



등록특허 10-2695287



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월13일
(11) 등록번호 10-2695287
(24) 등록일자 2024년08월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7037321(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년03월16일
심사청구일자 2023년11월15일
- (85) 번역문제출일자 2023년10월30일
- (65) 공개번호 10-2023-0155025
- (43) 공개일자 2023년11월09일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7028728
원출원일자(국제) 2018년03월16일
심사청구일자 2021년02월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/022782
- (87) 국제공개번호 WO 2018/170351
국제공개일자 2018년09월20일
- (30) 우선권주장
62/472,214 2017년03월16일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2013096380 A2
KR1020140107493 A
- (73) 특허권자
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호샴 럿지뷰 드라이브 800/850
- (72) 발명자
마르케인 마르크
벨기에 2340 비어세 투른호우트세베크 30
말리아 토마스
미국 19130 펜실베이니아주 필라델피아 825 앤.
29티에이치 에스티.
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 15 항

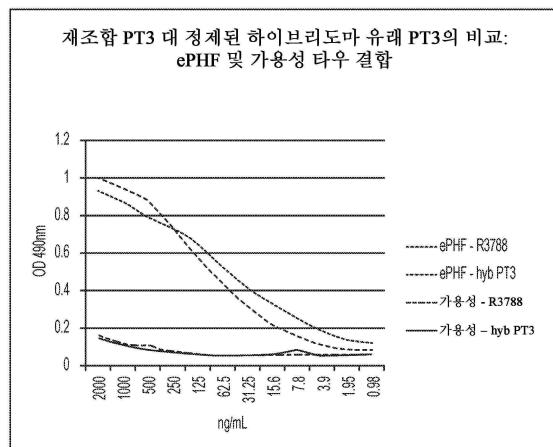
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 항-PHF-타우 항체 및 이의 용도

(57) 요약

단일클론 항-PHF-타우(tau) 항체 및 이의 항원-결합 단편이 기재된다. 또한, 상기 항체를 인코딩하는 핵산, 상기 항체를 포함하는 조성물, 상기 항체를 생성하는 방법 및 타우병증과 같은 질환을 치료 또는 예방하기 위하여 상기 항체를 사용하는 방법이 기재된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/30 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

보르거스 마리안느

벨기에 2340 비어세 투른호우트세베크 30

반 콜렌 크리스토프

벨기에 2340 비어세 투른호우트세베크 30

명세서

청구범위

청구항 1

- a) (i) 서열번호 80의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, (ii) 서열 번호 81의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2, (iii) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, (iv) 서열 번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, (v) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 (vi) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- b) (i) 서열 번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, (ii) 서열 번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2, (iii) 서열 번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, (iv) 서열 번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, (v) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 (vi) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는
- c) (i) 서열 번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, (ii) 서열 번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2, (iii) 서열 번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, (iv) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, (v) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 (vi) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;을 포함하는, 인산화된 타우 단백질에 결합하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

- (a) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(VL);
- (b) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 VL;
- (c) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 VL;
- (d) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 VL;
- (e) 서열 번호 74의 1 내지 118의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 75의 1 내지 107의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 갖는 VL;
- (f) 서열 번호 76의 1 내지 118의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 77의 1 내지 107의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 갖는 VL; 또는
- (g) 서열 번호 78의 1 내지 118의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 79의 1 내지 107의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 갖는 VL;을 포함하는,

인산화된 타우 단백질에 결합하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열 번호 74, 76 및 78 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성이 있는 폴리펩티드 서열을 가지는 중쇄 및 서열 번호 75, 77 및 79 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성이 있는 폴리펩티드 서열을 가지는 경쇄를 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열 번호 74, 76 및 78 중 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 가지는 중쇄 및 서열 번호 75, 77 및 79 중 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 가지는 경쇄를 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서,

- (a) 서열 번호 74의 중쇄 및 서열 번호 75의 경쇄;
- (b) 서열 번호 76의 중쇄 및 서열 번호 77의 경쇄; 또는
- (c) 서열 번호 78의 중쇄 및 서열 번호 79의 경쇄;를 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 6

제2항에 있어서, 인간 중쇄 IgG1 불변 영역 및 인간 경쇄 카파 불변 영역을 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항의 항체 또는 항원-결합 단편, 또는

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항의 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는, 단리된 핵산.

청구항 8

제7항의 단리된 핵산을 포함하는, 백터.

청구항 9

제7항의 핵산을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 10

제1항의 항체 또는 항원-결합 단편, 또는

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항의 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편 및

약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 타우병증의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 병리학적 타우 응집 또는 타우병증의 확산의 감소를 필요로 하는 대상체에 투여하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 타우병증은 가족성 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 산발성 알츠하이머병, 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매(FTDP-17), 진행성 핵상 마비, 피질기저핵 변성, 픽병(Pick's disease), 진행성 피질하 신경교증, 농축체 단독 치매(tangle only dementia), 석회화를 동반하는 광범위 신경섬유 농축체, 은친화성 과립성 치매(argyrophilic grain dementia), 근위축성 측삭 경화증 파킨슨증-치매 복합군, 다운 증후군, 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커병(Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease), 할러포르텐-스파츠병(Hallervorden-Spatz disease), 봉입체 근염, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeld-Jakob disease), 다계통 위축증, C형 니만-픽병(Niemann-Pick disease type C), 프리온 단백질 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 아급성 경화성 뇌뇌염, 근진장성 이영양증, 신경섬유 농축체를 동반하는 비-괌(non-Guamanian) 운동 신경세포병, 뇌염 후 파킨슨증, 만성 외상성 뇌병증, 및 권투선수 치매(복싱병)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항의 항체 또는 항원-결합 단편, 또는

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항의 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편을 생성하는 방법으로서,

상기 항체 또는 항원-결합 단편을 생성하는 조건 하에서 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계, 및

상기 세포 또는 세포 배양물로부터 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

대상체로부터의 생물학적 샘플에서 PHF-타우의 존재를 검출하는 방법으로서,

상기 생물학적 샘플을 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계, 및

상기 대상체로부터 상기 샘플 내의 PHF-타우에 대한 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 간질액, 또는 뇌척수액 샘플인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항-PHF-타우(tau) 항체, 상기 항체를 인코딩하는 핵산 및 발현 벡터, 상기 벡터를 함유하는 재조합 세포, 및 상기 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 상기 항체의 제조 방법, 상기 항체를 사용하여 타우병증(tauopathy)을 포함한 질환을 치료하는 방법, 및 상기 항체를 사용하여 타우병증과 같은 질병을 진단하는 방법이 또한 제공된다.

배경 기술

[0002] 임상적으로 알츠하이머병(Alzheimer's Disease, AD)은 기억, 인지, 사고, 판단, 및 감정적 안정성의 점진적인 상실로 인하여 점진적으로 극심한 정신 황폐(mental deterioration) 및 궁극적으로 사망에까지 이르게 하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌 장애이다. AD는 노인의 진행성 정신 부전(치매)의 매우 보편적인 원인이며, 미국에서는 네 번째로 가장 보편적인 의학적 사망 원인을 나타내는 것으로 여겨진다. AD는 전세계적으로 인종 집단에서 관찰되었고, 현재 및 미래의 공중 보건상의 주요 문제를 나타낸다.

[0003] AD를 가진 개체의 뇌에는 노인성(또는 아밀로이드) 플라크, 아밀로이드 혈관병증(혈관 내 아밀로이드 침착) 및 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangle)로 명명되는 특징적인 병변이 나타난다. 다수의 이들 병변, 특히 쌍나선형 필라멘트의 신경섬유 농축체 및 아밀로이드 플라크가 AD를 가진 환자에서 기억 및 인지 기능에 중요한 인간 뇌의 몇몇 영역에서 일반적으로 발견된다.

[0004] 현재의 AD 치료 상황은 치매를 가진 환자에서 인지 증상을 치료하는 데 승인된 요법만을 포함한다. AD의 진행을 변경시키거나 둔화시키는 승인된 요법은 없다. 잠재적인 질병 변경제는 경도 AD를 가진 환자를 위한 Eli Lilly의 인간화 항- A_{β} 단일클론 솔라네주맙 및 경도 내지 중등도 AD를 가진 환자를 위한 Merck의 소분자 BACE 억제제 베루베세스타트를 포함한다. 이들 요법, 및 다음 10년 내에 출시될 수 있는 대부분의 다른 잠재적인 질병 변경제는 A_{β} (AD의 2가지 "특징적인" 병리학적 징후 중 하나인 아밀로이드 플라크의 주요 성분)를 표적화한다.

[0005] AD의 두 번째 특징적인 병리학적 징후인 신경섬유 농축체는 과인산화된 타우 단백질의 응집체로 주로 구성된다. 타우의 주요 생리학적 기능은 미세소관 중합 및 안정화이다. 미세소관에 대한 타우의 결합은 타우의 미세소관 결합 영역 내의 양전하와 미세소관 격자 상의 음전하 사이의 이온 상호작용에 의해 일어난다(문헌[Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991]). 타우 단백질은 85개의 가능한 인산화 부위를 함유하며, 이들 부위 중 다수에서의 인산화는 타우의 주요 기능을 방해한다. AD에서의 응집된 타우가 과인산화되어 있는 동안에, 축삭 미세소관 격자에 결합된 타우는 과인산화 상태에 있으며, 이로써 이는 타우의 생리학적으로 활성인 폴(pool)과 구별되는 특유의 에피토프를 제공한다.

[0006] 타우병증 전과 및 확산 가설이 기재된 바 있으며, 이는 인간 뇌에서 타우병증 진행의 브라크 병기(Braak stage) 및 전임상 타우 모델에서 타우 응집체 주사 후의 타우병증 확산을 기반으로 한다(문헌[Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845-52, 2009]; 문헌[Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909-13, 2009]).

[0007] 타우 응집을 예방하거나 제거하는 치료제의 개발은 여러 해 동안 관심의 대상이었고, 항-응집 화합물 및 키나제 억제제를 포함한 후보 약물이 임상 시험에 진입하였다(문헌[Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov.* 8:783-93,

2009]). 유전자도입 마우스 모델에서 능동적 타우 면역화 및 수동적 타우 면역화 둘 모두의 유익한 치료적 효과를 나타내는 다수의 연구가 공개되어 있다(문현[Chai et al., *J Biol Chem.* 286:34457-67, 2011]; 문현[Boutajangout et al., *J Neurochem.* 118:658-67, 2011]; 문현[Boutajangout et al., *J Neurosci.* 30:16559-66, 2010]; 문현[Asuni et al., *J Neurosci.* 27:9115-29, 2007]). 포스포(phospho)-유도 및 포스포-비유도 항체에 의한 활성이 보고되어 있다(문현[Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11(1):9-25, 2016]).

[0008] 당업계에서의 진보에도 불구하고, 타우 응집 및 타우병증 진행을 예방하여 타우병증, 예컨대 AD 및 다른 신경퇴행성 질병을 치료하는 효과적인 치료제에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 쌍 나선형 필라멘트(PHF)-타우에 대한 높은 결합 친화성을 갖고 인산화된 타우에 대해 선택적인 항-PHF-타우 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공함으로써 이러한 필요성을 충족시킨다. 마우스 PHF-타우-특이적 항체의 인간 프레임워크 적응화(HFA)에 의해 본 발명의 항체를 생성하였다. 인산화된 타우에 대한 항체의 선택성을 정상 타우 기능을 방해하지 않으면서 병원성 타우에 대한 효능을 가능하게 하는 것으로 여겨진다. 본 발명은 또한 항체를 인코딩하는 핵산, 항체를 포함하는 조성물, 및 항체의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 항-PHF-타우 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HEK 세포 용해물로부터 또는 돌연변이 타우 유전자도입 마우스로부터의 척수 용해물로부터 유래된 타우 시드(seed)를 사용하여 세포 검정에 의해 측정될 때, 타우 시드를 억제한다. 게다가, 본 발명의 항-PHF-타우 항체의 가변 영역 및 마우스 Ig 불변 영역, 예컨대 마우스 IgG2a 불변 영역을 갖는 키메라 항체는 생체내 돌연변이 타우 유전자도입 마우스 모델에서 시딩 활성을 차단하였다.

[0010] AD 뇌에서의 타우병증의 진행은 구별되는 특별한 확산 패턴을 따른다. 전임상 모델에서 세포외 포스포-타우 시드가 뉴런에서 타우병증을 유도할 수 있는 것으로 밝혀져 있다(문현[Clavaguera et al., PNAS 110(23):9535-40, 2013]). 따라서, 타우병증은 하나의 뇌 영역으로부터 그 다음 뇌 영역으로 프리온-유사 방식으로 확산될 수 있는 것으로 여겨진다. 이러한 확산 과정은 근처 뉴런에 의해 흡수될 수 있는 타우 시드의 외재화를 수반하여 추가의 타우병증을 유도할 것이다. 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 본 발명의 항-PHF-타우 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 포스포-타우 시드와 상호작용함으로써 뇌에서의 타우 응집 또는 타우병증의 확산을 예방하는 것으로 여겨진다.

[0011] 일 일반적인 태양에서, 본 발명은 PHF-타우에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 구체적인 실시 형태에서, 항체는 인간화 단일클론 항체이다.

[0012] 특정 태양에 따르면, 본 발명은 인산화된 타우 단백질의 프롤린 풍부 도메인 내의 인산화된 에피토프에서 인산화된 타우 단백질에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 더 특정한 태양에서, 인산화된 에피토프는 타우 단백질의 인산화된 T212 및/또는 인산화된 T217, 및 서열 번호 48, 52 및 54의 아미노산 서열 중 임의의 것을 갖거나 그 내에 있는 인산화된 에피토프를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 타우 단백질의 인산화된 T212 및 인산화된 T217을 포함하는 인산화된 에피토프에 결합한다.

[0013] 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

[0014] (1) 각각 서열 번호 4, 5 및 6의 폴리펩티드 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 16, 17 및 18의 폴리펩티드 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0015] (2) 각각 서열 번호 1, 2 및 3의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 13, 14 및 15의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0016] (3) 각각 서열 번호 7, 8 및 9의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 19, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0017] (4) 각각 서열 번호 10, 11 및 12의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 22, 23 및 24의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0018] (5) 각각 서열 번호 80, 81 및 9의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 70, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0019] (6) 각각 서열 번호 71, 72, 73의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 70,

20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0020] (7) 각각 서열 번호 71, 72 및 73의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 19, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0021] (8) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0022] (9) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0023] (10) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

[0024] (11) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하며,

[0025] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PHF-타우, 바람직하게는 인간 PHF-타우에 결합한다.

[0026] 더 특정한 태양에서, 중쇄 가변 영역 도메인 및 경쇄 가변 영역 도메인 내의 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린으로부터의 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 26, 27, 28 및 29 중 어느 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 또는 서열 번호 74, 76, 및 78 중 어느 하나의 임의의 중쇄의 V_H 영역; 또는 서열 번호 31, 32, 33 및 34 중 어느 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 또는 서열 번호 75, 77 및 79의 경쇄 중 어느 하나의 V_L 영역을 포함한다.

[0028] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 45, 74, 76, 및 78 중 어느 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄; 및 서열 번호 46, 75, 77 및 79 중 어느 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0029] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 불변 영역, 예컨대 인간 또는 마우스 중쇄 IgG 불변 영역, 및 인간 또는 마우스 항체 경쇄 카파 또는 람다 불변 영역을 추가로 포함한다.

[0030] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다.

[0031] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0032] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0033] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0034] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 병리학적 타우 응집 또는 타우병증의 확산의 감소를 필요로 하는 대상체에서 병리학적 타우 응집 또는 타우병증의 확산을 감소시키는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 약제학

적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0035] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 타우병증을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 타우병증은 가족성 알츠하이머병, 산발성 알츠하이머병, 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매(FTDP-17), 진행성 핵상 마비, 피질기저핵 변성, 꾹병(Pick's disease), 진행성 피질하 신경교증, 농축체 단독 치매(tangle only dementia), 석회화를 동반하는 광범위 신경섬유 농축체, 은친화성 과립성 치매(aryrophilic grain dementia), 근위축성 측삭 경화증 파킨슨증-치매 복합군, 다운 증후군, 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커 병(Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease), 할러포르텐-스파츠병(Hallervorden-Spatz disease), 봉입체 근염, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeld-Jakob disease), 다계통 위축증, C형 니만-꽈병(Niemann-Pick disease type C), 프리온 단백질 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 아급성 경화성 범뇌염, 근긴장성 이영양증, 신경섬유 농축체를 동반하는 비-괌(non-Guamanian) 운동 신경세포병, 뇌염후 파킨슨증, 만성 외상성 뇌병증, 및 권투선수 치매(복싱병)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0036] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생성하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생성하는 조건 하에서 상기 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계, 및 상기 세포 또는 세포 배양물로부터 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다.

[0037] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 생성하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 약제학적으로 허용되는 담체와 배합하여 상기 약제학적 조성물을 얻는 단계를 포함한다.

[0038] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 대상체에서 인산화된 PHF-타우의 존재를 검출하는 방법, 또는 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 대상체에서 PHF-타우의 존재를 검출함으로써 상기 대상체에서 타우병증을 진단하는 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명의 다른 태양, 특징 및 이점은 본 발명 및 그의 바람직한 실시 형태의 상세한 설명을 포함한 하기의 개시내용 및 첨부된 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0040] 전술한 발명의 내용뿐만 아니라 하기의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용도 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명은 도면에 나타낸 정확한 실시 형태로 제한되지 않음이 이해되어야 한다.

도 1은 PHF-타우 및 가용성 타우에 대한 재조합적으로 발현된 PT3("R3788") 및 하이브리도마-발현된 PT3("hyb")의 결합을 나타낸다.

도 2는 재조합 정상 인간 타우("NT") 및 사르코실-불용성 PHF-타우("PT")의 SDS-PAGE 후의 마우스 항-타우 단일클론 항체의 웨스턴 블로트 분석을 나타낸다.

도 3a 내지 도 3e는 항-아밀로이드 4G8 양성인 AD 해마 조직에 대한 PT3의 면역조직화학적 분석을 나타낸다. 사용된 단일클론 항체는 (a) PT1, (b) PT2, (c) PT3, (d) AT8, 및 (e) HT7이었다.

도 4a 내지 도 4e는 항-아밀로이드 4G8 음성인 대조군 AD 해마 조직에 대한 PT3의 면역조직화학적 분석을 나타낸다. 사용된 단일클론 항체는 (a) PT1, (b) PT2, (c) PT3, (d) AT8, 및 (e) HT7이었다.

도 5a 및 도 5b는 (a) 타우 녹아웃(knock out) 또는 (b) 야생형 마우스 뇌에서의 PT3의 포스포-타우 특이적 염색 패턴을 나타낸다.

도 6a 및 도 6b는 (a) 타우 녹아웃 또는 (b) 야생형 마우스 뇌에서의 타우-1의 포스포-타우 비특이적 염색 패턴을 나타낸다.

도 7은 PT3 Fab + pT212/pT217-타우 웨პ티드 복합체의 결정 구조를 나타내며, 여기서 PT3 Fab는 공간 채움형 표현(담회색)으로 나타나 있고, 타우 웨პ티드는 막대형 표현(검정색)으로 나타나 있다.

도 8은 PT3 Fab + pT212/pT217-타우 웨პ티드 복합체의 결정 구조를 나타내며, 여기서 PT3은 파라토프 잔기가 막대형 표현으로 나타나 있는 리본(담회색)으로 나타나 있고, 타우 웨პ티드는 막대형 표현(검정색)으로 나타나 있

다.

도 9는 PT3 Fab + pT212/pT217-타우 웨티드 구조에 대한 상호작용 다이어그램을 나타내며, 여기서 웨티드 잔기는 글자를 희게 빼서 검정색 상자 안에 나타나 있고, VH 잔기는 암회색으로 나타나 있고, VL 잔기는 담회색으로 나타나 있으며, 점선은 수소 결합을 나타내고, 실선은 반 데르 발스 접촉을 나타낸다.

도 10은 HFA PT3 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 나타내며, 여기서 HFA 변이체는 PT3 마우스 모 V-영역(VH10 및 VL7)과 정렬되며, 인간 FR에 전달된 모 CDR은 밀줄이 그어져 있고, 잔기 넘버링은 순차적이다.

도 11은 B324 + pT212/pT217-타우 웨티드 복합체의 결정 구조를 나타내며, 여기서 B324는 공간 채움형 표현(담회색)으로 나타나 있고, 타우 웨티드는 막대형 표현(검정색)으로 나타나 있다.

도 12는 B324 + pT212/pT217-타우 웨티드 복합체의 결정 구조를 나타내며, 여기서 B324는 파라토프 잔기가 막대형 표현으로 나타나 있는 리본(담회색)으로 나타나 있고, 타우 웨티드는 막대형 표현(검정색)으로 나타나 있으며, D92(L) 및 E93(L)은 Cγ 및 측쇄 카르복실레이트 원자에 대한 전자 밀도를 갖지 않음에 유의한다.

도 13은 B324 + pT212/pT217-타우 웨티드 구조에 대한 상호작용 다이어그램을 나타내며, 여기서 웨티드 잔기는 글자를 희게 빼서 검정색 상자 안에 나타나 있고, VH 잔기는 암회색으로 나타나 있고, VL 잔기는 담회색으로 나타나 있으며, 점선은 수소 결합을 나타내고, 실선은 반 데르 발스 접촉을 나타낸다.

도 14는 FRET 바이오센서 세포 모델의 개략도를 나타낸다.

도 15는 BRET 검정을 사용하여 결정된 바와 같이, GFP-타우P301L 응집체를 함유하는 HEK 세포 균질액에 의해 시딩된 K18 응집체 유도의 PT3에 의한 억제를 나타낸다.

도 16은 FRET 검정을 사용하여 결정된 바와 같이, TgP301S 척수 균질액에 의해 시딩된 K18 응집체 유도의 PT3에 의한 억제를 나타낸다.

도 17은 마우스 TgP301S 척수 추출물 면역고갈(immunodepletion) 검정의 결과를 나타내며, 이때 데이터는 2개의 독립적인 실험으로부터 획득된 것이다.

도 18은 인간 AD 뇌 추출물 면역고갈 검정의 결과를 나타내며, 이때 데이터는 2개의 실험으로부터 획득된 것이다(예외로서, HT7 및 AT8의 경우에는, n=1임). PT3은 FRET 검정을 사용하여 결정된 바와 같이 타우 시딩을 억제한다.

도 19a 내지 도 19g는 돌연변이 인간 P301L 타우를 발현하는 유전자도입 마우스에서의 주사 모델의 개략도를 나타낸다. IHC 이미지는 하기를 주사한 마우스로부터의 주사된 반구로부터의 대표적인 AT8 염색을 나타낸다: (a 및 b) 주사 후 3개월째의 대조군 추출물, (c 및 d) 주사 후 1개월째의 AD-뇌-유래 ePHF-타우, 및 (e 및 f) 주사 후 3개월째의 AD-뇌-유래 ePHF-타우. (g) 히스토그램은 증가하는 양의 ePHF로 처리된 마우스로부터의 대표적인 생화학적 데이터를 나타낸다.

도 20은 돌연변이 인간 P301L 타우를 발현하는 유전자도입 마우스에서의 PT3의 말초 투여(IP) 후 AD-뇌-유래 PHF-타우 시딩의 타우 응집에 대한 효과를 나타낸다.

도 21은 돌연변이 인간 P301L 타우를 발현하는 유전자도입 마우스에서의 감소하는 용량의 PT3 투여 후 AD-뇌-유래 PHF-타우 시딩의 동시주사의 타우 응집에 대한 효과를 나타낸다.

도 22a 내지 도 22c는 돌연변이 인간 P301L 타우를 발현하는 유전자도입 마우스에서의 PT3 동종형의 IP 말초 투여 후 AD-뇌-유래 PHF-타우 시딩과의 조합된 동시주사의 타우 응집에 대한 효과를 나타낸다. (a)에 따라 처리된 마우스는 (b) 주사된 반구 및 (c) 주사되지 않은 반구에서 효과를 나타낸다.

도 23a 및 도 23b는 AD 환자로부터 유래된 뇌 균질액의 수준과 대비하여 PSP 환자로부터 유래된 뇌 균질액 내의 응집된 타우의 수준을 나타낸다. 사용된 단일클론 항체는 (a) AT8 및 (b) PT3이었다.

도 24a 내지 도 24j는 (a, d) AD 환자 또는 (b, c, e, f) PSP 환자의 뇌 조직으로부터의 동결절편에 대한 (a 내지 c) AT8 또는 (d 내지 f) PT3 항체에 의한 염색을 나타내며, 이는 PSP에서 영향을 받은 해부학적 영역에서의 염색을 입증하였다. (g 및 j) 대조군은 염색을 나타내지 않았다.

도 25a 내지 도 25h는 PHF-타우와의 친화성-성숙된 mAb 및 이들의 Fab에 대한 SPR 결합 센서그램을 나타낸다. 실선(회색)은 2가 결합 모델(mAb) 또는 1:1 랭류어 모델(Fab)을 사용하는 속도론적 적합화(kinetics fitting)를 나타낸다. (a) B296 mAb, (b) B711 mAb, (c) B809 mAb, (d) B333 mAb, (e) B296의 B324 Fab, (f) B711의

B330 Fab, (g) B809의 B332 Fab, (h) B333의 B331 Fab.

도 26a 및 도 26b는 (a) mAb 또는 (b) Fab를 사용한 직접 ELISA 실험에서 pT212/pT217 펩티드에 대한 PT3-HFA 및 친화성 성숙된 변이체의 결합을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041]

다양한 간행물, 논문, 및 특허가 배경기술에 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되어 있거나 기재되어 있으며; 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 재료, 디바이스, 물품 등에 대한 논의는 본 발명에 대한 상황을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러한 논의는 이들 대상 중 임의의 것 또는 모든 것이 개시되거나 청구된 임의의 발명에 대하여 종래 기술의 일부를 형성하는 것을 인정하는 것은 아니다.

[0042]

정의

[0043]

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그렇지 않으면, 본 명세서에 사용되는 소정의 용어는 본 명세서에 제시된 바와 같은 의미를 갖는다. 본 명세서에 인용된 모든 특허, 공개된 특허 출원 및 간행물은 마치 본 명세서에 완전히 기재되어 있는 것처럼 참고로 포함된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 (부정 관사 및 정관사)는, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다.

[0044]

달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 농도 또는 농도 범위와 같은 임의의 수치 값은 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 수치 값은 전형적으로 인용된 값의 ± 10%를 포함한다. 예를 들어, 1 mg/mL의 농도는 0.9 mg/mL 내지 1.1 mg/mL를 포함한다. 마찬가지로, 1% 내지 10% (w/v)의 농도 범위는 0.9% (w/v) 내지 11% (w/v)를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 수치 범위의 사용은 모든 가능한 하위범위, 그 범위 내의 모든 개별 수치 값, 예를 들어 그러한 범위 내의 정수 및 값의 분율을 명시적으로 포함한다.

[0045]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 생물학적 성분(예컨대, 핵산, 펩티드 또는 단백질)이, 그러한 성분이 천연 발생하는 유기체의 다른 생물학적 성분들, 즉 다른 염색체 및 염색체외 DNA 및 RNA, 및 단백질로부터 실질적으로 분리되거나, 따로 생성되거나, 또는 따로 정제되었음을 의미한다. 따라서, "단리된" 핵산, 펩티드 및 단백질은 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 및 단백질을 포함한다. "단리된" 핵산, 펩티드 및 단백질은 조성물의 일부일 수 있고, 그러한 조성물이 핵산, 펩티드, 또는 단백질의 천연 환경의 일부가 아닌 경우 여전히 단리될 수 있다. 이 용어는 또한 숙주 세포에서의 재조합 발현에 의해 제조된 핵산, 펩티드 및 단백질뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산도 포함한다.

[0046]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "면역글로불린"은 넓은 의미로 사용되며, 다중클론 항체, 뮤린(murine), 인간, 인간-적응화, 인간화 및 키메라 단일클론 항체를 비롯한 단일클론 항체 및 항체 단편을 포함하는 면역글로불린 또는 항체 분자를 포함한다.

