

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

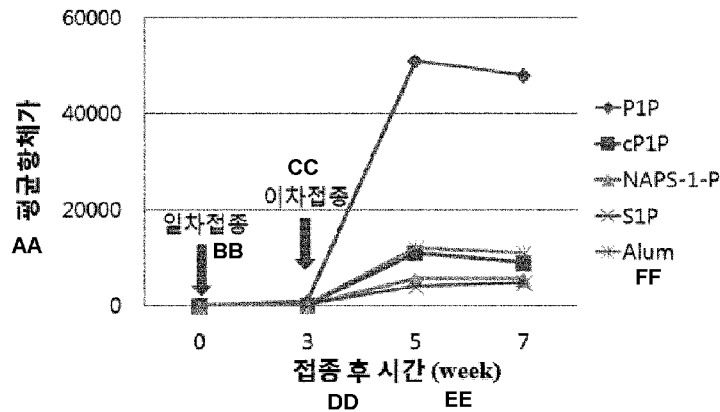
(43) 국제공개일
2017년 12월 14일 (14.12.2017) WIPO | PCT

WO 2017/213341 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 31/661 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/003804
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 7일 (07.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0070824 2016년 6월 8일 (08.06.2016) KR
- (71) 출원인: 주식회사 피토스 (PHYTOS CO., LTD) [KR/KR]; 14056 경기도 안양시 동안구 학의로 268, 609호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 최명준 (CHOI, Myeong Jun); 06286 서울시 강남구 영동대로 210, 2-107, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 박원미 (PARK, Weonmee); 06224 서울시 강남구 논현로 412, 603, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: USE AS IMMUNE ENHANCER OR PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF DEMENTIA, COMPRISING PHYTOSPHINGOSINE-1-PHOSPHATE OR DERIVATIVE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 피토스핑고신-1- 포스페이트 또는 그 유도체를 포함하는 면역증강제 또는 치매 치료용 약학 조성물로서의 용도



AA ... Average antibody titer
BB ... Primary vaccination
CC ... Secondary vaccination
DD ... Time after vaccination
EE ... Week
FF ... Alum

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a use as an immune enhancer of phytosphingosine-1-phosphate (P1P), O-cyclic P1P (cP1P), N-acetylphytosphingosine -1-phosphate (NAPS-1-P), and pharmaceutically acceptable salts thereof, and a pharmaceutical composition or vaccine for treating dementia, comprising such substance on the basis of a neuronal cell death inhibitory effect. The substance according to the present invention exhibits an effect of increasing the Th2 immune response and inhibiting the Th1 immune response and has an effect of protecting neurons as well, and thus can be useful as an immune enhancer to help the production of



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

antibodies for the development of a dementia vaccine, as well as an agent for preventing or treating dementia.

(57) 요약서: 본원은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 면역증강제로서의 용도 및 신경세포 사멸 억제 효과에 기반한 상기 물질을 포함하는 치매 치료용 약학조성물 또는 백신을 개시한다. 본원 따른 물질은 Th2 면역반응을 증가시키고, Th1 면역반응을 억제하는 효과를 나타낼 뿐 아니라 신경세포 보호효과도 있어 치매 예방 또는 치료제는 물론, 치매 백신 개발에 항체 생성을 돕는 면역증강제로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 피토스핑고신-1-포스페이트 또는 그 유도체를 포함하는 면역증강제 또는 치매 치료용 약학 조성물로서의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 피토스핑고신-1-포스페이트 또는 그 유도체의 면역보조제로 사용하는 기술에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 특정 질환의 예방 또는 치료를 위해 백신의 투여를 하는데, 이 경우, 항원으로 인한 면역반응이 충분하지 않거나 또는 종종 부적절한 반응이 동반되는 경우가 많다. 이런 경우, 면역보조제(또는 아드juv언트, 또는 면역증강제)가 함께 투여되어 항원의 면역원성에 영향을 주기 위해 투여된다.
- [3] 한편 알츠하이머병(alzheimer's disease, AD)은 치매의 가장 흔한 형태이며, 퇴행성 신경계 질환(neurodegenerative disorders)의 대표적인 질병이다. 특히, 노인성 치매의 대부분이 알츠하이머병이다. 알츠하이머병은 초기에는 최근 일에 대한 기억력 문제를 보이다가 병이 진행되면서 여러 인지 기능의 이상을 동반하게 되며 말기에는 모든 일상생활의 기능을 상실하게 된다.
- [4] 알츠하이머병의 발병원인은 완전히 이해되지 않은 상태이며, 아밀로이드 플라크가 정상 단백질을 변형시켜 플라크 덩어리를 형성해 고유기능을 잃어버리게 하는 것으로 추정된다. 병리학적으로는 뇌의 전반적인 위축, 뇌실의 확장, 신경섬유의 다발성 병변과 초로성(노인성) 반점 등의 특징을 보인다.
- [5] 알츠하이머병은 현재 미국의 10대 주요 사망원인 중 유일하게 예방이나 치료, 진행속도 완화 방법이 없는 질병으로 알려져 있다. 지금까지 많은 알츠하이머 치료제가 개발되었지만, 질병 자체를 근본적인 치료하는 것이 아니라 기억상실 등 증상 치료가 목적이지만 전문가들은 개발된 의약품이 특별히 효과가 높지 않다고 평가하고 있다. 현재 미국 내 알츠하이머 환자의 수는 5백만 명 이상으로 추정되며, 전 세계적으로는 4천만 명이 이 질병을 가지고 있다. 65세 노인의 10% 정도가 이 질병을 가지고 있으며, 85세 노인의 50% 이상이 이 질병을 가지고 있다. 사람의 수명이 증가하는 추세이기에 알츠하이머 환자의 수는 점점 증가할 것으로 보고 있고, 2040년에는 8천만 명이 이 질환을 가질 것으로 보고 있다 (Marciani (2015) Rev Neuropsychiatr, 78: 140-152).
- [6] 최근 국제알츠하이머병협회(Alzheimer's Disease International, ADI)에 따르면 AD 환자는 매우 빠르게 증가할 것으로 보고 있으며, 2030년에는 7,470만 명, 2050년에는 1억 3,100만 명으로 급증할 것으로 전망하고 있다. 또한 치매 환자의 증가로 인한 치매 간병 비용은 2015년 8,180억 달러로 추산되며, 2030년 2조 달러를 넘어설 것으로 예상하고 있다.
- [7] 따라서 치매 치료제 및 백신의 개발 및 개선이 절실히 요구되고 있다.

- [8] 최근에는 알츠하이머를 치료하기 위해 줄기세포를 이용하거나 AD 환자의 스펅고지질 대사이상을 수정하거나, A β 의 생성을 감소시키거나 과잉 생성된 A β 에 의해서 생성된 플라크와 타우 단백질(tau protein)의 과인산화를 방지하는 방법으로 치료제를 개발하고 있다. A β 는 신경세포의 사멸을 유도할 뿐 아니라 세포사멸에 관여한 스펅고지질인 세라마이드의 형성을 촉진시킨다. 형성된 세라마이드는 A β 의 생성을 촉진시키기도 한다. A β 의 형성과 플라크를 분해하는 전략이 필수적이다 (Marciani (2015) *Rev Neuropsychiatr*, 78: 140-152; He et al (2010) *Neurobiology of Aging*, 31: 398-408).
- [9] 알츠하이머 환자의 스펅고지질 변화를 살펴보면, AD 환자의 뇌에 스펅고미엘린(sphingomyelin, SM)이 감소하고 SM의 대사산물인 세라마이드는 증가한다. 또한 세라마이드의 분해산물인 스펅고신도 증가되어 있어 이 두 물질이 신경세포의 사멸을 초래한다. 신경세포의 생존을 높여주는 물질인 스펅고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate, S1P)의 함량은 감소되어 있다. A β 는 SM을 분해하는 효소를 활성화시켜 SM을 분해하여 세라마이드를 증가시키고, 세라마이드는 산화적 스트레스를 야기해 신경세포의 사멸과 A β 의 생성을 초래하게 된다. AD 환자의 뇌에 S1P의 함량이 감소되어 있어 신경세포의 사멸을 막지 못하지만, 인위적으로 S1P의 함량을 높여주면 신경세포의 사멸을 억제하고, A β 의 형성도 감소시킨다고 보고되어 있다. 이러한 원리로 S1P를 이용한 AD 치료제 개발이 이루어지고 있다 (He et al (2010) *Neurobiology of Aging*, 31: 398-408; Lee et al (2014) *J Exp Med*, 211: 1551-1570; Ceccom et al (2014) *Acta Neuropathologica Communications*, 2: 12; Couttas et al (2014) *Acta Neuropathologica Communications*, 2: 9; Czubowicz and Strosznajder (2014) 50: 26-37; Kolahdooz et al (2015) *Can J Neuro Sci*, 42: 195-202; Gomez-Brouchet et al (2007) *Molecular Pharmacology*, 72: 341-349; Gassowska et al (2014) *Neurochem Res*, 39: 645-652).
- [10] A β 의 형성과 A β 에 의한 플라크를 억제하는 방법으로 타우린 유도체를 이용해 플라크를 분해하는 시도가 있었으며, 플라크를 분해하는 물질을 탐색이 이루어지고 있다 (Roberto et al (2004) *FASEB J*, 18: 511-518; Kim et al (2015) *Nature Communications*, 6: 8997/DOI: 10.1038/ncomms9997). A β 의 형성과 플라크를 효율적으로 제거하는 방법이 A β 에 대한 항체를 만드는 방법이다. A β 에 선택적으로 작용하는 모노클로날 항체를 투여하거나 A β 를 항원으로 사용하여 항체를 몸속에서 만드는 백신 개발이 활발히 개발되고 있다 (Marciani (2015) *Rev Neuropsychiatr*, 78: 140-152; Carrera and Cacabelos (2013) *Drug Des*, 2:2).
- [11] 특히 알츠하이머 백신을 개발하기 위해 필요한 것이 항원의 선택과 면역원성을 높이는 아주번트의 개발이 필요하다. 현재 가장 많이 이용되고 있는 항원은 A β 와 타우 단백질이다. A β 를 항원으로 하고 적절한 아주번트를 사용하면 항체가 생성되고 생성된 항체는 플라크 형성을 억제할 뿐 아니라 생성된

플라크도 분해하는 결과를 나타내었다. 하지만 AD 백신의 경우 항체 생성을 높이는 Th2 면역반응은 높이고, 부작용을 초래할 수 있는 Th1 면역반응을 억제하는 아쥬번트의 개발이 필수적이다.

