(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0068993
(43) 공개일자 2011년06월22일

(51) Int. Cl.
A61K 38/19 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7005272
(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년08월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년03월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/052742
(87) 국제공개번호 WO 2010/017224
국제공개일자 2010년02월11일
(30) 우선권주장
61/086,351 2008년08월05일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 사우스 플로리다
미국 플로리다 33612-9220 스위트 100 스퀙트럼 블러바드 3802
(72) 발명자
포터, 헌팅턴
미국 플로리다주 33629 탐파 에스. 무디 애비뉴 1006
아렌대시, 개리, 떠블류.
미국 캘리포니아주 92234 캐시드럴 시티 퀴조 로드 67360
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 아주양헌

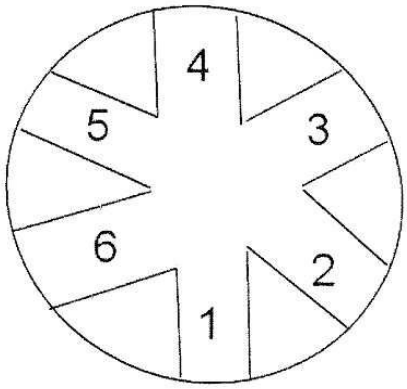
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 인지장애의 치료방법

(57) 요 약

본 발명은 인지장애를 지닌 인간 혹은 동물을 치료하는 물질 및 방법에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 1종 이상의 염증 매개체(들), 예를 들어, ms-관련 티로신 키나제 3(Flt3) 리간드, 인터루킨-6(IL-6), 대식세포 이동저지인자(MIF), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-3(IL-3), 에리트로포이에틴(EPO), 혈관 내피 성장인자 A(VEGF-A), 저산소증-유발성 전사인자(HIF-1알파), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1), 종양 괴사 인자(TNF), 과립구 집락자극인자(G-CSF), 과립구/대식세포 집락자극인자(GM-CSF), 대식세포 집락자극인자(M-CSF), 줄기 세포 인자(SCF), 다베포에틴(ARANESP) 및 금속단백분해효소의 유효량을, 치료를 필요로 하는 동물 혹은 인간에게 투여하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

베네트, 스티븐

미국 플로리다주 33647 탐파 워시번 플레이스 16102

보이드, 티모시

미국 플로리다주 33584-4012 세프너 올드 다비 스트리트 712

특허청구의 범위

청구항 1

인간 혹은 동물에서의 인지장애를 치료하는 방법으로서,

1종 이상의 염증 매개체(inflammatory mediator)(들), 또는 전체-길이 혹은 비변이 염증 매개체와 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 발휘하는 상기 염증 매개체의 기능성 단편(functional fragment) 혹은 변이체, 또는 상기 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 염증 매개체의 생산을 유도하는 화합물 혹은 제제의 유효량을 인간 혹은 동물에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 염증 매개체는 혈액 뇌장벽을 횡단(cross)할 수 있는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체는 fms-관련 티로신 키나제 3(Flt3: : fms-related tyrosine kinase) 리간드, 인터루킨-6(IL-6), 대식세포 이동저지인자(MIF: macrophage migration inhibitory factor), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-3(IL-3), 에리트로포이에틴(EPO: erythropoietin), 혈관 내피 성장인자 A(VEGF-A: vascular endothelial growth factor-A), 저산소증-유발성 전사인자(hypoxia-inducible transcription factor)(HIF-1알파), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1: insulin like growth factor-1), 종양 괴사 인자(TNF: tumor necrosis factor), 과립구 집락자극인자(G-CSF: granulocyte colony stimulating factor), 과립구/대식세포 집락자극인자(GM-CSF: granulocyte/macrophage colony stimulating factor), 줄기 세포 인자(SCF: Stem Cell Factor), 다베포에틴(Darbepoetin)(ARANESP), 또는 금속단백분해효소, 또는 전체-길이 혹은 비변이 염증 매개체와 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 발휘하는 이들의 기능성 단편 혹은 변이체의 하나 이상을 포함하는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체는 GM-CSF, 또는 전체-길이 혹은 비변이 GM-CSF와 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 발휘하는 상기 GM-CSF 기능성 단편 혹은 변이체를 포함하는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체는 GM-CSF의 생물학적 등가물(biological equivalent)을 포함하는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체는 치료된 인간 혹은 동물의 혈장 혹은 뇌 속의 아밀로이드 베타 수준을 저감시킬 수 있는 것인 인지장애의 치료방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 GM-CSF는 치료된 인간 혹은 동물의 혈장 혹은 뇌 속의 신경계 꼬임(neural tangle)을 저감시킬 수 있는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 인지장애는 알츠하이머병에 의해 야기되거나 해당 알츠하이머병으로부터 초래되는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체는 두개 내로(intracranially) 투여되는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체는 두개 내 주입에 의해 투여되는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체는 비신경(non-neural) 세포 혹은 조직에 투여되는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 방법은 치료전 인지장애에 대해 상기 인간 혹은 동물을 평가하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 용질을 포함하는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 발현 구조체(expression construct) 내에 제공되는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 발현 구조체는 신경 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 발현을 위해 제공되는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 신경 세포는 인간 세포인 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 염증 매개체의 생산을 유발하는 상기 화합물 혹은 제제는 EPO 혹은 HIF-1α인 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 인지장애는 뇌졸중, 다운 증후군, 권투선수 치매, 외상성 뇌손상, AIDS-연관 치매, 레비 소체병 또는 피크 병(Pick's disease)에 의해 유발되거나 이들로부터 초래되는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 18

제1항에 있어서, i) G-CSF 및/또는 GM-CSF 및 ii) 다베포에틴 및/또는 EPO를 인간 혹은 동물에게 투여하는 것인, 인지장애의 치료방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은, 1종 이상의 염증 매개체, 폴리뉴클레오타이드 혹은 조성물을 하나 이상의 용기 내에 포함하는 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 관한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 미국 가특허출원 제61/086,351호(출원일: 2008년 8월 5일)의 이득을 주장하며, 이 기초출원은 임의의 도표, 표, 핵산서열, 아미노산 서열 및 도면을 비롯하여 그의 전문이 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 인간 혹은 동물에서의 인지장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 기억 상실은 오랫동안 노화의 공통된 부산물로서 인식되어져 왔다. 최근에 알게 된 사람의 이름 혹은 간단한 쇼핑 리스트의 내용을 회상할 수 없는 것은 모든 사람이 친숙하게 경험하는 것이며, 이 경험은 나이가 듦에 따라 더욱 흔히 있는 것 같다.

[0006] 지난 수십년에 걸쳐, 의료계는 그들의 관점을 중장년층에서의 기억 상실로 변경하고 있다. 이들 문제는 과거에 "노망" 혹은 "건망증"이라고도 종종 불리는 노화의 불가피한 부산물로서 간주되었다. 더욱 최근에, 의사들은 그들의 관점을 기억 상실로 옮겨서, 어떤 정도의 기억 손상은 이제 병으로 간주되고, 따라서, 이는 뇌에 영향을 미치는 질환 과정을 나타낸다. 대부분의 의사가 이러한 판정을 행하는 데 이용하는 역점은 기억 상실이 정상의 독립적인 기능이 불가능하게 되는 정도로 진행되는 것; 예를 들어, 사람들이 자신의 재정 상태를 더 이상 계속해서 관리할 수 없거나 또는 그의 기본적인 욕구를 대비할 수 없게 된 경우 등이다. 이 정도의 인지장애는 치매라 지칭되게 되었다.

[0007] 그러나, 많은 나이 든 개인은 기억 문제를 호소할 수 있지만, 그들의 관행적인 과업을 모두 독립적으로 수행하도록 여전히 관리할 수 있다. 통상, 충분히 기능하는 그들의 능력은, 달력이나 기억용 메모, 리스트 등에 대한 의존성의 증가 등과 같은, 이들 난제에 대한 보상에 기초하고 있다. 몇몇 경우에, 이들 기억 곤란성은 나빠지는 기억 상실의 조짐이 보인다고 하는 징후이다.

[0008] 주관적인 기억 문제의 증후군은 통상 가벼운 인지장애(MCI: Mild Cognitive Impairment)로 알려져 있지만, 치매가 아닌 인지장애(CIND: Cognitive Impairment, Not Dementia)를 비롯한 다른 용어도 이용되고 있다. MCI 환자는 기억의 곤란을 호소하고 있다. 전형적으로, 이러한 호소증상은 최근에 만났던 사람의 이름을 기억해내는 곤란성, 대화의 흐름을 기억해내는 곤란성 및 물건을 잘못 두는 증가된 경향 혹은 이와 유사한 문제들을 포함한다. 많은 경우에, 개인은 이들 곤란성을 상당히 자각할 것이고 메모 및 달력에 대한 증가된 의존성으로 보상할 것이다. 가장 중요하게는, MCI의 진단은, 이들이 이전에 필요로 했던 것과는 다른 것으로부터 더 많은 원조 없이도 그들의 일상적인 활동을 성공적으로 수행할 수 있다는 사실에 기대를 건다.

[0009] 몇몇 연구는 MCI 환자의 인지 수행을 조사하였다. 이들은, 일반적으로, 이들 환자가, 그들의 연령군에 있는 다른 개인과 비교할 때에도, 기억의 정식 시험을 비교적 열등하게 수행하는 것을 입증한다. 이들은 또한 대상이나 사람의 이름을 부르는 것(물건의 이름을 떠올리는 것) 및 복잡한 계획 업무 등과 같은 다른 영역의 생각에 있어서 경미한 곤란성을 보인다. 이들 문제는 알츠하이머병과 연관된 신경심리학적 소견보다 덜 심각하지만 유사하다. 걱정되는 문제는, 또한 몇몇 경우에, 취미를 수행하는 등과 같은 일상의 활동의 경미한 곤란함이 명백한 것으로 드러났다.

[0010] 몇몇 연구는 중장년층에서의 기억 호소증상이 장래에 치매로 발전할 위험성이 정상보다 높은 것과 연관되는 것으로 입증한 바 있다. 가장 통상적으로, MCI 환자가 발전할 위험이 있는 치매의 유형은, 알츠하이머병이지만, 혈관 치매 혹은 전두측두엽 치매 등과 같은 기타 치매도 잘 일어날 수 있다. 그러나, 이들 호소증상을 가진 몇몇 환자는 결코 치매로 발전되지 않는 것도 명확하다.

[0011] 소정의 특성은 보다 높은 가능성의 진행과 연관된다. 이들은 정통한 통보자(배우자, 아이들 혹은 친한 친구 등)에 의한 기억 곤란성의 확인, 대상 기억 시험에 대한 열등한 수행, 및 취미나 재정관리 등의 일상의 업무, 돌발사태의 취급 혹은 개인적인 위생에 대한 참여를 수행하는 능력의 어떠한 변화도 포함한다.

[0012] 이들 연구의 다수에 있어서 제어할 필요가 있는 하나의 인자는 우울증이었는 바, 그 이유는 우울증을 지닌 많은 환자들이 또한 그들의 기억에 대해서 호소하고 있었기 때문이다. 수개의 연구는 뇌의 영상에 대한 위축증(수축) 혹은 감소된 대사작용의 소정의 측정치(PET 혹은 MRI 스캔)가 장래에 치매로 발전할 기회가 증가하는 것을 제안하고 있었다.

[0013] 이들 상기 인자들이 치매로 발전할 기회를 증가시키고 있지만, MCI 환자가 치매로 발전할지 혹은 발전하지 않을지의 확실성을 예측하는 것은 현재 가능하지 않다. 따라서, 이들 대책의 다수, 특히 뇌 영상으로부터의 측정치는 여전히 연구에 대해서만 유용한 것으로 간주되고 있다.

[0014] 지적 능력의 점진적인 상실에 대해서 가장 널리 알려진 하나의 신경계 장애는 알츠하이머병(AD: Alzheimer's disease)이다. 전세계적으로 약 2천만명이 알츠하이머병을 앓고 있다. AD는 임상적으로 기억의 초기 상실에 이어서 방향감 장애, 판단 및 추론의 손상(이것은 통상 인지장애라 지칭됨), 그리고 궁극적으로 완전 치매를 특징으로 한다. AD 환자는 마지막으로 질병의 발병 이후로 4년 내지 12년 사이에 심하게 쇠약화된 부동의 상태에

빠지게 된다.

[0015] AD에 대한 주된 병적 증거는 뇌 속의 세포외 아밀로이드 플라크와 세포내 타우 덩어리(tau tangle)의 존재이며, 이들은 신경세포 변성과 연관된다(Ritchie and Lovestone (2002)). 세포외 아밀로이드 플라크는 아밀로이드-베타 전구체 단백질(APP: amyloid-beta precursor protein)의 대사작용에 의해 생산된 불용성 아밀로이드 베타 펩타이드 1-42의 증가에 기인하는 것으로 여겨진다. β, γ 분비 후, 이들 아밀로이드 베타 1-42 펩타이드는, 건강한 사람에 있어서 지배적으로 생산되는 아밀로이드 베타 1-40 펩타이드보다 더욱 용이하게 아밀로이드 원섬유(amyloid fibril)를 형성한다. 이것은 아밀로이드 베타 펩타이드가 신경 독성 캐스케이드 위에 있는 것으로 나타나며, 즉, 실험은, 아밀로이드 베타 원섬유가, P301 L 타우 형질전환(transgenic) 마우스의 뇌 속에 주입된 경우, 신경원섬유 매듭의 형성을 증가시키는 것을 보인다(Gotz *et al*. (2001)). 사실상, 각종 아밀로이드 베타 펩타이드가 아밀로이드 베타 펩타이드 1-42, 1-40, 1-39, 1-38, 1-37로서 확인되었고, 이들은 플라크에서 발견될 수 있고, 또한 뇌의 척수액 속에서도 발견된다.

[0016] 아밀로이드 베타 펩타이드는 위치 671 및 711 혹은 713에서 각각 베타 분비효소 및 감마 분비효소에 의한 분열 후 막 고착된 APP로부터 발생(혹은 처리)된다. 또한, 베타 분비효소의 높은 활성으로 인해 위치 1 내지 위치 11에서 분열의 이동이 일어난다. 알파 분비효소 활성에 의한 아밀로이드-베타 전구체 단백질의 분열은 Aβ1-17을 발생하고, 40 혹은 42에서의 감마 분비효소 활성은 비병적 p3 펩타이드를 발생한다. 베타 분비효소는 막 고착된 아스파틸 프로테아제 BACE로서 확인된 반면, 감마 분비효소는 프레세닐린(Presenilin) 1(PS1) 혹은 프레세닐린 2(PS2), 니카스트린(nicastrin), APH1(Anterior Pharynx Defective 1) 및 프레세닐린 인핸서(Presenilin Enhancer) 2(PEN2)를 포함하는 단백질 복합체이다. 이들 단백질 중, 프레세닐린은 감마 분비효소의 촉매 활성을 구성하는 것으로 널리 여겨지고 있는 반면, 다른 성분은 상기 복합체의 성숙과 국소화의 역할을 한다. 알파 분비효소의 동질성은 여전히 유명하지만, 몇몇 결과는 용장 기능을 지닐 수 있었던 프로테아제 ADAM 10 및 TACE의 경향을 보인다.

[0017] 작은 부분의 AD 케이스(대부분 초기 발병 AD)는 프레세닐린 1 및 2(PS1; PS2) 및 아밀로이드-베타 전구체 단백질(APP)을 코드화하는 유전자에서 상염색체 우성 변이에 의해 초래되며, 이것은 APP, PS1 및 PS2에서의 변이가 뇌에서 생산되는 아밀로이드 베타 1-42의 이러한 증가된 수준으로 유도하는 아밀로이드-베타 전구체 단백질의 대사작용을 변화시키는 것으로 나타났다. PS1, PS2 및 아밀로이드-베타 전구체 단백질에서의 변이가 나중에 발병한 AD 환자에서 확인되지 않았지만, 병적 특성은 조기에 발병한 AD 환자와 고도로 유사하다. 이들 증가된 수준의 아밀로이드 베타 펩타이드는 교란된 아밀로이드-베타 전구체 단백질 처리(예컨대, 높은 콜레스테롤 수준이 아밀로이드 베타 펩타이드 생산을 증강시킴)로부터 혹은 감소된 아밀로이드 베타 펩타이드 이화작용으로부터 노화에 따라 점진적으로 기인될 수 있었다. 따라서, 나중에 발병한 AD 환자에서의 AD는 또한 뇌에서의 비정상적으로 증가된 아밀로이드 펩타이드 수준에 의해 초래되는 것도 일반적으로 받아들여지고 있다. 이들 아밀로이드 베타 펩타이드, 특히 아밀로이드-베타 펩타이드 1-42의 수준은 건강한 사람에서의 이들 펩타이드의 수준과 비교해서 알츠하이머 환자에서 증가된다.

발명의 내용

[0018] 본 발명은 인지장애를 지닌 인간 혹은 동물을 치료하는 물질 혹은 방법을 제공하되, 해당 방법은 혈액 뇌장벽을 횡단(cross)할 수 있는 염증 매개체(inflammatory mediator)를 유효량 투여하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 염증 매개체는 신경 보호 작용을 발휘하고/하거나 뇌 속의 인지 반응의 증가를 제공한다. 본 발명의 범위 내로 상정되는 염증 매개체는, fms-관련 티로신 키나제 3(Flt3: fms-related tyrosine kinase) 리간드, 인터루킨-6(IL-6), 대식세포 이동저지인자(MIF: macrophage migration inhibitory factor), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-3(IL-3), 에리트로포이에틴(EPO: erythropoietin), 혈관 내피 성장인자 A(VEGF-A: vascular endothelial growth factor-A), 저산소증-유발성 전사인자(hypoxia-inducible transcription factor)(HIF-1알파), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1: insulin like growth factor-1), 종양 괴사 인자(TNF: tumor necrosis factor), 과립구 집락자극인자(G-CSF: granulocyte colony stimulating factor), 과립구/대식세포 집락자극인자(GM-CSF: granulocyte/macrophage colony stimulating factor), 대식세포 집락자극인자(M-CSF: macrophage colony-stimulating factor), 줄기 세포 인자(SCF: Stem Cell Factor), 다베포에틴(Darbepoetin)(ARANESP) 및 금속단백분해효소를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일 실시형태에서, 염증 매개체는 GM-CSF, 또는 그의 기능성 단편 혹은 변이체이다. 구체적인 실시형태에서, 인지장애는 알츠하이머병에 의해 야기되거나 해당 알츠하이머병으로부터 초래된다. 또한, 포유동물에서의 GM-CSF 생산을 유발하는 능력을 지니고 이어서 뇌 속의 인지 반응의 증가에 영향을 미치는 화합물이 본 발명에 따라 이용될 수 있는 것으로 상정된다. 일 실시형태에서,

염증 매개체는 인간 혹은 동물의 비신경(non-neural) 세포 혹은 조직에 투여 혹은 전달된다.

[0019] 또, 본 발명은, 인지 기능과 연관된 기억 문제, 혹은 관련된 치매를 지니는 인간 혹은 동물에서의 인지장애의 진행을 저감 혹은 억제하기 위한 방법으로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 염증 매개체를 유효량 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020] **도 1 및 도 2**는 마우스에서의 인지 질환 행동 시험에 대한 전형적인 방사상 아암 워터 미로 장치(radial arm water maze device)의 사진으로, 도 1은 해당 장치를 위에서 내려다본 때의 미로의 개략도이고, 도 2는 동물의 행동 시험에 이용되는 상기 장치 자체를 나타낸 도면;

도 3 및 도 4는 GMCSF 간섭 시험- 블록 1(도 3) 및 블록 2(도 4)를 도시한 도면;

도 5a 및 도 5b는 마우스의 해마 내의 불용성 아밀로이드 베타 수준의 저감을 도시한 도면이고, **도 5c**는 GM-CSF의 혈장 농도의 증가에 따른 마우스의 해마에서의 가용성 아밀로이드 베타 수준의 증가를 도시한 도면;

도 6a는 GM-CSF(좌측 반구) 및 aCSF(우측 반구)의 해마내 주입을 도시한 도면으로, 14㎛에서 동결절편화되어 MabTech α-Aβ/Alexa 546으로 염색된 관상 조직을 나타내고, 화상은 10배로 촬영된 약 145 사진의 몽타주이며, 백색 반점은 아밀로이드 플라크 면역표지화를 나타내고(모두 4마리의 마우스의 대표적인 몽타주 구역에 대해서는 도 13a 내지 도 13d 참조), **도 6b**는 마우스당 5개의 정량화된 절편(section)으로부터 상정된(n = 4 마우스), 측정된 4 플라크 파라미터 모두에서 보여지는 전체적인 플라크 저감을 나타낸 도면으로, 에러 바는 ±SEM이고, 통계학적 유의성은 P값으로 쌍을 이룬 스튜던트의 t-검정에 의해 얻어진 것임(면적: P < 1.11E-07; 둘레값(Perimeter value): P < 1.41E-06; 페레트 직경(Feret Diameter): P < 2.36E-09; 적분 밀도(Integrated Density): P < 1.11E-07);

도 7a 내지 도 7f는 매일 피하 GM-CSF 주입 후의 행동 분석을 나타낸 도면으로, 도 7a 내지 도 7d는 표준 방사상 아암 워터 미로 에러를 도시하며, 개별 시험 블록(도 7a 및 도 7b)에서 그리고 4일 전체의 시험에 걸쳐서(도 7c 및 도 7d) NT 대조 마우스(n = 8)에 비해서 작업 기억 시도 T4 및 T5에 대해서 Tg 대조 마우스(n = 8)에서 실질적인 장애를 보인다. GM-CSF-처치된 Tg 마우스(n = 7)는 개별 블록 및 전체 동안 작업 기억 시도 T4 및 T5에 대해서 NT 대조 마우스처럼 양호 혹은 보다 양호하게 수행되었으며, GM-CSF-처리된 NT 마우스(n = 9)는 NT 대조군과 유사 혹은 약간 양호하게 수행되었지만(단, 도 7a의 블록 1의 T4에 대해서 NT+GMCSF군 대 NT군이 유의하게 보다 양호한 수행을 보임), 이 효과는 전체적으로 유의한 것은 아니었다. 통계학적 유의성은 일방향 ANOVA(**P < 0.05 이상의 유의성 대 모든 다른 군; ‡P < 0.05 이상의 유의성 대 Tg+GM-CSF 및 NT+GM-CSF)에 의해 결정되었다. 도 7e는 인지 간섭 과업(Cognitive Interference Task)을 나타내며, 전체(4일)는 측정된 모두 4가지 인지 척도에 대해서 NT 마우스에 비해서 Tg 대조 마우스가 손상된 것을 나타낸다. GM-CSF-처치된 Tg 마우스는 Tg 대조군에 비해서 유의하게 양호한 3-시도 회상(A1-A3)과 지연된 회상(A5)을 나타내었고, 전체 4가지 인지 척도에서 NT 마우스와 유사하게 수행되었다. NT 마우스의 GM-CSF 처치는 NT 대조군에 비해서 유의하게 양호한 수행으로 되지 않았지만, NT 마우스의 유익한 GM-CSF 효과에 대한 경향은 전체적으로 명백하였다. 통계학적 유의성은 일방향 ANOVA에 의해 결정되었다(*Tg는 NT+GM-CSF와는 유의하게 상이하고, **Tg는 모든 다른 군과는 유의하게 상이함). 도 7f는 인지 간섭 과업으로서 순방향 간섭 시험(proactive interference testing)(첫번째 2일)을 나타낸다. GM-CSF-처치된 Tg 마우스는 Tg 대조군보다 유의하게 양호하였고 NT 및 GM-CSF-처치된 NT 마우스와 동등하게 수행되었다. 통계학적 유의성은 일방향 ANOVA에 의해 결정되었다(**P < 0.05 이상의 유의성 대 모든 다른 군).

도 8a 내지 도 8e는 피하 GM-CSF-주입된 마우스에서의 아밀로이드 침착(amyloid deposition)을 나타낸 도면으로, 도 8a 내지 도 8d는 항 αβ 항체(클론 4G8)로 면역표지된 관상 5㎛ 파라핀-매립된(paraffin-embedded) 절편의 현미경 사진임. 이들 사진은 GM-CSF- 혹은 식염수-처치된 Tg 군의 평균에 가장 가까운 아밀로이드 부하를 나타낸다. 스케일 바 = 50㎛. 도 8e는 GM-CSF-처치된 마우스(n = 5) 대 식염수-처치된 마우스(n = 6) 당 평균 5개의 절편으로부터의 아밀로이드 부하%를 도시한다. 통계학적 유의성은 2-꼬리부착 등분산적 스튜던트의 t-검정(wo-tailed homoscedastic Student's t-test)에 의해 결정되었다: 후각뇌피질(Entorhinal cortex)(*P < 0.026), 해마(P = 0.12).

