



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월26일
(11) 등록번호 10-2593753
(24) 등록일자 2023년10월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1716 (2020.05)
A61K 31/436 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0125296
(22) 출원일자 2022년09월30일
심사청구일자 2022년09월30일
- (56) 선행기술조사문헌
Frontiers in Neuroscience, Vol. 14, No. 693,
pp. 1-14 (2020)*
Small, Vol. 17, No. 2101207, pp. 1-12 (2021)*
W02004014367 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
김병수
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 103동 304호(대치동, 대치삼성아파트)
- 정문교
서울특별시 관악구 관악로10길 67, 101호(봉천동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 5 항

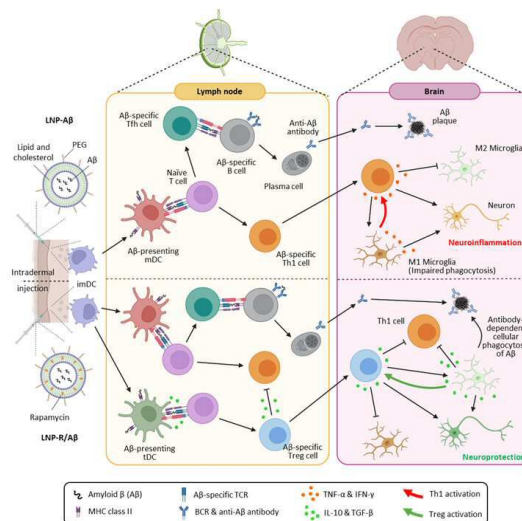
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 알츠하이머 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체;를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다. 이는 아밀로이드 베타에 대한 항체를 생성하여 아밀로이드 베타의 축적을 억제할 뿐만 아니라, 동시에 아밀로이드 베타에 특이적인 조절 T 세포를 유도하여 알츠하이머병 뇌에서의 염증 반응을 억제할 수 있으므로 치료효과가 우수하고 바람직하게는 부작용이 적은 알츠하이머 백신 조성물로서 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/0007 (2013.01)

A61K 9/5123 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

김영수

인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 100, 180
3동 503호(송도동, 송도 더샵 그린워크 3차)

이송민

인천광역시 연수구 송도과학로27번길 55, 201동
631호(송도동, 롯데캐슬 캠퍼스타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711154537

과제번호 2019M3A9H1103651

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발

연구과제명 알츠하이머병 치료를 위한 치료 효능 물질 및 뇌 타게팅 효율이 증진된 와튼 젤리

유래 중간엽줄기세포 생산 기술 최적화

기 여 율 1/2

과제수행기관명 서울대학교

연구기간 2022.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711153671

과제번호 2021R1A2C2093916

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 생체모사 펩타이드 엔지니어링 기반 아밀로이드 응집체 용해 기전의 신약후보물질

개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2021.09.01 ~ 2026.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신을 포함하고,
상기 아밀로이드 베타 펩타이드는 아밀로이드 베타 에피토프 서열을 포함하며,
상기 아밀로이드 베타 에피토프 서열은 서열번호 2 내지 4의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 서열인
알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신은 전달체에 담지
된 것인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 전달체는 바이러스 전달체, 바이러스 유사 입자(virus-like particle, VLP), 양전하성
폴리머, 리포솜, 지질나노입자(lipid nanoparticle), 금 또는 반도체 나노결정 입자(quantum dot)를 포함하는
군에서 선택되는 것인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 전달체는 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane(DOTAP),
dioleoylphosphatidylethanolamine(DOPE), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-
[methoxy(polyethylene glycol)-2000](PEG2000 PE) 및 콜레스테롤을 포함하는 지질나노입자인 알츠하이머병 예
방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 전달체의 직경은 50 nm 내지 600 nm인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알츠하이머 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 한국은 세계에서 가장 빠르게 초 고령사회에 진입하는 국가로서, 노인성 뇌질환 관리를 위한 국민 부담이 가중

되고 재정수지 악화를 초래하고 있다. 우리나라 65세 이상 인구의 약 10 %가 치매환자로 추정되며, 고령화 사회에 접어들며 개인적/사회적 부담이 가중되고 있다. 65 세가 지나면 치매 유병률은 5 년마다 두 배씩 증가하는 추세를 보이며, 선진국의 경우 85 세 이상 연령층의 약 30 %가 치매를 앓고 있는 실정이다. 치매는 당뇨병에 이어 두 번째로 높은 사회적 비용이 발생하고 있으며, 무엇보다 유일하게 사망률이 지속적으로 증가하는 질환으로써 치료제 개발이 매우 시급한 실정이다.

[0004] 알츠하이머병이란 인간이 가진 여러 가지 인지 기능인 기억력, 주의력, 언어기능, 시공간능력과 판단력을 포함한 전두엽 집행 기능 등의 장애가 발생하여 질환이 진행됨에 따라 본인의 일상생활이나 사회생활을 하는데 어려움을 초래할 뿐만 아니라 가족이나 지역 주민 등 주변인에게도 치명적 영향을 주며 다양한 사회적 문제를 유발하는 질병에 해당한다. 치매 환자의 약 60~70 %는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)으로 인한 치매로 아직까지 근본적인 치료약물이 없어 글로벌 시장의 미충족 수요가 높다. AD로 인한 사회/경제적 비용 부담이 점점 증가함에 따라 병의 진행을 근원적으로 억제할 수 있는 의약품 개발이 더욱 중요해지고 있다.

[0005] AD를 일으키는 단일 질병기전은 명확하게 밝혀지지 않았으며, 뇌에서 아밀로이드 베타(A β) 플라크의 축적, 콜린성 신경세포의 사멸, 미토콘드리아의 에너지 대사 이상, 신경세포 수상돌기의 이상, 산화스트레스, 뇌신경 염증 등이 다양한 발병원인 이론으로 제시되고 있다. 질병의 진행을 멈추거나 치료하기 위해 A β 또는 Tau 단백질을 타겟으로 하는 6가지 접근 방식(A β 제거, A β 분해/파괴, A β 생산 방지/지연, Tau 제거, Tau 분해/파괴, Tau 생산 방해/지연)이 가장 많이 시도되어 왔으며, 현재 대부분의 임상 치료제 개발은 이와 같은 접근법에 초점을 맞추어 왔다. 개발 초기에는 APP 분비효소 억제제 와 A β 응집 억제제 중심의 신약 개발이 이루어졌으며, 최근에는 A β 제거 기전의 항체 후보 물질이 다수 개발되고 있는 실정이나, 현재까지 개발된 AD 치료제의 경우, 실패율이 매우 높다.

[0006] A β 또는 Tau 기전을 조절하는 후보물질이 지속적으로 임상에서 실패하면서, 최근 AD에서 신경염증 및 장내 미생물의 변화 등이 관찰되면서 새로운 기전을 타겟으로 하는 약물이 다양하게 시도되고 있으나, 아직까지 확실한 치료제 개발은 제시되고 있지 않은 실정이다. 이에 AD의 궁극적인 치료를 위하여 다면적 치료 전략의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 2317080 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 1. 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체;를 포함하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 아밀로이드 베타 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열의 적어도 일부를 포함하는 서열로 이루어진 것인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 아밀로이드 베타 펩타이드는 서열번호 2 내지 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 서열로 이루어진 것인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0014] 4. 위 1에 있어서, 상기 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체;는 전달체에 담지된 것인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0015] 5. 위 4에 있어서, 상기 전달체는 바이러스 전달체, 바이러스 유사 입자(virus-like particle, VLP), 양전하성 폴리머, 리포솜, 지질나노입자(lipid nanoparticle), 금 또는 반도체 나노결정 입자(quantum dot)를 포함하는 군에서 선택되는 것인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0016] 6. 위 4에 있어서, 상기 전달체는 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane(DOTAP), dioleoylphosphatidylethanolamine(DOPE), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000](PEG2000 PE) 및 콜레스테롤을 포함하는 지질나노입자인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0017] 7. 위 4에 있어서, 상기 전달체의 직경은 50 nm 내지 600 nm인 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 아밀로이드 베타에 대한 항체를 생성하여 아밀로이드 베타의 축적을 억제할 뿐만 아니라, 동시에 아밀로이드 베타에 특이적인 조절 T 세포를 유도하여 알츠하이머병 뇌에서의 염증 반응을 억제하여 치료효과가 우수하고 부작용이 적은 알츠하이머 백신 조성물로서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 약학 조성물의 알츠하이머병 치료 기전을 나타낸 모식도이다.

도 2는 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신을 담지한 지질나노입자의 특성을 분석한 것이다.

도 3은 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신을 담지한 지질나노입자에 의한 아밀로이드 베타 특이적 항체 유도 및 알츠하이머병 동물 모델에서 아밀로이드 베타 응집에 미치는 영향을 분석한 것이다.

도 4는 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신을 담지한 지질나노입자에 의한 면역관용 수지상세포 및 조절 T 세포 유도 여부를 분석한 것이다.

도 5는 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신을 담지한 지질나노입자에 의해 유도된 아밀로이드 베타 특이적 조절 T 세포의 아밀로이드 베타 타겟 효율성을 확인한 것이다.

도 6은 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신을 담지한 지질나노입자가 뇌에서 신경염증 억제에 미치는 치료 효과를 분석한 것이다.

도 7은 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신을 담지한 지질나노입자가 알츠하이머병 동물 모델의 인지능력 향상에 미치는 영향을 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 본 발명을 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적인 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 의미를 따른다.

[0024] 본 발명은 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체;를 포함하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 상기 약학 조성물에 포함된 아밀로이드 베타 펩타이드는 인체 내에서 항원으로써 인식되어 면역반응에 의하여 아밀로이드 베타 펩타이드에 대한 항체 형성을 유도할 수 있다. 유도된 아밀로이드 베타에 대한 항체는 뇌로 이동하여 응집된 아밀로이드 베타 플라크의 제거를 유도할 수 있다. 동시에, 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신 또는 그 유도체는 함께 제 2형 MHC 분자를 가진 수지상세포에 이입될 수 있고, 그로 인하여 아밀로이드 베타 특이적인 조절 T 세포의 생성을 유도할 수 있다. 해당 아밀로이드 베타 특이적 조절 T 세포는 뇌로 이동하여 뇌에서 발생하는 뇌신경 염증을 감소시키고, 산화적 스트레스를 제거할 수 있다. 즉, 알츠하이머병의 주요 원인인 아밀로이드 베타 플라크를 제거하면서도 뇌 염증을 제거할 수 있어 알츠하이머병에 대한 다면적인 치료 효과를 보일 수 있는 것에 해당한다. 또한, 아밀로이드 베타에 대한 항체를 생성하는 백신의 대표적인 부작용인 뇌 염증을 억제할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 아밀로이드 베타 펩타이드는 아밀로이드 베타 단백질 중 적어도 일부의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다. 아밀로이드 베타 펩타이드는 수지상 세포의 MHC 분자에 결합하는 에피토프를 가지고 있어, 상기 적어도 일부는 상기 에피토프로서 인식될 수 있는 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 에피토프로서 인식될 수 있는 서열은 에피토프 서열 전체로 이루어지거나, 그 서열의 양 말단에 일부 아미노산

이 추가되거나, 양 말단에서 일부 아미노산이 제거되어도 에피토프로서 작동하는 서열을 의미한다.

