(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0020321
(43) 공개일자 2014년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2006.01) *A61K 35/12* (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01) *A61K 31/573* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7029659
(22) 출원일자(국제) 2012년04월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년11월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/033644
(87) 국제공개번호 WO 2012/142501
국제공개일자 2012년10월18일
(30) 우선권주장
61/475,119 2011년04월13일 미국(US)
61/497,882 2011년06월16일 미국(US)

(71) 출원인
레발레시오 코퍼레이션
미합중국 워싱턴 98421, 타코마, 이스트 '디' 스트리트 1200
(72) 발명자
왓슨, 리차드 엘.
미국 67460 캔자스주 맥퍼슨 코우가 트레일 1985
(74) 대리인
양영준, 양영환

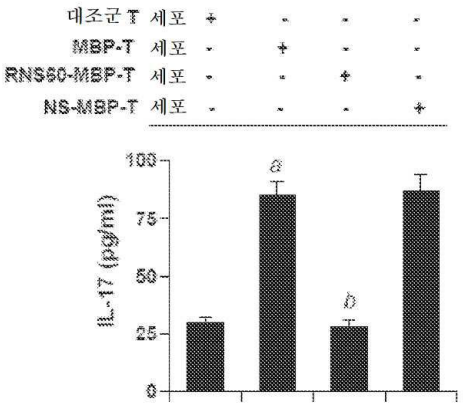
전체 청구항 수 : 총 63 항

(54) 발명의 명칭 **염증성 신경변성 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 억제하고/하거나 조절하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명의 적어도 하나의 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, 동전기적으로 생성된 산소 농후 유체)를 포함하는 치료학적 조성물을 투여하여 피험체에서 염증성 신경변성 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하는 방법이 제공된다. 특정 양태는 작동자 T 세포의 기능 및/또는 활성을 억제하고/하거나 조절하기 위한 및/또는 세포 기반 면역허용 치료를 위한 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 이러한 방법은 본원에 개시된 적어도 하나의 동전기적으로 변경된 유체에 대한 T 세포 및/또는 APC의 생체외 노출을 포함한다. 병용 치료가 추가로 제공된다.

대 표 도 - 도21b



특허청구의 범위

청구항 1

염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자(effector) T 세포를 억제하고/하거나 조절하는 방법으로서,

염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(antigen presenting cell: APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계; 및

상기 세포를 평균 직경이 주로 약 100나노미터 미만이고 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절을 제공하기에 충분한 양으로 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함하는 유체와 접촉시키는 단계를 포함하되, 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 억제하고/하거나 조절하는 방법이 제공되는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 것인 작동자 T 세포를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및 항원 제시 세포(antigen-presenting cell: APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 작동자 T 세포는 신경염증 및/또는 탈수초성 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병 및 파킨슨병 중 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 신경염증 및 탈수초성 질환은 다발성 경화증(multiple sclerosis: MS)을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 조절 T 세포(T_{REG}) 및/또는 항원 제시 세포(APC)의 발생 및/또는 기능 및/또는 활성을 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조절 T 세포(T_{REG})는 천연 T_{REG} 세포(nT_{REG}) 및 유도성 T_{REG} 세포(iT_{REG}) 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 항원 제시 세포(APC)는 단핵구 및 수지상 세포(dendritic cell: CD)(예를 들면, 골수성 DC 및 형질세포모양 DC(plasmacytoid DC)) 중 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 접촉 단계는 *생체외* 일어나는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 T_H17 세포, 바람직하게는 RORγt$^+$ T_H17 세포의 기능 및/또는 활성을 억제하고/하거나 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 Treg 세포(바람직하게는 NTreg 세포)와 RORγt$^+$ T_H17 세포 사이의 균형을 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서, RORγt$^+$ T_H17 세포의 양 및/또는 기능 및/또는 활성에 비해, Treg 세포의 양 및/또는 Treg 세포 기능 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 RORγt$^+$ T_H17 세포로의 Treg 세포의 분극을 조절(바람직하게는 감소 또는 예방)하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 RORγt$^+$ T_H17 세포 및/또는 기능 및/또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 RORγt$^+$ T_H17 세포를 Treg 세포로 전환하는 단계(바람직하게는 RORγt$^+$ T_H17 세포를 NTreg 세포 및/또는 NTreg 세포의 기능 및/또는 활성을 갖는 세포로 탈분극하는 단계)를 포함하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 그의 증상을 치료하기 위한 세포 기반 치료 또는 세포 기반 면역허용 치료의 일부로서 *생체외* 일어나고, 치료학적 유효량의 *생체외* 접촉된 세포를 이를 필요로 하는 피험체에게 도입하고, 상기 피험체에서 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절이 제공되는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병 및 파킨슨병 중 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증(MS) 또는 그의 증상을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은, 살아 있는 세포가 상기 유체와 접촉 시, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 제공하기에 충분한 양으로 상기 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성되는 것인 방법.

청구항 22

제1항에 따른 동전기적 유체(electrokinetic fluid)로서, 상기 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 평균 직경이 주로 90㎚; 80㎚; 70㎚; 60㎚; 50㎚; 40㎚; 30㎚; 20㎚; 10㎚; 및 5㎚ 미만으로 이루어진 군으로부터 선택된 크기보다 작은 것인 동전기적 유체.

청구항 23

제1항에 따른 동전기적 유체로서, 상기 이온성 수용액이 식염수 용액(바람직하게는 생리학적 식염수)을 포함하는 것인 동전기적 유체.

청구항 24

제1항에 따른 동전기적 유체로서, 상기 이온성 수용액은 초산소화되는(superoxygenated) 것인 동전기적 유체.

청구항 25

제17항에 있어서, 상기 그의 증상 중 적어도 하나는 중추 신경계 및 뇌에서의 만성 염증 및 중추 신경계 및 뇌에서의 급성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 병증과 관련되는 것인 방법.

청구항 26

제17항에 있어서, 상기 피험체를 다른 소염제로 동시에 또는 부가적으로 치료하여 염증을 상승적으로 또는 비상승적으로 억제하거나 감소시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 다른 소염제는 스테로이드 또는 글루코코르티코이드 스테로이드를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제17항에 있어서, 병용 치료를 추가로 포함하되, 적어도 하나의 추가의 치료제를 상기 환자에게 투여하는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가의 치료제는 글라티라머 아세테이트, 인터페론-β, 미톡산트론, 나탈리주맙, MMP-9 및 MMP-2의 억제제를 포함하는 MMP 억제제, 단기 작용성 β_2-효현제, 장기 작용성 β_2-효현제, 항콜린제, 코르티코스테로이드, 전신성 코르티코스테로이드, 거대 세포 안정화제, 류코트리엔 조절제, 메틸잔틴, β_2-효현제, 알부테롤, 레발부테롤, 피르부테롤, 아르트포르모테롤, 포르모테롤, 살메테롤, 이프라트로피움 및 티오트로피움을 포함하는 항콜린제; 베클로메타손, 부데소나이드, 플루니솔리드, 플루티카손, 모메타손, 트라이암시놀론, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손을 포함하는 코르티코스테로이드; 몬테루카스트, 자피르루카스트 및 질루톤을 포함하는 류코트리엔 조절제; 크로몰린 및 네도크로밀을 포함하는 거대 세포 안정화제; 테오필린을 포함하는 메틸잔틴; 이프라트로피움과 알부테롤, 플루티카손과 살메테롤, 부데소나이드와 포르모테롤을 포함하는 복합제 약물; 하이드록시진, 다이펜하이드라민, 로라타딘, 세티리진 및 하이드로코티손을 포함하는 항히스타민제; 타크롤리무스 및 피메크롤리무스를 포함하는 면역계 조절 약물; 사이클로스포린; 아자티오프린; 마이코페놀레이트모페틸; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가의 치료제는 TSLP 및/또는 TSLPR 길항제인 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 TSLP 및/또는 TSLPR 길항제는, 하나 초과의 수용체 사슬의 성분을 코딩하는 TSLPR-면역글로불린 Fc 분자 또는 폴리펩타이드를 포함하는, TSLP 및 이 TSLP 수용체, 가용성 TSLP 수용체 분자 및 TSLP 수용체 융합 단백질에 특이적인 중화 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 32

제21항에 있어서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 막 결합 단백질의 입체형태(conformation), 리간드 결합 활성 또는 촉매 활성 중 적어도 하나의 조절을 포함하는 세포막 구조 또는 기능 중 적어도 하나의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 막 결합 단백질은 수용체, 막관통 수용체, 이온 채널 단백질, 세포내 부착 단백질, 세포 접착 단백질 및 인테그린으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제26항에 있어서, 상기 막관통 수용체는 G 단백질 결합 수용체(G-Protein Coupled Receptor: GPCR)를 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 G 단백질 결합 수용체(GPCR)는 G 단백질 α 서브유닛과 상호작용하는 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 G 단백질 α 서브유닛은 $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ 및 $G\alpha_{12}$로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 적어도 하나의 G 단백질 α 서브유닛은 $G\alpha_q$인 것인 방법.

청구항 38

제21항에 있어서, 상기 세포막 전도율 조절은 전세포 전도도의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 전세포 전도도의 조절은 전세포 전도도의 적어도 하나의 전압 의존 기여의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제21항에 있어서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 칼슘 의존 세포 메시지 전달 경로 또는 시스템의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제21항에 있어서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 포스포리파제 C 활성의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제21항에 있어서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 아데닐산 고리화효소(adenylate

cyclase: AC) 활성의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제21항에 있어서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 중추 신경 및 뇌에서의 만성 염증 및 중추 신경 및 뇌에서의 급성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 병증 또는 증상과 연관된 세포내 신호 전달의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제1항에 있어서, 세포 회로망 또는 층에의 투여를 포함하고, 이 회로망 또는 층 내의 세포간 연접(intercellular junction)의 조절을 추가로 포함하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 세포내 연접은 밀착 연접, 갭 연접, 부착띠(zona adherin) 및 데스모솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제44항에 있어서, 상기 세포 회로망 또는 층은 CNS 혈관에서의 내피 세포 및 내피-성상교세포 밀착 연접, 혈액-뇌척수액 밀착 연접 또는 장벽, 폐 상피형 연접, 기관지 상피형 연접 및 장내 상피형 연접으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제1항에 있어서, 상기 이온성 수용액은 산소화되고, 상기 유체 내 산소는 대기압에서 적어도 8ppm, 적어도 15ppm, 적어도 25ppm, 적어도 30ppm, 적어도 40ppm, 적어도 50ppm 또는 적어도 60ppm의 산소의 양으로 존재하는 것인 방법.

청구항 48

제32항에 있어서, 상기 막 결합 단백질은 CCR3 및/또는 CCR6을 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제17항에 있어서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상의 치료는 세포내 NF-κB 발현 및/또는 활성의 조절을 포함하는 것인 방법.

청구항 50

염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 그의 증상을 치료하는 방법으로서,

염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계;

상기 세포를 평균 직경이 실질적으로 약 100나노미터 미만이고 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절을 제공하기에 충분한 양으로 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함하는 유체와 *생체외* 접촉시키는 단계; 및

상기 접촉된 세포를, 이를 필요로 하는 피험체에서 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절을 제공하기 위해 상기 피험체에게 도입하는 단계를 포함하되, 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 억제하고/하거나 조절하는 방법이 제공되는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제50항에 있어서, 조절 T 세포(T_{REG}) 및/또는 항원 제시 세포(APC)의 발생 및/또는 기능 및/또는 활성을 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 조절 T 세포(T_{REG})는 천연 T_{REG} 세포(nT_{REG}) 및 유도성 T_{REG} 세포(iT_{REG}) 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 항원 제시 세포(APC)는 단핵구 및 수지상 세포(CD)(예를 들면, 골수성 DC 및 형질세포모양 DC) 중 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제50항에 있어서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포는 상기 피험체의 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)를 포함하거나, 상기 피험체의 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)로부터 유도된 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제50항에 있어서, T_H17 세포, 바람직하게는 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포의 기능 및/또는 활성을 억제하고/하거나 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 57

제50항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 Treg 세포(바람직하게는 NTreg 세포)와 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 사이의 균형을 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 58

제50항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서, $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포의 양 및/또는 기능 및/또는 활성에 비해, Treg 세포의 양 및/또는 Treg 세포 기능 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 59

제50항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포로의 Treg 세포의 분극을 조절(바람직하게는 감소 또는 예방)하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

제50항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 및/또는 기능 및/또는 활성을 억제하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 61

제50항에 있어서, *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포를 Treg 세포로 전환하는 단계(바람직하게는 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포를 NTreg 세포 및/또는 NTreg 세포의 기능 및/또는 활성을 갖는 세포로 탈분극하는 단계)를 포함하는 방법.

청구항 62

제50항에 있어서, 도입 단계는 정맥내 투여를 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제1항에 있어서, 상기 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액은 본원에 개시된 표 1 및 표 2로부터의 적어도 하나의 염 또는 이온을 포함하는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 특정 양태는 일반적으로 다발성 경화증(이것으로 제한되지는 않음)을 포함하는 염증성 신경변성 질환(예를 들면, 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병), 및 신경염증을 규제하거나 조절하는 것, 더 특히 본 발명의 적어도 하나의 동전기적으로 생성된 유체(예를 들면, 동전기적으로 생성된 산소 농후 유체)를 포함하는 치료학적 조성물을 투여하여 피험체에서 다발성 경화증 또는 염증성 신경변성 질환의 적어도 하나의 증상을 치료하거나 예방하기 위한 조성물 및 방법, 심지어 더 특히 뇌염 유발성(encephalitogenic) T 세포를 억제하고/하거나 조절하고/하거나 분극하기 위한 및/또는 (예를 들면, T_H17 세포 및/또는 T_{REG} 세포 및/또는 수지상 세포(dendritic cell: DC)의 발생(예를 들면, 분극) 및/또는 기능의 조절에 의한) 세포 기반 면역허용 치료를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 추가의 양태는 병용 치료에 관한 것이다.

[0002] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0003] 본 출원은 2011년 6월 16일에 출원된 미국 가특허출원 제61/497,882호 및 2011년 4월 13일에 출원된 미국 가특허출원 제61/475,119호(둘 다 이들 전문이 참조문헌으로 본원에 포함됨)에 대한 우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0004] 신경변성 질환은 뉴런 또는 이의 수초의 파괴를 특징으로 하는 질환 군이다. 이러한 뉴런 파괴는 결국 기능부전 및 장애를 발생시킨다. 종종 염증은 신경변성 질환의 요소인 것으로 밝혀졌고 신경변성의 발병을 부추긴다(Minagar, et al. (2002) J. Neurological Sci. 202:13-23; Antel and Owens (1999) J. Neuroimmunol. 100: 181-189; Elliott (2001) Mol. Brain. Res. 95:172-178; Nakamura (2002) Biol. Pharm. Bull. 25:945-953; Whitton PS. (2007) Br J Pharmacol. 150:963-76). 전체적으로, 이러한 질환은 당해 기술에서 인정된 염증성 신경변성 질환을 포함한다. 몇몇 신경변성 장애에서 상당한 뉴런 손실 발생 수년전에 신경염증이 발생할 수 있다(Tansey et. al., *Fron Bioscience* 13:709-717, 2008). 대식세포, 호중구, T 세포, 성상교세포 및 소교세포를 비롯한 많은 상이한 유형의 면역 세포는 다발성 경화증(Multiple Sclerosis: M.S.), 파킨슨병, 아밀로이드증(예를 들면, 알츠하이머병), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis: ALS), 프리온병 및 HIV 관련 치매와 같은 면역 관련 질환의 병리학의 원인일 수 있다. 더 구체적으로, 연구진은 MS에서 미엘린 손상은 염증성 반응에 의해 중재되고(Ruffini et. al. (2004) *Am J Pathol* 164:1519-1522), 백혈구가 CNS를 침윤할 때 M.S. 발병이 악화된다는 것(Dos Santos et. al. (2008) *J Neuroinflammation* 5:49)에 주목하였다. (동물 모델의 실험적 자가면역 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)을 통해) CNS 염증 및 MS에서의 이의 영향을 시험하기 위해 유전자 모델이 개발되었다. 또한, 알츠하이머병, 파킨슨병 및 근위축성 측삭 경화증(ALS)에서 전염증성 사이토카인(구체적으로 TNF-알파)이 상승한 것으로 밝혀졌다. (Greig et al. (2006) *Ann NY Acad of Sci* 1035:290-315). 따라서, 이러한 염증성 신경변성 질환을 소염 약물에 의해 효과적으로 치료할 수 있다.

[0005] 염증성 신경변성 질환은 포유동물에서 다발성 경화증(MS), 파킨슨병, 아밀로이드증(예를 들면, 알츠하이머병), 근위축성 측삭 경화증(ALS), HIV 관련 치매, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0006] ***다발성 경화증***. 다발성 경화증(multiple sclerosis: MS)은 전세계에 걸쳐 거의 1,100,000명의 사람에게 영향을 미치는, 특히 청소년에게 영향을 미치는 중추 신경계(CNS)의 만성 염증성 신경변성 질환이다(Pugliatti et al. (2002) *Clin. Neurol. Neuros.* 104:182-191). MS는 병리학적으로 질환 상태의 양성으로부터 만성의 진행형 패

턴에 이르는 질환의 많은 형태 중 하나를 임상적으로 발생시키는 신경 조직의 탈수초화를 특징으로 한다. 더 구체적으로, 1) 양성 다발성 경화증; 2) 재발 경감 다발성 경화증(relapsing-remitting multiple sclerosis: RRMS); 3) 속발 진행성 다발성 경화증(secondary progressive multiple sclerosis: SPMS); 4) 원발 진행성 다발성 경화증(primary progressive multiple sclerosis: PPMS); 및 5) 재발 진행성 다발성 경화증(progressive-relapsing multiple sclerosis: PRMS)의 5가지의 주요 형태의 다발성 경화증이 기술된다. 만성 진행성 다발성 경화증은 SPMS, PPMS 및 PRMS를 전체적으로 의미하기 위해 사용되는 용어이다. 재발 형태의 다발성 경화증은 재발이 겹치는 SPMS, RRMS 및 PRMS이다.

[0007] 질환 과정에 걸쳐, 액손을 둘러싸는 수초가 진행성으로 파괴된다. 온전한 미엘린이 액손 통합성 보존에 필수적이므로(Dubois-Dalcq et al., *Neuron*. 48, 9-12 (2005)), 전신 파괴는 결국 임상적으로 감각이상 및 통증, 조정력 및 균형과 관련된 문제점, 실명 및 일반적인 인지 장애를 비롯한 다양한 신경학적 기능장애를 발생시킨다. 흥미롭게도, MS 진행은 환자마다 매우 달랐고, 이들 중 몇몇은 질환을 수십년 앓으면서도 약간의 기능장애만을 갖고, 나머지는 진단 후 몇년 내에 휠체어에 의존하게 되었다.

[0008] MS의 정확한 병인학은 현재 알려지지 않았지만, 유전 증거, 분자 기초 및 면역학 인자를 조사한 연구가 질환 과정 및 탈수초화가 일어나는 기전을 설명하기 시작했다. 유전자 분석에서, 몇몇 보고서는 관련 개인이 정상 집단(0.1%의 MS 이환률)과 비교할 때 더 높은 MS 발병률을 갖고: 일란성 쌍둥이는 다른 쌍둥이가 MS를 앓는 경우 30%의 질환 발생의 변화를 갖고, 이란성 쌍둥이 및 형제는 다른 형제가 MS에 이환된 경우 1 내지 2%의 변화를 갖는다는 것을 나타낸다. 몇몇 군은 이러한 유전성의 원인인 유전자를 개발하기 위해 계통 및 연관 연구를 이용하였고, 인간 백혈구 항원 (HLA)-DR2 대립유전자의 II형 주조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex: MHC) 대립유전자를 보유하는 것보다 MS에 이환될 상대 위험이 3배 내지 4배 높다는 것을 발견하였다. MS와 관련되지만, 위험이 훨씬 더 적은 다른 유전자가 확인되었다. MS 감수성과 II형 MHC 간의 관련성은 MS 발병에서 CD4+ T 세포에 대한 역할을 강력히 제시한다(Oksenberg et al., *JAMA* 270:2363-2369 (1993); Olerup et al., *Tissue Antigens* 38:1-3 (1991)).

[0009] 또한, 건강한 개인에 비해 MS를 앓고 있는 MS 환자에서 차등하여 발현되는 유전자의 확인이 시도되었다. 1) MS 플라크 유형(급성 대 만성) 및 플라크 부위(활성 대 불활성)로부터 전사를 조사하기 위해(Lock and Heller (2003)); 2) 인터페론-β 치료를 받거나 받지 않는 환자 둘 다로부터 대조군에 대해 RRMS 환자에서 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononucleocyte: PBMC)를 비교하기 위해(Sturzebecher et al. (2003); 및 3) MS의 동물 모델인 마우스에서의 실험적 알레르기 뇌척수염(experimental allergic encephalomyelitis: EAE) 단계에서 CNS 세포를 조사하기 위해(Lock et al. (2002)) 유전자 마이크로어레이를 사용하였다. 항염증성 항아폽토시스 유전자가 하향 조절되고 전염증성 증식 유전자가 상향 조절된다는 발견을 비롯한 이 실험이 발견한 것의 대부분은 예상되었다. 놀라운 결과는 오스테오폰틴(Chabas et al. 2001) 및 TRAIL(Wandinger et al. 2003)과 같은 치료학적 적용에 대한 가능한 신규한 표적의 확인을 포함한다. 그러나, MS 감수성 및/또는 진행에 영향을 미칠 수 있는 어떠한 유전자도 여전히 알려져 있지 않으므로, MS 환자로부터의 발현을 건강한 개인과 비교할 때 차등 조절을 갖는 유전자의 대부분이 MS 발생에 알려져 있지 않은 중요성을 갖는다.

[0010] 추가의 연구는 자가반응 CD4+ T 세포에 의해 개시된 염증성 반응이 미엘린에 대한 손상을 중재할 수 있다는 것을 밝혀냈다(Bruck et al., *J. Neurol. Sci*. 206:181-185 (2003)). 일반적으로, 전염증성(예를 들면, Th1 및 Th17) 사이토카인의 분비를 비롯한 염증성 반응을 생성시키는 자가반응 T 세포 반응을 통해 MS 에피소드 동안 수초 및 액손에 더 많은 손상이 일어난다고 생각된다(Prat et al., *J. Rehabil. Res. Dev*. 39:187-199 (2002); Hemmer et al., *Nat. Rev. Neurosci*. 3:291-301 (2002)).

[0011] MS에 현재 이용 가능한 치료제는 글라티라머 아세테이트, 인터페론-β, 나탈리주맙 및 미톡산트론을 포함한다. 일반적으로, 이들 약물은 비특이적 방식으로 면역계를 억제하고, 전체적인 질환 진행을 오직 미미하게 제한한다. (Lubetzki et al. (2005), *Curr. Opin. Neurol.* 18:237-244). 따라서, MS를 더 잘 치료하기 위한 치료 전략을 개발할 필요성이 존재한다.

[0012] 글라티라머 아세테이트는 랜덤 중합체로서 글루탐산, 라이신, 알라닌 및 타이로신으로 이루어진다. 글라티라머 아세테이트는 제한된 유효성 및 주사 부위에서의 응어리, 한기, 열, 통증, 호흡 짧아짐, 심박 빨라짐 및 불안과 같은 상당한 부작용을 갖는다. 원발 진행성 MS를 앓고 있는 943명의 환자를 사용한 중요한 임상 연구에서, 글라티라머 아세테이트는 기능장애 및 질환의 진행을 중지시키지 못했다(Wolinsky, et al. (2007) *Ann Neurol* 61:13-24).

[0013] 인터페론-β는 섬유아세포에 의해 생성되는 천연 단백질이고 선천성 면역 반응의 일부이다. MS를 위한

약물로서, 인터페론-β는 MS 에피소드 발생률을 감소시키는 데 있어서 약 18 내지 38% 효과적이다. 부작용은 경도의 감기 유사 증상 및 주사 부위에서의 반응 및 더 심각한 문제점(예를 들면, 우울증, 발작 및 간 문제점)을 포함한다.

[0014] 미톡산트론은 MS를 위한 치료제이다. 이는 DNA 복구 및 합성을 방해하여 암에 싸우기 위해 사용하기 위한 화학치료의 치료제로서 개발되었고 암 세포에 특이적이지 않다. 미톡산트론의 부작용은 쾌 심각할 수 있고, 구역, 구토, 탈모, 심장 손상 및 면역억제를 포함한다.

[0015] 나탈리주맙은 세포 접착 분자인 알파4-인테그린을 표적화하는 인간화 단일클론 항체이다. 나탈리주맙은 염증을 야기하는 면역 세포가 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier: BBB)을 횡단하지 못하도록 작용하는 것으로 생각된다. 부작용은 피로, 두통, 구역, 감기 및 알레르기 반응을 포함한다.

[0016] *MS에서의 조절 T 세포 및 수지상 세포의 관여도*. 유전적으로 감수성인 개인에서의 CNS 자기 항원에 대한 면역관용의 파괴가 MS 발생에서 중요한 사건인 것으로 생각된다. 조줄야(Zozulya) 및 위엔들(Wiendl)에 의한 검토문헌([Nature Clinical Practice Neurology 4:384-398, 2008]; 또한 문헌[O'Brien et al., *Immunotherapy* 2: 99-115, 2010] 및 문헌[Lovett-Racke et al., Biochimica et Biophysica Acta 1812:246-251, 2011] 참조; MS에 있어서의 조절 T(T_{REG}) 세포 및 수지상 세포(DC), EAE 및 MS에서 T 세포 기반 면역치료 및 MS에서 Th1 대 Th17에 관한 이의 교시를 위해 이들 모두 그 전문이 본원에 참조문헌으로 포함됨)에 기술된 바대로, 염증성 반응 및 면역 자가 관용의 조절이상은 MS에서 자가반응 면역 반응의 중요한 요소인 것으로 생각되고, 조절 T(T_{REG}) 세포는 CNS 자가면역 염증의 발병 시나리오에서 결정적 참가자로 보인다. 표적화된 T_{REG} 세포 고갈은 마우스에서 자발적인 자가면역 질환을 발생시키는 반면, T_{REG} 세포 기능 증강은 MS의 동물 모델인 실험적 자가면역 뇌척수염의 발생을 방지하거나 이의 변형을 경감시킬 수 있다. T_{REG} 세포의 발생 및 기능은 CNS에서 뇌염 유발성 세포의 활성화 및 재활성화에서 중심적인 역할을 하는 수지상 세포(DC)와 밀접하게 관련된다. DC 및 T_{REG} 세포는 밀접한 양방향 관계를 갖고, 다른 인자 및 세포 유형과 함께, 특정 유형의 DC는 T_{REG} 세포를 유도할 수 있다. 결과적으로, T_{REG} 세포 및 DC는 MS에서 가능한 치료학적 표적으로서 인식된다(상기 참조).

[0017] T_{REG} 세포 및 특정 유형의 DC는 말초 관용을 유도하고 유지시키는 기전의 필수적인 성분이다. 천연 T_{REG}(nTREG) 세포 및 유도성 T_{REG}(iTREG) 세포의 T_{REG} 세포의 2가지의 주요한 하위집단이 존재한다. 가장 잘 규명된 nT_{REG} 세포 집단은 포크헤드 박스 단백질 P3(forkhead box protein P3: FOXP3)을 발현할 수 있는 $CD4^+CD25^+$ T_{REG} 세포로 이루어진다. iT_{REG} 세포는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$인 미접촉 T 세포 유래의 T 보조 3(T_H3) 세포 및 $CD4^+$ 전구 세포 유래의 1형 T_{REG}(T_R1) 세포를 포함한다. iT_{REG} 세포는 비조절 T 세포로부터 말초에서 유도되거나 자가면역 반응 동안 자가항원에 의해 유도되고, 이는 FOXP3을 발현하거나 발현하지 않을 수 있다.

[0018] 명칭이 의미하는 것처럼 골수성 기원인 골수성 DC(mDC); 및 림프성 기원인 형질세포모양 DC(pDC)의 DC의 2가지 일반적인 하위집단은 인간 및 마우스에서 구별될 수 있다. 이러한 2가지 세포 유형은 상이한 래퍼토리의 패턴 인식 수용체를 발현하고 상이한 사이토카인 생성 프로필을 나타낸다. 일반적으로, DC 유형 둘 다 선천성 면역과 입양성 면역을 연결하여, 환경 인자에 따라 상이한 면역 반응을 발생시킨다(상기 참조). CNS 자가면역에 있어서, 실험 증거는 DC가 투여 경로 또는 분화 수단에 따라 면역관용 또는 면역원성 특성을 나타낼 수 있다는 것을 나타낸다. 뇌 유래 DC는 *실험실내* 항원 특이적 T 세포 활성화 및 면역관용을 유도하는 것으로 밝혀졌고, DC는 $CD4^+CD25^+$ T_{REG} 세포의 증식을 효과적으로 촉진할 수 있다. DC는 CNS로부터 말초로 이동할 수 있고, 이는 혈액-뇌 장벽을 쉽게 횡단하여 뇌로 돌아간다.

[0019] 호리(Hori) 등(*Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8213-8218, 2002)은, 야생형 동물로부터 얻은 $CD4^+CD25^+$ T 세포를 Tg MBP/$Rag^{-/-}$ 마우스로 입양 전달하면 자발적 EAE 발생이 방지된다는 것을 입증함으로써, T_{REG} 세포가 실제로 이 현상에 중대하게 기여한다는 것을 나타내는 실험을 수행하였다. 또한, 입양 전달 실험은 미접촉 마우스의 말초 림프절로부터 정제된 많은 분량의 $CD4^+CD25^+$ T 세포가 각각 EAE의 만성 및 재발 경감 형태를 경험하는 C57Bl/6 수혜자 마우스 균주(Kohm AP *et al.*, *Novartis Found Symp* **252**:45-52, 2003) 및 SJL(Zhang X *et al.*, *Int Immunol* **16**: 249-256, 2004) 수혜자 마우스 균주 둘 다에서 EAE의 발병률 및 중증도를 감소시킬 수 있다는 것을

나타낸다. 마츠모토(Matsumoto) 등(*J Neuroimmunol* **187**: 44-54, 2007)이 수행한 연구에서, EAE를 앓고 있는 마우스로부터 얻은 말초 $CD4^+CD25^+$ T 세포는 수혜자 래트에서 만성 EAE 발생을 억제하였다. 자가면역의 자연 파괴 동안 말초 구획으로부터 염증이 있는 CNS로의 항원 반응성 T_{REG} 세포의 직접 유입이 일어나는 것으로 제시되었고, 이 CNS 항원 특이적 T_{REG} 세포가 이민 T_{EFF} 세포와 유사한 방식으로 CNS에서 클론으로 확장될 수 있다(O'Connor RA *et al.*, *J Immunol* **179**: 958-966, 2007).

[0020] 추가의 연구에서, MS를 앓고 있는 환자에서 T_{REG} 세포 기능의 원발성 결함은 T_{REG} 세포에 고유한 것으로 보이고 더 높은 활성화 상태 또는 자가반응 T 세포의 억제에 대한 내성의 원인일 수는 없다(Viglietta V *et al.*, *J Exp Med* **199**: 971-979, 2004)(Baecher-Allan C *et al.*, *J Exp Med* **200**: 273-276, 2004).

[0021] MS를 치료하는 데 사용되는 글라티라머 아세테이트(GA)가 GA 반응성 CD4+ T 세포에서 TH2 사이토카인으로의 TH1 사이토카인의 이동을 유도하는 것으로 나타났지만, 이에 대한 기전은 알려져 있지 않다. CNS에 동원된 TH2 T 세포가 이웃하는 자가공격 TH1 세포를 억제("방관자 억제")하는 것으로 생각된다. 더 최근에, 베버(Weber) 등(Brain 127:1370-1378, 2004)은 (MS를 치료하는 데 사용되는) 글라티라머 아세테이트가 *실험실내* 및 *생체내* 단핵구 반응성을 억제한다는 것을 나타낸다. 단핵구는 주요 유형의 순환 항원 제시 세포(antigen-presenting cell: APC)이다. 따라서, GA가 T 세포에 직접적인 효과를 가질 수 있지만, 이것이 APC(예를 들면, 단핵구 및 수지상 세포)에 간접적으로 영향을 미쳐, 예를 들면 이것이 TH2 세포를 우선적으로 유도할 수 있다.

[0022] T 보조 17(T_H17) 세포는 전염증성 사이토카인 IL-17A(이하 IL-17)을 생성시켜 염증 조직에 호중구를 동원하고 케모카인을 생성시키는 CD4+ 작동자 T 세포의 명확한 계통으로 확인되었고, 마우스에서, TH17 세포는 이전에 확인되지 않은 TH1 반응이 원인이라 생각했던 실험적 자가면역 질환의 발병에 관여하는 것으로 나타났다(Weaver et al., *Immunity* 24:677-688, 2006). 또한, 자가면역 질환을 앓고 있는 환자의 평가는 인간 자가면역 장애에서 T_H17 세포의 관여를 제시하였다. RORγt는 T_H17 세포에 대한 계통 특이적 전사 인자로서 확인되었다.

[0023] 최근 연구는 FOXP3+Treg와 TH17 계통 사이의 밀접한 관계를 나타내고, 최근에, 발모리(Valmori) 등(*PNAS* 107:19402-19407, 2010(그 전문이 참조문헌으로 본원에 포함됨))은 인간 순환 미접촉 CD4+ T 세포로부터의 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 분화가 (주로 NTreg로부터의) 미접촉 $FOXP3^+$Treg로부터 주로 얻어지고, NTreg로부터의 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 분극이 IL-2 및 계통 특이적 분화/분극 인자의 존재 하의 자극 후 최적으로 일어난다(예를 들면, IL-2, IL-1β, IL-23 및 TGF-β의 존재 하의 최적 유도)는 것을 밝혔다. T_H17 계통 특이적 전사 인자 RORγt(이의 발현은 IL-17 분비에 필수적임)와 Treg 특이적 전사 인자 FOXP3(RORγt 활성을 길항함) 사이의 균형이 TH17 세포 분극에 영향을 미친다는 것이 제시되었다. 발모리 등(상기 참조)은 NTreg로부터 분화한 T_H17 세포가 FOXP3- 또는 FOXP3low이고, 높은 수치의 RORγt를 발현하고, $CCR6^+$ 발현 세포에서 매우 농후하다는 것을 밝혔다(상기 참조).

[0024] ***파킨슨병***. 다른 염증성 신경변성 질환인 파킨슨병은 근육 경직 및 느린 신체 이동을 비롯한 이동 장애를 특징으로 한다. 파킨슨병에 대한 최근 연구는 사이토카인 및 HLA-DR 항원의 발현 증대로 인해 면역 반응이 뉴런 손상의 원인일 것이라고 관측하였다(Czlonkowska et. al. (2002) *Med Sci Monit* 8:RA165-77).

[0025] 아밀로이드증은 특정한 단백질이 구조를 변경하고 특정 조직에서 각각의 구성단위에 결합하고 정상 조직 기능을 차단하는 경향이 있을 때 발생한다. 이러한 변경된 구조의 단백질을 아밀로이드라 칭한다. 아밀로이드증은 대개 원발성 또는 속발성의 2가지 카테고리로 분할된다. 원발성 아밀로이드증은 부적절한 면역 세포 기능을 갖는 병으로부터 발생한다. 속발성 아밀로이드증은 보통 몇몇 다른 만성 감염성 또는 염증성 질환의 합병증으로부터 생긴다. 이의 예로는 알츠하이머병 및 류마티스성 관절염을 들 수 있다. 속발성 아밀로이드증의 기본적인 문제점은 염증이므로, 염증을 치료하는 것이 유리할 것이다.

[0026] ***알츠하이머병***. 알츠하이머병은 다른 유형의 염증성 신경변성 질환이다. 이 질환은 학습 및 기억 손상 증가의 전형적인 예이지만, 이 질환은 그 자체가 인지 능력 변경을 나타내는 다른 방식으로 드러난다. 질환 동안 대뇌 피질에서의 뉴런 및 시냅스의 진행성 손실은 신경 조직을 크게 위축시킨다. 알츠하이머병의 원인이 알려져 있지 않지만, 많은 사람들은 염증이 중요한 역할을 한다고 생각하고 임상 연구는 염증이 질환 발병의 상당한 원인이라는 것을 나타낸다(Akiyama, et. al. (2000) Neurobiol Aging. 21:383-421).

[0027] ***근위축성 측삭 경화증(ALS)***. 근위축성 측삭 경화증에서, 염증과 질환 사이의 관련이 제시되었다(Centonze, et.

al. (2007) *Trends Pharm Sci* 28:180-7). 또한, TNF-알파 mRNA는 근위축성 측삭 경화증을 위한 형질전환 마우스 모델의 척수에서 발현되는 것으로 발견되었다. 흥미롭게도, ALS로 사망할 때까지 운동 장애 개시 전 초기에 전사물(transcript)이 검출되었다(Elliot (2001) *Brain Res Mol Brain Res* 95:172-8).

발명의 내용

[0028] 특정 양태는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자(effector) T 세포를 억제하고/하거나 조절하는 방법으로서, 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(antigen presenting cell: APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계; 상기 세포를 평균 직경이 실질적으로 약 100나노미터 미만이고 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절을 제공하기에 충분한 양으로 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함하는 유체와 접촉시키는 단계를 포함하고, 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 억제하고/하거나 조절하는 방법이 제공되는 것인 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 특정한 양태에서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 작동자 T 세포는 신경염증 및 탈수초성 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 신경염증 및 탈수초성 질환은 다발성 경화증(MS)을 포함한다.

[0029] 특정한 양태에서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병 및 파킨슨병 중 적어도 하나를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 신경염증 및 탈수초성 질환은 다발성 경화증(MS)을 포함한다.

[0030] 상기 방법의 특정 실시양태는 조절 T 세포(T_{REG}) 및/또는 항원 제시 세포(APC)의 발생 및/또는 기능 및/또는 활성의 조절을 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 조절 T 세포(T_{REG})는 천연 T_{REG} 세포(nT_{REG}) 및 유도성 T_{REG} 세포(iT_{REG}) 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 항원 제시 세포(APC)는 단핵구 및 수지상 세포(dendritic cell: CD) (예를 들면, 골수성 DC 및 형질세포모양 DC(plasmacytoid DC)) 중 적어도 하나를 포함한다.

[0031] 특정한 양태에서, 상기 접촉 단계는 상기 세포의 *생체외* 접촉을 포함한다.

[0032] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 T_H17 세포, 바람직하게는 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포의 기능 및/또는 활성을 억제하고/하거나 조절하는 단계를 포함한다.

[0033] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 Treg 세포(바람직하게는 NTreg 세포)와 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 사이의 균형을 조절하는 단계를 포함한다.

[0034] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서, $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포의 양 및/또는 기능 및/또는 활성에 비해, Treg 세포의 양 및/또는 Treg 세포 기능 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함한다.

[0035] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포로의 Treg 세포의 분극을 조절(바람직하게는 감소 또는 예방)하는 단계를 포함한다.

[0036] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 및/또는 기능 및/또는 활성을 억제하는 단계를 포함한다.

[0037] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포를 Treg 세포로 전환하는 단계(바람직하게는 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포를 NTreg 세포 및/또는 NTreg 세포의 기능 및/또는

활성을 갖는 세포로 탈분극하는 단계)를 포함한다.

[0038] 특정 실시양태에서, 상기 접촉 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 그의 증상을 치료하기 위한 세포 기반 치료 또는 세포 기반 면역허용 치료의 일부로서 *생체외* 일어나고, 치료학적 유효량의 *생체외* 접촉된 세포를 이를 필요로 하는 피험체에게 도입하고, 상기 피험체에서 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절이 제공된다. 특정한 양태에서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병 및 파킨슨병 중 적어도 하나를 포함한다. 바람직하게는, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증(MS) 또는 그의 증상을 포함한다.

[0039] 상기 방법의 특정한 양태에서, 상기 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은, 살아 있는 세포가 상기 유체와 접촉시, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 제공하기에 충분한 양으로 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된다. 특정 양태에서, 상기 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 평균 직경이 실질적으로 90㎚; 80㎚; 70㎚; 60㎚; 50㎚; 40㎚; 30㎚; 20㎚; 10㎚; 및 5㎚ 미만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 크기보다 작다. 특정한 실시양태에서, 상기 이온성 수용액은 식염수 용액(바람직하게는 생리학적 식염수)을 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 이온성 수용액은 초산소화된다(superoxygenated).

[0040] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 바람직하게는, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병 및 파킨슨병 중 적어도 하나를 포함한다. 바람직하게는, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증을 포함한다.

[0041] 상기 방법의 특정한 양태에서, 상기 그의 증상 중 적어도 하나는 중추 신경계 및 뇌에서의 만성 염증 및 중추 신경계 및 뇌에서의 급성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 병증과 관련된다.

[0042] 특정 양태에서, 상기 방법은 상기 피험체를 다른 소염제(예를 들면, 스테로이드 또는 글루코코르티코이드 스테로이드)로 동시에 또는 부가하여 치료하여 염증을 상승적으로 또는 비상승적으로 억제하거나 감소시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0043] 특정 양태에서, 상기 방법은 병용 치료를 추가로 포함하고, 적어도 하나의 추가의 치료제를 상기 환자에게 투여한다. 특정 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 추가의 치료제는 글라티라머 아세테이트, 인터페론-β, 미톡산트론, 나탈리주맙, MMP-9 및 MMP-2의 억제제를 포함하는 MMP 억제제, 단기 작용성 β_2-효현제, 장기 작용성 β_2-효현제, 항콜린제, 코르티코스테로이드, 전신성 코르티코스테로이드, 거대 세포 안정화제, 류코트리엔 조절제, 메틸잔틴, β_2-효현제, 알부테롤, 레발부테롤, 피르부테롤, 아르트포르모테롤, 포르모테롤, 살메테롤, 이프라트로피움 및 티오트로피움을 포함하는 항콜린제; 베클로메타손, 부데소나이드, 플루니솔리드, 플루티카손, 모메타손, 트라이암시놀론, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손을 포함하는 코르티코스테로이드; 몬테루카스트, 자피르루카스트 및 질루톤을 포함하는 류코트리엔 조절제; 크로몰린 및 네도크로밀을 포함하는 거대 세포 안정화제; 테오필린을 포함하는 메틸잔틴; 이프라트로피움과 알부테롤, 플루티카손과 살메테롤, 부데소나이드와 포르모테롤을 포함하는 복합제 약물; 하이드록시진, 다이펜하이드라민, 로라타딘, 세티리진 및 하이드로코티손을 포함하는 항히스타민제; 타크롤리무스 및 피메크롤리무스를 포함하는 면역계 조절 약물; 사이클로스포린; 아자티오프린; 마이코페놀레이트모페틸; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0044] 특정 양태에서, 상기 적어도 하나의 추가의 치료제는 (예를 들면, 하나 초과의 수용체 사슬의 성분을 코딩하는 TSLPR-면역글로불린 Fc 분자 또는 폴리펩타이드를 포함하는 TSLP 및 이 TSLP 수용체, 가용성 TSLP 수용체 분자 및 TSLP 수용체 융합 단백질에 특이적인 중화 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는) TSLP 및/또는 TSLPR 길항제이다.

[0045] 특정 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 막 결합 단백질의 입체형태(conformation), 리간드 결합 활성 또는 촉매 활성 중 적어도 하나의 조절을 포함하는 세포막 구조 또는 기능 중 적어도 하나의 조절을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 막 결합 단백질은 수용체, 막관통 수용체, 이온

채널 단백질, 세포내 부착 단백질, 세포 접착 단백질 및 인테그린으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 막관통 수용체는 G 단백질 결합 수용체(GPCR)를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 G 단백질 결합 수용체(G-Protein Coupled Receptor: GPCR)는 G 단백질 α 서브유닛과 상호작용한다(예를 들면, 상기 G 단백질 α 서브유닛은 $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ 및 $G\alpha_{12}$로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다). 특정 양태에서, 상기 적어도 하나의 G 단백질 α 서브유닛은 $G\alpha_q$이다.

[0046] 특정 양태에서, 상기 세포막 전도율 조절은 전세포 전도도의 조절을 포함한다. 특정한 양태에서, 전세포 전도도의 조절은 전세포 전도도의 적어도 하나의 전압 의존 기여의 조절을 포함한다.

[0047] 특정 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 칼슘 의존 세포 메시지 전달 경로 또는 시스템의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절을 포함한다.

[0048] 특정 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 포스포리파제 C 활성의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절을 포함한다.

[0049] 특정 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 아데닐산 고리화효소(adenylate cyclase: AC) 활성의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절을 포함한다.

[0050] 특정한 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 중추 신경 및 뇌에서의 만성 염증 및 중추 신경 및 뇌에서의 급성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 병증 또는 증상과 연관된 세포내 신호 전달의 조절을 포함한다.

[0051] 상기 방법의 특정한 실시양태는 세포 회로망 또는 층에의 투여를 포함하고, 이 회로망 또는 층 내의 세포간 연접(intercellular junction)의 조절을 추가로 포함한다. 특정 양태에서, 상기 세포내 연접은 밀착 연접, 갭 연접, 부착띠(zona adherin) 및 데스모솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다.

[0052] 특정 양태에서, 상기 세포 회로망 또는 층은 CNS 혈관에서의 내피 세포 및 내피-성상교세포 밀착 연접, 혈액-뇌척수액 밀착 연접 또는 장벽, 폐 상피형 연접, 기관지 상피형 연접 및 장내 상피형 연접으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다.

[0053] 상기 방법의 특정한 실시양태에서, 상기 이온성 수용액은 산소화되고, 상기 유체 내 산소는 대기압에서 적어도 8ppm, 적어도 15ppm, 적어도 25ppm, 적어도 30ppm, 적어도 40ppm, 적어도 50ppm 또는 적어도 60ppm의 산소의 양으로 존재한다.

[0054] 특정한 양태에서, 상기 막 결합 단백질은 CCR3 및/또는 CCR6을 포함한다.

[0055] 특정한 방법 양태에서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 억제하고/하거나 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하는 것은 세포내 NF-κB 발현 및/또는 활성의 조절(예를 들면, 증가 또는 감소)을 포함한다.

[0056] 다른 추가의 양태는 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 그의 증상을 치료하는 방법으로서, 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계; 상기 세포를 평균 직경이 실질적으로 약 100나노미터 미만이고 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절을 제공하기에 충분한 양으로 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함하는 유체와 *생체외* 접촉시키는 단계; 상기 접촉된 세포를, 이를 필요로 하는 피험체에서 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제 및/또는 조절을 제공하기 위해 상기 피험체에게 도입하는 단계를 포함하고, 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 억제하고/하거나 조절하는 방법이 제공되는 것인 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 특정한 양태에서, 세포를 제공하는 단계는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포를 제공하는 단계를 포함한다.

[0057] 특정한 양태에서, 상기 방법은 조절 T 세포(T_{REG}) 및/또는 항원 제시 세포(APC)의 발생 및/또는 기능 및/또는 활성의 조절을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 조절 T 세포(T_{REG})는 천연 T_{REG} 세포(nT_{REG}) 및 유도성 T_{REG} 세포(iT_{REG}) 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 항원 제시 세포(APC)는 단핵구 및 수지상 세포(CD)(예를 들면, 골수성 DC 및 형질세포모양 DC) 중 적어도 하나를 포함한다.

[0058] 특정한 양태에서, 상기 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포는 상기 피험체의 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)를 포함하거나, 상기 피험체의 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포 및/또는 항원 제시 세포(APC)로부터 유도된 세포를 포함한다.

[0059] 특정 양태에서, 상기 방법은 T_H17 세포, 바람직하게는 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포의 기능 및/또는 활성을 억제하고/하거나 조절하는 단계를 포함한다.

[0060] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 Treg 세포(바람직하게는 NTreg 세포)와 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 사이의 균형을 조절하는 단계를 포함한다.

[0061] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서, $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포의 양 및/또는 기능 및/또는 활성에 비해, Treg 세포의 양 및/또는 Treg 세포 기능 및/또는 활성을 증가시키는 단계를 포함한다.

[0062] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포로의 Treg 세포의 분극을 조절(바람직하게는 감소 또는 예방)하는 단계를 포함한다.

[0063] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포 및/또는 기능 및/또는 활성을 억제하는 단계를 포함한다.

[0064] 특정 양태에서, 상기 방법은 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포를 Treg 세포로 전환하는 단계(바람직하게는 $ROR\gamma t^+$ T_H17 세포를 NTreg 세포 및/또는 NTreg 세포의 기능 및/또는 활성을 갖는 세포로 탈분극하는 단계)를 포함한다.

[0065] 특정한 양태에서, 도입 단계는 정맥내 투여를 포함한다.

[0066] 특정한 양태에서, 상기 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액은 본원에 개시된 표 1 및 표 2로부터의 적어도 하나의 염 또는 이온을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 가스 농후 유체 및 탈이온화 대조군 유체의 존재 하의 미토겐 검정의 사이토카인 프로필을 나타낸 것이다.

도 2는 가압 포트 산소화 유체(1), 본 발명의 가스 농후 유체(2) 또는 대조군 탈이온화 유체(3)의 존재 하의 지라세포와 MOG의 접촉의 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)가 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 래트 모델에서 실질적으로 효과적이라는 것을 나타낸다.

도 4는 도 3에 도시된 실험에서 사용된 EAE 유도 및 치료 요법의 도식적 도해를 나타낸다.

도 5a는 도 3 및 도 4에 도시된 실험에서 EAE 치료 요법에 놓이는 동물의 체중(그램 단위)의 그래프 도해이다. 도 5b는 EAE 치료 요법에 놓이는 동물의 계산된 체중 변화(백분율 단위)를 나타낸다.

도 6a 내지 6d는 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)가 도 3 및 도 4에 도시된 실험에 사용되는 EAE 치료 요법 동안 비히클 대조군과 비교할 때 전체 백혈구(WBC), 호중구 및 림프구의 수치에 미치는 영향이 적다는 것을 나타낸다. a 패널, b 패널, c 패널 및 d 패널은 각각 0일, 7일, 14일 및 21일에 연구 결과를 나타낸다.

도 7a 내지 도 7h(a-d)는 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)가 도 3 및 도 4에 도시된 실험에서 사용된 EAE 치료 요법이 개시된 7일 후(a-d) 및 18일 후(e-h)에 사이토카인 수치에 미치는 효과를 나타낸다. a 패널 및 e 패널은 치료 후 IL-17 수치를 나타낸다. b 패널 및 f 패널은 치료 후 IL-1α 수치를 나타낸다. c 패널 및 g 패널은 치료 후 IL-1β 수치를 나타낸다. d 패널 및 h 패널은 치료 후 IL-4 수치를 나타낸다.

도 8은 대조군 노르말 식염수(NS)가 아니라 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)가 마우스 소교세포(BV-2

소교세포)에서 유도성 산화질소 합성효소(iNOS) 및 인터류킨-1β(IL-1β)의 MPP^+ 유도 발현을 약화시킨다는 것을 나타낸다.

