. 제시된 화합물의 IC50을 결정하는 몇몇 방법이 공지되어 있고; 통상적인 방법은 실시예에서, 즉 도 2a에 대해 본원에서 설명된 것과 같은 경쟁 결합 검정을 수행하는 것이다. 일반적으로, 높은 IC50은 보다 많은 항체가 공지의 리간드의 결합을 억제하기 위해 필요하고, 따라서 리간드에 대한 항체의 친화도가 비교적 낮음을 나타낸다. 반대로, 낮은 IC50은 보다 적은 항체가 공지의 리간드의 결합을 억제하기 위해 필요하고, 따라서 리간드에 대한 항체의 친화도가 비교적 높음을 나타낸다.

[0111] IC50을 측정하기 위한 예시적인 경쟁적 ELISA 검정은 TfR에 결합하기 위해 비오틴화된 TfR<sup>A</sup>에 대해 경쟁하기 위해 증가하는 농도의 항-TfR 또는 항-TfR/뇌 항원 (즉, 항-TfR/BACE1, 항-TfR/A베타 등) 변이체 항체가 사용되는 것이다. 항-TfR 경쟁 ELISA는 PBS 내의 2.5  $\mu$ g/ml의 정제된 뮤린 TfR 세포의 도메인으로 4°C에서 철야 코팅된 맥시소프 플레이트 (미국 뉴저지주 벵툼)에서 수행하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 세척하고, PBS 내의 수퍼블록 차단 완충제 (써모 사이언티픽, 미국 뉴햄프셔주 허드슨)를 사용하여 차단하였다. 각각의 개별적인 항-TfR 또는 항-TfR/뇌 항원 (즉, 항-TfR/BACE1 또는 항-TfR/A베타) (1:3 연속 희석)의 적정액을 비오틴화된 항-TfR<sup>A</sup> (0.5 nM 최종 농도)와 조합하고, 플레이트에 1시간 동안 실온에서 첨가하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 세척하고, HRP-스트렙타비딘 (서던 바이오테크, 버밍햄)을 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 세척하고, 플레이트에 결합된 비오틴화된 항-TfR<sup>A</sup>를 TMB 기질 (바이오에프엑스 래보러토리즈, 미국 오웬스 밀)을 사용하여 검출하였다.

[0112] 한 실시양태에서, 저친화도 항-BBB-R 항체는 본원에서 표지 및/또는 약물 또는 영상화제를 BBB를 가로질러 보다 효율적으로 수송하기 위해 표지 및/또는 신경계 장애 약물 또는 영상화제와 커플링된다. 상기 커플링은 화학적 가교-링커에 의해 또는 융합 단백질의 생성 등에 의해 달성할 수 있다.

[0113] 공유 접합은 직접 또는 링커를 통해 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, 직접 접합은 단백질 융합 (즉, BBB-R 항체 및 신경계 장애 약물을 코딩하는 2개의 유전자의 융합 및 단일 단백질로서의 발현)의 제작에 의해 이루어진다. 특정 실시양태에서, 직접 접합은 항-BBB-R 항체의 두 부분 중의 하나 상의 반응성 기와 신경계 약물 상의 대응하는 기 또는 수용기 사이의 공유 결합의 형성에 의한 것이다. 특정 실시양태에서, 직접 접합은 적절한 조건 하에 접합되는 다른 분자에 대한 공유 부착을 형성하는 반응성 기 (비제한적인 예로서, 술포히드릴 기 또는 카르복실기)를 포함하도록 접합되는 두 분자 중의 하나의 변형 (즉, 유전적 변형)에 의한 것이다. 하나의 비제한적인 예로서, 요구되는 반응성 기 (즉, 시스템인 잔기)를 갖는 분자 (즉, 아미노산)가 예를 들어 항-BBB-R 항체 내로 도입될 수 있고, 신경계 약물과 디설피드 결합이 형성된다. 또한, 핵산을 단백질에 공유 접합하는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (즉, 광가교결합, 예를 들어, 문헌 [Zatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74: 77-95 (2005)] 참조). 비-공유 접합은 당업자에 의해 쉽게 이해되는 바와 같이 소수성 결합, 이온 결합, 정전기 상호작용 등을 포함하는 임의의 비공유 부착 수단에 의해 이루어질 수 있다. 접합은 또한 다양한 링커를 이용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 항-BBB-R 항체 및 신경계 약물은 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리리디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미테이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 접합될 수 있다. 펩티드 결합에 의해 연결된 1 내지 20개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 링커가 또한 사용될 수 있다. 특정 상기 실시양태에서, 아미노산은 20개의 천연 생성 아미노산으로부터 선택된다. 특정한 다른 상기 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산은 글리신, 알라닌, 프롤린, 아스파라긴, 글루타민 및 리신으로부터 선택된다. 링커는 뇌로의 전달시에 신경계 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성

링커, 펩티다제-감수성 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992); 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0114] 본 발명은 본원에서 상업상 이용가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록포드)로부터), BMPs, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하고 이로 제한되지 않는 가교-링커 시약으로 제조된 접합체를 분명하게 고려하고 이로 제한되지 않는다.

[0115] 신경병증 장애에 대해, 마약성/오피오이드 진통제 (즉, 몰핀, 펜타닐, 히드로코돈, 메페리딘, 메타돈, 옥시모르폰, 펜타조신, 프로폭시펜, 트라마돌, 코데인 및 옥시코돈), 비스테로이드성 소염 약물 (NSAID) (즉, 이부프로펜, 나프록센, 디클로페낙, 디플루니살, 에토돌락, 페노프로펜, 플루르비프로펜, 인도메타신, 케토롤락, 메페남산, 벨록시캅, 나부메톤, 옥사프로진, 피록시캅, 숀리당, 및 톨메틴), 코티코스테로이드 (즉, 코르티손, 프레드니손, 프레드니솔론, 텍사메타손, 메틸프레드니솔론 및 트리암시놀론), 항-편두통제 (즉, 수마트립틴, 알모트립탄, 프로바트립탄, 수마트립탄, 리자트립탄, 엘레트립탄, 졸미트립탄, 디히드로에르고타민, 엘레트립탄 및 에르고타민), 아세트아미노펜, 살리실레이트 (즉, 아스피린, 콜린 살리실레이트, 마그네슘 살리실레이트, 디플루니살, 및 살살레이트), 항-경련제 (즉, 카르바마제핀, 클로나제팜, 가바펜틴, 라모트리진, 프레가발린, 트리아가빈, 및 토피라메이트), 마취제 (즉, 이소플루란, 트리클로로에틸렌, 할로탄, 세보플루란, 벤조카인, 클로로프로카인, 코카인, 시클로메타카인, 디메토카인, 프로폭시카인, 프로카인, 노보카인, 프로파라카인, 테트라카인, 아르티카인, 부피바카인, 카르티카인, 신코카인, 에티도카인, 레보부피바카인, 리도카인, 메피바카인, 피페로카인, 프틸로카인, 로피바카인, 트리메카인, 삭시톡신 및 테트로도톡신), 및 cox-2-억제제 (즉, 셀레콕시브, 로페콕시브, 및 발데콕시브)를 포함하고 이로 제한되지 않는 진통제인 신경계 약물이 선택될 수 있다. 현기증을 동반한 신경병증 장애에 대해, 메클리진, 디펜히드라민, 프로메타진 및 디아제팜을 포함하고 이로 제한되지 않는 항-현기증제인 신경계 약물이 선택될 수 있다. 오심을 동반하는 신경병증 장애에 대해, 프로메타진, 클로르프로마진, 프로클로르페라진, 트리메토벤즈아미드, 및 메토클로프라미드를 포함하고 이로 제한되지 않는 항-오심제인 신경계 약물이 선택될 수 있다. 신경변성 질환에 대해, 성장 호르몬 또는 신경영양 인자인 신경계 약물이 선택될 수 있고; 그 예는 뇌-유도 신경영양 인자 (BDNF), 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-4/5, 섬유모세포 성장 인자 (FGF)-2 및 다른 FGF, 뉴로트로핀 (NT)-3, 에리쓰로포이에틴 (EPO), 간세포 성장 인자 (HGF), 표피 성장 인자 (EGF), 형질전환 성장 인자 (TGF)-알파, TGF-베타, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 인터류킨-1 수용체 길항제 (IL-1ra), 섬유 신경영양 인자 (CNTF), 아교세포-유도 신경영양 인자 (GDNF), 뉴르투린, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 헤레굴린, 뉴레굴린, 아르테민, 페르세핀, 인터류킨, 아교 세포주 유도 신경영양 인자 (GFR), 과립구-콜로니 자극 인자 (CSF), 과립구-대식세포-CSF, 네트린, 카디오트리핀-1, 헤지호그 (hedgehog), 백혈병 억제 인자 (LIF), 미드킨, 플레이오토로핀, 뼈 형태형성 단백질 (BMP), 네트린, 사포신, 세마포린, 및 줄기 세포 인자 (SCF)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0116] 암에 대해, 화학치료제인 신경계 약물이 선택될 수 있다. 화학치료제 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)<sup>®</sup> (시클로소포스파미드); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리에틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)<sup>®</sup>); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 베틀린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)<sup>®</sup> 포함), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)<sup>®</sup>), 아세틸캄프토테신, 스크폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도제레신, 카르제레신 및 비제레신 합성 유사체 포함); 포도필로독소; 포도필린산; 테니포시드; 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 둘라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘뤼테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디타이인; 스펀기스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레틸아민 옥시드 염산염, 멜파란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디와인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가1I (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디와인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아

드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사체, 예컨대 메토티렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스타탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테치미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메몰신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 마이탄시노이드, 예컨대 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토잔트론; 모피다물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로소잔트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당류 복합체 (제이에이치에스 내처럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 미국 오레곤주 유진)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안귀딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)® (파클리탁셀, 브리스톨-마이어스 스кви브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴저지주 프린스턴)), 아브락산(ABRAXANE)™ (파클리탁셀의 크로모포르부제 알부민-처리된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너즈, 미국 일리노이주 샬롬버그)) 및 탁소테레(TAXOTERE)® (독세탁셀, 롱-쁘랑 로러 (Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 안토니)); 클로람부실; 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)®); 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포아이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®); 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 및 상기 물질의 2 이상의 조합물, 예를 들어 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법의 약어인 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)을 사용한 치료 요법의 약어인 FOLFOX를 포함한다.

[0117] 또한, 상기 화학치료제의 정의에는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단, 또는 억제하는 작용을 하고 종종 전신, 또는 전체-신체 치료의 형태로 사용되는 항호르몬제가 포함된다. 예를 들어, 이들은 호르몬 자체일 수 있다. 그 예는 항에스트로겐, 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절물질 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)® 타목시펜 포함), 에비스타(EVISTA)® 람록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤(FARESTON)® 토레미펜); 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절자 (ERD); 난소를 억제하거나 기능을 차단하는 작용제, 예를 들어 황체화 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예컨대 류프롤라이드 아세테이트 (루프론(LUPRON)® 및 엘리가르드(ELIGARD)®), 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트립테렐린; 다른 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신선에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대 4(5)-이미다졸, 아미노글루테치미드, 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)®), 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)®), 포르메스탄, 파드로졸, 보로졸 (리비소르(RIVISOR)®), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®), 및 아나스트로졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)®)을 포함한다. 또한, 상기 화학치료제의 정의에는 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스타크(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드르네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)®), 팔미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 티루드로네이트(스켈리드(SKELID)®), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®); 및 트룩사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 연관되는 신호 전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대, PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예를 들어 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 박시드(VAXID)® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (루르토테칸(LURTOTECAN)®); rmRH (아바렐릭스(ABARELIX)®); 라파티닙 디토실레이트 (ErbB-2 및 GW572016으로도 알려진 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허



용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

- [0118] 암 치료 또는 예방을 위한 신경계 약물로서 선택될 수 있는 화합물의 또 다른 군은 항암 이뮤노글로불린 (트라스투주맙, 베바시주맙, 알렘투주맙, 세톡시맙, 겐투주맙 오조가미신, 이브리투모맙 티옥세탄, 파니투무맙 및 리톡시맙을 포함하고 이로 제한되지 않음)이다. 일부 경우에, 독성 표지와 함께 항체가 요구되는 세포 (즉, 암 세포)를 표적화하고 사멸시키기 위해 사용될 수 있고, 이것은 <sup>131</sup>I 방사성 표지가 있는 토시투모맙을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0119] 눈 질환 또는 장애에 대해, 항-혈관형성 눈 치료제 (즉, 베바시주맙, 라니비주맙 및 페갑타닙), 눈 녹내장 치료제 (즉, 카르바콜, 에피네프린, 데메카륨 브로마이드, 아프라클로니딘, 브리모니딘, 브린졸라미드, 레보부놀롤, 티몰롤, 베타솔롤, 도르졸라미드, 비마토프로스트, 카르테올롤, 메티프라놀롤, 디피베프린, 트라보프로스트 및 라타노프로스트), 탄산 탈수효소 억제제 (즉, 메타졸라미드 및 아세타졸라미드), 눈 항히스타민제 (즉, 나파졸린, 페닐에프린 및 테트라히드로졸린), 눈 윤활제, 눈 스테로이드 (즉, 플루오로메톨론, 프레드니솔론, 로테프 레드놀, 텍사메타손, 디플루프레드네이트, 리멕솔론, 플로오시놀론, 메드리손 및 트리암시놀론), 눈 마취제 (즉, 리도카인, 프로파라카인 및 테트라카인), 눈 항-감염제 (즉, 레보플록사신, 가티플록사신, 시프로플록사신, 목시플, 클로람페니콜, 바시트라신/폴리믹신 b, 술폰세타미드, 토브라마이신, 아지트로마이신, 베시플록사신, 노르플록사신, 술폰속사졸, 겐타미신, 이독수리딘, 에리스로마이신, 나타마이신, 그라미시딘, 네오마이신, 오플록사신, 트리플루리딘, 강시클로버, 비다라빈), 눈 소염제 (즉, 네파펜, 케토틀락, 플루르비프로펜, 수프로펜, 시클로스포린, 트리암시놀론, 디클로페낙 및 브롬페낙), 및 눈 항히스타민제 또는 충혈제거제 (즉, 케시토펴, 올로파타딘, 에피나스틴, 나파졸린, 크로몰린, 테트라히드로졸린, 페미롤라스트, 베포타스틴, 나파졸린, 페닐에프린, 네도크로밀, 로독사미드, 페닐에프린, 에메다스틴 및 아젤라스틴)인 신경계 약물이 선택될 수 있다.
- [0120] 발작 장애에 대해, 바르비투레이트 항경련제 (즉, 프리미돈, 메타르비탈, 메포바르비탈, 알로바르비탈, 아모바르비탈, 아프로바르비탈, 알페날, 바르비탈, 브랄로바르비탈 및 페노바르비탈), 벤조디아제핀 항경련제 (즉, 디아제팜, 클로나제팜, 및 로라제팜), 카르바메이트 항경련제 (즉, 펠바메이트), 탄산 탈수효소 억제제 항경련제 (즉, 아세타졸라미드, 토피라메이트 및 조니사미드), 디벤자제핀 항경련제 (즉, 루피나미드, 카르바마제핀, 및 옥스카르바제핀), 지방산 유도체 항경련제 (즉, 디발프로엑스 및 발프로산), 감마-아미노부티르산 유사체 (즉, 프레가발린, 가바펜틴 및 비가바트린), 감마-아미노부티르산 재흡수 억제제 (즉, 트리아가빈), 감마-아미노부티르산 트랜스아미나제 억제제 (즉, 비가바트린), 히단토인 항경련제 (즉, 페니토인, 에토틀로인, 포스페니토인 및 메페니토인), 다양한 항경련제 (즉, 라코사미드 및 황산마그네슘), 프로게스틴 (즉, 프로게스테론), 옥사졸리딘 디온 항경련제 (즉, 파라메타디온 및 트리메타디온), 피롤리딘 항경련제 (즉, 레베티라세탐), 숙신이미드 항경련제 (즉, 에토숙시미드 및 메토숙시미드), 트리아진 항경련제 (즉, 라모트리진), 및 우레아 항경련제 (즉, 페나세미드 및 페네투리드)를 포함하고 이로 제한되지 않는 항경련제 또는 항간질제인 신경계 약물이 선택될 수 있다.
- [0121] 리소좀 축적 질환에 대해, 질환에서 손상된 효소의 활성 그 자체이거나 또는 이를 모방하는 신경계 약물이 선택될 수 있다. 리소좀 축적 장애의 치료를 위한 예시적인 재조합 효소는 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0142141에 제시된 것 (즉, 알파-L-이두로니다제, 이두로네이트-2-술폰타제, N-술폰타제, 알파-N-아세틸글루코사미니다제, N-아세틸-갈락토사민-6-술폰타제, 베타-갈락토시다제, 아릴술폰타제 B, 베타-글루쿠로니다제, 산 알파-글루코시다제, 글루코세레브로시다제, 알파-갈락토시다제 A, 헥소사미니다제 A, 산 스펅고미엘리나제, 베타-갈락토세레브로시다제, 베타-갈락토시다제, 아릴술폰타제 A, 산 세라미다제, 아스파르트아실라제, 팔미토일-단백질 티오에스테라제 1 및 트리펩티딜 아미노 펩티다제 1)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0122] 아밀로이드증에 대해, 베타 세크레타제, 타우, 프레세닐린, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 일부, 아밀로이드 베타 펩티드 또는 그의 올리고머 또는 피브릴, 사멸 수용체 6 (DR6), 고도 당화 최종 생성물에 대한 수용체 (RAGE), 파르킨, 및 헌팅틴로부터 선택된 표적에 특이적으로 결합하는 항체 또는 다른 결합 분자 (소분자, 펩티드, 앵타머, 또는 다른 단백질 바인더를 포함하고 이로 제한되지 않음); 콜린에스테라제 억제제 (즉, 갈란타민, 도네페질, 리바스티그민 및 타크린); NMDA 수용체 길항제 (즉, 메만틴), 모노아민 제거제 (즉, 테트라베나진); 에르골로이드 메실레이트; 항콜린성 항파킨슨제 (즉, 프로시클리딘, 디펜히드라민, 트리헥실페니딜, 벤즈트로핀, 비페리덴 및 트리헥시페니딜); 도파민성 항파킨슨제 (즉, 엔타카폰, 셀레길린, 프라미펙솔, 브로모크립틴, 로티고틴, 셀레길린, 로피니롤, 라사길린, 아모포르핀, 카르비도파, 레보도파, 페르골리드, 톨카폰 및 아만타딘); 테트라베나진; 소염제 (비스테로이드성 소염 약물 (즉, 인도메타신 및 상기 나열한 다른 화합물)을 포

함하고 이로 제한되지 않음); 호르몬 (즉, 에스트로겐, 프로게스테론 및 류프롤라이드); 비타민 (즉, 폴레이트 및 니코틴아미드); 디메볼린; 호모타우린 (즉, 3-아미노프로판술폰산; 3 APS); 세로토닌 수용체 활성 조절물질 (즉, 잘리프로텐); 인터페론, 및 글루코코르티코이드를 포함하고 이로 제한되지 않는 신경계 약물이 선택될 수 있다.

