(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0027278
(43) 공개일자 2025년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7004988(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년07월05일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7003689
원출원일자(국제) 2016년07월05일
심사청구일자 2021년06월30일
(85) 번역문제출일자 2025년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/065813
(87) 국제공개번호 WO 2017/005734
국제공개일자 2017년01월12일
(30) 우선권주장
15175522.0 2015년07월06일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
유씨비 바이오파마 에스알엘
벨기에 브뤼셀 1070 알레 더 라 러쉐르쉐 60
(72) 발명자
나이트 데이비드 에드워드 오르몬드
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피 디파트먼트 내
베이커 테런스 슈어드
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피 디파트먼트 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **타우 결합 항체**

(57) 요 약

본 발명은 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편에 관한 것이다.

대 표 도

VL_AB1

DIVMTQTPVSLSVTLGDQASISCRSSQSLEYSDGYTYLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS
NRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHNPYTFGAGTKLEIK

IGKV2_29

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVS
SRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLPYTFGQGTKLEIK

gVL3_AB1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLEYSDGYTYLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQATHNPYTFGQGTKLEIK

(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
맥밀런 데이비드 제임스
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피 디파트먼트 내
그리핀 로버트 앤서니
영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀텍 아이피 디파트먼트 내
메레-코엘로 조르쥬
벨기에 1070 브뤼셀 알레 드 라 르쉐르슈 60 유씨비 바이오파마 에스피알엘 아이피 디파트먼트 내
다우니 패트릭
벨기에 1070 브뤼셀 알레 드 라 르쉐르슈 60 유씨비 바이오파마 에스피알엘 아이피 디파트먼트 내
쿠라드 장-필립
벨기에 1070 브뤼셀 알레 드 라 르쉐르슈 60 유씨비 바이오파마 에스피알엘 아이피 디파트먼트 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, 및 S238을 포함하는 에피토프에 결합하는 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, 및 S238과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는, 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 단클론 인간화 항체인 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 가용성 인간 타우와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF: paired helical filament) 둘 다에 결합하는, 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 단리된 핵산 분자(들).

청구항 6

제5항의 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터.

청구항 7

제6항의 하나 이상의 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자를 포함하는 하나 이상의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 8

타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 제조 방법으로서, 적어도

a) 제7항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

b) 상기 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 단리하는 단계

를 포함하는, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 제조 방법.

청구항 9

타우병증의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 포함하는 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 타우병증이 알츠하이머병 또는 진행성 핵상 마비인 약학 조성물.

청구항 11

타우병증의 진단에 사용하기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합

단편을 포함하는 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 타우병증이 알츠하이머병 또는 진행성 핵상 마비인 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 특히 치료용 및 진단용 타우(Tau) 결합 항체 및 이의 결합 단편, 상기 항체의 제조 방법, 그리고 타우병증, 예를 들어 알츠하이머병; 근위축성 측색 경화증/파킨슨증 치매 복합; 은친화성 입자병; 만성 뇌상성 뇌병증; 피질 기저핵 변성; 석회화에 의한 광범위 신경 섬유 매듭; 다운 증후군; 가족성 영국형 치매; 가족성 덴마크형 치매; MAPT 돌연변이에 의해 유발된 17번 염색체에 연관된 전두 측두엽 치매 및 파킨슨증; 게르스트만 슈투로이슬러 샤잉커병(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease); 과들루프 파킨슨증(Guadeloupean parkinsonism); 근긴장성 이영양증; 뇌 철분 축적으로 인한 신경변성; 니만 피크병((Niemann-Pick disease) C형; 신경 섬유 매듭으로 인한 비-과마니안(non-Guamanian) 운동 뉴런 질환; 피크 병; 뇌염 후 파킨슨증; 프라이온 단백질 대뇌 아밀로이드 혈관병증; 진행성 피질하 신경아교증; 진행성 핵상 마비; SLC9A6 관련 정신지체; 아급성 경화성 범뇌염; 매듭 우세 치매(Tangle-only dementia); 구형 교세포 포함물로 인한 백질 타우병증(Clavaguera et al. Brain Pathology 23 (2013) 342-349)의 치료 및/또는 진단을 위한 이들의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기에 기재된 타우병증, 특히 알츠하이머병 및 진행성 핵상 마비와 같은 타우병증에 걸렸거나 걸리기 쉬운 것으로 의심되는 인간 피험체의 치료 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머병(AD: alzheimer's disease) 및 진행성 핵상 마비(PSP: progressive supranuclear palsy)는 높은 미충족 의료 수요, 고비용의 사회 의료 체계와 환자 가족의 무거운 부담을 가진 신경 퇴행성 질환이다. AD 임상 징후는 기억, 인지, 이성, 판단 및 정서 안정성의 소실과 결국에는 사망을 포함한다. PSP는 심각하고 점진적인 보행 제어 및 균형 문제, 추락, 수직 안구운동 장애, 인지문제, 우울증, 무관심, 및 경증 치매를 수반한다. 후기 증상은 시력 흐림, 제어되지 않는 안구 운동, 불분명한 발음, 연하 곤란 및 사망을 포함한다.

[0003] 10년 이상 동안, AD 질환 교정 프로그램은 다양한 기전을 통해 아밀로이드-베타-펩티드를 표적화하여 왔다. 대조적으로, AD의 2번째 주요 특징인 세포 내 타우 병리기전을 다루는 데 있어 진보는 훨씬 적었다. 응집된 과인산화 타우를 포함하는 신경 섬유 포함물 또는 매듭은 AD 병리기전 및 PSP를 포함한 기타 많은 타우병증을 정의하는 특징이다.

[0004] 상기 질병에서, 증상의 진행과 신경 내 타우 응집체의 수준 및 분포 사이에 밀접한 연관성이 있다. AD에서 신경 타우 매듭은 이들이 해마 및 신피질로 확산되는 횡단 내후각 피질에서 처음 나타난다. AD 뉴런에서 발견된 매듭은 과인산화되고 응집된 불용성 타우로 이루어진다. 병리학적 타우 종의 직접적인 독성 효과 및/또는 기능적인 타우가 과인산화 응집된 형태로 격리되어 더이상 측삭 수송을 지원할 수 없음으로 인한 측삭 수송의 소실이 질환의 원인이 된다고 제안되어왔다.

[0005] 타우는 비병리학적 상태에서 높은 가용성의 세포질의 미세소관-결합 단백질로, 인간 중추 신경계(CNS: central nervous system)에서 선택적 스플라이싱으로 인해 352 내지 441개 아미노산 길이 범위의 6가지 주요 이소형으로 존재한다. 이들 이소형은 0, 1 또는 2개의 N-말단 삽입체(0N, 1N, 2N), 및 3 또는 4개의 C-말단 "반복" 서열(3R 또는 4R)을 가질 수 있다. 이들 30-32개 아미노산 C-말단 반복 서열, R1, R2, R3 및 R4는 함께 타우 미세소관 결합 영역(MTBR: microtubule-binding region)을 구성한다. 실제로 타우의 주요 역할은 측삭 미세소관의 조립 및 안정화에 있다고 생각된다. 미세소관은 세포 성장을 위한 측삭 수송 경로 및 세포골격 요소를 형성한다(Clavaguera et al., Brain Pathology 23 (2013) 342-349). 3가지 타우 이소형은 3개의 미세소관 결합 영역(MTBR)을 포함한다고 입증되었다:

[0006] - 3R0N으로도 불리는 이소형 4, NCBI 참조 서열 NP_058525.1(352개 아미노산),

[0007] - 3R1N으로도 불리는 이소형 7, NCBI 참조 서열 NP_001190180.1(381개 아미노산)

[0008] - 3R2N으로도 불리는 이소형 8, NCBI 참조 서열 NP_001190181.1(410개 아미노산).

[0009] 반면 나머지 3가지 타우 이소형은 4개 MTBR을 포함한다:

[0010] - 4R2N으로도 불리는 이소형 2, NCBI 참조 서열 NP_005901.2(441개 아미노산),

[0011] - 4R0N으로도 불리는 이소형 3, NCBI 참조 서열 NP_058518.1(383개 아미노산), 및

[0012] - 4R1N으로도 불리는 이소형 5, NCBI 참조 서열 NP_001116539.1(412개 아미노산).

[0013] 현재 상기 질환에는 효능이 약하거나 없는 대증요법만이 이용 가능하다. 질환의 발생을 지연시키거나 이상적으로 정지시키는 치료법은 현재 이용 가능한 치료법은 이용 가능하지 않다. 따라서 당 업계에서는 타우병증의 치료에 유용한 신규 화합물 및 조성물이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] **본 발명의 목적 및 요약**

[0015] 본 발명의 목적은 특히 타우병증, 예를 들어 알츠하이머병(AD) 또는 진행성 핵상 마비(PSP)의 치료 또는 진단용 제제를 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 특히 타우병증, 예를 들어 알츠하이머병(AD) 또는 진행성 핵상 마비(PSP)의 치료 또는 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 상기 및 기타 목적은 이후에 뒤이은 설명으로부터 명백할 것이며, 이들은 독립적인 청구항의 청구 대상에 의해 성취된다. 본 발명으로부터 고려되는 일부 구체적인 측면 및 이의 실시양태는 종속항의 청구 대상을 형성한다. 그러나 본 발명에 의해 고려되는 기타 측면 및 이의 실시양태는 뒤이은 설명으로부터 취할 수 있다.

[0017] 제1 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0018] 서열 번호 1로부터 선택된 CDR1 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 2로부터 선택된 CDR2 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 및 서열 번호 3으로부터 선택된 CDR3 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는

[0019] 서열 번호 4로부터 선택된 CDR1 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 5로부터 선택된 CDR2 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 및/또는 서열 번호 6으로부터 선택된 CDR3 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0020] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0021] 제2 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0022] 서열 번호 7 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및/또는

[0023] 서열 번호 8 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0024] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0025] 제3 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0026] 서열 번호 9 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및/또는

[0027] 서열 번호 10 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0028] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0029] 제4 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246을 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 결합 단편을 제공한다.

[0030] 제1 및 제4 측면의 한 실시양태로서, 본 발명은 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있는 단클론 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0031] 제2 측면의 한 실시양태로서, 본 발명은 키메라 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있는 단클론 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0032] 제3 측면의 한 실시양태로서, 본 발명은 인간화 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있는 단클론 항체 또는 이의 결

합 단편을 제공한다.

[0033] 제5 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 제1 내지 제4 측면 또는 이의 실시양태 중 어느 하나의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편과 타우 결합에 대해 경쟁하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0034] 제6 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 제1 내지 제4 측면 또는 이의 실시양태 중 어느 하나의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편과 실질적으로 동일한 타우의 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0035] 제5 및 제6 측면의 한 실시양태로서, 본 발명은 인간화 항체 또는 이의 결합 단편일 수 있는 단클론 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0036] 제1 내지 제6 측면 및 이의 실시양태의 항체 또는 이의 결합 단편은 인간 타우의 가용성 형태, 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF: paired helical filament) 또는 인간 타우의 가용성 형태 및 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합할 수 있다.

[0037] 제7 측면에서, 본 발명은 제1 내지 제6 측면 또는 이의 실시양태의 항체 및 결합 단편을 코딩하는 핵산 서열, 예를 들어 DNA 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.

[0038] 제8 측면에서, 본 발명은 상기에 언급한 핵산 분자를 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터를 제공한다.

[0039] 제9 측면에서, 본 발명은 상기에 언급한 핵산 분자, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0040] 제10 측면에서, 본 발명은 제1 내지 제6 측면 및 이의 실시양태의 항체 및 이의 결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[0041] 제11 측면에서, 본 발명은 특히 AD 및 PSP와 같은 타우병증의 치료를 위한 제1 내지 제6 측면 및 이의 실시양태의 항체 및 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[0042] 본 발명의 또 다른 측면은 특히 AD 및 PSP와 같은 타우병증의 진단을 위한 제1 내지 제6 측면 및 이의 실시양태의 항체 및 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1: A)는 밑줄로 표시된 CDR 1(서열 번호 1), 2(서열 번호 2) 및 3(서열 번호 3)을 가진 서열 번호 7의 AB1의 공여 VL(VL_AB1)을 도시한다. B)는 밑줄로 표시된 수용 CDR 1, 2, 및 3을 가진 서열 번호 31의 인간 수용 영역 IGKV2-29의 VL 서열을 도시한다. C) 밑줄로 표시된 CDR 1(서열 번호 1), 2(서열 번호 2) 및 3(서열 번호 3)을 가진 서열 번호 9의 CDR 이식된 서열 gVL3_AB1을 도시한다.

도 2: A)는 밑줄로 표시된 CDR 1(서열 번호 4), 2(서열 번호 36) 및 3(서열 번호 6)을 가진 서열 번호 8의 AB1의 공여 VH(VH_AB1)를 도시한다. B)는 밑줄로 표시된 수용 CDR 1, 2, 및 3을 가진 서열 번호 32의 인간 수용 영역 IGHV4-59의 VH 서열을 도시한다. C) 밑줄로 표시된 CDR 1(서열 번호 4), 2(서열 번호 37) 및 3(서열 번호 6)을 가진 서열 번호 12의 CDR 이식된 서열 gVH17_AB1을 도시한다. 공여 잔기는 기울임 체와 음영으로 나타낸다: M48. 골격 내 돌연변이는 음영으로 나타낸다(E1). CDR2는 VH_AB1과 비교하여 S61A 치환을 포함한다. D) 밑줄로 표시된 CDR 1(서열 번호 4), 2(서열 번호 38) 및 3(서열 번호 6)을 가진 서열 번호 13의 CDR 이식된 서열 gVH18_AB1을 도시한다. 공여 잔기는 기울임 체와 음영으로 나타낸다(M48). 골격 내 돌연변이는 음영으로 나타낸다(E1). CDR2는 VH_AB1과 비교하여 S61T 치환을 포함한다.

도 3: 실험 3.1의 세포 응집 분석을 보여주는 다이아그램.

도 4: 인간 AD 환자(AD-PHF8)로부터 회수한 인간 타우 병리학적 원섬유를 시드(seed)로서 사용한 세포 타우 응집 분석에서 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 가진 타우 결합 항체 (A), 및 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄를 가진 타우 결합 항체 (B), 또는 음성 대조군 IgG4 항체 A33 (C)의 효능.

도 5: 인간 AD, PSP 또는 대조군 환자의 분획 8 시료로부터 회수한 타우에 대한 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 가진 타우 결합 항체 AB1(A), 및 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄를 가진 인간화 항체 (B), 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 가진 타우 결합 항체 (C)의 결합 특성을 나타내는 웨스턴

블롯.

도 6: 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄를 가진 타우 결합 항체, 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 가진 타우 결합 항체, 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 54의 중쇄를 가진 타우 결합 항체 및 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 55의 중쇄를 가진 타우 결합 항체의 온도 기록도의 오버레이.

도 7: 이. 콜라이(E. coli) 발현을 위한 인간 타우 이소형 2를 코딩하는 DNA 구조물(pET 6His TEV-hTau iso 2 (1-441))(BioReg ID: D0003105)(서열 번호 39). BamHI/XhoI 삽입체 코딩 아미노산 서열은 BamHI/XhoI로 절단한 변형된 pET32 벡터에 서브클로닝하였다(굵은 기울임 체는 6His-TEV-Tau 코딩 서열).

도 8: A) pET 6His TEV-hTau iso 2 (1-441)(서열 번호 40)로부터 발현된 아미노산 서열; B) TEV 절단 후 pET 6His TEV-hTau iso 2 (1-441)로부터 발현된 최종 아미노산 서열(서열 번호 41).

도 9: 이. 콜라이 발현을 위한 인간 타우 이소형 3을 코딩하는 DNA 구조물(pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383))(BioReg ID: D0003104)(서열 번호 42). BamHI/XhoI 삽입체 코딩 아미노산 서열은 BamHI/XhoI로 절단한 변형된 pET32 벡터에 서브클로닝하였다(굵은 기울임 체는 6His-TEV-Tau 코딩 서열).

도 10: A) pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383)(서열 번호 43)로부터 발현된 아미노산 서열; B) TEV 절단 후 pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383)으로부터 발현된 최종 아미노산 서열(서열 번호 44).

도 11: 이. 콜라이 발현을 위한 인간 타우 이소형 4를 코딩하는 DNA 구조물(pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352))(BioReg ID: D0003093)(서열 번호 45). BamHI/XhoI 삽입체 코딩 아미노산 서열은 BamHI/XhoI로 절단한 변형된 pET32 벡터에 서브클로닝하였다(굵은 기울임 체는 6His-TEV-Tau 코딩 서열).

도 12: A) pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352)(서열 번호 46)로부터 발현된 아미노산 서열; B) TEV 절단 후 pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352)로부터 발현된 최종 아미노산 서열(서열 번호 47).

도 13: 이. 콜라이 발현을 위한 인간 타우 이소형 5를 코딩하는 DNA 구조물(pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412))(BioReg ID: D0003103)(서열 번호 48). BamHI/XhoI 삽입체 코딩 아미노산 서열은 BamHI/XhoI로 절단한 변형된 pET32 벡터에 서브클로닝하였다(굵은 기울임 체는 6His-TEV-Tau 코딩 서열).

도 14: A) pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412)(서열 번호 49)로부터 발현된 아미노산 서열; B) TEV 절단 후 pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412)로부터 발현된 최종 아미노산 서열(서열 번호 50).

도 15: HEK293 세포에서 발현을 위한 인간 타우 이소형 2를 코딩하는 DNA 구조물(pMH-10His-TEV-hTau iso2 (1-441))(BioReg ID: D0003109)(서열 번호 51). BamHI/XhoI 삽입체 코딩 아미노산 서열은 BamHI/XhoI로 절단한 포유동물 발현 벡터 pMH-10HisTEV에 서브클로닝하였다(굵은 기울임 체는 10His-TEV-Tau 코딩 서열, 밑줄로 표시된 제한 부위를 제거하기 위한 잠재성 점 돌연변이 A1032T).

도 16: A) pMH-10His-TEV-hTau iso2 (1-441)(서열 번호 52)로부터 발현된 아미노산 서열; B) TEV 절단 후 pMH-10His-TEV-hTau iso2 (1-441)로부터 발현된 최종 아미노산 서열(서열 번호 53).

도 17: 인간 AD 환자, 또는 인간 PSP 환자, 또는 인간 FTD 환자로부터 회수한 인간 타우 병리학적 원섬유를 시드로서 사용한 세포 타우 응집 분석에서 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 가진 타우 결합 항체의 효능.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 하기에서 예시적으로 기재된 본 발명은 본원에서 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제약 또는 제약들이 없이도 적절하게 실시될 수 있다.

[0045] 본 발명은 특정 측면 및 이의 실시양태와 관련하여 그리고 특정 도면 및 실시예를 참고로 하여 기재될 것이지만 본 발명은 이에 제한되지 않고 청구 범위에 의해서만 제한된다.

[0046] 기술 용어는 달리 명시되지 않는다면 이들의 통상의 의미로 사용된다. 특정 의미가 특정 용어를 시사하는 경우, 용어의 정의는 하기에 용어가 사용되는 상황에서 제공될 것이다.

[0047] 용어 "포함하는(comprising)"이 본 설명 및 청구 범위에 사용되는 경우, 다른 요소를 배제하지 않는다. 본 발명을 위해서, 용어 "~로 이루어진"은 용어 "~로 구성된"의 바람직한 실시양태로 간주해야 한다. 이후에 군이 적어도 특정 개수의 실시양태를 포함한다고 정의된다면, 이는 또한 바람직하게는 이들 실시양태만으로 이루어진

군을 개시하는 것으로 이해해야 한다.

[0048] 본 발명을 위해서, 용어 "획득된(얻은)"은 용어 "획득 가능한(얻을 수 있는)의 바람직한 실시양태로 간주한다. 이후에, 예를 들어 항체가 구체적인 공급원으로부터 획득 가능하다고 정의된다면, 이는 또한 이 공급원으로부터 획득되는 항체를 개시하는 것으로 이해해야 한다.

[0049] 단수 명사를 언급할 때 부정관사 또는 정관사, 예를 들어 "하나의(a, an)" 또는 "그(the)"가 사용될 경우, 이는 그 밖에 어떤 것이 구체적으로 언급되지 않는다면 그 명사의 복수를 포함한다. 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자가 논의되고 있는 특징의 기술적인 효과를 여전히 보장한다고 이해할 정확도의 간격을 나타낸다. 용어는 전형적으로 명시된 수치의 ±10%, 바람직하게는 ±5%의 편차를 나타낸다.

[0050] 여러 가지 측면의 바람직한 실시양태로서 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편에 대한 모든 언급은 단클론 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 고려하는 것으로 이해해야 한다.

[0051] 여러 가지 측면에 대해, 본 발명은 각각의 경쇄 및/또는 중쇄 영역의 CDR 및 가변 영역을 포함하는 항체 및 이의 결합 단편을 언급한다. 가변 경쇄 영역 또는 가변 중쇄 영역만을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편은 상응하는 기타 가변 영역과 효과적으로 결합할 수 있는 가변 영역의 제조 방법 또는 예를 들어 스크리닝 방법에 유용할 수 있다. 그러나 각각의 경쇄 및/또는 중쇄 영역의 CDR 및 가변 영역을 포함하는 항체 및 이의 결합 단편을 언급하는 경우, 이는 언제나 각각의 경쇄 및 중쇄 영역의 CDR 및 가변 영역을 포함하는 바람직한 실시양태의 항체 및 이의 결합 단편으로서 고려한다는 것을 이해해야 한다.

[0052] 본원에서 사용되는 용어 "치료", "치료하는" 등은 바라는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 획득하는 것을 언급한다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 것과 관련하여 예방적일 수 있고/거나 질환 및/또는 질환으로 인한 부작용의 부분적인 또는 완전한 치유와 관련하여 치료적일 수 있다. 따라서, 치료는 포유동물, 특히 인간에서 질환의 모든 치료를 포함하고, (a) 질환에 걸리기 쉬울 수 있지만 아직 걸렸다고 진단받지 않은 피험체에서 질환이 발생하는 것을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉 이의 발생을 방지하는 것; 및 (c) 질환을 완화하는 것, 즉 질환의 퇴행을 일으키는 것을 포함한다.

[0053] "치료학적 활성제"로서 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 언급은 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 질환 치료에 있어서의 용도를 언급한다.

[0054] "치료 유효량"은 질환 치료를 위해 포유동물 또는 기타 피험체에 투여될 때, 질환을 위한 상기 치료에 효과를 일으키기에 충분한 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 양을 언급한다. 치료 유효량은 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 치료되는 피험체의 질환 및 이의 중증도 및 나이, 체중 등에 따라 달라질 것이다.

[0055] "진단 활성제"로서 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 언급은 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 질환 진단에 있어서의 용도를 언급한다.

[0056] "진단 유효량"은 생물학적 시료의 진단 시험에 사용될 때, 질환의 확인을 가능하게 하거나 치료 개입의 효능을 모니터링하는 수단으로서 질환 조직의 양을 모니터링하는데 충분한 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 양을 언급한다.

[0057] 본 출원은 인간 타우에 결합하는 AB1로 명명된 항체의 확인에 부분적으로 기초한다. 본 분야의 관례대로, 본 명세서에서 타우 잔기 넘버링은 서열 번호 35(NCBI 참조 서열: NP_005901.2)의 타우 이소형 2를 언급한다. 아래에서 제시되는 바와 같이, 면역화된 쥐로부터 단리된 AB1은 서열 번호 35의 적어도 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246을 포함하는 에피토프를 인식한다. 상기 영역은 중추신경계에서 발견될 수 있는 타우의 6가지 모든 이소형에 존재하는 첫 번째 MTBR 반복 영역 바로 앞에 있다.

[0058] 실시예는 AB1이 인간 타우의 가용성 형태와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합할 수 있다(실시예 2.3 참조)는 것과 AB1이 인간 시료의 동결 절편에서 신경 내 신경 섬유 매듭(NFT: neurofibrillary tangle), 신경 외 NFT, 신경반(neuritic plaque) 유사 구조 및 신경망 실(neurophil thread)을 검출할 수 있었다(실시예 3.2 참조)는 것을 입증한다. 시험된 일부 분석 및 모델에서, AB1은 선행 기술의 항체보다 더 낮은 IC50을 나타냈다. 이러한 양상이 AB1의 가변 경쇄 영역(VL) 및 가변 중쇄 영역(VH)의 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region)에 의해 적어도 부분적으로 매개된다고 추정하는 것은 타당해 보인다.

[0059] 상기 배경에 대해서, 본 발명은 AB1의 VL 영역의 CDR 또는 특이성 결정 잔기(서열 번호 7) 및/또는 AB1의 VH 영역의 CDR(서열 번호 8)을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0060] 항체 가변 도메인 내 잔기는 통상적으로 카밧(Kabat) 연구자들이 고안한 체계에 따라 넘버링된다. 이 체계는 문헌(Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (이후로 "Kabat et al. (상기 문헌)")에 개시되어 있다. 달리 명시되는 경우를 제외하고 본 명세서에서 이 넘버링 체계가 사용된다.

[0061] 카밧 잔기 지정은 항상 아미노산 잔기의 선형 넘버링과 직접적으로 일치하지는 않는다. 실제 선형 아미노산 서열은 기본 가변 도메인 구조의 골격 또는 상보성 결정 영역(CDR)인 구조적 요소의 단축 또는 이에 삽입에 상응하는 엄격한 카밧 넘버링에서보다 더 적거나 추가의 아미노산을 포함할 수 있다. 잔기의 정확한 카밧 넘버링은 "표준" 카밧 넘버링된 서열과 항체의 서열에서 상동성 잔기의 정렬에 의해 주어진 항체에 결정될 수 있다. 그러나 코티아(Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901- 917 (1987))에 따르면 CDR-H1에 해당하는 루프는 잔기 26 내지 잔기 32에 걸쳐 있다.

[0062] 따라서, AB1의 VL의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 각각 서열 번호 1, 2 및 3에 해당하는 것으로 확인되었다. AB1의 VH의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 각각 서열 번호 4, 36, 및 6에 해당하는 것으로 확인되었다. 항체가 타우에 결합하는 능력을 크게 변경하지 않으면서 본 발명의 발명에 의해 제공된 CDR에 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실을 만들 수 있다는 것은 보편적으로 공지되어 있다. 임의의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실의 효과는, 예를 들어, 실시예에 기재되거나 보편적이고 일반적인 지식으로부터 알고 있는 방법을 이용하여, 당 업자에 의해 쉽게 시험될 수 있다. 본래 확인된 VH의 CDR2(CDRH2), 즉 서열 번호 36에서, 예를 들어 가능한 아스파라긴 탈아미드화 부위를 확인하고 인접한 세린 잔기를 알라닌 또는 트레오닌으로 대체하여 변형하였다. 이는 결과적으로 CDRH2에 대해 각각 서열 번호 37 및 38이 된다. 간략하게 하기 위해서, CDRH2에 대한 3가지 서열, 즉 서열 번호 36, 37, 및 38은 서열 번호 5로 결합하였다.

[0063] 추가의 변형, 예를 들어 치환, 첨가 및/또는 결실은 AB1과 비교하여 예를 들어 결합 특성을 실질적으로 변화시키지 않으면서 CDR에 만들어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이는 주로 CDR 내 아미노산을 유사한 아미노산으로 대체하여 달성될 수 있다. 본원에서 사용되는 "유사성"은 정렬된 서열 내 임의의 특정 위치에서 아미노 잔기가 서열 사이에 유사한 유형인 것을 나타낸다. 예를 들어, 류신은 이소류신 또는 발린에 치환될 수 있다. 대개 또 다른 아미노산에 치환될 수 있는 기타 아미노산은 하기를 포함하나 이에 제한되지 않는다:

[0064] - 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 가진 아미노산);

[0065] - 리신, 아르기닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 가진 아미노산);

[0066] - 아스파테이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 가진 아미노산);

[0067] - 아스파라긴 및 글루타민(아미드 측쇄를 가진 아미노산); 및

[0068] - 시스테인 및 메티오닌(황을 포함하는 측쇄를 가진 아미노산).

[0069] 상기 배경에 대하여, 본 발명은 한 측면에서 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0070] 서열 번호 1 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열로부터 선택된 CDR1, 서열 번호 2 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열로부터 선택된 CDR2, 및 서열 번호 3 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열로부터 선택된 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는

[0071] 서열 번호 4 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열로부터 선택된 CDR1, 서열 번호 5 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열로부터 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 6 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열로부터 선택된 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0072] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0073] 본원에서 사용되는 "동일성"은 정렬된 서열 내 임의의 특정 위치에서 아미노산 잔기가 서열 사이에서 동일하다는 것을 나타낸다. 동일성의 정도는 예를 들어 NCBI로부터 이용 가능한 블라스트(BLAST)™ 소프트웨어를 이용하여 쉽게 계산될 수 있다(Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. k Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

[0074] CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3의 각각 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 및 6과의 동일성은 적어도 90%일 수 있지만, 경우에 따라 더 높은 동일성을 선호하는 경우 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%와 같이 더

높을 수도 있다. 상이한 동일성의 위치는 유사성을 고려하여 선택될 수 있다.

[0075] 이와 관련하여, 본 발명은 구체적으로 각각 서열 번호 1, 2, 및 3의 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 가진 VL 및 각각 서열 번호 4, 5, 및 6의 CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3을 가진 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 고려한다. 또한, 본 발명은 각각 서열 번호 1, 2, 및 3의 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 가진 VL 및 각각 서열 번호 4, 36, 및 6의 CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3을 가진 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 각각 서열 번호 1, 2, 및 3의 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 가진 VL 및 각각 서열 번호 4, 37, 및 6의 CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3을 가진 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 및 각각 서열 번호 1, 2, 및 3의 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 가진 VL 및 각각 서열 번호 4, 38, 및 6의 CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3을 가진 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 고려한다.