도 9는 노르말 식염수 대조군(NS)이 아니라 RNS60이 인간 SHSY5Y 뉴런 세포의 섬유성 Aβ(1-42) 매개 아폽토시스를 억제한다는 것을 나타낸다. 분화 후, SHSY5Y 세포를 1시간 동안 상이한 농도의 RNS60 또는 NS와 항온처리한 후 1μM 섬유성 Aβ(1-42) 펩타이드로 공격하였다. 치료 18시간 후, 아폽토시스를 TUNEL(칼바이오켐(Calbiochem))에 의해 모니터링하였다. Aβ(42-1) 펩타이드를 또한 대조군으로서 항온처리하였다. 결과는 3회 독립 실험을 나타낸다.

도 10은 비히클 대조군(비히클)이 아니라 RNS60이 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 실험적 알레르기 뇌척수염(EAE) 마우스 MOG 모델에서 용량 반응 방식으로 임상 점수를 억제하는 데 있어서 실질적으로 효과적이라는 것을 나타낸다. RNS-60의 *치료학적* 고용량 및 저용량의 매일 투여 둘 다 및 RNS-60의 고용량의 3일마다의 투여(모든 경우에 제1 임상 징후와 함께 시작하는 RNS-60의 투여)는 현저한 임상 점수 감소를 나타낸다(빈 다이아몬드형 = 비히클 대조군; 빈 사각형 = 덱사메타손 양성 대조군; 밝은 "x" = 임상 징후 개시로부터 저용량(0.09㎖의 RNS60)의 매일 투여; 어두운 "x" = 임상 징후 개시로부터 3일마다의 고용량(0.2㎖의 RNS60) 투여; 및 빈 삼각형 = 임상 징후 개시로부터 고용량(0.2㎖의 RNS60) 매일 투여).

도 11a 및 11b는 형광 활성화 세포 분류(Fluorescence-Activated Cell Sorting: FACS) 분석의 결과를 나타낸 것이고, 여기서 백혈구에서의 세포 표면 수용체인 CD193(CCR3)의 발현 수준을 노르말 식염수 또는 RNS-60을 사용하여 비교하였다. X축은 샘플의 형광 로그값을 나타내고, Y축은 샘플에서 발생하는 형광 사건을 나타낸다.

도 12a 내지 도 12c는 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석의 결과를 나타낸 것이고, 여기서 백혈구에서의 세포 표면 수용체인 CD154(CD40L)(a 패널); CD11B(b 패널); 및 CD3(c 패널)의 발현 수준을 노르말 식염수 또는 RNS-60을 사용하여 비교하였다. X축은 샘플의 형광 로그값을 나타내고, Y축은 샘플에서 발생하는 형광 사건을 나타낸다.

도 13a 내지 도 13c는 MBP 프라이밍된 T 세포에서 NFκB의 활성화에 미치는 RNS60의 효과를 조사한 2회 겔 이동 실험(a 패널 및 b 패널) 및 루시퍼라제 활성(리포터 유전자) 검정(c 패널)의 결과를 나타낸다.

도 14a 및 도 14b는 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)가 마우스에서 MOG 유도 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)의 임상 증상을 억제하고(도 14a), IL6 및 IL17의 전신 수치를 감소시킨다(도 14b)는 것을 나타낸다.

도 15는 마우스에서 입양 전달된 재발 경감 EAE의 임상 증상에 미치는 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)의 용량 의존 효과를 나타낸다.

도 16a 및 도 16b는 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)가 마우스에서 입양 전달된 재발 경감 EAE의 진행을 억제한다는 것을 나타낸다. MBP 프라이밍된 T 세포의 입양 전달에 의해 암컷 마우스에서 EAE를 유도하였다. 도 16a에서, 이후 마우스를 급성 단계(8dpt) 개시로부터 RNS60 또는 노르말 식염수로 치료하였다. 대안적으로, 마우스를 재발 경감 단계(22dpt; 도 16b) 개시로부터 RNS60 또는 노르말 식염수로 치료하였다.

도 17은 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)에 의한 *생체외* 치료가 MBP 프라이밍된 T 세포의 뇌염 유발성을 억제한다는 것을 나타낸다.

도 18a 및 도 18b는, 특정한 예시적 실시양태에 따라, RNS60에 의한 Th1 세포의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 말초 림프절 세포(이하 "LNC(lymph node cell)"라 칭함)를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 자극하였다. 도 18a에서, 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 PE 항-T-bet 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면에서의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 3회 다른 실험의 평균±SD이다. 도 18b에서, ELISA에 의해 IFN-γ에 대해 상청액을 평가하였다. 대조군에 대해 $^a p<0.001$; MBP에 대해 $^b p<0.001$.

도 19a 및 도 19b는, 특정한 예시적 실시양태에 따라, RNS60에 의한 Th2 세포의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 자극하였다. 도 19a에서, 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-GATA3 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면에서의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 3회 다른 실험의 평균±SD이다. 도 19b에서, ELISA에 의해 IL-10에 대해 상청액을 평가하였다. 대조군에 대해 $^a p<0.001$; MBP에 대해

[b] *p<0.001*.

도 20은, 특정한 예시적 실시양태에 따라, IL-4의 세포내 발현에 미치는 RNS60의 효과를 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 자극하였다. 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-CD4 및 FITC 접합 항-IL-4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면에서의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 3회 다른 실험의 평균±SD이다.

도 21a 및 도 21b는, 특정한 예시적 실시양태에 따라, RNS60에 의한 Th17 세포의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 자극하였다. 도 21a에서, 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-RORγT 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면에서의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 3회 다른 실험의 평균±SD이다. 도 21b에서, ELISA에 의해 IL-17에 대해 상청액을 평가하였다. 대조군에 대해 [a] *p<0.001*; MBP에 대해 [b] *p<0.001*.

도 22는, 특정한 예시적 실시양태에 따라, IL-17의 세포내 발현에 미치는 RNS60의 효과를 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 자극하였다. 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-IL-17 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면에서의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 3회 다른 실험의 평균±SD이다.

도 23은, 특정한 예시적 실시양태에 따라, RNS60에 의한 Treg의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 자극하였다. 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-FoxP3 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면에서의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 3회 다른 실험의 평균±SD이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 본원에 개시된 특정한 실시양태는 다발성 경화증(이것으로 제한되지는 않음)을 포함하는 염증성 신경변성 질환(예를 들면, 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병)을 치료하기 위한 조성물 및 치료 방법, 및 세포를 접촉시키고/시키거나 본원에 개시된 동전기적으로 생성된 유체를 포함하는 치료학적 조성물을 투여하여 신경염증을 제어하거나 조절하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다. 특정한 구체적인 실시양태에서, 동전기적으로 생성된 유체는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물을 포함하는 가스 농후 동전기적으로 생성된 유체를 포함한다. 특정 양태는 작동자 T 세포의 기능 및/또는 활성을 억제하고/조절하기 위한 및/또는 (예를 들면, T_{REG} 세포 및/또는 수지상 세포(DC) 및/또는 T_H17 세포(예를 들면, RORγt$^+$ T_H17 세포)의 발생 및/또는 기능 및/또는 활성의 조절에 의한) 세포 기반 면역허용 치료를 위한 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 상기 방법은 본원에 개시된 적어도 하나의 동전기적으로 변경된 유체에 대한 T 세포 및/또는 APC(예를 들면, 수지상 세포)의 *생체외* 노출을 포함한다. 병용 치료가 추가로 제공된다.

[0069] 동전기적으로 생성된 유체:

[0070] 본원에 사용되는 "동전기적으로 생성된 유체" 또는 "동전기적으로 변경된 유체"는, 본원의 실시예를 위해, 본원에 자세히 기재된 예시적인 혼합 장치(또한 US200802190088 및 WO2008/052143(둘 다 그 전문이 본원에 참조문헌으로 포함됨) 참조)에 의해 생성된 출원인의 본 발명의 동전기적으로 생성된 유체를 의미한다. 본원에 개시되고 제시된 데이터에 입증된 바대로, 동전기적 유체는 선행 기술의 산소화된 비동전기적 유체(예를 들면, 압력 포트 산소화 유체 등)를 비롯하여 선행 기술의 비동전기적 유체에 비해 신규하고 기본적으로 구별되는 유체를 나타낸다. 본원에서 다양한 양태에 개시된 바대로, 동전기적으로 생성된 유체는 하기(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 독특하고 신규한 물리적 및 생물학적 특성을 갖는다:

[0071] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 평균 직경이 실질적으로 약 100나노미터 미만이고, 살아 있는 세포가 유체와 접촉 시, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 제공하기에 충분한 양으로 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함한다.

[0072] 특정 양태에서, 동전기적으로 생성된 유체는 본원에 기술된 바와 같은 장치 피쳐(feature) 국재화 효과와 같은

유체역학적으로 유도되는 국재화된(예를 들면, 전체 유체 용적과 관련하여 불균일한) 동전기적 효과(예를 들면, 전압/전류 펄스)의 존재 하에 생성되는 유체를 의미한다. 특정 양태에서 상기 유체역학적으로 유도되는 국재화된 동전기적 효과는 본원에 개시되고 기술된 바와 같은 표면 관련 이중 층 및/또는 유동 전류 효과와 함께 있다.

[0073] 특정 양태에서, 투여된 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체는 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 제공하기에 충분한 양으로 전하 안정화 산소 함유 나노구조물을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 동전기적으로 변경된 유체는 초산소화된다(예를 들면, 표준 식염수 중 각각 20ppm, 40ppm 및 60ppm의 용존 산소를 포함하는 RNS-20, RNS-40 및 RNS-60). 특정 실시양태에서, 동전기적으로 변경된 유체는 초산소화되지 않는다(예를 들면, 10ppm(예를 들면, 표준 식염수 중 용존 산소의 거의 주변 수치)을 포함하는 RNS-10 또는 솔라스(Solas)). 특정한 양태에서, 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체의 염도, 무균도, pH 등을 동전기적 유체 생성 시기에 확립하고, 무균 유체를 적절한 경로에 의해 투여한다. 대안적으로, 유체의 염도, 무균도, pH 등 중 적어도 하나를 유체 투여 전에 투여 경로와 생리학적으로 적합하도록 (예를 들면, 무균 식염수 또는 적절한 희석제를 사용하여) 적절히 조절한다. 바람직하게는, 유체의 염도, 무균도, pH 등 중 적어도 하나를 조정하기 위해 사용되는 희석제 및/또는 식염수 용액 및/또는 완충제 조성물은 또한 동전기적 유체이거나, 그렇지 않으면 적합하다.

[0074] 특정 양태에서, 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체는, 각각의 경우 F-, Cl-, Br-, I-, PO4-, SO4- 및 질소계 음이온(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 적합한 음이온 성분과 함께, 식염수(예를 들면, 하나 이상의 용해 염(들); 예를 들면, 알칼리 금속계 염(Li+, Na+, K+, Rb+, Cs+ 등), 알칼리 토금속계 염(예를 들면, Mg++, Ca++) 등 또는 전이 금속계 양이온(예를 들면, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn 등))을 포함한다. 특정 양태는 임의로 반대이온의 혼합물과 함께 다양한 조합 및 농도의 혼합 염 기반 동전기적 유체(예를 들면, Na+, K+, Ca++, Mg++, 전이 금속 이온(들) 등)를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체는 표준 식염수(예를 들면, 대략 0.9% NaCl 또는 약 0.15M NaCl)를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체는 적어도 0.0002M, 적어도 0.0003M, 적어도 0.001M, 적어도 0.005M, 적어도 0.01M, 적어도 0.015M, 적어도 0.1M, 적어도 0.15M 또는 적어도 0.2M의 농도로 식염수를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체의 전도율은 적어도 10㎲/cm, 적어도 40㎲/cm, 적어도 80㎲/cm, 적어도 100㎲/cm, 적어도 150㎲/cm, 적어도 200㎲/cm, 적어도 300㎲/cm 또는 적어도 500㎲/cm, 적어도 1mS/cm, 적어도 5mS/cm, 10mS/cm, 적어도 40mS/cm, 적어도 80mS/cm, 적어도 100mS/cm, 적어도 150mS/cm, 적어도 200mS/cm, 적어도 300mS/cm 또는 적어도 500mS/cm이다. 특정 양태에서, 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체를 제조하는 데 임의의 염을 사용할 수 있지만, 단 이것이 본원에 개시된 생물학적 활성 염 안정화 나노구조물(예를 들면, 염 안정화 산소 함유 나노구조물)을 형성해야 한다.

[0075] 특정 양태에 따르면, 유체의 이온 성분을 변경하여 및/또는 유체의 가스 성분을 변경하여 전하 안정화 가스 함유 나노구조물을 포함하는 본 발명의 유체 조성물의 생물학적 효과를 변경(예를 들면, 증가, 감소, 조정 등)할 수 있다.

[0076] 특정 양태에 따르면, 유체의 가스 성분을 변경하여 전하 안정화 가스 함유 나노구조물을 포함하는 본 발명의 유체 조성물의 생물학적 효과를 변경(예를 들면, 증가, 감소, 조정 등)할 수 있다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 동전기적 유체를 제조하는 데 산소를 사용한다. 추가의 양태에서 질소, 산소, 아르곤, 이산화탄소, 네온, 헬륨, 크립톤, 수소 및 제논으로부터 선택되는 적어도 하나의 다른 가스와 함께 산소의 혼합물을 사용한다. 상기 기재된 바대로, 가스 성분(들)을 변경함과 동시에 이온을 또한 변경할 수 있다.

[0077] 본원에 개시된 교시 및 검정 시스템(예를 들면, 세포 기반 사이토카인 검정, 패치 클램프 검정 등)을 고려하여, 당해 분야의 당업자는 본원에 개시된 생물학적 활성을 성취하기 위한 적절한 염 및 이의 농도를 쉽게 선택할 수 있을 것이다.

표 1

일반적인 양이온:

명칭	화학식	다른 명칭(들)
알루미늄	Al^{+3}	
암모늄	NH_4^+	
바륨	Ba^{+2}	
칼슘	Ca^{+2}	
크롬(II)	Cr^{+2}	제2크롬
크롬(III)	Cr^{+3}	제3크롬
구리(I)	Cu^+	제1구리
구리(II)	Cu^{+2}	제2구리
철(II)	Fe^{+2}	제1철
철(III)	Fe^{+3}	제2철
수소	H^+	
하이드로늄	H_3O^+	
납(II)	Pb^{+2}	
리튬	Li^+	
마그네슘	Mg^{+2}	
망간(II)	Mn^{+2}	제2망간
망간(III)	Mn^{+3}	제3망간
수은(I)	Hg_2^{+2}	제1수은
수은(II)	Hg^{+2}	제2수은
니트로늄	NO_2^+	
칼륨	K^+	
은	Ag^+	
나트륨	Na^+	
스트론튬	Sr^{+2}	
주석(II)	Sn^{+2}	제1주석
주석(IV)	Sn^{+4}	제2주석
아연	Zn^{+2}	

[0078]

일반적인 음이온:

단순 이온:

하이드라이드	H^-	옥사이드	O^{2-}
플루오라이드	F^-	설파이드	S^{2-}
클로라이드	Cl^-	니트라이드	N^{3-}
브로마이드	Br^-		
요오다이드	I^-		

옥소음이온:

아르세네이트	AsO_4^{3-}	포스페이트	PO_4^{3-}
아르세나이트	AsO_3^{3-}	수소 포스페이트	HPO_4^{2-}
		다이수소 포스페이트	$H_2PO_4^-$
설페이트	SO_4^{2-}	니트레이트	NO_3^-
하이드로겐 설페이트	HSO_4^-	니트라이트	NO_2^-
티오설페이트	$S_2O_3^{2-}$		
설파이트	SO_3^{2-}		
퍼클로레이트	ClO_4^-	요오데이트	IO_3^-
클로레이트	ClO_3^-	브로메이트	BrO_3^-
클로라이트	ClO_2^-		
하이포클로라이트	OCl^-	하이포브로마이트	OBr^-
카보네이트	CO_3^{2-}	크로메이트	CrO_4^{2-}
수소 카보네이트 또는 바이카보네이트	HCO_3^-	다이크로메이트	$Cr_2O_7^{2-}$

유기 산으로부터의 음이온:

아세테이트	CH_3COO^-	포르메이트	$HCOO^-$

기타:

사이아나이드	CN^-	아미드	NH_2^-
사이아네이트	OCN^-	퍼옥사이드	O_2^{2-}
티오사이아네이트	SCN^-	옥살레이트	$C_2O_4^{2-}$
하이드록사이드	OH^-	퍼망가네이트	MnO_4^-

[0079]

표 2

예시적인 양이온 및 음이온.

단원자 양이온

화학식	전하	명칭
H^+	1+	수소 이온
Li^+	1+	리튬 이온
Na^+	1+	나트륨 이온
K^+	1+	칼륨 이온
Cs^+	1+	세슘 이온
Ag^+	1+	은 이온
Mg^{2+}	2+	마그네슘 이온
Ca^{2+}	2+	칼슘 이온
Sr^{2+}	2+	스트론튬 이온
Ba^{2+}	2+	바륨 이온
Zn^{2+}	2+	아연 이온
Cd^{2+}	2+	카드뮴 이온
Al^{3+}	3+	알루미늄 이온

다원자 양이온

화학식	전하	명칭
NH_4^+	1+	암모늄 이온
H_3O^+	1+	하이드로늄 이온

다가 양이온

화학식	전하	명칭
Cr^{2+}	2	크롬(II) 또는 2가 크롬 이온
Cr^{3+}	3	크롬(III) 또는 3가 크롬 이온
Mn^{2+}	2	망간(II) 또는 2가 망간 이온
Mn^{4+}	4	망간(IV) 이온
Fe^{2+}	2	철(II) 또는 2가 철 이온
Fe^{3+}	3	철(III) 또는 3가 철 이온
Co^{2+}	2	코발트(II) 또는 2가 코발트 이온
Co^{3+}	3	코발트(II) 또는 3가 코발트 이온
Ni^{2+}	2	니켈(II) 또는 2가 니켈 이온
Ni^{3+}	3	니켈(III) 또는 3가 니켈 이온
Cu^+	1	구리(I) 또는 1가 구리 이온
Cu^{2+}	2	구리(II) 또는 2가 구리 이온
Sn^{2+}	2	주석(II) 또는 2가 주석 이온
Sn^{4+}	4	주석(IV) 또는 4가 주석 이온
Pb^{2+}	2	납(II) 또는 2가 납 이온
Pb^{4+}	4	납(IV) 또는 4가 납 이온

[0080]

단원자 음이온

화학식	전하	명칭
H^-	1-	하이드라이드 이온
F^-	1-	플루오라이드 이온
Cl^-	1-	클로라이드 이온
Br^-	1-	브로마이드 이온
I^-	1-	요오다이드 이온
O^{2-}	2-	옥사이드 이온
S^{2-}	2-	설파이드 이온
N^{3-}	3-	니트라이드 이온

다원자 음이온

화학식	전하	명칭
OH^-	1-	하이드록사이드 이온
CN^-	1-	사이아나이드 이온
SCN^-	1-	티오사이아네이트 이온
$C_2H_3O_2^-$	1-	아세테이트 이온
ClO^-	1-	하이포클로라이트 이온
ClO_2^-	1-	클로라이트 이온
ClO_3^-	1-	클로레이트 이온
ClO_4^-	1-	퍼클로레이트 이온
NO_2^-	1-	니트라이트 이온
NO_3^-	1-	니트레이트 이온
MnO_4^{2-}	2-	퍼망가네이트 이온
CO_3^{2-}	2-	카보네이트 이온
$C_2O_4^{2-}$	2-	옥살레이트 이온
CrO_4^{2-}	2-	크로메이트 이온
$Cr_2O_7^{2-}$	2-	다이크로메이트 이온
SO_3^{2-}	2-	설파이트 이온
SO_4^{2-}	2-	설페이트 이온
PO_3^{3-}	3-	포스파이트 이온
PO_4^{3-}	3-	포스페이트 이온

[0081]

[0082] 본 개시내용은 당뇨병 또는 당뇨병 관련 장애의 치료에서 유용한 가스 농후 이온성 수용액, 수성 식염수 용액(예를 들면, 표준 수성 식염수 용액 및 임의의 생리학적 상용성 식염수 용액을 포함하는 본원에 기술되고 당해 분야에 인식되는 다른 식염수 용액), 세포 배양 배지(예를 들면, 최소 배지 및 다른 배양 배지)(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 신규한 가스 농후 유체를 기술하고 있다. 배지 또는 배지들은 성장에 필수적인 영양소를 포함하는 경우에만 "최소"라 칭한다. 원핵 숙주 세포의 경우, 최소 배지는 통상적으로 탄소, 질소, 인, 마그네슘 및 미량의 철 및 칼슘 공급원을 포함한다. (Gunsalus and Stanter, The Bacteria, V. 1, Ch. 1 Acad. Press Inc., N.Y. (1960)). 대부분의 최소 배지는 탄소원으로서 글루코스를 사용하고, 질소원으로서 암모니아를 사용하고, 인 공급원으로서 오쏘포스페이트(예를 들면, PO_4)를 사용한다. 표적 단백질 생성을 억제하면서 최적 성장을 독려하기 위해 성장된 특이적 원핵 또는 진핵 유기체(들)에 따라 배지 성분이 변경되거나 보충될 수 있다. (Thompson et al., *Biotech. and Bioeng*. 27: 818-824 (1985)).

[0083] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 용해된 리포터 용질(예를 들면, 트레할로스)의 ^{13}C-NMR 선폭을 조절하는 데 적합하다. NMR 선폭 효과는 특정 실시예에서 본원에 기술된 시험 유체에서, 예를 들면 용질 '텀블링(tumbling)'을 측정하는 간접 방법에 생긴다.

[0084] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 -0.14V, -0.47V, -1.02V 및 -1.36V 중 어느 하나에서의 명확한 구형파 전압전류법 피크 차이; -0.9볼트에서의 폴라로그래픽 피크(polarographic peak); 및 특정 실시예에서 본원에 개시된 동전기적으로 생성된 유체에 독특한 -0.19볼트 및 -0.3볼트에서의 폴라로그래픽 피크의 부재 중 적어도 하나를 특징으로 한다.

[0085] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 세포막 전도율을 변경하는 데 적합하다(예를 들면, 본원에 개시된 패치 클램프 연구에서의 측정으로서 전세포 전도도의 전압 의존 기여).

[0086] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 산소화되고, 유체 내 산소는 대기압에서 적어도 15ppm, 적어도 25ppm, 적어도 30ppm, 적어도 40ppm, 적어도 50ppm 또는 적어도 60ppm의 용존 산소의 양으로 존재한다. 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 대기압에서 15ppm 미만, 10ppm 미만의 용존 산소 또는 거의 주변 산소 수치를 갖는다.

[0087] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 산소화되고, 유체 내 산소는 대략 8ppm 내지 대략 15ppm의 양으로 존재하고, 이 경우 때때로 본원에서 "솔라스"라 칭한다.

[0088] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 (예를 들면, 분자 산소에 의해 안정화된) 적어도 하나의 용매화 전자 및 동전기적으로 변형된 및/또는 하전된 산소 종을 포함하고, 특정한 실시양태에서 용매화 전자 및/또는 동전기적으로 변형된 또는 하전된 산소 종은 적어도 0.01ppm, 적어도 0.1ppm, 적어도 0.5ppm, 적어도 1ppm, 적어도 3ppm, 적어도 5ppm, 적어도 7ppm, 적어도 10ppm, 적어도 15ppm 또는 적어도 20ppm의 양으로 존재한다.

[0089] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 세포내 신호 전달의 조절을 제공하기에 충분한 세포막 구조 또는 기능을 변경(예를 들면, 막 결합 단백질의 입체형태, 리간드 결합 활성 또는 촉매 활성을 변경)하는 데 적합하고, 특정 양태에서, 막 결합 단백질은 수용체, 막관통 수용체(예를 들면, G 단백질 결합 수용체(GPCR), TSLP 수용체, 베타 2 아드레날린 수용체, 브래디키닌 수용체 등), 이온 채널 단백질, 세포내 부착 단백질, 세포 접착 단백질 및 인테그린으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 특정한 양태에서, 작동된 G 단백질 결합 수용체(GPCR)는 G 단백질 α 서브유닛(예를 들면, $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ 및 $G\alpha_{12}$)과 상호작용한다.

[0090] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 칼슘 의존 세포 메시지 전달 경로 또는 시스템의 조절(예를 들면, 포스포리파제 C 활성의 조절 또는 아데닐산 고리화효소(AC) 활성 조절)을 포함하는 세포내 신호 전달을 조절하는 데 적합하다.

[0091] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 실시예 및 본원의 다른 곳에 기재된 다양한 생물학적 활성(예를 들면, 사이토카인, 수용체, 효소 및 다른 단백질 및 세포내 신호전달 경로의 조절)을 특징으로 한다.

[0092] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 글라티라머 아세테이트 인터페론-β, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙과 상승작용을 나타낸다. 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 본원의 실시예에 기재된 바대로 기관지 상피 세포(BEC)에서 DEP 유도 TSLP 수용체 발현을 감소시킨다.

[0093] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 본원의 실시예에 기재된 바대로 기관지 상피 세포(BEC)에서 DEP 유도 세포 표면 결합 MMP9 수치를 억제한다.

[0094] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체의 생물학적 효과는 디프테리아 독소에 의해 억제되고, 이는 베타 봉쇄, GPCR 봉쇄 및 Ca 채널 봉쇄가 본원의 실시예에 기재된 바대로 (예를 들면, 조절 T 세포 기능에 대한) 동전기적으로 변경된 수성 유체의 활성에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[0095] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체의 물리적 및 생물학적 효과(예를 들면, 세포내 신호 전달의 조절을 제공하기에 충분한 세포막 구조 또는 기능을 변경하는 능력)는 밀폐 용기(예를 들면, 밀폐 기밀 용기) 내에서 적어도 2달, 적어도 3달, 적어도 4달, 적어도 5달, 적어도 6달 이상 동안 지속한다.

[0096] 따라서, 추가의 양태는 상기 동전기적으로 생성된 용액 및 동전기적으로 변경된 산소화 수성 유체 또는 용액을 제조하는 방법으로서, 떨어진 두 표면 사이의 유체 물질의 흐름을 상대 운동으로 제공하는 단계 및 이들 사이의 혼합 용적을 획정하는 단계(여기서, 혼합 용적 내 및 이 용적을 통과하는 흐르는 유체 물질의 단일 통과의 체류 시간이 0.06초 초과 또는 0.1초 초과임); 및 적어도 20ppm, 적어도 25ppm, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50 또는 적어도 60ppm의 산소를 상기 물질에 용해시키고, 유체 또는 용액을 동전기적으로 변경하기에 적합한 조건 하에 혼합 용적 내 흐르는 유체 물질로 산소(O_2)를 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 산소는 100밀리초 미만, 200밀리초 미만, 300밀리초 미만 또는 400밀리초 미만으로 상기 물질에 주입된다. 특정 실시양태에서, 표면적 대 용적 비는 적어도 12, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40 또는 적어도 50이다.

[0097] 다른 추가의 양태는 동전기적으로 변경된 산소화 수성 유체 또는 용액을 제공하는 방법으로서, 표면 사이의 혼합 용적을 획정하는 떨어진 두 표면 사이의 유체 물질의 흐름을 제공하는 단계; 및 적어도 20ppm, 적어도 25ppm, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50 또는 적어도 60ppm의 산소를 100밀리초 미만, 200밀리초 미만, 300밀리초 미만 또는 400밀리초 미만으로 상기 물질에 주입하기에 적합한 조건 하에 혼합 용적 내 흐르는 물질로 산

소를 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 혼합 용적 내 흐르는 물질의 체류 시간은 0.06초 초과 또는 0.1초 초과이다. 특정 실시양태에서, 표면적 대 용적 비는 적어도 12, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40 또는 적어도 50이다.

[0098] 추가의 실시양태는 제1 물질과 제2 물질의 혼합에 의해 배출 혼합물을 생성하기 위한 혼합 장치의 사용을 포함하는 동전기적으로 변경된 산소화 수성 유체 또는 용액을 제조하는 방법으로서, 상기 장치가 제1 물질 공급원으로부터 제1 물질을 수신하도록 구성된 제1 챔버; 고정자; 회전축을 갖고, 고정자 내에 배치되고, 내부 회전축 주위에서 회전하도록 구성된 로터(로터 및 고정자 중 적어도 하나가 복수의 관통 홀을 가짐); 로터와 고정자 사이에 획정되고, 제1 챔버와 유체 연통하고, 이로부터 제1 물질을 수신하도록 구성된 혼합 챔버(제2 물질이 로터 및 고정자 중 하나에 형성된 복수의 관통 홀을 통해 혼합 챔버에 제공됨); 혼합 챔버와 유체 연통하고, 이로부터의 배출 물질을 수신하도록 구성된 제2 챔버; 및 제1 챔버 내에 하우징되고, 제1 물질을 제1 챔버로부터 혼합 챔버로 펌프질하도록 구성된 제1 내부 펌프를 포함하는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 제1 내부 펌프는 제1 물질이 혼합 챔버에 진입하기 전에 제1 물질에 원주 속도를 부여하도록 구성된다.

[0099] 추가의 실시양태는 제1 물질과 제2 물질의 혼합에 의해 배출 혼합물을 생성하기 위한 혼합 장치의 사용을 포함하는 동전기적으로 변경된 산소화 수성 유체 또는 용액을 제조하는 방법으로서, 상기 장치가 고정자; 회전축을 갖고, 고정자 내에 배치되고, 내부 회전축 주위에서 회전하도록 구성된 로터; 로터와 고정자 사이에 획정된 혼합 챔버(혼합 챔버는 제1 물질이 혼합 챔버에 진입하는 개방 제1 말단 및 배출 물질이 혼합 챔버를 빠져나가는 개방 제2 말단을 갖고, 제2 물질은 로터 및 고정자 중 적어도 하나를 거쳐 혼합 챔버에 진입함); 혼합 챔버의 개방 제1 말단의 적어도 주요 부분과 연통하는 제1 챔버; 및 혼합 챔버의 개방 제2 말단과 연통하는 제2 챔버를 포함하는 방법을 제공한다.

[0100] 추가의 양태는 임의의 상기 방법에 따라 제조된 동전기적으로 변경된 산소화 수성 유체 또는 용액을 제공한다. 특정 양태에서, 투여된 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물을 제공하기에 충분한 양으로 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 동전기적으로 변경된 유체는 초산소화된다(예를 들면, 표준 식염수 중 각각 20ppm, 40ppm 및 60ppm의 용존 산소를 포함하는 RNS-20, RNS-40 및 RNS-60). 특정 실시양태에서, 동전기적으로 변경된 유체는 초산소화되지 않는다(예를 들면, 10ppm(예를 들면, 표준 식염수 중 용존 산소의 거의 주변 수치)을 포함하는 RNS-10 또는 솔라스). 특정한 양태에서, 본 발명의 동전기적으로 변경된 유체의 염도, 무균도, pH 등을 동전기적 유체 생성 시기에 확립하고, 무균 유체를 적절한 경로에 의해 투여한다. 대안적으로, 유체의 염도, 무균도, pH 등 중 적어도 하나를 유체 투여 전에 투여 경로와 생리학적으로 적합하도록 (예를 들면, 무균 식염수 또는 적절한 희석제를 사용하여) 적절히 조절한다. 바람직하게는, 유체의 염도, 무균도, pH 등 중 적어도 하나를 조정하기 위해 사용되는 희석제 및/또는 식염수 용액 및/또는 완충제 조성물은 또한 동전기적 유체이거나, 그렇지 않으면 적합하다.

[0101] 본 개시내용은 가스 농후 이온성 수용액, 수성 식염수 용액(예를 들면, 표준 수성 식염수 용액 및 임의의 생리학적 상용성 식염수 용액을 포함하는 본원에 기술되고 당해 분야에 인식되는 다른 식염수 용액), 세포 배양 배지(예를 들면, 최소 배지 및 다른 배양 배지)(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 신규한 가스 농후 유체를 기술하고 있다.

[0102] 염증성 신경변성 병증의 치료. 특정 양태는 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상의 치료 방법으로서, 평균 직경이 실질적으로 약 100나노미터 미만이고 염증성 신경변성 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상의 치료를 제공하기에 충분한 양으로 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함하는 치료학적 유효량의 동전기적으로 변경된 수성 유체를 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은, 살아 있는 세포가 유체와 접촉 시, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 제공하기에 충분한 양으로 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된다. 특정 실시양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 유체 내 주요 전하 안정화 가스 함유 나노구조물 종이다. 특정한 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물로서의 유체 내 존재하는 용존 산소 분자의 백분율은 0.01%, 0.1%, 1%, 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 및 95%로 이루어진 군으로부터 선택되는 백분율이다. 특정 양태에서, 전체 용존 산소는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물 내에 실질적으로 존재한다. 특정한 실시양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 평균 직경이 실질적으로 90㎚; 80㎚; 70㎚; 60㎚; 50㎚; 40㎚; 30㎚; 20㎚; 10㎚; 및 5㎚ 미만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 크기보다 작다.

[0103] 특정 양태에서, 이온성 수용액은 식염수 용액을 포함한다.

[0104] 특정 양태에서, 유체는 초산소화이다.

[0105] 특정 양태에서, 유체는 용매화 전자 형태를 포함한다.

[0106] 특정 실시양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체의 변경은 유체역학적으로 유도되는 국재화된 동전기적 효과에 대한 유체의 노출을 포함한다. 특정한 양태에서, 국재화된 동전기적 효과에 대한 노출은 전압 펄스 및 전류 펄스 중 적어도 하나에 대한 노출을 포함한다. 특정 양태에서, 유체역학적으로 유도되는 국재화된 동전기적 효과에 대한 유체의 노출은 유체를 생성하기 위해 사용되는 장치의 동전기적 효과 유발 구조 피쳐에 대한 유체의 노출을 포함한다.

[0107] 특정한 양태에서, 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 포유동물에서 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중/뇌 허혈, 두부 외상, 척수 손상, 헌팅턴병, 편두통, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, AIDS와 관련된 염증성 신경변성 병증, 나이 관련 인지력 감퇴; 경도 인지 장애 및 프리온병으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 바람직하게는, 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 실시양태에서, 염증성 신경변성 병증 또는 질환은 다발성 경화증을 포함한다.

[0108] 특정한 양태에서, 이의 적어도 하나의 증상은 중추 신경계 및 뇌에서의 만성 염증 및 중추 신경계 및 뇌에서의 급성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 병증에 관한 것이다.

[0109] 특정 실시양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 국재화 또는 세포내 산화질소 수치를 조절한다. 특정한 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 IL-1베타, IL-8, TNF-알파 및 TNF-베타로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인의 투여 부위에서 국재화된 감소를 촉진한다.

[0110] 특정 방법 양태는 피험체를 다른 소염제로 동시에 또는 부가하여 치료하여 염증을 상승적으로 또는 비상승적으로 억제하거나 감소시키는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 다른 소염제는 스테로이드 또는 글루코코르티코이드 스테로이드(예를 들면, 부데소나이드 또는 이의 활성 유도체를 포함하는 글루코코르티코이드 스테로이드)를 포함한다.

[0111] 특정 방법 양태는 적어도 하나의 추가의 치료제를 환자에게 투여하는 병용 치료를 추가로 포함한다. 특정한 양태에서, 적어도 하나의 추가의 치료제는 글라티라머 아세테이트, 인터페론-β, 미톡산트론, 나탈리주맙, MMP-9 및 MMP-2의 억제제를 포함하는 MMP 억제제, 단기 작용성 β_2-효현제, 장기 작용성 β_2-효현제, 항콜린제, 코르티코스테로이드, 전신성 코르티코스테로이드, 거대 세포 안정화제, 류코트리엔 조절제, 메틸잔틴, β_2-효현제, 알부테롤, 레발부테롤, 피르부테롤, 아르트포르모테롤, 포르모테롤, 살메테롤, 이프라트로피움 및 티오트로피움을 포함하는 항콜린제; 베클로메타손, 부데소나이드, 플루니솔리드, 플루티카손, 모메타손, 트라이암시놀론, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손을 포함하는 코르티코스테로이드; 몬테루카스트, 자피르루카스트 및 질루톤을 포함하는 류코트리엔 조절제; 크로몰린 및 네도크로밀을 포함하는 거대 세포 안정화제; 테오필린을 포함하는 메틸잔틴; 이프라트로피움과 알부테롤, 플루티카손과 살메테롤, 부데소나이드와 포르모테롤을 포함하는 복합제 약물; 하이드록시진, 다이펜하이드라민, 로라타딘, 세티리진 및 하이드로코티손을 포함하는 항히스타민제; 타크롤리무스 및 피메크롤리무스를 포함하는 면역계 조절 약물; 사이클로스포린; 아자티오프린; 마이코페놀레이트모페틸; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0112] 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 추가의 치료제는 TSLP 및/또는 TSLPR 길항제이다(예를 들면, TSLP 및/또는 TSLPR 길항제는 하나 초과의 수용체 사슬의 성분을 코딩하는 TSLPR-면역글로불린 Fc 분자 또는 폴리펩타이드를 포함하는 TSLP 및 이 TSLP 수용체, 가용성 TSLP 수용체 분자 및 TSLP 수용체 융합 단백질에 특이적인 중화 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다).

[0113] 특정한 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 막 결합 단백질의 입체형태, 리간드 결합 활성 또는 촉매 활성 중 적어도 하나의 조절을 포함하는 세포막 구조 또는 기능 중 적어도 하나의 조절을 포함한다. 특정한 양태에서, 막 결합 단백질은 수용체, 막관통 수용체, 이온 채널 단백질, 세포내 부착 단백질, 세포 접착 단백질 및 인테그린으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 특정 실시양태에서, 막관통 수용체는 G 단백질 결합 수용체(GPCR)를 포함한다. 특정한 양태에서, G 단백질 결합 수용체(GPCR)는 G 단백질 α 서브유닛과 상호작용한다(예를 들면, G 단백질 α 서브유닛은 $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ 및 $G\alpha_{12}$로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다).

[0114] 특정 실시양태에서, 세포막 전도율의 조절은 전세포 전도도의 조절을 포함한다. 특정한 양태에서, 전세포 전도

도의 조절은 전세포 전도도의 전압 의존 기여의 적어도 하나의 조절을 포함한다.

[0115] 특정 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절은 칼슘 의존 세포 메시지 전달 경로 또는 시스템의 조절; 포스포리파제 C 활성의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절; 아데닐산 고리화효소(AC) 활성 조절을 포함하는 세포내 신호 전달의 조절; 및 중추 신경 및 뇌에서의 만성 염증 및 중추 신경 및 뇌에서의 급성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 병증 또는 증상과 연관되는 세포내 신호 전달의 조절 중 적어도 하나를 포함하는 세포내 신호 전달의 조절을 포함한다.

[0116] 특정한 양태는 세포 회로망 또는 층에의 투여를 포함하고, 이 회로망 또는 층 내의 세포간 연접의 조절을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 연접은 밀착 연접, 갭 연접, 부착띠 및 데스모솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다. 특정한 양태에서, 세포 회로망 또는 층은 CNS 혈관에서의 내피 세포 및 내피-성상교세포 밀착 연접, 혈액-뇌척수액 밀착 연접 또는 장벽, 폐 상피형 연접, 기관지 상피형 연접 및 장내 상피형 연접으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다.

[0117] 특정 실시양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 산소화되고, 유체 내 산소는 대기압에서 적어도 8ppm, 적어도 15ppm, 적어도 25ppm, 적어도 30ppm, 적어도 40ppm, 적어도 50ppm 또는 적어도 60ppm의 산소의 양으로 존재한다. 특정한 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체의 전하 안정화 산소 함유 나노구조물 내 존재하는 산소의 양은 대기압에서 적어도 8ppm, 적어도 15ppm, 적어도 20ppm, 적어도 25ppm, 적어도 30ppm, 적어도 40ppm, 적어도 50ppm 또는 적어도 60ppm의 산소이다.

[0118] 특정한 양태에서, 동전기적으로 변경된 수성 유체는 용매화 전자 및 동전기적으로 변형된 또는 하전된 산소 종 형태 중 적어도 하나를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 용매화 전자 또는 동전기적으로 변형된 또는 하전된 산소 종 형태는 적어도 0.01ppm, 적어도 0.1ppm, 적어도 0.5ppm, 적어도 1ppm, 적어도 3ppm, 적어도 5ppm, 적어도 7ppm, 적어도 10ppm, 적어도 15ppm 또는 적어도 20ppm의 양으로 존재한다. 특정한 양태에서, 동전기적으로 변경된 산소화 수성 유체는 분자 산소에 의해 적어도 부분적으로 안정화된 용매화 전자를 포함한다.

[0119] 특정 양태에서, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절 능력은 밀폐 기밀 용기 내에서 적어도 2달, 적어도 3달, 적어도 4달, 적어도 5달, 적어도 6달, 적어도 12달 이상 동안 지속한다.

[0120] 특정한 양태에서, 막 결합 단백질은 CCR3을 포함한다.

[0121] 특정 양태에서, 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상의 치료는 세포내 NF-κB 발현 및/또는 활성의 조절을 포함한다.

[0122] 추가의 양태는 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하는 데 사용하기에 적합한 치료제를 제제화하는 방법으로서, 피험체의 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하는 데 사용하기에 적합한 치료제를 얻는 단계; 및 치료제를 평균 직경이 실질적으로 약 100나노미터 미만이고 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하기에 충분한 양으로 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함하는 일정량의 동전기적으로 변경된 수성 유체와 배합하는 단계를 포함하고, 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하는 데 사용하기에 적합한 치료제를 제제화하는 것이 제공되는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은, 살아 있는 세포가 유체와 접촉 시, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 제공하기에 충분한 양으로 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된다.

[0123] 추가의 양태는 피험체의 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하는 데 사용하기에 적합한 치료제; 및 평균 직경이 실질적으로 약 100나노미터 미만이고 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 이의 적어도 하나의 증상을 치료하기에 충분한 양으로 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 이온성 수용액을 포함하는 일정량의 동전기적으로 변경된 수성 유체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0124] 추가의 양태는 본원에 개시된 방법에 의해 제조된 약제학적 조성물을 제공한다.

[0125] 치료 양태의 특정한 방법에서, 치료는 국소, 흡입, 비강내, 경구 및 정맥내 중 적어도 하나에 의한 투여를 포함한다.

[0126] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체의 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 본원에 개시된 표 1 및 표 2로부터의 적어도 하나의 염 또는 이온을 포함한다.

[0127] 작동자 T 세포. 본원에 사용되는 "작동자 T 세포"란 구문은 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포를 의미한다. 특정 양태에서, "작동자 T 세포"는 신경염증 및 탈수초성 질환(예를 들면, MS)에 관여하는 작동자 T 세포를 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다. 특정 양태에서, 신경염증 및 탈수초성 질환(예를 들면, MS)에 관여하는 T 세포는 II형 MHC 제한 Th1 CD4+ T 세포를 포함하는 작동자 T 세포, 높은 수치의 VLA4를 발현하는 세포를 포함하는 II형 MHC 제한 Th1 CD4+ T 세포, II형 MHC 제한 Th17 CD4+ T 세포를 포함하는 작동자 T 세포 및 T-bet를 발현하는 세포를 포함하는 II형 MHC 제한 Th17 CD4+ T 세포 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 양태에서, Th1 세포는 CD4 및 T bet 양성이고 IFN감마를 방출한다. 특정 양태에서, Th2 세포는 CD4 및 GATA4 양성이고 IL10을 방출한다. 특정 양태에서, Th17 세포는 CD4 및 R13g 양성이고 IL17을 방출한다.

[0128] 특정 양태에서, 조절 T 세포(T_{REG}) 및/또는 항원 제시 세포(APC)의 발생 및/또는 기능의 "조절"은 상기 발생 및/또는 기능의 감소를 포함하는 반면, 다른 양태에서 조절은 상기 발생 및/또는 기능의 증가를 포함한다. 특정 양태에서, 반응성 CD4+ T 세포에서 TH2 사이토카인으로의 TH1 사이토카인의 이동이 제공된다.

[0129] 염증

[0130] 특히 미생물 기원의 외래 물질이 피험체에 침입하는 데 대한 방어 반응으로서 염증이 일어날 수 있다. 추가로, 기계적 외상, 독소 및 종양형성이 염증성 반응을 유도할 수 있다. 백혈구의 축적 및 후속 활성화는 대부분의 형태의 염증 발병에서 중요한 사건이다. 염증 결핍증은 숙주를 위태롭게 하는데, 숙주가 감염 또는 외상을 악화시도록 만들 수 있다. 염증성 반응 지속과 같은 과도한 염증은 당뇨병, 동맥경화증, 백내장, 만성 피부 장애, 재관류 손상 및 암, 예컨대 감염성 뇌수막염에서의 감염후 증후군, 류마티스성 열 및 류마티스성 질환, 예컨대 전신성 홍반성 루푸스 및 류마티스성 관절염(이들로 제한되지는 않음)을 비롯한 염증성 질환을 야기할 수 있다. 이러한 질환은 전세계적으로 수백만명의 사람에게 영향을 미치고, 사망률 및 이환률을 증가시킨다. 이러한 다양한 질환 과정에서의 염증성 반응의 공통점은 인간 질환의 예방 또는 치료에서 이의 조절을 중요 요소로 만든다.

[0131] 전염증성 사이토카인 과생성은 다양한 염증성 및 자가면역 질환의 발병에 관련된다. TNFα 분비는 염증성 케스케이드 개시에서 최초 사건이고(Brennan F. M., et. al. *Lancet*, 1989, 2:244-7; Haworth C, et. al. *Eur. J. Immunol*. 1991, 21:2575-2579), 이 질환의 개시 및 유지에 직접적으로 기여한다. 인터류킨 1β(IL-1β), IL-6, IL-8, IL-12 산화질소(NO), IFN-γ, 과립구 집락 자극 인자(G-CSF), 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF) 및 IL-10을 비롯한 다른 사이토카인도 또한 역할을 한다. 이 사이토카인 중 몇몇(예를 들면, IL-8)은 염증성 반응을 증가시키거나 악화시킬 수 있는 반면, 다른 것(예를 들면, IL-10)은 염증성 반응을 감소시키거나 경감시킬 수 있다.

[0132] 면역계 세포, 특히 대식세포는 자극 활성화에 반응하여 이러한 많은 사이토카인을 분비한다. 사이토카인의 표적 세포는 임의의 신체 구획에 국재화될 수 있고, 원거리 기전을 통해 작용할 수 있거나 이웃하는 세포에 작용할 수 있다. 따라서, 사이토카인은 국소 또는 전신 방식으로 염증을 조절할 수 있다.

[0133] 금속단백분해효소

[0134] 금속단백분해효소는, 예를 들면 문헌[N. M. Hooper FEBS Letters 354:1-6, 1994]에 기재된 바대로 패밀리 및 하위패밀리로 분류되는 단백분해효소(효소)의 슈퍼패밀리이다. 금속단백분해효소의 예는 기질 금속단백분해효소(MMP), 예컨대 콜라게나제(MMP1, MMP8, MMP13), 젤라티나제(MMP2, MMP9), 스트로멜리신(MMP3, MMP10, MMP II), 마트릴리신(MMP7), 메탈로엘라스타제(MMP12), 에나멜리신(MMP19), MT-MMP(MMP14, MMP15, MMP16, MMP17); 레프롤리신 또는 아다말리신 또는 TNF 전환 효소(ADAM10 및 TACE)와 같은 세크레타제 및 쉬드다제(sheddase)를 포함하는 MDC 패밀리; 프로콜라겐 처리 단백분해효소(procollagen processing proteinase: PCP)와 같은 효소를 포함하는 아스타신 패밀리; 및 다른 금속단백분해효소, 예컨대 아그레카나제, 엔도텔린 전환 효소 패밀리 및 안지오텐신 전환 효소 패밀리를 포함한다. 전체적으로, 금속단백분해효소는 넓은 범위의 매트릭스 기질, 예컨대 콜라겐, 프로테오글라이칸 및 피브로넥틴을 분해하는 것으로 알려져 있다. 금속단백분해효소는 종양 괴사 인자(TNF)와 같은 생물학적으로 중요한 세포 중재자의 처리 또는 분비; 및 저 친화도 IgE 수용체 CD23과 같은 생물학적으로 중요한 막 단백질의 번역후 단백질분해 처리 또는 유리(shedding)에 관련된다(예를 들면, 문헌[N. M. Hooper et al., Biochem. J. 321:265-279, 1997] 참조).

[0135] 따라서, 당연히 금속단백분해효소는 조직 개형(예를 들면, 배자 발생, 골 형성, 월경 중 자궁 개형 등)에 관여하는 많은 생리학적 질환 과정에서 중요한 것으로 생각된다. 더욱이, 하나 이상의 금속단백분해효소의 활성 억제는 또한 다양한 염증성 및 알레르기 질환, 예컨대 관절 염증(특히 류마티스성 관절염, 골관절염 및 통풍), 위장관 염증(특히 염증성 장 질환, 궤양성 대장염 및 위염), 피부 염증(특히 건선, 습진, 피부염); 종양 전이 또

는 침윤; 골관절염과 같은 세포외 기질의 비제어 분해와 관련된 질환; 골 재흡수 질환(예컨대, 골다공증 및 파제트병); 비정상 혈관신생과 관련된 질환; 당뇨병과 관련된 콜라겐 리모델링 증대, 치주 질환(예컨대, 치은염), 각막 궤양, 피부 궤양, 수술후 병증(예컨대, 결장 문합술) 및 피부 상처 치유; 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질환(예컨대, 다발성 경화증); 알츠하이머병; 재협착증 및 죽상동맥경화증과 같은 심혈관 질환에서 관찰되는 세포외 기질 개형; 천식; 비염; 및 만성 폐쇄성 폐 질환(COPED)과 같은 질환 또는 병증에서 유리할 수 있다.

[0136] 대식세포 엘라스타제 또는 메탈로엘라스타제로도 공지된 MMP12를 초기에 마우스에서 클로닝하였고(Shapiro et al., Journal of Biological Chemistry 267: 4664, 1992), 또한 1995년에 동일 집단이 인간에서 클로닝하였다. MMP12는 활성화 대식세포에서 우선적으로 발현되고, 흡연자의 폐포 대식세포로부터 분비되고(Shapiro et al., 1993, Journal of Biological Chemistry, 268: 23824), 죽상동맥경화 병변에서 거품 세포에서(Matsumoto et al., Am. J. Pathol. 153: 109, 1998) 분비되는 것으로 보인다. COPD의 마우스 모델은 6달 동안 1주 6일 1일 2회 담배로 담배 연기에 의한 마우스의 공격에 기초한다. 야생형 마우스는 이러한 처리 후 폐기종이 발생하였다. 이 모델에서 MMP12 넛 아웃 마우스를 시험할 때, 이 마우스는 뚜렷한 폐기종을 발생시키지 않았고, 이는 MMP12가 COPD 발병에서 중요한 효소라는 것을 강력히 나타낸다. COPD(폐기종 및 기관지염)에서의 MMP12와 같은 MMP의 역할은 문헌[Anderson and Shinagawa, 1999, Current Opinion in Anti-inflammatory and Immunomodulatory Investigational Drugs 1(1): 29-38]에 기술되어 있다. 흡연이 인간 경동맥 플라크에서 대식세포 침습 및 대식세포 유래 MMP-12 발현을 증가시킨다는 것이 최근에 발견되었다(Matetzky S, Fishbein M C et al., Circulation 102:(18), 36-39 Suppl. S, Oct. 31, 2000).

