



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0084362
(43) 공개일자 2020년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2020-7018712(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년09월14일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2014-7010525
원출원일자(국제) 2012년09월14일
심사청구일자 2017년09월13일
(85) 번역문제출일자 2020년06월29일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/002246
(87) 국제공개번호 WO 2013/041962
국제공개일자 2013년03월28일
(30) 우선권주장
61/536,339 2011년09월19일 미국(US)
61/653,115 2012년05월30일 미국(US)

(71) 출원인
악손 뉴로사이언스 에스이
사이프러스, 6016 라르나카, 오피스 506, 5층, 니
콜레이즈 씨 뷰 시티, 아치. 마카리우 & 칼로그
레온, 4
(72) 발명자
노박, 미찰
슬로바키아 노보스페츠키 27 브라티슬라바 04 811
콘트세코바, 에바
슬로바키아 리치네로바 41 세벡 01 903
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한라특허법인(유한)

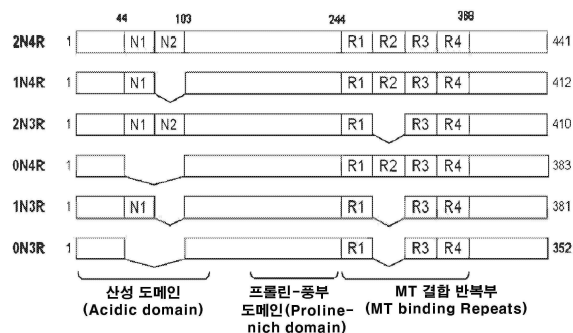
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 알츠하이머병의 타우 매개된 병리학의 단백질 기재 요법 및 진단

(57) 요약

본 발명은 병적인 타우-타우 상호작용의 개시 및 전파에 기여하는 타우 단백질의 영역에 결합하는 독특한 치료 및 진단 항체뿐만 아니라 그의 단편, 부분, 유도체 및 변체, 및 그의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 알츠하이머병 및 관련된 타우병증의 진단, 예방 및 치료를 위해 상기 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 알츠하이머병 및 다른 신경퇴행성 타우병증의 예방학적 및 치료학적 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 환자의 뇌 중의 병적인 타우 단백질 및 타우 침착물에 대한 면역 반응을 유도하는 항체 및/또는 펩타이드 백신의 주사를 수반한다. 적합한 백신은 본 발명에 제공된 타우 치료 에피토프 중 하나 이상을 갖는 타우 펩타이드를 나타낸다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/0007 (2013.01)

A61K 47/6843 (2017.08)

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

C07K 14/4711 (2013.01)

G01N 33/6896 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/55505 (2013.01)

A61K 2039/55566 (2013.01)

(72) 발명자

코바세치, 브라니슬라브

슬로바키아 에스엠퍼 1461 포바즈스카 비스트리카
01 017

질카, 놀베르트

슬로바키아 프리에보즈스카 37 브라티슬라바 05
821

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로,

상기 항체 또는 결합 단편은 HQPGGG (서열번호 223), HVPGGG (서열번호 154), 및 HKPGGG (서열번호 224)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 영역에서 타우의 결합이 가능한, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 타우의 잔기 HVPGGG (서열번호 154)에 결합이 가능한, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 타우의 잔기 HQPGGG (서열번호 223), HVPGGG (서열번호 154), 및 HKPGGG (서열번호 224)에 결합이 가능한, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

a) i. CDR1에 대해서 QSLNSRTRKNY (서열번호 117);

ii. CDR2에 대해서 WAS (서열번호 118); 및

iii. CDR3에 대해서 KQSFYLRT (서열번호 119);

를 포함하는 항체 경쇄 가변 영역; 및

b) iv. CDR1에 대해서 GYIFTDYVIS (서열번호 120);

v. CDR2에 대해서 IFPRSGST (서열번호 121); 및

vi. CDR3에 대해서 ARDYGTSTFAMDY (서열번호 122);

를 포함하는 항체 중쇄 가변 영역

을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 141의 아미노산 서열을 포함하는,

단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 항체는 DC8E8 이고, 상기 DC8E8이 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 특허 기탁 번호 PTA-11994 하에서 기탁된 하 이브리도마에 의해 생산된 항체이거나, 또는

상기 항체 또는 결합 단편이 DC8E8로부터 CDR1, CDR2 및 CDR3 중쇄 및 경쇄를 포함하는,

단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하고,

상기 중쇄 불변 영역은 인간 IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgG4 중 어느 하나이며,

상기 경쇄 불변 영역은 인간 카파 불변 영역 또는 인간 람다 불변 영역인,

단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 IgG1 불변 영역 및 인간 카파 불변 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 중 어느 하나인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- a) 단클론 항체;
- b) 다클론 항체;
- c) 재조합 항체;
- d) 키메라 항체;
- e) 인간화된 항체;
- f) 인간 항체; 및
- g) (a) 내지 (f) 중 어느 하나의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 부분.

청구항 10

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 결합 단편은 하나 이상의 표지제로 검출 가능하게 표지된, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 하나 이상의 표지제가 효소, 방사성동위원소, 형광단, 핵자기 공명 마커, 및 중금속 중에서 선택되는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 12

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 결합 단편은 비-항체 작용제에 결합된, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 비-항체 작용제에 결합된 항체 또는 결합 단편은 항체 약물 접합체(ADC)인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 14

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 항체 또는 결합 단편의 면역글로불린쇄의 결합 도메인 및 가변 영역 중 하나 이상을 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 15

제 14 항의 단리된 핵산을 포함하는 단리된 벡터.

청구항 16

제 14항의 단리된 핵산을 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 17

항체 또는 결합 단편을 생산하기에 충분한 조건하에서 제 16 항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 타우 결합이 가능한, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 결합 단편을 포함하는 약학 조성물.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 더 포함하는, 약학 조성물.

청구항 20

제 18 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 아세틸콜린에스테라제 억제제, NMDA 수용체 길항물질, 전이금속 킬레이터, 성장 인자, 호르몬, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 산화방지제, 지질 강하제, 선택적인 포스포다이에스테라제 억제제, 타우 응집의 억제제, 단백질 키나제의 억제제, 열충격 단백질의 억제제, 항-아밀로이드 수동 및 능동 면역화, 항-아밀로이드 응집 억제제, 또는 세크레타제 억제제를 더 포함하는, 약학 조성물.

청구항 21

제 18 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 알츠하이머병 또는 다른 타우병증의 진단, 예방 또는 치료에 사용되는, 약학 조성물.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 알츠하이머병의 진단, 예방 또는 치료에 사용되는, 약학 조성물.

청구항 23

제 21 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 아세틸콜린에스테라제 억제제, NMDA 수용체 길항물질, 전이금속 킬레이터, 성장 인자, 호르몬, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 산화방지제, 지질 강하제, 선택적인 포스포다이에스테라제 억제제, 타우 응집의 억제제, 단백질 키나제의 억제제, 열충격 단백질의 억제제, 항-아밀로이드 수동 및 능동 면역화, 항-아밀로이드 응집 억제제, 또는 세크레타제 억제제를 더 포함하는, 약학 조성물.

청구항 24

제 21 항에 있어서,

상기 조성물은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복부내, 캡슐내, 연골내, 강내, 복내, 소뇌내, 뇌혈관내, 척추강내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장막공간내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활액내, 흉내, 자궁내, 방광내, 병변내, 일시주사, 질, 직장, 구강, 설하, 비내, 및 경피 중에서 선택된 하나 이상의 방식에 의해 투여되는 것으로 제형화된, 약학 조성물.

청구항 25

제 21 항에 있어서,

상기 조성물은 상기 항체 또는 결합 단편이 환자 체중 kg당 1 mg 이상으로 포함된, 약학 조성물.

청구항 26

제 21 항에 있어서,

상기 조성물은 상기 항체 또는 결합 단편이 환자 체중 kg당 10 mg 이상으로 포함된, 약학 조성물.

청구항 27

제 21 항에 있어서,

상기 항체 또는 결합 단편은 6 개월 이상의 기간 동안 수회의 투여량으로 투여되는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알츠하이머병에서 병적인 타우-타우 응집체의 촉진 및/또는 발생과 관련된 몇몇 형태의 타우의 생성 및 클리어런스를 방해하는 단백질-기재(예를 들어 항체, 펩타이드) 방법 및 수단뿐만 아니라, 알츠하이머병의 진단 및 치료에 유용한 항-타우 항체의 생성 방법을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 병기 결정(staging) 및 치료 진행의 평가 방법을 포함한, 알츠하이머병의 진단을 위한 방법 및 수단에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 출원은 2011년 9월 19일자로 출원된 미국 가 출원 제 61/536,339 호, 및 2012년 5월 30일자로 출원된 제 61/653,115 호의 우선권의 이점을 청구하며, 이들 출원의 내용은 모두 본 발명에 참고로 인용된다.

서열 목록

[0004] 본 출원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출되고 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된 서열 목록을 함유한다. 2012년 9월 13일자로 생성된 상기 ASCII 사본을 SEQUENCE_LISTING.txt라 명명하며 크기는 155,400 바이트이다.

배경

[0006] 알츠하이머병(AD)은 고위 뇌 구조, 예를 들어 기억 및 인식에 관여하는 것들을 파괴하는 진행성 신경퇴행성 질환이다. 상기 질병은 인지 기능의 결손, 및 기억, 학습, 언어, 및 의도적이고 고의적인 움직임을 수행하는 능력의 감퇴를 도출한다. AD는 또한 동반되는 행동, 감정, 개인간 및 사회성 악화를 동반한다. 이러한 인지 및 행동 결손은 생활을 어렵게 만든다(문헌[Burns et al., 2002]). 말기 AD 환자들은 종종 말을 할 수 없고, 언어를 이해할 수 없으며, 자기 자신의 기본적인 신체 수발을 할 수가 없어, 결국에는 전일 보호 및 관리가 필요하고, 종종 가족 구성원 및 요양원에 의존하게 된다. AD는 노인성 치매의 주요 원인이며, 인구중 노령 인구 비율이 증가함에 따라 이환율이 증가하는 것으로 예측된다. AD 환자의 총 수는 단지 2000년에서 2050년 사이에 3배 이상 증가할 것으로 예측되며, 이는 AD를 세계적인 공중보건 문제가 되게 할 것이다(문헌[Sloane et al., 2002]). AD의 임상적인 관리는 주로 협조적인 채로 있다. 즉, 환자들에게 예방, 억제, 또는 AD로부터의 합병증 및 부작용의 경감, 및 그들의 편안함과 삶의 질의 개선을 목적으로 하는 치료가 제공된다. 상기 질병 과정을 직접 표적으로 하고 질병-완화 효과를 갖는 치료에 대한 충족되지 못한 필요성이 여전히 존재한다.

[0007] AD는 조직학적으로 뇌의 신경의 플라크 및 세포내 및 세포외 신경섬유 매듭의 존재를 특징으로 한다. 플라크는 주로 β 아밀로이드($A\beta$)로 구성되는 반면, 매듭은 타우의 병적인 형태, 예를 들어 병적인 타우 형태이성질체 및 이들의 응집체를 포함한다. 플라크 및 매듭과 상기 질병 과정간의 관계는 불명확한 채로 있지만, 연구들은 아밀로이드와 타우 병인간의 연관성을 암시한다(문헌[Hardy et al., 1998]; [Oddo et al., 2004]; [Rapoport et al., 2002]; [Roberson, et al., 2007]; [Shipton et al., 2011]). AD 병리학에서 $A\beta$ 의 중심 역할은 처음에 " $A\beta$ 캐스케이드"라 칭하는 가설로 제안되었으며, 상기 가설에서 $A\beta$ 침착에 이어서 타우 인산화 및 매듭 형성이 발생하고, 이어서 신경이 죽는다(문헌[Hardy and Allsop, 1991]; [Hardy and Selkoe, 2002]; 고찰을 위해서 문헌[Walsh and Selkoe, 2004]을 참조하시오; 또한 문헌[Seabrook et al. 2007]을 참조하시오). 따라서, AD에 대한 초기 치료학적 접근법은 주로 $A\beta$ 의 표적화에 초점을 두었다. 그러나, AD 환자에서 뇌 $A\beta$ 병리의 정도와 상기 질병의 임상적 진행간의 상관성에 대한 기록은 없다(문헌[Braak and Braak, 1991]). 또한, 무증상 개인들은 부검시 광범위한, 종종 확산성의 아밀로이드 침착을 보였으며(문헌[Braak and Braak, 1991]), 적어도 초기 AD에서, 신경 손상 및 아밀로이드 침착이 상기 뇌의 상이한 영역들에서 발생한다(문헌[Carter and Lippa, 2001]). 따라서, $A\beta$ 만을 표적화하는 것은 임의의 또는 모든 환자들에서 상기 질병 과정을 변경시키기에 충분

할 수 없다. 그럼에도 불구하고, AD 환자에서 임상 시험 중인 가장 진보된 질병-표적화 요법은 여전히 A β 의 생성 및 클리어런스를 목적으로 하고 있다. 이들 요법은 수동적인 면역요법, 예를 들어 BAPINEUZUMAB, SOLANEUZUMAB, 및 PONEZUMAB뿐만 아니라 소분자 감마-세크레타제 억제제 SEMAGACESTAT을 포함한다(고찰을 위해서 문헌[Citron et al., 2010]을 참조하십시오).

[0008] AD 병리학에서 타우에 대해 인식된 역할이 다수의 연구들에서 입증되었다. 예를 들어, 브라크(Braak)은 AD 신경 퇴행에 가장 가깝게 상관있는 것은 타우 매듭의 존재이며, 아밀로이드 플라크는 아님을 보였다(문헌[Braak and Braak, 1991]). 또 다른 연구에서, 배양된 신경 중의 A β 신경독성이 타우에 의존하는 것으로 나타났다(문헌[Rapoport et al., 2002]). 최근에, 내생적인 타우의 감소는 높은 A β 수준의 변경 없이 인간 아밀로이드 전구체 단백질을 발현한 트랜스제닉 마우스에서 행동 결손을 예방하였다(문헌[Roberson et al., 2007]). 타우 감소는 또한 트랜스제닉 및 비트랜스제닉 마우스 모두를 흥분세포독성에 대해 보호하였다. 같은 문헌에서, 산타크루즈(Santacruz) 등은 타우량의 감소가 타우병증의 모델에서 기억 기능을 회복함을 입증하였다(문헌[Santacruz et al., 2005]). 따라서, 타우의 감소를 목적으로 하는 요법들은 AD 및 다른 타우-관련된 질병 상태에 유효한 전략을 나타낼 수 있다.

[0009] 타우는 본질적으로 무질서(disordered) 단백질 군에 속하며, 생리적 환경에서 엄격한 3차원 구조의 부재를 특징으로 한다(문헌[Zilka et al., 2008]). 그러나, 타우 절두 및 과인산화는 본질적으로 무질서 상태에서 다수의 용해성 및 불용성 오-무질서(misdisordered) 구조(쌍나선 필라멘트(PHF) 및 다른 응집체 포함)로의 병적인 형질 전환을 유발할 수 있다(문헌[Wischik et al., 1988a]; [Wischik et al., 1988b]; [Novak et al., 1993]; [Skrabana et al., 2006]; [Zilka et al., 2008]; [Kovacech et al., 2010]). 이러한 구조적 변화는 기능의 독성 증가, 고유 단백질의 생리기능의 상실, 또는 이들 모두에 이르게 한다(문헌[Zilka et al., 2008]; [Kovacech et al., 2010]).

[0010] 타우의 생리학적 기능은 튜불린 단량체의, 신경 미세소관 네트워크를 구성하는 미세소관으로의 조립을 증대함에 있다(문헌[Buee et al., 2000]). 타우는 상기 단백질의 C-말단 부분에 위치한 반복적인 영역들을 통해 미세소관에 결합한다. 같은 문헌 내에서, 이들 반복 도메인(R1-R4)은 서로 동일하지 않지만, 고도로 보존된 31-32 아미노산을 포함한다(문헌[Taniguchi et al., 2005b]). 인간 뇌에서, 타우의 6 개의 독특한 동형단백질들이 존재하며, 이들은 타우의 N-말단 부분에서 몇몇 아미노산의 존재 또는 부재 하에서, 상기 단백질의 C-말단 단부에서 3 개(R1, R3 및 R4) 또는 4 개(R1-R4) 반복 도메인들과 함께 서로 상이하다. 또한 6 개의 인간 동형단백질들(2N4R, 1N4R, 2N3R, 0N4R, 1N3R, 및 0N3R)을 도시하는 도 1을 참조하십시오. 미세소관 중합을 유도하기에 가장 효능 있는 타우의 부분은 274-KVQIINKK-281 영역(서열번호 113)이며, 이는 R1-R2와 중복되는 것으로 제안되었다. 같은 문헌 내에서, 또한, 타우의 병리학적 및 생리학적 기능들은 특정한 구조적 일치, 및 완전 길이 단백질 동형들 및 이들의 단편에 의해 채워진 본질적인 무질서 구조에 의해 영향을 받는 것으로 보인다. 예를 들어 콘체코바(Kontsekova) 등은 미세소관 조립체상의 몇몇 절두된 타우 분자의 기능과 중요한 관계가 있는 상기 절두된 타우 분자 내의 형태적 영역(잔기 297-IKHVPGGGSQIVYKPVLSKVTSKCGSL-325 (서열번호 114) 포함)을 개시하였다(WO 2004/007547).

[0011] 타우 반복부는 그의 생리학적 역할 외에, 병적인 타우 응집체 및 다른 구조의 형성에 관여하는 것으로 여겨진다. 따라서, 생리학 및 병적인 반복부-매개된 활성들을 식별할 수 있는 타우-표적 치료 및 진단적 접근법이 필요하다. 예를 들어, 병적인 쌍나선 필라멘트(PHF)의 프로나제 내성 코어는 3- 및 4-반복 타우 동형단백질의 미세소관 결합 영역들로 이루어진다(문헌[Jakes et al., 1991]; [Wischik, et al. 1988a]; [Wischik, et al. 1988b]). 더욱이, 노박(Novak) 등은 93-95 아미노산 길이인 상기 PHF의 프로나제 내성 코어가 3 개의 직렬 반복부(문헌[Novak et al., 1993])로 제한됨을 보였으며, 폰 베르겐(Von Bergen) 등은 최소-타우 펩타이드/상호작용 동기(306-VQIVYK-311; 서열번호 115)뿐만 아니라, 베타-시트를 형성하는 타우상의 두 번째 부위(275-VQIINK-280)(서열번호 116)를 측정하고 병적인 타우 응집체인 PHF의 형성을 개시시키는데 잠재적으로 책임이 있는 것으로서 개시하였다(문헌[Von Bergen et al., 2000]; EP 1214598; WO 2001/18546)). 타우의 작용 지도에 대해서 도 2를 참조하십시오. 결과적으로, 현행 전략들은 미세소관 안정화에서 타우의 세포내 역할을 파괴하지 않는 항-응집성 약물을 생성시키는 것을 목적으로 한다.

[0012] 더욱이, 생리학적 환경 하에서 타우는 세포내 세포질 단백질인 것으로 간주되지만, 세포내 타우는 세포외 공간으로 방출되어 신경퇴행에 원인이 될 수 있다(문헌[Gomez-Ramos et al., 2006]). 실제로, 신경 손실은 AD 뇌에서 신경섬유 매듭(타우 단백질로 구성됨)의 지형적 분포와 관련되었다(문헌[West et al., 1994]; [Gomez-Isla et al., 1996, 1997]). 더욱이, 전체 타우 및 인산화된 타우의 수준은 AD 환자의 뇌척수액(CSF) 중에서 증가하며(문헌[Hampel et al., 2010]), 세포외 타우는 뇌 중의 "유령 매듭"으로서 개시되었고(문헌[Frost and

Diamond, 2009]), 이는 세포내 타우가 세포의 공간으로 방출됨을 가리킨다. 또한, 세포의 타우 응집체는 세포로 들어가 세포내 타우의 피브릴화를 자극하고, 이는 추가로 병적인 타우 응집체의 생성을 위해 타우 단량체를 시딩한다(문헌[Frost et al., 2009]). 상기와 같은 연구들은 세포외, 불용성 타우가 전염체로서 작용하여 프리온-유사 방식으로 상기 뇌 전체를 통해 타우 병리를 확산시킬 수 있음을 강조하였다(문헌[Frost et al., 2009]; [Frost and Diamond, 2009]). 세포의 타우 매듭의 클리어런스는 타우-관련된 세포외 및 세포내 병리를 감소시킬 수 있다. 예를 들어 문헌[Asuni et al., 2007]을 참조하시오. 따라서, 세포의 타우의 형성을 방해하거나, 그의 클리어런스를 촉진하거나, 또는 이들 모두에 의해 상기 세포의 타우를 감소시킬 수 있는 치료뿐만 아니라, 세포내 질병 타우를 감소시키는 치료가 필요하다.

[0013]

대체로, 타우는 AD의 임상적 발현에 병적인 역할을 하는 것으로 보이지만, 타우에 대해 작용하는 약물의 개발은, 부분적으로 생리학적 미세소관 역학에서의 타우의 중요성 및 그의 복잡한 생물학으로 인해 늦어졌다(문헌[Dickey and Petrucelli, 2006]). 그러나, 상기 타우의 병적인 형질전환의 근원인 분자 기전의 증가된 이해는 치료를 목적으로 타우의 병적인 변형을 특이적으로 표적화하는 가능성을 열었다. 그 결과, 상기 타우 캐스케이드를 직접적으로 또는 간접적으로 표적화하는 다수의 치료학적 접근법들(고찰 논문에 대해서, 예를 들어 문헌[Dickey and Petrucelli, 2006]; [Schneider and Mandelkow, 2008]; [Zilka et al., 2008]을 참조하시오), 예를 들어 타우 응집을 방지하거나 역전시키는 화합물(문헌[Wischik et al., 1996]; [Necula et al. 2005]; [Pickhardt et al., 2005]; [Taniguchi et al., 2005a]; [Larbig et al., 2007]), 타우 키나제를 억제하거나 타우 포스파타제를 활성화하는 소분자 유형 약물(문헌[Iqbal and Grundke-Iqbal, 2004]; [Noble et al., 2005]; [Iqbal and Grundke-Iqbal, 2007]), 미세소관 안정화 약물(문헌[Zhang et al., 2005]), 잘못접힌 타우 단백질의 단백질 분해적 분해를 촉진하는 약물(문헌[Dickey et al., 2005], [Dickey et al. 2006]; [Dickey and Petrucelli, 2006]), 및 면역억제성 약물(문헌[Zilka et al., 2008]) 뿐만 아니라, 능동 및 수동 면역화를 포함한 면역요법 전략(문헌[Schneider and Mandelkow et al., 2008]; [Zilka et al., 2008; Tabira, T. Immunization Therapy for Alzheimer disease: A Comprehensive Review of Active Immunization Strategies. Tohoku J. Exp. Med., 220: 95-106 (2010)])이 출현하였다.

[0014]

보다 일반적으로, 신규의 단클론 항체들(mAb)이 2007년 이래로 매년 40 개 이상의 비율로 임상 연구에 진입하였다. 2010년의 끝에서, 25 개 이상의 mAb 및 5 개의 Fc 융합 단백질이 미국에서 2/3기 또는 3기 임상 연구 하에 있었다(문헌[Reichert, 2011]). 이러한 경향은 수동 면역요법이 AD를 포함하여 인간 질환의 치료에 있어서 점점 증가하고 있는 접근법임을 나타낸다. 예를 들어 문헌[Citron et al., 2010]을 참조하시오. 실제로, AD 치료는 혈액-뇌-장벽(BBB) 극복의 장애물에 직면해 있지만, 증가하는 수의 전-임상 및 임상 연구들은 항체-매개된 요법이 뇌로부터 AD 응집체를 정리할 수 있음을 보고하며, 다수의 작용 기전들, 예를 들어 (i) AD에서 변경된 BBB 투과성, 또는 BBB 누출을 통한 상기 뇌로의 항체 흡수; (ii) 용해성 플라크-형성 아밀로이드 종에 대해 "말초 개수대"로서 작용하는 항체; (iii) 항체를 국소로 전달하는, 상기 말초로부터 뇌로의 항체-분비 세포의 입구; 및 (iv) 세포 내부 및 세포를 가로지르는 IgG의 운반을 제안한다. 고찰을 위해 예를 들어 문헌[Citron et al., 2010], 및 [Asuni et al., 2007]을 참조하시오. 따라서, 타우의 질병 형태를 표적화하는 치료 항체는 AD 및 다른 타우병증의 치료 및/또는 진단을 위한 전망있는 접근법을 나타낸다(WO 2004/007547, US2008/0050383).

[0015]

타우 병리를 표적화하는 면역요법 접근법들 중 하나는 항-타우 항체가 타우 응집을 예방하거나, 타우 응집체를 정리하거나, 또는 이들 둘 다를 할 수 있다는 개념을 기본으로 한다. 연구들이 타우 서열에 결합하는 항체를 개시하였고, 들리는 바에 의하면 상기 항체들 중 일부는 타우 응집 및 클리어런스를 방해한다지만(문헌[Asuni et al., 2007]), 들리는 바에 의하면 단클론성 항-타우 항체는 아직도 AD에서 생체내 전-임상 또는 임상 시험을 받고 있지 않다고 한다. 실제로, 하나의 mAb가 쥐 타우 미세소관-결합 도메인 내에 3 개의 결합 부위(즉, R3, R4 및 추정상 R1)를 갖는 것으로 예측되었지만, 상기는 미세소관 결합을 차단하지 않았다(문헌[Dingus et al., 1991]). 딩구스(Dingus)는 타우 응집에 대한 상기 항체의 역할을 개시하지 않았으며, 따라서 상기 딩구스가 타우 응집을 차단할 것이라 여길 이유가 없다. 다른 보고서에서, 타우 동형단백질을 식별하는 mAb가 생성되었지만, 다시 상기가 타우 응집에 대해 임의의 효과를 가질 것이라는 암시는 없다(문헌[DeSilva et al., 2003]; [Ueno et al., 2007]). 타니구치(Taniguchi) 등은 R1 또는 R2에 대한 몇몇 항-타우 mAb가, 타우-유발된 튜불린 조립을 촉진하면서 시험관내에서 PHF로의 타우 응집을 억제함을 입증하였다(문헌[Taniguchi et al., 2005b]). 타니구치의 RTA-1 및 RTA-2 항체는 각각 R1 및 R2에 특이적으로 결합하였다. 어느 항체도 하나보다 많은 타우 반복부에 결합하지 않았고 들리는 바에 의하면 타우 응집 또는 클리어런스에 대한 생체내 효과에 대해서도 시험되지 않았다. AD의 수동 면역-기본 요법(즉 항체들을 환자에게 투여하는 것)에 대한 임상 시험에서 3 개 이상의 항-아밀로이드 항체의 존재에도 불구하고, AD에 대한 수동 타우-기본 면역요법에 대한 임상 시험

보고서를 여전히 입수할 수 없다.

[0016] 능동 면역화 접근법(즉 환자의 몸 자체가 표적에 대한 면역성을 생성시키는 것)이 AD의 여러 APP-트랜스제닉 마우스 연구에서 Aβ 침착물의 정리 및 신경병리학적 병변의 역전에 유효한 것으로 밝혀졌다(예를 들어 문헌 [Schenk et al., 1999]; [Janus et al., 2000]; [Morgan et al., 2000]; [Sigurdsson et al., 2001]을 참조하십시오). 최근에, 인간화된 타우 에피토프(Tau 379-408 [P-Ser 396, 404])에 의한 능동 면역요법이 뇌에서 응집된 타우의 범위를 감소시켰으며, 타우 매듭 병리학의 마우스 모델에서 행동 표현형의 진행을 보였다(문헌[Asuni et al., 2007]; [Boutajangout et al. 2010]; US2008/0050383; US/2010/00316564)). 처리된 동물들은 항-타우 항체를 생성시켰으며, 상기 항체가 뇌에서 검출되었고 병적인 타우를 인식하는 항체와 같은 위치에 있었다(문헌[Asuni et al., 2007]). 상기 면역요법적 접근법은 말기(8 개월)에서보다 상기 동물의 기능 손상의 초기 단계(5 개월)에서 실질적으로 더 유효하였으며, 이는 초기 병적인 타우의 클리어런스가 치료 이점을 가질 수 있음을 암시한다(문헌[Asuni et al., 2007]; [Zilka et al., 2008]). 실제로, 모든 타우가 파괴 및 클리어런스에 민감하거나 또는 추정상 심지어 적합한 것은 아님을 알고 있다. 일부는 타우 응집체의 파괴가 독성 중간체 종의 풍부성을 증가시킬 수 있음을 시사하였지만, 다른 일부는 검출 가능한 타우 응집체가 반드시 독성인 것은 아니며 심지어 보호 역할을 수행할 수 있음을 시사하였다(문헌[Lee et al., 2005]). 따라서, 타우를 표적화하는 면역요법적 접근법들이 전-임상 희망을 보였지만, 타우의 제거가 개선되고 지속적인 이점을 생성시키는 상기 타우의 초기, 이상 형태를 특이적으로 표적화하는 요법들이 여전히 필요하다. 그럼에도 불구하고, 면역요법에 적합한 표적인 타우 종들을 확인할 필요가 또한 여전히 존재한다.

[0017] 이를 위해서, 타우에 대한 mAb를 개발하기 위한 또 다른 고려사항은 타우의 다양한 구조적 형태의 확인 및 특성화(생리학적, 초기 질병, 말기 질병) 및 표적화되는 타우 병리의 단계이다. 오도(Oddo) 등은 Aβ 면역요법이 AD의 트랜스제닉 마우스 모델에서 Aβ 플라크 및 초기 타우 병리를 깨끗이 하였지만, 성숙한 타우 응집체는 여전히 온전한 채로 남아있음이 관찰되었다(문헌[Oddo et al., 2004]). 유사하게, 비록 신경섬유 매듭이 계속해서 축적된다 하더라도, 타우병증의 P301L 타우 모델에서 타우 발현의 유전적(면역요법적이지 아닌) 감소는 기억을 개선시켰다(문헌[Santacruz et al., 2005]).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] AD는 그의 만연에도 불구하고, 여전히 신경병학에서 가장 큰 충족되지 않은 의학적 요구로 남아있다(문헌 [Citron, 2010]). 가장 우세한 의학적 접근법은 대중 요법을 제공하는 것이나, 이는 수년의 치료 후에조차도 효능이 없다. AD에 대한 새로운 치료학적 접근법 및 전략들은 증상의 치료를 넘어서서 인지 감퇴를 예방하고 상기 질병의 근본적인 병리 과정을 없애야 할 필요가 있다. 특히, 단독으로 또는 다른 AD-표적화된 약물과 함께 상기 질병의 가장 초기 단계 중 적어도 일부를 방해하는 분자를 개발할 필요가 있다. 상기과 같은 분자는 AD의 초기 진단(그 자체가 치료 결과를 개선시킬 것이다), 예방 및 치료에 있어서 새롭고, 이로인 선택권을 제공할 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] **발명의 요약**

[0020] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 단리된 항체를 제공하며, 여기에서 상기 항체는 하나 이상의 타우 에피토프에 결합하고 하기 중 2 개 이상이 가능하며:

[0021] a) 생리학적 타우보다는 병적인 타우에 대해 더 높은 친화성을 나타내고;

[0022] b) 타우-타우 응집을 억제하고;

[0023] c) 미세아교세포에 의한 병적인 타우 단백질의 흡수 및 분해를 매개하고;

[0024] 여기에서 각각의 타우 에피토프는 타우의 응집-촉진 영역을 포함한다.

[0025] 하나의 실시태양에서, 상기 단리된 항체는 상기 하나 이상의 에피토프가 각각 독립적으로 하기 내의 에피토프들 중에서 선택되는 것이다:

[0026] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 267-273 또는 잔기 KHQPGGG (서열번호 98);

- [0027] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 298-304 또는 잔기 KHVPGGG (서열번호 99)
- [0028] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 329-335 또는 잔기 HHKPGGG (서열번호 100); 및
- [0029] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 361-367 또는 잔기 THVPGGG (서열번호 101).
- [0030] 몇몇 실시태양에서, 선행 단락의 실시태양들에 개시된 성질들을 갖는 단리된 항체는 인간 알츠하이머병 환자의 뇌 생검, 알츠하이머병의 동물 모델로부터의 뇌 샘플, 또는 이들 모두 중의 오정렬된(misordered) 타우, 오-무질서(misdisordered) 타우, 사르코실-불용성 타우, 신경섬유매듭, 신경망 쓰레드 및 신경염 플라크 중에서 선택된 병적인 타우의 하나 이상의 형태에 결합할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단리된 항체는 상기 항체가 인식하는 에피토프 중 하나 이상이 형태적 에피토프인 것이다.
- [0031] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 단리된 항체를 제공하며, 상기 항체는 하나 이상의 타우 에피토프에 결합하고 하기 중 2 개 이상이 가능하며:
- [0032] a) 생리학적 타우에 대해서보다 병적인 타우에 대해서 더 높은 친화성을 나타낸다;
- [0033] b) 타우-타우 응집을 억제한다; 및
- [0034] c) 미세아교세포에 의한 병적인 타우 단백질의 흡수 및 분해를 매개한다;
- [0035] 여기에서 각각의 타우 에피토프는 타우의 응집-촉진 영역을 포함한다.
- [0036] 하나의 실시태양에서, 상기 단리된 항체는 상기 하나 이상의 에피토프가 각각 독립적으로 하기 내의 에피토프들 중에서 선택되는 것이다:
- [0037] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0038] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0039] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및
- [0040] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154).
- [0041] 하나의 실시태양에서, 상기 단리된 항체는 상기가 결합하는 하나 이상의 에피토프가 각각 독립적으로 하기 내의 에피토프들 중에서 선택되는 것이고:
- [0042] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0043] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0044] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및
- [0045] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154).
- [0046] 상기 항체는
- [0047] a) i. CDR1에 대해서 QSLNSRTRKNY (서열번호 117) 또는 서열번호 247;
- [0048] ii. CDR2에 대해서 WAS (서열번호 118) 또는 서열번호 253; 및
- [0049] iii. CDR3에 대해서 KQSFYLRT (서열번호 119) 또는 서열번호: 255, 257, 258, 259, 및 260 중 어느 하나
- [0050] 를 포함하는 항체 경쇄 가변 영역; 및
- [0051] b) iv. CDR1에 대해서 GYIFTDYVIS (서열번호 120), 서열번호 261, 또는 서열번호 262;
- [0052] v. CDR2에 대해서 IFPRSGST (서열번호 121), 서열번호 264, 또는 서열번호 265; 및
- [0053] vi. CDR3에 대해서 ARDYGTSTFAMDY (서열번호 122), 서열번호 266, 서열번호 267, 또는 서열번호 269
- [0054] 를 포함하는 항체 중쇄 가변 영역
- [0055] 을 포함한다.

- [0056] 본 발명은 또한 형태-특이적인 방식으로 타우상의 하나 이상의 에피토프에 결합하는 단리된 항체를 제공하며, 여기에서
- [0057] a) 상기 하나 이상의 에피토프가 각각 독립적으로 하기 내의 에피토프들 중에서 선택되고:
- [0058] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 267-273 또는 잔기 KHQPGGG (서열번호 98);
- [0059] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 298-304 또는 잔기 KHVPGGG (서열번호 99)
- [0060] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 329-335 또는 잔기 HHKPGGG (서열번호 100); 및
- [0061] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 361-367 또는 잔기 THVPGGG (서열번호 101)
- [0062] b) 상기 에피토프 중 0, 1, 2 또는 3 개가 선형 에피토프(들)이고;
- [0063] c) 상기 에피토프 중 1, 2, 3 또는 4 개가 형태적 에피토프(들)이다.
- [0064] 본 발명은 또한 형태-특이적인 방식으로 타우상의 하나 이상의 에피토프에 결합하는 단리된 항체를 제공하며, 여기에서
- [0065] a) 상기 하나 이상의 에피토프가 각각 독립적으로 하기 내의 에피토프들 중에서 선택되고:
- [0066] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0067] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0068] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및
- [0069] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154)
- [0070] b) 상기 에피토프 중 0, 1, 2 또는 3 개가 선형 에피토프(들)이고;
- [0071] c) 상기 에피토프 중 1, 2, 3 또는 4 개가 형태적 에피토프(들)이다.
- [0072] 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 DC8E8이며, 여기에서 DC8E8은 아메리칸 타입 걸쳐 콜렉션 특허 기탁 번호 PTA-11994 하에서 기탁된 하이브리도마에 의해 생산된 항체이다.
- [0073] 몇몇 실시태양에서, 상기 단리된 항체는 DC8E8에 의해 결합된 것들과 동일한 타우상의 에피토프들 중 하나 이상에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 상기 단리된 항체는 타우에 대한 결합에 대해 단클론 항체 DC8E8과 경쟁한다.
- [0074] 본 발명은 또한 에피토프 결합 도메인 중에 하기 중에서 선택된 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 서열을 포함하는 단리된 항체를 제공한다:
- [0075] i. QSLNSRTRKNY (서열번호 117)
- [0076] ii. WAS (서열번호 118)
- [0077] iii. KQSFYLRT (서열번호 119)
- [0078] iv. GYIFTDYVIS (서열번호 120)
- [0079] v. IFPRSGST (서열번호 121); 및
- [0080] vi. ARDYGTSTFAMDY (서열번호 122).
- [0081] 본 발명은 또한 선행 단락들에 개시된 임의의 실시태양들에 개시된 항체들 중 임의의 항체가
- [0082] a) i. CDR1에 대해서 QSLNSRTRKNY (서열번호 117);
- [0083] ii. CDR2에 대해서 WAS (서열번호 118); 및
- [0084] iii. CDR3에 대해서 KQSFYLRT (서열번호 119)
- [0085] 를 포함하는 항체 경쇄 가변 영역; 및

- [0086] b) iv. CDR1에 대해서 GYIFTDYVIS (서열번호 120)
- [0087] v. CDR2에 대해서 IFPRSGST (서열번호 121); 및
- [0088] vi. CDR3에 대해서 ARDYYGTSFAMDY (서열번호 122)
- [0089] 를 포함하는 항체 중쇄 가변 영역
- [0090] 을 포함하는 것일 수 있음을 제공한다.
- [0091] 본 발명은 또한 선행 실시태양들에 개시된 항체들 중 임의의 항체가
- [0092] a) 단클론 항체 DC8E8로부터의 경쇄 CDR 중 하나 이상의 서열, 또는 상기 경쇄 CDR 중 하나와 최적의 정렬 후에 80%, 90% 또는 95% 이상의 일치성을 갖는 하나 이상의 서열; 및
- [0094] *b) 단클론 항체 DC8E8로부터의 중쇄 CDR 중 하나 이상의 서열, 또는 상기 중쇄 CDR 중 하나와 최적의 정렬 후에 80%, 90% 또는 95% 이상의 일치성을 갖는 하나 이상의 서열
- [0095] 을 포함하는 것일 수 있음을 제공하며; 여기에서
- [0096] i. 상기 경쇄 CDR은 QSLNSRTRKNY (서열번호 117), WAS (서열번호 118), 및 KQSFYLRT (서열번호 119) 중에서 선택된 서열을 포함하고;
- [0097] ii. 상기 중쇄 CDR은 GYIFTDYVIS (서열번호 120), IFPRSGST (서열번호 121), 및 ARDYYGTSFAMDY (서열번호 122) 중에서 선택된 서열을 포함한다.
- [0098] 본 발명은 또한 선행 실시태양들에 개시된 항체들 중 임의의 항체가 Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv 단편, 임의의 다른 항원-결합 단편; 또는 그의 항원-결합 항체 부분으로 이루어지거나 이를 포함할 수 있고; 하기의 면역학적 결합 특성들 중 하나 이상을 가짐을 제공한다:
- [0099] 1. 상기 항체는 형태-특이적 방식으로 하나 이상의 타우 에피토프에 결합하며, 여기에서
- [0100] a) 상기 하나 이상의 에피토프가 각각 독립적으로 하기 내의 에피토프들 중에서 선택되고:
- [0101] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 267-273 또는 잔기 KHQPGGG (서열번호 98);
- [0102] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 298-304 또는 잔기 KHVPGGG (서열번호 99)
- [0103] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 329-335 또는 잔기 HHKPGGG (서열번호 100); 및
- [0104] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 361-367 또는 잔기 THVPGGG (서열번호 101)
- [0105] b) 상기 에피토프 중 0, 1, 2 또는 3 개가 선형 에피토프이고;
- [0106] c) 상기 에피토프 중 1, 2, 3 또는 4 개가 형태적 에피토프이다;
- [0107] 2. 상기 항체는 2 개 이상의 타우 에피토프에 결합하고 생리학적 타우보다 병적인 타우에 대해서 더 높은 친화성을 나타낼 수 있으며, 여기에서 상기 2 개의 타우 에피토프는 하기 내의 에피토프들 중에서 선택된다:
- [0108] v. 타우₄₄₁에 대해, 위치 267-273 또는 잔기 KHQPGGG (서열번호 98);
- [0109] vi. 타우₄₄₁에 대해, 위치 298-304 또는 잔기 KHVPGGG (서열번호 99)
- [0110] vii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 329-335 또는 잔기 HHKPGGG (서열번호 100); 및
- [0111] viii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 361-367 또는 잔기 THVPGGG (서열번호 101).
- [0112] 본 발명은 또한 선행 실시태양들에 개시된 항체들 중 임의의 항체가 Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv 단편, 임의의 다른 항원-결합 단편; 또는 그의 항원-결합 항체 부분으로 이루어지거나 이를 포함할 수 있고; 하기의 면역학적 결합 특성들 중 하나 이상을 가짐을 제공한다:

- [0113] 1. 상기 항체는 형태-특이적 방식으로 하나 이상의 타우 에피토프에 결합하며, 여기에서
- [0114] a) 상기 하나 이상의 에피토프가 각각 독립적으로 하기 내의 에피토프들 중에서 선택되고:
- [0115] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0116] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0117] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및
- [0118] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154)
- [0119] b) 상기 에피토프 중 0, 1, 2 또는 3 개가 선형 에피토프이고;
- [0120] c) 상기 에피토프 중 1, 2, 3 또는 4 개가 형태적 에피토프이다;
- [0121] 2. 상기 항체는 2 개 이상의 타우 에피토프에 결합하고 생리학적 타우보다 병적인 타우에 대해서 더 높은 친화성을 나타낼 수 있으며, 여기에서 상기 2 개의 타우 에피토프는 하기 내의 에피토프들 중에서 선택된다:
- [0122] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0123] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0124] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및
- [0125] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154).
- [0126] 본 발명은 또한 선행 실시태양들에 개시된 단리된 항체들 중 임의의 항체에 대해 타우와 경쟁적으로 결합하는 임의의 단리된 항체에 관한 것이다. 하나의 실시태양에서, 상기 단리된 항체는 타우에 대한 결합에 대해서 단리된 DC8E8에 대해 시험될 때 타우에 경쟁적으로 결합한다.
- [0127] 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 서열번호 141을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 서열번호 138을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 서열번호 141을 포함하는 경쇄 및 서열번호 138을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0128] 본 발명은 본 발명에 의해 제공된 항체가 하기 중에서 선택될 수 있음을 제공한다:
- [0129] a) 단클론 항체;
- [0131] *b) 다클론 항체;
- [0132] c) 재조합 항체;
- [0133] d) 키메라 항체;
- [0134] e) 인간화된 항체;
- [0135] f) 인간 항체; 및
- [0136] g) (a) 내지 (f) 중 어느 하나의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 부분.
- [0137] 본 발명에 의해 제공된 단리된 항체들 중 임의의 항체를 포유동물에서 발생시킬 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 단리된 항체를 재조합 동물에 의해서 또는 재조합 숙주 세포에 의해서 생성시킨다.
- [0138] 본 발명은 본 발명에 제공된 단리된 항-타우 항체들 중 임의의 항체가 하나 이상의 표지제로 검출 가능하게 표지되도록 할 수 있음을 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 하나 이상의 표지제는 효소, 방사성동위원소, 형광단, 핵자기 공명 마커, 및 중금속 중에서 선택된다.
- [0139] 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 상기 항체 분자에 부착된 하나 이상의 약물(복합제)을 포함한다.
- [0140] 본 발명은 또한 선행 실시태양들에 개시된 항-타우 항체들 중 임의의 항체의 면역글로불린 쇄의 하나 이상의 CDR, 또는 결합 도메인 및 가변 영역 중 하나 이상을 암호화하는 단리된 핵산을 제공한다. 또한 상기 핵산들

중 임의의 핵산을 포함하는 단리된 벡터를 제공한다. 일부의 실시태양에서, 본 발명은 이들 단리된 핵산 및 벡터 중 하나 이상을 포함하는 단리된 숙주 세포를 제공한다.

- [0141] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 선행 실시태양들에 개시된 항-타우 항체들 중 임의의 항체를 발현하는 단리된 세포주를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 단리된 세포주는 하이브리도마이다. 하나의 실시태양에서, 상기 단리된 세포주는 단클론 항체 DC8E8을 생산하는 하이브리도마이며, 상기 세포주는 2011년 7월 13일자로 미국 버지니아주 마나사스 소재의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁명 PTA-11994로 기탁되었다.
- [0142] 본 발명은 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 또는 약물로서 본 발명에 제공된 항-타우 항체, 핵산 및 세포 중 어느 하나의 용도를 제공한다.
- [0143] 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 추가로 포함하는 약학 조성물 중에 포함된다. 하나의 실시태양에서, 상기 약학 조성물은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제의 조합을 포함하며, 여기에서 상기 조합은 2 개 이상의 상이한 항체를 포함하고, 상기 항체들은 각각 독립적으로 선행 실시태양들에 개시된 항체들 중에서 선택된다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체들 중 하나 이상은 DC8E8, 또는 DC8E8의 인간 버전, 또는 DC8E8의 인간화된 버전이다.
- [0144] 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 희석제 및/또는 담체를 추가로 포함하는 조성물 중에 포함된다. 상기 조성물은 약학 조성물, 진단 조성물 또는 임의의 다른 조성물일 수 있다. 일부의 실시태양에서, 상기 조성물은 검출 가능한 표지, 키홀 림펫 헤모시아닌, 과산화물 독소 또는 다른 병원성 세균으로부터 유래된 독소, 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 면역글로불린 분자 또는 그의 단편, 타이로글로불린, 오보글로불린, 만능 T-세포 에피토프, 사이토킨, 케모킨, 인터류킨 1-알파(IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-10, 인터페론-감마(IFN- γ), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 대식세포 염증 단백질 1 알파(MIP1 α), MIP1 β , 및 RANTES(활성화 시 조절되고, 정상 T-세포 발현되고 분비된다) 중에서 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 작용제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0145] 본 발명은 또한 포장재 및 본 발명에서 제공된 항-타우 항체들 중 임의의 하나 이상의 동결건조된 형태의 용액을 포함하는 용기를 포함하는, 약학적 또는 진단적 용도를 위한 제조 물품(예를 들어 키트)을 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 용기는 환자에게 상기 항체의 전달을 위한 장치 또는 시스템의 성분이다.
- [0146] 일부의 실시태양에서, 본 발명은 본 발명에 제공된 바와 같은 항-타우 항체(상기 참조)를 포함하는 의료 장치를 제공하며, 여기에서 상기 장치는 상기 항체를 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복부내, 캡슐내, 연골내, 강내, 복내, 소뇌내, 뇌혈관내, 척추강내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장막공간내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활액내, 흉내, 자궁내, 방광내, 병변내, 일시주사, 질, 직장, 구강, 설하, 비내, 및 경피 중에서 선택된 하나 이상의 방식에 의해 접촉하거나 투여하기에 적합하다.
- [0147] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진행을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에서 제공된 항-타우 항체들 중 하나 이상을 투여함을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 상기 방법은 운동 장애를 감소시키거나, 운동 기능을 개선시키거나, 인지 장애를 감소시키거나, 인지 기능을 개선시키거나, 또는 이들의 조합이 가능하다.
- [0148] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 개선시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에서 제공된 항-타우 항체들 중 하나 이상을 투여함을 포함한다.
- [0149] 더욱 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 존재에 대해서, 또는 상기 환자가 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증을 나타낼 위험성을 측정하기 위해서 상기 환자를 진단하거나 선별하는 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0150] a) 상기 환자, 또는 상기 환자의 세포, 조직, 기관, 체액 또는 임의의 다른 샘플을 유효량의 본 발명에서 제공된 바와 같은 하나 이상의 항-타우 항체와 접촉시키고;
- [0151] b) 병적인 타우 및 상기 항체를 포함하는 복합체의 존재를 측정함을 포함하며, 여기에서 상기 복합체의 존재가 병적인 타우의 존재와 관련된 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진단 특징이다.
- [0152] 관련된 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 존재, 진행, 역행 또는 안정화에 대해서, 또는 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 단계를 측정하기 위해서 상기 환자를 모니

터하는 방법을 제공하며, 상기 방법은

- [0153] a) 상기 환자, 또는 상기 환자의 세포, 조직, 기관, 체액 또는 임의의 다른 샘플을 유효량의 본 발명에서 제공된 바와 같은 하나 이상의 항-타우 항체와 접촉시키고;
- [0154] b) 병적인 타우 및 상기 항체를 포함하는 복합체의 존재 및/또는 특징을 측정함을 포함하며, 여기에서 상기 복합체의 존재가 병적인 타우의 존재와 관련된 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진단 특징이다.
- [0155] 일부의 실시태양에서, 상기 항체를 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 비내, 뇌혈관내, 척추강내로, 또는 에어로졸로서 투여한다.
- [0156] 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진행을 치료 또는 예방하는 방법, 및 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 개선시키는 방법의 일부 실시태양에서, 상기 각 항체의 유효량은 용량당, 환자 체중 kg당 1 mg 이상이다. 일부의 실시태양에서, 상기 각 항체의 유효량은 용량당, 환자 체중 kg당 10 mg 이상이다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체들 중 하나 이상을 6 개월 이상의 기간 동안 수회의 투여량으로 투여한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체를 그의 이로운 효과를 발휘하도록 인간 환자에게 말초로 투여한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 인간 환자에게 말초로 투여될 때 용해성 타우, 사르코실-불용성 타우, 또는 이들 모두에 결합한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 인간 환자에게 말초로 투여될 때 타우에 결합하며, 여기에서 타우는 인간 알츠하이머병 환자의 뇌 생검, 알츠하이머병의 동물 모델로부터의 뇌 샘플 중의 오정렬된 타우, 오-무질서 타우, 사르코실-불용성 타우, 신경섬유 매듭, 신경망 쓰레드, 및 신경염 플라크 중에서 선택된 하나 이상의 병적인 형태들로 존재한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 인간 환자에게 말초로 투여될 때, 상기 환자에 대해 하나 이상의 효과기-작용 매개된 이로운 효과를 발휘한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 항체-발현 세포의 상기 환자 뇌 내로의 주사/이식에 의해 말초로 전달된다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체-발현 세포는 하이브리도마 세포이다. 일부의 실시태양에서, 상기 하이브리도마 세포는 DC8E8을 발현하는 하이브리도마이다.
- [0157] 몇몇 관련된 실시태양에서, 본 발명은 단리된 펩타이드를 제공하며, 여기에서
- [0158] a) 상기 단리된 펩타이드는 6 개 아미노산-잔기-길이 이상, 7 개 아미노산-잔기-길이 이상, 9 개 아미노산-잔기-길이 이상, 10 개 아미노산-잔기-길이 이상, 12 개 아미노산-잔기-길이 이상, 또는 30 개 아미노산-잔기-길이인 타우의 단편이고;
- [0159] b) 상기 단리된 펩타이드는 타우 치료 에피토프를 포함한다.
- [0160] 일부의 관련된 실시태양에서, 상기 치료 에피토프는
- [0161] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 267-273 또는 잔기 KHQPGGG (서열번호 98);
- [0162] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 298-304 또는 잔기 KHVPGGG (서열번호 99)
- [0163] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 329-335 또는 잔기 HHKPGGG (서열번호 100); 및
- [0164] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 361-367 또는 잔기 THVPGGG (서열번호 101)
- [0165] 내의 것들 중에서 선택된 치료 에피토프를 포함한다.
- [0166] 몇몇 관련된 실시태양에서, 본 발명은 단리된 펩타이드를 제공하며, 여기에서: a) 상기 단리된 펩타이드는 6 개 아미노산-잔기-길이 이상, 7 개 아미노산-잔기-길이 이상, 9 개 아미노산-잔기-길이 이상, 10 개 아미노산-잔기-길이 이상, 12 개 아미노산-잔기-길이 이상, 또는 30 개 아미노산-잔기-길이인 타우의 단편이고;
- [0167] b) 상기 단리된 펩타이드는 타우 치료 에피토프를 포함한다.
- [0168] 일부의 관련된 실시태양에서, 상기 치료 에피토프는
- [0169] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0170] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0171] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및

- [0172] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154)
- [0173] 내의 것들 중에서 선택된 치료 에피토프를 포함한다.
- [0174] 일부의 관련된 실시태양에서, 상기 치료 에피토프는
- [0175] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0176] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0177] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및
- [0178] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154)
- [0179] 중에서 선택된다.
- [0180] 다른 실시태양에서, 상기 단리된 펩타이드는 서열번호 1-4, 서열번호 9-101, 및 서열번호 108-112, NIKAVPGGGS (서열번호 200), NIKHVPGGGS (서열번호 201), IKHVPGGGS (서열번호 202), KHVPGGGSV (서열번호 203), HVPGGGSVQ (서열번호 204), VPGGGSVQ (서열번호 205), GWSIHSPGGGSC (서열번호 250), SVFQHLPGGGSC (서열번호 251), ANIKHVPGGGS (서열번호 144), DAIKHVPGGGS (서열번호 146), DNAKHVPGGGS (서열번호 149), DNIAHVPGGGS (서열번호 151), DNIAVPGGGS (서열번호 159), DNIAHAPGGGS (서열번호 161), 및 DNIAHVPGGGS (서열번호 171) 중에서 선택된 서열이다.
- [0181] 다른 실시태양에서, 상기 단리된 펩타이드는 서열번호 270 (TENLKHQPGGGK); 서열번호 271 (KHQPGGG), 서열번호 272 (HQPGGG); 서열번호 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIAHVPGGGS), 서열번호 276 (KHVPGGG), 서열번호 277 (HVPGGG), 서열번호 280 (DNIAHVPGGGSVQIVYKPV), 서열번호 281(HHKPGGG), 서열번호 282 (HKPGGG), 및 서열번호 283 (THVPGGG) 중에서 선택된 서열이다.
- [0182] 다른 실시태양에서, 상기 단리된 펩타이드는 서열번호 270 (TENLKHQPGGGK); 서열번호 271 (KHQPGGG), 서열번호 272 (HQPGGG); 서열번호 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIAHVPGGGS), 서열번호 276 (KHVPGGG), 서열번호 277 (HVPGGG), 서열번호 280 (DNIAHVPGGGSVQIVYKPV), 서열번호 281(HHKPGGG), 서열번호 282 (HKPGGG), 및 서열번호 283 (THVPGGG) 중에서 선택된 서열이고; 상기 치료 에피토프는
- [0183] i. 타우₄₄₁에 대해, 위치 268-273 또는 잔기 HQPGGG (서열번호 223);
- [0184] ii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 299-304 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154);
- [0185] iii. 타우₄₄₁에 대해, 위치 330-335 또는 잔기 HKPGGG (서열번호 224); 및
- [0186] iv. 타우₄₄₁에 대해, 위치 362-367 또는 잔기 HVPGGG (서열번호 154)
- [0187] 중에서 선택된다.
- [0188] 다른 실시태양에서, 상기 단리된 펩타이드는 서열번호 272 (HQPGGG) 및 서열번호 277 (HVPGGG) 중에서 선택된 서열이다.
- [0189] 몇몇 실시태양에서, 상기 단리된 펩타이드는 상기 펩타이드의
- [0190] a) 단클론 항체 DC8E8에 대한 결합에 대해 타우와 경쟁하는 능력;
- [0191] b) 생체내에서, 사르코실-불용성 타우의 수준을 감소시키는 능력;
- [0192] c) 생체내에서, 뇌로부터 타우 클리어런스를 촉진하는 능력;
- [0193] d) 생체내에서, AD의 하나 이상의 생화학적 마커의 수준을 감소시키는 능력;
- [0194] e) 생체내에서, 신경섬유매듭(NFT) 부하를 감소시키는 능력;
- [0195] f) 생체내에서, 하나 이상의 신경행동 매개변수를 개선시키는 능력;
- [0196] g) 환자에게서 AD의 과정을 이롭게 변형시키는 능력;

- [0197] h) 뇌, 뇌척수액 또는 이들 모두에서 타우의 수준을 감소시키는 능력; 및/또는
- [0198] i) 타우에 대한 결합에 대해서 단클론 DC8E8과 경쟁할 수 있는 항체의 제조에서 면역원으로서 작용하는 능력
- [0199] 을 측정하는 분석들 중에서 선택된 하나 이상의 분석에서 활성이다.
- [0200] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공된 단리된 펩타이드들 중 임의의 펩타이드 및 하나의 부분을 포함하는 화합물에 관한 것이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 부분은 N-말단, C-말단, 또는 상기 펩타이드의 내부 아미노산에 결합되며, 여기에서 상기 부분은 시스테인 잔기, 포스포 그룹, 키홀 림펫 헤모시아닌, 파상풍 독소 또는 다른 병원성 세균으로부터 유래된 독소, 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 면역글로불린 분자 또는 그의 단편, 타이로글로불린, 오보글로불린, 만능 T-세포 에피토프, 사이토킨, 케모킨, 인터류킨 1-알파(IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-10, 인터페론-감마(IFN- γ), 파립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 대식세포 염증 단백질 1 알파(MIP1 α), MIP1 β , 및 RANTES(활성화 시 조절되고, 정상 T-세포 발현되고 분비된다) 중 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0201] 또한 본 발명에 의해 제공된 상기 단리된 펩타이드 및/또는 화합물 중 하나 이상 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 및/또는 희석제, 및/또는 항원보강제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부의 실시태양에서, 상기 약학 조성물은 1 ng 내지 10 mg의 펩타이드 또는 화합물의 투여량을 제공하기에 적합하다. 몇몇 실시태양에서, 상기 약학 조성물은 10 마이크로그램 초과인 펩타이드 또는 화합물의 투여량을 제공하기에 적합하다.
- [0202] 본 발명은 또한 포장재 및 본 발명에서 제공된 펩타이드 및/또는 화합물의 동결건조된 형태의 용액을 포함하는 용기를 포함하는, 약학적 또는 진단적 용도를 위한 제조 물품(예를 들어 키트)을 제공한다. 일부의 실시태양에서, 상기 용기는 환자에게 상기 펩타이드 또는 상기 화합물의 전달을 위한 장치 또는 시스템의 성분이다.
- [0203] 또한 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 펩타이드, 화합물 및/또는 펩타이드/화합물 조성물을 포함하는 의료 장치를 제공하며, 여기에서 상기 장치는 상기 항체를 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복부내, 캡슐내, 연골내, 강내, 복내, 소뇌내, 뇌혈관내, 척추강내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장막공간내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활액내, 흉내, 자궁내, 방광내, 병변내, 일시주사, 질, 직장, 구강, 설하, 비내, 및 경피 중에서 선택된 하나 이상의 방식에 의해 접촉하거나 투여하기에 적합하다.
- [0204] 관련된 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진행을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 펩타이드 및/또는 하나 이상의 화합물을 투여함을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 상기 방법은 운동 장애를 감소시키거나, 운동 기능을 개선시키거나, 인지 장애를 감소시키거나, 인지 기능을 개선시키거나, 또는 이들의 조합이 가능하다.
- [0205] 관련된 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 개선시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 펩타이드 및/또는 하나 이상의 화합물을 투여함을 포함한다.
- [0206] 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 개선시키는 방법과 관련된 증상들 중 하나 이상의 상기 치료, 예방 또는 개선 방법들 중 일부에서, 상기 방법은 인간 환자에게 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 펩타이드 및/또는 화합물, 및/또는 면역 반응을 증대시키는 항원보강제를 투여함을 포함하며, 상기 방법은 병적인 타우에 대한 항체를 포함하는 면역 반응을 실행하며, 이에 의해 상기 인간 환자에게서 AD와 관련된 증상들 중 하나 이상을 치료하거나, 진행을 예방하거나, 또는 개선시킨다.
- [0207] 본 발명은 또한 타우에 결합하기 위해 DC8E8과 경쟁할 수 있는 항체를 생성시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 환자를 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 펩타이드 및/또는 하나 이상의 화합물로 면역시킴을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 하나 이상의 펩타이드는 서열번호 1-4, 서열번호 9-101, 및 서열번호 108-112, NIKHVPGGGS (서열번호 201), IKHVPGGGS (서열번호 202), KHVPGGGSV (서열번호 203), HVPGGGSVQ (서열번호 204), VPGGGSVQ (서열번호 205), GWSIHSPGGGSC (서열번호 250), SVFQHLPGGGSC (서열번호 251), ANIKHVPGGGS (서열번호 144), DAIKHVPGGGS (서열번호 146), DNAKHVPGGGS (서열번호 149), DNIAHVPGGGS (서열번호 151), DNIAVPGGGS (서열번호 159), DNIAHVPGGGS (서열번호 161), 및 DNIAHVPGGGS (서열번호 171) 중 어느 하나로부터 선택된다. 하나의 실시태양에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1-4 중에서 선택된다. 또 다른 실시태양에서, 상기 펩타이드는 서열번호 108이다. 하나의 실시태양에서, 상기 펩타이드는 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 펩타이드는 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 펩타이드는

서열번호 270 (TENLKHQPGGGK); 서열번호 271 (KHQPGGG), 서열번호 272 (HQPGGG); 서열번호 275 (ENLKHQPGGGKVQIIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPVGGGS), 서열번호 276 (KHVPGGG), 서열번호 277 (HVPGGG), 서열번호 280 (DNKHPVGGGSVQIVYKPV), 서열번호 281(HHKPGGG), 서열번호 282 (HKPGGG), 및 서열번호 283 (THVPGGG) 중에서 선택된다. 다른 실시태양에서, 상기 펩타이드는 서열번호 272 (HQPGGG) 및 서열번호 277 (HVPGGG) 중에서 선택된다.

- [0208] 또한 DC8E8의 단리 방법, 또는 타우에 결합하기 위해서 DC8E8과 경쟁할 수 있는 항체의 단리 방법을 제공하며, 상기 방법은 DC8E8 또는 상기 항체를 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 펩타이드 및/또는 화합물과 접촉시킴을 포함한다.
- [0209] 관련된 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 존재에 대해서, 또는 상기 환자가 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증을 나타낼 위험성을 측정하기 위해서 상기 환자를 진단하거나 선별하는 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0210] a) 상기 환자, 또는 상기 환자의 세포, 조직, 기관, 체액 또는 임의의 다른 샘플을 유효량의 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 항체와 접촉시키고;
- [0211] b) 병적인 타우 및 상기 항체를 포함하는 복합체의 존재를 측정함을 포함하며, 여기에서 상기 복합체의 존재가 병적인 타우의 존재와 관련된 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진단 특징이다.
- [0212] 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 존재, 진행, 역행 또는 안정화에 대해서, 또는 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 단계를 측정하기 위해서 상기 환자를 모니터링하는 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0213] a) 상기 환자, 또는 상기 환자의 세포, 조직, 기관, 체액 또는 임의의 다른 샘플을 유효량의 본 발명의 하나 이상의 실시태양에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 항체와 접촉시키고(예를 들어 투여하고);
- [0214] b) 병적인 타우 및 상기 항체를 포함하는 복합체의 존재 및/또는 특징을 측정함을 포함하며, 여기에서 상기 복합체의 존재가 병적인 타우의 존재와 관련된 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진단 특징이다.
- [0215] 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 존재, 진행, 역행 또는 안정화에 대해서, 또는 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 단계를 측정하기 위해서 상기 환자를 모니터링하는 방법의 일부 실시태양에서, 상기 항체, 펩타이드, 및/또는 화합물을 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 비내, 뇌혈관내, 척추강내로, 또는 에어로졸로서 투여한다. 일부의 실시태양에서, 각각의 펩타이드 및/또는 화합물의 유효량은 용량당 1 μ g 이상, 용량당 10 μ g 이상, 용량당 100 μ g 이상이다. 일부의 실시태양에서, 각각의 펩타이드 및/또는 화합물의 유효량은 항원 보강제의 존재 하에서 용량당 10 μ g 이상, 및 항원보강제의 부재 하에서 용량당 100 μ g 이상이다. 일부의 실시태양에서, 하나 이상의 펩타이드 또는 화합물을 6 개월 이상의 기간 동안 수회의 투여량으로 투여한다.
- [0216] 관련된 실시태양에 따라, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진행을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 항체, 및/또는 하나 이상의 펩타이드, 및/또는 하나 이상의 화합물을, 아세틸콜린에스테라제 억제제, N-메틸-D-아스파테이트(NMDA) 수용체 길항물질, 전이금속 킬레이터, 성장 인자, 호르몬, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 산화방지제, 지질 강하제, 선택적인 포스포다이에스테라제 억제제, 타우 응집의 억제제, 단백질 키나제의 억제제, 열충격 단백질의 억제제, 항-아밀로이드 수동 및 능동 면역화, 항-아밀로이드 응집 억제제, 및 세크레타제 억제제 중에서 선택된 하나 이상의 복합체와 함께 투여함을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 상기 방법은 운동 장애를 감소시키거나, 운동 기능을 개선시키거나, 인지 장애를 감소시키거나, 인지 기능을 개선시키거나, 또는 이들의 조합이 가능하다.
- [0217] 관련된 실시태양에서, 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 개선시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 환자에게 유효량의 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 항체, 하나 이상의 펩타이드, 및/또는 하나 이상의 화합물을, 아세틸콜린에스테라제 억제제, NMDA 수용체 길항물질, 전이금속 킬레이터, 성장 인자, 호르몬, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 산화방지제, 지질 강하제, 선택적인 포스포다이에스테라제 억제제, 타우 응집의 억제제, 단백질 키나제의 억제제, 열충격 단백질의 억제제, 항-아밀로이드 수동 및 능동 면역화 시약, 항-아밀로이드 응집 억제제, 및 세크레타제 억제제 중에서 선택된 하나 이상의 복합체와 함께 투여함을 포함한다.
- [0218] 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 개선시키는 방법과 관련된 증

상들 중 하나 이상의 상기 치료, 예방 또는 개선 방법들 중 일부의 실시태양에서, 상기 방법은 인간 환자에게 유효량의 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 하나 이상의 항체, 하나 이상의 펩타이드 및/또는 화합물, 및/또는 면역 반응을 증대시키는 항원보강제를, 아세틸콜린에스테라제 억제제, NMDA 수용체 길항물질, 전이금속 킬레이터, 성장 인자, 호르몬, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 산화방지제, 지질 강하제, 선택적인 포스포다이에스테라제 억제제, 타우 응집의 억제제, 단백질 키나제의 억제제, 열충격 단백질의 억제제, 항-아밀로이드 수동 및 능동 면역화, 항-아밀로이드 응집 억제제, 및 세크레타제 억제제 중에서 선택된 하나 이상의 복합제와 함께 투여함을 포함하며; 여기에서 상기 방법은 병적인 타우에 대한 항체를 포함하는 면역 반응을 실행하고, 이에 의해 상기 인간 환자에게서 AD와 관련된 증상들 중 하나 이상을 치료하거나, 진행을 예방하거나, 또는 개선시킨다.

[0219] 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 치료, 예방 또는 개선시키는 방법의 일부 실시태양에서, 상기 복합제를 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 항체, 펩타이드, 및/또는 화합물의 투여 전, 상기 투여와 동시에, 또는 상기 투여 후에 투여한다.

[0220] 관련된 실시태양에서, 본 발명은 또한 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제; 및

[0221] a) 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 항체; 및/또는

[0222] b) 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 펩타이드; 및/또는

[0223] c) 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 화합물을,

[0224] 아세틸콜린에스테라제 억제제, NMDA 수용체 길항물질, 전이금속 킬레이터, 성장 인자, 호르몬, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 산화방지제, 지질 강하제, 선택적인 포스포다이에스테라제 억제제, 타우 응집의 억제제, 단백질 키나제의 억제제, 열충격 단백질의 억제제, 항-아밀로이드 수동 및 능동 면역화 시약, 항-아밀로이드 응집 억제제, 및 세크레타제 억제제 중에서 선택된 하나 이상의 복합제와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 DC8E8이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 항체는 DC8E8로부터의 하나 이상의 CDR을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 DC8E8로부터의 하나 이상의 가변 쇄(경 또는 중)를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, DC8E8의 인간화된 또는 인간 버전을 사용할 수 있다. 일부의 실시태양에서, 하나 이상의 펩타이드는 서열번호 1-4, 서열번호 9-101, 및 서열번호 108-112, NIKHVPGGGS (서열번호 201), IKHVPGGGS (서열번호 202), KHVPGGGSV (서열번호 203), HVPGGGSVQ (서열번호 204), VPGGGSVQ (서열번호 205), GWSIHSPGGGSC (서열번호 250), SVFQHLPGGGSC (서열번호 251), ANIKHVPGGGS (서열번호 144), DAIKHVPGGGS (서열번호 146), DNAKHVPGGGS (서열번호 149), DNIAHVPGGGS (서열번호 151), DNIAKAVPGGGGS (서열번호 159), DNIAKHVPGGGS (서열번호 161), 및 DNIAKHVPGGGS (서열번호 171) 중 어느 하나로부터 선택된다. 하나의 실시태양에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1-4 중에서 선택된다. 또 다른 실시태양에서, 상기 펩타이드는 서열번호 108이다. 하나의 실시태양에서, 상기 펩타이드는 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 펩타이드는 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251)이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 펩타이드는 서열번호 270 (TENLKHQPGGGK); 서열번호 271 (KHQPGGG), 서열번호 272 (HQPGGG); 서열번호 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIAKHVPGGGS), 서열번호 276 (KHVPGGG), 서열번호 277 (HVPGGG), 서열번호 280 (DNIAKHVPGGGSVQIVYKPV), 서열번호 281(HHKPGGG), 서열번호 282 (HKPGGG), 및 서열번호 283 (THVPGGG) 중에서 선택된다. 다른 실시태양에서, 상기 펩타이드는 서열번호 272 (HQPGGG) 및 서열번호 277 (HVPGGG) 중에서 선택된다.

[0225] 상기 실시태양들의 추가의 목적 및 이점을 하기의 설명에 부분적으로 나타낼 것이며, 부분적으로 이들은 상기 설명으로부터 명백하거나, 또는 상기 실시태양들의 실시에 의해 알 수 있다. 상기 실시태양들의 목적 및 이점은 첨부된 청구의 범위에서 특별히 지정한 요소 및 조합에 의해 실현되고 획득될 것이다.

[0226] 상기의 일반적인 설명 및 하기의 상세한 설명은 모두 단지 예시적이고 설명적일뿐이며, 청구된 바와 같은 실시태양들의 제한은 아니다.

[0227] 본 명세서의 일부에 포함되고 이를 구성하는 첨부된 도면들은 다수의 실시태양들을 예시하며, 설명과 함께 상기 실시태양들의 원리의 설명을 돕는다. 본 발명에서 논의된 공보들은 오직 본 출원의 출원일 이전의 명세만이 제공된다. 상기 공보는 모두 내용 전체가 모든 목적을 위해 참고로 인용된다. 본 원에서 본 발명이 선행 발명에 의해 상기와 같은 공보에 앞서는 권리를 부여받지 못함을 시인하는 것으로서 해석되는 것은 없다. 더욱이, 제공된 공개일들은 실제 공개일(별도로 확인이 필요할 수 있다)과 상이할 수 있다.

발명의 효과

[0228] 본 발명은 환자에게서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상들 중 하나 이상을 개선시킨다.

도면의 간단한 설명

[0229] 도 1은 인간 타우의 6 개의 동형단백질의 도해이다.

도 2는 인간 타우(2N4R)의 도식적인 작용지도이다. 도 2는 각각 서열번호 116 및 115로서 "VQIINK" 및 "VQIVYK"를 개시한다.

도 3은 DC8E8 가변 영역들의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 및 가장 가까운 마우스 생식계열 서열에 대한 그들의 정렬이다. 상기 도면은 뉴클레오타이드(서열번호 165)(A) 및 아미노산(나타낸 순서로, 각각 서열번호 141(가변 경쇄에 대해) 및 117-119(IMGt에 따라, 그의 CDR 각각에 대해)); (B) DC8E8의 가변 경(VL) 쇠 영역의 서열들(정렬은 나타낸 순서로, 각각 서열번호 166 및 168을 개시한다); 및 (C) 가장 가까운 마우스 생식계열 서열 IGKV8-21^{*}01에 대한 DC8E8의 가변 경쇄 V-유전자의 정렬(정렬은 나타낸 순서로, 각각 서열번호 166 및 167을 개시하고; 이어서 가장 가까운 마우스 J 유전자, IGKJ1^{*}01(서열번호 169)에 대한 DC8E8의 VL J-유전자(서열번호 168)가 정렬된다)를 도시한다. 상기 도면은 (D에서) 뉴클레오타이드(서열번호 170) 및 DC8E8의 가변 중쇄의 아미노산 서열 및 그의 3 개의 CDR(나타낸 순서로, 각각 서열번호 171 및 120-122) 서열을 도시한다. (F)에서, DC8E8에 대한 하기의 정렬들을 도시한다: 첫 번째, 가장 가까운 마우스 생식계열 서열 IGHV1-81^{*}01(서열번호 172)를 갖는 DC8E8의 가변 중(VH) 쇠 V-유전자(서열번호 172); 두 번째, 가장 가까운 마우스 생식계열 서열 IGHV2-14^{*}01(서열번호 175)를 갖는 DC8E8의 가변 중(VH) 쇠 D-유전자(서열번호 174); 마지막으로, 가장 가까운 마우스 생식계열 서열 IGHJ4^{*}01(서열번호 177)을 갖는 DC8E8의 가변 중(VH) 쇠 J-유전자(서열번호 176). DC8E8 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 178)(G)의 서열 및 중쇄 불변 영역(서열번호 179)(H)의 서열을 또한 도시한다. 상보성 결정 영역들(CDR)을 단백질 서열 (B) 및 (E)에서 밑줄을 그었으며, IMGt 넘버링 시스템에 따라 나타내었다.

도 4는 가장 가까운 인간 생식계열 VL 유전자(나타낸 순서로, 각각 서열번호 180-181)에 대한 DC8E8 가변 경(VL) 쇠 서열(서열번호 166)(V-유전자) 및 168(J-유전자) 각각의 정렬이다.

도 5는 가장 가까운 인간 생식계열 VH 유전자(나타낸 순서로, 각각 서열번호 182-183 및 185)에 대한 DC8E8 가변 중(VH) 쇠 서열(V, D 및 J 유전자에 대해서 각각 서열번호 172, 174 및 176)의 정렬이다.

도 6은 ELISA를 사용한 타우 결실 돌연변이체에 의한 DC8E8의 에피토프 지도화이다. (A) DC8E8 에피토프 지도화에 사용된 타우 단백질의 도해, 및 (B) 상기 단백질들의 아미노산 서열(나타낸 순서로, 각각 서열번호 186-197, 102, 104 및 198-199). (C) ELISA 판독. DC8E8은 하기의 타우 단백질들을 인식한다: Δ358-441, Δ421-441, Δ134-168, Δ1-220, Δ1-126, 2N4R, 2N3R, Δ(1-296;392-441) 및 Δ(1-150;392-441)/4R. DC8E8은 하기의 타우 단백질들을 인식하지 못한다: Δ222-427, Δ306-400, Δ228-441, Δ300-312, Δ257-400, Δ137-441, Δ283-441.

도 7에서 (A) 및 (B)는 각각 에피토프 지도화 및 이들의 서열에 대한 합성 펩타이드(각각 나타낸 순서로, 서열번호 206, 207, 208, 2, 210, 211, 212, 3, 214, 215, 4, 217, 26, 219, 36, 221, 222, 109, 및 88)의 도해이다. (C) ELISA에 의한 합성 펩타이드와의 DC8E8의 에피토프 지도화. (D) DC8E8이 타우 내에서 타우에 결합할 수 있는 에피토프들의 도해. DC8E8은 4 개의 별도의 결합 영역들 중 어느 하나에 결합할 수 있으며, 이들은 각각 에피토프 1 내지 4라 명명되는 별도의 에피토프이다. 상기 4 개의 에피토프는 각각 단백질 타우의 첫 번째(에피토프 #1), 두 번째(에피토프 #2), 세 번째(에피토프 #3) 및 네 번째(에피토프 #4) 반복 도메인 내에 별도로 위치한다. 도시된 바와 같이, 상기 4 개의 DC8E8 에피토프는 각각 하기의 아미노산 서열들 각 하나 내에 포함된다: 각각 267-KHQPGGG-273 (서열번호 98) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 298-KHVPGGG-304 (서열번호 99) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (서열번호 100) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인) 및 361-THVPGGG-367 (서열번호 101) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내).

도 8은 (A) 다른 종들로부터의 타우 단백질 서열(나타낸 순서로, 각각 서열번호 226-245)에 대한 인간 타우 아미노산 서열(서열번호 225)의 정렬이다. 인간 타우 단백질의 전체 길이를 상기 정렬에 사용하였으며; 상기 정렬로부터 단지 인간 타우의 아미노산 265-368만을 나타낸다. 인간 타우상의 4 개의 별도의 DC8E8 에피토프를

포함하는 영역 및 정렬된 서열들을 상자 표시하고 굵게 나타낸다. (B) 항체 DC8E8에 결합하기 위해 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ (서열번호 199)과 경쟁하는 6 개의 타우 펩타이드(나타낸 순서로, 각각 서열번호 201-205 및 200)의 능력을 나타내는 경쟁 ELISA, (C) 항체 DC8E8에 결합하기 위해 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 와 경쟁하는 7 개의 타우 펩타이드(서열번호 144, 146, 149, 151, 159, 161 및 171)의 능력을 나타내는 경쟁 ELISA, 이들은 타우-타우 응집에 관련된 타우 에피토프들 중 하나 이상을 인식할 수 있다.

도 9에서, (A) 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 2N4R에 대한 DC8E8의 결합을 특성화하는 표면 플라즈몬 공명 (SPR). (B) 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 및 2N3R에 대한 DC8E8의 결합을 특성화하는 표면 플라즈몬 공명 (SPR).

도 10에서, (A) SPR에 의해 측정된 바와 같은, 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 타우 2N4R에 결합하는 DC8E8의 결합 및 해리 속도. (B) SPR에 의해 측정된 바와 같은, 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 및 타우 2N3R에 결합하는 DC8E8의 결합 및 해리 속도. 상기 측정에 사용된 농도들을 플롯에 나타내고, 파선은 동역학 매개변수 계산을 위해 측정된 데이터로부터 컴퓨터 프로그램 BIA 평가 소프트웨어 4/1(비아코어 AB)에 의해 삽입되었다.

도 11에서 단클론 항체 DC8E8이 전임상 AD, 임상적으로 초기의 AD 및 완전히 발병된 최종 단계의 AD를 식별할 수 있다. DC8E8은 인간 전임상 AD-브락의 I기에서 병적인 타우의 초기 단계(타우 단량체, 이량체)의 염색을 나타낸다. (A). 상기 항체는 병적인 타우 올리고머(화살표)의 단계 및 병적인 타우 중합체(매듭)(화살촉)를 인식한다(B). 완전히 발병된 알츠하이머병에서(최종 단계 - 브락의 VI기), DC8E8은 주로 신경섬유매듭(화살촉), 신경염 플라크(원 내부) 및 신경염 스레드(오각형 내부)의 형태의 병적인 타우 중합체들을 인식한다(C). 스케일 바: 100 μm . 단클론 항체 DC8E8은 알츠하이머병에서 매듭 형성의 모든 발생 단계들을 인식한다(D). DC8E8은 매듭 형성의 초기 발생 단계들 - 단량체성, 이량체성 및 초기 올리고머성 단계(D1), 및 말기 올리고머성, 전-매듭 단계(D2)뿐만 아니라 병적인 타우 중합체 - 세포내(D3) 및 세포외 신경섬유매듭의 발생 단계들(D4)을 인식한다. 화살촉은 피라미드 해마 뉴런(D1) 내부의 작은 올리고머성 타우 응집체를 가리킨다. 스케일 바: 10 μm .

도 12에서 (A) 단클론 항체 DC8E8은 트랜스제닉 래트 SHR72에서 신경섬유 퇴행을 인식한다. DC8E8은 타우 신경 퇴행의 타우 올리고머 단계(화살표) 및 매듭 단계(화살촉)를 인식한다. 더욱이, 상기 항체는 축삭 섬유 중에 위치한 잘못된 접힌 타우와 반응한다(직사각형 내부). (B) 나이-합치된 대조용 래트 뇌에서 상기 항체는 신경내 염색을 나타내지 않는다. 스케일 바: 20 μm . DC8E8은 또한 인간 알츠하이머병에서와 같이 트랜스제닉 래트 뇌 (SHR72)에서 매듭 형성의 모든 발생 단계들을 인식한다. DC8E8은 매듭 형성의 초기 발생 단계 - 단량체, 이량체 및 초기 올리고머 단계 (C) 및 말기 올리고머 매듭 전 단계 (D)뿐만 아니라 병적인 타우 중합체의 말기 발생 단계 - 세포내 (E) 및 세포외 신경섬유매듭(핵 빠져) (F)를 인식한다. (C)에서 화살촉은 상기 뉴런 (A) 내부의 작은 올리고머성 타우 응집체를 가리킨다. 스케일 바: 10 μm .

도 13에서, (A) SHR24 트랜스제닉 래트(타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 을 발현한다)의 피질에서 신경섬유매듭의 DC8E8 염색. (B) DC8E8은 상기 트랜스제닉 래트 SHR72(타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 을 발현한다)의 뇌줄기 중의 신경섬유매듭을 인식하였다. 조직 절편을 메틸그린으로 대조염색하였다. 화살표 - 신경섬유매듭. 스케일 바: 50 μm

도 14에서, 단클론 항체 DC8E8은 트랜스제닉 래트 모델 SHR24(등피질) 및 알츠하이머병 환자(해마, 내비상 및 측두엽 피질을 포함한 이중피질)로부터 단리된 뇌 샘플 중의 용해성(A) 및 불용성 타우 단백질(B) 모두를 인식한다. 화살촉 - 인간 절두된 타우, 화살표 - 래트 내생 타우. 용해성 타우 분획의 경우 라인당 15 μg 의 단백질을 로딩하였다. 불용성 타우 분획의 경우 펠릿을 1S의 1/50 부피로 1x 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 샘플 로딩 완충제에 용해시키고, 같은 부피를 용해성 분획의 경우에서와 같이 로딩하였다. 단클론 항체 DC8E8은 알츠하이머병 환자(해마, 내비상 및 측두엽 피질을 포함한 이중피질)(C) 및 트랜스제닉 래트 모델 SHR72(뇌줄기)(D)로부터 단리된 뇌 샘플 중의 용해성 및 불용성 타우 단백질을 모두를 인식한다. 화살표 - 생리학적인 인간 타우 단백질(A) 및 래트 내생 타우(B), 화살촉 - SHR72 래트(D)의 뉴런에서 트랜스유전자로서 발현된 인간 절두된 타우(타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$). 용해성 타우 분획의 경우 라인당 15 μg 의 총 단백질을 로딩하였다. 불용성 타우 분획의 경우 펠릿을 1S의 1/50 부피로 1x 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 샘플 로딩 완충제에 용해시키고, 같은 부피를 용해성 분획의 경우에서와 같이 로딩하였다.

도 15에서, DC8E8은 형광-기재 타우 피브릴화 분석에서 병적인 타우-타우 상호작용을 억제한다. 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ (도 15A) 또는 타우 $\Delta(1-296;392-441)/4R$ (도 15B)을, 티오플라빈 T 형광에 의해 측정된 바와 같이 형태 변화 및 피브릴화를 겪도록 헤파린에 의해 유도하였으며; mAb DC8E8, Rab50 및 DC11을 병적인 형태 변화를 방지하는 그들의 능력에 대해 시험하였다.

도 16은 HRP-접합된 mAb DC25를 사용하는 면역블롯팅에 의한, 절두된 타우 단백질 타우 Δ(1-296;392-441)/4R에 의한 타우 이량체, 삼량체, 및 올리고머의 형성을 방지하는 DC8E8의 억제 가능성의 분석이다.

도 17은 미세아교세포 BV2 세포에 의한 타우 Δ(1-150;392-441)/4R의 흡수 및 분해이다. 타우 Δ(1-150;392-441)/4R을 단독으로 또는 단클론 항체 DC8E8과 함께(1 μM 타우 Δ(1-150;392-441)/4R + 1 μM DC8E8) 마우스 BV2 세포에 가하였다. 다양한 길이의 시간(2, 4, 6 및 12 시간) 동안 배양 후에, 상기 BV2 세포를 산-세척하고, 세포 단백질을 추출하고 내면화된 타우의 수준을 판-타우 항체 DC25에 의한 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 타우 Δ(1-150;392-441)/4R을 세포 용해물(세포내 타우)(A) 및 세포 배양 배지(세포외 타우)(B) 중에서 면역표지하였다. DC8E8 항체를 항-마우스 HRP-접합된 항체로 가시화하였다. 레인당 20 μg의 단백질을 로딩하였다.

도 18은 ELISA에 의해 시험된 바와 같은, 37 °C에서 DC8E8의 안정성(저장 수명)이다. 상기 항체는 수 개월(1, 2, 3 및 4 개월) 보관 후에 타우 Δ(1-150;392-441)/4R을 인식하였다. 막대는 지시된 바와 같은 일련의 항체의 회석을 나타낸다. 상기 측정을 3 회 중복하여 수행하였다.

도 19에서, DC8E8은 인간 알츠하이머병의 뇌 조직 중의 잘못접힌(병든) 타우를 인식하고 표적화한다. (A) 판-타우 DC25 항체에 의한 웨스턴 블롯 분석:

1) 인간 알츠하이머병의 뇌 조직으로부터의 병적인 타우의 생화학적 추출(문헌[Greenberg and Davies, 1989]);

2) 모의 항체(Rab50)는 타우를 인식하지 않는다;

3) DC8E8은 인간 알츠하이머병의 뇌 조직 중의 잘못접힌(병든) 타우를 인식하고 표적화한다; 및

(B) 폰소 S 염색: 2), 3) 실험에 사용된 항체량의 대조군(Rab50 및 DC8E8).

도 20에서, DC8E8은 AD의 SHR72 래트 모델의 뇌 조직 중의 잘못접힌(병든) 타우를 인식하고 표적화한다. (A) 판-타우 DC25 항체에 의한 웨스턴 블롯 분석:

4) 인간 알츠하이머병의 뇌 조직으로부터의 병적인 타우의 생화학적 추출(문헌[Greenberg and Davies, 1989]);

5) 모의 항체(Rab50)는 타우를 인식하지 않는다;

6) DC8E8은 인간 알츠하이머병의 뇌 조직 중의 잘못접힌(병든) 타우를 인식하고 표적화한다; 및

(B) 폰소 S 염색: 2), 3) 실험에 사용된 항체량의 대조군(Rab50 및 DC8E8).

도 21에서, 생체 내에서 DC8E8은 트랜스제닉 래트(SHR72)의 뇌 중의 타우의 병적인 형태를 표적화하고 병적인 타우를 상기 뇌로부터 말초혈액으로 수송한다. (A) DC8E8 처리된 동물의 혈청 중의 상기 DC8E8 항체의 농도는 각각 466, 200 및 273 μg/ml에 도달하였다. (B) 뇌로부터 말초혈액으로의 상기 DC8E8-타우 복합체의 생체내 수송이 관찰되었다. 병적인 타우는 혈청의 ml당 350 pg의 평균 농도에 도달하였다. DC8E8에 의한 타우의 능동 수송은 병적인 타우 단백질을 뇌로부터 제거한다. 다른 한편으로, 광견병 바이러스를 인식하는 모의 항체(Rab50)(문헌[Macikova et al., 1992])로 처리된 동물의 혈청에서는 타우 단백질이 검출되지 않았다. 상기 처리된 동물의 혈청 중의 타우의 농도를 이노테스트(Innotest) hTAU ELISA(이노제네틱스(Innogenetics), 벨기에 소재)에 의해 측정하였다. 그래프는 평균의 표준 오차(SEM)와 함께 평균을 나타낸다. 래트 A-C에 대한 8 개의 막대는 각각 상이한 연속적인 혈청 회석을 가리킨다(좌에서 우로, 100 배에서부터 12,800 배).

도 22에서, DC8E8 단클론 항체는 트랜스제닉 래트(SHR72)의 뇌로부터 병적인 타우를 제거한다. (A) DC8E8의 뇌 내 적용(좌측 패널)은 모의 처리된 동물(우측 패널)에 비해 뉴런으로부터 병적인 타우를 제거한다(화살표). (B) 모의-처리된 및 DC8E8-처리된 동물의 뉴런 중의 병적인 타우량의 정량 분석은 DC8E8로 처리된 동물에서 병적인 타우량의 근본적인 감소를 나타내었다(p<0.0001).

도 23에서, 세균에서 발현된 단클론 항체 DC8E8의 재조합 scFv 단편(scDC8E8v)은 병적인 오-무질서 타우 Δ(1-150;392-441)/4R을 인식한다. (A) 10% SDS-PAGE에 의해 분리된, 대조용 BL21 세균 및 scDC8E8v 발현 플라스미드를 갖는 세균의 조 용해물의 쿠마씨 블루 염색: 레인 1, 대조용 BL21 세균의 조 용해물; 레인 2, scDC8E8v를 발현하는 BL21 세균의 조 용해물; 및 레인 M, 단백질 분자량 마커(페이지 룰러 프리스테인드 프로테인 래더(Page Ruller Prestained Protein Ladder) #SM0672, 페르멘타스(Fermentas)). (B) 폰소 S는 타우 단백질을 함유하는 나이트로셀룰로스 멤브레인을 염색하였다: 레인 1, 타우 Δ(1-150;392-441)/4R, 500 ng; 레인 2, 타우 Δ(1-150;392-441)/4R, 250 ng; 레인 3, 타우 Δ(1-150;392-441)/4R, 125 ng; 레인 4, 타우 Δ228-441, 50 ng; 및

레인 M, 단백질 분자량 마커. (C) 타우 단백질을 함유하는 웨스턴 블롯/나이트로셀룰로스 멤브레인, B)에서와 같이 로딩되고, scDC8E8v를 발현하는 세균으로부터의 용해물에 의해 검출됨. (D) 타우 단백질을 함유하는 웨스턴 블롯/나이트로셀룰로스 멤브레인, B)에서와 같이 로딩되고, 음성 대조용 세균 용해물에 의해 전개됨.

도 24에서, 단클론 항체 DC8E8의 재조합 scFv 단편(scDC8E8v)은 상기 DC8E8 항체와 유사한 타우 결합 성질을 나타낸다 - 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 를 선택적으로 인식한다. (A) AD 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 결합하는 scDC8E8v의 SPR에 의한 동역학적 친화성 측정. (B) 타우 2N4R에 결합하는 scDC8E8v의 SPR에 의한 동역학적 친화성 측정. (C) scDC8E8v 결합에 대한 속도 상수(k_{ON} 및 k_{OFF}) 및 해리 평형 상수.

