(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월02일
(11) 등록번호 10-2129220
(24) 등록일자 2020년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/04 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/04 (2013.01)
A61K 38/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7008710(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년09월23일
심사청구일자 2019년04월25일
(85) 번역문제출일자 2019년03월26일
(65) 공개번호 10-2019-0035948
(43) 공개일자 2019년04월03일
(62) 원출원 특허 10-2016-7021791
원출원일자(국제) 2011년09월23일
심사청구일자 2016년09월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/052992
(87) 국제공개번호 WO 2013/044147
국제공개일자 2013년03월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050118669 A
KR1020070040824 A
KR1020080084830 A*
Neurobiolgy of Aging, Vol. 26, pp. 383-389(2005.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에이씨 이뮨 에스.에이.
스위스, 체하-1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프엘 이노베이션 파크
(72) 발명자
페이퍼, 안드레아
스위스, 체하-1806 에스티.-레기어, 루트 드 페닐 16에이
무스, 안드레아스
스위스, 1053 쿠기, 체민 데 알로우에떼스 12
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

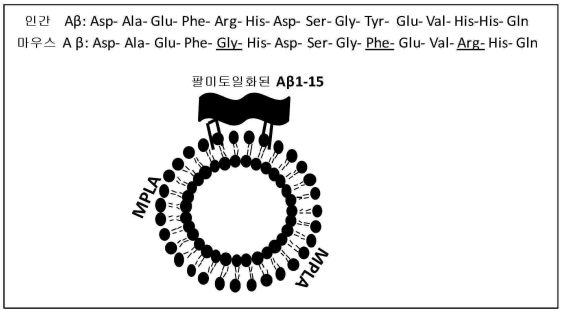
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **백신 요법**

(57) 요 약

본 발명은 다운증후군(DS)의 젊은 환자 내지 중년 환자의 아밀로이드 관련 병리학을 치료 및 예방하기 위한 수단을 제공한다. 특히, 본 발명은 다운증후군(DS)의 젊은 환자 내지 중년 환자의 아밀로이드 관련 병리학의 예방적 치료에 사용하기 위한 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 유도된 항원성 펩티드 단편(fragment)를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/385 (2013.01)
(72) 발명자
마다니, 리메
스위스, 체하-1006 라우산느, 체민 뒤 바닐 4
벨리첸코, 파벨, 바실리에비치
미국, 캘리포니아, 샌 디에고, 유닛 디, 마운트 알리판 플레이스 4161
모블리, 윌리엄
미국, 캘리포니아, 라 졸라, 빌라 207, 프로스펙트 스트리트 464

명 세 서

청구범위

청구항 1

애주번트(adjuvant), 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께 치료적 유효량으로 리포솜 내에서 재구성된 테트라-팔미토일화된 Aβ1-15 항원성 펩티드 단편을 포함하는, 다운증후군을 갖는 환자의 기억 손상 또는 이상, 인지의 손상 또는 이상, 또는 양쪽 모두의 치료 또는 경감용 조성물로서, 상기 다운증후군 환자는 나이가 40세 미만이고, 뇌에서 Aβ-연관 플라크가 아직 전개되지 않은 것인, 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 다운증후군을 갖는 환자의 인지 용량의 보유를 증진시키기 위한, 조성물.

청구항 3

애주번트(adjuvant), 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께 치료적 유효량으로 리포솜 내에서 재구성된 테트라-팔미토일화된 Aβ1-15 항원성 펩티드 단편을 포함하는, 다운증후군을 갖는 환자의 기억 손상 또는 이상, 인지의 손상 또는 이상, 또는 양쪽 모두의 치료 또는 경감용 조성물로서, 상기 다운증후군 환자는 나이가 40세 미만이고, 뇌에서 Aβ-연관 플라크가 아직 전개되지 않은 것이고, 상기 손상 또는 이상은 인식 기억(recognition memory) 또는 맥락적 연상 기억(contextual associative memory) 또는 양쪽 모두의 손상 또는 이상인, 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 손상 또는 이상은 맥락적 연상 기억의 손상 또는 이상인, 조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 손상 또는 이상은 인식 기억의 손상 또는 이상인, 조성물.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 다운증후군을 갖는 환자의 인지 용량의 보유를 증진시키기 위한, 조성물.

청구항 7

애주번트(adjuvant), 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께 치료적 유효량으로 리포솜 내에서 재구성된 테트라-팔미토일화된 Aβ1-15 항원성 펩티드 단편을 포함하는, 다운증후군을 갖는 환자의 기억 손상 또는 이상, 인지의 손상 또는 이상, 또는 양쪽 모두의 치료 또는 경감용 조성물로서, 상기 다운증후군 환자는 나이가 40세 미만이고, 뇌에서 Aβ-연관 플라크가 아직 전개되지 않은 것이고, 상기 치료는

a) 기억의 개선 또는 회복; 또는

b) 치료되는 환자의 인지 용량의 보유의 증진

을 가져오는 것인, 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 다운증후군을 갖는 환자의 인지 용량의 보유를 증진시키기 위한, 조성물.

청구항 9

애주번트(adjuvant), 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께 치료적 유효량으로 리포솜 내에서 재구성된 테트라-팔미토일화된 Aβ1-15 항원성 펩티드 단편을 포함하는, 다운증후군을 갖는 환자의 기억 손상 또는 이상, 인지의 손상 또는 이상, 또는 양쪽 모두의 치료 또는 경감용 조성물로서, 상기 다운증후군 환자는

나이가 40세 미만이고, 뇌에서 Aβ-연관 플라크가 아직 전개되지 않은 것이고, 상기 치료는

a) 기억의 개선 또는 회복; 또는

b) 치료되는 환자의 인지 용량의 보유의 증진

을 가져오는 것이며,

상기 치료는 수막뇌염(meningoencephalitis) 및 미세출혈(microhemorrhage)을 유도하지 않는 것인, 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 다운증후군을 갖는 환자의 인지 용량의 보유를 증진시키기 위한, 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다운증후군(DS)의 젊은 환자 내지 중년 환자의 아밀로이드 관련 병리학을 치료하기 위한 수단을 제공하는 것이다. 특히, 본 발명은 다운증후군(DS)의 젊은 환자 내지 중년 환자의 알츠하이머 질환(AD)-유사 치매의 치료에 사용하기 위한 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 유도된 항원성 펩티드 단편(fragment)을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 유전 장애인 다운증후군(DS)은 가장 일반적인 삼염색체성(trisomy)이며 신생아 700-1000명 중 한 명으로 발생한다. 추정치는 35세 초과 연령의 다운증후근이 있는 개인의 25% 이상이 알츠하이머 유사 치매의 징후 및 증상을 나타낸다는 것을 제시한다(Stanton L.R 및 Coetzee R.H, 2004). 백분율은 연령과 함께 증가한다. DS에서, 전체 또는 일부 이상의 염색체 21은 3중으로 존재한다(Antonarakis 등, 2004; Moncaster 등, 2010). 결과적으로 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 유전자의 3 카피는 과량의 아밀로이드-β(Aβ)의 발생을 초래하며, 주 이상 단백질 중의 하나가 알츠하이머 질환(AD)에 책임이 있다는 것은 공지되어 있다(Ballard 등, 2011). 그러므로, Aβ는 대부분의 DS사람들 중 AD-유사 치매에 대하여 가능한 역할을 한다는 것을 제시한다.(Lee 등, 2005;Liu 등, 2005;Gilman 등, 2005).

[0003] 다운증후군을 갖는 사람들에서, AD-유사 기억 결함은 몇몇 병리학적 단백질에 관련될 수 있다. Aβ 증가는 이미 배아기에서 시작되어, 출생시 진행되며 연령이 증가함에 따라 계속해서 증강된다(Stoltzner 등, 2000). 또한, DS의 젊은 사람들보다 더 나이든 사람(>40 년)이 Aβ42의 뇌척수액(CSF) 레벨은 더 낮으며 타우(tau) 레벨은 더 높았다(Tapiola 등, 2001). Aβ가 일단 플라크 내에 침착되면, Apo E는 12세 때 많은 플라크에서 검출될 수 있으며 연령이 증가함에 따라 꾸준히 증가된다(Lemere 등, 1996). 신경섬유 매듭(Neurofibrillary tangles)(NFTs)은 40대 동안 DS의 뇌에서 발견된다. 이들 NFT는 타우 축적물로부터 초래되는 것으로 생각된다. 과인산화(hyperphosphorylation)는 Dyrk1A(이중-특이성 티로신-포스포릴화 및 조절 키나아제 1A(dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A))로 명명된 키나아제의 과발현에 의해 야기될 수 있다는 것을 나타낸다(Lemere 등, 1996;Liu 등, 2008). 그러므로, DS의 사람들은 40세까지 아밀로이드-관련 병리학이 전개될 수 있으며 대부분은 60세까지 인지 저하 및 기억 손상과 같은 알츠하이머와 유사한 임상 증상을 갖는다(Stanton 2004).

[0004] DS를 갖는 개인들은 주로 그들의 다양한 건강 문제(예컨대, 심장 결함, 감염 및 갑상선저하증)에 대하여 건강 관리를 받지만, 신경병리학적 성향(neuropathological trait), 즉 정신 장애 및 기억 결핍증에 대한 특정 치료는 드물게 고려된다. 현재, 소수의 임상 시도가 진행중이며, 모두 정신 능력 향상 또는 신경 손상 감소에 목적을 두고 있다. DS 치료용 약물은 또한 AD에서 사용될 수 있으며 모두 리바스티그민(Rivastigmine) 또는 도네페질(Donepezil), 콜린에스테라아제(cholinesterase) 억제제 및 메만틴(Memantine), NMDA 수용체 길항제와 같은

콜린성 시스템 또는 글루타메이트의 신경전달(glutamatergic neurotransmission)에 작용한다(Prasher, 1993; Prasher, 2004). 그러나, 효능의 증거는 DS 사람들에 대하여 결여되어 있다. 현재, 표적화-Aβ-면역요법을 비롯한 많은 아밀로이드-변형 치료가 검토되고 있다(Rafii, 2010). 몇몇 백신은 마우스 AD 모델에서 뇌의 Aβ부하(burden)의 효율적인 감소 및 인지 저하의 역전을 나타낸 후, 최근 임상 단계에 도달했다(Weiner 및 Frenkel, 2006). AD와는 대조적으로, 면역요법 표적화 Aβ는 DS에서 다루어지지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러므로 다운증후군(DS) 환자의 아밀로이드-관련 병리학과 연관된 임상 증상의 치료가 필요하다. 특히, 다운증후군(DS) 환자의 기억 용량의 향상 또는 회복을 초래하는 치료가 필요하다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 범주 내에서, 이러한 필요에 부합되도록 도움이 되는 방책 및 수단이 제공된다. 특히, 본 발명은 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자 중 AD-유사 인지 손상의 치료에 사용하기 위한 항원성 펩티드를 제공한다.

[0007] 제1 실시 양태에서, 본 발명은 뇌에서 Aβ 연관 플라크가 아직 전개되지 않은 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자, 특히 다운증후군의 젊은 환자의 기억 및/또는 인지(memory and/or cognitive)의 손상 또는 이상, 특히 AD-유사 기억 및/또는 인지의 손상 또는 이상을 치료, 경감 및/또는 예방하기 위해 사용되는 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 유도된 항원성 펩티드 단편, 또는 상기 항원성 펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0008] 어떤 실시 양태에서, 본 발명은 뇌에서 Aβ 연관 플라크가 이미 전개된 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자의 기억 및/또는 인지의 손상 또는 이상, 특히 AD-유사 기억 및/또는 인지의 손상 또는 이상을 치료, 경감 및/또는 예방에 사용되는 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 유도된 항원성 펩티드 단편, 또는 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 상기 항원성 펩티드를 포함하는 조성물의 사용이 고려된다.

[0009] 한 실시 양태에서, 본 발명에 따른 항원성 펩티드 또는 조성물로 치료될 환자 군은 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자, 특히 65세 미만, 특히 60, 55 또는 50 미만인 환자를 포함한다. 한 실시 양태에서, 0 내지 65세, 특히 5 내지 55세, 특히 10 내지 50세, 특히 15 내지 45세, 특히 20 내지 40세, 특히 25 내지 35세의 환자가 본 발명에 따른 항원성 펩티드 또는 조성물로 치료될 수 있다.

[0010] 본 발명의 목적을 위해, 젊은 환자는 35세 미만의 환자, 특히 0 내지 35세, 특히 1 내지 30세, 특히 5 내지 25세의 환자를 나타낸다.

[0011] 본 발명의 목적을 위해, 중년 환자는 36 내지 65세. 특히 40 내지 60세, 특히 45 내지 55세의 환자를 나타낸다.

[0012] 한 실시 양태에서, 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 항원성 펩티드 또는 조성물을 사용하여 기억 및/또는 인지 손상 또는 이상, 특히 AD-유사 기억 및/또는 인지 손상 또는 이상으로 고통받고 있는 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자의 치료는 상기 손상 또는 이상의 개선 또는 회복, 특히 기억 개선, 특히 인식 기억(recognition memory) 및/또는 맥락적 연상 기억(contextual associative memory)의 개선 또는 회복을 초래한다.

[0013] 한 실시 양태에서, 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 항원성 펩티드 또는 조성물을 사용하여 인지 손상 또는 이상, 특히 AD-유사 기억 및/또는 인지 손상 또는 이상으로 고통받고 있는 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자의 치료는 치료된 환자의 기억력(retention) 증진 또는 인지 기억 용량의 완전한 회복을 초래한다.

[0014] 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 항원성 펩티드를 사용한 다운증후근의 젊은 환자 내지 중년 환자의 AD-유사 인지 손상 또는 이상의 치료는 수막뇌염(meningoencephalitis) 및 미세출혈(microhemorrhage)과 같은 원치 않는 부작용을 유도함이 없이 본원에서 개시된 바와 같은 치료효과를 나타낸다.

[0015] 한 실시 양태에서, 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 항원성 펩티드는 프리온(prion) 단백질, 타우 단백질, 알파-시누클레인(alpha-synuclein), 헌팅틴(huntingtin) 및 아밀로이드-β로 이루어진 군으로부터 선택된 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드-유사 단백질, 또는 상기 펩티드의 하나 이상의 조합으로부터 유도된다.

[0016] 상기 Aβ항원성 펩티드 단편은 본 발명의 한 실시 양태에서, Aβ펩티드의 N-말단부, 특히 Aβ-15 단편으로부터의 5 이상, 특히 6 이상, 특히 7 이상, 특히 8 이상, 특히 9 이상, 특히 10 이상, 특히 11 이상, 특히 12 이상, 특히 13 이상, 특히 14 이상, 특히 모든 아미노산 잔기를 포함하는 N-말단부에 상응한다.

[0017] 한 실시 양태에서, Aβ 항원성 펩티드 단편은 Aβ1-16 단편, Aβ1-17 단편, Aβ1-18 단편, Aβ1-19 단편, Aβ1-20 단편, Aβ1-22 단편, Aβ1-23 단편, Aβ1-24 단편, Aβ1-25 단편 또는, Aβ1-26 단편, 또는 3-15 Aβ단편으로부터의 5 이상, 특히 6 이상, 특히 7 이상, 특히 8 이상, 특히 9 이상, 특히 10 이상, 특히 11 이상, 특히 12 이상, 특히 13 이상, 특히 14 이상, 특히 15 이상, 특히 모든 아미노산 잔기를 포함하는 Aβ펩티드의 N-말단부에 상응한다.