- [0029] 상기 에피토프는 서열번호 1의 아미노산 서열의 적어도 일부를 포함할 수 있고, 보다 구체적으로는 서열번호 2 내지 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 서열일 수 있다. 다만 이에 제한되는 것은 아니고, 상기 에피토프로서 인식될 수 있는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있고 공지된 에피토프 서열을 사용할 수도 있다.
- [0030] 상기 아밀로이드 베타 펩타이드의 길이는 앞서 언급하였듯, MHC 분자에 결합하여 아밀로이드 베타 펩타이드로 인식될 수 있는 것이라면 제한되지 않으며, 예를 들면 0.5 kDa 내지 5 kDa, 1 kDa 내지 4 kDa, 1.5 kDa 내지 3 kDa 또는 1.8 kDa 내지 2 kDa 등일 수 있다. 다만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 아밀로이드 베타 펩타이드는 바람직하게는 인간의 아밀로이드 베타 펩타이드에서 유래한 것 일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 아밀로이드 베타 펩타이드를 코딩하는 핵산은 앞서 언급한 아밀로이드 베타 펩타이드를 코딩하고 있는 것이라면 그 핵산의 종류에 무관하게 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 핵산의 종류의 예를 들면, DNA 또는 RNA 일 수 있다. 상기 아밀로이드 베타 펩타이드를 코딩하는 핵산의 예를 들면 서열번호 1 내지 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 것일 수 있다. 다만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 아밀로이드 베타 펩타이드를 코딩하는 핵산은 인체 내에서 상기 아밀로이드 베타 펩타이드를 생성할 수 있고, 유도된 상기 펩타이드는 앞서 언급되었듯 제 2형 MHC 분자를 가진 수지상세포 등의 항원제시세포에 유입되어 아밀로이드 베타 펩타이드 특이적인 조절 T 세포를 유도하거나, 아밀로이드 베타 펩타이드에 특이적인 항체를 생성할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 상기 라파마이신 또는 그 유도체는 그 종류에 무관하게 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 라파마이신은 림프구의 성장을 억제하고, 분화를 촉진하여 아밀로이드 베타에 대해 특이적인 조절 T세포를 유도할 수 있고, 아밀로이드 베타 펩타이드에 의하여 유발되는 염증 반응을 억제할 수 있다. 따라서 이러한 기능을 수행할 수 있는 라파마이신의 유도체라면 제한 없이 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 그 예를 들면, 벤조일 라파마이신, 템시로리무스, 에베로리무스, 조타롤리무스, 바이오리무스, 피메크로리무스, 피메크로리무스, 타크로리무스, 리다포르리무스 등을 들 수 있다. 다만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 상기 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체;는 전달체에 담지되어 전달될 수 있고, 바람직하게는 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체;가 함께 개별 전달체마다 포함되도록 담지되어 전달될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 전달체는 아밀로이드 베타 펩타이드 및 라파마이신 또는 그 유도체의 수지상세포에의 전달효율을 크게 향상시키므로, 결과적으로 아밀로이드 베타 펩타이드를 제 1형 또는 제 2형 MHC 분자에 제시하는 관용 수지상세포의 유도 효율을 증가시킬 수 있고, 따라서 아밀로이드 베타 펩타이드 특이적인 항체의 생성 효율 및 아밀로이드 베타 펩타이드 특이적 조절 T 세포의 유도 효율을 크게 높일 수 있다. 상기 아밀로이드 베타 특이적 조절 T 세포의 유도 효율의 증가는 앞서 언급하였듯, 뇌신경 염증을 억제하고, 산화적 스트레스를 억제하여 신경을 보호할 수 있어 유리하다.
- [0039] 본 발명에서 상기 전달체는 내부에 아밀로이드 베타 펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산; 및 라파마이신 또는 그 유도체;를 담지하고, 타겟 세포에 전달하여 내부의 물질을 방출할 수 있는 것이라면, 당업자에 의하여 제한 없이 선택될 수 있다. 예를 들면, 바이러스 전달체, 바이러스 유사 입자(virus-like particle, VLP), 양전하성 폴리머, 리포솜, 지질나노입자(lipid nanoparticle), 금 및 반도체 나노결정 입자(quantum dot)를 포함하는 군에서 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 지질나노입자일 수 있다. 다만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에서 상기 지질나노입자는 그 성분에 무관하게 당업자에 의하여 선택하여 사용할 수 있다. 지질나노입자를 구성하는 인지질 분자로서, 중성지질, 음이온성 및/또는 양이온성 인지질 모두가 사용이 가능하고, 바람직하게는 양이온성 인지질을 포함하는 지질나노입자를 사용할 수 있다.
- [0041] 상기 중성지질의 예를 들면, L- α -포스파티딜콜린(L- α -phosphatidylcholine, PC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있고, 상기

PC는 콩, 계란, 수소화된 콩 또는 계란으로부터 유래된 PC일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0042]

상기 음이온성 지질의 예를 들면, L- α -포스파티딕산(L- α -phosphatidic acid), L- α -포스파티딜-DL-글리세롤(L- α -phosphatidyl-DL-glycerol), 카디올리핀(cardiolipin), L- α -포스파티딜이노시톨(L- α -phosphatidylinositol), L- α -포스파티딜세린(L- α -phosphatidylserine), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)], DLP), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DLPS), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphate, DLP), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)], DMP), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DMP), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate, DMP), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)], DOP), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate, DOP), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DPP), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate, DPP), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)], DSP), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DSP), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate, DSP), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[카복시(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy(polyethylene glycol)2000]), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)2000]), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[PDP(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[PDP(polyethylene glycol)2000]), 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)], POP), 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], POP), 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-포스페이트(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate, POP) 및 올레산(oleic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0043]

상기 양이온성 지질의 예를 들면, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane, DOTAP), 디올레오일 글루타마이드(dioleoyl glutamide), 디스테아로일 글루타마이드(distearoylglutamide), 디팔미토일 글루타마이드(dipalmitoyl glutamide), 디올레오일 아스파르타마이드(dioleoylaspartamide), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane, DODAP), β -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄-카바모일)], (3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoil], DC-Chol), 메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE) 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0044]

본 발명에서 상기 지질입자는 입자의 유동성, 담지 효율 및/또는 안정성 등을 개선하기 위하여 추가적으로 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG) 등으로 인지질 표면이 PEGylation 될 수 있고, 콜레스테롤, 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane (DOTAP)을 더 포함할 수도 있다. 바람직하게는 앞서 언급한 양이온성 지질인 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, DOTAP, PEG2000 및 콜레스테롤을 포함하도록 지질 입자를 사용할 수 있다. 다만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045]

본 발명에서 상기 전달체의 평균 직경은 제한 없이 본 발명의 범위에 포함되고, 담지되는 펩타이드, 핵산 및 약물의 양 등의 조건에 따라 담지자에 의해 선택될 수 있다. 전달체의 직경이 클수록 더 많은 양의 물질의 담지가 가능하나, 전달체의 혈중 안정성, 혈중 이동속도 등에 영향을 줄 수 있어 적절한 범위의 평균 직경을 선택할 수 있다. 평균 직경의 예를 들면, 50 nm 내지 600 nm일 수 있다. 평균 입자 직경의 하한의 예를 들면, 50 nm, 80 nm, 110 nm, 140 nm 또는 170 nm 일 수 있고, 상한의 예를 들면, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 350 nm, 300 nm 일 수 있다. 다만, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0047] 본 발명의 상기 조성물은 상기 알츠하이머병의 예방 또는 치료와 관련하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가 시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 상기 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며, 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여시간, 투여 경로 및 배설 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 상기 조성물의 투여 방법은 제한 없이 선택될 수 있다. 예를 들면, 근육주사(intramuscular injection, IM), 피하주사(subcutaneous injection, SC), 정맥주사(intravenous injection, IV), 피내주사(intradermal injection, ID), 복강주사(intraperitoneal injection, IP) 할 수 있고, 바람직하게는 피부하층에 위치하는 수지상세포에 의하여 흡수되기 용이한 피하주사가 유리할 수 있다. 다만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 상기 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양하며, 적절한 투여량은 예를 들면 환자의 체내에 축적된 약물의 양 및/또는 사용되는 본 발명의 전달체의 구체적 효능정도에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면 체중 1 kg당 0.01 μg 내지 1 g 일 수 있으며, 일별, 주별, 월별 또는 연별의 단위 기간으로, 단위 기간 당 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있으며, 또는 인퓨전 펌프를 이용하여 장기간 연속적으로 투여될 수 있다. 반복투여 횟수는 약물이 체내 머무는 시간, 체내 약물 농도 등을 고려하여 결정된다. 질환 치료 경과에 따라 치료가 된 후라도, 재발을 위해 조성물이 투여될 수 있다.
- [0053] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0055] **제조예 1. LNP-R/A β 의 제조**
- [0056] 846 μg 의 18:1 TAP (DOTAP, 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), 675 μg 의 18:1 (Δ^9 -Cis) PE (DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 358 μg 의 18:0 PEG2000 [1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]], 115 μg 의 콜레스테롤, 70 μg 의 라파마이신을 공기 중에서 건조시켜 thin film으로 만들었다. 그 후 200 μg 의 아밀로이드 단백질을 함유한 1mL의 PBS로 1시간 동안 수화시켰다. 수화된 용액은 polycarbonate membrane filters (pore sizes of 1 μm , 400 nm, and 200 nm)를 통과시켜 centrifugal filter unit (100 kDa)를 이용해 농축하였다.
- [0058] **실시예 1. 지질 나노입자의 특성 확인**
- [0059] 상기 제조예 1에 의해 만들어진 LNP-R/A β 를 투과전자현미경으로 관찰하였고 인지질 이중막을 가진 구형의 나노입자 형태임을 확인하였다. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) 분석 결과 탄소, 산소, 아밀로이드 단백질에 함유된 질소, 지질에 함유된 인 등이 검출되었다. 본 발명의 LNP-R/A β 은 232.7 ± 84.0 nm의 크기를 가진 나노입자이며, 그 크기는 7일간 관찰하였을 때 그 안정성을 유지하였다. 본 지질 나노입자의 주 구성 지질인 DOTAP에 의해 나노입자는 약간의 양전하를 가짐을 확인하였다(도 2a).
- [0060] 31P-NMR 분석 결과 본 치료용 백신은 unilamellar 구조임을 확인하였고, HPLC 분석을 통해 LNP-R/A β 내에 라파마이신이 함유되었음을 확인하였으며, BCA protein assay를 통해 함유된 항원(단백질)의 양을 정량하여 표 1에 나타내었다. 라파마이신이 LNP-R/A β 와 단순히 혼합된 것이 아닌 봉입되어 있음을 확인하기 위해 DSC 분석을 통해 확인하였고 Free 라파마이신에서는 관찰된 피크가 LNP-R/A β 에서는 관찰되지 않았음을 확인하였다. 아밀로이드 베타 단백질이 LNP-R/A β 에 함유되어 있음을 확인하기 위해 FITC로 표지된 아밀로이드 베타 단백질을 이용하여 DiD 표지된 지질 나노입자를 제조하였고 공초점 형광현미경을 통해 관찰하여 두 형광이 동시에 검출됨을 확인하였다. 이를 유세포분석기를 통해 분석한 결과 약 91.7 %의 입자가 두 형광이 모두 검출되어 대부분의 지질

나노입자에 항원이 봉입되었음을 확인하였다. FT-IR을 통해 확인해본 결과 LNP-R/Aβ에서는 라파마이신, 아밀로이드 베타 단백질, 지질 나노입자에서 나타난 peak가 모두 나타남을 확인하였다(도 2b). LNP-R/Aβ의 세포 및 동물에서의 독성을 분석해본 결과 특별한 독성이나 염증 유발이 나타나지 않았다(도 2c).

표 1

지질 나노입자	라파마이신		항원	
	담지량(μg)	담지 효율(%)	담지량(μg)	담지 효율(%)
LNP-R	18.36 ± 0.60	26.23 ± 0.86	N/A	N/A
LNP-Aβ	N/A	N/A	106.18 ± 12.3	53.09 ± 6.17
LNP-R/Aβ	18.73 ± 0.83	26.75 ± 1.19	103.78 ± 9.25	51.89 ± 4.63

실시예 2. LNP-R/Aβ에 의한 Aβ 특이적인 항체 유도 및 알츠하이머병 동물 모델의 뇌에서 Aβ 응집체 집적에 미치는 효과 검증

LNP-R/Aβ는 쥐에 피내 주사한 후 수지상세포에 의해 uptake되어 림프절로 이동하여 작용할 것이라 기대되므로, 세포 수준에서 수지상세포에 LNP-R/Aβ를 처리하고 시간에 따라 관찰하였다. 시간에 따라 항원이 수지상세포에 의해 processing하여 표면에 제시됨을 확인하였다. 지질나노입자가 없는 라파마이신과 항원의 혼합물과 수지상세포의 항원 제시 능력을 비교해본 결과 지질나노입자를 이용하였을 때 그 효율이 월등히 높아짐을 확인하였다. MHC class II에 항원이 로딩된 복합체를 검출하기 위하여 이 때에는 아밀로이드 베타가 아닌 Eα 펩타이드를 항원으로 사용하였고(LNP-R/Eα), Eα-MHC class II를 검출하는 항체를 이용하였다. LNP-R/Aβ를 피내주사한 24시간 후 IVIS를 통해 분석한 결과 림프절로 이동하였음을 확인하였다(도 3a).

림프절을 동결시편제작하여 조직면역염색을 통해 확인해 본 결과 수지상세포에서 LNP-R/Aβ가 검출되었다. 체내에서 LNP-R/Aβ에 의해 항원 특이적 follicular helper T (Tfh) 세포가 유도됨을 확인하기 위해 항원으로 Ovalbumin을 이용하여 LNP-R/OVA를 제조하였고 이를 마우스에 1주일 간격으로 2회 피내주사하고 5일 후 림프절을 수확하여 OVA-specific Tfh 세포의 비율을 정량하였을 때, LNP-OVA, LNP-R/OVA 그룹에서 유사한 수준의 Tfh와 항원 특이적 Tfh가 유도됨을 확인하였다(도 3b).