도 25는 오-무질서 타우의 scDC8E8v/DC8E8의 인식에 영향을 주는 scDC8E8v 결합 부위 중의 잔기의 확인이다. (A) scDC8E8v 발현 플라스미드(wt) 및 그의 돌연변이 형태를 갖는 BL21 세균의 조 용해물로부터 단백질 분리 후의 폴리아크릴아미드 겔의 쿠마씨 브릴리언트 블루 염색. 각 번호의 레인은 각 클론 번호에 상응한다(예를 들어 레인 2는 2-VL-R33A에 상응한다). 발현된 단일 쇠 단백질을 별표에 의해 나타낸다. 대조용 세균 배양물은 단일 쇠 단백질을 발현하지 않는다. (B) 폰소 S는 타우 단백질을 함유하는 나이트로셀룰로스 멤브레인을 염색 하였다: 레인 1, 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$, 500 ng; 레인 2, 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$, 250 ng; 레인 3, 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$, 125 ng. (C) 타우 단백질을 함유하는 나이트로셀룰로스 멤브레인 상의 웨스턴 블롯, B)에서와 같이 로딩되고, scDC8E8v(wt 겔) 또는 그의 돌연변이 형태들 중 하나를 발현하는 세균으로부터의 용해물에 의해 검출됨(블롯 1-VL-N31A 내지 22-VH-G102A).

도 26에서, (A) 각각 잔기 261 내지 373(서열번호 246) 사이의 확대된 영역: 서열번호 98-101 내의 빗금친 상자 안에 나타난 4 개의 DC8E8 에피토프를 갖는 타우 2N4R(서열번호 102)의 도해. (1) 활성 백신으로서 사용하기 위한, 또는 DC8E8 항체 등을 정제하기 위한, 상기 DC8E8 항체에 의해 인식된 타우의 4 개 영역 중 하나 이상을 포함하는 겹치는 타우-유래된 펩타이드 면역원들의 도해; (2) 선택적인 부분들을 갖는, 다른 변형된 및 디자인된 펩타이드 및 화합물에 대한 일반적인 가능성. (B) 펩타이드 서열번호 1-8 및 108로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72, 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 를 발현한다)의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 면역블롯 분석의 요약. 면역블롯 분석을 다양한 mAb로 수행하여 하기 AD-관련된 에피토프의 불용성 타우의 감소를 측정하였다: mAb DC25 (타우 347-353), mAb DC217 (타우 pThr217), mAb DC209 (타우 pThr 231), mAb AT8 (타우 pSer202/pThr205) 및 mAb AT270 (타우 pThr181). (C) 항원보강제와 결합된 타우 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280 (서열번호 1)로 처리된 래트 및 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 농도측정 면역블롯 분석. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 27은 타우 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280 (서열번호 1)로 처리된 AD를 모델링하는 트랜스제닉 래트(SHR72)의 신경행동 평가이다. 상기 면역원의 다섯 번째 투여 후 10일째에, 상기 트랜스제닉 래트를 행동 시험에 사용하였다. 다이어그램은 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-윌트니 U-시험을 사용하여 획득하였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일(NeuroScale).

도 28에서, 타우 펩타이드 서열번호 1에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 49% 감소를 생성시켰다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 29는 항원보강제와 함께 타우 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285 (서열번호 2)로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 정량적인 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 30은 타우 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285 (서열번호 2)로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72)의 신경행동 평가이다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-윌트니 U-시험을 사용하여 획득하였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일.

도 31에서, 타우 펩타이드 서열번호 2에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 60% 감소를 생성시켰다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 32는 항원보강제와 함께 인산화된 Ser262를 갖는 타우 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285 (서열번호 2)로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 정량적인 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 33에서, 타우 펩타이드 서열번호 2/포스포에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 77% 감소를 생성시켰다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 34는 항원보강제와 함께 타우 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288 (서열번호 3)로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 정량적인 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 35는 타우 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288 (서열번호 3)로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72)의 신경행동 평가이다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일.

도 36에서, 타우 펩타이드 서열번호 3에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 58% 감소를 생성시켰다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 37은 타우 275-VQIINKKLDL SNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (서열번호 4)로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 정량적인 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 38에서 타우 펩타이드 서열 4에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경행동 매개변수에서 보통의 개선을 보였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일. 데이터를 평균의 표준 오차와 함께 상기 평균값으로서 나타낸다.

도 39에서, 타우 펩타이드 서열번호 4에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 66% 감소를 생성시켰다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 40은 항원보강제와 함께 타우 201-GSPGTPGSRSTPSLPTPTT REPKKVAVVR-230/217번 위치에서 인산화된 쓰레오닌을 가짐(서열번호 5)으로 면역된 트랜스제닉 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 정량적인 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 41은 타우 201-GSPGTPGSRSTPSLPTPTT REPKKVAVVR-230/217번 위치에서 인산화된 쓰레오닌을 가짐(서열번호 5)으로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72)의 신경행동 평가이다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일.

도 42에서, 타우 펩타이드 서열번호 5에 의한 트랜스제닉 마우스 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하에 효과를 보이지 않았다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 43은 396번 및 404번 위치에서 인산화된 세린 잔기 및 항원보강제를 갖는 타우 379-RENAKAKTDHGAEIVYKSPVV SGDTSPRHL-408 (서열번호 6)로 면역된 트랜스제닉 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 정량적인 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 44는 Ser396/Ser404에서 인산화된 타우 서열번호 6으로 처리된 트랜스제닉 래트(SHR72)의 신경행동 평가이다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일.

도 45에서, 타우 펩타이드 서열번호 6에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하에 효과를 보이지 않았다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 46은 항원보강제와 함께, 202번 위치에서 인산화된 세린 및 205번 위치에서 쓰레오닌 잔기를 갖는 타우 181-TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGTPGSR-210 (서열번호 7)로 면역된 트랜스제닉 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 정량적인 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 47은 202번 위치에서 인산화된 세린 및 205번 위치에서 쓰레오닌 잔기를 갖는 타우 181-TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGTPGSR-210 (서열번호 7)로 처리된 SHR72 래트의 신경행동 평가이다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄

러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일.

도 48에서, 타우 펩타이드 서열번호 7에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하에 효과를 보이지 않았다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 49는 항원보강제와 함께 타우 300-VPGGGSQIVYKPVDLSK-317 (서열번호 8)로 면역된 래트(SHR72) 또는 항원보강제 단독으로 처리된 대조용 래트의 뇌 줄기로부터 제조된 불용성 타우의 면역블롯 분석이다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 50은 타우 300-VPGGGSQIVYKPVDLSK-317 (서열번호 8)로 처리된 트랜스제닉 AD 래트(SHR72)의 신경행동 평가이다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다. (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일.

도 51에서, 타우 펩타이드 서열번호 8에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 감소를 보이지 않았다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 52에서, 타우 펩타이드 (서열번호 108)에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 불용성의 병적인 타우를 통계학적 유의수준으로 감소시켰다($p < 0.001$). 병적인 불용성 타우를 타우 펩타이드로 면역시킨 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌로부터 추출하고 면역블롯팅에 의해 분석하였다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 53에서 타우 펩타이드(서열번호 108)에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 통계학적 유의수준으로 신경행동 매개변수를 개선시켰다($p < 0.05$). (A) 들보 걷기 시험(3.5 들보). (B) 뒷다리 미끄러짐 회수(3.5 들보). (C) 뉴로스케일. 데이터를 평균의 표준 오차와 함께 상기 평균값으로서 나타낸다.

도 54에서, 타우 펩타이드(서열번호 108)에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 60% 감소를 생성시켰다. 항체 AT8을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 조직 중의 NFT의 평가에 사용하였다.

도 55에서, 펩타이드 타우 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPVPGGG-304 (서열번호 4)에 의한 트랜스제닉 래트(SHR72)의 면역화로부터 생성된 항혈청의 ELISA는 인간 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 인간 생리학적 타우 2N4R에 대한 상기 항혈청의 결합에 있어서 차이를 보인다.

도 56에서, 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 병적인 타우 단백질에 우선적으로 결합하는 항체의 형성을 유도하였다. ELISA에 의해 측정된 기하 평균 항체 역가는 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 백신화에 의해 유도된 항체가 면역원(서열번호 108 펩타이드) 및 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해 최고의 결합 활성을 나타내었음을 보인다. 대조군으로서 사용된 생리학적 타우(타우2N4R)는 보다 약하게 인식되었다.

도 57에서, 타우 펩타이드 서열 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 병적인 타우에 특이적인 IgG 항체 아이소타입의 형성을 우선적으로 유도하였다. 타우 펩타이드 서열번호 108에 의해 유도된 항체의 아이소타입 프로파일을 나타낸다. 개별적인 래트로부터의 혈청들을 1:800으로 희석하고 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대한 결합 활성을 ELISA에 의해 분석하였다.

도 58은 인간 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 인간 타우 2N4R에의 결합에 대한, 펩타이드 타우 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPVPGGG-304 (서열번호 4)에 의한 SHR72 래트의 면역화로부터 생성된 항혈청의 SPR 친화성 측정이다.

도 59는 타우 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPVPGGG-304 (서열번호 4)에 의한 트랜스제닉 래트(SHR72)의 면역화로부터 생성된 래트 항체에 의한 인간 AD 환자로부터의 뇌의 면역조직화학적 염색이다. (A) 상기 항혈청은 알츠하이머병 뇌, 해마 중의 신경섬유 병변을 인식하였다. (B) 보다 높은 배율은 신경섬유매듭을 나타내었다. 스케일 바: 100 μm (A), 10 μm (B).

도 60에서 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 인간 알츠하이머병 뇌 조직으로부터의 절편 중의 병적인 타우 단백질을 인식하는 항체를 유도하였다. 래트 혈청 3(A), 5(B), 6(C), 7(D) 및 8(E)의 전형적인 면역염색은 모든 시험된 래트 혈청 항체가 알츠하이머병 환자의 내비상피질의 전- α 층 중의 신경섬유매듭을 인식하였음을 보인다. 단지 항원보강제로만 면역된 래트로부터 모은 혈청을 음성 대조군(F)으로서 사용하였다. 상기 내비상피질로부터의 일련의 뇌 조직 절편들을 사용하였다. 스케일 바: 50 μm .

도 61에서, 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 인간 알츠하이머병 뇌뿐만

아니라 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 중의 병적인 타우 단백질을 인식하는 특이 항체들을 유도하였다. 병적인 타우를 인간 및 래트 뇌 조직으로부터 추출하고 펩타이드 서열번호 108 면역된 트랜스제닉 래트 SHR72로부터 모은 혈청에 의한 면역블롯에 의해 분석하였다. 상기 혈청 항체들은 AD 특징 A68 병적인 타우를 포함하여 단량체성(레인 1, 2 및 3 번) 및 올리고머성(레인 2 및 3 번)의 병적인 타우를 인식하였다.

도 62에서, 타우 펩타이드 서열번호 109에 의한 마우스의 면역화는 생리학적 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해 통계학적 유의수준으로 더 높은 결합 활성을 갖는 항체를 유도하였다($p = 0.0115$). 그래프는 1:800으로 희석된 개별적인 혈청에 대한 ELISA 결과의 통계학적 평가를 나타낸다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 63에서, 타우 펩타이드 서열번호 110에 의한 마우스의 면역화는 생리학적 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해 통계학적 유의수준으로 더 높은 결합 활성을 갖는 항체를 유도하였다($p = 0.0029$). 그래프는 1:800으로 희석된 개별적인 혈청에 대한 ELISA 결과의 통계학적 평가를 나타낸다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 64에서, 타우 펩타이드 서열번호 111에 의한 마우스의 면역화는 생리학적 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해 통계학적 유의수준으로 더 높은 결합 활성을 갖는 항체를 유도하였다($p = 0.0007$). 그래프는 1:800으로 희석된 개별적인 혈청에 대한 ELISA 결과의 통계학적 평가를 나타낸다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 65에서, 타우 펩타이드 서열번호 112에 의한 마우스의 면역화는 생리학적 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해 통계학적 유의수준으로 더 높은 결합 활성을 갖는 항체를 유도하였다($p < 0.001$). 그래프는 1:800으로 희석된 개별적인 혈청에 대한 ELISA 결과의 통계학적 평가를 나타낸다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 66에서, 디자이너 치료 에피토프 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250) 및 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251)는 항체 DC8E8에 결합하기 위해서 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 경쟁하였다.

도 67에서, 디자이너 치료 에피토프 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250) 및 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251)는, ELISA에 의해 분석된 바와 같이, 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 생리학적 타우 2N4R 사이를 통계학적 유의수준으로 식별하는 항체의 생산을 유도하였다. 상기 펩타이드 250 및 251 중 하나로 면역된 마우스로부터의 혈청(1:3200 희석)을 ELISA에 의해 타우 단백질: 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 생리학적 타우 2N4R에 특이적인 항체에 대해 시험하였다.

도 68에서, 디자이너 치료 에피토프 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250) 및 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251)에 의한 면역화는 IgG1-아이소타입 항체의 가장 확고한 생산을 유도하였다.

도 69에서, 정량적인 SPR(표면 플라즈몬 공명) 측정은 디자이너 치료 에피토프 1(GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250) (도 69A) 및 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)(도 69B)가 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 생리학적 2N4R 타우를 통계학적 유의수준(각각 $p < 0.001$ 및 $p < 0.01$)으로 식별했음을 보인다.

도 70은 디자이너 치료 에피토프 1(GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250) 및 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 대해 생성된 혈청에 의한 인간 AD 병든 뇌 조직의 면역조직화학 염색이다. (A) 디자이너 치료 에피토프 1에 대한 항혈청은 AD 환자의 뇌에서 신경섬유 병리학을 인식하였다. (C) 고 배율의 신경섬유매듭 및 신경망 쓰레드(화살표). (B) 디자이너 치료 에피토프 2에 대한 항혈청은 AD 환자의 뇌에서 신경섬유 병리를 인식하였다. (D) 고 배율의 염색된 신경섬유매듭 및 신경망 쓰레드(화살표). 디자이너 치료 에피토프 1 및 디자이너 치료 에피토프 2에 대한 항혈청들은 대조용 인간 뇌 중에서 정상적인 타우를 인식하지 못했다(E,F). 스케일 바: 50 μm (A,B,E,F), 20 μm (C,D). (G) 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 대해 생성된 혈청은 트랜스제닉 래트 SHR72에서 신경섬유 병변을 인식한다. (H) 나이-합치된 대조용 래트 뇌에서 상기 항체는 신경내 염색을 나타내지 않는다. 상기 혈청은 올리고머성 전 매듭 단계(I)뿐만 아니라 세포내(J)를 인식한다. 스케일 바: 20 μm (A,B), 10 μm (C,D).

도 71에서, 디자이너 치료 에피토프 1(GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250) 및 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 의해 유도된 항체는 인간 알츠하이머병 뇌 조직으로부터 단리된 용해성 및 사르코실-불용성의 병적인 타우를 인식하였다.

도 72에서, 디자이너 치료 에피토프 1(GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250) 및 디자이너 치료 에피토프

2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 의해 유도된 항체는 상기 알츠하이머병 래트 모델(SHR72)로부터 단리된 용해성(레인 1, 3, 5) 및 불용성(레인 2, 4, 6)의 병적인 타우를 인식하였다.

도 73에서, 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 의한 면역요법은 처리된 SHR72 래트의 신경행동 매개변수(뉴로스케일)의 현저한 개선을 보였다. (A) 들보 걷기 시험. (B) 뒷다리 미끄러짐 회수($p < 0.05$). (C) 뉴로스케일. 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)로 처리된 래트는 a) 상기 들보 걷기 시험에서 27%까지의 감소된 이탈 지연(escape latency), b) 44%까지의 감소된 뒷다리 미끄러짐 회수($p < 0.05$), 및 c) 항원보강제만을 수용한 트랜스제닉 대조용 래트보다 26%까지 감소된 뉴로스케일 점수를 보였다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다.

도 74에서, 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 의한 면역요법은 면역된 알츠하이머 트랜스제닉 SHR72 래트의 뇌에서 병적인 타우의 통계학적 유의수준의 감소를 보였다. 면역요법은 항원보강제만을 수용한 대조용 트랜스제닉 래트에 비해 면역된 동물에서 병적인 불용성 타우량을 통계학적 유의수준으로($p < 0.05$) 감소시켰다. 상기 병적인 불용성 타우의 감소는 모든 분석된 타우 에피토프에서 관찰되었다($P < 0.05$).

도 75는 (A) DC8E8의 최소 에피토프(치료 핵심 단위)의 추가의 평가 및 면역원 효능 측정에 사용된 합성 펩타이드의 도해 및 (B) 상기 펩타이드의 아미노산 서열이다.

도 76은 경쟁적인 ELISA에 의한 합성 펩타이드를 사용하는 DC8E8 최소 에피토프(치료 핵심 단위)의 측정이다. 상기 DC8E8 인식 서열의 6 개 이상의 아미노산을 함유하는 10 개의 타우 펩타이드(서열번호: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281, 282 및 283)는 항체 DC8E8에 결합하기 위해서 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 경쟁할 수 있다. 상기 DC8E8 인식 서열(서열번호: 273, 274, 278 및 279)의 단지 5 개 아미노산만을 함유하는 타우 펩타이드는 항체 DC8E8에 대한 결합을 위해 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ (서열번호 199)과 경쟁하지 않는다.

도 77은 타우 펩타이드에 의한 C57BL 마우스의 면역화 후의 타우 특이 항체의 유도이다. (A) 12-머, 7-머 및 6-머 펩타이드(각각 서열번호 270, 271 및 272)는 면역원성이다. 상기 면역화에 의해 유도된 항체들은 생리적인 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해서 통계학적 유의수준으로 더 높은 결합 활성을 나타낸다(각각 $p < 0.0079$; $p < 0.0052$; $p < 0.0079$). 5-머 펩타이드 서열번호 273 및 274는 면역원성이 아니다. (B) 42-머, 19-머, 7-머 및 6-머 펩타이드(각각 서열번호 275, 280, 276 및 277)는 면역원성이다. 상기 면역화에 의해 유도된 항체들은 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 생리학적 타우 2N4R을 통계학적 유의수준으로 식별하였다(각각 $p < 0.0079$, $p < 0.0159$, $p < 0.0079$ 및 $p < 0.0379$). 5-머 펩타이드 서열번호 278 및 279는 면역원성이 아니다. (C) 7-머 펩타이드(서열번호 281 및 283)는 면역원성이다. 이들 펩타이드에 대한 항혈청은 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 생리학적 타우 2N4R을 통계학적 유의수준으로 식별하였다(각각 $p < 0.0379$ 및 $p < 0.0286$). 6-머 펩타이드 서열번호 282에 의해 유도된 병적인 타우 및 생리학적 타우에 대한 항체의 수준은 매우 낮았다. 그래프는 1:800으로 희석된 개별적인 혈청에 대한 ELISA 결과의 통계학적 평가를 나타낸다. 평균값을 상기 평균의 표준 오차와 함께 나타낸다.

도 78은 타우 펩타이드에 의한 C57BL의 면역화 후의 타우 특이 항체의 기하평균 항체 역가이다. 타우 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 의한 C57BL 마우스의 백신화는 타우 특이 항체의 형성을 유도하였다. ELISA에 의해 측정된 기하평균 항체 역가는 타우 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 의한 백신화에 의해 유도된 항체가 생리학적 타우(타우2N4R)에 대해서보다 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해서 더 높은 결합 활성을 나타내었음을 보인다. 타우 특이 항체의 보다 낮은 역가가 타우 펩타이드 서열번호 273, 274, 278, 279 및 282에 의한 마우스의 면역화 후에 검출되었다.

도 79A 및 79B에서, 타우 펩타이드에 의해 유도된 항체들의 아이소타입 프로파일을 도시한다. 최소 DC8E8 에피토프를 갖는 타우 펩타이드에 의한 C57/BL 마우스의 면역화는 병적인 타우에 특이적인 IgG1 및 IgG2b 항체 아이소타입의 형성을 우선적으로 유도하였다. 개별적인 마우스로부터 모은 혈청을 1:800으로 희석하였으며 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대한 결합 활성을 ELISA에 의해 분석하였다.

도 80은 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 2N4R에 대한, 타우 펩타이드로 면역된 마우스 C75BL에서 유도된 항체의 결합 능력의 정량적인 평가이다. 표면 플라스몬 공명(SPR) 측정은 타우 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 대한 항체가 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 생리학적 타우 2N4R을 통계학적 유의수준으로 식별함을 보였다(**... $p < 0.001$ 및 *... $p < 0.01$). KA - 해리 평형 결합 상수.

도 81에서, 타우 펩타이드로 면역된 마우스에서 유도된 항체는 웨스턴 블롯팅에서 타우의 병적인 형태들을 인식한다. 타우 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 의한 C57BL 마우스의 백신

화는, 인간 알츠하이머병 뇌 조직뿐만 아니라 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 줄기로부터 단리된 병적인 타우 단백질을 인식하는 특이 항체들을 유도하였다. 펩타이드 서열번호 273, 274, 278, 279 및 282에 의한 마우스의 면역화 후의 항혈청은 병적인 타우 형태를 인식하지 못했다.

도 82A-C는 인간 AD 뇌 조직에서 타우 펩타이드-유도된 항체에 의해 인식된 신경섬유매듭이다. 타우 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 의한 C57BL 마우스의 백신화는 알츠하이머병 뇌의 해마에서 신경섬유병변을 인식하는 항체를 유도하였다. 항원보강제만으로 면역된 마우스로부터의 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였다. 해마 CA1으로부터의 뇌 조직 절편을 사용하였다. 스케일 바: 100 μ m.

도 83은 타우 펩타이드 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 및 283에 의한 C57BL 마우스의 면역화로부터 생성된 혈청 항체에 의한 인간 AD 환자로부터의 뇌 조직의 면역조직화학 염색(및 각각의 상대적인 강도)의 요약이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0230] "항체"란 용어는 유전자 조작이든, 천연이든, 또는 전적으로 또는 부분적으로 합성적으로 또는 재조합적으로 생성되었는지 간에 면역글로불린을 지칭한다. 항원-결합 성질 및 본 발명에 따른 타우-관련된 특징적인 성질들 중 하나 이상을 유지하는 모든 유도체, 부분 및 그의 단편들이 또한 상기 용어에 포함된다. 상기 용어는 또한 면역글로불린 결합 도메인에 상동성이거나 대체로 상동적인 결합 도메인을 갖는 임의의 단백질을 포함한다. 이들 단백질은 천연 공급원으로부터 유래되거나, 또는 부분적으로 또는 전적으로 합성적으로 또는 재조합적으로 생성될 수 있다. 항체는 단클론성 또는 다클론성일 수 있다. 상기 항체는 인간 부류: IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 중 어느 하나를 포함한, 임의의 면역글로불린 부류의 일원일 수 있다. 상기 IgG 부류의 유도체들이 본 발명의 일부 실시태양들에 바람직하다.

[0231] "단리된 항체" 및 "단리된 펩타이드"란 용어는 cDNA-, 재조합 RNA-, 또는 임의의 다른 합성-기원, 또는 이들의 일부 조합으로부터 생성되는 단백질 또는 펩타이드; 및 기원에 의해 또는 유래의 원인에 의해, (1) 천연에서 발견되는 단백질과 관련되지 않거나, (2) 동일한 공급원으로부터의 다른 단백질이 없거나, 예를 들어 쥐 단백질이 없거나, (3) 상이한 종들로부터의 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 자연에 존재하지 않는 단백질 및 펩타이드를 지칭한다.

[0232] 본 발명에 따른 항체는 또한, 본 발명에 따른 항체의 상기 언급된 특징들에 영향을 미치지 않거나 상기 특징들을 변경시키지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 변형, "보존적인 서열 변형"을 갖는 상기와 같은 항체를 포함한다. 변형은 당해 분야에 공지된 표준 기법, 예를 들어 위치-지정 돌연변이 및 PCR-매개된 돌연변이에 의해 도입될 수 있다. 보존적인 아미노산 치환은 상기 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 것들을 포함한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 그룹들은 당해 분야에 정의되어 있다. 이들 그룹은 염기성 측쇄(예를 들어 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들어 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예를 들어 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지된 측쇄(예를 들어 트레오닌, 발린, 아이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산들을 포함한다. 따라서, 항-타우 항체 중의 예측되는 불필수 아미노산 잔기를 예를 들어 동일한 측쇄 그룹으로부터의 또 다른 아미노산 잔기로 치환시킬 수 있다.

[0233] "항체 단편" 및 "항체 부분"은 완전 길이 항체의 일부, 일반적으로 적어도 항원 결합 부분/도메인 또는 그의 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 다이아바디, 단일-쇄 항체 분자, 면역독소, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다. 또한, 항체 단편은 VH 쇄 결합 병적인 타우의 특징을 갖는, 즉 병적인 타우에 결합하는 VL 쇄와 함께 조립할 수 있는 또는 상기 VL 쇄를 갖는, 즉 VH 쇄와 함께 조립되어 작용성 항원 결합 포켓을 형성할 수 있고 이에 의해 병적인 타우에 결합되는 성질을 제공할 수 있는 단일 쇄 폴리펩타이드를 포함한다. 상기 용어는 또한 그 자체가 효과기 작용을 제공할 수 없지만(예를 들어 ADCC/CDC), 적합한 항체 불변 도메인(들)과 결합 후에 상기 작용을 제공할 수 있는 단편을 포함한다.

[0234] "키메라 항체"란 용어는, 대개 재조합 DNA 기법에 의해 제조되는, 하나의 공급원 또는 종들로부터의 가변 영역, 즉 결합 영역, 및 상이한 공급원 또는 종들로부터 유래된 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 단클론 항체를 지칭한다. 쥐 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체가 특히 바람직하다. 상기와 같은 쥐/인간 키메라 항체는 쥐 면역글로불린 가변 영역을 암호화하는 DNA 구획 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 DNA 구획을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 산물이다. 본 발명에 의해 포함되는 "키메라 항체"의

다른 형태는 상기 부류 또는 하위부류가 기원 항체의 형태로부터 변형되었거나 또는 변화된 것들이다. 상기과 같은 "키메릭" 항체를 또한 "부류-전환된 항체"라 칭한다. 키메릭 항체의 생성 방법은 현재 당해 분야에 공지된 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기법들을 포함한다. 예를 들어 문헌[Morrison, S. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855]; 미국 특허 제 5,202,238 호 및 5,204,244 호를 참조하시오.

[0235] "인간화된 항체"란 용어는 프레임워크 영역(FR) 및/또는 상보성 결정 영역(CDR)이 모 면역글로불린의 경우에 비해 상이한 특이성을 갖는 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 쥐 CDR을 인간 항체의 프레임워크 영역에 이식하여 "인간화된 항체"를 제조한다. 예를 들어 문헌[Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327]; 및 [Neuberger, M. S., et al., Nature 314 (1985) 268-270]을 참조하시오. 특히 바람직한 CDR은 본 발명에서 타우상의 "치료 에피토프"로서 개시된 에피토프 및 항원을 인식하는 서열들을 나타내는 것들에 상응한다.

[0236] 본 발명에 사용된 바와 같은 "인간 항체"란 용어는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하고자 한다. 상기 항체의 불변 영역은 예를 들어 인간 IgG1 유형의 불변 영역일 수 있다. 상기과 같은 영역은 알로타입일 수 있으며 예를 들어 문헌[Johnson, G., and Wu, T. T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218] 및 상기 문헌 중에 참조된 데이터베이스에 의해 개시되며, 본 발명에 따른 ADCC 및 예를 들어 CDC의 유도의 성질이 유지되는 한, 일부의 실시태양들에 우선적으로 유용하다.

[0237] 본 발명에 사용된 바와 같은 "재조합 인간 항체"란 용어는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 단리되는 모든 인간 항체, 예를 들어 NSO 또는 CHO 세포와 같은 숙주 세포, 또는 인간 면역글로불린 유전자에 트랜스제닉인 동물(예를 들어 마우스, 예를 들어 인간 항체의 아미노산 서열, 예를 들어 인간 프레임워크(FR) 및 인간 불변 영역 아미노산 서열을 갖는 항체를 생산하는 유전자 변형된 마우스, XENOMOUSE)로부터 단리된 항체, 또는 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체를 포함하고자 한다. 상기과 같은 재조합 인간 항체는 재배열된 형태로, 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 본 발명에 따른 재조합 인간 항체에는 생체내 체세포 초돌연변이가 가해졌다. 따라서, 상기 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이와 관련되지만 생체내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 천연으로 존재할 수 없는 서열이다.

[0238] "효과기 작용"이란 용어는 비제한적으로 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC); 식작용; 및 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절을 포함한다.

[0239] "에피토프"란 용어는 본 발명에서 결합 단백질 또는 항체에 의해 인식되는 결합 부위를 지칭하는데 사용된다. 에피토프는 임의의 분자 또는 그의 집단, 예를 들어 비제한적으로 아미노산, 아미노산 측쇄, 당 및 지질일 수 있으며, 특이적인 3-차원 구조 또는 형태를 가질 수 있다. 따라서, 에피토프는 1차, 2차, 3차 또는 4차 구조를 포함하는 타우 펩타이드/단백질 분자의 임의의 부분을 포함할 수 있으며, 이들 용어는 당해 분야에 일반적으로 공지되어 있다. "선형 에피토프"는 아미노산 잔기의 연속적인 시퀀스로 구성된다. 선형 에피토프는 생리학적 타우 상에 존재하는(예를 들어 타우 2N/4R 중에 존재하는) 것이다. "형태적 에피토프"는 상기 항체 또는 결합 단백질이 형태-특이적인 방식으로 결합하는 에피토프이다. 단백질-기재 에피토프의 경우에, 상기 결합은 에피토프-운반-단백질의 2차, 3차 또는 4차 구조에 따라 변할 수 있다. 즉, 상기 항체는 구조-특이적인 방식, 3차-구조-특이적인 방식, 또는 4차-구조-특이적인 방식으로 결합한다. 형태적 에피토프는 병적인 타우 중에 존재하는(예를 들어 타우 Δ(1-150;392-441)/4R 중에 존재하는) 것이다.

[0240] "치료 에피토프"란 용어는, 본 발명에서 확인되었고 일정한 형태(DC8E8 항체에 의해 인식되는)로 존재하는 경우 타우-타우 응집을 촉진하는 것으로 밝혀진 영역을 지칭한다. 이들 영역 중 하나 이상에 결합하는 항체(및 다른 결합 단백질)는 타우 단량체에서 이량체로의 전환, 및 보다 고차의 응집체 형태로의 전환을 포함하여, 타우 응집의 초기 및 말기 단계를 억제한다; 즉 상기 항체는 생리학적 타우의 병적인 타우로의 전환을 억제한다. 타우 내의 상기 영역들은, 타우의 인접한 영역들 내의 베타-시트의 형성을 촉진함으로써, 짝나선 필라멘트(PHF)로의 타우 피브릴화를 촉진하는데 관련될 수 있다. 치료 에피토프는 267-KHQPGGG-273 (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 298-KHVPGGG-304 (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인) 및 361-THVPGGG-367 (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내) 내에 포함된다. 일부의 실시태양에서, 상기 치료 에피토프들은 각각이 268-HQPGGG-273 (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 299-HVPGGG-304 (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 330-HKPGGG-335 (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인 내), 및 362-HVPGGG-367 내에 포함된다.

- [0241] "생리학적 타우에 대해서보다는 병적인 타우에 대해서 더 높은 친화성을 나타냄"이란 용어는 상기 항체와 생리학적 타우의 하나 이상의 형태 사이에서보다, 상기 항체와 병적인 타우의 하나 이상의 형태 사이에서 더 높은 상호작용 정도를 지칭한다. 상기 상호작용을 예를 들어 하기 실시예에 개시된 바와 같이, ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 수 있다.
- [0242] "특이적으로 결합하다", 및 "에 특이적인"이란 용어는 호환가능하며, 항체 또는 그의 항원-결합 단편(또는 다른 결합 단백질)이 생리적 조건 하에서 비교적 안정한 항원 또는 에피토프와의 복합체를 형성함을 의미한다. 특이적인 결합은 약 1×10^{-6} M 이하의 해리 상수, 예를 들어 약 100 nM 미만, 및 예를 들어 최대 10 nM 미만의 해리 상수를 특징으로 할 수 있다. 2 개의 분자가 특이적으로 결합하는지의 여부를 측정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명 등을 포함한다. 전형적으로, 본 발명에 의해 제공된 항체 또는 항원-결합 단편은 적어도 약 1×10^{-6} M 이하의 상기와 같은 해리 상수로 항원 또는 에피토프에 결합하지만, 다른 분자와는 상기와 같은 해리 상수로 결합하지 않는 분자이다.
- [0243] "우선적으로 결합하는"은 생리적인 타우에 대해서보다는 병적인 타우에 대해서 더 높은 친화성을 갖는 결합, 예를 들어 2N4R에 대해서보다는 타우 $\Delta(1-150;392-441)$ 에 대해서 더 높은 친화성을 갖는 결합을 지칭한다.
- [0244] "만능 T-세포 에피토프"는 인플루엔자 헤마글루티닌: HA307-319 (PKYVKQNTLKLAT) (서열번호 123); PADRE (AKXVAAWTLKAAA) (서열번호 124); 말라리아 CS: T3 에피토프 (EKKIAMEKASSVFNV) (서열번호 125); B형 간염 표면 항원: HBsA919_28 (FLLTRILTI) (서열번호 126); 열충격 단백질 65: hsp65153_171 (DQSIGDLIAEAMDKVGNEG) (서열번호 127); BCG(bacille Calmette-Guerin) (QVHFQPLPPAVVKL) (서열번호 128); 파상풍 독소: TI830-844 (QYIKANSKFIGITEL) (서열번호 129); 파상풍 독소: TI947-967 (FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) (서열번호 130); 및 HIV gp120 T1 (KQIINMWQEVGKAMYA) (서열번호 131) 중에서 선택된 서열이다.
- [0245] "고유의 무질서 타우"란 용어는 임의의 한정된 3D 구조가 없는, 통상적인/생리학적 형태의 타우 단백질을 지칭한다. 상기는 건강한 뇌 중에 존재한다(문헌[Kovacech et al., 2010]).
- [0246] "오-무질서(misdisordered) 타우"는 통상적인/생리학적인 고유의 무질서 타우와 형태적으로 상이하고 확고한/한정된 3D-구조를 갖지 않는 타우의 형태를 지칭한다. 오-무질서 절두된 타우는 생체내에서 신경섬유 퇴행을 유도할 수 있다. 상기는 건강한 뇌 중에 존재하지 않는다(문헌[Kovacech et al., 2010]). "오정렬(misordered) 타우"는 NFT를 형성하는 PHF의 중합체로 조립되는 타우의 구조적인 병적인 형태를 지칭한다. 오-정렬 타우는 건강한 뇌 중에 존재하지 않는다(문헌[Kovacech et al., 2010]).
- [0247] "SHR24"는 타우 유형 IIB(151-391/R3)을 발현하는 트랜스제닉 래트 계열을 지칭한다. 상기 트랜스제닉 래트는 피질 뇌 영역에서 진행성 나이-의존성 신경섬유 퇴행을 나타내었다. SHR24 래트에서 신경섬유매듭(NFT)은 은친화성, 콩고 레드 복굴절, 및 티오프라빈 S 반응성을 포함하여, 인간 알츠하이머병에서 신경섬유 퇴행을 확인하는데 사용되는 다수의 핵심적인 조직학적 기준을 충족시킨다. 이러한 기준은 본 발명의 실시태양들 중 임의의 것을 수용하는 환자에게서 신경섬유 퇴행을 분석하는데 사용될 수 있다. 신경섬유매듭은 또한 DC11을 포함하여, 비정상 타우 형태를 인식하는, 인간 뇌 중의 병적인 타우를 검출하는데 사용되는 항체, 및 타우 단백질의 과인산화된 형태에 특이적인 항체에 의해 확인되었다. 더욱이, 신경섬유 퇴행은 래트의 내생적이고 절두된 타우 종들로 이루어지는 사르코실 불용성 타우 단백질 복합체의 광범위한 형성을 특징으로 하였다(문헌[Filipcik et al., 2010]).
- [0248] "SHR72"는 여러 뇌 영역 및 척수 중에서 국제 특허 출원 PCT W02004/007547에 따라 인간 절두된 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 을 발현하는 트랜스제닉 래트를 지칭한다. 상기 래트 계열의 생성은 문헌[Zilka et al., 2006]에 의해 개시되었고, 타우 병리학은 문헌[Koson et al., 2008]에 개시되었다.
- [0249] "타우 유형 IA"는 절두된 타우43을 함유하는 4 개의 반복부의 적어도 처음 236 개 N-말단 아미노산 및 적어도 마지막 45 개 C-말단 아미노산을 갖는 N- 및 C-말단 이중 절두된 타우 단백질을 지칭한다. 상기 분자는 알츠하이머병 뇌 조직 중에서 검출가능한 반면, 상기 분자는 정상적인 건강한 뇌 조직 중에서는 검출될 수 없다(W02004/007547 A2).
- [0250] "타우 유형 IB"는 절두된 타우44를 함유하는 3 개의 반복부의 적어도 처음 236 개 N-말단 아미노산 및 적어도 마지막 45 개 C-말단 아미노산을 갖는 N- 및 C-말단 이중 절두된 타우 단백질을 지칭한다. 상기 분자는 알츠하이머병 뇌 조직 중에서 검출가능한 반면, 상기 분자는 정상적인 건강한 뇌 조직 중에서는 검출될 수 없다(W02004/007547 A2).

- [0251] "타우 유형 IIA"는 절두된 타우43을 함유하는 4 개의 반복부의 적어도 처음 68 개 N-말단 아미노산 및 적어도 마지막 40 개 C-말단 아미노산을 갖는 N- 및 C-말단 이중 절두된 타우 단백질을 지칭한다. 상기 분자는 알츠하이머병 뇌 조직 중에서 검출가능한 반면, 상기 분자는 정상적인 건강한 뇌 조직 중에서는 검출될 수 없다 (W02004/007547 A2).
- [0252] "타우 유형 IIB"는 절두된 타우44를 함유하는 3 개의 반복부의 적어도 처음 68 개 236 N-말단 아미노산 및 적어도 마지막 20 개 C-말단 아미노산을 갖는 N- 및 C-말단 이중 절두된 타우 단백질을 지칭한다. 상기 분자는 알츠하이머병 뇌 조직 중에서 검출가능한 반면, 상기 분자는 정상적인 건강한 뇌 조직 중에서는 검출될 수 없다 (W02004/007547 A2).
- [0253] 본 발명에 사용된 바와 같이, "치료", "치료하는" 등의 용어는 목적하는 약물학적 및/또는 생리학적 효과를 획득함을 지칭한다. 상기 효과는 질병 또는 그의 증상의 완전한 또는 부분적인 예방에 의해 예방학적이고/이거나 질병의 부분적인 또는 완전한 치유에 의해 치료학적이고/이거나 상기 질병에 불리하게 영향을 미칠 수 있다. "치료"는 본 발명에 사용된 바와 같이, 또한 포유동물, 특히 인간에서 AD 또는 관련된 타우병증의 임의의 치료를 포함하며, (a) 상기 질병의 소인이 있거나 상기 질병에 걸릴 위험이 있을 수 있지만 아직 질병에 걸린 것으로 진단되지 않은 환자에게서 상기 질병이 발생하는 것을 방지하고; (b) 상기 질병을 억제하고, 즉 그의 발달을 저지하고; (c) 상기 질병을 완화시킴, 즉 상기 질병의 역행을 야기함을 포함한다. "치료"의 바람직한 실시태양을 하기에 추가로 논의한다. 일부의 실시태양에서, "치료함"은 치료제를 AD 또는 또 다른 타우병증을 앓는 것으로 의심이 되거나 또는 이미 앓고 있는 환자에게 투여함을 지칭한다. 이는 또한 상기 질병의 하나 이상의 증상 및/또는 상기 질병과 관련된 하나 이상의 증상 및/또는 그의 합병증의 감소, 제거, 또는 적어도 부분적인 저지뿐만 아니라 상기에 대한 임의의 이로인 효과의 발휘를 지칭한다.
- [0254] "예방"은 특정 질병이 의심되거나 또는 달리 위험이 있는 환자에의 투여를 지칭한다. 일반적인 집단에서 누구라도 AD의 위험이 있다. 일부 개인은 AD에 대해 증가된 유전적 위험을 갖는다. 예방은 질병을 제거하거나, 질병의 위험성을 감소시키거나, 질병의 개시를 지연시킬 수 있다. 개시 또는 진행의 지연을, 유사한 집단 또는 개인에서의 질병 진행의 표준 시간을 근거로 측정할 수 있다.
- [0255] "타우병증"은 병적인 타우의 형성과 관련된 질병을 지칭한다.
- [0256] "생리학적 타우"는 정상적인 인간 타우의 6 개의 동형단백질, 즉
- [0257] 2N4R (서열번호 102)
- [0258] 1N4R (서열번호 103)
- [0259] 2N3R (서열번호 104)
- [0260] 0N4R (서열번호 105)
- [0261] 1N3R (서열번호 106)
- [0262] 0N3R (서열번호 107)
- [0263] 중 어느 하나를 지칭한다.
- [0264] 알츠하이머병 및 다른 타우병증과 관련된 인산화 중 어느 하나를 갖는 것들은 상기 정의에서 제외한다.
- [0265] "병적인 타우"는 병적인 타우 형태이성질체 및 구조를 포함하고 하기 전부를 포함한다: 타우 유형 IA, IB, IIA 및 IIB, 오정렬, 오-무질서 타우(단량체, 이량체, 삼량체, 올리고머), 오-무질서 용해성 타우, 사르코실-불용성 타우, 세포외 타우 침착물, 타우 응집체, 찢나선 필라멘트, 신경섬유 병리학, 예를 들어 신경섬유 병변, 매듭, 쓰레드, 피브릴, 축삭돌기 회전타원체, 절두된 타우 및 완전길이 타우의 고도로 인산화된 형태, 또는 AD 또는 또 다른 타우병증과 관련된 타우의 임의의 다른 형태.
- [0266] "결합된"은 펩타이드, 항체 또는 화합물에의 부분의 부착을 지칭한다. 상기 부분은 커플링되거나, 착화되거나, 또는 공유 또는 비공유 부착될 수 있다. 상기 부분은 상기 펩타이드 또는 항체와의 융합물로서 화학적으로 가교결합되거나 발현되거나 합성될 수 있다.
- [0267] "부분"은 상기 펩타이드, 항체, 또는 결합 단백질에 부착될 수 있지만, 청구된 펩타이드, 항체, 또는 결합 단백질 자체는 아닌 임의의 화합물, 유기물, 펩타이드, 단백질, 핵산, 담체, 항원보강제를 지칭한다.

- [0268] "면역원성"은 면역 반응을 이끌어낼 수 있는 어떤 것을 지칭한다. 상기 면역 반응은 항체- 또는 세포-매개되거나, 또는 이들 둘 모두일 수 있다.
- [0269] "항원보강제"는 동반하는 펩타이드에 대한 면역 반응을 증가시키거나, 증폭시키거나, 또는 조절할 수 있는 물질을 지칭한다.
- [0270] "다른 요법"은 주환자가 수용할 수 있는 추가의 요법을 지칭한다.
- [0271] "클리어런스"는 병적인 타우 및/또는 병적인 타우 구조의 수준 또는 검출의 감소를 지칭한다. 클리어런스는 병적인 타우의 완전한 소멸일 필요는 없다, 즉 상기는 부분 소멸일 수 있다.
- [0272] "촉진하는"이란 용어는 유도, 개선 또는 증가를 포함한다.
- [0273] "뇌 조직"은 예를 들어 뇌, 뇌 줄기 및 척수로부터의 임의의 신경 조직을 지칭한다.
- [0274] "특이적인 결합" 및 "높은 친화성"이란 용어는 각각 소정의 항원, 즉 상기 정의된 타우 에피토프에의 항체 결합을 지칭한다. 전형적으로, 상기 항체는 10^{-6} M 이하의 해리 상수(KD)로 결합하고, 상기 소정의 항원보다는 비특이적 항원(예를 들어 BSA, 카제인, 또는 임의의 다른 명시된 폴리펩타이드)에의 결합에 대해 그의 KD보다 2 배 이상 적은 KD로 상기 소정의 항원에 결합한다. "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"란 어구는 본 발명에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"란 용어와 호환적으로 사용된다. 본 발명에 사용되는 바와 같이, "고도로 특이적인" 결합은 오-무질서 타우에 대한 항체의 상대적인 K_D 가 다른 리간드 또는 정상적인 완전길 이 타우에 대한 상기 항체의 결합에 대한 K_D 보다 4 배 이상 적음을 의미한다.
- [0275] "원핵생물"이란 용어는 본 발명의 항체 또는 상응하는 면역글로불린쇄 중 하나 이상의 발현을 위해 DNA 또는 RNA 분자로 형질전환되거나 형질감염될 수 있는 모든 세균을 포함하는 것으로 되어 있다. 원핵생물 속주는 그람 음성뿐만 아니라 그람 양성 세균, 예를 들어 에스케리키아 콜라이, 살모넬라 티피뮤리움, 세라티아 마르세센스 및 바실러스 서브틸리스를 포함할 수 있다. "진핵생물"이란 용어는 효모, 고등 식물, 곤충, 및 예를 들어 포유동물, 대개는 예를 들어 HEK293, NSO, 및 CHO 세포를 포함하는 것으로 되어 있다.
- [0276] "화학적 유도체"란 용어는 통상적으로 기본 분자의 일부가 아닌 추가적인 화학 부분들을 함유하는 분자를 개시한다. 상기와 같은 부분은 상기 기본 분자의 용해도, 반감기, 흡수성 등을 개선시킬 수 있다. 한편으로, 상기 부분은 상기 기본 분자의 바람직하지 못한 부작용을 약하게 하거나 상기 기본 분자의 독성을 감소시킬 수 있다.
- [0277] "핵산", "핵 서열", "핵산 서열", "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드", "폴리뉴클레오타이드 서열" 및 "뉴클레오타이드 서열"은 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 핵산의 단편 또는 영역을 한정하고, 비천연 뉴클레오타이드를 함유하거나 함유하지 않고, 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA 또는 상기 DNA들의 전사 산물인, 변형되거나 변형되지 않은 뉴클레오타이드의 정확한 서열을 지칭한다.
- [0278] 본 발명에 사용된 바와 같은 "단리된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "단리된 핵산"이란 용어는, 그의 기원으로 인해 (1) 상기 "단리된 폴리뉴클레오타이드"가 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오타이드의 전부 또는 일부와 관련되지 않거나, (2) 자연에서 결합되지 않는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 결합되거나, 또는 (3) 보다 큰 서열의 부분으로서 자연에서 존재하지 않는 게놈, cDNA, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합을 의미할 것이다.
- [0279] 진단, 수동 면역화, 약물 전달, 및 AD-요법을 위한 항체
- [0280] 본 발명은 타우의 병적인 형태에 의해 표현되는 하나 이상의 타우 에피토프에 특이적인 신규의 단리된 항체를 개시한다. 이들 에피토프는 병적인 타우 응집에서의 역할이 최초로 지적된 타우의 영역 내, 즉 267-KHQPGGG-273 (서열번호 98) (즉, 에피토프 #1은 타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내에 있는 267-KHQPGGG-273 내에 위치한다), 298-KHVPGGG-304 (서열번호 99) (에피토프 #2, 타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (서열번호 100) (에피토프 #3, 타우 단백질의 세 번째 반복 도메인 내), 및 361-THVPGGG-367 (서열번호 101) (에피토프 #4, 타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내) 내에 위치한다. 이들 항체는 인간 AD 뇌뿐만 아니라 AD 및 관련된 타우병증의 트랜스제닉 래트 모델 중의 오정렬 및 오-무질서 타우를 인식하고, 인간 오-무질서 절두된 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 또는 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 를 발현할 수 있다. 상기 단리된 항체는 또한 (i) 오정렬 또는 생리학적 타우에서 오-무질서 타우로의 변이; (ii) "병적인 타우" 단량체, 이량체, 삼량체 및 다른 타우 다량체의 형성; (iii) 불용성 타우 응집체의 형성; 및 (iv) 세포의 타우의 클리어런스의

촉진을 포함하여, AD 병리에 기여하는 다수의 타우-매개된 활성들 중 하나 또는 여럿을 방해할 수 있다.

[0281]

상기 개시된 발명은 부분적으로, 267-KHQPGGG-273 (서열번호 98) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 298-KHVPGGG-304 (서열번호 99) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (서열번호 100) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인) 및 361-THVPGGG-367 (서열번호 101) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내) 중에서 선택된 타우의 4 개의 앞서 확인되지 않은 작용 영역들 중 하나에 특이적으로 결합하는 항체가 병적인 타우 응집체의 형성을 억제하고, 타우의 다양한 병적인 형태들(이들 중 일부는 상기 질병에서 가장 먼저 형성된다(예를 들어 병적인 단량체)을 검출할 수 있다는 발견을 기본으로 한다. 인간 오-무질서 타우 II(151-391/4R)(또한 본 출원에서 타우 Δ(1-150;392-441)/4R로서 지칭됨)에 대해 생성된 하이브리도마를 면역조직화학(IHC) 및 효소-결합된 면역 분석(ELISA) 모두에 의해 인간 PHF에 특이적인 단클론 항체의 생성에 대해 선별하였다. 상기 생성되는 조합은 IgG1 하위부류의 것인 마우스 단클론 항체(mAb) DC8E8을 포함하였다. DC8E8의 에피토프 지도화는 상기가 인간 타우 상의 4 개의 앞서 확인되지 않은 에피토프에 결합함을 밝혀냈다. 더욱이, DC8E8의 추가의 작용 분석은 각각의 에피토프가 타우 내의 독특한 작용 영역을 나타냄을 밝혀냈다. 이들 영역(본 발명에 이르러 AD 진단 및 요법을 위한 신규의 표적으로서 개시될 수 있고, 따라서 "치료 에피토프"라 지칭된다)은 267-KHQPGGG-273 (서열번호 98) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 298-KHVPGGG-304 (서열번호 99) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (서열번호 100) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인) 및 361-THVPGGG-367 (서열번호 101) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내) 내에 포함된다. 일부의 실시태양에서, 상기 치료 에피토프 중 하나 이상은 268-HQPGGG-273 (서열번호 223) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 299-HVPGGG-304 (서열번호 154) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 330-HKPGGG-335 (서열번호 224) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인 내), 및 362-HVPGGG-367 (서열번호 154) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내) 내에 포함된다. 일부의 실시태양에서, 상기 치료 에피토프 중 하나 이상은 299-HVPGGG-304 (서열번호 154) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내) 내에 포함된다. 일부의 실시태양에서, 상기 치료 에피토프 중 하나 이상은 299-HVPGGG-304 (서열번호 154)이다.

[0282]

실제로, DC8E8은 병적인 타우 단백질과 정상 타우 단백질을 식별할 수 있으며, 이는 이들 4 개의 에피토프 중 하나 이상이 형태적임을 암시한다. 즉, DC8E8은 상기 4 개의 치료 에피토프 각각에 포함되는 영역들 중 하나 이상이, 고유의 무질서 타우(정상 타우)를 띠는 형상(들)과 상이한 병적인 타우의 형태를 나타냄을 밝혀냈다. DC8E8은 상기가 생리학적 타우에 결합하는 것보다 더 높은 친화성으로 병적인 타우에 결합하는 변화를 감지하거나 탐지할 수 있다. 더욱이, 타우에 결합하는 DC8E8은 시험관 내에서 불용성 타우 응집체의 형성을 억제하는 DC8E8의 능력에 의해 측정되는 바와 같이, 병적인 타우 응집체의 형성을 도출하는 타우-타우 상호작용을 억제한다. 예를 들어, 정상 타우에 결합하는 DC8E8은 상기 치료 에피토프를 포함하는 영역에 대해 상기 논의된 형태/형상 변화 중 하나 이상을 방지할 수 있다.

[0283]

또한, 상기 영역 또는 치료 에피토프 중 하나 이상에서 정상 타우에 대한 DC8E8의 결합은, 병적인 타우의 생성에 필요한 상기 분자 중의 다른 곳에서의 몇몇 다른 형태적 변화를 방해한다. 임의의 특정한 기전에 얽매이지 않는 것은 아니지만, DC8E8에 의해 인식되는 타우 내의 상기 에피토프/영역 중 하나 이상은 타우-타우 응집의 촉진제로서 타우 내에서 작용하는 것으로 생각된다. 예를 들어, 상기 에피토프 중 하나 이상의 구조/형상/형태는 인접한 영역들의 구조에 영향을 미치고, 따라서 DC8E8의 결합에 의해 상기 타우 분자 내에서 그의 형상을 고정시키는 것은, 베타-시트(이때 베타 시트 형성은 타우-타우 응집에 필요하다)를 형성하는 상기 인접 영역들(예를 들어 274-281)의 능력 또는 성향을 방해한다. 따라서, 정상 타우 내의 상기 4 개 영역들 중 하나에 대한 DC8E8의 결합은 지금까지 확인된 타우 중의 가장 이른 병적인 변화들 중 하나, 즉 타우 내 베타-시트의 형성의 촉진에 필요하거나 또는 그 자체가 상기 형성을 촉진하거나 형성하는 변화를 방지할 수 있는 것으로 생각된다. 더욱이, 오-무질서/병적인 타우 내의 상기 4 개 영역 중 하나에 대한 DC8E8의 결합은, 즉 상기 4 개 중 하나 이상이 이미 병적인 형태로 변화된 후에, 적어도 상기가 여전히 베타-시트 형성을 억제하거나, 타우-타우 물리적 상호작용을 차단하거나, 또는 이들 모두이기 때문에, 병적인 타우-타우 응집을 여전히 억제할 수 있는 것으로 생각된다.

[0284]

따라서, 타우 내의 신규의 표적 또는 작용성 영역들을 확인하기 위한 도구로서 DC8E8을 사용하여, 타우 상의 4 개의 특이적인 DC8E8 결합 부위들의 알츠하이머병에서의 역할을 지정하였다. 이는 상기 타우 부위들 중 하나 이상이 병적인 타우 단량체 및 다량체의 형성에 관여한다는 인식을 통해 이루어졌는데, 이는 적어도 상기 중 하나 이상에 DC8E8의 결합이 상기 과정들을 억제할 수 있기 때문이다. 더욱이, 이들 치료 에피토프 중 하나 이상에 결합하는 항체(예를 들어 DC8E8)는 세포외 환경으로부터 병적인 타우의 클리어런스를 촉진할 수 있는데, 이는 적어도 상기가 시험관 내에서 미세아교세포에 의한 병적인 타우의 흡수 및 분해; 생체내에서 뇌 중의 세포

의 및 세포내 타우의 감소; 또는 이들 모두를 매개할 수 있기 때문이다. 즉, 이들 항체는 상기와 같은 병적인 형태의 타우가 뇌에 일으키는 손상을 감소시키는 것을 돕는 능력을 갖는다.

[0285] 따라서, 본 발명은 타우상의 하나 이상의 치료 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 개시하며, 여기에서 상기 치료 에피토프는 각각 아미노산 잔기 267-KHQPGGG-273 (서열번호 98) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 298-KHVPGGG-304 (서열번호 99) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (서열번호 100) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인) 및 361-THVPGGG-367 (서열번호 101) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내) 내에 별도로 위치한다. 일부의 실시태양에서, 상기 치료 에피토프 #1 내지 4는 268-HQPGGG-273 (서열번호 223) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 299-HVPGGG-304 (서열번호 154) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 330-HKPGGG-335 (서열번호 224) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인 내), 및 362-HVPGGG-367 (서열번호 154) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내) 내에 포함된다. 상기 항체는 단클론성 또는 다클론성일 수 있다. 또한 항원-결합 항체 부분, 항체 단편, 항체 변체, 조작된 단백질, 및 중합체 스캐폴드가 포함된다. 이들은 면역글로불린 분자의 적어도 일부, 예를 들어 비제한적으로 중쇄 또는 경쇄의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 그의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 영역, 또는 그의 임의의 부분을 포함하는 임의의 단백질 또는 펩타이드-함유 분자를 포함한다.

[0286] 비제한적인 예로서, 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 적합한 항체, 항체 부분, 단편 또는 변체는 상기 개시된 치료 에피토프들 중 하나 이상에 결합할 수 있다. "항체"란 용어는 또한 항체 절단 단편, 명시된 항체 부분 및 그의 변체, 예를 들어 항체 유사물질, 또는 항체 또는 명시된 단편 또는 그의 부분의 구조 및/또는 작용을 모방하는 항체의 부분, 예를 들어 단쇄 항체 및 그의 단편을 포함한다. 작용성 단편은 하나 이상의 치료 에피토프에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어 치료 에피토프에 결합할 수 있는 항체 단편은 비제한적으로 Fab(예를 들어 파파인 절단에 의해), Fab'(예를 들어 펩신 절단 및 부분 환원에 의해) 및 F(ab')₂(예를 들어 펩신 절단에 의해)을 포함하며, facb(예를 들어 플라스민 절단에 의해), pFc'(예를 들어 펩신 또는 플라스민 절단에 의해), Fd(예를 들어 펩신 절단, 부분 환원 및 재응집에 의해), Fv 또는 scFv(예를 들어 분자 생물학 기법에 의해) 단편은 본 발명에 의해 제공된다. 또한 본 발명에 내용 전체가 인용된 문헌[William E. Paul (ed.) Fundamental Immunology, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, NY, N.Y. (2008)]을 참조하십시오. 몇몇 단편들을 효소적 절단, 합성 또는 재조합 기법에 의해, 당해 분야에 통상적으로 공지된 바와 같이, 또는 본 발명에 제공된 바와 같이 생성시킬 수 있다. 항체를 또한, 하나 이상의 정지 코돈이 천연 정지 부위의 상류에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 절두된 형태들로 생성시킬 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 중쇄 부분을 암호화하는 복합 유전자를, 상기 중쇄의 CH1 도메인 및/또는 힌지 영역을 암호화하는 DNA 서열을 포함하도록 설계할 수 있다. 항체의 다양한 부분들을 통상적인 기법에 의해 함께 화학적으로 결합시키거나, 또는 통상적인 유전 공학 기법을 사용하여 연속적인 단백질로서 제조할 수 있다.

[0287] 기본적인 항체 구조 단위는 사량체를 포함하는 것으로 공지되어 있다. 각각의 사량체는 2 개의 동일한 폴리펩타이드 사슬의 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경"(약 25 kDa) 및 하나의 "중" 사슬(약 50-70 kDa)을 갖는다. 상기 각 사슬의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 맡고 있는 약 100 내지 110 개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카복실-말단 부분은 주로 효과기 작용을 맡고 있는 불변 영역을 한정한다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로서 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 입실론으로서 분류되며, 각각 IgM, IgD, IgA 및 IgE로서 상기 항체의 아이소타입을 한정한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 상기 가변 및 불변 영역들은 약 12 개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 결합되고, 이때 중쇄는 약 10 개 이상 아미노산의 "D" 영역을 또한 포함한다. 일반적으로 문헌[Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)](모든 목적을 위해서 내용 전체가 참고로 인용된다)을 참조하십시오. 각 경쇄/중쇄의 가변 영역들은 상기 항체 결합 부위를 형성한다. 따라서, 본래의 항체는 2 개의 결합 부위를 갖는다. 이작용성 또는 이중특이성 항체를 제외하고, 상기 2 개의 결합 부위는 동일하다. 상기 사슬들은 모두 3 개의 고 가변 영역(또한 상보성 결정 영역 또는 CDR이라 칭한다)에 의해 결합되는 비교적 보존된 프레임워크 영역(FR)의 동일한 일반적인 구조를 나타낸다. 각 쌍의 2 개의 사슬로부터의 CDR은 상기 프레임워크 영역에 의해 정렬되어, 특이적인 에피토프에 결합할 수 있다. N-말단에서부터 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄는 모두 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각 도메인에 대한 아미노산의 지정은 IMGT의 정의에 따른다. 또 다른 정의가 또한 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어 문헌[Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)], 또는 [Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]; [Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989)]을 참조하십시오.

[0288] 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 141, 143, 152 및 153 중 어느 하나에 대해 약 80% 이상, 약 85% 이

상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 일치성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 단지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 아미노산에 의해 서열번호 141, 143, 152 및 153 중 어느 하나와 상이한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 당해 분야의 통상적인 숙련가들은 경쇄 가변 영역 중 어느 아미노산이 변경될 수 있는 지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 동일한 특이성을 갖는 항체들의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 비교함으로써, 당해 분야의 숙련가들은 상기 특이성을 변경시키지 않으면서 어느 아미노산을 변경시킬 수 있는 지를 결정할 수 있다. 예시적인 DC8E8 항체 경쇄의 CDR 아미노산 서열의 비교를 위해서 실시예를 참조하십시오. 더욱 또한, 상기 특이성의 변경 여부를 항원 결합 분석을 사용하여 측정할 수 있다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 141, 143, 152 및 153 중 어느 하나에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0289] 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 138, 140, 147 및 148 중 어느 하나에 대해 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 일치성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 단지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 아미노산에 의해 서열번호 138, 140, 147 및 148 중 어느 하나와 상이한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 당해 분야의 통상적인 숙련가들은 중쇄 가변 영역 중 어느 아미노산이 변경될 수 있는 지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 동일한 특이성을 갖는 항체들의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 비교함으로써, 당해 분야의 숙련가들은 상기 특이성을 변경시키지 않으면서 어느 아미노산을 변경시킬 수 있는 지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 예시적인 DC8E8 항체 중쇄의 CDR 아미노산 서열의 비교를 위해서 도 3E 및 25B를 참조하십시오. 더욱 또한, 상기 특이성의 변경 여부를 항원 결합 분석을 사용하여 측정할 수 있다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 138, 140, 147 및 148 중 어느 하나에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0290] 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 141에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 138에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 141에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 140에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 141에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 147에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 141에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 148에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 143에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 140에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 143에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 147에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 143에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 148에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 152에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 138에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 152에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 140에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 152에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 147에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 152에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 148에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 153에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 138에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 153에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 140에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 153에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 147에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 153에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 148에 나열된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0291] 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 117-119 중에서 선택된 하나 이상, 둘 이상 또는 3 개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 주 항체는 서열번호 120-122 중에서 선택된 하나 이상, 둘 이상 또는 3 개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 또한 이들 6 개의 CDR 중 어느 하나가

실시에 14에 개시된 바와 같이 변경되는 실시태양을 제공한다. 일부의 실시태양에서, 상기 경쇄 중의 변경된 CDR 중 하나 이상은 CDR1의 경우 서열번호 247, CDR2의 경우 서열번호 235, 및 CDR3의 경우 서열번호 255, 257, 258, 259 및 260 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부의 실시태양에서, 상기 중쇄 중의 변경된 CDR 중 하나 이상은 CDR1의 경우 서열번호 261 또는 서열번호 262, CDR2의 경우 서열번호 264, 또는 서열번호 265, 및 CDR3의 경우 서열번호 266, 서열번호 267 또는 서열번호 269로부터 선택된다.

[0292] 이중특이성 또는 이작용성 항체는 2 개의 상이한 중/경쇄 쌍 및 2 개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이성 항체는 하이브리도마들의 융합 또는 Fab' 단편의 결합을 포함한 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어 문헌[Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)]을 참조하십시오. 이중특이성 항체의 생성은 통상적인 항체의 생성에 비해 비교적 노동 집약적인 과정일 수 있으며 수율 및 순도는 이중특이성 항체의 경우 일반적으로 더 낮다. 이 중특이성 항체는 단일 결합 부위를 갖는 단편들(예를 들어, Fab, Fab' 및 Fv)의 형태로 존재하지 않는다.

[0293] 본 발명은 천연 형태의 항체에 관한 것이 아니다, 즉 상기 항체를 그의 천연 환경으로부터 취하는 것이 아니고 천연 공급원으로부터 정제에 의해 분리 및 수득하거나, 또는 유전자 재조합 또는 화학 합성에 의해 수득하며, 따라서 상기 항체는 비천연 아미노산을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명에 사용된 바와 같이, 20 개의 통상적인 아미노산 및 그의 약어는 통상적인 용법에 따른다. 문헌[Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)](본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하십시오. 상기 20 개의 통상적인 아미노산, 비천연 아미노산, 예를 들어 .알파.-, .알파.-이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산, 및 다른 통상적이지 않은 아미노산의 입체이성질체(예를 들어 D-아미노산, Nle, Nva, Cha, Orn, Hle, Chg, Hch, 또는 Har)가 또한 본 발명의 폴리펩타이드에 적합한 성분일 수 있다. 통상적이지 않은 아미노산의 예는 비제한적으로 4-하이드록시프롤린, 감마.-카복시글루타메이트, 입실론.-N,N,N-트라이메틸리신, .입실론.-N-아세틸리신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-폼일메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시리신, .시그마.-N-메틸아르기닌, 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산(예를 들어 4-하이드록시프롤린)을 포함한다. 본 발명에 사용된 폴리펩타이드 표시에서, 표준 용법 및 규약에 따라, 좌측 방향은 아미노 말단 방향이고 우측 방향은 카복시 말단 방향이다.

[0294] 유사하게, 본 명세는 천연 염색체 환경, 즉 천연 상태의 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이 아니다. 본 발명의 서열은 분리되고 정제되었다, 즉 상기는 예를 들어 복사에 의해 직접 또는 간접적으로 샘플링되었으며, 그의 환경은 적어도 부분적으로 변형되었다. 재조합 유전학에 의해, 예를 들어 숙주 세포에 의해, 또는 화학 합성에 의해 수득된 분리된 핵산이 또한 제공된다.

[0295] 본 명세와 관련하여, 핵산 또는 아미노산의 2 개 서열들 간의 "일치율"은 최적의 정렬 후에 획득된, 비교되는 상기 두 서열들 간의 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 백분율을 의미하며, 상기 백분율은 순전히 통계적인 것이고 상기 두 서열들 간의 차이는 그들의 길이를 따라 무작위로 분포된다. 2 개의 핵산 또는 아미노산 서열의 비교는 전통적으로 상기 서열들을 최적으로 정렬시킨 후에 비교함으로써 수행되며, 상기 비교는 구획에 의해 또는 "정렬창"을 사용함으로써 수행될 수 있다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬을 수작업에 의한 비교 외에, 스미스와 워터맨(Smith and Waterman(1981)[Ad. App. Math. 2:482])의 국소 상동성 연산에 의해, 니들맨과 분취(Neddleman and Wunsch (1970)[J. Mol. Biol. 48:443])의 국소 상동성 연산에 의해, 피어슨과 립만(Pearson and Lipman (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444])의 유사성 탐색 방법에 의해, 또는 상기 연산들을 사용하는 컴퓨터 소프트웨어(위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(the Wisconsin Genetics Software Package)(제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 575 사이언스 드라이브 소재) 중의 GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA, 또는 비교 소프트웨어 BLAST NR 또는 BLAST P에 의해)에 의해 수행할 수 있다.

[0296] 2 개의 핵산 또는 아미노산 서열간의 일치율은 2 개의 최적으로 정렬된 서열들을 비교함으로써 측정되며, 여기에서 상기 비교하기 위한 핵산 또는 아미노산 서열은 상기 두 서열들 간의 최적 정렬을 위해 기준 서열에 비해 첨가 또는 결실을 가질 수 있다. 일치율은 아미노산 뉴클레오타이드 또는 잔기가 상기 두 서열들 간에, 예를 들어 상기 두 완전한 서열들 간에 동일한 위치의 수를 측정하고, 상기 동일한 위치의 수를 정렬창 중의 전체 위치의 수로 나누고, 그 결과를 100으로 곱하여 상기 두 서열간의 일치율을 획득함으로써 계산된다.

[0297] 예를 들어, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 사이트상에서 입수할 수 있는 BLAST 프로그램, "BLAST 2 서열"(문헌[Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250])을 디폴트 매개변수(상기 매개변수들에 대해서

특히, "개방 간격 별점": 5, 및 "연장 간격 별점": 2; 선택된 매트릭스는 예를 들어 상기 프로그램에 의해 제안된 "BLOSUM 62" 매트릭스이다)와 함께 사용할 수 있으며; 비교하기 위한 상기 두 서열간의 일치율을 상기 프로그램에 의해 직접 계산한다.

[0298] 기준 아미노산 서열과 80% 이상, 예를 들어 85%, 90%, 95%, 및 98%의 일치성을 나타내는 아미노산 서열에 대해서, 바람직한 예는 상기 기준 서열, 몇몇 변형들, 특히 하나 이상의 아미노산의 결실, 첨가 또는 치환, 절두 또는 연장을 함유하는 것들을 포함한다. 하나 이상의 연속적인 또는 비-연속적인 아미노산의 치환의 경우에, 치환된 아미노산이 "동등한" 아미노산으로 대체되는 치환이 바람직하다. 여기에서, "동등한 아미노산"이란 표현은 상응하는 항체 및 하기에 정의되는 구체적인 예들의 생물 활성을 변형시키지 않으면서 구성 아미노산들 중 하나를 치환시키는 듯한 임의의 아미노산들을 가리키는 것으로 되어 있다.

[0299] 동등한 아미노산들은 이들을 치환하는 아미노산과 구조적 상동성에 따라, 또는 생성되는 듯한 다양한 항체들 간의 생물 활성의 비교 시험의 결과에 따라 결정될 수 있다. 비제한적인 예로서, 하기의 표는 상응하는 변형된 항체의 생물 활성의 현저한 변형을 생성시키지 않으면서 수행되는 듯한 가능한 치환들을 요약하며; 동일한 조건 하에서 역치환도 당연히 가능하다.

Original residue	Substitution(s)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0300]

[0301] 본 발명은 실시예 1 내지 2에 개시된 바와 같이, ATCC 특허 기탁명 PTA-11994(2011년 7월 29일 허여됨)로, 2011년 7월 13일에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC, 미국 버지니아주 마나사스 10801 유니버시티 블러바드 소재)에 기탁된 마우스 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체를 제공한다. 다른 적합한 항체들은 당해 분야에 공지된 바와 같이, 세포주, 혼합된 세포주, 불멸화된 세포 또는 불멸화된 세포의 클론 집단에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어 하기 문헌들(각각 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오: Ausubel et al. (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. (1987-2001)); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) and Sambrook et al., Molecular Cloning--A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 (collectively, "Sambrook"); Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); Colligan, et al. (Eds.), Current Protocols in Immunology, (John Wiley & Sons, Inc., N.Y. (1994-2001)); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, (John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)).

[0302] 본 발명에 의해 제공된 항체를 생성시키기 위한 한 가지 접근법으로, 적합한 불멸 세포주(예를 들어 골수종 세포주)를 다양한 항체-생산 세포들 중 하나와 융합시킴으로써 하이브리도마를 생성시킨다. 적합한 불멸 세포주는 비제한적으로 Sp2/0, Sp2/0-AG14, P3/NS1/Ag4-1, NS0, P3X63Ag8.653, MCP-11, S-194, 이종골수종, 그의 융합 산물, 또는 이로부터 유도된 임의의 세포 또는 융합 세포, 또는 당해 분야에 공지되고/되거나 상기 목적을 위해 상업적으로 입수할 수 있는(예를 들어 ATCC) 바와 같은 임의의 다른 적합한 세포주를 포함한다. 적합한 항체 생산 세포는 비제한적으로, 단리되거나 클로닝된 비장, 말초혈액, 림프, 편도선, 또는 다른 면역 또는 B

세포 함유 세포, 또는 내생적이거나 또는 이중성 핵산으로서, 제조합 또는 내생적인 바이러스, 세균, 조류, 원핵생물, 양서류, 곤충, 파충류, 어류, 포유동물, 설치류, 말, 양, 염소, 양, 영장류, 진핵생물, 게놈 DNA, cDNA, rDNA, 미토콘드리아 DNA 또는 RNA, 염색체 DNA 또는 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 단일, 이중 또는 삼중 가닥, 하이브리드화 등 또는 이들의 임의의 조합으로서, 중쇄 또는 경쇄 불변 또는 가변 또는 프레임워크 또는 CDR 서열을 발현하는 임의의 다른 세포를 포함한다. 예를 들어 문헌[Ausubel, supra, and Colligan, Immunology, supra, Chapter 2](내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오.

[0303] 상술한 다양한 실시태양의 항체를 생성시키기 위한 다른 접근법은 비제한적으로 펩타이드 또는 단백질 라이브러리, 예를 들어 캄브리지 안티바디 테크놀로지스(Cambridge antibody Technologies)(영국 캄브리지셔 소재); 몰포시스(MorphoSys)(Martinsreid/Planegg, Del.); 바이오베이션(Biovation)(Aberdeen, Scotland, 영국 소재); 바이오인벤트(BioInvent, Lund, 스웨덴 소재); 다이엑스 코포레이션(Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite); 소마(Xoma, Berkeley, 미국 캘리포니아주 소재); 익시스(Ixsys); 어플라이드 몰레큘라 에볼루션(Applied Molecular Evolution) 등으로부터 상업적으로 입수할 수 있는 것들로부터 제조합 항체를 선택하는 방법; 인간 항체의 선택 가능한 조합을 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물의 면역화에 의존하는 방법(일반적으로 상기 마우스는 작용적으로 재배열되거나 또는 작용상 재배열을 겪을 수 있는 하나 이상의 인간 면역글로불린 유전자좌로부터의 DNA를 포함하는 하나 이상의 트랜스유전자를 포함하며; 상기와 같은 마우스에서 내생적인 면역글로불린 유전자좌는 파괴되거나 결실되어, 내생적인 유전자에 의해 암호화되는 항체를 생산하는 상기 동물의 능력을 제거할 수 있다); 리보솜 디스플레이, 단일 세포 항체 생성 기술(예를 들어 선택된 림프구 항체 방법("SLAM")), 및 B-세포 선택을 포함하는 선택 방법; 사이클로포스파미드 처리를 사용하는 감산 면역화; 뿐만 아니라 당해 분야에 통상적인 임의의 다른 방법, 예를 들어 비제한적으로 미국 공개 출원 제 2005/0142609 호에 개시된 방법(상기 방법은 본 발명에 전체가 참고로 인용된다)을 포함한다.

[0304] 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 키메라 또는 인간화된, 최적화된 완전길이 항체이며, 이를 예를 들어 문헌["Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals Emerging technologies and new therapeutic candidates, by James Shirvill, 2010"] (내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)의 3, 4 및 5 장에 나열되고 예시된 바와 같은 공지된 기법들 중 어느 하나 또는 이들의 조합, 예를 들어 CDR 그래프팅, 예를 들어 UBC's SLAM 기술, PDL's SMART 기술, 아라나 쉐라퓨틱스 plc's 초인간화(Arana Therapeutics plc's Superhumanization), 프레임워크 패칭, 혼성 인간 항체의 제조 기법, 바이오아틀라(BioAtla) LLC's ATLab 플랫폼, 휴머니어링(humaneering), 돌연변이 계통 유도(MLG) 전략(Mutational Lineage Guided (MLG) strategies), 탈면역화 전략, 인간화 전략, 인간 공학(예를 들어 XOMA's HE 기술), FcX, 바이오렉스 쉐라퓨틱스 인코포레이티드(Biolex Therapeutics Inc)(미국 노쓰캐롤라이나주 피츠보로 소재) LEX 시스템, 포텔리전트(Potelligent) 접근법(예를 들어, BioWa), 컴플리전트(Compligent) 기술, BestMAb, 임뮤노바디(ImmunoBody), EB66, 시나제바 익스프레션 플랫폼(Synageva Expression Platforms), 젠코 인코포레이티드(Xencor Inc.) XmAb, 당 공학 항체(Sugar Engineered Antibodies)(예를 들어, 씨애틀 제네틱스 인코포레이티드(Seattle Genetics Inc)(미국 워싱턴주 보텔 소재), "Wox" (트립토판 산화된) 항체(예를 들어, 인넥서스 바이오 테크놀로지 인코포레이티드(InNexus Biotechnology Inc)(캐나다 BC 밴쿠버 소재)); 등에 의해 생성시킬 수 있다. 일부의 실시태양에서, 상기 항체는 완전히 인간 단클론 항체이며, 이를 예를 들어 문헌["Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals Emerging technologies and new therapeutic candidates, by James Shirvill, 2010"]의 4 장에 나열되고 예시된 바와 같은 기술 플랫폼들 중 하나 또는 이들의 조합, 예를 들어 비제한적으로 파지 디스플레이(예를 들어 PDL, Dyax Corp; 미국 매사추세츠주 캄브리지 소재); 분자 기재 항체 선별(MBAS)(예를 들어, Affitech A/S, 예를 들어 EP0547201 및 US 6,730,483에 개시되어 있다); 세포 기재 항체 선별(CBAS) 플랫폼; 인간 조합 항체 라이브러리(HuCAL; 예를 들어, MorphoSys AG); MAbstract 플랫폼(예를 들어, Crucell NV), 예를 들어 PER.C6 세포주를 갖는 것들; Adimab 플랫폼; XenoMouse; UltiMAb 플랫폼; SEBVI 플랫폼; VelocImmune 플랫폼, 개방 단클론 기술 플랫폼, Xenerex 플랫폼; 인간 반응 플랫폼 클로닝(예를 들어, IQ Therapeutics) 및 "즉석 면역 항체"; Viventia 플랫폼(예를 들어, Fusogenics, UnLock, ImmunoMine); "천연 인간 항체" 플랫폼(예를 들어 OncoMab, Patrys, Acceptys); MabIgX (예를 들어, Kenta Biotech); 역 번역 약물 플랫폼(예를 들어, Neuimmune Therapeutics); I-STAR (예를 들어, Theraclone Sciences); CellSpot (예를 들어, Trellis Bioscience); iBioLaunch (예를 들어, iBio Inc.) 등에 의해 생성시킬 수 있다.

[0305] 일부의 실시태양에서, 상기 항체를 예를 들어 문헌["Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals Emerging technologies and new therapeutic candidates, by James Shirvill, 2010"]의 5 장에 개시된 바와 같은 기술 플랫폼 및 방법들 중 하나 이상, 예를 들어 항체 약

물 접합체(예를 들어 ADC, Seattle Genetics); 표적된 항체 페이로드(TAP; Immunogen Inc); 프로바디(예를 들어, CytomX Therapeutics); 항체 클로킹(예를 들어, BioTransformations); 표적화된 광역학적 요법(예를 들어, PhotoBiotics; AlbuDAb(예를 들어, GSK); hyFc (예를 들어, Genexine); 리간드 트랩(예를 들어, BioLogix); CovX-Body (예를 들어, CovX); 동적인 가교결합(예를 들어, InNexus Biotechnology); LEC 기술(예를 들어, Pivotal BioSciences, Morphotek) 등을 사용하여, 비-항체 작용제에 결합시킴으로써 변형시킨다.

[0306] 일부의 실시태양에서, 상기 항체 또는 그의 암호화 cDNA를 추가로 변형시킬 수 있다. 따라서, 추가의 실시태양에서, 본 발명은 상기 다양한 실시태양들의 항체들을 생성시키는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 방법은 키메라 항체, 인간화된 항체, 또는 상기 중 어느 하나의 유사체를 생성시키는 단계(들) 중 어느 하나를 포함한다. 일부의 실시태양에서, 키메라 항체의 생성은 국제 출원 W089/09622에 개시된 바와 같다. 인간화된 항체의 생성 방법은 예를 들어 미국 특허 제 6,548,640 호 또는 캐나다 특허 제 1340879 호(CDR 그래프트화)에 개시되어 있다.

[0307] 또한, 상기 항체 또는 그의 암호화 cDNA를 추가로 변형시킬 수 있다. 따라서, 추가의 실시태양에서, 본 발명은 단일 체 항체, Fab-단편, 이중특이성 항체, 융합 항체, 표지된 항체 또는 이들 중 어느 하나의 유사체를 생성시키는 단계(들) 중 어느 하나를 포함하는 방법을 제공한다. 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 항체는 완전 항체 외의 다양한 형태, 예를 들어 Fv, Fab 및 F(ab)2뿐만 아니라 단일 체로 존재할 수 있다. 예를 들어 국제 출원 W088/09344를 참조하십시오. 더욱 또한, 다이아바디 및 V-형 도메인 결합 분자가 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지되어 있다; 예를 들어 미국 특허 제 7,166,697 호를 참조하십시오.

[0308] 일부의 실시태양에서, 상기 항체(예를 들어 DC8E8)는 상기 DC8E8 항체에 대해 개시된 항원-결합 성질들 중 하나 이상을 갖는 결합 분자의 제조를 위한 기초로서 작용하거나 변형된다. 이러한 결합 단백질은 예를 들어 문헌 ["Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals Emerging technologies and new therapeutic candidates, by James Shirvill, 2010"]의 6장에 나열되고 예시된 기법들 중 하나 이상에 의해 제조될 수 있으며, Fab, TetraMABs (예를 들어, Galileo Oncologics); scFv; Immuna (예를 들어, ESBA Tech AG); [scFv]2, DC8E8의 4 개의 치료 에피토프 중 임의의 2 개와 결합하는 결합 분자 포함; BiTE (Affitech, Micromet AG); 아비바디스(Avibodies) (예를 들어, Avipec Pty); TandAb (예를 들어, Affimed Therapeutics); 플렉시바디(Flexibody) (예를 들어, Affimed); V-NAR (예를 들어, AdAlta); 나노바디 (Ablinx NV); 도메인 항체 (e.g, Diversys Ltd. GSK, 미국 특허 제 6,248,516 호 및 EP0368684); 이중중합체 (예를 들어, Elusys Therapeutics Inc.); 유니바디(Unibody) (예를 들어, GenMab A/S); 도메인 교환된 항체 (예를 들어, Calmune Corporation, Science. 2003 Jun 27;300(5628):2065-71); 스몰 모듈러 임뮤노파마슈티칼스 (Small Modular ImmunoPharmaceuticals) (SMIP) 및 SCORPION 분자 (예를 들어, Trubion Pharmaceuticals); 이중 가변 도메인 면역글로불린, DVD-Ig (Abbott Laboratories) 등을 포함한다.

[0309] 본 발명의 항체 또는 그의 상응하는 면역글로불린 체(들)를, 당해 분야에 공지된 통상적인 기법을 사용하여, 예를 들어 당해 분야에 공지된 아미노산 결실(들), 삽입(들), 치환(들), 첨가(들) 및/또는 재조합(들) 및/또는 임의의 다른 변형(들)을 단독으로 또는 함께 사용함으로써 추가로 변형시킬 수 있다. 예를 들어 하기에 추가로 제공되는 실시예를 참조하십시오. 면역글로불린 체의 아미노산 서열에 근원하는 DNA 서열 중에 상기과 같은 변형을 도입시키는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어 상기 샘브룩(Sambrook)과 상기 오수벨(Ausubel)의 문헌을 참조하십시오. 본 발명의 항체의 변형은 측쇄 변형, 주쇄 변형, 및 아세틸화, 하이드록실화, 메틸화, 아미드화, 및 탄수화물 또는 지질 부분, 보조인자 등의 결합 또는 제거를 포함한 N- 및 C-말단 변형을 포함한, 하나 이상의 구성 아미노산에서의 화학적 및/또는 효소적 유도체화를 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 카복시 말단에서 면역자극 리간드와 같은 이중 분자에 융합된 아미노 말단에 상기 개시된 항체 또는 그의 일부 단편을 포함하는 키메라 단백질의 생성을 포함한다. 예를 들어 상응하는 기술적 세부사항에 대해서, 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된 국제 출원 W000/30680을 참조하십시오.

[0310] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 항체 또는 그의 결합 단편 또는 면역글로불린 체(들)의 생성 방법에 관한 것이며, 상기 방법은

[0311] (a) 상술한 바와 같은 세포를 배양하고;

[0312] (b) 상기 배양물로부터 상기 항체 또는 그의 결합 단편 또는 면역글로불린 체(들)를 단리시킴을 포함한다.

[0313] 일부의 실시태양에서, 상기 단리는 상기 항체-함유 샘플을, 상기 항체가 결합되는, 본 발명에 의해 제공된 펩타이드들 중 하나와 접촉시킴을 포함한다.

- [0314] 상기 형질전환된 숙주를 발효기에서 증식시키고 당해 분야에 공지된 기법에 따라 배양하여 최적의 세포 생육을 성취할 수 있다. 일단 발현되었으면, 본 발명의 전체 항체, 그의 이량체, 개별적인 경쇄 및 중쇄, 또는 다른 면역글로불린 형태들을 당해 분야의 표준 과정에 따라, 예를 들어 암모늄 설페이트 침전, 친화성 컬럼, 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등에 따라 정제할 수 있다; 문헌[Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982)]을 참조하시오. 이어서 상기 항체 또는 그의 상응하는 면역글로불린 쇄(들)를 상기 생육 배지, 세포 용해물, 또는 세포막 분획으로부터 분리시킬 수 있다. 예를 들어 본 발명에 의해 제공된 재조합 발현된 항체 또는 면역글로불린 쇄의 분리 및 정제를, 본 발명의 항체의 불변 영역에 대한 단클론 또는 다클론 항체의 사용을 수반하는 것들과 같은 임의의 통상적인 수단, 예를 들어 예비 크로마토그래피 분리 및 면역학적 분리에 의해 수행할 수 있다.
- [0315] 약 90 내지 95% 이상의 동질성을 갖는 실질적으로 순수한 면역글로불린이 바람직하며, 약학적 용도를 위해서 98 내지 99% 이상의 동질성이 가장 바람직하다. 일단 부분적으로 또는 목적하는 동질성으로 정제되었으면, 상기 항체를 치료학적으로(체외 포함) 또는 분석 과정의 개발 및 수행에 사용할 수 있다.
- [0316] 본 발명은 또한 약물 표적화 및 영상화 용도와 같은 목적을 위해 다른 부분들에 커플링된 항체를 제공한다. 상기와 같은 커플링을 상기 항체의 결합 부위에의 노출 후에 화학적으로 수행하거나, 또는 상기 커플링 산물을 DNA 수준에서 본 발명의 항체 내로 조작할 수 있다. 이어서 DNA를 적합한 숙주 시스템에서 발현시키고, 상기 발현된 단백질을 수거하고 필요하다면 재생시킨다.
- [0317] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 세포를 유전자 조작함을 포함하는, 본 발명의 항체 또는 그의 상응하는 면역글로불린 쇄(들)를 발현할 수 있는 세포의 생성 방법을 포함한다. 본 발명의 방법에 의해 수득할 수 있는 세포를, 예를 들어 본 발명의 항체와 그의 항원과의 상호작용을 시험하기 위해서 사용할 수 있다.
- [0318] 본 발명은 또한 본 발명에 의해 제공된 항체의 공급원으로서 항체-생산 세포주 및 재조합 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명에 의해 제공된 항체 또는 동등한 결합 분자를 포함하는 진단 분석 및 키트 및 이를 기본으로 하는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0319] 본 발명은 또한 DC8E8과 경쟁할 수 있고 병적인 타우-타우 상호작용을 억제할 수 있는 항체의 생성 방법을 제공한다. 상기 항체를 타우에 대한 결합 및 본 발명에서 확인된 "치료 에피토프" 중 1, 2, 3 또는 4 개 전부에 대한 결합에 대해서 DC8E8과 충분히 경쟁하는 그의 능력에 의해 선별할 수 있다.
- [0320] 본 발명은 또한 본 발명에 의해 제공된 항체-기본 작용제 중 하나 이상을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 몇몇 경우에, 상기 뉴클레오타이드는 예를 들어 상술한 항체의 면역글로불린 쇄의 적어도 결합 도메인 또는 가변 영역을 암호화한다. 전형적으로, 상기 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 가변 영역은 상기 항체의 가변 영역의 VH 및/또는 VL의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 항체의 각각의 가변 도메인(중쇄 VH 및 경쇄 VL)이 3 개의 고가변 영역(때때로 비교적 보존된 프레임워크 영역 또는 "FR"에 인접한 상보성 결정 영역 또는 "CDR"이라 칭하며 이는 항원-결합을 맡고 있는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다)을 포함함을 알고 있다. 카뮈 넘버링 시스템에 따라, 항체의 인간 IgG 하위유형의 고가변 영역 또는 CDR은 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 개시된 바와 같이 경쇄 가변 도메인 중의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 중의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3)로부터의 아미노산 잔기 및/또는 고가변 루프로부터의 잔기들, 즉 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917]에 개시된 바와 같이 경쇄 가변 도메인 중의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 중의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3)로부터의 잔기를 포함한다. 상기 IMGT 특유의 넘버링 시스템에서, 상기 보존된 아미노산은 항상 동일한 위치, 예를 들어 시스테인 23 (첫 번째-CYS), 트립토판 41 (보존된-TRP), 소수성 아미노산 89, 시스테인 104 (두 번째-CYS), 페닐알라닌 또는 트립토판 118 (J-PHE 또는 J-TRP)을 갖는다. 예를 들어 문헌[Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997)]; [Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)]; [Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]을 참조하시오. 상기 IMGT 특유의 넘버링은 상기 프레임워크 영역들(FR1-IMGT: 위치 1 내지 26, FR2-IMGT: 39 내지 55, FR3-IMGT: 66 내지 104 및 FR4-IMGT: 118 내지 128) 및 상보성 결정 영역: CDR1-IMGT: 27 내지 38, CDR2-IMGT: 56 내지 65 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117의 표준화된 한계 결정을 제공한다. 상기 IMGT 특유의 넘버링은 IMGT Colliers de Perles로서 표시하는 2D 그래프 표시에 사용된다. 예를 들어 문헌[Ruiz, M. and

Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)]; [Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)]을 참조하십시오. 상기는 또한 3D 구조의 표시에 사용된다. 예를 들어 문헌 [IMGT/3Dstructure-DB Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]을 참조하십시오. 프레임워크 또는 FR 잔기는 상기 고가변 영역들 이외의, 상기 영역 밖의 가변 도메인 잔기들이다.

