(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0145065
(43) 공개일자 2024년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 47/69* (2017.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/0007 (2013.01)
A61K 47/6911 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2024-7031724(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년10월24일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7014520
원출원일자(국제) 2018년10월24일
심사청구일자 2021년09월09일
(85) 번역문제출일자 2024년09월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/057286
(87) 국제공개번호 WO 2019/084118
국제공개일자 2019년05월02일
(30) 우선권주장
62/577,157 2017년10월25일 미국(US)

(71) 출원인
얀센 파마슈티칼즈, 인코포레이티드
미국 뉴저지 08560 타이터스빌 트렌턴-하버톤 로드 1125
에이씨 이뮨 에스에이
스위스, 체하-1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프엘 이노베이션 파크
(72) 발명자
람스부르그, 엘리자베스 앤
미국 뉴저지 08560 타이터스빌 트렌턴-하버톤 로드 1125 얀센 파마슈티칼즈, 인코포레이티드 내
드 마르코, 도나타
미국 뉴저지 08560 타이터스빌 트렌턴-하버톤 로드 1125 얀센 파마슈티칼즈, 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

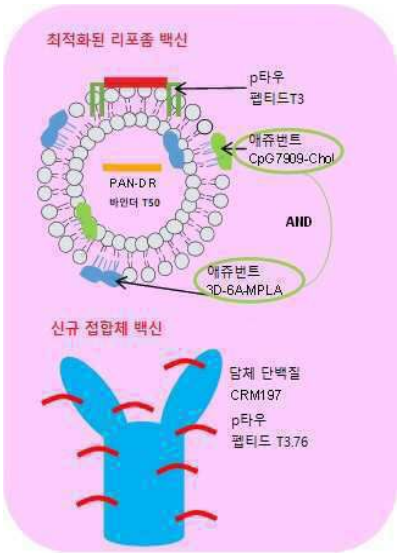
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **인산화 타우 펩티드의 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

타우 펩티드, 바람직하게는 인산화 타우 펩티드를 함유하는 리포좀, 및 면역원성 담체에 접합된 타우 펩티드, 바람직하게는 인산화된 타우 펩티드를 함유하는 접합체가 기재된다. 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 리포좀 및/또는 접합체의 약학 조성물 및 용도가 또한 기재된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
A61K 2039/55505 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)
A61K 2039/6037 (2013.01)
A61K 2039/627 (2013.01)

(72) 발명자
차크쿰칼, 아니쉬
미국 뉴저지 08560 타이터스빌 트렌턴-하버톤 로드 1125 얀센 파마슈티칼즈, 인코포레이티드 내
사다카, 샬럿
미국 뉴저지 08560 타이터스빌 트렌턴-하버톤 로드 1125 얀센 파마슈티칼즈, 인코포레이티드 내
고즈미트, 얍
미국 뉴저지 08560 타이터스빌 트렌턴-하버톤 로드 1125 얀센 파마슈티칼즈, 인코포레이티드 내
무스, 안드레아스
스위스 체하-1015 라우산느 빌딩 비 이피에프엘 이 노베이션파크 에이씨 이뮨 에스.에이. 내
필그렌 보쉬, 마리아
스위스 체하-1015 라우산느 빌딩 비 이피에프엘 이 노베이션파크 에이씨 이뮨 에스.에이. 내
부키체비치 버힐레,마리야
스위스 체하-1015 라우산느 빌딩 비 이피에프엘 이 노베이션파크 에이씨 이뮨 에스.에이. 내
히크만, 데이비드
스위스 체하-1015 라우산느 빌딩 비 이피에프엘 이 노베이션파크 에이씨 이뮨 에스.에이. 내
피오트, 니콜라스
스위스 체하-1015 라우산느 빌딩 비 이피에프엘 이 노베이션파크 에이씨 이뮨 에스.에이. 내
기미르, 사로지 라즈
스위스 체하-1015 라우산느 빌딩 비 이피에프엘 이 노베이션파크 에이씨 이뮨 에스.에이. 내

명 세 서

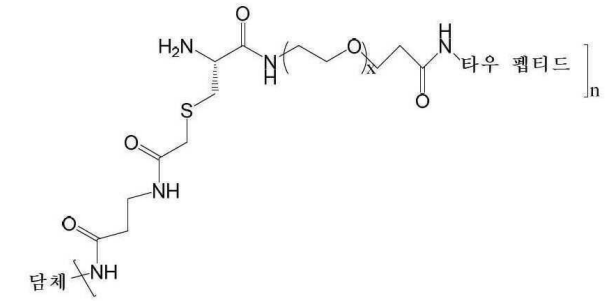
청구범위

청구항 1

타우 포스포펩티드 및

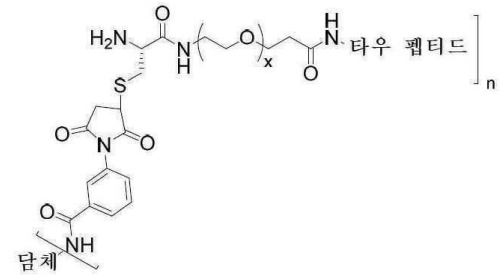
링커를 통해 상기 타우 포스포펩티드에 접합된 면역원성 담체를 포함하는 하기 구조를 가지는 접합체:

(i) 화학식 (I):



또는

(ii) 화학식 (II):



여기서,

x는 0 내지 10, 바람직하게는 2 내지 6, 가장 바람직하게는 3의 정수이고;

n은 3 내지 15, 바람직하게는 3 내지 12의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 면역원성 담체가 열쇠구멍삿갓조개 헤모시아닌 (KLH), 파상풍 톡소이드, CRM197 및 N. 메닌기티디스 (*N. meningitidis*)로부터의 외막 단백질 혼합물, 또는 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체.

청구항 3

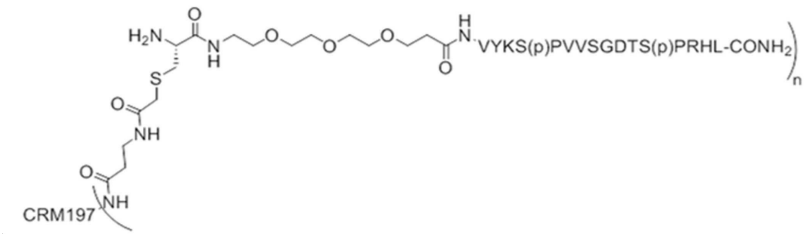
제1항에 있어서, 타우 펩티드가 서열번호 1 내지 3 및 서열번호 5 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 접합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 접합체가 화학식 (I)의 구조를 가지며, 면역원성 담체는 CRM197인 접합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 하기 구조를 가지는 접합체:



여기서, n은 3 내지 7의 정수이고 VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-$CONH_2$는 서열번호 2의 포스포-타우 펩티드를 포함한다.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 애쥬번트를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 애쥬번트가 알루미늄 염 및 CpG 중 적어도 하나를 포함하는 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 애쥬번트가 알루미늄 염 및 CpG를 포함하는 약학 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서, 신경퇴행성 장애를 앓고 있는 대상에서 면역 반응을 유도하기 위한 약제의 제조를 위한, 약학 조성물.

청구항 11

제6항에 있어서, 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상에서 신경퇴행성 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조를 위한, 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 신경퇴행성 질환 또는 장애가 신경원섬유 병변의 형성에 의해 유발되거나 이와 관련된 것인, 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 신경퇴행성 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병, 권투선수 치매, 다운 증후군, 게르스트만 슈트로이슬러 샤잉커 (Gerstmann-Straeussler-Scheinker) 병, 봉입체 근염, 프리온 단백질 뇌 아밀로이드 맥관장애, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 괌의 파킨슨증-치매 복합 (parkinsonism-dementia complex of Guam), 신경원섬유 매듭을 동반하는 비-괌 (non-Guamanian) 운동 신경세포병, 은친화성 과립성 치매 (argyrophilic grain dementia), 피질기저핵변성, 루이 치매 근위축성 측삭 경화증, 석회화가 있는 확산성 신경원섬유 매듭, 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매 (FTDP-17), 할러포르덴-스파츠병 (Hallervorden-Spatz disease), 다계통위축, C형 니만-픽병 (Niemann-Pick disease type C), 픽병, 진행성 피질하 신경교증, 진행성 핵상 마비, 아급성 경화성 범뇌염, 매듭 단독 치매, 뇌염 후 파킨슨증, 근긴장성 이영양증, 만성 외상성 뇌병증 (CTE), 일차 연령 관련 타우병증 (PART) 또는 루이소체 치매 (LBD)인 것인, 약학 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 신경퇴행성 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 파킨슨병, 다운 증후군, 17번 염색체와 연관된 전측두엽 치매 및 파킨슨증 (FTDP-17), 피질기저핵변성, 루이 치매 근위축성 측삭 경화증, 근긴장성 이영양증, 만성 외상성 뇌병증 (CTE), 뇌맥관병증, 일차 연령 관련 타우병증 (PART) 또는 루이소체 치매 (LBD)인 것인, 약학 조성물.

청구항 15

제6항의 약학 조성물을 포함하는 키트로서, 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상에서 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 의약 분야에 관한 것이다. 본 발명은 특히 타우 펩티드의 리포좀 또는 접합체 및 타우병증, 예컨대 알츠하이머병을 예방 또는 치료하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머병 (AD)은 전 세계적으로 어림잡아 약 4 천 4 백만 명에 영향을 끼치는 진행성 쇠약성 신경퇴행성 질환이다 (Alzheimers.net). 현재 임상적으로 이용 가능한 AD 요법은 임상 증상의 진행을 늦추는 것을 목표로 하고 질환 기저를 이루는 병원성 과정을 목표로 하지는 않는다. 불행하게도, 이러한 치료법은 최소 효과만 있으므로 추가적인 예방 및 치료 방법을 개발하고 시험하는 것이 시급하다.

[0003] 알츠하이머병에 대한 특징적인 병리는 응집된 아밀로이드 베타 단백질을 포함하는 세포 외 플라크의 축적 및 과인산화된 타우 단백질의 세포 내 "매듭" 또는 응집이다. 이들 단백질의 축적을 초래하는 분자 사건은 잘 특성화되어 있지 않다. 아밀로이드의 경우, 아밀로이드 전구체 단백질의 비정상적 절단은 아미노산 1-42를 포함하는 응집되기 쉬운 단편의 축적을 초래한다고 가정하고 있다. 타우의 경우, 키나제, 포스파타제 또는 둘 다의 조절 장애가 타우의 비정상적인 인산화를 유발한다고 가정하고 있다. 일단 타우가 과인산화되면, 미세소관을 효과적으로 결합하고 안정화시키는 능력을 상실하고, 대신 영향받은 뉴런의 세포질에 축적된다. 결합되지 않은 과인산화된 타우는 제 1 올리고머 및 이어서 고차 응집체를 형성하는 것으로 보이며, 이의 존재는 아마도 정상적인 축색 돌기 수송의 중단을 통해 이들이 형성하는 뉴런의 기능에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보인다.

[0004] 선진국에서, 알츠하이머병 또는 다른 치매성 타우병증으로 진단된 개인들은 일반적으로 콜린에스테라제 억제제 (예를 들어, Aricept®) 또는 메만틴 (예를 들어, Namenda™)으로 치료된다. 이들 약물은 상당히 내약성이 있지만 효능은 대단치 않다. 예를 들어, Aricept®는 치료받은 개인의 약 50%에서 6-12 개월 동안 증상 악화를 지연시킨다. 나머지 치료법은 비약리학적이며, 인지 능력이 떨어졌을때 환자가 일상 업무를 보다 잘 관리할 수 있도록 하는 데 중점을 둔다.

[0005] 몇몇 공개된 연구 (Asuni AA *et al*,. J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34):9115-29., Theunis C *et al*., PLoS One. 2013; 8(8): e72301., Kontsekova E *et al*., Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1;6(4):44)는 타우 펩티드를 함유하는 활성 백신이 마우스 또는 래트에서 항-타우 면역 반응을 유도할 수 있음을 입증하고; 설치류의 뇌에서 병적인 타우 응집체의 축적을 줄이며; 알츠하이머병의 동물 모델에서 인지 기능 저하의 진행 속도를 줄인 것으로 입증되었다. 병리적 타우 단백질에 대한 활성 백신은 알츠하이머병을 가진 인간 환자에서 면역원성인 것으로 나타났다 (Novak P et al., *Lancet Neurology* 2017, 16:123-134). WO2010/115843호는 알츠하이머병을 포함한 타우병증의 치료에서 치료 및 진단 용도를 위해 단백질 타우의 주요 병리학적 포스포-에피토프 및 관련 조성물을 모방하는 항원성 포스포펩티드를 기술한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 그러나, 현재 타우 매개 질환의 발병을 예방하도록 승인된 효과적인 백신은 아직 없다. 일단 시작되면 질환을 중단하거나 늦추는 효과적인 약물도 시장에 나와 있지 않다. 따라서 이러한 질환을 예방할 수 있는 새로운 예방

조치 (예를 들어, 백신)를 찾아야 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 요약

[0008] 하나의 일반적인 측면에서, 본 발명은

[0009] a. 타우 펩티드, 바람직하게는 타우 포스포펩티드; 및

[0010] b. 헬퍼 T-세포 에피토프를 포함하고,

[0011] 여기서 타우 펩티드는 리포좀의 표면에 존재하는,

[0012] 리포좀에 관한 것이다.

[0013] 일 구체예에서, 리포좀은 톨-유사 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 애쥬번트를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 리포좀은 톨-유사 수용체 4 리간드 및 톨-유사 수용체 9 리간드 중 적어도 하나를 추가로 포함한다.

[0014] 바람직한 구체예에서, 본 발명은

[0015] a. 타우 펩티드, 바람직하게는 타우 포스포펩티드;

[0016] b. 헬퍼 T-세포 에피토프; 및

[0017] c. i. 톨-유사 수용체 9 리간드, 바람직하게는 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드; 및

[0018] ii. 톨-유사 수용체 4 리간드, 바람직하게는 톨-유사 수용체 4 작용제 중의 적어도 하나를 포함하고,

[0019] 여기서 타우 펩티드는 리포좀의 표면에 존재하는,

[0020] 리포좀에 관한 것이다.

[0021] 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명은

[0022] a. 타우 포스포펩티드;

[0023] b. 헬퍼 T-세포 에피토프;

[0024] c. 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드; 및

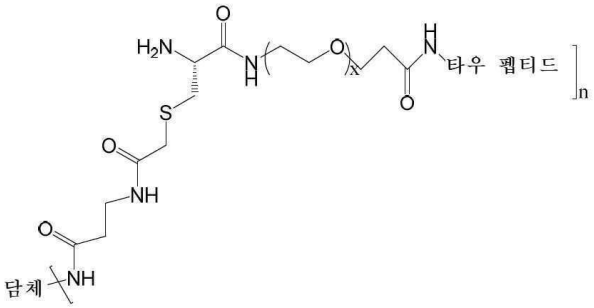
[0025] d. 톨-유사 수용체 4 리간드를 함유하는 애쥬번트를 포함하고,

[0026] 여기서 타우 포스포펩티드는 리포좀의 표면에 존재하는,

[0027] 리포좀에 관한 것이다.

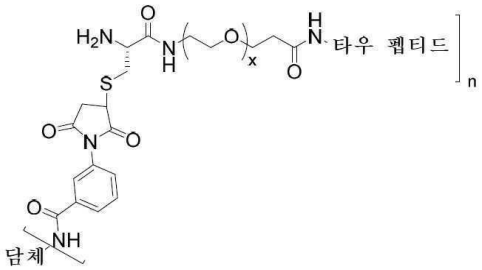
[0028] 다른 일반적인 측면에서, 본 발명은 타우 펩티드, 바람직하게는 타우 포스포펩티드 및 이에 접합된 면역원성 담체를 포함하는 접합체에 관한 것이며, 여기서 타우 펩티드는 링커를 통해 담체에 접합된다. 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP) 및 m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 (MBS) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 본 발명에 유용한 면역원성 담체의 예는 열쇠구멍 삿갓조개 헤모시아닌 (KLH), 파상풍 톡소이드 (TT), CRM197 및 N. 메닌기티디스 (*N. meningitidis*)로부터의 외막 단백질 혼합물 (OMP), 또는 이의 유도체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 하나의 바람직한 구체예에서, 본 발명은 하기 화학식 (I)의 구조 또는 화학식 (II)의 구조를 가지는 접합체에 관한 것이다:



(I)

[0030]



(II)

[0031]

[0032] 상기 식에서,

[0033] x는 0 내지 10, 바람직하게는 2 내지 6, 가장 바람직하게는 3의 정수이며;

[0034] n은 2 내지 11, 바람직하게는 3 내지 11의 정수이다.

[0035] 본 발명의 추가의 측면은 본 발명의 리포좀 또는 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물, 약학 조성물의 제조 방법 및 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방이 필요한 대상에서 타우에 대한 면역 반응을 유도하거나 상기 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0036] 일 구체예에서, 본 발명은 신경퇴행성 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상에서 면역 반응을 유도하거나 이의 대상에서 신경퇴행성 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본 발명의 리포좀 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물, 또는 본 발명의 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 본 방법은 프라이밍 면역화를 위해 본 발명의 약학 조성물, 및 면역 강화를 위해 본 발명의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0037] 본 발명의 추가의 측면, 특징 및 이점은 이하의 본 발명의 상세한 설명 및 청구 범위를 읽음으로써 더 잘 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0038] 전술한 요약 및 본 출원의 바람직한 구체예에 대한 다음의 상세한 설명은 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 본 출원은 도면에 도시된 정확한 구체예로 제한되지 않음을 이해해야 한다.

도 1은 본 발명의 일 구체예에 따른 신규 백신: 본 발명의 일 구체예에 따른 타우 리포좀 (위) 및 본 발명의 일 구체예에 따른 타우 접합체 (아래)를 도시한다;

도 2는 캡슐화된 헬퍼 T-세포 에피토프 (예를 들어, 파상풍 폴리펩티드 (tet))를 함유하는 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 (2 세대 리포좀)을 포함하는 백신이 헬퍼 T-세포를 활성화함을 도시한다;

도 3은 비-자기 또는 면역원성 담체 단백질을 함유하는 본 발명의 일 구체예에 따른 접합체를 포함하는 백신이 헬퍼 T-세포를 활성화시킴을 도시한다;

도 4는 본 발명의 구체예에 따른 타우 백신이 붉은털원숭이에서 지속적인 고역가 항-인산화 타우 항체를 유도함을 나타낸다: 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)에 의해 측정된 그룹당 종점 역가의 경시 기하 평균은 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 (리포좀 Z)을 포함하는 백신 또는 본 발명의 일 구체예에 따른 접합체 (Conjugate

A)를 포함하는 백신이 헬퍼 T-세포 에피토프가 없는 대조 리포좀 백신에 비해 더 높다;

도 5는 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 (리포좀 Z)으로 면역화된 붉은털원숭이로부터의 혈청이 건강한 인간 뇌 부분 (오른쪽 패널)과 비교하여 인간 AD 뇌 부분 (왼쪽 패널)에서 병리적 타우 구조에 결합함을 도시한다;

도 6은 가용성 CpG 및 수산화알룸을 함유하는 조성물에서 제형화된 본 발명의 일 구체예에 따른 접합체 (접합체 A)로 면역화된 붉은털원숭이로부터의 혈청이 건강한 인간의 뇌 부분 (하단 행)과 비교하여 인간 AD 뇌 부분에서 병리적 타우 구조 (상단 행)에 결합함을 도시한다;

도 7은 본 발명의 구체예에 따른 리포좀 백신, 각각 캡슐화된 T-세포 에피토프 T50 및 하나 이상의 애쥬번트를 함유하는 리포좀 X, Y 및 Z에 의해 유도된 붉은털원숭이에서의 항-인산화된 타우 항체의 역가를 나타낸다; 역가는 ELISA에 의해 측정되었고 개별 원숭이에서 경시적인 종점 역가로 제시되다. 특히:

도 7A는 애쥬번트로서 TLR4 리간드, MPLA (3D-(6-아실) PHAD®)만을 가지는 리포좀 X에 의해 유도된 항-인산화된 타우 항체의 역가를 도시한다;

도 7B는 애쥬번트로서 TLR9 리간드 (지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드)만을 가지는 리포좀 Y에 의해 유도된 항-인산화된 타우 항체의 역가를 도시한다;

도 7C는 애쥬번트로서 TLR4 리간드, MPLA (3D-(6-아실) PHAD®) 및 TLR9 리간드 (지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드)의 조합을 가지는 리포좀 Z에 의해 유도된 항-인산화 타우 항체의 역가를 도시하고, 또한 두 애쥬번트의 조합이 개별 원숭이들 사이에서 항체 역가의 변동성을 덜 유발한다는 것을 보여준다;

도 7D는 상기 언급된 면역화 그룹 및 TLR4 리간드, MPLA를 갖지만 T-세포 에피토프가 없는 대조 리포좀 백신의 항체 역가의 기하 평균을 제시하고, 본 발명의 구체예에 따른 백신이 대조군 리포좀 백신보다 더 높은 항체 역가의 항-인산화된 타우 항체로 이어짐을 나타낸다: 역가는 ELISA에 의해 측정되었고 경시적인 그룹당 종점 역가의 기하 평균 +/- 95% 신뢰 구간으로 제시된다;

도 8은 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 백신 (예를 들어, 리포좀 X, Y 또는 Z) 또는 접합체 백신 (접합체 A)을 사용한 면역화가 알츠하이머병 환자의 사후 뇌로부터 단리된 농축된 쌍 나선형 필라멘트 (ePHF)에 특이적인 항체 IgG 역가를 유도함을 보여준다: 항체 역가는 MSD (Meso Scale Discovery) 기술에 의해 측정되었고, 50 일에 개별 원숭이에 대한 값 및 일차 면역화 후 기하 평균 +/- 95% CI로서 제시된다;

도 9는 애쥬번트로 TLR4 리간드 (3D-(6-아실) PHAD®) 및 TLR9 리간드 (지질화 CpG 올리고뉴클레오티드)의 조합 및 캡슐화된 T50을 함유하는 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 백신 (리포좀 Z)에 의한 면역화가 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드의 N-말단에 주로 결합하는 항체를 유도하는데 반해 (도 9A), 본 발명의 일 구체예에 따른 접합체 백신 (접합체 A)으로 면역화된 원숭이는 인산화된 펩티드 (왼쪽) 및 비인산화된 펩티드 (오른쪽) 둘 다에 대해 펩티드의 C-말단 부분에 주로 결합하는 IgG 항체를 생성함 (도 9B)을 도시한다;

도 10A 및 B는 애쥬번트로서 TLR4 리간드 (3D-(6-아실) PHAD®) 및 캡슐화된 T-세포 에피토프 T50을 함유하는 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 백신에 의한 백신 접종이 마우스에서 대조군 리포좀 백신 (TLR4 리간드, 3D-(6-아실) PHAD®를 갖지만 T-세포 에피토프 T50, 리포좀 R을 갖지 않음) 및 또한 표면 T-세포 에피토프 T57 (디팔미토일화된 T50) 및 TLR4 리간드 (3D-(6-아실) PHAD®, 리포좀 T)을 함유하는 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 백신보다 현저히 높은 항체 역가를 유도함을 보여준다: 일차 면역화 후 21 일 (도 10A) 및 35 일 (도 10B)에서 항체 역가를 ELISA에 의해 측정하고 개별 값 및 그룹당 기하 평균 ± 95% CI로 제시됨; (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$);

도 11은 T-세포 펩티드 T48 또는 T52의 리포좀 (각각 리포좀 M 또는 N)으로의 캡슐화가 마우스에서 캡슐화된 펩티드에 특이적인 T-세포 반응을 유도함을 나타낸다: T-세포 반응은 IFN-γ (도 11A) 및 IL-4 (도 11B) ELISPOT로 평가하였음;

도 12는 캡슐화된 T-세포 에피토프 (리포좀 L)를 포함하는 리포좀 백신 및 고정된 T-세포 에피토프 (리포좀 O)를 포함하는 리포좀 백신이 각각 T-세포 에피토프가 없는 대조군 리포좀 백신보다 더 높은 타우 포스포펩티드-특이적 항체 역가를 유도함을 보여준다; 리포좀 L, 리포좀 O 및 대조군 리포좀은 각각 애쥬번트로서 MPLA를 추가로 함유함;

도 13은 타우 접합체 (KLH-TAUVAC-p7.1 또는 KLH-TAUVAC-p22.1)가 야생형 마우스에서 타우 펩티드에 대한 TfH

세포 및 강력한 Ab 역가를 유도함을 보여주며, 특히:

도 13A는 성체 암컷 Balb/C 마우스 그룹 (그룹 당 n = 14)을 100 ug 애쥬번트된 KLH-타우 접합체 백신 (KLH-TAUVAC-p7.1 또는 KLH-TAUVAC-p22.1), 활성 플라시보 백신 (KLH + 알룸 또는 Ribi) 또는 비활성 플라시보 (PBS)로 총 4 회 표시된 스케줄에 따라 면역화되었음을 나타낸다: 일차 면역화 7 일 후 각 면역화 그룹에서 4 마리의 동물을 희생시키고 주사 부위 배액으로 림프절을 수집함;

도 13B는 배액 절에서 면역화 그룹 (개별적으로 분석된 그룹당 n = 4 마리 마우스)에 의한 TfH의 기하 평균 백분율을 나타낸다: 활성 백신 또는 플라시보를 투여받은 모든 그룹은 측정 가능한 TfH를 가졌다; 또한, 백신 KLH-TAUVAC-p7.1, KLH-TAUVAC-p22.1 또는 활성 플라시보 KLH + 알룸을 투여받은 동물은 비활성 플라시보가 주어진 동물보다 현저히 많은 TfH를 가졌다 (KLH-TAUVAC-p7.1의 경우 p = 0.0044; KLH-TAUVAC-p22.1의 경우 p = 0.0482; KLH의 경우 p = 0.0063, ANOVA 검정을 사용한 후 다중 비교를 위한 듀넷 (Dunnett) 조정);

도 13C 내지 H는 95% 신뢰 구간으로 그룹 평균 (n = 5-10)에 대한 면역화 후 네 시점 (14, 28, 56 및 84 일)에서 기준선 (0 일)으로부터 혈청 역가의 변화를 나타낸다: 별표는 KLH-TAUVAC-유도된 항체 반응이 활성 플라시보에 의해 유도된 것보다 유의하게 높은 시점을 나타낸다 ($p \leq 0.05$, ANOVA 검정 후 다중 비교를 위해 터키 (Tukey) 조정을 사용하여 측정);

도 13C는 인산화된 타우 펩티드 p7.1에 대한 결합 역가를 도시한다;

도 13D는 인산화된 타우 펩티드 p22.1에 대한 결합 역가를 도시한다;

도 13E는 비인산화된 타우 펩티드 7.1에 대한 결합 역가를 도시한다;

도 13F는 비인산화된 타우 펩티드 22.1에 대한 결합 역가를 도시한다;

도 13G 및 H는 각각 담체 단백질 KLH에 대한 결합 역가를 도시한다;

도 14는 타우 접합체로 면역화된 마우스로부터의 혈청이 또한 다른 타우병증으로부터의 병리적 타우 구조에 결합함을 나타낸다: 일차 면역화 후 84 일에 각 백신 접종 그룹으로부터의 풀링된 혈청 (n = 6)이 MAPT 돌연변이가 있는 전측두엽 치매 사례 (MAPT P301S, 전두 피질), 픽병이 있는 사례 (전두 피질), 진행성 핵상 마비 (PSP, 미상핵) 및 일차 연령 관련 타우병증 (PART, 해마)로부터의 뇌 조직을 염색하는데 사용되었다; 활성 백신을 투여한 동물로부터의 혈청은 각 타우병증의 전형적인 타우 관련 구조를 강조한 반면, 활성 플라시보 (KLH-알룸 또는 KLH-Ribi) 또는 비활성 물질 (PBS)로 면역화된 동물로부터의 혈청은 이들 구조 중 어느 것도 염색하지 않았다; 참조로, 상응하는 영역의 AT8에 의한 면역 염색이 도시되어 있으며; 스케일 바 = 50 um;