[0123]

바이러스 또는 미생물 질환에 대해, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는 신경계 약물이 선택될 수 있다: 항바이러스 화합물 (아다만탄 항바이러스제 (즉, 리만타딘 및 아만타딘), 항바이러스 인터페론 (즉, peg인터페론 알파-2b), 케모킨 수용체 길항제 (즉, 마라비록), 인테그라제 가닥 전달 억제제 (즉, 랄테그라버), 뉴라미니다제 억제제 (즉, 오셀타미버 및 자나미버), 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제 (즉, 에파비렌즈, 에트라비린, 텔라비르딘 및 네비라핀), 뉴클레오시드 역전사효소 억제제 (테노포버, 아바카버, 라미부딘, 지도부딘, 스타부딘, 엔테카버, 엠트리시타빈, 아데포버, 잘시타빈, 텔비부딘 및 디다노신), 프로테아제 억제제 (즉, 다루나버, 아타자나버, 포삼프레나버, 티프라나버, 리토나버, 벨피나버, 암프레나버, 인디나버 및 사퀴나버), 퓨린 뉴클레오시드 (즉, 발라시클로버, 팜시클로버, 아시클로버, 리파비린, 강시클로버, 발강시클로버 및 시도포버), 및 다양한 항바이러스제 (즉, 에푸비르티드, 포스카르네트, 팔리비주맙 및 포미비르센)를 포함하고 이로 제한되지 않음), 항생제 (아미노페니실린 (즉, 아목시실린, 암피실린, 옥사실린, 나프실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플루록사실린, 테모실린, 아즐로실린, 카르베니실린, 티카르실린, 메즐로실린, 피페라실린 및 바캄피실린), 세팔로스포린 (즉, 세파졸린, 세팔렉신, 세팔로틴, 세파만돌, 세프트리악손, 세프트락심, 세프트독심, 세프타지덤, 세파드록실, 세프라딘, 포라카르베프, 세포테탄, 세푸록심, 세프프로질, 세파클로르, 및 세폭시틴), 카르바페넴/페넴 (즉, 이미페넴, 메로페넴, 에르타페넴, 파로페넴 및 도리페넴), 모노박탐 (즉, 아스트레오남, 티게모남, 노르카르디신 A 및 탐독시딘-베타-락탐, 또 다른 베타-락탐 항생제와 조합된 베타-락타마제 억제제 (즉, 클라불라닌산, 타조박탐 및 술박탐), 아미노글리코시드 (즉, 아미카신, 겐타미신, 카나마이신, 네오마이신, 네틸미신, 스트렙토마이신, 토브라마이신, 및 파로모마이신), 안사마이신 (즉, 겐다나마이신 및 헤르비마이신), 카르바세뎴 (즉, 로라카르베프), 당펩티드 (즉, 테이코플라닌 및 반코마이신), 마크롤리드 (즉, 아지쓰로마이신, 클라리쓰로마이신, 디리쓰로마이신, 에리쓰로마이신, 록시쓰로마이신, 트롤레안도마이신, 텔리쓰로마이신 및 스펙티노마이신), 모노박탐 (즉, 아스트레오남), 퀴놀론 (즉, 시프로플록사신, 에녹사신, 가티플록사신, 레보플록사신, 로메플록사신, 목시플록사신, 노르플록사신, 오픈플록사신, 트로파플록사신, 그레코플록사신, 스파르플록사신 및 테마플록사신), 술폰아미드 (즉, 마페니드, 술폰아미도크리소이딘, 술폰세타미드, 술폰디아진, 술폰메티졸, 술폰닐아미드, 술폰살라진, 술폰속사졸, 트리메토프림, 트리메토프림 및 술폰메톡사졸), 테트라사이클린 (즉, 테트라사이클린, 데메클로사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린 및 옥시테트라사이클린), 항진생 또는 세포독성 항생제 (즉, 독소루비신, 미토잔트론, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 에피루비신, 이다루비신, 플리카마이신, 미토마이신, 펜토스타틴 및 발루비신) 및 다양한 항균 화합물 (즉, 바시트라신, 콜리스틴 및 폴리믹신 B)를 포함하고 이로 제한되지 않음), 항진균제 (즉, 메트로니다졸, 니타족사니드, 이미다졸, 클로로퀸, 요오도퀴놀 및 파로모마이신), 및 구충제 (퀴닌, 클로로퀸, 아모디아퀸, 피리메타민, 술폰독신, 프로구아닐, 메플로퀸, 아토바쿠온, 프리마퀸, 아르테메시닌, 할로판트린, 독시사이클린, 클린다마이신, 메벤다졸, 피란텔 파모에이트, 티아벤다졸, 디에틸카르바마진, 이베르멕틴, 리팜핀, 암포테리신 B, 벨라르소프롤, 에포르니틴 및 알벤다졸을 포함하고 이로 제한되지 않음).

[0124]

허혈에 대해, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는 신경계 약물이 선택될 수 있다: 혈전용해제 (즉, 유로키나제, 알테플라제, 레테플라제 및 테넥테플라제), 혈소판 응집 억제제 (즉, 아스피린, 실로스타졸, 클로피도그렐, 프라수그렐 및 디피리다몰), 스타틴 (즉, 로바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 로수바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 세리바스타틴 및 피타바스타틴), 및 혈류 또는 혈관 탄력성을 개선하는 화합물, 예를 들어, 혈압약.

[0125]

행동 장애에 대해, 신경계 약물은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는 행동 조절 화합물로부터 선택될 수 있다: 비정형적인 항정신병제 (즉, 리스페리돈, 올란자핀, 아프리피프라졸, 퀘티아핀, 팔리페리돈, 아세나핀, 클로자핀, 일로페리돈 및 지프라스돈), 페노티아진 항정신병제 (즉, 프로클로르페라진, 클로르프로마진, 플루페나진, 페페나진, 트리플루오페라진, 티오리다진 및 메소리다진), 티옥산텐 (즉, 티오티센), 다양한 항정신병제 (즉, 피모지드, 리튬, 몰리돈, 할로페리돌 및 록사핀), 선택적인 세로토닌 재흡수 억제제 (즉, 시탈로프람, 에스시탈로프람, 파록세틴, 플루옥세틴 및 세르트랄린), 세로토닌-노르에피레프린 재흡수 억제제 (즉, 돌록세틴, 벤라팍신, 데스벤라팍신, 삼환계 항우울제 (즉, 독세핀, 클로미프라민, 아목사핀, 노르트립틸린, 아미트립틸린, 트리미프라민, 이미프라민, 프로트립틸린 및 데시프라아민), 삼환계 항우울제 (즉, 미르타자핀 및 마프롤린), 페닐피페라진 항우울제 (즉, 트라조돈 및 네파조돈), 모노아민 옥시다제 억제제 (즉, 이소카르복사지드, 페넬진, 셀레길린 및 트라닐시프로민), 벤조디아제핀 (즉, 알프라졸람, 에스타졸람, 플루라젠탐, 클로나제팜,



로라제팜 및 디아제팜), 노르에피레프린-도파민 재흡수 억제제 (즉, 부프로피온), CNS 자극제 (즉, 펜테르민, 디에틸프로피온, 메탐페타민, 텍스트로amphetamine, amphetamine, 메틸페니데이트, 텍스메틸페니데이트, 리스텍스amphetamine, 모다피닐, 페몰린, 펜디메트라진, 벤즈페타민, 펜디메트라진, 아르모다피닐, 디에틸프로피온, 카페인, 아토목세틴, 독사프람, 및 마진돌), 항불안제/진정제/수면제 (바르비투레이트 (즉, 세코바르비탈, 페노바르비탈 및 메포바르비탈), 벤조디아제핀 (상기 설명된 바와 같은), 및 다양한 항불안제/진정제/수면제 (즉, 디펜히드라민, 나트륨 옥시베이트, 잘레플론, 히드록시진, 클로랄 히드레이트, 아올피렘, 부스피론, 독세핀, 에스조피클론, 라멜테온, 메프로바메이트 및 에트클로르비놀)를 포함하고 이로 제한되지 않음), 세크레틴 (예를 들어, 문헌 [Ratliff-Schaub et al. *Autism* 9: 256-265 (2005)] 참조), 오피오이드 펩티드 (예를 들어, 문헌 [Cowen et al., *J. Neurochem.* 89:273-285 (2004)] 참조), 및 신경펩티드 (예를 들어, 문헌 [Hethwa et al. *Am. J. Physiol.* 289: E301-305 (2005)] 참조).

- [0126] CNS 염증에 대해, 염증 자체를 다루는 (즉, 비스테로이드성 소염제, 예컨대 이부프로펜 또는 나프록센), 또는 염증의 근본적인 원인을 처리하는 (즉, 항바이러스제 또는 항암제) 신경계 약물이 선택될 수 있다.
- [0127] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, "커플링"은 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체)를 생성함으로써 달성된다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체는 BBB-R에 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 뇌 항원에 결합하는 제2 항원 결합 부위, 예컨대 베타-세크레타제 1 (BACE1) 또는 A베타, 및 본원에 개시된 다른 뇌 항원을 포함한다.
- [0128] 상기 다중특이적/이중특이적 항체에 의해 결합되는 예시적인 뇌 항원은 BACE1이고, 이에 결합하는 예시적인 항체는 본원에서 도 5a-b에 제시된 YW412.8.31 항체이다.
- [0129] 또 다른 실시양태에서, 뇌 항원은 A베타이고, 예시적인 상기 항체는 명백하게 본원에 참고로 포함시킨 WO2007068412, WO2008011348, WO20080156622, 및 WO2008156621에 기재된 것이고, 예시적인 A베타 항체는 각각 도 7a 및 7b에 제시된 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 IgG4 MABT5102A 항체를 포함한다.
- [0130] 다중특이적 항체의 제조를 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄쌍의 재조합 동시-발현 ([Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)], WO 93/08829, 및 [Trauneker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "뿔-인-홀 (knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다중-특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 조종 (steering) 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2 이상의 항체 또는 단편의 가교결합 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 [Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)] 참조); 이중 특이적 항체의 생산을 위한 류신 지퍼 (zipper)의 사용 (예를 들어, [Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 "디아바디" 기술의 사용 (예를 들어, [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용 (예를 들어, [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)]에 기재된 삼중특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다.
- [0131] "옥토퍼스 (Octopus) 항체" 또는 "이중-가변 도메인 이뮤노글로불린" (DVD)을 포함하는, 3개 이상 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체도 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1, 및 문헌 [Wu et al. *Nature Biotechnology* (2007)] 참조).
- [0132] 항체 또는 단편은 본원에서 또한 BBB-R (예를 들어 TfR) 및 뇌 항원 (예를 들어 BACE1)에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어 US 2008/0069820 참조).
- [0133] 한 실시양태에서, 항체는 항체 단편이고, 다양한 상기 단편이 위에 개시되어 있다.
- [0134] 또 다른 실시양태에서, 항체는 무손상 또는 전장 항체이다. 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 무손상 항체는 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 무손상 항체의 5개의 주요 클래스 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위클래스 (이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다. 항체의 상이한 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 및  $\mu$  로 불린다. 이뮤노글로불린의 상이한 클래스의 하위 단위 구조 및 3차원 입체형태는 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 무손상 항체에는 이펙터 기능이 결여된다.
- [0135] 항체의 생성 기술은 알려져 있고, 그 예는 본원 명세서의 상기 정의 섹션에서 제시되어 있다. 한 실시양태에서, 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.

- [0136] BBB-R에 대한 항체의 결합을 결정하기 위해 다양한 기술이 이용가능하다. 하나의 상기 검정은 인간 BBB-R (및 뇌 항원)에 결합하는 능력을 확인하기 위한 효소 연결 면역흡착 검정 (ELISA)이다. 상기 검정에 따라, 항원 (예를 들어 재조합 sBBB-R)을 코팅한 플레이트를 항-BBB-R 항체를 포함하는 샘플과 함께 인큐베이션하고, 항체의 관심있는 항원에 대한 결합을 결정한다.
- [0137] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 예를 들어 공지의 방법, 예컨대 ELISA, 웨스턴 블롯 (Western blot) 등에 의해 그의 항원 결합 활성에 대해 시험된다.
- [0138] 전신 투여된 항체의 흡수 및 항체의 다른 생물학적 활성을 평가하기 위한 분석은 실시예에서 논의되는 바와 같이 또는 관심있는 항-뇌 항원 항체에 대해 공지된 바와 같이 수행할 수 있다.
- [0139] 다중특이적 항체가 BACE1에 결합하는 예시적인 검정을 이제 설명한다.
- [0140] BACE1에 대한 결합을 위해 본원에서 설명되는 임의의 항체 또는 Fab, 예를 들어 YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10과 경쟁하는 항체를 확인하기 위해 경쟁 검정을 사용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 그러한 경쟁 항체는 본원에서 설명되는 임의의 항체 또는 Fab, 예를 들어, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10과 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑 (mapping)하기 위한 상세한 예시적인 방법은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제시되어 있다.
- [0141] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정된 BACE1을 BACE1에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10) 및 BACE1에 대한 결합을 위해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험되는 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 내에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 BACE1은 제2 비표지된 항체가 아니라 제1 표지된 항체를 포함하는 용액 내에서 인큐베이션된다. BACE1에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후, 과량의 미결합 항체를 제거하고, 고정된 BACE1과 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 BACE1과 회합된 표지의 양이 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소하면, 이것은 제2 항체가 BACE1에 대한 결합을 위해 제1 항체와 경쟁함을 나타낸다. 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.
- [0142] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-BACE1 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 BACE1 아스파르트릴 프로테아제 활성의 억제체를 포함할 수 있다. 또한, 예를 들어 균일한 시간차 (time-resolved) 형광 HTRF 검정 또는 합성 기질 펩티드를 사용한 미세유동 (microfluidic) 모세관 전기영동 (MCE) 검정에 의해, 또는 BACE1 기질, 예컨대 APP를 발현하는 세포주에서 생체 내에서 평가할 때 생체 내 및/또는 시험관 내에서 상기 생물학적 활성을 갖는 항체가 제공된다.
- [0143] 항체 (다중특이적 항체 포함)는 본원에서 임의로 그의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 서열로 형질전환된 숙주 세포에서 재조합 방식으로 생산된다 (예를 들어, 여기서 숙주 세포는 그 내에 핵산을 갖는 하나 이상의 벡터로 형질전환되었다). 숙주 세포는 임의로 포유동물 세포, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.
- [0144] **III. 제약 제제**
- [0145] 본 발명에 따라 사용되는 항체의 제약 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 항체를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 동결 건조된 제제 또는 수용액의 형태로 혼합함으로써 저장을 위해 제조된다. 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메치오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 핵사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤;카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저 분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 포도당, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온 계면활성제, 예컨대 트윈™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

