



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월02일

(11) 등록번호 10-2118116

(24) 등록일자 2020년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5153 (2013.01)

A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0031714

(22) 출원일자 2019년03월20일

심사청구일자 2019년03월20일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170095512 A

KR101734697 B1

JOURNAL OF NEUROSCIENCE 20 MARCH 2019, 39

(12) 2326~2346

(73) 특허권자

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김동운

세종특별자치시 보람동로 13, 603동 704호(보람동, 호려울마을6단지)

홍진표

서울특별시 영등포구 당산로50길 17(당산동6가)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 11 항

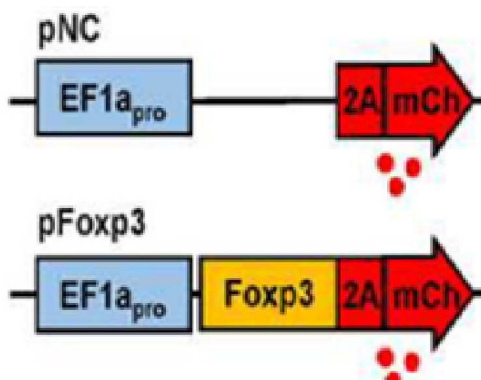
심사관 : 윤재욱

(54) 발명의 명칭 **Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 나노입자 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 나노입자에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 나노입자를 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물과, 신경병증성 통증 치료방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자는 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 세포 및 동물 수준에서 신경병증성 통증을 감소시키는 효과가 우수한바, 신경병증성 통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 9/0085 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/25 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)

신주희

대전광역시 중구 계룡로904번안길 22, 106호(문화동)

(72) 발명자

이선열

대전광역시 서구 둔산로 155, 117동 1301호(둔산동, 크로바아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3C7A1905074
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 뇌과학원천기술개발(R&D)
 연구과제명 신경손상 연관 뇌기능조절 microglia 타겟 발굴 및 제어 융합기술 개발
 기 여 율 25/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4009409
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
 연구과제명 신경병증성통증에서 p66shc의 미토콘드리아 ROS제어기전연구
 기 여 율 25/100
 주관기관 충남대학교(의대)
 연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03028839
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
 연구과제명 PLGA 나노입자를 이용한 신경병증성통증 유전자치료제 개발
 기 여 율 25/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A1A1A05001310
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
 연구과제명 복합부위통증증후군의 편도체에서 미세아교세포의 기능 연구
 기 여 율 25/100
 주관기관 충남대학교병원
 연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

Foxp3(forkhead box P3) 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Foxp3은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Foxp3을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 Foxp3을 코딩하는 유전자는 세포 내 전달을 위한 발현 벡터에 포함된 것인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노입자는 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리스티렌-코-에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이민-코-에틸렌글리콜, 폴리포스파젠-코-에틸렌글리콜, 폴리락타이드-코-에틸렌글리콜, 폴리락티드-코-글리콜라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리카프로락톤-코-에틸렌글리콜, 폴리안하이드라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리말릭산-코-에틸렌글리콜 및 이의 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리하이드로옥시부틸레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리카르보네이트-코-에틸렌글리콜 및 폴리오르소에스테르-코-에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리-L-라이신-코-에틸렌글리콜, 폴리글리콜라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리메틸메타아크릴레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈-코-에틸렌글리콜 및 이의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 나노입자는 폴리락티드-코-글리콜라이드(PLGA, (poly(lactic-co-glycolic acid) 나노입자인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 0.1 내지 1000mg/ml의 농도로 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자는 미세아교세포(microglia cell), 뉴런 세포(neuronal cell) 및 성상세포(astrocytic cell)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 타겟하는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계;를 포함하는 신경병증성 통증 치료방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 척수에 주입되는 것인, 신경병증성 통증 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 나노입자에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 나노입자를 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물과, 신경병증성 통증 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 통증은 삶을 위협하거나 강한 외부자극에 대한 방어기작으로 나타나는 생리적 반응 중 하나로서 위험에서 신체를 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 통증은 조직손상에 의한 침해성 통증(nociceptive pain)과 조직손상을 수반하지 않지만 신경계 이상반응으로 나타나는 신경병증성 통증(neuropathic pain)으로 구분된다. 침해성 통증은 조직손상에 의한 염증반응이 수반되어 통증과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며 일반적으로 손상된 부위가 치유되면서 자연히 소멸된다. 신경병증성 통증을 외상(trauma)이나 염증, 허혈성 손상, 또는 대사산물 등 다양한 원인에 의해 신경계가 손상될 때 유발되는 만성적 신경질환이다. 이와 같은 신경병증성 통증을 막대한 치료비용이 지출되어(척수손상 환자의 경우 환자 개인당 연간 2,500만 원으로 평생 약 10억 원) 환자 및 가족을 넘어 심각한 사회, 경제적 문제로 대두되고 있다.

[0003] 한편, 건강한 중추신경계에서 신경세포는 (i) CD200-CD200 수용체(CD200R), HSP60-TREM2/DAP12, CD22-CD45 및 CD47 CD172A를 통한 접촉 의존성 저해; (ii) 수용성 ICAM5, LFA1, CX3CL1-CX3CR1, IL-10-IL-10 수용체 및 TGF-β-TGF-β 수용체를 통해 사이토카인 또는 가용성 접착분자-매개 억제; (iii) 도파민 수용체(D1, D2, D3 및 D4 아형) 및 노르아드레날린-아드레날린 수용체를 통한 신경 전달 관련 억제;와 같은 방법을 통해 미세아교세포의

활성을 억제한다. 그러나 질병 또는 신경 손상을 입은 중추신경계는 전술한 바와 같은 신호전달이 이루어지지 않으며, 미세아교세포를 자극하여 유용하지 않은 인자들의 분비를 유도함으로써 신경질환을 악화시킨다. 따라서 신호전달 경로의 정상화를 통해 신경질환의 예방 또는 치료를 달성할 수 있으며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 이에 본 발명자들은 전술한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구하던 중, Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 나노입자를 개발하고 이의 신경병증성 통증에 대한 치료 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0005] 따라서 본 발명의 목적은, Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증 치료방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0008] 또한 본 발명은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명에 따른 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자는 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 세포 및 동물 수준에서 신경병증성 통증을 감소시키는 효과가 우수한바, 신경병증성 통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 본 발명에 따른 플라스미드 pFoxp3의 구조를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 플라스미드 pFoxp3의 벡터맵 및 제한효소 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 플라스미드 pFoxp3의 형질감염 여부 및 형질감염된 세포에서 Foxp3 및 염증관련 유전자의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 플라스미드 pFoxp3이 포함된 나노입자의 형태 및 세포독성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 플라스미드 pFoxp3이 포함된 나노입자의 실험관 내 세포 섭취 및 사이토카인 발현 억제 활성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 플라스미드 pFoxp3이 포함된 나노입자의 생체 내 세포 섭취 및 타겟하는 세포의 유형을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 플라스미드 pFoxp3이 포함된 나노입자를 주입한 래트 모델에서 본 프레이 필라멘트를 이용한 통증 행동 시험 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 신경병증성 통증 래트 모델에서 플라스미드 pFoxp3이 포함된 나노입자의 통증 관련 유전자의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0013] 본 발명은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에 있어서, “Foxp3(forkhead box P3)”는 면역계의 면역 반응에 관여하는 단백질로써, Foxp3을 발현하는 조절 T세포(regulatory T cell, Treg)는 면역관용, 특히, 자기 관용(self-tolerance)의 전달에 중요한 역할을 한다. 최근 연구에서 Foxp3 양성 T세포의 유도 또는 투여가 당뇨, 다발성경화증, 천식, 염증성 장질환, 갑상선염 및 신장질환 동물 모델에서 병증을 감소시킨다는 것이 밝혀졌다.
- [0015] 본 발명의 구체예에서, Foxp3은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.
- [0016] 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80% 이상의, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 것을 포함하며, 서열번호 1의 Foxp3과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 또한, 본 발명의 Foxp3에는 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. Foxp3의 변이체란 Foxp3의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 Foxp3 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성(Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).
- [0017] 또한 상기 서열 상동성은 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두 개 이상의 단백질을 각각 구성하는 아미노산이 최적으로 매칭(matching) 되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디폴트 오픈링 패널티(default opening penalty) 및 디폴트 갭 패널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코어링 매트릭스; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3, 1978)와 같은 스코어링 매트릭스를 제공한다. 예를 들어, 백분율로 표시되는 서열 상동성은 다음과 같이 계산할 수 있다: 일치하는 서열(identical matches)의 총 수에 100을 곱한 다음 대응되는 스패(matched span) 내의 보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.
- [0018] 상기에서 "실질적으로 동질의 생리활성"이란 항염증 활성과, 신경병증성 통증의 개선, 예방 또는 치료 활성을 의미한다.
- [0019] 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 Foxp3의 기본골격; 및 항염증, 신경병증성 통증의 개선, 예방 또는 치료 활성을 유지하면서 구성하는 아미노산의 일부 화학 구조가 변형된 유도체;가 포함된다. 예를 들어 단백질의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.
- [0020] 본 발명의 구체예에서, Foxp3을 코딩하는 유전자는 Foxp3을 코딩하는 핵산분자를 의미하며, 이들은 자연에서 분리되거나 인위적으로 합성 및 변형된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 Foxp3을 코딩하는 유전자로서 사용될 수 있는 Foxp3을 코딩하는 핵산분자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, Foxp3을 코딩하는 핵산분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, Foxp3을 코딩하는 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다.
- [0022] 또한, 본 발명의 Foxp3을 코딩하는 핵산분자는 게놈 DNA, cDNA 및 화학합성 DNA를 포함할 수 있으며, 게놈 DNA 및 cDNA는 당업계의 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다.