도 15는 백신-유도된 항체가 가속화된 타우병증 모델에서 응집된 타우를 감소시킴을 나타낸다. 특히:

도 15A: 3 개월령 P301L 트랜스제닉 마우스 (그룹당 n = 15)에게 KLH-TAUVAC-p7.1 + RIBI 또는 활성 플라시보 KLH + RIBI으로 면역화된 마우스로부터 정제된 IgG와 예비 인큐베이션된 인간 ePHF를 정위 주사하고; 주사 2 개월 후, 모든 마우스를 희생시킨 뒤, 마우스에서 응집된 타우의 양을 총 분획 및 사르코실-불용성 분획으로 측정하였다;

도 15B 및 15C: 각 동물의 주사된 반구로부터 수집된 총 분획 (B) 및 사르코 실-불용성 분획 (C): 그래프는 MSD에 의해 측정된 타우의 양을 나타내고; 총 분획 및 불용성 분획 모두에서, KLH-TAUVAC-p7.1 면역화 마우스로부터의 IgG와 예비 인큐베이션된 ePHF가 투여된 마우스의 뇌는 대조군 항체와 예비 인큐베이션된 ePHF가 투여된 마우스보다 응집된 타우가 상당히 적었다. ($p < 0.0001$, ANOVA 검정을 사용한 후 다중 비교를 위해 홀름-본페로니 (Holm-Bonferroni) 조정);

도 16은 본 발명의 일 구체예에 따른 타우 접합체 (접합체 B)가 비인간 영장류에서 인산화된 타우 및 ePHF에 대해 높은 역가의 항체를 유도함을 보여준다: 붉은털원숭이는 1, 29, 85 및 169 일에 알룸 및 CpG 애쥬번트된 KLH-TAUVAC-p7.1 (n = 6) 또는 KLH (n = 2)로 면역화되었고; 혈액은 14 일마다 수집되었다. 특히:

도 16A: KLH-TAUVAC-p7.1로 면역화된 동물로부터의 혈청을 ELISA를 사용하여 면역화 펩티드 p7.1에 대한 반응성에 대해 시험하였다;

도 16B: 일차 면역화 후 50 일에 모든 동물로부터 수집된 혈청은 MSD를 사용하여 인간 ePHF에 대해 측정 가능한 항체 수준을 가졌으며, 6 마리 중 3 마리는 이 항원에 대해 높은 반응성을 나타냈다;

도 16C: 일차 면역화 후 50 일에 동물로부터 수집된 혈청을 건강한 개인 또는 AD 환자로부터의 인간 뇌 부분에

적용하였는데, KLH-TAUVAC-p7.1 그룹으로부터의 면역 후 혈청은 병리적 타우 구조, 즉 AD 뇌 조직에서 신경원섬유 매듭, 신경망 가닥 및 신경반을 염색시킨 반면, KLH-면역화된 마우스로부터의 혈청은 어떠한 반응성도 나타내지 않았으며, 대조군 조직에서 염색은 관찰되지 않았다;

도 16D: 타우 면역 고갈 분석에서 시험한 경우, KLH-TAUVAC-p7.1이 투여된 동물은 타우 종자에 결합하여 고갈시킬 수 있는 항체를 가졌고 (50 일에 ANOVA 검정을 사용한 후 다중 비교를 위해 듀넷 조정 후 $p = 0.03$), 반면에 KLH에 의한 면역화는 이러한 항체를 유발하지 않았다;

도 16E: 면역화 전 및 면역화 후 혈청을 연속 희석된 개별 샘플로서 중화 분석에서 또한 시험하였다; 기준선으로부터의 변화 (CFB)를 백신 접종 전 -14 일 (기준선) 및 백신 접종 후 50, 106 및 190 일에 각각 판독에 대한 FRET 계수 간 차이로 계산하였다. 이어 백신 접종 후 특정 일 ($일_i$)에서의 반응을 다음과 같이 계산하였다: $반응 = \%FRET_일_i - \%FRET_기준선$; 랜덤 효과로서의 동물과 함께, 상기 언급된 반응에 대한 일반적인 선형 혼합 모델에 변수 백신 그룹, 범주형 변수로 처리된 일차 및 혈청 수준 및 이들의 모든 상호 작용을 적용하였다;

도 17은 본 발명의 일 구체예에 따른 접합체 백신 (접합체 A) 및 수산화알룸 (알룸) 및 올리고 CpG (CpG) 애쥬번트와의 조합으로 면역화된 마우스가 백신 펩티드에 대해 더 높은 역가의 항체 반응을 초래함을 보여준다: 성체 암컷 C57BL/6 마우스 (그룹당 $n = 5$-6)를 2 ug 또는 0.2 ug의 접합체 A 백신으로 근육 내 면역화시키고, 접합체 백신을 알룸, CpG 단독, 또는 알룸과 CpG의 조합을 투여하고; 모든 마우스에 연구 0 일에 일차 면역화시키고 28 일에 단일 부스터 면역화시켰다; 알룸 애쥬번트의 용량은 주사 당 500 ug/마우스였고, CpG 애쥬번트의 용량은 주사 당 20 ug/마우스였다; 그래프는 코팅 항원으로서 백신 펩티드 T3.5를 사용하여 면역화된 마우스로부터 수집된 혈청을 사용한 ELISA 결합 결과를 보여주고, 면역화 전 (0 일) 및 면역화 후 두 시점 (28 및 42 일)에 플롯된 그룹 당 T3.5 특이적 종말점 역가를 갖고, 표준 오차를 나타내는 오차 막대를 가지며; 표는 비모수적 크러스칼-왈리스 검정 (Kruskal-Wallis Test)을 사용하여 항체 역가를 비교한 결과의 통계적 분석을 보여주며, 크러스칼-왈리스 검정 후 윌콕슨 부호-서열 검정 (Wilcoxon Signed Rank Test)을 사용하여 쌍별 그룹 비교를 평가하였다. 특히:

도 17A: 마우스를 2 ug의 접합체 A 백신으로 면역화시켰다;

도 17B: 마우스를 0.2 ug의 접합체 A 백신으로 면역화시켰다;

도 18은 상이한 비율의 타우 펩티드 대 T-세포 에피토프를 갖는 본 발명의 구체예에 따른 타우 백신이 붉은털원숭이에서 지속된 고역가 항-인산화 타우 항체를 유도함을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 발명의 상세한 설명

[0040] 다양한 간행물, 논문, 및 특허가 배경기술과 본 명세서 전반에 걸쳐 인용 또는 기재되어 있으며; 이들 참고문헌은 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 재료, 디바이스, 물품 등에 대한 논의는 본 발명에 대한 상황을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러한 논의는 이들 대상 중 임의의 것 또는 모든 것이 개시되거나 청구된 임의의 발명에 대하여 종래 기술의 일부를 형성한다고 인정하는 것은 아니다.

[0041] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그렇지 않으면, 본 명세서에 사용된 소정의 용어는 본 명세서에 제시된 바와 같은 의미를 갖는다.

[0042] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태는, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다.

[0043] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 농도 또는 농도 범위와 같은 임의의 수치 값은 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 수치 값은 전형적으로 인용된 값의 ±10%를 포함한다. 예를 들어, 1 mg/mL의 농도는 0.9 mg/mL 내지 1.1 mg/mL를 포함한다. 마찬가지로, 1% 내지 10% (w/v)의 농도 범위는 0.9% (w/v) 내지 11% (w/v)를 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 수치 범위의 사용은 모든 가능한 하위범위, 그 범위 내의 모든 개별 수치 값, 예를 들어 그러한 범위 내의 정수 및 값의 분율을 명시적으로 포함한다.

[0044] 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소 앞에 있는 "적어도"라는 용어는 시리즈의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이

해되어야 한다. 당업자는 본원에 기술된 본 발명의 특정 구체예에 대한 많은 등가물을 일상적인 실험을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0045] 본원에 사용된 용어 "포함하다", "포함하는", "포함한다", "포함한", "가지고 있다", "갖는", "함유하다" 또는 "함유하는" 또는 이의 임의의 다른 변형이 언급된 정수 또는 정수 그룹을 포함하지만 다른 정수 또는 정수 그룹을 배제하지 않는 것을 의미하며 비배타적이거나 개방적인 것으로 의도된 것임이 이해될 것이다. 예를 들어, 요소 목록을 포함하는 조성물, 혼합물, 공정, 방법, 물품 또는 장치는 반드시 이들 요소에만 한정되는 것은 아니며, 그러한 조성물, 혼합물, 공정, 방법, 물품 또는 장치에 명시적으로 열거 또는 고유하지 않은 다른 성분을 포함할 수 있다. 또한, 반대로 명시적으로 언급되지 않는 한, "또는"은 배타적 또는 배타적이지 않은 것을 의미한다. 예를 들어, 조건 A 또는 B는 다음 중 하나에 의해 충족된다. A가 사실 (또는 존재), B가 사실이 아님 (또는 존재하지 않음)이고, A가 사실이 아님 (또는 존재하지 않음), B가 사실 (또는 존재함)이고, A와 B가 모두 사실 (또는 존재함)이다.

[0046] 또한, 본 발명의 구성 요소의 치수 또는 특성을 언급할 때 본원에 사용된 용어 "약", "대략", "일반적으로", "실질적으로" 및 유사한 용어는 기술된 치수/특성이 엄격한 경계 또는 파라미터가 아니며, 당업자에게 이해되는 바와 같이 기능상 동일하거나 유사한 작은 변형을 배제하지 않음을 가리키는 것으로 이해되어야 한다. 최소한, 수치 파라미터를 포함하는 이러한 참조는 당 업계에서 허용되는 수학적 및 산업적 원리 (예를 들어, 반올림, 측정 또는 다른 체계적 오차, 제조 공차 등)를 사용하여 최소 유효 자릿수를 변화시키지 않는 변형을 포함할 것이다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "타우" 또는 "타우 단백질" (미세소관 관련 단백질 타우, MAPT, 신경원섬유 매듭 단백질, 쌍 나선형 필라멘트-타우, PHF-타우, MAPTL, MTBT1이라고도 함)은 다수의 이소형을 갖는 풍부한 중추 및 말초 신경계 단백질을 지칭한다. 인간 중추 신경계 (CNS)에는, 선택적 스플라이싱으로 인해 크기가 352 내지 441 아미노산 길이의 범위인 6개의 주요 타우 이소형이 존재한다 ([Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009]). 타우의 예는 CNS에서의 타우 이소형, 예를 들어 4 개의 반복체 및 2 개의 삽입체를 갖는 441-아미노산 최장 타우 이소형 (4R2N) 및 3 개의 반복체 및 삽입체를 갖지 않는 352-아미노산 길이 최단 (태아) 타우 이소형 (3R0N)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 타우의 예는 또한 300 개의 추가 잔기 (엑손 4a)를 함유하는 말초 신경에서 발현된 "빅 타우" 이소형을 포함한다. Friedhoff et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1502 (2000) 122-132. 타우의 예는 mRNA 전사체 6762 뉴클레오티드 길이 (NM_016835.4)에 의해 코딩된 758 아미노산-길이 단백질인 인간 빅 타우, 또는 이의 이소형을 포함한다. 예시된 인간 빅 타우의 아미노산 서열은 유전자 은행 수탁 번호 NP_058519.3에 제시되어 있다. 본원에 사용된 용어 "타우"는 인간 이외의 종, 예컨대 필리핀 원숭이 (Macaca Fascicularis) (사이노몰거스 원숭이) 또는 Pan troglodytes (침팬지)으로부터의 타우 상동체를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "타우"는 돌연변이, 예를 들어, 전장 야생형 타우의 점 돌연변이, 단편, 삽입, 결실, 및 스플라이스 변이체를 포함하는 단백질을 포함한다. 용어 "타우"는 또한, 타우 아미노산 서열의 번역후 변형을 포함한다. 번역후 변형은 인산화를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0048] 본원에 사용된 용어 "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산 잔기, 관련 자연 발생 구조 변이체 및 펩티드 결합을 통해 연결된 이의 합성 비자연 발생 유사체로 구성된 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 임의의 크기, 구조 또는 기능의 펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 펩티드는 적어도 3 개의 아미노산 길이를 가진다. 펩티드는 자연 발생, 재조합 또는 합성, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 합성 펩티드는 예를 들어 자동 폴리펩티드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 타우 펩티드의 예는 약 5 내지 약 30 개 아미노산 길이, 바람직하게는 약 10 내지 약 25 개 아미노산 길이, 더욱 바람직하게는 약 16 내지 약 21 개 아미노산 길이의 타우 단백질의 임의의 펩티드를 포함한다. 본 개시에서, 펩티드는 표준 3 또는 1 문자 아미노산 약어를 사용하여 N에서 C 말단으로 열거되며, 여기서 포스포 잔기는 "p"로 표시된다. 본 발명에 유용한 타우 펩티드의 예는 서열 번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 타우 펩티드, 또는 서열 번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 타우 펩티드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0049] 본원에 사용된 용어 "포스포펩티드" 또는 "포스포-에피토프"는 하나 이상의 아미노산 잔기에서 인산화되는 펩티드를 지칭한다. 타우 포스포펩티드의 예는 하나 이상의 인산화된 아미노산 잔기를 포함하는 임의의 타우 펩티드를 포함한다. 본 발명에 유용한 타우 포스포펩티드의 예는 서열 번호 1 내지 3 또는 5 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 타우 포스포펩티드, 또는 서열 번호 1 내지 3 또는 5 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 타우 포스포펩티드를 포함하나,

이에 제한되지는 않는다.

[0050] 본 발명의 타우 펩티드는 고상 펩티드 합성 또는 재조합 발현 시스템에 의해 합성될 수 있다. 자동 펩티드 합성기는 Applied Biosystems (캘리포니아 포스터 시티 소재)와 같은 수많은 공급업체로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 재조합 발현 시스템은 대장균과 같은 박테리아, 효모, 곤충 세포 또는 포유동물 세포를 포함할 수 있다. 재조합 발현 절차는 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989)]에 의해 설명된다.

[0051] 타우는 인간 "자기" 단백질이다. 이는 원칙적으로, 타우에 특이적인 수용체를 갖는 모든 림프구가 발달하는 동안 결실되거나 (중추 관용), 말초 관용 메커니즘에 의해 반응하지 않아야 한다는 것을 의미한다. 이 문제는 자기 또는 "변경된 자기" 단백질 (예를 들어, 종양 항원)에 대한 백신 개발에 중요한 장애물로 판명되었다.

[0052] 항원 (자기 또는 감염성)에 대한 고품질 항체를 생성하는 것은 항체를 생성하는 B 림프구뿐만 아니라 $CD4^+$ T "헬퍼" 림프구의 작용을 필요로 한다. $CD4^+$ T-세포는 B 림프구에 결정적인 생존 및 성숙 신호를 제공하고, $CD4^+$ T-세포 결핍 동물은 상당히 면역억제된다. $CD4^+$ T-세포는 또한 관용 메카니즘의 적용을 받으며, 강력한 항-자기 (예를 들어, 항-타우) 항체 반응을 생성하는 데 있어 추가 장애는 타우 반응성 $CD4^+$ T-세포가 인간/동물 레퍼토리에 희귀 내지는 존재하지 않는다는 것이다.

[0053] 이론에 구애없이, 본 발명의 범위를 제한하지 않는 방식으로, 본 발명의 백신 조성물에 의해 이러한 문제를 피해갈 수 있을 것으로 여겨진다.

[0054] 일 구체예에서, 대부분 또는 모든 HLA DR (인간 백혈구 항원-항원 D 관련) 분자에 결합할 수 있는 T-세포 에피토프를 또한 포함하는 타우 펩티드를 포함하는 리포좀 (일례가 도 1에 도시됨; 상단)이 생성된다. 이어서 T-세포 에피토프는 $CD4^+$ T-세포를 활성화할 수 있으며 타우-특이적 B-세포에 필수적인 성숙 및 생존 신호를 제공한다 (도 2). 다른 구체예에서, 타우 펩티드와 담체 단백질의 접합체가 생성되고 (일례가 도 1에 도시됨; 하단), 강력한 헬퍼 T-세포 반응을 생성한다 (도 3). 이 구체예에서, 담체-특이적 T-세포가 생존 및 성숙 신호를 자기 반응성 B-세포에 제공하는 "비-연결 인식"이 사용된다. 따라서, 타우-특이적 B-세포는 친화도 성숙, 면역글로불린 클래스 스위칭을 유발하고 장기 기억 풀을 확립하는 데 중요한 신호를 수신한다. 타우 리포좀 및 타우 접합체는 동종 또는 이종 면역 체계에서 타우 항원에 대한 고품질 항체를 생성하는데 사용될 수 있으며, 이때 리포좀 또는 접합체는 프라임 및/또는 부스트에 사용된다.

[0055] *리포좀*

[0056] 하나의 일반적인 측면에서, 본 발명은

[0057] a. 타우 펩티드, 바람직하게는 타우 포스포펩티드; 및

[0058] b. 헬퍼 T-세포 에피토프를 포함하고,

[0059] 여기서 타우 펩티드는 리포좀의 표면에 존재하는,

[0060] 리포좀에 관한 것이다.

[0061] 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀은 또한 본원에서 "개선된 리포좀", "개선된 리포좀 백신" 또는 "본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀 백신" 또는 "타우 리포좀" 또는 "2 세대 리포좀"의 "최적화된 리포좀 백신"으로 지칭된다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "리포좀"은 일반적으로 지질 함량이 높은 물질, 예를 들어 인지질, 콜레스테롤로 만들어진 지질 소포를 지칭한다. 이들 소포의 지질은 일반적으로 지질 이중층 형태로 조직된다. 지질 이중층은 일반적으로 지질 이중층의 다수의 양파-유사 쉘 사이에 산재되어 다중 라멜라 지질 소포 (MLV)를 형성하거나 무정형 중앙 공동 내에 함유된 부피를 캡슐화한다. 무정형 중심 공동을 갖는 지질 소포는 단일라멜라 지질 소포, 즉 공동을 둘러싸는 단일 말초 이중층을 갖는 것이다. 큰 단일 라멜라 소포 (LUV)는 일반적으로 100 nm 내지 수 마이크로미터, 예컨대 100 내지 200 nm 이상의 직경을 갖는 반면, 작은 단일 라멜라소포 (SUV)는 일반적으로 100 nm 미만, 예를 들어 20 내지 100 nm, 전형적으로 15 내지 30 mm의 직경을 갖는다.

[0063] 특정 구체예에 따라, 리포좀은 하나 이상의 타우 펩티드를 포함한다. 특정 구체예에 따라, 리포좀의 타우 펩티드는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0064] 당업자에게 공지된 임의의 적합한 타우 펩티드가 본 개시에 비추어 본 발명에 사용될 수 있다. 특정 구체예에 따라, 하나 이상의 타우 펩티드는 서열 번호 1 내지 12 중 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 하나 이상의 타우 펩티드는 서열 번호 1 내지 12 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 아미노산 잔기 중 어느 것도 인산화되지 않거나, 하나 이상의 아미노산 잔기가 인산화된다.

[0065] 특정 구체예에 따라, 하나 이상의 타우 펩티드는 타우 포스포펩티드이다. 특정 구체예에 따라, 하나 이상의 타우 포스포펩티드는 서열 번호 1 내지 3 또는 5 내지 12 중 하나의 아미노산 서열 또는 서열 번호 1 내지 3 또는 5 내지 12 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 제시된 아미노산 잔기 중 하나 이상은 인산화 된다. 바람직하게는, 타우 포스포펩티드는 서열 1 내지 3 중 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 타우 펩티드는 아미드화된 C-말단을 가질 수 있다.

[0066] 본 출원의 구체예에 따라, 타우 펩티드는 리포좀의 표면에 존재한다. 타우 펩티드, 바람직하게는 타우 포스포펩티드는 본 개시에 비추어 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 리포좀의 표면에 존재할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제8,647,631호 및 9,687,447호의 관련 개시 내용을 참조하며, 그 내용은 본원에 참고로 포함된다. 특정 구체예에 따라, 포스포펩티드를 포함하는 하나 이상의 타우 펩티드는 타우 펩티드가 리포좀의 표면 상에 제시될 수 있도록 팔미토일화 또는 도데실 변형과 같은 하나 이상의 변형을 추가로 포함한다. 추가 아미노산 잔기, 예컨대 Lys, Cys 또는 때로는 Ser 또는 Thr이 용이한 변형을 위해 타우 펩티드에 첨가될 수 있다. 지질 앵커의 위치는 상이한 형태의 펩티드 서열을 유도하는 것으로 보고되었다 (Hickman et al., J. Biol. Chem. vol. 286, NO. 16, pp. 13966-13976, April 22, 2011). 이론에 구애없이, 양쪽 말단에 소수성 부분을 첨가하면 타우 펩티드의 병리학적 베타-시트 형태를 증가시킬 수 있다고 여겨진다. 따라서, 하나 이상의 타우 펩티드는 양쪽 말단에 소수성 부분을 추가로 포함한다. 변형된 타우 펩티드는 아미드화된 C-말단을 가질 수 있다. 바람직하게는, 리포좀의 표면 상에 제시된 타우 펩티드는 서열 번호 27 내지 서열 번호 38 중 하나의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "헬퍼 T-세포 에피토프"는 헬퍼 T-세포에 의해 인식될 수 있는 에피토프를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 헬퍼 T-세포 에피토프의 예는 파상풍 톡소이드 (예를 들어, P2 및 P30 에피토프, 또한 각각 T2 및 T30으로도 지칭됨), B 형 간염 표면 항원, 콜레라 독소 B, 톡소이드, 디프테리아 톡소이드, 홍역 바이러스 F 단백질, 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*) 주요 외막 단백질, 열대열말라리아원충 (*Plasmodium falciparum*) circumsporozite T, 열대열말라리아원충 CS 항원, 만손주혈흡충 (Schistosoma mansoni) 트리오스 포스페이트 이소머라제, 백일해 (*Bordetella pertussis*), 파상풍 (*Clostridium tetani*), 퍼투사리아 트라키탈리나 (*Pertusaria trachythallina*), 대장균 (*Escherichia coli*) TraT, 및 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA)을 포함하나 이들에만 제한되지는 않는다.

[0068] 당업자에게 공지된 임의의 적합한 헬퍼 T-세포 에피토프가 본 개시에 비추어 본 발명에 사용될 수 있다. 특정 구체예에 따라, 헬퍼 T-세포 에피토프는 서열 번호 23 내지 서열 번호 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 헬퍼 T-세포 에피토프는 하나 이상의 아미노산, 예를 들어 Val (V), Ala (A), Arg (R), Gly (G), Ser (S), Lys (K)을 포함하는 펩티드 링커와 같은 링커를 통해 함께 융합된 서열 23 내지 서열 26의 2 이상의 아미노산 서열을 포함한다. 링커의 길이는 바람직하게는 1-5 아미노산으로 다양할 수 있다. 바람직하게는, 헬퍼 T-세포 에피토프는 VVR, GS, RR, RK로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 링커를 통해 함께 융합된 서열 번호 23 내지 서열 번호 26의 3 개 이상의 아미노산 서열을 포함한다. 헬퍼 T-세포 에피토프는 아미드화된 C-말단을 가질 수 있다.

[0069] 본 출원의 구체예에 따르면, 헬퍼 T-세포 에피토프는 예를 들어 공유 결합된 소수성 모이어티에 의해 고정된 리포좀 표면에 도입될 수 있으며, 상기 소수성 모이어티는 알킬기, 지방산, 트리글리세리드, 디글리세리드, 스테로이드, 스핑고지 질, 당지질 또는 인지질, 특히 3 개 이상의 탄소 원자, 특히 4 개 이상의 탄소 원자, 특히 6 개 이상의 탄소 원자, 특히 8 개 이상의 탄소 원자, 특히 12 개 이상의 탄소 원자, 특히 16 개 이상의 탄소 원자의 탄소 백본을 갖는 알킬기 또는 지방산이다. 본 발명의 일 구체예에서, 소수성 부분은 팔미트산이다. 대안적으로, 헬퍼 T-세포 에피토프는 리포좀에 캡슐화될 수 있다. 특정 구체예에 따라, 헬퍼 T-세포 에피토프는 리포좀에 캡슐화된다.

[0070] 헬퍼 T-세포 에피토프는 본 개시에 비추어 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 리포좀에서 이의 원하는 위치에서 변형될 수 있다. 특정 구체예에 따라, 본 발명에 유용한 헬퍼 T-세포 에피토프는 서열 번호 39 내지 서열 번호 44 중 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 헬퍼 T 세포 에피토프는 서열 번호 13 내지 서열 번호

17로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진다.

[0071] 특정 구체예에 따라, 리포좀은 타우 펩티드 및 헬퍼 T-세포 에피토프를 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 또는 6:1의 중량비로 포함한다.

[0072] 일 구체예에서, 리포좀은 톨-유사 수용체 리간드를 포함하는 적어도 하나의 애쥬번트를 추가로 포함한다. 따라서, 또 다른 일반적인 측면에서, 본 발명은

[0073] a. 타우 펩티드, 바람직하게는 타우 포스포펩티드;

[0074] b. 헬퍼 T-세포 에피토프; 및

[0075] c. i. 톨-유사 수용체 9 리간드, 및

[0076] ii. 톨-유사 수용체 4 리간드 중 적어도 하나

[0077] 를 포함하는 리포좀에 관한 것이다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "톨-유사 수용체" 또는 "TLR"은 선천적 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 패턴 인식 수용체 (PRR) 부류를 지칭한다. TLR은 박테리아, 진균, 기생충 및 바이러스와 같은 미생물 병원체로부터 병원체 관련 분자 패턴 (PAMP)을 인식하는데, 이는 숙주 분자와 구별될 수 있다. TLR은 전형적으로 이량 체로서 기능하고 항원-제시 수지상 세포 및 식세포 대식세포를 비롯한 선천적 면역 반응에 관여하는 세포에 의해 발현되는 막-스패닝 단백질이다. 적어도 10 종의 인간 TLR 패밀리 구성원, TLR1 내지 TLR10 및 적어도 12 종의 뮤린 TLR 패밀리 구성원, TLR1 내지 TLR9 및 TLR11 내지 TLR13이 있으며, 이들이 인식하는 항원의 유형은 상이하다. 예를 들어, TLR4는 다수의 그램 음성 박테리아에 존재하는 성분인 리포폴리사카라이드 (LPS)뿐만 아니라 바이러스성 단백질, 다당류 및 저밀도 지단백질, 베타-데펜신 및 열 충격 단백질과 같은 내인성 단백질을 인식하며; TLR9는 원핵 생물 게놈에는 풍부하지만 척추 동물 게놈에는 드문 메틸화되지 않은 시토신-포스페이트-구아닌 (CpG) 단일 가닥 또는 이중 가닥 디뉴클레오티드에 의해 활성화되는 뉴클레오티드-감지 TLR이다. TLR의 활성화는 I 형 인터페론 (IFN), 염증성 사이토카인 및 케모카인의 생성 및 면역 반응의 유도를 야기하는 일련의 신호 전달 사건을 초래한다. 결국, 이 염증은 또한 적응 면역계를 활성화시켜 침입하는 병원체와 감염된 세포를 제거한다.

[0079] 본원에 사용된 용어 "리간드"는 생물학적 목적을 제공하기 위해 생체 분자 (예를 들어, 수용체)와 복합체를 형성하는 분자를 지칭한다. 특정 구체예에 따라, 톨-유사 수용체 리간드는 톨-유사 수용체 작용제이다.