- [0146] 제제는 본원에서 또한 필요한 하나 초과와 활성 화합물, 임의로 서로 유해한 영향을 주지 않는 보완 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 상기 의약의 종류 및 유효량은 예를 들어 제제에 존재하는 항체의 양, 및 대상체의 임상 파라미터에 따라 결정된다. 예시적인 상기 의약은 아래 논의되어 있다.
- [0147] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 미세캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미세캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에 또는 마크로에멀전에 봉입될 수 있다. 상기 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.
- [0148] 지속 방출 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 성형품, 예를 들어 필름 또는 미세캡슐의 형태로 존재하는, 항체 함유 고상 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락타이드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포(LUPRON DEPOT)<sup>TM</sup> (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주사가능 미세구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.
- [0149] 생체 내 투여를 위해 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.
- [0150] 한 실시양태에서, 제제는 등장성이다.
- [0151] **IV. 항-BBB-R 항체의 치료 용도**
- [0152] 항-BBB-R 항체 (그를 포함하는 다중특이적 항체 포함)는 다양한 생체 내 방법에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 항체가 그에 커플링된 치료 화합물을 BBB를 가로질러 수송하도록, 치료 화합물에 커플링된 항-BBB-R 항체 (예를 들어 BBB-R 및 뇌 항원 둘 모두에 결합하는 다중특이적 항체)를 BBB에 노출시키는 것을 포함하는, 치료 화합물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하는 방법을 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 항체가 그에 커플링된 신경계 장애 약물을 BBB를 가로질러 수송하도록, 뇌 장애 약물에 커플링된 항-BBB-R 항체 (예를 들어 BBB-R 및 뇌 항원 둘 모두에 결합하는 다중특이적 항체)를 BBB에 노출시키는 것을 포함하는, 신경계 장애 약물을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, BBB는 본원에서 포유동물 (예를 들어 인간), 예를 들어 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는 신경계 장애가 있는 포유동물에 존재한다: 알츠하이머 질환 (AD), 뇌졸중, 치매, 근이영양증 (MD), 다발 경화증 (MS), 근위축 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 엔젤만 증후군, 리들 증후군, 파킨슨 질환, 피크 질환, 파제트 질환, 암, 외상성 뇌 손상 등.
- [0153] 한 실시양태에서, 신경계 장애는 다음으로부터 선택된다: 신경병증, 아밀로이드증, 암 (예를 들어, CNS 또는 뇌와 연관된), 눈 질환 또는 장애, 바이러스 또는 미생물 감염, 염증 (예를 들어, CNS 또는 뇌의), 허혈, 신경변성 질환, 발작, 행동 장애, 리소좀 축적 질환 등.
- [0154] 신경병증 장애는 부적절한 또는 비제어된 신경 신호전달 또는 그의 결여를 특징으로 하는 신경계 질환 또는 이상이며, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 만성 통증 (통각성 통증 포함), 신체 조직에 대한 손상에 의해 야기되는 통증, 예를 들어 암-관련 통증, 신경병증성 통증 (신경, 척수, 또는 뇌의 이상에 의해 야기되는 통증), 및 심인성 통증 (전부 또는 대부분 정신적인 장애에 관련된), 두통, 편두통, 신경병증, 및 종종 상기 신경병증 장애에 동반되는 증상 및 증후군, 예컨대 현기증 또는 오심.
- [0155] 아밀로이드증은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는, CNS 내의 세포외 단백질 침착과 연관된 일군의 질환 및 장애이다: 속발성 아밀로이드증, 연령 관련 아밀로이드증, 알츠하이머 질환 (AD), 경도 인지 장애 (MCI), 루이 소체 치매, 다운 (Down) 증후군, 아밀로이드증이 있는 유전성 뇌출혈 (더치 (Dutch) 타입); 괄 (Guam) 파킨슨-치매 복합체, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 헌팅턴 질환, 진행성 핵상 마비, 다발 경화증; 크로이츠펠트-야콥 질환, 파킨슨 질환, 전염성 해면상 뇌병증, HIV-관련 치매, 근위축 측삭 경화증 (ALS), 봉입체 근염 (IBM), 및 베타-아밀로이드 침착 관련 눈 질환 (즉, 황반 변성, 드루젠 (drusen)-관련 시각 신경병증, 및 백내장).
- [0156] CNS의 암은 하나 이상의 CNS 세포 (즉, 신경 세포)의 이상 증식을 특징으로 하며, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 신경아교종, 다형성 아교모세포종, 수막종, 성상세포종, 청신경종, 연골종, 희소돌기아교세포종, 수모세포종, 신경절 신경아교종, 신경초종, 신경섬유종, 신경모세포종, 및 경막외, 골수내 또는 경막내 종양.

- [0157] 눈 질환 또는 장애는 본원의 목적을 위해 BBB에 적용되는 CNS 장기로 간주되는 눈의 질환 또는 장애이다. 눈 질환 또는 장애는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 공막, 각막, 홍채 및 모양체의 장애 (즉, 공막염, 각막염, 각막 궤양, 각막 찰과상, 실명, 광각막염, 티제슨 (Thygeson)의 표층 점상 각막병증, 각막 신생혈관 증식, 폭스 (Fuchs) 이영양증, 원추각막, 건성 각결막염, 홍채염 및 포도막염), 수정체의 장애 (즉, 백내장), 맥락막 및 망막의 장애 (즉, 망막 박리, 망막 층간 분리, 고혈압 망막병증, 당뇨 망막병증, 망막병증, 미숙아 망막병증, 연령 관련 황반 변성, 황반 변성 (습식 또는 건식), 망막전막, 색소성 망막염 및 황반 부종), 녹내장, 부유물, 시신경 및 시각 경로의 장애 (즉, 레버 (Leber)의 유전성 시각 신경병증 및 시신경 유도 드루젠), 눈 근육/양안 운동 조절/굴절의 장애 (즉, 사시, 안구운동 마비, 진행성 외 안근마비, 내사시, 외사시, 원시, 근시, 난시, 부동시, 노안 및 안근마비), 시각 장애 및 실명 (즉, 약시, 레버의 선천적 흑내장, 암점, 색맹, 색맹증, 야맹증, 실명, 강변 실명증 및 미소 안염/결손), 충혈안, 아르길로버트슨 (Argyll Robertson) 홍채, 각막 사상균증, 안구건조증 및 무홍채증.
- [0158] CNS의 바이러스 또는 미생물 감염은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 급성 또는 만성일 수 있는, 수막염, 뇌염, 척수염, 혈관염 및 농양을 포함하고 이로 제한되지 않는 CNS 병리생리학을 야기하는, 바이러스 (즉, 인플루엔자, HIV, 폴리오바이러스, 풍진), 세균 (즉, 네이세리아 (*Neisseria*) 종, 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 종, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종, 프로테우스 (*Proteus*) 종, 이. 콜라이 (*E. coli*), 에스. 아우레우스 (*S. aureus*), 뉴모코커스 (*Pneumococcus*) 종, 메닝고코커스 (*Meningococcus*) 종, 헤모필루스 (*Haemophilus*) 종, 및 미코박테리움 튜베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*)) 및 다른 미생물, 예컨대 진균 (즉, 효모, 크립토코커스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*)), 기생충 (즉, 톡소플라스마 곤디아 (*Toxoplasma gondii*) 또는 아메바의 감염.
- [0159] CNS의 염증은 물리적 손상 (즉, 사고, 수술, 뇌 외상, 척수 손상, 뇌진탕에 의한) 또는 CNS의 하나 이상의 다른 질환 또는 장애 (즉, 농양, 압, 바이러스 또는 미생물 감염)에 의한 또는 이와 관련된 손상일 수 있는 CNS에 대한 손상에 의해 야기되는 염증이다.
- [0160] CNS의 허혈은 본원에서 사용되는 바와 같이, 뇌에서 이상 혈류 또는 혈관 거동에 관한 일군의 장애 또는 그의 원인을 의미하며, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 소상성 뇌 허혈, 전체적 뇌 허혈, 뇌졸중 (즉, 지주막하 출혈 및 뇌내 출혈), 및 동맥류.
- [0161] 신경변성 질환은 CNS의 신경 세포 기능 상실 또는 사멸과 연관된 일군의 질환 및 장애이며, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 부신백질 이영양증, 알렉산더 질환, 알퍼 (Alper) 질환, 근위축 측삭 경화증, 모세혈관 확장성 운동실조증, 바텐 (Batten) 질환, 코케인 증후군, 피질기저 변성, 아밀로이드증에 의해 야기되거나 이와 연관된 변성, 프리드리히 (Friedreich) 운동실조증, 전측두엽 변성, 케네디 (Kennedy) 질환, 다계통 위축, 다발 경화증, 원발성 측삭 경화증, 진행성 상기 핵상 마비, 척수성 근위축, 횡단성 척수염, 레프섬 (Refsum) 질환, 및 척수소뇌성 실조증.
- [0162] CNS의 발작 질환 및 장애는 CNS의 부적절한 및/또는 비정상적 전기 전도를 수반하며, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 간질 (즉, 소발작, 무긴장성 발작, 양성 롤란드 (Rolandic) 간질, 유아기 결여, 간대성 발작, 복합 부분 발작, 전두엽 간질, 열성 발작, 영아 연축, 연소성 근 간대성 간질, 연소성 결여 간질, 레녹스-가스타우트 (Lennox-Gastaut) 증후군, 란다우-클레프너 (Landau-Kleffner) 증후군, 드라베트 (Dravet) 증후군, 오타하라 (Ohtahara) 증후군, 웨스트 (West) 증후군, 근 간대성 발작, 미토콘드리아 장애, 진행성 근 간대성 간질, 심인성 발작, 반사 간질, 라스무센 (Rasmussen) 증후군, 단순 부분 발작, 2차성 전신 발작, 측두엽 간질, 긴장성 간대성 발작, 긴장성 발작, 정신운동성 발작, 변연계 간질, 부분적 발병 발작, 전신적 발병 발작, 간질 지속 증, 복부 간질, 무동성 발작, 자율신경성 발작, 양측성 간대성 근경련, 월경 간질, 적하 발작, 감정적 발작, 초점성 발작, 폭소 발작, 잭슨 행진 (Jacksonian March), 라포라 (Lafora) 질환, 운동 발작, 다초점성 발작, 야간 발작, 광민감성 발작, 가성 발작, 감각 발작, 미세 발작, 실반 (sylvan) 발작, 금단 발작, 및 시각 반사 발작).
- [0163] 행동 장애는 고통받는 대상체에 의한 이상 행동을 특징으로 하는 CNS의 장애이며, 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 수면 장애 (즉, 불면증, 반응소실증, 야경증, 24시간 주기 리듬 수면 장애, 및 기면증), 기분 장애 (즉, 우울증, 자살충동을 느끼는 우울증, 불안증, 만성 정동 장애, 공포증, 공황 발작, 강박 장애, 주의력 결핍 과다행동 장애 (ADHD), 주의력 결핍 장애 (ADD), 만성 피로 증후군, 광장공포증, 외상후 스트레스 장애, 조울증), 식이 장애 (즉, 거식증 또는 과식증), 정신병, 발달 행동 장애 (즉, 자폐증, 레트 (Rett) 증후군, 아스퍼거 (Asperger)의 증후군), 인격 장애 및 정신병적 장애 (즉, 정신분열병, 망상 장애 등).



- [0164] 리소좀 축적 장애는 일부의 환자에서 CNS와 연관되거나 CNS-특이적 증상을 갖는 대사 장애이며; 상기 장애는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 테이-삭스 (Tay-Sachs) 질환, 고세 (Gaucher) 질환, 파브리 (Fabry) 질환, 점액다당류증 (타입 I, II, III, IV, V, VI 및 VII), 글리코겐 축적 질환, GM1-강글리오시드증, 이염성 백질 이영양증, 파버 (Farber) 질환, 카나반의 백질 이영양증, 및 뉴런 세로이드 지방갈색소증 타입 1 및 2, 니만-피크 (Niemann-Pick) 질환, 폼페 (Pompe) 질환, 및 크라베 (Krabbe)의 질환.
- [0165] 한 측면에서, 항체는 증상의 발생 전에 신경계 장애를 검출하기 위해 및/또는 질환 또는 장애의 중증도 또는 지속 기간을 평가하기 위해 사용된다. 한 측면에서, 항체는 방사선 촬영, 단층 촬영, 또는 자기 공명 영상화 (MRI)에 의한 영상화를 포함하는 신경계 장애의 검출 및/또는 영상화를 허용한다.
- [0166] 한 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한 저친화도 항-BBB-R 항체를 제공한다. 추가의 측면에서, 신경계 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한 저친화도 항-BBB-R 항체가 제공된다 (예를 들어, 알츠하이머 질환). 특정 실시양태에서, 치료 방법에 사용하기 위한 저친화도 항-BBB-R 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-BBB-R 항체 (신경계 장애 약물에 임의로 커플링된)를 투여하는 것을 포함하는, 신경계 질환 또는 장애가 있는 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 저친화도 항-BBB-R 항체를 제공한다. 하나의 상기 실시양태에서, 방법은 개체에게 유효량의 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 신경계 질환 또는 장애 (예를 들어, 알츠하이머 질환)의 위험이 있거나 이로 고통 받는 환자에서 아밀로이드 플라크 형성을 감소 또는 억제하는데 사용하기 위한 항-BBB-R 항체를 제공한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 임의로 인간이다. 특정 측면에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항-BBB-R 항체는 그 항체가 커플링된 신경계 장애 약물의 흡수를 개선한다.
- [0167] 추가의 측면에서, 본 발명은 의약의 제조 또는 제제에서 저친화도 항-BBB-R 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 신경계 질환 또는 장애의 치료를 위한 것이다. 추가의 실시양태에서, 의약은 신경계 질환 또는 장애가 있는 개체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는 신경계 질환 또는 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 것이다. 하나의 상기 실시양태에서, 방법은 개체에게 유효량의 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0168] 추가의 측면에서, 본 발명은 알츠하이머 질환의 치료 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 알츠하이머 질환이 있는 개체에게 BACE1 및 TIR 둘 모두에 결합하는 유효량의 다중특이적 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 상기 실시양태에서, 방법은 개체에게 유효량의 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.
- [0169] 본 발명의 항-BBB-R 항체는 요법에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-BBB-R 항체는 적어도 하나의 추가의 치료제와 동시-투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 항-BBB-R 항체가 치료를 위해 사용되는 것과 동일한 또는 상이한 신경계 장애의 치료에 효과적인 치료제이다. 예시적인 추가의 치료제는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 상기한 다양한 신경계 약물, 콜린에스테라제 억제제 (예컨대 도네페질, 갈란타민, 로바스티그민 및 타크린), NMDA 수용체 길항제 (예컨대 메만틴), 아밀로이드 베타 펩티드 응집 억제제, 항산화제,  $\gamma$ -세크레타제 조절물질, 신경 성장 인자 (NGF) 모방체 (mimic) 또는 NGF 유전자 요법제, PPAR  $\gamma$  효능제, HMS-CoA 환원효소 억제제 (스타틴), 암파킨, 칼슘 채널 차단제, GABA 수용체 길항제, 글리코겐 합성효소 키나제 억제제, 정맥내 이뮤노글로불린, 무스카린성 (muscarinic) 수용체 효능제, 니코틴 수용체 조절물질, 능동 또는 수동 아밀로이드 베타 펩티드 면역화, 포스포디에스테라제 억제제, 세로토닌 수용체 길항제 및 항-아밀로이드 베타 펩티드 항체. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 치료제는 신경계 약물의 하나 이상의 부작용을 완화하는 그의 능력에 대해 선택된다.
- [0170] 상기 언급된 조합 요법은 조합 투여 (2 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 제제에 포함됨), 및 본 발명의 항체가 추가의 치료제 및/또는 아주반트 (adjuvant)의 투여 전, 투여와 동시에, 및/또는 투여 후에 투여될 수 있는 별개의 투여를 포함한다. 또한, 본 발명의 항체는 방사선 요법, 행동 요법, 또는 치료 또는 예방되는 신경계 장애에 대해 당업계에 공지되고 적절한 다른 요법을 포함하고 이로 제한되지 않는 다른 증제 요법과 조합되어 사용될 수 있다.
- [0171] 본 발명의 항-BBB-R 항체 (및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내, 및 비내, 및 국소 처리가 요구될 경우 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여할 수 있다. 비경구 주입은 근내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 부분적으로는 투여가 짧은지 또는 장시간에 걸치는 것인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의해 실시될 수 있다. 다양한 시점에 걸친 단일 또는 다수 투여, 볼러스 (bolus) 투여, 및 펄스 주입을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 투여 스케

질이 본원에서 고려된다.

[0172] 항체 또는 그의 단편을 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하는 지질-기반 방법은 혈액-뇌 장벽의 혈관 내피 상의 수용체에 결합하는 항체 결합 단편에 커플링되는 리포솜 내에 항체 또는 그의 단편의 캡슐화 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20020025313 참조), 및 저밀도 지질단백질 입자 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20040204354 참조) 또는 아포지질단백질 E (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20040131692 참조)를 사용한 항체 또는 그의 활성 단편의 코팅을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0173] 본 발명의 항체는 우수 의료 실무에 일치하는 방식으로 제제화, 투약, 및 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료되는 특정 장애, 치료되는 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의사에게 알려진 다른 인자를 포함한다. 항체는 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로 논의되는 장애의 예방 또는 치료를 위해 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 상기 다른 작용제의 유효량은 제제에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 종류, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 결정된다. 이들은 일반적으로 본원에 설명된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 설명된 투여량의 약 1 내지 99%, 또는 적절한 것으로 경험적으로/임상적으로 결정된 임의의 투여량 및 임의의 경로에 의해 사용된다.

[0174] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합하여 사용될 때)은 치료되는 질환의 종류, 질환의 중증도 및 과정, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 이전에 시행된 요법, 환자의 임상력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 결정될 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐서 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 종류 및 중증도에 따라, 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 15  $\text{mg}/\text{kg}$  (예를 들어 0.1  $\text{mg}/\text{kg}$  - 10  $\text{mg}/\text{kg}$ )의 항체가 예를 들어 하나 이상의 별개의 투여에 의한 것인지, 또는 연속 주입에 의한 것인지 상관없이 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 하나의 일반적인 1일 투여량은 상기 언급한 인자에 따라 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 100  $\text{mg}/\text{kg}$  또는 그 초과 범위일 수 있다. 수일 또는 그보다 긴 기간 동안에 걸친 반복 투여를 위해, 병태에 따라, 치료는 일반적으로 질환 증상의 요구되는 역제가 발생할 때까지 지속될 것이다. 항체의 한 예시적인 투여량은 약 0.05  $\text{mg}/\text{kg}$  내지 약 10  $\text{mg}/\text{kg}$ 의 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5  $\text{mg}/\text{kg}$ , 2.0  $\text{mg}/\text{kg}$ , 4.0  $\text{mg}/\text{kg}$  또는 10  $\text{mg}/\text{kg}$  (또는 이들의 임의의 조합)의 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 상기 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 (예를 들어 환자에게 약 2 내지 약 20, 또는 예를 들어 약 6 용량의 항체가 투여되도록) 투여될 수 있다. 초기의 보다 높은 로딩 용량에 이어서 하나 이상의 보다 적은 용량이 투여될 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 상기 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링될 수 있다.

