



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0127258  
(43) 공개일자 2017년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/17 (2014.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2013.01)

A61K 38/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0057656

(22) 출원일자 2016년05월11일

심사청구일자 2016년05월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

백현수

서울특별시 서초구 반포대로 316, 218호(잠원동, 한신시티 21)

백현정

서울특별시 노원구 공릉로41라길 14, 304호(공릉동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

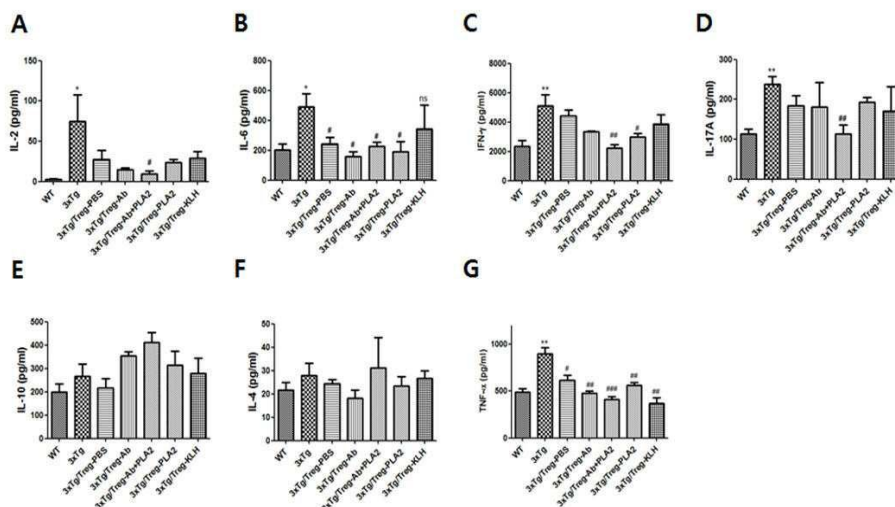
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 조절 T 세포를 유효성분으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물

(57) 요약

본 발명은 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물, 상기 조성물을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 개인맞춤형 키트 및 상기 조성물을 퇴행성 뇌질환 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

**A61K 38/1709** (2013.01)

**A61K 9/0019** (2013.01)

(72) 발명자

**예민숙**

경기도 남양주시 퇴계원면 경춘북로613번길 15,  
101동 602호(쌍용예가아파트)

**이찬주**

경기도 고양시 덕양구 화신로 76, 112동 1503호(행  
신동, 샘터마을1단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1C1A2A01054270

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 봉독유효성분을 이용한 알츠하이머병의 면역치료요법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조절 T 세포(Treg 세포)는 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)을 투여하여 유도된 아밀로이드 베타 특이적인 조절 T 세포(Treg 세포)인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 헌팅턴병 및 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항의 조성물을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 개인맞춤형 키트.

#### 청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항의 조성물을 퇴행성 뇌질환 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 조절 T 세포를 유효성분으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 알츠하이머병은 노인에서 치매를 일으키는 퇴행성 뇌질환의 일종으로 진행성 기억력 및 인지기력 상실이 주요 증상이다. 알츠하이머병의 정확한 발병원인 및 기전이 밝혀지지 않았으나 환자의 뇌에서 발견되는 노인반점(Senile plaque)과 신경섬유 덩어리(Neurofibrillary tangle)가 관찰되었고, 아밀로이드-베타와 APP-C 단백질(Anti-amyloid Precursor Protein)과 같은 독성 단백질에 의한 신경세포 사멸, 시냅스 손실 및 Tau 단백질의 변성 및 과인산화에 의한 신경섬유 덩어리의 형성기전이 밝혀졌고, 이상적인 질환모델을 확립이나, 새로운 예방

및 치료방법 개발 등의 많은 연구가 진행되고 있다. 또한, 알츠하이머질환에서 신경염증이 중요하다는 사실이 밝혀지면서 신경염증 제어를 통한 뇌질환 예방 및 치료를 위한 연구가 최근 중요한 분야로 인식되고 있다.

[0003] 현재 알츠하이머병 정신 및 행동장애증상을 완화시키는 약물치료가 시행되고 있으며, 질병을 예방하거나 근본적으로 치료할 수 있는 효과적인 치료법 및 치료제가 없는 실정이다. 지난 30년간 알츠하이머병의 발병기전에 관한 활발한 연구가 진행되었고 다양한 치료 기전이 연구되었으며 상당수의 임상 시험도 진행되었다. 특히 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 등의 퇴행성 뇌질환에 대하여 줄기세포에 의한 신경세포 재생 기법이 치료효과가 있음이 동물 모델에서 확인되고 있다. 그 중면역거부 반응, 종양형성, 윤리도덕적 문제가 없는 성체줄기세포 연구가 크게 주목받고 있다.

[0004] 21세기 노령화 사회에서 우리 인류를 가장 괴롭히게 될 일명 "21세기 질환"으로 불려지고 있는 알츠하이머병(노인성치매)의 연구가 매우 활발히 이루어지고 있기 때문에 뇌질환 가운데에서는 가장 빠른 시간 내에 원인에 기반을 둔 치료제와 백신개발 및 줄기세포 치료기술이 개발되어 어느 정도 정복이 가능하리라 예견되고 있다. 고령인구 증가에 따라 노인에게서 나타나는 치매, 뇌졸중 등의 뇌질환이 폭발적으로 증가하는 추세이며 이를 극복하기 위한 치료제의 개발은 고령화 사회 국민 건강 증진을 위한 핵심기반기술이다. 또한, 신경과학 특히 뇌질환 연구에서의 성과는 무한경쟁시대에서의 국가적 생존, 더 나아가 선진국 진입의 국가적 목표들을 달성하는데 있어 우리나라 과학기술 발전의 견인차 역할을 할 것이다.