[0076] 상기 제1 측면에서 고려되는 바와 같은 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 상이한 기원의 골격 영역에 포함된 상기 CDR을 포함할 수 있다. 따라서, CDR은 AB1의 본래 골격 영역, 즉 서열 번호 7의 쥐 VL 영역 및 서열 번호 8의 쥐 VH 영역 내에 포함될 수 있다. 그러나 CDR은 생쥐 또는 인간 골격 영역과 같이 상이한 종의 기원의 골격 영역 내에 포함될 수도 있다. 이 같은 골격 영역과 조합될 수 있는 골격 영역 및 불변 영역의 기원에 따라서, 키메라, 인간화 또는 완전 인간 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 얻을 수 있다.

[0077] 키메라 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 인간 기원의 불변 영역과 결합된 비인간 기원의 골격 영역 내에 CDR을 포함할 것이다. 인간화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 인간 기원의 불변 영역과 함께 결합된 인간 기원의 골격 영역 내에 CDR을 포함할 것이다.

[0078] 상기 배경에 대하여, 본 발명은 또 다른 측면에서 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0079] 서열 번호 7 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및/또는

[0080] 서열 번호 8 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0081] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0082] VL 및 VH의 각각 서열 번호 7 및 8과의 동일성은 적어도 80%일 수 있지만, 경우에 따라 더 높은 동일성을 선호하는 경우 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%와 같이 더 높을 수도 있다. 상이한 동일성의 위치는 유사성을 고려하여 선택될 수 있다. 동일성과 관련하여 CDR에 비해 골격 영역이 더 가변적일 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0083] 이와 관련하여, 본 발명은 구체적으로 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 고려한다.

[0084] 인간화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 특히 본 발명에 의해 고려된다.

[0085] 상기를 위하여, CDR은 인간 골격 영역에 이식될 수 있다. 이 같이 인간화 CDR 이식된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 당 업계에 확립된 접근법에 따라 확인될 수 있다는 것을 이해할 것이다. CDR 또는 특이성 결정 잔기가 이식될 때, 임의의 적합한 수용 인간 가변 영역 골격 서열은 CDR이 유래하는 공여 항체의 부류/유형을 고려하여 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호(Cabilly et al.); 유럽 특허 제0,125,023 B1호(Cabilly et al.); 미국 특허 제4,816,397호(Boss et al.); 유럽 특허 제0,120,694 B1호(Boss et al.); WO 86/01533호(Neuberger, M. S. et al.); 유럽 특허 제0,194,276 B1호(Neuberger, M. S. et al.); 미국 특허 제5,225,539호(Winter); 유럽 특허 제0,239,400 B1호(Winter); 유럽 특허 출원 제0,519,596 A1호(Padlan, E. A. et al.) 참조).

[0086] 또한, 본 발명의 CDR 이식된 항체 가변 영역에서, 골격 영역은 수용 항체의 서열과 정확하게 동일한 서열을 가질 필요는 없다. 따라서, CDR은 골격 변화가 있거나 없이 이식될 수 있다. 공여 가변 영역의 골격 영역과 수용 골격 영역 사이의 비교를 기초로 한 골격 변화의 도입은 예를 들어 그렇지 않으면 인간화의 결과로서 감소될 수 있는 항체의 친화도의 유지를 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 드문 잔기는 그 수용 쇄 부류 또는 유형에 더 빈번하게 존재하는 잔기로 변화될 수 있다. 별법으로, 수용 골격 영역에서 선택된 잔기는 이들이 공여 항체의 동일한 위치에서 발견되는 잔기와 일치하도록 변화될 수 있다(문헌(Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324) 참조). 이러한 변화는 공여 항체의 친화도를 회복하는데 필수적인 최소한으로 유지되어야 한다. 변화를 위한 잔기는 WO91/09967호(Adair et al.(1991), Humanised antibodies)에 개략적으로 설명된 프로토콜을 이용하여 선택될 수 있다. 본 발명의 CDR 이식된 항체에서, 수용 중쇄 및 경쇄는 반드시 동일한 항체로부터 유래

할 필요는 없고, 바라는 경우, 상이한 쇄로부터 유래한 골격 영역을 가진 합성 쇄를 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명에 사용될 수 있는 인간 수용 골격의 예는 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY 및 POM이다(Kabat et al., 상기 문헌)이다. 예를 들어, KOL 및 NEWM은 중쇄에 사용될 수 있고, REI는 경쇄에 사용될 수 있고, EU, LAY 및 POM은 중쇄와 경쇄 둘 다에 사용될 수 있다. 별법으로, 인간 생식세포 계열 서열이 사용될 수 있다; 이들은 http://vbase.mrc-ce.cam.ac.uk/ 또는 http://www.imgt.org에서 이용 가능하다). 본 발명은 구체적으로 경쇄 CDR의 수용 골격 영역으로서 서열 번호 31의 인간 V-영역 IGKV2-29 + JK2 J-영역(IMGT, http://www.imgt.org/) 및 중쇄 CDR의 수용 골격 영역으로서 서열 번호 32의 인간 V-영역 IGHV4-59 + JH3 J-영역(IMGT, http://www.imgt.org/)을 사용하는 것을 고려한다. 서열 번호 32에서, 위치 1 및 48은 예를 들어 골격 영역 내 잔기 변화에 대해 고려될 수 있다. 위치 1의 글루타민 잔기는 글루타메이트 또는 아스파테이트로 변화될 수 있다. 위치 48의 이소류신 잔기는 메티오닌으로 변화될 수 있다. 골격 영역 내 잔기 변화를 위한 서열 번호 32의 기타 위치는 위치 37 및/또는 71일 수 있다. 예를 들어, 서열 번호 32의 위치 37에서 이소류신 잔기는 발린으로 변화될 수 있다. 위치 71의 발린 잔기는 아르기닌으로 변화될 수 있다. 골격 영역 내 잔기 변화를 위한 서열 번호 31의 위치는 위치 68일 수 있다. 서열 번호 31의 위치 68에서 세린 잔기는 이소류신으로 변화될 수 있다.

[0088] 상기 배경에 대하여, 본 발명은 또 다른 측면에서 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0089] 서열 번호 9 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및/또는

[0090] 서열 번호 10 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0091] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다.

[0092] 상기 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은

[0093] 서열 번호 9 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및/또는

[0094] 서열 번호 11, 12, 13 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0095] 을 포함할 수 있다.

[0096] VL 및 VH의 각각 서열 번호 9 및 10과의 동일성은 적어도 80%일 수 있지만, 경우에 따라 더 높은 동일성을 선호하는 경우 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%와 같이 더 높을 수도 있다. 상이한 동일성의 위치는 유사성을 고려하여 선택될 수 있다. 동일성과 관련하여 CDR에 비해 골격 영역이 더 가변적일 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0097] 이와 관련하여, 본 출원은 구체적으로 서열 번호 9의 VL 및 서열 번호 11의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 및 서열 번호 9의 VL 및 서열 번호 12의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 및 서열 번호 9의 VL 및 서열 번호 13의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 고려한다.

[0098] 인간화 CDR 이식된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 인간 기원의 불변 영역을 포함할 수 있다. 이들의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 항체 또는 면역글로불린은 부류 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 나뉘고, 이들 중 몇몇은 하위 부류(아형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, IgA1, 및 IgA2로 더 나뉠 수 있다. 특히, 인간 IgG 불변 영역 도메인은 항체 분자가 치료 용도로 의도되거나 항체 이펙터 기능이 필요할 때 특히 IgG1 및 IgG3 이소형일 수 있다. 별법으로, IgG2 및 IgG4 이소형은 항체 분자가 치료 목적으로 의도되고 항체 이펙터 기능이 필요하지 않을 때 사용될 수 있다. 본 발명은 구체적으로 IgG1 및 IgG4 아형의 인간화 항체를 고려한다.

[0099] 상기 불변 영역 도메인의 서열 수정이 또한 이용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 타우에 결합하는 항체의 능력을 크게 변화시키지 않으면서 항체 불변 도메인에 하나 이상의 아미노산, 예를 들어 1 또는 2개의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실이 만들어질 수도 있다. 또한, 문헌(Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (I), 105-108)에 기재된 바와 같이 위치 241의 세린이 프롤린으로 변화된 IgG4 분자가 사용될 수 있다.

[0100] 항체 이펙터 기능은 ADCC 및 CDC를 포함한다. ADCC는 항체 의존성 세포 독성(antibody-dependent celluar cytotoxicity)을 가리킨다. 항체가 원칙적으로 ADCC를 매개할 수 있는 지를 결정하기 위해서, ADCC는 예를 들어 소위 Cr^{51}, Eu, 및 S^{35}-방출 분석에 의해 시험관 내에서 측정될 수 있다. 관심 항원, 즉 타우를 포함하는 표적 세포는 이들 화합물로 표지될 수 있다. 치료 항체를 결합시킨 후, 세포를 세척하고, FcγRIII과 같은 Fc 수용체

를 발현하는 이펙터 세포를 항체 표지된 표적 세포와 함께 인큐베이션하고 표적 세포의 용해를 표지의 방출에 의해 모니터할 수 있다. 또 다른 접근법은 소위 아셀라 톡스(aCella TOX)™ 분석을 이용한다. CDC는 보체 의존성 세포 독성(complement-dependent cellular cytotoxicity)을 언급한다. 항체가 원칙적으로 CDC를 매개할 수 있는지를 결정하기 위해서, CDC는 예를 들어, 문헌(Delobel A et al, Methods Mol Biol. (2013); 988:115-43 또는 Current Protocols in Immunology, Chapter 13 Complement(Print ISSN: 1934-3671)에 기재된 바와 같이 시험관 내에서 측정될 수 있다.

[0101] 상기 배경에 대하여, 본 발명은 또 다른 측면에서 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0102] 서열 번호 14 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 경쇄, 및/또는

[0103] 서열 번호 15 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 중쇄

[0104] 를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0105] 상기 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은

[0106] 서열 번호 14 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 경쇄, 및/또는

[0107] 서열 번호 16, 17, 18 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 중쇄

[0108] 를 포함할 수 있다.

[0109] 경쇄 및 중쇄의 각각 서열 번호 14 및 15와의 동일성은 적어도 70%일 수 있지만, 경우에 따라 더 높은 동일성을 선호하는 경우 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%와 같이 더 높을 수도 있다. 상이한 동일성의 위치는 유사성을 고려하여 선택될 수 있다. 동일성과 관련하여 CDR에 비해 골격 영역이 더 가변적일 수 있고 불변 영역이 훨씬 더 가변적일 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0110] 이와 관련하여, 본 출원은 구체적으로 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 16의 중쇄를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 및 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 고려한다.

[0111] 게다가, 본 발명은 또 다른 측면에서 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0112] 서열 번호 14 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 경쇄, 및/또는

[0113] 서열 번호 54 또는 서열 번호 55 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 중쇄

[0114] 를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0115] 경쇄 및 중쇄의 각각 서열 번호 14 및 서열 번호 54 또는 55와의 동일성은 적어도 70%일 수 있지만, 경우에 따라 더 높은 동일성을 선호하는 경우 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%와 같이 더 높을 수도 있다. 상이한 동일성의 위치는 유사성을 고려하여 선택될 수 있다. 동일성과 관련하여 CDR에 비해 골격 영역이 더 가변적일 수 있고 불변 영역이 훨씬 더 가변적일 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0116] 또한, 본 발명은 본 발명에 의해 제공되는 항체 또는 이의 결합 단편, 특히 CDR-H1(서열 번호 4), CDR-H2(서열 번호 5), CDR-H3(서열 번호 6), CDR-L1(서열 번호 1), CDR-L2(서열 번호 2) 또는 CDR-L3(서열 번호 3) 중 어느 하나를 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편, 예를 들어 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VL을 포함하는 항체에 의해 결합된 인간 타우의 특정 영역 또는 에피토프를 제공한다.

[0117] 또한, 본 발명은 본 발명에 의해 제공되는 항체 또는 이의 결합 단편, 특히 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VL을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편에 의해 결합된 인간 타우의 특정 영역 또는 에피토프, 특히 서열 번호 35의 아미노산 235-250 내의 에피토프를 제공한다.

[0118] 타우의 상기 특정 영역 또는 에피토프는 본 발명에 의해 제공되는 항체 중 어느 하나와 결합하여 당 업계에 공지된 임의의 적합한 에피토프 맵핑 방법에 의해 확인될 수 있다. 상기 방법의 예는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편에 의해 인식되는 에피토프의 서열을 포함하는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 가장 작은 단편을 가진 본 발명의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편에 결합에 대해 서열 번호 35로부터 유래한 다양한 길이의 펩티드를 스크리닝하는 단계를 포함한다. 중추 신경계에서 다양한 타우 이소형이 존재하기 때문에, 임의의 이러한 이소형이 본원에서 상세하게 설명된 방법에서 사용될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 구체적인 예로, 타우의

가장 긴 이소형, 즉 서열 번호 35에 정의된 이소형 2가 사용될 수 있다. 서열 번호 35의 타우 펩티드는 재조합, 합성에 의해 또는 타우 폴리펩티드의 단백질 분해에 의해 생산될 수 있다. 항체에 결합하는 항체는 예를 들어 웨스턴 블롯 또는 질량 분광 분석에 의해 확인될 수 있다. 또 다른 예로, NMR 분광학 또는 X선 결정학은 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편에 의해 결합되는 에피토프를 확인하는데 이용될 수 있다. 일단 확인되면, 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프 단편은 필요한 경우 동일한 에피토프에 결합하는 추가의 항체를 얻기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프 단편은 동일한 에피토프에 결합하고, 필요한 경우, 타우의 적어도 하나의 생물학적 활성을 억제하는 단백질, 예를 들어 당 업계에 공지된 바와 같은 (Tomlinson, 2004; Mosavi et al., 2004; Gill and Damle, 2006; Nilsson and Tolmachev, 2007; Binz et al., 2004) 리포칼린("안티칼린"), 피브로넥틴("아드넥틴", 트리넥틴), 쿠니츠 도메인, C-형 렉틴, 트랜스페린, 감마형 결정, 시스테인-노트(cystein-knot), 안키린 반복("DARPin") 또는 단백질 A("애피바디")로부터의 단백질 스캐폴드에 기초한 10개 초과의 아미노산을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드 화합물을 얻기 위해 사용될 수 있다. 추가로, 동일한 에피토프에 결합하는 분자는 10개 이하의 아미노산을 포함하는 펩티드 및 고리형 펩티드 뿐 아니라 펩티드 모방체를 포함하는 추가의 유기 분자를 포함한다. 펩티드 모방체는 단백질-단백질 상호작용 부위에서 발견된 아미노산 서열에 기초하거나 당 업계에 공지된 화합물이다(Sillerud and Larson, 2005).

[0119] 상기 배경에 대하여, 본 발명은 또 다른 측면에서 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로, 적어도 서열 번호 35의 S238, A239, S241, T245, A246의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 전체 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 232 내지 251에 걸쳐있는 것으로 보인다. 한 예로, 본 발명의 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함한다.

[0120] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 적어도 서열 번호 35의 S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, 및 A246의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 한 예로, 본 발명의 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, A246과, 서열 번호 35의 S237, R242, L243, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함한다.

[0121] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 적어도 서열 번호 35의 S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, 및 A246의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 한 예로, 본 발명의 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, A246과, 서열 번호 35의 R242, L243, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함한다.

[0122] 한 예로, 본 발명의 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 아미노산 잔기 S235, S237, S238, A239, K240, S241, R242, L243, Q244, T245, A246, V248, 및 M250를 포함한다.

[0123] 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 상기에 언급한 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 대표한다.

[0124] 상기 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체일 수 있거나 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체를 얻기 위해 사용될 수 있다.

[0125] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 중화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246을 포함하는 타우의 에피토프에 결합하는 중화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 한 예로, 본 발명의 중화 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함한다.

[0126] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 중화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 적어도 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, 및 A246을 포함하는 에피토프에 결합하는 중화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 한 예로, 본 발명의 중화 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 S235, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, 및 A246과, 서열 번호 35의 S237, R242, L243, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함한다.

[0127] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 중화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 적어도 서열 번호 35의

아미노산 잔기 S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, 및 A246을 포함하는 에피토프에 결합하는 중화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 한 예로, 본 발명의 중화 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 S235, S237, S238, A239, K240, S241, Q244, T245, A246과, 서열 번호 35의 R242, L243, V248 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함한다.

[0128] 한 예로, 본 발명의 중화 항체에 의해 결합되는 인간 타우의 에피토프는 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S235, S237, S238, A239, K240, S241, R242, L243, Q244, T245, A246, V248, 및 M250을 포함한다.

[0129] 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 상기에 언급한 에피토프에 결합하는 중화 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 대표한다.

[0130] 상기 중화 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체일 수 있거나 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체를 얻기 위해 사용될 수 있다.

[0131] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 상기에 기재된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편과 실질적으로 동일한 타우의 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 에피토프에의 결합은 예를 들어 기준으로서 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 이용하여 에피토프 맵핑에 대해 기재된 바와 같이 결정될 수 있다.

[0132] 상기 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체일 수 있거나 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체를 얻기 위해 사용될 수 있다.

[0133] 또한, 본 발명은 이종핵 단일 양자 결맞음 핵자기 공명(HSQC NMR: heteronuclear single quantum coherence nuclear magnetic resonance)에 의해 결정된 바와 같이, 인간 타우의 영역 또는 에피토프, 특히 서열 번호 35의 아미노산 235-250 내의 특정 에피토프에 특이적으로 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0134] 상기 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체일 수 있거나 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체를 얻기 위해 사용될 수 있다.

[0135] 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 타우와의 결합에 대해 상기에 기재된 타우 결합 항체와 경쟁하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0136] 이와 관련하여, 본 발명은 구체적으로 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 타우와의 결합에 대해 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편과 경쟁하는, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 고려한다.

[0137] 상기 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체일 수 있거나 키메라, 인간화 또는 완전 인간 단클론 항체를 얻기 위해 사용될 수 있다.

[0138] 타우와의 결합에 대한 경쟁은 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 포함할 수 있는 기준 항체 또는 이의 결합 단편의 존재하에서 항체 또는 이의 결합 단편의 타우와의 결합에 있어 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 또는 약 100% 감소에 의해 결정될 수 있다. 결합은 바이아코어(BIAcore)® 장치를 이용한 표면 플라스몬 공명, 여러 형광 검출 기술(예를 들어, 형광 상관 분광법, 형광 상호 연관법, 형광 수명 측정법 등) 또는 여러 유형의 방사 면역 측정법 또는 표적 분자와 항체 결합을 추적하는데 사용되는 기타 분석을 이용하여 측정될 수 있다.

[0139] 용어 "타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편"은 항체 또는 이의 결합 단편이 이의 가변 영역에 의해 타우에 특이적으로 결합한다는 것, 즉 타우와 상동성을 갖지 않는 기타 항원보다 더 큰 친화도로 타우 항원에 결합한다는 것을 의미한다. "타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편"은 이의 가변 영역에 의해 타우와 상동성을 갖지 않는 기타 항원보다 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10, 20, 100, 10^3, 10^4, 10^5 또는 적어도 10^6배의 친화도로 타우에 결합한다. 그럼에도, 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편이 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 가변 영역 밖 서열과의 상호작용을 통해 기타 단백질(예를 들어, ELISA 기술에서 에스. 아우레우스(*S. aureus*) 단백질 A 또는 기타 항체)과도 상호작용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 가변 영역 밖 서열, 특히 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 불변 영역에 의해 매개되는 상기 후자 결합 특성을 용어 "타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편"에 포함하고자 하는 것은 아니다. 항체의 결합 특이성을 결정하는 스크리닝 분석은 당 업계에 잘 알려져 있으며 당 업계에서 통상적으로 실시된다. 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 항체(또는 이의 결합 단편)의 이의 항원에의 결합의 친화도에 대해 나노몰 범위의 평형 해리 상수(K_D)를 가질 수

있다. 따라서, K_D는 약 $1*10^{-6}$, 예를 들어 약 $2*10^{-7}$ 이하와 같은 약 $5*10^{-7}$ 미만일 수 있고 예를 들어 실시예에 기재된 바와 같이 표면 플라스몬 공명 및 바이아코아 장치를 이용하여 측정될 수 있다.

[0140] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명은 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 전장의 항체는 불변 도메인 및 가변 영역을 포함한다. 불변 영역은 항체의 항원 결합 단편 내에 이의 전체 길이로 존재할 필요는 없을 수 있다. 그러나 본 출원이 ADCC 및/또는 CDC를 매개하는 항체의 용도를 고려할 경우, 결합 단편은 여전히 ADCC 및/또는 CDC를 매개할 수 있는 충분한 길이의 불변 영역을 포함해야만 한다는 것을 이해해야 한다.

[0141] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명은 또한 인간화의 대안으로서 생성될 수 있는 인간 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 언급한다. 예를 들어, 면역화시 내인성 설치류 항체를 생산하지 않으면서 전체 모든 인간 항체를 생산할 수 있는 형질전환 동물(예를 들어, 생쥐)을 생산할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포 계열 돌연변이 생쥐에서 항체 중쇄 연결 영역(JH) 유전자의 동형 결실은 결과적으로 내인성 항체 생산을 완전히 억제한다고 개시되었다. 이러한 생식세포 계열 돌연변이 생쥐에서 인간 생식세포 계열 면역글로불린 유전자 배열의 전달은 결과적으로 인간 생식세포 계열 면역글로불린 유전자를 포함하는 형질전환 동물을 특정 항원으로 면역화시 상기 항원에 대한 특이성을 가진 인간 항체를 생산할 것이다. 상기 형질전환 동물의 생산 기술 및 상기 형질전환 동물로부터 인간 항체의 단리 및 생산 기술은 당 업계에 잘 알려져 있다(Lonberg, 2005; Green, 1999; Kellermann and Green, 2002; Nicholson et al., 1999). 별법으로, 형질전환 동물, 예를 들어 생쥐에서, 생쥐 항체의 가변 영역을 코딩하는 면역글로불린 유전자만이 상응하는 인간 가변 면역글로불린 유전자 서열로 대체된다. 항체 불변 영역을 코딩하는 생쥐 생식세포 계열 면역글로불린 유전자는 여전히 변화되지 않는다. 이 방법에서, 형질전환 생쥐의 면역계에서 항체 이펙터 기능 및 결과적으로 B 세포 발생은 본질적으로 변화되지 않으며, 이는 생체 내에서 항원 공격 시 향상된 항체 반응을 유발할 수 있다. 관심의 특정 항체를 코딩하는 유전자가 상기 형질전환 동물로부터 단리되면, 불변 영역을 코딩하는 유전자는 완전 인간 항체를 얻기 위해서 인간 불변 영역 유전자로 대체될 수 있다. 시험관 내에서 인간 항체, 항체 단편을 얻기 위한 기타 방법은 적어도 부분적으로 인공적으로, 또는 공여체의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 모두로부터 생성된 재조합 DNA 라이브러리가 사용되는 디스플레이 기술, 예를 들어 파지 디스플레이 또는 리보솜 디스플레이에 기초한다. 인간 항체를 생성하기 위한 파지 및 리보솜 디스플레이 기술은 당 업계에 잘 알려져 있다(Winter et al., 1994; Hoogenboom, 2002; Kretzschmar and von Ruden, 2002; Groves and Osbourn, 2005; Dufner et al., 2006).

[0142] 또한, 단리된 인간 B 세포를 관심 항원으로 생체 외 면역화하고, 계속하여 융합하여, 하이브리도마를 생성한 후, 이를 최적의 인간 항체에 대해 스크리닝할 수 있어, 단리된 인간 B 세포로부터 인간 항체를 생성할 수 있다(Grasso et al., 2004; Li et al., 2006).

[0143] 본원에서 사용되는 용어 "타우 결합 항체" 또는 이의 결합 단편은 타우에 결합하거나 타우의 적어도 하나의 생물학적 활성을 억제하는 항체 또는 이의 결합 단편을 언급한다. 타우의 생물학적 활성은 당 업계에 알려져 있으며 상기에 기재된 매듭 또는 원섬유와 같은 다양한 유형의 응집체를 형성하는 타우 분자의 응집을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 본원에서 사용되는 "중화 타우 결합 항체" 또는 이의 결합 단편은 시험관 내 분석 예를 들어 하기 실험 3.1에 기재된 것과 같은 시험관 내 분석에서 타우 응집에 결합하거나 이를 억제하는 항체 또는 이의 결합 단편을 언급한다.

[0144] 본원에서 사용되는 용어 '항체'는 일반적으로 완전(전체, 전장) 항체, 즉 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄의 요소를 포함하는 항체에 관한 것이다. 항체는 예를 들어 WO 2007/024715호에 개시된 분자 DVD-Ig, 또는 WO2011/030107호에 기재된 소위 (FabFv)2Fc와 같이 추가의 결합 도메인을 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 이용되는 항체는 2가, 3가, 또는 4가의 전장 항체를 포함한다.

[0145] 항체의 결합 단편은 단쇄 항체(즉, 전장의 중쇄 및 경쇄); Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, Fab-scFv, Fab-scFc, 디설피드 안정화된 Fab-scFv, 단일 도메인 항체(예를 들어, VH 또는 VL 또는 VHH), scFv, scFv-scFc, dsscFv, dsscFv-scFc, 2가, 3가, 또는 4가 항체, 비스-scFv, 디아바디, 트리바디, 트리아바디, 테트라바디, 도메인 항체(dAb), 예를 들어 sdAb, VHH 및 VNAR 단편, 및 상기 중 어느 하나의 에피토프 결합 단편을 포함한다(예를 들어, 문헌(Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217) 참조). 상기 항체 단편의 생성 및 제조 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌(Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181) 참조). Fab-Fv 형식은 WO2009/040562호에서 최초로 개시되었고 이의 디설피드 안정화된 형태인 Fab-dsFv는 WO2010/035012호에 최초로 개시되었다. 디설피드 안정화된 형태의 Fab-scFv는

WO2013/068571호에 기재되었다. scFc 형식을 포함하는 항체 형식은 WO2008/012543호에 최초로 기재되었다. 본 발명에 사용하기 위한 기타 항체 단편은 국제 특허 출원 WO2005/003169호, WO2005/003170호 및 WO2005/003171호에 기재된 Fab 및 Fab' 단편을 포함한다.

[0146] 다가 항체는 다중 특이성을 포함할 수 있으며, 예를 들어 이중 특이적일 수 있거나 단일 특이적일 수 있다(예를 들어, WO92/22583호 및 WO05/113605호 참조). 후자의 이러한 한 예는 WO92/22583호에 기재된 트리-Fab(또는 TFM)이다.

[0147] 한 실시양태에서, Fab 단편이 제공된다.

[0148] 한 실시양태에서, Fab' 단편이 제공된다.

[0149] 전형적인 Fab' 분자는 중쇄가 가변 영역 VH, 불변 도메인 CH1 및 중성 또는 변형된 힌지 영역을 포함하고 경쇄가 가변 영역 VL 및 불변 도메인 CL을 포함하는 중쇄 및 경쇄 쌍을 포함한다.

[0150] 한 실시양태에서, 예를 들어 이량체화가 힌지를 통해서 이루어질 수 있는 (Fab')2를 생성하는 본 발명에 따른 Fab'의 이량체가 제공된다.

[0151] 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 결합 도메인을 포함한다. 결합 도메인은 일반적으로 중쇄로부터 3개 및 경쇄로부터 3개인 6개 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, CDR은 골격에 존재하며 함께 가변 영역을 형성한다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체 또는 결합 단편은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.

[0152] 본 발명에 의해 제공되는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 친화도는 당 업계에 공지된 적합한 방법을 이용하여 변경될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 그러므로 본 발명은 또한 타우에 대해 향상된 친화도를 갖는 본 발명의 항체 분자의 변이체에 관한 것이다. 이러한 변이체는 CDR를 변이시키는 것(Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), 쇄 셔플링(Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), 이. 콜라이의 뮤테이터 균주의 사용(Low et al., J. Mol.Biol., 250, 359-368, 1996), DNA 셔플링(Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), 파지 디스플레이(Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) 및 성적(sexual) PCR(Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998)을 포함한 많은 친화도 성숙 프로토콜에 의해 얻을 수 있다. 문헌(Vaughan et al.(상기 문헌))은 상기 친화도 성숙의 방법을 논의한다.

[0153] 따라서, 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편은 또한 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 보존적 치환)을 가진 경쇄 또는 중쇄의 상기에 구체적으로 언급된 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 누구든 보존적 치환의 후보가 되는 아미노산 서열의 위치를 결정할 수 있고, 누구든 임의의 특정 아미노산에 보존적 치환의 효과를 주는 합성 및 천연 아미노산을 선택할 수 있다. 보존적 치환을 선택하기 위한 고려 사항은 임의의 특정 아미노산 치환이 만들어지는 상황, 측쇄의 소수성 또는 극성, 측쇄의 일반적 크기, 및 생리 조건하에서 산성 또는 염기성 특성을 가진 측쇄의 pK 값을 포함한다. 예를 들어, 리신, 아르기닌, 및 히스티딘은 대개 서로에 대해 적합하게 치환된다. 당 업계에 공지된 바와 같이, 이는 세 가지 모든 아미노산이 염기성 측쇄를 가지기 때문이며, 한편 리신과 아르기닌의 측쇄에 대한 pK 값(약 10과 12)은 히스티딘(약 6)에 대해서보다 서로 훨씬 더 근접하다. 유사하게, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신은 대개 서로에 대해 적합하게 치환된다. 단, 글리신은 종종 상기 군의 다른 일원에 대해 적합하게 치환되지 않는다. 서로에 대해 빈번하게 적합하게 치환되는 아미노산의 다른 군은 글루탐산과 아스파르트산으로 이루어진 군; 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판으로 이루어진 군; 및 세린, 트레오닌, 및, 경우에 따라, 티로신으로 이루어진 군을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0154] 본 발명과 관련하여 언급될 때 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편은 본원에 개시된 대표적인 항체, 단편 및 서열의 유도체를 포함할 수 있다. "유도체"는 화학적으로 변형된 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편을 포함한다. 화학 변형의 예는 하나 이상의 중합체, 예를 들어 수용성 중합체, N-결합되거나 O-결합된 탄화수소, 당, 인산염, 및/또는 형광단과 같이 검출 가능한 표지와 같은 기타 분자의 공유적인 부착을 포함한다.