- [12] 최초로 임상에 들어간 AD 백신 (AN-1792, Elan/Wyeth)은 QS21 아쥬번트로 사용하고 A β 를 항원으로 사용하였다. 그 결과 항체생성은 높았으나, Th1 면역반응도 높게 나타났고, 그 결과 Th1 면역반응은 부작용으로 염증반응이 나타날 수 있다. 이 백신은 임상 1상을 통과하고 임상 2상에서 Th1 면역반응에 의한 무균성 뇌수막염 발생으로 임상 2상에서 중단되었다.

- [13] 따라서 Th1 반응을 나타나지 않은 짧은 펩타이드를 사용하거나 Th1을 억제하고 항체생성을 도와주는 Th2 면역반응을 유도하는 아쥬번트의 개발이 필요했다. Th1을 억제하고 Th2를 유도하는 아쥬번트로 최근에 S1P를 함유한 리포솜이 Atlas사에서 개발되었다. A β 전체를 항원으로 하며, S1P를 함유한 리포솜을 아쥬번트로 사용한 결과 항체생성은 높이지만, Th1 면역반응을 억제하여 효과적인 백신 (EB101)이 개발되어 동물실험을 완료하여 임상실험을 준비 중에 있다. EB101 백신에 들어간 S1P는 Th1 면역반응을 억제하고 Th2 면역반응을 유도하는 역할 외에 A β 와 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 사멸을 막아주는 유용한 물질로 부작용이 없는 효과적인 백신 개발이 가능하게 한 물질이다 (Marciani (2014) *Austin Alzheimers J Parkinsons Dis*, 1: 4; Marciani (2015) *Rev Neuropsychiatr*, 78: 140-152; Hughs et al (2008) *Circ Res*, 102: 950-958; Carrera et al (2012) *International Journal of Alzheimer's Disease*, volume2012, Article ID 376138, 17 pages; Carrera et al (2013) *BioMed Research International*, Volume2013, Article ID 709145, 12 pages; Carrera et al (2015) *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 807146, 16 pages).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본원은 피토스핑고신-1-포스페이트 또는 그 유도체의 면역증강제 또는 치매 치료용 약학 조성물로서의 용도를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [15] 한 양태에서 본원은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 면역증강제를 제공한다.
- [16] 본원에 따른 면역증강제는 백신 조성물에 사용되며, P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트)은 백신 도스(dose) 당 1 μ g 내지 10 mg의 농도로 포함된다.
- [17] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 면역증강제는 산화스트레스 또는 아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸과 면역세포의 Th1 면역반응 억제 및 Th2

면역반응을 촉진을 통해, 치매예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 이런 측면에서 치매예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[18] 본원에 따른 조성물은 아밀로이드 베타를 추가로 포함할 수 있으며, 백신 조성물로 제공된다.

[19] 본원에 따른 백신에 포함되는 활성화제로서 아밀로이드 베타의 존재 중에서 기존의 아쥬번트와 비교하여 IL-4 생성을 높이는 Th2 세포성 면역반응을 유도할 뿐 아니라 월등히 높은 체액성 면역반응을 나타내며, 특히 높은 IgG1 아이소타입 항체를 생성할 수 있다.

[20] 다른 양태에서 본원은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 인비보 또는 인비트로에서 산화스트레스 또는 아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸 억제용 키트를 제공한다.

[21] 또 다른 양태에서 본원은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 인비보 또는 인비트로에서 면역세포의 Th1 면역반응 억제 및 Th2 면역반응 촉진용 키트를 제공한다.

[22] 또 다른 양태에서 본원은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 신경세포에 처리하는 단계를 포함하는 인비보 또는 인비트로에서 산화스트레스 또는 아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸 억제 방법을 제공한다.

[23] 또 다른 양태에서 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 신경세포에 처리하는 단계를 포함하는 인비보 또는 인비트로에서 Th2 면역반응을 증가시키고, Th1 면역반응을 억제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[24] 본원에 따른 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 화합물을 포함하는, 면역증강제는, 특히 치매 백신용 면역보조제로서, Th1 면역반응을 억제하고 Th2 면역반응을 유도하는 조성물을 개발하여 AD 백신 조성물에 효과적으로 사용될 수 있다. 백신에 포함되는 활성화제로서 아밀로이드 베타의 존재 중에서 세포 면역 반응을 효과적으로 유도하여 실시예에 기재된 바와 같이 고품질의 IgG1 아이소타입 항체를 생성할 수 있다.

[25] 본원에 따른 면역보조제는 Th1 면역반응 억제하는 능력 및 항체생성 능력을

비교한 결과 S1P와 비교시 그 효과가 월등히 우수하여, AD 백신의 개발에 특히 유용하게 사용될 수 있다.

- [26] 또한 본원에 따른 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 화합물은 산화성 스트레스 또는 아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸을 효과적으로 억제하여 치매 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

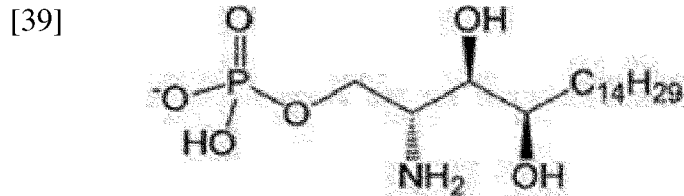
- [27] 도 1은 대식세포에서 lipopolysaccharide 처리 후 염증성 사이토카인인 TNF- α 생성에 미치는 P1P(phytosphingosine-1-phosphate), cP1P(O-cyclic P1P), 및 NAPS-1-P(N-acetyl phytosphingosine-1-phosphate)의 효능을 S1P(Sphingosine-1-phosphate)와 비교하여 나타낸 그래프이다.
- [28] 도 2는 산화적 스트레스에 의해 유도된 신경세포 사멸을 보호하는 P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P의 효능을 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 3은 아밀로이드 펩타이드(A β)에 의해 유도된 신경세포 사멸에 대한 P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P 및 항혈청의 보호 효능을 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 4는 S1P, P1P, cyclic P1P, 또는 NAPS-1-P를 함유한 리포솜 아쥬번트의 입자 분포를 나타낸 그래프이다.
- [31] 도 5는 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 백신과 Alum, S1P를 포함하는 백신의 항체생성능을 나타낸 그래프이다.
- [32] 도 6은 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 백신에 대해 생성된 항체의 아이소타입을 비교한 그래프이다.
- [33] 도 7은 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 P1P를 포함하는 백신과 Alum을 포함하는 백신의 IgG1/IgG2 비를 비교한 그래프이다.
- [34] 도 8은 본원에 따른 일 구현예에서 제조된 백신이 투여된 마우스의 비장세포에서 분비하는 Th1/Th2 사이토카인의 양을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

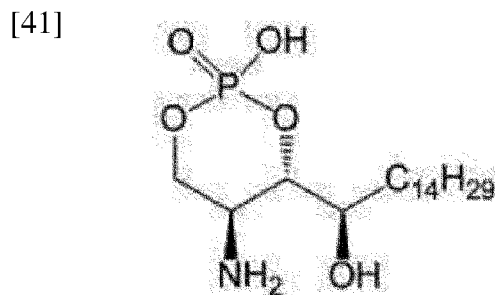
- [35] 본원은 피토스핑고신-1-포스페이트 또는 그 유도체가 Th1 면역반응 억제 효과, 면역원성 물질에 대한 우수한 항체 생성 촉진 효과 및 신경세포 사멸에 대한 보호 효과를 갖는다는 것을 발견에 근거한 것이다.
- [36] 이에 한 양태에서 본원은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 화합물을 포함하는, 면역증강제에 관한 것이다.
- [37] 본원에 따른 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트)(하기 화학식 I), cP1P(O-싸이클릭 P1P)(하기 화학식 II), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트)(하기 화학식 III)는

스핑고신-1-포스페이트(sphingosine- 1-phosphate, S1P)의 유도체로 본 발명자에 의해 다양한 용도로 개발되어 특허등록을 받은 물질로서, 대한민국 등록특허 제10-1003532호, 및 제10-1340556호 (신규 물질 및 그의 탈모치료용 용도), 및 제10-1514970호 (아토피 또는 피부상처 치료 및 예방용 조성물)에 개시되어 있으며, 하기 화학식 I, II 및 III으로 표시된다.

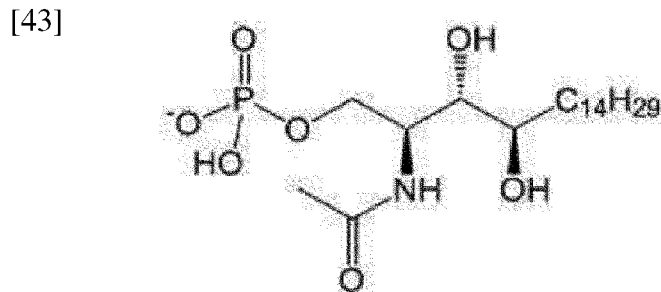
[38] [화학식 I]



[40] [화학식 II]



[42] [화학식 III]



[44] 본원에 따른 화합물은 유기화학 분야에 공지되어 있는 통상의 지식을 이용하여 제조할 수 있으며, 예를 들어 (S. Li, W.K. Wilson, G.J. Schroepfer, Chemical synthesis of D-ribo-phytosphingosine-1-phosphate, potential modulator of cellular processes. J. Lipid Res. 40: 117-125, 1999)에 개시되어 있는 방법 또는 상기 등록특허 제10-1514970호를 이용하여 제조할 수 있다.