[0137] MMP9-(젤라티나제 B; 92kDa - IV형 콜라게나제; 92kDa 젤라티나제)는 1989년에 처음에 정제되고, 이후 클로닝되고, 서열분석된 분비된 단백질이다(S. M. Wilhelm et al., J. Biol. Chem. 264 (29): 17213-17221, 1989; (J. Biol. Chem. 265(36): 22570, 1990)에 오자로 공개)(이 단백분해효소에 대한 자세한 정보 및 참조문헌의 검토를 위해 문헌[T. H. Vu & Z. Werb (1998)(Matrix Metalloproteinases, 1998에서, 편집: W. C. Parks & R. P. Mecham, pp. 115-148, Academic Press. ISBN 0-12-545090-7)] 참조). MMP9의 발현은 영양막세포, 파골세포, 호중구 및 대식세포를 비롯한 몇몇 세포 유형으로 보통 제한된다(상기 Vu 및 Werb 문헌). 그러나, 성장 인자 또는 사이토카인에 대한 세포의 노출을 비롯하여 여러 중재자에 의해 이 동일한 세포 및 다른 세포 유형에서 발현이 유도될 수 있다. 이것은 염증성 반응을 개시하는 데 종종 연루되는 동일한 중재자이다. 다른 분비된 MMP에서처럼, MMP9는 불활성 전효소(차후 분해되어 효소적으로 활성인 효소를 형성함)로서 방출된다. 생체내 이러한 활성화에 필요한 단백분해효소가 공지되어 있다. 불활성 효소에 대한 활성 MMP9의 균형은 천연 단백질인 TIMP-1(금속단백분해효소-1의 조직 억제제)과의 상호작용에 의해 생체내 추가로 조절된다. TIMP-1은 MMP9의 C 말단 구역에 결합하여 MMP9의 촉매 도메인을 억제한다. ProMMP9의 유도 발현, 활성 MMP9로의 ProMMP9의 분해와 TIMP-1의 존재의 균형을 조합하여 국소 부위에 존재하는 촉매적으로 활성인 MMP9의 양을 결정한다. 단백질분해적으로 활성인 MMP9는 젤라틴, 엘라스틴 및 미접촉 IV형 및 V형 콜라겐을 포함하는 기질을 공격하고; 이는 미접촉 I형 콜라겐, 프로테오글라이칸 또는 라미닌에 활성을 갖지 않는다. 다양한 생리학적 및 병리학적 과정에서 MMP9에 대한 역할을 보여주는 점점 더 많은 신체 데이터가 존재한다. 생리학적 역할은 배자 이식의 초기 단계에서 자궁상피로의 배자 영양막세포의 침윤을 포함하고; 몇몇 역할은 골 성장 및 발생; 및 맥관구조로부터 조직으로의 염증성 세포의 이동을 포함한다.

[0138] 다른 집단의 환자와 비교하여 비치료 천식 환자로부터 얻은 유체 및 AM 상청액에서 MMP9 방출이, 효소 면역검정을 이용하여 측정할 때, 현저히 증대되었다(Am. J. Resp. Cell & Mol. Biol., 5:583-591, 1997). 또한, MMP9 발현 증가가 특정한 다른 병리학적 병증에서 관찰되어 COPD, 관절염, 종양 전이, 알츠하이머병, 다발성 경화증 및 죽상동맥경화증에서의 플라크 파열과 같은 질환에서 MMP9가 심근 경색과 같은 급성 관상동맥 병증을 발생시킨다는 것을 나타낸다(또한 WO07087637A3(본원에 참조문헌으로 포함됨) 참조).

[0139] 최근에, MMP-9 수치가 건강한 대조군 피험체와 비교하여 안정한 천식을 앓고 있는 환자에서 현저히 증가하고 심지어 급성 천식을 앓고 있는 환자에서 더 높다는 것이 입증되었다. MMP-9는 기도 염증성 세포 침습 및 기도 과반응성 유도에서 중요한 역할을 하여 MMP-9가 천식을 유도하고 유지시키는 데 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 나타낸다(Vignola et al., Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis, Am J Respir Crit Care Med 158:1945-1950, 1998; Hoshino et al., Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma, J Allergy Clin Immunol 104:356-363, 1999; Simpson et al., Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma, Am J Respir Crit

Care Med 172:559-565,2005; Lee et al., A murine model of toluene diisocyanate-induced asthma can be treated with matrix metalloproteinase inhibitor, J Allergy Clin Immunol 108:1021-1026, 2001; 및 Lee et al., Matrix metalloproteinase inhibitor regulates inflammatory cell migration by reducing ICAM-1 and VCAM-1 expression in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma, J Allergy Clin Immunol 2003;111:1278-1284).

[0140] MMP 억제제:

[0141] 여러 금속단백분해효소 억제제가 공지되어 있다(예를 들면, MMP 억제제의 검토를 위해 Beckett R. P. 및 Whittaker M.의 문헌[1998, Exp. Opin. Ther. Patents, 8(3):259-282]; 및 Whittaker M. 등의 문헌[1999, Chemical Reviews 99(9):2735-2776] 참조). WO 02/074767은 MMP 억제제, 특히 강력한 MMP12 억제제로서 유용한 화학식의 하이단토인 유도체를 개시한다. 미국 특허 출원 제11/721,590호(공개: US 2008/0032997)는 금속단백분해효소의 억제제이고 MMP12 및 MMP9와 같은 MMP를 억제하는 데 있어서 특히 중요한 하이단토인 유도체의 추가의 군을 개시한다. MMP12 및 MMP9와 같은 MMP를 억제하기 위한 신규한 트라이아졸론 유도체는 미국 특허 출원 제10/593,543호(공개: US 2007/0219217)에 개시되어 있다. 추가의 MMP12 및 MMP9 억제제는 11/509,490에 개시되어 있다(공개: US 2006/0287338)(또한 10/831,265(공개: US 2004/0259896) 참조).

[0142] 추가로, 4-(4-페녹시페닐설포닐)부탄-1,2-다이티올(1) 및 5-(4-페녹시페닐설포닐)펜탄-1,2-다이티올(2)의 2종의 화합물이 MMP-2 및 MMP-9에 선택적으로 결합하고 이를 강력히 억제하는 것으로 보인다(Bernardo, et. al (2002) J. Biol. Chem. 277:11201-11207). 이 2종의 화합물은 MMP-2 및 MMP-9를 억제하고 따라서 염증을 줄이기 위해 임상에서 중요하게 사용될 수 있다. 또한, 항생 수치 이하의 수치에서의 특정한 테트라사이클린 항생제(예를 들면, 미노사이클린 및 독시사이클린)의 사용은 MMMP 활성을 효과적으로 억제하는 것으로 보인다. 본 발명의 특정한 양태는 MMMP를 억제하는 데 유용한 항생 수치 이하의 수치의 항생제와 함께 본 발명의 유체의 사용을 포함한다.

[0143] 치료 방법:

[0144] 용어 "치료하는"은 질환, 장애 또는 병증 또는 이의 하나 이상의 증상의 진행을 역전하거나, 경감하거나, 억제하거나, 이들을 예방하는 것을 의미하고 이들을 포함하며; "치료" 및 "치료학적"은 본원에 정의된 바대로 치료 작용을 의미한다.

[0145] "치료학적 유효량"은 본 발명을 실행하는 과정에서 유용한 임의의 화합물의 임의의 양이고, 단 질환, 장애 또는 병증 또는 이의 하나 이상의 증상의 진행을 역전하거나, 경감하거나, 억제하거나, 이들을 예방하기에 충분해야 한다.

[0146] 본원의 특정한 실시양태는 염증성 신경변성 질환과 같은 특정한 병증 또는 질환과 관련된 염증의 적어도 하나의 증상을 예방하거나 경감하여 피험체를 치료하기 위한 치료학적 조성물 및 방법에 관한 것이다. 예를 들면, 본원에 개시된 치료학적 조성물 및/또는 방법은 다발성 경화증(MS), 파킨슨병, 아밀로이드증(예를 들면, 알츠하이머병), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 프리온병 및 HIV 관련 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 병증 또는 질환을 치료하거나 예방하기에 유용할 수 있다.

[0147] 염증과 관련된 많은 병증 또는 질환을 스테로이드, 메토트렉세이트, 면역억제 약물, 예컨대 사이클로포스파미드, 사이클로스포린, 아자티오프린 및 레플루노마이드, 비스테로이드성 소염제, 예컨대 아스피린, 아세트아미노펜 및 COX-2 억제제, 금 물질 및 항말레리아 치료제에 의해 치료한다. 이러한 약물은 주사 부위 반응, 발진, 상기도 감염, 자가면역 장애 및 감염에 대한 감수성 증가를 비롯한 다양한 단점 및 부작용을 갖는다. 또한, 많은 항염증성 약제학적 약물은 더 편리하고 순응성인 경구 또는 국소 피부 경로와 반대로 정맥내(IV) 또는 피하(SC) 투여를 요한다. 따라서, 염증과 관련된 병증 및 질환을 위한 신규한 약제 및 치료 방법을 개발할 필요성이 여전히 존재한다.

[0148] 다발성 경화증 및 병증:

[0149] 본원의 특정한 실시양태는 (예를 들면, 인지 장애 증상의 경감을 비롯한) 다발성 경화증 및/또는 그의 증상을 치료하기 위한 치료학적 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0150] MS에 대한 현재의 치료제는 글라티라머 아세테이트, 인터페론-β, 미톡산트론 및 나탈리주맙이다. 글라티라머 아세테이트는 랜덤 중합체로서 글루탐산, 라이신, 알라닌 및 타이로신으로 이루어진다. 글라티라머 아세테이트는 제한된 유효성 및 주사 부위에서의 응어리, 한기, 열, 통증, 호흡 짧아짐, 심박 빨라짐 및 불안과 같은 상당

한 부작용을 갖는다. 원발 진행성 MS를 앓고 있는 943명의 환자를 사용한 중요한 임상 연구에서, 글라티라머 아세테이트는 기능장애 및 질환 진행을 중지시키지 못했다(Wolinsky, et al. (2007) Ann Neurol 61:13-24).

[0151] 인터페론-β는 섬유아세포에 의해 생성되는 천연 단백질이고 선천성 면역 반응의 일부이다. MS를 위한 약물로서, 인터페론-β는 MS 에피소드 발생률을 감소시키는 데 있어서 약 18 내지 38% 효과적이다. 부작용은 경도의 감기 유사 증상 및 주사 부위에서의 반응 및 더 심각한 문제점(예를 들면, 우울증, 발작 및 간 문제점)을 포함한다.

[0152] 미톡산트론은 MS를 위한 치료제이다. 이는 암에 싸우기 위해 사용하기 위한 화학치료의 치료제로서 개발되었다. 이는 DNA 복구 및 합성을 방해하고 암 세포에 특이적이지 않다. 미톡산트론의 부작용은 쾌 심각할 수 있고, 구역, 구토, 탈모, 심장 손상 및 면역억제를 포함한다.

[0153] 나탈리주맙은 세포 접착 분자인 알파4-인테그린을 표적화하는 인간화 단일클론 항체이다. 나탈리주맙은 염증을 야기하는 면역 세포가 혈액 뇌 장벽을 횡단하지 못하게 하여 작용하는 것으로 생각된다. 부작용은 피로, 두통, 구역, 감기 및 알레르기 반응을 포함한다.

[0154] 일반적으로, 이 약물은 면역계를 비특이적 방식으로 억제하고 전체 질환 진행을 미미하게 제한할 뿐이다. (Lubetzki et al. (2005), Curr. Opin. Neurol. 18:237-244). 따라서, MS를 더 우수하게 치료하기 위한 치료 전략을 개발할 필요성이 존재한다.

[0155] 병용 치료:

[0156] 추가의 양태는 병용 치료를 추가로 포함하는 본원에 개시된 본 발명의 방법으로서, 적어도 하나의 추가의 치료제를 환자에게 투여하는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 적어도 하나의 추가의 치료제는 글라티라머 아세테이트, 인터페론-β, 미톡산트론 및 나탈리주맙 및/또는 MMP 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0157] 동전기적으로 생성된 가스 농후 유체 및 용액의 항염증 활성:

[0158] 본 발명의 특정한 양태에 따르면, 본원에 개시된 가스 농후 유체 및/또는 용액은 항염증 특성 및 효과를 갖고, 염증성 신경변성와 관련된 질환 또는 장애에 의해 영향을 받는 피험체의 치료를 위한 소염제로서 사용될 수 있다. 도 1은 건강한 혈액 도너로부터 얻은 자극된 림프구에서의 사이토카인 프로필의 실험 결과를 나타낸다. 도 1에서 볼 수 있는 것처럼, 본 발명의 산소 농후 유체(물)는 특정한 사이토카인, 특히 IL-6, IL-8 및 IL-1β의 하향 조절에 영향을 미친다.

[0159] 전염증성 사이토카인 생성 증가는 다양한 염증성 및 자가면역 질환의 발병에 관여한다. TNFα 분비는 염증성 케스케이드 억제에서 최초 사건이고(Brennan F. M., et. al. *Lancet*, 1989, 2:244-7; Haworth C, et. al. *Eur. J. Immunol*. 1991, 21:2575-2579), 염증성 및 자가면역 질환의 개시 및 유지에 직접적으로 기여한다. 인터류킨 1β(IL-1β), IL-6, IL-8, IL-12, 산화질소, IFN-γ 및 GM-CSF를 비롯한 다른 전염증성 사이토카인이 또한 역할을 하고, IL-10과 같은 항염증성 사이토카인이 질환을 감소시킬 수 있다. 면역계 세포, 특히 대식세포는 자극 활성화에 반응하여 이러한 많은 사이토카인을 분비한다.

[0160] 다양한 세포 유형은 염증성 과정에 관여한다. 단핵구, 대식세포 및 다른 면역 세포에 의한 TNFα 과생성은 다수의 질환의 발병에서 중요한 요소이다. 대식세포 및 T 세포는 특히 면역 반응의 개시 및 유지에서 중요한 역할을 한다. 대식세포는, 병리학적 또는 면역원성 자극에 의해 활성화되면, TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-12, 산화질소(NO), IL-6, GM-CSF, G-CSF, M-CSF 및 기타를 비롯한 사이토카인의 숙주를 방출하여 반응한다. T 세포는 IL-2, IL-4, INF-γ 및 다른 염증성 사이토카인을 방출한다. 이 사이토카인은 다른 면역 세포를 활성화하고 몇몇은 또한 독립적인 세포독성 물질로서 작용할 수 있다. 대식세포 및 T 세포 유도 염증성 중재자의 과도한 방출은 정상 세포 및 주변 조직을 특히 손상시킬 수 있다.

[0161] 전염증성 사이토카인은 HIV-AIDS, 및 바이러스의 거대세포바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 헤르페스 패밀리를 포함하는 다른 바이러스 감염과 관련된다. TNFα는 인간 거대세포바이러스의 주요한 즉각적 초기 인핸서(enhancer)/프로모터의 기초 활성을 증대시키고 전단핵세포(premonocytic cell)에서 잠복 HCMV 감염의 재활성화에서 역할을 할 수 있다(Prosch S., et. al. *Virology* 1995, 208:197-206).

[0162] 추가로, 여러 염증성 사이토카인은 패혈증 또는 내독소 쇼크를 앓고 있는 환자에서 사망률에 기여한다. 예를 들면, TNFα 및 IL-1β는 패혈증, 패혈증 쇼크 및 내독소 쇼크에서 널리 확립된 중심적 역할을 한다. 이 사이토카인 수치 증가는, 포스포리파제 A2(Gronich J., et al. *J. Clin. Invest.* 1994, 93:1224-1233) 및 NO 합성효소에 대한 유전자 발현 유도와 함께, 열, 저혈압 및 쇼크와 관련된다(Smith J. W. et. al. *J. Clin. Oncol.*

1992, 10:1141-1152; Chapman P. B., et. al. *J. Clin. Oncol*. 1987, 5:1942-1951).

[0163] 평활근 세포로부터의 NO 유도는 패혈증 쇼크 동안 감소된 평균 동맥 압력 및 전신 혈관 저항을 중재하여, NO에 대한 본질적인 역할을 제시한다. 따라서, IL-8, IL-1β 및 NO에 대한 하향 조절 효과를 표적화하는 치료가 패혈증, 패혈증 쇼크 및 내독소 쇼크를 비롯한 염증성 질환 또는 장애의 치료에서 유리하다.

[0164] TNFα 과생성은 다양한 자가면역 질환, 예컨대 당뇨병 및 류마티스성 관절염의 임상 특징에 기여한다. 전신성 홍반성 루푸스(SLE)는 또한 IL-1β 및 TNFα 수치 증가에 의해 예상된다. 루푸스 환자에서, 혈청 C 반응성 단백질, IL-1β 및 TNFα 수치는 대조군에서보다 높아 염증성 반응 증가가 질환에서 역할을 한다는 것을 제시한다(Liou L. B. *Clin. Exp. Rheumatol*. 2001, 19:515-523). SLE의 일 형태인 신경정신병학적 홍반성 루푸스(neuropsychiatric lupus erythematosus: NPLE)를 앓고 있는 환자에 대한 연구는 TNFα에 대해 mRNA를 발현하는 말초 혈액 단핵 세포의 수, 및 NO 대사산물의 뇌척수액 수치가 NPLE 질환 중증도와 상관된다는 것을 나타낸다(Svenungsson E., et al. *Ann. Rheum. Dis*. 2001, 60:372-9).

[0165] IL-1 및 TNFα는 동물 모델에서 다양한 급성 및 만성 반응에서 중심적 역할을 한다. 추가로, IL-11, IFNα 및 IFNβ는 또한 염증성 반응을 상향 조절할 수 있다. 반대로, 몇몇 사이토카인(즉, 무엇보다도 IL-4, IL-10, IL-13)은 염증성 반응의 하향 조절에 관여할 수 있다. 실시예 1에 기재된 바대로, 본 발명의 가스 농후 유체와 접촉한 세포는 T3 항원을 갖는 대조군 배양 배지에서보다 T3 항원에 의해 IFN-γ 수치 증가를 나타내고, IL-8은 T3 항원을 갖는 대조군 배양 배지에서보다 T3 항원을 갖는 본 발명의 가스 농후 배양 배지에서 낮다. 추가로, IL-6, IL-8 및 TNF-α 수치는 PHA를 갖는 대조군 배지에서보다 PHA를 갖는 본 발명의 가스 농후 배지에서 낮고, IL-1β 수치는 PHA를 갖는 대조군 배지와 비교할 때 본 발명의 가스 농후 유체에서 낮다. 본 발명의 가스 농후 배지 단독에서, IFN-γ 수치는 대조군 배지에서보다 높다. 이 결과는 항염증성 미세환경과 일치한다.

[0166] NO는 염증성 반응의 중재자 및 조절자로서 인식된다. 이는 병원균에 대해 세포독성 특성을 보유하지만, 또한 피험체 자신의 조직에 해로운 효과를 갖지 않는다. (Korhonen et al., *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(4): 471-9, 2005). NO는 가용성 구아닐산 고리화효소와 반응하여 사이클릭 구아노신 일인산염(cyclic guanosine monophosphate: cGMP)을 형성하고, 이는 NO의 많은 효과를 중재한다. NO는 또한 분자 산소 및 슈퍼옥사이드 음이온과 상호작용하여 다양한 세포 기능을 변경할 수 있는 반응성 산소 종을 생성할 수 있다. NO의 이러한 간접 효과는 염증에서 중요한 역할을 하고, NO는 유도성 NO 합성효소(iNOS)에 의해 다량 생성되고, 반응성 산소 종은 활성화된 염증성 세포에 의해 합성된다.

[0167] NO는 케라틴 세포, 섬유아세포, 내피 세포 및 가능하게는 다른 세포에 의해 생성될 수 있다. NO의 혈관 작용 중 일부는 혈관 확장, 혈관 내피에 대한 혈소판 접착 억제, 혈관 내피에 대한 백혈구 접착 억제 및 슈퍼옥사이드 소거를 포함한다. (Shah et al., *Env. Health Persp.* v. 106 (5): 1139-1143.)

[0168] 더구나, NO 합성 억제는 상처 수축을 지연시키고, 콜라겐 조직화를 변경하고, 새표피 두께를 변경하는 것으로 나타났다. (Amadeu and Costa, *J. Cutan. Pathol.* 33: 465-473, 2006.) 상처에서의 거대 세포 이동 및 혈관신생은 또한 NO 억제에 의해 영향을 받는다. (*Id.*) 기전의 임의의 특정 이론에 구속됨이 없이, 특정한 실시양태에서 본 발명의 가스 농후 유체는 본원에 개시된 실시예 섹션에 예시된 상처 치유 효과의 스펙트럼과 일치하게 국재화 및/또는 세포내 NO 생성 또는 분해를 조절할 수 있다. 다양한 분해 경로로 인해, 특정한 실시양태에서, 본 발명의 가스 농후 유체는 NO 생성을 증가시키고/시키거나 NO 분해를 지연시킬 수 있는 반면, 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 가스 농후 유체는 NO 생성을 감소시키고/시키거나 NO 분해를 재촉할 수 있다.

[0169] 구체적으로, 산소 농후 식염수 용액으로 치료된 상처는 본원의 실시예 9에 기재된 바대로 4일 내지 11일에 상처 치유 증가를 나타내고, 3일과 11일 사이에 산소 농후 식염수 용액으로 치료된 상처에서의 새로운 표피는 노르말 식염수 용액으로 치료된 상처의 표피보다 2배 내지 4배 빠르게 이동하였다. 상기 연구는 또한, 15일과 22일 사이에, 산소 농후 식염수 용액으로 치료된 상처가, 더 성숙한 표피 층의 조기 형성으로 입증되는 것처럼, 더 신속히 분화된다는 것을 나타낸다. 모든 단계에서, 정상 치유와 관련하여 표피에서 일어나는 비후화가 산소 농후 식염수 용액로 치료된 상처에서 일어나지 않았다.

[0170] 따라서, 이러한 스펙트럼의 상처 치유 효과에 따라, 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이, 산소 농후 식염수 용액이 상처 내 국재화 및/또는 세포내 NO 수치를 조절할 수 있는 것으로 생각된다. NO는 상처 치유에서 성장 인자, 콜라겐 침착, 염증, 거대 세포 이동, 표피 비후화 및 신생혈관생성을 조절한다. 더구나, 산화질소는 산소에 의해 조절되는 유도성 효소에 의해 생성된다.

[0171] 거대 세포 이동의 경우, 산소 농후 용액에 대한 초기 이동과 후기 이동 사이에 차이가 또한 생긴다. 이는 NO 합

성 억제와 관련하여 당해 분야에 공지된 것과 일치한다(Amadeu and Costa, *J. Cutan Pathol* 33: 465-473, 2006).

[0172] 염증성 과정의 처음 2 단계에서, 예를 들면 외래 물체가 유기체인 경우 외래 물체는 파괴되거나, 예를 들면 외래 물체가 파편인 경우 이 주위의 조직이 느슨해진다. 치유 단계에서, 염증이 가라앉기 시작한다; 개인의 혈관 및 혈관 패턴은 다시 정상이 되고; 상처 복구가 시작한다. 복구 과정에서 3가지 주요 사건은 (1) 섬유아세포 증식에 의한 새로운 연결 조직 형성; (2) 상피 재생; 및 (3) 새로운 모세혈관 과성장이다.

[0173] 염증이 가라앉기 전에도, 섬유아세포는 주변 정상 조직으로부터 손상 부위로 이동하기 시작하고, 섬유아세포는 보통 휴먼 상태로 존재한다. 섬유아세포는 피브린 가닥과 함께 아메바 운동으로 이동하고 치유 부위에 걸쳐 그 자체가 분포된다. 섬유아세포가 손상 조직의 위치에 고정되면, 섬유아세포는 콜라겐을 합성하고 이 단백질을 분비하기 시작하고, 이 단백질은 그 자체를 섬유에 배치시킨다. 섬유는 그 자체를 가장 큰 응력 방향으로 이의 장축으로 배열시킨다. 콜라겐 다발이 견고히 성장하면서, 섬유아세포는 점진적으로 퇴화하고 이 다발에 밀접히 부착되고, 손상 부위는 반흔 조직으로 변형된다.

[0174] 반흔 조직 형성과 동시에, 상처 가장자리에서의 온전한 표피 세포는 손상 부위 중심을 향해 하나의 시트로 증식하고 이동하기 시작한다. 염증이 가라앉으면서, 혈액을 직접 공급할 필요성이 생기고, 상처 부위에서 혈관신생이 생긴다.

[0175] 염증은 다수의 세포 유형이 관여하는 복잡한 과정이다. 예를 들면, 거대 세포는 내피하 층에서 내피 세포 분리 및 콜라겐 섬유 노출을 수반하면서 혈관 확장의 초기 단계를 촉발하는 중재자를 방출한다. 혈관에서 형성하는 세포간 갭에서의 섬유는 혈소판을 포획하고 이 세포로부터 중재자의 방출을 촉발한다.

[0176] 혈소판 이외에, 노출된 콜라겐 섬유는 또한 혈액 응집 케스케이드의 인자 촉발, 혈관 확장 증가, 혈관 투과성 증가 및 화학주성을 비롯하여 확장된 혈관벽의 기공을 통해 여과되는 혈장의 단백질과 상호작용한다.

[0177] 추가로, 보체 케스케이드는 손상 혈관, 손상 세포에 의해 방출된 단백질분해 효소, 임의의 침가 박테리아의 막 성분 및 항원-항체 보체의 여러 자극에 의해 활성화될 수 있다. 활성화된 보체 성분 중 몇몇은 염증 부위로의 백혈구 유입을 담당하는 화학주성 인자로서 작용하는 반면, 다른 것은 식균작용을 촉진하고 세포 용해에 참여한다.

[0178] 또한, 본 발명의 가스 농후 유체 또는 용액은 또한 적어도 하나의 염증 양태에 관여하는 적어도 하나의 사이토카인을 조절할 수 있는 것으로 생각되고, 사이토카인(들)은 MAF(대식세포 활성화 인자), MMIF(대식세포 이동 억제 인자), MCF(대식세포 화학주성 인자), LMIF(백혈구 이동 억제 인자), HRF(히스타민 방출 인자), TF(전달 인자), 인터류킨(IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15 등), TNF-α, TNF-β, 인터페론(IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IFN-ζ, IFN-δ 등), G-CSF(과립구 집락 자극 인자), GM-CSF(과립구-대식세포 CSF), M-CSF(대식세포 CSF), 다중-CSF(IL-3), 섬유아세포 성장 인자(aFGF, bFGF), EGF(표피 성장 인자), NGF(신경 성장 인자), PDGF(혈소판 유도 성장 인자), VEGF(혈관 내피 성장 인자), 변환 성장 인자(TGF-α, TGF-β 등), NAP-2(호중구 활성화 단백질 2), PF-4(혈소판 인자 4), 트롬보글로불린, MCP-1(단핵구 화학주성인자 단백질 1), MCP-3, MIP-1α, MIP-1β-+(대식세포 염증성 단백질), RANTES(활성화시 조절되는 발현된 정상 T 및 아마도 분비된 케모카인: regulated upon activation normal T expressed and presumably secreted chemokine), HSP(열 쇼크 단백질), GRP(글루코스 조절 단백질), 유비퀴틴 및 기타 등등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0179] 따라서, 특정한 실시양태에서, 가스 농후 유체 및/또는 치료학적 조성물은 항염증성 분자 또는 사이토카인의 생성 및/또는 분비를 증가시키거나 항염증성 분자 또는 사이토카인의 분해를 감소시켜, 염증 및/또는 염증성 신경변성 중 적어도 하나의 증상을 경감하거나 예방할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 가스 농후 유체 및/또는 치료학적 조성물은 전염증성 분자 또는 사이토카인의 생성 및/또는 분비를 감소시키거나 전염증성 분자 또는 사이토카인의 분해를 증가시켜, 염증 및/또는 염증성 신경변성의 적어도 하나의 증상을 경감하거나 예방할 수 있다.

[0180] 선행 연구는 류마티스성 관절염의 인간 자가면역 장애에 대한 동물 모델 시스템인 EAE(실험적 자가면역 뇌척수염)의 악화 및 탈수초 증대에서의 항-MOG 항체의 결정적인 역할을 나타낸다. (Linington, et al. 1992. *J. Neuroimmunol.* 40:219-224). 추가로, MOG에 대한 항체는 다발성 경화증 발병에 관여한다. (Berger et al. *N. Engl. J. Med.* 2003 Jul 10;349(2):139-45).

[0181] 도 2 및 실시예 3에 도시된 바대로, 본 발명의 가스 농후 유체는 이전에 프라이밍된 동물에 대한 항원에 대한

림프구 반응을 증폭시킨다. 도 2에 표시된 바대로, 림프구 증식은 가압된 산소화 유체(압력 포트) 또는 대조군 탈이온화 유체와 비교할 때 용매화 전자를 포함하는 본 발명의 가스 농후 유체로 재구성된 유체 중에 배양될 때 MOG 공격에 대한 반응이 더 컸다.

[0182] 예시적인 관련 분자 상호작용:

[0183] 전통적으로, 양자 특성은 10^{-10}미터 미만의 소립자에 속하는 것으로 생각되는 반면, 우리 일상의 거시 세계는 이것이 뉴턴의 운동 법칙에 따라 행동한다는 점에서 고전적이라 칭한다.

[0184] 최근에, 분자는 희석에 의해 크기가 증가하는 클러스터를 형성하는 것으로 기술된다. 이러한 클러스터는 수 마이크로미터의 직경을 측정하고, 희석에 의해 비선형으로 크기를 증가시키는 것으로 보고되었다. 100나노미터의 직경을 측정하는 양자 동착(coherent) 도메인은 순수(pure water)에서 생기는 것으로 상정되었고, 동착 도메인에서의 물 분자의 전체적 진동은 결국 위상을 전자기장 변동으로 고정시켜, 물 중에 안정한 진동을 제공하여, 물의 전체적 구조를 변경하는(결국 발생한 특징적인 동착 진동을 결정할 수 있음) 물 중에 용해된 물질에 특징적인 오래 지속되는 동착 진동의 여기 형태의 '기억' 형태를 제공한다. 이러한 진동이 자기장 위상 연관에 의해 안정화되면, 물은 희석 시 여전히 '시드(seed)' 동착 진동을 전달한다. 분자 클러스터가 크기가 증가하면서, 이의 전자기 서명이 상응하게 증폭되어, 물에 의해 전달된 동착 진동을 강화하다.

[0185] 용해된 분자의 클러스터 크기 변경 및 물의 상세한 미세 구조에도 불구하고, 동착 진동의 특수성이 그럼에도 불구하고 존재할 수 있다. 물 특성의 변경을 고려한 하나의 모델은 결정화에 관여하는 고려에 기초한다.

[0186] 나노규모 케이지를 형성하는 단순화된 양성자화 물 클러스터는 WO 2009/055729인 출원인의 선행 특허 출원에 기재되어 있다. 양성자화 물 클러스터는 통상적으로 $H^+(H_2O)_n$ 형태를 취한다. 몇몇 양성자화 물 클러스터는 자연히, 예컨대 이온층(ionosphere)에서 생긴다. 임의의 특정 이론에 구속됨이 없이, 특정 양태에 따르면, 본 발명의 배출 물질에 전달된 산소 및 안정화 전자를 포함하는 구조를 비롯한 다른 유형의 물 클러스터 또는 구조(클러스터, 나노케이지 등)가 가능하다. 산소 원자는 생성된 구조에 갇힐 수 있다. 반결합 나노케이지의 화학은 산소 및/또는 안정화 전자가 연장된 시간 동안 계속 용해되게 한다. 다른 원자 또는 분자, 예컨대 의학 화합물은 지속된 전달 목적을 위해 감금될 수 있다. 용액 물질 및 용해된 화합물의 특정 화학은 이 물질의 상호작용에 따라 달라진다.

[0187] 혼합 장치에 의해 처리되는 유체는 이전에 실험을 통해 클러스터 구조와 관련하여 유체 분석과 일치하는 상이한 구조 특징을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, WO 2009/055729를 참조한다.

[0188] 전하 안정화 나노구조물(예를 들면, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물):

[0189] 출원인의 WO 2009/055729의 "이중 층 효과(Double Layer Effect)", "체류 시간(Dwell Time)", "주입 속도(Rate of Infusion)" 및 "버블 크기 측정(Bubble size Measurements)"에 이전에 기재된 바대로, 동전기적 혼합 장치는, 본원에 기재된 신규한 동전기적 효과를 제공하는 효과적으로 거대한 표면적(상기 장치 및 100㎚ 미만의 유난히 작은 가스 버블의 표면적 포함)과 접촉 시 복잡한 혼합을 제공하는 복잡한 동적 섭동으로, 수밀리초로 제1 물질 및 제2 물질의 독특한 비선형 유체 동적 상호작용을 생성한다. 추가로, 절연 로터 및 고정자 피처를 포함하는 특수 설계된 혼합 장치를 사용하여 피처 국재화 동전기적 효과(전압/전류)를 입증하였다.

[0190] 당해 분야에서 널리 인식되는 것처럼, 전하 재분배 및/또는 용매화 전자는 수용액 중에 매우 불안정한 것으로 알려져 있다. 특정 양태에 따르면, 출원인의 동전기적 효과(예를 들면, 특정 양태에서 용매화 전자를 포함하는 전하 재분배)는 놀랍게도 배출 물질(예를 들면, 식염수 용액, 이온성 용액) 내에 안정화된다. 사실, 본원에 기술된 바대로, 본 발명의 동전기적 유체(예를 들면, RNS-60 또는 솔라스)의 특성 및 생물학적 활성의 안정성을 기밀 용기 내에서 개월 동안 유지시킬 수 있고, 이는 본 발명의 용액의 특성 및 활성을 생성하고/하거나 유지시키고/시키거나 중재하는 것을 돕는 데 있어서 용해된 가스(예를 들면, 산소)의 관여를 나타낸다. 중요하게는, 전하 재분배 및/또는 용매화 전자는, 살아 있는 세포(예를 들면, 포유동물 세포)가 유체와 접촉 시, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나의 조절을 제공하기에 충분한 양으로 본 발명의 동전기적 이온성 수성 유체 중에 안정하게 구성된다(예를 들면, WO 2009/055729의 실시예 23 및 본원에 개시된 세포 패치 클램프 참조).

[0191] "분자 상호작용" 하에 본원에 기술된 바대로, 본 발명의 동전기적 유체(예를 들면, 동전기적 식염수 용액)의 안정성 및 생물학적 상용성을 설명하기 위해, 출원인은 물 분자와 물 중에 용해된 물질(예를 들면, 산소)의 분자 사이의 상호작용이 물의 전체적 구조를 변경하고 본 발명의 배출 물질에 부여되는 산소 및/또는 안정화 전자를 포함하는 나노구조물을 비롯한 나노규모 케이지 클러스터를 제공한다는 것을 제시하였다. 기전에 구속됨이

없이, 특정 양태에서 나노구조물의 구성은, 이것이 (적어도 형성 및/또는 안정성 및/또는 생물학적 활성을 위해) 용존 가스(예를 들면, 산소)를 포함하고; 동전기적 유체(예를 들면, RNS-60 또는 솔라스 식염수 유체)가 세포막 또는 이의 관련 구성성분과의 접촉 시 전하 및/또는 전하 효과를 조정(예를 들면, 부여 또는 수신)하도록 하고; 특정 양태에서 생물학적으로 관련된 형태의 용매화 전자의 안정화(예를 들면, 운반, 보유, 포획)를 제공하도록 하는 것이다.

[0192] 특정 양태에 따르면, 본 개시내용에 의해 지지되는 것처럼, 이온성 또는 식염수(예를 들면, 표준 식염수, NaCl) 용액 중에서, 본 발명의 나노구조물은 전하 안정화된 수화 쉘 내에 적어도 하나의 용존 가스 분자(예를 들면, 산소)를 포함하는 전하 안정화 나노구조물(예를 들면, 100㎚ 미만의 평균 직경)을 포함한다. 추가의 양태에 따르면, 전하 안정화된 수화 쉘은 적어도의 하나 용존 가스 분자(예를 들면, 산소)를 보유하는 케이지 또는 보이드를 포함할 수 있다. 추가의 양태에 따르면, 적합한 전하 안정화된 수화 쉘의 제공에 의해, 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 용매화 전자(예를 들면, 안정화된 용매화 전자)를 추가로 포함할 수 있다.

[0193] 기전 또는 특정 이론에 구속됨이 없이, 본원의 우선일 후에, 주변(대기) 가스와 평형인 수성 액체 중의 이온에 의해 안정화된 전하 안정화 마이크로버블이 제시되었다(Bunkin et al., *Journal of Experimental and Theoretical Physics*, 104:486-498, 2007(그 전문이 본원에 참조문헌으로 포함됨)). 본 발명의 특정 양태에 따르면, 출원인의 신규한 동전기적 유체는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 신규한 생물학적으로 활성인 형태를 포함하고, 이러한 구조물의 신규한 어레이, 클러스터 또는 연합을 추가로 포함할 수 있다.

[0194] 전하 안정화 마이크로버블 모델에 따르면, 단거리 분자 차수의 물은 가스 분자에 의해 파괴되어(예를 들면, 비흡착성 이온과 초기에 착화된 용존 가스 분자는 단거리 차수의 결함을 제공함), 이온성 액적의 응축을 제공하고, 이 결함은 물 분자의 제1 배위 구 및 제2 배위 구에 의해 둘러싸이고, 이는 배위 구에서 각각 6원자가 및 12원자가를 차지하는 흡착성 이온(예를 들면, 전기 이중 층을 형성하는 Na^+ 이온의 스크리닝 쉘의 획득) 및 비흡착성 이온(예를 들면, 제2 배위 구를 차지하는 Cl^- 이온)에 의해 교대로 충전된다. 미포화 이온성 용액(예를 들면, 미포화 식염수 용액)에서, 이 수화 '핵'은 제1 구 및 제2 구가 각각 6개의 흡착성 이온 및 5개의 비흡착성 이온으로 충전될 때까지 안정하게 남아 있고, 이후 가스 분자를 포함하는 내부 보이드를 생성하는 쿨롱 폭발(Coulomb explosion)을 겪고, 흡착성 이온(예를 들면, Na^+ 이온)은 생성된 보이드의 표면에 흡착되고, 비흡착성 이온(또는 이의 몇몇 일부)은 용액으로 확산된다(상기 Bunkin 외 문헌). 이 모델에서, 나노구조물 내의 보이드는 이의 표면에 흡착된 이온(예를 들면, Na^+ 이온) 사이의 쿨롱 반발에 의해 붕괴가 방지된다. 보이드 함유 나노구조물의 안정성은 보이드/버블 표면에 대한 전하와 같은 용해된 이온의 선택적 흡착 및 용존 가스와 버블 내 가스 사이의 확산 평형으로 인한 것으로 상정되고, 생성된 전기 이중 층이 가하는 외부로의 정전 음압은 표면 장력에 안정한 보상을 제공하고, 버블 내 가스 압력은 주변 압력과 균형을 이룬다. 모델에 따르면, 이러한 마이크로버블의 형성은 이온 성분을 요하고, 특정한 양태에서 입자 사이의 충돌 매개 연합은 더 큰 차수의 클러스터(어레이)를 제공할 수 있다(상기 참조).

[0195] 전하 안정화 마이크로버블 모델은 입자가 가스 마이크로버블일 수 있다는 것을 제시하지만, 주변 공기와의 평형으로 이온성 용액 중에 이러한 구조물의 오직 자발적인 형성을 고려하고, 산소가 이러한 구조물을 형성할 수 있는지에 대해 규명하지 못하고 침묵하고, 마찬가지로 용매화 전자가 이러한 구조물에 의해 연합되고/되거나 안정화될 수 있는지에 대해서도 침묵한다.

[0196] 특정 양태에 따르면, 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물을 포함하는 본 발명의 동전기적 유체는 신규하고 마이크로버블 모델에 따라 상정된 비동전기적인 대기 전하 안정화 마이크로버블 구조와 기본적으로 다르다. 상당히, 이러한 결론은 피할 수 없고, 적어도 부분적으로, 대조군 식염수 용액이 본원에 개시된 생물학적 특성을 갖지 않는 반면, 출원인의 전하 안정화 나노구조물이 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 신규한 생물학적으로 활성인 형태를 제공한다는 사실이 추론된다.

[0197] 본 발명의 특정 양태에 따르면, 출원인의 신규한 동전기적 장치 및 방법은 공기와 평형인 이온성 유체 또는 임의의 비동전기적으로 생성된 유체 중에 자발적으로 생기거나 생기지 않을 수 있는 양을 초과하는 상당한 분량의 전하 안정화 나노구조물을 포함하는 신규한 동전기적으로 변경된 유체를 제공한다. 특정 양태에서, 전하 안정화 나노구조물은 전하 안정화 산소 함유 나노구조물을 포함한다. 추가의 양태에서, 전하 안정화 나노구조물은 모두 또는 실질적으로 모두 전하 안정화 산소 함유 나노구조물이거나, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 동전기적 유체 중의 주요한 전하 안정화 가스 함유 나노구조물 종이다.

[0198] 다른 추가의 양태에 따르면, 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 용매화 전자를 포함하거나 보유하고, 따라서 신규한 안정화된 용매화 전자 담체를 제공할 수 있다. 특정 양태에서, 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 단일의 유기적으로 배위된 양이온을 갖는 종래의 용질 전극과 반대로, 오히려 보이드 또는 산소 원자를 포함하는 보이드 주위에 안정하게 배열된 복수의 양이온을 갖는 신규한 유형의 전극(또는 인버티드 전극)을 제공하고, 배열된 나트륨 이온은 유기 분자보다는 물 수화 쉘에 의해 배위된다. 특정 양태에 따르면, 용매화 전자는 물 분자의 수화 쉘에 수용되거나, 바람직하게는 모든 양이온에 걸쳐 분포된 나노구조물 보이드 내에 수용될 수 있다. 특정한 양태에서, 본 발명의 나노구조물은 복수의 배열된 나트륨 양이온에 걸쳐 용매화 전자의 분포/안정화를 제공할 뿐만 아니라, 또한 용매화 전자와 보이드 내에 갇힌 산소 분자(들)의 회합 또는 부분 회합을 제공함(용매화 전자가 나트륨 원자 어레이 및 적어도 하나의 산소 원자에 걸쳐 분포함)으로써 용액 내에 신규한 '슈퍼 전극' 구조를 제공한다. 따라서, 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 유체와 관련하여 본원에 개시된 '용매화 전자'는 물 분자에 의한 직접적인 수화를 포함하는 전통적인 모델에서 용매화될 수 없다. 대안적으로, 건조된 전극 염과의 제한된 유사성으로, 본 발명의 동전기적 유체 내의 용매화 전자는 복수의 전하 안정화 나노구조물에 걸쳐 분포되어 수용액 내에 더 고차의 어레이를 안정화시키기 위한 '격자 글루(lattice glue)'를 제공할 수 있다.

[0199] 특정 양태에서, 본 발명의 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 세포막 또는 이의 구성성분 또는 단백질 등과 상호작용하여 생물학적 활성을 중재할 수 있다. 특정 양태에서, 용매화 전자를 보유하는 본 발명의 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 세포막 또는 이의 구성성분 또는 단백질 등과 상호작용하여 생물학적 활성을 중재할 수 있다.

[0200] 특정 양태에서, 본 발명의 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 전하 및/또는 전하 효과 도너(전달) 및/또는 전하 및/또는 전하 효과 수용자로서 세포막 또는 이의 구성성분 또는 단백질 등과 상호작용하여 생물학적 활성을 중재한다. 특정 양태에서, 용매화 전자를 보유하는 본 발명의 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 전하 및/또는 전하 효과 도너 및/또는 전하 및/또는 전하 효과 수용자로서 세포막과 상호작용하여 생물학적 활성을 중재한다.

[0201] 특정 양태에서, 본 발명의 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 본 발명의 동전기적 유체의 관찰된 안정성 및 생물학적 특성과 일치하고 이의 원인이 되며, 수성 이온성 용액(예를 들면, 식염수 용액, NaCl 등) 중에 안정화된 용매화 전자를 제공하는 신규한 전극(또는 인버티드 전극)을 추가로 제공한다.

[0202] 특정 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 실질적으로 전하 안정화 산소 함유 나노버블을 포함하거나, 이의 형태를 취하거나, 이를 생성시킬 수 있다. 특정 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 클러스터는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물의 비교적 큰 어레이, 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노버블 또는 이의 어레이의 형성을 제공한다. 특정 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 소수성 표면과 접촉 시 소수성 나노버블의 형성을 제공할 수 있다.

[0203] 특정 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 실질적으로 적어도 하나의 산소 분자를 포함한다. 특정한 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 실질적으로 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 50개, 적어도 100개 이상의 산소 분자를 포함한다. 특정 양태에서, 전하 안정화 산소 함유 나노구조물은 약 20㎚ x 1.5㎚의 나노버블(예를 들면, 소수성 나노버블)을 포함하거나 생성시키고, 약 12개의 산소 분자를 포함한다(예를 들면, 산소 분자 크기(대략 0.3㎚ x 0.4㎚)에 기초하여, 이상 기체 및 n = PV/RT(여기서, P = 1atm이고, R = 0.082 0571.atm/mol.K이고; T = 295K이고; $V = pr^2h = 4.7x10^{-22}L$(여기서, r = 10 x 10^{-9}m, h = 1.5 x 10^{-9}m 및 n = 1.95 x 10^{-22}몰)임)의 적용 가정).

[0204] 특정한 양태에서, 이온성 수성 유체 중에 전하 안정화된 구성을 갖는 이러한 나노구조물 또는 이의 어레이에 있는 유체 내 존재하는 산소 분자의 백분율은 0.1%, 1%; 2%; 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 및 초과 95% 초과로 이루어진 군으로부터 선택되는 백분율 양이다. 바람직하게는, 이 백분율은 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과 또는 약 20% 초과이다. 추가의 양태에서, 이온성 수성 유체 중에 전하 안정화된 구성을 갖는 실질적인 크기의 전하 안정화 산소 함유 나노구조물 또는 이의 어레이는 100㎚; 90㎚; 80㎚; 70㎚; 60㎚; 50㎚; 40㎚; 30㎚; 20㎚; 10㎚; 5㎚; 4㎚; 3㎚; 2㎚; 및 1㎚ 미만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 크기이다. 바람직하게는, 이 크기는 약 50 ㎚ 미만, 약 40 ㎚ 미만, 약 30 ㎚ 미만, 약 20 ㎚ 미만 또는 약 10 ㎚ 미만이다.

[0205] 특정한 양태에서, 본 발명의 동전기적 유체는 용매화 전자를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 동전기적 유체는 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물 및/또는 이의 어레이를 포함하고, 이는 용매화 전자(들); 및 독특한 전하 분배(극성, 대칭, 비대칭 전하 분배) 중 적어도 하나를 포함한다. 특정한 양태에서, 전하 안정화 나노구조물 및/또는 전하 안정화 산소 함유 나노구조물 및/또는 이의 어레이는 상자성 특성을 갖는다.

[0206] 반대로, 본 발명의 동전기적 유체에 비해, 조절 압력 포트 산소화 유체(비동전기적 유체) 및 기타 등등은, 세포막 전위 및 세포막 전도율 중 적어도 하나를 조절할 수 있는, 이러한 동전기적으로 생성되는 생물학적으로 활성인 전하 안정화 나노구조물 및/또는 생물학적으로 활성인 전하 안정화 산소 함유 나노구조물 및/또는 이의 어레이를 포함하지 않는다.

[0207] 가스 농후 유체를 제조하기 위한 시스템:

[0208] 출원인의 WO 2009/055729 특허 출원에 이미 개시된 시스템 및 방법은 가스(예를 들면, 산소)가 최소의 소극적인 손실로 고농도로 안정하게 농후하도록 한다. 다양한 가스가 고조된 백분율로 다양한 유체에 농후하도록 이 시스템 및 방법을 효과적으로 사용할 수 있다. 오직 예의 방식으로, 실온에서 용존 산소 수치가 통상적으로 약 2 내지 3ppm(백만분율)인 탈이온수는 개시된 시스템 및/또는 방법을 이용하여 적어도 약 5ppm, 적어도 약 10ppm, 적어도 약 15ppm, 적어도 약 20ppm, 적어도 약 25ppm, 적어도 약 30ppm, 적어도 약 35ppm, 적어도 약 40ppm, 적어도 약 45ppm, 적어도 약 50ppm, 적어도 약 55ppm, 적어도 약 60ppm, 적어도 약 65ppm, 적어도 약 70ppm, 적어도 약 75ppm, 적어도 약 80ppm, 적어도 약 85ppm, 적어도 약 90ppm, 적어도 약 95ppm, 적어도 약 100ppm 또는 임의의 더 큰 값 또는 이들 사이 값 범위의 용존 산소 수치를 성취할 수 있다. 특정한 예시적 실시양태에 따라, 산소 농후 물이 약 30 내지 60ppm의 용존 산소 수치로 생성될 수 있다.

[0209] 표 3은 산소 농후 식염수 용액(표 3) 및 본 발명의 가스 농후 산소 농후 식염수 용액의 샘플에서 치료된 치유 상처에서 취한 다양한 분압 측정을 나타낸 것이다.

표 3

[0210]

조직 산소 측정	
프로브 Z082BO	
공기 중: 171mmHg	23℃
칼럼	분압(mmHg)
B1	32-36
B2	169-200
B3	20-180*
B4	40-60
* 최소 상처 폭, 대부분 >150, 때때로 20s	

[0211] 경로 및 투여 형태:

[0212] 특정한 예시적 실시양태에서, 본 발명의 가스 농후 유체는 치료학적 조성물 단독으로 또는 다른 치료제와 병용되어 작용하여 치료학적 조성물이 염증의 적어도 하나의 증상을 예방하거나 경감시킬 수 있다. 본 발명의 치료학적 조성물은 이를 필요로 하는 피험체에게 투여될 수 있는 조성물을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 치료학적 조성물 제제는 또한 담체, 부형제, 유화제, 현탁제, 감미료, 향료, 향수 및 결합제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 물질을 포함할 수 있다.

[0213] 본원에 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체" 및 "담체"는 일반적으로 임의의 보조적인 유형의 비독성, 불활성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제제를 의미한다. 약제학적으로 허용되는 담체로서 작용할 수 있는 물질의 몇몇 비제한적인 예로는 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유; 해바라기유; 참깨유; 올리브유; 옥수수유 및 대두유; 글라이콜; 예컨대, 프로필렌 글라

이콜; 에스터, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열원 비함유 물; 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알코올 및 포스페이트 완충제 용액 및 다른 비독성 상용성 활택제, 예컨대 라우릴 황산 나트륨 및 스테아르산마그네슘 및 착색제, 이형제, 코팅제, 감미료, 향료 및 향수 물질을 들 수 있고, 보존제 및 항산화제가 또한 제제화 기술자의 판단에 따라 조성물 내에 존재할 수 있다. 특정 양태에서, 이러한 담체 및 부형제는 본 발명의 가스 농후 유체 또는 용액일 수 있다.

[0214] 본원에 기재된 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들면 비히클, 부형제, 부형제 또는 희석제는 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다. 통상적으로, 약제학적으로 허용되는 담체는 치료제에 화학적으로 불활성이고 사용 조건 하에 해로운 부작용 또는 독성을 갖지 않는다. 약제학적으로 허용되는 담체는 중합체 및 중합체 매트릭스, 나노입자, 마이크로버블 등을 포함할 수 있다.