- [0321] 따라서, 본 발명은 또한 하기의 핵산들(임의의 퇴행 유전자 암호 포함) 가운데 선택됨을 특징으로 하는 단리된 핵산에 관한 것이다:
- [0322] a) 본 발명에 따른 항체를 암호화하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- [0323] b) a)에서 정의된 바와 같은 핵산에 상보성인 핵산;
- [0324] c) 고도로 엄격한 조건 하에서 서열번호 117-122 및 서열번호 247, 253, 255, 257-259, 122, 261, 262, 264, 265-267, 및 269 중에서 선택된 CDR 중 하나 이상과 하이브리드화할 수 있는 18 개 이상의 뉴클레오타이드의 핵산; 및
- [0325] d) 고도로 엄격한 조건 하에서 적어도 핵산 서열 서열번호 165의 경쇄 및/또는 핵산 서열 서열번호 170의 중쇄, 또는 서열번호 165 및/또는 서열번호 170 서열과 최적의 정렬 후에 80% 이상, 예를 들어 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치성을 갖는 서열, 예를 들어 상기 IMGT 넘버링에 따라 상기로부터의 CDR 중 하나 이상과 하이브리드화할 수 있는 18 개 이상의 뉴클레오타이드의 핵산.
- [0326] 바람직한 서열과 최적의 정렬 후에 80% 이상, 예를 들어 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치율을 나타내는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열에 관하여, 몇몇 변형, 예를 들어 특히 결실, 절두, 연장, 키메라 융합 및/또는 치환(특히 매우 정확한)을 나타내는 핵산 서열을 의미한다. 일부의 실시태양에서, 이들은 기준 서열과 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 서열이며, 상기는 예를 들어 고도로 엄격한 조건, 특히 하기에 정의된 조건 하에서, 상기 기준 서열과 특이적으로 하이브리드화하는 듯한 유전자 암호 또는 상보성 서열의 퇴화와 관련된다.
- [0327] 고도로 엄격한 조건 하에서의 하이브리드화는 온도 및 이온 강도와 관련된 조건이 2 개의 상보성 DNA 단편들 간에 하이브리드화가 유지되도록 하는 방식으로 선택됨을 의미한다. 순전히 예시적으로, 상술한 폴리뉴클레오타이드 단편을 정의하기 위한 상기 하이브리드화 단계의 고도로 엄격한 조건은 유리하게는 하기와 같다.
- [0328] DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화를 2 개의 단계로 수행한다: (1) 5x SSC(1x SSC는 0.15 M NaCl + 0.015 M 나트륨 시트레이트의 용액에 상응한다), 50% 폼아미드, 7% 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 10x 덴하르트, 5% 텍스트란 설페이트 및 1% 연어 정자 DNA를 함유하는 포스페이트 완충제(20 mM, pH 7.5) 중에서 3 시간 동안 42 °C에서 예비하이브리드화; (2) 탐침의 길이에 따른 온도(즉 길이 >100 뉴클레오타이드 탐침의 경우 42 °C)에서 20 시간 동안 1차 하이브리드화에 이은 2x SSC + 2% SDS 중에서 20 °C에서 2 회 20-분 세척, 0.1x SSC + 0.1% SDS 중에서 20 °C에서 1 회 20-분 세척. 최종 세척은 길이 >100 뉴클레오타이드 탐침의 경우 60 °C에서 30 분 동안 0.1x SSC + 0.1% SDS 중에서 수행한다. 한정된 크기의 폴리뉴클레오타이드에 대해 상술한 고도로 엄격한 하이브리드화 조건은, 당해 분야의 숙련가에 의해 보다 길거나 보다 짧은 올리고뉴클레오타이드에 대해서, 문헌[Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001)]에 따라 적합하게 될 수 있다.
- [0329] 항원에 대한 항체의 친화성 또는 결합활성을 임의의 적합한 방법(예를 들어 문헌[Pope ME, Soste MV, Eyford BA, Anderson NL, Pearson TW. (2009) J Immunol Methods. 341(1-2):86-96]을 참조하십시오) 및 본 발명에 개시된 방법들을 사용하여 실험적으로 측정할 수 있다. 특정한 항체-항원 상호작용에 대해 측정된 친화성은 상이한 조건, 예를 들어 염 농도, pH 하에서 측정되는 경우 변할 수 있다. 따라서, 친화성 및 다른 항원-결합 매개변수, 예를 들어 K sub D, IC50의 측정을 예를 들어 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충제로 수행한다.
- [0330] 본 발명은 또한 상술한 가변 도메인을 갖는 항체의 가변 도메인을, 목적하는 특이성 및 생물 작용의 다른 폴리펩타이드 또는 항체의 제작에 사용할 수 있음을 제공한다. 따라서, 본 발명은 또한 상술한 가변 도메인의 하나 이상의 CDR을 포함하고 유리하게는 첨부된 실시예에 개시된 항체와 동일하거나 유사한 결합 성질들을 실질적으로 갖는 폴리펩타이드 및 항체를 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 본 발명에 개시된 가변 도메인 또는 CDR을 사용하여, 항체를 당해 분야에 공지된 방법에 따라, 예를 들어 유럽 특허 출원 EP 0 451 216 A1 및 EP 0 549 581 A1에 개시된 바와 같이 제작할 수 있음을 알 것이다. 더욱 또한, 당해 분야의 숙련가는 결합 친화성을, 카트에 의해 정의된 바와 같이, 상기 CDR 내에, 또는 상기 CDR과 부분적으로 중복되는 고가변 루프(문헌[Chothia

and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917]) 내에 아미노산 치환을 수행함으로써 증대시킬 수 있음을 안다. 따라서, 본 발명은 또한 상기 언급된 CDR 중 하나 이상이 하나 이상, 예를 들어 2 개 이하의 아미노산 치환을 포함하는 항체에 관한 것이다. 일부의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 그의 면역글로불린쇄 중 하나 또는 둘 모두에 도 3B 및 3E에 나타낸 바와 같은 가변 영역 중 2 개 또는 3 개 전부의 CDR을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 그의 면역글로불린쇄 중 하나 또는 둘 모두에 도 25 B에 나타낸 바와 같은 2 개 또는 3 개 전부의 CDR을 포함한다.

[0331] 상술한 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 예를 들어 DNA, cDNA, RNA, 또는 합성적으로 생성된 DNA 또는 RNA 또는 상기 폴리뉴클레오타이드들 중 임의의 것을 단독으로 또는 함께 포함하는 재조합적으로 생성된 키메라 핵산 분자일 수 있다. 일부의 실시태양에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부이다. 상기과 같은 벡터는 적합한 숙주 세포 중에서 및 적합한 조건 하에서 상기 벡터의 선택을 허용하는 마커 유전자와 같은 추가의 유전자를 포함할 수 있다.

[0332] 일부의 실시태양에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 발현 조절 서열에 작동적으로 결합하여, 원핵생물 또는 진핵생물 세포에서의 발현을 허용한다. 상기 폴리뉴클레오타이드의 발현은 상기 폴리뉴클레오타이드의 번역된 mRNA 내로의 전사를 포함한다. 진핵생물 세포, 예를 들어 포유동물 세포에서의 발현을 보장하는 조절 요소는 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있다. 상기는 대개 전사의 개시를 보장하는 조절 서열 및 임의로 전사의 종료 및 전사물의 안정화를 보장하는 폴리-A 신호를 포함한다. 추가의 조절 요소는 전사뿐만 아니라 번역 인핸서, 및/또는 천연으로 관련되거나 이종의 프로모터 영역을 포함할 수 있다.

[0333] 이에 관하여, 당해 분야의 숙련가는 적어도 경쇄 및/또는 중쇄의 가변 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린쇄 모두 또는 단지 하나만의 가변 도메인을 암호화할 수 있음을 알 것이다. 마찬가지로, 상기 폴리뉴클레오타이드는 동일한 프로모터의 조절 하에 있거나 또는 발현에 대해 별도로 조절될 수 있다. 원핵생물 숙주 세포에서의 발현을 허용하는 가능한 조절 요소는 예를 들어 에스케리키아 콜라이에서 PL, lac, trp 또는 tac 프로모터를 포함하며, 진핵생물 숙주 세포에서의 발현을 허용하는 조절 요소에 대한 예는 효모에서 AOX1 또는 GAL1 프로모터, 또는 포유동물 및 다른 동물 세포에서 CMV-, SV40-, RSV-프로모터, CMV-인핸서, SV40-인핸서 또는 글로빈 인트론이다.

[0334] 전사의 개시에 기여할 수 있는 요소 외에, 상기과 같은 조절 요소는 또한 전사 종결 신호, 예를 들어 SV40-폴리-A 부위 또는 tk-폴리-A 부위를 상기 폴리뉴클레오타이드의 하류에 포함할 수 있다. 더욱 또한, 사용되는 발현 시스템에 따라, 상기 폴리펩타이드를 세포 구획으로 향하게 하거나 또는 상기를 배지 내로 분비시킬 수 있는 리더 서열을 상기 폴리뉴클레오타이드의 암호화 서열에 가할 수 있으며 이는 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 리더 서열(들)은 번역, 개시 및 종결 서열, 및 임의로 번역된 단백질 또는 그의 일부의 주변세포질 공간 또는 세포외 매질로의 분배를 조종할 수 있는 리더 서열과 적합한 위상으로 조립된다. 일부의 실시태양에서, 상기 이중 서열은 목적하는 특성, 예를 들어 발현된 재조합 산물의 안정화 또는 단순화된 정제를 부여하는 C- 또는 N-말단 확인 펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 암호화할 수 있다. 이와 관련하여, 적합한 발현 벡터는 당해 분야에 공지되어 있으며, 비제한적으로 오카야마-버그(Okayama-Berg) cDNA 발현 벡터 pcDV1 (파마시아(Pharmacia)), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (인비트로젠(Invitrogen)), 및 pSPORT1 (GIBCO BRL)를 포함한다.

[0335] 일부의 실시태양에서, 상기 발현 조절 서열은 진핵생물 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 중의 진핵생물 프로모터 시스템일 수 있으나, 원핵생물 숙주에 대한 조절 서열을 또한 사용할 수 있다. 일단 상기 벡터가 적합한 숙주 내에 통합되었으면, 상기 숙주를 상기 뉴클레오타이드 서열의 높은 수준 발현에 적합한 조건 하에서 유지시키고, 경우에 따라, 상기 면역글로불린 경쇄, 중쇄, 경/중쇄 이량체 또는 본래의 항체, 결합 단편 또는 다른 면역글로불린 형태의 수거 및 정제가 이어질 수 있다. 예를 들어 문헌[Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979)]을 참조하십시오.

[0336] 더욱 또한, 본 발명은 본 발명의 항체의 면역글로불린쇄의 가변 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를; 임의로 본 발명의 항체의 다른 면역글로불린쇄의 가변 도메인을 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드와 함께 포함하는, 유전자 공학에 통상적으로 사용되는 벡터, 특히 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 제공한다. 일부의 실시태양에서, 상기 벡터는 발현 벡터 및/또는 유전자 전달 또는 표적화 벡터이다. 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스, 우두 바이러스, 아데노-관련된 바이러스, 헤르페스 바이러스, 또는 소 우두종 바이러스로부터 유도되는 발현 벡터가 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터의 표적화된 세포 집단으로 전달에 사용될 수 있다. 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 재조합 바이러스 벡터를 제

작할 수 있다. 예를 들어 상기 샘플룩과 오수벨의 문헌에 개시된 기법을 참조하시오. 한편으로, 본 발명에 의해 제공된 폴리뉴클레오타이드 및 벡터를 표적 세포로의 전달을 위해 리포솜 내로 재구성시킬 수 있다. 본 발명에 의해 제공된 폴리뉴클레오타이드(예를 들어 상기 면역글로불린쇄 암호화 서열 및 발현 조절 서열의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인(들))을 함유하는 벡터를, 세포 숙주의 유형에 따라 변할 수 있는 공지된 방법에 의해 숙주 세포 내로 전달할 수 있다. 예를 들어 염화 칼슘 형질감염이 원핵생물 세포에 통상적으로 사용되는 반면, 칼슘 포스페이트 처리 또는 일렉트로포레이션은 다른 세포 숙주에 사용될 수 있다.

[0337] 본 발명은 더욱 또한 본 발명에 의해 제공된 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 상기 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 상기 숙주 세포 중에 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 상기 숙주 세포의 계층 내에 통합시키거나 또는 염색체 외에서 유지시킬 수 있다. 상기 숙주 세포는 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 세포, 예를 들어 세균, 곤충, 진균, 식물, 동물 또는 인간 세포일 수 있다. 바람직한 진균 세포는 예를 들어 사카로마이세스 속의 세포, 특히 사카로마이세스 세레비시아에 종의 세포이다. 제조할 생산 과정에 사용되는 숙주에 따라, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 항체 또는 면역글로불린쇄를 글리코실화하거나 비-글리코실화할 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 몇몇 항체, 또는 상응하는 면역글로불린쇄는 또한 초기 메티오닌 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 사용하여, 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 통상적으로 공지된 기법들 중 임의의 기법을 사용하여 상기 숙주를 형질전환시키거나 형질감염시킬 수 있다. 더욱 또한, 융합된, 작동적으로 결합된 유전자를 제조하고 이를 예를 들어 포유동물 세포 및 세균에서 발현시키는 방법들이 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어 샘플룩을 참조하시오. 상기 문헌 중에 개시된 유전자 구조물 및 방법을 본 발명에 의해 제공된 항체 또는 그의 상응하는 면역글로불린쇄의 진핵생물 또는 원핵생물 숙주에서의 발현에 사용할 수 있다. 일반적으로, 삽입된 폴리뉴클레오타이드의 효율적인 전사를 촉진하는 프로모터 서열을 함유하는 발현 벡터를 상기 숙주와 관련하여 사용한다. 상기 발현 벡터는 전형적으로는 복제 기원, 프로모터, 및 종결자뿐만 아니라, 형질전환된 세포의 표현형 선택을 제공할 수 있는 특정 유전자를 함유한다. 상기 DNA 서열에 적합한 공급원 세포 및 면역글로불린 발현 및 분비를 위한 숙주 세포를 다수의 출처들, 예를 들어 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(본 발명에 참고로 인용된, 문헌["Catalogue of Cell Lines and Hybridomas," Fifth edition (1985) Manassas, VA, U.S.A.] 및 다른 입수 가능한 버전)으로부터 취득할 수 있다. 더욱 또한, 본 발명의 세포를 포함하는 트랜스제닉 동물, 예를 들어 포유동물을 본 발명의 항체의 대규모 생산에 사용할 수 있다.

[0338] 또한, 본 발명은 상술한 바와 같은 결합 분자, 예를 들어 상기 언급된 항체들 중 어느 하나의 가변 영역의 CDR 영역, 특히 중쇄의 CDR3를 함유하는 것들을 포함한 작은 펩타이드를 포함하며, 따라서 몇몇 항체의 경우, 중쇄 CDR3(HCDR3)이, 항원-항체 상호작용에서 보다 큰 정도의 가변성을 갖고 현저하게 관여하는 영역임이 빈번히 관찰되었다. 상기와 같은 펩타이드를 제조할 수단에 의해 합성하거나 제조하여 본 발명에 따라 유용한 결합체를 생성시킬 수 있다. 상기와 같은 방법들은 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지되어 있다. 펩타이드를 예를 들어 상업적으로 입수할 수 있는 자동화된 펩타이드 합성기를 사용하여 합성할 수 있다. 상기 펩타이드를 또한, 상기 펩타이드를 발현하는 DNA를 발현 벡터에 통합시키고 세포를 상기 발현 벡터로 형질전환시켜 상기 펩타이드를 생성시킴으로써 제조할 기법에 의해 생성시킬 수 있다.

[0339] 상술한 융합 단백질은 프로테이나제에 대한 절단 가능한 링커 또는 절단 부위(이격자 부분이라 칭할 수 있다)를 추가로 포함할 수 있다. 이들 이격자 부분은 차례로 불용성 또는 용해성일 수 있으며(문헌[Diener et al., Science 231 (1986), 148]), 표적 부위에서 항체로부터 약물을 방출할 수 있도록 선택될 수 있다. 면역요법을 위해 본 발명의 항체에 커플링될 수 있는 치료제의 예는 약물, 방사성동위원소, 렉틴 및 독소이다. 본 발명의 항체 및 항원에 접합시킬 수 있는 약물은 고전적으로 미토마이신 C, 다우노루비신, 및 빈블라스틴과 같은 약물로서 지칭되는 화합물을 포함한다. 예를 들어 면역요법을 위해 본 발명의 방사성동위원소 접합된 항체 또는 항원을 사용함에 있어서, 몇몇 동위원소가 백혈구 분포뿐만 아니라 아이소타입 안정성 및 방출과 같은 인자에 따라 다른 것들보다 더 바람직할 수 있다. 자가면역 반응에 따라, 일부 방사체가 다른 것들보다 바람직할 수 있다. 일반적으로, 방사성동위원소를 방출하는 알파 및 베타 입자가 면역요법에서 바람직하다. 몇몇 바람직한 경우에, 상기 방사성동위원소는 짧은 범위의 고에너지 알파 방사체, 예를 들어 ^{212}Bi 이다. 치료 목적으로 본 발명의 항체 또는 항원에 결합될 수 있는 방사성동위원소의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd 및 ^{188}Re 이다. 몇몇 경우에, 방사성표지는 ^{64}Cu 이다. 본 발명의 항체 또는 항원에 커플링될 수 있는 다른 치료제들뿐만 아니라 생체외 및 생체내 치료 프로토콜들이 공지되어 있거나, 또는 당해 분야의 통상적인 숙련가들에 의해 확인될 수 있다. 적합하다면, 당해 분야의 숙련가는 상술한 항체들 중 어느 하나를 암호화하는(및

상기에 대한 공급원으로서) 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 항원, 또는 상응하는 벡터를 상기 단백질성 물질 자체 대신에 사용할 수 있다.

[0340] 본 발명은 또한 환자에서 오-무질서 및/또는 오정렬된 타우의 형성을 억제하거나 또는 달리 그 수준을 감소시키기 위해 생체내에서 사용하기 위한 조성물의 제조; 또는 체액으로부터 병적인 타우 화합물 또는 그의 전구체의 체외 추출을 위한, 본 발명에서 제공된 바와 같은 결합 분자 또는 항체의 용도에 관한 것이다. 상기 방법을 인지를 개선시키거나 또는 질병과 관련된 인지 감퇴를 늦추거나 역전시키기 위해 사용할 수 있다. 본 발명에 의해 제공된 항체 또는 결합 분자, 또는 그의 화학적 유도체를 혈액 또는 CSF에 직접 투여하고 상기 혈액 또는 CSF로부터 친화성 포획에 의해 후속 단계에서 격리시킬 수 있으며, 이때 오정렬 및 오-무질서 타우는 상기 언급한 결합 분자와 함께 격리된다. 따라서, 본 발명은 또한 환자의 몸으로부터 혈액 또는 CSF를 제거하고, 상기 혈액 및 CSF에 본 발명을 가하고, 각각 상기와 같이 수득된 혈액 및 CSF를 상기 환자에게 다시 복귀시킴을 포함하는, 상기 환자에서 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 개시 또는 진행을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0341] 본 발명의 항체, 펩타이드 또는 결합 분자/단백질을 갖는 분자 및 입자는 또한 진단 유용성을 갖는다. 본 발명은 알츠하이머병의 별개의 단계들에 존재하는 타우 단백질의 독특한 형태들을 인식하고 식별하는 항체를 제공한다. 상기 항체는 시험관내 및 생체내 모두에서 타우(및 그의 다양한 형태적 변화)를 검출할 수 있다. 상기 항체는 생화학, 면역침전, ELISA, 웨스턴 블롯팅, 및 면역조직화학 분석(예를 들어 신선한, 고정된, 동결된, 파라인-매몰된)뿐만 아니라 예를 들어 방사성 표지된 DC8E8(단일체 DC8E8과 같은 DC8E8의 단편 포함)(상기는 병적인 타우로부터 생리학적 타우를 식별한다(실시에 참조))을 사용하는 생체내 영상화를 포함한 다양한 분석들에서 생리학적 타우와 병적인 타우를 식별할 수 있다. 상기 항체는 고체 및 유체(예를 들어 혈액, 혈장, CSF, 균질물) 모두의 동물(예를 들어 설치류, 인간) 샘플 및 생검 중에서 그렇게 할 수 있다. 이들 검출 분석 중 일부는 하기 실시예에 개시된다. 단백질을 검출하기 위한 다른 통상적인 방법은 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있으며, 따라서 본 발명에 의해 제공된 항체, 펩타이드, 및 타우-결합 분자에 통상적으로 적합하게 될 수 있다. 본 발명의 항체를 표지하고(예를 들어 형광, 방사성, 효소, 핵자기, 중금속) 사용하여, 시험관내에서 면역화학 같은 분석을 포함하여 생체내 또는 시험관 내에서 특정 표지를 검출할 수 있다(예를 들어 하기 개시된 실시예를 참조하시오). 또한, 생체내에서, 상기 항체를 핵의학 영상화 기법과 유사한 방식으로 사용하여 오-무질서 타우 및 그의 침착물을 갖는 조직, 세포 또는 다른 물질을 검출할 수 있었다. MRI 또는 PET에 의해 검출할 수 있는 진단 영상화 탐침으로 세포내 및 세포외 오-무질서 타우 및 신경섬유 병변을 표적화하는 것은 AD의 보다 명확한 사망전 진단을 위한 생물 마커뿐만 아니라 타우 단백질을 표적화하는 요법의 효능을 모니터링하기 위한 수단을 제공할 것이다. 따라서, 본 발명은 AD 진단을 위해, 타우 검출 및/또는 뇌의 병적인 타우 및 신경섬유 병변에 대한 진단제의 표적화를 위한 조성물의 제조 및 상기 표적화 방법을 위한 본 발명에 개시된 항체의 용도를 제공한다. 이들 조성물 및 방법을 AD 및 관련된 타우병증의 치료 프로토콜의 일부로서 사용할 수 있다.

[0342] 본 발명은 액체 상 중에서 사용되거나 고체 상 담체에 결합될 수 있는, 면역분석에 사용하기에 적합한 항체를 제공한다. 본 발명의 항체를 사용할 수 있는 면역분석의 예는 직접 또는 간접 포맷의 경쟁적 및 비-경쟁적 면역분석이다. 상기와 같은 면역분석의 예는 방사성면역분석(RIA), 샌드위치(면역측정 분석), 유식 세포측정 및 웨스턴 블롯 분석이다. 본 발명의 항체를 다수의 상이한 담체들 중 하나에 결합시키고 상기에 특이적으로 결합된 세포를 단리시키는데 사용할 수 있다. 공지된 담체의 예는 유리, 폴리스타이렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 텍스트란, 나일론, 아밀로스, 천연 및 변형된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 아가로스 및 마그네타이트를 포함한다. 상기 담체는 본 발명의 목적을 위해서 용해성이거나 불용성일 수 있다. 다수의 상이한 표지 및 표지 방법들이 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지되어 있다.

[0343] 본 발명에 사용될 수 있는 표지 유형의 예는 효소, 방사성동위원소 및 방사성핵종, 콜로이드성 금속, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 비오틴 그룹, 제 2 정보제공인자(예를 들어 류신 지퍼쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인식되는 소정의 폴리펩타이드 에피토프, 및 화학/전기화학/생물발광 화합물을 포함한다. 상기 효소는 페록시다제(예를 들어 HRP), 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, α-D-갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 글루코스 아밀라제, 카보닉 안하이드라제, 아세틸콜린에스테라제, 라이소자임, 말레이트 데하이드로게나제 또는 글루코스-6 포스페이트 데하이드로게나제를 포함한다. 한편으로, 상기 표지는 비오틴, 디곡시제닌, 또는 5-브로모-데옥시유리딘이다. 로다민, 란타나이드 인, 플루오레세인 및 그의 유도체, 형광색소, 로다민 및 그의 유도체, 녹색 형광 단백질(GFP), 적색 형광 단백질(RFP) 등, 단일, 옴벨리페론을 포함한 형광 표지를 또한 본 발명에 의해 제공된 항체 및 타우-결합 단백질과 결합시킬 수 있다. 상기와 같은 접합체에서, 본 발명의 항체/결합 단백질을 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다.

이어서 상기를 효소 또는 형광 표지와 직접적으로; 이격자 그룹 또는 결합 그룹, 예를 들어 폴리알데하이드, 글루타르알데하이드, 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA) 또는 다이에틸렌트라이아민펜타아세트산(DPTA)을 통해; 또는 당해 분야에 통상적으로 공지된 것들과 같은 다른 결합체의 존재 하에서 결합시킬 수 있다. 플루오레세인 표지를 갖는 접합체를, 예를 들어 아이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조할 수 있다. 몇몇 상황에서, 상기 표지 또는 마커는 또한 치료제일 수 있다.

[0344] 다른 접합체들은 화학발광 표지, 예를 들어 루미놀 및 다이옥세탄, 생물발광 표지, 예를 들어 루시페라제 및 루시페린, 또는 방사성 표지, 예를 들어 요오드¹²³, 요오드¹²⁵, 요오드¹²⁶, 요오드^{133,131}, 브롬⁷⁷, 테크네슘^{99m}, 인듐¹¹¹, 인듐^{113m}, 갈륨⁶⁷, 갈륨⁶⁸, 루테튬⁹⁵, 루테튬⁹⁷, 루테튬¹⁰³, 루테튬¹⁰⁵, 수은¹⁰⁷, 수은²⁰³, 레늄^{99m}, 레늄¹⁰¹, 레늄¹⁰⁵, 스칸듐⁴⁷, 텔루륨^{121m}, 텔루륨^{122m}, 텔루륨^{125m}, 텔루륨¹⁶⁵, 툴륨¹⁶⁷, 툴륨¹⁶⁸, 불소¹⁸, 이트륨¹⁹⁹ 및 요오드¹³¹을 포함할 수 있다. 항체를 방사성동위원소로, 직접 또는 킬레이트제, 예를 들어 상기 언급된 EDTA 또는 DTPA를 통해 표지하기 위한, 당해 분야의 숙련가에게 공지된 기존의 방법들을 진단학적 방사성동위원소에 관하여 사용할 수 있다. 예를 들어 클로라민-T 기법(문헌[Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495])에 의한 $[I^{125}]Na$ 에 의한 표지; 크록포드(Crockford) 등(미국 특허 제 4,424,200 호)에 의해 개시된 바와 같은 테크네슘^{99m}에 의한 표지; 및 나토비치(Hnatowich)(미국 특허 제 4,479,930 호)에 의해 개시된 바와 같은 DTPA를 통한 결합을 참조하시오.

[0345] 본 발명은 또한 개인으로부터의 체액 샘플(이는 혈액 샘플, 림프 샘플, 또는 임의의 다른 체액 샘플일 수 있다)을 수득하고 상기 체액 샘플을 항체-항원 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에서 본 발명의 항체와 접촉시킴으로써 상기 개인에게서 질환을 진단하는 방법에 사용될 수 있는 항체 및 다른 타우-결합 분자를 제공한다. 이어서 상기와 같은 복합체의 존재 및/또는 양을 당해 분야에 공지된 방법에 의해 측정하며, 대조용 샘플 중에서 형성된 경우보다 현저하게 더 높은 수준은 시험된 개인에서의 질병의 존재를 가리킨다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 시험관 내 면역분석에 관한 것이다.

[0346] 더욱 또한, 본 발명은 본 발명의 타우-결합 분자들 중 어느 하나를 사용하는 생체내 영상화 기법에 관한 것이다. 예를 들어, 신체 부분의 3-차원 상을 생성시키는 의학적 영상화 기법인 양전자 단층촬영(PET)은 양전자의 방출로부터 방사선의 검출을 기본으로 한다. 전형적으로, 생물분자를 방사성 표지한다, 예를 들어 상기는 방사성 추적자 동위원소를 포함한다. 상기 표지된 생물분자를, 전형적으로는 혈액 순환에의 주사에 의해 환자에게 투여하면, 상기 방사성 표지된 생물분자는 관심 조직 중에 농축되게 된다. 이어서 상기 환자를, 양전자의 방출을 검출하는 영상화 스캐너에 놓는다. 하나의 실시태양에서, 표지된, 예를 들어 ⁶⁴Cu 표지된 결합 분자, 예를 들어 항체를 환자에게 투여하고 상기 결합 분자 및 따라서 오-무질서 또는 오정렬된 타우의 검출을, 상기 환자를 영상화 스캐너에 놓고 양전자의 방출을 검출함으로써 수행하며, 이에 의해 방출의 검출여부가 신경학적 질환을 가리킨다. 따라서 본 발명은 본 발명의 ⁶⁴Cu-표지된 또는 동등하게 표지된 결합 분자를 환자에게 투여함을 포함하는, PET 영상화 방법을 포함한다.

[0347] 본 발명은 또한 약제 및 진단 팩과 같은 제조 물품 또는 상술한 성분들, 즉 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 결합 분자, 항체 또는 그의 결합 단편, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포가 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 상기와 같은 용기(들)에, 약제 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 당국에 의해 지정된 형태의 통지가 결합될 수 있으며, 상기 통지는 인간 투여에 대한 제조, 사용 또는 판매에 대한 당국의 승인을 반영한다. 또한 또는 한편으로 상기 키트는 적합한 진단 분석에 사용하기 위한 시약 및/또는 설명서를 포함한다. 본 발명의 조성물 또는 키트는 알츠하이머병 및 관련된 타우병증의 진단, 예방 및 치료에 적합하다.

[0348] 상기 결합 분자, 예를 들어 본 발명에 의해 제공된 항체의 생물 활성은 상기 분자가 상기를, 세포 또는 조직으로의 약물 국소화/약물 전달에 대한 후보로 만들기엔 충분한 친화성을 가짐을 암시한다. 오-무질서 타우 침착물에 대한 표적화 및 결합은 치료학적으로 또는 진단학적으로 활성인 작용제의 전달 및 유전자 요법/유전자 전달에 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 병적인 타우 및 뇌의 신경섬유 병변의 검출 및/또는 상기 타우 및 병변에 대한 치료제 또는 진단제의 표적화를 위한 조성물의 제조 및 상기 검출 및 표적화 방법에 대한 본 발명에 개시된 항체의 용도를 제공한다. 이러한 조성물 및 방법을 AD 및 관련된 타우병증에 대한 치료 프로토콜의 일부로서 사용할 수 있다.

[0349] 따라서, 본 발명은 상기 언급한 화합물들, 예를 들어 결합 분자, 항체, 결합 단편; 그의 화학적 유도체; 폴리뉴

클레오타이드, 벡터 및 세포 중 하나 이상을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 몇몇 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 화학적 유도체들은 통상적으로는 기본 분자 또는 세포의(예를 들어 항체, 결합 분자, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 세포의) 일부가 아니지만, 통상적인 방법에 의해 이들에 결합되는 화학적 부분을 포함한다. 상기와 같은 부분은 예를 들어 상기 기본 분자 또는 세포의 용해도, 반감기, 가시화, 검출성, 및/또는 흡수성을 개선시키는 작용을 할 수 있다. 한편으로, 상기 부분은 상기 기본 분자의 바람직하지 못한 부작용을 약화시키거나 또는 상기 기본 분자의 독성을 감소시킬 수 있다.

[0350] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공된 항체와, 약학 조성물의 목적하는 용도에 따른 추가의 작용제, 예를 들어 인터류킨 또는 인터페론과의 조합을 포함하는 상기 약학 조성물을 제공한다. 예를 들어, 알츠하이머병의 치료에 사용하기 위해서, 상기 추가적인 작용제는 작은 유기분자, 항-타우 항체, 항-베타-아밀로이드 항체, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있다. 다른 작용제는 비제한적으로 아세틸콜린에스테라제 억제제, NMDA 수용체 길항물질, 전이 금속 킬레이터, 성장 인자, 호르몬, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 산화방지제, 지질 강화제, 선택성 포스포다이에스테라제 억제제, 타우 응집의 억제제, 단백질 키나제의 억제제, 열충격 단백질의 억제제, 항-아밀로이드-수동 및 -능동 면역화 시약, 항-아밀로이드 응집 억제제, 및 세크레타제 억제제를 포함한다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 본 발명은 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 진행을 치료 또는 예방하기 위한; 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증과 관련된 증상을 개선시키기 위한; 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 존재에 대해 환자를 진단하거나 선별하기 위한; 환자의 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 발병 위험성을 측정하기 위한, 본 발명의 결합 분자, 항체 또는 결합 단편 또는 상기 중 어느 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 결합 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포의 용도에 관한 것이다.

[0351] 진단, 능동 면역화, 및 AD-요법을 위한 펩타이드

[0352] 본 발명은 부분적으로 타우의 몇몇 단편들이 AD의 래트 모델에 주입 시 병적인 타우에 대한 면역 반응을 유도함에 있어서 활성이라는 발견을 기본으로 하며 인간에서 그럴 것이라 예측될 수 있다. DC8E8을 통해, AD의 발생 및 진행에서 촉진제로서 또는 적어도 관여자로서, 상기 확인된 타우의 영역들 중 하나 이상을 포함하는 상기 면역원성 타우 단편은, 동물 모델에서 하나 이상의 생화학적 및 신경학적 분석에 의해 측정된 바와 같이, (i) AD 뇌(래트 모델) 내의 세포의 타우 침착물의 클리어런스를 촉진하고; (ii) 동물 모델에서 AD에 대한 보호 항체의 생산을 유도하고/하거나; (iii) 수용 환자에서 AD의 진행을 늦출 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상기는 또한 상기 영역들을 따라 병적인 타우-타우 상호작용을 형성하는 타우의 능력을 물리적으로 직접 방해할 수 있다.

[0353] 본 발명은 PHF의 코어의 형성에 중요하고 시험관 내에서 PHF 조립을 촉진하는 타우 단백질의 새롭게 확인된 영역들로부터 유래된 면역원 또는 면역원성 펩타이드를 제공한다. 이들 영역("치료 에피토프")을 전략적으로 표적화하는 것은 AD 및 관련된 타우병증의 성공적인 치료를 도출할 수 있다. 면역원을 동물 모델, 예를 들어 하기에 개시되는 트랜스제닉 래트 모델에서 치료 효능에 대해 선별할 수 있다.

[0354] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 타우 펩타이드는 예를 들어 하기의 아미노산 서열들 중 하나를 포함하며, 상기 서열 내에 각각의 4 개의 치료 에피토프들이 별도로 포함된다: a) 서열번호 98 타우 267-KHQPGGG-273, b) 서열번호 99 타우 298-KHVPGGG-304, c) 서열번호 100 타우 329-HHKPGGG-335, 및 d) 서열번호 101 타우 361-THVPGGG-367(가장 긴 인간 타우 동형단백질 타우 2N4R에 따라 넘버링됨, 441 잔기-길이, 서열번호 102 참조). 또 다른 실시태양에서, 타우 펩타이드는 하나 이상의 치료 에피토프를 포함하며, 여기에서 상기 치료 에피토프는 서열번호 223 타우 268-HQPGGG-273, 서열번호 154 타우 299-HVPGGG-304, 서열번호 224 타우 330-HKPGGG-335, 및 서열번호 154 타우 362-HVPGGG-367 중에서 선택된다.

[0355] 본 발명은 30-아미노산 길이 면역원들, 예를 들어 표 1에 나타난 서열번호들 중 어느 하나를 제공한다. 표 1에 포함된 면역원들 중 각 하나는 서열번호 98, 서열번호 99, 서열번호 100 및 서열번호 101 내에 위치된, 치료 에피토프들 중 하나를 함유하는 타우의 단리된 단편이다.

[0356] [표 1]

[0357]

각각 하나의 치료 에피토프를 갖는 타우 30-머 펩타이드

SEQ ID NO	Immunogen	Sequences
SEQ ID NO:1	Tau251-280	PDLKNVSKIGS TENLKHQPGGGKVQIINK
SEQ ID NO:2	Tau256-285	VKSKIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLS
SEQ ID NO:3	Tau259-288	KIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQ
SEQ ID NO:4	Tau275-304	VQIINKKLDL SNVQSKCGSK DNIKHVPGGG
SEQ ID NO:9	Tau244-273	QTAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG
SEQ ID NO:10	Tau245-274	TAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
SEQ ID NO:11	Tau246-275	APVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKV
SEQ ID NO:12	Tau247-276	PVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQ
SEQ ID NO:13	Tau248-277	VPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQI

[0358]

SEQ ID NO:14	Tau249-278	PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQII
SEQ ID NO:15	Tau250-279	MPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIIN
SEQ ID NO:16	Tau252-281	DLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKK
SEQ ID NO:17	Tau253-282	LKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL
SEQ ID NO:18	Tau254-283	KNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD
SEQ ID NO:19	Tau255-284	NVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL
SEQ ID NO:20	Tau257-286	KSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSN
SEQ ID NO:21	Tau258-287	SKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNV
SEQ ID NO:22	Tau260-289	IGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQS
SEQ ID NO:23	Tau261-290	GSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK
SEQ ID NO:24	Tau262-291	STENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKC
SEQ ID NO:25	Tau263-292	TENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCG
SEQ ID NO:26	Tau264-293	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
SEQ ID NO:27	Tau265-294	NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSK
SEQ ID NO:28	Tau266-295	LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
SEQ ID NO:29	Tau267-296	KHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN
SEQ ID NO:30	Tau 276-305	QIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
SEQ ID NO:31	Tau 277-306	IINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSV
SEQ ID NO:32	Tau 278-307	INKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQ
SEQ ID NO:33	Tau 279-308	NKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQI
SEQ ID NO:34	Tau 280-309	KKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIV
SEQ ID NO:35	Tau 281-310	KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVY
SEQ ID NO:36	Tau 282-311	LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK
SEQ ID NO:37	Tau 283-312	DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKP
SEQ ID NO:38	Tau 284-313	LSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:39	Tau 285-314	SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:40	Tau 286-315	NVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:41	Tau 287-316	VQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:42	Tau 288-317	QSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:43	Tau 289-318	SKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:44	Tau 290-319	KCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:45	Tau 292-321	GSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV

[0359]

SEQ ID NO:46	Tau 293-322	SKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKC
SEQ ID NO:47	Tau 294-323	KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCG
SEQ ID NO:48	Tau 295-324	DNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGS
SEQ ID NO:49	Tau 296-325	NIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSL
SEQ ID NO:50	Tau 297-326	IKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG
SEQ ID NO:51	Tau 298-327	KHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGN
SEQ ID NO:52	Tau 307-336	QIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQ
SEQ ID NO:53	Tau 308-337	IVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQV
SEQ ID NO:54	Tau 309-338	VYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVE
SEQ ID NO:55	Tau 310-339	YKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEV
SEQ ID NO:56	Tau 311-340	KPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVK
SEQ ID NO:57	Tau 312-341	PVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKS
SEQ ID NO:58	Tau 313-342	VDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
SEQ ID NO:59	Tau 314-343	DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK
SEQ ID NO:60	Tau 315-344	LSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKL
SEQ ID NO:61	Tau 316-345	SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD
SEQ ID NO:62	Tau 317-346	KVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDF
SEQ ID NO:63	Tau 318-347	VTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFK
SEQ ID NO:64	Tau 319-348	TSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKD
SEQ ID NO:65	Tau 320-349	SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDR
SEQ ID NO:66	Tau 321-350	KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRV
SEQ ID NO:67	Tau 322-351	CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
SEQ ID NO:68	Tau 323-352	GSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQS
SEQ ID NO:69	Tau 324-353	SLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSK
SEQ ID NO:70	Tau 325-354	LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
SEQ ID NO:71	Tau 326-355	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIG
SEQ ID NO:72	Tau 327-356	NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGS
SEQ ID NO:73	Tau 328-357	IHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSL
SEQ ID NO:74	Tau 329-358	HHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLD
SEQ ID NO:75	Tau339-368	VKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
SEQ ID NO:76	Tau340-369	KSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNK
SEQ ID NO:77	Tau341-370	SEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKK

[0360]

SEQ ID NO:78	Tau342-371	EKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKI
SEQ ID NO:79	Tau343-372	KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE
SEQ ID NO:80	Tau344-373	LDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET
SEQ ID NO:81	Tau345-374	DFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETH
SEQ ID NO:82	Tau346-375	FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK
SEQ ID NO:83	Tau 347-376	KDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKL
SEQ ID NO:84	Tau 348-377	DRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
SEQ ID NO:85	Tau 349-378	RVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTF
SEQ ID NO:86	Tau 350-379	VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR
SEQ ID NO:87	Tau351-380	QSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRE
SEQ ID NO:110	Tau352-381	SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFREN
SEQ ID NO:89	Tau353-382	KIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENA
SEQ ID NO:90	Tau354-383	IGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
SEQ ID NO:91	Tau355-384	GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKA
SEQ ID NO:92	Tau356-385	SLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK
SEQ ID NO:93	Tau357-386	LDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKT
SEQ ID NO:94	Tau358-387	DNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTD
SEQ ID NO:95	Tau359-388	NITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDH
SEQ ID NO:96	Tau360-389	ITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHG
SEQ ID NO:97	Tau361-390	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGA

[0361]

[0362]

일부의 실시태양에서, 상기 면역원성 펩타이드는 서열번호 1 타우 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280; 서열번호 2 타우 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285; 서열번호 3 타우 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQ-288; 및 서열번호 4 타우 275-VQIINKLDLSNVQSKGSKDNIKHVPGGG-304 중에서 선택된다.

[0363]

본 발명은 또한 인간 타우 단백질의 6 개의 동형단백질 중 어느 하나로부터 유도될 수 있는 아미노산 서열들 서열번호 98 267-KHQPGGG-273, 또는 아미노산 서열번호 99 298-KHVPGGG-304, 또는 아미노산 서열번호 100 329-HHKPGGG-335, 또는 아미노산 서열번호 101 361-THVPGGG-367 중 하나 이상을 함유하는 본 발명에 사용하기 위한 보다 짧고 보다 긴 면역원성 펩타이드를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 면역원성 펩타이드는 하나 이상의 치료 에피토프를 포함하며, 여기에서 상기 치료 에피토프는 서열번호 223 타우 268-HQPGGG-273, 서열번호 154 타우 299-HVPGGG-304, 서열번호 224 타우 330-HKPGGG-335, 및 서열번호 154 타우 362-HVPGGG-367 중에서 선택된다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 펩타이드는 서열번호 109 타우 314-DLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE-342; 서열번호 110 타우 352-SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFREN-380; 서열번호 111 타우 325-LGNIHHKPGGGQ-336; 서열번호 112 타우 357-LDNITHVPGGGN-368; 서열번호 108 타우 294-305 KDNIKHVPGGGS 중에서 선택된 서열을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 하나 이상의 면역원성 펩타이드는 서열번호 1-4, 서열번호 9-101, 및 서열번호 108-112, NIKAVPGGGS (서열번호 200), NIKHVPGGGS (서열번호 201), IKHVPGGGS (서열번호 202), KHVPGGGSV (서열번호 203), HVPGGGSVQ (서열번호 204), VPGGGSVQ (서열번호 205), GWSIHSPGGGSC (서열번호 250), and SVFQHLPGGGSC (서열번호 251), ANIKHVPGGGS (서열번호 144), DAIKHVPGGGS (서열번호 146), DNAKHVPGGGS (서열번호 149), DNIAHVPGGGS (서열번호 151), DNIAVPGGGS (서열번호 159), DNIAHVPGGGS (서열번호 161), 및 DNIAHVPGGGS (서열번호 171) 중 어느 하나로부터 선택된다.

[0364]

상기 인간 타우 동형단백질에 상응하는 아미노산 서열들을 서열번호 102-107에 제공한다

[0365]

서열번호 102 (2N4R):

[0366]

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGRDSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPTP REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIAHV PGGGSVQIVY KPVDSLKVTs KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

[0367]

서열번호 103 (1N4R):

[0368] MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEAEAGIG DTPSLEDEAA
GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
SRTPSLPTTP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN KKLDSLNVQS KCGSKDNIKH
VPGGGSVQIV YKPVLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
AEIVYKSPVV SGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

[0369] 서열번호 104 (2N3R):

[0370] MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA
AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
TPPSSGEPK SGRSGYSSP GSPGTPGSR RTPLPTPT REPKKVAVR TPPKSPSSA SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP
GGGKVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIH PGGGQVEVKS EKLDKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGA
IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQL

[0371] 서열번호 105 (0N4R):

[0372] MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA AGHVTQARMV SKSKDGTGSDD DKKAKGADGK
TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIK HVPGGGSVQI VYKPVLSKV TSKCGSLGNI
HHKPGGGQVE VKSEKLDKDR RVQSKIGSLD NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID
MVDSPQLATL ADEVASLAK QGL

[0373] 서열번호 106 (1N3R):

[0374] MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEAEAGIG DTPSLEDEAA
GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
SRTPSLPTTP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIVY KPVLSKVT KCGSLGNIH
KPGGGQVEK SEKLDKDRV QSKIGSLDN THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
DSPQLATLAD EVASLAKQ L

[0375] 서열번호 107 (0N3R):

[0376] MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA AGHVTQARMV SKSKDGTGSDD DKKAKGADGK
TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGKVQIV YKPVLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN
ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV SGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

[0377] 통상적인 백신을 여전히 입수할 수 없는 질병에서 면역 반응을 이끌어내기 위한 펩타이드-기재 백신의 사용은 매력적이다(문헌[Brown, 1994]; [BenYedidia, et al., 1997]). 그러나, 많은 경우에 작은 펩타이드들은 불량한 면역원인데, 그 이유는 상기가, 필수적인 Th-세포 에피토프가 없고/없거나 항원 제공 세포(APC)에 의해 낮은 효율로 포획되는 항원으로 작용하기 때문이다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 에피토프는 타우 펩타이드의 보호성 에피토프를 포함하는 보다 긴 폴리펩타이드, 또는 다른 아미노산들을 갖는 유사체일 수 있다.

[0378] 면역 반응을 유도하기 위해 본 발명에 개시된 작용제들 중 일부는 병적인 타우 및 타우 침착에 대해 면역 반응을 유도하기에 적합한 에피토프를 함유하지만 면역원성이기에는 너무 작다. 이 경우에, 펩타이드 면역원을 적합한 담체에 결합시켜 면역 반응의 유도를 도울 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 적합한 담체는 혈청 알부민, 키홀 림프 헤모시아닌, 면역글로불린 분자, 타이로글로불린, 오브알부민, 과산화물 독소, 또는 다른 병원성 세균, 예를 들어 디프테리아, 에스케리키아 콜라이, 콜레라, 또는 헬리코박터 파이로리로부터의 독소, 또는 감독된 독소 유도체를 포함한다. 면역 반응을 자극하거나 증대시키기 위한 다른 담체는 사이토킨, 예를 들어 IL-1, IL-1 α 및 β 펩타이드, IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF, 및 케모킨, 예를 들어 MIP1 α 및 β 및 RANTES를 포함한다. 면역원성 작용제를 또한 오마호니(O'Mahony)의 WO 97/17613 및 WO 97/17614에 개시된 바와 같이, 조직 교차 수송을 증대시키는 펩타이드에 결합시킬 수 있다.

[0379] 면역원성 작용제를 화학적 가교결합에 의해 담체에 결합시킬 수 있다. 담체에 면역원을 결합시키는 기법은 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜-티오) 프로피오네이트(SPDP) 및 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC)를 사용하는 다이설파이드 결합의 형성을 포함한다(상기 펩타이드가 설프하이드릴 그룹이 없는

경우, 시스테인 잔기의 첨가에 의해 이를 제공할 수 있다). 상기 시약은 자신과 하나의 단백질 상의 펩타이드 시스테인 잔기 사이에 다이설파이드 결합, 및 리신 상의 .입실론.-아미노, 또는 다른 아미노산 중의 다른 유리 아미노 그룹을 통한 아마이드 결합을 생성시킨다. 다양한 상기와 같은 다이설파이드/아미드-형성체들은 문헌 [Immun. Rev. 62, 185(1982)]에 개시되어 있다. 다른 이작용성 커플링제는 다이설파이드 결합보다는 오히려 티오에테르를 형성한다. 이들 티오에테르-형성체 중 다수는 상업적으로 입수할 수 있으며 6-말레이미도카프로산, 2-브로모아세트산 및 2-요오도아세트산, 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실산의 반응성 에스터를 포함한다. 상기 카복실 그룹을, 상기 그룹과 숙신이미드 또는 1-하이드록실-2-나이트로-4-설폰산, 나트륨 염을 결합시킴으로써 활성화시킬 수 있다.

[0380] 면역원성 펩타이드를 또한 담체와의 융합 단백질로서 발현시킬 수 있다. 상기 면역원성 펩타이드를 아미노 말단, 카복실 말단, 또는 상기 펩타이드 내의 임의의 부위에서(내부적으로) 상기 담체에 결합시킬 수 있다. 일부의 실시태양에서, 상기 면역원성 펩타이드의 다수의 반복부가 상기 융합 단백질 중에 존재할 수 있다.

[0381] 예를 들어, 보호 에피토프에 대한 B-세포 반응을 유도하는 무차별한 비-천연 Pan DR Th-세포 에피토프에 결합된 상기 보호성 B 세포 에피토프를 갖는 타우 펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 면역원을 또한 제공한다. 추가의 대안으로, 본 발명은 중합체(문헌[Jackson et al., 1997]), 다수의 항원 펩타이드 시스템(MAP)(문헌[Tam and Recent, 1996]), 면역자극 복합체(ISCOM)(문헌[Barr, I.G. and Mitchell, 1996]) 및 가능하게는 다른 분지된 양쪽성 폴리펩타이드(문헌[Wilkinson et al., 1998]), 또는 에피토프의 공-선형화에 의해 생성된 키메라 펩타이드(문헌[Marussig et al., 1997])로서 설계될 수 있는 면역원을 제공한다.

[0382] 몇몇 실시태양에서, 상기 치료 에피토프들을, KLH, 과산화물 독소, 알부민 결합 단백질, 소 혈청 알부민, 덴드리머(MAP; 문헌[Biol. Chem. 358:581])뿐만 아니라 항원보강제 물질, 또는 예를 들어 문헌[O'Hagan et al.(2003)](특히 상기 중에 개시된 내생적인 면역강화 화합물 및 분배 시스템) 및 문헌[Wilson-Welder et al.(2009)](특히 상기 문헌의 표 2 및 3에 나타난 것들)에 개시된 이들의 조합, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 담체에 결합되거나 결합되지 않고, 단독으로 또는 함께 적용할 수 있다.

[0383] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 작용제를 화학적 가교결합에 의해 적합한 담체에 결합시켜 타우 침착물을 포함한, 병적인 타우에 대한 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 결합된 약학적으로 허용 가능한 담체는 키텔 림프 헤모시아닌(KLH), 과산화물 독소, 소 혈청 알부민(BSA), 면역글로불린(Ig) 분자, 타이로글로불린, 또는 오보글로불린이다. 면역 반응의 자극을 위한 다른 담체는 사이토킨(예를 들어 IL-1, IL-2, IL-10 IFN γ , GM-CSF) 및 케모킨(예를 들어 MIP1 α 및 β)을 포함한다.

[0384] 타우 펩타이드 또는 유사체를 고상 펩타이드 합성 또는 재조합 발현에 의해 합성하거나, 또는 천연 공급원으로부터 수득할 수 있다. 자동 펩타이드 합성기를 다양한 출처, 예를 들어 어플라이드 바이오시스템스, EZBiolab, 또는 안타진(Antagene)으로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 재조합 발현 시스템은 세균, 예를 들어 에스케리키아 콜라이, 효모, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포를 포함할 수 있다. 재조합 발현을 위한 DNA 및 표본 DNA 구조물의 조작 과정이 문헌[Sambrook et al.(1989)]에 개시되어 있으며, 재조합 단백질의 생성 방법은 문헌[Current Protocols in Protein Science (Chapter 5 "Production of Recombinant Proteins", UNITS 5.1-5.24, DOI: 10.1002/0471140864, 또한 onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471140864/toc에서 온라인으로 입수할 수 있다)]에 상세히 개시되어 있다.

[0385] 본 발명의 면역원성 작용제를 벡터 또는 담체로서 바이러스 또는 세균에 의해 발현시킬 수 있다. 상기 면역원성 펩타이드를 암호화하는 핵산을 상기 바이러스 또는 세균의 게놈 또는 에피솜에 통합시킨다. 최종적으로, 상기 면역원성 펩타이드를 분비된 단백질로서 또는 바이러스의 외부 표면 단백질과의 융합 단백질로서 발현시키거나, 또는 세균의 막관통 단백질로서 나타낼 수 있다. 상기와 같은 방법에 사용되는 바이러스 또는 세균은 일반적으로 비병원성이거나 감독된다. 적합한 바이러스는 아데노바이러스, HSV, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 및 다른 알파 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 및 다른 라브도 바이러스, 우두 및 계두를 포함한다. 적합한 세균은 살모넬라 및 시겔라를 포함한다. 한편으로, HBV의 HBsAg에 대한 면역원성 펩타이드의 융합이 적합하다.

[0386] 본 발명의 추가의 태양은 치료제 또는 면역원에 관한 것이며, 이들은 또한 다양한 실시태양들에 개시된 다양한 펩타이드(예를 들어 서열번호 1-4;9-97) 또는 그의 단편들의 유사체일 수 있다.

[0387] 본 발명은 또한 디자이너 치료 에피토프로서 본 출원에 표시되는 신규 펩타이드의 발견을 기본으로 한다. 타우 및 타우 단편의 경우와 상이한 1차 서열을 가짐에도 불구하고, 본 발명은 상술한 타우 "치료 에피토프" 중 하나 이상의 형상을 모방하는 형상(예를 들어 고유의 무질서 구조, 3차 구조, 형태)을 가질 수 있는 디자이너 치료

에피토프를 특징으로 한다. 상기 디자이너 치료 에피토프는 상기 영역들 중 하나 이상을 모방함으로써 그들에 대한 항체, 예를 들어 CD8E8과 경쟁하는 항체를 생성시키기에 유용할 수 있다. 이들 펩타이드는 상기 개시한 DC8E8 항체에 결합하기 위해 타우 또는 타우 단편과 경쟁할 수 있다.

[0388] 또한 AD의 래트 모델에 주입될 때 병적인 타우에 대해 면역 반응을 유도할 수 있고 인간에서 그렇게 할 것으로 예상되는 면역원성 디자이너 치료 에피토프를 포함한다. 또한, 하나 이상의 디자이너 치료 에피토프에 의한 면역에 반응하여 생성되고, (i) DC8E8의 에피토프이거나 또는 이를 모방하는 하나 이상의 에피토프를 인식할 수 있고; (ii) 병적인 타우와 정상 타우를 식별할 수 있고/있거나; (iii) 인간 AD 뇌 및/또는 AD의 트랜스제닉 래트 모델에서 신경섬유 병변을 인식할 수 있는 마우스 항체/항원체를 개시한다.

[0389] 본 발명은 또한 알츠하이머병의 예방, 치료 및/또는 진단을 위한 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 조성물은 (i) 타우-타우 응집을 억제함으로써 환자에게서 알츠하이머병을 치료하기 위한 수단; 및 (2) 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 포함한다. 본 발명은 또한 알츠하이머병의 예방, 치료 및/또는 진단을 위한 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 조성물은 (i) 병적인 타우 중의 하나 이상의 "치료 에피토프"에 결합함으로써 환자에게서 알츠하이머병을 치료하기 위한 수단; 및 (2) 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 포함한다. 본 발명은 또한 알츠하이머병의 예방, 치료 및/또는 진단을 위한 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 조성물은 (i) 병적인 타우 중의 하나 이상의 "치료 에피토프"에 결합함으로써 타우-타우 응집을 감소시키기 위한 수단; 및 (2) 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 포함한다.

[0390] 제형

[0391] 본 발명의 작용제들을 치료제(예를 들어 상술한 바와 같은 항체 또는 펩타이드) 및 다른 약학적으로 허용 가능한 성분들 중 하나 이상을 포함하는 약학 제형으로서 투여할 수 있다. 문헌[Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980)]을 참조하십시오. 상기 제형은 예를 들어 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질(양이온 또는 음이온성) 함유 소낭(예를 들어 LIPOFECTIN), DNA 접합체, 무수 흡수성 페이스트, 수중 유적형 및 유중 수적형 유화액, 유화 카보왁스(다양한 분자량의 폴리 에틸렌 글리콜), 반-고체 젤, 및 카보왁스를 포함하는 반-고체 혼합물을 포함한다. 상기 혼합물들 중 어느 것이든, 상기 제형 중의 활성 성분이 상기 제형에 의해 불활성화되지 않고 상기 제형이 생리학적으로 적합하며 투여 경로에 허용 가능하다면, 본 발명에 따른 치료 및 요법에 적합할 수 있다. 또한 약사에게 공지된 제형, 부형제 및 담체에 관한 추가의 정보들에 대해서 하기의 문헌 및 문헌 중 인용문을 참조하십시오: Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman W N "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J. Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998).

[0392] 광범위하게 다양한 약학적으로 허용 가능한 부형제들이 당해 분야에 공지되어 있으며 이들을 본 발명에서 상세히 논의할 필요는 없다. 약학적으로 허용 가능한 부형제는 예를 들어 문헌[A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins]; [Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds., 7.sup.th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins]; 및 [Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3 ed. Amer. Pharmaceutical Assoc]을 포함하여, 다양한 발행물들에 충분히 개시되었다.

[0393] 상기 선택된 제형은 의도하는 투여 방식 및 치료 용도에 따라 변한다. 상기 제형은 약학적으로 허용 가능한 무독성 담체 또는 희석제를 또한 포함할 수 있으며, 이들은 동물 또는 인간 투여를 위한 약학 조성물의 제형화에 통상적으로 사용되는 비히클로서 한정된다. 상기 희석제를 상기 조합의 생물 활성이 영향을 받지 않도록 선택한다. 상기와 같은 희석제의 예는 증류수, 생리학적인 포스페이트 완충 염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 및 헵크의 용액이다. 상기 약학 조성물 또는 제형은 또한 다른 담체, 항원보강제, 또는 무독성, 비치료학적, 비면역원성 안정제 등을 포함할 수 있다. 그러나, 동물에게 투여하기에 적합한 일부 시약들, 예를 들어 완전 프로인트 항원보강제는 전형적으로는 인간 사용을 위한 조성물 중에 포함되지 않는다.

[0394] 적합한 약학 담체의 예는 당해 분야에 공지되어 있으며 포스페이트 완충된 염수 용액, 물, 유화액, 예를 들어 오일/물 유화액, 다양한 유형의 습윤제, 멸균 용액 등을 포함한다. 상기와 같은 담체를 포함하는 조성물을 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화할 수 있다. 보다 많은 담체들은 하기에 추가로 개시된다.

- [0395] 항원보강제
- [0396] 본 발명의 치료제, 면역원을 항원보강제, 즉 자신은 적합한 면역 반응을 야기하지 않지만 동반되는 항원에 대한 반응은 증폭시키거나 조절하는 물질과 함께 투여할 수 있다. 다양한 항원보강제들을 면역 반응을 이끌어내기 위해서, 본 발명의 치료 펩타이드 및 항체와 함께 사용할 수 있다. 바람직한 항원보강제(들)는 고유 반응의 정성적인 형태에 영향을 미치는 면역원 중의 형태 변화는 야기하지 않으면서 상기 면역원의 상기 고유 반응을 증대시킨다.
- [0397] 몇몇 실시태양에서, 상기 항원보강제는 알루미늄 염(알루미늄, 예를 들어 수산화 알루미늄, 알루미늄 포스페이트, 및 알루미늄 셀레이트이다(문헌[Hunter, 2002])). 상기와 같은 항원보강제를 다른 특이적인 면역자극제, 예를 들어 3 탈-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A(MPL) 또는 3-DMP, 중합체성 또는 단량체성 아미노산, 예를 들어 폴리글루탐산 또는 폴리아민과 함께 또는 상기 없이 사용할 수 있다. 상기와 같은 항원보강제를 다른 특이적인 면역자극제, 예를 들어 류라밀 펩타이드(예를 들어 N-아세틸류라밀-L-쓰레오닐-D-아이스글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르류라밀-L-알라닐-D-아이스글루타민(노르-MDP), N-아세틸류라밀-L-알라닐-D-아이스글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2' 다이팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민(MTP-PE), N-아세틸글루코사아미닐-N-아세틸류라밀-L-Al-D-아이스글루-L-Ala-다이팔미톡시 프로필아민(DTP-DPP)세라마이드(상표)), 또는 다른 세균 세포벽 성분과 함께 또는 상기 없이 사용할 수 있다. 다른 항원보강제는 수중 유적형 유화액이며 (a) 모델 110Y 미세유동화기(마이크로플루이딕스(Microfluidics), 미국 매사추세츠주 뉴튼 소재)와 같은 미세유동화기를 사용하여 서브마이크론 입자로 제형화된, 5% 스쿠알렌, 0.5% 트윈 80, 및 0.5% 스팬 85(다양한 양의 MTP-PE를 임의로 함유한다)를 함유하는 MF59(WO 90/14837, Van Nest et al., 본 발명에 내용 전체가 참고로 인용된다), (b) 서브마이크론 유화액으로 미세유동화되거나 보다 큰 입자 크기 유화액을 생성시키기 위해 와동된, 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉-차단된 중합체 L121 및 thr-MDP를 함유하는 SAF, 및 (c) 2% 스쿠알렌, 0.2% 트윈 80, 및 모노인지질 A(MPL), 트레할로스 다이마이콜레이트(TDM) 및 세포벽 골격(CWS)으로 이루어지는 그룹으로부터의 하나 이상의 세균 세포벽 성분, 예를 들어 MPL+CWS(데톡스(Detox)(상표))를 함유하는 리비(Ribi)(상표) 항원보강제 시스템(RAS)(리비 이누노캠(Ribi InunoChem), 미국 몬타나주 해밀톤 소재)을 포함한다. 일부의 실시태양에서, 상기 항원보강제는 사포닌, 예를 들어 스티물론(Stimulon)(상표)(QS21, 아퀼라(Aquila), 미국 매사추세츠주 월체스터 소재) 또는 그로부터 생성된 입자, 예를 들어 ISCOM(면역자극 복합체) 및 ISCOMATRIX이다. 다른 항원보강제는 완전 프로인트 항원보강제(CFA) 및 불완전 프로인트 항원보강제(IFA), 사이토킨, 예를 들어 인터류킨(IL-1, IL-2 및 IL-12), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 및 종양 괴사 인자(TNF)를 포함한다.
- [0398] 한편으로, 타우 펩타이드 및 그의 면역원성 유사체를 항원보강제에 커플링시킬 수 있다. 예를 들어, 타우 펩타이드의 리포펩타이드 버전 "A"는 B형 간염 백신화에 대해 개시된 바와 같이 "A"의 N-말단에 직접 팔미트산 또는 다른 지질을 커플링시킴으로써 제조될 수 있다(문헌[Livingston, J. Immunol. 159, 1383-1392 (1997)]). 그러나, 상기와 같은 커플링은 면역 반응의 성질에 영향을 미칠만큼 상기 타우 펩타이드 "A"의 형태를 실질적으로 변화시켜서는 안 된다.
- [0399] 항원보강제를 단일 조성물로서 면역원과 함께 투여하거나, 또는 상기 면역원의 투여 전, 투여와 동시, 또는 투여 후에 투여할 수 있다. 면역원 및 항원보강제를 동일한 바이알 중에 패키징하여 공급하거나, 또는 별도의 바이알에 패키징하고 사용전에 혼합할 수 있다. 면역원 및 항원보강제를 전형적으로는 표지와 함께 패키징하며, 상기 표지는 목적하는 치료 용도를 가리킨다. 면역원 및 항원보강제를 별도로 패키징하는 경우, 상기 패키징은 전형적으로 사용전 혼합에 대한 설명서를 포함한다. 항원보강제 및/또는 담체의 선택은 상기 항원보강제를 함유하는 면역원성 제형의 안정성, 투여 경로, 투여 스케줄, 백신화되는 종에 대한 항원보강제의 효능에 따라 변하며, 인간의 경우, 약학적으로 허용 가능한 항원보강제는 적절한 규제기관에 의해 인간 투여가 승인되었거나 또는 승인될 수 있는 것이다. 예를 들어 완전 프로인트 항원보강제는 인간 투여에 적합하지 않다. 그러나, 알루미늄, MPL 또는 불완전 프로인트 항원보강제(문헌[Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32:173-186 (1998)](본 발명에 내용 전체가 참고로 인용된다))는 단독으로 또는 임의로 알루미늄, QS21, 및 MPL 중 어느 하나 및 그의 모든 조합과 함께 인간 투여에 적합하다.
- [0400] 약학 조성물은 또한 크고, 느리게 대사되는 거대분자, 예를 들어 단백질, 키토산과 같은 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 공중합체(예를 들어 라텍스 작용화된 세파로스, 아가로스, 셀룰로스 등), 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 지질 응집체(예를 들어 오일 소적 또는 리포솜)를 포함할 수 있다. 추가로, 이들 담체는 면역자극제(즉 항원보강제)로서 작용할 수 있다.
- [0401] 조합

- [0402] 본 발명은 본 발명에 개시된 항체 및 펩타이드를 AD 및 관련된 타우병증을 위한 다른 치료제와 병용하는 치료 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 현재, 타우-관련된 치료 전략은 주로 타우 키나제를 억제하거나 포스파타제를 활성화하는 약물(문헌[Iqbal and Grundke-Iqbal, 2004, 2005, 2007]; [Noble et al. 2005]), 미세소관을 안정화시키는 약물(문헌[Zhang et al. 2005]), 잘못된 접힌 타우 단백질의 단백질분해적 분해를 촉진하는 약물(문헌[Dickey et al. 2005]; [Dickey and Petrucelli, 2006]; [Dickey et al. 2006]), 타우 응집을 방지하거나 역전시키는 화합물(문헌[Wischik et al. 1996]; [Pickhardt et al. 2005]; [Taniguchi et al. 2005]; [Necula et al. 2005]; [Larbig et al. 2007]) 또는 응집된 타우의 백신-매개된 클리어런스(문헌[Asuni et al. 2007])에 집중하고 있다. 따라서, 본 발명은 다중 표적화(예를 들어 타우와 타우-아밀로이드 모두를 표적화함)가 치료 효율을 실질적으로 증가시킬 수 있음을 제공한다.
- [0403] 병적인 용해성 타우 및 불용성 타우(타우 침착물)가 뇌 중에 존재하는 알츠하이머병 및 관련된 타우병증의 경우에, 본 발명의 작용제를 또한 혈액-뇌 장벽을 통한 본 발명의 작용제의 통과를 증가시키는 다른 작용제와 함께 투여할 수 있다.
- [0404] 투여 방법
- [0405] 본 발명에 개시된 면역 반응(수동 또는 능동)을 유도하거나, 타우의 수준을 감소시키거나, 또는 예방, 치료 또는 진단(생체내) 방법들 중 어느 하나를 위한 작용제들을 예방학적 및/또는 치료학적 치료를 위해서 비경구, 국소, 피내, 정맥내, 경구, 피하, 복강내, 비내 또는 근육내 수단에 의해 투여할 수 있다. 전형적인 투여 경로는 피하이지만, 다른 것들도 동등하게 유효할 수 있다. 또 다른 전형적인 경로는 근육내 주사이다. 상기 유형의 주사는 팔 또는 다리 근육에서 가장 전형적으로 수행된다. 정맥내 주사뿐만 아니라 복강내 주사, 동맥내, 두개내, 또는 피내 주사도 또한 면역반응 생성에 유효하다. 일부의 방법에서, 작용제들을 침착물이 축적된 특정 조직에 직접 주사한다.
- [0406] 에어로졸 제형, 예를 들어 코 스프레이 제형은 상기 활성제의 정제된 수성 또는 다른 용액을 보존제 및 등장제와 함께 포함한다. 상기와 같은 제형을 예를 들어 코 점막에 적합한 pH 및 등장성 상태로 조절한다. 직장 또는 질 투여용 제형은 적합한 담체와 함께 좌약으로서 제공될 수 있다.
- [0407] 비경구 투여를 위해서, 본 발명의 치료 펩타이드를 물, 오일, 염수, 글리세롤 또는 에탄올일 수 있는 약학 담체와 함께 생리학적으로 허용 가능한 희석제 중의 상기 물질의 용액 또는 현탁액의 주사 가능한 투여량으로서 투여할 수 있다. 추가로, 보조 물질, 예를 들어 습윤 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등이 조성물 중에 존재할 수 있다. 약학 조성물의 다른 성분은 석유, 동물, 식물성 또는 합성 기원의 것들이다. 땅콩 오일, 대두 오일 및 미네랄 오일이 유용한 물질의 모든 예이다. 일반적으로, 글리콜, 예를 들어 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 특히 주사액에 바람직한 액체 담체이다. 본 발명의 작용제를 또한 상기 활성 성분의 지속적인 방출을 허용하는 바와 같은 방식으로 제형화될 수 있는 데포 주사 또는 임플란트 제제의 형태로 투여할 수 있다. 예시적인 조성물은 HCl에 의해 pH 6.0으로 조절된, 50 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl로 이루어진 수성 완충제 중에서 제형화된 단클론 항체 5 mg/mL을 포함한다.
- [0408] 비경구 투여용 제제는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 유화액을 포함한다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예를 들어 올리브 오일 및 주사성 유기 에스터, 예를 들어 에틸올리에이트이다. 수성 담체는 염수 및 완충 매질을 포함하는, 물, 알콜/수성 용액, 유화액 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화 나트륨 용액, 링거의 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화 나트륨, 락테이트화된 링거액, 또는 불휘발성 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충제, 전해질 보충제(예를 들어 링거의 텍스트로스를 기본으로 하는 것들) 등을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제들, 예를 들어 항균제, 산화방지제, 킬레이트제, 및 불활성 기체 등이 또한 존재할 수 있다.
- [0409] 전형적으로, 조성물을 주사가능물질로서, 액체 용액 또는 현탁액으로서 제조하며; 주사 전에 액체 비히클 중에 용해 또는 현탁하기에 적합한 고체 형태를 또한 제조할 수 있다. 상기 제제를 또한 상기 논의된 바와 같이, 증대된 항원보강제 효과를 위해서 유화시키거나 폴리락티드, 폴리글리콜리드 또는 공중합체와 같은 리포솜 또는 미세 입자 중에 캡슐화시킬 수 있다(문헌[Langer, Science 249, 1527 (1990) and Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)]을 참조하시오). 본 발명의 작용제를 상기 활성 성분의 지속적인 또는 박동성 방출을 허용하는 바와 같은 방식으로 제형화될 수 있는 데포 주사 또는 임플란트 제제의 형태로 투여할 수 있다.
- [0410] 다른 투여 방식에 적합한 추가적인 제형은 경구, 비내, 및 폐 제형, 좌약, 및 경피 적용을 포함한다.

- [0411] 좌약의 경우, 결합제 및 담체는 예를 들어 폴리알킬렌 글리콜 또는 트라이글리세라이드를 포함하며; 상기와 같은 좌약은 0.5% 내지 10%의 범위, 예를 들어 1%-2%의 활성 성분을 함유하는 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구 제형은 부형제, 예를 들어 약제 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 및 마그네슘 카보네이트를 포함한다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환제, 캡슐, 서방성 제형 또는 분말의 형태를 취하며 10% 내지 95%, 예를 들어 25% 내지 70%의 활성 성분을 함유한다.
- [0412] 국소 적용은 경피 또는 피내 전달을 생성시킬 수 있다. 국소 투여는 상기 작용제를 콜레라 독소 또는 그의 해독된 유도체 또는 서브유닛 또는 다른 유사한 세균 독소와 함께 투여함으로써 촉진될 수 있다(문헌[Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)]을 참조하시오). 공-투여는 상기 성분들을 혼합물로서 또는 화학적 가교결합 또는 융합 단백질로서 발현에 의해 획득되는 결합된 분자로서 사용함으로써 성취될 수 있다.
- [0413] 한편으로, 경피 전달을 피부 패치를 사용하거나 트랜스페로솜을 사용하여 성취할 수 있다(문헌[Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995)]; [Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)]). 주 항체, 펩타이드, 또는 화합물의 피하 투여를 표준 방법 및 장치, 예를 들어 바늘 및 주사기, 피하 주사 포트 전달 시스템 등을 사용하여 수행한다. 근육내 투여는 표준 수단, 예를 들어 바늘 및 주사기, 연속적인 전달 시스템 등에 의해 수행된다. 일부의 실시태양에서, 주 항체, 펩타이드, 및/또는 화합물을 연속적인 전달 시스템에 의해 전달한다. "연속적인 전달 시스템"이란 용어는 본 발명에서 "조절된 전달 시스템"과 호환적으로 사용되며 연속적인(예를 들어 조절된) 전달 의료 장치(예를 들어 펌프)를 카테터, 주사 장치 등과 함께 포함하며, 광범위하게 다양한 것들이 당해 분야에 공지되어 있다. 기계적 또는 전기기계적 주입 펌프가 또한 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있다. 상기와 같은 장치의 예는 예를 들어 미국 특허 제 4,692,147; 4,360,019; 4,487,603; 4,360,019; 4,725,852; 5,820,589; 5,643,207; 6,198,966 호 등에 개시된 것들을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 약물 전달 방법은 임의의 다양한 재충전성 펌프 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 펌프는 시간에 따라 안정되고 조절된 방출을 제공한다.
- [0414] 상기 작용제를 또한 약물을 투여하기 위해 두개골에 작은 구멍을 뚫는 표준 현행 기술에 의해 투여할 수 있다. 바람직한 태양에서, 본 발명의 결합 분자, 특히 항체 또는 항체-기체 약물은 혈액-뇌 장벽을 가로지를 수 있으며, 이는 정맥내 또는 경구 투여를 허용한다.
- [0415] 약학적 투여형에서, 상기 작용제(본 발명에 의해 제공되는 항체, 펩타이드, 화합물)를 그의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 투여하거나, 또는 단독으로 또는 적합하게 회합시켜서, 및 다른 약학적으로 활성인 화합물들과 함께 또한 사용할 수 있다. 본 발명에 개시된 방법 및 부형제는 단지 예시적일뿐이며 결코 제한은 아니다. 주 항체, 펩타이드, 또는 화합물을 수성 또는 비수성 용매, 예를 들어 식물성 또는 다른 유사한 오일, 합성 지방산 글리세라이드, 고급 지방산 또는 프로필렌 글리콜의 에스테르에 용해, 현탁 또는 유화시키고; 경우에 따라 통상적인 첨가제, 예를 들어 용해제, 등장제, 현탁제, 유화제, 안정제 및 보존제와 함께 주사용 제제로 제형화할 수 있다. 주사 또는 정맥내 투여를 위한 단위 투여형은 상기 활성제를 멸균수, 식염수 또는 또 다른 약학적으로 허용 가능한 담체 중의 용액으로서 조성물 중에 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같은 "단위 투여형" 또는 "용량"이란 용어는 인간 및 동물 환자에게 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 약학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 비히클과 함께 목적하는 효과를 생성시키기에 충분한 양으로 계산된 소정량의 주 항체를 함유한다. 본 발명의 단위 투여형의 명세서는 사용되는 특정한 화합물 및 성취되는 효과, 및 숙주에서의 각 화합물과 관련된 약동학에 의존한다.
- [0416] 병적인 타우 단백질 및 타우 침착물에 대한 면역 반응을 또한 치료학적 타우 펩타이드를 암호화하는 핵산의 투여에 의해 유도할 수 있다. 상기와 같은 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 상기 면역원을 암호화하는 핵산 구획을 환자의 의도된 표적 세포 중에 상기와 같은 DNA 구획의 발현을 허용하는 조절 요소, 예를 들어 프로모터 및 인핸서에 결합시킨다. 대개, 면역글로불린 유전자(경쇄 또는 중쇄)로부터의 프로모터 및 인핸서 요소, 또는 CMV 주 중간체 초기 프로모터 및 인핸서가 혈액 세포에서 발현을 지시하기에 적합하며, 상기 혈액 세포는 면역 반응의 유도에 바람직한 표적이다. 상기 결합된 조절 요소 및 암호화 서열을 종종 벡터 내로 클로닝시킨다.
- [0417] 다수의 바이러스 벡터 시스템들, 예를 들어 레트로바이러스 시스템(예를 들어 문헌[Lawrie et al., Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 (1993)](내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오); 아데노바이러스 벡터(문헌[Bett et al., J. Virol. 67:5911 (1993)](내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오); 아데노-관련된 바이러스 벡터(문헌[Zhou et al., J. Exp. Med. 179:1867 (1994)](내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오), 우두 바이러스 및 조류수두 바이러스를 포함한 수두 집단으로부터의 바이러스 벡터, 알파 바이러스 유전자로부터의 바이러스 벡터, 예를 들어 신드비스 및 쉼리키 포레스트 바이러스로부터 유래된

것들(문헌[Dubensky et al., J. Virol 70:508-519 (1996)(내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)]; 베네수엘라 말 너염 바이러스(존스톤(Johnston) 등의 미국 특허 제 5,643,576 호(내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)를 참조하시오) 및 라브도바이러스, 예를 들어 수포성 구내염 바이러스(로즈(Rose)의 WO 96/34625(내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)를 참조하시오) 및 유두종 바이러스(문헌[Ohe, et al., Human Gene Therapy 6:325-333 (1995)]; 우(Woo) 등의 WO 94/12629; 및 문헌[Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24:2630-2622 (1996)](내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오)를 입수할 수 있다.

[0418] 면역원을 암호화하는 DNA, 또는 이를 함유하는 벡터를 리포솜 내에 패키징할 수 있다. 적합한 지질 및 관련된 유사체들이 미국 특허 제 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833 및 5,283,185 호에 개시되어 있다. 면역원을 암호화하는 벡터 및 DNA를 또한 미립자 담체에 흡착시키거나 상기 담체와 결합시킬 수 있으며, 상기 담체의 예는 폴리메틸 메트아크릴레이트 중합체 및 폴리락티드 및 폴리(락티드-코-글리콜리드)를 포함한다. 예를 들어 문헌[McGee et al., J. Micro Encap. (1996)]을 참조하시오.

[0419] 유전자 요법 벡터 또는 네이키드 DNA를 개별적인 환자에서의 투여에 의해, 전형적으로는 전신 투여(예를 들어 정맥내, 복강내, 코, 위, 피내, 근육내, 피하 또는 두개내 주입) 또는 국소 적용에 의해 생체내로 전달할 수 있다(예를 들어 미국 특허 제 5,399,346 호를 참조하시오). DNA를 또한 유전자 건을 사용하여 투여할 수 있다(미국 특허 제 6,436,709 호를 참조하시오). 본 출원에서, 면역원을 암호화하는 DNA를 미시적인 금속 비드의 표면에 침전시킨다. 상기 미세투사물을 충격과 또는 팽창하는 헬륨 가스로 가속화하고, 다수 세포층의 깊이까지 조직에 침투시킨다(문헌[Haynes et al., 1996]을 검토하시오). 예를 들어, 아가세투스 인코포레이티드(Agacetus, Inc.)(미국 위스콘신주 미들톤 소재)에 의해 제조된 아셀(Accel)(상표) 유전자 전달 장치 또는 바이오 래드 레보라토리즈 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 헤르클레스 소재)에 의해 제조된 헬리오스(Helios) 유전자 건이 적합하다. 치료 목적으로, DNA를 또한 일렉트로포레이션에 의해 전달할 수 있다(예를 들어 문헌[Trollet et al., 2008] 및 상기 문헌 중의 참고문헌에 개시된 바와 같이). 한편으로, 네이키드 DNA는, 간단히 화학적 또는 기계적 자극(WO 95/05853 참조) 또는 문신(예를 들어 문헌[van den Berg et al., 2009]에 개시된 바와 같이)에 의해 상기 DNA를 피부에 스폿팅함으로써 혈류 내로 통과될 수 있다.

[0420] 상이한 변화에서, 면역원을 암호화하는 DNA 또는 벡터를 생체외에서 세포에, 예를 들어 개인 환자로부터 외식된 세포(예를 들어 림프구, 골수 흡출물, 조직 생검) 또는 만능 공여체 조혈 줄기세포에 전달한 다음, 상기 세포를, 예를 들어 상기 면역원의 발현의 확인 후 및 대개는 상기 벡터가 통합된 세포의 선택 후에 환자에게 재이식할 수 있다.

[0421] 인간 치료를 위한, 잠재적으로 보다 위험하지만 유망한 또 다른 접근법은 수지상 세포(DC, 바로 DNA 전달을 통해서 또는 바이러스 전략을 사용하여)를 형질감염시켜 항원 자체를 생성시켜(문헌[Xing et al., 2005]), MHC I를 통해 제공된 본래 항원의 연속적인 공급을 제공하는 것이었다.

[0422] 치료가 가능한 환자

[0423] 치료가 가능한 환자는 알츠하이머병 또는 관련된 타우병증의 위험이 있지만 증상을 보이지 않은 개인뿐만 아니라 이미 증상을 나타내고 있는 환자를 포함한다. 알츠하이머병의 경우에, 사실상 누구나 충분히 오래산다면 알츠하이머병을 앓을 위험이 있다. 따라서, 본 발명의 치료제 또는 요법을 심지어 상기 피실험 환자의 위험성의 임의의 평가 없이 일반적인 집단에 예방학적으로 투여할 수 있다. 상기 환자에게 제공된 백신은 기지의 알츠하이머병의 유전적 위험성을 갖는 개인에게 특히 유용할 수 있다. 상기와 같은 개인은 상기 질병을 앓았던 친척이 있는 개인, 및 유전자 또는 생화학적 마커의 존재에 의해 위험성이 측정된 개인을 포함한다. 조기 발병 가족성 알츠하이머병의 위험성의 유전자 마커는 APP 유전자의 돌연변이, 프레세닐린 유전자 PS1 및 PS2, 및 ApoE4 유전자 중의 말기 발병 알츠하이머병에 대한 마커를 포함한다(최근에 문헌[Bertram and Tanzi, 2008]에 고찰됨). 추가적인 위험 인자는 AD의 가족력, 고콜레스테롤혈증 또는 죽상동맥경화증을 포함한다. 현재 알츠하이머병을 앓고 있는 개인은 특징적인 치매뿐만 아니라 상술한 위험 인자들의 존재로부터 알아볼 수 있다. 또한, 다수의 진단 시험들을 AD가 있는 개인의 확인에 이용할 수 있다. 여기에는 CSF 중의 전체 타우, 인-타우 및 아밀로이드 β (1-42) 수준의 측정이 포함된다. 상승된 타우 및/또는 인-타우 및 감소된 아밀로이드 β (1-42) 수준은 AD의 존재를 가리킨다. 알츠하이머병을 앓고 있는 개인은 또한 MMSE, ADRDA 또는 다른 기준에 의해 진단될 수 있다.

[0424] 무증상 환자에서, 치료는 임의의 연령(예를 들어 10, 20, 30)에서 시작할 수 있다. 그러나, 환자가 40, 50, 60 또는 70세에 도달할 때까지 치료를 시작할 필요가 없을 수도 있다. 치료는 일정 기간에 걸쳐 수회의 투여량을 수반할 수 있다. 치료를 시간에 따른 치료제(예를 들어 타우 캡타이드)에 대한 항체, 또는 활성화된 T-세포 또

는 B-세포 반응을 분석함으로써 모니터링할 수 있다. 상기 반응이 실패하면, 추가 투여량이 지시된다. 잠재적인 다운 증후군 환자(보다 높은 AD 또는 관련된 타우병증 위험이 있다)의 경우에, 치료를 태아기때 치료제를 어머니에게 투여함으로써, 또는 출생직후에 시작할 수 있다.

[0425] 일부의 실시태양에서, DC8E8(또는 그의 키메라, 인간화된, 인간 또는 다른 유도체/부분/단편)은 T-세포 상의 동시-자극 분자 CD28의 수준의 현저한 감소를 보이는 나이든 면역노화성 알츠하이머병(AD) 환자에서 사용이 의도되는 항체 또는 수동 백신이다. 동시-자극 분자 CD28의 감소는 손상된 면역 반응을 가리킨다(문헌[Saurwein-Teissl et al., 2002]). 흔히 CD45RA⁺인 CD8⁺CD28⁻T 세포 클론(면역표현형: CD8⁺CD28⁻CD45RA⁺)은 다량의 염증전 사이토킨 IFN- γ 및 소량의 IL-5를 생성시킨다. 이들 클론은 정상적인 노화 중에 축적되며 Th₁ 및 Th₂ 사이토킨의 생성에 있어서 불균형을 유도한다. 따라서, 순수한 B 세포의 축소하는 집단과 함께 CD8⁺CD28⁻CD45RA⁺ T 세포 클론의 축적은 노령 인구의 약 1/3이 걸리는 면역 기능의 감퇴에 대한 주요 공헌자이다(문헌[Weng et al., 2009], [Saurwein-Teissl et al., 2002]).

[0426] 따라서, 수동 면역요법(예를 들어 DC8E8(또는 그의 키메라, 인간화된, 인간 또는 다른 유도체/부분/단편)은 AD 환자의 큰 집단의 면역계가 고장나는 것을 피하고 신경섬유 퇴행을 야기하는 병적인 타우 단백질을 표적화하는 수단을 제공한다.

[0427] 일부의 실시태양에서, 상기 타우 치료 에피토프들 중 하나(또는 본 발명에 개시된 타우 치료 에피토프들 중 하나를 포함하는 펩타이드)를, 나이든 면역적격성 알츠하이머병 환자에 사용이 의도되는 활성 백신으로서 사용한다. 상기 면역적격 환자의 면역표현형은 CD8⁺CD28⁻CD45RA⁺이다. 따라서, CD8⁺T 상의 동시-자극 분자 CD28의 수준을 측정하고 이를 능동 백신화를 위한 환자의 선택 마커로서 사용할 것이다.

[0428] 더욱 또한, 치료에 앞서 환자로부터 취한 CSF 및 혈액을 보렐리아, 트레포네마, 클라미디아, 헤르페스바이러스 및 다른 뇌 병원체에 대한 항체에 대해 시험하여 AD의 증상을 모방하거나 악화시킬 수 있는 만성 감염성 및 염증성 CNS 질환이 있는 개인들은 배제할 것이다(문헌[Balin et al., 2008]; [Itzhaki and Wozniak, 2008]; [Miklossy, 2008]; [Andreasen, 2010]). CNS 감염, 특히 뇌 내피 세포의 클라미디아 감염은 종종 혈액-뇌 장벽(BBB)의 기능을 손상시키고, 이는 뇌 실질조직 내로의 단백질의 증가된 유입을 도출하며 따라서 국소 면역 반응에 영향을 미칠 수 있다(문헌[Balin et al., 2008]). 또한 사이토메갈로바이러스(CMV)에 대한 높은 수준의 IgG를 갖는 노령 환자는 보다 빠른 인지 감퇴속도로 고통받는 것으로 나타났다(문헌[Itzhaki and Wozniak, 2008]). 따라서, 본 발명에 의해 제공된 작용제들 중 하나로 면역화 후에 부작용(예를 들어 정상 타우에 대한 통제되지 않는 면역 반응)을 방지하기 위해서, CNS 감염이 있는 알츠하이머병 환자들 또는 상기 언급한 병원체에 대한 항체에 대해 양성으로 시험된 환자들을 고도로 선택적인 백신으로 치료할 것이다.

[0429] 상기 치료에 앞서, 환자들로부터 취한 CSF 및 혈액을 보렐리아, 트레포네마, 클라미디아, 헤르페스바이러스 및 다른 뇌 병원체에 대한 항체에 대해 시험하여 AD의 증상을 모방하거나 악화시킬 수 있는 만성 감염성 및 염증성 CNS 질환이 있는 개인들은 배제할 수 있다(문헌[Balin et al., 2008]; [Itzhaki and Wozniak, 2008]; [Miklossy, 2008]; [Andreasen, 2010]). 다양한 만성 감염에 의해 촉진되는 가능한 부작용들을 예방하기 위해서, 상기 그룹의 환자들을 보다 선택적인 항체 또는 치료-에피토프-함유 백신으로 치료할 것이다. 일부의 경우에, 상기 활성 백신은, 병적인 타우 단백질 상의 치료 에피토프를 표적화하는 엄격하게 선택적인 항체의 생성을 유도하는 디자이너 에피토프(예를 들어 실시예 참조)이다. 일부의 실시태양에서, 상기 백신은 정상/생리학적인 타우 단백질과 공유하는 임의의 아미노산 서열을 함유하지 않는다.

[0430] 치료 섭생

[0431] 예방학적 용도에서, 약학 조성물 또는 약제를 특정 질병의 발병 위험성을 제거하거나 감소시키거나 또는 상기 발병을 지연시키기에 충분한 양으로 상기 질병에 걸리기 쉽거나 또는 걸릴 위험이 있는 환자에게 투여한다. 치료학적 용도에서, 조성물 또는 약제를 상기와 같은 질병 및 그의 합병증의 증상을 치유하거나, 또는 적어도 부분적으로 저지시키기에 충분한 양으로 상기 질병이 의심되거나 이미 상기 질병을 앓고 있는 환자에게 투여한다. 이를 수행하기에 적합한 양을 치료 또는 약학적 유효 용량으로서 정의한다. 예방학적 및 치료학적 섭생 모두에 있어서, 작용제들을 대개는 충분한 면역 반응이 성취될 때까지 수회의 투여량으로 투여한다. 전형적으로, 상기 면역 반응을 모니터링하고 상기 면역 반응이 퇴색되기 시작하면 반복되는 투여량을 제공한다.

[0432] 상술한 병의 치료를 위한, 본 발명 조성물의 유효 용량은 다수의 인자들, 예를 들어 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 동물인지 여부, 투여되는 다른 약제, 및 치료가 예방학적인지 치료학적

인지의 여부에 따라 변한다. 대개, 상기 환자는 인간이다. 치료 투여량을 안전성 및 효능의 최적화를 위해 적정할 필요가 있다. 따라서, 항체 또는 타우-결합 단백질에 의한 치료는 일정 시간에 걸쳐 수회 투여량을 수반할 것이다. 항체에 의한 수동 면역화의 경우, 상기 투여량 범위는 숙주 체중 kg당 약 0.0001 내지 100 mg, 및 보다 대개는 0.01 내지 5 mg이다. 일부의 적용에서, 항체 또는 타우-결합 단백질의 양은 체중 kg당 0.1 mg 이상의 투여량, 체중 kg 당 0.5 mg 이상, 체중 kg 당 1 mg, 또는 체중 kg 당 0.1 내지 10 mg 투여량의 임의의 조합으로 투여될 수 있다. 일부의 방법에서, 상기 항체 또는 타우-결합 단백질을 1 개월 이상, 3 개월 이상 또는 6 개월 이상의 기간에 걸쳐 수회 투여량(동등하거나 상이함)으로 투여할 수 있다. 임의의 하나의 치료 기간 동안 총 투여 회수는 예를 들어 4 내지 6 회일 수 있지만, 상기 논의된 인자에 따라 다른 회수들도 사용될 수 있다. 치료를 하기에 추가로 개시되는 방법들 중 임의의 방법에 의해 모니터링할 수 있다.

[0433] 면역원의 양은 항원보강제가 또한 투여되는지의 여부에 따라 변하며, 이때 항원보강제의 부재 하에서는 보다 높은 투여량이 요구된다. 투여를 위한 면역원의 양은 때때로 환자당 1 μ g 내지 500 μ g 및 보다 대개는 인간 투여를 위해 주사당 5 내지 500 μ g으로 다양하다. 때때로, 주사당 1 내지 2 mg의 보다 높은 용량이 사용된다. 전형적으로 약 10, 20, 50 또는 100 μ g이 각각의 인간 주사에 사용된다. 주사 시기는 하루에 1회에서부터 1년에 1회, 10년에 1회까지 상당히 다양할 수 있다. 면역원의 투여량이 제공되는 임의의 정해진 날에, 상기 투여량은 항원보강제가 또한 투여되는 경우 1 μ g/환자 초과 및 대개는 10 μ g/환자 초과이고, 항원보강제의 부재 하에서는 10 μ g/환자 초과 및 대개는 100 μ g/환자 초과이다. 전형적인 섭생은 면역화에 이어서 6 주 간격의 추가 주사로 이루어진다. 또 다른 섭생은 면역화에 이어서 1, 2 및 12 개월 후의 추가 주사로 이루어진다. 또 다른 섭생은 평생 매 2 개월마다의 주사를 수반한다. 한편으로, 추가 주사는 면역 반응의 모니터링에 의해 지시되는 바와 같이 불규칙한 기준으로 있을 수 있다. 일부의 실시태양에서, 상기 활성 백신은 적합한 담체, 우선적으로는 KLH, 및 항원보강제로서 수산화 알루미늄으로 제형화될 것이다. 우선적으로는, 100 μ g 펩타이드/용량/환자(뿐만 아니라 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g 및 1 mg을 전-임상 단계에, 및 10 μ g, 100 μ g, 200 μ g을 I기 독성 연구에서 적용할 것이다)를 4 주에 1 회, 총 5 회 용량으로 적용할 것이다.

