

명세서

발명의 명칭: 비염증성 식세포작용 유도 활성을 갖는 융합분자

기술분야

- [1] 본 발명은 비염증성 식세포작용 유도 활성을 갖는 융합분자에 관련된 것으로서, 이의 단백질중 등 물질의 이상 축적에 의해 일어나는 질환의 예방 또는 치료용도로 활용가능성을 제시한다.

[2]

배경기술

- [3] 많은 퇴행성 질환은 특정 단백질의 비정상적인 접힘(folding), 폴리머화(polymerization) 및 축적을 특징으로 한다. 이러한 단백질중(proteopathy)에는 여러 종류의 아밀로이드증(amyloidosis)이 포함된다.
- [4] 아밀로이드증(amyloidosis)은 아밀로이드로 불리는 비정상적인 단백질이 조직에 축적되어 나타나는 질환이다. 아밀로이드는 7-13 nm의 직경 및 베타 시트(β -sheet) 구조를 가지고 현미경 하에서 보면 섬유성 형태로 나타나는 단백질 덩어리로, Thioflavin T (ThioT) 및 콩고 레드(congo red)에 의해 염색되는 특징을 가지고 있다. 아밀로이드는 정상적인 체내에서 발견되지 않으며, 현재까지 36가지 단백질이 이를 형성할 수 있음이 보고되어 있다 (Picken, *Acta Haematol.* (2020), 143:322-334). 대표적인 아밀로이드증에는 알츠하이머 병(Alzheimer's disease), 파킨슨 병(Parkinson's disease), 헌팅턴 병(Huntington disease) 및 프리온 병(prion disease) 등의 신경질환이 포함되며, 그 외에도 원인 단백질과 영향받은 장기에 따라 다양한 양상을 가지는 다수의 아밀로이드증이 존재한다.
- [5] 알츠하이머 병은 치매의 가장 큰 원인이며 학습과 기억 장애를 동반하는 치명적인 질환이다. 2050년에는 세계 인구 중 1억 3천만 명이 알츠하이머 병을 앓게 될 것으로 예측되고 있으며, 이미 65세 이상 인구 중에서는 9명당 1명이 알츠하이머 병으로 진단받고 있다.
- [6] 알츠하이머 병은 아밀로이드 전구단백질(Amyloid precursor protein; APP)이 비정상적으로 분해되어 생기는 베타-아밀로이드($A\beta$) 단백질이 뇌 세포막 바깥에 침착되어 쌓이는 특이점을 보이며, 이와 동반되어 미세소관(microtubule)에 결합하는 타우(tau) 단백질의 과인산화에 따른 비정상적인 결합을 나타낸다.
- [7] 이 중, 베타-아밀로이드가 뭉쳐서 생기는 올리고머(oligomer)와 피브릴(fibril)은 다양한 경로를 통해 시냅스(synapse) 기능 저하 및 세포 독성을 일으키며, 뇌에서 면역을 담당하는 별아교세포(astrocyte) 및 미세아교세포(microglia)의 기능 변화를 통해 다시 신경 세포에 악영향을 끼치는 악순환이 이루어진다는 것이 최근 보고되고 있다.
- [8] 현재까지의 FDA 승인된 알츠하이머 병 치료제는 아세틸콜린(Acetylcholine)

분해를 억제하거나 NMDA 수용체의 활성을 억제하는 약물들이며, 이들은 병의 근본 치료가 아니라 증상의 일시적인 완화만을 목표로 한다. 따라서 아직까지 알츠하이머 병을 근본적으로 치료할 수 있는 방법은 존재하지 않으며 이에 따라 인구 고령화 시대에 있어서 환자 치료 및 케어에 가장 고비용이 드는 질환으로 알려져 있다.

- [9] 알츠하이머 병의 근본적인 치료를 위해 현재까지 수십 년 동안 베타-아밀로이드의 생성 억제 및 제거에 중점을 두고 약 개발이 이루어지고 있다. 하지만 안타깝게도 대부분의 베타-아밀로이드의 생성 억제 및 제거를 위해 개발된 알츠하이머 치료 약물들이 임상 단계에서 효과를 보이지 못해 실패하였다. 한 예로, 베타-아밀로이드 감소를 위한 BACE 저해제의 경우 인지기능저하가 발생한 알츠하이머 환자에서는 이미 베타-아밀로이드 플라크가 축적되고 신경세포사멸이 이루어지고 있어 추가적인 생성을 방해하는 전략이 크게 효과가 없다.
- [10] 최근 베타-아밀로이드 올리고머와 피브릴에 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체가 알츠하이머 병 환자에서 베타-아밀로이드 제거를 유도하고 인지기능을 회복시켰다는 연구결과가 보고되면서, 베타-아밀로이드 항체를 통한 알츠하이머 병 치료 전략이 새로운 희망으로 급부상하였다.
- [11] 현재까지 제안된 베타-아밀로이드 단일 클론 항체의 작용 기전으로는 베타-아밀로이드 항체가 베타-아밀로이드 올리고머와 피브릴에 결합하여 이들의 응집을 막거나, 또는 미세아교세포가 단일 클론 항체를 인식하는 Fc 수용체를 통해 베타-아밀로이드의 식세포작용(phagocytosis)을 일으키는 것 등이 있다.
- [12] 하지만 이 같은 알츠하이머 병 치료제 개발의 진전에도 불구하고 베타-아밀로이드 단일 클론 항체를 이용한 현 면역요법은, 항체 처리 환자의 55%에서 심한 이데마(edema)를 수반하는 ARIA(Amyloid-Related-Imaging-Abnormalities) 현상을 보이고 있으며, 실제 이 때문에 35% 정도의 ARIA 환자는 임상 실험 중도 제외되었다. ARIA 현상은 베타-아밀로이드 단일 클론 항체가 Fc 수용체 자극시 필연적으로 활성화되는 염증 반응에 의한 시냅스 및 세포 독성에 따른 것으로 알려져 있다.
- [13] 뇌에 존재하는 시냅스들과 신경세포들은 염증성 사이토카인에 민감하게 반응하므로 베타-아밀로이드 단일 클론 항체를 이용한 치료는 결국 베타-아밀로이드가 어느 정도 제거되더라도 동시에 신경세포 및 시냅스의 손상을 일으킬 수밖에 없는 태생적인 문제점을 가지고 있다. 또한, 단일 클론 항체와 더불어 Alector와 Denali 등의 기업들은 미세아교세포의 면역학적 기전을 조절하는 TREM2와 같은 타겟을 활성화시켜 미세아교세포의 베타-아밀로이드 제거능력을 향상시키려는 전략을 제시하여 크게 조명을 받고 있다. 하지만, 이 역시 미세아교세포가 과하게 활성화될 경우, 전반적인 식세포작용 능력의 증가로 인한 시냅스 손상이 예상된다.

- [14] 따라서, 앞으로 알츠하이머병의 치료에 있어 중요한 과제는 염증 반응과 시냅스 손상을 일으키지 않으면서 베타-아밀로이드 올리고머와 피브릴만을 선택적으로 제거할 수 있는 방법을 개발하는 것이며, 이러한 약물은 알츠하이머병 치료에 획기적인 기여를 할 수 있을 것으로 예상된다.
- [15] 더 나아가, 위와 같이 염증 반응과 이에 따른 추가적인 조직 손상을 일으키지 않으면서 목표로 하는 이상 축적 물질, 예컨대 단백질증의 원인이 되는 이상 축적 단백질을 선택적으로 제거할 수 있는 방법을 넓게 적용하여 타우 (Tau)나 알파-시누클린(α -Synuclein) 및 헌팅틴(Huntingtin) 등 이상 축적된 단백질을 선택적으로 제거할 수 있는 방법을 개발할 수 있을 것이다. 이러한 약물은 헌팅틴병 등의 신경질환뿐 아니라, 특정 물질의 이상 축적과 관련된 질환 전반의 치료에 획기적인 기여를 할 수 있을 것으로 예상된다.

[16]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [17] 본 발명은 식세포작용 유도 활성을 갖는 융합분자에 관련된 것으로서, 이의 표적 물질의 이상 축적에 의한 질병의 예방 또는 치료용도로 활용가능성을 제시하는 것에 그 목적이 있다.
- [18] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 당업계 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[19]

과제 해결 수단

- [20] 본 발명의 일 양태는 TAM 수용체 결합능을 갖는 제1영역; 및 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제2영역을 포함하는, 식세포작용 유도 활성을 갖는 융합분자를 제공한다.
- [21] 여기서, 상기 TAM 수용체는 구체적으로 Tyro3, Axl 및 MerTK로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 이들은 라미닌 G-유사 도메인(laminin G-like domain, 또는 LG domain)과 결합하여 식세포작용(phagocytosis)을 유도할 수 있다.
- [22] 상기 제1영역은 Gas6, ProS1, Tubby, Tulp1, Gal3 또는 이들의 활성 단편을 포함하는 것일 수 있는데, 이들 고유의 TAM 수용체와의 상호작용을 통한 식세포작용(phagocytosis) 유도능이 보존된 형태의 단백질이라면 그 형태나 범위에 있어 특별히 제한되는 것은 아니다. 상기 제1영역은 바람직하게 Gas6, ProS1 또는 이들의 활성 단편 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [23] 보다 구체적으로, 상기 제1영역은 Gas6 또는 ProS1의 라미닌 G-유사 도메인, 또는 이의 활성 단편을 포함하는 것일 수 있고, 이들은 다양한 조직에서 강하게 발현되는 식세포작용 관련 결합 분자(bridging molecule)로서 라미닌 G-유사

- 도메인을 포함하고 있어 TAM 수용체를 통해 식세포작용을 유도할 수 있다.
- [24] 상기 라미닌 G-유사 도메인은 구체적으로 LG1 도메인, LG2 도메인 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 LG1 도메인과 LG2 도메인을 모두 포함하는 것일 수 있는데, 이들은 상기 TAM 수용체와 결합하여 식세포작용(phagocytosis)을 유도할 수 있다.
- [25] 상기 제1영역은 서열번호 1 및 서열번호 2 중 하나 이상; 또는 서열번호 3 및 서열번호 4 중 하나 이상;의 서열을 포함하는 펩타이드인 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 제1영역은 서열번호 1 및 서열번호 2의 서열을 모두 포함하는 서열; 또는 서열번호 3 및 서열번호 4를 모두 포함하는 서열; 중 어느 하나를 포함하는 펩타이드인 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게 서열번호 5 또는 서열번호 6의 서열을 포함하는 펩타이드인 것일 수 있다. 상기 서열번호의 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 아미노산 서열뿐만 아니라 아미노산 서열 변이체도 포함한다. 상기 서열 변이체란, 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미하고, 상기 융합분자의 활성을 유지하는 한, 단백질의 최종 구조물에서 어떤 절단, 결실, 삽입, 치환 등과 이들의 조합도 가능하다. 서열 변이체의 한 예는, 활성화에 필수적이지 않은 부위의 아미노산 잔기를 절단 또는 결실한 형태이거나, 자가억제에 중요한 부위의 아미노산 잔기 치환시킨 형태이다. 또한 경우에 따라서는, 인산화(phosphorylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다. 이러한 서열의 변이와 수식을 통하여, 아미노산 서열상의 변이에 의해 단백질의 기능 및/또는 안정성 (열 안정성, pH 안정성, 구조 안정성 등) 및/또는 용해도가 증가될 경우 더욱 바람직하다.
- [26] 상기 아미노산 서열에서 변이를 유발하는 방법은 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 변이시킴으로써 변경하고자 하는 아미노산 서열에 해당하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 갖도록 제조하는 방법을 이용하는 것으로, 이를 코딩하는 유전자를 획득하는 방법은 당 분야에서 잘 알려져 있는 모든 돌연변이 기술을 사용하여 생체 내 또는 실험관 내에서 돌연변이될 수 있다. 예컨대, 사이트-다이렉트 돌연변이(site-directed mutagenesis) (Hutchinson et al., *J. Biol. Chem.*, 253:6551, 1978; Zoller and Smith, *DNA*, 3:479-488, 1984; Oliphant et al., *Gene*, 44:177, 1986; Hutchinson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:710, 1986), TAB 링커(Pharmacia), PCR 기술(Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA" in *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Chapter 6, pp. 61-70) 등이 사용될 수 있다.
- [27] 또한, 상기 제1영역이 Gas6 또는 ProS1의 라미닌 G-유사 도메인(laminin G-like domain), 또는 이의 활성 단편을 포함하는 경우, 상기 제1영역은 Gla 도메인을 포함하지 않을 수 있는데, 이는 제1영역이 PS(phosphatidylserine)을 인지하지

않도록 하되, 제2영역이 표적 물질을 인지하여 식세포작용을 유도하고자 하는 목적일 수 있다.

[28] 또한, 상기 제1영역이 Gas6 또는 ProS1의 라미닌 G-유사 도메인(laminin G-like domain), 또는 이의 활성 단편을 포함하는 경우, 상기 제1영역은 Gla 도메인 및 EGF 도메인을 모두 포함하지 않을 수 있는데, 이는 전술한 Gla 도메인을 포함하지 않음으로써 얻을 수 있는 기술적 효과와 더불어, 상기 융합분자의 정제과정에서 응집(aggregation)현상을 억제하여 수율을 증대시키기 위한 목적일 수 있다.

[29]

[30] 상기 표적 물질은 생체 조직에 축적되어 질병을 일으키는 물질일 수 있다. 예컨대, 환자의 영향받은(affected), 즉 병든(diseased) 조직에 축적되어 있는 것일 수 있다. 상기 질병에 있어 축적되는 물질은 단백질, 즉 상기 질병은 단백질증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 상기 표적 물질은 아밀로이드이고, 즉, 상기 단백질증은 아밀로이드증일 수 있다. 상기 표적 물질은 하기 표1의 이상 축적 물질 중에서 선택되는 것일 수 있고, 이때 상기 질병은 각 이상 축적 물질이 검출되는 질병일 수 있다. 예컨대, 상기 단백질증은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 프라이온 병 중에서 선택되는 것일 수 있고, 이때, 상기 표적 물질은 해당 질환의 원인이 되는 이상 축적된 단백질일 수 있으며, 즉, 각각(respectively) 베타-아밀로이드(β -Amyloid), 타우(Tau), 알파-시누클린(α -Synuclein), 헌팅턴(Huntingtin), 프라이온(prion) 단백질일 수 있다.