[0175] 임의의 상기 제제 또는 치료 방법은 항-BBB-R 항체 대신에 또는 이에 추가로 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행할 수 있음이 이해된다.

[0176] **V. 제조품**

[0177] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기한 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 포함하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 (syringe), IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 그 단독인 또는 병태의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 또 다른 조성물과 조합된 조성물을 보유하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통가능한 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 병태의 치료에 사용됨을 나타낸다. 또한, 제조품은 (a) 본 발명의 항체를 포함하는 조성물이 그 안에 존재하는 제1 용기; 및 (b) 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물이 그 안에 존재하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시양태에서 제조품은 조성물이 특정 병태의 치료를 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 별법으로, 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예를 들어 주사용 정균수 (BWF1), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 상업적인 관점 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.

[0178] 임의의 상기 제조품은 항-BBB-R 항체 대신에 또는 이에 추가로 본 발명의 면역접합체를 포함할 수 있음이 이해된다.

[0179] 제조품은 임의로 대상체에서 신경계 장애의 치료를 위한 설명서와 함께 포장 삽입물을 추가로 포함하고, 여기서 설명서는 본원에 개시된 항체를 사용한 치료가 신경계 장애를 치료함을 나타내고, 임의로 항체가 BBB-R에 대한 그의 저친화도 때문에 BBB를 가로지르는 개선된 흡수를 보임을 나타낸다.

[0180] **III. 실시예**

[0181] 본 실시예는 홀로-트랜스페린 복합체를 통해 뇌 내로 철 수송을 매개하는 트랜스페린 수용체 (TfR)를 평가하였다 (Skarlatos et al. Brain Res 683: 164-171 (1995)). TfR에 결합하는 내인성 트랜스페린과 경쟁하지 않는 인간 키메라 항-뮤린 트랜스페린 수용체 (항-TfR<sup>A</sup>) 항체를 야생형 마우스 뇌에서 흡수에 대해 이중-표지된 실험에서 인간 대조군 IgG와 비교하였다. 단일 미량 용량 (약 50 µg/kg)의 [<sup>131</sup>I]항-TfR<sup>A</sup> 및 [<sup>125</sup>I]대조군 IgG를 야생형 마우스 내에 정맥내 (i.v.) 주사하고, 뇌 흡수를 5분, 0.5, 1, 4, 24, 48, 및 72시간에 측정하였다. 뇌의 그램당 주사한 용량의 백분율로서 측정된 뇌 내의 [<sup>131</sup>I]항-TfR<sup>A</sup> 흡수의 유의한 증가가 모든 시점에 관찰되었다 (도 1a). 그의 피크에서, 주사의 1시간 후에, [<sup>125</sup>I]대조군 IgG에 비해 [<sup>131</sup>I]항-TfR<sup>A</sup> 뇌 축적에서 >11배 차이가 존재하였다 (n=6). 비표지된 항-TfR<sup>A</sup> (4 mg/kg 체중)을 또한 동시-투여하면, [<sup>131</sup>I]항-TfR<sup>A</sup>의 뇌 축적은 거의 대조군 IgG의 수준으로 감소하였고, 이것은 특이적인 표적-구동된 흡수를 나타낸다.

[0182] 뇌 내의 유의한 항체 흡수가 치료 용량 수준에서 또한 일어나는지 여부를 평가하기 위해, 야생형 마우스에게 항-TfR<sup>A</sup> 또는 대조 IgG를 20 mg/kg로 정맥내 (i.v.) 투여하였다. 피질 및 혈청 내의 인간 항체 농도를 인간 Fc 샌드위치 ELISA를 이용하여 주사 1 및 24시간 후에 결정하였다. 간단히 설명하면, 투여의 지시된 시간 후에, 마우스를 D-PBS로 2 ml/min의 속도로 8분 동안 관류시켰다. 뇌를 추출하고, 피질 및 해마를 단리하고, 완전 미니 EDTA-비함유 프로테아제 억제제 카테일 정제 (로슈 다이아그노스틱스 (Roche Diagnostics))을 함유하는 PBS 내에서 1% NP-40 (칼-바이오켄 (Cal-Biochem)) 내에 균질화시켰다. 균질화시킨 뇌 샘플을 4°C에서 1시간 동안 회전시킨 후, 14,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 뇌 항체 측정을 위해 상청액을 단리하였다. 관류 전에 전체 혈액을 혈청 분리기 마이크로테이너 튜브 (비디 다이아그노스틱스) 내에 수집하고, 적어도 30분 동안 응고시키고, 5,000 x g에서 90초 동안 원심분리하였다. 혈청 항체 측정을 위해 상청액을 단리하였다. 마우스 혈청 및 뇌 샘플 내의 항체 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 닝크 (NUNC) 384-웰 맥시소프 면역플레이트 (미국 뉴저지주 벵툼)를 당나귀 항-인간 IgG, Fc 단편-특이적 폴리클로날 항체 (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson ImmunoResearch, 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브))의 F(ab')<sub>2</sub> 단편으로 4°C에서 철야 코팅하였다. 플레이트를 0.5% BSA를 함유하는 PBS로 1시간 동안 25°C에서 차단하였다. 각각의 항체 농도를 정량하기 위해 각각의 항체를 내부 표준물로서 사용하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 세척기 (바이오-텍 인스트루먼트즈, 인크. (Bio-Tek Instruments, Inc., 미국 버몬트주 위누스키))를 이용하여 0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS로 세척하였다. 표준물 및 샘플을 0.5% BSA, 0.35 M NaCl, 0.25% CHAPS, 5 mM EDTA, 0.05% 트윈-20 및 15 ppm 프로클린을 함유하는 PBS 내에 희석하고, 마이크로플레이트에 2시간 동안 25°C에서 첨가하였다. 결합된 항체는 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 F(ab')<sub>2</sub> 염소 항-인간 IgG, Fc-특이적 폴리클로날 항체 (잭슨 이뮤노리서치)를 사용하여 검출하고, 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (TMB) (케이피엘, 인크. (KPL, Inc., 미국 메릴랜드주 게이터스버그))를 사용하여 발색시키고, 흡광도를 멀티스칸 에센트 (Multiskan Ascent) 관독기 (썬모 사이언티픽, 미국 뉴햄프셔주 허드슨) 상에서 450 nm에서 측정하였다. 농도는 4-파라미터 비-선형 회귀 프로그램을 이용하여 표준 곡선으로부터 결정하였다. 검정의 정량의 하한 (LLOQ) 값은 혈청에서 3.12 ng/ml, 및 뇌에서 15.6 ng/g이었다. 실험 군들 사이의 차이의 통계적 분석은 양측 언페어드 t-검정을 이용하여 수행하였다.

[0183] 대조군 IgG에 비해, 항-TfR<sup>A</sup>의 농도는 항체 투여 24시간 후에 뇌에서 유의하게 더 높았다 (도 1b, p=0.0002, n=10). 추가로, 뇌 내의 인간 IgG 농도는 24시간에 대조군 IgG에 비해 항-TfR<sup>A</sup>에 대해 혈청에 비해 >2.5배 더 높았다 (도 1c, p=0.003, n=10). 방사성 표지된 미량 데이터와 함께, 이들 결과는 전신 투여한 항-TfR<sup>A</sup>가 뇌 내에 축적할 수 있지만, 뇌 내의 항체의 조직 분포는 아직 더 이해되어야 함을 나타낸다.

[0184] 뇌 내에 전신 투여된 항체의 분포를 다루기 위해, 야생형 마우스에게 항-TfR<sup>A</sup> 또는 대조군 IgG를 20 mg/kg i.v. 주사하고, 임의의 남아있는 순환 항체를 제거하기 위해 PBS로 관류시키고, 항체 국재화를 결정하기 위해 뇌 절편을 형광 항-인간 2차 IgG로 염색하였다. 1시간의 순환 후에, 항-TfR<sup>A</sup>는 기저막 마커 항-콜라겐 IV와의 공동 국재화에 의해 나타난 바와 같이 현저한 혈관 분포를 보였다 (도 1d, 좌측 컬럼). 덜 현저하기는 하지만, 대조군 IgG는 또한 혈관계에 국재화하였고, 이것은 노출의 1시간 후에, 치료 용량 수준의 전신 투여된 IgG가 혈관

분포를 유지함을 나타낸다 (도 1e, 좌측 컬럼). 그러나, 주사 후 24시간에 항체 국제화의 두드러진 차이가 있었다. 항-TfR<sup>A</sup> 분포는 더 이상 독점적으로 혈관에 존재하지 않고, 대신에 보통의 실질 염색을 보였다 (도 1d, 우측 컬럼). 이와 반대로, 대조군 IgG 항체는 주사 24시간 후에 뇌 조직 내에 대부분 부재한다 (도 1e, 우측 컬럼). 이들 결과는 치료상 관련된 수준으로 투여될 때, 항-TfR<sup>A</sup>는 보통의 실질 염색에 의해 입증되는 바와 같이 BBB를 관통할 수 있지만, 그러나 뇌-축적된 항체의 대부분은 BBB의 내피 세포에 주로 한정되었음을 나타낸다.

[0185] 실질 내의 축적은 뇌 내피 세포 상에 발현된 표면 TfR에의 결합뿐만 아니라 RMT 이후의 수용체로부터의 해리를 필요로 한다. 임의의 이론에 매이지 않으면서, TfR에 대한 감소된 친화도가 RMT 후의 해리를 촉진하고 실질 내의 향상된 축적을 허용할 수 있는 것으로 가정되었다. 추가로, 감소된 친화도를 갖는 항-TfR은 항-TfR 농도가 낮은 뇌 내에서와 같은 농도-제한 환경에서 덜 효율적으로 포획 및 수송될 것이다. 그러나, 임상 상황에서, 항-TfR 치료제의 혈청 수준은 혈관강 내의 수용체의 포화를 유지하기 위해 여전히 충분히 높을 것이다.

[0186] 상기 예측을 시험하기 위해, TfR에 대한 결합 친화도가 상이한 항-TfR<sup>A</sup>의 변이체들을 생성하였다. 이들 변이체를 경쟁 ELISA 검정으로 시험하였는데 (도 2a); 항-TfR<sup>A</sup>가 TfR에 대해 시험된 임의의 항체의 가장 강한 친화도 및 최저 IC50을 가졌고, 각각의 항-TfR<sup>B,C,D</sup>는 연속적으로 더 낮은 친화도 및 더 높은 IC50을 가졌다. 나중에, 변이체 항-TfR<sup>E</sup>를 생성하고 항-TfR<sup>A,B,C,D</sup> 변이체와 동일한 검정으로 시험하였는데; 도 2a에 제시된 바와 같이, 이는 임의의 다른 시험된 항-TfR 항체보다 TfR에 결합하기 위해 실질적으로 덜 경쟁할 수 있고, 상응하는 높은 IC50 값을 가졌다 (표 2).

**표 2**

[0187]

항-TfR 항체에 대한 IC50 측정치		
항체	IC50 (nM)	표준 편차
항-TfR <sup>A</sup>	1.7	0.1
항-TfR <sup>B</sup>	6.9	0.4
항-TfR <sup>C</sup>	65	12
항-TfR <sup>D</sup>	111	16
항-TfR <sup>E</sup>	> 5x10 <sup>4</sup>	-

[0188] 이들 변이체를 비-TfR 포화 (미량 투여) 및 TfR 포화 (치료 투여) 환경으로 시험하였다. 미량 수준의 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>A</sup>, [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>B</sup>, [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>C</sup>, [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>D</sup> 및 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>E</sup> (이들은 TfR에 대한 친화도가 상이하고, 여기서 항-TfR<sup>A</sup>의 친화도 > 항-TfR<sup>B</sup>의 친화도 > 항-TfR<sup>C</sup>의 친화도 > 항-TfR<sup>D</sup>의 친화도 > 항-TfR<sup>E</sup>의 친화도임)를 마우스에게 i.v. 주사하고, 뇌 흡수를 주사의 1, 4, 또는 24시간 후에 측정하였다. 상기 검정은 원래 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>A</sup>, [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>B</sup>, [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>C</sup>, 및 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>D</sup>를 사용하여 수행하고, 나중에 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>E</sup>의 구축 시에 반복하였고, 그 결과를 도 2b에 제시한다. 제안된 모델과 일치하게, 미량 용량 수준의 보다 저친화도 항-TfR 항체는 보다 고친화도 변이체에 비해 뇌 내에 더 적은 흡수를 일으켰다 (도 2b). 그러나, 미량 투여와는 뚜렷하게 반대로, 치료 수준에서 이들 동일한 보다 저친화도 변이체의 뇌 흡수 (20 mg/kg를 1 및 24시간에 평가하였다)는 친화도가 저하되므로 24시간에서 증가된 뇌 흡수를 보인 한편, 1시간에서 흡수의 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (도 2c). 이들 데이터는 보다 저친화도 RMT 항체는 제한하는 농도 하에 감소된 수송을 보이는 반면에, 포화 조건 하의 수송은 영향을 받지 않을 것이라는 가설을 지지한다.

[0189] 따라서, 다음 모델이 제안된다: 고친화도 항체에 비해, 더 적은 저친화도 항체가 비-포화 농도 하에 혈관계의 강관 측면 상의 수용체에 결합하여, 보다 낮은 내피 흡수를 일으킨다 (도 2d, 좌측 패널). 그러나, 보다 높은 치료 용량에서, 강관 수용체는 친화도와 무관하게 포화될 것이고, 따라서 유사한 내피 흡수를 일으킨다 (도 2d, 우측 패널). 이들 조건 하에, 보다 저친화도 RMT 항체는 1) RMT 표적으로부터 해리를 최대화하여 뇌 내로의 방출을 용이하게 하고, 2) 농도가 BBB의 실질 측면 상에 제한되기 때문에 뇌로부터의 유출 가능성을 감소시킴으로



써 보다 큰 뇌 축적을 달성할 수 있다. 따라서, 치료 상황에서, 놀랍게도 RMT 표적에 대한 보다 저친화도 항체가 실질 축적을 위해 유리하다.

[0190] 증가된 뇌 흡수를 보이는 이들 변이체의 국제화를 평가하기 위해, 마우스에게 20 mg/kg의 고친화도 항-TfR<sup>A</sup> 또는 보다 저친화도의 변이체 항-TfR<sup>B,C,D</sup>를 i.v. 투여하였다. 24시간 후에, 동물을 PBS-관류시키고, 뇌 절편을 인간 IgG 및 뉴런 마커 NeuN에 대해 동시-염색하였다 (도 2e). 이전에 관찰된 바와 같이, 고친화도 항-TfR<sup>A</sup> 처리된 동물은 대부분 낮은 수준의 실질 신호를 갖는 혈관 염색을 보였다 (도 2e, 맨윗줄). 그러나, 보다 저친화도 항-TfR<sup>B,C,D</sup>는 피질 혈관을 보이지 않는 현저하게 보다 두드러진 세포 염색을 나타내었다 (도 2e, 항-TfR<sup>B,C,D</sup>에 대한 데이터). 또한, NeuN의 공동 국제화된 염색은 혈관계로부터 뉴런으로의 항체의 재분포를 나타내었다. 이것은 특히 항-TfR<sup>D</sup> 변이체의 대표적인 보다 고배율 영상에서 현저하다 (도 2f). 뇌 흡수 데이터와 함께, 이들 결과는 항체의 유의하게 더 높은 뇌 축적이 TfR에 대한 항-TfR의 친화도를 저하시킴으로써 달성될 수 있고, 보다 저친화도 항체, 예컨대 항-TfR<sup>D</sup>가 뉴런에 선택적으로 분포함을 나타낸다.

[0191] BBB를 가로지르는 항-TfR 항체의 수송은 TfR 및 아밀로이드 전구체 단백질 (APP) 절단 효소인 베타 세크레타제 (BACE1) 둘 모두에 결합하는 이중특이적 항체 (항-TfR<sup>A</sup>/BACE1)를 평가할 때 추가로 확립되었다 (도 3a). 표준 '놉 인 홀' 이중특이적 항체 제조 기술을 사용하여 이중특이적 항체의 TfR 결합 아암을 조작하기 위해 고친화도 항-TfR<sup>A</sup>가 사용되었다 (예를 들어, 문헌 [Ridgway et al., Protein Eng. (1996) 9(7): 617-621] 참조). 항-TfR (홀) 및 항-BACE1 (놉)의 Fc 내의 놉 및 홀 돌연변이에 추가로, 항체의 항-TfR 아암은 글리코실화 (N297G)를 제거하는 Fc 영역 내의 돌연변이를 포함하였다. 놉 및 홀 1/2-항체를 별개로 정제하고 어닐링하여 비글리코실화된 이중특이적 IgG를 시험관 내에서 생성하였다. TfR에 대한 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체의 결합 친화도는 2가 결합의 손실 때문에 모 항-TfR<sup>A</sup>에 비해 상당히 감소되었다 (도 3b). BACE1은 CNS에서 뉴런 상에서 주로 발현되고, APP 절단을 통한 베타 아밀로이드 (Aβ<sub>1-40</sub>) 형성의 주요 기여자인 것으로 간주된다 (Vassar et al., Science 286:735-741 (1999)). BACE1에 대한 항체는 BACE1 활성을 억제하기 위한 효과적인 수단으로서 설명되었고, 생체 내에서 Aβ<sub>1-40</sub> 생산을 감소시킬 수 있다. 항-TfR/BACE1에 의한 BACE1의 억제는 APP를 안정하게 발현하는 HEK293 세포주에서 검사하였다. 항-BACE1에 비해, 이중특이적 항체는 유사한 효능 및 Aβ<sub>1-40</sub> 생산 억제시의 효능을 모두 가졌고, 이것은 항-TfR/BACE1이 BACE1 활성의 완전히 기능적인 큰 분자 억제제임을 제안한다 (도 3c).

