(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0029627
(43) 공개일자 2020년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 31/4155 (2006.01) *A61K 31/7068* (2006.01)
A61K 33/36 (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7007068(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년03월12일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-7028294
원출원일자(국제) 2015년03월12일
심사청구일자 2017년11월09일
(85) 번역문제출일자 2020년03월10일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2015/050265
(87) 국제공개번호 WO 2015/136541
국제공개일자 2015년09월17일
(30) 우선권주장
61/951,783 2014년03월12일 미국(US)
62/030,164 2014년07월29일 미국(US)

(71) 출원인
예다 리서치 앤드 디벨럽먼트 캄파니 리미티드
이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스
(72) 발명자
아이젠바흐-슈왈츠, 마이클
이스라엘, 7610002 레호보트, 웨이쯔만 인스티튜트 오브 사이언스, 하우스 4, 뉴 사이언티스츠 하우징 앨리 에이치
바루크, 쿠티
이스라엘, 7610002 레호보트, 피.오. 박스 95, 웨이쯔만 인스티튜트 오브 사이언스, 예다 리서치 앤드 디벨럽먼트 캄파니 리미티드 내
로젠츠바이크, 네타
이스라엘, 7610002 레호보트, 피.오. 박스 95, 웨이쯔만 인스티튜트 오브 사이언스, 예다 리서치 앤드 디벨럽먼트 캄파니 리미티드 내
(74) 대리인
특허법인한얼

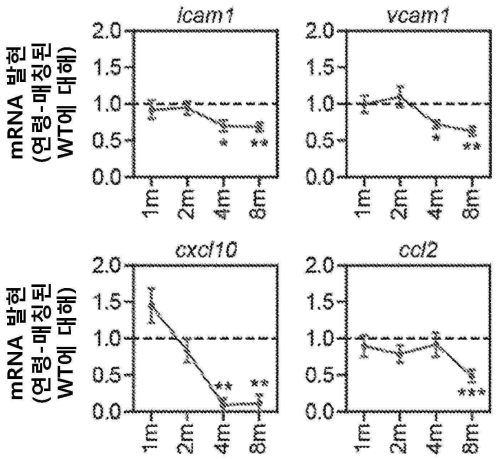
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **CNS의 질환 및 손상을 치료하기 위한 전신적 조절 T 세포 수준 또는 활성의 감소**

(57) 요 약

자가면역 신경염증성 질환, 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 사용하기 위한, 개체에서 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 활성제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 제약 조성물은 두 과정 이상의 치료를 포함하는 투여 요법에 의한 투여를 위한 것이고, 치료의 각각의 과정은 순차적으로 치료 세션 후에 간격 세션을 포함한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/4155 (2013.01)
A61K 31/7068 (2013.01)
A61K 33/36 (2013.01)
A61K 38/208 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

자가면역 신경염증성 질환, 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 사용하기 위한, 개체에서 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 활성제를 포함하는 제약 조성물로서, 여기서 상기 제약 조성물이 두 과정 이상의 치료를 포함하는 투여 요법에 의한 투여를 위한 것이고, 치료의 각각의 과정은 순차적으로 치료 세션(treatment session) 후에 간격 세션(interval session)을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치료 세션이 상기 제약 조성물을 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 치료 세션이 적어도 상기 수준이 기준 미만으로 하락할 때까지 유지되고, 상기 투여가 간격 세션 동안에 중단되고, 상기 간격 세션이 상기 수준이 상기 기준 미만인 동안은 유지되는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 기준이:

(a) 상기 투여 전에 상기 개체로부터 수득된 가장 최근의 혈액 샘플에서 측정된 조절 T 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준; 또는

(b) CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상으로 고통받는 개체의 모집단에 특유한 조절 T 세포 또는 골수-유래 억제 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준

으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 기준이 상기 투여 전에 상기 개체로부터 수득된 가장 최근의 혈액 샘플에서 측정된 조절 T 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준인 것인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 치료 세션이 상기 제약 조성물을 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 치료 세션이 적어도 IFNγ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 수준이 기준 초과로 상승할 때까지 유지되고, 상기 투여가 간격 세션 동안에 중단되고, 상기 간격 세션이 상기 수준이 상기 기준 초과인 동안은 유지되고,

여기서 상기 기준이:

(a) 상기 투여 전에 상기 개체로부터 수득된 가장 최근의 혈액 샘플에서 측정된 IFNγ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 활성의 수준; 또는

(b) CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상으로 고통받는 개체의 모집단에 특유한 IFNγ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 활성의 수준

으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 세션의 기간이 1 내지 4주인 것인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 간격 세션의 기간이 2주 내지 6개월인 것인 제약 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 T 세포가 CD25, CD127, GITR, CTLA-4 또는 PD-1 중 하나 이상을 발현하는 $FoxP3^+$ 세포; 또는 CD25, CD127, GITR, CTLA-4 또는 PD-1 표면 분자 중 하나 이상을 발현하는 $FoxP3^-$ 세포로부터 선택된 $CD4^+$ 세포인 것인 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조절 T 세포가 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 세포 또는 $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ 세포인 것인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성제가 다음으로부터 선택되는 것인 제약 조성물:

(i) 다음으로부터 선택된 항체:

(a) 항-PD-1;

(b) 항-PD-L1;

(c) 항-PD-L2

(d) 항-CTLA-4;

(e) 인터페론 α와 조합된 항-PD-1;

(f) 항-CTLA-4와 조합된 항-PD-1;

(g) 항-CD47;

(h) 항-OX40;

(i) 항-VEGF-A;

(j) 항-CD25;

(k) 항-GITR;

(l) 항-CCR4;

(m) 항-TIM-3/갈렉틴9;

(n) 항-킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체;

(o) 항-LAG-3; 또는

(p) 항-4-1BB;

(ii) (a) 내지 (p)의 임의의 조합물;

(iii) 아주반트와 조합된 (a) 내지 (p)의 임의의 조합물, 예컨대 항 OX40 항체 및 TLR9 리간드, 예컨대 CpG와 조합된 항-CTLA-4 항체.

(iv) 다음으로부터 선택된 소 분자:

(a) p300 억제제, 예컨대 C646, C146, C375 및 겜시타빈;

(b) 수니티닙;

(c) 폴리옥소메탈레이트-1 (POM-1);

(d) α,β-메틸렌아데노신 5' -디포스페이트 (APCP);

(e) 삼산화비소 (As_2O_3);

(f) GX15-070 (오바토클락스);

(g) 레티노산 길항제, 예컨대 Ro 41-5253 또는 LE-135;

(h) 단독 작용제로서 또는 항-CD47 항체와 조합된, SIRPα (CD47) 길항제, 예컨대 CV1-hIgG4;

(i) 단독 작용제로서 또는 항-CCR4 항체와 조합된, CCR4 길항제, 예컨대 AF399/420/18025;

(j) 아데노신 A2B 수용체 길항제, 예컨대 PSB603;

(k) 인돌아민-2,3-디옥시게나제의 길항제; 또는

(l) HIF-1 조절제;

(v) 다음으로부터 선택된 단백질:

(a) 님 잎 당단백질 (Neem leaf glycoprotein: NLGP); 또는

(b) sCTLA-4;

(vi) 침묵(silencing) 분자, 예컨대 miR-126 안티센스 및 항-갈렉틴-1 (Gal-1);

(vii) OK-432;

(viii) IL-12와 항-CTLA-4의 조합물;

(ix) 항생제, 예컨대 반코마이신; 또는

(x) (i) 내지 (ix)의 임의의 조합물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 작용제가 PD-1에 대한 특이적인 항체인 것인 제약 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 작용제가 p300 억제제인 것인 제약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 p300 억제제가 C646인 것인 제약 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 알츠하이머병; 근위축성 측삭경화증; 파킨슨병, 헌팅턴병; 일차 진행형 다발성 경화증; 이차 진행형 다발성 경화증;피질기저 핵변성(corticobasal degeneration); 레트 증후군; 연령 관련 황반 변성 및 망막색소 변성증으로 이루어진 군으로부터 선택된 망막 변성 장애; 전방 허혈성 시신경병증; 녹내장; 포도막염; 우울증; 외상 연관 스트레스 또는 외상 후 스트레스 장애; 전두측두엽 치매; 루이소체 치매; 경도 인지 장애; 후두 피질 위축증; 일차 진행형 실어증; 진행성 핵상 안근마비 또는 연령 관련 치매로부터 선택된 신경변성 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 신경변성 질환, 장애 또는 병태가 알츠하이머병, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨병 및 헌팅턴병으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 알츠하이머병을 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 척수 손상, 폐쇄성 뇌 손상, 둔상, 관통성 외상, 출혈성 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 대뇌 허혈, 시신경 손상, 심근 경색, 유기인산염 중독 및 종양 절제로 인한 손상으로부터 선택된 CNS의 손상을 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료가 CNS 운동 및/또는 인지 기능을 개선시키는 것인 제약 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 연령 연관 인지 기능의 상실을 경감시키는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 연령 연관 인지 기능의 상실이 진단된 질환이 없는 개체에서 일어나는 것인 제약 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 급성 스트레스 또는 외상 에피소드로부터 생기는 인지 기능의 상실을 경감시키는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인지 기능이 학습, 기억 또는 둘 다인 것인 제약 조성물.

청구항 23

자가면역 신경염증성 질환 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, 중추신경계 (CNS)의 질환, 장애, 병태 또는 손상의 치료를 필요로 하는 개체에게 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상의 치료 방법으로서, 상기 제약 조성물이 두 과정 이상의 치료를 포함하는 투여 요법에 의해 투여되고, 치료의 각각의 과정은 순차적으로 치료 세션 후에 간격 세션을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

자가면역 신경염증성 질환 RRMS를 포함하지 않는 CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물로서, 상기 제약 조성물이 다음으로부터 선택된, 개체에서 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 활성제를 포함하는 것인 제약 조성물:

(i) 다음으로부터 선택된 항체:

(a) 항-CD47;

(b) 항-OX40;

(c) 항-VEGF-A (베바시주맙);

(d) 항-CD25;

(e) 항-GITR (GITR 유발 mAb (DTA-1));

(f) 항-CCR4;

(g) 항-TIM-3/갈렉틴9;

(h) 항-킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체;

(i) 항-LAG-3; 또는

(j) 항-4-1BB;

(ii) (a) 내지 (j)의 임의의 조합물;

(iii) 아주반트, 예컨대 TLR9 리간드, 예컨대 CpG와 조합된, (a) 내지 (j)의 임의의 조합물;

(iv) 다음으로부터 선택된 단백질:

(a) 님 잎 당단백질 (NLGP); 또는

(b) sCTLA-4;

(v) 다음으로부터 선택된 소 분자:

(a) 수니티닙;

(b) 폴리옥소메탈레이트-1 (POM-1);

(c) α,β-메틸렌아데노신 5' -디포스페이트 (APCP);

(d) 삼산화비소 (As_2O_3);

(e) GX15-070 (오바토클락스);

(f) 레티노산 길항제, 예컨대 Ro 41-5253 또는 LE-135;

(g) 단독 작용제로서 또는 항-CD47 항체와 조합된, SIRPα (CD47) 길항제, 예컨대 CV1-hIgG4;

(h) 단독 작용제로서 또는 항-CCR4 항체와 조합된, CCR4 길항제, 예컨대 AF399/420/18025;

(i) 아데노신 A2B 수용체 길항제, 예컨대 PSB603;

(j) 인돌아민-2,3-디옥시게나제의 길항제; 또는

(k) HIF-1 조절제;

(vi) 침묵 분자, 예컨대 miR-126 안티센스 및 항-갈렉틴-1 (Gal-1);

(vii) OK-432;

(viii) IL-12와 항-CTLA-4의 조합물;

(ix) 항생제, 예컨대 반코마이신; 또는

(x) (i) 내지 (ix)의 임의의 조합물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로, 순환(circulation)에서 전신 면역억제의 수준을 일시적으로 감소시킴으로써 중추신경계(CNS)의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대부분의 중추신경계 (CNS) 병리는 질환 진행의 일부이고, 질환 악화의 한 원인이 되는 일반적인 신경염증성 구성 요소를 공유한다. 이들 병리 중에 기억과 인지 기능의 진행성 상실을 특징으로 하는, 연령 관련(age-related) 신경변성 질환인 알츠하이머병 (AD)이 있으며, 여기서 아밀로이드-베타 (Aβ) 펩티드 응집체의 축적은, CNS 내의 염증성 캐스케이드에서 핵심적인 역할을 하며, 이는 신경 손상 및 조직 파괴을 야기하는 것으로 제안되었다 (Akiyama et al, 2000; Hardy & Selkoe, 2002; Vom Berg et al, 2012). 신경변성 질환에서 만성 신경염증 반응에도 불구하고, 신경변성 질환에서 면역억제-기반 치료를 조사하는, 지난 십년에 걸친 임상 및 전임상 연구는 항염증 약물이 왜 미흡한지에 대한 의문을 제기하였다 (Breitner et al, 2009; Group et al, 2007; Wyss-Coray & Rogers, 2012). 본 발명자들은 AD 및 CNS의 유사한 질환 및 손상의 기존 치료의 단점을 극복하는 새로운 해결책을 제공하며; 이 방법은 CNS의 유지 및 회복에 전신 및 중추 면역 체계의 상이한 구성 요소의 역할에 대한 본 발명자들의 독특한 이해를 기반으로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 AD 및 CNS의 유사한 질환 및 손상의 기존 치료의 단점을 극복하는 새로운 해결책을 제공하기 위한 것

이다.

과제의 해결 수단

[0004] 한 측면에서, 본 발명은 자가면역 신경염증성 질환, 재발 완화형(relapsing-remitting) 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 사용하기 위한, 개체에서 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 활성제를 포함하는 제약 조성물로서, 여기서 상기 제약 조성물이 두 과정 이상의 치료를 포함하는 투여 요법(dosage regimen)에 의한 투여를 위한 것이고, 치료의 각각의 과정은 순차적으로 치료 세션(treatment session) 후에 무-치료(non-treatment)의 간격 세션(interval session)을 포함하는 것인 제약 조성물을 제공한다.

[0005] 또 다른 측면에서, 본 발명은 자가면역 신경염증성 질환 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, 중추신경계 (CNS)의 질환, 장애, 병태 또는 손상의 치료를 필요로 하는 개체에게 청구항 1 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 따른 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상의 치료 방법으로서, 상기 제약 조성물이 두 과정 이상의 치료를 포함하는 투여 요법에 의해 투여되고, 치료의 각각의 과정은 순차적으로 치료 세션 후에 무-치료 기간의 간격 세션을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0006] 본 발명에 따르면, 자가면역 신경염증성 질환, 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 사용하기 위한, 개체에서 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 활성제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0007] **도 1A-B**는 AD의 5XFAD 트랜스제닉(transgenic) 마우스 모델 (AD-Tg)에서 질환 진행에 따른 맥락막총(choroid plexus) (CP) 활성을 도시한다. (**A**) 연령-매칭된(age-matched) WT 대조군과 비교된 배수-변화(fold-change)로서 나타낸, 1, 2, 4 및 8-개월 연령 AD-Tg 마우스로부터 단리된 CP에서, RT-qPCR에 의해 측정된, 유전자 *icam1*, *vcam1*, *cxcl10* 및 *ccl2*의 mRNA 발현 수준 (군당 n=6-8; 각각의 시점에 대한 스튜던트 t 검정(Student's t test)). (**B**) 상피 밀착 연결 분자 클라우딘(Claudin)-1, 헥스트(Hoechst) 핵 염색, 및 인테그린 리간드, ICAM-1에 대해 면역염색된 8-개월 연령 AD-Tg 마우스 및 연령-매칭된 WT 대조군의 CP의 대표적 현미경 상 (스케일 바(scale bar), 50 ㎛). 모든 패널에서, 오차 막대(error bar)는 평균 ± s.e.m.; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$을 나타낸다.

도 2A-C는 (**A**) 젊은 및 고령의 비(non)-CNS 질환에 걸린, 및 AD 환자의 인간 사후 CP에서 ICAM-1 면역반응성의 정량 (군당 n=5; 일원분산분석(one-way ANOVA) 후에 뉴먼-쿨스(Newman-Keuls) 사후 분석); (**B**) 8-개월 연령 AD-Tg 마우스 및 연령-매칭된 WT 대조군의 CP에서 IFN-γ-발현 면역 세포 (세포내 염색되고, CD45상에 프리-게이트됨(pre-gated))에 대한 유동세포 계수법 분석. (음영 히스토그램은 이소형(isotype) 대조군 (군당 n=4-6; 스튜던트 t 검정)을 나타낸다); 및 (**C**) 연령-매칭된 WT 대조군과 비교된, 4- 및 8-개월 연령 AD-Tg 마우스로부터 단리된 CP 조직에서, RT-qPCR에 의해 측정된, *ifn-γ*의 mRNA 발현 수준 (군당 n=5-8; 각각의 시점에 대한 스튜던트 t 검정)을 나타낸다. 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$을 나타낸다.

도 3A-B는 (**A**) 8-개월 연령 AD-Tg 및 WT 대조군 마우스에서 $CD4^{+}Foxp3^{+}$ 비장세포(splenocyte) 빈도(frequency)의 대표적 유동세포 계수법 플롯; 및 (**B**) 1, 2, 4 및 8-개월 AD-Tg 및 WT 대조군 마우스로부터의 비장세포의 정량 분석 (군당 n=6-8; 각각의 시점에 대한 스튜던트 t 검정)을 도시한다. 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$을 나타낸다.

도 4는 DTx의 마지막 주사 후 1일, AD-Tg/Foxp3-$DTR^{+/-}$ 마우스로부터의 비장세포의 게이팅 전략(gating strategy) 및 대표적 유동세포 계수법 플롯을 나타낸다. DTx를 연이어 4일 동안 복강내 주사하여, $Foxp3^{+}$ 세포의 ~99% 고갈을 달성하였다.

도 5A-G는 AD-Tg 마우스에서 Treg의 일시적 고갈의 영향을 나타낸다. (**A**) AD-Tg/Foxp3-DTR^{+} (이는 DTR 트랜스진을 발현함) 및 비(non)-DTR-발현 AD-Tg 한배새끼 (AD-Tg/Foxp3-DTR^{-}) 대조군을 연이어 4일 동안 DTx로 치료하

였다. 마지막 DTx 주사 후 1일, 6-개월 연령 DTx-치료된 AD-Tg 마우스에서, RT-qPCR에 의해 측정된, 유전자 *icam1*, *cxcl10* 및 *ccl2*에 대한 CP mRNA 발현 수준 (군당 n=6-8; 스튜던트 t 검정). **(B-D)** 마지막 DTx 주사 후에 3주, 6-개월 연령 DTx-치료된 AD-Tg 마우스 및 대조군의 뇌 실질(parenchyma) (별도 절제된, 맥락막총 제외)의 유동세포 계수법 분석. DTx로 치료된, AD-Tg/Foxp3-DTR^{+} 마우스 및 AD-Tg/Foxp3-DTR^{-}대조군의 뇌 실질에서, 증가된 수의 CD11b^{높은}/CD45^{높은} mo-MΦ 및 CD4^{+} T 세포를 나타내는 정량적 유동세포 계수법 분석 (**B**), 및 대표적 유동세포 계수법 플롯 (**C**) 및 CD4^{+}Foxp3^{+} Treg 빈도의 정량 분석 (**D**) (군당 n=3-7; 스튜던트 t 검정). **(E)** 마지막 DTx 주사 후 3주, 6-개월 연령 DTx-치료된 AD-Tg AD-Tg/Foxp3-DTR^{+} 및 AD-Tg/Foxp3-DTR^{-} 대조군의 뇌 실질에서 *foxp3* 및 *il10*의 mRNA 발현 수준 (군당 n=6-8; 스튜던트 t 검정). **(F)** 마지막 DTx 주사 후에 3주, 6-개월 연령 DTx-치료된 AD-Tg/Foxp3-DTR^{+} 및 AD-Tg/Foxp3-DTR^{-} 대조군 마우스로부터의 해마 절편에서 감소된 성상교세포증(astrogliosis)을 나타내는, GFAP 면역염색의 정량 분석 (스케일 바, 50 ㎛; 군당 n=3-5; 스튜던트 t 검정). **(G)** 마지막 DTx 주사 후에 3주, 뇌 실질에서 *il-12p40* 및 *tnf-a*의 mRNA 발현 수준 (군당 n=6-8; 스튜던트 t 검정). 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05; **, P < 0.01;***, P < 0.001을 나타낸다.

도 6A-E는 Aβ 플라크 학습/기억 성능에 미치는 Treg의 일시적 고갈의 영향을 나타낸다. 훽스트 핵 염색 및 Aβ 플라크에 대해 면역염색된, 마지막 DTx 주사 후 3주, 5-개월 연령 DTx-치료된 AD-Tg/Foxp3-DTR^{+} 및 AD-Tg/Foxp3-DTR^{-} 대조군 마우스 뇌의, (**A**) 대표적 현미경 상 및 (**B**) 정량 분석 (스케일 바, 250 ㎛). 대뇌 피질의 5번째 층 및 해마의 치상회(dentate gyrus) (DG)에서 평균 Aβ 플라크 면적 및 수를 정량화하였다 (6 ㎛ 뇌 슬라이스(slice)로); 군당 n=5-6; 스튜던트 t 검정). **도 6C-E)**는 마지막 DTx 주사 후 3주, 6-개월 연령 DTx-치료된 AD-Tg/Foxp3-DTR^{+} 및 대조군 마우스의 모리스 수중 미로(Morris water maze) (MWM) 시험 성능을 나타낸다. 일시적 Treg 고갈 후에, AD-Tg 마우스는 AD-Tg 대조군에 비해, MWM의 (**C**) 획득, (**D**) 프로브(probe) 및 (**E**) 역전 위상(reversal phase)에서 보다 양호한 공간 학습/기억 성능을 나타냈다 (군당 n=7-9; 개별 쌍별 비교를 위해 이원배치 반복 측정 분산분석(two-way repeated measures ANOVA) 후에 본페로니(Bonferroni) 사후 분석; *, P < 0.05 (전체 획득, 프로브, 및 역전에 대해)). 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05; **, P < 0.01;***, P < 0.001을 나타낸다.

도 7은 연령-매칭된 WT 대조군과 비교된, 6- 및 12-개월 연령 APP/PS1 AD-Tg 마우스 (알츠하이머병에 대한 마우스 모델 (물질 및 방법(Materials and Methods) 참조))로부터 단리된 CP에서, RT-qPCR에 의해 측정된, *ifn-γ*의 mRNA 발현 수준을 나타낸다 (군당 n=5-8; 스튜던트 t 검정). 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05를 나타낸다.

도 8A-I는 AD-Tg 마우스에서 매주 글라티라머 아세테이트(Glatiramer acetate) (GA)의 투여의 치료 효과를 나타낸다. (**A**) 매주-GA 치료 요법의 개략적 표시. 마우스 (5-개월 연령)에게 GA (100 ㎍)를 4주의 전체 기간 동안, 제1주 동안에 2회 (1일 및 4일째), 및 그 후에 매주 1회 피하 투여하였다. 마우스를 마지막 주사 후, 1주 (MWM), 1개월 (RAWM) 및 2개월 (RAWM, 상이한 실험 공간 설정을 사용)에, 인지 수행(cognitive performance)에 대해, 및 해마 염증에 대해 조사하였다. **도 8B-D**는 매주-GA 치료된 마우스에서, (**B**) 염증-유발성(pro-inflammatory) 시토카인, 예컨대 TNF-α, IL-1β 및 IL-12p40의 감소된 발현, (**C**) 항-염증성 시토카인 IL-10 및 TGF-β의 상승, 및 (**D**) 향신경성 인자(neurotropic factor), IGF-1 및 BDNF의 상승을 나타내는, 미치료(untreated) AD-Tg 마우스, 및 매주-GA로 치료된 AD-Tg 마우스 (6m의 연령에서)의 해마에서 유전자의 mRNA 발현 수준 (군당 n=6-8; 스튜던트 t 검정)을 나타낸다. **도 8E-G**에서, AD-Tg 마우스 (5개월 연령)를 매주-GA 또는 비히클 (PBS) 중 어느 하나로 치료하고, 6m의 연령에서 MWM 과제(task)에서 연령-매칭된 WT 한배새끼와 비교하였다. 치료된 마우스는 대조군과 비교하여, MWM의 획득 (**E**), 프로브 (**F**) 및 역전 (**G**) 위상에서 보다 양호한 공간 학습/기억 성능을 나타냈다 (군당 n=6-9; 개별 쌍별 비교를 위해 이원배치 반복 측정 분산분석 후에 본페로니 사후). 도 **8H-I**는 마지막 GA 주사 후에 1개월 (**H**) 또는 2개월 (**I**), RAWM 과제에서 동일한 마우스의 인지 수행을 나타낸다 (군당 n=6-9; 개별 쌍별 비교를 위해 이원배치 반복 측정 분산분석 후에 본페로니 사후). 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험의 대표이다. 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05; **, P < 0.01;***, P < 0.001을 나타낸다.

도 9A-H는 AD-Tg 마우스에서 매주-GA의 투여의 추가 치료 효과를 나타낸다. **A-B는** 매주-GA, 또는 비히클 (PBS) 중 어느 하나로 치료되고, 투여 요법의 제1주의 종료시에 (총 2회의 GA 주사 후에) 조사된 5XFAD AD-Tg 마우스

를 나타낸다. 연령-매칭된 WT 대조군과 비교된, 치료된 6-개월 연령 AD-Tg 마우스에서, $CD4^{+}Foxp3^{+}$ 비장세포 빈도 (**A**), 및 CP IFN-γ-발현 면역 세포 (**B**; 세포내 염색되고, CD45상에 프리-게이트됨)에 대한 유동세포 계수법 분석 (군당 n=4-6; 일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석). (**C**) 매주-GA 또는 비히클 중 어느 하나로 치료되고, 매주-GA 요법의 제1주 또는 제4주 중 어느 하나의 종료시에 조사된 4-개월 연령 AD-Tg 마우스의 CP에서, RT-qPCR에 의해 측정된, 유전자 *icam1*, *cxcl10* 및 *ccl2*에 대한 mRNA 발현 수준 (군당 n=6-8; 일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석). **도 9D-E**는 매주-GA 후에 6-개월 연령 AD-Tg/$CX_3CR1^{GFP/+}$ BM 키메라로부터 뇌 절편의 대표적 영상을 나타낸다. CX_3CR1^{GFP} 세포는 매주-GA로 치료된 AD-Tg 마우스에서 제3 뇌실의 CP (3V; ***i***), 인접하는 뇌실 공간 (***ii***), 및 CP의 측 뇌실 (LV; ***iii***)에 국소화되었다 (**D**; 스케일 바, 25㎛). 매주-GA로 치료된 7-개월 연령 AD-Tg/$CX_3CR1^{GFP/+}$ 마우스의 CP에서, 골수 마커로 GFP^{+} 세포의 공-국소화(co-localization)를 나타내는, 그러나 대조군 PBS-치료된 AD-Tg/$CX_3CR1^{GFP/+}$ 마우스에서는 아닌, 공초점형 z-축 스택(stack)의 대표적 직각 투영 (**E**; 스케일 바, 25㎛). (**F**) CX_3CR1^{GFP} 세포는 Aβ 플라크의 부근에서 GA-치료된 AD-Tg/$CX_3CR1^{GFP/+}$ 마우스의 뇌에서 골수 마커 IBA-1로 국소화되고, 골수 마커, IBA-1을 공-발현한다 (스케일 바, 25㎛). **도 9G-H**는 매주-GA 요법의 제2주에서, 4-개월 연령 WT, 미치료 AD-Tg, 및 AD-Tg 마우스의 해마로부터 단리된 세포의 대표적 유동세포 계수법 플롯을 나타낸다. $CD11b^{높은}/CD45^{높은}$ mo-MΦ를 게이트하고 (**G**) 정량화하였다 (**H**; 군당 n=4-5; 일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석). 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$을 나타낸다.

도 10A-H는 AD-Tg 마우스에서 p300 억제제 (C646)의 투여의 치료 효과를 도시한다. **도 10A-B**에서, 고령의 마우스 (18개월)를 1주의 기간 동안 p300i 또는 비히클 (DMSO) 중 어느 하나로 치료하고, 치료 중단 후 1일에 조사하였다. p300i 치료 후에, 비장에서 $CD4^{+}$ T 세포 발현 IFN-γ의 빈도에서의 상승 (**A**), 및 CP에서 IFN-γ-발현 면역 세포 수 (**B**)를 나타내는, 대표적 유동세포 계수법 플롯. **도 10C-E**는 1주의 기간 동안, p300i 또는 비히클 (DMSO) 중 어느 하나를 받은 후에 추가적 3주 후에 조사된, 10-개월 연령 AD-Tg 마우스의 뇌에서, 대표적 현미경 상 (**C**), 및 Aβ 플라크 부하(burden)의 정량 분석을 나타낸다. 뇌는 Aβ 플라크에 대해 및 훽스트 핵 염색에 의해 염색되었다 (군당 n=5; 스케일 바, 250 ㎛). 평균 Aβ 플라크 면적 및 플라크 수를 해마 DG (**D**) 및 대뇌 피질의 5번째 층 (**E**)에서 정량화하였다 (6㎛의 뇌 슬라이스로; 군당 n=5-6; 스튜던트 t 검정). (**F**) 1개 또는 2개 세션 중 어느 하나로, 7개월의 연령에서 AD-Tg 마우스의 상이한 군에 대한 p300i 치료 (또는 비히클로서 DMSO) 투여 요법의 개략적 표시. **도 10G-H**는 미치료 AD-Tg 군에 비해, 대뇌 피질 (5번째 층)의 Aβ 플라크 퍼센트 커버리지(percentage coverage)의 변화 평균 (**G**), 및 평균 대뇌의 가용성 $Aβ_{1-40}$ 및 $Aβ_{1-42}$ 단백질 수준 (**H**)에서의 변화 (미치료 군에서 $Aβ_{1-40}$ 및 $Aβ_{1-42}$ 평균 수준, 각각 90.5±11.2 및 63.8±6.8 pg/mg 전체 분량; 군당 n=5-6; 일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석)를 나타낸다. 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$을 나타낸다.

도 11A-B는 AD-Tg 마우스에서 항-PD1 항체의 투여의 치료 효과를 나타낸다. (**A**) 실험 군의 마우스, 그의 연령, 치료 투여 요법, 및 마우스가 조사된 시점의 개략적 표시. 10개월의 연령에서, 5XFAD 알츠하이머병 (AD) 트랜스제닉 (Tg) 마우스에 실험의 1일 및 4일째, 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14) 또는 대조군 IgG (쥐) 항체 중 어느 하나를 복강내 주사하였고, 방사상 아암 수중 미로(radial arm water maze) (RAWM) 공간 학습 및 기억 과제에 의해 그의 인지 수행에 대해 3주 후에 조사하였다. 연령 매칭된 미치료 WT 및 AD-Tg 마우스를 대조군으로서 사용하였다. (**B**)는 방사상 아암 수중 미로 (RAWM) 공간 학습 및 기억 과제에 의해 평가된 바와 같이, 인지 수행을 나타낸다. 데이터를 이원배치 반복 측정 분산분석를 사용하여 분석하였고, 본페로니 사후 절차를 후속 조치 쌍별 비교에 사용하였다. 군당 n=6-12. 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$을 나타낸다.

도 12A-B는 AD-Tg 마우스에서 항-PD1 항체의 투여의 $IFN-γ^{+}$ 생성 T 세포에 미치는 전신 효과를 나타낸다. (**A**) 마우스의 실험 군, 그의 연령, 치료 투여 요법, 및 마우스가 조사된 시점의 개략적 표시. 마우스에 실험의 1일 및 4일째 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14) 또는 대조군 IgG (쥐) 항체 중 어느 하나를 복강내 주사하고, 7일째 조사하였다. (**B**) PD-1 또는 IgG 치료된 AD-Tg 마우스, 및 미치료 AD-Tg 및 WT 대조군에서, $CD4^{+}IFN-γ^{+}T$ 세포 비장세포 빈도 (세포내 염색되고, CD45 및 TCR-β 상에 프리-게이트됨)에 대한 유동세포 계수법 분석 (군당 n=4-6;

일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석; **, P < 0.01 (명시된 치료군 사이에); 오차 막대는 평균 ± s.e.m을 나타낸다).

도 13A-B는 AD-Tg 마우스에서 항-PD1 치료 후에 CP에 미치는 영향을 도시한다. 10개월 연령에서 AD-Tg 마우스를 PD-1, IgG로 치료하거나 아니면 미치료된 상태로 두었다. 마우스에 실험의 1일 및 4일째, 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14) 또는 대조군 IgG (쥐) 항체 중 어느 하나를 복강내 주사하고, 7일째 조사하였다. (**A**) 유동세포 계수법에 의해 측정된 바와 같은, $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+T$ 세포 비장세포 빈도에 대해 양의 상관관계 (피어슨의(Pearson's) r = 0.6284, P <0.05), 및 음의 상관 관계인, 실시간 정량적 PCR (RT-qPCR)에 의해 측정된 바와 같은 CP IFN-γ 수준. CP IFN-γ 수준을 $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ Treg 비장세포 빈도와 비교한 경우, 반대의 음의 경향이 동일한 마우스에서 발견되었다 (군당 n=3-4). (**B**) 동일한 마우스의 CP에서, RT-qPCR에 의해 측정된, 유전자 *cxc110* 및 *ccl2*에 대한 mRNA 발현 수준 (군당 n=3-4; 일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석). 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05를 나타낸다.