[0434] 면역원을 암호화하는 핵산에 대한 용량은 환자당 약 10 ng 내지 1 g, 100 ng 내지 100 mg, 1 μ g 내지 10 mg, 또는 30 내지 300 μ g DNA의 범위이다. 감염성 바이러스 벡터에 대한 용량은 용량당 10 내지 10^9 이상으로 다양하다. 치료를 시간에 따라 치료제에 대한 항체, 또는 활성화된 T-세포 또는 B-세포 반응을 분석함으로써 모니터링할 수 있다. 상기 반응이 실패하는 경우, 추가 용량이 지시될 수 있다.

[0435] 최종적으로, 상기 투여량 섭생은 주치의 및 임상적 인자에 의해 결정될 것이다. 의학 분야에 공지된 바와 같이, 임의의 한 환자에 대한 투여량은 다수의 인자들, 예를 들어 환자의 크기, 체표면적, 연령, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강, 및 동반 투여되는 다른 약물에 따라 변한다. 전형적인 용량은 예를 들어 0.001 내지 1000 mg의 범위일 수 있으나; 상기 예시적인 용량 이하 또는 이상의 용량, 특히 상기 언급한 인자들을 고려하여 구상된다. 일반적으로, 상기 약학 조성물의 규칙적인 투여로서의 상기 섭생은 하루에 1 mg 내지 10 mg 단위의 범위이어야 한다. 상기 섭생이 연속적인 주입인 경우, 상기 투여는 또한 각각 체중 킬로그램당 1 mg 내지 10 mg의 범위이어야 한다. 진행을 주기적인 평가에 의해 모니터링할 수 있다.

[0436] 또한, 다른 작용제의 동시-투여 또는 연속 투여가 바람직할 수 있다. 일부의 실시태양에서, 치료 유효 용량 또는 양은 상기 증상 또는 상태를 개선시키기에 충분한 활성 성분의 양을 지칭한다. 상기 투여와 같은 화합물의 치료 효능 및 독성을 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약학적 과정에 의해, 예를 들어 ED50(집단의 50%에서 치료학적으로 유효한 용량) 및 LD50(집단의 50%에 치명적인 용량)에 의해 측정할 수 있다. 치료효과와 독성 효과 간의 용량비가 치료 지수이며, 이를 비, LD50/ED50으로서 나타낼 수 있다. 일부의 실시태양에서, 상기 조성물 중의 치료제는 알츠하이머병 및 관련된 타우병증의 경우에 정상적인 행동 및/또는 인지 성질을 복원시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0437] 본 발명은 본 발명에 의해 제공되는 작용제들 중 어느 하나에 의한 치료 유효성의 평가에 따라 변할 수 있는 상이한 척도들을 제공한다. 예로서 비제한적으로 하나 이상의 병적인 타우 형태의 감소된 수준(예를 들어 뇌 내의), 뇌 및/또는 CSF로부터의 병적인 타우의 증가된 클리어런스; 개선된 인지 성능 척도, 예를 들어 인지 기능(예를 들어 임상적 치매 평가 - CDR, 알츠하이머병 평가 등급 - 인지 하위등급 - ADAS-Cog 소규모 정신 상태 검사 - MMSE에 의해 시험됨); 개선된 운동 기능 시험(예를 들어 잡기 강도 시험, 타이드 업 & 고(TUG) 시험, TUG 매뉴얼, 걸으면서 말하기 시험, 통합된 파킨슨병 평가 등급 - UPDRS); 일상 생활(ADL)의 기본 활동의 개선된 수행 시험(예를 들어 위생, 복장, 금욕, 식사, 음식물 준비, 전화걸기, 나들이, 재우, 및 통신; 치매 시험에서 불능 평가); 및 AD 손상된 잡기 강도의 줄어든 엄격성/등급, 이동성, 및 운동신경장애(하기 실시예에 개시된 동물

모델 및 분석과 직접적인 상관성을 갖는다), 기억력 감퇴, 실어증, 인지불능, 시간과 공간의 혼미, 및 우울증을 포함한다.

[0438] 치료 유효성의 평가를 위해서, 타우의 수준 및 분포(뇌 내 및 체액 중)를 본 발명에 개시된 방법들 중 어느 하나에 의해서, 및/또는 타우 검출에 이용 가능한 임의의 다른 방법들에 의해서 평가할 수 있다. 예를 들어, 타우의 수준을 신규의 영상화 방사능추적자 18F-THK523(이는 시험관 내, 생체외(조직 조각) 및 생체내(트랜스제닉 마우스)에서의 타우 및 타우 병리에 선택적으로 결합한다)을 사용하여 생체 내에서 측정할 수 있다(양전자 단층촬영)(문헌[Fodero-Tavoletti et al., 2011, Brain]). 타우를 전체 타우 또는 인-타우를 인식하는 ELISA 키트를 사용하여 뇌척수액 및 혈액 중에서도 또한 확인할 수 있었다.

[0439] 실제로, 트랜스제닉 래트에서 신경행동 손상은 알츠하이머병 환자에서 운동 장애와 대등하며, 상기 환자는 본 발명에서 제공된 치료제들(비제한적으로 능동 백신화제를 포함한다) 중 임의의 치료제에 의한 임상 시험 및 치료 프로토콜에 예상되는 결과를 갖는다. 인간에서, 알츠하이머병은 임상적으로 진행성 기억 장애 및 인지 감퇴, 행동 변화 및 정신적인 증상(기분, 감정, 식욕, 잠깨기 잠들기 주기, 혼란, 흥분 및 우울의 장애) 및 손상된 운동 기능(운동신경장애, 근육간대경련, 보행 장애, 감소된 근육 강도, 추체외로 특징, 예를 들어 운동완서, 강직 및 안정떨림)을 특징으로 한다(문헌[Goldman et al., 1999; Boyle et al., 2009]). 많은 연구들은 운동 징후가 알츠하이머병(AD)에서 통상적으로 관찰되고 상기 질병이 진행함에 따라 보다 현저해짐을 보고하였다(문헌[Goldman et al., 1999]; [Wilson et al., 2003]; [Louis et al., 2004]; [Pettersson et al., 2005]; [Scarmeas et al., 2004]; [Scarmeas et al., 2005]; [Waite et al., 2005]; [Alfaro-Acha et al., 2006]; [Wang et al., 2006]; [Buchman et al., 2007a]; [Boyle et al., 2009]). 현저하게, 알츠하이머병에서 상기 운동 징후는 인지 장애에 선행되며 인지 및 기능 감퇴, 보호시설로 보내기 및 사망을 예측할 수 있다(문헌[Morris et al., 1989]; [Soininen et al., 1992]; [Kraemer et al., 1994]; [Chui et al., 1994]; [Scarmeas et al., 2004]; [Scarmeas et al., 2005]). 감소된 근육 강도가 인지 장애의 발생에 선행하는 것으로 나타났다(문헌[Buchman et al., 2007b]; [Boyle et al., 2009]).

[0440] AD에서 운동 징후의 발생은 뇌줄기에서의 신경 퇴행 및 신경 손실과 관련되었다(문헌[Zarow et al. 2003]; [Burns et al. 2005]; [Grudzien et al. 2007]; [Simic et al., 2009]; [Wai et al., 2009]; [Braak and DelTredici, 2011]). 더욱이, 여러 연구들은 신경섬유 퇴행이 뇌줄기에서 기원하고 퍼질 신경퇴행에 선행함을 암시하였다(문헌[Hertz, 1989]; [Simic et al., 2009]; [Braak and DelTredici, 2011]).

[0441] 이러한 발견은 운동 장애가 AD 병인에서 핵심적인 특징을 나타냄을 보인다. 더욱이, 일부 운동 도메인의 기능 손상이 치매에 선행하고 인지 감퇴를 예측한다. 본 발명에 개시된 펩타이드(치료 에피토프 포함)에 의한 능동 면역요법은 인간 병적인 타우를 발현하는 트랜스제닉 래트의 운동 장애를 개선시킬 수 있다. 따라서, 능동 면역요법에 의한 상기 뇌줄기 병리학의 직접적인 표적화는 인간 AD 환자에게서 운동뿐만 아니라 인지 장애를 예방하거나, 늦추거나, 또는 지연시킬 수 있다. 따라서, 운동 기능의 시험을 본 발명에 개시된 작용제들(예를 들어 타우 클리어런스제, 능동 및 수동 백신)의 임상 효능의 평가에 사용될 수 있는 종합 시험에 포함시킬 수 있다.

[0442] 또한, 당해 분야의 통상적인 숙련가는 병적인 타우(예를 들어 퍼질/해마 중의 NFT)의 수준 및 분포와 질병 진행 간에 잘-확립된 상관성을 알고 있다. 병적인 타우(NFT 병리학)의 밀도는 상기 알츠하이머병의 중증도 및 인지 감퇴와 상관되었다(문헌[Braak and Braak, 1991]; [Bierer et al., 1995]; [Berg et al., 1998]; [Duyckaerts et al., 1998]; [Giannakopoulos et al., 1998, 2003]). 내비상 퍼질 및 해마 중의 병적인 타우(예를 들어 NFT, 신경망 쓰레드)는 기억의 종단적 변화와 역으로 관련된다(문헌[Reitz et al., 2009]). 유사하게, 뇌줄기에서, 병적인 타우(NFT)는 매우 초기 단계에서는 배후 술기 핵 중에 존재하고; 다른 술기 핵은 후속으로 영향을 받는다. 이들 병변은 AD에서 발견되는 세로토닌작동성 결손을 설명한다(문헌[Duyckaerts et al., 2009]). 상기 추체외로 증상들은 흑질 타우 병리학과 상관되었다(문헌[Liu et al., 1997]). 따라서, 이들 AD 분포 패턴들 중 하나 이상에 영향을 미칠 수 있는 치료제는 마찬가지로 AD에서도 이로온 효과를 가질 것이다.

[0443] 실시예

[0444] 실시예 1: 재조합 인간 타우 단백질의 제조

[0445] 인간 완전길이 타우(2N4R, 2N3R) 및 타우 결실 돌연변이체: 타우 재조합 단백질(도 1 및 6)을 클론 T40(문헌[Goedert, 1989])으로부터 생성시켰으며, 이를 발현 플라스미드 pET-17b(노바젠(Novagen)) 내로 서브클로닝하고 세균에서 발현시켰다. 각각의 타우 결실 돌연변이체를 DNA-서열화에 의해 확인하였다. 모든 타우 결실 돌연변이체 및 타우 펩타이드를 가장 긴 인간 타우 동형단백질 2N4R(이는 길이가 441 아미노산이고 따라서 또한 타우

441라 칭한다)에 따라 넘버링한다(문헌[D'Souza, 2005]). 상기 동형단백질 2N3R로부터 유도된 타우 결실 돌연변이체 및 펩타이드를 두 번째 미세소관 결합 반복부(2N4R의 아미노산 275-305)가 결실됨을 가리키기 위해서 "3R"로 표시한다. 타우 단백질의 생성은 하기 단계를 수반하였다: a) 세균에서 타우의 발현; b) 이온 교환 크로마토그래피에 의한 타우 정제; c) 젤-여과에 의한 타우 정제; d) 단리된 타우의 농축 및 보관; 및 e) 면역친화성 정제(이는 미세아교세포 흡수 실험에 사용된 타우 Δ(1-150;392-441)/4R에 대해서만 채택된 예외이다, 실시예 10, 도 17 참조).

[0446] a) 인간 완전길이 타우(2N4R 또는 2N3R) 및 재조합 타우 결실 돌연변이체의 세균 발현: 인간 타우(상기) 발현 플라스미드를 에스케리키아 콜라이(이 콜라이), 생산 균주 BL21(DE3) 내로 형질전환시켰다. 적합한 발현 플라스미드를 함유하는 세균 세포를 배양하고 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook and Russell (2001)]에 개시된 바와 같이 유도하였다. 타우 단백질 또는 그의 단편의 발현을 구동하는 pET-17b 플라스미드로 형질전환된, BL21(DE3) 세균의 단일 콜로니를 37 °C에서 100 μg/ml 암피실린이 있는 500 ml의 루리아 브로쓰 배지 중에서 300 rpm으로 증식시키고 0.4 mM의 최종 농도로의 아이소프로필-β-D-1-티오갈락토포라노사이드(IPTG)의 첨가에 의해 유도하였다. 37 °C에서 3 시간 동안 추가로 배양 후에, 세균을 4 °C에서 15 분간 3,000 x g에서 원심분리에 의해 수거하였다.

[0447] b) 염기성 및 중성 타우 단백질(완전길이 타우 동형단백질, 타우 Δ358-441, 타우 Δ306-400, 타우 Δ421-441, 타우 Δ300-312, 타우 Δ134-168, 타우 Δ1-220, 타우 Δ1-126, 타우 Δ(1-150; 392-441)/4R, 타우 Δ(1-150; 392-441)/3R 및 타우 Δ(1-296;392-441)/4R)의 양이온-교환 크로마토그래피 정제를 필수적으로 앞서 개시된 바와 같이 수행하였다(문헌[Krajciova et al., 2008]). 발현 후에, 세균 펠릿을 10 ml의 용해 완충제(50 mM 1,4-피페라진다이에탄설폰산(PIPES) pH 6.9, 50 mM 염화 나트륨(NaCl), 1 mM 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), 5 mM 다이티오쓰레이톨(DTT), 0.1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF), 5%(v/v) 글리세롤) 중에 재현탁시키고, 액체 질소에서 급속히 동결시키고 타우 단백질의 정제에 사용될 때까지 -80 °C에서 보관하였다. 타우 단백질 정제를 위해서, 상기 동결된 세균 현탁액을 급속히 해동시키고 얼음 상에 놓았다. 세균 세포벽을, 50% 사용률, 50 W 전력 출력, 30 s 중지와 함께 30 s 동안 6 회로 설정한 소노펄스(Sonopuls) HD 2200, 팁 TT-13(반델린(Bandelin), 독일 소재)을 사용함으로써 얼음 상에서 초음파처리하여 파괴시켰다. 상기 용해물을 원심분리(4 °C에서 15 분간 21,000 x g)에 의해 등명화하고 상등액을 0.45 μm 멤브레인 필터를 통해 여과하였다. 상기 재조합 타우 단백질의 대규모 정제를 AKTA-FPLC 워크스테이션(에머삼 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences), 스웨덴 소재)를 사용하여 6 °C에서 수행하였다. 상기 여과된 용해물을 3 ml/분의 유속으로, 용해 완충제로 평형화시킨 5-ml HiTrap SP HP 컬럼(GE 헬쓰케어, 스웨덴 옅살라 소재) 상에 로딩하고, 280 nm에서의 기준선이 안정해질 때까지 60 ml의 용해 완충제로 광범위하게 세척하였다. 결합된 타우 단백질을 완충제 B(1M NaCl이 보충된 용해 완충제)의 구배(15 ml 내에서 0 내지 30%)에 의해 용리시켰다. 개별적인 1 ml 분획들을 수거하고 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분석하였다. 핵산을 제거하기 위해서, 양으로 하전된 타우 단백질과 함께 정제시키고, 타우 단백질을 함유하는 분획을 모으고 덜 가파른 구배의 완충제 B(45 ml 중의 0 내지 30%)를 갖는 5-ml HiTrap SP HP 컬럼(GE 헬쓰케어, 스웨덴 옅살라 소재)을 사용하여 두 번째 양이온-교환 크로마토그래피 단계에 의해 정제시켰다.

[0448] c) 산성 타우 단백질(타우 Δ222-427, 타우 Δ228-441, 타우 Δ257-400, 타우 Δ137-441, 타우 Δ283-441)의 음이온-교환 크로마토그래피 정제를 앞서 개시된 바와 같이 수행하였다(문헌[Csoikova et al., 2004]). 발현 후에, 세균 펠릿을 10 ml의 히스티딘 용해 완충제(20 mM 히스티딘, pH 6.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 및 5%(v/v) 글리세롤) 중에 재현탁시켰다. 세균 세포벽을, 50% 사용률, 50 W 전력 출력, 30 s 중지와 함께 30 s 동안 6 회로 설정한 소노펄스 HD 2200, 팁 TT-13(반델린, 독일 소재)을 사용함으로써 얼음 상에서 초음파처리하여 파괴시켰다. 상기 용해물을 원심분리(4 °C에서 15 분간 21,000 x g)에 의해 등명화하였다. 세균 용해물을 1% 스트렙토마이신 설페이트(메덱스포트(Medexport), 러시아 소재)에 의해 침전시키고, 얼음 상에서 5 분간 배양하고, 원심분리(4 °C에서 15 분간 21,000 x g)에 의해 등명화하고 0.45 μm 멤브레인 필터를 통해 여과하였다. 상기 여과된 스트렙토마이신 침전된 용해물을 3 ml/분의 유속으로 5-ml HiTrap Q세파로스 HP 컬럼(에머삼 바이오사이언시즈, 스웨덴 소재) 상에 로딩하고, A280에서의 기준선이 안정해질 때까지 30 내지 50 ml의 히스티딘 용해 완충제로 광범위하게 세척하였다. 타우 단백질을 히스티딘 용해 완충제 중의 2-단계 염 구배(40 ml 중의 0.05 내지 0.5 M NaCl에 이어서, 20 ml 중의 0.5 내지 1 M NaCl)로 용리시켰다.

[0449] d) 정제의 최종 젤-여과 단계(모든 타우 단백질들에 대해서 동일함)에서, 이온 교환 크로마토그래피에 의해 수득된 모든 타우 단백질 분획들을 100 mM NaCl이 보충된, 각각 염기성/중성 또는 산성 타우 단백질에 대해 PIPES 또는 히스티딘 용해 완충제 중의 젤-여과 컬럼(하이로드(HiLoad) 26/60 슈퍼덱스(Superdex) 200 준비 등급

컬럼, GE 헬스케어) 상에 3 ml/분으로 주입하였다. 용리된 타우 단백질들을 모았다.

[0450] e) 젤-여과 정제 후 타우 단백질 농도에 대해서, 모든 분획들을 1.5 부피의 2.5% 글리세롤로 희석하고 다시 HiTrap SP HP 컬럼(염기성 및 중성 타우 단백질) 또는 HiTrap Q HP 컬럼(산성 타우 단백질) 상에 로딩하였다. 이어서 상기 농축된 재조합 타우 단백질을 상기 컬럼으로부터 1 M NaCl 단계 구배로 용리시켰다. 최종적으로, 상기 완충제를 5 ml HiTrap 탈염 컬럼(GE 헬스케어)을 사용하여, 포스페이트-완충된 염수(PBS, 8.09 mM 이나트륨 포스페이트(Na_2HPO_4), 1.47 mM 칼륨 이수소 포스페이트(KH_2PO_4), 136.89 mM NaCl, 아르곤으로 포화된 2.7 mM 염화 칼륨(KCl))로 교환하였다. 정제된 샘플의 단백질 정량분석을 표준으로서 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여, 바이신코닌산(BCA) 정량분석 키트(피어스(Pierce), 미국 소재)를 사용하여 수행하였다. 타우 단백질들을 실행 분액으로 분액하고, 액체 질소에서 급속 동결시키고, -70°C 에서 보관하였다.

[0451] f) 미세아교세포에 의해 흡수된 타우의 측정(실시에 10, 도 17)에 사용된 재조합 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 로부터 가능한 세균 오염물질을 제거하기 위해서, 상기 재조합 타우 단백질을 하기와 같이 변형된 방법에 의해 정제시켰다. 첫 번째 양이온-교환 크로마토그래피 단계 후에, 타우를 함유하는 분획들을 모으고 빙냉 5% 폴리에틸렌이민의 1/20 부피를 교반하면서 가하였다. 상기 교반을 추가로 30 분간 얼음 상에서 계속하였다. 상기 샘플을 4°C 에서 15 분간 $20,000 \times g$ 에서 원심분리시켰다. 상등액을 수거하고, 100 mM NaCl이 보충되었지만 DTT 또는 어떠한 다른 환원제도 없는 PIPES 용해 완충제 중에서 3 ml/분으로 하이로드 26/60 슈퍼텍스x 200 준비 등급 컬럼(GE 헬스케어) 상에 주입하였다. 젤 여과 후에, 타우 단백질을 갖는 분획들을 모으고 CNBr-활성화된 세파로스 상에 고정화된 DC25 항체(2N4R 타우의 에피토프 347-353, 액손 뉴로사이언스(Axon Neuroscience), 오스트리아 비엔나 소재)를 함유하는 면역친화성 컬럼 상에 로딩하였다(0.5 ml/분의 유속으로). 상기 컬럼은 20 mM 트리스-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20(TBS-트윈) 중에서 예비-평형화되었다. 결합 후에, 상기 컬럼을 5 컬럼 부피의 TBS-트윈으로 세척하고 결합된 타우 단백질을 0.1 M 글리신, pH 2.7로 용리시켰다. 상기 수거된 분획들을 1/30 부피의 1 M 트리스-HCl pH 8.8을 가하여 중화시키고 모았다. 마지막으로, 상기 완충제를 HiTrap 탈염 컬럼, 5 ml(GE 헬스케어)을 사용하여 PBS(아르곤으로 포화된)으로 교환하였다. 정제된 샘플의 단백질 정량분석을, 표준으로서 BSA를 사용하여, 바이신코닌산(BCA) 정량분석 키트(피어스, 미국 소재)를 사용하여 수행하였다. 상기 단백질들을 실행 분액으로 분액하고, 액체 질소에서 급속 동결시키고, -70°C 에서 보관하였다.

[0452] 상기 DC25 친화성 컬럼(상기)에 사용된 정제된 DC25 항체(액손 뉴로사이언스, 오스트리아 비엔나 소재)를 하기와 같이 제조하였다. 무혈청 DC25 하이브리도마 배양 상등액을, 0.2 부피의 PBS를 가하여 pH 7.5로 조정하고, 4°C 에서 10 분 동안 $20,000 \times g$ 에서 원심분리에 의해 예비등명화하고, 상기 상등액을 0.2 μm 필터를 통해 여과하였다. 상기 예비-등명화된 DC25 하이브리도마 배양 상등액을 PBS-평형화된 HiTrap 단백질 G HP 컬럼(5 ml, GE 헬스케어) 상에 1 ml/분으로 로딩하였다. 로딩을 완료한 후에, 상기 컬럼을 4 컬럼 부피의 PBS로 세척하고, 결합된 항체를 100 mM 글리신 pH 2.7로 용리시켰다. 용리된 분획들을 1 M 트리스-HCl pH 9로 중화시키고, 모으고, 완충제를 HiTrap 탈염 컬럼(5 ml, GE 헬스케어)을 사용하여 PBS로 교환하였다. 상기 정제된 DC25 항체를 작은 분액들로 -70°C 에서 보관하였다.

[0453] 실시예 2: 인간 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대한 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주의 제조, ELISA에 의한 단클론 항체의 선별, 및 단클론 항체 DC8E8의 초기 특성화

[0454] 6-주된 Balb/c 마우스를 완전 프로인트 항원보강제(SIGMA) 중에서 50 μg 의 재조합 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ (실시에 1에 개시된 바와 같이 제조됨)로 피하 프라이밍하고, 불완전 프로인트 항원보강제 중의 동일 항원 50 μg 으로 5 주 간격으로 5 회 추가접종하였다. 융합 3일 전에, 마우스에게 PBS 중의 동일 항원 50 μg 을 정맥내 주사하였다. 면역된 마우스로부터 비장 세포를 문헌[Kontsekova et al.(1988)]의 방법에 따라 NS/O 골수종 세포와 융합시켰다. 비장세포(10^8)를 2×10^7 NS/O 골수종 세포와 혼합하고(비 5:1), 10% 다이메틸 설펝사이드가 보충된 무혈청 둘베코의 변형된 이글 배지(DMEM) 중의 50% 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 1550(세르바(Serva)) 1 ml 중에서 1 분간 융합시켰다. 상기 융합된 세포를 96-웰 플레이트 상에서 웰당 2.5×10^5 비장 세포의 밀도로, 20% 말 혈청, L-글루타민(2 mM), 하이포잔틴(0.1 mM), 아미노프테린(0.04 mM), 티미딘(0.016 mM) 및 젠타마이신(40 U/ml)을 함유하는 DMEM 중에 재현탁시켰다. 상기 세포를 37°C 에서 10일간 배양하고 증식하는 하이브리도마를 효소-결합된 면역흡수 분석(ELISA)에 의해 항-타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ -특이성 단클론 항체의 생산에 대해 선별하였다.

[0455] ELISA를 사용하여 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ (타우의 오-무질서 형태)에 대한 하이브리도마 배양 상등액 중의 단

클론 항체를 검출하였다. 미세적정 플레이트를 PBS 중의 타우Δ(1-150;392-441)/4R(5 μg/ml, 50 μl/웰)로 37 °C에서 밤새 코팅하였다. 1% 무지방 분유로 차단하여 비특이적 결합을 감소시킨 후에, 상기 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 세척하고 37 °C에서 1 시간 동안 50 μl/웰의 하이브리도마 배양 상등액과 함께 배양하였다. 결합된 단클론 항체를 양고추냉이 페록시다제(HRP, DAKO)와 접합된 양 항-마우스 면역글로불린(Ig)으로 검출하였다. 상기 반응을 페록시다제 기질로서 오쏘페닐렌다이아민 용액으로 전개시키고 50 μl의 2 M H₂SO₄로 정지시켰다. 492 nm에서의 흡광도를 멀티스캔 MCC/340 ELISA 판독기(랩시스템스(Labsystems))를 사용하여 측정하였다. 음성 대조군(PBS) 값의 2 배 이상의 흡광도 값 판독결과를 양성으로 간주하였다. 양성 하이브리도마 배양물을 면역조직화학(문헌[Zilka et al., 2003]에 따라)에 의해 추가로 시험하고 문헌[Kontseikova et al.(1991]에 개시된 과정에 따라 연결 아가에 서브클로닝하였다.

[0456] 상기 단클론 항체 DC8E8(2011년 7월 13일자로 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에, ATCC 특허 기탁명 PTA-11994로 기탁된 마우스 하이브리도마 세포주에 의해 생산된)을 상기와 같이 생성된 양성 하이브리도마 배양물 중에서 확인하고 선택하였다. DC8E8을 하기에 개시하는 바와 같이 추가로 특성화하였다. 상기 항체 아이소타입은 마우스 Ig 아이소타이핑 키트(ISO-2, SIGMA)를 사용하여 ELISA에 의해 쥐 IgG1인 것으로 측정되었다.

[0457] 실시예 3: DC8E8의 가변 영역의 서열화 및 CDR-그래프트화에 의한 그의 인간화

[0458] a) DC8E8의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열의 측정(도 3). DC8E8의 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열(도 3A 및 3D)을 마우스 하이브리도마 세포주 PTA-11994(ATCC)(상기 DC8E8 단클론 항체를 발현한다)로부터 추출된 전체 RNA를 사용하여 합성된 cDNA의 DNA 서열화에 의해 측정하였다. 전체 RNA를 트리졸(TRIZOL)(등록상표) 시약(인비트로젠, 미국 소재)을 사용하여 추출하였다. 첫 번째 가닥 cDNA의 합성을 제조사의 프로토콜(어플라이드 바이오시스템스, 미국 소재)에 따라 "고성능 cDNA 역 전사" 키트를 사용하여 수행하였다. 2x 역전사 마스터-믹스를 위한 시약들의 조성은 하기와 같았다(20 μl 반응당 분량): 2 μl의 10x RT 완충제; 0.8 μl의 25x dNTP 믹스 (100 mM); 2 μl의 10x RT 무작위 프라이머 (50 μM); 1 μl의 멀티스크라이브(MultiScribe)(상표) 역전사효소 (50 U/μl); 4.2 μl의 뉴클레아제-부재 H₂O. 역전사를 위해서, 10 μl의 상기 2x 역전사 마스터-믹스를 RNA 샘플(2 μg/10 μl)과 혼합하고 cDNA를 하기의 조건 하에서 합성하였다: 25 °C에서 10 분, 37 °C에서 120 분, 85 °C에서 5 분, 및 4 °C로 최종 냉각. 상기 경쇄 및 중쇄의 가변 영역들을 암호화하는 유전자들의 증폭을 퓨전(Phusion)(등록상표) 하이-피델리티(High-Fidelity) DNA 폴리머라제(핀자임스(Finnzymes), 핀란드 소재)를 사용하여 폴리머라제 체 반응(PCR)에 의해 수행하였다. 순방향 프라이머(8E8L-센스 5' -ACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCC-3' (서열번호 132) 및 8E8H-센스 5' -CTCCTCCAATTGCAGCAGTCTGG-3' (서열번호 133))를 DC8E8 경쇄 (DIVMSQSPSS) (서열번호 134) 및 중쇄 (QVQLQQSGPE)의 N-말단 단부의 단백질 서열화에 따라 설계하였다. 상기 N-말단 단백질 서열을 에드만(Edman) 분해(경쇄) 및 MALDI 인-소스 붕괴(중쇄)를 사용하여 측정하였다. 상기 정보를 사용하여, 상기 경쇄 및 중쇄에 가장 유사한 단백질들을 진뱅크(Genebank)에서 그들의 상응하는 뉴클레오타이드 서열과 함께 확인하였다. 이어서 마우스 V-유전자(경쇄 및 중쇄)의 가장 있음직한 뉴클레오타이드 서열을 IMGT/LIGM-DB 데이터베이스(www.imgt.org)에서 확인하였다. 이들 유전자를 순방향 프라이머의 설계에 사용하였다(DC8E8의 N-말단 단백질 서열을 사용하여 보정을 수행하였다). 경쇄 및 중쇄의 역방향 프라이머(카파-안티센스 5' -GGAATTCGTTGAAGCTCTTGACAATGGGTG-3' (서열번호 136) 및 G1-안티센스 5' -GGAATTCACATATGAAGGCTTACAACCAC-3 (서열번호 137))는 각각 카파 및 IgG1 체 불변 영역으로부터 유도되었다.

[0459] 상기 PCR 산물들을 서열화하고 DC8E8의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역의 생성되는 DNA 서열을 각각 도 3A 및 3D에 나타낸다. 가장 가까운 마우스 생식계열 경쇄 IGKV8-21*01 및 중쇄 IGHV1-81*01에 대한 DC8E8의 정렬을 각각 도 3C 및 3F에 나타낸다. 상보성 결정 영역(CDR)을 DC8E8 경쇄 및 중쇄 단백질 서열에서 밀줄 그었다(각각 도 3B 및 3E). CDR 및 프레임워크 영역(FR)을 임뮤노젠 틱스(ImMunoGene Tics)(IMGT) 넘버링 시스템에 따라 확인하였다(예를 들어 문헌[Lefranc M.P. The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T-cell receptors, and Ig-like domains. The Immunologist 7, 132-136, 1999 (1999)]을 참조하시오).

[0460] b) DC8E8의 인간화. 마우스 DC8E8 상보성 결정 영역(CDR)의 그래프트화를 통해 인간화된 DC8E8의 생성을 위한 적합한 후보 인간 면역글로불린을 확인하기 위해서, DC8E8과 가장 높은 서열 일치성을 갖는 인간 생식계열 유전자를, IMGT/LIGM-DB 플랫폼 파일 방출 201112-6(www.imgt.org)로부터 추출된 인간 면역글로불린 유전자의 선택된 조합에 대한 상기 DC8E8 뉴클레오타이드 서열의 클러스탈(Clustal)x2 짝 정렬을 사용하여 측정하였다. IgKv4-1*01이 상기 DC8E8 경쇄에 가장 가까운 인간 생식계열 유전자(도 4)로서 확인되었고, IGHV1-69*10은 상기 DC8E8

중쇄에 가장 가까운 생식계열 유전자(도 5)로서 확인되었다. 하기의 접근법(방법 1 및 방법 2)을 설계하고 사용하여 상기 8E8 항체의 하나 이상의 인간화된 버전을 제조할 수 있다. 적합한 항체 발현 시스템(예를 들어 시협관내(예를 들어 HEK293 세포) 또는 생체내(트랜스제닉 동물) 항체 발현에 사용되는 포유동물 발현 벡터)에서 발현 후에, 생성되는 인간화된 재조합 항체들을, DC8E8의 활성의 특성화에 사용되는 방법들 중 어느 하나에 따라 활성(예를 들어 생화학 및 치료 활성)에 대해 시험할 수 있다.

[0461] 방법 1: CDR 그래프트화 및 필요한 경우 프레임워크 영역(FR)에서의 돌연변이(CDR은 굵게 밑줄을 긋고, FR 돌연변이는 굵게 나타낸다):

[0462] 중쇄 변 영역(나타낸 순서로, 각각 서열번호 138-140):

DC8E8_heavy QVQLQSQSGPELVKPGTSVKMPCKASGYIFTDYVISVWKQRTGGGLEWIGIEIPRSGSTYY
human_germ_heavy QVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSKASGGTFSSYALSWVRQAPGGGLEWVGIIPIILGIANY
**** *:*

SEQ ID No. 140 QVQLVQSGPEVKKPGSSVKVPCKASGYIFTDYVISWVRQATGQGLEWMGEIFPRSGSTNY

DC8E8_heavy
human_germ_heavy

NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSSEDSAVYFCARDYYGTSFAMDYWGQGTSVTVSS
AQKPGGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCARENHCYYYGMDVWGQGTITVTVSS
: **:* : * :***** : ***** : *** :*** :*** : : : ** ***** :*****

SEQ ID No.140 A Q K F Q G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D Y Y G T S F A M D Y W G Q G T T V T V S S

[0464] 경쇠 가변 영역(나타낸 순서로, 각각 서열번호 141-143):

```
DC8E8_light      DIVMSQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKESQSLNLSRTRKNYLAWYQQKPGQSPFKLLIYWASTR
human_germ_light DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPFPKLLIYWASTR
****.*..***** *.:*.*****+ * ..*****.*****
```

SEQ ID No.143 DIVNTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR

```
DC8E8_light      ESGVPDRFTSGSGSGTDFTLTITSSVQAEDLAVVYCKQSFYLRTPGGGTKLDIK
human_germ_light ESGVPDRFTSGSGSGTDFTLTITSSVQAEDLAVVYCCQYYSTLTPGGGTKVEIK
*****
```

SEQ ID No: 143 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCKQSFYLRITFGGGTKVEIK

[0466] 방법 2: DC8E8과 최고의 서열 일치성을 갖는 마우스(도 3) 및 인간(도 4 및 5) 생식계열 면역글로불린이 발견되었고 이를 상기 8E8 단백질 서열에 정렬시켰다. CDR 영역을 IMGT 넘버링 시스템에 따라 확인하였다. 상기 DC8E8 결합 부위 내에 가장 있음직한 항원-접촉 잔기들이 논문[MacCallum et al, J. Mol. Biol. 1996]을 근거로 확인되었다.

[0467] DC8E8의 인간화된 버전에서 돌연변이에 대한 다양한 아미노산 후보들이 하기의 조합된 기준들을 근거로 확인되었다:

[0468] i. CDR 중의 그들의 존재 및 항원과의 접촉 확률

[0469] ii. 버니어 대역 중의 그들의 존재

[0470] iii. 이들이 마우스 생식계열에서 돌연변이되었는지의 여부

[0471] 돌연변이 후보들의 2 개의 수준을 상기 기준에 따라 확인하였다:

[0472] X-유형 잔기(굵게):

[0473] - DC8E8과 가장 가까운 마우스 생식계열간에 상이한 잔기들, 비-유사 아미노산

[0474] - CDR 및 접촉 항원 중의 잔기들. CDR은 하기 DC8E8 서열 중에 소문자로, 굵은 이탤릭체이다.

[0475] Y-유형 잔기(굵게 밑줄그은):

[0476] - DC8E8과 가장 가까운 마우스 생식계열간에 동일하지만, 가장 가까운 인간 생식계열에 차이가 있고 버니어 대역에 위치하는 잔기들(비-유사 아미노산)

[0477] - DC8E8과 가장 가까운 마우스 생식계열간에 상이한 잔기들(유사한/보존된 아미노산)

이 인간 타우상의 4 개의 결합 부위 또는 에피토프를 가지며, 이들은 각각 상기 타우 단백질의 미세소관-결합 반복 도메인 영역 중에 위치하고 상기 에피토프들은 각각 하기의 타우 서열들 중 하나 내에 위치함을 암시한다: 267-KHQPGGG-273 (서열번호 98) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 298-KHVPGGG-304 (서열번호 99) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (서열번호 100) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인) 및 361-THVPGGG-367 (서열번호 101) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내)(도 7D). 더욱이, DC8E8은 완전 길이 3-반복부 및 4-반복부 타우보다 절두된 형태의 타우에 더 잘 결합하기 때문에, 상기 결과는 또한 DC8E8이 생리학적 타우(타우39(2N3R) 및 타우40(2N4R))보다 질병 형태의 타우에 더 잘 결합함을 암시한다. 또한, 타우는 생리학적 타우(고유의 무질서)에서부터 질병 타우(오-무질서 및 오정렬된, Kovacech et al., 2010)로의 형태 변화가 고려되기 때문에, 상기 결과는 DC8E8에 대한 결합 부위들(DC8E8 에피토프) 중 하나 이상이 생리학적 타우에서, 질병 타우에서의 경우와 상이한 형태를 가지며 DC8E8은 상기 형태적 변화를 검출할 수 있음을 암시한다.

[0489] 이들 타우 반복 도메인은 종들을 교차하여 보존되기 때문에(도 8A), DC8E8은 래트, 마우스, 소, 침팬지, 개구리 등과 같은 다양한 종들로부터의 타우 단백질에 대해 반응하는 듯하다. 다양한 동물 종들의 타우 단백질들의 정렬을 소프트웨어 클러스탈/W2(예를 들어 www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/에서 입수할 수 있다)를 사용하여 수행하였다. 인간 타우는 인간 뇌 뉴런에서 발견되는 가장 긴 타우 동형단백질(2N4R, 441 아미노산)로 표현된다. 다른 종들의 타우 단백질을 공개된 데이터베이스로부터 선택하였다. DC8E8 항체에 의해 인식된 상기 4 개의 에피토프들 각각이 위치하는 서열들을 네모 안에 나타낸다.

[0490] 추가적인 점 돌연변이 및 결실을 몇몇 타우-유도된 펩타이드(8-머, 9-머, 및 10-머)에 대해 수행하여, DC8E8에 결합하기 위해 타우 Δ (1-150;392-441/4R)과 경쟁하는 각 펩타이드의 능력에 의해 평가되는 바와 같이, DC8E8 에피토프를 추가로 정의하였다. 펩타이드를 85% 초과와 순도로 이지바이오랩(미국 소재)에 의해 합성하였다. 경쟁 ELISA를 하기의 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. ELISA 플레이트(이와키(IWAKI) 고 결합 플레이트, #3801-096, 베르토니 게엠베하(Bertoni GmbH), 오스트리아 소재)를 100 μ l/웰의 BPS 중의 5 μ g/ml의 재조합 정제된 타우 Δ (1-150;392-441/4R)로 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 코팅하였다. 상기 이와키 고 결합 플레이트를 PBS/트윈 20(0.05% v/v)으로 4 회 세척하고, 25 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 PBS/트윈 20으로 차단시켰다. 상기 펩타이드들을 각각 PBS 중에 5 mM의 최종 농도로 별도로 용해시켰다. PBS/트윈 20 중의 상기 펩타이드의 일련의 희석물(2배)을 원추형 웰 기부를 갖는 폴리프로필렌 플레이트(그라이너(Greiner), #651201)에서 제조하였다(농도 범위 80 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 및 2.5 μ M). 100 μ l의 각각의 희석물을 웰당 가하였다. 정제된 DC8E8 단클론 항체(정제를 실시예 5에 개시된 바와 같이 수행하였다)를 PBS/트윈 20 중에서 2 μ g/ml의 농도로 희석하고 상기 희석된 항체 100 μ l를 펩타이드의 각각의 일련의 희석물과 혼합하여, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 및 1.25 μ M의 농도로 각각의 시험 펩타이드를 함유하는, 100 ng의 항체/100 μ l를 갖는 200 μ l 혼합물을 생성시켰다. 상기 항체/펩타이드 혼합물을 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 배양하였다. 100 마이크로리터(100 μ l)의 항체/펩타이드 혼합물을 상기 폴리프로필렌 플레이트로부터 타우 Δ (1-150;392-441/4R)-코팅되고 PBS/트윈 20-차단된 이와키 고 결합 플레이트로 옮기고, 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 PBS/트윈 20으로 4회 세척하였다. 상기 샘플들(상기 플레이트 중의)을 PBS/트윈 20 중에서 1:4,000으로 희석된 다클론 염소 항-마우스 면역글로불린/HRP(Dako, #P0447) 100 μ l와 함께 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 PBS/트윈으로 4 회 세척하였다. 이어서 상기 샘플/플레이트를 암실에서 25 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안, 1.5 μ l/2 ml의 30% H₂O₂(SIGMA, H-0904)가 보충된, 0.1 M Na-아세테이트 pH 6.0(Roth, #6779) 중의 o-PDA(o-페닐렌다이아민, SIGMA, P1526)의 1.5 mg/2 ml 용액 100 μ l와 함께 배양하였다. 상기 반응을 100 μ l의 2 M H₂SO₄(Merck, 1.00731.1000)를 가하여 정지시켰다. 상기 반응의 정도를 490 nm에서의 샘플/플레이트의 흡광도를 판독함으로써 추적하였다(예를 들어 빅터 멀티라벨 카운터(Victor Multilabel Counter)(왈락) 사용).

[0491] 도 8B는 하기 6 개 펩타이드들을 사용하여 수행된 경쟁 ELISA의 결과를 나타낸다: NIKAVPGGGS (서열번호 200), NIKHVPGGGS (서열번호 201), IKHVPGGGS (서열번호 202), KHVPGGGSV (서열번호 203), HVPGGGSVQ (서열번호 204), VPGGGSVQ (서열번호 205). 타우 치료 에피토프 #2를 포함하는 펩타이드 KHVPGGGSV (서열번호 203) 및 HVPGGGSVQ (서열번호 204)는 타우 Δ (1-150;392-441/4R) 상에 존재하는 원래의 치료 에피토프들 중 하나 이상과 경쟁하였다. 상기 서열번호 204의 에피토프로부터 밀줄 그은 히스티딘의 제거는 경쟁 활성을 상실시켰다(펩타이드 VPGGGSVQ, 서열번호 205 참조). 히스티딘에서 알라닌으로 변화시키는 점 돌연변이("에피토프 #2"에서, 상응하는 타우 위치 299에서)는 경쟁 활성을 상실시켰다(펩타이드 NIKAVPGGGS, 서열번호 200). "히스티딘 299"

앞(N-말단 방향으로)의 2 또는 3 개 아미노산을 함유하는 펩타이드는 또한 원래의 에피토프(각각 펩타이드 IKHVPGGGS (서열번호 202) 및 NIKHVPGGGS (서열번호 201))와 경쟁한다. 이러한 결과는 두 번째 타우 반복부(에피토프 #2) 내에 있는 DC8E8의 최소 에피토프가 6-머 서열, 즉 HVPGGG (서열번호 154) 내에 있음을 암시한다.

[0492] 상기 언급한 지도화 실험은 DC8E8 항체의 에피토프들 중 하나 이상 내의 아미노산 서열 PGGG의 존재를 암시하였다. 더욱 또한, 상기 아미노산 서열은 DC8E8에 의해 결합된 타우 단백질 상의 모두 4 개의 에피토프(서열번호 98, 99, 100, 101 참조) 중에 존재한다. 상기 DC8E8 에피토프의 N-말단 영역 중의 잔기들을 측정하기 위해서, 알라닌 스캐닝 실험을 타우 펩타이드 295-DNIKHVPGGGS-305 상에서 수행했으며, 상기 펩타이드는 타우의 두 번째 반복 도메인 내에 있는 DC8E8 에피토프(298-KHVPGGG-304, 서열번호 99 내의)를 포함한다.

[0493] DC8E8에 대한 상기 돌연변이 펩타이드의 결합 능력을, DC8E8에 결합하기 위해 타우 Δ(1-150;392-441/4R)와 경쟁하는 각 펩타이드의 능력에 의해 평가하였다. 7 개의 펩타이드를 85% 초과 순도로 이지바이오랩스(미국소재)에 의해 합성하였다: ANIKHVPGGGS (서열번호 144), DAIKHVPGGGS (서열번호 146), DNAKHVPGGGS (서열번호 149), DNIAHVPGGGS (서열번호 151), DNIKAVPGGG (서열번호 159), DNIKHAPGGGS (서열번호 161), 및 원래 서열 DNIKHVPGGGS (서열번호 171)을 갖는 펩타이드. 상기 경쟁 ELISA를 하기의 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. ELISA 플레이트(이와키 고 결합 플레이트, #3801-096, 베르토니 게엠베하, 오스트리아 소재)를 100 μl/웰의 BPS 중의 5 μg/ml의 재조합 정제된 타우 Δ(1-150;392-441/4R)로 4 °C에서 밤새 코팅하였다. 상기 이와키 고 결합 플레이트를 PBS/트윈 20(0.05% v/v)으로 4 회 세척하고, 25 °C에서 2 시간 동안 PBS/트윈 20으로 차단시켰다. 상기 펩타이드들을 각각 PBS 중에 5 mM의 최종 농도로 별도로 용해시켰다. PBS/트윈 20 중의 상기 펩타이드의 일련의 희석물(2배)을 원추형 웰 기부를 갖는 폴리프로필렌 플레이트(그라이너, #651201)에서 제조하였다(농도 범위 320 μM, 160 μM, 80 μM, 40 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 및 2.5 μM). 100 μl의 각각의 희석물을 웰 당 가하였다. 정제된 DC8E8 단클론 항체(정제를 실시예 5에 개시된 바와 같이 수행하였다)를 PBS/트윈 20 중에서 2 μg/ml의 농도로 희석하고 상기 희석된 항체 100 μl를 펩타이드의 각각의 일련의 희석물과 혼합하여, 160 μM, 80 μM, 40 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM, 및 1.25 μM의 농도로 각각의 시험 펩타이드를 함유하는, 100 ng의 항체/100 μl를 갖는 200 μl 혼합물을 생성시켰다. 상기 항체/펩타이드 혼합물을 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 100 마이크로리터(100 μl)의 항체/펩타이드 혼합물을 상기 폴리프로필렌 플레이트로부터 타우 Δ(1-150;392-441/4R)-코팅되고 PBS/트윈 20-차단된 이와키 고 결합 플레이트로 옮기고, 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 PBS/트윈 20으로 4회 세척하였다. 상기 샘플들(상기 플레이트 중의)을 PBS/트윈 20 중에서 1:4,000으로 희석된 다클론 염소 항-마우스 면역글로불린/HRP(Dako, #P0447) 100 μl와 함께 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 PBS/트윈으로 4 회 세척하였다. 이어서 상기 샘플/플레이트를 암실에서 25 °C에서 10 분 동안, 1.5 μl/2 ml의 30% H₂O₂(SIGMA, H-0904)가 보충된, 0.1 M Na-아세테이트 pH 6.0(Roth, #6779) 중의 o-PDA(o-페닐렌다이아민, SIGMA, P1526)의 1.5 mg/2 ml 용액 100 μl와 함께 배양하였다. 상기 반응을 100 μl의 2 M H₂SO₄(Merck, 1.00731.1000)를 가하여 정지시켰다. 상기 반응의 정도를 490 nm에서의 샘플/플레이트의 흡광도를 판독함으로써 추적하였다(예를 들어 빅터 멀티라벨 카운터(알라) 사용).

[0494] 도 8C는 하기 7 개 펩타이드들을 사용하여 수행된 경쟁 ELISA의 결과를 나타낸다: ANIKHVPGGGS (서열번호 144), DAIKHVPGGGS (서열번호 146), DNAKHVPGGGS (서열번호 149), DNIAHVPGGGS (서열번호 151), DNIKAVPGGG (서열번호 159), DNIKHAPGGGS (서열번호 161), 및 DNIKHVPGGGS (서열번호 171). 히스티딘에서 알라닌으로 변화시키는 점 돌연변이("에피토프 #2"에서, 상응하는 타우 위치 299에서)는 DC8E8에 결합하기 위해 타우 Δ(1-150;392-441/4R)과 경쟁하는 활성의 완전한 상실을 도출했다(펩타이드 DNIKAVPGGG, 서열번호 159). 아미노산 D,N,I,K 및 V를 알라닌으로 변화시킨 돌연변이는 각 돌연변이 펩타이드의 경쟁 활성을 완전히 없앴다(펩타이드 ANIKHVPGGGS (서열번호 144), DAIKHVPGGGS (서열번호 146), DNAKHVPGGGS (서열번호 149), DNIAHVPGGGS (서열번호 151), DNIKHAPGGGS (서열번호 161)). 이러한 결과는 두 번째 타우 반복부(에피토프 #2) 내에 있는 DC8E8의 최소 에피토프가 6-머 서열, 즉 HVPGGG (서열번호 154) 내에 있고 DC8E8은 HXPGGG (서열번호 164)에 결합함을 암시한다.

[0495] 실시예 5: DC8E8은 표면 플라즈몬 공명에 의해 평가된 바와 같이, 오-무질서 타우 Δ(1-150;392-441)/4R을 인식한다

[0496] 표면 플라즈몬 공명(SPR)을, 실시간으로 결합 사건을 직접 모니터링함으로써 단백질 결합의 검출 및 단백질 복합

체(예를 들어 항체-항원 복합체)의 열역학적 매개변수들의 측정에 사용할 수 있다. 상기 기술은 통상적으로 진단 및 치료 항체 모두를 특성화하는데 사용된다(예를 들어 문헌[Karlsson and Larsson, Affinity Measurement Using Surface Plasmon Resonance, in Methods in Molecular Biology, Vol. 248: Antibody Engineering: Methods and Protocols. Edited by: B. K. C. Lo © Humana Press Inc., Totowa, NJ, (2008)]을 참조하시오).

[0497] SPR 실험을 위해서, DC8E8 단클론 항체(mAb)를 하기와 같이, 단백질 G 친화성 컬럼 상에서 무혈청 하이브리도마 상등액으로부터 정제하였다. 상기 하이브리도마 상등액을 pH 7.5로 조절하고, 상기 용액을 원심분리에 의해 예비등명화시키고, 0.45 μm 멤브레인 필터를 통해 여과하고, 5 ml 단백질 G 세파로스 컬럼 상에 로딩하였다. DC8E8 mAb를 0.1 M 글리신-HCl, pH 7.2로 상기 컬럼으로부터 용리시켰다. 용출된 분획들을 1 M 트리스-HCl pH 9.0으로 바로 중화시켰다. 모든 분획들을 PBS에 대해 투석시키고, 한외여과에 의해 농축시키고, -70 °C에서 보관하였다. 상기 항체의 농도를 식 $c(\text{mg/ml}) = A_{280\text{ nm}}/1.43$ 을 사용하여, 280 nm에서 흡광도를 측정함으로써 측정하였다.

[0498] CM5 센서 칩(비아코어(Biacore) AB, 스웨덴 옉살라 소재)을 갖는 비아코어3000을 상기 SPR 분석에 사용하였다. 아민-커플링 시약(EDC, NHS, 에탄올아민 pH 8.5), P20 세제, 및 10 mM 나트륨 아세테이트 pH 5.0을 비아코어 AB로부터 수득하였다. 상기 실험을 실행 완충제로서 0.005%의 P20(PBS-P)를 사용하여 PBS pH 7.4 중에서 25 °C에서 수행하였다. 전형적으로, 5,000 RU(반응 단위)의 다클론 항-마우스 항체(No. Z 0420; 다코사이토테이션(DakoCytomation), 덴마크 글로스트롭 소재)를 pH 5.0에서 2 개의 유동 세포에서 동시에 1차 아민을 통해 커플링시켰으며, 이들 중 하나는 비교 측정으로서 사용되었다.

[0499] 각각의 분석 주기에서, 정제된 DC8E8을 230 내지 250 RU의 고정화 수준에 도달하도록 상기 분석학적 유동 세포에 포획시켰다. K_A 측정을 위해서, 타우 단백질(상기에 대해 DC8E8 친화성이 시험되었다) 또는 대조군으로서 PBS-P의 일련의 2 배 희석물을 센서 칩 상에 50 μl /분의 유속으로 주입하였다. 동역학적 결합 데이터를 문헌[Myszka, 1999]에 따라 이중 참조하고 BIA 평가 소프트웨어 4.1(비아코어 AB)에 의해 2-상 반응 모델에 맞추었다. 동역학적 속도 상수를 전체적으로 어렵하고, 최대 반응을 국소적으로 맞추고, 벌크 반응을 0으로 설정하였다.

[0500] 시험된 타우 단백질 각각에 대한 DC8E8의 친화성을 정량분석하기 위해서, 결합 평형 결합 상수(K_A)를 4 개의 반복 타우 단백질 동형단백질 2N4R, 3 개의 반복 타우 단백질 동형단백질 2N3R뿐만 아니라 오-무질서 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 오-무질서 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 에 대한 DC8E8 결합에 대해서 측정하였다. SPR에 사용된 모든 타우 단백질들은 실시예 1에 따라 제조되었다. DC8E8의 친화성은 4 개의 반복 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해서 가장 높았으며, 다음으로 완전 길이의 4 개의 반복 타우 동형단백질 2N4R, 이어서 3 개의 반복 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$, 및 마지막으로 3 개의 반복 완전길이 타우 동형단백질 2N3R의 순이었다(도 9A, B). 이러한 결과는 (1) 오-무질서 형태의 타우에 대한 DC8E8의 특이성, 및 (2) 완전길이 타우(즉 정상 또는 생리학적 타우)에 대한 오-무질서 타우(즉 질병 또는 병적인 타우)에 대한 DC8E8의 선택성을 입증하였다.

[0501] SPR을 사용하는 결합 사건들에 대한 실시간 모니터링은 DC8E8과 다수의 타우 단백질들 간의 결합(k_{ON}) 및 해리(k_{OFF})의 동역학적 속도의 측정을 가능하게 하였다. DC8E8의 결합 동력학은 생리학적 2N4R 타우와 비교 시, 오-무질서 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 에 대해 변경된 형태를 나타내었으며, 이는 상기 오-무질서 타우 단백질 중의 보다 용이하게 접근할 수 있는 DC8E8 에피토프(들)에 의해 지시된다. 이는 완전길이 대응물에 비해 상기 오-무질서 타우 단백질의 더 빠른 결합 및 더 높은 k_{ON} 에 의해 반영된다. 더욱이, 상기 4-반복 타우 단백질 종들 상의 DC8E8에 대한 잉여 결합 부위의 존재는, DC8E8과의 복합체로부터의 4R 타우 종들의 10 배 더 느린 해리 및 상응하는 10 배 더 낮은 k_{OFF} 를 생성시켰다(도 10A, B; 파선은 컴퓨터 프로그램 BIAEvaluation v4.1을 사용하는 동역학적 매개변수 계산에 의해 측정된 데이터로부터 보간되었다).

[0502] **실시예 6: DC8E8은 인간 알츠하이머병 뇌에서 신경섬유 퇴행의 모든 발생 단계들을 인식한다**

[0503] 인간 뇌 조직(파라핀 블록상의)을 네덜란드 뇌 은행으로부터 수득하였다. 상기 블록을 마이크로톰상에서 절단하였다. 알츠하이머병 뇌(브락의 단계 VI) 및 비-치매 대조군(브락의 단계 I 및 III)으로부터의 해마-내비상피질의 파라핀-섹션(8 μm)을 실온(25 °C)에서 1 분간 저온(+4 °C) 99% 폼산으로 처리하였다. 상기 조직섹션을 차단 용액(50 nM 트리스-HCl 중의 5% BSA, 0.3% 트리톤 X-100) 중에서 및 이어서 정제된 1차 항체 DC8E8(7.8 mg/ml; 실시예 5에 개시된 바와 같이 제조됨)(차단 용액 중에서 1:2,000으로 희석되었다)과 함께 밤새 배양하였다. 후속으로, 상기 섹션들을 실온에서 1 시간 동안 비오틴화된 2차 항체(벡타스테인 엘리트 ABC 키트(Vectastain Elite ABC Kit), 벡터 레보라토리즈(Vector Laboratories))와 함께 배양하고, 이어서 60 분 동안 아비딘-비오

틴 페록시다제-복합체(벡타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)와 반응시켰으며, 모두 실온(25 °C)에서 수행되었다. 상기 면역반응을 페록시다제 기질 키트(벡터 VIP, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 소재)로 가시화하고 메틸 그린(벡터 레보라토리즈)으로 대조염색시켰다. 상기 섹션들을 올림푸스(Olympus) BX71 현미경으로 검사하였다.

[0504] 단클론 항체 CD8E8은 전임상 AD, 임상적으로 초기의 AD, 및 완전히 발병된 AD의 최종 단계를 식별하였다. 면역조직화학 연구는 DC8E8이 인간 전임상 AD - 브락의 단계 I에서 병적인 타우의 초기 단계(타우 단량체, 이량체)를 검출함을 보였다(도 11A). 상기 뇌는 내비상피질 중에 단지 제한된 수의 신경섬유매듭(NFT)만을 함유하고 해마에는 NFT가 없다(브락의 단계 I). 임상적으로 초기의 AD 뇌에서, 소수의 NFT가 해마에서 발견된 경우에(브락의 단계 III), 상기 DC8E8 mAb는 병적인 타우 올리고머(화살표)의 단계와 병적인 타우 중합체(매듭)의 단계 모두를 인식하였다(도 11B). 완전히 진행된 알츠하이머병 뇌에서, 광범위한 신경섬유 퇴행이 존재하는 경우, DC8E8은 주로 신경섬유매듭, 신경염 플라크 및 신경망 쓰레드 형태의 병적인 타우 중합체들을 인식한다(도 11C). 따라서, mAb DC8E8은 단량체, 이량체, 초기-올리고머 단계(도 11D1) 및 말기-올리고머 전-매듭 단계(도 11D2)뿐만 아니라 병적인 타우 중합체의 발생 단계 - 세포내(도 11D3) 및 세포외 신경섬유매듭(도 11D4)을 포함하여, 인간 알츠하이머병 뇌 조직 중의 모든 발생 단계의 신경섬유 병변들을 인식한다. 이러한 mAb DC8E8의 반응성은 따라서 상기 항체의 진단 및 치료 용도 모두에 유용하다.

[0505] **실시예 7: DC8E8은 인간 알츠하이머병에서 보이는 바와 같이, 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌 중의 신경섬유 퇴행의 모든 발생 단계들을 인식한다**

[0506] SHR24 트랜스제닉 래트 계열: 상기 계열은 국제 특허 출원 PCT WO 2004/007547에 개시된 단백질인 타우 Δ(1-150;392-441)/3R을 발현한다. 상기 트랜스제닉 계열의 생성 및 특성화는 문헌[Filipczik et al., 2010]에 개시되었다. 이들 트랜스제닉 래트는 피질 뇌 영역에서 진행성 나이-의존성 신경섬유 퇴행을 나타낸다. 신경섬유매듭(NFT)은 은친화, 콩고 레드 복굴절, 및 티오플라빈 S 반응성을 포함하여, 인간 알츠하이머병에서의 신경섬유 퇴행을 확인하는데 사용되는 다수의 핵심적인 조직학적 기준을 충족시켰다. 신경섬유매듭을 또한 질병 타우 형태를 인식하는 DC11(문헌[Vechterova et al. 2003]; [Kovacech et al. 2010])을 포함하여, 인간 뇌 중의 병적인 타우를 검출하는데 사용되는 항체, 및 타우 단백질의 과인산화된 형태에 특이적인 항체로 확인하였다. 더욱이, 신경섬유 퇴행은 래트 내생 및 트랜스제닉 절두된 타우 종들로 이루어지는 사르코실 불용성 타우 단백질 복합체의 광범위한 형성을 특징으로 하였다(문헌[Filipczik et al., 2010]). 이들 트랜스제닉 래트의 가장 두드러지는 조직병리학적 특징은 광범위한 신경섬유 병리 - 피질 중의 신경섬유매듭이다. 트랜스제닉 래트의 중간 생존 시간은 222.5일(SD = 43.56)이고 최장 생존 기간은 475일에 달한다(문헌[Filipczik et al., 2010]).

[0507] SHR72 트랜스제닉 래트 계열: 상기 트랜스제닉 래트는 다수의 뇌 영역 및 척수에서 국제 특허 출원 PCT WO 2004/007547에 따라 인간 절두된 타우 Δ(1-150;392-441)/4R을 발현한다. 상기 래트 계열의 생성은 문헌[Zilka et al., 2006]에 개시되었으며 타우 병리학은 문헌[Koson et al., 2008]에 개시되었다. 이들 트랜스제닉 래트의 가장 현저한 조직병리학적 특징은 광범위한 신경매듭 병리, 예를 들어 신경섬유매듭이다. NFT의 출현은 은친화, 콩고 레드 복굴절 및 티오플라빈 S 반응성을 포함하여 인간 AD에서 신경섬유 퇴행을 확인하는데 사용되는 다수의 조직학적 기준들을 충족시켰다. NFT는 또한 비정상 타우 형태를 인식하는, DC11을 포함하여 인간 뇌에서 병적인 타우를 검출하는데 사용되는 항체(미국 특허 제 7,446,180 호 참조), 및 타우 단백질의 과인산화된 형태에 특이적인 항체에 의해 확인되었다. 더욱이, 신경섬유 퇴행은 래트 내생 및 인간 절두된 타우 종으로 이루어지는 사르코실-불용성 타우 단백질 복합체의 광범위한 형성을 특징으로 하였다. 상기 모델의 이형접합체 계열에서 가장 광범위한 신경섬유 병리는 뇌줄기 및 척수에서 관찰되었다(문헌[Zilka et al., 2006]). 상기 트랜스유전자 발현 수준, NFT 부하, 및 래트의 수명은 앞서 측정되었다. 상기 트랜스제닉 래트(계열 SHR72)에 대한 중간 생존 시간은 222.5 일(SD = 24.48)이었다(문헌[Koson et al., 2008]).

[0508] 트랜스제닉 래트 계열 SHR24(타우 Δ(1-150;392-441)/3R을 발현한다) 및 SHR72(타우 Δ(1-150;392-441)/4R을 발현한다)는 뇌 및 척수에서 광범위한 신경섬유 퇴행을 나타낸다. 트랜스제닉 래트 계열 SHR24는 등피질, 뇌줄기 및 척수에서 심한 신경퇴행을 나타내는 반면, SHR72 트랜스제닉 래트는 피질에서는 아닌, 주로 뇌줄기 및 척수에서 NFT를 나타낸다. 감각 운동 및 신경학적 손상의 진행은 상기 두 트랜스제닉 계열 모두에서 유사하지만; SHR72 트랜스제닉 마우스가 더 짧은 수명을 보인다.

[0509] 본 출원에서 제공된 트랜스제닉 래트 연구에서, 이종접합성 트랜스제닉 래트가 사용되었다(SHR24 및 SHR72). 모든 래트를 표준 실험실 조건 하에서 물과 먹이에 자유롭게 접근시키면서 수용하고 하루 조명 조건(오전 7:00에 빛으로 시작하여 12 시간 명/암 주기) 하에서 유지시켰다. 사용되는 래트의 수를 최소화하고 그들의

불편함, 통증 및 고통을 제한하고자 노력하였다.

- [0510] DC8E8에 의한 래트 뇌 조직의 면역조직화학: 트랜스제닉 래트(7 개월 된)를 깊은 마취하에서 1 분간 PBS로 심장을 관통하여 관류시킨 다음 100 ml의 4% 파라폼알데하이드(pH 7.4)로 관류시켰다. 관류 후에, 머리를 절단하고 뇌를 신속히 제거하였다. 상기 뇌를 일회용 메스 날을 사용하여 2 개의 동일한 크기의 반구로 시상면으로 절단하였다. 상기 뇌 조직을 4% 파라폼알데하이드 중에 후-고정시키고, 파라핀에 매몰하고, 마이크로톰 상에서 섹션으로 절단하였다. 면역조직화학 및 조직병리학을 8 μ m 파라핀-매몰된 조직 섹션 상에서 수행하였다. 조직 섹션들을 실온(25 °C)에서, 20 분간 항원 폭로 용액(벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 소재)으로 20 분 및 저온(+4 °C) 90% 폼산(애플리캠(Applichem), 독일 소재)으로 1 분간 전처리하였다. 차단 후에, 상기 섹션들을 차단 용액(50 mM 트리스-HCl 중의 5% 소 혈청 알부민, 0.3% 트리톤 x 100) 중에서 1:2000으로 희석한 정제된 단클론 항체 DC8E8(7.8 mg/ml)과 밤새 배양하였다. 세척 후에, 상기 섹션들을 실온에서 1 시간 동안 비오티닌화된 2차 항체(벡타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)와 함께 배양하고, 이어서 60 분 동안 아비딘-비오티닌 페록시다제-복합체 용액(벡타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)과 반응시켰으며, 모두 실온(25 °C)에서 수행되었다. 상기 면역반응을 페록시다제 기질 키트(벡터 VIP, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 소재)로 가시화하고 상기 섹션들을 메틸 그린(벡터 레보라토리즈)으로 대조염색시켰다. 상기 섹션들을 올림푸스 BX71 현미경으로 검사하였다.
- [0511] 상기 트랜스제닉 래트 뇌(SHR72)에서, mAb DC8E8은 병적인 타우 올리고머(화살표)의 질병 단계 및 병적인 타우 중합체(매듭)의 질병 단계를 인식하였다(도 12A). 더욱이, DC8E8은 축삭 섬유 중에 위치한 잘못된 접힌 타우와 반응하였다. 나이-합치된 대조용 래트 뇌에서 상기 항체는 신경 세포체 또는 축삭 과정을 염색하지 않았다(도 12B).
- [0512] mAb DC8E8은 인간 알츠하이머병 뇌에서와 같이(상기 참조), SHR72 트랜스제닉 래트 뇌에서 신경매듭 병변의 모든 발생 단계들(병든 단량체, 이량체 및 초기-올리고머 단계 포함)(도 12C) 및 말기 올리고머 매듭 전 단계 타우(도 12D)뿐만 아니라 병적인 타우 중합체의 말기 발생 단계 - 세포내(도 12E) 및 세포외 신경섬유매듭(도 12F)을 인식하였다.
- [0513] DC8E8은 또한 타우 Δ (1-150;392-441)/3R을 발현하는 트랜스제닉 래트의 뇌에서 신경섬유매듭을 인식하였다(SHR24, 도 13A; SHR72, 도 13B).
- [0514] **실시예 8: DC8E8은 인간 알츠하이머병 및 타우 트랜스제닉 래트의 뇌에서 용해성 오-무질서 타우 및 불용성 타우 종들을 모두 인식한다**
- [0515] 용해성 타우 및 불용성 타우 복합체를 인간 AD 뇌 또는 트랜스제닉 래트 뇌(실시예 7에 개시된 SHR24 및 SHR72 계열)로부터, 사르코실 방법(문헌[Greenberg and Davies, 1990])을 사용하여 분리하였다. 단백질을 추출을 위해서, 동결된 인간 AD 뇌 조직(이중피질, 네덜란드 뇌 은행으로부터 수득된 브락 단계 V 및 VI의 샘플) 및 트랜스제닉 SHR24 래트(등피질, 10, 12 및 14 개월 된) 및 트랜스제닉 SHR72 래트(뇌줄기, 7.5 개월 된)로부터의 조직을 10 부피의 저온 추출 완충제(10 mM 트리스 pH 7.4, 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, 및 10% 슈크로스) 중에 균질화시켰다. 상기 균질물을 20,000 x g에서 20 분간 원심분리시키고 50 μ l의 상등액을 용해성 타우의 분석에 사용하였다.
- [0516] 사르코실-불용성 타우를 제조하기 위해서, 나머지 상등액에 N-라우로일사르코신(SIGMA)을 1%의 최종 농도까지 보충하고, 이를 진탕시키면서 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 100,000 x g에서 1 시간 동안 원심분리 후에, 생성되는 상등액을 버렸으며, 펠렛은 사르코실-불용성 타우 분획을 포함한다.
- [0517] 용해성 타우 및 사르코실-불용성 타우 분획을 면역블롯팅에 의해 분석하였다. 용해성 타우 분획을 동부피의 2x SDS-샘플 로딩 완충제(β -머캅토에탄올)로 희석하고(문헌[Laemmli, 1970]) 레인당 15 μ g의 단백질을 로딩하였다. 사르코실-불용성 타우 분획을 위해서, 상기 펠렛을, 상기 불용성 타우 분획의 제조에 사용된 용해성 분획의 1/50 부피의 1x SDS-샘플 로딩 완충제에 용해시켰다. 이어서, 동부피의 용해성 타우 및 사르코실-불용성 타우 분획을 면역블롯 분석에 사용하였으며, 이는 상기 용해성 분획 중의 15 μ g의 총 단백질에 상응하였다(문헌[Filipczik et al. 2010] 참조). 샘플을 95 °C에서 5 분간 가열하고, 5 내지 20% 구배 SDS 폴리아크릴아미드 젤 상에 로딩하고, 트리스-글리신-SDS 완충제 시스템에서 25 mA에서 40 분간 전기영동시켰다. 단백질을 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 멤브레인으로 옮겼다(10 mM CAPS, pH 12 중에서 150 mA에서 1 시간). 상기 이동 후에, 상기 멤브레인을 실온에서 1 시간 동안 포스페이트-완충된-염수(PBS; 136.89 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) 중의 5% 무-지방 분유 중에서 차단시키고, 이어서 TBST-우유(20 mM 트리스-

HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20, 5% 무지방 분유)로 1:1 희석한 DC8E8 하이브리도마 배양 상등액과 함께 1 시간 동안 배양한 다음 큰 부피의 PBS로 3 회 세척하였다. 상기 멤브레인을 2차 항체로서, PBS로 1:4,000 희석한, HRP-접합된 염소 항-마우스 Ig(DAKO, 덴마크 소재)와 함께 배양하였다. 상기 배양에 이어서 PBS 중의 0.2% 이게팔(Igepal) CA-630(SIGMA)으로 세척하였다(3 회). 상기 블릿들을 슈퍼시그널 웨스트 피코(SuperSignal West Pico) 화학발광 기질(피어스, 미국 소재)로 전개시키고, 상기 단백질 신호를 LAS3000 영상화 시스템(후지 포토 필름 캄파니, 일본 소재)을 사용하여 검출하였다. 상기 화학발광 신호 강도를 AIDA(어드밴스드 이미지 데이터 분석기, 레이테스트(Raytest), 독일 스트라우벤하르트 소재) 소프트웨어를 사용하여 정량분석하였다.

[0518] DC8E8은 SHR24 트랜스제닉 래트에서 용해성 인간 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 및 생리학적인 래트 타우 동형단백질을 모두 인식하였다(도 14A). 더욱이, DC8E8은 SHR24 래트 뇌로부터의 사르코실-불용성 타우 분획 중에서 타우 $\Delta(1-150;392-441)/3R$ 및 병적인 래트 타우 단백질을 인식하였다(도 14B). 중요하게는, DC8E8은 인간 AD 뇌에서 사르코실-불용성 타우 분획 중의 병적인 인간 타우 단백질을 인식하였다(브락 단계 V 및 VI, 도 14B 및 14C). DC8E8은 SHR72 트랜스제닉 래트에서 용해성 인간 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 완전길이가(생리학적인) 래트 타우 동형단백질을 모두 인식하였다(도 14D). 현저하게, DC8E8은 SHR72 래트 뇌로부터의 사르코실-불용성 타우 분획에서 래트 타우의 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 병적인 형태의 래트 타우를 특이적으로 인식하였다(도 14D).

[0519] **실시예 9: DC8E8은 병적인 타우-타우 상호작용을 억제한다**

[0520] 타우 피브릴화 분석. 시험관내 타우 피브릴화 분석을 사용하여 DC8E8이 병적인 타우-타우 상호작용에 대한 억제 효과를 갖는지의 여부를 측정하였다. 상기 분석은 타우 단백질의 고유 성질, 즉 다중음이온, 예를 들어 황산화된 글리코사미노글리칸 헤파린과 상호작용시 형태 변화를 겪는 능력에 근거한다. 하나의 타우 분자 상에서의 이러한 변경된 형태는 또 다른 타우 분자와의 그의 병적인 상호작용, 상기 상호작용하는 타우 분자들의 미세소관 결합 영역 중의 교차- β 시트 구조의 형성을 통한 타우-타우 복합체의 안정화, 및 마지막으로 알츠하이머병-유사 짝나선 필라멘트(PHF)의 형성을 추가로 도출한다(문헌[Skrabana et al., 2006]). 상기 베타-시트 풍부 구조의 형성은 티오플라빈 T와 같은 형광 염료에 의해 검출될 수 있다.

[0521] 병적인 타우-타우 상호작용에 대한 DC8E8의 효과를 측정하기 위한 분석을 실시예 1에 개시된 바와 같이 정제된, 20 μM 의 시험된 재조합 타우 단백질(타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 또는 타우 $\Delta(1-296;392-441)/4R$) 중 어느 하나; 5 μM 헤파린(돼지 장 점막으로부터의 헤파린 나트륨 염, ≥ 150 IU/mg, 건조 기준, SIGMA); 및 12.5 μM (최종 농도) 티오플라빈 T를 함유하는 PBS 중에서 설정하였다. 각 반응물(최종 부피 80 μl)을 37 $^{\circ}C$ 에서 20 시간 동안 밀폐된 흑색 고체 폴리스타이렌 플레이트(384 웰, 그라이너 바이오원(Greiner BioOne))에서 배양하였다. 티오플라빈 T 형광을 형광 판독기(플루오로스칸 애센트(Fluoroskan Ascent) FL(랩시스템스))를 사용하여 측정하였으며, 이때 450 nm의 여기파장, 510 nm에서 방출, 및 200 ms 측정 시간을 가졌다. 병적인 타우-타우 상호작용에 대한 mAb DC8E8의 억제 활성을 측정하기 위해서, 정제된 DC8E8(실시예 5)을 상기 반응 혼합물에 20 μM 의 최종 농도로 가한 후에, 37 $^{\circ}C$ 에서 배양하였다. 2 개의 항체를 대조군으로서 사용하였다: DC51(광견병 바이러스의 외막 단백질을 인식함; 문헌[Macikova et al., 1992]) 및 DC11(몇몇 절두된 형태적으로 변경된 형태의 타우를 인식함, 미국 특허 제 7,446,180 호).

[0522] 형태적으로 변경되고 피브릴화된 타우의 양을 DC8E8의 부재("Ctrl") 및 존재("DC8E8") 하에서 티오플라빈 T 형광에 의해 측정하였다(도 15A 및 15B). 20 μM 최종 농도로 첨가된 mAb DC8E8은 상기 두 오-무질서 타우 단백질 모두의 병적인 형태 변화 및 피브릴화를 방지하여, 피브릴화된 병적인 타우 형태의 양을 각각 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 타우 $\Delta(1-296;392-441)/4R$ 에 대해서 5% 및 16% 미만으로 감소시켰다. 이러한 DC8E8의 억제 활성은 비-모수 t-시험에 의해 분석 시 통계학적으로 유의수준이었다(각각 도 15A 및 15B에서, "DC8E8", $p < 0.001$ 및 $p < 0.01$). 타우에 결합하지 않는, 무관한 항체, Rab50(문헌[Macikova et al., 1992])은 타우의 형태 변화를 방지하지 못했으며, 이는 변경되지 않은 티오플라빈 T 형광("Rab50")을 생성시켰다. 타우의 몇몇 병적으로 변경된 형태를 인식하는 항체 DC11(문헌[Vechterova et al., 2003] 및 미국 특허 제 7,446,180 호)은 피브릴화된 타우의 형성을 더욱 촉진하였으며; 이러한 효과는 DC11에 의한 비정상 타우-타우 상호작용 및 피브릴 형성에 필요한 타우의 병적인 형성의 안정화를 반영할 수 있다.

[0523] DC8E8은 또한 오-무질서 타우 $\Delta(1-296;392-441)/4R$ 에 의한 타우 이량체, 삼량체 및 올리고머의 형성을 억제하였다(도 16). 재조합 타우 $\Delta(1-296;392-441)/4R$ 을 상기 피브릴화 분석에 대해 상술한 바와 같이 DC8E8의 존재 또는 부재 하에서 1, 4 및 20 시간 동안 배양하였다. 지시된 시점들에서, SDS-샘플 로딩 완충제의 첨가에 의해

상기 반응을 정지시켰다. 단백질 분석을 위해서, 10 μ l의 각각의 피브릴화 반응물을 5 내지 20% 구배 SDS 폴리아크릴아미드 젤 상에 로딩하고 25 mA에서 40 분간 트리스-글리신-SDS 완충제 시스템 중에서 전기영동시켰다. PVDF 멤브레인으로 단백질 이동 후에(10 mA CAPS, pH 12 중의 150 mA에서 1 시간), 상기 멤브레인을 실온에서 1 시간 동안 PBS 중의 5% 무지방 분유 중에서 차단하고 이어서 1 시간 동안 PBS 중에서 1:1,000 희석한 HRP-접합된 DC25(문헌[Skrabana et al.(2006)]와 함께 배양한 다음, 큰 부피의 PBS로 3 회 세척하였다. 상기 블롯들을 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(피어스, 미국 소재)로 전개시키고, 상기 화학발광 신호를 LAS3000 영상화 시스템(후지 포토 필름 캄파니, 일본 소재)을 사용하여 검출하였다. 상기 화학발광 신호 강도를 AIDA(어드밴스드 이미지 데이터 분석기, 레이테스트, 독일 스트라우벤하르트 소재) 소프트웨어를 사용하여 정량분석하였다.

[0524] 이러한 결과는 DC8E8이 인간 타우를 인식하고/결합하는 4 개의 결합 부위 중 하나 이상이 단량체 타우 형태 변화, 타우 피브릴화, 및 타우 응집체(이량체, 삼량체 및 다른 올리고머)의 형성에 관여함을 밝힌다. 즉, 잔기 267-KHQPGGG-273 (서열번호 98) (타우 단백질의 첫 번째 반복 도메인 내), 298-KHVPGGG-304 (서열번호 99) (타우 단백질의 두 번째 반복 도메인 내), 329-HHKPGGG-335 (서열번호 100) (타우 단백질의 세 번째 반복 도메인) 및 361-THVPGGG-367 (서열번호 101) (타우 단백질의 네 번째 반복 도메인 내)에 의해 포함되는 타우의 4 개 영역들 중 하나 이상은 타우 피브릴화 및 타우 응집체(이량체, 삼량체 및 다른 올리고머)의 형성을 촉진하고/하거나 이에 관여한다.

[0525] **실시예 10: DC8E8은 오-무질서 타우의 흡수 및 분해를 매개한다**

[0526] 마우스 BV2 미세아교세포를 상이한 기간 동안 6-웰 플레이트에서 1 μ M의 재조합 타우 Δ (1-150;392-441)/4R 단독으로, 또는 타우 Δ (1-150;392-441)/4R과 DC8E8의 혼합물/복합체와 함께 처리하였다. 상기 배지를 수거하고 상기 세포를 먼저 PBS로 세척하고, 이어서 1 분 동안 순한 산 세척액(0.5 M NaCl, 0.2 M 아세트산, pH 3)으로 세척하였다. 이어서 상기 세척된 세포를 TTL 완충제(20 mM 트리스 pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% 트리톤 X-100, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 루슈 - 완전한 프로테아제 억제제) 중에서 용해시키고 액체 질소 중에서 신속히 동결시켰다. 생성되는 세포 추출물을 앞서 개시된 바와 같이(문헌[Koson et al., 2008]) 12% SDS-PAGE 젤 및 웨스턴 블롯 상에서 분석하였다. 간단히, 상기 단백질들을 나이트로셀룰로스 멤브레인(밀리포어, 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재)으로 옮기고 폰소 S로 염색하여 균일한 단백질 이동을 확인하고, 이어서 상기 멤브레인을 타우 잔기 347-353을 인식하는 DC25 하이브리도마 배양 상등액으로 탐침하고, 이를 판-타우 항체라 칭하였다(엑손 뉴로사이언스, 오스트리아 비엔나 소재). 항-GADPH 항체(1:1,000, 아브캠(Abcam))에 의한 웨스턴 블롯팅을 단백질 로딩 대조군으로서 사용하였다. DC25 1차 항체와의 배양에 이어서 세척하고, HRP-접합된(1:3,000; 다코, 덴마크 글로스트롭 소재) 다클론 염소 항-마우스 IgG 2차 항체와 함께 배양하였다. 상기 블롯들을 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(피어스, 미국 소재)로 전개시키고, 상기 화학발광 신호를 LAS3000 영상화 시스템(후지 포토 필름 캄파니, 일본 소재)을 사용하여 검출하였다.

[0527] 타우 Δ (1-150;392-441)/4R을 선행 단락에 개시된 바와 같이, 1 μ M의 농도로 단독으로 또는 1 μ M mAb DC8E8과 함께 마우스 BV2의 배양물에 가하였다. 2, 4, 6 및 12 시간 동안 배양 후, 세포 단백질을 추출하고, 내면화된 타우의 수준을 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 판-타우 항체 DC25는 상기 미세아교세포 내부의 오-무질서 타우의 존재를 보였다. 상기 웨스턴 블롯 프로파일은 오-무질서 타우의 분해가 DC8E8의 존재 하에서 더 빠름을 밝혔다(도 17A).

[0528] 상기 DC8E8 항체 자체가 또한 상기 BV2 세포의 내부에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 도 17A. 더욱이, DC8E8은 상기 세포 매질 중의 용해성 오-무질서 타우의 부하를 감소시켰으며, 이는 세포의 단백질분해 기구의 활성화를 반영할 수 있다(도 17B).

[0529] **실시예 11: DC8E8은 37 °C에서 안정성이다**

[0530] DC8E8(실시예 5에 개시된 바와 같이 정제됨)을 PBS 중의 2 mg/ml의 농도로 희석하고 분액들(100 μ l)을 37 °C에서 배양하였다. 다양한 1-개월 간격으로, 분액들을 -20 °C에서 동결시켰다. 실험 기간 전체를 통해 -20 °C에서 보관된 DC8E8의 분액(2 mg/ml)을 "대조군"으로서 사용하였다. 4 개월 후에(모든 샘플이 수거되었을 때) DC8E8 활성(고체상으로서 재조합 타우 Δ (1-150;392-441)/4R에 결합하는), 따라서 37 °C에서의 저장수명 안정성의 분석을 실시예 2에 개시된 바와 같이 ELISA에 의해 수행하였다. 각각의 DC8E8 분액을 2,000 배(즉 2,000x 또는 1:2,000), 4,000x, 8,000x, 16,000x, 32,000x, 64,000x, 128,000x, 256,000x, 및 512,000x 희석하였다. DC8E8은 활성이었으며(타우 Δ (1-150;392-441)/4R에 결합하는 그의 능력에 의해 측정되는 바와 같이) 따라서 상

기 "대조군"에 비해, 37 °C에서 4 개월 배양 후에조차 안정성이었다(도 18).

- [0531] 실시예 12: DC8E8은 고유의 생체의-유사 조건 하에서 인간 AD 뇌 및 SHR72 래트의 뇌로부터 용해성 및 불용성 타우 모두에 결합하고 이들을 면역침전시킬 수 있다
- [0532] 사르코실-불용성의 잘못접힌 타우 단백질을 사르코실 방법(문헌[Greenberg and Davies, 1990])을 사용하여 인간 AD 뇌 또는 타우 트랜스제닉 래트 뇌(실시예 7에 개시된 계열 SHR72)로부터 생화학적으로 분리하였다. 단백질 추출을 위해서, 고정되지 않은 동결된 인간 AD 뇌(비강내통과 피질, 브락 단계 V, 네덜란드 뇌 은행으로부터 수득함, 네덜란드 소재) 및 SHR72 트랜스제닉 래트(등피질, 7.5 개월된 동물) 조직을 10 부피의 빙냉 추출 완충제 [10 mM 트리스 pH 7.4, 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, 및 10% 슈크로스(50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 및 EDTA 없는 프로테아제 억제제 콤플리트(등록상표)의 카테일(룻슈)이 보충됨)] 중에서 균질화시켰다. 상기 균질물을 20,000 x g에서 20 분 동안 원심분리시켜 막성 물질을 제거하였다. 사르코실-불용성 타우 분획을 제조하기 위해서, 상등액에 N-라우로일사르코신(SIGMA)을 1%의 최종 농도로 보충하고 진탕시키면서 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 100,000 x g에서 1 시간 동안 원심분리시킨 후에, 생성되는 상등액은 버리고 펠렛은 3 ml의 포스페이트-완충된 염수(PBS, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 136.89 mM NaCl, 2.7 mM (KCl))로 2 회 세척하였다. 이어서, 올리고머 및 중합체성의 잘못접힌 타우 종들이 풍부한 뇌 단백질 분획(즉 질병 타우 단백질)을 나타내는 상기 펠렛을 MS72 탐침이 구비된 반델린 소노펠스 HD2200/UW2200(반델린 일렉트로닉, 독일 소재)을 사용하여 20% 사용률에서 20%의 출력 설정으로, 얼음 상에서 2 분간 초음파 처리에 의해 1 ml의 PBS(50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 및 EDTA 없는 프로테아제 억제제 콤플리트(등록상표)의 카테일(룻슈)이 보충됨) 중에 재현탁시켰다.
- [0533] 질병 타우 단백질이 풍부한 상기 생성 현탁액들(둘 다 인간 AD 뇌 및 래트 AD 모델의 뇌로부터)을 2 개의 500 µl 분취량으로 분할하였으며, 각 분취량은 25 µg의 2 개의 정제된 항체: DC8E8 또는 대조용 항체 Rab50(광견병 바이러스의 외막 단백질을 인식한다; 문헌[Macikova et al., 1992]) 중 하나를 수용하였다. 상기 현탁액들을 상기 항체들과 함께 6 °C에서 2 시간 동안 헤드-오버-테일 회전으로 배양하였다. 상기 형성된 항체-질병 타우 복합체를 분리하기 위해서, PBS 중에서 평형화시킨 단백질 G 맥 세파로스 비드(GE 헬스케어)의 50% 현탁액 50 µl를 각 현탁액 반응물에 가하였으며, 이를 6 °C에서 1 시간 동안 추가로 배양하였다. 결합된 항체-타우 복합체를 갖는 비드를 수확하고 PBS(50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.02% 이계판 CA-630(SIGMA) 및 EDTA 없는 프로테아제 억제제 콤플리트(등록상표)의 카테일(룻슈)이 보충됨)로 3 회 세척하였다. 상기 결합된 항체 복합체를 100 µl의 200 mM 폼산 pH 2.7 중에서 3 개의 별도의 5-분 배양에 의해 상기 비드로부터 용리시켰다. 상기 100 µl 용리물들을 모으고, 동결건조시키고, 상기 단백질들을 SDS-PAGE 샘플 로딩 완충제에 용해시키고(문헌[Laemmli, 1970]), 12% SDS-PAGE 젤 상에서 분리시키고, 나이트로셀룰로스 멤브레인 상으로 옮기고, 상기 타우 단백질을 상기과 같이 HRP-접합된 판-타우 항체 DC25(2N4R 타우의 에피토프 347-353, 액손 뉴로사이언스, 오스트리아 비엔나 소재)와의 배양에 의해 검출하였다. 배양(실온에서 1 시간)에 이어서 PBS 중의 0.2% 이계판 CA-630(SIGMA)로 세척(3 회)하였다. 상기 블롯을 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질 시스템(피어스, 미국 소재)으로 전개시키고, 상기 신호를 LAS3000 영상화 시스템(후지 포토 필름 캄파니, 일본 소재)을 사용하여 검출하였다.
- [0534] DC8E8은 표적을 인식하고 알츠하이머병 환자의 뇌 중에 존재하는 모든 형태의 질병 타우 단백질, 즉 올리고머성 및 중합체성의 잘못 접힌 타우 종과 결합한다(도 19A). 도 19A에서 레인 1은 인간 AD 뇌로부터 생화학적으로 추출된 병적인 타우 종을 나타낸다. 레인 3은 DC8E8과의 면역침전에 의해 인식되고, 상기에 의해 결합되고 분리된 타우 종들을 나타낸다. DC8E8-결합/면역침전된 질병 타우 종의 패턴은 생화학적으로 추출된 타우 단백질의 패턴이었다. 이러한 결과는 인간 뇌 중의, 즉 상기 단백질이 생체내에서와 같이 변형되지 않은 형태로 있는 추출물 중의 병적인 타우 종의 DC8E8에 의한 효율적인 생체의 인식을 보이며, 이는 DC8E8이 생체내에서 질병 타우 종들을 표적화할 수 있는 유용한 치료학적 성질을 가짐을 나타낸다. 대조용 항체 Rab50("모의 항체", 레인 2)은 상기 뇌 추출물 중에 존재하는 타우 단백질을 중 임의의 것을 인식하며, 이는 타우 단백질에 대한 DC8E8의 결합이 특이적임을 입증한다.
- [0535] 도 19B는 타우 단백질의 면역정제에 사용되는 모의 항체(Rab50) 및 DC8E8(각각 레인 2 및 3)의 양을 도시한다. DC8E8의 중쇄 및 경쇄의 위치를 또한 도 19A의 레인 3에 표시한다. 항체 쇄의 보다 많은 양의 존재는 질병 타우의 패턴을 왜곡시킨다.
- [0536] DC8E8은 또한 알츠하이머병의 SHR72 래트 모델의 뇌에서 모든 형태의 잘못접힌(병든) 타우를 인식하고 표적화한다. 도 20A, 레인 1은 트랜스제닉 래트의 뇌로부터 생화학적으로 추출된 질병 타우 종을 나타낸다. DC8E8 항

체와 트랜스제닉 래트 뇌 추출물과의 배양은 상기 뇌 중에 존재하는 질병 타우 종의 면역정제를 허용하였다(도 20A, 라인 3). 상기 DC8E8 정제된 타우 종은 생화학적으로 단리된 타우 단백질의 경우에 일치하는 패턴을 보였으며(도 20A, 라인 1), 이는 DC8E8이 상기 트랜스제닉 래트 뇌 중에 존재하는 모든 병적인 타우 종들을 인식하고 결합함을 입증한다. 상기 타우 단백질 밴딩 패턴의 약간의 왜곡은 DC8E8 항체 중쇄 및 경쇄의 존재에 의해 야기된다(도 20A, 라인 3). 모의 항체 Rab50(도 20A, 라인 2)는 타우 단백질들 중 어느 것과도 결합하지 않았다.

[0537] 도 20B는 알츠하이머병의 트랜스제닉 모델의 래트의 뇌 추출물로부터 타우 단백질의 면역정제에 사용되는 모의 항체(Rab50) 및 DC8E8(각각 라인 2 및 3)의 양을 도시한다. DC8E8의 중쇄 및 경쇄의 위치를 또한 도 20A의 라인 3에 표시한다. 상기 항체 쇄의 보다 많은 양의 존재는 질병 타우의 패턴을 약간 왜곡시켰다.