- [0023] 게놈 DNA는 예를 들어, Foxp3를 코딩하는 유전자를 가지는 세포로부터 게놈 DNA를 추출하고 게놈 라이브러리(백터는 예를 들면 플라스미드, 파지, 코스미드, BAC, PAC 등이 이용될 수 있다)를 제작하고 상기 라이브러리를 본 발명의 단백질을 암호화하는 DNA를 기초로 제작한 프로브를 이용하여 콜로니 또는 플러그 혼성화를 수행하거나, 본 발명의 단백질을 암호화하는 DNA에 특이적인 프라이머를 작성하고, 이를 이용한 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써 제조할 수도 있다.
- [0024] cDNA는 예를 들어, Foxp3를 코딩하는 유전자를 가지는 세포에서 추출한 mRNA를 기초로 cDNA를 합성하고, 상기 합성된 cDNA를 벡터로 삽입하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 상기 cDNA 라이브러리를 전개하여, 상기과 동일한게 콜로니 또는 플러그 혼성화를 수행하거나 또는 PCR을 수행하여 제조할 수 있다.
- [0025] 이렇게 분리된 유전자는 이들이 코딩하는 아미노산 수준에 있어서, Foxp3의 아미노산 서열(서열번호 1)과 높은 상동성을 가지는 것이 바람직하며, 높은 상동성이란 아미노산 서열 전체에서, 적어도 50% 이상, 더 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상의 서열 동일성을 가리킨다. 아미노산 서열이나 염기서열의 상동성은 BLAST(Karlin, S and Altschul, SF. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873-5877, 1993) 에 기초하여 개발된 BLASTN 이나 BLASTX 라 불리는 프로그램(Altschul, SF. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990)을 사용하여 분석될 수 있으며 구체적인 방법은 다음의 웹사이트에 공지되어 있다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- [0026] 본 발명의 구체예에서, Foxp3을 코딩하는 유전자는 세포 내 전달을 위한 발현 벡터에 포함되어 제공되는 것이 바람직하다. 상기 Foxp3을 코딩하는 유전자는 DNA 및 DEAE-텍스트란의 복합체, DNA 및 핵 단백질의 복합체, DNA 및 지질의 복합체 등의 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입시킬 수 있는데, 이를 위해 상기 Foxp3을 코딩하는 유전자는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터 모두 사용할 수 있으며, 상기 벡터의 종류는 플라스미드, 파지, 코스미드 등이 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, “형질전환” 형질도입에 의해 외래 DNA를 세포로 유입시키는 것을 의미한다. 형질전환은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-텍스트란-매개 형질전환법, 폴리브렌-매개 형질전환법, 전기충격법, 미세주사법, 리포좀 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당업계에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 또는 바이러스 벡터 입자를 사용하여 세포 내로 유전자를 전달시키는 것을 의미한다.
- [0028] 또한, Foxp3을 코딩하는 유전자는 발현 벡터 내에서 프로모터/인핸서 서열과 같은 발현 조절 서열 및 기타 전사, 해독 또는 프로세싱에 필요한 서열들과 함께 결합될 수 있다. 조절 서열은 뉴클레오타이드의 구성적 발현(constitutive expression)을 지시하는 것뿐만이 아니라 조직-특이적 조절 및/또는 유도성 서열을 포함할 수 있으며, 발현 벡터의 설계는 형질전환시킬 숙주 세포, 목적하는 발현 수준 등과 같은 요소에 의해 결정될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 Foxp3을 코딩하는 유전자는 벡터에 포함된 상태로 세포배양 시스템에서 적절한 진핵세포에 도입시켜 Foxp3을 직접적으로 발현시키거나, 원핵세포에 형질전환시켜 Foxp3을 발현시킨 후, 이들 단백질을 정제하여 사용할 수 있다. 이러한 본 발명의 Foxp3은 예를 들면 정제된 단백질, 수용성 단백질, 또는 표적 세포로의 전달 또는 투여를 위한 담체에 결합된 형태의 단백질이나 아미노산 잔기와 융합된 형태를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 이용할 수 있는 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자는 인간을 포함한 동물, 예를 들어 원숭이(monkeys), 돼지(pigs), 말(horses), 소(cows), 양(sheeps), 개(dogs), 고양이(cats), 생쥐(mice), 토끼(rabbits) 등으로부터 유래할 수 있다. 상기 Foxp3을 코딩하는 유전자는 바람직하게는 서열번호 2로 표시되며, 항염증, 신경병증성 통증의 개선, 예방 또는 치료 활성을 가지는 한 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명에 있어서, “나노입자”는 약물을 중심으로 하여 고분자의 코팅층이 형성되어 이루어진 입자를 의미하는 것으로서, 편의상 “고분자의 종류 나노입자”의 형태로 표기할 수 있다.
- [0032] 상기 약물을 둘러싸는(즉, 코팅하는) 고분자로는 당업계에 공지된 생분해성 고분자(biodegradable polymer)가 이용될 수 있다. 또한, 오랜 시간 동안 체내에서 머물기 위해 다양한 분자량의 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리에틸렌글리콜과 결합되어 있는 생분해성 고분자를 사용한다. 그 예로는 폴리스티렌-코-에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이민-코-에틸렌글리콜, 폴리포스파젠-코-에틸렌글리콜, 폴리락타이드-코-에틸렌글리콜, 폴리락티드-코-글리콜라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리카프로락톤-코-에틸렌글리콜, 폴리안하이드라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리말릭산-코-에틸렌글리콜 및 이의 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리하이드록시부틸레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리카르보네이트-코-에틸렌글리콜 및 폴리오르소에스테르-코-에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리

콜, 폴리-L-라이신-코-에틸렌글리콜, 폴리글리콜라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리메틸메타아크릴레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈-코-에틸렌글리콜, 및 이의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 것이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 폴리락티드-코-글리콜라이드(PLGA, (poly(lactic-co-glycolic acid)이다. 상기 고분자들은 낮은 독성뿐만 아니라 탁월한 생체 적합성을 보여주는 것으로 알려져 있다[A. J. Domb, et al. Handbook of biodegradable polymers, Harwood academic publishers, USA, 1997).