[0155] 따라서, 바람직한 경우, 본 발명에 사용하기 위한 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 하나 이상의 이펙터 분자(들)에 접합될 수 있다. 이펙터 분자는 단일 이펙터 분자 또는 본 발명의 항체에 부착될 수 있는 단일 모이어티를 형성하도록 결합된 두 개 이상의 이펙터 분자를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이펙터 분자에 결합된 항체 단편을 얻는 것이 바람직한 경우, 이는 항체 단편이 이펙터 분자에 직접 또는 커플링제에 의해 결합되는 표준 화학적 또는 재조합 DNA 절차에 의해 제조될 수 있다. 이러한 이펙터 분자를 항체 접합하는 기술은 당 업계에 잘 알려져 있다(문헌(Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al.,

eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 및 Dubowchik et al , 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123) 참조). 상기 이펙터 분자의 접합 방법은 부위 특이적 접합 또는 비-부위 특이적 또는 무작위 접합을 포함할 수 있다. 구체적인 화학적 절차는, 예를 들어, WO 93/06231호, WO 92/22583호, WO 89/00195호, WO 89/01476호 및 WO 03/031581호에 기재된 것들을 포함한다. 별법으로, 이펙터 분자가 단백질 또는 폴리펩티드일 경우, 결합은, 예를 들어 WO 86/01533호 및 EP0392745호에 기재된 바와 같이, 재조합 DNA 절차를 이용하여 달성될 수 있다. 별법으로, 이펙터 분자의 특정 부착 부위는 예를 들어 WO2008/038024호에 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 조작될 수 있다. 게다가, 커플링제가, 예를 들어 WO 2005/113605호에 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 이펙터 분자를 결합시키는데 사용될 수 있다. 상기에 나열된 가능성은 그들 자체로 또는 조합하여 사용될 수 있다.

[0156] 본원에 사용되는 용어 이펙터 분자는, 예를 들어, 약물, 독성, 생물학적 활성 단백질, 예를 들어 효소, 기타 항체 또는 항체 단편, 합성 또는 천연 중합체, 핵산 및 이의 단편, 예를 들어 DNA, RNA 및 이의 단편, 방사성 핵종, 특히 방사성 요오드, 방사성 동위원소, 킬레이트 금속, 나노입자 및 리포터 기, 예를 들어 NMR 또는 ESR 분광법에 의해 검출될 수 있는 형광 화합물 또는 화합물들을 포함한다. 또한, 본원에서 사용되는 이펙터 분자는 치료제 예를 들어 화학치료제, 치료 폴리펩티드, 나노입자, 리포솜 또는 치료 핵산을 포함한다.

[0157] 기타 이펙터 분자는 킬레이트 방사성 핵종 예를 들어 ^{111}In 및 ^{90}Y, Lu^{177}, 비스무트^{213}, 칼리포르늄^{252}, 이리듐^{192} 및 텅스텐^{188}/레늄^{188}; 또는 약물, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는, 알킬포스포콜린, 토포이소머라아제 I 억제제, 택소이드 및 수라민을 포함할 수 있다.

[0158] 기타 이펙터 분자는 단백질, 펩티드 및 효소를 포함한다. 관심 효소는 단백질 분해 효소, 가수분해효소, 리아제, 이소머라아제, 트랜스퍼라아제를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 관심의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드는 면역글로불린, 독소 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소, 단백질 예를 들어 인슐린, 종양 괴사 인자, α-인터페론, β-인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 또는 조직 플라스미노겐 활성화 인자, 혈전제 또는 항-혈관형성제, 예를 들어 안지오텐신 또는 엔도스타틴, 또는, 생체반응 조절 인자, 예를 들어 림포카인, 인터류킨-1(IL-I), 인터류킨-2(IL-2), 과립구 대식구 집락 자극 인자(GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor), 과립구 집락 자극 인자(G-CSF: granulocyte colony stimulating factor), 신경 성장 인자(NGF: nerve growth factor): 또는 기타 성장 인자 및 면역글로불린, 또는 예를 들어 당 업계에 공지된 바와 같이(Tomlinson, 2004; Mosavi et al., 2004; Gill and Damle, 2006; Nilsson and Tolmachev, 2007; Binz et al., 2004; Silacci et al. 2014) 리포칼린("안티칼린"), 피브로넥틴("아드넥틴", 트리넥틴), 쿠니츠 도메인, C-형 렉틴, 트랜스페린, 감마형 결정, 시스테인-노트, 안키린 반복("DARPin"), Fyn SH3 도메인("피노머") 또는 단백질 A("애피바디")로부터의 단백질 스캐폴드에 기초한 10개 초과의 아미노산을 포함하는 기타 단백질 또는 폴리펩티드 화합물을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0159] 기타 이펙터 분자는 혈관-뇌 장벽 침투를 향상시키거나 촉진하는 펩티드 및 단백질을 포함한다. 예를 들어, WO2010/043047호, WO2010/063122호, WO2010/063123호 또는 WO2011/041897호는 혈관-뇌 장벽을 통과하여 치료 분자를 운반할 수 있는 벡터로서 작용할 수 있는 펩티드 또는 폴리펩티드 및 이들을 치료 분자에 접합시키는 방법을 기재한다. 혈관-뇌 장벽 침투와 관련하여 관심의 펩티드 및 단백질은 혈관 뇌 장벽 수용체에 결합하는 펩티드 및 단백질, 예를 들어 트랜스페린 수용체, 글루코오스 수용체, 인슐린 수용체, 인슐린 유사 성장 인자 수용체, 저밀도 지질 단백질 수용체 관련 단백질 8, 저밀도 지질 단백질 수용체 관련 단백질 1 및 헤파린 결합 상피 성장 인자 유사 성장 인자를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 별법으로, 이펙터 분자는 상기 혈관-뇌 장벽 수용체 중 하나에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 예를 들어 도메인 항체, 낙타과 항체, 또는 상어 유래 항체(VNAR)이다.

[0160] 기타 이펙터 분자는 예를 들어 진단에 유용한 검출 가능 물질을 포함할 수 있다. 검출 가능 물질의 예는 여러 가지 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 핵종, 양전자 방출 단층촬영 또는 단일 광자 방사형 컴퓨터 단층촬영에 사용될 수 있는 것과 같은 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 일반적으로 진단제로서 사용하기 위해 항체에 접합될 수 있는 금속이온에 대해 미국 특허 제 4,741,900호를 참조한다. 적합한 효소는 겨자무 과산화효소, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린에스테라아제를 포함하고; 적합한 보결 분자단은 스트렙타비딘, 아비딘 및 비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질은 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 및 피코에리트린을 포함하고; 적합한 발광 물질은 루미놀을 포함하고; 적합한 생물발광 물질은 루시페라아제, 루시페린, 및 에쿠오린을 포함하고; 적합한 방사성 핵종은 ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In,

^{99}Tc, ^{89}Zr, ^{90}Y, ^{64}Cu, ^{68}Ga 및 ^{18}F를 포함한다. 진단에 유용한 검출 가능한 물질로서 적합한 이펙터 분자의 구체적인 유형은 문헌(Wyffels et al. 2014, Nuclear Medicine and biology 41 (2014):513-523)에 기재된 바와 같이 전자 결핍 테트라진 및 트랜스-시클로옥텐(TCO: trans-cyclooctene)을 포함한다. 상기 문헌에서, 테트라진에 결합된 본 발명의 타우 결합 항체를 투여하여 최대의 흡수 및 비표적 부위로부터 충분한 제거를 가능하게 하고, 이어서 적합한 방사성 핵종으로 표지된 TCO 또는 최적화된 TCO 유사체를 계속하여 투여하여, 그 결과 TCO가 본 발명의 타우 결합 항체 상 테트라진에 공유적으로 결합하고, 예를 들어 양전자 방출 단층촬영 또는 단일 광자 방사형 컴퓨터 단층촬영에 의해, 이의 검출을 가능하게 할 것이다.

[0161] 한 실시양태에서, 방사성 핵종 또는 테트라진에 결합된 타우 결합 Fab, Fab', 또는 scFv를 제공한다. 방사성 핵종 또는 테트라진과의 결합은 항체 단편에 위치한 임의의 이용 가능한 아미노산 측쇄 또는 말단 아미노산 작용기, 예를 들어 임의의 유리 아미노, 이미노, 티올, 히드록실 또는 카복실 기를 통한 부착을 통해 이루어질 수 있다. 이러한 아미노산은 항체 단편에 자연적으로 존재할 수 있거나 재조합 DNA 방법(예를 들어 US 제5,219,996호; US 제5,667,425호; WO98/25971호, WO2008/038024호)을 이용하여 단편에 조작될 수 있다. 한 예로, 본 발명의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 변형된 Fab 단편으로, 변형이 이펙터 분자의 부착을 가능하게 하는 하나 이상의 아미노산을 이의 중쇄의 C-말단 끝에 첨가하는 것인 Fab 단편이다. 적합하게는, 추가의 아미노산은 이펙터 분자가 부착될 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 변형된 힌지 영역을 형성한다. 한 실시양태에서, 방사성 핵종이 금속이온, 예를 들어 ^{111}In, ^{99}Tc, ^{89}Zr, ^{90}Y, ^{64}Cu, 또는 ^{68}Ga일 경우, 이는 예를 들어 문헌(Turner et al. (Br. J. Cancer, 1994, 70:35-41; *Comparative biodistribution of indium-111-labelled macrocycle chimeric B72.3 antibody conjugates in tumour-bearing mice*)에 기재된 바와 같이 매크로사이클 킬레이트제에 의해 결합될 수 있으며, 이로써 후자는 차례로 상기에 언급된 아미노산 측쇄 또는 말단 아미노산 작용기 또는 항체 또는 항체 단편의 기에 공유적으로 결합된다. 또 다른 실시양태에서, 결합된 방사성 핵종을 가진 후자의 매크로사이클 킬레이트는 두 개 이상의 항-타우 항체 또는 이의 단편을 결합시키는 교차 링커의 일부분인, WO05/113605호에 기재된 이펙터 분자일 수 있다.

[0162] 또 다른 예로, 이펙터 분자는 생체 내에서 항체의 반감기를 증가시키고/거나 항체의 면역원성을 감소시키고/거나 면역계의 상피 장벽을 통과하는 항체의 전달을 향상시킬 수 있다. 이러한 유형의 적합한 이펙터 분자의 예는 중합체, 알부민, 및 알부민 결합 단백질 또는 알부민 결합 화합물, 예를 들어 WO05/117984호에 기재된 것들을 포함한다.

[0163] 이 같은 이펙터 분자가 중합체일 경우, 이는 일반적으로 합성 또는 천연 중합체, 예를 들어 경우에 따라 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌, 또는 폴리옥시알킬렌 중합체 또는 분지형 또는 비분지형 다당류, 예를 들어 호모- 또는 헤테로-다당류일 수 있다.

[0164] 상기에 언급된 합성 중합체에 존재할 수 있는 구체적이고, 경우에 따른 치환기는 하나 이상의 히드록시, 메틸 또는 메톡시 기를 포함한다.

[0165] 합성 중합체의 구체적인 예는 경우에 따라 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(프로필렌글리콜) 폴리(비닐알코올) 또는 이들의 유도체, 특히 경우에 따라 치환된 폴리(에틸렌글리콜) 예를 들어 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 이의 유도체를 포함한다.

[0166] 구체적인 천연 중합체는 락토오스, 아밀로오스, 덱스트란, 글리코겐 또는 이들의 유도체를 포함한다.

[0167] 한 실시양태에서, 중합체는 알부민 또는 이의 단편, 예를 들어 인간 혈청 알부민 또는 이의 단편이다.

[0168] 중합체의 크기는 바라는 바에 따라 달라질 수 있지만 일반적으로 500Da 내지 50000Da, 예를 들어 5000 내지 40000Da, 예를 들어 20000 내지 40000Da 범위의 평균 분자량일 것이다. 중합체 크기는 특히 산물의 의도하는 용도, 예를 들어 뇌와 같은 특정 조직에 국소화하거나 순환 반감기를 연장하는 능력을 기준으로 선택될 수 있다(리뷰를 위해 문헌(Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545) 참조). 따라서, 예를 들어, 산물은 순환을 떠나 조직에 침투하도록 의도된다.

[0169] 적합한 중합체는 폴리알킬렌 중합체, 예를 들어 폴리(에틸렌글리콜) 또는, 특히, 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 이의 유도체, 및 특히 약 15000Da 내지 약 40000Da 범위의 분자량을 가진 것을 포함한다.

[0170] 한 예로, 본 발명에 사용하기 위한 항체는 폴리(에틸렌글리콜)(PEG) 모이어티에 부착된다. 하나의 구체적인 예로, 항체는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편이고 PEG 분자는 항체 단편에 위치한 임의의 이용 가능한 아미노산 측쇄 또는 말단 아미노산 작용기, 예를 들어 임의의 유리 아미노, 이미노, 티올, 히드록실 또는 카복실 기

를 통해 부착될 수 있다. 상기 아미노산은 항체 단편에 자연적으로 존재할 수 있거나 재조합 DNA 방법을 이용하여 단편에 조작될 수 있다(예를 들어 US 5,219,996호; US 5,667,425호; WO98/25971호, WO2008/038024호 참조). 한 예로, 본 발명의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 변형된 Fab 단편으로서, 변형은 이펙터 분자의 부착을 가능하게 하는 하나 이상의 아미노산을 이의 중쇄의 C-말단 끝에 첨가하는 것인 Fab 단편이다. 적합하게는, 추가의 아미노산은 이펙터 분자가 부착될 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 변형된 힌지 영역을 형성한다. 여러 부위가 2개 이상의 PEG 분자를 부착하는데 사용될 수 있다.

[0171] 적합하게는 PEG 분자는 항체 단편에 위치한 적어도 하나의 시스테인 잔기의 티올 기를 통해 공유 결합된다. 변형된 항체 단편에 부착된 각 중합체 분자는 단편에 위치한 시스테인 잔기의 황 원자에 공유 결합될 수 있다. 공유 결합은 일반적으로 디설피드 결합 또는, 특히, 황-탄소 결합일 것이다. 티올 기가 부착 지점으로 사용될 경우, 적합하게 활성화된 이펙터 분자, 예를 들어 티올 선택적인 유도체, 예를 들어 말레이미드 및 시스테인 유도체가 사용될 수 있다. 활성화된 중합체는 상기에 기재된 중합체-변형된 항체 단편의 제조에 출발 물질로서 사용될 수 있다. 활성화된 중합체는 티올 반응기를 포함하는 임의의 중합체, 예를 들어 α-할로카복실산 또는 에스테르, 예를 들어 요오도아세트아미드, 이미드, 예를 들어 말레이미드, 비닐 설폰 또는 디설피드일 수 있다. 상기 출발 물질은 (예를 들어 이전에 쉐어워터 폴리머스(Shearwater Polymers Inc., 미국 앨라배마주 헌츠빌 소재)인 넥타(Nektar)로부터) 상업적으로 구입할 수 있거나 통상의 화학 절차를 이용하여 상업적으로 이용 가능한 출발 물질로부터 제조할 수 있다. 구체적인 PEG 분자는 20K 메톡시-PEG-아민(이전에 쉐어워터인 넥타; 랩 폴리미어(Rapp Polymere); 및 선바이오(SunBio)로부터 구입 가능) 및 M-PEG-SPA(이전에 쉐어워터인 넥타로부터 구입 가능)를 포함한다.

[0172] 또 다른 측면에서, 본 발명은 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자, 이의 가변 경쇄 및/또는 중쇄를 코딩하는 핵산 서열 포함하는 핵산 분자 및 이의 가변 경쇄 및/또는 중쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.

[0173] 예로써, AB1의 VL(서열 번호 7)은 서열 번호 19에 의해 코딩될 수 있다. AB1의 VH(서열 번호 8)는 서열 번호 20에 의해 코딩될 수 있다.

[0174] 서열 번호 9의 인간화 VL은 서열 번호 21에 의해 코딩될 수 있다. 서열 번호 12의 인간화 VH는 서열 번호 22에 의해 코딩될 수 있고 서열 번호 13의 인간화 VH는 서열 번호 23에 의해 코딩될 수 있다.

[0175] 서열 번호 14의 인간화 경쇄는 서열 번호 24에 의해 코딩될 수 있다. 서열 번호 17의 인간화 중쇄는 서열 번호 25에 의해 코딩될 수 있고 서열 번호 18의 인간화 중쇄는 서열 번호 26에 의해 코딩될 수 있다. 서열 번호 54의 인간화 중쇄는 서열 번호 56에 의해 코딩될 수 있고 서열 번호 55의 인간화 중쇄는 서열 번호 57에 의해 코딩될 수 있다.

[0176] 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편은 단일 핵산(예를 들어 항체의 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단일 핵산), 또는 각각이 항체 또는 항체 단편의 상이한 부분을 코딩하는 2개 이상의 분리된 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명은 상기 임의의 항체 또는 결합 단편을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 제공한다. 핵산 분자는 DNA, cDNA, RNA 등일 수 있다.

[0177] 예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄의 일부분 또는 전체를 코딩하는 DNA 서열은 결정된 DNA 서열로부터 또는 상응하는 아미노산 서열을 기초로 하여 바라는 대로 합성될 수 있다. 수용 골격 서열을 코딩하는 DNA는 당 업자에게 널리 이용 가능하고 이들의 공지된 아미노산 서열을 기초로 하여 쉽게 합성될 수 있다.

[0178] 분자 생물학의 표준 기술이 본 발명의 항체 분자를 코딩하는 DNA 서열을 제조하는데 사용될 수 있다. 바라는 DNA 서열은 올리고뉴클레오티드 합성 기술을 이용하여 완전히 또는 부분적으로 합성될 수 있다. 부위 지정 돌연변이 유발법 및 중합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction)이 적절하게 이용될 수 있다.

[0179] 바람직하게는, 코딩하는 핵산 서열은 원핵 또는 진핵 세포에서 발현을 가능하게 하는 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된다. 상기 폴리뉴클레오티드의 발현은 폴리뉴클레오티드의 번역 가능한 mRNA로의 전사를 포함한다. 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물에서 발현을 보장하는 조절 인자는 당 업자에게 잘 알려져 있다. 이들은 대개 전사의 개시를 보장하는 조절 서열, 및 경우에 따라 전사의 종료 및 전사체의 안정화를 보장하는 폴리-A 신호를 포함한다. 추가의 조절 인자는 전사 및 번역 인핸서, 및/또는 자연적으로 결합되거나 이종의 프로모터 영역을 포함할 수 있다.

[0180] 따라서, 또 다른 측면에서 본 발명은 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편을 코딩하는 상기 핵산 서열을 포함하는

클로닝 또는 발현 벡터를 제공한다.

[0181] "벡터"는 핵산 서열을, 예를 들어 코딩된 폴리펩티드의 합성이 일어날 수 있는, 적합한 숙주 세포에 운반하는 능력을 가진 임의의 분자 또는 조성물이다. 전형적으로 그리고 바람직하게는, 벡터는 당 업계에 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 바라는 핵산 서열(예를 들어 본 발명의 핵산)을 포함하도록 조작된 핵산이다. 발현 벡터는 전형적으로 (이들이 핵산분자에 의해 미리 제공되지 않을 경우) 하기 구성요소 중 하나 이상을 포함한다: 프로모터, 하나 이상의 인핸서 서열, 복제 기점, 전사 종료 서열, 공여 및 수용 스플라이스 부위를 포함하는 전체 인트론 서열, 분비를 위한 선도서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현될 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 서열, 및 선별 마커 인자.

[0182] 벡터는 전형적으로 벡터가 사용될 숙주 세포에서 기능적인 것으로 선택된다(벡터는 유전자의 증폭 및/또는 유전자의 발현이 일어날 수 있도록 하기 위해서 숙주 세포 기구와 적합하다).

[0183] 따라서, 추가의 측면에서 본 발명은 상기에 기재된 클로닝 또는 발현 벡터 및/또는 상기에 기재된 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0184] 숙주 세포는 핵산 또는 벡터로 형질전환되어 이로써 코딩되는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 생산할 수 있는 임의의 유형의 세포일 수 있다. 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 이의 일부분(예를 들어, 핵산 또는 벡터에 의해 코딩되는 중쇄 서열, 또는 경쇄 서열)을 생산하는데 사용될 수 있다. 핵산 또는 벡터를 세포에 도입한 후, 세포는 코딩된 서열의 발현에 적합한 조건하에서 배양된다. 그 후, 항체, 항원 결합 단편, 또는 항체의 일부분은 세포로부터 단리될 수 있다.

[0185] 숙주 세포는 원핵 숙주 세포(예를 들어, 이. 콜라이) 또는 진핵 숙주 세포(예를 들어, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 척추동물 세포)일 수 있다. 숙주 세포는 적합한 조건하에서 배양될 때 항체 또는 이의 결합 단편을 발현하고 (숙주 세포가 이를 배지로 분비할 경우) 이는 계속하여 배양 배지로부터 수집되거나 (분비되지 않을 경우) 이를 생산하는 숙주 세포로부터 직접 수집될 수 있다. 적합한 숙주 세포의 선택은 여러 가지 인자, 예를 들어 바라는 발현 수준, 활성에 바람직하거나 필요한 폴리펩티드 변형, 예를 들어 글리코실화 및 인산화, 및 생물학적 활성 분자로의 접힘의 용이성에 따라 결정될 것이다. 숙주 세포의 선택은 부분적으로 항체 또는 이의 결합 단편이 전사 후 변형되는지(예를 들어, 글리코실화되고/거나 인산화되는지)의 여부에 따라 결정될 것이다. 그럴 경우, 효모, 곤충, 또는 포유동물 숙주 세포가 바람직하다.

[0186] 적합한 포유동물 숙주 세포는 CHO(Chinese Hamster Ovary), 골수종 또는 하이브리도마 세포를 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 유형의 중국 햄스터 난소(CHO 세포)는 CHO 및 CHO-K1 세포를 포함할 수 있으며, 이들은 DHFR 선별 마커와 사용될 수 있는 dhfr- CHO 세포, 예를 들어 CHO-DG44 세포 및 CHODXB11 세포, 및 글루타민 신테타아제 선별 마커와 사용될 수 있는 CHOKI-SV 세포를 포함한다. 많은 것이 미국 균주 은행(ATCC: American Type Culture Collection)(버지이나주 마나사스 소재)로부터 이용 가능하다. 예로는 포유동물 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소 세포(CHO)(ATCC No. CCL61), 인간 배아 신장(HEK: human embryonic kidney) 293 또는 293T 세포(ATCC No. CRL1573), 3T3 세포(ATCC No. CCL92), 또는 PER.C6 세포가 포함된다. 항체를 발현하는데 사용되는 기타 세포 유형은 림프구 세포 주, 예를 들어 NSO 골수종 세포 및 SP2 세포, COS 세포를 포함한다.

[0187] 본 발명의 또 다른 측면은 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 제조 방법으로서, 예를 들어 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 코딩하는 DNA로부터, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 발현을 유도하는데 적합한 조건하에서, 예를 들어 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 항체 분자를 단리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0188] 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드만을 포함할 수 있으며, 이 경우, 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드 코딩 서열만이 숙주 세포에 형질감염 시키는데 사용되어야 한다. 중쇄 및 경쇄 모두를 포함하는 산물을 생산하기 위해, 세포 주는 2개의 벡터, 경쇄 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터 및 중쇄 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터로 형질감염될 수 있다. 별법으로, 단일 벡터, 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 벡터가 사용될 수 있다.

[0189] 본 발명에 따른 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 숙주 세포로부터 우수한 수준으로 발현된다. 따라서, 항체 및/또는 단편의 특성은 상업적인 공정에 도움이 된다.

[0190] 따라서 숙주 세포를 배양하고, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 발현하고, 후자를 단리하고, 경우에 따라 상기를 정제하여 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 제공하는 과정이 제공된다. 한 실시양태에서, 과정은 이펙터 분자를 단리된 항체 또는 단편에 접합하는 단계, 예를 들어 특히 본원에서 상기에 기재된 PEG 중

합체에 접합하는 단계를 더 포함한다.

[0191] 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 조성물, 특히 약학 또는 진단 조성물에 제제화될 수 있다. 약학 조성물은 적합한 담체, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 제제와 혼합하여 치료 또는 예방 유효량의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 진단 조성물은 적합한 담체, 예를 들어 진단상 허용 가능한 제제와 혼합하여 진단 유효량의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다.

[0192] 본 약학 조성물에 사용하기 위한 약학적으로 허용 가능한 제제는 담체, 부형제, 희석제, 항산화제, 방부제, 착색제, 향미제 및 희석제, 유화제, 현탁제, 용매, 충전제, 증량제, 완충제, 전달 비히클, 긴장제, 보조용매, 습윤제, 착화제, 완충 제제, 항미생물제, 및 계면활성제를 포함한다.

[0193] 조성물은 액체 형태 또는 동결건조된(lyophilized 또는 freeze-dried) 형태일 수 있고 하나 이상의 동결건조 보호제, 부형제, 계면활성제, 고분자량 구조 첨가제 및/또는 증량제를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,685,940호, 제6,566,329호, 및 제6,372,716호 참조).

[0194] 조성물은 비경구 투여에 적합할 수 있다. 대표적인 조성물은 당 업자에게 이 용 가능한 임의의 경로, 예를 들어 관절 내, 피하, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 뇌 내(뇌실질 내), 뇌실 내, 근육 내, 안구 내, 동맥 내, 또는 병변 내 경로에 의한 동물로의 주사 또는 주입에 적합하다. 비경구 제제는 전형적으로 멸균, 발열성 물질이 제거된 등장성 수용액으로, 경우에 따라 약학적으로 허용 가능한 방부제를 포함한 용액일 수 있다.

[0195] 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 예를 들어 올리브유, 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 식염수 및 완충 매질을 포함하여 물, 알코올/수성 용액, 유탁액 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링커 덱스트로오스, 덱스트로오스 염화나트륨, 젖산 링거액, 또는 고정유를 포함한다. 정맥 내 비히클은 액체 및 영양 보충제, 전해질 보충제, 예를 들어 링거 덱스트로오스를 기반으로 하는 것들 등을 포함한다. 또한, 예를 들어 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 기체 등과 같은 방부제 및 기타 첨가제가 존재할 수 있다. 일반적으로, 본원에서 참고로 포함된 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 16th Ed., Mack Eds., 1980)을 참조한다.

[0196] 본원에 기재된 약학 조성물은 산물의 국소 농도(예를 들어, 볼러스, 데포 효과) 및/또는 특정 국소 환경에서 증가된 안정성 또는 반감기를 제공하는 방식으로 제어 또는 지속 전달을 위해 제제화될 수 있다. 조성물은 중합체 화합물 예를 들어 폴리락트산, 폴리글리콜산 등의 입자상 제제뿐 아니라 데포 주사로서 전달될 수 있는 활성제의 제어 방출 또는 지속 방출을 제공하는 생체 분해성 기질, 주사 가능한 미세소구, 미세캡슐 입자, 미세캡슐, 생체 부식성 입자 비드, 리포솜, 및 이식 가능한 전달 장치와 같은 제제를 이용한 본 발명의 항체, 결합 단편, 핵산, 또는 벡터의 제형을 포함할 수 있다.

[0197] 별법으로 또는 추가로, 조성물은 본 발명의 항체, 결합 단편, 핵산 또는 벡터가 흡수되거나 캡슐화된 막, 스펀지, 또는 기타 적합한 물질을 환부에 이식하여 국소 전달될 수 있다. 이식 장치가 사용될 경우, 장치는 임의의 적합한 조직 또는 기관에 이식될 수 있고, 본 발명의 항체, 결합 단편, 핵산, 또는 벡터는 볼러스에 의해서, 또는 연속 투여에 의해서, 연속 주입을 이용하여 카테터에 의해서 장치를 통해 직접 전달될 수 있다.

[0198] 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 포함하는 약학 조성물은 흡입용으로, 예를 들어 건조 분말로서 제제화될 수 있다. 또한, 흡입 용액은 에어로졸 전달을 위해 액화 압축가스에 제제화될 수 있다. 또 다른 제제에서, 용액은 분무될 수 있다.

[0199] 본 발명의 한 측면은 질환의 치료에 치료학적 활성제로서 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[0200] 본 발명의 또 다른 측면은 타우병증의 치료에 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다. 타우 포함물을 포함한다고 기재된 타우병증(Clavaguera et al. Brain Pathology 23 (2013) 342-349)은 알츠하이머병(AD); 근위축성 측색 경화증/파킨슨증 치매 복합; 은친화성 입자병; 만성 뇌상성 뇌병증; 피질 기저핵 변성; 석회화에 의한 광범위 신경 섬유 매듭; 다운 증후군; 가족성 영국형 치매; 가족성 덴마크형 치매; MAPT 돌연변이에 의해 유발된 17번 염색체에 연관된 전두 측두엽 치매 및 파킨슨증; 게르스트만 슈투로이슬러 샤잉커병; 과들루프 파킨슨증; 근긴장성 이영양증; 뇌 철분 축적으로 인한 신경변성; 니만 피크병 C형; 신경 섬유 매듭으로 인한 비-과마니안 운동 뉴런 질환; 피크 병; 뇌염 후 파킨슨증; 프라이온 단백질 대뇌 아밀로이드 혈관병증; 진행성 피질하 신경아교증; 진행성 핵상 마비(PSP); SLC9A6 관련 정신지체; 아급성 경화성 범뇌염; 매듭 우세 치매; 및 구형 교세포 포함물로 인한 백질 타우병증을 포함한다.

