



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0127257  
(43) 공개일자 2017년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)  
A61K 9/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)  
A61K 38/1709 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0057652

(22) 출원일자 2016년05월11일

심사청구일자 2016년05월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

배현수

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

백현정

서울특별시 노원구 공릉로41라길 14, 304호(공릉동)

예민숙

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

(74) 대리인

위병갑

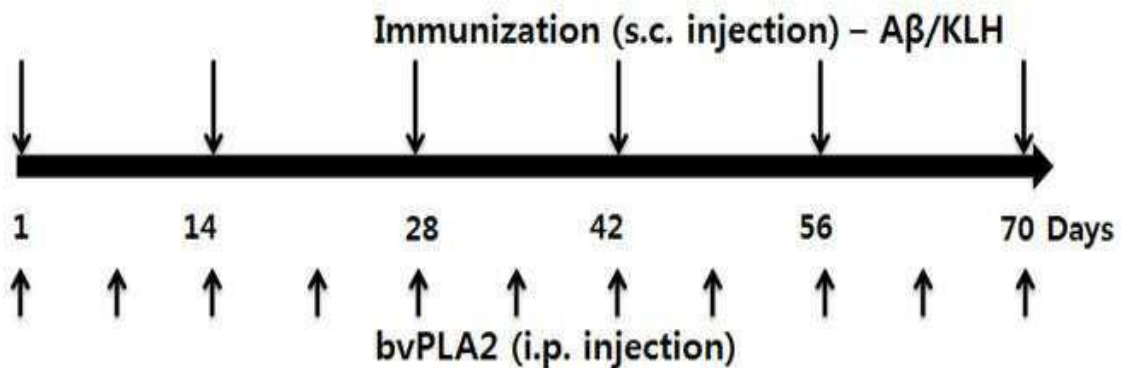
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료용 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 서열번호 1인 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 서열번호 2인 vPLA2(bee venom phospholipase A2)를 백신으로 하여 알츠하이머병 또는 치매를 예방 또는 치료하기 위한 백신 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 39/39* (2013.01)

*A61K 9/0019* (2013.01)

*A61K 9/0021* (2013.01)

*A61K 9/08* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-067891

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 미래창조과학부

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 봉독의 조절T세포 기능 조절 기전 규명 및 면역질환 적용 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료용 백신 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

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

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

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

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 백신 조성물은 면역증강제(adjuvant)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 백신 조성물은 조절 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 백신 조성물은 뇌 조직에서 아밀로이드 베타 플라크를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 알츠하이머병은 치매를 일으키는 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로서, 주요증상으로는 기억력 감퇴, 언어능력저하, 시공간과악능력 저하 등이 있다. 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 밝혀졌다.

[0003] 아밀로이드 베타(A $\beta$  or A $\beta$ )는 알츠하이머병 환자의 뇌에서 발견되는아밀로이드 플라크(amyloid 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  $\gamma$ -세크레타아제라

에 의해 분해되는데, 상기 분해효소를 타겟으로 하여 아밀로이드 베타의 농도를 줄이는 연구가 진행되어 왔으나, 아밀로이드 베타의 생성 기전을 타겟으로 하는 치료물질들은 알츠하이머병에 대한 치료효과가 미미한 실정이다. 또한, 능동 및 수동 면역치료가 동물실험에서 치료 효과가 밝혀진 후 알츠하이머 환자를 대상으로 연구가 진행되고 있다. 알츠하이머 동물모델에 항원인 A $\beta$  42를 이용하여 능동면역을 유도했을 때 A $\beta$  플라크가 감소되고 모리스 수중미로(Morris water maze) 실험에서 기억력 향상을 보였다. 그러나 합성 A $\beta$  펩타이드인 AN1792/QS-21를 이용하여 알츠하이머 환자를 대상으로 한 임상 2상 시험에서 6%의 환자가 뇌수막염을 보여 임상 시험이 중단되었다. 최근에 시행된 임상시험에서도 A $\beta$  플라크가 감소하였으나 진행성 신경세포퇴화를 개선하지는 못하였다. 그 후 뇌수막염의 주된 원인이 T-cell response에 의한 것임이 밝혀져 그 부분을 제거한 펩타이드가 개발되어 현재 그에 따른 임상시험이 진행 중이다.