[0047]

일반적으로, 항체는 특정 항원에 대하여 결합 특이성을 나타내는 단백질 또는 펩티드 사슬이다. 항체 구조는 잘 알려져 있다. 면역글로불린은 중쇄 불변 도메인 아미노산 서열에 따라, 5개의 주요 분류, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 정해질 수 있다. IgA 및 IgG는 동종형(isotype) IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 추가로 하위-분류된다. 따라서, 본 발명의 항체는 5개의 주요 부류 또는 상응하는 하위-클래스 중 임의의 것일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 본 발명의 항체는 야생형 Fc 영역과 비교하여, 연장된 반감기, 감소된 또는 증가된 ADCC 또는 CDC 및 침묵된 Fc 이펙터 기능을 포함하지만 이로 한정되지 않는 변경된 특성을 갖도록 그들의 Fc 영역에 변이를 갖는 것들을 포함한다. 임의의 척추동물 종의 항체 경쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 명확하게 별개의 2개의 유형, 즉 카파 및 람다 중 하나로 정해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인을 함유할 수 있다. 특정 실시 형태에 따르면, 본 발명의 항체는 마우스 항체 또는 인간 항체로부터의 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0048]

중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 더하여, 항체는 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 함유한다. 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역은 "항원-결합 부위"가 개재된 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 항원-결합 부위는 하기와 같이 다양한 용어 및 넘버링 체계를 사용하여 정의된다:

- [0049] (i) 카바트(Kabat): "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 서열 가변성을 기반으로 한다(문헌[Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970]). 일반적으로, 항원-결합 부위는 각각의 가변 영역 내에 3개의 CDR을 가짐(예를 들어, 중쇄 가변 영역(VH) 내의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 가변 영역(VL) 내의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3);
- [0050] (ii) 초티아(Chothia): 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 초티아 및 레스크(Lesk)에 의해 정의되는 바와 같이 구조 면에서 초가변성인 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다(문헌[Chothia and Lesk, *J Mol Biol.* 196:901-17, 1987]). 일반적으로, 항원-결합 부위는 각각의 VH(H1, H2, H3) 및 VL(L1, L2, L3) 내에 3개의 초가변 영역을 갖는다. 넘버링 체계뿐만 아니라 CDR 및 HV의 주석이 아하난단(Abhinandan) 및 마틴(Martin)에 의해 개정되었음(문헌[Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.* 45:3832-9, 2008]);
- [0051] (iii) IMGT: 항원-결합 부위를 형성하는 영역의 다른 정의가 면역글로불린으로부터의 V 도메인과 T-세포 수용체로부터의 V 도메인의 비교를 기준으로 레프란크(Lefranc)(문헌[Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003])에 의해 제안되었다. IMGT(International ImMunoGeneTics) 데이터베이스는 이를 영역의 표준화된 넘버링 및 정의를 제공한다. CDR, HV 및 IMGT 기술 사이의 대응성은 문헌[Lefranc et al., 2003, 상동]에 기재되어 있음;
- [0052] (iv) AbM: 카바트와 초티아 넘버링 체계 사이의 절충이 마틴(문헌[Martin ACR (2010) *Antibody Engineering*, eds Kontermann R, Dubel S (Springer-Verlag, Berlin), Vol 2, pp 33-51])에 의해 기술된 AbM 넘버링 규약이다.
- [0053] (v) 항원-결합 부위는 또한 "특이성 결정 잔기 용법(Specificity Determining Residue Usage)"(SDRU)에 기초하여 기술될 수 있으며(문헌[Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004]), 여기서 SDR은 항원 접촉에 직접 관여하는 면역글로불린의 아미노산 잔기를 지칭한다.
- [0054] "프레임워크" 또는 "프레임워크 서열"은 항원-결합 부위 서열인 것으로 정의된 것들 외에 항체의 가변 영역 내에 남아 있는 서열이다. 항원-결합 부위의 정확한 정의는 상기와 같이 다양한 기술에 의해 결정될 수 있으므로, 정확한 프레임워크 서열은 항원-결합 부위의 정의에 따라 달라진다. 프레임워크 영역(FR)은 가변 도메인의 더 고도로 보존된 부분이다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR(각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함하며, 이들은 일반적으로 3개의 초가변 루프에 의해 연결된 베타-시트 구성을 채택한다. 각각의 사슬 내의 초가변 루프들은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되며, 이때 다른 사슬로부터의 초가변 루프들은 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. 항체의 구조 분석은 상보성 결정 영역에 의해 형성된 결합 부위의 서열과 형상 사이의 관계를 밝혀내었다(문헌[Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817, 1992]; 문헌[Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215:175-182, 1990]). 높은 서열 가변성에도 불구하고, 6개의 루프 중 5개가 "표준 구조"라고 불리는 주체 입체구조의 작은 레퍼토리(repertoire)만을 채택한다. 이를 입체구조는 무엇보다 먼저 루프의 길이에 의해 결정되고, 둘째로, 팩킹(packing), 수소 결합 또는 통상적이지 않은 주체 입체구조를 추정하는 능력을 통해 입체구조를 결정하는, 루프 내의 그리고 프레임워크 영역 내의 소정의 위치에서의 주요 잔기의 존재에 의해 결정된다.
- [0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항원-결합 단편"은 항체 단편, 예컨대 다이아바디(diabody), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 이황화물 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이성 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화물 안정화된 다이아바디(ds 다이아바디), 단일쇄 항체 분자(scFv), 단일 도메인 항체(sdab), scFv 이랑체(2가 다이아바디), 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체의 일부분으로부터 형성된 다중특이성 항체, 낙타화(camelized) 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체, 또는 항원에 결합하지만 완전한 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 단편을 지칭한다. 항원-결합 단편은 모(parent) 항체 또는 모 항체 단편이 결합하는 것과 동일한 항원에 결합할 수 있다. 특정 실시 형태에 따르면, 항원-결합 단편은 경쇄 가변 영역, 경쇄 불변 영역, 및 중쇄의 불변 영역의 Fd 세그먼트를 포함한다. 다른 특정 실시 형태에 따르면, 항원-결합 단편은 Fab 및 F(ab')을 포함한다.
- [0056] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "인간화 항체"는 인간 항체와의 서열 상동성을 증가시키도록 변형되어, 항체의 항원-결합 특성은 유지되지만, 인간 체내에서의 이의 항원성은 감소되도록 한 비-인간 항체를 지칭한다.
- [0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "에피토프"는 면역글로불린, 항체, 또는 이의 항원-결합 단편이 특이적으로 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 연속 아미노산으로부터 또는 단백질의 3차 접힘에 의해 병치된 불연속 아미노산으로부터 이들 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 대한 노출 시에 보유되는 반면, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변

성 용매에 의한 처리 시에 상실된다. 에피토프는 전형적으로 특유의 공간 입체구조로 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 입체구조를 결정하는 방법은, 예를 들어 X-선 결정구조해석 및 2차원 핵자기 공명을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)]을 참조한다.

[0058] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "타우" 또는 "타우 단백질"은 다수의 아이소형을 갖는 풍부한 종주 및 말초 신경계 단백질을 지칭한다. 인간 종주 신경계(CNS)에는, 선택적 스플라이싱으로 인해 크기가 352 내지 441 아미노산 길이의 범위인 6개의 주요 타우 아이소형이 존재한다(문헌[Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009]). 이들 아이소형은, 0 내지 2개의 N-말단 삽입체 및 3개 또는 4개의 직렬로 배열된 미세소관-결합 반복체의 조절된 포함에 의해 서로 상이하며, ON3R(서열 번호 64), 1N3R(서열 번호 65), 2N3R(서열 번호 66), ON4R(서열 번호 67), 1N4R(서열 번호 68), 및 2N4R(서열 번호 69)이라고 지칭된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "대조군 타우"는 인산화 및 다른 번역후 변형이 없는 서열 번호 69의 타우 아이소형을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "타우"는 돌연변이, 예를 들어, 전장 야생형 타우의 점 돌연변이, 단편, 삽입, 결실, 및 스플라이스 변이체를 포함하는 단백질을 포함한다. 용어 "타우"는 또한, 타우 아미노산 서열의 번역후 변형을 포함한다. 번역후 변형은 인산화를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0059] 타우는 미세소관에 결합하며, 타우 인산화에 의해 조절될 수 있는 과정인, 세포를 통한 카고(cargo)의 수송을 조절한다. AD 및 관련 장애에서는, 타우의 비정상적인 인산화가 만연하며, 퍼브릴로의 타우의 응집(쌍 나선형 필라멘트(PHF)라고 명명됨)에 선행하고/하거나 이를 촉발하는 것으로 여겨진다. PHF의 주요 성분은 과인산화된 타우이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "쌍 나선형 필라멘트-타우" 또는 "PHF-타우"는 쌍 나선형 필라멘트 내의 타우 응집체를 지칭한다. 전자 현미경법에서는 PHF 구조 내의 2개의 주요 영역, 퍼지 코트(fuzzy coat) 및 코어 필라멘트(core filament)가 뚜렷하며; 퍼지 코트는 단백질 분해에 민감하고 필라멘트의 외부에 위치하며, 필라멘트의 프로테아제 저항성 코어는 PHF의 골격을 형성한다(문헌[Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4884-8, 1988]).

[0060] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "PHF-타우에 결합하는 단리된 인간화 항체" 또는 "단리된 인간화 항-PHF-타우 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 인간화 항-PHF-타우 항체를 지칭하는 것으로 의도된다(예를 들어, 단리된 인간화 항-PHF-타우 항체에는 PHF-타우 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, 단리된 인간화 항-PHF-타우 항체는 다른 관련 항원, 예를 들어 다른 종(예컨대, PHF-타우 종 상동체)으로부터의 항원에 대한 교차-반응성을 가질 수 있다.

[0061] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적 결합"은 본 발명의 항-PHF-타우 항체가 약 1×10^{-6} M 이하, 예를 들어 약 1×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-12} M 이하, 또는 약 1×10^{-13} M 이하의 해리 상수(K_D)로 사전결정된 표적에 결합하는 능력을 지칭한다. KD는 K_D 대 K_a 의 비(즉, K_D/K_a)로부터 구해지고, 몰농도(M)로 표현된다. 항체에 대한 KD 값은 본 발명을 고려하여 당업계의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 항-PHF-타우 항체의 KD 값은 표면 플라즈몬 공명을 사용함으로써, 예컨대 바이오센서 시스템, 예를 들어 Biacore® 시스템, ProteOn 기기(BioRad), KinExA 기기(Sapidyne), 당업자에게 알려진 ELISA 또는 경쟁적 결합 검정을 사용함으로써 결정될 수 있다. 전형적으로, 항-PHF-타우 항체는, 예를 들어 ProteOn 기기(BioRad)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 때 비특이적 표적에 대한 그의 K_D 보다 적어도 10배 더 작은 K_D 로 사전결정된 표적(즉, PHF-타우)에 결합한다. 그러나, PHF-타우에 특이적으로 결합하는 항-PHF-타우 항체는 다른 관련 표적들과의, 예를 들어 다른 종(상동체)으로부터의 동일한 사전결정된 표적과의 교차-반응성을 가질 수 있다.

[0062] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 동의어로서 "핵산 분자", "뉴클레오티드", 또는 "핵산"으로 지칭되는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 지칭하며, 이는 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. "폴리뉴클레오티드"는, 제한 없이, 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일-가닥, 또는 더 전형적으로는 이중-가닥일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하거나 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물을 포함하는 혼성(hybrid) 분자를 포함한다. 게다가, "폴리뉴클레오티드"는 RNA 또는 DNA 또는 RNA 및 DNA 둘 모두를 포함하는 삼중-가닥 영역을 지칭한다. 용어 폴리뉴클레오티드는 또한 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 또는 RNA, 및 안정성 또는 다른 이유로 골격이 변형된 DNA 또는 RNA를 포함한다. "변형된" 염기는, 예를 들어 트리틸화(tritylated) 염기 및 통상이 아닌 염기, 예컨대 이노신을 포함한다. DNA 및

RNA에 대해 다양한 변형이 실행될 수 있으며; 따라서, "폴리뉴클레오티드"는 천연에서 전형적으로 발견되는 바와 같은 폴리뉴클레오티드의 화학적으로, 효소적으로, 또는 대사적으로 변형된 형태뿐만 아니라, 바이러스 및 세포에 특징적인 DNA 및 RNA의 화학적 형태도 포함한다. "폴리뉴클레오티드"는, 종종 올리고뉴클레오티드로 지칭되는 비교적 짧은 핵산 쇄를 또한 포함한다.

[0063] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 레플리콘이며, 그 안에는 세그먼트의 복제 또는 발현을 일으키도록 다른 핵산 세그먼트가 작동가능하게 삽입될 수 있다.

[0064] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 세포를 지칭한다. "숙주 세포"는 임의의 유형의 세포, 예를 들어 초대 세포, 배양 중인 세포, 또는 세포주로부터의 세포일 수 있다. 일 실시 형태에서, "숙주 세포"는 본 발명의 핵산 분자로 형질감염된 세포이다. 다른 실시 형태에서, "숙주 세포"는 그러한 형질감염된 세포의 자손 또는 잠재적 자손이다. 세포의 자손은, 예를 들어, 후속 세대에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향 또는 숙주 세포 계놈 내로의 핵산 분자의 통합으로 인해 모세포와 동일하거나 동일하지 않을 수 있다.

[0065] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "발현"은 유전자 산물의 생합성을 지칭한다. 이 용어는 RNA로의 유전자의 전사를 포함한다. 이 용어는 또한, 하나 이상의 폴리펩티드로의 RNA의 번역을 포함하고, 모든 천연 발생 전사 후 및 번역후 변형을 추가로 포함한다. PHF-타우에 결합하는 발현된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 숙주 세포의 세포질 내에 있거나, 세포 배양물의 성장 배지와 같은 세포외 환경 내로 유입될 수 있거나, 또는 세포막에 고정될 수 있다.

[0066] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "담체"는 임의의 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 오일, 지질, 지질 함유 베시클, 미소구체, 리포좀 캡슐화, 또는 약제학적 제형에 사용하기 위한 당업계에 잘 알려진 다른 물질을 지칭한다. 담체, 부형제, 또는 희석제의 특성은 특정 응용을 위한 투여 경로에 좌우될 것임이 이해될 것이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 본 발명에 따른 조성물의 유효성 또는 본 발명에 따른 조성물의 생물학적 활성을 방해하지 않는 비독성 물질을 지칭한다. 특정 실시 형태에 따르면, 본 개시내용을 고려하여, 항체 약제학적 조성물에 사용하기에 적합한 임의의 약제학적으로 허용되는 담체가 본 발명에 사용될 수 있다.

[0067] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 동물, 바람직하게는 포유류를 지칭한다. 특정 실시 형태에 따라, 대상체는 비-영장류(예를 들어, 낙타, 당나귀, 얼룩말, 소, 돼지, 말, 염소, 양, 고양이, 개, 래트, 토끼, 기니 피그, 또는 마우스) 또는 영장류(예를 들어, 원숭이, 침팬지, 또는 인간)를 포함하는 포유류이다. 특정 실시 형태에서, 대상체는 인간이다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료적 유효량"은 대상체에서 원하는 생물학적 또는 의학적 반응을 도출하는 활성 성분 또는 성분의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 언급된 목적에 관하여 경험적으로 그리고 일상적인 방식으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 최적의 투여량 범위의 확인을 돋기 위해 시험관내(*in vitro*) 검정이 선택적으로 사용될 수 있다. 특정 유효 용량의 선택은 치료 또는 예방될 질병, 수반되는 증상, 환자의 체중, 환자의 면역 상태 및 당업자에게 알려진 다른 인자를 포함한 몇몇 인자의 고려에 기초하여 당업자에 의해 (예를 들어, 임상 시험을 통해) 결정될 수 있다. 제형에 사용되는 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 질병의 중증도에 좌우될 것이며, 전문의의 판단 및 각각의 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래하는 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0069] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 모두 타우병증과 관련된 하나 이상의 측정가능한 물리적 파라미터의 개선 또는 역전을 지칭하고자 하는 것이며, 이는 반드시 대상체에서 식별가능하지는 않지만, 대상체에서 식별가능할 수 있다. 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 또한, 퇴행을 야기하거나, 진행을 예방하거나, 적어도 질병, 장애 또는 질환의 진행을 둔화시키는 것을 지칭할 수 있다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 타우병증과 관련된, 경감, 발생 또는 발병의 예방, 또는 하나 이상의 증상의 지속기간의 감소를 지칭한다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질병, 장애 또는 질환의 재발의 예방을 지칭한다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질병, 장애 또는 질환을 갖는 대상체의 생존율의 증가를 지칭한다. 특정 실시 형태에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 대상체에서 질병, 장애 또는 질환의 제거를 지칭한다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "타우병증"은 뇌 내에 타우의 병리학적 응집을 수반하는 임의의 신경퇴행성 질병을 포함한다. 가족성 및 산발성 AD에 더하여, 다른 예시적인 타우병증은 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을

동반하는 전측두엽 치매(FTDP-17), 진행성 학상 마비, 피질기저핵 변성, 광범위 신경섬유 농축체, 은진화성 과립성 치매, 근위축성 측삭 경화증 파킨슨증-치매 복합군, 다운 증후군, 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커병, 할러포르텐-스파츠병, 봉입체 근염, 크로이츠펠트-야콥병, 다계통 위축증, C형 니만-핀병, 프리온 단백질 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 아급성 경화성 범뇌염, 근긴장성 이영양증, 신경섬유 농축체를 동반하는 비-팜 운동 신경세포병, 뇌염후 파킨슨증, 및 만성 외상성 뇌병증, 예컨대 권투선수 치매(복싱병)이다(문헌[Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011]).

[0071] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 대상체에 대한 2가지 이상의 요법의 투여와 관련하여 용어 "병용하여"는 하나 초과의 요법의 사용을 지칭한다. 용어 "병용하여"의 사용은 요법이 대상체에게 투여되는 순서를 제한하지 않는다. 예를 들어, 대상체에게 제2 요법을 투여하기 전에(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 16시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 전에), 그와 동시에, 또는 그 후에(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 16시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후에) 제1 요법(예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물)이 투여될 수 있다.

항-PHF-타우 항체

[0073] 일 일반적인 태양에서, 본 발명은 PHF-타우에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 그러한 항-PHF-타우 항체는 PHF-타우 상의 인산화된 에피토프에 결합하거나 또는 PHF-타우 상의 비-인산화된 에피토프에 결합하는 특성을 가질 수 있다. 항-PHF-타우 항체는 치료제로서, 그리고 생물학적 샘플 내의(예를 들어, 조직 또는 세포 내의) PHF-타우를 검출하기 위한 연구 시약 또는 진단 시약으로서 유용할 수 있다.

[0074] 특정 태양에 따르면, 본 발명은 인산화된 타우 단백질의 프롤린 풍부 도메인 내의 에피토프에서 인산화된 타우 단백질에 결합하는 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 더 특정한 태양에서, 본 발명은 인산화된 T212 및/또는 T217 잔기를 포함하는 에피토프에서 인산화된 타우 단백질에 결합하는 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 더 특정한 태양에서, 본 발명은 서열 번호 48, 52, 및 54 중 임의의 것의 인산화된 에피토프에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 더욱 더 특정한 태양에서, 본 발명은 서열 번호 48의 인산화된 에피토프에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 인간화 항체일 수 있다.

[0075] 표 1은 포스포 타우에 결합하는 5개의 인간화 mAb에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 서열 번호에 의해 나타낸다. 인간화 mAb B296에 대해서는 중쇄 및 경쇄 서열이 또한 나타나 있다. 이 mAb를 친화성 성숙시켰다(표 3 참조).

[0076] 표 2는 초티아, ABM, 카바트 및 IMGT 넘버링 체계에 따라 정의된 본 발명의 예시적인 항체의 항원-결합 부위 잔기(즉, CDR 영역)를 나타낸다. 예시적인 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호 26-29에 제시되어 있고, 예시적인 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호 31-34에 제시되어 있다.

[0077] 표 3은 B296으로부터 생성된 친화성 성숙된 단일클론 항체(즉, B333, B711 및 B809)의 서열을 나타낸다. 가변 영역 서열은 중쇄 및 경쇄 서열에 밑줄이 그어져 있다. 친화성 성숙된 단일클론 항체의 CDR 내의 볼드체 아미노산은 B296 CDR 서열과 대비하여 치환을 나타낸다. CDR 서열은 카바트 넘버링 체계에 의해 결정된다.

[0078] [표 1]

인간화 포스포 타우 mAb				
mAb	V _H	V _L	중쇄	경쇄
B235	26	31		
B252	28	34		
B280	26	34		
B282	28	31		
B296	27	31	45	46

[0079]

[0080]

[표 2]

인간화 항-PHF-타우 항체 B296 의 VH(VH10) 및 VL(VL7) 도메인에 대한 CDR 서열

V-영역 ID	초티아 넘버링 체계		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSY (서열 번호 1)	SKGGN (서열 번호 2)	GWGDYGWFAY (서열 번호 3)
VL7	KASQDINRYLN (서열 번호 13)	RANRLLD (서열 번호 14)	LQYDEFPLT (서열 번호 15)
ABM 넘버링 체계			
VH10	GFTFSSYAMS (서열 번호 4)	SISKGGNTY (서열 번호 5)	GWGDYGWFAY (서열 번호 6)
	KASQDINRYLN (서열 번호 16)	RANRLLD (서열 번호 17)	LQYDEFPLT (서열 번호 18)
카바트 넘버링 체계			
VH10	SYAMS (서열 번호 7)	SISKGGNTYYADSVKG (서열 번호 8)	GWGDYGWFAY (서열 번호 9)
	KASQDINRYLN (서열 번호 19)	RANRLLD (서열 번호 20)	LQYDEFPLT (서열 번호 21)
IMGT 넘버링 체계			
VH10	GFTFSSYA (서열 번호 10)	ISKGGNT (서열 번호 11)	ARGWGVDYGFAYW (서열 번호 12)
	QDINRY (서열 번호 22)	RAN (서열 번호 23)	LQYDEFPLT (서열 번호 24)

[0081]

[0082]

[표 3]

천화성 성숙된 B296

mAb	명칭	서열 번호	서열
PT1B33			
	V _H	CDR1 80	SSYAMS
		CDR2 81	SISKGNTYYADSVKG
		CDR3 9	GWGDYGFAY
	중쇄	74	QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAVASIKGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCARGWGWDYGFAYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPTEVTCVVDVSHEDPEVFKFNVYVVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG
	V _L	CDR1 70	KASQDINRWLN
		CDR2 20	RANRLLD
		CDR3 21	LQYDEFPLT
	경쇄	75	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRWLNWFOQKPGKAPKSLIYRANRLLDGVPSPRSFSGSGSTDFLTISLQPEDFATYYCLOQYDEFPLTGFQGKTLKLEIKRTVAAPSVFIPPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PT1B711			
	V _H	CDR1 71	TSYAMS
		CDR2 72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3 73	GWGIYGFAY
	중쇄	76	QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAVASIKGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCARGWGWIYGFAYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPTEVTCVVDVSHEDPEVFKFNVYVVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG
	V _L	CDR1 70	KASQDINRWLN
		CDR2 20	RANRLLD
		CDR3 21	LQYDEFPLT
	경쇄	77	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRWLNWFOQKPGKAPKSLIYRANRLLDGVPSPRSFSGSGSTDFLTISLQPEDFATYYCLOQYDEFPLTGFQGKTLKLEIKRTVAAPSVFIPPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PT1B809			
	V _H	CDR1 71	TSYAMS
		CDR2 72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3 73	GWGIYGFAY
	중쇄	78	QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVAVASIKGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCARGWGWIYGFAYWGQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPTEVTCVVDVSHEDPEVFKFNVYVVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG
	V _L	CDR1 19	KASQDINRYLN
		CDR2 20	RANRLLD
		CDR3 21	LQYDEFPLT
	경쇄	79	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFOQKPGKAPKAPKSLIYRANRLLDGVPSPRSFSGSGSTDFLTISLQPEDFATYYCLOQYDEFPLTGFQGKTLKLEIKRTVAAPSVFIPPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0083]

[0084]

인간화 항체는, 인간 항체(수용자 항체로 지칭됨)로부터 실질적으로 유래하는 가변 영역 프레임워크 잔기 및 비-인간 항체(즉, 마우스-항체)(공여자 면역글로불린으로 지칭됨)로부터 실질적으로 유래하는 상보성 결정 영역을 갖는다. 문헌[Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:10029-10033, 1989], 국제 특허 출원 공개 WO 90/07861호, US5693762호, US5693761호, US5585089호, US5530101호, 및 US5225539호를 참조한다. 존재하는 경우, 불변 영역(들)은 또한 인간 면역글로불린으로부터 실질적으로 또는 전체적으로 유래한다. 인간 가변 도메인은 통상, 프레임워크 서열이 CDR의 유래가 되는 뮤린 가변 영역 도메인과 높은 서열 동일성 정도를 나타내는 인간 항체로부터 선택된다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 잔기는 동일하거나 상이한 인간 항체 서열로부터 유래될 수 있다. 인간 항체 서열은 천연 발생 인간 항체의 서열일 수 있거나, 또는 몇몇 인간 항체의 컨센서스 서열일 수 있다. 국제 특허 출원 공개 WO 92/22653호를 참조한다. 인간 가변 영역 프레임워크 잔기로부터의 소정의 아미노산은 CDR 입체구조 및/또는 항원에 대한 결합에 미치는 그들의 가능한 영향에 기초하여 치환을 위해 선택된다. 그러한 가능한 영향의 조사는 모델링, 특정 위치에서의 아미노산의 특징 검사, 또는 특정 아미노산의 치환 또는 돌연변이 생성의 효과의 경험적 관찰에 의해 행해진다.

[0085]

예를 들어, 아미노산이 뮤린 가변 영역 프레임워크 잔기와 선택된 인간 가변 영역 프레임워크 잔기 사이에서 상이할 때, 인간 프레임워크 아미노산은 마우스 항체로부터의 동등한 프레임워크 아미노산에 의해 통상 치환되어

야 하는데, 이는, 그러한 아미노산이 하기와 같을 것이 합리적으로 예상될 때 행해진다: (1) 항원에 직접 비공유적으로 결합하거나, (2) CDR 영역에 인접하거나, (3) CDR 영역과 달리 상호작용하거나(예를 들어, CDR 영역의 약 6 옹스트롬 이내에 존재함), 또는 (4) VL-VH 계면에 참여함.

[0086] 치환에 대한 다른 후보는 그 위치에서의 인간 면역글로불린에 대해 통상적이지 않은 수용자 인간 프레임워크 아미노산이다. 이들 아미노산은 마우스 공여자 항체의 동등한 위치로부터의 또는 더 전형적인 인간 면역글로불린의 동등한 위치로부터의 아미노산으로 치환될 수 있다. 치환에 대한 다른 후보는 그 위치에서의 인간 면역글로불린에 대해 통상적이지 않은 수용자 인간 프레임워크 아미노산이다. 인간화 면역글로불린의 가변 영역 프레임워크는 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 그러한 서열의 컨센서스와 적어도 85%의 서열 동일성을 통상 나타낸다.

[0087] 항체 인간화는 잘 알려진 방법, 예컨대 특이성 결정 잔기 재표면화(specificity determining residues resurfacing; SDRR)(US2010/0261620호), 재표면화(문헌[Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991]), 수퍼 인간화(국제 특허 출원 공개 WO 04/006955호) 및 인간 스트링 함량 최적화(US7657380호)를 사용하여 달성될 수 있다. 이식 또는 인간화에 유용한 인간 프레임워크 서열은 당업자에 의해 관련 데이터베이스로부터 선택될 수 있다. 선택된 프레임워크는 문헌[Queen et al., 1989, 상동]에 개시된 것들과 같은 기법에 의해 결합 친화성을 보존하거나 향상시키도록 추가로 변형될 수 있다. 특정 실시 형태에 따르면, 마우스 모 항체로부터의 항-PHF-타우 항체를 인간화하기 위한 방법은 하기 실시예 4에 기재된 것들을 포함한다.

[0088] 본 발명의 항체는 다양한 기법에 의해, 예를 들어 하이브리도마 방법(문헌[Kohler and Milstein, *Nature*. 256:495-7, 1975])에 의해 생성될 수 있다. 수용자 항체(전형적으로 다른 포유동물 종, 예컨대 인간)로부터 유래된 경쇄 및 종쇄 불변 영역과 회합된 공여자 항체(전형적으로 뮤린)로부터 유래된 경쇄 및 종쇄 가변 영역을 포함하는 키메라 단일클론 항체는 US4816567호에 개시된 방법으로 제조될 수 있다. 비-인간 공여자 면역글로불린(전형적으로 뮤린)으로부터 유래된 CDR을 갖고 분자의 나머지 면역글로불린-유래 부분이 하나 이상의 인간 면역글로불린으로부터 유래된 CDR-이식 단일클론 항체는 US5225539호에 개시된 것과 같은 당업자에게 알려져 있는 기법에 의해 제조될 수 있다. 어떠한 비-인간 서열도 부재하는 완전 인간 단일클론 항체는 하기 문헌에 언급된 기법에 의해 인간 면역글로불린 유전자도입 마우스로부터 제조될 수 있다(문헌[Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994]; 문헌[Fishwild et al., *Nat Biotechnol.* 14:845-51, 1996]; 문헌[Mendez et al., *Nat Genet.* 15:146-56, 1997]). 인간 단일클론 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리로부터 제조되고 최적화될 수 있다(문헌[Knappik et al., *J Mol Biol.* 296:57-86, 2000]; 문헌[Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001]; 문헌[Shi et al., *J Mol Biol.* 397:385-96, 2010]).

[0089] 본 발명의 단일클론 항체는 서열 번호 1, 4, 7, 10, 71, 80 중 어느 하나의 HCDR1; 서열 번호 2, 5, 8, 11, 72, 81 중 어느 하나의 HCDR2; 서열 번호 3, 6, 9, 12, 73 중 어느 하나의 HCDR3; 서열 번호 13, 16, 19, 22, 70 중 어느 하나의 LCDR1; 서열 번호 14, 17, 20, 23 중 어느 하나의 LCDR2; 서열 번호 15, 18, 21, 24 중 어느 하나의 LCDR3을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명은 또한 서열 번호 1, 4, 7, 10, 71, 80 중 어느 하나의 HCDR1; 서열 번호 2, 5, 8, 11, 72, 81 중 어느 하나의 HCDR2; 서열 번호 3, 6, 9, 12, 73 중 어느 하나의 HCDR3; 서열 번호 13, 16, 19, 22, 70 중 어느 하나의 LCDR1; 서열 번호 14, 17, 20, 23 중 어느 하나의 LCDR2; 서열 번호 15, 18, 21, 24 중 어느 하나의 LCDR3과 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 더 바람직하게는 적어도 99% 동일한 CDR 서열을 갖는 단일클론 항체를 포함한다.

[0090] 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

[0091] (1) 각각 서열 번호 4, 5 및 6의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 각각 서열 번호 16, 17 및 18의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0092] (2) 각각 서열 번호 1, 2 및 3의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 13, 14 및 15의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0093] (3) 각각 서열 번호 7, 8 및 9의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 19, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0094] (4) 각각 서열 번호 10, 11 및 12의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 22, 23 및 24의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0095] (5) 각각 서열 번호 80, 81 및 9의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호

70, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0096] (6) 각각 서열 번호 71, 72, 73의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 70, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0097] (7) 각각 서열 번호 71, 72 및 73의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 19, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0098] (8) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0099] (9) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0100] (10) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

[0101] (11) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하며,

[0102] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PHF-타우, 바람직하게는 인간 PHF-타우에 결합하고, 상기 중쇄 가변 영역 도메인 및 상기 경쇄 가변 영역 도메인 내의 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린으로부터의 아미노산 서열을 포함한다.