도 9a 내지 도 9e는 피하 GM-CSF-주입된 마우스에서의 시냅토파이신 면역염색(synaptophysin immuno염색)을 도시한 도면이다. 도 9a 내지 도 9d는 항-시냅토파이신 항체로 면역표지된 관상 5㎛ 파라핀-매립된 절편의 현미경 사진이며, 이들 사진은 GM-CSF- 혹은 식염수-처치된 군의 평균에 가장 가까운 시냅토파이신 면역표지를 나타

낸다. 스케일 바 = 50㎛. 도 9e는 GM-CSF-처치된 마우스(n = 5) 대 식염수-처치된 마우스(n = 6) 당 평균 5 절편으로부터의 시냅토파이신 면역반응성의 퍼센트를 나타낸다. 수치적으로 작기는 하지만, 두 군 간의 차이는 2-꼬리부착 등분산적 스튜던트의 t-검정에 의해 통계학적으로 유의하였다: CA1($P < 0.0013$), CA3($P < 0.0023$).

도 10은 M-CSF의 양측 icv 주입(intracerebroventricular infusion) 후 유사한 나이(태어난 날에 따라 순차적으로 세어서)의 PS/APP 마우스들 간의 아밀로이드 플라크 적재의 유의한 변화를 도시한 도면. 마우스 번호 148, 160, 171 및 211은 M-CSF를 공급받았고, 마우스 번호 164, 170, 176 및 177은 aCSF를 공급받았다. 주입 후 2주 지나, 14㎛에서 동결절편화하였고 6E10/Alexa 488 및 헥스트(Hoechst)로 염색하였다. 밝은 녹색 반점은 아밀로이드 플라크를 나타낸다. 사진은 5배로 촬영되었다.

도 11a 내지 도 11c는 M-CSF(좌측 반구) 및 aCSF(우측 반구)의 해마내 주입을 나타낸 도면으로, 도 11a에서, 화상은 ~145 10배 사진의 몽타주이며, 4 M-CSF-주입된 마우스 모두에서 앞쪽 해마에서 뒤쪽으로 본 효과를 나타낸다. M-CSF-주입된 반구는 반구 간에 아밀로이드 침착의 차이를 보이지 않는다. 도 11b는 식염수 관류 후에 보여지는 바와 같이, M-CSF-주입된 좌측 반구의 확대도를 나타낸다. 단, 주입 부위에 작은 융기가 있다. 도 11c는 M-CSF 주입 부위에서 침 트랙에 형성된 낭종 혹은 종양 유사 성장물을 나타낸 화상으로, 14㎛에서 동결절편화되어 6E10/Alexa 488 및 헥스트(Hoechst)로 염색되었다. 밝은 녹색 염색은 비특이적이며 아밀로이드 플라크를 나타내지 않는다. 사진은 20배로 촬영되었다.

도 12a 및 도 12b는 G-CSF(좌측 반구) 및 aCSF(우측 반구)의 해마내 주입을 도시한 것으로, 아밀로이드 플라크는 백색 반점으로 표시되었다. 뇌는 약간 비스듬히 절단되었지만, 아밀로이드 플라크의 시각적 관찰은 좌측 G-CSF-주입된 반구를 통한 대체적인 감소를 나타낸다. 14㎛에서 동결절편화되었고, 6E10/IR800로 염색되었다. Licor Odyssey 상에서 스캔되었고, 가시화를 위하여 확대되었다. 1에서 6으로 번호 붙인 구역은 앞에서 뒤쪽으로 대응한다.

도 13a 내지 도 13d는 GM-CSF(좌측 반구) 및 aCSF(우측 반구)의 해마내 주입을 도시한 것으로, 주입 부위에 인접한 각 마우스의 절편을 나타낸다. 조직 절편은 MabTech α-Aβ/Alexa 488로 염색되었다. 백색 반점은 아밀로이드 플라크 면역표지화를 나타낸다. 화상은 10배로 촬영된 약 145개의 사진의 몽타주이다. 도 13a 내지 도 13c는 14㎛ 동결 절편으로부터 얻어진 것이고, 도 13d는 5㎛ 파라핀-매립된 절편으로부터 얻어진 것이다.

도 14a 내지 도 14f는 GM-CSF-주입된 좌측 반구 대 aCSF-주입된 반대쪽에 위치된 우측 반구 내의 저감된 아밀로이드 침착물의 정량화를 도시한 것으로, 정량화된 마우스당 5개의 절편이 있었다. 각 몽타주화된 절편은 이들의 140개의 10배 사진에 포함되었고, 반구당 15 - 25개의 사진이 정량화하기 위해 선택되었다. 절편당 모든 사진은 Axiovision 4.7 소프트웨어를 이용해서 Zeiss Axiocam Mrm 카메라(Oberkochen, Germany)를 구비한 Zeiss Imager.Z1 형광 현미경 상에서 동일 노출에서 촬영되었다. 각 도면은 개별적인 마우스 및 전체 당 유의성을 지닌 5 절편/마우스로부터의 총 혹은 평균치를 나타낸다. 에러 바는 ±SEM이다: (도 14a-도 14b) 플라크 면적 (도 14c-도 14d) 둘레 값 (도 14e) 평균 페레트 직경 (도 14f) 평균 적분 밀도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 인지장애를 지닌 인간 혹은 동물을 치료하는 방법을 제공하되, 해당 방법은 혈액 뇌장벽을 횡단할 수 있는 1종 이상의 염증 매개체, 또는 해당 염증 매개체(들)를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드(들)(염증 매개체가 폴리펩타이드인 경우), 또는 상기 염증 매개체(들) 혹은 폴리뉴클레오타이드(들)를 포함하는 조성물을 유효량 인간 혹은 동물에 투여하는 단계를 포함한다. 인지장애는 진행성 인지장애일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 인지장애는 알츠하이머병에 의해 야기되거나 해당 알츠하이머병으로부터 초래된다. 일 실시형태에서, 인지장애는 뇌졸중, 다운 증후군, 권투선수 치매(dementia pugilistica), 외상성 뇌손상, AIDS-연관 치매, 레비소체병(Lewy body disease) 또는 피크 병(Pick's disease)에 의해 야기되거나 이들로부터 초래된다. 일 실시형태에서, 염증 매개체는 신경 보호 작용을 발휘하고/하거나 뇌에서의 인지 반응의 증가를 제공한다. 일 실시형태에서, 염증 매개체, 또는 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드는 인간 기원 혹은 서열이다.

[0022] 본 발명의 범위 내로 상정되는 염증 매개체는, fms-관련 티로신 키나제 3(Flt3) 리간드, 인터루킨-6(IL-6), 대식세포 이동저지인자(MIF), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-3(IL-3), 에리트로포이에틴(EPO), 혈관 내피 성장인자 A(VEGF-A), 저산소증-유발성 전사인자(HIF-1알파), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1), 종양 괴사 인자(TNF), 과립구 집락자극인자(G-CSF), 과립구/대식세포 집락자극인자(GM-CSF), 대식세포 집락자극인자(M-CSF), 줄기 세포 인자(SCF), 다베포에틴(ARANESP) 및 금속단백분해효소, 또는 전체-길이(full-length) 혹은 비변이(non-variant)

염증 매개체와 실질적으로 동일한 생물학적 활성(biological activity)을 발휘하는 그의 기능성 단편 혹은 변이체를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 전형적으로, 인간에서의 인지장애를 치료하기 위하여, 염증 매개체는 인간 단백질 혹은 이를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열을 지닐 것이다. 본 명세서에 기재된 염증 매개체의 인간 서열은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, GenBank의 등록번호 NM_013520.3, NM_000799.2, NM_000759.2, M11220.1, NM_181054.2, NG_011713.1, NG_008851.1, NM_000588.3, NG_011640.1, NM_000757.4, NG_012099.1, NM_004530.4, NG_011468.1, NG_007462.1 및 NG_008732.1). 일 실시형태에서, 염증 매개체는 GM-CSF, 또는 GM-CSF 생물학적 활성을 발휘하는 그의 기능성 단편 혹은 변이체이다. 구체적인 실시형태에서, GM-CSF는 인간 GM-CSF이다. 일 실시형태에서, GM-CSF 및 다베포에틴 및/또는 EPO는 인지장애를 치료하기 위한 본 발명의 방법에서 투여된다. 다른 실시형태에서, G-CSF 및 다베포에틴 및/또는 EPO이 투여된다. 또한, 포유동물에서 본 발명의 염증 매개체, 예컨대, 그 결과로서 뇌에서의 인지 반응을 증가시키는 작용을 하는 GM-CSF 등의 생산을 유발시킬 수 있는 화합물이 본 발명에 따라 이용될 수 있다는 것이 상정된다. 이러한 화합물의 예로는, EPO 및 HIF-1(Fisher (2003))을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일 실시형태에서, 염증 매개체는 인간 혹은 동물의 비신경 조직에 투여 혹은 전달된다.

[0023] 일 실시형태에서, 본 발명의 염증 매개체, 또는 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 해당 염증 매개체 혹은 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 조성물은, 피하 혹은 관통 주입, 두개 내, 경구, 비경구, 비내, 흡입, 경막내, 근육내, 설하 혹은 이러한 요법을 필요로 하는 인간 혹은 동물에 대한 약물전달의 기타 공지된 허용가능한 방법으로 유효량 전달된다.

[0024] 본 발명은 또한 인지장애와 관련된 기억 문제 및 관련된 치매를 지닌 인간 혹은 동물에서의 인지장애의 진행을 감소 혹은 억제하기 위한 방법에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 염증 매개체, 또는 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 해당 염증 매개체 혹은 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 조성물을 유효량 인간 혹은 동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] 본 발명의 염증 매개체의 생체내 응용에 있어서, 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 이들을 포함하는 조성물은 당업자에게 현재 혹은 장래에 공지된 임의의 적절한 기술과 방법에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 화합물은 생리학적으로 혹은 약제학적으로 허용가능한 형태로 제형화될 수 있고, 당업계에 공지된 임의의 적절한 경로, 예를 들어, 구강, 코, 직장 및 투여의 비경구적 경로 등에 의해 투여될 수 있다. 여기서 이용되는 바와 같이, 비경구란 용어는 주사를 이용하는 등에 의한 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 복강내 및 흉골내측 투여를 포함한다. 본 발명의 대상인 염증 매개체의 투여는, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있는 바와 같이, 단일 투여, 또는 연속 혹은 별개의 간격으로 실시될 수 있다.

[0026] 본 발명의 염증 매개체, 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 및 이들을 포함하는 조성물은 리포좀 기술, 서방성 캡슐, 매립식 펌프 및 생분해성 용기를 이용해서 투여될 수도 있다. 이들 전달 방법은 유리하게는 연장된 기간에 걸쳐 균일한 용량을 제공할 수 있다. 본 발명의 염증 매개체는 그들의 염 유도체 형태 혹은 결정 형태로 투여될 수도 있다.

[0027] 본 발명의 염증 매개체 및 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드는 생리학적으로 허용가능한 및/또는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 제조하는 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 제형은 당업자에게 충분히 공지되고 용이하게 입수가능한 다수의 공급원에 대해 상세히 설명된다. 예를 들어, 문헌[*Remington's Pharmaceutical Science* by E.W. Martin]은 본 발명과 관련하여 이용될 수 있는 제형을 기재하고 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물은, 해당 조성물의 효율적인 투여를 용이하게 하기 위하여 유효량의 화합물을 적절한 담체와 조합하도록 제형화될 것이다. 본 방법에 이용되는 조성물은 또한 다양한 형태일 수 있다. 이들은 예를 들어 고형, 반고형 및 액체 투약 형태, 예컨대, 정제, 환제, 산제, 액체 용액 혹은 현탁제, 좌제, 주사 및 주입가능한 용액, 및 스프레이를 포함한다. 바람직한 형태는 의도된 투여 모드 및 치료적 응용에 의존한다. 상기 조성물은 또한 바람직하게는 당업자에게 공지된 종래의 생리학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 화합물과 함께 이용하기 위한 담체 혹은 희석제의 예로는 에탄올, 다이메틸 설폭사이드, 글라이세롤, 알루미나, 전분, 식염수, 및 등가의 담체 및 희석제를 들 수 있다. 원하는 치료적 처치를 위한 이러한 투약량의 투여를 제공하기 위하여, 본 발명의 조성물은 담체 혹은 희석제를 포함하는 전체 조성물의 중량에 의거해서 본 발명의 염증 매개체의 1종 이상의 합계를 약 0.1% 내지 99%, 특별히 1 내지 15중량% 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 염증 매개체, 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 및 이들을 포함하는 조성물은 세포와의 직접적인 접촉을 통해서 혹은 담체(캐리어) 수단을 개재해서 세포에 전달될 수 있다. 염증 매개체 및 조성물을 세포에 전달하는 담체 수단은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 리포솜 모이어티(moiety) 내에 해

당 조성물을 캡슐화한 것을 포함한다. 본 발명의 염증 매개체 및 조성물을 세포에 전달하는 다른 수단은 표적 세포에 전달하기 위하여 표적화된 단백질 혹은 핵산에 해당 염증 매개체를 부착시키는 것을 포함한다. 미국 특허 제6,960,648호 공보 및 미국 특허 출원 공개 제20030032594호 및 제20020120100호 공보는 다른 조성물에 결합될 수 있고, 생물학적 막을 가로질러 조성물을 이전시킬 수 있는 아미노산 서열을 개시하고 있다. 미국 특허 공개 제20020035243호 공보도 세포내 전달을 위한 세포막을 가로질러 생물학적 모이어티를 수송하는 조성물을 기재하고 있다. 염증 매개체는 또한 폴리머 내에 편입될 수 있으며, 이때의 폴리머의 예로는 두개내 전달용의 폴리(D-L 락타이드-코-글라이콜라이드) 폴리머; 폴리[비스(p-카복시페녹시)프로판:세바스산](몰비 20:80)(GLIADEL에 사용됨); 콘드로이틴; 키틴; 및 키토산을 들 수 있다.

[0029] 본 발명의 염증 매개체 및 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드는 그 자체로 투여될 수 있지만, 이들 염증 매개체는 또한 약제학적 조성물의 일부로서 투여될 수도 있다. 이와 같이 해서, 본 발명은 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 담체와 연관하여 1종 이상의 염증 매개체를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 해당 약제학적 조성물은 장관, 비경구, 정맥내, 근육내, 국소, 피하 등등의 각종 투여경로에 대해서 적합화되어 있을 수 있다. 투여는 당업자에 의해 결정될 수 있는 바와 같은 연속적으로 혹은 별개의 간격으로 실시될 수 있다.

[0030] 염증 매개체 및 이들을 코드화하는 폴리뉴클레오타이드의 투여에 적합한 기타 제형은, 예를 들어, 산화방지제, 완충제, 세균발육 억제제, 및 의도된 수용체의 혈액과 등장성인 제형을 부여하는 용질을 함유할 수 있는 수성 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 상기 제형은 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알 등과 같은 단일 투약량 혹은 다회 투약량 용기에 제공될 수 있고, 사용 전에, 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용수의 조건만을 필요로 하는 동결건조(냉동 건조) 조건에서 보존될 수 있다. 임시 주사 용액 및 현탁액은 멸균 산제, 과립, 정제 등으로부터 조제될 수 있다. 본 발명의 조성물은, 위에서 특별히 언급된 성분 이외에, 당해 제형의 유형과 관련하여 당업계에서 통상적인 기타 제제를 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 염증 매개체, 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 및 이들의 조성물은 경우에 따라 불활성 희석제 등과 같은 약제학적으로 허용가능한 담체와 병용하여 하나 이상의 해부학상 부위에서 국소적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 염증 매개체 및 이들의 조성물은 경우에 따라 불활성 희석제, 또는 경구 전달용의 융합가능한 식용 담체 등과 같은 약제학적으로 허용가능한 담체와 병용하여 정맥내 혹은 경구 등의 방식으로 전신에 투여될 수 있다. 이들은 경질 혹은 연질 셸 젤라틴 캡슐 내에 둘러싸여 있을 수 있거나, 정제 내에 압축되어 있을 수 있거나, 혹은 환자의 식사의 음식물과 함께 직접 내포될 수도 있다. 경구 치료적 투여를 위하여, 염증 매개체는 하나 이상의 부형제와 병용될 수 있고, 삼킬 수 있는 정제, 구강정, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현택액, 시럽, 웨이퍼, 에어로졸 스프레이 등의 형태로 이용될 수 있다.

[0032] 정제, 트로키, 환제, 캡슐 등은 또한 이하를 함유할 수 있다: 트래거캔스 검, 아카시아, 옥수수 전분 혹은 젤라틴 등의 바인더; 인산이칼슘 등의 부형제; 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등의 붕해제; 스테아르산 마그네슘 등의 윤활제; 수크로스, 프럭토스, 락토스 혹은 아스파탐 등의 감미제 또는 박하, 동록유 혹은 체리향 등의 향미제 등이 첨가될 수 있다. 단위 투약량 형태가 캡슐인 경우, 상기 유형의 물질 이외에, 식물성 기름 혹은 폴리에틸렌 글라이콜 등의 액체 담체를 함유할 수 있다. 각종 기타 물질이 코팅으로서 존재할 수 있거나 혹은 다르게는 고형의 단위 투약량 형태로 물리적 형태를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제 혹은 캡슐은 젤라틴, 왁스, 셸락 혹은 당 등으로 코팅되어 있을 수 있다. 시럽 혹은 엘릭시르는 활성 화합물, 감미제로서의 수크로스 혹은 프럭토스, 방부제로서의 메틸 프로필파라벤, 체리 혹은 오렌지향으로서 건조 향미제를 함유할 수 있다. 물론, 임의의 단위 투약량 형태를 준비하는 데 이용되는 기타 물질은 이용되는 양으로 실질적으로 비독성이고 약제학적으로 허용가능할 필요가 있다. 또한, 활성 화합물은 서방성 제제 및 기구 내에 편입되어 있을 수도 있다.

[0033] 염증 매개체, 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 약제학적으로 허용가능한 염 혹은 그의 유사체를 포함하는 본 발명의 조성물은 정맥내, 근육내 혹은 복막내에 주입 혹은 주사에 의해 투여될 수 있다. 활성제 혹은 그의 염의 용액은 경우에 따라 비독성 계면활성제와 혼합된 물로 조제될 수 있다. 분산액은 글라이세롤, 액체 폴리에틸렌 글라이콜, 트라이아세틴 및 이들의 혼합물 및 오일로 조제될 수 있다. 보존 및 사용의 통상의 조건 하에, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하는 방부제를 함유할 수 있다.

[0034] 주사 혹은 주입에 적합한 약제학적 투약량 형태는 즉석 제조되는 멸균 주사가능 또는 주입성 용액 또는 분산액으로 개조되고, 경우에 따라 리포좀에 캡슐화되는 활성 성분을 함유한 멸균 수용액 또는 수성 분산액 또는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 최종 투약량 형태는 제조 및 보관 조건 하에 멸균성, 유동성 및 안정성이어야 한다.

액상 담체 또는 비히클은 예컨대 물, 에탄올, 폴리올(예, 글라이세롤, 프로필렌 글라이콜, 액상 폴리에틸렌 글라이콜 등), 식물성 기름, 비독성 글라이세릴 에스터 및 이의 적당한 혼합물 등을 포함하는 용매 또는 액상 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예컨대 리포좀 형성에 의해, 분산액인 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 경우에 따라, 미생물 작용 방지는 다양한 기타 항세균제 또는 항진균제, 예컨대 파라벤, 클로로뷰탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 야기될 수 있다. 대부분의 경우에는 당, 완충액 또는 염화나트륨과 같은 등장제를 첨가하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능 조성물의 연장된 흡수는 흡수 지연 제제, 예컨대 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴의 내포에 의해 야기될 수 있다.

[0035] 멸균 주사가능 용액은 본 발명의 염증 매개체를 필요에 따라 앞에서 열거한 다양한 여타 성분들과 함께 적당한 용매에 필요한 양만큼 첨가한 뒤, 여과 멸균하여 제조한다. 멸균 주사가능 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이며, 결과적으로 전술한 멸균 여과된 용액에 존재하는 활성 성분과 임의의 바람직한 추가 성분의 분말이 수득된다.

[0036] 국소 투여하기 위해, 본 발명의 염증 매개체 및 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드는 액체 또는 고체로서 적용될 수 있다. 하지만, 일반적으로 고체 또는 액체일 수 있는 피부학적으로 허용되는 담체와 함께 조성물로 피부에 국소 투여되는 것이 바람직할 것이다. 염증 매개체는 연고, 크림, 로션, 용액, 팅크제(tincture) 등과 같은 제형으로 적용될 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,167,649호 공보에 기술된 것과 같은 피부 병변에 약리학적 물질을 전달하기 위한 약물 전달 시스템을 사용할 수도 있다.

[0037] 유용한 고체 담체로는 탤크, 점토, 미세결정형 셀룰로스, 실리카, 알루미나 등과 같은 미분쇄된 고체를 포함한다. 유용한 액체 담체로는 화합물이 유효 수준으로, 경우에 따라 비독성 계면활성제의 도움을 받아 용해 또는 분산되는 물, 알코올 또는 글라이콜 또는 물-알콜/글라이콜 배합물을 포함한다. 방향제 및 추가 항미생물제와 같은 보조제는 주어진 용도의 성질을 최적화하기 위해 첨가될 수 있다. 수득되는 액체 조성물은 붕대 및 기타 드레싱을 함침시키는데 사용되는 흡수제 패드로부터 적용되거나, 또는 예컨대 펌프형 또는 에어로졸 분무기를 사용해서 환부에 분무될 수 있다.

[0038] 증점제, 예컨대 합성 중합체, 지방산, 지방산 염 및 에스터, 지방 알코올, 변성 셀룰로스 또는 변성 무기 재료는 또한 사용자의 피부에 직접 적용하기 위한 도포성 페이스트, 겔, 연고, 비누 등을 제조하기 위해 액체 담체와 함께 사용될 수 있다. 염증 매개체를 피부로 전달하는 데 사용될 수 있는 유용한 피부학적 조성물의 예는 미국 특허 제4,608,392호 공보; 미국 특허 제4,992,478호 공보; 미국 특허 제4,559,157호 공보; 및 미국 특허 제4,820,508호 공보에 개시되어 있다.

[0039] 본 발명의 염증 매개체, 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 및 약제학적 조성물의 유용한 투약량은 시험관내 활성과 동물 모델에서의 생체내 활성을 비교하여 결정할 수 있다. 마우스 및 기타 동물의 유효 투약량을 사람에게 외삽시키는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대 미국 특허 제4,938,949호 공보를 참조할 수 있다.

[0040] 또, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체와 병용하여 본 발명의 염증 매개체, 또는 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 일정량의 화합물을 포함하는 경구, 국소 또는 비경구 투여용으로 개조된 약제학적 조성물은 본 발명의 바람직한 실시형태를 구성한다. 본 발명의 상황에서 환자, 특히 사람에게 투여되는 투약량은 치명적 독성 없이, 바람직하게는 부작용이나 유병률을 허용되는 수준 이상으로 유발시킴이 없이, 적당한 시간 프레임 동안 환자에 있어서 치료학적 반응을 달성하기에 충분해야 한다. 당업자라면, 대상체의 병태(건강), 대상체의 체중, 병행 치료의 종류(존재한다면), 치료 빈도, 치료 비율뿐만 아니라 병리학적 상태의 중증도 및 단계를 비롯한 다양한 요인에 따라 투약량이 달라진다는 것을 인지하고 있을 것이다.

[0041] 몇몇 실시형태에서, 원하는 치료적 처치를 위한 이러한 투약량의 투여를 제공하기 위하여, 본 발명의 약제학적 조성물은 담체 또는 희석제를 포함하는 총 조성물의 중량에 의거해서 하나 이상의 화합물의 총합의 약 0.1 내지 45중량%, 특히 1 내지 15중량%일 수 있다. 예시적으로, 투여되는 활성 성분의 투약량 수준은 정맥내 0.01 내지 약 20㎎/㎏ 동물 중량(체중); 복강내 0.01 내지 약 100㎎/㎏; 피하 0.01 내지 약 100㎎/㎏; 근육내 0.01 내지 약 100㎎/㎏; 경구 0.01 내지 약 200㎎/㎏, 바람직하게는 약 1 내지 100㎎/㎏; 비내 점적주입 0.01 내지 약 20㎎/㎏; 에어로졸 0.01 내지 약 20㎎/㎏일 수 있다.

[0042] 본 발명은 또한 본 발명의 염증 매개체를 코드화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 발현 구조체(expression construct)에 관한 것이다. 일 실시형태에서,

폴리뉴클레오타이드는 인간 GM-CSF, 또는 전체-길이 혹은 비변이 GM-CSF와 실질적으로 동일한 활성을 발휘하는 그의 단편 혹은 변이체를 코드화한다.

[0043] 여기서 이용되는 바와 같이, "발현 구성체"란 용어는 작동적으로 연결된 핵산 서열의 전사를 제공하는 핵산 서열의 조합을 의미한다. 여기서 이용되는 바와 같이, "작동적으로 연결된"이란 용어는 설명된 성분들의 병치를 의미하며, 여기서 해당 성분들은 그들의 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있다. 일반적으로, 작동적으로 연결된 성분들은 인접한 관계에 있다.

[0044] 본 발명의 발현 구조체는 또한 일반적으로 발현 구조체가 발현될 의도된 숙주 세포에 작용성이 있는 조절 요소를 포함할 것이다. 이와 같이 해서, 당업자는 예를 들어 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 포유동물 숙주 세포 및 인간 숙주 세포에 이용하기 위한 조절 요소를 선택할 수 있다. 조절 요소는 프로모터, 전사 종결 서열, 번역 종결 서열, 인핸서 및 폴리아데닐화 요소를 포함한다.