도 14A-B는 치료의 한 과정 대 두 과정을 비교할 때, AD-Tg 마우스에서 항-PD1 항체의 투여의 치료 효과를 나타낸다. 항-PD1 치료의 한 과정을 받은 도 11A-B에 기재된 마우스의 군에서의 마우스의 절반은, 제1의 RAWM 과제 후에 항-PD1 치료의 또다른 과정을 받거나, 아니면 미치료된 상태로 두었다. 추가적 3주 후에, 모든 마우스를 인지 학습 및 기억에 대한 공간 단서(spatial cue)의 상이하고 새로운 실험 설정을 사용하는 RAWM에 의해 시험하였다. (**A**) 마우스의 실험 군, 그의 연령, 치료 투여 요법, 및 마우스가 조사된 시점의 개략적 표시. 각각의 치료 과정 동안, 마우스에 250 ug의 항-PD1 (RMP1-14) 또는 대조군 IgG (쥐) 항체 중 어느 하나를 복강내 주사하였다. (**B**)는 RAWM 공간 학습 및 기억 과제에 의해 평가된 바와 같은 인지 수행을 나타낸다. 데이터를 이원 배치 반복 측정 분산분석를 사용하여 분석하였고, 본페로니 사후 절차를 후속 조치 쌍별 비교에 사용하였다. 군당 n=6-12. 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05; **, P < 0.01;***, P < 0.001을 나타낸다.

도 15A-H는 모든-트랜스 레티노산 (ATRA)에 의해 증대된 전신 Treg 수준의 AD 병리에 미치는 역 효과를 나타낸다. **도 15A-B**는 1주의 기간 동안 ATRA 또는 비히클 (DMSO) 중 어느 하나를 받은 5-개월 연령 AD-Tg 마우스에서 $CD4^+/Foxp3^+/CD25^+$ Treg 비장세포의 빈도에서의 상승을 나타내는, 유동세포 계수법 플롯 (**A**), 및 정량 분석 (**B**)을 나타낸다 (군당 n=5; 스튜던트 t 검정). **도 15C-F**는 5-개월의 연령에서 1주의 기간 동안 ATRA 또는 비히클 (DMSO) 중 어느 하나로 치료한 후에, 추가적 3주 후에 조사한, AD-Tg 마우스의 뇌에서 Aβ 플라크 부하 및 성상교세포증의, 대표적 현미경 상 (**C**), 및 정량 분석 (**D, E, F**)을 나타낸다. 뇌는 Aβ 플라크, GFAP (성상교세포증 표시)에 대해, 및 훽스트 핵 염색에 의해 염색되었다 (군당 n=4-5; 스케일 바, 250 ㎛). 평균 Aβ 플라크 면적 및 플라크 수를 해마 DG 및 대뇌 피질의 5번째 층에서 정량화하고, GFAP 면역반응성을 해마에서 측정하였다 (6 ㎛ 뇌 슬라이스로; 군당 n=5-6; 스튜던트 t 검정). (**G**) 5-개월의 연령에서 1주의 기간 동안 ATRA 또는 비히클 (DMSO) 중 어느 하나로 치료한 후에, 추가적 3주 후에 조사한, 대뇌 뇌 실질 AD-Tg 마우스에서, ELISA에 의해 정량화된, 가용성 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$의 수준 (군당 n=5-6; 스튜던트 t 검정). (**H**) 5-개월의 연령에서 1주의 기간 동안 ATRA 또는 비히클 (DMSO)로 중 어느 하나로 치료한 후에, 추가적 3주 후에 조사한, AD-Tg 마우스의 RAWM 과제에서의 인지 수행 (군당 n=5; 개별 쌍 비교를 위해 이원배치 반복 측정 분산분석 후에 본페로니 사후). 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05; **, P < 0.01;***, P < 0.001을 나타낸다.

도 16A-F는 매주-GA 투여에 의해 증대된 전신 Treg 수준의 AD 병리에 미치는 역 효과를 나타낸다. (**A**) 매주-GA 요법과 비교된 매일-GA 치료 요법의 개략적 표시. 매일-GA 치료된 군에서, 마우스에 1개월의 기간 동안 100 ㎍의 GA를 피하 주사하였다. (**B**) RAWM 학습 및 기억 과제에서 하루 오차의 평균 수에 의해 평가된 바와 같은, 연령-매칭된 WT 및 미치료 AD-Tg 마우스와 비교된, 매일-GA 및 매주-GA 치료된 7-개월 연령 AD-Tg 마우스의 인지 수행 (군당 n=6-8; 일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석). (**C**) Aβ 플라크에 대해 및 훽스트 핵 염색에 대해 면역염색된, 미치료 AD-Tg, 및 매일 또는 매주-GA 치료된 AD-Tg 마우스의 대뇌 피질 및 해마 (HC)의 대표적 현미경 상 (스케일 바, 250 ㎛). **도 16D-F**는 GA 치료된 (매일-GA 및 매주-GA 군) 및 미치료 AD-Tg 마우스에서의 Aβ 플라크 크기 및 수 (6 ㎛ 슬라이스당)의 정량을 나타낸다. 매주-GA 치료된 AD-Tg 마우스는 그의 해마의 치상회 (DG)의 전체 면적의 백분율로서 Aβ 플라크 로드(load), 및 평균 Aβ 플라크 수에서의 감소를 나타냈다 (군당 n=6; 일원분산분석 후에 뉴먼-쿨스 사후 분석). 모든 패널에서, 오차 막대는 평균 ± s.e.m.; *, P < 0.05; **, P < 0.01;***, P < 0.001을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 본 발명에 따라서 알츠하이머병의 마우스 모델 (AD-Tg 마우스)에서 $Foxp3^+$ 조절 T 세포 (Treg)의 단기간의 일시적 고갈은 뇌의 맥락막총을 통해 CNS로의 백혈구의 개선된 유입(recruitment), CNS-침윤성 항-염증성 단핵구-유래 대식세포 mo-MΦ 및 $CD4^+$ T 세포의 상승된 수, 및 뇌 내에 축적하는 $Foxp3^+$ Treg의 현저한 보강(enrichment)을 초래한다는 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 치료의 단일 세션의 장기 효과는 해마의 신경아교증의 감소 및 뇌 내에 염증-유발성 시토카인의 감소된 mRNA 발현 수준을 야기한다. 중요하게는, 질환 병리에 미치는 효과는 AD-Tg 마우스에서 강건한 Aβ 플라크 병리를 나타내는 뇌의 두 영역인, 대뇌 피질 (5번째 층), 및 해마의 치상회에서 감소된 대뇌 아밀로이드 베타 (Aβ) 플라크 부하를 포함한다. 가장 중요하게는, Treg의 단기간의 일시적 고갈 후에 공간 학습 및 기억에서의 극적인 개선으로 이어지고, 이는 야생형 마우스의 인지 수행과 유사한 인지 수행에 이른다 (**실시예 2 및 3**). 종합하면, 이들 연구결과들은 Treg 고갈의 짧은 세션에 이어서 비개입의 기간은, AD-Tg 마우스에서, Treg-매개 전신 면역 억제의 일시적인 파괴를 초래하고 이는 염증-분해성(inflammation-resolving) 세포, mo-MΦ 및 Treg가, 뇌에 유입할 수 있게 하고, 신경염증 반응의 분해(resolution), Aβ의 청소, 및 인지 감퇴의 역전을 야기한다는 것을 입증한다. 이들 연구결과들은, 이 분야의 연구에서의 통설에 따르면, 전신 면역 억제 증가가 신경염증 반응의 완화를 초래할 것이라는 점을 강하게 논박한다. 이에 반하여, 우리의 연구결과들은 뇌 내에 Treg 자체를 포함한, 염증-분해성 면역 세포 축적을 달성하여, 따라서 AD 병리를 격퇴하기(fighting off) 위해서는 전신 Treg-매개 억제에서의 단기간의, 잠시 동안의 그리고 일시적 감소에 의한, 전신 반응의 증진이 필요함을 나타낸다.

[0009] 본원에 제시된 본 발명자들의 특이성은 아래에 상세히 설명된 바와 같이, 여러 독립적인 실험 패러다임을 사용하여 입증되었다. 간략하게, 먼저 본 발명자들은 말초(peripheral) Treg 수준에, CP 활성화에, 및 질환 병리에 미치는 반대 효과를 야기하는 두 가지의 상이한 투여 요법; 말초 Treg 수준을 증대시키는 매일 투여 요법 (Weber et al, 2007), 및 말초 Treg 수준을 감소시키는 것으로 밝혀진 매주 투여 요법 (**실시예 3 및 실시예 5**)에서 면역조절성 화합물을 사용하였다. 본 발명자들은 또한, Treg의 일시적인 생체내 유전적 고갈 (**실시예 2**)에 의해, 또는 그의 Foxp3 기능의 약리 억제 (**실시예 3 및 4**)에 의해, AD-Tg 마우스에서, 이들 조작은 CNS에 백혈구 소통(leukocyte trafficking)을 용이하게 하기 위한 CP의 활성화, 병리의 부위에서 염증-분해성 면역 세포 축적, 대뇌 Aβ 플라크의 청소, 및 뇌 실질 염증의 분해 방향으로 뇌 실질의 면역학적 환경의 사행(skewing)을 초래한다는 점을 입증할 때, 말초 Treg 수준과 질환 병리 사이의 직접적인 기능적 연계성을 제공한다.

[0010] 게다가 본 발명에 따라서, 제한된 기간 동안 범용 항원, 코폴리머(Copolymer)-1의 간헐적 투여 (치료의 1개 세션을 나타냄)는, Treg-매개 전신 면역 억제를 감소시키고, 뇌의 맥락막총 관문(gateway) 활성을 증가시킴으로써 CNS로의 백혈구의 선택적 침윤을 개선시켜, 알츠하이머병 병리에서 극적인 유익한 효과를 야기하며 (**실시예 3**), 한편 Treg 면역 억제를 증진시키는 코폴리머 1의 매일 투여 (Hong et al, 2005; Weber et al, 2007)는, 질환 병리에, 어떤 유익한 효과도 나타내지 않거나, 심지어 일부 보통 정도의 유해한 효과를 나타내는 것 (**실시예 5**)으로 밝혀졌다. 본 발명의 본 발명자들은 게다가 본원에서, 특이적 소 분자 억제제 (p300i)를 이용한 p300의 억제, 또는 항-PD-1 항체에 의한 PD-1 수용체와의 상호작용 중 어느 하나에 의해, Foxp3 Treg 활성의 직접적인 방해는, AD-Tg 마우스에서 맥락막총 관문 활성을 개선시키고, 알츠하이머병 병리를 완화시킨다는 것 (**실시예 4**)을 보여준다.

[0011] 중요하게는, 본 발명자들에 의해 제공된 이들 실시예 각각은, 전신 면역 억제에서 단기간의 감소를 유발하는 상이한 개입을 입증한다: 코폴리머-1은 Foxp3 아세틸화 및 Treg 기능을 감소시키는 소 분자로서 면역조정성 화합물, p300i로서 작용하고, 항-PD-1은 Treg 상에서 발현된 PD-1에 대한 중화 항체로서 사용된다. 이들 치료 접근법은, 주로 말초 IFN-γ 수준 및 IFN-γ-생성 세포의 상승에 의해 말초에서 면역 반응을 일시적으로 증대시키고, 따라서 뇌의 맥락막총을 활성화시켜 T 세포 및 단핵구의 CNS로의 선택적 침윤, 및 이들 세포의 병리 부위로의 귀소(homing)를 가능하게 하는, 치료의 짧은 세션에 사용하였다. 또한, 본원에서, 무-치료의 간격 세션에 의해 간섭되는 치료의 반복 세션은 치료의 단일 세션에 비해 치료의 효능을 극적으로 개선시킨다는 것이 밝혀졌다 (**실시예 4**). 그 다음의 무-치료의 시간 간격은 뇌 내에 Treg 수준 및 활성에서의 일시적인 증대를 가능하게 하고, 신경염증의 분해를 용이하게 하고, CNS의 치유와 회복에 유리한 환경 조건을 유도하고, 이후 조직의 회복을 야기하였다. 이들 경우 각각에서 뇌 병리에 미치는 효과는 신경염증 반응의 분해, AD 마우스 뇌로부터의 아밀로이드 베타 플라크 청소, 및 인지 감퇴의 역전을 포함하여, 강건하였다. 현재 접근법의 특이성은 AD의 트랜스제닉 마우스 모델에서, $Foxp3^+$ 조절 T 세포의 일시적 고갈의 유전적 모델을 사용하여 추가로 입증되었다 (**실시예 2**).

[0012] 따라서, 본 발명에 따라서 전신 $Foxp3^+CD4^+$ Treg-매개 면역억제는 염증-분해성 백혈구의 CNS로의 유입을 조정하

는데 필요한 (Schwartz & Baruch, 2014b), CP의 IFN-γ-의존적 활성화를 억제함으로써, 적어도 부분적으로 작용하는, AD 병리를 격퇴하는 능력을 방해하는 것으로 밝혀졌다. 전신 Treg는 자가면역 질환으로부터의 보호 및 자가면역 항상성의 유지에 중대하다 (Kim et al, 2007). 그러나, 우리의 연구결과들은 신경변성 병태 하에, 회복력 있는 면역 반응이 뇌에서 필요한 경우, 이 반응을 마운팅하는 능력은 전신 Treg에 의해 방해된다는 것을 시사한다. 그럼에도 불구하고 우리의 결과에 따르면, Treg는 뇌 내에 필요하고, 신경병리의 부위로 귀소하고, 항-염증성 활성을 국소적으로 수행한다. 본 발명은 AD에서와 같은 진행성 신경세포 사를 격퇴하고; 질환에 걸린 뇌에서 Treg를 증가시키는 대신에 순환에서 Treg를 일시적으로 감소/억제하는데 있어서 명백한 모순적 필요성에 대한 독특하고 예기치 않은 해결책을 나타낸다. 이런 이유로, 대뇌 플라크의 부위에, Treg 및 mo-MΦ를 포함한, 항-염증성 세포의 유입을 가능하게 하는, 말초 면역 억제에서의 단기간의 그리고 일시적인 감소는, 병리에 장기 효과를 야기한다. 그러나, 특히, 전신 Treg 수준 또는 활성의 일시적인 감소는, CNS-특이적 보호적 자가면역 반응을 지지하는 것 (Schwartz & Baruch, 2014a), 또는 혈관 Aβ의 청소에서 중요한 역할을 하는 순환 단핵구의 수준을 증대시키는 것을 포함한, 추가적 메커니즘을 통해 질환 완화의 한 원인이 될 수 있다 (Msichaud et al, 2013).

[0013] 상이한 병인의 신경변성 질환이, 일반적인 국소 신경염증성 구성 요소를 공유하긴 하지만, 우리의 결과는 전신 항-염증성 치료로부터 균일하게 유익할 것이라는 질환으로서의 모든 CNS 병리의 지나치게 단순화한 특성화를 강하게 논박한다. 따라서, 자가면역 염증성 뇌 병리, 예컨대 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)이, 장기 지속 말초 면역 억제를 달성하기 위해, 항-염증성 및 면역-억제 약물의 지속적인 전신 투여로부터 유익하지만, 이는, 만성 신경변성 질환에서, 예컨대 AD, 일차 진행형 다발성 경화증 (PP-MS) 및 이차 진행형 다발성 경화증 (SP-MS)의 경우에, 효과적이지 못하거나 유해한 영향을 미칠 것이다 (**실시예 5**). 게다가, 우리의 연구결과들은 이들 병리에서 전신 대 조직 연관 Treg의 역할에 관한 오인 (He & Balling, 2013)을 해명하였다. 면역-뇌 축은 평생 뇌 가소성의 부분 (Baruch et al, 2014)이고, 신경변성 질환은 대부분 연령 관련이기 때문에, 우리의 본 연구결과들은 또한 보다 일반적인 현상을 시사하며, 여기서 전신 면역 억제는 뇌 기능을 방해한다. 따라서, 전신 면역 억제를 감소시키는 단기의 주기적인 과정은 AD 및 연령 연관 치매를 포함한, 광범위한 뇌 병리에 적용가능한, 치료적 또는 심지어 예방적 접근법을 나타낼 수 있다.

[0014] 중요하게는, AD 마우스 모델에서 본원에서 제시된 본 발명자들의 접근법 및 연구결과들은, AD, 예컨대 아밀로이드 베타 또는 타우(tau) 병리에서 임의의 질환-특이적 인자를 직접 표적으로 하는 것이 아니라, CNS 병리의 광범위한 범위로 임상적으로 적용가능할 것으로 예상되는 신규한 접근법 - CNS 내에 병리의 부위로 염증-분해성 면역 세포의 유입을 증대시키기 위해 전신 Treg-매개 면역 억제의 일시적 감소를 입증한다.

[0015] 상기 기재된 예기치 않은 결과의 관점에서, 본 발명은 자가면역 신경염증성 질환, 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 사용하기 위한, 개체에서 전신 면역 억제의 수준을 감소시키는 활성제를 포함하는 제약 조성물로서, 여기서 상기 제약 조성물이 두 과정 이상의 치료를 포함하는 투여 요법에 의한 투여를 위한 것이고, 치료의 각각의 과정은 순차적으로 치료 세션 후에 무-치료의 간격 세션을 포함하는 것인 제약 조성물을 제공한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 투여 요법은 전신 면역억제의 수준이 일시적으로 감소되도록 교정된다.

[0017] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료하는"은 목적하는 생리학적 효과를 수득하는 수단을 지칭한다. 효과는 질환 및/또는 질환에 기인하는 증상을 부분적으로 또는 완전히 치유한다는 관점에서 치료적일 수 있다. 상기 용어는 질환을 억제하는 것, 즉 그의 진행을 저지하거나 둔화시키는 것; 또는 질환을 개선시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 유발하는 것을 지칭한다.

[0018] 용어 "무-치료 세션"은 본원에서 "치료가 없는 기간"과 교대해서 사용되며 어떤 활성제도 치료되는 개체에게 투여되지 않는 세션을 지칭한다.

[0019] 본원에 사용된 바와 같은 용어 조절 T 세포의 "전신 존재"는 순환 면역 체계, 즉 혈액, 비장 및 림프절에서, 조절 T 세포의 존재 (그의 수준 또는 활성에 의해 측정된 바와 같은)를 지칭한다. 비장에서의 세포 모집단 프로파일은 혈액에서의 세포 모집단 프로파일에 반영된다는 점은 면역학의 분야에서 널리 공지된 사실이다 (Zhao et al, 2007).

[0020] 본 치료는 전신 면역 억제의 상승을 보이는 환자, 뿐만 아니라 이러한 상승을 보이지 않는 환자 둘 다에게 적용가능하다. 때때로 본 발명에 따른 치료를 필요로 하는 개체는 특정 수준의 말초 면역억제를 갖고, 이는 순환에서 Treg의 상승된 빈도 또는 수, 및/또는 그의 상승된 기능적 활성 및/또는 IFNγ-생성 백혈구에서의 감소 및/

또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 감소된 증식에 의해 반영된다. Treg의 빈도 또는 수의 상승은 전체 CD4 세포의 백분율로서 또는 전체 수에서 일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 알츠하이머병의 마우스 모델은 야생형 마우스와 비교하여 CD4세포 중 보다 높은 빈도의 Foxp3을 갖는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 비록 전신 Treg 세포의 수준이 상승되지 않거나, 그의 기능적 활성이 증진되지 않거나, IFNɣ-생성 백혈구의 수준은 감소되지 않거나 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식이 감소되지 않긴 하더라도, 상기 개체에서, 전신 면역의 수준 또는 활성을 감소시키는 본 발명의 방법은 자가면역 신경염증성 질환 RRMS를 포함하지 않는 CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 효과적이다. 중요하게는, 상기 전신 면역 억제는 또한 Treg를 제외한 추가적 면역 세포 유형, 예컨대 골수-유래 억제제 세포 (MDSC)를 포함할 수 있다 (Gabrilovich & Nagaraj, 2009).

[0021] 전신 면역억제의 수준은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, Treg의 수준은 Treg의 세포 표면 마커 또는 핵 세포내 마커 (Chen & Oppenheim, 2011), 림프구의 CD45, TCR-β, 또는 CD4 마커에 대해 면역 염색된, 말초 혈액 단핵 세포 또는 T 림프구의 유동세포 계수법 분석에 의해, 그리고 세포에 특이적으로 결합된 항체의 양을 측정하여 측정될 수 있다. Treg의 기능적 활성은 다양한 검정에 의해 측정될 수 있고; 예를 들어 티미딘 혼입(thymidine incorporation) 검정이 통상적으로 사용되고, 여기서 $CD4^{+}CD25^{-}$ T 세포 (통상적인 T 세포)의 항-CD3 mAb 자극된 증식의 억제는 [^{3}H]티미딘 혼입에 의해 또는 CFSE (5-(및 6)-카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르 (이는 세포 진입이 가능할 수 있다)를 사용하여 측정되며; 세포 분할은 CFSE의 형광 강도의 연속적 이등분으로 측정한다)를 사용함으로써 측정한다. IFNɣ-생성 백혈구의 수 또는 그의 활성 또는 그의 증식 능력은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 통상의 기술자에 의해 용이하게 평가될 수 있으며; 예를 들어, IFNɣ-생성 백혈구의 수준은, 단시간의 생체외 자극 및 골지-스톱(golgi-stop), 및 IFNɣ 세포내 면역에 의한 면역 염색 (예를 들어, BD 바이오사이언시스(BD Biosciences) 시토픽스(Cytofix)/시토펌(cytoperm)™ 고정/침투 키트를 사용하여)에 이은 말초 혈액 단핵 세포의 유동세포 계수법 분석에 의해, 또는 이들 세포의 조건 배지를 수집하고 ELISA를 사용하여 분비된 시토카인의 수준을 정량화하는 것에 의해, 또는 조건 배지, 예를 들어 IL2/IL10, IL2/IL4, INFɣ/TGFβ 등에서 상이한 시토카인의 비를 비교하는 것에 의해 측정될 수 있다. 인간 말초 혈액 중 MDSC의 수준은, 예를 들어 기재된 바와 같이 (Kotsakis et al, 2012), DR/LIN/CD11b+, DR/LIN/CD15+, DR/LIN/CD33+ 및 DR(-/낮은)/CD14+ 세포의 빈도의 유동세포 계수법 분석을 사용하여, 통상의 기술자에 의해 용이하게 평가될 수 있다.

[0022] 인간에서, 말초/전신 면역억제는 순환에서 Treg의 전체 수가 건강한 대조군 모집단에서 보다 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100% 또는 그 초과로 더 높거나, 전체 CD4+ 세포 중 Treg 세포의 백분율이 건강한 대조군 모집단에서 보다 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100% 또는 그 초과로 상승되거나, Treg의 기능적 활성이 건강한 대조군 모집단에서 보다 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100% 또는 그 초과로 상승되는 경우, 상승된 것으로 간주될 수 있다. 대안으로, 말초/전신 면역억제는 IFNɣ-생성 백혈구 또는 그의 활성의 수준이 건강한 대조군 모집단의 것에 비해 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100% 감소되거나; 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식이 건강한 대조군 모집단에 비해 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100% 감소된 경우 상승된 것으로 간주될 수 있다.

[0023] 작용제는, 작용제를 개체에 투여시, 이 개체의 순환에서 Treg의 전체 수가 작용제의 투여 전 수준과 비교하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100% 감소되거나, 전체 CD4+ 세포 중 Treg 세포의 백분율이 건강한 대조군 모집단의 것과 비교하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%로 하락하거나, Treg의 기능적 활성이 작용제의 투여 전 수준과 비교하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100% 감소되는 경우, 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 작용제로서 간주될 수 있다. 대안으로, 작용제는, 작용제를 개체에 투여시, IFNɣ-생성 백혈구의 전체 수 또는 그의 활성이 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100% 증가되거나; 자극에 대하 반응에서 백혈구의 증식이 건강한 대조군 모집단의 것과 비교하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100% 증가되는 경우, 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 작용제로서 간주될 수 있다.

[0024] 본 발명에 따라 사용된 작용제는 조절 T 세포의 수준 또는 활성을 하향-조절하거나 그의 활성을 방해하는 임의의 작용제일 수 있으나, 대안으로 (i) 도파민 또는 그의 제약상 허용되는 염; (ii) 도파민 전구체 또는 그의 제약상 허용되는 염; (iii) 도파민 수용체 유형 1 패밀리의 효능제 (D1-R 효능제) 또는 그의 제약상 허용되는 염; 및 (iv) 도파민 수용체 유형 2 패밀리의 길항제 (D2-R 길항제) 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 작용제를 제외한 이러한 작용제의 군에 제한될 수 있지만, 이들 작용제는 본 발명에 따른 치료의 과정에 따른 사용을 위해서는 공지되어 있지 않다.

[0025] 특정 실시양태에서, 치료 세션은 제약 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 치료 세션을 적어도 수준이

기준(reference) 미만으로 하락할 때까지 유지시키고, 투여를 간격 세션 동안에 중단하고, 간격 세션을 수준이 기준 미만인 동안은 유지시킨다. 기준은 (a) 상기 투여 전에 상기 개체로부터 수득된 가장 최근의 혈액 샘플에서 측정된 조절 T 세포 또는 골수-유래 억제제 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준; 또는 (b) CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상으로 고통받는 개체의 모집단에 특유한 조절 T 세포 또는 골수-유래 억제제 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준으로부터 선택될 수 있다.

[0026] 대안으로, 치료 세션은 제약 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 치료 세션을 적어도 IFNɣ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 수준, 또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식의 속도가 기준 초과로 상승할 때까지 유지시키고, 투여를 간격 세션 동안에 중단하고, 간격 세션을 상기 수준이 상기 기준 초과인 동안은 유지시키고, 여기서 기준은 (a) 상기 투여 전에 상기 개체로부터 수득된 가장 최근의 혈액 샘플에서 측정된 IFNɣ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 활성의 수준, 또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식의 속도; 또는 (b) CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상으로 고통받는 개체의 모집단에 특유한 IFNɣ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 활성의 수준, 또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식의 속도로부터 선택된다.

[0027] 치료 및 간격 세션의 기간은 개인을 기초로 면역억제의 수준을 모니터링할 필요없이, 특정 환자 모집단에 대한 임상 시험에서 의사에 의해 결정된 다음에 이 환자 모집단에 지속적으로 적용될 수 있다.

[0028] 특정 실시양태에서, 치료 세션은 기간이 3일 내지 4주, 예를 들어 기간이 1 내지 4주일 수 있다.

[0029] 특정 실시양태에서, 간격 세션은 기간이 1주 내지 6개월, 예를 들어 2주 내지 6개월, 특히 기간이 3주 내지 6개월일 수 있다.

[0030] 치료 세션에서, 제약 조성물의 투여는 반복 투여일 수 있고, 예를 들어 제약 조성물은 매일, 또는 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일마다 1회, 매주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회 또는 4주마다 1회 투여될 수 있다. 이들 빈도는 임의의 활성제에 적용가능하고, 관련 기술분야에서 일반적으로 사용되는 관례를 기초로 할 수 있고, 마지막으로 임상 시험에서의 의사에 의해 결정될 수 있다. 대안으로, 치료 세션에서 반복 투여의 빈도는 활성제의 성질에 따라 적합화될 수 있을 것이고, 여기서 예를 들어, 소 분자는 매일 투여될 수 있고; 항체는 3일마다 1회 투여될 수 있고; 코폴리머 1은 매주, 2주마다 1회, 3주마다 1회 또는 4주마다 1회 투여된다. 작용제, 예컨대 코폴리머 1이, 치료 세션 동안에 상대적으로 낮은 빈도로, 예를 들어 1개월의 치료 세션 동안에 1주당 1회, 또는 6개월의 치료 세션 동안에 1개월당 1회 투여되는 경우, 이 치료 세션 후에 무-치료 간격 세션이 이어지며, 이 기간은 치료 세션 동안의 반복 투여 간의 기간보다 더 길다 (즉 이 예에서, 각각 1주 또는 1개월 보다 길다)는 점을 이해하여야 한다. 이 예에서 치료 세션 동안에 투여 간의 1주 또는 1개월의 중단은 간격 세션으로 간주되지 않는다.

[0031] 치료 세션 및 간격 세션의 기간은, 예를 들어, 3일마다 1회 활성제를 투여하는 빈도가 6 또는 9일의 치료 세션 및 그에 따라서 시작되는 간격 세션을 초래할 수 있도록 하는 투여의 빈도로 조정될 수 있다.

[0032] 미리 결정된 일반 치료 요법의 대안으로서, 면역억제의 수준은, Treg 세포의 수준 또는 활성 (또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식 속도 또는 IFN-ɣ-생성 백혈구)을 개별적으로 모니터링하고, 모니터링의 결과로부터 결정된 바와 같이 치료 세션, 투여의 빈도 및 간격 세션을 경험적으로 및 개인적으로 조정함으로써, 치료 중인 각각의 환자에 대해 목적하는 수준으로 교정될 수 있다 (맞춤형 의료((personalized medicine)).

[0033] 따라서, 치료 세션의 기간은 (a) 상기 투여 후에 미리 결정된 시한 내에 개체로부터 수득된 혈액 샘플에서의 수준을 측정함으로써 개체에서 조절 T 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준을 모니터링하고; (b) (a)에서 측정된 수준을 상기 언급된 기준과 비교하여 수준이 기준과 상이한 지의 여부를 결정하고; (c) 상기 기준에 대해 (a)에서 측정된 상기 수준의 관계에 기초하여, 투여를 반복하거나 투여 반복을 삼가하여 그 다음 간격 세션을 시작함으로써 치료 세션을 계속할 지의 여부를 결정하고; (d) (c)에서의 결정에 따라 투여를 반복하거나 그 다음 간격 세션을 시작함으로써, 결정할 수 있다. 대안으로, 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식 속도 또는 IFN-ɣ-생성 백혈구의 수준은 상기 언급된 바와 같이 모니터링하고 적절한 기준과 비교할 수 있다.

[0034] 유사하게, 간격 세션의 기간은 (a) 상기 투여 후에 미리 결정된 시한 내에 개체로부터 수득된 혈액 샘플에서의 수준을 측정함으로써 개체에서 조절 T 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준을 모니터링하고; (b) (a)에서 측정된 수준을 상기 언급된 기준과 비교하여 수준이 기준과 상이한 지의 여부를 결정하고; (c) 상기 기준에 대해 (a)에서 측정된 상기 수준의 관계에 기초하여, 투여 및 단계 (a) 및 (b)를 반복하여 치료의 새로운 과정을 시작하거나 단지 단계 (a) 및 (b)를 반복하여 간격 세션을 연장시킬 지의 여부를 결정하고; (d) (c)에서의 결정에 따라 투여 및 단계 (a) 및 (b) 또는 단지 단계 (a) 및 (b)를 반복함으로써, 결정할 수 있다. 대안으로, 자극에 대한

반응에서 백혈구의 증식 속도 또는 IFN-γ-생성 백혈구의 수준은 상기 언급된 바와 같이 모니터링하고 적절한 기준과 비교할 수 있다.

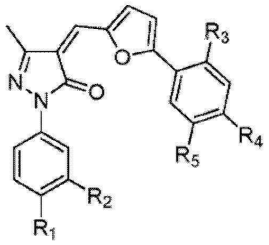
[0035] 어떤 경우에도, 투여 요법, 즉 치료 세션의 기간 및 간격 세션은, 예를 들어 개체에서 조절 T 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준의 감소에 의해 측정된 바와 같이 면역억제의 수준에서의 감소가 일시적이 되도록 교정한다.

[0036] 특정 실시양태에서, 미리 결정된 시한, 즉 활성제의 가장 최근의 투여와 모니터링 단계 사이에 경과된 시간은 2일 내지 6개월이다.

[0037] 특정 실시양태에서, 모니터링되는 조절 T 세포는 CD25, CD127, GITR, CTLA-4 또는 PD-1 중 하나 이상을 발현하는 $FoxP3^+$ 세포; 또는 CD25, CD127, GITR, CTLA-4 또는 PD-1 표면 분자 중 하나 이상을 발현하는 $FoxP3^-$ 세포로부터 선택된 CD4+ 세포이다. 특히, 조절 T 세포의 일반적인 표현형은 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 세포 또는 $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ 세포이다.

[0038] 조절 T 세포의 수준을 감소시킬 수 있는 작용제는 관련 기술분야에 공지되어 있고 (Colombo & Piconese, 2007), 이들 작용제는 본 발명에 따라서 사용될 수 있다. 아래에 인용 간행물의 각각의 하나는 본원에 완전히 개시된 것처럼 본원에 포함된다.