[0215] 본 발명의 치료학적 가스 농후 유체 이외에, 치료학적 조성물은 불활성 희석제, 예컨대 추가의 가스가 농후하지 않는 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 아이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글라이콜, 1,3-부틸렌 글라이콜, 다이메틸포름아미드, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 캐스터유 및 참깨유), 글라이세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 소르비탄의 폴리에틸렌 글라이콜 및 지방산 에스터, 및 이들의 혼합물을 추가로 포함할 수 있다. 당업자가 이해하는 것처럼, 하나 이상의 불활성 희석제를 동일한, 유사한 또는 상이한 조성물의 가스 농후 유체로 대체하여 특정한 치료학적 조성물의 신규한 개선된 제제, 신규한 가스가 농후한 치료학적 유체 및 신규한 가스가 농후한 치료학적 유체를 전달하는 신규한 방법을 얻을 수 있다. 예를 들면, 가스 농후 유체를 제공하도록 산소를 물 또는 탈이온수와 혼합하여 생성된 가스 농후 유체에 의해 종래의 물을 대체하거나 보충할 수 있다.

[0216] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 가스 농후 유체를 하나 이상의 치료제와 조합하고/하거나 단독으로 사용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 가스 농후 유체의 도입은 당해 분야에 공지된 하나 이상의 용액, 예컨대 탈이온수, 식염수 용액 등을 하나 이상의 가스 농후 유체로 대체하여, 피험체에 전달하기 위한 개선된 치료학적 조성물을 제공하는 것을 포함할 수 있다.

[0217] 특정한 실시양태는 본 발명의 가스 농후 유체, 약제학적 조성물 또는 다른 치료제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물 및 적어도 하나의 약제학적 담체 또는 희석제를 포함하는 치료학적 조성물을 제공한다. 이 약제학적 조성물을 상기 질환 또는 병증의 예방 및 치료 및 상기 언급된 치료법에서 사용할 수 있다. 바람직하게는, 담체는 약제학적으로 허용되어야 하고, 상기 조성물 내 다른 성분과 상용성이어야, 즉 해로운 효과를 갖지 않아야 한다. 담체는 고체 또는 액체일 수 있고, 바람직하게는 단위 용량 제제, 예를 들면 0.05 내지 95중량%의 활성 성분을 포함할 수 있는 정제로 제제화될 수 있다.

[0218] 가능한 투여 경로는 경구, 설하, 볼내, 비경구(예를 들면, 피하, 근육내, 동맥내, 복강내, 낭내, 방광내, 척추강내 또는 정맥내), 직장내, 국소, 예컨대 피하, 질내, 안와내, 귀내, 비강내, 흡입, 및 이식용 장치 또는 물질의 주사 또는 삽입을 포함한다.

[0219] 투여 경로:

[0220] 특정한 피험체에 대한 투여의 대부분의 적합한 수단은 치료되는 질환 또는 병증의 성질 및 중증도 또는 사용되는 치료제의 성질, 및 치료학적 조성물 또는 추가의 치료제의 성질에 따라 달라진다. 특정한 실시양태에서, 경구 또는 국소 투여가 바람직하다.

[0221] 경구 투여에 적합한 제제는 각각 소정량의 활성 화합물을 포함하는 별개 단위, 예컨대 정제, 캡슐제, 카세제, 시럽제, 엘릭시르제, 츄잉 검, "롤리팝" 제제, 마이크로유화제, 용액제, 현탁제, 로젠지제 또는 겔 코팅 앰플로서; 산제 또는 과립제로서; 수성 또는 비수성 액체 중의 용액제 또는 현탁제로서; 또는 수중유 또는 유중수 유화제로서 제공될 수 있다.

[0222] 경구 투여에 적합한 추가의 제제는 다양한 유형의 계량 용량 가압 에어로졸, 무화기, 분무기 또는 취입기의 수단에 의해 생성될 수 있는 미세한 입자 가루 또는 미스트를 포함하도록 제공될 수 있다. 특히, 치료제의 분말 또는 다른 화합물을 본 발명의 가스 농후 유체 중에 용해하거나 현탁할 수 있다.

[0223] 예컨대, 설하 또는 볼내 투여에 의한 경점막 방법에 적합한 제제는 활성 화합물 및 통상적으로 당 및 아카시아 또는 트래거캔스와 같은 향 기제를 포함하는 로젠지 패치, 정제 등, 및 젤라틴 및 글라이세린 또는 수크로스 아카시아와 같은 불활성 기제 중에 활성 화합물을 포함하는 캔디를 포함한다.

[0224] 비경구 투여에 적합한 제제는 통상적으로 소정 농도의 활성 가스 농후 유체 및 가능하게는 다른 치료제를 포함하는 무균 수용액을 포함하고; 용액은 바람직하게는 의도하는 수혜자의 혈액과 등장성이다. 비경구 투여에 적합한 추가의 제제는 생리학적으로 적합한 공용매 및/또는 착화제, 예컨대 계면활성제 및 사이클로덱스트린을 포함하는 제제를 포함한다. 수중유 유화제는 또한 가스 농후 유체의 비경구 투여를 위한 제제에 적합할 수 있다. 이러한 용액을 바람직하게는 정맥내 투여하지만, 이를 또한 피하 또는 근육내 주사에 의해 투여할 수 있다.

[0225] 요도, 직장내 또는 질내 투여에 적합한 제제는 겔제, 크림제, 로션제, 수성 또는 유성 현탁제, 분산성 산제 또는 과립제, 유화제, 용해성 고체 물질, 질 세정제(douche) 등을 포함한다. 상기 제제는 바람직하게는 코코아 버터와 같은 좌제 기제를 형성하는 하나 이상의 고체 담체 중에 활성 성분을 포함하는 단일 용량 좌제로서 제공된다. 대안적으로, 본 발명의 가스 농후 유체를 갖는 대장 세척제가 대장 또는 직장내 투여를 위해 제제화될 수 있다.

[0226] 국소, 안와내, 귀내 또는 비강내 적용에 적합한 제제는 유동 압축가스(예컨대, 리포솜 스프레이, 점비액, 비강 스프레이 등) 및 오일을 사용하는 연고제, 크림제, 페이스트제, 로션제, 페이스트제, 겔제(예컨대, 하이드로겔), 스프레이, 분산성 산제 및 과립제, 유화제, 스프레이 또는 에어로졸을 포함한다. 이러한 제제에 적합한 담체는 페트롤륨 젤리, 라놀린, 폴리에틸렌글라이콜, 알코올 및 이들의 조합을 포함한다. 비강 또는 비강내 전달은 임의의 이러한 제제 또는 다른 제제의 계량 용량을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 귀내 또는 안와내는 점안액, 연고, 자극 유체 등을 포함할 수 있다.

[0227] 통상적으로 가스 농후 유체를 임의로 활성 화합물과 필요한 비로 액체 또는 미세하게 분산된 고체 담체 또는 둘 다와 균일하게 친밀히 혼합한 후, 필요한 경우, 생성된 혼합물을 원하는 형상으로 성형하여 본 발명의 제제를 임의의 적합한 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0228] 활성 성분 및 하나 이상의 임의의 성분, 예컨대 결합제, 활택제, 불활성 희석제 또는 표면 활성 분산제의 분말 또는 과립을 포함하는 친밀한 혼합물을 압축하여 또는 분말화된 활성 성분 및 본 발명의 가스 농후 유체의 친밀한 혼합물을 성형하여, 예를 들면 정제를 제조할 수 있다.

[0229] 흡입에 의한 투여에 적합한 제제는 다양한 유형의 계량 용량 가압 에어로졸, 무화기, 분무기 또는 취입기에 의해 생성될 수 있는 미세한 입자 가루 또는 미스트를 포함한다. 특히, 치료제의 분말 또는 다른 화합물을 본 발명의 가스 농후 유체 중에 용해시키거나 현탁시킬 수 있다.

[0230] 입을 통한 폐 투여의 경우, 분말 또는 액적의 입자 크기는 기관지로 전달되는 것을 보장하기 위해 통상적으로 0.5 내지 10㎛M, 바람직하게는 1 내지 5㎛M 범위이다. 비강 투여의 경우, 비강에서의 정체를 보장하기 위해 10 내지 500㎛M 범위의 입자 크기가 바람직하다.

[0231] 계량 용량 흡입기는 통상적으로 액화 압축가스 중에 치료제의 현탁액 또는 용액 제제를 포함하는 가압 에어로졸 분배기이다. 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 바대로, 본 발명의 가스 농후 유체를 표준 액화 압축가스 이외에 또는 이것 대신에 사용할 수 있다. 사용 동안, 이 장치는 통상적으로 10 내지 150㎕의 계량 용적을 전달하기에 적합한 밸브를 통해 제제를 배출시켜 치료제 및 가스 농후 유체를 포함하는 미세한 입자 스프레이를 생성시킨다. 적합한 압축가스는 특정한 클로로플루오로탄소 화합물, 예를 들면 다이클로로다이플루오로메탄, 트라이클로로플루오로메탄, 다이클로로테트라플루오로에탄 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0232] 상기 제제는 하나 이상의 공용매, 예를 들면 에탄올 계면활성제, 예컨대 올레산 또는 소르비탄 트라이올레이트, 항산화제 및 적합한 향료 물질을 추가로 포함할 수 있다. 분무기는 좁은 벤투리 오리피스를 통한 압축 가스(통상적으로 공기 또는 산소)의 가속에 의해 또는 초음파 교반에 의해 활성 성분의 용액 또는 현탁액을 치료학적 에어로졸 미스트로 변형시키는 상업적으로 구입 가능한 장치이다. 분무기에 사용하기에 적합한 제제는 가스 농후 유체 중의 다른 치료제로 이루어지고 상기 제제를 40%(w/w) 미만, 바람직하게는 20%(w/w) 미만으로 포함한다. 또한, 증류수, 무균수 또는 묽은 알코올 수용액과 같은 다른 담체를 사용할 수 있고, 이는 바람직하게는 염화나트륨과 같은 염의 첨가에 의해 체액과 등장성이 된다. 특히 상기 제제가 무균으로 제조되지 않는 경우, 임의의 첨가제는 보존제이고, 메틸 하이드록시-벤조에이트, 항산화제, 향료 물질, 휘발성 오일, 완충제 및 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0233] 통기법에 의한 투여에 적합한 제제는 취입기에 의해 전달되거나 코를 킁킁거려 비강에 취해질 수 있는 미세하게 분쇄된 분말을 포함한다. 취입기에서, 분말은 동일 자리에서 구멍이 있거나 열리는 통상적으로 젤라틴 또는 플라스틱으로 제조된 캡슐 또는 카트리지에 포함되고, 분말은 흡입시 장치로부터 공기 흡입에 의해 또는 수동 조작되는 펌프에 의해 전달된다. 취입기에 사용되는 분말은 활성 성분으로만 이루어지거나, 활성 성분, 적합한 분

말 희석제, 예컨대 락토스 및 임의의 계면활성제를 포함하는 분말 블렌드로 이루어진다. 활성 성분은 통상적으로 상기 제제를 0.1 내지 100(w/w)으로 포함한다.

[0234] 상기 구체적으로 언급된 성분 이외에, 본 발명의 제제는 당해 제제의 유형과 관련하여 당업자에게 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 경구 투여에 적합한 제제는 향료 물질을 포함할 수 있고, 비강내 투여에 적합한 제제는 향수를 포함할 수 있다.

[0235] 본 발명의 치료학적 조성물을 약제학적 약물과 관련하여 사용하기에 이용 가능한 임의의 종래 방법에 의해 개별 치료제로서 또는 치료제의 복합제로 투여할 수 있다.

[0236] 투여되는 용량은 물론 특정한 물질의 약동학적 특징 및 이의 투여 방식 및 경로; 수혜자의 나이, 건강 및 체중; 증상의 성질 및 정도; 병용되는 치료제의 종류; 치료 빈도; 및 원하는 효과와 같은 알려진 인자에 따라 변할 것이다. 활성 성분의 일일 용량은 체중 1킬로그램(kg)당 약 0.001 내지 1000밀리그램(mg)인 것으로 예상되고, 바람직한 용량은 0.1 내지 약 30mg/kg이다. 특정한 양태에 따르면, 활성 성분의 일일 용량은 0.001리터 내지 10리터일 수 있고, 바람직한 용량은 약 0.01리터 내지 1리터이다.

[0237] 제형(투여에 적합한 조성물)은 단위당 약 1mg 내지 약 500mg의 활성 성분을 포함한다. 이 약제학적 조성물에서, 활성 성분은 대개 조성물의 전체 중량을 기준으로 약 0.5 내지 95중량%의 양으로 존재한다.

[0238] 연고제, 페이스트제, 폼제, 교합(occlusion), 크림제 및 겔제는 또한 부형제, 예컨대 전분, 트래거캔스, 셀룰로스 유도체, 실리콘, 벤토나이트, 실리카산 및 탈크 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 산제 및 스프레이는 또한 부형제, 예컨대 락토스, 탈크, 실리카산, 수산화알루미늄 및 규산칼슘 또는 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다. 에어로졸 의약품을 제조하기 위해 통상 사용되는 임의의 공지된 수단에 의해 나노결정질 항균 금속의 용액을 에어로졸 또는 스프레이로 전환할 수 있다. 일반적으로, 이러한 방법은 보통 불활성 담체 가스를 갖는 용액의 용기를 가압하고 가압 가스를 작은 오리피스를 통해 통과시키는 수단을 제공하는 것을 포함한다. 스프레이는 질소, 이산화탄소 및 다른 불활성 가스와 같은 통상의 압축가스를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 피험체에게 치료학적 화합물을 투여하는 데 필요한 임의의 경로에서 마이크로구 또는 나노입자를 본 발명의 가스 농후 치료학적 조성물 또는 유체와 함께 사용할 수 있다.

[0239] 주사용 제제는 단일 용량 또는 다중 용량 밀봉 용기, 예컨대 앰플 및 바이알에 존재할 수 있고, 사용 직전 무균 액체 부형제 또는 가스 농후 유체의 첨가만을 요하는 냉동 건조(동결건조) 상태에서 저장할 수 있다. 임기 주사용액제 및 현탁제를 무균 산제, 과립제 및 정제로부터 제조할 수 있다. 주사용 조성물에 효과적인 약제학적 담체를 위한 요건은 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, Eds., 238-250 (1982) 및 ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., 622-630 (1986)]을 참조한다.

[0240] 국소 투여에 적합한 제제는 본 발명의 가스 농후 유체 및 임의로, 추가의 치료제 및 항료, 보통 수크로스 및 아카시아 또는 트래거캔스를 포함하는 로젠지제; 불활성 기제, 예컨대 젤라틴 및 글라이세린 또는 수크로스 및 아카시아 중에 가스 농후 유체 및 임의의 추가의 치료제를 포함하는 캔디; 및 적합한 액체 담체; 및 크림제, 유화제, 겔제 등 중에 가스 농후 유체 및 임의의 추가의 치료제를 포함하는 구강 세척제 또는 경구 세정제를 포함한다.

[0241] 추가로, 직장내 투여에 적합한 제제는 다양한 기제, 예컨대 유화 기제 또는 수용성 기제와 혼합하여 좌제로서 존재할 수 있다. 질내 투여에 적합한 제제는, 활성 성분 이외에, 당해 분야에 적절한 알려진 담체를 포함하는 패서리, 탐폰, 크림제, 겔제, 페이스트, 폼제 또는 스프레이 제제 중에 존재할 수 있다.

[0242] 적합한 약제학적 담체가 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company(이 분야에서의 표준 참조 문헌)]에 기재되어 있다.

[0243] 본 발명에 있어서 피험체, 특히 동물, 특히 인간에게 투여되는 용량은 합당한 시간 간격에 걸쳐 동물에서 치료 반응을 생성시키도록 충분해야 한다. 당해 분야의 당업자는 동물의 상태, 동물 체중 및 치료되어야 하는 병증과 같은 다양한 인자에 따라 용량이 달라진다는 것을 인식할 것이다. 적합한 용량은 원하는 반응을 생성시키는 것으로 알려진 피험체에서 일정 농도의 치료학적 조성물을 생성시키는 것이다.

[0244] 용량 크기는 또한 투여 경로, 시기 및 빈도 및 치료학적 조성물의 투여에 수반되는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도 및 원하는 생리학적 효과에 의해 결정된다.

[0245] (1) 복합 제제 중의 화합물의 복합제에 의해 동시에 또는 (2) 교대로, 즉 별개의 약제학적 제제 중에 연속하여,

순차적으로, 병행하여 또는 동시에 화합물을 전달하여 복합제의 화합물을 투여할 수 있는 것으로 이해된다. 교대 치료에서, 제2 활성 성분 및 임의로 제3 활성 성분을 투여시 지연은 활성 성분의 병용의 상승적 치료 효과의 이익을 손실하지 않아야 한다. (1) 또는 (2) 투여 방법에 의한 특정한 실시양태에 따르면, 이상적으로는 가장 효과적인 결과를 성취하기 위해 복합제를 투여해야 한다. (1) 또는 (2) 투여 방법에 의한 특정한 실시양태에서, 이상적으로는 각각의 활성 성분의 피크 혈장 농도를 성취하기 위해 복합제를 투여해야 한다. 병용 복합 제제의 투여에 의한 1일 1회 1정 환제 요법은 염증성 신경변성 질환을 앓고 있는 몇몇 환자에서 실현될 수 있다. 특정한 실시양태에 따르면 복합제의 활성 성분의 효과적인 피크 혈장 농도는 거의 0.001 내지 100μM 범위일 것이다. 특정한 환자에 처방되는 제제 및 투약 요법에 의해 최적 피크 혈장 농도를 성취할 수 있다. 본 발명의 유체 및 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙 또는 이들의 임의의 생리학적 기능성 유도체를, 동시에 또는 순차로 제시되든 간에, 개별적으로, 다수로 또는 이들의 임의의 조합으로 투여할 수 있는 것으로 또한 이해된다. 일반적으로, 교대 치료(2) 동안, 각각의 화합물의 효과적인 용량을 순차적으로 투여하고, 복합 제제 치료(1)에서, 2종 이상의 화합물의 효과적인 용량을 함께 투여한다.

[0246] 본 발명의 복합제는 편리하게는 단일 제형으로 약제학적 제제 중에 존재할 수 있다. 편리한 단일 용량 제제는 각각 10㎎ 내지 300㎎(이들로 제한되지는 않음)과 같은 1㎎ 내지 1g의 임의의 양으로 활성 성분을 포함한다. 본 발명의 유체와 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙에 의한 상승적 효과는 1:50 내지 50:1과 같은 넓은 비율에 걸쳐 실현될 수 있다(본 발명의 유체: 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙). 일 실시양태에서, 상기 비율은 약 1:10 내지 10:1 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 환제, 정제, 당의정 또는 캡슐제와 같은 공조제 복합제 제형 중에 본 발명의 유체 대 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙의 중량/중량 비율은 약 1이고, 즉 본 발명의 유체 및 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙의 양이 대략 동일하다. 다른 예시적인 복합 제제에서, 본 발명의 유체 및 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙이 더 많거나 적을 수 있다. 일 실시양태에서, 각각의 화합물을 단독으로 사용될 때 항염증 활성을 나타내는 양으로 복합제 중에 사용할 수 있다. 상기 복합제의 화합물의 다른 비율 및 양이 본 발명의 범위 내에 고려된다.

[0247] 단일 제형은 본 발명의 유체 및 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙 또는 이의 생리학적 기능성 유도체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0248] 당업자는 치료에서 사용하는 데 필요한 본 발명의 복합제 중의 활성 성분의 양이 치료되는 병증의 성질 및 환자의 나이 및 상태와 같은 다양한 인자에 따라 변하고, 궁극적으로 주치의 또는 건강 관리 임상의의 재량에 달려 있다는 것을 이해할 것이다. 고려되어야 하는 인자는 투여 경로 및 제제의 성질, 동물의 체중, 나이 및 일반적인 상태 및 치료되는 질환의 성질 및 중증도를 포함한다.

[0249] 또한 제3 활성 성분과의 동시 또는 순차 투여를 위해 단위 제형에서 임의의 2종의 활성 성분을 배합할 수 있다. 3성분 복합제를 동시에 또는 순차로 투여할 수 있다. 순차로 투여할 때, 상기 복합제를 2회 또는 3회 투여로 투여할 수 있다. 특정한 실시양태에 따르면 본 발명의 유체 및 글라티라머 아세테이트, 인터페론-베타, 미톡산트론 및/또는 나탈리주맙의 3성분 복합제를 임의의 순서로 투여할 수 있다.

[0250] 본 발명의 특정 양태는 세포를 동전기적으로 변경된 유체/용액에 의해 *생체외* 치료하는 것을 포함한다. 특정 양태는 세포를 동전기적으로 변경된 유체/용액에 의해 생체외 치료하는 것 및 치료된 세포를 이를 필요로 하는 피험체에게 도입하여 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포의 억제를 제공하는 것을 포함하는 염증성 신경변성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 치료하고자 하는 세포는 치료된 세포를 투여받는 피험체의 세포이거나 이로부터 유래한다.

[0251] 하기 실시예는 예시만을 위한 것이고 어떠한 방식으로든 제한하지 않는 것으로 의도된다.

[0252] **실시예**

[0253] ***실시예 1***

[0254] 마이크로버블 크기

[0255] 본 발명의 확산기를 사용하여 가스 농후 유체에 의해 실험을 수행하여 가스 마이크로버블 크기 제한을 결정하였다. 0.22 및 0.1마이크론 필터에 가스 농후 유체를 통과시켜 마이크로버블 크기 제한을 확립하였다. 이 시험을 수행 시, 일정 용적의 유체가 본 발명의 확산기를 통과하고 가스 농후 유체를 생성하였다. 60밀리리터의 이 유체를 60㎖ 주사기로 빼냈다. 이후, 주사기 내의 유체의 용존 산소 수치를 윈클러(Winkler) 적정에 의해 측정하였다. 주사기 내의 유체를 0.22마이크론 밀리포어 밀렉스(Millipore Millex) GP50 필터 및 50㎖ 비커에 주입하

였다. 이후, 50㎖ 비커에서의 물질의 용존 산소 속도를 측정하였다. 실험을 3회 수행하여 하기 표 4에 기재된 결과를 얻었다.

표 4

[0256]

주사기에서 실행	0.22마이크론 필터 후 실행
42.1ppm	39.7ppm
43.4ppm	42.0ppm
43.5ppm	39.5ppm

[0257] 볼 수 있는 것처럼, 주사기 내에 측정된 용존 산소 수치 및 50㎖ 비커 내에 측정된 용존 산소 수치는 0.22마이크론 필터에 확산된 물질을 통과시킨 후 유의적으로 변하지 않았고, 이는 유체 내의 용존 가스의 마이크로버블이 0.22마이크론을 초과하지 않는다는 것을 의미한다.

[0258] 제2 시험을 수행하고, 여기서 식염수 용액 배취(batch)를 본 발명의 확산기로 농후하게 하고 배출 용액의 샘플을 비여과 상태로 수집하였다. 비여과 샘플의 용존 산소 수치는 44.7ppm였다. 본 발명의 확산기로부터 산소 농후 용액을 여과시키기 위해 0.1마이크론 필터를 사용하고 2개의 추가의 샘플을 취했다. 제1 샘플의 경우, 용존 산소 수치는 43.4ppm였다. 제2 샘플의 경우, 용존 산소 수치는 41.4ppm였다. 마지막으로, 필터를 제거하고 최종 샘플을 비여과 용액으로부터 취했다. 이 경우, 최종 샘플은 용존 산소 수치가 45.4ppm였다. 이 결과는 밀리포어 0.22마이크론 필터를 사용한 것과 일치하였다. 따라서, 식염수 용액 내의 대부분의 가스 버블 또는 마이크로버블은 크기가 거의 0.1마이크론 미만이었다.

[0259] ***실시예 2***

[0260] (*사이토카인 프로필을 결정하였다*)

[0261] 단일의 건강한 지원자 도너로부터 혼합 림프구를 얻었다. 버피 코트(buffy coat) 샘플을 표준 절차에 따라 세척하여 혈소판을 제거하였다. 림프구를 본 발명의 가스 농후 유체 또는 증류수(대조군)로 희석된 RPMI 배지(+50mm HEPES)에서 플레이트당 2 x 10^6의 농도로 평판배양하였다. 세포를 1마이크로그램/㎖의 T3 항원 또는 1마이크로그램/㎖의 피토헤마글루티닌(phytohemagglutinin: PHA) 렉틴(pan-T 세포 활성자)으로 자극하거나, 자극하지 않았다(음성 대조군). 24시간 항온처리 후, 세포를 생존능력에 대해 확인하고 상청액을 추출하고 냉동하였다.

[0262] 상청액을 해동하고, 원심분리하고, XMAP(등록상표)(루미넥스) 비드 라이트 프로토콜 및 플랫폼을 사용하여 사이토카인 발현에 대해 시험하였다.

[0263] 2백만개의 세포를 본 발명의 산소 농후 유체(물)(1웰, 3웰 및 5웰) 또는 증류수(2웰, 4웰 및 6웰)과 함께 완전 RPMI + 50mm Hepes 중에 24웰 플레이트의 6개의 웰에 평판배양하였다(1x를 만들기 위해 물에 희석된 10X RPMI). 세포를 1㎍/㎖의 T3 항원(1웰 및 2웰) 또는 PHA(3웰 및 4웰)로 자극하였다. 대조군 5웰 및 6웰을 자극하지 않았다. 24시간 후, 세포를 생존능력에 대해 확인하고 상청액을 수집하고 냉동시켰다. 다음에, 상청액을 해동하고, 8,000g에서 스피닝하여 펠렛을 만들었다. 투명한 상청액을 루미넥스 비드 라이트(상표명) 프로토콜 및 플랫폼을 사용하여 기재된 사이토카인에 대해 평가하였다. 숫자의 데이터가 표 5에 기재되어 있고, 상응하는 막대 그래프가 도 1에 도시되어 있다. 특히 IFN-γ 수치는 T3 항원을 갖는 대조군 배양 배지에서보다 T3 항원을 갖는 본 발명의 가스 농후 배양 배지에서 높은 반면, IL-8은 T3 항원을 갖는 대조군 배양 배지에서보다 T3 항원을 갖는 본 발명의 가스 농후 배양 배지에서 낮았다. 추가로, IL-6, IL-8 및 TNF-α 수치는 PHA를 갖는 대조군 배지에서보다 본 발명의 가스 농후 배지에서 낮은 반면, IL-1β 수치는 PHA를 갖는 대조군 배지와 비교할 때 PHA를 갖는 본 발명의 가스 농후 유체에서 낮았다. 본 발명의 가스 농후 배지 단독에서, IFN-γ 수치는 대조군 배지에서보다 높았다.

표 5

[0264]

샘플	IFN	Il-10	Il-12p40	Il-12p70	Il-2	Il-4	Il-5	Il-6	Il-8	Il-ib	IP-10	TNFa
1	0	0	0	2.85	0	0	7.98	20.3	1350	7.56	11500	15.5
2	0	0	0	3.08	0	0	8	15.2	8940	3.68	4280	7.94
3	0	581	168	3.15	0	0	8	16400	2200	3280	862	13700
4	0	377	56.3	4.22	0	0	8.08	23800	22100	33600	558	16200
5	0	0	0	2.51	0	0	7.99	24	1330	7.33	5900	8.55
6	0	0	0	2.77	0	0	8	5.98	3210	4.68	3330	0

[0265] *실시예 3*

[0266] 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG)

[0267] 도 2에 도시된 바대로, MOG 항원 펩타이드에 반응하는 림프구 증식은 가압된 산소화 유체(압력 포트) 또는 탈이온화 대조군 유체와 비교할 때 본 발명의 가스 농후 유체의 존재 하에 배양될 때 증가하였다. 따라서, 본 발명의 가스 농후 유체는 이전에 프라이밍된 세포에 대한 항원에 대한 림프구 증식 반응을 증폭시켰다.

[0268] 공지된 마우스 서열에 상응하는 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질 펩타이드 35-55(MOG 35-55)(M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-O-V-H-L-Y-R-N-G-K)(서열 번호 1; 공보 US20080139674(이 서열 번호 1을 위해 참조문헌으로 본원에 포함됨) 참조)를 합성하였다. 다음에, 5 x 10^5개의 비장 세포를 MOG로 이미 면역화된 MOG T 세포 수용체 형질전환 마우스로부터 제거하고, 본 발명의 가스 농후 유체인 가압된 산소화 물(압력 포트 물) 또는 대조군 탈이온수로 재구성된 0.2㎖의 TCM 유체 중에 배양하였다. 지라세포를 MOG p35-55와 각각 48 또는 72시간 동안 배양하였다. 배양물을 1Ci [3H]-티미딘으로 펄스 처리하고 16시간 후 수확하였다. [3H] 티미딘 혼입의 평균 cpm을 3회 배양에 대해 계산하였다. 결과가 도 2에 도시되어 있다.

[0269] *실시예 4*

[0270] 사이토카인 발현

[0271] 특정 양태에서, 인간 혼합 림프구를 본 발명의 동전기적 유체 또는 대조군 유체 중의 T3 항원 또는 PHA로 자극하고, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, 이오탁신(Eotaxin), IFN-γ, GM-CSF, MIP-1β, MCP-1, G-CSF, FGFb, VEGF, TNF-α, RANTES, 렙틴(Leptin), TNF-β, TFG-β 및 NGF 변화를 평가하였다. 도 1로부터 볼 수 있는 것처럼, 시험된 전염증성 사이토카인(IL-1β, TNF-α, IL-6 및 GM-CSF), 케모카인(IL-8, MIP-1α, RANTES 및 이오탁신), 염증성 효소(iNOS, COX-2 및 MMP-9), 알레르겐 반응(II형 MHC, CD23, B7-1 및 B7-2) 및 Th2 사이토카인(IL-4, IL-13 및 IL-5)이 대조군 유체에 비해 시험 유체에서 감소하였다. 반대로, 시험된 항염증성 사이토카인(예를 들면, IL1R-α, TIMP)이 대조군 유체에 비해 시험 유체에서 증가하였다.

[0272] 이 데이터를 상세히 설명하기 위해, 출원인은 알레르기 과민 반응을 평가하기 위해 난알부민 감작을 포함하는 당해 분야에 인식되는 모델 시스템을 사용하였다. 연구된 종점은 반응의 특정한 세포학적 성분 및 세포 성분, 및 단백질 및 LDH의 혈청학적 측정을 수행하였다. 이오탁신, IL-1A, IL-1B, KC, MCP-1, MCP-3, MIP-1A, RANTES, TNF-A 및 VCAM의 분석을 포함하는 사이토카인 분석을 수행하였다.

[0273] 간단히 말하면, 수컷 갈색 노르웨이(Brown Norway) 래트에 각각 1일, 2일 및 3일에 1회 수산화알루미늄($Al(OH)_3$)(200mg/㎖)을 포함하는 용액(2.0mg/㎖) 중의 0.5㎖ 난알부민(OVA) V 등급(A5503-1G, 시그마(Sigma))을 복강내 주사하였다. 연구를 2 x 2 계승 행렬(factorial arrangement)의 치료군(4개의 그룹)으로 무작위하였다. 면역 반응이 일어나도록 2주 기다린 후, 래트를 RDC1676-00(레발레시오(Revalesio) 독점적 장치를 통해 처리된 무균 식염수) 및 RDC1676-01(산소가 추가로 첨가된 레발레시오 독점적 장치를 통해 처리된 무균 식염수)로 1주일 동안 노출시키거나 치료하였다. 1일 1회 1주일의 치료 종료시, 2개의 그룹을 반으로 나누고 각각의 그룹의 래트의 50%는 흡입에 의해 식염수 또는 OVA 공격을 받았다.

[0274] 구체적으로, 초기 직렬화 14일 후, 12마리의 래트를 연속 7일 동안 매일 30분 동안 흡입에 의해 RDC 1676-00에 노출시켰다. 시스템을 통한 공기 흐름 속도를 10리터/분으로 설정하였다. 전체 12마리의 래트를 분무 물질이 에어로넵(Aeroneb)의 12개의 하위챔버에 진입하고 심지어 분배되게 하는 단일 포트를 갖는 파이 챔버에 정렬하였

다.

[0275] 초기 직렬화 15일 후, 12마래의 래트를 연속 7일 동안 매일 30분 동안 초음파 분무에 의해 RDC 1676-01에 노출시켰다. 동일한 분무기 및 챔버를 사용하여 공기 흐름을 또한 10리터/분으로 설정하였다. RDC 1676-00을 처음에 분무하고, RDC 1676-01이 분무되기 전에 에어로넵 챔버를 완전히 건조하였다.

[0276] 마지막 분무 치료 대략 2시간 후, RDC 1676-00 그룹으로부터 얻은 6마리의 래트를 펜 컨투리 마이크로스프레이어(Penn Century Microsprayer)(모델 1A-1B)를 사용하여 기관내 설치에 의해 전달되는 OVA(식염수 중 1%)로 재공격하였다. RDC 1676-00 그룹으로부터 얻은 다른 6마리의 래트를 기관내 설치에 의해 전달되는 대조군으로서 식염수로 공격하였다. 다음날, 상기 절차를 RDC 1676-01 그룹에 대해 반복하였다.

[0277] 재공격 24시간 후, 각각의 그룹의 모든 래트를 펜토바비탈 나트륨으로 과용량으로 마취시켰다. 전혈 샘플을 하대정맥으로부터 수집하고 퀴아젠 팍스진(Qiagen PAXgene)(상표명) 혈액 RNA 관 및 퀴아젠 팍스진(상표명) 혈액 DNA 관의 2개의 다른 혈액 수집 관에 위치시켰다. 폐 장기를 처리하여 기관지폐포 세정액(bronchoalveolar lavage: BAL) 유체 및 RT-PCR을 위한 폐 조직을 얻어 이 모델에서 폐 염증과 관련되는 것으로 알려진 사이토카인 발현의 마커의 변화를 측정하였다. 일측 세정액 기술을 이용하여 폐의 오른측에서의 4개의 폐엽의 통합성을 보존하였다. 왼쪽 "큰" 폐엽을 세정하고, 4개의 오른쪽 폐엽을 묶고, 트라이졸(TRI-zol)(상표명)에 즉시 위치시키고, 균질화하고, 추가의 처리를 위해 실험실로 옮겼다.

[0278] *BAL 분석*. 폐 세정액을 수집하고, 600 내지 800g에서 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 펠렛으로 만들었다. 상청액을 새로운 관에 옮기고, -80℃에서 냉동시켰다. 기관지 세정액 유체("BAL")을 2의 분취량으로 분리하였다. 제1 분취량을 스핀 다운하고, 상청액을 분쇄 아이스 드라이에서 급속 냉동하고, -80℃에 위치시키고, 추가의 처리를 위해 실험실로 수송하였다. 존재하는 단백질 및 LDH의 양은 각각 혈액 혈청 단백질(단백질은 실험에서처럼 공격될 때 막을 통해 누수하는 혈청 성분임) 및 세포사의 수치를 나타낸다. 독점 시험 측면은 대조군보다 약간 더 적은 단백질을 나타낸다.

[0279] 기관지 세정액 유체의 제2 분취량을 전체 단백질 및 LDH 함량에 대해 평가하고, 세포학적 검사를 수행하였다. 치료군은 식염수 대조군을 초과하는 전체 세포를 나타낸다. 추가로, 대조군에 비해 치료군에서 호산구가 증가하였다. 또한 대조군에 비해 치료군에 약간 다른 다형핵 세포가 있었다.

[0280] *혈액 분석*. 1.2 내지 2.0㎖의 혈액을 관에 옮기고, 이를 적어도 30분 동안 응고시켜 전혈을 분석하였다. 트라이졸(상표명) 또는 팍스진(상표명)을 사용하는 RNA 추출을 위해 남은 혈액 샘플(대략 3.5 내지 5.0㎖)을 비축하였다. 다음에, 응고된 혈액 샘플을 1200g에서 실온에서 10분 동안 원심분리하였다. 혈청(상청액)을 제거하고 2개의 새로운 관에 위치시키고, 혈청을 -80℃에서 저장하였다.

[0281] 트라이 시약(Tri-Reagent)(TB-126, 몰레큘러 리서치 센터 인크.(Molecular Research Center, Inc.))을 사용하는 RNA 추출을 위해, 0.2㎖의 전혈 또는 혈장을 전혈 또는 혈장 0.2㎖당 20㎕의 5N 아세트산이 보충된 0.75㎖의 트라이 시약 BD에 첨가하였다. 관을 진탕시키고 -80℃에서 저장하였다. 팍스진(상표명)을 사용하여, 관을 실온에서 대략 2시간 항온처리하였다. 이후, 관을 다른 측에 위치시키고, 24시간 동안 -20℃ 냉동기에서 저장한 후, 장기간 저장을 위해 -80℃ 냉동기로 옮겼다.

[0282] *루미넥스(Luminex) 분석*. 루미넥스 플랫폼에 의해, 마이크로비드 분석을 광도 단위에서 판독되는 항체 관련 결합 반응에 대한 기질로서 사용하고 정량화된 표준품과 비교할 수 있다. 각각의 혈액 샘플을 2회 샘플로서 동시에 실행하였다. 측정 단위는 광도 단위이고, 그룹을 OVA 공격 대조군, OVA 공격 치료군 및 독점적 유체에 의한 식염수 공격 치료군으로 나눴다.

[0283] 아질란트(Agilant) 유전자 어레이 데이터 생성을 위해, 폐 조직을 분리시키고, 트라이 시약(TR118, 몰레큘러 리서치 센터 인크.)에 침지시켰다. 간단히 말하면, 대략 1㎖의 트라이 시약을 각각의 관 내의 50 내지 100㎎의 조직에 첨가하였다. 샘플을 유리-테플론(Teflon)(상표명) 또는 폴리트론(Polytron)(상표명) 균질기를 사용하여 트라이 시약 중에서 균질시켰다. 샘플을 -80℃에서 저장하였다.

[0284] 요약하면, 공지된 감작에 대한 염증성 반응의 이 표준 검정은, 적어도 혈액 샘플에서, 현저한 임상 및 혈청학적 효과를 생성하였다. 추가로, 상당한 수의 대조군 동물을 생리학적으로 스트레스를 주고 그 과정에서 거의 죽게 하였지만, RDC1676-01 치료군 중 어느 것도 이러한 임상 스트레스 효과를 나타내지 않았다. 이는 사이토카인의 순환 수치에서 반영되고, OVA 공격 그룹에서 RDC1676-01 치료군과 RDC1676-01 치료균 사이의 차이는 대략 30%였다. 반대로, OVA 비공격 그룹에서 RDC1676-01 치료군과 RDC1676-01 치료군 사이에 사이토카인, 세포 및 혈청학적 프로필에서의 변화가 작고 쾌 무의미해서, 아마도 단지 유체 그 자체의 최소 기준선 변화만을 나타내는 것

같았다.

[0285] ***실시예 5***

[0286] (*T 세포 증식의 조절에서 본 발명의 동전기적으로 생성된 유체의 효과 및 조절 T 세포 검정에서 사이토카인(I1-10) 및 다른 단백질(예를 들면, GITR, 그랜자임(Granzyme) A, XCL1, pStat5 및 Foxp3) 및 PBMC에서 예를 들면 트립타제의 정교화를 나타내기 위해 조절 T 세포 검정을 사용하였다*)

[0287] 항원 제시 세포를 자극하고, 항원 및 T 세포를 도입함으로써 T 세포를 조절하는 본원에 개시된 특정 실시양태의 능력을 연구하였다. 통상적으로, 이 자극된 T 세포는 증식하였다. 그러나, 조절 T 세포 도입시, 일반적인 T 세포 증식이 억제되었다.

[0288] 방법:

[0289] 간단히 말하면, 분류에서 사용된 FITC 접합 항-CD25(ACT-1) 항체를 단코사이토메이션(DakoCytomation)(일리노이 드주 시카고)로부터 구입하였다. 사용된 다른 항체는 다음과 같다: CD3(가용성 조건을 위한 HIT3a), GITR(PE 접합), CD4(Cy-5 및 FITC 접합), CD25(APC 접합), CD28(CD28.2 단독), CD127-APC, 그랜자임 A(PE 접합), FoxP3(바이오레전드(BioLegend)), 마우스 IgG1(아이소유형 대조군) 및 XCL1 항체. 모든 항체를 제조업자의 지시에 따라 사용하였다.

[0290] CD4+ 로제트(Rosette) 키트(스템셀 테크놀로지스(Stemcell Technologies))로 말초 전혈로부터 CD4+ T 세포를 분리하였다. CD4+ T 세포를 항-CD127-APC, 항-CD25-PE 및 항-CD4-FITC 항체와 항온처리하였다. 유세포분석법에 의해 세포를 FACS 아리아(Aria)를 사용하여 CD4+CD25hiCD127lo/nTreg 및 CD4+CD25- 반응자 T 세포로 분류하였다.

[0291] 환저 96웰 미량적정 플레이트에서 억제 검정을 수행하였다. 3.75 x 103개의 CD4+CD25neg 반응자 T 세포, 3.75 x 103개의 자가 T reg, 3.75 x 104개의 동종 자극된 CD3 결핍 PBMC를 표시한 바대로 첨가하였다. 모든 웰에 항-CD3(5.0㎍/㎖에서 클론 HIT3a)을 보충하였다. T 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI 1640 배지에서 37℃에서 7일 동안 배양하였다. 항온처리 종료 16시간 전, 1.0mCi의 ^{3}H-티미딘을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 톰텍(Tomtec) 세포 수확장치를 사용하여 수확하고, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) 섬광 계수기를 사용하여 ^{3}H-티미딘 혼입을 결정하였다. 항원 제시 세포(APC)는 스템셉(StemSep) 인간 CD3+ T 세포 결핍(스템셀 테크놀로지스)에 이어 40Gy의 자극을 이용하여 T 세포가 결핍된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로 이루어졌다.

[0292] 조절 T 세포를 항-CD3 및 항-CD28 조건에 의해 자극한 후, 라이브/데드 레드(Live/Dead Red) 생존능력 염료(Invitrogen) 및 표면 마커 CD4, CD25 및 CD127로 염색하였다. 세포를 Lyze/Fix 포스플로우(PhosFlow)(상표명) 완충제 중에 고정하고 변성 펌버퍼(Permbuffer) III(등록상표)에 투과시켰다. 이후, 세포를 각각의 특정한 선택된 분자에 대해 항체로 염색하였다.

[0293] 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 양방 검증, 독립 스튜던츠 t-시험을 이용하여 2개의 그룹을 비교하였다. 1원 ANOVA를 이용하여 3개의 그룹을 비교하였다. 0.05 미만의 P 값이 유의적인 것으로 생각되었다(양방 검증). r 값이 0.7을 초과하거나 -0.7보다 작은 경우, 2개의 그룹 사이의 상관을 스피어맨(Spearman) 계수를 통해 통계학적으로 유의적인 것으로 결정하였다(양방 검증).

[0294] 요약하면, 데이터는 대조군 유체(Rev 무, Solis 무)에서 PM에 비해 PM 및 Rev의 존재 하에 증식이 감소하였다는 것을 나타내고, 본 발명의 동전기적으로 생성된 유체 Rev가, 검정에서 비교적 감소된 증식으로 보이는 것처럼, 조절 T 세포 기능을 개선한다는 것을 나타낸다. 더욱이, 이 실시예의 증거는 베타 봉쇄, GPCR 봉쇄 및 Ca 채널 봉쇄가 Treg 기능에 대한 Revera의 활성에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[0295] ***실시예 6***

[0296] (*본 발명의 동전기적으로 생성된 유체(RNS-60 및 솔라스)가 관류된 Calu-3 세포에서 수행한 패치 클램프 분석은 (i) RNS-60 및 솔라스에 대한 노출은 전세포 전도도를 증가시키고, (ii) RNS-60에 대한 세포의 노출은 15분 항온처리 시간에 명확한 것처럼 비선형 전도도를 증가시키고, (iii) RNS-60에 대한 세포의 노출은 칼슘 투과성 채널에 대한 RNS-60 식염수의 효과를 생성시킨다는 것을 나타낸다*)

[0297] 개관:

[0298] 이 실시예에서, 패치 클램프 연구를 수행하여 전세포 전류를 조절하는 유용성을 비롯하여, 본원에 기술된 바와

같은, 본 발명의 동전기적으로 생성된 식염수 유체(RNS-60 및 솔라스)의 유용성을 추가로 확인하였다. 2 세트의 실험을 수행하였다.

[0299] *제1* 세트의 실험의 데이터의 요약은 솔라스 식염수로 얻은 전세포 전도도(전류 대 전압 관계식)가 항온처리 시간(2시간 15분) 둘 다 및 모든 전압 프로토콜에 매우 선형이라는 것을 나타낸다. 그러나, 솔라스에 의한 더 긴 항온처리(2시간)가 전세포 전도도를 증가시킨다는 것이 명확하다. RNS-60에 대한 세포의 노출은 15분 항온처리 시간에만 명확한 델타 전류(Rev-Sol 공제)에서 나타난 것처럼 비선형 전도도를 증가시켰다. 이 비선형 전류에 대한 RNS-60의 효과는 사라지고, 대신 2시간 항온처리 시간에 매우 선형이었다. 상기 관찰된 비선형 전세포 전도도의 기여는 모든 전압 프로토콜에 존재하더라도 전압에 민감하였다.

[0300] *제2* 세트의 실험의 데이터의 요약은 비선형 전류에 대한 RNS-60 식염수의 효과(이는 외부 용액 중에 고농도 칼슘으로 명확함)가 존재한다는 것을 나타낸다. 비선형 전세포 전도도의 기여는 전압에 민감하였지만 전압 프로토콜 둘 다에 존재하고, 칼슘 투과성 채널에 대한 RNS-60 식염수의 효과를 나타낸다.

[0301] 제1 세트의 실험(전도도 증가; 및 비선형 전압 조절 전도도의 활성화)

[0302] 물질 및 방법:

[0303] 패치 클램프 연구에서 기관지 상피 세포주 Calu-3을 사용하였다. 실험 시간까지 Calu-3 기관지 상피 세포(ATCC HTB-55호)를 유리 커버슬립에 10% FBS가 보충된 DMEM 배지와 햄(Ham)의 F12의 1:1 혼합물로 성장시켰다. 간단히 말하면, 본 발명의 동전기적으로 생성된 유체(예를 들면, RNS-60; 60ppm 용존 산소를 포함하는 동전기적으로 처리된 노르말 식염수; 때때로 이 실시예에서 "약물"이라 칭함)에 노출된 Calu-3 세포에 대한 효과를 측정하기 위해 전세포 전압 클램프 장치를 사용하였다.

[0304] 상피 세포막 극성 및 이온 채널 활성에 대한 시험 물질(RNS-60)의 효과를 평가하기 위해 패치 클램핑 기술을 이용하였다. 구체적으로, 135mM NaCl, 5mM KCl, 1.2mM CaCl2, 0.8mM MgCl2 및 10mM HEPES(N-메틸 D-글루카민으로 pH가 7.4로 조정됨)로 이루어지는 욕 용액 중에 기관지 상피 세포주 Calu-3에서 전세포 전압 클램프를 수행하였다. RNS-60을 세포에 관류한 후 기준 전류를 측정하였다.

[0305] 더 구체적으로, 2단 나리시게(Narishige) PB-7 수직 풀러(puller)로 붕규산 유리(캘리포니아주 클레어몬트에 소재하는 가드너 글래스 코포레이션(Garner Glass Co))로부터 패치 피펫을 끌어 당기고, 이후 나리시게 MF-9 마이크로포지(microforge)(뉴욕주 이스트 매도우에 소재하는 나리시게 인터내셔널 유에스에이(Narishige International USA))로 6 내지 12Mohm 사이의 저항으로 화염 연마하였다. 피펫을 135 KCl, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 Hepes를 (mM 단위로) 포함하는 세포내 용액으로 충전하고, pH를 NMDG(N-메틸-D-글루카민)로 7.4로 조정하였다.

[0306] 배양된 Calu-3 세포를 (mM 단위의) 135 NaCl, 5 KCl, 1.2 CaCl2, 0.5 MgCl2 및 10 Hepes(유리 산)의 세포외 용액을 포함하는 챔버에 위치시키고, pH를 NMDG로 7.4로 조정하였다.

[0307] 올림푸스(Olympus) IX71 현미경(일본 도쿄에 소재하는 올림푸스 인크(Olympus Inc.))의 40X DIC 대물렌즈를 사용하여 세포를 관찰하였다. 세포 부착 기가시일(gigaseal)을 확립한 후, 온화한 흡인을 가하여 침투하고 전세포 구성을 얻었다. 침투 즉시, 세포를 -120, -60, -40 및 0mV에서 전압 클램핑하고, ±100 mV(500ms/단) 사이에서 전압 단으로 자극하였다. 통제 조건에서 전세포 전류를 수집한 후, 동일한 세포에 상기 대조군 유체와 동일한 세포외 용질 및 pH를 포함하는 시험 유체로 욕을 통해 관류하고, 상이한 유지 전위에서의 전세포 전류를 동일한 프로토콜에 의해 기록하였다.

[0308] 전기생리학적 데이터를 액손 패치 200B 증폭기로 얻고, 10kHz에서 저역 여과하고, 1400A 디지데이터(Digidata)(캘리포니아주 유니온 시티에 소재하는 액손 인스트루먼츠(Axon Instruments))로 디지털화하였다. pCLAMP 10.0 소프트웨어(액손 인스트루먼츠)를 사용하여 데이터를 얻고 분석하였다. 실제 전류 값을 유지 전위(V)에 대해 단으로 대략 400msec로 작도하여 전류(I) 대 전압(V) 관계식(전세포 전도도)을 얻었다. I/V 관계식의 기울기는 전세포 전도도였다.

[0309] *약물 및 화학물질*. 표시된 때마다, 세포를 8-Br-cAMP(500mM), IBMX(아이소부틸-1-메틸잔티, 200mM) 및 포스콜린(10mM)을 포함하는 cAMP 자극 칵테일로 자극하였다. cAMP 유사체 8-Br-cAMP(시그마 켐 코포레이션(Sigma Chem. Co.))를 H2O 용액 중의 25mM 스톡으로부터 사용하였다. 10mM 포스콜린 및 200mM IBMX 스톡 용액 둘 다를 포함하는 DMSO 용액으로부터 포스콜린(시그마) 및 IBMX(시그마)를 사용하였다. 얻은 데이터를 5개 내지 9개의 세포에 대한 평균±SEM 전세포 전류로서 표시하였다.

[0310] 결과:

[0311] 미국 특허 출원 공보 제2010-0310609-A1호의 도 3A 내지 도 3C는 2의 시점(15분(왼쪽 패널) 및 2시간(오른쪽 패널)) 및 상이한 전압 프로토콜(A, 0mV로부터의 단으로; B, -60mV로부터의 단으로; 및 C, -120mV로부터의 단으로)에서 상피 세포막 극성 및 이온 채널 활성에 미치는 동전기적으로 생성된 유체(예를 들면, RNS-60 및 솔라스)의 효과를 평가한 일련의 패치 클램핑 실험의 결과를 보여준다. 결과는 RNS-60(채운 원형)이 솔라스(빈 원형)에 비해 전세포 전도도에 더 큰 효과를 갖는다는 것을 나타낸다. 실험에서 15분 및 2시간 항온처리 시점 둘 다에서 3개의 전압 프로토콜에서 유사한 결과가 나타났다.