[0103] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 26, 27, 28, 또는 29와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호 31, 32, 33 또는 34와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0104] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 74, 76, 및 78 중 어느 하나의 중쇄 내의 가변 영역과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호 75, 77, 및 79 중 어느 하나의 경쇄 내의 가변 영역과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0105] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 26과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 31과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0106] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 28과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 34와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0107] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 26과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게

100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄, 및 서열 번호 75와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 서열 번호 74의 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 75의 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.

[0115] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 76과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄, 및 서열 번호 77과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 서열 번호 76의 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 77의 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.

[0116] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 78과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄, 및 서열 번호 79와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 서열 번호 78의 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 및 서열 번호 79의 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.

[0117] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 인간 중쇄 IgG1 불변 영역 및 인간 경쇄 카파 불변 영역을 포함하는 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다.

[0118] 다른 특정 태양에 따르면, 본 발명은 단리된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것으로, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 5×10^{-9} M 이하의 해리 상수(K_D), 바람직하게는 1×10^{-9} M 이하 또는 1×10^{-10} M 이하의 K_D 로 인간 PHF-타우에 결합하며, 여기서 K_D 는 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해, 예컨대 Biacore 또는 ProteOn 시스템을 사용함으로써 측정된다.

[0119] PHF-타우에 결합하는 인간화 항체 및 이의 항원-결합 단편의 기능적 활성을 당업계에 알려져 있고 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법에 의해 특성화될 수 있다. PHF-타우에 결합하는 항체 및 이의 항원-결합 단편을 특성화하기 위한 방법은 Biacore, ELISA, 및 FACS 분석을 포함한 친화성 및 특이성 검정; 면역조직화학 분석; 타우 시딩을 억제하는 데 있어서의 항체의 효능을 결정하기 위한 시험관내 세포 검정 및 생체내 주입 검정; 항체의 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성의 존재를 검출하기 위한 세포성 세포독성 검정 등을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 특정 실시 형태에 따르면, PHF-타우에 결합하는 항체 및 이의 항원-결합 단편을 특성화하기 위한 방법은 하기 실시예 5, 실시예 6, 실시예 8 및 실시예 9에 기재된 것들을 포함한다. PHF-타우에는 결합하지만 대조군 타우에는 결합하지 않는 인간화 항체의 예시적인 마우스 모 항체는 서열 번호 25의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 30의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 PT3이다(예를 들어, 전체적으로 참고로 포함된 미국 특허 제9,371,376호 참조).

[0120] 몇몇 잘 알려져 있는 방법이 본 발명의 항체의 결합 에피토프를 결정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 개별 성분 둘 모두의 구조가 알려져 있는 경우에, 컴퓨터 모의실험(*in silico*) 단백질-단백질 도킹(docking)이 양립 가능한 상호작용 부위를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 항원 및 항체 복합체를 사용하여 수소-중수소(H/D) 교환을 수행하여, 항체에 의해 결합되는 항원 상의 영역을 맵핑할 수 있다. 항원의 세그먼트 및 점 돌연변이 생성을 사용하여, 항체 결합에 중요한 아미노산의 위치를 찾을 수 있다. 항체-항원 복합체의 공결정(co-crystal) 구조를 사용하여, 에피토프 및 파라토프에 기여하는 잔기를 확인한다. 특정 실시 형태에 따르면, 본 발명의 항체의 결합 에피토프를 결정하기 위한 방법은 하기 실시예 2, 실시예 3 및 실시예 7에 기재된 것들을 포함한다.

[0121] 본 발명의 항체는 이중특이성 또는 다중특이성일 수 있다. 예시적인 이중특이성 항체는 PHF-타우 상의 2개의 별개의 에피토프에 결합할 수 있거나 PHF-타우와 아밀로이드 베타(A베타)에 결합할 수 있다. 다른 예시적인 이중특이성 항체는 PHF-타우와 내인성 혈액-뇌 장벽 트랜스사이트스(transcytosis) 수용체, 예를 들어 인슐린

수용체, 전달 수용체, 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체, 및 지질단백질 수용체에 결합할 수 있다. 예시적인 항체는 IgG1 유형의 것이다.

[0122] 당업자에게 알려진 기법에 의한 Fc 변형을 통해 본 발명의 항체의 면역 이펙터 특성이 향상되거나 침묵될 수 있다. 예를 들어, Fc 이펙터 기능, 예컨대 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 식세포작용, 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이, 이를 활성을 담당하는 Fc 내의 잔기를 변형시킴으로써 제공 및/또는 제어될 수 있다. 항체 반감기를 연장하는 Fc 도메인 내의 잔기를 돌연변이시킴으로써 약동학적 특성이 또한 향상될 수 있다(문헌[Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20:685-91, 2009]).

[0123] 추가적으로, 본 발명의 항체는 글리코실화, 이성질체화, 탈글리코실화(deglycosylation), 또는 천연 비발생 공유적 변형, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 첨가 및 지질화와 같은 과정에 의해 변역후 변형될 수 있다. 그러한 변형은 생체내에서 또는 시험관내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 폴리에틸렌 글리콜에 접합되어(PEG화되어), 그의 약동학적 프로파일을 개선할 수 있다. 접합은 당업자에게 알려져 있는 기법에 의해 수행될 수 있다. 치료적 항체와 PEG의 접합은 기능을 방해하지 않으면서 약력학적 특성을 향상시키는 것으로 밝혀져 있다(문헌[Knight et al., *Platelets.* 15:409-18, 2004]; 문헌[Leong et al., *Cytokine.* 16:106-19, 2001]; 문헌[Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003])

[0124] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 단백질의 코딩 서열을 변화(예를 들어, 대체, 결실, 삽입 등)시킬 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 변경할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 예시적인 단리된 폴리뉴클레오티드는, 각각 서열 번호 4, 5 및 6에 제시된 면역 글로불린 중쇄 CDR HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 폴리펩티드, 또는 각각 서열 번호 16, 17 및 18에 제시된 면역글로불린 경쇄 CDR LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 다른 예시적인 단리된 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체 가변 영역을 인코딩하는, 서열 번호 36-39 또는 41-44에 제시된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드이다. 주어진 발현 시스템에서의 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy) 또는 코돈 선호도를 고려하여, 본 발명의 항체를 인코딩하는 다른 폴리뉴클레오티드도 또한 본 발명의 범주 내에 있다. 본 발명의 단리된 핵산은 잘 알려진 재조합 기법 또는 합성 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 단일 클론 항체를 인코딩하는 DNA는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 용이하게 단리되고 서열분석된다. 하이브리도마가 생성되는 경우, 그러한 세포는 그러한 DNA의 공급원으로서의 역할을 할 수 있다. 대안적으로, 코딩 서열과 번역 산물이 연결되어 있는 디스플레이 기법, 예컨대 파지 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리가 사용될 수 있다.

[0125] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 플라스미드, 코스미드, 파지 벡터, 또는 바이러스 벡터와 같은, 본 발명을 고려하여 당업자에게 알려진 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 벡터는 재조합 발현 벡터, 예컨대 플라스미드이다. 벡터는 발현 벡터의 통상적인 기능을 확립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어 프로모터, 리보솜 결합 요소, 종결자, 인핸서, 선택 마커, 및 복제 기점을 포함할 수 있다. 프로모터는 구성적, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 세포에 핵산을 전달할 수 있는 다수의 발현 벡터가 당업계에 알려져 있으며, 세포에서의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 생성을 위해 본 발명에 사용될 수 있다. 통상적인 클로닝 기법 또는 인공 유전자 합성이 본 발명의 실시 형태에 따른 재조합 발현 벡터를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0126] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명을 고려하여 당업자에게 알려진 임의의 숙주 세포가 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 재조합 발현에 사용될 수 있다. 그러한 숙주 세포는 진핵 세포, 세균 세포, 식물 세포 또는 고세균(archeal) 세포일 수 있다. 예시적인 진핵 세포는 포유류, 곤충, 조류 또는 다른 동물 기원의 것일 수 있다. 포유류 진핵 세포는 불멸화 세포주, 예컨대 하이브리도마 또는 골수종 세포주, 예컨대 SP2/0(미국 버지니아주 머내서스 소재의 ATCC(American Type Culture Collection), CRL-1581), NS0(영국 월트셔주 솔즈베리 소재의 ECACC(European Collection of Cell Cultures), ECACC No. 85110503), FO(ATCC CRL-1646) 및 Ag653(ATCC CRL-1580) 뮤린 세포주를 포함한다. 예시적인 인간 골수종 세포주는 U266(ATCC CRL-TIB-196)이다. 다른 유용한 세포주는, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 예컨대 CHO-K1 SV(Lonza

Biologics), CHO-K1(ATCC CRL-61, Invitrogen), 또는 DG44로부터 유래된 것들을 포함한다.

[0127] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생성하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생성하는 조건 하에서 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 배양하는 단계, 및 (예를 들어, 상충액으로부터의) 상기 세포 또는 세포 배양물로부터 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다. 발현된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 세포로부터 수집되고, 당업계에 알려진 통상적인 기법에 따라 정제될 수 있다.

약제학적 조성물 및 치료 방법

[0129] 본 발명의 항-PHF-타우 항체 또는 본 발명의 이의 단편은 뇌 내에 타우의 병리학적 응집을 수반하는 신경퇴행성 질병, 또는 타우병증을 갖는 환자, 예컨대 AD를 앓고 있는 환자에서 증상을 치료, 감소 또는 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0130] 따라서, 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0131] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 질병, 장애 또는 질환, 예컨대 타우병증의 증상의 치료 또는 감소를 필요로 하는 대상체에서 질병, 장애 또는 질환, 예컨대 타우병증의 증상을 치료 또는 감소시키는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0132] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 병리학적 타우 응집 또는 타우병증의 확산의 감소를 필요로 하는 대상체에서 병리학적 타우 응집 또는 타우병증의 확산을 감소시키는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0133] 본 발명의 실시 형태에 따르면, 약제학적 조성물은 단일클론 항-PHF-타우 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 포함한다. 인간화 항-PHF-타우 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 관련하여 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 치료적 유효량은 질병, 장애, 또는 질환의 치료를 가져오거나; 질병, 장애, 또는 질환의 진행을 예방 또는 둔화시키거나; 또는 면역 질병, 장애, 또는 질환과 관련된 증상을 감소시키거나 완전히 경감시키는 단일클론 항-PHF-타우 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양을 의미한다.

[0134] 특정 실시 형태에 따르면, 치료적 유효량은 하기 효과 중 하나, 둘, 셋, 넷, 또는 그 이상을 달성하기에 충분한 요법의 양을 지칭한다: (i) 치료하고자 하는 질병, 장애, 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상의 중증도를 감소 또는 개선함; (ii) 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상의 지속기간을 감소시킴; (iii) 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상의 진행을 예방함; (iv) 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상의 퇴행을 야기함; (v) 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상의 재발을 예방함; (vi) 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상을 갖는 대상체의 입원을 감소시킴; (vii) 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상을 갖는 대상체의 입원 길이를 감소시킴; (viii) 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상을 갖는 대상체의 생존율을 증가시킴; (ix) 대상체에서 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 증상을 억제하거나 감소시킴; 및/또는 (xii) 다른 요법의 예방적 또는 치료적 효과(들)를 향상시키거나 개선함.

[0135] 특정 실시 형태에 따라, 치료하고자 하는 질병, 장애, 또는 질환은 타우병증이다. 더 특정한 실시 형태에 따르면, 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환은 가족성 알츠하이머병, 산발성 알츠하이머병, 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매(FTDP-17), 진행성 핵상 마비, 피질기저핵 변성, 광범위 진행성 피질하 신경교증, 농축체 단독 치매, 석회화를 동반하는 광범위 신경섬유 농축체, 은친화성 과립성 치매, 근위축성 측삭경화증 파킨슨증-치매 복합군, 다운 증후군, 계르스트만-슈투로이슬러-샤잉커병, 할러포르텐-스파츠병, 봉입체 근염, 크로이츠펠트-야콥병, 다계통 위축증, C형 니만-핀병, 브리온 단백질 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 아급성 경화성 범뇌염, 근긴장성 이영양증, 신경섬유 농축체를 동반하는 비-팜 운동 신경세포병, 뇌염후 파킨슨증, 만성 외상성 뇌병증, 또는 권투선수 치매(복싱병)를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0136] 타우병증-관련 행동적 표현형은 인지 장애, 조기 인격 변조 및 탈억제, 감정둔마(apathy), 의지결여증(abulia), 무언증, 행위상실증, 보속증(perseveration), 상동성 운동/행동, 과잉구강증(hyperorality), 부조화, 순차적 임무의 계획 또는 체계화 불능, 이기심/무감각, 반사회적 특성, 공감 결여, 말더듬기(halting), 빈번한 착어증 오류를 동반하는 비문법적 담화(그러나 상대적으로 보존된 이해력), 손상된 이해력 및 단어 찾기 장애, 서서히 진

행하는 보행 불안정성, 후방돌진, 동결, 자주 넘어짐, 비-레보도파 반응성 체간 강직(non-levodopa responsive axial rigidity), 핵상 주시 마비, 사각파 단수축, 느린 수직 단속성 암구운동(slow vertical saccade), 가성 연수 마비, 사지 실행증, 근육 긴장이상, 피질성 감각상실, 및 진전증을 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0137] 치료에 적합한 환자는 AD 또는 다른 타우병증의 위험이 있는 무증상 개체뿐만 아니라, 현재 증상을 나타내는 환자를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 치료에 적합한 환자는 공지된 AD의 유전자적 위험, 예를 들어, AD의 가족력 또는 게놈 내의 유전자적 위험 인자의 존재를 가진 개체를 포함한다. 예시적인 위험 인자는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP) 내의, 특히 위치 717 및 위치 670 및 671에서의 돌연변이(각각 하디(Hardy) 및 스웨디시(Swedish) 돌연변이)이다. 다른 위험 인자는 프레세닐린 유전자 PS1 및 PS2 내의 그리고 ApoE4 내의 돌연변이, 고콜레스테롤혈증 또는 죽상 동맥경화증의 가족력이다. 상기 위험 인자의 존재에 의해 현재 AD를 앓고 있는 개체를 특징적인 치매로부터 인식할 수 있다. 추가로, AD를 가진 개체를 확인하기 위한 다수의 진단 시험이 이용가능하다. 이들은 뇌척수액 타우 및 A베타 42 수준의 측정을 포함한다. 상승된 타우 및 감소된 A베타 42 수준은 AD의 존재를 의미한다. AD를 가진 개체는 또한 AD 및 관련 장애 협회(AD and Related Disorders Association) 기준에 의해 진단될 수 있다.

[0138] 본 발명의 항-PHF-타우 항체는, 타우의 병리학적 응집을 수반하는 신경퇴행성 질병, 예를 들어 AD 또는 다른 타우병증의 치료 또는 예방을 위한 치료제 및 예방제 둘 모두로서 적합하다. 무증상 환자에서는, 임의의 연령(예를 들어, 약 10, 15, 20, 25, 30세)에서 치료를 시작할 수 있다. 그러나 통상적으로는, 환자가 약 40, 50, 60, 또는 70세에 도달할 때까지 치료를 시작하는 것이 필요하지 않다. 치료는 전형적으로 소정 기간에 걸쳐 다회 투여를 수반한다. 시간 경과에 따라 항체, 또는 치료제에 대한 활성화된 T-세포 또는 B-세포 반응을 검정함으로써 치료를 모니터링할 수 있다. 반응이 하락할 경우, 추가 투여(boostor dosage)가 지시될 수 있다.

[0139] 예방적 응용에서는, 질병의 생화학적, 조직학적, 및/또는 행동 증상, 질병의 전개 중에 나타나는 그의 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 포함하여, 질병의 위험을 제거 또는 감소시키거나, 중증도를 경감시키거나, 개시를 지연시키기에 충분한 양으로 약제학적 조성물 또는 약제를 AD에 걸리기 쉽거나 달리 AD의 위험이 있는 환자에게 투여한다. 치료적 응용에서는, 질병의 증상 중 임의의 것(생화학적, 조직학적, 및/또는 행동)을 감소시키거나, 정지시키거나, 지연시키기에 충분한 양으로 조성물 또는 약제를 이러한 질병이 의심되거나 이러한 질병을 이미 앓고 있는 환자에게 투여한다. 치료제의 투여는 특징적인 알츠하이머 병리가 아직 전개되지 않은 환자에서 경도 인지 장애를 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0140] 치료적 유효량 또는 투여량은 다양한 인자, 예컨대 치료하고자 하는 질병, 장애 또는 질환, 투여 수단, 표적 부위, 대상체의 생리학적 상태(예를 들어, 연령, 체중, 건강을 포함함), 대상체가 인간인지 또는 동물인지의 여부, 투여되는 다른 약, 및 치료가 예방적인지 또는 치료적인지의 여부에 따라 변동될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 최적으로 적정된다.

[0141] 본 발명의 항체는 약제학적으로 허용되는 담체 중에 활성 성분으로서 항체의 치료적 유효량을 함유하는 약제학적 조성물로서 제조될 수 있다. 담체는 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들, 예컨대 낙화생유, 대두유, 꿩유, 참기름 등을 포함하는, 물 및 오일과 같은 액체일 수 있다. 예를 들어, 0.4% 식염수 및 0.3% 글리신이 사용될 수 있다. 이들 용액은 무균성이고 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들은 통상적인 잘 알려진 멸균 기법(예를 들어, 여과)에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조정제 및 완충제, 안정제, 증점제, 윤활제 및 착색제 등과 같은 생리적 조건에 근접시키기 위하여 필요한, 약제학적으로 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다. 그러한 약제학적 제형에서 본 발명의 항체의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.5 중량% 미만, 통상 적어도 약 1 중량%부터 많게는 15 또는 20 중량%까지 변동될 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식에 따라, 필요 용량, 유체 부피, 점성 등에 기초하여 주로 선택될 것이다.

[0142] 본 발명의 항체의 치료적 용도를 위한 투여 방식은 작용제를 숙주에게 전달하는 임의의 적합한 경로일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물은 비경구 투여, 예를 들어, 피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하, 비강내, 또는 두개내 투여에 적합하도록 제형화될 수 있거나, 뇌 또는 척추의 뇌척수액 내로 투여될 수 있다.

[0143] 치료는 단회 용량 스케줄로, 또는 다회 용량 스케줄로 주어질 수 있으며, 다회 용량 스케줄에서는 치료의 1차 과정이 1 내지 10회의 개별 용량을 사용한 후, 반응을 유지하고/하거나 강화하기 위해 필요한 후속 시간 간격에, 예를 들어, 제2 용량을 위해 1 내지 4개월에 다른 용량이 주어지며, 필요한 경우에는, 몇 개월 후에 후속 용량(들)이 주어질 수 있다. 적합한 치료 스케줄의 예는 (i) 0, 1개월 및 6개월, (ii) 0, 7일 및 1개월, (iii) 0 및 1개월, (iv) 0 및 6개월, 또는 질병 증상을 감소시키거나 질병의 심각성을 감소시킬 것으로 예상되는 바람직한 반응을 유도하는 데 충분한 다른 스케줄을 포함한다.

- [0144] 본 발명의 항체는 저장을 위해 동결건조되고, 사용 전에 적합한 담체 중에 재구성될 수 있다. 이 기법은 항체 및 다른 단백질 제제에 효과적인 것으로 밝혀져 있으며, 당업계에 알려진 동결건조 및 재구성 기법이 사용될 수 있다.
- [0145] 특정 실시 형태에 따르면, 타우병증의 치료에 사용되는 조성물은 관련 신경퇴행성 질병의 치료에 효과적인 다른 작용제와 병용하여 사용될 수 있다. AD의 경우, 본 발명의 항체는 아밀로이드-베타(A베타)의 침착을 감소시키거나 예방하는 작용제와 병용하여 투여될 수 있다. PHF-타우와 A베타 병리는 상승적일 가능성이 있다. 그러므로, PHF-타우와 A베타 및 A베타-관련 병리 둘 모두의 제거를 동시에 목표로 하는 병용 요법이 각각을 개별적으로 목표로 하는 것보다 더 효과적일 수 있다. 파킨슨병 및 관련 신경퇴행성 질병의 경우, 알파-시누클레인 단백질의 응집된 형태를 제거하기 위한 면역 조절이 또한 신형 요법이다. 타우 및 알파-시누클레인 단백질 둘 모두의 제거를 동시에 목표로 하는 병용 요법은 각각의 단백질을 개별적으로 목표로 하는 것보다 더 효과적일 수 있다.
- [0146] 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 생성하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 약제학적으로 허용되는 담체와 배합하여 상기 약제학적 조성물을 얻는 단계를 포함한다.
- [0147] **진단 방법 및 키트**
- [0148] 본 발명의 단일클론 항-PHF-타우 항체는 대상체에서 AD 또는 다른 타우병증을 진단하는 방법에 사용될 수 있다.
- [0149] 따라서, 다른 일반적인 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 대상체에서 PHF-타우의 존재를 검출하는 방법, 및 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 대상체에서 PHF-타우의 존재를 검출함으로써 상기 대상체에서 타우병증을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [0150] 인산화된 타우는, 생물학적 샘플을 진단 항체 시약과 접촉시키고, 대상체로부터의 샘플 내의 인산화된 타우에 대한 진단 항체 시약의 결합을 검출함으로써, 대상체로부터의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장, 간질액, 또는 뇌척수액 샘플) 내에서 검출될 수 있다. 검출을 수행하기 위한 검정은 ELISA, 면역조직화학, 웨스턴 블로트, 또는 생체내 이미징과 같은 잘 알려진 방법을 포함한다. 예시적인 진단 항체는 본 발명의 항체 PT3이다.
- [0151] 진단 항체 또는 유사한 시약은 정맥내 주사에 의해 환자의 체내로 투여되거나, 숙주에게 작용제를 전달하는 임의의 적합한 경로에 의해 뇌 내로 직접 투여될 수 있다. 항체의 투여량은 치료 방법에 대한 것과 동일한 범위 이내여야 한다. 전형적으로, 항체는 표지되지만, 일부 방법에서는 인산화된 타우에 대해 친화성을 갖는 1차 항체는 표지되지 않고, 2차 표지제(labeling agent)가 1차 항체에 결합하기 위해 사용된다. 표지의 선택은 검출 수단에 좌우된다. 예를 들어, 광학적 검출에는 형광 표지가 적합하다. 외과적 중재가 없는 단층촬영 검출을 위해서는 상자성 표지(paramagnetic label)의 사용이 적합하다. PET 또는 SPECT를 사용하여 방사성 표지가 또한 검출될 수 있다.
- [0152] 대상체로부터의 샘플에서, 또는 대상체에서, 표지된 PHF-타우, 타우 응집체, 및/또는 신경섬유 농축체의 수, 크기, 및/또는 강도를 상응하는 기저선 값과 대비함으로써 진단이 수행된다. 기저선 값은 건강한 개체의 집단 내의 평균 수준을 나타낼 수 있다. 기저선 값은 또한 동일한 대상체에서 결정된 이전 수준을 나타낼 수 있다.
- [0153] 전술된 진단 방법은 또한, 치료 전에, 치료 동안에, 또는 치료 후에 대상체에서 인산화된 타우의 존재를 검출함으로써 요법에 대한 대상체의 반응을 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 기저선과 대비하여 값의 감소는 치료에 대한 양성 반응을 의미한다. 병리학적 타우가 뇌로부터 제거됨에 따라 생물학적 체액에서 값이 또한 일시적으로 증가할 수 있다.
- [0154] 본 발명은 추가로, 상기 진단 방법 및 모니터링 방법을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다. 전형적으로, 그러한 키트는 본 발명의 항체와 같은 진단 시약, 및 선택적으로, 검출가능한 표지를 함유한다. 진단 항체 자체가 검출가능한 표지(예를 들어, 형광 문자, 비오틴 등)를 함유할 수 있으며, 이는 직접 검출가능하거나 2차 반응(예를 들어, 스트렙타비딘과의 반응)을 통해 검출가능하다. 대안적으로, 검출가능한 표지를 함유하는 2차 시약이 사용될 수 있으며, 2차 시약은 1차 항체에 대한 결합 특이성을 갖는다. 생물학적 샘플 내의 PHF-타우를 측정하기에 적합한 진단 키트에서, 키트의 항체는 미세역가 디시(microtiter dish)의 웰과 같은 고체상(solid phase)에 사전결합되어 공급될 수 있다.
- [0155] 본 출원 전체에 걸쳐 인용된 (서적 참고문헌, 발행 특허, 공개된 특허 출원, 및 공계류 중인 특허 출원을 포함

한) 모든 인용된 참고문헌의 내용은 이로써 본 명세서에 참고로 명확히 포함된다.

[0156] **실시 형태**

[0157] 본 발명은 또한 하기의 비제한적인 실시 형태를 제공한다.

[0158] 실시 형태 1은 인산화된 타우 단백질의 프롤린 풍부 도메인 내의 인산화된 에피토프에서 인산화된 타우 단백질에 결합하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0159] 실시 형태 2는 인산화된 타우 단백질의 인산화된 T212를 포함하는 인산화된 에피토프에서 상기 인산화된 타우 단백질에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 바람직하게는 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 54의 아미노산 서열을 갖거나 그 내에 있는 인산화된 에피토프에 결합한다.

[0160] 실시 형태 3은 인산화된 타우 단백질의 인산화된 T217을 포함하는 인산화된 에피토프에서 상기 인산화된 타우 단백질에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 바람직하게는 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 52의 아미노산 서열을 갖거나 그 내에 있는 인산화된 에피토프에 결합한다.

[0161] 실시 형태 4는 인산화된 타우 단백질의 인산화된 T212 및 인산화된 T217을 포함하는 인산화된 에피토프에서 상기 인산화된 타우 단백질에 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 바람직하게는 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호 48의 아미노산 서열을 갖거나 그 내에 있는 인산화된 에피토프에 결합한다.

[0162] **실시 형태 5는**

[0163] (1) 각각 서열 번호 4, 5 및 6의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 각각 서열 번호 16, 17 및 18의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0164] (2) 각각 서열 번호 1, 2 및 3의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 13, 14 및 15의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0165] (3) 각각 서열 번호 7, 8 및 9의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 19, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0166] (4) 각각 서열 번호 10, 11 및 12의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 22, 23 및 24의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0167] (5) 각각 서열 번호 80, 81 및 9의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 70, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0168] (6) 각각 서열 번호 71, 72, 73의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 70, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0169] (7) 각각 서열 번호 71, 72 및 73의 폴리펩티드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 번호 19, 20 및 21의 폴리펩티드 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0170] (8) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0171] (9) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

[0172] (10) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

[0173] (11) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편으로서,

- [0174] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PHF-타우에 결합하고,
- [0175] 상기 중쇄 가변 영역 도메인 및 상기 경쇄 가변 영역 도메인 내의 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린으로부터의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0176] 실시 형태 6은 서열 번호 26, 27, 28, 또는 29와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호 31, 32, 33 또는 34와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0177] 실시 형태 7은 서열 번호 74, 76, 및 78 중 어느 하나의 중쇄 내의 가변 영역과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호 75, 77, 및 79 중 어느 하나의 경쇄 내의 가변 영역과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0178] 실시 형태 8은
- [0179] (1) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L ;
- [0180] (2) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L ;
- [0181] (3) 서열 번호 26의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 34의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L ;
- [0182] (4) 서열 번호 28의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L ;
- [0183] (5) 서열 번호 27의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 31의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L ;
- [0184] (6) 서열 번호 74의 중쇄의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 75의 경쇄의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L ;
- [0185] (7) 서열 번호 76의 중쇄의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 77의 경쇄의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L ; 또는
- [0186] (8) 서열 번호 78의 중쇄의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_H 및 서열 번호 79의 경쇄의 폴리펩티드 서열을 갖는 V_L 을 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0187] 실시 형태 9는 서열 번호 45와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄, 및 서열 번호 46과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98% 동일한, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄를 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0188] 실시 형태 10은, 실시 형태 1 내지 실시 형태 9 중 어느 하나에 있어서, 인간 중쇄 IgG1 불변 영역 및 인간 경쇄 카파 불변 영역을 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0189] 실시 형태 11은, 실시 형태 1 내지 실시 형태 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 5×10^{-9} M 이하의 K_D , 바람직하게는 1×10^{-9} M 이하 또는 1×10^{-10} M 이하의 K_D 로 인간 PHF-타우에 결합하며, 여기서 상기 K_D 는 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해, 예컨대 Biacore 시스템을 사용함으로써 측정되는, 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0190] 실시 형태 12는 실시 형태 1 내지 실시 형태 12 중 어느 하나의 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는, 단리된 핵산이다.