[0005] 현재 노인성 뇌질환인 뇌졸중, 치매, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환의 연간 시장 규모는 미국이 200조원, 한국이 약 10조원에 달하며, 2026년경에는 우리나라도 초고령 국가에 진입하게 되어 시장규모는 최소 2-3배이상 증가하리라 예상되고 있다. 뇌질환 치료제 관련 의약품시장에서 화합물 기반의 고전적 치료약물 이외에, 단백질/백신, 세포치료제 등의 대체 치료제 시장도 확대되고 있는 추세이다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 면역관용 및 면역항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하는 조절 T 세포 (Treg)를 분리하여 알츠하이머 질환 동물모델에 세포이식하는 알츠하이머병의 치료를 위한 세포치료제를 개발하였고, 또한, 아밀로이드 베타 펩타이드와 bvPLA2를 투여하여 아밀로이드-베타 특이적인 Treg 세포를 생산하여 이를 알츠하이머 질환 동물모델에 세포이식을 함으로써 알츠하이머병의 질환치료를 위한 세포치료제를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 1. 미국공개특허 제2006/0115899호  
(특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 제20130110283호  
(특허문헌 0003) 3. 한국등록특허 제1578591호

### 비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 1. Nature Communications, 6, Article number: 7967, 18 Aug, 2015

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 하는 세포치료제 조성물을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 개인맞춤형 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 조절 T 세포(Treg 세포)를 포함하는 조성물을 퇴행성 뇌질환 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

## 과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조절 T 세포(Treg 세포)는 아밀로이드 베타 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)을 투여하여 유도된 아밀로이드 베타 특이적인 조절 T 세포(Treg 세포)일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 용어, "아밀로이드 베타"는 알츠하이머병 환자의 뇌에서 발견되는 아밀로이드 베타 플라크(amyloid beta plaque)의 주요 성분으로서, 36 내지 43의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이고, 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)로부터 만들어진다고 알려져 있다. 아밀로이드 전구 단백질은  $\beta$ -와  $\gamma$ -세크레타아제에 의해 분해될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 용어, "bvPLA2"은 "bee venom phospholipase A2"으로서, 봉독(bee venom)의 혼합물의 성분 중 PLA2를 말하며, "PLA2"는 글리세롤의 두번째 탄소위치에서 가수분해하여 지방산을 생성하는 기능을 가진 효소로서, 인지질의 sn-2 아실 결합을 특이적으로 인식하여 가수분해 활성을 촉매하여 아라키돈산과 라이소인지질(lysophospholipid)을 방출한다. PLA2는 일반적으로 박테리아, 곤충이나 뱀독뿐만 아니라 포유류의 조직에서도 발견된다. 본 발명의 bvPLA2는 꿀벌(Apis mellifera) 유래일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 헌팅턴병 및 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 용어, "퇴행성 뇌질환"은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅턴 질환, 피크(Pick) 질환 또는 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob) 질환을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 용어, "조절 T 세포"는 T 세포의 일종으로서, 비정상적으로 활성화된 면역세포의 염증 반응을 제어하는 특성이 있는 세포이며, Regulatory T cells 또는 Treg 로 표시한다. 이러한 조절 T 세포는 크게 자연성(natural) Treg와 적응성(adaptive) Treg 세포로 나눌 수 있으며, 자연성 Treg인 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T세포는 흉선에서 새로이 만들어질 때부터 면역억제기능을 부여받게 되며, 정상개체의 말초 CD4<sup>+</sup> T 림프구 중 5~10%의 빈도로 존재한다. 아직까지 자연성 Treg의 면역억제 기전은 정확히 파악되지 못하고 있지만, Foxp3라는 유전자의 발현 제어 인자가 자연성 Treg의 분화와 활성화에 중요한 역할을 수행한다는 사실이 최근에 밝혀졌다. 또한, 말초 자연성 T 세포는 특정 환경 하에서 자가 또는 외부항원의 자극을 받으면 면역억제효과를 나타내는 세포로 분화될 수 있는데, 이를 적응성 Treg 또는 유도성(inducible) Treg로 부르며, IL-10을 분비하는 Tr1, TGF- $\beta$ 를 분비하는 Th3 및 CD8 Ts 등이 적응성 Treg에 해당한다.
- [0021] 본 발명의 용어, "세포치료제"란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식·선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 미국은 1993년부터, 우리나라는 2002년부터 세포치료제를 의약품으로 관리하고 있다. 이러한 세포치료제는 크게 두 분야로 분류할 수 있으며 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포 치료제이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역세포 치료제로 분류할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 세포치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0023] 본 발명에서의 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 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. 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 아스

코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0024] 또한, 본 발명에서의 조성물은 세포치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다.

[0025] 본 발명의 세포치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포치료제를 포함할 수 있다.