알츠하이머병 마우스 모델인 5XFAD 마우스를 이용하여 LNP-R/Aβ의 체내 항체 유도 효과를 확인하였다. 5개월령 5XFAD 마우스에 LNP-R/Aβ 또는 그 대조군들을 1주일 간격으로 5회 피내주사하고 2주 뒤 혈청과 뇌 조직을 얻었다(도 3b). 그 결과 Aβ 항원이 포함되어 있는 LNP-Aβ와 LNP-R/Aβ 투여군의 혈청 및 뇌 조직에서 Aβ 특이적인 항체가 관측되었다. 두 투여군에서 생성된 항체들은 Aβ 항원의 N-말단의 8개 아미노산 서열 이내의 에피토프를 가지고 있는 것으로 확인되었다(도 3c). 5XFAD 마우스의 비장에서 Tfh 및 형질 세포의 비율을 조사해본 결과 LNP-Aβ, LNP-R/Aβ 그룹에서 유의미하게 증가하는 경향성을 보였다(도 3d). 상기 투여 조건에서 알츠하이머병 마우스 모델의 뇌 내에서 Aβ 플라크의 집적을 면역조직염색법(immunohistochemistry)를 통해 형광현미경으로 관측하였다. 항 Aβ 항체인 6E10을 이용하여 뇌 조직 내의 Aβ 플라크의 양을 확인한 결과, LNP-Aβ와 LNP-R/Aβ 투여군에서 해마와 대뇌피질을 비롯한 전체 뇌 조직에 걸쳐 Aβ 플라크가 현저히 감소한 것을 확인하였다. 따라서 실시예 1과 2에서의 결과로부터 LNP-Aβ와 LNP-R/Aβ가 항 Aβ 항체의 유도를 통해 뇌 내 Aβ를 제거하였음을 유추할 수 있다(도 3e, 3f).

실시예 3. LNP-R/Aβ에 의한 면역관용 수지상세포 및 조절 T세포 유도 확인

LNP-R/Aβ에 의해 면역관용 수지상세포 및 조절 T세포가 유도됨을 확인하기 위하여 OVA를 항원으로 하여 LNP-R/OVA를 만들었다. 이를 먼저 야생형 C57BL/6 마우스 골수 유래 수지상세포에 처리하여 유세포 분석기와 qRT-PCR을 통해 분석하였고 면역관용 수지상세포의 특징으로 알려진 낮은 수준의 MHC class II와 공동자극분자(co-stimulatory molecule)의 발현과 높은 수준의 CCR7, TGF-beta1, IL-10, HO-1, IDO, PD-L1의 발현을 확인하였다. 이 수지상세포를 OT-2 마우스 유래 naive CD4 T cell과 공배양하였고, 그 결과 높은 수준의 조절 T세포가 유도됨을 확인하였다. qRT-PCR 결과에서도 높은 수준의 Foxp3, IL-10, TGF-beta1의 발현, 낮은 수준의 IFN-gamma, TNF-alpha 발현을 확인하였다(도 4a).

항원만 봉입된 LNP-OVA와 라파마이신과 항원이 동시에 봉입된 LNP-R/OVA를 비교하고자 웨스턴 블랏을 실시하였고 LNP-R/OVA 그룹에서 더 높은 수준의 Foxp3, 더 낮은 수준의 T helper 1 세포의 마커인 T-bet이 발현되었다. 신경세포의 보호에 관여한다고 알려진 amphirgulin도 LNP-R/OVA에서 더 많이 발현함을 확인하였다. LNP가 아닌 라파마이신과 항원의 혼합물의 경우 LNP-R/OVA에 비해 더 낮은 수준의 조절 T 세포를 유도하였고 이를 통해 LNP

의 필요성을 확인하였다(도 4b).

[0072] 야생형 C57BL/6 마우스에 1 주일 간격으로 2 회 피내주사하고 5 일 후 비장과 림프절을 수확하여 조절 T 세포와 T helper 1 세포의 비율을 정량하였을 때 두 장기 모두에서 LNP-R/OVA는 높은 수준의 조절 T 세포를 유도하면서 T helper 1 세포는 증가시키지 않음을 확인하였다(도 4c). 상기 실시예 2에서의 5XFAD 알츠하이머병 마우스 모델에서도 뇌 조직 내에서 LNP-R/Aβ는 가장 높은 수준의 조절 T 세포를 유도함을 확인하였고(도 4c), 비장에서도 비슷한 경향성을 확인하였다(도 4d).

[0074] 실시예 4. LNP-R/Aβ에 의해 유도된 Aβ 특이적 조절 T세포의 Aβ 타겟 효율성 확인.

[0075] 상기 실시예 3에서와 마찬가지로 야생형 C57BL/6 마우스에 1 주일 간격으로 2 회 피내주사하고 5 일 후 비장을 수확하여 추가로 3 일 간 OVA 항원에 의해 제자극을 실시하였다. 그 후 qRT-PCR, FACS, ELISA를 통해 분석하였고 이를 통해 항원 특이적 조절 T 세포가 유도됨을 확인하였다. 특히 OVA-specific TCR을 인식하는 tetramer를 이용한 tetramer staining에서 항원 특이적 조절 T 세포가 다른 그룹에 비해 현저히 높음을 확인하였다(도 5a).

[0076] 체내에서 LNP-R/Aβ에 의해 유도된 Aβ 특이적인 조절 T세포가 비특이적인 조절 T세포에 비해 효율적으로 뇌 내의 Aβ를 타겟하고 Aβ 플라크의 집적을 억제하는 것을 확인하기 위하여 adoptive Treg cell transfer를 진행하였다. 이는 LNP-R/Aβ의 주사에 의해 형성되는 항 Aβ 항체의 효과를 제외한 조절 T세포에 의한 효과만을 보기 위한 시험이다. 6 주령의 야생형 마우스 모델에 LNP와 LNP-R/Aβ를 1 주일 간격으로 2 회 투여 후, 1 주일 후 두 그룹에서 동일한 세포수의 조절 T세포를 분리하여 각각 5 개월령 5XFAD 마우스에 정맥 주사하고, 2 주 뒤에 그 효과를 면역조직염색법으로 확인하였다(도 5b). 이 때 transfer한 조절 T세포에 CFSE dye로 염색하여 뇌 내에서 transfer된 조절 T세포가 존재하는지 형광현미경을 통해 관측하였다. 또한 Aβ 플라크의 변화를 확인하기 위해 항 Aβ 항체를 통하여 면역조직염색하였다. 그 결과, LNP-R/Aβ에 의해 유도된 조절 T세포를 투여한 마우스의 뇌에서 Aβ 플라크가 대조군에 비해 유의하게 감소한 것을 확인하였으며, 대조군과 달리 Aβ 플라크 주변에서 transfer한 조절 T세포를 발견하였다. 따라서, LNP-R/Aβ에 의해 Aβ 특이적으로 작용하는 조절 T세포가 유도되고, Aβ 특이적이지 않은 조절 T세포에 비해 더욱 효율적인 Aβ 타겟팅 및 제거 작용을 보임을 확인하였다(도 5b). 또한 뇌 조직 내에 조절 T세포가 실험군에서 월등히 높음을 확인하였고, 염증성 미세아교세포(M1 microglia)는 감소하고, 항염증성 미세아교세포(M2 microglia)는 증가함을 확인하였다(도 5c). 이를 통해 LNP-R/Aβ가 유도한 항원 특이적 조절 T세포는 M1 미세아교세포를 M2 미세아교세포로 전환시키고 이 M2 미세아교세포로 인해 아밀로이드 베타 플라크가 감소함을 확인하였다.

[0078] 실시예 5. LNP-R/Aβ가 뇌에서 신경염증 억제에 미치는 치료 효과 확인.

[0079] LNP-R/Aβ가 뇌에서 신경염증을 완화할 수 있음을 확인하기 위하여, OT-2 마우스 유래 비장세포(splenocyte)에 LNP-R/OVA를 처리하고, 4 일간 배양하여 조절 T 세포를 유도하였다. 그 후, 각각 미세아교세포를 모사하는 LPS-treated Raw264.7 cell 혹은 교세포와 공배양하여 분석하였다. Raw264.7 세포의 qRT-PCR와 ELISA 분석 결과, M1 미세아교세포의 마커인 iNOS나 염증성 사이토카인 (TNF-α)는 LNP-R/OVA에 의해 감소하였고, M2 미세아교세포의 마커인 Arg-1나 항염증성 사이토카인 (IL-10)는 증가하였다. 이를 통해 M2 미세아교세포로의 polarization이 LNP-R/OVA에 의해 유도됨을 확인하였다(도 6a). 교세포와의 공배양에서도 LNP-R/OVA는 교세포의 성장인자 발현을 증가시켰고, 특히 LNP-OVA에 비해 LNP-R/OVA는 반응성 있는 성상세포(reactive astrocyte)가 발현하는 것으로 알려진 사이토카인의 분비를 감소할 수 있음을 확인하였다. 또한 LNP-R/OVA가 유도하는 조절 T 세포는 그 자체로도 신경을 보호할 수 있음을 확인하였다(도 6b).

[0080] 상기 실시예의 5XFAD 마우스 실험에서도 유사하게 뇌 내에 M1 미세아교세포는 감소하고 M2 미세아교세포는 증가하는 경향성을 보였다(도 6b). 또한 LNP-R/Aβ는 기존 백신과 유사한 LNP-Aβ에 비해 염증성 사이토카인은 크게 증가하지 않은 반면, 항염증성 사이토카인은 증가하는 경향성을 보였다(도 6c). 특히 기존 백신의 부작용의 원인으로 지목된 T helper 1 세포를 뇌 및 비장에서 분석한 결과, 동일하게 항원을 주사해주었음에도 불구하고 본 실험군에서 LNP-Aβ에 비해 낮은 Th1 세포가 관찰되었다(도 6c, 6d).

[0081] 알츠하이머병의 주요 병변 중 하나인 만성적인 신경염증에 LNP-R/Aβ이 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2의 5XFAD 마우스 뇌 내에서 염증반응의 주요 바이오마커인 활성화된 미세아교세포와 교세포(각 Iba1, GFAP)를 면역조직염색을 통하여 관찰하였다. 뇌 내에 집적된 Aβ의 양과 밀접한 상관관계를 보이는 미세아교세포는 LNP-Aβ와 LNP-R/Aβ 투여군에서 모두 상당히 감소하였으며, 교세포의 활성화와 같은 경우에는 LNP-Aβ 투여군에 비해 LNP-R/Aβ 투여군에서 현저히 감소하였다. 이를 통해 알츠하이머병 마우스 모델의 뇌 내에서 LNP-

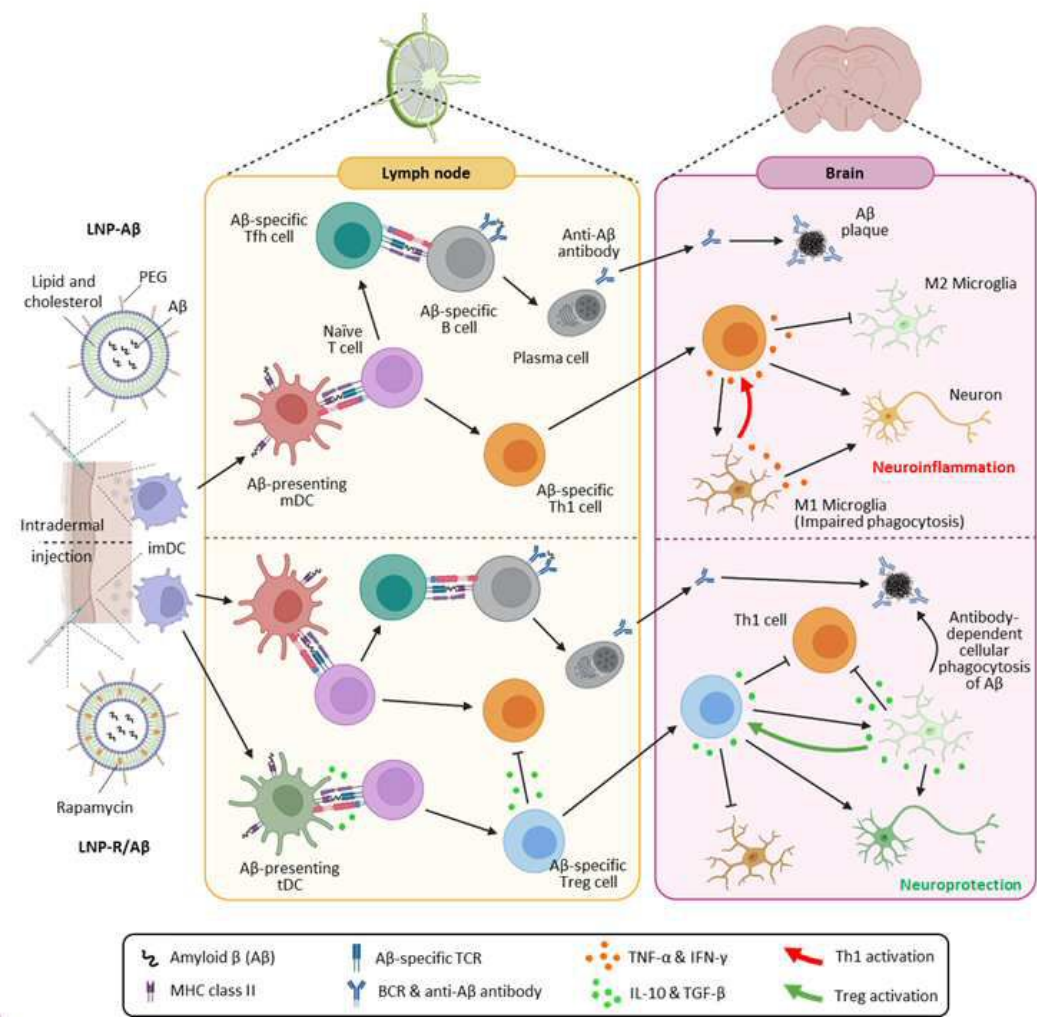
R/A β 투여군이 LNP-A β 투여군과 같이 항체 형성을 통해 뇌 내의 A β 집적을 줄여 만성적인 미세아교세포의 활성을 억제하며, 추가로 LNP-R/A β 투여군에서 A β 특이적인 조절 T세포를 유도하여 교세포의 활성화를 감소시키는 것을 확인하였다 (도 3f, 6d). 또한, LNP-R/A β 는 5XFAD 마우스의 피질에서 시냅스의 기능 또한 회복시키는 것을 확인하였다 (도 6d).