- [0033] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 고분자는 미국 FDA에 의해 승인된 PLGA를 이용하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 구체예에서, 본 발명의 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 0.1 내지 1000mg/ml의 농도로 포함하는 것이 바람직하며, 5 내지 20 µg/ml의 농도로 포함하는 것이 더 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 구체예에서, Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자는 미세아교세포(microglia cell), 뉴런 세포(neuronal cell) 및 성상세포(astrocytic cell)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 타겟하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 미세아교세포를 타겟하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명에 따른 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자의 내부는 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자가 고분자 나노입자의 내부 임의의 위치에 위치하고 있는 것이다. 상기 나노입자를 척수관 주사할 경우 고분자가 서서히 분해되면서 담지되어 있는 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자가 방출되기 때문에 오랫동안 높은 약물 농도를 유지할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, “예방”은 본 발명의 조성물에 의해 병인을 제거하거나 조기 발견하여 해당질환을 막는 모든 행위를 의미한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, “치료”는 본 발명의 조성물에 의해 질환의 증세가 호전되는 모든 행위를 의미한다.
- [0039] 본 발명에 있어서, “개선”은 본 발명의 조성물에 의해 생체 대사, 세포 또는 기관의 기능이 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 상기 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자와 함께 신경병증성 통증의 예방, 치료 또는 개선 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 구체예에서, 본 발명은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 제제화 할 수 있다.
- [0043] 상기 약학적 조성물은 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 추가적인 성분의 예로는 유당, 탈크, 전분, 스테아린산 마그네슘, 결정성 셀룰로오스, 락토오스, 젤라틴, 만니톨, 과옥소산, 이성화당, 폴리비닐알코올, 붕산 및 탄산나트륨이 있다.
- [0044] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여할 수 있으며, 신속한 효과를 위하여 비경구 투여하는 것이 바람직하며, 척수강에 척수관 주사되는 것이 더 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두 개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 구체예에서, 본 발명은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 포함하는, 신경병증성 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 식품 첨가제 또는 식이보조제일 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 첨가제인 경우, Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식

품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0047] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0048] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 10중량%, 바람직하게는 0.01 내지 0.1중량%로 포함된다.

[0049] 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.

[0050] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 장기간 복용이 가능하다.

[0052] 또한 본 발명은 상기 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증 치료방법포함하는 신경병증성 통증 치료방법을 제공한다.

[0053] 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 개체의 척수에 주입되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 발명에 따른 신경병증성 통증 치료방법은 Foxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자가 척수 내 세포의 염증관련 인자의 발현을 감소시킴으로써, 신경병증성 통증을 치료할 수 있다.

[0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0058] 실험예 1. 신경병증성 통증 동물모델 제조

[0059] 1-1. 동물 실험

[0060] 신경병증성 통증 동물 모델을 제조하기 위하여, 대한 바이오링크(DBL, 충북)에서 Sprague-Dawley 래트(6 wks males, 150-200 g)를 구입하여 1주일 동안 새로운 환경에 적응시켰다. 모든 동물은 12시간의 밝음/어두움 주기에서 1 케이지 당 3마리씩 사육하였으며, 음식 및 물에 대한 자유로운 접근이 가능한 환경에서 사육하였다. 본 실시예의 동물실험은 충남대학교의 동물 관리 및 이용위원회(CNUH-A018-0020)의 승인을 받았으며, 식약처의 통증 연구의 윤리 가이드라인에 따라 수행되었다.

[0062] 1-2. L5 SNL(L5 spinal nerve ligation) 유도된 신경병증성 통증 동물 모델 제조

[0063] 실험예 1-1의 Sprague-Dawley 래트를 아이소플루레인(isoflurane, 2% in oxygen mixture; Hana pharm, Kyung-gi, Republic of Korea)으로 마취하고, 시각적으로 L4 및 L5 척추 신경을 확인할 수 있도록 왼쪽 6번 횡돌기(left lumbar(L) 6 transverse process)를 제거하였다. 이어서 왼쪽 L5 척추 신경을 분리하고 3-0 실크실로 타이트하게 묶었다. 완전히 지혈한 후에 상처를 봉합하였다. 대조군은 실험군과 동일한 방법으로 수술하되, SNL을 유도하지 않은 것이다.

[0065] 실험예 2. 본 프레이 필라멘트(von frey filament)를 이용한 통증 행동 시험

- [0066] 통증 행동 시험은 J. M. Chung, H. K. Kim and K. Chung, **Segmental spinal nerve ligation model of neuropathic pain**. *Methods Mol Med*. 2004;99:35-45에 기재된 방법으로 수행하였다. 기계적 이질통(Mechanical allodynia)은 수술 후 3, 7, 10, 12 및 14일 째에 본 프레이 필라멘트(NC12775-99, Touch Test® Sensory Evaluators, 20-Piece Hand Kit, North Coast Medical & Rehabilitation Products, Camino Arroyo Gilroy, CA)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 동물모델의 뒷발의 발바닥 표면에 본 프레이 필라멘트를 1 내지 2초 동안 3회 적용하였으며, 업-다운 테스트 패러다임을 통해 각 발의 역치를 측정하였다. 역치 측정 시 기준선을 설정하기 위하여 10-g 자극을 사용하였으며, 신경병증성 통증의 발생을 판단하기 위하여 4-g의 자극을 먼저 적용하였다. 자극을 적용하였을 시 긍정적 응답이 발생하는 경우 더 작은 본 프레이 헤어를 사용하였다. 이와 반대로, 부정적인 응답이 발생하는 경우 더 높은 힘을 가하였다.
- [0068] **실험예 3. 척수관 주사(Intrathecal injection)**
- [0069] 척수관 주사는 J. L. Hylden and G. L. Wilcox, **Intrathecal morphine in mice: a new technique**. *Eur J Pharmacol*. 1980;67:313-6에 기재된 방법으로 수행하였다.
- [0070] 구체적으로, 래트를 수술대에 눕힌 후 아이소플루레인을 이용하여 마취시켰다. 해밀톤 주사기(50 μ l; Reno, NV)를 이용하여, 마취된 래트의 5번 요추(L5) 및 6번 요추(L6)의 사이의 요추강에 PLGA 나노입자 용액(플라스미드 pFxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 PBS에 10mg/ml의 농도로 재부유시킨 것) 20 μ l를 주사하였다. 대조군은 Fxp3을 클로닝하지 않은 플라스미드 pNC를 이용하였다. 척수관 주사가 완료되었을 시 꼬리-플릭 반응(tail-flick response, TFR)이 관찰되었다.
- [0072] **실험예 4. 정량적 RT-PCR(quantitative real time PCR)**
- [0073] Hybrid-R 키트(GeneA11, Seoul, Korea)를 이용하여 동물모델의 척수의 동측성 배면각(ipsilateral dorsal horn)(L4-L5 segment, 0.7 cm) 또는 BV2 세포로부터 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA에 TOPscript RT DryMix(Enzynomics, 대전, 한국) 20 μ l를 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 구체적으로, 상기 정량적 RT-PCR은 95°C에서 10분, 그 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 40회 반복하였다. 또한 상기 정량적 RT-PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다; mouse GAPDH, forward: 5' - ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG -3', reverse: 5' - CAC ATT GGG GGT AGGAAC AC- -3'; mouse TNF- α , forward: 5' - AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA-3', reverse: 5' - GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T -3'; mouse IL-1 β , forward: 5' - TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT -3', reverse: 5' - AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT -3'; mouse IL-6, forward: 5' - TCC ATCCAG TTG CCT TCT TGG -3', reverse: 5' - CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G -3'; rat Fxp3, forward: 5' - CGG GAG AGT TTC TCAAGC AC-3', reverse: 5' - GGAGCT CTT GTC CAC TGA GG--3'; rat GAPDH, forward: 5' - CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC-3', reverse: 5' - TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT -3'; rat IL-1 β , forward: 5' - CAGCAG CAT CTC GAC AAG AG -3', reverse: 5' - CAT CAT CCC ACG AGT CAC AG -3'; TNF- α , forward: 5' - AGA TGT GGA ACT GGC AGA GG -3', reverse: 5' - CCC ATT TGG GAA CTTCTC CT -3'; rat IL-6, forward: 5' - CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG -3', reverse: 5' -ACA GTG CAT CAT CGC TGT TC -3'; rat COX-2 forward: 5' - CAG TAT CAG AAC CGC ATTGCC -3', reverse: 5' - GAG CAA GTC CGT GTT CAA GGA-3'; rat IL-10 forward: 5' -CCT GCT CTT ACT GGC TGG AG-3', reverse: 5' - TGT CCA GCT GGT CCT TCT TT-3'. 각 표적 유전자의 mRNA 발현 수준은 GAPDH mRNA의 발현 수준으로 정규화 하였으며, 그 값은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 계산하였다(K. J. Livak and T. D. Schmittgen, **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method**. *Methods*. 2001;25:402-8).
- [0075] **실험예 5. 웨스턴 블롯팅(western blotting)**
- [0076] 세포를 단백질을 추출 버퍼(PRO-PREP, Intron, Daejeon, Republic of Korea)와 함께 배양하여 세포 용해물을 준비하였다. 브래드포드 분석(Bradford assay, BIO-RAD, Hercules, CA)을 통해 세포 용해물의 단백질을 정량하였다. 세포 용해물 20 μ g을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔로 분리하였으며, 이를 니트로셀룰로오스 멤브레인에 트랜스퍼하였다. 상기 멤브레인을 1차 항체(anti-Fxp3, 1:1,000; Abcam; anti- β actin, 1:1,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 함께 배양한 후 세척하였다. 세척된 멤브레인에 HRP가 결합되어 있는 2차 항체(anti-rabbit-HRP or anti-mouse-HRP, KOMA, Seoul, Republic of Korea)를 첨가하여 배양한 후 세척하였다. 세척된 멤브레인을 ECL 용액(enhanced chemiluminescence solution, GE Healthcare, Little Chalfont, UK)과 반응시켰으며, 이를 ChemiDoc Touch imaging system(BIO-RAD)을 통해 신호를 검출하였다.
- [0078] **실험예 6. 면역조직화학염색**