[45] 상기 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 그 용매화물은 유기화학분야에서 통상의 지식을 가진 자가 당해 기술분야에 공지된 지식을 이용하여 적절히 제조하거나 선택할 수 있다. 염은 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여시 통상적인 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말하며, 상기 염으로는 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산은 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산,

푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탄산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한, 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다. 본원에 따른 일 구현예에서 약학적으로 허용 가능한 염은 상기 화학식 I, II 또는 III의 화합물이 유리산과 함께 염을 형성하는 산부가염으로 존재할 수 있다. 또한, 본원에 따른 상기 화학식 I, II 또는 III의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물을 모두 포함할 수 있다. 상기 화학식 I, II 또는 III의 화합물은 화합물 내의 암모늄 양이온과 짝을 이루는 음이온에 의해 안정화될 수 있으며, 상기 음이온은 약제학적으로 허용되면서 암모늄 양이온과 함께 짝을 이룰 수 있는 임의의 음이온일 수 있으며, 예를 들어 요오다이드(I⁻), 설퍼네이트(SO₃²⁻), 클로라이드(Cl⁻) 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [46] 본원에 따른 상기 하나 이상의 화합물은 백신 면역증강제로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [47] 본원에서 용어 면역증강제는 활성화제(active agent)에 대한 면역반응을 향상, 유발 및/또는 조절하기 위해 활성화제에 추가되거나 이와 함께 제형화되는, 면역능 향상을 위한 물질을 의미하며, 아쥬번트(adjuvant) 또는 면역보조제라고도 한다.
- [48] 본원에 따른 물질은 활성화제로서 특히, 알츠하이머병의 원인으로 지목되는 아밀로이드 베타와 함께 사용될 수 있다. 아밀로이드 베타란 알츠하이머병을 가진 환자의 뇌에 존재하는 아밀로이드 플라크의 주요 성분을 의미한다. 상기 아밀로이드 베타는 막통과 당단백질인 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 C-말단에서 유래된 아미노산으로 구성된 펩티드일 수 있다. 상기 A β 는 APP로부터 β - 및 γ -절단 효소(secretase)에 의해 분해되어 생성된다. 상기 A β 는 39-43개, 예를 들면 40-42개 아미노산으로 구성된 것일 수 있다. 상기 A β 는 예를 들면, 인간 유래 APP (amyloid beta A4 protein isoform precursor)인 NCBI accession No.NP_000475 서열로 공지되어 있으며, 이 중 672-713 잔기 (A β 42) 또는 672-711 잔기 (A β 40)로 구성된 것일 수 있다. 상기 아밀로이드 베타(A β)는 포유동물 유래의 것일 수 있다. 예를 들면, 인간 또는 마우스 유래의 것일 수 있다.
- [49] 따라서 다른 양태에서 본원은 또한 활성화제로서 아밀로이드 베타 및 상술한 바와 같은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 화합물을 포함하는 알츠하이머 또는 치매예방용 백신 조성물에 관한 것이다.
- [50] 본원에서 사용된 용어 "알츠하이머병"은 치매를 일으키는 퇴행성 뇌질환으로 서서히 발병하여 기억력을 포함한 인지기능이 점진적으로 악화되는 병을 말한다. 65세 미만에서 발병한 경우를 조발성(초로기) 알츠하이머병, 65세 이상에서 발병하는 만발성(노년기) 알츠하이머병, 가족성 알츠하이머병(Familial

Alzheimer's disease, FAD)를 포함한다. 대부분의 조발성 알츠하이머병은 특이한 유전자 돌연변이에 의해 발생하며 가족성 알츠하이머병은 몇몇 잘 알려진 알츠하이머병을 일으키는 유전자 변이에 의해 발생한다.

- [51] 본원에 따른 조성물은 아밀로이드 베타에 의한 신경세포의 사멸을 억제하기 때문에 아밀로이드 베타가 원인이 되는 다양한 종류의 알츠하이머병의 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 아밀로이드 베타는 아밀로이드 플라크를 형성하여 질환을 유발할 수 있다. 아밀로이드 플라크는 아밀로이드 베타를 포함하는 불용성 섬유성 단백질 응집체일 수 있다. 상기 아밀로이드 플라크는 세포 내, 세포 표면에, 및/또는 세포 사이의 공간에 존재하는 것일 수 있다. 예를 들면, 신경조직의 세포 사이의 공간에 존재하는 것일 수 있다. 본원에 따른 물질은 또한 아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸 억제효과를 나타낸다.
- [52] 본원에서 "신경조직"은 뇌와 같은, 중추신경계 조직을 포함한다. 뇌 조직은 대뇌, 소뇌 및 해마 조직을 포함할 수 있다. 대뇌 조직은 대뇌 피질을 포함한다. 신경조직은 신경조직 자체뿐만 아니라 신경세포를 포함하며, 신경세포란 신경조직을 이루는 성분 중 하나이다. 이러한 신경세포는 뉴론세포 및/또는 미세아교 세포를 포함한다. 신경조직의 배양은 인 비트로 또는 인 비보에서 뉴론세포 및/또는 미세아교 세포와 같은 신경 세포를 배양하는 것을 포함한다. 인비보 배양이란 개체에 세포를 투여하여 개체내에서 세포 배양이 이루어지는 것을 포함한다.
- [53] 따라서 다른 양태에서 본원은 또한 상술한 바와 같은 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 화합물을 포함하는 알츠하이머병 또는 치매 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [54] 본원에 따른 일 구현예에서 본원에 따른 약학 조성물은 백신의 형태로 제공될 수 있으며, 치매 예방이 가능한 활성화제 예를 들면 아밀로이드 베타를 추가로 포함할 수 있다. 백신의 사용을 통해 A β 에 대한 항체가 생성되고, 이는 A β 에 결합해 플라크의 생성을 방해할 뿐 아니라, 플라크를 분해하는 기능을 또한 가지고 있어, 백신을 사용하는 경우 예방 및 치료 효과를 동시에 나타낼 수 있다.
- [55] 본원에 사용된 용어 "치료"란 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [56] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 신경 심리검사를 통하여 경도인지장애(mild cognitive impairment)를 가진 치매 전 단계 환자의 진단이 가능한데, 1년 동안 경도인지장애를 가진 환자의 평균 12%가

알츠하이머병으로 발전하며, 경도인지장애를 그대로 방치할 경우, 약 6년 경과시 80%가 알츠하이머병으로 진전하기 때문에, 아밀로이드베타를 포함하는 아밀로이드 베타 플라크에 의한 독성을 완화 또는 감소시킬 수 있는 본원의 조성물을 투여하면 알츠하이머병의 진행을 막거나 진행을 늦추는 효과를 볼 수 있을 것이다.

- [57] 이에 본원의 조성물은 약학 조성물로 제조될 수 있다. 약학 조성물은 동시에 또는 연속적으로 투여가능하며, 단독으로, 또는 수술, 상기 질환 치료를 위한 다른 약학적 활성성분 및 생물학적 반응조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [58] 본원에 따른 치료제 또는 약학 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 예로서 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.
- [59] 본원의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.
- [60] 본원의 약학 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 산제, 정제, 환제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 액, 에멀전, 현탁액, 시럽제, 엘릭서, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화되어 전신 또는 국소적으로 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 특히 비경구 투여가 바람직할 수도 있다.
- [61] 비경구 투여를 위한 제형에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사

가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로폴, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [62] 본원의 조성물은 목적하는 방법에 따라 특히 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [63] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적 또는 치료적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 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.
- [64] 본원의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있으나, 유효 투여량은 통상적으로 성인(60kg)의 경우, 약 1ng 내지 10mg/일, 특히 약 1 μ g 내지 1mg/일이다. 투여량은 여러 가지 조건에 따라 변동 가능하기 때문에, 상기 투여량에 가감이 있을 수 있다는 사실은 당업자에게 자명하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 예를 들면 본원에 따른 약학 조성물이 백신으로 제공되는 경우, 한달에 1회 총 4 내지 5회를 투여할 수 있다. 또한 백신으로 제공되는 경우 백신 도스(dose) 당 1 μ g 내지 10mg로 포함될 수 있다. 상기와 같은 농도로 포함될 경우, 백신에 포함되는 활성화제 예를 들면 아밀로이드 베타의 존재 중에서 세포 면역 반응을 효과적으로 유도하여 실시예에 기재된 바와 같이 고품질의 IgG1 아이소타입 항체를 생성할 수 있다.
- [65] 본원에 따른 물질은 상술한 바와 같이 그리고 이하 기술되는 실시예의 실험에서와 같이 Th1 면역반응 억제 및 Th2 면역반응 촉진 시켜 백신에 포함하는 활성화제 또는 면역원성 조성물의 부작용을 줄일 수 있음은 물론 아밀로이드베타 독성에 의한 신경세포 사멸 억제 효과는 신경세포 또는 조직의 손상을 억제할 수 있다.
- [66] Th1 면역반응은 타입 1 CD4+ T helper (Th1) 림프구에 의해 매개되는 획득성 면역반응(adaptive immunity)으로 Th1 세포는 interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-2, tumor necrosis factor (TNF)-beta를 생산하고, 세포매개 면역 및 과고사이트