[0538] **실시예 13: DC8E8 단클론 항체는 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌로부터 병적인 타우를 제거한다**

[0539] DC8E8 또는 Rab50(음성 대조용 항체, 광견병 바이러스를 인식한다)을 생산하는 하이브리도마 세포를 10% NHS 및 1% 글루타민을 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 상기 세포를 부르커(Burker) 카운팅 챔버에서 카운트하였다. 500,000 세포/밀리리터를 함유하는 세포 현탁액을 100xg에서 5 분간 회전시키고 펠릿을 1 ml의 pBS에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 다시 100xg에서 5 분간 회전시키고 펠릿을 5 μ l의 PBS에 재현탁시켰다.

[0540] 트랜스제닉 래트 SHR72(6 개월 된것)를 상기 실험에 사용하였다(그룹당 3마리 래트). 수술 적어도 1 시간 전에, 면역억제 약물 샌디문(15 mg/kg)을 상기 래트에 피하로 적용하였다. 트랜스제닉 래트를 복강내 주사된, 3:5 비의 티레타민-졸라제팜(100 mg/ml)/자일라진(20 mg/ml)의 혼합물에 의해 마취시켰다. 마취제의 투여는 하기와 같았다: 졸레틸(30 mg/kg) 및 자일라리엠(10 mg/kg). 상기 마취된 래트의 머리를, 각 동물의 외이도 내에 고정팔을 놓음으로써 주축성 장치(데이비드 코프 인스트루먼트즈(David Kopf Instruments), 미국 캘리포니아주 터링가 소재) 중에 고정시켰다. 각 동물의 머리에, 수술용 드릴을 사용하여, 선택된 주축 좌표(대천문에 대해, 측방향 5 mm; 전-후 4 mm; 등배 -5 mm)에 따라 구멍을 뚫었다. DC8E8(10^5 세포) 또는 Rab50(10^5 세포)를 생산하는 하이브리도마 세포 현탁액을 상기 래트 뇌의 해마술에 양측으로 주사하였다. 수술 직후, 케토날(5 mg/kg)을 근육내 투여하였다. 샌디문(15 mg/kg)을 적용 후 8일 동안 피하 적용하였다. 엔록실(20 mg/kg/24 h)을 10 일 동안 음료수 중에서 투여하였다.

[0541] 상기 시술 후 2 주째에, 상기 래트를 졸레틸(30 mg/kg) 및 자일라리엠(10 mg/kg)의 혼합물에 의해 마취시켰다. 2 내지 5 분 후에, 래트를 해부단 위에 올려놓고, 개복하였다. 관류 전에 혈액 혈청 중의 타우 및 항체 수준을 분석하기 위해서 채혈하였다. 관류 바늘을 좌심실에 넣고, 상기 래트를 연동펌프(타입 pp1-05, Zalimp, 속도 - 10x, 7도 - 22 ml/1 분의 관류 액체)를 사용하여 2 분간 PBS로 관류시켰다. 각각의 래트를 참수하고, 그의 두 개골을 열고, 뇌(척수 부분과 함께)를 조심스럽게 제거하였다. 뇌를 2 개의 부분으로 시상면으로 절단하고; 우측 부분을 4% PFA(4 °C)에서 밤새 고정시켰다. 좌측 부분을 절단하고 뇌줄기 및 2 개의 피질 영역을 액체 질소 중에서 급속히 동결시켰다.

[0542] 상기 처리된 동물의 혈청 중의 DC8E8의 양을, 고체상으로서 타우 Δ (1-150;392-441)4R을 사용하여 실시예 19에 개시된 바와 같이, ELISA에 의해 측정하였다. 각 동물의 혈청(A,B,C)을 100x 내지 12,800로 연속적으로 희석하였다(도 21A). DC8E8 항체의 혈청 농도를 표준으로서 정제된 DC8E8을 사용하여 측정하였다. DC8E8은 처리된 동물(각각 DC8E8 처리 그룹의 A,B,C)에서 466, 200 및 273 ng/ml의 농도에 도달하였다.

[0543] 각각의 처리된 동물의 혈청 중의 타우의 농도를 또한 측정하였다. 이를 제조사의 프로토콜에 따라 이노테스트 hTAU ELISA 키트(이노제네틱스, 벨기에 소재)를 사용하여 수행하였다. DC8E8에 의한 처리는 상기 항체-타우 복합체의 혈액 내로의 수송을 야기하였으며, 상기 혈액에서 타우는 350 pg/ml의 평균 농도에 도달하였다. DC8E8의 상기 효과는 뇌로부터 병적인 타우 단백질의 제거를 돕는다. 다른 한편으로, 모의 항체(Rab50)(광견병 바이러스의 외막 단백질을 인식한다)(문헌[Macikova et al., 1992])로 처리된 동물의 혈청에서는 타우 단백질이 검출되지 않았다. 그래프는 평균의 표준 오차(SEM)와 함께 평균을 나타낸다(도 21B).

[0544] 상기 고정된 뇌 조직을 파라핀에 매몰시키고 마이크로톰 상에서 절단하였다. 면역조직화학을 8 μ m 파라핀-매몰된 섹션상에서 수행하였다. 조직 섹션을 비등하는 항원 폭로 용액(벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 벌링게임 소재)으로 20 분간 및 85% 폼산(애플리켄(Applichem), 독일 다름스타트 소재)으로 1 분간 전처리하였다. 차단 후에, 상기 조직 섹션을 mAb DE8E8과 함께 밤새 배양시킨 다음, 세척하고 비오틴화된 2차 항체(벡타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)와 함께 배양시켰다(1 시간, 실온에서). 세척 후에, 상기 섹션을 실온에서 60 분 동안 아비딘-비오틴 페록시다제-복합체(벡타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)와 반응시켰

다. 상기 면역반응을 페록시아제 기질 키트 VIP(백터 VIP, 백터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재)로 가시화하였다. DC8E8 뉴런내 신호의 정량분석을 위해 우수한 난소 복합체를 사용하였다. 전체 신호를 개별적인 운동 뉴런에서, 섹션당 15 개 이상의 뉴런에 대해 정량분석하였다. 상 분석을 AIDA(어드밴스드 이미지 데이터 분석기, 레이테스트, 독일 스트라우벤하르트 소재) 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 카운팅을 모든 처리된 동물들의 섹션상에서 수행하고 이어서 비모수 만-휘트니 시험을 사용하여 통계학적으로 평가하였다.

[0545] 모의-처리된(도 22A, 우측 패널) 및 DC8E8-처리된(도 22A, 좌측 패널) 동물로부터의 섹션의 우수한 난소 복합체 중의 병적인 타우의 양의 정량분석(도 22B)은 모의-처리된 동물에 비해 DC8E8로 처리된 3 개의 동물 모두의 시험된 뇌 영역에서 병적인 타우량의 감소를 보였다($p < 0.0001$)(도 22A 및 22B).

[0546] **실시예 14: 타우의 치료 에피토프의 DC8E8의 인식에 영향을 미치는 DC8E8 결합 부위 내 잔기들의 지도화**

[0547] a) 단일쇄 DC8E8 항체의 클로닝 및 상기 항체 결합 부위의 돌연변이.

[0548] 완전길이 CD8E8 mAb의 작용성 단일쇄 버전(scDC8E8v)를 제조하여 타우 단백질의 인식에 필수적인 mAb DC8E8의 아미노산 잔기의 지도화를 도왔다. 이를 실시예 3에 개시된 바와 같이 제조된 DC8E8의 경쇄 및 중쇄의 cDNA를 사용하여 수행하였다.

[0549] DC8E8의 가변 영역을 NcoI에 대한 제한 부위를 갖는 클로닝 프라이머(순방향 프라이머: 5'-ATATTACCATGGACATTGTGATGTCACAG-3' (서열번호 155)) 및 XhoI (역방향 프라이머: 5'-ATATTATTCTCGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3' (서열번호 156)) 제한 효소 및 올리고뉴클레오타이드 링커 서열(VH-LINK-F: 5'-GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTTCATGCAGGTCCAATTGCAGCAG-3' (서열번호 157); VL-LINK-R: 5'-GGAGCCGCCGCCGAGAACCAACCACCAGAACCAACCACCCCGTTGATGTCCAGCTTGGTGCC-3' (서열번호 158)(중쇄 및 경쇄 가변 영역들을 결합시키는데 사용되었으며, 상기 링커 서열은 문헌[Krebber et al., 1997]에 따라 설계되었다)을 사용하여 PCR에 의해 추가로 증폭시켰다. 상기 단리된 PCR 산물의 절단(NcoI 및 XhoI 효소 사용) 및 아가로스 젤 전기영동을 통한 정제 후에, 상기 단편들을 T4-DNA-리가제(페르멘타스(Fermentas), 독일 소재)를 사용하여, NcoI- 및 XhoI-절단된 pET22b 플라스미드 내로 클로닝하였다. 상기 세균 균주 DH5 α 를 상기 생성되는 플라스미드의 증폭에 사용하였으며 상기 선택된 클론 중의 정확한 삽입 위치를 제한 효소 분석에 의해 확인하였다. 상기 생성되는 단일-쇄 DC8E8 구조물(scDC8E8v)의 서열의 정확성을 3130 유전자 분석기(어플라이드 바이오시스 템스, 미국 소재)를 사용하여 DNA 서열화에 의해 확인하였다.

[0550] b) 병적인 타우의 DC8E8의 인식에 영향을 미치는 DC8E8 결합 부위 중의 잔기의, 알라닌 스캐닝 돌연변이에 의한 확인.

[0551] 타우에 대한 DC8E8 결합에 영향을 미치는 잔기들의 확인을 위해서, Ala 스캐닝 돌연변이를 scDC8E8v의 선택 부위(굵고 밑줄그은, 하기 참조) 상에서 수행하였다. Ala 치환에 대해 선택된 아미노산을 문헌[MacCallum et al., J. Mol. Biol. 1996]의 연구를 근거로 확인하였다. scDC8E8v의 돌연변이를 문헌[“Molecular Cloning: A Laboratory manual” by Sambrook and Russell (2001)]에 개시된 표준 과정에 의해 PCR 중의 돌연변이 올리고 뉴클레오타이드를 사용하는 중복 연장 방법에 의해 수행하였다.

[0552] 돌연변이 단일쇄를, 각각의 원래 DC8E8 서열에 대해서, 하기에 나열한다. 상기 돌연변이된 잔기들은 굵고 밑줄을 그었다. 상기 돌연변이 단일쇄의 명칭은 상기 구조물의 번호, 가변 중쇄 또는 경쇄 약어(VH 또는 VL), DC8E8 중의 원래 아미노산의 단일 문자 암호에 이은 각각 경쇄 및 중쇄 서열 서열번호 141 및 138 중의 그의 위치, 및 이어서 치환 알라닌에 대한 A로 이루어진다. 예를 들어, 돌연변이 1-VL-N31A는 단일쇄 돌연변이 번호 1에 상응하며, 이때 상기 가변 경쇄는 아스파라진 31(N31)을 알라닌(A)으로 치환시킴으로써, 31 번 위치(DC8E8에 대해)에서 돌연변이되었다:

[0553] DC8E8 경쇄 가변 영역(CDR은 밑줄을 그었다):

[0554] [서열번호 141]

[0555] 1 10 20 30 40 50

[0556] DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQKPGQSPKLL

[0557] 60 70 80 90 100

[0558] IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCKQSFYLRITFGGG

- [0559] 110
- [0560] TKLDIK
- [0561] CDR1(서열번호 117) 중의 돌연변이(돌연변이된 잔기들은 굵고 밑줄을 그었다): QSL**L****NS**TRK**NY** (서열번호 117) (CDR1의 원래 DC8E8 서열)
- [0562] 1-VL-N31A [서열번호 247]
- [0563] 2-VL-R33A [서열번호 248]
- [0564] 3-VL-Y38A [서열번호 249]
- [0565] CDR2에 선행하는 프레임워크 영역 FR2 중의 돌연변이: LAWYQQKPGQSPKLL**IY** (서열번호 160) (프레임워크 영역 FR2의 원래 DC8E8 서열)
- [0566] 4-VL-Y55A [서열번호 252]
- [0567] CDR2[서열번호 118] 중의 돌연변이: **W**AS (서열번호 118) (CDR2의 원래 DC8E8)
- [0568] 5-VL-W56A [서열번호 253]
- [0569] CDR3[서열번호 119] 중의 돌연변이: **KQSFY**LRT (서열번호 119) (CDR3의 원래 DC8E8 서열)
- [0570] 6-VL-K95A [서열번호 254]
- [0571] 7-VL-Q96A [서열번호 255]
- [0573] *8-VL-S97A [서열번호 256]
- [0574] 9-VL-F98A [서열번호 257]
- [0575] 10-VL-Y99A [서열번호 258]
- [0576] 11-VL-L100A [서열번호 259]
- [0577] 12-VL-R101A[서열번호 260]
- [0578] DC8E8 중쇄 가변 영역(CDR은 밑줄을 그었다):
- [0579] [서열번호138]:
- [0580] 1 10 20 30 40 50
- [0581] QVQLQQSGPELVKPGTSVKMPCKASGYIF**TDY****Y**VISWVKQRTGQGLEWIG**E**IFP
- [0582] 60 70 80 90 100
- [0583] **RSGST**YYNEKFKGKATLTADKSSNTAY**MLSS**VTSEDSAVYFC**ARD**YYGTSFA
- [0584] 110
- [0585] **MDY**WGQGTSTVTVSS
- [0586] CDR1 [서열번호 120] 중의 돌연변이(돌연변이된 잔기는 굵고 밑줄을 그었다): GYIF**TDY****Y**IS (서열번호 120) (CDR1의 원래 DC8E8 서열)
- [0587] 14-VH-Y32A [서열번호 261]
- [0588] 15-VH-V33A [서열번호 262]
- [0589] CDR2에 선행하는 프레임워크 영역 FR2 중의 돌연변이: WVKQRTGQGLEWIG**E** (서열번호 162) (프레임워크 영역 FR2의 원래 DC8E8 서열)
- [0591] *16-VH-E50A [서열번호 263]

- [0592] CDR2 [서열번호 121] 중의 돌연변이: IFPRSGST (서열번호 121) (CDR2의 원래 DC8E8 서열)
- [0593] 17-VH-F52A [서열번호 264]
- [0594] 18-VH-S57A [서열번호 265]
- [0595] CDR3 [서열번호 122] 중의 돌연변이: ARDYGTGTSFAMDY (서열번호 122) (CDR3의 원래 DC8E8 서열)
- [0596] 19-VH-D99A [서열번호 266]
- [0597] 20-VH-Y100A [서열번호 267]
- [0598] 21-VH-Y101A [서열번호 268]
- [0599] 22-VH-G102A [서열번호 269]
- [0600] 재조합 DC8E8 항체 변체의 분석 및 예비 발현:
- [0601] 야생형 항체 및 그의 돌연변이체의 pET22b-scDC8E8v DNA 구조물들(이들은 모두 His-태그된다)을 생산 균주 BL21(DE3)의 에스케리키아 콜라이 세포내로 형질전환시켰다. 상기 생성되는 클론들은 먼저 재조합 scDC8E8v의 생성에 대해 입증되었다. 형질전환 후에 수득된 개별적인 콜로니들을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 암피실린이 보충된 2 ml의 LB 배지에 접종하고 일정하게 교반하면서 37 °C에서 5 시간 동안 증식시켰다(문헌[Sambrook and Russell 2001]). 각 배양물의 100 μl 분액을 제거하고, 상기 부피의 2/3의 100% 글리세롤과 혼합하고 나중에 사용하기 위해 -80 °C에서 동결 보관하였다. 상기 재조합 단백질의 발현을, 아이소프로필- β -D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)의 1 mM의 최종 농도로의 첨가에 의해 유도하고 추가로 3 시간 동안 배양을 계속하였다. 상기 세포를 벤치탑 원심분리기에서 10,000xg에서 4 °C에서 1 분간 원심분리에 의해 수거하고, 상등액을 버리고, 세포 펠릿을 1 x SDS-샘플 완충제(문헌[Laemmli 1970])에 재현탁시키고 5 분간 비등시켰다. 상기 샘플을 10,000xg에서 5 분간 원심분리시키고 상등액(세균 용해물)을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분석하였다. 상기 분리된 단백질을 쿠마씨 브릴리언트 블루 R250(SIGMA)로 염색하여 가시화하였다.
- [0602] 각 scDC8E8v 항체(고유 및 돌연변이)의 예비 발현을 위해서, 각각의 발현 플라스미드를 함유하는 세균 세포를 배양하고 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory manual" by Sambrook and Russell (2001)]에 개시된 바와 같이 유도하였다. 형질전환된 세포를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 암피실린이 있는 LB 배지 100 내지 500 ml 중에서 230 rpm에서 37 °C에서 증식시켰다. 600 nm에서 상기 배양물의 흡광도가 0.8 내지 1.0에 도달했을 때, IPTG를 1 mM의 최종 농도로 가하여 scDC8E8v의 발현을 유도하였다. 37 °C에서 3 시간 동안 추가로 배양한 후에, 세포를 4 °C에서 15 분간 3,000 g에서 원심분리에 의해 수거하였다. 세포 펠릿을 10 ml의 용해 완충제(50 mM PIPES pH 6.9, 50 mM NaCl, 0.1 mM PMSF) 중에 재현탁시키고 TT-13 팁(50% 사용률, 50 W 출력, 소노펄스 HD 2200, 반델린, 독일 소재)을 사용하여 30 s 중지로 30 s 동안 얼음 상에서 6 회 초음파 처리하였다. 상기 용해물을 원심분리(4 °C에서 15 분간 21,000xg)에 의해 등분화하였다. 용해물을 0.45 μm 멤브레인 필터를 통해 여과하고 사용시까지 -80 °C에서 보관하였다. 발현의 성공적인 유도 및 수준의 검사를 위해서, 상기 유도된 배양물 1 ml을 수거하고, 상기과 같이 원심분리에 의해 세포를 수확하고, 100 μl 의 1 x SDS 샘플 완충제 중에 재현탁하고, 95 °C에서 5 분간 비등시키고 이어서 SDS-PAGE에 의해 분석하였다(도 23A). 상기 원형질 용해물을 타우 단백질의 결합/검출(웨스턴 블롯 분석에 의해) 및 타우에 대한 재조합 항체의 친화성의 SPR 측정을 위해 사용하였으며, 이들은 모두 고유 및 돌연변이 scDC8E8v 항체의 활성의 척도이다.
- [0603] 실시예 15: 단클론 항체 DC8E8(scDC8E8v)의 재조합 scFv 단편은 병적인 타우(타우 Δ (1-150;392-441)/4R)를 인식한다
- [0604] 타우의 병적인 형태에 대한 scDC8E8v의 결합 성질의 측정을 위해서, scDC8E8v를 발현하는 세균으로부터의 단백질 용해물을 TBS-T 완충제(20 mM 트리스 pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20)내로 16 배 희석하고 이를 사용하여 500, 250 및 125 ng의 재조합 절두된 타우 단백질(타우 Δ (1-150;392-441)/4R) 및 재조합 C-말단 절두된 타우 단백질(타우 Δ 228-441)을 함유하는 나이트로셀룰로스 멤브레인 위를 덮었다(상기 단백질들의 폰소 S 염색, 도 23B). 결합된 scDC8E8v를 항-6xhis태그(서열번호 163) 항체(No. A00174; 젠스크립트, 미국 뉴저지주 피스 카타웨이 소재)로 면역블롯팅함으로써 검출하고 항-토끼 HRP-접합된 항체(다코 사이토메이션, 덴마크 소재)로 가시화하였다(도 23C). 상기 블롯을 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(피어스, 미국 소재)로 전개시키고, 상기 신호를 LAS3000 영상화 시스템(후지 포토 필름 캄파니, 일본 소재)을 사용하여 검출하였다.
- [0605] 웨스턴 블롯 분석은 재조합 단일쇄 항체(scDC8E8v)가 타우[타우 Δ (1-150;392-441)/4R]를 검출함을 보였다. 상

기 결합은 특이적인데, 그 이유는 scDC8E8v가 본래의 DC8E8에 의해 인식되는 4 개의 치료 에피토프들 중 어느 것도 함유하지 않는 대조용의 절두된 타우 단백질 타우 Δ 228-441을 인식하지 못하기 때문이다(도 23C 라인 4). scDC8E8v를 발현하지 않는 대조용 세균으로부터의 용해물로 상기 타우 단백질(도 23B에 나타낸 바와 같이 로딩된)을 함유하는 나이트로셀룰로스 멤브레인을 탐침하는 것은 어떤 신호도 생성시키지 않았다(도 23D).

[0606] 실시예 16: 단클론 항체 DC8E8(scDC8E8v)의 제조합 SCFV 단편은 상기 EC8E8 항체와 유사한 타우 결합 성질을 나타낸다 - 병적인 타우(타우 Δ (1-150;392-441)/4R)를 선택적으로 인식하고 생리학적, 고유 타우(타우2N4R)로부터 이를 뚜렷하게 식별한다.

[0607] 제조합 단일쇄 항체 scDC8E8v의 타우 결합 성질을 정량분석하기 위해서, 동역학적 친화성 측정을 병적인 절두된 타우(타우 Δ (1-150;392-441)/4R)(도 24A) 및 정상적인 인간 4 개의 반복 타우 동형단백질 2N4R(도 24B)에 대한 scDC8E8v의 결합을 측정하는 SPR(비아코어 3000, 비아코어, 스웨덴 소재)에 의해 수행하였다. 이를 위해서, 11,000 RU의 토끼 다클론 항-His 태그 항체(No. A00174; 젠스크립트, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 CM5 센서 칩상에 고정화시켰다. 모든 실험을 실행 완충제로서 0.005%의 P20(PBS-P)을 사용하여 PBS pH 7.4 중에서 25 °C에서 수행하였다. 제조합 His-태그된 scDC8E8v를 60 RU의 고정화에 도달하도록 분석학적 유동 세포에서 포획하고, 기지 농도의 각 타우 단백질 또는 PBS-P 대조용 샘플을 센서 칩 상에 100 μ l/분의 유속으로 주입하였다. 동역학적 결합 데이터를 이중 참조하고 BIA 평가 소프트웨어 4.1(비아코어 AB)에 의해 1:1 상호작용 모델에 맞추었다. 동역학적 속도 상수를 전체적으로 어렵하고, 최대 반응을 국소적으로 맞추고, 벌크 반응을 0으로 설정하였다.

[0608] 상기 동역학적 측정은 정상 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 AD 타우 Δ (1-150;392-441)/4R에 대해서 더 높은 결합 속도 상수 및 더 낮은 해리 속도 상수를 보였다(도 24C). 결과적으로, 절두된 AD 타우에 대한 scDC8E8v의 친화성은 완전길이 타우 동형단백질 2N4R의 경우보다 더 높다(더 높은 값의 평형 결합 상수 K_A). 이러한 측정은 DC8E8 항체의 단일쇄 버전(scDC8E8v)이 모 완전길이 DC8E8 항체처럼, 형태적으로 변경된, 병적인 타우 단백질에 대해 결합 편애를 보임을 입증하였다. 따라서 제조합 scDC8E8v는 그의 결합 성질을 맡고 있는 DC8E8 항체 결합 부위 내의 아미노산 잔기를 확인하기에 적합하다.

[0609] 실시예 17: 병적인 타우 에피토프의 scDC8E8v/DC8E8의 인식에 영향을 미치는 scDC8E8v 결합 부위 중의 잔기의 확인

[0610] DC8E8-항원 상호작용에 영향을 미치는 다수의 아미노산 잔기들을 scDC8E8v 결합 부위의 잔기의 돌연변이의 알라닌 스캐닝에 의해 측정하였다. 경쇄 및 중쇄 중의 잠재적인 항원-접촉 잔기들을 문헌[MacCallum et al., J. Mol. Biol. 1996]의 연구를 근거로 확인하였으며 실시예 14에 개시된 바와 같이 알라닌에 대해 돌연변이시켰다. scDC8E8v의 돌연변이체 버전들을 BL21 에스케리키아 콜라이 균주에서 후속 발현시켰다(도 25A, 단일쇄 단백질을 별표로 나타낸다). 상기 돌연변이된 scDC8E8v의 결합 성질을 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다(도 25B-C). 도 25B는 다양한 양의 절두된 타우 Δ (1-150;392-441)/4R 단백질을 함유하는 나이트로셀룰로스 멤브레인의 폰소S 염색을 도시한다. 동일한 멤브레인들을 다양한 돌연변이 단일쇄 항체에 의한 절두된 타우의 검출에 사용하였다(도 25C).

[0611] 상기 결과를 근거로, DC8E8의 가변 영역 중의 아미노산 잔기들을 하기와 같이 3 개의 주요 범주로 분류하였다:

[0612] 범주 1: 본 범주에 나열된 잔기들(굵게)은 병적인 절두된 AD 타우(타우 Δ (1-150;392-441)/4R)에 대한 scDC8E8v의 결합에 가장 기여하였다. 알라닌에 대한 이들 잔기 중 어느 하나의 돌연변이가 타우 단백질 상의 DC8E8 에피토프의 인식을 가장 방지하였다.

[0613] DC8E8 경쇄 중의 범주 1 잔기:

[0614] CDR1[서열번호 117] 중의 31번 위치의 **아스파라진**

[0615] CDR1[서열번호 117] 중의 38번 위치의 **타이로신**

[0616] CDR3[서열번호 119] 중의 97번 위치의 **세린**

[0617] DC8E8 중쇄 중의 범주 1 잔기:

[0618] CDRH2[서열번호 121]에 선행하는 FRH2 중의 50번 위치의 **글루탐산**

[0619] CDRH3[서열번호 122] 중의 101번 위치의 **타이로신**

- [0620] 범주 2: 본 범주에 나열된 잔기들은 병적인 절두된 AD 타우(타우 Δ(1-150;392-441)/4R)에 대한 scDC8E8v의 결합에 기여한다. 알라닌에 대한 이들 잔기 중 어느 하나의 돌연변이가 절두된 AD 타우(타우 Δ(1-150;392-441)/4R)에 대한 scDC8E8v의 반응성을 감소시키지만, 범주 1 잔기에 대한 돌연변이보다 적은 정도로 방지한다:
- [0621] DC8E8 경쇄 중의 범주 2 잔기:
- [0622] CDRL2[서열번호 118]에 선행하는 FRL2 중의 55번 위치의 **타이로신**
- [0623] CDRL3[서열번호 122] 중의 102번 위치의 **리신**
- [0624] DC8E8 중쇄 중의 범주 2 잔기
- [0625] CDRH2[서열번호 121] 중의 57번 위치의 **세린**
- [0626] CDRH3[서열번호 122] 중의 100번 위치의 **타이로신**
- [0627] CDRH3[서열번호 122] 중의 102번 위치의 **글리신**
- [0628] 범주 3: 본 마지막 범주에 나열된 잔기들은 병적인 절두된 AD 타우(타우 Δ(1-150;392-441)/4R)에 대한 scDC8E8v의 결합에 최소로 기여한다. 알라닌에 대한 이들 잔기의 돌연변이는 절두된 AD 타우(타우 Δ(1-150;392-441)/4R)에 대한 scDC8E8v의 반응성을 변화시키지 않는다:
- [0629] 경쇄 중의 범주 3 잔기:
- [0630] CDRL1[서열번호 117] 중의 33번 위치의 **아르기닌**
- [0631] CDRL2[서열번호 118] 중의 56번 위치의 **트립토판**
- [0632] CDRL3[서열번호 119] 중의 96번 위치의 **글루타민**
- [0633] CDRL3[서열번호 119] 중의 98번 위치의 **페닐알라닌**
- [0634] CDRL3[서열번호 119] 중의 99번 위치의 **타이로신**
- [0635] CDRL3[서열번호 119] 중의 100번 위치의 **류신**
- [0636] CDRL3[서열번호 119] 중의 101번 위치의 **아르기닌**
- [0637] 중쇄 중의 범주 3 잔기
- [0638] CDRH1[서열번호 120] 중의 32번 위치의 **타이로신**
- [0639] CDRH1[서열번호 121] 중의 33번 위치의 **발린**
- [0640] CDRH2[서열번호 121] 중의 52번 위치의 **페닐알라닌**
- [0641] CDRH3[서열번호 122] 중의 99번 위치의 **아스파르트산**
- [0642] **실시예 18: 치료 타우 에피토프에 의한 능동 백신화: 타우상의 DC8E8 결합 에피토프를 기본으로 하는 백신을 위한 면역원의 제조 및 백신 투여**
- [0643] a. 펩타이드: 인간 타우 단백질 2N4R의 합성 단편들로 이루어지는 펩타이드 면역원을 안타진 인코포레이티드 (Antagen, Inc.)(미국 캘리포니아주 썬니베일 소재) 및 이지바이오랩(미국 소재)에 의해 95% 초과로 순도로 합성하였다. 각 펩타이드 서열을 타우 피브릴화/응집에 관여하고/하거나 촉진하는 것으로 여겨지는 서열들 중 하나 이상을 포함하도록 설계하였으며(신규의 표적 "치료 에피토프"), 상기 에피토프는 상기에서 DC8E8에 대한 결합 부위로서 및 실시예 1 내지 11에 개시된 분석에 의해 확인되었다. 도 26A를 참조하십시오. 이들 4 개의 서열을 또한 본 발명에서 "치료 에피토프"라 칭한다(하기 참조). 이들 에피토프는 타우-타우 상호작용 동기(응집 에피토프)를 나타내며, 이는 타우 피브릴화/PHF 조립에 중요하다. 따라서, 이들 전략적 치료 에피토프를 표적화하는 것은 AD 및 관련된 타우병증의 성공적인 치료에 이르게 할 수 있다. 더욱 또한, 상기와 같은 특이적 타우-타우 요법의 사용은 무작위로 선택되는 타우 에피토프에 의존하는 광범위한 목적의 요법들보다 더 안전한 것으로 입증되었는데, 그 이유는 일부 타우 에피토프의 표적화는 자가면역 반응을 일으키고 상기 질병을 잠재적으로 악화시키는 것으로 생각되었기 때문이다(문헌[Furlan et al., 2003]; [Gruden et al., 2004]).
- [0644] 따라서, 타우-기재 면역요법의 치료 가능성을 추가로 측정하기 위해서, 다수의 타우 펩타이드 집합을 면역원으로서 사용하기 위해 지정하였다. 상기 잔기들은 모두 완전길이 타우 2N4R의 것들을 지칭하며, 이들은 441 아미노산

노산 잔기를 갖는다. 첫 번째 면역원 집합은 서열번호 1 타우 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280; 서열번호 2 타우 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285; 서열번호 3 타우 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQ-288; 서열번호 4 타우 275-VQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304; 서열번호 5 타우 201-GSPGTPGSRSPTPSLPTPTREPKKVAVVR-230; 서열번호 6 타우 379-RENAKAKTDHGAEI VYKSPVVS GDTSPRHL-408; 서열번호 7 타우 181-TPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSP-210; 서열번호 8 타우 300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317; 및 서열번호 108 타우 294-KDNIKHVPGGGS-305로 구성되었다. 이들 서열 중 일부는 AD 타우 병리에서 앞서 발견된 인산화된 에피토프를 갖는다. 따라서, 타우 펩타이드 서열번호 5는 217번 위치에서 인산화된 쓰레오닌을 함유하고, 타우 펩타이드 서열번호 6은 396 및 404번 위치에서 인산화된 세린 잔기를 함유하고, 타우 펩타이드 서열번호 7은 202번 위치에서 인산화된 세린 및 205번 위치에서 쓰레오닌을 함유한다. 타우 펩타이드 서열번호 2는 인산화되지 않은 형태 및 인산화된 형태로 합성되었다. 상기 인산화된 형태는 262번 위치에서 인산화된 세린 잔기를 함유한다.

[0645] 상기 집합 내에서, 면역원의 하나의 부분집합(타우 펩타이드 서열번호 1-4 및 108)은 서열번호 98(타우 267-KHQPGGG-273) 또는 서열번호 99(타우 298-KHVPGGG-304)에 의해 나타낸 치료 에피토프들 중 하나를 포함한다. 타우 펩타이드(서열번호 5-7)의 또 다른 부분집합은 알츠하이머병 및 다른 타우병증에서 발견되는 인산화된 부위를 포함한다. 타우 펩타이드 서열번호 8은 상기 언급한 에피토프들 중 임의의 것을 갖지 않으며 대조군으로서 사용된다(도 26).

[0646] 상기 펩타이드의 두 번째 집합은 서열번호 9 내지 97로 구성되었으며, 이들은 인간 타우 2N4R의 잔기 244-390에 걸쳐 있는 중복 서열들을 나타낸다. 이들 펩타이드는 각각 상이한 타우-기재 환경에서 상기 타우 치료 에피토프 서열들 중 하나를 포함한다. 즉, 각각의 부분집합에서, 에피토프 #1 내지 #4는 각각 그의 N- 및 C-말단 모두 상에 상이한 타우 잔기들에 의해 둘러싸인다(도 26).

[0647] b. 백신으로서 사용하기 위한 접합: 타우 펩타이드 서열번호 2, 4, 7 및 108을 시스테인 링크를 통해서 키홀 림프 헤모시아닌(KLH)에 접합시켰다.

[0648] 이를 위해서, 타우 펩타이드 서열번호 2, 4, 7 및 108을 상기 KLH 단백질의 표면에 상기 펩타이드의 배향된 부착을 획득할 목적으로 잉여 N-말단 배치된 시스테인 잔기를 갖는 시스테인화된 펩타이드로서 합성하였다. 펩타이드들을 이작용성 가교결합제 N-[γ -말레이미도부틸옥시]숙신이미드 에스터(GMBS)를 통해 상기 KLH 담체에 커플링시켰다. 상기 접합 반응을 준비하기 위해서, 20 mg의 KLH(칼바이오켄(Calbiochem))를 접합 완충제(0.9 M NaCl, 10 mM EDTA를 갖는 PBS)와 함께 10 분간 온화한 혼합에 의해 10 mg/ml의 농도로 용해시켰다. 말레이미드-활성화된 KLH의 제조를 위해서, 2 mg의 활성 이작용성 가교결합제 GMBS를 50 μ l의 무수 다이메틸폼아미드에 용해시키고 실온에서 1 시간 동안 2 ml의 KLH 용액과 혼합하였다. 후속으로, 반응되지 않은 GMBS를 접합 완충제 중에서 평형화시킨 5 ml HiTrap 탈염 컬럼(GE 헬스케어) 상에서 제거하였다. 접합을 1:1 비의 펩타이드 대 말레이미드-활성화된 KLH(w/w, 20 mg의 펩타이드)에서 실온(25 °C)에서 2 시간 동안 수행하였다. 상기 생성되는 접합체를, 접합되지 않은 펩타이드의 제거를 위해 투석 완충제를 4 회 교환하면서 100 배 과잉의 PBS에 대해 투석시켰다. 투석 후에, 상기 접합체를 21,000xg에서 15 분 동안 2 °C에서 원심분리시켰다. 접합의 완성도를, LC-MS/MS를 사용하여 측정되는, 상기 투석 완충제 중의 유리 펩타이드의 부재에 의해 확인하였다. 상기 접합체를 분액하고 사용시까지 -20 °C에서 보관하였다.

[0649] c. 백신 제제: 알루미늄/알루미늄 항원보강제 애쥬포스(AdjuPhos)(브렌타크 바이오섹터(Brenntag Biosector), 덴마크 소재)를 갖는 면역화 용량을 제조하기 위해서, 200 μ g의 각각의 타우 펩타이드 접합체(150 μ l의 PBS 중에 용해됨)를 1:1(부피/부피) 비의 애쥬포스 항원보강제로, 300 μ l의 최종 용량 부피로 유화시켰다. 각각의 현탁액/유화액을 4 °C에서 밤새 회전기에 의해 배양하여 펩타이드가 상기 알루미늄 포스페이트 입자상에 흡착되도록 하였다.

[0650] 완전 프로인트 항원보강제를 갖는 면역화 용량을 제조하기 위해서, 200 μ g의 각각의 타우 펩타이드 접합체(PBS 150 μ l 중에 용해됨)를 1:1(부피/부피)의 완전 프로인트 항원보강제로, 300 μ l의 최종 용량 부피로 유화시켰다. 후속의 추가 용량을 위해서, 상기 면역원을 유사하게 제조하였으나, 불완전 프로인트 항원보강제로 유화시켰다.

[0651] d. 백신 투여: 제조된 백신 용량을 인간 절두된 타우 트랜스유전자(상기 실시예 7에 개시된 SHR72 계열, 타우 Δ (1-150;392-441)/4R(문헌[Zilka et al., 2006])을 발현한다)를 갖는 타우 트랜스제닉 래트에 주사하였다. 상기 래트에게 2개월령제에 300 μ l의 최종 부피로 200 μ g의 면역원의 1차 피하 주사를 제공한다음, 3 주 후에 2차 주사하고, 그 후에 매달 스케줄로 주사하였다. 대조용 트랜스제닉 래트에게 PBS와 1:1 혼합된 항원보강제를 제공하였다. 상기 면역요법의 효능 평가를 실시예 19에 개시한다.

- [0652] 백신-처리된 래트에서 불용성 타우의 정량분석에서 내부 표준으로서 사용하기 위한, 태아 래트 타우의 분리 및 정제:
- [0653] 태아 래트 타우 정제를 1% 과염소산을 사용하여, 필수적으로 문헌[Ivanovova et al., 2008]에 개시된 바와 같이 수행하였다. 1 내지 7일된 래트 새끼로부터 수득한 뇌 조직을 빙냉 1% 과염소산 중에서 균질화시키고(과염소산 PCA 5 ml당 1.5 g 조직) 얼음 상에서 20 분간 정치시켰다. 상기 균질물을 15,000xg에서 20 분간 회전시키고, 등명한 상등액을 농축시키고 동시에 상기 완충제를 아미콘(Amicon) 울트라 원심분리 필터 장치(밀리포어)를 사용하여 세척 완충제(20 mM 트리스, pH 7.4, 150 mM NaCl, 트윈 20)로 교환하였다. 약 10 mg의 총 단백질을 함유하는 상기 여과된 PCA 뇌 추출물을 고정화된 판-타우 mAb DC25(상기 참조)를 갖는 세파로스가 충전된 폴리-프랩 컬럼 C10/10(GE 헬스케어) 상에 0.2 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 결합되지 않은 단백질을 용출 분획의 흡광도(280 nm에서)가 안정해질 때까지 10 내지 15 ml의 세척 완충제로 세척하였다. mAb DC25에 결합된 태아 타우를 0.1 M 글리신, pH 2.6으로 용리시켰다. 용리된 0.5 ml 분획을 50 μ l의 1 M 트리스-HCl, pH 9로 즉시 중화시키고, SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 태아 타우를 함유하는 분획을, 완충제를 PBS로 교환하는 동시에 아미콘 울트라 원심분리 필터 장치(밀리포어)를 사용하여 농축시켰다. 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 태아 타우를 10% 트라이클로로아세트산을 함유하는 4 부피의 빙냉 아세톤을 첨가하여 문헌[Chen et al., (2005)]에 따라 침전시켰다. 상기 혼합물을 -20 °C에서 2 시간 동안 배양하고 2 °C에서 15,000xg에서 20 분간 원심분리시켰다. 상등액을 버리고 침전물을 1 ml의 빙냉 아세톤에 재현탁시키고, 얼음 상에서 20 분간 정치시키고 다시 상기와 같이 원심분리시켰다. 상기 생성 펠릿을 실온에서 건조시키고 침전 전에 상기 부피와 동등한 부피의 PBS에 용해시켰다.
- [0654] **실시예 19: 알츠하이머병의 트랜스제닉 래트 모델에서 타우 펩타이드 백신의 일반적인 평가 방법**
- [0655] 능동 백신을 하기의 접근법에 의해 평가하였다: (a) 생화학적으로, 인산화-특이적인 단클론 항체 AT270, DC290, DC217 및 AT8을 갖는 래트 뇌 샘플의 면역블롯 분석을 사용하는 불용성 타우의 인산화된 형태의 수준, 및 판-타우 단클론 항체 DC25를 사용하는 불용성 타우의 총량에 대한 효과를 평가함으로써; (b) 신경행동적으로, 뉴로스케일 평가를 사용하여; (c) NFT 정량분석을 포함하여 면역조직화화학적으로; 및 (d) 유도된 항체 반응의 분석에 의해. 수동 백신을 또한 다른 것들 중에서도, 상기 접근법들 중 하나 이상에 의해 전임상적으로 평가할 수 있다.
- [0656] (a) 생화학적 분석: 실시예 8에 개시된 바와 같이, 시험 펩타이드로 면역시킨 트랜스제닉(SHR72) 래트의 뇌 줄기뿐만 아니라 모의-처리된 SHR72 래트(항원보강제만을 주사함(대조군))로부터, 사르코실 방법(문헌[Greenberg and Davies, 1990])을 사용하여 불용성 타우 분획을 제조하였다. 사르코실-불용성 타우 샘플을 하기에 개시하는 바와 같이, 다양한 단클론 항체를 사용하여 면역블롯팅에 의해 분석하였다. 면역원성 펩타이드 서열번호 1-8 및 108에 대한 상기 분석의 결과를 도 26B에 요약한다. 불용성 타우의 수준은 SHR72 트랜스제닉 래트의 타우 병리학의 진행과 상관있는 것으로 나타났다(문헌[Koson et al., 2008]).
- [0657] 면역블롯 분석: 사르코실-불용성 타우 분획의 샘플을 1/50 부피의 용해성 분획 중의 1x 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 샘플 로딩 완충제(문헌[Laemmli, 1970]) 중에 용해시키고(문헌[Filipcik et al. 2010] 참조) 95 °C에서 5 분간 가열하였다. 이어서 각각 6 μ l를 5 내지 20% 구배 SDS 폴리아크릴아미드 젤 상에 로딩하고 25 mA에서 40 분간 트리스-글리신-SDS 완충제 시스템에서 전기영동하였다. 단백질을 PVDF 멤브레인으로 옮겼다(10 mM CAPS, pH 12 중에서 150 mA에서 1 시간). 상기 이동 후에, 상기 멤브레인을 실온에서 1 시간 동안 PBS 중의 5% 무-지방 분유 중에서 차단시키고, 이어서 1 시간 동안 1차(타우-특이성) 단클론 항체(각 항체에 대한 보다 상세한 설명을 참조하십시오)와 함께 배양한 다음, 큰 부피의 PBS로 3 회 세척하였다. 세척 후에, 2차 항체로서, PBS로 1:4,000 희석한, HRP-접합된 염소 항-마우스 Ig(DAKO, 덴마크 소재)를 사용하였다. 배양(실온에서 1 시간)에 이어서 PBS 중의 0.2% 이계팔로 세척하였다(3 회). 상기 블롯들을 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(피어스, 미국 소재)로 전개시키고, 상기 신호를 LAS3000 영상화 시스템(후지 포토 필름 캄파니, 일본 소재)을 사용하여 검출하였다. 상기 신호 강도를 AIDA 소프트웨어(어드벤스드 이미지 데이터 분석기, 레이테스트, 독일 스트라우벤하르트 소재)를 사용하여 정량분석하였다. 태아 타우(0.6 μ g/레인)를 정량분석을 위한 내부 표준으로서 사용하였다.
- [0658] 단클론 항체 AT8 및 AT270을 이노제네틱스(Innogenetics, 벨기에 소재)로부터 구입하고 이들을 모두 면역블롯 분석에 사용하였다. AT8을 또한 면역조직화학에 사용하였다. AT8은 타우의 프롤린 풍부 도메인(타우의 미세소관-결합 친화성의 큰 부분에 기여한다) 중에 위치한 인산화된 세린 202 및 쓰레오닌 205를 인식한다. AT270은 프롤린 풍부 도메인 중에 또한 위치한 인산화된 쓰레오닌 181을 인식한다. 상기 두 항체는 모두 용해성 및 불

용성 타우에 결합한다. 본 연구에 사용된 인산화-특이성 단백론 항체 DC209(pT231을 인식한다), DC217(pT217을 인식한다)을 액손 뉴로사이언스 게엠베하(오스트리아 비엔나 소재)에 의해 제조하였다. 판-타우 항체 DC25(액손 뉴로사이언스 게엠베하)는 모든 형태의 용해성 및 불용성 타우 중의 타우 단백질(347-353)의 C-말단의 네 번째 미세소관-결합 반복부 중의 에피토프를 인식한다. DC25 항체는 그의 인산화 수준과 독립적으로 타우 단백질을 인식한다.

[0659] (b) 신경행동 평가: 래트에서 신경행동 반응을 뉴로스케일(원래 인간 절두된 타우 단백질을 발현하는 트랜스제닉 래트에 대해 설계된 일련의 행동 시험이다(문헌[Korenova et al., 2009])을 사용하여 최종 백신 투여 후 10 일째에 평가하였다. 상기 뉴로스케일은 기본적인 관찰 평가가 강화된, 감각운동(들보 걷기 시험), 신경근육(물건잡기 건인력 시험), 및 신경학적 임무(놓기, 바로잡기, 자세, 콧바퀴, 깜짝 놀람, 및 뒷다리 미끄러짐 신전 반사)로 구성된다.

[0660] 일반적인 관찰은 자세 및 사지 기능의 평가를 수반하였으며; 신경학적 검사는 기본적인 반사 반응을 포함하였고, 모두 1-점 규모로 평가되었다(정상 반응 0; 지연되거나 불완전한 반응 1 점). 상기 뒷다리 미끄러짐 신전 반사의 평가는 3-점 규모로 평가되었다(정상 반응 0-1; 결함 2-3 점).

[0661] 상기 들보 걷기 시험의 경우, 3 가지 종류의 횡단 조각을 사용하였다(3x3 cm, 4x2 cm, 및 3.5 cm 직경의 둥근 들보). 최대 점수는 10이었다(한가지 들보 유형 상에서 지연의 시간에 대해 5 점 + 뒷다리 미끄러짐에 대해 5 점). 상기 들보 걷기 시험으로부터 획득한 점수가 낮을수록, 시험된 동물의 감각운동-조화 능력이 양호하다. 성취가능한 점수들의 합은 30이었다.

[0662] 상기 물건잡기 건인력 시험의 경우, 래트가 그의 앞발로 폭신한 표면의 76 cm 위에 매달린 수평 강선(직경 3 mm)을 쥐게 하였다. 상기 강선으로부터 떨어질때까지의 시간을 측정하였다. 받을 수 있는 최대 점수는 5였으며, 이는 신경근육 기능의 중증 손상과 근육 허약을 반영한다. 떨어질때까지의 시간이 길수록, 상기 임무로부터 획득되는 점수는 낮았으며, 이는 시험된 동물의 앞다리 근육 강도 및 민첩성을 반영한다.

[0663] 상기 뉴로스케일 점수를 상기 개별적인 시험에서 획득한 점수들로부터 계산하였다. 관찰 평가, 신경학적 검사, 3 가지 일련의 들보 걷기 시험 및 물건잡기 건인력 시험의 기여를 더하여 최대 총 49 점의 점수가 가능하였다. 상기 신경행동 장애가 심할수록, 상기 뉴로스케일 점수가 높았다.

[0664] (c) 면역조직화학: 뇌 샘플의 수거를 위해서, 래트를 깊은 마취하에서 2 분 동안 PBS로 경심막으로 관류시켰다. 관류 후에, 상기 래트 뇌를 제거하고 2 개의 동등한 크기의 반구로 시상면으로 절단하였다. 우측 반구의 뇌줄기 및 소뇌를 생화학적 분석을 위해 수거하였다. 좌측 반구를 4 °C에서 밤새 4% 폼알데하이드로 고정시킨 다음 48 시간 동안 25% 슈크로스 처리하여 저온보호를 제공하였다. 이어서 상기 물질을 저온 2-메틸부탄(-42 °C) 중에서 30 s 동안 동결시키고 극저온마이크로톰상에서 절개하였다. 시상면 섹션(40 μm)을 -18 °C에서 저온유지 장치에서 절단하였다. 자유-부유 섹션들을 면역조직화학 연구에 사용하였다.

[0665] 면역조직화학 염색을 처리된 및 대조용 래트의 동결된 뇌 섹션상에서 수행하였다. 문헌[Koson et al., 2008]은 SHR72 트랜스제닉 래트의 뇌 중의 NFT의 수가 상기 동물의 사망 시간과 상관있음을 보인다(즉, NFT가 많을수록, 동물의 사망이 이른다). 상기 래트 뇌의 신경염색 변화를 분석하기 위해서, 상기 뇌의 시상면 섹션을 준비하였다. 자유 부유 조직 섹션을 실온(25 °C)에서 30 s 동안 저온(+4 °C)의 80% 폼산으로 처리하였다. 뇌 섹션을 실온에서 0.3% 트리톤 X-100 및 1% H₂O₂를 함유하는 PBS 중에서 20 분간 배양한 다음, 차단 용액(0.3% 트리톤 X-100, 1% 말 혈청을 함유하는 PBS) 중에서 30 분 배양한 다음, 4 °C에서 정제된 AT8 항체(차단 완충제 중의 0.2 μg/ml) 또는 하이브리도마 배양 상등액 DC217(차단 완충제 중의 1:100)과 함께 밤새 배양하였다. 상기 두 항체는 모두 트랜스제닉 래트의 뇌줄기에서 유사한 면역염색 패턴을 보였다. 세척 후에, 상기 섹션들을 표준 아비딘 비오틴 페록시다제 방법(ABC 엘리트, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재)을 사용하여 면역염색하였다. 상기 반응 생성물을 아비딘-비오틴 시스템 및 색원체로서 벡터 VIP(벡터 레보라토리즈)를 사용하여 가시화하였다. 이어서 섹션들을 올림푸스 BX51 현미경으로 검사하였다.

[0666] (d) 항체 반응: 상기 트랜스제닉 마우스를 상기 연구의 개시 전(즉 1차 주사 전) 및 최종 주사 후 2 주째에 채혈하였다. 투여된 면역원/백신에 대한 항체 반응을 연속 희석된 혈장 샘플을 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 펩타이드 면역원, 재조합 타우 단백질 타우 Δ(1-150;392-441)/4R, 및 재조합 완전길이 타우 동형단백질 2N4R을 96 웰 플레이트(이와키, 일본 소재) 상에, PBS 중의 10 μg/ml의 농도로 37 °C에서 별도로 코팅하였다. PBS 중의 1% 무지방 분유로 차단 후에, 상기 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 세척하고 37 °C에서 1 시간 동안 50 μl/웰의 연속 혈장 희석액(차단 완충제 중에서 1:200 내지 1:128,000)과 함께 배양하였다. 배양 및 세척

후에, 페록시다제-접합된 2차 항체(토끼 항-라트 Ig, DAKO, 덴마크 소재)를 1:1000 희석하고 37 °C에서 1 시간 동안 상기 웰에 적용시켰다(50 μ l/웰). 상기 반응을 페록시다제 기질 용액(0.1 M 포스페이트 완충제) 중의 o-페닐렌디아민으로 전개시키고 50 μ l 2 M H₂SO₄로 정지시켰다. 492 nm에서의 흡광도를 멀티스캔 MCC/340 ELISA 판독기(랩시스템스)를 사용하여 측정하였다. 음성 대조군 값의 2 배 이상의 흡광도 판독치는 양성으로 간주되었다.

[0667] 친화성 측정을 상기 실시예 5에 개시된 바와 같이, SPR을 사용하여 수행하였다. 간단히, 실험을 실행 완충제로서 0.005%의 P20(PBS-P)과 함께 포스페이트-완충된 염수 중에서 25 °C에서 수행하였다. 3000 RU(반응 단위)의 다클론 항-마우스 항체(No. Z 0420; 다코사이토메이션, 덴마크 글로스트롭 소재)를 1 차 아민을 통해, 동시에 2 개의 유동 세포(이중 하나는 상기 측정에서 기준으로서 사용되었다)에서, 5 μ g/ml의 농도(10 mM 나트륨 아세테이트 완충제 pH 4.5 중에서 0.5xPBS 모액 200 μ g/ml의 40배 희석에 의해 제조됨)로 커플링시켰다. 각 분석 순환에서, 1000 배 희석된 혈청을 약 850 RU(포화에 접근되었다)의 고정화 수준에 도달하도록 분석학적 유동 세포에서 포획하였다. K_A 측정을 위해서 뿐만 아니라 동역학적 속도 상수의 측정을 위해서, 타우 면역원성 펩타이드 또는 타우 단백질의 100 nM 용액을 센서 칩 상에 100 μ l/분의 유속으로 주입하였다. PBS-P 주사를 이중 참조 과정(문헌[Myszka J Mol Rec 1999])에서 배경 신호 삭감에 사용하였다. 동역학적 데이터를 BIA 평가 소프트웨어 4.1(비야코어 AB)에 의해 1:1 반응 모델에 맞추었다. 동역학적 속도 상수를 전체적으로 어렵하고, 최대 반응을 국소적으로 맞추고, 벌크 반응을 0으로 설정하였다.

[0668] 실시예 20: 4 개의 치료 에피토프 서열 중 하나 이상을 포함하는 타우 펩타이드 백신은 인간 알츠하이머병 모델 인 트랜스제닉 래트에 이롭다

[0669] a. 서열번호 1 타우 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGKVQIINK-280. 트랜스제닉 래트(SHR72)를 애쥬포스 항원보강제로 제형화한 타우 펩타이드 서열번호 1로 면역시켰다.

[0670] 용해성으로부터 사르코실-불용성 병적인 형태로의 타우의 전환은 타우 병리의 발생에 중요한 단계로서 보이며 다수의 인자들, 예를 들어 타우의 농도, 타우의 절두, 및 타우 인산화의 정도에 의존하는 것으로 보인다(문헌 [Alonso et al. 2001]; [Koson et al. 2008]; [Kovacech and Novak 2010]). 타우 펩타이드 서열번호 1로 면역된 래트의 그룹 및 대조용 그룹으로부터 수확된 사르코실 불용성 뇌 분획 중의 불용성 타우의 면역블롯 정량적 분석의 결과를 도 26C에 나타낸다. 상기 백신화는 대조용 래트(항원보강제만을 제공받음)에 비해 타우251-280(서열번호 1)으로 면역된 래트에서 불용성 타우의 양을 감소시켰다(도 26C). 이러한 감소는 불용성 타우의 전체적인 수준(간지 347-353을 인식하는 DC25 판-타우 항체에 의해 평가된 바와 같다)뿐만 아니라 도 26B 및 26C에 개시되고 사르코실-불용성 분획 중에 존재하는 것으로 공지된 다른 모든 시험된 AD-관련된 타우 에피토프(AD의 대용 마커) 모두에 대해 관찰되었다. 실제로, 타우 펩타이드 서열번호 1에 의한 면역화는 불용성 타우의 통계학적 유의수준(p<0.001) 감소를 유도하였으며, 이는 판-타우 단클론 항체 DC25를 사용한 전체 불용성 타우 수준(71%)에서 관찰되었다(도 26B, C). DC217(pThr217), AT270(pThr181)에 의한 분석은, 대조용 래트에 비해 상기 면역된 래트에서 불용성 타우의 Thr217(42%) 및 pThr181(58%)에서의 인산화 수준의 감소를 향한 성향을 밝혀냈다. 불용성 타우 단백질 포스포에피토프 pThr231에서 보다 약한 치료 효과(11%)가 관찰되었다(도 26B). 이러한 결과는 상기 백신이 타우-타우 상호작용의 경향이 있는 타우 단백질들의 수준의 감소에 관련된 기전 및/또는 타우 응집의 억제에 원인이 되는 기전을 활성화했음을 암시한다.

[0671] 타우 펩타이드 면역원 서열번호 1로 처리된 래트는 대조용 래트에 비해 들보 걷기 시험에서 통계적 유의수준의 감소된 이탈 지연을 나타내었다(*p = 0.045). 유사하게, 뒷다리 미끄러짐의 회수가 대조군에 비해 백신화된 그룹에서 감소되었으나; 상기 차이는 약간 통계학적으로 유의수준이었다(p = 0.059, 도 27B). 상기 뉴로스케일 점수(상기 실시예 19에 개시됨)를 상기 들보 걷기 시험, 물건잡기 견인력 시험 및 신경학적 검사(기본 반사, 뒷다리 미끄러짐 신전반사)에서 획득된 값으로부터 계산하였다. 상기 면역화는 대조용 그룹에 비해 펩타이드 서열번호 1로 처리된 래트의 뉴로스케일 점수를 개선시켰으나, 상기 개선은 통계학적으로 유의수준이 아니었다(p = 0.065, 도 27C). 전체 뉴로스케일 점수는 처리되지 않은 래트에 비해 시험된 래트의 신경행동 개선을 입증하였다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다.

[0672] 상기 신경행동 매개변수들은 뇌졸중 중의 불용성 타우 수준과 상관있었다. 낮은 수준의 불용성 타우로 처리된 래트는 대조용에 비해 보다 낮은 이탈 지연 및 뒷다리 미끄러짐을 보였다. 이러한 발견은 고도로 불용성인, 잘못된 접힌 타우의 감소가 면역된 래트에서 기능 개선을 도출하고, 이는 치료학적 수준을 가질 수 있음을 가리킨다. 타우 펩타이드 서열번호 1에 의한 면역요법은 처리된 래트의 신경행동 매개변수의 개선을 생성시켰다. 상기 효

과에 이어서 면역된 래트의 뇌 중의 불용성 타우 수준의 감소가 이어졌다. 상기 발견은 불용성 타우 수준을 낮추는 것이 치료학적 이점을 가짐을 가리킨다.

[0673] 타우 펩타이드 서열번호 1에 의한 면역요법의 효능을 면역조직화학적 수준에서 추가로 시험하였다(도 28). 신경섬유매듭(NFT)을, 병적인 타우상의 인산화된 에피토프를 인식하는 항-타우 항체 AT8, DC217을 사용하여, 처리된 및 모의-처리된 대조용 트랜스제닉 래트 SHR72(항원보강제/PBS만을 제공받았다)의 뇌줄기에서 분석하였다. NFT의 수를 반정량적인 방법을 사용하여 측정하였다. 3 개의 정량적인 수준이 지정되었다: 1) 없거나 거의 없는 신경섬유매듭(뇌줄기 중 3 개 이하); 2) 보통(주로 뇌 줄기의 망상체 중에 다수의 NFT); 및 3) 심함(뇌줄기 중의 모든 영역에 다수의 NFT). "광범위한"은 신경섬유 퇴행의 보통 내지 심한 단계를 의미한다. 면역조직화학적 분석은 트랜스제닉 동물의 백신-처리된 그룹에서 신경섬유매듭 부하의 50% 감소를 보였다.

[0674] 생화학적으로 측정된 불용성 타우 수준의 감소는 상기 면역조직화학적 분석 결과와 상관있었다. 서열번호 1에 의한 면역화로부터의 데이터는 DC8E8 에피토프 1번을 함유하는, 상기 에피토프의 치료 능력을 나타낸다.

[0675] b. 서열번호 2 타우 256-VKSKIGSTENLKHQPGGKVQIINK KLDLS-285. 트랜스제닉 래트(SHR72)를 담체 KLH에 접합된(상술한 바와 같이) 타우 펩타이드 서열번호 2로 면역시켰다.

[0676] 면역블롯 분석은 상기 백신이 항원보강제만을 제공받은 대조용 래트에 비해 면역된 래트에서 불용성 타우의 양을 감소시킴을 밝혔다. 도 29는 불용성/응집된 타우 중에 존재하는 모든 모니터링 에피토프의 감소를 보인다. 판-타우 DC25 면역반응성에 대한 정량적인 분석은 항원보강제만을 제공받은 대조용 래트에 비해 면역된 래트에서 불용성 타우의 41% 감소(통계학적 유의수준, $p < 0.001$)를 밝혀냈다(도 26B). 마찬가지로, 불용성 타우 상의 인산화된 AD-특이성 에피토프를 인식하는 다른 항체의 면역반응성이 감소되었다(도 26B 및 도 29). 추가로, 상기 처리는 또 다른 타우 포스포에피토프(2 개의 포스포잔기 Ser202/Thr205에 의해 생성되고 AD 병리의 마커로서 공지되어 있다)의 수준에 영향을 미쳤다. 상기 백신은 비-처리된 동물에 비해, 면역된 트랜스제닉 래트에서 상기 에피토프의 80% 감소를 유도하였다. 유사하게, 상기 인산화된 타우 에피토프 Thr217, Thr231, 및 Thr181의 수준이 각각 72% ($p < 0.001$), 64%, 및 74% ($p < 0.01$)까지 감소되었다. 이러한 결과는 상기 백신이 병적인 타우-타우 상호작용의 경향이 있는 타우 종들을 낮추는 기전 및/또는 타우 응집의 억제를 맡고 있는 기전을 유도했음을 암시한다.

[0677] 상기 래트에 대해 행동 분석을 수행하였으며, 도 30은 들보 걷기 시험(도 30A), 뒷다리 미끄러짐 시험(도 30B), 및 뉴로스케일 분석(도 30C, $p, 0.05$)에서 획득된 결과들을 도시한다. 들보 걷기 이탈 지연에서 양의 성향은 타우 펩타이드 서열번호 2로 처리된 래트 그룹에서 관찰되었다($p = 0.096$). 상기 면역화는 횡단 들보 시험에서 뒷다리 미끄러짐 수를 감소시켰으나; 그 차이는 대조군에 비해 통계학적으로 유의수준이 아니었다($p = 0.25$). 운동 장애 시험을 물건잡기 견인력 시험 및 신경학적 검사와 함께 뉴로스케일 점수로 요약하였다. 도 30은 대조군에 비해 타우 펩타이드 서열번호 2로 처리된 래트의 뉴로스케일 점수의 통계학적 유의수준의 개선을 보인다($p = 0.036$). 일반적으로, 타우 펩타이드 서열번호 2에 의한 면역화는 전체 운동 성능을 개선시켰다. 신경행동 수준에 대한 개선은 대조군에 비해 면역된 동물 중의 불용성 타우(AD-주형 타우)의 양의 감소와 상관있었다. 이러한 발견은 불용성 타우 수준의 강하가 치료학적 이점을 가질 수 있음을 가리킨다.

[0678] 타우 펩타이드 서열번호 2에 의한 면역요법의 효능을 면역조직화학적 수준에서 추가로 시험하였다(도 31). 이를 위해서, 2 개의 상이한 항-타우 항체(둘 다 인산화된 용해성 및 불용성 타우를 인식한다)(AT8, DC217)를 사용하였다. 이들 래트(SHR72)에서, 신경섬유 병리는 주로 뇌줄기 및 척수에, 및 부분적으로 소뇌에 위치한다(데이터 도시 안 됨). NFT의 수를 반정량적인 방법을 사용하여 측정하였다. 3 개의 정량적인 수준이 지정되었다: 1) 없거나 거의 없는 신경섬유매듭(뇌줄기 중 3 개 이하); 2) 보통(주로 뇌 줄기의 망상체 중에 다수의 NFT); 및 3) 심함(뇌줄기 중의 모든 영역에 다수의 NFT). "광범위한"은 신경섬유 퇴행의 보통 내지 심한 단계를 의미한다. 펩타이드 서열번호 2에 의한 면역요법은 뇌줄기에 광범위한 NFT를 갖는 트랜스제닉 래트의 수를 거의 60%까지 감소시켰다(도 31).

[0679] 상기 결과는 타우 펩타이드 서열번호 2에 의한 백신화가 다수의 바람직한 백신 성과, 즉 1) 생화학적 수준에서 면역된 트랜스제닉 래트의 뇌 중의 불용성 타우의 감소; 2) 행동 수준에서 상기 면역된 트랜스제닉 래트의 감감 운동 결함의 경감; 및 3) 면역조직화학적 수준에서 신경섬유 병변수의 감소를 보임을 입증한다.

[0680] 인산화된 Ser262를 갖는 서열번호 2 타우 256-VKSKIGSTENLKHQPGGKVQIINKKLDLS-285. 262번 위치에서 인산화된 세린을 함유하는 서열번호 2를 KLH에 접합시켰다.

- [0681] DC25 항체를 갖는 래트 뇌 사르코실-불용성 타우 분획의 면역블롯은 상기 백신이 항원보강제만을 제공받은 대조용 트랜스제닉 래트에 비해 면역된 동물에서 전체 불용성 타우의 양을 46%까지 통계학적 유의수준으로 감소시킴 ($p < 0.01$)을 밝혀냈다(도 32 및 도 26B, DC25-기재 측정("347-353" 데이터)). 마찬가지로, DC209 (pThr231), DC217 (pThr217), AT8 (pSer202, pThr205) 및 AT270 (pT181)의 신호의 정량분석은 대조군에 비해 동물의 면역된 그룹 중의 불용성 인산화된 타우의 보다 낮은 수준을 보였다(도 26B). 그러나, pThr217 ($p < 0.001$; 73%), pThr231 (84%), pSer202/pThr205 (82%) 및 pThr181 ($p < 0.01$; 82%)에서 인산화된 불용성 타우의 수준의 감소는 전체 불용성 타우 중에서 관찰된 감소보다 더 현저하였다. 상기 AD 타우 잘못접힘 캐스케이드에 관련된 포스포에피토프의 이러한 수준 변화는 상기 치료 효과에 대한 유용한 지표이다. AD-관련된 타우 에피토프의 감소는 상기 백신이 내생 타우와 병적인 상호작용의 경향이 있는 타우의 수준을 감소시키는 기전 및/또는 타우 응집의 억제를 맡고 있는 기전을 활성화시켰음을 보인다.
- [0682] 면역조직화학 프로파일(도 33)은 포스포펩타이드 서열번호 2에 의한 면역요법이 뇌줄기 중에 광범위한 NFT를 갖는 트랜스제닉 래트의 수를 감소시킴을 보인다. 대조용 비-면역된 그룹에 비해, 광범위한 NFT를 갖는 트랜스제닉 래트의 수의 78% 감소가 상기 면역된 그룹에서 관찰되었다. 상기 면역화는 면역된 동물물에서 뇌 타우 병증의 발생을 중단시켰다. 유사한 효과가 생화학적 수준에서 획득되었으며, 이때 분석된 AD-관련된 에피토프상의 불용성 타우가 감소되었다(도 26B 및 32).
- [0683] 이러한 결과는 타우 포스포펩타이드 서열번호 2/pSer262에 의한 백신화가 1) 생화학적 수준에서 면역된 트랜스제닉 래트의 뇌 중의 불용성 타우의 감소; 및 2) 면역조직화학적 수준에서 신경섬유 병변 수에 대한 양의 치료 효과를 유발시켰음을 입증한다.
- [0684] d. 서열번호 3: 타우 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288. 트랜스제닉 래트(SHR72 계열)를 알룸 항원보강제(애쥬포스)로 제형화된 타우 펩타이드 서열번호 3으로 면역시켰다.
- [0685] 도 34는 면역요법이 항원보강제만을 제공받은 대조용 래트에 비해 면역된 래트에서 불용성 타우를 감소시킴을 입증한다. 상기 불용성 타우 수준의 감소가 모든 분석된 타우 에피토프들(즉 347-353/DC25 항체, pT217/DC217 항체, pT231/DC209 항체, pS202/pT205/AT8 항체, 및 pT181/AT270 항체)에 대해 검출되었다. 상기 전체 불용성 타우의 수준이 판-타우 항체 DC25에 의한 면역검출에 의해 나타난 바와 같이, 40%까지 감소되었다. 유사하게, 상기 백신은 도 26B 및 도 34에 나타난 바와 같이, pT217에서 인산화된 타우 단백질의 30% 감소를 유도하였다. 상기 처리는 비-면역된 래트에 비해, 면역된 래트에서 Thr231 (63%), Thr181 (74%), 및 Ser202/Thr205 (61%)에서 인산화된 불용성 타우 형태의 수준에 대해 더 큰 효과를 가졌다(도 26B 및 도 34). 이러한 발견은 병리에 이르는 불용성 타우의 감소가 타우 단백질의 수준의 추가적인 변경을 도출시킬 수 있으며 따라서 치료학적 중요성을 가질 수 있음을 보인다. AD-관련된 타우 에피토프의 감소는 상기 백신이 타우 응집의 억제를 맡고 있는 기전 및/또는 내생 타우와 병적인 상호작용의 경향이 있는 타우의 수준을 감소시키는 기전을 활성화시켰음을 보인다.
- [0686] 도 35A 내지 C는 신경행동 평가에 의해 획득된 결과를 보인다. 펩타이드 서열번호 3에 의해 처리된 래트의 그룹에서, 들보 걷기 이탈 지연에서 양의 추세가 관찰되었으나; 상기 펩타이드-처리된 및 비-처리된/대조용 래트 간에 통계학적 유의수준의 차이는 없었다(도 35A; $p = 0.21$). 유사하게, 처리는 비처리된 래트에 비해 면역된 그룹에서 뒷다리 미끄러짐 회수의 감소를 도출하였지만, 상기 효과는 통계학적으로 유의수준이 아니었다(도 35B, $p = 0.15$). 전체 뉴로스케일 점수는 비처리 래트에 비해 타우 펩타이드 서열번호 3으로 처리된 래트에서 신경행동적 개선을 입증하였다(두 경우 모두 $p = 0.11$). 그러나, 뉴로스케일 점수의 차이는 통계학적으로 유의수준이 아니었다($p = 0.19$). 타우 펩타이드 서열번호 3에 의한 면역요법은 들보 걷기 시험뿐만 아니라 뒷다리 미끄러짐 시험에서 대조용 래트에 비해 처리된 래트의 보다 양호한 감각운동 조화를 생성시켰으며; 이러한 결과는 뉴로스케일 점수에 의해 입증되었다.
- [0687] 더욱이, 상기 면역조직화학적 프로파일은 포스포펩타이드 서열번호 3에 의한 면역요법이 백신-처리된 동물의 뇌 줄기에서 NFT의 58% 감소를 도출함을 보였다(도 36). 상기 결과는 DC8E8 에피토프 1번을 함유하는 서열번호 3에 의한 면역화가 NFT로 조립되는 병적인 중합체성 타우를 현저하게 감소시켰음을 보인다. 더욱 또한, 상기 양의 처리 효과는 불용성의 병적인 타우의 통계학적 유의수준의 감소에 의해 나타난, 생화학적 수준에서 또한 나타났다.
- [0688] e. 서열번호 4 타우 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPVGGG-304. 타우 펩타이드 서열번호 4를 KLH에 접합시켰으며 이를 알룸 항원보강제(애쥬포스)에 의한 면역화에 사용하였다.

- [0689] 도 37 및 도 26B는 서열번호 4에 의한 면역요법이 항원보강제만을 제공받은 대조용 래트에 비해 면역된 래트에 서 불용성 타우의 양을 감소시킴을 보인다. 상기 데이터는 모든 분석된 타우 에피토프에 대해 불용성 타우 수준의 감소가 검출되었음을 보인다. 전체 불용성 타우 수준이, 판-타우 항체 DC25에 의해 밝혀진 바와 같이, 63%까지 감소되었다. 유사하게, 상기 백신은 도 26B에 나타난 바와 같이, pThr217 (92%), Thr231 (95%), Thr181 (87%), 및 Ser202/Thr205 (95%)에서 인산화된 타우 단백질의 감소를 유도하였다. 불용성 타우의 수준이 타우 병리학의 진행과 상관있음은 앞서 입증되었다(문헌[Zilka et al., 2006]), 본 결과는 서열번호 99내에 포함된 치료학적 타우 에피토프에 관한 면역요법이 불용성 타우의 수준을 감소시키고 타우 병리학의 진행을 지연시킬 수 있음을 보인다.
- [0690] 복합 운동 장애를 복합 점수 - 뉴로스케일에서의 신경 검사와 결합된 일련의 표준 운동 시험에 의해 측정하였다. 6.5 개월된, 타우 펩타이드 서열번호 4로 처리된 트랜스제닉 래트 SHR72에 대해 상기 면역요법의 효과를 측정할 목적으로 행동 시험을 수행하였다. 타우 펩타이드 면역원 서열번호 4로 처리된 래트는 항원보강제만을 제공받은 트랜스제닉 래트(대조군)에 비해, 들보 걷기 시험에서 감소된 이탈 지연을 나타내었다(도 38A). 유사하게, 뒷다리 미끄러짐 회수의 양의 결과가 트랜스제닉 처리 대조군과 비교하여 백신화된 그룹에서 관찰되었다(도 38B). 전체 뉴로스케일 점수를 들보 걷기 시험, 물건잡기 견인력 시험, 및 신경학적 검사(기본 반사, 뒷다리 이탈 신전반사)에서 획득된 데이터로부터 계산하였다. 상기 면역화는 대조용 치료 그룹에 비해, 펩타이드 서열번호 4로 처리된 래트의 뉴로스케일 점수를 개선시켰다(도 38C). 전체 뉴로스케일 점수는 처리되지 않은 트랜스제닉 래트에 비해 처리된 트랜스제닉 래트의 신경행동 개선을 입증하였다.
- [0691] 타우 펩타이드 서열번호 4에 의한 면역요법의 효능을 면역조직화학적 수준에서 추가로 시험하였다(도 39). 신경섬유매듭(NFT)을 백신-처리된 및 항원보강제-처리된(대조용) SHR72 래트의 뇌줄기에서, 항-타우 항체 AT8 및 DC217(병적인 타우 상의 인산화된 에피토프를 인식한다)을 사용하여 분석하였다. 항원보강제만을 제공받은 동물로부터의 뇌 조직은 상기 뇌줄기의 모든 영역 및 주로 뇌줄기의 망상체에서 AT8- 및 DC217-양성 NFT를 함유하였다. 면역조직화학적 분석은 백신-처리된 트랜스제닉 래트 SHR72에서 신경섬유 병리의 66% 감소를 보였다(도 39).
- [0692] 트랜스제닉 래트 계열 SHR72의 뇌줄기 중의 불용성 타우 수준의 변화는 치료 효과의 민감한 지표이다. 불용성 전체 타우뿐만 아니라 인산화된 타우 수준(병적인 단량체, 이량체, 올리고머 및 중합체) 모두 타우 펩타이드 서열 4에 의한 처리에 의해 뇌줄기 중에서 유효하게 감소되었다(63-95% 감소; 도 26B). 측정된 불용성 타우 수준의 감소는 면역조직화학 분석으로부터 획득된 결과와 생화학적으로 상관있었다. 이러한 분석은 백신-주입된 트랜스제닉 래트의 뇌줄기에서 신경섬유 병리의 60% 초과 감소를 보였다(도 38). 서열번호 4에 의한 면역화로부터의 데이터는 DC8E8 에피토프 2변을 함유하는, 상기 펩타이드의 치료 성능을 보인다.
- [0693] f. 217번 위치에서 인산화된 쓰레오닌을 갖는 서열번호 5 타우 201-GSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKAVVR-230. 쓰레오닌 217의 위치에서 인산화된, 타우 펩타이드 서열번호 5를 알람 항원보강제(애쥘포스)를 사용하여 SHR72 트랜스제닉 래트에 투여하였다.
- [0694] 면역블롯 분석은 포스포펩타이드 서열번호 5에 의한 면역화가, 항원보강제만을 제공받은 대조용 Tg 래트에 비해 전체 불용성 타우의 양에 영향을 미치지 않음을 보였다(도 40 및 도 26B). 그러나, 항체 DC209 및 AT270에 의한 분석은 불용성 타우 분획 중 포스포-타우 pThr231 및 pThr181 수준의 약 30% 감소를 밝혔다(도 26B). 다른 한편으로, 처리는 대조용 트랜스제닉 래트에 비해, 쓰레오닌 217에서 인산화된 불용성 타우(11% 증가) 및 포스포부위 Ser202/Thr205를 갖는 타우(31% 증가)의 보통의 증가를 유도하였다. 이러한 발견은 상기 평가된 AD-관련된 마커상의 포스포펩타이드 서열번호 5에 의한 면역화의 모호하거나 애매한 백신 효과를 암시할 것이며, 상기 펩타이드는 치료 에피토프로서 상기 나타난 타우 응집 에피토프 #1 내지 #4 중 임의의 것을 포함하지 않는다(실시예 1 내지 11).
- [0695] 인산화된 타우 펩타이드 서열번호 5로 처리된 래트의 신경행동 분석은 대조용 그룹에 비해 들보 걷기 시험(도 41A, $p = 0.19$)에서 또는 뒷다리 미끄러짐 회수에서 처리된 그룹의 신경행동 기능의 현저한 개선이 없음을 보였다(도 41B). 전체 뉴로스케일 점수(도 41C)는 모의-면역된 래트에 비해 처리된 래트의 신경행동 개선이 없음을 입증하였다($p = 0.28$).
- [0696] 타우 포스포펩타이드 서열번호 5에 의한 면역요법은 면역조직화학에 의한 대조용 트랜스제닉 래트에 비해 뇌줄기 중의 광범위한 NFT를 갖는 트랜스제닉 래트(SHR72)의 수를 감소시키지 않았다(도 42).
- [0697] 이러한 결과는 치료 에피토프(서열번호 98-101)가 전부 없는 타우 펩타이드 서열번호 5 pT217에 의한 백신화는

신경행동 기능의 통계학적 유의수준의 개선을 생성시키지 않고 단지 면역조직화학 수준에서 신경섬유 병변수의 대략 11%의 감소만을 생성시킴을 보인다. DC25 항체에 의해 평가된 바와 같이, 불용성 타우의 감소에 관하여 생화학적 수준에 대한 효과는 관찰되지 않았다.

[0698] g. 396 및 404 위치에 인산화된 세린 잔기를 갖는 서열번호 6 타우 379-RENAKAKTDHGAEIVYKSPVWSGDTSRHL-408. 396 및 404 위치에서 인산화된 타우 펩타이드를 알룸 항원보강제(에쥬포스)를 사용하여 SHR72에 투여하였다. 서열번호 6/pS396/pS404는 서열번호 98-101에 의해 나타낸 치료 에피토프들 중 어느 것도 없지만, AD 뇌 타우 단백질에서 과잉으로 나타난 포스포에피토프를 함유한다(문헌[Greenberg et al. 1992]; [Otvos et al. 1994])).

[0699] 펩타이드 서열번호 1-4에 의해 관찰된 사르코실-불용성 타우의 양의 감소와 대조적으로, 인산화된 펩타이드 서열번호 6에 의한 면역화는 항원보강제만을 제공받은 대조용 래트에 비해 면역된 래트에서 불용성 타우의 양의 증가를 도출하였다. 면역블롯 분석은 불용성 포스포-타우 수준의 전반적인 증가쪽으로서의 성향을 밝혔다(도 43 및 도 26B). 면역화는 판-타우 mAb DC25에 의해 밝혀진 바와 같이, 불용성 타우 분획의 전체 타우 수준의 증가를 도출하였다. 타우 에피토프 pT217 (33% 증가), Thr231 (44% 증가), 및 Thr181 (7% 증가)에서 또한 증가가 관찰되었다. 그러나, AD-관련된 에피토프 pS202/pT205는 예외이었다(도 26B). 상기 포스포에피토프를 갖는 타우 단백질의 수준은 대조용 래트에 비해 19%까지 감소되었다. 다수의 질병-관련된 병적인 불용성 타우 단백질의 증가된 수준은 상기 래트에 대한 상기 백신의 바람직하지 못한 음의 효과를 가리킨다.

[0700] 타우 펩타이드 서열번호 6/pS396/pS404로 처리된 래트의 신경행동 반응을 평가하였다(도 44A, B 및 C). 면역요법은 들보 걷기 이탈 지연($p=0.82$) 또는 뒷다리 미끄러짐 회수($p=0.75$)에서 처리된 래트와 대조용 래트간에 통계학적 유의수준 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 뉴로스케일 점수에 의해 입증되었는데($p=0.96$), 여기에서 면역된 래트와 대조용 래트 간에 전체 신경행동 수행에 있어서 통계학적 유의수준 차이가 관찰되지 않았다. 따라서, 펩타이드 서열번호 6/pS396/pS404에 의한 처리는 시험된 래트의 들보 걷기 시험 이탈 지연, 뒷다리 미끄러짐 회수, 또는 전반적인 운동 수행에 통계학적 유의수준 영향을 미치지 않았다.

[0701] 도 45는 AT8에 의한 면역조직화학에 의해 평가된 바와 같이, 광범위한 타우 병리를 갖는 트랜스제닉 래트의 백분율을 나타낸다. 타우 펩타이드 서열번호 6/pS396/pS404에 의한 면역요법은 대조용 그룹에 비해 매듭 부하를 9%까지 증가시켰다. 따라서, 면역조직화학 수준에서 서열번호 6/pS396/pS404의 음의 효과가 생화학적 및 신경행동 수준에서 입증되었다.

[0702] 이러한 결과는 서열번호 98-101에 나타낸 치료 타우 에피토프들 중 어떤 것도 없는 타우 포스포에피토프 서열번호 6/pS396/pS404에 의한 백신화가 1) 면역된 래트의 뇌에서 불용성 타우에 대한 치료 효과가 없고; 2) 행동 수준에서 효과가 없고; 3) 매듭 부하에서 감소가 없고, 오히려 9% 증가를 보임을 나타낸다. 따라서, AD-특이적인 것으로 보고된 상기 포스포에피토프(문헌[Greenberg et al. 1992]; [Otvos et al. 1994])는 치료 효과를 유도하지 않았다.

[0703] h. 202번 위치에서 인산화된 세린 잔기 및 205번 위치에서 인산화된 스레오닌 잔기를 갖는 서열번호 7 타우 181-TPSSGEPKSGDRSGYSSPGTPGSR-210. 생성되는 타우 펩타이드 서열번호 7/pS202/pT205는 서열번호 98-101 중에 존재하는 치료 에피토프 중 어느 것도 없다. 상기 포스포에피토프는 KLH에 접합되었고 프로인트 항원보강제 중에서 트랜스제닉 래트(SHR72 계열)에게 투여되었다.

[0704] 면역블롯에 의한 뇌 줄기 중의 타우 면역반응성에 대한 정량 분석은 어떠한 치료 효과를 보이지 않았다(도 46). 전체 타우(DC25 에피토프, 6% 증가) 및 질병-관련된 타우 에피토프 pT217 (3% 증가), Thr231 (11% 증가), 및 Thr181 (7% 증가) 상에서 인산화된 타우 단백질의 수준은 대조용에 비해 면역된 래트에서 약간 증가하였다(도 46 및 26B). 면역화는 Ser202/Thr205에서 인산화된 불용성 타우 단백질에서 보다 높은 증가를 유도하였다(41% 증가).

[0705] 인산화된 펩타이드 서열번호 7에 의한 면역요법은 래트의 감각운동 기능에 현저한 영향을 미치지 않았다(도 47). 면역된 래트는 대조용에 비해 신경행동 매개변수의 명백한 개선을 보였다. 그러나, 상기 그룹들은 들보 걷기 이탈 지연($p=0.47$, 도 47A)뿐만 아니라 뒷다리 미끄러짐 회수($p=0.54$, 도 47B) 및 뉴로스케일 점수($p=0.3$, 도 47C)에서 처리된 래트와 대조군간에 통계학적 유의수준 차이가 관찰되지 않았기 때문에, 통계학적으로 상이하지 않았다.

[0706] 펩타이드 서열번호 7은 DC8E8 에피토프 중 어느 것도 함유하지 않는 인산화된 타우 에피토프를 갖는다. 상기 처리된 SHR72 래트의 뇌줄기의 검사는 타우 펩타이드 서열번호 7에 의한 면역요법이 신경섬유매듭 부하를 감소

시킬 수 없음을 밝혔다(도 48). 백신화된 및 대조용 동물로부터의 뇌 조직은 뇌줄기의 모든 영역, 주로 망상체 중에 거의 동일한 수의 AT8 및 DC217-양성 NFT를 함유하였다. DC8E8 에피토프가 없는, 서열번호 7을 함유하는 백신은 상기 처리된 동물에서 어떠한 이로운 효과도 보이지 않았다.

[0707] 상기 결과는, 서열번호 7/pS202/pT205에 의한 백신화가 1) 생화학적 수준에서 면역된 래트의 뇌에서 불용성 타우 수준을 변화시키지 않고; 2) 행동 수준에서 효과가 없음을 입증한다. 상기 포스포펩타이드는 상기 pS202/pThr205에 의해 나타난 포스포-부위가 병적인 타우 단백질을 제거하고/하거나 래트의 신경행동 상태에 긍정적으로 영향을 미치는 면역반응을 도출하기에 충분하지 않다는 추가적인 증거를 제공한다. 대조적으로, 치료 타우 에피토프(서열번호 98-101)는 상기 효과를 성취한다.

[0708] i. 서열번호 8 타우 300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317.

[0709] 4 개의 타우 "치료 에피토프" 중 하나가 존재할 수 있는 완전한 타우 6-머를 갖지 않고 인산화된 에피토프도 갖지 않기 때문에 대조군으로서 사용된 보다 짧은 타우 펩타이드에 의한 면역요법을, 뇌 중의 병적인 불용성 타우 및 신경섬유 침착물의 수준에 영향을 미치는 그의 능력을 측정하기 위해서 수행하였다. 판-타우 mAb DC25에 의해 검출된 전체 불용성 타우의 수준은 항원보강제만을 제공받은 대조군에 비해 면역된 래트에서 현저하게 증가되었다(82%)(도 49 및 도 26B). 유사하게, 면역요법은 T231에서 인산화된 불용성 타우의 수준의 증가(60%) 및 T181 위치에서 인산화된 불용성 타우의 보다 작은 증가(10%)를 유도하였다. 상이한 조합의 항체, DC217(pT217) 및 AT8(pS202/pT205)에 의한 정량 분석은 불용성 타우 중 상기 에피토프에 대한 어떠한 효과도 나타내지 않았다(도 26B).

[0710] 동물들에 대해서 행동 분석을 수행하였다(도 50A,B,C). 펩타이드 서열번호 8로 처리된 래트는 대조군에 비해 들보 걷기 시험에서 이탈 지연의 통계학적 유의수준 차이를 보이지 않았다($p=0.6$). 뒷다리 미끄러짐 회수의 차이도 또한 대조군에 비해 통계학적으로 유의수준이 아니었다($p=0.49$). 유사하게, 뉴로스케일 점수의 통계학적 유의수준 차이가 없었다($p=0.9$). 따라서, 펩타이드 서열번호 8의 투여는 상기 래트의 운동 수행에 통계학적 유의수준의 영향을 미치지 않았다.

[0711] 이러한 결과는 치료 에피토프(서열번호 98-101 내)가 전부 없는 타우 펩타이드 서열번호 8에 의한 백신화가 1) 생화학적 수준에서 면역된 래트의 뇌 중의 불용성 타우를 변화시키지 않고; 2) 신경행동 수준에 영향을 미치지 않음을 입증한다.

[0712] 처리된 및 모의-대조용 동물(항원보강제만을 제공받은)의 뇌줄기에서 NFT 부하에 대한 펩타이드 백신의 효과를 면역조직화학에 의해 평가하였다. 상기 결과는 타우 펩타이드 서열번호 8에 의한 면역요법이 신경섬유매듭의 양을 감소시키지 않음을 보였다(도 51). 처리된 및 모의-대조용 동물은 AT8 및 DC217 염색에 의해 밝혀진 바와 같이 뇌줄기의 모든 영역, 즉 뇌줄기의 망상체에서 거의 동일한 수의 신경퇴행 변화를 나타내었다.

[0713] 어떠한 완전한 치료 에피토프(서열번호 98-101)도 포함하지 않는 서열번호 8에 의한 백신화는 처리된 동물에서 어떠한 이로운 효과도 보이지 않았다. 따라서, 펩타이드 서열번호 5-8에 의한 면역화의 결과는 하나 이상의 완전한 치료 에피토프(서열번호 98-101 내에 위치함)의 존재가 상기 백신의 목적하는 양의 효과, 즉 타우 병리의 감소 및 하나 이상의 신경행동 매개변수의 개선에 필요함을 보인다.

[0714] j. 서열번호 108 타우 294-KDNIKHVPGGS-305. SHR72 래트를 알룸 항원보강제로 제형화된, 담체 KLH에 접합된 타우 펩타이드 서열번호 108로 면역시키고, 동물당 100 μ g의 용량으로 투여하였다.

[0715] 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 불용성 병적인 타우를 통계학적 유의수준으로 감소시켰다($p<0.001$). SHR72에서 알츠하이머병의 병리는 병적인 불용성 타우 형태(병적인 타우의 단량체, 이량체, 올리고머 및 중합체에 의해 나타남)에 의해 야기되기 때문에, 상기 불용성 타우 수준에 대한 12-머 수동 백신 서열번호 108에 의한 처리의 영향을 분석하였다. 각각의 면역원으로 면역시킨 트랜스제닉 동물 및 항원보강제만으로 면역시킨 대조군의 뇌줄기를 사르코실-불용성 병적인 타우의 추출에 사용하였다(상술한 바와 같이). 타우 펩타이드 서열번호 108로 면역시킨 트랜스제닉 래트의 그룹 및 대조용 그룹으로부터의 정량적인 면역블롯 분석의 결과를 도 52 및 26B에 나타낸다. 상기 백신화는 항원보강제만을 제공받은 대조용 트랜스제닉 래트에 비해 면역된 동물에서 병적인 불용성 타우를 통계학적 유의수준으로 감소시켰다(도 52). 이러한 감소는 모든 분석된 AD 관련 타우 에피토프에서 관찰되었다. 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 면역화는 불용성의 병적인 타우의 현저한 감소를 유도하였으며($p<0.001$; 70%); 이는 판-타우 단클론 항체 DC25에 의한 측정에 의해 밝혀졌다(도 52), 더욱이, 포스포-의존성 mAb DC217(pThr217) 및 AT8(pSer202/pThr205)에 의한 분석은 대조용에 비해 면역된 래트의 불용성 타우 중의 Thr217 ($p<0.001$; 96%) 및 Ser202/pThr205 ($p<0.05$; 98%)에서 인산

화된 병적인 타우 종의 수준의 현저한 감소를 밝혀냈다(도 52). 통계학적 유의수준의 감소가 또한 pThr231($p < 0.05$; 97%) 및 pThr181 ($p < 0.05$; 94%)을 갖는 불용성의 병적인 타우의 수준에서 관찰되었다. 이러한 결과는 상기 백신 유도된 면역반응이 병적인 타우의 초기 형태(단량체, 이량체, 올리고머에 의해 나타남) 및 병적인 타우 중합체의 말기 형태(PHF에 의해 나타남)의 통계학적 유의수준의 감소를 생성시킴을 보인다.