[0018] 한 실시 양태에서, Aβ 항원성 펩티드 단편은 Aβ20-40 또는 Aβ20-42 단편, Aβ21-40 또는 Aβ21-42 단편, Aβ22-40 또는 Aβ22-42 단편, Aβ23-40 또는 Aβ23-42 단편, Aβ24-40 또는 Aβ24-42 단편, Aβ25-40 또는 Aβ25-42 단편, Aβ26-46 또는 Aβ27-42 단편, 또는 Aβ27-40 또는 Aβ27-42 단편, 또는 Aβ29-40으로부터의 5 이상, 특히 6 이상, 특히 7 이상, 특히 8 이상, 특히 9 이상, 특히 10 이상, 특히 11 이상, 특히 12 이상, 특히 13 이상, 특히 14 이상, 특히 15 이상, 특히 모든 아미노산 잔기를 포함하는 Aβ 펩티드의 C-말단부에 상응한다.

[0019] 한 실시 양태에서, Aβ항원성 펩티드 단편은 Aβ15-35, 특히 Aβ20-35 단편으로부터의 5 이상, 특히 6 이상, 특히 7 이상, 특히 8 이상, 특히 9 이상, 특히 10 이상, 특히 11 이상, 특히 12 이상, 특히 13 이상, 특히 14 이상, 특히 15 이상, 특히 모든 아미노산 잔기를 포함하는 Aβ펩티드의 중간부에 상응한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시 양태에서, 전체 길이의 Aβ1-39, Aβ1-40, 또는 Aβ1-42 단편이 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 어떤 실시 양태에서, 본원에서 개시된 바의 Aβ항원성 펩티드 단편은 하나 이상 변형된 또는 인위적인 아미노산 잔기를 함유할 수 있다.

[0022] 본 발명의 어떤 실시 양태에서, Aβ항원성 펩티드 단편의 사용은 Aβ펩티드의 N-말단부로부터의 13 및 15 사이의 인접한 아미노산 잔기의 단일 또는 반복적인 스트레치로 이루어진 단편이 아닌 것, 특히, 상기 13 내지 15 아미노산 잔기의 인접한 스트레치가 Aβ펩티드의 N-말단 단편 1-16 또는 1-17로부터, 특히 잔기 1-15, 1-14, 및 1-13으로 이루어진, 특히 WO 2007/068411호에 개시된 서열 식별 번호 1로 주어진 $Aβ_{1-15}$ 펩티드 항원 및 서열 식별 번호 3으로 주어진 $Aβ_{1-16(△14)}$으로 이루어진 군에서 선택된 Aβ펩티드의 N-말단부로부터 수득되는 단편이 아닌 것을 고려한다. 한 실시 양태에서, 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 항원성 펩티드는 예컨대 소수포(vesicle), 미립자체(particulate body) 또는 분자와 같은 담체 내에서 재구성(reconstituted)되어 존재하거나, 특히, 리포솜 내에서 재구성된다.

[0023] 한 실시 양태에서, 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 항원성 펩티드는 담체 또는 리포솜 표면상에서 단일 또는 반복적인 배열로 존재한다.

[0024] 한 실시 양태에서, 상기 담체 또는 리포솜의 표면상에서 고도로 반복적인 배열은 10 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 50 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 100 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 200 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 300 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자; 특히 400 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 500 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자를 포함한다.

[0025] 본원에서 기술된 바의 본 발명의 항원 조성물은 30% 초과, 특히 40% 초과, 특히 50% 초과, 특히 60% 초과, 특히 70% 초과, 특히 80% 초과, 특히 90% 초과, 특히 95% 초과 및 100% 까지가 베타-시이트 입체형태인 입체형태 항원(conformal antigen), 특히 본원에서 기술된 바와 같은 Aβ항원을 포함할 수 있다.

[0026] 항원성 펩티드의 원하는 입체 형태의 형성 및 안정화는 예컨대, 소수포, 미립자체 또는 분자와 같은 담체 또는 항원성 펩티드에 대하여 담체/애주번트(adjuvant)로서 적절히 작용할 수 있는 기타 수단에 부분적으로 또는 완전히 부착시키거나 또는 혼입시키거나 또는 재구성시킨 항원성 펩티드를 존재하게 함으로서 성취될 수 있다. 본 발명의 특정 실시 양태에서, 항원성 펩티드는 입체형태의 변화를 방지하거나 또는 심하게 제한하도록 상기 항원성 펩티드의 삼차원적 움직임에 대한 자유를 제한함으로서 유지 및 안정화되는, 특정 입체 형태로 펩티드가 담체 표면상에 존재하도록, 예컨대, 반데르발스, 소수성 또는 정전기 상호 작용과 같은 약한 상호 작용, 또는 2 이상의 상기 상호 작용의 조합을 통해 담체 내에서 부착, 또는 혼입 또는 재구성된다.

[0027] 소수포, 입자 또는 미립자체가 예컨대 리포솜과 같은 담체/애주번트로서 사용될 때, 항원성 펩티드의 조성물은

그의 전체 순 전하(net charge)가 펩티드가 부착된 담체/애주번트 표면의 것과 동일하도록 선택될 수 있다. 동일하게 하전된 담체/애주번트 표면과 항원성 펩티드 사이, 그러나 특히 동일하게 하전된 담체 표면과 항원성 펩티드로 구성된 아미노산 잔기 및 특히 더 동일하게 하전된 담체 표면과 동일하게 하전된 항원성 펩티드에 포함된 아미노산 잔기 사이에서의 효과적인 정전기 반발력은 높은 생물학적 활성을 보장하는 매우 특이적이고 안정화된 입체형태로 정의된 성질을 갖는 항원성 펩티드를 초래할 수 있다. 결과로서, 항원성 펩티드는 표적 유기체의 면역 시스템이 생물학적으로 활성인 입체 형태로 항원 조립물에 함유된 항원 결정기와 자유롭게 상호작용하도록 허용하는 매우 생물학적으로 활성인 입체 형태로 존재하거나 노출되며, 이것은 예컨대 표적 유기체에서 높은 항체 역가(titer)를 야기하는 강한 입체형태-특이적 면역 반응을 초래한다.

[0028] 면역원성 반응은 담체로서 리포솜을 사용하여 더 증진될 있으며, 이 리포솜은 본 발명에 따른 치료 백신으로 치료될 표적 동물 또는 인간의 면역 반응을 증진 또는 촉진하는 애주번트로서 기능할 수 있다. 임의로, 리포솜은 또한 예를 들어, 지질 A, 명반(alum), 인산 칼슘, 인터류킨 1, 및/또는 다당류 및 단백질의 마이크로캡슐, 그러나 특히 모노포스포릴 또는 디포스포릴 지질 A와 같은 무독화된(detoxified) 지질 A와 같은 애주번트, 또는 예를 들어, 명반, 인산 칼슘, 인터류킨 1, 및/또는 다당류 및 단백질의 마이크로캡슐, LPS, CpG ODN, Pam2CSK4, Pam3CSK4, dsRNA, ssRNA, 무라밀 디펩티드, Quil Q, QS-21과 같은 본 발명의 범주 내에서 적당하게 사용될 수 있는 기타 애주번트를 더 함유할 수 있다.

[0029] 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 리포솜은 당업자에게 알려진 것을 포함한다. 리포솜을 제조하기 위해 유용한 표준 지질이 사용될 수 있다. 표준 이중층 및 다중층 리포솜이 본 발명의 조성물을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 당업자에게 공지된 리포솜의 제조방법이 사용될 수 있지만, 가장 바람직한 리포솜은 여기에서 참고로 혼입된 알빙 (Alving) 등,「*Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992,(Lauer 등, 1992)」의 방법에 따라 제조되는 것이다. 리포솜은 전에 본원에서 기술된 바의 초분자(supramolecular) 조립물을 포함하는 담체로서 사용될 수 있으며 동시에 본 발명에 따른 치료 백신으로 치료될 표적 동물 또는 인간의 면역 반응을 증진 또는 촉진하기 위한 애주번트로서의 기능을 할 수 있는 이중 기능을 가질 수 있다. 임의로, 리포솜은 또한 예를 들어, 지질 A, 명반, 인산 칼슘, 인터류킨 1, 및/또는 다당류 및 단백질의 마이크로캡슐, 그러나 특히 지질 A, 특히 더 모노포스포릴 또는 디포스포릴 지질 A와 같은 무독화된 지질 A, 또는 명반과 같은 애주번트 또는 및 면역조절인자 또는 양자를 더 함유할 수 있다.

[0030] 리포솜은 디미리스토일 포스파티딜 콜린 (DMPC), 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPEA), 디미리스토일 포스파티딜 글리세롤(DMPG) 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 구성 성분으로 구성될 수 있다.

[0031] 한 실시 양태에서, 본 발명은 리포솜막에서 양이온 지질에 대한 대체물로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 음이온 지질의 사용을 고려한다:

[0032] a. 헤드그룹(headgroup) 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린, 포스파티딜 이노시톨, L-α-포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 또는 포스파티드산을 갖는 디아실-인지질;

[0033] b. 헤드그룹 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린 또는 포스파티드산을 갖는 리소(lyso)-인지질, 및

[0034] c. 카르디올리핀, 디리소-카르디올리핀, 모노리소-카르디올리핀

[0035] 한 양상에서, 본 발명은 리포솜막 내의 음이온 지질에 대한 대체물로서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 양이온 지질의 사용을 고려한다:

[0036] a. 헤드그룹 3-트리메틸암모늄-프로판, 3-디메틸암모늄-프로판, 3-에틸포스포-콜린 또는 3-포스파티딜에탄올아민을 갖는 디아실-인지질;

[0037] b. D-에리트로-스핑고신, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, N-[1-(2, 3-디미리스틸옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-(2-히드록시에틸) 암모늄 브로마이드, N,N,N-트리메틸-2-비스[(1-옥소-9-옥타데세닐)옥시]-(Z,Z)-1-프로판아미늄 메틸 술페이트 또는 3β[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일]콜레스테롤 히드로클로라이드.

[0038] 본 발명의 한 실시 양태에서, 상기 헤드그룹에 부착된 지질 사슬은

[0039] a. 포화 또는 불포화될 수 있으며,

[0040] b. n 이 3 내지 24인 $(CH_2)_n$으로부터 길이가 가변적일 수 있고, 및

[0041] 대칭으로 또는 비대칭으로 치환될 수 있다.

[0042] 한 실시 양태에서, 본원에서 기술된 바의 본 발명의 항원 조성물은 리포솜 제제 및 애주번트, 특히 지질 A, 명반, 인산 칼슘, 인터류킨 1, 및/또는 다당류 및 단백질의 마이크로캡슐, 그러나 특히 지질 A, 특히 더, 모노포스포릴 또는 디포스포릴 지질 A와 같은 무독화된 지질 A, 또는 명반을 포함한다.

[0043] 본원에서 기술된 바의 리포솜으로 포매된(embedded) 친유성 부분과 커플된 Aβ 펩티드를 포함하는 본 발명의 리포솜 조성물은 본원에서 개시된 방법론에 따라 제조될 수 있다.

[0044] 리포솜이 담체/애주번트로서 사용될 때, 본원에서 제공된 바의 항원성 펩티드는 적절히/애주번트의 지질 이중층으로의 삽입을 용이하게 하는 친유성 또는 소수성 부분에 커플링 함으로서 더 변형될 수 있다. 상기 소수성 부분은 지방산, 트리글리세리드, 디글리세리드, 스테로이드, 스핑고지질, 당지질 또는 인지질일 수 있다.

[0045] 특이적 실시 양태에서, 친유성 또는 소수성 부분은 1 이상의 탄소 원자, 특히 2 이상의 탄소 원자, 특히 3 이상의 탄소 원자, 특히 4 이상의 탄소 원자, 특히 6 이상의 탄소 원자, 특히 8 이상의 탄소 원자, 특히 12 이상의 탄소 원자, 특히 16 이상의 탄소 원자의 탄소 주쇄(carbon backbone)를 갖는 알킬기 또는 지방산이다.

[0046] 친유성 또는 소수성 부분은 지방산, 트리글리세리드 및 인지질일 수 있으며 여기에서 지방산 탄소 주쇄는 4 이상의 탄소 원자를 가지며, 특히 친유성 부분은 약 14 이상의 탄소 원자 및 약 24까지의 탄소 원자의 탄소 주쇄가 있는 지방산을 가지며, 특히 더 소수성 부분은 14 이상의 탄소 원자의 탄소 주쇄를 갖는 것이다. 소수성 부분의 예는 이것으로 제한되는 것은 아니지만, 팔미트산, 스테아르산, 미리스트산, 라우르산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산 및 콜레스테롤 또는 DSPE를 포함한다. 본 발명의 특이적 실시 양태에서 소수성 부분은 팔미트산이다.

[0047] 본 발명의 특이적 실시 양태에서, 본원에서 기술된 바의 본 발명의 항원 조성물은 2개의 팔미트산 부분, 특히 4개의 팔미트산 부분을 포함하는 펩티드 항원을 포함한다.

[0048] 리포솜 이중층에서 펩티드를 위한 고정(anchor)을 제공하면서, 비교적 감소된 $C_{16:0}$ 지방산 부분의 길이로 인하여 팔미토일화(palmitoylation)는 리포솜 표면상에 또는 아주 근접하게 노출되어 존재하는 펩티드를 야기한다. 그러므로, 항원을 처리하는 세포는 펩티드와 함께 전체 리포솜을 흡수해야만 할 것이다.

[0049] 본 발명의 항원 조립물은, 한 실시 양태에서, PEG화(pegylation)(폴리에틸렌 글리콜 또는 변형된 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여)를 통해 변형된 펩티드 또는 전에 본원에서 기술된 바와 같은 팔미트산, 폴리-아미노산(예컨대, 폴리-글리신, 폴리-히스티딘), 폴리-사카라이드(예컨대, 폴리갈락투론산, 폴리락트산, 폴리글리콜리드, 키틴, 키토산), 합성 중합체(폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리에스테르) 또는 공중합체(예컨대, 폴리(메타크릴산) 및 N-(2-히드록시) 프로필 메타크릴아미드) 등에 의한 기타 방법을 통해 변형된 펩티드를 포함할 수 있다.

[0050] PEG가 항원 조립물의 제조에 사용된다면, 유리 PEG 말단은 공유 결합으로 포스파티딜에탄올아민(여기에서, 지방산은 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 올레산 등, 또는 그의 조합일 수 있다)의 분자에 부착될 수 있다. 이러한 초분자 구조는 인지질 및 콜레스테롤(다양한 몰비의 포스파티딜에탄올 아민, 포스파티딜 글리세롤, 콜레스테롤)로 이루어진 리포솜 내에서 재구성될 수 있다. 기타 인지질이 사용될 수 있다. 지질 A는 약 40㎍/pmole의 인지질의 농도로 사용될 수 있다.

[0051] 어떤 실시 양태에서, 본 발명의 항원 조립물은 전에 본원에서 기술된 바와 같이 적어도 하나의 각 말단에서, 그러나 특히 1 또는 2의 각 말단에서 PEG화된 라이신에 공유 결합으로 부착된 항원성 펩티드 서열을 포함한다. PEG(폴리에틸렌글리콜) 사슬의 길이는 n=8 내지 n=150,000 이상, 특히 n=10 내지 n=80,000, 특히 더 n = 10 내지 n=10,000으로 변할 수 있다. 본 발명의 특이적 실시 양태에서, PEG 사슬의 길이는 n=45 이하, 특히 n=5 내지 n=40, 특히 더 n=10 내지 n=30, 및 더욱 더 특히 n=10이다.