- [0191] 실시 형태 13은 실시 형태 12의 단리된 핵산을 포함하는, 벡터이다.
- [0192] 실시 형태 14는 실시 형태 13의 핵산을 포함하는, 숙주 세포이다.
- [0193] 실시 형태 15는 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물이다.
- [0194] 실시 형태 16은 병리학적 타우 응집 또는 타우병증의 확산의 감소를 필요로 하는 대상체에서 병리학적 타우 응집 또는 타우병증의 확산을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 실시 형태 15의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0195] 실시 형태 17은 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 타우병증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시 형태 15의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0196] 실시 형태 18은, 실시 형태 17에 있어서, 상기 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 타우병증을 치료하기 위한 추가의 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이다.
- [0197] 실시 형태 19는 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 타우병증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시 형태 15의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 상기 타우병증은 가족성 알츠하이머 병, 산발성 알츠하이머 병, 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매(FTDP-17), 진행성 핵상 마비, 피질기저핵 변성, 광범위 신경교증, 농축체 단독 치매, 석회화를 동반하는 광범위 신경섬유 농축체, 은친화성 과립성 치매, 근위축성 측삭 경화증 파킨슨증-치매 복합군, 다운 증후군, 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커병, 할러포르텐-스파츠병, 봉입체 근염, 크로이츠펠트-야콥병, 다계통 위축증, C형 니만-괴병, 프리온 단백질 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 아급성 경화성 범뇌염, 근긴장성 이영양증, 신경섬유 농축체를 동반하는 비-팜 운동 신경세포병, 뇌염후 파킨슨증, 만성 외상성 뇌병증, 및 권투선수 치매(복싱병)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0198] 실시 형태 20은, 실시 형태 19에 있어서, 상기 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 타우병증을 치료하기 위한 추가의 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법이다.
- [0199] 실시 형태 21은 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편을 생성하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 생성하는 조건 하에서 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계, 및 상기 세포 또는 세포 배양물로부터 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0200] 실시 형태 22는 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 생성하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 약제학적으로 허용되는 담체와 배합하여 상기 약제학적 조성물을 얻는 단계를 포함한다.
- [0201] 실시 형태 23은 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 타우병증을 치료하는 데 사용하기 위한 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0202] 실시 형태 24는 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 타우병증을 치료하는 데 사용하기 위한 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편 또는 실시 형태 15의 약제학적 조성물로서, 상기 타우병증은, 예를 들어 가족성 알츠하이머 병, 산발성 알츠하이머 병, 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매(FTDP-17), 진행성 핵상 마비, 피질기저핵 변성, 광범위 신경교증, 농축체 단독 치매, 석회화를 동반하는 광범위 신경섬유 농축체, 은친화성 과립성 치매, 근위축성 측삭 경화증 파킨슨증-치매 복합군, 다운 증후군, 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커병, 할러포르텐-스파츠병, 봉입체 근염, 크로이츠펠트-야콥병, 다계통 위축증, C형 니만-괴병, 프리온 단백질 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 아급성 경화성 범뇌염, 근긴장성 이영양증, 신경섬유 농축체를 동반하는 비-팜 운동 신경세포병, 뇌염후 파킨슨증, 만성 외상성 뇌병증, 또는 권투선수 치매(복싱병)이다.
- [0203] 실시 형태 25는 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 타우병증을 치료하는 약제를 제조하기 위한 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편의 용도이다.
- [0204] 실시 형태 26은 타우병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 타우병증을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 단리된 단일클론 항체 또는 항원-결합 단편의 용도로서, 상기 타우병증은, 예를 들어 가족성 알츠하이머 병, 산발성 알츠하이머 병, 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는

전측두엽 치매(FTDP-17), 진행성 핵상 마비, 괴질기저핵 변성, 괴병, 진행성 괴질하 신경교증, 농축체 단독 치매, 석회화를 동반하는 광범위 신경섬유 농축체, 은진화성 과립성 치매, 근위축성 측삭 경화증 파킨슨증-치매 복합군, 다운 증후군, 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커병, 할러포르텐-스파츠병, 봉입체 근염, 크로이츠펠트-야콥병, 다계통 위축증, C형 니만-핀병, 프리온 단백질 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 아급성 경화성 범뇌염, 근긴장성 이영양증, 신경섬유 농축체를 동반하는 비-팜 운동 신경세포병, 뇌염후 파킨슨증, 만성 외상성 뇌병증, 또는 권투선수 치매(복싱병)이다.

[0205] 실시 형태 27은 대상체로부터의 생물학적 샘플에서 인산화된 타우의 존재를 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 생물학적 샘플을 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계 및 상기 대상체로부터 상기 샘플 내의 PHF-타우에 대한 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 단계를 포함한다.

[0206] 실시 형태 28은, 실시 형태 27에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 간질액, 또는 뇌척수액 샘플인, 방법이다.

[0207] 실시 형태 29는 대상체로부터의 생물학적 샘플에서 인산화된 타우의 존재를 검출함으로써 상기 대상체에서 타우 병증을 진단하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 생물학적 샘플을 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계 및 상기 대상체로부터 상기 샘플 내의 PHF-타우에 대한 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 단계를 포함한다.

실시예

[0209] 본 발명의 하기 실시예는 본 발명의 성질을 추가로 예시하기 위한 것이다. 하기 실시예는 본 발명을 제한하지 않으며, 본 발명의 범주는 첨부된 청구범위에 의해 결정됨이 이해되어야 한다.

실시예 1 - 항체 특성화

[0211] AD 뇌로부터의 풍부화된 PHF-타우(ePHF-타우)에 의한 Balb/c 마우스의 면역화로부터 유래된 한 세트의 항체 및 PT3를 직접 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 웨스턴 블롯, 및 면역조직화학(IHC)에서 포스포-타우 vs. 비-포스포-타우에 대한 표적 선택성에 대해 시험하였다. PT3은 서열 번호 25의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열 번호 30의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 갖는 마우스-하이브리도마-유래 항체이다. PT3의 VH 및 VL 도메인에 대한 CDR 서열은 미국 특히 제9,371,376호에 제시되어 있다. PT3을 인간 프레임워크 적응화(HFA) 방법(실시예 4 참조)을 사용하여 인간화하여 본 발명의 인간화 항-포스포-타우 항체를 생성하였다(표 1 및 표 2 참조). 인간화 B296은 PT3과 동일한 CDR 서열을 갖는다. 인간화 mAb B296을 친화성 성숙시켜 본 발명의 추가의 항체를 생성하였다(표 3 참조).

ELISA

[0213] 마우스 IgG1(mIgG1)로서의 재조합 PT3을 ELISA 포맷으로 풍부화된 PHF-타우 및 재조합 인간 야생형 타우에 대한 결합에 대해 평가하였다. 이러한 재조합적으로 유래된 PT3을 정제된 하이브리도마-유래 PT3과 대비하였다. 결과는 정제된 하이브리도마-유래 PT3 항체 배치와 재조합적으로 유래된 PT3 항체 배치 양쪽간에 비견되는 결합 적정 곡선을 보여주었다(도 1). PHF-타우 상에서 강한 결합이 존재하였으며, 더 높은 농도에서 가용성 타우 상에서 최소한의 결합이 존재하였다.

웨스턴 블롯

[0215] 정제된 비-인산화된 재조합 인간 타우 및 AD 뇌로부터 준비된 사르코실-불용성 PHF-타우에 대하여 PT3을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. PT3은 PHF-타우와의 선택적 반응성을 보여주었는데, 이는 포스포-선택적 참조 항체 AT8 pS202/pT205/pS208(문헌[Mercken et al., *Acta Neuropathol.* 84(3):265-72, 1992]; 문헌[Malia et al., *Proteins.* 84:427-434, 2016]) 및 AT100 pT212/pS214(문헌[Mercken et al., 1992, 상동]; 문헌[Hoffmann et al., *Biochemistry.* 36(26):8114-24, 1997])와 유사하였다(도 2). 포스포-비의존적 참조 항체 HT7(문헌[Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991])은 재조합 타우 및 PHF-타우 둘 모두와 반응하였다. 포스포-민감성인 애피토프에 대해 유도되는 BT2는 S199/S202에서 인산화되지 않은 재조합 타우와만 반응하였다(문헌[Mercken, 1991, 상동]). 다른 웨스턴 블롯 실험에서, PT3은 더 높은 농도에서 블롯팅되었을 때에도 재조합 타우와의 약한 반응성을 나타내었다.

인간 뇌에 대한 면역조직화학

[0217] AD 및 대조군 뇌의 포르말린-고정되고 파라핀-포매된 절편에 대해 면역조직화학적 분석을 수행하여 원위치(*in situ*)에서 타우병증과의 반응성을 확인하였다. PT3은 타우병증-특이적 참조 진단 항체 양성 대조군 AT8과 유사하지만 더 강한 반응성 패턴을 나타내었다(도 3). 이들 실험 조건 하에서는 대조군 뇌 내의 정상 타우와 어떠한 유의한 반응도 검출되지 않았다(도 4).

[0218] 야생형 마우스 및 타우 녹아웃 마우스에 대한 면역조직화학

[0219] 야생형 마우스 뇌 및 타우 녹아웃 마우스 뇌에서 PT3에 의해 IHC 분석을 수행하였다. 야생형 마우스 뇌에서의 PT3에 의한 IHC 분석은 야생형 타우의 선택된 풀과의 반응성이 최적의 에피토프 보존의 조건 하에서 관찰될 수 있음을 나타낸다. PT3의 염색 패턴은 세포체수상돌기 국재화(도 5, 화살표)를 보여주는데, 이는 래트 및 인간-생검-유래 조직에서의 항-포스포-타우 항체에 대해 문헌에 기재된 염색을 연상시킨다(문헌[Matsuo et al., *Neuron*. 13(4):989-1002, 1994]). 타우-1 항체에 대해 관찰되는 바와 같은 타우에 대한 전형적인 비-포스포 측삭 염색 패턴(도 6, 화살표)은 존재하지 않는데, 이는 PT3이 미세소관-결합된 타우의 생리학적으로 중요한 풀과는 제한된 반응성을 가짐을 나타낸다. 타우 녹아웃 동물에서의 반응성의 부재는 PT3 염색 패턴의 타우 특이성을 확인시켜 준다.

[0220] 야생형 마우스 뇌에서의 PT3 에피토프(pT212/pT217, 실시예 2 참조)에서의 인산화의 존재는 문헌[Morris et al. (*Nat Neurosci*. 18(8):1183-9, 2015)]에 의한 질량 분석적 분석에서 T212 및 T217의 마우스 상동체에서의 인산화의 검출에 의해 지지된다(문헌[*Nat Neurosci*. 18(8):1183-9, 2015]). 이는 PT3 에피토프가 또한 타우 인산화 및 응집체 형성의 초기 단계에 존재할 것임을 시사하는데, 이는 치료적 항체 에피토프에 있어서 바람직할 것이다.

[0221] 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의한 결합 평가

[0222] PT1 및 PT3 항-PHF-타우 항체에 대한 PHF-타우 및 재조합 타우와의 상호작용을 ProteOn(미국 캘리포니아주 허큘레스 소재의 Bio-Rad) 및 Biacore(스웨덴 옵살라 소재의 Biacore) 기기 상에서 SPR에 의해 평가하였다. 총 타우 항체 HT7을 양성 대조군으로서 시험하였고, AT8을 항-PHF-타우 참조 항체로서 시험하였다.

[0223] 표 4 및 표 5는 PHF-타우 및 재조합 타우와의 이들 항체의 친화성 평가의 대표적인 결과를 나타낸다. PT3 단일 클론 항체는 PHF-타우에 대한 매우 긴밀한 결합을 나타내었다(표 4).

[0224] [표 4]

하이브리도마 및 재조합 mAb 및 Fab의 PHF-타우와의 ProteOn SPR 친화도

mAb/Fab 명칭	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM) ^a
HT7 mAb	$(7.06 \pm 0.62) \times 10^5$	$(9.26 \pm 2.77) \times 10^{-5}$	131 ± 41
PT1 mAb (hyb)	2.01×10^5	6.47×10^{-5}	322
PT3 mAb (rec mG2a)	$(3.12 \pm 0.40) \times 10^6$	$<5.0 \times 10^{-5}$	≤ 16
PT3 Fab	$(1.83 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.15 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	63 ± 3
AT8 mAb (hyb)	$(2.30 \pm 0.19) \times 10^6$	$(2.11 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	92 ± 8
AT8 Fab	$(8.89 \pm 0.87) \times 10^5$	$(2.30 \pm 0.14) \times 10^{-2}$	$25,844 \pm 2,995$

n 이 3 개 이상의 반복시험물인 경우, 표준 편차가 기록되어 있음;

hyb, 하이브리도마-발현된 mAb; rec, 재조합 mAb;

^a 활성 안의 K_D 값은 75 nM 의 주사된 mAb 농도를 제외시킴으로써 획득됨.

[0225]

[0226] 재조합 PT3-mG2a의 겉보기 결합 친화도(K_D)는 16 pM 이하였으며, 이와 함께 매우 느린 해리 속도(off-rate)를 가졌다. 하이브리도마-발현된 PT3의 경우 4개의 반복시험물 중 1개에서 재조합 타우에 대해 단지 매우 약한 결합이 관찰되었다(표 5).

[0227] [표 5]

하이브리도마 및 재조합 mAb 및 Fab의 재조합 타우와의 Biacore SPR 친화도

mAb/Fab 명칭	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
HT7 mAb	$(3.86 \pm 2.00) \times 10^6$	$(1.18 \pm 0.54) \times 10^2$	$3,050 \pm 2,110$
PT1 mAb (hyb)		유의한 결합 없음 ^a	
PT3 mAb (hyb)		4 개의 반복시험물 중 1 개에서만 낮은 결합이 관찰됨	
PT3 mAb (rec mG2a)		결합 없음	
PT3 Fab		결합 없음	
AT8 mAb (hyb)		결합 없음 ^a	

hyb, 하이브리도마-발현된 mAb; rec, 재조합;

^a Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로부터의 재조합 타우(5 배 희석물에서 0.12 내지 75 nM)를 사용하여 ProteOn 상에서 시험하였으며, 이것은 추후에 응집될 것으로 결정됨. 다른 모든 시험된 샘플의 경우, 자체 생성된 재조합 타우를 Biacore 상에서 사용하였다.

[0228]

[0229] 에피토프의 다수의 카페를 갖는 PHF-타우의 다량체적/응집된 성질과 IgG의 2가 성질로 인해, 단일클론 항체 친화성을 본 연구 포맷에서 결합력(avidity)에 의해 영향을 받았다. Fab 친화성은 항체의 고유 친화도에 대한 정보를 제공한다. PT3 Fab는 PHF-타우에 대한 강한 고유 결합 친화도($K_D = 63 \text{ pM}$) 및 느린 해리 속도를 나타내었다(표 4). Biacore SPR에서의 재조합 타우와의 Fab의 반응성은 분석 조건 하에서 검출 한계 미만이었다(표 5).

[0230] 특성화 연구는 PT3이 PHF-타우에 선택적으로 결합하고, AD 뇌로부터 유래된 PHF-타우에 대해 고친화성을 갖는다는 것을 입증하였다.

실시예 2 – PT3의 에피토프 맵핑

[0232] 표 6에 나타낸 포스포펩티드들의 패널을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(ProteOn)에 의해 PT3의 에피토프를 결정하였다.

[0233] 재료 및 방법. 중쇄의 C-말단에 6xHis 태그를 갖는, 마우스 가변 및 인간 IgG1/κ 불변 영역을 갖는 키메라 버전으로서 PT3 Fab(B187)를 생성하였다(VH10, 서열 번호 25 및 VL7, 서열 번호 30). Fab를 HEK 293 세포에서 일시적 발현에 의해 생성하고, Ni-친화성 크로마토그래피에 의해 정제하고, 20 mM Tris(pH 7.4), 50 mM NaCl(Sino Biologicals) 내로 투석하였다.

[0234] 표 6에 나타낸 14개의 타우 포스포펩티드 각각에 대한 PT3 Fab의 결합 친화성을 Bio-Rad ProteOn XPR36을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 평가하였다. 웨프티드는 N-말단에 PEG4 모이어티(moiety) 및 단쇄 비오틴을 갖도록 표준 화학적 방법(New England Peptide)에 의해 합성하였다. 비오틴화 웨프티드를 뉴트라비딘-코팅된 NLC 바이오센서 칩 상에 포획하고, PT3 Fab를 표면 위로 유동시켜 속도론적 파라미터를 측정하였다.

[0235] 모든 실험은, 전개 완충액 및 샘플 희석 완충액 둘 모두로서 인산염 완충 식염수(pH 7.4), 0.005% Tween 20(PBST)을 사용하여 25°C에서 수행하였다. 샘플을 전개시키기 전에, NLC 칩을 1시간 동안 칩 표면 위로 PBST를 전개시킴으로써 커디셔닝하였다. 웨프티드를 PBST 중에 10 ng/mL로 희석시키고 유동 채널 위로 100초 동안 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 주입함으로써 대략 5 내지 10 RU의 웨프티드가 칩 표면 상에 포획되었다. PT3 Fab의 연속 희석물(1.1 내지 90 nM)을 분석하였으며, 웨프티드-8을 제외하고는, 각각의 농도를 2회 반복하여 측정하였다. 웨프티드의 포획 후에, 항체 적정물을 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 3분 동안 주입하고(회합 단계), 이후에 300초 동안 완충액만을 주입하였다(해리 단계).

[0236] 데이터는 스콧간 반응(interspot response) 및 완충액-단독 주입에 의해 생성된 곡선을 차감함으로써 이중 참조하였다. 100초의 접촉 시간 동안 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 0.85% 인산의 단회 주입을 사용하여 칩 표면을 재생한 후, 다음 항체 적정 주입 전에 전개 완충액을 4회 주입하였다. 데이터 처리 및 속도론적 분석을 기기 소프트웨어를 사용하여 행하였다. 간단한 랜덤이 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0237] 결과. PT3 Fab에 대한 속도론적 속도 상수 및 평형 결합 친화도가 표 6에 나타나 있다.

[0238] [표 6]

웨프티드에 대한 PT3 Fab 결합에 대한 ProteOn SPR 친화도 테이터								
웨프티드 명칭	인산화된 부위	서열***		평균 KD (nM)	평균 ka 또는 표준편차 (1/Ms)	ka 범위 또는 표준편차 (1/Ms)	평균 kd (1/s)	kd 범위 또는 표준편차 (1/s)
		(pT)	(pS)					
웨프티드-1	212/214/ 217	GTPGSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPTREPKK (서열 번호 47)	0.26	0.14 - 0.38	1.27 E+06 (0.87 - 1.67) E+06	2.80 E-04 (5.46 - 9.82) E+05	(2.36 - 3.24) E-04	2
웨프티드-2	212/217	GTPGSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPKK (서열 번호 48)	0.27	0.09 - 0.45	7.64 E+05 (5.46 - 9.82) E+05	1.68 E-04 (0.91 - 2.45) E-04	(0.91 - 2.45) E-04	2
웨프티드-3*	214/212	GTPGSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPTREPKK (서열 번호 49)	5.57	1.64	1.04 E+06 (2.83 E+06) E+05	5.47 E-03 (9.22 - 9.68) E+05	1.77 E-04 (6.19 - 6.27) E-03	3
웨프티드-4	210/217	GTPGSR(pS)RSLP(pT)PPTREPKK (서열 번호 50)	6.60	6.48 - 6.71	9.68 E+05 (5.44 E+05) E+05	6.27 E-03 (9.22 - 9.68) E+05	(6.19 - 6.27) E-03	2
웨프티드-5	210/214/ 217	GTPGSR(pS)RTP(pT)P(pS)LP(pT)PPTREPKK (서열 번호 51)	8.70	6.6 - 10.8	7.04 E+05 (5.45 - 8.63) E+05	5.84 E-03 (5.69 - 5.98) E+03	(5.69 - 5.98) E-03	2
웨프티드-6	217	GTPGSRSRTPSLP(pT)PPTREPKK (서열 번호 52)	11.4	10.9 - 11.9	5.41 E+05 (5.24 - 5.58) E+05	6.16 E-03 (6.06 - 6.25) E-03	(6.06 - 6.25) E-03	2
웨프티드-7	212/214	GTPGSRSR(pT)P(pS)LPPTPPTREPKK (서열 번호 53)	13.5	11.3 - 15.7	4.22 E+05 (3.57 - 4.87) E+05	5.55 E-03 (5.49 - 5.60) E-03	(5.49 - 5.60) E-03	2
웨프티드-8**	212	GTPGSRSR(pT)PSLPPTPPTREPKK (서열 번호 54)	23	n/a	2.81 E+05 (n/a) E+05	6.46 E-03 (n/a) E-03	(n/a) E-03	1
웨프티드-9	214	GTPGSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPTREPKK (서열 번호 55)	> 500	n/a	n/a	n/a	n/a	1
웨프티드-10	210/214	GTPGSR(pS)RTP(pT)P(pS)LPPTPPTREPKK (서열 번호 56)	>500	n/a	n/a	n/a	n/a	2
웨프티드-11*	208/212/ 214	SPGTPG(pS)RSPR(pT)P(pS)LPPTPPT (서열 번호 57)	결합 없음	n/a	n/a	n/a	n/a	1
웨프티드-12	210	GTPGSR(pS)RTPSLP(pT)PPTREPKK (서열 번호 58)	결합 없음	n/a	n/a	n/a	n/a	2
웨프티드-13	214/220	GTPGSRSRTP(pS)LPPTP(pT)PPTREPKK (서열 번호 59)	결합 없음	n/a	n/a	n/a	n/a	2
웨프티드-C	없음	GTPGSRSRTPSLPPTPPTREPKK (서열 번호 60)	결합 없음	n/a	n/a	n/a	n/a	4

n=2 의 경우, 범위가 기록됨.

* 웨프티드-3(n=3)의 경우, 표준 편차가 기록됨;

** 웨프티드-8(n=1)의 경우, 평균 또는 범위가 기록되지 않음;

*** 언급되지 않는 한, 모든 웨프티드는 타우 칼이 204-225(아이소형 2N4R)를 포함하며, N-말단에 단쇄 비오틴 모이어티(SCBiot) 및 dPEG4를 그리고 C-말단에 아미드를 함유함;

* 웨프티드-11은 타우 칼이 202-220(아이소형 2N4R)을 포함함.

[0239]

[0240] PT3 Fab는 T212 또는 T217에서 인산화된 웨프티드에 대한 나노몰 결합을 보였으며, PT3 Fab의 결합은 T212 및 T217 둘 모두가 인산화되었을 때 향상되었다. PT3 Fab는 pT212 및/또는 pT217을 함유하는 웨프티드에 최상으로 결합하였다. T212/T217에서 인산화된 타우 웨프티드(웨프티드-2)와 T212/S214/T217에서 인산화된 타우 웨프티드(웨프티드-5)에 대한 결합은 T212/T217에서 인산화된 타우 웨프티드(웨프티드-6)와 T212/T217에서 인산화된 타우 웨프티드(웨프티드-7)에 대한 결합과 유사하였다.

드-1)에 대해 유사한 친화성으로 결합된 PT3 Fab는 S214에서의 추가의 인산화가 PT3 Fab의 결합을 향상시키지 않음을 입증한다. PT3 Fab는 pS214-타우 웨티드(웨티드-9)에 단지 매우 약한 결합을 가졌다. S210이 단독으로 또는 다른 인산화된 잔기와 조합하여 인산화되었을 때 결합의 효과가 거의 내지 전혀 관찰되지 않았다. T220에서의 인산화는 PT3 Fab에 대한 결합 활성의 손실에 기여하는 것으로 나타났다(웨티드-9 vs. 웨티드-13). 비-인산화된 타우 웨티드(웨티드-C)에 대해서는 PT3 Fab에 대해 어떠한 결합 활성도 검출되지 않았다. PT3은 타우의 프롤린 풍부 도메인 내의 포스포에피토프에 결합한다.

[0241] 이러한 결합 연구들은 PT3 에피토프가 pT212 및 pT217을 포함하고 PT3의 최대 결합 에피토프가 이중으로 인산화된 pT212/pT217-타우를 포함함을 시사한다. PT3의 에피토프는 포스포-의존성 항-타우 항체, 예컨대 AT8(pS202/pT205/pS208; 문헌[Malia et al., 2016, 상동]), AT180(pT231; 문헌[Goedert et al., *Biochemical J.* 301(Pt3):871-877]), AT270(pT181; 문헌[Goedert et al., 상동]), PHF1(pS396/pS404; 문헌[Otvos et al., *J Neurosci Res.* 39(6):669-73, 1994]), 12E8(pS262; 문헌[Seubert et al., *J Biol Chem.* 270(32):18917-22, 1995]), 항-tau pS422 항체(문헌[Collin et al., *Brain.* 137(Pt 10):2834-46, 2014]), 및 항-tau pS409 항체(문헌[Lee et al., *Cell Rep.* 16(6):1690-700, 2016])에 대한 다른 보고된 에피토프와 구별된다.

[0242] 실시예 3 – PT3 Fab + pT212/pT217-타우 웨티드 복합체의 결정 구조

[0243] 2개의 타우 포스포웨티드를 갖는 PT3 Fab(B187)의 공-구조(co-structure)를 X-선 결정구조해석에 의해 결정하였으며, 이는 타우 에피토프 및 PT3 파라토프의 확인으로 이어졌다.

[0244] **샘플 제조 및 결정화.** 결정화를 위한 웨티드를 New England Peptides에 의해 합성하였으며, 이는 하기 서열을 가졌다: 잔기 T212, S214, 및 T217에서 인산화된 타우-441(2N4R 아이소형)의 잔기 207-220에 상응하는 Ac-GSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPT-OH (서열 번호 61) (pT212/pS214/pT217-타우 웨티드), 및 T212 및 T217에서 인산화된 잔기 210-222에 상응하는 Ac-SR(pT)PSLP(pT)PPTRE-OH (서열 번호 62) (pT212/pT217-타우 웨티드). 동결건조된 웨티드를 100 mM Tris(pH 8.5) 중에 대략 55 mg/mL로 용해시켰다.

[0245] PT3 Fab를 19.64 또는 17.76 mg/mL로 농축시키고, 10.7배 또는 9.3배 몰 과량의 pT212/pS214/pT217-타우 웨티드 또는 pT212/pT217-타우 웨티드와 혼합하여 최종 복합체 농도가 20 mM Tris(pH 7.5), 100 mM 또는 50 mM NaCl 중에서 각각 16.9 및 16.7 mg/mL가 되게 하였다. 150 nL 복합체와 150 nL 저장소 용액을 혼합하여, Mosquito 결정화 로봇을 사용하여, 사내 스크린(in-house screen) 및 PEG(Qiagen)에 의해 결정화를 수행하였다. 회절을 위한 결정을 하기 조건에서 얻었다: 0.1 M 아세테이트(pH 4.5), 18% PEG 3350, 0.2 MgCl₂ 중 PT3 Fab + pT212/pS214/pT217-타우 웨티드 복합체, 및 20% PEG 3350, 0.2 M 인산암모늄(일염기성) 중 PT3 Fab + pT212/pT217-타우 웨티드 복합체.

[0246] 테이터 수집 및 구조 결정. PT3 Fab + pT212/pS214/pT217-타우 웨티드 복합체의 결정을 0.1 M 아세테이트(pH 4.5), 18% PEG 3350, 0.2 M MgCl₂(모액)로부터 수집하고, 20% 글리세롤이 보충된 모액으로 구성된 동결보호 용액과 혼합하였다. 결정을 액체 질소 중에서 순간-냉각(flash-cool)시키고, Osmic™ VariMax™ 공초점 광학장치, Saturn 944 CCD 검출기, 및 X-Stream™ 2000 저온냉각 시스템(Rigaku)이 구비된 Rigaku MicroMax™-007HF 마이크로포커스 X-선 발생기 상에서 데이터를 수집하였다.

[0247] 데이터를 XDS로 처리하였다(문헌[Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):125-32, 2010]). 검색 모델로서 Fab H3-23:L1-39 (PDB ID: 5I19) Fab를 사용하여 PHENIX 프로그램 제품군(문헌[Adams et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):213-21, 2010])에서 Phaser(문헌[McCoy et al., *J Appl Crystallogr.* 40(Pt 4):658-674, 2007])를 사용하여 분자 대체(molecular replacement)를 수행하였다. Phenix.xtriage는 7% 쌍정 분획을 갖는 결정에서 유사결면 쌍정 형성(pseudomerohedral twinning)을 확인시켜 주었다. 모델 구축의 대부분에 대하여 쌍정 정밀화를 사용하여 정밀화를 수행하였다. Coot를 사용하여 모델 구축을 수행하고(문헌[Emsley and Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004]), phenix.refine을 사용하여 정밀화를 수행하였다(문헌[Adams et al., 2010, 상동]). 정밀화의 최종 단계는 쌍정 정밀화 없이 수행되었는데, 그 이유는 쌍정 정밀화가 맵을 개선하지 않는 것으로 추후에 결정되었기 때문이다. 데이터 및 정밀화 통계가 표 7에 제시되어 있다.

[0248]

[표 7]

X-선 데이터 및 정밀화 통계

	PT3 Fab + pT212/pS214/pT217-타우 펩티드 복합체	PT3 Fab + pT212/pT217- 타우 펩티드 복합체
빔라인/검출기	Rigaku MicroMax- 007HF / Saturn 944	APS IMCA-CAT/ Pilatus 6M
레이저		
파장 (Å)	1.5418	1.000
분해능 범위 (Å)	30-2.5 (2.6-2.5)	8.94-2.0 (2.05-2.00)
공간군	C2	C2
단위-셀 축 (Å)	125.21, 83.50, 167.41	126.24, 83.66, 166.87
단위-셀 각도 (°)	90.00, 91.71, 90.00	90.00, 92.50, 90.00
분자수/비대칭 단위	3	3
V_m (Å ³ /Da)/용매 (%)	2.92 / 58	3.08 / 60
완전성 (%)	97.0 (89.3)	99.2 (99.6)
R_{merge}	0.108 (0.318)	0.053 (0.555)
평균 $I/\sigma(I)$	4.9 (1.7)	13.09 (2.49)
측정된 반사의 수	177373 (11739)	384718 (27833)
고유 반사의 수	57942 (3878)	116430 (8607)
B-인자 (윌슨(Wilson)) (Å ²)	29.1	36.49
정밀화 통계		
원자의 수	11165	10968
물 분자의 수	961	779
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	19.4/23.1	18.6 / 21.3
이상적인 기하학적 형태로부터의 r.m.s.d.		
결합 길이 (Å)	0.005	0.008
결합 각 (°)	1.005	1.215
평균 B 인자 (Å ²)	26.87	41.2
라마찬드란(Ramachandran) 도표		
선호되는 영역 내의 잔기 (%)	97.23	98.31
허용된 영역 내의 잔기 (%)	2.47	1.62
이상치(outlier) (%)	0.31	0.08

최고 분해능 셀(shell)에 대한 값은 팔호 안에 나타나 있다.