[0080] 본원에 사용된 용어 "작용제"는 하나 이상의 TLR에 결합하고 수용체 매개 반응을 유도하는 분자를 지칭한다. 예를 들어, 작용제는 수용체의 활성을 유도, 자극, 증가, 활성화, 촉진, 향상 또는 상향 조절할 수 있다. 이러한 활성을 "작용적 활성"이라고 한다. 예를 들어, TLR4 또는 TLR9 작용제는 결합된 수용체를 통해 세포 신호 전달을 활성화 또는 증가시킬 수 있다. 작용제는 핵산, 소분자, 단백질, 탄수화물, 지질 또는 수용체와 결합하거나 상호 작용하는 임의의 다른 분자를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 작용제는 천연 수용체 리간드의 활성을 모방할 수 있다. 작용제는 서열, 입체 형태, 전하 또는 수용체에 의해 인식될 수 있는 다른 특성과 관련하여 이들 천연 수용체 리간드와 상동성일 수 있다. 이러한 인식으로 세포 내에서 생리학적 및/또는 생화학적 변화를 일으켜, 천연 수용체 리간드가 존재하는 것과 동일한 방식으로 세포가 작용제의 존재에 반응하도록 한다. 특정 구체예에 따라, 톨-유사 수용체 작용제는 톨-유사 수용체 4 작용제 및 톨-유사 수용체 9 작용제 중 적어도 하나이다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "톨-유사 수용체 4 작용제"는 TLR4의 작용제로서 작용하는 임의의 화합물을 지칭한다. 본 개시에 비추어 당업자에게 공지된 임의의 적합한 톨-유사 수용체 4 작용제가 본 발명에 사용될 수 있다. 본 발명에 유용한 톨-유사 수용체 4 리간드의 예는 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 TLR4 작용제를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "모노포스포릴 지질 A" 또는 MPLA"는 그램 음성 박테리아 리포폴리사카라이드 (LPS) 내독소의 생물학적 활성 부분인 변형된 형태의 지질 A를 지칭한다. MPLA는 면역 자극 활성을 유지하면서 LPS보다 독성이 적다. 백신 애쥬번트로서, MPLA는 백신 항원에 대한 세포성 및 체액성 반응을 모두 자극한다. MPLA의 예는 3-O-데사실-4'-모노포스포릴 지질 A, 모노포스포릴 헥사-아실 지질 A, 3-데아실, 모노포스포릴 3-데아실 지질 A 및 이들의 구조적으로 관련된 변이체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 유용한 MPLA는 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 수득할 수 있거나, 또는 Avanti Polar Lipids (미국 앨라배마 앨러배스터 소재) 제의 3D-(6-아실) PHAD®, PHAD®, PHAD®-504, 3D-PHAD® 또는 다양한 상업적 공급처로부터의 MPL™과 같이 상업적 공급처로부터 얻을 수 있다. 특정 구체예에 따라, 톨-유사 수용체 4 작용제는 MPLA이다. 본원에 사용된 용어 "톨-유사 수용체 9 작용제"는 TLR9의 작용제로서 작용하는 임의의 화합물을 지칭

한다. 본 개시에 비추어 당업자에게 공지된 임의의 적합한 톨-유사 수용체 9 작용제가 본 발명에 사용될 수 있다. 본 발명에 유용한 톨-유사 수용체 9 리간드의 예는 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 TLR9 작용제를 포함한다.

[0082] 본원에 사용된 용어 "CpG 올리고뉴클레오티드", "CpG 올리고데옥시뉴클레오티드" 또는 "CpG ODN"은 적어도 하나의 CpG 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 본원에 사용된 "올리고뉴클레오티드", "올리고데옥시뉴클레오티드" 또는 "ODN"은 복수의 연결된 뉴클레오티드 단위로부터 형성된 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 기존의 핵산 공급원으로부터 수득될 수 있거나 합성 방법에 의해 생성될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "CpG 모티프"는 포스페이트 결합 또는 포스포디에스테르 골격 또는 다른 뉴클레오티드 간 연결에 의해 연결된 메틸화되지 않은 시토신-포스페이트-구아닌 (CpG) 디뉴클레오티드 (즉, 시토신 (C)에 이어 구아닌 (G))를 함유하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0083] 특정 구체예에 따라, CpG 올리고뉴클레오티드는 지질화, 즉 지질 모이어티에 접합 (공유 결합)된다.

[0084] 본원에 사용된 "지질 모이어티"는 친유성 구조를 함유하는 모이어티를 지칭한다. 알킬기, 지방산, 트리글리세리드, 디글리세리드, 스테로이드, 스핑고지질, 당지질 또는 인지질, 특히 콜레스테롤과 같은 스테롤 또는 지방산 등의 지질 잔기가 핵산과 같은 고도로 친수성인 분자에 부착되는 경우, 친수성 분자의 혈장 단백질 결합 및 결과적으로 순환 반감기를 실질적으로 향상시킬 수 있다. 또한, 지단백질과 같은 특정 혈장 단백질에 대한 결합은 상응하는 지단백질 수용체 (예를 들어, LDL-수용체 HDL-수용체 또는 스캐빈저 수용체 SR-B1)를 발현하는 특정 조직에서의 흡수를 증가시키는 것으로 나타났다. 특히, 포스포펩티드 및/또는 CpG 올리고뉴클레오티드에 접합된 지질 모이어티는 상기 펩티드 및/또는 올리고뉴클레오티드를 소수성 모이어티를 통해 리포좀의 막에 고정시킬 수 있다.

[0085] 특정 구체예에 따라, 본 개시 내용의 관점에서, CpG 올리고뉴클레오티드는 임의의 적합한 뉴클레오티드 간 연결을 포함할 수 있다.

[0086] 본원에 사용된 용어 "뉴클레오티드 연결"은인 원자 및 인접한 뉴클레오시드 사이의 하전 또는 중성 그룹으로 구성된 그들의 당을 통해 두 뉴클레오티드를 연결하는 화학적 연결을 지칭한다. 뉴클레오티드 간 연결의 예는 포스포디에스테르 (po), 포스포로티오에이트 (ps), 포스포로디티오에이트 (ps2), 메틸포스포네이트 (mp) 및 메틸포스포로티오에이트 (rp)를 포함한다. 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트 및 메틸포스포로티오에이트는 뉴클레오티드 간 결합을 안정화시키는 반면, 포스포디에스테르는 자연 발생 뉴클레오티드 간 결합이다. 올리고뉴클레오티드 포스포로티오에이트는 전형적으로 Rp 및 Sp 포스포로티오에이트 연결의 랜덤 라세미 혼합물로서 합성된다.

[0087] 당업자에게 공지된 임의의 적합한 CpG 올리고뉴클레오티드가 본 개시에 비추어 본 발명에 사용될 수 있다. 이러한 CpG 올리고뉴클레오티드의 예는 CpG2006 (CpG 7909로도 알려짐), CpG 1018, CpG2395, CpG2216 또는 CpG2336을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0088] CpG 올리고뉴클레오티드는 본 개시에 비추어 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 지질화될 수 있다. 일부 구체예에서, CpG 올리고뉴클레오티드의 3' 말단은 포스페이트 결합을 통해, 임의로 PEG 링커를 통해 콜레스테롤 분자에 공유적으로 연결된다. 다른 친유성 모이어티가 또한 CpG 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 공유적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, CpG 올리고뉴클레오티드는 리포좀으로부터 인지질과 동일한 길이의 지질 앵커에 공유적으로 연결될 수 있다: 임의로 PEG 링커를 통해 하나의 팔미트산 사슬 (Pal-OH 또는 유사물 사용, 커플링을 위해 활성화됨) 또는 2 개의 팔미트산 (예를 들어, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-(숙시닐) 또는 유사물 사용, 커플링을 위해 활성화됨). 예를 들어, 미국 특허 제7,741,297호의 관련 내용을 참조하며, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다. PEG의 길이는 예를 들어 1 내지 5 개의 PEG 단위로 변할 수 있다.

[0089] 다른 링커는 또한 CpG 올리고뉴클레오티드를 친유성 모이어티 (예를 들어, 콜레스테롤 분자)에 공유적으로 연결하는데 사용될 수 있으며, 이의 예는 3 내지 12 개의 탄소를 갖는 알킬 스페이서를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 아미노디올로서 올리고뉴클레오티드 화학물질과 상용성인 짧은 링커가 필요하다. 일부 구체예에서, 공유 결합에는 링커가 사용되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Ries et al., "Convenient synthesis and application of versatile nucleic acid lipid membrane anchors in the assembly and fusion of liposomes, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 9673]을 참조하며, 이의 관련 개시는 본원에 참고로 포함된다.

[0090] 특정 구체예에 따라, 본 발명에 유용한 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 18 내지 서열 번호 22로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 여기서 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 포스포로

티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 포함하고, 뉴클레오티드 서열은 링커를 통해 적어도 하나의 콜레스테롤에 공유적으로 연결된다. CpG 올리고뉴클레오티드를 콜레스테롤 분자에 공유 결합시키기 위해 임의의 적합한 링커가 사용될 수 있다. 바람직하게는, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0091] 특정 구체예에 따라, 리포좀은

[0092] a. 타우 포스포펩티드;

[0093] b. 헬퍼 T-세포 에피토프;

[0094] c. 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드; 및

[0095] d. 톨-유사 수용체 4 리간드를 포함하고;

[0096] 여기서 타우 포스포펩티드는 리포좀의 표면에 존재하고, 헬퍼 T-세포 에피토프는 리포좀에 캡슐화된다.

[0097] 특정 구체예에 따라, 리포좀은

[0098] a. 서열 번호 27 내지 서열 번호 38로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 타우 펩티드;

[0099] b. 서열 번호 39 내지 서열 번호 44로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 헬퍼 T 세포 에피토프, 바람직하게는 서열 번호 13 내지 서열 번호 17로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 헬퍼 T 세포 에피토프;

[0100] c. 서열 번호 18 내지 서열 번호 22로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 갖는 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드 (여기서 CpG 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 포함하고, CpG 올리고뉴클레오티드는 링커를 통해 적어도 하나의 콜레스테롤에 공유적으로 연결됨); 및

[0101] d. 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함한다.

[0102] 특정 구체예에 따라, 리포좀은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DMPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포릴-3'-rac-글리세롤 (DMPG) 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 지질을 추가로 포함한다.

[0103] 특정 구체예에 따라, 리포좀은 완충제를 추가로 포함한다. 본 개시에 비추어 당업자에게 공지된 임의의 적합한 완충제가 본 발명에서 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 리포좀은 포스페이트-완충 염수를 포함한다. 특정 구체예에 따라, 완충제는 히스티딘 및 수크로스를 포함한다.

[0104] 특정 구체예에 따라, 리포좀은 DMPC, DMPG, 콜레스테롤, 타우 포스포펩티드 및 헬퍼 T-세포 에피토프를 9:1:7:0.07:0.04의 몰비로 포함한다.

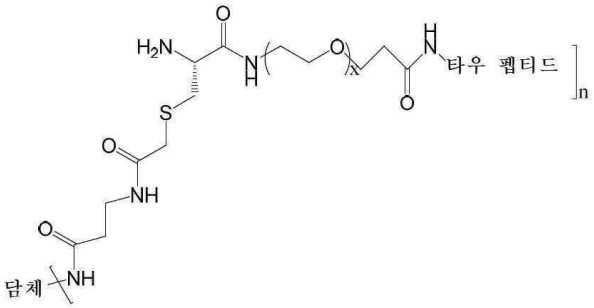
[0105] 본 발명의 리포좀은 본 개시에 비추어 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0106] 본 출원의 예시적인 리포좀이 도 1에 도시되어 있다. 보다 구체적으로, 타우 테트라팔미토일화 포스포펩티드 (pTau 펩티드 T3, 서열 번호 28)는 타우 펩티드의 각 말단에서 2 개의 팔미트산을 통해 리포좀의 표면에 제시된다. 지질화된 CpG (애쥬번트 CpG7909-Chol)를 포함하는 TLR-9 리간드는 공유 연결된 콜레스테롤을 통해 리포좀 막에 통합된다. TLR-4 리간드 (애쥬번트 3D-(6-아실) PHAD®)도 막에 포함된다. 헬퍼 T-세포 에피토프 (PAN-DR 바인더 T50)는 캡슐화된다.

[0107] *접합체*

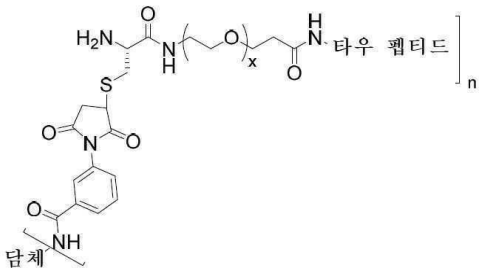
[0108] 하나의 일반적인 측면에서, 본 발명은 타우 펩티드 및 이에 접합된 면역원성 담체를 포함하는 접합체에 관한 것이다.

[0109] 특정 측면에 따르면, 접합체는 다음 구조를 갖는다:



(I)

[0110]



(II)

[0111]

[0112] 상기 식에서,

[0113] x는 0 내지 10의 정수이고;

[0114] n은 2 내지 15, 바람직하게는 3 내지 11의 정수이다.

[0115] 특정 구체예에 따라, x는 1 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 또는 2 내지 3의 정수이다. 특정 구체예에 따라, x는 3이다.

[0116] 특정 구체예에 따라, n은 2 내지 15, 3 내지 11, 3 내지 9, 3 내지 8, 또는 3 내지 7이다.

[0117] 특정 구체예에 따라, 접합체는 하나 이상의 타우 펩티드를 포함한다. 특정 구체예에 따라, 접합체의 타우 펩티드는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0118] 특정 구체예에 따라, 본 개시 내용의 관점에서, 임의의 적합한 타우 펩티드가 본 발명에서 사용될 수 있다. 특정 구체예에 따라, 하나 이상의 타우 펩티드가 서열 번호 1 내지 12 중 하나의 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1 내지 12 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 하나 이상의 아미노산 잔기는 인산화되지 않는다.

[0119] 특정 구체예에 따라, 하나 이상의 타우 펩티드는 타우 포스포펩티드이다. 특정 구체예에 따라, 하나 이상의 타우 포스포펩티드는 서열 번호 1 내지 3 또는 5 내지 12 중 하나의 아미노산 서열, 또는 서열 1 내지 3 또는 5 내지 12 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 제시된 아미노산 잔기 중 하나 이상은 인산화된다.

[0120] 특정 구체예에 따라, 타우 포스포펩티드는 서열 1 내지 3 중 하나의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "면역원성 담체"는 타우 펩티드에 커플링될 수 있는 면역원성 물질을 지칭한다. 타우 펩티드에 커플링된 면역원성 모이어티는 면역 반응을 유도하고 타우 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 생성을 유도할 수 있다. 면역원성 모이어티는 단백질, 폴리펩티드, 당단백질, 복합 다당류, 입자, 핵산, 폴리뉴클레오티드 등을 포함하는 작동 모이어티로, 외래로 인식되어 숙주로부터 면역학적 반응을 이끌어낸다. 본 개시에 비추어 당업자에게 공지된 임의의 적합한 면역원성 담체가 본 발명에 사용될 수 있다. 특정 구체예에 따라, 면역원성 담체는 열쇠구멍삿갓조개 헤모시아닌 (KLH), 파상풍 톡소이드, CRM197 (비독성 형태의 디프테리아 독소), N. 메닌기티디스 (OMP)로부터의 외막 단백질 혼합물 또는 이의 유도체이다. 특정 구체예에 따라, 면역원성 담체는 KLH 또는 CRM197이다.

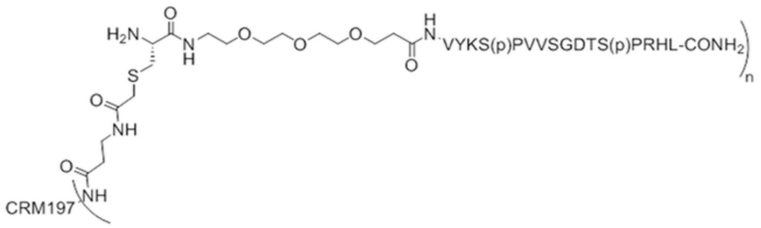
[0122] 특정 구체예에 따라, 타우 펩티드는 링커를 통해 담체에 접합된다. 본원에 사용된 용어 "링커"는 면역원성 담체를 타우 펩티드에 연결하는 화학적 모이어티를 지칭한다. 본 개시에 비추어 당업자에게 공지된 임의의 적합한 링커가 본 발명에서 사용될 수 있다. 링커는 예를 들어 단일 공유 결합, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 모이어티, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 펩티드 링커, 당-기반 링커 또는 절단 가능한 링커, 예컨대 이황화 결합 또는 프로테아제 절단 부위, 또는 아미노산, 또는 이들의 조합일 수 있다. 링커의 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 (MBS), 또는 하나 이상의 아미노산, 예컨대 Cys, Lys, 또는 때때로 Ser 또는 Thr 또는 이들의 조합의 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0123] 특정 구체예에 따라, 링커는 $(C_2H_4O)x$-시스테인-아세트아미도프로피온아미드 또는 m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 - 시스테인 - $(C_2H_4O)x$를 포함하고, 여기서 x는 0 내지 10의 정수, 예컨대 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0124] 특정 구체예에 따라, 담체는 링커를 통해 타우 펩티드의 N-말단에 공유적으로 연결된다.

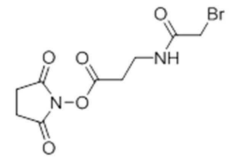
[0125] 다른 특정 구체예에 따라, 담체는 링커를 통해 타우 펩티드의 C-말단에 공유적으로 연결된다.

[0126] 특정 구체예에 따라, 접합체는 다음의 구조를 갖는다:

[0127] 

[0128] 상기 식에서, n은 2 내지 15, 바람직하게는 3 내지 11, 보다 바람직하게는 3 내지 7의 정수이다.

[0129] 본 발명의 접합체는 본 개시에 비추어 당 업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 접합체는 숙신이미딜-3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP)를 CRM197의 아미노기와 반응시켜 아미드 연결을 형성함으로써 형성될 수 있다:

[0130] 

[0131] 이 CRM197 전구체는 N-말단 또는 C-말단에서 유리 친핵성 티올기를 갖는 PEG-시스테인 링커에 접합된 타우 펩티드 (예를 들어, 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드)와 후속 반응하여 타우 포스포펩티드 접합체를 형성할 수 있다.

[0132] 본 출원의 구체예에 따른 예시적인 접합체는 도 1에 도시되어 있다. 보다 구체적으로, 다수의 타우 포스포펩티드 (pTau 펩티드 T3.76)가 담체 단백질 CRM197에 공유적으로 연결된다.

[0133] *약학 조성물*

[0134] 하나의 일반적인 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 리포좀 또는 접합체를 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 담체와 함께 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 담체는 당 업계에 잘 알려져 있다 (Remington's Pharmaceutical Science (15th ed.), Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980 참조). 약학 조성물의 바람직한 제형은 의도된 투여 방식 및 치료적 적용에 의존한다. 조성물은 약학적으로 허용되는 비독성 담체 또는 희석제를 포함할 수 있으며, 이는 동물 또는 인간 투여용 약학 조성물을 제형화하는데 일반적으로 사용되는 비히클로 정의된다. 희석제는 조합물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는 증류수, 생리적 인산 완충 염수, 링거액, 덱스트로스 용액 및 행크 액이다. 또, 약학 조성물 또는 제형은 또한 다른 담체, 애쥬번트, 또는 비독성, 비치료성, 비면역원성 안정화제 등을 포함할 수 있다. 담체, 부형제 또는 희석제의 특성은 특정 적용을 위한 투여 경로에 의존할 것이라는 것이

이해될 것이다.

[0135] 약학 조성물은 동일한 면역원성 타우 펩티드의 혼합물을 함유할 수 있다. 대안적으로, 약학 조성물은 본 발명의 상이한 면역원성 타우 펩티드의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0136] 뉴런 질환에 대한 백신과 관련된 또 다른 문제점은 효능을 보장하기 위해 예외적으로 높은 항체 역가가 필요할 수 있다는 것이다. 이러한 이유는 백신의 표적 항원이 뇌에 위치하기 때문이다. 뇌는 혈액 뇌 장벽 (BBB)이라는 특수한 세포 구조에 의해 순환으로부터 분리된다. BBB는 순환계에서 뇌로 물질이 통과하는 것을 제한한다. 이것은 독소, 미생물 등이 중추 신경계로 유입되는 것을 방지한다. BBB는 또한 면역 매개체 (예를 들어, 항체)가 뇌를 둘러싸는 간질액 및 뇌척수액으로 효율적으로 유입되는 것을 방지하는 잠재적으로 덜 바람직한 효과를 갖는다.

[0137] 전신 순환에 존재하는 항체의 대략 0.1%가 BBB를 가로질러 뇌로 들어간다. 이는 CNS 항원을 표적으로 하는 백신에 의해 유도된 전신 역가가 뇌에서 효과적이 도록 최소 유효 역가보다 적어도 1000 배 더 커야함을 의미한다.

[0138] 따라서 특정 구체예에 따라, 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 적합한 애쥬번트를 추가로 포함한다. 이에 따라, 리포좀 또는 접합체에 존재하는 본 발명의 타우 펩티드는 대상에서 원하는 면역 반응을 달성하기 위해 적합한 애쥬번트와 함께 투여될 수 있다. 적합한 애쥬번트는 본 발명의 리포좀 또는 접합체의 투여 전, 후 또는 동시에 투여될 수 있다. 바람직한 애쥬번트는 정성적 형태의 반응에 영향을 미치는 면역원의 형태적 변화를 일으키지 않으면서 면역원에 대한 고유한 반응을 증강시킨다. 애쥬번트의 예는 수산화알루미늄, 인산알루미늄 및 황산알루미늄과 같은 알루미늄염 (알룸)이다. 이러한 애쥬번트는 MPLA 류 (3 De-O-아실화 모노포스포릴 지질 A (MPL™), 모노포스포릴 헥사-아실 지질 A 3-데아실 합성 (3D-(6-아실) PHAD®), PHAD™, PHAD®-504, 3D-PHAD®) 지질 A), 폴리글루탐산 또는 폴리리신과 같은 중합체 또는 단량체 아미노산와 같은 다른 특정 면역자극제와 함께 또는 없이 사용될 수 있다. 이러한 애쥬번트는 다른 특정 면역자극제, 예컨대 뮤라밀 펩티드 (예를 들어, N-아세틸뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), N-아세틸-노르뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타민 (nor-MDP), N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'디팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE), N-아세틸글루코사미닐-N-아세틸뮤라밀-L-Al-D-이소글루-L-Ala-디팔미톡시 프로필아미드 (DTP-DPP) Theramide™), 또는 다른 박테리아 세포벽 성분과 함께 또는 없이 사용될 수 있다. 수중유 에멀젼은 미세유동화기를 사용하여 서브미크론 입자로 제형화된 5% 스쿠알렌, 0.5% Tween 80 및 0.5% Span 85 (임의로 다양한 양의 MTP-PE를 함유함)를 함유하는 MF59 (WO 90/14837 참조); 서브마이크론 에멀젼으로 미세유동화되거나 더 큰 입자 크기의 에멀젼을 생성하기 위해 와동된 10% 스쿠알렌, 0.4% Tween 80, 5% 플루로닉-차단 중합체 L121 및 thr-MDP를 함유하는 SAF; 및 0.2% Tween 80, 및 모노포스포릴 지질 A (MPL™), 트레할로스 디마이콜레이트 (TDM) 및 세포벽 골격 (CWS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세균 세포벽 성분을 함유하는 Ribi™ 애쥬번트 시스템 (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, Mont.), 바람직하게는 MPL™ + CWS (Detox™)를 포함한다. 다른 애쥬번트는 CFA (완전 프로인트 애쥬번트 (Complete Freund's Adjuvant)) 및 인터루킨 (IL-1, IL-2 및 IL-12)과 같은 사이토카인, 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF) 및 종양 괴사 인자 (TNF)를 포함한다.

[0139] 대상에게 2 이상의 요법을 투여하는 것과 관련하여 본원에 사용된 용어 "조합으로"는 복수의 요법의 사용을 지칭한다. "조합하여"라는 용어의 사용은 요법이 대상에게 투여되는 순서를 제한하지는 않는다. 예를 들어, 제 1 요법 (예를 들어, 본원에 기술된 조성물)은 대상에게 제 2 요법의 투여 전 (예를 들어, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 16 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 또는 12 주 전), 동시 또는 이후 (예를 들어, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 16 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 또는 12 주 후)에 투여될 수 있다.

[0140] 본 발명의 약학 조성물은 당 업계에 널리 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 조성물 중 각 성분의 최적 비율은 본 개시에 비추어 당업자에게 널리 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0141] *사용 방법*

[0142] 본 발명의 다른 일반적인 측면은 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태를 앓고 있는 대상에서 타우 단백질에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다. 특정 측면에 따라, 인산화된 타우 단백질, 바람직하게는 ePHF에 대한 면역 반응이 유도된다.

[0143] 본 발명의 다른 일반적인 측면은 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0144] 본원에 사용된 용어 "유도" 및 "자극" 및 이의 변형은 세포 활성의 임의의 측정 가능한 증가를 지칭한다. 면역 반응의 유도는 예를 들어 면역 세포 집단의 활성화, 증식 또는 성숙, 사이토카인의 생성 증가 및/또는 증가된 면역 기능의 다른 지표를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 면역 반응의 유도는 B 세포의 증식 증가, 항원-특이적 항체 생성, 항원-특이적 T 세포의 증식 증가, 수지상 세포 항원 제시 개선 및/또는 특정 사이토카인, 케모카인 및 공동-자극 마커의 발현 증가를 포함할 수 있다.

[0145] 동물 또는 인간 유기체에 투여시 항-타우 면역 반응을 유도 또는 자극하는 능력은 관련 기술 분야에서 표준인 다양한 분석법을 사용하여 시험관 내 또는 생체 내에서 평가될 수 있다. 면역 반응의 개시 및 활성화를 평가할 수 있는 기술에 대한 일반적인 설명은, 예를 들어 [Coligan et al. (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health)]를 참조한다. 세포 면역의 측정은 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포로부터 유래된 것을 포함하는 활성화된 이펙터 세포에 의해 분비된 사이토카인 프로파일의 측정, (예를 들어, ELISPOT에 의한 IL-4 또는 IFN 감마-생산 세포의 정량화), 면역 이펙터 세포의 활성화 상태 결정 (예를 들어, 고전적인 [3H] 티미딘 흡수에 의한 T-세포 증식 분석), 감작된 대상에서 항원-특이적 T 림프구의 분석 (예를 들어, 세포 독성 분석에서 펩티드 특이적 용해 등)에 의해 수행될 수 있다

[0146] 세포 및/또는 체액성 반응을 자극하는 능력은 대상으로부터의 생물학적 샘플 (예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, PBMC, 소변, 타액, 대변, CSF 또는 림프액)에 대해 약학 조성물로 투여된 면역원성 타우 펩티드(들)에 대한 항체의 존재를 검사함으로써 결정될 수 있다 (예를 들어 Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press 참조). 예를 들어, 면역원을 제공하는 조성물의 투여에 반응하여 생성된 항체의 역가는 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA), 도트 블롯, SDS-PAGE 겔, ELISPOT 또는 항체-의존성 세포성 식세포 작용 (ADCP) 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0147] 본원에 사용된 용어 "대상"은 동물을 지칭한다. 특정 구체예에 따라, 대상은 비영장류 (예를 들어, 낙타, 당나귀, 얼룩말, 소, 돼지, 말, 염소, 양, 고양이, 개, 래트, 토끼, 기니피그 또는 마우스) 또는 영장류 (예를 들어, 원숭이, 침팬지 또는 인간)를 포함하는 포유동물이다. 특정 구체예에 따라, 대상은 인간이다.