- 의존성 염증 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Romagnani S1. Ann Allergy Asthma Immunol. 2000 Jul;85(1):9-18).
- [67] Th2 면역반응은 타입 2 CD4+ T helper (Th2) 림프구에 의해 매개되는 획득성 면역반응(adaptive immunity)으로 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, 및 IL-13을 생산하고, 항체 생성 반응을 유발하고, 과고사이트 세포의 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Romagnani S1. Ann Allergy Asthma Immunol. 2000 Jul;85(1):9-18).
- [68] 따라서 이런 측면에서 본원은 또한 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 인비트로에서 면역세포의 Th1 면역반응 억제 및 Th2 면역반응 촉진용 또는 신경세포 사멸 억제용 키트에 관한 것이다.
- [69] 본원에 따른 키트에 포함되는 유효성분은 앞서 언급한 바를 참조할 수 있으며 인비트로에서 상기 목적하는 효과를 위한 추가의 성분 및 사용법 등을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 따른 키트는 면역세포의 Th1 면역반응 억제 및 Th2 면역반응 촉진 또는 신경세포의 사멸이 필요한 다양한 방식으로 사용될 수 있다.
- [70] 본원에 따른 Th1 면역반응 억제 및 Th2 면역반응 촉진에 사용될 수 있는 세포는 이로 제한하는 것은 아니나, 수지상세포, T 세포, 또는 대식세포와 같은 면역세포가 사용될 수 있다.
- [71] 또한 다른 측면에서 본원은 또한 P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 신경세포에 처리하는 단계를 포함하는 인비트로에서 인비트로에서 면역세포의 Th1 면역반응 억제 및 Th2 면역반응 촉진 방법 또는 신경세포 사멸 억제 방법에 관한 것이다.
- [72] 본원에 따른 방법에서 신경세포 또는 신경조직은 앞서 언급한 바와 같으며, 상기 방법에 포함된 단계는 성분은 상기 언급한 사항 및 이하 실시예의 기재를 참고할 수 있다.
- [73] 신경세포의 배양과 관련된 배지는 상기 배지는 이 기술분야의 통상의 기술자들에게 널리 알려진 배지라면 제한없이 사용될 수 있다. 상기 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium), MEF을 예로 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [74] 상기 P1P 또는 이들 유도체 화합물은 본원의 목적에 부합하는 한, 목적하는 구체적 세포의 종류에 따라 적절한 농도로 포함할 수 있다.
- [75] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의

실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[76] 실시예

[77] 실험방법

[78] **PIP 및 그 유도체의 제조**

[79] P1P(피토스핑고신-1-포스페이트), cP1P(O-싸이클릭 P1P), NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트)는 대한민국 등록특허 제1514970호에 기재된 바와 같이 제조되었다.

[80] 리포솜 제형 제조를 위한 **stock solution**(모액)의 제조

[81] Egg phosphatidylcholine (PC) 모액 (PC01): 500mg을 10mL 클로로포름에 녹여서 50mg/mL의 농도 용액을 제조하였다. 또한 콜레스테롤(Cholesterol) 모액 (CH01): 100mg의 콜레스테롤을 10mL 클로로포름에 녹여서 10mg/mL의 농도 용액을 제조하였다. S1P 모액 (S1P01, Sigma)은 1mg의 S1P를 메탄올을 녹여서 1mg/mL의 농도의 용액을 제조하였다. P1P 모액 (P1P01): 10mg의 P1P를 클로로포름/메탄올 (2:1) 용액 10mL에 녹여서 1mg/mL의 농도 용액으로 제조하였다. Cyclic P1P 모액 (CP1P01): 10mg에 녹여서 1mg/mL의 농도 용액으로 제조하였다. NAPS-1-P 모액 (NP01): 10mg의 NAPS-1-P에 녹여서 1mg/mL의 농도 용액으로 제조하였다.

[82] 항원을 포함하지 않는 리포솜 (**empty** 리포솜) 아쥬번트 조성물의 제조

[83] - **S1P**를 함유한 리포솜 아쥬번트의 제조

[84] S1P01 용액 300 μ L, PC01과 CH01 각각 1mL을 유리용기에 취하였다. 이어 클로로포름을 질소가스를 이용해 날리면서 유리 기벽에 얇은 필름이 형성되도록 하였다. 필름이 형성된 후 잔존하는 유기용매를 완전히 제거하기 위해 질소가스를 충분히 불어주거나 진공건조기(vacuum decicator)에 overnight 보관하여 유기용매를 완전히 제거하였다. 5mL의 PBS 용액을 유리용기에 첨가하고 30분간 강하게 교반하였다. 리피드 필름이 떨어지면서 현탁된 용액이 생성되었다. 필름이 완전히 떨어져 현탁된 후에, 2분 초음파하고 1분 쉬는 방식으로 5회 초음파 처리를 반복하여, 현탁된 용액이 투명한 용액을 수득하였다. 이어 초음파 시 생기는 금속 티타늄을 제거하기 위해, 상기 용액을 14000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액만 취하여 실험에 사용하였다.

[85] - **P1P**를 함유하는 리포솜 아쥬번트의 제조

[86] P1P01 용액 300 μ L, PC01과 CH01 각각 1mL을 유리용기에 취하였다. 이어 클로로포름을 질소가스를 이용해 날리면서 유리 기벽에 얇은 필름이 형성되도록 하였다. 필름이 형성된 후 잔존하는 유기용매를 완전히 제거하기 위해 질소가스를 충분히 불어주거나 진공건조기(vacuum decicator)에 overnight 보관하여 유기용매를 완전히 제거하였다. 5mL의 PBS 용액을 유리용기에 첨가하고 30분간 강하게 교반하였다. 리피드 필름이 떨어지면서 현탁된 용액이 생성되었다. 필름이 완전히 떨어져 현탁된 후에 2분 초음파하고 1분 쉬는

방식으로 5회 초음파 처리를 반복하여, 현탁된 용액이 투명한 용액을
수득하였다. 이어 초음파 시 생기는 금속 티타늄을 제거하기 위해, 상기 용액을
14000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액만 취하여 실험에 사용하였다.

[87] - **Cyclic P1P**를 함유하는 리포좀 아쥬번트의 제조

[88] CP1P01 용액 300 μ L, PC01과 CH01 각각 1mL을 유리용기에 취하였다. 이어
클로로포름을 질소가스를 이용해 날리면서 유리 기벽에 얇은 필름이
형성되도록 하였다. 필름이 형성된 후 잔존하는 유기용매를 완전히 제거하기
위해 질소가스를 충분히 불어주거나 진공건조기(vacuum decicator)에 overnight
보관하여 유기용매를 완전히 제거하였다. 5mL의 PBS 용액을 유리용기에
첨가하고 30분간 강하게 교반하였다. 리피드 필름이 떨어지면서 현탁된 용액이
생성되었다. 필름이 완전히 떨어져 현탁된 후에 2분 초음파하고 1분 쉬는
방식으로 5회 초음파 처리를 반복하여, 현탁된 용액이 투명한 용액을
수득하였다. 이어 초음파 시 생기는 금속 티타늄을 제거하기 위해, 상기 용액을
14000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액만 취하여 실험에 사용하였다.

[89] - **NAPS-1-P**를 함유하는 리포좀 아쥬번트의 제조

[90] NP01 용액 300 μ L, PC01과 CH01 각각 1mL을 유리용기에 취하였다. 이어
클로로포름을 질소가스를 이용해 날리면서 유리 기벽에 얇은 필름이
형성되도록 하였다. 필름이 형성된 후 잔존하는 유기용매를 완전히 제거하기
위해 질소가스를 충분히 불어주거나 진공건조기(vacuum decicator)에 overnight
보관하여 유기용매를 완전히 제거하였다. 5mL의 PBS 용액을 유리용기에
첨가하고 30분간 강하게 교반하였다. 리피드 필름이 떨어지면서 현탁된 용액이
생성되었다. 필름이 완전히 떨어져 현탁된 후에 2분 초음파하고 1분 쉬는
방식으로 5회 초음파 처리를 반복하여, 현탁된 용액이 투명한 용액을
수득하였다. 이어 초음파 시 생기는 금속 티타늄을 제거하기 위해, 상기 용액을
14000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액만 취하여 실험에 사용하였다.

[91] **A β** 항원을 포함하는 리포좀 (empty 리포좀) 아쥬번트 조성물의 제조

[92] - **S1P**와 **A β** 항원을 함유하는 리포좀 아쥬번트의 제조

[93] 항원이 없는 empty S1P 함유 리포좀 0.9mL과 5mg/mL의 농도의 A β 용액(A β 42
펩타이드 단편:

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-P
he-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val
-Val-Ile-Ala, Sigma, USA) 0.1mL을 냉동용 바이알(cryo vial)에 담고 잘 섞은 다음
액체질소에서 30분 이상 냉동하였다. 이어 상온에서 해동시키고, 교반한 후에
액체질소에서 다시 냉동하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상기 항원을 포함하는
리포좀 아쥬번트를 생성하였다. 동물 실험을 위해 이 리포좀 100 μ L를 마우스에
근육주사로 투여하였다.

[94] - **P1P**와 **A β** 항원을 함유하는 리포좀 아쥬번트의 제조

[95] 항원이 없는 empty P1P 함유 리포좀 0.9mL과 5mg/mL의 농도의 A β 용액

0.1mL을 냉동용 바이알(cryo vial)에 담고 잘 섞은 다음 액체질소에서 30분 이상 냉동하였다. 이어 상온에서 해동시키고, 교반한 후에 액체질소에서 다시 냉동하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상기 항원을 포함하는 리포솜 아쥬번트를 생성하였다. 동물 실험을 위해 이 리포솜 100 μ L를 마우스에 근육주사로 투여하였다.

[96] - **Cyclic P1P**와 **A β** 항원을 함유하는 리포솜 아쥬번트의 제조

[97] 항원이 없는 empty Cyclic P1P 함유 리포솜 0.9mL과 5mg/mL의 농도의 A β 용액 0.1mL을 냉동용 바이알(cryo vial)에 담고 잘 섞은 다음 액체질소에서 30분 이상 냉동하였다. 이어 상온에서 해동시키고, 교반한 후에 액체질소에서 다시 냉동하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상기 항원을 포함하는 리포솜 아쥬번트를 생성하였다. 동물 실험을 위해 이 리포솜 100 μ L를 마우스에 근육주사로 투여하였다.

[98] - **NAPS-1-P**와 **A β** 항원을 함유하는 리포솜 아쥬번트의 제조

[99] 항원이 없는 empty NAPS-1-P 함유 리포솜 0.9mL과 5mg/mL의 농도의 A β 용액 0.1mL을 냉동용 바이알(cryo vial)에 담고 잘 섞은 다음 액체질소에서 30분 이상 냉동하였다. 이어 상온에서 해동시키고, 교반한 후에 액체질소에서 다시 냉동하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상기 항원을 포함하는 리포솜 아쥬번트를 생성하였다. 동물 실험을 위해 이 리포솜 100 μ L를 마우스에 근육주사로 투여하였다.