[0004] 따라서, 본 발명자들은 능동면역요법으로서 A $\beta$  항원에 의해 백신화하고 동시에 Treg 조절물질을 처리하여 면역관용을 유도함으로써 알츠하이머병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료를 위한 백신 조성물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 미국등록특허 제74795509호  
(특허문헌 0002) 2. 미국공개특허 제2014/0227304호  
(특허문헌 0003) 3. 한국공개특허 제2015-0132396호

### 비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. The Journal of Immunology, May 1, 2015, vol.194

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)를 포함하는 알츠하이머병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드 및 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)를 포함하는 알츠하이머병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0011] 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.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 bvPLA2(bee venom phospholipase A2)는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 용어, "bvPLA2"는 "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.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 백신 조성물은 면역증강제(adjuvant)를 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 백신 조성물은 단독으로 투여 가능하지만, 바람직하게는 면역증강제(adjuvant)와 함께 투여할 수 있다. 면역증강제는 면역세포의 초기 성화 과정에서 비특이적으로 항원에 대한 면역 반응을 촉진하는 물질로, 숙주에게 면역원은 아니지만 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 면역을 강화하는 제제, 분자등을 의미한다(Warren et al., 1986, Annu.Rev.Immunol., 4:369). 본 발명의 백신 조성물과 함께 투여되어 면역 반응을 증강시킬 수 있는 면역증강제는 임의의 다양한 면역증강제를 포함하며, 전형적인 면역증강제로는 프로인트 면역증강제(Freund adjuvant), 알루미늄 화합물(aluminum compound), 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide), 리포폴리싸카라이드(LPS), 모노포스포릴 리피드 A, 또는 쿨일 A 등이 알려져 있고, 이에 제한되는 것은 아니나 바람직한 예시 중 하나로 프로인트 면역증강제를 사용한 예를 개시한다. 상기 면역증강제는 백신 조성물과 동시에 투여되거나 시간 간격을 두고 순차적으로 투여될 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 백신 조성물은 추가적으로 용매, 부형제 등을 더 포함할 수 있다. 상기 용매에는 생리식염수, 증류수 등이 포함되며, 상기 부형제에는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포타슘 설페이트 등이 포함되나, 이에 제한되지 않으며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상적으로 백신 제조에 사용하는 물질을 더 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 백신 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 이용되는 방법으로 제조할 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있고, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액제로 제조하며, 진피 내, 근육 내, 복막 내, 정맥 내, 피하 내, 비강 또는 경막 외(eidural) 경로로 투여할 수 있다.

[0018] 본 발명의 백신 조성물은 면역학적 유효량으로 개체에 투여할 수 있다. 상기 “면역학적 유효량”이란 알츠하이머병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 정확한 투여 농도는 투여될 특정 면역원에 따라 달라지며, 예방 접종 대상자의 연령, 체중, 건강, 성별, 개체의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 1회 내지 수회 투여가능 하다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 백신 조성물은 조절 T 세포를 증가시키는 것일 수 있다.

[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+ CD25+ T세포는 흉선에서 새로이 만들어질 때부터 면역억제기능을 부여받게 되며, 정상개체의 말초 CD4+ 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-β를 분비하는 Th3 및 CD8 Ts 등이 적응성 Treg에 해당한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 백신 조성물은 뇌 조직에서 아밀로이드 베타 플라크를 감소시키는 것일 수 있다.

## 발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 알츠하이머병 또는 치매에 대한 예방 또는 치료용 백신 조성물은 알츠하이머병 또는 치매에서 발견되는 아밀로이드 베타 플라크를 효과적으로 감소시킴으로써, 알츠하이머병 또는 치매에 대한 근본적인 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 아밀로이드-베타 백신과 Treg 조절물질(bvPLA2)의 접종을 위한 실험 스케줄을 나타낸 것이다.