[0039] 따라서, 작용제는 다음으로부터 선택될 수 있으나, 그에 반드시 제한되는 것은 아니다: (i) 다음과 같은 항체: (a) **항-PD-1**, (b)**항-PD-L1** (c) **항-PD-L2** (Coyne & Gulley, 2014; Duraiswamy et al, 2014; Zeng et al, 2013); (d) **항-CTLA-4** (Simpson et al, 2013; Terme et al, 2012); (e) **인터페론 α와 조합된 항-PD-1** (Terawaki et al, 2011); (f) 항-CTLA4**와 조합된 항-PD-1**; (g) **항-CD47** (Tseng et al, 2013); (h) **항-OX40** (Voo et al, 2013); (i) **항-VEGF-A** (베바시주맙(bevacizumab)) (Terme et al, 2013); (j) **항-CD25** (Zhou et al, 2013); (k) **항-GITR** (GITR 유발(triggering) mAb (DTA-1) (Colombo & Piconese, 2007); (l) **항-CCR4;** (m) **항-TIM-3/갈렉틴9** (Ju et al, 2014); (n) **항-킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체 (KIR)**; (o) **항-LAG-3**; 또는 (p) **항-4-1BB** (ii) (a) 내지 (p)의 임의의 조합물; (iii) 아주반트와 조합된 (a) 내지 (p)의 임의의 조합물, 예를 들어 항 OX40 항체 및 TLR9 리간드, 예컨대 CpG와 조합된 항-CTLA-4 항체 (Marabelle et al, 2013); (iv) 다음으로부터 선택된 소 분자: (a) A **p300 억제제** (Liu et al, 2013), 예컨대 **겜시타빈** (저 용량) (Shevchenko et al, 2013), 또는 **C646** 또는 그의 유사체, 즉 화학식 I의 화합물:



[0040]

[0041] 상기 식에서

[0042] (R_1은 H, $-CO_2R_6$, $-CONR_6R_7$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NR_6R_7$로부터 선택되고;

[0043] R_2는 H, $-CO_2R_6$, 또는 할로겐, 바람직하게는 Cl로부터 선택되고;

[0044] R_3은 할로겐, 바람직하게는 F, $-NO_2$, -CN, $-CO_2R_6$, 바람직하게는 CO_2CH_3 또는 $CO_2CH_2CH_3$, 또는 $-CH_2OH$로부터 선택되고;

[0045] R_4 및 R_5는 각각 독립적으로 H 또는 $-C_1$-C_6 알킬, 바람직하게는 메틸이고;

[0046] R_6 은 H 또는 $-C_1$-C_6 알킬, 바람직하게는 H, 메틸 또는 에틸이고;

[0047] R_7은 H 또는 $-C_1$-C_6 알킬, 바람직하게는 H 또는 메틸이다) [문헌 (Bowers et al, 2010) 참조];

[0048] (b) **수니티닙** (Terme et al, 2012); (c) **폴리옥소메탈레이트-1** (POM-1) (Ghiringhelli et al, 2012); (d) **α,β-메틸렌아데노신 5' -디포스페이트 (APCP)** (Ghiringhelli et al, 2012); (e) **삼산화비소 (As_2O_3)** (Thomas-Schoemann et al, 2012); (f) **GX15-070** (오바토클락스(Obatoclax)) (Kim et al, 2014); (g) **레티노산 길항제,**

예컨대 Ro 41-5253 (합성 레티노이드 및 선택적 소 분자 길항제) (Galvin et al, 2013) 또는 **LE-135** (Bai et al, 2009); (h) 단독 작용제로서 또는 항-CD47 항체와 조합된, **SIRPα (CD47) 길항제**, 예컨대 **CV1-hIgG4 (SIRPα 변이체)** (Weiskopf et al, 2013); (i) 단독 작용제로서 또는 항-CCR4 항체와 조합된, **CCR4 길항제, 예컨대 AF399**/420/18025 (Pere et al, 2011); (j) **아데노신 A2B 수용체 길항제**, 예컨대 **PSB603** (Nakatsukasa et al, 2011); (k) **인돌아민-2,3-디옥시게나제 (IDO)의 길항제**; 또는 (l) **HIF-1 조절제**; (v) 다음으로부터 선택된 단백질: (a) **님 잎(Neem leaf) 당단백질 (Neem leaf glycoprotein: NLGP)** (Roy et al, 2013); 또는 (b) **sCTLA-4** (CTLA-4의 가용성 이소형) (Ward et al, 2013); (vi) **침묵(silencing) 분자**, 예컨대 miR-126 안티센스 (Qin et al, 2013) 및 항-갈렉틴-1 (Gal-1) (Dalotto-Moreno et al, 2013); (vii) **OK-432** (스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*)의 동결건조 제제) (Hirayama et al, 2013); (viii) **IL-12와 항-CTLA-4**의 조합물; (ix) **코폴리머 1** 또는 Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체; (x) 항생제, 예컨대 **반코마이신** (Brestoff & Artis, 2013; Smith et al, 2013) 또는 (xi) (i) 내지 (x)의 임의의 조합.

[0049] 특정 실시양태에서, 작용제는 항-PD-1 항체, 즉 PD-1에 대한 특이적인 항체이다.

[0050] 많은 항-PD-1 항체가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용되는 항-PD-1 항체는, 문헌 [Ohaegbulam et al. (Ohaegbulam et al, 2015)] (이의 전체 내용이 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 것들, 즉 CT-011 (피딜리주맙; 인간화 IgG1; 큐어테크(Curetech)), MK-3475 (람브롤릴주맘, 펨브롤리주맙; 인간화 IgG4; 머크(Merck)), BMS-936558 (니볼루맙; 인간 IgG4; 브리스톨-마이어스 스퀩(Bristol-Myers Squibb)), AMP-224 (PD-L2 IgG2a 융합 단백질; 아스트라제네카(AstraZeneca)), BMS-936559 (인간 IgG4; 브리스톨-마이어스 스퀩), MEDI4736 (인간화 IgG; 아스트라제네카), MPDL3280A (인간 IgG; 제넨테크(Genentech)), MSB0010718C (인간 IgG1; 머크-세로노(Merck-Serono))로부터 선택될 수 있거나; 본 발명에 따라서 사용되는 항체는 MEDI0680 (AMP-514;아스트라제네카) 인간화 IgG4 mAb일 수 있다.

[0051] 특정 실시양태에서, CT-011 항체는 인간에게 0.2-6 mg/kg 또는 1.5-6 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고; MK-3475 항체는 인간에게 1-10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고; BMS-936558은 인간에게 0.3-20 mg/kg, 0.3-10 mg/kg, 1-10 mg/kg으로 또는 1 또는 3 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고; BMS-936559는 인간에게 의 0.3-10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고; MPDL3280A는 인간에게 1-20 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고; MEDI4736은 인간에게 0.1-15 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고; MSB0010718C는 인간에게 1-20 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있다.

[0052] 항-CTLA4 항체는 트레멜리무맙(Tremelimumab) (화이자(Pfizer)), 완전 인간형(fully human) IgG2 모노클로날 항체; 또는 이필리무맙, 완전 인간형 인간 IgG1 모노클로날 항체일 수 있다.

[0053] 항-킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체 (KIR) 항체는 리릴루맙(Lirilumab) (BMS-986015; 인네이트 파마(Innate Pharma)에 의해 개발되고 브리스톨-마이어스 스퀩에게 허가됨(licenced)), 완전 인간형 모노클로날 항체일 수 있다.

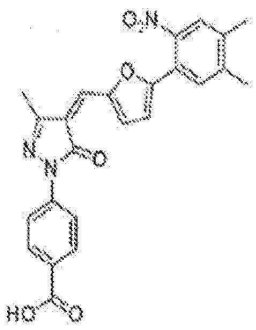
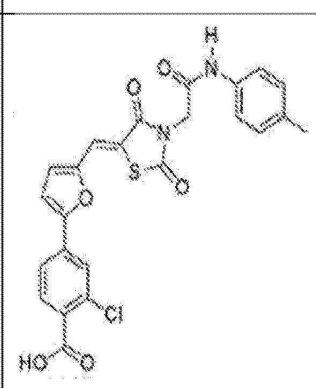
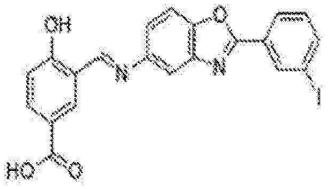
[0054] 항-LAG-3 항체는 림프구 활성화 유전자-3에 대항하는 것이다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는, 한 이러한 항체는 모노클로날 항체 BMS-986016 (펨브롤리주맙; 인간화 IgG4; 머크)이다.

[0055] 항-4-1BB 항체는 PF-05082566 (화이자 온콜로지(Pfizer Oncology), 완전 인간형 IgG2 효능제 모노클로날 항체; 또는 우렐루맙(Urelumab) (BMS-663513; 브리스톨-마이어스 스퀩), 완전 인간형 IgG4 모노클로날 항체 (4-1BB를 표적으로 함)일 수 있다.

[0056] 특정 실시양태에서, 항체의 조합물이 예컨대 사용될 수 있지만 그에 제한되지는 않는다: 단백질 CD20에 대한 키메라 모노클로날 항체인, 리툭시맙(Rituximab) (상품명 리툭산(Rituxan), 맙테라(MabThera) 및 지툭스(Zytux))와 조합된 CT-011, 예를 들어, 각각 3 mg/kg; 이필리무맙 (예를 들어 3 mg/kg로)과 조합된 BMS-936558 (예를 들어 1 mg/kg); 또는 HLA-A*0201-제한 멀티펩티드(multipeptide) 백신과 조합된 BMS-936558 (예를 들어 1-10 mg/kg) (Weber et al, 2013).

표 1

[0057]

C646	C375	C146
		

[0058] * 상기 표 1은 문헌 [Bowers et al. (2010)]을 기반으로 함

[0059] 특정 실시양태에서, 작용제는 p300 억제제이며, 이의 식은 표 1에 기재되어 있고, 즉 C646 (4-(4-((5-(4,5-디메틸-2-니트로페닐)푸란-2-일)메틸렌)-3-메틸-5-옥소-4,5-디히드로-1H-피라졸-1-일)벤조산), C146 (4-히드록시-3-(((2-(3-아이오도페닐)벤조[d]옥사졸-5-일)이미노)메틸)벤조산) 또는 C375 (2-클로로-4-(5-((2,4-디옥소-3-(2-옥소-2-(p-톨릴아미노)에틸)티아졸리딘-5-일리덴)메틸)푸란-2-일)벤조산)이다. 특히, p300 억제제는 C646이다.

[0060] 특정 실시양태에서, 인돌아민-2,3-디옥시게나제 경로의 소 분자 억제제는 인독시모드(Indoximod) (NLG-9189; 뉴링크 제네틱스(NewLink Genetics)), INCB024360 (인사이트(Incyte)) 또는 NLG-919 (뉴링크 제네틱스)일 수 있다.

[0061] HIF-1 조절제는 문헌 [Zheng et al. (Zheng et al, 2015)]에 기재된 M30, 5-[N-메틸-N-프로파르길아미노메틸]-8-히드록시퀴놀린일 수 있다.

[0062] 특정 실시양태에서, 작용제는 그램-양성 및 그램-음성 박테리아를 표적으로 하고, 그로 인해 Treg의 면역조정을 용이하게 하는 광범위한 항생제, 예를 들어 그램-양성 박테리아를 표적으로 하고 Treg 수준/활성을 감소시키는 것으로 나타난는 반코마이신으로부터 유래될 수 있다 (Brestoff & Artis, 2013; Smith et al, 2013).

[0063] 특정 실시양태에서, 작용제는 특정 요법에서 Treg의 하향 조절을 야기할 임의의 공중합체, 예컨대 YFAK, VYAK, VWAK, VEAK, FEAK, FAK, VAK 또는 WAK일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Cop-1" 및 "코폴리머 1"은 교대해서 사용된다.

[0064] 본 발명의 제약 조성물은 활성제로서, 적합한 양의 양전하 아미노산, 예컨대 리신 또는 아르기닌을, 음전하 아미노산 (바람직하게는 보다 적은 양으로), 예컨대 글루탐산 또는 아스파르트산과 조합하여, 임의로 하전되지 않은 중성 아미노산, 예컨대 알라닌 또는 글리신과 조합하여 (충전제로서 역할을 한다), 및 임의로 공중합체에 면역원성 특성을 부여하도록 적합화된 아미노산, 예컨대 방향족 아미노산, 예컨대 티로신 또는 트립토판과 함께 포함하는, Treg 활성 또는 수준을 조정하는 랜덤 공중합체를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 WO 00/05250 (이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 그러한 공중합체 중 어느 것이든 포함할 수 있다.

[0065] 보다 구체적으로, 본 발명에서 사용하기 위한 조성물은 다음의 군, 즉 (a) 리신 및 아르기닌; (b) 글루탐산 및 아스파르트산; (c) 알라닌 및 글리신; 및 (d) 티로신 및 트립토판 중 적어도 3개의 각각으로부터 선택된 하나의 아미노산을 포함하는, 랜덤 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 공중합체를 포함한다.

[0066] 본 발명에서 사용하기 위한 공중합체는 L- 또는 D-아미노산 또는 그의 혼합물로 구성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 바와 같이, L-아미노산은 대부분의 천연 단백질에서 발생한다. 그러나, D-아미노산은 시판되고 있으며 본 발명에서 사용되는 삼원중합체 및 다른 공중합체를 제조하기 위해 사용되는 아미노산의 일부 또는 전부 대신에 사용될 수 있다. 본 발명은 D- 및 L-아미노산 둘 다를 함유하는 공중합체, 뿐만 아니라 본질적으로 L- 또는 D-아미노산 중 어느 하나로 이루어진 공중합체의 사용을 고려한다.

[0067] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 약 2 KDa 내지 약 40 KDa의 분자량 및 순(net) 전체 양의 전하를

갖는, 1.5:4.8:1:3.6의 대략적인 비로 본질적으로 아미노산 L-글루탐산 (E), L-알라닌 (A), L-티로신 (Y) 및 L-리신 (K)으로 이루어진 랜덤 폴리펩티드의 혼합물인 코폴리머 1을 포함한다. 특정 실시양태에서, Cop 1은 약 2 KDa 내지 약 20 KDa, 약 4,7 KDa 내지 약 13 K Da, 약 4 KDa 내지 약 8.6 KDa, 약 5 KDa 내지 9 KDa, 또는 약 6.25 KDa 내지 8.4 KDa의 평균 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, Cop 1은 약 13 KDa 내지 약 20 KDa, 약 13 KDa 내지 약 16 KDa 또는 약 15 KDa 내지 약 16 KDa의 평균 분자량을 갖는다. 40 KDa 미만의, Cop 1에 대한 다른 평균 분자량이 또한 본 발명에 포함된다. 상기 분자량 범위의 코폴리머 1은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 미국 특허 번호 5,800,808 (이의 전체 내용은 전체로 본원에 포함됨)에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 코폴리머 1은 약 15 내지 약 100, 또는 약 40 내지 약 80의 아미노산 길이를 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 특정 실시양태에서, Cop 1은 다발성 경화증 (MS)의 치료를 위해 여러 국가에서 상표명, 코팍손(Copaxone)® (테바 파마슈티칼즈 리미티드(Teva Pharmaceuticals Ltd.), 이스라엘 페타크틱바(Petach Tikva))으로 승인된 일반명 글라티라머 아세테이트로 공지된 그의 아세테이트 염의 형태이다. 본원에 개시된 제약 조성물의 경우 코폴리머 1의 활성은 다음의 치환 중 하나 이상이 이루어지는 경우 남는 것으로 예상된다: 글루탐산 대신에 아스파르트산, 알라닌 대신에 글리신, 리신 대신에 아르기닌, 및 티로신 대신에 트립토판.

[0068] 본 발명의 특정 실시양태에서, Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체는각각 군 (a) 내지 (d)의 3개의 군의 상이한 하나로부터의 3개의 상이한 아미노산의 공중합체이다. 이들 공중합체는 본원에서 삼원중합체로 지칭된다.

[0069] 한 실시양태에서, Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체는 티로신, 알라닌, 및 리신을 함유하는 삼원중합체 (이하에 YAK로 지정됨)이고, 여기서 아미노산의 평균 몰 분율은 다를 수 있다: 티로신은 약 0.05-0.250의 몰 분율로; 알라닌은 약 0.3 - 0.6의 몰 분율로; 그리고 리신은 약 0.1-0.5의 몰 분율로 존재할 수 있다. 티로신, 알라닌 및 리신의 몰비는 각각 약 0.10:0.54:0.35일 수 있다. 리신 대신에 아르기닌, 알라닌 대신에 글리신, 및/또는 티로신 대신에 트립토판을 사용하는 것이 가능하다.

[0070] 특정 실시양태에서, Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체는 티로신, 글루탐산, 및 리신을 함유하는 삼원중합체 (이하에 YEK로 지정됨)이고, 여기서 아미노산의 평균 몰 분율은 다를 수 있다: 글루탐산은 약 0.005 - 0.300의 몰 분율로 존재할 수 있고, 티로신은 약 0.005-0.250의 몰 분율로 존재할 수 있고, 리신은 약 0.3-0.7의 몰 분율로 존재할 수 있다. 글루탐산, 티로신, 및 리신의 몰비는 각각 약 0.26:0.16:0.58일 수 있다. 글루탐산 대신에 아스파르트산, 리신 대신에 아르기닌, 및/또는 티로신 대신에 트립토판을 사용하는 것이 가능하다.

[0071] 특정 실시양태에서, Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체은 Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체는 리신, 글루탐산, 및 알라닌을 함유하는 삼원중합체 (이하에 KEA로 지정됨)이고, 여기서 아미노산의 평균 몰 분율은 다를 수 있다: 글루탐산은 약 0.005-0.300의 몰 분율로 존재할 수 있고, 알라닌은 약 0.005-0.600의 몰 분율로, 그리고 리신은 약 0.2 - 0.7의 몰 분율로 존재할 수 있다. 글루탐산, 알라닌 및 리신의 몰비는 각각 약 0.15:0.48:0.36일 수 있다. 글루탐산 대신에 아스파르트산, 알라닌 대신에 글리신, 및/또는 리신 대신에 아르기닌을 사용하는 것이 가능하다.

[0072] 특정 실시양태에서, Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체는 티로신, 글루탐산, 및 알라닌을 함유하는 삼원중합체 (이하에 YEA로 지정됨)이고, 여기서 아미노산의 평균 몰 분율은 다를 수 있다: 티로신은 약 0.005-0.250의 몰 분율로 존재할 수 있고, 글루탐산은 약 0.005-0.300의 몰 분율로, 그리고 알라닌은 약 0.005-0.800의 몰 분율로 존재할 수 있다. 글루탐산, 알라닌 및 티로신의 몰비는 각각 약 0.21: 0.65:0.14일 수 있다. 티로신 대신에 트립토판, 글루탐산 대신에 아스파르트산, 및/또는 알라닌 대신에 글리신을 사용하는 것이 가능하다.

[0073] 삼원중합체 YAK, YEK, KEA 및 YEA의 평균 분자량은 약 2 KDa 내지 40 KDa, 바람직하게는 약 3 KDa 내지 35 KDa, 보다 바람직하게는 약 5 KDa 내지 25 KDa로 다를 수 있다.

[0074] 코폴리머 1 및 Treg 활성 또는 수준을 조정하는 다른 공중합체는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어, 용액 중의 아미노산의 목적하는 몰비를 사용하여 축합 조건 하에서, 또는 고상 합성 절차에 의해 제조될 수 있다. 축합 조건은 하나의 아미노산의 카르복실 기를 또 다른 아미노산의 아미노 기와 축합시켜 펩티드 결합을 형성하기 위한, 적절한 온도, pH, 및 용매 조건을 포함한다. 축합제, 예를 들어 디시클로헥실카르보디이미드를 사용하여, 폴리펩티드 결합의 형성을 용이하게 할 수 있다. 차단 기(Blocking group)를 사용하여 관능기, 예컨대 원하지 않은 부 반응에 대하여 측쇄 모이어티 및 일부의 아미노 또는 카르복실 기를 보호할 수 있다.

[0075] 예를 들어, 공중합체는 미국 특허 3,849,550에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있고, 여기서 티로신, 알라닌, γ

-벤질 글루타메이트 및 N ε-트리플루오로아세틸-리신의 N-카르복시무수물을 개시제로서 디에틸아민과 무수 디옥산 중 주위 온도 (20℃-26℃)에서 중합시킨다. 글루탐산의 γ-카르복실 기를 빙초산 중에서 브로민화수소에 의해 탈차단(deblock)시킬 수 있다. 트리플루오로아세틸 기는 1M 피페리딘에 의해 리신으로부터 제거된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 방법을 조정하여, 글루탐산, 알라닌, 티로신, 또는 리신 중 어느 하나와 관련된 반응을 선택적으로 제거함으로써, 목적하는 아미노산, 즉, 코폴리머 1에서 4개의 아미노산 중 3개를 함유하는 펩티드 및 폴리펩티드를 제조할 수 있다는 점을 용이하게 이해한다.

[0076] 공중합체의 분자량은 폴리펩티드 합성 동안에 또는 공중합체가 제조된 후에 조정될 수 있다. 폴리펩티드 합성 동안에 분자량을 조정하기 위해, 폴리펩티드가 목적하는 대략적인 길이에 이르렀을 때 합성이 중단되도록 합성 조건 또는 아미노산의 양을 조정한다. 합성 후에, 목적하는 분자량을 가진 폴리펩티드는 임의의 이용가능한 크기 선택 절차, 예컨대 분자량 크기 결정(sizing) 컬럼 또는 겔 상에 폴리펩티드의 크로마토그래피, 및 목적하는 분자량 범위의 수집에 의해 수득될 수 있다. 공중합체는 또한, 예를 들어, 산 또는 효소 가수분해에 의해, 부분적으로 가수분해하여 고분자량 종을 제거한 다음에, 정제하여 산 또는 효소를 제거할 수 있다.

[0077] 한 실시양태에서, 목적하는 분자량을 가진 공중합체는 보호된 폴리펩티드를 브로민화수소산과 반응시켜 목적하는 분자량 프로파일을 갖는 트리플루오로아세틸-폴리펩티드를 형성시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 반응은 1 또는 2개의 시험 반응에 의해 미리 결정되는 시간 동안 및 온도에서 수행한다. 시험 반응 동안에, 시간 및 온도는 다양하고 시험 폴리펩티드의 소정의 배치의 분자량 범위가 결정된다. 폴리펩티드의 그 배치를 위한 최적 분자량 범위를 제공하는 시험 조건이 그 배치에 사용된다. 따라서, 목적하는 분자량 프로파일을 갖는 트리플루오로아세틸-폴리펩티드는 보호된 폴리펩티드를 시험 반응에 의해 미리 결정되는 시간 동안 및 온도에서 브로민화수소산과 반응시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 그 다음에 목적하는 분자량 프로파일을 가진 트리플루오로아세틸-폴리펩티드를 피페리딘 수용액으로 처리하여 목적하는 분자량을 갖는 낮은 독성의 폴리펩티드를 형성시킨다.

[0078] 특정 실시양태에서, 소정의 배치로부터의 보호된 폴리펩티드의 시험 샘플을 약 20-28℃의 온도에서 약 10-50시간 동안 브로민화수소산과 반응시킨다. 그 배치를 위한 최선의 조건은 여러 시험 반응을 시행함으로써 결정한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 보호된 폴리펩티드를 약 26℃의 온도에서 약 17시간 동안 브로민화수소산과 반응시킨다.

[0079] MS-연관 HLA-DR 분자에 대한 Cop 1의 결합 모티프(motif)가 공지되어 있기 때문에 (Fridkis-Hareli et al, 1999), 정의된 서열을 갖는 폴리펩티드를 상기 문헌 [Fridkis-Hareli et al (1999)] 간행물에 기재된 바와 같이 용이하게 제조하고, HLA-DR 분자의 펩티드 결합 그루브(groove)에 대한 결합에 대해 시험할 수 있다. 이러한 펩티드의 예는 WO 00/05249 및 WO 00/05250 (이의 전체 내용이 본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있고, 서열식별번호 1 내지 32의 펩티드 (**표 2**)를 포함한다.

[0080] 이러한 펩티드 및 다른 유사한 펩티드는 Cop 1과 유사한 활성을 갖는 것으로 예상될 것이다. 이러한 펩티드, 및 다른 유사한 펩티드는, 또한 CNS 미엘린 항원과의 교차-반응하는 공중합체의 정의 내에 있는 것으로 간주되고 그의 용도는 본 발명의 부분으로 간주된다.

표 2

서열식별번호	펩티드 서열
1	AAAYAAAAAAKAAAA
2	AEKYAAAAAAKAAAA
3	AKEYAAAAAAKAAAA
4	AKKYAAAAAAKAAAA
5	AEAYAAAAAAKAAAA
6	KEAYAAAAAAKAAAA
7	AEEYAAAAAAKAAAA
8	AAEYAAAAAAKAAAA
9	EKAYAAAAAAKAAAA
10	AAKYEAAAAAKAAAA
11	AAKYAEAAAAKAAAA
12	EAAYAAAAAAKAAAA
13	EKKYAAAAAAKAAAA
14	EAKYAAAAAAKAAAA
15	AEKYAAAAAAAAAAA
16	AKEYAAAAAAAAAAA
17	AKKYEAAAAAAAAAA
18	AKKYAEAAAAAAAAA
19	AEAYKAAAAAAAAAA
20	KEAYAAAAAAAAAAA
21	AEEYKAAAAAAAAAA
22	AAEYKAAAAAAAAAA
23	EKAYAAAAAAAAAAA
24	AAKYEAAAAAAAAAA
25	AAKYAEAAAAAAAAA
26	EKKYAAAAAAAAAAA
27	EAKYAAAAAAAAAAA
28	AEYAKAAAAAAAAAA
29	AEKAYAAAAAAAAAA
30	EKYAAAAAAAAAAAA
31	AYKAEAAAAAAAAAA
32	AKYAEAAAAAAAAAA

[0081]

[0082] 본 발명에 따른 "Treg 활성 또는 수준을 조정하는 공중합체"의 정의는 다른 합성 아미노산 공중합체, 예컨대 (다발성 경화증의 치료를 위한 후보로서) 문헌 [Fridkis-Hareli et al., 2002] 및 미국 특허 8,017,125 에 기재된 랜덤 4개-아미노산 공중합체, 즉 아미노산 발린 (V), 페닐알라닌 (F), 알라닌 (A) 및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 VFAK; 아미노산 발린 (V), 티로신 (Y), 알라닌 (A) 및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 VYAK; 아미노산 발린 (V), 트립토판 (W), 알라닌 (A) 및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 VWAK; 아미노산 발린 (V), 글루탐산 (E), 알라닌 (A) 및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 VEAK; 아미노산 페닐알라닌 (F), 글루탐산 (E), 알라닌 (A) 및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 FEAK ; 아미노산 페닐알라닌 (F), 알라닌 (A) 및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 FAK; 아미노산 발린 (V), 알라닌 (A) 및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 VAK; 및 아미노산 트립토판 (W), 알라닌 (A)및 리신 (K)을 포함하는 공중합체 WAK를 포함하는 것을 의미한다.

[0083] 본 발명에 따른 제약 조성물은 알츠하이머병, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 일차 진행형 다발성 경화증; 이차 진행형 다발성 경화증, 피질기저 핵변성(corticobasal degeneration), 레트 증후군(Rett syndrome), 연령 관련 황반 변성 및 망막색소 변성증으로 이루어진 군으로부터 선택된 망막 변성 장애; 전방 허

혈성 시신경 병증(anterior ischemic optic neuropathy); 녹내장; 포도막염; 우울증; 외상 연관 스트레스(trauma-associated stress) 또는 외상 후 스트레스 장애, 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia), 루이소체 치매(Lewy body dementia), 경도 인지 장애, 후두 피질 위축증(posterior cortical atrophy), 일차 진행형 실어증 또는 진행성 핵상 안근마비(progressive supranuclear palsy)로부터 선택된 신경변성 질환, 장애 또는 병태인 CNS의 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 것일 수 있다. 특정 실시양태에서, CNS의 병태는 연령 관련 치매이다.

[0084] 특정 실시양태에서, CNS의 병태는 알츠하이머병, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병이다.

[0085] 본 발명에 따른 제약 조성물은 추가로 척수 손상, 폐쇄성 뇌 손상(closed head injury), 둔상(blunt trauma), 관통성 외상(penetrating trauma), 출혈성 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 대뇌 허혈(cerebral ischemia), 시신경 손상, 심근 경색, 유기인산염 중독 및 종양 절제로 인한 손상으로부터 선택된 CNS의 손상을 치료하기 위한 것일 수 있다.

[0086] 상기에 서술한 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명이 알츠하이머병을 모방하는 마우스에서 인지 기능을 개선시킨다는 것을 밝혀냈다. 따라서, 제약 조성물은 진단된 질환이 없는 개체에서, 뿐만 아니라 신경변성 질환을 앓고 있는 사람들에서 일어날 수 있는, CNS 운동 및/또는 인지 기능을 개선시키는데 사용하기 위한, 예를 들어 연령 연관 인지 기능의 상실을 경감시키는데 사용하기 위한 것일 수 있다. 더욱이, 제약 조성물은 급성 스트레스 또는 외상 에피소드(traumatic episode)로부터 생긴 인지 기능의 상실을 경감시키는데 사용하기 위한 것일 수 있다. 상기에서 본원에 언급된 인지 기능은 학습, 기억 또는 둘 다를 포함할 수 있다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "CNS 기능"은, 특히, 감각 정보의 수용 및 처리, 사고, 학습, 기억, 언어의 인지, 생성 및 이해, 운동 기능 및 청각 및 시각 반응의 제어, 균형과 평형의 유지, 동작 조정력(movement coordination), 감각 정보의 수행 및 호흡, 심박수, 및 소화와 같은 자율 기능의 제어를 지칭한다.

[0088] 용어 "인지", "인지 기능" 및 "인지 수행"은, 본원에서 교대해서 사용되며, 학습, 기억, 이미지의 창출, 사고, 인식, 추론, 공간 능력, 말하기 및 언어 능력, 언어 획득 및 판단 주의 능력을 포함하지만 그에 제한되지 않는, 임의의 정신적 과정 또는 상태와 관련이 있다. 인지는 뇌의 여러 영역, 예컨대 해마, 피질 및 다른 뇌 구조에서 형성된다. 그러나, 장기 기억은 피질에 적어도 부분적으로 저장되는 것으로 추정되고 감각 정보는 섬 피질(insular cortex) 내에 존재하는, 특이적 피질 구조, 미각 피질에 의해 획득되고, 통합되고, 회수되는 것으로 공지되어 있다.

[0089] 인간에서, 인지 기능은, 임의의 공지된 방법에 의해, 예를 들어 그리고 제한 없이, 전반적 임상 인상 변화 척도(clinical global impression of change scale) (CIBIC-플러스 척도(plus scale)); 간이 정신 진단 검사(Mini Mental State Exam) (MMSE); 신경정신행동검사(Neuropsychiatric Inventory) (NPI); 임상 치매 척도(Clinical Dementia Rating Scale) (CDR); 전산화 캠브리지 신경인지 검사법 (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery) (CANTAB) 또는 산도스 노인 임상 평가(Sandoz Clinical Assessment-Geriatric) (SCAG)에 의해 측정될 수 있다. 인지 기능은 또한 영상화 기술, 예컨대 양전자 단층 촬영(Positron Emission Tomography) (PET), 기능적 자기 공명 영상법(fuctional magnetic resonance imaging) (fMRI), 단일 광자 단층 촬영(Single Photon Emission Computed Tomography) (SPECT), 또는 뇌 기능을 측정할 수 하는 임의의 다른 영상화 기술을 사용하여 간접적으로 측정될 수 있다.

[0090] 환자에서 인지에 영향을 주는 과정 중 하나 이상의 개선은 상기 환자에서 인지 기능의 개선을 의미할 것이고, 따라서 특정 실시양태에서 인지를 개선시키는 것은 학습, 가소성, 및/또는 장기 기억을 개선시키는 것을 포함한다. 용어 "개선" 및 "증진"은 교대해서 사용될 수 있다.

[0091] 영어 "학습"은 새로운 것을 획득하거나 얻는 것, 또는 기존 지식, 행동, 기술, 가치, 또는 선호도를 변경하고 강화시키는 것에 관한 것이다.

[0092] 용어 "가소성"은 학습으로 변화시키고, 이미 획득된 기억을 변화시키는 뇌의 능력과 연관된 시냅스 가소성, 뇌 가소성 또는 신경가소성에 관한 것이다. 가소성을 반영하는 하나의 측정가능한 파라미터는 기억 소멸이다.

[0093] 용어 "기억"은 정보가 코딩되고, 저장되고, 회수되는 과정이다. 기억은 세 가지 구별 가능한 카테고리, 즉 감각 기억, 단기 기억 및 장기 기억을 갖는다.