[0249]

[0250]

PT3 Fab + pT212/pT217-타우 펩티드 복합체의 단결정을 결정화 적하(crystallization drop)로부터 추출하고, 20% 글리세롤이 보충된 저장조 용액(20% PEG 33500, .2 M 인산암모늄(일염기성)) 중에 수 초 동안 침지하고, 액체 질소 중에서 순간-냉각시켰다. 100 K에서 Advanced Photon Source(미국 일리노이주 아르곤 소재) IMCA-CAT 빔라인 17-ID-B에서 데이터를 수집하였다. 1/2도 이미지당 0.5초의 노출 시간으로 180° 회전에 걸쳐 Pilatus 6M 검출기 상에서 회절 강도를 수집하였다. 2.0 Å의 최대 분해능까지 XDS(문헌[Kabsch, 2010, 상동])를 사용하여 데이터를 처리하였다. 이 구조는, 검색 모델로서 PT3 Fab + pT212/pS214/pT217-타우 펩티드 구조를 사용하여 프로그램 Phaser(문헌[McCoy et al., 2007, 상동])를 사용하여 분자 대체에 의해 결정하였다. NCS(문헌[Adams et al., 2010, 상동])를 사용하여 phenix.refine에 의해 구조 정밀화를 수행하였다. 프로그램 Coot(문헌[Emsley and Cowtan, 2004, 상동])를 사용하여 모델 조정을 수행하였다. X-선 데이터 수집 및 정밀화 통계가 표 7에 제시되어 있다. 4.0 Å의 거리 컷오프를 사용하여 CONTACT(문헌[Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 50(Pt 5):760-3, 1994])를 사용하여 분자간 접촉 거리를 계산하고, Pymol을 사용하여 시각적으로 검사하였다.

[0251]

구조 분석. PT212/pS214/pT217-타우 펩티드를 갖는 PT3 Fab의 구조를 2.5 Å 분해능으로 결정하였다. PT3 Fab + pT212/pT217-타우 펩티드 구조에 대해 하기와 기재된 바와 같이 비대칭 단위당 복합체의 카페는 3개이다. 이 구조는, T212 및 T217이 또한 포스포릴화될 때 pS214의 포스페이트와 PT3이 상호작용하지 않음을 보여주는데 (데이터는 나타나 있지 않음), 이는 ProteOn에 의한 포스포펩티드 맵핑에 의해 지지된다(실시예 2).

[0252]

PT212/pT217-타우 펩티드를 갖는 PT3 Fab의 구조를 2.0 Å 분해능으로 X-선 결정구조해석에 의해 결정하였다(도 7). 비대칭 단위 내에 복합체의 카페가 3개 있으며(카페 1: 사슬 A, C, E; 카페 2: 사슬 B, D, F; 카페 3: 사슬 H, L, P), 이들은 중쇄 A, C 및 H, 경쇄 B, D, 및 L, 및 펩티드 사슬 E, F 및 P로 이루어진다. 3개의 카페는 매우 유사하다 - 가변 영역이 0.3 Å rmsd 이내이다. 도 7 및 도 8은 카페 3(사슬 H, L, P)의 것이다. 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, Fab 중쇄 및 경쇄는 얇은 결합 포킷을 형성하고, 펩티드는 Fab를 가로질러 놓인다. 타우 포스포펩티드는 폴리프롤린-II 나선 2차 구조와 일치하는 특징을 갖는 연장된 입체구조로 존재한다.

[0253]

상호작용 계면을 포함하는 PT3 Fab 파라토프 및 pT212/pT217-타우 펩티드 애피토프 잔기는 도 8 및 도 9에, 그

리고 표 8에 나타나 있다. PT3과 그의 에피토프 웨티드 사이의 계면은 반테르발스 및 정전기 상호작용으로 이루어지며, 이는 웨티드 잔기 211부터 221까지 연장된다. pT212/pT217-타우 웨티드와 복합체를 형성한 PT3 Fab의 구조는 에피토프가 pT212 및 pT217의 포스페이트를 포함한다는 것을 보여준다. 중쇄 Y32 하이드록실 기는 pT212의 포스페이트 산소와 중요한 수소 결합을 형성한다. T28(VH)의 측쇄 하이드록실 기가 또한 pT212의 포스페이트 산소와 수소 결합을 형성한다. 중쇄 K53은 pT217과의 주요 염 가교 상호작용을 형성한다. 중쇄 W99는 웨티드의 L215 및 P216의 측쇄 잔기와 소수성 상호작용을 형성한다. 중쇄 잔기 W104는 웨티드와의 광범위한 상호작용을 가지며, 또한 VH/VL 계면의 일부를 형성한다. 경쇄 Y32는 P219와 소수성 상호작용을 형성한다. PT212 및 pT217의 포스페이트와의 정전기 상호작용은 포스포-타우에 대한 PT3의 선택성에 중요하며, 소수성 상호작용이 pT212/pT217-타우(실시예 5) 및 PHF-타우(실시예 1 및 실시예 6)에 대한 PT3의 높은 친화도에 추가로 기여한다.

[0254]

[표 8] PT3 Fab + pT212/pT217-타우 웨티드의 에피토프 및 파라토프 pT212/pT217-타우 웨티드 잔기와 상호작용하는 PT3 Fab VH 또는 VL로부터의 잔기가 나타나 있다. 수소 결합 상호작용은 블록 타입으로 표시되어 있다.

VH	웨티드	VL
T28	R211	
F27, T28, S31, Y32	pT212	
S31	P213	
S31, K53	S214	
S31, Y32, K53, W99	L215	
W99, G100	P216	
S52, K53, W104	pT217	
W99, G100, G103, W104	P218	
G100, D101	P219	Y32
W104	T220	Y91, D92, E93, F94, L96
	R221	D92, E93, F94

[0255]

[0256] 실시예 4: PT3의 인간 프레임워크 적응화

[0257]

항-타우 마우스 항체 PT3을 인간 프레임워크 적응화(HFA) 방법을 사용하여 인간화하였다(문헌[Fransson et al., *J Mol Biol.* 398(2):214-31, 2010]). 인간 프레임워크 적응화를 위하여, CDR을 마틴(Martin)(문헌[Martin and Thornton, *J Mol Biol.* 263(5):800-15, 1996])에 따라 정의하였다. 인간화 HC 및 LC의 최상의 조합을 찾기 위하여, 몇몇 인간 중쇄 및 경쇄 V-영역 서열을 시험을 위해 선택하였다. 4개의 인간 프레임워크 적응화된 PT3 중쇄 가변 영역 및 4개의 인간 프레임워크 적응화된 PT3 경쇄 가변 영역을 설계하고, 완전한 인간 중쇄 IgG1 및 인간 경쇄 카파 분자로서 생성하였다(도 10). 단지 프레임워크 영역(FR) 내의 마우스 PT3 VH 및 VL과의 서열 유사성에 기초하여, 인간 생식세포계열 V 유전자(VH의 경우 4개: IGHV3-23*01, IGHV3-33*01, IGHV3-11*01 및 IGHV1-3*01; VL의 경우 4개: IGVK1-16*01, IGVK1-16*01+, IGVK1-39*01 및 IGVK2-24*01)를 인간 프레임워크 적응화된 VH 및 VL 변이체를 생성하기 위하여 선택하였다. VL78(IGVK1-16*01+)은 VL77(IGVK1-16*01)의 단일 점 돌연변이이고, D56S 돌연변이를 함유하여 잠재적인 이성질화 위험을 없앤다. 4개의 HFA HC와 4개의 HFA LC 분자를 조합한 것으로부터 생성된 16개의 HFA 변이체 단일클론 항체의 명칭이 표 9에 나타나 있다.

[0258]

[표 9] HFA-PT3 변이체 B234는 마우스 모 가변 영역을 함유하고 양성 대조군으로서 포함되었다. 상응하는 인간 생식세포계열 유전자는 괄호 안에 나타나 있다. VL78(IGVK1-16*01+)은 VL77(IGVK1-16*01)의 단일 점 돌연변이를 함유한다.

	VH10 (PT3) (서열 번호 35)	VH91 (IGHV3-23*01) (서열 번호 36)	VH92 (IGHV3-33*01) (서열 번호 37)	VH93 (IGHV3-11*01) (서열 번호 38)	VH94 (IGHV1-3*01) (서열 번호 39)
VL7 (PT3) (서열 번호 40)	B234				
VL77 (IGVK1-16*01) (서열 번호 41)		B235	B296	B282	B268
VL78 (IGVK1-16*01+) (서열 번호 42)		B250	B236	B297	B283
VL79 (IGKV1-39*01) (서열 번호 43)		B265	B251	B237	B298
VL80 (IGKV2-24*01) (서열 번호 44)		B280	B266	B252	B238

[0259]

[0260] 16개의 HFA-PT3(hIgG1/κ) 변이체의 패널에 대한 클로닝 및 DNA 합성을 표준 방법에 의해 수행하였다. 표준 프

로토콜에 의해 DNA를 HEK(Expi293) 세포 내로 형질감염시키고, 세포 상충액을 5일간의 배양 후에 수집하였다. 고체리량 평행 정제를 위해 Protein BioSolutions ProteinMaker(미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재)를 사용하여, 1x dPBS(pH 7.2) 중에서 사전평형화된 MabSelectSure 단백질 A 수지 상에 IgG를 포획함으로써, 청정화된 상충액을 정제하였다. 1x dPBS(pH 7.2)로 케럼 세척 후, 단일클론 항체를 0.1 M 소듐 아세테이트(pH 3.5)를 사용하여 용리하였다. 용리 분획을 20 부피%까지 2.5 M Tris-HCl(pH 7.2)을 첨가하여 중화시켰으며, 최종 단백질 제형은 0.08 M Na 아세테이트, 0.5 M Tris-HCl(pH 7.1)이었다.

[0261] HFA 패널의 초기 평가는 정제 수율, 크기-배제 고성능 액체 크로마토그래피(SE-HPLC) 프로파일, ELISA 결합 검정에서의 PHF-타우에 대한 결합, 및 생물물리학적 특성화에 기초하였다.

[0262] B296의 Fab(B324) 및 B252의 Fab(B326)를 또한, 인간 IgG1/κ 불변 영역 및 중쇄의 C-말단에 있는 6xHis 태그를 갖는 상응하는 단일클론 항체의 HC 및 LC 가변 영역을 쌍형성함으로써 생성하였다. B324 및 B326을 HEK(Expi293) 세포에서 발현시키고, 기재된 것과 유사한 방법으로 정제하였다(문헌[Zhao et al., *Protein Expr Purif.* 67(2):182-9, 2009]).

실시예 5 – 포스포펩티드에 대한 SPR에 의한 HFA-PT3 항체의 특성화

[0264] 생물물리학적 특성화 및 PHF에 대한 ELISA 결합에 기초하여 선택된, HFA-PT3 단일클론 항체 변이체의 하위세트를 하기 포스포펩티드에 대한 결합에 대하여 ProteOn XPR36을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 분석하였다: pT212/pT217-타우 웨프티드(웨프티드-2, 서열 번호 48) 및 pT212-타우 웨프티드(웨프티드-8, 서열 번호 54). 모든 실험은, 전개 완충액 및 샘플 회석 완충액 둘 모두로서 PBST(pH 7.4) (Bio-Rad Cat# 176-2720)를 사용하여 25°C에서 수행하였다.

[0265] 단일클론 항체/웨프티드 결합. PBST에 의한 사전-컨디셔닝 후에, Biorad GLC 칩에 항-인간 Fc(Jackson 109-005-098)를 대략 6500 RU의 밀도로 코팅함으로써 바이오센서 표면을 제조하였다. 항-인간 IgG를 EDC/NHS를 사용하여 칩 표면에 아민-커플링시키고, 이어서 에탄올아민으로 세척하였다. 항체를 PBST 중에 2 μ g/mL로 회석시키고, 30 μ L/min으로 5분 동안 표면 상에 주입하여 900 내지 1000 RU의 최대 밀도를 달성하였다. 웨프티드를 60 μ L/min으로 3분 동안 분석물로서 주입한 후, 5분간 해리시켰다. 웨프티드-2를 PBST 중에 회석시켜 3배 농도 연속물(0 내지 30 nM)을 생성하고, 2회 반복하여 측정하였다. 웨프티드-8에 대한 단일클론 항체 결합의 단회 측정을 0 내지 100 nM의 농도 범위에 걸쳐 기록하였다.

[0266] Fab/웨프티드 결합. 비오티닐화 웨프티드를 PBST로 사전-컨디셔닝된 뉴트라비딘-코팅된 NLC 바이오센서 칩 상에 포획하고, Fab를 표면 위로 유동시켜 속도론적 파라미터를 측정하였다. 웨프티드를 PBST 중에 10 ng/mL로 회석시키고 유동 채널 위로 100초 동안 30 μ L/min으로 주입함으로써 대략 5 내지 10 RU의 웨프티드가 칩 표면 상에 포획되었다. PT3 Fab의 연속 회석물(1.1 nM 내지 90 nM)을 60 μ L/min으로 3분 동안 주입하고(회합 단계), 이후에 300초 동안 완충액만을 주입하였다(해리 단계).

[0267] 데이터는 스포간 반응 및 완충액-단독 주입에 의해 생성된 곡선을 차감함으로써 이중 참조하였다. 칩 표면을 0.85% 인산으로 재생하고, 이어서 PBST 주입을 수행한 후, 다음 항체 적정 주입을 수행하였다. 데이터 처리 및 분석을 기기 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 간단한 랭류어 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 적합화하였다.

[0268] 웨프티드-8에 대한 HFA-PT3 IgG에 대한 속도론적 속도 상수 및 평형 결합 친화도가 표 10에 나타나 있다. B234는 마우스 PT3 가변 영역 및 인간 IgG1/κ 불변 영역을 함유한다. 인간화 변이체들 중에서, B296이 웨프티드-8(pT212-타우)에 대한 가장 강한 결합을 나타내었다.

[0269] [표 10]

웨프티드-8에 대한 HFA-PT3 mAb 패널 결합에 대한 ProteOn SPR 친화도 데이터

샘플	단백질 설명	평균 k_a , (1/Ms)	평균 k_d , (1/s)	평균 K_D , nM
B234	마우스 PT3, hIgG1	2.31E+06	8.02E-03	3.48
B235	VH91 / VL77	결합 없음		
B252	VH93 / VL80	7.42E+05	2.42E-02	32.6
B280	VH91 / VL80	2.18E+05	7.57E-03	34.7 (불량한 데이터 적합화)
B282	VH93 / VL77	4.42E+05	3.82E-02	86.5
B296	VH92 / VL77	8.56E+05	2.30E-02	26.8

[0270] 모든 항체에 대해 n=2

[0271] 웨프티드-2에 대한 HFA-PT3 IgG에 대한 속도론적 속도 상수 및 평형 결합 친화도가 표 11에 나타나 있다. B252

및 B296은 웨티드-2(pT212/pT217-타우)에 대한 가장 강한 결합을 나타내었으며, 이때 평균 K_D 값은 각각 172 및 190 pM이었다.

[0272] [표 11]

웨티드-2에 대한 HFA-PT3 mAb 패널 결합에 대한 ProteOn SPR 친화도 데이터

샘플	단백질 설명	평균 k_a (1/Ms)	k_a 범위 (1/Ms)	평균 k_d (1/s)	k_d 범위 (1/s)	평균 K_D , pM	K_D 범위 (pM)
B234	마우스 PT3, hIgG1	9.35 E+06	(8.7-10) E+06	3.25 E-04	(2.42-4.08) E-04	29.2	(27.8-30.6)
B235	VH91 / VL77	3.21 E+06	(2.84-3.58) E+06	5.69 E-03	(5.28-6.10) E-03	1790	(1710-1860)
B252	VH93 / VL80	5.75 E+06	(3.95-7.54) E+06	9.01 E-04	(8.56-9.46) E-04	172	(126-217)
B280	VH91 / VL80	4.71 E+06	(2.21-7.20) E+06	2.74 E-03	(2.46-3.01) E-03	769	(418-1120)
B282	VH93 / VL77	3.12 E+06	(2.34-3.89) E+06	1.32 E-03	(1.24-1.40) E-03	445	(360-529)
B296	VH92 / VL77	5.00 E+06	(3.10-6.90) E+06	8.26 E-04	(7.88-8.63) E-04	190	(125-255)

[0273] 모든 항체에 대해 n=2

[0274] B296 및 B252의 Fab의 친화도를 ProteOn에 의해 pT212/pT217-타우 웨티드(웨티드-2) 상에서 측정하고 마우스 모 Fab B187과 대비하였다(표 12). 모 마우스 Fab와 대비하여 HFA Fab에 대해 해리 속도의 2.7 내지 5.1배 증가 및 K_D 값의 3.5 내지 5.6배 증가가 있었다. B296의 Fab(B324)는 B252의 Fab(B326)보다 pT212/pT217-타우 웨티드에 대해 더 강한 친화도뿐만 아니라, 더 느린 해리 속도를 나타내었다.

[0275] [표 12]

웨티드-2에 대한 HFA-PT3 Fab 결합에 대한 ProteOn SPR 친화도 데이터

샘플	설명	평균 k_a (1/Ms)	k_a 범위 (1/Ms)	평균 k_d (1/s)	k_d 범위 (1/s)	평균 K_D (pM)	K_D 범위 (pM)
B187	PT3 의 마우스 모 Fab	7.76 E+05	(4.91-10.6) E+05	6.39 E-05	(4.93-7.84) E-05	87.4	(73.8-101)
B324	B296 의 Fab	6.10 E+05	(4.27-7.93) E+05	1.74 E-04	(1.61-1.86) E-04	305	(234-376)
B326	B252 의 Fab	7.10 E+05	(5.07-9.12) E+05	3.29 E-04	(3.04-3.53) E-04	493	(387-599)

[0276] 모든 Fab에 대해 n=2

실시예 6 – PHF-타우 및 재조합 타우에 대한 SPR에 의한 HFA-PT3 항체의 특성화

[0278] HFA-PT3 단일클론 항체들의 하위세트를 알츠하이머병 뇌로부터 단리된 PHF-타우에 대한 결합에 대해 시험하였다. 3 mM EDTA, 및 0.005% Tween 20이 보충된 PBS(pH 7.4)를 전개 완충액 또는 시스템 완충액으로서 사용하여 25°C에서 모든 상호작용을 연구하였다. 마우스 항-타우 항체인 HT7(Pierce, 카탈로그 번호 MN1000)을 양성 대조군으로서 사용하였다.

[0279] 포획 시약으로서 HT7을 사용하여 PHF-타우를 포획-커플링함으로써 제조된 바이오센서 표면을 사용하여 ProteOn에 의해 항-타우 단일클론 항체와 PHF-타우의 상호작용을 분석하였다. PHF-타우를 5°C에서 10분 동안 5000xg로 2회 원심분리하여 제조하고; 이어서, 두 번째 원심분리로부터의 상층액을 전개 완충액 중에 1/40로 희석시켰다. 칩을 제조하기 위하여, 아민-커플링 화학에 대한 제조자의 설명서를 사용하여 GLC(ProteOn) 센서 칩의 표면에 HT7을 공유적으로 고정화시켰다(약 5000 반응 단위(RU)). 커플링 완충액은 10 mM 소듐 아세테이트(pH 4.5)였다. HT7 고정화 후에, PHF-타우를 주입하고 HT7에 의해 포획하였다(약 300 RU). 포획 후에, 아민-커플링 화학에 대한 제조자의 설명서를 사용하여 칩의 활성화에 의해 PHF-타우를 센서 칩에 공유적으로 고정화시켰다. 에탄올아민의 주입에 의해 나머지 반응 부위를 차단시켰다. PHF-타우-변형된 표면 및 기준 표면(항원을 함유하지 않음)의 제조 및 안정화 후에, 항-타우 항체를 전개 완충액 중에 희석시키고 용액 상태로 주입하였다(5배 희석률 중 0.12 내지 75 nM). 희석률 3분 동안 모니터링하였다(40 μ L/min으로 120 μ L 주입). 해리를 15분 동안 모니터링하였다. 10 mM Gly(pH 2.0)를 사용하여 센서 표면의 재생을 수행하였다. 단일클론 항체에 대한 데이터를 2가 결합 모델을 사용하여 적합화하였으며, 여기서 결보기 친화도(K_D)는 k_{off}/k_{on} 의 비로서 기록하였다. 랭류어 1:1 결합 모델을 Fab의 속도론적 분석에 사용하였다.

[0280] 대부분의 HFA 단일클론 항체는 마우스 모 PT3 단일클론 항체와 유사한 긴밀한 결합을 보유하였으며, 27 내지 165 pM 범위였다(표 13). 최상에 있는 2개의 HFA 단일클론 항체, B252 및 B296은 각각 32 및 27 pM의 친화도

를 가졌다. B235는 이 패널로부터 가장 약한 단일클론 항체 친화도(165 pM)를 나타내었다. B324(B296의 Fab) 및 B326(B252의 Fab)을 PHF-타우 결합에 대해 평가하였으며, 마우스 PT3 모 Fab B187보다 각각 2.5배 및 3.3배 더 약한 K_D 를 나타내었다. B324는 B326보다 1.3배 더 강한 친화도(K_D) 및 1.7배 더 느린 해리 속도를 나타내었다. Fab 친화도는 이들의 상응하는 단일클론 항체보다 더 약하였으며, 이는 PHF-타우에 대한 단일클론 항체에 대한 결합력을 시사한다. 동일한 가변 영역을 갖는 B296의 IgG4 변이체인 B352를 또한 PHF-타우에 대한 결합에 대해 시험하였으며, 친화도(43 pM)는 B296의 것의 2배 이내였다(표 11).

[0281] [표 13]

PT3 HFA mAb 및 Fab의 PHF-타우와의 ProteOn SPR 친화도

샘플	설명	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
HT7	마우스 (양성 대조군)	(5.69±0.99) E+05	(1.10±0.18) E-04	193±46
B17 (mAb)	마우스 PT3, muG2a	(2.48±0.20) E+06	(2.68±0.43) E-05	11±1.9
B234 (mAb)	마우스 PT3, hIgG1	(2.23±0.13) E+06	(2.71±0.17) E-05	12±1.0
B235 (mAb)	VH91 / VL77	(4.90±0.34) E+05	(8.06±0.24) E-05	165±12
B252 (mAb)	VH93 / VL80	(1.32±0.09) E+06	(4.28±0.19) E-05	32±2.6
B280 (mAb)	VH91 / VL80	(1.02±0.03) E+06	(5.63±0.28) E-05	55±3.3
B282 (mAb)	VH93 / VL77	(6.65±0.09) E+05	(4.08±0.25) E-05	61±3.9
B296 (mAb)	VH92 / VL77	(1.07±0.02) E+06	(2.93±0.19) E-05	27±1.8
B297 (mAb)	VH93 / VL78	(1.44±0.07) E+06	(6.03±0.32) E-05	42±3.0
B187 (Fab)	PT3 Fab	(1.67±0.05) E+06	(1.13±0.04) E-05	68±3
B326 (Fab)	B252 Fab	(1.02±0.05) E+06	(2.30±0.04) E-04	224±12
B324 (Fab)	B296 Fab	(8.16±0.45) E+05	(1.36±0.06) E-04	167±12
B352 (IgG4 mAb)	hIgG4 로서의 B296	(2.55±0.56) E+05	(1.11±0.54) E-05	43±23

mAb: n=2이며, 각 실험마다 3개의 반복시험물을 사용함.

Fab: n=2이며, 각 실험마다 2개의 반복시험물을 사용함.

B352: n=2이며, 각 실험마다 4개의 반복시험물을 사용함.

[0282]

항-타우 단일클론 항체 및 Fab와의 재조합적으로 발현된 대조군 타우(인간 타우 아이소형 2N4R 441 aa, N-말단 6xHis-태그, 서열 번호 63)의 상호작용을 Biacore T200을 사용하여 연구하였다. 아민-커플링 화학에 대한 제조자의 설명서를 사용하여 CM5 센서 칩의 표면에 항-인간 IgG Fc 특이적 항체(Ab) 또는 항-Fd를 커플링 함으로써 바이오센서 표면을 제조하였다(약 6500 반응 단위(RU)). 커플링 완충액은 10 mM 소듐 아세테이트(pH 4.5)였다. 항-타우 항체를 전개 완충액 중에 희석시키고 주입하여 적어도 5 RU의 포획을 얻었다. 항-타우 단일클론 항체 또는 Fab의 포획 후, 용액 중 재조합적으로 발현된 대조군 타우(5배 희석물 중 0.12 내지 75 nM)를 주입하였다. 회합을 3분 동안 모니터링하였다(50 μ L/min으로 150 μ L 주입). 합리적인 해리 속도 결정을 위해 신호의 적어도 5% 감소가 관찰될 때까지 해리를 모니터링하였다. 0.85% 인산에 이어서 50 mM NaOH를 사용하여 센서 표면의 재생을 얻었다. 결합이 관찰되면 1:1 행류어 결합 모델을 사용하여 단일클론 항체 및 Fab 둘 모두에 대한 데이터를 적합화하였다.

[0283]

B324 또는 B326 어느 것도 대조군 타우에 대한 유의한 결합을 나타내지 않았다. B296이 또한 대조군 타우에 대한 결합을 나타내지 않았다.

[0285] 실시예 7 – B324 + pT212/pT217-타우 웨티드 복합체의 결정 구조

[0286]

PT212/pT217-타우 웨티드(서열 번호 62)를 갖는 B324의 공-구조를 X-선 결정구조해석에 의해 결정하였으며, 이는 타우 에피토프 및 B324(및 B296) 파라토프의 확인으로 이어졌다.

[0287]

샘플 제조 및 결정화. VH92 및 VL77을 갖는 B296의 Fab인 B324를 HEK 293 세포에서 일시적 발현에 의해 생성하고, Ni-친화성 크로마토그래피, SEC, 및 20 mM MES(pH 6.0), 0.2 M NaCl의 최종 완충액 중에서의 이온 교환에 의해 정제하였다. 실시예 3에 기재된 pT212/pT217-타우 웨티드(서열 번호 62)를 공결정화를 위해 사용하였다. B324 Fab + pT212/pT217-타우 웨티드 복합체의 제조를 위하여, 10배 몰과량의 웨티드를 첨가하였다.

[0288]

B324 Fab + pT212/pT217-타우 웨티드의 결정화를 20 mM MES(pH 6.0), 0.2 M NaCl 중에서 9 내지 18 mg/mL로 수행하였다. Mosquito 결정화 로봇을 사용하여, 2개의 사내 스크린 및 PEG(Qiagen)를 사용하여 20 °C에서 시팅 드롭 증기 확산법(sitting drop vapor diffusion method)에 의해 초기 결정화 스크리닝을 수행하였다. 0.1 M 소듐 아세테이트(pH 4.6), 20% PEG 10K로부터 결정이 출현되었으며, 추가의 최적화 스크리닝에 사용하기 위하여 시드 비드 키트(Seed Bead kit)(Hampton Research)에 의한 기계적 균질화에 의해 시드를 제조하였다.

[0289]

데이터 수집 및 구조 결정. 0.1 M 소듐 아세테이트(pH 5.5), 37% PEG200으로부터 결정이 출현되었으며, 이것을 수집하고, X-선 회절 데이터 수집을 위하여 동결보호 없이 액체 질소 중에서 순간-냉각시켰다. 100 K에서

Advanced Photon Source(미국 일리노이주 아르곤 소재)에서 IMCA-CAT 빔라인 17-ID-B 상에서 결정학적 데이터를 수집하였다. 1/2도 이미지당 0.5초의 노출로 180° 회전에 걸쳐 Pilatus 6M 검출기 상에서 회절 강도를 수집하였다. 2.6 Å의 최대 분해능까지 XDS(문헌[Kabsch, 2010, 상동])를 사용하여 데이터를 처리하였다. PT212/pT217-타우 웨이퍼드와 복합체를 형성한 B324의 X-선 결정 구조를, 검색 모델로서 관련 Fab 구조를 사용하여 Phaser(문헌[McCoy et al., 2007, 상동])를 사용하여 분자 대체에 의해 해석하고, Refmac(문헌[Murshudov et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55, 1997])을 사용하여 정밀화하였다(표 14). 4.0 Å의 거리 컷오프를 사용하여 CONTACT(문헌[Collaborative Computational Project, Number 1994, 상동])를 사용하여 분자간 접촉 거리를 계산하고, Pymol을 사용하여 시각적으로 검사하였다.

[0290] [표 14]

X-선 데이터

데이터 수집		
내용물	B324 + pT212/pT217-타우 웨이퍼드	
모액	0.1 M NaAc(5.5), 37% PEG 200	
동결보호	없음	
공급원/검출기	APS IMCA-CAT 17ID-B/Pilatus 6M	
파장 (Å)	1.000	
온도 (K)	100	
거리 (mm)	450	
총 회전 (°)	180 **	
Exp(초)/0.5°	0.5	
공간군	I222	
단위 셀 축 (Å)	97.60, 104.43, 133.35	
단위 셀 각도 (°)	90, 90, 90	
분자수/비대칭 단위	1	
V_m (Å ³ /Da)/용매 (%)	3.43 / 64	
분해능 (Å)	30-2.6	(2.67-2.60)
측정된 반사의 수	113,798	(6,597)
고유 반사의 수	21,019	(1,367)
완전성 (%)	98.6	(87.6)
리dundancy	5.4	(4.8)
R-因子(merge)	0.040	(0.417)
$\langle I/\sigma \rangle$ (unavg)	10.8	(1.1)
$\langle I/\sigma \rangle$ (avg)	24.5	(3.5)
B-인자 (월슨) (Å ²)	69.4	
정밀화 통계		
원자수의 수	3331	
R_{work}/R_{free}	0.230/0.265	
이상적인 기하학적 형태로부터의 r.m.s.d.		
결합 길이 (Å)	0.005	
결합각 (°)	1.027	
평균 B 인자 (Å ²)	96.2	
라마찬드란 도표		
선험되는 영역 내의 잔기 (%)	95.14%	
허용되는 영역 내의 잔기 (%)	3.94%	
이상치 (%)	0.93%	
최고 분해능 셀에 대한 값은 팔호 안에 나타나 있다.		