[0083] 실시예 6. LNP-R/A β 가 알츠하이머병 마우스 모델의 인지능력 향상에 미치는 영향 확인.

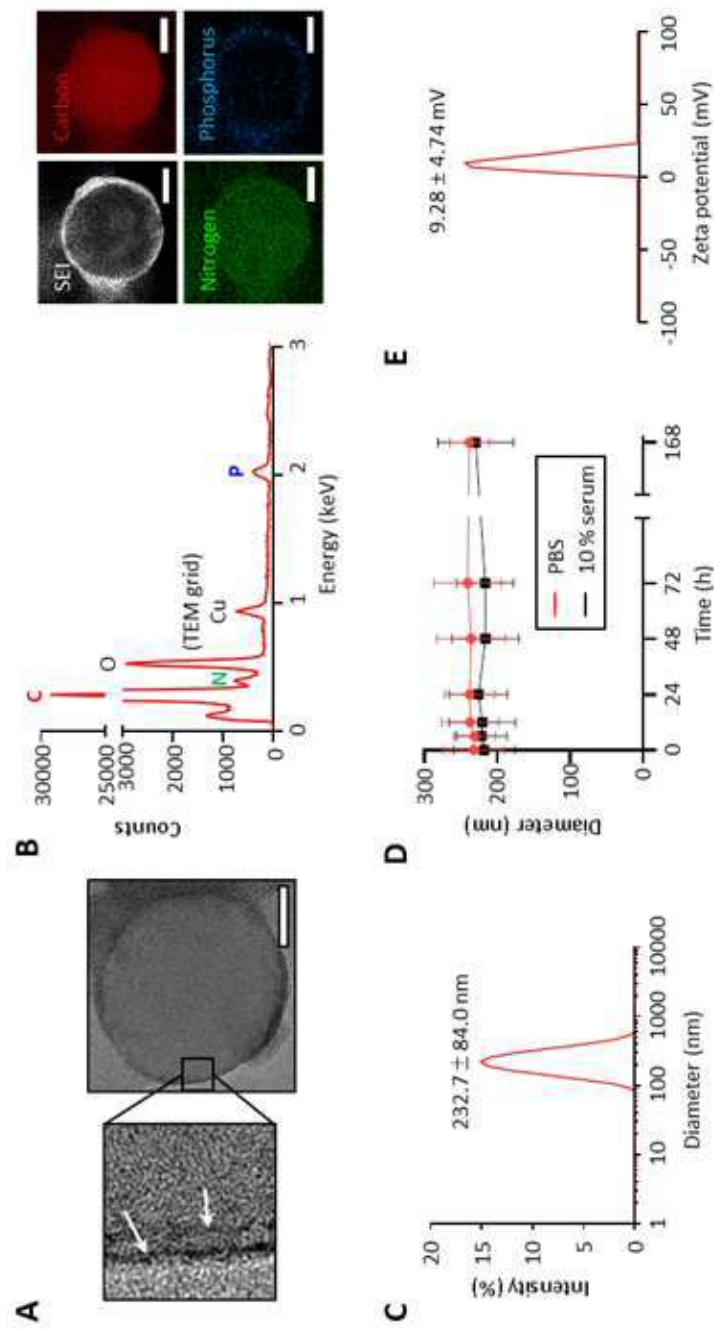
[0084] 공간 학습 및 기억 능력을 평가하는 모리스 수중 미로 실험을 통해 LNP-R/A β 가 알츠하이머병 마우스 모델에 미치는 영향을 평가하였다. 5XFAD 마우스 모델의 모리스 수중 미로에서 뚜렷한 인지 기능 저하가 나오는 연령대에서 실험하기 위하여 7 개월령 5XFAD 마우스 모델에 1 주일 간격으로 5 회 LNP-R/A β 와 대조군들을 피내주사하였다. 주사 후 2 주일 후부터 5 일의 학습 기간을 가진 후 6 일째에 학습 및 기억 능력을 평가하였다. 5 일의 학습기간 동안 쥐는 네 개의 사분면을 큐(Que)를 이용하여 표시한 직경 1 m, 수심 60 cm의 수조에서 보이지 않는 플랫폼을 찾을 수 있도록 훈련하였다. 물에는 불투명한 흰색 페인트를 풀어 플랫폼이 보이지 않도록 하였으며, 물의 온도는 21~22 ℃로 유지하였다. 마우스들은 하루에 각 사분면에서 출발하는 네 번의 시행을 5일의 학습기간 동안 반복하였으며, 각 시행에서 60 초 동안 자유롭게 수영하여 숨겨진 플랫폼을 찾도록 하였다. 플랫폼을 제한 시간 내에 찾지 못했을 경우 플랫폼 위로 실험자가 유도 후 15 초 동안 주변 큐를 통해 공간을 학습시켰다. 만일 제한 시간 내에 플랫폼을 찾은 경우 6 초 이상 플랫폼에 머무른 경우 마우스를 꺼내주고, 플랫폼 도달 시간을 측정하였다. 마지막 평가일에는 플랫폼을 없앤 후 하나의 사분면에서 출발하여 60 초간 자유롭게 수영한 후 꺼내주었으며, 플랫폼의 위치(타겟)에 도달하는데 걸린 시간, 타겟에 도달할 때까지 수영한 거리와 수영 궤적을 기록하였다. 5 일간의 학습기간 동안 LNP-R/A β 투여군의 마우스들이 LNP 투여군에 비해 플랫폼 도달 시간이 유의하게 빨라졌으며, 평가일에 더 빠르고 짧은 거리 내에 플랫폼의 위치를 찾아갔으며 야생형 대조군과 비슷한 수준의 수행능력을 보여주었다. 따라서 LNP-R/A β 투여에 의해 마우스들의 공간 학습 및 기억 능력이 야생형 수준으로 회복된 것을 확인하였다(도 7).