[0045] 본 발명의 발현 구조체는 본 발명의 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합된 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 당업계에 공지된 표준 기술을 이용해서 폴리뉴클레오타이드 내에 편입될 수 있다. 다수의 프로모터 복제물 혹은 다수의 프로모터가 본 발명의 발현 구조체에 이용될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 프로모터는 그의 천연 기원 환경에서의 전사 개시 부위로부터와 같이 전사 개시 위치로부터 대략 동일 거리에 위치되어 있을 수 있다. 이 거리에 있는 몇몇 변형은 프로모터 활성의 실질적인 감소 없이 허용된다. 전사 개시 부위는 전형적으로 발현 구조체 내에 포함된다.

[0046] 동물 세포에서의 발현을 위하여, 본 발명의 발현 구조체는 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사를 추진할 수 있는 적절한 프로모터를 포함할 수 있다. 세포가 포유동물 세포이면, 예를 들어 액틴 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, NF-kappaB 프로모터, EGR 프로모터, SRE 프로모터, IL-2 프로모터, NFAT 프로모터, 오스테오칼신 프로모터, SV40 초기 프로모터 및 SV40 말기 프로모터, Lck 프로모터, BMP5 프로모터, TRP-1 프로모터, 쥣과 포유동물 종양 바이러스 긴 말단 반복 프로모터, STAT 프로모터, 혹은 면역글로불린 프로모터 등과 같은 프로모터가 발현 구조체에 이용될 수 있다. 바큘로바이러스 폴리헤드린 프로모터는 곤충 세포에서 발현하기 위하여 본 발명의 발현 구조체와 함께 이용될 수 있다. 효모 세포에서 본 발명의 발현 구조체와 함께 이용하기에 적합한 프로모터로는 3-포스포글라이세라이트 키나제 프로모터, 글라이세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 알코올 데하이드로게나제-2 프로모터 및 헥소키나제 프로모터를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0047] 원핵 시스템 내에서의 발현을 위하여, 본 발명의 발현 구조체는, 예를 들어, 알칼리 포스파타제 프로모터, 트립토판(trp) 프로모터, 람다 P_L 프로모터, β-락타마제 프로모터, 락토스 프로모터, phoA 프로모터, T3 프로모터, T7 프로모터 혹은 tac 프로모터 등의 프로모터를 포함할 수 있다(de Boer *et al.*, 1983).

[0048] 발현 구조체가 식물 세포 내에 제공될 경우, 예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S(증강된 CaMV 35S 프로모터를 포함함(예컨대, 미국특허 제5,106,739호 공보 참조)) 혹은 19S 프로모터 등의 식물 바이러스 프로모터가 이용될 수 있다. 프롤리페라(prolifera) 프로모터, Ap3 프로모터, 히트 쇼크 프로모터, 아그로박테리움 투마파시엔스(*A. tumafaciens*)의 T-DNA 1'- 혹은 2'-프로모터, 폴리갈락투로나제 프로모터, 피튜니아로부터의 칼콘 합성효소 A(CHS-A) 프로모터, 담배 PR-1a 프로모터, 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터, 액틴 프로모터, alcA 유전자 프로모터, pin2 프로모터(Xu *et al.*, 1993), 옥수수 WipI 프로모터, 옥수수 trpA 유전자 프로모터(미국 특허 제5,625,136호 공보), 옥수수 CDPK 유전자 프로모터, 및 RUBISCO SSU 프로모터(미국 특허 제5,034,322호 공보) 등의 식물 프로모터도 이용될 수 있다. (강남콩의) β-파세올린 유전자(phaseolin gene) 혹은 (대두의) 글라이시닌 유전자 등으로부터의 프로모터 등과 같은 종자-특이적 프로모터도 이용될 수 있다. 구성 프로모터(CaMV, 유비퀴틴, 액틴 혹은 NOS 프로모터 등), 조직-특이적 프로모터(토마토로부터의 E8 프로모터 등), 발육적으로-조절된 프로모터 및 유발성 프로모터(열, 광, 호르몬 혹은 화학물질에 의해 유발될 수 있는 프로모터 등)가 본 발명의 폴리뉴클레오타이드와 함께 이용하기 위하여 상정된다.

[0049] 본 발명의 발현 구조체는 경우에 따라 전사 말단 서열, 번역 말단 서열, 신호 펩타이드 서열 및/또는 인핸서 요소를 포함할 수 있다. 전사 말단 영역은 전형적으로 진핵 혹은 바이러스 유전자 서열의 3' 비해석 영역(untranslated region) 영역으로부터 얻어질 수 있다. 전사 말단 서열은 효율적인 말단을 제공하기 위하여 코드화 서열의 하류에 위치결정될 수 있다. 신호 펩타이드는 특정 소기관 구획으로부터 단백질 작용 및 세포 외 환경의 부위까지에 이르는 번역 후의 세포 목적지의 넓은 범위로 작동적으로 연결된 펩타이드의 재배치를 담당하는 정보를 코드화하는 짧은 아미노 말단 서열의 군이다. 작동적으로 연결된 신호 펩타이드 서열의 사용을 통해 의도된 세포 및/또는 세포 외 목적지로 폴리펩타이드를 표적화하는 것은 본 발명의 염증 매개체와 함께 이용

하기 위하여 상정된다. 화학적 인핸서는 유전자 전사를 증가시키고 또한 발현 구조체 내에 포함될 수도 있는 cis-작용 요소이다. 화학적 인핸서 요소는 당업계에 공지되어 있고, 또한 CaMV 35S 인핸서 요소, 거대세포바이러스(CMV: cytomegalovirus) 초기 프로모터 인핸서 요소 및 SV40 인핸서 요소를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 구조 유전자에 의해 코드화된 mRNA의 폴리아데닐화를 유도하는 DNA 서열은 또한 발현 구조체 내에 포함될 수 있다.

[0050] 고유한 제한 효소 부위는 폴리뉴클레오타이드 벡터 내로 삽입을 허용하기 위하여 발현 구조체의 5' 및 3' 말단에 포함될 수 있다. 여기서 이용되는 바와 같이, "벡터"란 용어는, 예를 들어, 적절한 제어 요소와 연관된 경우 복제가능하고 세포들 간에 폴리뉴클레오타이드 서열을 이전시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드(cosmid), 염색체, 파지, 바이러스 등을 비롯한 임의의 유전자 요소를 의미한다. 벡터는 해당 벡터가 선택된 숙주 세포 내에서 복제가능하게 하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 많은 벡터가 발현 및/또는 클로닝을 위해 이용가능하며, 그 예로는 pBR322, pUC 시리즈, M13 시리즈 및 pBLUESCRIPT 벡터(Stratagene, La Jolla, CA)를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 발현 구조체는 당업계에 공지된 방법에 의해 세포 속으로 도입될 수 있다. 이러한 방법으로는 트랜스펙션, 미세주사, 전기천공, 리포펙션(lipofection), 세포 융합, 인산칼슘 침강 및 바이오리스틱(biolistic) 방법을 들 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 혹은 발현 구조체는 아데노-연관 바이러스(AAV: adeno-associated virus), 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 엡스타인-바 바이러스(EBV: Epstein-Barr virus) 등과 같은 바이러스 벡터를 통해서 생체 내에 도입될 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 감쇠 혹은 결손 형태는 당업계에 공지되어 있다. 전형적으로, 결손 바이러스는 해당 바이러스가 세포 내로 도입된 후 주입될 수 없다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 발현 구조체는 또한 리포펙션(합성 양이온성 지질로부터 제조된 리포솜을 통한 DNA 트랜스펙션)을 통해서 생체 내에 도입될 수 있다(Felgner *et al.*, 1987). 합성 양이온 지질(LIPOFECTIN, Invitrogen Corp., La Jolla, CA)은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 발현 구조체를 내포하는 리포솜을 제조하여 이용될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 벡터 혹은 발현 구조체는 또한 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 트랜스펙션, 미세주입, 전기 천공, 인산칼슘 침강법 및 바이오리스틱 방법을 이용해서 비결합 상태의 DNA(naked DNA)로서 생체내에 도입될 수 있다.

[0052] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드는 본 명세서에 예시된 것과의 더욱 특별한 동일성 및/또는 상사성 범위의 관점에서 규정될 수 있다. 서열 동일성(sequence identity)은 전형적으로 60% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱더 바람직하게는 90% 이상이며, 또한 95% 이상일 수 있다. 서열의 동일성 및/또는 상사성은 본 명세서에 예시된 서열과 비교해서 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 혹은 99%일 수 있다. 달리 특정된 경우를 제외하고, 본 명세서에 이용되는 바와 같이, 두 서열의 퍼센트 서열 동일성 및/또는 상사성은 Karlin & Altschul(1993)에서와 같은 변형된, Karlin & Altschul(1990)의 알고리즘을 이용해서 결정될 수 있다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul *et al.* (1990)]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 내포되어 있다. BLAST 검색은, 소망의 퍼센트 서열 동일성을 지니는 서열을 얻기 위하여, NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 단어길이 = 12로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭트 얼라인먼트(gapped alignment)를 얻기 위하여, 갭트(gapped) BLAST는 문헌[Altschul *et al.* (1997)]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 갭트 BLAST 프로그램을 이용할 경우, 각 프로그램의 디폴트 프로그램(NBLAST 및 XBLAST)이 이용될 수 있다. NCBI/NIH 웹사이트를 참조할 수 있다.

[0053] 본 발명은 또한 표준의 엄격한(stringent) 조건 및 표준 방법(Maniatis, T. *et al.*, 1982) 하에 그 서열과 하이브리드화(hybridization)를 허용하도록 본 발명의 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 충분히 동일한 서열을 지니는 폴리뉴클레오타이드 분자(본 발명의 염증 매개체를 코드화함)를 상정한다. 여기서 이용되는 바와 같이, 하이브리드화를 위한 "엄격한" 조건이란 하이브리드화가 6x SSPE, 5x Denhardt의 용액, 0.1% SDS, 0.1㎎/㎖ 변성 DNA 중의 DNA 하이브리드의 용융 온도(Tm) 이하의 20 내지 25℃에서 하룻밤 전형적으로 수행되는 조건을 의미한다. 상기 용융 온도는 이하의 식에 의해 기술된다(Beltz, G.A. *et al.*, 1983):

[0054] Tm=81.5℃+16.6 Log[Na+]+0.41(%G+C)-0.61(%포름아마이드)-600/염기쌍 중의 이중가닥(duplex)의 길이.

[0055] 세척은 전형적으로 다음과 같이 수행된다:

[0056] (1) 1x SSPE, 0.1% SDS에서 15분간 실온에서 2회(낮은 엄격한 세척).

[0057] (2) 0.2x SSPE, 0.1% SDS에서 15분간 Tm-20℃에서 1회(중간 정도의 엄격한 세척).

[0058] 여기서 이용되는 바와 같이, "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드 서열"이란 용어는 단쇄 혹은 이중쇄 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 혹은 리보뉴클레오타이드 폴리머를 의미하며, 달리 제한된 경우를 제외하고, 천연 유래 뉴클레오타이드와 유사한 방법으로 기능할 수 있는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함할 것이다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 RNA로 전사되는 DNA 가닥 서열 및 단백질로 번역되는 RNA 서열의 양쪽을 모두 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 전체-길이 서열뿐만 아니라 전체-길이 서열로부터 유도된 보다 짧은 서열을 모두 포함한다. 특정 폴리뉴클레오타이드 서열은 특정 숙주 세포 내의 코돈 선호를 제공하도록 도입될 수 있는 천연 서열 혹은 서열들의 변성 코돈을 포함한다. 본 발명의 범위 내에 들어가는 폴리뉴클레오타이드 서열은 또한 본 발명의 염증 매개체에 대해서 코드화하는 서열로 특이적으로 하이브리드화되는 서열을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 개별적인 가닥으로서 혹은 이중 가닥으로서의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 모두 포함한다.

[0059] 본 발명은 염증 매개체 및/또는 해당 염증 매개체를 코드화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 해당 염증 매개체를 포함하는 조성물, 또는 하나 이상의 용기 내에서 본 발명의 염증 매개체의 생산을 유도하는 화합물 혹은 제제를 포함하는 키트에 관한 것이다. 본 발명의 키트는 경우에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 fms-관련 티로신 키나제 3(Flt3) 리간드, 인터루킨-6(IL-6), 대식세포 이동저지인자(MIF), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-3(IL-3), 에리트로포이에틴(EPO), 혈관 내피 성장인자 A(VEGF-A), 저산소증-유발성 전사인자(HIF-1알파), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1), 종양 괴사 인자(TNF), 과립구 집락자극인자(G-CSF), 과립구/대식세포 집락자극인자(GM-CSF), 대식세포 집락자극인자(M-CSF) 및 금속단백분해효소의 1종 이상을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 성분, 보조제 혹은 애주번트를 1종 이상 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 키트는 해당 키트의 염증 매개체 혹은 조성물을 투여하는 방법을 기재한 설명서 혹은 포장 재료를 포함한다. 상기 키트의 용기는 임의의 적당한 재료, 예컨대 유리, 플라스틱, 금속 등과 임의의 적당한 크기, 형태 또는 형상인 것일 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 염증 매개체는 정제, 환제 또는 산제 형태와 같은 고형으로서 키트 내에 제공된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 염증 매개체는 액체 혹은 용액으로서 키트 내에 제공된다. 일 실시형태에서, 키트는 액체 또는 용액 형태의 본 발명의 화합물 및/또는 제제를 수용하는 앰플 또는 주사기를 포함한다.

[0060] 본 발명은 인지장애를 저감시킴에 있어서 GM-CSF의 활성 및 그의 생물학적 활성을 자극시키는 화합물을 확인(즉, 동정)하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0061] 본 발명은 또한 인지장애를 저감시킴에 있어서 GM-CSF의 활성 및 그의 생물학적 활성을 경쟁적으로 저해시키는 화합물을 확인하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0062] 개시된 방법으로부터 혜택을 받는 포유동물 종으로는, 영장류, 예컨대 유인원, 침팬지, 오랑우탄, 사람, 원숭이; 길들인 동물(예, 애완동물), 예컨대 개, 고양이, 기니아피그, 햄스터, 베트남 배불뚝이 돼지(Vietnamese pot-bellied pigs), 토끼 및 흰족제비; 길들인 농장 동물, 예컨대 소, 물소, 바이슨(bisons), 말, 당나귀, 돼지, 양 및 염소; 전형적으로 동물원에서 볼 수 있는 이국 동물, 예컨대 곰, 사자, 호랑이, 표범, 코끼리, 하마, 코뿔소, 기린, 영양, 나무늘보, 가젤(gazelles), 얼룩말, 누(wildebeests), 프레리도그(prairie dogs), 코알라 베어, 캥거루, 주머니쥐, 미국너구리, 팬더, 하이에나, 바다표범, 바다사자, 코끼리물범, 수달, 참돌고래, 돌핀 및 고래가 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 개시된 방법으로부터 혜택을 받을 수 있는 다른 종으로는 어류, 양서류, 조류(avians) 및 파충류가 있다. 본 명세서에 이용되는 바와 같이, "환자" 및 "대상체"란 용어는 호환가능하게 이용되며 또한 이러한 사람 및 사람이 아닌 종을 포함하도록 의도되어 있다. 이와 마찬가지로, 본 발명의 시험관내 방법은 이러한 사람 및 사람이 아닌 종의 세포에 수행될 수 있다.

[0063] 이하의 용어는 이하에 함께 제시되는 의미를 지니도록 의도되어, 본 발명의 설명을 이해하는 데 유용하며, 본 발명의 범위를 제한하도록 의미하는 것은 아니다.

[0064] "신경 세포"란 용어는 뉴런, 신경교, 성상세포 등과 같은 중추 신경계 혹은 말초 신경계로부터 감각기관 세포, 전송 세포 및 운동신경세포를 비롯한 신경학상 기관(예를 들어, 뇌, 척수)의 세포이면 어떠한 것이라도 의미한다.

[0065] "아밀로이드 베타 펩타이드"란 용어는 아밀로이드 베타 전구체 단백질(APP)로부터 처리된 아밀로이드 베타 펩타이드를 의미한다. 가장 통상적인 펩타이드는 아밀로이드 베타 펩타이드 1-40, 1-42, 11-40 및 11-42를 포함한다. 덜 일반적인 아밀로이드 베타 펩타이드의 기타 종은 y-42 및 1-x로서 설명되고, 여기서 y는 2-17의 범위이고, x는 24-39 및 41의 범위이다.

[0066] "담체"란 용어는 매체, 덩어리 및/또는 이용가능한 형태를 약제학적 조성물에 제공하기 위하여 약제학적 조성물 내에 이용되는 비독성 재료를 의미한다. 담체는 부형제, 안정화제 혹은 수성 pH 완충 용액 등과 같은 이러한 재료를 1종 이상 포함할 수 있다. 생리학적으로 허용가능한 담체의 예로는 인산염, 구연산염 및 기타 유기산을 비롯한 수성 혹은 고형 완충액 성분; 아스코르브산을 비롯한 산화방지제; 저분자량(약 10 잔기 이하) 폴리펩타이드; 혈청, 알부민, 젤라틴 혹은 면역글로불린 등의 단백질; 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 친수성 폴리머; 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 혹은 리신 등과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 혹은 덱스트린을 비롯한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA 등과 같은 킬레이트제; 만니톨 혹은 솔비톨 등과 같은 당 알코올; 나트륨 등과 같은 염형성 상대 이온; 및/또는 TWEEN, 폴리에틸렌글라이콜(PEG) 및 플루로닉스(PLURONICS) 등과 같은 비이온성 계면활성제들 들 수 있다.

[0067] "접촉" 혹은 "접촉하는"이란 용어는 시험관내 계이든 생체내 계이든지 적어도 2종의 모이어티를 함께 지니는 것을 의미한다.

[0068] "병태" 혹은 "질환"(혹은 질병)이란 용어는 증상(즉, 병)의 명백한 제시 혹은 비정상적인 임상적 지표(예컨대, 생화학적 지표) 혹은 이러한 증상 혹은 비정상적인 임상적 지표를 발전시키는 유전적 혹은 환경적 위험성이나 성향을 의미한다.

[0069] "내인성"이란 용어는 동물이 천연적으로 생산하는 물질을 의미할 수 있다. 예를 들어 내인성과 관련되지만 제한되는 일 없이, "키나제"란 용어는 동물, 예컨대, 포유동물(예를 들어, 제한되지 않지만, 인간) 혹은 바이러스 등에 의해 천연적으로 생산되는 것을 의미할 수 있다. 이에 대해서, 이와 관련하여 비내인성(non-endogenous)이란 용어는 동물, 예컨대, 포유동물(예를 들어, 제한되지 않지만, 인간) 혹은 바이러스 등에 의해 천연적으로 생산되지 않는 것을 의미할 수 있다. 이들 두 용어는 "생체내" 및 "시험관내" 시스템의 양쪽 모두를 설명하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 제한하는 일없이, 선별 접근에 있어서, 내인성 혹은 비내인성 키나제는 시험관내 선별시스템과 관련될 수 있다. 또 다른 예로서, 제한되는 일없이, 포유동물의 게놈이 비내인성의 구조적으로 활성화된 키나제를 포함하도록 조작되어 있는 경우, 시험관내 시스템에 의해 후보 화합물의 선별은 실행가능하다.

[0070] "반응"이란 용어와 관련하여 "저해하다" 혹은 "저해하는" 혹은 "억제하다" 혹은 "억제하는" 혹은 "억제"란 용어는 화합물의 부재시와 반대인 화학식의 존재 시 반응이 저감되거나 방지되는 것을 의미한다.

[0071] "리간드"란 용어는 내인성의 천연 유래 수용체에 특이적인 내인성의 천연 유래 분자를 의미한다.

[0072] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "약제학적으로 허용가능한 전구약물"이란 용어는, 과도한 독성, 자극, 적절한 유익/유해비율에 상응하는 알레르기 반응을 지니는 환자의 조직과 접촉하여 이용하기에 적합하고, 본 발명의 화합물의 의도된 용도에 효율적인, 정통한 의료 판단의 범위 내에 있는, 본 발명에 유용한 화합물의 전구약물을 의미한다. "전구약물"이란 용어는 본 발명에서 이용가능한 유효한 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물 혹은 용매화물을 얻기 위하여 생체내에서 변형되는 화합물을 의미한다. 상기 변형은 각종 기전, 예컨대, 혈중 가수분해를 통하는 등에 의해 일어날 수 있다. 대사작용으로 분해가능한 기를 지니는 화합물은, 해당 대사작용으로 분해가능한 기의 존재로 인해 모 화합물(parent compound) 상에 부여되는 흡수율 및/또는 증강된 가용성의 결과로서 향상된 생물학적 이용률(bioavailability)을 발휘할 수 있는 이점을 지닌다. 이에 대한 전적인 개시는 문헌들[Bundgaard (1985), Widder *et al*. (1985), Krogsgaard-Larsen and Bandaged (1991), Bundgard (1992), Nielsenw and Bundgaard (1988), Nakeya *et al*. (1984), Higuchi and Stella (1987)]에서 제공되며, 이들은 참조로 본 명세서에 포함된다. 전구약물의 예는 에스터 전구약물이다. "에스터 전구약물"은 본 발명에 따른 저해제 화합물로 대사 작용 수단에 의해(예컨대, 가수분해에 의해) 생체내에서 변환가능한 화합물을 의미한다. 예를 들어, 카복시기를 함유하는 화합물의 에스터 전구약물은 대응하는 카복시기로 생체내에서 가수분해에 의해 전환가능할 수 있다.

[0073] "약제학적으로 허용가능한 염"이란 용어는 본 발명의 화합물의 비독성의 무기 및 유기산부가염, 및 염기 부가염을 의미한다. 이들 염은 본 발명에 유용한 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 원래의 위치에서(in situ) 제조될 수 있다.

[0074] "약제학적 부형제"란 용어는 펩타이드의 생물학적 활성 작용 혹은 체내 그의 흡광도를 증가시킬 수 있는 능력을 지니는 본 발명에 첨가가능한 비독성의 애주번트 혹은 화합물을 의미한다.

[0075] "폴리펩타이드"란 용어는 천연 혹은 합성 아미노산 중 어느 하나 혹은 그들의 등가물로 구성되는 단백질에 관한 것이다. 본 발명에서, 폴리펩타이드는, 예를 들어, GM-CSF 단백질 혹은 그의 생물학적으로 활성인 등가물의 아

미노산 서열을 의미할 수 있다. 몇몇 예에서, 천연적으로 존재하는 아미노산 중 어느 하나는 펩타이드의 생물학적 활성을 변화시키는 일없이 기능성 아미노산으로 대체될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 아미노산을 구성하는 짧은, 서열- 및 길이-특이적 올리고머이다. 이들 친숙한 생체분자는 살아있는 세포 내에서 도처에 존재하며, 세포 수용체 리간드, 내인성 항생체 및 심지어 폐의 계면활성제의 성분을 비롯한 무수한 역할을 담당한다. 생체활성 펩타이드가 담당하는 각 역할은 전형적으로 고유의 3차원 구조에 상응한다. 이와 같이 해서, 속성은 정교하게 정련된 생체 펩타이드 서열 및 진화를 통한 활성을 지니며, 당연하게는, 약제학적 선도 화합물(pharmaceutical lead compound)로서 이들 분자를 이용함에 있어서 상당히 이익이 있었다. 종종 제2세대 약제학적 요법은 비천연 펩타이드 모방체의 작성에 집중하고 있었다. 이들 "펩티도미네틱"(peptidomimetics)은, 아마이드 결합 동배체(isostere)의 이용 및/또는 사슬 연장 혹은 헤테로원자의 편입 등을 비롯한 고유의 펩타이드 골격의 변성을 통해서 펩타이드 1차 구조를 모방하는 임의의 올리고머에 기초할 수 있다. 펩티도미네틱 올리고머는 종종 프로테아제 내성이 있으며, 펩타이드 유사체에 대해서 저감된 면역원성 및 향상된 생물학적 이용률을 지닐 수 있다. 1차 구조적 모방체에 부가해서, 서열-특이적인 펩티도미네틱 올리고머, 소위 폴다머(foldamer)의 선택 서브세트는 나선형, 턴(회전) 및 작은 시트-유사 구조 등과 같은 잘 규명된 2차 구조 요소를 나타낸다. 펩타이드의 생체활성 혹은 그의 생물학적 등가물(biological equivalent)이 정확한 3차원 구조에 의존할 경우, 포개지는 생체모방 올리고머의 능력은 필수불가결할 수 있다. 단순한 펩티도미네틱의 예로는 아자펩타이드, 올리고카바메이트 및 올리고유레아를 들 수 있고, 통상의 폴다머의 예로는 β-펩타이드, γ-펩타이드, 올리고(페닐렌 에틸렌), 비닐로고스 설포노펩타이드 및 폴리-N-치환된 글라이신(펩토이드류)을 들 수 있다. 따라서, 본 발명의 염증 매개체의 펩티도미네틱, 예컨대, GM-CSF 폴리펩타이드 등은 본 발명의 범위 내이다.