[0291]

구조 분석. B324 + pT212/pT217 타우 웨이퍼드 상호작용의 전체 구조가 도 11에 나타나 있다. pT212/pT217-타우 웨이퍼드는 B324 VH 및 VL의 계면에 형성된 흄에 끼워맞춰진다. B324와 pT212/pT217 타우 웨이퍼드 사이의 계면은 반데르발스 및 정전기 상호작용으로 이루어지며, 이는 웨이퍼드 잔기 211부터 221까지 연장된다(도 12). 하기 CDR이 pT212/pT217-타우 웨이퍼드에 대한 직접 결합에 관여한다: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L3. pT212/pT217-타우 웨이퍼드와 복합체를 형성한 B324의 구조는 에피토프가 pT212 및 pT217의 포스페이트를 포함한다는 것을 보여준다. 상호작용하는 B324 Fab 잔기와 pT212/pT217-타우 웨이퍼드 잔기의 다이어그램이 도 13에 나타나 있다. 주요 상호작용 중 일부는 다음과 같다: VH Y32 하이드록실 기 및 VH T28 하이드록실 기는 각각 pT212의 상이한 포스페이트 산소에 수소 결합을 형성하고; 타우 웨이퍼드의 L215의 메틸 기에 대해 VH Y32 및 VH

W99의 측쇄로부터 소수성 상호작용이 존재하고; VH K53은 타우 웨티드 잔기 pT217과의 염 가교 상호작용을 형성하고; VH W104의 측쇄는 pT217 메틸 기와는 소수성 상호작용을 그리고 P218과는 CH-π 적층 상호작용을 형성하며, 이것은 VH/VL 계면의 일부를 형성하고; VH W104의 인돌 아미드는 T220의 측쇄 하이드록실과 수소 결합을 형성하고; VL Y32의 측쇄와 P219 사이에 소수성 상호작용이 존재하고; VL L96과 T220의 메틸 기 사이에 소수성 상호작용이 존재하고; VL F94 측쇄와 T220 메틸 기에 의해 소수성 상호작용이 형성된다. PT212 및 pT217의 포스페이트와의 정전기 상호작용은 포스포-타우에 대한 B324의 선택성에 중요하며, 소수성 상호작용이 pT212/pT217-타우 웨티드(실시예 5) 및 PHF-타우(실시예 6)에 대한 B324의 높은 친화도에 추가로 기여한다. 마우스 PT3 및 B324의 에피토프 및 파라토프는 매우 유사한데, 이는 에피토프 또는 파라토프 어느 것도 인간화 후에 유의하게 변경되지 않음을 나타낸다(도 9 및 도 13, 표 8 및 표 15).

[0293] [표 15]

B324 + pT212/pT217-타우 웨티드의 에피토프 및 파라토프 pT212/pT217-타우 웨티드 잔기와 상호작용하는 B324 VH 또는 VL로부터의 잔기가 나타나 있다. 수소 결합 상호작용은 볼드 타입으로 표시되어 있다.

VH	웨티드	VL
G26, T28	R211	
F27, T28 , S31, Y32	pT212	
S31	P213	
S31	S214	
S31 , Y32, K53 , W99	L215	
K53, W99, G100	P216	
S52, K53 , W104	pT217	
G100, W104	P218	
G100, D101	P219	Y32
W104	T220	Y91 , D92, E93, F94, L96
	R221	D92 , E93, F94

[0294]

실시예 8 – 세포 검정에서의 기능적 시험

[0295]

PT3을 다음 2가지 유형의 세포 검정에서 타우 시드의 억제에 대해 시험하였다: 동시-인큐베이션 검정 및 고갈 검정. 두 검정 유형은 모두, 예를 들어 응집으로 인해 매우 근접할 때 신호를 생성하는 2개의 발색단-태깅된 K18 타우 단편을 발현하는 HEK 세포를 사용한다. 세포를 상이한 공급원으로부터 유래된 응집 및 인산화된 전장 (full length) 타우의 시드로 처리할 때, K18 응집체가 유도되며, 이것은 생물발광 공명 에너지 전달(BRET) 비의 변화에 의해(즉, BRET 검정) 또는 형광-활성화 세포 분류(FACS)를 사용하여 형광 공명 에너지 전달(FRET)-양성 세포를 계수함으로써(즉, FRET 검정; 도 14)(문헌[Holmes et al., 2014, PNAS 111(41):E4376-85]) 정량화될 수 있다.

[0296]

HEK 세포 균질액 동시-인큐베이션 검정(BRET 검정)

[0297]

동시-인큐베이션을 위한 타우 시드를 함유하는 균질액을 K18-유도된 응집된 GFP-태깅된 전장 타우를 함유하는 안정한 GFP-타우P301L-과발현 HEK 세포주로부터 생성하였다. 수용 세포는 K18/P301L-NanoLuc 및 K18/P301L-HaloTag를 안정하게 발현하는 HEK 세포였다. 타우 시드를 72시간 동안 시험 항체 및 수용 발색단-K18-함유 HEK 세포와 함께 동시-인큐베이션하였다. K18 응집체 형성을 BRET 비(590 nm/450 nm)의 변화에 의해 측정하였다. PT3은 300 nM에서 46.97%, 30 nM에서 18.02%, 그리고 3 nM에서 12.57%만큼 응집체 유도를 차단하였다(도 15).

[0298]

척수 동시-인큐베이션 검정(FRET 검정)

[0299]

동시-인큐베이션을 위한 타우 시드를 함유하는 균질액을 응집된 유전자도입 인간 타우를 함유하는 22 내지 23주령된 P301S 유전자도입 동물로부터의 척수로부터 생성하였다. 증가된 감수성을 위하여, 본 검정에 사용된 수용 세포는 K18/P301S-YFP 및 K18/P301S-CFP를 안정하게 발현하는 HEK 세포였다. 타우 시드를 72시간 동안 시험 항체 및 수용 발색단-K18-함유 HEK 세포와 함께 동시-인큐베이션하였다. K18 응집체 형성을 FACS에 의해 FRET-양성 세포를 계수함으로써 측정하였다. PT3은 300 nM에서 34.03%, 30 nM에서 37.02%, 그리고 3 nM에서 30.68%만큼 응집체 유도를 차단하였다(도 16).

[0300]

면역고갈 세포 검정

[0301]

최대 백분율 억제 값이 시드 상의 에피토프의 밀도 또는 PT3 에피토프를 함유하는 시드 수와 관련되어 있는지를 조사하기 위하여, 면역고갈 검정을 수행하였다. 면역고갈 검정에서는, 타우 시드를 시험 항체와 함께 인큐베이션하고, 단백질 G 비드를 사용하여 용액으로부터 제거하였다. 고갈된 상층액을 발색단-K18-함유 HEK 세포에서 잔류 시드 능력에 대해 시험하고, 이전에 기재된 바와 같이 FACS에 의해 분석하였다(문헌[Holmes et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 111(41):E4376-85, 2014]).

[0303] 면역고갈을 위한 타우 시드를 함유하는 균질액을 22 내지 23주령된 P301S 유전자도입 동물(도 17) 또는 동결보존된 인간 AD 뇌 조직(도 18)으로부터의 척수로부터 생성하였다. 인간 AD 뇌 면역고갈 검정에서, 고갈 후의 상층액을 형질감염 시약 Lipofectamine2000의 존재 하에서 시험하여 허용가능한 검정 범위(assay window)를 얻었다. 타우 시드는 인간 AD 뇌로부터의 척수 추출물 및 총 균질액 둘 모두에서 PT3에 의해 거의 완전히(90% 초과) 고갈될 수 있었다(도 17 및 도 18).

[0304] 결과

[0305] PT3은 HEK 세포 용해물 및 TgP301S 척수 용해물 둘 모두로부터 유래된 타우 시드를 억제하였다. 본 검정에서 얻어진 최대 억제는 상이한 항-포스포-타우 항체들 및 상이한 시드들에 대해 변동되었다(표 16). 300 nM의 PT3에 대해 관찰된 억제 값은 HEK 세포 시드의 경우 46.97 ± 5.87%이고, TgP301S 척수 추출물의 경우 34.03 ± 2.05%였다. 상이한 세포 검정에서의 포스포-타우 항체에 대한 상이한 최대 억제 값은 사용되는 타우 시드의 인산화 상태의 차이를 나타낼 수 있다. TgP301S 척수에서 생성된 타우 시드는 신경 기원의 것으로 HEK 세포 기원의 타우 시드보다 PHF-타우와 더 많은 유사성을 가질 것으로 예상되며, 이는 포스포-타우 항체의 효능이 HEK 세포 용해물과 대조하여 척수 추출물에 대해 대체로 더 높게 관찰되는 것을 설명할 수 있다.

[0306] 타우 시드는 인간 AD 뇌로부터의 척수 추출물 및 총 균질액 둘 모두에서 PT3에 의해 거의 완전히 고갈될 수 있었으며, 이러한 결과는, 척수 시드 물질에 의한 동시-인큐베이션 실험에서의 완전한 억제의 결여는 PT3 에피토프가 없는 시드의 존재로부터 야기된 것이 아니라 오히려 시드 상의 제한된 에피토프 밀도로부터 야기되었음을 시사한다.

[0307] [표 16]

세포 검정에서의 기능적 시험으로부터의 결과의 요약

MAB	BRET/GFP-타우 P301L 동시-인큐베이션 검정	FRET/P301S 척수 동시-인큐베이션 검정	FRET/P301S 척수 면역고갈 검정	FRET/인간 AD 뇌 균질액 면역고갈 검정
PT3	46.97±5.87	34.03±2.05	96.24±0.43	92.24±2.30
AT8	10.52±9.48	26.4±1.74	96.71±0.42	80.69±5.79
HT7	65.44±1.08 ^a	73.51±1.78 ^b	99.16±0.21	82.99±0.68

단위는 음성 대조군의 %, 상이한 항체의 평균이고; 모든 검정에서의 항체 농도는 ^a 166.67 nM에서의 억제 및 ^b 89.99 nM에서의 억제인 것을 제외하고는 300 nM 이었다.

[0308]

[0309] 타우 항체 요법에 대한 작용 기전은 여전히 논쟁의 쟁점이며 다수의 기전이 제안되어 있다. 미세교세포에 의한 세포외 시드의 항체-매개 제거가 최근에 한 가지 우세한 작용 기전으로서 제안되어 있다(문헌[Funk et al., *J Biol Chem.* 290(35):21652-62, 2015] 및 문헌[McEwan et al., 2017, *PNAS* 114:574-9]). 이와 관련하여, 인간-뇌-유도 시드 물질의 면역고갈은 대부분의 번역 세포 결과로 간주될 수 있으며, 이러한 유형의 세포 검정에서의 모 마우스 항체 PT3의 높은 효능은 PT3의 HFA 버전이 효과적인 치료제일 것임을 시사한다.

[0310] 실시예 9 – ePHF 주사 모델에서의 뮤린 PT3의 생체내 효능

[0311] 생체내 타우 항체 효능을 평가하기 위하여, 뇌 타우 병리를 나타내는 마우스는 필수 모델 시스템이다(문헌[Julien et al., *Methods Mol Biol.* 849:473-91, 2012]). 이들 모델 중 몇몇은 기재되어 있으며, 이들은 일반적으로 3개의 군으로 나누어질 수 있다: 1) WT 또는 돌연변이(예를 들어, P301L 또는 P301S) 타우를 과발현하는 타우 유전자도입 마우스 - 이때, 돌연변이체는 균주에 따라 5 내지 9개월 후에 심각한 병리를 나타냄(문헌[Allen et al., *J Neurosci.* 22(21):9340-51, 2002]; 문헌[Scattoni et al., *Behav Brain Res.* 208(1):250-7, 2010]; 문헌[Terwel et al., *J Biol Chem.* 280(5):3963-73, 2005]; 문헌[Yoshiyama et al., *Neuron.* 53(3):337-51, 2007]); 2) 돌연변이 타우(예를 들어, P301L)의 시공간적으로 조절된(spatio-temporally-regulated) 발현을 갖는 마우스(문헌[Liu et al., *Brain Imaging Behav.* 6(4):610-20, 2012]) 또는 전-응집(pro-aggregating) 단편(예를 들어, K18)의 시공간적으로 조절된 발현을 갖는 마우스(문헌[Mocanu et al., *J Neurosci.* 28(3):737-48, 2008]); 및 3) 플라크 및 타우 병리 둘 모두를 나타내는 돌연변이 타우 및 APP 둘 모두의 발현을 갖는 마우스(문헌[Oddo et al., *J Neurochem.* 102(4):1053-63, 2007]).

[0312] 돌연변이 타우를 발현하는 마우스는 강한 병리를 나타내지만, 병리의 개사는 동물간에 변동될 수 있어서, 연구에서 가변성을 야기할 수 있고, 세포-자가 타우 응집과 전체 타우 응집 신호로의 확산의 상대적 기여는 명확하지 않다. 따라서, 타우 시드 및 확산을 효과적으로 연구하는 데 사용될 수 있는 모델(예를 들어, 문헌[de Calignon et al., 2012, *Neuron.* 73(4):685-97, 2012]; 문헌[Liu et al., 상동])은 가치가 높다. 그러한 모델의 확산치는 ALZ17 마우스(정상 인간 타우를 발현하는 균주)에의 상이한 타우병증으로부터 유래된 뇌 균질액의 주사가 인간 뇌에서의 타우병증과 유사한 형태를 갖는 타우 함유물의 형성을 유도한다는 조사결과에 의해 추가

로 증강된다. 예를 들어, 마우스에의 은친화성 과립성 질병 샘플로부터의 물질의 주사는 질병 자체에 특징적인 구상체 또는 콤마-유사 구조를 갖는 침착물을 생성하였으며, AD-유사 타우 병리는 AD 물질이 주사된 마우스에서 관찰되었다(문헌[Clavaguera et al., 2013, PNAS 110(23):9535-40]).

[0313] 따라서, 유전자도입 P301L 마우스 주사 모델이 확립되어 있는데, 여기서는 타우의 전-응집 단편, 예컨대 합성 K18 피브릴(문헌[Li and Lee, *Biochemistry*. 45(51):15692-701, 2006]) 또는 인간 AD 뇌로부터 유래된 PHF-타우 시드가 세포-자가 응집이 개시되지 않은 생후령에서의 P301L 유전자도입 마우스 모델의 피질 또는 해마 영역에 주사된다. 이러한 주사 모델은 타우 확산의 중요한 세포외 시딩 성분을 모방하는 것을 목표로 한다. 주사된 K18 또는 PHF-타우 시드는 주사 부위에서, 그리고 더 적은 정도로는, 결합된 대측 영역에서 타우병증을 유도한다(문헌[Peeraer et al., *Neurobiol Dis.* 73:83-95, 2015]). 이 모델은 AD-뇌-유래 PHF-타우 시드 또는 K18 피브릴과 함께 동시주사될 때, 항체, 예컨대 본 발명의 항-타우 항체의 항-시딩 잠재력의 시험을 가능하게 한다(문헌[Iba et al., 2015, *J Neurosci.* 33(3):1024-37, 2013]; 문헌[Iba et al., *Acta Neuropathol.* 130(3):349-62]).

[0314] 유전자도입 P301L 마우스 주사 모델의 개략도가 도 19에 나타나 있다. 간략하게 말하면, 사후 AD 뇌의 사르코실-불용성 분획의 피질 주사는 타우 응집의 서서히 진행되는 증가를 촉발한다. 주사된 반구에서, 제1 신호는 주사 후 1개월째에 측정되고, 주사 후 3개월째에 추가로 진행한다. 주사 후 5개월째에, 일부 동물은 P301L 돌연변이에 의해 유도된 농축체를 형성하기 시작한다(문헌[Terwel et al., 2005, 상동]). AT8 염색 수준은 1개월 내지 3개월에서 증가하며(도 19c와 도 19d 및 도 19e와 도 19f), 이에 따라 항체 효능 실험은 동시주사 후 2개월째에 분석된다. 추가로, 사후 AD 뇌의 사르코실-불용성 분획의 해마 주사는 주사된 반구로부터의 사르코실 불용성 분획의 MesoScale Discoveries (MSD) 분석에 의해 측정된 타우 응집의 용량-의존적 진행성 증가를 촉발한다(도 19g).

동물 처리 및 두개내 주사

[0315] 주사 연구를 위하여, P301L 돌연변이를 갖는 최장 인간 타우 아이소형(타우-4R/2N-P301L)을 발현하는 유전자도입 tau-P301L 마우스(문헌[Terwel et al., 2005, 상동])를 생후 3개월째에 수술에 사용하였다. 모든 실험은 지방윤리위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다. 정위적 수술의 경우, 마우스는 피질(AP +2.0, ML +2.0(브레그마(bregma)로부터), DV, 2.7 mm(듀라(dura)로부터) 또는 해마(AP -2.0, ML +2.0(브레그마로부터), DV 1.8 mm(듀라로부터))에, 단일클론 항체의 존재 또는 부재 하에서, 3 μ l(0.25 μ l/min 속도)로, 사후 AD 조직으로부터의 사르코실 불용성 프렙(prep)(풍부화된 쌍 나선형 필라멘트, ePHF)에 의한 단측(우측 반구) 주사를 받았다. 항체 또는 식염수에 의한 복막내(IP) 주사의 경우, 처리(20 mg/kg, 2x/주)를 두개내 주사 1주 전에 시작하고, 마우스가 해부를 위해 희생될 때까지(두개내 주사 후 2개월째) 계속하였다.

적출 절차

[0316] 주사된 반구로부터의 마우스 조직을 침량하고, 6 부피의 균질화 완충액(10 mM Tris HCl(pH 7.6)) 중에서 균질화하였다. 균질액을 27 000 x g로 20분 동안 원심분리하고, 생성된 상층액(총 균질액)으로부터 분취물을 취한 후, 1% N-라우로일사르코신을 첨가하였다. 90분(900 rpm, 37°C) 후에, 용액을 다시 184 000 x g로 1시간 동안 원심분리하였다. 상층액은 사르코실-가용성 분획으로 유지한 반면, 사르코실-불용성 물질을 함유하는 펠릿은 균질화 완충액 중에 재현탁시켰다.

생화학적 분석

[0317] 코팅 항체(항-AT8 또는 총 타우 항체)를 PBS(1 μ g/ml) 중에 희석시키고, MSD 플레이트(웰당 30 μ L)(L15XA, Mesoscale Discoveries) 내로 분취하였으며, 이를 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 5 \times 200 μ l의 PBS/0.5% Tween-20으로 세척한 후, PBS 중 0.1% 카세인으로 플레이트를 차단시키고, 5 \times 200 μ l의 PBS/0.5% Tween-20으로 다시 세척하였다. 샘플 및 표준물(둘 모두 PBS 중 0.1% 카세인 중에 희석됨)을 첨가한 후, 플레이트를 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 후속으로, 플레이트를 5 \times 200 μ l의 PBS/0.5% Tween-20으로 세척하고, PBS 중 0.1% 카세인 중의 SULFO-TAG™ 접합된 검출 항체를 첨가하고, 600 rpm으로 진탕하면서 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 최종 세척(5 \times 200 μ l의 PBS/0.5% Tween-20) 후에, 150 μ l의 2 x 완충액 T를 첨가하고, 플레이트를 MSD 이미저로 판독하였다. 원시 신호를 사후 AD 뇌로부터의 사르코실 불용성 프렙(ePHF)의 16개의 희석물로 이루어진 표준 곡선에 대해 정규화하고, 임의적인 단위(AU) ePHF로 표현하였다. 통계학적 분석(본페로니 사후 검정을 동반하는 ANOVA)을 GraphPad 프리즘 소프트웨어로 수행하였다.

결과

[0322] 피질 동시주사 모델(도 19) 하에서의 마우스 PT3의 활성을 4개의 독립적인 연구에서 확인하였다. 마우스를 표 17에 따라 말초 투여하였으며, 결과가 도 20에 나타나 있다. 모델의 추가의 개선(도 19d)은 표 18에 나타낸 바와 같이 ePHF-타우의 용량 및 동시주입된 항체의 용량을 낮추는 것을 가능하게 하였으며, 결과가 도 21에 나타나 있다. 이러한 더 낮은 용량의 ePHF-타우의 사용으로, PT3은 말초 투여될 때 응집된 타우를 낮추는 데 있어서 유의한 효과를 갖는 것으로 또한 밝혀졌다($P<0.0001$; 도 21).

[0323] [표 17]

말초 투여

군	ePHF 의 양(pmol)	Ab 동시주사의 양(pmol)	항체 IP	n
IgG	0.2	5	20 mg/kg (2x/w)	12
PT3	0.2	-	20 mg/kg (2x/w)	13
PT3	0.2	5		5

[0324]

[0325] [표 18]

동시주사 투여

군	ePHF 의 양(pmol)	Ab 동시주사의 양(pmol)	n
IgG	0.2	5	14
PT3	0.2	5	15
PT3	0.2	0.5	15
PT3	0.2	0.05	15

[0326]

[0327] 도 19a에서의 레이아웃에 따른 PT3-HFA IgG2a 변이체(이는 mIgG2a/카파 불변 영역 상에 가변 영역 VH92(서열 번호 27) 및 VL77(서열 번호 31)을 함유함)를 포함한 PT3 동종형과 ePHF의 동시주사는 P301L 마우스에서 ePHF-유도 타우 응집을 약화시켰다(도 22). 주사는 피질에서 행하였다. (해마는 아님). 주사된 반구(생화학적 데이터, 도 22b) 및 비주사된 반구(IHCAT100 염색, 도 22c)에서 효과가 관찰되었다. IgG2a 및 IgG1 동종형 둘 모두는 AD-뇌-유래 PHF-타우와 함께 동시주사될 때 타우병증의 유도를 유의하게 감소시켰다($p<0.0001$). 그 결과를 대측 반구 내의 IHC에서 확인하였다.

[0328]

본 발명이 상세히 그리고 그의 구체적인 실시 형태를 참조하여 설명되어 있지만, 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않고서 거기서 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.

[0329] 실시예 10 - PSP 타우와 AD 타우의 비교

[0330]

진행성 핵상 마비(PSP)는 파킨슨증, 자세 불안정성 및 낙상, 상핵 주시 마비, 및 치매를 특징으로 하는 희귀하고 치명적인 신경퇴행성 장애이다(문헌[Steele et al., 1964, Archives of Neurology 10:333-359]). 병리학적으로, 뇌줄기 및 기저핵뿐만 아니라 다른 뇌 영역에서의 4-반복체(4R) 타우의 우선적인 축적이 있다(문헌 [Dickson DW. Handbook of Clinical Neurology 2008;89:487-491]; 문헌[Williams & Lees, 2009, The Lancet Neurology 8:270-279]). 아밀로이드와 같은 다른 병리의 부재를 고려하면, PSP는 1차 타우병증으로 간주되고, 동물 모델 데이터는 PSP 타우가 AD에서 발생하는 것으로 가정되는 것과 유사한 시딩을 겪을 수 있음을 시사한다(문헌[Clavaguera et al., 2013, PNAS 110:9535-9540]; 문헌[Sanders et al., 2014, Neuron 82:1271-1288]). 이와 같이, PSP는 본 발명의 항체로 치료될 수 있다. 일련의 실험에 착수하여 PSP 타우와 AD PHF 타우의 유사성을 특징규명하였다.

[0331] 방법

[0332]

인간 뇌 조직: 임상적으로 진단된 PSP($n=5$) 환자로부터의 2개의 전형적으로 고도로 이환된 뇌 영역(미상핵(nucleus caudatus) = CAU 및 피각(putamen) = PUT) 및 덜 이환된 뇌 영역(상전두회(gyrus frontalis superior) = GFS) 및 2명의 대조군(= 타우병증 없음) 환자에 대한 동일한 뇌 영역으로부터의 동결보존된 조직을 NBB(Netherland Brain Bank)로부터 입수하였다. 하기에 기재된 응집 검정 및 면역조직화학 염색 둘 모두에 의한 분석에 조직을 사용하였다. 9명의 산발성 AD 환자로부터의 동결보존된 조직을 펜실베니아 대학교(University of Pennsylvania)로부터 획득하고, 응집 검정에 의한 분석에 사용하였다. 1명의 AD 환자로부터의 동결보존된 조직을 뉴캐슬 대학교(University of Newcastle)로부터 획득하고, 면역조직화학 염색에 사용하였다.

[0333]

뇌 조직의 균질화: 동결보존된 조직을 다운스 균질기(dounce homogenizer)를 10회 스트로크에 대해 1000 rpm으로 사용하여, 10 mM Tris, 150 mM NaCl(pH 7.4), 필터: 0.22 μ m + 완전 미니 EDTA-무함유 프로테아제 억제제(Roche, 카탈로그 번호 11 836 170 001) 중에서 균질화하여 10% w/v 균질액을 얻었다. 균질액을 4°C에서 10분 동안 27.000xg로 원심분리하고, 상층액을 사용 시까지 -80°C에서 분취물로 저장하였다.

- [0334] **응집 검정:** 응집 특이적 샌드위치 MSD 면역검정을 수행하였는데, 여기서는 포스포-타우 항체 AT8 및 PT3을 포획 항체 및 검출 항체로서 사용하였다. 코팅 항체를 PBS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 중에 희석시키고, MSD 플레이트(웰당 30 μL)(L15XA, Mesoscale Discoveries) 내로 분취하고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. $5 \times 200 \mu\text{l}$ 의 PBS/0.5% Tween-20으로 세척한 후, PBS 중 0.1% 카세인으로 플레이트를 차단시키고, $5 \times 200 \mu\text{l}$ 의 PBS/0.5% Tween-20으로 다시 세척한다. 샘플 및 표준물(둘 모두 PBS 중 0.1% 카세인 중에 희석됨)을 첨가한 후, 플레이트를 4°C에서 하룻밤 인큐베이션한다. 후속으로, 플레이트를 $5 \times 200 \mu\text{l}$ 의 PBS/0.5% Tween-20으로 세척하고, PBS 중 0.1% 카세인 중의 SULFO-TAG™ 접합된 검출 항체를 첨가하고, 600 rpm으로 진탕하면서 실온에서 2시간 인큐베이션한다. 최종 세척($5 \times 200 \mu\text{l}$ 의 PBS/0.5% Tween-20) 후에, $150 \mu\text{l}$ 의 2 x 완충액 T를 첨가하고, 플레이트를 MSD 이미저로 판독한다. 원시 신호를 하나의 AD 총 뇌 균질액의 7개의 희석물로 이루어진 표준 곡선에 대해 정규화하고, 이러한 표준물의 백분율로서 보간된 값으로서 표현한다.
- [0335] **면역조직화학:** 동결보존된 인간 뇌 조직을 크라이오스탯(cryostat)(20 μm 두께)을 사용하여 슬라이싱하고, 사용 전까지 -80°C에서 저장하였다. 절편을 건조시킨 후, 포르말린 고정, 3% 과산화수소(덴마크 글로스트립 소재의 DAKO, S2023)에 의한 내인성 펴옥시다제의 차단, 및 PBS1x + 0.3% Triton X-100에서의 1시간 동안의 투파화(permeabilization)를 수행하였다. 1차 항체(PT3 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; AT8 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 백그라운드 감소 성분(DAKO, S3022)을 사용하여 항체 희석제 중에 희석시키고, 1시간 동안 절편에 적용하였다. 광범위한 세척 후에, 슬라이드를 HRP-접합된 항-마우스 2차 항체(Envision, DAKO, K4000)와 함께 인큐베이션한 후, 빨색성 DAB 표지화(DAKO, K4368)를 행하였다. 슬라이드를 혜마톡실린으로 대비염색하고, 탈수시키고, 유기 마운팅 배지(Vectamount, 미국 캘리포니아주 벌링게임 소재의 Vector labs, H-5000)로 마운팅하였다. Hamamatsu NanoZoomer 2.0 rs(일본 시즈오카 소재의 Hamamatsu Photonics)를 사용하여 이미징을 수행하였다.
- [0336] **결과**
- [0337] **응집 검정:** 응집 검정을 수행하여 PSP 타우의 인산화 정도를 특징규명하였다. PT3 반응성 응집체는 PSP 뇌에 존재하였지만, 응집의 수준은 AD 뇌에서보다 더 낮았다(도 23). 참조 항체 AT8에 의해 얻어진 결과는 PT3에 대해 관찰된 것과 유사하였다. 이들 결과는 다양한 포스포-타우 항체를 사용하여 평가된 모든 인산화 부위가 PSP 타우 상에 존재하지만, AD에 비해 PSP에 더 적은 타우 응집체가 존재함을 시사한다.
- [0338] **면역조직화학:** AD 또는 PSP 뇌로부터의 동결절편에서의 PT3 항체에 의한 염색은 PSP에서 이환된 해부학적 영역(즉, 미상부(caudate) 및 피각)에서의 염색을 보여주었다(도 24). 타우+ 뉴런 및 소방(tufted) 성상세포를 포함한 PSP의 신경병리학적 특징이 포스포-타우 항체 PT3에 의해 검출되었다. AT8에 의해 얻어진 결과는 PT3에 대해 관찰된 것과 유사하였다.
- [0339] **결론**
- [0340] 이용가능한 데이터는 PT3이 PSP의 타우에 결합함을 시사한다.
- [0341] **실시예 11 - PT3-HFA의 친화성 성숙**
- [0342] **PHF-타우에 대한 친화성 성숙된 항체의 SPR 결합 특성화**
- [0343] 친화성 성숙된 단일클론 항체를 알츠하이머병 뇌로부터 단리된 PHF-타우에 대한 결합에 대해 시험하였다. 전개 완충액 또는 시스템 완충액으로서의 3 mM EDTA, 및 0.005% Tween 20이 보충된 PBS(pH 7.4)와 함께, 25 °C에서 ProteOn XPR36 시스템(미국 캘리포니아주 허큘레스 소재의 Bio Rad)을 사용하여 결합 속도론 및 친화도 연구를 수행하였다.
- [0344] GLC 센서 칩을, 아민-커플링 화학에 대한 벤더 권장 프로토콜을 사용하여 마우스 항-타우 항체, HT7(ThermoFisher, 카탈로그 번호 MN1000)로 공유적으로 고정화시켰다(약 5000 반응 단위, RU). 커플링 완충액은 10 mM 소듐 아세테이트(pH 4.5)였다. PHF-타우를 5°C에서 10분 동안 5000xg로 2회 원심분리하여 제조하였다. 두 번째 원심분리로부터의 상층액을 전개 완충액 중에 희석시키고(1/125), HT7 고정화된 표면에 포획-커플링하였다(약 300 RU). 포획-커플링 후에, 표면을 활성화시키고 불활성화시켜 항체 결합 연구를 위한 균질한 PHF-타우 표면을 생성하였다. 항-타우 항체 및 그의 Fab(전개 완충액 중에서 제조됨, 5배 희석물에서 0.024 내지 75 nM)를 PHF-타우 표면 위로 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 주사하여 결합을 측정하였다. 회합 및 해리 프로파일을 각각 4분 및 2시간 동안 모니터링하였다. 해리 후, 센서 칩을 10 mM 글리신(pH 2.0) 및 전개 완충액의 다회 주입을 사용하여 재생시켰다. 참조 표면(어떠한 PHF-타우도 없음)을 사용하여 주입된 mAb 또는 Fab의 비특이적 결합을 모니터링하였다. HT7 항체를 양성 대조군으로 사용하였다. mAb에 대한 결합 센서그램을 2가 결합 모델을 사용

하여 적합화하였으며, 여기서는 걸보기 친화도 또는 결합력-유도 결합(K_D)을 해리 속도와 결합 속도의 비 (k_{off}/k_{on})로서 기록하였다. 1:1 랭류어 결합 모델을 Fab의 속도론적 분석에 사용하였다.