- [0079] 래트를 소디움펜토바비탈(100 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 헤파린화된 PBS(pH 7.4)를 관류(perfuse)시켰다. 그 후, 연동 펌프를 사용하여, 래트에 4% 파라포름알데하이드(Merck, Darmstadt, Wetzlar, Germany)(in PBS)를 20ml/min의 속도로 10분 동안 관류하였다. 관류를 마친 후 래트의 척수(L4-L6) 절편을 즉시 채취하여 고정액에 밤새도록 담근 후, 10 내지 30% 수크로오스 용액에 담갔다. 2일 후 척수 절편을 크라이오스탯(CM1950, Leica Biosystems, Germany)을 이용하여 30 μ m의 두께로 절단하였으며, 절단된 절편을 저장 버퍼(30% 글리세롤, 30% 에틸렌글리콜 in PBS)에 담가 4℃로 유지하였다. 이중 면역염색을 위하여, 유지된 절편을 블로킹 버퍼(5% 닭 혈청, 0.3% Triton X-100 in PBS)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 절편과 1차 항체(Iba1, 1:400,; Wako, Richmond, VA, USA; NeuN, 1:200; Millipore, Billerica, MA, USA; GFAP, 1:2,000; DAKO, Glostrup, Denmark; Arg1, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; iNOS, 1:200; BD, San Jose, CA, USA; Foxp3, 1:400; Abcam, Cambridge, UK)를 함께 배양한 후 세척하였다. 절편을 1차 항체와 동일한 버퍼에 희석된 Cy3 또는 FITC(1:400, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 접합된 이차 항체와 함께 배양한 후 세척하여 준비하였다. 준비된 절편을 DAPI(5 μ g/ml)로 대조 염색하였으며, 마운팅 배지(Biomedica, Foster city, CA)를 포함하는 슬라이드에 장착하였다. 면역 염색된 절편의 이미징은 공초점 현미경(TCS SP8, Leica)을 이용하였다.
- [0081] **실험예 7. MTT 분석을 통한 세포 독성 확인**
- [0082] MTT 분석을 통해 상기 실험예 5의 플라스미드 pFoxp3을 포함하는 PLGA 나노입자의 세포 독성을 확인하였다. 구체적으로, BV2 세포를 96웰 플레이트에 5×10^3 cells/well로 접종하여 배양하였다. 배양 1일 경과 후, BV2 세포에 플라스미드 pFoxp3을 포함하는 PLGA 나노입자를 각각 10, 20, 50, 100, 200 μ g/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. PLGA 나노입자가 처리된 BV2 세포에 MTT 용액(100 μ l of 5mg/ml solution)을 첨가하고, 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 웰의 배지를 제거한 후 DMSO 100ml을 첨가하여 15분 동안 반응시켰다. 세포 생존율은 마이크로플레이트 리더(Sunrise, Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria)를 이용하였으며, 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.
- [0084] **실험예 8. PLGA 나노입자의 실험관 내(in vitro) 섭취 분석**
- [0085] 24웰 플레이트에 BV2(murine microglial cell line), HT22(murine neuronal cell line) 및 U87MG(human astrocytic cell line) 세포를 1×10^4 cells/well로 접종하였다. 쿠마린 6이 포함된 PLGA 나노입자는 PBS에 5mg/ml의 농도로 재부유시켰으며, 재부유된 용액 10 μ l을 각 웰에 첨가하여 3시간 동안 배양하였다.
- [0086] 배양 후 형광 현미경을 이용하여 쿠마린 6이 포함된 PLGA 나노입자의 위치를 시각화하여, 각 세포에서 PLGA 나노입자의 세포질 섭취를 조사하였다.
- [0088] **실시예 1. Foxp3 과발현을 위한 플라스미드(pFoxp3) 제작**
- [0089] Foxp3 과발현을 위한 플라스미드를 제작하기 위하여, EcoRI 또는 XbaI 제한 효소 서열에 적응된 프라이머 쌍(5' -GAA TTC ATG CCC AAC CCT AGG CCA G-3' ; 5' -GTC TAG AAG GGC AGG GAT TGG AGC ACT TG-3')을 이용한 RT-PCR을 통해 전배양된 마우스 미세아교세포(microglia)로부터 마우스 Foxp3 유전자의 서열을 획득하였다. 획득된 마우스 Foxp3 유전자의 서열을 플라스미드 pAAV-EF1a-MCS-T2A-mCherry(pNC)에 서브클로닝하여 mFoxp3(서열번호 1) 및 mCherry를 발현하는 플라스미드 pAAV-EF1a-mFoxp3-T2AmCherry(pFoxp3)를 제작하였다. 상기 플라스미드 pFoxp3은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 Foxp3을 발현한다. 제조된 플라스미드 pFoxp3의 구조 및 벡터 맵은 각각 도 1 및 2A에 나타내었다.
- [0091] 제한효소 분석을 통해 제작된 플라스미드 pFoxp3를 확인하였다. 구체적으로, 플라스미드 pFoxp3를 제한효소 EcoR/XbaI으로 절단한 후 1% 아가로오스 겔에서 전기영동하였으며, 밴드를 확인하였다. 제한효소 분석 결과는 도 2B에 나타내었다.
- [0092] 도 2B에 나타난 바와 같이, 제한효소 EcoR/XbaI에 의해 절단된 플라스미드 pFoxp3은 크기가 5493 및 1293bp인 단편이 생성된다는 것을 확인하였다.
- [0094] **실시예 2. 플라스미드 pFoxp3을 포함하는 PLGA 나노입자 제조**
- [0095] 플라스미드 pFoxp3를 함유하는 PLGA 나노입자를 제조하기 위하여, 플라스미드 pFoxp3 용액(TE8.0 완충액 200 μ l, 플라스미드 pFoxp3 100 μ g)을 PLGA(Corbion, Amsterdam, the Netherlands) 25mg이 포함된 디클로로메탄(dichloromethane, DCM) 1ml에 첨가하였다. 상기 혼합물을 초음파 처리하여 1차 W1/O 에멀전으로 유화시켰다.

2% PVA1500(w/v) 2ml을 1차 W1/O 에멀전에 첨가한 후 초음파 처리하여 W1/O/W2 이중 에멀전을 제조하였다. 제조된 W1/O/W2 이중 에멀전을 2% PVA1500(w/v) 6ml에 희석하였으며, DCM을 증발시키기 위하여 실온에서 3시간 동안 교반시켰다. 또한 4℃에서 15분 동안 15,000g에서 초원심분리(Optima™ Max Ultracentrifuge, Beckman COULTER, Brea, CA)하여 PLGA 나노입자를 수집하였다. 수집된 PLGA 나노입자를 탈이온화된 RNase 프리-워터로 2회 세척하였다. 세척된 PLGA 나노입자를 물에 재현탁시킨 후 동결건조 시켰다.

[0097] 실시예 3. 플라스미드 pFoxp3의 Foxp3 과발현 및 염증관련 유전자 발현 억제 효과 검증

[0098] 플라스미드 pFoxp3(도 3A, 왼쪽)이 포함된 PLGA 나노 입자의 제조 및 신경병증성 동물 모델에의 상기 나노 입자의 적용에 앞서, 플라스미드 pFoxp3이 HEK293T 세포주에서 Foxp3 유전자를 과발현 시킬 수 있는지 여부를 검증하였다.

[0100] 3-1. 플라스미드 pFoxp3의 형질감염 여부 및 Foxp3 과발현 효과 확인

[0101] 플라스미드 pFoxp3을 세포에 형질감염시킨 후 형질감염 여부를 확인하였다. 구체적으로, HEK293T 세포에 플라스미드 pFoxp3을 형질감염시킨 후 mCherry의 발현을 형광현미경을 이용하여 확인하였다. 대조군은 플라스미드 pNC를 사용하였다.