[100] 제조된 리포솜 아쥬번트의 입자 크기 측정

[101] 위에서 제조된 리포솜 아쥬번트의 입자 크기는 ELS-Z (Otsuka Electronics, Tokyo, Japan) 장비를 제조자의 방법대로 사용하여 laser light scattering 방법으로 측정하였다. 리포솜 아쥬번트의 입자 크기는 Number distribution으로 나타내었다.

[102] 마우스 백신 접종

[103] 상기와 같이 제조한 백신을 마우스에 접종하였다. 6주령의 Balb/c 마우스를 실험에 사용하였고, 군당 4마리로 하였다. 상기와 같이 PBS, Alum, S1P (EB101), P1P, Cyclic P1P, NAPS-1-P를 포함하여 제조된 백신을 마우스에 근육주사 하였다. 마우스당 100 μ L씩 주사하였으며, 100 μ L 리포솜 용액 속에는 약 50 μ g의 A β 항원과 약 1.08mg의 지질(레시틴과 콜레스테롤)이 포함되어 있다. 백신 후보물질을 3주 간격으로 2번 접종하였다. PBS는 A β 항원이 없는 음성대조군으로 사용하였고, 대조군으로 S1P와 Alum을 사용하였다. Alum은 백신에 사용하는 아쥬번트로 Th2 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있어 Th2 반응을 보는 양성대조군으로 사용하였고, S1P는 항체생성 능력을 비교하는 대조군으로 사용하였다.

[104] 마우스에서 항체형성 능력 측정

[105] 실시예 5에서와 같이 마우스에 백신 최초 접종 후 3주, 2차 접종 후 2주와 4주 후에 혈액을 채취하여 2차 접종 후 2주까지는 안와채혈로 100-150 μ L 정도로

채취하고, 마지막 4주째에는 심장채혈로 300-400 μ l 정도로 채취하며, 상온에서 1400rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청성분을 분리하였다. 상기 혈청에서 항체 형성능을 다음과 같이 측정하였다.

[106] - 총 IgG 함량 측정

[107] 96 well plate에 A β 항원 (1 μ g/mL)을 코팅하고 상온에서 하룻밤 반응시켰다. 이어 각 well에 있는 용액을 제거하고 알부민으로 블락킹 한 후 일차항체 (상기 면역 혈청)을 다음 조성 용액 (0.014M sodium phosphate, pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.6% albumin, 0.05% thimerosal)으로 2배 희석하여 각 well에 첨가하였다. 상온에서 1시간정도 반응시킨 후 0.05% 트윈20이 함유된 PBS로 5번 세척하였다. 이어 Horseradish peroxidase가 결합된 이차항체 (goat mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase, Boehringer Mannheim)를 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어 트윈을 함유한 PBS로 5번 씻어준 다음, 발색을 위해 100 μ L 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (from Pierce Chemicals)을 첨가하고, 상온에서 15분간 반응시켰다. 발색반응을 황산을 첨가하여 종료하였다. 이어 흡광도를 ELISA plate reader (BioRad 680 ELISA Reader)로 판독하고, 항체의 역가는 흡광도가 0.2 이상인 희석배수의 역수로 계산하였다.

[108] - IgG isotyping 측정

[109] 이차항체로 다음의 것을 사용한 것을 제외하고는 상기 총 IgG 측정과 같은 방법으로 측정하였다. 즉 IgG1, IgG2a, IgG2b을 위해서는 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b (Boehringer Mannheim)를 사용하였다.

[110] 대식세포에서의 염증성 사이토카인 분석

[111] 마우스 대식세포주인 Raw264.7 세포 (한국세포주은행, RPMI 1640/10% 우태아혈청으로 배양) 를 4.5X10⁵/mL로 씨딩하여 하루밤 배양한 후에 LPS (1ng/mL)와 S1P 및 P1P 물질을 배양배지로 희석하여 농도별(20nM, 100nM, 500nM, 1000nM)로 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 상등액을 수거하여 4°C에 보관하였다. 이어 상등액으로 분비된 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 농도를 ELISA kit (BD OptEIA™ TNF Mouse set)을 제조자의 방법대로 사용하여 측정하였다. 배양배지를 처리군을 제외한 모든 실험군은 1/4로 희석하여 농도를 측정하였다.

[112] 접종한 마우스의 비장세포(splenocyte)에서의 Th1/Th2 사이토카인 분석

[113] 상기와 같이 접종한 마우스로부터 비장을 적출하여, 비장세포를 수득하였다. 적혈구 세포는 100mM Tris buffer를 이용해 용해시켰다. 얻어진 비장세포를 PBS로 2번 씻어준 후에 1600rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 비장세포를 수를 과액하고, 10% 우태아혈청을 함유한 RPMI 1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 얻어진 비장세포에 일정한 양의 A β 항원으로 72시간 동안 비장세포를 재자극하였다.

[114] 이어 마우스 비장세포에서 분비되는 Th1 사이토카인 (TNF- α)와 Th2 사이토카인(IL-4)를 ELISPOT (BD Pharmingen) 키트를 제조자의 방법대로

사용하여 수행하였다. 색을 띠고 있는 spot의 수를 측정하여 싸이토카인을 분비하는 세포의 수를 비교하였다.

[115] 마우스 신경세포주 (PC12 cell)에서의 효능 검증

[116] 과산화수소와 A β 에 의한 신경세포의 사멸에 대한 P1P와 항체의 효과를 검정하기 위해 PC12 세포주 (KCLB 21721, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)를 사용하였으며, PC12 세포를 10% 우태아혈청과 1% penicillin/streptomycin이 함유된 RPMI1640 배지에서 배양하였으며, 배양조건은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[117] 세포를 24시간 배양한 후에 2mM 농도가 되도록 DMSO에 녹인 P1P, Cyclic P1P와 NAPS-1-P를 배지에 희석하여 10nM, 100nM, 1000nM이 되도록 첨가하였다. 1시간 배양 후에 350 μ M H₂O₂를 줄기세포에 첨가하여 배양하였다. 이어 세포 생활도(cell viability) 측정을 위해 6시간 후에 Ez-Cytox(두젠)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 산화적 스트레스에 대한 P1P와 유도체들의 효능을 측정하였다. A β 에 의한 세포사멸은 350 μ M 과산화수소 대신에 10 μ M의 A β 를 처리하고 24시간 후에 Ez-Cytox를 이용하여 A β 에 의한 세포사멸에 대한 P1P와 항체의 효능을 측정하였다.

[118] 실시예 1. LPS로 자극한 대식세포주에서 Th1 싸이토카인의 변화

[119] 효과적인 AD 백신의 개발을 위해서는 Th1 면역반응을 억제하는 아췌번트의 개발이 필수적이다. 이를 확인하기 위해, LPS로 대식세포를 자극하는 실험을 수행하였다. LPS로 대식세포를 자극하면 Th1 싸이토카인인 TNF- α 의 분비가 현저히 증가한다. 결과는 도 1에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 1ng/mL의 농도의 LPS로 자극한 경우, Th1 타입의 염증성 싸이토카인인 TNF- α 의 분비가 매우 증가한 것으로 나타났고, S1P의 경우 농도의존적으로 TNF- α 의 분비가 약하게 감소하는 경향을 보이지만, P1P를 처리한 군에서 농도의존적으로 TNF- α 의 분비가 현저히 감소하는 경향을 나타냈다. 특히 P1P와 cyclic P1P에서 TNF- α 의 분비가 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (표 1-1 내지 1-4). TNF- α 의 생성 억제율을 1000nM에서 비교한 결과, S1P의 경우 19% 정도 억제하지만, P1P의 경우 52% 정도를 억제하므로 S1P 보다 3배 정도 높은 Th1 억제 효과를 나타냈다. TNF- α 의 양이 감소하는 것은 Th1에 의해 유도되는 면역반응이 억제된다는 의미이다. 즉, TNF- α 의 양이 감소하는 것은 Th1 면역반응 억제 효과가 높다는 것을 의미한다. 따라서 S1P와 비교하여 본원의 P1P와 cyclic P1P가 Th1 면역반응을 현저히 우수하게 억제하였다. 이러한 결과는 P1P와 cyclic P1P 물질이 S1P와 비교하여 Th1을 억제하는 물질로서 AD 백신에 보다 유용하게 사용할 수 있다는 것을 나타낸다.

[120] [표 1-1] LPS에 의해 자극된 대식세포에서 S1P와 P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P의 Th1 면역반응 억제 효과 (10nM)

[121]

구분	무처리군	LPS 처리군				
		대조군	S1P	P1P	CP1P	NAPS-1-P
TNF- α 양 (pg/mL)	550	14400	15000	13350	10600	15000
TNF- α 생성억제율	-	0%	-4.2%	7.3%	26.3%	-4.2%

[122] [표 1-2] LPS에 의해 자극된 대식세포에서 S1P와 P1P, cyclic P1P(cP1P), NAPS-1-P의 Th1 면역반응 억제 효과 (100nM)

[123]

구분	무처리군	LPS 처리군				
		대조군	S1P	P1P	cP1P	NAPS-1-P
TNF- α 양 (pg/mL)	550	14400	13880	12500	7800	15200
TNF- α 생성억제율	-	0%	-4.2%	7.3%	26.3%	-4.2%

[124] [표 1-3] LPS에 의해 자극된 대식세포에서 S1P와 P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P의 Th1 면역반응 억제 효과 (500nM)

[125]

구분	무처리군	LPS 처리군				
		대조군	S1P	P1P	CP1P	NAPS-1-P
TNF- α 양 (pg/mL)	550	14400	12700	10000	7500	12200
TNF- α 생성억제율	-	0%	11.8%	30.6%	47.9%	15.3%

[126] [표 1-4] LPS에 의해 자극된 대식세포에서 S1P와 P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P의 Th1 면역반응 억제 효과 (1000nM)