[0192] 상기 모델을 기초로 하여, 상기 보다 저친화도 이중특이적 항체는 항-TfR 단독에 비해 증가된 흡수를 위한 보다 유리한 후보인 것으로 예상될 것이다. 이중특이적 항체의 뇌 축적을 조사하기 위해, 미량 용량의 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>A</sup>/BACE1을 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>A</sup> 및 [<sup>125</sup>I]항-BACE1과 비교하고, 뇌 흡수를 i.v. 주사 30분, 6, 24, 및 48시간 후에 평가하였다. 모든 시점에 [<sup>125</sup>I]항-BACE1에 비해 [<sup>125</sup>I]항-TfR/BACE1에서 유의하게 더 높은 뇌 흡수가 관찰되었다 (도 3d, n=4). 친화도 가설과 일치하게, 상기 비-포화성 미량 용량의 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>A</sup>의 뇌 흡수는 보다 저친화도 [<sup>125</sup>I]항-TfR<sup>A</sup>/BACE1보다 훨씬 더 컸다. 치료 용량 수준에서 항체 축적을 평가하기 위해, 마우스에게 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 또는 항-BACE1을 20 mg/kg으로 i.v. 주사하고, 항체의 뇌 흡수를 1, 12, 24, 및 48시간 후에 결정하였다. 단일특이적 항-BACE1에 비해, 이중특이적 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1의 투여는 모든 시점에서 유의하게 더 높은 뇌 흡수를 일으켰다 (도 3e). 친화도 모델에 의해 예측할 때, 흡수 정도는 더 높은 친화도 항-TfR<sup>A</sup> 단독보다 유의하게 더 컸다 (도 3e를 도 1b와 비교한다). 피크 축적은 주사 24시간 후에 달성되었고, ~20 nM의 농도에 도달하였고, 항체의 말초 수준이 1시간에 그의 농도의 ~12%로 소실될 때에도 주사 48시간 후에 상승한 상태로 유지되었다. 이중특이적 항체에 의한 향상된 흡수는 뇌 대 혈청 내의 항체의 평균 %를 비교할 때 극히 명백하다 (도 3f).

[0193] 진신 투여 후 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1의 국제화를 결정하기 위해, 마우스를 주사 24시간 후에 PBS-관류시키고, 항체 분포를 항-인간 형광 2차 항체로 가시화하였다 (도 3g). 보다 저친화도 항-TfR 항체 국제화와 유사하게, 혈관 염색에 추가로 실질의 실질적인 염색이 존재하였다. NeuN과의 실질 공동 국제화는 이들 항체가 뉴런 집단에 국제화

됨을 나타냈다. 이와 대조적으로, 대조군 IgG를 주사한 동물은 혈관 및 실질 염색 둘 모두의 완전한 결핍을 보였다. 함께 살펴보면, 이들 데이터는 이중특이적 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1이 BBB를 가로지르고, 뇌 실질 내에 유의하게 축적될 수 있음을 나타낸다.

[0194] 생체 내에서 Aβ<sub>1-40</sub> 생산에 대한 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1의 효능을 평가하기 위해, 야생형 마우스에게 단일 25 mg/kg 또는 50 mg/kg 용량의 대조군 IgG, 항-BACE1, 또는 항-TfR/BACE1을 투여하였다. 주사 24시간 후에 뇌 항체 흡수가 피크에 도달한다는 관찰을 기초로 하여 (도 3e 참조), 뇌 및 혈장 Aβ<sub>1-40</sub> 수준을 i.v. 항체 투여 24 및 48시간 후에 결정하였다. 25 mg/kg에서, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1은 주사 24 (p=0.001, n=10) 및 48 (p=0.0003, n=10) 시간 후에 둘 모두에서 대조군 IgG에 비해 뇌 Aβ<sub>1-40</sub> 수준을 유의하게 감소시킬 수 있었지만, 항-BACE1은 Aβ<sub>1-40</sub> 감소에 대한 효과가 없었다 (도 4a). 50 mg/kg에서, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1은 대조군 IgG에 비해 두 시점 모두에서 뇌 Aβ<sub>1-40</sub>을 감소시키는데 훨씬 더 극적인 효과를 가졌다 (도 3b, 24 및 48 hr 둘 모두에 대해 p< 0.0001, n=10). 상기 용량에서 항-BACE1의 투여는 또한 이중특이적 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1보다 유의하게 더 적은 정도이지만 (24 및 48시간 둘 모두에 대해 p<0.0001, n=10), 대조군에 비해 뇌 Aβ<sub>1-40</sub> 수준을 유의하게 감소시켰다 (24 hr에 대해 p<0.0001, n=10; 48 hr에 대해 p=0.006, n=10). 특히, Aβ<sub>1-40</sub>을 감소시키는 이중특이적 항체의 능력은 측정된 모든 시점 및 용량에 대해 항-BACE1보다 2배 내지 3배 더 컸다. 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1의 최대 효과는 50 mg/kg에서 주사 48시간 후에 달성되었고, 여기서 대조군 IgG에 비해 뇌 Aβ<sub>1-40</sub>이 50.0 ± 1.9% 감소하였다 (도 4e). 말초 Aβ<sub>1-40</sub>의 유의한 감소가 또한 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1에 대해 용량 및 시점 둘 모두에서 관찰되었다 (도 4c-d). 항-BACE1을 사용한 처리는 24시간 시점에서만 말초 Aβ<sub>1-40</sub>의 감소를 야기하였다 (25 mg/kg에 대해 p=0.01, 50 mg/kg에 대해 p=0.002; 각각에 대해 n=10). 이들 데이터는 BBB를 가로지르도록 조작된 항체가 약역학상 효과적일 수 있음을 확인해 준다. 또한, 이중특이적 항체의 뇌 투과도의 증가는 뇌 Aβ<sub>1-40</sub> 수준을 유의하게 감소시킴으로써 항체를 보다 효능있는 BACE1 억제제 약물로 만든다.

[0195] 그러나, 20 mg/kg의 치료 용량에서, BBB 투과 및 CNS의 비-혈관 부분으로의 도입은 항-TfR<sup>A</sup> 또는 항-TfR<sup>D</sup>-처리 동물에 비해 항-TfR<sup>E</sup>-처리 동물에서 향상되었다 (도 8b). 특히, 항-TfR<sup>D</sup>는 뇌에서 보다 높은 초기 농도를 달성하였지만, 제2일 후에 꾸준히 감소하였고; 다른 한편으로 항-TfR<sup>E</sup>는 시험한 8일에 걸쳐 지속적으로 높은 수준의 뇌 노출을 유지하였다. 이와 관련하여, 혈청 내의 항-TfR<sup>E</sup> 농도는 평가된 기간에 걸쳐 모든 항-TfR 항체 중에서 가장 적게 감소하였다 (도 8a). 종합적으로, 상기 데이터는 일반적으로 TfR에 대한 보다 저친화도가 놀랍게도 혈청 소실을 감소시키고 뇌 노출을 증가시키지만, 일부 역치에서는 보다 저친화도가 항체에서 얻을 수 있는 최대 뇌 노출을 손상시키기 시작함을 나타낸다. 본 실시예에서, 최적은 트랜스페린 수용체에 대한 항체 항-TfR<sup>D</sup>와 항-TfR<sup>E</sup>의 친화도 사이에서 발견될 것으로 보인다.

[0196] 중요하게는, 이들 데이터는 보다 저-친화도 항체 방법을 사용하여 항체의 CNS 내로의 흡수 증가에 대한 몇몇의 원인이 되는 메커니즘을 강조한다. 먼저, 고친화도 항-TfR 항체 (예를 들어, 항-TfR<sup>A</sup>, 도 1d)는 뇌 혈관계 내의 TfR을 신속하게 포화시켜 뇌 내로 흡수되는 항체의 총량을 감소시키고, 또한 혈관계로의 그의 분포를 제한함으로써 뇌 흡수를 제한한다. 놀랍게도, 친화도 저하 (예를 들어, 항-TfR<sup>B-E</sup>, 및 항-TfR<sup>A,D,E</sup>/BACE1, 도 2c, 2e, 2f, 3e-g 및 9c)는 뇌 흡수 및 분포를 개선하고, 혈관계로부터 뉴런 및 결합된 호중구로의 위치의 강력한 이동이 관찰되었다. 두 번째로, 항체의 TfR에 대한 보다 낮은 친화도는 항체가 막의 CNS 측으로부터 TfR을 통해 BBB의 혈관 측으로 복귀하는 능력을 손상시키는 것으로 제안되고, 그 이유는 TfR에 대한 항체의 총 친화도는 낮고, BBB의 CNS 측 상의 항체의 국소 농도는 항체의 CNS 구획 내로의 신속한 분산에 의해 비-포화성이기 때문이다 (예를 들어, 도 1d, 2e 및 2f 참조). 세 번째로, 생체 내에서, TfR에 대해 보다 작은 친화도를 갖는 항체는 TfR에 대해 더 큰 친화도를 갖는 것만큼 효율적으로 시스템으로부터 소실되지 않고 (도 8a 및 9b), 따라서 그의 보다 고친화도 대응물보다 더 높은 순환 농도를 유지한다. 이것은 보다 저친화도 항체의 순환 항체 수준이 보다 고친화도 항체보다 보다 긴 기간 동안 치료 수준에서 유지되고, 이어서 보다 긴 기간 동안 뇌에서 항체의 흡수를 개선하기 때문에 유리하다 (도 9c에서 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1을 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1과 비교함). 또한, 상기 혈장 및 뇌

노출 둘 모두의 개선은 임상에서 투여 빈도를 감소시킬 수 있고, 이것은 환자 순응성 및 편의성뿐만 아니라 항체의 및/또는 항체에 커플링된 치료 화합물의 임의의 잠재적인 부작용 또는 표적 이탈 효과를 완화하는 잠재적인 잇점을 가질 것이다.

[0197] 이중특이적 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체의 친화도를 추가로 저하시키면 그의 BBB 및 실질 투과가 추가로 개선될 수 있는 지를 평가하기 위해 추가의 연구를 수행하였다. 2개의 추가의 이중특이적 항체, 즉 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 및 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1을 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 항체에 대해 사용된 것과 동일한 제조 방법을 사용하여 제조하였다. 경쟁적 ELISA 검정을 수행하였고 (도 9a), 생성되는 IC50은 다음과 같았다:

표 3

항-TfR/BACE1 항체에 대한 IC50/친화도 측정치		
항체	IC50	Kd (비아코어) (nM)
항-TfR <sup>A</sup> /BACE1	15 nM	33.3±1.7
항-TfR <sup>D</sup> /BACE1	1.6 μM	630±50
항-TfR <sup>E</sup> /BACE1	>50 μM	N.D.

[0199] 또한, 각각의 이중특이적 항체와 TfR 사이의 결합에 대한 Kd의 표면 플라즈몬 공명 측정을 수행하였다. 표 3의 비아코어® 분석을 다음과 같이 수행하였다. 5-His Ab 포획 (퀴아겐 (Qiagen, 미국 캘리포니아주 발렌시아))을 사용하여 25°C에서 비아코어®-T-100 (비아코어, 인크., 미국 뉴저지주 피츠카타웨이)를 사용한 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 Kd를 측정하였다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 제조사의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시켰다. 5-His 항체를 100 mM 아세트산나트륨 (pH 4.0)을 사용하여 50 μg/ml로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10000 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μl/분의 유량으로 주입하였다. 항체 주입 후에, 미반응 기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입하였다. 운동학 측정을 위해, MuTfR-His를 약 50 RU에 도달하도록 HBS-P 내에서 주입한 후, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 (1.95 nM 내지 1000 nM) 또는 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 (9.75 nM 내지 5000 nM)의 2배 연속 희석액을 약 30 μl/분의 유량으로 25°C에서 HBS-P 내에서 주입하였다. 회합률 (k<sub>on</sub>) 및 해리율 (k<sub>off</sub>)은 회합 및 해리 센스그램을 동시 피팅함으로써 단순 일대일 랭그뮤어 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비 koff/kon으로서 계산하였다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)] 참조). 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1의 친화도는 너무 약하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정할 수 없었다.

[0200] 도 9a와 표 2 및 3에서 보이는 바와 같이, 이중특이적 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 및 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 항체는 상응하는 단일특이적 항-TfR<sup>A</sup> 및 항-TfR<sup>D</sup>보다 현저하게 더 적게 TfR에 결합하였다 (도 9a를 도 2a와 비교함). 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1의 경우, 이중특이적 및 단일특이적 항체에 대한 부분 결합 곡선은 또한 이중특이적 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1이 상응하는 단일특이적 항-TfR<sup>E</sup>보다 훨씬 더 높은 IC50을 가짐을 제안한다.

[0201] 이들 항체는 상기 설명된 바와 동일한 생체 내 Aβ<sub>1-40</sub> 생산 검정으로 시험하였다. 간단히 설명하면, 6-8주령 야생형 C57B1/6 마우스에게 i.v. 꼬리 정맥 주사를 통해 단일 50 mg/kg 용량의 대조군 IgG, 단일특이적 항-BACE1, 또는 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1, 또는 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1을 투여하였다 (처리된 총 180마리의 마우스에 대해 시점마다 항체 처리당 6마리의 마우스). 뇌 및 혈장 Aβ<sub>1-40</sub> 수준을 i.v. 항체 투여 1, 2, 4, 6, 8, 및 10일 후에 결정하였다 (도 9b-9e). 가장 빠른 시점에 뇌에서 발견된 이중특이적 항체의 농도 (도 9c)는 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 및 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1에서 가장 컸고, 그 각각의 농도는 1일 시점에 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1에 의해 달성된 농도의 2배를 초과하였다. 그러나, 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 뇌 농도 수준은 제6일까지 대조군 수준으로 되돌아가고, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1 수준은 제10일까지 그렇지 않았다. 이와 대조적으로, 최저 친화도 이중특이적 항체 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1은 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 및 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1에 비해 뇌 항체 농도의 훨씬 더 낮은 상대적인 하락을 보였고, 이것은 항-TfR에 대한 보다 저친

화도가, 항체가 실질 공간으로부터 배출되는 능력의 감소를 야기한다는 제안된 모델과 일치하였다. 뇌 내의 A 베타1-40의 수준 (도 9e)은 뇌에서 이중특이적 항체의 관찰된 농도에 의해 예상되는 바와 대략 동일한 비율로 감소되었고: 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1 및 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1은 가장 이른 시점 (제1-2일)에서 관찰된 뇌 A베타1-40의 수준을 유사하게 감소시켰고, 이것은 후속 시점에서 신속하게 증가하거나 (항-TfR<sup>A</sup>/BACE1) 또는 후속 시점에서 보다 적당하게 증가하였고 (항-TfR<sup>D</sup>/BACE1), 이것은 각각의 이들 항체의 뇌 농도의 관찰된 감소와 일치하였다 (도 9c). 특히, 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 항체 처리는 다른 이중특이적 항체를 사용할 때 관찰된 것보다 뇌 A베타1-40 수준의 상대적으로 보다 보통의 감소를 일으킨 한편, 상기 감소는 모든 시점에 걸쳐 일관되었다 (도 9e).

[0202] 혈장 측정 (도 9b)은 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1이 제4일까지 제거된 반면, 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1은 모든 시점에 걸쳐 비교적 낮은 수준으로 지속되고, 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1의 수준은 모든 시점에 걸쳐 대조군과 유사하게 유지됨을 보여주었다. 상기 발견과 일치하게, 관찰된 혈장 A베타1-40 수준 (도 9d)은 각각의 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1, 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1 및 항-BACE1를 사용하는 모든 시점에서 대조군 항-gD 수준으로부터 유사하게 감소되었다. 항-TfR<sup>A</sup>/BACE1은 1, 2 및 4일 시점에 유사한 감소를 보였고, 보다 추후 시점에 대조군 수준으로 신속하게 되돌아갔고, 이것은 혈장으로부터 항체의 관찰된 소실과 일치하였다.

[0203] 이들 결과는 다시 이중특이적 항-TfR/BACE1 항체가 포유동물의 생체 내 시스템에서 BBB를 효과적으로 가로지르고, BACE1 활성을 억제함을 입증한다. 이들은 또한 항-TfR<sup>D</sup>/BACE1과 항-TfR<sup>E</sup>/BACE1의 TfR에 대한 친화도 사이의 친화도가 실질/뇌에서 지속성 및 활성의 최적의 조합을 제공할 수 있음을 제안한다. 그러나, 각각의 뇌 표적에 대해, 그 표적에 특이적인 이중특이적 아암의 효능이, 목적하는 결과를 달성하기 위해 얼마나 많은 항-TfR/표적 이중특이적 항체가 BBB의 CNS 측에 존재해야 하는지, 따라서 그 농도를 얻기 위해 TfR에 대한 항-TfR의 어느 정도의 친화도가 이중특이적 항체에 사용되어야 하는지를 좌우할 것임을 알아야 한다. 본 발명은 BBB의 통상적인 (nonprivileged) 측면 상에 투여한 후에 CNS 내에서 상기 표적 수준을 달성하기 위해 이중특이적 항체를 결정하고 설계하기 위한 수단을 제공한다.