[31] [표1]

이상 축적 물질	약자	질병
Amyloid precursor protein 유래의 β -Amyloid	A β	알츠하이머병, 아밀로이드증 동반 유전성 뇌출혈(Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis) 등
α -Synuclein	A α Syn	파킨슨병, 파킨슨성 치매, 루이바디 치매(Dementia with Lewy bodies), 다계통 위축증(Multiple System Atrophy) 등
PrP ^{Sc}	APrP	전파성 해면양뇌증(Transmissible Spongiform Encephalopathy; Fatal familial insomnia, Gerstmann-Straussler-Scheinker disease, Creutzfeldt-Jacob disease, New variant Creutzfeldt-Jacob disease 등) 등
미세소관관련단백질 타우 (Microtubule-associated protein tau)	ATau	각종 타우병증(Tauopathies; Pick's disease, Progressive supranuclear palsy, Corticobasal degeneration, Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17, Argyrophilic grain disease 등), 알츠하이머병, 파킨슨병 등
Huntingtin exon 1	(없음)	헌팅턴병 등
TAR DNA-binding protein 43 (TDP43)	(없음)	전두엽성 치매(Frontotemporal Dementia), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 등
Superoxide dismutase 1 (SOD1)	(없음)	근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 등
ABri 펩타이드	ABri	가족성 영국형 치매(Familial British dementia)
ADan 펩타이드	ADan	가족성 덴마크형 치매(Familial Danish dementia)
이뮤노글로불린 경쇄 단편	AL	경쇄 아밀로이드증(Light chain amyloidosis)
이뮤노글로불린 중쇄 단편	AH	중쇄 아밀로이드증(Heavy chain amyloidosis)
혈장 아밀로이드 A (Serum amyloid A) 단백질의 N말단 전체	AA	AA 아밀로이드증(AA 아밀로이드증)

단편		
트랜스티레틴(Transthyretin)	ATTR	노인전신성아밀로이드증(Senile systemic amyloidosis), Familial amyloid polyneuropathy, Familial amyloid cardiomyopathy, Leptomeningeal amyloidosis
베타-2 마이크로글로불린(β -2 Microglobulin)	A β 2M	투석관련 아밀로이드증(Dialysis related amyloidosis), 유전성 내장 아밀로이드증(Hereditary visceral amyloidosis)
아포지질단백질 AI(Apolipoprotein AI)의 N말단 단편	AApoAI	ApoAI 아밀로이드증
C말단이 연장된 아포지질단백질 AII	AApoAI I	ApoAII 아밀로이드증
아포지질단백질 AIV의 N말단 단편	AApoAI V	ApoAIV 아밀로이드증
아포지질단백질 C-II	AApoCI I	ApoCII 아밀로이드증
아포지질단백질 C-III	AApoCI II	ApoCIII 아밀로이드증
겔솔린(Gelsolin) 단편	AGel	핀란드형(Finnish type) 가족성 아밀로이드증
라이소자임(Lysozyme)	ALys	유전성 비신경성 전신 아밀로이드증(Hereditary non-neuropathic systemic amyloidosis)
피브리노겐 α 쇄(Fibrinogen alpha chain) 단편	AFib	피브리노겐 아밀로이드증(Fibrinogen amyloidosis)
N말단이 절단된 시스테인 C (Cystatin C)	ACys	아이슬란드형(Icelandic type) 아밀로이드증 동반 유전성 뇌출혈
아밀린(Amylin, IAPP)	AIAPP	2형 당뇨병(Diabetes mellitus type 2), 인슐린종(Insulinoma)
칼시토닌(Calcitonin)	ACal	갑상선수질암(Medullary carcinoma of the thyroid)
심방나트륨이노인자(A	AANF	심장 부정맥(Cardiac arrhythmias), 격리심방

trial natriuretic factor)		아밀로이드증(Isolated atrial amyloidosis)
프롤락틴(Prolactin)	APro	뇌하수체 프롤락틴선종(Pituitary Prolactinoma)
인슐린(Insulin)	AIns	주입 국소성 아밀로이드증(Injection-localized amyloidosis)
락타드헤린(Lactadherin 또는 Medin)	AMed	대동맥중합병증(Aortic medial amyloidosis)
락토티랜스페린(Lactotransferrin 또는 Lactoferrin)	ALac	젤라틴드롭형 각막이상증(Gelatinous drop-like corneal dystrophy)
ODAM(Odontogenic ameloblast-associated protein)	AOAAP	치원성석회화상피종(Calcifying epithelial odontogenic tumors)
SP-C(Pulmonary surfactant-associated protein C)	ASPC	폐포 단백증(Pulmonary alveolar proteinosis)
LECT-2(Leukocyte cell-derived chemotaxin-2)	ALECT2	신장 LECT2 아밀로이드증(Renal LECT2 amyloidosis)
갈렉틴-7(Galectin-7)	Agal7	태선양 아밀로이드증(Lichen amyloidosis), 황반 아밀로이드증(Macular amyloidosis)
코네오데스모신(Corneodesmosin)	ACor	두부 단순 감모증(Hypotrichosis simplex of the scalp)
TGFBI (또는 Keratoepithelin)의 C말단 단편	AKer	과립형각막이상증(Lattice corneal dystrophy; type I, 3A 또는 Avellino가 있음)
SGL(Semenogelin-1)	ASem1	정낭 아밀로이드증(Seminal vesicle amyloidosis)
S100 단백질(A8 또는 A9)	(없음)	전립선암(Prostate cancer)
엔푸비르타이드(Enfuvirtide)	AEnf	주입 국소성 아밀로이드증(Injection-localized amyloidosis)

[32]

[33] 상기 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제2영역은 상기 표적 물질에

특이적으로 결합하는 항체, 이의 활성 단편, 항체 유사 단백질, 펩타이드, 압타머 및 가용성 수용체 중에서 선택되는 것일 수 있으나, 해당 표적 물질에 특이적으로 결합할 수 있는 형태의 것이라면 특별한 제한은 없다.

- [34] 여기서 항체 또는 이의 활성 단편은, 예컨대 i) IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 중에서 선택된 면역글로불린; ii) Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, VHH, VNAR 등과 같은 천연(native) 항체 단편; iii) scFv, dsFv, ds-scFv, (scFv)₂, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), 펜타바디(pentabody) 등과 같은 엔지니어링된 항체; 중에서 선택된 것일 수 있다. 상기 항체 또는 이의 활성 단편은, 예컨대 해당 표적 물질에 대해 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체로부터 유래한 6개의 상보성 결정 영역(complementarity-determining regions, CDRs)에 기반한 Mab, Fab 또는 이의 단일사슬 Fv 단편(scFv)일 수 있다. 즉, 상기 표적 물질에 특이적으로 결합하는 단백질 또는 이의 활성 단편은 해당 표적 물질에 특이적으로 결합하는 활성에 필수적인 부분을 포함하는 것으로서, 상기 제1영역과 연결되어, 염증반응을 수반하지 않으면서 시냅스 손상을 일으키지 않는 효과를 나타내는 것이라면 그 형태나 범위에 있어 특별히 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 상기 표적 물질은 베타-아밀로이드일 수 있고, 이때 상기 표적 물질에 특이적으로 결합하는 단백질 또는 이의 활성 단편에 있어 아두카누맙(aducanumab) 또는 이의 단일사슬 Fv 단편을 포함하는 것일 수 있다. 상기 제2영역은 아두카누맙(aducanumab), 세모리네맙(semorinemab) 및 신파네맙(cinpanemab)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로부터 유래한 6개 상보성 결정 영역(CDR)에 기반한 Mab, Fab, 또는 단일사슬 Fv 단편을 포함하는 것일 수 있다.
- [35] 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 Fc 영역을 포함하지 않는 것일 수 있으며, 바람직하게 Fc 수용체(특히 Fcγ 수용체)에 결합하지 않는 Fc 영역 변이체를 포함할 수 있다. 이러한 Fc 영역 변이체는 정제 등 물성을 향상시키기 위한 것으로 포함될 수 있다.
- [36] 상기 항체 유사 단백질(antibody-like protein)은 항체와 같이 표적 물질에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드(scaffold)를 말한다. 항체 유사 단백질은 평균 150 kDa 정도인 항체에 비해 2-20 kDa로 크기가 작아 항체가 닿을 수 없는 결합 부위를 표적으로 할 수 있게 설계될 수 있다. 항체보다 고온에서 안정적이며, 바이러스, 효모 등 비 포유류 세포를 이용한 합성, 화학적 합성이 훨씬 용이한 것으로 알려져 있다.
- [37] 본 발명에서, 압타머란 특정 물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA(ssDNA) 또는 RNA를 말한다. 압타머는 특정 물질에 대한 친화도가 매우 높고 안정하고, 비교적 단순한 방법으로 합성할 수 있으며, 결합력을 높이기 위해 다양한 변형이 가능하고, 세포, 단백질, 및 작은 유기물질까지도 표적물질이 될 수 있기 때문에, 그 특이성 및 안정성이 이미 개발되어 있는 항체에 비해 매우 높은 특징이 있다. 또한 압타머의 제조방법은

공지된 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 방법을 통해 제조될 수 있다. 이러한 압타머는 예컨대, 베타 아밀로이드, 타우, 알파-시누클레인에 특이적으로 결합하는 압타머를 공지된 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 방법을 통해 제조한 후 상기 제1영역과 연결할 수 있으며, 이를 통해 본 발명에 따른 융합분자를 생성할 수 있다.

- [38] 본 발명의 압타머는 베타 아밀로이드, 타우, 알파-시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 제한되지 않으며, 압타머에 사용되는 염기는 특별한 언급이 없는 한, A, G, C, U 이들의 deoxy 형태의 염기들로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [39] 또한, 상기 압타머는, 안정성 증진을 위하여, 5' 말단 부위, 중간 부위, 3' 말단 부위, 또는 양 말단 부위에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), idT(inverted deoxythymidine), LNA(Locked Nucleic Acid), 2'-메톡시 뉴클레오사이드, 2'-아미노 뉴클레오사이드, 2'F-뉴클레오사이드, 아민 링커, 티올 링커 및 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것이 결합되어 변형된 것일 수 있다. idT(inverted deoxythymidine)는 일반적으로 뉴클레아제에 대한 내성이 약한 압타머의 뉴클레아제에 의한 분해를 막기 위하여 사용되는 분자 중 하나로서, 핵산단위체는 앞 단위체의 3'-OH와 다음 단위체의 5'-OH와 결합하여 사슬을 이루지만, idT는 앞 단위체의 3'-OH와 다음 단위체의 3'-OH를 결합하여 3'-OH가 아닌 5'-OH가 노출이 되도록 인위적인 변화를 가함으로써 뉴클레아제의 일종인 3'엑소뉴클레아제(3'exonuclease)에 의한 분해를 억제하는 효과를 일으키는 분자이다.
- [40] 본 발명의 가용성 수용체(soluble receptor)는 표적 물질, 즉 내재적 리간드(endogenous ligand)와 결합할 수 있는 활성을 가지는 영역(domain)을 포함하는 것으로서, 상기 영역은 내재적인 막 수용체 또는 세포 내 수용체에서 유래한 것 또는 그 유도체(derivative)일 수 있다. 이때, 본 발명의 융합분자의 제2영역에 포함되는 상기 가용성 수용체는 바람직하게 상기 내재적인 수용체에서 표적 물질에 대한 결합 외의 활성을 가지는 영역은 제거된 것을 이용할 수 있다.
- [41] 본 발명에서 상기 제2영역일 수 있는 펩타이드는 표적 물질에 특이적으로 결합할 수 있는 아미노산을 모노머(monomer)로 한 폴리펩타이드 중 상기 항체 또는 이의 활성 단편, 항체 유사 단백질 및 가용성 수용체를 제외한 나머지를 의미한다.
- [42]
- [43] 본 발명에 따른 융합분자는 TAM 수용체와의 상호작용을 통해 상기 식세포작용을 유도하게 되므로, 상기 식세포작용은 TAM 수용체를 발현하는 세포에서 유도되는 것일 수 있다. 식세포작용(phagocytosis)은 일반적으로 세포나 0.5 μm 이상의 입자를 삼키는 것으로, 해당 세포 또는 입자를 붙잡고(tether),

삼킨(engulf) 후 분해(degrade)시키는 과정을 포함한다. 이때, 식세포작용은 삼켜진(internalized) 세포나 입자를 에워싸는 포식소체(phagosome)를 형성하며, 포식소체와 리소좀(lysosome)의 융합에 의한 포식용해소체(phagolysosome) 내에서 분해하는 과정을 포함하기도 한다. 이때, 식세포작용 중에서 아포토시스나 괴사(apoptosis or necrosis) 기작으로 죽거나 죽어가는 세포에 대한 것을 efferocytosis라고 하기도 한다.

- [44] 상기 TAM 수용체를 발현하는 세포는 한 가지 이상의 전문적인 포식세포(professional phagocyte), 한 가지 이상의 비전문적인 포식세포(non-professional phagocyte) 또는 그 조합인 것일 수 있다. 여기서, 전문적인 포식세포는 주된 역할이 포식작용을 통해 사멸한 세포 및 축적된 찌꺼기 등을 제거하는 데에 있는 세포를 말하며, 대식세포(macrophage), 호중구(neutrophil), 수지상세포(dendritic cell) 및 비만세포(mast cell)가 여기에 포함된다. 대식세포는 대체로 감염의 길목이 될 수 있는 각 조직에 머물게 되고, 많은 경우 조직별로 다른 이름으로 불리는데, 지방조직의 지방조직 대식세포(adipose tissue macrophage), 골수나 혈액의 단핵구(monocyte), 간의 쿠퍼 세포(Kuffer cell), 림프절의 부비동 조직구(sinus histiocyte), 폐포의 폐포 대식세포(alveolar macrophage), 결합조직의 조직구(histiocyte) 내지는 그 연결체인 거대세포(giant cell), 중추신경계의 미세아교세포(microglia), 태반의 호프바우어 세포(Hopfbauer cell), 신장의 사구체내 혈관사이세포(Intraglomerular mesangial cell), 뼈의 파골세포(osteoclast), 육아종(granulomas)의 상피모양세포(epithelioid cell), 비장 적색속질(red pulp of spleen)의 적색속질 대식세포(red pulp macrophage), 복강(peritoneal cavity)의 복막 대식세포(peritoneal macrophage), 페이에르판(Peyer's patch)의 리소맥(LysoMac) 등을 그 예로 들 수 있다. 반면 비전문적인 포식세포는 해당 포식세포가 상주하는 조직에 특이적인 기능을 주로 하되 필요시 포식작용을 할 수 있는 세포를 의미하며, 상피세포(epithelial cell), 내피세포(endothelial cell), 섬유아세포(fibroblast), 중간엽세포(mesenchymal cell) 등이 해당되고, 일부 조직 특이적인 세포, 예컨대 중추신경계의 별아교세포(astrocyte)나 희돌기세포(oligodendrocyte), 망막의 뮐러세포(Muller glia), 간의 간세포(hepatocyte), 근육의 위성세포(satellite cell), 고환의 세르톨리세포(Sertoli cell) 등과, 자연살해세포(natural killer cell), 대형과립림프구(large granular lymphocyte), 호산구(eosinophil), 호염구(basophil), B세포(B cell) 등의 일부 림프구를 포함한다. 본 발명에 따른 융합분자는 제거하고자 하는 표적 물질 축적된 조직에 특이적인 식세포(phagocyte) 내에서 식세포작용을 유도할 수 있다. 예컨대, 뇌 내에 축적된 이상 단백질을 제거하고자 하는 경우, 상기 식세포작용은 별아교세포(astrocyte), 미세아교세포(microglia), 희돌기세포(oligodendrocyte) 또는 이들의 조합에서 유도될 수 있다. 이는 예컨대 본 발명에 따른 융합분자를 이러한 조직에 국소투여하거나 해당 조직 내 세포가 상기 융합분자를 발현 및 분비하도록

조작하여 유도될 수 있다.

- [45] 상기 식세포작용의 유도는 염증반응을 수반하지 않는 것일 수 있다. 이는 표적 물질을 제거하면서도 염증반응을 유도하지 않고, 염증반응으로 인한 조직 손상을 억제할 수 있다는 점에서, 해당 표적 물질의 축적에 의한 조직의 기능 저하를 기존의 기술에 비해 좀더 안전하게 치료할 수 있다.
- [46]
- [47] 상기 융합분자는 추가로 표지(tag)를 포함할 수 있다. 이러한 표지를 융합분자에 부가하면 이를 상기 융합분자의 정제나, 발현, 작용여부 또는 작용과정 등의 확인에 이용할 수 있다.
- [48] 상기 표지는 His-태그, T7-태그, S-태그, FLAG-태그, Strep-태그, 씨오레독신 (Trx: thioredoxin)-태그, 히스-패치 시오레독신 (His-patch thioredoxin)-태그, *lacZ* (L-Galactosidase)-태그, 클로로암페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (chloramphenicol acetyltransferase)-태그, *trpE*-태그, 아비딘/스트렙타아비딘/스트립 (avidin/streptavidin/Strep)-태그, T7gene10-태그, 스타필로코칼 단백질 A (staphylococcal protein A)-태그, 스타필로코칼 단백질 G (streptococcal protein G)-태그, GST (glutathione-S-transferase)-태그, DHFR (dihydrofolate reductase)-태그, CBD's (cellulose binding domains)-태그, MBP (maltose binding protein)-태그, 갈락토즈-결합 단백질 (galactose-binding protein)-태그, 칼모듈린 결합 단백질 (CBP: calmodulin binding protein)-태그, HAI (hemagglutinin influenza virus)-태그, HSV-태그, B-(VP7 protein region of bluetongue virus)-태그, 폴리스스테인 (polycysteine)-태그, 폴리페닐알라닌 (polyphenylalanine)-태그, (Ala-Trp-Trp-Pro)_n-태그, 폴리아스파틱 에시드 (polyaspartic acid)-태그, c-myc-태그, lac-억제자 (*lac* repressor)-태그 등이 있으며, 이로 제한되지 않는다. 상기 표지는 목적 단백질의 N-말단, C-말단 또는 내부에 위치할 수 있다.
- [49] 상기 융합분자는 추가로 N말단에 시그널 펩타이드(signal peptide 또는 리더 서열(leader sequence))를 포함할 수 있다. 시그널 펩타이드는 분비 경로(secretory pathway)를 향하는 단백질의 합성 초기에 N 말단에 존재하는 짧은 펩타이드로서, 해당 단백질의 세포 내 위치, (막 단백질의 경우) 막 방향성(membrane topology) 등을 지정하는 것으로 알려져 있다. 상기 시그널 펩타이드는 상기 융합분자가 발현되어 세포외로 분비되는 과정에서 잘려나갈 수 있다.
- [50] 상기 융합분자에 포함되는 전술한 제1영역, 제2영역, 표지, 시그널 펩타이드 또는 최소한의 기능성을 가지는 영역(예컨대 LG1 및 LG2 영역 또는 scFv의 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역)은 서로 직접 연결되거나, 짧은 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드를 포함하는 링커에 의해 연결될 수 있다. 일반적으로 링커는 2 내지 500개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 상기 링커는 전술한 각 영역이 의도한 활성을 가질 수 있도록 연결하여 상기 융합분자가 구성될 수 있도록 할 수 있는 링커라면, 특별히 그 길이나 종류에 제한되지 않는다. 흔하게 쓰이는 올리고펩타이드 링커로 (GGGGS)_n, 즉 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 유닛이 하나 이상