[0148] 본원에 사용된 용어 "치료적 유효량"은 대상에서 원하는 생물학적 또는 의학적 반응을 도출하는 활성 성분 또는 구성성분의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 언급된 목적에 관하여 경험적으로 그리고 일상적인 방식으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 최적의 투여량 범위의 확인을 돕기 위해 시험관내 (*in vitro*) 검정이 선택적으로 사용될 수 있다. 특정 유효 용량의 선택은 치료 또는 예방될 질병, 수반되는 증상, 환자의 체질량, 환자의 면역 상태 및 당업자에게 알려진 다른 인자를 포함한 몇몇 인자를 고려하여 당업자에 의해 (예를 들어, 임상 시험을 통해) 결정될 수 있다. 제형에 사용되는 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 질병의 중증도에 좌우될 것이며, 전문의의 판단 및 각각의 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 시험관 내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래하는 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0149] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 모두 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태와 관련된 적어도 하나의 측정가능한 물리적 파라미터의 개선 또는 역전을 지칭하고자 하는 것이며, 이는 대상에서 반드시 식별되어야 하는 것은 아니지만, 대상에서 식별가능할 수는 있다. 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 또한, 퇴행을 야기하거나, 진행을 예방하거나, 적어도 질환, 장애 또는 상태의 진행을 둔화시키는 것을 지칭할 수 있다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태와 관련된 하나 이상의 증상의 경감, 발생 또는 발병의 예방, 또는 지속기간의 감소를 지칭한다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질환, 장애 또는 상태의 재발 방지를 지칭한다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질환, 장애 또는 상태를 갖는 대상의 생존율 증가를 지칭한다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 대상에서 질환, 장애 또는 상태의 제거를 지칭한다.

[0150] 특정 구체예에 따르면, 치료적 유효량은 하기 효과 중 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상을 달성하기에 충분한 요법의 양을 지칭한다: (i) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상의 중증도를 감소 또는 개선함; (ii) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상의 지속기간을 감소시킴; (iii) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상의 진행을 예방함; (iv) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상의 퇴행을 야기함; (v) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관

련된 증상의 발생 또는 발병을 예방함; (vi) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상의 재발을 방지함; (vii) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상을 갖는 대상의 입원을 감소시킴; (viii) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상을 갖는 대상의 입원 기간을 감소시킴; (ix) 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상을 갖는 대상의 생존율을 증가시킴; (xi) 대상에서 치료하고자 하는 질환, 장애 또는 상태, 또는 이와 관련된 증상을 억제하거나 감소시킴; 및/또는 (xii) 다른 요법의 예방적 또는 치료적 효과(들)를 향상시키거나 개선함.

[0151] 본원에 사용된 "신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태"는 본 개시에 비추어 당업자에게 공지된 임의의 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태를 포함한다. 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태의 예는 신경원섬유 병변의 형성에 의해 유발되거나 이와 관련된 신경퇴행성 질환 또는 장애, 예컨대 타우병증으로 지칭되는 타우 관련 질환, 장애 또는 상태를 포함한다. 특정 구체예에 따라, 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태는 알츠하이머병, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병, 권투선수 치매, 다운 증후군, 게르스트만 슈트로이슬러 샤잉커 (Gerstmann-Straeussler-Scheinker) 병, 봉입체 근염, 프리온 단백질 뇌 아밀로이드 맥관장애, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 괌의 파킨슨증-치매 복합 (parkinsonism-dementia complex of Guam), 신경원섬유 매듭을 동반하는 비-괌 (non-Guamanian) 운동 신경세포병, 은친화성 과립성 치매 (argyrophilic grain dementia), 피질기저핵변성, 루이 치매 근위축성 측삭 경화증, 석회화가 있는 확산성 신경원섬유 매듭, 전측두엽 치매, 바람직하게는 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매 (FTDP-17), 이마관자엽 치매, 할러포르덴-스파츠병 (Hallervorden-Spatz disease), 다계통위축, C형 니만-픽병 (Niemann-Pick disease type C), 픽병, 진행성 피질하 신경교증, 진행성 핵상 마비 (PSP), 아급성 경화성 범뇌염, 매듭 단독 치매, 뇌염 후 파킨슨증, 근긴장성 이영양증, 만성 외상성 뇌병증 (CTE), 일차 연령 관련 타우병증 (PART) 또는 루이소체 치매 (LBD)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 타우 및 아밀로이드 병리의 공존을 나타내는 임의의 질환 또는 장애를 포함한다. 특정 구체예에 따라, 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태는 알츠하이머병 또는 다른 타우병증이다.

[0152] 본 발명은 또한 대상의 뇌로부터 타우 응집체의 제거를 촉진하기에 효과적인 조건 하에서 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상의 뇌로부터 타우 응집체의 제거를 촉진하는 방법을 제공한다. 특정 구체예에 따라, 타우 응집체는 신경원섬유 매듭 또는 이의 병리적 타우 전구체이다.

[0153] 본 발명은 또한 대상에서 타우 병리 관련 행동 표현형의 진행을 늦추는데 효과적인 조건 하에서 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 타우-병리 관련 행동 표현형의 진행을 늦추는 방법을 제공한다.

[0154] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 일 구체예에 따른 약학 조성물의 투여를 통한 타우 펩티드의 투여는 대상에서 타우 펩티드 및 병리학적 타우 형태에 대한 활성 면역 반응을 유도함으로써 관련 타우 응집체의 제거를 촉진시키고, 타우-병리 관련 행동의 진행을 늦추고/거나 기저 타우병증을 치료한다. 본 발명의 이러한 측면에 따르면, 면역 반응은 타우 펩티드에 대한 유익한 체액성 (항체 매개성) 반응 및 T-세포 에피토프 또는 면역원성 담체에 대한 세포 (항원성-특이적 T 세포 또는 이들의 분비 산물에 의해 매개됨) 반응의 발달을 포함한다.

[0155] 본원에 사용된 타우 병리 관련 행동 표현형은 인지 장애, 초기 성격 변화 및 탈억제, 무관심, 무의지, 무언증, 운동불능, 고집증, 정형화 움직임/행동, 과탐식, 무체계, 순차적 작업의 계획 또는 조직화 불능, 이기심/냉담, 반사회적 특성, 공감 부족, 주저함, 빈번한 착어증 오류가 있지만 이해력은 있는 비문법적 말투, 이해력 장애 및 단어 찾기 결손, 서서히 진행되는 걸음걸이 불안정, 후방돌진, 쌀쌀맞음, 빈번한 낙상, 비-레보도파 반응성 축 경직, 핵상 응시 마비, 사각파 떨림, 느린 단속적 운동, 가성구마비, 사지 실행증, 긴장 이상, 피질 감각 상실 및 떨림을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0156] 본 발명의 방법을 수행하는데, 본 발명의 면역원성 펩티드 또는 항체를 투여하기 전에 알츠하이머병 또는 다른 타우병증을 앓고 있거나 걸릴 위험이 있는 대상, 뇌에 타우 응집체를 갖는 대상, 또는 매듭 관련 행동 표현형을 나타내는 대상을 선택하는 것이 바람직하다. 치료가 가능한 대상은 현재 증상을 보이는 환자뿐만 아니라 질환의 위험이 있지만 증상을 보이지 않는 개체를 포함한다. 알츠하이머병의 경우 사실상 거의 모든 사람이 알츠하이머병으로 고통받을 위험이 있다. 따라서, 본 방법은 대상 환자의 위험을 평가할 필요없이 일반 집단에게 예방적으로 투여될 수 있다. 본 방법은 알츠하이머병의 유전적 위험이 알려진 개인에게 특히 유용하다. 이러한 개체에는 질환을 경험한 친척이 있고 유전 또는 생화학적 마커의 분석에 의해 위험이 결정된 개체가 포함된다.

[0157] 무증상 환자에서, 치료는 임의의 연령 (예를 들어, 10, 20, 30 대 연령)에서 시작할 수 있다. 그러나 보통 환자는 40, 50, 60 또는 70 세가 될 때까지 치료를 시작할 필요는 없다. 치료는 전형적으로 일정 기간에 걸쳐 다중 투여량을 수반한다. 치료는 경시적으로 치료제에 대한 항체, 또는 활성화된 T-세포 또는 B-세포 반응을 분석함

으로써 모니터링될 수 있다. 반응이 감소하면 부스터 용량이 제시된다.

[0158] 예방적 적용에서, 타우 펩티드를 함유하는 약학 조성물은 질환의 생화학적, 조직학적, 및/또는 행동 증상, 질환의 전개 중에 나타나는 그의 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 포함하여, 알츠하이머병 또는 다른 타우병증에 걸리기 쉽거나 위험이 있는 환자에게 위험을 제거 또는 감소시키거나, 중증도를 경감시키거나 질환 발생을 지연시키기에 충분한 양으로 투여된다. 치료적 응용에서, 타우 펩티드를 함유하는 약학 조성물은 질환의 전개 중에 그의 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 포함하여, 질환의 증상 (생화학적, 조직학적, 및/또는 행동)을 치유하거나, 적어도 부분적으로 정지시키거나, 지연시키기에 충분한 양으로 이러한 질환이 의심되거나 이러한 질환을 이미 앓고 있는 환자에게 투여된다.

[0159] 신경퇴행성 질환, 장애 또는 상태의 예방 및/또는 치료를 위한 본 발명의 약학 조성물의 유효 용량은 투여 방식, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 투여되는 다른 약물, 및 치료가 예방 또는 치료인지의 여부에 따라 달라질 수 있다. 펩티드의 양은 애쥬번트의 투여 여부에 따라 다르며, 애쥬번트가 없는 경우 더 많은 용량이 요구된다. 주사 시기는 하루에 한 번, 일년에 한 번, 10 년에 한 번으로 크게 달라질 수 있다. 전형적인 요법은 면역화 후 6 주 간격과 같은 시간 간격으로 부스터 주사로 구성된다. 다른 요법은 면역화 후 1, 2, 6, 9 및 12 개월 후 부스터 주사로 구성된다. 다른 요법은 생애 2 개월마다 주사를 수반한다. 대안적으로, 부스터 주사는 면역 반응의 모니터링으로 지시되는 바와 같이 불규칙적으로 이루어질 수 있다.

[0160] 프라이밍 및 부스팅 투여를 위한 요법은 투여 후 측정된 면역 반응에 기초하여 조절될 수 있다는 것을 당업자는 쉽게 이해한다. 예를 들어, 부스팅 조성물은 일반적으로 프라이밍 조성물의 투여 후 수 주 또는 수 개월, 예를 들어 프라이밍 조성물의 투여 후, 약 2 내지 3 주 또는 4 주, 또는 8 주 또는 16 주, 또는 20 주, 또는 24 주 또는 26 주, 또는 28 주, 또는 30 주 또는 32 주 또는 36 주 또는 1 내지 2 년에 투여된다.

[0161] 펩티드는 예방 및/또는 치료를 위해 비경구, 국소, 정맥 내, 경구, 피하, 동맥 내, 두개 내, 복강 내, 피내, 비강 내 또는 근육 내 수단에 의해 투여될 수 있다. 면역원제의 가장 전형적인 투여 경로는 피하 또는 근육 내 주사이다. 후자의 주사 유형은 팔 또는 다리 근육에서 가장 일반적으로 수행된다.

[0162] 특정 측면에 따라, 하나 이상의 부스팅 면역이 투여될 수 있다. 그러나 많은 부스팅 조성물이 사용되는 각각의 프라이밍 및 부스팅 조성물에서 항원은 동일할 필요는 없지만, 항원 결정기를 공유하거나 실질적으로 서로 유사해야 한다.

[0163] 필요한 경우, 조성물은 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 키트, 팩 또는 디스펜서로 제공될 수 있다. 예를 들어, 키트는 금속 또는 플라스틱 포일, 예컨대 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 키트, 팩 또는 디스펜서에는 투여 설명서가 제공될 수 있다.

[0164] 특정 구체예에 따라, 키트는 본 발명의 일 구체예에 따른 리포좀을 포함하는 약학 조성물 및 본 발명의 일 구체예에 따른 접합체를 포함하는 약학 조성물 중 적어도 하나를 포함한다.

[0165] 구체예

[0166] 본 발명은 또한 다음의 비제한적인 구체예를 제공한다.

[0167] 구체예 1은 다음을 포함하는 리포좀이다:

[0168] a. 타우 펩티드; 및

[0169] b. 헬퍼 T 세포 에피토프;

[0170] 여기서 타우 펩티드는 리포좀의 표면에 존재한다.

[0171] 구체예 2는 타우 펩티드가 타우 포스포펩티드인 구체예 1의 리포좀이다.

[0172] 구체예 3은 톨-유사 수용체 리간드를 추가로 포함하는, 구체예 1 또는 2의 리포좀이다.

[0173] 구체예 4는 톨-유사 수용체 리간드가 톨-유사 수용체 4 리간드 및 톨-유사 수용체 9 리간드 중 적어도 하나를 포함하는 구체예 3의 리포좀이다.

[0174] 구체예 5는 톨-유사 수용체 리간드가 톨-유사 수용체 4 리간드인 구체예 3 또는 4의 리포좀이다.

[0175] 구체예 6은 톨-유사 수용체 4 리간드가 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하는 구체예 5의 리포좀이다.

[0176] 구체예 7은 톨-유사 수용체 리간드가 톨-유사 수용체 9 리간드인 구체예 3 또는 4의 리포좀이다.

[0177] 구체예 8은 톨-유사 수용체 9 리간드가 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함하는 구체예 7의 리포좀이다.

[0178] 구체예 9는 다음을 포함하는, 구체예 1의 리포좀이다:

[0179] a. 타우 펩티드;

[0180] b. 헬퍼 T 세포 에피토프; 및

[0181] c. i. 톨-유사 수용체 9 리간드, 및

[0182] ii. 톨-유사 수용체 4 리간드 중 적어도 하나.

[0183] 구체예 10은 타우 펩티드가 타우 포스포펩티드인 구체예 9의 리포좀이다.

[0184] 구체예 11은 톨-유사 수용체 9 리간드가 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드인 구체예 9 또는 10의 리포좀이다.

[0185] 구체예 12는 리포좀이 톨-유사 수용체 4 리간드 및 톨-유사 수용체 9 리간드를 포함하는 구체예 9 내지 11 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0186] 구체예 13은 톨-유사 수용체 4 리간드가 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하는 구체예 12의 리포좀이다.

[0187] 구체예 14는 다음을 포함하는 리포좀이다:

[0188] a. 타우 포스포펩티드;

[0189] b. 헬퍼 T-세포 에피토프;

[0190] c. 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드; 및

[0191] d. 톨-유사 수용체 4 리간드를 함유하는 애쥬번트;

[0192] 여기서 타우 포스포펩티드는 리포좀의 표면에 존재한다.

[0193] 구체예 15는 톨-유사 수용체 4 리간드가 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하는 구체예 14의 리포좀이다.

[0194] 구체예 16은 헬퍼 T 세포 에피토프가 리포좀에 캡슐화된, 구체예 1 내지 15 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0195] 구체예 16a는 헬퍼 T 세포 에피토프가 리포좀의 막에 도입된, 구체예 1 내지 15 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0196] 구체예 16b는 헬퍼 T 세포 에피토프가 리포좀의 표면에 존재하는, 구체예 1 내지 15 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0197] 구체예 17은 다음을 포함하는 리포좀 조성물이다:

[0198] a. 타우 포스포펩티드;

[0199] b. 헬퍼 T 세포 에피토프;

[0200] c. 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드; 및

[0201] d. 모노포스포릴 지질 A (MPLA);

[0202] 여기서 타우 포스포펩티드는 리포좀의 표면에 존재하며,

[0203] T-세포 에피토프는 리포좀에 캡슐화된다.

[0204] 구체예 17a는 MPLA가 3-O-데사실-4'-모노포스포릴 지질 A, 바람직하게는 MPL™인 구체예 17의 리포좀이다.

[0205] 구체예 17b는 MPLA가 모노포스포릴 헥사-아실 지질 A, 3-데아실, 바람직하게는 3D-(6-아실) PHAD®인 구체예 17의 리포좀이다.

[0206] 구체예 17c는 MPLA가 모노포스포릴 3-데아실 지질 A, 바람직하게는 3D-PHAD®인 구체예 17의 리포좀이다.

[0207] 구체예 18은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DMPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포릴-3'-rac-글리세롤 (DMPG), 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 지질을 추가로 포함하는 구체예 1 내지 17c 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0208] 구체예 19는 타우 펩티드가 서열 번호 1 내지 서열 번호 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는

서열 번호 1 내지 서열 번호 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 구체예 1 내지 18 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0209] 구체예 19-1은 타우 펩티드가 서열 번호 1 내지 3 및 5 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 포스포펩티드인 구체예 19의 리포좀이다.

[0210] 구체예 19-2는 타우 포스포펩티드가 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 구체예 19-1의 리포좀이다.

[0211] 구체예 19-3은 타우 포스포펩티드가 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 구체예 19-1의 리포좀이다.

[0212] 구체예 19-4는 타우 포스포펩티드가 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 구체예 19-1의 리포좀이다.

[0213] 구체예 19a는 아미노산 서열이 타우 펩티드가 리포좀의 표면에 제시될 수 있도록 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는 구체예 19, 19-1, 19-2, 19-3 및 19-4 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0214] 구체예 19b는 하나 이상의 변형이 팔미토일화 및 도데실 변형 중 하나 이상을 포함하는 구체예 19a의 리포좀이다.

[0215] 구체예 19c는 타우 펩티드가 하나 이상의 변형에 의해 N-말단에서 변형된 구체예 19a 또는 19b의 리포좀이다.

[0216] 구체예 19d는 타우 펩티드가 하나 이상의 변형에 의해 이의 C-말단에서 변형된 구체예 19a 내지 19c 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0217] 구체예 19e는 타우 펩티드가 N-말단 및 C-말단 모두에서 팔미토일화된 구체예 19d의 리포좀이다.

[0218] 구체예 19f는 타우 펩티드가 하나 이상의 변형을 촉진하기 위해 하나 이상의 추가 아미노산을 추가로 포함하는 구체예 19a 내지 19e 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0219] 구체예 19g는 하나 이상의 추가 아미노산이 Lys, Cys, Ser 및 Thr로 이루어진 군에서 선택되는 구체예 19f의 리포좀이다.

[0220] 구체예 19h는 타우 펩티드가 C-말단에서 아미드화된 구체예 19 내지 19g 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0221] 구체예 19i는 타우 펩티드가 서열 번호 27 내지 서열 번호 38로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 구체예 19 내지 19h 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0222] 구체예 19j는 타우 펩티드가 서열 번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 구체예 19 내지 19i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0223] 구체예 19k는 타우 펩티드가 서열 번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 구체예 19 내지 19i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0224] 구체예 19l은 타우 펩티드가 서열 번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 구체예 19 내지 19i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0225] 구체예 20은 헬퍼 T 세포 에피토프가 서열 번호 23 내지 서열 번호 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 구체예 1 내지 19l 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0226] 구체예 20a는 헬퍼 T 세포 에피토프가 서열 번호 23 내지 서열 번호 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2 개의 아미노산 서열을 포함하는 구체예 20의 리포좀이다.

[0227] 구체예 20b는 헬퍼 T 세포 에피토프가 서열 번호 23 내지 서열 번호 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 3 개의 아미노산 서열을 포함하는 구체예 20의 리포좀이다.

[0228] 구체예 20c는 헬퍼 T 세포 에피토프가 서열 번호 23 내지 서열 번호 26의 4 개의 아미노산 서열을 포함하는 구체예 20의 리포좀이다.

[0229] 구체예 20d는 서열 번호 23 내지 서열 번호 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 개 이상의 아미노산 서열이 링커에 의해 공유적으로 연결된 구체예 20a 내지 20c 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0230] 구체예 20e는 링커가 Val (V), Ala (A), Arg (R), Gly (G), Ser (S), Lys (K)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 구체예 20d의 리포좀이다.

[0231] 구체예 20f는 링커가 VVR, GS, RR 및 RK로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 구체예 20e의

리포좀이다.

[0232] 구체예 20g는 헬퍼 T 세포 에피토프가 이의 C-말단에서 아미드화된, 구체예 20 내지 20f 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0233] 구체예 20h는 헬퍼 T 세포 에피토프가 헬퍼 T 세포 에피토프의 의도된 위치에 따라, 리포좀의 막으로의 삽입, 리포좀의 표면 상에 제시 또는 리포좀 내 캡슐화를 위해 변형된 구체예 20 내지 20g 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0234] 구체예 20i는 헬퍼 T 세포 에피토프가 서열 번호 13 내지 서열 번호 17로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 구체예 20 내지 20h 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0235] 구체예 20j는 리포좀이 타우 펩티드 및 헬퍼 T 세포 에피토프를 6:1의 중량비로 포함하는 구체예 1 내지 20i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0236] 구체예 20k는 리포좀이 타우 펩티드 및 헬퍼 T 세포 에피토프를 5:1의 중량비로 포함하는 구체예 1 내지 20i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0237] 구체예 20l은 리포좀이 타우 펩티드 및 헬퍼 T 세포 에피토프를 4:1의 중량비로 포함하는 구체예 1 내지 20i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0238] 구체예 20m은 리포좀이 타우 펩티드 및 헬퍼 T 세포 에피토프를 3:1의 중량비로 포함하는 구체예 1 내지 20i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0239] 구체예 20n은 리포좀이 타우 펩티드 및 헬퍼 T 세포 에피토프를 2:1의 중량비로 포함하는 구체예 1 내지 20i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0240] 구체예 20o는 리포좀이 타우 펩티드 및 헬퍼 T 세포 에피토프를 1:1의 중량비로 포함하는 구체예 1 내지 20i 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0241] 구체예 21은 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드가 서열 번호 18 내지 서열 번호 22로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 구체예 1 내지 20o 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0242] 구체예 21a는 CpG 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 갖는 구체예 21의 리포좀이다.

[0243] 구체예 21b는 CpG 올리고뉴클레오티드가 모든 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 갖는 구체예 21a의 리포좀이다.

[0244] 구체예 21c는 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드가 링커를 통해 적어도 하나의 친유성기에 공유 연결된 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함하는 구체예 21 내지 21b 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0245] 구체예 21d는 링커가 $(C_2H_4O)_n$을 포함하고, 여기서 n은 0 내지 10의 정수인 구체예 21c의 리포좀이다.

[0246] 구체예 21e는 링커가 3 내지 12 개의 탄소를 갖는 알킬 스페이서를 포함하는 구체예 21c의 리포좀이다.

[0247] 구체예 21f는 적어도 하나의 친유성 그룹이 콜레스테롤인 구체예 21 내지 21e 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0248] 구체예 21g는 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드가 $(C_2H_4O)_n$ (여기서 n은 3 내지 5의 정수임)을 포함하는 링커를 통해 콜레스테롤 분자에 공유적으로 연결된 서열 번호 18 또는 서열 번호 19의 뉴클레오티드를 포함하는 구체예 21 내지 21f 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0249] 구체예 22는 다음을 포함하는 리포좀이다:

[0250] a. 서열 번호 27 내지 서열 번호 38로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 타우 펩티드;

[0251] b. 서열 번호 39 내지 서열 번호 44로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 헬퍼 T 세포 에피토프, 바람직하게는 서열 번호 13 내지 서열 번호 17로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 헬퍼 T 세포 에피토프;

[0252] c. 서열 번호 18 내지 서열 번호 22로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 갖는 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드 (여기서 CpG 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을

포함하고, CpG 올리고뉴클레오티드는 링커를 통해 적어도 하나의 콜레스테롤에 공유적으로 연결됨); 및

[0253] d. 모노포스포릴 지질 A (MPLA).

[0254] 구체예 22a는

[0255] a. 서열 번호 27, 서열 번호 28 또는 서열 번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 타우 포스포펩티드;

[0256] b. 서열 번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 헬퍼 T 세포 에피토프;

[0257] c. $(C_2H_4O)_n$ (여기서, n은 3 내지 7의 정수임)을 포함하는 링커를 통해 콜레스테롤에 공유 결합된, 서열 번호 18 또는 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드; 및

[0258] d. 모노포스포릴 지질 A (MPLA)를 포함하는 구체예 22의 리포좀이다.

[0259] 구체예 22b는 MPLA가 3-O-데사실-4'-모노포스포릴 지질 A, 바람직하게는 MPL™인 구체예 22 또는 22a의 리포좀이다.

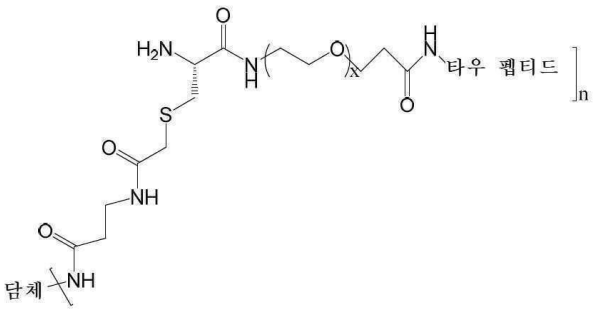
[0260] 구체예 22c는 MPLA가 바람직하게는 3D-(6-아실) PHAD®인 구체예 22 또는 22a의 리포좀이다.

[0261] 구체예 22d는 MPLA가 바람직하게는 3D-PHAD®인 구체예 22 또는 22a의 리포좀이다.

[0262] 구체예 23은 헬퍼 T 세포 에피토프가 리포좀에 캡슐화된 구체예 22 내지 22d 중 어느 하나의 리포좀이다.

[0263] 구체예 24는 구체예 1 내지 23 중 어느 하나의 리포좀 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이다.

[0264] 구체예 25는 타우 포스포펩티드 및 링커를 통해 이에 접합된 면역원성 담체를 포함하는 다음 구조 (I)를 갖는 접합체이다:



(I)

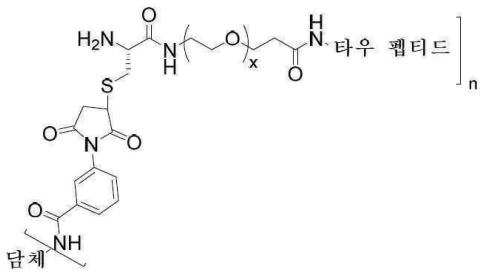
[0265]

[0266] 상기 식에서,

[0267] x는 0 내지 10의 정수이고;

[0268] n은 2 내지 15의 정수이다.

[0269] 구체예 25a는 타우 포스포펩티드 및 링커를 통해 이에 접합된 면역원성 담체를 포함하는 다음 구조 (II)를 갖는 접합체이다:



(II)

[0270]

[0271] 상기 식에서,

[0272] x는 0 내지 10의 정수이고;

[0273] n은 2 내지 15의 정수이다.

[0274] 구체예 26은 x가 2 내지 6의 정수인 구체예 25 또는 25a의 접합체이다.

[0275] 구체예 27은 x가 3인 구체예 25 또는 25a의 접합체이다.

[0276] 구체예 28은 n이 3 내지 7인 구체예 25 내지 25a 중 어느 하나의 접합체이다.

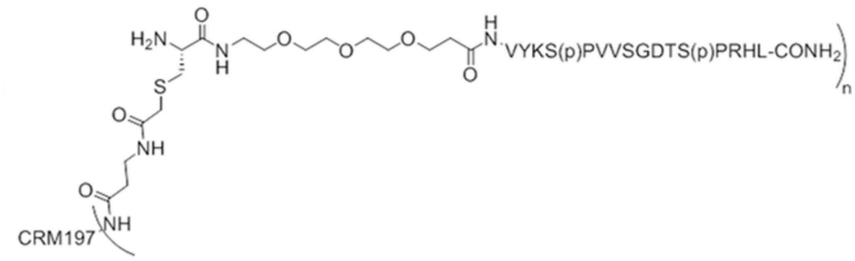
[0277] 구체예 29는 담체가 열쇠구멍삿갓조개 헤모시아닌 (KLH), 파상풍 톡소이드, CRM197 및 N. 메닌기티디스 (*N. meningitidis*) (OMP) 또는 이의 유도체로부터의 외막 단백질 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 면역원성 담체인 구체예 25 내지 28 중 어느 하나의 접합체이다.