도 2는 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/Ab: Aβ 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab+PLA2: Aβ 백신과 bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/PLA2: bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/KLH: Aβ 백신에 대한 대조군(negative control)으로서 KLH 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 3은 각 마우스 모델에서 비장과 림프절을 분리하여 Treg 세포(CD25+ Foxp3+ 세포)의 분포 정도를 FACS 분석법을 통하여 확인한 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab: Aβ 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab+PLA2: Aβ 백신과 bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/PLA2: bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/KLH: Aβ 백신에 대한 대조군(negative control)으로서 KLH 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 4는 각 마우스 모델에서 헬퍼 T 세포의 분포 정도를 FACS 분석법을 통하여 확인한 것이다. (A)는 CD4+ T 세포군에서 IFN-γ+ 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/Ab: Aβ 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab+PLA2: Aβ 백신과 bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/PLA2: bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/KLH: Aβ 백신에 대한 대조군(negative control)으로서 KLH 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 5는 각 마우스 모델에서 염증관련 사이토카인의 발현정도를 확인한 것이다. (A)는 IL-2, (B)는 IL-6, (C)는 IFN-γ, (D)는 IL-17A, (F)는 IL-10, (F)는 IL-4, 및 (G)는 TNF-α을 나타낸 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab: Aβ 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab+PLA2: Aβ 백신과 bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/PLA2: bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/KLH: Aβ 백신에 대한 대조군(negative control)으로서 KLH 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 6은 각 마우스 모델에서 항-Aβ 항체의 역가를 확인한 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab: Aβ 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab+PLA2: Aβ 백신과 bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/PLA2: bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/KLH: Aβ 백신에 대한 대조군(negative control)으로서 KLH 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군.

도 7은 각 마우스 모델의 해마와 뇌피질 부위에서 아밀로이드-베타 플라크를 확인한 것이다. WT: 정상 마우스 군; 3xTg: 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab: Aβ 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/Ab+PLA2: Aβ 백신과 bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/PLA2: bvPLA2 투여한 알츠하이머 모델 마우스 군; 3xTg/KLH: Aβ 백신에 대한 대조군(negative control)으로서 KLH 백신을 진행한 알츠하이머 모델 마우스 군.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 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.

### [0027] 실시예 1. 실험방법

#### [0028] 1.1. 아밀로이드-베타 백신 방법

[0029] 아밀로이드-베타(Aβ) 백신을 위하여 Aβ 1-42 펩타이드(서열번호 1)와 CFA(Complete Freund's Adjuvant)를 섞어 접종하였다. KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)은 Aβ에 대한 대조군(negative control)으로 사용되었다. Aβ 또는 KLH는 2주일마다 1회씩 총 6회에 걸쳐 피하주사로 접종하였고, Treg 조절물질인 bvPLA2(bee venom phospholipase A2, 서열번호 2)는 1주일마다 1회씩 총 11회에 걸쳐 복강주사로 접종하였다(도 1).

#### [0031] 1.2. 동물모델

[0032] 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(APPSwe KM670/671NL), 돌연변이 프레셀린1(PS1 M146V)과 돌연변이 타우(tau P301L)를 동시에 함유한 동물이다.

### 1.3. 모리스 수중미로 실험

각 실험군의 기억 및 인지능력 향상 효과를 확인하기 위하여 모리스 수중 미로 실험을 실시하였다. 모리스 수중 미로 실험은 원통안에 물을 채우고 사분면으로 나눈 후 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 제에 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.

### 1.4. FACS 분석

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.

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.

### 1.5. 사이토카인(cytokine) 발현정도 확인

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

### 1.6. 항-A $\beta$ 항체의 역가 확인

각 마우스 모델의 혈청을 분리한 후 A $\beta$  1-42 에 대한 항체의 생성 여부를 확인하였다. 마우스의 심장채혈을 통해 혈액을 채취하고 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 아밀로이드 베타 펩타이드를 코팅한 96-웰 플레이트에 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000로 희석한 후 처리하였다. 항-rat IgG-HRP 항체를 처리한 후 TMB substrate로 발색을 확인하였다. 발색정도를 마이크로플레이트 리더에서 450nm 흡광도를 측정하였다.

### 1.7. 면역조직염색법

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 블리킹한 후 항-아밀로이드 베타 항체 (1:500 희석)를 4°C에서 오버나잇 처리하였다. Vectastatin ABC kit를 이용하여 2차 항체와 ABC reagent를 처리한 후 DAB substrate 넣어 발색하였다.

## 실시예 2. A $\beta$ 백신과 Treg 조절물질(PLA2) 투여에 의한 인지능력 회복 효과

A $\beta$ , A $\beta$ +PLA2, PLA2 또는 KLH 를 처리한 각 마우스 모델에서 모리스 수중 미로 실험을 진행하여, 시간에 따른 탈출로의 대기시간(latency), 각 마우스 모델에 따른 유지 % (retention), 각 마우스 모델에 따른 사분면에서의

시간(%) 및 각 마우스 모델에 따른 플랫폼 크로싱의 수를 측정하였다. 그 결과 A $\beta$  백신과 PLA2를 투여한 마우스 모델(3xTg/A $\beta$ +PLA2)에서 정상 마우스 모델과 유사할 정도로 인지능력이 향상되었음을 확인하였다 (도 2).