[0345] 모 인간 항체(B296)는 PHF-타우에 대한 긴밀한 결합을 보여주었으며($K_D = 6.2 \text{ pM}$), 매우 느린 해리 속도에 의해 지배되었는데, 여기서는 mAb의 5% 이하의 해리가 2시간에 걸쳐 관찰되었다(표 19, 도 25). 친화성-성숙된 항체는 1.8 내지 2.5 pM 범위의 친화도로 PHF-타우에 대한 결합의 개선을 나타내었다. B711 및 B809는 모 항체와 대비하여 결합 속도에서 3배 개선을 나타내었지만, 해리 속도는 모든 항체간에 사실상 구별 불가능하였다(도 25). Fab는 전체적으로 그들의 상응하는 mAb와 대비하여 PHF-타우에 대한 결합이 한 자리수 더 약하게 나타났는데, 이는 PHF-타우에 대한 mAb의 결합력-유도 결합을 시사한다. B324(모 mAb, B296의 Fab)는 63.2 pM의 고유 친화도로 PHF-타우에 결합하였다. 친화성-성숙된 mAb의 Fab는 15.6 내지 31 pM 범위의 값으로 친화도에 있어서 유사한 개선을 나타내었다. 더욱이, 2개의 Fab, B330(B711의 Fab) 및 B332(809의 Fab)는 결합 속도에 있어서 그들의 상응하는 mAb와 유사한 3 내지 4배 개선을 나타내었다.

[표 19]

PHF-타우와의 친화성-성숙된 mAb 및 이들의 Fab에 대한 ProteOn SPR 결합 속도론 및 친화도				
샘플	설명	$k_{on} (\times 10^6 \text{ 1/Ms})$	$k_{off} (\times 10^{-5} \text{ 1/s})$	$K_D (\text{pM})$
B296 (mAb)	인간화 모 mAb	1.89 ± 0.09	1.17 ± 0.09	6.2 ± 0.5
B711 (mAb)	친화성 성숙된 B296	$6.17 (5.72 - 6.61)$	$1.13 (1.08 - 1.17)$	$1.8 (1.6 - 2.1)$
B809 (mAb)	친화성 성숙된 B296	6.45 ± 1.18	1.27 ± 0.15	2.0 ± 0.5
B333 (mAb)	친화성 성숙된 B296	2.68 ± 0.23	0.68 ± 0.08	2.5 ± 0.4
B324 (Fab)	B296 의 Fab	1.43 ± 0.06	9.03 ± 0.08	63.2 ± 2.8
B330 (Fab)	B711 의 Fab	$4.60 (4.53 - 4.66)$	$7.15 (6.94 - 7.36)$	$15.6 (15.3 - 15.8)$
B332 (Fab)	B809 의 Fab	4.64 ± 0.29	12.0 ± 0.12	25.8 ± 1.7
B331 (Fab)	B333 의 Fab	1.72 ± 0.07	5.31 ± 0.10	31.0 ± 1.5

1 회의 실험에서 $N = 2$ 개 또는 3 개의 반복시험물. 값은 평균 \pm SD(또는 범위)로서 기록됨

[0347]

ELISA에 의한 포스포펩티드에 대한 결합

[0349] 타우 포스포펩티드에 대한 결합을 ELISA에 의해 분석하였는데, 여기서는 웨이트(10 ng/mL)를 플레이트에 하룻밤 직접 코팅하였다. 플레이트를 세척하고 PBS 중 0.1% 카세인으로 차단한 후, 플레이트를 상이한 농도의 HFA-PT3(B296) 및 HFA-PT3의 친화성 성숙된 변이체(B809, B333 및 B711) mAb와 함께 인큐베이션하였다(도 26a). 항체와의 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고, 50 $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 HRPO 표지 항-Fab 항체(Jackson Immunoresearch laboratories)(차단 완충제 중에 1:10000으로 희석됨). 추가 세척 단계 후에, 제조자의 설명서에 따라 "원 스텝" TMB(Thermo Scientific)를 사용하여 검출을 수행하였다. 플레이트를 EnVision® 2102 멀티라벨 판독기 (Multilabel Reader)(미국 매사추세츠주 월섬 소재의 Perkin Elmer)에서 분석하였다. GraphPad Prism7.0 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선을 생성하였다. 도 26a의 결합 곡선으로부터, B296은 가장 낮은 친화성을 나타낸 반면, B711은 B296뿐만 아니라 B333 및 B809와 대비해서도 가장 강력한 결합을 나타내었음을 알 수 있다. 이는, B711이 pT217 웨이트에 대해 가장 강한 친화성을 갖는 인간화 PT3 항체임을 시사한다. Fab에 의한 유사한 실험(도 26b)은 M333 (B711의 Fab)이 모 PT3 분자의 Fab인 B187과 대비하여 유사한 웨이트 결합을 가졌음을 보여주었다. 역시, M324(B296, HFA-PT3의 Fab)는 PT3-HFA의 모 Fab 및 친화성 성숙된 변이체와 대비하여 더 약한 결합을 나타내었다.

[표 20]

ELISA에 의한 pT217 결합으로부터의 결과의 요약

	EC ₅₀ (pM)	
Fab	평균	Fab
B187	109.82	B187
M324	340.8333	M324
M330	106.5133	M330
mAb	평균	mAb
B296	433.425	B296
B809	91.6675	B809
B333	164.345	B333
B711	70.745	B711

적어도 2 회의 실험에서 $N = 2$ 개의 반복시험물. 값은 평균 \pm SD로서 기록됨

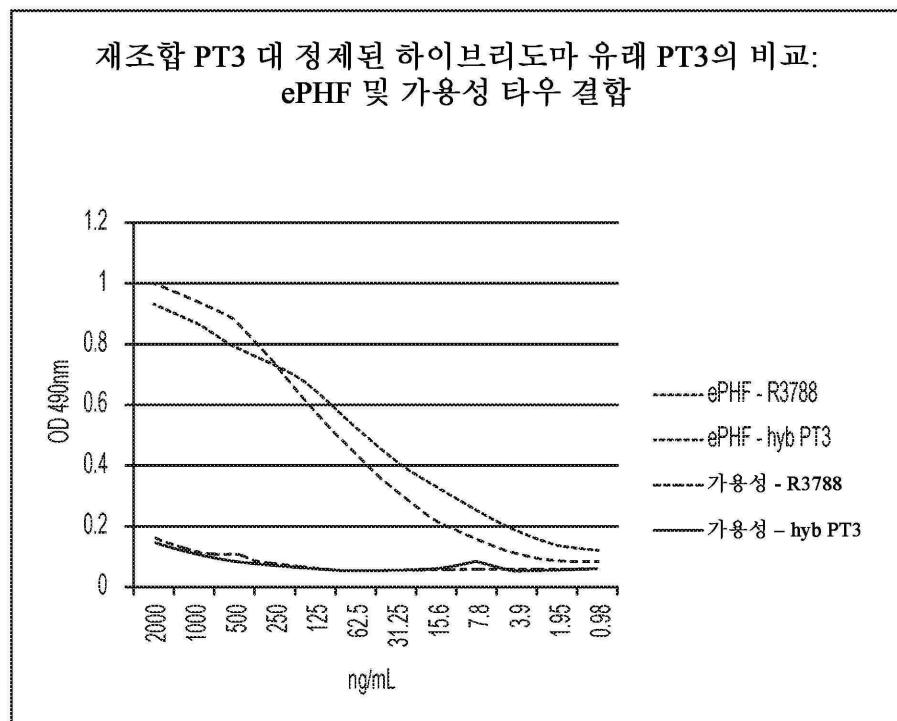
참고문헌

- [0352] Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.* 45:3832-9, 2008
- [0353] Adams et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):213-21, 2010
- [0354] Allen et al., *J Neurosci.* 22(21):9340-51, 2002
- [0355] Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004
- [0356] Asuni et al., *J Neurosci.* 27:9115-29, 2007
- [0357] Boutajangout et al., *J Neurochem.* 118:658-67, 2011
- [0358] Boutajangout et al., *J Neurosci.* 30:16559-66, 2010
- [0359] Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov.* 8:783-93, 2009
- [0360] Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991
- [0361] Chai et al., *J Biol Chem.* 286:34457-67, 2011
- [0362] Chothia and Lesk, *J Mol Biol.* 196:901-17, 1987
- [0363] Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909-13, 2009
- [0364] Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(23):9535-40, 2013
- [0365] Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(23):9535-40, 2013
- [0366] Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50(Pt 5):760-3, 1994
- [0367] Collin et al., *Brain.* 137(Pt 10):2834-46, 2014
- [0368] de Calignon et al., *Neuron.* 73(4):685-97, 2012
- [0369] Emsley and Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004
- [0370] Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)
- [0371] Fishwild et al., *Nat Biotechnol.* 14:845-51, 1996
- [0372] Fransson et al., *J Mol Biol.* 398(2):214-31, 2010
- [0373] Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845-52, 2009
- [0374] Funk et al., *J Biol Chem.* 290(35):21652-62, 2015
- [0375] Goedert et al., *Biochemical J.* 301(Pt3):871-877
- [0376] Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009
- [0377] Hoffmann et al., *Biochemistry.* 36(26):8114-24, 1997
- [0378] Holmes et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(41):E4376-85, 2014
- [0379] Iba et al., *Acta Neuropathol.* 130(3):349-62, 2015
- [0380] Iba et al., *J Neurosci.* 33(3):1024-37, 2013
- [0381] Julien et al., *Methods Mol Biol.* 849:473-91, 2012
- [0382] Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):125-32, 2010
- [0383] Knappik et al., *J Mol Biol.* 296:57-86, 2000
- [0384] Knight et al., *Platelets.* 15:409-18, 2004
- [0385] Kohler and Milstein, *Nature.* 256:495-7, 1975

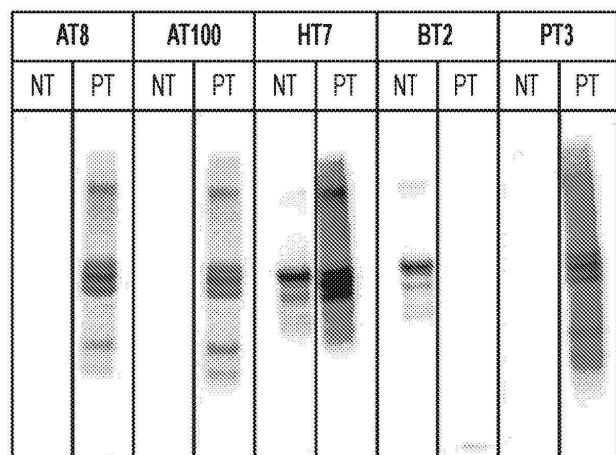
- [0387] Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001
- [0388] Lee et al., *Cell Rep.* 16(6):1690-700, 2016
- [0389] Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003
- [0390] Leong et al., *Cytokine*. 16:106-19, 2001
- [0391] Li and Lee, *Biochemistry*. 45(51):15692-701, 2006
- [0392] Liu et al., *Brain Imaging Behav.* 6(4):610-20, 2012
- [0393] Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994
- [0394] Malia et al., *Proteins*. 84:427-434, 2016
- [0395] Martin and Thornton, *J Mol Biol.* 263(5):800-15, 1996
- [0396] Matsuo et al., *Neuron*. 13(4):989-1002, 1994
- [0397] McCoy et al., *J Appl Crystallogr.* 40(Pt 4):658-674, 2007
- [0398] McEwan et al., 2017, PNAS 114(3):574-9
- [0399] Mendez et al., *Nat Genet.* 15:146-56, 1997
- [0400] Mercken et al., *Acta Neuropathol.* 84(3):265-72, 1992
- [0401] Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991
- [0402] Mocanu et al., *J Neurosci.* 28(3):737-48, 2008
- [0403] Morris et al., *Nat Neurosci.* 18(8):1183-9, 2015
- [0404] Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011
- [0405] Murshudov et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55, 1997
- [0406] Oddo et al., *J Neurochem.* 102(4):1053-63, 2007
- [0407] Otvos et al., *J Neurosci Res.* 39(6):669-73, 1994
- [0408] Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991
- [0409] Peeraer et al., *Neurobiol Dis.* 73:83-95, 2015
- [0410] Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:10029-33, 1989
- [0411] Scattoni et al., *Behav Brain Res.* 208(1):250-7, 2010
- [0412] Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11(1):9-25, 2016
- [0413] Seubert et al., *J Biol Chem.* 270(32):18917-22, 1995
- [0414] Shi et al., *J Mol Biol.* 397:385-96, 2010
- [0415] Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20:685-91, 2009
- [0416] Terwel et al., *J Biol Chem.* 280(5):3963-73, 2005
- [0417] Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4884-8, 1988
- [0418] Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970
- [0419] Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003
- [0420] Yoshiyama et al., *Neuron*. 53(3):337-51, 2007
- [0421] Zhao et al., *Protein Expr Purif.* 67(2):182-9, 2009

도면

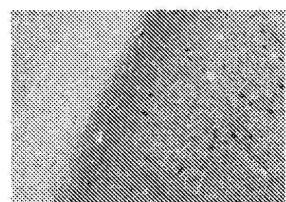
도면1



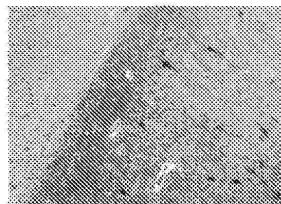
도면2



도면3a



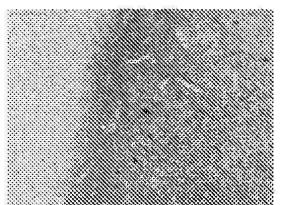
도면3b



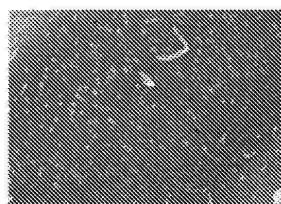
도면3c



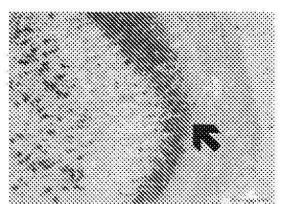
도면3d



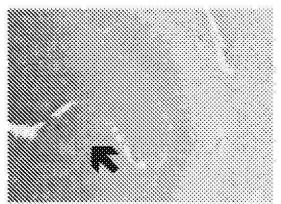
도면3e



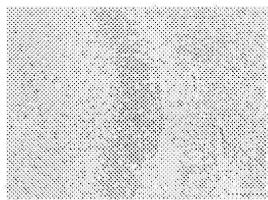
도면4a



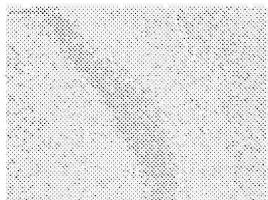
도면4b



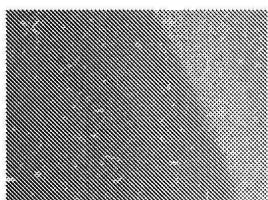
도면4c



도면4d



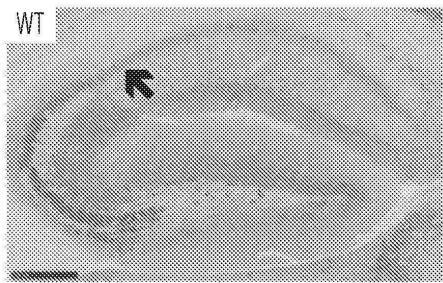
도면4e



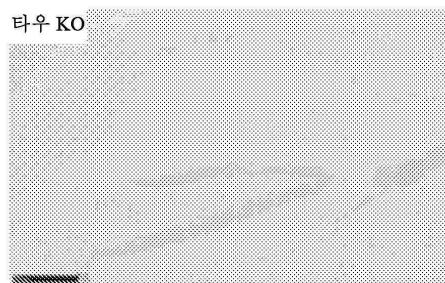
도면5a



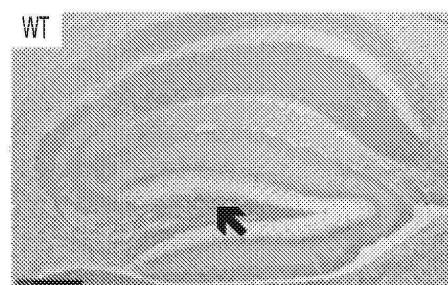
도면5b



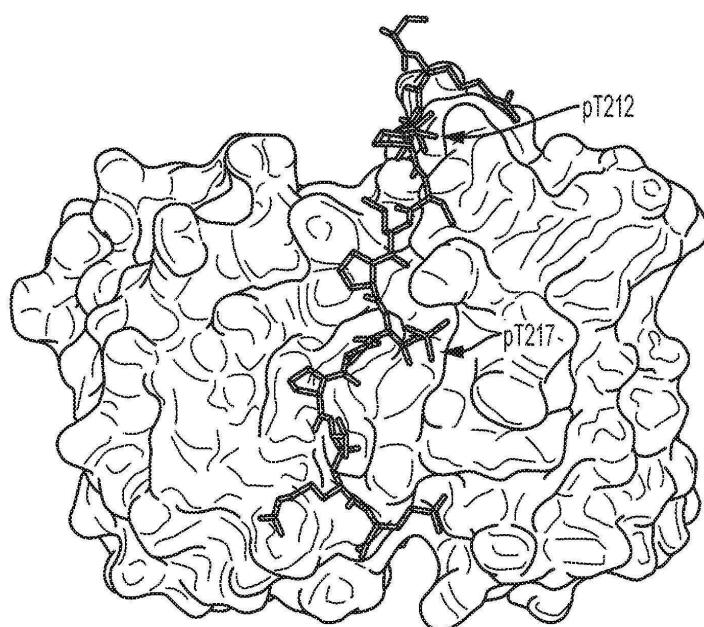
도면6a



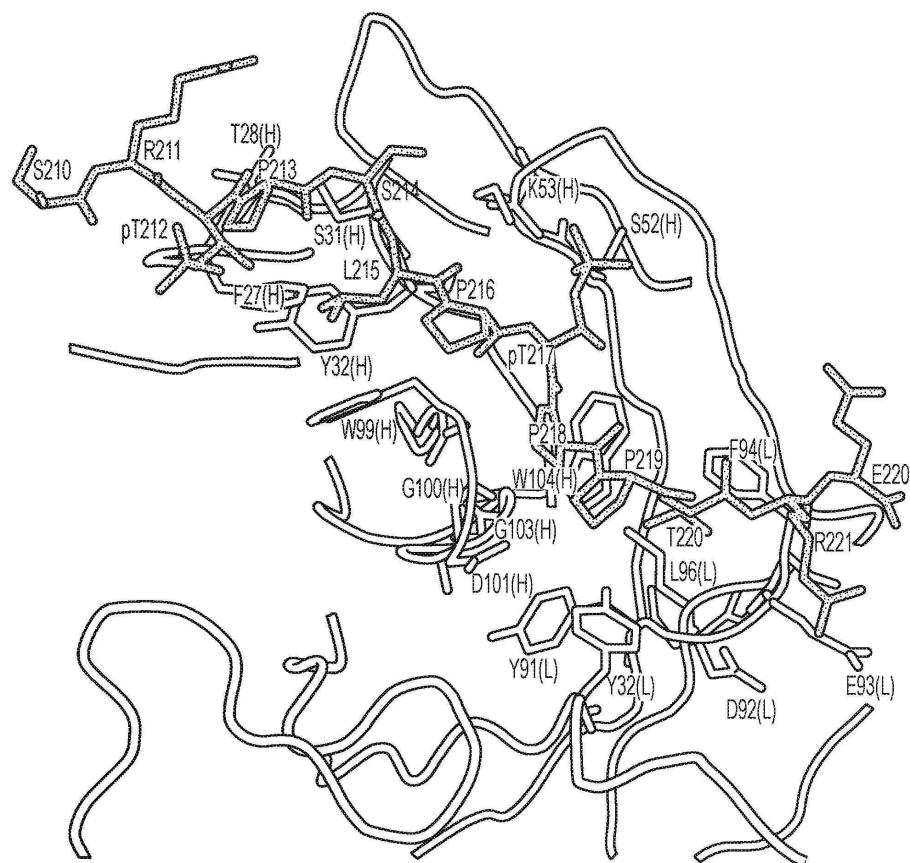
도면6b



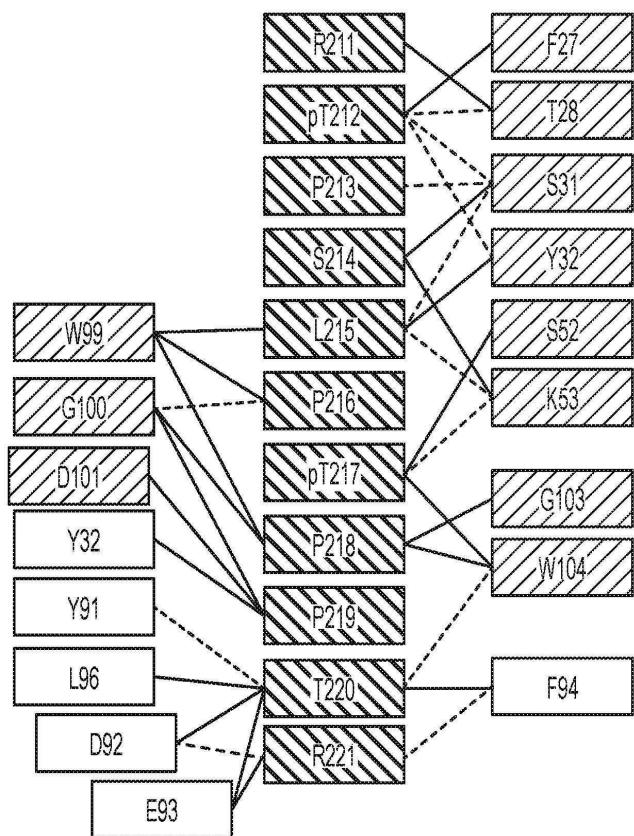
도면7



도면8



도면9



도면10

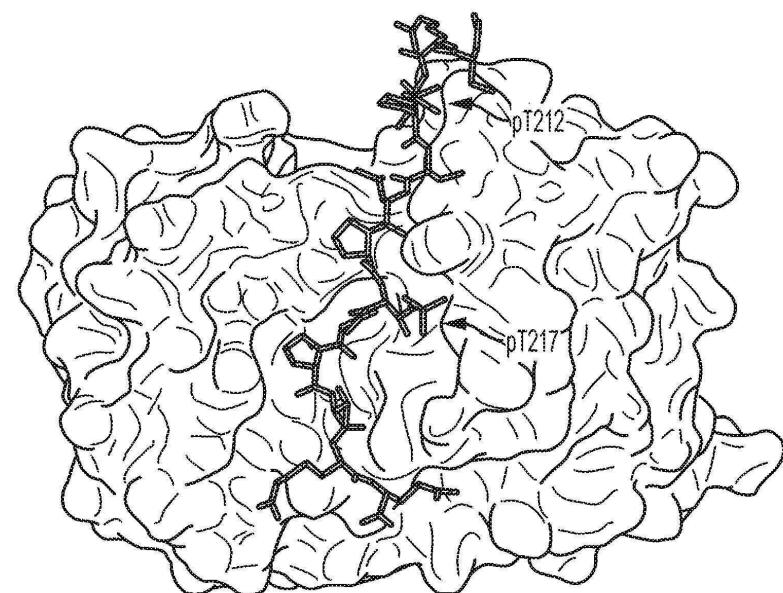
VH 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110

VH10 EVKLVESGGDLVKPGGSILKLS
CAASGFTFSSYAMS
WVRQNPEKRL
EWASISKG
GNTTYPNSV
KGRFTIS
SRDNARNI
YIQLQ
MSSLR
EDTAL
YCAR
G/GD
WFA
YQ
VLT
VSS
VH11 EVQLLESGGGLVQPGS
LRLSC
CAASGFTFSSYAMS
WVRQAP
GKLEW
VSI
SK
GNTT
YAD
SV
KGR
FTIS
RDN
SKNT
YIQLQ
MSSLR
EDT
AVY
CAR
G/GD
WFA
YQ
VLT
VSS
VH12 QVQLVESGGGLVQPGS
LRLSC
CAASGFTFSSYAMS
WVRQAP
GKLEW
VSI
SK
GNTT
YAD
SV
KGR
FTIS
RDN
SKNT
YIQLQ
MSSLR
EDT
AVY
CAR
G/GD
WFA
YQ
VLT
VSS
VH13 QVQLVESGGGLVQPGS
LRLSC
CAASGFTFSSYAMS
WVRQAP
GKLEW
VSI
SK
GNTT
YAD
SV
KGR
FTIS
RDN
NAK
NIS
YIQLQ
MSSLR
EDT
AVY
CAR
G/GD
WFA
YQ
VLT
VSS
VH14 QVQLVQSGAEVK
KPGAS
VKV
SCKA
S
GFT
SSYAMS
WVRQAP
GQRL
EW
MG
SIS
KG
GNTT
YIQLQ
FGR
VIT
RDT
SAST
Y
MEL
SSLR
EDT
AVY
CAR
G/GD
WFA
YQ
VLT
VSS

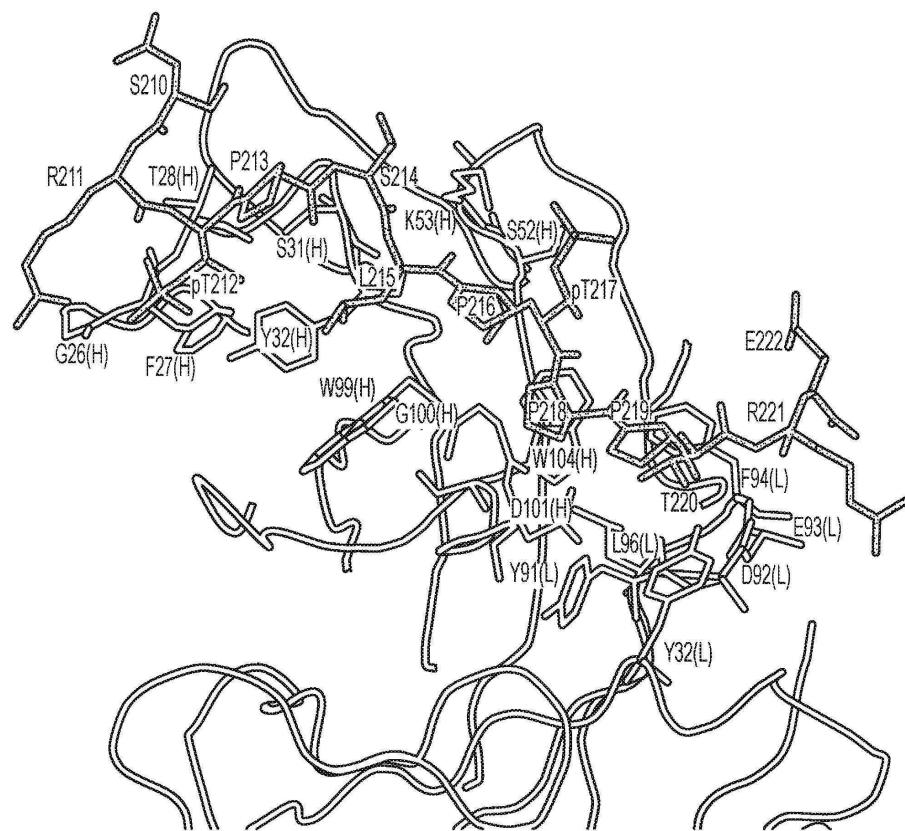
VL 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