[0076] "용매화물"이란 용어는 본 발명에 이용가능한 화합물의 1종 이상의 용매 분자와의 물리적 연합을 의미한다. 이 물리적 연합은 수소 결합을 포함할 수 있다. 소정의 예에서, 용매화물은, 예를 들어, 1종 이상의 용매 분자가 결정성 고체의 결정 격자 내에 편입될 경우 단리 가능할 것이다. "용매화물"은 용액상과 불용성 용매의 양쪽 모두를 포함한다. 대표적인 용매화물로는 수화물, 에탄올레이트 및 메탄올레이트를 들 수 있다.

[0077] "유효량" 또는 "치료상 유효량"이란 용어는 의사 혹은 기타 임상의가 발견해낸 대상체의 생물학적 혹은 의학적 반응을 끌어내는 화합물 혹은 제제의 양을 의미한다. 특히, 뉴런 장애의 치료와 관련하여, "유효량"이란 용어는 대상체의 인지장애를 저감시킬 수 있는 약물의 유효 투약량을 의미하는 것으로 의도된다. 평균 마우스에 대한 전형적인 체중은 인간의 대사율의 대략 7.2배의 대사율을 지니는 대략 .025kg이다. 평균 인간의 전형적인 체중은 대략 70kg이다. 표준 체중 및 대사율 조정에 의하여, 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 약물의 요법을 위한 유효 투약량을 유도해낼 수 있는 것은 당업자의 범위 내이다. 예를 들어, 본 발명의 범위 내의 유효량은 인간에 대해서 약 2 mg/day 내인 인지 효과를 얻는 데 필요한 바와 같은 기간 동안 약 5mcg/day 내인 등가량의 마우스 투약량이다. 대안적으로, 인간에 대한 유효 투약량은, 약 50 mcg/day 내지 약 2 mg/day, 대안적으로 50 mcg/day, 또는 100 mcg/day, 또는 250 mcg/day, 또는 500 mcg/day, 또는 750 mcg/day 또는 1 mg/day 또는 1.25 mg/day, 또는 1.5 mg/day 또는 2 mg/day, 또는 2.25 mg/day, 또는 2.5 mg/day 또는 개인의 유효한 인지 효과를 적어도 얻기 위하여 이러한 개인의 체중, 대사 작용 및 대사산물에 필요로 되는 바와 같이 조정된 범위 내일 수 있다.

[0078] "치료하는"(처치하는)이란 용어는, 장애, 질환 혹은 병태를 역전시키거나 이들의 발달을 예방하거나 이들의 병상을 변화시킴으로써, 이러한 장애, 질환 혹은 병태의 하나 이상의 증상을 비롯하여 해당 장애, 질환 혹은 병태를 경감시키기 위하여 본 발명에 의해 수행되는 개입을 의미한다. 예방이란 예방적 혹은 방지 대책을 의미한다. 관련된 용어 "치료"는, 여기서 이용되는 바와 같이, "치료하는"이란 용어가 위에서 정의된 바와 같이, 장애, 증상, 질환 혹은 병태를 치료하는 작용을 의미한다.

[0079] Flt3 리간드는 FLT3 티로신 키나제 수용체용의 리간드이며, 조기 해마 세포의 증식을 조절하는 작은 성장인자군에 속한다. Flt3 리간드의 다수의 아이소형(isoform)은 확인되어 있다. 우세한 형태는 막 통과 형태(transmembrane form)이며, 이것은 세포 표면 상에서 생물학적으로 활성이다. 단백질분해방식으로 분열된 막 통과 아이소형태가 가용성 형태를 발생하면, 이것도 생물학적으로 활성이다. Flt3 리간드는 티로신 키나제 수용체 Flt3을 발현하는 세포에 결합한다. Flt3 리간드 단독은 증식을 자극시킬 수 없지만, 다른 집락자극인자(CSF) 및 인터루킨과 충분히 상승작용하여 성장 및 분화를 유발시킨다.

[0080] 인터루킨 6(IL-6)은 RNA 자극된 섬유아세포타입 세포의 매체에서 원래 발견된 다작용성 24 kDa 단백질이다. 이것은 IL-1, TNF, PDGF, IFN-베타, TNF-알파, NGF, IL-17에 의해 상향조절되고, 글루코코르티코이드 IL-4, TGF-베타에 의해 하향 조절된다. IL-6은 감염 및 세포 손상 후에 일어나는 반응에 직접 포함되는 것으로 여겨지고, 급성 위상 반응을 조절함에 있어서 IL-1 및 TNF-알파로서 중요한 것으로 입증될 수 있다. IL-6은 또한 아디포

스 질량을 조절함에 있어서 연루되어 있다. IL-6은 섬유모세포, 활성화된 T 세포, 활성화된 단핵세포 혹은 대식세포 및 내피 세포에 의해 생산되는 것으로 보고되어 있다. 이것은 섬유모세포, 골수 전구세포, T 세포, B 세포 및 간세포를 비롯한 각종 세포에 영향을 미친다. 또한, IL-6은 T 림프구의 증식에서 IL-2와 상호작용하는 것으로 보인다. IL-6은 다능성 조혈 전구체에 대한 IL-3의 증식 효과를 강화시킨다.

[0081] 대식세포의 랜덤 이동을 저지하는 T 림프구-유도 인자로서 원래 기재된 대식세포 이동저지인자(MIF)는, 거의 30년간 정체를 알 수 없는 사이토카인이다. 최근, 생체활성 재조합 MIF 단백질의 클로닝과 발현 및 뇌하수체전엽의 산물로서의 MIF의 발견은 생체내 그의 임계적 생물학적 역할의 정의를 유도해내고 있다. MIF는 글루코코르티코이드에 의해 자극된 대식세포 및 T 림프구로부터 방출되는 고유의 특성을 지닌다. 일단 방출되면, MIF는 시험관내 LPS-자극된 단핵 세포에 의한 TNF 알파, IL-1 베타, IL-6 및 IL-8 생산에 대한 글루코코르티코이드의 저해 효과를 극복하고, 생체내 치명적인 내독소혈증에 대한 스테로이드의 방어 효과를 억제한다. MIF는 또한 IL-2 및 IFN-감마 생산을 회복함으로써 시험관내 T-세포 증식의 글루코코르티코이드 저해에 대항한다. 이 관찰의 결과, 면역 시스템 내의 MIF에 대한 중추적인 역할을 확인하게 되었고, 또한 감염 및 면역 반응의 제어를 이해함에 있어서 중요한 격차를 채우게 되었다. 글루코코르티코이드는 감염 혹은 조직 침습에 대한 스트레스성 반응의 일체적 성분인 것으로 여겨져왔고, 감염 및 면역 반응을 조절하는 역할을 한다. MIF는 글루코코르티코이드의 저해 효과를 대항 조절할 수 있는 것으로 확인된 제1매개체이므로, 감염 및 면역의 주된 제어에서 중요한 역할을 한다.

[0082] 종양 괴사 인자(TNF)는 각각 157개의 아미노산을 지니고 종양 세포의 괴사(사멸)를 유도하고 광범위한 전염증성(proinflammatory) 작용을 지니는 단백질의 상과(superfamily)의 일원이다. 종양 괴사 인자는 지질 대사작용, 인지, 인슐린 내성 및 혈관을 라이닝하는 내피세포의 기능에 대한 효과를 지니는 다기능성 사이토카인이다.

[0083] 인터루킨-1(IL-1)은 이미 앞에서 설명된 제1사이토카인의 하나이다. 그의 초기 발견은 열을 유발시키고, 림프구를 제어하며, 골수 세포의 수를 증가시키고, 골 접합부의 변성을 일으킬 수 있는 인자로서 였다. 이때, IL-1은 특히 내인성 발열원, 림프구 활성화 인자, 헤모포에틴(haemopoetin)-1 및 단핵 세포 인자를 비롯하여 수개의 다른 이름으로 알려져 있다. 과학자들이 IL-1이 두개의 별도의 단백질로 실제로 구성된 것(이제는 IL-1α 및 IL-1β라 불림)을 확인한 때는 1984년 내지 1985년경이었다.

[0084] 통상 글라이코실화된 152 아미노산 단백질로 이루어진 인터루킨-3(IL-3)은 헤모포에틴 세포 내에 20알파-하이드록시스테로이드 데하이드로게나제 합성을 유발하는 T 림프구-유도 인자로서 원래 발견되었다. 이것은, GM-CSF 및 IL-5에 의해 공유되는, 통상의 베타 c 수용체 서브유닛과 헤테로다이머화하는 IL-3 수용체와 결합되며 활성화 T 세포에 의해 분비된다. IL-3은 GM-CSF와 유사하게 기능하고, 인간 IL-3 유전자는 GM-CSF 유전자로부터 떨어져 있는 9킬로베이스인 염색체 5 상에 위치되어 있다. IL-3는 다수의 조혈 세포 유형의 증식을 뒷받침하는 것으로 확인되어 있고, 이러한 세포 성장, 분화 및 세포자멸사 등과 같은 각종 세포 활성에 내포된다.

[0085] 에리트로포이에틴(EPO)은 신장 피질의 세관주위 섬유모세포에 의해 주로 생산되는 30.4 kDA 당단백질 호르몬이고, 이것은 세포자멸사로부터 적혈구를 보호할 뿐만 아니라 기타 성장인자(IGF-1, IL-3 및 GM-CSF)와의 상승 작용을 통해 적혈구 전구 세포의 증식 및 성숙을 촉진시키는 작용을 한다. 혈액 산화는 저산소증 유발 인자라고 불리는 구조적으로-합성된 전사 인자를 통해서 EPO의 발현을 조절하는 것으로 여겨진다. EPO는 또한 신경보호 인자와 혈관형성 인자를 지니는 것으로 보고되어 있다.

[0086] 혈관 내피 성장인자 A(VEGF-A)는 혈소판-유도 성장인자에 속하며 혈관 생성 및 혈관 신생에 내포되는 다작용성 단백질이다. 이것은 저산소 세포에서 생산되어, HIF-1α 발현에 의해 방출되어, 따라서 각종 기능을 유발하는 세포 표면 수용체 VEGFR-1(Flt-1) 혹은 VEGFR-2(KDR/Flk-1)에 결합된다. 이것은 내피세포의 세포분열과 이동, 혈관확장을 자극시키는 것으로 밝혀졌으며, 또한 단핵 세포-연결 조혈세포에 대해서 화학주성이 있는 것으로 밝혀졌다.

[0087] 저산소증-유발성 전사인자 알파(HIF-1α)는 이용가능한 세포 산소 변화에 반응하는 전사 인자이다. 정상 산소 상태 조건(normoxic condition)에서, 이것은 HIF 프롤릴-수산화효소에 의한 프롤릴 수산화 시 프로테아좀(proteasome)에 의해 급속하게 열화되고, 이어서 그의 유비퀴틴화를 유발한다. 저산소 조건은 이 프롤릴 수산화를 방지하고, HIF-1은 안정화되어, EPO 및 VEGF 등과 같은, 저산소 생존을 촉진하는 수개의 유전자를 상향 조정하는 작용을 한다. HIF-1α는 이와 같이 해서, 이들 유전자의 상향 조정을 통해서 혈관 생성 및 혈관 신생을 증가시킨다.

[0088] 인슐린-유사 성장인자 1(IGF-1)은 인슐린에 대한 분자 구조와 유사한 70 아미노산 폴리펩타이드 단백질 호르몬

이며, 이것은 간에 의해 주로 생산된다. IGF-1은 IGF-1 수용체(IGF-R) 및 인슐린 수용체(IR)에 결합되고, 세포 성장 및 항세포자멸 AKT 신호 경로의 잠재적인 활성자이다. 생존 동안에 걸쳐서 생산되지만, 그의 발현은 영아기 및 노인기에서 최저이며, IGF-R 및 IR은 알츠하이머병(AD)에서 저감되고 신경퇴행과 상관이 있는 것으로 보고되어 있다. IGF-1은, 또한 인슐린 및 EPO에 의한 그의 불충분한 신호 발생에 기인하는 혈관 합병증을 통하여, AD에 대한 양성-위험 인자인 2형 당뇨병의 병인에 내포되어 있었다.

[0089] 과립구 집락자극인자(G-CSF 혹은 GCSF)는 집락자극인자 호르몬이다. 이것은 골수를 자극시켜 과립구 및 줄기 세포를 생산하도록 하는 다수의 상이한 조직에 의해 생산된 당단백질, 상장인자 혹은 사이토카인이다. G-CSF는 이어서 골수를 자극시켜 이들을 혈액 속으로 방출시킨다. 이것은 또한 호중구 전구체 및 성숙한 호중구의 생존, 증식, 분화 및 기능을 자극시킨다. G-CSF는 집락자극인자 3(CSF-3)으로도 공지되어 있다.

[0090] 과립구-대식세포 집락자극인자(GM-CSF)는 대식세포, T 세포, 비만 세포, 내피 세포 및 섬유모세포에 의해 분비되는 단백질이다. GM-CSF는 백혈구 세포 성장인자로서 기능하는 사이토카인이다. GM-CSF는 과립구(호중구, 호산구 및 호염구), 단핵세포 및 수지상 세포(dendritic cell)를 생산하도록 줄기 세포를 자극시킨다. 단핵세포는 순환계를 떠나 조직 속으로 이동하여, 이들은 대식세포로 숙성한다. 이것은, 이와 같이 해서, 면역/감염 캐스케이드의 일부이고, 이것에 의해, 적은 수의 대식세포의 활성화는 감염과 싸우는 데 결정적인 과정의 수의 증가를 급속하게 유발시킬 수 있다. 단백질의 활성 형태는 호모다이머로서 세포외에서 발견된다.

[0091] 대식세포 집락자극인자(M-CSF 혹은 CSF-1)는 숙성 대식세포, 파골세포 및 미세아교세포를 활성화할 뿐만 아니라, 대식세포 혹은 파골세포 등과 같은 기타 관련된 세포 유형으로 증식하여 분화하도록 조혈 단핵 세포에 영향을 미치는 분비된 사이토카인이다. M-CSF는 AD 환자에서 저감된 발현을 지니고 AD의 아말로이드증 쥣과 동물 모델에서의 그의 말초 투여는 아밀로이드 침착 및 인지기능을 개선시키는 것으로 최근 보고되어 있다.

[0092] 금속단백분해효소(또는 metalloprotease)는 활성 부위에서 가장 우세한 작용기의 속성에 의해 분류되는, 단백분해효소의 군으로부터 효소의 과를 구성한다. 금속단백분해효소에는 2개의 하위 군, 즉, 메탈로엑소펩타다제로도 불리는 엑소펩타다제 및 메탈로엔도펩타다제로도 불리는 엔도펩티다제가 있다. 잘 알려진 금속단백분해효소는 ADAM 단백질 및 기질 금속단백분해효소를 포함한다.

[0093] 다베포에틴은 EPO보다 혈장 반감기가 길고 5 아미노산 위치에서 고유한 인간 EPO에 의해서만 변화하는 신규한 에리트로포에틴-자극 인자(NESP: novel erythropoetin-stimulating factor)이다. 다베포에틴은 또한 대집락-형성 및 집락-형성 에리트로이드 단위의 적혈구 생성의 적혈모구 단계로의 성숙 및 증식에서 GM-CSF와 상승작용적으로 작용할 것으로 예상된다(Fisher (2003)). 적혈구 생성은 적혈구 표면 상에서의 보체 수용체 1(CR1: complement receptor 1)의 발현을 통해서 보체-결합된 순환 아밀로이드 베타 단백질의 청소 및 뉴런 세포의 산화로 인해 알츠하이머병에서 중요하다(Rogers *et al.* (2006); Cadman and Puttfarcken (1997); Helmy *et al.* (2006)).

[0094] 줄기 세포 인자(SCF)는 단독으로 혹은 GM-CSF, G-CSF 및 EPO 등과 같은 기타 사이토카인과 조합하여 원시의 다능성 및 단일 기능성 조혈 줄기 세포의 성장과 발달을 자극하는 것으로 보고된 사이토카인이다(Fisher (2003)). SCF는 또한 성숙 과립구의 기능을 자극시키는 작용을 한다(Czygier *et al.* (2007)).

[0095] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 특허출원, 가출원 및 공개문헌들은, 모든 도면 및 표를 비롯한 그들의 전문이 본 명세서의 분명한 교시와 모순되지 않는 정도까지 참고로 포함된다.

[0096] 이하는 본 발명을 실행하는 절차를 예시한 실시예이다. 이러한 실시예는 제한하는 것으로 간주하지 않아야 한다. 모든 백분율(퍼센트)은 중량 기준이며, 모든 용매 혼합물 비율은 달리 언급된 경우를 제외하고 용적 기준이다.

[0097] **실시예 1**

[0098] 방사상 아암 워터 미로 시험 - 작업(단기) 기억은, 모리스 워터 미로 및 플랫폼 인지 시험의 양쪽 모두에 내포된 동일 풀(pool)을 이용해서, 방사상 아암 워터 미로(RAWM: radial arm water maze) 과업에서 평가된다. 이 과업은 또한 모리스 미로 시험과 동일한 깨끗한 플랫폼 및 시각적 단서를 이용한다.

[0099] 공간 작업 기억의 방사상 아암 워터 미로 과업을 위하여, 알루미늄 삽입물을 100㎝ 원형 풀 속에 배치하여, 중앙의 원형 스윔 영역(central circular swim area)으로부터 뻗은 6개의 방사상 분포된 스윔 아암(swim arm)을 형성한다. 2차원 및 3차원 시각적 단서의 모임(assortment)은 상기 풀로 둘러싸여 있었다. 6개의 스윔 아암 중 하나가 침수된 도피 플랫폼(escape platform)(직경 9㎝)을 수용하고 있는 것을 정착시키기 전의 에러의 수는

8일의 전처리 시험 기간 및 4일의 후처리 시험 기간에 걸쳐서 5회 시도/day로 결정되었다. 4번째 시도(T4; 최종 획득 시도)와 5번째 시도(T5; 기억 유지 시도) 간에 30분 시간 지연이 있었다. 상기 플랫폼 위치는 상이한 아암으로 매일 변화시켰고, 이때 나머지 5개의 스윔 아암으로부터 5회의 각각에 대한 상이한 개시 아암이 세미-랜덤하게 선택되었다. 각 시도 동안(최대 60초), 마우스는 옳지 않은 아암으로 수영 시 그 시도의 개시 아암으로 되돌아왔고, 상기 침수된 플랫폼을 정착시키는 데 요구되는 시간이 초(second)로서 기록되었다. 60초 시도 내에 플랫폼에서 마우스가 발견되지 않았다면, 이것은 30초 체재 동안 해당 플랫폼으로 안내된 것이다. 시도 4 및 5 동안 에러 수 및 도피 대기 시간은 모두 작업 기억의 지수인 것으로 생각되며, 이들은 AD 환자의 평가에서 임상적으로 이용되는 구체적인 항목의 표준 기록/회상 시험과 일시적으로 유사하다.

[0100] RAWM 시험(4일)의 후-처치 완료에 이어서, 모든 마우스는 6일 동안 신규한 인지 간섭 과업이 더욱 평가되었다. 이 과업은 상이한 방에서 설치된 두 방사상 아암 워터 미로와 3세트의 상이한 시각적 단서를 포함한다. 이 과업은 동물에게 시각적 단서의 세트를 기억해내도록 요구하므로, 상이한 단서의 세트와의 간섭 후, 초기 세트의 단서가 방사상 아암 워터 미로 과업을 성공적으로 해결하도록 회상될 수 있다. 5개의 행동 척도의 세트가 조사되었다. 행동 척도는 다음과 같았다: A1 내지 A3(RAWM "A"에서 수행된 처음 3회 시도로부터의 복합적인 3-시도 회상 점수), "B"(RAWM "B"에서 단일 시도로부터 얻어진 순방향 간섭 척도), A4(RAWM "A"에서의 단일 시도 동안 얻어진 역방향 간섭 척도) 및 "A5"(A4와 A5 사이의 20분 지연 후 RAWM "A"에서의 단일 시도로부터 얻어진 지연된-회상 척도). 표준 RAWM 과업과 함께, 이 간섭 과업은 이용된 RAWM 설비의 양쪽에 대한 상이한 아암 및 두 RAWM 설비에 대한 각 시험일에 대한 상이한 개시 아암으로 매일 변화되는 플랫폼 위치를 포함하였다. A1 시도와 B 시도에 대해서, 동물은 상기 플랫폼에 유도되기 전에 그 자체 상에 있는 해당 플랫폼을 발견하는 데 처음 1분이 허용되었다. 이어서, 실제의 시도는 각 케이스에서 수행되었다.

[0101] 마우스 재조합 GM-CSF는 PS/APP 마우스를 이용해서 각 실험에서 이용되었다. 주사당 5㎍이 식염수 중에 재구성되었고, 이하에 개략적으로 나타낸 바와 같이 연구 기간에 걸쳐서 처치된 마우스에 피하 주입되었다.

[0102] 코호트(Cohort) 1: 29마리의 마우스, F8 백색 세대, DOB 04/20-05/07/2007

[0103] 8마리의 APP 마우스, 21마리의 비형질전환(non-transgenic) 마우스

[0104] 전처리 RAWM: 1년된 마우스

[0105] 8일의 RAWM: 04/25-05/02/2008

[0106] 시험전 주입과 개시 주입 사이에 15-일 지연

[0107] 처치 시작 05/17/2008

[0108] 전체 시험 기간에 걸쳐서 매일 주입하면서 RAWM 후-시험 전에 10일 주입(5㎍/day s.c.)

[0109] 후-시험 RAWM 개시 05/27/2008 - 05/30/2008; 시험 안함 05/31/2008 - 06/01/2008, 하지만 매일 주입은 계속함; 간섭 RAWM 개시 06/02/2008 - 06/07/2008

[0110] 연구에 추가된 추가의 마우스 = 코호트 2

[0111] 8마리의 마우스: F8 밝은 오렌지색, DOB 05/27/2007, 3마리의 APP/PS1, 4마리의 APP, F7 연한 청색, DOB 06/27/2007, 1마리의 APP

[0112] 예비-시험 RAWM

[0113] RAWM 8일: 05/12-05/19/2008

[0114] 코호트 1후 17일째에 개시됨

[0115] 예비-시험과 주입 개시 사이에 15-일 지연

[0116] 처치 시작 06/03/2008

[0117] 전체 시험 기간에 걸쳐서 매일 주입하면서 RAWM 후-시험 전에 10일 주입(5㎍/day s.c.)

[0118] 후-시험 RAWM 개시 06/12/2008 -06/15/2008; 시험 안함 06/16/2008 - 06/17/2008, 하지만 매일 주입은 계속함; 간섭 RAWM 개시 06/18/2008 - 06/23/2008

[0119] **결과:**

[0120] 도 3, 도 4 및 도 7은 GM-CSF 시험의 결과를 도시하고 있다. 도 7a 내지 도 7d: 표준 RAWM 에러(4일의 시험; 2-일 블록 2개). 시험 블록 1 및 2 모두에 대해서, 미처치된 APP 유전자 조작군은 작업 기억 시도 T4 및 T5에 대해 모든 혹은 대부분의 다른 군과 비교해서 명백한 손상을 보였다. 시험의 모든 후-처치일에 대한 수행능력은 미처치된 APP 유전자 조작군이 다른 3군 모두에 비해서 실질적으로 손상된 것으로 드러났고, 이들은 서로 유사하게 수행되었다.

[0121] 도 7e: GM-CSF 간섭 시험-전체

[0122] 미처치된 APP 형질전환 군은 다른 3군 모두에 비해서 즉각적인 회상 시험(A1-A3)에서 매우 손상이 있었다. 미처치된 APP 형질전환 군은 GM-CSF 처치된 비형질전환된 한배 새끼(littermate)의 대조군에 비해서 순방향(시도 B) 및 역방향(시도 A4) 간섭 시험 모두에 대해서 상당히 손상된 수행능력을 보였다. APP 형질전환 GM-CSF 처리된 군은 이들 시도에 대한 처치된 및 미처치된 비형질전환 한배 새끼 대조군과 달리 수행하지 않았다. 미처치된 APP 형질전환 군은 다른 3군 모두에 비해서 지연된 회상 시도(A5)에서 매우 손상되어, 수행능력에서 서로 차이가 없었다.

[0123] 도 3 및 도 4: GM-CSF 간섭 시험 - 블록 1 및 블록 2

[0124] 두 블록 동안, 미처치된 APP 형질전환 군은 다른 3군 모두에 비해서 손상된 즉각적인 회상(A1-A3) 및 손상된 지연된 회상(A5)을 보였고, 이것은 서로 수행 능력에서 차이를 보이지 않았다. 블록 1 동안, APP 미처치된 형질전환 군은 순방향 간섭 수행능력(시도 B)에서 선택적인 손상을 보였다. 다른 군은 모두 이 시도 동안 더욱 양호하게 수행하였고, 수행 능력은 서로 동일하였다. 두 블록 동안, 미처치된 APP 형질전환 군은 GM-CSF 처치된 비형질전환된 한배 새끼 군에 비해서 역방향 간섭(A4)에 있어서 손상되었다.