**실시예 3. A $\beta$  백신과 Treg 조절물질(PLA2) 투여에 의한 Treg 세포 증가**

A $\beta$ , A $\beta$ +PLA2, PLA2 또는 KLH 를 처리한 각 마우스 모델의 비장과 림프절을 분리하여 Treg 세포 분포를 확인하였다. A $\beta$  백신과 PLA2를 투여한 마우스 모델(3xTg/A $\beta$ +PLA2)에서는 비장과 림프절 모두에서 정상 마우스 모델에서보다 현저하게 Treg 세포가 약 2배 증가되었음을 확인하였다 (도 3).

**실시예 4. A $\beta$  백신과 Treg 조절물질(PLA2) 투여에 의한 헬퍼 T 세포의 증가 및 사이토카인의 발현 확인**

A $\beta$ , A $\beta$ +PLA2, PLA2 또는 KLH 를 처리한 각 마우스 모델의 비장세포에서 헬퍼 T 세포의 분포를 조사하였다. 알츠하이머 질환모델인 3xTg 마우스에서는 정상 마우스 모델(WT)과 비교할 때, Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 가 현저히 증가되었으나, A $\beta$  백신과 PLA2를 투여한 마우스 모델(3xTg/A $\beta$ +PLA2)에서는 정상 마우스 모델과 유사한 정도로 감소됨을 확인하였다 (도 4).

또한, 각 마우스 모델에서 염증관련 사이토카인인 IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, IL-4 및 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 조사하였다. 그 결과 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17A 및 TNF- $\alpha$  발현은 3xTg 마우스와 비교할 때 감소되었고, IL-6, IL-10 및 IL-4 발현은 3xTg 마우스보다 증가되었음을 확인하였다 (도 5).

**실시예 5. A $\beta$  백신과 Treg 조절물질(PLA2) 투여에 의한 A $\beta$  항체 생성 확인**

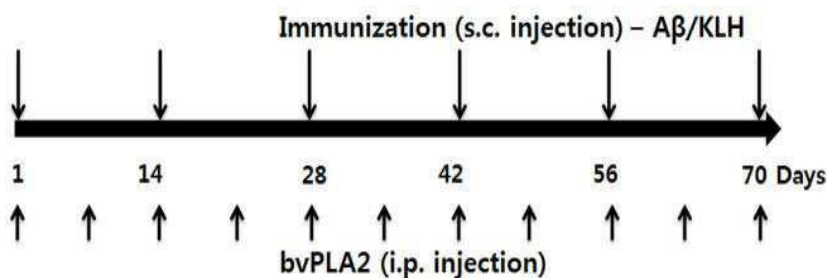
각 마우스 모델에서 A $\beta$  항체의 역가를 확인하였고, 그 결과 A $\beta$  백신이 진행된 마우스 모델에서만 A $\beta$  항체가 생성되었음을 확인하였다 (도 6). A $\beta$  백신만 처리된 군(3xTg/Ab)과 A $\beta$  백신과 PLA2를 처리한 마우스 군(3xTg/Ab+PLA2)에서 항체 생성에 큰 차이가 없는 것으로 보아 PLA2 처리에 의한 병증 완화 효과는 A $\beta$  항체 생성과는 다른 메커니즘에 의한 것으로 예상된다.