[0204] 이들 결과는 TfR 및 아밀로이드 베타 둘 모두에 결합하는 또 다른 항-TfR 이중특이적 항체인 항-TfR/A베타를 사용하여 확인되고 확장되었다. 상기 항-TfR/BACE1 이중특이적 항체의 제조를 위해 사용된 것과 동일한 방법을 이용하여 3가지 이중특이적 변이체를 제조하였다: 항-TfR<sup>A</sup>/A베타, 항-TfR<sup>D</sup>/A베타 및 항-TfR<sup>E</sup>/A베타. A베타는 아밀로이드 플라크의 주요 구성분이고, 이것은 AD의 발병에 관여하는 것으로 생각된다. 그의 유리 또는 올리고머화 상태의 A베타 결합 및 제거에 의한 플라크 형성의 억제는 AD의 발병 또는 진행을 억제할 수 있다. 각각의 이들 이중특이적 항체의 약동학적 특성을 평가하였다.

[0205] 단일 50 mg/kg 용량의 대조군 IgG, 단일특이적 항-A베타 항체, 또는 각각의 이중특이적 항체를 8-16주령 야생형 C57BL/6J 마우스, 또는 인간 프레세닐린 2 및 인간 아밀로이드 전구체 단백질을 모두 발현하는 마우스 (PS2APP)에게 i.p. 주사하였다. 제한된 수의 트랜스제닉 동물 때문에, 단지 2가지 이중특이적 변이체 (항-TfR<sup>D</sup>/A베타 및 항-TfR<sup>E</sup>/A베타)를 PS2APP 마우스에서 검정하였다. 각각의 처리군에서 4 내지 6마리의 반복 검증 마우스에게 투여하였다. 마우스를 24시간 후에 희생시키고, 항-TfR/BACE1 이중특이적 항체 연구에서처럼 약물 수준을 뇌 및 혈장 모두 내에서 측정하였다. 희생 전에, 혈액을 또한 혈장 항체 농도의 초기 평가를 위해 투여 6시간 후에 수집하였다. 항체 농도의 혈장 측정 (도 10a 및 11a)은 모든 항체가 투여 6시간 후에 유사한 수준으로 존재함을 보여주었다. 그러나, 대조군 단일특이적 항-A베타 수준은 24시간까지 대조군 IgG에 비해 감소되었다. 이것은 상기 항-A베타 분자에 대한 선행 관찰과 유사하다. 24시간에서, 항-TfR<sup>A</sup>/A베타는 말초에서 항-A베타와 유사한 항체 수준을 보여준 반면, 항-TfR<sup>D</sup>/A베타 및 항-TfR<sup>E</sup>/A베타는 항-A베타와 대조군 IgG 사이의 중간에 있는 약간 상승된 수준을 보여주었다.

[0206] 뇌에서 발견된 이중특이적 항체의 농도는 대조군 IgG 및 항-A베타 둘 모두에 비해 증가하였다 (도 10b 및 11b). 항-A베타에 비해, 항-TfR<sup>A</sup>/A베타는 12배 더 높은 농도를 갖고, 항-TfR<sup>D</sup>/A베타는 8 내지 15배 더 높은 농도를 갖고, 항-TfR<sup>E</sup>/A베타는 4 내지 5배 더 높은 농도를 가졌다. 항-A베타와 비교시에 항-TfR<sup>A,D,E</sup>/A베타 항체의 뇌 흡수 증가는 항-BACE1에 비해 항-TfR<sup>A,D,E</sup>/BACE 이중특이적 항체에 대해 보이는 증가보다 훨씬 더 컸다. 이것은 아마도 투여 24시간 후에 대조군 IgG에 비해 항-A베타의 감소된 말초 노출 때문인 것 같고, 이것은 대조군 IgG



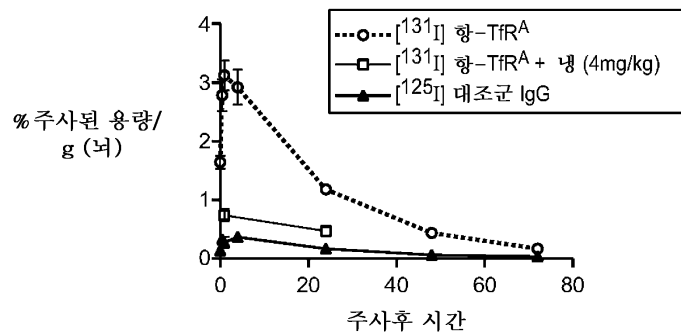
에 비해 뇌 내의 보다 낮은 수준의 항-A베타를 유도하였다.

[0207] 이들 발견은 치료상 관련된 용량으로 투여된 큰 분자 항체가 BBB를 가로지르고 유의하고 지속적인 뇌 흡수를 일으킬 수 있음을 최초로 입증한 것이다. 또한, 항체 친화도와 뇌 흡수 정도 사이의 반비례 관계를 보여주는 이들 결과는 RMT 동역학의 이해를 확장한다. 상기 새로운 통찰력은 CNS 내로 항체 약물 전달을 위한 보다 효과적인 전략을 제공하기 위해 다양한 다른 잠재적인 RMT 표적에 적용될 수 있다. 추가로, 이들 생체 내 결과는 이 중독이적 항체가 표적화 항체 약물의 뇌 투과를 유의하게 증가시킴으로써 유망한 항-아밀로이드 형성 치료제의 효능을 크게 개선할 수 있음을 입증한다. 이것은, 향상된 약물 전달이 요구되는 치료 용량의 저하 때문에 잠재적인 부작용이 더 적은 것으로 해석될 것이기 때문에 크게 유리할 수 있다. 보다 일반적으로, 상기 기술은 매우 다양한 CNS 질환에 대한 치료에 적용될 크나큰 잠재성을 갖고, 보다 안전한 항체 약물을 제공하기 위한 개선된 방법을 나타낸다.

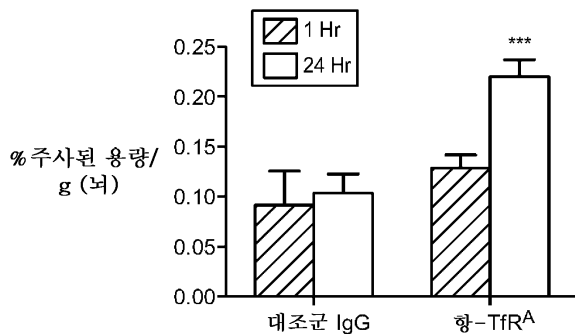
[0208] 상기한 본 발명은 명확한 이해를 위해 예시 및 실시예에 의해 일부 상세하게 설명되었지만, 상세한 설명 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 본원에서 인용된 모든 특허 및 학술 문헌의 개시내용은 명백하게 그 전체가 참고로 포함된다.

**도면**

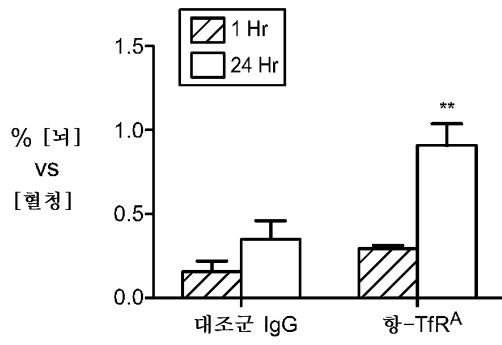
**도면1a**



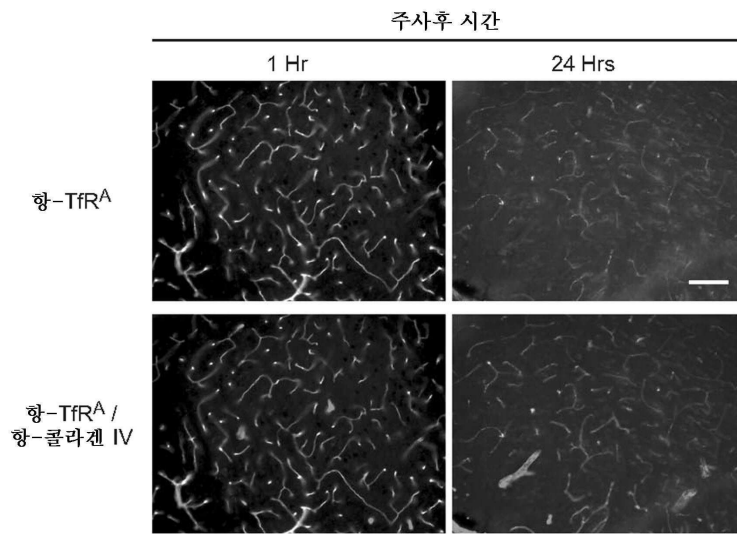
**도면1b**



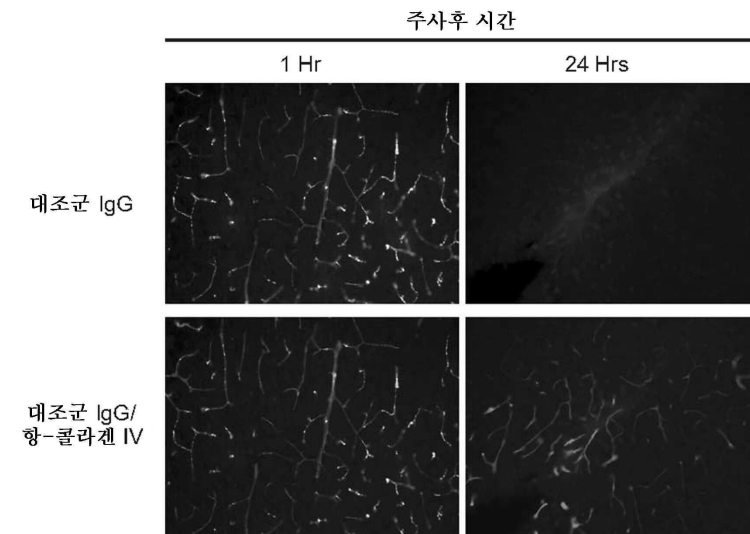
도면1c



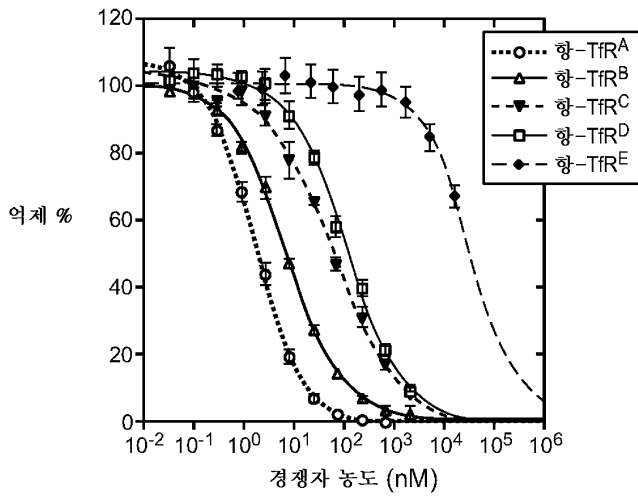
도면1d



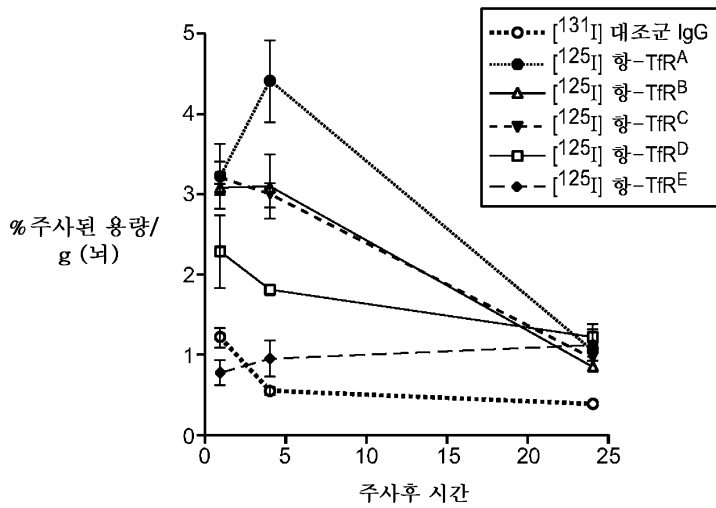
도면1e



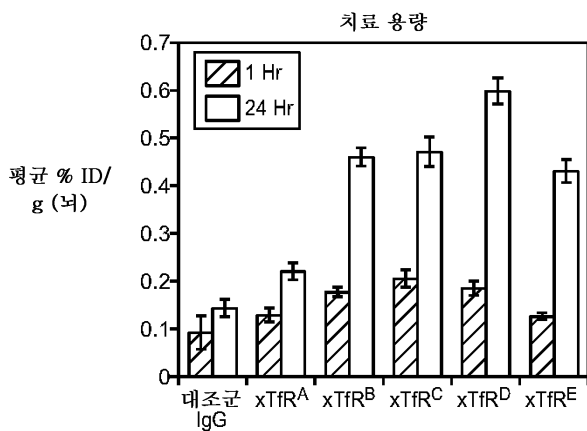
도면2a



도면2b



도면2c

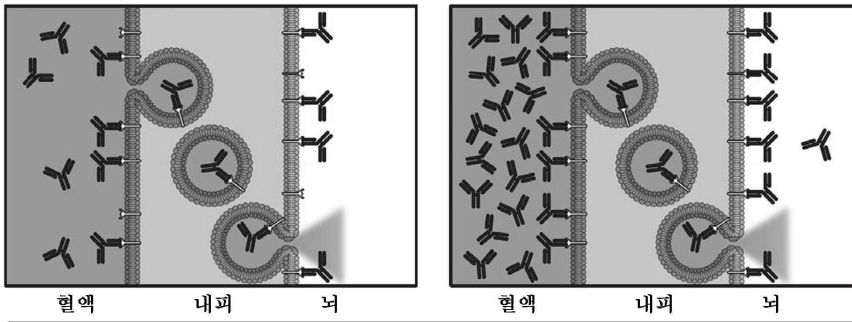


도면2d

시나리오 1: 고친화도 mAb (예: 항-TfR<sup>A</sup>)

미량 용량 = 보다 다량 흡수

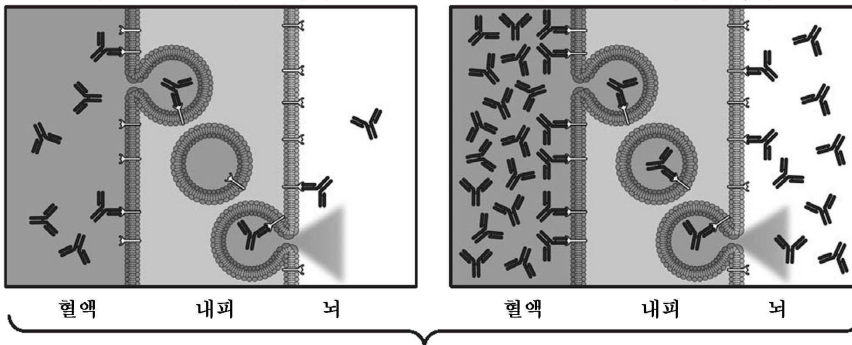
치료 용량 = 보다 소량 흡수



시나리오 2: 저친화도 mAb (예: 항-TfR<sup>D</sup>)