[0278] 구체예 30은 타우 포스포펩티드가 서열 번호 1 내지 서열 번호 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 구체예 25 내지 29 중 어느 하나의 접합체이다.

[0279] 구체예 30a는 타우 포스포펩티드가 서열 번호 1, 서열 번호 2 또는 서열 번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 구체예 30의 접합체이다.

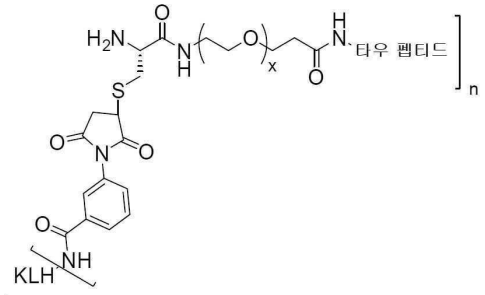
[0280] 구체예 31은 담체가 CRM197인 구체예 25 내지 30 중 어느 하나의 접합체이다.

[0281] 구체예 32는 다음의 구조를 갖는 구체예 25의 접합체이다:

[0282] 

[0283] 상기 식에서, n은 3 내지 7이다.

[0284] 구체예 32a는 KLH-[m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 - 시스테인 - $(C_2H_4O)_x$-타우 펩티드]$_n$인 구체예 25의 접합체이다:

[0285] 

[0286] 상기 식에서,

[0287] 타우 펩티드는 서열 번호 1 또는 서열 번호 3으로 이루어지고;

[0288] x는 0 내지 10의 정수이며;

[0289] n은 2 내지 15의 정수이다.

[0290] 구체예 33은 구체예 25 내지 32a 중 어느 하나의 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이다.

[0291] 구체예 33a는 애쥬번트를 추가로 포함하는 구체예 33의 약학 조성물이다.

[0292] 구체예 33b는 애쥬번트가 TLR-4 리간드 및 TLR-9 리간드 중 적어도 하나를 포함하는 구체예 33a의 약학 조성물이다.

[0293] 구체예 34는 대상에게 구체예 24 및 33 내지 33b의 약학 조성물 중 적어도 하나를 투여하는 것을 포함하는, 신경퇴행성 장애를 앓고 있는 대상에서 면역 반응을 유도하는 방법이다.

[0294] 구체예 35는 프라이밍 면역을 위해 구체예 24 및 33 내지 33b의 약학 조성물 중 적어도 하나를 대상에게 투여하고, 면역 부스팅을 위해 구체예 24 및 33 내지 33b의 약학 조성물 중 적어도 하나를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 구체예 34의 방법이다.

[0295] 구체예 36은 구체예 24 또는 33의 약학 조성물 중 적어도 하나를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상에서 신경퇴행성 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법이다.

[0296] 구체예 37은 프라이밍 면역을 위해 구체예 24 및 33 내지 33b의 약학 조성물 중 적어도 하나를 대상에게 투여하고, 면역 부스팅을 위해 구체예 24 및 33 내지 33b의 약학 조성물 중 적어도 하나를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 구체예 36의 방법이다.

[0297] 구체예 38은 신경퇴행성 질환 또는 장애가 신경원섬유 병변의 형성에 의해 유발되거나 이와 관련된 구체예 34 내지 37 중 어느 하나의 방법이다.

[0298] 구체예 39는 신경퇴행성 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병, 권투선수 치매, 다운 증후군, 게르스트만 슈트로이슬러 샤잉커 (Gerstmann-Straeussler-Scheinker) 병, 봉입체 근염, 프리온 단백질 뇌 아밀로이드 맥관장애, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 괌의 파킨슨증-치매 복합 (parkinsonism-dementia complex of Guam), 신경원섬유 매듭을 동반하는 비-괌 (non-Guamanian) 운동 신경세포병, 은친화성 과립성 치매 (argyrophilic grain dementia), 피질기저핵변성, 루이 치매 근위축성 측삭 경화증, 석회화가 있는 확산성 신경원섬유 매듭, 전측두엽 치매, 바람직하게는 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매 (FTDP-17), 이마관자엽 치매, 할러포르텐-스파츠병 (Hallervorden-Spatz disease), 다계통위축, C형 니만-픽병 (Niemann-Pick disease type C), 픽병, 진행성 피질하 신경교증, 진행성 핵상 마비, 아급성 경화성 범뇌염, 매듭 단독 치매, 뇌염 후 파킨슨증, 근긴장성 이영양증, 만성 외상성 뇌병증 (CTE), 일차 연령 관련 타우병증 (PART) 또는 루이소체 치매 (LBD)인 구체예 34 내지 38 중 어느 하나의 방법이다.

[0299] 구체예 40은 신경퇴행성 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 파킨슨병, 다운 증후군, 진행성 핵상 마비 (PSP), 17번 염색체와 연관된 전측두엽 치매 및 파킨슨증 (FTDP-17), 픽병 (Pick disease), 피질기저핵변성, 루이 치매 근위축성 측삭 경화증, 근긴장성 이영양증, 만성 외상성 뇌병증 (CTE), 뇌맥관병증, 일차 연령 관련 타우병증 (PART) 또는 루이소체 치매 (LBD)인 구체예 34 내지 39 중 어느 하나의 방법이다.

[0300] 구체예 40b는 신경퇴행성 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 진행성 핵상 마비 (PSP), 17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매 (FTDP-17), 또는 픽 병 및 PART (일차 연령 관련 타우병증)인 구체예 34 내지 39 중 어느 하나의 방법이다.

[0301] 구체예 40c는 신경퇴행성 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 파킨슨병, 다운 증후군,17번 염색체와 연관된 파킨슨증을 동반하는 전측두엽 치매 (FTDP-17), 피질기저핵변성, 루이 치매 근위축성 측삭 경화증, 근긴장성 이영양증, 만성 외상성 뇌병증 (CTE), 뇌맥관병증, 일차 연령 관련 타우병증 (PART) 또는 루이소체 치매 (LBD)인 구체예 34 내지 39 중 어느 하나의 방법이다.

[0302] 구체예 41은 구체예 24의 약학 조성물 및 구체예 33, 33a 또는 33b의 약학 조성물 중 적어도 하나를 포함하는 키트이다.

[0303] 구체예 42는 서열 번호 13 내지 서열 번호 17로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 헬퍼 T 세포 에피토프이다.

[0304] 구체예 43은 구체예 42의 헬퍼 T 세포 에피토프를 포함하는 약학 조성물이다.

[0305] 구체예 44는 구체예 43의 약학 조성물과 함께 항원을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법이다.

[0306] 실시예

[0307] 본 발명의 하기 실시예는 본 발명의 특성을 추가로 설명하기 위한 것이다. 하기 실시예는 본 발명을 제한하지

않으며 본 발명의 범위는 첨부된 청구 범위에 의해 결정된다는 것을 이해해야 한다.

[0308] 달리 지시되지 않는 한, 하기 실시예에서 사용된 실험 방법은 모두 일반적인 방법이다. 달리 지시되지 않는 한, 하기 실시예에서 사용된 시약은 모두 일반 시약 공급업체로부터 구매하였다.

[0309] 실시예 1: 리포좀 백신의 제조

[0310] *대조 리포좀 백신 (에탄올 주사 기술)의 제조*

[0311] 에탄올 (EtOH) 주입 기술에 이어 압출에 의해 대조 리포좀 백신을 제조하였다. 먼저, DMPC (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), DMPG (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), 콜레스테롤 (Dishman, 네덜란드 소재) 및 MPLA (Avanti Polar Lipids, 미국 앨라바마 소재)를 60 ℃에서 EtOH와 tert-부탄올 (t-BuOH)의 20:1 (V/V) 혼합물 중에 9:1:7:0.05의 몰비로 용해시켰다. 지질/에탄올 용액을 60 ℃에서 인산염 완충 염수 (PBS) pH 7.4로 희석하여 10% EtOH 농도를 유지하고 다중 라멜라 리포좀 소포 (MLV)를 형성시켰다. 이어서, MLV를 Emulsiflex-C5 (Avestin, 캐나다 소재)를 사용하여 일련의 기공 크기 0.08 um의 세 폴리카보네이트 필터 (Whatman)를 통해 5 회 연속 압출 통과시켰다. 생성된 리포좀을 PBS pH 7.4에서 희석하고 60 ℃로 가열하여 타우 펩티드 첨가 전에 리포좀 용액을 수득하였다.

[0312] 본원에서 활성 약학 성분 (API)으로 지칭되는 서열 번호 2의 아세테이트 테트라팔미토일화 인산화 타우 펩티드 (Bachem AG, 스위스 소재)를 1 mg/mL 농도로 2.0% 옥틸 β-D-글루코피라노사이드 (Sigma-Aldrich, 미국 소재)와 함께 pH 11.4 PBS에 용해시키고, 펩티드 용액을 60 ℃에서 리포좀 용액에 주입한 다음 60 ℃에서 30 분 동안 교반하였다. 한외 여과를 통해 목표 최종 부피까지 농축시키고, 정용 여과 동안 PBS pH 7.4로 10 회 완충제 교환을 수행하였다. 이어서, 리포좀의 표면에 API가 제시된 생성된 리포좀을 직렬의 두 0.2 um 폴리카보네이트 시린지 필터에 통과시켜 멸균 여과하고, 최종 생성물을 5 ℃에서 저장하였다.

[0313] *리포좀 X, Y, Z 및 Z^{+} 백신의 제조*

[0314] 지질 박막 기술에 이어 균질화 및 압출에 의해 리포좀 X 및 Y 백신을 제조하였다.

[0315] 최종 API 농도가 1200 ug/ml이고 최종 T50 농도가 1200 ug/ml인 리포좀 Z^{+} 백신을 에탄올 주입 기술에 이어 압출에 의해 생성한 다음, 지질 박막 기술에 이어 균질화 및 압출에 의해 최종 API 농도가 400 ug/ml이고 최종 T50 농도가 100 ug/ml인 리포좀 Z 백신을 생성하였다.

[0316] 최종 API 농도가 400 ug/ml이고 최종 T50 농도가 400 ug/ml인 리포좀 Z^{++} 백신을 지질 박막 기술에 이어 균질화 및 압출에 의해 제조하였다.

[0317] 최종 API 농도가 1200 ug/ml이고 최종 T50 농도가 300 ug/ml인 리포좀 Z^{+++} 백신을 에탄올 주입 기술에 이어 압출에 의해 제조하였다.

[0318] *지질 박막 기술에 의한 리포좀 X, Y, Z 및 Z^{++} 백신의 제조*

[0319] 지질 박막 기술에 이어 균질화 및 압출에 의해 리포좀 X, Y, Z 및 Z^{++} 백신을 제조하였다. 먼저, DMPC (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), DMPG (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), 콜레스테롤 (Dishman, 네덜란드 소재) 및 모노포스포릴 헥사-아실 리피드 A 3-데아실 합성 (3D-(6-아실) PHAD®) (Avanti Polar Lipids, 미국 앨라바마 소재)를 60 ℃에서 EtOH 중에 9:1:7:0.05의 몰비로 용해시켰다 (3D-(6-아실) PHAD®를 함유하지 않는 리포좀 Y는 제외). 진공 회전 증발기에서 에탄올을 증발시켜 지질 박막을 수득하였다.

[0320] 지질막을 PBS pH 7.4, 0.15 mg/mL T50 펩티드 (Peptides & Elephants, 독일 소재)를 함유하는 5% DMSO (모두 Sigma-Aldrich 제품)로 재수화시켰다. 샘플을 15 분 동안 온화하게 교반하고 추가로 강하게 와동시켜 지질 박막을 용해시켰다. 생성된 다중 라멜라 소포를 10 회 동결-해동 사이클 (액체 N_2 및 37 ℃ 수조)에 적용하고 균질화한 다음, 기공 크기 0.08 um의 폴리카보네이트 막 (Whatman, 영국 소재)을 통해 순차적 압출을 수행하였다. 균질화 및 압출 단계는 모두 EmulsiFlex-C5 (Avestin, 캐나다 소재)에서 수행되었다. 캡슐화된 T50 펩티드를 갖는 압출된 리포좀을 한외 여과에 의해 농축시키고, 완충제를 정용 여과에 의해 PBS pH 7.4로 교환하였다. 생성된 리포좀을 PBS pH 7.4에서 희석하고 60 ℃로 가열하여 타우 펩티드 및 애쥬번트 첨가 전에 리포좀 용액을 수득하였다.

[0321] CpG2006-콜레스테롤 (CpG2006-Chol) (Microsynth, 스위스 소재)은 PEG 스페이서에 의한 포스페이트 결합을 통해 콜레스테롤 분자로 5' 말단에서 변형된 티오 포스페이트로서 모든 뉴클레오티드 간 연결을 갖는 DNA 올리고뉴클레오티드이다. CpG2006-콜레스테롤 (CpG2006-Chol) (Microsynth, 스위스 소재)을 1 mg/mL로 PBS pH 7.4에 용해시키고 리포좀 용액 (CpG2006-Chol을 함유하지 않는 리포좀 X 제외)에 주입한 후 API 삽입 전에 15 분 동안 인큐베이션하였다.

[0322] API (Bachem AG, 스위스 소재)를 2% 옥틸 ß-D-글루코피라노사이드 (Sigma-Aldrich, 미국 소재)와 함께 1 mg/mL의 농도로 PBS pH 11.4에 용해시키고, 펩티드 용액을 60 ℃에서 리포좀 용액에 주입한 다음, 60 ℃에서 30 분 동안 교반하였다. 한외 여과를 통해 농축하여 목표 값 (리포좀 X, Y, Z에 대해 400 ug/ml API 및 100 ug/ml T50, 리포좀 Z^{++}에 대해 400 ug/ml API 및 400 ug/ml의 T50)을 얻고, 정용 여과 동안 PBS pH 7.4로 10 회 완충제 교환을 수행하였다. 이어서, 리포좀의 표면 상에 제시된 API를 갖는 생성된 리포좀을 0.2 um 폴리카보네이트 시린지 필터에 통과시켜 멸균 여과하고, 최종 생성물을 5 ℃에서 저장하였다.

[0323] *에탄올 주입 기술에 의한 리포좀 0의 제조*

[0324] 에탄올 (EtOH) 주입 기술에 이어 압출에 의해 리포좀 0 백신을 제조하였다. 먼저, DMPC (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), DMPG (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), 콜레스테롤 (Dishman, 네덜란드 소재) 및 MPLA (Avanti Polar Lipids, 미국 앨라바마 소재)를 60 ℃에서 EtOH와 tert-부탄올 (t-BuOH)의 20:1 (V/V) 혼합물 중에 9:1:7:0.05의 몰비로 용해시켰다. 지질/에탄올 용액을 60 ℃에서 인산염 완충 염수 (PBS) pH 7.4로 희석하여 10% EtOH 농도를 유지하고 다중 라멜라 리포좀 소포 (MLV)를 형성시켰다. 이어서, MLV를 Emulsiflex-C5 (Avestin, 캐나다 소재)를 사용하여 일련의 기공 크기 0.08 um의 세 폴리카보네이트 필터 (Whatman)를 통해 5 회 연속 압출 통과시켰다. 생성된 리포좀을 PBS pH 7.4에서 희석하고 60 ℃로 가열하여 타우 펩티드 첨가 전에 리포좀 용액을 수득하였다.

[0325] T46 펩티드 (Pepscan, 네덜란드 소재)를 PBS pH 7.4에 1 mg/mL로 용해시키고 리포좀 용액에 주입한 후 API를 삽입하기 전에 15 분 동안 인큐베이션하였다.

[0326] API (Bachem, 스위스 소재)를 2% 옥틸 ß-D-글루코피라노사이드 (Sigma-Aldrich, 미국 소재)와 함께 1 mg/mL의 농도로 PBS pH 11.4에 용해시키고, 펩티드 용액을 60 ℃에서 리포좀 용액에 주입한 후, 60 ℃에서 30 분 동안 교반하였다. 한외 여과를 통해 농축하여 목표 값 (400 ug/ml API 및 100 ug/ml T46)을 얻었으며, 정용 여과 동안 PBS pH 7.4로 10 회 완충제 교환을 수행하였다. 이어서, 리포좀의 표면 상에 제시된 API를 갖는 생성된 리포좀을 0.2 um 폴리카보네이트 시린지 필터를 통과시켜 멸균 여과하고, 최종 생성물을 5 ℃에서 저장하였다.

[0327] *에탄올 주입에 의한 리포좀 Z^{+} 및 리포좀 Z^{+++} 백신의 제조*

[0328] 에탄올 주입 기반 공정을 사용하여 리포좀 Z^{+} 및 리포좀 Z^{+++} 백신을 제조하였다. 먼저, DMPC (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), DMPG (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), 콜레스테롤 (Dishman, 네덜란드 소재) 및 3D-(6-아실) PHAD® (Avanti Polar Lipids, 미국 앨라바마 소재)를 60 ℃에서 EtOH 중에 9:1:7:0.04의 몰비로 용해시켰다. T50 펩티드 (Bachem AG, 스위스 소재)를 10 mM His/270 mM 수크로스 (pH 5.8-6.0)에 용해시켰다. 이어서, 지질 에탄올 용액을 T50 펩티드를 함유하는 용액에 주입하고 15 분 동안 온화하게 교반하여 다중 라멜라 소포 (MLV)를 생성하였다. MLV를 균질화 (리포좀 Z^{+}의 경우 6 회, 리포좀 Z^{+++}의 경우는 균질화하지 않음)한 다음, 기공 크기가 0.08 um인 폴리카보네이트 막 (Whatman, 영국 소재)을 통한 일련의 압출을 수행하였다 (리포좀 Z^{+}의 경우 5 회 통과, 리포좀 Z^{+++}의 경우 3-5 회 통과). 균질화 및 압출 양 단계는 리포좀 Z^{+}에 대해 EmulsiFlex-C5 (Avestin, 캐나다 소재)에서 수행하였다. 리포좀 Z^{+++}의 압출은 LIPEX 필터 압출기를 사용하여 수행되었다. 압출된 리포좀을 한외 여과에 의해 농축시키고, 완충제를 정용 여과에 의해 20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4로 교환하였다. 캡슐화된 T50 펩티드를 갖는 생성된 리포좀을 20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4에서 희석하고 60 ℃로 가열하여 API 및 애쥬번트를 첨가하기 전에 리포좀 용액을 수득하였다.

[0329] CpG2006-Chol (리포좀 Z^{+}의 경우 Microsynth, 스위스 소재; 리포좀 Z^{+++}의 경우 Avecia, 미국 소재)을 1 mg/mL로 20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4에 용해시키고 리포좀 용액에 주입한 후 API를 삽입하기 전에 15 분 동안 인큐베이션하였다.

[0330] API (Bachem AG, 스위스 소재)를 1% 옥틸 ß-D-글루코피라노사이드 (Sigma-Aldrich, 미국 소재)와 함께 1

mg/mL의 농도로 카보네이트 완충제 pH 10.2에 용해시키고, 펩티드 용액을 60 ℃에서 리포좀 Z^+ 용액에 주입한 뒤, 60 ℃에서 30 분 동안 교반하였다. 펩티드 용액을 60 ℃에서 T-라인 혼합을 사용하여 리포좀 Z^+ 용액에 혼합한 후 60 ℃에서 30 분 동안 교반하였다. 한외 여과를 통해 농축하여 목표 값 (리포좀 Z^+의 경우 1200 ug/ml API 및 1200 ug/ml T50; 및 리포좀 Z^{+++}의 경우 1200 ug/ml API 및 300 ug/ml T50)을 얻고, 정용 여과 동안 10 mM His/270 mM 수크로스 pH 6.5으로 10 회 완충제 교환을 수행하였다. 리포좀의 표면에 제시된 API를 갖는 생성된 Z^+ 리포좀 및 리포좀의 표면에 제시된 API를 갖는 생성된 Z^{+++} 리포좀을 0.2 um 폴리카보네이트 주사기/캡슐 필터에 통과시켜 멸균 여과하고, 최종 생성물을 5 ℃에서 저장하였다.

[0331] *리포좀 L, M 및 N 백신의 제조*

[0332] 지질 박막 기술에 이어 균질화 및 압출에 의해 리포좀 L, M 및 N 백신을 제조하였다. 먼저, DMPC (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), DMPG (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), 콜레스테롤 (Dishman, 네덜란드 소재) 및 MPLA (Avanti Polar Lipids, 미국 앨라바마 소재)를 60 ℃에서 EtOH 중에 9:1:7:0.05의 몰비로 용해시켰다. 에탄올을 진공 회전 증발기에서 증발시켜 지질 박막을 수득하였다.

[0333] 지질막을 다음 중 하나를 함유하는 PBS pH 7.4, 5% DMSO로 재수화시켰다 (모두 Sigma-Aldrich 제품):

[0334] · 0.15 mg/mL T48 펩티드 (Peptides&Elephants, 독일 소재) - 리포좀 M에 대해; 또는

[0335] · 0.13 mg/mL T50 펩티드 (Peptides&Elephants, 독일 소재) - 리포좀 L에 대해; 또는

[0336] · 0.15 mg/mL T52 펩티드 Peptides&Elephants, 독일 소재) - 리포좀 N에 대해.

[0337] 샘플을 15 분 동안 온화하게 교반하고, 추가로 강하게 와동시켜 지질 박막을 용해시켰다. 생성된 다중 라멜라 소포에 10 회 동결-해동 사이클 (액체 N_2 및 37 ℃에서 수조)을 실시하고 균질화한 다음, 기공 크기 0.08 um의 폴리카보네이트 막 (Whatman, 영국 소재)을 통해 일련의 압출을 수행하였다. 균질화 및 압출 단계는 모두 EmulsiFlex-C5 (Avestin, 캐나다 소재)에서 수행하였다. 압출된 리포좀을 한외 여과에 의해 농축시키고, 완충제를 정용 여과에 의해 PBS pH 7.4로 교환하였다. 캡슐화된 T48, T50 또는 T52 펩티드를 갖는 생성된 리포좀을 PBS pH 7.4로 희석하고 60 ℃로 가열하여 타우 펩티드 첨가 전에 리포좀 용액을 수득하였다.

[0338] API (Bachem AG, 스위스 소재)를 2% 옥틸 ß-D-글루코피라노사이드 (Sigma-Aldrich, 미국 소재)와 함께 1 mg/mL의 농도로 PBS pH 11.4에 용해시키고, 펩티드 용액을 60 ℃에서 리포좀 용액에 주입한 뒤, 60 ℃에서 30 분 동안 교반하였다. 한외 여과를 통해 농축하여 목표 값 (400 ug/ml API 및 100 ug/ml T48, T50 또는 T52)을 얻고, 정용 여과 동안 PBS pH 7.4로 10 회 완충제 교환을 수행하였다. 이어서, 리포좀의 표면 상에 제시된 API를 갖는 생성된 리포좀을 0.2 um 폴리카보네이트 시린지 필터에 통과시켜 멸균 여과하고 최종 생성물을 5 ℃에서 저장하였다.

[0339] *리포좀 R, S 및 T 백신의 제조*

[0340] 에탄올 주입 기반 공정을 사용한 후 압출에 의해 리포좀 R, S 및 T 백신을 제조하였다. 먼저, DMPC (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), DMPG (Lipoid GmbH, 독일 루드빅샤펜 소재), 콜레스테롤 (Dishman, 네덜란드 소재) 및 3D-(6-아실) PHAD® (Avanti Polar Lipids, 미국 앨라바마 소재)를 60 ℃에서 EtOH 중에 9:1:7:0.04의 몰비로 용해시켰다. 리포좀 R 및 T의 경우, 상기 지질 에탄올 용액을 270 mM 수크로스가 보충된 10 mM 히스티딘 pH 5.8에 혼합하여 10% 용매 (EtOH)에 도달시킨 후 60 ℃에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 리포좀 S의 경우, T50 펩티드 (Bachem AG, 스위스 소재)를 10 mM His/270 mM 수크로스 (pH 5.8-6.0)에 용해시켰다. 리포좀 R, S 및 T와 관련된 지질-완충제 믹스를 15 분 동안 온화하게 교반하여 다중 라멜라 소포 (MLV)를 생성하였다. 생성된 다중 라멜라 소포를 EmulsiFlex-C5 고압 시스템 (Avestin, 캐나다)에서 수행되는 기공 크기 0.08 um (5X)의 폴리카보네이트 막 (Whatman, 영국 소재)을 통해 압출시켰다.

[0341] 압출된 리포좀을 한외 여과에 의해 농축시키고, 완충제를 정용 여과에 의해 20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4로 교환하였다. 리포좀 S에 대해 캡슐화된 T50을 갖는 생성된 리포좀 및 생성된 리포좀 R 및 T를 20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4에서 추가로 희석하고 60 ℃로 가열하여 리포좀 T에 대해 API 및 T57을 첨가하기 전에 리포좀 용액을 수득하였다.

[0342] 리포좀 T의 경우, T57을 탈이온 증류수에서 1% 옥틸 ß-D-글루코피라노사이드 (Sigma-Aldrich, 미국 소재)에서

1 mg/mL로 용해시키고 리포좀에 삽입한 후 API 삽입 전에 60 ℃에서 15 분 동안 인큐베이션하였다.

[0343] API (Bachem AG, 스위스 소재)를 1% 옥틸 ß-D-글루코피라노사이드 (Sigma-Aldrich, 미국 소재)와 함께 1 mg/mL의 농도로 카보네이트 완충제 pH 10.2에 용해시키고, 펩티드 용액을 60 ℃에서 리포좀 용액에 혼합한 후 60 ℃에서 30 분 동안 교반하였다. 한외 여과를 통해 농축하여 다음과 같은 목표 값을 얻었다:

[0344] - 리포좀 R에 대해 1200 ug/ml API;

[0345] - 리포좀 S에 대해 1200 ug/ml API 및 300 ug/ml T50; 및

[0346] - 리포좀 T에 대해 1200 ug/ml API 및 300 ug/ml T57.

[0347] 정용 여과 동안 10 mM His/270 mM 수크로스 pH 6.5로 10 회 완충제 교환을 수행하였다. 이어서, 리포좀의 표면 상에 제시된 API를 갖는 생성된 리포좀을 0.2 um 폴리카보네이트 시린지 필터에 통과시켜 멸균 여과하고, 최종 생성물을 5 ℃에서 저장하였다.

[0348] 실시예 2: 접합체 백신의 제조

[0349] *펩티드 및 애쥬번트*

[0350] 두 다중 인산화 펩티드 에피토프 (각각 3 개 및 2 개의 인산화된 아미노산을 갖는 TAUVAC-p7.1 및 TAUVAC-p22.1)의 서열을 이들이 B의 표면 면역글로불린에 더 잘 결합할 수 있고 서열이 인간 HLA 클래스 IA, B 및 C 분자에 높은 친화도로 결합하는 것으로 예측된 에피토프를 함유하지 않도록 길이를 최적화시켜 정제하였다. 후자의 기준은 잠재적으로 심각한 뉴런 손상을 유발할 수 있는 타우에 대한 세포 독성 $CD8^+$ T 세포 반응의 유도를 피하는데 중요하였다. 면역 에피토프 데이터베이스 및 분석 자료의 T 세포 에피토프 예측 도구를 사용하여, 펩티드 TAUVAC-p7.1은 인간 HLA 클래스 IA, B, C 및 HLA 클래스 II DQ 및 DR 분자에 높은 친화도로 결합할 수 있는 예측된 에피토프를 나타내지 않은 반면, 펩티드 TAUVAC-p22.1은 중간/높은 친화도로 HLA 클래스 II DQ 및 DR 분자에 결합하는 에피토프를 함유하는 것으로 예측되었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0351] 본 연구에 사용된 인산화 타우 펩티드 (서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3)는 합성 동안 첨가된 포스포-잔기로 합성적으로 (Pepscan, 네덜란드 소재) 생산되었다. 링커를 통해 KLH 담체에 공유적으로 연결된, 서열 번호 1 또는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 가지는 인산화된 타우 펩티드를 포함하는 접합체는 본원에서 각각 접합체 B 또는 접합체 C로 지칭된다. 링커를 통해 CRM 담체에 공유적으로 연결된 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 인산화된 타우 펩티드를 포함하는 접합체는 본원에서 접합체 A로 지칭된다.