[127]

구분	무처리군	LPS 처리군				
		대조군	S1P	P1P	CP1P	NAPS-1-P
TNF- α 양 (pg/mL)	550	14400	11660	6940	7550	10000
TNF- α 생성억제율	-	0%	19.0%	51.8%	47.5%	30.6%

[128] 실시예 2. P1P와 항체의 신경세포의 보호 효과 검증

- [129] 알츠하이머는 산화적 스트레스에 의한 세포사멸로 병이 야기되므로 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 사멸에 대한 P1P 물질의 효능을 측정하였다. 결과는 도 2 및 3에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P 모두 350 μ M 과산화수소에 의한 신경세포의 사멸을 보호하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 신경세포에 350 μ M의 과산화수소를 처리하면 신경세포의 약 90%가 사멸되지만, 100nM의 P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P 물질을 처리한 경우, 신경세포가 사멸되지 않은 것으로 나타났다 (도 2). 따라서 P1P와 그 유도체는 산화적 스트레스에 의한 신경세포 보호에 우수한 효과가 있어, 세포사멸 보호를 통한 알츠하이머 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [130] 알츠하이머병에서 가장 중요한 것은 A β 의 축적으로 산화적 스트레스가 발생하고, 세라마이드가 증가해 신경세포의 사멸이 이루어진다. 이에 A β 로 인한 세포 사멸에 대한 보호효과를 측정하였다. 결과는 도 3에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 신경세포에 10 μ M의 A β 를 처리하면 50% 이상에 세포 사멸이 이루어지지만, P1P와 그 유도체를 처리한 경우, 신경세포가 사멸되지 않은 것으로 나타났다 (도 3). 따라서 P1P와 그 유도체는 A β 의 축적으로 산화적 스트레스에 의한 신경세포 보호에 우수한 효과가 있어, 세포사멸 보호를 통한 알츠하이머 예방 또는 치료제, 특히 예방제로서 유용하게 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [131] 또한 도 3에 나타난 바와 같이 A β 항원을 포함하는 P1P 리포솜 아쥬번트로 면역된 마우스의 혈청(serum, 항체를 함유하고 있는 혈청)을 처리한 경우에도 신경세포의 사멸을 예방할 수 있는 것으로 나타났다.
- [132] 상기 결과는 본원에 따른 P1P와 그 유도체는 신경세포를 보호하는 효능을 가져 예방 또는 치료제는 물론, AD 백신 개발에 항체 생성을 돕는 아쥬번트로 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [133] 실시예 3. 리포솜 제형 아쥬번트의 입자 크기 측정
- [134] 실험방법에 기재된 바와 같이 제조된 S1P, P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P를 함유한 리포솜을 제조한 후 입자 크기를 측정하였다. S1P와 P1P 및 그 유도체들이 리포솜 제조자체에는 아무런 영향을 미치지 못하며, S1P나 P1P의 존재여부에 관계없이 리포솜 입자가 잘 만들어지며, 입자 크기는 초음파 처리한 후의 리포솜 아쥬번트를 사용하였으며, S1P나 P1P 종류에 관계없이 100-120nm 전후의 입자 크기를 나타냈다 (도 4).
- [135] 도 4에 나타난 바와 같이 S1P 함유 리포솜이 105nm 정도이며, P1P 함유 리포솜은 119nm, cyclic P1P은 122nm, NAPS-1-P은 129nm로 나타났으며, 입자의 크기 변화에 영향을 나타내지 않음을 알 수 있다. 본원에 따른 아쥬번트는 리포솜 제형으로 특히 우수한 효과를 나타냈다.
- [136] 실시예 4. 항체 생성능 측정
- [137] S1P와 P1P 및 그 유도체를 함유한 백신 후보 물질을 제조하여 마우스에 1차

접종한 후 3주에 2차 접종한 후 각 2주와 4주 후에 마우스 혈액을 얻어 항체 생성 여부를 확인하였다. 결과는 도 5에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 2차 접종한 후 항체의 역가가 매우 증가하는 것을 확인할 수 있었고, S1P 함유 백신보다 P1P가 함유된 백신에서 항체의 생성능력이 훨씬 높은 것으로 나타났다 (도 5, 표 2). 이러한 결과는 Th1 면역반응을 억제하는 면역 실험 결과와 잘 일치한다. S1P로 만들어진 백신 후보의 경우 항체의 생성이 매우 낮게 나타나며 양성대조군으로 사용한 Alum보다 낮은 항체 생성 능력을 보였다. 이에 반해, P1P로 만들어진 백신 후보물질은 항체 생성 능력이 S1P보다 높을 뿐 아니라 양성대조군으로 사용한 Alum보다 훨씬 높은 항체 생성 능력을 보였다. 이러한 결과는 P1P 또는 그 유도체가 신경세포의 보호 능력과 후술하는 Th1을 억제하여 백신의 부작용을 줄여주고, 항체의 생성을 높여주는 물질로 판명되었다.

[138] 상기 결과는 본원에 따른 P1P와 그 유도체는 신경세포를 보호하는 효능을 가져 예방 또는 치료제는 물론, AD 백신 개발에 항체 생성을 돕는 아주번트로 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

[139] [표 2] 접종 후 시간에 따른 AD 후보 백신의 평균 항체가의 변화

[140]

시간	AD 후보 백신의 평균 항체가					
	PBS	Alum	S1P	P1P	Cyclic P1P	NAPS-1-P
접종 전	0	0	0	0	0	0
1차 접종 후 3주	0	140±70	140±80	860±90	140±50	84±50
2차 접종 후 2주	0	12000±3000	4000±1500	51000±1600	11000±2500	5600±2000
2차 접종 후 4주	0	11000±3000	4800±2000	48000±2500	9000±2000	5600±2000

[141] 실시예 5. AD 후보 백신들의 Isotype 항체가 변화

[142] 실시예 4에서 생성된 항체가 Th1 면역반응에 의해서 생성되었는지 아니면 Th2 면역반응에 의해서 생성되었는지 확인하기 위해 IgG1, IgG2a, 및 IgG2b isotype 항체가를 비교하였다. 결과는 도 6 및 7에 기재되어 있다. Th1 면역반응에 의해 IgG2a와 IgG2b가 많이 생성되지만, Th2 면역반응에 의해서는 IgG1이 많이 생성된다. 따라서 IgG1과 IgG2의 양을 비교하면 Th1/Th2 면역반응을 구분할 수 있다. 2차 접종 후 4주차의 혈액을 이용해 IgG1, IgG2a, IgG2b 항체가를 비교한 결과 Alum과 S1P 모두 IgG1이 많이 생성되었다 (표 3, 도 6). P1P 또는 그 유도체로 이루어진 백신의 경우도 IgG1이 많이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. P1P의 경우 IgG1의 생성이 가장 높게 나타났으며, Alum과 S1P에 비해 5-20배 정도 높은 IgG1 항체가를 보였다. 일반적으로 Th1 면역반응을 유도하는 경우

IgG1/IgG2의 비율이 1보다 낮은 상태이지만, Th2 면역반응을 유도하는 경우 IgG1/IgG2의 비율이 1보다 훨씬 높은 값을 나타낸다. 실제로 Alum의 경우 IgG1/IgG2의 비율이 24.6정도이며, P1P의 경우 이보다 높은 28.1로 나타났다 (도 7). Alum은 Th2 면역반응에 의해 항체를 생성하는 것이 알려져 있기 때문에, 이와 비교하여 Th2 면역반응에 의한 항체 생성에 보다 우수한 효과를 갖는 P1P이 백신 조성물의 아쥬번트로서 효과적으로 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[143] [표 3] AD 후보 백신들의 Isotype 항체가 비교

[144]

	AD 후보 백신의 평균 항체가					
	PBS	Alum	S1P	P1P	cyclic P1P	NAPS-1-P
IgG1	0	5900±2000	1200±430	27000±5000	6100±2100	1700±600
IgG2a	0	130±80	0	290±120	0	0
IgG2b	0	110±60	0	670±200	0	0

[145] 실시예 6. Th1 싸이토카인 (TNF- α)과 Th2 싸이토카인 (IL-4) 생성 측정

[146] AD 백신에서 항체는 치료효과를 나타내고, Th1 면역반응은 부작용을 초래할 수 있기에, 항체 생성을 돕는 Th2 면역반응을 유도하는 것이 필요하다. 이를 확인하기 위해 면역한 마우스로부터 얻어진 비장세포로 Th1/Th2 면역반응을 비교하였다. Th2 면역반응을 유도하는 Alum의 경우 IL-4는 통계적으로 유의하게 증가하는 반면에 TNF- α 는 통계적으로 유의하지 않는 증가를 보였다 (표 4, 도 8). 이에 반해 EB101 백신에 사용한 S1P의 경우도 IL-4는 통계적으로 유의하게 증가하지만, TNF- α 는 통계적으로 유의하게 증가하지 않았고, IL-4의 증가량은 Alum보다 못한 결과를 보이고 있다. 본 발명의 P1P 백신의 경우 Alum가 마찬가지로 IL-4는 통계적으로 유의하게 증가하지만, TNF- α 는 통계적인 유의한 증가를 보이지 않는 것으로 나타났다. P1P의 경우 IL-4에서는 Alum보다 높게 나타나고, TNF- α 는 적은 양상을 보이고 있다. 즉, P1P가 Alum과 비교하여 Th2 면역반응을 증가시키고, Th1은 억제하는 결과를 보이고 있다.

[147] 또한 S1P와 비교하여 인비트로 세포실험에서 TNF- α 생성억제효과를 살펴본 결과, P1P는 S1P보다 3배 정도 높은 효과를 보이며, 인비보 실험에서는 P1P가 S1P보다 total IgG와 IgG1의 생성에서는 20배 정도 높은 효과를 보이고 있다. Th2 싸이토카인 생성에서도 P1P가 S1P보다 Th2 싸이토카인의 생성을 높이고, 반대로 Th1에 기인한 TNF- α 는 감소시키는 경향을 보이고 있으므로, P1P는 S1P보다 항체생성은 높이고, 부작용으로 작용할 수 있는 Th1 면역반응은 감소시키는 효과를 가지고 있다.