[0094] 용어 "장기 기억"은 장기간 또는 무기한으로 정보를 유지하는 능력이다. 장기 기억은 두 가지 주요 부문, 즉 외현 기억(explicit memory) (서술 기억(declarative memory)) 및 암묵 기억 (비선언적 기억(non-declarative

memory))을 포함한다. 장기 기억은 그의 초기 획득 후에 기억 흔적을 안정화시키는 과정의 카테고리인 기억 응고화(consolidation)에 의해 달성된다. 응고화는 두가지 구체적 과정, 학습 후 처음 몇 시간 내에 발생하는 시냅스 응고화(synaptic consolidation), 및 해마에 의존하는 기억이 수주 내지 수년의 기간에 걸쳐 해마에 독립적이 되는 시스템 응고화(synaptic consolidation))로 구별된다.

[0095] 추가적 측면에서, 본 발명은 자가면역 신경염증성 질환 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS)을 포함하지 않는, 중추신경계 (CNS)의 질환, 장애, 병태 또는 손상의 치료를 필요로 하는 개체에게 상기 정의된 바와 같은 본 발명에 따른 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상의 치료 방법으로서, 상기 제약 조성물이 두 과정 이상의 치료를 포함하는 투여 요법에 의해 투여되고, 치료의 각각의 과정은 순차적으로 치료 세션 후에 간격 세션을 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.

[0096] 특정 실시양태에서, 치료 세션은 제약 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 치료 세션을 적어도 수준이 기준 미만으로 하락할 때까지 유지시키고, 투여를 간격 세션 동안에 중단하고, 간격 세션을 수준이 기준 미만인 동안은 유지시킨다. 기준은 (a) 상기 투여 전에 상기 개체로부터 수득된 가장 최근의 혈액 샘플에서 측정된 조절 T 세포 또는 골수-유래 억제제 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준; 또는 (b) CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상으로 고통받는 개체의 모집단에 특유한 조절 T 세포 또는 골수-유래 억제제 세포의 전신 존재 또는 활성의 수준으로부터 선택된다.

[0097] 대안으로, 치료 세션은 제약 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하고, 치료 세션을 적어도 IFNɣ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 수준, 또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식의 속도가 기준 초과로 상승할 때까지, 투여를 간격 세션 동안에 중단하고, 간격 세션을 상기 수준이 상기 기준 초과인 동안은 유지시키고, 여기서 기준은 (a) 상기 투여 전에 상기 개체로부터 수득된 가장 최근의 혈액 샘플에서 측정된, IFNɣ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 활성의 수준, 또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식의 속도; 또는 (b) CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상으로 고통받는 개체의 모집단에 특유한 IFNɣ-생성 백혈구의 전신 존재 또는 활성의 수준, 또는 자극에 대한 반응에서 백혈구의 증식의 속도로부터 선택된다.

[0098] 본 발명의 제약 조성물의 상이한 특징을 기재하는 상기 실시양태는 본 발명의 방법과 또한 관련이 있는데, 그 이유는 방법이 동일한 제약 조성물을 사용하기 때문이다.

[0099] 또한 추가적 측면에서, 본 발명은 자가면역 신경염증성 질환 RRMS를 포함하지 않는 CNS의 질환, 장애, 병태 또는 손상을 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물로서, 상기 제약 조성물이 다음으로부터 선택된, 개체에서 전신 면역억제의 수준을 감소시키는 활성제를 포함하는 것인 제약 조성물을 제공한다: (i) 다음에 특이적인 항체: (a) CD47; (b) OX40; (c) VEGF-A (베바시주맙); (d) CD25; (e) GITR (GITR 유발 mAb (DTA-1)); (f) CCR4; 또는 (g) TIM-3/갈렉틴9; (h) 항-킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체; (i) 항-LAG-3; 또는 (j) 항-4-1BB; (ii) (a) 내지 (j)의 임의의 조합물; (iii) 아주반트, 예컨대 TLR9 리간드, 예컨대 CpG와 조합된, (a) 내지 (j)의 임의의 조합물; (iv) 다음으로부터 선택된 단백질: (a) 님 잎 당단백질 (NLGP); 또는 (b) sCTLA-4; (v) 다음으로부터 선택된 소 분자: (a) 수니티닙; (b)폴리옥소메탈레이트-1 (POM-1); (c)α,β-메틸렌아데노신 5' -디포스페이트 (APCP); (d) 삼산화비소 (As_2O_3); (e) GX15-070 (오바토클락스); (f) 레티노산 길항제, 예컨대 Ro 41-5253 또는 LE-135; (g) 단독 작용제로서 또는 항-CD47 항체와 조합된, SIRPα (CD47) 길항제, 예컨대 CV1-hIgG4; (h) 단독 작용제로서 또는 항-CCR4 항체와 조합된, CCR4 길항제, 예컨대 AF399/420/18025; 또는 (i) 아데노신 A2B 수용체 길항제, 예컨대 PSB603; (j) 인돌아민-2,3-디옥시게나제의 길항제; (k) HIF-1 조절제; (vi) 침묵 분자, 예컨대 miR-126 안티센스 및 항-갈렉틴-1 (Gal-1); (vii) OK-432; (viii) IL-12와 항-CTLA-4의 조합물; (ix) 항생제, 예컨대 반코마이신; 또는 (x) (i) 내지 (ix)의 임의의 조합물.

[0100] 본 발명에 따라서 사용하기 위한 제약 조성물은 하나 이상의 생리학상 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방식으로 제제화될 수 있다. 담체(들)은 조성물의 다른 성분들과 상용성이고 그의 수용자에 유해하지 않다는 의미에서 "허용되는"이어야 한다.

[0101] 담체, 투여의 방식, 투여 형태 등의 다음의 예시는 공지된 가능성으로서 기재되며, 이로부터 담체, 투여의 방식, 투여 형태 등이 본 발명과 함께 사용하기 위해 선택될 수 있다. 그러나, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 선택된 임의의 소정의 제제 및 투여 방식을 먼저 시험하여 그것이 목적하는 결과를 달성하는지를 알아내야 한다는 점을 이해할 것이다.

[0102] 투여의 방법은 비경구, 예를 들어 정맥 내, 복강 내, 근육 내, 피하, 점막 (예를 들어, 경구, 비강, 협측, 질, 직장, 안내), 척수 강 내, 국소 및 피내 경로를 포함하나, 그에 제한되지는 않는다. 투여는 전신 또는 국소일

수 있다.

[0103] 용어 "담체"는 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비히클을 지칭하고 이와 함께 활성제가 투여된다. 제약 조성물 중의 담체는 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈 (폴리비돈 또는 포비돈), 트라가칸트 검, 젤라틴, 전분, 락토스 또는 락토스 일수화물; 붕해제, 예컨대 알긴산, 옥수수 전분 등; 윤활제 또는 계면활성제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트, 또는 소듐 라우릴 술페이트; 및 활택제, 예컨대 콜로이드상 이산화규소를 포함할 수 있다.

[0104] 경구 투여의 경우, 제약 제제는 액체 형태, 예를 들어, 용액, 시럽 또는 현탁액일 수 있거나, 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클을 이용하여 재구성하기 위한 약물 제품으로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 통상적인 수단에 의해 제약상 허용되는 첨가제, 예컨대 현탁화제 (예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화 식용 지방); 유화제 (예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클 (예를 들어, 아몬드유, 유성 에스테르 또는 분별화 식물성유); 및 보존제 (예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 함께 제조될 수 있다. 제약 조성물은, 예를 들어, 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 결합제 (예를 들어, 예비젤라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 히드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제 (예를 들어, 락토스, 미세결정질 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제 (예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 붕해제 (예를 들어, 감자 전분 또는 소듐 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제 (예를 들어, 소듐 라우릴 술페이트)와 함께 통상적인 수단에 의해 제조되는 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다.

[0105] 경구 투여용 제제는 활성 화합물의 제어 방출을 제공하도록 적합하게 제제화될 수 있다.

[0106] 협측 투여의 경우, 조성물은 통상적인 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠 지 형태를 취할 수있다.

[0107] 조성물은 주사, 예를 들어, 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의해 비경구 투여용으로 제제화될 수 있다. 주사용 제제는, 첨가된 보존제와 함께, 단위 투여 형태로, 예를 들어, 앰풀로 또는 다회 용량 용기로, 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중 현탁액, 용액 또는 에멀젼과 같은 형태를 취할 수 있으며, 제제화제, 예컨대 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안으로, 활성 성분은 사용 전에, 적합한 비히클, 예를 들어 발열원이 없는 멸균수(sterile pyrogen free water)를 이용하여 구성을 위해 분말 형태일 수 있다.

[0108] 조성물은 또한, 예를 들어, 통상적인 좌제 베이스, 예컨대 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드를 함유하는, 좌제 또는 정체 관장과 같은 직장 조성물로 제제화될 수 있다.

[0109] 흡입에 의한 투여의 경우, 본 발명에 따라 사용하기 위한 조성물은, 편리하게는 네뷸라이저 또는 가압 팩으로부터 에어로졸 스프레이 제공물(presentation)의 형태로, 적합한 추진제, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체의 사용과 함께 전달된다. 가압 에어로졸의 경우에, 투여 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 화합물의 분말 믹스 및 적합한 분말 베이스, 예컨대 락토스 또는 전분을 함유하는, 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한, 예를 들제라틴의 카트리지 및 캡슐이 제제화될 수 있다.

[0110] 인간 용도에 사용되는 활성 성분의 용량의 결정은 관련 기술분야에서 일반적으로 사용되는 관례를 기반으로 하고, 임상 시험에서 의사에 의해 마지막으로 결정될 것이다. 인간에게 투여하기 위한 예상되는 대략적인 등가 용량은 공지된 식을 사용하여, 아래에 본원에 개시된 생체내 실험적인 증거에 기초하여 계산될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Reagan-Show et al. (2007) Dose translation from animal to human studies revisited. The FASEB Journal 22:659-661)]. 이 패러다임에 따르면, 성인 인간 등가 용량 (mg/kg 체중)은 마우스에게 제공된 용량 (mg/kg 체중)에 에 0.081을 곱한 것과 같다.

[0111] 본 발명은 이제 다음의 비제한적 실시예들에 의해 설명될 것이다

[0112] **실시예**

[0113] ***물질 및 방법***

[0114] 동물. 뉴런-특이적 마우스 Thy-1 프로모터의 전사 제어 하에 PS1 (M146L/L286V) 트랜스진, 및 인간 APP의 가족성 AD 돌연변이 형태 (스웨덴 돌연변이(Swedish mutation), K670N/M671L; 플로리다 돌연변이(Florida mutation), I716V; 및 런던 돌연변이(London mutation), V717I)를 공-발현하는 5XFAD 트랜스제닉 마우스 (Tg6799), 및 AD 이중 트랜스제닉 B6.Cg-Tg (APPswe, PSEN1dE9) 85Dbo/J 마우스 (Borchelt et al, 1997)를 더 잭슨 래보러토리(The Jackson Laboratory)로부터 구매하였다. 유전자형결정을 이전에 기재된 바와 같이, 꼬리

DNA의 PCR 분석에 의해 수행하였다 (Oakley et al, 2006). 이형접합적 돌연변이체 *cx$_3$cr1*$^{GFP/+}$ 마우스 (Jung et al, 2000) (B6.129P-*cx3cr1*^{tm1Litt}/J, 여기서, CX$_3$CR1 케모카인 수용체 대립유전자 중 하나가 GFP를 코딩하는 유전자로 대체되었다)를 BM 키메라의 공여자로서 사용하였다. Foxp3.LuciDTR 마우스 (Suffner et al, 2010)를 5XFAD 마우스와 함께 사육하여 Foxp3$^+$ Treg의 조건부 고갈을 가능하게 하였다. 동물은 바이츠만 과학 연구소 (Weizmann Institute of Science)의 동물 사육 센터(Animal Breeding Center)에서 사육되고 유지되었다. 본원에 상세히 설명된 모든 실험은 바이츠만 과학 연구소의 실험동물 운영 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) (IACUC)에 의해 공식화된 규정을 준수하였다.

[0115] **RNA 정제, cDNA 합성, 및 정량적 실시간 PCR 분석.** 해마의 치상회 (DG)의 전체 RNA를 TRI 시약 (몰레큘라 리서치 센터(Molecular Research Center))으로 추출하고 알엔이지 키트(RNeasy Kit) (퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 용해물로부터 정제하였다. 맥락막총의 전체 RNA를 RNA 마이크로프렙 키트(MicroPrep Kit) (지모 리서치(Zymo Research))를 사용하여 추출하였다. mRNA (1 ㎍)를 대용량 cDNA 역전사 키트(High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 사용하여 cDNA로 전환시켰다. 특이적 mRNA의 발현은 형광-기반 정량적 실시간 PCR (RT-qPCR)을 사용하여 검정하였다. RT-qPCR 반응을 패스트(Fast)-SYBR PCR 매스터 믹스(Master Mix) (어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 수행하였다. 정량 반응을 표준 곡선 방법을 사용하여 각각의 샘플에 대해 삼중으로 수행하였다. 펩티딜프로필 이소머라제 A (*ppia*)를 기준 (항존(housekeeping)) 유전자로서 선택하였다. 증폭 주기는 5 s 동안 95℃, 20 s 동안 60℃, 및 15 s 동안 72℃이었다. 분석의 종료시에, 용융 곡선을 반응의 특이성을 평가하기 위해 구축하였다. *ifn-γ* 및 *ppia* 유전자 분석을 위해, cDNA를 비-랜덤 PCR 프라이머로 14회 PCR 주기로 미리 증폭시켰고, 그로 인해 제조업자의 프로토콜 (프리엠프 매스터 믹스 키트(PreAmp Master Mix Kit); 어플라이드 바이오시스템즈)에 따라, 후속 실시간 PCR 분석의 민감도를 증가시켰다. mRNA 발현은 제조업자의 설명서 (어플라이드 바이오시스템즈)에 따라, TaqMan RT-qPCR을 사용하여 측정하였다. 모든 RT-qPCR 반응을 수행하고 스텝온(StepOne) 소프트웨어 V2.2.2 (어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 분석하였다. 하기 TaqMan 에세이-온-디맨드(Assays-on-Demand)™ 프로브를 사용하였다: Mm02342430_g1 (ppia) 및 Mm01168134_m1 (ifn-γ).

[0116] 조사된 모든 다른 유전자에 대해, 다음의 프라이머를 사용하였다:

[0117] *ppia* 정방향 5'-AGCATACAGGTCCTGGCATCTTGT-3' (SEQ ID NO: 33) 및 역방향 5'-CAAAGACCACATGCTTGCCATCCA-3' (SEQ ID NO: 34);

[0118] *icam1* 정방향 5'-AGATCACATTCACGGTGCTGGCTA-3' (SEQ ID NO: 35) 및 역방향 5'-AGCTTTGGGATGGTAGCTGGAAGA-3' (SEQ ID NO: 36);

[0119] *vcam1* 정방향 5'-TGTGAAGGGATTAACGAGGCTGGA-3' (SEQ ID NO: 37) 및 역방향 5'-CCATGTTTCGGGCACATTTCCACA-3' (SEQ ID NO: 38);

[0120] *cxcl10* 정방향 5'-AACTGCATCCATATCGATGAC-3' (SEQ ID NO: 39) 및 역방향 5'-GTGGCAATGATCTCAACAC-3' (SEQ ID NO: 40);

[0121] *ccl2* 정방향 5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3' (SEQ ID NO: 41) 및 역방향 5'-GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT-3' (SEQ ID NO: 42);

[0122] *tnf-γ* 정방향 5'-GCCTCTTCTCATTCCTGCTT-3' (SEQ ID NO: 43) 역방향 CTCCTCCACTTGGTGGTTTG-3' (SEQ ID NO: 44);

[0123] *il-1β* 정방향 5'-CCAAAAGATGAAGGGCTGCTT-3' (SEQ ID NO: 45) 및 역방향 5'-TGCTGCTGCGAGATTTGAAG-3' (SEQ ID NO: 46);

[0124] *il-12*p40 정방향 5'-GAAGTTCAACATCAAGAGCA-3' (SEQ ID NO: 47) 및 역방향 5'-CATAGTCCCTTTGGTCCAG-3' (SEQ ID NO: 48);

[0125] *il-10* 정방향 5'-TGAATTCCCTGGGTGAGAAGCTGA-3' (SEQ ID NO: 49) 및 역방향 5'-TGGCCTTGTAGACACCTTGGTCTT-3' (SEQ ID NO: 50);

[0126] *tgfβ2* 정방향 5'-AATTGCTGCCTTCGCCCTCTTTAC-3' (SEQ ID NO: 51) 및 역방향 5'-TGTACAGGCTGAGGACTTTGGTGT-3' (SEQ ID NO: 52);

[0127] *igf-1* 정방향 5'-CCGGACCAGAGACCCTTTG (SEQ ID NO: 53) 및 역방향 5'-CCTGTGGGCTTGTTGAAGTAAAA-3' (SEQ ID NO: 54);

[0128] *bdnf* 정방향 5'-GATGCTCAGCAGTCAAGTGCCTTT-3' (SEQ ID NO: 55) 및 역방향 5'-GACATGTTTGCGGCATCCAGGTAA-3' (SEQ ID NO: 56);

[0129] **면역 조직 화학.** 조직 프로세싱 및 면역 조직 화학은 파라핀 포매된 마우스 (6 ㎛ 두께) 및 인간 (10 ㎛ 두께)의 뇌 절편에 대해 수행하였다. 인간 ICAM-1 염색의 경우, 1차 마우스 항-ICAM (1:20 압캠(Abcam); ab2213) 항체를 사용하였다. 슬라이드를 3% H2O2로 10분 동안 인큐베이션하고, 2차 비오틴-접합 항-마우스 항체를 사용한 후에, 벡타스테인(Vectastain) ABC 키트 (벡터 래보러토리스(Vector Laboratories)를 이용하여 비오틴/아비틴을 증폭시켰다. 그 후에, 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB 기질) (지토메드(Zytomed) 키트)을 적용하였고; 슬라이드를 탈수시키고 크실렌-기반 마운팅(mounting) 용액으로 마운팅하였다. 조직 염색을 위해, 마우스를 PBS로 경심(transcardially) 관류한 후에 조직을 절제하고 고정시켰다. CP 조직을 뇌의 측, 제3, 및 제4 뇌실로부터 해부 현미경 (스테미(Stemi) DV4; 자이스(Zeiss)) 하에 단리하였다. 전체 마운트 CP 염색을 위해, 조직을 4℃에서 1시간 동안 2.5% 파라포름알데히드 (PFA)로 고정시킨 후에, 0.05% 소듐 아지드를 함유하는 PBS에 옮겼다. 염색 전에, 절개 조직을 PBS로 세척하고 실온에서 1h 동안 차단시켰다 (20% 말 혈청, 0.3% 트리톤(Triton) X-100, 및 PBS). 1차 항체 (2% 말 혈청 및 0.3% 트리톤 X-100을 함유하는 PBS에서), 또는 2차 항체로 전체 마운트 염색을 실온에서 1h 동안 수행하였다. 각각의 단계에 이어서 PBS에서 3회 세척하였다. 조직을 슬라이드에 적용하고, 이뮤-마운트(Immu-mount) (9990402, 서모 사이언티픽(Thermo Scientific))로 마운팅하고, 커버-슬립(cover-slip)으로 밀봉하였다. 뇌 절편의 염색을 위해, 두개의 상이한 제법 프로토콜 (파라핀 포매된 또는 마이크로톰 처리된 프리-플로팅 세션(microtomed free-floating section))을 이전에 기재된 바와 같이 적용하였다 (Baruch et al, 2013; Kunis et al, 2013). 다음의 1차 항체를 사용하였다: 마우스 항-Aβ (1:300, 코반스(Covance), #SIG-39320); 토끼 항-GFP (1:100, MBL, #598); 쥐 항-CD68 (1:300, 이바이오사이언스(eBioscience), #14-0681); 쥐 항-ICAM-1 (1:200, 압캠, #AB2213); 염소 항-GFP (1:100, 압캠, #ab6658); 토끼 항-IBA-1 (1:300, 와코(Wako), #019-19741); 염소 항-IL-10 (1:20, 알앤드디 시스템즈(R&D systems), #AF519); 쥐 항-Foxp3 (1:20, 이바이오사이언스, #13-5773-80); 토끼 항-CD3 (1:500, 다코(Dako), #IS503);; 마우스 항-ZO-1, 마우스 항-E-카데린(Cadherin), 및 토끼 항-클라우딘-1 (모든 1:100, 인비트로겐(Invitrogen), #33-9100, #33-4000, #51-9000); 토끼 항-GFAP (1:200, 다코, #Z0334). 2차 항체는 다음을 포함하였다: Cy2/Cy3/Cy5-접합 당나귀 항-마우스/염소/토끼/쥐 항체 (1:200; 모두 잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch)로부터). 슬라이드를 헥스트 핵 염색 (1:4000; 인비트로겐 프로브)에 1분 동안 노출시켰다. 2개의 음성 대조군을 이소형 대조군 항체에 이어서 2차 항체로 염색하거나, 2차 항체 단독으로 염색하여, 면역염색 절차로 통상적으로 사용하였다. Foxp3 세포내 염색을 위해, 파라핀-포매 슬라이드로부터 항원 회수를 레트레이바겐 키트(Retreivagen Kit) (#550524, #550527; BD 파르밍겐(Pharmingen)™)를 사용하여 수행하였다. 현미경 분석을, 형광 현미경 (E800; 니콘(Nikon)) 또는 레이저-주사(laser-scanning) 공초점형 현미경 (칼 자이스, 인크.(Carl Zeiss, Inc.))을 사용하여 수행하였다. 형광 현미경에 디지털 카메라 (DXM 1200F; 니콘)를, 그리고 20× NA 0.50 또는 40× NA 0.75 대물 렌즈 (플랜 플루오르(Plan Fluor); 니콘) 중 어느 하나를 장착하였다. 공초점형 현미경에 LSM 510 레이저 주사 용량(laser scanning capacity) (3개의 레이저: Ar 488, HeNe 543, 및 HeNe 633)을 장착하였다. 획득 소프트웨어(acquisition software) (NIS-엘리먼츠(Elements), F3 [니콘] 또는 LSM [칼 자이스, 인크.])를 사용하여 후고정된(postfixed) 조직에 대해 판독하였다. 염색 강도의 정량을 위해, 전체 세포 및 배경 염색을 이미지제이(ImageJ) 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 측정하고, 특이적 염색의 강도를 이전에 기재된 바와 같이 계산하였다 (Burgess et al, 2010). 영상을 포토샵(Photoshop) CS6 13.0 (아도베(Adobe))을 사용하여 잘라내고, 병합하고, 최적화하고, 일러스트레이터(Illustrator) CS5 15.1 (아도베)를 사용하여 배열하였다.

[0130] **인간 CP의 파라핀 포매된 절편.** 젊은 및 고령의 사후 비-CNS-질환 개체, 뿐만 아니라 AD 환자의 인간 뇌 절편을, 옥스포드 브레인 뱅크(Oxford Brain Bank) (이전에는 토마스 윌리스 옥스포드 브레인 콜렉션(Thomas Willis Oxford Brain Collection) (TWOBC)으로 공지됨)로부터 적절한 동의 및 윤리 위원회(Ethics Committee) 승인 (TW220)과 함께 입수하였다. 이들 절편을 포함하는 실험은 바이츠만 과학 연구소 생명윤리 위원회(BioEthics Committee)에 의해 승인되었다.

[0131] **유동세포 계수법, 샘플 제조 및 분석.** 마우스를 PBS로 경심 관류하고, 조직을 이전에 기재된 바와 같이 처리하였다 (Baruch et al, 2013). 뇌를 절개하고 상이한 뇌 영역을 PBS 중에서 해부 현미경 (스테미 DV4; 자이스) 하에 제거하고, 조직을 젠틀맥스(gentleMACS)™ 해리체(dissociator) (밀테닐바이오텍(MiltenyiBiotec))를 사

용하여 해리시켰다. 맥락막총 조직을 뇌의 측, 제3, 및 제4 뇌실로부터 단리하고, 400 U/ml 콜라게나제 유형 IV (워싱턴 바이오케미칼 코포레이션(Worthington Biochemical Corporation))를 함유하는 PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+} 포함)에서 45분 동안 37℃에서 인큐베이션한 다음에, 피펫팅하여 수동으로 균질화하였다. 비장은 주사기의 플런저로 매싱(mashing)하고 ACK (암모늄 클로라이드 포타슘) 용해 완충제로 처리하여 적혈구를 제거하였다. 모든 경우에, 샘플을 제조업자의 프로토콜에 따라 염색하였다. 모든 샘플을 70 ㎛ 나일론 메시를 통해 여과하고, 항-Fc CD16/32 (1:100; BD 바이오사이언시스)로 차단시켰다. IFN-γ의 세포내 염색을 위해, 세포를 6h 동안 파라-메톡시암페타민 (10 ng/ml; 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)) 및 이오노마이신(ionomycin) (250 ng/ml; 시그마-알드리치)으로 인큐베이션하고, 브레펠딘(Brefeldin)-A (10 ㎍/ml; 시그마-알드리치)를 마지막 4h 동안 첨가하였다. 시토카인의 세포내 표지화를 BD 시토픽스/시토펌™ 플러스(Plus) 고정/침투 키트 (카탈로그 번호 555028)로 행하였다. Treg 염색을 위해, 이바이오사이언스 FoxP3 염색 완충제 세트 (카탈로그 번호 00-5523-00)를 사용하였다. 다음의 플루오로크롬-표지된 모노클로날 항체를 BD 파르밍겐, 바이오레전드(BioLegend), 알앤드디 시스템즈, 또는 이바이오사이언시스로부터 구매하였고, 제조업자의 프로토콜에 따라 사용하였다: PE 또는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 450-접합 항-CD4; PE-접합 항-CD25; PerCP-Cy5.5-접합 항-CD45; FITC-접합 항-TCRβ; APC-접합 항-IFN-γ; APC-접합 항-FoxP3; 브릴리언트-바이올렛(Brilliant-violet)-접합 항-CD45. 세포를 플로우조(FlowJo) 소프트웨어를 사용하여 LSRII 세포측정기 (BD 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다. 각각의 실험에서, 관련 음성 대조군, 양성 대조군, 및 각각의 조직에 대한 단일 염색된 샘플을 사용하여 관심 모집단을 식별하고 다른 모집단을 제외하였다.

[0132] **BM 키메라의 제조.** BM 키메라를 이전에 기재된 바와 같이 제조하였다 (Shechter et al, 2009; Shechter et al, 2013). 요컨대, 성별-매칭된 수령자 마우스를 머리를 차폐하면서 치사 전신 방사선 조사 (950 RAD)를 실시하였다 (Shechter et al, 2009). 그 다음에 마우스에 $CX_3CR1^{GFP/+}$ 공여자로부터 5×10^6 BM 세포로 정맥내 주사하였다. 마우스는 실험에서 그의 사용 전에, 조혈 계통의 재구성을 가능하게 하기 위해 BM 이식 후에 8-10주 동안 방치하였다. 키메라현상의 백분율은 순환 단핵구 ($CD11b^+$) 중 GFP 발현 세포의 백분율에 따라 혈액 샘플의 FACS 분석에 의해 결정하였다. 이러한 머리-차폐된 모델에서, 평균 60% 키메라현상이 달성되었고, CNS-침윤성 GFP^+ 골수성 세포는 $CD45^{높은}$/$CD11b^{높은}$인 것으로 확인되었고, 이는 단핵구-유래 대식세포를 나타내고 미세아교세포(microglia)는 아니었다 (Shechter et al, 2013).

[0133] **모리스 수중 미로.** 마우스에게 연이어 4일 동알, 하루에 3회 시험을 제공하여, 풀(pool) (직경 1.1 m) 속에 수면 아래 1.5 cm에 위치된 숨겨진 플랫폼을 찾는 것을 학습하도록 하였다. 수온은 21-22℃로 유지하였다. 분유로 물을 불투명하게 만들었다. 시험실 내에서는, 침수된 플랫폼의 위치를 돕기 위해 단지 말단 시각적 형상 (distal visual shape) 및 대상 단서(object cue)를 마우스가 사용할 수 있었다. 탈출 잠복기(escape latency), 즉, 플랫폼을 찾아 오르는데 필요한 시간을 최대 60 s 동안 기록하였다. 각각의 마우스를 15 s 동안 플랫폼에 남게 한 다음에 미로에서 꺼내어 그의 홈 케이지(home cage)로 보냈다. 마우스가 60 s 이내에 플랫폼을 찾지 못한 경우, 마우스를 플랫폼에 수동으로 배치하고 15 s 후에 그의 홈 케이지로 복귀시켰다. 각각의 마우스의 시험간 간격(inter-trial interval)은 10분이었다. 5일째에, 플랫폼을 제거하고, 마우스에게 이용가능한 탈출 없이 단일의 시험 지속 60s가 제공되었다. 6일 및 7일째, 플랫폼은 원래 훈련 사분면(quadrant)에 대향하는 사분면에 배치하였다. 마우스는 매일 3개 세션 동안 재훈련시켰다. 데이터는 에토비젼(EthoVision) V7.1 자동 추적 시스템 (놀두스 인포메이션 테크놀로지(Noldus Information Technology))을 사용하여 기록하였다. 통계 분석은 분산 분석 (ANOVA) 및 본페로니 사후 검정을 사용하여 수행하였다. 모든 MWM 시험은 조명 오프 단계 (lights-off phase) 동안에 오전 10시와 오후 5시 사이에 수행하였다.

[0134] **방사상 아암 수중 미로.** 방사상 아암 수중 미로 (RAWM)를 사용하여, 이전에 상세하게 기재된 바와 같이 (Alamed et al, 2006), 공간 학습 및 기억을 시험하였다. 요컨대, 6개 스테인리스 강 삽입물(insert)을 탱크 내에 배치하였고, 이 삽입물은 개방 중앙 영역에서 방사하는 6개의 스윔 아암(swim arm)을 형성하였다. 탈출 플랫폼은 풀 직경 1.1 m의 풀 속에, 수면 아래 1.5 cm에, 하나의 아암 (목표 아암)의 말단에 위치시켰다. 수온은 21-22℃로 유지하였다. 분유로 물을 불투명하게 만들었다. 시험실 내에서는, 침수된 플랫폼의 위치를 돕기 위해 단지 말단 시각적 형상 및 대상 단서를 마우스가 사용할 수 있었다. 목표 아암 위치는 소정의 마우스에 대해 일정하게 유지하였다. 1일째, 마우스를 15회 시험들 (3시간 이상 간격을 둠) 동안 훈련시켰고, 여기서 시행은 가시적 플랫폼과 숨겨진 플랫폼 사이에서 교대시켰고, 마지막 4회 시험들은 단지 숨겨진 플랫폼이었다. 2일째, 마우스를 숨겨진 플랫폼으로 15회 시험들 동안 훈련시켰다. 잘못된 아암에 진입하거나, 15초 내에 아암을 선택하는데 실패하는 것은, 오류로서, 점수를 매겼다. 공간 학습 및 기억은 각각의 시험에서 마우스의 탈출

잠복기 또는 아암 진입 오류의 수를 계수함으로써 측정하였다. 훈련 데이터는 세 개의 연속 시험의 훈련 블록을 위한, 평균 오류 또는 탈출 잠복기로서 분석하였다.

[0135] **GA 투여.** 각각의 마우스에 200 μl의 PBS에 용해된 100 ㎍의 GA (배치 번호 P53640; 테바 파마슈티칼즈 인더스트리즈(Teva Pharmaceutical Industries), 이스라엘 페타티크바(Petah Tiqva))의 전체 용량을 피하 (s.c.) 주사하였다. 마우스에매주-GA 요법 (Butovsky et al, 2006), 또는 매일-GA 투여에 따라 주사하였다 (**도 8 및 도 16**). 마우스는, 각각의 실험에 명시된 바와 같이, 마지막 GA 주사 후 1주, 또는 치료 후 1개월 중 어느 하나에 안락사시켰다.

[0136] **Treg의 조건부 절제(Conditional ablation).** 디프테리아 독소 (DTx; 8 ng/g 체중; 시그마)를 Foxp3.LuciDTR 마우스에게 연이어 4일 동안 매일 복강내 (i.p.) 주사하였다 (Suffner et al, 2010). DTX의 효율은 혈액 및 비장에서 면역 세포의 유동 세포 계수법 분석에 의해 확인되었고, 이는 GFP-발현 $FoxP3^+$ $CD4^+$ Treg 세포의 거의 완전한 (>99%) 고갈을 달성하였다 (**도 4**).

[0137] **P300 억제.** 마우스에서 p300의 억제는 이전에 기재된 바와 유사하게 수행하였다 (Liu et al, 2013). p300i (C646; 토크리스 바이오사이언스)를 DMSO에 용해시키고 1주 동안 매일 복강내 (8.9 mg kg^{-1} d^{-1}, 복강내) 주사하였다. 비히클-치료된 마우스에 DMSO를 마찬가지로 주사하였다.

[0138] **ATRA 치료.** 마우스에의 올-트랜스 레티노산 (ATRA) 투여는 이전에 기재된 바와 유사하게 수행하였다 (Walsh et al, 2014). ATRA (시그마)를 DMSO에 용해시키고 1주의 과정에 걸쳐 이틀에 한번 복강내 (8 mg kg^{-1} d^{-1}) 주사하였다. 비히클-치료된 마우스에 DMSO를 마찬가지로 주사하였다.