도면

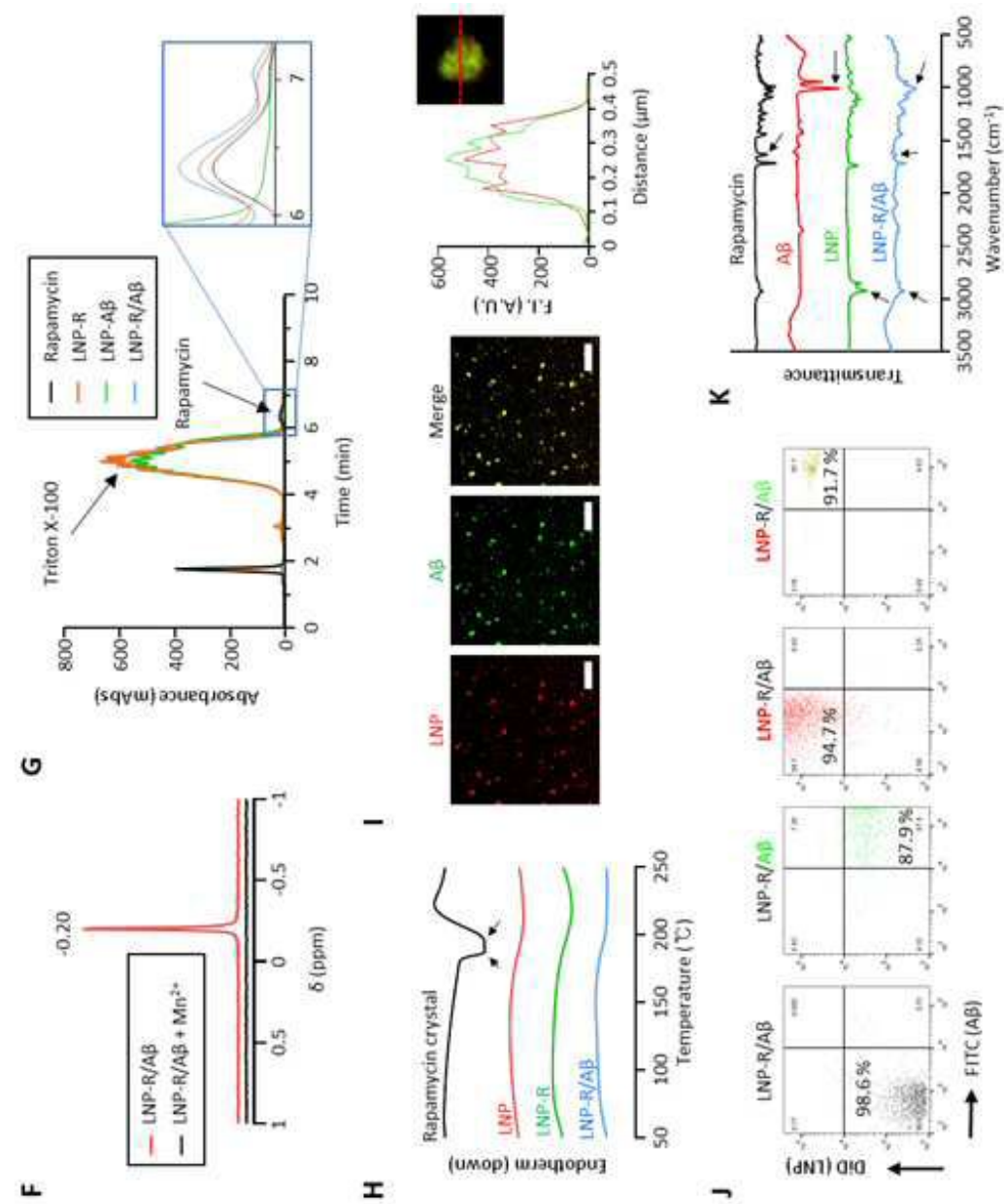
도면1



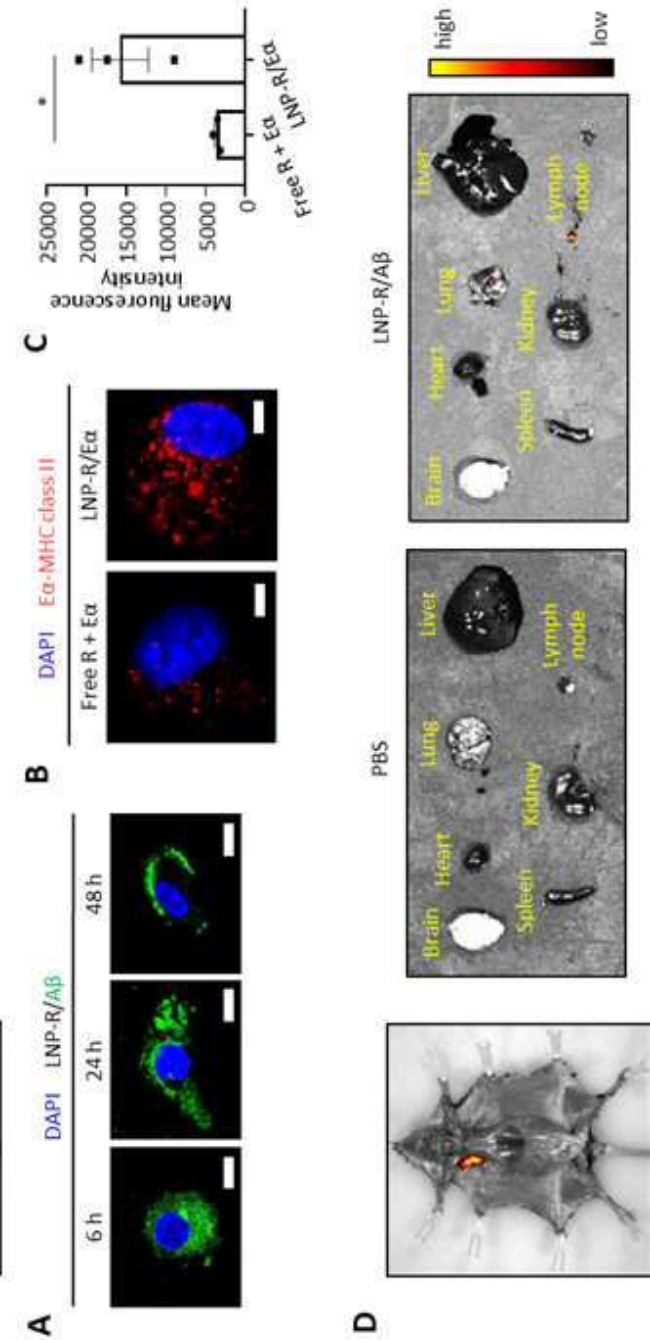
도면2a



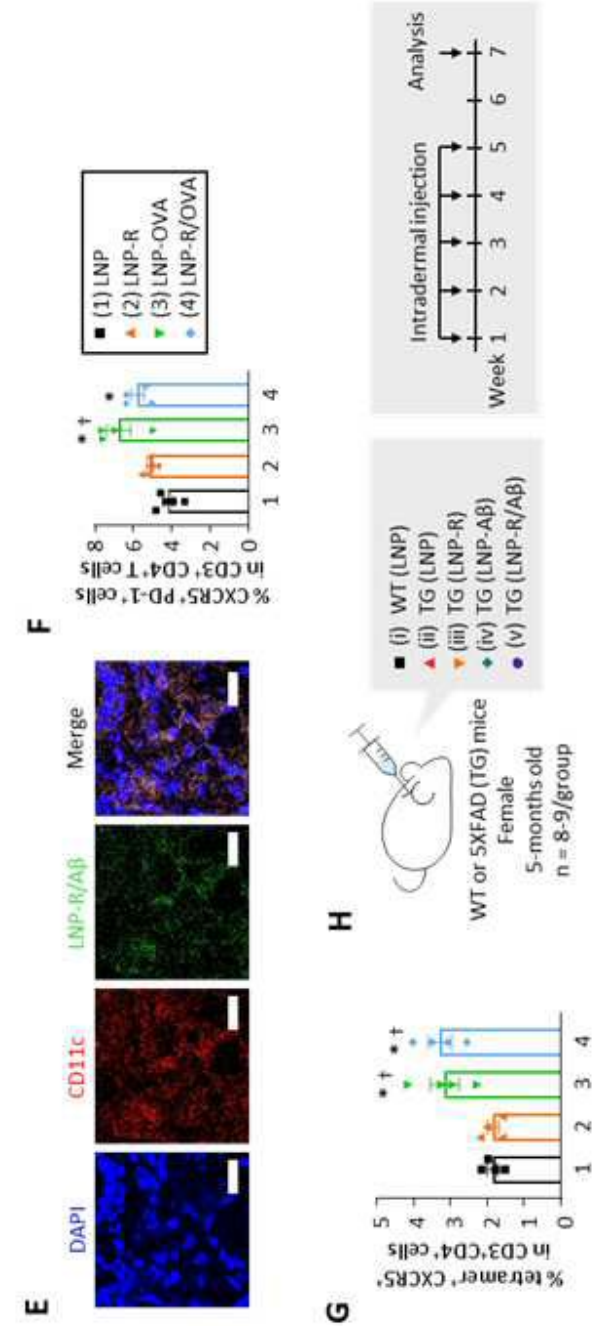
도면2b



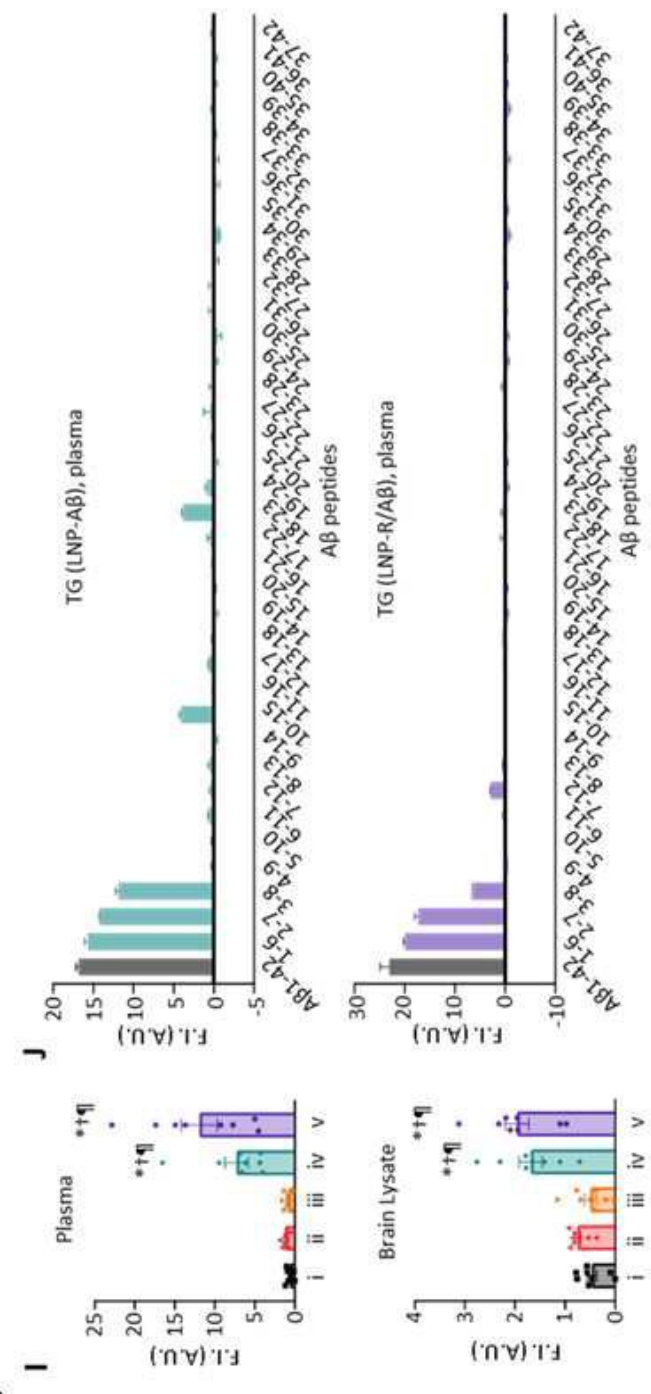
도면3a



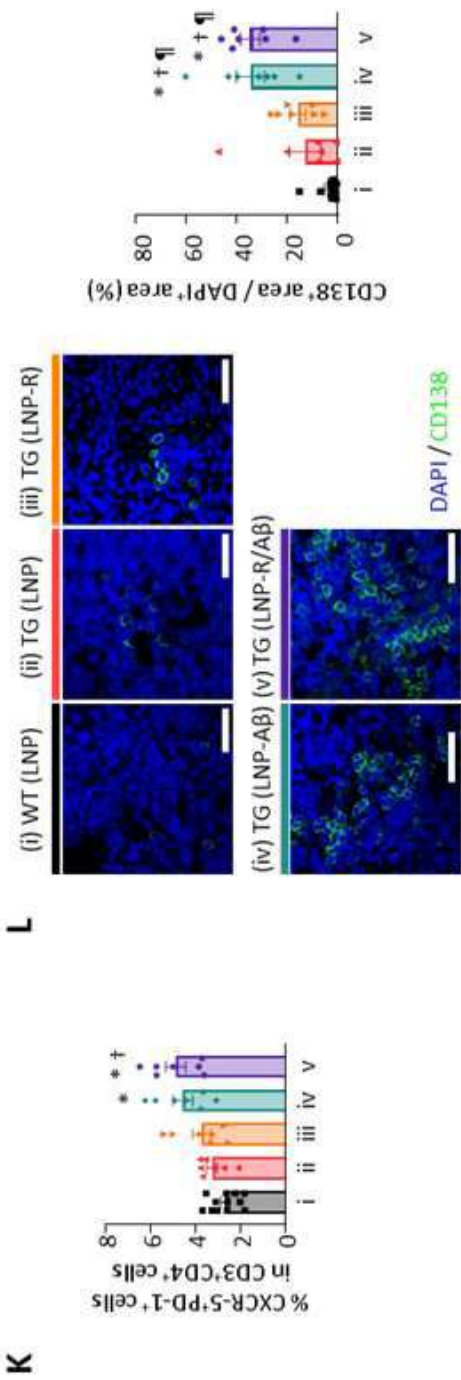
도면3b