[0201] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 알츠하이머병 및/또는 진행성 핵상 마비의 치료에 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[0202] 따라서, 본 발명은 또한 타우병증, 특히 알츠하이머병 및/또는 진행성 핵상 마비의 치료 방법으로 치료 활성량의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계에 의한 방법에 관한 것이다.

[0203] 또한, 본 발명은 타우병증, 특히 알츠하이머병 및/또는 진행성 핵상 마비의 치료를 위한 의약의 제조에 있어 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[0204] 본 발명의 또 다른 측면에서, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 요법에서 단독으로 또는 다른 제제와 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 적어도 하나의 추가의 치료제와 동시 투여될 수 있다. 특정 측면에서, 추가의 치료제는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편이 치료하는 데 사용되고 있는 것과 동일하거나 상이한 장애를 치료하는데 영향을 주는 치료제이다. 대표적인 추가의 치료제는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 콜린에스테라아제 억제제(예를 들어 도네페질, 갈란타민, 리바스티그민 및 타크린), NMDA 수용체 길항체(예를 들어 메만틴), 아밀로이드 베타 펩티드 응집 억제제, 항산화제, 감마-세크레타아제 조절 인자, 신경 성장 인자(NGF) 모방체 또는 NGF 유전자 요법, PPARy 작용제, HMS-CoA 리덕타아제 억제제(스타틴), 암파킨, 칼슘 경로 차단제, GABA 수용체 길항제, 글리코겐 신타아제 키나아제 억제제, 정맥 내 면역글로불린, 무스카린 수용체 작용제, 니코틴 수용체 조절 인자, 능동 또는 수동 아밀로이드 베타 펩티드 면역화, 포스포디에스테라아제 억제제, 세로토닌 수용체 길항제 및 항-아밀로이드 베타 펩티드 항체 또는 추가의 항-타우 항체. 추가의 대표적인 신경계 약물은 성장 호르몬 또는 신경 영양 인자로부터 선택될 수 있다; 예는 뇌 유래 신경 영양 인자(BDNF: brain-derived neurotrophic factor), 신경 성장 인자(NGF), 뉴로트로핀-4/5, 섬유모세포 성장 인자(FGF: fibroblast growth factor)-2 및 기타 FGF, 뉴로트로핀(NT: neurotrophin)-3, 에리트로포이에틴(EPO: erythropoietin), 간세포 성장 인자(HGF: hepatocyte growth factor), 상피 성장 인자(EGF: epidermal growth factor), 형질전환 성장 인자(TGF: transforming growth factor)-알파, TGF-베타, 혈관 내피 성장 인자(VEGF: vascular endothelial growth factor), 인터류킨-1 수용체 길항제(IL-1ra), 섬모체 신경 영양 인자(CNTF: ciliary neurotrophic factor), 교세포 유래 신경 영양 인자(GDNF: glial-derived neurotrophic factor), 뉴투린, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF: platelet-derived growth factor), 헤레귤린, 뉴레귤린, 아르테민, 페르세핀, 인터류킨, 교세포 주 유래 신경 영양 인자(GDNF: Glial cell-line derived neurotrophic factor), 과립구 집락 자극 인자(CSF), 과립구 대식구-CSF, 네트린, 카디오트로핀-1, 헤지호그, 백혈병 억제 인자(LIF: leukemia inhibitory factor), 미드카인, 플레이오트로핀, 뼈 형성 단백질(BMP: bone morphogenetic protein), 네트린, 사포신, 세마포린, 및 줄기 세포 인자(SCF: stem cell factor)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 치료제는 신경계 약물의 하나 이상의 부작용을 완화하는 이의 능력에 대해 선택된다. 상기에 나타낸 이 같은 병용 요법은 조합된 투여(2가지 이상의 치료제가 동일하거나 분리된 제제에 포함될 경우), 및 분리 투여를 포함하여, 이 경우, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 투여는 추가의 치료제 및/또는 애주번트의 투여 전에, 동시에, 그리고/또는 후에 일어날 수 있다. 또한, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편은 기타 중재 요법, 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는, 방사선 요법, 행동 요법, 또는 당 업계에 공지된, 치료되거나 예방될 신경계 장애에 적합한 기타 요법과 병용하여 이용될 수 있다.

[0205] 본 발명의 또 다른 측면은 진단 활성제로서의 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[0206] 또한, 본 발명의 한 측면은 타우병증, 특히 알츠하이머병 및/또는 진행성 핵상 마비의 진단에 있어 타우 결합 항체 및 이의 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[0207] 이 같은 진단 시험은 바람직하게는 생물학적 시료에 실시될 수 있다. "생물학적 시료"는 개체로부터 얻은 다양한 시료 유형을 포함하며 진단 또는 모니터링 분석에 사용될 수 있다. 정의는 뇌척수액, 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액체 시료, 고체 조직 시료, 예를 들어 생검 검체 또는 조직 배양 또는 이로부터 유래한 세포 및 이의 자손을 포함한다. 또한, 정의는 이의 획득 후, 임의의 방법으로, 예를 들어 시약의 처리, 용해화, 또는 특정 구성요소, 예를 들어 폴리뉴클레오티드의 증식에 의해 조작된 시료를 포함한다. 용어 "생물학적 시료"는 임상 시료를 포함하고, 또한 배양물 내 세포, 세포 상등액, 세포 용해액, 혈청, 혈장, 생체액, 및 조직 시료를 포함한다. 용어 "생물학적 시료"는 소변, 타액, 뇌척수액, 혈액 분획, 예를 들어 혈장 및 혈청 등을 포함한다.

[0208] 진단 시험은 바람직하게는 인간 또는 동물 신체와 접촉되지 않은 생물학적 시료에 실시될 수 있다. 이 같은 진단 시험은 또한 시험관 내 시험으로도 언급된다.

[0209] 시험관 내 진단 시험은 개체로부터 얻은 생물학적 시료 내에서 타우의 시험관 내 검출 방법으로 (i) 생물학적 시료를 본원에 기재된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편과 접촉하는 단계, (ii) 본원에 기재된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 타우와의 결합을 검출하는 단계를 포함하는 방법에 의존할 수 있다. 그 후, 검출된 타우 수준과 적합한 대조군을 비교하여, 타우병증, 예를 들어 알츠하이머병 및/또는 진행성 핵상 마비의 존재 또는 발생 가능성을 진단할 수 있다. 따라서, 이 같은 검출 방법을 이용하여 피험체가 타우병증의 단계(중증도)를 결정하는 것을 포함하여 타우병증을 가지거나 발생할 위험에 있는 지를 결정할 수 있다.

[0210] 따라서, 본 발명은 피험체에서 타우병증, 예를 들어 알츠하이머병 및/또는 진행성 핵상 마비의 시험관 내 진단 방법으로, i) 본원에 기재된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 이용하여 피험체로부터 얻은 생물학적 시료에서 타우의 수준 또는 상태를 평가하는 단계; 및 ii) 타우의 수준 또는 상태를 정상 대조군 피험체에서 타우의 수준 또는 상태를 나타내는 기준, 표준 또는 정상 대조군 값과 비교하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 생물학적 시료 내 타우 폴리펩티드의 수준 및/또는 상태와 정상 대조군 값 사이의 유의한 차이는 개체가 타우병증, 예를 들어 알츠하이머병 및/또는 진행성 핵상 마비를 가진다는 것을 나타낸다.

[0211] 본원에서 기재된 상기 여러 측면 및 실시양태와 관련하여, 본 발명은 특히 하기를 고안한다:

[0212] 1. 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0213] 서열 번호 1로부터 선택된 CDR1 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 2로부터 선택된 CDR2 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 및 서열 번호 3으로부터 선택된 CDR3 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및/또는

[0214] 서열 번호 4로부터 선택된 CDR1 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 서열 번호 5로부터 선택된 CDR2 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열, 및/또는 서열 번호 6으로부터 선택된 CDR3 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0215] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0216] 2. 실시양태 1에 있어서,

[0217] 서열 번호 1로부터 선택된 CDR1, 서열 번호 2로부터 선택된 CDR2, 및 서열 번호 3으로부터 선택된 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

[0218] 서열 번호 4로부터 선택된 CDR1, 서열 번호 5로부터 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 6으로부터 선택된 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0219] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0220] 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서, 서열 번호 5의 X_1은 A인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0221] 4. 실시양태 1 또는 2에 있어서, 서열 번호 5의 X_1은 T인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0222] 5. 실시양태 1, 2, 3 또는 4 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 단클론 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0223] 6. 실시양태 5에 있어서, 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0224] 7. 실시양태 6에 있어서, IgG1 또는 IgG4 아형의 인간화 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0225] 8. 실시양태 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, S238을 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0226] 9. 실시양태 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0227] 10. 실시양태 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0228] 11. 실시양태 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF: paired helical filament)에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0229] 12. 실시양태 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0230] 13. 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0231] 서열 번호 7 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및/또는

[0232] 서열 번호 8 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역.

[0233] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0234] 14. 실시양태 13에 있어서,

[0235] 서열 번호 7을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및

[0236] 서열 번호 8을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0237] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0238] 15. 실시양태 13 또는 14에 있어서, 서열 번호 8의 X_1은 A인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0239] 16. 실시양태 13 또는 14에 있어서, 서열 번호 8의 X_1은 T인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0240] 17. 실시양태 13, 14, 15, 또는 16 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 단클론 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0241] 18. 실시양태 17에 있어서, 키메라 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0242] 19. 실시양태 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, S238을 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0243] 20. 실시양태 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0244] 21. 실시양태 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0245] 22. 실시양태 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF)에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0246] 23. 실시양태 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0247] 24. 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0248] 서열 번호 9 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및/또는

[0249] 서열 번호 10 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0250] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0251] 25. 실시양태 24에 있어서,

[0252] 서열 번호 9를 포함하는 경쇄 가변 영역, 및

[0253] 서열 번호 10을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0254] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0255] 26. 실시양태 24 또는 25에 있어서, 서열 번호 10의 X_3은 A인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0256] 27. 실시양태 24 또는 25에 있어서, 서열 번호 10의 X_3은 T인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0257] 28. 실시양태 24에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11 또는 12를 포함하는 것인 타우 결합 항체 또는 이의

결합 단편.

[0258] 29. 실시양태 24, 25, 26, 27, 또는 28 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 단클론 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0259] 30. 실시양태 29에 있어서, 인간화 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0260] 31. 실시양태 30에 있어서, IgG1 또는 IgG4 아형인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0261] 32. 실시양태 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, S238을 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0262] 33. 실시양태 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 또는 32 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0263] 34. 실시양태 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 또는 32 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0264] 35. 실시양태 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 또는 32 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF)에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0265] 36. 실시양태 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 또는 32 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0266] 37. 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0267] 서열 번호 14 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 경쇄, 및/또는

[0268] 서열 번호 15 또는 이와 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 중쇄

[0269] 를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0270] 38. 실시양태 37에 있어서,

[0271] 서열 번호 14를 포함하는 경쇄, 및

[0272] 서열 번호 15를 포함하는 중쇄.

[0273] 를 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0274] 39. 실시양태 37 또는 38에 있어서, 서열 번호 15의 X_3은 A인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0275] 40. 실시양태 37 또는 38에 있어서, 서열 번호 15의 X_3은 T인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0276] 41. 실시양태 37에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열 번호 17 또는 18을 포함하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0277] 42. 실시양태 37, 38, 39, 40, 또는 41 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 단클론 인간화 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0278] 43. 실시양태 42에 있어서, IgG1 또는 IgG4 아형인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0279] 44. 실시양태 37, 38, 39, 40, 41, 42, 또는 43 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, S238을 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0280] 45. 실시양태 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 또는 44 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0281] 46. 실시양태 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0282] 47. 실시양태 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF)에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0283] 48. 실시양태 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0284] 49. 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, S238을 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0285] 50. 실시양태 49에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0286] 51. 실시양태 50에 있어서, 단클론 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0287] 52. 실시양태 50 또는 51에 있어서, 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편

[0288] 53. 실시양태 52에 있어서, IgG1 또는 IgG4 아형의 단클론 인간화 항체 또는 이의 결합 단편인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0289] 54. 실시양태 50, 51, 52, 또는 53 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0290] 55. 실시양태 50, 51, 52, 또는 53 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF)에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0291] 56. 실시양태 50, 51, 52, 또는 53 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0292] 57. 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 타우와의 결합에 대해 실시양태 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, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 또는 56 중 어느 하나의 실시양태의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편과 경쟁하는, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0293] 58. 실시양태 57에 있어서, 타우와의 결합에 대해

[0294] 서열 번호 9를 포함하는 경쇄 가변 영역, 및

[0295] 서열 번호 12 또는 13을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0296] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 결합 단편과 경쟁하는, 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0297] 59. 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편으로서,

[0298] 실시양태 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, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 또는 56 중 어느 하나의 실시양태의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편과 실질적으로 동일한 타우의 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0299] 60. 실시양태 59에 있어서,

[0300] 서열 번호 9를 포함하는 경쇄 가변 영역, 및

[0301] 서열 번호 12 또는 13을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0302] 을 포함하는 타우 결합 항체 또는 결합 단편과 실질적으로 동일한 타우의 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0303] 61. 실시양태 57, 58, 59, 또는 60 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 단클론 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0304] 62. 실시양태 61에 있어서, 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0305] 63. 실시양태 62에 있어서, IgG1 또는 IgG4 아형의 인간화 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0306] 64. 실시양태 57, 58, 59, 60, 61, 62, 또는 63 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 A246, A239, S241, T245, S238를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0307] 65. 실시양태 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 또는 64 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 서열 번호 35의 아미노산 잔기 S238, A239, S241, T245, A246과, 서열 번호 35의 S235, S237, K240, R242, L243, Q244, V248, 및 M250으로부터 선택된 하나 이상의 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0308] 66. 실시양태 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 또는 65 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0309] 67. 실시양태 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 또는 65 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF)에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0310] 68. 실시양태 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 또는 65 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, 가용성 인간 타우와 인간 타우의 쌍 나선 필라멘트(PHF) 둘 다에 결합하는 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0311] 69. 실시양태 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, 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, 또는 68 중 어느 하나의 실시양태에 있어서, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd 및 Fv, scFv, Fab-Fv, Fab-scFv, Fab-dsFv, Fab-scFc, scFv-scFc, dsscFv, dsscFv-scFc, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 또는 VHH 포함 항체인 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0312] 70. 실시양태 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, 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, 또는 69 중 어느 하나의 실시양태의 경쇄 및/또는 중쇄를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

[0313] 71. 실시양태 70의 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 클로닝 또는 발현 벡터.

[0314] 72. 실시양태 70의 하나 이상의 핵산 서열 또는 실시양태 71의 하나 이상의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0315] 73. 실시양태 72에 있어서, 인간 배아 줄기 세포가 아닌 숙주 세포.

[0316] 74. 실시양태 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, 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, 또는 69 중 어느 하나의 실시양태의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편의 제조 방법으로서, 적어도

[0317] a) 실시양태 72 또는 73의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

[0318] b) 상기 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 단리하는 단계

[0319] 를 포함하는 제조 방법.

[0320] 75. 치료학적 활성제로서 사용하기 위한 실시양태 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, 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, 또는 68 중 어느 하나의 실시양태의 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0321] 76. 타우병증의 치료에 사용하기 위한 실시양태 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, 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, 또는 68 중 어느 하나의 실시양태의 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0322] 77. 실시양태 76에 있어서, 상기 타우병증은 알츠하이머병인 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0323] 78. 실시양태 76에 있어서, 상기 타우병증이 진행성 핵상 마비인 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0324] 79. 타우병증의 치료 방법으로서, 실시양태 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, 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, 또는 68 중 어느 하나의 실시양태의 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0325] 80. 실시양태 79에 있어서, 상기 타우병증은 알츠하이머병인 방법.

[0326] 81. 실시양태 79에 있어서, 상기 타우병증은 진행성 핵상 마비인 방법.

[0327] 82. 진단제로서 사용하기 위한 실시양태 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, 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, 또는 68 중 어느 하나의 실시양태의 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0328] 83. 타우병증의 진단에 사용하기 위한 실시양태 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, 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, 또는 68 중 어느 하나의 실시양태의 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0329] 84. 실시양태 83에 있어서, 상기 타우병증은 알츠하이머병인 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0330] 85. 실시양태 83에 있어서, 상기 타우병증은 진행성 핵상 마비인 단리된 타우 결합 항체 또는 이의 결합 단편.

[0331] 본 발명은 이제 몇몇 실시예와 관련하여 기재되지만 이는 제한하는 것으로 해석되서는 안 된다.

[0332] **실험**

[0333] *실험 1 - 타우 결합 항체의 생성*

[0334] 1.1 재조합 타우 발현

[0335] 인간 타우 단백질은 2가지 숙주 시스템, 이. 콜라이 BL21(DE3) 및 HEK293 세포(인간 배아 신장 세포 주)에서 발현하였다. 타우의 4가지 상이한 이소형, 이소형 2, 3, 4 & 5는 이. 콜라이에서 생산하였으며, 하나의 이소형, 이소형 2는 HEK293 세포에서 생산하였다. 모든 발현 벡터 및 생산된 단백질의 전체 서열은 도 5 내지 14에 포함된다.

[0336] 이. 콜라이에서 타우 생산

[0337] 상이한 타우 이소형을 코딩하는 유전자는 합성으로 이. 콜라이에서 발현을 위해 코돈을 최적화하여 생성하였다. 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 N-말단 6His-TEV 태그를 가진 타우를 생산하도록 조작된 변형된 pET32 벡터에 서브클로닝하였다.

[0338] 이. 콜라이 BL 21(DE3) 세포는 상기 벡터로 형질전환시키고, 표준 기술을 이용하여 단백질을 발현하였다.

[0339] 그 후, 이. 콜라이 세포는 원심분리에 의해 회수하고, 타우 단백질은 용해하고 NiNTA(Qiagen)를 이용한 친화도 크로마토그래피에 의해 가용성 분획으로부터 캡쳐하였다. 6His 태그는 TEV 프로테아제, 이어서 2차 NiNTA 크로마토그래피 단계를 이용하여 제거하였다. 정제된 타우는 적용에 따라 결정되는 적합한 완충액으로 완충액을 교환하였다. 면역화를 위해 생성한 시료는 프로테우스 노엔도(Proteus NoEndo)™ 컬럼(Vivaproducts)을 이용하여 내독소를 제거하였다.

[0340] 핵 자기 공명(NMR: nuclear magnetic resonance) 연구를 위한 동위원소 표지된 타우의 생성:

[0341] 단백질 발현은 단백질로 ^{15}N, ^{13}C 및 ^{2}H를 포함시키기 위해 최소 배지를 사용한 것을 제외하고 상기에 기재된 바와 같이 실시하였다. 이. 콜라이 세포 펠렛을 용해하고 NiNTA(Qiagen) 친화도 크로마토그래피 단계를 이용하여 타우 단백질을 정제하고, 6His 태그는 TEV 프로테아제로 제거한 후 수퍼덱스(Superdex) 200 유니트(GE-Healthcare)를 이용한 겔 여과에 의해 타우 단백질을 정제하였다.

[0342] HEK293에서 타우 생산

[0343] 타우 이소형 2를 코딩하는 유전자는 야생형 DNA 서열을 이용하여 합성하여 생성하였다. 표준 분자 생물학 기술

을 이용하여 이를 N-말단 10His-TEV 태그(서열 번호 51)를 가진 타우를 생산하도록 조작된 발현 벡터 pMV-10HisTEV(CMV 프로모터 포함)에 서브클로닝하였다.

[0344] 생성 벡터는 Expi293™ 발현 시스템(Invitrogen)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 형질감염시켰다. 이 시스템은 HEK293 세포 주로부터 유래한 Expi293F 인간 세포를 사용한다.

[0345] 타우 단백질은 배양 배지에 축적되었으며, 이로부터 고정된 금속이온 친화도 크로마토그래피 Ni 세파로스 엑셀(Sepharose Excel)(GE Healthcare)을 이용하여 회수하였다. 그 후 10His 태그는 TEV 프로테아제를 사용하여 제거한 후 Ni 세파로스 컬럼에 다시 적용하여 통과액에서 절단된 타우를 수집하였다. 정제된 타우는 적용에 따라 결정되는 적합한 완충액으로 완충액 교환을 하였다.

[0346] 원섬유 형성

[0347] 450 μM의 타우 단백질을 멸균 여과하고 1.5ml 에펜도르프(Eppendorf) 튜브에서 서모믹서(thermomixer)(Eppendorf)를 이용하여 750 rpm, 37℃에서 310시간 진탕하였다. 원섬유 형성은 티오플라빈(Thioflavin)-T 염료를 사용하고 플루오스타 오메가(Fluostar Omega) 분광 광도계(BMG Labtech)에서 흡광도를 판독하여 모니터하였다. 쌍 나선 필라멘트(PHF) 형성은 음성 염색 전자 현미경에 의해 확인하였다.

[0348] 1.2면역화

[0349] 10마리 암컷 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 쥐(260-280g)는 동일 부피의 완전 프로인트 애주번트(CFA: complete Freund's adjuvant)에 주사기로 격렬하게 혼합하여 유화시킨 50μg 재조합 타우 단백질로 피하에 면역화하였다. 꼬리로부터 얻은 혈액과 함께 불완전 프로인트 애주번트(IFA: incomplete Freund's adjuvant)를 사용하여 쥐에 14일 간격으로 3회 추가 주사하였다. 제조하여 -80℃에서 소 태아 혈청(FCS: fetal calf serum) 중 10% 디메틸 설폭시드(DMSO: dimethyl sulfoxide)에 냉동한 비장 및 골수의 단일 세포 현탁액으로 최종 추가 접종 후 14일에 종료하였다. 재조합 인간 타우 단백질을 이. 콜라이에서 발현하고 정제하고 시험관 내에서 응집시킨 후 면역화하였다. 가용성 타우와 불용성 원섬유 타우의 혼합물을 포함하는 타우의 4가지 이소형(2, 3, 4 & 5)의 등몰 혼합물의 최종 시료를 면역화에 사용하였다.

[0350] 1.3B 세포 배양물

[0351] B 세포 배양물은 문헌(Zubler et al. (1985))에 기재된 것과 유사한 방법을 이용하여 제조하였다. 간략하게, 면역화된 쥐의 PBMC 유래 B 세포는 바코드된 96웰 조직 배양 플레이트에서 10% FCS(PAA laboratories ltd), 2% HEPES(Sigma Aldrich), 1% L-글루타민(Gibco BRL), 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액(Gibco BRL), 0.1% β-머캅토에탄올(Gibco BRL), 3% 활성화된 비장 세포 배양 상등액 및 감마 조사된 돌연변이체 EL4 설치류 흉선종 세포($5x10^4$/웰)가 보충된 200 ㎕/웰 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)와 대략 웰당 3000개 세포의 밀도로 5% CO_2 대기, 37℃에서 7일간 배양하였다. 통틀어, 대략 1.2 x 10^8개 B 세포를 시료로 사용하였다.

[0352] 1.41차 스크리닝

[0353] B 세포 배양 상등액 중에 타우 결합 항체의 존재는 1.1 부분에 기재된 바와 같이 얻은 비오티닐화된 가용성 또는 불용성 타우로 코팅된 수퍼아비딘(Superavidin)™ 비드(Bangs laboratories)를 이용한 균일 형광 기반 결합 분석법(homogeneous fluorescence-based binding assay)을 이용하여 결정하였다. 생성된 타우는 가용성 및 불용성 분획 둘 다 있었다. 불용성 타우는 벤치형 에펜도르프 미니-스핀 플러스(mini-spin plus) 원심분리기를 이용하여 14,500 RPM에서 10분간 원심분리에 의해 혼합물로부터 제거하였다. 각 분획은 EZ-링크 설포-NHS-LC 비오티닐레이션(EZ-link sulfo-NHS-LC-Biotinylation) 키트를 사용하여 제조사의 설명에 따라 별도로 비오티닐화하였다. 가용성 비오티닐화 분획은 제바(Zeba) 스핀 탈염 컬럼을 이용하여 제조사의 설명에 따라 유리 비오틴으로부터 제거하였다. 불용성 분획은 에펜도르프 스핀 플러스 원심분리기에서 14,500 RPM에서 10분간 혼합물을 원심분리하여 유리 비오틴으로부터 제거하고, 타우 포함 펠렛을 회수하고 이를 1.5ml 인산 완충 식염수(PBS: phosphate buffered saline)에 재현탁하고 상기 과정을 5회 반복하였다. 분석은 가용성 또는 불용성 타우 형태에 결합을 보이는 상등액에 대해 스크리닝을 가능하게 하였다. 매트릭스 플레이트메이트(Matrix Platemate) 액체 처리기를 사용하여 바코드된 96웰 조직 배양 플레이트로부터 비드(10㎕/웰)에 고정된 가용성 또는 불용성 타우를 포함하는 바코드된 384웰 검정 벽 분석 플레이트로 10 ㎕의 상등액을 옮겼다. 염소 항-쥐 IgG Fcγ-특이적 Cy-5 접합체(Jackson)로 결합을 밝혔다. 플레이트는 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems) 8200 세포 검출 시스템에서 판독하였다.

[0354] 1.52차 스크리닝

[0355] 1차 스크리닝 후, 양성 상등액은 아비소 오닉스 히트-피킹 로봇(Aviso Onyx hit-picking robot)을 사용하여 96웰 바코드된 마스터 플레이트로 합하고 세포 배양 플레이트 내 B 세포는 -800℃에서 냉동하였다. 그 후 마스터 플레이트는 가용성 타우 분획에 대해 ELISA 분석으로 스크리닝하였다. 이는 더 엄격한 스크리닝에서 항체가 타우에 결합하는 능력을 결정하고 이들이 1차 스크리닝에서 비드에 결합하지 않고 있었는 지를 확인하기 위해 실시하였다. ELISA 분석을 위해 탄산 코팅 완충액(dH_2O + 0.16%Na_2CO_3 + 0.3% NaHCO3) 중 3㎍/ml로 384웰 맥시솝(Maxisorp) 플레이트(ThermoScientific/Nunc)에 가용성 타우를 코팅하였다. 플레이트는 PBS 중 1% w/v 카제인 + 1% w/v BSA로 차단한 후 10㎕/웰의 B 세포 배양 상등액과 인큐베이션하였다. 2차 HRP-접합된 염소 항-쥐 IgG Fc 항체(Stratech Scientific Ltd/ Jackson ImmunoResearch)를 플레이트에 첨가한 후, TMB 기질(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(EMD Millipore); 10㎕/웰)과의 결합을 가시화하였다. 광학 밀도는 바이오텍 시너지(BioTek Synergy) 2 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 630nM에서 측정하였다. 타우에 대해 특이성을 나타내는 B 세포 상등액을 가변 영역 회수를 위해 선택하였다.

[0356] 1.6가변 영역 회수

[0357] 선택된 관심 웰로부터 항체 가변 영역 유전자의 회수를 가능하게 하기 위해서, 이종 집단의 B 세포를 포함한 주어진 웰에서 항원 특이적 B 세포를 확인할 수 있도록 디콘볼루션 단계를 실시해야만 했다. 이는 형광 초점 방법(Clargo et al., 2014)을 이용하여 달성하였다. 간략하게, 양성 웰로부터의 면역글로불린-분비 B 세포를 비오티닐화된 가용성 타우로 코팅된 스트렙타비딘 비드(New England Biolabs) 및 1:1200 최종 희석된 염소 항-쥐 Fcɣ 단편-특이적 FITC 접합체(Jackson)와 혼합하였다. 37℃에서 1시간 동안 정지 상태로 인큐베이션한 후, 항원 특이적 B 세포는 그 B 세포를 둘러싸는 형광 할로의 존재로 인해 확인할 수 있었다. 이들 각각의 B 세포를 올림푸스(Olympus) 현미경을 사용하여 확인한 후 에펜도르프 현미 조작 장치로 찍어 PCR 튜브에 넣었다.

[0358] 항체 가변 영역 유전자는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 특이적 프라이머를 사용하여 역전사(RT: reverse transcription)-PCR에 의해 단일 세포로부터 회수하였다. 생쥐 ɣ1 IgG(VH) 또는 생쥐 카파(VL) 포유동물 발현 벡터에 가변 영역의 클로닝을 가능하게 하는 3' 및 5' 말단의 제한 부위를 포함시키는 네스티드(nested) 2° PCR을 이용하여 아비소 오닉스 액체 처리 로봇에서 2차례의 PCR을 실시하였다. 중쇄 및 경쇄 구조물은 펙틴(Fectin) 293(Invitrogen)을 사용하여 HEK-293 세포에 동시 형질감염시키고 재조합 항체를 125ml 엘렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크에서 30ml 부피로 발현하였다. 배양 5-7일 후에, 상등액을 수거하고 항체는 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0359] *실험 2 - 확인된 항체의 추가의 스크리닝*

[0360] 2.1PHF 제조

[0361] 쌍 나선 필라멘트(PHF)-타우 단백질은 알츠하이머병 또는 진행성 핵상 마비 또는 전두 측두엽 치매를 가진 공여자의 뇌 시료로부터 문헌(Ksiezak-Reding and Wall, Neurobiology of Aging 15, 11-19, 1994)에 공개된 프로토콜에 따라 정제하였다. 이전에 PHF-타우가 많다고 기재된 분획 8(상기 참고에서 슈크로오스 구배 원심분리 전에 조 PHF-Tau에 해당) 및 11(상기 참고에 기재된 분획 A2의 SDS 가용성 PHF에 해당)을 회수하고 실험 3의 바이아코어 분석 및 세포 분석에 사용하였다.