[0352] 접합체 B 및 C를 제조하기 위해, 백신 펩티드를 m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 (MBS) 링커 및 펩티드의 N-말단에 추가 시스테인을 통해 담체 단백질 KLH에 접합시켰다. 결합되지 않은 펩티드는 접합체를 농축하기 전에 Sephadex G25 컬럼을 사용하여 제거하였다. 제조업체의 지시에 따라 강력한 다성분 애쥬번트 (Sigma Adjuvant System, Sigma-Aldrich) 또는 단일 성분 데포 애쥬번트 (수산화알루미늄, Alhydrogel®, Invivogen)에 주입하기 전에 접합체들을 혼합하였다.

[0353] 백신 펩티드를 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-시스테인-아세트아미도프로피온아미드 링커를 통해 담체 단백질 CRM197에 접합시켰다. 합성 동안 포스포-잔기 및 PEG3 스페이서를 첨가하여 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 인산화된 타우 펩티드를 합성적으로 (Polypeptide Laboratories SAS) 제조하였다. 접합체 A는 담체 단백질 CRM197을 숙신이미딜 3-(브로모아세트아미드)프로피오네이트 (SBAP) 링커를 통해 펩티드의 N-말단의 시스테인에 접합시킴으로써 제조되었다. SBAP를 NHS 에스테르 반응 화학을 통해 CRM197 단백질 일차 아민 (-NH2)에 결찰시켰다. 한외 여과 및 정용 여과 (UF/DF)를 사용하여 과량의 SBAP 링커를 제거하였다. CRM197-SBAP 중간체를 인산화된 타우 펩티드에 접합시키고, 반응이 완료되면, 과량의 L-시스틴을 첨가하여 반응을 중단시킴으로써 접합 반응을 종료시켰다. 조 CRM197-펩티드 접합 생성물을 Capto Q ImpRes (GE Healthcare) 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 정제하고 염 등용매법을 사용하여 용리시켰다. 이어서 정제된 CRM197-펩티드 산물을 UF/DF를 사용하여 20 mM 트리스, 250 mM 수크로스, pH 8.1로 0.5 mg/mL의 농도로 제제화시켰다. 10% PS80 스톡 완충제를 첨가하여 0.01% PS80의 최종 농도에 도달시킴으로써 CRM197-타우 펩티드 약물 물질 (DS)을 생성하였다. 여과 전에 용액을 철저히 혼합하였다.

[0354] 실시예 3: 타우 포스포펩티드에 특이적인 백신 유도된 IgG 항체

[0355] 모든 동물 실험은 동물 실험에 대한 현지 법규에 따라 승인되고 수행되었다. 붉은털원숭이 (*Macaca mulatta*)는 중국 Kunming Biomed International Ltd, 중국 Yunnan Yinmore Bio-Tech Co. LTD 및 중국 Yunnan Laboratory

Primates Inc.로부터 입수하였다. 동물은 예방 접종 개시시 2 내지 5 세령이었고, 최소 체중은 2.5 kg이었다. 처리 시작 전 및 그 후 매 주 상세한 임상 검사가 수행되었다. 또한, 하루에 두 번 원숭이를 관찰하고 임상 징후를 기록하였다.

[0356] 성체 붉은털원숭이 (그룹당 n = 3 마리 수컷 및 3 마리 암컷)에게 1, 29 및 85 일에 대조 리포좀 백신 (MPLA 및 서열 번호 2의 테트라팔미토일화 인산화 타우 펩티드를 갖는 리포좀) 또는 본 출원의 구체예에 따른 리포좀 백신, 예를 들어 리포좀 Z (서열 번호 2의 테트라팔미토일화 인산화 타우 펩티드, 3D-(6-아실) PHAD®, 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드 CpG 2006 및 T-세포 펩티드 T50을 갖는 리포좀)의 용량 당 1800 ㎍의 서열 번호 2의 아세테이트 테트라팔미토일화 인산화 타우 펩티드를, 또는 CpG 올리고뉴클레오티드 CpG 2006 및 알붐과 공동 주입된 본 발명의 일 구체예에 따른 접합체 백신 (예를 들어, 접합체 A, CRM197에 연결된 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드)을 용량 당 15 ㎍로 피하 면역화시켰다. 면역화 전 및 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134 및 148 일에 채혈하고, 혈청을 단리하였다.

[0357] 코팅 항원으로서 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드를 사용하여 ELISA에 의해 특이적 IgG 항체 역가를 결정하였다. 개별 면역화된 원숭이로부터의 혈청을 분석 완충제 (PBS, 0.05% Tween20, 1% BSA)에서 연속 희석하고 관련 펩티드로 코팅된 96-웰 플레이트에 적용하였다. 2 시간 인큐베이션 후, 샘플을 제거하고 플레이트를 PBST (PBS, 0.05% Tween20)에서 세척하였다. HRP 접합체화 항-원숭이 IgG (KPL)에 이어 ABTS 기질 (Roche)을 사용하여 항체를 검출하였다. 모든 샘플을 8 회 2 배 희석액으로 진행하고, 각 플레이트에 양성 및 음성 대조군 샘플을 포함시켰다. 데이터는 그룹당 종점 역가 (양성 반응을 유도하는 최종 혈청 희석)의 기하 평균으로서 표현되었다.

[0358] 도 4에 도시된 바와 같이, 리포좀 Z 백신 및 접합체 A 둘 다 대조군 리포좀 백신과 비교하여 더 높은 포스포펩티드-특이적 IgG 역가를 유도하였다.

[0359] 실시예 4: 인간 뇌에서 병리적 타우 구조에 특이적인 백신 유도된 항체

[0360] 모든 뇌 조직은 네덜란드 뇌 은행 (NBB)으로부터 입수하였고 뇌 부검에 대한 사전 동의 및 연구 목적을 위한 샘플 사용뿐만 아니라 임상 정보에 대한 서명 후 공여자로부터 수집하였다. 비치매 대조군 (건강한 사람), 알츠하이머병 (AD), 타우 병리학을 동반한 전측두엽 치매 (FTD-타우), 픽병, 일차 연령 관련 타우병증 (PART) 및 진행성 핵상 마비 (PSP)로부터의 파라핀 절편을 사용하였다. 뇌 영역에는 두정엽 피질, 중간 전두회, 해마 또는 미상핵이 포함되었다.

[0361] 특히, 대조군 인간 대상 (건강한 사람) 및 알츠하이머병을 앓고 있는 인간 대상 (AD Braak V/VI)의 두정 피질로부터의 포르말린-고정 파라핀 포매 절편을 정상 항체 희석제 (Immunologic)에서 1:100으로 희석된 면역후 붉은털원숭이 혈청으로 염색하였다. 이어서, 절편을 세척하고 염소 항-원숭이-HRP (Abcam)로 염색하였다. 마지막으로 염색을 겨자무과산화효소 (HRP)의 존재하에 갈색 특이적 염색을 침착시키는 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB; Dako)을 사용하여 가시화하였다. 슬라이드를 헤마톡실린으로 대조 염색하여 탈수시키고 Quick D 마운팅 매체 (Klinipath)로 장착하였다. Leica DC500 현미경으로 촬영하였다.

[0362] 도 5의 결과는 리포좀 Z (서열 번호 2의 테트라팔미토일화 인산화 타우 펩티드, 3D-(6-아실) PHAD®, 지질화된 CpG 올리고뉴클레오티드 CpG 2006 및 T-세포 펩티드 T50을 가지는 리포좀)로 면역화된 붉은털원숭이로부터의 면역 후 혈청이 인간 뇌 절편에서 병리적 타우 구조를 염색하였음을 나타낸다. 개선된 리포좀으로 일차 면역화 후 106 일에 붉은털원숭이로부터 혈청을 수집하였다. 이 붉은털원숭이는 혈청 수집 전 0, 1 및 3 개월에 면역화되었다. 왼쪽 (AD Braak V/VI) 패널은 Braak 단계 V 공여자로부터의 두정엽 피질의 염색을 보여준다. 화살표는 타우 매듭의 염색을 나타낸다. 오른쪽 (건강한) 패널은 Braak 단계 0 공여자로부터의 두정엽 피질의 염색을 보여준다. 혈청을 1:100 희석으로 섹션에 적용한 다음 1:100에서 염소 항-원숭이 항체를 적용하고, DAB 현상액을 사용하여 염색을 시각화하였다.

[0363] 도 6의 결과는 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드와 가용성 CpG 및 수산화알룸을 함유하는 접합체 A로 면역화된 붉은털원숭이로부터의 혈청이 인간 AD 뇌 절편에서 병리적 타우 구조에 결합함을 보여준다. CRM 접합체 백신으로 일차 면역화 후 106 일에 혈청을 수집하였다. 이들 붉은털원숭이는 혈청 수집 전 0, 1 및 3 개월에 면역화되었다. 상부 (AD) 패널은 Braak 단계 V 공여자로부터 타우 매듭을 포함하여 두정엽 피질의 염색을 보여준다. 하부 (CTRL) 패널은 Braak 단계 0 공여자로부터의 두정엽 피질의 염색을 보여준다. 혈청을 1:100 희석으로 섹션에 적용한 후 1:100에서 염소 항-원숭이 항체를 적용하고, DAB 현상액을 사용하여 염색을 시각화하였다.

[0364] 실시예 5: 1 또는 2 종의 애쥬번트를 갖는 리포좀 백신

[0365] 개선된 리포좀 백신에서 두 애쥬번트의 첨가는 타우 포스포펩티드-특이적 IgG 항체 역가의 수준뿐만 아니라 개체 간 항체 반응의 일관성을 증가시킨다.

[0366] 성체 붉은털원숭이 (그룹당 n = 3 마리 수컷 및 3 마리 암컷)를 1, 29, 85 및 169 일에 대조 리포좀 백신 또는 3D-(6-아실) PHAD® 애쥬번트 단독 (리포좀 X, 도 7A), 지질화된 CpG 2006 올리고뉴클레오티드 애쥬번트 단독 (리포좀 Y, 도 7B) 또는 3D-(6-아실) PHAD® 및 지질화된 CpG 2006 올리고뉴클레오티드 애쥬번트를 둘 다 (리포좀 Z, 도 7C) 함유하는 캡슐화된 T50 T-세포 에피토프로 개선된 리포좀 백신의 용량 당 1800 ㎍의 서열 번호 2의 아세테이트 테트라팔미토일화 인산화 타우 펩티드로 피하 면역화시켰다. 면역화 전 및 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176 및 190 일에 채혈하고, 혈청을 단리하였다. 코팅 항원으로서 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드 및 항-원숭이 IgG 이차 항체를 사용하여 ELISA에 의해 혈청 중 특이적 IgG 항체 역가를 결정하였다. 생성된 항체 수준은 경시적으로 각 개별 원숭이에 대한 종점 역가 (양의 반응을 유도하는 마지막 혈청 희석)로서 제시된다. 각 면역화 그룹이 하나의 패널에 표시되었다 (도 7A-C). 그룹당 종점 역가의 기하 평균 ± 95% 신뢰 구간이 도 7D에 나와 있다. 요약하면, 도 7A-D는 캡슐화된 T50을 함유하는 리포좀 백신에 2종 애쥬번트를 포함시키는 것이 타우 포스포펩티드에 대한 항체 반응의 수준 및 일관성을 개선시켜 개별 원숭이들 사이에서 항체 반응의 변동성을 감소시키는 것을 보여준다. 보다 구체적으로, 도 7D에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드, T50 T-세포 에피토프 (리포좀 X, Y 및 Z) 및 1 또는 2 개의 애쥬번트를 갖는 개선된 리포좀 백신은 T-세포 에피토프가 없는 대조 리포좀 백신보다 타우 포스포펩티드에 대해 더 높은 역가를 유도하였다. 개선된 각 리포좀 백신을 주사했을 때 모든 원숭이는 반응자였고, 6 마리 원숭이 중 4 마리가 대조 리포좀 백신에 반응자였다.

[0367] 실시예 6: 농축된 쌍 나선형 필라멘트 (ePHF)에 특이적인 백신 유도된 항체

[0368] 붉은털원숭이 그룹 (그룹당 n = 3 마리 수컷 및 3 마리 암컷)을 1 및 29 일에 (i) T50 T-세포 에피토프 및 3D-(6-아실) PHAD® 애쥬번트 단독을 함유하는 개선된 리포좀 백신 (리포좀 X), (ii) T50 T-세포 에피토프 및 지질화된 CpG 2006 애쥬번트 단독을 함유하는 개선된 리포좀 백신 (리포좀 Y), (iii) T50 T-세포 에피토프 및 두 애쥬번트 (3D-(6-아실) PHAD® 및 지질화된 CpG2006를 포함하는 개선된 리포좀 백신 (리포좀 Z), 또는 (iv) 알룸 및 CpG 올리고뉴클레오티드 CpG 2006와 함께 주입된 접합체 백신 (CRM197에 연결된 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드) (접합체 A)로 백신 접종하여 피하로 면역화시켰다.

[0369] Greenberg and Davies (Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15):5827-31)의 수정된 방법을 사용하여 불용성 타우의 사르코실 추출에 의해 조직학적으로 확인된 AD 대상의 사후 뇌 조직으로부터 농축된 쌍 나선형 필라멘트 (ePHF) 제제를 얻었다. 농축 쌍 나선형 필라멘트 (ePHF)에 특이적인 항체 역가를 Mesoscale Discovery (MSD) 플랫폼을 사용하여 평가하였다. 알츠하이머병 환자로부터 단리된 ePHF와 인큐베이션하기 전에 MSD 스트렙타비딘 플레이트를 비오티닐화 항-타우 포획 항체 (HT7-비오틴, ThermoScientific)로 코팅하고, 원숭이 IgG 항체와 교차 반응하는 설포 태그-표지된 항-인간 IgG 항체를 사용하여 ePHF에 특이적인 IgG 항체를 추가로 검출하였다. 보다 구체적으로, ePHF를 사전에 1% BSA로 포화시키고 비오티닐화된 HT-7 (Thermo Scientific)로 코팅된 MSD Gold 소 스폿 스트렙타비딘 96-웰 플레이트 (MSD)에 첨가하였다. 1 시간의 인큐베이션 후, 플레이트를 PBST로 세척하고 연속 혈청 희석물을 첨가한 후, 2 시간 동안 인큐베이션하였다. Read 완충제 T를 첨가하기 전에 설포 태그 (SulfoTag) 표지된 항-인간 IgG 항체를 사용하여 결합된 항체를 검출한 후 1% PFA에서 고정 단계를 수행하였다. Sector Imager (MSD)를 사용하여 플레이트를 분석하였다. 결과를 그룹당 기하 평균과 함께 각 개별 원숭이에 대해 밀리리터당 임의 단위 (AU/mL)로 표현하였다. 제 1 면역화 후 50 일에 ePHF에 특이적인 항체 역가가 표시되었다.

[0370] 도 8은 모든 백신이 고역가의 ePHF-특이적 IgG 항체를 유도함을 보여준다.

[0371] 고역가의 ePHF-특이적 IgG 항체에 대해 유사한 결과가 근육 내 투여를 통해 붉은털원숭이에 투여된 리포좀 Z^+와 같은 다른 리포좀으로도 얻어졌다.

[0372] 실시예 7: 붉은털원숭이에서 리포좀 백신 및 접합체 백신에 의해 유도된 타우 포스포펩티드-특이적 항체 범위

[0373] 붉은털원숭이 그룹 (그룹당 n = 3 마리 수컷 및 3 마리 암컷)을 1 및 29 일에 (i) 캡슐화된 T50 및 두 애쥬번트: TLR4 리간드 (3D-(6-아실) PHAD® 및 지질화된 CpG 2006 올리고뉴클레오티드를 함유하는 개선된 리포좀 백신 (리포좀 Z), 및 (ii) 알룸 및 CpG 올리고뉴클레오티드 CpG 2006과 함께 주입된 접합체 백신 (CRM에 연결된 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드) (접합체 A)로 백신 접종하여 피하로 면역화시켰다. 하나의 아미노산 이동 N-말단 비오티닐화 8-mer 펩티드 라이브러리를 사용하고 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드의 서열뿐 아

니라, 서열 번호 4의 서열 (VYKSPVVSGDTSPRHL, 서열 번호 2와 동일한 아미노산 서열을 갖는 비인산화된 타우 펩티드) 및 상응하는 비오티닐화된 전장 펩티드의 서열을 커버링하여 이차 면역화 3 주 후 (50 일)에 에피토프 맵핑 ELISA에 의해 항체의 에피토프 인식 프로파일을 결정하였다.

[0374] 도 9는 리포좀 Z로 면역화된 원숭이가 서열 번호 2의 인산화된 펩티드의 N-말단 부분에 주로 결합하는 IgG 항체를 생성 (도 9A)한 반면, 접합체 백신 (CRM에 연결된 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드)으로 면역화된 원숭이는 서열 번호 2의 타우 펩티드의 C-말단 부분에 주로 결합하는 IgG 항체를 생성 (도 9B)하였음을 보여준다.

[0375] 실시예 8: 캡슐화된 T-세포 에피토프를 갖는 리포좀 백신에 의해 유도된 타우 포스포펩티드에 특이적인 IgG 항체의 역가 증가

[0376] C57BL/6J 마우스 세 그룹 (그룹당 n = 10)을 0 및 14 일에 i) TLR4 작용제 (3D-(6-아실) PHAD®)를 함유하는 리포좀 백신 (리포좀 R), ii) 애쥬번트로서 캡슐화된 T-세포 에피토프 T50 및 TLR4 리간드 (3D-(6-아실) PHAD®)를 함유하는 리포좀 백신 (리포좀 S), 또는 iii) 애쥬번트로서 리포좀 표면 상에 고정된 T-세포 에피토프 T57 (즉, 디팔미토일화 T50) 및 TLR4 리간드 (3D-(6-아실) PHAD®)을 함유하는 리포좀 백신 (리포좀 T)으로 피하 면역화시켰다. 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드에 특이적인 IgG 항체의 수준을 ELISA에 의해 마우스 혈장에 처음 주입 후 21 일 및 35 일에 측정하였다; 결과는 mL 당 임의의 단위 (AU)로 표현된 그룹당 기하 평균 ± 95% CI와 함께 개별 마우스의 값으로 제시되었다. 도 10A에 도시된 바와 같이, 캡슐화된 T50을 함유하는 리포좀 백신 (리포좀 S)을 사용한 백신 접종은 첫 면역화 후 21 일에 대조 리포좀 백신 (리포좀 R) 및 고정된 T-세포 에피토프를 함유한 리포좀 백신 (리포좀 T)보다 상당히 높은 항체 역가 (각각 크러스칼-왈리스 검정: p = 0.0089 및 p = 0002), 및 또한 첫 면역화 후 35 일에 대조군 리포좀 백신보다 더 높은 항체 역가 및 고정 T-세포 에피토프를 함유하는 리포좀 백신보다 현저하게 높은 항체 역가 (크러스칼-왈리스 검정: 각각 p = 0.7591 및 p = 0053)를 유도하였다 (도 10B).

[0377] 실시예 9: 도입된 T-세포 에피토프에 특이적인 리포좀 백신 유도된 T-세포 반응

[0378] C57BL/6J 마우스 세 그룹 (그룹당 n = 5)을 0, 14 및 28 일에 (i) 애쥬번트로서 TLR4 작용제 (MPLA) 및 캡슐화된 T-세포 펩티드 T48 (GS 링커로 분리된 T-세포 에피토프 PADRE, T2, T30 및 T17를 함유)을 가지는 개선된 리포좀 백신 (리포좀 M), (ii) 애쥬번트로서 TLR4 작용제 (MPLA) 및 캡슐화된 T52 (RK 링커로 분리된 T-세포 에피토프 PADRE, T2 및 T30을 함유)를 가지는 개선된 리포좀 백신 (리포좀 N) 또는 (iii) PBS로 피하 면역화시켰다. IL-4 및 IFN-γ ELISPOT에 의한 T-세포 반응의 분석을 위해 제 1 면역화 후 42 일에 마우스로부터 비장을 수확하였다. 단일 세포 현탁액을 10 ug/mL에서 48 시간 동안 배지, T48 또는 T52 펩티드와 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 비오티닐화된 항-마우스 IL-4 또는 IFN-γ 모노클로날 항체 및 스트렙타비딘 알칼리성 포스파타제 (AP)와 함께 인큐베이션하였다. AP 기질을 추가하여 스팟을 전개시켰다. 도 11은 리포좀 유도된 IL-4 (도 11B) 및 IFN-γ 스팟 형성 세포 (도 11A)에 캡슐화된 것과 동일한 펩티드를 갖는 마우스 비장 세포의 재자극을 나타내지만, PBS-주입된 마우스의 비장 세포는 그렇지 않았음을 보여준다. 이는 백신에 T-세포 에피토프의 첨가가 특이적 T-세포의 활성화를 유도함으로써 타우-특이적 B-세포에 대한 항체 생산에 추가적인 도움을 제공할 수 있음을 확인시켰다.

[0379] 실시예 10: 캡슐화된 T-세포 에피토프 및 고정된 T-세포 에피토프를 함유하는 리포좀 백신

[0380] 붉은털원숭이 그룹 (그룹당 n = 6)을 1, 29, 85 및 169 일에 (i) 애쥬번트로서 캡슐화된 T-세포 에피토프 T50 및 TLR4 리간드 (MPLA)를 함유하는 리포좀 백신(리포좀 L), (ii) 애쥬번트로서 고정된 T-세포 에피토프 T46 및 TLR4 리간드 (MPLA)를 가지는 리포좀 백신 (리포좀 O) 및 (iii) 애쥬번트로서 TLR4 리간드 (MPLA)를 함유하고 T-세포 에피토프를 함유하지 않는 대조 리포좀 백신으로 피하 면역화시켰다. 면역화 전 (-14 일) 및 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176 및 190 일에 채혈하고, 혈청을 단리하였다. 코팅 항원으로서 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드 및 항-원숭이 IgG 이차 항체를 사용하여 ELISA에 의해 특이적 IgG 항체 역가를 결정하였다. 생성된 항체 수준을 종점 역가 (양의 반응을 유도하는 최종 혈청 희석)로 계산하고, 데이터를 그룹당 기하 평균으로 표현하였다. 도 12에 도시된 바와 같이, 캡슐화된 T-세포 에피토프를 포함하는 리포좀 백신 (리포좀 L) 및 고정된 T-세포 에피토프를 포함하는 리포좀 백신 (리포좀 O)은 각각 T-세포 에피토프가 없는 대조 리포좀 백신에 비해 더 높은 타우 포스포펩티드-특이적 항체 역가를 유도하였다.

[0381] 실시예 11: 접합체 백신에 의해 유도된 마우스에서의 항체 반응

[0382] 암컷 BALB/c 마우스 (그룹당 14 마리의 마우스)를 도 13A에 도시된 스케줄에 따라 접합체 B 또는 접합체 C (KLH에 공유적으로 연결된 서열 번호 1 또는 서열 번호 3을 함유함)로 면역화하고 강력한 다성분 애쥬번트 (Sigma

Adjuvant System®, Sigma-Aldrich (여기서는 Ribi라고 함)) 또는 단일 성분 저장소 애쥬번트 (Alhydrogel® 애쥬번트 2% 또는 수산화알루미늄 겔, InvivoGen (여기서는 알룸이라고 함))로 조정된 백신 후보로 면역화하였다. 서열 번호 1의 아미노산 서열은 마우스 단백질에서의 것과 비교하여 단 하나의 아미노산 차이를 가지는 반면, 서열 번호 3의 서열은 인간과 마우스 사이에서 100% 보존된다. 따라서, 선택된 에피토프는 마우스에 대한 "자기" 단백질로 타당하게 고려될 수 있으며, 마우스는 면역 내성이 면역원성에 미칠 수 있는 한계를 조사하기 위한 관련 모델임에 틀림없다.

[0383] 백신 면역원성의 제 1 측정으로서 유세포 측정법을 사용하여 백신 주사 부위 배액 경부 림프절에서 T 여포 헬퍼 세포 (TfH)의 유도를 측정하였다 (그룹당 4 마리의 마우스). TfH는 다른 분자 중에서도 CXCR5, PD-1 및 ICOS의 발현을 특징으로 하는 $CD4^+$ T 세포의 특수화 집단이다. TfH는 백신 또는 다른 면역 자극에 노출된 후 확장되고 배아 센터에서 B 세포의 친화도 성숙을 지원한다 (Crotty, 2011, Annual Reviews of Immunology. Vol 29:p621-663). 유도된 TfH의 수는 인간 (Bentebibel et al., 2013, Sci Transl Med., 5(176):176ra32; Spensieri et al., 2013, Proc Natl Acad Sci U S A., 110(35):14330-5) 및 작은 동물에서 백신의 보호 효능과 양의 상관 관계가 있다. 도 13B에 도시된 바와 같이, 양 백신뿐만 아니라, KLH + 애쥬번트 조절 면역화는 백신 접종된 마우스에서 측정 가능한 TfH를 유도하였다. 더욱이, 활성 백신 (접합체 B 및 접합체 C 그룹) 또는 활성 플라시보 (KLH) + 알룸을 투여받은 모든 동물은 첫 면역화 7 일 후에 배액된 경부 림프절을 수확했을 때 비활성 플라시보 (PBS 그룹)이 제공된 동물보다 TfH가 훨씬 더 많았다 (KLH-TAUVAC-p7.1의 경우 P = 0.0044; KLH-TAUVAC-p22.1의 경우 P = 0.0482; KLH의 경우 P = 0.0063, ANOVA 검정을 사용한 후 다중 비교를 위해 듀넷 조정 이용).

[0384] 제 0 일 및 면역화 후 네 추가 시점 (14, 28, 56 및 84 일, 도 13C, D, G 및 H 참조)에 타우 포스포펩티드 및 KLH에 결합하는 항체의 혈청 역가를 결정하기 위해 ELISA를 수행하였다. 도 13C에 도시된 바와 같이, 접합체 B에 의한 면역화는 상응하는 백신 펩티드에 대해 반응성인 결합 항체를 유도하였다. 접합체 B 및 Ribi 애쥬번트로 면역화된 동물의 경우, 백신 펩티드에 대한 결합 역가는 측정된 모든 시점에서 활성 플라시보에 의해 유도된 결합 역가보다 유의하게 높았다 (접합체 B + Ribi 대 KLH + Ribi 비교) (P <0.001, ANOVA 검정 후 다중 비교를 위해 터키 조정 사용). 알룸 애쥬번트 그룹의 경우, 차이는 56 일 및 84 일에만 유의미하였다 (각각 P = 0.001 및 0.012).

[0385] 분석 차이 (상이한 코팅 펩티드)는 두 백신 사이에 직접적인 통계적 비교를 불가능하게 하였지만, 접합체 C (도 13D)에 대한 타우 특이적 항체 반응은 접합체 B에 대한 반응보다 전체적으로 작은 크기였다. 그럼에도 불구하고, 접합체 C에 대한 항체 역가는 면역화 후 28 일 및 84 일에 활성 플라시보 KLH Ribi를 투여받은 마우스에서보다 접합체 C + Ribi로 백신 접종된 마우스에서 유의하게 더 높았다 (각각 P = 0.001 및 0.008); 알룸 애쥬번트 그룹의 역가는 활성 플라시보의 역가와 크게 다르지 않았다.