[0716] 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경행동 매개변수를 통계학적 유의수준으로 개선시켰다($p < 0.05$). 운동 장애를 복합 점수, 즉 뉴로스케일에서의 신경학적 검사와 병행된 일련의 표준 운동 시험에 의해 측정하였다. 6.5 개월된, 타우 펩타이드 서열번호 108로 처리된 트랜스제닉 래트 SHR72에 대해 상기 면역요법의 효과를 측정할 목적으로 행동 시험을 수행하였다. 타우 펩타이드 면역원 서열번호 108로 처리된 래트는 항원보강제만을 제공받은 트랜스제닉 래트(대조군)에 비해, 들보 걷기 시험($p = 0.04$)에서 감소된 이탈 지연을 나타내었다(도 53). 유사하게, 뒷다리 미끄러짐 회수의 양의 추세가 트랜스제닉 처리 대조군과 비교하여 백신화된 그룹에서 관찰되었으며, 상기 차이는 유의수준이었다($p = 0.045$, 도 53). 전체 뉴로스케일 점수를 들보 걷기 시험, 물건잡기 견인력 시험, 및 신경학적 검사(기본 반사, 뒷다리 이탈 신전반사)에서 획득된 데이터로부터 계산하였다. 상기 면역화는 대조용 치료 그룹에 비해, 펩타이드 서열번호 108로 처리된 래트의 뉴로스케일 점수를 개선시켰다($p = 0.047$)(도 53C). 전체 뉴로스케일 점수는 처리되지 않은 트랜스제닉 래트에 비해 처리된 트랜스제닉 래트의 신경행동 개선을 입증하였다. 모든 통계학적 데이터를 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다.

[0717] 신경행동 매개변수는 처리된 트랜스제닉 동물의 뇌줄기 중의 불용성의 병적인 타우 수준과 상관있었다. 백신 펩타이드 서열번호 108로 처리된 동물은 낮은 수준의 불용성의 병적인 타우를 나타내었으며, 이는 대조용 처리 동물에 비해 더 낮은 이탈 지연 및 더 낮은 뒷다리 미끄러짐 회수와 관련되었다. 이러한 발견은 불용성의 병적인 타우의 감소가 12-머 펩타이드(서열번호 108) 백신으로 면역된 트랜스제닉 동물 그룹에서 신경행동 결함의 통계학적 유의수준의 개선을 도출함을 보인다(그의 치료학적 가치를 나타낸다).

[0718] 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 신경섬유매듭(NFT) 부하의 60% 감소를 생성시켰다.

[0719] 뇌줄기에서 신경섬유 타우 병리(신경섬유매듭, NFT)의 면역조직화학적 분석은 상기 백신 처리된 SHR72 래트에서 성취되는 NFT의 감소를 보였다(도 54). 항원보강제 처리된 동물에 비해 뇌줄기 중에 광범위한 NFT를 갖는 면역된 트랜스제닉 래트의 수가 60%를 초과하여 감소되었다. 상기 면역화는 서열번호 108 펩타이드 백신으로 면역된 트랜스제닉 동물의 뇌 중의 타우 병리(병적인 타우 중합체, PHF)를 감소시켰다.

[0720] 상기 결과는 서열번호 108에 의한 면역요법이 SHR72 래트에서 타우 병리를 효율적으로 감소시켰음을 보인다. 백신화는 면역된 동물의 뇌에서 불용성의 병적인 타우 수준의 통계학적 유의수준의 감소뿐만 아니라 신경섬유매듭 부하(PHF)의 감소를 도출하였다. 상기 병적인 타우 단백질량의 감소는 상기 처리된 트랜스제닉 래트의 신경행동 매개변수의 통계학적 유의수준의 개선을 생성시켰다. 따라서, 타우 펩타이드 서열번호 108의 투여는 AD의 치료 능력을 갖는다.

[0721] **실시예 21: AD 치료 펩타이드에 의한 면역요법은 면역원성이며 트랜스제닉 래트에서 질병-타우-특이성 항체의 생산을 유도한다**

[0722] a. 타우 펩타이드 백신의 5 회 투여 후에, 처리된 래트의 펩타이드의 면역원성의 분석을 수행하였다. 면역된 래트로부터의 혈청을 항체 역가 측정에 사용하였다. 항원보강제만으로 면역시킨 래트의 혈청은 대조군으로서 사용하였다. 특이성 항-타우 항체의 역가를 실시예 19에 개시된 바와 같이, ELISA에 의해 측정하였다. 각 혈청의 일련의 희석물을, 앞서 미세적정 웰 플레이트상에 코팅된 AD 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 재조합 완전길이 타우 2N4R에 대해 시험하였다. 상기 분석된 면역원은 특이성 항-타우 항체의 생산을 유도하였다.

[0723] 예를 들어, 항-타우 특이성 항체가 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKIHVPGGG-304 (서열번호 4)로 면역 후에 생성되었다. 타우 펩타이드 서열번호 4에 의해 유도된 항체는 타우 2N4R에 대해서보다 오-무질서 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해서 대략 3 배 더 높은 결합 활성을 나타내었다(도 55; 1:3,200 희석). 이러한 결과는 상기 백신이 알츠하이머병 중의 병적인 타우 단백질을 인식하고 제거/중화시키는 치료 가능성을 갖는 항체를 유도했음을 추가로 암시한다.

[0724] 또한, 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 생리학적 타우에 비해, 병적인 타우 단백질에 우선적으로 결합하는 항체의 형성을 유도하였다. 5 회의 백신 투여 후에, 상기 면역원성의 분석을

상기 백신화된 각각의 래트에서 수행하였다. 동물들을 최종 추가 투여 후 2주째에 채혈하고 수거된 혈청을 기하평균 항체 역가(GMT) 측정에 사용하였다. 상기 특이성 항-타우 항체의 역가를 실시예 19에 개시된 바와 같이, ELISA에 의해 측정하였다. 각 혈청의 일련의 희석물(1:100 내지 1:51,200)을 고체상으로서 사용된, 병적인 타우 Δ (1-150;392-441)/4R 및 생리학적 타우 2N4R에 대해서 시험하였다. 역가는 최대 광학 밀도(흡광도)의 절반을 제공하는 혈청의 희석의 역으로서 정의되었다. 기하평균 항체 역가를 계산하기 위해서, 100 미만의 역가 판독치를 값 10으로서 지정하였다. 도 56에 나타난 바와 같이, 병적인 타우 Δ (1-150;392-441)/4R(GMT12800)에 대한 항체 역가는 완전길이 타우 2N4R(GMT4200)의 경우보다 3 배 더 높았다. 항체 역가를 또한 실시예 19에 개시된 동일한 방법을 사용하여 접합되지 않은 펩타이드 서열번호 108에 대해 측정하였다. 도 56은 최고의 항체 역가가 타우 펩타이드 서열번호 108(GMT20800)에 대해 생성되었음을 보인다. 항원보강제만으로 면역시킨 트랜스제닉 래트(GMT10; 데이터 도시 안 됨)에서는 항체 반응이 관찰되지 않았다. DC8E8 에피토프 2번(서열번호 99 내)을 갖는 펩타이드 서열번호 108에 의한 백신화는 병적인 타우 단백질을 우선적으로 인식하는 항체를 유도하였으며, 따라서 병적인 타우 Δ (1-150;392-441)/4R와 생리학적 타우 2N4R을 식별할 수 있었다. 더욱이, 결과는 서열번호 108이 면역원성이고 따라서 알츠하이머병에서 병적인 타우 단백질을 제거하는 치료 가능성을 가짐을 보였다.

[0725] 더욱이, 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 병적인 타우에 특이적인 IgG 항체 아이소타입의 형성을 우선적으로 유도하였다. 펩타이드 서열번호 108에 대한 반응으로 생성되는 항체의 특이적인 아이소타입을 측정하기 위해서, 상기 면역된 및 대조용 그룹의 래트로부터의 혈청을 1:100 내지 1:12,800으로 연속 희석하고, 병적인 타우 Δ (1-150;392-441)/4R에 대해 ELISA에 의해 중복 시험하였다(실시예 19에 개시된 바와 같이). 래트 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c 및 IgM 아이소타입을 검출하기 위해서, 항-래트 하위부류 특이성 HRP-접합된 2차 항체를 PBS 중에서 1:5,000 희석하였다(피어스, 항-IgG1 - PA1-84708, 항 IgG2a - PA1-84709, 항 IgG2b - PA1-84710, 항-IgG2c - PA1-84711 및 항-IgM - PA1-84712). 도 57은 전형적인 1:800 희석에 대한 결과를 나타낸다. 상기 데이터는 KLH에 접합된 펩타이드 서열번호 108이 광범위한 항-타우 항체 아이소타입을 유도하였음을 입증한다. 상기 백신은 높은 수준의 항체 아이소타입(IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG2c)을 생성시켰으며, 이는 높은 친화성 항체인 것으로 생각된다. 대조적으로, 아이소타입 프로파일은 매우 낮은 수준의 IgM 항체를 나타내었다. 이들은 상기 항원에 대해 낮은 친화성을 갖는 것으로 생각된다. 병적인 타우에 대해 우선적인 친화성을 갖는 IgG 항체의 높은 역가의 존재는 상기 백신에 의해 유도된 면역 반응이 병적인 타우 종들에 대한 것임을 가리켰다. 모의-면역된 래트(항원보강제만을 제공받음)로부터 수득된 대조용 혈청은 음성이었다.

[0726] 상기 데이터를 상기 면역 반응의 분극(Th1/Th2 표현형) 측정에 추가로 사용하였다. 면역화에 의해 유도된 IgG1 및 IgG2a 아이소타입의 수준은 면역 반응에 대한 Th1 사이토킨 대 Th2 사이토킨의 기여를 간접적으로 암시한다. 일반적으로, IgG1 항체의 생성은 Th2 사이토킨에 의해 유도되고 IgG2a 항체의 생성은 Th1 사이토킨에 의해 유도된다. 따라서, IgG1과 IgG2a 아이소타입의 비율, IgG1에 대한 OD 값을 IgG2a에 대한 OD 값으로 나누어 계산하였다. 상기 데이터는 면역 반응이 Th1 표현형쪽으로 약간 이동함을 암시한다(비 = 0.625).

[0727] b. 타우 펩타이드 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPVGGG-304(서열번호 4)에 의해 면역된 래트로부터 모은 혈청으로부터의 항체의 결합(k_{ON}) 및 해리(k_{OFF})의 동역학적 속도의 측정을 가능하게 하는 표면 플라스몬 공명을 사용하는 결합 사건의 실시간 모니터링. 상기 분석은 타우 Δ (1-150;392-441)/4R와 생리학적 타우 동형단백질 2N4R 간의 차별을 나타내었다. 면역화에 의해 유도된 항체는 타우 Δ (1-150;392-441)/4R(상응하는 완전길이 동형단백질 2N4R에 대한 친화성에 비해 절두된 AD 타우에 대해 3 배 더 높은 친화성으로 상기 타우 단백질에 결합한다)에 대해 우선적인 친화성을 나타내었다. 상기 결합 차이는 부분적으로 타우 Δ (1-150;392-441)/4R에 대해 대략 5 배 더 큰 k_{ON} 속도에 기인하는 것으로 측정되었다(데이터 도시 안 됨).

[0728] c. 치료 타우 펩타이드로 면역된 래트에서 유도된 항체의 특이성을 추가로 측정하기 위해서, 상기 항혈청을 인간 AD 뇌로부터의 해마의 동결된 섹션의 면역조직화학적 염색에 사용할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 4에 의한 면역화 후에 유도된 항체를 상기 분석에 의해 평가하였다. 인간 AD 뇌로부터의 해마를 4 °C에서 4% 파라폼알데하이드로 2일간 고정화시킨 다음, 72 시간 동안 25% 슈크로스 처리하여 저온보호를 제공하였다. 이어서 상기 물질을 저온 2-메틸부탄(-42 °C)에서 30초간 동결시키고 저온마이크로톰 상에서 절단하였다. 관상단면(40 μ m)을 저온유지장치에서 -18 °C에서 절단하였다. 자유-부유 섹션을 면역조직화학 연구에 사용하였다. 자유 부유 조직 섹션을 실온(25 °C)에서 1 분 동안 저온(+4 °C)의 99% 폼산으로 처리하였다. 뇌 섹션을 실온에서 0.3% 트리톤 X-100 및 1% H₂O₂를 함유하는 0.01 M PBS 중에서 20 분간 배양한 다음, 차단 용액(0.3% 트리톤 X-100,

1% 말 혈청을 함유하는 0.01 M PBS) 중에서 30 분 배양한 다음, 4 °C에서 펩타이드 서열번호 4(1:1000 희석됨)을 함유하는 백신으로 면역된 트랜스제닉 래트로부터의 혈청과 함께 밤새 배양하였다. 세척 후에, 상기 섹션들을 표준 아비딘 비오틴 페록시다제 방법(ABC 엘리트, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재)을 사용하여 면역염색하였다. 상기 반응 생성물을 아비딘-비오틴 및 색원체로서 벡터 VIP(벡터 레보라토리즈)를 사용하여 가시화하였다. 이어서 섹션들을 올림푸스 BX51 현미경으로 검사하였다. 면역조직화학 염색은 펩타이드 서열번호 4에 의한 면역화에 의해 유도된 항체가 알츠하이머병 뇌의 병적인 타우 구조물, 즉 해마 중의 신경 섬유 병변을 특이적으로 인식함을 보였다(도 59A,B). 항원보강제만을 제공받은 대조용 래트로부터의 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였으며, 상기는 어떠한 신경 병리도 인식하지 못했다(데이터 도시 안 됨).

[0729] 타우 펩타이드 서열번호 108에 의한 트랜스제닉 래트 SHR72의 백신화는 인간 알츠하이머병 뇌 조직으로부터의 섹션 중의 병적인 타우 단백질을 인식하는 항체를 유도하였다. 치료학적 타우 펩타이드 서열번호 108로 면역된 래트에서 유도된 항체의 특이성을 추가로 측정하기 위해서, 상기 혈청을 인간 AD 뇌(브라 단계 VI)의 동결된 섹션을 사용하여 내비상피질의 면역조직화학적 염색에 사용하였다. 자유 부유 조직 섹션을 4 °C에서 면역된 트랜스제닉 래트로부터의 혈청(1:1000 희석됨)과 배양하였다. 서열번호 108로 백신화된 동물로부터의 개별적인 혈청을 별도로 사용한 반면, 항원보강제에만 백신화된 동물로부터의 혈청을 모았다. 표준 아비딘-비오틴 페록시다제 방법을 사용하여 면역염색 후에(ABC 엘리트, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재), 상기 섹션을 올림푸스 BX 51 현미경으로 검사하였다. 면역조직화학 염색은 펩타이드 서열번호 108에 의한 면역화에 의해 유도된 항체가 알츠하이머병 뇌의 내비상피질 중의 병적인 타우 구조, 즉 신경섬유 병변을 특이적으로 인식함을 보였다. 도 60(A 내지 E)은 5 개의 백신화된 트랜스제닉 래트 SHR72로부터 수거한 래트 혈청에 의한 전형적인 면역염색을 나타낸다. 서열번호 108로 백신화된 동물들의 혈청은 상기 섬유매듭 병리를 매우 집중적으로 장식하였으며, 이는 상기 항체가 병적인 타우 단백질을 효율적으로 표적화했음을 입증한다. 항원보강제만을 제공받은 대조용 래트로부터의 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였다. 상기는 어떠한 신경섬유 병리도 인식하지 못했다(도 60F).

[0730] 서열번호 108에 의해 유도된 항체는 SHR72의 뇌 및 인간 AD 뇌로부터 추출된 병적인 타우 단백질을 인식한다. 타우 펩타이드 서열번호 108로 면역된 래트로부터의 혈청의 특이성을 면역블롯 방법을 사용하여(실시예 19에 개시된 바와 같이) 용해성 및 불용성 병적인 타우의 병적인 형태에 대해 추가로 검사하였다. 상기 병리의 말기 단계의 SHR72 래트의 뇌줄기를 용해성 불용성 병적인 타우 단백질의 추출에 사용하였다. 인간 AD 뇌의 측두엽(브라 단계 VI; 네덜란드 뇌 은행으로부터 수득됨, 네덜란드 소재)을 인간 병적인 AD 타우의 추출에 사용하였다. 상기 용해성 및 불용성 병적인 타우 단백질을 실시예 8에 개시된 바와 동일한 방법을 사용하여 제조하였다. 용해성 타우 분획의 경우 15 μ g의 전체 단백질을 레인당 로딩하였다. 불용성 타우 분획의 경우, 상기 펠릿을 상기 불용성 타우 분획의 제조에 사용된 용해성 분획의 1/50 부피 중의 1x 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 샘플 로딩 완충제(문헌[Laemmli, 1970])에 용해시키고 같은 부피를 SDS-PAGE 상에 로딩하였다. 면역된 동물로부터 모은 혈청을 PBS 중에서 1:1000으로 희석하고 1차 항체로서 사용하였다. 1차 항체와의 배양에 이어서 다클론 토끼 항-래트 면역글로불린을 양고추냉이 페록시다제(1:3000; 다코 글로스트롭, 덴마크 소재)에 접합시켰다. 웨스턴 블롯 신호를 LAS3000 CCD 영상화 시스템(후지필름, 일본 소재)으로 디지털화하였다. 상기 면역블롯 분석의 결과를 도 61에 나타낸다.

[0731] 상기 결과(도 61)는 DC8E8 에피토프 2(서열번호 99)를 갖는 펩타이드에 대해 생성된 항체가 SHR72 및 AD 뇌 조직으로부터 추출된 병적인 타우 단백질을 인식함을 보인다. 상기 유도된 항체는 단량체성 형태의 병적인 타우(레인 1, 2 및 3 번)뿐만 아니라 AD의 특징인 A68 타우 코돈을 포함하여 올리고머성 형태의 병적인 타우(레인 2 및 3)를 인식하였다. 이러한 발견은 알츠하이머병의 상기 래트 모델을 사용하는 면역요법에 핵심적인 영향을 미친다. 백신에 의해 생성된 높은 친화성 항체는 모든 형태의 병적인 타우 단백질을 표적화한다. 상기는 단량체성 형태의 병적인 타우 단백질을 표적화하며 따라서 병적인 타우-타우 상호작용(올리고머화)을 방지하여 백신화된 래트에서 불용성 타우 수준의 감소 및 결과적으로 신경행동 매개변수의 개선을 도출한다. 상기 생성된 항체는 또한 올리고머성 형태의 병적인 타우에 결합하며, mAb DC8E8에 대해 실시예 10에 개시된 바와 같이, 예를 들어 미세아교세포에 의해, 상기를 분해에 대해 표적화한다.

[0732] **실시예 22: AD 치료 펩타이드에 의한 면역요법은 마우스에서 질병-타우-특이성 항체의 생산을 유도한다**

[0733] 서열번호 100 또는 101 내의 치료 에피토프들 중 하나를 갖는, 펩타이드 서열번호 109, 서열번호 110(서열번호 88은 서열번호 110 + 접합을 위한 추가의 N-말단 Cys에 상응한다), 서열번호 111 및 서열번호 112는 면역된 마우스에서 항체의 생산을 유도한다. 상기 생성되는 항체들은 생리학적 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 타우 Δ

(1-150;392-441)/4R에 대해 통계학적 유의수준으로 더 높은 결합 활성을 나타낸다.

[0734] 서열번호 109 타우 314-DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE-342

[0735] 서열번호 110 타우 352-SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRN-381

[0736] 서열번호 111 타우 325-LGNIHHKPGGGQ-336

[0737] 서열번호 112 타우 357-LDNITHVPGGGN-368

[0738] 서열번호 100 타우 329-HHKPGGG-335

[0739] 서열번호 101 타우 361-THVPGGG-367

[0740] 실제로, 하나 이상의 치료 DC8E8 에피토프(예를 들어 7-머 내에: 서열번호 100 및 서열번호 101)를 갖는 펩타이드의 면역원성 가능성을 추가로 측정할 목적으로, 상기 DC8E8 치료 에피토프 중 하나를 갖는 12 및 30 개 아미노산 길이 펩타이드(서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111 및 서열번호 112)를 설계하였다. 타우 펩타이드 서열번호 109(30 아미노산) 및 서열번호 111(12 아미노산)은 상기 내에 서열번호 100 중의 치료 에피토프를 함유한다. 타우 펩타이드 서열번호 110(30 아미노산) 및 서열번호 112(12 아미노산)는 상기 중에 서열번호 101 중의 치료 에피토프를 함유한다. 펩타이드들을 실시예 18-19에 개시된 바와 같이 그들의 N-말단 Cys 잔기를 통해 KLH에 접합시켰다. 면역화를 위한 백신을, 100 μ l의 PBS 중에 100 μ g의 접합된 펩타이드를 함유하는 펩타이드-KLH 접합체를 사용하여 제조하고, 이를 200 μ l의 최종 투여 부피로 프로인트 항원보강제로 1:1(부피/부피) 유화시켰다. 처리 그룹당 5 마리의 Balb/c 마우스를 사용하였다. 1차 면역화는 프로인트 완전 항원보강제로 제형화된 PBS 중의 펩타이드-접합체를 사용하여 수행하였다. 2-주 간격으로 2 회의 다음 면역화들을 프로인트 불완전 항원보강제로 제형화된 PBS 중의 펩타이드-접합체를 사용하여 수행하였다. 대조군으로서, 항원보강제만을 함유하는 백신을 사용하였다. 최종 면역화 후 10일째에 혈청을 수거하고 항체 반응을 실시예 19에 개시된 바와 같이 ELISA에 의해 측정하였다. 개별적인 마우스로부터의 혈청을 1:100 내지 1:12,800으로 연속 희석하고 중복 시험하였다. 혈청의 특이성을 측정하기 위해서, 병적인 타우 Δ (1-150;392-441)/4R 및 생리학적 타우 2N4R을 고체상으로서 사용하였다. 도 62 내지 65는 1:800 희석의 혈청에 대한 결과의 요약을 도시한다. ELISA 결과를 만-휘트니 비모수 시험을 사용하여 통계학적으로 평가하였다.

[0741] 모든 시험된 펩타이드들은 면역된 마우스에서 타우-특이성 항체를 생성시켰다. 타우 펩타이드 서열번호 109, 서열번호 110, 서열번호 111, 및 서열번호 112에 의한 백신화에 의해 유도된 항체는 생리학적 타우 2N4R에 대한 것보다 병적인 타우 Δ (1-150;392-441)/4R에 대해 통계학적 유의수준으로 더 높은 결합 활성을 나타내었다(도 62-65). 더욱이, 30 아미노산(서열번호 109, 서열번호 110)에서 12 아미노산(서열번호 111 및 서열번호 112)으로의 펩타이드의 단축은, 병적인 타우(서열번호 109, $p=0.0115$; 서열번호 110, $p=0.0029$; 서열번호 111, $p=0.0007$; 서열번호 112, $p<0.001$)를 우선적으로 인식하는 특이성 항체의 현저하게 더 높은 생성을 유도하였다. 대체로, 이러한 결과는 펩타이드 서열번호 109 및 서열번호 111 (서열번호 100 내의 치료 에피토프를 갖는다) 및 펩타이드 서열번호 110 및 서열번호 112 (서열번호 101 내의 치료 에피토프를 갖는다)가 면역원성이며 알츠하이머병을 앓고 있는 환자의 뇌 중에 존재하는 병적인 타우 단백질을 표적화하는 치료 활성을 가짐을 보였다.

[0742] **실시예 23: 하나 이상의 DC8E8 에피토프에 결합하기 위해서 병적인 타우와 경쟁할 수 있는 디자이너 펩타이드(디자이너 치료 에피토프)의 확인**

[0743] 2 개의 추가적인 펩타이드(11-머)를 에피토프 #1 (KHQPGGG, 서열번호 98 내), #2 (KHVPGGG, 서열번호 99 내), #3 (HHKPGGG, 서열번호 100 내) 및 #4 (THVPGGG, 서열번호 101 내) 간에 보존된 아미노산 잔기들을 기본으로 설계하였다. 상기 디자인에서, 이들 에피토프에 대한 DC8E8의 결합에 기여하는 5 개의 잔기, 즉 서열 HxPGGG(서열번호 164) 중의 히스티딘, 프롤린 및 3 개의 글리신 잔기를 고정된 채 유지시켰다. 펩타이드를 85% 초과순도로 이지마이오랩스(미국소재)에 의해 합성하였다. 상기 2 개의 디자이너 치료 에피토프는 GWSIHSPGGGSC(서열번호 250) 및 SVFQHLPGGGSC(서열번호 251)이다.

[0744] 이들 펩타이드를 경쟁 ELISA에 의해 병적인 타우와 경쟁하는 그들의 능력에 대해 분석하였다. ELISA 플레이트(이와키 고 결합 플레이트, #3801-096, 베르토니 게엠베하, 오스트리아 소재)를 4 $^{\circ}$ C에서 PBS 중의 5 μ g/ml의 재조합 정제된 타우 Δ (1-150;392-441)/4R의 100 μ l/웰로 밤새 코팅하였다. 상기 코팅된 ELISA 플레이트를 PBS/트윈 20(0.05% v/v 트윈 20이 보충된 포스페이트-완충된 염수)으로 4 회 세척하고, 25 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 PBS/트윈 20으로 차단시켰다. 상기 펩타이드를 각각 5 mM의 최종 농도로 PBS에 별도로 용해시켰다. 폴리프로필렌 플레이트(그라이너, #651201)에서 PBS/트윈 20 중의 펩타이드의 일련의 2배 희석액을 제조하였다(농도 범위 80

μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 및 2.5 μM). 100 μl 의 각각의 펩타이드 희석물을 100 μl 의 2 $\mu\text{g/ml}$ 정제된 DC8E8 단클론 항체(정제를 실시예 5에 개시된 바와 같이 수행하였다)와 혼합하였다. 이어서 상기 생성되는 혼합물 200 μl 는 1 $\mu\text{g/ml}$ DC8E8 항체, 및 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2.5 μM , 및 1.25 μM 펩타이드를 함유하였다. 타우 Δ (1-150;392-441/4R)을 양성 대조군으로서 포함시켰다. 상기 항체/펩타이드 혼합물을 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 배양하였다. 이어서 100 마이크로리터의 항체/펩타이드 혼합물을 상기 제조된 ELISA 플레이트로 옮기고, 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 ELISA 플레이트를 PBS/트윈 20으로 4회 세척하였다. 이어서 상기 ELISA 플레이트를 PBS/트윈 20 중에서 1:4,000으로 희석된 다클론 염소 항-마우스 면역글로불린/HRP(Dako, #P0447) 100 μl 와 함께 배양하고 250 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 ELISA 플레이트를 PBS/트윈으로 4 회 세척하였다. 이어서 상기 ELISA 플레이트를 암실에서 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분 동안, 1.5 $\mu\text{l}/2\text{ ml}$ 의 30% H_2O_2 (SIGMA, H-0904)가 보충된 0.1 M Na-아세테이트 pH 6.0(Roth, #6779) 중의 o-PDA(o-페닐렌다이아민, SIGMA, P1526)의 1.5 mg/2 ml 용액 100 μl 와 함께 배양하였다. 상기 반응을 100 μl 의 2 M H_2SO_4 (Merck, 1.00731.1000)를 가하여 정지시켰다. 상기 발생된 신호를 490 nm에서 관독함으로써 측정하였다(예를 들어 빅터 멀티라벨 카운터(왈락) 사용).

[0745] 상기 2 개의 디자이너 펩타이드, 즉 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250) 및 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251)은 둘 다 DC8E8에 결합하기 위해 타우 Δ (1-150;392-441/4R)과 경쟁할 수 있었다. 상기 펩타이드 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250)(디자이너 치료 에피토프 1이라 칭한다)는 타우 Δ (1-150;392-441/4R)에 비해 DC8E8에 대해 가장 유사한 친화성을 나타냈다. DC8E8에 대한 펩타이드 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251)(디자이너 치료 에피토프 2라 칭한다)의 친화성은 상기 항체에 대해 질병 타우 Δ (1-150;392-441/4R)의 친화성보다 더 높은 1 초과 정도의 크기였다.

[0746] 실시예 24: 면역원성 및 면역 반응의 특이성에 대한 디자이너 치료 에피토프 1 및 2의 생체 내 시험

[0747] 디자이너 치료 에피토프 1(GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250) 및 디자이너 치료 에피토프 2 (SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)를 그들의 C-말단 Cys 잔기를 통해 KLH에 접합시키고(실시예 18에 개시된 바와 같이) Balb/c 마우스 면역에 사용하였다. 3 마리의 마우스를 각 디자이너 치료 에피토프에 대해 사용하였다. 면역화를 하기와 같이 수행하였다. 면역화를 위한 백신을, 100 μl 의 PBS 중에 100 μg 의 접합된 펩타이드를 함유하는 디자이너 치료 에피토프-KLH 접합체를 사용하여 제조하고, 이를 200 μl 의 최종 투여 부피로 프로인트 항원보강제로 1:1(부피/부피) 유화시켰다. 1차 면역화는 프로인트 완전 항원보강제로 제형화된 PBS 중의 상기 디자이너 치료 에피토프-KLH 접합체를 사용하여 수행하였다. 4-주 간격으로 4 회의 다음 면역화들을 프로인트 불완전 항원보강제로 제형화된 PBS 중의 상기 디자이너 치료 에피토프-KLH 접합체를 사용하여 수행하였다. 대조용 면역화를 위해서, PBS를 디자이너 치료 에피토프-접합체 대신에 사용하였다. 최종 면역화 후 14일째에 혈청을 수거하였다.

[0748] 1. 항체는 병적인 타우를 식별한다. 혈청의 특이성을 측정하기 위해서, 2 개의 타우 단백질, 즉 재조합 병적인 타우 Δ (1-150;392-441/4R) 및 생리학적 타우 2N4R을 사용하였다. 각 마우스로부터의 혈청을 1:100 내지 1:12,800으로 연속 희석하고 3회 중복 시험하였다. 항체 역가를 1:4,000 희석된 다클론 염소 항-마우스 면역글로불린/HRP(다코, #P0447)를 사용하여 측정하였다. 도 67은 1:3200 희석에 대한 전형적인 결과를 도시한다.

[0749] 상기 두 디자이너 치료 에피토프는 모두 면역된 마우스에서 높은 면역 반응을 생성시켰다. 더욱 또한, 상기 두 시험된 디자이너 치료 에피토프는 생리학적 타우 2N4R에 비해 더 높은 친화성으로 병적인 타우 Δ (1-150;392-441/4R)을 인식하는 항체를 유도하였다(도 67). 이러한 차별은 모든 면역된 동물들로부터의 혈청에 대해 통계학적으로 유의수준이다. 대체로, 및 DC8E8에 대해 관찰된 활성으로 수득된 결과와 함께, 상기 결과는 상기 두 디자이너 치료 에피토프 1 및 2가 면역원성이고 알츠하이머병 환자의 뇌에서 병적인 타우 단백질을 표적화하는 치료 가능성을 갖는 항체 반응을 유도함을 나타낸다.

[0750] 2. 항체 아이소타입: 상기 디자이너 치료 에피토프 1 및 2에 반응하여 생성된 항체의 특이적인 아이소타입을 측정하기 위해서, 같은 그룹의 마우스들로부터 혈청을 모으고, 1:100 내지 1:12,800으로 연속 희석하고, 항체 아이소타입 ELISA에 의해 3중으로 시험하였다. 마우스 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, 및 IgG3 아이소타입을 검출하기 위해서, 항-마우스 하위부류 특이성 HRP-접합된 2차 항체들을 사용하였다(항체들을 라이프스팬 바이오사이언시즈(Lifespan Biosciences)로부터 구입하였다, 항 IgG1 - #LS-C59107, 항 IgG2a - #LS-C59112, 항 IgG2b - #LS-C59117, 항-IgG3 - #LS-C59125 및 항-IgM - #LS-C55875). 대조용 마우스로부터 수득된 항혈청은 음성이었다. 도 68은 1:800 희석에 대한 전형적인 결과를 도시한다. 모은 혈청에 대해 수득된 결과는 상기 두 시험된 디자이너 치료 에피토프에 의한 면역화가 광범위한 항-타우 항체 아이소타입을 유도하고 상기 아이소타입 프로

파일이 모든 시험에서 매우 유사함을 입증하였다. 상기 두 디자이너 치료 에피토프는 IgG2a, IgG2b 및 IgG3 반응에 비해 주로 IgG1 항체를 생성시켰다(도 68).

[0751] 3. 디자이너 치료 에피토프는 병적인 타우와 생리학적 타우를 통계학적으로 고도의 유의수준으로 식별하는 항체 반응을 유도한다. 디자이너 치료 에피토프에 대해 생성된 항체의 친화성의 분석을 실시예 5 및 19에 개시된 바와 같이 CM5 센서 칩(비아코어 AB, 옘살라소재)을 사용하여 비아코어3000 상에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다. 각각의 분석 순환에서, GWSIHSPGGGSC (서열번호 250), 디자이너 치료 에피토프 1 (100 배 희석됨) 또는 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251), 디자이너 치료 에피토프 2(100 배 희석됨)에 대한 마우스 항혈청(3 마리 마우스로부터 모은 항혈청)을 분석학적 유동 세포에서 약 950 RU의 고정화 수준(포화에 접근하였다)에 도달하도록 포획하였다. 비교로서, 타우에 결합하지 않는, 관계없는 항체 Rab50(문헌[Macikova et al., 1992])을 상기 비교 유동 세포에서 포획하였다. K_A 측정을 위해서 뿐만 아니라 동역학적 속도 상수 k_{ON} 및 k_{OFF} 의 측정을 위해서, 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)4R$ 또는 생리학적 타우 2N4R의 100 nM 용액을 센서 칩 상에 100 μ l/분의 유속으로 주입하였다.

[0752] 디자이너 치료 에피토프 1 및 2에 의한 백신화에 의해 유도된 항체는 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)4R$ 과 생리학적 타우 2N4R을 식별하였다(도 69A 및 69B). 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 디자이너 치료 에피토프 1(GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250)에 대한 항혈청 중에 존재하는 항체의 친화성은 생리학적 타우에 비해, 병적인 타우에 대해 고도로 통계학적으로 유의수준인($p<0.001$) 거의 50 배 이상의 친화성을 나타내었다. 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC (서열번호 251))에 대해 항혈청 중에 존재하는 항체의 친화성은 생리학적 타우에 비해, 병적인 타우에 대해 고도로 통계학적으로 유의수준인($p<0.01$) 거의 15 배 이상의 친화성을 나타내었다.

[0753] 4. 디자이너 치료 에피토프는 인간 AD 뇌에서 병적인 타우 종을 인식하는 항체 반응을 유도한다. 디자이너 치료 에피토프로 면역된 마우스에서 생성된 항체의 특이성을 측정하기 위해서, 면역조직화학 염색을 인간 AD 뇌의 동결된 섹션상에서 수행하였다.

[0754] 상기 인간 AD 뇌 조직 샘플(내비상피질, AD 브락 VI, 네덜란드 뇌 은행에 의해 제공됨)을 4 °C에서 2일 동안 PBS 중의 4% 파라폼알데하이드로 고정시키고 이어서 저온보호하고(25% 슈크로스), 저온 2-메틸부탄(-42 °C)에서 동결시키고 사이토포솜에서 절단하였다. 자유 부유 조직 섹션(40 μ m)을 실온(25 °C)에서 1 분간 저온(+4 °C) 99% 폼산으로 처리하였다. 상기 섹션을 표준 아비딘-비오틴 페록시다제 방법(ABC 엘리트, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재)을 사용하여 면역염색하였다. 디자이너 치료 에피토프 1(서열번호 250) 및 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)에 대한 마우스 항혈청(각각 3 마리의 면역된 마우스로부터 모았다)을 차단 용액(PBS 중의 5% 소 혈청 알부민, 0.3% 트리톤 X-100) 중에서 1:2000 희석하였다. 이어서 상기 섹션들을 올림푸스 BX51 현미경으로 검사하였다.

[0755] 면역조직화학 염색은 상기 두 디자이너 치료 에피토프 GWSIHSPGGGSC (서열번호 250) 및 SVFQHLPGGGSC (서열번호 251) 모두에 대해 생성된 마우스 면역혈청이 알츠하이머병 뇌의 내비상피질에서 병적인 타우 구조물, 즉 신경섬 유매듭 및 신경망 쓰레드를 특이적으로 인식함을 보였다(도 70A-D). 디자이너 치료 에피토프 1 및 디자이너 치료 에피토프 2에 대한 항혈청은 대조용 인간 뇌에서 정상 타우를 인식하지 못했다(도 70E, F).

[0756] 5. 디자이너 치료 에피토프 2 (SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)는 알츠하이머병의 트랜스제닉 래트 모델의 뇌에서 병적인 타우 종을 인식하는 항체 반응을 유도한다. 디자이너 치료 에피토프로 면역된 마우스에서 생성된 항체의 특이성을 측정하기 위해서, 면역조직화학 염색을 트랜스제닉 래트 SHR72의 뇌의 파라핀 매몰된 섹션상에서 수행하였다.

[0757] 상기 군주 SHR72(7 개월된)의 트랜스제닉 래트를 깊은 마취하에서 1 분간 PBS로 심장을 관통하여 관류시킨 다음 100 ml의 4% 파라폼알데하이드(pH 7.4)로 관류시켰다. 관류 후에, 머리를 절단하고 뇌를 신속히 제거하였다. 상기 뇌를 일회용 메스 날을 사용하여 2 개의 동일한 크기의 반구로 시상면으로 절단하였다. 상기 뇌 조직을 4% 파라폼알데하이드 중에 후-고정시키고, 파라핀에 매몰하고, 마이크로톰 상에서 섹션으로 절단하였다. 면역조직화학 및 조직병리학을 8 μ m 파라핀-매몰된 조직 섹션 상에서 수행하였다. 조직 섹션들을 실온(25 °C)에서, 20 분간 항원 폭로 용액(벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 소재)으로 20 분 및 저온(+4 °C) 90% 폼산(애플 리캡, 독일 소재)으로 1 분간 전처리하였다. 차단 후에, 상기 섹션들을 차단 용액(50 nM 트리스-HCl 중의 5% 소 혈청 알부민, 0.3% 트리톤 x 100) 중에서 1:1000으로 희석한 디자이너 치료 에피토프 2 (SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 대해 생성된 혈청과 밤새 배양하였다. 세척 후에, 상기 섹션들을 실온에서 1 시간 동안 비오틴화된 2차 항체(벡타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)와 함께 배양하고, 이어서 60 분 동안 아비딘-

비오틴 페록시다제-복합체 용액(벡타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)과 반응시켰으며, 모두 실온(25 °C)에서 수행되었다. 상기 면역반응을 페록시다제 기질 키트(벡터 VIP, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 소재)로 가시화하였다. 섹션들을 올림푸스 BX71 현미경으로 검사하였다.

[0758] 상기 트랜스제닉 래트 뇌(SHR72)에서, 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 대해 생성된 혈청은 신경섬유매듭을 인식하였다(도 70G). 나이-합치된 대조용 래트 뇌에서 상기 항체는 신경세포를 염색하지 않았다(도 70H).

[0759] 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 대해 생성된 혈청은 올리고머성 전 매듭 단계 타우(도 70I)뿐만 아니라 세포내 신경섬유매듭(도 70J)을 인식하였다.

[0760] 6. 디자이너 치료 에피토프 1 및 2에 의해 유도된 항체는 인간 AD 뇌에서 용해성 및 불용성 병적인 타우를 인식한다: 사르코실 용해성 및 불용성 병적인 타우를 인간 알츠하이머병의 측두엽(네덜란드 뇌 은행으로부터 수득됨)으로부터 분리하고 실시예 8에 개시된 바와 같이 면역블롯팅에 의해 분석하였다.

[0761] 용해성 및 불용성 병적인 타우 단백질 분획을 함유하는 멤브레인을 PBST 중의 5% 무지방 분유로 1:1 희석된 DC8E8 하이브리도마 상등액 또는 디자이너 치료 에피토프 1(GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250)에 대해 생성된 수거된 마우스 항혈청 또는 디자이너 치료 에피토프 2(SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 대해 생성된 수거된 마우스 항혈청과 함께 배양하였으며, 이때 상기 두 수거된 항혈청들은 PBST 중의 5% 무지방 분유로 1:100 희석되었다. 멤브레인을 세척하고 이어서 1:4000 희석된 페록시다제-접합된 염소 항-마우스 IgG(다코, 덴마크 소재)와 함께 배양하였다. 상기 블롯을 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(피어스, 미국소재)로 전개시키고, 상기 단백질 신호를 LAS3000 영상화 시스템(후지 포토 필름 캄파니, 일본 소재)을 사용하여 검출하였다. 상기 신호 강도를 AIDA 소프트웨어(어드밴스드 이미지 데이터 분석기, 레이테스트, 독일 스트라우벤하르트 소재)를 사용하여 정량 분석하였다.

[0762] 상기 면역블롯 분석의 결과를 도 71에 나타낸다. 상기 결과는 상기 두 디자이너 치료 에피토프 1(즉 GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250) 및 2(즉 SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251) 모두에 대해 생성된 항체가 DC8E8과 동일한 병적인 타우 단백질을 인식함을 보인다. 상기 GWSIHSPGGGSC(서열번호 250) 항혈청, SVFQHLPGGGSC(서열번호 251) 항혈청 및 DC8E8 항체는 모두 AD 뇌 조직으로부터 분리된 사르코실 용해성 및 불용성 타우 분획 중에 존재하는 병적인 타우 단백질을 특이적으로 인식하였다(도 71).

[0763] 7. 디자이너 치료 에피토프 1 및 2에 의해 유도된 항체는 타우 트랜스제닉 래트에서 용해성 및 불용성 병적인 타우를 인식한다. 사르코실 용해성 및 불용성 병적인 타우를 실시예 8에 개시된 바와 같이 타우 트랜스제닉 래트(실시예 7에 개시된 SHR72 계열)의 뇌로부터 분리하였다.

[0764] 면역블롯 분석(실시예 8에 개시됨)의 결과를 도 72에 나타낸다. 상기 결과는 상기 디자이너 치료 에피토프 1(즉 GWSIHSPGGGSC, 서열번호 250) 및 2(즉 SVFQHLPGGGSC, 서열번호 251)에 의해 유도된 항체가 DC8E8과 동일한 병적인 타우 단백질을 인식함을 보인다(도 72). 단량체성 및 올리고머성 병적인 타우 단백질의 표적화는 병적인 타우 응집체의 발생을 방지하여, 감소된 타우 병리를 생성시키고, 이는 인간에서 AD의 치료학적 효과 및 치료를 도출한다.

[0765] **실시예 25: AD를 모델링하는 트랜스제닉 마우스에서 디자이너 치료 에피토프의 생체 내 효능**

[0766] 디자이너 치료 에피토프에 의한 면역요법은 처리된 래트의 신경행동 매개변수의 개선을 보였다. 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)를 트랜스제닉 래트 SHR72에서 면역요법을 위해 선택하였다. 래트를 애쥬포스 항원보강제와 결합된 KLH에 접합된 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)를 함유하는 백신 용량으로 피하로 면역시켰다. 백신을 실시예 18에 개시된 바와 같이 제조하였다. 하나의 용량은 100 μ g의 접합된 디자이너 치료 에피토프 2를 함유하였다. 복합 운동 장애를 복합 점수 - 뉴로스케일에서의 신경 검사와 병행된 일련의 표준 운동 시험에 의해 측정하였다. 6.5 개월된, 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)를 함유하는 백신으로 처리된 트랜스제닉 래트 SHR72에 대해 상기 면역요법의 효과를 측정할 목적으로 행동 시험을 수행하였다.

[0767] 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)로 처리된 래트는 항원보강제만을 제공받은 트랜스제닉 대조용 래트보다 들보 걷기 시험에서 27%까지 감소된 이탈 지연을 보였다(도 73A). 상기 뒷다리 미끄러짐 회수는 트랜스제닉 대조군에 비해 백신화된 그룹에서 44%까지 통계학적 유의수준으로 감소되었다($p < 0.05$)(도 73B). 상기 뉴로스케일 점수를 들보 걷기 시험, 물건잡기 전인력 시험, 및 신경학적 검사(기본 반사, 뒷다리 이탈 신전반사)에서 획득된 데이터로부터 계산하였다. 상기 면역화는 대조용 치료 그룹에 비해, 펩타이드 서열번호 251로 처리된 래트의 뉴로스케일 점수를 26%까지 개선시켰다(도 73C). 전체 뉴로스케일 점수는 처리되지 않은 트랜스제닉 래트

에 비해 처리된 트랜스제닉 래트의 신경행동 개선을 입증하였다. 모든 통계학적 데이터는 비모수 만-휘트니 U-시험을 사용하여 획득하였다.

[0768] 디자이너 치료 에피토프 2에 의한 면역화는 처리된 알츠하이머 트랜스제닉 래트에서 병적인 타우의 통계학적 유의수준의 감소($p < 0.05$)를 나타내었다. 불용성 병적인 타우의 수준에 대한 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)에 의한 면역화의 효과를 확인하기 위해서, 우리는 래트 뇌 샘플의 면역블롯 분석을 사용하였다. 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)로 면역된 트랜스제닉 동물의 뇌 조직(뇌줄기) 및 항원보강제만으로 면역된 트랜스제닉 동물의 대조용 그룹을 실시예 8에 개시된 바와 같이 사르코실-불용성 타우 분획의 제조에 사용하였다. 면역블롯 분석을 실시예 19에 개시된 바와 같이 수행하였다. 상기 통계 분석을 T-시험에 의해 수행하였다. 인산화 의존성 단백질 분해 AT8, DC209, DC217, 및 판-타우 단백질 분해 DC25를 상기 연구에 사용하였다.

[0769] 디자이너 치료 에피토프 2(서열번호 251)로 면역된 그룹 및 대조용 그룹으로부터의 불용성 타우 수준의 면역블롯 정량분석의 결과를 도 74에 나타낸다. 면역요법은 항원보강제만을 제공받은 대조용 트랜스제닉 래트에 비해 면역된 동물에서 불용성 타우의 양을 통계학적 유의수준으로 감소시켰다. 불용성 타우의 감소가 모든 분석된 타우 에피토프에서 관찰되었다. 347-353 에피토프 및 포스포-타우 에피토프에서의 감소는 통계학적으로 유의수준이었다($P < 0.05$). 관찰된 감소는 하기와 같았다: 347-353 타우 에피토프에서 46%까지($P < 0.05$), pT217 타우 에피토프에서 57%까지($P < 0.05$), p231-타우 에피토프에서 55%까지($P < 0.05$), pS202/pT205 타우 에피토프에서 47%까지($P < 0.05$).

[0770] 상기 결과는 상기 백신이 병적인 타우의 감소를 도출시킨 병적인 타우 특이성 항체를 유도했음을 보인다. 처리된 알츠하이머병 래트 모델의 뇌에서 병적인 타우 수준의 감소는 신경행동 매개변수와 상관있었다. 낮은 수준의 불용성 타우를 갖는 처리된 동물은 대조용 동물에 비해 보다 짧은 이탈 지연을 나타내었고 뒷다리 미끄러짐 회수를 통계학적 유의수준으로 감소시켰다($p < 0.05$). 상기 발견은 디자이너 치료 에피토프에 의한 면역화가 처리된 동물에서 불용성 병적인 타우의 감소 및 신경행동 개선을 도출함을 보이며, 이는 인간 알츠하이머병 및 관련된 타우병증의 치료에 대한 상기 백신의 치료 가능성을 뒷받침한다.

[0771] **실시예 26: DC8E8 최소 에피토프의 추가적인 특성화(치료 핵심 단위에 대해서)**

[0772] DC8E8의 최소 에피토프를 추가로 특성화하기 위해서, 인간 타우 단백질 2N4R의 미세소관 결합 반복 영역(MTBR1, MTBR2, MTBR3, MTBR4)으로부터 유도된, 상이한 길이를 갖는 타우 펩타이드의 패널(42-머, 19-머, 12-머, 7-머, 6-머, 및 5-머)을 설계하였다(도 75A,B). 펩타이드들을 95% 초과 순도로 이지바이오랩스(미국소재)에 의해 합성하였다. 모든 펩타이드를 경쟁 ELISA에 의해 DC8E8에 결합하기 위해 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 경쟁하는 그들의 능력에 대해 분석하였다. ELISA 플레이트(사르스테트(Sarstedt), #821581001)를 37 °C에서 PBS 중의 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 재조합 정제된 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 의 50 μl /웰로 밤새 코팅하였다. 상기 코팅된 플레이트를 PBS/트윈 20(0.05% v/v)으로 5 회 세척하고, 25 °C에서 1 시간 동안 PBS/트윈 20(0.05% v/v)으로 차단시켰다. 상기 펩타이드를 각각 1 mM의 최종 농도로 PBS에 별도로 용해시켰다. 원추형 웰 기부를 갖는 폴리프로필렌 미세적정 플레이트(그라이너, #651201)에서 PBS/트윈 20 중의 펩타이드의 일련의 2.5배 희석액을 제조하였다(농도 범위 200 μM ; 80 μM ; 32 μM ; 12.8 μM ; 5.12 μM ; 2.048 μM ; 0.8192 μM ; 0.32768 μM 이내). 확인 단백질 분해 DC8E8을 PBS 중의 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하고 60 μl 의 상기 희석된 항체를 각 웰에 일련의 펩타이드 희석물에 가하여 120 μl /웰의 혼합물을 생성시켰다. 상기 항체/펩타이드 혼합물을 230 rpm으로 설정된 회전 플랫폼 상에서 25 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 50 μl /웰의 항체/펩타이드 혼합물을 폴리프로필렌 플레이트로부터 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 코팅되고 PBS/트윈 20 차단된 ELISA 플레이트로 옮기고(중복하여) 25 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 PBS/트윈 20으로 5회 세척하고 PBS/트윈 20 중에서 1:1000으로 희석된 다클론 염소 항-마우스 면역글로불린/HRP(Dako, #P0447) 50 μl /웰과 함께 25 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 세척 후에, 상기 플레이트를 암실에서 25 °C에서 20 분 동안, 1.5 $\mu\text{l}/2\text{ ml}$ 의 30% H_2O_2 (SIGMA, H-0904)가 보충된 0.1 M Na-아세테이트 pH 6.0(Roth, #6779) 중의 o-PDA(o-페닐렌다이아민, SIGMA, P1526)의 1 mg/2 ml 용액 50 μl /웰과 함께 배양하였다. 상기 반응을 50 μl /웰의 2 M H_2SO_4 (Merck, 1.00731.1000)를 가하여 정지시킨 다음, 상기 플레이트를 492 nm에서 관독(예를 들어 파워웨이브(Powerwave) HT, 바이오-텍)하였다.

[0773] 도 76은 하기의 펩타이드들에 대해 수행된 경쟁 ELISA의 결과를 도시한다: TENLKHQPGGGK (서열번호 270), KHQPGGG (서열번호 271), HQPGGG (서열번호 272), HQPGG (서열번호 273), QPGGG (서열번호 274), ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKIHVPGGG (서열번호 275), KHVPGGG (서열번호 276), HVPGGG (서열번호 277), HVPGG (서열번호 278), VPGGG (서열번호 279), DNKIHVPGGGSVQIVYKPV (서열번호 280), HHKPGGG (서열번호 281), HKPGGG (서열번호 282) 및 THVPGGG (서열번호 283). 타우 치료 에피토프를 포함하는 모든 분석

된 펩타이드들은 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441/4R)$ 과 경쟁하였다. 도 76에 나타난 바와 같이, 심지어 6-머 펩타이드(서열번호 272, 서열번호 277 및 서열번호 282)도 DC8E8에 대한 결합에 대해서 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 경쟁할 수 있었다. 그러나, 히스티딘(5-머 펩타이드 서열번호 274, 279) 또는 최종 글리신(5-머 펩타이드 서열번호 273, 278)의 제거는 DC8E8에 대한 결합에 대해서 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과의 경쟁 활성을 상실시켰다(상기 5-머 펩타이드는 아미노산 His 및 Gly가 제거된 서열번호 272 및 서열번호 277로부터 유도되었다, 상기 참조). 이러한 결과는 상기 5-머 펩타이드가 병적인 타우 상의 DC8E8에 의해 인식되는 치료학적 3D 구조를 생성시키지 않았음을 암시한다. 다른 한편으로, 6 개의 아미노산 잔기를 포함하는 펩타이드는 경쟁 ELISA에 의해 측정된 생물 활성을 맡고 있는 치료학적 3D 구조를 생성시키고 DC8E8의 최소 에피토프(치료 핵심 단위)를 형성한다. 5 개의 아미노산 잔기는 그들의 설계에서, DC8E8 인식에 중요하며, 이들은 보존된다(서열 HxPGGG에서 히스티딘, 프롤린, 및 3 개의 글리신 잔기).

[0774] 결론: 상기 데이터는 인간 타우상의 최소 DC8E8 에피토프는 6 개 아미노산(잔기 HQPGGG (MTBR1 내에 위치됨), HVPGGG (MTBR2 내에), HKPGGG (MTBR3 내에) 및 HVPGGG (MTBR4 내에)을 포함한다)으로 이루어짐을 암시한다. 따라서, 상기 DC8E8 결합 부위(=에피토프)는 2N4R 타우에서 4 배 및 2N3R 타우에서 3 배 존재한다. 이는 상기 6-머 서열 내에 필요한 아미노산이 히스티딘 및 3 개의 글리신 전부임을 암시한다.

[0775] 실시예 27: DC8E8 최소 에피토프를 갖는 펩타이드의 면역원성의 측정

[0776] a) DC8E8의 최소 에피토프를 갖는 펩타이드는 면역원성이다: 개별적인 타우 펩타이드의 면역원 잠재성을 측정할 목적으로, 펩타이드들을 그들의 N-말단 Cys 잔기를 통해 KLH에 접합시켰다.

[0777] 이를 위해서, 타우 펩타이드를 KLH 단백질의 표면에 상기 펩타이드의 배향된 부착을 수득할 목적으로, 잉여 N-말단 위치된 시스테인 잔기를 갖는 시스테인화된 펩타이드로서 합성하였다. 펩타이드를 이작용성 가교결합제 N-[γ -말레이미도부틸옥시]숙신이미드 에스터(GMBS)를 통해 KLH 담체에 커플링시켰다. 상기 접합 반응을 준비하기 위해서, 20 mg의 KLH(칼바이옴)를 접합 완충제(0.9 M NaCl, 10 mM EDTA를 갖는 PBS)에 10 mg/ml의 농도로 10 분간 서서히 혼합함으로써 용해시켰다. 말레이미드-활성화된 KLH의 제조를 위해서, 2 mg의 활성 이작용성 가교결합제 GMBS를 50 μ l의 무수 다이메틸폼아미드에 용해시키고 실온에서 1 시간 동안 KLH 용액 2 ml과 혼합하였다. 후속으로, 반응되지 않은 GMBS를 접합 완충제로 평형화시킨 5 ml HiTrap 탈염 컬럼(GE 헬스케어) 상에서 제거하였다. 접합을 펩타이드 대 말레이미드-활성화된 KLH의 1:1 비(w/w, 20 mg의 펩타이드)로 실온(25 $^{\circ}$ C)에서 2 시간 동안 수행하였다. 상기 생성되는 접합체를 100 배 과잉의 PBS에 대해 투석시키고, 4 회 투석 완충제를 교환하여 접합되지 않은 펩타이드를 제거하였다. 투석 후에, 상기 접합체를 2 $^{\circ}$ C에서 21,000xg에서 15 분 동안 원심분리시켰다. 상기 접합체를 분액하고 사용시까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0778] 면역화를 위한 백신을 100 μ l의 PBS 중의, 100 μ g의 접합된 펩타이드를 포함하는 펩타이드-KLH 접합체로 제조하고 200 μ l의 최종 투여 부피로 프로인트 항원보강제로 1:1(vol/vol) 유화시켰다. 처리 그룹당 5 마리의 C57/BL 마우스를 사용하였다. 1차 면역화를 프로인트 완전 항원보강제로 제형화된 PBS 중의 펩타이드-접합체를 사용하여 수행하였다. 1-주일 간격으로 2 개의 다음 면역화를 프로인트 불완전 항원보강제로 제형화된 PBS 중의 펩타이드-접합체를 사용하여 수행하였다. 최종 추가 투여 후 1주일째에 동물들을 채혈하고 수거된 혈청을 항체 역가 측정에 사용하였다. 특이성 항-타우 항체의 역가를 실시예 19에 개시된 바와 같이, ELISA에 의해 측정하였다. 각 혈청의 일련의 희석물(1:100 내지 1:102400)을 고체상으로서 사용된, 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 및 생리학적 타우 2N4R에 대해 시험하였다. 도 77A 내지 C는 1:800 희석된 혈청에 대한 결과의 요약을 나타낸다. 상기 ELISA 결과를 만-휘트니 비모수 시험을 사용하여 통계학적으로 평가하였다. 역가는 최대 OD의 1/2을 제공하는 혈청의 희석의 역으로서 정의되었으며 도 78에 요약되었다.

[0779] 타우 펩타이드 TENLKHQPGGGK (서열번호 270), KHQPGGG (서열번호 271), ENLKHQPGGGKVQIINKKLDSN VQSKCGS KDNKHVPGGGS (서열번호 275), KHVPGGG (서열번호 276), HVPGGG (서열번호 277), DNKHVPGGGSVQIVYKPV (서열번호 280), HHKPGGG (서열번호 281) 및 THVPGGG (서열번호 283)에 의한 마우스의 면역화는 면역된 마우스에서 높은 수준의 타우 특이성 항체를 유도하였다. 더욱 또한, 유도된 항체는 생리학적 타우 2N4R에 대해서보다 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해서 더 높은 친화성을 나타내었다(도 77A 내지 C). 상기 식별은 모든 면역된 동물들로부터의 혈청에 대해서 통계학적으로 유의수준이었다(서열번호 270, $p<0.0079$; 서열번호 271, $p<0.0052$; 서열번호 275, $p<0.0079$; 서열번호 276, $p<0.0079$; 서열번호 277, $p<0.0379$; 서열번호 280, $p<0.0159$; 서열번호 281, $p<0.0379$, 및 서열번호 283, $p<0.0286$). 일반적으로, 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대한 기하평균 항체 역가는 생리학적 타우 2N4R에 대한 경우보다 3- 내지 5-배 더 높았다(도 78). 도 78에 나타난 바와 같이, 병적인 타우에 대한 최고의 항체 역가는 타우 펩타이드 서열번호 275 (GMT 51200), 서열번호 280

(GMT 51200), 서열번호 270 (GMT 22286) 및 서열번호 276 (GMT 22286)에 의해 유도되었다. 치료학적 3D 구조가 없는 것으로 보이는 5-머 펩타이드 (서열번호 273, 274, 278, 279)는 면역된 동물에서 타우 특이성 항체를 유도할 수 없었다. 대체로, 이러한 결과는 최소 치료 에피토프(치료 핵심 단위)를 갖는 펩타이드(서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283)가 면역원성이고 알츠하이머병 환자의 뇌에서 병적인 타우 단백질을 표적화할 치료 가능성을 갖는 항체를 유도함을 보였다. 상기 언급한 에피토프 지도화 실험은 펩타이드 서열번호 282가 치료학적 3D 구조(예를 들어 내부 DC8E8 에피토프를 적어도 부분적으로 모방한다)를 생성시키지만, 그림에도 불구하고, 상기는 면역된 마우스에서 특이성 항체 반응을 유도하지 못함을 보였다(병적인 타우에 대한 GMT는 174였다, 도 78).

[0780] b) 아이소타입 프로파일: 타우 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 의한 C57/BL 마우스의 백신화는 병적인 타우에 특이적인 IgG1 및 IgG2b 항체 아이소타입의 형성을 우선적으로 유도하였다. 펩타이드에 반응하여 생성된 항체의 특이성 아이소토프를 측정하기 위해서 마우스로부터 혈청을 모으고 1:100 내지 1:12,800으로 희석하고, 병적인 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해 ELISA에 의해 중복 시험하였다(실시예 19에 개시된 바와 같이). 마우스 IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 및 IgM 아이소타입을 검출하기 위해서, 항-마우스 하위부류 특이성 HRP 접합된 2차 항체를 PBS 중에서 1:5,000 희석하였다(라이프스팬 바이오사이언스즈로부터 구입한 항체). 도 79는 전형적인 1:800 희석에 대한 결과를 나타낸다. 상기 데이터는 KLH에 접합된 펩타이드가 광범위한 항-타우 항체 아이소타입을 유도했음을 암시한다. 일반적으로, 펩타이드에 의한 백신화는 최고 수준의 항체 아이소타입(IgG1, IgG2b)을 생성시켰으며, 이는 높은 친화성 항체인 것으로 생각된다. 병적인 타우에 대해 우선적인 친화성을 갖는 IgG1 및 IgG2b의 높은 역가의 존재는 상기 백신에 의해 유도된 면역 반응이 병적인 타우 중에 대한 것임을 가리켰다. 모의-면역된 마우스(항원보강제만을 제공받은)로부터 수득된 대조용 혈청은 음성이었다(데이터 도시 안 됨).

[0781] c) 치료 에피토프를 갖는 펩타이드는 병적인 타우와 생리학적 타우 사이를 식별하는 항체를 유도한다: 표면 플라즈몬 반응을 사용하는 결합 사건의 실시간 모니터링은 개별적인 타우 펩타이드 TENLKHQPGGGK (서열번호 270), KHQPGGG (서열번호 271), HQPGGG (서열번호 272), HQPGG (서열번호 273), QPGGG (서열번호 274), ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKGSKDNKIHVPGGGS (서열번호 275), KHVPGGG (서열번호 276), HVPGGG (서열번호 277), HVPGG (서열번호 278), VPGGG (서열번호 279), DNKIHVPGGGSVQIVYKPV (서열번호 280), HHKPGGG (서열번호 281), HKPGGG (서열번호 282) 및 THVPGGG (서열번호 283)로 면역된 마우스 C57/BL의 수거된 혈청으로부터의 항체의 결합(kON) 및 해리(kOFF)의 동역학적 속도의 측정을 가능하게 하였다. 상기 분석을 실시예 5 및 19에 개시된 바와 같이 CM5 센서 칩(비아코어 AB, 읍살라소제)을 사용하여 비아코어3000 상에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다. 상기 분석은 상기 펩타이드에 의한 면역화에 의해 유도된 항체들이 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 의 인식과 생리학적 타우 동형단백질 2N4R을 식별할 수 있음을 보였다(도 80). 최소 치료 에피토프를 갖는 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 의한 면역화에 의해 유도된 항체는 상응하는 생리학적 타우 2N4R에 대한 친화성에 비해 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 에 대해 우선적인 친화성을 나타내었다. 상기 식별은 펩타이드: 서열번호 270 ($p=0.0392$), 서열번호271 ($p= 0.0363$), 서열번호 272 ($p= 0.0022$), 서열번호 276 ($p= 0.0013$), 서열번호 277 ($p= 0.0023$), 서열번호 280 ($p= 0.0104$), 서열번호 281 ($p=0.0123$) 및 서열번호 283 ($p=0.0011$)로부터 혈청에 대해 통계학적으로 유의수준이었다. 상기 획득된 결과는 도 77A 내지 C 및 도 78에 요약된 선행 면역원성 실험에 따른다.

[0782] d) 펩타이드-유도된 항체는 웨스턴 블롯에 의해 타우의 병적인 형태를 인식한다: 개별적인 타우 펩타이드에 의한 마우스 C57/BL의 면역화에 의해 유도된 항체를 면역블롯 방법(실시예 19에 개시된 바와 같음)을 사용하여 병적인 형태의 타우에 대해 검사하였다. 신경섬유 병리의 말기 단계의 SHR72 래트의 뇌줄기를 불용성 병적인 타우 단백질의 추출에 사용하였다. 인간 AD 뇌의 측두엽(브라크 단계 VI; 네덜란드 뇌 은행으로부터 수득됨, 네덜란드 소재)을 인간 병적인 AD 타우의 추출에 사용하였다. 추출된 타우 단백질을 사르코실 방법(문헌[Greenberg and Davies 1990])에 따라 제조하였다. 면역된 동물들로부터 모은 혈청을 PBS 중에서 1:1000 희석하고 1차 항체로서 사용하였다. 1차 항체와의 배양에 이어서 양고추냉이 페록시다제(1:3000; 다코, 글로스트롭, 덴마크 소재)에 접합된 다클론 토끼 항-래트 면역글로불린과 배양하였다. 이어서 상기 양고추냉이 페록시다제-접합된 항체를 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(씨모 사이언티픽, 벨기에 소재)에 의해 가시화하였다. 상기 신호를 LAS3000 CCD 영상화 시스템(후지필름, 일본 소재)으로 디지털화하였다. 요약된 결과를 도 81에 제공한다. DC8E8 에피토프(들)(서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283)의 치료학적 3D 구조물을 생성시키는 듯한 펩타이드에 의한 백신화에 의해 유도된 항체는 AD에 대해 특징적인 A68 타우 코돈을 포함하여, AD 뇌 조직 및 SHR72로부터 추출된 타우 단백질의 모든 병적인 형태들을 인식하였다. 그림에도 불구하고, 치료학적 3D 구조물(DC8E8에 결합하기 위해 타우 $\Delta(1-150;392-441)/4R$ 과 경쟁한다)을 생성시키는 것으로 보이는 펩타

이드 서열번호 282는 상기 면역된 마우스에서 특이적인 항체 반응을 유도하지 못했으며, 따라서 반응성이 음성이었다. 유사하게, 타우 특이성 항체 반응을 유도할 수 없는 5-머 펩타이드는 상기 분석에서 음성이었다.

- [0783] e) 펩타이드-유도된 항체는 인간 알츠하이머병 뇌 조직으로부터의 섹션 중의 병적인 타우 단백질을 인식한다: 개별적인 펩타이드에 의한 마우스 C57/BL의 백신화에 의해 유도된 타우-특이성 항체를 네덜란드 뇌 은행으로부터 수득한 인간 뇌 조직(파라핀 블록) 상에서 시험하였다. 상기 블록을 마이크로톰 상에서 절단하였다. 알츠하이머병 뇌(브라 단계 V)로부터의 해마-CA1 섹터의 파라핀-섹션(8 μ m)을 실온(25 $^{\circ}$ C)에서 1 분간 저온(+4 $^{\circ}$ C) 99% 폼산으로 처리하였다. 상기 조직섹션을 차단 용액(50 nM 트리스-HCl 중의 5% BSA, 0.3% 트리톤 X-100) 중에서 배양하고 이어서 차단 용액 중에서 1:1000으로 희석된 혈청과 함께 밤새 배양하였다. 후속으로, 상기 섹션들을 실온에서 1 시간 동안 비오틴화된 2차 항체(백타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)와 함께 배양하고, 이어서 추가로 1 시간 동안 아비딘-비오틴 페록시다제-복합체(백타스테인 엘리트 ABC 키트, 벡터 레보라토리즈)와 반응시켰으며, 모두 25 $^{\circ}$ C에서 수행되었다. 상기 면역반응을 페록시다제 기질 키트(벡터 VIP, 벡터 레보라토리즈, 미국 캘리포니아주 소재)로 가시화하고 메틸 그린(벡터 레보라토리즈)으로 대조염색시켰다. 상기 섹션들을 올림푸스(Olympus) BX71 현미경으로 검사하였다. 면역조직화학 염색(도 82A 내지 C, 도 83)은 펩타이드 서열번호 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 및 283에 의한 면역화에 유도된 항체가 알츠하이머병 뇌 조직의 해마에서 병적인 타우 구조, 즉 신경섬유매듭을 특이적으로 인식하였음을 암시한다. 상기 언급한 펩타이드로 백신화된 동물들의 혈청은 상기 신경섬유 병리를 집중적으로 장식하였으며, 이는 상기 항체가 병적인 타우 펩타이드를 표적화하였음을 입증한다. 펩타이드 서열번호 272 및 277에 의한 백신화에 의해 유도된 항체는 뇌 조직 중의 병적인 타우 구조물의 보다 약한 염색 강도를 보인다. 타우 특이성 항체 반응의 보다 낮은 수준을 유도하거나 또는 타우 특이성 항체 반응을 유도하지 않은 펩타이드(서열번호 273, 274, 278, 279 및 282)는 상기 분석에서 음성이었다. 항원보장제만을 제공받은 마우스로부터의 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였다. 이들은 신경섬유 병리를 인식하지 못했다(도 82C).
- [0784] 특허, 특허 출원, 논문, 교과서 등 및 상기 중에 인용된 참고문헌들을 포함하여 본 발명에 인용된 모든 참고문헌들은, 이미 인용되지 않은 정도로, 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다. 또한, 하기의 참고문헌들(보다 축약된 형태로 선행 단락들에서 인용된)도 또한 상기와 같은 참고문헌들에 인용된 참고문헌들을 포함하여, 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.
- [0785] Alfaro-Acha *et al.* Handgrip Strength and Cognitive Decline in Older Mexican Americans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* (2006);61(8):859865.
- [0786] Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6923-6928.
- [0787] Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *Journal of molecular biology* 273, 927-948.
- [0788] Andreasen N, Blennow K, Zetterberg H. 2010. Neuroinflammation Screening in Immunotherapy Trials against Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2010:638379.
- [0789] Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 27:9115-9129 (2007).
- [0790] Balin BJ, Little CS, Hammond CJ, Appelt DM, Whittum-Hudson JA, Gerard HC, Hudson AP. 2008. *Chlamydia pneumoniae* and the Etiology of Late-Onset Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 13:371380.
- [0791] Berg, L., *et al.* Clinicopathologic Studies in Cognitively Healthy Aging and Alzheimer disease. *ARCHNEUROL/VOL55,MAR1998.*
- [0792] Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9:768-778 (2008).
- [0793] Bierer, L.M., *et al.* Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate With Dementia Severity in Alzheimer's disease. *ArchNeuro/Vol.52,Jan 1995.*

- [0794] Boyle, P., *et al.* Association of Muscle Strength With the Risk of Alzheimer disease and the Rate of Cognitive Decline in Community-Dwelling Older Persons.(REPRINTED)ARCHNEUROL/VOL66(NO.11), NOV 2009.
- [0795] Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of the cerebral cortex, vol. 14 (Peters, A. and Morrison, J. H., eds), pp 475-512 New York: Kluwer Academic/Plenum Publications.
- [0796] Braak, H., *et al.* Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259(1991).
- [0797] Braak, H., *et al.* The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol* (2011) 121:171-181.
- [0798] Buchman, A., *etal.*, Frailty is Associated With Incident Alzheimer's disease and Cognitive Decline in the Elderly. *Psychosomatic Medicine* 69:483-489(2007).
- [0799] Buchman, A., *et al.*, Grip Strength and the Risk of Incident Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*;29:66-73(2007)
- [0800] Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Brain Research Reviews.* 33, 95-130.
- [0801] Burns, A., Zaudig, M. 2002. Mild cognitive impairment in older people. *Lancet.* 360(9349),1963-5.
- [0802] Burns, J.M., *et al.* The pathology of the substantia nigra in Alzheimer disease with extrapyramidal signs. *Neurology* 2005;64:1397.
- [0803] Carter J, Lippa CF. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 1:733-737 (2001).
- [0804] Cevc G, Gebauer D, Stieber J, SchA, Blume G (1998) Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15.
- [0805] Chui, H.C., *et al.* Extrapyramidal Signs and Psychiatric Symptoms Predict Faster Cognitive Decline in Alzheimer's disease. *Arch Neurol/Vol* 51, July 1994.
- [0806] Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Rev Drug Discovery* 9, 387-398.
- [0807] Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11(7), 909-13.
- [0808] Csokova N, Skrabana R, Liebig HD, Mederlyova A, Kontsek P, Novak M. Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Protein Expr Purif* 35:366-372 (2004).
- [0809] Current Protocols in Protein Science 2001 May;Chapter 5
- [0810] Dickey CA, Ash P, Klosak N, Lee WC, Petrucelli L, Hutton M, Eckman CB (Pharmacologic reductions of total tau levels; implications for the role of microtubule dynamics in regulating tau expression. *Mol Neurodegener* 1:6.2006).
- [0811] Dickey CA, Eriksen J, Kamal A, Burrows F, Kasibhatla S, Eckman CB, Hutton M, Petrucelli L (Development of a high throughput drug screening assay for the detection of changes in tau levels -- proof of concept with HSP90 inhibitors. *Curr Alzheimer Res* 2:231-238.2005).
- [0812] Dickey CA, Petrucelli L. Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Expert Opin Ther Targets* 10:665-676 (2006).

- [0814] *Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM (Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5:452-457 (2002).
- [0815] Duyckaerts, C., *et al.* Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* (2009) 118:536.
- [0816] Duyckaerts, C., *et al.* Diagnosis and Staging of Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, Vol. 18, No. S4, pp. S33-S42 (1997)
- [0817] Duyckaerts, C., *et al.* The progression of the lesions in Alzheimer disease: insights from a prospective clinicopathological study. *J. Neural Transm* (1998) [Suppl] 53:119-126.
- [0818] D'Souza, I., and Schellenberg, G.D. (2005). Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochimica et biophysica acta* 1739, 104-115.
- [0819] Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117 (2005).
- [0820] Filipcik P, Zilka N, Bugos O, Kucerak J, Koson P, Novak P, Novak M. (2010) First transgenic rat model developing progressive cortical neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging*. 2010 Dec 31. [Epub ahead of print]
- [0821] Fodero-Tavoletti, M.T., *et al.* F-THK523: a novel *in vivo* tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* 134;1089-1100 (2011)
- [0822] Frenkel D, Dewachter I, Van Leuven F, Solomon B (Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine* 21:1060-1065 (2003).
- [0823] Frost, B., Diamond, M.I. (2009). The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease. *Prion* 3(2):74-7.
- [0824] Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284(19), 12845-52
- [0825] Furlan R, Brambilla E, Sanvito F, Roccatagliata L, Olivieri S, Bergami A, Pluchino S, Uccelli A, Comi G, Martino G (Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Brain* 126:285-291 (2003).
- [0826] Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St George-Hyslop P, McLaurin J (Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14657-14662 (2004).
- [0827] Giannakopoulos, P., *et al.* Pathologic Correlates of Apraxia in Alzheimer disease. *ARCHNEUROL/VOL* 55, MAY 1998.
- [0828] Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussiere, T., Bouras, C., K, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60, 1495-500.
- [0829] Glenn GM, Rao M, Matyas GR, Alving CR. (1998). Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 391:851.
- [0830] Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 3, 519-526.
- [0831] Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A. (1989b.) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four

tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8,393-399.

- [0832] Goldman, W.P., *et al.*, Motor dysfunction in mildly demented AD individuals without extrapyramidal signs. *Neurology*(1999);53:956.
- [0833] Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24 (1997).
- [0834] Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel Jr, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16(14),4491-500.
- [0835] Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hern, F., and Avila, J. (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett* 580(20), 4842-50.
- [0836] Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Diaz-Hernandez, J.I., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2009). Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol* 19(10):708-17.
- [0837] Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2008). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 37(4), 673-81.
- [0838] Goode, B.L., Chau, M., Denis, P.E., Feinstein, S.C. 2000. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem* 275, 38182-38189.
- [0839] Goode, B.L., Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol.* 124, 769-782.
- [0840] Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5827-5831 (1990).
- [0841] Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. (1992). Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 564-569.
- [0842] Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18:165-171 (2004).
- [0843] Grudzien, A., *et al.* Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer' s disease. *Neurobiology of Aging* 28(2007)327335.
- [0844] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917 (1986).
- [0845] Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L.M., Hoessler, Y.C., Zetterberg, H., Trojanowski, J.Q. (2010). Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 45(1), 30-40.
- [0846] Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388 (1991).
- [0847] Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1:355-358 (1998).
- [0848] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road

to therapeutics. *Science* 297:353-356 (2002).

- [0849] Haynes JR, McCabe DE, Swain WF, Widera G, Fuller JT. Particle-mediated nucleic acid immunization. *J Biotechnol* 44:37-42.1996).
- [0850] Hertz, L. Is Alzheimer's disease an anterograde degeneration, originating in the brainstem, and disrupting metabolic and functional interactions between neurons and glial cells? *Brain Research Reviews*, 14 (1989) 335-353.
- [0851] Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 2002;20 Suppl. 3:S712.
- [0852] Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Developing pharmacological therapies for Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 64:2234-2244 (2007).
- [0853] Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies. *Curr Drug Targets* 5:495-502 (2004).
- [0854] Ivanovova N, Handzusova M, Hanes J, Kontseikova E, Novak M. High-yield purification of fetal tau preserving its structure and phosphorylation pattern. *J Immunol Methods* 339:17-22 (2008).
- [0855] Itzhaki RF, Wozniak MA. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's disease: The Enemy Within. *J Alzheimers Dis.* 13:393405.
- [0856] Jacobsen JS, Reinhart P, Pangalos MN. Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2:612-626 (2005).
- [0857] Jakes, R., Novak, M., Davison, M., Wischik, C.M. (1991). Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J* 10, 2725-2729.
- [0858] Jansen FK, Blythman HE, CarriD, Casellas P, Gros O, Gros P, Laurent JC, Paolucci F, Pau B, Poncelet P, Richer G, Vidal H, Voisin GA. (1982). Immunotoxins: hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity. *Immun. Rev.* 62, 185-216
- [0859] Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.2000).
- [0860] Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC (1998). Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:173-186.
- [0861] Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, PIA. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods*. 1997 Feb 14;201(1): 35-55
- [0862] Kawasaki G (1991). International Patent Application Publication No. WO91/05058.
- [0863] Kontseikova, E. (2002) International Patent Application Publication No. WO/2004/007547.
- [0864] Korenova M, Zilka N, Stozicka Z, Bugos O, Vanicky I, Novak M (NeuroScale, the battery of behavioural tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. *J Neurosci Methods* 177:108-114.2009).
- [0865] Kosik, K.S., Kowall, N.W., McKee, A. (1989a). Along the way to a neurofibrillary tangle: a look at the structure of tau. *Ann Med.* 21,109-112.
- [0866] Koson P, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Korenova M, Filipcik P, Novak M. Truncated tau expression levels determine life span of a rat model of tauopathy without causing neuronal loss or correlating with terminal neurofibrillary tangle load. *Eur J Neurosci* 28:239-246 (2008).
- [0867] Kovac, A., Zilkova, M., Deli, M.A., Zilka, N., Novak, M. (2009). Human truncated tau is using a different mechanism from amyloid-beta to damage the blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis* 18(4), 897-

906.

- [0868] Kovacech B, Novak M. (2010). Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 7: in press.
- [0869] Kovacech B, Skrabana R, Novak M. (2010). Transition of tau protein from disordered to misordered in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 7: 24-27.
- [0870] Kraemer, H.C., *et al.* 'HowFar' vs 'HowFast' in Alzheimer's disease. *ArchNeurol/Vol51*, Mar(1994).
- [0871] Krajciova, G., Skrabana, R., Filipcik, P., and Novak, M. (2008). Preserving free thiols of intrinsically disordered tau protein without the use of a reducing agent. *Anal Biochem* 383, 343-345.
- [0872] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).
- [0873] Langer R, Cleland JL, Hanes J. (1997). New advances in microsphere-based single-dose vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119.
- [0874] Langer R. New methods of drug delivery. (1990) *Science* 249:1527-33.
- [0875] Larbig G, Pickhardt M, Lloyd DG, Schmidt B, Mandelkow E. Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: a ligand based approach results in successful scaffold hopping. *Curr Alzheimer Res* 4:315-323 (2007).
- [0876] Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med* 11:164-169 (2005).
- [0877] Liu, Y., *et al.* Pathological Correlates of Extrapyrmidal Signs in Alzheimer's disease. *AnnNeurol*(1997);41:368-374.
- [0878] Livingston, B.D., Crimi, C., Grey, H., Ishioka, G., Chisari, F.V., Fikes, J., Grey, H., Chesnut, R.W., and Sette, A. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159:1383-1392 (1997).
- [0880] *Louis, E.D., *et al.* Parkinsonian Signs in Older People in a Community-Based Study. (REPRINTED) *ARCHNEUROL/VOL61*, (AUG2004).
- [0881] MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol.* (1996) Oct 11;262(5):732-45.
- [0882] Macikova I., Dedek L., Kontseikova E., Kontsek P., Ciampor F, Novak M., Vrzal V. (1992) Common and different antigenic properties of the rabies virus glycoprotein between strains SAD-Vnukovo and Pitman-Moore. *Acta virol.* 36, 541-55.
- [0883] Marz W, Scharnagl H, KirM, Bohl J, Gross W, Ohm TG. 1996. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann N Y Acad Sci.* 777:276-80.
- [0884] Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13:989-1002 (1994).
- [0885] Miklossy J. 2008. Chronic Inflammation and Amyloidogenesis in Alzheimer's disease Role of Spirochetes. *J Alzheimer's Dis* 13:381391 381
- [0886] Moe, J.G., Chatterjee, I., Davidowitz, E.J., Arancio, O. (2009). Modulation of synaptic function by extracellular tau enriched in oligomers. *Alzheimer Dem* 5 (4), P499

- [0887] Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985 (2000).
- [0888] Morgan D. 2011. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med.* 269(1):54-63.
- [0889] Morris, J.C., *et al.* Clinical and Pathological Aspects of Parkinsonism in Alzheimer's disease. *ArchNeurol-Vol146*(June1989).
- [0890] Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB J* 21:2135-2148 (2007).
- [0891] Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* 12, 279-84.
- [0892] Necula M, Chirita CN, Kuret J Cyanine dye N744 inhibits tau fibrillization by blocking filament extension: implications for the treatment of tauopathic neurodegenerative diseases. *Biochemistry* 44:10227-10237 (2005).
- [0893] Nicolau C, Greferath R, Balaban TS, Lazarte JE, Hopkins RJ A liposome-based therapeutic vaccine against beta -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2332-2337 (2002).
- [0894] Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *ProcNatlAcadSciUSA*102:6990-6995(2005).
- [0895] Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M. (1993). Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* 12, 365-70.
- [0896] Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 43:321-332 (2004).
- [0897] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421 (2003).
- [0898] O'Hagan DT, Valiante NM (Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2:727-735 (2003).
- [0899] O'Mahony, DJ. (1995) International Patent Application Publication No. W09717613
- [0900] Otvos L, Jr., Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. (1994). Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *Journal of neuroscience research* 39: 669-673.
- [0901] Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. (1995). Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur J Immunol.* Dec;25(12):3521-4.
- [0902] Pettersson, A.F., *et al.* Motor Function in Subjects with Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer ' s disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*(2005);19:299304.
- [0903] Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Hascher A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E Screening for inhibitors of tau polymerization. *Curr Alzheimer Res* 2:219-226 (2005).
- [0904] Price JL, Morris JC Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358-368 (1999).
- [0905] Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364-6369 (2002).

- [0906] Reichert, J.M. (2011). Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *mAbs* 3(1),76-99.
- [0907] Reitz, C., *et al.* Memory performance is related to amyloid and tau pathology in the hippocampus.(Mar2009);*J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2009;80;715-721; originally published online.
- [0908] Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754 (2007).
- [0909] Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0910] Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481 (2005).
- [0911] Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, GschC, Asch E, Blasko I, Parson W, BG, SchD, Trannoy E, Grubeck-Loebenstien B. 2002. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol.* 168(11):5893-9.
- [0912] Scarneas, N., *et al.* Motor signs during the course of Alzheimer disease. *Neurology*.(2004);63(6):975982.
- [0913] Scarneas, N., *et al.* Motor signs predict poor outcomes in Alzheimer disease.*Neurology*.(2005);64(10):16961703.doi:10.1212/01.WNL.0000162054.15428.E9.
- [0914] Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177 (1999).
- [0915] Schenk D, Hagen M, Seubert P Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 16:599-606 (2004).
- [0916] Schneider, A., Mandelkow, E., (2008). Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics* 5(3), 443-57.
- [0917] Seabrook GR, Ray WJ, Shearman M, Hutton M Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. *Mol Interv* 7:261-270 (2007).
- [0918] Selkoe DJ Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:438-447 (1994).
- [0919] Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CE, Tunbridge EM, Denk F, Dawson HN, Vitek MP, Wade-Martins R, Paulsen O, Vargas-Caballero M (Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *J Neurosci* 31:1688-1692 (2011).
- [0920] Siegrist CA, Aspinall R. (2009). B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol.* 9(3):185-94
- [0921] Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Fitzner-Attas C, Sage D, Quartermain D, Goni F, Frangione B, Wisniewski T (An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *J Neurosci* 24:6277-6282 (2004).
- [0922] Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, Frangione B, Wisniewski T Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am J Pathol* 159:439-447 (2001).
- [0923] Simic, G., *et al.* Annotation-Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009 December ; 35(6): 532554. doi:10.1111/j.1365-2990.2009.01038.x.

- [0924] Skrabana, R., Sevcik, I., Novak, M. (2006). Intrinsically disordered proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1085-1097.
- [0925] Skrabana, R., M. Skrabanova-Khuebachova, *et al.* (2006). "Alzheimer's-disease-associated conformation of intrinsically disordered tau protein studied by intrinsically disordered protein liquid-phase competitive enzyme-linked immunosorbent assay." *Anal Biochem* 359(2): 230-7.
- [0926] Sloane PD, Zimmerman S, Suchindran C, Reed P, Wang L, Boustani M, Sudha S The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances. *Annu Rev Public Health* 23:213-231 (2002).
- [0927] Soininen, H., *et al.* Extrapyramidal signs in Alzheimer's disease:a3-yearfollow-upstudy. *JNeuralTransm[P-DSect]*(1992)4:107-119.
- [0928] Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL, Feany MB (Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity *in vivo*. *Mol Biol Cell* 18:5060-5068(2007a).
- [0929] Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow EM, Feany MB. S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J Neurosci Res* 85:1271-1278 (2007b).
- [0930] Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem* 280:7614-7623 (2005a).
- [0931] Taniguchi T, Sumida M, Hiraoka S, Tomoo K, Kakehi T, Minoura K, Sugiyama S, Inaka K, Ishida T, Saito N, Tanaka C (Effects of different anti-tau antibodies on tau fibrillogenesis: RTA-1 and RTA-2 counteract tau aggregation. *FEBS Lett* 579:1399-1404 (2005b).
- [0932] Trollet C, Scherman D, Bigey P Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges. *Methods Mol Biol* 423:199-214 (2008).
- [0933] van den Berg JH, Nuijen B, Beijnen JH, Vincent A, van Tinteren H, Kluge J, Woerdeman LA, Hennink WE, Storm G, Schumacher TN, Haanen JB. Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum Gene Ther* 20:181-189 (2009).
- [0934] Van Nest G., Ott G., Barchweld G. (1990) Patent Application Publication No. WO9014837
- [0935] Vechterova L, Kontseikova E, Zilka N, Ferencik M, Ravid R, Novak M. (2003). DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope. *Neuroreport* 14: 87-91.
- [0936] Wai, M., *et al.* Co-localization of hyperphosphorylated tau and caspases in the brainstem of Alzheimer's disease patients. *Biogerontology*(2009)10:457469.
- [0938] *Waite, L.M., *et al.* Gait slowing as a predictor of incident dementia:6-year longitudinal data from the Sydney Older Persons Study. *Journal of the Neurological Sciences* 229230(2005)8993
- [0939] Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193 (2004).
- [0940] Wang, Li, *et al.* Performance-Based Physical Function and Future Dementia in Older People. (REPRINTED) *ARCHINTERNMED/VOL166(MAY22,2006)*.
- [0941] Weiner HL, Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Issazadeh S, Hancock WW, Selkoe DJ (Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48:567-579 (2000).
- [0942] Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. 2009. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of

immune function. Trends Immunol. 30(7):306-12.

- [0943] West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., Troncoso, J.C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. Lancet 344,769-72.
- [0944] Wilson, R.S., *et al.* Parkinsonian-like Signs and Risk of Incident Alzheimer disease in Older Persons.(REPRINTED)ARCHNEUROL/VOL60(APR2003).
- [0945] Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. J Pharm Sci 98:1278-1316 (2009).
- [0947] * Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR (Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11213-11218 (1996).
- [0948] Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A. (1988a). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85,4884-8.
- [0949] Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A. (1988b). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85, 4506-10.
- [0950] Xing Z, Santosuosso M, McCormick S, Yang TC, Millar J, Hitt M, Wan Y, Bramson J, Vordermeier HM. Recent advances in the development of adenovirus- and poxvirus-vectored tuberculosis vaccines. Curr Gene Ther 5:485-492 (2005).
- [0951] Zarow, C., *etal.* Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. (REPRINTED) ARCH NEUROL/VOL 60, MAR 2003.
- [0952] Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. Proc Natl Acad Sci U S A 102:227-231 (2005).
- [0953] Zhang J, Wu X, Qin C, Qi J, Ma S, Zhang H, Kong Q, Chen D, Ba D, He W (A novel recombinant adeno-associated virus vaccine reduces behavioural impairment and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis 14:365-379 (2003).
- [0954] Zielinski C, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H, Pehamberger H. (2003). Patent Application Publication No. W003/020750
- [0955] Zilka N, VechterovL, KontsekovE, NovM.(2003) A rapid immunohistochemical primary screening assay for hybridomas. J Immunol Methods. 272(1-2):49-53.
- [0956] Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseкова E, Novak M. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration *in vivo*.FEBSLett580:3582-3588(2006).
- [0957] Zilka, N., *et al.* Chaperone-like Antibodies Targeting Misfolded Tau Protein: New Vistas in the Immunotherapy of Neurodegenerative Foldopathies. Journal of Alzheimer' s disease15(2008)169-179.
- [0958] Zilkova, M., Koson, P., Zilka, N. 2006. The hunt for dying neurons: insight into the neuronal loss in Alzheimer's disease. Bratisl Lek Listy 107(9-10), 366-73.