[0362] 2.2ELISA 스크리닝

[0363] ELISA 분석을 위해 384웰 맥시솝 플레이트(ThermoScientific/Nunc)에 가용성 타우를 탄산 코팅 완충액(dH_2O + 0.16%Na_2CO_3 + 0.3% $NaHCO_3$) 중 3㎍/ml로 캡쳐하였다. 플레이트는 PBS 중 1% w/v 카제인 + 1% w/v BSA로 차단한 후 10㎕/웰의 정제된 항체와 인큐베이션하였다. 2차 HRP 접합된 염소 항-생쥐 IgG Fc 항체(Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch)를 플레이트에 첨가한 후, HRP 기질 TMB 기질(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)(EMD Millipore; 10㎕/웰)과의 결합을 가시화하였다. 광학 밀도는 바이오텍 시너지 2 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 630nM에서 측정하였다.

[0364] 2.3바이아코어 스크리닝

[0365] 선택된 단클론 Fab 단편(mFab)은 키메라 mIgG1 항체로부터 피어스 피신(Pierce Ficin) 절단 키트(Cat.No. 44980, Thermo Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 제조하였다.

[0366] 280nm에서 흡광도를 이용하여 바이아코어 분석을 위한 Fab 저장 용액의 농도를 결정하였다. 알츠하이머병 환자

의 불용성 타우 단백질 제제(AD-PHF, 분획 11), HEK 유래 타우 이소형-2 단량체(아미노산 1-441), 및 이. 콜라이에서 발현된 이소형-2 단량체를 CM5 칩에 아민 고정하고, 항-타우 mFab의 결합을 바이아코어 T200 장치로 측정하였다. 10mM 아세트산(pH3.0)이 사용된 AD-PHF를 제외하고 GE 헬스케어(GE Healthcare)의 완충액 HBS-EP를 고정에 사용하였다. HBS-EP + 완충액에 300mM NaCl 및 1.25% CM-덱스트란(Sigma)을 보충하고 분석 완충액으로 사용하였다. 유세포(Fc: flow cell) 1을 기준으로 사용할 때, Fc2-4에 대해 하기 RU 값을 얻었다: 5μg/ml 이. 콜라이 타우는 44 RU, 5μg/ml HEK 타우는 56 RU, AD-PHF 물질의 1:20 희석된 용액은 500 RU. 10mM 글리신(pH1.7)의 2회의 60초 사이클을 재생에 이용하였다. 10㎕/분의 유속을 고정 및 재생에 사용하는 한편, 30㎕/분의 유속을 분석물 결합에 사용하였다. AD-PHF의 경우, EDC/NHS 및 EtoA 캡핑을 포함하여 500RU에 도달하도록 다회 수동 주입을 적용하였다. 해리를 위해 180s 또는 300s 동안 90㎕ 분석물 주입을 이용하여, mFA 시료 또는 완충 대조군에 대해 5회의 스타트-업 사이클 및 12 사이클을 적용하였다. 600nM 용액 + 완충액의 11회의 1:3 희석액을 각 mFab에 사용하였다. AB 1을 바이아코아 시험을 이용하여 분석하였다.

[0367] 결과는 표 1에 나타내며, 이는 서열 번호 7의 쥐 VL 및 서열 번호 8의 쥐 VH를 가진 mFab AB1이 이. 콜라이에서 발현된 단량체 타우 이소형-2, 포유동물 HEK293 세포로부터 유래한 단량체 타우 이소형-2, 및 알츠하이머병 환자로부터 단리된 타우 PHF 원섬유(응집된 타우)에 결합한다는 것을 보여준다. AB1 및 상기에 참조된 선행 기술 항체의 결합 프로파일은 표 3에 나타낸다.

[0368] <표 1>

Ab	타우 출처	Rmax (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)*
101.4 (이소형 대조군)	이.콜라이 이소형-2	nb	-	-	-
	HEK 이소형-2	nb	-	-	-
	AD-PHF	nb	-	-	-
AB1	이.콜라이 이소형-2	17	6.9E+04	1.1E-02	1.6E-07
	HEK 이소형-2	17	7.3E+04	1.1E-02	1.6E-07
		15	7.0E+04	1.1E-02	1.6E-07
	AD-PHF	15	6.6E+04	1.1E-02	1.7E-07
		7	5.2E+04	9.6E-03	1.9E-07
		6	4.4E+04	8.0E-03	1.8E-07

nb = 결합 없음

[0369] * 주요 결합 구성요소 값을 나타냄

[0370] *실험 3 - 확인된 항체의 추가의 특성화*

[0371] 3.1세포 분석

[0372] *타우 응집을 유도하는 타우 형질전환 생쥐로부터의 미정제 가용성 및 불용성 분획의 제조*

[0373] 본 실험을 위해, 인간 타우 P301S(Allen et al., 2002 J. Neurosci.22(21):9340-51), 및 P301L(Lewis et al., 2000 Nat Genet. (4):402-5. ; Gotz J, et al., 2001 J Biol Chem. 276(1):529-34)를 발현하는 형질전환 생쥐를 사용하였다.

[0374] 미정제 가용성 및 불용성 분획은 P301S 및 P301L 타우 형질전환 생쥐의 뇌로부터 분별 원심분리에 의해 제조하였다. 간략하게, P301S(척수 및 뇌간) 및 P301L(중뇌 및 뇌간) 타우 형질전환 생쥐의 뇌 조직은 얼음 위 1.5 ml 마이크로원심분리 튜브에서 소형 균질기 펠렛 페슬 모터(Pellet Pestle Motor)(Kontes)를 사용하여 냉각된 TBS(Fisher Scientific)에서 균질화하였다. 그 후, 균질화물(H)은 4,000g, 4℃에서 10분간 원심분리하여 조직 파편을 제거하였다. 생성된 상등액(S0)은 20,000g, 4℃에서 20분간 원심분리하여 미정제 가용성 분획(S1)에 해당하는 상등액을 제공하였다. 남아있는 펠렛(P1)은 TBS 중에 제조된 1% 사코실 용액 1 ml에 재현탁하고, 실온에서 1h 인큐베이션한 후, 100,000g, 4℃에서 1h 원심분리하였다. 상등액(S2)은 버렸다. 펠렛(P2)은 5 ml 냉각 TBS로 세척한 후, PBS에 재현탁하여 조 불용성 분획(P2')을 제공하였다.

[0375] *P301S 돌연변이를 가진 인간 타우를 발현하는 HEK-293-F 세포의 제조*

[0376] HEK-293-F 세포(Life Technologies)는 P301S 돌연변이를 가진 인간 타우 이소형 2를 발현하는 pcDNA3.1(+) 벡터로 293펙틴(Life Technologies)을 사용하여 제조사의 설명에 따라 형질감염시켰다. 감염된 세포 분액은 액체 질소에 보관하였다.

[0377] *타우 응집의 유도*

[0378] 도 3은 타우 치료 항체의 활성을 특성화하는데 사용되는 세포 응집 분석의 여러 단계를 예시한다. 제1일에, P301S 돌연변이를 가진 인간 타우 이소형 2(P301S-tau)를 발현하는 HEK-293-F 세포를 37℃에서 해동하고 10% 소 태아 혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 293 발현 배지(FFBS)(Life Technologies)에 희석하였다. 세포는 자동 세포 계수기(Vi-CELL XR, Beckman Coulter)를 사용하여 계수한 후, 폴리-D-리신으로 미리 코팅된 96웰 플레이트(Greiner Bio-One)에 웰당 25,000개의 생존 세포 농도로 플레이트하였다. 세포는 5% CO_2, 37℃에서 유지하였다. 같은 날, 알츠하이머병(AD-PHF, 분획 8) 또는 진행성 핵상 마비(PSP-PHF, 분획 8) 또는 전두 측두엽 치매(FTD-PHF, 분획 8) 환자의 초음파 처리된 인간 불용성 타우 또는 P301S 또는 P301L 형질전환 생쥐 뇌의 뇌 분획(타우 응집을 유도하는 시드로 사용됨)을 FFBS 배지 중에 항-타우 항체와 함께 또는 없이 4℃에서 서서히 흔들어주면서 하룻밤 인큐베이션하였다. AD-PHF, 분획 8은 AD 및 PSP 시료에 각각 80 ng/㎕ 및 60 ng/㎕로 사용하였다; 형질전환 생쥐 P301S 및 P301L의 가용성 뇌 분획은 각각 0.1 μg/㎕ 및 1.2 μg/㎕로 사용하였다. 제2일에, 시드 또는 시드/항체 혼합물을 세포에 24h 동안 적용하였다. 제3일에, 배양 배지를 항체를 포함하는 새로운 FFBS 배지로 교체하고, 세포를 배양물에서 추가 24h 동안 유지시켰다. 제4일에, 타우 응집은 균일 시간 분해 형광 에너지 전달(HTRF: homogenous time-resolved fluorescence energy transfer)에 기반한 타우 응집 분석 키트(Cisbio)를 사용하여 제조사의 설명에 따라 측정하였다. 형광도는 스펙트라맥스 패러다임(SpectraMax Paradigm)(Molecular Devices)으로 측정하였다. 응집은 항체 없이 외인성 원섬유 또는 분획에 의해 유도된 최대 응집 반응에 상응하는 대조군(-)에 대한 퍼센트 응집으로서 보고하였다.

[0379] 유도된 타우 응집에 대한 AB1 및 선행 기술의 기타 타우 결합 항체의 효과를 시험하였다. 선행 기술 항체는 WO2014/028777A2호의 IPN002, WO2013/096380A2호의 PT3, WO2010/142423A2호의 mAb2.10.3 및 WO 2014/008404호의 HJ8.5였다.

[0380] 상기 분석의 결과는 표 2 및 도 4에 요약한다.

[0381] 표 2는 서열 번호 7의 쥐 VL 및 서열 번호 8의 쥐 VH를 가진 AB1, 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄를 가진 타우 결합 항체(L14H17), 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 가진 타우 결합 항체(L14H18), 및 여러 뇌 추출물의 다양한 타우 시드에 대해 경쟁 항체의 역가(IC_{50}) 및 최대 효능(300 nM에서 I_{max})을 요약한다. 한편, 도 4는 인간 AD 환자의 인간 병리학적 원섬유를 이용한 세포 응집 분석에서 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄를 가진 타우 결합 항체(L14H17), 및 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 가진 타우 결합 항체(L14H18)의 효능을 나타낸다.

[0382] 3.2조직학적 분석

[0383] 서열 번호 7의 쥐 VL 및 서열 번호 8의 쥐 VH를 가진 AB1 및 선행 기술의 항체 IPN002, PT3 및 Mab2.10.3을 분석하고 AT8 면역염색(예를 들어 문헌(Braak & Braak, 1995, Neurobiol Aging; 16(3):271-8) 기재됨)을 이용하여 이전에 병리학적 타우 구조를 포함한다고 밝혀진 알츠하이머병 공여자로부터의 인간 해마의 동결 절편을 사용하여 최적 농도를 결정하였다. AB1 및 모든 선행 기술 항체는 101.4(음성 대조군 항체)를 제외하고 특이적이고 농도 의존적 면역 반응성을 나타냈다. 상기 데이터로부터, 항체의 단일, 최적 농도를 선택하여 일련의 6개의 인간 뇌 시료를 스크리닝하는데 사용하였다. 3개의 시료는 알츠하이머병 공여자 또는 높은 수준의 타우 병태(AT8 면역염색을 이용하여 검출된 양성 타우 병태)를 나타낸 초고령 공여자로부터 유래하였고, 타우 병태가 없는(AT8 면역염색을 이용하여 검출된 음성 타우 병태) 공여자로부터 3개의 시료가 유래하였다.

[0384] AB1 및 IPN002는 타우 양성 병태 시료 내에서 신경 섬유 매듭(신경 내 NFT), 신경 섬유 매듭(신경 외 NFT)의 세포질 염색, 신경반 유사 구조, 및 신경망 실의 특이적 면역염색을 나타냈다. 또한, 이들은 타우 음성 병태로 분류된 시료에서 면역염색을 나타냈다.

[0385] 실험 2 및 3의 결과는 하기 표 2 및 3에 요약한다.

[0386] <표 2>

	실험 3.1				
mAB	Tg 생쥐 (P301S) IC_{50}/I_{max}	Tg 생쥐 (P301L) IC_{50}/I_{max}	인간 AD 시료 IC_{50}/I_{max}	인간 PSP 시료	인간 FTD 시료
AB1	IC_{50} 2 nM I_{max}: 93%	IC_{50} 30 nM I_{max}: 89%	IC_{50} 4 nM I_{max}: 98%	시험되지 않음	IC_{50}: 3 nM I_{max}: 97%
L14H17	시험되지 않음	시험되지 않음	IC_{50} 11 nM I_{max}: 98%	시험되지 않음	시험되지 않음
L14H18	시험되지 않음	시험되지 않음	IC_{50} 12 nM I_{max}: 98%	IC_{50} 42 nM I_{max}: 100%	IC_{50}: 1 nM I_{max}: 99%
IPN002	IC_{50} ND I_{max}: 22%	IC_{50} 122 nM I_{max}: 73%	IC_{50} ND I_{max}: 19%	IC_{50} 207 nM I_{max}: 64%	IC_{50}: ND I_{max}: 50%
PT3	IC_{50} 350nM I_{max}: 56%	IC_{50} 26 nM I_{max}: 69%	IC_{50} 32 nM I_{max}: 69%	IC_{50} 47 nM I_{max}: 55%	IC_{50}: 1nM I_{max}: 80%
Mab2.10.3	IC_{50} ND I_{max}: 35%	IC_{50} ND I_{max}: 29%	IC_{50} ND I_{max}: 16%	IC_{50} ND I_{max}: 28%(*)	IC_{50}: ND I_{max}: 30%
HJ8.5	IC_{50}: ND I_{max}: 43%	시험되지 않음	IC_{50}: ND I_{max}: 46%	IC_{50}: 73 nM I_{max}: 79%	IC_{50}: ND I_{max}: 67%

[0387]

[0388] <표 3>

mAB	실험 3.2	실험 2.3	실험 3.3
AB1	AD[1] & ctrl.[2]	Monom.[3] & Agg.[4]	+AD, PSP, ctr
IPN002	AD[1] & ctrl.[2]	Monom. &	+ AD, PSP, ctr
		Agg.	
PT3	AD>ctr	Agg	약함
Mab2.10.3	AD>ctr	Agg	약함

[1]확인된 타우 병태의 시료에서 타우의 검출을 나타낸다.

[2]타우 음성 병태의 시료에서 타우의 검출을 나타낸다.

[3]이. 콜라이에서 발현된 단량체 타우 이소형-2 및 포유동물 HEK293 세포로부터 유래한 단량체 타우 이소형-2의 단량체 타우 형태를 나타낸다.

[4]알츠하이머병 환자로부터 단리된 타우 PHP 원섬유의 응집된 타우 형태를 나타낸다.

ND: 결정되지 않음.

(*) 100 nM에서 최대 효능

[0389]

[0390] 3.3웨스턴 블롯

[0391] 웨스턴 블롯을 화학발광 판독을 이용하여 실시하였다: AD, PSP 또는 대조군 인간으로부터 제조된 균질화물을 10% 폴리아크릴아미드 겔(레인당 20 μg 단백질)에 로딩하였다. 단백질은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate

Polyacrylamide gel electrophoresis: 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 의해 분리하고 PVDF(Polyvinylidene fluoride: 폴리비닐리덴 플루오라이드) 막에 전기이동시켰다. 막은 4% BSA(bovine serum albumin: 소 혈청 알부민)(TBST: 50 mM 트리스(Tris), 150 mM NaCl, 0.05% 트윈(Tween) 20 중에, pH는 HCl로 pH 7.6으로 조정)에서 차단하였다. 막은 1차 항체 또는 비면역 IgG 대조군 항체와 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하고, TBST에서 세척하고, 2차 항체(생쥐 항-비오틴)와 1시간 인큐베이션하고, TBST에서 세척하고, 3차 항체(항-생쥐 IgG 페록시다아제)와 1시간 인큐베이션하고, TBST에서 세척하고, ECL(enhanced chemiluminescence: 증강 화학발광)- 필름 노출을 이용하여 2 내지 5분간 현상하였다.

[0392] 별법으로, 웨스턴 블롯은 형광 판독을 이용하여 실시하였다: 타우 형질전환 생쥐로부터의 균질화물(H), 가용성(S1) 및 불용성(P2') 분획 또는 AD-PHF 분획 8은 NuPAGE® 노벡스(Novex) 4-12% 비스(Bis)-트리스 겔(Life Technologies)에 로딩한 후, SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 분리된 단백질은 트랜스-블롯® 터보™ 트랜스퍼 시스템(Trans-Blot® Turbo™ Transfer System)(Bio-Rad)을 이용하여 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막에 전기이동시켰다. 막은 오디세이(Odyssey)® 차단 완충액(LI-COR)으로 차단하고 0.1% 트윈-20을 포함하는 동일한 완충액에 희석된 다양한 1차 항체와 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. IR다이(IRDye) 2차 항체를 0.1% 트윈-20 및 0.01% SDS를 포함하는 오디세이® 차단 완충액에 희석하고(1:5,000; LI-COR) 실온에서 1 h 인큐베이션하고, 오디세이 CLx 영상화 시스템(LI-COR)을 이용하여 가시화하였다. VR4295(UCB Biopharma S.P.R.L), IPN002, PTR3 및 Mab2.10.3 항체는 0.1-1㎍/ml로 사용하였다. 항-타우 pS202/T205(AT8; Thermo Scientific), 항-타우 pThr231(AT180; Thermo Scientific) 및 항-전체 타우(HT7; Thermo Scientific)은 1:200으로 희석하여 사용하였다. 로딩을 대조하기 위해, 블롯은 β-액틴(1:2,000; Sigma)에 대해 분석하였다. 신호 세기는 이미지 스튜디오(Image Studio) 3.1(Li-COR)을 이용하여 정량하였다.

[0393] 서열 번호 7의 쥐 VL 및 서열 번호 8의 쥐 VH를 가진 AB1 및 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄 또는 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄를 가진 인간화 형태는 P301S 및 P301L 형질전환 생쥐 및 인간 AD, PSP 및 대조군 환자의 병리학적 타우에 결합한다. 세 가지 모든 항체가 웨스턴 블롯에 의해 유사한 결합 양상을 나타내고 AD 및 PSP에서 AD 및 PSP의 병리학적 타우에 해당하는 50과 75 kDa 사이에서 전형적인 밴드 양상을 나타낸다(도 5 참조). IPN002는 유사한 양상을 보였지만, PTR3 및 Mab2.10.3 항체는 P301S 및 P301L 형질전환 생쥐의 병리학적 타우에 결합하고 인간 AD에 약하게 결합하지만 웨스턴 블롯에서 상이한 양상을 나타낸다. 음성 대조군 101.4 및 A33 항체는 유의한 신호를 전혀 보이지 않았다. 액틴은 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0394] 3.4AB1의 에피토프의 정의

[0395] 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 가진 항체 AB1의 에피토프 결합은 항체의 Fab 단편을 이용한 이종핵 단일 양자 결맞음 핵자기 공명(HSQC NMR)을 이용하여 결정하였다.

[0396] *타우 이소형 4의 백본 지정*

[0397] NMR 시료는 전형적으로 5 mm 시게미(Shigemi) 튜브에 270 μM의 $^{2}H/^{13}C/^{15}N$ 표지된 인간 타우 이소형 4의 단백질 농도를 가지며 350 $\mu\ell$ 부피였다. 완충액 조건은 100 mM NaCl, 25 mM 인산나트륨 pH 6.4, 10 μM AEBSF, 0.02% NaN_3이었다. 모든 실험은 극저온으로 냉각된 프로브가 장착된 600 MHz 브루커(Bruker) DRX 또는 800 MHz 브루커 아방스(Avance) 분광 광도계에서 20℃에서 기록하였다. 단백질 내 잔기의 백본 NMR 신호 사이에서 순서 연결, $H_N(i)$-N(i)-N(i±1)은 증가당 8회 스캔 및 1.5 s 이완 지연으로 ^{15}N, ^{15}N 및 ^{1}H 크기에서 각각 1640, 1640 및 7000 Hz의 스펙트럼 너비 및 120 (F1), 120 (F2) 및 150 (F3) ms의 획득 시간으로 기록된 3D (H)N(CA)NNH 실험(Weisemann et al., 1993 3D Triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and 15N resonances in 15N- and 13C-labelled proteins. J. Biomol. NMR 3. doi:10.1007/BF00242479)을 이용하여 만들었다. 3.5일의 총 획득 시간을 제공하는 13 %(40000 하이퍼-복합체 지점 중에서 5200)의 샘플링 밀도로 비-균일한 샘플링을 이용하였다. 순서 연결을 확인하고 잔기 유형은 HNCA(Grzesiek and Bax, 1992 Improved 3D triple resonance NMR techniques applied to 31 kDa protein. J. Magn, Reson. 96, 432-440. doi:10.1016/0022-2364(92)90099-S) 및 HNCACB(Wittekind and Mueller, 1993 HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. J. Magn. Reson. Ser. B 101, 201-205. doi:10.1006/jmrb.1993.1033) 실험을 이용하여 확인하였다. HNCA 실험은 ^{15}N, ^{13}C 및 ^{1}H 크기에서 각각(증가당 8회 스캔, 1.5 s 이완 지연, 19시간의 총 획득 시간) 1640, 4830 및 6600 Hz의 스펙트럼 너비 및 24 (F1), 6.6 (F2) 및 80 (F3) ms의 획득 시간으로 기록

된 반면, HNCACB는 ^{13}C, ^{15}N 및 ^{1}H 크기에서 각각(증가당 8회 스캔, 1.5 s 이완 지연, 1.5일의 총 획득 시간) 9800, 1640 및 6600 Hz의 스펙트럼 너비 및 6 (F1), 24 (F2) 및 80 (F3) ms의 획득 시간을 기록하였다. NMR 스펙트럼은 하버드 반복 소프트 임계 처리법(Harvard iterative soft thresholding method)(Hyberts et al., 2012)을 이용하여 실시된 NUS 데이터를 재구성하여 NMR파이프(NMRPipe)(Delaglio et al., 1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR 6, 277-93)를 이용하여 처리하였다. 데이터 분석은 스파키(Sparky)(Goddard and Kneller, , D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco)를 이용하여 수행하여, 결과적으로 잔기의 96%에 해당하는 304개 잔기의 아미드 양성자 및 질소 공명을 지정하였다(프롤린 잔기 및 N-말단 글리신 제외).

[0398] *AB1의 결합 부위 맵핑:*

[0399] AB1의 결합 부위의 맵핑은 80 내지 150 μM 농도 범위에 있으면서 10% 몰의 과량의 상응하는 AB1 Fab를 포함하는 $^{2}H/^{13}C/^{15}N$ 표지된 인간 타우 이소형 4의 시료를 이용하여 수행하였다. 시료는 타우의 백본 지정에 대해 상기에 기재된 바와 동일한 완충액에 제조하였다. ^{1}H, ^{15}N 및 ^{13}C 화학적 이동 변화는 타우/Fab 복합체 시료뿐 아니라 유리 타우의 시료(상기에 기재된 바와 같은)에 대해 기록된 HNCO(Grzesiek and Bax, 1992 Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440. doi:10.1016/0022-2364(92)90099-S) 스펙트럼으로부터 결정하였다. HNCO 실험은 총 획득 시간을 60시간에서 15-21시간으로 감소시키는 25-35%의 샘플링 밀도를 사용하여 이용되는 NUS로 ^{15}N, ^{13}C 및 ^{1}H 크기(증가당 8회 스캔, 1.8 s 이완 지연)에서 각각 2190, 2210 및 8800 Hz의 스펙트럼 너비 및 25 (F1), 29 (F2) 및 80 (F3) ms의 획득 시간으로 기록되었다. 화학적 이동 변화는 카보닐 화학적 이동을 포함하는 화학적 이동 변화(Δδ)의 합을 계산하는데 사용되는 식의 변형을 제외하고 필수적으로 이전에 기재된 바와 같이(Veverka et al., 2008 Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. Oncogene 27, 585-95. doi:10.1038/sj.onc.1210693), 최소 이동 접근법(Williamson et al., 1997 Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. Biochemistry 36, 13882-9. doi:10.1021/bi9712091), 결과적으로 하기식을 이용하여 분석하였다:

[0400] $$\Delta\delta = \frac{\sqrt{(\Delta\delta HN)^2 + (\Delta\delta N\alpha N)^2 + (\Delta\delta C\alpha C)^2}}{3}$$

[0401] 상기 식에서, $\Delta\delta_{HN}$, $\Delta\delta_{N}$ 및 $\Delta\delta_{C}$는 각각 ^{1}H, ^{15}N 및 ^{13}C 화학적 이동에서 차이이다. δN 및 δC는 각각 환산 계수 0.2 및 0.35에 해당하며, 아미드 양성자, 질소 및 카보닐 화학적 이동의 화학적 이동 범위에서 차이를 설명하는데 사용된다.

[0402] 타우에서 Fab 결합 부위(에피토프)를 확인하기 위해서, 합해진 최소 이동 vs 단백질 서열의 히스토그램을 이용하여 유의하게 방해받은 신호를 포함하는 타우 영역을 나타냈다. 각각의 아미노산에 대해 합해진 화학적 이동 변화의 크기가 모든 아미노산에 대해 합해진 화학적 이동 변화의 평균의 역치 값 + 그 평균의 1 표준편차를 초과할 경우, 이들 잔기는 Fab 결합 부위 내 가능한 접촉 잔기로서 더 평가하기 위해 선택하였다.

[0403] 유의하게 방해받은 잔기는 최소 이동이 적어도 계산된 모든 이동의 평균 + 1 표준편차보다 더 큰 것들로서 확인되었다. 4개의 상이한 역치를 적용하여 Fab에 의해 결합된 잔기를 확인하였다. 결합 부위와 관련된 잔기는 하기로서 엄격도를 증가시키면서 점수를 매긴다: 최소 이동이 계산된 모든 이동의 평균 + 1 표준편차를 초과하는(>0.009817인) 것들; 최소 이동이 계산된 모든 이동의 평균 + 2 표준편차를 초과하는(>0.016913인) 것들; 최소 이동이 계산된 모든 이동의 평균 + 3 표준편차를 초과하는(>0.024009인) 것들; 최소 이동이 계산된 모든 이동의 평균 + 4 표준편차를 초과하는(>0.031105인) 것들. 이 분석에서, 프롤린 잔기는 이들이 아미드 양성자를 포함하는 것으로 확인될 수 없다.

[0404] 따라서 AB1 Fab의 에피토프는 하기로서 엄격도를 증가시키면서 정의한다: 최소 이동이 계산된 모든 이동의 평균 + 1 표준편차: A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244, S237, V248, L243, M250, R242; 계산된 모든 이동의 평균 + 2 표준편차: A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244, S237; 계산된 모든 이동의 평균 + 3 표준편차: A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244; 최소 이동이 계산된 모든 이동의 평균

+ 4 표준편차: A246, A239, S241, T245, S238.

[0405] NCBI 참조 서열 NP_005901.2(서열 번호 35)에 사용된 아미노산 넘버링을 이용하여, AB1은 적어도 하기 잔기에 결합한다고 확인되었다(평균 + 3 SD): A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244. 항체는 하기 잔기 모두에 결합할 수 있다(평균 + 1 SD): A246, A239, S241, T245, S238, S235, K240, Q244, S237, V248, L243, M250, R242.

[0406] *실험 4 - 확인된 항체의 인간화*

[0407] 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 가진 항체 AB1은 쥐 항체 V-영역의 CDR을 인간 생식세포 계열 항체 V-영역 골격에 이식하여 인간화하였다.

[0408] 항체의 활성을 회복하기 위해서, 쥐 또는 토끼 V-영역의 많은 골격 잔기도 인간화 서열에 포함시켰다. 이들 잔기는 WO91/09967호(Adair et al. (1991), Humanised antibodies)에 개략적으로 설명된 프로토콜을 이용하여 선택하였다. 인간 생식세포 계열(수용체(acceptor)) V-영역 서열과 쥐 항체(공여체) V-영역 서열의 정렬은 설계된 인간화 서열과 함께, 도 1, 및 2에 나타낸다. 공여체로부터 수용체 서열로 이식된 CDR은 결합된 코티아/카밧 정의가 이용된 CDR-H1(WO91/09967호(Adair et al., 1991 Humanised antiboies) 참조)을 제외하고 카밧(Kabat et al., 1987) 에 의해 정의된다.

[0409] 인간 V-영역 IGKV2-29 + JK2 J-영역(IMGT, http://www.imgt.org/)(서열 번호 31)은 항체 AB1 경쇄 CDR의 수용체로서 선택하였다. 이식체 gVL3_AB1(서열 번호 14)의 경쇄 골격 잔기는 모두 인간 생식세포 계열 유전자이다.

[0410] 인간 V-영역 IGHV4-59 + JH3 J-영역(IMGT, http://www.imgt.org/)(서열 번호 32)은 항체 AB1의 중쇄 CDR의 수용체로서 선택하였다. 이식체 gVH17_AB1(서열 번호 17) 및 gVH18_AB1(서열 번호 18)에서 중쇄 골격 잔기는 공여체 잔기 메티오닌(M48)이 포함된 잔기 48(카밧 넘버링)을 제외하고는 모두 인간 생식세포 계열 유전자이다. 잔기 M48의 보유는 인간화 항체의 최대 역가를 가능하게 하였다. 인간 골격의 위치 1의 글루타민 잔기는 글루탐산(E1)으로 대체하여 동종의 산물의 발현 및 정제를 제공하였다: 항체 및 항체 단편의 N-말단에서 글루타민의 피로글루타메이트로 의 전환은 널리 보고되어 있다. 서열 번호 37 및 38의 CDRH2는 각각 이식체 gVH17_AB1 및 gVH18_AB1에서 돌연변이시켜 가능한 탈아미드화 부위를 변형하였다.