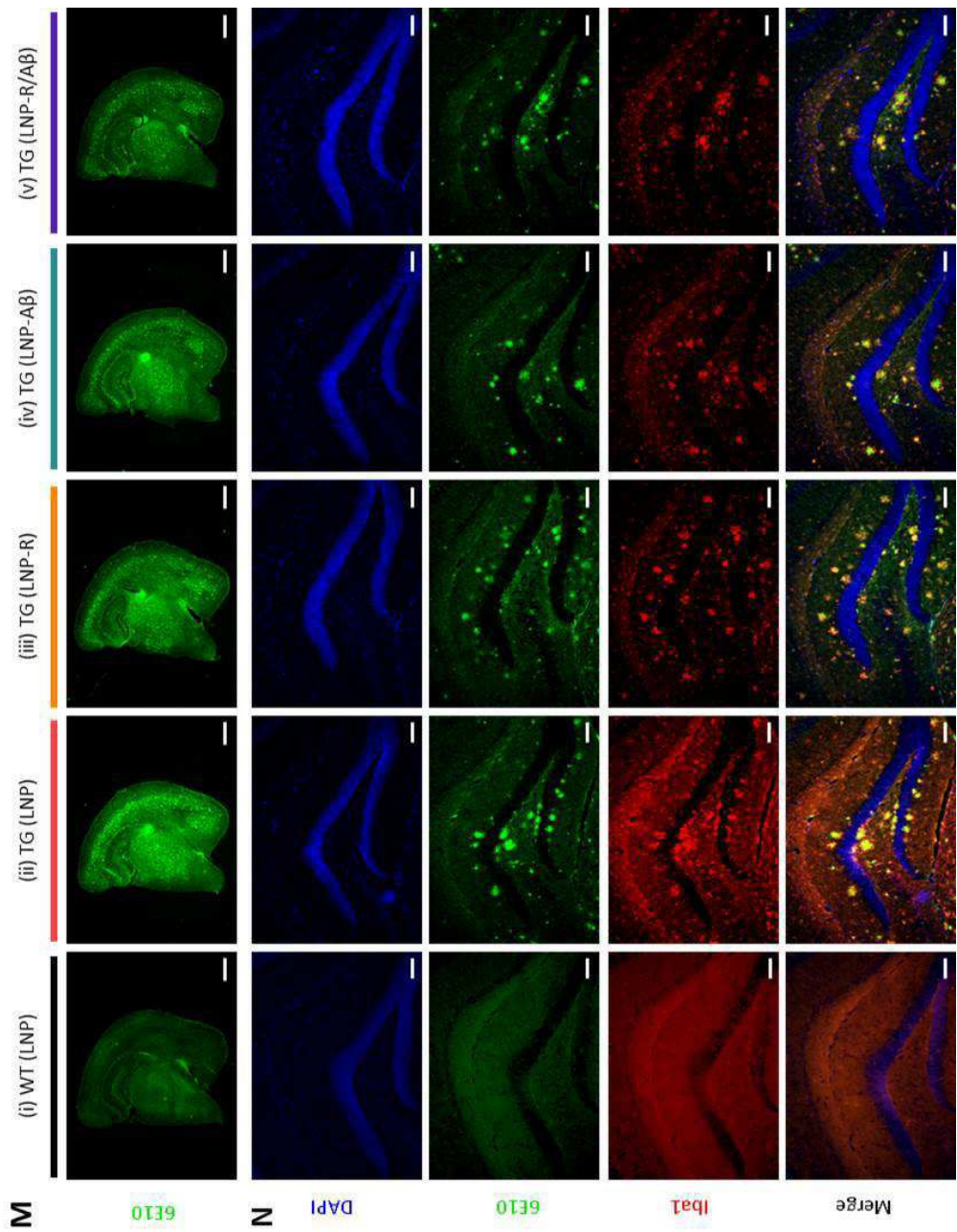
도면3c



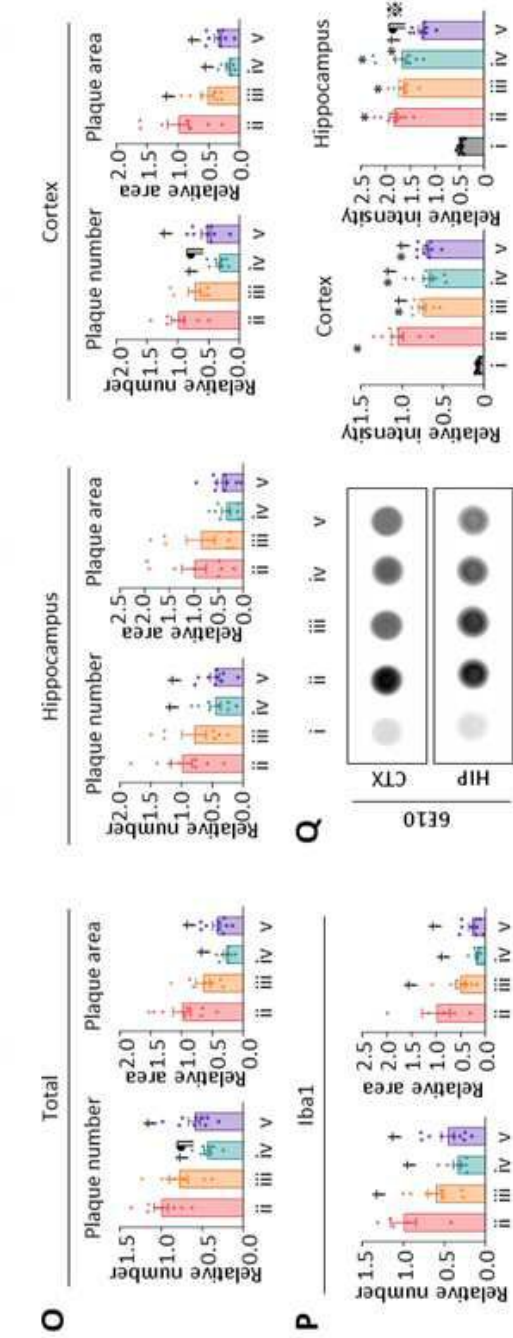
도면3d



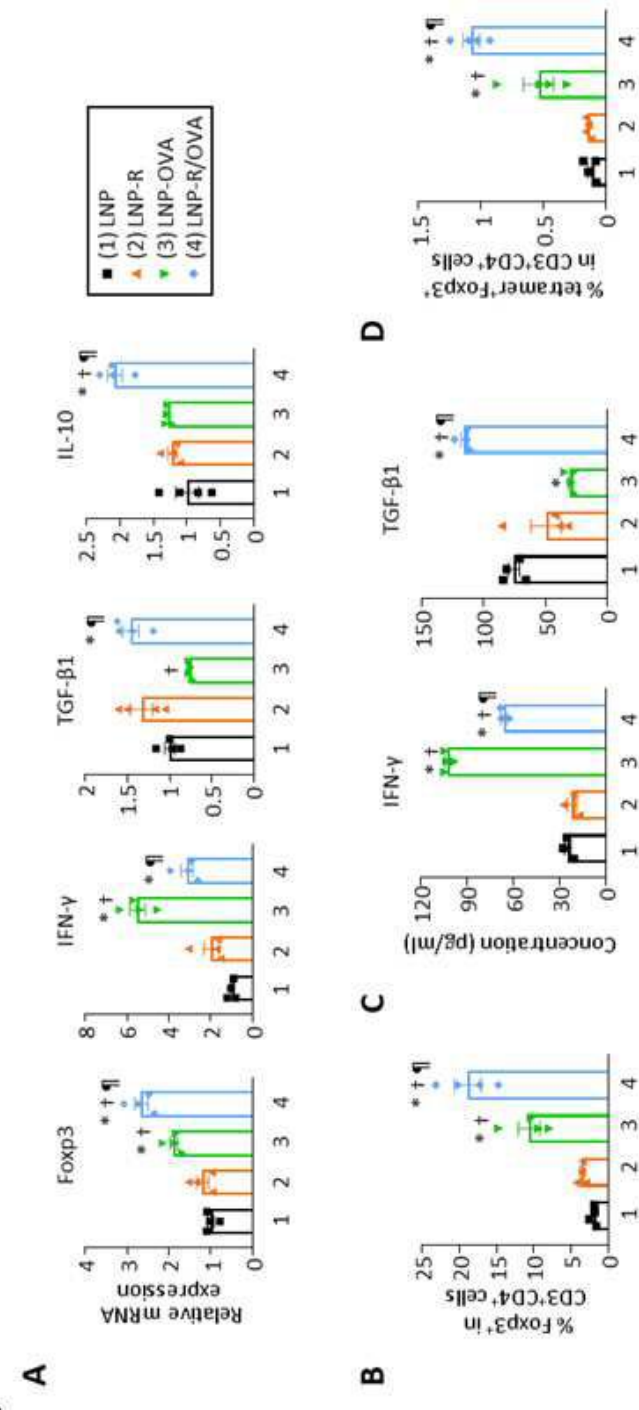
도면3e



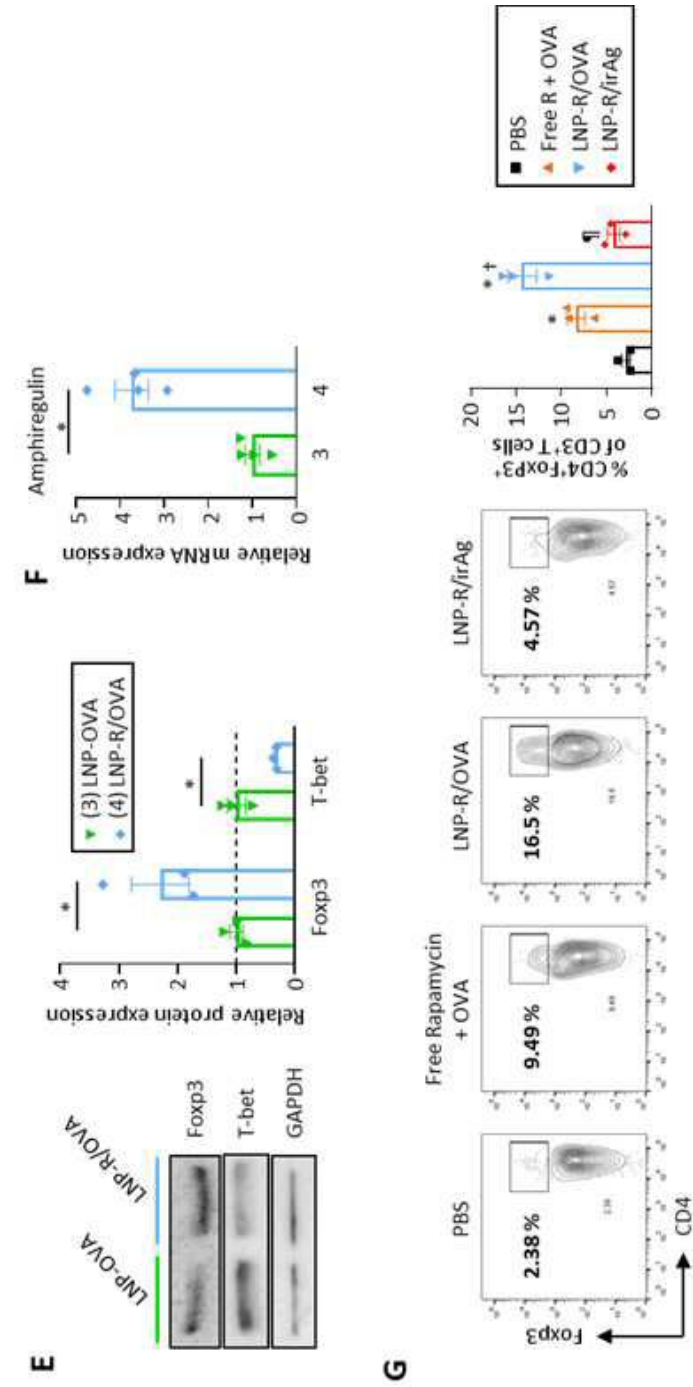
도면3f



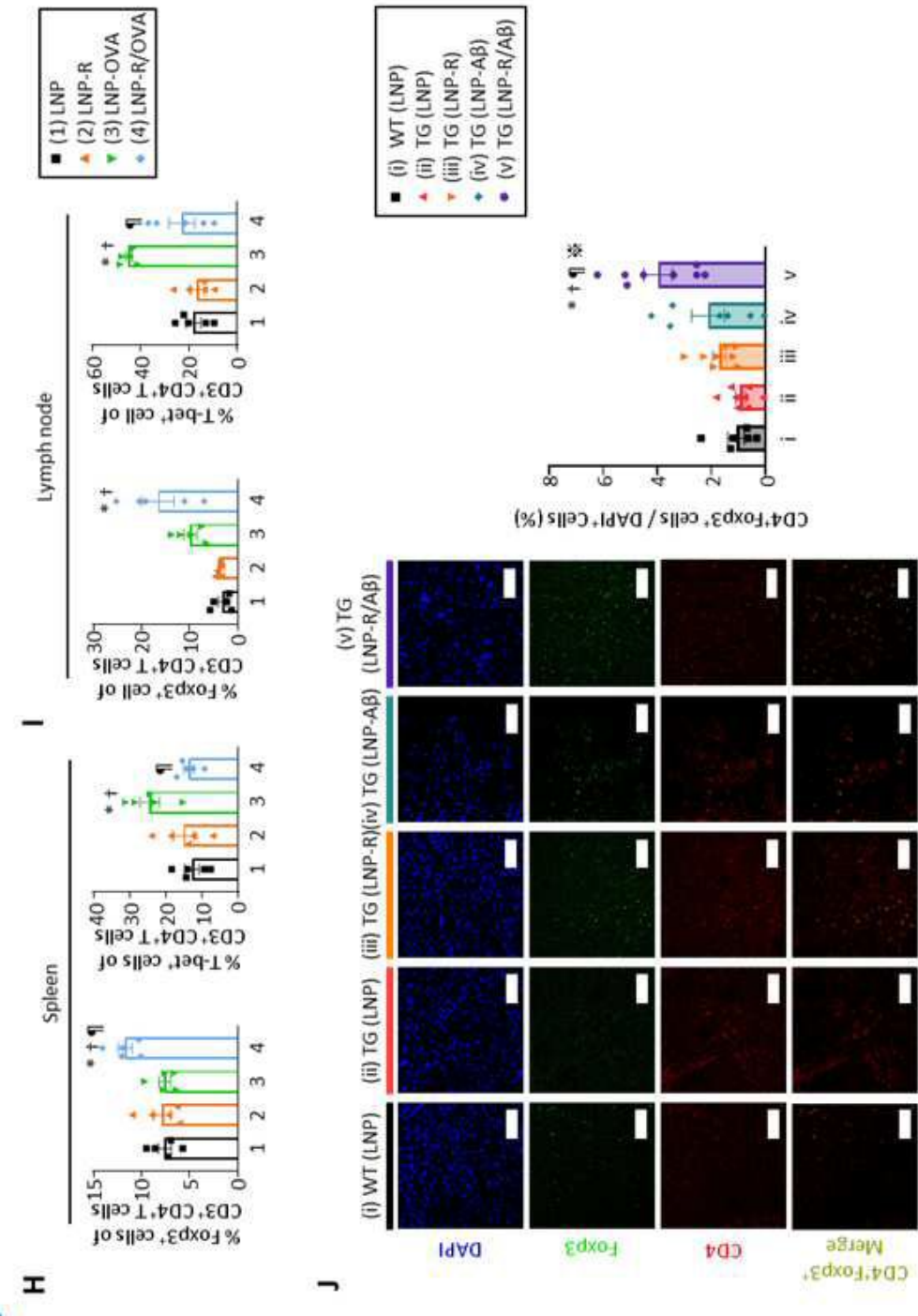
도면4a