[0312] 미국 특허 출원 공보 제2010-0310609-A1호의 도 4A 내지 도 4C는 3개의 전압 프로토콜("델타 전류")(A, 0mV로부터의 단으로; B, -60mV로부터의 단으로; 및 C, -120mV로부터의 단으로) 및 2 시점(15분(빈 원형) 및 2시간(채운 원형))에서 RNS-60 전류 데이터로부터 솔라스 전류 데이터를 공제하여 생긴 그래프를 보여준다. 이 데이터는 RNS-60에 의한 15분 시점에서, 2시간 시점에 부재하는 비선형 전압 의존 성분이 존재한다는 것을 나타낸다.

[0313] 이전 실험에서처럼, "노르말" 식염수에 의한 데이터는 매우 일치하였고 시간 독립 전도도를 표준품으로서 사용하였다. 그룹을 솔라스 또는 RNS-60 식염수와 연결시켜 이 결과를 얻고, 기준 조건(cAMP 또는 임의의 다른 자극 없음) 하에 RNS-60 식염수에 대한 Calu-3 세포의 노출이 더 짧은 항온처리 시간(15분)에서 전압 조절 전도도의 활성화와 일치하는 시간 의존 효과(들)를 생성한다는 것을 나타낸다. 이 현상은 2시간 항온처리 시점에서 명확하지 않았다. 본원의 다른 곳에 기재된 바대로, cAMP "칵테일"에 의한 자극에 의해 전도도가 증가할 때 선형 성분이 더 분명하다. 그럼에도 불구하고, 2시간 항온처리 시간은 RNS-60 및 솔라스 식염수 둘 다에 더 높은 선형 전도도를 나타내고, 이 경우, RNS-60 식염수는 솔라스 단독과 비교하여 전세포 전도도를 2배로 만들었다. 이 증거는 전세포 전도도에 대한 적어도 두가지 기여가 RNS-60 식염수에 의해 영향을 받는다는 것, 즉 비선형 전압 조절 전도도 및 선형 전도도의 활성화라는 것을 나타내고, 이는 더 긴 항온처리 시간에서 더 명확하다.

[0314] 제2 세트의 실험(칼슘 투과성 채널에 대한 효과)

[0315] 제2 세트의 실험 방법:

[0316] 일반적인 패치 클램프 방법에 대해 상기를 참조한다. 하기 제2 세트의 실험에서, 다른 추가의 패치 클램프 연구를 수행하여, 0mV 또는 -120mV 유지 전위의 프로토콜 단으로 기준 조건 하에 Calu-3 세포를 사용하여 전세포 전류를 조절하는 본 발명의 동전기적으로 생성된 식염수 유체(RNS-60 및 솔라스)의 유용성을 추가로 확인하였다.

[0317] 식염수로 15분 동안 항온처리된 세포로부터 얻은 전류 대 전압 관계식으로부터 각각의 경우의 전세포 전도도를 얻었다. 전세포 전도도에 대한 칼슘 투과성 채널의 기여가 있는지 및 전세포 전도도의 이 부분이 RNS-60 식염수에 의한 항온처리에 의해 영향을 받는지를 결정하기 위해, 세포를 항온처리 시간(고농도 NaCl 외부 용액 수반, 반면 내부 용액은 고농도 KCl을 포함) 후 노르말 식염수로 패치하였다. 이후, 외부 식염수를 NaCl이 CsCl로 대체된 용액으로 대체하여 주요 외부 양이온을 대체함으로써 전도도 변화가 있는지를 결정하였다. 이후, 이러한 조건 하에, 동일한 세포를 증가하는 농도의 칼슘에 노출시켜, 칼슘 진입 단을 더 명확하게 만들었다.

[0318] 결과:

[0319] 미국 특허 출원 공보 제2010-0310609-A1호의 도 5A 내지 도 5D는 상이한 전압 프로토콜(A 패널 및 C 패널은 0mV로부터의 단을 보여주는 반면, B 패널 및 D 패널은 -120mV로부터의 단을 보여줌)에서 상이한 외부 염 용액을 사용하여 상피 세포막 극성 및 이온 채널 활성에 대한 동전기적으로 생성된 유체(예를 들면, 솔라스(A 패널 및 B 패널) 및 RNS-60(C 패널 및 D 패널))의 효과를 평가한 일련의 패치 클램핑 실험의 결과를 보여준다. 이 실험에서, 15분의 1시점을 사용하였다. 솔라스(A 패널 및 B 패널)의 경우, 결과는 1) 외부 용액으로서 NaCl 대신에 CsCl(정사각형 기호)을 사용하는 것이 대조군(다이아몬드 기호)과 비교할 때 선형 거동으로 전세포 전도도를 증가시킨다는 것; 및 2) 20mM $CaCl_2$(원형 기호) 및 40mM $CaCl_2$(삼각형 기호) 둘 다에서의 $CaCl_2$가 비선형 방식으로 전세포 전도도를 증가시킨다는 것을 나타낸다. RNS-60(C 패널 및 D 패널)의 경우, 결과는 1) 외부 용액으로서 NaCl 대신에 CsCl(정사각형 기호)를 사용하는 것이 대조군(다이아몬드 기호)과 비교할 때 전세포 전도도에 효과가 거의 없다는 것; 및 2) 40mM에서의 $CaCl_2$(삼각형 기호)가 비선형 방식으로 전세포 전도도를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0320] 미국 특허 출원 공보 제2010-0310609-A1호의 도 6A 내지 도 6D은 솔라스(A 패널 및 B 패널) 및 RNS-60(C 패널 및 D 패널)에 대한 2개의 전압 프로토콜(A 패널 및 C 패널, 0mV로부터의 단으로; 및 B 패널 및 D 패널, -120mV로부터의 단으로)에서 20mM $CaCl_2$(다이아몬드 기호) 및 40mM $CaCl_2$(정사각형 기호) 전류 데이터로부터 CsCl 전

류 데이터(미국 특허 출원 공보 제2010-0310609-A1호, 도 5에 도시됨)를 공제하여 얻은 그래프를 나타낸다. 결과는 솔라스 및 RNS-60 용액 둘 다 칼슘 유도 비선형 전세포 전도도를 활성화한다는 것을 나타낸다. 효과는 RNS-60(용량 반응성을 나타냄)에 의해 더 컸고, RNS-60에 의해 더 높은 칼슘 농도에서 오직 증가하였다. 더욱이, 더 높은 칼슘 농도에서의 비선형 칼슘 의존 전도도는 또한 전압 프로토콜에 의해 증가하였다.

[0321] 이 제2 세트의 실험의 데이터는 Calu-3 세포에서 얻은 전세포 전도도 데이터에 대한 RNS-60 식염수 및 솔라스 식염수의 효과를 추가로 나타낸다. 데이터는 식염수 중 어느 하나에 의한 15분 항온처리가 전세포 전도도에 명확한 효과를 생성시킨다(RNS-60에 의해 가장 명확함)는 것을 나타내고, 외부 칼슘이 증가할 때, RNS-60 식염수가 전세포 전도도의 칼슘 의존 비선형 성분을 증가시킨다는 것을 추가로 나타낸다.

[0322] 축적된 증거는 기준 세포 전도도에 상이한 기여를 하는 이온 채널의 레발레시오 식염수에 의한 활성화를 제시한다.

[0323] 출원인의 다른 데이터(예를 들면, 출원인의 다른 실시예의 데이터)를 함께 취할 때, 본 발명의 특정 양태는, GPCR 및/또는 G 단백질(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 막 구조(예를 들면, 막 및/또는 막 단백질, 수용체 또는 다른 막 성분)에서 전기화학 및/또는 입체형태 변화를 부여하기 위한 본 발명의 동전기적으로 생성된 용액의 용도를 포함하는, 막 구조, 막 전위 또는 막 전도율, 막 단백질 또는 수용체, 이온 채널, 지질 성분 또는 세포에 의해 교환 가능한 세포내 성분 중 적어도 하나의 조절을 포함하는 세포내 신호 전달(예를 들면, 신호전달 경로, 예컨대 칼슘 의존 세포 신호전달 시스템)을 조절하는 조성물 및 방법을 제공한다. 추가의 양태에 따르면, 이 효과는 유전자 발현을 조절하고, 예를 들면 개별적인 메시지 전달 성분 등의 반감기에 따라 지속될 수 있다.

[0324] ***실시예 7***

[0325] (*본 발명의 동전기적 유체는 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 급성 실험 알레르기(자가면역) 뇌척수염(EAE) 래트 MBP 모델에서 용량 반응 방식으로 실질적으로 효율적인 것으로 나타났다*)

[0326] 개관:

[0327] 이 실시예에서, 당해 기술에서 인정된 미엘린 염기성 단백질 MBP 유발 급성 실험적 알레르기 뇌척수염(EAE) 래트 모델에서 예방학적 및 치료학적 투여 요법 둘 다에서 2 용량으로 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60을 평가하였다. 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60은 용량 반응 방식으로 실질적으로 효율적인 것으로 나타났다. *치료학적*(MBP 주사와 동시에 시작하여 RNS-60 매일 투여) 및 *예방학적*(MBP 주사 7일 전 시작하여 RNS-60 매일 투여) RNS-60 용량 요법 둘 다는 임상 점수의 현저한 감소 및 개시 지연(고용량 그룹에서)을 나타냈다. 따라서, 본 발명의 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 인간 MS의 당해 기술에서 인정된 래트 모델에서 EAE 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 추가의 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 고통받는 포유동물(바람직하게는 인간)에서의 MS 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다. 다른 추가의 양태에서, 본 발명의 동전기적 조성물은 혈액 뇌 장벽(BBB)을 횡단하며, 따라서 중추 신경계의 염증성 병증을 치료하기 위한 신규한 방법을 제공한다.

[0328] *다발성 경화증(MS)*. 다발성 경화증(MS)은 중추 신경계(CNS)의 탈수초성 질환이고, 청소년에서 가장 흔히 장애를 입히는 신경학적 질환 중 하나이다. 이 질환의 주요 특징은 탈수초 및 염증의 병소 부위이다. 이 질환 과정은 예상치 못하게 평생 지속되고 남성보다는 여성에게 더 흔히 영향을 미친다. 질환의 병인학은 유전 및 환경 인자에 의존하는 것으로 보인다. 말초에서, 항원이 II형 MCH를 통해 항원 제시 세포(APC)에 결합한다. Th0 세포는 항원에 결합하고 활성화 및 분화를 겪는다. 접착 분자 및 기질 금속단백분해효소(MMP)는 Th1 세포가 결합하고 혈액 뇌 장벽(BBB)을 침투하는 것을 돕는다. BBB를 횡단하여 CNS로 갈 때에, Th1 세포는 항원-MHC 복합체를 사로잡고 전염증성 사이토카인을 생성시켜 CNS를 손상시킨다. 자가면역계는 미엘린 단백질을 외래로서 인식하고 공격하기 시작한다. 역사적으로, Th1 세포는 질환의 병리학에서 중요한 역할을 하는 것으로 교시되었지만, 최근 증거는 Th17 세포, IL-6 및 TGF-β의 전염증성 케스케이드가 EAE 및 MS의 발병에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0329] *실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)*. 실험적 알레르기 뇌척수염으로도 불리는 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)은 다발성 경화증(MS)의 비인간 동물 모델이다. MS이 아니라, EAE의 상이한 형태 및 병기가 여러 방식으로 MS의 다양한 형태 및 병기와 매우 가깝게 닮았다. 더 구체적으로, EAE는 급성 또는 만성 재발 후천성 염증성 및 탈수초성 자가면역 질환이다. 절연 수초인 신경 세포(뉴런)을 둘러싸는 미엘린을 구성하는 다양한 단백질(예를 들면, 미엘린 염기성 단백질(MBP), 프로테오지질 단백질(PLP) 및 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG))의 전부 또는

일부를 동물에게 주사하여 동물 자신의 미엘린에 대한 자가면역 반응을 유도하였고, 이는 인간에서 MS와 가깝게 닮았다. 마우스, 래트, 기니아 피그, 래빗, 마카크(macaque), 붉은털 원숭이(rhesus monkey) 및 마모셋을 비롯한 여러 상이한 동물 종에서 EAE를 유도하였다. 면역학적 도구 수, 이용 가능성, 동물의 수명 및 생산력 및 유도된 질환의 MS에 대한 유사성을 비롯한 다양한 이유로, 마우스 및 래트는 가장 흔히 사용되는 종이다. 급성 래트 EAE 모델은 강한 염증성 성분을 갖고, 따라서 MS에서 면역 사건을 표적화하는 물질의 치료학적 가능성을 조사하기 위한 적절한 모델이다.

[0330] *MBP 유도 EAE*. 1용량 후 루이스(Lewis) 래트에서의 MPB는 재발을 발생시키고 이는 뒷발 마비를 주로 특징으로 하였다. 루이스 래트에 0일에 MBP 주사하였다. 질환은 12일 내지 16일에 발생하였고, 18일 내지 21일에 완전히 질환이 회복되었다. 모델은 자기 제한적이고 탈수초를 나타내지 않았다.

[0331] 물질 및 방법:

[0332] *시험 유체(RNS-60)의 제조 및 규명*. US2008/0219088(2008년 9월 11 공개), US2008/0281001(2008년 11월 11일 공개) 및 WO2008/052143(2008년 5월 02일 공개)(이들 모두 그 전문으로 특히 출원인의 본 발명의 동전기적 유체를 제조하기 위한 장치 및/또는 방법에 관한 모든 양태를 위해 본원에 참조문헌으로 포함됨)에 기재된 방법에 따라 출원인이 필터 무균화 RNS-60을 제조하였다. 사용된 RNS-60의 용존 산소(DO) 함량은 윈클러 적정 검정에 의해 결정할 때 59ppm였다(Y.C. Wong & C.T. Wong. New Way Chemistry for Hong Kong A-Level Volume 4, Page 248. Or Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - 20th Edition ISBN 0-87553-235-7). RNS-60 유체에 시험 품목(TI) 번호, 레시피 날짜, 저장 조건 및 만료일을 표지하였다. RNS-60의 저장 조건 및 취급은 시험 동안 시험 설비에서 안정성을 보장하기 위해 출원인의 명세서에 따랐다. 유체를 사용하지 않을 때 2 내지 8℃에서 냉동기에서 유지시켰다. 유체를 포함하는 바이알을 단일 사용 용기로서 사용하였다.

[0333] *비히클 대조군 유체*. 비히클 대조군 유체는 호스피라(Hospira)로부터 얻은 주사(0.9%)를 위한 노르말 식염수이다.

[0334] *덱사메타손*. 덱사메타손을 시그마(카달로그 D1756호; 롯트 번호 096K1805)로부터 구입하였다. 투여 후, 덱사메타손(백색 분말)을 에탄올로 희석하여 1mg/㎖의 농도를 성취한 후 증류수에 다시 희석하여 0.1mg/㎖의 용량 농도를 성취하였다.

[0335] *EAE 유도 품목*:

[0336] *MBP 항원 물질*. MBP는 기니아 피그(Des-Gly-77, Des-His-78)-MBP(68-84); 카달로그 H-6875호; 엠디 바이오사이언스(MD Bioscience) 제공)로부터 얻은 미엘린 염기성 단백질이다. MBP를 2mg/㎖의 농도로 생리학적 식염수 중에 용해시켰다;

[0337] *CFA 증감제*. 완전 프로인트 부형제(Complete Freund's Adjuvant: CFA)를 모웰 다이아그노스틱스 게엠베하(Morwell Diagnostics GmbH)의 엠디 바이오사이언스 디비젼(카달로그 IMAD-4호)으로부터 얻었다. 4mg/㎖의 농도에서 열 사멸 *마이코박테리움 투버큘로시스*(*Mycobacterium Tuberculosis*) H37 Ra를 포함하는 CFA 현탁액을 제공된 대로 사용하였다.

[0338] *MBP/CFA 에멀션(항원 물질/증감제)*. 연구 0일에 수행된 단일 접종 전에, 1 용적의 MBP 용액을 루어(Luer) 핏팅에 의해 연결된 2개의 주사기를 사용하여 동일 용적의 CFA(4mg/㎖)와 혼합함으로써 에멀젼 혼합물을 완전히 혼합하여 동물당 100㎕의 전체 용량 용적이 되게 하였다. 용량을 2 x 50㎕의 피하(SC) 양측 주사로서 족부 부위에 전달하였다.

[0339] *시험 동물; 래트*. 육십(60)마리의 암컷 루이스 래트(연구 개시 시 6 내지 7주령)를 하란 래버러토리즈 이스라엘 엘디티(Harlan Laboratories Israel, Ltd)로부터 얻었다. 치료 개시 시기에 동물의 체중 변화는 평균 체중을 20% 초과하지 않았다. 이 연구에 사용된 동물의 건강한 상태를 이 동물이 도착시 검사하였다. 건강한 상태의 동물만을 실험실 조건에 적응시키고 연구에 사용하였다. 연구 시작 전에, 동물을 적어도 5일 동안 적응시켰다. 적응 동안 그리고 연구 기간에 걸쳐, 동물을 접근 제한 설치류 시설에 감금하고, 고체 바닥을 장착하고 잠자리 재료로서 무균 목재 대팻밥을 채운 폴리프로필렌 케이지 내에서 최대 5마리의 래트의 그룹을 유지시켰다. 동물은 임의로 상업용 설치류 식이를 제공받았고 식수에 자유롭게 접근하였고, 이들은 스테인리스 강 빨대가 있는 폴리에틸렌 병을 통해 각각의 케이지에 제공되었다. 연구에 사용된 식이 배취의 공급물 롯트 분석은 연구 데이터에 의한 기록 보관에 포함되었다. 물을 주기적으로 모니터링하였다. 연구실에서 30 내지 70%의 상대 습도(RH), 12:12 시간의 광:암 사이클 및 시간당 15 내지 30의 공기 변화와 함께 20 내지 24℃ 온도를 유지시키도록 자동 제어 환경 조건을 설정하였다. 온도 및 RH를 매일 모니터링하였다. 광 사이클을 기준 시계에 의해 모니터링하였

다. 꼬리 마크를 사용하여 동물에 독특한 동물 표식을 하였다. 이 숫자는 또한 각각의 케이지의 전면에서 보이는 케이지 카드에 보였다. 케이지 카드는 또한 치료군에 관한 연구 및 그룹 수, 투여 경로, 성별, 균주 및 모든 다른 관련 상세내용을 포함하였다.

표 6

연구를 포함하는 6개의 실험군을 기술하는 *시험군 및 용량 수준의 구성*:

[0340]

그룹 번호	그룹 크기	시험 물질	경로	용량 수준 (mg/kg/투여)	용적 용량 (ml/kg)	요법
1F	n=10	비히클 대조군	IV	0	350g 래트에 2㎖	연구 종료까지 질환 유도 7일 전
2F	n=10	덱사메타손	IP	1	10	연구 0일에 시작하여 1일 1회
3F	n=10	RNS-60	IV		350g 래트에 1㎖	연구 종료까지 질환 유도 7일 전
4F	n=10	RNS-60	IV		350g 래트에 2㎖	연구 종료까지 질환 유도 7일 전
5F	n=10	RNS-60	IV		350g 래트에 1㎖	연구 0일에 시작하여 1일 1회
6F	n=10	RNS-60	IV		350g 래트에 2㎖	연구 0일에 시작하여 1일 1회

[0341] *급성 EAE 쥐과 모델의 시험 절차 및 원칙*. 실험적 알레르기 뇌척수염(EAE)은 다발성 경화증(MS)의 많은 임상 및 병리학적 특징을 모방하는 중추 신경계(CNS) 자가면역 탈수초성 질환이다. 급성 래트 모델은 연구 0일에 완전 프로인트 부형제(CFA) 중에 유화된 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 단일 피하(SC) 주사에 의해 유도되는 감작 기간으로 이루어진다.

[0342] EAE 유도 및 치료 요법의 도식적 도해가 도 4에 도시되어 있다.

[0343] EAE 유도:

[0344] *MBP/CFA*. 도 4에서 도식적 설명으로 도시된 것처럼, 모든 동물에 연구 0일(연구 시작)에 MBP 및 CFA의 세포분쇄액(homogenate) 에멀젼 혼합물로 이루어지는 단일 접종원을 주사하였다(MBP/CFA 뇌염 유발성 에멀젼 접종원(100㎍의 MBP/200㎍의 CFA)을 동물당 100㎕의 전체 용량 용적으로 주사하고 2 x 50㎕의 피하(SC) 양측 주사로서 족부 부위에 전달하였다).

[0345] 치료:

[0346] *치료 요법 및 절차*. 동물에 점수 매기는 사람과 다른 사람이 모든 화합물을 매일 새로 제조하였다. 바이알을 투여받는 동물에 점수 매기는 사람이 그룹 숫자로만 표시하였고 치료를 알지 못했다.

[0347] *투여 경로*: (i) RNS-60(IV); (ii) 비히클 대조군: (IV); 및 (iii) 양성 대조군: (IP).

[0348] *용량 수치 및 용적 용량*: (i) RNS-60: 350g에 대해 저용량 2㎖; 350g에 대해 고용량 4㎖; (ii) 비히클 대조군: 0; 및 (iii) 양성 대조군(덱사메타손): 1mg/kg.

[0349] *보조 관리*. 연구 과정 동안 결정하지 않는 한, 일단 EAE 실험 효과가 (단일 뇌염 유발성 접종 대략 8 내지 12일 후) 예상되고/되거나 관찰되면 또는 동물이 이의 이전 결정으로부터 15% 초과의 체중 감소 또는 이의 초기 체중 측정의 20% 초과의 감소를 나타낼 때, 사례 기준으로 적절한 보조 관리를 수행하였다.

[0350] *먹이 공급 및 물 공급*. 쪼갠 펠렛 또는 물기가 적은 설치류 식이로 이루어지고, 식수 중에 담근 추가의 물 공급원을 케이지 바닥에 기어다니는/움직이지 않는 동물 앞에 위치시켰다.

[0351] *탈수*. 동물을 체중이 초기 결정의 10% 내로 돌아올 때까지 2㎖/동물/일까지 적어도 매일 2회 덱스트로스 5% 용액에 의해 피하(SC) 보충 유체 치료로 처리할 수 있다.

[0352] *배뇨*. 배뇨를 돕고 동물이 이의 방광을 비울 수 있는지를 관찰하기 위해 동물의 복부의 촉진을 수행하였다.

[0353] *다른 특수 관리*. 동물의 항문 부위 및 뒷다리를 축축한 가즈 패드로 필요한 대로 세정하였다.

[0354] 관찰 및 검사:

[0355] *임상 징후*. 전체 21일 연구에 걸쳐, 조심스럽 임상 검사를 수행하고 EAE 임상 점수 및 평가(하기 참조) 이외에 적어도 매일 1회 기록하였다. 관찰은 피부, 털, 눈, 점막, 분비물 및 배설물 발생(예를 들면, 설사) 및 자율 활성(예를 들면, 유루(lacrimation), 타액 분비, 입모(piloerection), 동공 크기, 비일반적인 호흡 패턴), 걸음걸이, 자세 및 조련에 대한 반응 및 비일반적인 거동의 존재, 떨림, 경련, 수면 및 혼수의 변화를 포함하였다.

[0356] *체중*. 체중 감소는 질환 개시의 처음 증상일 수 있고, 갑작스런 현저한 체중 증가는 EAE 증상의 관해를 수반하는 경향이 있다. 따라서, 동물의 개별 체중을 연구 0일(연구 개시)에 EAE 유도 직전에 결정하고 이후 전체 21일 관찰 기간에 걸쳐 매일 기준으로 결정하였다.

[0357] *EAE 임상 점수 및 평가*. 초기에, 모든 동물을 EAE 유도 전(연구 0일)에 임의의 신경학적 반응 및 증상의 징후를 검사하고 이후 전체 21일 관찰 기간에 걸쳐 매일 기준으로 검사하였다. 실험 편차를 피하기 위해, 적용되는 특정 치료를 알지 못하는 직원이 가능한 맹검 방식으로 EAE 반응을 결정하였다. EAE 반응을 점수 매기고 하기 표 7에 기재된 바대로 중증도가 증가하는 순서로 전통적인 당해 기술에서 인정된 통상의 0 내지 5점 스케일에 따라 기록하였다:

표 7

중증도가 증가하는 순서로 전통적인 당해 기술에서 인정된 통상의 0 내지 5점 스케일에 따라 EAE 반응을 점수 매기고 기록하였다.

등급	*징후/증상*
0	비정상 없음
0.5	꼬리 약해짐, 먼 쪽에서 절반
1	꼬리 약해짐, 가까운 쪽에서 절반
1.5	뒷발 약해짐, 한 발
2	뒷발 약해짐, 두 발
2.5	앞발 마비, 한 발
3	앞발 마비, 두 발
4	완전 마비
5	사망

[0358]

[0359] *혈액 샘플*. 연구 종료일(21일)에, 모든 동물을 주사 1 시간 후 출혈시켰다. 연구 0일(오직 예방군), 7일, 14일 및 21일에 샘플을 수집하였다. 혈장을 헤파린을 넣은 바이알에 수집하고 -20℃에서 유지시켰다. 혈액 계수 분석을 위해 300㎕의 용적을 저장하고 루미넥스 기술을 통한 추가의 사이토카인 분석을 위해 100㎕를 저장하고 사용하였다. 0일, 7일, 14일 및 21일에 혈액 계수를 분석하였다.

[0360] *조직 수집*. 연구 종료시, 동물에 4% PFA를 관류하였다. 뇌 및 척수를 수집하고 4% PFA 중에 유지시켰다.

[0361] *인도적 사망*. 빈사 상태에 있는 동물 및/또는 중증 통증 및 오래가는 중증 스트레스 징후를 나타내는 동물을 인도적으로 안락사시켰다.

[0362] 통계/데이터 평가:

[0363] 평가는 비히클 대조군에 대해 모든 치료군에서 관찰되는 절대 값, 백분율(%) 변화 및 평균 그룹 값으로 표시되는 신경학적 증상 및 체중 둘 다에서 기록된 상대 변화에 주로 기초하였다. 치료 효과의 유의성을 결정하기 위해 적절한 통계 방법에 의한 데이터 분석을 적용하였다.

[0364] 동물 관리 및 사용 설명:

[0365] 규칙 및 규제에 따른 연구가 기재되어 있는 실험실 동물의 관리 및 사용에 대한 적절한 윤리 위원회(Committee for Ethical Conduct)에 제출된 신청서의 승인에 따라 이 연구를 수행하였다.

[0366] 결과:

[0367] 연구 결과가 도 3에 도시되어 있고, 시간(MBP 주사 후 일수)이 X축에 도시되어 있고, "임상 점수"("물질 및 방법"에서 상기 참조)가 Y축에 도시되어 있다.

[0368] 도 3은 본 발명의 동전기적 유체(RHS-60)가 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 실험적 자가면역 뇌척수

염(EAE) 래트 모델("물질 및 방법"에서 참조)에서 실질적으로 효율적이라는 것을 나타낸다.

[0369] 구체적으로, 17일 기간에 걸쳐 비히클 대조군(채운 다이아몬드)과 비교할 때, *치료학적*(MBP 주사와 동시에 시작하여 RNS-60 매일 투여) 및 *예방학적*(MBP 주사 7일 전 시작하여 RNS-60 매일 투여) RNS-60 용량 요법 둘 다 임상 점수의 현저한 감소 및 개시 지연(고용량 그룹에서)을 나타냈다.

[0370] 저용량(매일 1회 cc 주사) RNS-60 치료군의 임상 점수는 비히클 대조군의 대략 절반(1/2)인 반면, 고용량(매일 2회 cc 주사) RNS-60 치료군의 임상 점수는 비히클 대조군의 대략 5분의 1(1/5) 내지 10분의 1(1/10)일 뿐만 아니라, 개시 지연을 나타냈다.

[0371] 저용량(매일 1회 cc 주사) RNS-60 예방군의 임상 점수는 비히클 대조군의 대략 3분의 1(1/3)인 반면, 고용량(매일 2회 cc 주사) RNS-60 예방군의 임상 점수는 16일에 걸쳐 0(검출 가능하지 않은 임상 점수)이여서, 실질적으로 개시 지연을 나타낼 뿐만 아니라, 17일에 관찰 가능할 때 동일한 시점에 비히클 대조군의 10분의 1(1/10) 미만이었다.

[0372] 따라서, 본 발명의 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 인간 MS의 당해 기술에서 인정된 래트 모델에서 EAE 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0373] ***실시예 8***

[0374] (*본 발명의 동전기적 유체는 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 급성 실험 알레르기(자가면역) 뇌척수염(EAE) 래트 MBP 모델에서 래트의 체중을 유지시키는 데 있어서 효과적인 것으로 나타났다*)

[0375] 개관:

[0376] 이 실시예는 실시예 7에 기재된 실험에 처리된 래트의 체중 변화를 개시한다. 체중 감소는 질환 개시의 처음 증상일 수 있고, 갑작스런 현저한 체중 증가는 EAE 증상의 관해를 수반하는 경향이 있다. 따라서, 동물의 개별 체중을 연구 0일(연구 개시)에 EAE 유도 직전에 결정하고 이후 전체 21일 관찰 기간에 걸쳐 매일 기준으로 결정하였다. 체중에 대한 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60의 효과는 EAE 래트 모델에 처리된 래트의 체중을 유지시키는 데 있어서 효과적인 것으로 나타났다(도 5).

[0377] 체중 데이터:

[0378] 도 5는 그램(a 패널) 단위로 및 100그램에 기초한 백분율(패널 B)로서 체중을 나타낸다. 이 실시예에서 치료된 동물의 평균 체중의 약간의 감소 후, 평균 체중은 연구 종료까지 증가하기 시작했다. 연구 종료시, 평균 체중 증가는 비히클 치료(1F 그룹)에서 20%였다. 연구에 걸쳐, 연구 0일에 시작하여 투여받은 덱사메타손 치료군(2F 그룹)은 연구 동안 평균 체중이 10% 감소하였다. 연구 종료시, 덱사메타손 치료 동물은 평균 체중이 2% 감소하였다. 예방적인 저용량 치료군(3F 그룹)은 연구 1 내지 3일에 4%까지 평균 체중 감소를 나타냈고, 이후 연구 종료일에 평균 체중이 23% 증가하였다. 예방적인 고용량 치료군(4F 그룹)은 연구 1 내지 3일에 5%까지 평균 체중 감소를 나타냈고, 이후 연구 종료일에 평균 체중이 28% 증가하였다. 치료학적 저용량 치료군(5F 그룹)은 연구 1 내지 3일에 4%까지 평균 체중 감소를 나타냈고, 이후 연구 종료일에 평균 체중이 21% 증가하였다. 치료학적 고용량 치료군(6F 그룹)은 연구 1 내지 3일에 4%까지 평균 체중 감소를 나타냈고, 이후 연구 종료일에 평균 체중이 19% 증가하였다.

[0379] 따라서, 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60은 EAE 래트 모델에 처리된 래트의 체중을 유지시키는 데 있어서 효과적인 것으로 밝혀졌다.

[0380] 따라서, 본 발명의 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 인간 MS의 당해 기술에서 인정된 래트 모델에서 EAE 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0381] ***실시예 9***

[0382] (*본 발명의 동전기적 유체는 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 급성 실험 알레르기(자가면역) 뇌척수염(EAE) 래트 MBP 모델에 처리된 래트로부터 취한 혈액 샘플에서 백혈구, 호중구 및 림프구의 수치에 미치는 효과가 작다는 것을 나타낸다*)

[0383] 개관:

[0384] 이 실시예는 실시예 7에 기재된 바대로 실험 동안 래트로부터 취한 혈액 샘플에서 백혈구, 호중구 및 림프구의 수치를 개시한다. 사이토카인 수치 변화가 백혈구의 전체 변화로 인한 것인지 결정하기 위해, 출원인이 실험에

걸쳐 EAE 실험에 처리된 래트로부터 취한 혈액 샘플을 취했다.

[0385] 백혈구, 호중구 및 림프구의 수치:

[0386] 도 6a 내지 도 6d는 EAE 실험에 걸쳐 수집된 혈액 샘플에서 백혈구, 호중구 및 림프구의 수치를 나타낸다.

[0387] 시험 품목을 연구 0일(a 패널), 7일(b 패널), 14일(c 패널) 및 21일(d 패널)에 투여한 후 백혈구(WBC), 호중구 및 림프구를 1시간 계수하였다. 연구 7일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 WBC 수는 8.23±0.36포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 2.46±0.38포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.05$). 저용량의 시험 품목(5F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 9.59±0.46포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.1$). 고용량의 시험 품목(6F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 10.84±0.88포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$).

[0388] 연구 14일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 WBC 수는 6.34±0.28포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 3.79±0.69포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.05$). 고용량의 시험 품목(4F 그룹)에 의한 예방학적 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 7.83±0.51포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$). 저용량의 시험 품목(5F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 7.65±0.52포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$). 고용량의 시험 품목(6F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 8.05±0.43포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$). 연구 21일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 WBC 수는 9.09±0.75포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 WBC 수를 5.12±0.57포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.05$).

[0389] 연구 7일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 호중구 수는 26.20±1.62포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 호중구 수를 65.38±4.62포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$). 고용량의 시험 품목(4F 그룹)에 의한 예방학적 치료는 비히클에 비해 평균 호중구 수를 31.90±0.96포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$). 고용량의 시험 품목(6F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 호중구 수를 33.90±2.79포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$).

[0390] 연구 14일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 호중구 수는 33.00±2.58포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 호중구 수를 73.10±3.15포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$).

[0391] 연구 21일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 호중구 수는 41.40±2.32포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 호중구 수를 89.33±1.97포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$). 고용량의 시험 품목(6F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 호중구 수를 34.60±3.08포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.1$).

[0392] 연구 7일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 림프구 수는 73.20±1.95포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 림프구 수를 30.63±1.31포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.05$). 고용량의 시험 품목(4F 그룹)에 의한 예방학적 치료는 비히클에 비해 평균 림프구 수를 68.30±1.42포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.1$). 고용량의 시험 품목(6F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 림프구 수를 64.80±3.00포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.05$).

[0393] 연구 14일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 림프구 수는 66.10±2.53포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 림프구 수를 26.80±3.23포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.05$).

[0394] 연구 21일에 비히클로 동물을 치료한지 1시간 후 최대 림프구 수는 57.50±2.09포인트였다. 덱사메타손에 의한 치료는 비히클에 비해 평균 림프구 수를 10.11±2.08포인트로 유의적으로 감소시켰다($p<0.05$). 고용량의 시험 품목(6F 그룹)에 의한 치료학적 치료는 비히클에 비해 평균 림프구 수를 66.20±2.74포인트로 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$).

[0395] 따라서, 예방학적으로 및 치료학적으로 고용량으로 투여된 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60은 연구 7일에 비히클에 비해 호중구 수를 유의적으로 증가시키고 림프구 수를 유의적으로 감소시켰다. 예방학적으로 고용량으로 투여되고, 치료학적으로 용량 둘 다에서 투여된 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60은 연구 14일에 비히클에 비해 WBC 수를 유의적으로 증가시켰다. 치료학적으로 고용량으로 투여된 시험 품목 RNS60은 연구 21일에 비히클에 비해 호중구 수를 유의적으로 감소시키고 림프구 수를 증가시켰다. 따라서, 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60은 WBC, 호중구 및 림프구의 전체 수치에 효과가 거의 없는 것으로 밝혀졌다.

[0396] *실시예 10*

[0397] *(본 발명의 동전기적 유체는 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 급성 실험 알레르기(자가면역) 뇌척수염(EAE) 래트 MBP 모델에 처리된 래트로부터 취한 혈액 샘플에서 특정한 사이토카인의 수치에 영향을 미치는 것으로 나타났다)*

[0398] 개관:

[0399] 이 실시예는 사이토카인 수치가 실시예 7에 기재된 바대로 실험 동안 래트로부터 취한 혈액 샘플에서 발견된다는 것을 개시한다. 실시예 7에 기재된 바대로 치료학적 투여 요법에서 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60을 평가하였다. 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60은 EAE 래트 모델에 처리된 래트로부터 취한 혈액 샘플에서 특정한 사이토카인의 수치에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

[0400] 특정한 사이토카인은 다발성 경화증에서 역할을 하는 것으로 나타났다. 특히, CTLA-8 또는 IL-17A로도 공지된 인터류킨 17(IL-17)은 급성 및 만성 EAE에서 중추 신경계에서 수치가 증가한 것으로 나타났다(Hofstetter, H. H., et al., Cellular Immunology (2005), 237:123-130). IL-17은 다양한 비면역 세포로부터 광범위한 다른 사이토카인의 분비를 자극하는 전염증성 사이토카인이다. IL-17은 섬유아세포, 케라틴 세포, 상피 및 내피 세포와 같은 및 부착 세포에 의해 IL-6, IL-8, PGE2, MCP-1 및 G-CSF의 분비를 유도할 수 있고, 또한 ICAM-1 표면 발현, T 세포 증식 및 조사된 섬유아세포의 존재 하에 동시 배양될 때 호중구로의 CD34+ 인간 전구체의 성장 및 분화를 유도할 수 있다(Fossiez et al., 1998, Int.Rev.Immunol. 16, 541-551). IL-17은 활성화된 기억 T 세포에 의해 주로 생성되고, 편재하여 분포된 세포 표면 수용체(IL-17R)에 결합하여 작용한다(Yao et al., 1997, Cytokine, 9, 794-800). IL-17의 여러 동족체가 염증성 반응을 조절하는 데 있어서 둘 다 비슷하고 명확한 역할을 갖는 것으로 확인되었다. IL-17 사이토카인/수용체 패밀리의 검토를 위해, 문헌[Dumont, 2003, Expert Opin. Ther. Patents, 13, 287-303]을 참조한다.

[0401] IL-17은 비정상 면역 반응, 예컨대 류마티스성 관절염 및 기도 염증 및 장기 이식 거부 및 항종양 면역력에 의해 중재되는 여러 질환에 기여할 수 있다. IL-17 활성의 억제제가 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들면 IL-17R:Fc 융합 단백질은 콜라겐 유도 관절염에서 IL-17의 역할을 입증하기 위해 사용되고(Lubberts et al., J.Immunol. 2001,167, 1004-1013), 중화 다중클론 항체는 복막 접착 형성을 감소시키기 위해 사용되었다(Chung et al., 2002, J.Exp.Med., 195, 1471-1478). 중화 단일클론 항체는 상업적으로 구입 가능하다(R&D Systems UK).

[0402] 따라서, IL-17이 MS 발병에서 담당하는 역할에 기초하여, 출원인이 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60이 EAE 연구에서 래트로부터 취한 혈액 샘플에서 IL-17 수치에 미치는 효과를 조사하였다.

[0403] 사이토카인 데이터:

[0404] 연구 동안 혈액 중 다양한 사이토카인의 수치를 분석하였다. 간단히 말하면, 모든 동물을 주사 1시간 후 출혈시키고 혈장 헤파린을 넣은 바이알에서 수집하였다. 동일한 샘플로부터 다수의 사이토카인을 동시에 측정하게 하는 루미넥스 기술(파노믹스(Panomics)사의 프로카르타(Procarta) 래트 사이토카인 검정 키트 PC4127)에 의해 다양한 염증성 사이토카인에 대해 100㎕의 샘플을 분석하였다. 가우시안 분포가 아닌 데이터 및 때때로 검정 검출 한계점보다 낮은 결과로 인해, 센서드(censored) 데이터에 대한 비모수 Cox 회귀 모델을 채택하여 상이한 유체를 비교하였다. 도 7a 내지 도 7h에 도시된 것처럼, IL1a, IL1b 및 IL17 수치는 RNS60의 치료학적 치료 용량(고용량 및 저용량) 둘 다에 의해 거의 뚜렷이 감소하였다. MBP의 임상 출현은 10일 근처에 EAE 시작 및 18일 주위에 피크를 유도하였다. 그러므로, 본 발명자들은 7일(질환 출현 직전) 및 18일(질환 피크 근처)이 사이토카인 분석에 가장 중요한 시점이라고 생각하였다. 7일 및 18일에 그룹마다 10마리의 동물로부터 IL1a, IL1b 및 IL17의 전신 수치가 도 7a 내지 도 7h에 제시되어 있다.

[0405] IL-1은 주요 전염증성 사이토카인 중 하나이고 선천성 면역 반응의 상향 중재자이다. IL-1은 양성 피드백 루프를 사용하여 직접적으로 및 간접적으로 다양한 성장 및 영양 인자, 염증성 중재자, 접착 분자 및 다른 사이토카인의 생성을 유도하였다(A. Basu *et al.*, The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury, *J. Neurosci.* **22** (2002), pp. 6071-6082; P.N. Moynagh, The interleukin-1 signaling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain, *J. Anat.* **207** (2005), pp. 265-269). 이는 NGF, ICAM 1, IL6, TNFa, CSF 등과 같은 중요한 중재자를 포함한다. MS 진행은 말초에서 자기 항원 반응성 T 세포의 활성화, 이후 CNS로의 침윤을 포함한다. IL-1은 미엘린 특이적 T 세포 활성화뿐만 아니라 말초

에서 대식세포 활성화의 주요한 중재자를 나타내므로 MS 발생에서 중요하다[R. Furlan *et al.*, HSV-1-mediated IL-1 receptor antagonist gene therapy ameliorates MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice, *Gene Ther.* **14** (2007), pp. 93-98]. MS에 대한 EAE 모델에서, IL-1α 및 IL-1β 둘 다 염증성 과정의 중재자인 것으로 밝혀졌다. IL-1β의 말초 수치는 임상 과정과 상관되고, IL-1β 반응성이 CNS 침윤 대식세포 및 정주 소교세포에서 EAE 동안 나타났다(C.A. Jacobs *et al.*, Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated by IL-1 alpha and suppressed by soluble IL-1 receptor, *J. Immunol.* **146** (1991), pp. 2983-2989). 따라서, IL-1은 EAE 및 MS에서 적합한 치료학적 표적이다. IL-1의 비선택적 억제 기전이 MS에 대한 기존의 치료제; 즉 인터페론 베타, 항염증성 글루코코르티코이드, 면역억제제, 아토르바스타틴 및 오메가-3 다중 불포화 지방산에서 나타났다[F.L. Sciacca *et al.*, Induction of IL-1 receptor antagonist by interferon beta: implication for the treatment of multiple sclerosis, *J. Neurovirol.* **6** (Suppl. 2) (2000), pp. S33-S37.; R. Pannu *et al.*, Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats, *J. Neurosci. Res.* **79** (2005), pp. 340-350; A.P. Simopoulos, Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases, *J. Am. Coll. Nutr.* **21** (2002), pp. 495-505]. 도 11c 내지 도 11f에 입증된 바대로, RNS60의 IV 투여는 IL1α 및 IL1β 둘 다의 전신 수치를 효과적으로 감소시켰다. IL1α의 경우, RNS60 치료는 비히클 치료군과 비교할 때 혈액 수치를 유의적으로 감소시켰고, 이 시점에서 덱사메타손만큼 효과적이었다. 그러나, 18일 시점에, 치료가 IL1α 전신 수치에 유의적인 효과를 갖지 않았다. IL1β의 전신 수치가 또한 RNS60의 IV 치료 7일 후 독성 부작용의 어떠한 징후 없이 덱사메타손 치료군과 비슷한 수치로 유의적으로 감소하였다. 동일한 경향이 18일 시점에 관찰되었지만, 그 차이가 통계적으로 유의적이지 않았고, 대조군 IL-17과 비교할 때 또한 강력한 전염증성 효과로 중요한 작동자 사이토카인이었다. 이것은 종양 괴사 인자-α 및 케모카인과 같은 다른 전염증성 사이토카인의 발현을 유도하고, 호중구인 백혈구를 유인하고, 수지상 세포의 성숙을 증대시켰다(Kolls JK, Linden A.Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity. 2004 Oct;21(4):467-76). IL-17 생성 세포는 콜라겐 유도 관절염, 대장염, 건선 및 EAE와 같은 자가면역 질환에서 필수적인 염증성 중재자인 것으로 생각된다. EAE에서의 T 보조 17 세포는 CD4+ 세포이고, EAE에서 면역 말초 신경계 및 염증이 생긴 중추 신경계 둘 다에 존재한다. 더욱이, IL-17 중화는 임상 질환을 경감시키고, 이러한 발견은 IL-17 결핍 동물에서 EAE 중증도 감소와 일치한다(문헌[Gold and Lⅱhder, Interleukin-17-Extended Features of a Key Player in Multiple Sclerosis Am J Pathol. 2008 January; 172(1): 8-10]로부터). RNS60에 의한 7일 IV 치료는 혈액에서 덱사메타손 치료 동물과 유사한 수치로 IL17 수치를 유의적으로 감소시켰다. 결과가 통계적으로 유의적이지 않았지만, 심지어 치료 18일 후에도 동일하였다. RNS60이 심지어 IV 주사 21일 후에도 주목할 만한 독성 부작용 없이 IL1 수치 및 EAE, IL1 및 IL17에서 2가지 중요한 사이토카인의 조합을 감소키는 데 있어서 효과적이라는 것이 특히 중요하다.

[0406] IL1 및 IL17 이외에, 신경계의 염증에서 중요한 역할을 하는 여러 다른 분자가 또한 RIS60에 의해 중재된다. 이는 Rantes, KC, NGF 및 ICAM(데이터 기재 생략)을 포함한다.

[0407] 따라서, 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60은 EAE 연구에서 래트로부터 취한 혈액 샘플에서 IL-17 수치에 상당한 효과를 갖는다. 또한, IL-17이 IL-6, IL-8, PGE2, MCP-1 및 G-CSF의 분비를 자극하므로, 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60이 혈액에서 이 사이토카인의 수치에 상당한 효과를 갖을 것이다. 따라서, 본 발명의 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 인간 MS의 당해 기술에서 인정된 래트 모델에서 EAE 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0408] ***실시예 11***

[0409] (*RNS-60은 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석에 의해 CD193(CCR3); CD154(CD40L); CD11B; 및 CD3의 세포 표면 수용체의 발현에 뚜렷한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다*)

[0410] 개관:

[0411] 출원인은 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석을 이용하여 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60) 또는 노르말 식염수 대조군 유체와 항온처리된 백혈구에서의 CD193(CCR3); CD154(CD40L); CD11B; 및 CD3의 세포 표면 수용체의 발현의 수치를 비교하였다.

[0412] 방법:

[0413] 피콜-하이파크(Ficoll-hypaque) 분리 PBMC(성분채집술(apheresis) - 모든 세포)를 RNS60 또는 노르말 식염수(NS)의 30% 용액 중에 대략 1 시간 동안 예비 항온처리하였다;

[0414] PBMC를 24 또는 40시간 동안 2㎍/㎖의 PHA-L로 활성화하였다;

[0415] 세포를 수집하고 차단/염색 완충제로 세척하고, 염색하고 고정하였다;

[0416] 세포를 유세포분석법에 의해 분석하였다.

[0417] 결과:

[0418] CD193(CCR3)과 관련하여, 수용체를 노르말 식염수 대조군에서의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 실질적으로 하향 조절하였다. 이 하향 조절은 MAPK p38(데이터 기재 생략)의 인산화에 영향을 미치고, 이는 결국 이오탁신을 하향 조절하고(예를 들면, 출원인의 공개 특허 출원 WO 2009/055729(2009년 4월 30일 공개)의 실시예 13 및 도 57 참조), 이는 결국 IL5를 하향 조절하고 기관지수축 반응을 변경하는 인자 중 하나인 호산구 수를 또한 변경한다.

[0419] 난알부민 공격 모델과 관련하여 출원인의 공개 특허 출원 WO 2009/055729(2009년 4월 30일 공개)의 실시예 13에 기술된 바대로, RNS-60은 노르말 식염수의 효과와 비교할 때 OVA 공격 그룹에서 혈청 이오탁신 수치를 감소시켰다. 따라서, 특정 양태에 따르면, RNS-60은 리간드 이오탁신 및 이의 수용체 CCR3 둘 다를 감소시키는 가능성을 갖는다.

[0420] CD154(CD40L)와 관련하여, 노르말 식염수 중의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 수용체를 하향 조절하였다.

[0421] CD11B와 관련하여, 노르말 식염수 중의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 수용체를 하향 조절하였다.

[0422] CD3과 관련하여, 노르말 식염수 중의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 수용체를 하향 조절하였다.

[0423] 특정 양태에 따르면, 본원의 실시예 외에 기재된 바대로, 본 발명의 동전기적 조성물은 염증을 감소시키는 실질적인 유용성을 갖는다. 예를 들면, 기전에 구속됨이 없이, 본원의 다른 곳에 기술된 바대로, IL7R은 사이토카인 수용체 유사 인자 2 유전자(CRLF2)와 이합체화하여 TSLP 수용체를 형성한다(Al Shami et al. (2004) J. Exp. Med. 200:159-168). TSLP는 실험실내 미성숙 B 세포 발생을 유도하는 IL7 유사 사이토카인이고, 골수성 수지상 세포에서, 미접촉 CD4+ T 세포가 T 보조 2형(Th2) 표현형으로 분화하도록 촉진하고 CD4+ Th2 기억 세포의 팽창을 촉진할 수 있다(Huston et al. (2006) Curr. Allergy Asthma Rep. 6:372-376). TSLP는 수지상 세포 매개 Th2형 염증성 반응을 촉발하는 것으로 생각되고, 알레르기 염증의 마스터 스위치로 생각되고(Koyama et al. (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 357:99-104), 이는 MS의 병인학과 관련된다(예를 들면, 문헌[Gregory et al. *Nature Genetics*, 39:1083-1091](2007년 7월 29일 온라인상 공개되어 참조문헌으로 본원에 포함됨; IL7Rα 대립유전자와 M.S.의 연관) 참조). 추가의 양태에서, 본 발명의 동전기적 조성물은 기질 금속단백분해효소 9(MMP-9)를 조절하는(예를 들면, 저하시키는) 실질적인 유용성을 갖는다. 다발성 경화증(MS)에서, 조직에서의 기질 금속단백분해효소(MMP) 활성은 MMP와 이의 조직 억제제(TIMP) 사이의 균형의 결과이다. MMP-9는 급성 MS 병변에 우세하고 TIMP-1에 의해 억제되는 반면, MMP-2는 마찬가지로 예컨대 만성 질환에서 세포외 기질(ECM)의 리모델링에 참여하고 TIMP-2에 의해 억제된다(예를 들면, 문헌[Avolio et al., *J NeuroImmunol,136:46-53, 2003*](참조문헌으로 본원에 포함됨) 참조).

[0424] 따라서, 본 발명의 추가의 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 고통받는 포유동물(바람직하게는 인간)에서 MS 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0425] 다른 추가의 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물을 본원의 다른 곳에 기재되어 있는 적어도 하나의 추가의 M.S. 치료제와 함께 투여할 수 있다.