[0411] 항체의 많은 변이 중쇄 및 경쇄 V-영역 서열을 코딩하는 유전자를 DNA2.0 Inc.에 의한 자동 합성 접근법에 의해 설계하고 제작하였다. 중쇄 및 경쇄 V-영역의 추가 변이체는 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이 유발법에 의해 VH 및 VK 유전자를 변형하여 생성하였으며, 이는 일부 경우에 가능한 탈아미드화 부위를 변형하는 CDR 내 돌연변이를 포함한다. 포유동물 세포에서 일시적인 발현을 위해, 인간화 경쇄 V-영역 유전자는 인간 카파쇄 불변 영역(Km3 동종이인자형)을 코딩하는 DNA를 포함하는 UCB 인간 경쇄 발현 벡터 pMhCK에 또한 클로닝하였다. 인간화 중쇄 V-영역 유전자는 힌지 안정화 돌연변이 S241P 돌연변이를 가진 인간 감마-4 중쇄 불변 영역을 코딩하는 DNA를 포함하는 UCB 인간 감마-4 중쇄 발현 벡터 pMhγ4P FL에 클로닝하였다(Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30(1):105-8). 별법으로, 인간화 VH 유전자는 인간 감마-1 중쇄 불변 영역(G1m17, 1 동종이인자형)을 코딩하는 DNA를 포함하는 UCB 인간 감마-1 중쇄 발현 벡터 pMhγ1FL에 클로닝하였다. 인간화 항체의 1가 결합 반응 속도론을 평가하기 위해서, 인간화 VH 유전자를 10개 히스티딘 잔기의 C-말단 태그를 가진 인간 감마-1 CH1-힌지 도메인을 코딩하는 DNA를 포함하는 UCB 인간 Fab-HIS 발현 벡터 pMhFab10HIS에 클로닝하였다: 히스티딘 태그는 친화도 크로마토그래피에 의해 발현된 Fab의 정제를 용이하게 한다. 생성된 중쇄 및 경쇄 벡터의 HEK293 현탁 세포로의 동시 형질감염은 293 펙틴(12347-019 Invitrogen)을 사용하여 달성하고, 인간 IgG4P, IgG1 또는 Fab-HIS 형식의 인간화 재조합 항체의 발현을 제공하였다.

[0412] 변이 인간화 항체 쇄, 및 이들의 조합을 발현하고 부모 항체에 비교한 이들의 효능, 이들의 생물물리학적 특성 및 하류 공정에 대한 적합성을 평가하였다.

[0413] 포유동물 세포에서 인간화 재조합 항체의 안정한 발현을 위해, 인간화 경쇄 V-영역 유전자를 인간 C-카파 불변 영역(Km3 동종이인자형)을 코딩하는 DNA 서열에 연결하여 인접한 경쇄 유전자를 생성하였다. 인간화 중쇄 유전자는 인간 감마-4P 중쇄 불변 영역, 또는 인간 감마-1 중쇄 불변 영역(G1m17, 1 동종이인자형)을 코딩하는 DNA에 연결하여 인접한 중쇄 유전자를 생성하였다. 중쇄 및 경쇄 유전자는 포유동물 발현 벡터에 클로닝하였다.

[0414] *실험 5 - 열 안정성 측정*

[0415] 풀림의 융점(Tm) 또는 중점의 온도는 서모플루오르(Thermofluor) 분석을 이용하여 결정하였다. 이 방법에서, 형광 염료 사이프로(SYPRO) 오렌지를 사용하여 온도가 증가하면서 노출되는 소수성 영역에의 결합에 의한 단백질

풀림 과정을 모니터하였다.

[0416] 반응 혼합물은 5000X 저장용액으로부터 PBS로 희석된 5 ㎕의 30x 사이프로® 오렌지 염료(Invitrogen), 및 0.12 mg/ml(PBS pH 7.4 중)의 45 ㎕ 시료를 포함하였다. 10 ㎕의 혼합물을 384 PCR 광학 웰 플레이트에 4개씩 중복하여 분배하고 7900HT 패스트 리얼-타임 PCR 시스템((Fast Real-Time PCR System)(Applied Biosystems)에서 PCR을 실시하였다. PCR 시스템 가열 장치는 1.1 ℃/분의 증가 속도로 20℃에서 99℃로 설정하였다. 전하가 결합된 장치는 웰에서 형광 변화를 모니터하였다. 세기 증가를 플롯팅하고, 기울기(들)의 변곡점을 이용하여 하기에 기재되 바와 같이 Tm을 계산하였다.

[0417] 이소형 IgG1(서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 54의 중쇄(L14/H54), 또는 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 55의 중쇄(L14/H55)) 및 IgG4(서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 17의 중쇄(L14/H17), 또는 서열 번호 14의 경쇄 및 서열 번호 18의 중쇄(L14/H18))에 대해 서열 번호 14의 경쇄, 및 서열 번호 12 또는 서열 번호 13의 중쇄를 포함하는 항체의 분석은 하기 도 6 및 표 3에 나타낸다. 2개의 풀림 도메인이 두 가지 이소형 모두에서 관찰되었다. 첫째는 CH2 도메인의 Tm에 기인할 수 있다; IgG1 이소형 경우 이는 문헌(Garber E, Demarest SJ. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 13;355(3):751-7)에 부합하여 IgG4 형식보다 더 높다(더 안정하다)고 확인되었다. 둘째 풀림 도메인은 Fab 풀림 도메인과 CH3 도메인의 Tm의 평균에 기인할 수 있다.

[0418]

항체	Fab/CH3 (평균)	Fab/CH3 (SD)	CH2 (평균)	CH2 (SD)
L14/H17	80.9 ℃	0.3 ℃	64.5 ℃	0.3 ℃
L14/H18	81.4 ℃	0.7 ℃	64.5 ℃	0.5 ℃
L14/H54	82.8 ℃	0.2 ℃	68.8 ℃	0.2 ℃
L14/H55	83 ℃	0.1 ℃	68.8 ℃	0.2 ℃

[0419] *실험 6 - X선 결정학*

[0420] 서열 14의 경쇄와 서열 번호 18의 중쇄(L14H18)를 가진 타우 결합 항체와 서열 번호 35에 정의된 타우의 잔기 234 내지 250으로 이루어진 펩티드(펩티드, 서열 번호에 정의된 N-아세틸-KSPSSAKSRLQTAPVPM-아미드) 사이의 상호작용은 x선 결정학에 의해 연구하였다.

[0421] L14H18 Fab와 복합체를 형성한 타우 펩티드의 결정화, 구조 결정 및 결정 구조의 정밀화

[0422] 결정화

[0423] L14H18 Fab/타우 펩티드 234-250 복합체는 MRC 플레이트 내 30% w/v 폴리에틸렌 글리콜 4000, 0.1M HEPES, pH 7.5, 0.2 M 염화칼슘 탈수물을 포함하는 저장소에 대해 증기 상을 통한 시팅 드롭(sitting drop)으로부터 1-2주간 결정화하였다.

[0424] 드롭은 2몰 과량의 타우 펩티드 234-250을 포함한 11mg/ml의 400 nl의 L14H18 Fab 단백질 및 400 nl의 저장소 용액을 포함하였다.

[0425] 결정은 비대칭 단위의 2카피의 L14H18 Fab/타우 펩티드 234-250을 가지며 공간군 P 31 2 1에 속한다.

[0426] X선 회절 수집

[0427] 본 발명자들은 단일 L14H18 Fab/타우 펩티드 234-250 결정을 통해 x선 회절 데이터를 수집하였다. 결정은 30% 폴리에틸렌 글리콜 4000, 0.2M 염화칼슘, 0.1M HEPES 완충액 pH 7.5 및 10% 에틸렌 글리콜을 포함하는 동결보호 용액을 신속하게 통과시킨 후, 리소 루프에 현탁하고 액체 질소 하에서 급속 냉동하였다. 회절 데이터는 영국 옥스퍼드셔주 디드코트 소재의 다이아몬드 싱크로트론(Diamond synchrotron)에서 I04-1 빔라인 스테이션에서 필라티스(Pilatis) 6M에 수집하였다. 단색광 x선 빔의 파장은 0.92819Å였다. 역격자 공간은 ψ 고니오스타트(goniostat) 축 주변에 0.2° 진동 단계에서 샘플링하였다. 싱크로트론 시설로부터 제공된 처리 데이터 XIA 파일을 구조 결정에 사용하였다.

[0428] 구조 결정

[0429] Fab 위치는 PDB 코드 4HIX를 가진 Fab를 이용하여 분자 대체 프로그램 페이저(Phaser)(Read,RJ, Acta Cryst.

D57, 1373-1382 (2001))에 의해 지정하였다. 매튜(Matthews) 계수는 단위 셀에서 100 kDa의 가능한 분자량을 나타냈으며, 솔루션은 비대칭 단위의 2카피의 Fab를 발견하였다.

[0430] 모델 구축 및 정밀화

[0431] 2Fo-Fc 및 Fo-Fc 전자 밀도 맵을 이용하여, Fab 분자 내 잔기를 L14H18 Fab의 서열에 따라 전자 밀도 맵에 의해 안내받은 위치로 대체하였다.

[0432] Fab의 둘째 카피에 대한 Fab 쇄 C 및 D는 첫째 카피(쇄 H 및 L)보다 더 선명한 밀도를 보였다.

[0433] 추가의 전자 밀도가 한 카피의 Fab(쇄 C 및 D)의 CDR에 인접하게 보였다. 이는 펩티드 234-250의 서열의 일부로 설계될 수 있는 나선 구조를 가진 펩티드 쇄를 나타냈다. 그러면 공지된 서열에 따라 설계된 아르기닌 및 리신 잔기에 대한 선명한 밀도를 이용하여 펩티드를 정렬하였다. 추가의 일련의 모델 구축 및 정밀화는 펩티드 영역에 대한 밀도를 개선하였고 다른 카피의 Fab(쇄 H 및 L)에 결합된 펩티드에 대해 약간의 밀도를 보였다.

[0434] 모델 구축을 위해 컴퓨터 프로그램 쿠트(Coot)(Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowton K. Acta Crystallography D Biol Crystallography, 2010 Apr; 66 (Pt 4): 486 - 501)를 이용하였다. 정밀화는 프로그램 REFMAC(Murshudov G.N., Skubak P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2011 Apr; 67 (Pt 4): 355-67)을 이용하여 수행하였다.

[0435] L14H18 Fab/타우 펩티드 234-250 복합체의 모델은 서열 번호 35에 정의된 타우 펩티드의 잔기 234-244, 중쇄의 잔기 2-219 및 경쇄의 1-219로 이루어진다.

[0436] 36483 반사에 대해 모델의 R 인자는 0.234이고 R-free는 0,291이다. 표준 기하로부터 rms 편차는 결합 길이 경우 0.0145이고 결합 각 경우 1.93° 이다.

[0437] 에피토프

[0438] 항체 L14H18과 타우 펩티드, N-아세틸-KSPSSAKSRLQTAPVPM-아미드(인간 타우 이소형 2 서열 234 내지 250 기반) 사이의 상호작용은 펩티드와 인큐베이션된 L14H18 Fab 단편으로부터 제조된 공복합체를 이용한 x선 결정학에 의해 연구하였다. 결과로 생성된 구조는 L14H18 Fab와 타우 펩티드 사이의 주요 접촉 부위를 밝혔고 항체의 CDR 루프와 타우 단백질의 잔기 235-244에 상응하는 펩티드 잔기 SPSSAKSRLQ에 주로 모여있는 것으로 확인되었다. 서열 번호 35에 나타낸 넘버링 서열에 따르면, 5.0A 내에 L14H18 Fab의 CDR 영역과 가장 밀접하게 상호작용하는 잔기는 S235, P236, S237, S238, A239, K240, R242, L243, Q244 및 T245이다.

도면

도면1

VL_AB1

DIVMTQTPVSLSVTLGDQASISCRSSQSLEYSDGYTYLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS
NRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHNPYTFGAGTKLEIK

IGKV2_29

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVS
SRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLPYTFGQGTKLEIK

gVL3_AB1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLEYSDGYTYLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQATHNPYTFGQGTKLEIK

도면2

VH_AB1

EVKLEESGPGLMQPSETLSLTCTVSGFSLTSNDIAWVRQPLGKGLVWMGTIWTDGSTNYN
SAVQSRLSISRDTSKSQFFLKMNSLQPEDTGTYYCARHRLYYGAFDYWGQGTMVTVSS

IGHV4-59

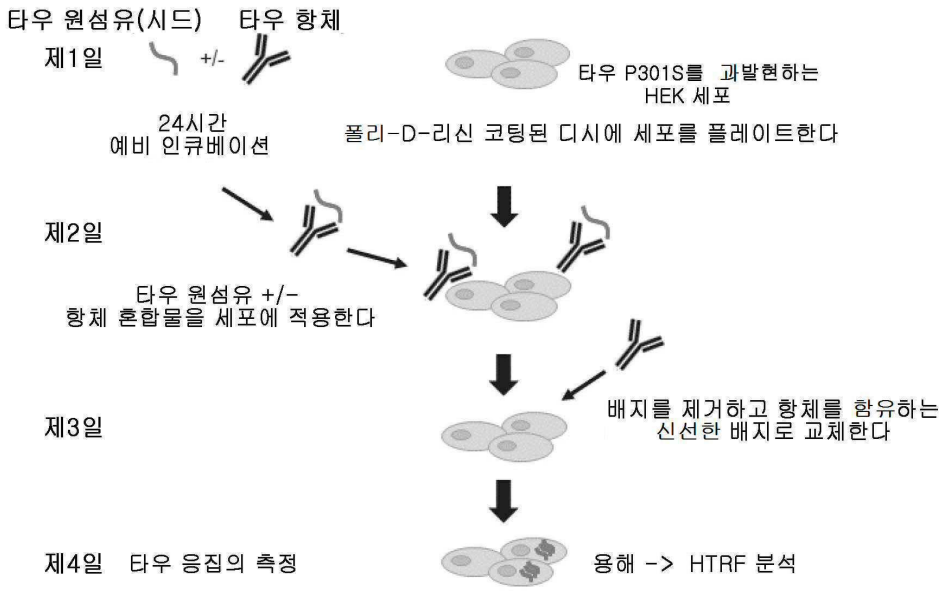
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYN
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR-----DAFDVWGQGTMVTVSS
|

gVH17_AB1

EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSNDIAWIRQPPGKGLEWMGTIWTDGSTNYN
AAVQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHRLYYGAFDYWGQGTMVTVSS

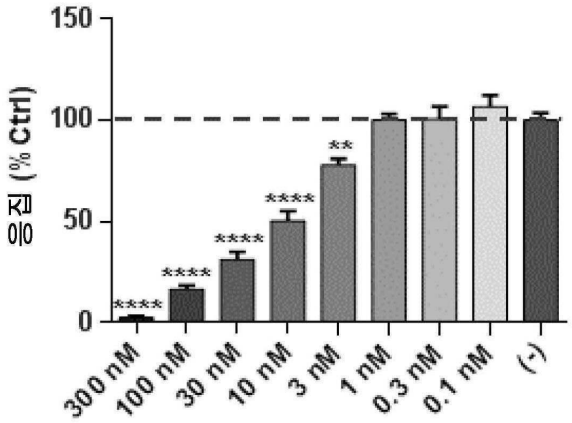
gVH18_AB1
EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSNDIAWIRQPPGKGLEWMGTIWTDGSTNYN
TAVQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHRLYYGAFDYWGQGTMVTVSS

도면3

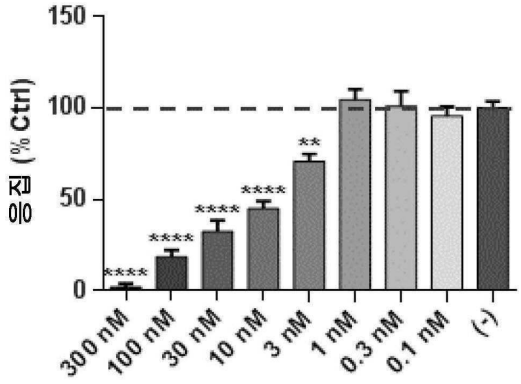


도면4

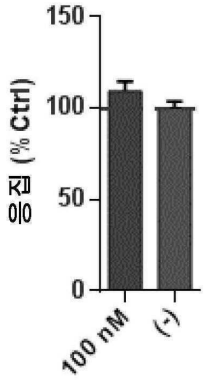
A


150
100
50
0
응집 (% Ctrl)
****
****
****
****
**
300 nM
100 nM
30 nM
10 nM
3 nM
1 nM
0.3 nM
0.1 nM
(-)

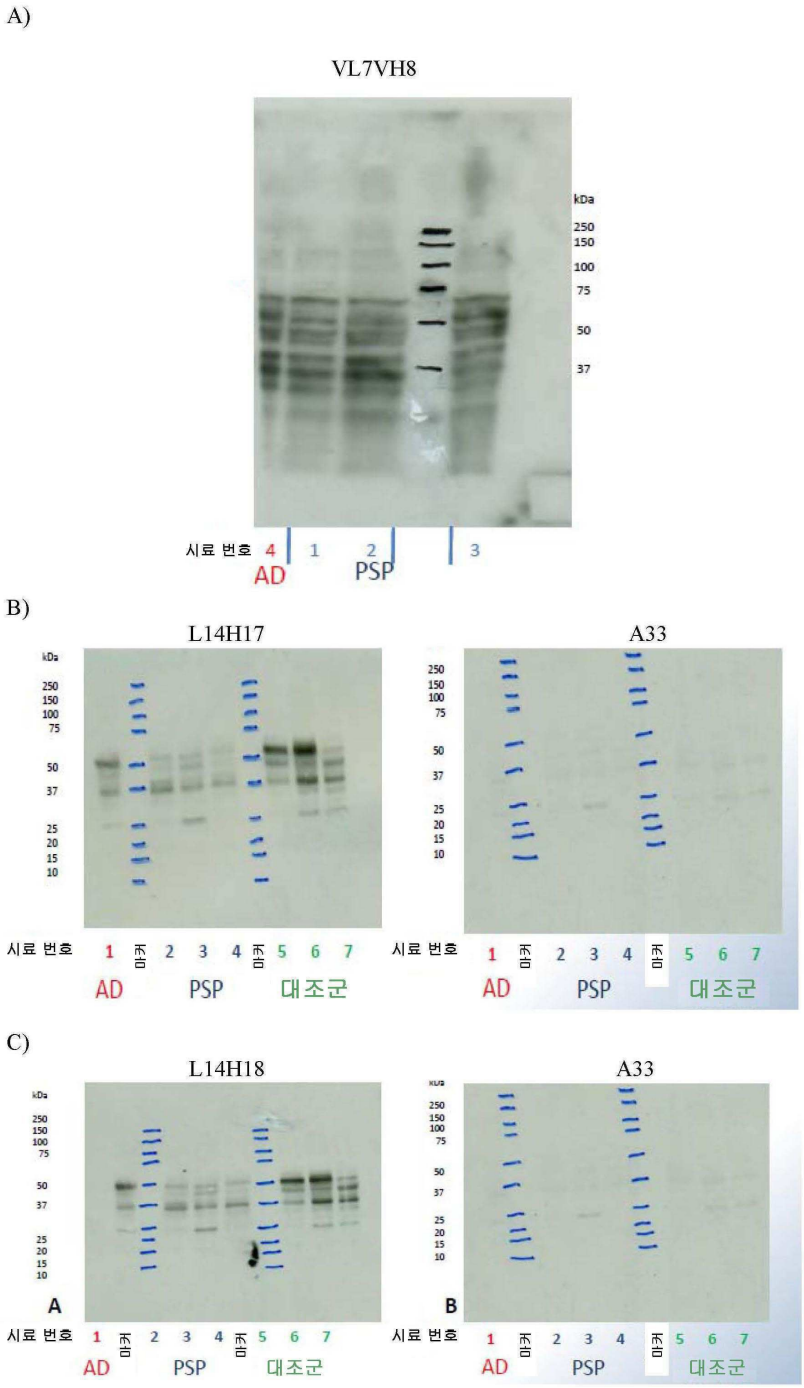
B


150
100
50
0
응집 (% Ctrl)
****
****
****
****
**
300 nM
100 nM
30 nM
10 nM
3 nM
1 nM
0.3 nM
0.1 nM
(-)

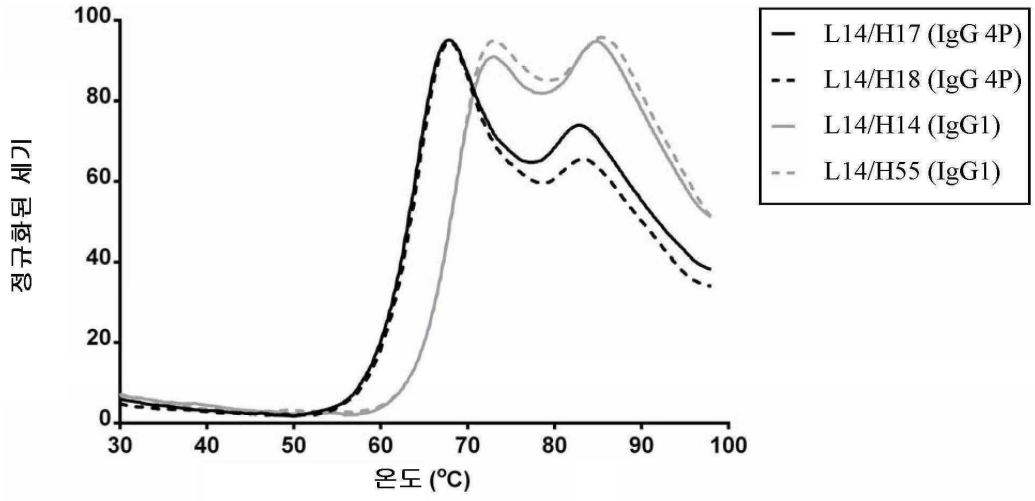
C


150
100
50
0
응집 (% Ctrl)
100 nM
(-)

도면5


A)
VL7VH8
kDa
250
150
100
75
50
37
시료 번호 4 1 2 3
AD
PSP
B)
L14H17
A33
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
시료 번호 1 마커 2 3 4 마커 5 6 7
AD PSP 대조군
C)
L14H18
A33
A
B
시료 번호 1 마커 2 3 4 마커 5 6 7
AD PSP 대조군

도면6


100
80
60
40
20
0
30
40
50
60
70
80
90
100
정규화된 세기
온도 (°C)
L14/H17 (IgG 4P)
L14/H18 (IgG 4P)
L14/H14 (IgG1)
L14/H55 (IgG1)

도면7a

이. 콜라이 발현을 위한 인간 타우 이소형 2를 코딩하는 DNA 구조물 (pET 6His TEV-hTau iso 2 (1-441)) (서열 번호39)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTC
GCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTC
AACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCA
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACA
TTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGC
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATT
CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
ACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTT
GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACA
CCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
CTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGC
GATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
GCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAG
GGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACT
GATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGA
CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
GCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGA
CTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCA
GTCGCTTCACGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCC
TGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCC

도면7b

GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCC
AGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA
GTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCGAGATCC
CGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
CAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAG
AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAAC
GGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCG
CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
TGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCT
TCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACG
CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCT
CCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
TCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGG
ATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA
CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
GCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTT
CCCGCGTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCG
GCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCC
TTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAG
GAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGC
CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAG
GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
CGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTC
TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT***ATGGGCTCAAGCCACCACCACCACCACC***
ACAGCAGCGGCGAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGCAGAACCACGTCAAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACGCGGGCACTTACGGTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGCTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGCGACACCGATGCTGGCTTGAAAGAGTCGCCGCTGCAGACTCCGACCGAGGATGGCAGCGAAG
AGCCGGGCAGCGAGACTAGCGATGCGAAGTCGACCCCGACCGCCGAGGACGTTACCGCACCGCTGGTC
GACGAGGGTGCTCCGGGTAAACAGGCGGCTGCACAGCCGCACACGGAGATTCCGGAAGGCACCACCGC
AGAAGAGGCGGGTATCGGCGACACTCCGTCCCTGGAAGATGAGGCAGCCGGTCATGTCACGCAGGCGC
GTATGGTGAGCAAGAGCAAAGATGGTACGGGTAGCGACGACAAGAAGGCGAAGGGCGCAGATGGCAAG
ACCAAAATTGCGACGCCGCGTGGTGCGGCACCGCCAGGCCAGAAAGGTCAGGCGAATGCCACGCGCAT
CCCGGCAAAGACGCCACCGGCTCCGAAAACCCCGCCTTCCAGCGGTGAACCGCCGAAATCCGGTGACC
GCAGCGGTTATAGCTCTCCGGGTAGCCCGGGTACCCCAGGCAGCCGTAGCCGCACCCCGAGCCTGCCG
ACCCCACCGACCCGCGAGCCGAAGAAAGTGGCGGTGGTTCGTACGCCGCCAAAAAGCCCGAGCTCTGC
CAAGAGCCGTCTGCAAACCGCTCCTGTGCCGATGCCGGACCTGAAGAACGTTAAGTCTAAAATCGGTA
GCACCGAAAATCTGAAGCACCAACCTGGTGGCGGTAAGGTTCAAATCATCAACAAAAAGCTGGACTTG
AGCAATGTACAAAGCAAGTGTGGTAGCAAGGACAATATCAAACACGTCCCGGGTGGTGGTTCCGTCCA
GATTGTGTACAAACCGGTGGACCTGAGCAAGGTTACCAGCAAATGCGGTTCCCTGGGTAACATCCATC
ATAAACCGGGTGGCGGCCAAGTTGAGGTCAAGAGCGAGAAACTGGACTTCAAAGACCGCGTTCAGTCC
AAAATCGGTTCTCTGGACAACATTACGCACGTGCCTGGTGGTGGCAACAAGAAGATTGAAACCCATAA
ACTGACGTTTCGTGAAAATGCGAAGGCGAAAACCGACCACGGCGCAGAGATTGTCTACAAAAGCCCGG
TGGTGAGCGGTGATACCAGCCCGCGTCACCTGTCCAACGTCAGCAGCACGGGCAGCATTGATATGGTG
GATAGCCCGCAGTTGGCTACGCTGGCCGATGAGGTTAGCGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTGTGACT
CGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTG
CTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
CTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

도면8

A)

6His 태그-TEV 부위를 포함하는 pET 6His-TEV-hTau iso2 (1-441)의 발현된 서열 (서열 번호 40)

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGL
KESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEA
GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANAT
RIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTP
PKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
NIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLD
NITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVD
SPQLATLADEVSASLAKQGL

B)

TEV 절단 후 pET 6His-TEV-hTau iso2 (1-441)의 최종 발현 서열 (서열 번호 41)

GSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPGSE
TSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA
RMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEP
PKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMP
DLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
LSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQG
L

도면9a

이. 콜라이 발현을 위한 인간 타우 이소형 3을 코딩하는 DNA 구조물 (pET 6His TEV-hTau iso 3 (1-383)) (서열 번호42)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTC
GCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTC
AACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCA
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACA
TTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGC
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATT
CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
ACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTT
GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACA
CCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
CTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGC
GATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
GCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAG
GGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACT
GATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGA
CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
GCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGA
CTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCA
GTCGCTTCACGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCC
TGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCC
GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCC
AGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA

도면9b

GTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCGAGATCC
CGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
CAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAG
AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAAC
GGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCG
CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
TGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCT
TCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACG
CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCT
CCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
TCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGG
ATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA
CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
GCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTT
CCCGCGTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCG
GCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCC
TTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAG
GAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGC
CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAG
GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
CGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTC
TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT***ATGGGCTCAAGCCACCACCACCACCACC***
ACAGCAGCGGCGAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGCAGAACCACGTCAAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACGCGGGCACTTACGGTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGCTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGCGACACCGATGCTGGCTTGAAAGCAGAAGAGGCGGGTATCGGCGACACTCCGTCCCTGGAAG
ATGAGGCAGCCGGTCATGTCACGCAGGCGCGTATGGTGAGCAAGAGCAAAGATGGTACGGGTAGCGAC
GACAAGAAGGCGAAGGGCGCAGATGGCAAGACCAAAATTGCGACGCCGCGTGGTGCGGCACCGCCAGG
CCAGAAAGGTCAGGCGAATGCCACGCGCATCCCGGCAAAGACGCCACCGGCTCCGAAAACCCCGCCTT
CCAGCGGTGAACCGCCGAAATCCGGTGACCGCAGCGGTTATAGCTCTCCGGGTAGCCCGGGTACCCCA
GGCAGCCGTAGCCGCACCCCGAGCCTGCCGACCCCACCGACCCGCGAGCCGAAGAAAGTGGCGGTGGT
TCGTACGCCGCCAAAAAGCCCGAGCTCTGCCAAGAGCCGTCTGCAAACCGCTCCTGTGCCGATGCCGG
ACCTGAAGAACGTTAAGTCTAAAATCGGTAGCACCGAAAATCTGAAGCACCAACCTGGTGGCGGTAAG
GTTCAAATCATCAACAAAAAGCTGGACTTGAGCAATGTACAAAGCAAGTGTGGTAGCAAGGACAATAT
CAAACACGTCCCGGGTGGTGGTTCCGTCCAGATTGTGTACAAACCGGTGGACCTGAGCAAGGTTACCA
GCAAATGCGGTTCCCTGGGTAACATCCATCATAAACCGGGTGGCGGCCAAGTTGAGGTCAAGAGCGAG
AAACTGGACTTCAAAGACCGCGTTCAGTCCAAAATCGGTTCTCTGGACAACATTACGCACGTGCCTGG
TGGTGGCAACAAGAAGATTGAAACCCATAAACTGACGTTTCGTGAAAATGCGAAGGCGAAAACCGACC
ACGGCGCAGAGATTGTCTACAAAAGCCCGGTGGTGAGCGGTGATACCAGCCCGCGTCACCTGTCCAAC
GTCAGCAGCACGGGCAGCATTGATATGGTGGATAGCCCGCAGTTGGCTACGCTGGCCGATGAGGTTAG
CGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTGTGACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTA
ACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG
GCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