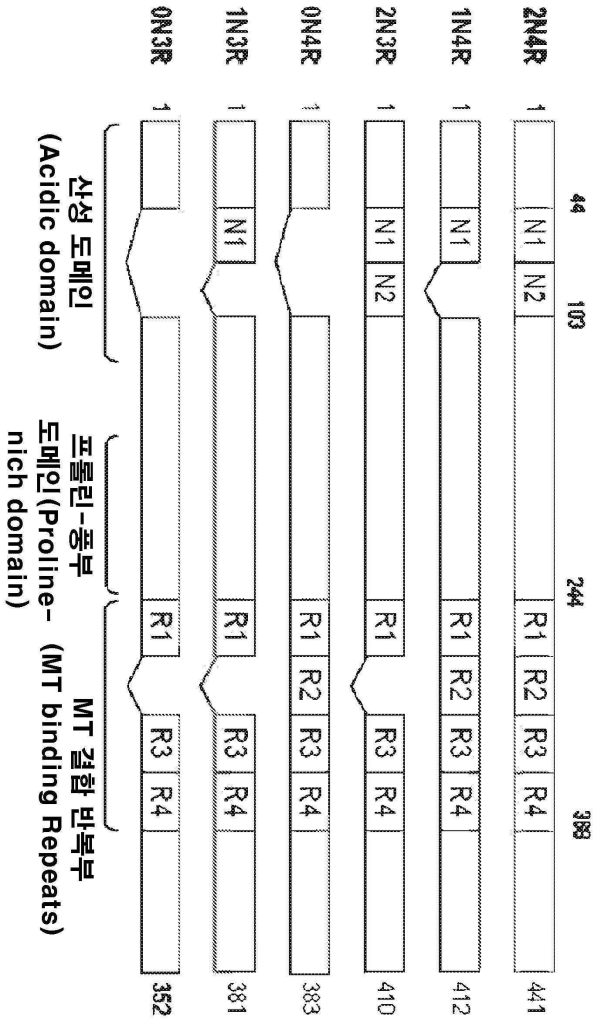
수탁번호

[0960]

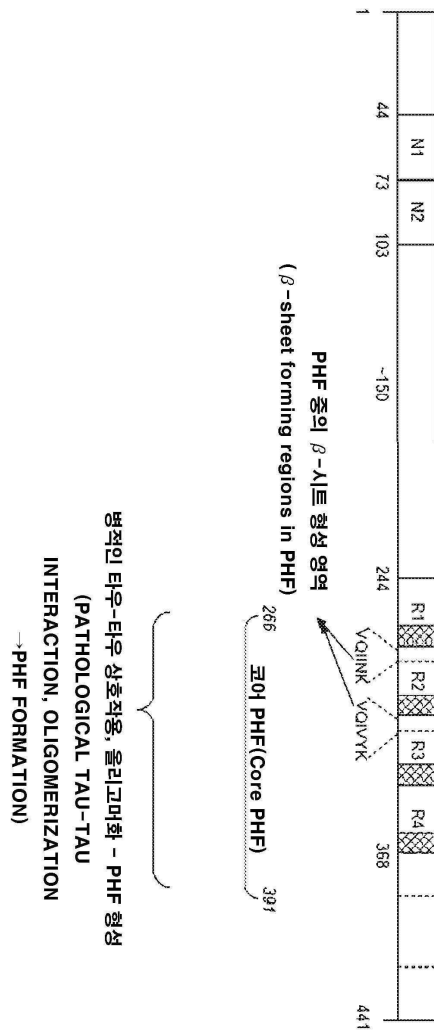
기탁기관명 : The American Type Culture Collection(ATCC)
수탁번호 : PTA-11994
수탁일자 : 20110713

도면

도면1



도면2



도면3

A. Nucleotide sequence of DC8E8 variable light chain (VL):
GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCTCCCTGGCTGTGTGACAGAGAGAGAGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTC
AAGCTAGAACCCGAAAGACTACCTGGCTTGGTACAGCAGAAACAGGSCAGTCTCTAAACTGCTGATCTACTGGGATCCACTAGG
GATCTGGGGTCTCTGATGCTTCCAGAGTGGATCTGGGACGAAATTTCACTTCCACATTCAGGAGTGTGACAGGTCGAGAGCTGGCA
GTTTATTATGCAAGCAATCTTTTATCTTCGACGTTGGGTGGAGGCAACAAGCTGGACATCAAA

B. Amino acid sequence of DC8E8 variable light chain (VL):
DIVMSQSFLAVSAGEKVMKSKSSQSLNSRTEKNYLAWYQKPGQSPKLLIYMASTRSGVPRFRTGSGSGTDFTLTSSVQAEDLA
VYYKQSPFYLRTPGGGTGLDIAK

CDR1: QSLNSRTRNY
CDR2: WAS
CDR3: KQSPFYLRTP

C. Alignment of DC8E8 (VL) sequence with the closest mouse germline sequence IGV8-21*01:
V-gene (298/301; 99.0% sequence identity):
DC8E8 light GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCTCCCTGGCTGTGTGACAGAGAGAGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTC
IGV8-21*01 GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCTCCCTGGCTGTGTGACAGAGAGAGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTC

DC8E8 light GAAGGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAA
IGV8-21*01 GAAGGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAA

DC8E8 light CCGAAGAAGACTACTGGCTTGGTACAGAGAAACAGGGCAGTCTCCT
IGV8-21*01 CCGAAGAAGACTACTGGCTTGGTACAGAGAAACAGGGCAGTCTCCT

DC8E8 light AAACCTGCTGATCTACTGGGATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
IGV8-21*01 AAACCTGCTGATCTACTGGGATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG

DC8E8 light CTTACAGGCGAGTGGATCTGGAGCAGATTTCACCTCAACATCAGCAGTG
IGV8-21*01 CTTACAGGCGAGTGGATCTGGAGCAGATTTCACCTCAACATCAGCAGTG

DC8E8 light TGCAGGCTGAGAGCTGGCAGTTTATTAATGCAAGCAATCTTTTATCTT
IGV8-21*01 TGCAGGCTGAGAGCTGGCAGTTTATTAATGCAAGCAATCTTTTATCTT

DC8E8 light C
IGV8-21*01 C
*

J-gene (35/36; 97.2% sequence identity):
DC8E8 light GGAAGTTGGTGGAGGCAACAAGCTGGAAATCAAAAC
IGKJ1*01 GGAAGTTGGTGGAGGCAACAAGCTGGAAATCAAAAC

D. Nucleotide sequence of DC8E8 heavy chain variable region (VH):
CAGGTCCAATGTCAGAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCTGGGACTTCAGTGAAGATGCCCTGTAAAGCTTCTGGATACATATTCACT
GACTATGTCATAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGCGCTTGAATGATGAGAGATTTTCTAGAGTGGTAGTACTACTACTAC
AATGCAAGTTCAAGGGAAGGCTCACTGCTGAGCAAAATCTTCAACACAGCTTACGAGCTGACAGGCTGACATCTGAGGAC
TCTCGGCTCTATTCTGTGCAAGAGATTACAGTACTTATTGCTATGAGTACTAGGCGTCAAGGAACCTCAGTCACTGCTCCTCA

E. Amino acid sequence of DC8E8 heavy chain variable region (VH):
QVQIQSGSPFLVPGTSMKPKASGYIFDYVIGWVKRTGGGLEMTGPIEPSSGTYVNEKPKGKATLTADKSSMTAYNQLSSVTSED
SAVYFCARDYVYTSFAMDYWGQGTSTVTVSS

CDR1: GYIFDYVIS
CDR2: IFPRSGST
CDR3: ARDYVYTSFAMDY

F. Alignment of DC8E8 (VH) sequence with the closest mouse germline sequence IGV8-81*01:
V-gene (269/294; 91.5% sequence identity):
DC8E8 heavy CAGGTCCAATGTCAGAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCTGGGACTTC
IGV1-81*01 CAGGTCCAATGTCAGAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCTGGGACTTC

DC8E8 heavy AGTGAAGATGCCCTGTAAAGCTTCTGGATACATATTCACTGACTATGTC
IGV1-81*01 AGTGAAGATGCCCTGTAAAGCTTCTGGATACATATTCACTGACTATGTC

DC8E8 heavy TAAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGCGCTTGAATGATGAGAG
IGV1-81*01 TAAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGCGCTTGAATGATGAGAG

DC8E8 heavy ATTTTCTAGAGATGTAAGTACTTACTAAGTGAAGATTCAGAGGCAA
IGV1-81*01 ATTTTCTAGAGATGTAAGTACTTACTAAGTGAAGATTCAGAGGCAA

DC8E8 heavy GGCCACACTGACTGACAGCAAAATCTCCACACAGCCTACATGCAGCTCA
IGV1-81*01 GGCCACACTGACTGACAGCAAAATCTCCACACAGCCTACATGCAGCTCA

DC8E8 heavy GCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGA
IGV1-81*01 GCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGA

D-gene (12/15; 80.0% sequence identity):
DC8E8 heavy GATTACTAC-GGTAC
IGH2-14*01 GATTACTATAGGTAC
** *****

J-gene (50/53; 94.3% sequence identity):
DC8E8 heavy TTCAATTGCTATGGACTACTGGGTGCAAGGAACTCACTCAACCTCTCC
IGH34*01 TTCAATTGCTATGGACTACTGGGTGCAAGGAACTCACTCAACCTCTCC
** *****

DC8E8 heavy TCAG
IGH34*01 TCAG

G. Nucleotide sequence of the DC8E8 kappa light chain constant region:
gggctgatgctgacccaactgatatccatctccaccatccagtgagcagtgtaacatctggaggtgctcagtcgtgtctcttggaaca
actctaccaccaagactcaactgtagtgaggagatgtagtgagtgagcagcaaaatgggtgctgagcaggtggaactgtagcagga
gcaaaagacagcaactacagatgagcagcaccctcagctgacaaagcagcagtgatgaacgacataaacgctatacctgtgaggcca

H. Nucleotide sequence of the DC8E8 heavy chain constant region CH1:
gcaaaagacacccccatgtgtctatccactggccccctggatctgctgccccaaactaaactccatggtagccctggagtcctgggtcaagg
gctatctccctgagccagtgacagtgacctggaactctggatccctgtccagcgtgtgacacactccagctgtcctgagctctgacc
tctacactctgagcagctcagtgatgctgctccctccagcactggccagcagcagtgctacactgcaactgtgccaccggcagcagca
ccaagg

도면4

V-gene (242/301; 80.4 % sequence identity):

```

DC8E8          GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTGTCAGCAGGAGA
IGKV4-1*01_Homo+sapiens GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGA
*****
DC8E8          GAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAA
IGKV4-1*01_Homo+sapiens GAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTATTATACAGCTCCA
*****
DC8E8          CCCGAAAGAACTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCT
IGKV4-1*01_Homo+sapiens ACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCTCCT
*****
DC8E8          AAAGTCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
IGKV4-1*01_Homo+sapiens AAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGAATCCGGGGTCCCTGACCG
*****
DC8E8          CTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG
IGKV4-1*01_Homo+sapiens ATTCAGTGGCAGCGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCC
*****
DC8E8          TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTTTATCTT
IGKV4-1*01_Homo+sapiens TGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT
*****
DC8E8          C---
IGKV4-1*01_Homo+sapiens CCTCC
*
```

J-gene (30/36; 83.3 % sequence identity):

```

DC8E8          --GGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGACATCAAAC
IGKV1*01_Homo+sapiens_J-REGION GTGGACGTTTCGGCCAAGGCACCAAGGTGAAATCAAAC
*****
```

도면5

V-gene (219/294; 74.5% sequence identity):

```

DC8E8_heavy_V   CAGGTCCAATTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTC
IGHV1-69*10_Homo+sapiens CAGGTCCAGCTGGTGCACTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCTC
*****
DC8E8_heavy_V   AGTGAAGATGCCCTGTAAGGCTTCTGGATACATATTCAGTACTATGTCA
IGHV1-69*10_Homo+sapiens AGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTA
*****
DC8E8_heavy_V   TAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAG
IGHV1-69*10_Homo+sapiens TCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTTGGACAAGGGCTTGAGTGGATTGGAGAG
*****
DC8E8_heavy_V   ATTTTTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACTACAATGAGAAGTTCAGGGGCAA
IGHV1-69*10_Homo+sapiens ATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAG
*****
DC8E8_heavy_V   GGCCCACTGACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTCA
IGHV1-69*10_Homo+sapiens AGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACAGCAGCAGCCTACATGGAGCTGA
*****
DC8E8_heavy_V   GCAGCGTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGA--
IGHV1-69*10_Homo+sapiens GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTCTGTGCGAGAGA
*****
```

D-gene (9/14; 64.3 % sequence identity):

```

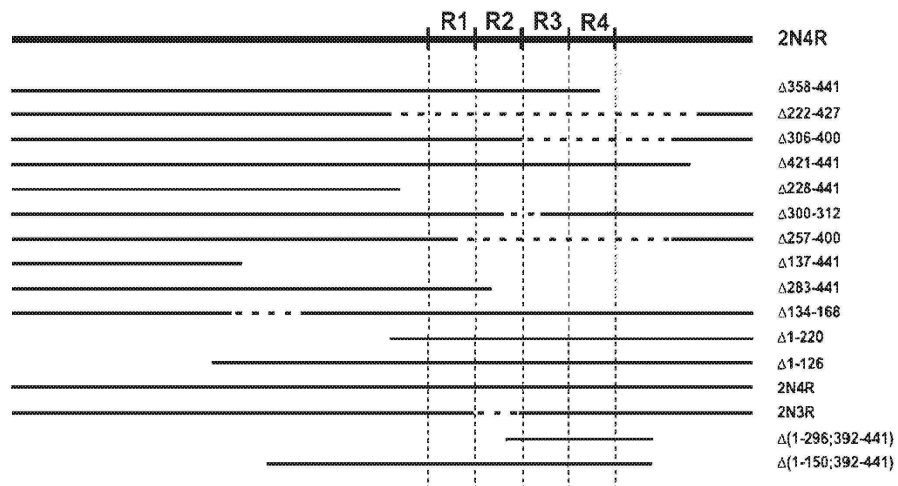
DC8E8          -----GATTACTACGGTAC-----
IGHD7-27*01_Homo+sapiens CTGAGCTGAGAACCAGTGTGCTAACTGGGGACACAGTGATTGGCAGCTCT
*****
DC8E8          -
IGHD7-27*01_Homo+sapiens A
```

J-gene (35/53; 66.0 % sequence identity):

```

DC8E8          TTCATTGCTATGGAAGTCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCT
IGHJ3*01_Homo+sapiens ---TGATGCTTTTGTGTCTGGGGCAAGGGACAAATGGTCACCGTCTCCT
*****
DC8E8          CAG
IGHJ3*01_Homo+sapiens CAG
*****
```


도면6a



도면6b

Δ358-441
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLNSVQSK CGSKDNIKHV
 301 PGGGSGVQIV YKVDLSKVTG KCGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDPKDRV QSKIGSLN

 Δ222-427
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLNSVQSK CGSKDNIKHV
 301 PGGGSGDTSP RHLNVSSTG SIDMVSPQL ATLADEVSA LAKQGL

 Δ306-400
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLNSVQSK CGSKDNIKHV
 301 PGGGSGDTSP RHLNVSSTG SIDMVSPQL ATLADEVSA LAKQGL

 Δ421-441
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVA

 Δ228-441
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVA

 Δ300-312
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLNSVQSK CGSKDNIKHV
 301 DLKRVTSKCG SLGNHKKPG GQGVKVSSEK LDFKDRVQSK IGLSDNITV PGGGNNKLET
 361 HLTFTFENAK AKTDHGAELV YKSPVSGDT SEHLSNVSS TGSIDMVSPQL ATLADEVSA
 421 ASLAKQGL

 Δ257-400
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSGTS PHLSNVSSST GSDMVSPQL ATLADEVSA SLAKQGL

 Δ137-441
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTG

 Δ283-441
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KL

 Δ134-168
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SDTDLIAKT IPAKTPPSS GEPKSGDSS GYSRSGRGT PGRRTPTSL
 181 TPTPTREKK VAVVTPPKS PSASRLQT AVVMPOLN VSKSGSTEN LKHQPGGGRV
 241 QIINKLCLS NVQSKCGSKD NIKHVPGGG VQIVYKPVUL SKVTSKCSL GNHHRKPGGG
 301 QVVKSEKLD FKDRVQSKL SLNITHVPG GNNKTIETH LTFENAKAK TDHGAELVTK
 361 SPVSGDTSP RHLNVSSTG SIDMVSPQL ATLADEVSA LAKQGL

 Δ1-220
 1 MEPEKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPV MPDLKNVSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN
 61 KCLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSGVQIV YKVDLSKVT SKCGLGNIH KPGGGQVEV
 121 KSEKLDPKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGNN KIETHKLTER ENAKAKTDHG AEIVKSPVV
 181 GSDTSPHLS NVSGTSDIM VDSPLATLA DEVASLAKQ GL

 Δ1-126
 1 MVSKSDGTG SDDKAKGAD GKTKIATPSS AAPQQRGQA NATRIDAKT IPAKTPPSSS
 61 EPEKSGDRG YSSPGSPGTG GSRRTPSLF TPTPEPKKV AVVTPPKSP PSASRLQTA
 121 PVVMPOLNV KSKIGSTENL KHQPGGGRV IINKLCLSN VQSKCGSKDN IKHVPGGGSGV
 181 QIVYKPVULS KVTSKCSLGN NIHRKPGGG VEVKSEKLD FKDRVQSKIGL LONITHVPGG
 241 GNNKTIETHK LTFENAKAK TDHGAELVTK YVSGDTSPR HLSNVSSSTG IDMVSPQLA
 301 TLADEVSA LAKQGL

 ΔR2N
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLNSVQSK CGSKDNIKHV
 301 PGGGSGVQIV YKVDLSKVTG KCGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDPKDRV QSKIGSLDN
 361 THVPGGNNK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA AEIVKSPVV GDTSPHLSNV VSGTSDIMV
 421 DSPLATLAD VASLAKQGL L

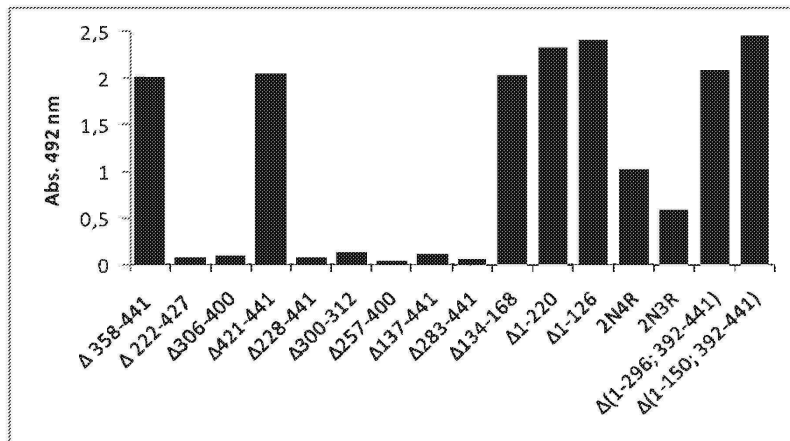
 ΔR2N
 1 MAEPHQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAAPGQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAAPK
 181 TTPSSGSEPPK SGRSSGYSSP GSPDTGSRSS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM POLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLNSVQSK CGSKDNIKHV
 301 PGGGSGVQIV YKVDLSKVTG KCGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDPKDRV QSKIGSLDN
 361 THVPGGNNK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA AEIVKSPVV GDTSPHLSNV VSGTSDIMV
 421 DSPLATLAD VASLAKQGL L

 Δ(1-296;392-441)
 1 NIKHVPGGG VQIVYKPVUL SKVTSKCSL GNHHRKPGGG QVEVKSEKLD FKDRVQSKIG
 61 SLDNITHVPG GNNKTIETHK LTFENAKAK TDHGA

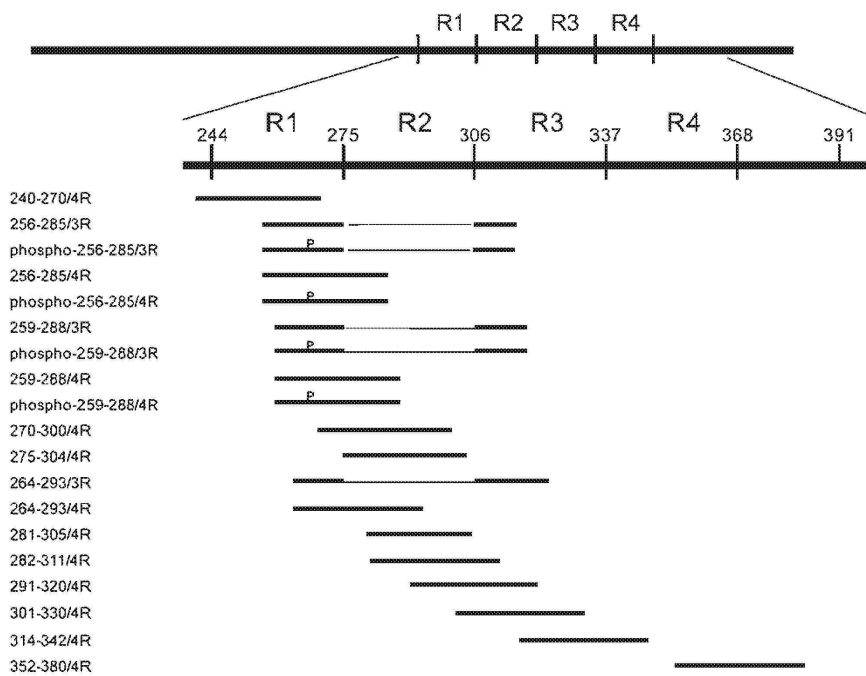
 Δ(1-150;392-441)
 1 MIATPRGAAP PGKGQANAT IPAKTPPAAP TTPSSGSEPP KSGDRSSYSS PGPDTGSRSS
 61 RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPKRSPSSA KSRLQTAPV MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
 121 PGGGKVQIIN KCLDLSNVQS KCGSKDNIKH VEGGSGVQIV YKVDLSKVT SKCGLGNIH
 181 NKPGGGQVEV KSEKLDPKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGNN KIETHKLTFRE ENAKAKTDHG
 241 AE

Note
 The Methionine (M) at the position 1 in the tau deletion constructs Δ1-220, Δ(1-296;392-441) and Δ(1-150;392-441) is not part of the natural human tau sequence. It was added in order to provide a start codon for the bacterial translational machinery.

도면6c



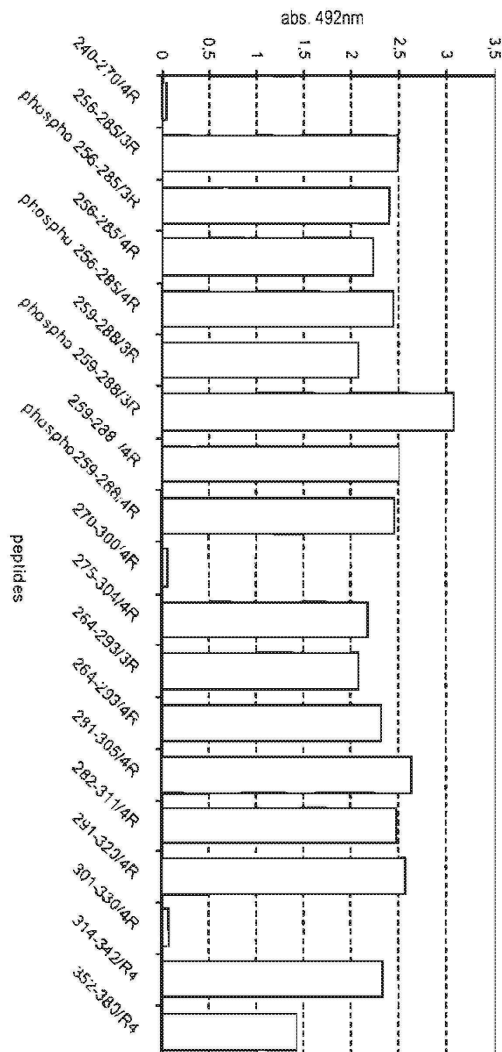
도면7a



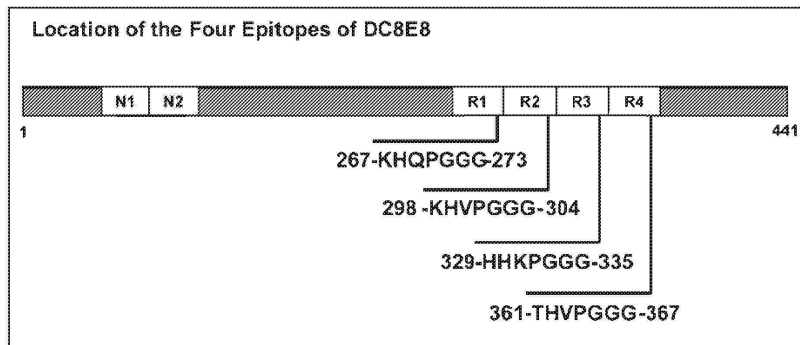
도면7b

Synthetic peptide	Sequence
240-270/4R	KSRLQTAPVPMPLKKNVKSIGSTENLKHQP
256-285/3R	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSL
phospho 256-285/3R (pSer262)	VKSKIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSL
256-285/4R	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDSL
phospho 256-285/4R (pSer262)	VKSKIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDSL
259-288/3R	KIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVT
phospho 259-288/3R (pSer262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVT
259-288/4R	KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDSLNVQ
phospho 259-288/4R (pSer262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDSLNVQ
270-300/4R	PGGGKVQIINKKLDSLNVQSKCGSKDNIKHV
275-304/4R	VQIINKKLDSLNVQSKCGSKDNIKHVPGGG
264-293/3R	ENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSCGGS
264-293/4R	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDSLNVQSKCGS
281-305/4R	KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGGS
282-311/4R	LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK
291-320/4R	CGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVT
301-330/4R	PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHH
314-342/4R	DLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
352-380/4R	SKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFRN

도면7c



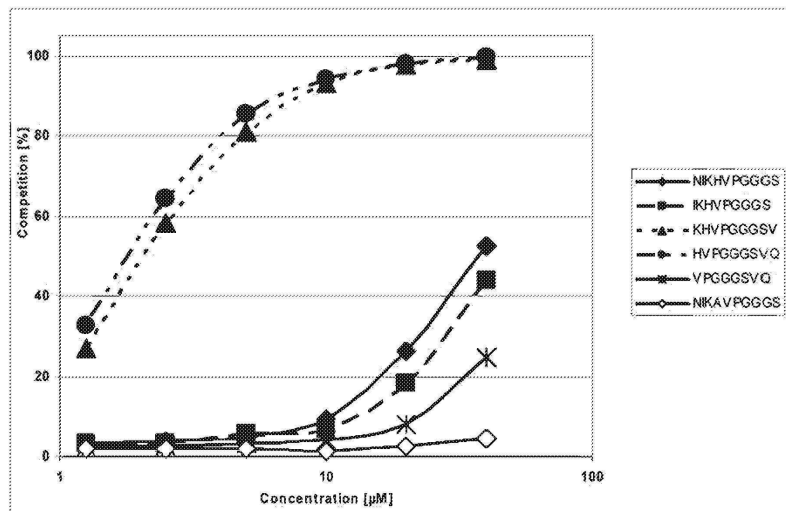
도면7d



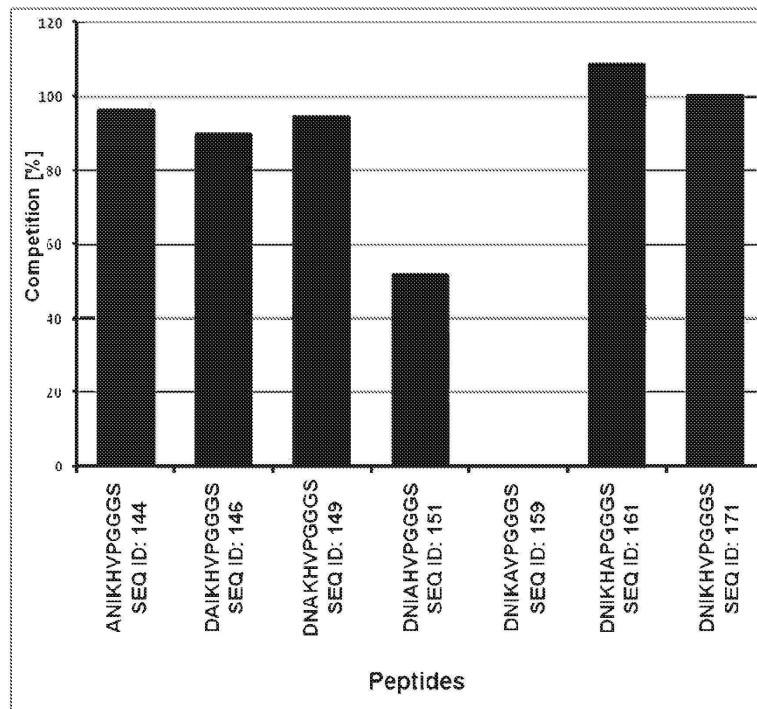
도면8a

Human	265-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Chimpanzee	572-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Macaque	572-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Gibbon	572-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Orangutan	554-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Giant_panda	596-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Pig	541-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Horse	241-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Dog	237-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Rabbit	228-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Rat	228-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Vole	226-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Mouse	226-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Ground_Squirrel	226-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Cattle	244-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Fowl	141-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSSVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Finch	502-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSSVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Zebra_fish	206-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSSVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
African_clawed_frog	468-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSSVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Fruit_fly	157-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSSVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Roundworm	269-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSSVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Human	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-368
Chimpanzee	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-703
Macaque	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-703
Gibbon	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-703
Orangutan	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGH-685
Giant_panda	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-727
Pig	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-673
Horse	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGH-372
Dog	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-368
Rabbit	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-359
Rat	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-359
Vole	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-357
Mouse	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-357
Ground_Squirrel	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-357
Cattle	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-375
Fowl	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-272
Finch	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-633
Zebra_fish	LSNVQSKCGSKDNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN-332
African_clawed_frog	LTRVTSKCGSFVNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGA-600
Fruit_fly	WN-AKSKIGSLENAHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGD-287
Roundworm	FSAASPKVGS--KTYQPAKSDVKIVSEKLTW--QAKSKVGSMDNAHHKPGAGN-396

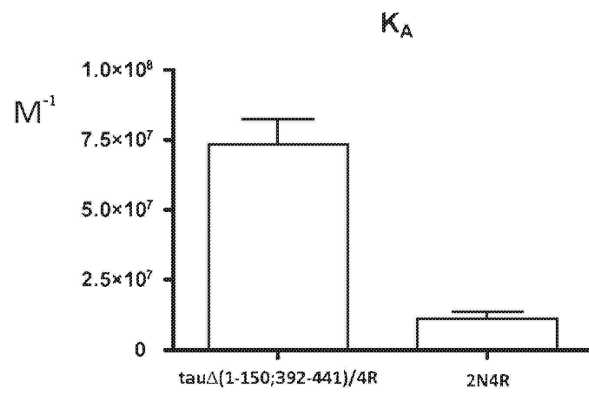
도면8b



도면8c

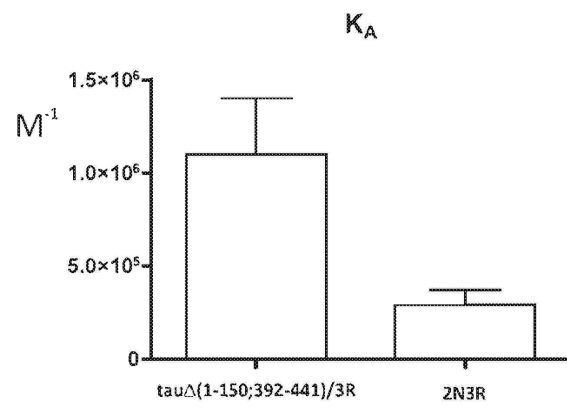


도면9a



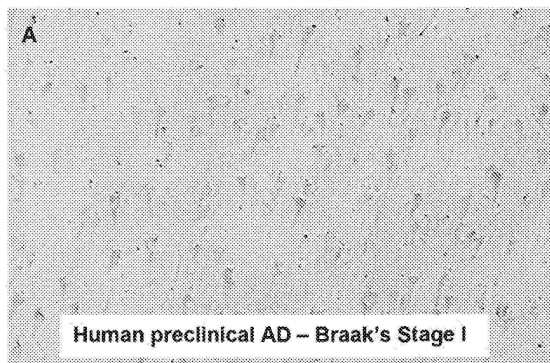
	K_A
$\tau\Delta(1-150;392-441)/4R$	$7.3 \pm 0.9 \times 10^7 M^{-1}$
2N4R	$1.1 \pm 0.3 \times 10^7 M^{-1}$

도면9b

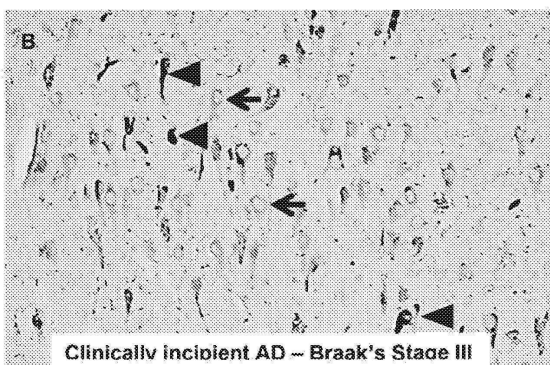


	K_A
$\tau\Delta(1-150;392-441)/3R$	$1.1 \pm 0.3 \times 10^6 M^{-1}$
2N3R	$2.9 \pm 0.8 \times 10^5 M^{-1}$

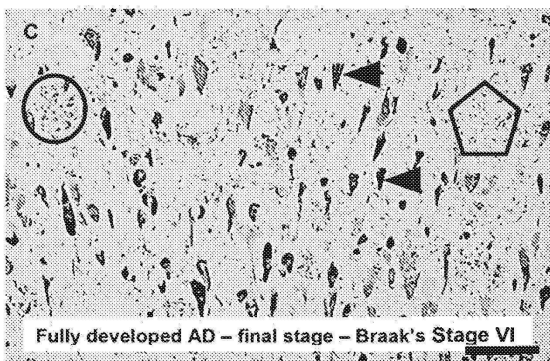
도면11a



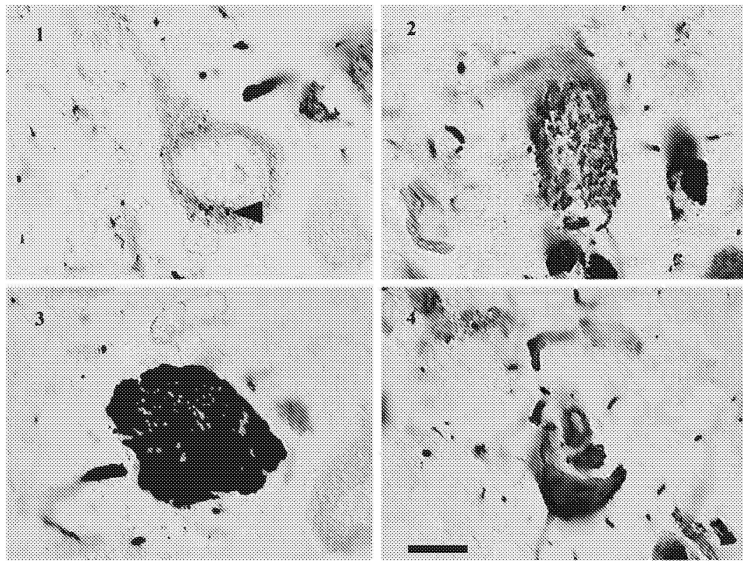
도면11b



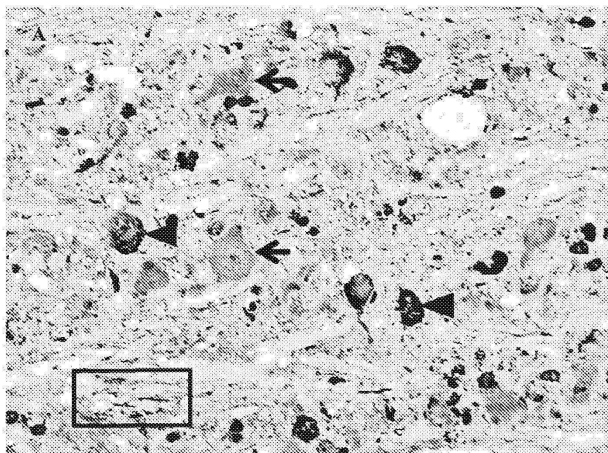
도면11c



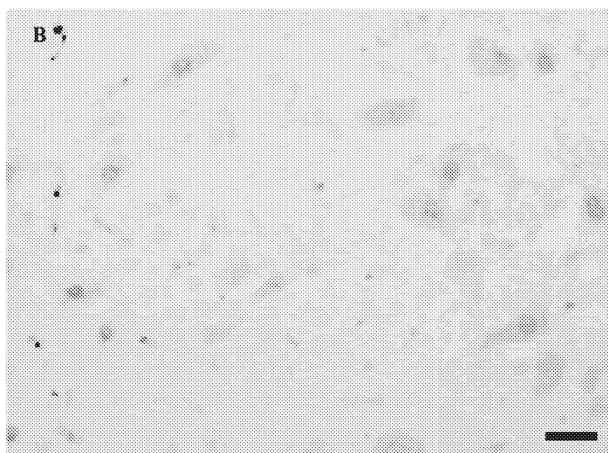
도면11d



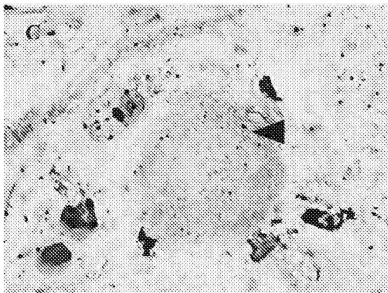
도면12a



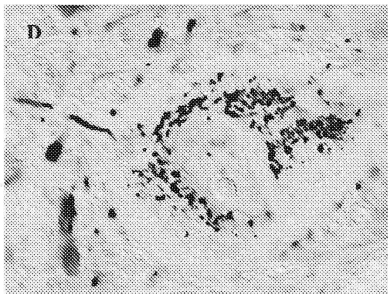
도면12b



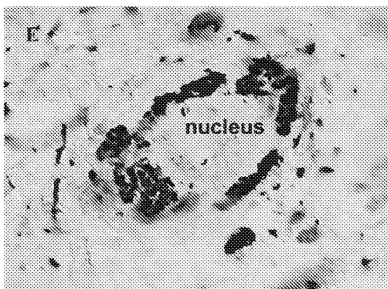
도면12c



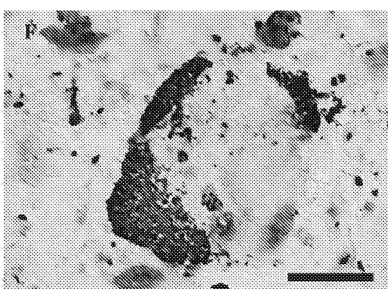
도면12d



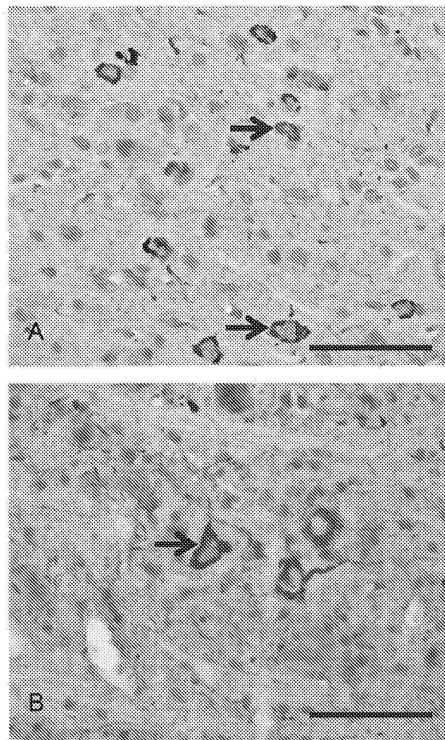
도면12e



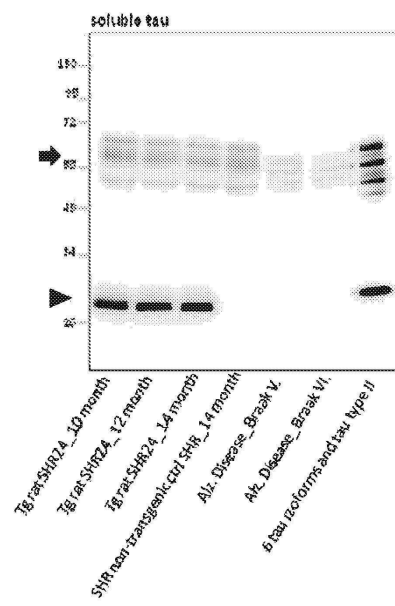
도면12f



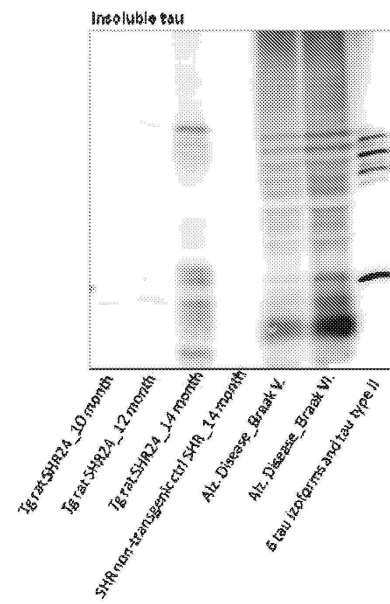
도면13



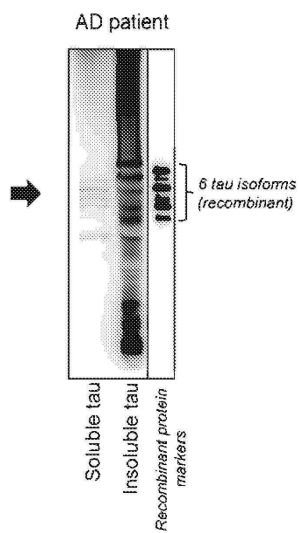
도면14a



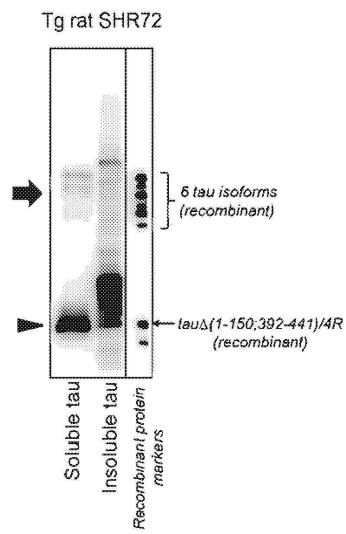
도면14b



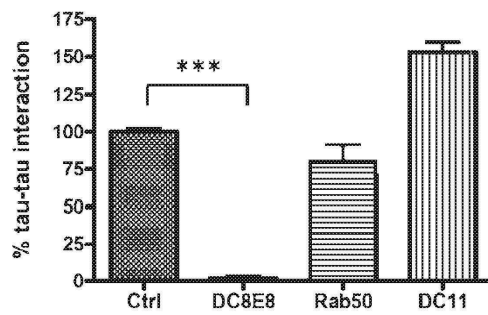
도면14c



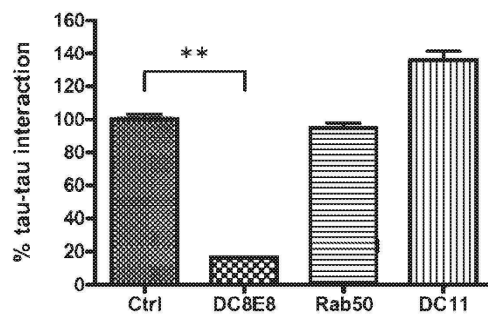
도면14d



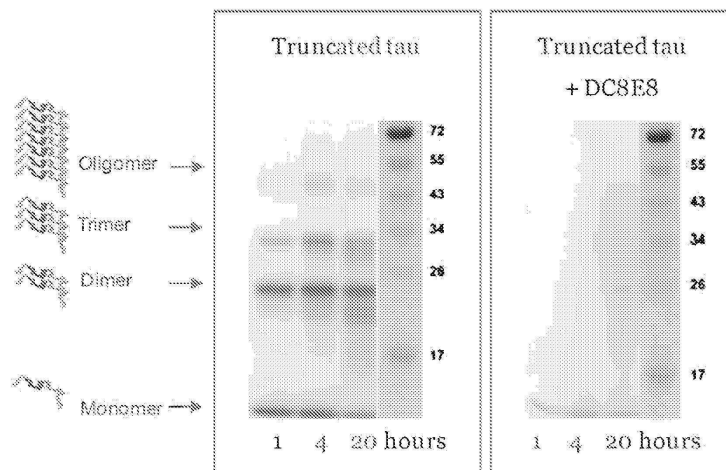
도면15a



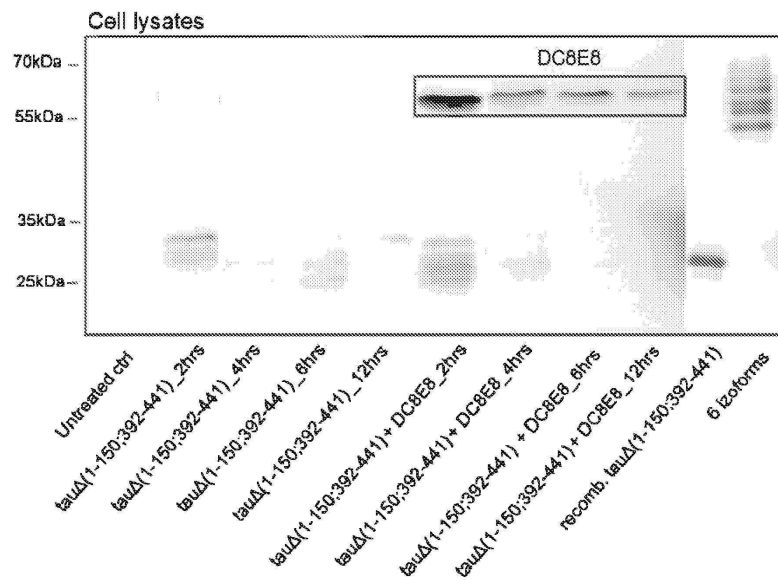
도면15b



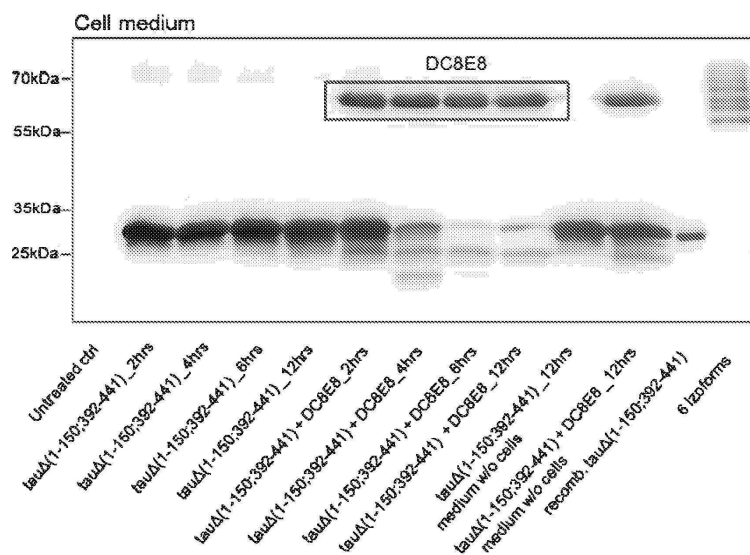
도면16



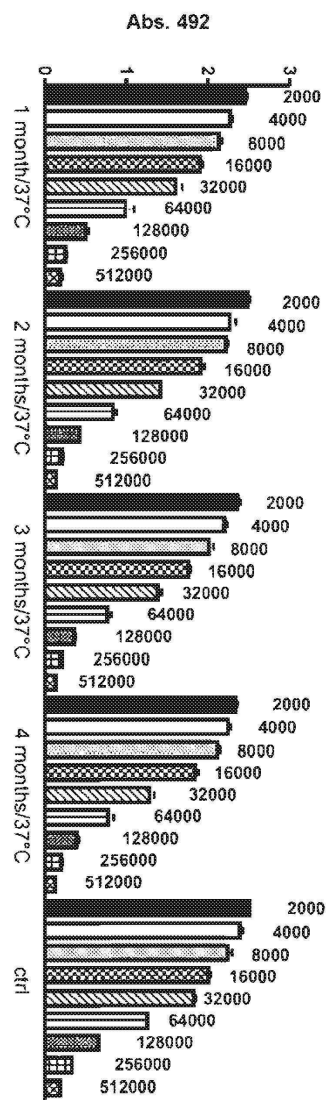
도면17a



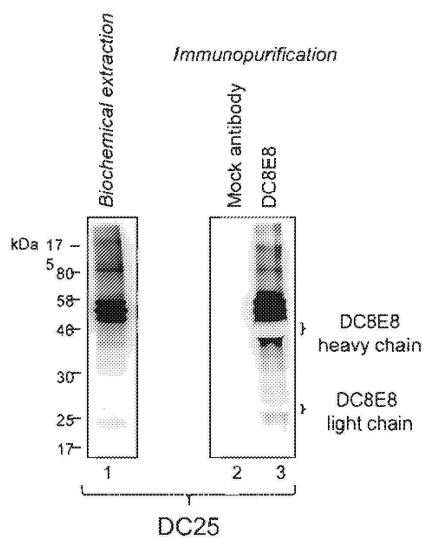
도면17b



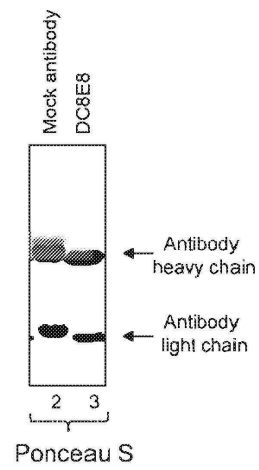
도면18



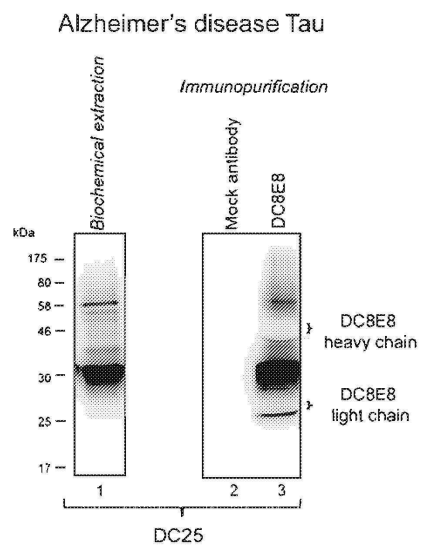
도면19a



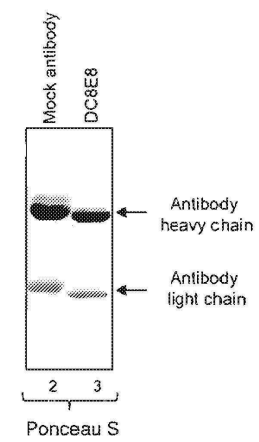
도면19b



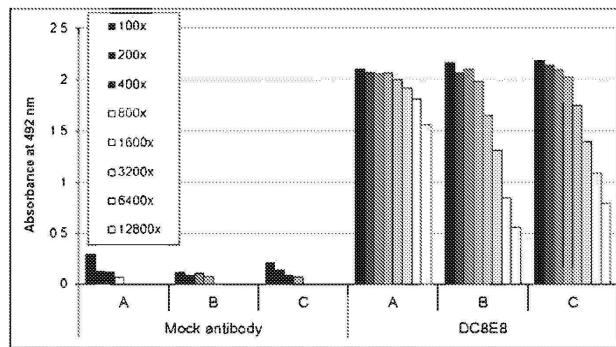
도면20a



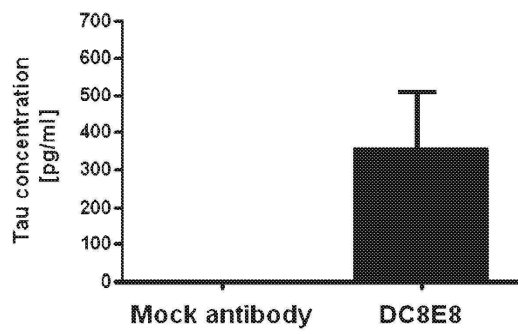
도면20b



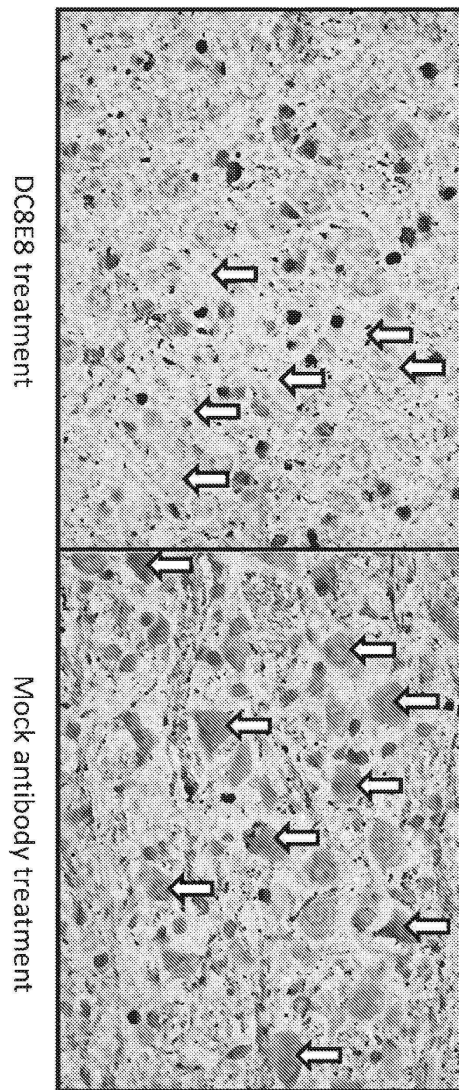
도면21a



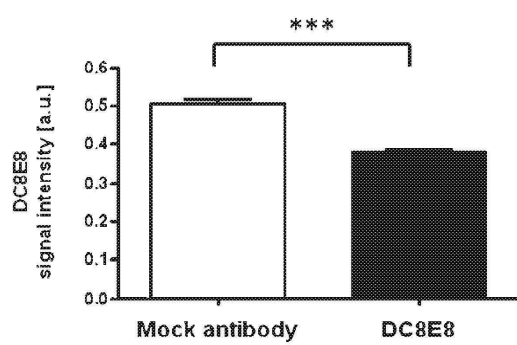
도면21b



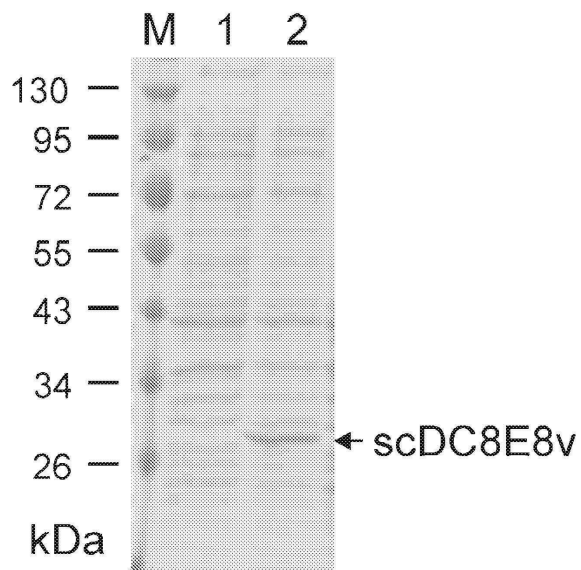
도면22a



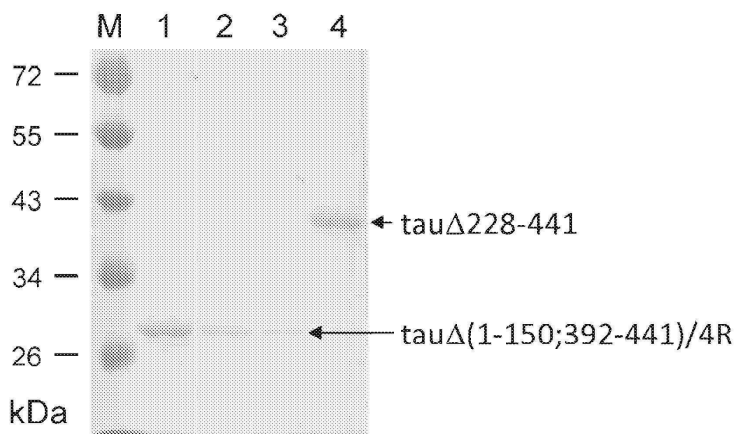
도면22b



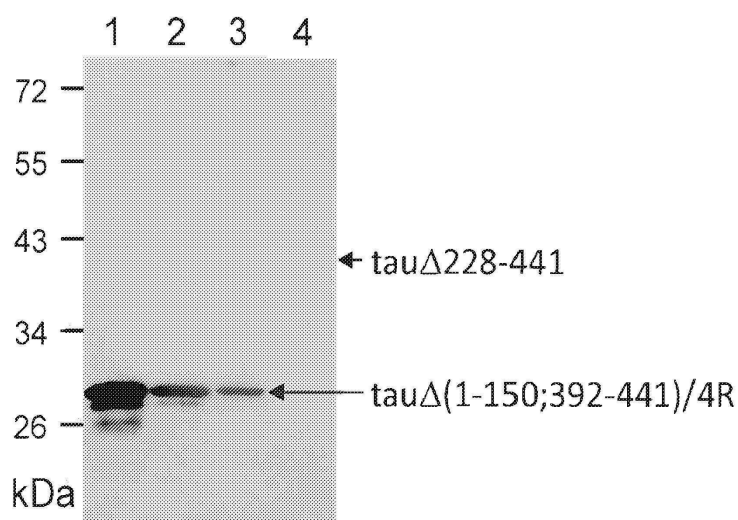
도면23a



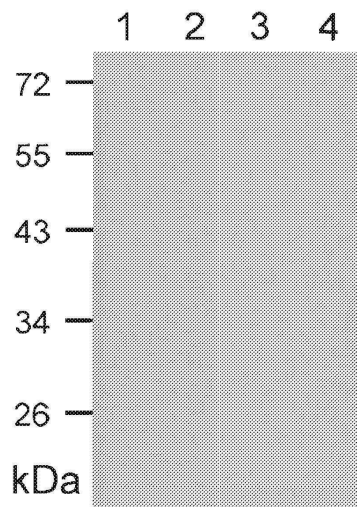
도면23b



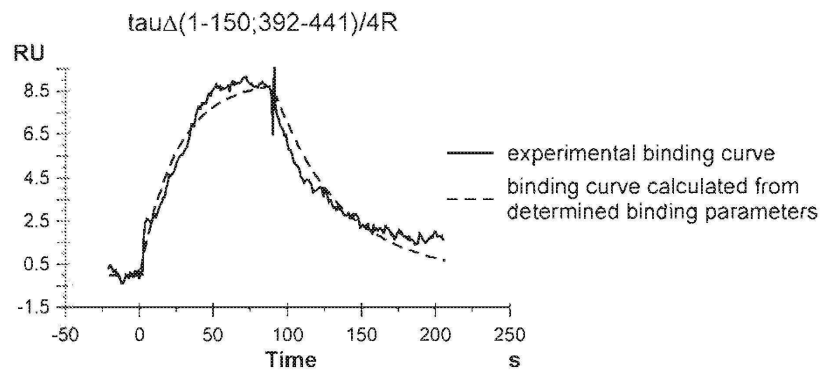
도면23c



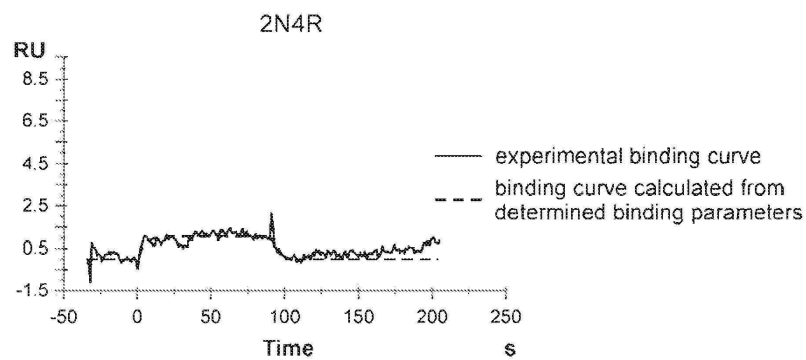
도면23d



도면24a



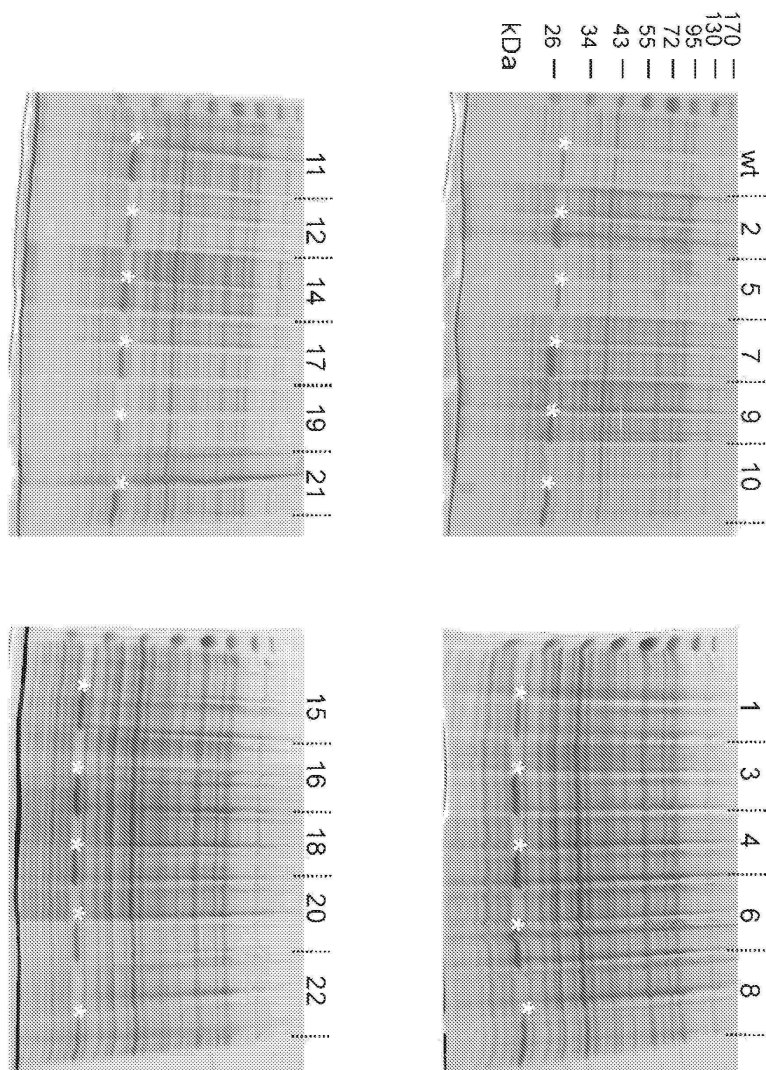
도면24b



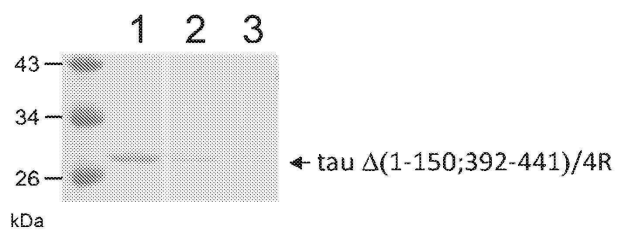
도면24c

	$k_{ON}(s^{-1} M^{-1})$	$k_{OFF}(s^{-1})$	$K_A(M^{-1})$
$\tau\Delta(1-150;392-441)/4R$	1.8×10^5	0.02	8.1×10^6
2N4R	5.7×10^4	0.2	2.7×10^5

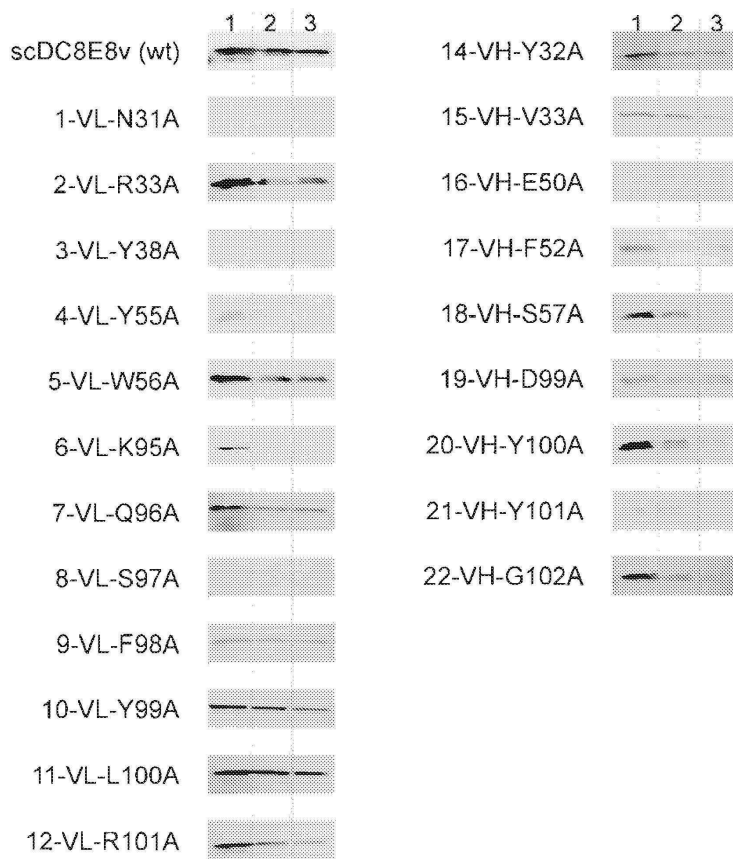
도면25a



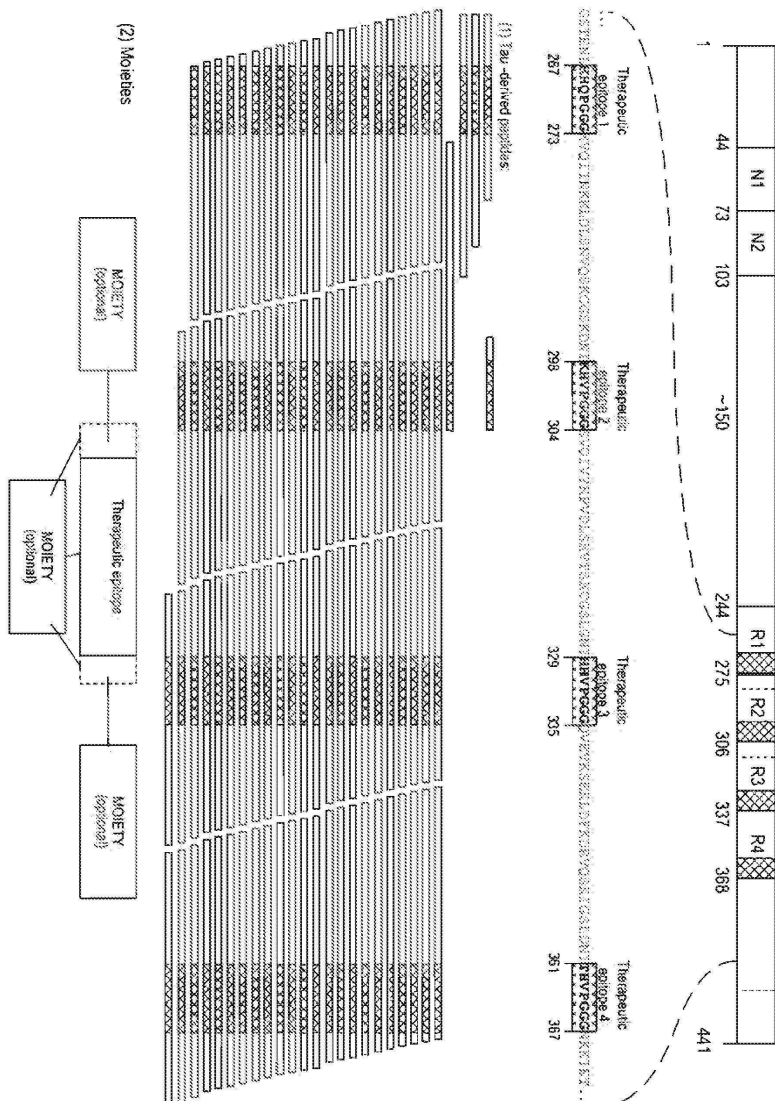
도면25b



도면25c



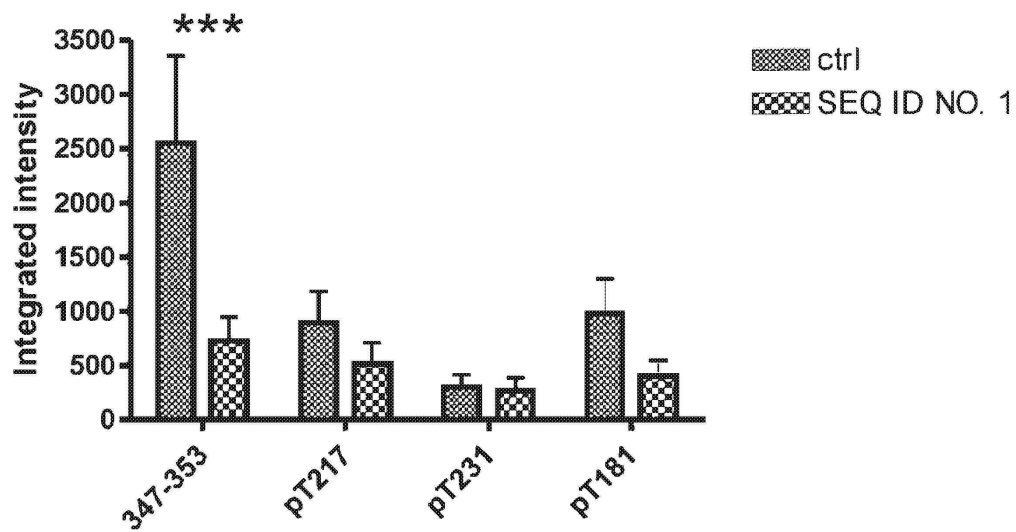
도면26a



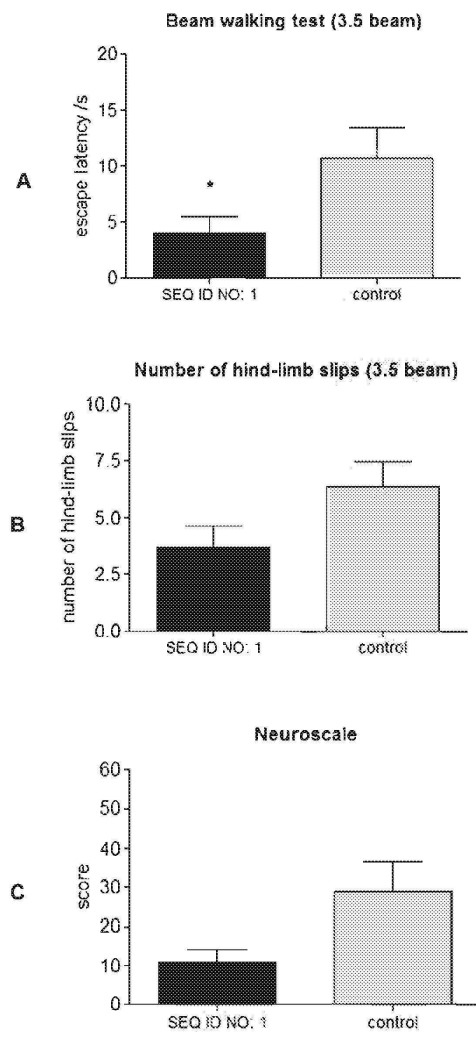
도면26b

SEQ ID NO	Immunogen	Reduction of insoluble tau (%)				
		347-353	pT217	pT231	pS202/pT205	pT181
SEQ ID NO: 1	Tau251-280	71	42	11	N/D	58
SEQ ID NO: 2	Tau 256-285	41	72	64	80	74
SEQ ID NO: 2	Tau 256-285/pS262	46	73	85	82	82
SEQ ID NO: 3	Tau 259-288	40	30	63	61	74
SEQ ID NO: 4	Tau 275-304	63	92	95	95	87
SEQ ID NO: 108	Tau 294-305	70	96	97	98	94
SEQ ID NO: 5	Tau 201-230/pT217	1	-11	33	-31	30
SEQ ID NO: 6	Tau 379-408/pS396/pS404	-87	-33	-44	19	-7
SEQ ID NO: 7	Tau 181-210/pS202/pT205	-6	-3	-11	-41	-7
SEQ ID NO: 8	Tau 300-317	-82	9	-60	17	-10