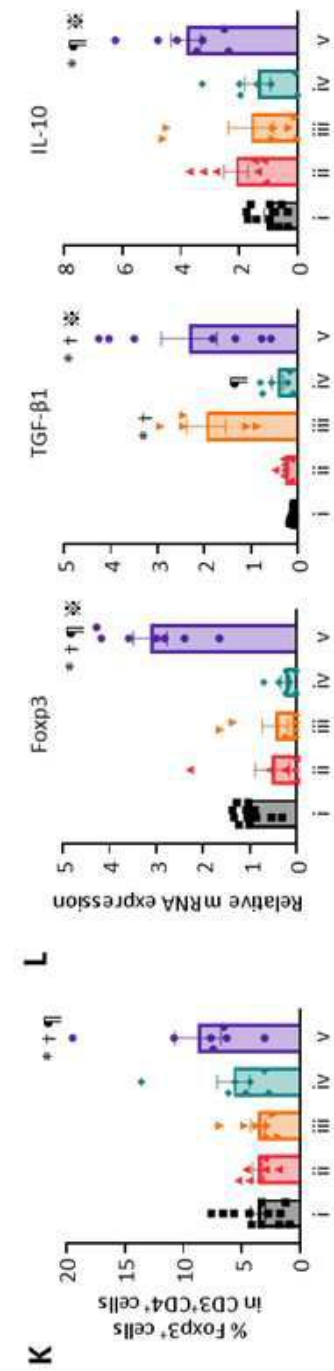
도면4b



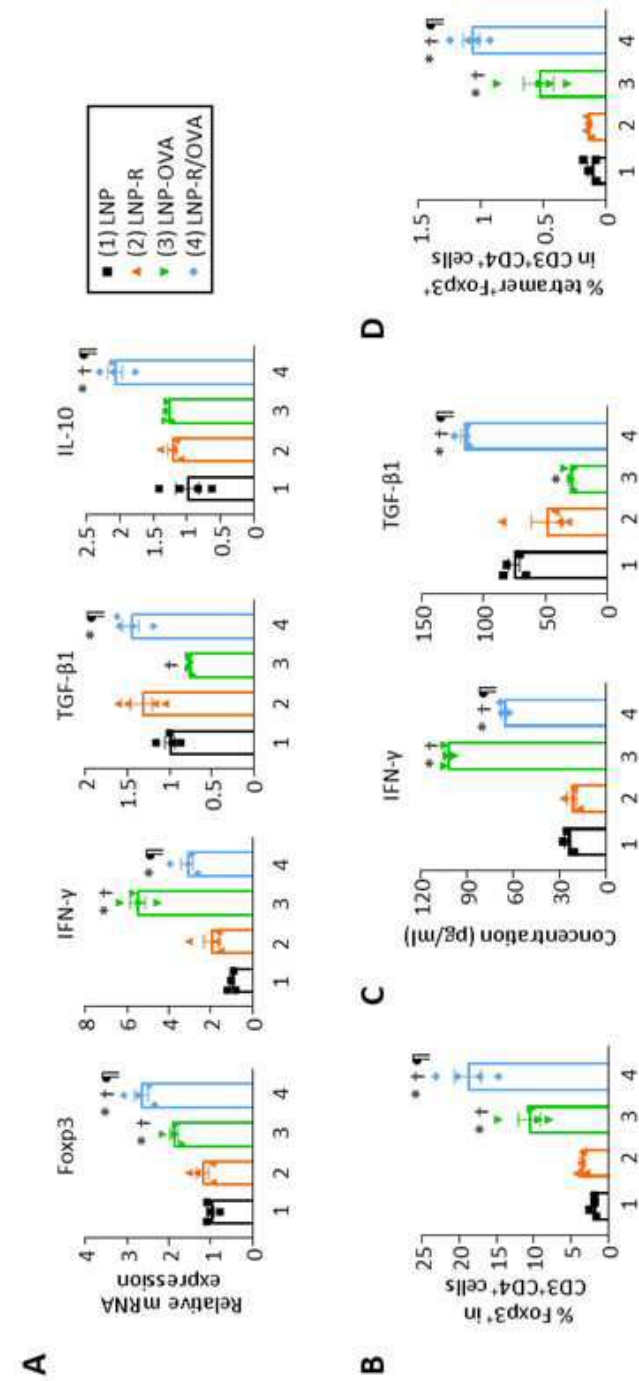
도면4c



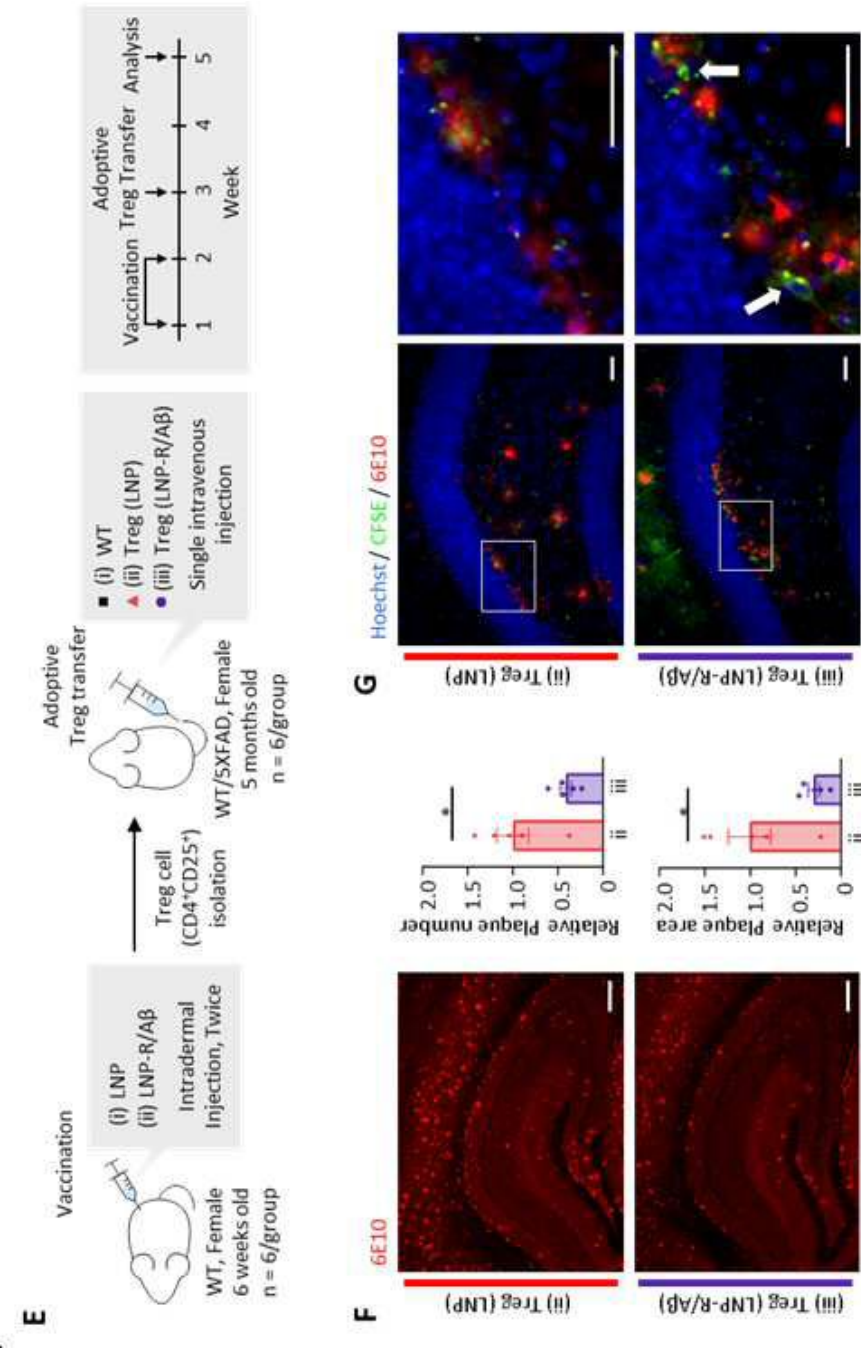
도면4d



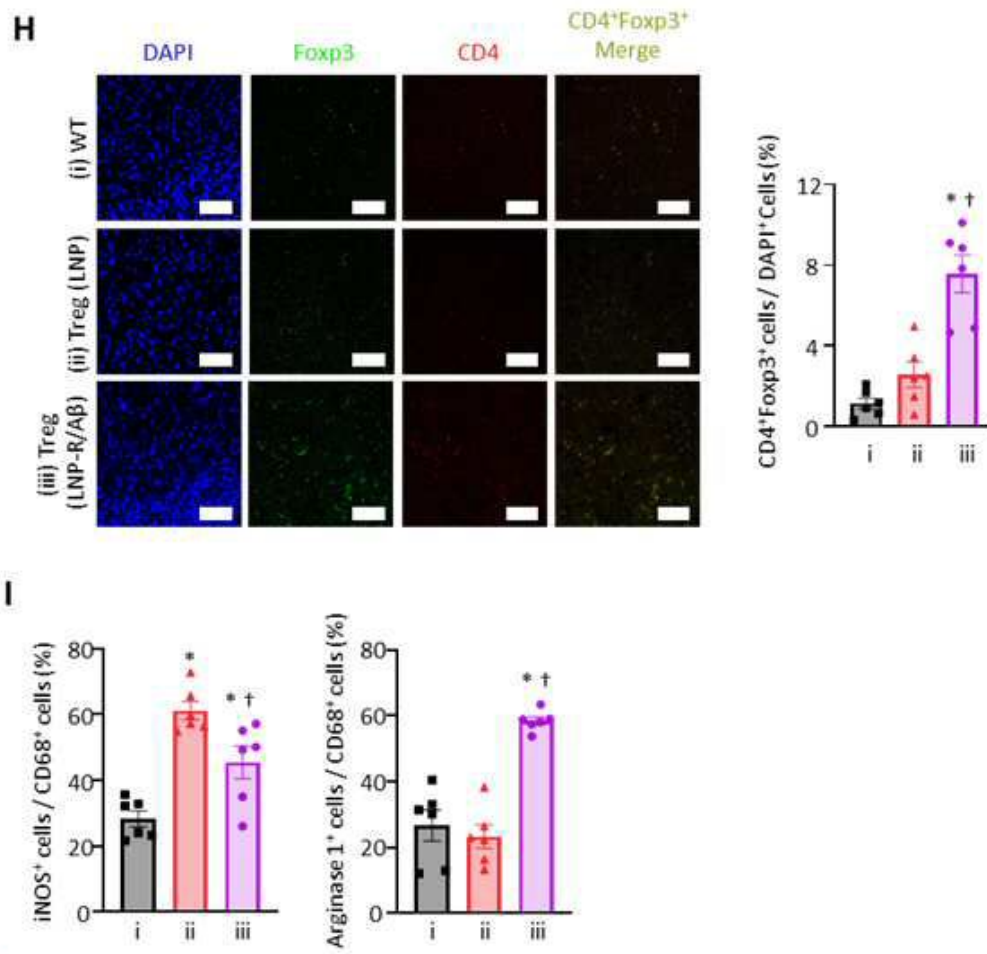
도면5a



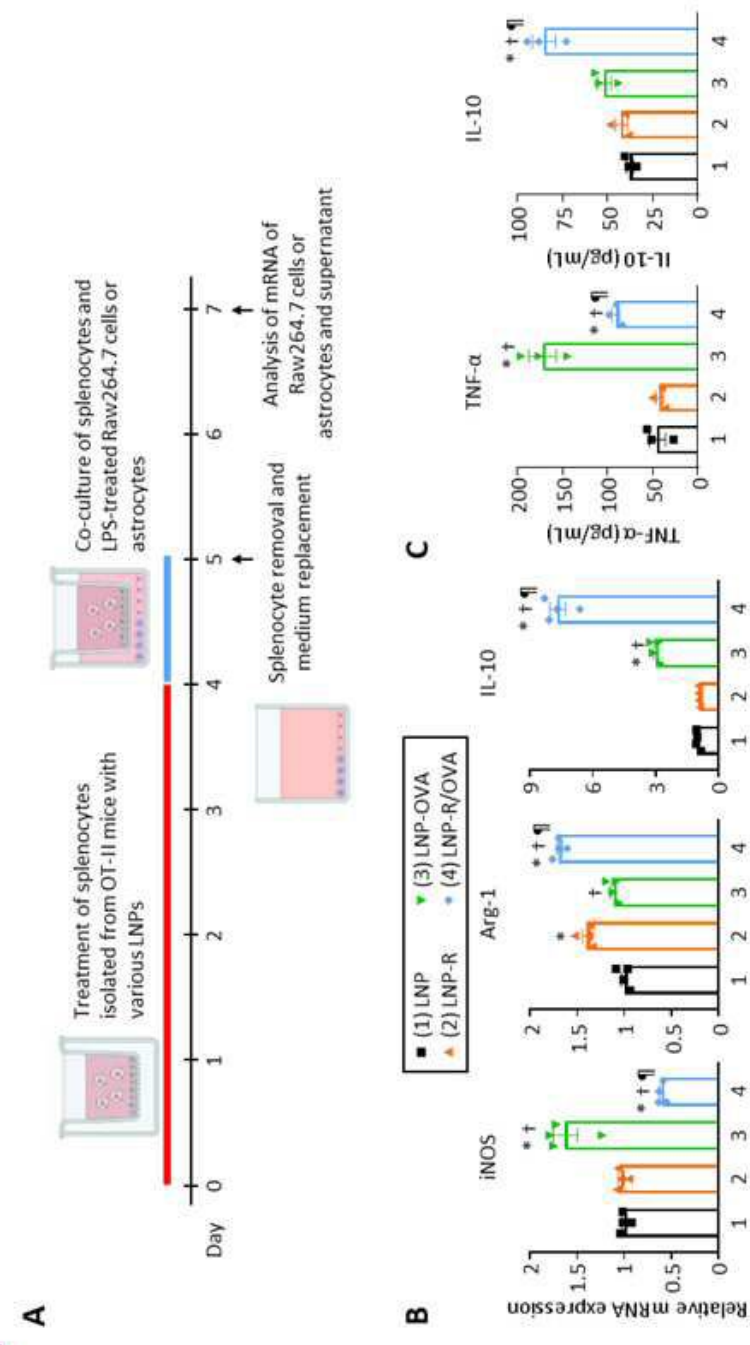
도면5b