[0426] 따라서, 본 발명의 추가의 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 고통받는 포유동물(바람직하게는 인간)에서 염증성 신경변성 질환 증상(예를 들면, 본원의 다른 곳에 정의된 알츠하이머병, 파킨슨병, 아밀로이드증 유형 장애)을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0427] ***실시예 12***

[0428] *(본 발명의 동전기적 유체(예를 들면, RNS60)는 소교세포에서 용량 의존 방식으로 iNOS 및 IL-1β 둘 다의 발현을 억제하는 것으로 나타났다)*

[0429] 개관:

[0430] 특정 양태에 따르면 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 동전기적 유체는 파킨슨병(PD)을 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0431] 파킨슨병(PD)은 인간에서 가장 손상을 입히는 신경변성 장애 중 하나이다. PD는 어떤 연령에서도 나타날 수 있지만, 30세보다 어린 사람에게서는 흔치 않다. 임상적으로, PD는 수전증, 운동완서, 경직성 및 자세 불안정성을 특징으로 한다. 병리학적으로, 이는 흑질 밀집부(substantia nigra pars compacta: SNpc)에서 세포질내 봉입체(루이소체)의 존재와 관련되는 도파민 작동성 뉴런의 진행성 변성으로 나타난다. 사후 PD 뇌에서, 죽은 뉴런이 세포 수축, 염색사 응축 및 DNA 분절화를 비롯한 아폽토시스의 형태학적 특징을 나타내는 것으로 보고되었다. 따라서, 질환 진행을 중지시키는 효과적인 신경보호의 치료학적 접근법의 개발이 가장 중요하다. MPTP 마우스 모델은 PD에 대한 치료학적 접근법을 시험하고 검증하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0432] 소교세포 활성화는 파킨슨병(PD) 및 다른 신경변성 장애의 발병에 중요한 역할을 한다. PD의 특정한 특징이 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(MPTP)에 도취된 동물에서 모델링되었다. MPTP의 신경독성 효과는 MPP^+로의 이의 전환에 따라 달라진다. 교질 세포에서, 모노아민 옥시다제 B(MAO-B)는 MPTP를 MPP^+로 전환시키고, 이후 교질 세포를 활성화하고, 최근에는, MPP^+가 소교세포에서 전염증성 분자 발현을 유도하는 것으로 나타났다.

[0433] 이 실시예에서, MPP^+ 자극 소교세포에서 전염증성 분자의 발현을 조절하는 RNS60의 능력이 확인되었다.

[0434] 물질 및 방법:

[0435] 간단히 말하면, 마우스 BV-2 소교세포를 상이한 농도의 RNS60 및 노르말 식염수(NS)와 1시간 동안 항온처리한 후, 혈청 비함유 조건 하에 2μM MPP^+로 자극하였다.

[0436] 결과:

[0437] 도 8에서 반정량적 RT-PCR 분석에 의해 입증된 것처럼, MPP^+는 단독으로 마우스 BV-2 소교세포에서 유도성 산화질소 합성효소(iNOS) 및 인터류킨-1β(IL-1β) mRNA의 발현을 유도하였다. 중요하게는, RNS60은 소교세포에서 용량 의존 방식으로 iNOS 및 IL-1β 둘 다의 발현을 억제하였다(도 8). 반대로, 유사한 실험 조건 하에, 노르말 식염수 대조군(NS)은 이 2개의 전염증성 유전자(도 8)의 발현에 효과를 갖지 않고, 이는 이 효과의 특이성을 나타낸다.

[0438] 구체적으로, 도 8은 대조군 노르말 식염수(NS)가 아니라, 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60)가 마우스 소교세포에서 유도성 산화질소 합성효소(iNOS) 및 인터류킨-1β(IL-1β)의 MPP^+ 유도 발현을 약화시킨다는 것을 나타낸다. 혈청 비함유 배지 중에 상이한 농도의 RNS60 및 노르말 식염수(NS)와 1시간 동안 예비 항온처리된 BV-2 소교세포를 MPP+(파킨슨병 독소)로 자극하였다. 자극 6시간 후, 전체 RNA를 분리하고 iNOS 및 IL-1β의 mRNA 발현을 반정량적 RT-PCR에 의해 분석하였다. 결과는 3회 독립 실험을 나타낸다.

[0439] 특정 양태에 따르면 따라서, MPP^+가 파킨슨병 독소이므로, 이 결과는 RNS60이 파킨슨병의 당해 기술에서 인정된 MPTP 유도 마우스 모델에서 보호 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0440] 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 유체는 파킨슨병(PD)을 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0441] ***실시예 13***

[0442] (*본 발명의 동전기적 유체(예를 들면, RNS60)는 아밀로이드-β 독성으로부터 뉴런을 보호하는 것으로 나타났다*)

[0443] 개관:

[0444] 본원에 기술된 바와 같은 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 유체는 알츠하이머병(AD)을 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0445] 알츠하이머병(AD)은 진행성 뉴런사 및 기억 손실을 야기하는 신경변성 장애이다. 사후 AD 뇌에서 TUNEL 염색 증가는 AD 환자의 뇌에서 뉴런이 아폽토시스를 통해 죽는다는 것을 나타낸다. 섬유성 아밀로이드-β 펩타이드는 AD의 병리생리학에 참여한다. 신경병리학적으로, 이 질환은 아밀로이드 전구체 단백질로부터 유도되는 40-43개의 아미노산 단백질분해 단편인 β-아밀로이드(Aβ) 단백질 및 인산화 타우(tau)의 응집체로 이루어지는 신경반

및 신경섬유 엉킴을 특징으로 한다. 형질전환 마우스에서 세포내 Aβ 펩타이드의 과발현은 염색사 분절, 응축을 발생시키고 TUNEL 염색을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 세포 배양 연구는 또한 Aβ 펩타이드가 뉴런 세포에 아폽토시스 및 세포독성을 발생시킨다는 것을 나타내고, 섬유성 Aβ1-42 펩타이드가 뉴런 세포에서 아폽토시스를 유도할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0446] 추가로, 염증과 AD 사이의 연관을 규명하는 연구가 증가하고 있고, 신경반 및 신경섬유 엉킴 주위에 확산된 교질 활성화가 발견되었다.

[0447] 이 실시예에서, 인간 SHSY5Y 신경 세포에서 Aβ(1-42) 유도 아폽토시스를 차단하는 데 있어서 RNS60의 효과가 확인되었다.

[0448] 물질 및 방법:

[0449] SHS5Y 인간 신경 세포의 분절 DNA가 칼바이오켐으로부터 상업적으로 구입 가능한 키트(TdT FragEL(상표명))를 사용하여 섬유성 Aβ1-42에 반응하여 생성된 DNA 분절의 3'-OH 말단의 말단 데옥시뉴클레오티딜트랜스퍼라제(TdT) 매개 결합에 의해 동일 자리에서 검출되었다. 간단히 말하면, 커버 슬립을 20㎍/㎖의 단백분해효소 K로 실온에서 15분 동안 처리하고 세척한 후 TdT 염색하였다.

[0450] 결과:

[0451] 도 9에 도시된 것처럼, 섬유성 Aβ1-42 펩타이드는 뉴런 세포에서 아폽토시스 소체 형성을 현저히 유도하였다. 본 발명자들은 또한 Aβ1-42 치료 후 뉴런 과정 손실을 관찰하였다(제2 열; 도 9). 반대로, 리버스 펩타이드 Aβ42-1은 뉴런 아폽토시스 및 과정 손실을 유도할 수 없었다(제3 열; 도 9). 중요하게는, 시험된 상이한 용량에서의 RNS60은 Aβ(1-42) 유도 아폽토시스를 현저히 차단하고 뉴런 세포에서의 과정을 보존하였다(제4, 제5 및 제6 열; 도 9). 반대로, 노르말 식염수 대조군 유체(NS)는 Aβ(1-42) 유도 아폽토시스 및 과정 손실에 효과를 갖지 않았다(제7 및 제8 열; 도 9).

[0452] 구체적으로, 도 9는 노르말 식염수 대조군(NS)이 아니라 RNS60이 인간 SHSY5Y 뉴런 세포의 섬유성 Aβ(1-42) 매개 아폽토시스를 억제한다는 것을 나타낸다. 분화 후, SHSY5Y 세포를 상이한 농도의 RNS60 또는 NS와 1시간 동안 항온처리한 후, 1μM 섬유성 Aβ(1-42) 펩타이드로 공격하였다. 치료 18시간 후, 아폽토시스를 TUNEL(칼바이오켐)에 의해 모니터링하였다. Aβ(42-1) 펩타이드를 대조군으로서 또한 항온처리하였다. 결과는 3회 독립 실험을 나타낸다.

[0453] 이 결과는 AD의 병인성 시약(섬유성 Aβ1-42)이 RNS60 감작 경로를 통해 뉴런에서 아폽토시스를 유도한다는 것을 나타낸다.

[0454] 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 유체는 알츠하이머병(AD)을 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0455] ***실시예 14***

[0456] (*본 발명의 동전기적 유체는 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 마우스 MOG 모델에서 용량 반응 방식으로 임상 점수를 억제하는 데 있어서 실질적으로 효과적이라는 것을 나타낸다*)

[0457] 개관:

[0458] 이 실시예에서, 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 실험적 알레르기 뇌척수염(EAE) 마우스 MOG 모델에서 치료학적 투여 요법에서 본 발명의 동전기적 유체 RNS-60을 2 용량에서 평가하였다.

[0459] 물질 및 방법:

[0460] 실험적 알레르기 뇌척수염(EAE)은 다발성 경화증(MS)의 많은 임상 및 병리학적 특징을 모방하는 중추 신경계(CNS) 자가면역 탈수초성 질환이다. MOG 쥐과 모델은 연구 0일에 완전 프로인트 부형제(CFA) 중에 유화된 MOG의 단일 피하(SC) 주사(허리주위 부위에 걸쳐 2 X 100㎕ 피하 양측 주사로서 전달되는 동물당 200㎕의 전체 용량 용적으로 주사되는 200㎍의 MOG/300㎍의 CFA); 이후 연구 0일의 EAE 유도시 및 다시 48시간 후 연구 2일에 1회 복강내(IP) 주사를 통해 20㎍/kg(대략 400ng/마우스)에서 백일해 독소(PT)에 의한 복강내(IP) 보충적 면역자극에 의해 유도되는 감작 기간으로 이루어진다(Gilgun-Sherki Y. et al., *Neurosciences Research* 47:201-207, 2003). 이후, 동물을 도 10에 도시된 바대로 RNS60 IV 점적에 의해 치료하였다. 사용된 동물은 하란 래버러토리즈 이스라엘 엘디티로부터 얻은 암컷 C57BL/6J 마우스(그룹마다 10마리의 동물; 청소년; 연구 개시 시 8 내지 9주령) 였다.

[0461] 모든 동물을 EAE 유도 전(연구 0일)에 신경학적 반응 및 증상의 징후에 대해 검사하고 이후 35일 관찰 기간에 걸쳐 매일 조사하였다. EAE 반응을 점수 매기고 중증도가 증가하는 순서로 당해 기술에서 인정된 0 내지 15점 스케일에 따라 기록하였다. 임상 범수를 각각의 섹션의 점수를 합하여 결정하였다(예를 들면, 문헌[Weaver et al., *FASEB* 2005; *The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.04-2030fje.](2005년 8월 4일 온라인상에 공개) 참조).

[0462] 결과:

[0463] 도 10는 비히클 대조군(비히클)이 아니라 RNS60이 다발성 경화증(MS)의 당해 기술에서 인정된 마우스 MOG 모델에서 용량 반응 방식으로 임상 점수를 억제하는 데 있어서 실질적으로 효과적이라는 것을 나타낸다. RNS-60의 치료학적 고용량 및 저용량의 매일 투여 둘 다 및 RNS-60의 고용량의 3일마다의 투여(모든 경우에 제1 임상 징후와 함께 시작하는 RNS-60의 투여)는 현저한 임상 점수 감소를 나타낸다(빈 다이아몬드형 = 비히클 대조군; 빈 사각형 = 덱사메타손 양성 대조군; 밝은 "x" = 임상 징후 개시로부터 저용량(0.09㎖의 RNS60)의 매일 투여; 어두운 "x" = 임상 징후 개시로부터 3일마다의 고용량(0.2㎖의 RNS60) 투여; 및 빈 삼각형 = 임상 징후 개시로부터 고용량(0.2㎖의 RNS60) 매일 투여).

[0464] 본원의 상기 실시예의 MBP 모델과 비교하여, 이 마우스 MOG 모델은 MBP 모델이 나타내지 않는 MS의 특징적인 액손 손상을 모방하는 이의 능력에 대해 당해 분야에 공지되어 있고, 더 긴 기간(MBP 모델의 21일과 비교하여 28 내지 30일)에 걸쳐 관찰된 치료학적 효율을 연장시킨다. 추가의 양태에 따르면, 비히클 대조군(비히클)이 아니라 RNS60이 이 마우스 MOG 모델에서 액손 손상을 감소시키는 데 있어서 실질적으로 효과적이다.

[0465] 본 발명의 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 인간 MS의 당해 기술에서 인정된 마우스 모델에서 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다. 본 발명의 추가의 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적 조성물은 고통받는 포유동물(바람직하게는 인간)에서 MS 증상을 경감시키고 예방하는 것을 비롯하여 이를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0466] 다른 추가의 양태에서, 본 발명의 동전기적 조성물은 혈액 뇌 장벽(BBB)을 횡단하고, 따라서 중추 신경계의 염증성 병증을 치료하는 신규한 방법을 제공한다.

[0467] ***실시예 15***

[0468] (*RNS-60은 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석에 의해 CD193(CCR3); CD154(CD40L); CD11B; 및 CD3의 세포 표면 수용체의 발현에 뚜렷한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다*)

[0469] 개관:

[0470] 출원인은 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석을 이용하여 본 발명의 동전기적 유체(RNS-60) 또는 노르말 식염수 대조군 유체와 항온처리된 백혈구에서의 CD193(CCR3); CD154(CD40L); CD11B; 및 CD3의 세포 표면 수용체의 발현의 수치를 비교하였다.

[0471] 방법:

[0472] 피콜-하이파크 분리 PBMC(성분채집술 - 모든 세포)를 RNS60 또는 노르말 식염수(NS)의 30% 용액 중에 대략 1 시간 동안 예비 항온처리하였다;

[0473] PBMC를 24 또는 40시간 동안 2㎍/㎖의 PHA-L로 활성화하였다;

[0474] 세포를 수집하고 차단/염색 완충제로 세척하고, 염색하고 고정하였다;

[0475] 세포를 유세포분석법에 의해 분석하였다.

[0476] 결과:

[0477] CD193(CCR3)과 관련하여, 도 11b에 도시된 바대로, 수용체를 노르말 식염수 대조군에서의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 실질적으로 하향 조절하였다. 이 하향 조절은 MAPK p38(데이터 기재 생략)의 인산화에 영향을 미치고, 이는 결국 이오탁신을 하향 조절하고(예를 들면, 실시예 4 참조), 이는 결국 IL5(데이터 기재 생략)를 하향 조절하고 기관지수축 반응을 변경하는 인자 중 하나인 호산구 수를 또한 변경한다(예를 들면, 실시예 4 참조).

[0478] 난알부민 공격 모델과 관련하여 상기 실시예 4에 기술된 바대로, RNS-60은 노르말 식염수의 효과와 비교할 때

OVA 공격 그룹에서 혈청 이오탁신 수치를 감소시켰다. 따라서, 특정 양태에 따르면, RNS-60은 리간드 이오탁신 및 이의 수용체 CCR3 둘 다를 감소시키는 가능성을 갖는다.

[0479] CD154(CD40L)와 관련하여, 도 12a에 도시된 바대로, 노르말 식염수 중의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 수용체를 하향 조절하였다.

[0480] CD11B와 관련하여, 도 12b에 도시된 바대로, 노르말 식염수 중의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 수용체를 하향 조절하였다.

[0481] CD3과 관련하여, 도 12c에 도시된 바대로, 노르말 식염수 중의 수용체 발현 수치와 비교할 때 RNS-60의 존재 하에 수용체를 하향 조절하였다.

[0482] ***실시예 16***

[0483] (*노르말 식염수(NS)가 아니라 RNS60이 MBP 프라이밍된 T 세포에서 NFκB의 활성화를 약화시킨다*)

[0484] 개관:

[0485] NF-κB 키나아제는 염증 매개 병증 및 질환에서 염증성 반응을 중재하는 것으로 당해 분야에 널리 인식된 키나아제이다.

[0486] 이 실시예는 노르말 식염수(NS)가 아니라 RNS60이 MBP 프라이밍된 T 세포에서 NFκB의 활성화를 약화시킨다는 것을 나타낸다. 따라서, 특정 양태에 따르면, 본 발명의 동전기적으로 생성된 유체는 당뇨병 및 관련 대사 장애, 인슐린 내성, 신경변성 질환(예를 들면, M.S., 파킨슨병, 알츠하이머병 등), 천식, 낭포성 섬유증, 혈관/관상동맥 질환, 망막 및/또는 황반 변성, 소화 장애(예를 들면, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 크론병 등)(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 염증 및 염증 매개 병증 및 질환을 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0487] 방법:

[0488] 도 13a 및 도 13b에 도시된 실험의 경우, MBP 면역화 마우스로부터 분리된 T 세포를 MBP로 다시 프라이밍하고, 24시간 후, 세포에 상이한 농도의 RNS60 및 NS를 주었다. 치료 2시간 후, NF-κB의 DNA 결합 활성을 전기영동 이동도 이동 검정(EMSA)에 의해 핵 추출물에서 모니터링하였다.

[0489] 도 13c에 도시된 실험의 경우, MBP 면역화 마우스로부터 분리된 T 세포를 NFκB 의존 리포터 구성체인 PBIIX-Luc로 형질감염시킨 후 MBP로 다시 프라이밍하였다. MBP 프라이밍 24시간 후, 세포를 상이한 농도의 RNS60 및 NS로 2시간 동안 치료한 후, 전체 세포 추출물에서 루시퍼라제 검정 키트(프로메가(Promega))에 의해 루시퍼라제 활성을 검정하였다. 다른 경우에, MBP 프라이밍된 T 세포를 또한 30nM PMA로 1시간 동안 자극하였다. 이 경우에, PMA를 1시간 후 첨가하여 RNS60 및 NS로 예비 치료하였다. 결과는 상이한 3회 실험의 평균 + SD이다.

[0490] 결과:

[0491] 도 13a 내지 도 13c는 노르말 식염수(NS)가 아니라 RNS60이 MBP 프라이밍된 T 세포에서 NF-κB의 활성화를 약화시킨다는 것을 나타낸다. 구체적으로, 도 13a 및 도 13b는 NS(도 13a 및 도 13b의 가장 오른쪽 레인 참조)가 아니라 RNS60(도 13a 및 도 13b의 중간 3개의 레인 참조)이 MBP 프라이밍된 T 세포에서 용량 반응 방식으로 NF-κB의 활성화를 약화시킨다는 것을 나타낸다.

[0492] 마찬가지로, 도 13c의 막대 그래프는 NS(도 13a 및 도 13b의 제1 막대 참조)가 아니라 RNS60(도 13a 및 도 13b의 제2, 제3 및 제4 막대 참조)이 MBP 프라이밍된 T 세포에서 NF-κB의 활성화를 약화시키고, 그러므로 또한 전체 세포 추출물에서 형질감염된 NF-κB 의존 리포터 구성체(PBIIX-Luc)로부터의 루시퍼라제 활성을 용량 반응 방식으로 약화시킨다는 것을 나타낸다.

[0493] 따라서, 특정 양태에 따르면, 개시된 동전기적으로 생성된 유체는 당뇨병 및 관련 대사 장애, 인슐린 내성, 신경변성 질환(예를 들면, M.S., 파킨슨병, 알츠하이머병 등), 천식, 낭포성 섬유증, 혈관/관상동맥 질환, 망막 및/또는 황반 변성, 소화 장애(예를 들면, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 크론병 등)(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 염증 및 염증 매개 병증 및 질환을 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0494] ***실시예 17***

[0495] (*노르말 식염수(NS)가 아니라 RNS60이 MS의 3개의 EAE 모델에서 임상 점수를 감소시키는 데 효과적이고, MBP 프*

라이밍된 T 세포의 뇌염 유발성을 억제(세포의 생체외 치료 포함)하는 데 효과적이다)

[0496] 개관:

[0497] 다발성 경화증(MS)은 중추 신경계의 만성 자가면역 탈수초화 질환이다. 기존의 치료는 제한되고 상당한 부작용을 제시한다. RNS60이 다수의 실험실내 및 생체내 모델에서 이례적으로 저독성인 광범위 항염증성 효율을 나타내므로, 본 발명자들은 실험 알레르기 뇌염 유발성(EAE) 모델에서 이의 효율을 시험하였다.

[0498] 물질 및 방법:

[0499] 본원에 기술된 바와 같은 높은 산소 압력 하에 노르말 식염수를 테일러-쿠에트-포아죄유(Taylor-Couette-Poiseuille)(TCP) 유동 처리하여 RNS60을 생성하였다. a) 래트에서의 미엘린 염기성 단백질(MBP) 유도 EAE, b) 마우스에서의 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질(MOG) 유도 만성 EAE 및 c) 마우스에서 입양 T 세포 전달 유도 재발 경감 EAE에서 정맥내/복강내 RNS60 치료를 시험하였다.

[0500] 결과:

[0501] RNS60의 치료학적 용량은 모든 3개 모델에서 임상 점수를 감소시키는 데 효과적였다. MOG 유도 모델에서, RNS60 치료학적 치료는, 임상 증상의 제1 징후에 시작하여, 대조군과 비교할 때 제1 임상 증상 개시 후 연구 9일 내지 12일 및 18일 내지 23일에 임상 점수를 유의적으로 감소시키고(n = 10/그룹, P<.01), 전염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-17의 순환 수치를 감소시켰다. 유사하게, RNS60은 전달 13 내지 40일 후 암컷 SJL/J 마우스에서 입양 전달된 재발 경감 EAE의 임상 증상을 약화시켰다(n = 5/그룹, P<.01).

[0502] 구체적으로, 도 14a는 RNS60이 마우스에서 MOG 유도 EAE의 임상 증상을 억제한다는 것을 나타낸다. C57BL/6J 균주의 암컷 마우스를 MOG 및 완전 프로인트 부형제의 피하 주사 0일에 감작시킨 후, EAE 유도시 및 다시 한번 48시간 후 운반된 백일해 독소(PT)로 복강내(IP) 보충적 면역자극하였다. 동물은 MOG 투여 후 연구 8일 내지 10일에 EAE 관련 임상 징후를 나타내기 시작했다. RNS60에 의한 치료학적 치료(마우스당 매일 0.2㎖ 투여)는 제1 임상 증상 개시 후 연구 9일 내지 12일 및 18일 내지 23일에 노르말 식염수 대조군과 비교하여 질환의 임상 점수를 유의적으로 감소시켰다.

[0503] 도 14b는 RNS60 치료가 IL6 및 IL17의 전신 수치를 감소시킨다는 것을 나타낸다. 모든 동물로부터 얻은 혈액 샘플(그룹마다 n = 10)을 35일에 연구 종료시 수집하였다. 혈액을 헤파린을 넣은 바이알에 수집하고, 3000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 혈장 상청액을 제거하고, 각각 표시된 에펜도르프 관으로 옮기고, -80℃에서 저장하였다. 마우스 사이토카인 멀티플렉스 키트를 사용하여 루미넥스 기술에 의해 샘플을 분석하였다.

[0504] 도 15는 마우스에서 입양 전달된 재발 경감 EAE의 임상 증상에 대한 RNS60의 용량 의존 효과를 나타낸다. MBP 프라이밍된 T 세포의 입양 전달에 의해 암컷 SJL/J 마우스에서 EAE를 유도하였다. 0dpt로부터, 마우스를 i.p. 주사(다음날 1 내지 8dpt; 매일 9 내지 16dpt; 그 다음날 17dpt)를 통해 상이한 용량의 RNS60 또는 NS로 치료하였다. 각각의 그룹에 5마리의 마우스가 포함되었다. 마우스를 54dpt까지 임상 증상에 대해 매일 검사하였다.

[0505] 도 16a 및 도 16b는 RNS60이 마우스에서의 입양 전달된 재발 경감 EAE/MBP 프라이밍된 T 세포의 입양 전달에 의해 암컷 SJL/J 마우스에서 유도된 EAE의 진행을 억제한다는 것을 나타낸다. 이후, (A) 마우스를 급성기(8dpt)(매일 8 내지 16dpt; 그 다음날 17dpt) 개시로부터 i.p. 주사를 통해 RNS60 또는 NS로 치료하였다. 각각의 그룹에 5마리의 마우스가 포함되었다. 45dpt까지 임상 증상에 대해 매일 검사하였다. (B) 대안적으로, 마우스를 재발 경감기(22dpt)개시로부터 i.p. 주사(다음날)를 통해 RNS60 또는 NS로 치료하였다. 각각의 그룹에 5마리의 마우스가 포함되었다. 54dpt까지 임상 증상에 대해 매일 검사하였다.

[0506] 도 17은 RNS60이 MBP 프라이밍된 T 세포의 뇌염 유발성을 억제한다는 것을 나타낸다. 암컷 SJL/J 도너 마우스로부터 분리된 MBP 프라이밍된 T 세포를 4일 동안 MBP 재프라이밍 동안 RNS60 또는 NS로 치료한 후, MBP 프라이밍된 T 세포를 미접촉 암컷 SJL/J 마우스로 꼬리 정맥에 주사하였다. 각각의 그룹에 5마리의 마우스가 포함되었다. 54dpt까지 임상 증상에 대해 매일 검사하였다.

[0507] 특정 양태에 따르면, 따라서, RNS60은 (1) EAE의 여러 모델에서 임상 증상의 중증도를 감소시키고; (2) 전염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-17의 혈장 수치를 감소시키고; (3) 재발 경감 EAE의 입양 전달 모델에서 유도 8일 또는 22일 후 주사할 때 효과적이고; (4) MBP 프라이밍된 T 세포의 뇌염 유발성을 억제(세포(예를 들면, 프라이밍된 T 세포)의 *생체외* 치료 포함)하였다.

[0508] ***실시예 18***

[0509] (*CD4에 대한 표면 염색과 함께 T-bet, GATA3, IL-4, RORγT, IL-17 및 Foxp3에 대한 MBP 면역화 마우스로부터 분리된 말초 림프절 세포(LNC)의 세포내 염색은 노르말 식염수(NS)가 아니라 RNS60이 IL-4 및 IL-10의 발현 증가와 함께 Th1에서 Th2로의 이동을 증가시키고, T_H17 마커를 발현하는 세포수를 증가시키고, Treg 세포수를 증가시키는 데 효과적이라는 것을 나타낸다*)

[0510] 개관:

[0511] 본원에 상기 기재된 바대로, 전염증성(예를 들면, Th1 및 Th17) 사이토카인의 분비를 비롯한 염증성 반응을 생성시키는 자가반응 T 세포 반응을 통해 MS 에피소드 동안 수초 및 액손에 더 많은 손상이 일어난다고 생각된다(Prat et al., *J. Rehabil. Res. Dev.* 39:187-199 (2002); Hemmer et al., *Nat. Rev. Neurosci.* 3:291-301 (2002)). 더욱이, 본원에 상기 기재된 바대로, 염증성 반응 및 면역 자가 관용의 조절 장애는 MS에서 자가반응 면역 반응에서 중요한 요소로 생각되고, 조절 T(T_{REG}) 세포는 CNS 자가면역 염증의 발병 시나리오에서 결정적 참가자로 보인다. T_{REG} 세포의 표적화된 고갈은 마우스에서 자발적인 자가면역 질환을 발생시키는 반면, T_{REG} 세포 기능 증강은 MS의 동물 모델인 실험적 자가면역 뇌척수염의 발생을 방지하거나 이의 변이체를 경감시킬 수 있다.

[0512] 방법:

[0513] 이 실시예에서, MBP 면역화 마우스로부터 분리된 말초 림프절 세포(LNC)를 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 부재 또는 존재 하에 MBP로 재자극한 후, CD4에 대한 표면 염색과 함께 T-bet, GATA3, IL-4, RORγT, IL-17 및 Foxp3을 세포내 염색한 후, FACS 분석을 수행하였다. ELISA에 의해 IFN-γ, IL-10 및 IL-17에 대해 상청액을 평가하였다.

[0514] 간단히 말하면, 유동 염색 완충제 중에 현탁된 말초 림프절 세포(LNC)를 적절히 희석된 CD4에 대한 FITC 라벨 표지 Ab와 4℃에서 30분 동안 항온처리하고, 세척하고, 고정 및 투과 용액 중에 재현탁시켰다. 암소에서 30분 동안 항온처리한 후, 세포를 세척하고, 투과 완충제 중의 시험 Fc 블록(항마우스 CD16/32)으로 차단하고, 이후 T-bet, GATA3, RORγT, IL-17 또는 Foxp3에 대한 적절히 희석된 PE 표지 Ab와 암소에서 4℃에서 항온처리하였다. 일 실험(도 20)에서, IL-4에 대한 FITC 표지 Ab함께 PE 표지 항-CD4 Ab를 사용하였다. 항온처리 후, 세포 현탁액을 원심분리하고, 3회 세척하고, 적절한 용적의 유동 염색 완충제 중에 재현탁하였다. 이후, FACS(캘리포니아주 산호세에 소재하는 비디 바이오사이언시즈)를 통해 세포를 분석하였다. 형태학적 특징에 기초하여 세포를 개폐하였다. FACS 분석에 아폽토시스 및 괴사 세포는 인정되지 않았다.

[0515] 결과:

[0516] 도 18a 및 도 18b는, 특정한 예시적 실시양태에 따르면, RNS60에 의한 Th1 세포의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된, 말초 림프절 세포(본원에서 이하 "LNC")를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 재자극하였다. 도 18a에서, 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 PE 항-T-bet 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 상이한 3회 실험의 평균±SD이다. 도 18b에서, ELISA에 의해 IFN-γ에 대해 상청액을 평가하였다. 대조군에 대해 $^{a}p < 0.001$; MBP에 대해 $^{b}p < 0.001$.

[0517] 도 19a 및 도 19b는, 특정한 예시적 실시양태에 따르면, RNS60에 의한 Th2 세포의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 재자극하였다. 도 19a에서, 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-GATA3 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 상이한 3회 실험의 평균±SD이다. 도 19b에서, ELISA에 의해 IL-10에 대해 상청액을 평가하였다. 대조군에 대해 $^{a}p < 0.001$; MBP에 대해 $^{b}p < 0.001$.

[0518] 도 20은, 특정한 예시적 실시양태에 따르면, IL-4의 세포내 발현에 대한 RNS60의 효과를 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 재자극하였다. 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-CD4 및 FITC 접합 항-IL-4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 상이한 3회 실험의 평균±SD이다.

[0519] 도 21a 및 도 21b는, 특정한 예시적 실시양태에 따르면, RNS60에 의한 Th17 세포의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로

재자극하였다. 도 21a에서, 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-RORγT 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 상이한 3회 실험의 평균±SD이다. 도 21b에서, ELISA에 의해 IL-17에 대해 상청액을 평가하였다. 대조군에 대해 $^{a}p < 0.001$; MBP에 대해 $^{b}p < 0.001$.

[0520] 도 22는, 특정한 예시적 실시양태에 따르면, IL-17의 세포내 발현에 대한 RNS60의 효과를 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 재자극하였다. 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-IL-17 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 상이한 3회 실험의 평균±SD이다.

[0521] 도 23은, 특정한 예시적 실시양태에 따르면, RNS60에 의한 Treg의 조절을 나타낸다. MBP 면역화 마우스로부터 분리된 LNC를 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 재자극하였다. 자극 72시간 후, T 세포를 적절히 희석된 PE 접합 항-FoxP3 및 FITC 접합 항-CD4 Ab와 항온처리한 후, FACS 분석을 수행하였다. 다양한 사분면의 세포의 백분율이 기재되어 있다. 데이터는 상이한 3회 실험의 평균±SD이다.

[0522] *요약하면*, 이 실시예에서, MBP 면역화 마우스로부터 분리되고 CD4에 대한 표면 염색과 함께 T-bet, GATA3, IL-4, RORγT, IL-17 및 Foxp3에 대해 각각 RNS60(10% v/v) 및 NS(10% v/v)의 존재 또는 부재 하에 MBP로 재자극된 말초 림프절 세포(LNC)의 세포내 염색은, 노르말 식염수(NS)가 아니라 RNS60이 IL-4 및 IL-10 발현 증가 및 IFN-γ 및 IL-17 발현 감소와 함께 TH2 사이토카인으로의 TH1 사이토카인의 이동을 유도하고(도 18a, 도 18b, 19a, 도 19b, 도 20 및 도 21b), T_h17 마커를 발현하는 세포수를 감소시키고(도 21a, 도 21b 및 22), Treg 세포수(예를 들면, 천연 T_{REG} 세포(nT_{REG}))(도 23)를 증가시키는 데 효과적이라는 것을 나타낸ㅈ다.

[0523] 본원에 상기 기술된 바대로, T 보조 17(T_H17) 세포는 전염증성 사이토카인 IL-17A(이하 IL-17)을 생성시켜 염증 조직에 대해 호중구를 동원하고 케모카인을 생성시키는 CD4+ 작동자 T 세포의 명확한 계통으로 확인되었고, 마우스에서, TH17 세포는 확인되지 않은 TH1 반응의 이전의 원인인 실험적 자가면역 질환의 발병에 관여하는 것으로 나타났다(Weaver et al., *Immunity* 24:677-688, 2006). 또한, 자가면역 질환을 앓고 있는 환자의 평가는 인간 자가면역 장애에서 T_H17 세포의 관여를 제시한다. RORγt는 T_H17 세포에 대한 계통 특이적 전사 인자로서 확인되었다. 더욱이, 최근 연구는 FOXP3+Treg와 TH17 계통 사이의 밀접한 관계를 나타내고, 최근에, 발모리 등(*PNAS* 107:19402-19407, 2010(그 전문이 참조문헌으로 본원에 포함됨))은 인간 순환 미접촉 CD4+ T 세포로부터의 RORγt^{+} T_H17 세포 분화가 (주로 NTreg로부터의) 미접촉 FOXP3^{+}Treg로부터 주로 얻어지고, NTreg로부터의 RORγt^{+} T_H17 세포 분극이 IL-2 및 계통 특이적 분화/분극 인자의 존재 하의 자극 후 최적으로 일어난다(예를 들면, IL-2, IL-1β, IL-23 및 TGF-β의 존재 하에 최적 유도)는 것을 밝혔다. T_H17 계통 특이적 전사 인자 RORγt(이의 발현은 IL-17 분비에 필수적임)와 Treg 특이적 전사 인자 FOXP3(RORγt 활성을 길항함) 사이의 균형이 TH17 세포 분극에 영향을 미친다는 것이 제시되었다. 발모리 등(상기 참조)은 NTreg로부터 분화한 T_H17 세포가 FOXP3- 또는 FOXP3low이고, RORγt의 높은 수치로 발현되고, CCR6^{+} 발현 세포에서 매우 농후하다는 것을 밝혔다(상기 참조).

[0524] 특정 양태에 따르면, 따라서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 염증성 신경변성 병증 또는 질환에 관여하는 작동자 T 세포(예를 들면, T_h17 세포)를 억제 및/또는 조절 및/또는 분극(또는 탈분극)하면서, T_{REG} 세포수/기능을 증대시키고, 염증성 사이토카인 프로필을 조절하여(예를 들면, TH2 사이토카인으로의 TH1 사이토카인의 이동) 염증성 신경변성 병증 또는 질환을 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0525] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 Treg 세포(예를 들면, NTreg 세포)와 RORγt^{+} T_H17 세포 사이의 균형을 유지하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0526] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서, RORγt^{+} T_H17 세포의 양 및/또는 기능 및/또는 활성에 비해, Treg 세포(예를 들면, NTreg 세포) 및/또는 Treg 세포 기능 및/또는 활성의 양을 증가시키기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0527] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 RORγt^{+} T_H17 세포로의 Treg 세포(예를 들면, NTreg 세포)의 분극을 조절(예를 들면, 감소 또는 예방)하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0528] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 RORγt^{+} T_H17 세포 및/또는 기능 및/또는 활성을 억제하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0529] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 RORγt^{+} T_H17 세포를 Treg 세포(예를 들면, NTreg 세포 및/또는 이의 기능 및/또는 활성)로 전환(탈분극)하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0530] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 Treg 세포(예를 들면, NTreg 세포)와 RORγt^{+} T_H17 세포 사이의 균형을 정상화하고 개선함으로써 M.S.를 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 실질적인 유용성을 갖는다. 특정 양태에서, 이러한 치료는 상기 환자에 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)를 투여하는 것을 포함한다. 특정 양태에서, 이러한 치료는 염증성 신경변성 병증 또는 질환 또는 그의 증상을 치료하기 위한 세포 기반 치료 또는 세포 기반 면역허용 치료의 일부로서 세포(예를 들면, 환자 또는 적합한 도너로부터의 세포)를 *생체외* 접촉시키는 것을 포함하고, 치료학적 유효량의 *생체외* 접촉된 세포를 이를 필요로 하는 피험체에게 도입하고, 피험체의 치료가 제공된다.

[0531] 특정 양태에서, 동전기적으로 변경된 유체(예를 들면, RNS-60)는 *생체내*, *생체외*, *실험실내* 또는 이들의 조합 중 어느 하나에서 Treg 세포(예를 들면, NTreg 세포)와 RORγt^{+} T_H17 세포 사이의 균형을 확립하고 유지시키기 위한 실질적인 유용성을 갖는다.

[0532] *참조문헌에 의한 포함*. 본 명세서에 인용되고/되거나 출원 데이터 시트에 수록된 모든 상기 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외래 특허, 외래 특허 출원 및 비특허 공보는 그 전문이 본원에 참조문헌으로 포함된다.

[0533] 본원의 도면 및 상세한 설명이 제한 방식보다는 예시 방식인 것으로 고려되고, 본 발명을 개시된 특정 형태 및 예로 제한하도록 의도되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 반대로, 본 발명은 특허청구범위에 의해 정의되는 것처럼 본 발명의 정신 및 범위로부터 벗어남이 없이 당업자에게 명확한 임의의 추가의 변경, 변형, 재배치, 치환, 대안, 설계 선택 및 실시양태를 포함한다. 따라서, 하기 특허청구범위가 모든 이러한 추가의 변경, 변형, 재배치, 치환, 대안, 설계 선택 및 실시양태를 포함하도록 해석되는 것이 의도된다.

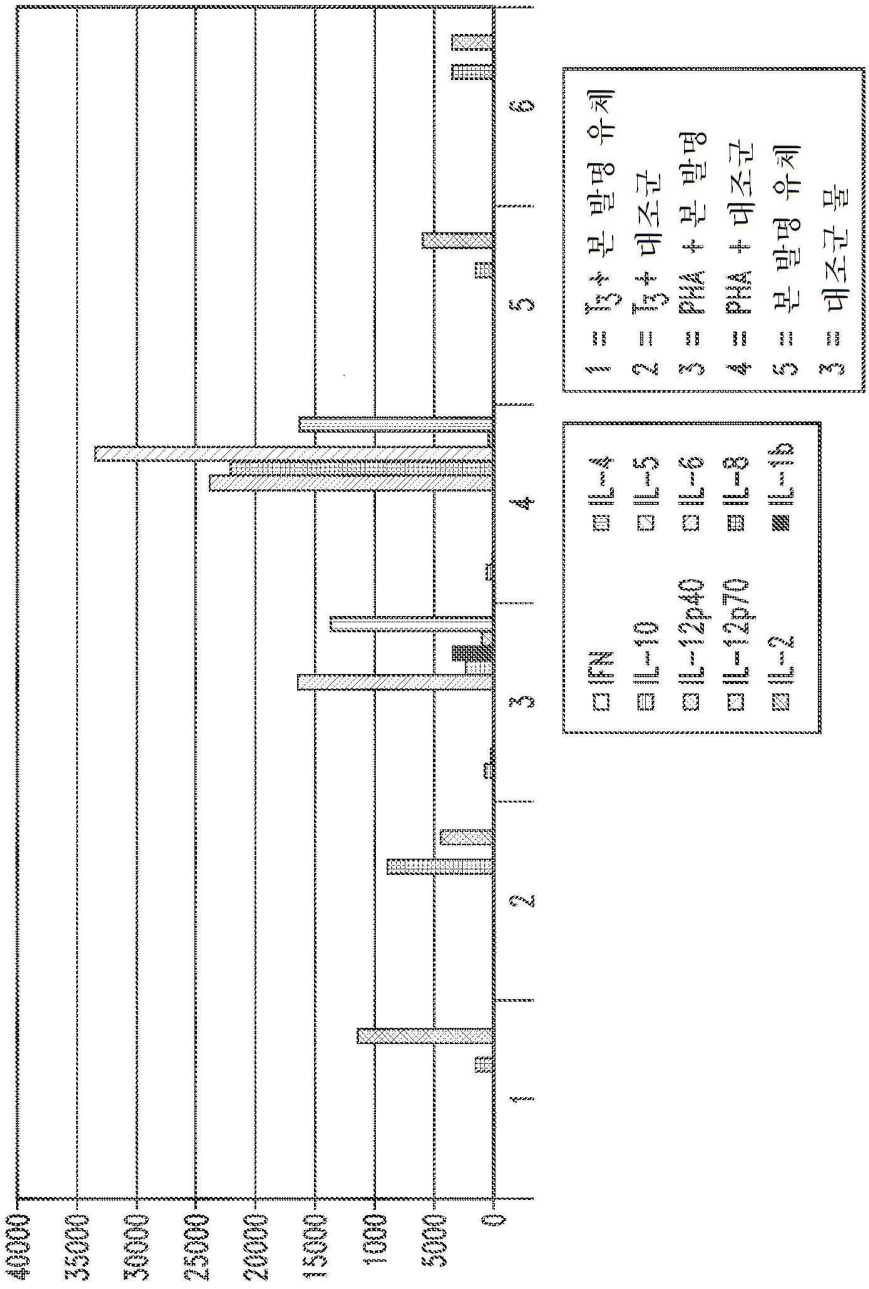
[0534] 상기 상세한 실시양태는 상이한 다른 구성성분 내에 포함되거나 이와 연결된 상이한 구성성분을 기술한다. 이러한 상세한 구성은 단지 예시이고, 사실 동일한 기능을 성취하는 많은 다른 구성이 실행될 수 있는 것으로 이해된다. 개념상, 동일한 기능을 성취하기 위한 성분의 임의의 배치가 효과적으로 "연관"되어 원하는 기능이 성취된다. 그러므로, 특정 기능을 성취하기 위해 합해진 본원의 임의의 2개의 성분은 서로 "연관"되는 것으로 보일 수 있어서, 구성 또는 중간 성분과 관련 없이 원하는 기능이 성취된다. 마찬가지로, 이렇게 연관된 임의의 2개의 성분이 또한 원하는 기능이 성취되도록 서로 "작동적으로 연결되거나", "작동적으로 커플링"된 것으로 보일 수 있다.

[0535] 본 발명의 특정 실시양태가 도시되고 기재되어 있지만, 본원의 교시에 기초하여, 본 발명 및 이의 더 넓은 양태로부터 벗어나지 않고 변경 및 변형할 수 있고, 따라서 특허청구범위가 본 발명의 진정한 정신 및 범위 내에 있는 모든 이러한 변경 및 변형을 이의 범위 내에 포함하는 것을 당업자는 명확히 알 것이다. 더구나, 본 발명은 특허청구범위에 의해서만 한정되는 것으로 이해된다. 당업자는 일반적으로 본원, 특히 특허청구범위(예를 들면, 특허청구범위의 대상)에 사용된 용어가 일반적으로 "개방" 용어로 해석된다(예를 들면, 용어 "포함하는"은 "포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다"로 해석되어야 하고, 용어 "갖는"은 "적어도 갖는"으로 해석되어야 하고, 용어 "포함한다"는 "포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다"로 해석되어야 하며, 기타도 그러하다)는 것을 이해할 것이다. 당업자는 도입된 청구항 인용의 특정 수가 의도되는 경우, 이러한 의도는 청구항에서 명확히 인용되고, 이러한 인용 부재시 이러한 의도가 존재하지 않는다는 것을 추가로 이해할 것이다. 예를 들면, 이해를 돕기 위해, 하기 특허청구범위는 청구항 인용을 도입하기 위해 "적어도 하나" 및 "하나 이상"이라는 도입 구문의 사용을 포함할 수 있다. 그러나, 이러한 구문의 사용은, 동일한 청구항이 "하나 이상" 또는 "적어도 하나" 및 "단

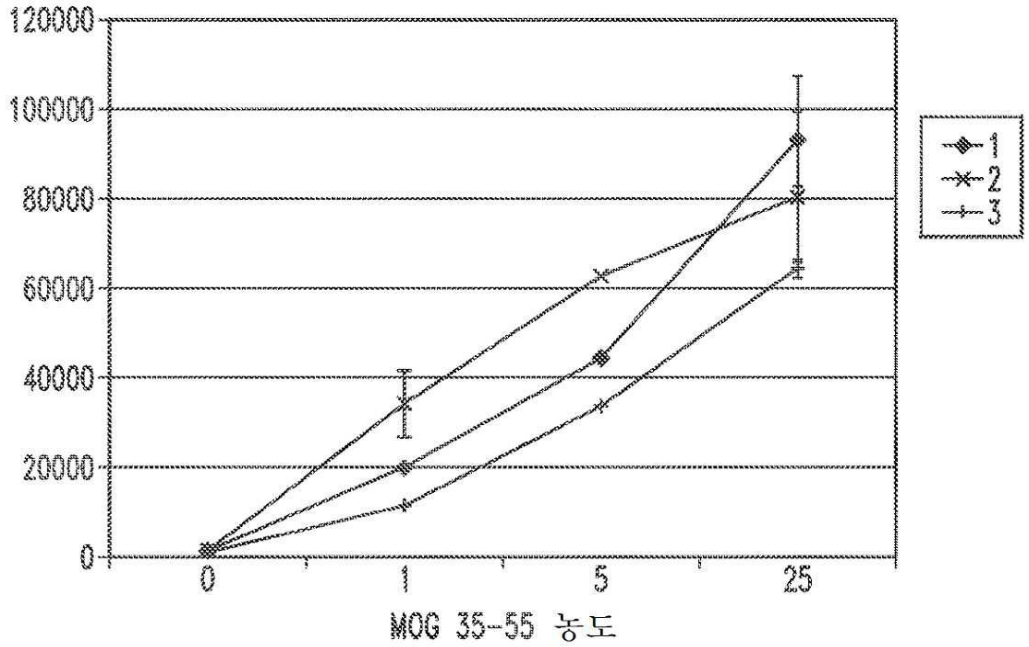
수" 형태의 표현의 도입 구문을 포함할 때에도, 그 단수 형태에 의한 청구항 인용의 도입이 오직 하나의 이러한 인용을 포함하는 발명에 대한 이러한 도입된 청구항 인용을 포함하는 임의의 특정한 청구항을 제한한다는 것을 의미하도록 해석되어서는 안 된다(예를 들면, "단수" 형태는 통상적으로 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 해석되어야 한다); 동일사항이 청구항 인용을 도입하기 위해 사용된 '상기'의 사용에도 적용 유지된다. 또한, 도입된 특정 청구항 인용수가 명확히 기재되어 있더라도, 당업자는 이러한 인용이 통상적으로 적어도 인용된 수를 의미하는 것으로 해석되어야 한다는 것을 인식할 것이다(예를 들면, "2개의 인용"의 기본적인 인용은 다른 변형 없이 통상적으로 적어도 2개의 인용 또는 *2개 이상*의 인용을 의미한다). 따라서, 본 발명은 특허청구범위에 의해서만 제한된다.