[0052] 어떤 실시 양태에서, 본 발명은 본원에서 그의 전체를 포함시킨 EP 출원 제10188832호 개시물에 기술된 바와 같이 상이한 농도의 예비 형성된(preformed) 리포솜의 외층에 상이한 펩티드(예컨대, 항원) 타입 및/또는 애주번트 타입을 후-삽입(post-insertion)하는 것을 고려한다. 이러한 후-삽입 방법은 용액에서 리포솜을 예비 형성(preforming)하고, 변형된 항원성 펩티드가 미셀 형태(micellar form)로 이용될 수 있도록 소수성 부분을 통한 항원성 펩티드의 변형을 포함한다. 그 방법은 미셀 분해(breakdown)를 유도후 예비 형성된 리포솜으로 통합하여 미셀로부터 항원성 펩티드의 방출을 더 포함한다. 통합 방법은 리포솜의 (인)지질 이중층과 변형된 항원 및/또는 애주번트의 소수성 상호 작용에 의해 추진된다. 특히, 변형된 항원성 펩티드 및/또는 애주번트의 리포솜 외층으로의 가용화는 화학 반응 또는 추가 분자 변형의 도움없이, 계면활성제의 임계 미셀 농도 이하에서 가용화된 항원성 펩티드 또는 애주번트(초기에 미셀 형태로 존재)를 희석하여 성취된다. 항원성 펩티드 또는 애주

번트의 유리 형태는 그후 인지질의 아실 부분에서 그의 소수성 도메인의 가용화로 인하여 리포솜의 외층에서 통합된다. 따라서, 상기 방법은 각각의 필요에 따라, 하중에 대하여 이용가능한 "엠프티 리포솜(empty liposomes)"의 스톡을 제공한다.

[0053] 특히, 리포솜에서 재구성된 소수성 부분을 통해 변형된 관계의 항원성 펩티드를 포함하는 리포솜-기재 항원 조립물의 후-삽입 제조 방법은, i) 용액 내에서 리포솜을 제조하는 단계; ii) 하나 이상의 소수성 부분에서 펩티드 분자의 N- 및/또는 C-말단에 첨가하여 변형된 항원성 펩티드를 제조하는 단계; iii) 계면활성제의 존재하에 변형된 항원성 펩티드를 가용화 하는 단계; iv) 계면활성제의 임계 미셀 농도(CMC) 이하에서 가용화된 펩티드 및, 임의로, 애주번트를 희석하는 단계; 및 v) 상기 항원성 펩티드 및, 임의로, 상기 애주번트를 예비 형성된 리포솜 제제에 첨가하고 첨가된 펩티드 및, 임의로, 첨가된 애주번트를, 특히 화학 반응 또는 추가의 분자 변형의 도움 없이, 리포솜의 외층으로 가용화하여, 희석된, 가용화된 항원성 펩티드 및, 임의로, 애주번트가 있는 예비 형성된 리포솜을 적재하는 단계를 포함한다.

[0054] 유리하게, 이 방법은 리포솜 이중층의 외층을 직면하는 리포솜 상에서 특유의 분자 디스플레이와 혼합된 펩티드 및/또는 애주번트의 높은 수율을 초래한다. 특히, 적어도 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100%까지의 재구성된 항원성 펩티드가 그의 소수성 부분을 통해 지질 이중층으로 삽입된 리포솜의 표면상에 존재한다.

[0055] 이 방법은 또한 0.4 내지 0.6, 특히 0.45 내지 0.55의 범위, 특히 0.5의 다분산 지수를 갖는 균일한 크기 분포를 나타내는 리포솜 제제를 야기한다. 또한, 이 방법 및 조립물은 면역 시스템에 대하여 펩티드 및/또는 애주번트의 높은 생체 이용률 및 그 결과, 개선된 면역 반응을 허용한다. 애주번트 분해(degradation), 예컨대, MPLA 분해는 최소화되거나 또는 전혀 존재하지 않으며, 따라서, 증진된 배치 재현성이 제공된다. 상기 방법에 의해 제조된 조립물은, 안정하며, 무균 여과할 수 있고 부 면역 반응을 유도하지 않는다.

[0056] 어떤 실시 양태에서, 항원성 펩티드는 매우 반복적인 배열, 특히 10 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 50 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 100 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 200 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 300 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자; 특히 400 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자, 특히 500 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자를 포함하는 반복적인 배열로 담체 분자의 표면상에 존재한다.

[0057] 본 발명의 어떤 실시 양태에서, 항체는 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자의 기억 및/또는 인지 손상 또는 이상, 특히 AD-유사 기억 및/또는 인지 손상 또는 이상의 치료, 경감 및/또는 예방을 위한 본원에서 기술된 바와 같이 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있으며, 이 항체는 본원에서 개시된 항원 조립물중 어느 하나에 반응하여 생성된다. 이 항체는 다중클론 항체, 단일클론 항체, 인간화(humanized) 항체, 완전한 인간(fully human) 항체, 다이아바디(diabody), 카멜리드(camelid) 항체 또는 실질적으로 동일한 전술한 항체의 기능 단편일 수 있다.

[0058] 본원에서 사용된 용어 "항체" 또는 "항체들"은 당업계에서 인식되는 용어를 사용한 것이며, 공지 항원에, 특히 면역글로불린 분자에 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편, 즉, 면역특이적으로 항원을 결합하는 결합 부위를 함유하는 분자를 나타내는 것으로 이해된다. 본 발명에 따른 면역글로불린은 임의의 타입(IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY) 또는 클래스(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 서브클래스 일 수 있다.

[0059] "항체들"은 단일클론 항체, 다중클론, 키메라, 단일 사슬, 이중 특이(bispecific), 원숭이화(simianized), 인간 및 인간화 항체들 뿐만 아니라 그의 활성 단편들을 포함하여 본 발명의 범주 내인 것을 의미한다. 항원들에 결합하는 분자의 활성 단편들의 예는 상술한 항체들 및 단편들의 Fab 면역글로불린 발현 라이브러리 및 에피토프-결합 단편들의 생성물을 포함하는 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편들을 포함한다.

[0060] 이들 활성 단편들은 다수의 기술에 의해 본 발명의 항체로부터 유도될 수 있다. 예를 들어, 정제된 단일클론 항체들은 펩신과 같은 효소로 절단될 수 있으며, HPLC 겔 여과가 수행될 수 있다. Fab 단편들을 함유하는 적절한 분획은 그후 막 여과 등에 의해 수집 및 농축될 수 있다. 항체들의 활성 단편들의 단리를 위한 일반 기술의 추가적인 설명을 위해, 예를 들어, 「Khaw, B. A. 등 J. Nucl. Med. 23:1011-1019(1982); Rousseaux 등 Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986」를 참조한다.

[0061] "인간화 항체"는 비-인간 도너 면역글로불린으로부터 유도된 그의 CDR을 갖는 유전자 조작된(engineered) 항체의 타입을 나타내며, 잔존하는 분자의 면역글로불린-유도 부분은 하나(또는 그 이상)의 인간 면역글로불린(들)

로부터 유도된다. 또한, 프레임워크 지지 잔기는 결합 친화성을 보존하기 위해 교대될 수 있다. "인간화 항체들"을 수득하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다(예컨대, 「Queen 등, Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032(1989), Hodgson 등, Bio/Technoloy, 9:421(1991)」 참조).

[0062] "인간화 항체"는 또한 예를 들어, 토끼와 같은 큰 동물에서 친화-성숙된(affinity-matured) 인간유사 다중클론(humanlike polyclonal) 항체들의 제조를 가능하게 하는 신규 유전자 조작 접근에 의해서도 수득될 수 있다.

[0063] 용어 "단일 클론 항체"는 또한 당업계에서 잘 인식하고 있는 것이며 단지 하나의 항원만 인식하는 단일 클론으로부터 실험실에서 대량 생산된 항체를 나타낸다. 전형적으로 단일클론 항체들은 보통 단명하는, 항체-생성 B 세포를 암세포(때때로 "불멸(immortal)" 세포로서 언급됨)와 같은 급성장 세포로 융합하여 만들어 진다. 수득한 하이브리드 세포, 또는 하이브리도마는 급속히 증식하여 다량의 항체를 생성하는 클론을 만들어 낸다.

[0064] 한 실시 양태에서 치료백신일 수 있는 면역원성 조성물은 전에 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 항원 조립물을 치료적 또는 예방적 유효량으로 포함하며, 하기 기술되는 바와 같이, 예컨대 본 발명의 조성물을 사용할 수 있도록 하는 키트와 관련하여 주사 전 가용화를 위해 적당한 액체 용액으로서, 또는 주사할 수 있는 현탁액으로서, 또는 이밖에 고체 형태로 제조될 수 있다.

[0065] "치료적 또는 예방적 유효량"은, 인간 또는 동물에게 투여될 때, 상기 인간 또는 동물의 치료 또는 예방 효과를 초래하는 항체, 펩티드, 화합물 또는 약제학적 조성물의 양을 나타낸다. 유효량은 하기 정규 절차에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0066] 본 발명의 면역원성 조성물은 인간 또는 동물, 특히 AD-유사 인지 손상 또는 이상을 앓고 있는 다운증후군의 인간 또는 동물에게 투여되어, 질환과 연관된 상기 AD-유사 증상을 완화시키거나 또는 질환에 의해 영향을 받지 않은 건강한 개인에서 찾을 수 있는 병태를 회복시켜 상기 인간 또는 동물의 면역 반응을 유도시킬 수 있다.

[0067] 사실상 모든 다운증후군 환자들이 결국 삶의 어느 시점에서 AD-유사 인지 손상으로 고통을 받을 것이므로, AD-유사 손상의 소견 전에 다운증후군 환자들에게 상기 백신을 투여하는 것이 또한 유익할 것이다. 상기 백신은 그후 예방적인 치료로서 작용할 수 있다.

[0068] 본 발명의 면역원성 조성물은 적절한 표준 투여 경로에 의해 인간 또는 동물에게 투여될 수 있다. 일반적으로, 조성물은 국소, 경구, 직장, 코 또는 비경구(예를 들어, 정맥내, 피하, 또는 근육내) 경로로 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 생분해성 중합체와 같은 서방성 매트릭스(sustained release matrices)에 혼입될 수 있으며, 중합체는 전달이 요구되는 곳의 근처, 예를 들어, 종양 부위에 주입된다. 이 방법은 단일 투여량의 투여, 소정 시간 간격에서 반복 투여량의 투여 및 소정 기간의 시간 동안 지속 투여를 포함한다.

[0069] 본 발명의 특이적 실시 양태에서, 본 발명에 따른 항원 조립물, 특히 치료적 유효량의 상기 항원 조립물을 포함하는 면역원성 조성물은 반복 투여량으로, 특히 1 내지 15 투여량으로, 특히 2 내지 10 투여량으로, 특히 더 3 내지 7 투여량으로 및 더욱더 특히 4 내지 6 투여량으로, 1 내지 10주의 시간 간격으로, 특히 1 내지 6주의 시간 간격으로, 특히 더 1 내지 4 주의 시간 간격으로, 및 더욱더 특히 2 내지 3주의 시간 간격으로 투여된다. 면역 반응은 부스팅(boosting)후 적당한 시간에서, 특히 부스팅 후 3 내지 10일, 특히 더 부스팅 후 4 내지 8일 및 특히 더 부스팅 후 5 내지 6일에 Sera 표본을 취하여 모니터하고 공지의 방법론, 특히 예를 들어, ELISA 측정법과 같은 일반적으로 사용된 면역측정법 중의 하나를 사용하여 항원 조립물의 면역원성을 측정한다.

[0070] 특히, 본 발명에 따른 항원성 펩티드 조성물은 비경구, 특히 복강내, 정맥내, 피하 및 근육내 주사로 투여된다.

[0071] 조성물의 복용량은 치료되는 병태, 사용된 특정 조성물 및 기타 임상 요소, 예컨대, 환자의 체중, 크기 및 병태, 체표면적, 투여될 특정 화합물 또는 조성물, 동시에 투여될 기타 약물, 및 투여 경로에 의존될 것이다

[0072] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 다운증후군과 연관된 증상의 치료를 위한 절차 및 기타 생물학적 활성 물질과의 조합으로 투여될 수 있다. 기타 생물학적 활성 물질은 혼합물 형태의 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 이미 포함하는 동일 조성물의 일부일 수 있으며, 면역원성 조성물 및 기타 생물학적 활성 물질은 동일한 약제학적으로 허용 가능한 용매 및/또는 담체와 혼합되거나 또는 키트의 부품의 형태로 개별적으로 또는 함께 제공될 수 있는 별개 조성물의 일부로서 개별적으로 제공될 수 있다.

[0073] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 기타 생물학적 활성 물질 또는 물질들과 동시에, 간헐적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 제 1 추가 생물학적 활성 물질과 동시에 또는 상기 조성물의 투여 전 또는 후에 순차적으로 투여될 수 있다. 적용 계획이 하나 초과의 추가적인 생물학적

활성 물질이 본 발명에 따른 하나 이상의 면역원성 조성물과 함께 투여되는 것으로 선택된다면, 그 화합물 또는 물질은 여러 가지 조합으로 부분적으로는 동시에 투여될 수 있고, 부분적으로는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0074] 그러므로, 본 발명의 또 다른 목적은 치료적 또는 예방적 유효량의 본 발명에 따른 면역원성 조성물 및 임의로, 하나 이상의 추가의 생물학적 활성 물질과의 혼합물, 뿐만 아니라 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자의 아밀로이드 관련 병리학의 효과의 예방 및/또는 치료 및/또는 경감, 특히 기억 손상 또는 이상의 개선 또는 회복, 특히 인식 기억 및/또는 맥락적 연상 기억의 개선 또는 회복을 위한 본 발명에 따른 이러한 조성물 또는 그의 혼합물의 사용 방법을 제공하는 것이다.

[0075] 본 발명에 따른 혼합물은 또한 본 발명에 따른 면역원성 조성물 이외에, 예를 들어, 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자에서 AD-유사 증상의 약물 처치에 사용된 공지 화합물과 같은 생물학적 활성 물질을 포함할 수 있다.

[0076] 기타 생물학적 활성 물질 또는 화합물은 본 발명에 따른 면역원성 조성물과 동일 또는 유사한 메커니즘에 의해 또는 관련없는 작용 메커니즘에 의해 또는 관련 및/또는 관련없는 작용 메커니즘의 다양성에 의해 그의 생물학적 효과가 발휘될 수 있다.

[0077] 일반적으로, 기타 생물학적 활성 화합물은 중성자-전달 증강제(neutron-transmission enhancer), 정신치료제(psychotherapeutic durgs), 아세틸콜린 에스테라아제 억제제, 칼슘-채널 차단제(blocker), 생원성(biogenic) 아민, 벤조디아제핀 진정제(tranquillizer), 아세틸콜린 합성, 저장 또는 방출 증강제, 아세틸콜린 시냅스 후부의 수용체 작용제, 모노아민 옥시다아제-A 또는 -B 억제제, N-메틸-D-아스파르테이트 글루타메이트 수용체 길항제, 비스테로이드성 항염증제, 항산화제, 및 세로토닌 수용체(serotonergic receptor) 길항제와 같은 신경 장애의 약물 처치에 사용된 화합물 또는 본원에서 개시된 바의 항원성 펩티드에 결합 및 그에 대한 항체를 포함할 수 있다.