[0102] 또한, 플라스미드 pFoxp3이 형질감염된 HEK293T 세포에서 Foxp3이 과발현 여부를 확인하였다. 구체적으로, 플라스미드 pFoxp3이 형질감염된 HEK293T 세포와 항-Foxp3 항체를 함께 배양한 후 웨스턴 블롯팅(실험예 5)을 수행하였다.

[0103] 플라스미드 pFoxp3의 형질감염 여부와 형질감염된 세포에서 Foxp3 단백질 발현 여부를 확인한 결과는 도 3A에 나타내었다.

[0104] 도 3A에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3에 형질감염된 HEK293T 세포에서 mCherry가 발현되는 것을 확인하였으며, 이는 플라스미드가 형질감염되었다는 것을 의미한다. 또한 플라스미드 pFoxp3에 형질감염된 HEK293T 세포에서 Foxp3 단백질 발현을 확인한 결과 대조군보다 현저히 높게 발현되는 것을 확인하였다.

[0106] 3-2. 플라스미드 pFoxp3이 형질감염된 세포의 염증관련 유전자 발현 억제 확인

[0107] 플라스미드 pFoxp3이 형질감염된 BV 세포를 이용하여 Foxp3이 LPS-자극된 세포에서 전염증성 사이토카인의 유전자 발현을 억제할 수 있는지 여부를 조사하였다. 구체적으로, 플라스미드 pFoxp3 및 pNC(대조군)을 각각 BV 세포에 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 LPS(100ng/ml) 존재하에서 3시간 동안 추가로 배양하였다. 배양된 세포를 이용하여 정량적 RT-PCR(실험예 4)을 수행하여 전염증 사이토카인 유전자의 mRNA 발현을 측정하였으며, 그 결과는 도 3B에 나타내었다.

[0108] 도 3B에 나타낸 바와 같이, LPS로 처리한 pFoxp3군은 LPS를 처리한 대조군에 비해 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현이 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[0110] 실시예 4. 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 특성 분석

[0111] 4-1. 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 특성

[0112] 플라스미드 pFoxp3를 척수의 미세아교세포에 효율적으로 전달하기 위하여, 효능, 비용, 안전성 및 유전자 전달 시스템 선택의 편의성 등을 고려하였다. 그 결과, PLGA 공중합체를 플라스미드 pFoxp3의 전달 물질로 선정하였다. 상기 PLGA 공중합체는 미국 FDA(Food and Drug Administration)에서 우수한 생분해성 및 생체적합성을 인정받은 물질이다. 구체적으로, 상기 실험예 2에서 개시한 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자는 이중 PLGA 나노입자에 친수성인 플라스미드 pFoxp3을 캡슐화하기 위해 초음파 처리(sonication)에 의한 에멀전(W/O/W) 방법을 사용하였다. 제조된 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 크기 및 제타 전위를 측정하였다. 또한 상기 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 무결성(integrity) 및 크기를 투과 전자 현미경(TEM) 및 주사 전자 현미경(SEM)을 통해 측정하였다. 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 크기, 제타전위 및 무결성을 측정한 결과는 도 4A에 나타내었다.

[0113] 도 4A에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 평균 크기는 $224 \pm 16.5\text{nm}$ 이며, 제타전위는 $-18.9 \pm 5.08\text{mV}$ 임을 확인하였다. 또한 투과전자현미경(TEM) 및 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 무결성 및 캡슐 형태인 것을 확인하였다.

[0115] 4-2. 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 세포독성

- [0116] 상기 실험에 7에 개시한 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자에 대한 세포 독성을 확인하였다. MTT 분석을 통하여, 미세아교세포 BV2 세포에서 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 세포 독성을 확인하였다. MTT 분석 결과는 도 4B에 나타내었다.
- [0117] 도 4B에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자는 세포 독성이 거의 없는 것을 확인하였다.
- [0119] **실시예 5. 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 실험관 내(in vitro) 세포 섭취 및 사이토카인 발현 억제 활성 조사**
- [0120] 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 신경병증성 통증 동물 모델에 적용하기에 앞서, 세포가 상기 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 섭취하는지, 섭취된 후 Foxp3 단백질을 발현시키는지 및 LPS 자극에 대해 항염증 활성을 나타내는지 여부를 실험관 내에서 조사하였다. 구체적으로, HEK293T 세포를 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자와 38시간 동안 배양한 후 mCherry의 발현을 형광 현미경을 이용하여 확인하였다. 또한 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자가 섭취된 세포에서 Foxp3이 과발현되는지를 웨스턴 블롯팅(실험예 5)을 통해 확인하였다. 본 실험의 대조군으로는 플라스미드 pNP가 섭취된 세포를 이용하였다. 상기 실험 결과는 도 5A에 나타내었다.
- [0121] 도 5A에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자는 세포 내로 섭취되며, 섭취된 나노입자에 의해 세포 내 Foxp3이 과발현되는 것을 확인하였다.
- [0123] 또한 세포 내 섭취된 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자가 LPS-자극된 세포에서 전염증성 사이토카인의 유전자 발현을 억제할 수 있는지 여부를 조사하였다. 구체적으로, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 BV 세포에 형질감염시켰다. 대조군으로는 플라스미드 pNP가 포함된 PLGA 나노입자를 사용하였다. 형질감염된 세포를 LPS(100ng/ml) 존재 하에서 3시간 동안 추가로 배양하였다. 배양된 세포를 이용하여 정량적 RT-PCR(실험예 4)을 수행하여 전염증 사이토카인 유전자의 mRNA 발현을 측정하였으며, 그 결과는 도 5B에 나타내었다.
- [0124] 도 5B에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자처리군은 대조군에 비해 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현이 현저히 감소한 것을 확인하였다.
- [0126] **실시예 6. 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 생체 내(in vivo) 세포 섭취 분석 및 타겟 세포 유형 확인**
- [0127] 상기 실험예 1에서 제조한 신경병증성 통증 래트를 이용하여 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 생체 내 표적을 확인하였다. 구체적으로, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 신경병증성 통증 래트 모델의 척수관 주사하였다(실험예 3). 투여 4일 후 척수 내에 포함된 세포의 타입을 결정하기 위하여, 상기 래트 모델의 L5 척추 절편을 Iba1(microglia), GFAP(astrocytes) 및 NeuN(neurons) 항체로 면역염색하였으며, 이를 형광 현미경으로 확인하였다. 구체적인 실험방법은 실험예 6의 개시와 동일하게 수행하였으며, 생체 내 세포 섭취(실험예 8) 및 타겟 세포의 유형(실험예 6)을 확인한 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0128] 도 6에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 주사한 신경병증성 통증 래트 모델의 척추 세포에서 mCherry 및 Foxp3의 발현을 확인하였다(도 6A). 또한 신경병증성 통증 래트 모델에서 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자는 대부분 척추 미세신경 줄기, 즉, 미세아교세포에서 다량 흡수되었으나 정상세포 및 뉴런에는 흡수되지 않은 것을 확인하였다(도 6B).
- [0129] 상기 결과는 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자가 신경병증성 통증 래트 모델의 척추 미세아교세포를 표적하며, 상기 세포 내에서 Foxp3의 발현을 증가시킨다는 것을 의미한다.
- [0131] **실시예 7. 본 프레이 필라멘트(von frey filament)를 이용한 통증 행동 시험**
- [0132] 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자가 신경병증성 통증의 진통 감소 효과를 검증하기 위한 실험을 설계하였다(도 7A). 구체적으로, 상기 실험예 1의 방법으로 신경병증성 통증 래트 모델을 제조하였다. SNL 수술 후 3일째에 실험군에는 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 척수관(L5/L6 추간 관절) 주사하였다. 대조군에는 플라스미드 pNP가 포함된 PLGA 나노입자를 척수관 주사하였다. SNL 수술 후 3, 5, 7, 10, 14 일에 기계적 역치를 측정하여 통증 행동을 분석하였으며, 그 결과는 도 7B에 나타내었다.
- [0133] 도 7B에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자 투여군은 기계적 과민반응(Mechanical hypersensitivity)이 약 7일 동안, 특히 4일 째에 현저히 감소하는 것을 알 수 있다.