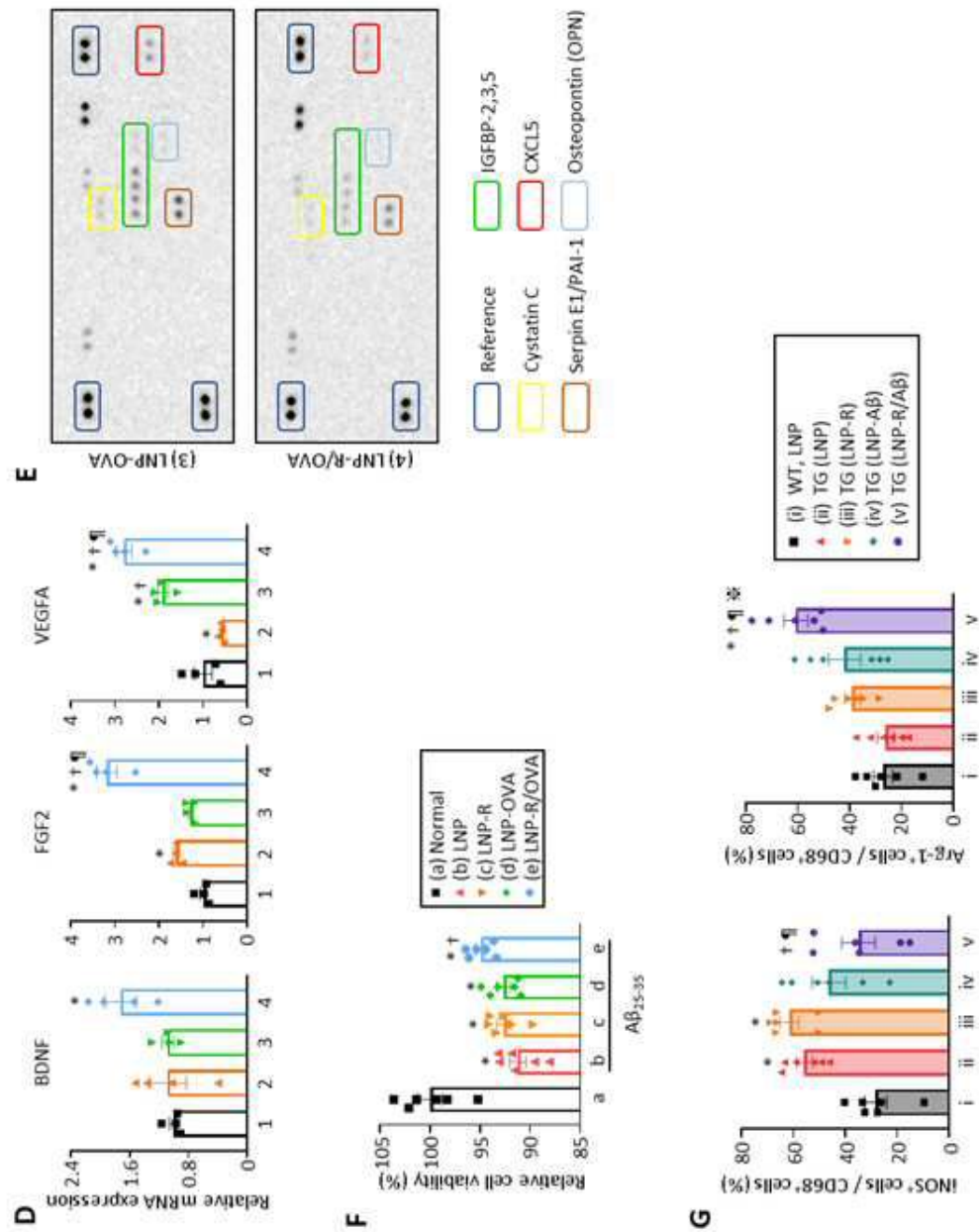
도면5c



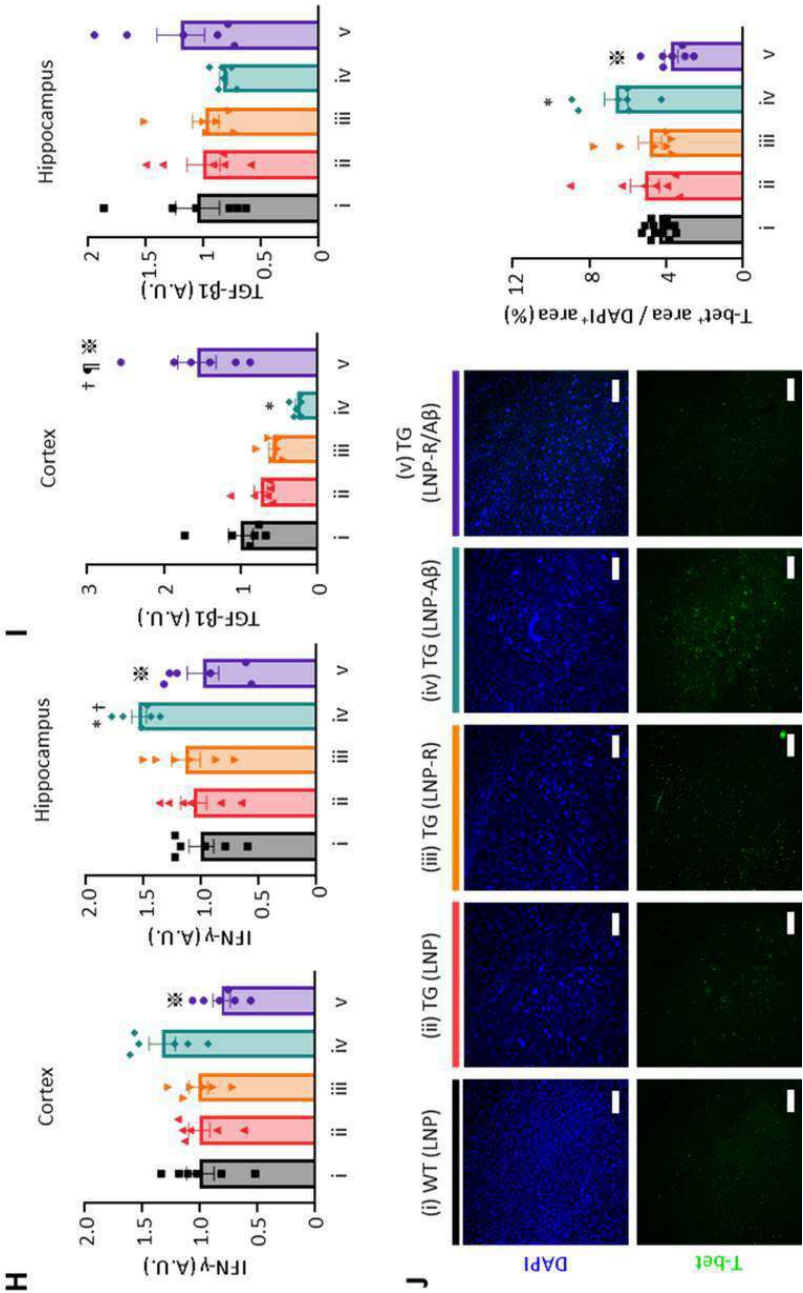
도면6a



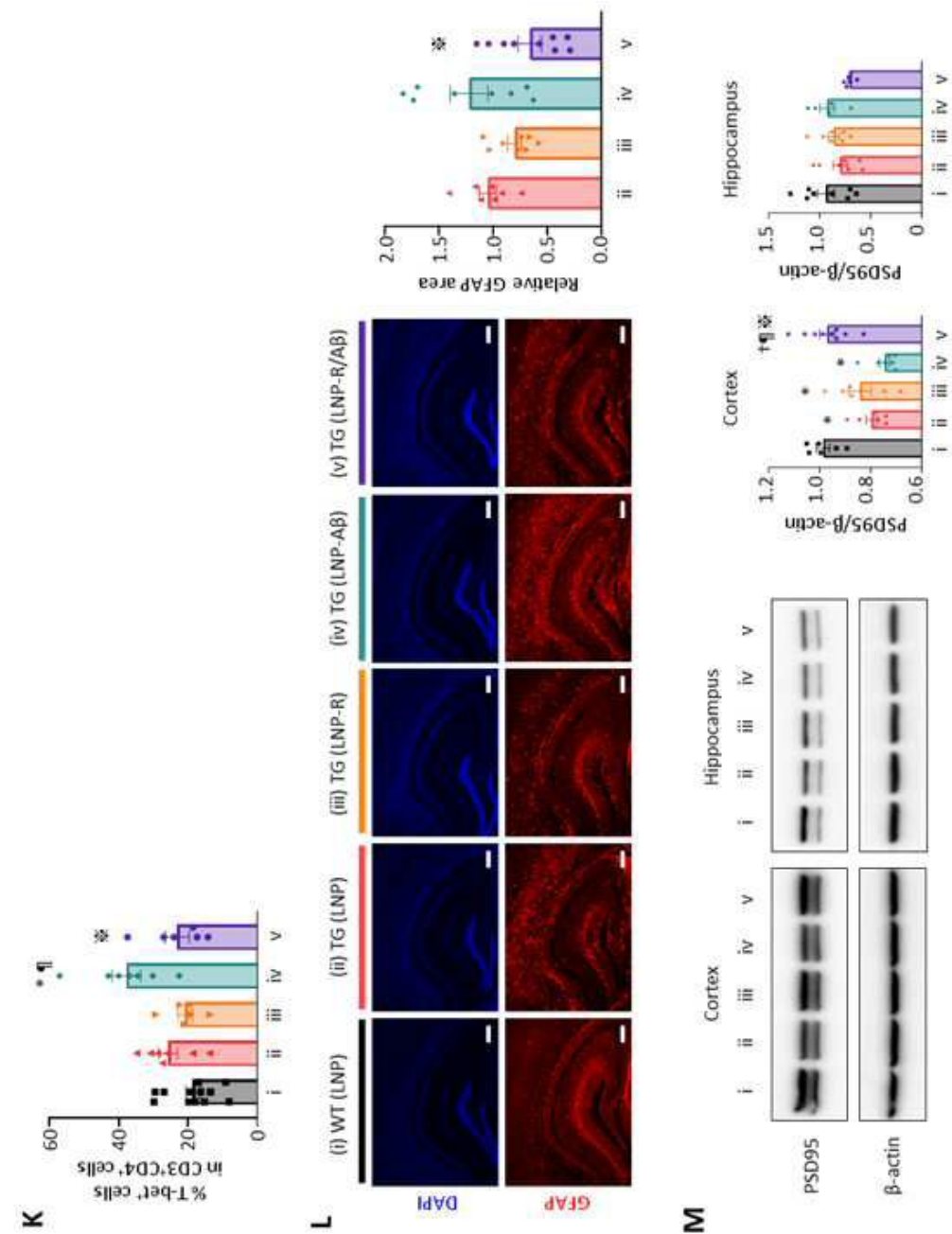
도면6b



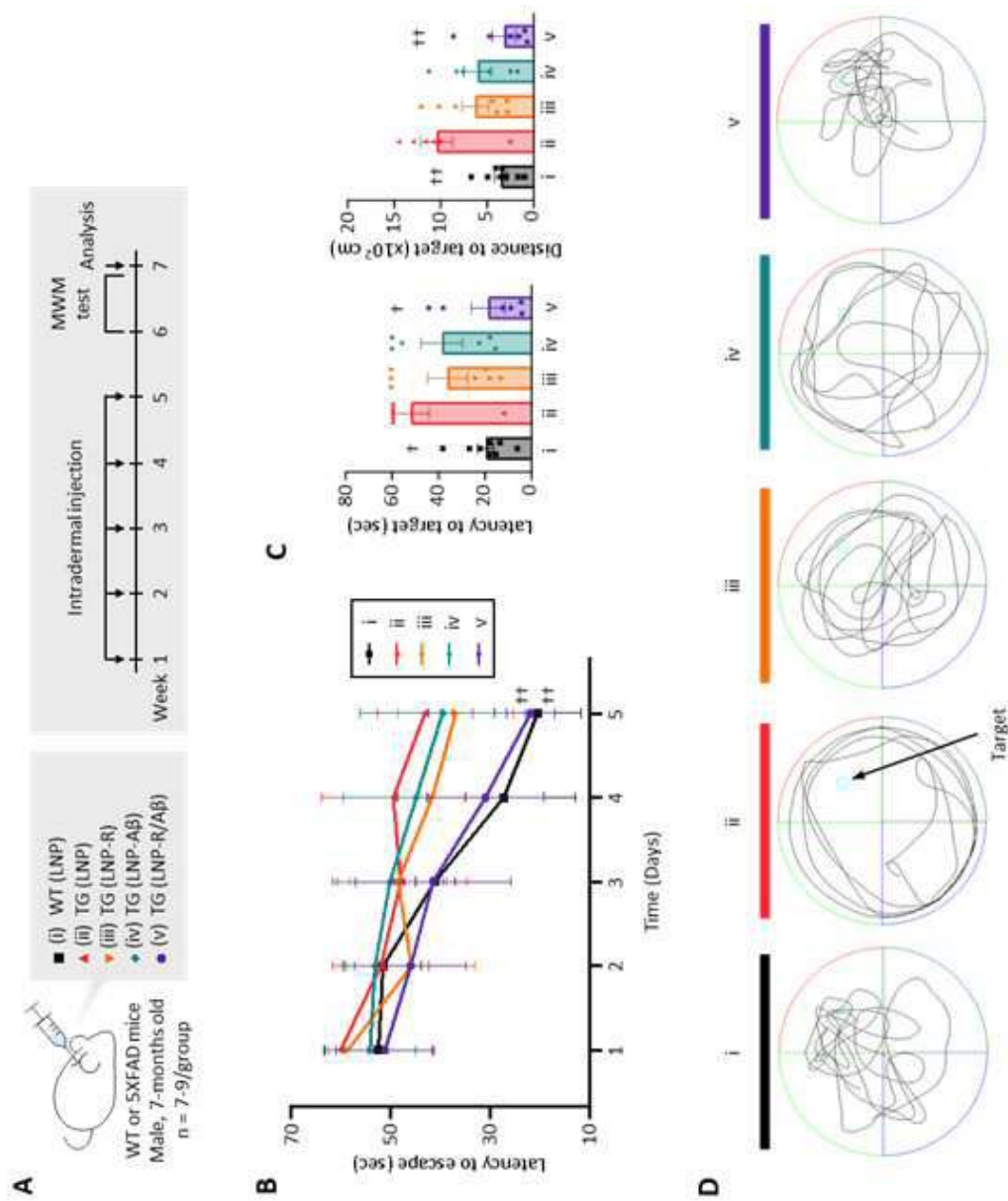
도면6c



도면6d



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.