[0078] 특히, 본 발명에 따른 혼합물은 산화적스트레스에 대한 화합물, 항-세포사멸 (anti-apoptotic) 화합물, 금속 킬레이터(chelator), 피렌제핀(pirenzepin) 및 대사물과 같은 DNA 수복 억제제, 3-아미노-1-프로판술폰산(3APS), 1,3-프로판디술포네이트(1,3PDS), 세크레타아제 활성제(secretase activator), β- 및 γ-세크레타아제 억제제, 타우 단백질(tau protein), 신경전달물질(neurotransmitter), β-시이트 파괴제(sheet breaker), 항-염증분자, 또는 타크린(tacrine), 리바스티그민(rivastigmine), 도네페질(donepezil), 및/또는 갈란타민(galantamine)과 같은 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs), 및 기타 약물 및 영양 보조제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기타 생물학적 활성 화합물을 본 발명에 따른 치료 백신, 및 임의로 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께 함유할 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 혼합물은 본 발명에 따른 면역원성 조성물과 함께 니아신(niacin) 또는 메만틴(memantine) 및, 임의로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제를 더 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명의 또 다른 구현예에서 제공되는 혼합물은, 환각(hallucination), 망상(delusion),(두드러진 사고산란(marked incoherence), 탈선(derailment), 사고이탈(tangentiality)로 표시되는) 사고 장애(thought disorder), 및 기묘한 또는 혼란된 행동, 뿐만 아니라 무쾌감증(anhedonia), 정서둔마(flattened affect), 무감동(apathy), 및 사회적 위축(social withdrawal)을 포함하는 양성 및 음성 정신병 증상의 치료를 위해, 예를 들어, 클로자핀(clozapine), 지프라시돈(ziprasidone), 리스페리돈(risperidone), 아리피프라졸(aripiprazole) 또는 올란자핀(olanzapine)과 같은, "비전형적 항정신병약(atypical antipsyotics)"을, 본 발명에 따른 면역원성 조성물 및/또는 치료 백신 및, 임의로, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및/또는 부형제와 함께 포함한다.

[0081] 본 발명에 따른 면역 조성물과 조합되어 혼합물에 적당하게 사용될 수 있는 기타 화합물은, 예를 들어 치료 약물 타겟(36-39면), 알칸술폰산 및 알칸올황산(39-51면), 콜린에스테라아제 억제제(51-56면), NMDA 수용체 길항제(56-58면), 에스트로겐(58-59면), 비스테로이드성 항-염증제(60-61면), 항산화제(61-62면), 퍼옥시좀 증식체-활성화된 수용체(peroxisome proliferators-activated receptor; PPAR) 작용제(63-67면), 콜레스테롤-저하제(68-75면); 아밀로이드 억제제(75-77면), 아밀로이드 형성 억제제(77-78면), 금속 킬레이터(78-79면), 항-정신병약 및 항-우울제(80-82면), 영양 보충제(83-89면) 및 뇌 내 생물학적 활성 물질의 유용성을 증가시키는 화합물(89-93면 참조) 및 프로드러그(93 및 94면)를 포함하는, 본원에서 참고로, 그러나 특히 상기 나타낸 면 상에서 언급된 화합물이 혼입된 문서인 WO 2004/058258호(특히 16 및 17면 참조)에 기술된다.

[0082] 본 발명의 한 실시 양태에서, 항원 조립물은 T-세포 에피토프를 함유하지 않는 Aβ 펩티드를 포함하며 따라서 과

활성화 보체(complement) 시스템에 의해 야기된 신경 합병증과 같은 잠재적인 부작용이 없는 것으로 제공된다. 이것은 보체 억제제와의 조합으로 Aβ펩티드 항원, 특히 팔미토일화된 Aβ 펩티드 항원, 특히 더 팔미토일화된 $A\beta_{1-15}$ 펩티드 항원, 그러나 특히 팔미토일화된 $A\beta_{1-15}$ 펩티드 항원, $A\beta_{1-15}$ 를 투여함으로서 본 발명의 범주 내에서 성취될 수 있다.

[0083] 보체 억제제는 가용성 인간 보체 수용체 1, 항- 인간 보체 단백질 C5와 예컨대 인간화 항 C5 단일클론 항체 또는 인간화 단일클론 항체의 단일-사슬 단편, C1-에스테라제 억제제-N 및 자연(Nature) 인간 C1 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물일 수 있다.

[0084] 예를 들어, 아밀로이드 베타 1-15 펩티드 항원과 같은 변형된 아밀로이드 펩티드 항원은 하기(니콜라우(Nicolau) 등, 2002)에 보고된 방법에 의해 합성될 수 있다. 니콜라우 등에서 보고된 접근법은 수지상에서 예비 형성된 펩티드의 말단 아미노산 잔기에 친유성 또는 소수성 부분을 그라프팅하여 더 변형되는 항원성 펩티드를 처음으로 합성하여 변형될 수 있다. 특히, 보호된 아미노산, 특히 Fmoc-보호된 아미노산은 공지의 커플링 화학을 사용하여 수지에 부착된다. 보호기는 제거되고 두번째 보호된 아미노산 잔기가 커플링된다. 그후, 공지의 보호 화학, 특히 Fmoc/tBu 화학을 사용한 표준 자동화 펩티드 합성 및 표준 측쇄(side-chain) 보호기는 이어서 아밀로이드 단백질 $A\beta_{1-42}$의 1 내지 15의 아미노산 상에서 커플링 하여 주어진 서열을 갖는 펩티드 단편을 생성함으로 서 Aβ항원성 펩티드, 특히 $A\beta_{1-15\ 항원성\ 펩티드}$를 합성하기 위해 사용된다. 최종 단계에서 추가의 두개의 보호된 아미노산은 성장 펩티드 단편에 커플링된다. 첫번째 두 개 및 마지막 두 개의 아미노산의 측쇄 상에서 Mtt기는 그후 선택적으로 절단되어 팔미트산에 커플링된다. 표준 방법론을 사용하여 수지의 세정 후, 보호기는 제거되고 수지는 동시에 절단되며, 이어서 측쇄가 탈보호된다. 최종 생성물은 그후 고순도로 수득 될 수 있으며 그의 실체는, 예를 들어, 전자분사 질량 분석법(electrospray mass spectrometry)과 같은 당업계의 공지 방법에 의해 확인된다.

[0085] 변형된 아밀로이드 Aβ 항원성 펩티드, 특히 변형된 $A\beta_{1-15}$ 항원성 펩티드는 리포솜, 특히 디미리스토일 포스파티딜 콜린(DMPC), 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPEA), 디미리스토일 포스파티딜 글리세롤(DMPG) 및 콜레스테롤로 제조되며, 임의로 모노포스포릴 지질 A를 함유하는 리포솜으로 이루어진 조립물 내에서 재구성될 수 있다.

[0086] 한 실시 양태에서, 본 발명은 리포솜 막의 양이온 지질에 대한 대체물로서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 음이온 지질의 사용을 고려한다:

[0087] a. 헤드그룹 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린, 포스파티딜 이노시톨, L-α-포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 또는 포스파티드산을 갖는 디아실-인지질;

[0088] b. 헤드그룹 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 세린 또는 포스파티드산을 갖는 리소-인지질, 및

[0089] c. 카르디올리핀, 디리소-카르디올리핀, 모노리소-카르디올리핀

[0090] 한 양상에서, 본 발명은 리포솜 막의 음이온 지질에 대한 대체물로서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 양이온 지질의 사용을 고려한다:

[0091] a. 헤드그룹 3-트리메틸암모늄-프로판, 3-디메틸암모늄-프로판, 3-에틸포스포콜린 또는 3-포스파티딜에탄올아민을 갖는 디아실-인지질;

[0092] b. D-에리트로-스핑고신, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, N-[1-(2, 3-디미리스틸옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-(2-히드록시에틸) 암모늄 브로마이드, N,N,N-트리메틸-2-비스[(1-옥소-9-옥타데세닐)옥시]-(Z,Z)-1-프로판아미늄 메틸 술페이트 또는 3β[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일]콜레스테롤 히드로-클로라이드.

[0093] 본 발명의 한 실시 양태에서, 상기 헤드그룹에 부착된 지질 사슬은

[0094] a. 포화 또는 불포화일 수 있으며,

[0095] b. n 이 3 내지 24인 $(CH_2)_n$으로부터 길이가 가변적일 수 있고, 및

[0096] 대칭 또는 비대칭으로 치환될 수 있다.

[0097] 본 발명의 특이적 실시 양태에서, 지질 A를 갖는 리포솜은 애주번트로서 사용되어 항-아밀로이드 백신을 제조한다. 디미리스토일포스파티딜-콜린, -글리세롤 및 콜레스테롤을, 특히, 0.9:1.0:0.7의 몰비로, 혼합한다. 예를

들어, 모노포스포릴 지질 A와 같은 강한 면역 조절인자는 그후 적당한 농도, 특히 30 내지 50mg/mmol, 특히 더 40mg/mmol의 인지질 농도에서 첨가된다. 변형된 항원 Aβ펩티드는 1:30 내지 1:200의 펩티드:인지질의 몰비, 특히 1:50 내지 1:120의 몰비, 특히 더 1:100의 몰비로 첨가된다. 용매는 예를 들어 증발을 통해 제거하고, 수득한 필름은, 예를 들어 PBS와 같은 살균 완충 용액으로 수화시킨다.

[0098] 리포솜은 또한, 예를 들어,(Wagner 등, 2002)에서 기술된 바와 같은 크로스플로우(crossflow) 주사 기술에 의해 제조될 수 있다. 수성 완충 시스템으로 지질 용액을 주사하는 동안, 지질은 "침전물(precipitates)"을 형성하는 경향이 있으며, 이어서 소수포에서 자가 배열(self arrangement)된다. 수득된 소수포 크기는 지질 농도, 교반 속도, 주사 속도, 및 지질의 선택과 같은 요소에 의존한다. 제조 시스템은 크로스플로우 주사 모듈, 극성 단계(예컨대, PBS 완충 용액)를 위한 용기, 에탄올/지질 용액 용기 및 압력 장치, 그러나 특히 질소 압력 장치로 이루어질 수 있다. 수용액 또는 극성 용액이 크로스플로우 주사 모듈을 통해 펌프되는 동안 에탄올/지질 용액은 적용된 가변 압력으로 극성 상 내로 주사된다.

[0099] 특이적 실시 양태에서, 본 발명에 따른 방법에 사용하기 위한 리포솜 조성물은 애주번트로서 모노포스포릴 지질 A(MPLA)와 함께 팔미토일화된 Aβ 1-15, 특히 테트라팔미토일화된 Aβ1-15를 포함하도록 제조된다.

[0100] 리포솜 조성물의 4 내지 10, 특히 5 내지 6 투여량은 백신 접종될 환자에게 매주 또는 격주로 피하 투여될 수 있다. 혈장 프로브가 수득될 수 있으며 주기적으로 IgG 역가에 대하여 분석될 수 있다.

[0101] 다운증후근의 젊은 환자 내지 중년 환자에서 면역원으로서 본 발명의 리포솜 조성물의 유효성 및 상기 환자의 기억 결핍을 치료하기 위한 치료적인 잠재력은 다운증후군에 대한 적절한 동물 모델로 입증될 수 있다. 특히, DS에 대한 동물 모델로서 광범위하게 받아들여지는 Ts65Dn 마우스가 사용되었다. Ts65Dn 마우스는 뮤린 APP 유전자를 호스트하는 삼중(triplicate)의 뮤린(murine) 염색체 16을 나타낸다(Davisson 등, 1993;Netzer 등, 2010). 이들 형질전환 마우스는 1.5배 증진된 뮤린 Aβ(Hunter 등, 2004)를 나타내며 몇몇 기억 과제에서 행동 결핍을 보여준다(Belichenko 등, 2009).

[0102] 본 발명의 리포솜 조성물은 고 역가의 항체를 유도하며 상기 항체는 최종 면역화 후 40일에도 상승된 것으로 남아 있다는 점은 본 발명의 범주 내임이 입증되는 것이다. 따라서, 본원에서 기술된 바의 본 발명에 따른 리포솜 조성물은 다운증후군 치료 환자에서 강건한(robust) 면역 반응을 유도할 수 있고 Aβ 자체 내성(self-tolerance)을 파괴할 수 있다.

[0103] 본원에서 기술된 바의 본 발명의 리포솜 조성물은 또한 다운증후군이 없는 대조군의 대상보다 다운증후군의 젊은 연령의 마우스 내지 중간 연령의 마우스에서 더 높은 IgG 역가를 유도할 수 있다는 것을 나타냈다. 본 발명의 리포솜 조성물은 대조군과 비교시 IgG2a 이소타입(isotype) 항체들의 증진된 역가를 유도하며, 반면, IgG1 및 IgG2b 이소타입의 항체 역가는 치료군과 대조군이 필적한다. IgM 클래스 항체들의 역가는 대조군과 비교시 치료군에서 더 낮다. 이러한 약간 낮은 IgM 레벨은 다운증후군 마우스의 변경된 면역시스템에 의해 야기될 수 있다. 따라서, 리포솜 조성물은 DS 피플(Monsonego 등, 2001)에서 기술된 Aβ에 대한 손상된 후천성 면역 반응을 극복할 수 있다.

[0104] 본원에서 기술된 바의 본 발명의 리포솜 조성물은 또한 안전하며 원치않는 부작용을 유도하지 않는다. 특히, 리포솜 조성물을 사용한 치료는 별아교 세포(astrocytes) 및 미세아교세포(microglia)의 활성화와 같은 뇌의 세포 활성화를 유발한다.

[0105] 다운증후군을 앓는 환자는 기억 손상 및 이상 활동과 같은 인지 이상을 나타낸다.

[0106] 본원에서 기술된 바의 본 발명의 리포솜 조성물은 치료된 동물에서 치료가 기억의 유의한(significant) 향상을 야기한다는 것을 제시하는 동물 모델에서의 높은 판별비(discrimination ratio)를 초래하는 것으로 나타났다.

[0107] 본원에서 기술된 바의 본 발명의 리포솜 조성물은 대조 동물에서의 관측과 필적하는 레벨에 도달하는 동물 모델에서 향상된 프리징(freezing)을 초래하는 연습, 신호 및 맥락적 세션(sessions)으로 이루어진 시험에서 더 보여주었다. 면역화는 효율적이었으며 모델 동물의 기억 용량을 향상시킨다는 것을 제시한다.

[0108] 본원에서 기술된 바의 본 발명의 리포솜 조성물은 따라서 다운증후군을 앓고 있는 젊은 환자 내지 중년 환자, 특히, 뇌에서 아직 Aβ-연관된 플라크가 전개되지 않은 다운증후근의 젊은 환자 내지 중년 환자에서의 기억 결핍을 구조할 수 있다.

[0109] 본원에서 기술된 바의 본 발명의 리포솜 조성물은 또한 다운증후군을 앓고 있는 젊은 환자 내지 중년 환자, 특

히, 뇌에서 이미 Aβ-연관된 플라크가 전개된 다운증후근의 젊은 환자 내지 중년 환자에서의 기억 결핍을 구조할 수 있다.

[0110] 한 실시 양태에서, 리포솜 조성물을 사용한 치료는 다운증후군의 젊은 환자 내지 중년 환자에서 기억 결핍, 특히 인식 기억 및/또는 맥락적 연상 기억에서의 결핍을 개선 또는 회복시킬 수 있다.

[0111] 정리하면, 본 발명의 바람직한 실시 양태는 다음과 같다. 그러나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0112] 1. 다운증후군 환자의 기억 및/또는 인지(memory and/or cognitive)의 손상 또는 이상을 치료, 경감 및/또는 예방하기 위해 사용되는 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드-유사 단백질로부터 유도된 항원성 펩티드 단편(fragment).