[0139] **가용성 Aβ (sAβ) 단백질 단리 및 정량.** 조직의 균질화 및 sAβ 단백질 추출을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Schmidt et al, 2005). 요컨대, 대뇌 뇌 실질을 절개하고 급속(snap)-냉동하고 균질화까지 -80℃에서 유지하였다. 단백질을 샘플로부터 순차적으로 추출하여 상이한 용해도의 단백질을 함유하는 개별 분획을 수득하였다. 샘플을, 다운스(Dounce) 균질화기에서 그라운드 글래스 페슬(ground glass pestle)을 사용하여, 250 mM의 수크로스, 20 mM의 트리스(Tris) 염기, 1 mM의 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 및 1 mM의 에틸렌 글리콜 테트라아세트산 (pH 7.4)을 함유하는, 10 부피의 빙-냉 조직 균질화 완충제 중에서 균질화하였다. 6회 스트로크(stroke) 후에, 균질화물을 추가적 6회 스트로크 전에 100-mM NaCl 용액 중 0.4% 디에틸아민 (DEA)과 1:1로 혼합한 다음에, 45분 동안 4℃에서 135,000g 에서 원심분리하였다. 상청액 (세포외 및 세포질 단백질을 함유하는 DEA-가용성 분획)을 수집하고 10%의 0.5 M의 트리스-HCl (pH 6.8)로 중화시켰다. $Aβ_{1-40}$ 및 $Aβ_{1-42}$를 제조업자의 설명서에 따라 시판되는 키트 (바이오레전드; #SIG-38954 및 #SIG-38956 각각)를 사용하여 가용성 분획으로부터 효소-연결 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay) (ELISA)에 의해 개별적으로 측정하였다.

[0140] **Aβ 플라크 정량.** 각각의 뇌로부터, 6 ㎛ 관상 슬라이스(coronal slice)를 수집하고, 관심 영역 (치상회 또는 대뇌 피질)에 걸쳐 4개의 상이한 미리 결정된 깊이로부터, 마우스당 8개의 절편을 면역염색하였다. 명확하게 (positively) 염색된 픽셀의 히스토그램-기반 세그멘테이션(segmentation)을 이미지-프로 플러스(Image-Pro Plus) 소프트웨어 (미디어 사이버네틱스(Media Cybernetics), 미국 메릴랜드주 베데스다)를 사용하여 수행하였다. 세그멘테이션 알고리즘은 치상회 영역 또는 피질 층 V에서, 각각의 영상에 수동으로 적용하였고, 전체 Aβ 면역염색에 의해 점유되는 면적의 백분율을 결정하였다. 플라크 수는 동일한 6 ㎛ 관상 뇌 슬라이스로부터 정량화하였고, 뇌 영역 당 플라크의 평균 수로서 제시된다. 정량 전에, 슬라이스를 코팅하여 실험 군의 정체성(identity)를 마스킹하고, 플라크 부하는 군의 정체성에 대해 알지 못하는 관찰자에 의해 정량화하였다.

[0141] **통계 분석.** 각각의 세트의 실험을 분석하는데 사용된 구체적 시험은 도면 범례에 명시되어 있다. 두 군을 비교하기 위해 양방 스튜던트 t 검정을 사용하여 데이터를 분석하고, 일원분산분석을 사용하여 여러 그룹을 비교한 후에, 귀무 가설(null hypothesis)이 거부된 후에 군의 쌍별 비교를 위해 뉴먼-쿨스 사후 절차를 사용하였다 ($P < 0.05$). 거동 시험으로부터의 데이터를 이원배치 반복 측정 분산분석를 사용하여 분석하였고, 본페로니 사후 절차를 후속 조치 쌍별 비교에 사용하였다. 샘플 크기를 문헌 및 과거 경험을 기반으로 적당한 통계적 검증력(statistical power)으로 선택하였고, 마우스를 연령, 성별, 유전자형에 따라 실험군에 할당하였다. 조사관들은 실험 및 결과 평가 동안에 군의 정체성을 알지 못하였다. 모든 포함 및 제외 기준은 IACUC 지침에 따라 사전에 설정하였다. 결과는 평균 ± s.e.m.으로서 제시하였다. 그래프에서, y-축 오차 막대는 s.e.m을 나타낸다. 통계 계산은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad

Software), 캘리포니아주 샌디에이고)를 사용하여 수행하였다.

[0142] **도입.** 알츠하이머병 (AD)은 중추신경계 (CNS) 내에, 신경세포 손상, 아밀로이드 베타 (Aβ) 플라크 형성, 및 만성 염증을 특징으로 하며, 인지 기능의 점진적인 상실 및 뇌 조직 파괴를 야기하는 연령 관련 신경변성 질환이다 (Akiyama et al, 2000; Hardy & Selkoe, 2002). 이들 병태 하에, CNS의 순환 골수성 세포, 및 상재 (resident) 골수성 세포, 미세아교세포는, 신경염증 반응을 완화시키는데 비-중복적 역할을 한다 (Britschgi & Wyss-Coray, 2007; Cameron & Landreth, 2010; Lai & McLaurin, 2012). 구체적으로, 미세아교세포가 Aβ 침착물을 궁극적으로 청소하지는 못하지만, CNS-침윤성 단핵구-유래 대식세포 (mo-MΦ)는 Aβ 플라크 형성을 제한하고 AD-유사 병리를 격퇴하는데 유익한 역할을 한다 (Butovsky et al, 2007; Koronyo-Hamaoui et al, 2009; Mildner et al, 2011; Simard et al, 2006; Town et al, 2008). 그의 상피 층이 혈액-CSF-장벽 (BCSFB)을 형성하는, 뇌의 맥락막총 (CP)은 CNS에 백혈구 진입을 위한 선택적 관문으로서 확인되었고, 이는 신경 조직 손상 후에 mo-MΦ 및 T 세포의 유입을 가능하게 한다 (Kunis et al, 2013; Shechter et al, 2013). 여기서, 우리는 AD에서, 질환에 걸린 실질에 염증-분해성 면역 세포의 불충분한(suboptimal) 유입이, CP 관문 기능 장애를 수반하는, 전신 면역 장애(immune failure)의 결과인 것으로 가정하였다.

[0143] **실시예 1. AD의 마우스 모델에서 질환 진행에 따른 맥락막총 (CP) 관문 활성.**

[0144] 우리는 먼저 AD의 5XFAD 트랜스제닉 마우스 모델 (AD-Tg)에서 질환 진행에 따른 CP 활성을 조사하였고; 이들 마우스는 가족성 AD와 연관된 5가지 돌연변이를 공-발현하고 및 대뇌 Aβ 병리 및 신경아교증이 이미 2개월 연령에 생긴다 (Oakley et al, 2006). 우리는 질환 병리의 진행 단계에 따라, 연령-매칭된 야생형 (WT) 대조군과 비교하여, AD-Tg 마우스의 CP는, *icam1*, *vcam1*, *cxcl10*, 및 *ccl2*를 포함한, 백혈구 귀소 및 소통 결정 인자의 상당히 보다 낮은 수준을 발현한다는 점을 밝혀냈는데 (**도 1A**), 이는 급성 CNS 손상에 대한 반응에서의 CP에 의해 상향조절되는며, 백혈구의 경상피 이송에 필요한 것으로 보여진다 (Kunis et al, 2013; Shechter et al, 2013). 인테그린 리간드, ICAM-1에 대한 면역 조직 화학 염색은, AD-Tg 마우스의 CP 상피에 의한 그의 감소된 발현을 확인해 주었다 (도 1b). 게다가, 인간 사후 뇌에서 ICAM-1에 대한 염색은, 우리의 이전의 관찰 (Baruch et al, 2014)과 일치하여 CP 상피에서의 그의 연령 연관 감소를 나타냈고, 이러한 효과의 정량적 평가는 CNS 질환이 없는 고령의 개체와 비교하여 AD 환자에서 추가 하락을 밝혀냈다 (**도 2A**). CP에 의한 백혈구 소통 결정 인자의 유도가 상피 인터페론 (IFN)-γ 신호전달에 의존적이기 때문에 (Kunis et al, 2013), 그 다음에 우리는 관찰된 효과가 CP에서 IFN-γ 이용가능성(availability)의 상실을 반영할 수 있는 지의 여부를 시험하였다. 유동세포 계수법 세포내 염색을 사용하여 5XFAD AD-Tg 마우스의 CP의 조사는, 이 구획에서 IFN-γ-생성 세포의 상당히 보다 낮은 수를 밝혀냈고 (**도 2B**), 정량적 실시간 PCR (RT-qPCR) 분석은 연령-매칭된 WT 대조군과 비교하여 AD-Tg 마우스의 CP에서 *ifn-γ*의 보다 낮은 mRNA 발현 수준을 확인해 주었다 (**도 2C**).

[0145] **실시예 2. Treg-매개 전신 면역 억제, CP 관문 활성, 및 AD 병리 사이의 기능적 관계.**

[0146] 조절 T 세포 (Treg)는 전신 이펙터 면역 반응을 억제하는데 중요한 역할을 한다 (Sakaguchi et al, 2008). 우리는 Treg-매개 전신 면역 억제가 CP에서 IFN-γ 이용가능성에 영향을 미치는 것으로 상상하고, 따라서 AD 병리에서 Treg의 관여에 집중하였다. AD 환자에서 상승된 Treg 수준 및 억제 활성의 이전 보고와 일치하여 (Rosenkranz et al, 2007; Saresella et al, 2010; Torres et al, 2013), 그의 연령-매칭된 WT 한배새끼에 비해, 5XFAD AD-Tg 마우스의 비장 세포에서 $Foxp3^+$ Treg 빈도를 평가한 결과, 질환 진행에 따라 그의 상승된 수준을 밝혀냈다 (**도 3A, B**). Treg-매개 전신 면역 억제, CP 관문 활성, 및 AD 병리 사이의 기능적 관계를 연구하기 위해, 우리는 5XFAD AD-Tg 마우스를 Foxp3-디프테리아 독소 수용체 (DTR^+) 마우스와 이종교배하여, 디프테리아 독소 (DTx)의 투여에 의한 AD-Tg/DTR^+ 마우스에서 $Foxp3^+$ Treg의 일시적 조건부 생체내 고갈을 가능하게 하였다 (**도 4A**). Treg의 일시적 고갈은 DTx-치료된 AD-Tg/DTR^- 한배새끼에 비해 AD-Tg/DTR^+ 마우스의 CP에 의해 백혈구 소통 분자의 상승된 mRNA 발현을 초래하였다 (**도 5A**). 뇌 실질에 미치는 일시적 Treg 고갈의 장기간 효과 (3주 후에)의 분석은, $CD4^+$ T 세포, 및 침윤성 mo-MΦ를 나타내는 (Shechter et al, 2013), 상승된 수의 $CD45^{높은}$/$CD11b^{높은}$ 골수성 세포를 포함한, 뇌에서의 면역 세포 축적을 밝혀냈다 (**도 5B**). 게다가, Treg의 단시간 그리고 일시적 고갈은 유동세포 계수법에 의해 평가된 바와 같이, 뇌 내에 축적된 $CD4^+$ T 세포 중서 $Foxp3^+$ Treg의 현저한 보강을 초래하였다 (**도 5C, D**). 해마의 RT-qPCR 분석은 *foxp3* 및 *il10* mRNA의 증가된 발현을 나타냈다 (**도 5E**).

[0147] 그 다음에 우리는 Treg의 단기간의 고갈에 이어서 뇌 병리의 부위에서 면역조절성 세포의 축적이 뇌 기능에 장

기 효과를 야기하는 지의 여부를 조사하였다. 우리는 해마의 신경아교증에서의 감소 (**도 5F**), 및 염증-유발성 시토카인, 예컨대 *il-12p40* 및 *tnf-α*의 감소된 mRNA 발현 수준을 관찰하였다 (**도 5G**). 게다가, 해마의 치상회, 및 대뇌 피질 (5번째 층), (두개의 뇌 영역은 5XFAD AD-Tg 마우스에서 강건한 Aβ 플라크 병리를 나타낸다 (Oakley et al, 2006))에서의 대뇌 Aβ 플라크 부하가 감소되었다 (**도 6A, B**). 모리스 수중 미로 (MWM) 시험을 사용하여 인지 기능에 대한 영향을 평가한 결과, DTx-치료된 AD-Tg/DTR$^-$ 연령 매칭된 마우스에 비해, Treg 고갈 후에 AD-Tg/DTR$^+$ 마우스에서 공간 학습 및 기억에서 상당한 개선이밝혀졌으며, 이는 WT 마우스의 것과 유사한 성능에 이르는 것이었다 (**도 6C-E**). 종합하면, 이들 데이터는 AD-Tg 마우스에서 Treg-매개 전신 면역 억제를 일시적으로 파괴하면, 뇌에서, mo-MΦ 및 Treg를 포함한, 염증-분해성 세포의 축적에 이어서, 신경염증 반응의 분해, Aβ의 청소, 및 인지 감퇴의 역전을 초래한다는 것을 입증하였다.

[0148] **실시예 3. 코폴리머-1의 매주 투여는 Treg-매개 전신 면역 억제를 감소시키고, CP 관문 활성을 개선시키고, AD 병리를 완화시킨다.**

[0149] 전신 면역 억제, CP 기능 및 AD 병리 사이의 역전 관계의 인과적 성질을 추가로 입증하기 위해, 그 다음에 우리는 면역조정성 화합물, 글라티라머 아세테이트 (GA; 코폴리머-1 또는 코팍손®으로도 공지됨)을 이용하였고, 이는 매주 투여 요법에서 AD의 APP/PS1 마우스 모델에서 치료 효과를 갖는 것으로 밝혀졌고 (Butovsky et al, 2006); 이 효과는 질환 병리의 대뇌 부위로의 mo-MΦ 유입과 기능적으로 연관되어 있었다 (Butovsky et al, 2007). 여기서, 우리는 먼저 APP/PS1 AD-Tg 마우스에서의 CP가, 5XFAD AD-Tg 마우스에서 우리의 관찰과 유사하게 IFN-γ 발현 수준에 대하여 또한 결핍되어 있는지의 여부를 조사하였다. 우리는 APP/PS1 AD-Tg 마우스에서, CP에서의 IFN-γ 수준이 연령-매칭된 WT 대조군에 비해 감소된다는 것을 밝혀냈다 (**도 7A**). 이들 결과는 우리가 APP/PS1 마우스에서 매주-GA의 치료 효과 (Butovsky et al, 2006)가, 5XFAD AD-Tg 마우스에서 재현될 수 있는 지의 여부, 그리고 그렇다면, 그것이 전신 Treg, 및 mo-MΦ 소통을 위한 CP의 활성화에 영향을 미치는 지의 여부를 시험하도록 권장하였다. 따라서 우리는 5XFAD AD-Tg 마우스를 4주의 기간에 걸쳐 매주 GA의 투여 요법으로 치료하였다 (이런 이유로, "매주-GA"; **도 8A**에 개략적으로 도시됨). 우리는 매주-GA로 치료된 5XFAD AD-Tg 마우스는, 감소된 신경염증 (**도 8B-D**), 및 개선된 인지 수행을 나타냈고, 이는 치료 후에 2개월까지 지속된다는 것 (**도 8E-I**)을 밝혀냈다. 전신 면역 및 CP에 미치는 매주-GA의 영향을 유동세포 계수법으로 조사한 결과, 우리는 치료된 5XFAD AD-Tg 마우스의 CP에서, 감소된 비장세포 Foxp3$^+$ Treg 수준 (**도 9A**), 및 WT 대조군에서 관찰된 것들과 유사한 수준에 이르는, IFN-γ-생성 세포의 증가를 밝혀냈다 (**도 9B**). 매주-GA 치료된 마우스에서 CP에서의 IFN-γ-발현 세포의 상승된 수준은, 백혈구 소통 분자의 상향조절된 상피 발현을 동반하였다 (**도 9C**).

[0150] CNS로의 침윤성 mo-MΦ 진입을 검출하기 위해, 우리는 5XFAD AD-Tg/$CX_3CR1^{GFP/+}$ 골수 (BM) 키메라 마우스 (머리 보호를 위해 준비됨)를 사용하여, 순환 (녹색 형광 단백질 (GFP)$^+$ 표지됨) 골수성 세포 (Shechter et al, 2009; Shechter et al, 2013)의 가시화를 가능하게 하였다. 우리는 비히클-치료된 AD-Tg/$CX_3CR1^{GFP/+}$ 대조군와 비교하여, 매주-GA 치료 후에 CP로 및 인접하는 뇌실 공간으로 GFP$^+$ mo-MΦ의 증가된 귀소를 밝혀냈다 (**도 9D-E**). 뇌실질의 면역 조직 화학은 대뇌 플라크 형성의 부위에서 GFP$^+$ mo-MΦ 축적의 존재를 밝혀냈고 (**도 9F**), AD-Tg 비(non)-키메라 마우스에서 해마의 유동세포 계수법 분석에 의한, 침윤성 골수성 세포의 정량은 증가된 수의 $CD11b^{높은}CD45^{높은}$-발현 세포를 나타냈다 (**도 9G, H**). 함께, 이들 결과는 AD 병리의 부위로의 mo-MΦ 유입, 전신 Treg 수준의 감소 및 CP의 IFN-γ-의존성 활성화 사이의 기계적 연계성을 입증하였다.

[0151] **실시예 4. Treg 활성의 단기간의 직접적인 방해는, CP 관문 활성을 개선시키고, AD 병리를 완화시킨다.**

[0152] ***4.1소 분자 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 억제제를 사용한 Treg 활성의 방해.*** Treg-매개 전신 면역 억제가 AD 병리와 싸우는 능력을 방해함을 시사한 상기연구결과들은, 암 면역요법에서 Treg에 기인한 기능을 연상시키고, 여기서 이들 세포는 효과적인 항-종양 반응을 마운팅하는 면역 체계의 능력을 저해한다 (Bos & Rudensky, 2012; Nishikawa & Sakaguchi, 2010). 따라서, 우리는 Foxp3$^+$ Treg 세포 활성을 직접적으로 방해하는 치료가 AD에 유리할 수 있다는 점을 고려하였다. 우리는 p300i (C646 (Bowers et al, 2010)), Treg 기능을 조절하는 히스톤 아세틸트랜스퍼라제인 p300의 비펩티드성 억제제 (Liu et al, 2013)를 시험하였고; 이 억제제는 보호성 T 이펙터 세포 반응을 무손상으로 남기면서 Treg 억제 활성에 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Liu et al, 2013). 우리는 p300i로 치료된 마우스는, 비히클 (DMSO) 치료된 대조군과 비교하여, 비장 (**도 10A**)에서, 뿐만 아니라

CP (**도 10B**)에서 전신 IFN-γ-발현 세포의 상승된 수준을 나타낸다는 것을 밝혀냈다. 그 다음에 우리는 AD-Tg 마우스를 1주의 과정에 걸쳐 p300i 또는 비히클 중 어느 하나로 치료하였고, 대뇌 Aβ 플라크 부하에 대해 3주 후에 그들을 조사하였다. 면역 조직 화학 분석은 p300i 치료된 AD-Tg 마우스에서 대뇌 Aβ 플라크 로드에서 상당한 감소를 밝혀냈다 (**도 10C-E**). 우리는 또한 치료의 한 과정 후에 플라크 병리에 대한 효과가 3주 초과로 지속되는지의 여부, 그리고 그렇다면, 치료의 추가적 과정이 장기 지속 효과의 한 원인이 될 것인지의 여부를 시험하였다. 따라서 우리는 단일 과정의 p300i 치료를 받고 2개월 후에 조사된 AD-Tg 마우스를, 이 기간 동안에 두 과정의 치료를 받고, 그 사이에 1-개월 간격을 가진, 연령-매칭된 군과 비교하였다 (**도 10F**에 개략적으로 도시됨). 우리는 대뇌 플라크 로드의 감소가 단일 과정의 치료 2개월 후에서도 분명하였지만, 두 과정의 치료를 받고, 그 사이에 1-개월 간격을 가진 마우스에서 보다 강했다는 것을 밝혀냈다 (**도 10G**). AD에서 손상된 시냅스 가소성 및 기억은 상승된 대뇌 수준의 가용성 $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ ($sA\beta$) 수준과 연관되어 있기 때문에 (Shankar et al, 2008), 우리는 또한 단일 또는 반복된 주기의 p300i 치료 후에 sAβ 수준을 측정하였다. 다시, 우리는 한 과정 및 두 과정 (그 사이에 1개월의 간격을 가진) 둘 다 대뇌 $sA\beta$를 감소시키는데 효과적이지만, 이 효과는 $sA\beta_{1-42}$에 대한 효과에 대하여는 반복된 과정 후에 보다 강하다는 것을 밝혀냈다 (**도 10H**). 이들 결과는 단일의 단기 과정의 치료가 효과적이지만, 반복된 과정의 치료가, 매주-GA 치료 후에 우리의 관찰과 유사하게, 장기 지속 치료 효과를 유지하는데 유리할 수 있다는 것을 나타냈다.

[0153] ***4.2 항-PD1 항체를 사용한 Treg 활성의 방해.*** 10개월의 연령에서, 5XFAD 알츠하이머병 (AD) 트랜스제닉 (Tg) 마우스에 250 ug의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드(Bioxcell Lifesciences Pvt. LTD.)) 또는 대조군 IgG (IgG2a; #BE0089; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 실험의 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 이전에 상세히 기재된 바와 같이 (Alamed et al, 2006), 방사상 아암 수중 미로 (RAWM) 공간 학습 및 기억 과제에 의해 그들의 인지 수행에 대해 3주 후에 조사하였다 (**도 11A**에 개략적으로 도시됨). 요컨대, RAWM 과제의 1일째, 마우스를 15회 시험들 (3시간 이상 간격을 둠) 동안 훈련시켰고, 여기서 시행은 가시적 플랫폼과 숨겨진 플랫폼 사이에서 교대시켰고, 마지막 4회 시험들은 단지 숨겨진 플랫폼이었다. 2일째, 마우스를 숨겨진 플랫폼으로 15회 시험들 동안 훈련시켰다. 잘못된 아암에 진입하거나, 15초 내에 아암을 선택하는데 실패하는 것은, 오류로서, 점수를 매겼다. 공간 학습 및 기억은 각각의 시험에서 마우스의 탈출 잠복기 또는 아암 진입 오류의 수를 계수함으로써 측정하였다. 연령 매칭된 미치료 WT 및 AD-Tg 마우스를 대조군으로서 사용하였다. 우리는 항-PD1의 2회 주사 (1일 및 4일째)를 포함한, 하나의 치료 세션으로 치료된 5XFAD AD-Tg 마우스가, 3주 후 평가된 바, RAWM에서 상당히 개선된 공간 인지 수행을 나타낸다는 것을 밝혀냈다 (**도 11B**).

[0154] 그 다음에 우리는 질환 병리에 미치는 효과가 전신 면역 억제의 감소와 연관되는지의 여부를 조사하였다. 우리는 상기 기재된 실험을 반복했고, 이번에는 치료 세션의 종료시에 마우스를 조사하였다 (실험의 제7일; **도 12A**에 개략적으로 도시됨). 우리는 이 시점에서, PD-1-치료된 AD-Tg 마우스에서 전신 면역 억제의 약화는, IFN-γ-생성 CD4 비장세포의 상승의 전신 효과를 동반하고 (**도 12B**), 이는 IFN-γ mRNA 수준의 상승 (**도 13A**), 및 CP 백혈구 소통 분자, 케모카인 CCL2 및 CXCL10의 발현에서의 상승 (**도 13B**)의 CP에서의 국소 효과와 상관관계가 있다는 것을 관찰하였다. 이들 데이터는 AD-Tg 마우스에서 항-PD-1 치료의 짧은 세션은 예상된 바와 같이 (Naidoo et al, 2014), Treg-매개 면역 억제를 약화시키는 전신 반응, 및 CNS로의 백혈구 소통을 위한 CP 관문 활성의 활성화와 연관된다는 것을 나타냈다.

[0155] 마지막으로, 우리는 AD-Tg 마우스에서 질환 병리에 미치는 효과, 및 치료의 추가적 세션이 병리에 미치는 그의 효과에서 유리한 지의 여부를 조사하였다. 이를 위해, 10개월 연령 AD-Tg 마우스는 상기 기재된 바와 같은 1개 세션의 항-PD-1 치료, 또는 3주의 간격을 가진 추가적 치료 중 어느 하나를 받았다. 대조군은 IgG로 치료하거나 아니면 치료하지 않았고, 모든 군의 마우스를 3주 후에 그의 인지 수행에 대해 시험하였다 (**도 14A**에 개략적으로 도시됨). 우리는 1개 세션의 항-PD-1 ("AD-Tg + PD-1 X1")로 치료하고 2개월 후에 조사된 AD-Tg 마우스는, IgG-치료된 및 미치료 AD-Tg 마우스와 비교하여 상당한 인지 개선을 나타냈지만, 효과는 동일한 마우스를 1개월 먼저 인지 수행에 대해 평가한 경우보다 덜 강건하였다는 것을 밝혀냈다. 그에 반해서, 제2 세션의 항-PD-1 치료 ("AD-Tg + PD-1 X2")를 받은 AD-Tg 마우스는 1개 세션을 받은 AD-Tg와 비교하여, 뿐만 아니라 IgG-치료된 또는 미치료 AD-Tg 마우스와 비교하여, RAWM에서 상당히 보다 양호한 공간 학습 및 기억 능력을 나타냈다 (**도 14B**). 이들 연구결과들은 장기 지속 치료 효과를 유지하기 위해, 반복된 세션이 필요함을 밝혀냈다.

[0156] ***4.3 항-PD1 항체와 항-CTLA4 항체의 조합물을 사용한 Treg 활성의 방해.***

[0157] 10개월의 연령에서, 5XFAD 알츠하이머병 (AD) 트랜스제닉 (Tg) 마우스에 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146;

바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 및 250 ㎍ 항-CTLA4 (InVivoMAb 항-mCD152; #BE0131; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a, #BE0089 또는 폴리클로날 시리안 햄스터 (Polyclonal Syrian Hamster) IgG, #BE0087; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 실험의 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 이전에 상세히 기재된 바와 같이, 방사상 아암 수중 미로 (RAWM) 공간 학습 및 기억 과제에 의해 그들의 인지 수행에 대해 3주 후에 조사하였다.

[0158] 일부 마우스는 3주의 간격 세션을 가진 추가적 치료 세션을 받았다. 대조군은 IgG로 치료되거나 아니면 치료되지 않았고, 모든 군의 마우스를 3주 후 그들의 인지 수행에 대해 시험하였다.

[0159] 항체의 조합물로 치료된 마우스는 IgG-치료된 및 미치료 AD-Tg 마우스와 비교하여 상당한 인지 개선뿐만 아니라 대뇌 플라크 로드의 상당한 감소를 나타낼 것으로 예상되었다.

[0160] **실시예 5. Treg 활성의 증대는 AD 병리에 역효과를 미친다.**

[0161] AD에서 Treg-매개 전신 면역 억제의 부정적인 역할을 입증하기 위해, 그 다음에 우리는 전신 Treg 수준의 증대가 AD 병리에 반대의 역효과를 미칠 수 있는 지의 여부를 조사하였다. 이를 시험하기 위해, 우리는 올-트랜스 레티노산 (ATRA)의 투여에 의해AD-Tg 마우스에서의 Treg-억제 기능을 강화시켰고, 이는 Treg 분화를 유도하고 (Mucida et al, 2007), Treg 표현형을 안정화시키고 (Zhou et al, 2010), Treg를 보다 억제성이 되게 한다 (Zhou et al, 2010). 우리는 질환 진행의 비교적 초기 단계에 있는 5XFAD AD-Tg 마우스를 사용하였고 이들을 ATRA 또는 비히클 (DMSO) 중 어느 하나로 치료하였다. ATRA-치료된 AD-Tg 마우스는 $Foxp3^{+}CD25^{+}$ Treg의 상당히 보다 높은 비장세포 빈도를 나타냈다 (**도 15A, B**). 마지막 ATRA 주사 후 3주에 마우스를 조사한 결과, 보다 높은 대뇌 Aβ 플라크 부하 및 신경아교증이 밝혀졌고 (대략 2-3배 증가; **도 15C-E**), 및 sAβ의 평가는 전신 Treg의 증대 후에 증가된 대뇌 $sA\beta_{1-40}$ 및 $sA\beta_{1-42}$ 수준을 밝혀냈다 (**도 15F-G**). RAWM을 사용한, 인지 수행의 평가에 의하면, 비히클-치료된 AD-Tg 마우스에 비해, ATRA-치료된 AD-Tg 마우스에서 공간 기억 결핍(spatial memory deficit)의 악화가 나타났다 (**도 15H**).

[0162] GA의 매일 투여가 Treg를 유도하는 것으로 공지되어 있고 다발성 경화증 (MS)을 치료하기 위한 클리닉에서 사용되고 있다는 사실 (Haas et al, 2009; Hong et al, 2005; Weber et al, 2007)과 함께, AD 병리에 미치는 전신 Treg의 부정적인 효과의 우리의 본 연구결과들을 고려해 볼 때, 우리는 매일 요법 (1개월의 기간에 걸쳐)에서의 GA가, 매주-GA에 반해서, AD-Tg 마우스에서 질환 병리에 부정적인 효과를 미칠 수 있는 지의 여부를 시험하였다. 우리는 5XFAD AD-Tg 마우스에서, 매일- 대 매주-GA 투여의 효과를 비교하였다 (**도 16A**에 개략적으로 도시됨). RAWM 과제에 의한 인지 수행의 평가에 의하면, 매주-GA 치료의 유익한 효과에 반해서, 매일-GA를 받은 AD-Tg 마우스에서 공간 기억에 대한 어떤 유익한 효과도 없거나, 악화 효과의 경향이 관찰된 것으로 밝혀졌다 (**도 16B**). 게다가, 플라크 청소에 미치는 매주-GA 투여의 강건한 효과와 달리, 매일-GA 치료된 AD-Tg 마우스는 플라크 로드애 어떤 유익한 효과도 나타내지 않았거나, 보통의 역효과를 나타냈다 (**도 16C-F**). 이들 연구결과들은 신경염증과 연관된 MS 및 AD, 두 가지 CNS 병리가 어떻게 매일-GA를 이용한 동일한 면역조정성 치료 (Schwartz & Baruch, 2014a)에 의해 반대로 그리고 뚜렷하게 영향을 받을 수 있는지를 강조한다.

[0163] **실시예 6. *Treg 활성의 직접적인 방해*는 CP 관문 활성을 개선시키고 PTSD 병리를 예방하거나 완화시킨다.**

[0164] 심한 스트레스 상태 또는 만성 스트레스는 외상 후 스트레스 장애 (PTSD) 및 우울증을 야기할 수 있다. 우리는 이전에 CP 관문 활성이 정신적 스트레스에 대처하는데 매우 중요할 수 있으며 CP의 불충분한 기능의 경우에, 정신적 외상 에피소드는 PTSD를 야기할 수 있다는 점을 시사하였다 (Schwartz & Baruch, 2012). 우리는 CP 반응을 변화시키는데 도움이 되는, 외상 후 적시의 전신 개입은, PTSD의 만성 병태의 진행을 예방할 수 있다고 추가로 가정하였다. Treg-매개 전신 면역 억제의 단기 약화가 뇌 병리에 장기 효과를 미친다는 우리의 연구결과들은, 외상적 사건(traumatic event) 직후에 이러한 개입이, PTSD 발생을 예방할 것이라는 점을 시사한다.

[0165] CP가 외상 스트레스에 대처하는 것에 관여하고 그것이 외상 스트레스가 PTSD의 진행을 야기하는 경우에 기능 장애를 일으킬 수 있다는 우리의 연구 가설을 시험하기 위해, 우리는 생리학상 PTSD-유사 동물 모델을 채택하였고 여기서 마우스는 과각성 거동(hypervigilant behaviour), 주의력 장애(impaired attention), 증가된 위험 평가(risk assessment), 및 수면 부족을 나타냈다 (Lebow et al, 2012). PTSD 유도의 이러한 실험 모델에서, 마우스는 반대 밤/낮 주기로 10일 동안 길들여졌고, "PTSD 유도"로 칭해지는, 전기 충격의 두 에피소드 (외상 및 트리거(trigger))로 괴로움을 당했고, 외상 후에 상이한 시점에서 평가되었다. 외상적 사건 후에 마우스에 말초 면역 억제를 일시적으로 감소시키는 상기 화합물을 주사하였다. 마우스를 다음의 요법 중 하나 이상에 따라 치료하였다:

[0166] · 마우스에 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a; #BE0089; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 외상적 사건 후에 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 2주의 추가적 간격 세션 후에 조사하였다;

[0167] · 마우스에 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 및 250 ㎍ 항-CTLA4 (InVivoMAb 항-mCD152; #BE0131; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a, #BE0089 또는 폴리클로날 시리안 햄스터 IgG, #BE0087; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 실험의 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다;

[0168] · 마우스에 외상적 사건 후에 상기 기재된 바와 같이 매주-GA를 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다;

[0169] · 마우스를 외상적 사건 후에 1주의 과정에 걸쳐 p300i 또는 비히클로 치료하고, 상기 기재된 바와 같이 3주 후에 조사하였다.