**실시예 6. A $\beta$  백신과 Treg 조절물질(PLA2) 투여에 의한 아밀로이드 베타 플라크의 감소 효과**

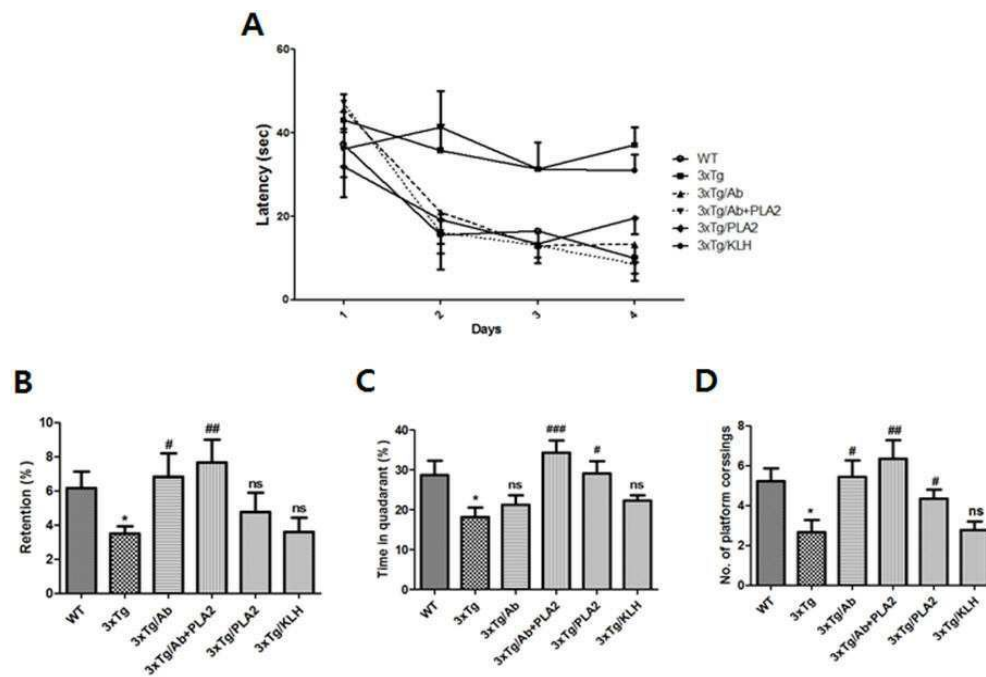
각 마우스 모델의 해마(CA1)와 뇌피질(cortex)에서 A $\beta$  플라크를 면역조직염색법에 의하여 확인하였고, A $\beta$  백신과 Treg 조절물질(PLA2) 투여한 마우스(3xTg/Ab+PLA2)의 해마에서 A $\beta$  플라크가 현저히 감소되었다 (도 7).