[0386] 담체 단백질이 포스포펩티드가 생체 내에서 어느 정도 분해되는 것을 보호하지만, 생체 내에서 펩티드 항원의 포스파타제 소화는 일부 비인산화된 펩티드를 면역계에 노출시킬 가능성이 있었다. 노출이 접합체 B 및 접합체 C에서 비인산화된 펩티드에 결합할 수 있는 항체의 생성을 초래하는지 여부를 결정하기 위해, 비인산화된 펩티드를 코팅 항원으로 사용하여 ELISA를 수행하였다. 도 13E-F에 도시된 바와 같이, 비인산화된 타우 펩티드에 대한 반응은 낮았으며, 동일한 비인산화된 펩티드에 대한 활성 플라시보의 반응과 비교할만 하였다. 또한, 접합체 B 및 Ribi로 면역화된 동물에서, 인산화된 펩티드에 대한 결합 역가는 측정된 모든 시점에서 비인산화된 펩티드에 대한 결합 역가보다 유의하게 더 높았다 (14 일에 P = 0.009; 28, 56 및 84 일에 P <0.0001, ANOVA 검정 사용). 알룸 애쥬번트 그룹의 경우, 차이는 56 일 및 84 일에만 유의미하였다 (각각 P = 0.0002 및 0.001). 접합체 C로 면역화된 동물의 경우, 인산화된 펩티드에 대한 반응은 Ribi 애쥬번트가 사용된 경우에만 더 높았다 (28 일에 P <0.0001; 56 일 및 84 일에 P = 0.0001).

[0387] 실시예 12: 접합체 백신에 의해 유도된 항체는 생리적으로 관련된 형태의 변형된 타우에 결합한다

[0388] 백신 유도된 항체가 생리적으로 관련된 형태의 변형된 타우에 결합할 수 있는지 여부를 추가로 결정하기 위해, 백신 접종된 마우스로부터의 면역 후 혈청을 사용하여 알츠하이머병 환자 (5 AD 사례), 다른 타우병증으로 영향을 받은 환자 (PART, FTD, PICK 및 PSP 3 사례) 또는 연령 매칭 건강한 대조군 (5 대조 사례, CTRL)로부터 수집된 사후 인간 뇌 부분을 염색하였다. 예상한 바와 같이, 대조군 동물 (PBS 및 활성 플라시보 그룹)로부터의 혈청은 뇌 절편에 결합하지 않았으며, 반면에 뮤린 클론으로부터 얻은 pTau [pSer202, pThr 205]에 결합하는 모노클로날 항체인 AT8은 해당 영역의 인접한 조직 절편에서 타우 병리의 강력한 면역 반응성을 나타냈다 (도 14). 활성 백신 접합체 B 및 접합체 C로 면역화된 동물로부터의 혈청은 AD 절편 (데이터는 나타내지 않음)에서

뿐만 아니라 다른 타우병증의 것에서도 병리적 타우 구조에 결합하였다 (도 14). AD 사례에서 접합체 B는 (사전) 매듭, 신경망 가닥 및 신경반과 반응하는 항체를 유도하였다. 이들 면역 후 혈청은 또한 PART 뇌 조직에서 신경원섬유 매듭 및 신경망 가닥, FTD-타우 (*MAPT P301S*) 조직에서 뉴런 내포물 및 신경망 가닥, 일부 피크병 사례에서 내포물 및 성상 세포 및 마지막으로 PSP의 전형인 뉴런 내포물, 신경망 가닥 및 성상 세포와 면역반응을 할 수 있었다. 접합체 C 유도된 폴리클로날 혈청은 또한 각각의 타우병증의 특징적인 병리적 타우 구조에 반응하였다. AD 사례에서, 염색은 주로 신경원섬유 매듭에 집중되었고 신경반 및 신경망 가닥에 덜 집중되었다. 해당 영역의 배율이 낮을수록 비슷한 결과가 나타난다 (데이터는 미도시).

[0389] 실시예 13: 백신-유도된 항체는 마우스에서 기능적이다

[0390] 접합체 B 백신의 보호 효능을 타우병증의 주사 모델에서 시험하였다 (Peeraer et al., 2015, Neurobiol Dis., 73:83-95). 이 모델에서, 유전자 돌연변이 (P301L)를 통해 타우병증에 취약한 마우스에 도 15A에 나타낸 타임라인에 따라 인간 AD 뇌로부터 단리된 농축 PHF를 뇌내 주사하였다. 트랜스진-유도된 타우병증 발병 전에 수행되는 주사는 이들 동물에서 타우병증의 발달을 가속화시킨다. 반대로, ePHF "시드"가 AT8과 같은 타우 파종 활성을 억제할 수 있는 항체와 사전 혼합되는 경우, 타우병증의 유도가 감소된다 (미공개 데이터, 미도시).

[0391] 도 15A의 스킴에 따라, 본 발명자들은 접합체 B, Ribi 또는 활성 대조군 KLH Ribi로 면역화된 동물의 혈청으로부터 정제된 IgG와 사전 혼합된 농축된 인간 PHF을 정위 주사한 후 타우병증의 발달을 평가하였다. 주사 2 개월 후, 이들 마우스의 뇌를 수확하고 표준 생화학적 분석을 사용하여 총 분획 및 사르코실-불용성 분획에서 응집된 타우의 양을 측정하였다. 획득된 데이터는 접합체 B로 백신 접종된 마우스로부터의 IgG와 사전 혼합된 ePHF를 마우스에 주사했을 때, 대조군이 주사된 동물과 비교하여 총 (도 15B) 및 사르코실-불용성 (도 15C) 분획 모두에서 응집된 포스포-타우가 현저히 적음을 나타냈다 ($p < 0.0001$ KLH Ribi 대 KLH-TAUVAC-p7.1 Ribi, ANOVA 검정 후 다중 비교를 위해 홀름-본페로니 (Holm-Bonferroni) 조정 사용). 사르코실-불용성 타우는 타우병증의 병리학적 특징과 관련이 있는 것으로 널리 인정되고 있으며, 이 결과는 KLH-TAUVAC-p7.1로의 백신 접종에 의해 유도된 항체가 생체 내에서 보호됨을 입증한다.

[0392] 실시예 14: 백신-유도 항체는 비인간 영장류에서 기능적이다

[0393] 붉은털원숭이를 1, 29, 85 및 169 일에 알룸 및 CpG 올리고뉴클레오티드 조정된 접합체 B (n = 6) 또는 KLH (n = 2)로 면역화시켰다. 14 일마다 혈액을 수집하고 접합체 B로 면역된 동물로부터의 혈청을 ELISA (도 16A)를 사용하여 면역화 펩티드 및 MSD (도 16B)를 사용하여 인간 ePHF에 대한 반응성에 대해 시험하였다. 접합체 B에 의한 면역화로 백신 포스포펩티드에 대한 지속적이고 일관된 항체 반응이 이어졌다. 또한, 모든 동물은 6 마리 중 3 마리의 동물이 이 항원에 대해 높은 반응성을 나타내는 동시에 인간 ePHF에 대해 측정 가능한 항체 수준을 가졌다. 일차 면역화 후 50 일에 동물로부터 수집된 혈청을 건강한 개인 또는 AD 환자로부터의 인간 뇌 절편에 적용하였다 (도 16C). 접합체 B 그룹으로부터의 면역 후 혈청은 AD 뇌 조직에서 병리적 타우 구조, 즉 신경원섬유 매듭, 신경망 가닥 및 신경성 플라크를 염색하였고, KLH 면역화된 마우스로부터의 혈청은 어떠한 반응성도 나타내지 않았다. 대조군 조직에서는 염색이 관찰되지 않았다. 타우 면역고갈 검정으로 시험했을 때, 접합체 B가 투여된 동물은 타우 시드에 결합하여 고갈시킬 수 있는 항체를 가졌으며 (50 일에 ANOVA 검정 후 듀넷의 다중 비교 조정을 사용하여 $p = 0.03$), KLH로의 면역화는 그러한 항체를 유발하지 않았다 (도 16D). 면역화 전 및 면역화 후 혈청을 또한 연속 희석된 개별 샘플로서 중화 분석으로 시험하였다 (도 16E). 백신 접종 전 -14 일 (기준선) 및 백신 접종 후 50, 106 및 190 일에 각각 판독값에 대한 FRET 카운트의 차이로 기준선 (CFB)으로부터의 변화를 계산하였다. 백신 접종 후 특정 일 ($일_i$)에서의 반응을 다음과 같이 계산하였다:

[0394] $반응 = \%FRET_일_i - \%FRET_기준선$

[0395] 랜덤 효과로서의 동물과 함께, 상기 언급된 반응에 대한 일반적인 선형 혼합 모델에 변수 백신 그룹, 범주형 변수로 처리된 일차 및 혈청 수준 및 이들의 모든 상호 작용을 적용하였다. 연구의 탐구적 특성을 고려하여, 다중 시험 조정은 고려되지 않았다. 가설 검정은 5% 유의 수준에서 수행되었다.

[0396] 실시예 15: 알룸 및 CpG 올리고뉴클레오티드 애쥬번트의 조합으로 접합체 백신으로 면역화된 마우스는 백신 펩티드에 대해 고역가의 항체 반응을 초래하였다

[0397] 성체 암컷 C57BL/6 마우스 (그룹당 n = 5-6)를 접합체 A 백신 2 ug (도 17A) 또는 0.2 ug (도 17B)로 근육 내로 면역화시켰다. 접합체 백신은 단독으로 (애쥬번트 없음), 수산화알룸과 함께, CpG 올리고뉴클레오티드와 함께, 또는 알룸 및 CpG 올리고뉴클레오티드 조합과 함께 투여되었다. 모든 마우스를 연구 0 일에 일차 면역화시

킨 후, 28 일에 단일 부스터 면역화시켰다. 알룸 애쥬번트의 용량은 주입 당 500 ug/마우스였고, CpG 올리고뉴클레오티드 애쥬번트의 용량은 주입 당 20 ug/마우스였다. 도 17의 그래프는 코팅 항원으로서 백신 펩티드 T3.5를 사용하여 면역화하기 전 (0 일) 및 면역화 후 두 시점에 (28 및 42 일) 마우스로부터 수집된 혈청을 사용한 결합 ELISA의 결과를 보여준다. 그룹 당 T3.5 특이적 평균 종점 역가를 도시하였으며, 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다. 표는 비모수적 크러스칼-왈리스 검정 (Kruskal-Wallis Test)을 사용하여 항체 역가를 비교한 결과에 대한 통계적 분석을 보여주며, 크러스칼-왈리스 검정에 대한 사후 분석으로 윌콕슨 부호 순위 (Wilcoxon Signed Rank) 검정을 사용하여 쌍별 그룹 비교를 평가하였다.

[0398] 도 17에 도시된 결과는 두 용량 모두에서 비-애쥬번트 백신이 강한 면역 반응을 유도하지 못했음을 나타낸다. 알룸 또는 CpG 올리고뉴클레오티드 또는 이 둘의 조합의 사용은 항체 반응의 크기를 개선시켰다 ($p \leq 0.0152$). 더욱이, 2 ug의 백신으로 면역화된 동물의 경우, 애쥬번트 조합은 28 일에 단일 애쥬번트보다 상당히 더 높은 항체 역가를 제공하였다 ($p = 0.0028$). 조합 알룸-CpG 올리고뉴클레오티드는 또한 42 일에 0.2 ug의 백신으로 면역화된 동물에 대해 CpG 올리고뉴클레오티드 단독보다 우수하게 수행하였다 ($p = 0.0497$). 이들 데이터는 알룸 및 CpG 올리고뉴클레오티드 애쥬번트 조합의 사용을 지지한다.

[0399] 실시예 16: 타우 펩티드:T-세포 에피토프의 비율이 상이한 리포좀 백신은 높고 지속적인 수준의 타우 포스포펩티드-특이적 IgG 항체 역가를 유도한다

[0400] 성체 붉은털원숭이 (그룹당 n = 6)를 1, 29, 85 및 169 일에 i) 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드 400 ug/mL 및 T50 100 ug/mL (리포좀 Z), ii) 서열 번호 2의 인산화 타우 펩티드 1200 ug/mL 및 T50 1200 ug/mL (리포좀 Z+), iii) 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드 400 ug/mL 및 T50 400 ug/mL (리포좀 Z^{++}), iv) 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드 1200 ug/mL 및 T50 300 ug/mL (리포좀 Z^{+++})와 함께 3D-(6-아실) PHAD® 및 지질화된 CpG 2006 올리고뉴클레오티드 애쥬번트 둘 다를 함유하는 캡슐화된 T50 T-세포 에피토프를 가지는 개선된 리포좀 백신으로 용량 당 1,800 μg의 서열 번호 2의 아세테이트 테트라팔미토일화 인산화된 타우 펩티드로 피하 면역화시켰다. 면역화 전 및 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176 및 190 일에 채혈하고 혈청을 단리하였다. 코팅 항원으로서 서열 번호 2의 인산화된 타우 펩티드 및 항-원숭이 IgG 이차 항체를 사용하여 ELISA에 의해 혈청 중의 특이적 IgG 항체 역가를 결정하였다. 생성된 항체 수준을 경시적인 각 개별 원숭이에 대한 종점 역가 (양의 반응을 유도하는 최종 혈청 희석)로서 계산하였다. 그룹당 종점 역가의 기하 평균 ± 95% 신뢰 구간이 도 18에 제시되어 있으며, 시험된 네 리포좀 백신 모두 타우 포스포-펩티드에 대해 높고 지속적인 역가를 유도했음을 보여준다.

서열 목록

서열 번호 1 - 포스포-타우 펩티드 **(7.1)**
GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRSRT

서열 번호 2 - 포스포-타우 펩티드 **(T3.5)**
VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

서열 번호 3 - 포스포-타우 펩티드 **(22.1)**
SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LA

서열 번호 4 - 타우 펩티드
VYKSPVVSGDTSPRHL

서열 번호 5 - 포스포-타우 펩티드
RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

서열 번호 6 - 포스포-타우 펩티드
RQEFEVMEDHAGT[pY]GL

서열 번호 7 - 포스포-타우 펩티드
PGSRSR[pT]P[pS]LPTPPTR

서열 번호 8 - 포스포-타우 펩티드
GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSR

서열 번호 9 - 포스포-타우 펩티드
GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSID

서열 번호 10 - 포스포-타우 펩티드
PG[pS]PG[pT]PGSRSR[pT]P[pS]LP

서열 번호 11 - 포스포-타우 펩티드
HL[pS]NVSSTGSID

서열 번호 **12 -** 포스포-타우 펩티드
VSGDT[pS]PRHL

서열 번호 **13 -** T50 T 세포 에피토프
AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-NH_2

서열 번호 **14 -** T46 T 세포 에피토프
AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEK(Pal)K(Pal)-NH_2

서열 번호 15 - T48 헬퍼 T 세포 에피토프
AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSLINSTKIYS YFPSVISKVNQ-NH_2

서열 번호 16 - T51 헬퍼 T 세포 에피토프
AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-NH_2

[0401]

서열 번호 17 - T52 헬퍼 T 세포 에피토프
AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-NH_2

서열 번호 18 - CpG 2006 (CpG 7909 라고도 함)
5'-tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt-3'
여기서 소문자는 포스포로티오에이트 (ps) 뉴클레오티드 간 연결을 의미함

서열 번호 19 - CpG 1018
5'-tgactgtgaacgttcgagatga-3'
여기서 소문자는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 의미함

서열 번호 20 – CpG2395
5'-tcgtcgttttcggcgcgcgccg-3'
여기서 소문자는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 의미함

서열 번호 21 – CpG2216
5'-ggGGGACGATCGTCgggggg-3'
여기서 소문자는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 의미하고 대문자는 포스포디에스테르 (po) 연결을 의미함

서열 번호 22 – CpG2336
5'- gggGACGACGTCGTGgggggg -3',
여기서 소문자는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 연결을 의미하고 대문자는 포스포디에스테르 연결을 의미함

서열 번호 23 - Pan DR 에피토프 (PADRE) 펩티드
AKFVAAWTLKAAA

서열 번호 24 – P2
QYIKANSKFIGITEL

서열 번호 25 – P30
FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

서열 번호 26 - $TT_{586-605}$
LINSTKIYSYFPSVISKVNQ

서열 번호 27 – 팔미토일화 포스포-타우 펩티드 **(팔미토일화 7.1)**
K(pal)K(pal)GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRSRTK(pal)K(pal)

서열 번호 28 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드 **(T3, 팔미토일화 T3.5)**
K(pal)K(pal)VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

서열 번호 29 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드 **(팔미토일화 22.1)**
K(pal)K(pal)SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LAK(pal)K(pal)

서열 번호 30 - 팔미토일화 타우 펩티드
K(pal)K(pal)VYKSPVVSGDTSPRHLK(pal)K(pal)

서열 번호 31 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

[0402]

서열 번호 32 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)RQEFEVMEDHAGT[pY]GLK(pal)K(pal)

서열 번호 33 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)PGSRSR[pT]P[pS]LPTPPTRK(pal)K(pal)

서열 번호 34 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSRK(pal)K(pal)

서열 번호 35 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSIDK(pal)K(pal)

서열 번호 36 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)PG[pS]PG[pT]PGSRSR[pT]P[pS]LPK(pal)K(pal)

서열 번호 37 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)HL[pS]NVSSTGSIDK(pal)K(pal)

서열 번호 38 - 팔미토일화 포스포-타우 펩티드
K(pal)K(pal)VSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

서열 번호 39 - T50 C-말단 아미드 없음
AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

서열 번호 40 - T46 C-말단에 -Lys(Pal)-Lys(Pal)-NH_2 없음
AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

서열 번호 41 - T48 C-말단 아미드 없음
AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSLINSTKIYS
YFPSVISKVNQ

서열 번호 42 - T51 C-말단 아미드 없음
AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

서열 번호 43 - T52 C-말단 아미드 없음
AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

서열 번호 44 - T57
AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
K(Pal)K(Pal)-NH2

[0403]

참조문헌

Asuni AA et al,. J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34):9115-29

Bentebibel et al., 2013, Sci Transl Med., 5(176):176ra32

Crotty, 2011, Annual Reviews of Immunology. Vol 29:p621-663

Friedhoff et al., Biochimica et Biophysica Acta 1502 (2000) 122-132

Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15):5827-31

Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009

Hickman et al., J. Biol. Chem. vol. 286, NO. 16, pp. 13966–13976, April 22, 2011

Kontsekova E et al., Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1;6(4):44

Novak P et al., Lancet Neurology 2017, 16:123-134

Peeraer et al., 2015, Neurobiol Dis., 73:83-95

Ries et al., 2015, Org. Biomol. Chem., 13:9673

Spensieri et al., 2013, Proc Natl Acad Sci U S A., 110(35):14330-5

Theunis C et al., PLoS One. 2013; 8(8): e72301

US7,741,297

US8,647,631

US9,687,447

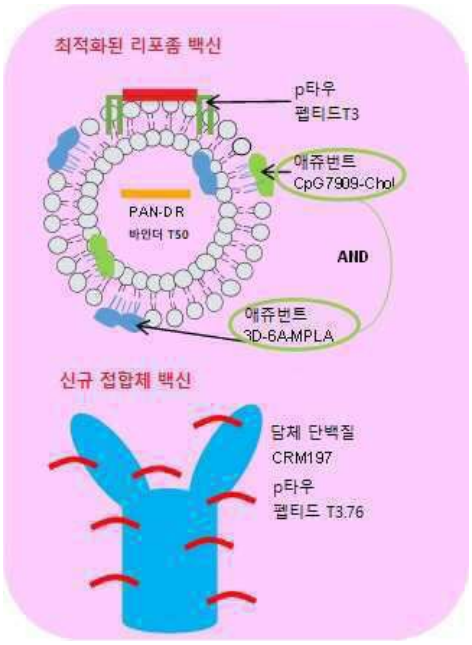
WO90/14837

WO2010/115843

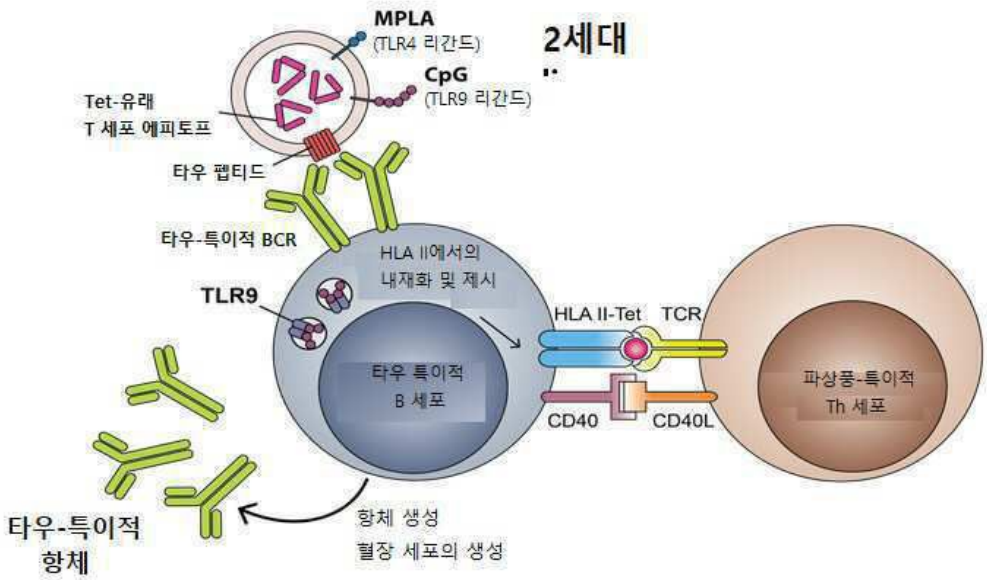
[0404]

도면

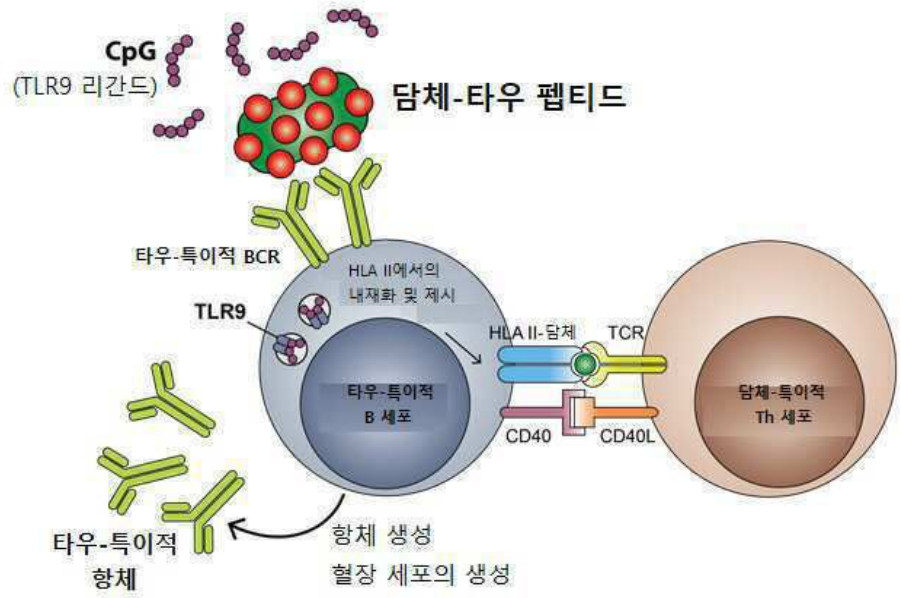
도면1


최적화된 리포좀 백신
p타우
펩티드T3
애쥬번트
CpG7909-Chol
PAN-DR
바인더 T50
AND
애쥬번트
3D-6A-MPLA
신규 접합체 백신
담체 단백질
CRM197
p타우
펩티드 T3.76

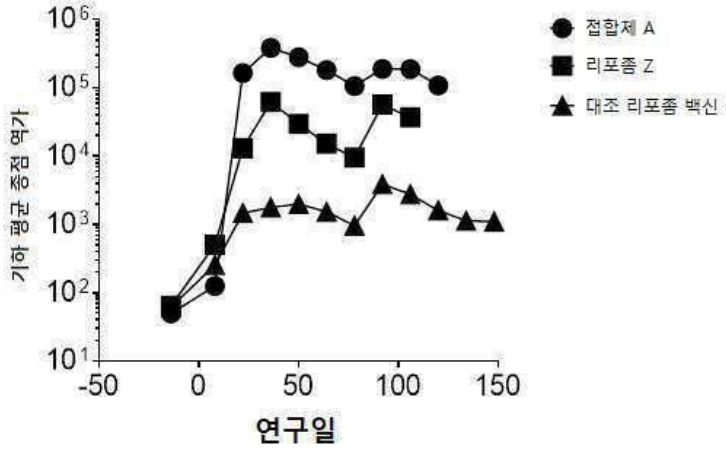
도면2


MPLA
(TLR4 리간드)
2세대
CpG
(TLR9 리간드)
Tet-유래
T 세포 에피토프
타우 펩티드
타우-특이적 BCR
HLA II에서의
내재화 및 제시
TLR9
HLA II-Tet
TCR
타우 특이적
B 세포
파상풍-특이적
Th 세포
CD40
CD40L
타우-특이적
항체
항체 생성
혈장 세포의 생성

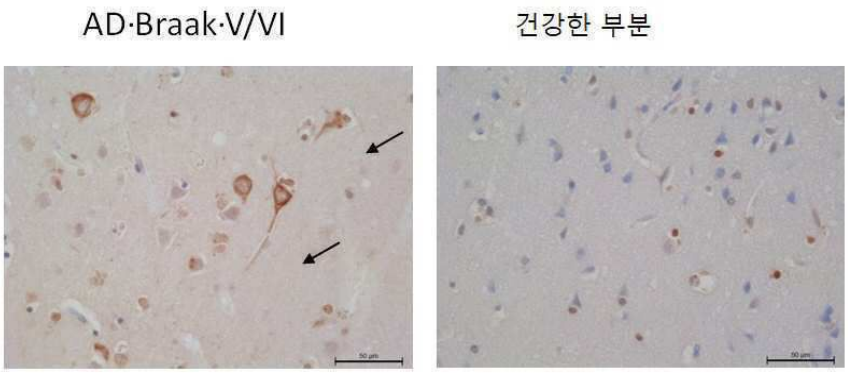
도면3


CpG
(TLR9 리간드)
담체-타우 펩티드
타우-특이적 BCR
HLA II에서의
내재화 및 제시
TLR9
HLA II-담체
TCR
타우-특이적
B 세포
담체-특이적
Th 세포
CD40
CD40L
타우-특이적
항체
항체 생성
혈장 세포의 생성

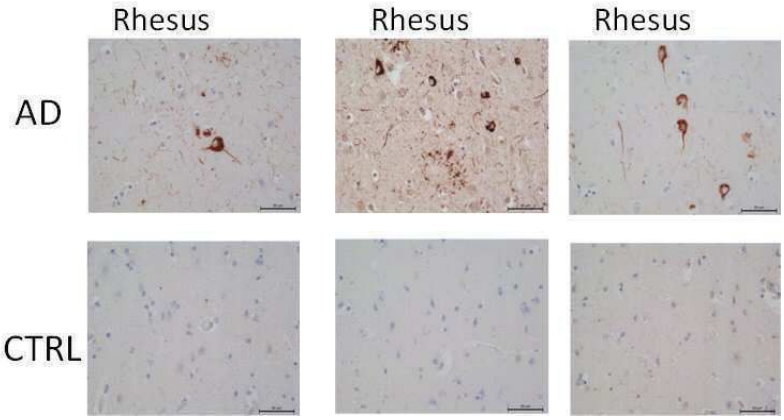
도면4


기하 평균 종점 역가
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
-50
0
50
100
150
연구일
접합체 A
리포좀 Z
대조 리포좀 백신