[0125] 표준 RAWM 시험과 RAWM 간섭 시험의 양쪽 모두로부터, 미처치된 APP 형질전환 군이 다른 3군 모두에 비해서 작업 기억, 순방향 간섭, 역방향 간섭 지연된 회상에서 일관되게 손상된 것은 명백하다. 이에 대해서, GM-CSF 처치된 APP 형질전환 군의 수행능력은 GM-CSF 처치된 혹은 미처치된 비유전자조작 한배 새끼와는 결코 통계학적으로 상이하지 않았다. 미처치된 APP 형질전환 군은 다른 3군 모두와 비교해서 다수의 인지 척도에 대해서 더욱 열등하게 수행한 것으로 명백하게 표시되어 있다.

[0126] 또한, 마우스들의 군이 카페인으로 처치되고 GM-CSF의 혈장 수준이 해마 내의 GM-CSF 수준과 아밀로이드 베타 수준 간에 상관이 있었는지의 여부를 판정하도록 규명되어 있는 별도의 실험 세트에서, 혈장 GM-CSF 수준과 해마 불용성 A-베타 수준 간에 강력한 역상관이 있었던 것으로 확인되었으며, 이는, 예를 들어, 도 5a 및 도 5b를 참조할 수 있다. 이에 대해서, 혈장 GM-CSF 수준과 해마 불용성 A-베타 수준 간에 유의한 긍정적인 상관이 있었다(도 5c 참조). 상이한 실험 세트에서 동물을 이용한 이 별도의 관찰 연구는 어떻게 해서든 뇌로부터 불용성의 침착된 A-베타를 제거하여 뇌 속에 가용성 A-베타가 증가한 것을 시사하고 있었다. 아마도 증가된 가용성 A-베타는 혈장 속으로 베타 플라크의 청소에 대한 이송 기전이다. 이것은 GM-CSF의 인지 이득의 기전을 시사할 수 있다. GM-CSF 혹은 그의 생물학적 등가물의 인지 이득을 설명할 수 있는 다른 기전이 가능하며, 이것은 본 명세서에 기재된 바와 같이 본 발명의 범위 내이며, 또한 증가된 대뇌 혈류를 지니는 뇌의 혈관신생, 플라크 및 그들의 연관된 감염의 저감, 골수 유래 신경발생 또는 미세혈관 플라크-유발 허혈 및 그 결과 얻어지는 산화성

스트레스에 대한 신경보호를 포함한다. 또한, 본 명세서에 언급된 이들 기전의 어떠한 조합도 GM-CSF 및 그의 생물학적 등가물의 인지적 이득에 대한 효과에 기여하는 것으로 여겨지고 또한 이것은 본 명세서에 기재된 바와 같이 청구된 발명의 실시 범위 내인 것으로 간주할 수 있다.

[0127] **실시예 2에 대한 재료 및 방법**

[0128] CSF의 뇌내 투여를 내포하는 형질전환 마우스들. PS/APP 마우스들은 스위스 웹스터(Swiss Webster) 및 C57BL/6 백그라운드의 양쪽 상에 PDGF-hPS1(M146L)를 지니는 잡종성의 PDGF-hAPP (V717F) 마우스와 교배시킴으로써 발생되었다. 형질전환 유전자 검출은 상대적인 실시간 PCR(Bio-Rad iCycler- Hercules, CA)을 이용해서 수행되었다. 이 모델에서의 병원성 표현형(pathogenic phenotype)은 6 내지 8개월의 월령에서 시작되는 확고한 아밀로이드 플라크 축적이다. 동물에 대한 실험을 포함하는 모든 절차는 사우스 플로리다 대학의 동물 실험윤리위원회(the University of South Florida Animal Care and Use Committee)에 의해 규정된 지침에 따라 수행되었다.

[0129] M-CSF의 두개 내 주입. 동물(PS/APP, 모두 8.8-9.6개월, 25-35g, 양쪽 성 모두)은 1-2% 아이소플루란으로 마취시키고 면도하고 절개 부위에 10%뷰타딘 용액으로 닦아내고, 정위 프레임(stereotaxic frame)에 배치하였다(Kopf Instruments, Tujunga, CA). 작은(4㎝) 절개를 실시하여 두개골을 노출시키고, 양날 가위를 이용해서 동물의 등을 따라 피하 포켓을 형성하고 그 안에 삼투압 미니펌프(Alzet model 1004, Durect Corp., Cupertino, CA)를 삽입하였다. 상기 두개골에 2개의 구멍을 뚫었다(대천문으로부터 앞뒤 -0.1㎜, 중앙-측면 ±0.9㎜, 30 게이지 카테터를 가쪽 뇌실에 대응하는 3.0㎜ 깊이에 삽입하였다). Alzet 펌프로부터의 선두는 시판의 외다리 캐뉼러보다는 두개골의 윤곽을 따른 전달 팁을 지니는 독점적인 카테터 시스템(국제특허 제PCT/US08/73974호)이다. 이 완전하게 피하-수납된 시스템은 시험 물질의 양측 대뇌 주입을 허용한다. 이 능력은, 각 반구 속으로의 주입을 허용함으로써, 동물들 간의 아밀로이드 침착의 편차의 문제를 극복하며(도 10 참조), 여기서, 시험 물질은 동측성으로 전달될 수 있고, 비히클은 반대쪽으로 전달되어 각 동물 자체의 제어를 효율적으로 행할 수 있게 한다. 또한, 두피를 치유하여 외다리 장착된 캐뉼러 이용에서 보여지는 개방된 상처로부터의 마우스에의 만성 감염 및 자극을 저감시킨다. 일단 캐뉼러가 양쪽 모두 삽입되면, 이들은 Locktite 454 접착제(Plastics One, Roanoke, VA)를 이용해서 두개골에 붙이고 1㎝ 직경의 나이트릴로 고정시킨다. 상기 접착제가 경화된 후, 두피를 6-7번 실크 봉합사로 봉합하고, 해당 동물에게는 케토프로펜(10 ㎎/㎏)을 즉시 투약하고, 재차 필요에 따라 48시간 동안 매 6시간마다 이를 실시하였다.

[0130] M-CSF는 0.12 ㎕/hour의 평균 유량으로 Alzet 모델 1004를 이용해서 14일 동안 가쪽 뇌실에 직접 양측으로 주입하였다(5 ㎍/day). 이 펌프 및 카테터는 이식 전에 37℃ 수욕에서 48시간 담가두었다. 14일의 기간 후에, 상기 동물에게는 소듐 페토바비탈을 치사량(~100 ㎎/㎏, i.p.) 부여하고 나서 0.9% 냉식염수로 심장을 통해 관류시켰다.

[0131] CSF의 정위 주입. (동측성) 해마 내로 모두 3 CSF를 정위 주입(5㎍/주입)하였고, 비히클(인공 뇌척수액(aCSF))은 4마리의 PS/APP 마우스(모두 10-12개월의 월령, 25-35g, 양쪽 성 모두)에 각각 반대쪽에 주입하였다. 두개골에 2개의 구멍을 뚫었다(대천문으로부터 앞뒤 -2.5㎜, 중앙-측면 ±2.5㎜, 30 게이지 바늘을 3.0㎜ 깊이에 삽입하였다). 마우스들은 7일 후 안락사시키고 0.9% 냉식염수-관류시켰다. 유전자 재조합 마우스 GM-CSF(rmGM-CSF), 유전자 재조합 생쥐 G-CSF (rmG-CSF), 및 유전자 재조합 마우스 M-CSF(rmM-CSF)(R&D Systems)는 이 명세서 전체에서 GM-CSF, G-CSF 및 M-CSF라 지칭할 것이다.

[0132] 해마내-주입된 마우스의 면역조직화학 및 화상 분석. 해마내 주입된 마우스로부터의 관류된 뇌 조직을 24 내지 36시간 동안 10% 중성 완충된 포르말린에 고정시키고 나서, 또 다른 72시간 동안 수크로스 구배(10-30%)를 통해 배치시켰다. 뇌는 이어서 히스토슬라이드(histoslide)(Leica, Heerbruug, Switzerland)의 펠티에(peltier)(Physitemp, Clifton, NJ)에 동결시키고, 14㎕에서 관상으로 절편화하였다. 대안적으로, 선택된 뇌는 10% 중성의 완충된 포르말린 고정화 후 파라핀 매립하고, 5㎛에서 절편화하여 슬라이드에 부착시켰다. 면역조직화학 염색 전에 탈파라핀화 및 항원 복구(20분 동안 10mM 구연산나트륨 완충액에서 끓임)를 수행하였다. 파라핀 매립된 슬라이드를 이용해서 시약과 항체의 비용을 상당히 줄이기 위하여, 신규한 자성 면역조직화학 염색 장치가 개발되었다. 표준 면역조직화학 기술은 항-Aβ 항체, 즉, 6E10(1:1000), 및 MabTech's(1:5000)를 이용해서 아밀로이드 침착을 면역표지화하고 나서 Alexa 488 및/또는 564 2차 형광단(secondary fluorophores)(1:1000, 1:4000 - Invitrogen), 및 훽스트(Sigma) 핵 염색을 행하였다. 해당 조직은 Axiovision 4.7 소프트웨어를 이용해서 Zeiss Axiocam Mrm 카메라(Oberkochen, Germany)를 구비한 Zeiss

Imager.Z1 형광 현미경 상에서 가시화되었다. 현미경사진은 10배로 촬영하였고, 각 뇌 반구의 대응하는 자취로부터 동등한 영역을 선택하도록 Axiovision Panarama Module로 몽타지화하였다. 15-25 10X 사진/반구 분석된 5개의 관상 절편/마우스가 있었다(전후 위치에 따라 변화됨). 아밀로이드 정량화는 ImageJ 소프트웨어 프로그램을 이용해서 수행되었다(National Institutes of Health에서 개발되었고 입수가능함). 간단하게는, 관상 절편 당 각 분석된 사진은 히스토그램 평균으로부터의 동일한 표준 편차에 대해서 동등하게 역치화되었고, 본 발명자들은 백그라운드 인공산물을 최소화하도록 동일한 면적 역치를 이용하였고, 면적, 둘레, 페레트 직경 및 적분 밀도 파라미터에 대해서 분석하였다. 페레트 직경은 주어진 플라크를 가로질러 가장 긴 거리이고, 적분 밀도는 플라크의 화소(pixel)의 평균 그레이값과 면적의 곱이다.

[0133] GM-CSF 처치를 내포하는 행동학적 형질전환 마우스 연구. 이 연구에서의 마우스들은 플로리다 알츠하이머병 연구센터 형질전환 마우스 집락(colony)으로부터 유래되었고, 여기서, 변이체 APPK670N, M671L 유전자(APPsw)를 수반하는 잡종성 마우스는 잡종성 PS1(Tg 라인 6.2) 마우스와 관례적으로 교배하여 혼합된 C57/B6/SW/SJL 백그라운드 상에 APPsw/PS1, APPsw, PS1 및 비형질전환(NT) 유전자타입으로 이루어진 자손을 얻었다. 11마리의 APPsw 마우스, 4마리의 APPsw/PS1 마우스 및 17마리의 NT 마우스(모두 12개월의 월령)가 이 연구에 이용하기 위해 선택되었고, 8일 동안 작업 기억의 RAWM 과업에 있어서 평가되었다(프로토콜은 이하 참조). 다수의 실험은 각종 유전자형의 AD가 이들이 일단 인지장애에 도달하면 동등하게 수행되는 것으로 드러났다. 이와 같이 해서, 15마리의 Tg 마우스는 RAWM 수행능력이 균등한 두 군으로 나뉘었고, 각 군에는 2마리의 APPsw 마우스가 포함되었다. 17마리의 NT 마우스도 RAWM 수행능력이 균등한 두 군으로 나뉘었다. 전처리 시험의 완료 후 2주째에, Tg 마우스 1군(n = 7)과 NT 마우스 1군(n = 9)에 대해 GM-CSF(5㎍/day 피하주입)로 10일처리 프로토콜을 개시하는 한편, 대조 Tg 및 NT 군(각 군당 n = 8)의 동물들에게 동일한 10일의 기간에 걸쳐서 비히클(식염수) 처치를 매일 피하에 주입하였다. 주입 11일째에, 모든 마우스는 RAWM 과업에서 4일 동안 평가를 시작하였고, 2일의 휴식이 주어졌으며, 이어서, 신규한 인지 간섭 과업 시험을 추가로 4일 시행하였다(프로토콜은 이하 참조). 매일 GM-CSF 및 식염수 주입을 행동 시험 기간 동안 계속하였다. 처치 3주에서 행동 시험의 완료 후, 모든 마우스를 안락사시키고, 전술한 바와 같이 뇌를 고정시키고, 파라핀 매립하였다. 부검시 모든 조직의 주의깊은 육안 검사 결과 형태학적 이상은 없었으므로, 마우스들은 매일의 피하 주입에 잘 견딘 것으로 드러났다.

[0134] 피하 GM-CSF-처치된 마우스들의 면역조직화학 및 화상 분석. 피하 주입으로부터 뇌 조직을 관류시키고, 행동-시험된 마우스들은 24 내지 36시간 동안 10% 중성의 완충된 포르말린에 고정시키고 나서, 파라핀 매립하였다. 해마(대천문 -2.92㎜ 내지 -3.64㎜)의 수준에서, 5개의 5㎛ 절편(150㎛ 떨어짐)이 슬라이딩 마이크로톰을 이용해서 각 마우스 뇌로부터 만들어졌고, 슬라이드당 장착되었다. 면역조직화학 염색은, 바이오티닐화 2차 항체 스텝을 Aβ 면역조직화학 염색에 대해서 생략한 것을 제외하고, 다이아미노벤지딘 반응과 결합된 Vectastain ABC *Elite* 키트(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 이용해서 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. 이하의 1차 항체가 면역조직화학 염색에 이용되었다: 즉, 바이오티닐화 인간 Aβ 단클론성 항체(클론 4G8; 1:200, Covance Research Products, Emeryville, CA) 및 토끼 시냅토파이신 다클론성 항체(미희석, DAKO, Carpinteria, CA). Aβ 면역조직화학 염색을 위하여, 뇌 절편은 예비-블로킹 단계 전에 70% 포름산으로 처리되었다. 인산염-완충 식염수(0.1mM, pH 7.4) 혹은 정상의 토끼 혈청(아이소타입 대조)이 음성 대조군으로서 1차 항체 혹은 ABC 시약 대신에 이용되었다. 정량화 화상 분석은 이전의 방법에 의거해서 행하였다(Sanchez-Ramos *et al.* (2009)). 부착된 디지털 카메라 시스템(DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 구비한 올림푸스 BX60 현미경을 이용해서 화상을 획득하였고, 해당 디지털 화상은 SimplePCI 소프트웨어(Compix Inc., Imaging Systems, Cranberry Township, PA)를 이용하여 정량화 분석을 위해서 윈도우 PC 내에 라우팅되었다. 양쪽 대상 해부 영역(해마 및 후각뇌피질)을 통해 5개의 5㎜ 절편(150㎜ 떨어짐)의 화상을 각 동물로부터 포착하였고, 백그라운드로부터 염색을 구별화하는 역치 광학 밀도가 얻어졌다. 각 대상 영역은 수동으로 편집하여 인공산물을 제거하였다. Aβ 부하 분석을 위하여, 데이터는 포착된 전체 면적(총 화소)에 대해서 포착된 면역표지화된 면적(양의 화소)의 퍼센트로서 기록된다. 시냅토파이신 면역활성을 평가하기 위하여, 모든 화상의 모드가 그레이 스케일로 변환된 후, 각 화상으로부터 양의 신호의 평균 강도는 제로(백색)에서 255(흑색)까지 상대 수치로서 해마의 CA1 및 CA3 영역에서 정량화되었다. 각 분석은 샘플 동일성에 대해 알지 못하는 단일 조사자(T.M.)에 의해 수행되었다.

[0135] 행동 과업. 각 분석은 샘플 동일성에 대해 알지못하는 단일의 조사자(N.G.)에 의해 수행되었고, 통계학적 분석은 처치군 동일성에 대해 알지못하는 단일의 조사자(M.R.)에 의해 수행되었다. 코드는 분석이 완료될 때까지 파손되지 않았다.

[0136] 방사상 아암 워터 미로. 공간적 작업 기억의 RAWM 과업을 위하여(Arendash *et al.* (2001); Ethell *et al.*

(2006); Arendash *et al.* (2007)), 알루미늄 삽입물을 100㎝ 원형 풀 속에 넣고, 중앙의 원형 스윔 영역으로부터 뻗은 6개의 방사상 분포된 스윔 아암을 형성한다. 2차원 및 3차원 시각적 단서의 모임은 상기 풀로 둘러싸여 있었다. 6개의 스윔 아암 중 하나가 침수된 도피 플랫폼(직경 9㎝)을 수용하고 있는 것을 정착시키기 전의 에러의 수는 8일의 전처리 시험 기간 및 4일의 후처리 시험 기간에 걸쳐서 5회 시도/day로 결정되었다. 4번째 시도(T4; 최종 획득 시도)와 5번째 시도(T5; 기억 유지 시도) 간에 30분 시간 지연이 있었다. 상기 플랫폼 위치는 상이한 아암으로 매일 변화시켰고, 이때 나머지 5개의 스윔 아암으로부터 5회의 각각에 대한 상이한 개시 아암이 세미-랜덤하게 선택되었다. 각 시도 동안(최대 60초), 마우스는 옳지 않은 아암으로 수영 시 그 시도의 개시 아암으로 되돌아왔고, 상기 침수된 플랫폼을 정착시키는 데 요구되는 시간이 초로서 기록되었다. 60초 시도 내에 플랫폼에서 마우스가 발견되지 않았다면, 이것은 30초 체재 동안 해당 플랫폼으로 안내된 것이다. 시도 4 및 5 동안 에러 수 및 도피 대기 시간은 모두 작업 기억의 지수인 것으로 생각되며, 이들은 AD 환자의 평가에서 임상적으로 이용되는 구체적인 항목의 표준 기록/회상 시험과 일시적으로 유사하다.

[0137] 인지 간섭 과업. 이 과업은 통상의 노령, MCI 및 AD 환자 간에 구별하기 위하여 임상적으로 최근 이용되는 인지 간섭 과업을 척도대로(measure-for-measure) 모방하도록 설계되었다(Loewenstein *et al.* (2004)). 과업은 두 상이한 방에 있는 2개의 RAWM 설비를 포함하고, 또한 표준 RAWM 시험에서 이용된 것과는 다른 시각적 단서 2세트를 구비한다. 이 과업은, 한 세트의 시각적 단서(RAWM-A에서)를 기억하도록 동물에게 요구하므로, 상이한 세트의 단서(RAWM-B에서)를 지니는 간섭 후, 초기 세트의 단서는 RAWM 과업을 성공적으로 해결하도록 회상될 수 있다. 5가지 행동 척도가 조사되었다: A1 내지 A3(RAWM "A"에서 수행된 처음 3회 시도로부터의 복합적인 3-시도 회상 점수), "B"(RAWM "B"에서 단일 시도로부터 얻어진 순방향 간섭 척도), A4(RAWM "A"에서의 단일 시도 동안 얻어진 역방향 간섭 척도) 및 "A5"(A4와 A5 사이의 20분 지연 후 RAWM "A"에서의 단일 시도로부터 얻어진 지연된-회상 척도). 표준 RAWM 과업과 함께, 이 간섭 과업은 이용된 RAWM 설비의 양쪽에 대한 상이한 아암 및 두 RAWM 설비에 대한 각 시험일에 대한 상이한 개시 아암으로 매일 변화되는 플랫폼 위치를 포함하였다. A1 시도와 B 시도에 대해서, 동물은 상기 플랫폼에 유도되기 전에 그 자체 상에 있는 해당 플랫폼을 발견하는 데 처음 1분이 허용되었다. 이어서, 실제의 시도는 각 케이스에서 수행되었다. 표준 RAWM 과업과 함께, 동물은 시도당 도피 플랫폼을 발견하는 데 60분이 부여되었고, 에러의 횟수와 도피 대기 시간은 시도당 기록되었다.

[0138] 통계학적 분석. 동축성 GM-CSF 투여 대 반대쪽 aCSF-주입 반구로부터의 아밀로이드 플라크 파라미터의 통계학적 분석은 쌍을 이룬 스튜던트 t-검정을 이용해서 수행되었고, < 0.05의 P-값이 유의한 것으로 여겨졌다. RAWM 데이터의 통계학적 분석을 위하여, 8일의 전처리 시험(2-일 블록 4개) 혹은 4일의 후처리 시험(2-일 블록 2개)이 일방향 ANOVA를 이용해서 개별의 블록에 대해서뿐만 아니라 모든 블록 전체에 대해서 평가되었다. 그 후, 각 군 간의 *post hoc* 쌍간 차이(pair-by-pair difference)는 피셔(Fisher) LSD(least significant difference) 시험으로 해소되었다. 인지 간섭 데이터의 통계학적 분석을 위하여, 2일 블록의 양쪽 모두는 개별적으로 분석되었고, 따라서 모두 4일이 일괄적으로 수행되었다. 일방향 ANOVA는 분석된 4개의 행동 척도의 각각에 대해서 이용되고 나서, $P < 0.05$에서의 군의 유의차를 결정하기 위하여 *post hoc* 피셔 LSD 시험을 행하였다. 피하 GM-CSF 투여로부터의 아밀로이드 플라크 침착 및 시냅토파이신 염색의 통계학적 분석은 두-꼬리부착 등분산적 스튜던트 t-검정을 이용해서 수행되었고, < 0.05의 P값이 유의한 것으로 고려된다.

[0139] **실시예 2**

[0140] 알츠하이머병은 인지 및 수행 기능의 쇠퇴의 증가에 따라 제시되는 연령관련 진행성 신경변성 장애이다. 알츠하이머 치매는 뇌혈관 기능장애(Humpel and Marksteiner (2005)), 뇌 실질(parenchyma) 및 혈관구조 벽에서의 아밀로이드 β(Aβ) 펩타이드의 세포외 축적(Rhodin *et al.* (2000); Scheuner *et al.* (1996))(주로 $A\beta_{1-42}$ 및 $A\beta_{1-40}$) 및 하이퍼포스폴릴화 타우 단백질로 구성된 신경섬유매듭의 신경세포내 축적(Rapoport *et al.* (2002))과 연관된다. 연관된 신경염증(neuroinflammation)은, 염증성 단백질 아폴리포프로테인 E(apoE) 및 α1-안티키모트립신(ACT)이 Aβ 펩타이드의 생체내 및 시험관내 아밀로이드 필라멘트로의 중합을 촉매하므로(Wisniewski *et al.* (1994); Ma *et al.* (1996); Potter *et al.* (2001); Nilsson *et al.* (2004); Padmanabhan *et al.* (2006)), AD 발병기전에 기여할 수 있다(Griffin *et al.* (1989); Akiyama *et al.* (2000); Wyss-Coray (2006)). 그러나, NSAID는 AD 병상을 역전시키거나 예방하는 데 실패하였고, 비정상 미세아교세포는 신경변성 치매에 우선하는 것으로 제시되어 있다(Streit *et al.* (2009)). 또한, 아밀로이드 플라크가 신속하게 형성되고 나서, 미세아교세포에 의해 장식되는 것으로 판명되었고(Koenigsknecht-Talboo *et al.* (2008); Meyer-Luehmann *et al.* (2008)), 상주 및 골수 유래의 양쪽 모두는 아밀로이드를 제거하는 능력과 의도를 제시하고 있다(Malm *et al.* (2005); Simard and Rivest (2004); Simard *et al.* (2006)).

[0141] 류마티스 관절염은 염증을 일으킨 활액 조직과 고도로 혈관이 분포된 파누스가 연골과 뼈에 회복할 수 없는 손상을 형성하는 자가면역질환이다. 이 염증성 파누스에서, 백혈구 모집단이 크게 확대되어, 많은 염증전 인자(proinflammatory factor)가 피드-포워드 기전(feed-forward mechanism)에서 함께 작용하여, 백혈구 증가증, 사이토카인/케모카인 방출, 파골세포형성, 혈관 신생 및 자가항체 생산(류머티스성 인자 및 항시트룰린단백 항체(anti-citrullinated protein antibodies)을 더욱 증가시킨다.(Szekanecz and Koch (2007); van der Voort *et al.* (2005); Schellekens *et al.* (2000)). 또, 적응성 면역 시스템은 $CD4^+$ 림프구 내의 Th17 표현형을 제시하고, 염증전 효과의 대부분을 유발시키는 역할을 담당하는 인터루킨(IL-17)의 궁극적인 생산을 가져온다(Parsonage *et al.* (2008); Cox *et al.* (2008)). 또한 백혈구 모집단의 증가는 집락자극인자, 즉, M-CSF(대식세포), G-CSF(과립구) 및 GM-CSF(과립구-대식세포)의 국소 발현을 일으킨다(Seitz *et al.* (1994); Leizer *et al.* (1990); Nakamura *et al.* (2000)).