[0113] 2. 상기 1에 있어서, 상기 환자는 젊은 환자 내지 중년 환자인 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0114] 3. 상기 1에 있어서, 상기 환자는 65세 미만인 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0115] 4. 상기 1에 있어서, 상기 환자는 60세 미만인 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0116] 5. 상기 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 손상 또는 이상은 인식 기억(recognition memory) 및/또는 맥락적 연상 기억(contextual associative memory)과 연관된 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0117] 6. 상기 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료는

[0118] a) 기억의 개선 및/또는 회복; 및/또는

[0119] b) 치료되는 환자의 기억력(retention) 증진 또는 인지 용량의 완전한 회복을 가져오는 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0120] 7. 상기 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료는 수막뇌염(meningoencephalitis) 및 미세출혈(microhemorrhage)과 같은 원치않는 부작용을 유도하지 않는 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0121] 8. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 환자는 뇌에서 Aβ 연관 플라크(Aβ-associated plaque)가 아직 전개되지 않은 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0122] 9. 상기 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 환자는 뇌에서 Aβ 연관 플라크가 전개된 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0123] 10. 상기 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 아밀로이드 단백질 또는 아밀로이드-유사 단백질은 프리온(prion) 단백질, 타우 단백질, 알파-시누클레인(alpha-synuclein), 헌팅틴(huntingtin) 및 아밀로이드 베타로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0124] 11. 상기 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 Aβ항원성 펩티드 단편은 Aβ펩티드의 N-말단부, 특히 N-말단부 Aβ1-15 단편에 상응하는 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0125] 12. 상기 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, Aβ 펩티드 항원은 리포솜 내에서 재구성되어 존재하는 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0126] 13. 상기 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, Aβ 펩티드 항원은 리포솜 담체/애주번트의 지질 이중층으로의 삽입을 용이하게 하는 친유성 또는 소수성 부분에 의해 변형되는 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0127] 14. 상기 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, Aβ 펩티드 항원은 펩티드 분자의 N- 및/또는 C-말단에 결합된 팔미트산에 의해 변형되는 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0128] 15. 상기 14에 있어서, 상기 Aβ 펩티드 항원은 펩티드 분자의 N- 및/또는 C-말단에 결합된 4개의 팔미트산에 의해 변형되는 것인, 항원성 펩티드 단편.

[0129] 16. 상기 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원성 펩티드는 리포솜 표면상에서 반복적인 배열로 존재하는 항원성 펩티드 단편.

[0130] 17. 상기 16에 있어서, 담체 또는 리포솜 표면상 고도로 반복적인 배열은 10 이상의 반복적인 항원 단위/담체 분자를 포함하는 것인 항원성 펩티드 단편.

[0131] 18. 상기 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 재구성된 항원성 펩티드의 75% 이상, 특히 80% 이상, 특히 90% 이상, 특별히 100%가 그의 소수성 부분을 통해 지질 이중층으로 삽입된 리포솜의 표면상에 존재하는 것인, 항원성

펩티드 단편.

[0132] 19. 다운증후군을 갖는 환자의 기억 및/또는 인지의 손상 또는 이상의 치료, 경감 및/또는 예방에, 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제와 함께 치료적 유효량으로 상기 1 내지 18 중 어느 하나에 기재된 항원성 펩티드 단편을 포함하는 조성물.

[0133] 20. 상기 19에 있어서, 애주번트(adjuvant)를 포함하는 조성물.

[0134] 21. 상기 1 내지 18 중 어느 하나에 기재된 항원성 펩티드 단편 또는 상기 19 또는 20에 기재된 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 다운증후군을 갖는 환자의 기억 및/또는 인지의 손상 또는 이상의 치료 방법.

[0135] 22. 상기 21에 있어서, 상기 손상 또는 이상은 인식 기억(recognition memory) 및/또는 맥락적 연상 기억(contextual associative memory)과 연관된 것인, 치료 방법.

[0136] 23. 상기 1 내지 18 중 어느 하나에 기재된 항원성 펩티드 단편 또는 상기 19 또는 20에 기재된 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 다운증후군을 갖는 환자의 기억력(retention) 증진 또는 인지 용량의 완전한 회복을 위한 방법.

[0137] 24. 상기 21 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 환자는 뇌에서 Aβ 연관 플라크가 아직 전개되지 않은 것인, 방법.

[0138] 25. 상기 21 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 환자는 뇌에서 Aβ 연관 플라크가 전개된 것인, 방법.

도면의 간단한 설명

[0139] 도 1은 테트라-팔미토일화된 마우스 Aβ1-15 항원 및 애주번트로서 MPLA 가 있는 리포솜-기재 백신인 ACI-DS-01 백신의 개략적인 프레젠테이션을 나타낸다. 인간 및 마우스 Aβ1-15간의 상이한 3개의 아미노산은 밑줄을 그었다.

도 2는 백신 ACI-DS-01로 면역화된 Ts65Dn 마우스에서 항-마우스 Aβ항체 레벨을 나타낸다.

A 및 B) 항-마우스-Aβ40 또는 42 IgG 역가는 ACI-DS-01로 면역화된 마우스의 혈장에서 검출되었다. 유도된 역가는 제 2 면역화 후에 관측했고 엠프티-리포솜으로 면역화된 마우스와 비교시 6차 주사 후 심지어 40일에도 높게 남아있었다. 2N 과 Ts65Dn 마우스의 측정된 역가 사이에는 차이가 없었다. C 내지 F) IgG 이소타입은 4차 면역화 후에 검출되었다. G) IgM 역가는 Ts65Dn 마우스에서 거의 내려가지 않았다. H) 동일한 레벨의 항-MPLA IgG 역가가 ACI-DS-01로 면역화된 모든 마우스에서 검출되었다. 그래프는 평균 ±SD를 나타낸다.

(n=20 2N-ACI-DS-01, n=15 Ts65Dn-ACI-DS-01, n= 18 2N-엠프티 및 n= 11 Ts65Dn-엠프티. 그래프는 평균 ±SD를 나타낸다).

도 3 은 기억 수행에 대한 면역화의 효능을 나타낸다.

A) 2N 및 Ts65Dn 마우스 간의 자발적인 운동력(locomotor) 활동의 차이는 면역화 후 유사한 것으로 남아있다. B) ACI-DS-01로 면역화된 마우스는 엠프티 백신으로 치료된 군과 비교시 새로운 대상 인식에서 유의하게 향상된 인식 지수(RI)를 나타냈다. C) 공포 조건에서, 면역화된 마우스는 맥락적 세션 동안 더 높은 레벨의 프리징에 대하여 경계선 유의성을 나타내었다. 그래프는 평균 ±SD를 나타낸다.

(n= 20 2N-ACI-DS-01, n= 13 Ts65Dn ACI-DS-01, n= 18 2N-엠프티 및 n= 11 Ts65Dn-엠프티)

도 4는 ACI-DS-01 백신으로 치료된 마우스에서의 Aβ40 레벨을 나타낸다.

A) 피질에서, Aβ40 레벨은 2N 마우스와 비교시 Ts65Dn에서 거의 높지 않았다. 해마 또는 소뇌에서 차이가 없는 것으로 관측되었다. ACI-DS-01 치료의 유의한 효과(significant effect)가 없는 것으로 관측되었다. 그래프는 평균 ±SD를 나타낸다. n=10 2N-ACI-DS-01, n=10 Ts65Dn ACI-DS-01, n= 8 2N-엠프티 및 n= 5 Ts65Dn-엠프티를 나타낸다.

B 및 C) 피질 또는 소뇌에서 Aβ-40/42 비와 RI의 상관 관계이다. D) 항-Aβ IgG 역가의 레벨은 ACI-DS-01로 치료된 Ts65Dn 마우스의 혈장에서 Aβ40 레벨과 약하게 상관 관계가 있다. E) 항-Aβ IgG 레벨 및 RI간의 유의한 상관 관계.

(n=19 2N ACI-DS-01, n=13 Ts65Dn ACI-DS-01, n= 18 2N-엠프티 및 n= 11 Ts65Dn-엠프티).

도 5 는 염증성 반응의 연구를 나타낸다.

A) 체중 및 뇌중량. B) 치료된 2N 및 Ts65Dn 마우스에서 GFAP 면역반응성(왼쪽) 및 CD45(오른쪽)의 공초점 영상(confocal images). 화살표는 각각의 CD45-양성 미세아교세포를 가리킨다. GFAP 면역반응성의 광학 밀도는 정량화되었으며 군 간의 차이는 없는 것으로 나타났다. 각각의 군으로부터 n=4.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0140] 실시예 1 일반 방법론

[0141] 1.1 동물:

[0142] DS 마우스 모델로서 공지된 Ts65Dn 마우스(Davisson 등, 1993)를 사용하였고(n =30) 나이는 대조 2N(n=40)에 맞추었다. 개시 일에, 사용된 마우스는 5월령(months old)된 것이었다. 연구(면역화 및 행동 시험)의 종료에서, 마우스는 9월령이 되었다. 그러므로, 희생물에서 수집된 모든 표본은 9월령의 마우스로부터이다.

[0143] Ts65Dn 신생아는 선천성 심장 기형(Randall 2006, Moore 2006)으로 인해 대부분 높은 치사율(약 6%)을 갖는다. 그러나, 마우스는 18 내지 24 개월이 되어서도 생존할 수 있다. 우리의 연구에서, 15%의 사망률이 관측되었다. 생존된 마우스는 정상의 한배 새끼와 비교된 크기로 ~20% 더 작다. 출생시 사망한 가장 심하게 영향을 받은 마우스는 분석하도록 생존하지 않으며, 일부 표현형(즉 심장 결함)에 대한 삼염색체(trisomic) 유전자의 충격의 과소평가를 야기한다. 그러나, 우리의 관심사에 대하여, 생존 마우스는 아밀로이드 및 AD-유사 병리학을 분석하기 위한 DS의 충분한 모델을 나타낸다.

[0144] 이들 연구에서 사용된 DS 마우스 모델에서, 마우스는 4월령에서 증진된 레벨의 아밀로이드를 나타낸다(Hunter 2004). 9월령에서, 아밀로이드의 레벨은 APP 유전자의 3 카피의 관점에서 예측된바 정상 레벨의 3배에 도달했다. DS 사람들과 유사하게, 노화는 TS65Dn 뇌에서 아밀로이드 침착화를 위한 중요한 요소이다. 나이-관련 아밀로이드의 축적에도 불구하고, TS65Dn 마우스는 플라크를 전개하지 않았다. 그럼에도 불구하고, 이들은 다운 증후군의 사람들 및 AD에서 볼 수 있는 뉴런 개체군의 퇴화를 정확하게 복제한다(Salehi 등, 2009)

[0145] 함께 취하여, 사용된 마우스-모델에서 DS-특징은 병리학적 단백질 및 표현형 양상; 즉 아밀로이드 적재 및 인지 손상의 존재를 포함한다. 그러므로 Ts65Dn 마우스는 DS의 병원성 과정을 정확하게 반복할 수 있다. 이들 마우스는 인간의 비교레벨인 6월령에서 아밀로이드를 축적하기 시작하므로, 모델 마우스의 연령은 젊은 연령 내지 중년 연령에서 인간의 DS 환자와 비교가 된다.

[0146] 1.2 백신 제조 - 리포솜-기재 항원 조립물의 제조

[0147] *1.2.1 방법 1:* 리포솜 항원 조립물이 WO2007/068411호에 기술된 방법에 따라 제조된다.

[0148] *1.2.2 방법 2:* 인지질 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디-미리스토일포스파티딜-글리세롤(DMPG) 및 콜레스테롤(아반티 극성 지질(Avanti Polar Lipids). 앨러배스터, 앨러바마)을 각기 9.0; 1.0 및 7.0의 몰비로 에탄올(100ml)내에서 혼합하였다. 완전하게 투명한 용액은 60℃에서 15분간 연속 교반 후 형성되었다. 이 지질 혼합물은 그후 다중층 소수포(다층 소수포- 스테이지 1)의 형성을 허용하는, 1600ml의 인산 완충액(PBS) pH7.4에서 용액(100ml)을 주입하여 희석(17x) 시켰다. 수득한 제제는 그후 한외여과(200ml/분 유량의 비바플로우(vivaflow) 200-100,000MWCO 폴리에테르술폰)로 농축하고 반응 용량은 1700ml에서 250ml으로 감소시켰다(한외여과 단계). 농축 용액은 10x 용량 교환이 PBS pH7.4로 수행되는 비바플로우 200 장치에서 더 투석되도록 하였다(투석여과(Diafiltration) 단계). 투석된 용액(다층 소수포 -스테이지 2)은 그후 아베스틴(Avestin)의 에멀시플렉스(Emulsiflex) C5 장치에서 균질화(15,000-20,000 Psi에서 7 회전)하고(균질화(Homogenization) 단계), 이어서 직경 47mm 폴리카르보네이트 막 0.2um를 통해 3 회전 압출(동일한 에멀시플렉스 기기 사용)하였다(압출(Extrusion) 단계). 상기 마지막 두 분립(sizing) 단계 후, 항원 및 애주번트가 없는 유니라멜라(unilamelar) 리포솜이 형성되었다(엠프티 리포솜 제조).

[0149] *1.2.2.1 애주번트 용액의 제조:* 765ug/ml의 MPLA 용액을 1.6%(wt/v) 옥틸-베타-D-글루코피라노시드(B-OG)로 20ml PBS pH7.4에서 제조하였다. 수득한 용액은 0.73%(wt/v)의 그의 임계 미셀 농도(CMC) 이상의 농도에서 세제(B-OG)를 함유하였다. 이 용액은 그후 60℃에서 30분간 가열하고 수동으로 250ml의 엠프티 리포솜 제제에 주입하였다. 이러한 희석 단계 동안, 세제 농도는 0.12%(wt/v)의 최종 농도를 야기하도록 13.5x로 희석하고, B-OG의 농도는 그의 CMC(제1 희석 단계) 이하이다. 애주번트(MPLA)를 함유하는 리포솜 용액은 그후 1450ml의 PBS pH7.4를 주입하여 희석(7x)된다(제2 희석 단계).

[0150] *1.2.2.2 펩티드 용액의 제조:* 1.33mg/ml의 펩티드 AβPal 1-15를 2.0%(wt/v) B-OG로 PBS pH11.8(총 용량45ml)에서 제조하였다. 수득한 용액은 0.73%(wt/v)의 그의 임계 미셀 농도(CMC) 이상의 세제 농도를 포함하였다. 이 용액은 투명한 용액이 형성될 때까지 60℃에서 교반 가열하고 15분간 교반하였다. 펩티드 용액(45ml)은 그 후 애주번트(1700ml)가 있는 리포솜 용액에 첨가하고 세제 CMC(0.73%)보다 훨씬 아래인 (0.05%)의 최종 B-OG 농도를 갖는 용액을 수득하도록 60℃에서 1시간 동안 교반하였다(희석 단계). 수득한 용액은 그후 한외여과(상술한 것과 동일한 조건)로 농축하였고 최종 백신 용량은 100ml로 하였다. 농축용액은 10x 용량교환이 PBS pH7.4로 수행되는 투석여과로 투석하였다.

[0151] 최종 단계에서, 백신 용액은 0.2um 폴리에테르술폰 막 여과기(사토리우스(Sartorius) 16541-K)를 통해 살균 여과하였다. 각각의 여과기는 15ml 팰콘(Falcon) 튜브에 5ml의 백신 용액을 살균 여과하기 위해 사용하였다. 이 마지막 과정 단계는 살균 환경에서 실행된다(층류 후드(laminar flow hood)).