[0026] 용어 치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 조절 T 세포를 체중 kg당  $1 \times 10^6$  내지  $5 \times 10^7$  세포수의 세포치료제가 포함될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 하는 세포치료제 조성물을 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 개인맞춤형 키트를 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 조절 T 세포(Treg 세포)를 포함하는 조성물을 퇴행성 뇌질환 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명에서의 용어, 개체는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0032] 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 세포치료제 조성물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 조성물에 포함되는 세포치료제는 체중 kg당  $1 \times 10^4$  내지  $1 \times 10^8$  세포수를 포함하는 것이 바람직하다.

[0033] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 세포치료제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 직장, 정맥내(intravenous therapy, i.v), 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

## 발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물은 퇴행성 뇌질환, 특히 알츠하이머병에 대한 근본적인 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 각 마우스 모델에서 모리스 수중미로(morris water maze) 실험을 통해 인지능력을 살펴본 것이다. (A)는 각 마우스모델이 4일간 훈련과정에서 hidden platform에 찾아가는데 걸리는 시간(latency)을 측정한 것이고, (B)는 각 마우스모델이 platform 위치에 머무르는 시간(Retention)을 측정한 것이며, (C)는 각 마우스모델이 platform이 있던 사분면 안에 머무르는 시간(Time in quadrant)을 측정한 것이며, (D)는 각 마우스모델이 platform이 있던 위치를 지나가는 횡수(Number of crossing)를 측정한 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Teff: Teff 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg: Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 2는 각 마우스 모델의 비장에서 Treg 세포(Foxp3+CD4+)의 분포를 확인한 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Teff: Teff 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg: Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 3은 각 마우스 모델의 염증관련 사이토카인의 발현정도를 확인한 것이다. (A)는 IL-2, (B)는 IL-6, (C)는 IFN- $\gamma$ , (D)는 IL-17A, (F)는 IL-10, (F)는 IL-4, 및 (G)는 TNF- $\alpha$ 을 나타낸 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Teff: Teff 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg: Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 4는 각 마우스 모델의 뇌 해마부위에서 아밀로이드-베타 플라크를 살펴본 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Teff: Teff 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg: Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 5는 각 마우스 모델의 뇌 해마부위에서 아밀로이드-베타 플라크와 microglia를 살펴본 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Teff: Teff 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg: Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 6은 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 이식한 실험 스케줄을 나타낸 것이다.

도 7은 각 마우스 모델에서 모리스 수중미로(morris water maze) 실험을 통해 인지능력을 살펴본 것이다. (A)는 각 마우스모델이 4일간 훈련과정에서 hidden platform에 찾아가는데 걸리는 시간(latency)을 측정한 것이고, (B)는 각 마우스모델이 platform 위치에 머무르는 시간(Retention)을 측정한 것이며, (C)는 각 마우스모델이 platform이 있던 사분면 안에 머무르는 시간(Time in quadrant)을 측정한 것이며, (D)는 각 마우스모델이 platform이 있던 위치를 지나가는 회수(Number of crossing)를 측정한 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PBS: negative control로 PBS를 처리한 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab: A $\beta$  백신 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab+PLA2: A $\beta$  백신과 PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PLA2: PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-KLH: KLH 백신(negative control)을 진행한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 8은 각 마우스 모델에서 헬퍼 T 세포의 분포 정도를 FACS 분석법을 통하여 확인한 것이다. (A)는 CD4+ T 세포군에서 IFN- $\gamma$ + 의 발현정도, (B)는 CD4+ T 세포군에서 IL-4+ 의 발현정도, 및 (C)는 CD4+ T 세포군에서 IL-17A+의 발현정도를 나타낸 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PBS: negative control로 PBS를 처리한 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab: A $\beta$  백신 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab+PLA2: A $\beta$  백신과 PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PLA2: PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-KLH: KLH 백신(negative control)을 진행한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 9은 각 마우스 모델에서 염증관련 사이토카인의 발현정도를 확인한 것이다. (A)는 IL-2, (B)는 IL-6, (C)는 IFN- $\gamma$ , (D)는 IL-17A, (F)는 IL-10, (F)는 IL-4, 및 (G)는 TNF- $\alpha$ 을 나타낸 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PBS: negative control로 PBS를 처리한 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab: A $\beta$  백신 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab+PLA2: A $\beta$  백신과 PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PLA2: PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-KLH: KLH 백신(negative control)을 진행한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 10는 각 마우스 모델의 뇌 해마부위에서 아밀로이드-베타 플라크를 살펴본 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PBS: negative control로 PBS를 처리한 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab: A $\beta$  백신 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-Ab+PLA2: A $\beta$  백신과 PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-PLA2: PLA2 처리한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Treg-KLH: KLH 백신(negative control)을 진행한 후 Treg 세포를 이식한 알츠하이머 모델 마우스 군.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