반복된 형태의 링커를 예로 들 수 있다. 그 밖에 (GSSGGS)_n, KESGSVSSEQLAQFRSLD, EGKSSGSGSESKST, GSAGSAAGSGEF, (EAAAK)_n, CRRRRRREAEAC, A(EAAAK)4ALEA(EAAAK)4A, GGGGGGGG, GGGGGG, AEAAAKEAAAKA, PAPAP, (Ala-Pro)_n, VSQTSKLTRAETVFPDV, PLGLWA, TRHRQPRGWE, AGNRVRRSVG, RRRRRRRR, GFLG, 또는 GSSGSGSSGSGGGDEADGSRGSQKAGVDE 등도 링커로 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [51]
- [52] 본 발명의 일 양태로서, 상기 융합분자를 코딩하는 핵산분자 및 이를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [53] 상술한 바와 같이, 상기 융합분자를 코딩하는 핵산분자 서열은, 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다.
- [54] 상기 융합분자를 코딩하는 핵산분자 서열은 천연에서 분리되거나 인위적으로 합성 또는 유전적 재조합 방법을 통하여 제조할 수 있다. 상기 융합분자를 코딩하는 핵산분자 서열은 이를 발현할 수 있는 발현벡터에 작동적으로 연결시켜 제공된다.
- [55] 상기 "발현벡터"란 목적 유전자를 코딩하는 핵산 서열을 적합한 숙주세포로 도입하여 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 이런 발현벡터에는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 바이러스 벡터 등의 모든 벡터를 포함한다.
- [56] 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트를 가진다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 일부로 간주되며, 단백질 코딩 서열은 벡터에서 작동 가능하도록 인프레임(in frame)에 있도록 제작한다. 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 통상의 발현벡터는 선택 마커를 포함한다. 발현벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [57] 상기 발현벡터는 바람직하게 숙주세포에서 상기 융합분자를 발현시킨 후 정제 및 분리하기 위하여, 또는 생체 내 주입시 세포에 도입되어 해당 세포가 상기 융합분자를 발현, 분비할 수 있도록 구성될 수 있다. 생체 내 세포 도입을 목적으로 하는 경우, 상기 벡터는 바람직하게 비통합(non-integrating) 벡터, 즉 숙주세포의 게놈에 통합되지 않는 벡터일 수 있다.
- [58]
- [59] 본 발명의 일 양태로서, 상기 융합분자를 발현하는 세포를 제공한다.
- [60] 상기 세포는 상기 핵산분자 또는 이를 포함하는 발현벡터를 포함하도록

형질전환된 것일 수 있고, 상기 "형질전환"은 핵산분자를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 일렉트로포레이션 (electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘 (CaPO_4) 침전, 염화 칼슘 (CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

- [61] 상기 숙주 세포로는 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) (예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 (*Staphylococcus*) (예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스 (*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 아스페르길러스 (*Aspergillus*)와 같은 진균, 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*) 등을 포함하는 효모, 그 밖의 하등 진핵 세포 또는 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주 세포로 사용할 수 있다.
- [62] 상기 세포에서 융합분자를 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제의 의한 처리 (염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피 (겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다 (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deucher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)).
- [63]
- [64] 본 발명의 일 양태로서, 상기 융합분자 또는 상기 발현벡터를 포함하는, 상기 표적 물질이 생체 조직에 축적되어 일으키는 질병의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다. 여기서 상기 조성물은 상기 질병의 원인 물질, 즉 표적 물질이 축적되는 곳에 국부투여되는 것일 수 있다.
- [65] 또한, 본 발명의 일 양태로서, 상기 융합분자의 약학적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 단백질증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [66] 또한, 본 발명의 일 양태로서, 단백질증의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 상기 융합분자의 용도를 제공한다.
- [67] 상기 약학적 조성물에서 유효성분인 상기 융합분자는 "약학적 유효량"으로 포함된다. 상기 용어 "약학적 유효량"은 상술한 융합분자의 효능 또는 활성을

달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

- [68] 상기 약학적 조성물은 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 비경구적으로, 좀더 바람직하게 제거하고자 하는 표적 물질이 축적된 조직에 국소적으로 투여될 수 있다.
- [69] 본 명세서에서, "비경구적 투여"는 피하 주사, 정맥 내, 근육 내, 흉골 내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [70] 상기 약학적 조성물을 주사제로 제제화 시, 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상의 주사제 제조방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 주사제는 환자에게 투여 시 그대로 이용될 수 있도록 멸균 매질에 분산된 형태일 수도 있으며, 투여 시 주사용 증류수를 가해 적절한 농도로 분산시킨 다음 투여하는 형태일 수도 있다.
- [71] 상기 약학적 조성물을 경구투여제로 제제화 시, 담체로서 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 및 방부제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 및 항산화제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- [72] 상기 약학적 조성물의 제제화에 필요한 기술 및 약제학적으로 적절한 담체, 첨가제 등에 관해서는 당해 제제학 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려져 있으며, 이와 관련하여 문헌들 예컨대 the Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, Rowe et al., Eds., American Pharmaceuticals Association (2003); Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 20 th edition, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2000); Remington's Pharmaceutical Sciences (19 th ed., 1995) 등을 참조할 수 있다.
- [73] 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.0001-1000 $\mu\text{g/kg}$ (체중)이다.

[74]

발명의 효과

- [75] 본 발명은 식세포작용 유도 활성을 갖는 융합분자에 관련된 것으로서, 종래기술이 갖는 염증반응 활성화에 따른 조직 손상 문제를 해결할 수 있으며, 이에 따라 이상 축적된 물질, 예컨대 베타-아밀로이드, 타우, 알파-시누클린, 헌팅틴 또는 프라이온 등을 효과적으로 제거하여, 이러한 축적에 의해 일어나는 질병, 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 또는 프라이온 병의 예방 또는 치료용도로 활용이 가능하다. 이러한 융합분자는 정제된 융합분자 또는 세포 내 도입시 상기 융합분자를 발현 및 분비할 수 있는 유전자 치료제 벡터 형태로 환자에게 투여될 수 있다.
- [76] 다만, 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로

이해되어야 한다.

[77]

도면의 간단한 설명

[78] 도 1은 Gas6를 기반으로 하는 베타-아밀로이드 및 FITC 키메라 포식 유도체의 모식도이다.

[79] 도 2는 제조예 1에 따라 제조된 FLAG Tag를 포함하는 키메라 포식 유도체를 제작하고, 이를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.

[80] 도 3은 제조예 1에 따라 제조된 키메라 포식 유도체의 TAM 수용체에 대한 작용을 모식도로 나타낸 것이다.

[81] 도 4는 $\alpha A\beta$ -Gas6의 선택적인 베타-아밀로이드 섭취능력을 확인한 결과이다.

[82] 도 5는 *in vitro*에서 베타-아밀로이드 engulfment assay를 통해 HMC3 세포주에서 $\alpha A\beta$ -Gas6의 베타-아밀로이드 섭취능력을 확인한 대표도이다.

[83] 도 6은 *in vitro*에서 베타-아밀로이드 engulfment assay를 통해 HMC3 세포주에서 $\alpha A\beta$ -Gas6의 베타-아밀로이드 섭취능력을 확인한 결과이다.

[84] 도 7는 $\alpha A\beta$ -Gas6의 베타-아밀로이드 섭취능력이 TAM 수용체 중 Ax1에 의존적임을 확인한 결과이다.

[85] 도 8은 $\alpha A\beta$ -Gas6의 베타-아밀로이드 섭취능력이 TAM 수용체 중 Ax1에 의존적임을 확인한 결과이다.

[86] 도 9는 $\alpha A\beta$ -Gas6의 베타-아밀로이드 섭취능력이 TAM 수용체 중 Ax1에 의존적임을 확인한 결과이다.

[87] 도 10은 THP-Ax1 세포를 이용하여 $\alpha A\beta$ -Gas6와 아두카누맵에 의한 염증 반응 신호전달 활성화를 비교분석한 결과이다.

[88] 도 11은 THP-Ax1 세포를 이용하여 $\alpha A\beta$ -Gas6와 아두카누맵에 의한 전염증성 사이토카인 분비 수준을 비교분석한 결과이다.

[89] 도 12는 $\alpha A\beta$ -Gas6의 항염증 활성을 확인한 결과이다.

[90] 도 13은 $\alpha A\beta$ -Gas6에 의해 크게 증가한 미세아교세포의 베타-아밀로이드 제거능력을 확인한 결과이다.

[91] 도 14는 $\alpha A\beta$ -Gas6에 의해 크게 증가한 별아교세포의 베타-아밀로이드 제거능력을 확인한 결과이다.

[92] 도 15는 $\alpha A\beta$ -Gas6와 아두카누맵에 의해 변화하는 별아교세포의 전염증성 사이토카인의 전사 수준을 확인한 결과이다.

[93] 도 16은 $\alpha A\beta$ -Gas6와 아두카누맵에 의해 변화하는 BV2의 전염증성 사이토카인의 전사 수준을 확인한 결과이다.

[94] 도 17은 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 $\alpha A\beta$ -Gas6 단백질 투여를 통한 $\alpha A\beta$ -Gas6의 베타-아밀로이드 플라크 제거능력을 확인한 결과이다.

[95] 도 18은 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 $\alpha A\beta$ -Gas6 바이러스 투여를 통한 $\alpha A\beta$ -Gas6의 베타-아밀로이드 플라크 제거능력을 확인한 결과이다.

- [96] 도 19는 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 단백질 투여 시 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 미세아교세포에 의해 제거되어 리소솜에 함유된 베타-아밀로이드가 증가한 것을 확인한 결과이다.
- [97] 도 20은 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 단백질 투여 시 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 별아교세포에 의해 제거되어 리소솜에 함유된 베타-아밀로이드가 증가한 것을 확인한 결과이다.
- [98] 도 21은 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 바이러스 투여시 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 미세아교세포에 의해 제거되어 리소솜에 함유된 베타-아밀로이드가 증가한 것을 확인한 결과이다.
- [99] 도 22는 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 바이러스 투여시 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 별아교세포에 의해 제거되어 리소솜에 함유된 베타-아밀로이드가 증가한 것을 확인한 결과이다.
- [100] 도 23은 아두카누맙의 부작용으로 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 비정상적으로 증가한 미세아교세포에 의한 시냅스 소멸 현상이 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 바이러스 투여시에는 크게 회복됨을 확인한 결과이다.
- [101] 도 24는 아두카누맙의 부작용으로 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 비정상적으로 증가한 미세아교세포에 의한 시냅스 소멸 현상이 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 바이러스 투여시에는 크게 회복됨을 확인한 결과이다.
- [102] 도 25는 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 바이러스 투여시 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 인지 및 기억 능력을 확인하기 위한 실험 프로토콜이다.
- [103] 도 26은 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 바이러스 투여시 5XFAD 알츠하이머 병 모델 쥐에서 아두카누맙보다 우월하게 쥐의 인지 및 기억 능력이 회복됨을 확인한 결과이다.
- [104] 도 27은 *in vitro*에서 타우 engulfment assay를 통해 HMC3 세포주에서 $\alpha\text{Tau-Gas6}$ 의 타우 섭취능력을 확인한 결과이다.
- [105] 도 28은 *in vitro*에서 알파-시누클린 engulfment assay를 통해 HMC3 세포주에서 $\alpha\text{Syn-Gas6}$ 의 알파-시누클린 섭취능력을 확인한 결과이다.
- [106] 도 29는 *in vitro*에서 베타-아밀로이드 engulfment assay를 통해 일차배양된 별아교세포에서 $\alpha\text{A}\beta\text{-ProS1}$ 의 베타-아밀로이드 섭취능력을 확인한 결과이다.
- [107] 도 30은 *in vitro*에서 베타-아밀로이드 engulfment assay를 통해 HMC3 세포주에서 확인한 $\alpha\text{A}\beta(\text{Fab})\text{-Gas6}$ 의 베타-아밀로이드 섭취능력을 각각 확인한 결과이다.
- [108] 도 31은 *in vitro*에서 베타-아밀로이드 engulfment assay를 통해 HMC3 세포주에서 확인한 $\alpha\text{A}\beta(\text{Mab})\text{-Gas6}$ 의 베타-아밀로이드 섭취능력을 각각 확인한 결과이다.

[109]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [110] 이하, 보다 구체적으로 설명하기 위해 실시예와 실험예를 들어 상세하게

설명하기로 한다. 그러나, 하기 실시예와 실험에는 예시적인 것으로, 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[111]

[112] **제조예 1. 베타-아밀로이드 제거 활성을 갖는 Gas6 기반 융합분자의 제조(I): scFv 형태의 베타-아밀로이드 결합 영역**

[113] Gas6 단백질에 기반한 베타-아밀로이드(A β) 특이적 키메라 포식 유도체를 제작하기 위하여, 먼저 아포토틱(Apoptotic) 세포의 PS(phosphatidylserine)를 인지하는 부위인 Gla 도메인을 없애고, 그 위치에 베타-아밀로이드 특이 항체인 아두카누맵(aducanumab)의 단일사슬 Fv 단편(single-chain variable fragment; scFv)를 도입하였다(α A β -Gas6(E)).

[114] 또한, 단백질 생산의 효율성을 위해 Gas6 단백질의 내부 잔기(internal residue)에 존재하는 EGF 반복 도메인(EGF repeat domain)도 함께 제거하고 아두카누맵 scFv를 도입한 α A β -Gas6도 제작하였다(도 1).

[115] 또한, 아두카누맵의 scFv의 베타-아밀로이드 특이적 결합을 확인하기 위한 대조군으로, 아두카누맵 scFv 대신 FITC를 선택적으로 인식하는 E2 scFv를 도입한 α FITC-Gas6(E), α FITC-Gas6를 함께 제작하였다.

[116] 하기 표 2는 상기 융합분자의 제조에 관련된 아미노산 서열이고, 하기 표 3은 상기 융합분자의 제조에 관련된 뉴클레오티드 서열이다(밑줄 친 서열은 Flag tag).