[0152] *1.2.3 방법 3:* 방법 3은 애주번트(예컨대, MPLA)가 리포솜 형성 및 분립(sizing) 단계 전에 에탄올 용액 내에서 지질과 함께 첨가된다는 것만 상이하고 방법 2의 과정에 따른다. 그러므로, 리포솜 형성 후 애주번트 첨가 과정이 억제된다.

[0153] 1.3 면역화.

[0154] 모든 마우스는 200μl의 ACI-DS-01(51.2μg/Pal1-15의 투여량, 테트라팔미토일화된 Aβ펩티드 1-15) 또는 엠프티 리포솜 백신으로 피하(s.c.) 면역화를 받았다. 총 6회 주사를 1, 14, 28, 42, 56, 70 및 110일에 수행하였다. 동일한 날에, 꼬리 출혈은 1차 백신 주사 바로 전 -1일 (출혈-전(pre-bleeding)), 56일(4차 주사 후 14일) 및 희생시, 110일(6차 주사 후 40일)에 수행하였다. 마우스는 9월령에서 연구의 말미에 희생시키고 뇌를 수집하였다.

[0155] 1.4 마우스 Aβ-특이적 항체의 정량화.

[0156] Aβ1-42-특이적 IgG 반응은 ELISA로 측정하였다. 간단히, 플레이트를 10μg/mL의 마우스 Aβ1-42(Bachem H5966, 로트: 1013710, 1028321 또는 1033165) 또는 마우스 Aβ1-40(Bachem H5638, 로트: 1013645)로 4℃에서 밤새 코팅하였다. PBS-0.05% Tween 20으로 세정 및 1% BSA로 블로킹한 후, 혈장의 연속 희석액을 플레이트에 첨가하고 2시간 동안 37℃에서 배양하였다. 항체 항-Aβ 4G8(Covance SIG-39220, 로트: 08EC00905, 1mg/mL 희석화된 4000) 및 동일한 ACI-DS-01 배치의 3회 주사로 면역화된 C57BL/6JOlaHsd(Harlan)의 혈청을 양성 대조로서 사용하였다. 세정 후, 플레이트는 알칼리성 포스파타아제(AP) 복합 항-마우스 IgG 항체(Jackson Immunoresearch 웨스트 그로브, 펜실베이니아, 미국, Cat. N° 115-055-164 로트 87821, 1/4000에서 희석된 바이알(vial))로 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 최종 세정 후, 플레이트는 2시간 30분 동안 AP 기질(pNPP)로 배양하고 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 405nm에서 판독하였다. 결과는 광학 밀도(O.D)로 나타냈다.

[0157] 1.5 행동시험.

[0158] 모든 마우스는 약 8월령에서 시작한 동일한 일련의 행동 시험에 노출시켰다. 각각의 마우스는 시험이 진행되는 7일 동안 하루에 2회 10 분 동안 및 시험 사이에 3 일 동안 다루었다. 시험은 지시된 날(마지막 면역화에 따라)에 하기 순으로 수행되었다: 운동력 활동(시작 11일), 24시간 지연으로 새로운 대상 인식 과제(시작 18일), T-자형 미로(시작 25일), 및 맥락적 공포 조건화 시험(시작 34일). 모든 행동 시험은 7:00A.M. 내지 7:00P.M. 사이에 일광 사이클 동안 행하여졌으며 실온(22℃)에서 수행되었다. 시험 날, 마우스는 습관화를 위해 2시간 동안 동일한 실험실 내에서 일광 단계 동안 그들의 홈 케이지에 있게 하였다. 각 시험 동안 불안의 지표로, 변 펠릿(fecal pellets) 및 소변 방울의 수를 또한 측정하였다. 이전 시도로부터 후각 신호(cues)를 최소화하기 위해, 각각의 장치는 각 동물이 거주 후 10% 에탄올로 완전하게 깨끗이 하였다. 다루기 및 모든 행동 시험이 마우스를 다루는 연구원에게 유전자형 및 치료를 나타냄이 없이 맹목적인 방식으로 수행시켰다.

[0159] 1.6 자발적인 운동력 활동 시험.

[0160] 자발적인 운동력 활동은 플렉시글라스(Plexiglas) 활동 챔버(모델 MED-OFA-MS; Med Associates)(27.9x27.9x20cm) 및 활동 모니터 소프트웨어(활동 모니터, 버전 4.3.6)를 사용하여 모니터하였다. 벨리첸코(Belichenko) 등에서 기술된 바와 같이(Belichenko 등, 2009;Belichenko 등, 2007), 마우스는 밝은 환경광(ambient light) 조건하에서 챔버의 중심에 놓고 활동을 3회의 별개 시도에서 10분 동안 모니터하였다. 평균은 총 거리, 속도, 총 활동 시간, 총 활동 수치 및 버티컬 활동에 대하여 측정하였다.

[0161] 1.7 새로운 대상 인식 과제.

[0162] 우리는 베빈스(Bevins) 및 비쉬어(Besheer) 프로토콜(베빈스 및 비쉬어, 2006;O'Doherty 등, 2005)을 사용하였다: 24시간 지연으로 학습 및 기억을 연구하기 위해 한 환경으로 두 표본 대상에 대하여 인식 기억을 연구하는 단일-시도 표본 무대응(one-trial non-matching-to-sample) 학습 과제. 시험하기 전, 마우스는 어두운 환경광 조건하에 연속 2일에 10분 동안 흑색 플렉시글라스 챔버(31x24x20 cm)에서 길들였다. 대상 인식 과제 동안 8월령의 마우스의 활동은 비디오 카메라로 기록하였다. 우선, 두 동일한 대상을 이전에 기술한 바와 같은 챔버에 놓았다 (베빈스 및 비쉬어, 2006;O'Doherty 등, 2005). 마우스는 표본 대상 맞은편 벽의 중간지점에 놓았다. 대상 탐구 10분 후, 마우스는 24시간 동안 콜로니로 되돌려보냈다. 대상 인식 시험을 위해, 한 마리의 친숙한 대상 및 한 마리의 새로운 대상을 챔버에 놓고 마우스는 대상을 탐구하기 위해 3분간 챔버에 다시 놓았다. 대상 인식은 단일 시도로 측정하였다. 자료는 비디오 녹화의 직접 관측을 사용하여 측정하였다. 결과는 하기이다: 1) 새로운 및 친숙한 양자의 표본 대상의 평균 총 탐구시간 및 2) 판별 비(새로운 대상 상호 작용/양자 대상과의 총 상호 작용).

[0163] 1.8 T-자형 미로 시험

[0164] 8월령의 마우스를 사용하였다. 우리는 변형된 디컨(Deacon) 및 롤린스(Rawlins) 프로토콜(디컨 및 롤린스, 2006) 및 T-자형 미로에서 연속 교대 과제를 사용하여 해마 기능을 평가하였다. 미로는 스타트 아암(start arm)의 시작에 추가적인 미닫이 문이 있는 (디컨 및 롤린스, 2006)에서 기술된 바의 불투명한 아크릴 유리 (플렉시글라스)로 만들어졌다. 시험 동안, 마우스는 그의 뒤에 닫힌 미닫이 문이 있는 스타트 아암의 시작에 놓았다. 모든 문이 열린 후, 마우스는 스타트 아암의 아래로 달려가 오른쪽 또는 왼쪽 골(goal) 아암을 선택하였다. 마우스의 네개의 다리 모두가 한 골 아암에 들어간 후, 다른 골 아암에 대한 미닫이 문이 5초간 닫히고 그후 모든 미닫이 문을 다시 열고, 마우스가 스타트 아암으로 다시 가도록 허용하였다. T-자형 미로 활동은 마우스가 10회 교대를 끝낼 때까지 모니터하였다. 이 절차는 연속 3일 동안 총 30회의 시도에 대하여 반복하였다. 자발적인 교대 점수는 세션 동안 가능한 교대의 총 수의 백분율로 표현된 왼쪽-오른쪽 및 오른쪽-왼쪽 교대의 수로 정의되었다. 결과는 교대 점수 및 소비한 시간 양자에 대한 평균이다.

[0165] 1.9 맥락적 공포 조건화 시험.

[0166] 맥락적 및 신호 공포 조건화(contextual and cued fear conditioning)는 공포-의존 학습 및 복구의 평가를 위해 수행되었다. 시험은 콜보른 기기(Coulbourn Instruments)(화이트홀, 펜실베이니아, 미국)로 부터의 챔버를 사용하여 수행되었다. 첫 번째 날, 동물은 베이스라인 기록을 위해 3분간 챔버(맥락 A)에 놓았고, 이어서 5 톤-쇼크(tone-shock) 쌍을 이루었다. 쇼크(0.5mA, 2초)는 각각의 조건 /무조건 자극 쌍에서 톤(70dB, 2kHz, 20초)을 따라 전달되었다. 두 번째 날, 새로운 챔버(맥락 B; 새로운 방, 새로운 후각 환경, 새로운 바닥 질감, 벽을 위한 파란색 플라스틱 삽입물, 보조 청색 광원 (extra source of blue light), 및 시각적 단서)가 신호 시험화를 위해 사용되었다. 3-분의 예비-톤(pre-tone) 기간 후, 쇼크가 없는 3 톤을 3분의 시험화 기간 동안 동물에게 주었다. 실험 마지막 날, 마우스는 조건 또는 무조건 자극(Saxe 등, 2006)없이 5분 동안 맥락 A에 놓았다. 프리징(freezing)은 프리즈프레임(FreezeFrame) 소프트웨어(Actimetrics, Evanston, IL)에 의해 측정된 바로 최소 0.75초 동안 완전한 동작의 결여로 정의되었다. 각 기간에서 프리징의 백분율을 보고하였다.

[0167] 1.10 체중 및 뇌 중량의 측정.

[0168] 모든 행동 시험 후, 마우스는 펜토바비탈 나트륨(200mg/kg i.p.)(Abbott Laboratories)으로 깊게 마취시키고, 체중을 재고, 0.9% 염화나트륨(10ml)으로 1분 동안 및 그후 0.1 M PBS, pH7.4(100ml) 내의 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 심장을 통해(transcardially) 관류시켰다. 관류 후, 뇌는 즉시 제거하였다. 뇌의 중량(후각 망울 (olfactory bulbs), 피질, 해마, 소뇌, 뇌줄기 및 C1-C2를 통해 목 척수(cervical spinal cord)를 포함)을 기록하였다. 뇌는 그후 더 사용할 때까지 고정액에 놓았다.

[0169] 1.11 염증성 반응을 위한 면역형광법.

[0170] 뇌 절편을 0.3% 트리톤(Triton) X-100이 있는 0.1M PBS 내에서 5% 탈지유로 전 배양(pre-incubated)하였다. 절편은 그후 1:500의 희석에서 토끼 항-소 신경교 섬유질 산성 단백질(GFAP) 항체(DAKO, Glostrup, 덴마크)로, 또는 1:5000의 희석에서 다중클론 쥐 항-CD45(Pharmingen)로 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 이어서 배양(각기 1시간 및 실온)은 비오티닐화 당나귀 항-토끼 이차 항체(1:200; Jackson ImmunoResearch Labs, 웨스트 그로브, 펜실베이니아, 미국)를 사용하여 및 플루오레세인 이소시아네이트 (FITC)-복합 스트렙타비딘(1:500; Jackson ImmunoResearch Labs)을 사용하여 수행하였다. PBS(3시간, 각기 20분)를 사용한 헹굼은 상술한 배양 사이에 수행되었다. 절편은 0.1M 인산 완충액, pH7.4 내에서 90% 글리세롤을 사용하여 현미경 슬라이드 글라스에 탑재하

고 커버슬립하였다. 항체의 염색 특이성을 조절하기 위해, 선택된 절편은 프라이머리(primary) 항체들을 포함하지 않지만 동일한 프로토콜을 따르게 하였다. 면역형광법은 대조 절편에서 관측되지 않았다. 슬라이스는 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) E800 형광 현미경에 부착된 레디언스(Radiance) 2000(Bio-Rad, 허트퍼드셔, 영국) 공초점 현미경 내에서 검사 및 스캔하였다. 레이저는 488λ에서 FITC에 대한 여기 파장을 갖는 아르곤/크립톤 혼합 기체 레이저였다. 레이저샤프(LaserSharp) 소프트웨어(Bio-Rad)는 심상(image)을 수집하기 위한 최적 조건을 수립하기 위해 사용되었다. GFAP- 면역반응성(IR) 또는 CD45-IR의 공초점 심상화를 위한 최적 조건은 하기이다: 렌즈는 20x 대물 렌즈이고(니콘; Plan Apo 20x/0.75); 레이저 파워는 10% 또는 20%이며; 게인은 34.7이고; 오프셋은 0.0이며; 줌 팩터는 3이고; 스캔 속도는 500 lines/s이며; 각각의 광학 절편은 3시간 스캔하고 칼만(Kalman) 여과는 그후 노이즈를 감소시키기 위해 사용되고; 심상의 크기는 512x512 화소이고 화소 크기는 0.48x0.48um이었다.

[0171] 1.12 통계 분석

[0172] 자료는 평균 ±표준 편차(SD) 또는 평균의 표준 오차(SEM)로서 나타내었다. 통계 분석은 짝 안 지은 양방 T-검정에 의해 수행되었다. $p<0.05$의 확률은 유의한 것으로 간주되었다.

[0173] 실시예 2 ACI-DS-01 생산된 항-마우스 Aβ 항체를 사용한 면역화

[0174] 리포솜 백신 ACI-DS-01은 모노포스포릴 지질 A(MPLA)와 함께 리포솜으로 포매된 테트라팔미토일화 마우스 Aβ1-15 펩티드(Palm1-15), H-Lys(Pal)-Lys(Pal)-Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH를 사용하여 수프라항원™ (SupraAntigen™) 방법론(WO 2005/081872호)에 따라 제조하였다. 도 1. 6회 투여량의 ACI-DS-01은 Ts65Dn 수컷 마우스 및 연령 맞춘 대조 마우스(2N)에게 피하 및 격주로 투여하였다. 4차 투여 후 수집된 혈장의 분석은 Ts65Dn 및 2N 군 양자의 면역화된 마우스에서 마우스 Aβ40 또는 Aβ42에 대하여 강건한 IgG 역가를 나타내었다(도 2A 및 2B). 백신-유도된 항체는 마지막 면역화 후 40일에서도 상승된 것으로 남아있었다. 항원이 없는 엠프티 리포솜을 갖는 면역화된 마우스에서는 역가가 검출되지 않았다(도 2A 및 2B). 따라서, ACI-DS-01은 DS 마우스 모델 내에서 Aβ 자체-내성을 중단시킬 수 있었다 .

[0175] IgG의 서브클래스는 4차 면역화 후 ACI-DS-01로 면역화된 마우스의 혈장에서 분석되었다. Aβ40으로 수행한 ELISA는 Ts65Dn 군이 2N 군보다 더 높은 IgG2a 역가를 가지며(도 2D), 한편 IgG1 및 IgG2b 역가에 대한 두 군 간의 차이는 없다 (도 2C 및 2E)(일원 분산 분석(One-way ANOVA), 터키 포스톡 (Tukey posthoc); P=0.05)는 것을 나타내었다. IgG3 역가는 Ts65Dn 군에서 더 낮았다(도 2F)(일원 분산 분석, 터키 포스톡; $P<0.001$). IgM 역가는 약간, 그러나 유의하게, 2N 마우스와 비교하여 Ts65Dn 마우스에서 더 낮았다(도 2G). (일원 분산 분석, 터키 포스톡; $P = 0.05$). 유사한 결과가 Aβ42로 수행된 ELISA에서 수득되었다(자료는 나타내지 않았다).