- [0039] **실시예 1. 실험방법**
- [0040] **1.1. 세포분리 및 세포배양**
- [0041] 본 발명에서 사용된 조절 T 세포는 C57BL/6n 마우스의 췌장에서 분리하였다. 마우스의 췌장을 떼어 PBS (Phosphate buffered saline)에 넣고 갈아준 후 RBC 라이시스 버퍼(lysis buffer)로 적혈구를 제거하였다. 분리한 splenocytes는 MACS CE4CD25 조절 T 세포 분리 키트를 이용하여 조절 T 세포 (CD4+CD25+ 세포군)와 작용 T 세포 (CD4+CD25- 세포군)로 분리하였다.
- [0043] **1.2. 동물모델**
- [0044] 본 발명에서 사용된 모델은 알츠하이머 질환 동물 모델로서 3xTg-AD 마우스를 사용하였다. 본 마우스는 Jackson laboratory(미국)에서 구입하였으며, 이 마우스는 알츠하이머 유발과 관련된 3개의 유전자인 스웨덴 돌연변이 아밀로이드 베타 전구체(APP<sup>Swe</sup> KM670/671NL), 돌연변이 프레세닐린1(PS1 M146V)과 돌연변이 타우(tau P301L)를 동시에 함유한 동물이다.
- [0046] **1.3. 세포이식 방법**
- [0047] 본 발명에서 사용된 조절 T 세포와 작용 T 세포는 알츠하이머 질환 동물모델인 3xTg-AD 마우스의 꼬리혈관내로 정맥주사하여 이식하였다.
- [0048] 또한, 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 이식하기 위하여 Foxp3-DTR 마우스(Foxp3 유전자 뒤에 DTR(diphtheria toxin receptor)가 달려 있는 형질전환 마우스를 사용하였고, DT(Diphtheria toxin, 투여하는 경우 Foxp3가 제거됨)의 주입은 면역반응 유도 2일전에 실시하였으며, DT를 투여하여 Treg 세포를 제거한 후 A $\beta$ , A $\beta$ +PLA2, PLA2 또는 KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin, 대조군)를 처리하여 A $\beta$ -반응성의 Treg 세포의 생성을 유도하였다. PLA2는 1일 및 5일에 2회 주사하였다. 10일간 면역반응 유도 후에 마우스의 췌장을 각 A $\beta$ , A $\beta$ +PLA2, PLA2 또는 KLH를 처리하여 in vitro에서 4일간 배양하였고, 14일 후 알츠하이머 모델인 3xTg 마우스의 혈관 내로 세포를 이식(adoptive transfer)하였다(도 6).
- [0050] **1.4. 모리스 수중미로 실험**
- [0051] 각 실험군의 기억 및 인지능력 향상 효과를 확인하기 위하여 모리스 수중 미로 실험을 실시하였다. 모리스 수중 미로 실험은 원통안에 물을 채우고 사분면으로 나눈후 그 중 한분면 안에 hidden platform을 설치한 후, 처음 4일 동안 쥐를 hidden platform이 위치하지 않은 다른 분면에서 출발하여 hidden platform을 찾아가도록 훈련하는 것이다. 5일 째에 hidden platform을 제거 한 후 쥐가 platform이 있던 위치에 머무르는 시간 (Retention), platform이 있던 분면 안에 머무르는 시간(Time in quadrant), platform이 있던 위치를 지나가는 회수(Number of crossing)을 측정하였다.
- [0053] **1.5. FACS 분석**
- [0054] Treg 세포의 분포 정도를 확인하기 위하여, 각 마우스 모델에서 비장과 림프절을 분리하여 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)로 분석하였다. 비장과 림프절을 마우스로부터 분리하여 갈아준 후 항-CD4-FITC와 항-CD25-PE 항체로 세포표면 마커를 염색하였다. Fix/Perm buffer로 세포막을 뚫어 준 후 항-Foxp3-PE-cy5 항체로 염색한 후 Treg 세포의 분포를 확인하였다.
- [0055] 또한, 헬퍼 T 세포의 분포를 확인하기 위하여, 각 마우스 모델의 비장세포를 분리한 후 ionomycin과 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) 및 golgi-stop을 처리하고 5시간 후에 항-CD4-FITC, 항-IFN $\gamma$ -PE, 항-IL4-PE, 항-IL17A-APC 항체로 세포표면 마커를 염색하였다. 각 Th1, Th2, Th17 세포의 분포를 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)로 분석하였다.
- [0057] **1.6. 싸이토카인(cytokine) 발현정도 확인**

[0058] 각 마우스 모델의 비장세포를 72시간 항-CD3/CD-28 항체의 존재하여 배양한 후 Th1/2/17 싸이토카인 CBA 키트를 이용하여 염증관련 싸이토카인의 발현정도를 측정하였다. Th1/2/17 싸이토카인은 IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 및 IL-17A 항체가 바인딩 되어있는 비드(bead)에 배양액에 존재하는 싸이토카인을 반응 시킨 후 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)로 분석하였다.

[0060] **1.7. 면역조직염색법**

[0061] 마우스의 뇌를 고정과 탈수의 과정을 거친 후 냉동시킨 후 냉동절단(cryosection) 기를 이용하여 30  $\mu$ m의 크기로 절편하였다. 절편한 뇌절편을 citrate buffer (pH 6.0)에 넣어 고온에서 처리하여 antigen retrieval 한 후 내재적 퍼옥시다제 활성을 제거하기 위해 3% 과산화수소를 10분간 처리하였다. 1.5% BSA(bovine serum albumin)/PBS를 넣고 1시간 블러킹한 후 항-아밀로이드 베타 항체 (1:500 희석)를 4℃에서 오버나이트 처리하였다. Vectastatin ABC 키트를 이용하여 2차 항체와 ABC reagent를 처리한 후 DAB substrate 넣어 발색하였다.