- [0135] 또한 상기 실험을 통해 확인된 통증 감소가 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자 투여로 인한 것인지 여부를 조사하였다. 구체적으로 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 투여한 래트의 L5 척추 절편을 준비하였다. 상기 래트는 수술 후 3일째(POD3) 및 7일째(POD4)인 것을 이용하였으며, 대조군은 수술 후 플라스미드 pNC가 포함된 PLGA 나노입자를 투여한 래트를 이용하였다. 상기 래트 모델의 L5 척추 절편을 Iba1(microglia marker) 항체로 면역염색하였다. 면역염색된 절편을 형광현미경으로 관찰하였으며, 그 결과는 도 7C에 나타내었다. 도 7C의 점선은 척수 등쪽뿔의 동측(ipsilateral side of the spinal dorsal horn)을 표시한 것이다.
- [0136] 도 7C에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자 투여군은 미세아교세포의 Iba1 반응성은 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다.
- [0138] 상기 결과는 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자가 신경병증성 통증 래트 모델에서 미세아교세포의 활동을 감소시킴으로써 통증을 감소시킨다는 것을 의미한다.
- [0140] **실시예 8. 신경병증성 통증 래트 모델에서 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자의 통증 관련 유전자의 발현 조절 확인**
- [0141] **8-1.** 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자에 의한 통증 완화 기전을 이해하기 위해 척수 등쪽뿔에서 염증 관련 유전자의 발현을 분석하였다. 본 실시예에서 염증 관련 인자의 발현을 분석한 이유는 활성화된 미세아교세포는 신경병증성 통증이 발생하는 경우 염증인자의 발현을 조절하기 때문이다. 구체적으로, 신경병증성 통증 동물 모델에 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 척수관 주사하였다. 척수관 주사 3일째인 신경병증성 통증 동물 모델의 척수 등쪽뿔의 동측면에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 및 IL-10 유전자의 mRNA 발현을 정량적 RT-PCR을 통해 분석하였다. 대조군은 신경병증성 동물모델에 플라스미드 pNC가 포함된 PLGA 나노입자를 척수관 주사한 것이다. 정량적 RT-PCR 분석 결과는 도 8A에 나타내었다.
- [0142] 도 8A에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 주사한 실험군은 척수 등쪽뿔의 동측면에서 전 염증성 유전자(proinflammatory gene)인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 COX-2 유전자의 mRNA 발현이 모두 감소한 반면, 대조군은 상기 유전자들의 발현이 현저히 증가한 것을 알 수 있다. 또한 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 주사한 실험군은 항염증 유전자(anti-inflammatory gene)인 IL-10의 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였다.
- [0144] **8-2.** 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 주사한 실험군에서 척수 미세아교세포에서 신경병증성 통증 관련 유전자의 발현 조절에 대해 분석하였다. 이를 위해 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 척수관 주사한 후 4일째인 래트 모델의 L5 척추 절편을 제작하였다. 상기 L5 척추 절편을 항 Iba1 항체와 항 iNOS 항체(전 염증 마커) 또는 항 Arg1 항체(항염증 마커)로 동시에 면역염색하였다. 음성 대조군은 어떠한 처리도 하지 않았으며, 양성 대조군은 신경병증성 통증 래트 모델에 플라스미드 pNC가 포함된 PLGA 나노입자를 사용하였다. 신경병증성 통증 관련 유전자의 발현 조절에 대해 분석한 결과는 도 8B에 나타내었다.
- [0145] 도 8B에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 pNC가 포함된 PLGA 나노입자를 주사한 실험군은 척수 등쪽뿔에서 iNOS와 Arg1의 발현은 음성대조군(Sham)에 비해 증가하였다. 반면에, iNOS는 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 주사한 실험군에서 37.6%, Arg1은 양성대조군(NC NPs)에 비해 70.3%의 증가를 보였으며, 보다 구체적으로는 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 주사한 실험군의 미세아교세포에서 확인되었다.
- [0147] 상기 결과는 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자가 TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 및 iNOS와 같은 전 염증성 유전자의 하향 조절; 및 IL-10 및 Arg1과 같은 항 염증성 유전자의 상향 조절과 항 염증성 유전자의 상향 조절을 통해 신경병증성 통증을 감소시킨다는 것을 의미한다.
- [0149] 종합적으로 본 발명자들은 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자를 개발하고, 개발된 나노입자가 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 세포 및 동물 수준에서 신경병증성 통증을 감소시킨다는 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 플라스미드 pFoxp3이 포함된 PLGA 나노입자가 신경병증성 통증의 치료제로서 이용될 수 있음을 의미하는 바, 신경병증성 통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.
- [0151] 이하, 제제예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 제제예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 제제예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.
- [0153] **제제예 1. 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조**
- [0154] **1-1. 산제의 제조**

[0155] Fxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자 20 mg

[0156] 유당 100 mg

[0157] 탈크 10 mg

[0158] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0160] 1-2. 정제의 제조

[0161] Fxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자 10 mg

[0162] 옥수수전분 100 mg

[0163] 유당 100 mg

[0164] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0165] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0167] 1-3. 캡슐제의 제조

[0168] Fxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자 10 mg

[0169] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0170] 락토오스 14.8 mg

[0171] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0172] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0174] 1-4. 주사제의 제조

[0175] Fxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자 10 mg

[0176] 만니톨 180 mg

[0177] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0178] 인산이나트륨 이수화물 26 mg

[0179] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0181] 1-5. 액제의 제조

[0182] Fxp3 또는 이를 코딩하는 유전자를 함유하는 나노입자 20 mg

[0183] 이성화당 10 g

[0184] 만니톨 5 g

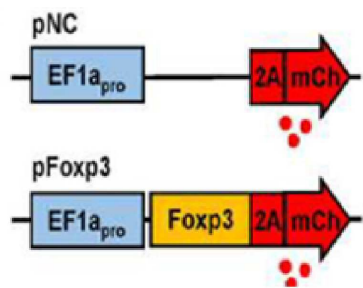
[0185] 정제수 적량

[0186] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

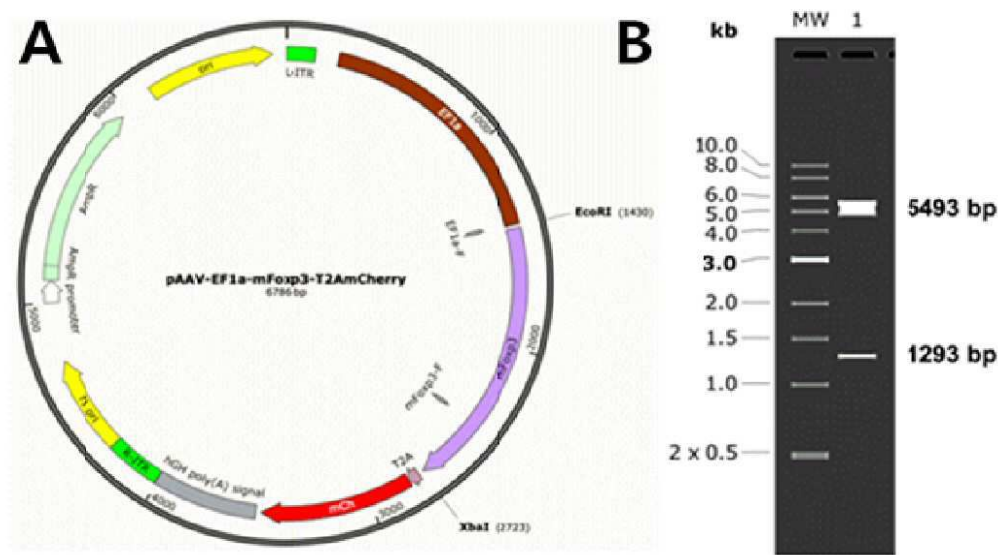
[0188] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