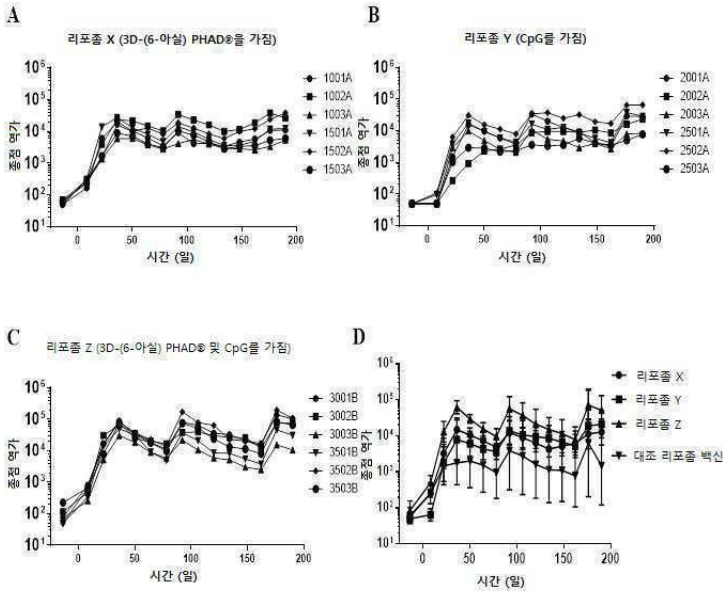
도면5


AD·Braak·V/VI
건강한 부분

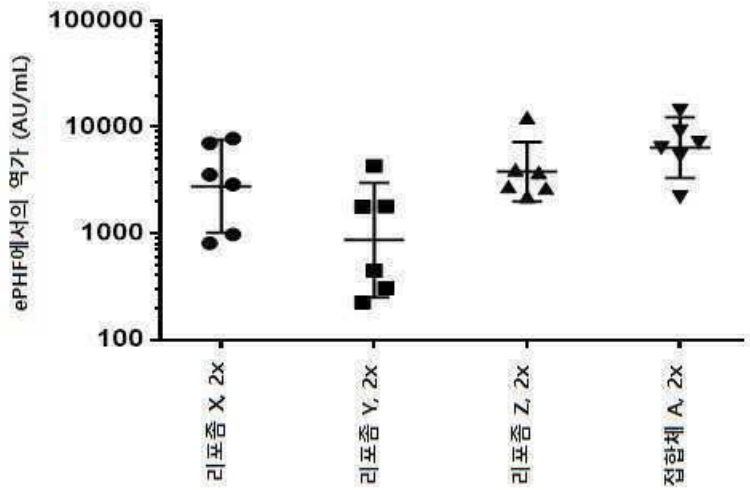
도면6


Rhesus
Rhesus
Rhesus
AD
CTRL

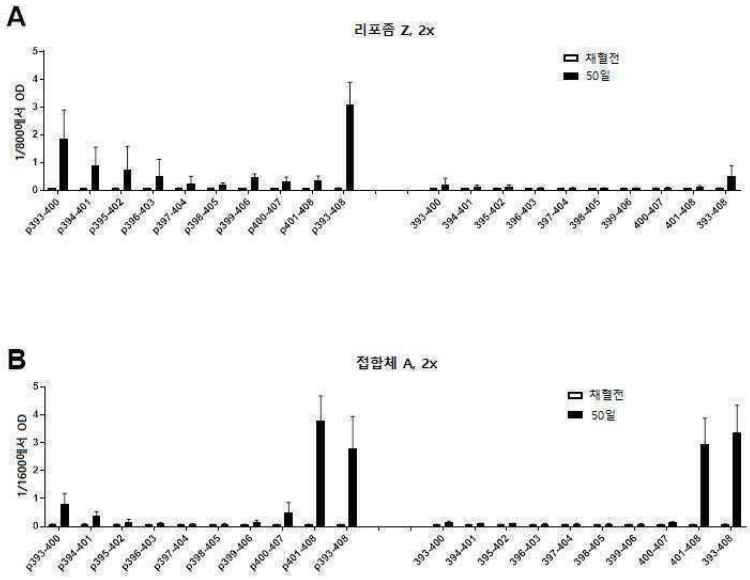
도면7


A
리포좀 X (3D-(6-아실) PHAD®을 가짐)
종점 역가
시간 (일)
1001A
1002A
1003A
1501A
1502A
1503A
B
리포좀 Y (CpG를 가짐)
종점 역가
시간 (일)
2001A
2002A
2003A
2501A
2502A
2503A
C
리포좀 Z (3D-(6-아실) PHAD® 및 CpG를 가짐)
종점 역가
시간 (일)
3001B
3002B
3003B
3501B
3502B
3503B
D
종점 역가
시간 (일)
리포좀 X
리포좀 Y
리포좀 Z
대조 리포좀 백신

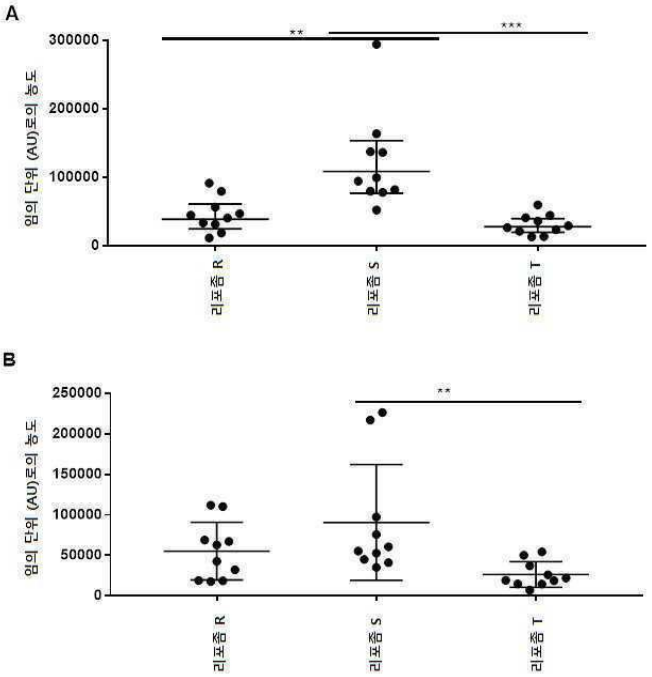
도면8


ePHF에서의 역가 (AU/mL)
100000
10000
1000
100
리포좀 X, 2x
리포좀 Y, 2x
리포좀 Z, 2x
접합체 A, 2x

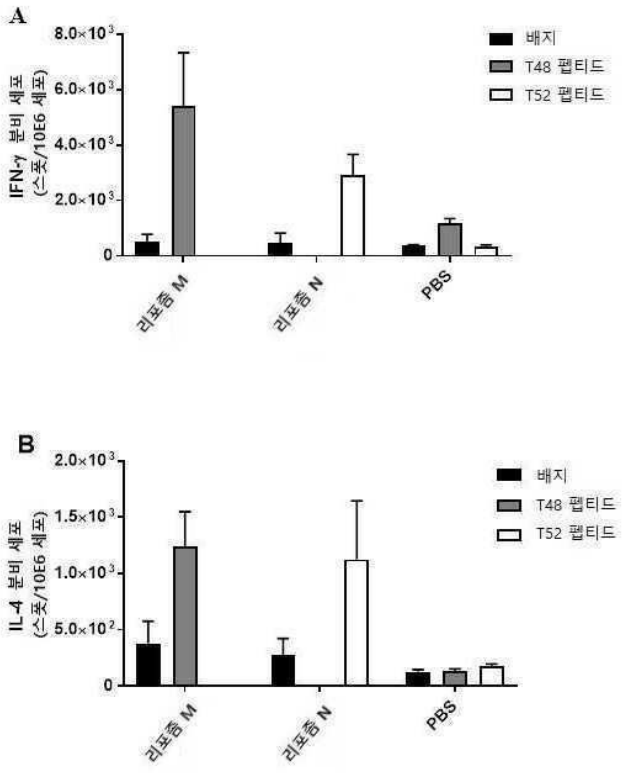
도면9


A
리포좀 Z, 2x
채혈전
50일
1/800에서 OD
p393-400
p394-401
p395-402
p396-403
p397-404
p398-405
p399-406
p400-407
p401-408
p393-408
393-400
394-401
395-402
396-403
397-404
398-405
399-406
400-407
401-408
393-408
B
접합체 A, 2x
채혈전
50일
1/1600에서 OD

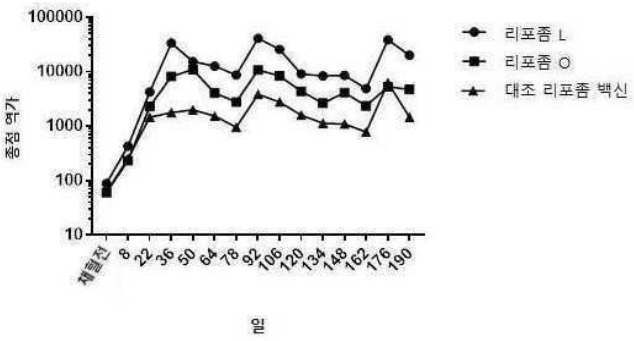
도면10


A
**
***
임의 단위 (AU)로의 농도
300000
200000
100000
0
리포좀 R
리포좀 S
리포좀 T
B
**
250000
200000
150000
100000
50000
0

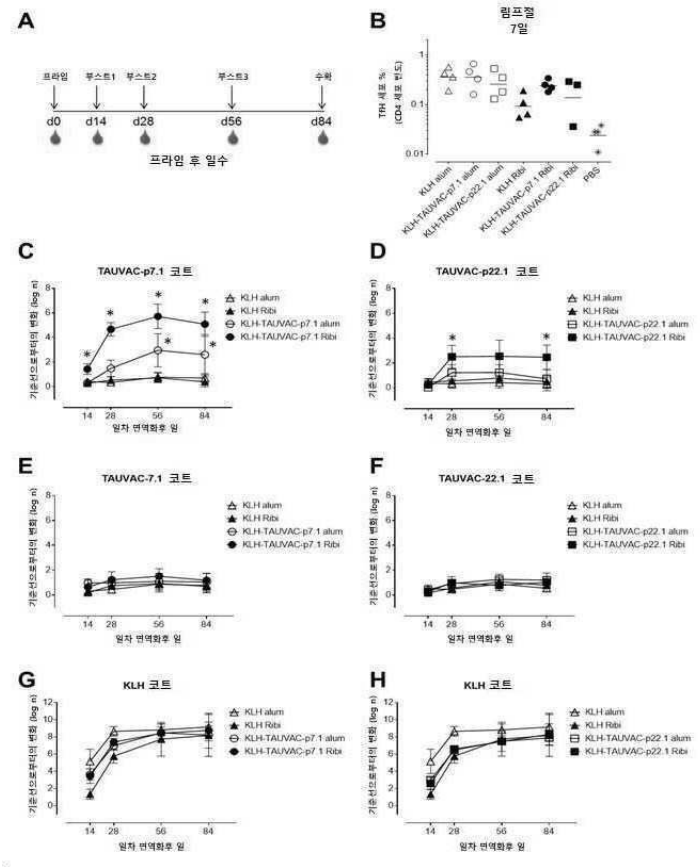
도면11


A
IFN-γ 분비 세포 (스폿/10E6 세포)
8.0×10³
6.0×10³
4.0×10³
2.0×10³
0
배지
T48 펩티드
T52 펩티드
리포좀 M
리포좀 N
PBS
B
IL-4 분비 세포 (스폿/10E6 세포)
2.0×10³
1.5×10³
1.0×10³
5.0×10²
0
배지
T48 펩티드
T52 펩티드
리포좀 M
리포좀 N
PBS

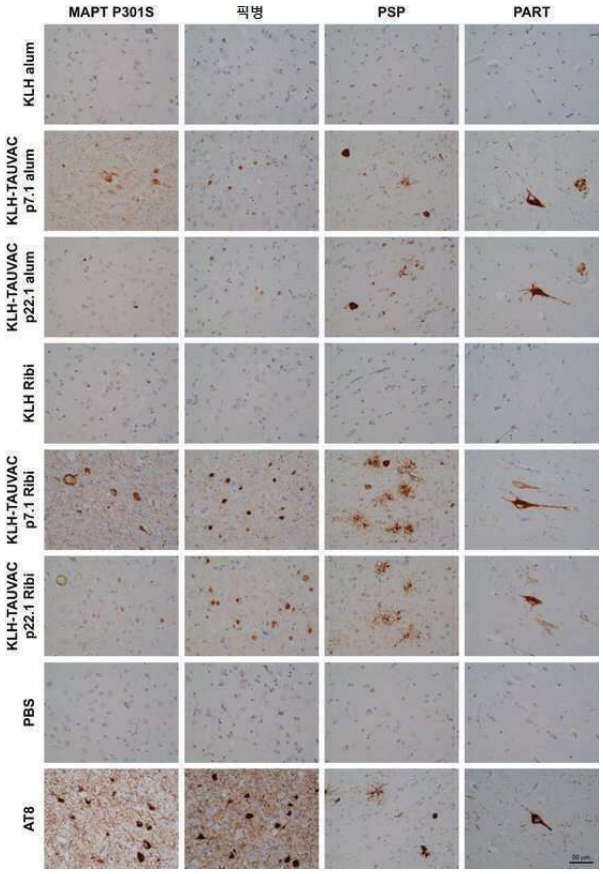
도면12


종점 역가
100000
10000
1000
100
10
채혈전
8
22
36
50
64
78
92
106
120
134
148
162
176
190
일
리포좀 L
리포좀 O
대조 리포좀 백신

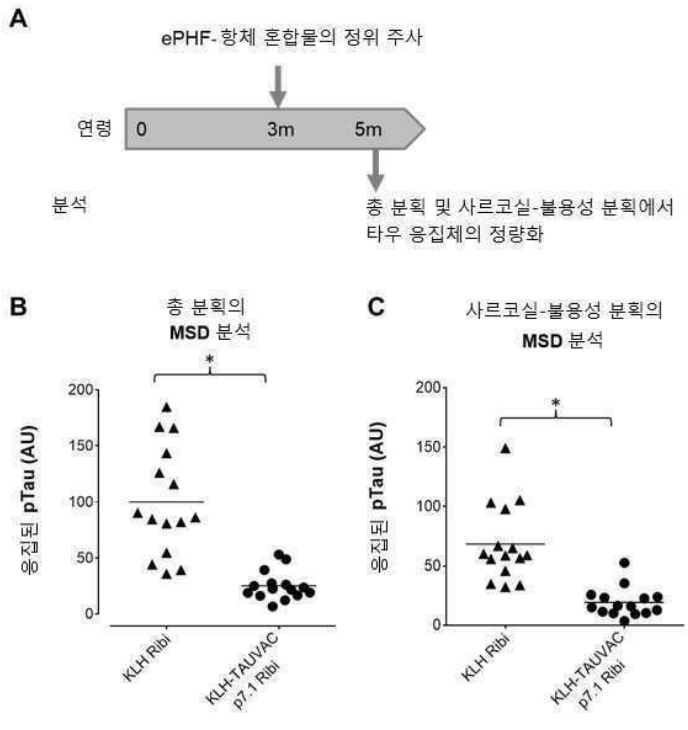
도면13


A
프라임
부스트1
부스트2
부스트3
수확
d0
d14
d28
d56
d84
프라임 후 일수
B
림프절
7일
KLH alum
KLH-TAUVAC-p7.1 alum
KLH-TAUVAC-p22.1 alum
KLH Ribi
KLH-TAUVAC-p7.1 Ribi
KLH-TAUVAC-p22.1 Ribi
PBS
C
TAUVAC-p7.1 코트
D
TAUVAC-p22.1 코트
E
TAUVAC-7.1 코트
F
TAUVAC-22.1 코트
G
KLH 코트
H
KLH 코트
일차 면역화후 일

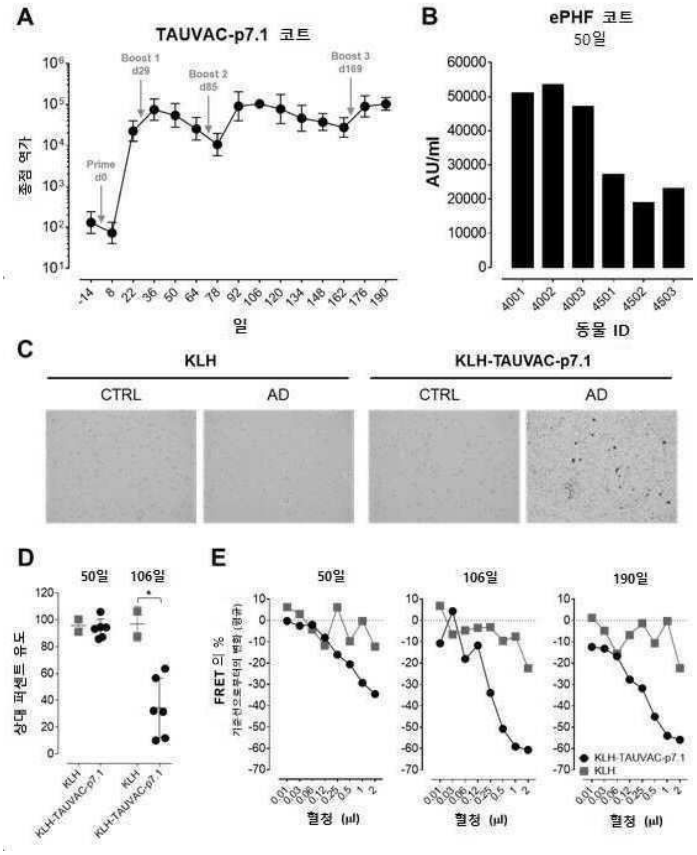
도면14


MAPT P301S
픽병
PSP
PART
KLH alum
KLH-TAUVAC p7.1 alum
KLH-TAUVAC p22.1 alum
KLH Ribi
KLH-TAUVAC p7.1 Ribi
KLH-TAUVAC p22.1 Ribi
PBS
AT8

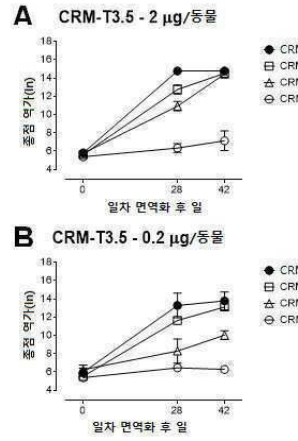
도면15


A
ePHF-항체 혼합물의 정위 주사
연령
0
3m
5m
분석
총 분획 및 사르코실-불용성 분획에서
타우 응집체의 정량화
B
총 분획의
MSD 분석
응집된 pTau (AU)
200
150
100
50
0
KLH Ribi
KLH-TAUVAC p7.1 Ribi
C
사르코실-불용성 분획의
MSD 분석
응집된 pTau (AU)
200
150
100
50
0
KLH Ribi
KLH-TAUVAC p7.1 Ribi

도면16



도면17

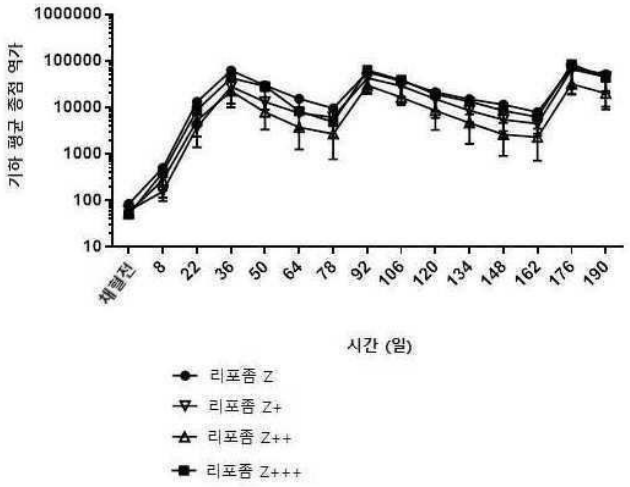


그룹 비교

그룹 1	그룹 2	비에쥬번트 p-값
	28 일	
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	**0.0022**
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	**0.0022**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5	**0.0028**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 alum	**0.0028**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 CpG	**0.0028**
	42일	
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	**0.0075**
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	**0.0075**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5	**0.0039**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 alum	0.0740
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 CpG	0.0740

	28 일	
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	**0.0022**
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.1320
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5	**0.0152**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 alum	0.0649
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 CpG	0.1994
	42일	
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	**0.0022**
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	**0.0043**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5	**0.0043**
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 alum	0.0609
CRM-T3.5 alum 및 CpG	CRM-T3.5 CpG	**0.0497**

도면18



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Pharmaceuticals, Inc.

AC Immune S.A.

<120> Compositions of phosphorylated tau peptides and uses thereof

<130> 689001-57WO

<150> US62/577,157

<151> 2017-10-25

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide 7.1

<220><221> phosphorylated serine

<222> (8)..(8)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (11)..(11)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (14)..(14)

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Arg Ser Arg Thr

20

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide T3.5

<220><221> phosphorylated serine

<222> (4)..(4)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (12)..(12)

<400> 2

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

1 5 10 15

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide 22.1

<220><221> phosphorylated serine

<222> (11)..(11)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (16)..(16)

<400> 3

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

1 5 10 15

Leu Ala

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> tau peptide

<400> 4

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

1 5 10 15

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated serine

<222> (18)..(18)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (26)..(26)

<400> 5

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> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated tyrosine

<222> (14)..(14)

<400> 6

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

1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (7)..(7)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (9)..(9)

<400

> 7

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

1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated serine

<222> (7)..(7)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (10)..(10)

<400> 8

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

1 5 10 15

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated serine

<222> (4)..(4)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (9)..(9)

<400> 9

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

1 5 10 15

Ile Asp

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated serine

<222> (3)..(3)

<220><221>

phosphorylated threonine

<222> (6)..(6)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (13)..(13)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (15)..(15)

<400> 10

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

1 5 10 15

Pro

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated serine

<222> (3)..(3)

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> phospho-tau peptide

<220><221> phosphorylated serine

<222> (6)..(6)

<400> 12

Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T50 T cell epitope

<220><221> C-terminal amide

<222> (55)..(55)

<400> 13

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Val Arg

1 5 10 15

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val

20 25 30

Val Arg Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys

35 40 45

Val Ser Ala Ser His Leu Glu

50 55

<210> 14

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T46 T cell epitope

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (54)..(54)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (55)..(55)

<220><221> C-terminal amide

<222> (55)..(55)

<400> 14

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

Ala Ser His Leu Glu Lys Lys
50 55
<210> 15
<211> 75
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> T48 helper T cell epitope
<220><221> C-terminal amide
<222> (75)..(75)
<400> 15
Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Gln
1 5 10 15
Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly Ser
20 25 30
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

35 40 45
Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr Ser
50 55 60
Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln
65 70 75
<210> 16
<211> 53
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> T51 helper T cell epitope
<220><221> C-terminal amide
<222> (53)..(53)

<400> 16

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

35 40 45

Ala Ser His Leu Glu

50

<210> 17

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T52 helper T cell epitope

<220><221> C-terminal amide

<222> (53)..(53)

<400> 17

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Lys Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

35 40 45

Ala Ser His Leu Glu

50

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG 2006

<220><221> phosphorothioate (ps) internucleotide linkages

<222> (1)..(24)

<400> 18

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG 1018

<220><221> phosphorothioate (ps) internucleotide linkages

<222> (1)..(22)

<400> 19

tgactgtgaa cgttcgagat ga 22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG 2395

<220><221> phosphorothioate (ps) internucleotide linkages

<222> (1)..(22)

<400> 20

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG 2216

<220><221> phosphorothioate (ps) internucleotide linkages

<222> (1)..(3)

<220><221> phosphodiester (po) internucleotide linkages

<222> (3)..(14)

<220><221> phosphorothioate (ps) internucleotide linkages

<222> (14)..(20)

<400> 21

ggggacgat cgtcgggggg 20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG 2336

<220><221> phosphorothioate (ps) internucleotide linkages

<222> (1)..(4)

<220><221> phosphodiester (po) internucleotide linkages

<222> (4)..(15)

<220><221> phosphorothioate (ps) internucleotide linkages

<222> (15)..(21)

<400> 22

ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pan DR epitope (PADRE) peptide

<400> 23

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2

<400> 24

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu

1 5 10 15

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P30

<400> 25

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> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TT586-605

<400> 26

Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser

1 5 10 15

Lys Val Asn Gln

20

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide (palmitoylated 7.1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (10)..(10)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (13)..(13)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (16)..(16)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (24)..(24)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (25)..(25)

<400> 27

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

1 5 10 15

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Lys Lys

20 25

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide (T3, palmitoylated T3.5)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (6)..(6)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (14)..(14)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (19)..(19)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (20)..(20)

<400> 28

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

1 5 10 15

His Leu Lys Lys

20

<210> 29

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide (palmitoylated 22.1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (13)..(13)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (18)..(18)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (21)..(21)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (22)..(22)

<400> 29

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

Ala Thr Leu Ala Lys Lys
20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (19)..(19)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (20)..(20)

<400> 30

Lys Lys Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg
1 5 10 15

His Leu Lys Lys

20

<210> 31

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<

222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (20)..(20)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (28)..(28)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (33)..(33)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (34)..(34)

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Lys

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated tyrosine

<222> (16)..(16)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (19)..(19)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (20)..(20)

<400> 32

Lys Lys Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr

1 5 10 15

Gly Leu Lys Lys

20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (9)..(9)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (11)..(11)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (19)..(19)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (20)..(20)

<400> 33

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

1 5 10 15

Thr Arg Lys Lys

20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (9)..(9)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (12)..(12)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (19)..(19)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (20)..(20)

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Arg Lys Lys

20

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (6)..(6)

<220><221> phosphorylated serine

<

222> (11)..(11)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (21)..(21)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (22)..(22)

<400> 35

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

1 5 10 15

Gly Ser Ile Asp Lys Lys

20

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (5)..(5)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (8)..(8)

<220><221> phosphorylated threonine

<222> (15)..(15)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (17)..(17)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (20)..(20)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (21)..(21)

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Leu Pro Lys Lys

20

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (5)..(5)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (15)..(15)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (16)..(16)

<400> 37

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

1 5 10 15

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> palmitoylated phospho-tau peptide

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (1)..(1)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (2)..(2)

<220><221> phosphorylated serine

<222> (8)..(8)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (13)..(13)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (14)..(14)

<400> 38

Lys Lys Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Lys Lys
1 5 10

<210> 39

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T50 without the C-terminal amide

<400> 39

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Val Arg
1 5 10 15

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val
20 25 30

Val Arg Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
35 40 45

Val Ser Ala Ser His Leu Glu
50 55

<210> 40

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T46 without the palmitoylated lysines and C-terminal amide

<400> 40

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Gln
1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly Ser
20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

35 40 45

Ala Ser His Leu Glu

50

<210> 41

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T48 without the C-terminal amide

<400> 41

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Gln

1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly Ser

20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

35 40 45

Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr Ser

50 55 60

Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln

65 70 75

<210> 42

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T51 without the C-terminal amide

<400> 42

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

35 40 45

Ala Ser His Leu Glu

50

<210> 43

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T52 without the C-terminal amide

<400> 43

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Lys Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

35 40 45

Ala Ser His Leu Glu

50

<210> 44

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T57

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (56)..(56)

<220><221> palmitoylated lysine

<222> (57)..(57)

<220><221

> C-terminal amide

<222> (57)..(57)

<400> 44

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Val Arg

1 5 10 15

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val

20 25 30

Val Arg Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys

35 40 45

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Lys Lys

50 55