도면10

A)

6His 태그-TEV 부위를 포함하는 pET 6His-TEV-hTau iso3 (1-383)의 발현된 서열 (서열 번호 43)

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEA
GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSR
LQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVY
KPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTF
RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

B)

TEV 절단 후 pET 6His-TEV-hTau iso3 (1-383)의 최종 서열 (서열 번호 44)

GSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA
RMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGD
RSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIG
STENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIH
HKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSP
VVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

도면11a

이. 콜라이 발현을 위한 인간 타우 이소형 4를 코딩하는 DNA 구조물 (pET 6His TEV-hTau iso 4 (1-352)) (서열 번호45)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTC
GCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTC
AACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCA
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACA
TTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGC
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATT
CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
ACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTT
GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACA
CCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
CTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGC
GATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
GCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAG
GGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACT
GATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGA
CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
GCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGA
CTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCA
GTCGCTTCACGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCC
TGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCC

도면11b

GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCC
AGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA
GTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCGAGATCC
CGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
CAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAG
AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAAC
GGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCG
CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
TGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCT
TCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACG
CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCT
CCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
TCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGG
ATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA
CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
GCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTT
CCCGCGTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCG
GCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCC
TTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAG
GAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGC
CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAG
GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
CGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTC
TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT***ATGGGCTCAAGCCACCACCACCACCACC***
ACAGCAGCGGCGAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGCAGAACCACGTCAAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACGCGGGCACTTACGGTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGCTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGCGACACCGATGCTGGCTTGAAAGCAGAAGAGGCGGGTATCGGCGACACTCCGTCCCTGGAAG
ATGAGGCAGCCGGTCATGTCACGCAGGCGCGTATGGTGAGCAAGAGCAAAGATGGTACGGGTAGCGAC
GACAAGAAGGCGAAGGGCGCAGATGGCAAGACCAAAATTGCGACGCCGCGTGGTGCGGCACCGCCAGG
CCAGAAAGGTCAGGCGAATGCCACGCGCATCCCGGCAAAGACGCCACCGGCTCCGAAAACCCCGCCTT
CCAGCGGTGAACCGCCGAAATCCGGTGACCGCAGCGGTTATAGCTCTCCGGGTAGCCCGGGTACCCCA
GGCAGCCGTAGCCGCACCCCGAGCCTGCCGACCCCACCGACCCGCGAGCCGAAGAAAGTGGCGGTGGT
TCGTACGCCGCCAAAAAGCCCGAGCTCTGCCAAGAGCCGTCTGCAAACCGCTCCTGTGCCGATGCCGG
ACCTGAAGAACGTTAAGTCTAAAATCGGTAGCACCGAAAATCTGAAGCACCAACCTGGTGGCGGTAAG
GTCCAGATTGTGTACAAACCGGTGGACCTGAGCAAGGTTACCAGCAAATGCGGTTCCCTGGGTAACAT
CCATCATAAACCGGGTGGCGGCCAAGTTGAGGTCAAGAGCGAGAAACTGGACTTCAAAGACCGCGTTC
AGTCCAAAATCGGTTCTCTGGACAACATTACGCACGTGCCTGGTGGTGGCAACAAGAAGATTGAAACC
CATAAACTGACGTTTCGTGAAAATGCGAAGGCGAAAACCGACCACGGCGCAGAGATTGTCTACAAAAG
CCCGGTGGTGAGCGGTGATACCAGCCCGCGTCACCTGTCCAACGTCAGCAGCACGGGCAGCATTGATA
TGGTGGATAGCCCGCAGTTGGCTACGCTGGCCGATGAGGTTAGCGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTG
TGACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTT
GGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT
TTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

도면12

A) 6His 태그-TEV 부위-h타우(1-352)를 포함하는 pET 6His-TEV-hTau iso4 (1-352)의 발현된 아미노산 서열 (서열 번호 46)

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEA
GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSR
LQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKS
EKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLS
NVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

B) TEV 절단 후 pET 6His-TEV-hTau iso4 (1-352)의 최종 서열 (서열 번호 47)

GSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQA
RMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGD
RSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIG
STENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNI
THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATL
ADEVSASLAKQGL

도면13a

이. 콜라이 발현을 위한 인간 타우 이소형 5를 코딩하는 DNA 구조물 (pET 6His TEV-hTau iso 5 (1-412)) (서열 번호48)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTC
GCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTC
AACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCA
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACA
TTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGC
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATT
CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACA
ACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTT
GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACA
CCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCG
CTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGC
GATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTG
GCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAG
GGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACT
GATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGA
CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTA
GCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGA
CTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCA
GTCGCTTCACGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCC
TGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCC

도면13b

GAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCC
AGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA
GTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCGAGATCC
CGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
CAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAG
AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAAC
GGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCG
CAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
TGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCT
TCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACG
CGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCT
CCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACA
TCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGG
ATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGA
CGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTT
GCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTT
CCCGCGTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCG
GCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCC
TTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAG
GAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGC
CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAG
GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
CGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTC
TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT***ATGGGCTCAAGCCACCACCACCACCACC***
ACAGCAGCGGCGAGAACTTGTACTTTCAAGGATCCGCAGAACCACGTCAAGAATTTGAGGTTATGGAA
GATCACGCGGGCACTTACGGTTTGGGTGATCGTAAAGACCAGGGCGGCTATACCATGCATCAAGATCA
AGAGGGCGACACCGATGCTGGCTTGAAAGAGTCGCCGCTGCAGACTCCGACCGAGGATGGCAGCGAAG
AGCCGGGCAGCGAGACTAGCGATGCGAAGTCGACCCCGACCGCCGAGGCAGAAGAGGCGGGTATCGGC
GACACTCCGTCCCTGGAAGATGAGGCAGCCGGTCATGTCACGCAGGCGCGTATGGTGAGCAAGAGCAA
AGATGGTACGGGTAGCGACGACAAGAAGGCGAAGGGCGCAGATGGCAAGACCAAAATTGCGACGCCGC
GTGGTGCGGCACCGCCAGGCCAGAAAGGTCAGGCGAATGCCACGCGCATCCCGGCAAAGACGCCACCG
GCTCCGAAAACCCCGCCTTCCAGCGGTGAACCGCCGAAATCCGGTGACCGCAGCGGTTATAGCTCTCC
GGGTAGCCCGGGTACCCCAGGCAGCCGTAGCCGCACCCCGAGCCTGCCGACCCCACCGACCCGCGAGC
CGAAGAAAGTGGCGGTGGTTCGTACGCCGCCAAAAAGCCCGAGCTCTGCCAAGAGCCGTCTGCAAACC
GCTCCTGTGCCGATGCCGGACCTGAAGAACGTTAAGTCTAAAATCGGTAGCACCGAAAATCTGAAGCA
CCAACCTGGTGGCGGTAAGGTTCAAATCATCAACAAAAAGCTGGACTTGAGCAATGTACAAAGCAAGT
GTGGTAGCAAGGACAATATCAAACACGTCCCGGGTGGTGGTTCCGTCCAGATTGTGTACAAACCGGTG
GACCTGAGCAAGGTTACCAGCAAATGCGGTTCCCTGGGTAACATCCATCATAAACCGGGTGGCGGCCA
AGTTGAGGTCAAGAGCGAGAAACTGGACTTCAAAGACCGCGTTCAGTCCAAAATCGGTTCTCTGGACA
ACATTACGCACGTGCCTGGTGGTGGCAACAAGAAGATTGAAACCCATAAACTGACGTTTCGTGAAAAT
GCGAAGGCGAAAACCGACCACGGCGCAGAGATTGTCTACAAAAGCCCGGTGGTGAGCGGTGATACCAG
CCCGCGTCACCTGTCCAACGTCAGCAGCACGGGCAGCATTGATATGGTGGATAGCCCGCAGTTGGCTA
CGCTGGCCGATGAGGTTAGCGCGAGCCTGGCGAAGCAGGGTCTGTGACTCGAGCACCACCACCACCAC
CACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATAT
CCGGAT

도면14

A) 6His 태그-TEV 부위-- hTau (1-412)를 포함하는 pET 6His-TEV-hTau iso5 (1-412)의 발현된 아미노산 서열 (서열 번호 49)

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPL
QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGA
DGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTP
SLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKK
LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDR
VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSI
DMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

B) TEV 절단 후 pET 6His-TEV-hTau iso5 (1-412)의 최종 서열 (서열 번호 50)

GSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAK
STPTAEAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKG
QANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTP
PKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
PGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
KKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASL
AKQGL

도면15a

포유동물 발현을 위한 인간 타우 이소형 2를 코딩하는 DNA 구조물
(pMH- 10His-TEV-hTau iso2(1-441) (서열 번호51)

GCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTTTGAGATTTCTGTCGCCGACTAAATTCATGTCG
CGCGATAGTGGTGTTTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAAAATCGGCGGCCGCCGATATTTGA
AAATATGGCATATTGAAAATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACTGACATCGCCATTTTTCCAAAA
GTGATTTTTGGGCATACGCGGTATCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACG
ACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTCGCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATAT
GAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTG
AATCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCC
ATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCAT
GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG
TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT
ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCC
TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACAATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCA
ATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGT
TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAT
GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAACTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCT
GGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGG
GAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAG
GCCCACCCCATTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCCGCTTCC
TCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTGACCATTATTGACCACTCCCC
TATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAACTCTCTTTATTGGCT
ATATGCCAATACACTGTCCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTT
ATTATTTACAAATTCACATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTATTAAACATAACGT
GGGATCTCCACGCGAATCTAGGGTACGTGTTACGGACATGGGCTATTCTCAGGTAGCGGCGGAGCTTC
TACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGAATCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCTCCTAACAG
TGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCCACCACCACCAGTGTGCCGCACAAGGCCGTGGCGGTA
GGGTATGTGTCTGAAAATGAACTAGGGGAGCGGGCTTGCACCGCTGACGCATTTGGAAGACTTAAGGC
AGCGGCAGAAGAAGATGCAGGCAACTGAGTTGTTGTGTTCTGATAAGAGTCAGAGGTAACTCCCGTTG
CGGTGCTGTTAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCACGCGCCACCAGA
CATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCCTTTCAATGGGTCTTTTATGCAGTCACCGTCCTTGACA
CGAAGCTTGCCACC***ATGGGCTCAAGCCACCATCACCACCACCATCATCACCACCACAGCAGCGGCGAG***
AACTTGTACTTTCAAGGATCCGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGAC
GTACGGGTTGGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGG
ACGCTGGCCTGAAAGAATCTCCCCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAA
ACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCAACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCC
CGGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCCACACGGAGATCCCAGAAGGAACCACAGCTGAAGAAGCAGGCA
TTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGTCAGTAAA
AGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCGCCAC
ACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCC
CGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGC
AGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCCACCCACCCG
GGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGC
AGACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTG
AAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTC
CAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAAC
CAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGT
GGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTAGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCT
GGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCG
AGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGAC
ACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCT
CGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGACTCGAGGAGAACTTGT

도면15b

ACTTCCAGGGAAGTGGTGGCAGTCATCACCATCACCATCACCATCACCATCACTGAGAATTCATTGAT
CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGA
ACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAA
TAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC
CAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCG
GCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCAC
TTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGG
CGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCT
GCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGC
CCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGCATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGAT
CAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGC
TTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGT
TCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAA
CTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCAGTGCTCGA
CGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCAT
CTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
CCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGC
CGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCA
GGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCACGGCGATGCCTGCTTGCCGAAT
ATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA
TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCC
TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTC
TTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATA
CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAA
ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCT
TTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCC
GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG
TTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG
ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG
AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
GGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT
TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTG
GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT

도면16

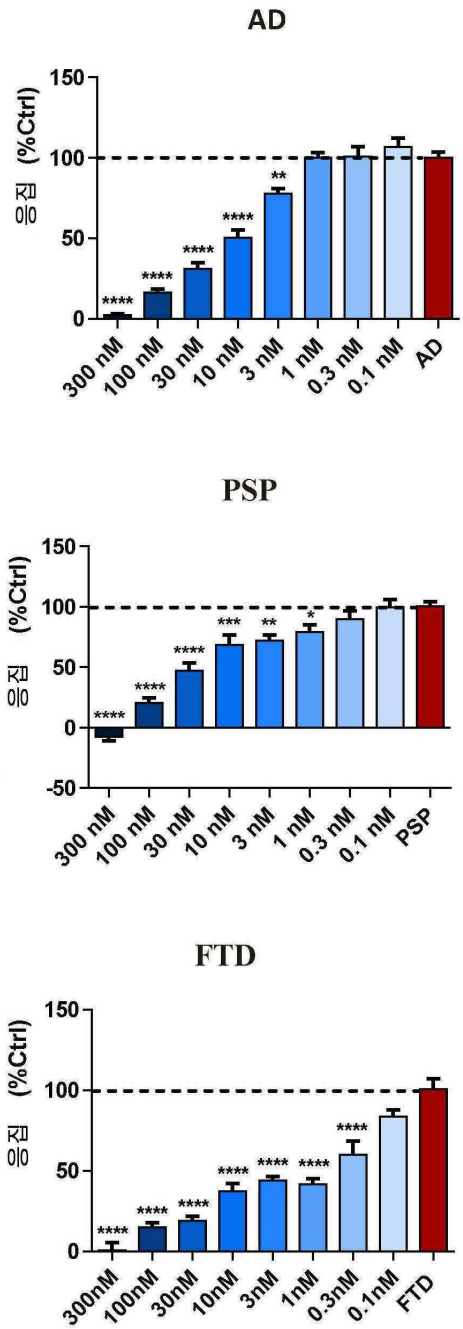
A) 10His 태그-TEV 부위- hTau (1-441)를 포함하는 pMH 10His-TEV-hTau iso2 (1-441)의 발현된 아미노산 서열 (서열 번호 52)

MGSSHHHHHHHHHHSSGENLYFQGSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK
ESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTP
SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPK
TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV
PMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLS
KVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKA
KTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

B) TEV 절단 후 pMH 10His-TEV-hTau iso2 (1-441)의 최종 서열 (서열 번호 53)

GSAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAK
STPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGT
GSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSP
GTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPG
GGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEV
KSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRH
LSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

도면17



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> UCB BIOPHARMA sprl

<120> Tau-binding antibodies

<130> PF0032-WO

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212

> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 3

Phe Gln Ala Thr His Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn Asp Ile Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be Ser, Ala, Thr

<400> 5

Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Xaa Ala Val Gln Ser
1 5 10 15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn
20 25 30

Asp Ile Ala Trp Val Arg Gln Pro Leu Gly Lys Gly Leu Val Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Val Gln
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser
115

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Xaa can be Ile and Met
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> Xaa can be Ser, Ala, Thr
<400> 10
Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn
20 25 30

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

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 11

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn

20 25 30

Asp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Val Gln

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 12

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn

20 25 30

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

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized
<400> 13

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn
20 25 30

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

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 14

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 15

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<220><221> misc_feature

<222> (48)..(48)

<223> Xaa can be Ile or Met

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> Xaa can be Ser Ala or Thr

<400> 15

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn

20 25 30

Asp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa

35 40 45

Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Xaa Ala Val Gln

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

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

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

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

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 16

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 16

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn

20 25 30

Asp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Val Gln

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

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

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

<210> 17
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized
<400> 17

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn
20 25 30
Asp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ala Ala Val Gln
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 18

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 18

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn

20 25 30

Asp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Thr Ala Val Gln

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 19
<211> 336
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 19
gatattgtga tgacccagac tccagtttcc ctgtctgtca cacttggaga tcaagcttct 60

atatcttgca ggtctagtca gagcctggaa tatagtgatg gctacactta tttggaatgg 120
tacctacaga agccaggcca gtctcctcag ctcctcatct atgaagtttc caaccgattt 180
tctggggtcc cagacaggtt cattggcagt gggtcaggga cagatttcac cctcaagatc 240
agcagagtag agcctgagga cttgggagtt tattactgct tccaagctac acataatccg 300
tacacgtttg gagctgggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 20
<211> 354
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 20
gaggtgaagc tggaggagtc tggacctggc ttgatgcagc cctcagagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggctt ctcactaacc agcaatgata tagcctgggt tcgacaacct 120
ctaggaaagg gtttggtgtg gatgggaaca atatggactg atggaagtac aaattataat 180
tcagctgtcc aatcccgact gagcatcagc agggacacct ccaagagcca atttttctta 240
aaaatgaaca gtctgcaacc tgaagacaca ggcacttact actgtgccag acatcgccta 300
tactacgggg cctttgatta ctggggccaa ggaaccatgg tcaccgtctc gagt 354

<210> 21
<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 21

gatatcgtga tgactcagac cccactctca ctgtccgtca ccccgggaca gcccgcgtca 60

atctcgtgta ggagctccca atccctcgaa tactcggacg gctatactta cctggagtgg 120

tacttgcaga agcccggaca gagcccgcag cttctgatct acgaagtgtc caacagattc 180

tccggcgtgc ctgaccgctt ttcggggtcg ggctccggta ctgatttcac cctgaaaatc 240

tcccgggtgg aagccgagga cgtgggagtc tactactgct tccaagccac ccacaaccct 300

tacaccttcg gacaggggac caagctggag atcaag 336

<210> 22

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 22

gaggtgcagc tgcaggaatc cggtcccggc ctcgtgaagc cttcagaaac cctgtcgctc 60

acatgcactg tgtccgggtt ctccctgacc tctaacgaca tcgcctggat tcggcagccg 120

ccaggaaagg gactggagtg gatgggcacc atttggaccg acgggtcaac caactacaat 180

gccgcggtgc aatccagagt gaccatcagc gtggacacgt ccaagaacca gttctcgctg 240

aaattgagct ccgtgactgc cgctgatact gccgtgtatt actgtgcccg gcaccgcctt 300

tactacggcg catttgacta ctggggacag ggaaccatgg tcactgtctc gagt 354

<210> 23

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 23

gaggtgcaac tgcaggaatc cggtcccggc ctcgtgaagc cttcagaaac cctgtcgctc 60

acatgcactg tgtccgggtt ctccctgacc tctaacgaca tcgcctggat tcggcagccg 120

ccaggaaagg gactggagtg gatgggcacc atttggaccg acgggtcaac caactacaat 180

accgcggtgc aatccagagt gaccatcagc gtggacacgt ccaagaacca gttctcgctg 240

aaattgagct ccgtgactgc cgctgatact gccgtgtatt actgtgcccg gcaccgcctt 300

tactacggcg catttgacta ctggggacag ggaaccatgg tcactgtctc gagt 354

<210> 24

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 24

gatatcgtga tgactcagac cccactctca ctgtccgtca ccccgggaca gcccgcgtca 60

atctcgtgta ggagctccca atccctcgaa tactcggacg gctatactta cctggagtgg 120

tacttgcaga agcccggaca gagcccgcag cttctgatct acgaagtgtc caacagattc 180

tccggcgtgc ctgaccgctt ttcggggtcg ggctccggta ctgatttcac cctgaaaatc 240

tcccgggtgg aagccgagga cgtgggagtc tactactgct tccaagccac ccacaaccct 300

tacaccttcg gacaggggac caagctggag atcaagcgga ccgtggccgc tccctccgtg 360

ttcatcttcc caccctccga cgagcagctt aagtccggca ccgcctccgt cgtgtgcctg 420

ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480

tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540

tcctccaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600

gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagtcct tcaaccgggg cgagtgc 657

<210> 25

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 25

gaggtgcagc tgcaggaatc cggtcccggc ctcgtgaagc cttcagaaac cctgtcgctc 60

acatgcactg tgtccgggtt ctccctgacc tctaacgaca tcgcctggat tcggcagccg 120

ccaggaaagg gactggagtg gatgggcacc atttggaccg acgggtcaac caactacaat 180

gccgcggtgc aatccagagt gaccatcagc gtggacacgt ccaagaacca gttctcgctg 240

aaattgagct ccgtgactgc cgctgatact gccgtgtatt actgtgcccg gcaccgcctt 300

tactacggcg catttgacta ctggggacag ggaaccatgg tcactgtctc gagtgcctcc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccttgctccc ggtccacctc cgagtctacc 420

gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcctggaac 480

tctggcgccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 540

tactccctgt cctccgtcgt gaccgtgccc tcctccagcc tgggcaccaa gacctacacc 600

tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac 660

ggccctccct gccccccctg ccctgcccct gaatttctgg gcggaccttc cgtgttcctg 720

ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccccgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggacg tgtcccagga agatcccgag gtccagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaagtgcaca atgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 960

gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020

ccccgcgagc cccaggtgta caccctgccc cctagccagg aagagatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgtctggt caagggcttc taccctccg acattgccgt ggaatgggag 1140

tccaacggcc agcccgagaa caactacaag accacccccc ctgtgctgga cagcgacggc 1200

tccttcttcc tgtactctcg gctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtc 1260

ttctcctgct ccgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc 1320

ctgagcctgg gcaag 1335

<210> 26

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 26

gaggtgcaac tgcaggaatc cggtcccggc ctcgtgaagc cttcagaaac cctgtcgctc 60

acatgcactg tgtccgggtt ctccctgacc tctaacgaca tcgcctggat tcggcagccg 120

ccaggaaagg gactggagtg gatgggcacc atttggaccg acgggtcaac caactacaat 180

accgcggtgc aatccagagt gaccatcagc gtggacacgt ccaagaacca gttctcgctg 240

aaattgagct ccgtgactgc cgctgatact gccgtgtatt actgtgcccg gcaccgcctt 300

tactacggcg catttgacta ctggggacag ggaaccatgg tcactgtctc gagtgcctcc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccttgctccc ggtccacctc cgagtctacc 420

gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcctggaac 480

tctggcgccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 540

tactccctgt cctccgtcgt gaccgtgccc tcctccagcc tgggcaccaa gacctacacc 600

tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac 660

ggccctccct gccccccctg ccctgcccct gaatttctgg gcggaccttc cgtgttcctg 720

ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccccgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggacg tgtcccagga agatcccgag gtccagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaagtgcaca atgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 960

gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020

ccccgcgagc cccaggtgta caccctgccc cctagccagg aagagatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgtctggt caagggcttc taccctccg acattgccgt ggaatgggag 1140

tccaacggcc agcccgagaa caactacaag accacccccc ctgtgctgga cagcgacggc 1200

tccttcttcc tgtactctcg gctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtc 1260

ttctcctgct ccgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc 1320

ctgagcctgg gcaag 1335

<210> 27

<211> 134

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> leader sequence

<400> 27

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Val Ser
20 25 30

Leu Ser Val Thr Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
35 40 45

Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu
50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr
85 90 95

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala Thr His Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly
115 120 125
Thr Lys Leu Glu Ile Lys
130

<210> 28
<211> 136
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 28
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Met Gln
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Thr Ser Asn Asp Ile Ala Trp Val Arg Gln Pro Leu Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Val Trp Met Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Ala Val Gln Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
85 90 95
Phe Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Gly Thr Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
130 135
<210> 29

<211> 402

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(66)

<223> leader sequence

<400> 29

atggacatga gggttcctgc tcaggttttt ggcttcttgt tgctctggtt tccaggcacc 60

aggtgtgata ttgtgatgac ccagactcca gtttccctgt ctgtcacact tggagatcaa 120

gcttctatat cttgcaggtc tagtcagagc ctggaatata gtgatggcta cacttatttg 180

gaatggtacc tacagaagcc aggccagtct cctcagctcc tcatctatga agtttccaac 240

cgattttctg gggtcccaga caggttcatt ggcagtgggt cagggacaga tttcaccctc 300

aagatcagca gagtagagcc tgaggacttg ggagtttatt actgcttcca agctacacat 360

aatccgtaca cgtttggagc tgggaccaag ctggaaataa aa 402

<210> 30

<211> 411

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(57)

<223> leader sequence

<400> 30

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctaccggtgt ccattctgag 60

gtgaagctgg aggagtctgg acctggcttg atgcagccct cagagaccct gtccctcacc 120

tgcactgtct ctggcttctc actaaccagc aatgatatag cctgggttcg acaacctcta 180

ggaaagggtt tggtgtggat gggaacaata tggactgatg gaagtacaaa ttataattca 240

gctgtccaat cccgactgag catcagcagg gacacctcca agagccaatt tttcttaaaa 300

atgaacagtc tgcaacctga agacacaggc acttactact gtgccagaca tcgcctatac 360

tacggggcct ttgattactg gggccaagga accatggtca ccgtctcgag t 411

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 32

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 33

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctcctaatct atgaagtttc cagccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaggtat acaccttcct 300

tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

<210> 34

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatgctttt 300

gatgtctggg gccaagggac aatggtcacc gtctcttca 339

<210> 35

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20 25 30

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

35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val

65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu

85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro

100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val

115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly

130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro

145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro

165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly

180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys

210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys

225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val

245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270
Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 36
Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Val Gln Ser
1 5 10 15

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 37

Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ala Ala Val Gln Ser

1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 38

Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Thr Ala Val Gln Ser

1 5 10 15

<210> 39

<211> 6757

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 39

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60

cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120

ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240

acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300

ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360

ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420

acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480

tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540

tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600

gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660

ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720

agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840

tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt 900

tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960

cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020

aggaccgaag gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080

tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140

tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200

ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260

ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320

cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440

actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500

aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560

caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620

aggatcttct tgagatcctt ttttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680

accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740

aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800

ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920

accggataag gcgcagcggt cgggctgaac gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980

gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040

tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100

cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160

cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220

cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 2280

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 2400

gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg 2460

tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520

cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 2580

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640

gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700

catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt 2760
tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820
ttttttcctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940
ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000
aaatcactca gggtcaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060
gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120

tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggtcgcag 3180
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300
cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg 3360
gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420
cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg 3480
gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca 3540

tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag 3600
atcccggtgc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt 3660
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720
gcggtttgcg tattgggcgc cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780
tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcggtccac gctggtttgc 3840
cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900
tcggtatcgt cgtatcccac taccgagatg tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960

atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcgttggcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020
atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080
tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140
cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc 4200
aatgcgacca gatgctccac gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260
ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320
tccacagcaa tggcatcctg gtcatccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380

tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc 4440

gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500

gacggcgcgt gcagggccag actggaggtg gcaacgccaa tcagcaacga ctgtttgccc 4560

gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact 4620

ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga 4680

taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc 4740

ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800

atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860

tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920

gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat 4980

gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040

aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100

cgatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 5160

ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatacatat gggctcaagc 5220

caccaccacc accaccacag cagcggcgag aacttgtact ttcaaggatc cgcagaacca 5280

cgtcaagaat ttgaggttat ggaagatcac gcgggcactt acggtttggg tgatcgtaaa 5340

gaccagggcg gctataccat gcatcaagat caagagggcg acaccgatgc tggcttgaaa 5400

gagtcgccgc tgcagactcc gaccgaggat ggcagcgaag agccgggcag cgagactagc 5460

gatgcgaagt cgaccccgac cgccgaggac gttaccgcac cgctggtcga cgagggtgct 5520

ccgggtaaac aggcggctgc acagccgcac acggagattc cggaaggcac caccgcagaa 5580

gaggcgggta tcggcgacac tccgtccctg gaagatgagg cagccggtca tgtcacgcag 5640

gcgcgtatgg tgagcaagag caaagatggt acgggtagcg acgacaagaa ggcgaagggc 5700

gcagatggca agaccaaaat tgcgacgccg cgtggtgcgg caccgccagg ccagaaaggt 5760

caggcgaatg ccacgcgcat cccggcaaag acgccaccgg ctccgaaaac cccgccttcc 5820

agcggtgaac cgccgaaatc cggtgaccgc agcggttata gctctccggg tagcccgggt 5880

accccaggca gccgtagccg caccccgagc ctgccgaccc caccgacccg cgagccgaag 5940

aaagtggcgg tggttcgtac gccgccaaaa agcccgagct ctgccaagag ccgtctgcaa 6000

accgctcctg tgccgatgcc ggacctgaag aacgttaagt ctaaaatcgg tagcaccgaa 6060

aatctgaagc accaacctgg tggcggtaag gttcaaatca tcaacaaaaa gctggacttg 6120

agcaatgtac aaagcaagtg tggtagcaag gacaatatca aacacgtccc gggtggtggt 6180

tccgtccaga ttgtgtacaa accggtggac ctgagcaagg ttaccagcaa atgcggttcc 6240

ctgggtaaca tccatcataa accgggtggc ggccaagttg aggtcaagag cgagaaactg 6300

gacttcaaag accgcgttca gtccaaaatc ggttctctgg acaacattac gcacgtgcct 6360

ggtggtggca acaagaagat tgaaacccat aaactgacgt ttcgtgaaaa tgcgaaggcg 6420

aaaaccgacc acggcgcaga gattgtctac aaaagcccgg tggtgagcgg tgataccagc 6480

ccgcgtcacc tgtccaacgt cagcagcacg ggcagcattg atatggtgga tagcccgcag 6540

ttggctacgc tggccgatga ggttagcgcg agcctggcga agcagggtct gtgactcgag 6600

caccaccacc accaccactg agatccggct gctaacaaag cccgaaagga agctgagttg 6660

gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccctg gggcctctaa acgggtcttg 6720

aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggat 6757

<210> 40

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 40

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu

1 5 10 15

Tyr Phe Gln Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu

20 25 30

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly

35 40 45

Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys

50 55 60

Glu Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly

65 70 75 80

Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr

85 90 95

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

100 105 110

Pro His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile

115 120 125

Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln

130 135 140

Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys

145 150 155 160

Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly

165 170 175

Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro

180 185 190

Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro

195 200 205

Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly

210 215 220

Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp

260 265 270

Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His

275 280 285

Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu

290 295 300

Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val

305 310 315 320

Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser

325 330 335

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro

340 345 350

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

355 360 365

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro

370 375 380

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu

385 390 395 400

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser

405 410 415

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210> 41

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 41

Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala

1 5 10 15

Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met

20 25 30

His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro

35 40 45

Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr

50 55 60

Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu

65 70 75 80

Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr

85 90 95

Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr

100 105 110

Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met
115 120 125

Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys
130 135 140

Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro
145 150 155 160

Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr
165 170 175

Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser
180 185 190

Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly
195 200 205

Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro
210 215 220

Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala
225 230 235 240

Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn
245 250 255

Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
260 265 270

Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val
275 280 285

Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly
290 295 300

Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
305 310 315 320

Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
325 330 335

Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
340 345 350

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly

355 360 365

Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
370 375 380
Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
385 390 395 400
Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
405 410 415
Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
420 425 430