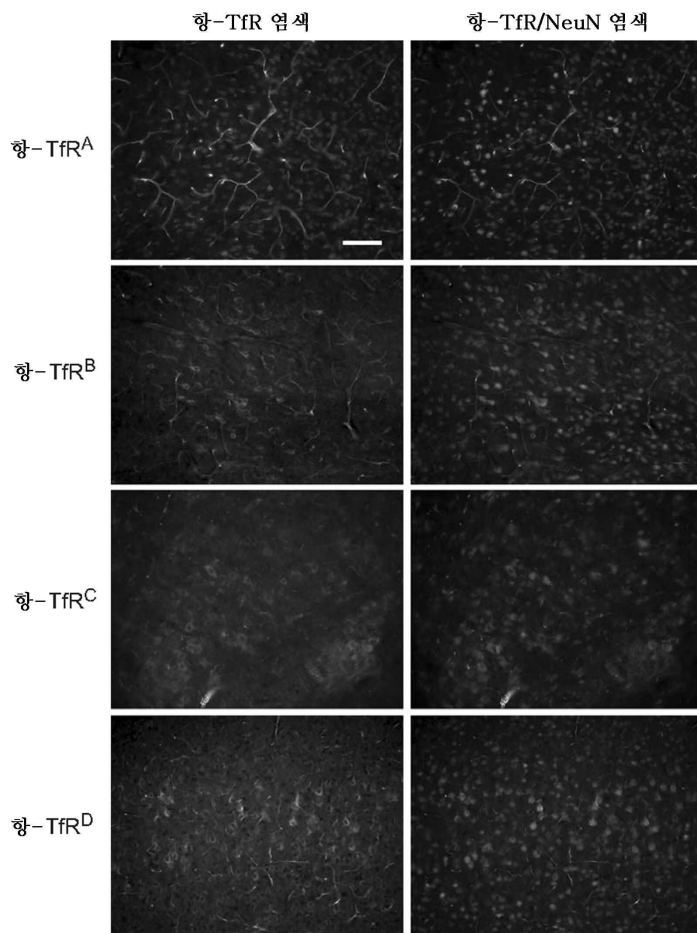
미량 용량 = 보다 소량 흡수

치료 용량 = 보다 다량 흡수

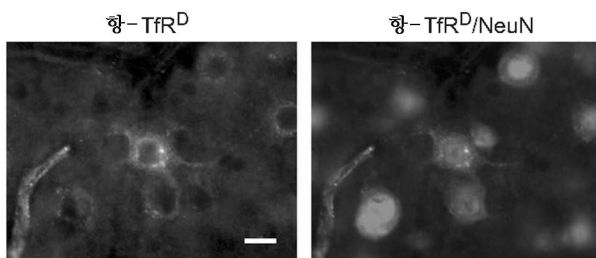




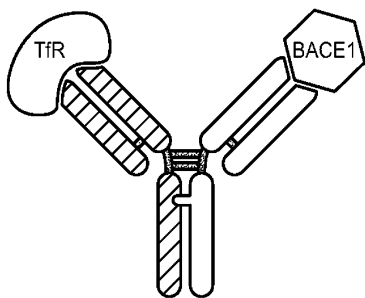
도면2e



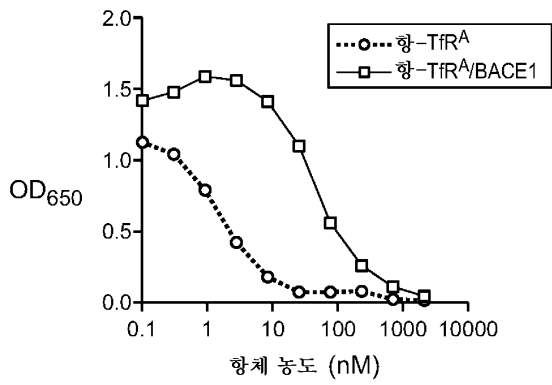
도면2f



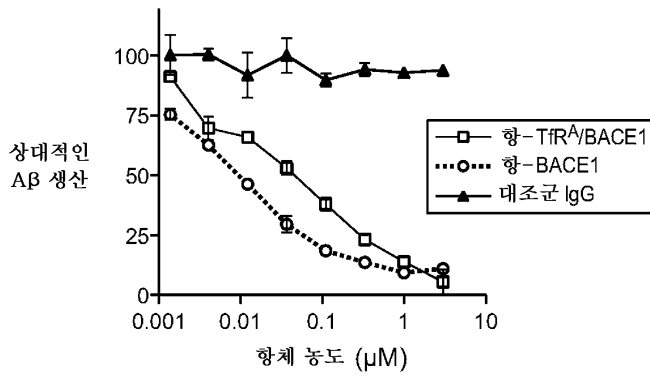
도면3a



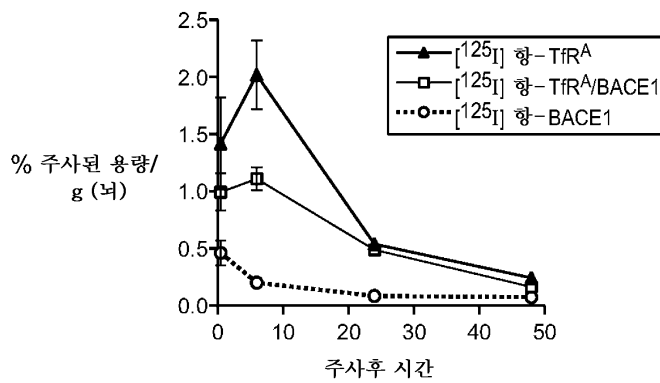
도면3b



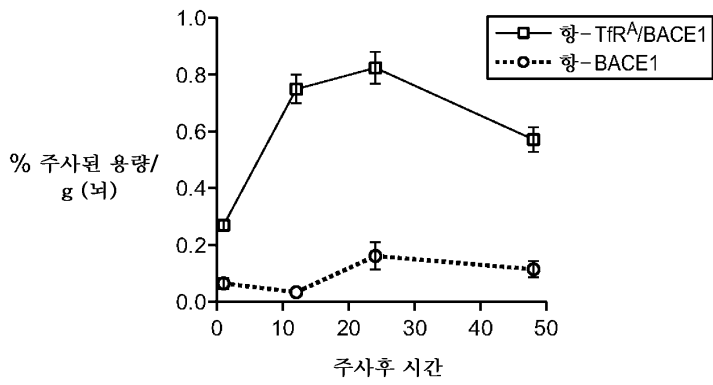
도면3c



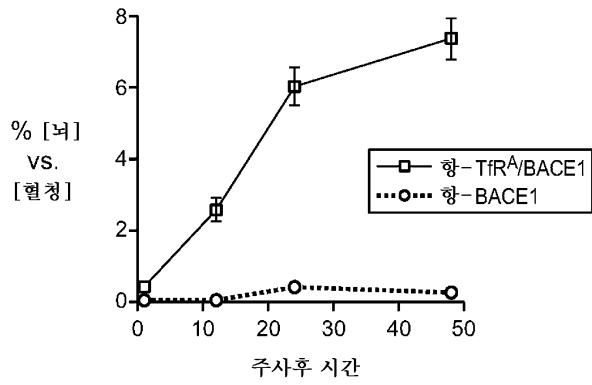
도면3d



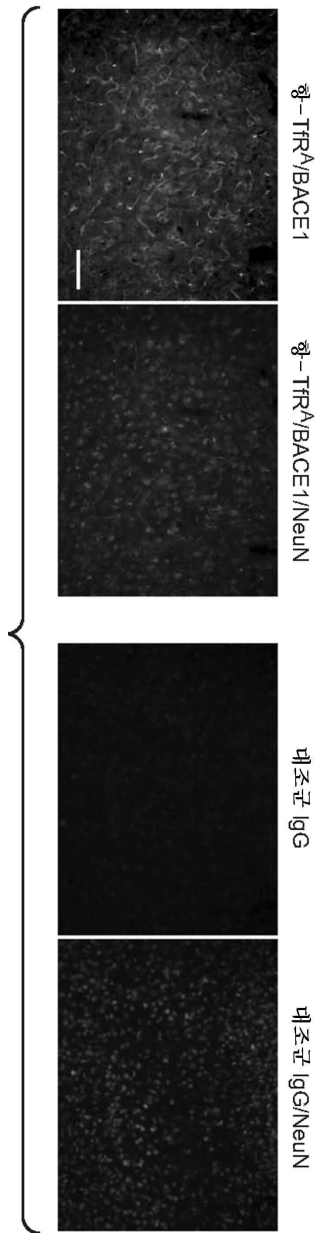
도면3e



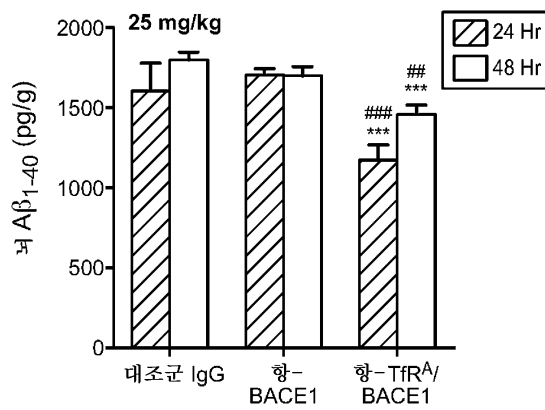
도면3f



도면3g

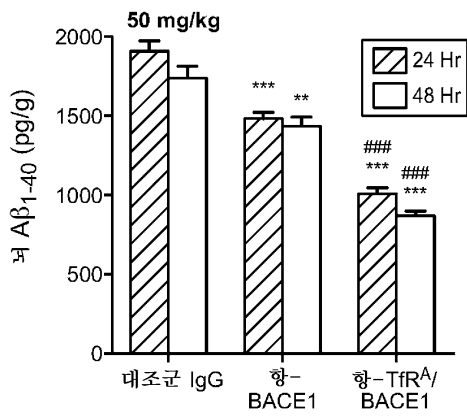


도면4a

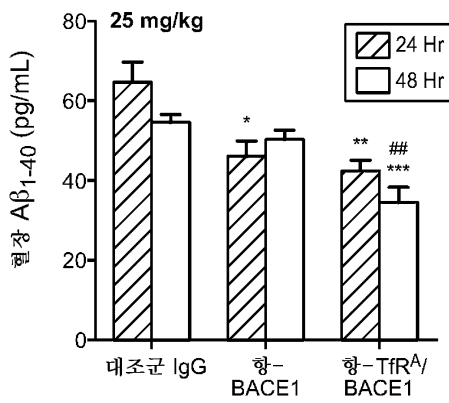




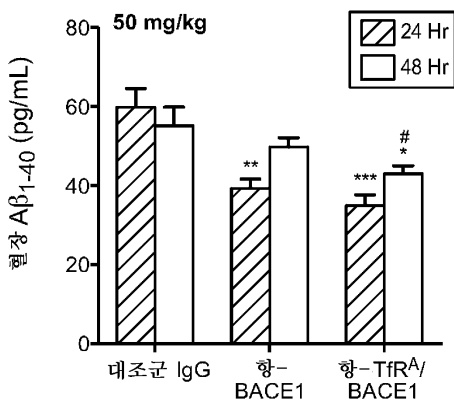
도면4b



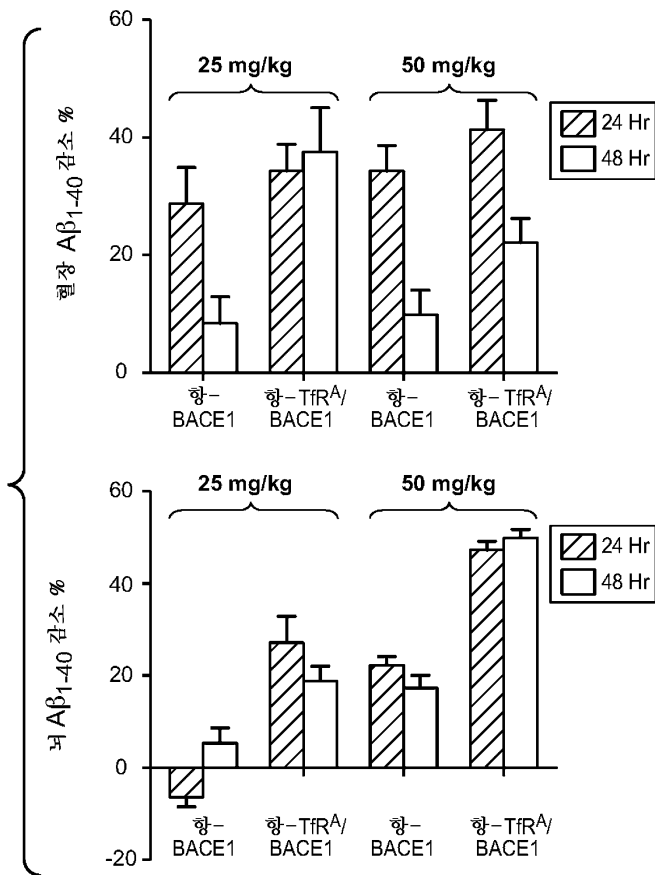
도면4c



도면4d



도면4e



도면5a

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

카바트 - CDR L1  
 코티아 - CDR L1

접속 - CDR L1

YM4128 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q  
 YM4128.31 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q  
 YM4128.30 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q  
 YM4128.2 YM4128.29 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q  
 YM4128.51 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q

카바트# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

카바트 - CDR L2  
 코티아 - CDR L2

접속 - CDR L2

YM4128 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 YM4128.31 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 YM4128.30 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 YM4128.2 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 YM4128.29 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 YM4128.51 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P

카바트# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

카바트 - CDR L3  
 코티아 - CDR L3

접속 - CDR L3

YM4128 E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R 서열 1  
 YM4128.31 E D F A T Y Y C Q Q F P T T Y L P T F G Q G T K V E I K R 서열 2  
 YM4128.30 E D F A T Y Y C Q Q G Y N D P P T F G Q G T K V E I K R 서열 3  
 YM4128.2 E D F A T Y Y C Q Q S S T D P P T F G Q G T K V E I K R 서열 4  
 YM4128.29 E D F A T Y Y C Q Q D A T S P P T F G Q G T K V E I K R 서열 5  
 YM4128.51 E D F A T Y Y C Q Q Y A T T D P P T F G Q G T K V E I K R 서열 6

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

카바트-CDRH1  
 코티아-CDRH1  
 절속-CDRH1

YM412.8 E V Q L V R S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A  
 YM412.8.31 E V Q L V R S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y A I H W V R Q A  
 YM412.8.30 E V Q L V R S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A  
 YM412.8.2 E V Q L V R S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A  
 YM412.8.29 E V Q L V R S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A  
 YM412.8.51 E V Q L V R S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A

카바트# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

카바트-CDRH2  
 코티아-CDRH2  
 절속-CDRH2

YM412.8 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D D T S K N T A  
 YM412.8.31 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D D T S K N T A  
 YM412.8.30 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D D T S K N T A  
 YM412.8.2 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D D T S K N T A  
 YM412.8.29 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D D T S K N T A  
 YM412.8.51 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D D T S K N T A

카바트# 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

카바트-CDRH3  
 코티아-CDRH3  
 절속-CDRH3

YM412.8 Y L Q M N S L R A E E D T F A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7  
 YM412.8.31 Y L Q M N S L R A E E D T F A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 8  
 YM412.8.30 Y L Q M N S L R A E E D T F A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7  
 YM412.8.2 Y L Q M N S L R A E E D T F A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7  
 YM412.8.29 Y L Q M N S L R A E E D T F A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7  
 YM412.8.51 Y L Q M N S L R A E E D T F A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 7

서열



카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

카바트 - CDR L1  
 코티아 - CDR L1

접속 - CDR L1

Fab12 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q  
 LC6 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q  
 LC9 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q  
 LC10 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q

카바트# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

카바트 - CDR L2  
 코티아 - CDR L2

접속 - CDR L2

Fab12 Q K P G K A P K L L I Y S A S S L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 LC6 IgG Q K P G K A P K L L I S W A S W L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 LC9 IgG Q K P G K A P K L L I W Y A S W L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 LC10 IgG Q K P G K A P K L L I W W A S S L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P

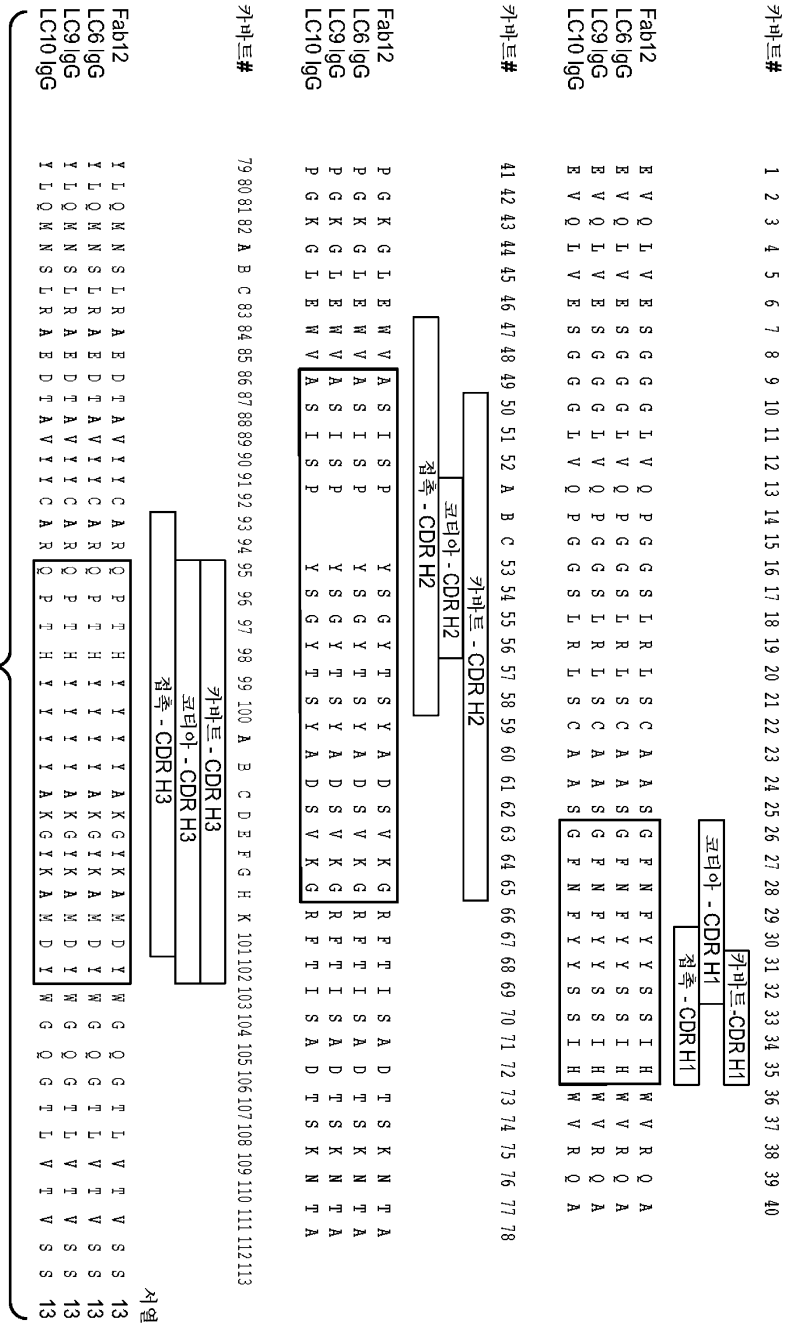
카바트# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