[148] 위에 기재한 바와 같이 항체 생성 양상과 싸이토카인 생성을 비교한 결과, P1P와 그 유도체를 함유한 백신은 Th2 면역반응을 증가시키고, Th1 면역반응을

억제하는 효과를 나타낼 뿐 아니라 신경세포 보호효과도 있어 AD 예방 또는 치료제는 물론, AD 백신 개발에 항체 생성을 돕는 아쥬번트로 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

[149] [표 4] AD 후보 백신들의 싸이토카인 생성 양상 비교

[150]

Cytokine (pg/mL)	AD 후보 백신 그룹					
	PBS	Alum	S1P	P1P	cyclic P1P	NAPS-1-P
IL-4	3.27± 1.51	18.26± 4.25	11.84± 2.25	24.21± 5.25	12.06± 1.25	11.04± 0.78
TNF- α	16.85± 9.58	37.5± 13.21	36.25± 20.15	25.5± 11.21	42.9± 15.52	40.4± 15.52

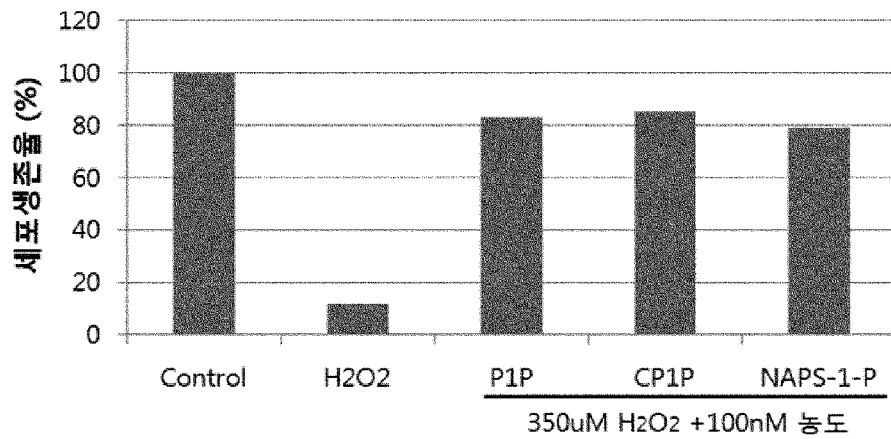
[151] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[152] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

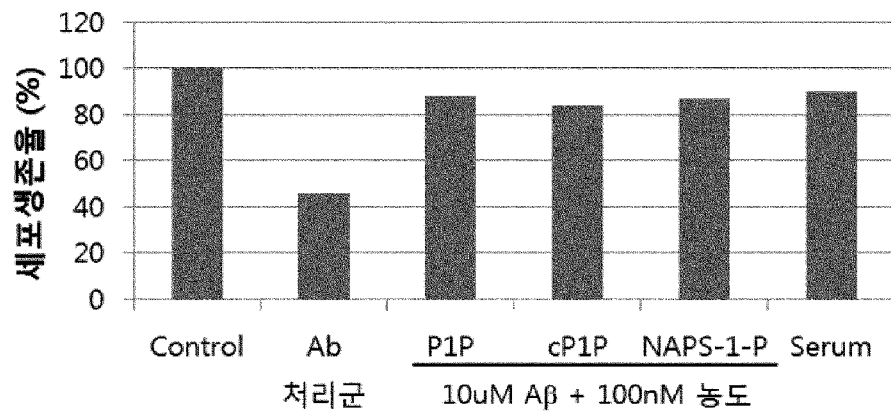
청구범위

- [청구항 1] PIP(피토스핑고신-1-포스페이트), cPIP(O-싸이클릭 PIP), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 면역증강제.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 PIP(피토스핑고신-1-포스페이트), cPIP(O-싸이클릭 PIP), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트)은 백신 도스(dose) 당 1 μ g 내지 10mg의 농도로 포함되는 것인, 면역증강제.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 면역증강제 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 치매예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 조성물은 아밀로이드 베타 펩타이드를 추가로 포함하며, 상기 면역증강제는 리포솜 형태로 포함되는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 백신인, 조성물.
- [청구항 6] 치매의 예방 또는 치료가 필요한 대상자에게
PIP(피토스핑고신-1-포스페이트), cPIP(O-싸이클릭 PIP), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는 치매 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 7] PIP(피토스핑고신-1-포스페이트), cPIP(O-싸이클릭 PIP), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 신경세포에 처리하는 단계를 포함하는 Th2 면역반응을 증가시키고, Th1 면역반응을 억제하는 방법.
- [청구항 8] PIP(피토스핑고신-1-포스페이트), cPIP(O-싸이클릭 PIP), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트), 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 신경세포에 처리하는 단계를 포함하는 산화스트레스 또는 아밀로이드 베타 펩타이드에 의한 신경세포 사멸 억제 방법.
- [청구항 9] PIP(피토스핑고신-1-포스페이트), cPIP(O-싸이클릭 PIP), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트)의 산화스트레스 또는 아밀로이드 베타 펩타이드에 의한 신경세포 사멸 억제 용도.
- [청구항 10] PIP(피토스핑고신-1-포스페이트), cPIP(O-싸이클릭 PIP), 또는 NAPS-1-P(N-아세틸피토스핑고신-1-포스페이트)의 면역세포의 Th1 면역반응 억제 및 Th2 면역반응 촉진 용도.

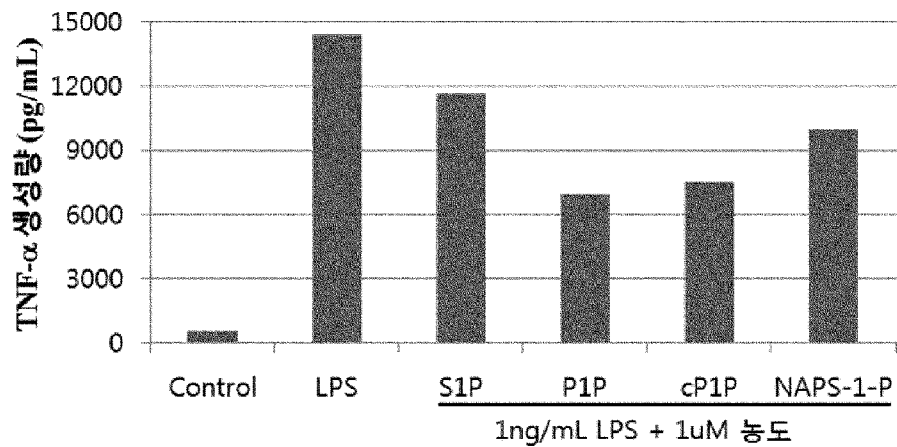
[도1]



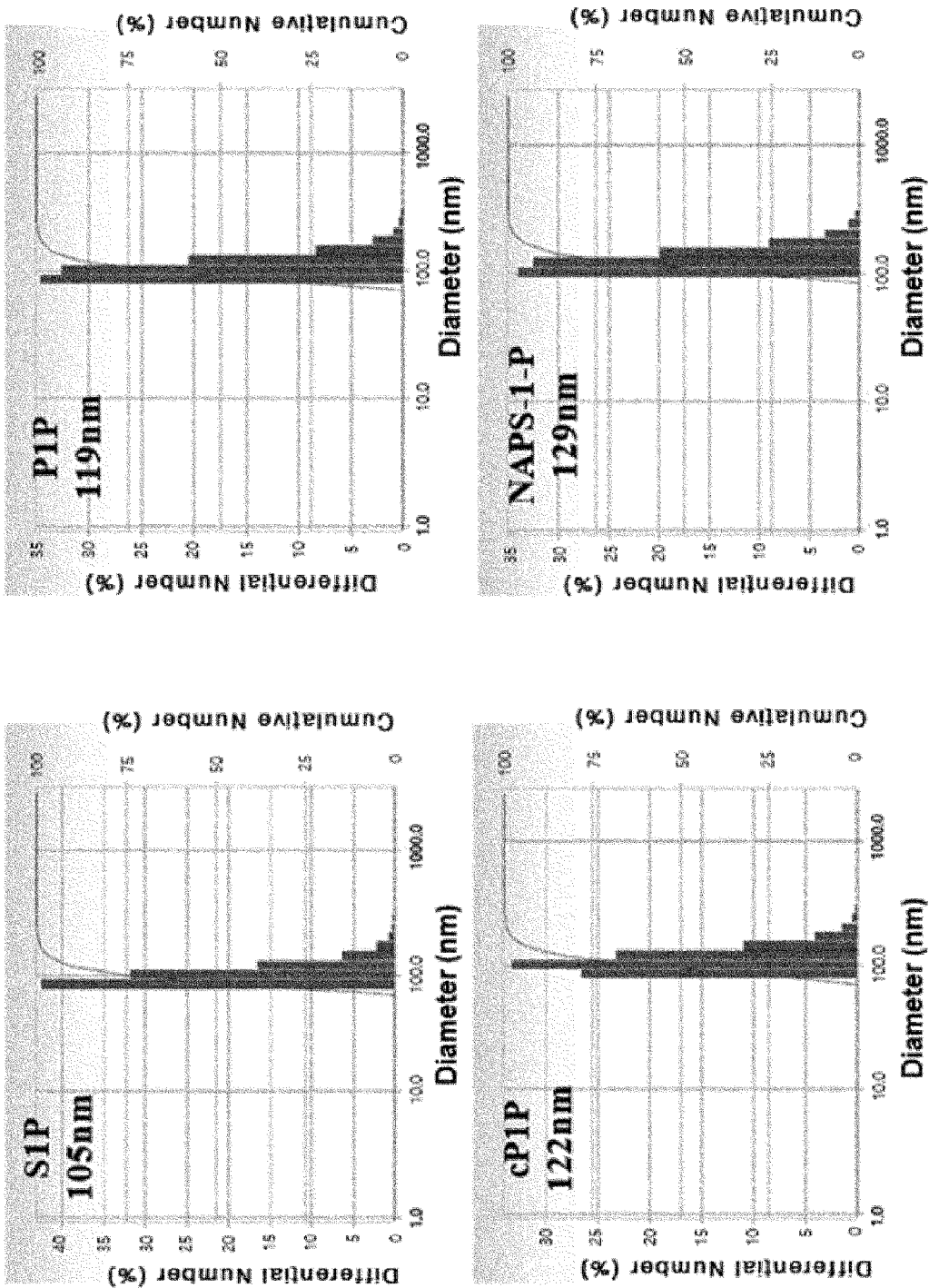
[도2]