[0142] RA 내의 상향 조절된 백혈구가 잠재적으로 뇌 속으로 들어가서 AD 병상 및/또는 뉴런 기능장애의 발달을 저해할 수 있었지만, AD 환자 뇌속으로의 림프구 침윤물은 보고되어 있지 않았다. 침윤의 결손은 고유의 면역 시스템의 활성화가 RA 환자의 AD 병상 예방을 담당할 수도 있는 것을 시사하고 있다. 예를 들어, 보체 단백질은 AD 뇌 속에서 상향 조절되고, C3 전환효소의 저해는 AD 마우스들에서 아밀로이드 병상을 상당히 증가시킨다(Wyss-Coray *et al.* (2002)). 골수-유도 미세아교세포는 아밀로이드 침착의 규제에 결정적인 역할을 하지만, 이 연관은 노화에 따라 저하되는 반면, AD 병상은 증가한다(Simard *et al.* (2006)). El Khoury 및 그의 동료들은, 미세아교세포가 다수의 방식으로, 즉, 케모카인 수용체(CCR2) 점증에 의한 아밀로이드증의 지연을 통해서, 그의 리간드인, MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)의 상향 조절에 의해(MCP-1/CCL2), Aβ-결합 청소제 수용체(scavenger receptor)(CD36, 청소제 수용체 A, 및 최종당화산물(advanced glycation end product)용의 수용체)의 유도 발현에 의해서, 그리고 Aβ-열화 효소[네프릴리신(neprilysin), 인슐리신(insulysin) 및 기질금속단백분해효소 (MMP9)]의 유도 발현에 의해서, AD 병인에 대해 실질적으로 보호되는 것을 제시하였다. 그러나, 이들 수용체 및 효소의 발현은 또한 노화에 따라 감소된다(Hickman *et al.* (2008); El Khoury *et al.* (2007)).

[0143] 고유의 면역 시스템 및 AD의 상호작용을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 3개의 구조적으로-무관한 집락자극인자(M-CSF, G-CSF 및 GM-CSF)의 AD 병인의 효과를 연구하였고, 이들 인자는 모두 RA에서 상향 조절된다(Seitz *et al.* (1994); Leizer *et al.* (1990); Nakamura *et al.* (2000)). 이들 CSF는 그들 각각의 백혈구의 생존을 향상시키고, 단핵 세포 전구체로부터의 그들의 증식 및 분화를 추진시킨다. M-CSF 및 G-CSF는 고유의 면역 시스템의 특정 서브세트를 유도하는 한편, GM-CSF는 고유의 세포의 전체 영역을 유도한다. PS/APP 마우스 내에 2주 동안 M-CSF의 양측 icv 주입을 이용해서, 본 발명자들은 우선 플라크 침착에 대한 M-CSF의 효과를 조사하였다. 면역조직화학 분석은 유사한 나이의 마우스들 간의 아밀로이드 침착의 상당한 편차를 보였고(도 10), 이것은 제한된 마우스 코호트에서 M-CSF의 효과를 결정하는 본 발명자들의 능력을 상당히 떨어뜨리는 것이었다. 신규한 양측 뇌 주입 카테터를 개발함으로써 본 발명자들의 약물 전달 시스템을 개선시키는 한편, 본 발명자들은 실질-주입된 재조합 펩타이드가 주입된 반구에 편재화된 채로 있는 것을 발견하였다. 이들 발견 사항으로 인해 대조군으로서 비히클의 반대쪽 주입과 함께 한쪽 해마내 일시주입으로서 CSF를 투여하여, 통계학적 유의성을 얻기 위하여 다수의 형질전환 마우스 및 연령-정합된 한배 새끼 대조군에 대한 필요를 미연에 방지하였다. 각 CSF는 4마리의 마우스의 해마 속으로 정위 주입되었고, 인공 뇌척수액 비히클(aCSF)은 그 반대쪽에 주입되었다. 마우스들은 주입 후 7일째에 희생되었다.

[0144] 현저하게는, M-CSF 주입은 전체의 처치된 반구의 가시적인 팽윤, 절개 시의 현저한 취약성 및 하나의 마우스에서, 주입 부위에서의 명백한 과다형성을 가져온다(도 11c). 유선에서의 M-CSF 및/또는 그의 수용체의 과발현은 마찬가지로 종양 형성 및 과다형성을 초래하였다(Kirma *et al.* (2004)). 아밀로이드 플라크 부하는 대조측에 비해서 M-CSF-주입된 반구에서 상당히 변화하지 않았다(데이터는 표시 생략). 그러나, 문헌[Boissonneault *et al.* (2009)]은 M-CSF의 만성 복막내(i.p.) 주입이 아밀로이드 침착과 인지장애를 예방하여 역전시키는 것을 개시하고 있다. GFP-발현 골수를 이용해서, 상기 저자는 또한 M-CSF가 골수 유래 미세아교세포의 상당한 축적을 유도하는 것도 발견하였다(Boissonneault *et al.* (2009)). Boissonneault *et al.*에 의하면, 상이한 연구길이와 투약량 효과에 대한 이들 데이터와 본 발명자들의 관점의 차이는 5㎍ 해마내 일시주입에 비해서 주입 당 1.3 ㎍ M-CSF의 만성 i.p.로 전달하는 것을 나타내고 있다.

[0145] M-CSF와는 대조적으로, G-CSF 주입은 팽윤을 유발하지 않았고 아밀로이드 침착의 일부의 적당한 저감을 보였으며(도 12a 및 도 12b), 이것은 동료 연구자들에 의한 독립적인 관찰에 의해 입증되었다(Sanchez-Ramos *et al.* (2009)). 그러나, GM-CSF 주입은 대조 반구에 비해서 명확한 아밀로이드 저감을 가져왔고(도 13a 내지 도 13d), 따라서, 본 발명자들의 후속의 실험은 모두 AD 마우스에서의 GM-CSF의 효과를 연구하는 데 중점을

두었다. 아밀로이드 플라크의 정량화는 개별적인 마우스 내에서 상당한 저감을 그리고 모든 측정된 플라크 파라미터에 대해 전체적으로 상당한 저감을 보였다(도 6b 및 도 14a 내지 도 14d의 아래쪽 도면). 페레트 직경 및 적분 밀도 파라미터는 모두 4마리의 마우스의 GM-CSF-주입된 반구를 통해 저감되었고, 이것은 전체적인 플라크 크기와 치밀한 코어가 동시에 저감된 것을 나타낸다. 동일한 마우스의 개별적인 구역간 그리고 상이한 마우스들 간에서의 플라크 침착의 감소율은 8 내지 62%(데이터는 표시 생략)의 범위 내에서 다양했고, 이에 따라 각 뇌를 통해서 그리고 다수의 마우스 간에 아밀로이드 침착의 편차를 더욱 두드러지게 하였다.

[0146] 이들 병리 데이터에 기초하여, 본 발명자들은 AD 병리 및 인지 기능에 대한 피하 GM-CSF 주입의 효과를 조사하였다. GM-CSF 처치 전에, APPsw+PS1(Tg) 마우스들은 먼저 RAWM 시험에 의해 작업 기억에 대해 인지-손상된 것으로 확인되었다. 비형질전환 대조 마우스들(NT)과 Tg 마우스들은 양쪽 모두 이어서 GM-CSF 처리군과 식염수 처치군으로 두 인지-균형 군으로 더욱 분할되었다. RAWM 시험 후-주입은 Tg 대조 마우스들이 NT 대조 마우스들에 비해서 실질적으로 손상된 것으로 재확인되었다. 이 손상은 개별 시험 블록에서 또한 4일의 시험 기간 모두에 대해서 명백하였다(도 7a 내지 도 7d). 첨예한 대비에 있어서, GM-CSF-처치된 Tg 마우스들은 개별 블록 또한 전체 동안 NT 대조 마우스들과 균일하거나 보다 양호하게 수행되었다. GM-CSF-처치된 NT 마우스들은 NT 대조군과 동일 혹은 다소 양호하게 수행되었다(도 7a 내지 도 7d).

[0147] 인지 간섭 과업의 평가 전에, 마우스들은 2일 휴식하였다. 이 과업은 높은 정도의 정밀도로 나이 든 대조군으로부터 경미한 인지장애(MCI) 환자를 구별하는 인간 간섭 시험을 모방하고 있다(Loewenstein *et al.* (2004)). 4일의 시험에 걸쳐서 평가된 4개의 인지 간섭 측정 모두에 대해서(도 7e), Tg 대조 마우스들은 NT 마우스들에 비해서 명백하게 손상되었고, GM-CSF로 처치된 Tg 마우스들은 Tg 대조군에 비해서 유의하게 양호한 3-시도 회상 및 지연된 회상을 보였다. 실제로, 4가지 인지 측정 모두에 대해서, GM-CSF-처치된 형질전환 AD 마우스들은 NT 마우스들과 유사하게 수행하였다. Tg 마우스에서의 GM-CSF 처치의 특히 강력한 효과는 시험의 처음 절반 동안 순방향 간섭 측정에 대해서 명백하였고(도 7f), 여기서 GM-CSF-처치된 Tg 마우스는 Tg 대조보다 상당히 양호하게 또한 NT 마우스의 양 군과 동일하게 수행하였다. 순방향 간섭에 대한 민감성은 망각 속도 및 지연된 회상의 전통적인 측보다 나이든 표준으로부터 MCI 환자와 AD 환자를 구별짓기 위하여 더욱 민감한 표지자인 것으로 보고되어 있다(Loewenstein *et al.* (2004)). 삽입어구적으로, GM-CSF-처치된 NT 마우스도, 통계학적으로 유의하지는 않지만, 행동 연구에서 개선된 인지 쪽으로 향하는 경향이 있었다. 이 연구의 Tg 마우스로부터의 뇌의 후속의 분석은 대조군의 Tg 마우스에 비해서 후각뇌피질(↓55%) 및 해마(↓57%) 내에서 커다란 감소를 유발시킨 것으로 드러났다(도 8e).

[0148] GM-CSF-처치된 Tg 마우스들의 개선된 인지 기능과 저감된 피질 아밀로이드증은 CA1 및 CA3 양쪽 모두에서 증가된 시냅토파이신 면역반응성만큼 유사하였고(도 9a 내지 도 9e), 이것은 이들 해마 영역에서 시냅스 밀도가 증가된 것을 나타낸다. 종래의 연구는 해마 치아이랑(DG: dentate gyrus) 내의 성인 신경 줄기 세포가 GM-CSF 수용체를 발현하고, GM-CSF는 용량 의존 방식으로 이들 세포의 신경 분화를 증가시킨 것을 나타내었다(Kruger *et al.* (2007)). 이와 같이 해서, 관찰된 GM-CSF-유발 인지 향상에 대한 하나의 기전은 해마 내의 침착된 Aβ의 증가된 제거이고, 이에 따라 CA3에 대한 DG 이끼섬유 신경감응의 뉴런 성장/시냅스 분화가 일어나, 결과적으로 CA1 내로의 섀퍼 곁가지(Schaffer collateral)의 신경감응/시냅스형성을 증가시킨다. 후각뇌피질로부터의 침착된 Aβ의 제거는 또한 DG 및 CA1에서의 해마 돌출 영역에 대한 관통로 시인성을 증가시킬 수 있다. 이와 같이 해서, 작업(단기) 기억에 중요한 해마/후각뇌피질 회로의 GM-CSF-유도 증강은 알츠하이머의 Tg 마우스에서 작업 기억 손상의 GM-CSF의 역전의 기초가 될 수 있다.

[0149] **실시예 3**

[0150] 4마리의 10 내지 12개월 월령 PS/APP 마우스에게는 뇌의 한쪽 반구 내의 해마 속으로 5㎍ rmGM-CSF를 정위 주입하고 그 반대쪽에는 비히클(aCSF: artificial cerebrospinal fluid)을 주입하였다. 마우스들은 7일 후 안락사시켜 식염수-관류시키고, 10% 포르말린으로 고착시킨 후, 14㎛에서 동결 절편되거나 혹은 파라핀 매립되고 5㎛에서 절편화되었다. 표준 면역조직화학 기술은 아밀로이드 침착을 표지화하도록 6E10 및 MabTech의 항-Aβ항체를 이용하였다. 현미경 검사 및 화상 처리는 Axiovision 소프트웨어를 이용해서 Zeiss Imager Z1 상에서 수행되었다. 화상 J는 아밀로이드 침착물을 정량화하기 위하여 이용되었다.

[0151] 16마리의 10 내지 12개월 월령 PS/APP 마우스와 17마리의 연령 정합된 비형질전환 마우스는 작업 기억 파라다임인 RAWM에 의해 인지적으로 예비검사되었다. 각 군으로부터 8마리의 마우스는 rmGM-CSF의 피하 주사(5㎍/day)를 위해 세미-랜덤하게 채택되었다. 나머지 절반은 매일 비히클(식염수)의 주입량을 공급하였다. 예비-시험 후 매일 주입을 개시하기 전에 15일의 휴식 기간이 있었다. 마우스들은 RAWM 후-시험 4일 전 10일 동안 주입되

었다. 인지 간섭 과업 시험 6일 전에 2일간 휴식 기간이 있었다. 주입은 시험 전체를 통해서, 그리고 행동 시험을 수행하기 1시간 이상 전에 부여되었다. 행동 시험 및 분석은 동일성 군에 대해서 맹검된 별도의 스태프에 의해 수행되었다.

[0152] 결과:

[0153] rmGM-CSF의 해마내 일시 주사는, 각각의 뇌 반구를 통해서, 아밀로이드 플라크 침착을 60%만큼 크게 저감시켰다. rmGM-CSF 피하 주입 시, 대조군에 비해서 인지 장애인 것으로 보이는 PS/APP 마우스들은, 표준 RAWM 과업 시 그들의 인지장애를 유의하게 역전시켰고, rmGM-CSF를 공급받은 PS/APP 마우스들은 모두 4개의 인지 척도에서 비형질전환 마우스들과 유사한 결과를 보였다. 그러나, 아밀로이드 플라크 침착의 저감은 피하 연구에서 관찰되지 않았다.

[0154] GM-CSF는 유의하게는 알츠하이머병-유사 병상을 유의하게 역전시키고 생체내 인지를 개선시킨다.

[0155] 본 명세서에 기술된 실시예 및 실시형태들은 예시적인 목적만을 위한 것일 뿐이며 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 시사될 수 있고, 이는 본 출원의 취지와 범위 및 후속되는 청구의 범위에 포함되어야 하는 것으로 이해될 필요가 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 모든 발명 또는 이의 실시형태의 모든 구성요소 또는 제한들은 임의의 및/또는 모든 다른 구성요소 또는 제한(개별적으로 또는 임의의 조합으로), 또는 본 명세서에 개시된 임의의 다른 발현 또는 이의 실시형태와 조합될 수 있고, 이러한 모든 조합들은 제한 없이 본 발명의 범위로 간주되어야 한다.

[0156] **참고 문헌**

참고 문헌

미국 특허 제4,559,157호 공보

미국 특허 제4,608,392호 공보

미국 특허 제4,820,508호 공보

미국 특허 제4,938,949호 공보

미국 특허 제4,992,478호 공보

미국 특허 제5,034,322호 공보

미국 특허 제5,106,739호 공보

미국 특허 제5,167,649호 공보

미국 특허 제5,625,136호 공보

미국 특허 제6,960,648호 공보

미국특허 출원 공개 제20020035243호 공보

미국특허 출원 공개 제20020120100호 공보

미국특허 출원 공개 제20030032594호 공보

국제특허출원 제PCT/US08/73974호 공보

Akiyama, H. *et al.* (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383-421.

Altschul, S. F. *et al.* (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Altschul, S. F. *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs" *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.

Arendash, GW *et al.* (2001) "Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes" *Brain Res* 891:42-53

Arendash, GW *et al.* (2007) "A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice" *Neuroscience* 149:286-302

Beltz, G.A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C. (1983) "Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods" *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285.

[0157]

Boissonneault, V. *et al.* (2009) Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1078-1092.

Bundgaard, H., Ed. (1985) Design of Prodrugs, Elsevier

Bundgard, H. (1992) *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8:1-38

Cox, C.A. *et al.* (2008) Both Th1 and Th17 are immunopathogenic but differ in other key biological activities. *J Immunol* 180, 7414-7422.

de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983) "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(1):21-25.

El Khoury, J. *et al.* (2007) Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13, 432-438.

Ethell, DW *et al.* (2006) "Abeta-specific T-cells reverse cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's mice" *Neurobiol Dis* 23:351-361

Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen (1987) "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure" *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84(21):7413-7417.

Fisher, J.W. (2003) "Erythropoietin: physiology and pharmacology update" *Exp Biol Med (Maywood)*. 228(1):1-14.

Götz, J, F. Chen, J. van Dorpe, R.M. Nitsch (2001) "Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils" *Science*, 293(5534):1491-5.

Griffin, W.S. *et al.* (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7611-7615.

Hickman, S.E., Allison, E.K. and El Khoury, J. (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28, 8354-8360.

Higuchi, T. and Stella, V. (1987) "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", 14 A.C.S. Symposium Series, and Bioreversible Carriers in Drug Design, E.B. Roche, Ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press

Humpel, C. and Marksteiner, J. (2005) Cerebrovascular damage as a cause for Alzheimer's disease. *Curr Neurovasc Res* 2, 341-347.

Karlin S., Altschul, S. F. (1990) "Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268.

[0158]

Karlin S., Altschul, S. F. (1993) "Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular Sequences" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.

Kirma, N. *et al.* (2004) Overexpression of the colony-stimulating factor (CSF-1) and/or its receptor c-fms in mammary glands of transgenic mice results in hyperplasia and tumor formation. *Cancer Res* 64, 4162-4170.

Koenigsknecht-Talboo, J. *et al.* (2008) Rapid microglial response around amyloid pathology after systemic anti-Abeta antibody administration in PDAPP mice. *J Neurosci* 28, 14156-14164.

Krogsgaard-Larsen and Bandaged, H., Eds. (1991) A Textbook of Drug Design and Development, Chapter 5 "Design and Applications of Prodrugs" 113-191

Kruger, C., Laage, R., Pitzer, C., Schabitz, W.R. and Schneider, A. (2007) The hematopoietic factor GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) promotes neuronal differentiation of adult neural stem cells in vitro. *BMC Neurosci* 8, 88.

Leizer, T., Cebon, J., Layton, J.E. and Hamilton, J.A. (1990) Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* 76, 1989-1996.

Loewenstein, D.A. *et al.* (2004) Semantic interference deficits and the detection of mild Alzheimer's disease and mild cognitive impairment without dementia. *J Int Neuropsychol Soc* 10, 91-100.

Ma, J., Brewer, H.B., Jr. and Potter, H. (1996) Alzheimer A beta neurotoxicity: promotion by antichymotrypsin, ApoE4; inhibition by A beta-related peptides. *Neurobiol Aging* 17, 773-780.

Malm, T.M. *et al.* (2005) Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis* 18, 134-142.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Martin, B.K. *et al.* (2008) Cognitive function over time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT): results of a randomized, controlled trial of naproxen and celecoxib. *Arch Neurol* 65, 896-905.

McGeer, P.L., Rogers, J. and McGeer, E.G. (2006) Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis* 9, 271-276.

Meyer-Luehmann, M. *et al.* (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720-724.

[0159]

Nakamura, H. *et al.* (2000) High serum and synovial fluid granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 18, 713-718.

Nakeya, N. *et al.* (1984) *Chem. Pharm. Bull.*, 32:692

Nielsenw, N.M. and Bundgaard, H. (1988) "Glycolamide esters as biolabile prodrugs of carboxylic acid agents: Synthesis, stability, bioconversion, and physicochemical properties" *J. Pharm. Sci.*, 77(4):285-298.

Nilsson, L.N. *et al.* (2004) Cognitive impairment in PDAPP mice depends on ApoE and ACT-catalyzed amyloid formation. *Neurobiol Aging* 25, 1153-1167.

Padmanabhan, J., Levy, M., Dickson, D.W. and Potter, H. (2006) Alpha1-antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in Alzheimer's disease brain, induces tau phosphorylation in neurons. *Brain* 129, 3020-3034.

Parsonage, G. *et al.* (2008) Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha. *Arthritis Res Ther* 10, R47.

Potter, H., Wefes, I.M. and Nilsson, L.N. (2001) The inflammation-induced pathological chaperones ACT and apo-E are necessary catalysts of Alzheimer amyloid formation. *Neurobiol Aging* 22, 923-930.

Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P. and Ferreira, A. (2002) Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6364-6369.

Rhodin, J., Thomas, T., Bryant, M. and Sutton, E.T. (2000) Animal model of Alzheimer-like vascular pathology and inflammatory reaction. *Ann N Y Acad Sci* 903, 345-352.

Ritchie, K. and S. Lovestone (2002) "The dementias" *Lancet*, 360(9347):1759-66.

Sanchez-Ramos, J. *et al.* (2009) Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) Decreases Brain Amyloid Burdenand Reverses Cognitive Impairment in Alzheimer's Mice. *Neuroscience*.

Schellekens, G.A. *et al.* (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43, 155-163.

Scheuner, D. *et al.* (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.

Seitz, M., Loetscher, P., Fey, M.F. and Tobler, A. (1994) Constitutive mRNA and protein production of macrophage colony-stimulating factor but not of other cytokines by synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Br J Rheumatol* 33, 613-619.

[0160]

Simard, A.R. and Rivest, S. (2004) Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* 18, 998-1000.

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

Streit, W.J., Braak, H., Xue, Q.S. and Bechmann, I. (2009) Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*

Szekanecz, Z. and Koch, A.E. (2007) Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 19, 289-295.

van der Voort, R. *et al.* (2005) Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum* 52, 1381-1391.

Widder, K. *et al*, Eds. (1985) Methods in Enzymology, Academic Press, 42:309-396

Wisniewski, T., Castano, E.M., Golabek, A., Vogel, T. and Frangione, B. (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 145, 1030-1035.

Wyss-Coray, T. (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12, 1005-1015.

Wyss-Coray, T. *et al.* (2002) Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10837-10842.

Xu, D., McElroy, D., Thornburg, R. W., Wu, R. *et al.* (1993) "Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants" *Plant Molecular Biology* 22:573-588.

Fisher, J.W. (2003) "Erythropoietin: physiology and pharmacology update" *Exp Biol Med (Maywood)*, 228:1-14).

Rogers, J. *et al.* (2006) "Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes" *Neurobiol Aging*, 27:1733-1739.

Cadman, E.D. and Puttfarcken, P.S. (1997) "Beta-amyloid peptides initiate the complement cascade without producing a comparable effect on the terminal pathway in vitro" *Exp Neurol* 146:388-394.

Helmy, K.Y. *et al.* (2006) "CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens" *Cell* 124:915-927.

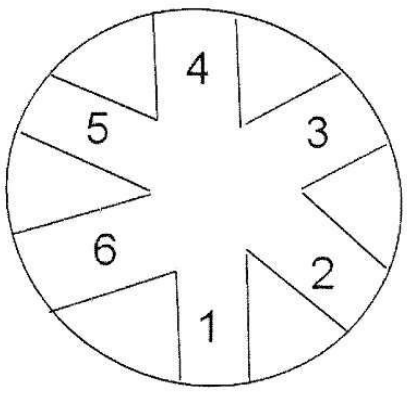
[0161]

Czygier, M., Lawicki, S., Stankiewicz, I. & Szmitkowski, M. (2007) [Stem cell factor (SCF) in the plasma and phagocytic functions of granulocytes in breast cancer patients]. *Przegl Lek* 64:1014-1017.