[117] [32]

1. α A β -Gas6(E) (FLAG tag, Gla delete, G-/-)

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALADIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL
 QPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTKVEIKRGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
 GGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGK
 KYYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTRLAEDTAVYYCARDRGIGARRGPY
 YMDVWVGKGTTVTVSSGGGSGGGGSCINKYGSPTYTKNSGFATCVQNLDPQC
 TPNPCDRKGTQACQDLMGNFFCLCKAGWGGRLCDKDVNECSQENGGCLQIC
 HNKPGSFHCSCHSGFELSSDGRTCQDIDECADSEACGEARCKNLPGSYSC
 LCDEGFAYSSQEKACRDVDECLQGRCEQVCVNSPGSYTCHCDGRGGLKLSQ
 DMDTCEDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFD
 RFTDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHG
 MWQTISVEELARNLVIKVNRDVAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLTVGIPFH
 EKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLNGETTIQETVKVNTRMQCFVTERGSFY
 P GSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVLFAWAPDLRA
 VPLSVALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRD
 GEATLEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGGLPDVPVTSAP
 VTAFYRGCMTLEVNRRLLDLDEAAKYHSDITAHSCPPVEPAAAQGSRADYK
 DHDGDYKDHIDYKDDDDK*

2. α FITC-Gas6(E) (FLAG tag, Gla delete, G-/-)

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALAQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSC
 AASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDN
 AKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFYSDMDVWVGQGT
 LV TVSGGGGSGGGGSGGGGSSVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSW
 YQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYC
 AAWDDSLSEFLFGTGKLTVLGGGGGSGGGGSCINKYGSPTYTKNSGFATCVQ
 NLPDQCTPNPCDRKGTQACQDLMGNFFCLCKAGW
 GGRLCDKDVNECSQENGGCLQICHNKPGSFHCSCHSGFELSSDGRTCQDIDEC
 ADSEACGEARCKNLPGSYSCLCDEGFAYSSQEKACRDVDECLQGRCEQVCV
 NSPGSYTCHCDGRGGLKLSQDMDTCEDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGT
 PVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQ
 LRYNGVGRVTSSGPVINHGMWQTISVEELARNLVIKVNRDVAVMKIAVAGDLF
 QPERGLYHLNLTVGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLNGETTIQETV
 KVNTRMQCFVTERGSFYPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIR
 PAADTGVLFAWAPDLRAVPLSVALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALM
 EIKVCDGQEHVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRS

PVLTFAAGGLPDVPVTSAPVTA FYRGCM TLEVNRRLLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAAQGSRADYKDHDG DYKDHDIDYKDDDDK*

3. α A β -Gas6 (FLAG tag, Gla EGF delete, GE-/-)

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALADIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR
ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL
QPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
GGGVVQGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWFDGK
KYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN TLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPY
YMDVWGKGTTTVTVSSGGGSGGGGSDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTP
VIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLF
AGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMWQTISVEELA
RNLVIKVN RDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLT VGGIPFHEKDLVQPINPRL
DGC MRSWNLNGEDTTIQETVKVNTRMQCF SVTERGSFYPGSGFAFYSLDY
MRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVL FALWAPDLRAVPLSVALVDYH
STKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRDGEATLEVDGTR
GQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGGLPDVPVTSAPVTA FYRGCM TLEVNRRLLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAAQGSRADYKDHDG DYKDHDIDYKDDDDK*

4. α FITC-Gas6 (FLAG tag, Gla EGF delete, GE-/-)

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALAQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSC
AASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDN
AKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFYSDYMDVWGQGTLV
TVSGGGGSGGGGSGGGGSSVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSW
YQQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYC
AAWDDSLSEFLFGTGKLTVLGGGGGSGGGGSCINKYGSPTKNSGFATCVQ
NKDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDP
EGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMW
QTISVEELARNLVIKVN RDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLT VGGIPFHEKD
LVQPINPRLDGC MRSWNLNGEDTTIQETVKVNTRMQCF SVTERGSFYPGSG
FAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVL FALWAPDLRAVPLS
VALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRDGEAT
LEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGGLPDVPVTSAPVTA FYRGCM TLEVNRRLLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAAQGSRADYKDHDG DYKDHDIDYKDDDDK*

5. α A β -Gas6 (HA tag, Gla EGF delete, GE-/-)

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALADIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR
ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL

QPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIKRGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
 GGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDTGK
 KYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPY
 YMDVWGKGTITVTVSSGGGSGGGGSDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTP
 VIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLF
 AGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMWQTISVEELA
 RNLVIKVNDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLTGGINFHEKDLVQPINPRL
 DGC MRSWNWLN GEDTTIQETVKVNTRMQCF SVTERGSFYPGSGFAFYSLDY
 MRTPLDVGTSTWEVEVVAHIRPAADTGVL FALWAPDLRAVPLSVALVDYH
 STKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRDGEATLEVDGTR
 GQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLT FAGGLPDVPVTSAPVTA FYRGCMTL
 EVNRRLDLDEAA YKHSDITAHSCPPVEPAAAGSGSGSGSGSGSYPYDVPDY
 A*

6. Lentiviral Aducanumab IgG_IRES Zsgreen

MGWSCILFLVATATGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQ
 KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSY
 STPLTFGGGKVEIKRKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGECRRKRGS GEGRGSLLTCGDVEENPGPMGWSCILF
 LVATATGEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGK
 LEWVAVIWFDTGKKYYTDSVKGRFTISR
 DNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTITVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSD
 KTHSTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK*

7. Endogenous full sequence human Gas6 protein

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALAALLPAREATQFLRPRQRRAFQVF
 EEAKQGHLERECVEELCSREEAREVFENDPETDYFYPRYLD CINKYGSPTKN
 SGFATCVQNL PDQCTPNPCDRKGTQACQDLMGNFFCLCKAGWGGRLCDKD
 VNECSQENGGLQICHNKPGSFHCSCHSGFELSSDGRTCDIDECADSEACGE
 ARCKNLPGSYSLCDEGFAYSSQE KACRDVDECLQGRCEQVCVNSPGSYTCH
 CDGRGGLKLSQDMDTCEDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRL
 QPTRLVAEFDRTFDPEGILLFAGGHQDSTW

IVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMMWQTISVEELARNLVIKVN
DAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLTVGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWN
WLNGEDTTIQETVKVNTRMQCFVTERGSFYPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGT
ESTWEVEVVAHIRPAADTGVLFAWAPDLRAVPLSVALVDYHSTKKLKKQL
VVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVSAAQ
LQERLAVLERHLRSPVLTFAAGGLPDVPVTSAPVTA FYRGCM TLEVNRRLDL
DEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAAQGSRADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK*

[118]

[119] [3]

1. α A β -Gas6(E) (FLAG tag, Gla delete, G-/-)

ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCCGGGCCCCGCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGCAG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCGACATTCAGATG
 ACTCAATCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCCGTTGGAGATAGAGTCACTATT
 ACCTGCAGAGCCAGCCAATCCATCAGCTCTTATCTAAATTGGTACCAACA
 GAAGCCCCGGCAAAGCGCCAAAGCTGCTCATCTACGCTGCAAGCTCCTTAC
 AGAGCGGAGTACCCAGCAGATTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACTGACTTC
 ACATTGACGATTAGCTCTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCCACATACTATTGT
 CAGCAGAGCTATAGCACCCCGCTGACGTTTGGAGGCGGAATAAGGTGGA
 AATCAAGAGAGGAGGCGGGGGCTCCGGCGGGGGTGGCTCGGGGGGAGGA
 GGCTCAGAGGTTGAGCTTGTCGAGTCTGGGGGGGGAG
 TCGTTCAGCCAGGTAGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCCGCAAGTGGGTTT
 GCTTTTTTCATCTTACGGTATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAAGGA
 CTCGAGTGGGTCGCTGTAATATGGTTCGATGGTACAAAGAAATACTATAC
 CGATAGTGTGAAAGGAAGATTCACCATTTACGAGACAACAGTAAAAATA
 CCTTGTACCTTCAGATGAACACCCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTGTAC
 TACTGCGCCAGAGATAGAGGTATCGGAGCAAGGCGTGGTCCCTATTATAT
 GGATGTGTGGGGGAAGGGAACAACAGTGAAGTGTGAGCTCTGGCGGGGGC
 GGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCTGCATCAACAAGTATGGGTCTCCGTACAC
 CAAAACTCAGGCTTCGCCA
 CCTGCGTGCAAAACCTGCCTGACCAGTGACGCCCCAACCCCTGCGATAGG
 AAGGGGACCCAAGCCTGCCAGGACCTCATGGGCAACTTCTTCTGCCTGTG
 TAAAGCTGGCTGGGGGGGCGGCTCTGCGACAAAGATGTCAACGAATGCA
 GCCAGGAGAACGGGGGCTGCCTCCAGATCTGCCACAACAAGCCGGGTAGC
 TTCCACTGTTCTGCCACAGCGGCTTCGAGCTCTCCTCTGATGGCAGGACC
 TGCCAAGACATAGACGAGTGCGCAGACTCGGAGGCCTGCGGGGAGGCGC
 GCTGCAAGAACCTGCCCGGCTCCTACTCCTGCCTCTGTGACGAGGGCTTT
 GCGTACAGCTCCCAGGAGAAGGCTTGCCGAGATGTGGACGAGTGTCTGCA
 GGGCCGCTGTGAGCAGGTCTGCGTGAAGTCCCCAGGGAGCTACACCTGCC
 ACTGTGACGGGCGTGGGGGCCTCAAGCTGTCCCAGGACATGGACACCTGT
 GAGGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGTGGCCAAGAGTGTGAAGTC
 CTTGTACCTGGGCCGGATGTTCAAGTGGGACCCCCGTGATCCGACTGCGCTT
 CAAGAGGCTGCAGCCCACCAGGCTGGTAGCTGAGTTTGACTTCCGGACCT
 TTGACCCCGAGGGCATCCTCCTCTTTGCCGGAGGCCACCAGGACAGCACC
 TGGATCGTGCTGGCCCTGAGAGCCGGCCGGCTGGAGCTGCAGCTGCGCTA
 CAACGGTGTGCGCCGTGTC

ACCAGCAGCGGCCCGGTCATCAACCATGGCATGTGGCAGACAATCTCTGT
 TGAGGAGCTGGCGCGGAATCTGGTCATCAAGGTCAACAGGGATGCTGTCA
 TGAAAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTC AACCGGAGCGAGGACTGTAT
 CATCTGAACCTGACCGTGGGAGGTATCCCTTCCATGAGAAGGACCTCGT
 GCAGCCTATAAACCTCGTCTGGATGGCTGCATGAGGAGCTGGA ACTGGC
 TGAACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAAACGGTGAAAGTGAACACGAG
 GATGCAGTGCTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCTTTCTACCCCGGGAGCG
 GCTTCGCTTCTACAGCCTGGACTACATGCGGACCCCTCTGGACGTCGGGA
 CTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCACATCCGCCCAGCCGCA
 GACACAGGCGTGCTGTTTGCGCTCTGGGCCCCCGACCTCC
 GTGCCGTGCCTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTATCACTCCACGAAGAAAC
 TCAAGAAGCAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCATAACGGCCTTGGCCCTA
 ATGGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTGGTCACCGTCTCGCT
 GAGGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCACCAGGGGGCCAGAGC
 GAGGTGAGCGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCCGTGCTCGAGAGGC
 ACCTGCGGAGCCCCGTGCTCACCTTTGCTGGCGGCCTGCCAGATGTGCCGG
 TGACTTCAGCGCCAGTCACCGCGTTCTACCGCGGCTGCATGACACTGGAG
 GTCAACCGGAGGCTGCTGGACCTGGACGAGGCGGCGTACAAGCACAGCG
 ACATCACGGCCCACTCCTGCCCCCGGTGGAGCCCGCCGAGCCcaagGATC
 CCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCG
 ACTACAAGGATGACGATGACAAGtga

2. α FITC-Gas6(E) (FLAG tag, Gla delete, G-/-)

ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCGGGCCCGCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGCAG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCAGGTTTCACTG
 GTTGAGAGCGGAGGCAATCTGGTTCAGCCCGGTGGTAGTCTGCGTCTGTCT
 TGTGCGGCGTCAGGGTTCACTTTCGGTAGTTTTTCAATGAGCTGGGTCCGT
 CAGGCACCAGGCGGTGGGCTGGAATGGGTGGCAGGTCTGTCTGCACGTAG
 CTCCTGACCCACTATGCAGATAGTGTTAAAGGGCGGTTCACAATTTACG
 CGACAACGCTAAGAATAGCGTCTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGGGTCG
 AGGATACCGCAGTGTATTACTGCGCTCGCCGTTCTTATGACTCTAGTGGAT
 ACTGGGGCCATTTTTATAGCTACATGGATGTGTGGGGACAGGGCACTCTG
 GTGACCGTTTCCGGAGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGGAGTGGAGGCGG
 TGGGTCAAGCGTTCTGACCCAGCCGTCCTCTGTCAGCGCCGCGCCAGGCC
 AGAAAGTGACAATTTCTGTTCTGGAAGTACTTCAAACATCGGCAACAAT
 TATGTTTCCTGGTATCAGCAGCAC
 CCGGGCAAAGCGCCCAAGCTGATGATTTATGATGTGTCTAAACGTCCAAG

TGGTGTTCTGACCGGTTTCAGCGGTTCCAAGTCTGGGAATAGTGCCTCACT
GGACATCTCAGGCCTGCAAAGCGAAGATGAGGCGGACTATTACTGCGCAG
CTTGGGATGACAGCCTGTCCGAATTTCTGTTTCGGCACCGGGACAAAGCTG
ACCGTGCTGGGCGGCGGGGGCGGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCTGCATCA
ACAAGTATGGGTCTCCGTACACCAAACTCAGGCTTCGCCACCTGCGTG
CAAAACCTGCCTGACCAGTGCACGCCCAACCCCTGCGATAGGAAGGGGAC
CCAAGCCTGCCAGGACCTCATGGGCAACTTCTTCTGCCTGTGTAAAGCTGG
CTGGGGGGGGCCGGCTCTGCGACAAAGATGTCAACGAATGCAGCCAGGAG
AACGGGGGCTGCCTCCAGATCTGCCACAACAAGCCGGGTAGCTTCCACTG
TTCCTGCCACAGCGGCTTCGAGCTCTCCTCTGATGGCAGGACCTGCCAAGA
CATAGACGAGTGCGCAGACTCGGAGGCCTGCGGGGAGGCGCGCTGCAAG
AACCTGCCCCGGCTCCTACTCCTGCCTCTGTGACGAGGGCTTTGCGTACAGC
TCCCAGGAGAAGGCTTGCCGAGATGTGGACGAGTGTCTGCAGGGCCGCT
GTGAGCAGGTCTGCGTGAACCTCCCCAGGGAGCTACACCTGCCACTGTGAC
GGGCGTGGGGGCCTCAAGCTGTCCAGGACATGGACACCTGTGAGGACAT
CTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGTGGCCAAGAGTGTGAAGTCCTTGACCT
GGGCCGGATGTTTCAGTGGGACCCCCGTGATCCGACTGCGCTTCAAGAGGC
TGCAGCCCACCAGGCTGGTAGCTGAGTTTGACTTCCGGACCTTTGACCCCG
AGGGCATCCTCCTCTTTGCCGGAGGCCACCAGGACAGCACCTGGATCGTG
CTGGCCCTGAGAGCCGGCCGGCTGGAGCTGCAGCTGCGCTACAACGGTGT
CGGCCGTGTACCAGCAGCGGCCCGGTCAACAACCATGGCATGTGGCAGA
CAATCTCTGTTGAGGAGCTGGCGCGGAATCTGGTCATCAAGGTCAACAGG
GATGCTGTATGAAAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTCCAACCGGAGCG
AGGACTGTATCATCTGAACCTGACCGTGGGAGGTATTCCTTCCATGAGA
AGGACCTC
GTGCAGCCTATAAACCCCTCGTCTGGATGGCTGCATGAGGAGCTGGAACCTG
GCTGAACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAAACGGTGAAAGTGAACACG
AGGATGCAGTGCTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCTTTCTACCCCGGGAG
CGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACTACATGCGGACCCCTCTGGACGTGCG
GACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCACATCCGCCAGCCG
CAGACACAGGCGTGCTGTTTGCGCTCTGGGCCCCCGACCTCCGTGCCGTGC
CTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTATCACTCCACGAAGAACTCAAGAAG
CAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCATACGGCCTTGGCCCTAATGGAGAT
CAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTGGTCACCGTCTCGCTGAGGGACG
GTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCACCAGGGGCCAGAGCGAGGTGAG
CGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCCGTGCTCGAGAGGCACCTGCGGA
GCCCCGTGCT
CACCTTTGCTGGCGGCCTGCCAGATGTGCCGGTGACTTCAGCGCCAGTCAC

CGCGTTCTACCGCGGCTGCATGACACTGGAGGTCAACCGGAGGCTGCTGG
 ACCTGGACGAGGCGGCGTACAAGCACAGCGACATCACGGCCCACTCCTGC
 CCCCCGTGGAGCCCGCCGCAGCCcaagGATCCCGGGCTGACTACAAAGAC
 CATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGA
 CAAGtga

3. α A β -Gas6 (FLAG tag, Gla EGF delete, GE-/-)

ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCGGGCCCGCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGCAG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCGACATTCAGATG
 ACTCAATCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCCGTTGGAGATAGAGTCACTATT
 ACCTGCAGAGCCAGCCAATCCATCAGCTCTTATCTAAATTGGTACCAACA
 GAAGCCCGGCAAAGCGCCAAAGCTGCTCATCTACGCTGCAAGCTCCTTAC
 AGAGCGGAGTACCCAGCAGATTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACTGACTTC
 ACATTGACGATTAGCTCTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCCACATACTATTGT
 CAGCAGAGCTATAGCACCCCGCTGACGTTTGGAGGCGGAACATAAGGTGGA
 AATCAAGAGAGGAGGCGGGGGCTCCGGCGGGGGTGGCTCGGGGGGAGGA
 GGCTCAGAGGTTGAGCTTGTGAGTCTGGGGGGGGAG
 TCGTTCAGCCAGGTAGAAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCCGCAAGTGGGTTT
 GCTTTTTTCATCTTACGGTATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAAGGA
 CTCGAGTGGGTCGCTGTAATATGGTTCGATGGTACAAAGAAATACTATAC
 CGATAGTGTGAAAGGAAGATTACCATTTACGAGACAACAGTAAAAATA
 CCTTGTACCTTCAGATGAACACCCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTGTAC
 TACTGCGCCAGAGATAGAGGTATCGGAGCAAGGCGTGGTCCCTATTATAT
 GGATGTGTGGGGGAAGGGAACAACAGTGAAGTGTGAGCTCTGGCGGGGGC
 GGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGT
 GGCCAAGAGTGTGAAGTCCTTGTACCTGGGCCGGATGTTGAGTGGGACCC
 CCGTGATCCGACTGCGCTTCAAGAGGCTGCAGCCCACCAG
 GCTGGTAGCTGAGTTTGACTTCCGGACCTTTGACCCCGAGGGCATCCTCCT
 CTTTGCCGGAGGCCACCAGGACAGCACCTGGATCGTGCTGGCCCTGAGAG
 CCGGCCGGCTGGAGCTGCAGCTGCGCTACAACGGTGTGCGCCGTGTCACC
 AGCAGCGGCCCCGGTCATCAACCATGGCATGTGGCAGACAATCTCTGTTGA
 GGAGCTGGCGCGGAATCTGGTCATCAAGGTCAACAGGGATGCTGTCATGA
 AAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTCCAACCGGAGCGAGGACTGTATCAT
 CTGAACCTGACCGTGGGAGGTATTCCCTTCCATGAGAAGGACCTCGTGCA
 GCCTATAAACCTCGTCTGGATGGCTGCATGAGGAGCTGGAAGTGGCTGA
 ACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAAACGGTGAAAGTGAACACGAGGAT
 GCAGTGCTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCTTTCTACCCC
 GGGAGCGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACTACATGCGGACCCCTCTGGA

CGTCGGGACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCACATCCGCC
 CAGCCGCAGACACAGGCGTGCTGTTTGCCTCTGGGCCCCCGACCTCCGT
 GCCGTGCCTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTATCACTCCACGAAGAACTC
 AAGAAGCAGCTGGTGGTCTTGGCCGTGGAGCATACGGCCTTGGCCCTAAT
 GGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTGGTCACCGTCTCGCTGA
 GGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCACCAGGGGCCAGAGCGA
 GGTGAGCGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCCGTGCTCGAGAGGCAC
 CTGCGGAGCCCCGTGCTCACC
 TTTGCTGGCGGCCTGCCAGATGTGCCGGTGACTTCAGCGCCAGTCACCGCG
 TTCTACCGCGGCTGCATGACACTGGAGGTCAACCGGAGGCTGCTGGACCT
 GGACGAGGCGGCGTACAAGCACAGCGACATCACGGCCCACTCCTGCCCCC
 CCGTGGAGCCCCGCGCAGCC_{caa}GGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATG
 ACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAG
 tga

4. α FITC-Gas6 (FLAG tag, Glu EGF delete, GE-/-)

ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCCGGGCCCCGCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGCAG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCCAGGTTTCACTG
 GTTGAGAGCGGAGGCAATCTGGTTCAGCCCGGTGGTAGTCTGCGTCTGTCT
 TGTGCGGCGTCAGGGTTCACTTTCCGGTAGTTTTTCAATGAGCTGGGTCCGT
 CAGGCACCAGGCGGTGGGCTGGAATGGGTGGCAGGTCTGTCTGCACGTAG
 CTCCCTGACCCACTATGCAGATAGTGTTAAAGGGCGGTTACAATTTACG
 CGACAACGCTAAGAATAGCGTCTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGGGTCTG
 AGGATACCGCAGTGTAATTACTGCGCTCGCCGTTCTTATGACTCTAGTGGAT
 ACTGGGGCCATTTTTATAGCTACATGGATGTGTGGGGACAGGGCACTCTG
 GTGACCGTTTCCGGAGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGGAGTGAGAGGCGG
 TGGGTCAAGCGTTCTGACCCAGCCGTCTCTGTCAGCGCCGCGCCAGGCC
 AGAAAGTGACAATTTCTGTTCTGGAAGTACTTCAAACATCGGCAACAAT
 TATGTTTCCTGGTATCAGCAGCAC
 CCGGGCAAAGCGCCCAAGCTGATGATTTATGATGTGTCTAAACGTCCAAG
 TGGTGTTCTGACCGGTTCAAGCGGTTCCAAGTCTGGGAATAGTGCCTCACT
 GGACATCTCAGGCCTGCAAAGCGAAGATGAGGCGGACTATTACTGCGCAG
 CTTGGGATGACAGCCTGTCCGAATTTCTGTTCCGGCACCGGGACAAAGCTG
 ACCGTGCTGGGCGGCGGGGGCGGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCTGCATCA
 ACAAGTATGGGTCTCCGTACACCAAAAACCTCAGGCTTCGCCACCTGCGTG
 CAAAACAAAGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGTGGCCAAGAGTGT
 GAAGTCCTTGACCTGGGCGGATGTTTCAAGTGGGACCCCCGTGATCCGACT
 GCGCTTCAAGAGGCTGCAGCCACCAGGCTGGTAGCTGAGTTTGACTTCC

GGACCTTTGACCCCGAGGGCATCCTCCTCTTTGCCGGAGGCCACCAGGAC
 AGCACCTGGATCGTGCTGGCCCTGAGAGCCGGCCGGCTGGAGCTGCAGCT
 GCGCTACAA
 CGGTGTCGGCCGTGTCACCAGCAGCGGCCCGGTTCATCAACCATGGCATGT
 GGCAGACAATCTCTGTTGAGGAGCTGGCGCGGAATCTGGTCATCAAGGTC
 AACAGGGATGCTGTCATGAAAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTCCAACC
 GGAGCGAGGACTGTATCATCTGAACCTCACCGTGGGAGGTATTCCCTTCC
 ATGAGAAGGACCTCGTGACGCCTATAAACCCTCGTCTGGATGGCTGTATG
 AGGAGCTGGAAGTGGCTGAACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAAACGG
 TGAAAGTGAACACGAGGATGCAGTGCTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCT
 TTCTACCCCGGGAGCGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACTACATGCGGACC
 CCTCTGGACGTCGGGACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCA
 CATCCGCCAGCCGCAGACACAGGCGTGCTGTTTGCGCTC
 TGGGCCCCCGACCTCCGTGCCGTGCCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTAT
 CACTCCACGAAGAACTCAAGAAGCAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCA
 TACGGCCTTGGCCCTAATGGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACG
 TGGTCACCGTCTCGCTGAGGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGC
 ACCAGGGGGCCAGAGCGAGGTGAGCGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGG
 CCGTGCTCGAGAGGCACCTGCGGAGCCCCGTGCTCACCTTTGCCGGCGGC
 CTGCCAGATGTGCCGGTGACTTCAGCGCCAGTCACCGCGTTCTACCGCGGC
 TGCATGACACTGGAGGTCAACCGGAGGCTGCTGGACCTGGACGAGGCGGC
 GTACAAGCACAGCGACATCACGGCCCACTCCTGCCCCCGTGGAGCCCG
 CCGCAGCC^{caa}GGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATA
 AAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAG^{tga}

5. α A β -Gas6 HA tag (Gla EGF delete, GE-/-)

ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCGGGCCCGCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGAG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCGACATTCAGATG
 ACTCAATCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCCGTTGGAGATAGAGTCACTATT
 ACCTGCAGAGCCAGCCAATCCATCAGCTCTTATCTAAATTGGTACCAACA
 GAAGCCCGGCAAAGCGCCAAAGCTGCTCATCTACGCTGCAAGCTCCTTAC
 AGAGCGGAGTACCCAGCAGATTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACTGACTTC
 ACATTGACGATTAGCTCTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCCACATACTATTGT
 CAGCAGAGCTATAGCACCCCGCTGACGTTTGGAGGCGGAATAAGGTGGA
 AATCAAGAGAGGAGGCGGGGGCTCCGGCGGGGGTGGCTCGGGGGGAGGA
 GGCTCAGAGGTTCACTTGTGAGTCTGGGGGGGGAG
 TCGTTCAGCCAGGTAGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCCGCAAGTGGGTTT
 GCTTTTTTCATCTTACGGTATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAAGGA

CTCGAGTGGGTCGCTGTAATATGGTTCGATGGTACAAAGAAATACTATAC
 CGATAGTGTGAAAGGAAGATTACCATTTACGAGACAACAGTAAAAATA
 CCTTGTACCTTCAGATGAACACCCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTGTAC
 TACTGCGCCAGAGATAGAGGTATCGGAGCAAGGCGTGGTCCCTATTATAT
 GGATGTGTGGGGGAAGGGAACAACAGTGACTGTGAGCTCTGGCGGGGGC
 GGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGT
 GGCCAAGAGTGTGAAGTCCTTGTACCTGGGCCGGATGTTCAAGTGGGACCC
 CCGTGATCCGACTGCGCTTCAAGAGGCTGCAGCCCACCAG
 GCTGGTAGCTGAGTTTGACTTCCGGACCTTTGACCCCGAGGGCATCCTCCT
 CTTTGCCGGAGGCCACCAGGACAGCACCTGGATCGTGCTGGCCCTGAGAG
 CCGGCCGGCTGGAGCTGCAGCTGCGCTACAACGGTGTGCGCCGTGTCACC
 AGCAGCGGCCCCGGTCATCAACCATGGCATGTGGCAGACAATCTCTGTTGA
 GGAGCTGGCGCGGAATCTGGTCATCAAGGTCAACAGGGATGCTGTCATGA
 AAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTCCAACCGGAGCGAGGACTGTATCAT
 CTGAACCTGACCGTGGGAGGTATTCCCTTCCATGAGAAGGACCTCGTGCA
 GCCTATAAACCTCGTCTGGATGGCTGCATGAGGAGCTGGAAGTGGCTGA
 ACGGAGAAGACACCACCAT
 CCAGGAAACGGTGAAAGTGAACACGAGGATGCAGTGCTTCTCGGTGACGG
 AGAGAGGCTCTTTCTACCCCGGGAGCGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACT
 ACATGCGGACCCCTCTGGACGTCGGGACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAA
 GTCGTGGCTCACATCCGCCCAGCCGCAGACACAGGCGTGCTGTTTGCCTC
 TGGGCCCCCGACCTCCGTGCCGTGCCTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTAT
 CACTCCACGAAGAACTCAAGAAGCAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCA
 TACGGCCTTGGCCCTAATGGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACG
 TGGTCACCGTCTCGCTGAGGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGC
 ACCAGGGGGCCAGAGCGAGGTGAGCGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGGCTGG
 CCGTGCTCGAGAGGCACCTGCGGAGCCCCGTGCTCACCTTTGCTGGCGGC
 CTGCCAGATGTGCCGGTGACTTCAGCGCCAGTCACCGCGTTCTACCGCGGC
 TGCATGACACTGGAGGTCAACCGGAGGCTGCTGGACCTGGACGAGGCGGC
 GTACAAGCACAGCGACATCACGGCCCACTCCTGCCCCCCCCGTGGAGCCCCG
 CCGCAGCCggcagcggcagcggcagcggcagcggcagcggcagctaccatacagatgtccagattacgctT
 GA

6. Lentiviral Aducanumab IgG_IRES Zsgreen

GGATCCATGGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTCCCTGGTGGCCACCGCCACC
 GCGGACATTCAGATGACTCAATCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCCGTTGGA
 GATAGAGTCACTATTACCTGCAGAGCCAGCCAATCCATCAGCTCTTATCTA
 AATTGGTACCAACAGAAGCCCGGCAAAGCGCCAAAGCTGCTCATCTACGC

TGCAAGCTCCTTACAGAGCGGAGTACCCAGCAGATTCTCAGGCAGTGGCA
GTGGGACTGACTTCACATTGACGATTAGCTCTCTGCAGCCTGAAGACTTTG
CCACATACTATTGTCAGCAGAGCTATAGCACCCCGCTGACGTTTGGAGGC
GGA ACTAAGGTGGAAATCAAGAGAAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGT
CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGT
CGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGTCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGCGAGAAAACGCGGAAGCGGAgagggcaga
ggaagtcttctaacatcggtgacgtggaggagaatccccggccctATGGGCTGGTCCTGCATCATCC
TGTTCTGTTGGGCCACCGCCACCGGCGAGGTTTCAGCTTGTGAGTCTGGGG
GGGGAGTCGTTTCAGCCAGGTAGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCCGCAAGT
GGGTTTGCTTTTTTCATCTTACGGTATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGC
AAAGGACTCGAGTGGGTCGCTGTAATATGGTTCGATGGTACAAAGAAATA
CTATACCGATAGTGTGAAAGGAAGATTCACCATTTCACGAGACAACAGTA
AAAATACCTTGTACCTTCAGATGAACACCCTGAGAGCAGAAGACACAGCC
GTGTACTACTGCGCCAGAGATAGAGGTATCGGAGCAAGGCGTGGTCCCTA
TTATATGGATGTGTGGGGGAAGGGAACAACAGTGACTGTGAGCTCTGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAA
TCTAGCGACAAA ACTCACACAAGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT
GGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG
TGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC

AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAAtga

7. Endogenous full sequence human Gas6 protein

ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCCGGGCCCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGCAG
CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCGCGCTGTTGCCG
GCGCGCGAGGCCACGCAGTTCCTGCGGCCAGGCAGCGCCGCGCCTTTCA
GGTCTTCGAGGAGGCCAAGCAGGGCCACCTGGAGAGGGAGTGCGTGAGAG
GAGCTGTGCAGCCGCGAGGAGGCGCGGGAGGTGTTGAGAACGACCCCCG
AGACGGATTATTTTTACCCAAGATACTTAGACTGCATCAACAAGTATGGGT
CTCCGTACACCAAAAACCTCAGGCTTCGCCACCTGCGTGCAAAAACCTGCCT
GACCAGTGCACGCCCAACCCCTGCGATAGGAAGGGGACCCAAGCCTGCCA
GGACCTCATGGGCAACTTC
TTCTGCCTGTGTAAAGCTGGCTGGGGGGGCGGCTCTGCGACAAAGATGT
CAACGAATGCAGCCAGGAGAACGGGGGCTGCCTCCAGATCTGCCACAACA
AGCCGGGTAGCTTCCACTGTTCTGCCACAGCGGCTTCGAGCTCTCCTCTG
ATGGCAGGACCTGCCAAGACATAGACGAGTGCGCAGACTCGGAGGCCTGC
GGGGAGGCGCGCTGCAAGAACCTGCCCGGCTCCTACTCCTGCCTCTGTGA
CGAGGGCTTTGCGTACAGCTCCCAGGAGAAGGCTTGCCGAGATGTGGACG
AGTGTCTGCAGGGCCGCTGTGAGCAGGTCTGCGTGAACCTCCCCAGGGAGC
TACACCTGCCACTGTGACGGGCGTGGGGGCCTCAAGCTGTCCCAGGACAT
GGACACCTGTGAGGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGTGGCCAAGA
GTGTGAAGTCCTTGTACCTGGGCCGGATGTTCAAGTGGGACCCCCGTGATCC
GACTGCGCTTCAAGAGGCTGCAGCCCACCAGGCTGGTAGCTGAGTTTGAC
TTCCGGACCTTTGACCCCGAGGGCATCCTCCTCTTTGCCGGAGGCCACCAG
GACAGCACCTGGATCGTGCTGGCCCTGAGAGCCGGCCGGCTGGAGCTGCA
GCTGCGCTACAACGGTGTGCGCCGTGTACCAGCAGCGGCCCGGTCATCA
ACCATGGCATGTGGCAGACAATCTCTGTTGAGGAGCTGGCGCGGAATCTG
GTCATCAAGGTCAACAG
GGATGCTGTATGAAAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTCCAACCGGAGC
GAGGACTGTATCATCTGAACCTGACCGTGGGAGGTATTCCCTTCCATGAG
AAGGACCTCGTGAGCCTATAAACCCCTCGTCTGGATGGCTGCATGAGGAG
CTGGAACCTGGCTGAACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAAACGGTGAAA
GTGAACACGAGGATGCAGTGCTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCTTTCTA
CCCCGGGAGCGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACTACATGCGGACCCCTCT
GGACGTCGGGACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCACATCC
GCCCAGCCGCAGACACAGGCGTGCTGTTTGCGCTCTGGGCCCCCGACCTC
CGTGCCGTGCCTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTATCACTCCACGAAGAAA

```

CTCAAGAAGCAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCATAACGGCCTTGGCCCT
AATGGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTGGTCACCGTCTCGC
TGAGGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCACCAGGGGCCAGAG
CGAGGTGAGCGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCCGTGCTCGAGAGG
CACCTGCGGAGCCCCGTGCTCACCTTTGCTGGCGGCCTGCCAGATGTGCCG
GTGACTTCAGCGCCAGTCACCGCGTTCTACCGCGGCTGCATGACACTGGA
GGTCAACCGGAGGCTGCTGGACCTGGACGAGGCGGCGTACAAGCACAGC
GACATCACGGCCCCACTCCTGCCCCCCCCGTGGAGCCCGCCGAGCCcaaGGA
TCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACAT
CGACTACAAGGATGACGATGACAAGtga

```

[120]

[121] 제조예 2. 타우를 표적으로 하는 Gas6 기반의 융합분자

[122] Gas6 단백질 기반한 타우 특이적 키메라 포식 유도체를 제작하기 위하여, 먼저 Gla 도메인 및 EGF 반복 도메인을 없애고, 그 위치에 타우 특이 항체인 세모리네맵(semorinemab)의 단일사슬 Fv 단편(single-chain variable fragment; scFv)를 도입하였다(α Tau-Gas6). 상기 키메라 포식 유도체의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열은 표 4와 같다.