[0063] **실시예 2. 세포이식된 동물모델의 인지능력 회복 효과**

[0064] 조절 T 세포(Treg)와 작용 T 세포(Teff)를 알츠하이머 질환 동물 모델인 3xTg-AD 마우스에 세포이식을 한 후 모리스 수중미로(morris water maze) 실험을 통해 인지능력을 실험하였다. 모리스 수중미로 실험에서는 각 마우스 모델이 4일간 훈련과정에서 hidden platform에 찾아가는데 걸리는 시간(latency), platform 위치에 머무르는 시간(Retention), platform이 있던 사분면 안에 머무르는 시간(Time in quadrant) 및 platform이 있던 위치를 지나가는 회수(Number of crossing)를 측정하였고, 그 결과 Treg 세포를 마우스에 이식한 경우에는 대조군(WT, wild-type)의 수준으로 인지능력이 향상되었음을 확인하였다 (도 1).

[0066] **실시예 3. 세포이식된 동물모델의 비장세포에서 Treg 세포의 증가 및 싸이토카인의 발현 확인**

[0067] Treg 세포와 Teff 세포를 이식한 경우 면역세포가 비장에서 증가하여 면역반응에 직접적으로 관련되는지를 조사하기 위하여 각 세포가 이식된 동물모델의 비장에서 Treg 세포의 분포를 조사하였고, 그 결과 Treg 세포를 이식한 경우에는 마우스의 비장에서 Treg 세포(Foxp3+CD4+)가 현저히 증가되었음을 확인하였다 (도 2).

[0068] 또한, Treg 세포와 Teff 세포를 이식한 경우 염증과 관련된 싸이토카인의 발현정도를 확인하기 위하여, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-4 및 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 조사하였다. 그 결과 Teff 세포를 이식한 경우에는 3xTg-AD 마우스에 비해 IL-2 IL-6, TNF- $\alpha$  발현이 증가한 반면, Treg 세포를 이식한 경우에는 IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17A 발현이 감소하였다. 특히, Treg 세포의 주요 싸이토카인인 IL-10은 Treg 세포를 이식한 마우스에서 현저히 증가되었음을 확인하였다 (도 3).

[0070] **실시예 4. 세포이식된 동물모델에서 아밀로이드 베타 플라크와 microglia의 감소 효과**

[0071] Treg 세포와 Teff 세포를 이식한 3xTg-AD 마우스의 뇌 해마부위에서 아밀로이드-베타 플라크를 살펴보고, WT와 비교할 때, Teff 세포를 이식한 마우스의 해마에서는 3xTg-AD 마우스와 비슷한 수준의 아밀로이드 베타 플라크가 형성되어 있는 반면, Treg 세포를 이식한 경우의 마우스의 해마에서는 아밀로이드 베타 플라크와 microglia가 현저히 감소되었음을 확인하였다 (도 4 및 도 5).

[0073] **실시예 5. 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포가 이식된 동물모델의 인지능력 회복 효과**

[0074] 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 알츠하이머 질환 동물 모델인 3xTg-AD 마우스에 세포이식을 한 후 모리스 수중미로(morris water maze) 실험을 통해 인지능력을 실험하였다. 모리스 수중미로 실험에서는 각 마우스모델이 4일간 훈련과정에서 hidden platform에 찾아가는데 걸리는 시간(latency), platform 위치에 머무르는 시간(Retention), platform이 있던 사분면 안에 머무르는 시간(Time in quadrant) 및 platform이 있던 위치를 지나가는 회수(Number of crossing)를 측정하였고, 그 결과 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 마우스에 이식한 동시에 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)를 투여한 경우에는 대조군(WT, wild-type)의 수준으로 인지능력이

향상되었음을 확인하였다(도 7).

[0076] 실시예 6. 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포가 이식된 동물모델의 비장세포에서 헬퍼 T 세포의 증가 및 싸이토카인의 발현 확인

[0077] 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 이식한 3xTg-AD 마우스에 Treg 조절물질을 투여한 경우 헬퍼 T 세포의 분포를 조사하였고, 그 결과 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 이식하고 Treg 조절물질을 투여한 경우에는 대조군(WT)과 유사하게 CD4<sup>+</sup> T 세포군에서 IFN- $\gamma$  및 IL-17A는 감소되었고, IL-4는 증가되었음을 확인하였다 (도 8).

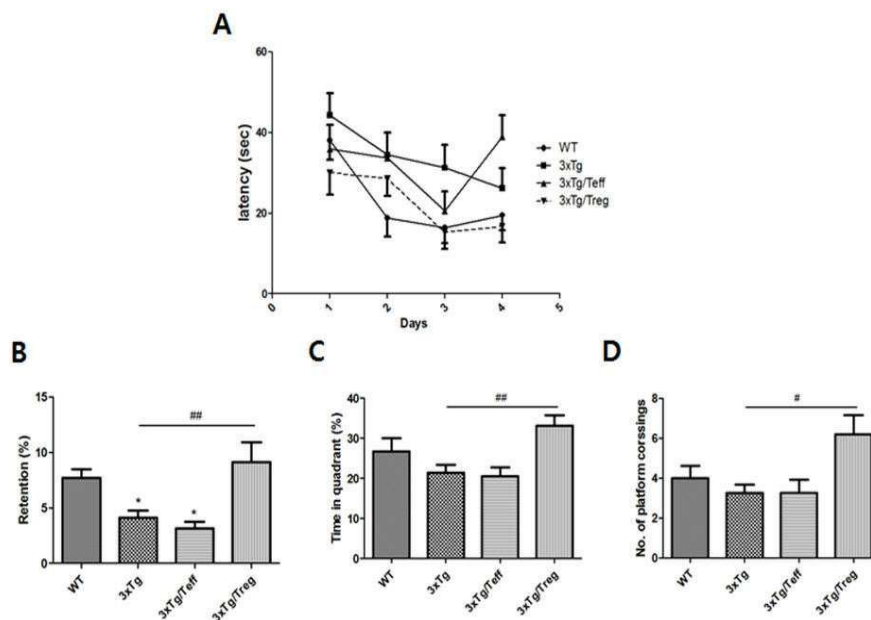
[0078] 또한, 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 이식한 3xTg-AD 마우스에 Treg 조절물질을 투여한 경우 염증과 관련된 싸이토카인의 발현정도를 확인하기 위하여, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-4 및 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 조사하였다. 그 결과 IL-2 IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17A 및 TNF- $\alpha$  발현은 대조군(WT)과 유사한 수준으로 감소된 반면, IL-10 및 IL-4 발현은 증가되었음을 확인하였다 (도 9).