도면

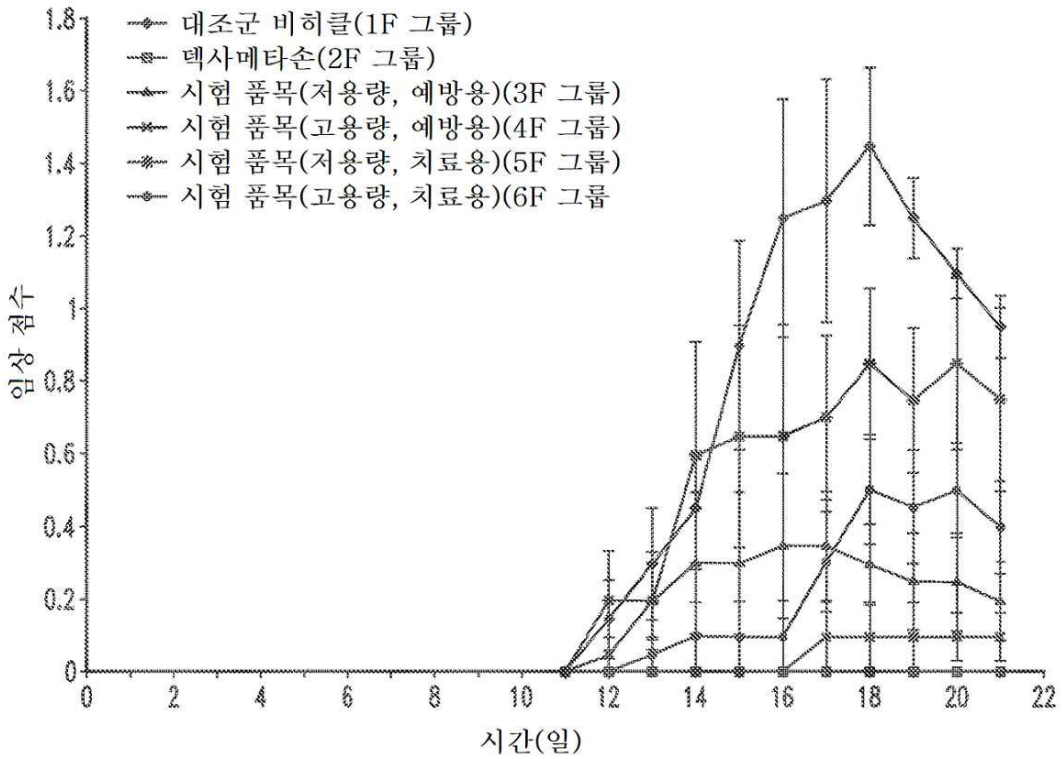
도면1



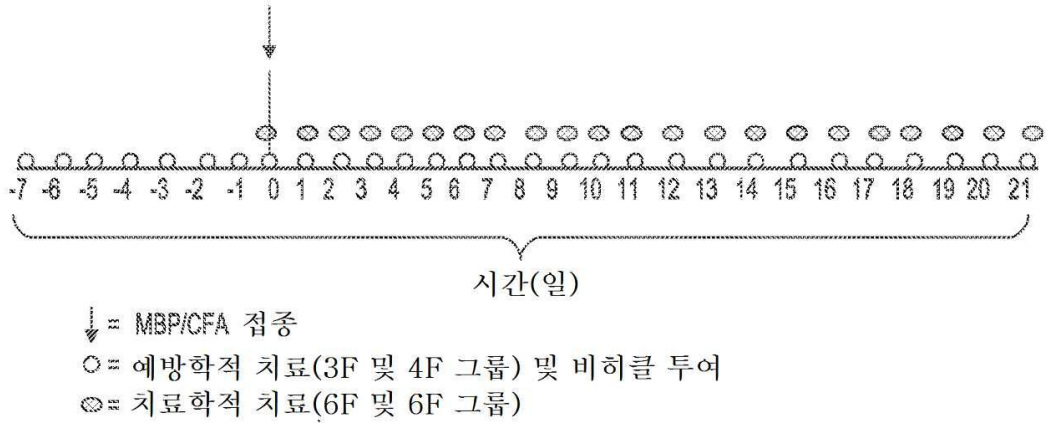
도면2


120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
1
5
25
MOG 35-55 농도
1
2
3

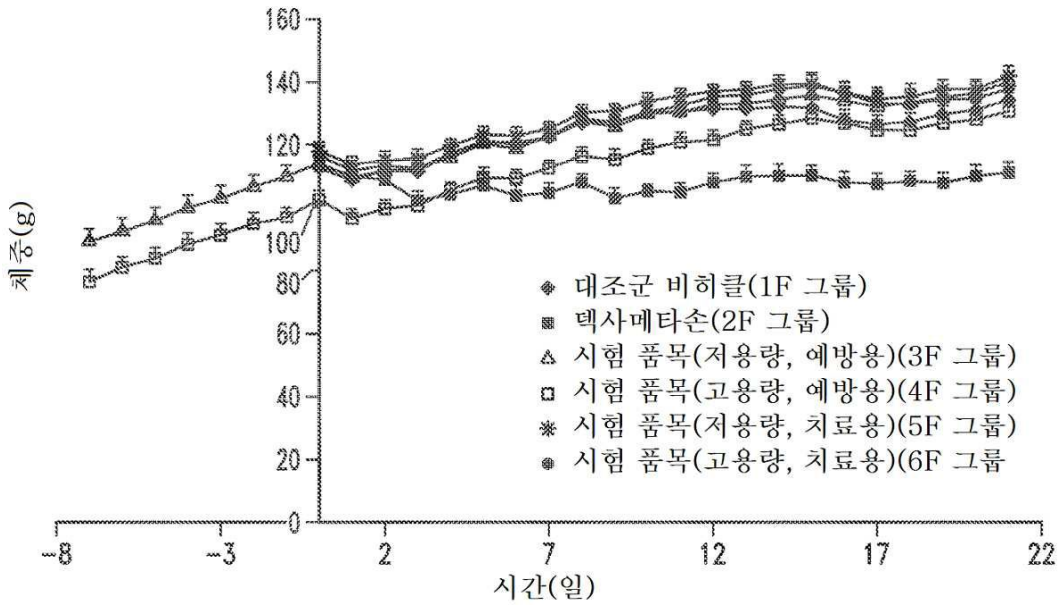
도면3


대조군 비히클(1F 그룹)
덱사메타손(2F 그룹)
시험 품목(저용량, 예방용)(3F 그룹)
시험 품목(고용량, 예방용)(4F 그룹)
시험 품목(저용량, 치료용)(5F 그룹)
시험 품목(고용량, 치료용)(6F 그룹
임상 점수
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
시간(일)

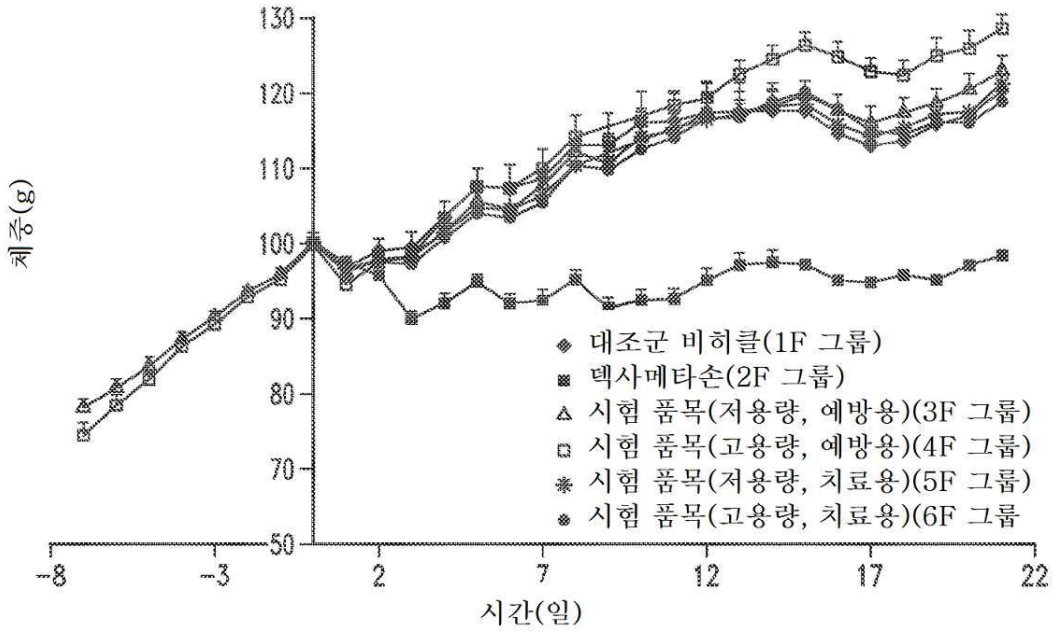
도면4


-7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
시간(일)
= MBP/CFA 접종
= 예방학적 치료(3F 및 4F 그룹) 및 비히클 투여
= 치료학적 치료(6F 및 6F 그룹)

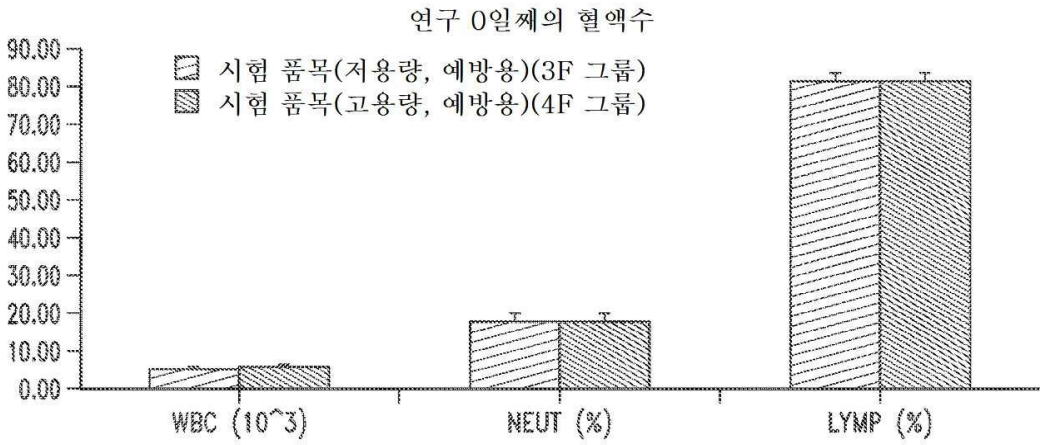
도면5a


체중(g)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-8
-3
2
7
12
17
22
시간(일)
대조군 비히클(1F 그룹)
덱사메타손(2F 그룹)
시험 품목(저용량, 예방용)(3F 그룹)
시험 품목(고용량, 예방용)(4F 그룹)
시험 품목(저용량, 치료용)(5F 그룹)
시험 품목(고용량, 치료용)(6F 그룹

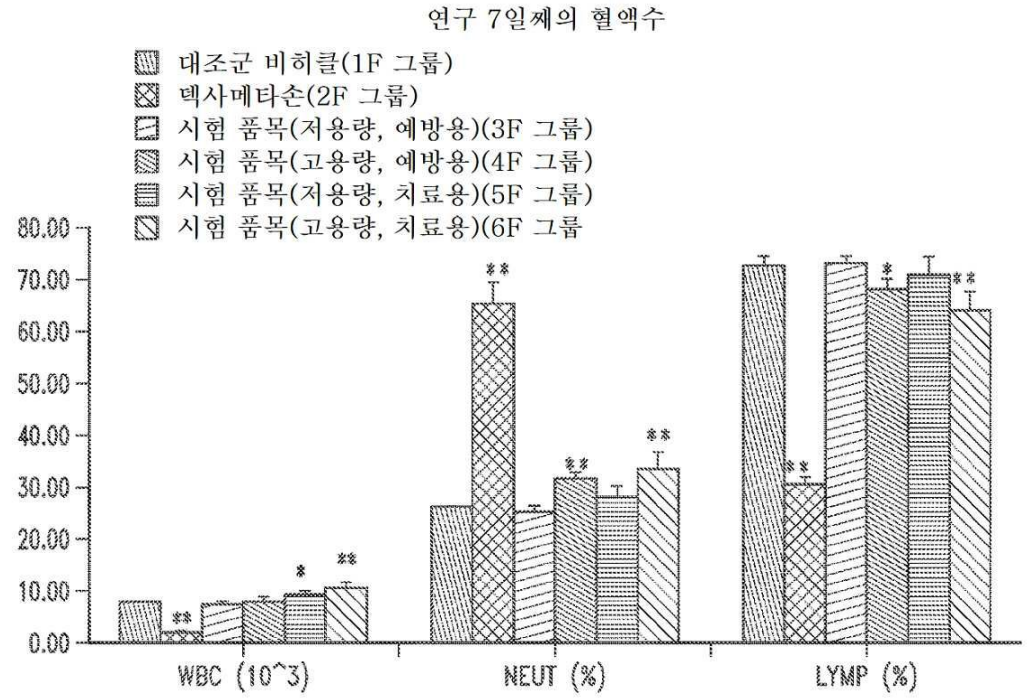
도면5b


체중(g)
130
120
110
100
90
80
70
50
-8
-3
2
7
12
17
22
시간(일)
대조군 비히클(1F 그룹)
덱사메타손(2F 그룹)
시험 품목(저용량, 예방용)(3F 그룹)
시험 품목(고용량, 예방용)(4F 그룹)
시험 품목(저용량, 치료용)(5F 그룹)
시험 품목(고용량, 치료용)(6F 그룹

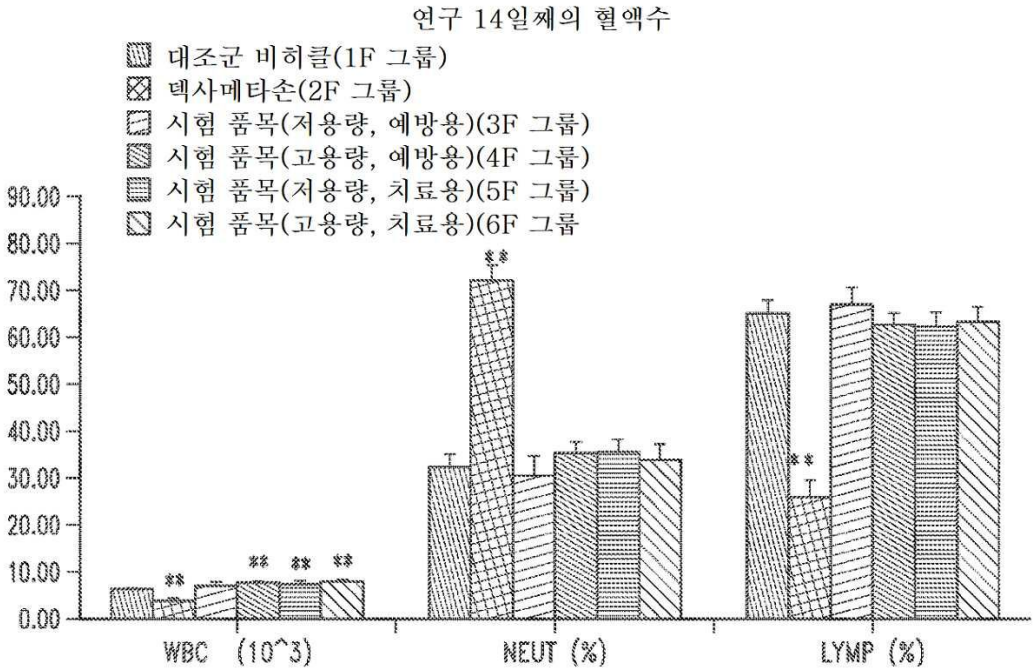
도면6a


연구 0일째의 혈액수
시험 품목(저용량, 예방용)(3F 그룹)
시험 품목(고용량, 예방용)(4F 그룹)
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
WBC (10^3)
NEUT (%)
LYMP (%)

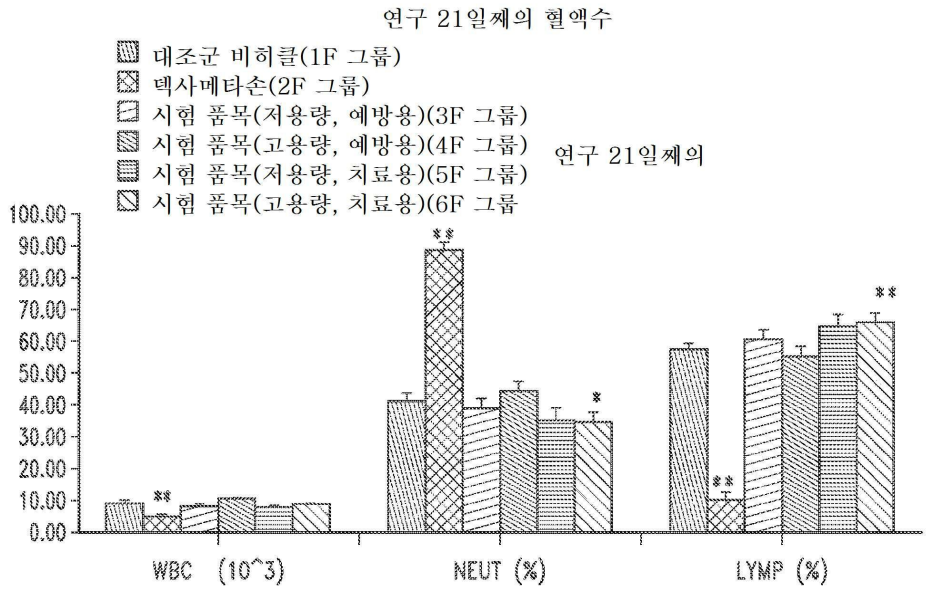
도면6b


연구 7일째의 혈액수
대조군 비히클(1F 그룹)
덱사메타손(2F 그룹)
시험 품목(저용량, 예방용)(3F 그룹)
시험 품목(고용량, 예방용)(4F 그룹)
시험 품목(저용량, 치료용)(5F 그룹)
시험 품목(고용량, 치료용)(6F 그룹
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
WBC (10^3)
NEUT (%)
LYMP (%)

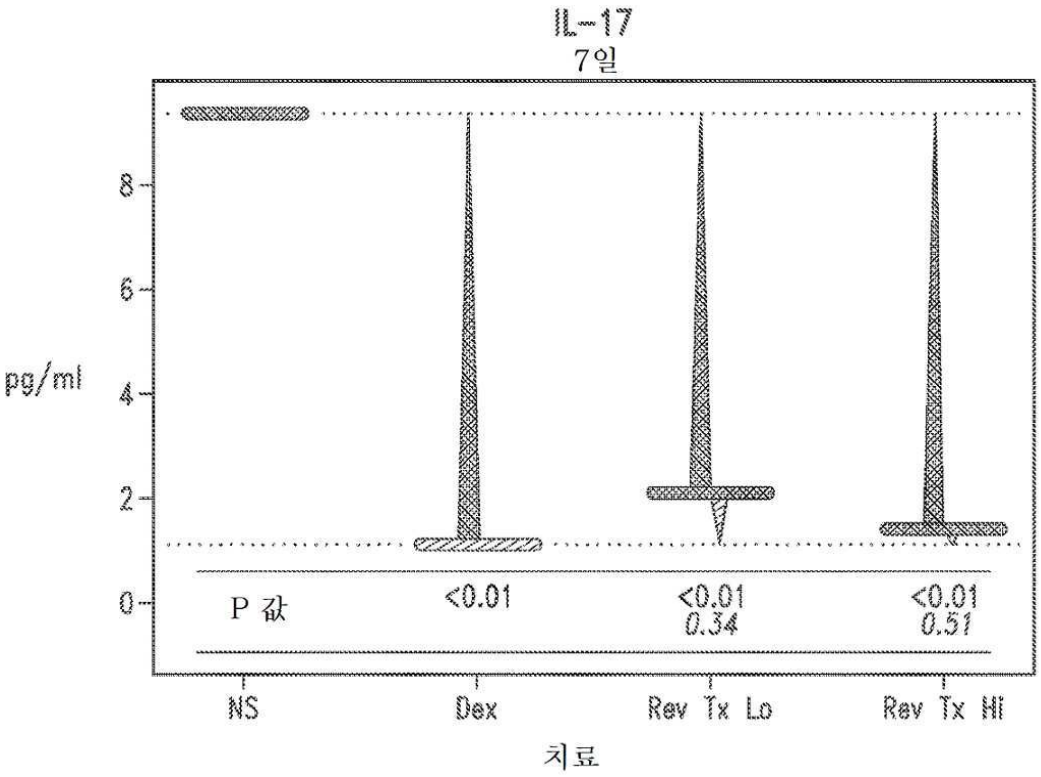
도면6c


연구 14일째의 혈액수
대조군 비히클(1F 그룹)
덱사메타손(2F 그룹)
시험 품목(저용량, 예방용)(3F 그룹)
시험 품목(고용량, 예방용)(4F 그룹)
시험 품목(저용량, 치료용)(5F 그룹)
시험 품목(고용량, 치료용)(6F 그룹
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
WBC (10^3)
NEUT (%)
LYMP (%)

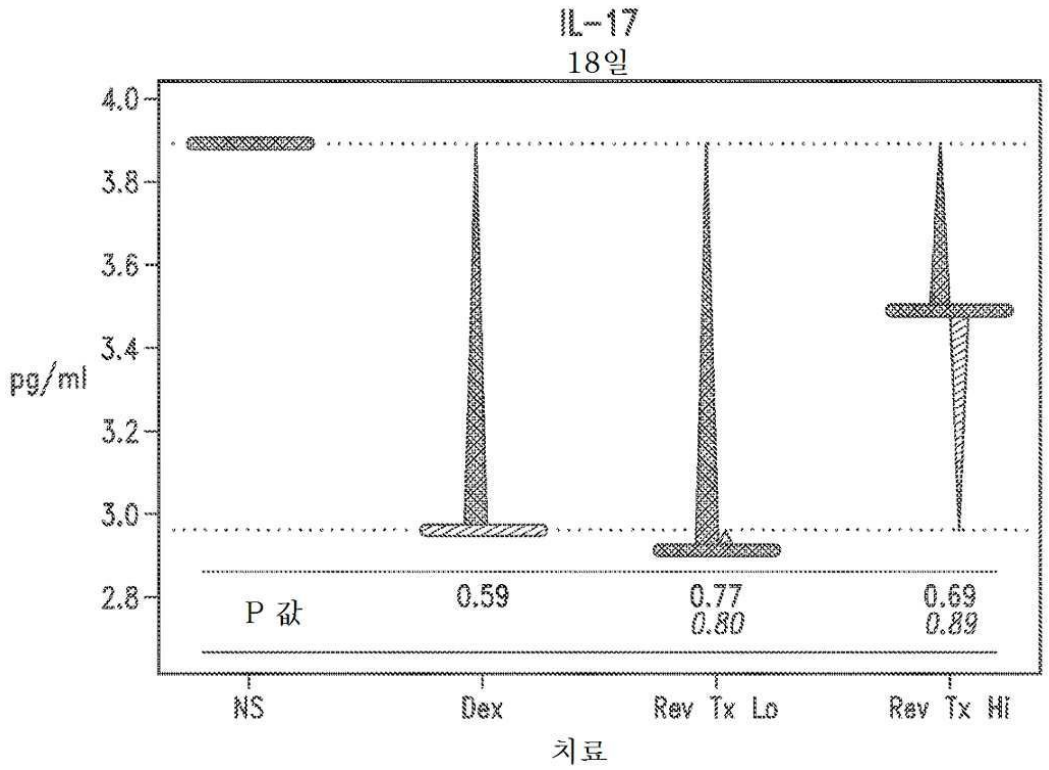
도면6d


연구 21일째의 혈액수
대조군 비히클(1F 그룹)
덱사메타손(2F 그룹)
시험 품목(저용량, 예방용)(3F 그룹)
시험 품목(고용량, 예방용)(4F 그룹)
시험 품목(저용량, 치료용)(5F 그룹)
시험 품목(고용량, 치료용)(6F 그룹)
연구 21일째의
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
WBC (10^3)
NEUT (%)
LYMP (%)

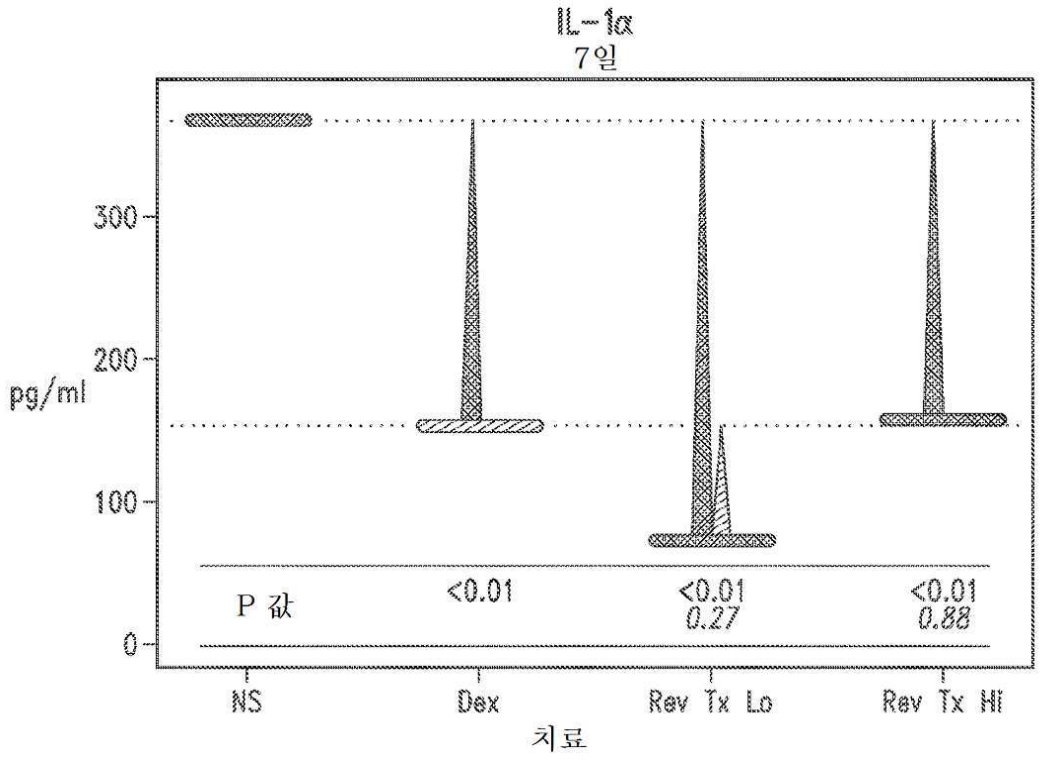
도면7a


IL-17
7일
pg/ml
8
6
4
2
0
P 값
<0.01
<0.01
0.34
<0.01
0.51
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

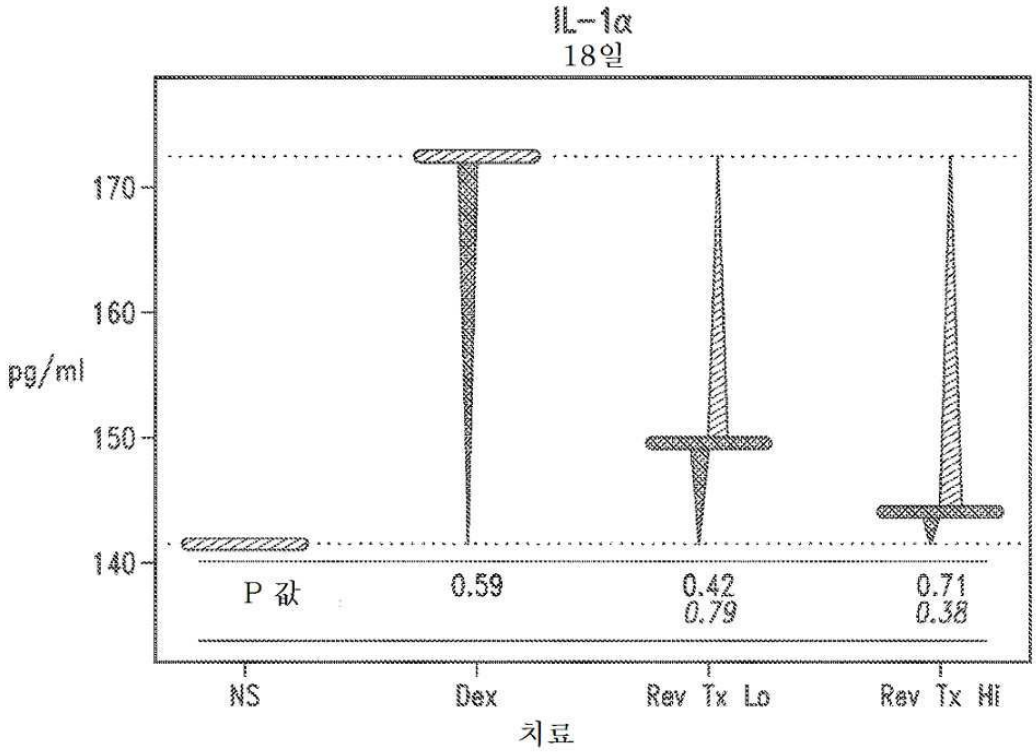
도면7b


IL-17
18일
4.0
3.8
3.6
3.4
3.2
3.0
2.8
pg/ml
P 값
0.59
0.77
0.80
0.69
0.89
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

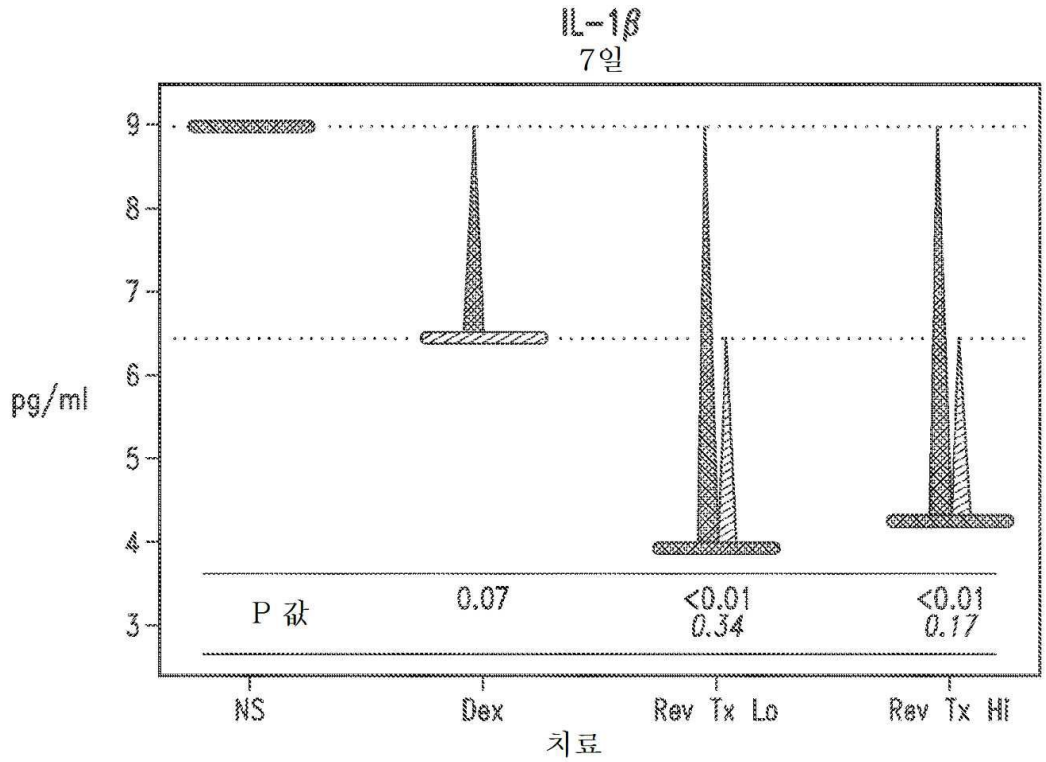
도면7c


IL-1α
7일
300
200
100
0
pg/ml
P 값
<0.01
<0.01
0.27
<0.01
0.88
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

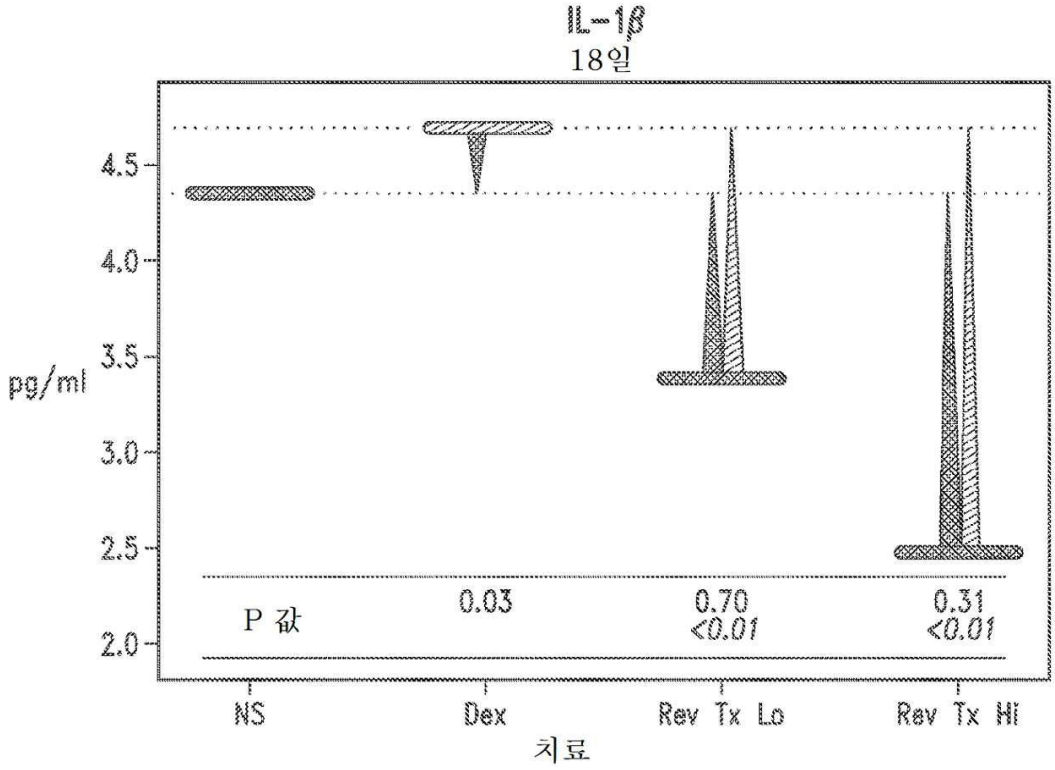
도면7d


IL-1α
18일
170
160
pg/ml
150
140
P 값
0.59
0.42
0.79
0.71
0.38
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

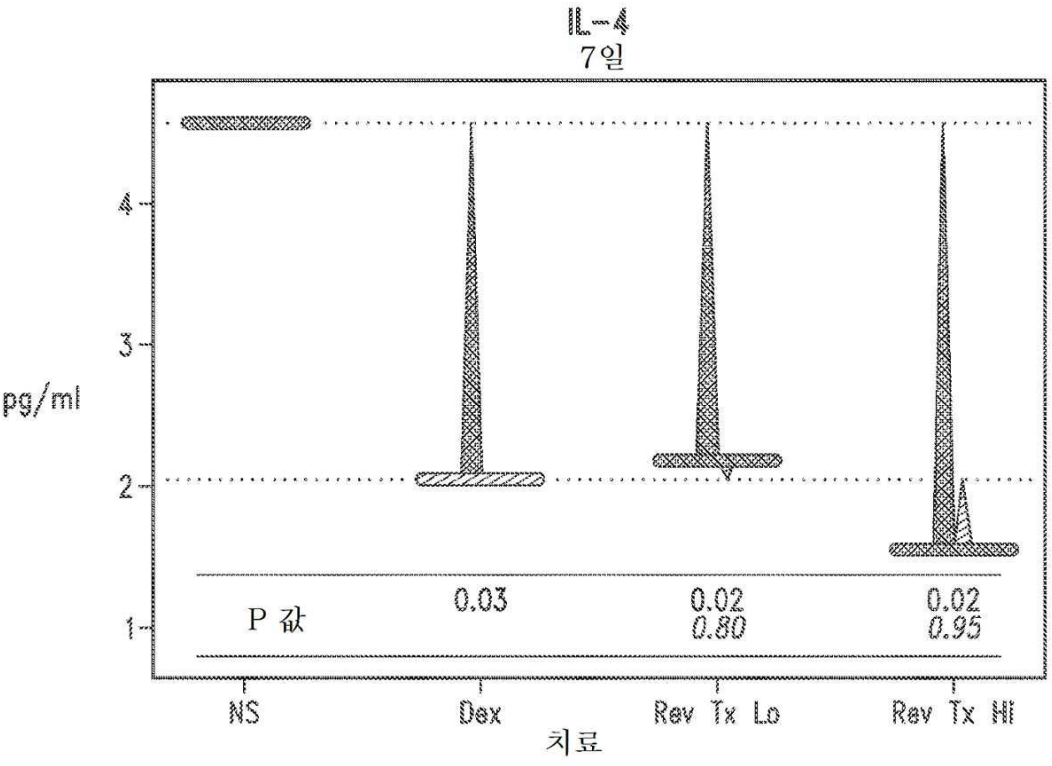
도면7e


IL-1β
7일
9
8
7
6
pg/ml
5
4
3
P 값
0.07
<0.01
0.34
<0.01
0.17
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

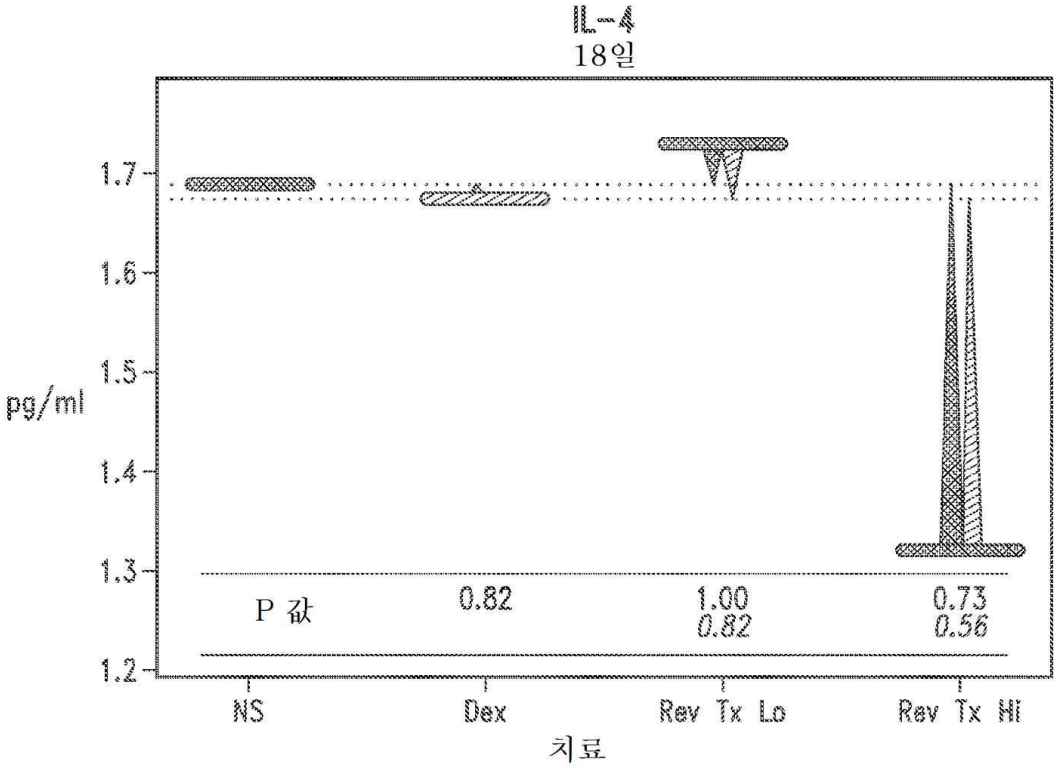
도면7f


IL-1β
18일
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
pg/ml
P 값
0.03
0.70
<0.01
0.31
<0.01
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

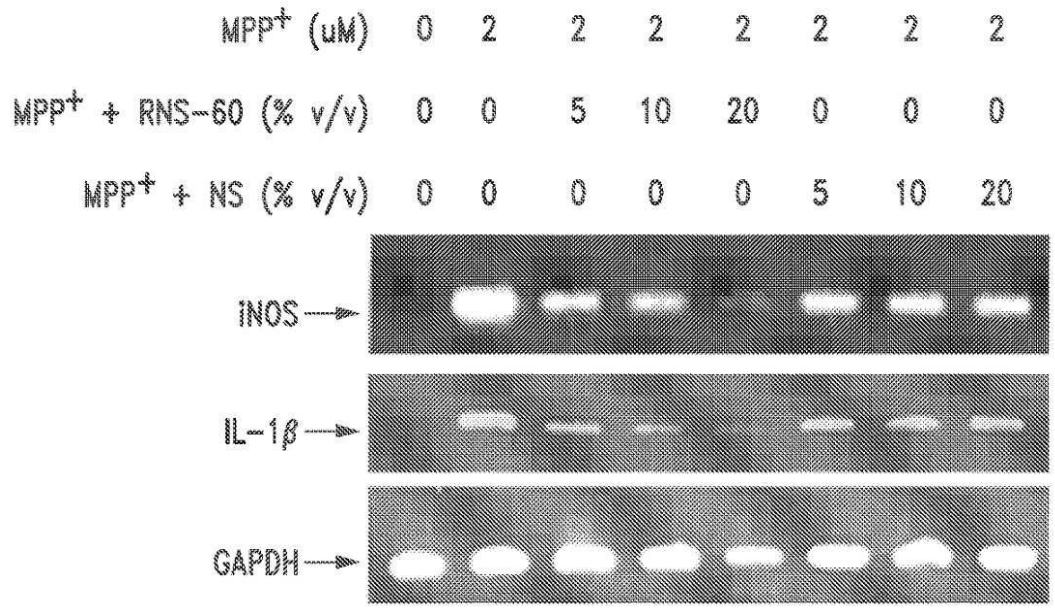
도면7g


IL-4
7일
4
3
2
1
pg/ml
P 값
0.03
0.02
0.80
0.02
0.95
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

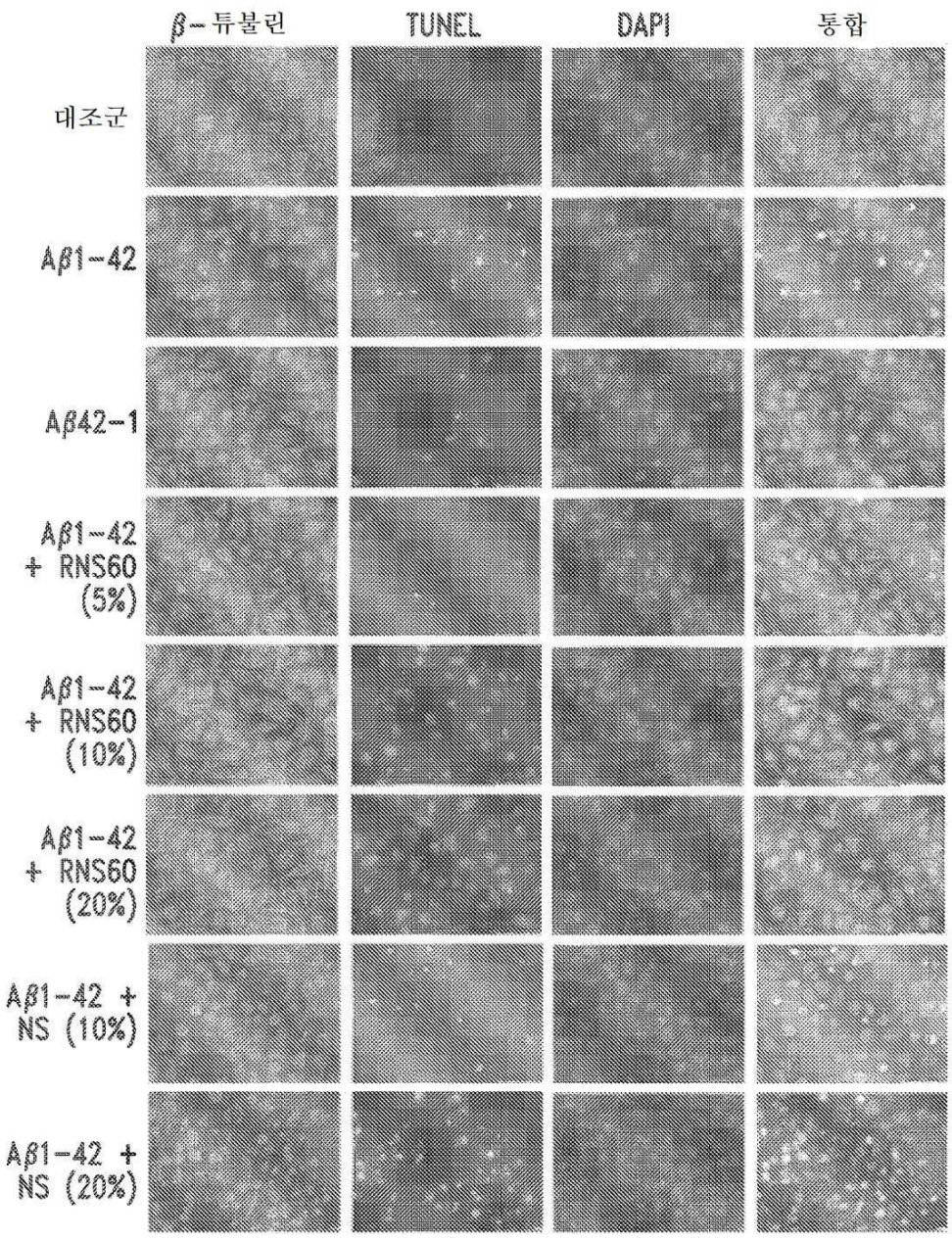
도면7h


IL-4
18일
pg/ml
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
P 값
0.82
1.00
0.82
0.73
0.56
NS
Dex
Rev Tx Lo
Rev Tx Hi
치료

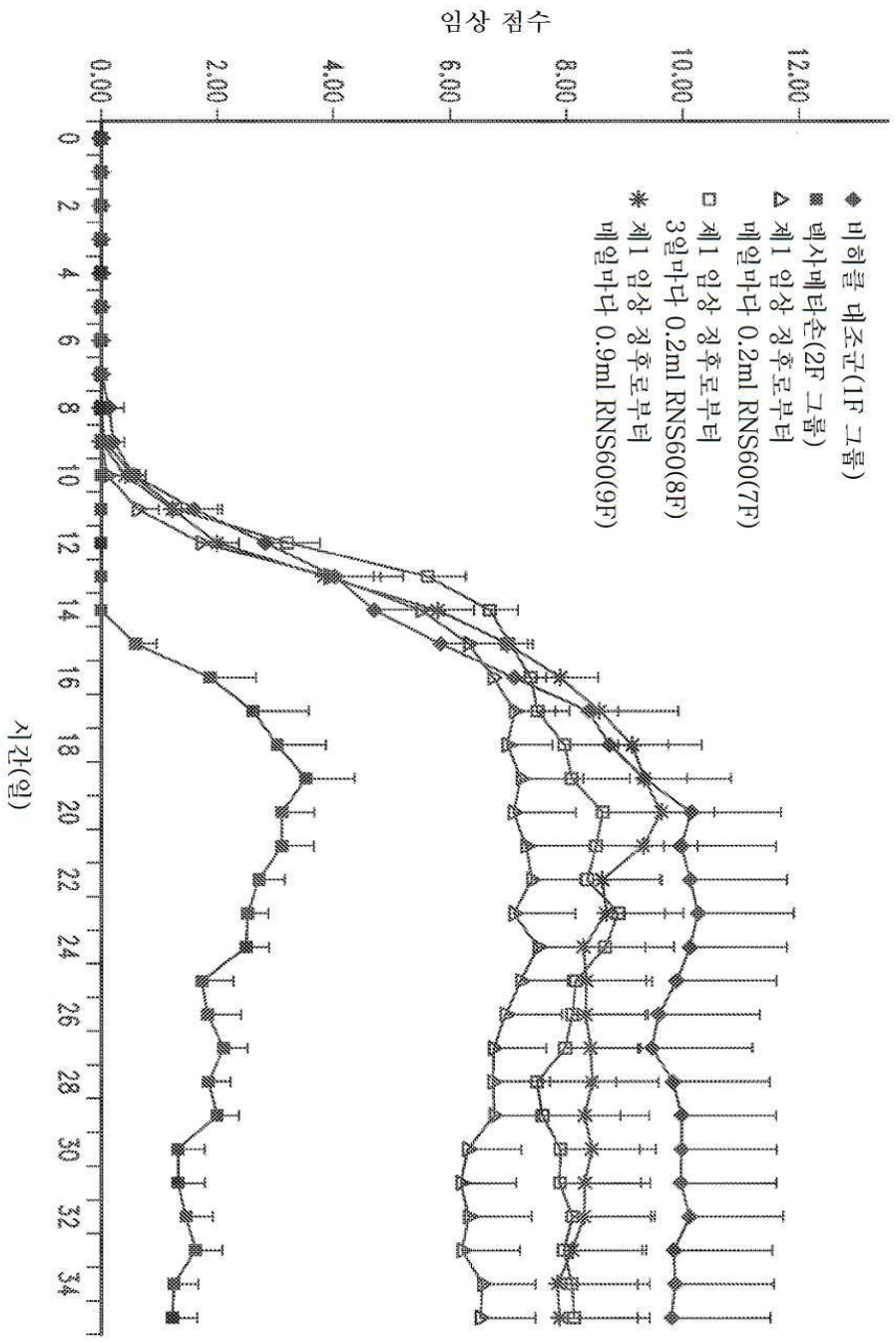
도면8


MPP+ (uM) 0 2 2 2 2 2 2 2
MPP+ + RNS-60 (% v/v) 0 0 5 10 20 0 0 0
MPP+ + NS (% v/v) 0 0 0 0 0 5 10 20
iNOS
IL-1β
GAPDH

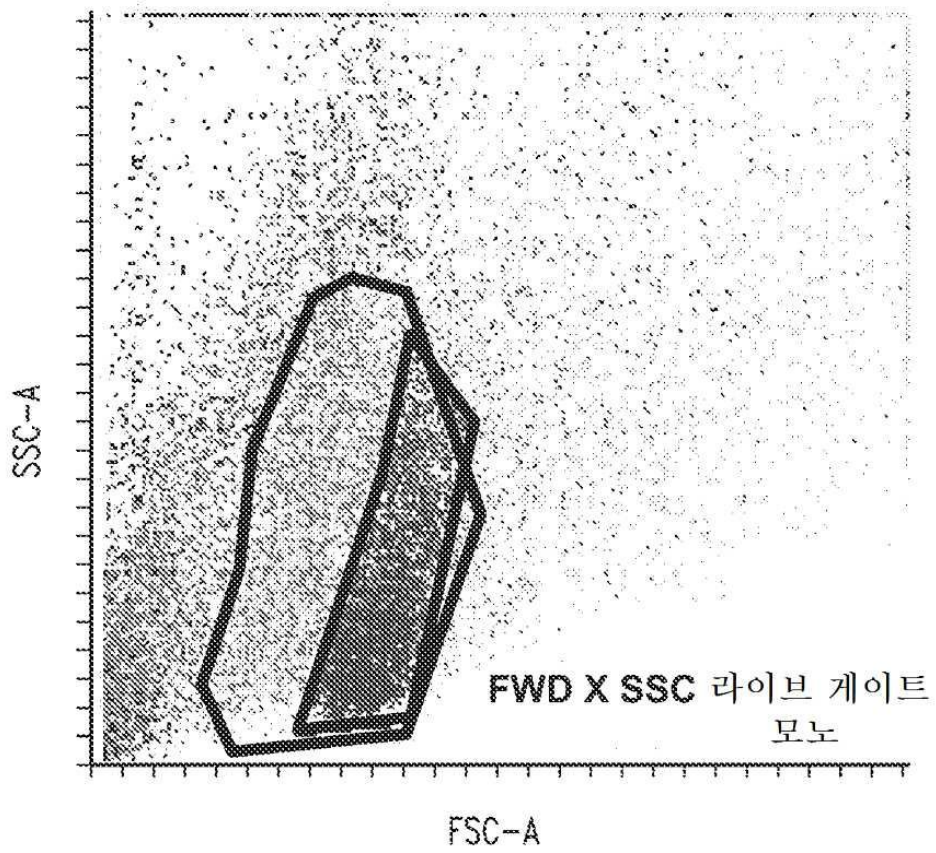
도면9


β-튜불린
TUNEL
DAPI
통합
대조군
Aβ1-42
Aβ42-1
Aβ1-42 + RNS60 (5%)
Aβ1-42 + RNS60 (10%)
Aβ1-42 + RNS60 (20%)
Aβ1-42 + NS (10%)
Aβ1-42 + NS (20%)

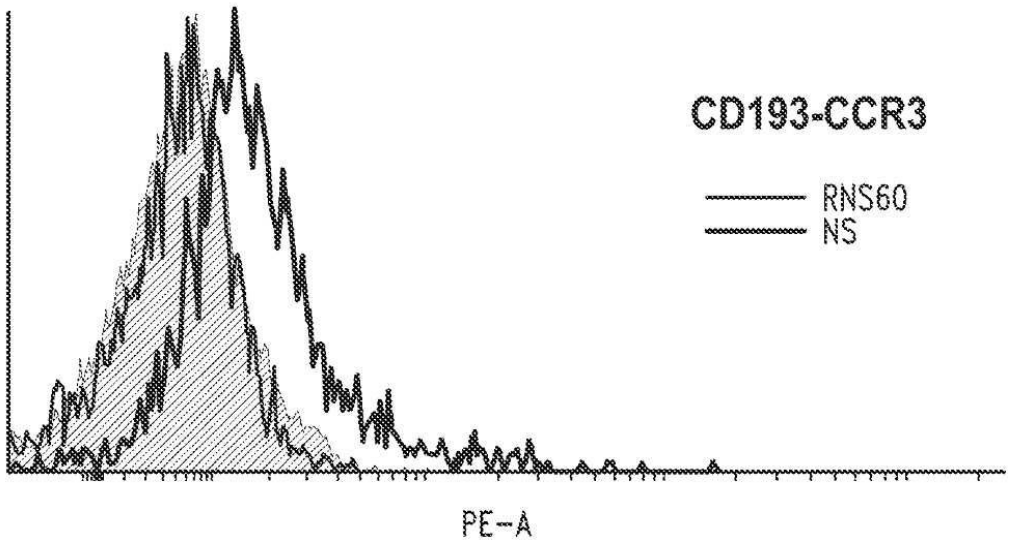
도면10


임상 점수
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
시간(일)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
비히클 대조군(1F 그룹)
덱사메타손(2F 그룹)
제1 임상 정후로부터
매일마다 0.2ml RNS60(7F)
제1 임상 정후로부터
3일마다 0.2ml RNS60(8F)
제1 임상 정후로부터
매일마다 0.9ml RNS60(9F)