[0170] 일부 마우스는 적절한 간격 세션을 가진 추가적 치료 세션을 받았다.

[0171] 상기 치료를 받은 마우스는 문헌 (Lebow et al, 2012)에 기재된 다른 거동 과제 또는 어두운/밝은 미로에서 시간 소모 탐험 및 위험 평가에 의해 평가된 바와 같이, 이 실험 모델에서 PTSD와 연관된 불안 거동을 나타내지 않을 것으로 예상되었다.

[0172] **실시예 7. 전신 면역 억제의 일시적 감소는 파킨슨병 병리를 완화시킨다.**

[0173] 파킨슨병 (PD) 트랜스제닉 (Tg) 마우스를 이들 실험에서 사용하였다. 마우스를 다음의 요법 중 하나 이상에 따라 질환의 진행 단계에서 치료하였다:

[0174] · 마우스에 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a; #BE0089; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 외상적 사건 후에 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 2주의 추가적 간격 세션 후에 조사하였다;

[0175] · 마우스에 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 및 250 ㎍ 항-CTLA4 (InVivoMAb 항-mCD152; #BE0131; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a, #BE0089 또는 폴리클로날 시리안 햄스터 IgG, #BE0087; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 실험의 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다;

[0176] · 마우스에 외상적 사건 후에 상기 기재된 바와 같이 매주-GA를 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다;

[0177] · 마우스를 외상적 사건 후에 1주의 과정에 걸쳐 p300i 또는 비히클로 치료하고, 상기 기재된 바와 같이 3주 후에 조사하였다.

[0178] 일부 마우스는 적절한 간격 세션을 가진 추가적 치료 세션을 받았다 (약 3주내지 1개월).

[0179] 운동 신경 기능은 예를 들어 로타로드(rotarod) 수행 시험을 사용하여 평가하였고, 이는 회전 로드 상에 머무는 마우스의 능력을 평가하는 것이다.

[0180] 하나의 치료 세션으로 치료된 PD-Tg 마우스는 IgG-치료된 또는 비히클 치료된 대조군, 또는 미치료 군과 비교하여, 상당히 개선된 운동 능력(motor performance)을 나타낼 것으로 예상되었다. 두 과정의 치료를 받고, 적절한 간격 세션 후에 조사된 PD-Tg 마우스는 장기 지속 치료 효과를 나타낼 것으로 예상되었다. 이 치료 효과를 유지하기 위해, 마우스를 각각의 세션 사이에 적절한 간격 세션을 가진 치료의 활성 세션에 적용시켰다.

[0181] **실시예 8. 전신 면역 억제의 일시적 감소는 헌팅턴병 병리를 완화시킨다.**

[0182] 이들 실험에서 사용된 모델은 헌팅턴병 (HD) R6/2 트랜스제닉 마우스 (Tg) 시험 시스템일 수 있다. R6/2 트랜스제닉 마우스는 질환의 진행 단계에서 다수개의 CAG 반복 마우스의 삽입을 포함하는 돌연변이된 인간 헌팅턴 유전자를 과발현시킨다. 이들 마우스는 이미 5-6주 연령에서 시작하여, 10-13주에 조기 사망을 야기하는, 진행성 거동-운동 결핍(behavioral-motor deficit)을 나타낸다. 증상은 저 체중, 클래스핑(clasping), 떨림 및 경련을 포함한다.

[0183] 마우스를 이들이 45일 연령일 때 다음의 요법 중 하나 이상에 따라 치료하였다:

[0184] · 마우스에 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a; #BE0089; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 외상적 사건 후에 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 2주의 추가적 간격 세션 후에 조사하였다;

[0185] · 마우스에 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146;바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 및 250 ㎍ 항-CTLA4 (InVivoMAb 항-mCD152; #BE0131; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a, #BE0089 또는 폴리클로날 시리안 햄스터 IgG, #BE0087; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 실험의 1일 및 4일째, 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다.

[0186] · 마우스에 외상적 사건 후에 상기 기재된 바와 같이 매주-GA를 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다;

[0187] · 마우스를 외상적 사건 후에 1주의 과정에 걸쳐 p300i 또는 비히클로 치료하고, 상기 기재된 바와 같이 3주 후에 조사하였다.

[0188] 일부 마우스는 적절한 간격 세션을 가진 추가적 치료 세션을 받았다 (약 3주 내지 1개월).

[0189] 운동 신경 기능은 예를 들어 로타로드 수행 시험을 사용하여 평가하였고, 이는 회전 로드 상에 머무는 마우스의 능력을 평가하는 것이다.

[0190] 하나의 치료 세션으로 치료된 HD-Tg 마우스는 IgG-치료된 또는 비히클 치료된 대조군, 또는 미치료 군과 비교하여, 상당히 개선된 운동 능력을 나타낼 것으로 예상되었다. 두 과정의 치료를 받고, 적절한 간격 세션 후에 조사된 HD-Tg 마우스는 장기 지속 치료 효과를 나타낼 것으로 예상되었다. 이 치료 효과를 유지하기 위해, 마우스를 각각의 세션 사이에 적절한 간격 세션을 가진 치료의 활성 세션에 적용시켰다.

[0191] **실시예 9. 전신 면역 억제의 일시적 감소는 근위축성 측삭경화증 병리를 완화시킨다.**

[0192] 이 시험에서 사용된 모델은 Gly93→Ala (G93A) 유전자 (B6SJL-TgN (SOD1-G93A)1Gur를 함유하는 결손 인간 돌연변이체 SOD1 대립유전자를 과발현하는 트랜스제닉 마우스일 수 있다 (본원에서 "ALS 마우스"). 이 모델은 운동 신경 질환을 발생시키고 따라서 ALS를 시험하기 위한 허용된 동물 모델을 구성한다.

[0193] 마우스를 이들이 75일 연령일 때 다음의 요법 중 하나 이상에 따라 치료하였다:

[0194] · 마우스에, 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a; #BE0089; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 외상적 사건 후에 1일 및 4일째 복강내 주사하고, 2주의 추가적 간격 세션 후에 조사하였다;

[0195] · 마우스에, 250 ㎍의 항-PD1 (RMP1-14; #BE0146; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 및 250 ㎍ 항-CTLA4 (InVivoMAb 항-mCD152; #BE0131; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 또는 대조군 IgG (IgG2a, #BE0089 또는 폴리클로날 시리안 햄스터 IgG, #BE0087; 바이옥스셀 라이프사이언시스 프라이빗 리미티드) 항체 중 어느 하나를, 실험의 1일 및 4일째 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다.

[0196] · 마우스에 외상적 사건 후에 상기 기재된 바와 같이 매주-GA를 복강내 주사하고, 2주의 간격 세션 후에 조사하였다;

[0197] · 마우스를 외상적 사건 후에 1주의 과정에 걸쳐 p300i 또는 비히클로 치료하고, 상기 기재된 바와 같이 3주 후에 조사하였다.

[0198] 일부 마우스는 적절한 간격 세션을 가진 추가적 치료 세션을 받았다 (약 3주 내지 개월).

[0199] 운동 신경 기능은 예를 들어 로타로드 수행 시험을 사용하여 평가하거나 (이는 회전 로드 상에 머무는 마우스의 능력을 평가하는 것이다), 마우스가 하단에서 작은 루프로 세로 와이어 (직경 2 mm) 상으로 꽉 잡고 보유할 수 있게 하였다. 수직 와이어는 마우스가 와이어 상으로 꽉 잡는데 앞다리와 뒷다리를 모두 사용할 수 있게 하였다. 와이어는 24 rpm에서 수직 배향된 원 운동으로 유지되었다 (원 반경은 10 cm이었다). 마우스가 와이어에 매달릴 수 있는 시간을 타이머로 기록하였다.

[0200] 하나의 치료 세션으로 치료된 ALS 마우스는 IgG-치료된 또는 비히클 치료된 대조군, 또는 미치료 군과 비교하여, 상당히 개선된 운동 능력을 나타낼 것으로 예상되었다. 두 과정의 치료를 받고, 적절한 간격 세션 후에 조사된 ALS 마우스는 장기 지속 치료 효과를 나타낼 것으로 예상되었다. 이 치료 효과를 유지하기 위해, 마우스를 각각의 세션 사이에 적절한 간격 세션을 가진 치료의 활성 세션에 적용시켰다.

[0201] 참고문헌

REFERENCES

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **21:** 383-421

Alamed J, Wilcock DM, Diamond DM, Gordon MN, Morgan D (2006) Two-day radial-arm water maze learning and memory task; robust resolution of amyloid-related memory deficits in transgenic mice. *Nature protocols* **1:** 1671-1679

Bai A, Lu N, Guo Y, Liu Z, Chen J, Peng Z (2009) All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *Journal of leukocyte biology* **86:** 959-969

Baruch K, Deczkowska A, David E, Castellano JM, Miller O, Kertser A, Berkutzki T, Barnett-Itzhaki Z, Bezalel D, Wyss-Coray T, Amit I, Schwartz M (2014) Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science* **346:** 89-93

Baruch K, Ron-Harel N, Gal H, Deczkowska A, Shifrut E, Ndifon W, Mirlas-Neisberg N, Cardon M, Vaknin I, Cahalon L, Berkutzki T, Mattson MP, Gomez-Pinilla F, Friedman N, Schwartz M (2013) CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110:** 2264-2269

Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19:** 939-945

Bos PD, Rudensky AY (2012) Treg cells in cancer: a case of multiple personality disorder. *Science translational medicine* **4:** 164fs144

Bowers EM, Yan G, Mukherjee C, Orry A, Wang L, Holbert MA, Crump NT, Hazzalin CA, Liszczak G, Yuan H, Larocca C, Saldanha SA, Abagyan R, Sun Y, Meyers DJ, Marmorstein R, Mahadevan LC, Alani RM, Cole PA (2010) Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chemistry & biology* **17:** 471-482

Breitner JC, Haneuse SJ, Walker R, Dublin S, Crane PK, Gray SL, Larson EB (2009) Risk of dementia and AD with prior exposure to NSAIDs in an elderly community-based cohort. *Neurology* **72:** 1899-1905

Brestoff JR, Artis D (2013) Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature immunology* **14:** 676-684

Britschgi M, Wyss-Coray T (2007) Immune cells may fend off Alzheimer disease. *Nature medicine* **13:** 408-409

Burgess A, Vigneron S, Brioudes E, Labbe JC, Lorca T, Castro A (2010) Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107:** 12564-12569

Butovsky O, Koronyo-Hamaoui M, Kunis G, Ophir E, Landa G, Cohen H, Schwartz M (2006) Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia

[0202]

expressing insulin-like growth factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103:** 11784-11789

Butovsky O, Kunis G, Koronyo-Hamaoui M, Schwartz M (2007) Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *The European journal of neuroscience* **26:** 413-416

Cameron B, Landreth GE (2010) Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease* **37:** 503-509

Chen X, Oppenheim JJ (2011) Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *International immunopharmacology* **11:** 1489-1496

Colombo MP, Piconese S (2007) Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* **7:** 880-887

Coyne GO, Gulley JL (2014) Adding fuel to the fire: Immunogenic intensification. *Human vaccines & immunotherapeutics* **10:** 3306-3312

Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Mendez-Huergo SP, Stupirski JC, Mazal D, Osinaga E, Toscano MA, Sundblad V, Rabinovich GA, Salatino M (2013) Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer research* **73:** 1107-1117

Duraiswamy J, Freeman GJ, Coukos G (2014) Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors--response. *Cancer research* **74:** 633-634; discussion 635

Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology* **9:** 162-174

Galvin KC, Dyck L, Marshall NA, Stefanska AM, Walsh KP, Moran B, Higgins SC, Dungan LS, Mills KH (2013) Blocking retinoic acid receptor-alpha enhances the efficacy of a dendritic cell vaccine against tumours by suppressing the induction of regulatory T cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62:** 1273-1282

Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rebe C (2012) Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012:** 473712

Group AR, Lyketsos CG, Breitner JC, Green RC, Martin BK, Meinert C, Piantadosi S, Sabbagh M (2007) Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology* **68:** 1800-1808

Haas J, Korporal M, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Wildemann B (2009) Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **216:** 113-117

Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297:** 353-356

He F, Balling R (2013) The role of regulatory T cells in neurodegenerative diseases. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* **5:** 153-180

Hirayama M, Nishikawa H, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S, Shiku H (2013) Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of Streptococcus pyogenes. *European journal of immunology* **43:** 989-1000

[0203]

Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ (2005) Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102:** 6449-6454

Ju Y, Shang X, Liu Z, Zhang J, Li Y, Shen Y, Liu Y, Liu C, Liu B, Xu L, Wang Y, Zhang B, Zou J (2014) The Tim-3/galectin-9 pathway involves in the homeostasis of hepatic Tregs in a mouse model of concanavalin A-induced hepatitis. *Molecular immunology* **58:** 85-91

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* **20:** 4106-4114

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY (2007) Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology* **8:** 191-197

Kim PS, Jochems C, Grenga I, Donahue RN, Tsang KY, Gulley JL, Schlom J, Farsaci B (2014) Pan-Bcl-2 inhibitor, GX15-070 (obatoclax), decreases human T regulatory lymphocytes while preserving effector T lymphocytes: a rationale for its use in combination immunotherapy. *Journal of immunology* **192:** 2622-2633

Koronyo-Hamaoui M, Ko MK, Koronyo Y, Azoulay D, Seksenyan A, Kunis G, Pham M, Bakhsheshian J, Rogeri P, Black KL, Farkas DL, Schwartz M (2009) Attenuation of AD-like neuropathology by harnessing peripheral immune cells: local elevation of IL-10 and MMP-9. *Journal of neurochemistry* **111:** 1409-1424

Kotsakis A, Harasymczuk M, Schilling B, Georgoulias V, Argiris A, Whiteside TL (2012) Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *Journal of immunological methods* **381:** 14-22

Kunis G, Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Miller O, Berkutzki T, Schwartz M (2013) IFN-gamma-dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain : a journal of neurology* **136:** 3427-3440

Lai AY, McLaurin J (2012) Clearance of amyloid-beta peptides by microglia and macrophages: the issue of what, when and where. *Future neurology* **7:** 165-176

Lebow M, Neufeld-Cohen A, Kuperman Y, Tsoory M, Gil S, Chen A (2012) Susceptibility to PTSD-like behavior is mediated by corticotropin-releasing factor receptor type 2 levels in the bed nucleus of the stria terminalis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32:** 6906-6916

Liu Y, Wang L, Predina J, Han R, Beier UH, Wang LC, Kapoor V, Bhatti TR, Akimova T, Singhal S, Brindle PK, Cole PA, Albelda SM, Hancock WW (2013) Inhibition of p300 impairs Foxp3(+) T regulatory cell function and promotes antitumor immunity. *Nature medicine* **19:** 1173-1177

Marabelle A, Kohrt H, Sagiv-Barfi I, Ajami B, Axtell RC, Zhou G, Rajapaksa R, Green MR, Torchia J, Brody J, Luong R, Rosenblum MD, Steinman L, Levitsky HI, Tse V, Levy R (2013) Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *The Journal of clinical investigation* **123:** 2447-2463

Michaud JP, Bellavance MA, Prefontaine P, Rivest S (2013) Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell reports* **5:** 646-653

Mildner A, Schlevogt B, Kierdorf K, Bottcher C, Erny D, Kummer MP, Quinn M, Bruck W, Bechmann I, Heneka MT, Priller J, Prinz M (2011) Distinct and non-redundant roles of

[0204]

microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31:** 11159-11171

Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H (2007) Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* **317:** 256-260

Naidoo J, Page DB, Wolchok JD (2014) Immune modulation for cancer therapy. *British journal of cancer* **111:** 2214-2219

Nakatsukasa H, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S (2011) Adenosine A2B receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochemical and biophysical research communications* **409:** 114-119

Nishikawa H, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *International journal of cancer Journal international du cancer* **127:** 759-767

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26:** 10129-10140

Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X (2015) Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in molecular medicine* **21:** 24-33

Pere H, Montier Y, Bayry J, Quintin-Colonna F, Merillon N, Dransart E, Badoual C, Gey A, Ravel P, Marcheteau E, Batteux F, Sandoval F, Adotevi O, Chiu C, Garcia S, Tanchot C, Lone YC, Ferreira LC, Nelson BH, Hanahan D, Fridman WH, Johannes L, Tartour E (2011) A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* **118:** 4853-4862

Qin A, Wen Z, Zhou Y, Li Y, Li Y, Luo J, Ren T, Xu L (2013) MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* **17:** 252-264

Rosenkranz D, Weyer S, Tolosa E, Gaenslen A, Berg D, Leyhe T, Gasser T, Stoltze L (2007) Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *Journal of neuroimmunology* **188:** 117-127

Roy S, Barik S, Banerjee S, Bhuniya A, Pal S, Basu P, Biswas J, Goswami S, Chakraborty T, Bose A, Baral R (2013) Neem leaf glycoprotein overcomes indoleamine 2,3 dioxygenase mediated tolerance in dendritic cells by attenuating hyperactive regulatory T cells in cervical cancer stage IIIB patients. *Human immunology* **74:** 1015-1023

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133:** 775-787

Saresella M, Calabrese E, Marventano I, Piancone F, Gatti A, Calvo MG, Nemni R, Clerici M (2010) PD1 negative and PD1 positive CD4+ T regulatory cells in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **21:** 927-938

Schmidt SD, Nixon RA, Mathews PM (2005) ELISA method for measurement of amyloid-beta levels. *Methods in molecular biology* **299:** 279-297

[0205]

Schwartz M, Baruch K (2012) Vaccine for the mind: Immunity against self at the choroid plexus for erasing biochemical consequences of stressful episodes. *Human vaccines & immunotherapeutics* **8:** 1465-1468

Schwartz M, Baruch K (2014a) Breaking peripheral immune tolerance to CNS antigens in neurodegenerative diseases: boosting autoimmunity to fight-off chronic neuroinflammation. *Journal of autoimmunity* **54:** 8-14

Schwartz M, Baruch K (2014b) The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *The EMBO journal* **33:** 7-22

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine* **14:** 837-842

Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M (2009) Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS medicine* **6:** e1000113

Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, Kim KW, Klein E, Kalchenko V, Bendel P, Lira SA, Jung S, Schwartz M (2013) Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* **38:** 555-569

Shevchenko I, Karakhanova S, Soltek S, Link J, Bayry J, Werner J, Umansky V, Bazhin AV (2013) Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* **133:** 98-107

Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* **49:** 489-502

Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch JV, Allison JP, Quezada SA (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *The Journal of experimental medicine* **210:** 1695-1710

Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341:** 569-573

Suffner J, Hochweller K, Kuhnle MC, Li X, Kroczek RA, Garbi N, Hammerling GJ (2010) Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3+ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. *Journal of immunology* **184:** 1810-1820

Terawaki S, Chikuma S, Shibayama S, Hayashi T, Yoshida T, Okazaki T, Honjo T (2011) IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *Journal of immunology* **186:** 2772-2779

Terme M, Colussi O, Marcheteau E, Tanchot C, Tartour E, Taieb J (2012) Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer. *Clinical & developmental immunology* **2012:** 492920

[0206]

Terme M, Tartour E, Taieb J (2013) VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* **2:** e25156

Thomas-Schoemann A, Batteux F, Mongaret C, Nicco C, Chereau C, Annereau M, Dauphin A, Goldwasser F, Weill B, Lemare F, Alexandre J (2012) Arsenic trioxide exerts antitumor activity through regulatory T cell depletion mediated by oxidative stress in a murine model of colon cancer. *Journal of immunology* **189:** 5171-5177

Torres KC, Araujo Pereira P, Lima GS, Bozzi IC, Rezende VB, Bicalho MA, Moraes EN, Miranda DM, Romano-Silva MA (2013) Increased frequency of T cells expressing IL-10 in Alzheimer disease but not in late-onset depression patients. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **47:** 40-45

Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekely CA, Tan J, Duman RS, Flavell RA (2008) Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nature medicine* **14:** 681-687

Tseng D, Volkmer JP, Willingham SB, Contreras-Trujillo H, Fathman JW, Fernhoff NB, Seita J, Inlay MA, Weiskopf K, Miyanishi M, Weissman IL (2013) Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110:** 11103-11108

Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kalin RE, Lopategui-Cabezas I, Wegner A, Mair F, Schipke CG, Peters O, Winter Y, Becher B, Heppner FL (2012) Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nature medicine* **18:** 1812-1819

Voo KS, Bover L, Harline ML, Vien LT, Facchinetti V, Arima K, Kwak LW, Liu YJ (2013) Antibodies targeting human OX40 expand effector T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. *Journal of immunology* **191:** 3641-3650

Walsh JT, Zheng J, Smirnov I, Lorenz U, Tung K, Kipnis J (2014) Regulatory T cells in central nervous system injury: a double-edged sword. *Journal of immunology* **193:** 5013-5022

Ward FJ, Dahal LN, Wijesekera SK, Abdul-Jawad SK, Kaewarpai T, Xu H, Vickers MA, Barker RN (2013) The soluble isoform of CTLA-4 as a regulator of T-cell responses. *European journal of immunology* **43:** 1274-1285

Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, Zhao X, Martinez AJ, Wang W, Gibney G, Kroeger J, Eysmans C, Sarnaik AA, Chen YA (2013) Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31:** 4311-4318

Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS (2007) Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **4:** 647-653

Weiskopf K, Ring AM, Schnorr PJ, Volkmer JP, Volkmer AK, Weissman IL, Garcia KC (2013) Improving macrophage responses to therapeutic antibodies by molecular engineering of SIRPalpha variants. *Oncoimmunology* **2:** e25773

Wyss-Coray T, Rogers J (2012) Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2:** a006346

Zeng J, See AP, Phallen J, Jackson CM, Belcaid Z, Ruzevick J, Durham N, Meyer C, Harris TJ, Albesiano E, Pradilla G, Ford E, Wong J, Hammers HJ, Mathios D, Tyler B, Brem H, Tran PT, Pardoll D, Drake CG, Lim M (2013) Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce

[0207]

long-term survival in mice with intracranial gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **86:** 343-349

Zhao L, Sun L, Wang H, Ma H, Liu G, Zhao Y (2007) Changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice. *Journal of leukocyte biology* **81:** 1386-1394

Zheng H, Fridkin M, Youdim M (2015) New approaches to treating Alzheimer's disease. *Perspectives in medicinal chemistry* **7:** 1-8

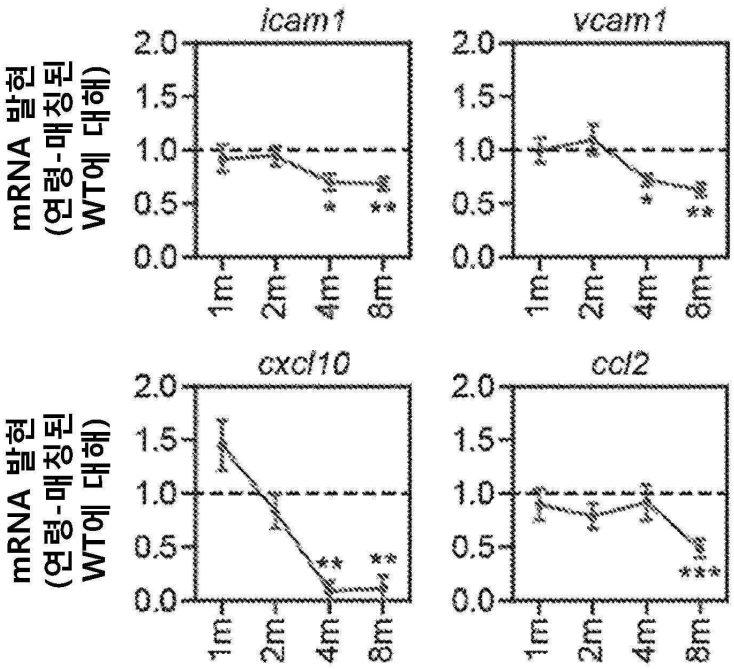
Zhou S, Chen L, Qin J, Li R, Tao H, Zhen Z, Chen H, Chen G, Yang Y, Liu B, She Z, Zhong C, Liang C (2013) Depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells promotes CCL21-mediated antitumor immunity. *PloS one* **8:** e73952

Zhou X, Kong N, Wang J, Fan H, Zou H, Horwitz D, Brand D, Liu Z, Zheng SG (2010) Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu. *Journal of immunology* **185:** 2675-2679

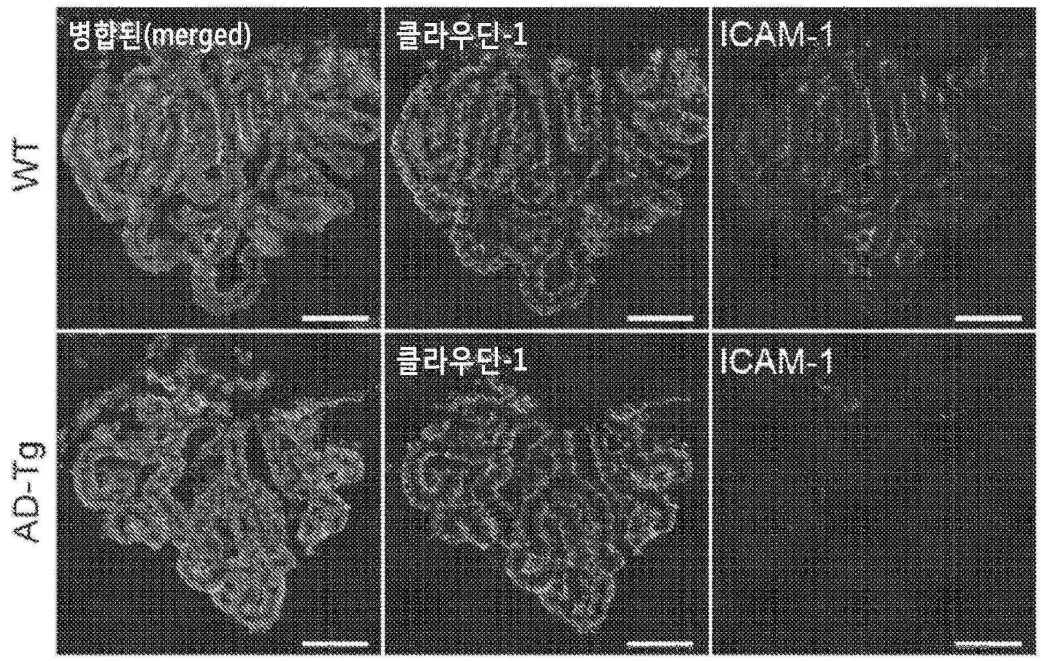
[0208]

도면

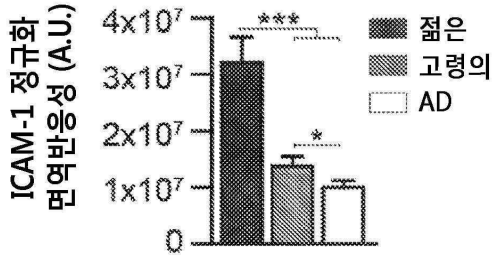
도면1a


icam1
vcam1
cxcl10
ccl2
mRNA 발현
(연령-매칭된
WT에 대해)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1m
2m
4m
8m