[0080] 실시예 7. 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포가 이식된 동물모델에서 아밀로이드 베타 플라크의 감소 효과

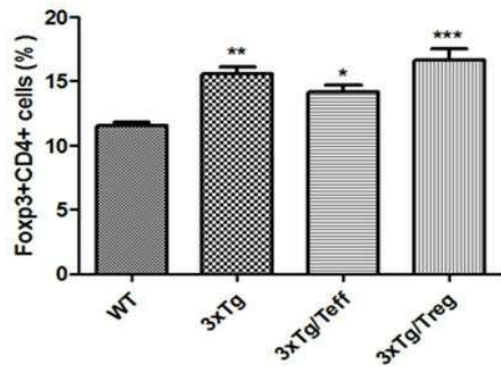
[0081] 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 이식한 3xTg-AD 마우스에 Treg 조절물질을 투여한 경우 마우스의 뇌 해마 부위에서 아밀로이드-베타 플라크를 살펴보고, 그 결과 아밀로이드-베타 특이적 Treg 세포를 이식하고 동시에 Treg 조절물질을 투여한 경우에는 대조군(WT)과 유사한 수준으로 아밀로이드 베타 플라크가 현저히 감소되었음을 확인하였다 (도 10).

## 도면

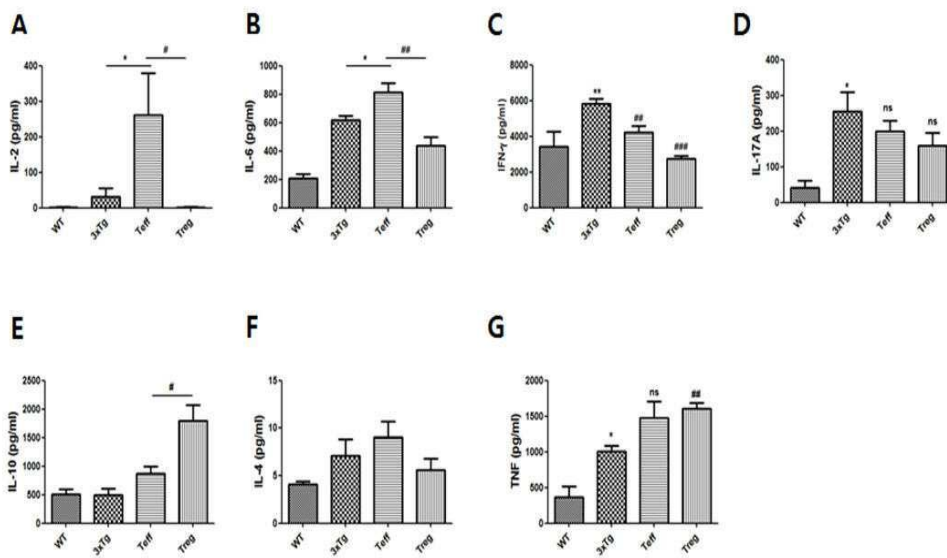
### 도면1



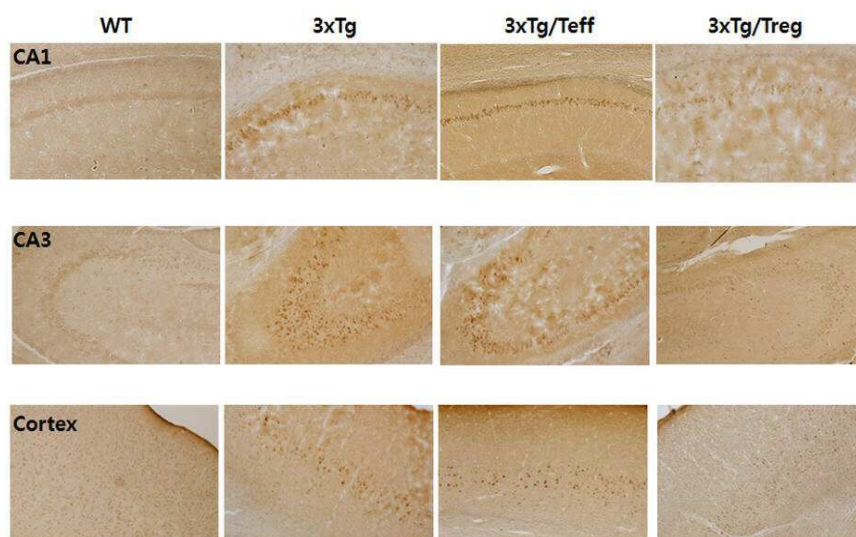
도면2



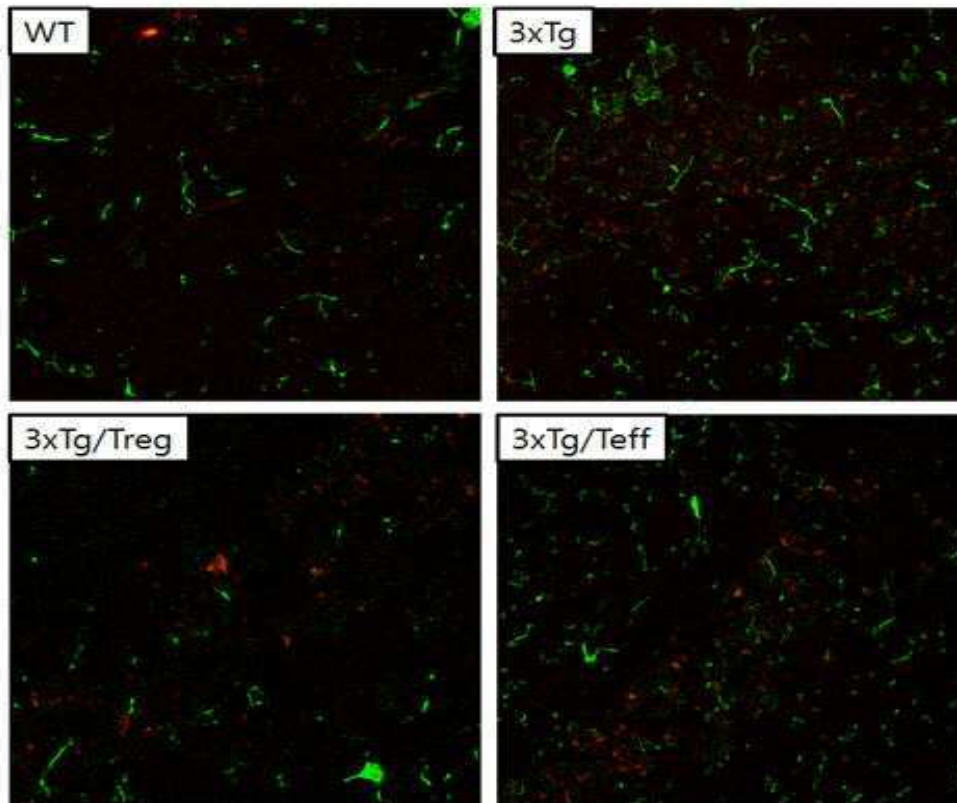
도면3



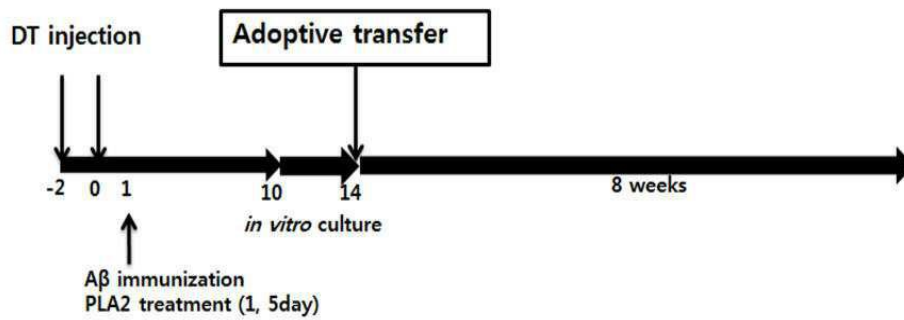
도면4



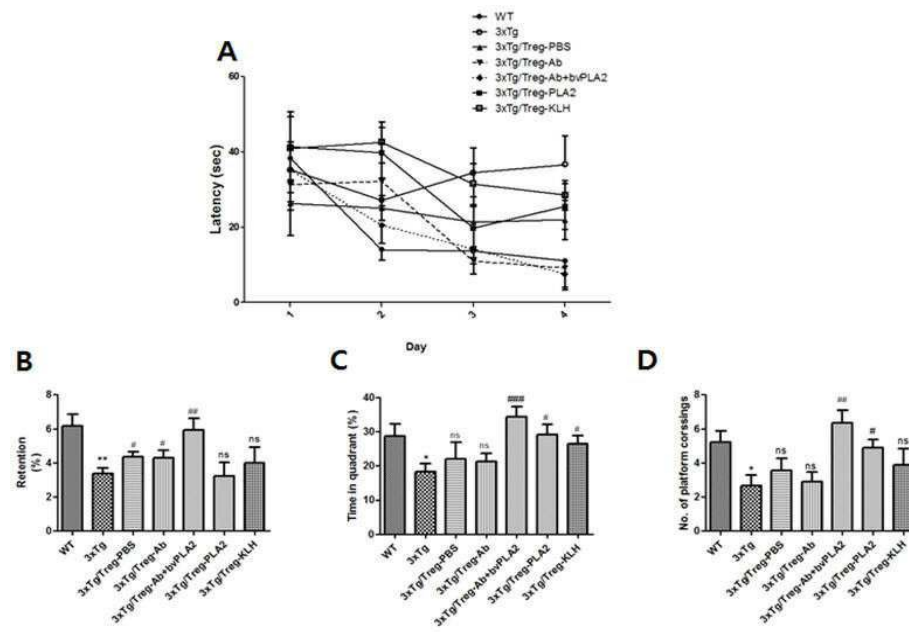