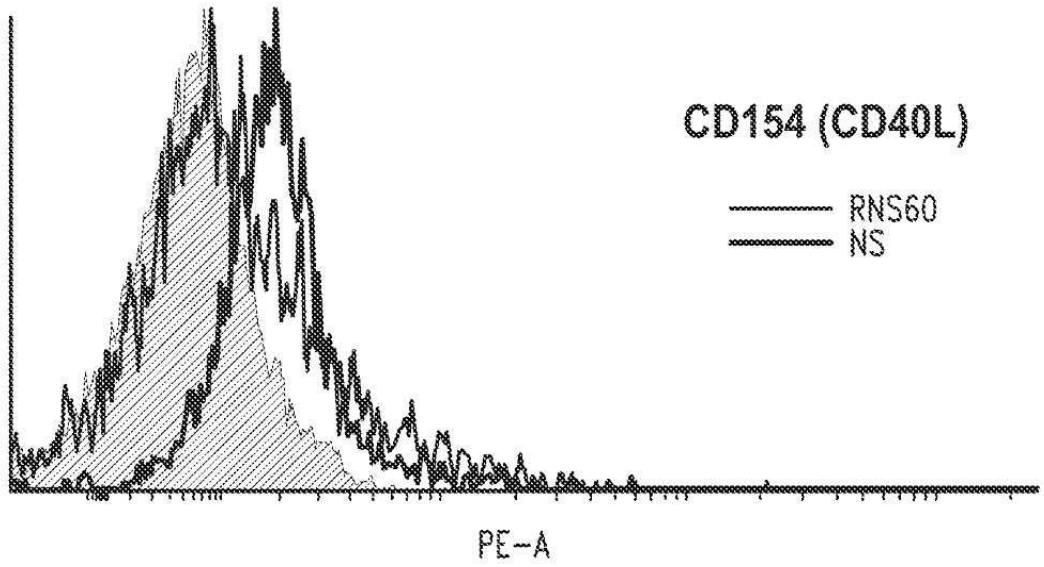
도면11a



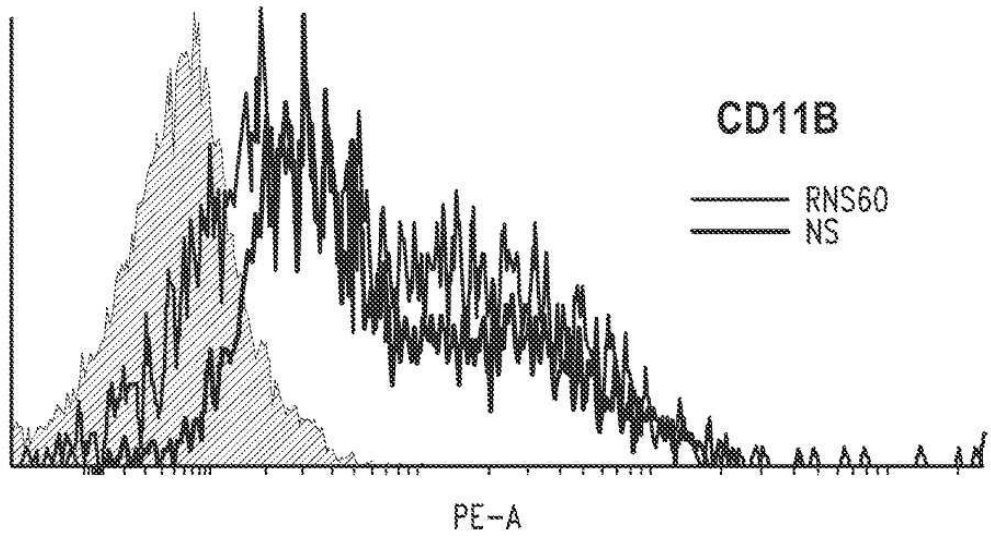
도면11b



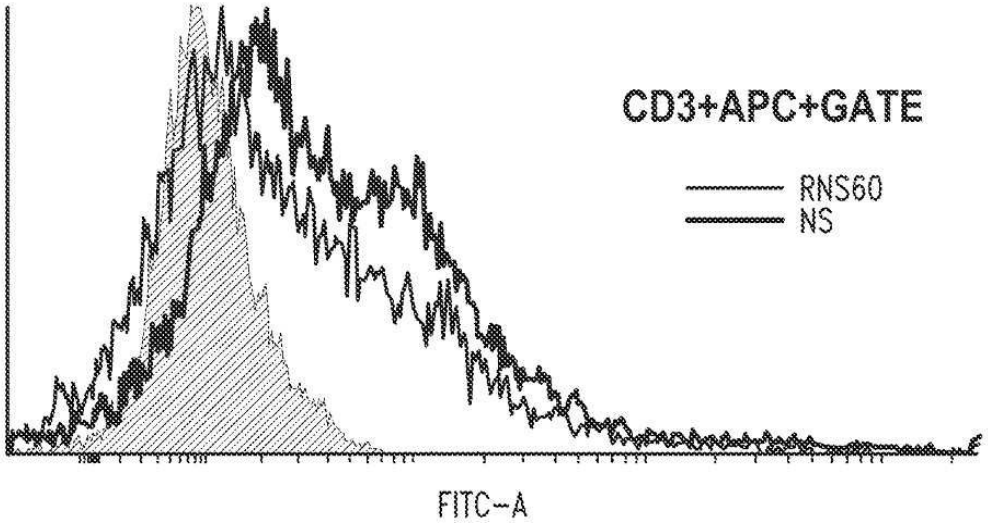
도면12a



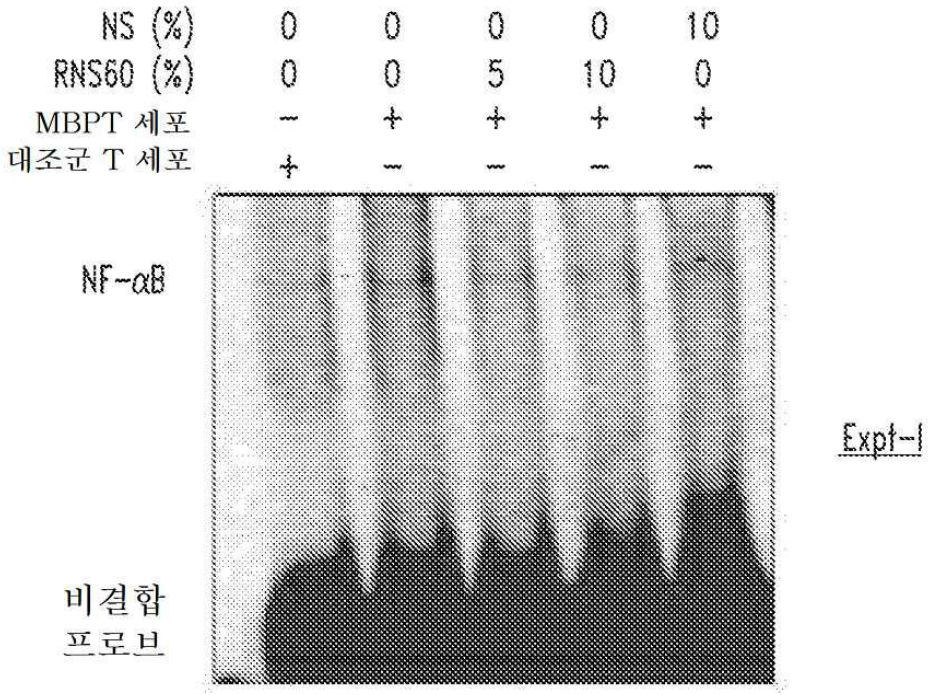
도면12b



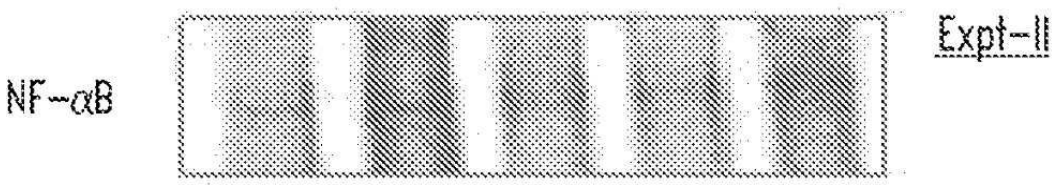
도면12c



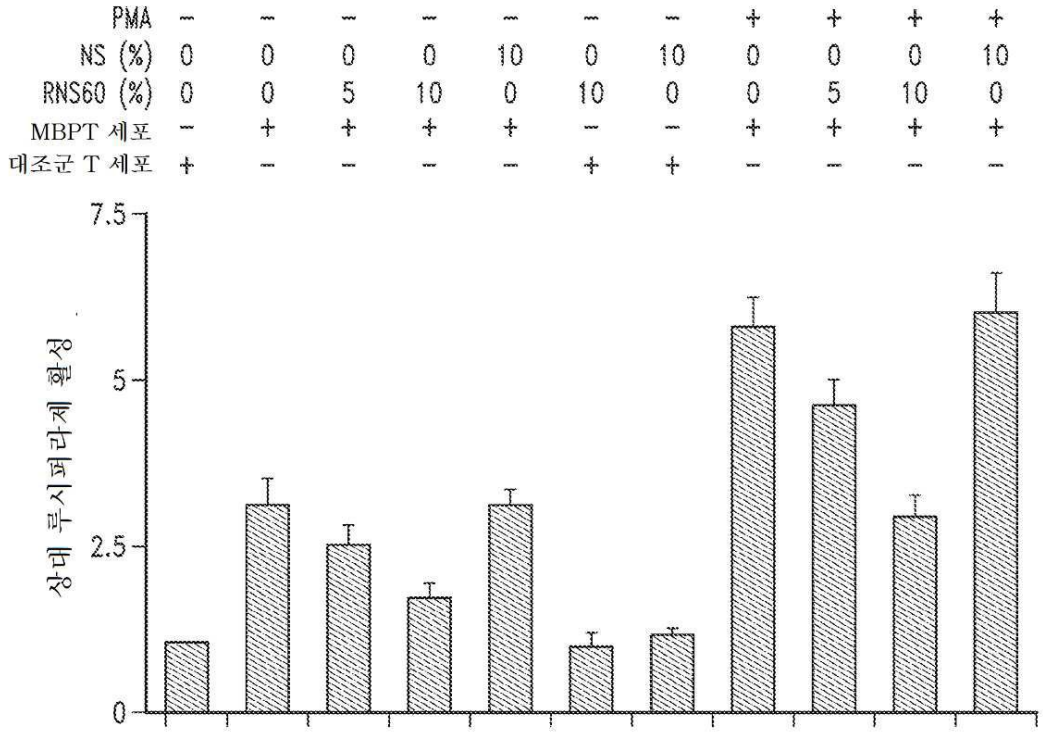
도면13a



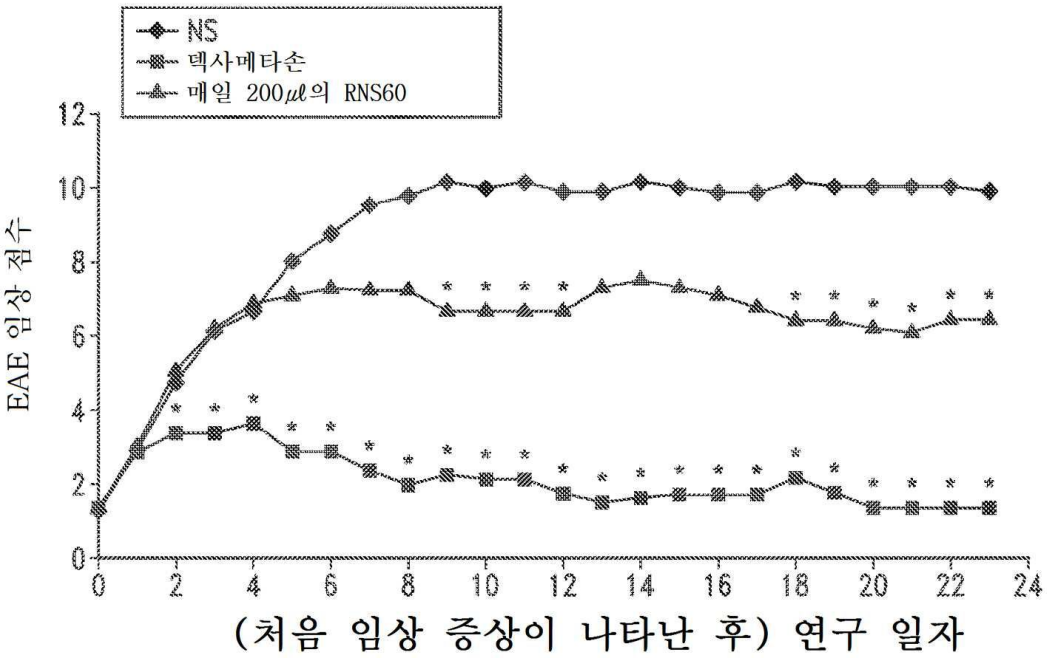
도면13b



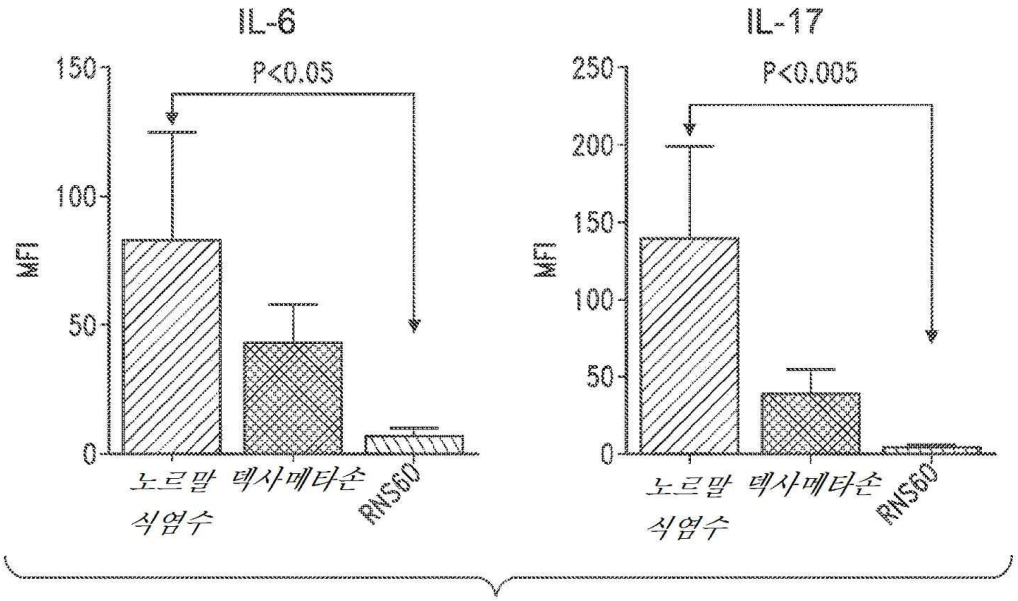
도면13c


PMA - - - - - - - + + + +
NS (%) 0 0 0 0 10 0 10 0 0 0 10
RNS60 (%) 0 0 5 10 0 10 0 0 5 10 0
MBPT 세포 - + + + + - - + + + +
대조군 T 세포 + - - - - + + - - - -
상대 루시퍼라제 활성
7.5
5
2.5
0

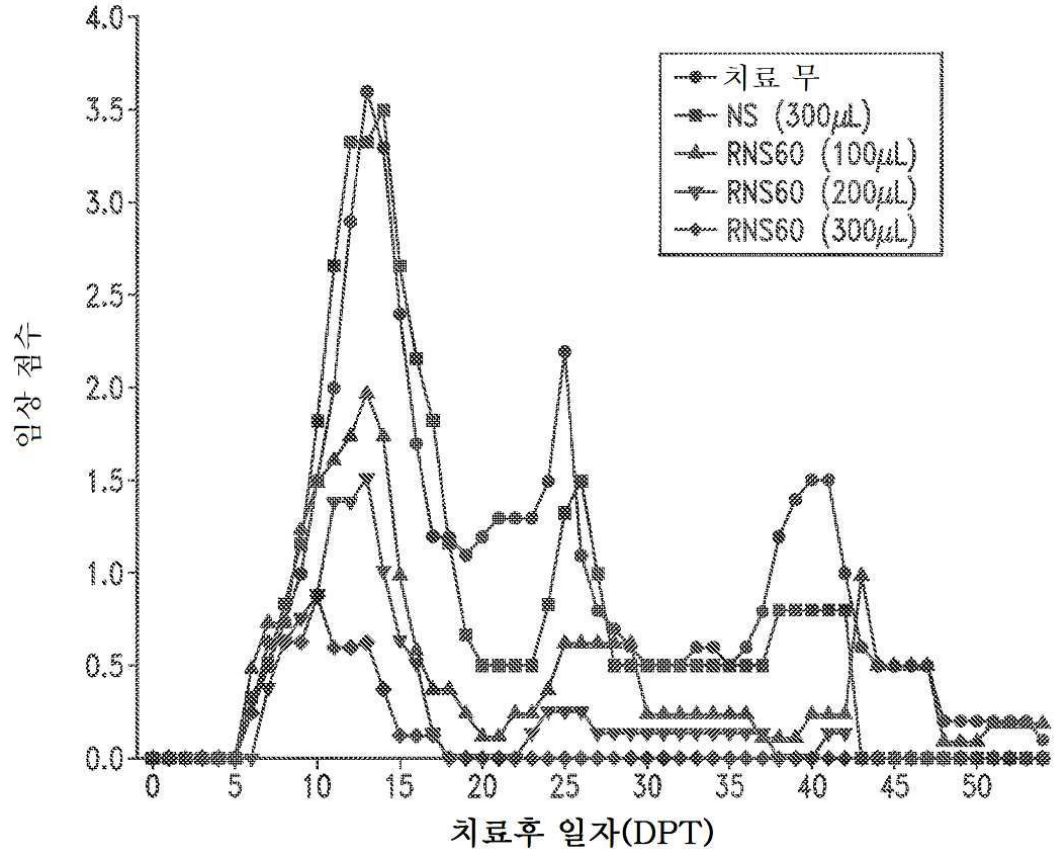
도면14a


NS
덱사메타손
매일 200㎕의 RNS60
EAE 임상 점수
12
10
8
6
4
2
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
(처음 임상 증상이 나타난 후) 연구 일자

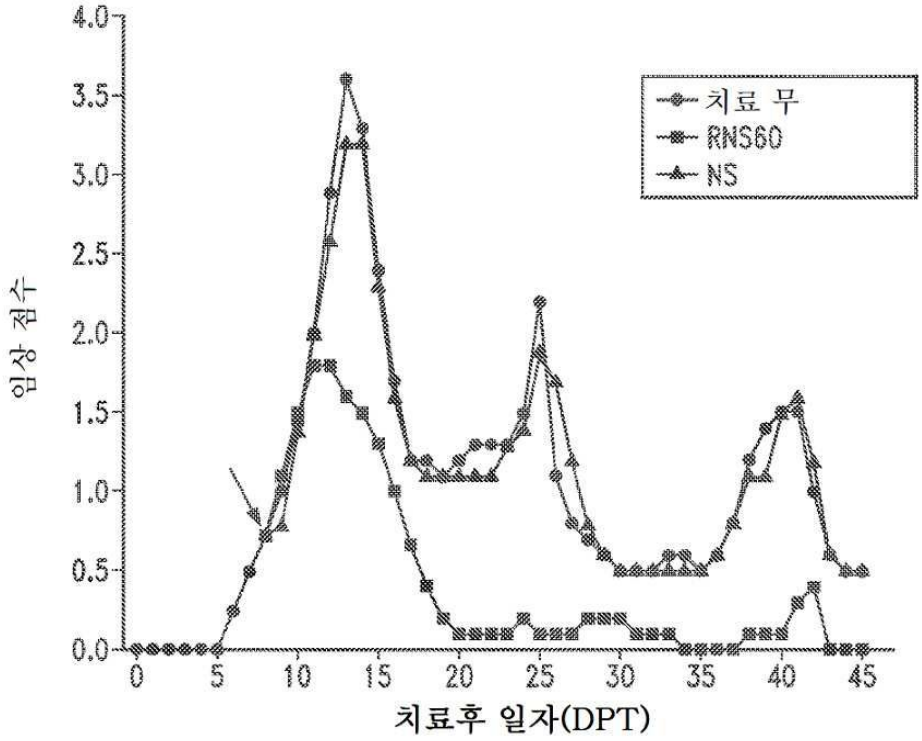
도면14b


IL-6
P<0.05
MFI
150
100
50
0
노르말 식염수
덱사메타손
RNS60
IL-17
P<0.005
MFI
250
200
150
100
50
0
노르말 식염수
덱사메타손
RNS60

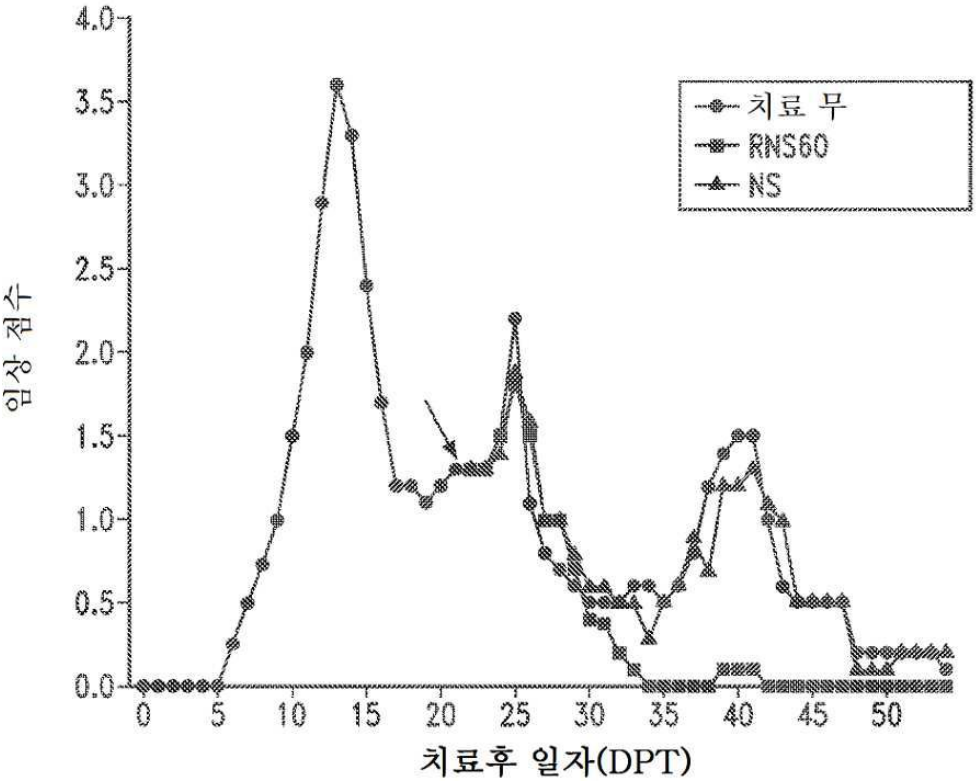
도면15


임상 점수
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
치료후 일자(DPT)
치료 무
NS (300μL)
RNS60 (100μL)
RNS60 (200μL)
RNS60 (300μL)

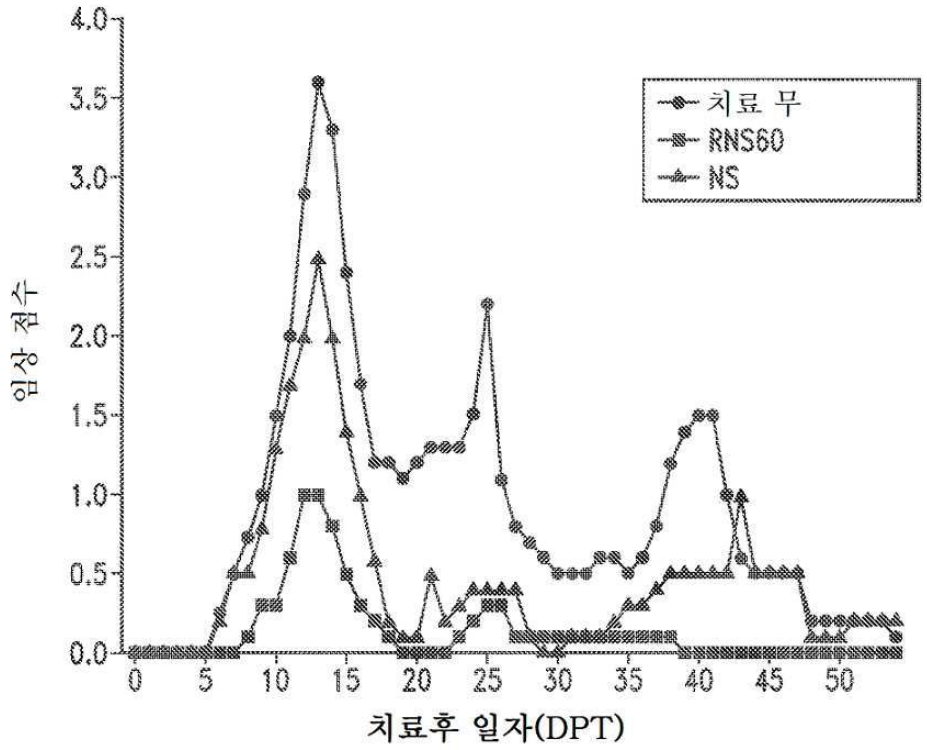
도면16a


4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
임상 점수
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
치료후 일자(DPT)
치료 무
RNS60
NS

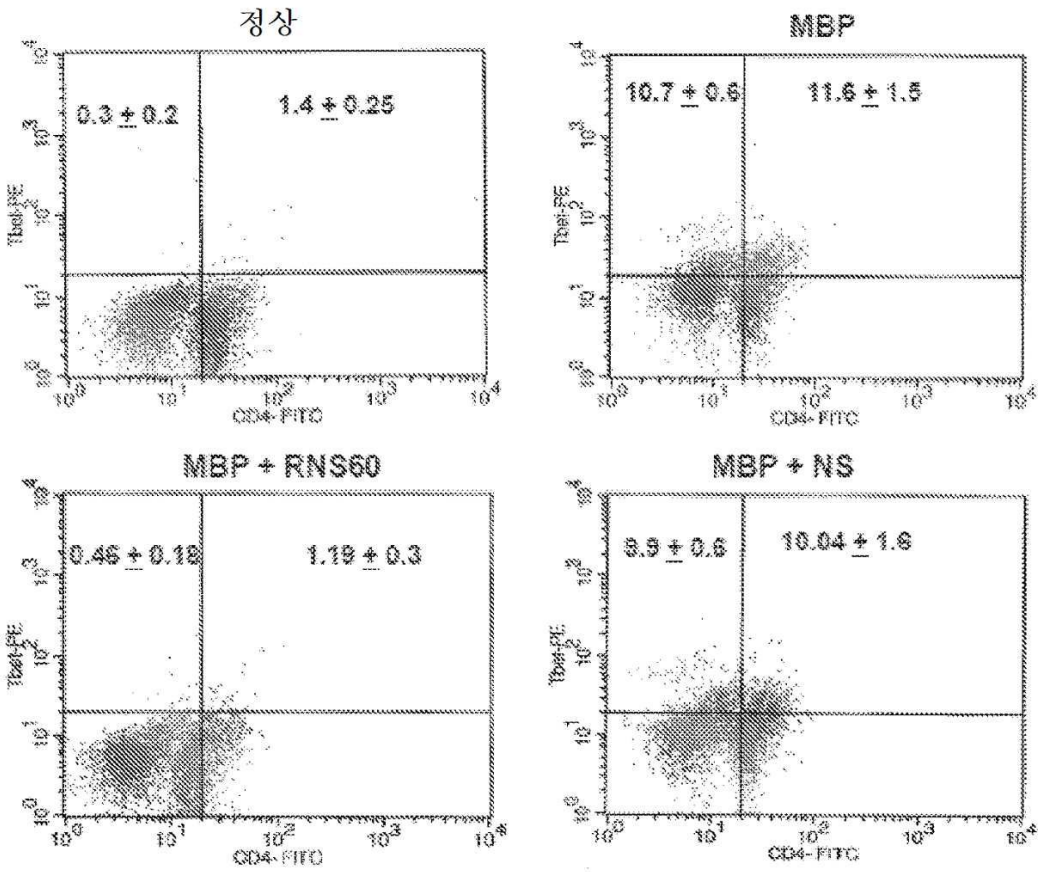
도면16b


4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
임상 점수
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
치료후 일자(DPT)
치료 무
RNS60
NS

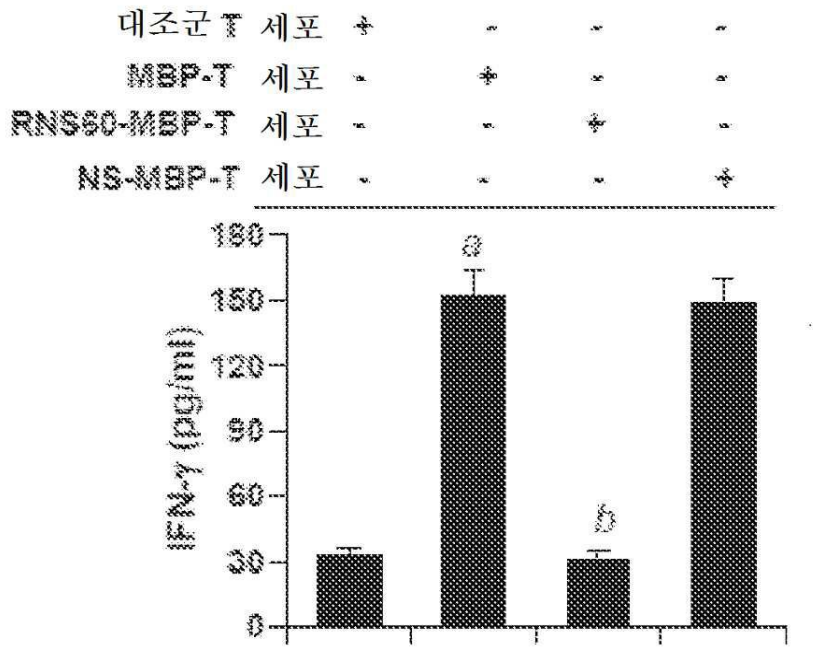
도면17


4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
임상 점수
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
치료후 일자(DPT)
치료 무
RNS60
NS

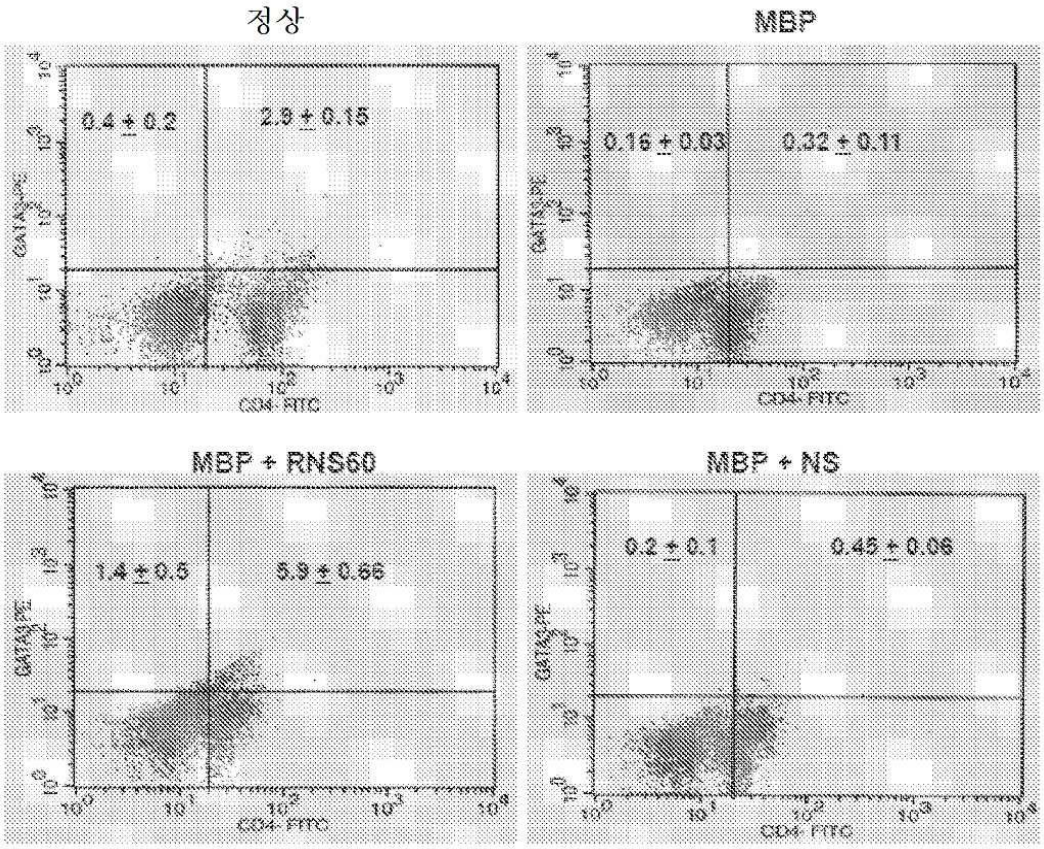
도면18a


정상
0.3 ± 0.2
1.4 ± 0.25
MBP
10.7 ± 0.6
11.6 ± 1.5
MBP + RNS60
0.46 ± 0.18
1.19 ± 0.3
MBP + NS
8.9 ± 0.6
10.04 ± 1.6
CD4-FITC

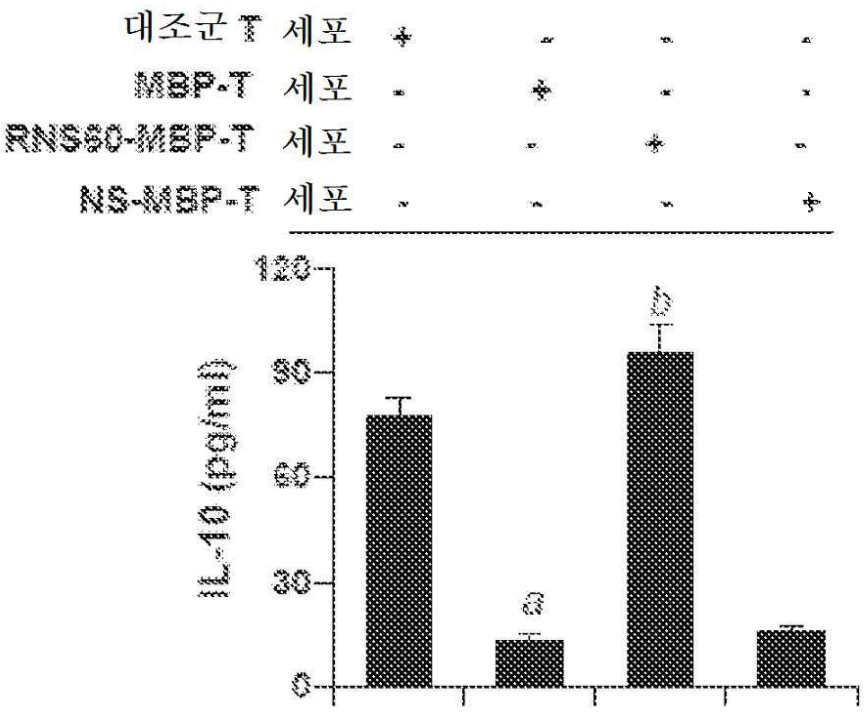
도면18b


대조군 T 세포
MBP-T 세포
RNS60-MBP-T 세포
NS-MBP-T 세포
IFN-γ (pg/ml)
180
150
120
90
60
30
0
a
b

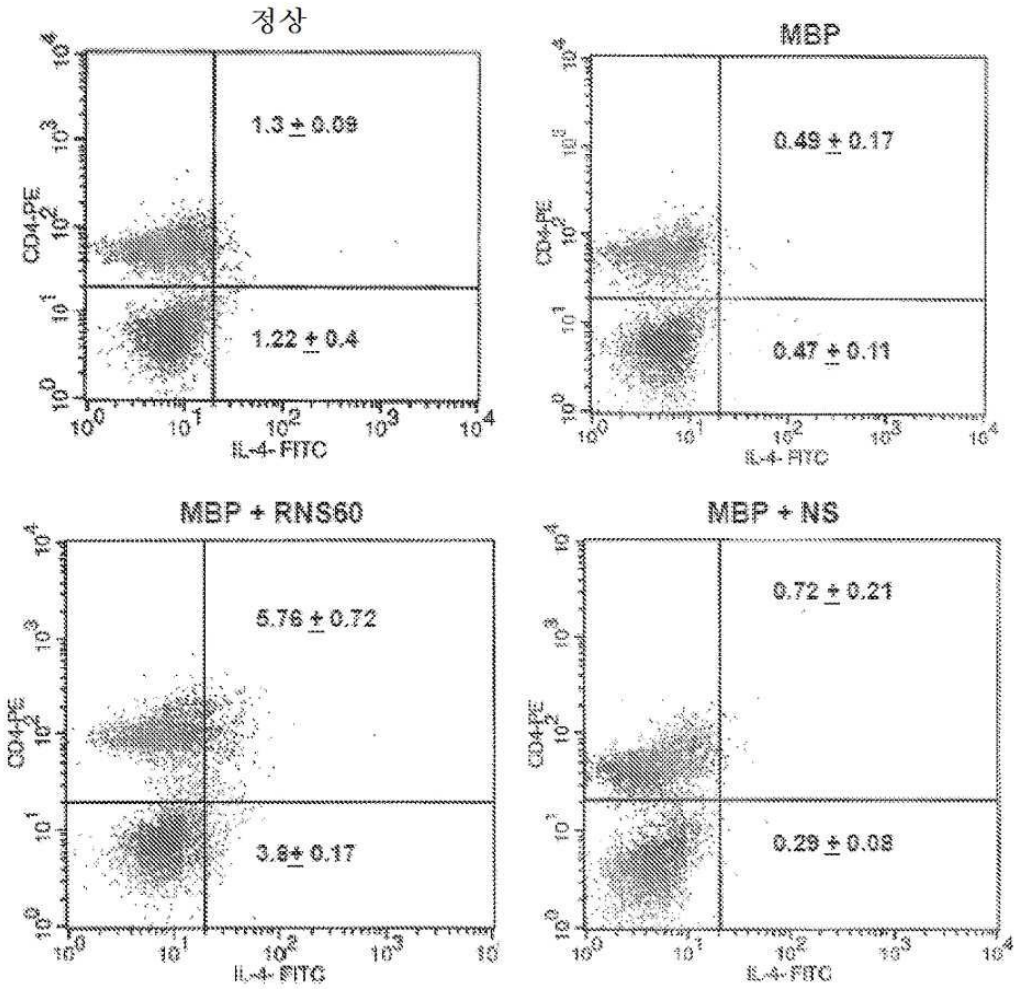
도면19a


정상
MBP
MBP + RNS60
MBP + NS
0.4 ± 0.2
2.9 ± 0.15
0.16 ± 0.03
0.32 ± 0.11
1.4 ± 0.5
5.9 ± 0.66
0.2 ± 0.1
0.45 ± 0.06
CD4-FITC

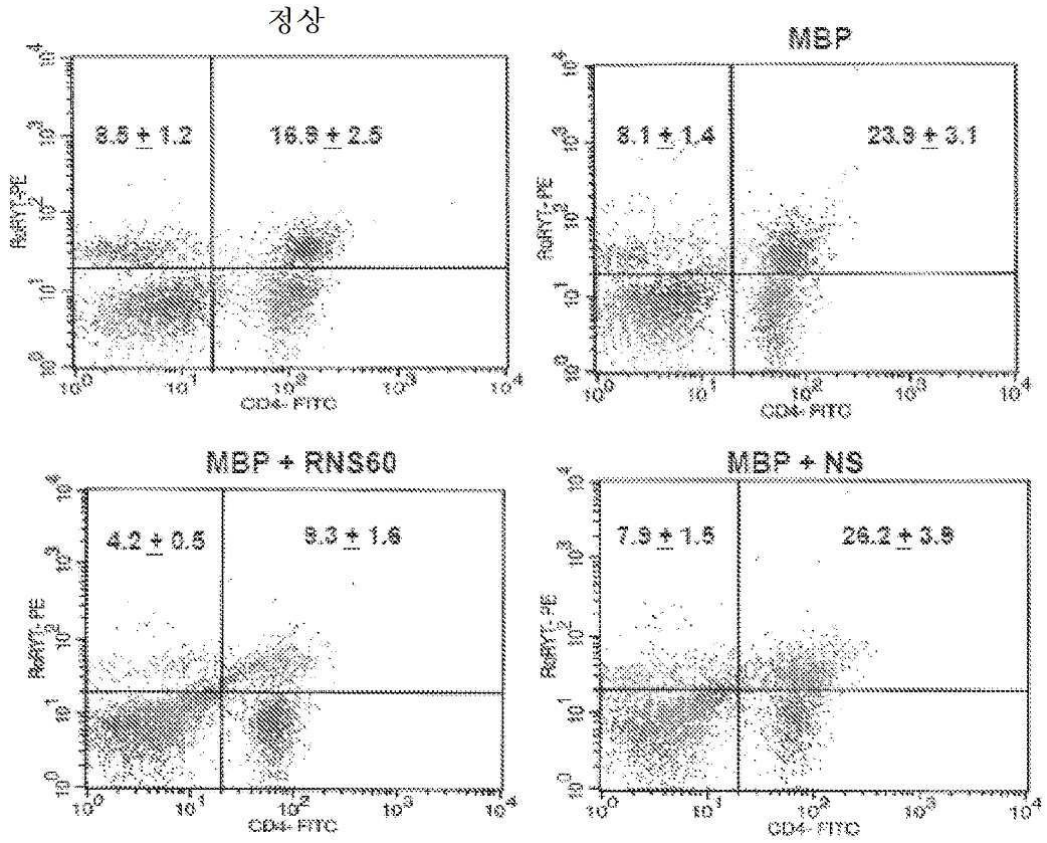
도면19b


대조군 T 세포
MBP-T 세포
RNS60-MBP-T 세포
NS-MBP-T 세포
IL-10 (pg/ml)
120
90
60
30
0
a
b

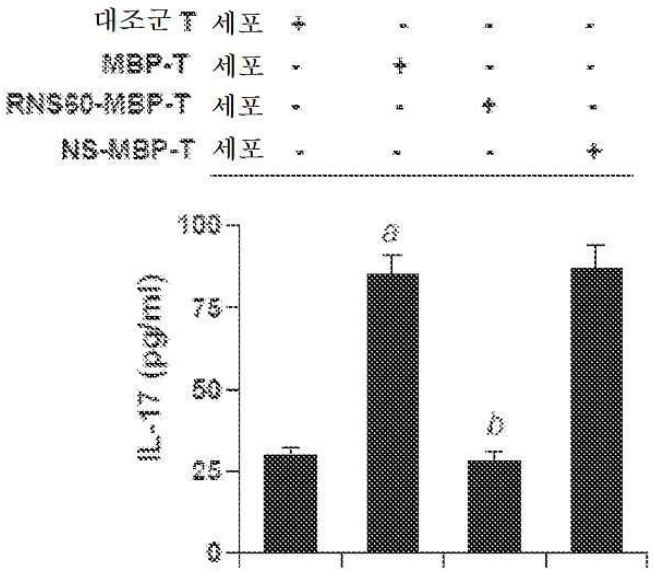
도면20


정상
1.3 ± 0.09
1.22 ± 0.4
CD4+PE
IL-4-FITC
MBP
0.49 ± 0.17
0.47 ± 0.11
MBP + RNS60
5.76 ± 0.72
3.6 ± 0.17
MBP + NS
0.72 ± 0.21
0.29 ± 0.08

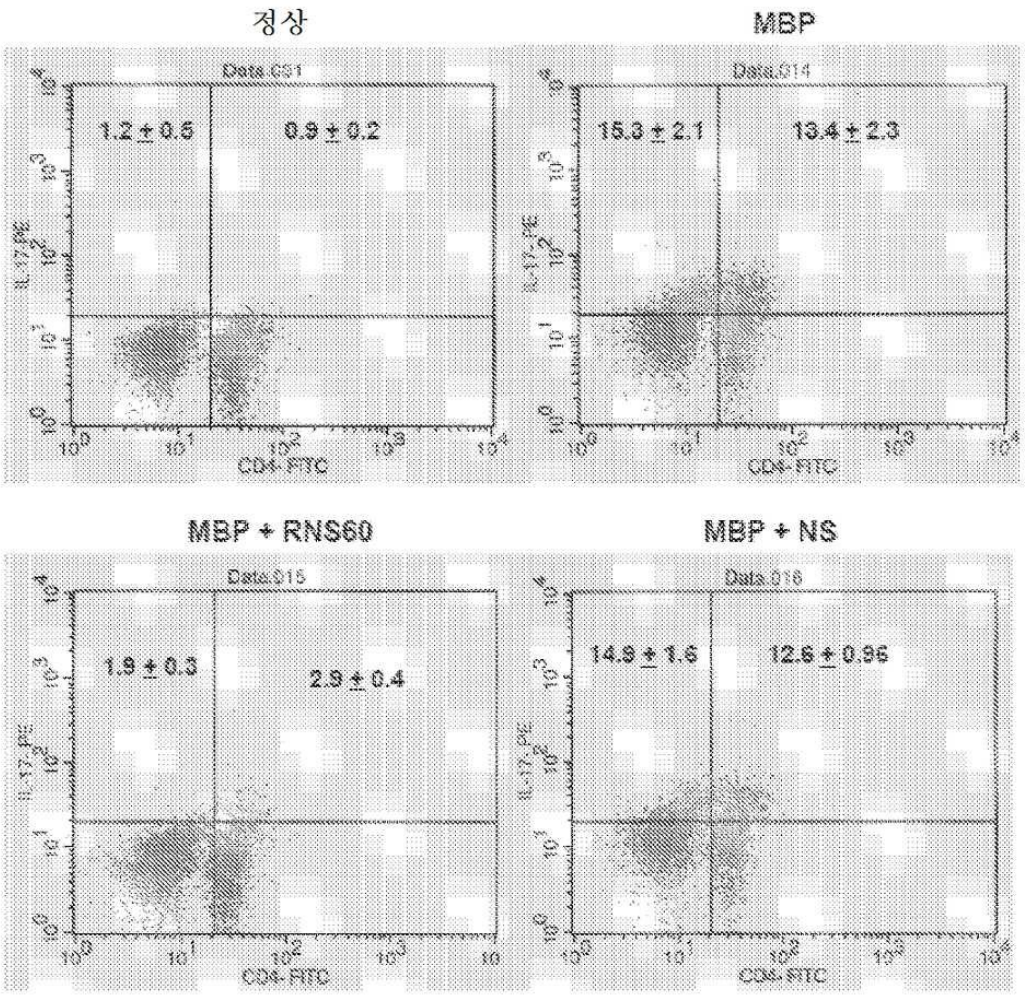
도면21a


정상
8.5 ± 1.2
16.9 ± 2.5
MBP
8.1 ± 1.4
23.9 ± 3.1
MBP + RNS60
4.2 ± 0.5
9.3 ± 1.6
MBP + NS
7.9 ± 1.5
26.2 ± 3.9
CD4- FITC

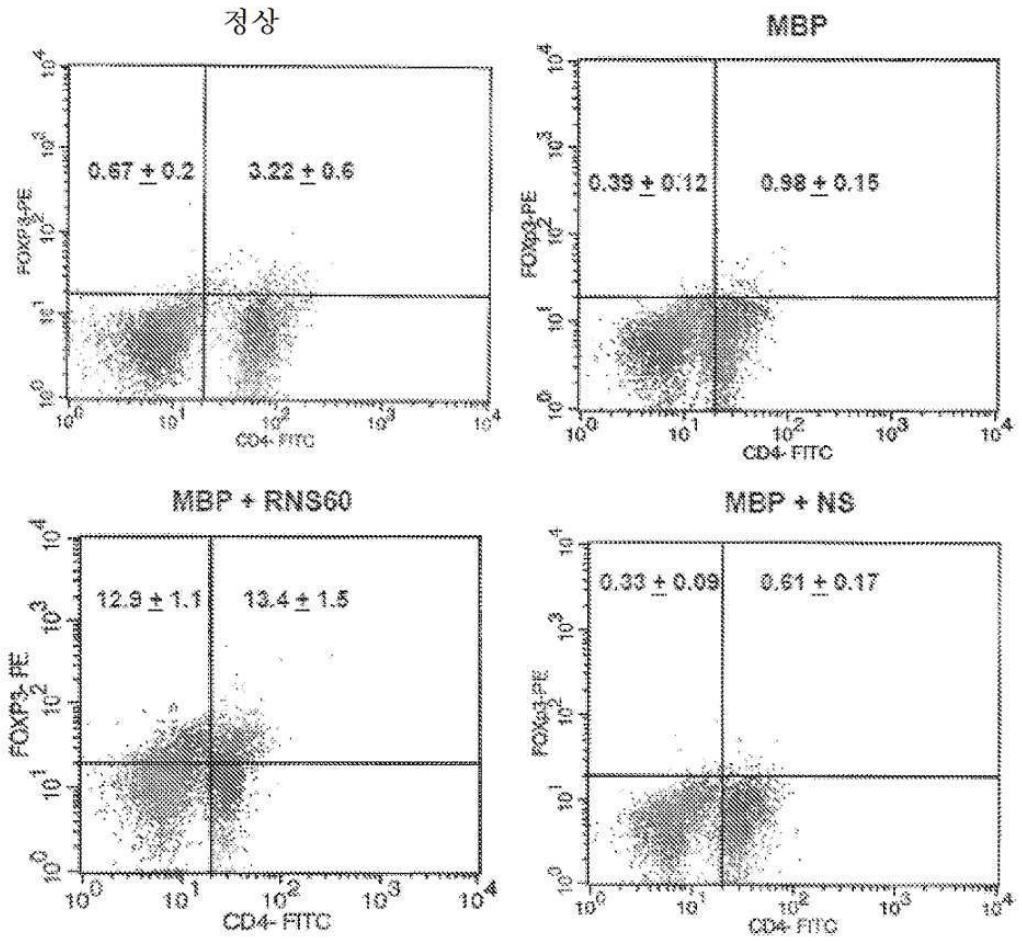
도면21b


대조군 T 세포 + - - -
MBP-T 세포 - + - -
RNS60-MBP-T 세포 - - + -
NS-MBP-T 세포 - - - +
IL-17 (pg/ml)
100
75
50
25
0
a
b

도면22


정상
MBP
MBP + RNS60
MBP + NS
1.2 ± 0.5
0.9 ± 0.2
15.3 ± 2.1
13.4 ± 2.3
1.9 ± 0.3
2.9 ± 0.4
14.9 ± 1.6
12.6 ± 0.96
CD4-FITC
IL-17-PE

도면23


정상
0.67 ± 0.2
3.22 ± 0.6
MBP
0.39 ± 0.12
0.98 ± 0.15
MBP + RNS60
12.9 ± 1.1
13.4 ± 1.5
MBP + NS
0.33 ± 0.09
0.61 ± 0.17
FOXP3-PE
CD4- FITC