**도면**

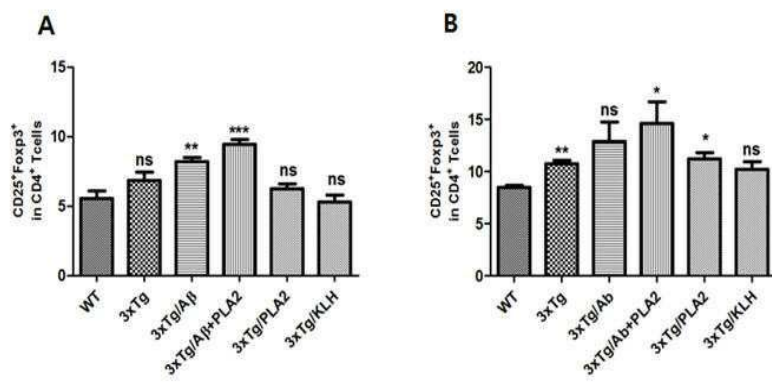
**도면1**



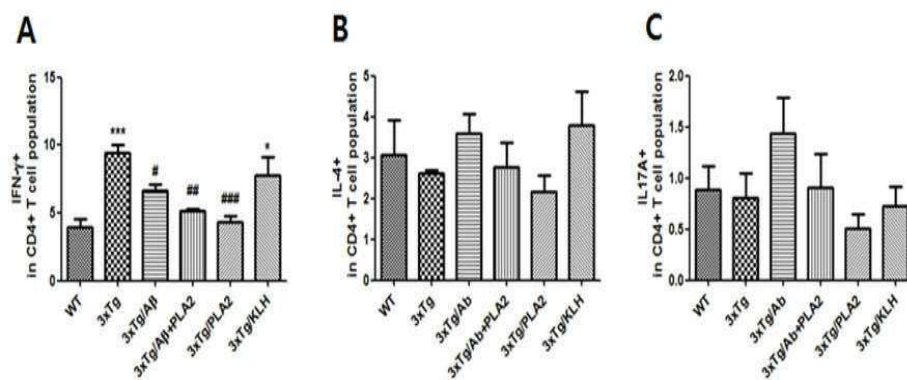
도면2



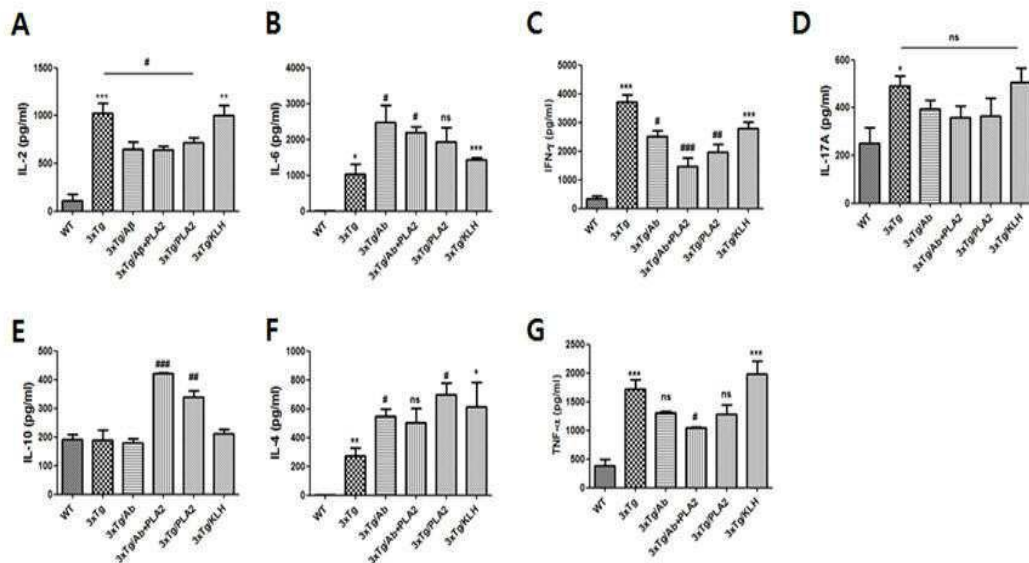
도면3



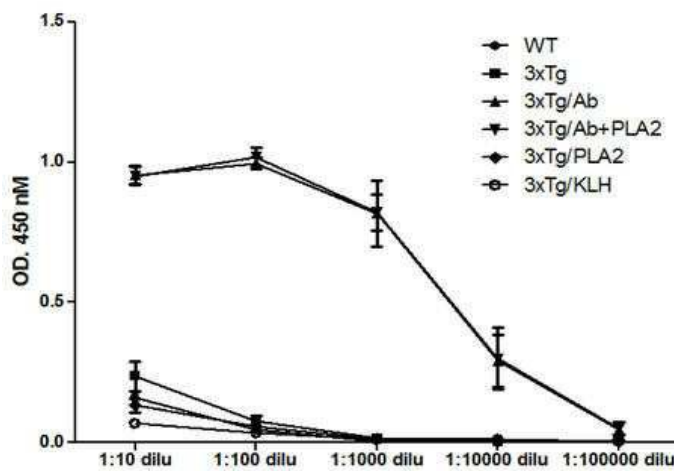
도면4



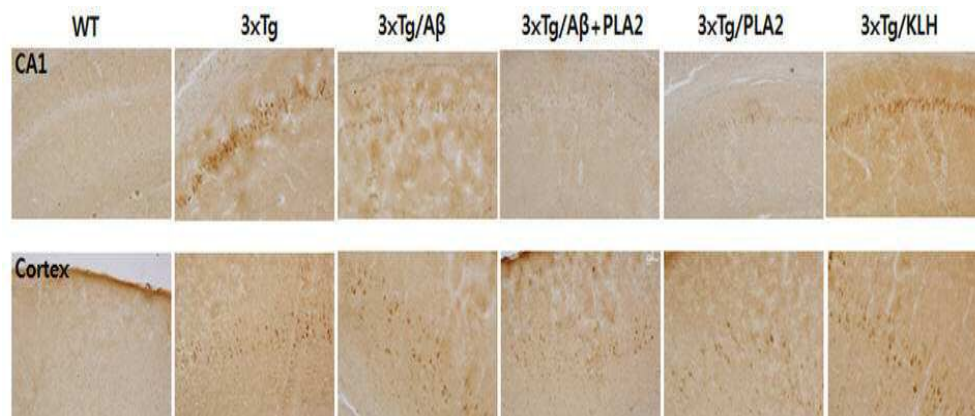
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation of Kyunghee Unversity  
 <120> Vaccine composition for preventing or treating alzheimer disease  
 or dementia comprising amyloid beta peptide and bee venom  
 phospholipase A2 as active ingredient  
 <130> PN1604-133  
 <160> 2  
 <170> KoPatentIn 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