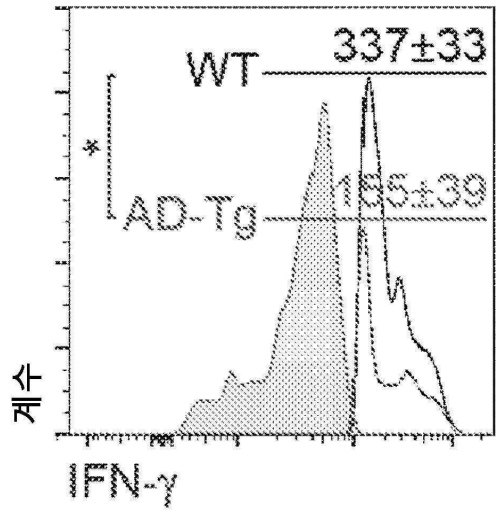
도면1b


병합된(merged)
클라우딘-1
ICAM-1
WT
AD-Tg

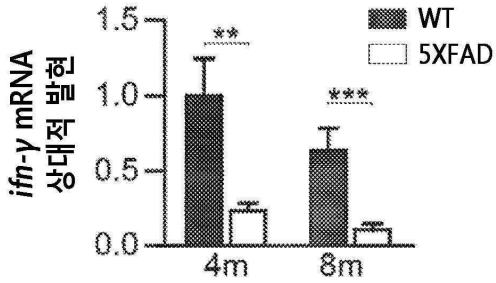
도면2a



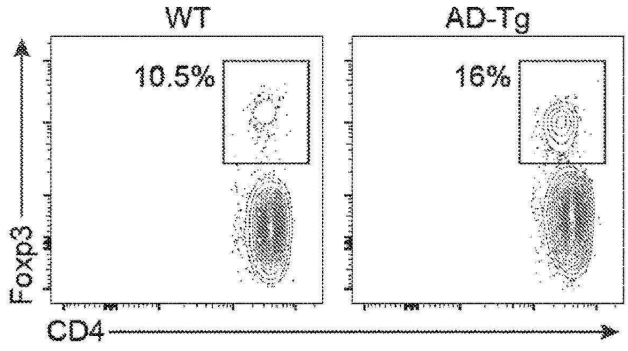
도면2b



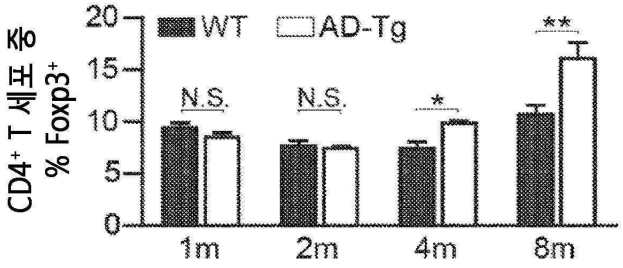
도면2c



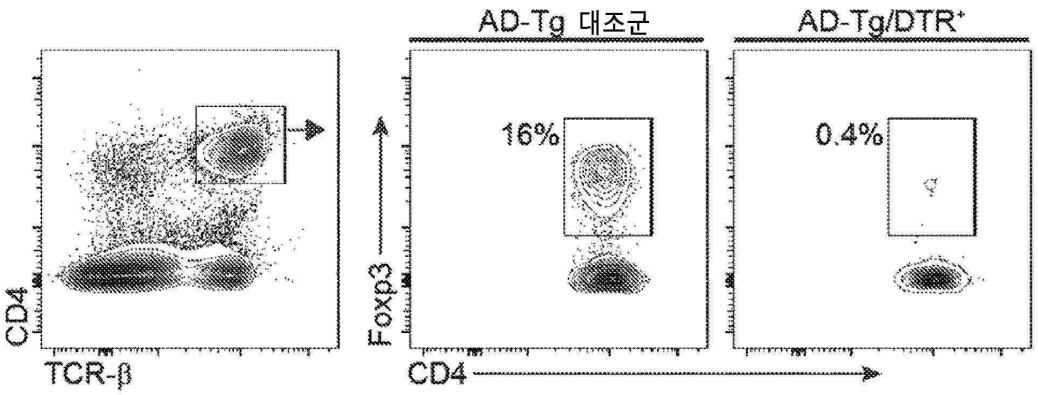
도면3a



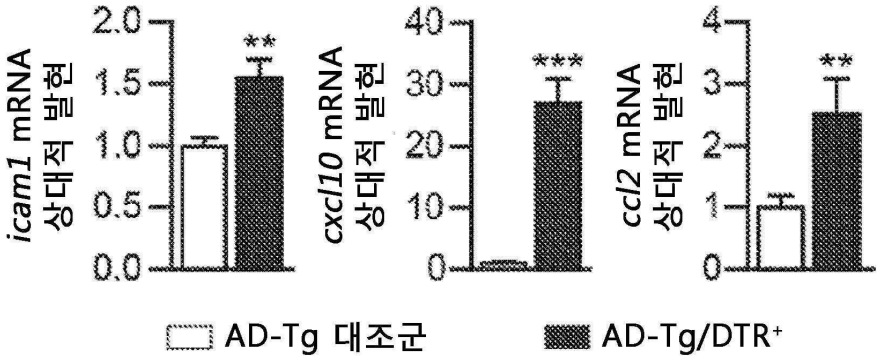
도면3b



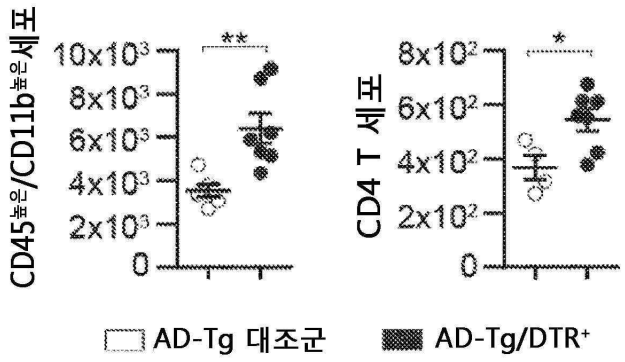
도면4



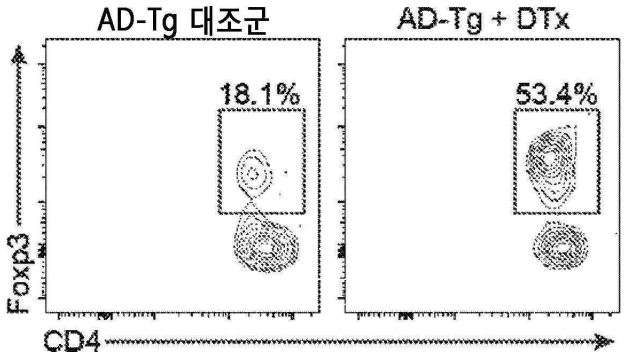
도면5a



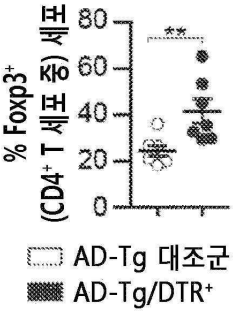
도면5b



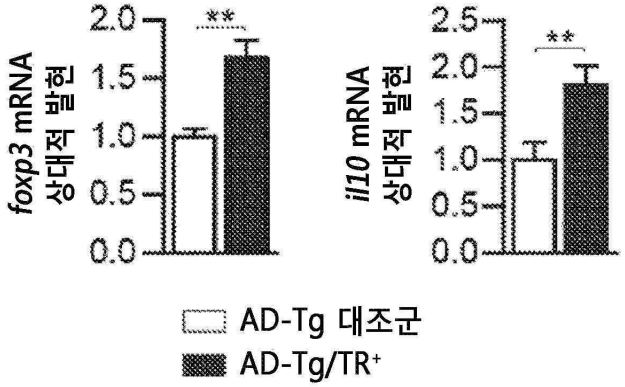
도면5c



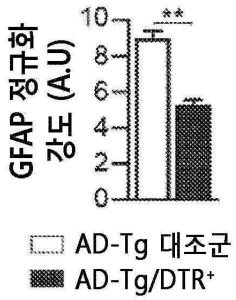
도면5d



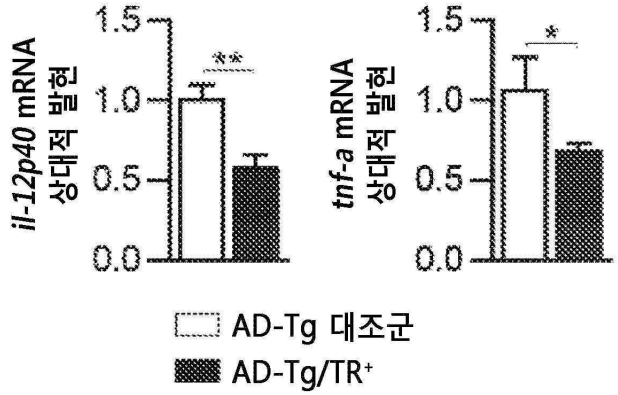
도면5e



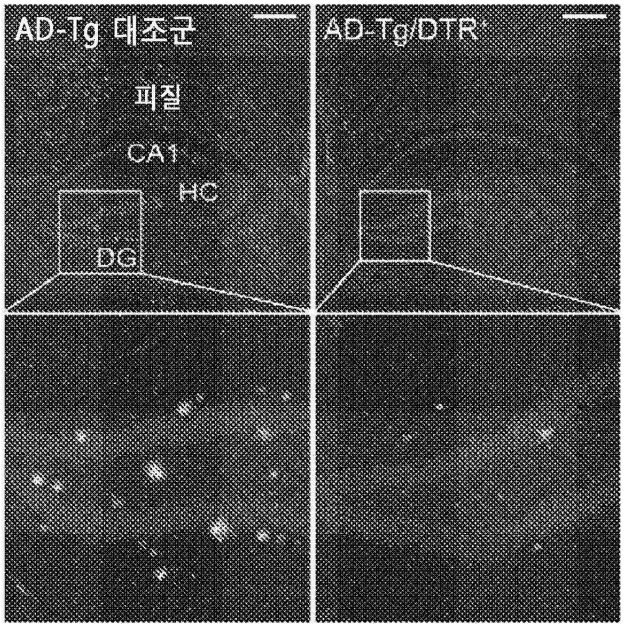
도면5f



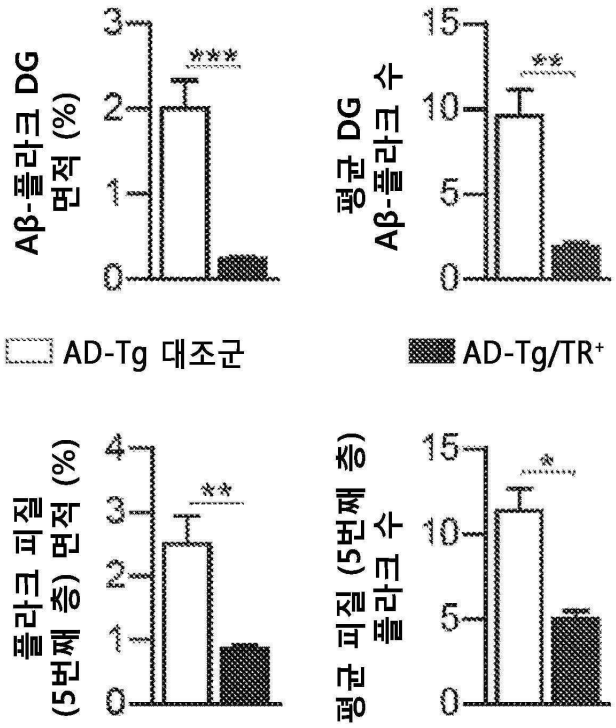
도면5g


il-12p40 mRNA 상대적 발현
1.5
1.0
0.5
0.0
**
tnf-a mRNA 상대적 발현
1.5
1.0
0.5
0.0
*
AD-Tg 대조군
AD-Tg/TR+

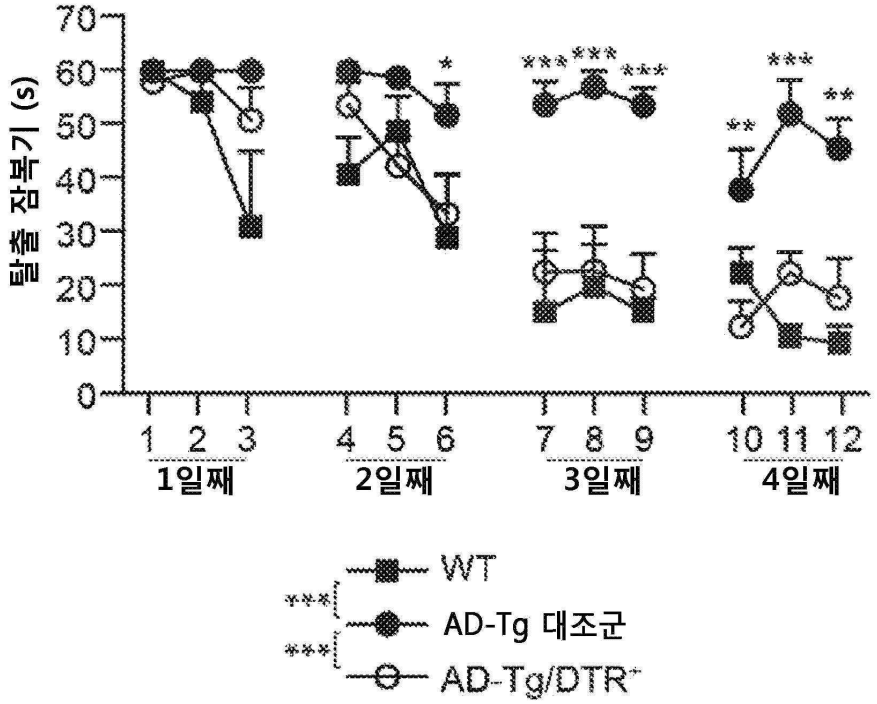
도면6a


AD-Tg 대조군
AD-Tg/DTR+
피질
CA1
HC
DG

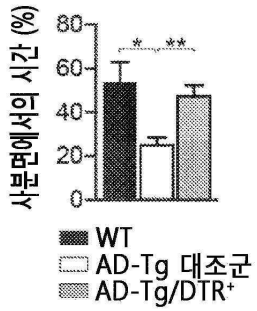
도면6b


Aβ-플라크 DG 면적 (%)
평균 DG Aβ-플라크 수
AD-Tg 대조군
AD-Tg/TR+
플라크 피질 (5번째 층) 면적 (%)
평균 피질 (5번째 층) 플라크 수