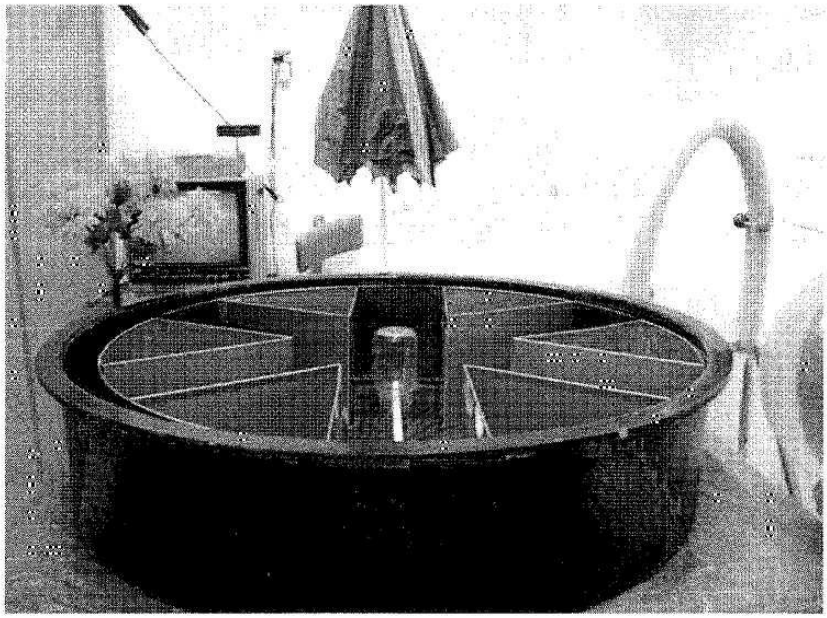
[0162]