카바트 - CDR L3  
 코티아 - CDR L3  
 접속 - CDR L3

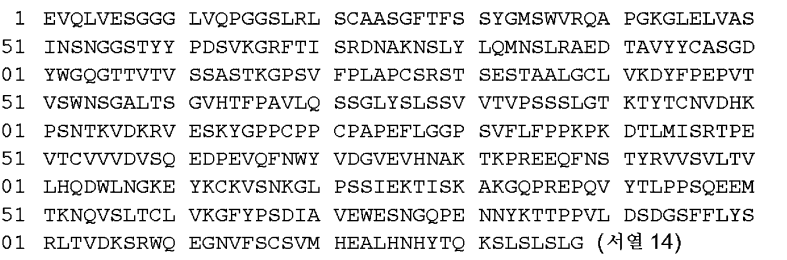
Fab12 E D F A T T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q Q G T K V E I K R 서열 9  
 LC6 IgG E D F A T T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q Q G T K V E I K R 서열 10  
 LC9 IgG E D F A T T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q Q G T K V E I K R 서열 11  
 LC10 IgG E D F A T T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q Q G T K V E I K R 서열 12

도면6a

도면6b



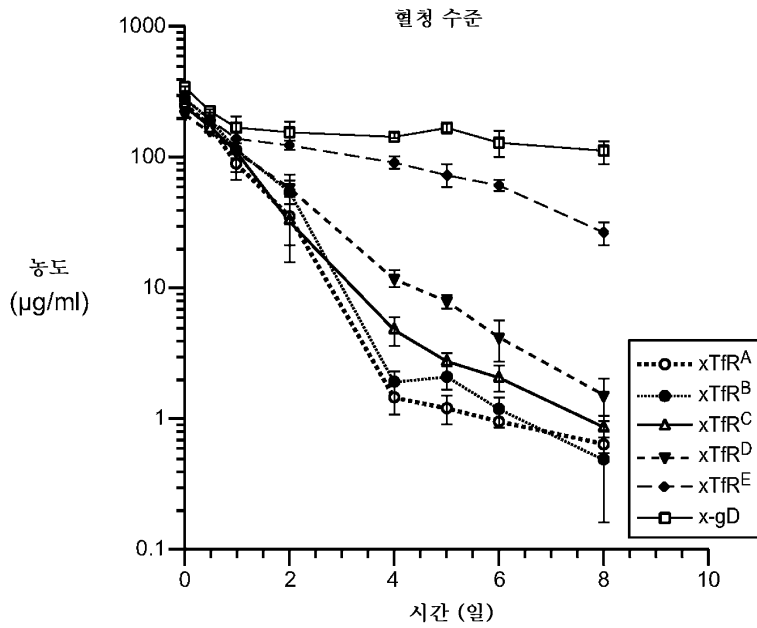
도면7a



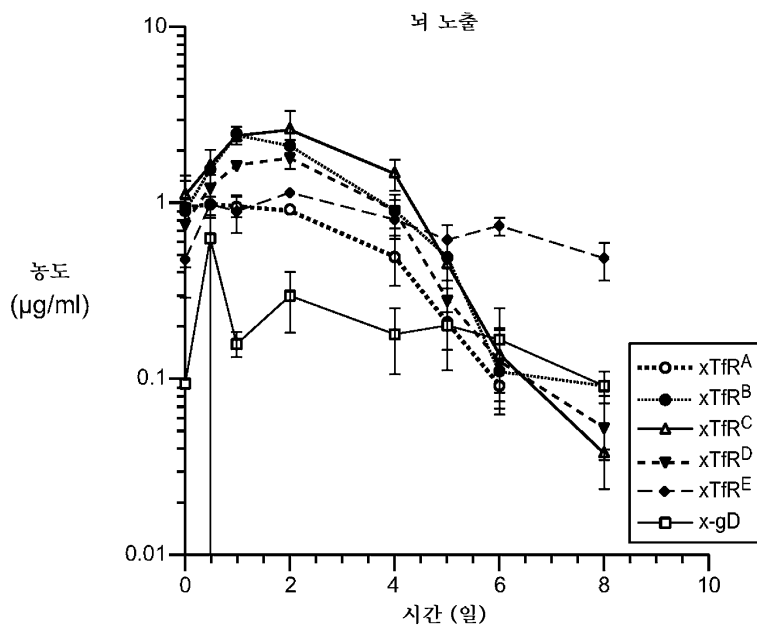
도면7b

1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ  
 51 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP  
 101 WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPPREAK  
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
 201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (서열 15)

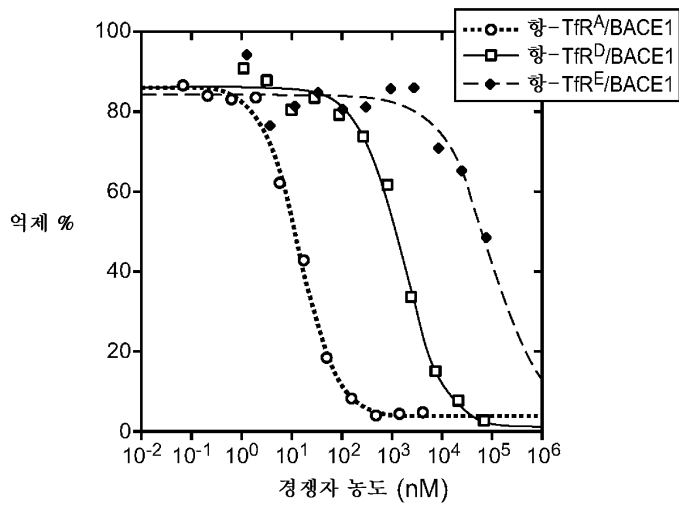
도면8a



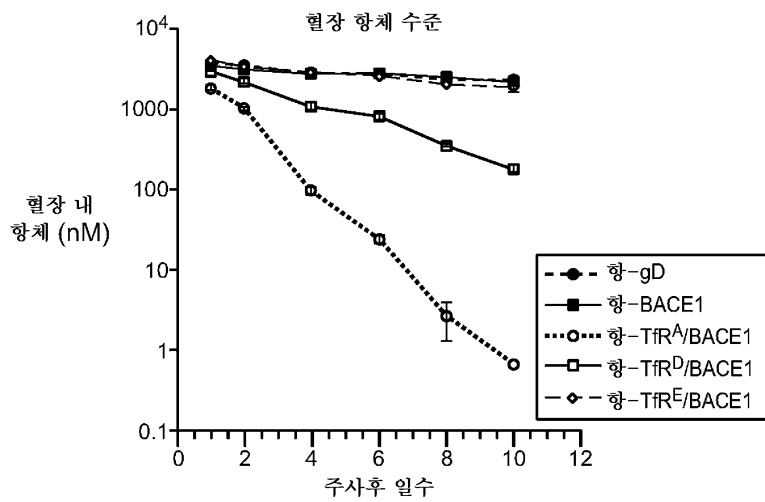
도면8b



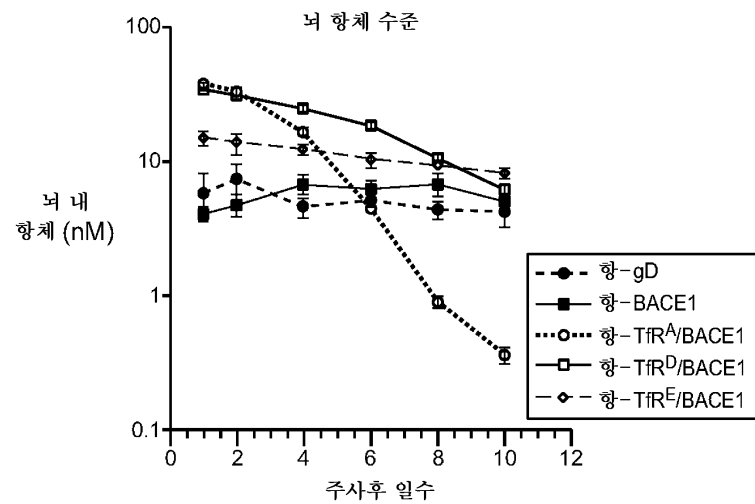
도면9a



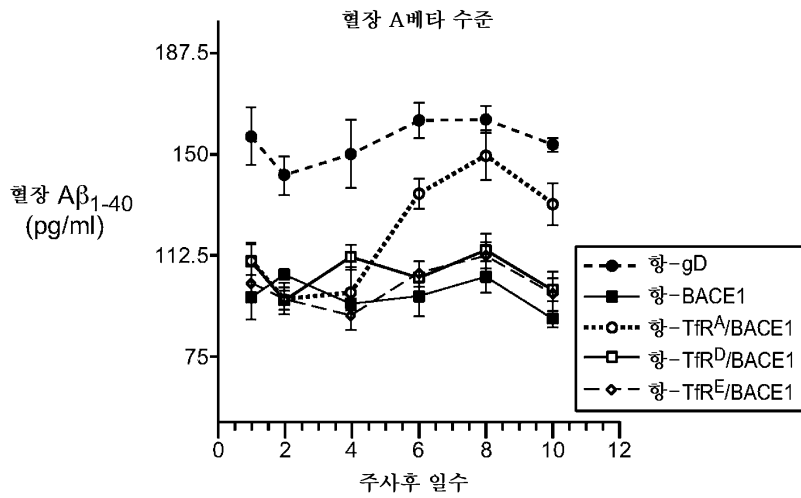
도면9b



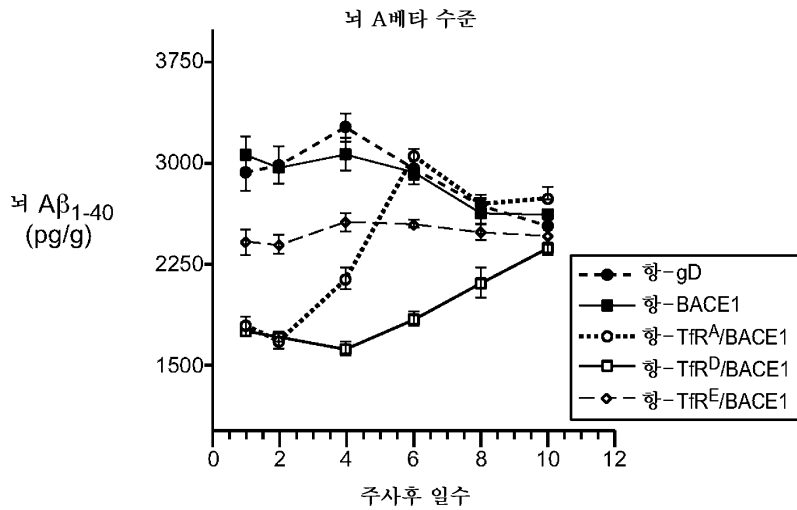
도면9c



도면9d

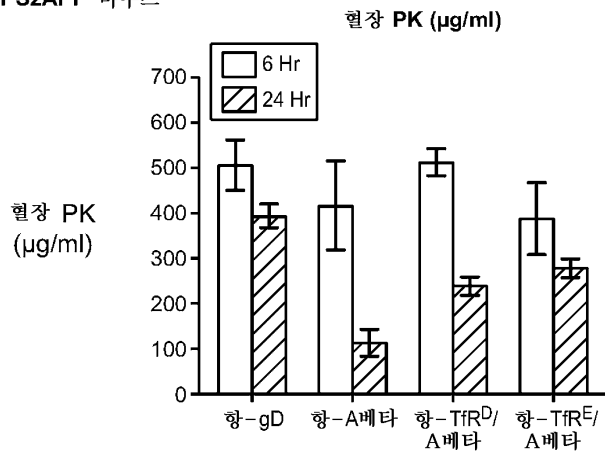


도면9e



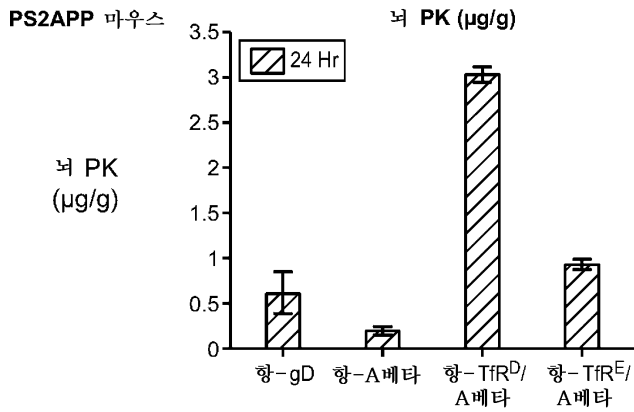
도면10a

PS2APP 마우스

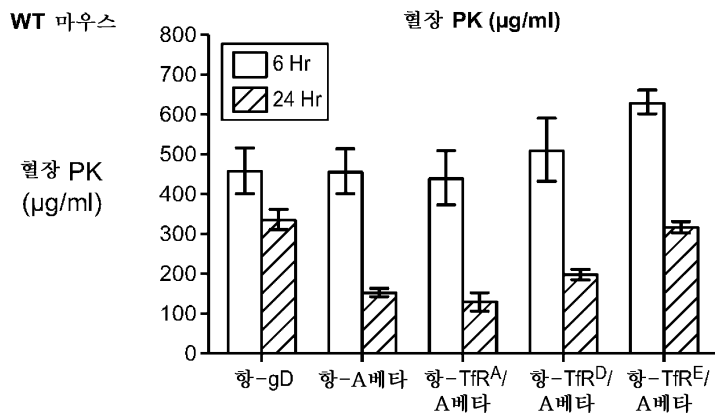




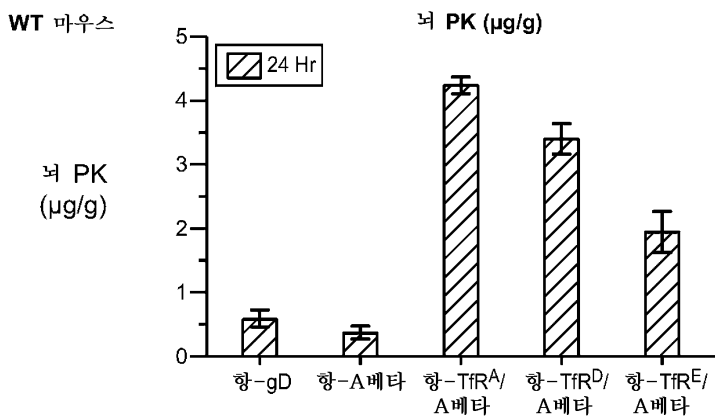
도면10b



도면11a



도면11b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

<120> LOW AFFINITY BLOOD BRAIN BARRIER RECEPTOR ANTIBODIES

AND USES THEREFOR

<130> P4499R1-WO

<141> 2011-11-29

<150> US 61/418,223

<151> 2010-11-30

<160> 15

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser  
 20 25 30  
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 35 40 45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 80 85 90  
 Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105  
 Ile Lys Arg

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser  
                          20                    25                    30  
  
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
                          35                    40                    45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
                          50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
                          65                    70                    75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
                          80                    85                    90  
 Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
  
                          95                    100                    105  
 Ile Lys Arg

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser  
                          20                    25                    30  
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
  
                          35                    40                    45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
                          50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
                          65                    70                    75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 80 85 90  
 Gly Tyr Asn Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 4

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

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

Ile Lys Arg

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Val Ala  
                          20                    25                    30  
 Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
                          35                    40                    45  
 Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
    50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
    65                    70                    75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
    80                    85                    90  
 Asp Ala Thr Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
    95                    100                    105  
 Ile Lys Arg

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 6

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



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

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Gly Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr  
 50 55 60  
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val  
 95 100 105  
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 8

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Leu
				20						25				30
Gly	Tyr	Gly	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35						40				45
Glu	Trp	Val	Gly	Trp	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr
				50						55				60
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser
				65						70				75
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80						85				90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Pro	Phe	Ser	Pro	Trp	Val
				95						100				105
Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				110						115				

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 9

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

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

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
   1                    5                            10                            15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser  
                             20                            25                            30  
 Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
                             35                            40                            45  
 Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
                             50                            55                            60  
  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
                             65                            70                            75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
                             80                            85                            90  
 Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
                             95                            100                            105  
 Ile Lys Arg

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400>

11

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5						10				15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser
				20						25				30
Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35						40				45
Leu	Leu	Ile	Trp	Tyr	Ala	Ser	Trp	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50						55				60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65						70				75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80						85				90
Tyr	Ser	Tyr	Ser	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95						100				105
Ile	Lys	Arg												

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 12

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 80 85 90  
 Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105  
 Ile Lys Arg

<210> 13

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Tyr  
 20 25 30

Tyr Ser Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr  
 50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr  
 95 100 105



Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   110                  115                  120  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   125  
 <210> 14  
 <211> 438  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> sequence is synthesized  
 <400> 14  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
  
       1                  5                  10                  15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
                   20                  25                  30  
 Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                   35                  40                  45  
 Glu Leu Val Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr  
                   50                  55                  60  
 Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
                   65                  70                  75  
  
 Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
                   80                  85                  90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   95                  100                  105  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
                   110                  115                  120  
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
                   125                  130                  135  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
  
                   140                  145                  150  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
                   155                  160                  165

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 170 175 180

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys  
 185 190 195

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val  
 200 205 210

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 215 220 225

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 305 310 315

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 320 325 330

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 335 340 345

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 350 355 360

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 365 370 375

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 380 385 390

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
 395 400 405

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

410 415 420

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

425 430 435

Ser Leu Gly

<210> 15

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val

110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 155 160 165  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 170 175 180  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 185 190 195  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 200 205 210  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 215