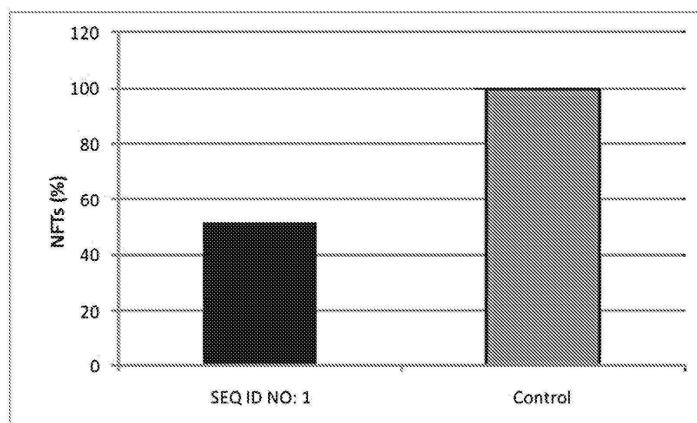
도면26c



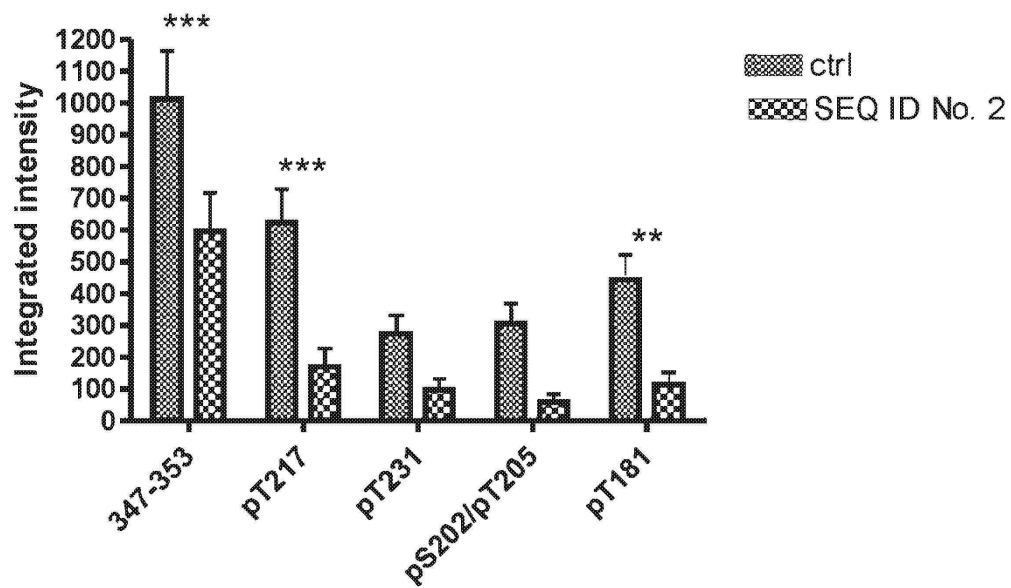
도면27



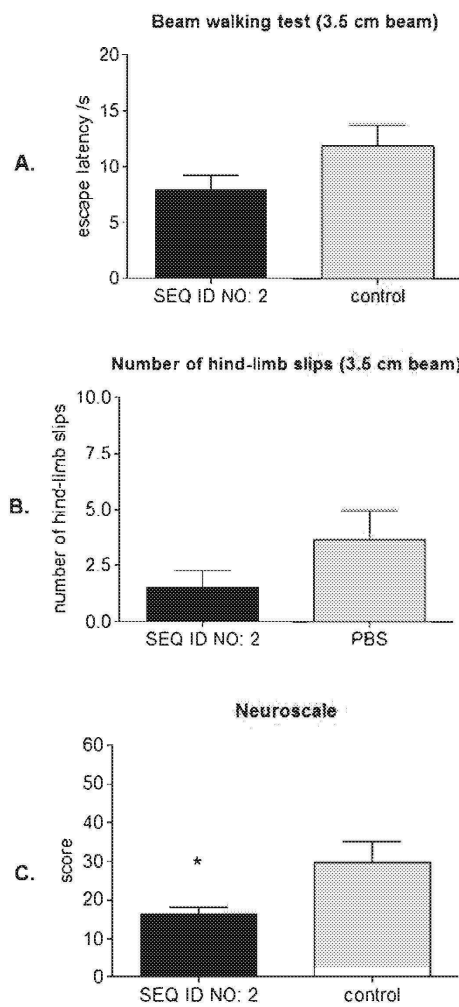
도면28



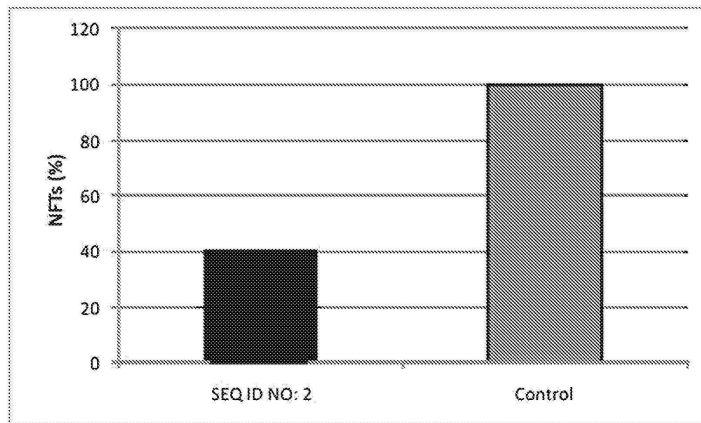
도면29



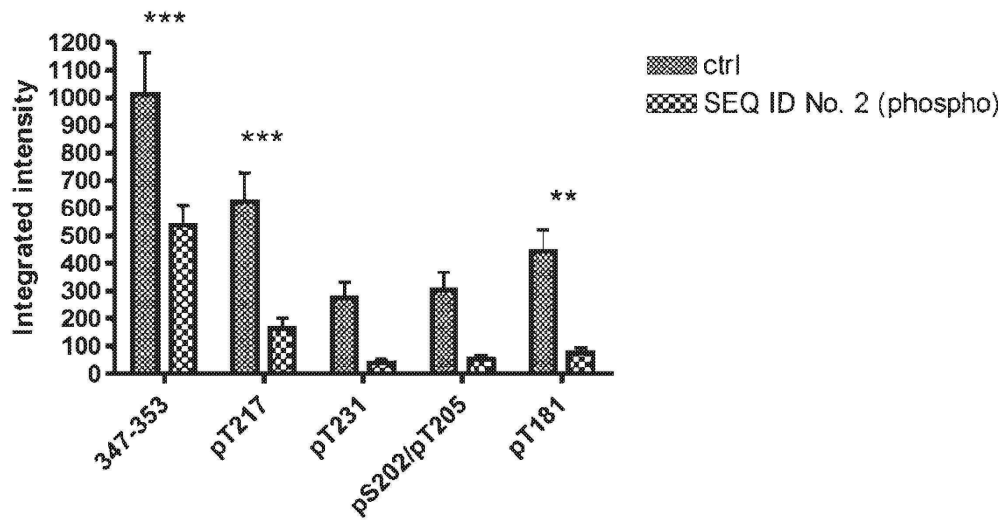
도면30



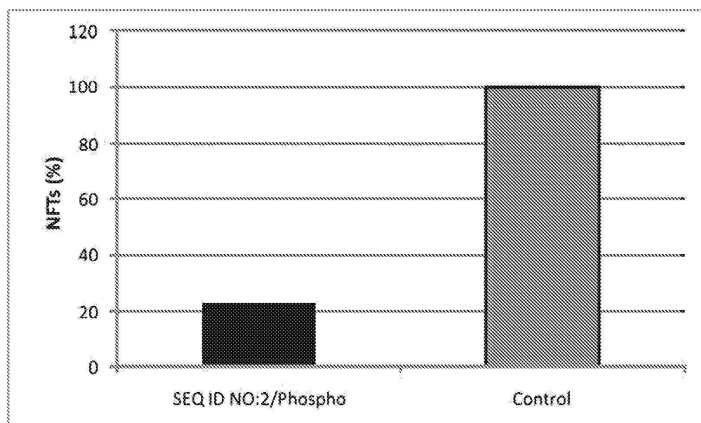
도면31



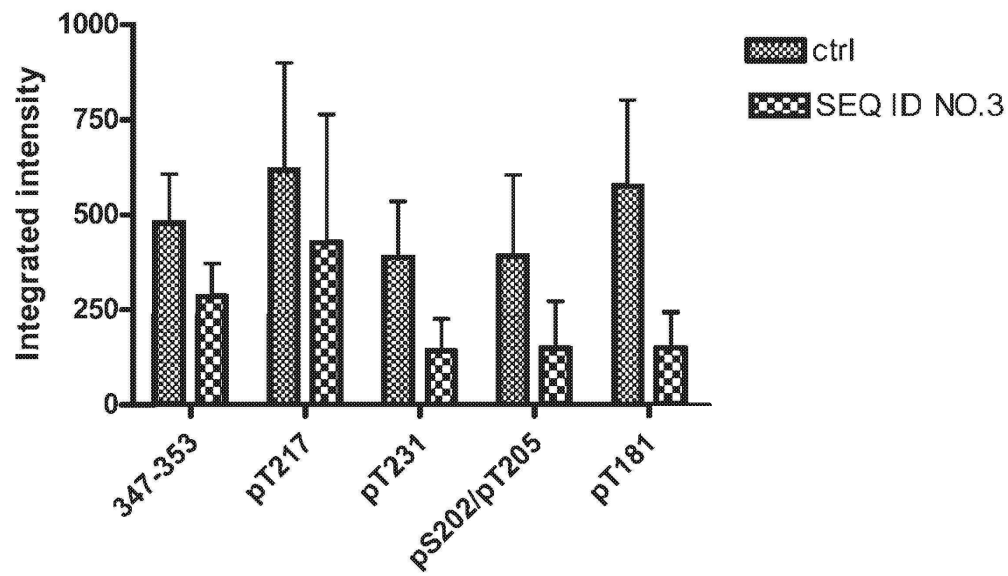
도면32



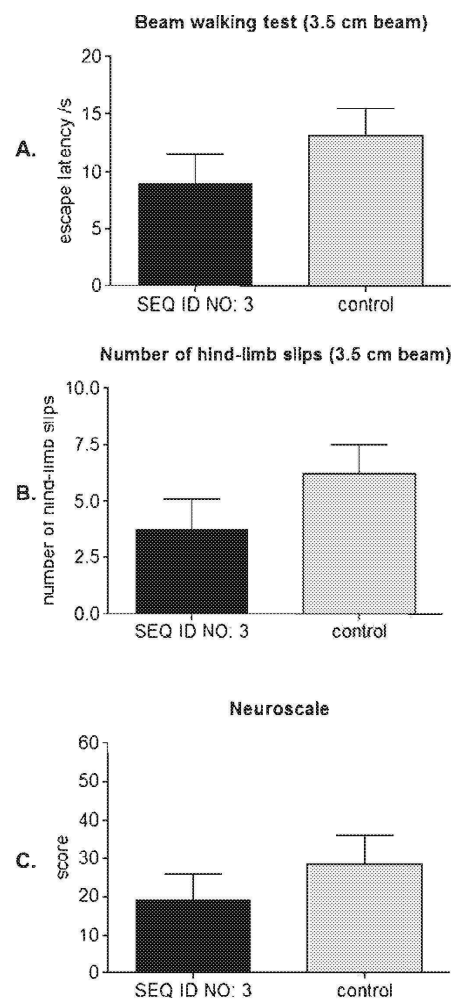
도면33



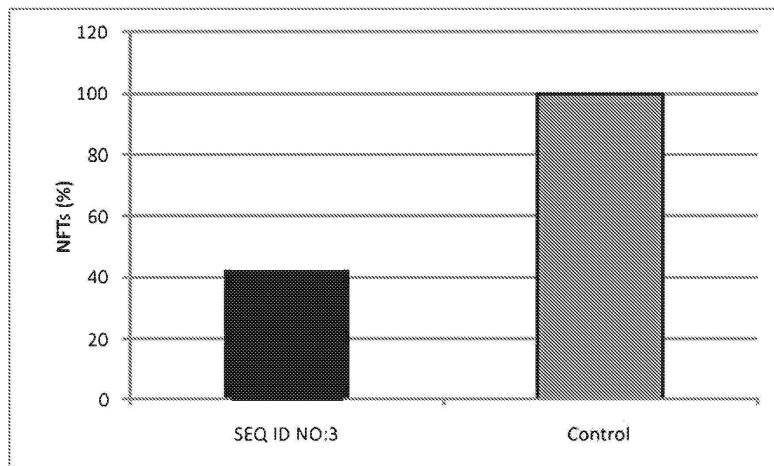
도면34



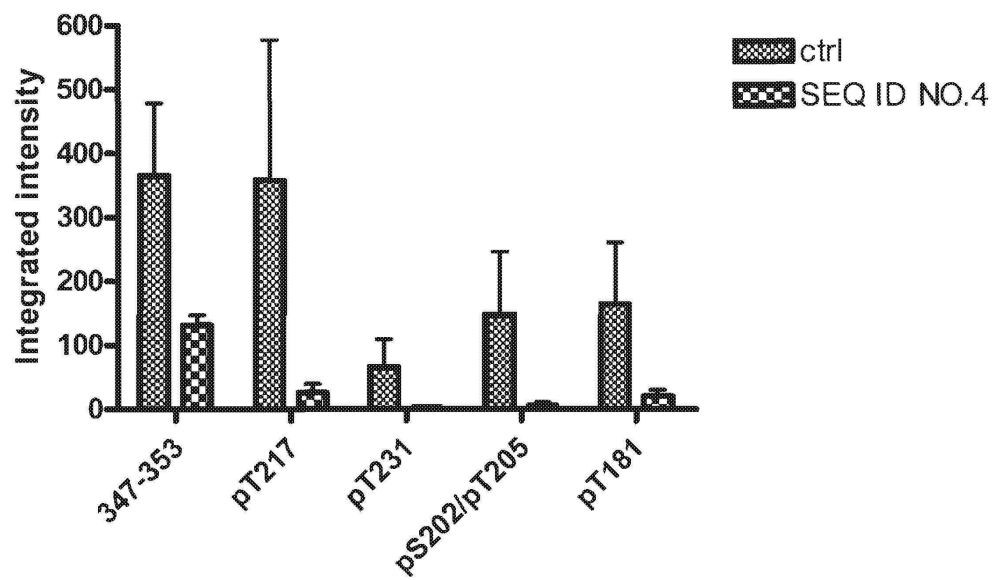
도면35



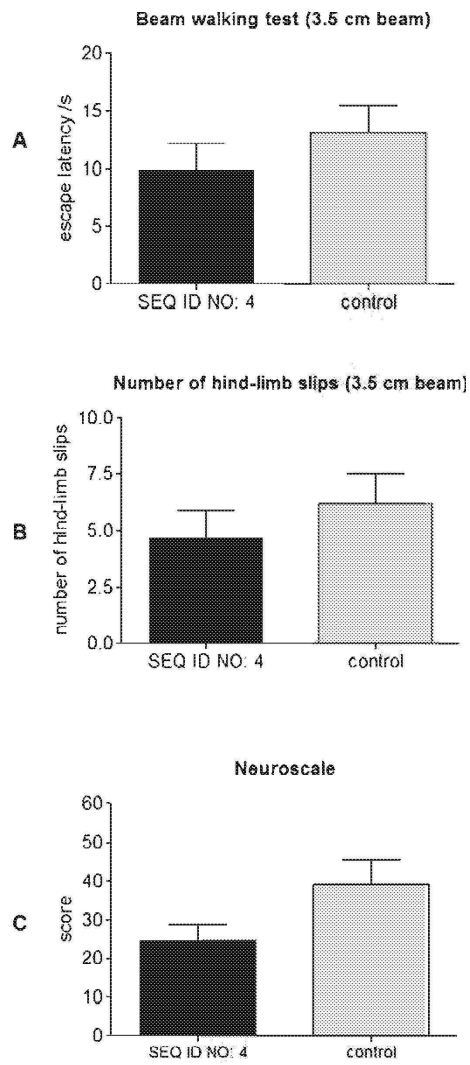
도면36



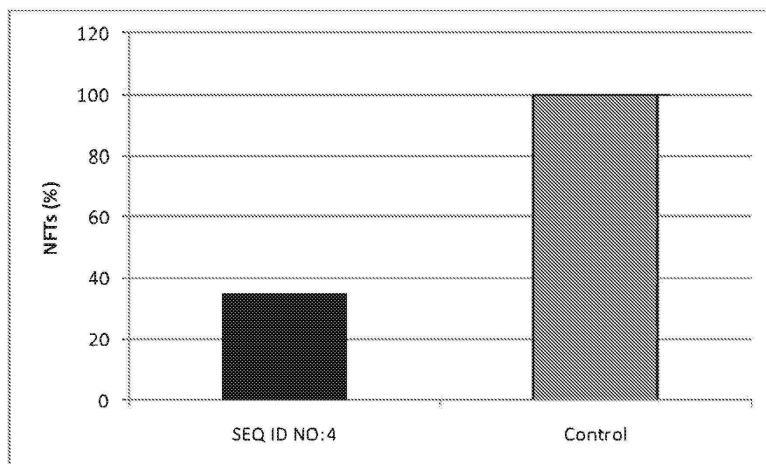
도면37



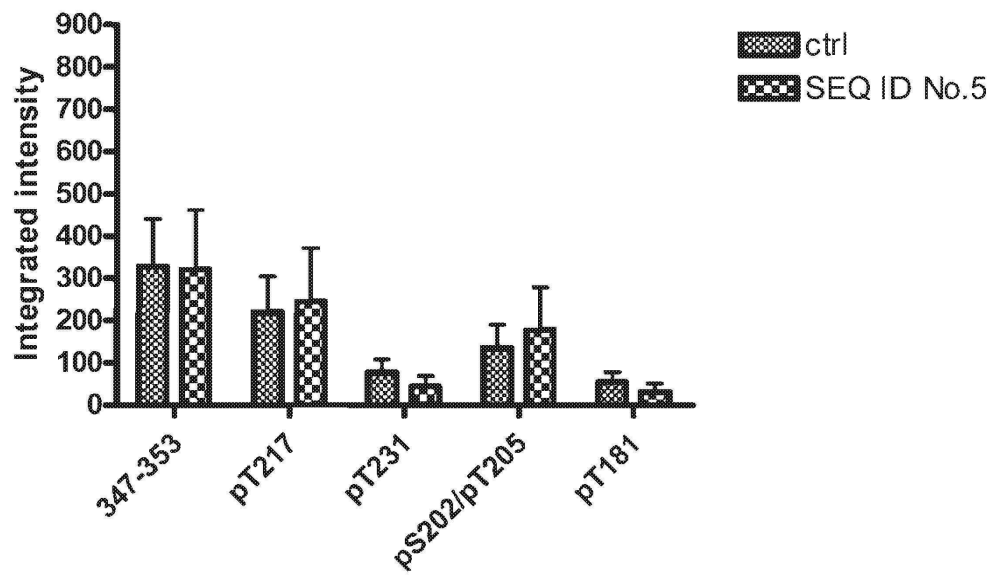
도면38



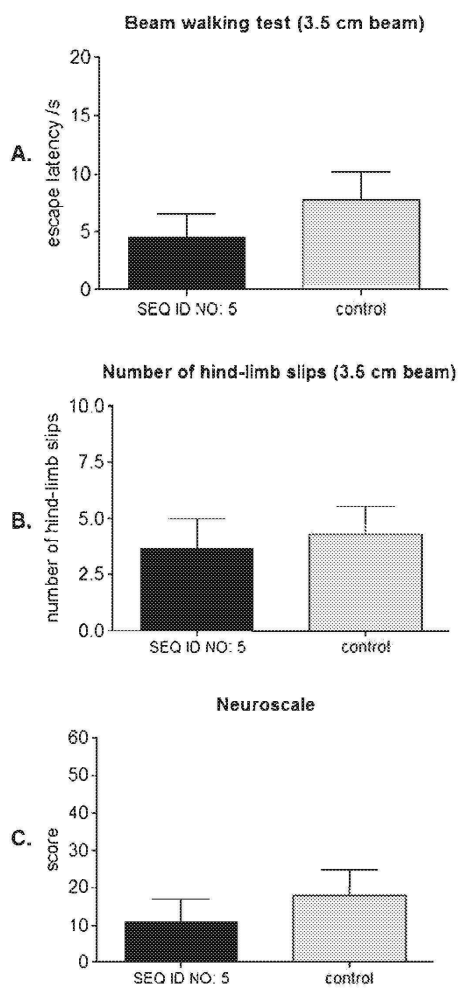
도면39



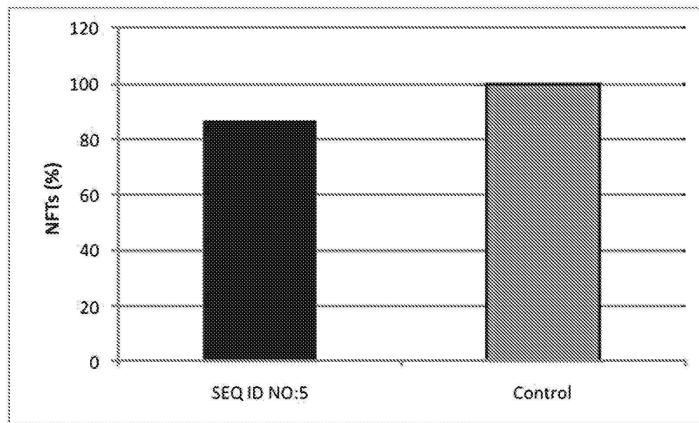
도면40



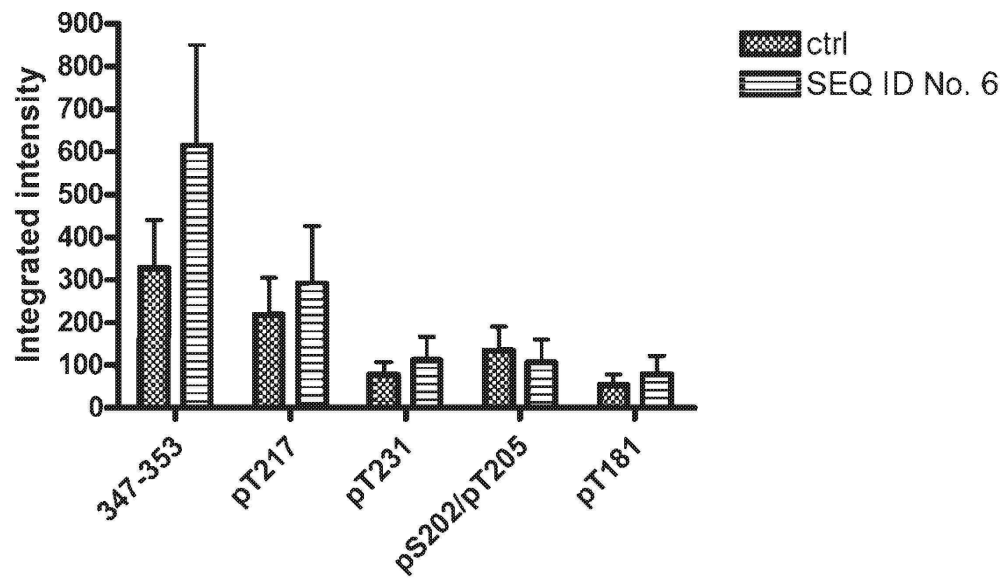
도면41



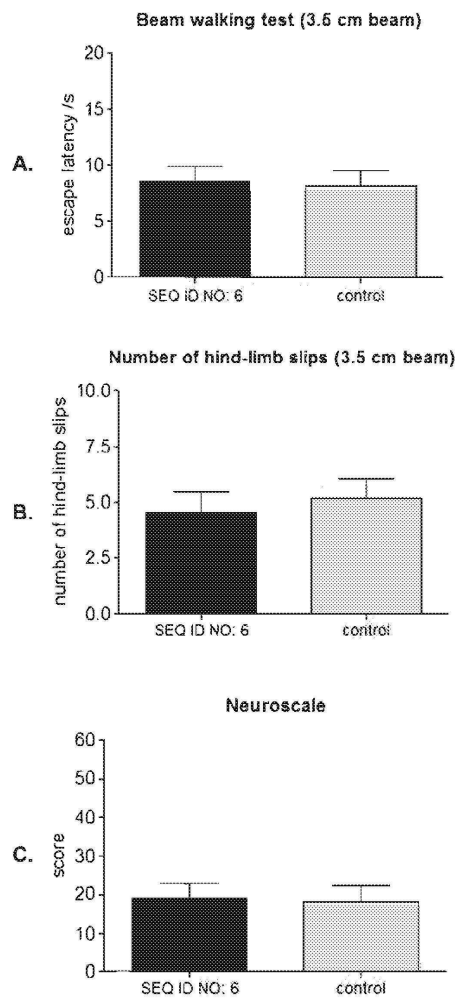
도면42



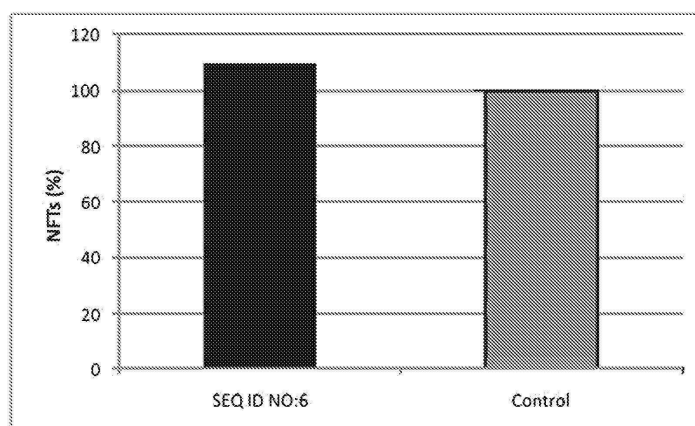
도면43



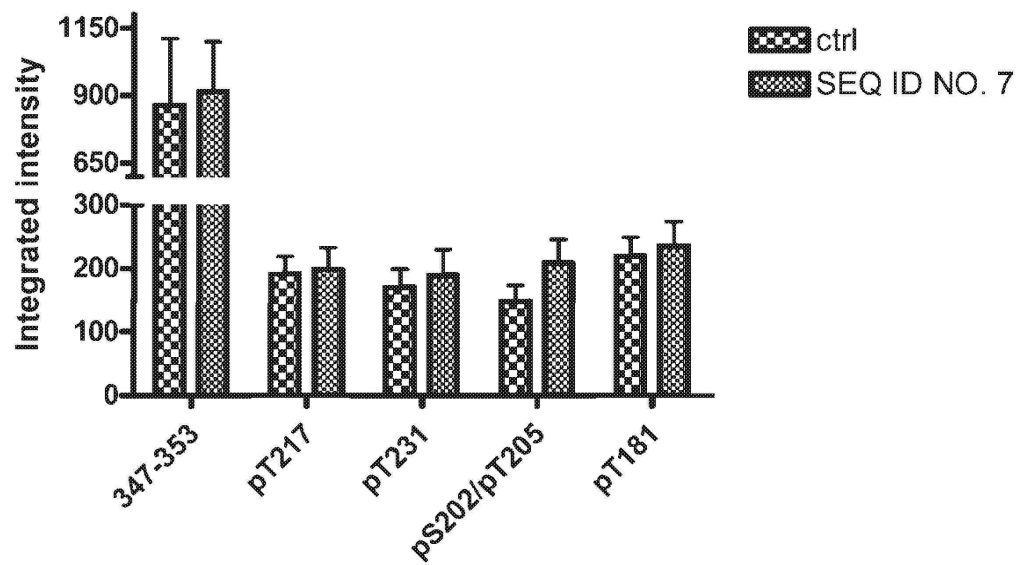
도면44



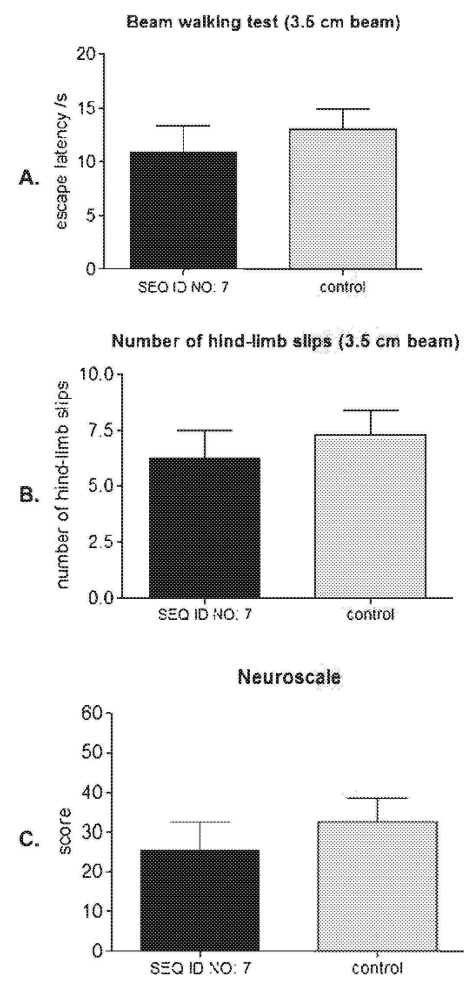
도면45



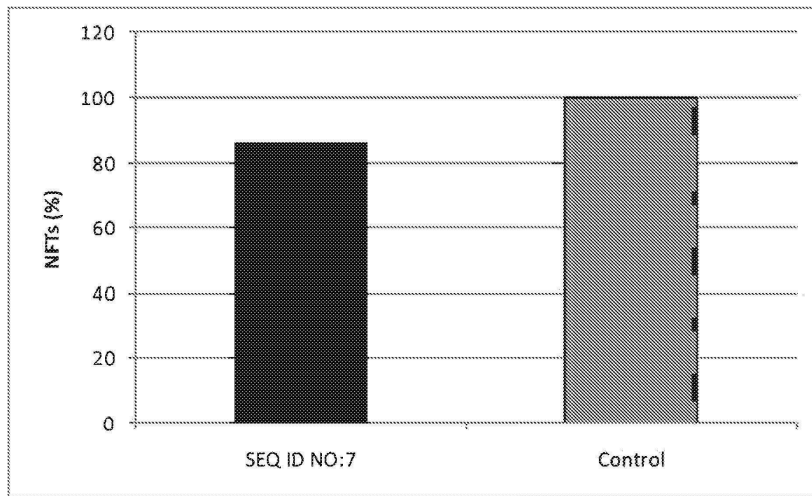
도면46



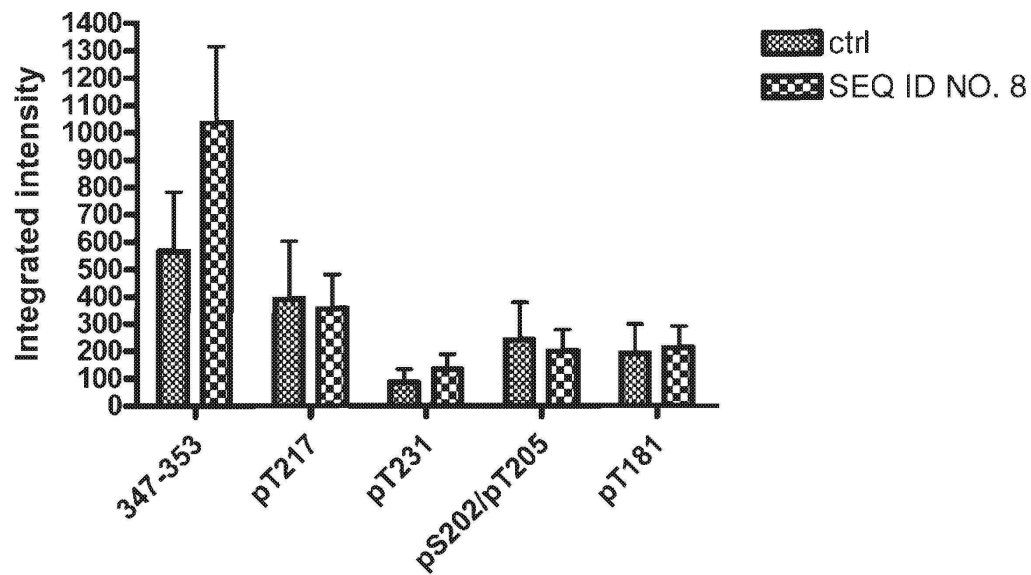
도면47



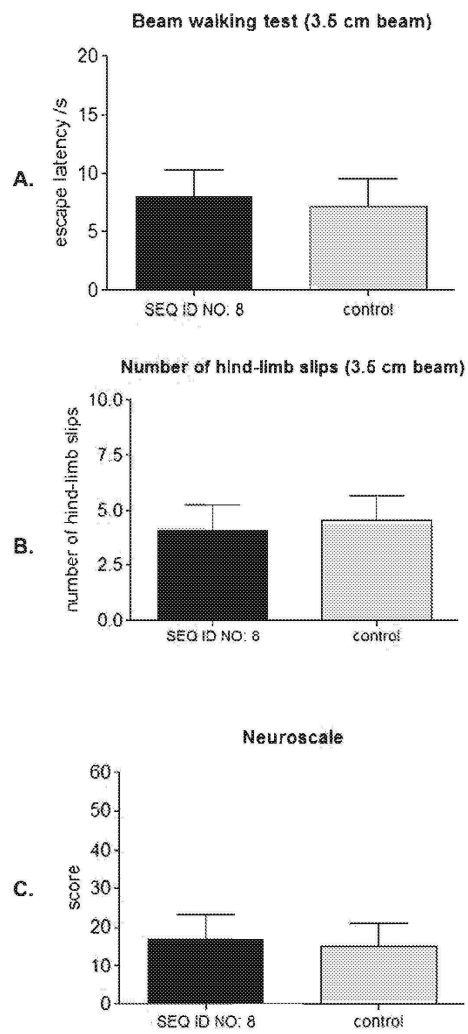
도면48



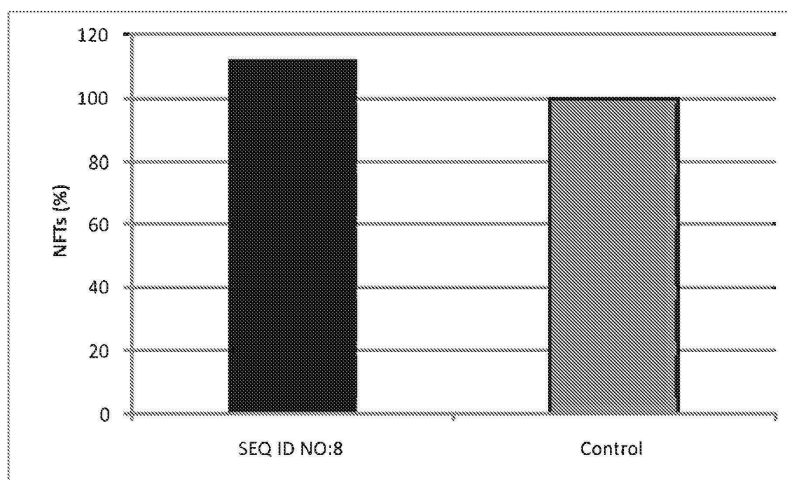
도면49



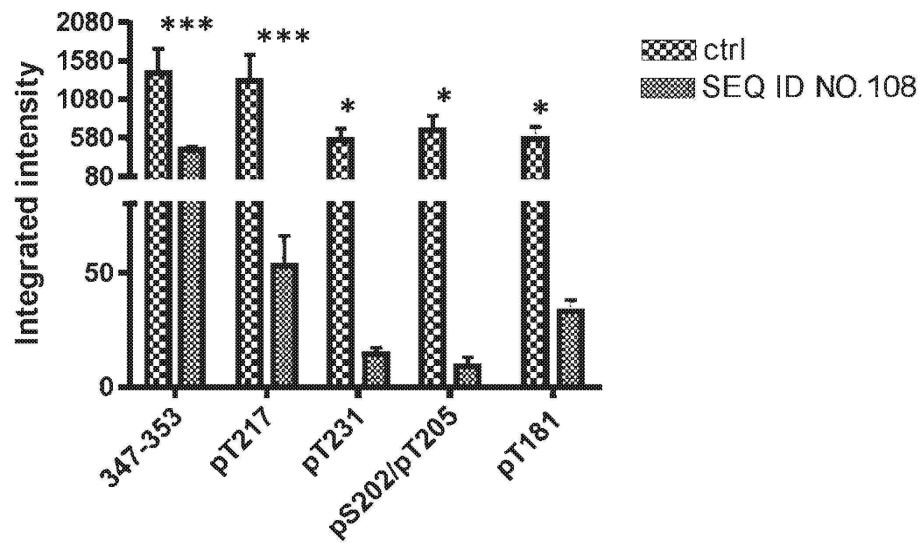
도면50



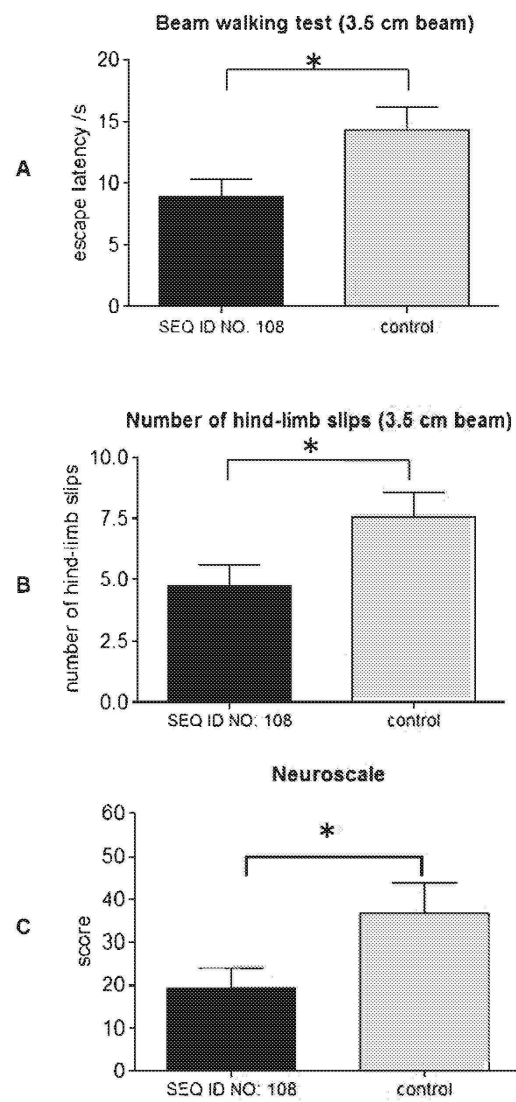
도면51



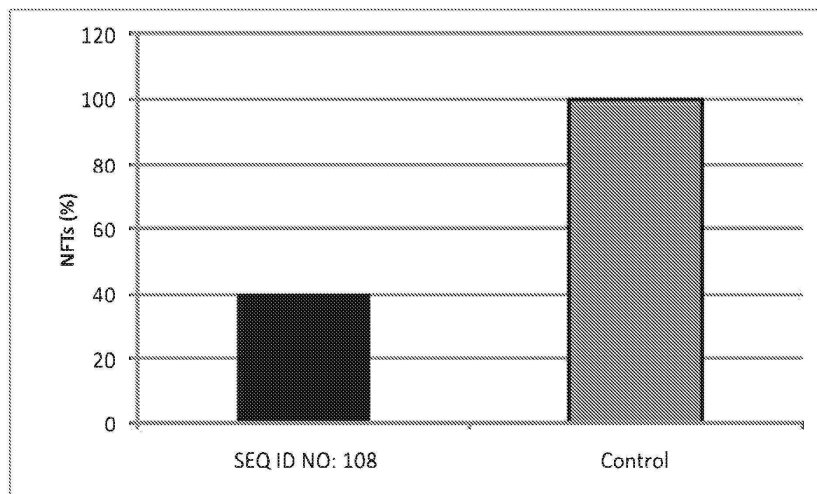
도면52



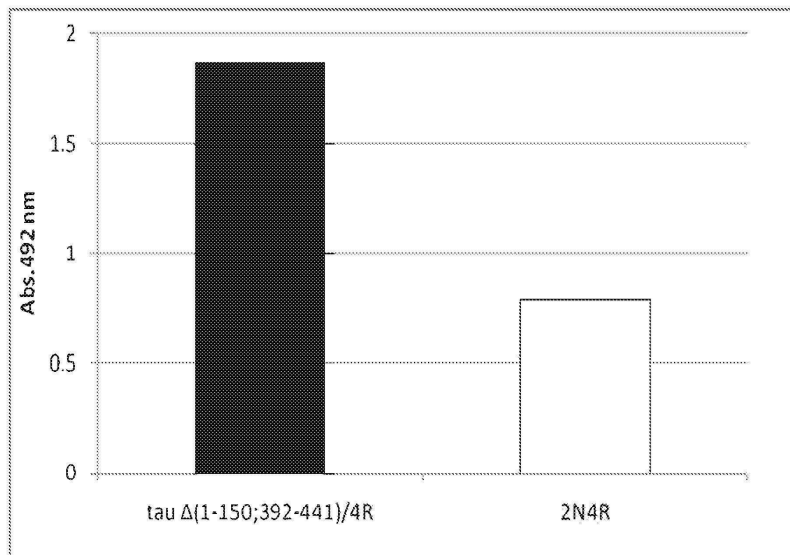
도면53



도면54



도면55



도면56

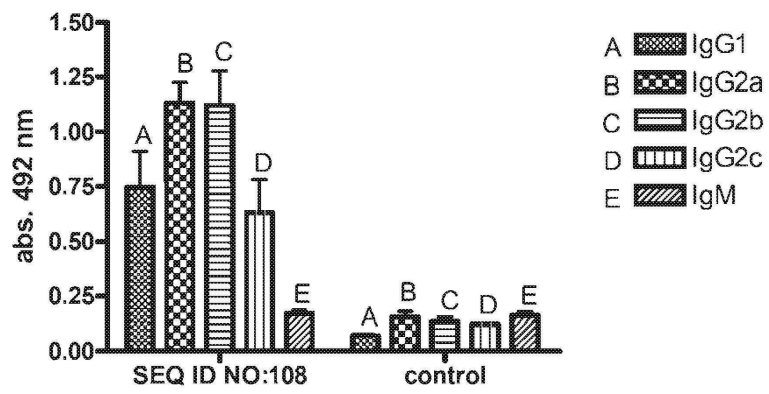
Geometric mean antibody titers			
Serum dilutions	Solid phase		
	Peptide SEQ ID NO:108	Tau Δ(1-150;392-441)/4R	Tau 2N4R
100	0 ^a	0	0
200	0	0	0
400	0	0	0
800	0	0	2
1 600	0	0	1
3 200	1	0	3
6 400	0	4	1
12 800	2	2	1
25 600	5	4	2
51 200	2	0	0
GMT ^b	20800	12800	4200

Footnotes:

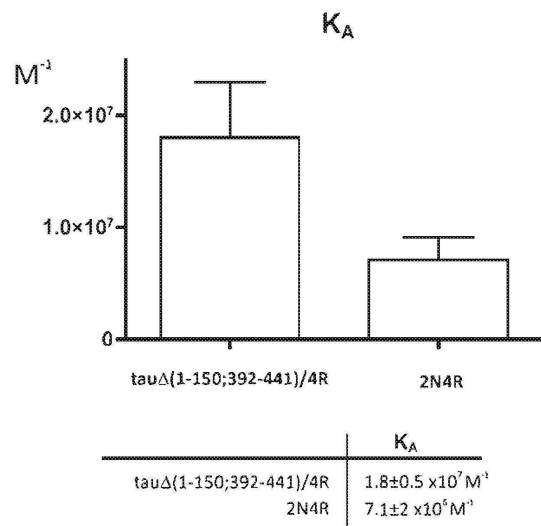
^a Number of responders

^b Geometric mean titre

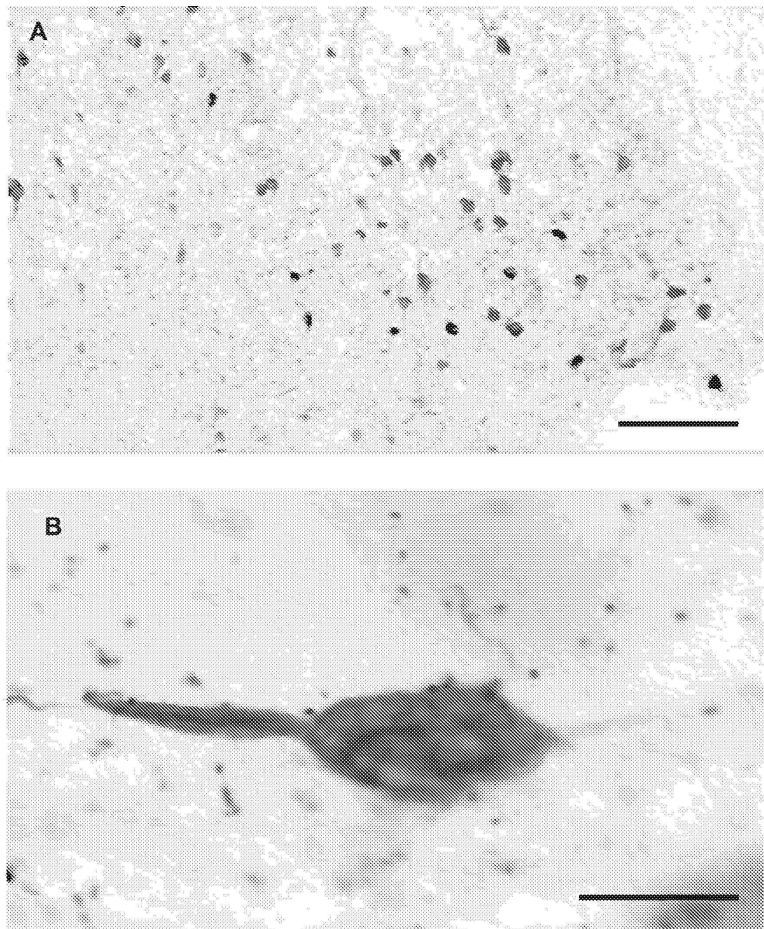
도면57



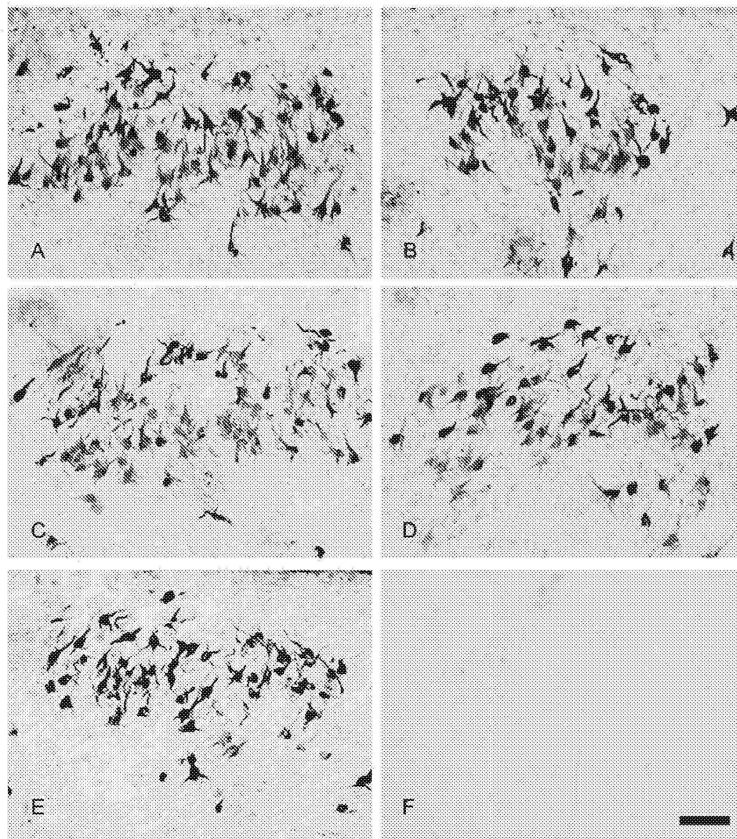
도면58



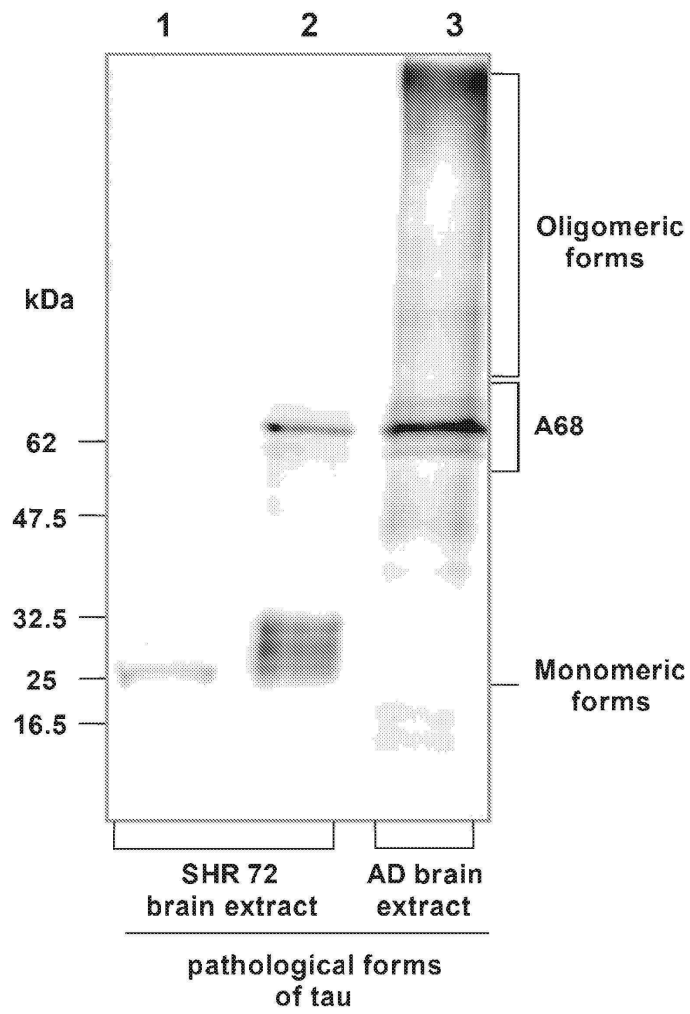
도면59



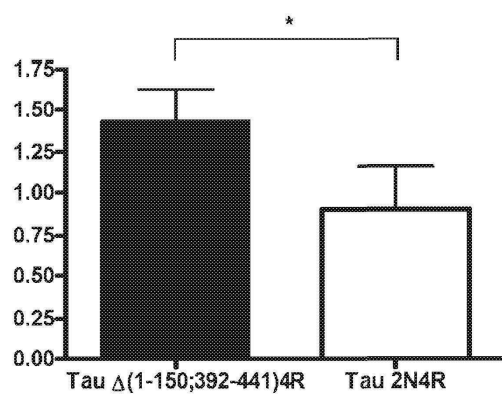
도면60



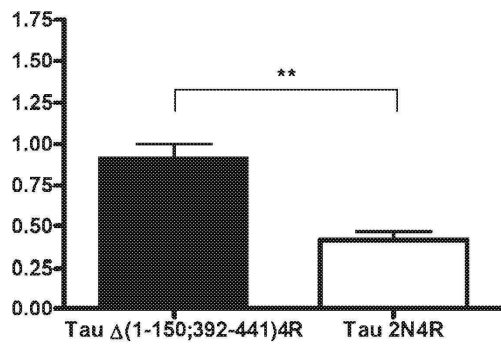
도면61



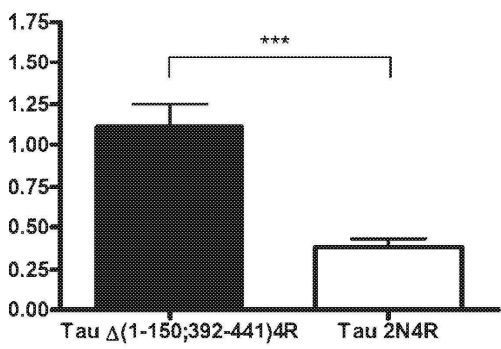
도면62



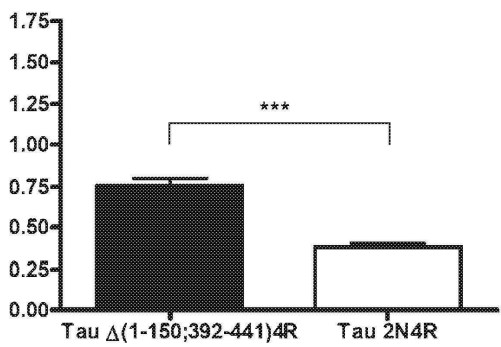
도면63



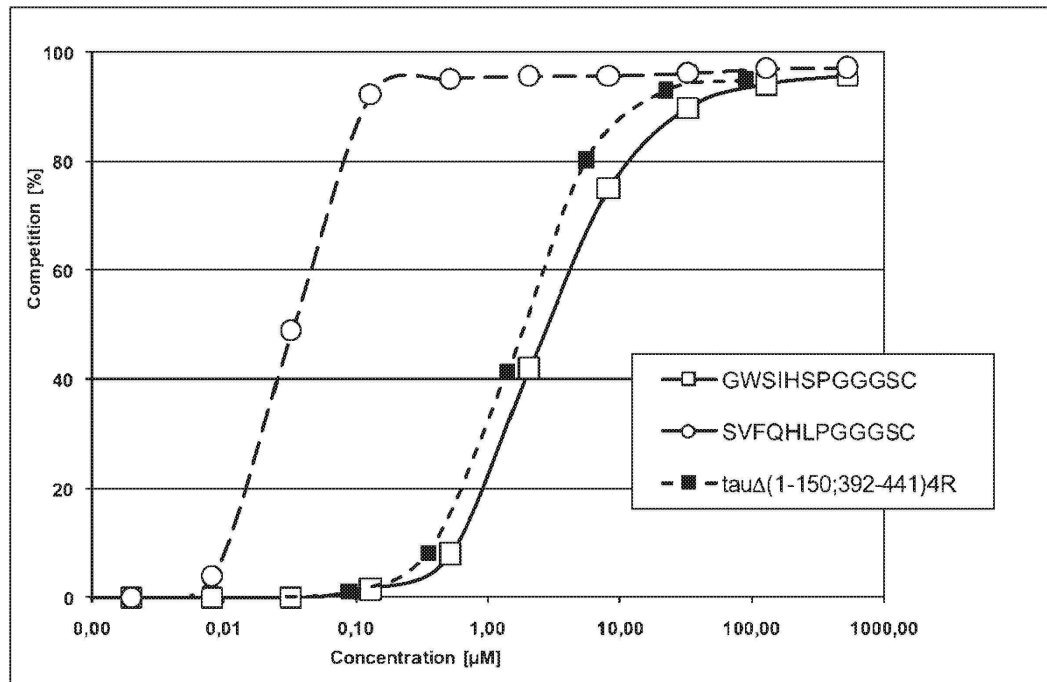
도면64



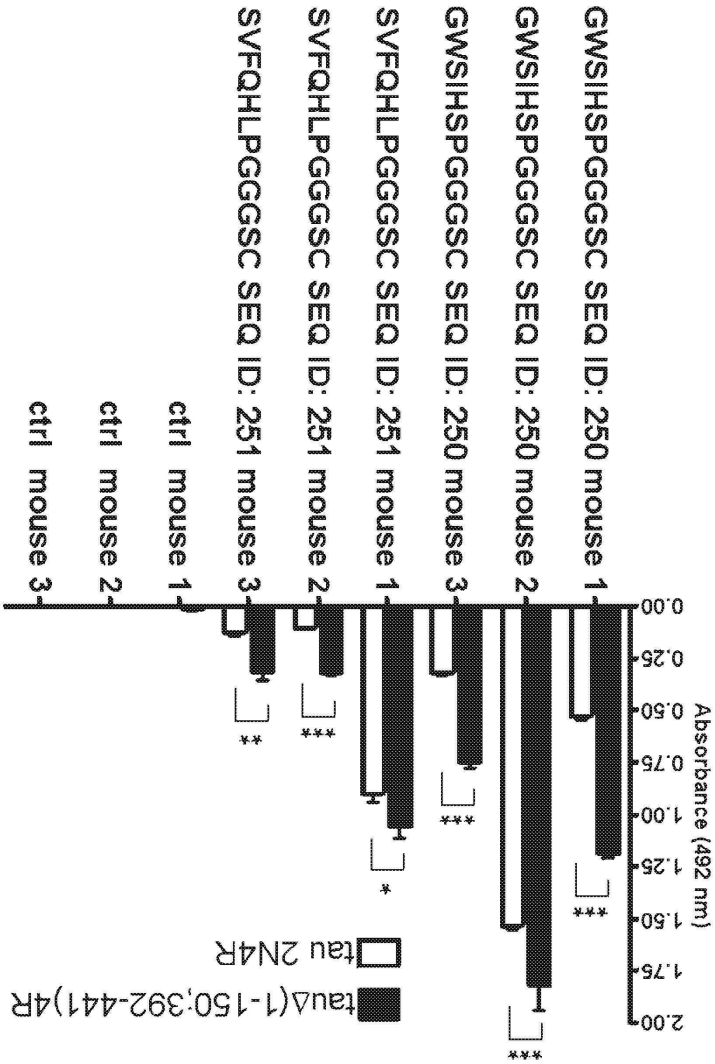
도면65



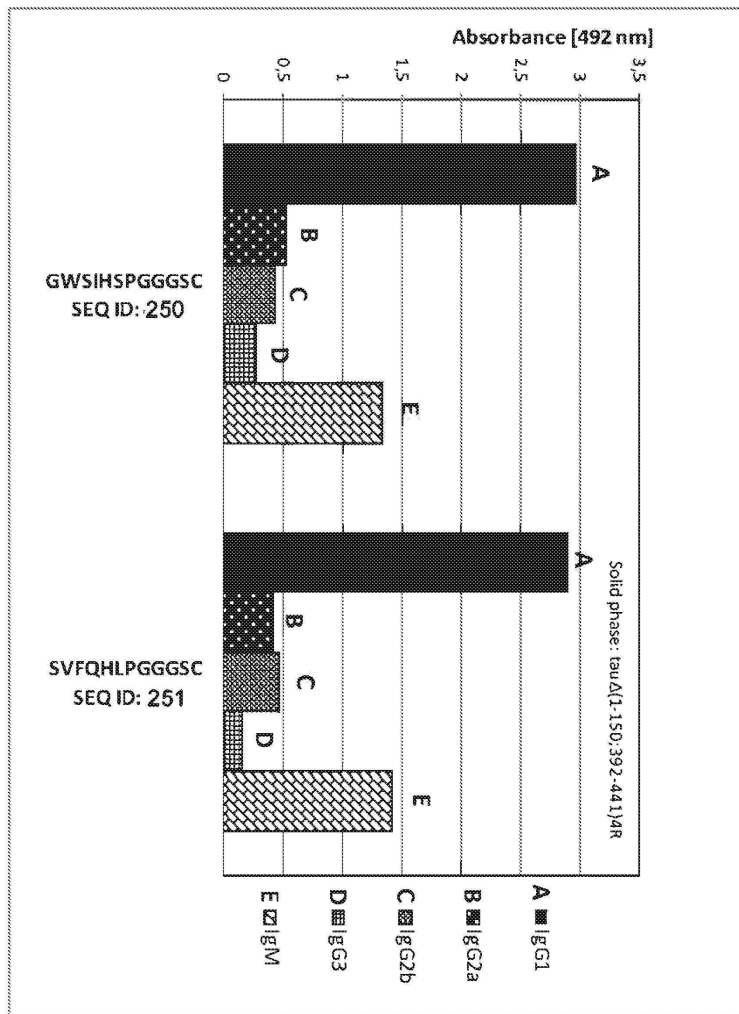
도면66



도면67

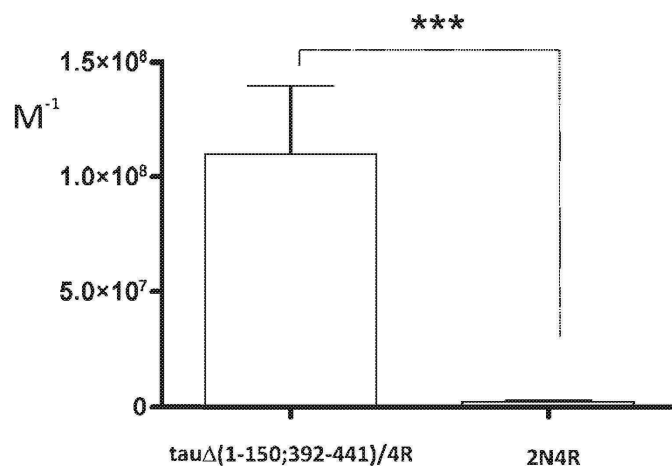


도면68



도면69a

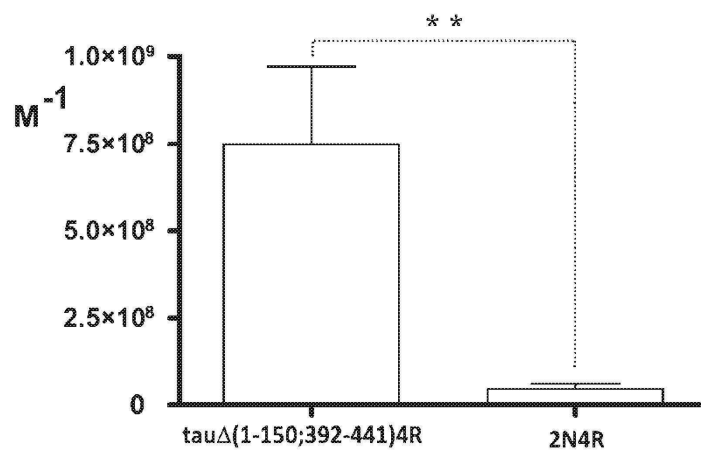
[GWSIHSPGGGSC (SEQ ID: 250)]



	K_A
$\tau\Delta(1-150;392-441)4R$	$1.1 \pm 0.3 \times 10^8 M^{-1}$
2N4R	$2.3 \pm 0.7 \times 10^6 M^{-1}$

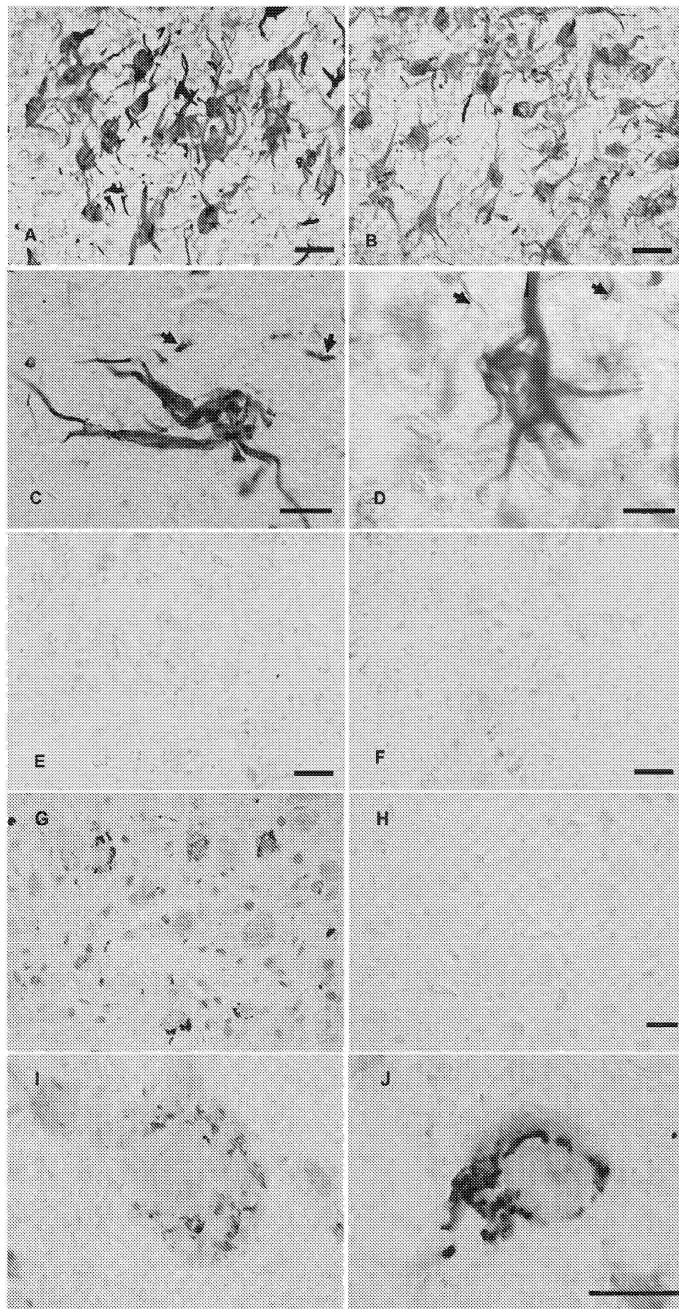
도면69b

[SVFQHLPGGGSC (SEQ ID: 251)]

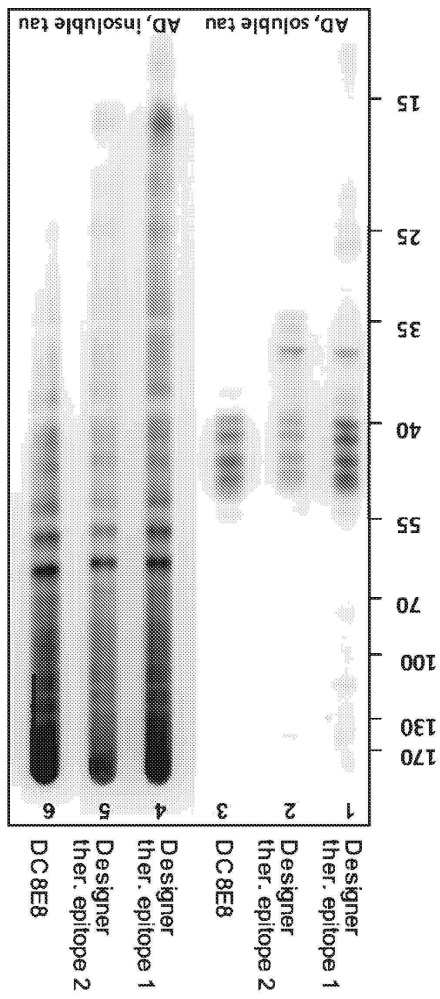


	K_A
$\tau\Delta(1-150;392-441)4R$	$7.5 \pm 2.2 \times 10^8 M^{-1}$
2N4R	$4.7 \pm 1.4 \times 10^7 M^{-1}$

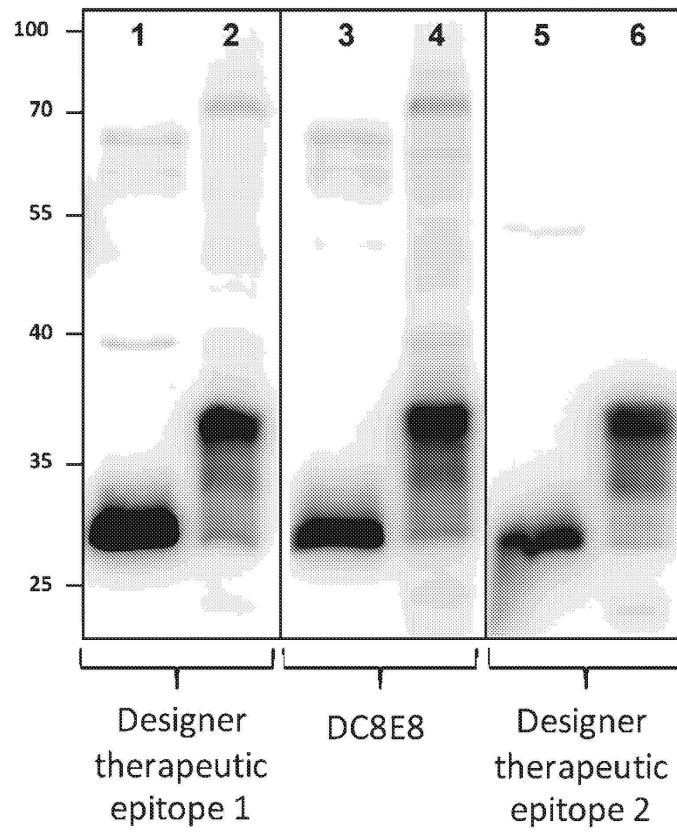
도면70



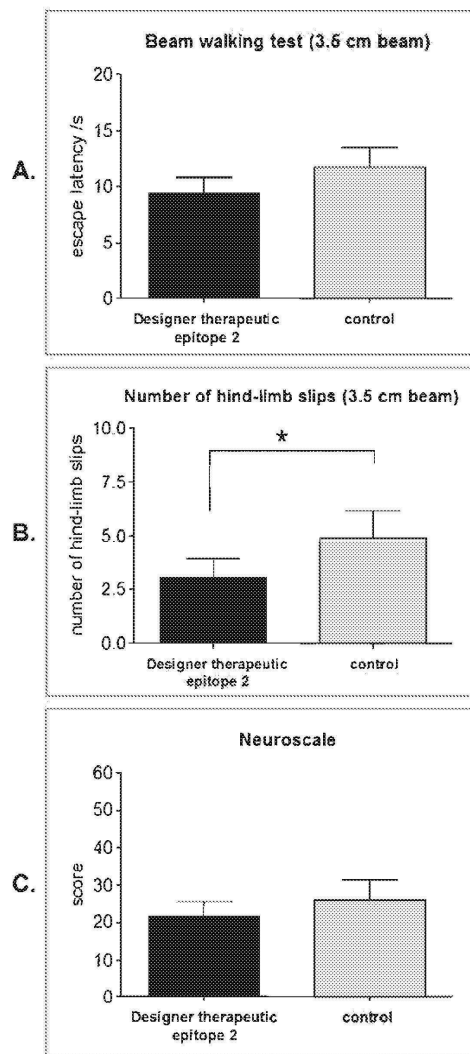
도면17



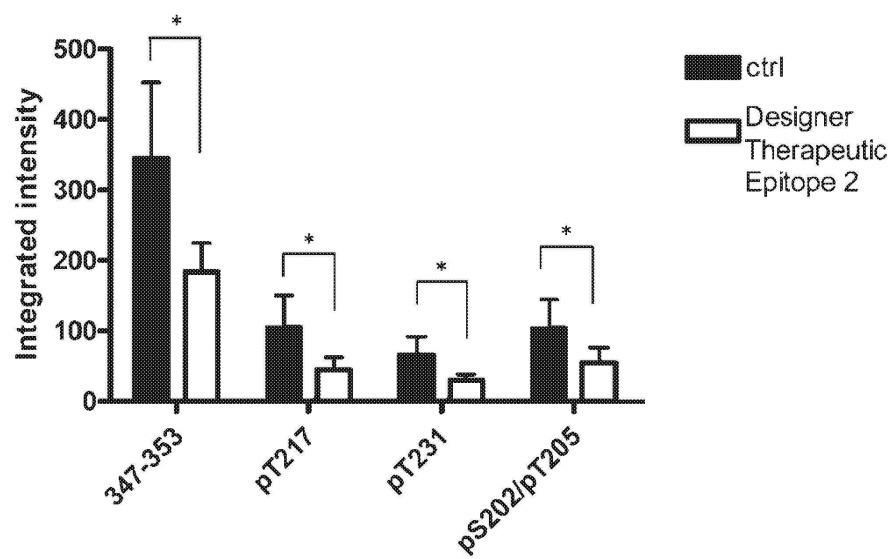
도면72



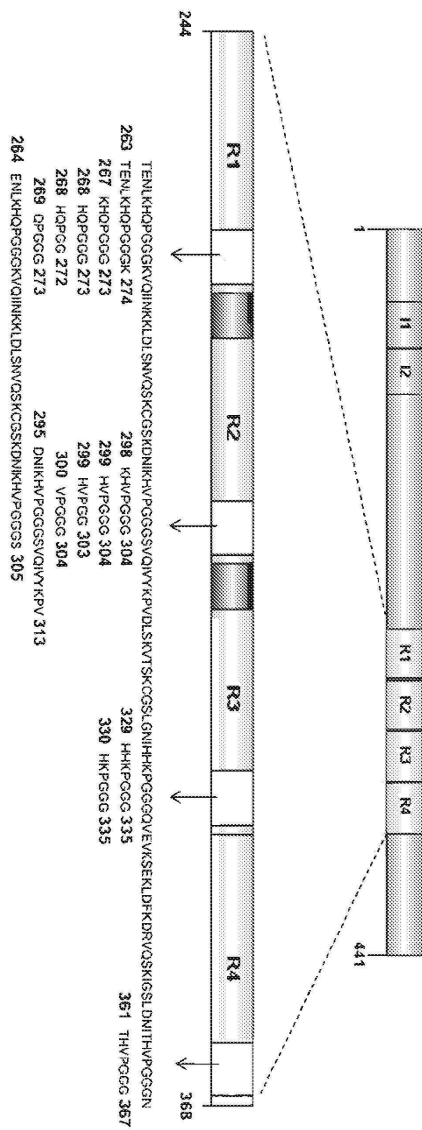
도면73



도면74



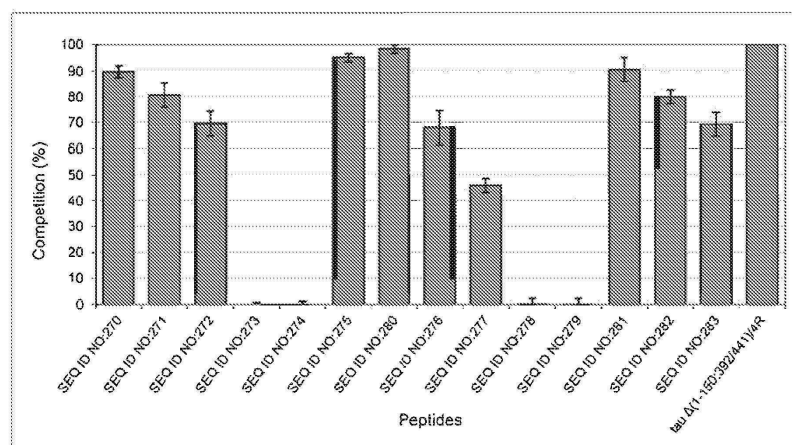
도면75a



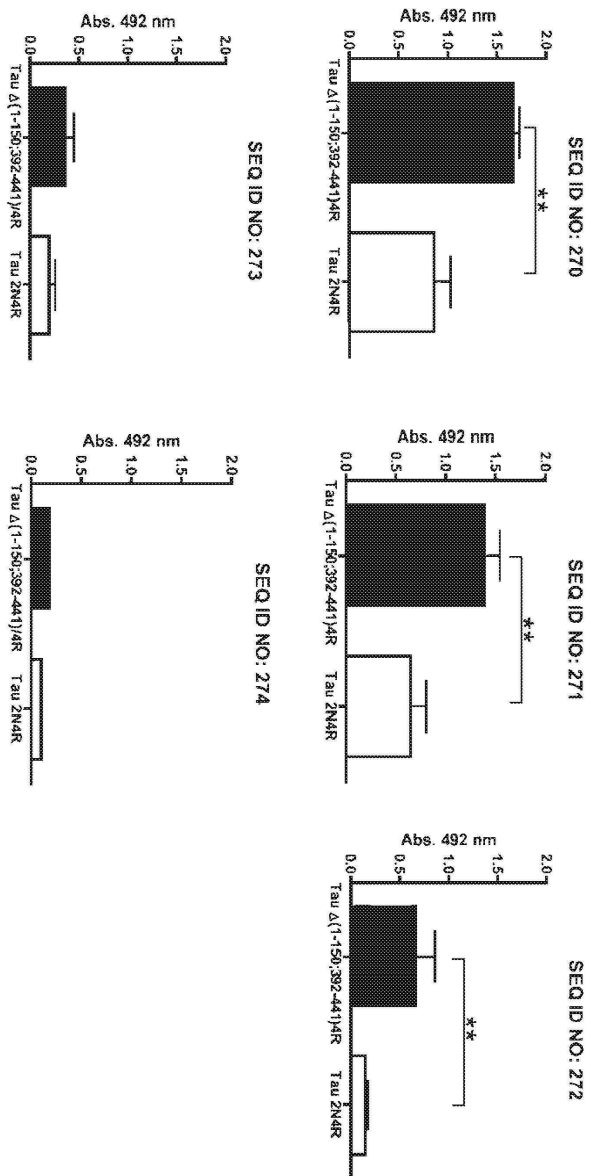
도면75b

Synthetic peptide	SEQ ID NO	Sequence
Tau263-274	SEQ ID NO: 270	TENLKHQPGGGK
Tau267-273	SEQ ID NO: 271	KHQPGGG
Tau268-273	SEQ ID NO: 272	HQPGGG
Tau268-272	SEQ ID NO: 273	HQPGG
Tau269-273	SEQ ID NO: 274	QPGGG
Tau264-305	SEQ ID NO: 275	ENLKHQPGGGKVVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
Tau298-304	SEQ ID NO: 276	KHVPGGG
Tau299-304	SEQ ID NO: 277	HVPGGG
Tau299-303	SEQ ID NO: 278	HVPGG
Tau300-304	SEQ ID NO: 279	VPGGG
Tau295-313	SEQ ID NO: 280	DNIKHVPGGGGVQIVYKPV
Tau329-335	SEQ ID NO: 281	HHKPPGGG
Tau330-335	SEQ ID NO: 282	HKPPGGG
Tau361-367	SEQ ID NO: 283	THVPGGG

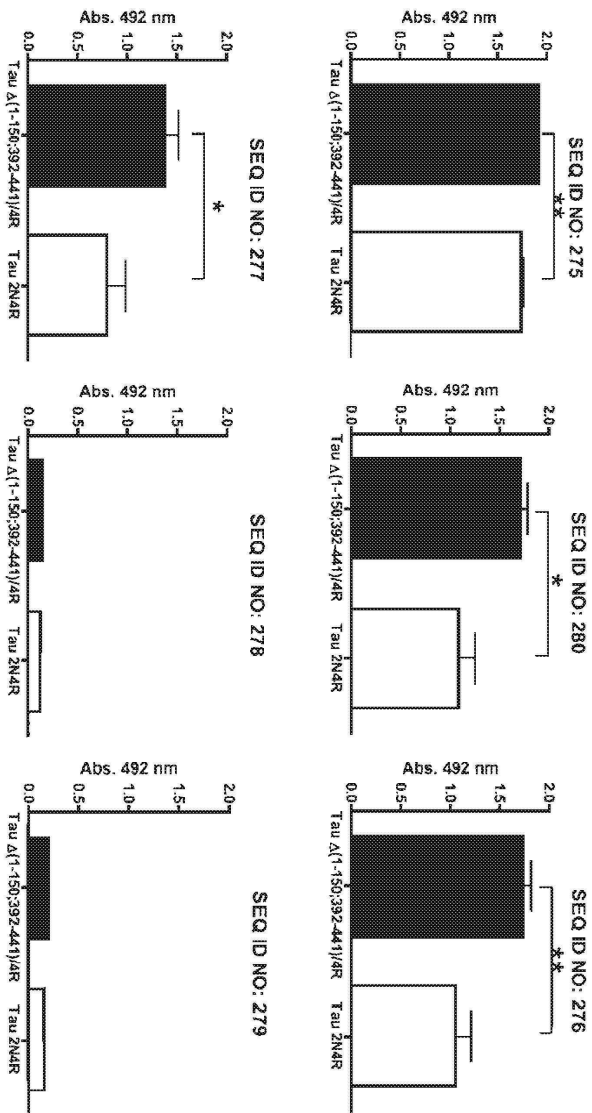
도면76



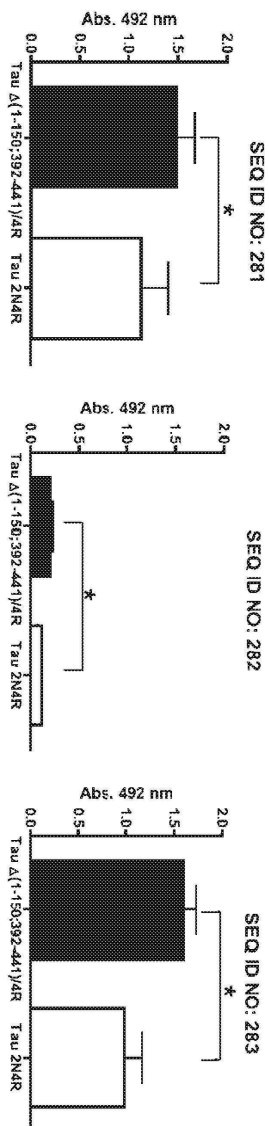
도면77a



도면77b



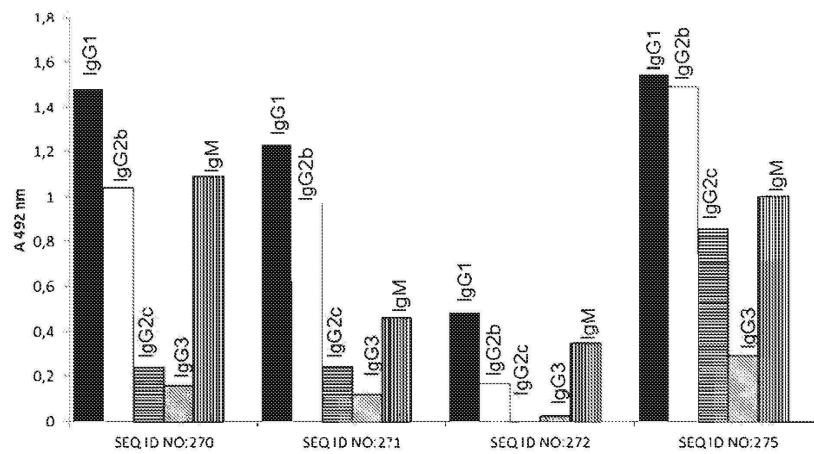
도면77c



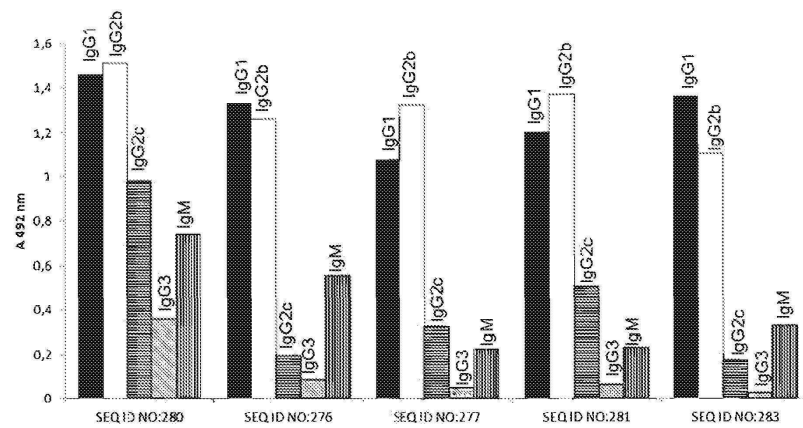
도면78

Peptides	Geometric mean antibody titers	
	solid phase	
	Tau Δ(1-150;392-441)/4R	Tau 2N4R
SEQ ID NO: 270	22286	4222
SEQ ID NO: 271	12800	3200
SEQ ID NO: 272	2786	264
SEQ ID NO: 273	400	<100
SEQ ID NO: 274	152	0
SEQ ID NO: 275	>51200	16890
SEQ ID NO: 280	51200	12800
SEQ ID NO: 276	22286	4038
SEQ ID NO: 277	12800	3805
SEQ ID NO: 278	277	383
SEQ ID NO: 279	<100	<100
SEQ ID NO: 281	8445	2425
SEQ ID NO: 282	174	<100
SEQ ID NO: 283	14703	4222

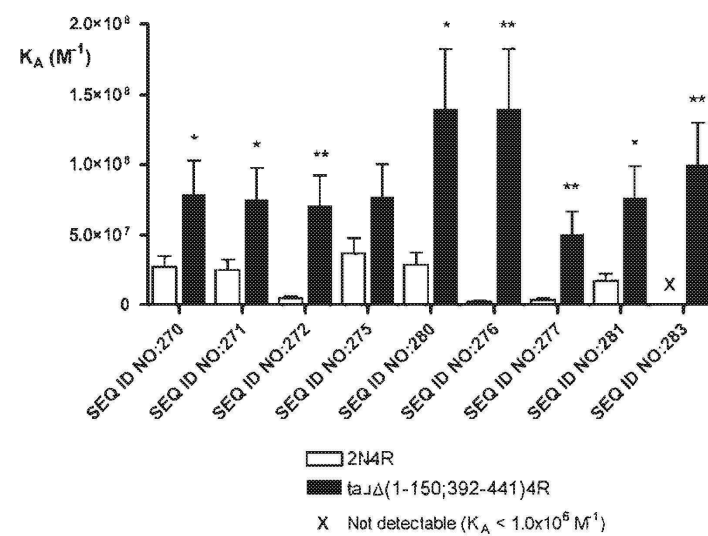
도면79a



도면79b



도면80

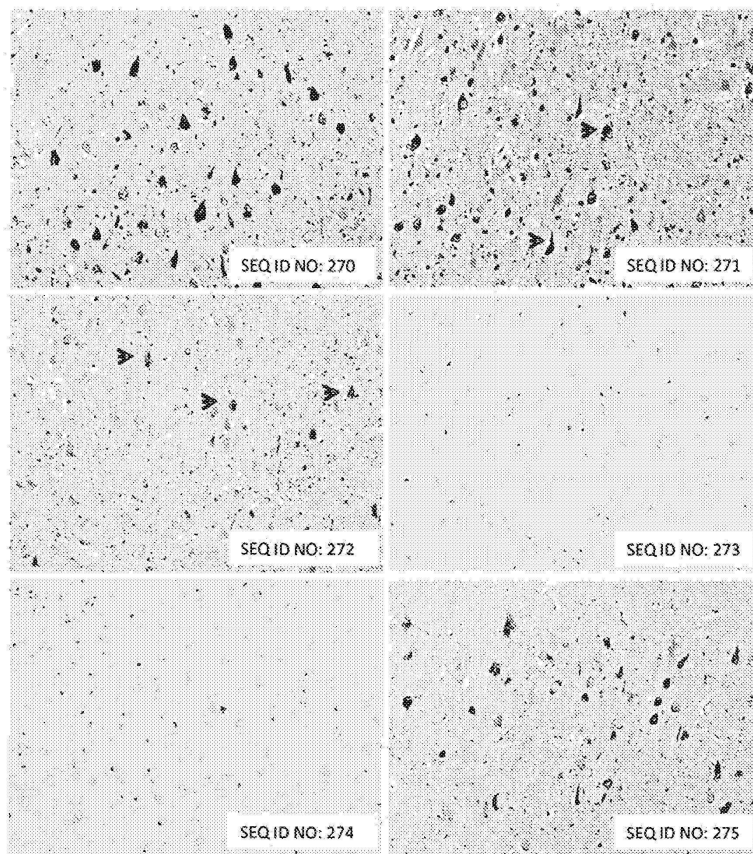


도면81

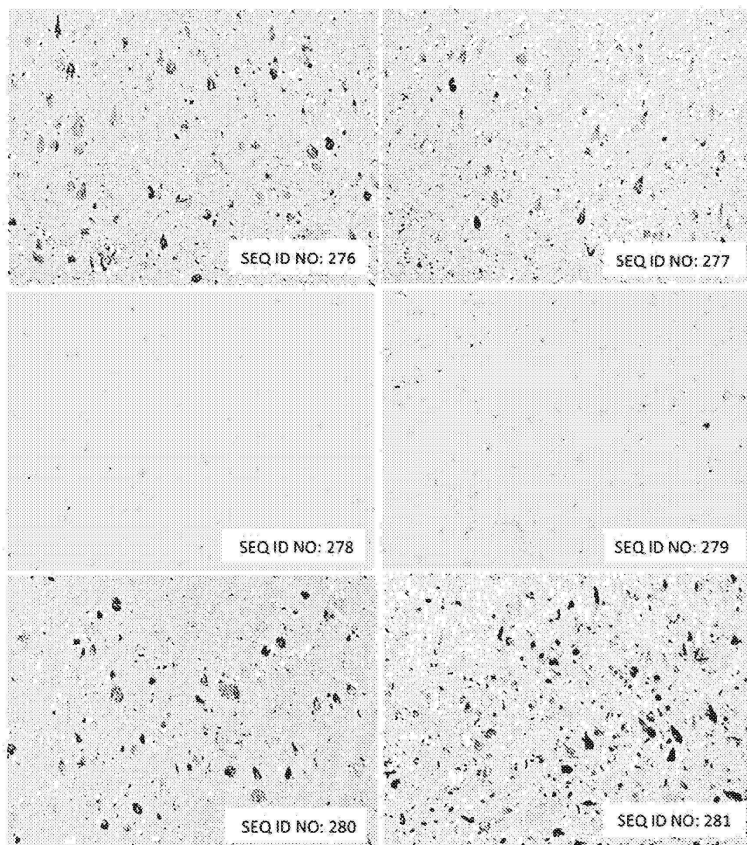
Pathological forms of tau recognized by tau peptides-induced antibodies in Western blot		
Peptides	SHR 72 brain extract	AD brain extract
SEQ ID NO: 270	-	+
SEQ ID NO: 271	-	+
SEQ ID NO: 272	-	+
SEQ ID NO: 273	-	-
SEQ ID NO: 274	-	-
SEQ ID NO: 275	-	+
SEQ ID NO: 276	-	+
SEQ ID NO: 277	-	+
SEQ ID NO: 278	-	-
SEQ ID NO: 279	-	-
SEQ ID NO: 280	-	+
SEQ ID NO: 281	-	+
SEQ ID NO: 282	-	-
SEQ ID NO: 283	-	+

+ positive
- negative

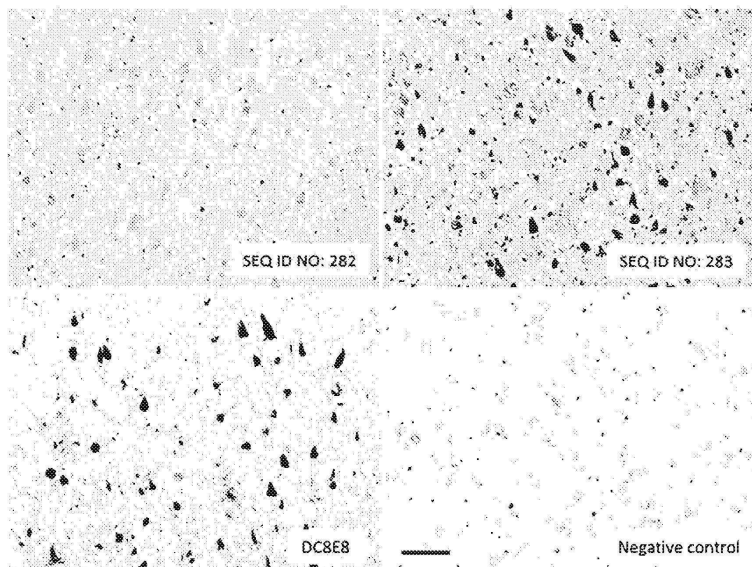
도면82a



도면82b



도면82c



도면83

Neurofibrillary tangles recognized by tau peptide-induced antibodies in human AD brain tissues		
Peptides	Intensity of staining	Number of NFTs
SEQ ID NO: 270	Very intensive staining of NFTs	+++
SEQ ID NO: 271	Intensive staining of NFTs	++
SEQ ID NO: 272	Weak staining of few NFTs	+
SEQ ID NO: 273	No NFT staining	-
SEQ ID NO: 274	No NFT staining	-
SEQ ID NO: 275	Very intensive staining of NFTs	+++
SEQ ID NO: 280	Intensive staining of NFTs	+++
SEQ ID NO: 276	Intensive staining of NFTs	+++
SEQ ID NO: 277	Weak staining of NFTs	++
SEQ ID NO: 278	No NFT staining	-
SEQ ID NO: 279	No NFT staining	-
SEQ ID NO: 281	Intensive staining of NFTs	++
SEQ ID NO: 282	No NFT staining	-
SEQ ID NO: 283	Very intensive staining of NFTs	+++

서열 목록

- <110> NOVAK, MICHAL
KONTSEKOVA, EVA
KOVACECH, BRANISLAV
ZILKA, NORBERT
- <120> PROTEIN-BASED THERAPY AND DIAGNOSIS OF TAU-MEDIATED PATHOLOGIES
IN ALZHEIMER'S DISEASE
- <130> 1163400010000
- <150> US 61/536,339
- <151> 2011-09-19
- <150> US 61/653,115
- <151> 2012-05-30
- <160> 283
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

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

1 5 10 15
Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

20 25 30

<210> 2

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 20 25 30

<210> 3

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 20 25 30

<210> 4

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys
 1 5 10 15
 Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 20 25 30

<210> 5

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro
 1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys

20 25 30

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 13

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>

13

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

Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
 20 25 30

<210> 14
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu
 1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn
 1 5 10 15

Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
 20 25 30

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

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

1 5 10 15
His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys

20 25 30

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 20

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn
20 25 30

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

21

Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val
20 25 30

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys
20 25 30

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 31

<211> 30

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val
 20 25 30

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10 15

Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile
 20 25 30

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 37

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 42

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42

Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
 20 25 30

<210> 43
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
 20 25 30

<210> 44
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 20 25 30

<210> 45
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>

45

Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 1 5 10 15

Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys

20 25 30

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 49

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49
 Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
 1 5 10 15

Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 20 25 30

<210> 50

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 1 5 10 15

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly
 20 25 30

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
 1 5 10 15

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
 20 25 30

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 20 25 30

<210> 53

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>
 53
 Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val
 20 25 30

<210> 54
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu
 20 25 30

<210> 55
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
 20 25 30

<210> 56
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly

1 5 10 15
Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys

20 25 30

<210> 57

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 58

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 60

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 60

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
1 5 10 15

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

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

61

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
20 25 30

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
20 25 30

<210> 63

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
20 25 30

<210> 64

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 65

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 66

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 67

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

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

1	5	10	15
Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln			
	20	25	30
<210>	68		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	68		
Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu			
1	5	10	15
Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser			
	20	25	30
<210>	69		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>			
	69		
Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val			
1	5	10	15
Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys			
	20	25	30
<210>	70		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	70		
Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys			
1	5	10	15
Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile			
	20	25	30
<210>	71		
<211>	30		

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 71

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
 20 25 30

<210> 72

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 73

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 74

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 75

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 76

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 77

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 78

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile

20 25 30
 <210> 79
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 79

Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
 1 5 10 15
 Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu

20 25 30
 <210> 80
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 80

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

1 5 10 15
 Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr

20 25 30
 <210> 81
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 81

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 1 5 10 15
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His

20 25 30
 <210> 82

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 82

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 1 5 10 15
 His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
 20 25 30

<210> 83
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
 1 5 10 15

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
 20 25 30

<210> 84
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
 1 5 10 15
 Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 20 25 30

<210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>

85

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 20 25 30

<210> 86

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
 20 25 30

<210> 87

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
 20 25 30

<210> 88

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Cys Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 20 25 30

<210> 89

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 90

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 91

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 93

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>

93

Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
 1 5 10 15
 Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr
 20 25 30

<210> 94
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 94

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 1 5 10 15
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
 20 25 30

<210> 95
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 95

Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
 1 5 10 15
 Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His
 20 25 30

<210> 96
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 96

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

1 5 10 15
Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly

20 25 30

<210> 97

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Lys His Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

His His Lys Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Thr His Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 102

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

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

 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 103
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 103

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 Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

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

 245 250 255
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 305 310 315 320

 Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 325 330 335
 Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 340 345 350
 Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
 355 360 365
 Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 370 375 380
 Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala

 385 390 395 400
 Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405 410
 <210> 104
 <211> 410
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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 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 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 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> 105

<211> 383

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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 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 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 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 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> 106

<211> 381

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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 Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 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 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> 107
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 107

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 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 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 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
305 310 315 320
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> 108
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 108

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

1 5 10

<210> 109
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 109

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 111

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

1 5 10

<210> 112

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

1 5 10

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys

1 5

<210> 114

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Val Gln Ile Val Tyr Lys

1 5

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Val Gln Ile Ile Asn Lys

1 5

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 117

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 118
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 118
 Trp Ala Ser
 1
 <210> 119
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 119
 Lys Gln Ser Phe Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 <210> 120
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 120
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Val Ile Ser
 1 5 10
 <210> 121
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 121
 Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 122

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 122

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 123

<211> 13

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 123

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)

<223> Any amino acid

<400> 124

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 125

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
 1 5 10 15

<210> 126

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Hepatitis B virus
 <400> 126
 Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
 1 5 10
 <210> 127
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Description of Unknown: Heat Shock protein 65
 <400> 127
 Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Leu Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
 1 5 10 15
 Asn Glu Gly
 <210> 128
 <211> 14
 <212> PRT
 <
 213> Mycobacterium bovis
 <400> 128
 Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
 1 5 10
 <210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani
 <400> 129
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 130
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani

<400> 130

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 131

<211> 16

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 131

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala

1 5 10 15

<210> 132

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 132

acattgtgat gtcacagtct ccacccctcc

29

<210> 133

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 133

ctcctccaat tgcagcagtc tgg

23

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 134

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser

1 5 10

<210> 135

<211> 10

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu

1 5 10

<210> 136

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 136

ggaattcggtt gaagctcttg acaatgggtg 30

<210> 137

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 137

ggaattcaca tatgcaaggc ttacaaccac 30

<210> 138

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 138

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr

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

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 139

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn His Cys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 140

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 140

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 141

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 141

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

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

100 105 110

<210> 142

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 143

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 143

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

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

100 105 110

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 144

Ala Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 145

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 145

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 146

Asp Ala Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 147

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 147

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Tyr

20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 148

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 148

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 149
 Asp Asn Ala Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 150

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 150

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

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

100 105 110

<210> 151

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 151

Asp Asn Ile Ala His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 152

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 152

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

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

100 105 110

<210> 153

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 153

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

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

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

Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 154

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

His Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 155

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 155

atattacat ggacattgtg atgtcacag

29

<210> 156

<211

> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 156
atattattct cgaggagac ggtgactgag gt 32

<210> 157
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
<400> 157
ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggtcc atgcaggtcc aattgcagca g 51

<210> 158
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
<400> 158
ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccccggt tgatgtccag 60
cttggtgcc 69

<210> 159
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 159
Asp Asn Ile Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 160
<211>
> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 160
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 161

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 161

Asp Asn Ile Lys His Ala Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 162

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 162

Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu

1 5 10 15

<210> 163

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag

<400> 163

His His His His His His

1 5

<210> 164

<

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)

<223> Any amino acid

<400> 164

His Xaa Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 165

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 165

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca aatccagtc gagtctgtc aacagtagaa cccgaaagaa ctacctggct 120

tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgtga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc tttttatctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggac atcaaa 336

<210> 166

<211> 301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 166

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca aatccagtc gagtctgtc aacagtagaa cccgaaagaa ctacctggct 120

tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgtga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc tttttatctt 300

c 301

<210> 167

<211> 301

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 167

gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggcact	60
atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt	300
c	301
<210> 168	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 168	
ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaca tcaaac	36
<210> 169	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Mus sp.	
<400> 169	
ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaac	36
<210> 170	
<211> 360	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 170	
caggtccaat tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagatg	60
ccctgtaagg cttctggata catattcact gactatgtca taagctgggt gaagcagaga	120
actggacagg gccttgagtg gattggagag atttttccta gaagtggtag tacttactac	180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctcaa cacagcctac	240
atgcagctca gcagcgtgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagattac	300
tacggtactt catttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca	360
	360

<210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 171
 Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 172
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 172
 caggtccaat tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagatg 60
 ccctgtaagg ctcttgata catattcact gactatgtca taagctgggt gaagcagaga 120
 actggacagg gccttgagtg gattggagag attttccta gaagtggtag tacttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctcaa cacagcctac 240

atgcagctca gcagcgtgac atctgaggac tctgcgtctt atttctgtgc aaga 294

<210> 173
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 173

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgagge ctggggcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg ctcttgcta caccttcaca agctatggta taagctgggt gaagcagaga 120
 actggacagg gccttgagtg gattggagag atttacccta gaagtggtaa tacttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcgtctt atttctgtgc aaga 294

<210> 174
 <211> 14
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400>	174	
	gattactacg gtac	14
<210>	175	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Mus sp.	
<400>	175	
	gactactata ggtac	15
<210>	176	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400>	176	
	ttcatttgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct cag	53
<210>	177	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	Mus sp.	
<400>	177	
	ttactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct cag	53
<210>	178	
<211>	267	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400>	178	
	gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg	60
	gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaggt	120
	ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca	180
	gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccttcacgtt gaccaaggac gagtatgaac	240

gacataacag ctatacctgt gaggcca	267
<210> 179	
<211> 276	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 179	
ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc caaactaact	60
ccatggtgac cctgggatgc ctggccaagg gctatttccc tgagccagtg acagtgacct	120
ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtgc acaccttccc agctgtcctg cagtctgacc	180
tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc gagaccgtca	240
cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaagg	276
<210> 180	
<211> 305	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 180	
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct	120
tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtca tttactgggc atctaccgg	180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact	300
cctcc	305
<210> 181	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 181	
gtggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaac	38
<210> 182	
<211> 296	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

<400> 182
caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tccttggtat agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaga 296

<210> 183
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 183
ctgagctgag aaccactgtg ctaactgggg acacagtgat tggcagctct a 51

<210> 184
<211> 8
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 184
Cys Thr His Val Pro Gly Gly Gly
1 5

<210> 185
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 185
tgatgctttt gatgtctggg gccaaaggac aatggtcacc gtctcttcag 50

<210> 186
<211> 357
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 186
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

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

 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu
 355
 <210> 187
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 187
 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 Leu Ala Asp
210 215 220

Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu

225 230 235

<210> 188

<211> 346

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

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 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly			
305	310	315	320
Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu			
325	330	335	

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu

	340		345	
<210>	189			
<211>	420			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	189			
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly				
1	5	10	15	
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His				
	20	25	30	
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu				
	35	40	45	
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser				
	50	55	60	
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val				
65	70	75	80	
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu				
	85	90	95	
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro				
	100	105	110	
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val				
	115	120	125	
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly				
	130	135	140	
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro				
145	150	155	160	
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro				
	165	170	175	
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly				
	180	185	190	

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ile Asp Met Val

420

<210> 190

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 190

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

225

<210> 191

<211> 428

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

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 Asp Leu Ser Lys
 290 295 300
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 305 310 315 320

 Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 325 330 335
 Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 340 345 350
 Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 355 360 365
 Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
 370 375 380
 Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser

 385 390 395 400
 Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
 405 410 415
 Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 420 425

 <210> 192
 <211> 297
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

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

Met	Arg	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	
225				230				235				240			
Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val
245						250						255			
Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser
260						265						270			
Ile	Asp	Met	Val	Asp	Ser	Pro	Gln	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Asp	Glu	Val
275						280						285			
Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Gln	Gly	Leu							
290				295											
<210>	193														
<211>	136														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	193														
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								
130				135											

<210> 194

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

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

275 280

<210> 195

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

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 Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro

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

 195 200 205
 Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
 210 215 220
 Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
 225 230 235 240
 Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
 245 250 255
 Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 260 265 270

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

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

385 390 395 400
 Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405
 <210> 196
 <211> 222
 <212>
 PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 196
 Met Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser
 1 5 10 15
 Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro
 20 25 30
 Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
 35 40 45
 His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
 50 55 60

 Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
 65 70 75 80
 Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
 85 90 95
 Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
 100 105 110
 Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
 115 120 125
 Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val

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

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr
195 200 205

Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
210 215 220

<210> 197

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala
1 5 10 15

Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala
20 25 30

Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys
35 40 45

Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys
50 55 60

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro
65 70 75 80

Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
85 90 95

Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser
100 105 110

Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys
115 120 125

Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro
130 135 140

Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn
145 150 155 160

Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly
165 170 175

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

180 185 190
 Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly
 195 200 205
 Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val
 210 215 220
 Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala
 245 250 255
 Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val
 260 265 270
 Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr
 275 280 285
 Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp
 290 295 300
 Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 305 310 315
 <210> 198
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 198
 Met Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
 1 5 10 15
 Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
 20 25 30
 Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
 35 40 45
 Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn
 50 55 60
 Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys

65					70				75				80			
Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	
				85				90				95				
<210>	199															
<211>	242															
<212>	PRT															
<213>	Homo sapiens															
<400>	199															
Met	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	
1				5				10				15				
Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	
				20				25				30				
Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	
				35				40				45				
Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	
50				55				60								
Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Ala	Val	Val	
65				70				75				80				
Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	
				85				90				95				
Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	
				100				105				110				
Ser	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	
				115				120				125				
Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	
130				135				140								
Lys	Asp	Asn	Ile	Lys	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ile	Val	
145				150				155				160				
Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	
				165				170				175				
Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Glu	Val	Lys	Ser	

180 185 190
Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
195 200 205
Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
210 215 220
His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
225 230 235 240
Ala Glu

<210> 200

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Asn Ile Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 201

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val

1 5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln

1 5

<210> 205

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln

1 5

<210> 206

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 206

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 207

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 207

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 208

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)

<223> phospho-Ser

<400> 208

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 209

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 210

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)

<223> phospho-Ser

<400> 210

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 211

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 211

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 212

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (4)

<223> phospho-Ser

<400> 212

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 213

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 213

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 214

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (4)

<223> phospho-Ser

<400> 214

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 215

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 215

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 216

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 216

Cys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 217

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 217

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 218

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 218

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

1 5 10

<210> 219

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 219

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

1 5 10 15

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 220

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

Cys His His Lys Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 221

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 221

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 222

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 222

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 223

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 223

His Gln Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 224

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 224

His Lys Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 225

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 225

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 226

<211> 104

<212> PRT

<213> Pan sp.

<400> 226

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 227

<211> 104

<212> PRT

<213> Macaca sp.

<400>

> 227

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Ser
100

<210> 228

<211> 104

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Gibbon tau polypeptide

<400> 228

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 229

<211> 104

<212> PRT

<213> Pongo sp.

<400> 229

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly His

100

<210> 230

<211> 104

<212> PRT

<213> Ailuropoda melanoleuca

<400> 230

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 231

<211> 104

<212> PRT

<213> Sus sp.

<400> 231

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

1	5	10	15
Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn			
	20	25	30
Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro			
	35	40	45
Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile			
	50	55	60
His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu			
65	70	75	80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile			
	85	90	95
Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn			
	100		

<210> 232

<211> 104

<212> PRT

<213> Equus sp.

<400> 232

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

1	5	10	15
Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn			
	20	25	30
Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro			
	35	40	45
Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile			
	50	55	60
His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu			
65	70	75	80
Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile			

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly His

100

<210> 233

<211> 104

<212> PRT

<213> Canis lupus

<400> 233

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 234

<211> 104

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Rabbit tau polypeptide

<400> 234

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

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

65 70 75 80
Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 235

<211> 104

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 235

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 236

<211> 104

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Vole tau polypeptide

<400> 236

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 237

<211> 104

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 237

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 238

<211> 104

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Ground squirrel tau polypeptide

<400> 238

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

1 5 10 15
Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30
Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45
Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60
His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 239

<211> 104

<212> PRT

<213> Bos sp.

<400> 239

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

1 5 10 15
Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 240

<211> 104

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Fowl tau polypeptide

<400> 240

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 241

<211> 104
<212> PRT
<213> Unknown

<220>

<223> Description of Unknown: Finch tau polypeptide

<400> 241

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 242

<211> 102

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 242

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

1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Thr Asn Val Gln Ala Arg Cys Gly Ser Lys Asp Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg His Lys Pro Gly Gly Gly Asn Ile Glu Ile Arg Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Phe Lys Ala Gln Ser Lys Ile Gly Ser Met Asp Asn Ile Lys His

85 90 95
 Thr Pro Gly Gly Gly Asn
 100

<210> 243
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*
 <400> 243

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

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

100
 <210> 244
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Drosophila* sp.
 <400> 244

Asn Ala Thr Tyr Lys Pro Gly Gly Gly His Val Lys Ile Glu Ser Lys
 1 5 10 15

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

Pro Gly Gly Gly Asp Lys Lys Ile Glu Thr Leu Lys Met Asp Phe Lys
65 70 75 80
Asp Lys Ala Lys Pro Lys Val Gly Ser Thr Ala Asn Val Lys His Gln
85 90 95

Pro Gly Gly Gly Asp
100

<210> 245

<211> 97

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Roundworm tau polypeptide

<400> 245

Asn His Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Glu Ile Phe Ser Glu Lys Arg

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

Ser Lys Val Gly Ser Met Asp Asn Ala Ala His Lys Pro Ala Gly Gly
85 90 95

Asn

<210> 246

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 246

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr

<210> 247

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 247

Gln Ser Leu Leu Ala Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 248

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 248

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ala Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 249

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 249

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Ala

1 5 10

<210> 250

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 250

Gly Trp Ser Ile His Ser Pro Gly Gly Gly Ser Cys

1 5 10

<210> 251

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 251

Ser Val Phe Gln His Leu Pro Gly Gly Gly Ser Cys

1 5 10

<210> 252

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 252

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

1	5	10	15
Ala			

<210> 253

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 253

Ala Ala Ser

1	
<210>	254

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 254

Ala Gln Ser Phe Tyr Leu Arg Thr

1	5
<210>	255

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 255

Lys Ala Ser Phe Tyr Leu Arg Thr

1	5
<210>	256

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 256

Lys Gln Ala Phe Tyr Leu Arg Thr

1 5

<210> 257

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 257

Lys Gln Ser Ala Tyr Leu Arg Thr

1 5

<210> 258

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 258

Lys Gln Ser Phe Ala Leu Arg Thr

1 5

<210> 259

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 259

Lys Gln Ser Phe Tyr Ala Arg Thr

1 5

<210> 260

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 260

Lys Gln Ser Phe Tyr Leu Ala Thr

1 5

<210> 261

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 261

Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Ala Val Ile Ser

1 5 10

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 262

Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser

1 5 10

<210> 263

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 263

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

1 5 10 15

<210> 264

<211> 8

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 264
 Ile Ala Pro Arg Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 265
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 265
 Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ala Thr
 1 5
 <210> 266
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 266
 Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 267
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 267
 Ala Arg Asp Ala Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 268
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 268

Ala Arg Asp Tyr Ala Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 269

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 269

Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 270

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 270

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

1 5 10

<210> 271

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 271

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 272

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

His Gln Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 273

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 273

His Gln Pro Gly Gly

1 5

<210> 274

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

Gln Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 275

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 275

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

35 40

<210> 276

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 276

Lys His Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 277

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 277

His Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 278

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

His Val Pro Gly Gly

1 5

<210> 279

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 279

Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 280

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 280

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

1 5 10 15

Lys Pro Val

<210> 281

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

His His Lys Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 282

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 282

His Lys Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 283
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 283

Thr His Val Pro Gly Gly Gly

1 5