[123] [표4]

1. αTau-Gas6 (Tau-VL-G4Sx3-VH-LG-HA-T2A-EGFP, amino acid sequence) MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALADDVLTQTPLSLPVTGQPASISCR SSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCFQGS LVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLIFRSYGMSWVRQAPGKGLEWVATINSG GTYYTYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANSYSGAMD YWGQGT LTVSSGGGSGGGGSDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRL RFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYN GVGRVTSSGPVINHG MWQTISVEELARNLVIKVN RDAVMKIAVAGDLFQPER GLYHLNLT VGGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLN GEDTTIQETVKVNT RMQCFSVTERGSFYPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAAD TGVLFALWAPDLRAVPLSVALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKV CDGQEHVVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLT FAGGLPDVPVTSAPVTA FYRGCMTLEVNRRLLDLDEAAYKHS DITAHSCPPV EPAAAGSGSGSGSGSGSY PYDVPDYA EGRGSL LTCGDVEENPGPVSKGEELFT GVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVT TLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNF KIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNH YLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYK*
2. αTau-Gas6 (Tau-VL-G4Sx3-VH-LG-HA-T2A-EGFP, nucleotide sequence) ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCGGGCCCGCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGCAG CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCGACGATGTATTA ACACAAACTCCCCTATCATTGCCGGTGACCCCGGGCCAACCAGCTTCGATC AGCTGCCGTAGCTCTCAGAGCATCGTGACAGCAACGGTAATACCTACCT GGAATGGTATTTGCAAAAACCGGGTCAATCCCCGCAGTTGCTGATTTATA AAGTTTCGAATCGTTTCAGCGGTGTTCCGGATCGTTTCAGCGGCTCTGGCT CCGGCACCGATTTTACGCTGAAGATCAGTCGCGTGGAAGCGGAGGACGTG GGTGTCTACTACTGCTTTACAGGGTAGTTTGGTGCCGTGGACCTTTGGTCAG GGTACTAAGGTGGAAATTAAGGGTGGTGGGGGATCAGGTGGCGGCGGCA GCGGCGGTGGCGGGAGCGAGGTACAAGTGAATCAGGTGGAGGGTT GGTTCAGCCAGGTGGTTCGCTGCGTCTGAGTTGTGCGGCAAGCGGTTTGAT CTTTCGCAGCTATGGTATGAGCTGGGTTCGTCAGGCGCCGGGCAAGGGTC TGGAGTGGGTGGCGACCATTA ACTCT GGCGGCACGTACACCTACTATCCCGACTCCGTGAAAGGCCGTTTCACCATC

TCCCGCGACAATAGCAAAAACACCCTGTATTTGCAGATGAACTCGCTCCG
CGCAGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAATTCCTACAGCGGTGCTA
TGGATTATTGGGGTCAGGGCACATTGGTGACTGTAAGCAGCGGCGGGGGC
GGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGT
GGCCAAGAGTGTGAAGTCCTTGTACCTGGGCCGGATGTTCAAGTGGGACCC
CCGTGATCCGACTGCGCTTCAAGAGGCTGCAGCCCACCAGGCTGGTAGCT
GAGTTTGACTTCCGGACCTTTGACCCCGAGGGCATCCTCCTCTTTGCCGGA
GGCCACCAGGACAGCACCTGGATCGTGCTGGCCCTGAGAGCCGGCCGGCT
GGAGCTGCAGCTGCGCTACAACGGTGTGCGCCGTGTCACCAGCAGCGGCC
CGGTCATCAACCATGGCATGTGGCAGACAATCTCTGTTGAGGAGCTGGCG
CGGAATCTGGTCATCAAGGTCAACAGGGATGCTGTCATGAAAATCGCGGT
GGCCGGGGACTTGTTCCAACCGGAGCGA
GGAAGTGTATCATCTGAACCTGACCGTGGGAGGTATTCCCTTCCATGAGAA
GGACCTCGTGACGCTATAAACCCCTCGTCTGGATGGCTGCATGAGGAGCT
GGAAGTGGCTGAACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAAACGGTGAAAGT
GAACACGAGGATGCAGTGCTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCTTTCTACC
CCGGGAGCGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACTACATGCGGACCCCTCTGG
ACGTGCGGACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCACATCCGC
CCAGCCGCAGACACAGGCGTGCTGTTTGCGCTCTGGGCCCCGACCTCCGT
GCCGTGCCTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTATCACTCCACGAAGAACTC
AAGAAGCAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCATAACGGCCTTGGCCCTAAT
GGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTGGTCACCGTCTCGCTGA
GGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCACCAGGGGCCAGAGCGA
GGTGAGCGC
CGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCCGTGCTCGAGAGGCACCTGCGGAGCC
CCGTGCTCACCTTTGCTGGCGGCCTGCCAGATGTGCCGGTGACTTCAGCGC
CAGTCAACGCGTTCTACCGCGGCTGCATGACACTGGAGGTCAACCGGAGG
CTGCTGGACCTGGACGAGGCGGCGTACAAGCACAGCGACATCACGGCCCA
CTCCTGCCCCCCCCGTGGAGCCCCGCCGAGCCGGCAGCGGCAGCGGCAGCG
GCAGCGGCAGCGGCAGCtaccatacagatgttcagattacgctGAGGGCAGAGGAAGTC
TGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAGAATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGC
GAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA
CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCC
GTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGACGTGCTTC
AGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCAT
GCCCCGAAGGCTACGTCCA
GGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG

```

AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA
CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCA
TCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT
GCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGtaa

```

[124]

[125] 제조예 3. 알파-시누클린을 표적으로 하는 Gas6 기반의 융합분자

[126] Gas6 단백질 기반한 알파-시누클린 특이적 키메라 포식 유도체를 제작하기 위하여, 먼저 Gla 도메인 및 EGF 반복 도메인을 없애고, 그 위치에 알파-시누클린 특이 항체인 신파네맵(cinpanemab)의 단일사슬 Fv 단편(single-chain variable fragment; scFv)를 도입하였다(α Syn-Gas6). 상기 키메라 포식 유도체의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열은 표 5와 같다.

[127] [35]

1. $\alpha\alpha$ Syn-Gas6 (Cinpanemab (aSyn)_VL-G4Sx3-VH-LG-HA-T2A-EGFP, amino acid sequence)

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALASYELTQPPSVSVSPGQTARITCSG
 EALPMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSERPSGVPERFSGSSSGTTATLTITGV
 QAEDEADYYCQSPDSTNTYEVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV
 ESGGGLVEPGGSLRLSCAVSGDFEKAWSWVRQAPGQGLQWVARIKSTAD
 GGTTSYAAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTEDTAVYYCTSAHWGQGTL
 VTVSSGGGGSGGGGSDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRLQP
 TRLVAEFDFTFDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTS
 SGPVINHGMWQTISVEELARNLVIKVNRDVAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNL
 TVGGIPFHEKDLVQPINRLDGCMRWNWLNGEDTTIQUETVKVNTRMQCFVS
 TERGSFYPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVLFA
 WAPDLRAVPLSVALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHV
 VTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGGLPD
 VPVTSAPVTAFYRGCMTELVNRRLLDLDEAAYKHS DITAHSCPPVEPAAAGS
 GSGSGSGSGSYPDVDPDYAEGRGSLLTCGDVEENPGPVSKGEELFTGVVPILV
 ELGDGVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTGYV
 QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDTL
 VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE
 DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFV
 TAAGITLGMDELYK*

2. $\alpha\alpha$ Syn-Gas6 (Cinpanemab (aSyn)_VL-G4Sx3-VH-LG-HA-T2A-EGFP, nucleotide sequence)

ATGGCCCCCTTCGCTCTCGCCCGGGCCCGCCGCCCTGCGCCGCGCGCCGCAG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCGCGGAGTGCGCGCTTGCCTCCTATGAGCTG
 ACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGACGGCCAGGATCAC
 CTGCTCTGGAGAAGCATTGCCAATGCAATTTGCTCATTGGTACCAACAGA
 GGCCAGGCAAGGCCCCAGTGATAGTGGTGTACAAAGACAGTGAGAGACC
 GTCAGGTGTCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAACAGCCA
 CGTTGACCATCACTGGAGTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGC
 CAGTCGCCAGACAGCACTAACACTTATGAAGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
 GCTGACCGTCCTAGGTGGTGGGGGATCAGGTGGCGGCGGCAGCGGCGGTG
 GCGGGAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTCTGGTTCGAGCC
 GGGGGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGTCTCCGGATTTCGATTTGAAAA
 AGCCTGGAT

GAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGCAGGGGCTACAGTGGGTGCCCCGTA
TCAAGAGCACAGCTGATGGTGGGACAACAAGCTACGCCGCCCCCGTGGA
GGCAGGTTTCATCATCTCAAGAGATGATTCGAGAAACATGCTTTATCTGCA
AATGAACAGTCTGAAAACCTGAAGACACAGCCGTCTATTATTGTACATCAG
CCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGGCGGGGGCGGC
AGCGGCGGCGGTGGCAGCGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGTGGC
CAAGAGTGTGAAGTCCTTGACCTGGGCCGGATGTTCAAGTGGGACCCCCG
TGATCCGACTGCGCTTCAAGAGGCTGCAGCCCACCAGGCTGGTAGCTGAG
TTTGAATTCGGACCTTTGACCCCGAGGGCATCCTCCTCTTTGCCGGAGGC
CACCAGGACAGCACCTGGATCGTGCTGGCCCTGAGAGCCGGCCGGCTGGA
GCTGCAGCTGCGCTACAACGGTGTGCGCCGTGTCACCAGCAGCGGCCCGG
TCATCAACC

ATGGCATGTGGCAGACAATCTCTGTTGAGGAGCTGGCGCGGAATCTGGTC
ATCAAGGTCAACAGGGATGCTGTCATGAAAATCGCGGTGGCCGGGGACTT
GTTCCAACCGGAGCGAGGACTGTATCATCTGAACCTGACCGTGGGAGGTA
TTCCCTTCCATGAGAAGGACCTCGTGACGCTATAAACCCCTCGTCTGGATG
GCTGCATGAGGAGCTGGAACCTGGCTGAACGGAGAAGACACCACCATCCA
GGAAACGGTGAAAGTGAACACGAGGATGCAGTGCTTCTCGGTGACGGAG
AGAGGCTCTTTCTACCCCGGGAGCGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACTAC
ATGCGGACCCCTCTGGACGTCGGGACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGT
CGTGGCTCACATCCGCCAGCCGCAGACACAGGCGTGCTGTTTTCGCTCTG
GGCCCCGACCTCCGTGCCGTGCCTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTATCA
CTCCACGAAGAACTCAAGAAGCAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCATA
CGGCCTTGGCCCTAATGGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTG
GTCACCGTCTCGCTGAGGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCAC
CAGGGGCCAGAGCGAGGTGAGCGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCC
GTGCTCGAGAGGCACCTGCGGAGCCCCGTGCTCACCTTTGCTGGCGGCCT
GCCAGATGTGCCGGTGACTTCAGCGCCAGTCACCGCGTTCTACCGCGGCT
GCATGACACTGGAGGTCAACCGGAGGCTGCTGGACCTGGACGAGGCGGC
GTACAAGCACAGCGACATCACGGCCCACTCCTGCCCCCGGTGGAGCCCCG
CCGACGCCGG

CAGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCtaccatacagatgtccagattacgc
tGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTG
GCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGA
GGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA
CCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCAACCCTCGTGACCACCCTGACCT
ACGGCGTGACGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA

```

AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG
ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTAC
AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGGCATCAA
GGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCTGCTG
CCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG
CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAA
CGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGA
TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGtaa

```

[128]

[129] 제조예 4. 베타-아밀로이드를 표적으로 하는 ProS1 기반의 융합분자

[130] ProS1 단백질 기반한 베타-아밀로이드(A β) 특이적 키메라 포식 유도체를 제작하기 위하여, 먼저 Gla 도메인 및 EGF 반복 도메인을 없애고, 그 위치에 베타-아밀로이드 특이 항체인 아두카누맙(aducanumab)의 단일사슬 Fv 단편(single-chain variable fragment; scFv)를 도입하였다(α A β -ProS1). 상기 키메라 포식 유도체의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열은 표 6과 같다.

[131] [36]

1. $\alpha\beta$ -ProS1 ($\alpha\beta$ -ProS1(GE-)-FLAG-IRES-ZsGreen, amino acid sequence)

MRVLGGRCGALLACLLLVLVSEADIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSSIS
 SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFA
 TYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKRGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVV
 QPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDTGKKYYTDS
 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVW
 GKGTTVTVSSGGGSGGGGSVSVCLPLNLDTKYELLYLAEQFAGVVLYLKF
 RLPEISRFAEFDFRTYDSEGVILYAESIDHSAWLLIALRGKIEVQLKNEHTSK
 ITTGGDVINNGLWNMVSVEELEHSISIKIAKEAVMDINKPGPLFKPENGLLET
 KYFAGFPRKVESELIKPINPRLDGCIRSWNLMKQGASGIKEIIQEKQNKHCLVT
 VEKGSYYPGSGIAF
 HIDYNNVSSAEGWHVNVTLNIRPSTGTGVMLALVSGNNTVPFAVSLVDSTSE
 KSQDILLSVENTVIYRIQALSCLSDQQSHLEFRVNRNNLELSTPLKIETISHEDL
 QRQLAVLDKAMKAKVATYLGGLPDVPFSATPVNAFYNGCMEVNINGVQLDL
 DEAIKHNDIRAHSCPSVWKKTKNSQGSRADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDD
 K*ASAPLPPPPLTLAEAAWNKAGVRLSICYFPPYCRLLAM*GPGNLALSS*RA
 FLGVFPLSPKECKVC*MS*RKQFLWKLLLEDKQRL*RPFAGSGTPHLATGASAA
 KSHVYKIHLLQRRHNPSATL*VG*LWKESNGSPQA
 YSTRG*RMPPRYPIVWDLIWGLGTHALHVFSG*KNV*APRTTGTWFSFEKH
 DDNMATTMAQSKHGLTKEMTMKYRMEGCVDPGHKFKVITGEGIGYPFKGKQA
 INLCVVEGGPLPFAEDILSAAFMYGNRVFTEYYPQDIVDYFKNSCPAGYTWDRS
 FLFEDGAVCICNADITVSVEENCMYHESKFYGVNFPADGPVMKKMTDNWEP
 SCEKIIPVPKQGILKGDVSMYLLLDGGRRLRCQFDTVYKAKSVPRKMPDWHF
 IQHKLTRDRSDAKNQKWHLTEHAIASGSALP*

2. $\alpha\beta$ -ProS1 ($\alpha\beta$ -ProS1(GE-)-FLAG-IRES-ZsGreen, nucleotide sequence)