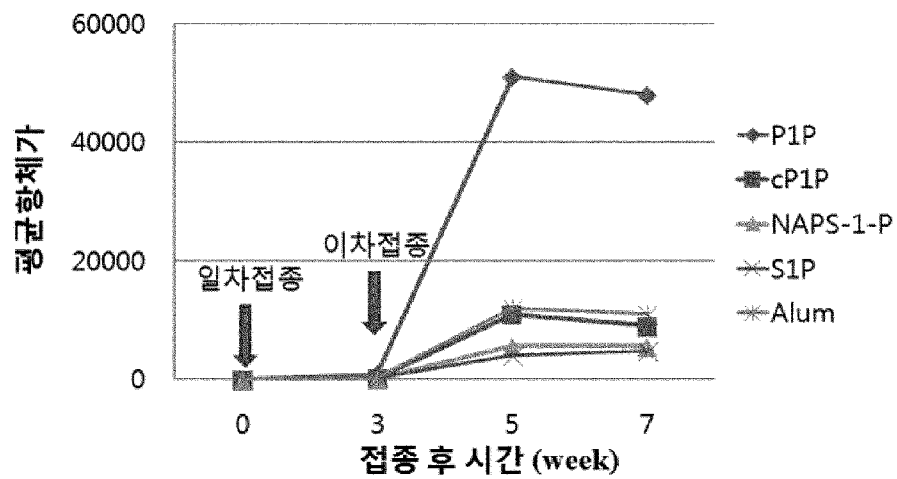
[도3]



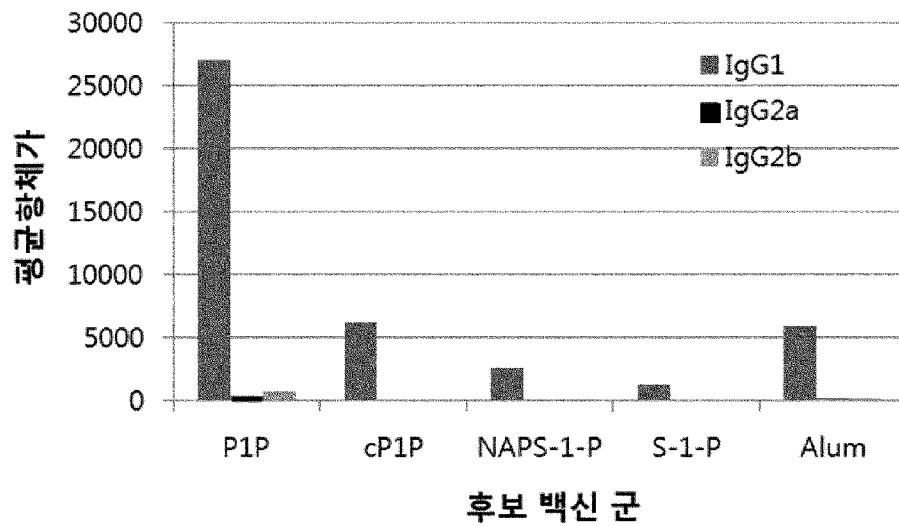
[도4]



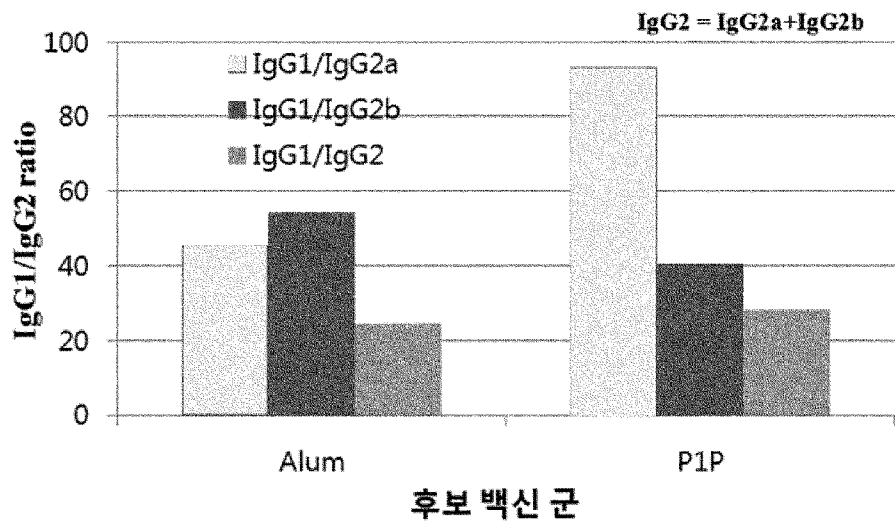
[도5]



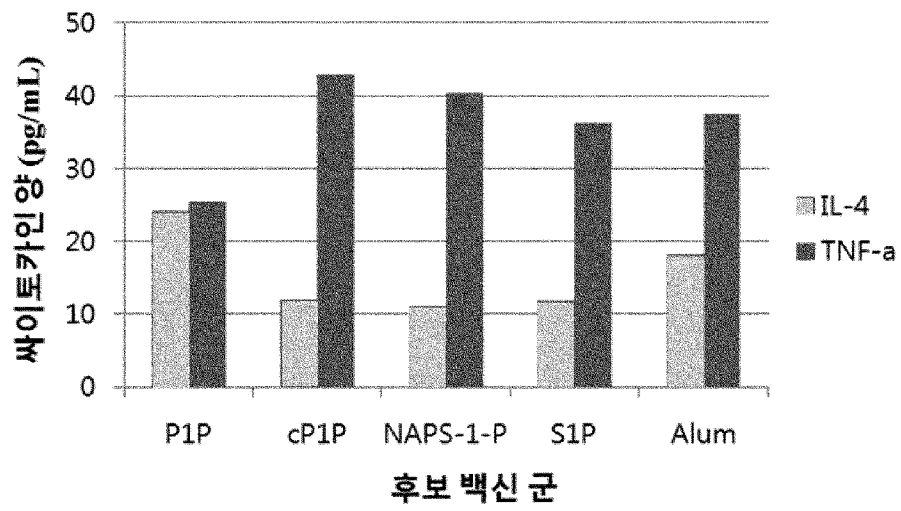
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/003804**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 31/661(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/661; C07F 9/11; A61Q 19/08; A61P 17/00; A61K 8/68; C07F 9/22; A61K 31/133; A61K 39/39; A61K 9/127; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: phytosphingosine-1 phosphate, P1P, cyclic P1P, NAPS-1-P, reinforcement of immunization, adjuvant, Th1, Th2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARRERA, I. et al., "Vaccine Development to Treat Alzheimer's Disease Neuropathology in APP/PS1 Transgenic Mice", International Journal of Alzheimer's Disease, 2012, vol. 2012, paper no. 376138, inner pages 1-17 See abstract; page 2; and figure 6.	1-5,9-10
A	KR 10-2015-0025286 A (PHYTOS CO., LTD. et al.) 10 March 2015 See the entire document.	1-5,9-10
A	HUGHES, J. E. et al., "Sphingosine-1-phosphate Induces an Antiinflammatory Phenotype in Macrophages", Circulation Research, 2008, vol. 102, pages 950-958 See the entire document.	1-5,9-10
A	WO 2012-134134 A2 (DAMY CHEMICAL CO., LTD. et al.) 04 October 2012 See the entire document.	1-5,9-10
A	KR 10-2013-0094547 A (PHYTOS CO., LTD.) 26 August 2013 See the entire document.	1-5,9-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Date of mailing of the international search report

10 JULY 2017 (10.07.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/003804

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **6-8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 6-8 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/003804

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0025286 A	10/03/2015	KR 10-1514970 B1	24/04/2015
WO 2012-134134 A2	04/10/2012	WO 2012-134134 A3	03/01/2013
KR 10-2013-0094547 A	26/08/2013	KR 10-1340556 B1	11/12/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/661(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/661; C07F 9/11; A61Q 19/08; A61P 17/00; A61K 8/68; C07F 9/22; A61K 31/133; A61K 39/39; A61K 9/127; A61K 39/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 피토스펩고신-1-포스페이트, P1P, 싸이클릭 P1P, NAPS-1-P, 면역증강, 이췌버트, Th1, Th2

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CARRERA, I. 등, 'Vaccine development to treat Alzheimer' s disease neuropathology in APP/PS1 transgenic mice' International Journal of Alzheimer' s Disease, 2012년, 2012권, 논문번호 376138, 내부페이지 1-17 초록; 페이지 2; 및 도면 6 참조.	1-5,9-10
A	KR 10-2015-0025286 A (주식회사 피토스 등) 2015.03.10 전체 문헌 참조.	1-5,9-10
A	HUGHES, J. E. 등, 'Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages' Circulation Research, 2008, 102권, 페이지 950-958 전체 문헌 참조.	1-5,9-10
A	WO 2012-134134 A2 ((주)다미화학 등) 2012.10.04 전체 문헌 참조.	1-5,9-10
A	KR 10-2013-0094547 A (주식회사 피토스) 2013.08.26 전체 문헌 참조.	1-5,9-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 10일 (10.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 6-8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 6-8은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제출원번호
PCT/KR2017/003804

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0025286 A	2015/03/10	KR 10-1514970 B1	2015/04/24
WO 2012-134134 A2	2012/10/04	WO 2012-134134 A3	2013/01/03
KR 10-2013-0094547 A	2013/08/26	KR 10-1340556 B1	2013/12/11