도면5



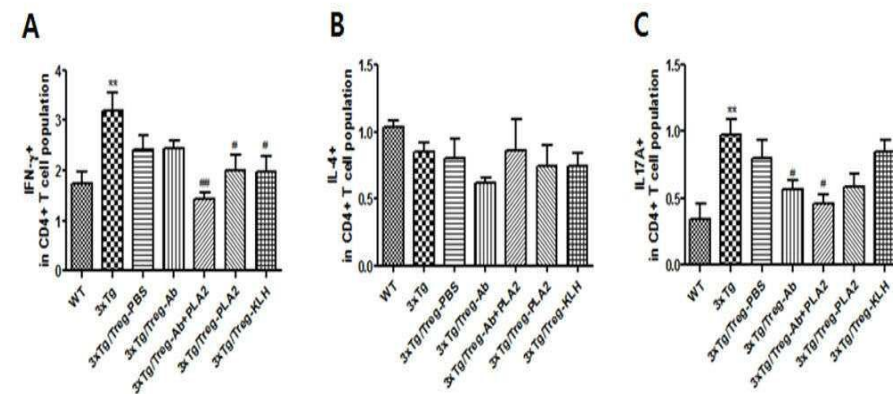
도면6



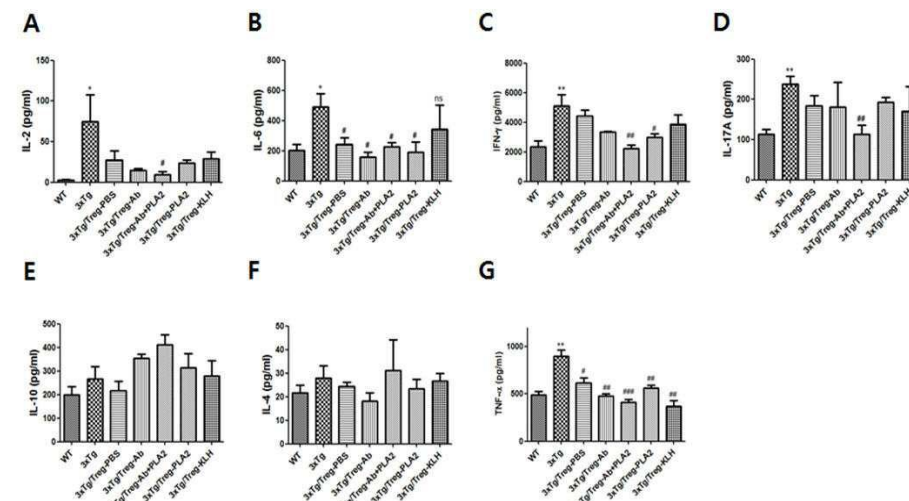
도면7



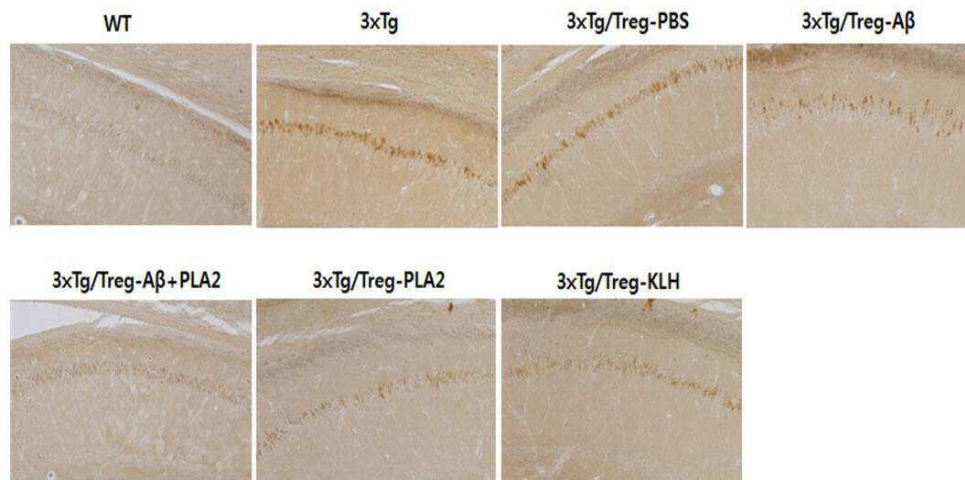
도면8



도면9



도면10



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation of Kyunghee Unversity
- <120> Cell therapy composition for preventing or treating  
neurodegenerative disease comprising regulatory T cells as active  
ingredient
- <130> PN1604-134
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 42
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

- <210> 2
- <211> 134
- <212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly Pro Asn Glu Leu Gly Arg Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg

20 25 30

Thr His Asp Met Cys Pro Asp Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His

35 40 45

Gly Leu Thr Asn Thr Ala Ser His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp

50 55 60

Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser

65 70 75 80

Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr

85 90 95

Lys Leu Glu His Pro Val Thr Gly Cys Gly Glu Arg Thr Glu Gly Arg

100 105 110

Cys Leu His Tyr Thr Val Asp Lys Ser Lys Pro Lys Val Tyr Gln Trp

115 120 125

Phe Asp Leu Arg Lys Tyr

130