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 42
<211> 6583
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 42

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300

ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660
ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720

agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780
agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840

tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt 900

tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960

cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020

aggaccgaag gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080

tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140

tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200

ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260

ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320

cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440

actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500

aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560

caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620

aggatcttct tgagatcctt ttttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680

accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740

aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800

ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920

accggataag gcgcagcggt cgggctgaac gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980

gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040

tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100

cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160

cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220

cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 2280

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 2400

gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg 2460

tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520

cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 2580

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640

gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700

catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt 2760

tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820

tttttttcctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880

tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940

ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000

aaatcactca gggtcaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060

gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120

tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggtcgcag 3180

acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240

cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300

cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg 3360

gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420

cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg 3480

gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca 3540

tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag 3600

atcccggtgc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt 3660

tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720

gcggtttgcg tattgggcgc cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780

tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcggtccac gctggtttgc 3840

cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900

tcggtatcgt cgtatcccac taccgagatg tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960

atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcgttggcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020

atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080

tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140

cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc 4200

aatgcgacca gatgctccac gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260

ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320

tccacagcaa tggcatcctg gtcatccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380

tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc 4440

gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500

gacggcgcgt gcagggccag actggaggtg gcaacgccaa tcagcaacga ctgtttgccc 4560
gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact 4620
ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga 4680
taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc 4740
ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800
atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860
tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920

gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat 4980
gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040
aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100
cgatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 5160
ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatacatat gggctcaagc 5220
caccaccacc accaccacag cagcggcgag aacttgtact ttcaaggatc cgcagaacca 5280
cgtcaagaat ttgaggttat ggaagatcac gcgggcactt acggtttggg tgatcgtaaa 5340

gaccagggcg gctataccat gcatcaagat caagagggcg acaccgatgc tggcttgaaa 5400
gcagaagagg cgggtatcgg cgacactccg tccctggaag atgaggcagc cggtcatgtc 5460
acgcaggcgc gtatggtgag caagagcaaa gatggtacgg gtagcgacga caagaaggcg 5520
aagggcgcag atggcaagac caaaattgcg acgccgcgtg gtgcggcacc gccaggccag 5580
aaaggtcagg cgaatgccac gcgcatcccg gcaaagacgc caccggctcc gaaaaccccg 5640
ccttccagcg gtgaaccgcc gaaatccggt gaccgcagcg gttatagctc tccgggtagc 5700
ccgggtaccc caggcagccg tagccgcacc ccgagcctgc cgaccccacc gacccgcgag 5760

ccgaagaaag tggcggtggt tcgtacgccg ccaaaaagcc cgagctctgc caagagccgt 5820
ctgcaaaccg ctcctgtgcc gatgccggac ctgaagaacg ttaagtctaa aatcggtagc 5880
accgaaaatc tgaagcacca acctggtggc ggtaaggttc aaatcatcaa caaaaagctg 5940
gacttgagca atgtacaaag caagtgtggt agcaaggaca atatcaaaca cgtcccgggt 6000
ggtggttccg tccagattgt gtacaaaccg gtggacctga gcaaggttac cagcaaatgc 6060
ggttccctgg gtaacatcca tcataaaccg ggtggcggcc aagttgaggt caagagcgag 6120
aaactggact tcaaagaccg cgttcagtcc aaaatcggtt ctctggacaa cattacgcac 6180

gtgcctggtg gtggcaacaa gaagattgaa acccataaac tgacgtttcg tgaaaatgcg 6240

aaggcgaaaa ccgaccacgg cgcagagatt gtctacaaaa gcccggtggt gagcggtgat 6300

accagcccgc gtcacctgtc caacgtcagc agcacgggca gcattgatat ggtggatagc 6360

ccgcagttgg ctacgctggc cgatgaggtt agcgcgagcc tggcgaagca gggtctgtga 6420

ctcgagcacc accaccacca ccactgagat ccggctgcta acaaagcccg aaaggaagct 6480

gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg 6540

gtcttgaggg gttttttgct gaaaggagga actatatccg gat 6583

<210> 43

<211> 403

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 43

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu

1 5 10 15

Tyr Phe Gln Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu

20 25 30

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly

35 40 45

Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys

50 55 60

Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala

65 70 75 80

Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly

85 90 95

Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys

100 105 110

Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala

115 120 125

Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro

130 135 140

Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser

145 150 155 160

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser

165 170 175

Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg

180 185 190

Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala

195 200 205

Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser

210 215 220

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile

225 230 235 240

Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys

245 250 255

Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr

260 265 270

Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly

275 280 285

Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu

290 295 300

Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp

305 310 315 320

Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His

325 330 335

Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala

340 345 350

Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg

355 360 365

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

Gln Gly Leu

<210> 44

<211> 384

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 44

Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala
1 5 10 15
Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met

20 25 30
His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu
35 40 45
Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His
50 55 60
Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser
65 70 75 80
Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr

85 90 95
Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr
100 105 110
Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser
115 120 125
Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly
130 135 140
Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr

145 150 155 160
Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro
165 170 175
Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro
180 185 190

Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn
195 200 205
Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys

210 215 220
Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile
225 230 235 240
Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
245 250 255
Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
260 265 270
His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp

275 280 285
Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
290 295 300
His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
305 310 315 320
Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
325 330 335
Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser

340 345 350
Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
355 360 365
Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 45
<211> 6490
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 45
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60

cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120

ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240

acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300

ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360

ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420

acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480

tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540

tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600

gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660

ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720

agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840

tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt 900

tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960

cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020

aggaccgaag gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080

tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140

tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200

ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260

ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320

cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440

actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500

aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560

caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620

aggatcttct tgagatcctt ttttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680

accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740

aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800

ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920

accggataag gcgcagcggt cgggctgaac gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980

gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040

tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100

cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160

cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220

cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 2280

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 2400

gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg 2460

tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520

cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 2580

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640

gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700

catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt 2760

tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820

ttttttcctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880

tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940

ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000

aaatcactca gggtcaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060

gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120

tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggtcgcag 3180

acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240

cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300

cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg 3360

gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420

cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg 3480

gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca 3540

tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag 3600

atcccggtgc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt 3660

tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720

gcggtttgcg tattgggcgc cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780

tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcggtccac gctggtttgc 3840

cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900
tcggtatcgt cgtatcccac taccgagatg tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960
atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcgttggcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020
atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080
tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140
cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc 4200
aatgcgacca gatgctccac gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260

ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320
tccacagcaa tggcatcctg gtcatccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380
tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc 4440
gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500
gacggcgcgt gcagggccag actggaggtg gcaacgccaa tcagcaacga ctgtttgccc 4560
gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact 4620
ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga 4680

taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc 4740
ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800
atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860
tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920
gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat 4980
gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040
aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100

cgatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 5160
ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatacatat gggctcaagc 5220
caccaccacc accaccacag cagcggcgag aacttgtact ttcaaggatc cgcagaacca 5280
cgtcaagaat ttgaggttat ggaagatcac gcgggcactt acggtttggg tgatcgtaaa 5340
gaccagggcg gctataccat gcatcaagat caagagggcg acaccgatgc tggcttgaaa 5400
gcagaagagg cgggtatcgg cgacactccg tccctggaag atgaggcagc cggtcatgtc 5460
acgcaggcgc gtatggtgag caagagcaaa gatggtacgg gtagcgacga caagaaggcg 5520

aagggcgcag atggcaagac caaaattgcg acgccgcgtg gtgcggcacc gccaggccag 5580

aaaggtcagg cgaatgccac gcgcatcccg gcaaagacgc caccggctcc gaaaaccccg 5640

ccttccagcg gtgaaccgcc gaaatccggt gaccgcagcg gttatagctc tccgggtagc 5700

ccgggtaccc caggcagccg tagccgcacc ccgagcctgc cgaccccacc gacccgcgag 5760

ccgaagaaag tggcggtggt tcgtacgccg ccaaaaagcc cgagctctgc caagagccgt 5820

ctgcaaaccg ctcctgtgcc gatgccggac ctgaagaacg ttaagtctaa aatcggtagc 5880

accgaaaatc tgaagcacca acctggtggc ggtaaggtcc agattgtgta caaaccggtg 5940

gacctgagca aggttaccag caaatgcggt tccctgggta acatccatca taaaccgggt 6000

ggcggccaag ttgaggtcaa gagcgagaaa ctggacttca aagaccgcgt tcagtccaaa 6060

atcggttctc tggacaacat tacgcacgtg cctggtggtg gcaacaagaa gattgaaacc 6120

cataaactga cgtttcgtga aaatgcgaag gcgaaaaccg accacggcgc agagattgtc 6180

tacaaaagcc cggtggtgag cggtgatacc agcccgcgtc acctgtccaa cgtcagcagc 6240

acgggcagca ttgatatggt ggatagcccg cagttggcta cgctggccga tgaggttagc 6300

gcgagcctgg cgaagcaggg tctgtgactc gagcaccacc accaccacca ctgagatccg 6360

gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta 6420

gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact 6480

atatccggat 6490

<210> 46

<211> 372

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 46

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu

1 5 10 15

Tyr Phe Gln Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu

20 25 30

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly

35 40 45

Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys

50 55 60

Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala

65 70 75 80

Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly

85 90 95

Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys

100 105 110

Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala

115 120 125

Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro

130 135 140

Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser

145 150 155 160

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser

165 170 175

Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg

180 185 190

Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala

195 200 205

Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser

210 215 220

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser

260 265 270

Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu

275 280 285

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr

290 295 300

His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly

305 310 315 320

Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
325 330 335
Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp

340 345 350
Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala
355 360 365
Lys Gln Gly Leu
370

<210> 47
<211> 353
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 47

Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala
1 5 10 15
Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met

20 25 30
His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu
35 40 45
Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His
50 55 60
Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser
65 70 75 80
Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr

85 90 95
Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr
100 105 110
Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser
115 120 125
Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly
130 135 140

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr

145 150 155 160

Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro

165 170 175

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

180 185 190

Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn

195 200 205

Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro

210 215 220

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile

225 230 235 240

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu

245 250 255

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile

260 265 270

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu

275 280 285

Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile

290 295 300

Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu

305 310 315 320

Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln

325 330 335

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

340 345 350

Leu

<210> 48

<211> 6670

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 48

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60

cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120

ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240

acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300

ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360

ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420

acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480

tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540

tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600

gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660

ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720

agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840

tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt 900

tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960

cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020

aggaccgaag gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080

tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140

tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200

ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260

ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320

cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440

actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500

aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560

caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620

aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680

accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740

aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800

ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920

accggataag gcgcagcggt cgggctgaac gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980

gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040

tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100

cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160

cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220

cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 2280

ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 2400

gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg 2460

tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520

cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 2580

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640

gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700

catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt 2760

tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820

ttttttcctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880

tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940

ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000

aaatcactca gggtcaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060

gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120

tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggtcgcag 3180

acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240

cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300

cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg 3360

gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420

cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg 3480

gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca 3540

tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag 3600

atcccggtgc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt 3660

tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720

gcggtttgcg tattgggcgc cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780

tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcggtccac gctggtttgc 3840

cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900

tcggtatcgt cgtatcccac taccgagatg tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960

atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcgttggcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020

atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080

tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140

cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc 4200

aatgcgacca gatgctccac gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260

ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320

tccacagcaa tggcatcctg gtcatccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380

tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc 4440

gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500

gacggcgcgt gcagggccag actggaggtg gcaacgccaa tcagcaacga ctgtttgccc 4560

gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact 4620

ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga 4680

taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc 4740

ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800

atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860

tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920

gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat 4980

gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040

aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100

cgatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 5160

ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatacatat gggctcaagc 5220

caccaccacc accaccacag cagcggcgag aacttgtact ttcaaggatc cgcagaacca 5280

cgtcaagaat ttgaggttat ggaagatcac gcgggcactt acggtttggg tgatcgtaaa 5340

gaccagggcg gctataccat gcatcaagat caagagggcg acaccgatgc tggcttgaaa 5400
gagtcgccgc tgcagactcc gaccgaggat ggcagcgaag agccgggcag cgagactagc 5460
gatgcgaagt cgaccccgac cgccgaggca gaagaggcgg gtatcggcga cactccgtcc 5520
ctggaagatg aggcagccgg tcatgtcacg caggcgcgta tggtgagcaa gagcaaagat 5580
ggtacgggta gcgacgacaa gaaggcgaag ggcgcagatg gcaagaccaa aattgcgacg 5640
ccgcgtggtg cggcaccgcc aggccagaaa ggtcaggcga atgccacgcg catcccggca 5700
aagacgccac cggctccgaa aaccccgcct tccagcggtg aaccgccgaa atccggtgac 5760

cgcagcggtt atagctctcc gggtagcccg ggtaccccag gcagccgtag ccgcaccccg 5820
agcctgccga ccccaccgac ccgcgagccg aagaaagtgg cggtggttcg tacgccgcca 5880
aaaagcccga gctctgccaa gagccgtctg caaaccgctc ctgtgccgat gccggacctg 5940
aagaacgtta agtctaaaat cggtagcacc gaaaatctga agcaccaacc tggtggcggt 6000
aaggttcaaa tcatcaacaa aaagctggac ttgagcaatg tacaaagcaa gtgtggtagc 6060
aaggacaata tcaaacacgt cccgggtggt ggttccgtcc agattgtgta caaaccggtg 6120
gacctgagca aggttaccag caaatgcggt tccctgggta acatccatca taaaccgggt 6180

ggcggccaag ttgaggtcaa gagcgagaaa ctggacttca aagaccgcgt tcagtccaaa 6240
atcggttctc tggacaacat tacgcacgtg cctggtggtg gcaacaagaa gattgaaacc 6300
cataaactga cgtttcgtga aaatgcgaag gcgaaaaccg accacggcgc agagattgtc 6360
tacaaaagcc cggtggtgag cggtgatacc agcccgcgtc acctgtccaa cgtcagcagc 6420
acgggcagca ttgatatggt ggatagcccg cagttggcta cgctggccga tgaggttagc 6480
gcgagcctgg cgaagcaggg tctgtgactc gagcaccacc accaccacca ctgagatccg 6540
gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta 6600

gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact 6660
atatccggat 6670
<210> 49
<211> 432
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 49
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu

1 5 10 15

Tyr Phe Gln Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu

20 25 30

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly

35 40 45

Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys

50 55 60

Glu Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly

65 70 75 80

Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu

85 90 95

Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His

100 105 110

Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser

115 120 125

Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr

130 135 140

Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr

145 150 155 160

Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser

165 170 175

Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly

180 185 190

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr

195 200 205

Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn

245 250 255

Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
260 265 270
Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile
275 280 285

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

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

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
420 425 430

<210> 50
<211> 413
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 50
Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala
1 5 10 15
Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met
20 25 30

His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro

35 40 45

Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr

50 55 60

Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile

65 70 75 80

Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln

85 90 95

Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys

100 105 110

Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly

115 120 125

Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro

130 135 140

Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro

145 150 155 160

Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly

165 170 175

Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp

210 215 220

Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His

225 230 235 240

Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu

245 250 255

Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val

260 265 270

Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser

275 280 285

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro

290 295 300

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

305 310 315 320

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro

325 330 335

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu

340 345 350

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser

355 360 365

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410

<210> 51

<211> 6016

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> synthetic

<400> 51

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttttgag atttctgtcg ccgactaaat 60

tcatgtcgcg cgatagtggt gtttatcgcc gatagagatg gcgatattgg aaaaatcggc 120

ggccgccgat atttgaaaat atggcatatt gaaaatgtcg ccgatgtgag tttctgtgta 180

actgacatcg ccatttttcc aaaagtgatt tttgggcata cgcggtatct ggcgatagcg 240

cttatatcgt ttacggggga tggcgataga cgactttggt gacttgggcg attctgtgtg 300

tcgcaaatat cgcagtttcg atataggtga cagacgatat gaggctatat cgccgataga 360

ggcgacatca agctggcaca tggccaatgc atatcgatct atacattgaa tcaatattgg 420

ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta ttggccattg 480

catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc aacattaccg 540

ccatgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt 600

catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga 660

ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 720

atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca 780

gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg 840

cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc 900

tacgtattag tcatcgctat tacaatggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt 960

ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt 1020

ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg 1080

acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagaac tcgtttagtg 1140

aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca cgctgttttg acctccatag aagacaccgg 1200

gaccgatcca gcctccgcgg ccgggaacgg tgcattggaa cgcggattcc ccgtgccaag 1260

agtgacgtaa gtaccgccta tagagtctat aggcccaccc cattggcttc ttatgcatgc 1320

tatactgttt ttggcttggg gtctatacac ccccgcttcc tcatgttata ggtgatggta 1380

tagcttagcc tataggtgtg ggttattgac cattattgac cactccccta ttggtgacga 1440

tactttccat tactaatcca taacatggct ctttgccaca actctcttta ttggctatat 1500

gccaatacac tgtccttcag agactgacac ggactctgta tttttacagg atggggtctc 1560

atttattatt tacaaattca catatacaac accaccgtcc ccagtgcccg cagtttttat 1620

taaacataac gtgggatctc cacgcgaatc tagggtacgt gttacggaca tgggctattc 1680

tcaggtagcg gcggagcttc tacatccgag ccctgctccc atgcctccag cgaatcatgg 1740

tcgctcggca gctccttgct cctaacagtg gaggccagac ttaggcacag cacgatgccc 1800

accaccacca gtgtgccgca caaggccgtg gcggtagggt atgtgtctga aaatgaacta 1860

ggggagcggg cttgcaccgc tgacgcattt ggaagactta aggcagcggc agaagaagat 1920

gcaggcaact gagttgttgt gttctgataa gagtcagagg taactcccgt tgcggtgctg 1980

ttaacggtgg agggcagtgt agtctgagca gtactcgttg ctgccgcacg cgccaccaga 2040

cataatagct gacagactaa cagactgttc ctttcaatgg gtcttttatg cagtcaccgt 2100

ccttgacacg aagcttgcca ccatgggctc aagccaccat caccaccacc atcatcacca 2160

ccacagcagc ggcgagaact tgtactttca aggatccgct gagccccgcc aggagttcga 2220

agtgatggaa gatcacgctg ggacgtacgg gttgggggac aggaaagatc agggggggcta 2280

caccatgcac caagaccaag agggtgacac ggacgctggc ctgaaagaat ctcccctgca 2340

gacccccact gaggacggat ctgaggaacc gggctctgaa acctctgatg ctaagagcac 2400

tccaacagcg gaagatgtga cagcaccctt agtggatgag ggagctcccg gcaagcaggc 2460

tgccgcgcag ccccacacgg agatcccaga aggaaccaca gctgaagaag caggcattgg 2520

agacaccccc agcctggaag acgaagctgc tggtcacgtg acccaagctc gcatggtcag 2580

taaaagcaaa gacgggactg gaagcgatga caaaaaagcc aaggggggctg atggtaaaac 2640

gaagatcgcc acaccgcggg gagcagcccc tccaggccag aagggccagg ccaacgccac 2700

caggattcca gcaaaaaccc cgcccgctcc aaagacacca cccagctctg gtgaacctcc 2760

aaaatcaggg gatcgcagcg gctacagcag ccccggctcc ccaggcactc ccggcagccg 2820

ctcccgcacc ccgtcccttc caaccccacc cacccgggag cccaagaagg tggcagtggt 2880

ccgtactcca cccaagtcgc cgtcttccgc caagagccgc ctgcagacag cccccgtgcc 2940

catgccagac ctgaagaatg tcaagtccaa gatcggctcc actgagaacc tgaagcacca 3000

gccgggaggc gggaaggtgc agataattaa taagaagctg gatcttagca acgtccagtc 3060

caagtgtggc tcaaaggata atatcaaaca cgtcccggga ggcggcagtg tgcaaatagt 3120

ctacaaacca gttgacctga gcaaggtgac ctccaagtgt ggctcattag gcaacatcca 3180

tcataaacca ggaggtggcc aggtggaagt aaaatctgag aagctagact tcaaggacag 3240

agtccagtcg aagattgggt ccctggacaa tatcacccac gtccctggcg gaggaaataa 3300

aaagattgaa acccacaagc tgaccttccg cgagaacgcc aaagccaaga cagaccacgg 3360

ggcggagatc gtgtacaagt cgccagtggt gtctggggac acgtctccac ggcatctcag 3420

caatgtctcc tccaccggca gcatcgacat ggtagactcg ccccagctcg ccacgctagc 3480

tgacgaggtg tctgcctccc tggccaagca gggtttgtga ctcgaggaga acttgtactt 3540

ccagggaagt ggtggcagtc atcaccatca ccatcaccat caccatcact gagaattcat 3600

tgatcataat cagccatacc acatttgtag aggttttact tgctttaaaa aacctcccac 3660

acctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg 3720

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 3780

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgaa 3840

tcctctacgc cggacgcatc gtggccggca tcaccggcgc cacaggtgcg gttgctggcg 3900

cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg ccacttcggg ctcatgagcg 3960

cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg gggactgttg ggcgccatct 4020

ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaaccta ctactgggct 4080

gcttcctaat gcaggagtcg cataagggag agcgtcgact ggggcgccct ctggtaaggt 4140

tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttctcgccg ccaagcatct gatggcgcag 4200

gggatcaagc tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg aacaagatgg 4260
attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca 4320
acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt 4380
tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaagacg aggcagcgcg 4440
gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagca gtgctcgacg ttgtcactga 4500
agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 4560
ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct 4620

tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc gagcacgtac 4680
tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc 4740
gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gagcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt 4800
gacccacggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 4860
catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg 4920
tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 4980
cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgaat 5040

tattaacgct tacaatttcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc 5100
acaccgcatc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 5160
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 5220
aatagcacgt gctaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atccttttg 5280
ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg 5340
tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 5400
aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 5460

tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt 5520
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 5580
taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 5640
caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac 5700
agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 5760
aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg 5820
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 5880

tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggggcgga 5940

gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 6000

ttgctcacat gttctt 6016

<210> 52

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 52

Met Gly Ser Ser His His His His His His His His His Ser Ser

1 5 10 15

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe

20 25 30

Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys

35 40 45

Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala

85 90 95

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

100 105 110

Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu

115 120 125

Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly

130 135 140

His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly

145 150 155 160

Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala

165 170 175

Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala

180 185 190

Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser

195 200 205

Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro

210 215 220

Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro

225 230 235 240

Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro

245 250 255

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

260 265 270

Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu

275 280 285

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

290 295 300

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn

305 310 315 320

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro

325 330 335

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile

340 345 350

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu

355 360 365

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile

370 375 380

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu

385 390 395 400

Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile

405 410 415

Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu

420 425 430

Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln
435 440 445
Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly
450 455 460
Leu
465

<210> 53
<211> 442
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 53
Gly Ser Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala
1 5 10 15
Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met
20 25 30
His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro
35 40 45
Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr

50 55 60
Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu
65 70 75 80
Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr
85 90 95
Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr
100 105 110
Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met

115 120 125
Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys
130 135 140
Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro
145 150 155 160

Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr
165 170 175
Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser

180 185 190
Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly
195 200 205
Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro
210 215 220
Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala
225 230 235 240
Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn

245 250 255
Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
260 265 270
Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val
275 280 285
Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly
290 295 300
Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr

305 310 315 320
Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
325 330 335
Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
340 345 350
Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
355 360 365
Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys

370 375 380
Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
385 390 395 400
Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly

405 410 415

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

420 425 430

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu

435 440

<210> 54

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 54

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asn

20 25 30

Asp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ala Ala Val Gln

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

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

435 440 445

<210> 55

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 55

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

Gly Thr Ile Trp Thr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Thr Ala Val Gln
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg His Arg Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 56

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 56

gaggtgcagc tgcaggaatc cggtcccggc ctcgtgaagc cttcagaaac cctgtcgctc 60

acatgcactg tgtccgggtt ctccctgacc tctaacgaca tcgcctggat tcggcagccg 120

ccaggaaagg gactggagtg gatgggcacc atttggaccg acgggtcaac caactacaat 180

gccgcggtgc aatccagagt gaccatcagc gtggacacgt ccaagaacca gttctcgctg 240

aaattgagct ccgtgactgc cgctgatact gccgtgtatt actgtgcccg gcaccgcctt 300

tactacggcg catttgacta ctggggacag ggaaccatgg tcactgtctc gagtgcctcc 360

accaagggcc cctccgtgtt cccgctcgct ccatcatcga agtctaccag cggaggcact 420

gcggctctcg gttgcctcgt gaaggactac ttcccggagc cggtgaccgt gtcgtggaac 480

agcggagccc tgaccagcgg ggtgcacacc tttccggccg tcttgcagtc aagcggcctt 540

tactccctgt catcagtggt gactgtcccg tccagctcat tgggaaccca aacctacatc 600

tgcaatgtga atcacaaacc tagcaacacc aaggttgaca agaaagtcga gcccaaatcg 660

tgtgacaaga ctcacacttg tccgccgtgc ccggcacccg aactgctggg aggtcccagc 720

gtctttctgt tccctccaaa gccgaaagac acgctgatga tctcccgcac cccggaggtc 780

acttgcgtgg tcgtggacgt gtcacatgag gacccagagg tgaagttcaa ttggtacgtg 840

gatggcgtcg aagtccacaa tgccaaaact aagcccagag aagaacagta caattcgacc 900

taccgcgtcg tgtccgtgct cacggtgttg catcaggatt ggctgaacgg gaaggaatac 960

aagtgcaaag tgtccaacaa ggcgctgccg gcaccgatcg agaaaactat ctccaaagcg 1020

aagggacagc ctagggaacc tcaagtctac acgctgccac catcacggga tgaactgact 1080

aagaatcaag tctcactgac ttgtctggtg aaggggtttt accctagcga cattgccgtg 1140

gagtgggaat ccaacggcca gccagagaac aactacaaga ctacccctcc agtgctcgac 1200

tcggatggat cgttcttcct ttactcgaag ctcaccgtgg ataagtcccg gtggcagcag 1260

ggaaacgtgt tctcctgctc ggtgatgcat gaagccctcc ataaccacta tacccaaaag 1320

tcgctgtccc tgtcgccggg aaag 1344

<210> 57

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized

<400> 57

gaggtgcaac tgcaggaatc cggtcccggc ctcgtgaagc cttcagaaac cctgtcgctc 60

acatgcactg tgtccgggtt ctccctgacc tctaacgaca tcgcctggat tcggcagccg 120

ccaggaaagg gactggagtg gatgggcacc atttggaccg acgggtcaac caactacaat 180

accgcggtgc aatccagagt gaccatcagc gtggacacgt ccaagaacca gttctcgctg 240

aaattgagct ccgtgactgc cgctgatact gccgtgtatt actgtgcccg gcaccgcctt 300

tactacggcg catttgacta ctggggacag ggaaccatgg tcactgtctc gagtgcctcc 360

accaagggcc cctccgtgtt cccgctcgct ccatcatcga agtctaccag cggaggcact 420

gcggctctcg gttgcctcgt gaaggactac ttcccggagc cggtgaccgt gtcgtggaac 480

agcggagccc tgaccagcgg ggtgcacacc tttccggccg tcttgcagtc aagcggcctt 540

tactccctgt catcagtggt gactgtcccg tccagctcat tgggaaccca aacctacatc 600

tgcaatgtga atcacaaacc tagcaacacc aaggttgaca agaaagtcga gcccaaatcg 660

tgtgacaaga ctcacacttg tccgccgtgc ccggcacccg aactgctggg aggtcccagc 720

gtctttctgt tccctccaaa gccgaaagac acgctgatga tctcccgcac cccggaggtc 780

acttgcgtgg tcgtggacgt gtcacatgag gacccagagg tgaagttcaa ttggtacgtg 840

gatggcgtcg aagtccacaa tgccaaaact aagcccagag aagaacagta caattcgacc 900

taccgcgtcg tgtccgtgct cacggtgttg catcaggatt ggctgaacgg gaaggaatac 960

aagtgcaaag tgtccaacaa ggcgctgccg gcaccgatcg agaaaactat ctccaaagcg 1020

aagggacagc ctagggaacc tcaagtctac acgctgccac catcacggga tgaactgact 1080

aagaatcaag tctcactgac ttgtctggtg aaggggtttt accctagcga cattgccgtg 1140

gagtgggaat ccaacggcca gccagagaac aactacaaga ctacccctcc agtgctcgac 1200

tcggatggat cgttcttcct ttactcgaag ctcaccgtgg ataagtcccg gtggcagcag 1260

ggaaacgtgt tctcctgctc ggtgatgcat gaagccctcc ataaccacta tacccaaaag 1320

tcgctgtccc tgtcgccggg aaag 1344