[0176] Ts65Dn 마우스에서 상술한 역가의 몇몇의 낮은 레벨은 항-MPLA IgG 레벨이 모든 마우스에서 비슷하기 때문에 Ts65Dn의 면역 반응 용량으로 인한 것이라고는 할 수 없다(도 2H).

[0177] 실시예 3 Ts65Dn 마우스의 기억 결핍을 회복시키는 ACI-DS-01을 사용한 면역화

[0178] Ts65Dn 마우스는 기억 손상 및 이상 활동과 같은 DS 인지 이상의 많은 특징을 나타낸다. ACI-DS-01 백신의 효능을 조사하기 위하여, 일련의 행동 시험을 마지막 면역화 후 2주 수행하였다. 마우스는 하기 순서로 시험을 수행하였다; 오픈 필드(open field), 대상 인식, T-자형 미로 및 공포 조건화.

[0180] 오픈 필드 시험의 분석은 Ts65Dn 마우스가 2N 마우스와 비교시 유의한 더 높은 자발적 운동력 활동을 갖는 것으로 나타났다(자료는 나타내지 않았다). ACI-DS-01로 면역화 후, Ts65Dn 마우스는 ACI-DS-01 치료된 2N 마우스보다 계속해서 유의하게 더 활동적이었다(도 3A, 짝 안 지은 단측 t 검정; $p=0.0004$). T-자형 미로에서, 2N 및 Ts65Dn 마우스는 치료 전 및 치료 후에 교대 비 또는 교대 지속 기간에서 유의한 차이를 나타냈다(자료는 나타내지 않았다).

[0181] 공간 기억 용량은 대상 인식(ORT)에서 측정하였다. Ts65Dn 마우스는 약한 판별비를 나타내며 따라서 불량하게 새로운 대상을 인식한다. ACI-DS-01 치료된 Ts65Dn 마우스는 치료가 유의한 기억 향상을 유발한다는 것을 나타내는 높은 판별비를 나타내었다(도 3B, 짝 안 지은 단측 t 검정; $p=0.03$. 일원 분산 분석, 유전자형, $P=0.12$, 백신, $P=0.002$. 상호 작용 $P=0.54$). 흥미롭게도, 동일한 결과가 2N 군에서 관측되었다.

[0182] 공포 조건화 시험은 연습, 신호 및 맥락적 세션으로 이루어진다. 동일한 프리징 레벨이 연습 또는 신호 세션 동안 모든 군에서 관측되었다(도 3C). 맥락적 세션 동안, 엠프티 백신(항원 없이 단지 리포솜만 있음)으로 치료된 Ts65Dn 마우스는 대조 2N 마우스보다 낮은 프리징 백분율을 나타내었다. 반대로, 면역화 후 Ts65Dn 마우

스는 향상된 프리징을 나타내었고 2N 마우스(짝 안 지은 단측 T-검정; P=0.04.(일원 분산 분석, 유전자형, P=0.01, 백신, P=0.16. 상호 작용 P=0.33)에 필적하는 레벨에 도달되었다. 이것은 면역화가 효율적이고 Ts65Dn 마우스의 기억 용량을 향상시킨다는 것을 제시한다.

[0183] 요약하면, 이들 결과는 ACI-DS-01 치료가 Ts65Dn 마우스의 기억 결핍을 회복시킬 수 있음을 나타낸다.

[0184] 실시예 4 인지 결핍증을 개선하기 위한 ACI-DS-01 백신의 메커니즘

[0185] Aβ 레벨 상에서 ACI-DS-01 유도된 항체들의 효과에 대한 질문을 다루기 위해, 해마, 피질 및 소뇌의 단백질 추출물을 사용하여 ELISA를 수행하였다. 이들 부위는 ACI-DS-01을 사용한 치료에서 하기의 Aβ 레벨에 대한 차이를 나타내었다: Aβ40 및 Aβ42에 대하여 (도 4A). 피질 및 소뇌에서 비 Aβ-40/42가 높은 인식 지수(RI)(도 4B 및 4C. 피질; 피어슨(Pearson) r 상관 관계=-0.3248, P=0. 0.03. 소뇌; 피어슨 r 상관 관계=-0.4127, P=0.009)로 유의하게 연관성이 있다는 것은 주목할 만한 가치가 있다. 이들 결과는 Aβ-40/42가 인지 결핍에 책임이 있을 수 있다는 것을 제시한다. 추가의 분석은 혈장에서 Aβ42가 감지할 수 없음을 나타내었다. 반대로, 혈장에서 Aβ40의 증진된 레벨은 ACI-DS-01 치료된 Ts65Dn 마우스의 군에서 측정된 항-Aβ IgG의 높은값과 연관되는 것으로 보인다(도 4D; 피어슨 r 상관 관계=0.51, P=0.09). 더욱이, RI는 항-Aβ IgG 역가와 연관성이 있다(도 4E; 피어슨 r 상관 관계=0.3154, P =0.007).

[0186] 이들 결과는 ACI-DS-01-유도 항체가 기억 개선을 유발할 수 있는 뇌에서 혈장의 깨끗한 Aβ일 수 있음을 제시한다.

[0187] APP 과정에서 ACI-DS-01 백신접종의 효과를 더 연구하기 위해, 전체 길이의 APP(FL-APP) 및 그의 C-말단 단편 App-CTF(C-83 플러스 C-99)의 레벨을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다.

[0188] 뇌 추출물에서 감지할 수 있는 항-Aβ IgG는 없었다.

[0189] 실시예 5 Ts65Dn ACI-DS-01-치료된 마우스 뇌의 형태학적 시험

[0190] ACI-DS-01 백신이 형태학적 이상의 회복에 의해 기억 결핍을 구할 수 있는 가를 판독하기 위해, 면역조직학적 분석을 수행하였다. 특히, 맥락적 학습과 연관됨을 나타낸 청반(locus coeruleus) 및 해마에서 뉴런의 퇴화를 시험하였다. 콜린성 뉴런의 크기 및 수는 NT 수용체인 p75NTR에 대한 면역조직화학 염색에 의해 확인하였다.

[0191] 해마 신경분포를 시험하기 위해, p75NTR 및 ChAT(아세틸콜린에 대한 전달체)에 대한 면역-염색의 강도를 측정하였다.

[0192] 또한, 콜린성 말단에서 Rab5b 양성 엔도솜의 분석은 VAChT에 대한 항체를 사용하여 시각화하였다.

[0193] 실시예 6 리포솜 백신 ACI-DS-01의 안전성

[0194] ACI-DS-01과의 면역화가 안전성 인식을 유도하는지의 여부를 판정하기 위해, 마우스의 체중, 일반적 관찰, 및 염증 표지를 기록하였다. 치료 전, Ts65Dn 마우스는 2N 마우스보다 유의하게 낮은 체중을 가졌다 (분산 분석, 터키 포스톡, p=0.001). 면역화는 체중을 유의하게 변경하지 못했다(도 5A). 뇌 중량은 마우스의 모든 4 군에서 유사했다(도 5A). 면역조직화학 결과는 신경교 섬유질 산성 단백질(GFAP)-양성 별아교 세포(astroglial cells) 또는 CD45-양성 미세아교 세포(microglial cells)의 수에 있어서 차이가 없다는 것을 나타냈다. 수득된 결과는 피질 및 해마에서 유사했다(도 5). 이들 결과는 ACI-DS-01 백신접종이 염증 반응을 유도하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0195] ACI-DS-01 유도된 항체의 특이성을 입증하기 위해 교차 반응 연구를 수행하였다. 2N 및 Ts65Dn의 뇌 절편은 ACI-DS-01-치료된 2N 마우스의 항혈청으로 염색하였다.

[0196] 요약하면, 이들 조사 결과들은 ACI-DS-01가 안전한 백신임을 나타낸다.

[0197] [참조 리스트]

1. Antonarakis,S.E., Lyle,R., Dermitzakis,E.T., Reymond,A., Deutsch,S., 2004. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. Nat. Rev. Genet. 5, 725-738.
2. Ballard,C., Gauthier,S., Corbett,A., Brayne,C., Aarsland,D., Jones,E., 2011. Alzheimer's disease. Lancet. 377, 1019-1031.
3. Belichenko,N.P., Belichenko,P.V., Kleschevnikov,A.M., Salehi,A., Reeves,R.H., Mobley,W.C., 2009. The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. J Neurosci. 29, 5938-5948.
4. Belichenko,P.V., Kleschevnikov,A.M., Salehi,A., Epstein,C.J., Mobley,W.C., 2007. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. J Comp. Neurol. 504, 329-345.
5. Bevins,R.A., Besheer,J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. Nat. Protoc. 1, 1306-1311.
6. Davisson,M.T., Schmidt,C., Reeves,R.H., Irving,N.G., Akeson,E.C., Harris,B.S., Bronson,R.T., 1993. Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. Prog. Clin. Biol. Res. 384, 117-133.
7. Deacon,R.M., Rawlins,J.N., 2006. T-maze alternation in the rodent. Nat. Protoc. 1, 7-12.
8. Gilman,S., Koller,M., Black,R.S., Jenkins,L., Griffith,S.G., Fox,N.C., Eisner,L., Kirby,L., Boada,R.M., Forette,F., Orgogozo,J.M., 2005. Clinical effects of A{beta} immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. Neurology.
9. Hunter,C.L., Bimonte-Nelson,H.A., Nelson,M., Eckman,C.B., Granholm,A.C., 2004. Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. Neurobiol. Aging. 25, 873-884.
10. Lee,M., Bard,F., Johnson-Wood,K., Lee,C., Hu,K., Griffith,S.G., Black,R.S., Schenk,D., Seubert,P., 2005. Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. Ann. Neurol. 58, 430-435.
11. Lemere,C.A., Blusztajn,J.K., Yamaguchi,H., Wisniewski,T., Saido,T.C., Selkoe,D.J., 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-

[0198]

peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. Neurobiol Dis. 3, 16-32.

12. Liu,F., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., Oda,Y., Tomizawa,K., Gong,C.X., 2005. Truncation and activation of calcineurin a by calpain I in Alzheimer disease brain. J. Biol. Chem. 280, 37755-37762.

13. Liu,F., Liang,Z., Wegiel,J., Hwang,Y.W., Iqbal,K., Grundke-Iqbal,I., Ramakrishna,N., Gong,C.X., 2008. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. FASEB J. 22, 3224-3233.

14. Moncaster,J.A., Pineda,R., Moir,R.D., Lu,S., Burton,M.A., Ghosh,J.G., Ericsson,M., Soscia,S.J., Mocofanescu,A., Folkerth,R.D., Robb,R.M., Kuszak,J.R., Clark,J.I., Tanzi,R.E., Hunter,D.G., Goldstein,L.E., 2010. Alzheimer's disease amyloid-beta links lens and brain pathology in Down syndrome. PLoS One 5, e10659.

15. Monsonego,A., Maron,R., Zota,V., Selkoe,D.J., Weiner,H.L., 2001. Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 10273-10278.

16. Netzer,W.J., Powell,C., Nong,Y., Blundell,J., Wong,L., Duff,K., Flajolet,M., Greengard,P., 2010. Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. PLoS One 5, e10943.

17. Nicolau,C., Greferath,R., Balaban,T.S., Lazarte,J.E., Hopkins,R.J., 2002. A liposome-based therapeutic vaccine against beta -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 2332 2337.

18. O'Doherty,A., Ruf,S., Mulligan,C., Hildreth,V., Errington,M.L., Cooke,S., Sesay,A., Modino,S., Vanes,L., Hernandez,D., Linehan,J.M., Sharpe,P.T., Brandner,S., Bliss,T.V., Henderson,D.J., Nizetic,D., Tybulewicz,V.L., Fisher,E.M., 2005. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. Science. 309, 2033-2037.

19. Prasher,V.P., 1993. Down's syndrome, longevity, and Alzheimer's disease. Br. J Psychiatry. 162, 711.

20. Prasher,V.P., 2004. Review of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine for the treatment of dementia in Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: implications for the intellectual disability population. Int. J Geriatr. Psychiatry. 19, 509-515.

21. Rafii,M.S., 2010. The pulse of drug development for Alzheimer's disease. Rev. Recent. Clin. Trials. 5, 57-62.

22. Saxe,M.D., Battaglia,F., Wang,J.W., Malleret,G., David,D.J., Monckton,J.E., Garcia,A.D., Sofroniew,M.V., Kandel,E.R., Santarelli,L., Hen,R., Drew,M.R.,

[0199]

2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 17501-17506.

23. Stanton L.R, Coetzee R.H . Down's syndrome and dementia. 10, 50-58. 2004. Advances in Psychiatric Treatment .
Ref Type: Generic

24. Stoltzner,S.E., Grenfell,T.J., Mori,C., Wisniewski,K.E., Wisniewski,T.M., Selkoe,D.J., Lemere,C.A., 2000. Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 156, 489-499.

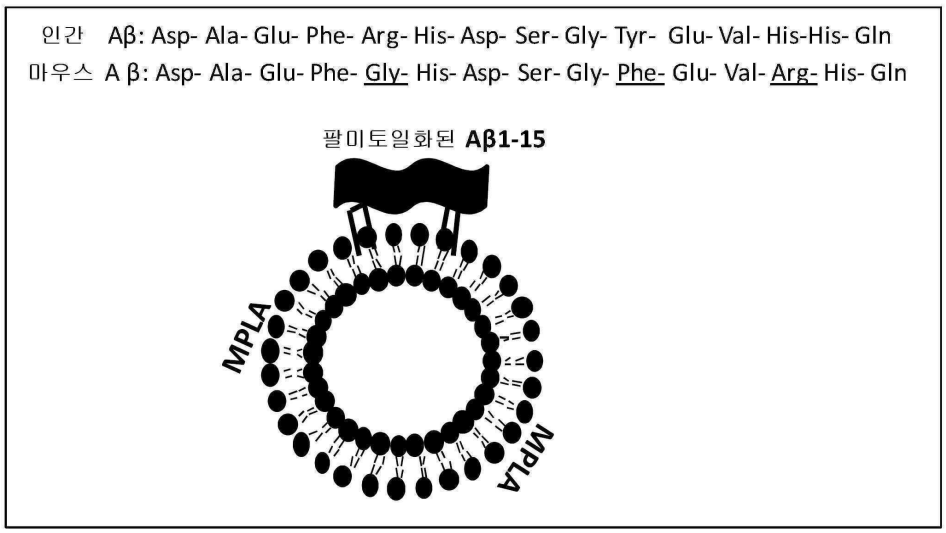
25. Tapiola,T., Soininen,H., Pirttila,T., 2001. CSF tau and Abeta42 levels in patients with Down's syndrome. Neurology. 56, 979-980.