ATGAGGGTCCTGGGTGGGCGCTGCGGGGCGCTGCTGGCGTGTCTCCTCCT
 AGTGCTTCCCGTCTCAGAGGCAGACATTCAGATGACTCAATCTCCTAGCTC
 TCTGAGCGCCTCCGTTGGAGATAGAGTCACTATTACCTGCAGAGCCAGCC
 AATCCATCAGCTCTTATCTAAATTGGTACCAACAGAAGCCCGCAAAGCG
 CCAAAGCTGCTCATCTACGCTGCAAGCTCCTTACAGAGCGGAGTACCCAG
 CAGATTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACTGACTTCACATTGACGATTAGCT
 CTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCCACATACTATTGTCAGCAGAGCTATAGCA
 CCCCCTGACGTTTGGAGGCGGAAGTAAAGGTGGAAATCAAGAGAGGAGG
 CGGGGGCTCCGGCGGGGGT
 GGCTCGGGGGGAGGAGGCTCAGAGGTTGAGCTTGTGAGTCTGGGGGGGG

AGTCGTTTCAGCCAGGTAGAAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCCGCAAGTGGGT
TTGCTTTTTTCATCTTACGGTATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAAG
GACTCGAGTGGGTCGCTGTAATATGGTTCGATGGTACAAAGAAATACTAT
ACCGATAGTGTGAAAGGAAGATTCACCATTTACGAGACAACAGTAAAAA
TACCTTGTACCTTCAGATGAACACCCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGAGATAGAGGTATCGGAGCAAGGCGTGGTCCCTATTAT
ATGGATGTGTGGGGGAAGGGAACAACAGTGACTGTGAGCTCTGGCGGGG
GCGGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCGTTGTTTCAGTGTGCCTTCCCTTGAACC
TTGACACAAAGTATGAATTACTTTACTTGGCGGAGCAGTTTGCAGGGGTTG
TTTTATATTTAAAATTTTCGTTTGCCAGAAATCAGCAGATTTTCAGCAGAAT
TTGATTTCCGGACATATGATTCAGAAGGCGTGATACTGTACGCAGAATCTA
TCGATCACTCAGCGTGGCTCCTGATTGCACTTCGTGGTGAAAGATTGAAG
TTCAGCTTAAGAATGAACATACATCCAAAATCACAACCTGGAGGTGATGTT
ATTAATAATGGTCTATGGAATATGGTGTCTGTGGAAGAATTAGAACATAG
TATTAGCATTAAAATAGCTAAAGAAGCTGTGATGGATATAAATAAACCTG
GACCCCTTTTTAAGCCGGAAAATGGATTGCTGGAA
ACCAAAGTATACTTTGCAGGATTCCCTCGGAAAGTGGAAGTGAACATCAT
TAAACCGATTAAACCCTCGTCTAGATGGATGTATACGAAGCTGGAATTTGAT
GAAGCAAGGAGCTTCTGGAATAAAGGAAATTATTCAAGAAAAACAAAAT
AAGCATTGCCTGGTTACTGTGGAGAAGGGCTCCTACTATCCTGGTTCTGGA
ATTGCTCAATTTACATAGATTATAATAATGTATCCAGTGCTGAGGGTTGG
CATGTAAATGTGACCTTGAATATTCGTCCATCCACGGGCACTGGTGTATG
CTTGCCCTTGGTTTCTGHTAACAACACAGTGCCCTTTGCTGTGTCCTTGGTG
GACTCCACCTCTGAAAAATCACAGGATATTCTGTTATCTGTTGAAAATACT
GTAATATATCGGATA
CAGGCCCTAAGTCTATGTTCCGATCAACAATCTCATCTGGAATTTAGAGTC
AACAGAAACAATCTGGAGTTGTGACACCACTTAAAATAGAAACCATCTC
CCATGAAGACCTTCAAAGACAACCTTGCCGTCTTGACAAAAGCAATGAAAG
CAAAAGTGGCCACATACCTGGGTGGCCTTCCAGATGTTCCATTCAAGTGCCA
CACCAGTGAATGCCTTTTATAATGGCTGCATGGAAGTGAATATTAATGGTG
TACAGTTGGATCTGGATGAAGCCATTTCTAAACATAATGATATTAGAGCTC
ACTCATGTCCATCAGTTTGGAAAAAGACAAAGAATTCTCAAGGATCCCGG
GCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTA
CAAGGATGACGATGACAAGtgAGCTAGCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTA
ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATA
TGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAAC
CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTCCCCTCTCGCCA
AAGGAATGCAAGGTCTGTTGA

ACGCCAAGAACCAGAAGTGGCACCTGACCGAGCACGCCATCGCCTCCGGC
TCCGCCTTGCCCTga

[132]

[133] 제조예 5. 베타-아밀로이드를 표적으로 하는 Gas6 기반의 융합분자(II): Fab 및 Mab 형태의 베타-아밀로이드 결합 영역

[134] Gas6 단백질 기반한 베타-아밀로이드(A β) 특이적 키메라 포식 유도체를 제작하기 위하여, 먼저 아폽토틱(apoptotic) 세포의 PS(phosphatidylserine)를 인지하는 부위인 Gla 도메인을 없애고, 그 위치에 베타-아밀로이드 특이 항체인 아두카누맙(aducanumab)의 항원-결합 단편(antigen-binding fragment; Fab) 또는 단클론 항체(monoclonal antibody; Mab)를 도입하였다(α A β [Fab]-Gas6, α A β [Mab]-Gas6). 상기 두 키메라 포식 유도체의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열은 표 7 및 표 8과 같다.

[135] [37]

1. $\alpha\beta$ [Fab]-Gas6 (Aducanumab (Fab)-Gas6-FLAG, amino acid sequence)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDEVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFAFSS
 YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTTKKYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYL
 QMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHGGGGS
 GGGGSDILPCVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRT
 FDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMW
 QTISVEELARNLVIKVN RDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLT VGGIPFHEKD
 LVQPINPRLDGCMRSWNWLN GEDTTIQETVKVNTRMQCF SVTERGSFYPGSG
 FAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVL FALWAPDLRAVPLS
 VALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVVTVSLRDGEAT
 LEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLT FAGGLPDVPVTSAPVTAF
 YRGCMTLEVNRRLLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAADYKDHDGDYKDH
 DIDYKDDDDK*

2 $\alpha\beta$ [Fab]-Gas6 (Aducanumab (Fab)-Gas6-FLAG, nucleotide sequence)

ATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGT
 TCCACTGGTGACGAGGTT CAGCTTGTCGAGTCTGGGGGGGAGTCGTTCA
 GCCAGGTAGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCCGCAAGTGGGTTTGCTTTTTC
 ATCTTACGGTATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTCGAGT
 GGGTCGCTGTAATATGGTTCGATGGTACAAAGAAATACTATAACCGATAGT
 GTGAAAGGAAGATTCACCATTTACGAGACAACAGTAAAAATACCTTGTA
 CCTTCAGATGAACACCCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTGTACTACTGCG
 CCAGAGATAGAGGTATCGGAGCAAGGCGTGGTCCCTATTATATGGATGTG
 TGGGGGAAGGGAACAACAGTGACTGTGAGCTCTGCCTCCACCAAGGGCCC
 ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC
 GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
 CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTC
 CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCT
 AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAA
 ACTCACGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTGGAAGCGACATCTTGCCGT
 GCGTGCCCTTCAGCGTGGCCAAGAGTGTGAAGTCCTTG TACCTGGGCCGG
 ATGTT CAGTGGGACCCCGTGATCCGACTGCGCTTCAAGAGGCTGCAGCC
 CACCAGGCTGGTAGCTGAGTTTGACTTCCGGACCTTTGACCCCGAGGGCAT

CCTCCTCTTTGCCGGAGGCCACCAGGACAGCACCTGGATCGTGCTGGCCCT
GAGAGCCGGCCGGCTGGAGCTGCAGCTGCGCTACAACGGTGTCGGCCGT
GTCACCAGCAGCGGCCCGGTCATCAACCATGGCATGTGGCAGACAATCTC
TGTTGAGGAGCTGGCGCGGAATCTGGTCATCAAGGTCAACAGGGATGCTG
TCATGAAAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTCCAACCGGAGCGAGGACTG
TATCATCTGAACCTCACCGTGGGAGGTATTCCCTTCCATGAGAAGGACCTC
GTGCAGCCTATAAACCCCTCGTCTGGATGGCTGTATGAGGAGCTGGAACCTG
GCTGAACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAAACGGTGAAAGTGAACACG
AGGATGCAGTGCTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCTTTCTACCCCGGGAG
CGGCTTCGCCTTCTACAGCCTGGACTACATGCGGACCCCTCTGGACGTCCG
GACTGAATCAACCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCACATCCGCCAGCCG
CAGACACAGGCGTGCTGTTTGCGCTCTGGGCCCCCGACCTCCGTGCCGTGC
CTCTCTCTGTGGCACTGGTAGACTATCACTCCACGAAGAACTCAAGAAG
CAGCTGGTGGTCCTGGCCGTGGAGCATACGGCCTTGGCCCTAATGGAGAT
CAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTGGTCACCGTCTCGCTGAGGGACG
GTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCACCAGGGGCCAGAGCGAGGTGAG
CGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCCGTGCTCGAGAGGCACCTGCGGA
GCCCCGTGCTCACCTTTGC
CGGCGGCCTGCCAGATGTGCCGGTGACTTCAGCGCCAGTCACCGCGTTCT
ACCGCGGCTGCATGACACTGGAGGTCAACCGGAGGCTGCTGGACCTGGAC
GAGGCGGCGTACAAGCACAGCGACATCACGGCCCACTCCTGCCCCCCCCGT
GGAGCCCGCCGACCCGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATC
ATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGtga

[136]

[137] [38]

1. α A β [Mab]-Gas6 (Aducanumab (Mab)-Gas6-FLAG, amino acid sequence)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDEVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFAFSS
 YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTTKKYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYL
 QMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGKGGGGSGGGGSDILPC
 VPFSAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLFA
 GGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMWQTISVEELAR
 NLVIKVN RD AVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLT VGGIPFHEKDLVQPINRLD
 GCMRSWNWLN GEDTTIQETVKVNTRMQCF SVTERGSFYPGSGFAFYSLDYM
 RTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVL FALWAPDLRAVPLSVALVDYHST
 KKKKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRDGEATLEVDGTRGQ
 SEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGLPDVPVTSAPVTA FYRGCMTLEV
 NRRLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAA*

2. α A β [Mab]-Gas6 (Aducanumab (Mab)-Gas6-FLAG, nucleotide sequence)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGT
 TCCACTGGTGACGAGGTT CAGCTTGTCGAGTCTGGGGGGGGAGTCGTTCA
 GCCAGGTAGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCCGCAAGTGGGTTTGCTTTTTTC
 ATCTTACGGTATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTCGAGT
 GGGTCGCTGTAATATGGTTCGATGGTACAAAGAAATACTATACCGATAGT
 GTGAAAGGAAGATTCACCATTTACGAGACAACAGTAAAAATACCTTGTA
 CCTTCAGATGAACACCCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTGTACTACTGCG
 CCAGAGATAGAGGTATCGGAGCAAGGCGTGGTCCCTATTATATGGATGTG
 TGGGGGAAGGGAACAACAGTGACTGTGAGCTCTGCCTCCACCAAGGGCCC
 ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
 CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
 CCGGTGACGGTGTCGTGGAAC TCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACAC
 CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
 GACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA
 ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT

TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAAGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTG
GAAGCGACATCTTGCCGTGCGTGCCCTTCAGCGTGGCCAAGAGTGTGAAG
TCCTTGACCTGGGCCGGATGTTCAAGTGGGACCCCCGTGATCCGACTGCGC
TTCAAGAGGCTGCAGCCCACCAGGCTGGTAGCTGAGTTTGAAGTCCGGAC
CTTTGACCCCGAGGGCATCCTCCTCTTTGCCGGAGGCCACCAGGACAGCA
CCTGGATCGTGCTGGCCCTGAGAGCCGGCCGGCTGGAGCTGCAGCTGCGC
TACAACGGTGTCGGCCGTGTCACCAGCAGCGGCCCGGTCATCAACCATGG
CATGTGGCAGACAATCTCTGTTGAGGAGCTGGCGCGGAATCTGGTCATCA
AGGTCAACAGGGATGCTGTCATGAAAATCGCGGTGGCCGGGGACTTGTTC
CAACCGGAGCGAGGACTGTATCATCTGAACCTCACCGTGGGAGGTATTCC
CTTCCATGAGAAGGACCTCGTGACGCTATAAACCCTCGTCTGGATGGCTG
TATGAGGAGCTGGAACTGGCTGAACGGAGAAGACACCACCATCCAGGAA
ACGGTGAAAGTGAACACGAGGATGCAGTG
CTTCTCGGTGACGGAGAGAGGCTCTTTCTACCCCGGGAGCGGCTTCGCCTT
CTACAGCCTGGACTACATGCGGACCCCTCTGGACGTGGGACTGAATCAA
CCTGGGAAGTAGAAGTCGTGGCTCACATCCGCCAGCCGCAGACACAGGC
GTGCTGTTTGCGCTCTGGGCCCCCGACCTCCGTGCCGTGCCTCTCTCTGTG
GCACTGGTAGACTATCACTCCACGAAGAACTCAAGAAGCAGCTGGTGGT
CCTGGCCGTGGAGCATAACGGCCTTGCC
CTAATGGAGATCAAGGTCTGCGACGGCCAAGAGCACGTGGTCACCGTCTC
GCTGAGGGACGGTGAGGCCACCCTGGAGGTGGACGGCACCAGGGGCCAG
AGCGAGGTGAGCGCCGCGCAGCTGCAGGAGAGGCTGGCCGTGCTCGAGA
GGCACCTGCGGAGCCCCGTGCTACCTTTGCCGGCGGCCTGCCAGATGTG
CCGGTGACTTCAGCGCCAGTCACCGCGTTCTACCGCGGCTGCATGACACTG

GAGGTCAACCGGAGGCTGCTGGACCTGGACGAGGCGGCGTACAAGCACA
GCGACATCACGGCCCACTCCTGCCCCCGTGGAGCCCCGCCGAGCCtga

[138]

[139] 실험예 1. 베타-아밀로이드를 표적으로 하는 Gas6 기반의 융합분자 (I): scFv 형태의 베타-아밀로이드 결합 영역

[140] **1-1. 형질전환 세포의 융합분자의 발현 확인**

[141] HEK293 세포에 플라스미드 형질주입(transfection) 후, 제조예 1에 따른, Flag tag를 포함하는 융합분자의 발현을 Flag tag를 이용한 웨스턴 블롯으로 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[142]

[143] **1-2. 제조된 융합분자의 베타-아밀로이드 특이적 결합능력 확인**

[144] $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6(E), $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6, αFITC -Gas6(E), αFITC -Gas6가 베타-아밀로이드와 FITC를 각각 선택적으로 인식할 수 있는지를 확인하고자, 각각의 플라스미드가 형질주입된 HEK293 세포로부터 분비된 세포 배양액을 모아 베타-아밀로이드 올리고머와 FITC가 부착된 비드(bead)를 통해 실험하였다. 그 결과 도 4와 같이, $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6(E), $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6는 베타-아밀로이드 올리고머 비드만을, αFITC -Gas6(E), αFITC -Gas6는 FITC 비드만을 인식하고 식세포작용(phagocytosis)을 유도함을 확인하였다.

[145] $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6(E), $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6는 비슷한 정도의 활성을 보임을 확인하였으나, Gas6의 EGF 도메인을 추가로 제거한 $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6가 단백질 정제과정에서 응집(aggregation)없이 높은 수율로 확보할 수 있음을 발견하여 $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6를 앞으로의 실험과정에 이용하기로 하였다.

[146]

[147] **1-3. 제조된 융합분자의 작용기전 확인**

[148] **(1) 세포주를 이용한 확인**

[149] 베타-아밀로이드 올리고머(oligomer)를 pH 지시계와 컨쥬게이션시켜 이들이 식세포작용에 의해 섭취(uptake)되었을 때, 세포 안 리소좀 안에서 붉은 형광을 낼 수 있도록 *in vitro* A β engulfment assay를 개발하였다.

[150] TAM 수용체들을 발현하는 인간 미세아교세포주인 HMC3 세포로 *in vitro* A β engulfment assay를 수행한 결과, 베타-아밀로이드 올리고머가 $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6에 의해 선택적으로 제거됨을 확인하였다(도 5 및 6).