도면

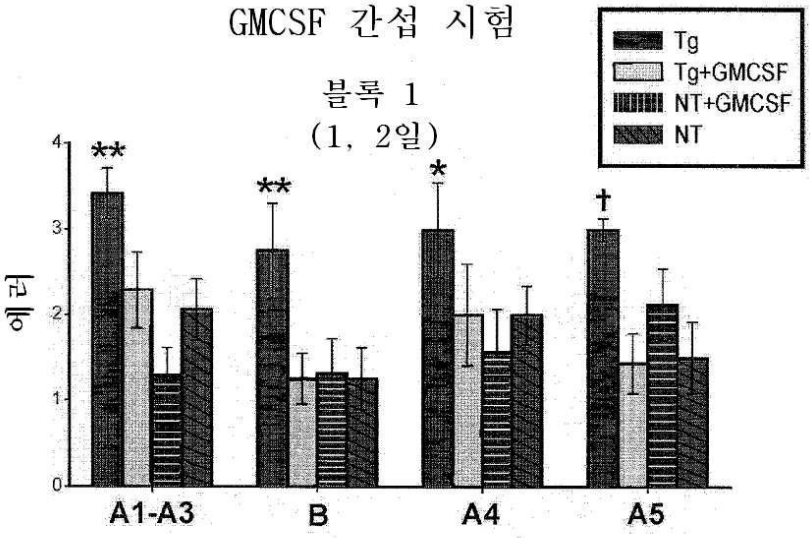
도면1



도면2



도면3

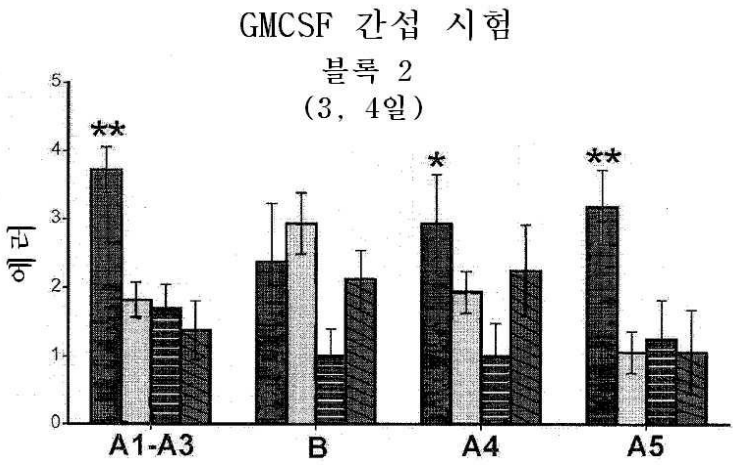


** Tg는 모든 다른 군과는 유의하게 상이함

* Tg는 3군과는 유의하게 상이함

† Tg는 Tg+GMCSF 및 NT(대 NT+GMCSF, p=0.09에서)와는 유의하게 상이함

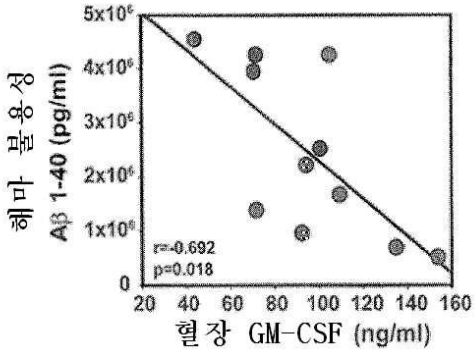
도면4



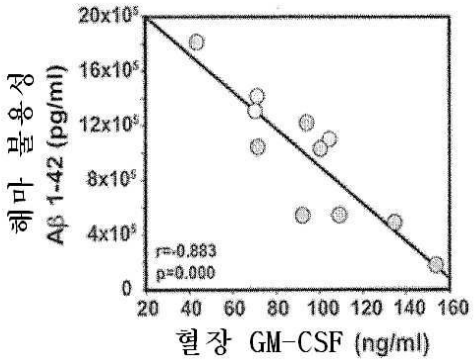
** Tg는 모든 다른 군과는 유의하게 상이함

* Tg는 3군과는 유의하게 상이함

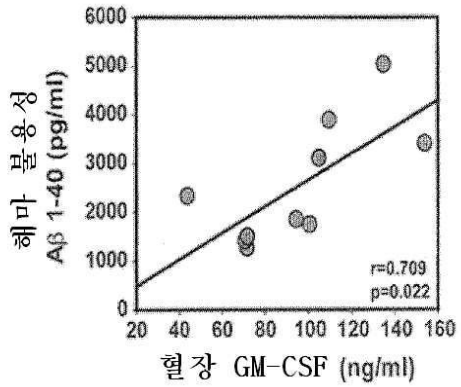
도면5a



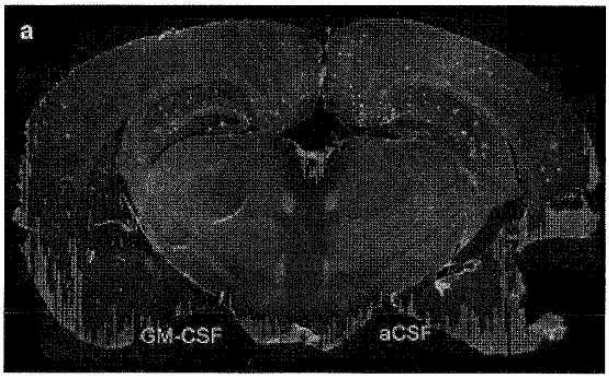
도면5b



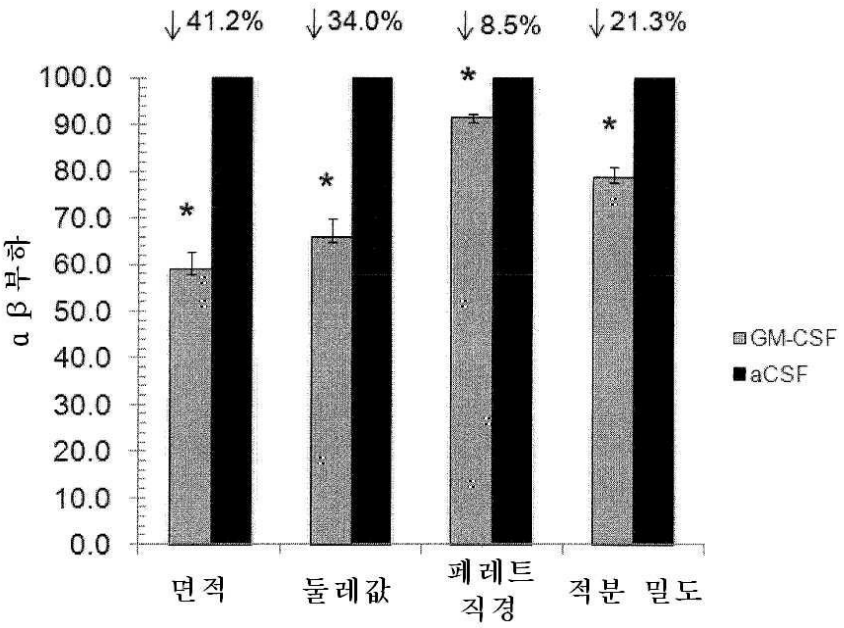
도면5c



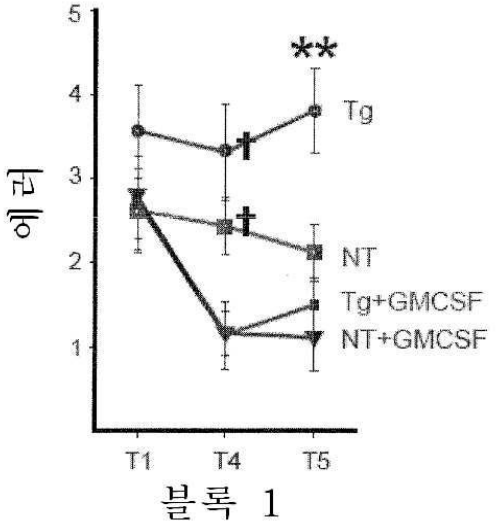
도면6a



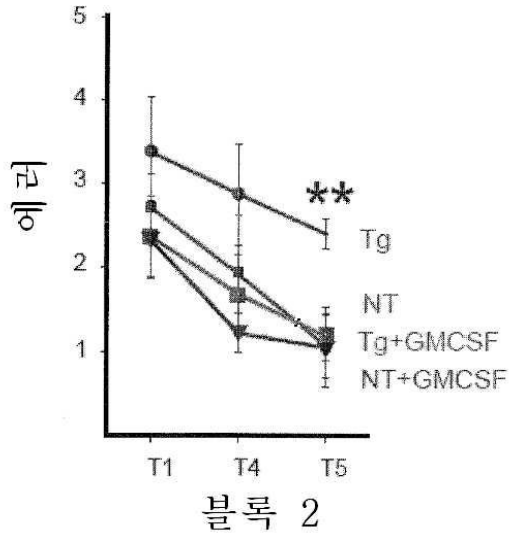
도면6b



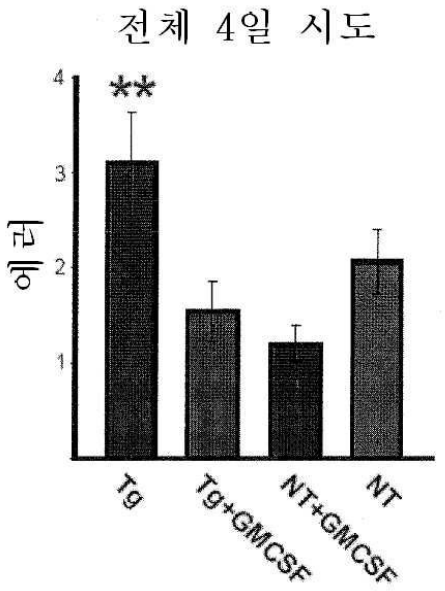
도면7a


5
4
3
2
1
에러
**
Tg
NT
Tg+GMCSF
NT+GMCSF
T1
T4
T5
블록 1

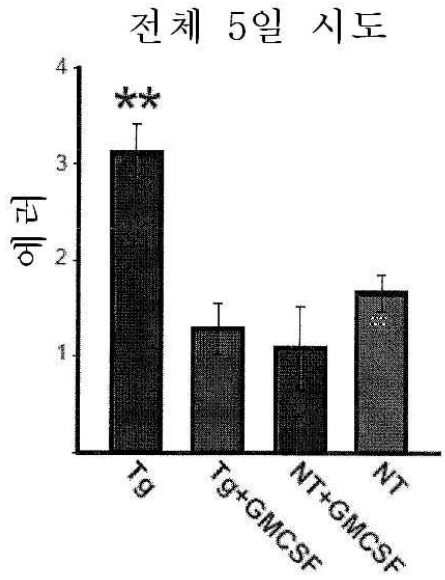
도면7b


5
4
3
2
1
에러
**
Tg
NT
Tg+GMCSF
NT+GMCSF
T1
T4
T5
블록 2

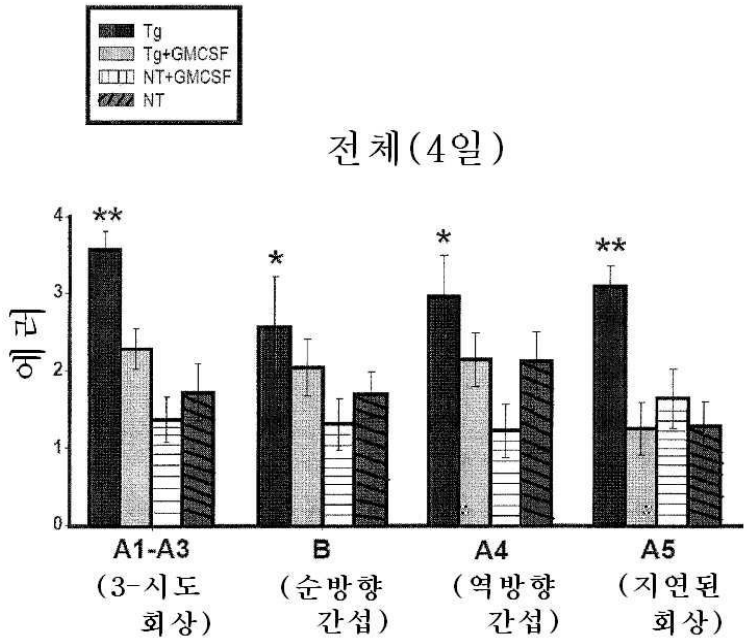
도면7c


전체 4일 시도
에러
4
3
2
1
**
Tg
Tg+GMCSF
NT+GMCSF
NT

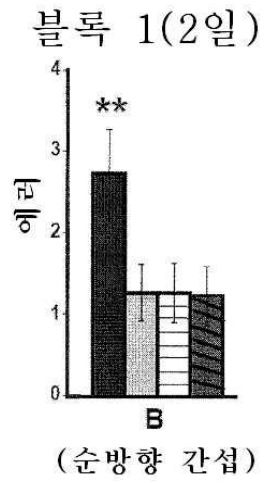
도면7d


전체 5일 시도
에러
4
3
2
1
**
Tg
Tg+GMCSF
NT+GMCSF
NT

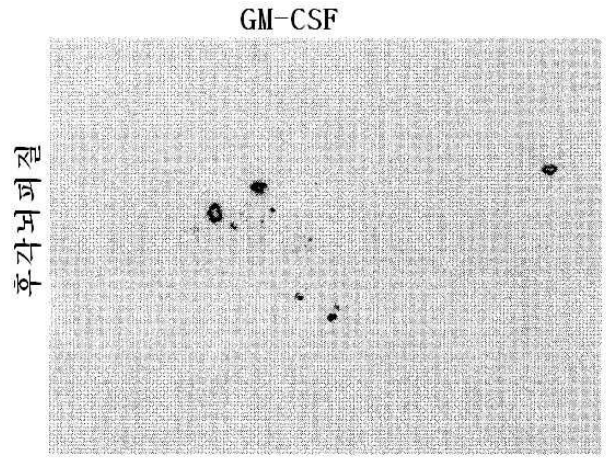
도면7e



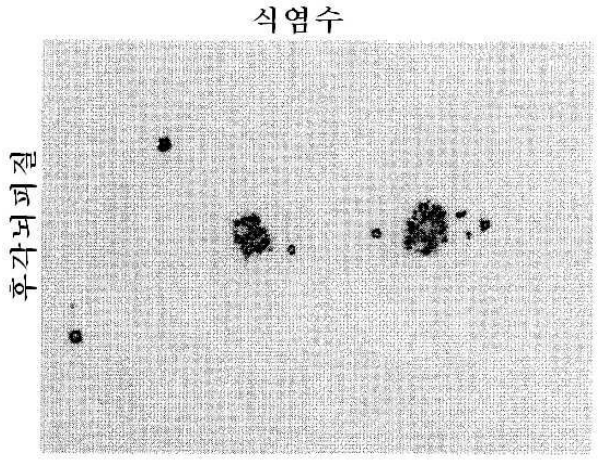
도면7f



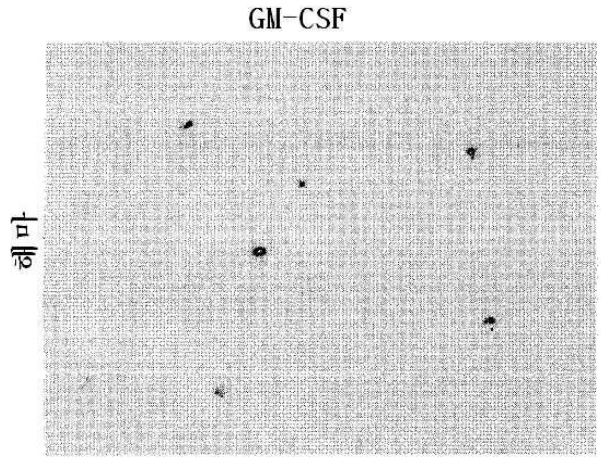
도면8a



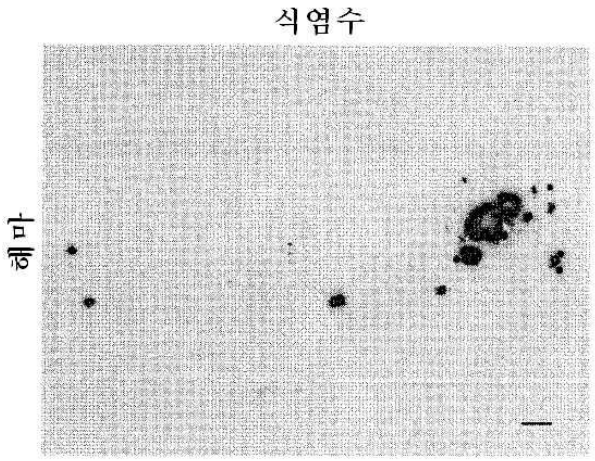
도면8b



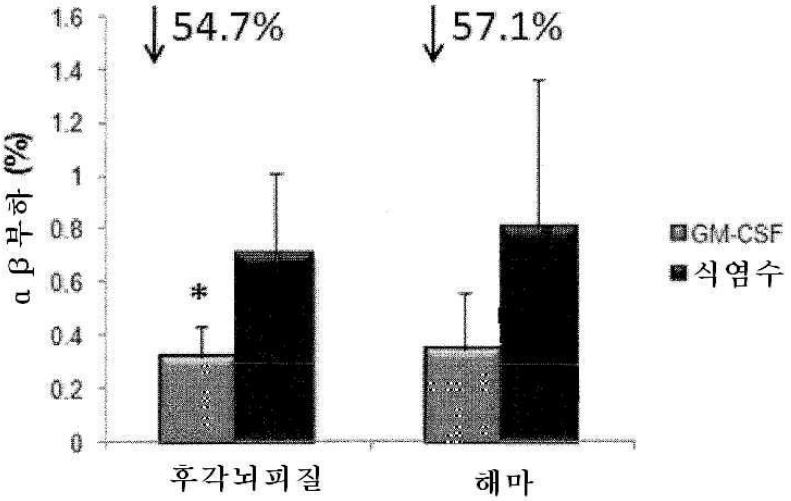
도면8c



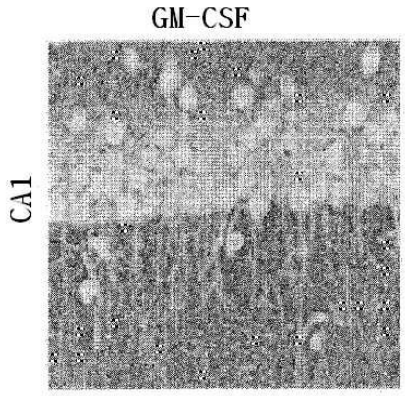
도면8d



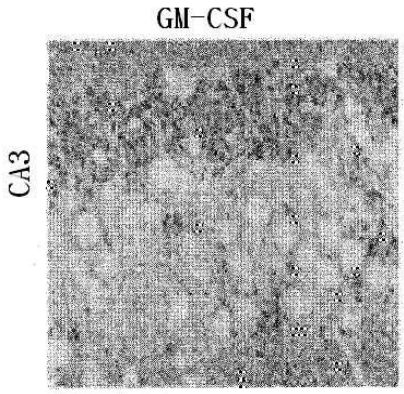
도면8e



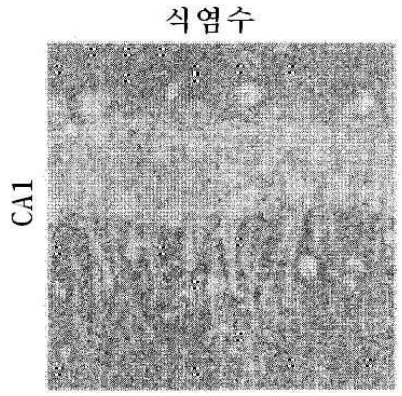
도면9a



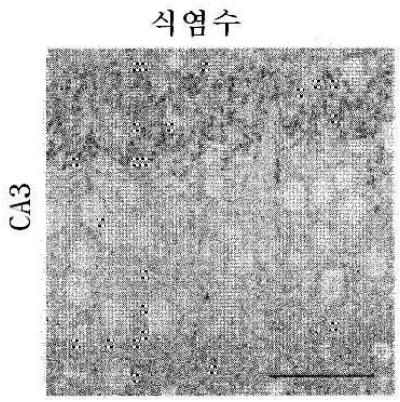
도면9b



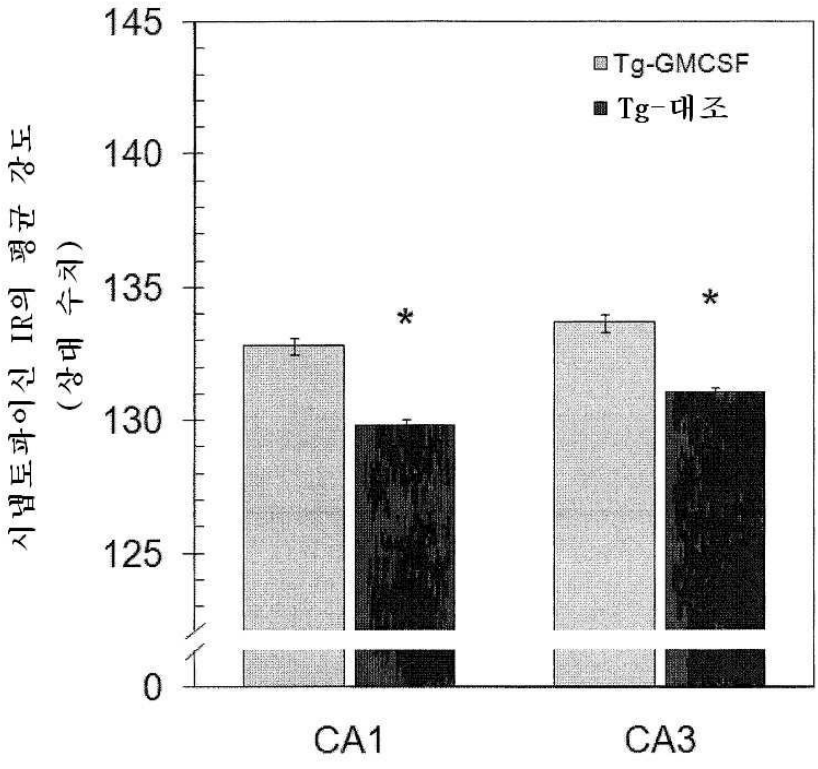
도면9c



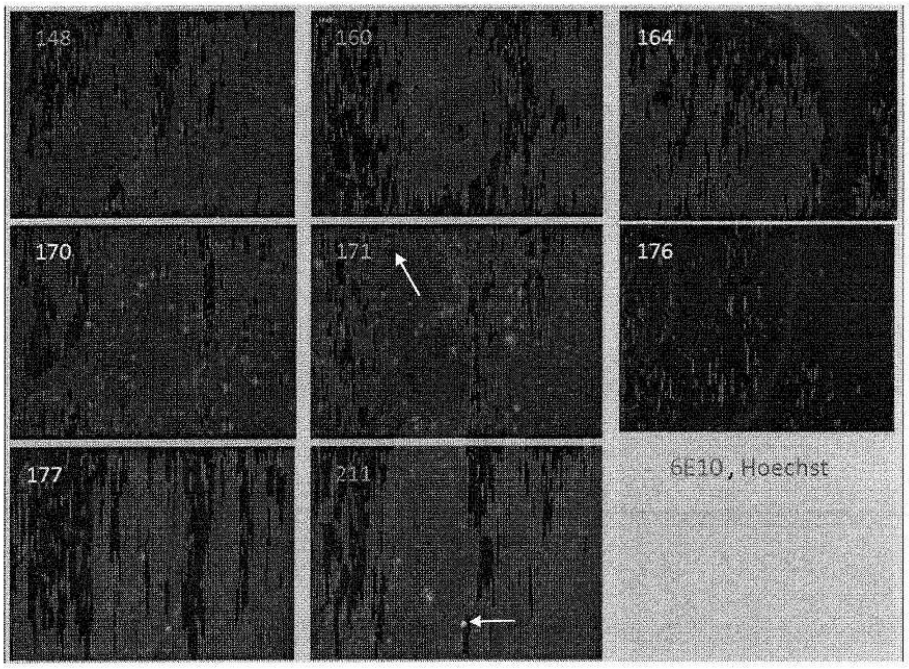
도면9d



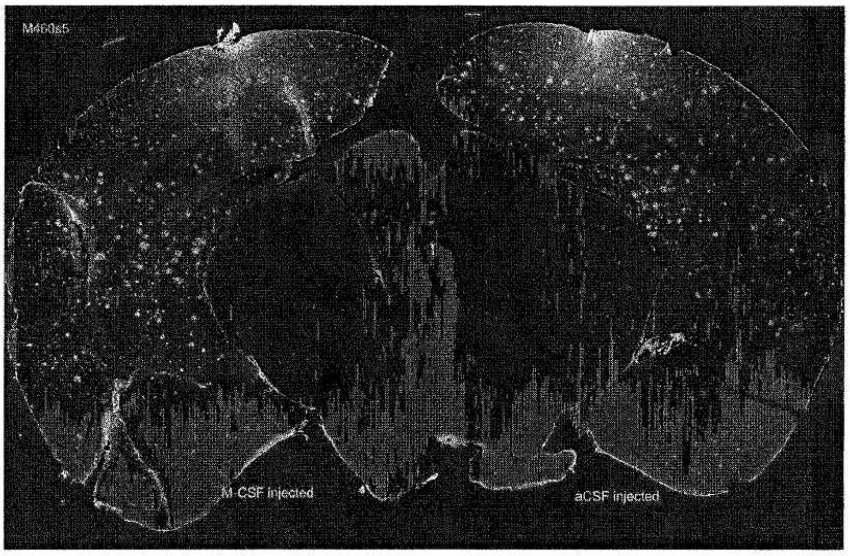
도면9e



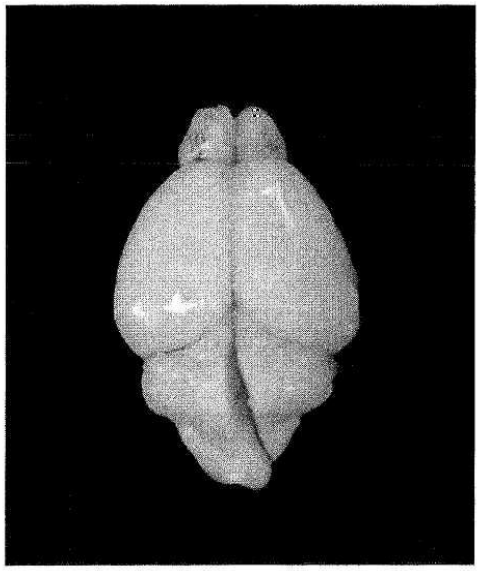
도면10


148
160
164
170
171
176
177
211
6E10, Hoechst

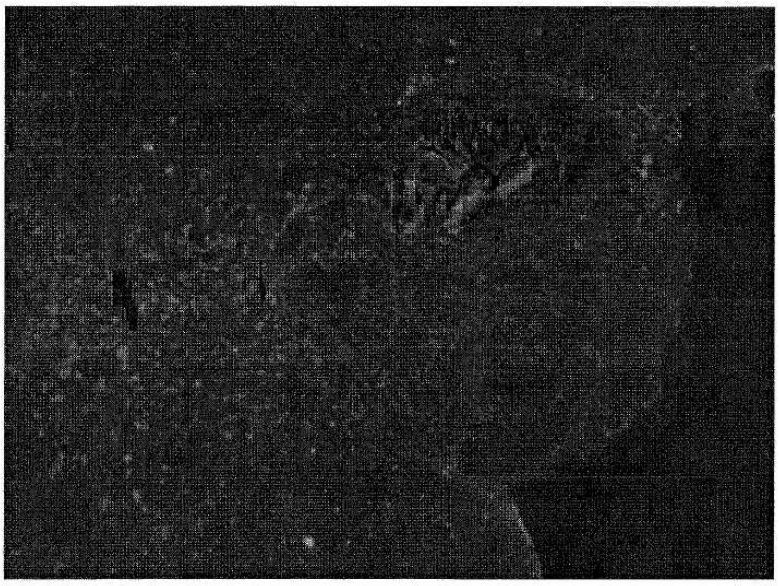
도면11a


M4004e5
M-CSF injected
aCSF injected

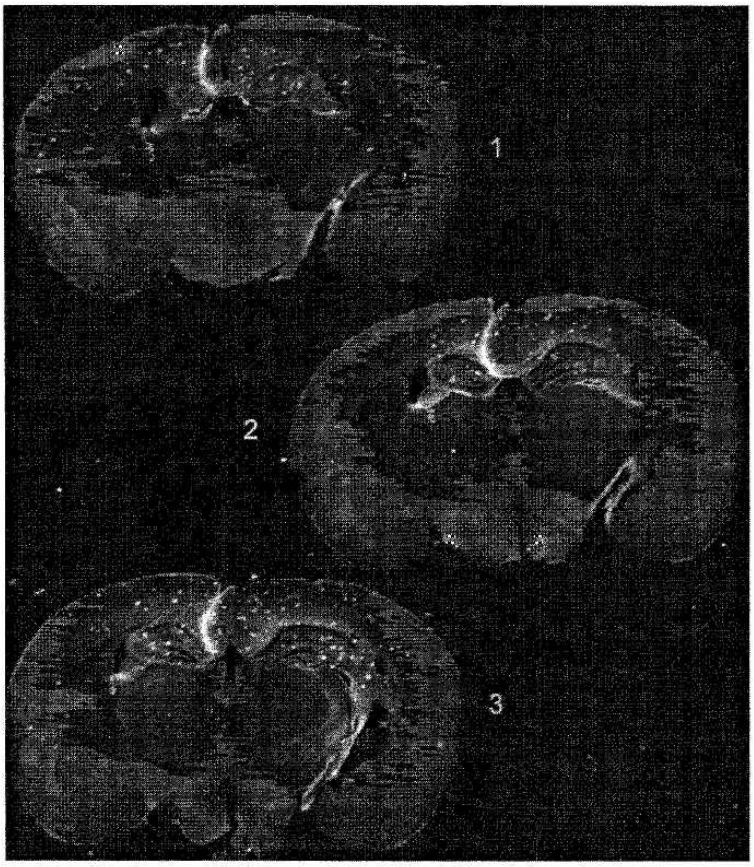
도면11b



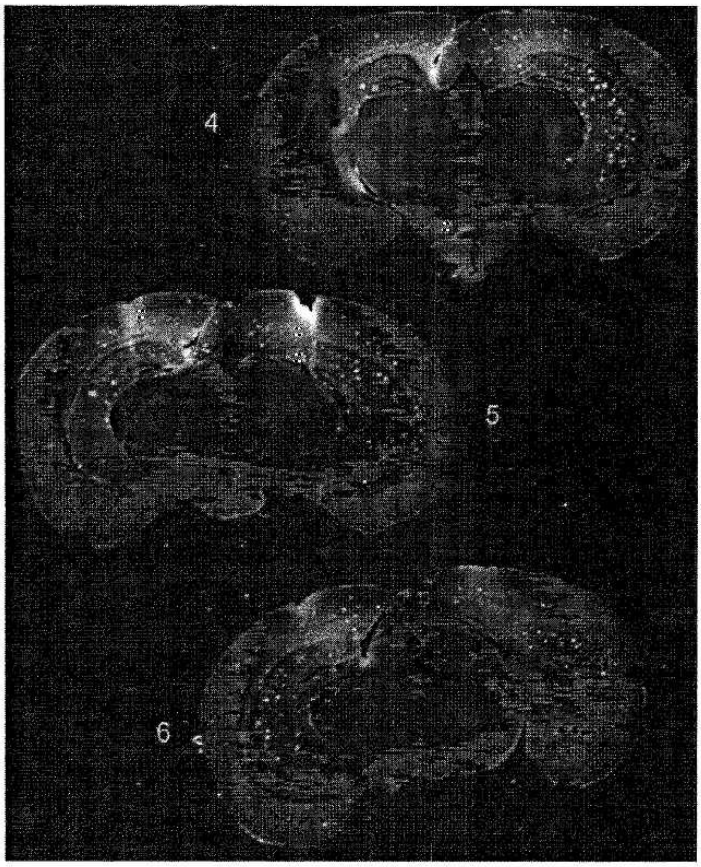
도면11c



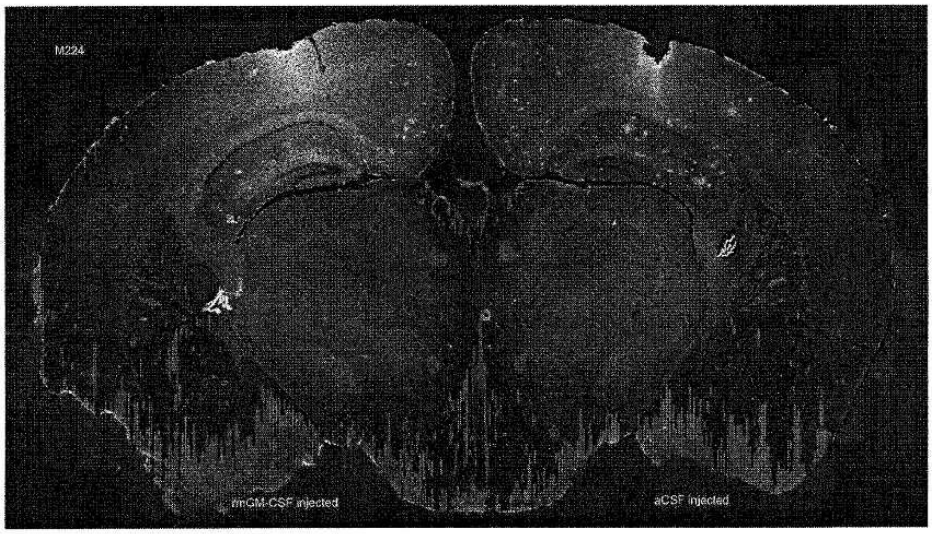
도면12a



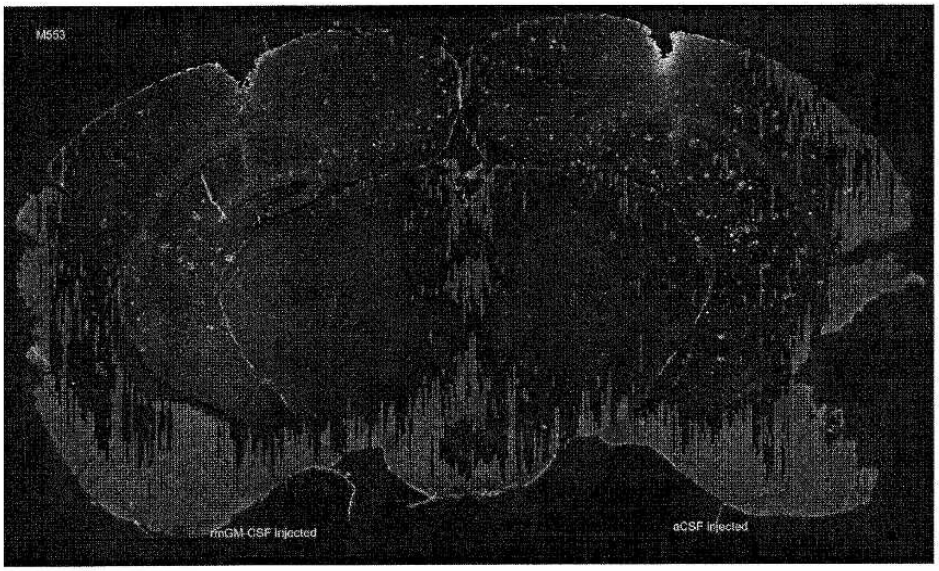
도면12b



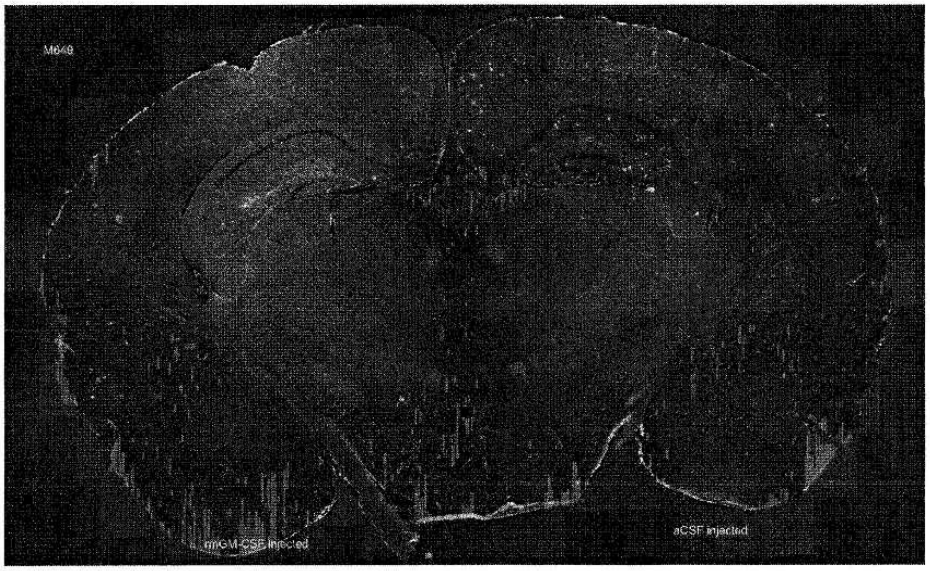
도면13a



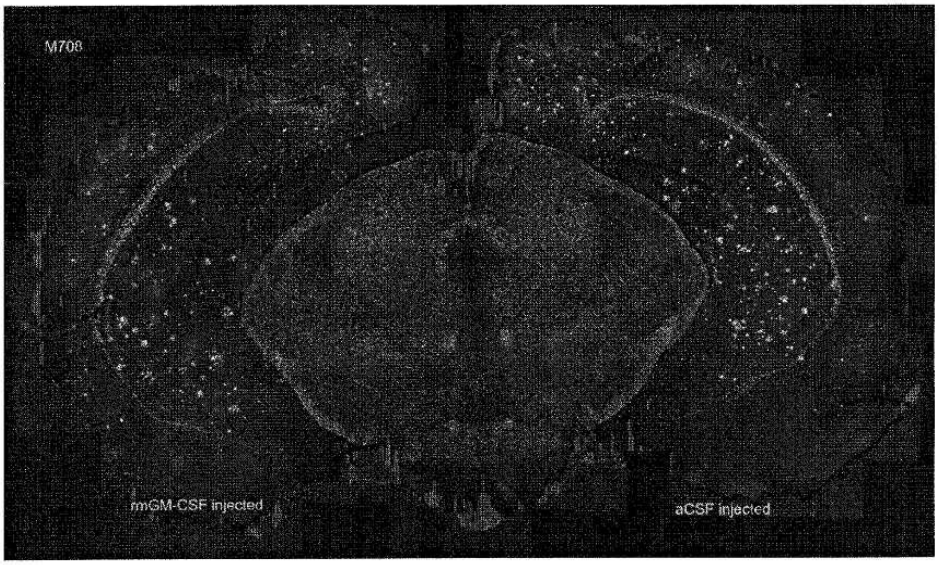
도면13b


M553
rmGM-CSF injected
aCSF injected

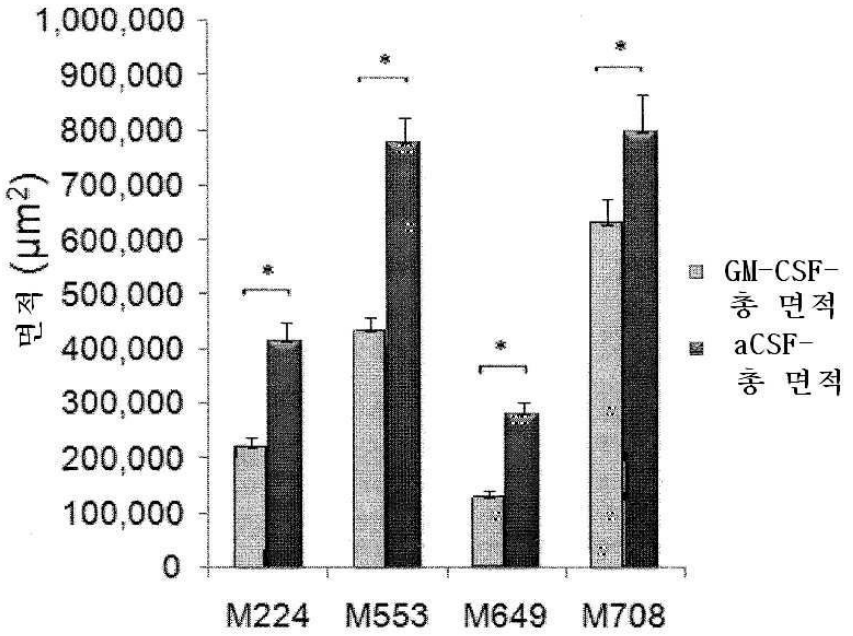
도면13c


M649
rmGM-CSF injected
aCSF injected

도면13d

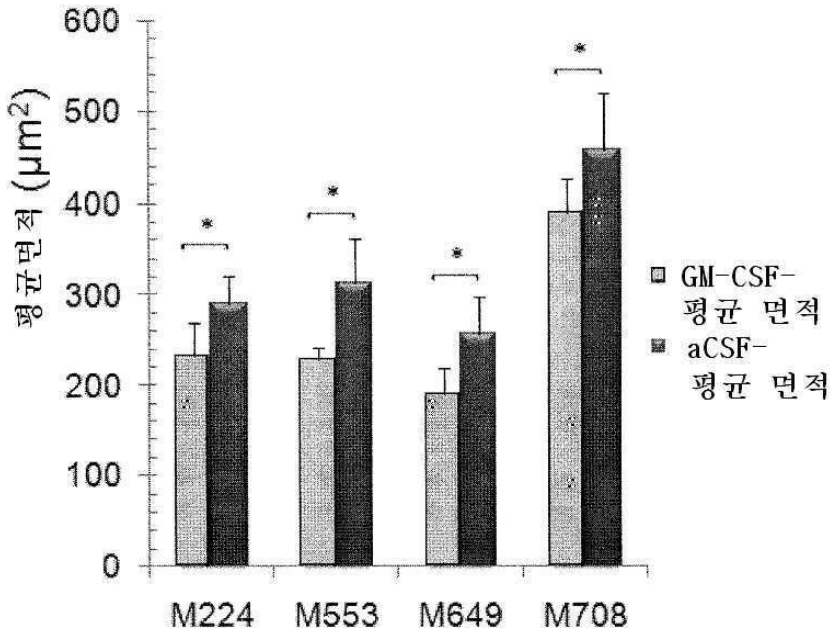


도면14a



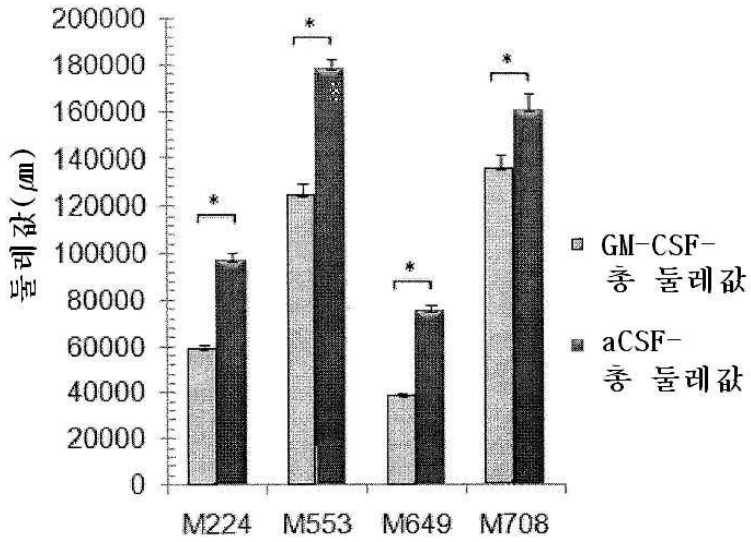
	플라크 면적의 합계 (μm²)		
마우스 #	GM-CSF	aCSF	개별적 p값 (1,1)
M224	219,640.41	413,046.79	0.0183
M553	433,471.79	779,502.56	0.0052
M649	131,155.13	281,403.85	0.0058
M708	628,152.56	798,960.90	0.0315
전체 p값 (1,1)		1.830E-06	

도면14b



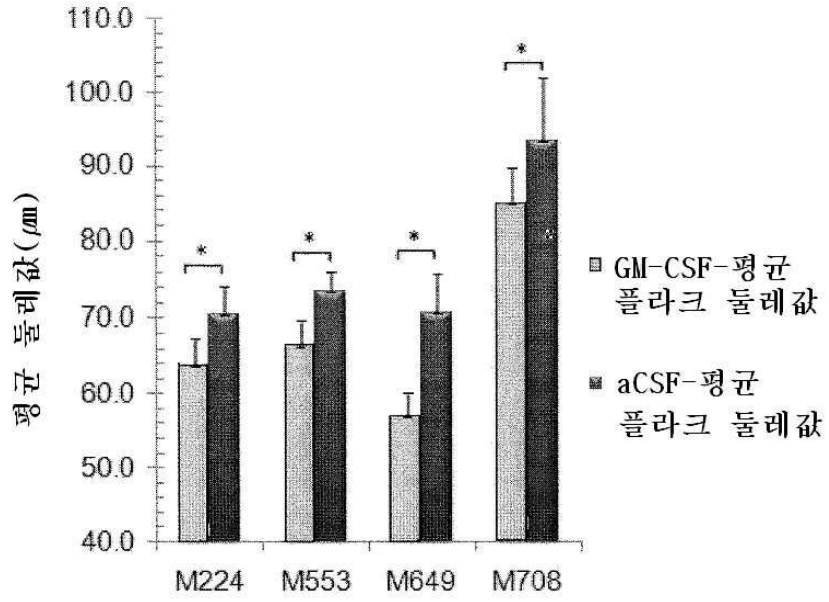
마우스 #	평균 플라크 면적 (μm²)		
	GM-CSF	aCSF	개별적 p값 (1,1)
M224	233.28	290.99	0.0042
M553	229.44	314.32	0.0144
M649	189.34	257.83	0.0035
M708	389.86	458.17	0.0157
전체 p값 (1,1)		1.108E-07	

도면14c



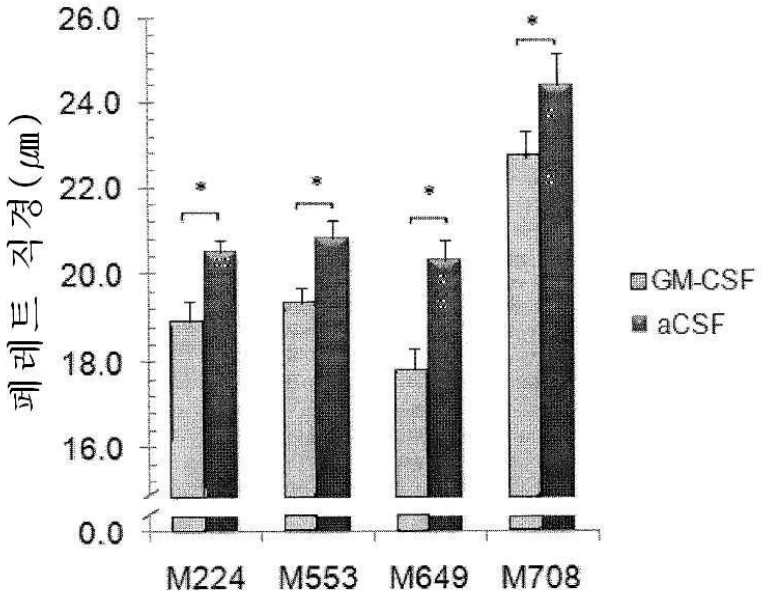
마우스 #	플라크 둘레값의 합계 (㎛)		
	GM-CSF	aCSF	개별적 p값 (1,1)
M224	58,195.47	96,487.37	0.0058
M553	124,357.04	178,036.92	0.0019
M649	38,406.26	75,075.73	0.0035
M708	135,661.28	160,032.43	0.0384
전체 p값 (1,1)		6.570E-08	

도면14d



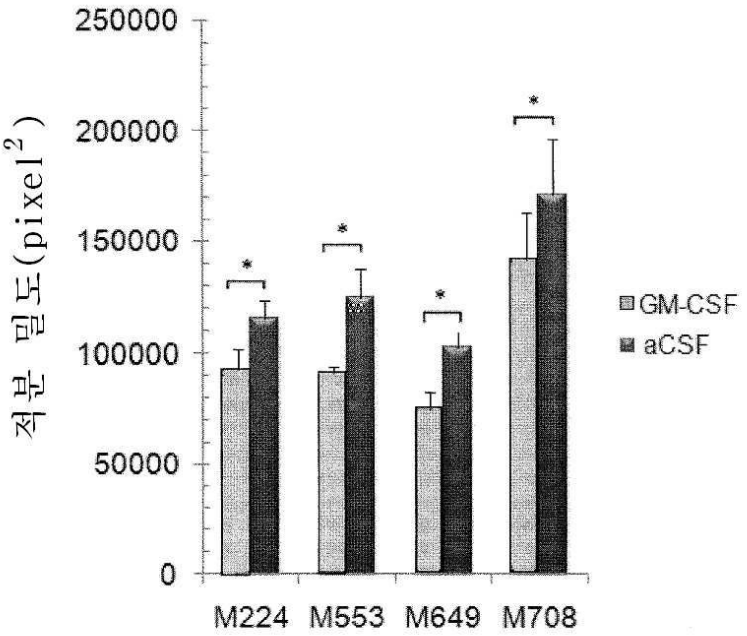
마우스 #	평균 플라크 둘레값(㎛)		
	GM-CSF	aCSF	개별적 p값 (1,1)
M224	63.55	70.31	0.0255
M553	66.18	73.38	0.0205
M649	56.83	70.66	0.0045
M708	84.81	93.31	0.0200
전체 p값 (1,1)		1.409E-06	

도면14e



마우스 #	페레트 직경(㎛)		
	GM-CSF	aCSF	개별적 p값 (1,1)
M224	18.94	20.49	0.0066
M553	19.35	20.83	0.0141
M649	17.82	20.34	0.0001
M708	22.72	24.41	0.0015
전체 p값 (1,1)		2.354E-09	

도면14f



	적분 밀도(pixel^2)		
마우스 #	GM-CSF	aCSF	개별적 p값 (1,1)
M224	92,800.2	115,756.9	0.0042
M553	91,270.5	125,037.5	0.0144
M649	75,320.8	102,565.7	0.0035
M708	142,068.6	171,162.1	0.0090
전체 p값 (1,1)		1.108E-07	