VL7 DIKMTQSPSSM
YASLG
E
R
V
T
I
T
C
K
A
S
Q
D
I
N
R
Y
L
N
W
F
Q
Q
K
P
G
K
P
T
L
I
Y
R
A
N
R
L
L
D
G
V
P
S
R
F
S
G
G
Q
D
F
S
L
T
I
S
S
L
D
Y
E
D
M
G
I
Y
Y
C
L
O
Y
D
E
F
P
L
I
F
G
D
G
T
K
L
E
I
K
VL77 DIQMTQSPSSLS
ASVG
D
R
V
T
I
T
C
K
A
S
Q
D
I
N
R
Y
L
N
W
F
Q
Q
K
P
G
K
P
T
L
I
Y
R
A
N
R
L
L
D
G
V
P
S
R
F
S
G
G
Q
D
F
T
L
T
I
S
S
L
Q
P
E
D
F
A
T
Y
Y
C
L
O
Y
D
E
F
P
L
I
F
G
Q
G
T
K
L
E
I
K
VL78 DIQMTQSPSSLS
ASVG
D
R
V
T
I
T
C
K
A
S
Q
D
I
N
R
Y
L
N
W
Y
Q
Q
K
P
G
K
P
T
L
I
Y
R
A
N
R
L
L
D
G
V
P
S
R
F
S
G
G
Q
D
F
T
L
T
I
S
S
L
Q
P
E
D
F
A
T
Y
Y
C
L
O
Y
D
E
F
P
L
I
F
G
Q
G
T
K
L
E
I
K
VL79 DIQMTQSPSSLS
ASVG
D
R
V
T
I
T
C
K
A
S
Q
D
I
N
R
Y
L
N
W
Y
Q
Q
K
P
G
K
P
T
L
I
Y
R
A
N
R
L
L
D
G
V
P
S
R
F
S
G
G
Q
D
F
T
L
T
I
S
S
L
Q
P
E
D
F
A
T
Y
Y
C
L
O
Y
D
E
F
P
L
I
F
G
Q
G
T
K
L
E
I
K
VL80 DIVMTQTP
LSSP
V
T
L
Q
P
A
S
C
K
A
S
Q
D
I
N
R
Y
L
N
L
Q
P
G
P
R
L
I
Y
R
A
N
R
L
L
D
G
V
P
D
R
F
S
G
G
A
G
T
D
F
T
L
K
I
S
R
V
E
A
D
V
G
V
Y
C
L
O
Y
D
E
F
P
L
I
F
G
Q
G
T
K
L
E
I
K

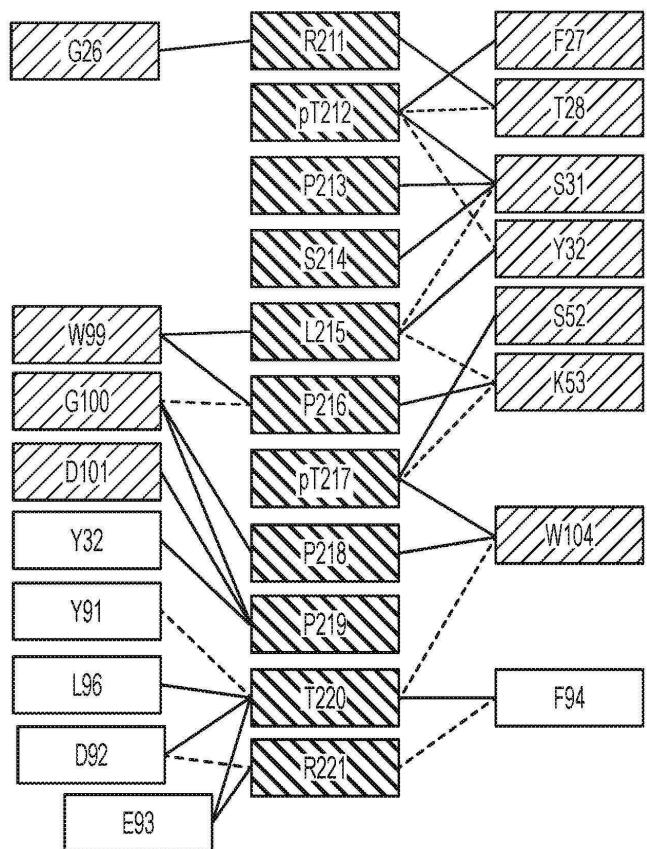
도면11



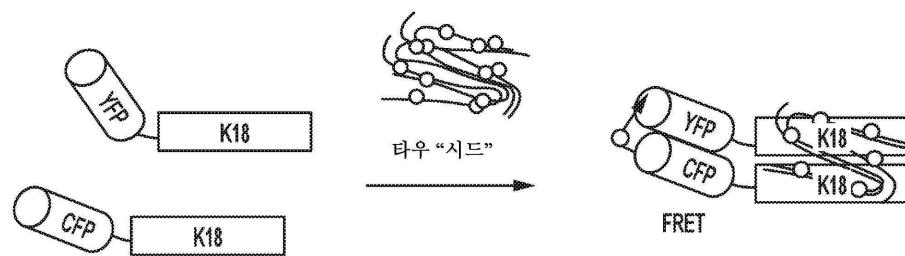
도면12



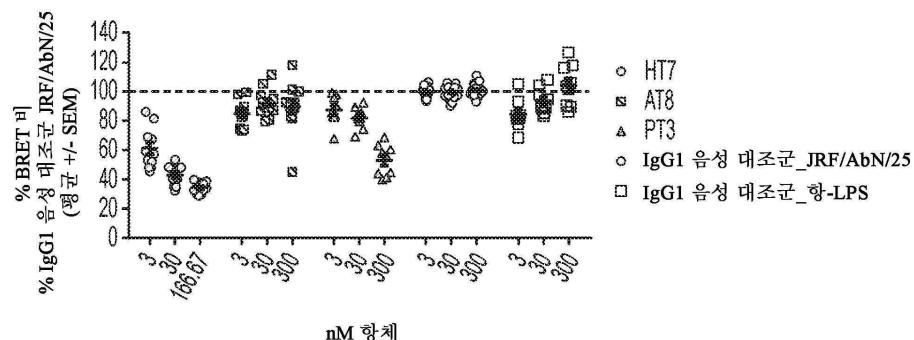
도면13



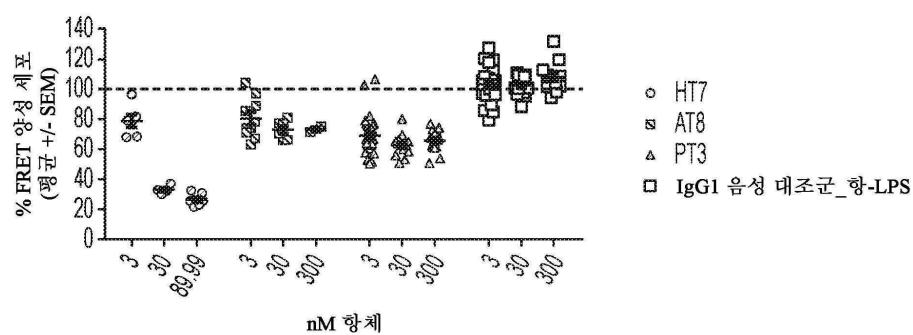
도면14



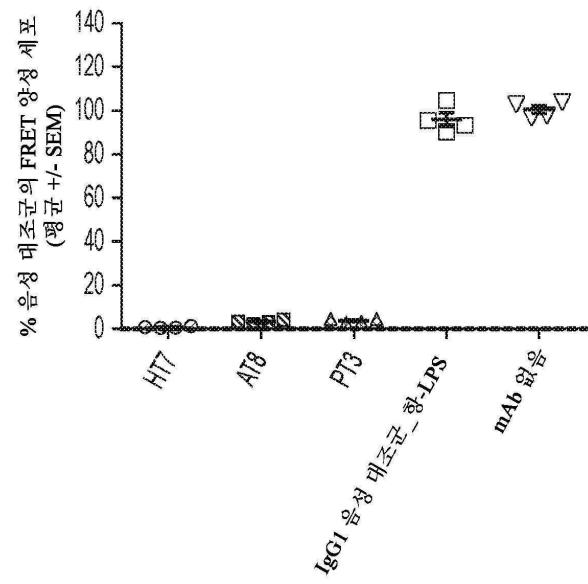
도면15



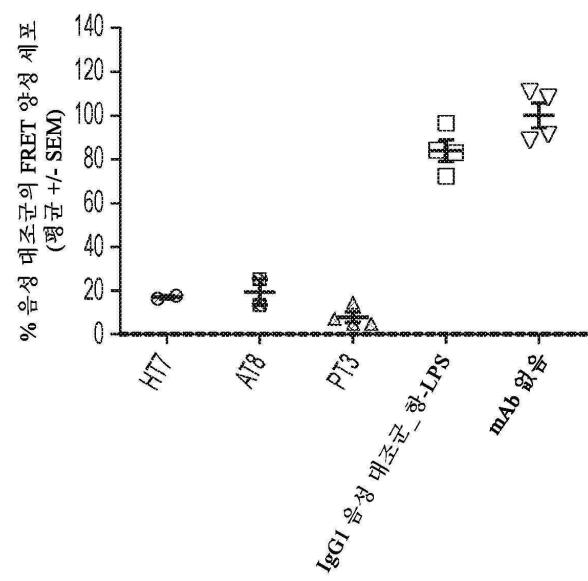
도면16



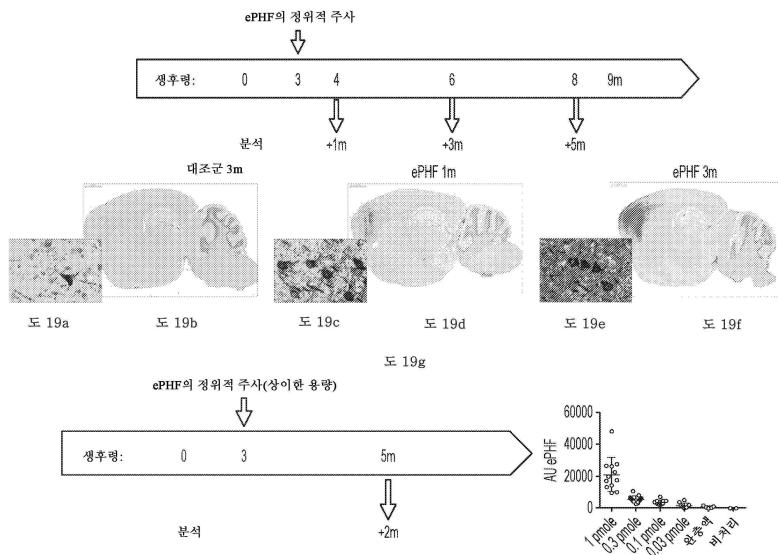
도면17



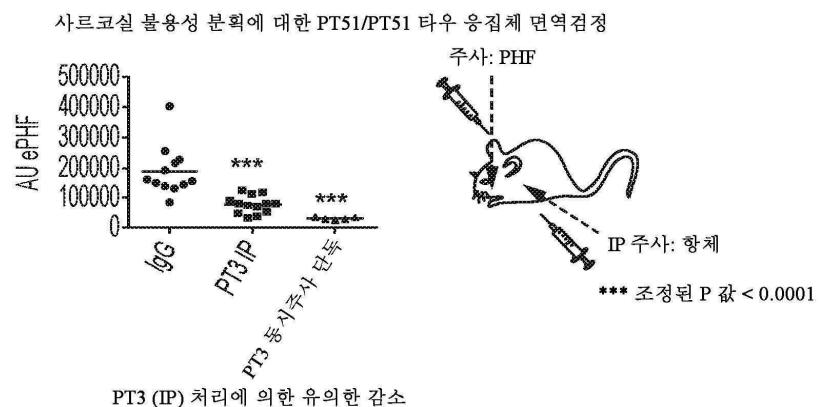
도면18



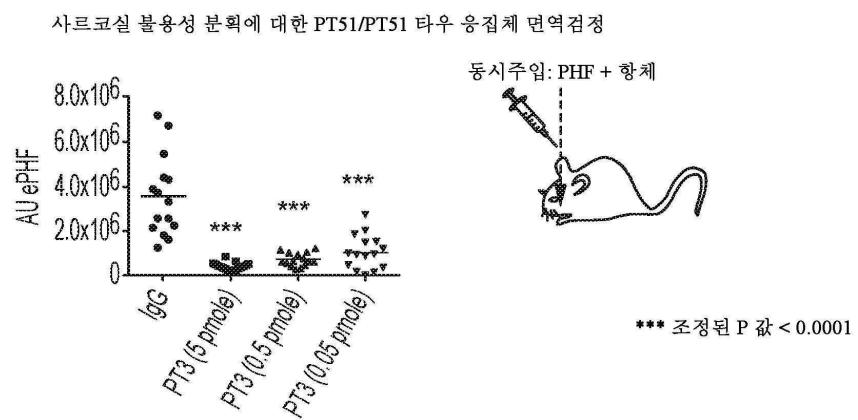
도면19



도면20



도면21

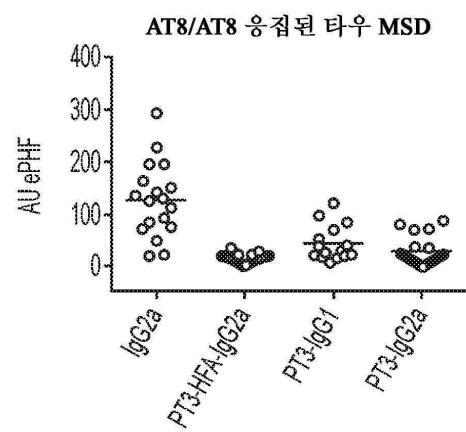


도면22a

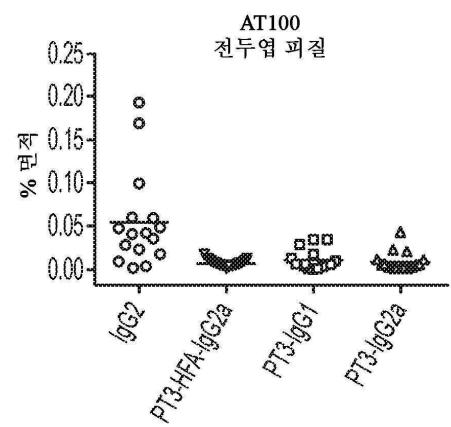
군	동시주사	IP (20 mg/kg, 2x/주)	n
1	IgG1	IgG1	19
2	PT3(G1)	PT3(G1)	16
3	PT3(G2a)	PT3(G2a)	18
4	PT3(G2a-HFA)	PT3(G2a-HFA)	15

주사	양	총 부피 (μL)	농도 (μM)
2.5 μL ePHF	1 pmol 타우	5	0.2
2.5 mL 항체	25 pmole ab	5	5

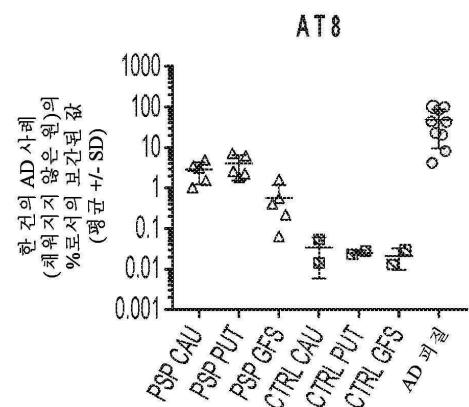
도면22b



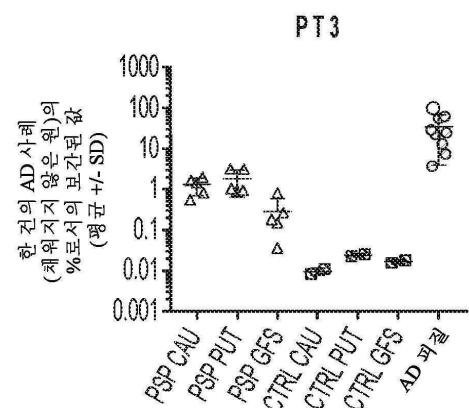
도면22c



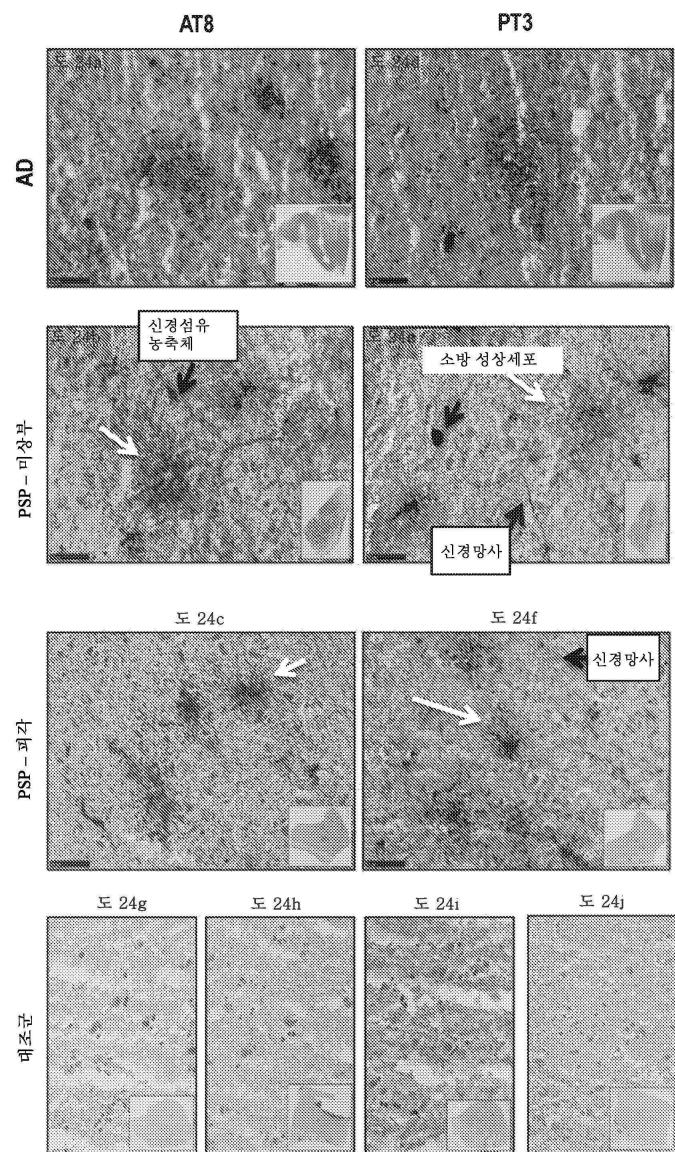
도면23a



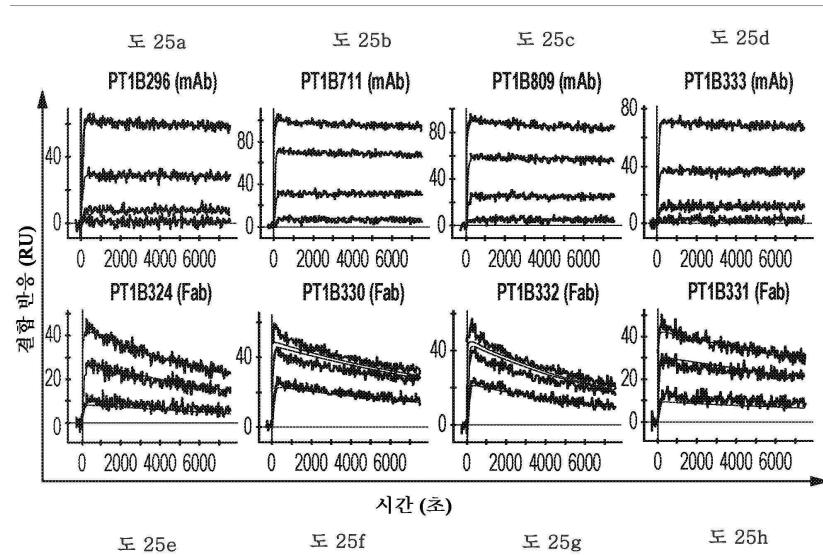
도면23b



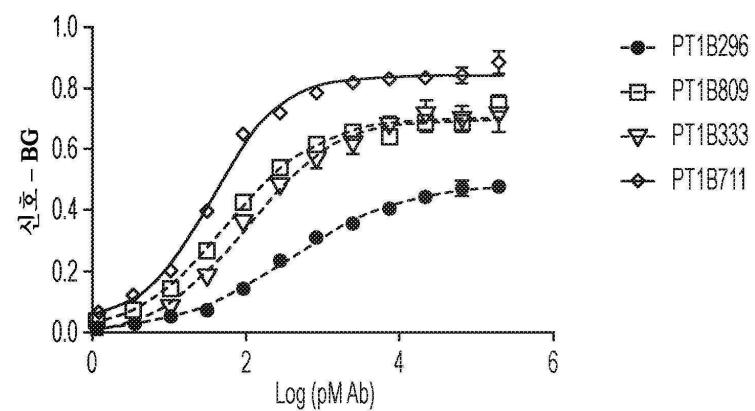
도면24



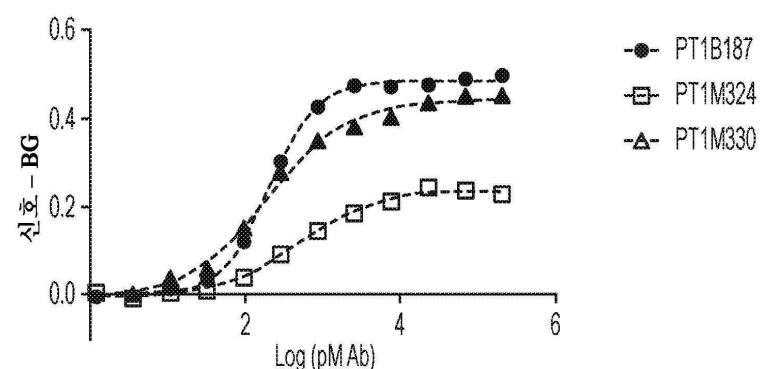
도면25



도면26a



도면26b



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Biotech, Inc.

<120> HUMANIZED ANTI-PHF-TAU ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 688097.0127

<150> 62/472214

<151> 2017-03-16

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

Ser Lys Gly Gly Asn

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 3

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

1 5 10 15

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr

1 5

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Ala Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213

> Mus musculus

<400> 21

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Gln Asp Ile Asn Arg Tyr

1 5

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Arg Ala Asn

1

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asn Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH91 sequence

<400> 26

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

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Lys Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 27
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH92 sequence			
<400> 27			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
50	55	60	

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			

85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH93 sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH94 sequence

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Gln Lys Phe Gln

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<

400> 30

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL77 sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL78 sequence

<400> 32

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL79 sequence

<400> 33

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL80 sequence

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35

gaagtgaagc tgggtgaatc tggcgccgac ctcgtgaagc ctggcggtc tctgaagctg	60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ggcggcagaac	120
cccgagaagc ggctggaatg ggtggccagc atcagcaagg gcccggcaacac ctactacccc	180
aacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaacg cccggaaacat cctgtacctg	240
cagatgagca gcctgcggag cgaggacacc gcccgtact attgtgccag aggctgggc	300

gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc cgct	354
---	-----

<210> 36

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH91 sequence

<400> 36

gaagtgcagc tggcggcgga ctggcggcagc ctggcgatc tctgagactg	60
agctgtgcgg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ggcggcaggcc	120
cctggaaaag gcctggaatg ggtgtccagc atcagcaagg gcccggcaacac ctactacgcc	180
gacagcgtga agggccgggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg	240
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtccaa gggctgggc	300

gactacggat gttcgccata ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct	354
---	-----

<210> 37

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH92 sequence

<400> 37

caggtgcagc tggcggcgga gtggcggcagc ctggcagaag cctgagactg	60
agctgtgcgg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ggcggcaggcc	120
cctggaaaag gcctggaatg ggtggccagc atcagcaagg gcccggcaacac ctactacgcc	180
gacagcgtga agggccgggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg	240
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtccag aggctgggc	300

gactacggat gttcgccata ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct	354
---	-----

<210> 38

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH93 sequence

<400> 38

caggtgcagc tggcggcggtt cggaggaggc ctggcggatc ctggcggcagc cctgagactg	60
agctgtgcgg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctggat cggcggcaggcc	120
cctggcaagg gactggaggat ggtggccagc atcagcaagg gcccggcaacac ctactacgcc	180
gacagcgtga agggcagggtt cacaatcagc agggacaacg ccaagaacag cctgtacctg	240

cagatgact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgctag gggctggggc 300
gattacggct ggttcgccta ctggggccag gtgaccctgg tgaccgttag cagc 354
<210> 39
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> VH94 sequence
<400> 39
caggtgcagc tgggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 600
tcctgcaagg ccagccgctt cacccgtcagc agctacgcca tggactgggt ggcggccaggct 1200
cctggccaga gactggaatg gatgggcagc atcagcaagg gcccggcaacac ctactacagc 1800
cagaaattcc agggcagagt gaccatcacc cgggacaccc tggccagcac cgcctacatg 2400
gaactgagca gcctgcccggag cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag aggctggggc 3000

gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct 354
<210> 40
<211> 321
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 40
gacatcaaga tgacccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 600
atacttttgcaggcaggatca ggacattaaat aggtatccaa actgggttcca gcagaaaccca 1200
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tgcttagatgg ggtcccatca 1800
aggttcagtg gcagtggatc tggcaagat tactcttca ccatcagcag cctggattat 2400
gaagatatgg gaatttatttta ttgtctacag tatgtgatgg ttccgctcac gttcggtgat 3000

gggaccaagc tggagctgaa a 321
<210> 41
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> VL77 sequence
<400> 41
gacatccaga tgacccagag ccccaagcagc ctgtctgcca gcgtggcga cagagtgacc 600

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agataacctga actggttcca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagagcct gatctacaga gccaacagac tgctggacgg cgtgccccc	180
agatttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag	300

ggcaccaagc tggaaatcaa g	321
-------------------------	-----

<210> 42

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL78 sequence

<400> 42

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtggcga cagagtgacc	60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agataacctga actggttcca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagagcct gatctacaga gccaacagac tgctgagcgg cgtgccccc	180
agatttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag	300

ggcaccaagc tggaaatcaa g	321
-------------------------	-----

<210> 43

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL79 sequence

<400> 43

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtggcga cagagtgacc	60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agataacctga actggatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaga gccaacagac tgctggacgg cgtgccccc	180
agatttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag	300

ggcaccaagc tggaaatcaa g	321
-------------------------	-----

<210> 44

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL80 sequence

<400> 44

gacatcgta	tgacccagac	ccccctgagc	agccctgtga	ccctggacac	gcctgccagc	60
atcagctgca	aggccagcca	ggacatcaac	agatacctga	actggctgca	gcagagaccc	120
ggccagcctc	ctaggctgct	gatctacagg	gccaaacagac	tgctggacgg	cgtccccac	180
agattctccg	gcagcggagc	tggcaccgac	ttcaccctga	agatcagcag	ggtggaggcc	240
gaggacgtgg	gcgtgtacta	ctgcctgcag	tacgacgagt	tcccccgtac	cttcggccag	300

ggcaccaagc	tggagatcaa	g	321
------------	------------	---	-----

<210> 45

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain sequence of HFA PT3

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr

100 105 110

Leu 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
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 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
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 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 Glu Tyr		
305	310	315
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 Glu Glu Met 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> 46

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain sequence of HFA PT3

<400> 46

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr

20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 47

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 47

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 48

<211

> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 48

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 49

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 49

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 50

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 50

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 51

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 52

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 52

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 53

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 53

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 54

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 54

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 55

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 56

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 57

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 57

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

1 5 10 15

Pro Pro Thr

<210> 58

<

211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 58

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 59

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 59

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> control tau peptide

<400> 60

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

1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pT212/pS214/pT217-tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 61

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

1 5 10

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pT212/pT217-tau peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> PHOSPHORYLATION

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 62

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

1 5 10

<210> 63

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> control tau (human tau isoform 2N4R 441 aa, N-terminal 6xHis-tag)

<400> 63

Met His His His His His Gly Ser Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu

1 5 10 15

Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260	265	270	
Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn			
275	280	285	
Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp			
290	295	300	
Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys			
305	310	315	320
Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn			
325	330	335	
Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys			
340	345	350	
Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn			
355	360	365	
Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys			
370	375	380	
Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu			
385	390	395	400
Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His			
405	410	415	
Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro			
420	425	430	
Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln			
435	440	445	
Gly Leu			
450			
<210> 64			
<211> 352			
<212>			
> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 64			
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 Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95
 Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110
 Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
 115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
 130 135 140
 Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175
 Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
 195 200 205
 Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
 210 215 220
 Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
 225 230 235 240
 His Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
 245 250 255

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

260	265	270
His Val Pro Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr		
275	280	285
Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val		
290	295	300
Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser		
305	310	315
Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu		
325	330	335
Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu		
340	345	350
<210> 65		
<211> 381		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 65		
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly		
1	5	10
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln 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 Ala Glu Ala Gly Ile Gly		
65	70	75
Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala		
85 90 95		
Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys		
100	105	110
Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala		
115	120	125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140
 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro

 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 180 185 190
 Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu

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

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

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

370	375	380	
<210> 66			
<211> 410			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 66			
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 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 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu

405 410

<210> 67

<211> 383

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

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 Ala Glu Glu Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
 245 250 255
 Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
 260 265 270
 Lys Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
 275 280 285
 Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
 290 295 300

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

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380

<210> 68

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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 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 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> 69

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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 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 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 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> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp Leu Asn

1 5 10

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Thr Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

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

1 5 10 15

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Gly Trp Gly Ile Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 74

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain sequence

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr

100 105 110

Leu 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
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 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
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 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 Glu Tyr		
305	310	315
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 Glu Glu Met 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> 75

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain sequence

<400> 75

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

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp
 20 25 30

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

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

130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210> 76			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> heavy chain sequence			
<400> 76			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Ser Ile Thr Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
50	55	60	
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Arg Gly Trp Gly Ile Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr			
100	105	110	
Leu 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 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 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 Glu Glu Met 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> 77

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain sequence

<400> 77

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp

20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 78

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain sequence

<400> 78

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

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

100	105	110
Leu 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
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 Pro Ser		
225	230	235
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 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 Glu Tyr		
305	310	315
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 Glu Glu Met 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> 79

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain sequence

<400> 79

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
160		
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 80		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400>		
> 80		
Ser Ser Tyr Ala Met Ser		
1	5	
<210> 81		
<211> 16		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 81		
Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly		
1	5	10
15		