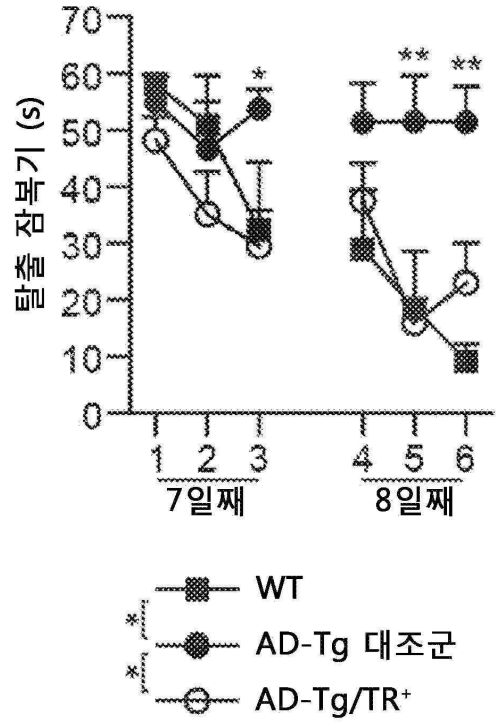
도면6c


탈출 잠복기 (s)
1일째
2일째
3일째
4일째
WT
AD-Tg 대조군
AD-Tg/DTR+

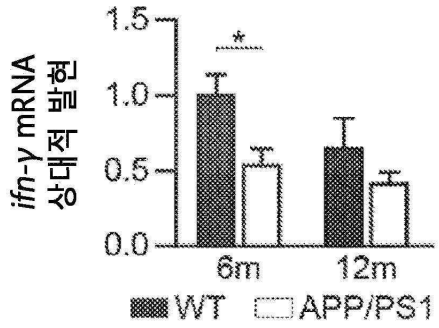
도면6d



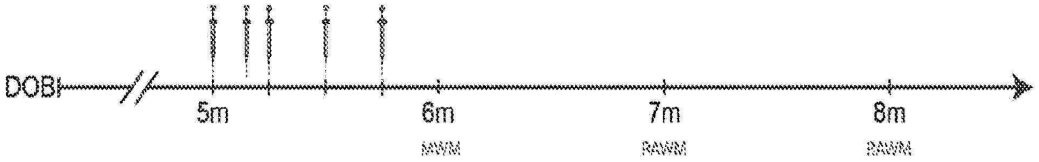
도면6e



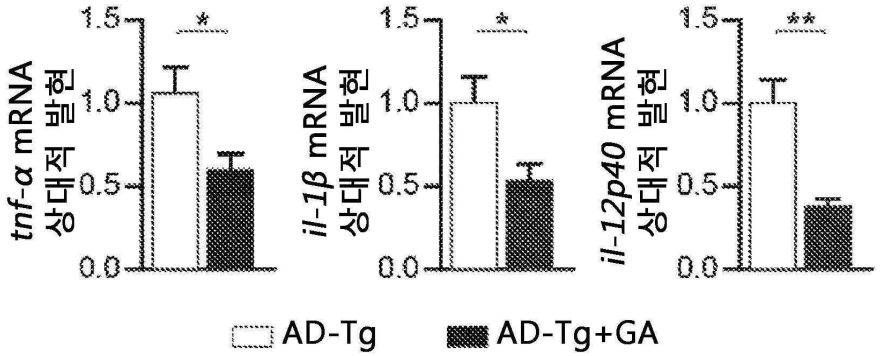
도면7



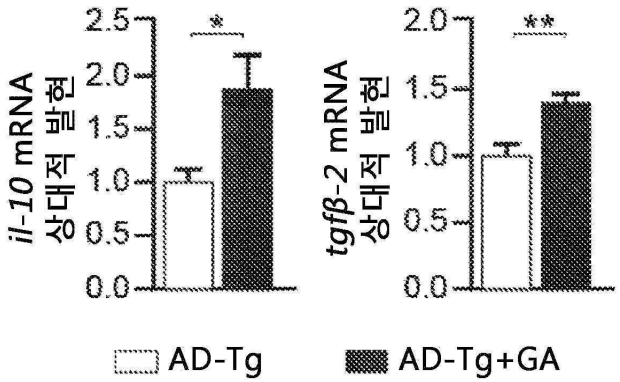
도면8a



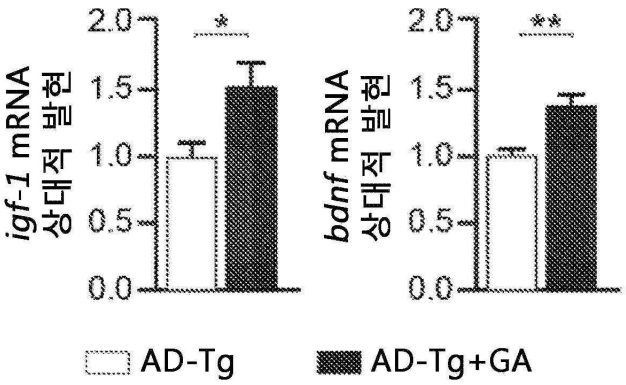
도면8b



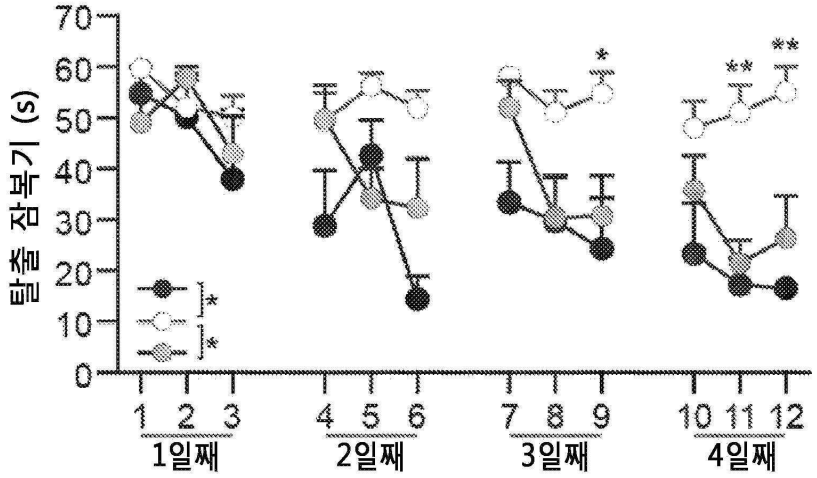
도면8c



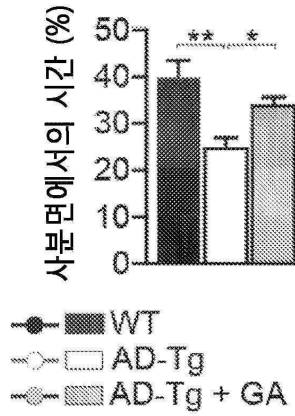
도면8d



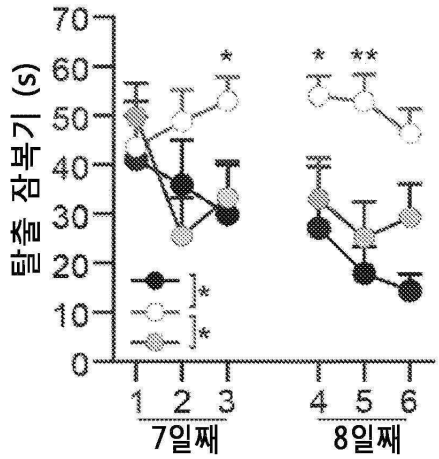
도면8e



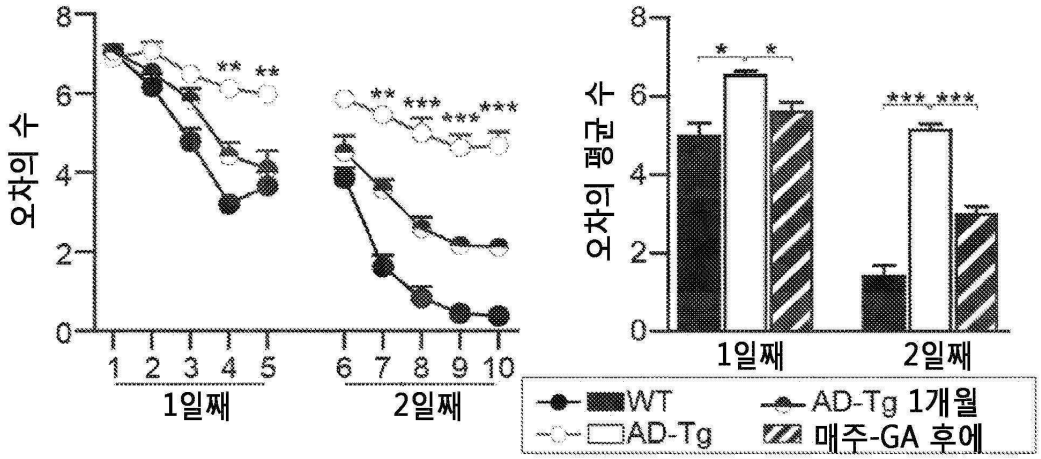
도면8f



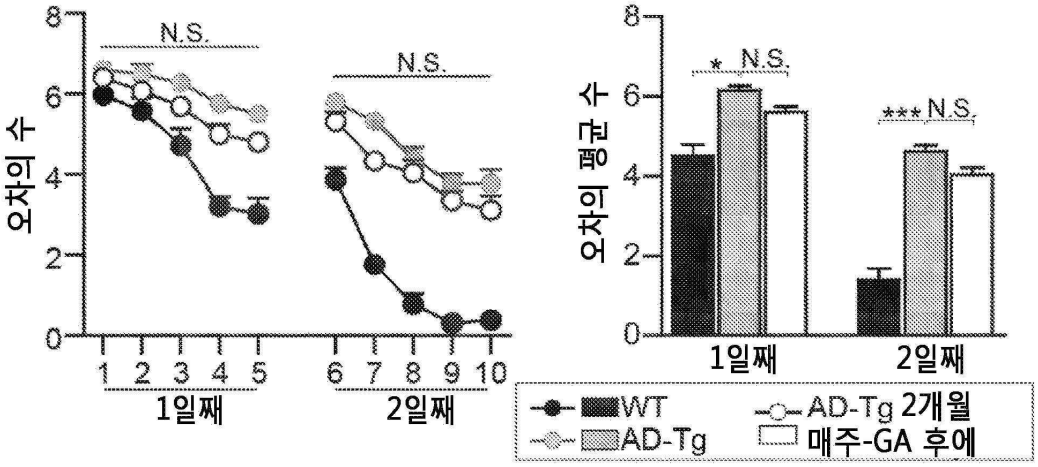
도면8g



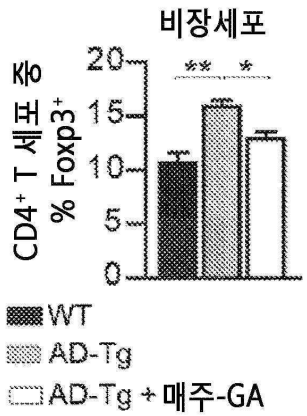
도면8h



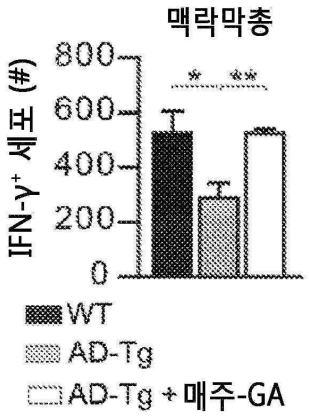
도면8i



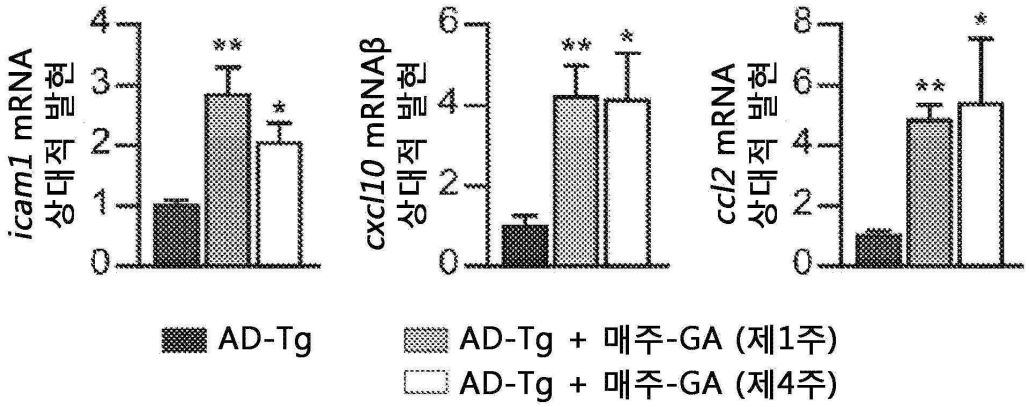
도면9a



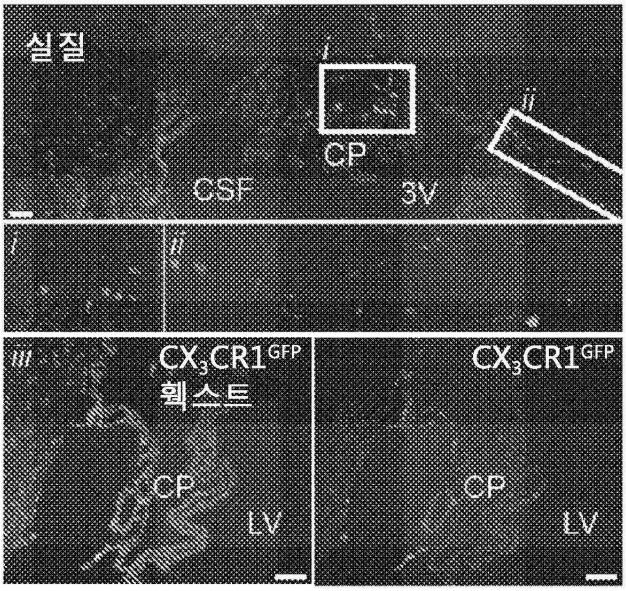
도면9b



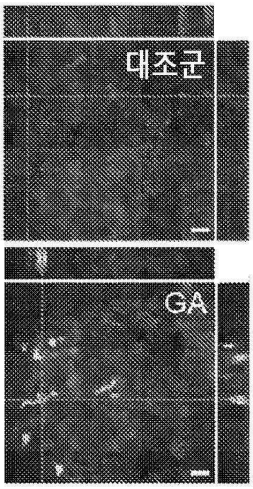
도면9c



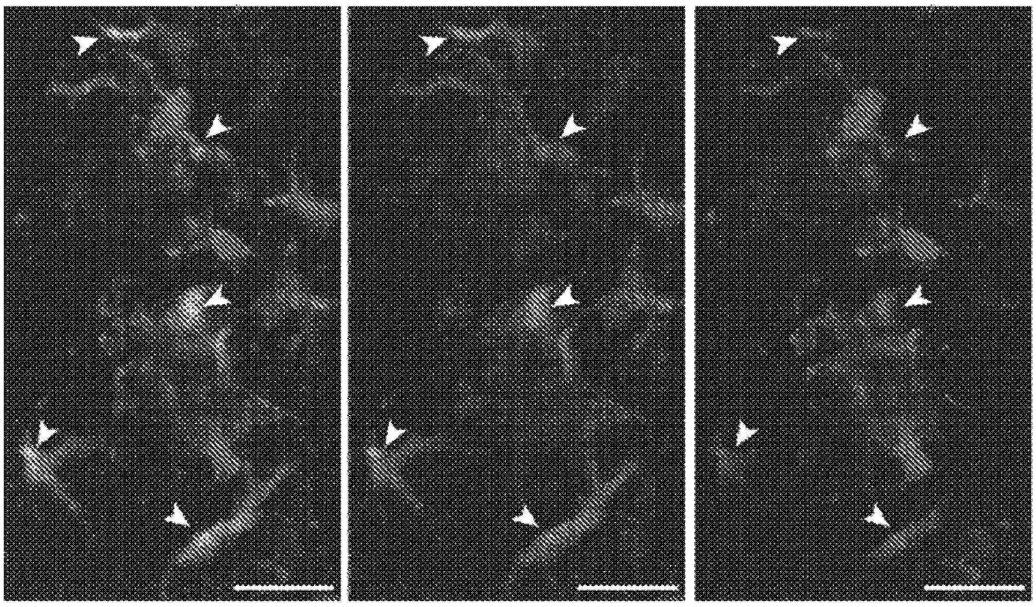
도면9d



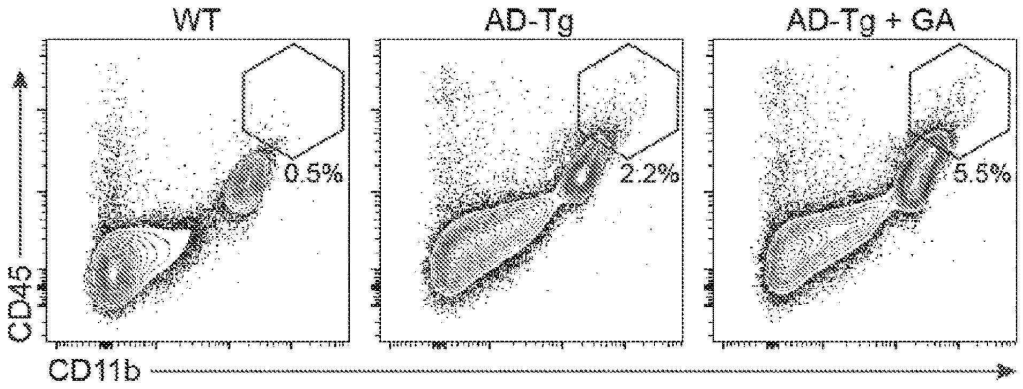
도면9e



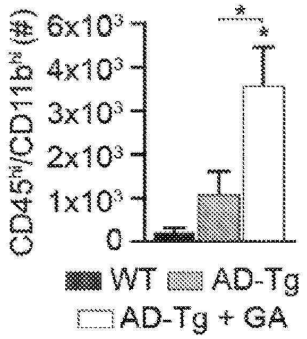
도면9f



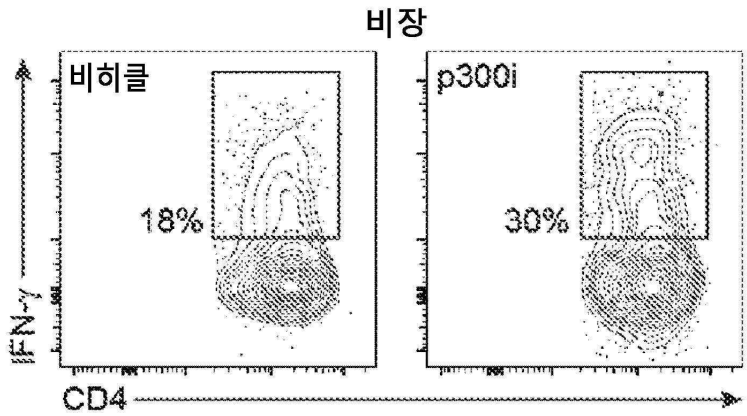
도면9g



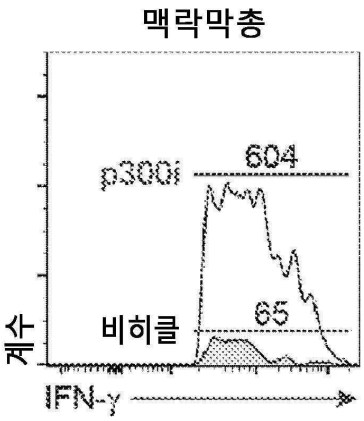
도면9h



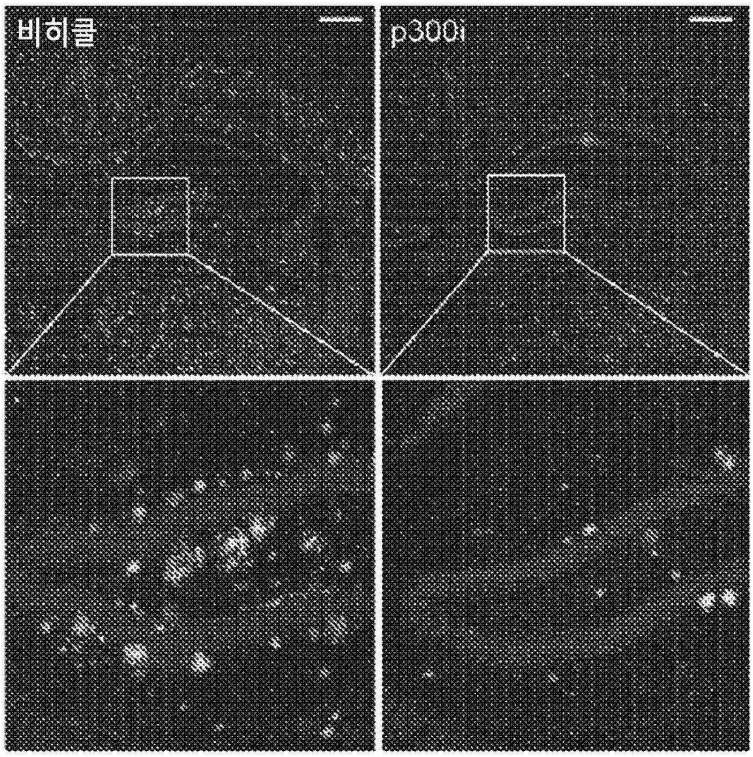
도면10a



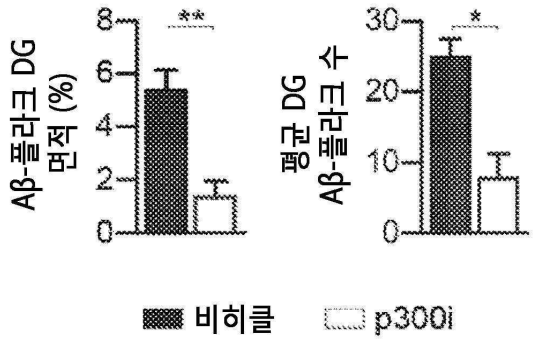
도면10b



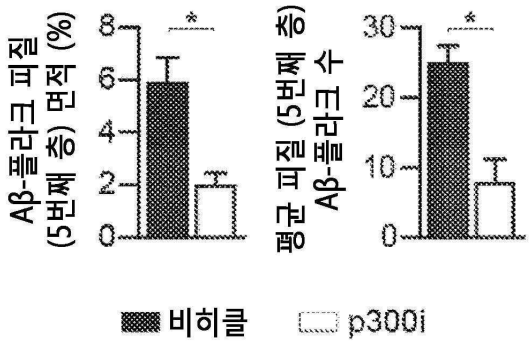
도면10c



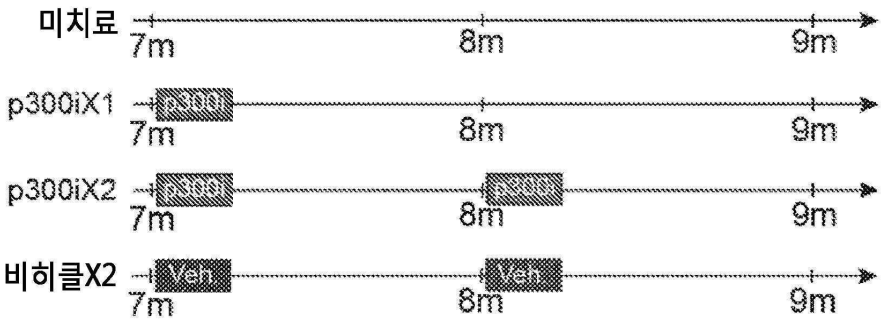
도면10d



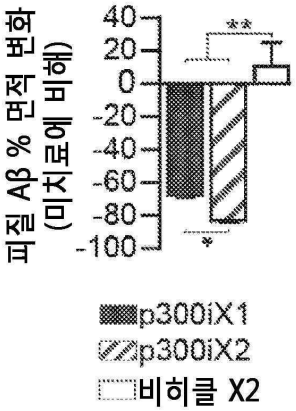
도면10e



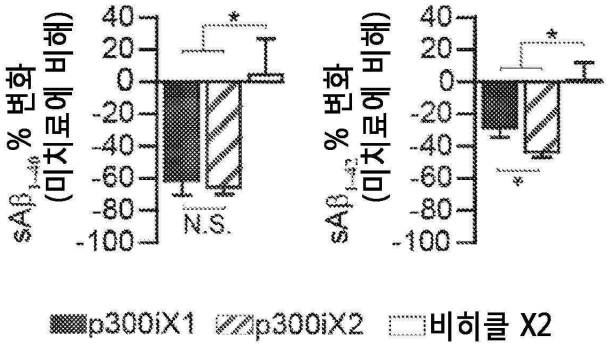
도면10f



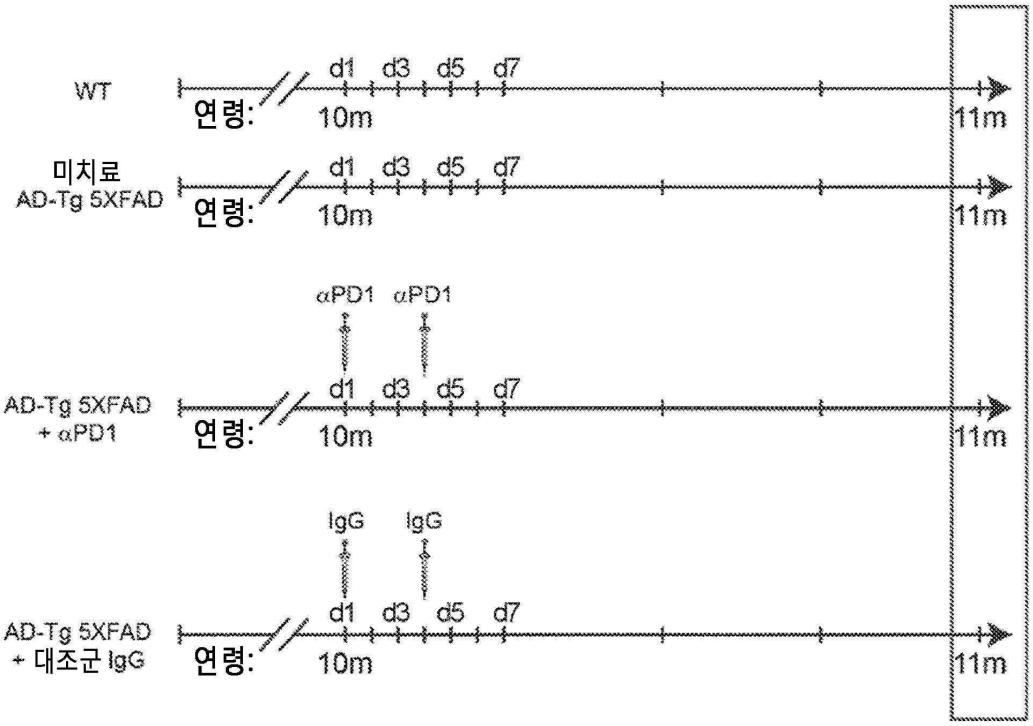
도면10g



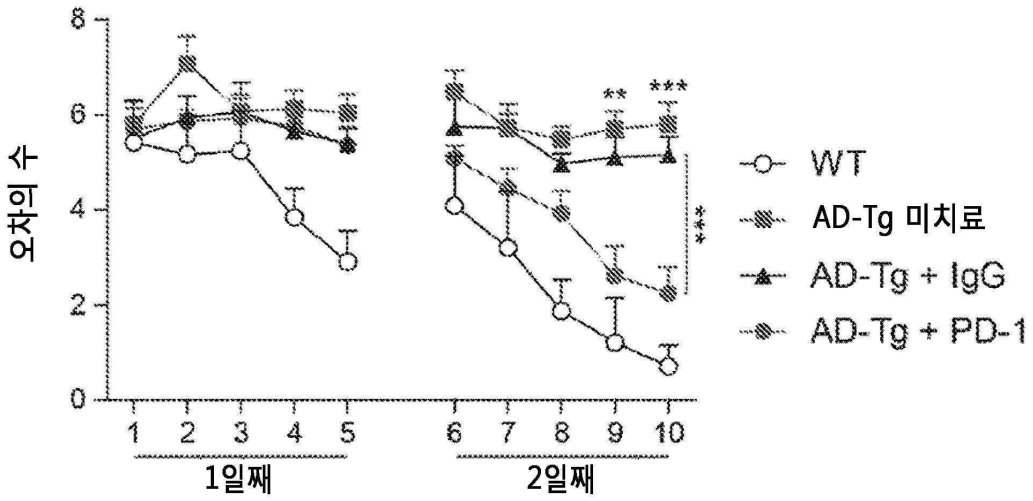
도면10h



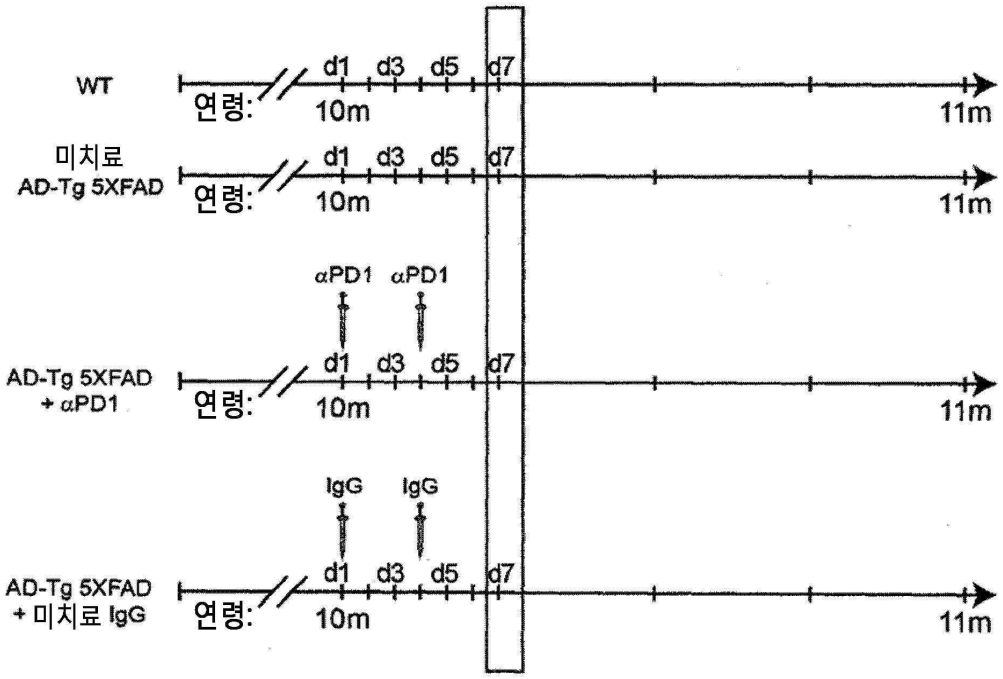
도면11a


WT
연령:
10m
d1 d3 d5 d7
11m
미치료
AD-Tg 5XFAD
αPD1 αPD1
AD-Tg 5XFAD
+ αPD1
IgG IgG
AD-Tg 5XFAD
+ 대조군 IgG

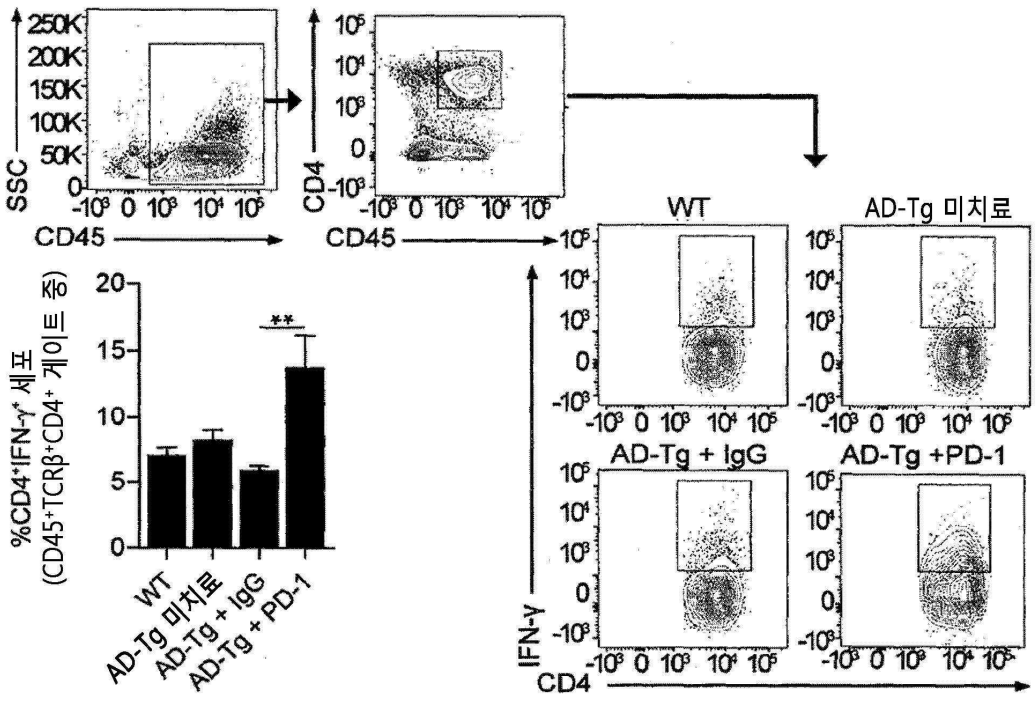
도면11b


오차의 수
0
2
4
6
8
1 2 3 4 5
1일째
6 7 8 9 10
2일째
**
***
***
WT
AD-Tg 미치료
AD-Tg + IgG
AD-Tg + PD-1

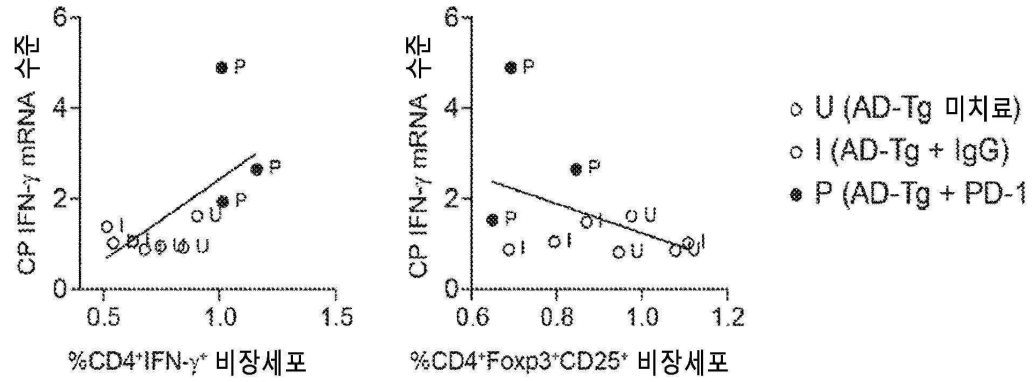
도면12a


WT
연령:
10m
d1
d3
d5
d7
11m
미치료
AD-Tg 5XFAD
αPD1
αPD1
AD-Tg 5XFAD
+ αPD1
IgG
IgG
AD-Tg 5XFAD
+ 미치료 IgG

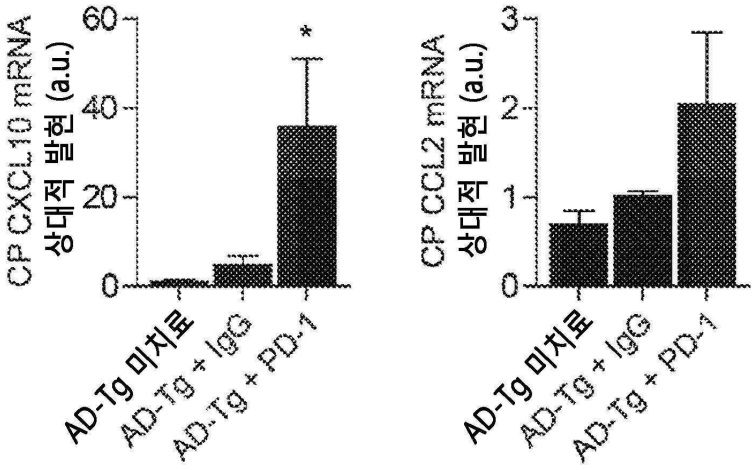
도면12b


SSC
CD45
CD4
CD45
WT
AD-Tg 미치료
AD-Tg + IgG
AD-Tg +PD-1
IFN-γ
CD4
%CD4+IFN-γ+ 세포
(CD45+TCRβ+CD4+ 게이트 중)
**
WT
AD-Tg 미치료
AD-Tg + IgG
AD-Tg + PD-1

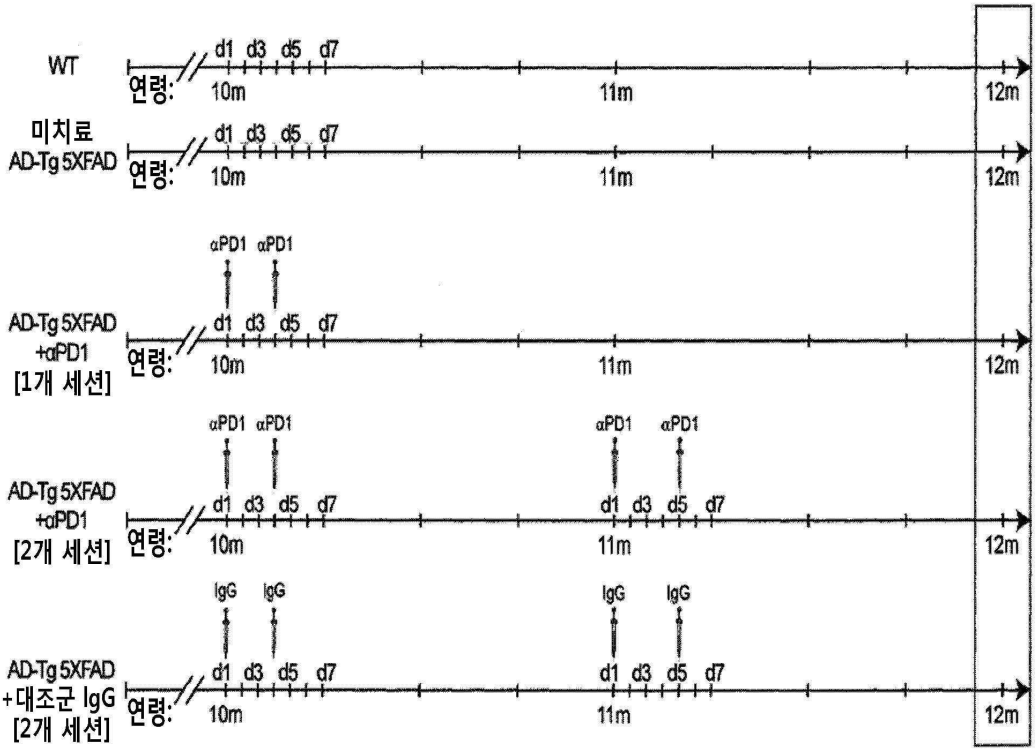
도면13a


CP IFN-γ mRNA 수준
%CD4+IFN-γ+ 비장세포
%CD4+Foxp3+CD25+ 비장세포
U (AD-Tg 미치료)
I (AD-Tg + IgG)
P (AD-Tg + PD-1

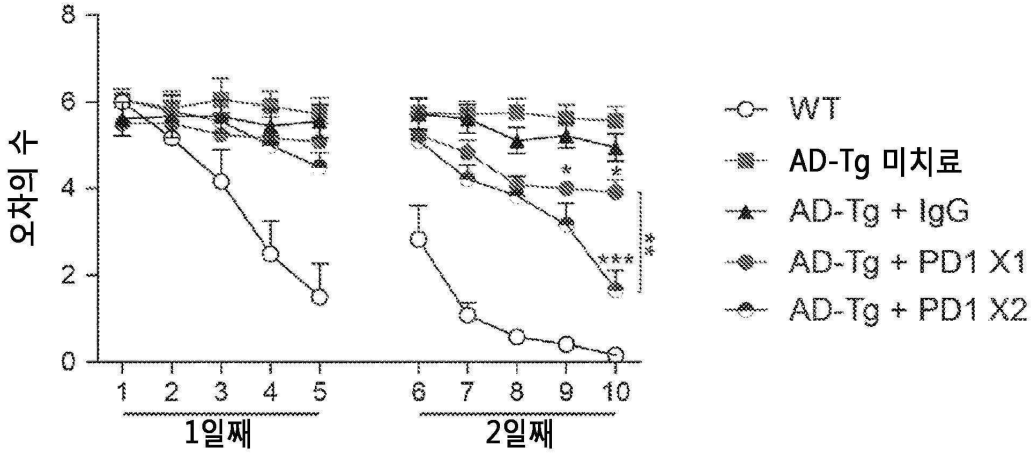
도면13b


CP CXCL10 mRNA 상대적 발현 (a.u.)
CP CCL2 mRNA 상대적 발현 (a.u.)
AD-Tg 미치료
AD-Tg + IgG
AD-Tg + PD-1

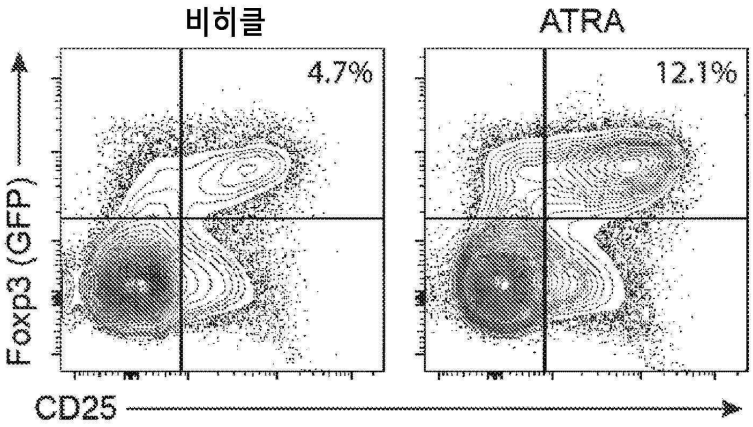
도면14a


WT
연령:
d1 d3 d5 d7
10m
11m
12m
미치료
AD-Tg 5XFAD
AD-Tg 5XFAD
+αPD1
[1개 세션]
αPD1 αPD1
AD-Tg 5XFAD
+αPD1
[2개 세션]
AD-Tg 5XFAD
+대조군 IgG
[2개 세션]
IgG IgG

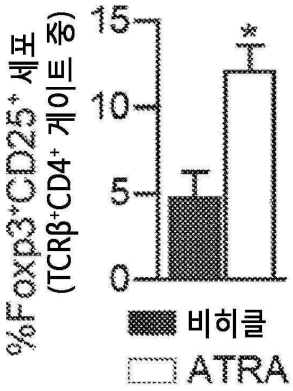
도면14b


8
6
4
2
0
오차의 수
1 2 3 4 5
6 7 8 9 10
1일째
2일째
WT
AD-Tg 미치료
AD-Tg + IgG
AD-Tg + PD1 X1
AD-Tg + PD1 X2

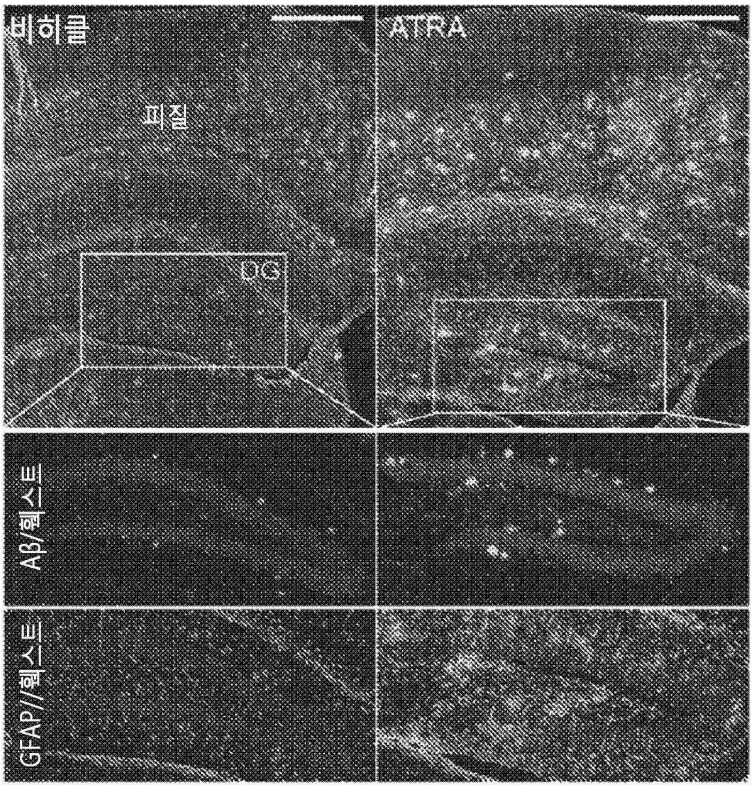
도면15a


비히클
ATRA
4.7%
12.1%
Foxp3 (GFP)
CD25

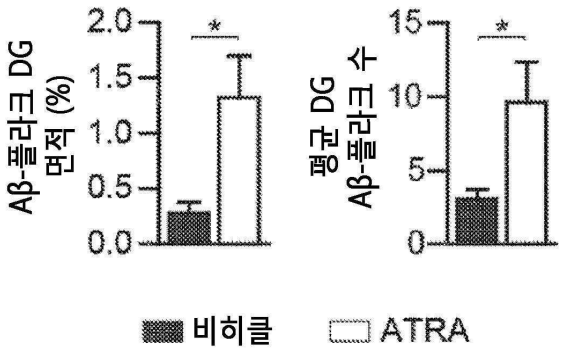
도면15b


%Foxp3+CD25+ 세포
(TCRβ+CD4+ 게이트 중)
15
10
5
0
*
비히클
ATRA

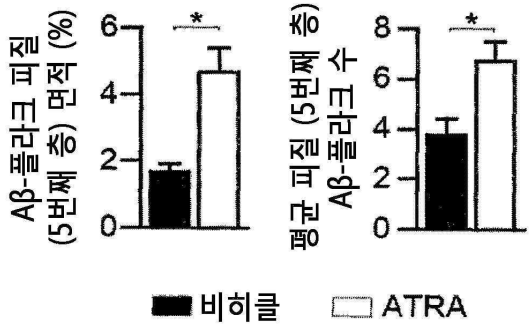
도면15c



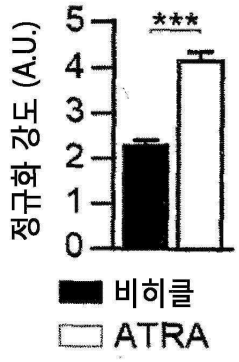
도면15d



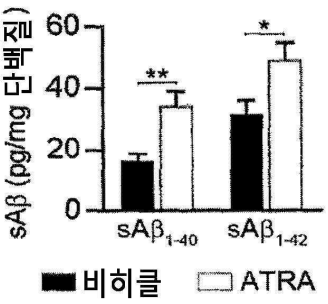
도면15e



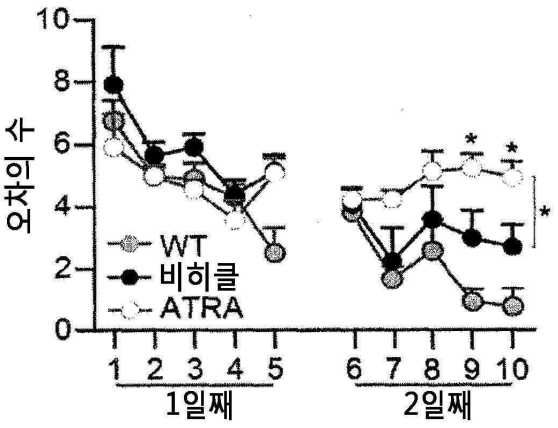
도면15f



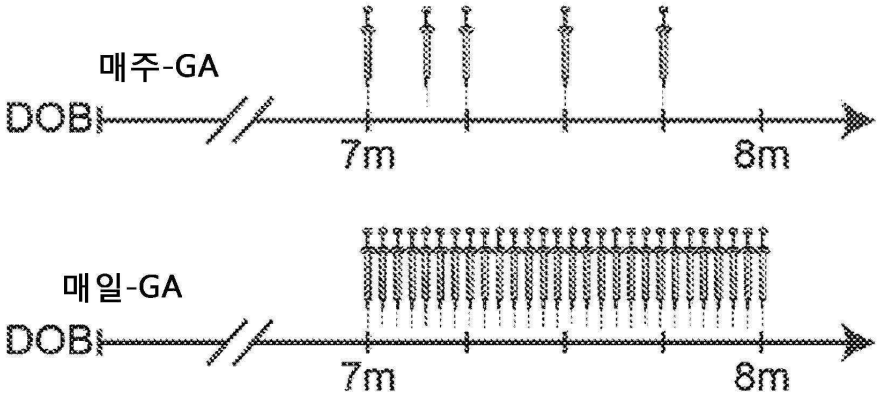
도면15g



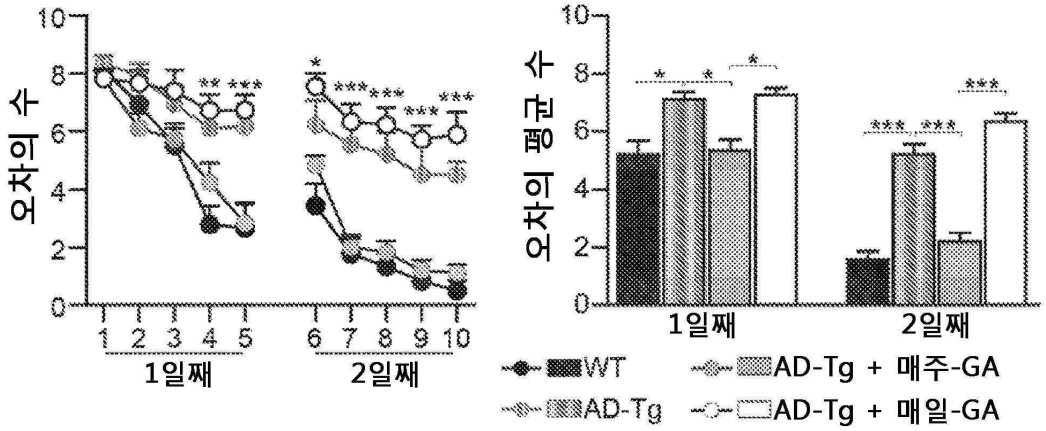
도면15h



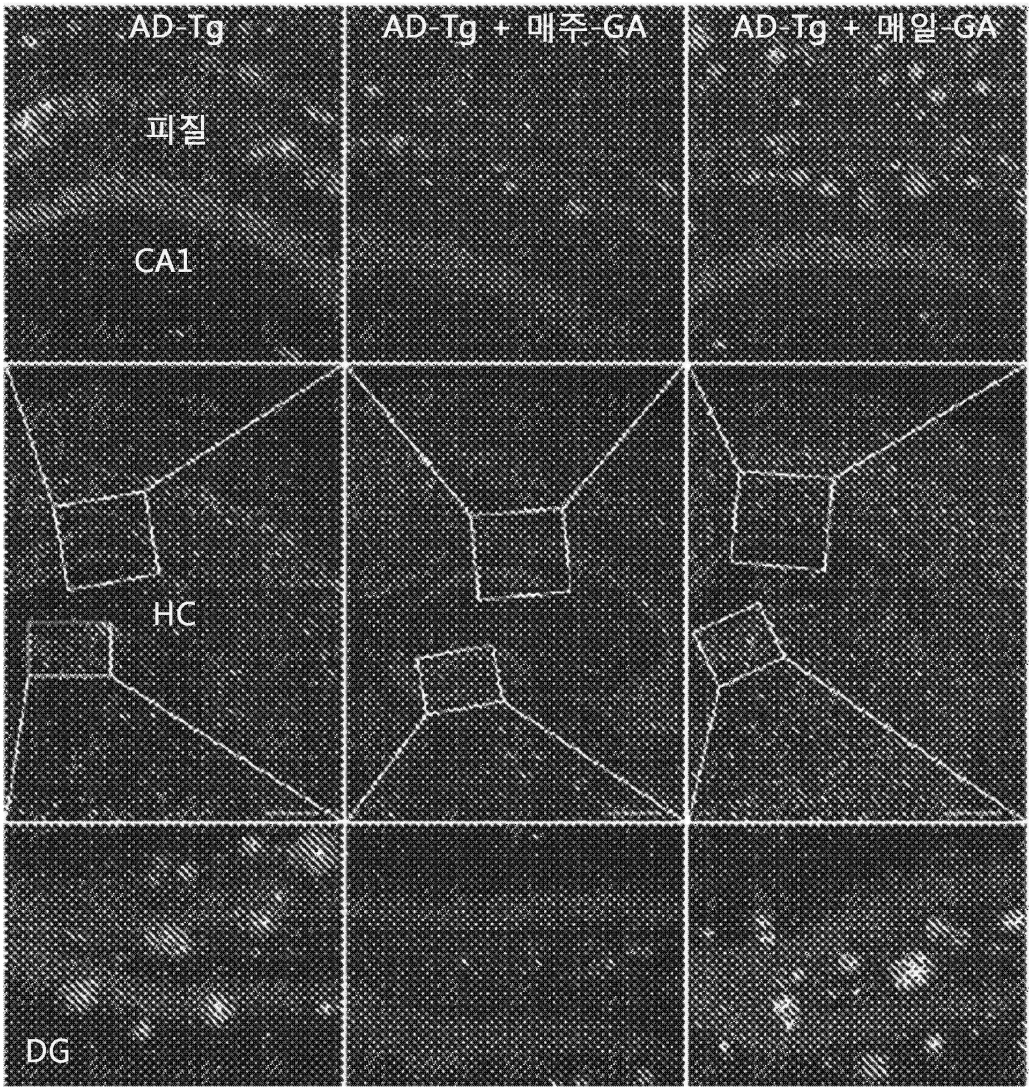
도면16a


매주-GA
DOB
7m
8m
매일-GA
DOB
7m
8m

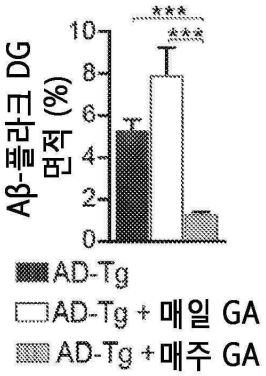
도면16b


오차의 수
1일째
2일째
오차의 평균 수
1일째
2일째
WT
AD-Tg
AD-Tg + 매주-GA
AD-Tg + 매일-GA

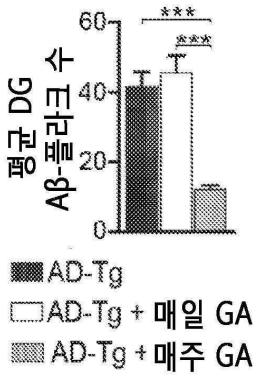
도면16c


AD-Tg
AD-Tg + 매주 GA
AD-Tg + 매일 GA
피질
CA1
HC
DG

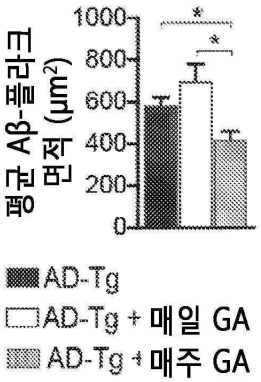
도면16d


***
***
10
8
6
4
2
0
Aβ-플라크 DG
면적 (%)
AD-Tg
AD-Tg + 매일 GA
AD-Tg + 매주 GA

도면16e



도면16f



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.

<120> Reducing systemic regulatory T cell levels or activity for treatment of disease and injury of the CNS

<130> IPA161417-IL-D1

<150> 61/951,783,

<151> 2014-03-12

<150> 62/030,164

<151> 2014-07-29

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Ala Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Ala Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Ala Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Glu Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Ala Lys Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

Ala Glu Ala Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

Ala Glu Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

Ala Ala Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Ala Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

Ala Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

agcatacagg tcctggcatc ttgt 24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

caaagaccac atgcttgcca tcca 24

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

agatcacatt cacggtgctg gcta 24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

agctttggga tggtagctgg aaga 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

tgtgaaggga ttaacgaggc tgga 24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

ccatgtttcg ggcacatttc caca 24

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

aactgcatcc atatcgatga c 21

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

gtggcaatga tctcaacac 19

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

catccacgtg ttggctca 18

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

gatcatcttg ctggtgaatg agt 23

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

gcctcttctc attcctgctt 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

ctcctccact tggtggtttg 20

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

ccaaaagatg aagggctgct t 21

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

tgctgctgcg agatttgaag 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

gaagttcaac atcaagagca 20

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

catagtccct ttggtccag 19

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

tgaattccct gggtgagaag ctga 24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

tggccttgta gacaccttgg tctt 24

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

aattgctgcc ttcgccctct ttac 24

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

tgtacaggct gaggactttg gtgt 24

<210> 53

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

ccggaccaga gacccttg 19

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

cctgtgggct tgttgaagta aaa 23

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

gatgctcagc agtcaagtgc cttt 24

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

gacatgtttg cggcatccag gtaa 24