[151] 특히, TAM 수용체들에 대한 기능을 방해하는 항체를 같이 처리하는 실험을 통해 Tyro3, Mertk, Axl 중 $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6는 주로 Axl를 통해 베타-아밀로이드 올리고머를 제거함을 확인하였다(도 7 내지 9). 실제로, Axl을 HMC3 세포에서 제거하였을 때는 $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6의 활성이 크게 감소하였다. 또한 TAM 수용체들을 발현하지 않는 인간 단핵구 세포주인 THP-1는 $\alpha\text{A}\beta$ -Gas6에 의한 베타-아밀로이드 제거능력이 상승하지 않았으나, Axl을 과발현 시킨 THP-Axl

세포는 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 에 의존적으로 베타-아밀로이드 피브릴(fibril)을 섭취하는 능력이 크게 증가함을 확인하였다.

- [152] 다음으로, Axl을 과발현 시킨 THP-Axl 세포가 Axl과 Fc 수용체를 모두 가지고 있으므로, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 와 아두카누맵을 통해 베타-아밀로이드를 섭취하였을 때 유도되는 염증반응 정도를 확인하였다. 이를 위해 먼저 NF- κB 리포터(reporter)를 THP-Axl 세포에서 발현시켜 대조군, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 와 아두카누맵을 베타-아밀로이드 올리고머와 함께 각각 넣어 주었을 때, NF- κB 리포터가 아두카누맵 첨가시에는 크게 증가하였지만, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 의 경우에는 대조군 수준 또는 그 이하로 발현되는 것을 확인하였다(도 10). 또한, 가장 대표적인 세 종류의 염증성 사이토카인인 IL-1b, IL-6와 TNF의 분비된 단백질 양을 측정하였을 때, 아두카누맵을 처리한 경우는 THP-Axl 세포에서 대조군에 비해 위의 염증성 사이토카인들의 단백질의 양이 현격히 증가하였다(도 11). 하지만, 중요하게도 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 에서는 이들 염증성 사이토카인의 양이 대조군에 비해 증가하지 않았음을 확인하였다. 이는 우리의 가설대로 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 융합 포식 유도체 단백질이 TAM 수용체를 통해 표적물질을 식세포작용할 때 자연적인 사멸세포의 인식 및 포식작용(efferocytosis)과 마찬가지로 염증반응을 유도하지 않는다는 핵심적인 결과이다.

- [153] 또한, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 는 아두카누맵과는 달리 염증반응을 억제시키는 기전으로 알려진 Twist1/2 유전자의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다(도 12).

[154]

[155] **(2) 별아교세포와 미세아교세포를 이용한 확인**

- [156] 뇌 안에서 TAM 수용체를 발현하는 세포인 별아교세포와 미세아교세포가 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 를 통해 베타-아밀로이드를 제거할 수 있는 지를 알아보기 위해, 쥐의 뇌에서 얻은 별아교세포(primary astrocyte)와 미세아교세포(microglia)를 각각 정제한 후 배양하였다. 이후, 정제된 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 와 아두카누맵을 베타-아밀로이드 피브릴과 같이 넣어 베타-아밀로이드 피브릴 제거 정도를 실시간으로 관찰하였다.

- [157] 그 결과, Axl을 발현하는 세포주인 HMC3에서 얻은 결과와 동일하게 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 가 농도 의존적으로 미세아교세포의 베타-아밀로이드 제거 능력을 증가시킴을 확인하였다(도 13). 중요하게도, 아두카누맵을 넣었을 경우에는 별아교세포의 베타-아밀로이드 제거 능력이 전혀 변화되지 않았지만, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 의 경우에는 농도 의존적으로 별아교세포의 베타-아밀로이드 제거 능력이 현격하게 증가함을 확인하였다(도 14). 이는 별아교세포가 Fc 수용체를 발현하지 않는 반면 TAM 수용체를 발현하기 때문에, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 로 인해 기존에 미미했던 베타-아밀로이드 제거 능력이 크게 향상됨을 의미한다.

[158]

- [159] 별아교세포와 미세아교세포 세포주인 BV2 세포에 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 와 아두카누맵을 베타-아밀로이드 피브릴과 각각 같이 넣어 베타-아밀로이드 섭취를 증가시킨 후,

각각 세포에서 염증반응 정도를 TNF, IL-1a, IL-1b의 mRNA 레벨을 측정하였다(도 15 및 16). 그 결과, 세포주에서 얻은 결과와 비슷하게, 아두카누맙을 처리한 경우 별아교세포와 BV2 세포에서 대조군에 비해 위의 염증성 사이토카인들의 전사체와 단백질의 양이 현격히 증가하였으나, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 에서는 이들 염증성 사이토카인의 양이 대조군에 비해 증가하지 않았음을 확인하였다.

- [160] 상기와 같이, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 융합 포식 유도체를 이용하는 것이 기존 단일클론 항체 치료제의 심각한 부작용인 염증반응을 동반하지 않고 환자의 뇌에 축적된 베타-아밀로이드 플라크를 별아교세포와 미세아교세포를 통해 효과적으로 제거하는 획기적인 방법이 될 수 있음을 발견하였으며, 이는 현재의 치료 전략을 크게 향상시킬 수 있는 매우 고무적인 결과로 판단된다.

[161]

[162] **1-4. *In vivo* 효능평가**

- [163] (1) 융합분자 또는 이의 발현벡터 도입에 따른 효능

- [164] 알츠하이머 병 모델 쥐로 5XFAD를 사용하였다. 5XFAD는 돌연변이가 있는 5개의 유전자를 동시에 발현시키므로 베타-아밀로이드 플라크가 생성되는 시기가 빠르며, 노화와는 관계없이 생후 3~4개월부터 베타-아밀로이드 플라크에 따른 병적 증상을 연구할 수 있다.

- [165] 5XFAD 모델을 통해 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 의 효과를 *in vivo*에서 검증하기 위해, 두 가지 다른 방식으로 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 를 뇌에 전달하였다. 이미 기존 연구를 통해 아두카누맙은 알츠하이머 병 모델 쥐로서도 혈관 주사나 복강 주사로 뇌로 전달이 잘 되지 않음이 알려져 있다. 따라서, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 의 효과를 아두카누맙과 정확하게 비교 분석하기 위해서, 1) 생쥐 뇌에 직접 관 삽입(cannulation) 수술을 해서, 정제된 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 와 아두카누맙을 각각 하루에 한 번씩 뇌의 뇌실(ventricle)에 3주간 주입하였고, 2) $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 와 아두카누맙 각각을 렌티바이러스 형태로 만들어 생쥐 해마에 입체주입(sterotaxic injection)을 통해 발현시켰다. 중요하게도, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 정제 단백질을 넣어주거나 렌티 바이러스 형태로 유전자를 발현시켰을 때 모두 유의미하게 베타-아밀로이드 플라크수들이 감소하였음을 발견하였다(도 17 및 18).

- [166] 또한, 각각 단백질과 바이러스 형태로 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 를 뇌에 전달했을 때 미세아교세포 및 별아교세포의 리소좀에 들어 있는 베타-아밀로이드 양을 정량한 결과, 이 두 세포 모두에서 베타-아밀로이드 제거 능력이 크게 상승한 것으로 나타났다(도 19 내지 도 22)

- [167] 이는, *in vitro* 연구결과와 마찬가지로 TAM 수용체들이 미세아교세포와 별아교세포에서 모두 발현하므로 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 도입시 미세아교세포와 별아교세포가 베타-아밀로이드를 인식하고 제거할 수 있게 됨을 의미한다.

- [168] (2) 항체치료제와 본 발명의 융합분자의 효과 비교

- [169] 알츠하이머 병에서는 미세아교세포에 의해 시냅스가 무분별하게 제거되어

시냅스 수가 감소함이 알려져 있다. 놀랍게도 아두카누맵을 알츠하이머 모델 쥐에 전달했을때는 이 현상이 심화되었지만, $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 를 바이러스 형태로 발현시켰을때는 미세아교세포에 의한 비정상적인 시냅스 제거가 정상수준으로 회복되었다 (도 23 및 24).

[170] 뿐만아니라 알츠하이머 모델 쥐에서 새로운 물체의 모양이나 위치를 기억하는 인지 및 기억력 테스트를 도 25의 프로토콜에 따라 각각 수행하였을때 아두카누맵에 비해 $\alpha\text{A}\beta\text{-Gas6}$ 의 발현은 현격하게 우월한 인지 및 기억력 회복 효과를 보였다 (도 26).

[171]

[172] 추가로, 본 발명의 키메라 포식 유도체 단백질이 다양한 표적 물질 제거에도 효과적인지 확인하기 위해, 베타-아밀로이드 외에 타우(Tau) 및 알파-시누클린(αSyn)에 특이적인 포식유도 단백질을 제조예 2 및 3과 같이 제조하여 실험예 2 및 3과 같이 각 표적 물질의 제거 효과를 확인하였다.

[173]

[174] **실험예 2. 타우를 표적으로 하는 Gas6 기반의 융합분자**

[175] 타우 올리고머(tau oligomer)를 pH 지시계와 컨쥬게이션시켜 이들이 식세포작용에 의해 섭취(uptake)되었을 때, 세포 안 리소좀 안에서 붉은 형광을 낼 수 있도록 *in vitro* tau engulfment assay를 개발하였다. TAM 수용체들을 발현하는 인간 미세아교세포주인 HMC3 세포에 제조예 2에 따른 포식 유도체 단백질[$\alpha\text{Tau-Gas6}$]을 발현하는 배양액을 처리하여 *in vitro* tau engulfment assay를 수행하였으며, 그 결과 도 27과 같이 타우 올리고머가 $\alpha\text{Tau-Gas6}$ 에 의해 선택적으로 제거됨을 확인하였다.

[176]

[177] **실험예 3. 알파-시누클린을 표적으로 하는 Gas6 기반의 융합분자**

[178] 알파-시누클린 올리고머(αSyn oligomer)를 pH 지시계와 컨쥬게이션시켜 이들이 식세포작용에 의해 섭취(uptake)되었을 때, 세포 안 리소좀 안에서 붉은 형광을 낼 수 있도록 *in vitro* αSyn engulfment assay를 개발하였다. TAM 수용체들을 발현하는 인간 미세아교세포주인 HMC3 세포에 제조예 3에 따른 포식 유도체 단백질[$\alpha\alpha\text{Syn-Gas6}$]을 발현하는 배양액을 처리하여 *in vitro* αSyn engulfment assay를 수행하였으며, 그 결과 도 28과 같이 알파-시누클린 올리고머가 $\alpha\alpha\text{Syn-Gas6}$ 에 의해 선택적으로 제거됨을 확인하였다.

[179]

[180] **실험예 4. 베타-아밀로이드를 표적으로 하는 ProS1 기반의 융합분자**

[181] 다음으로, 키메라 포식 유도 단백질의 제작에 있어 Gas6가 아닌 TAM 수용체의 다른 리간드(ligand)를 활용하여도 효과가 있는지 확인하기 위해 ProS1 리간드를 이용하여 $\alpha\text{A}\beta\text{-ProS1}$ 을 제조예 4와 같이 제작하고 효능을 평가하였다. 이를 위해 TAM 수용체들을 발현하는 일차배양된 쥐 별아교세포에서 $\alpha\text{A}\beta\text{-ProS1}$ 을 발현하는 배양액을 처리하여 실험예 1-3에서 사용한 *in vitro* A β engulfment

assay를 수행하였으며, 그 결과 도 29와 같이 베타-아밀로이드 올리고머가 $\alpha\text{A}\beta\text{-ProS1}$ 에 의해 선택적으로 제거됨을 확인하였다.

[182]

[183] **실험예 5. 베타-아밀로이드를 표적으로 하는 Gas6 기반의 융합분자(II): Fab 및 Mab 형태의 베타-아밀로이드 결합영역**

[184] 다음으로, 키메라 포식 유도 단백질의 제작에 있어 표적 단백질의 결합 도메인이 scFv 외 다양한 표적 결합 부위를 사용 가능한지 확인하기 위해, scFv 대신 항원결합단편(antigen-binding fragment, Fab) 혹은 완전한 형태의 단클론항체(monoclonal antibody; Mab)을 이용하여 제조된 포식 유도 단백질을 제조예 5에 따라 제조하여 실험을 수행하였다($\alpha\text{A}\beta[\text{Fab}]\text{-Gas6}$ 및 $\alpha\text{A}\beta[\text{Mab}]\text{-Gas6}$). 이를 위해 TAM 수용체들을 발현하는 인간 미세아교세포주인 HMC3 세포에 $\alpha\text{A}\beta[\text{Fab}]\text{-Gas6}$ 및 $\alpha\text{A}\beta[\text{Mab}]\text{-Gas6}$ 를 발현하는 배양액을 처리하여 실험예 1-3에서 사용한 *in vitro* A β engulfment assay를 수행하였으며, 그 결과 도 30 및 도 31과 같이 베타-아밀로이드 올리고머가 $\alpha\text{A}\beta[\text{Fab}]\text{-Gas6}$ 및 $\alpha\text{A}\beta[\text{Mab}]\text{-Gas6}$ 각각에 의해 선택적으로 제거됨을 확인하였다.

[185]

[186] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[187]

발명의 실시를 위한 형태

[188] 발명의 실시를 위한 형태는 발명의 실시를 위한 최선의 형태에서 함께 설명되었다.

[189]

산업상 이용가능성

[190] 본 발명의 실시예에 따른 식세포작용 유도 활성을 갖는 융합분자는 종래기술이 갖는 염증반응 활성화에 따른 조직 손상 문제를 해결할 수 있으며, 이에 따라 이상 축적된 물질, 예컨대 베타-아밀로이드, 타우, 알파-시누클린, 헌팅틴 또는 프라이온 등을 효과적으로 제거하여, 이러한 축적에 의해 일어나는 질병, 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅틴병 또는 프라이온 병의 예방 또는 치료용도로 활용될 수 있어 상기 질환들의 치료제 산업에서 이용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] TAM 수용체 결합능을 갖는 제1영역; 및
표적 물질에 특이적으로 결합하는 제2영역을 포함하는,
식세포작용 유도 활성을 갖는 융합분자.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 TAM 수용체는 Tyro3, Ax1 및 MerTK로 이루어진
군에서 선택된 하나 이상인 융합분자.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 제1영역은 Gas6, ProS1, Tubb3, Tulp1, Gal3 또는
이들의 활성 단편을 포함하는 것인 융합분자.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 제1영역은 Gas6 또는 ProS1의 라미닌 G-유사
도메인(laminin G-like domain), 또는 이의 활성 단편을 포함하는 것인
융합분자.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 제1영역은 서열번호 1 및 2의 서열을 포함하는
라미닌 G-유사 도메인, 또는 서열번호 3 및 4의 서열을 포함하는 라미닌
G-유사 도메인인 것인 융합분자.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 표적 물질은 생체 조직에 축적되어 질병을
일으키는 물질인, 융합분자.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 표적 물질은 아밀로이드인 융합분자.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 질병은 아밀로이드증인 융합분자.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 표적 물질은 베타-아밀로이드(β -amyloid),
타우(Tau), 알파-시누클린(α -synuclein), 헌팅틴(huntingtin),
프라이온(prion) 및 표 1의 이상 축적 물질 중에서 선택되는 것인,
융합분자.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제2영역은 상기
표적 물질에 특이적으로 결합하는 항체, 이의 활성 단편, 항체 유사
단백질, 펩타이드, 압타머 및 가용성 수용체 중에서 선택되는 것인
융합분자.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 식세포작용은 TAM 수용체를 발현하는 세포에서
유도되는 것인 융합분자.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 TAM 수용체를 발현하는 세포는 한 가지 이상의
전문적인 포식세포(professional phagocyte), 한 가지 이상의 비전문적인
포식세포(non-professional phagocyte) 또는 그 조합인 것인 융합분자.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 식세포작용의 유도는 염증반응을 수반하지 않는
것인 융합분자.
- [청구항 14] 제1항에 따른 융합분자를 인코딩하는 핵산분자.
- [청구항 15] 제1항의 핵산분자를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 16] 제1항에 따른 융합분자를 발현하는 세포.
- [청구항 17] 제1항에 따른 융합분자 또는 제15항에 따른 발현벡터를 포함하는, 상기

표적 물질이 생체 조직에 축적되어 일으키는 질병의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.