26. Weiner,H.L., Frenkel,D., 2006. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. Nat. Rev. Immunol. 6, 404-416.

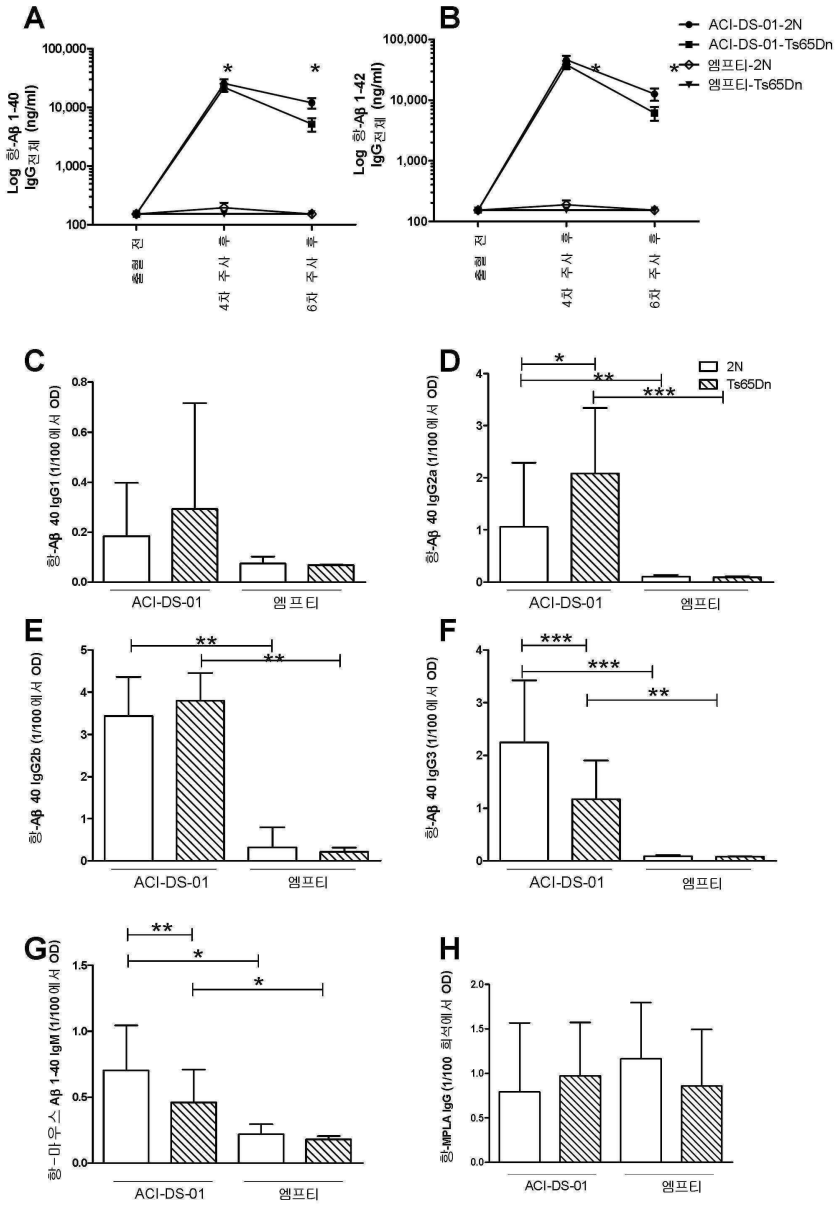
[0200]

도면

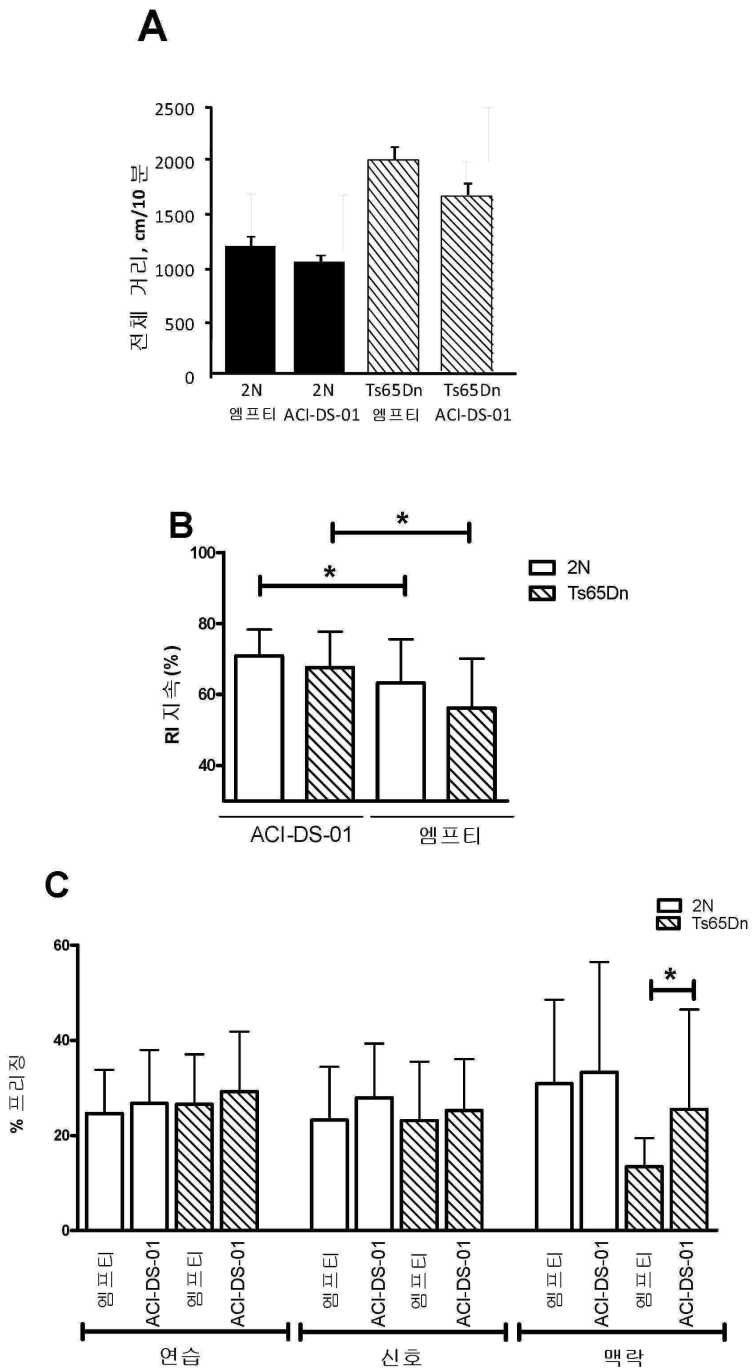
도면1


인간 Aβ: Asp- Ala- Glu- Phe- Arg- His- Asp- Ser- Gly- Tyr- Glu- Val- His-His- Gln
마우스 A β: Asp- Ala- Glu- Phe- Gly- His- Asp- Ser- Gly- Phe- Glu- Val- Arg- His- Gln
팔미토일화된 Aβ1-15
MPLA
MPLA

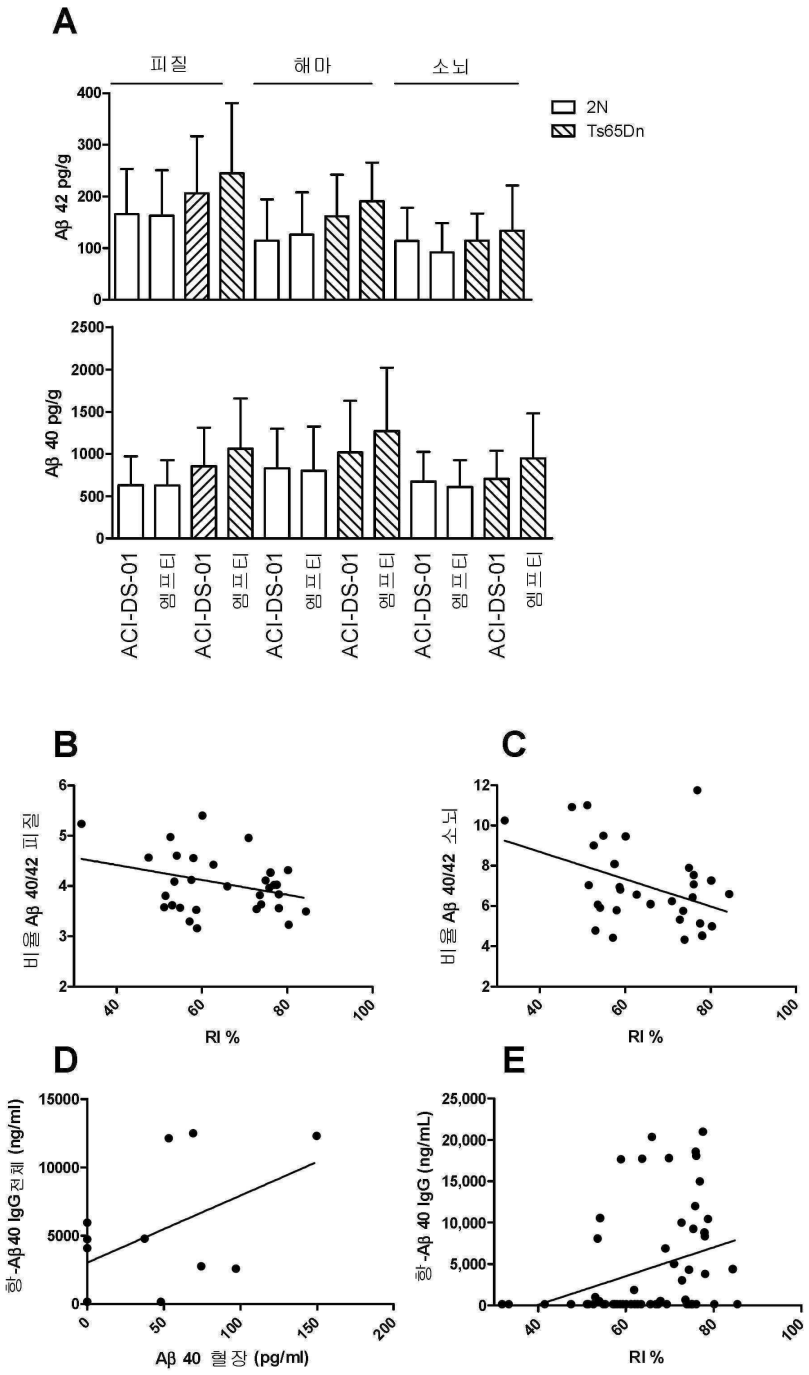
도면2


A
B
ACI-DS-01-2N
ACI-DS-01-Ts65Dn
엠프티-2N
엠프티-Ts65Dn
Log 항-Aβ 1-40 IgG전체 (ng/ml)
Log 항-Aβ 1-42 IgG전체 (ng/ml)
100,000
10,000
1,000
100
출혈 전
4차 주사 후
6차 주사 후
C
D
E
F
G
H
2N
Ts65Dn
항-Aβ 40 IgG1 (1/100 에서 OD)
항-Aβ 40 IgG2a (1/100 에서 OD)
항-Aβ 40 IgG2b (1/100 에서 OD)
항-Aβ 40 IgG3 (1/100 에서 OD)
항-마우스 Aβ 1-40 IgM (1/100 에서 OD)
항-MPLA IgG (1/100 희석에서 OD)
ACI-DS-01
엠프티

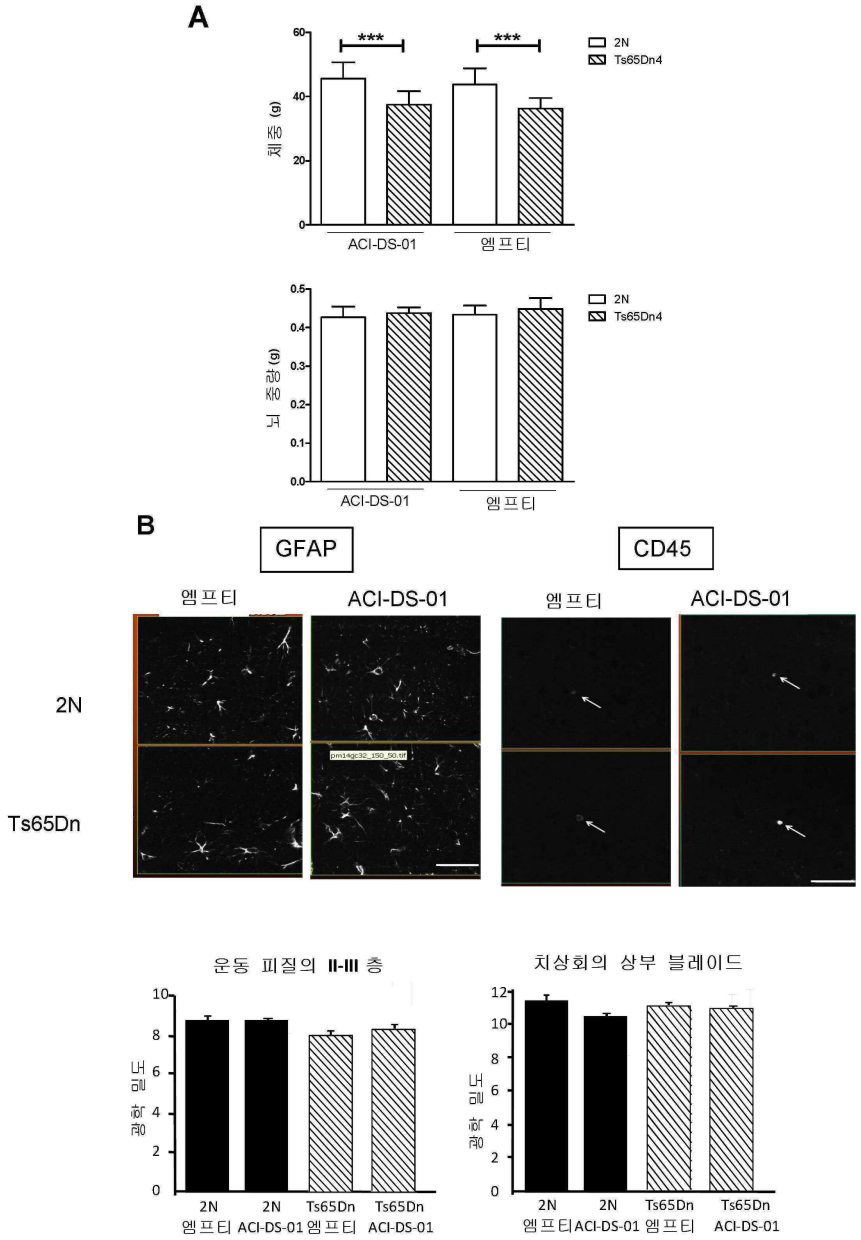
도면3


A
2500
2000
1500
1000
500
0
전체 거리, cm/10 분
2N 엠프티
2N ACI-DS-01
Ts65Dn 엠프티
Ts65Dn ACI-DS-01
B
100
80
60
40
RI 지속 (%)
*
*
2N
Ts65Dn
ACI-DS-01
엠프티
C
60
40
20
0
% 프리징
2N
Ts65Dn
*
엠프티
ACI-DS-01
엠프티
ACI-DS-01
엠프티
ACI-DS-01
엠프티
ACI-DS-01
엠프티
ACI-DS-01
엠프티
ACI-DS-01
연습
신호
맥락

도면4


A
피질
해마
소뇌
2N
Ts65Dn
Aβ 42 pg/g
Aβ 40 pg/g
ACI-DS-01
엠프티
B
비율 Aβ 40/42 피질
RI %
C
비율 Aβ 40/42 소뇌
RI %
D
항-Aβ40 IgG전체 (ng/ml)
Aβ 40 혈장 (pg/ml)
E
항-Aβ 40 IgG (ng/mL)
RI %

도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> AC Immune S.A.

PFEIFER, Andrea

MUHS, Andreas

MADANI, Rime

VASILYEVICH, Pavel Belichenko

MOBLEY, William

<120> Vaccine Therapy

<130> T2817 PCT BS

<140> PCT/US2011/052992

<141> 2011-09-23

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15