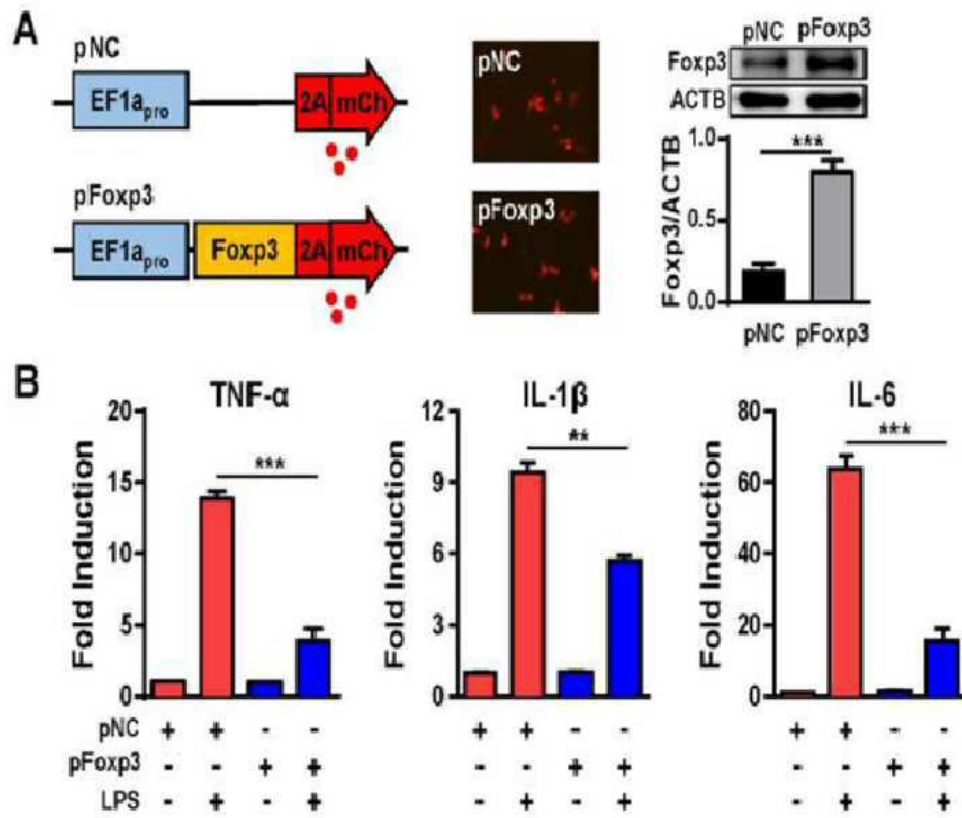
도면1



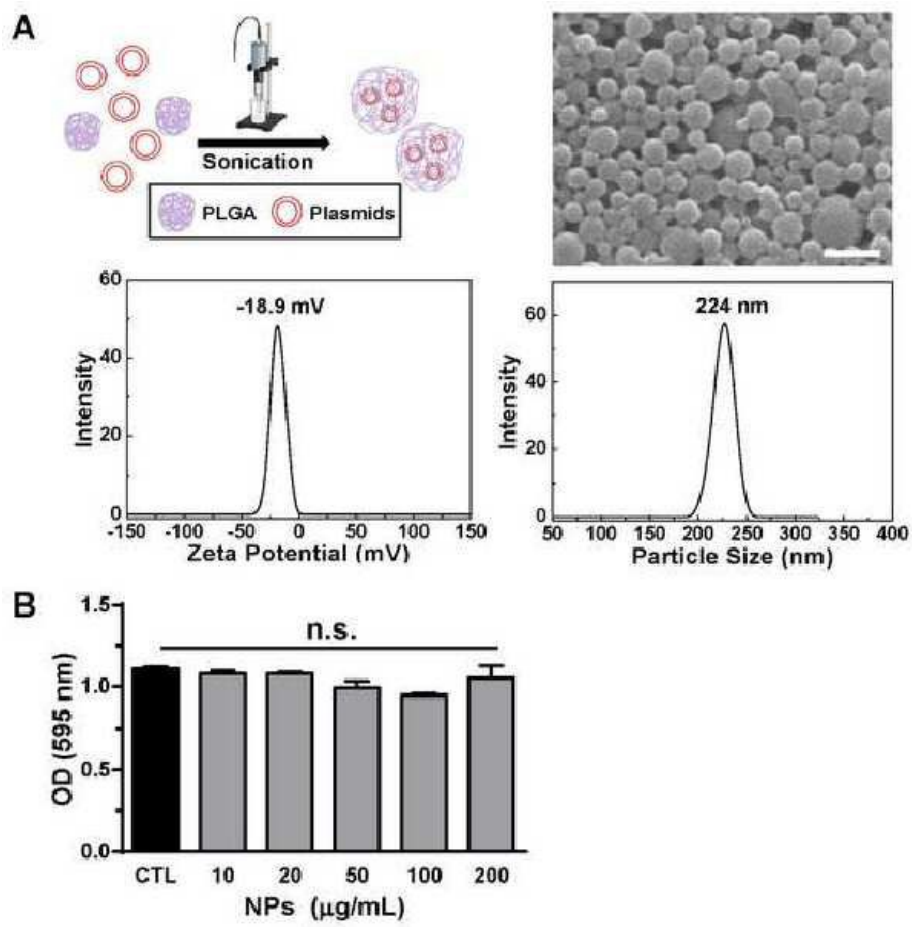
도면2



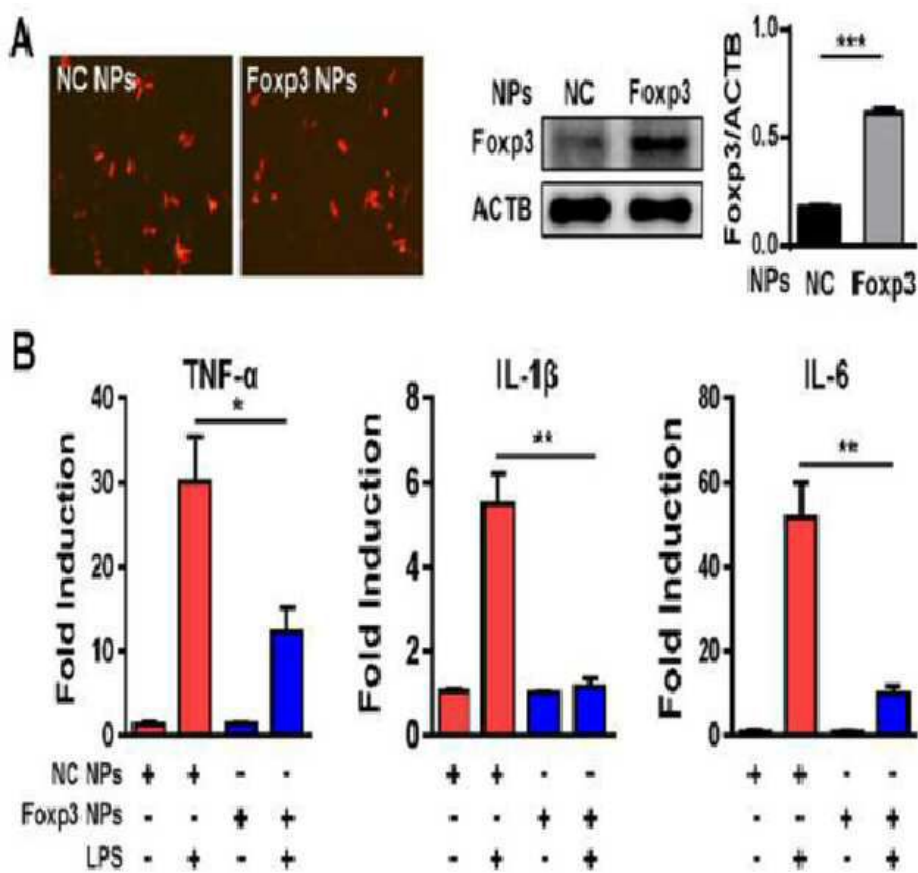
도면3



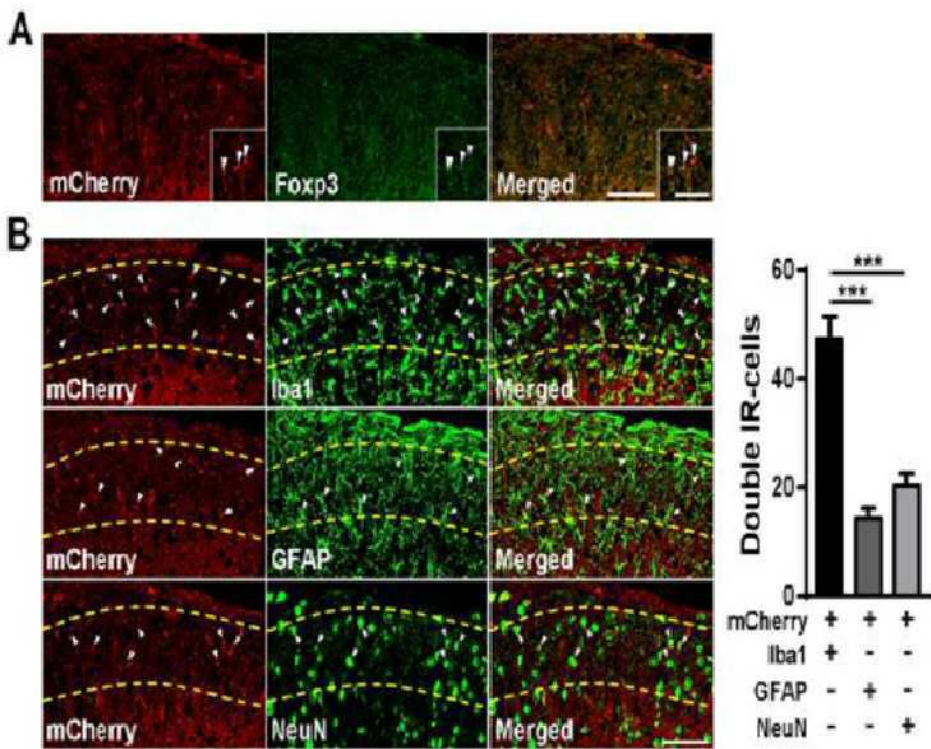
도면4



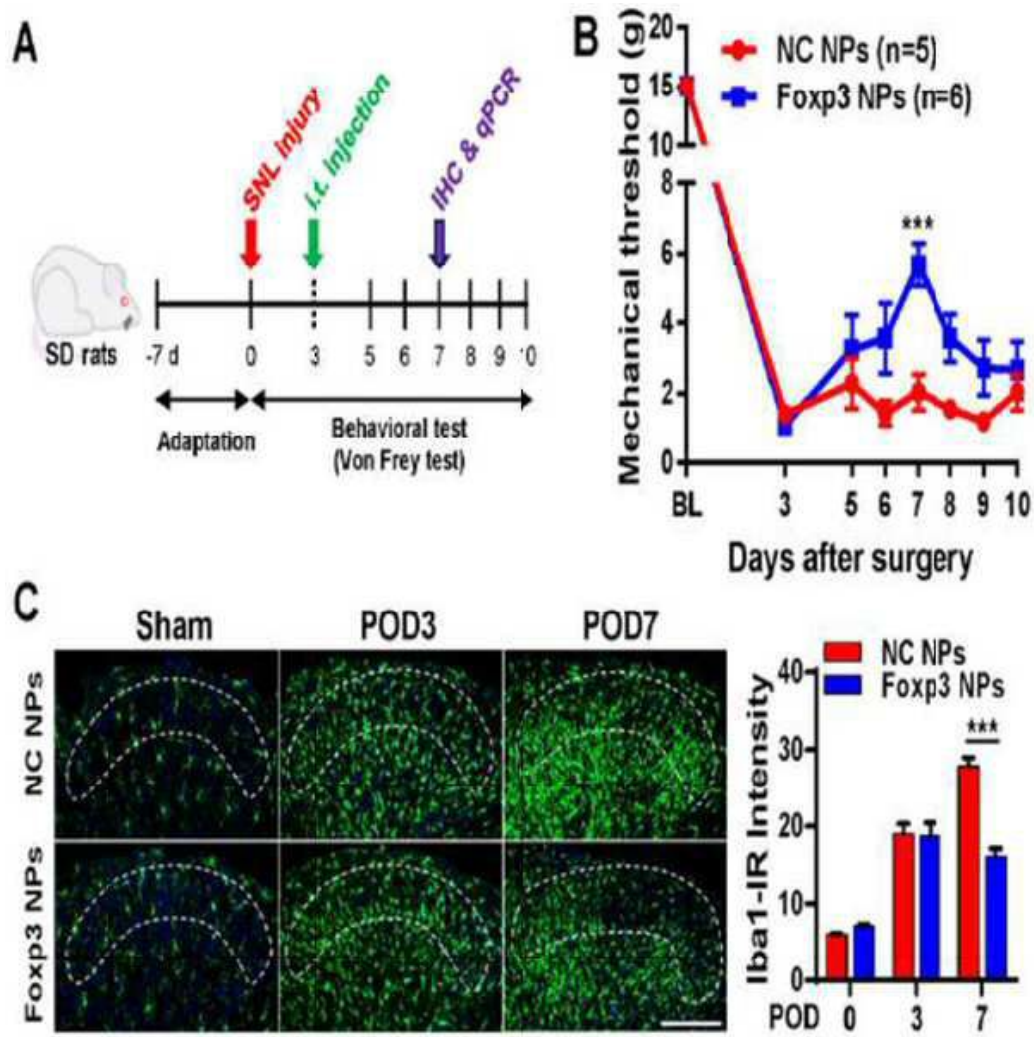
도면5



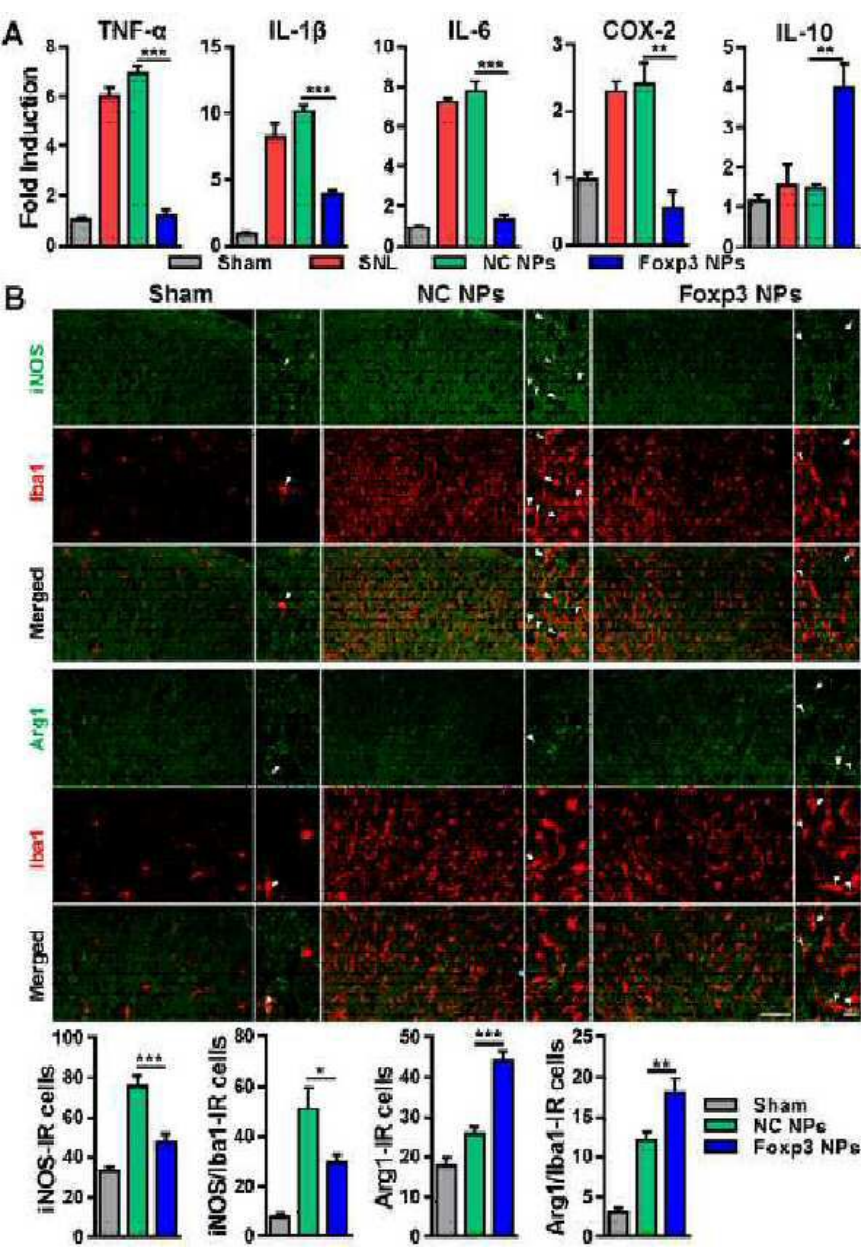
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University
- <120> Nanoparticle comprising Fosp3 or a gene encoding of the same and uses thereof
- <130> 1-66P
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 429
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxp3

<400> 1

Met Pro Asn Pro Arg Pro Ala Lys Pro Met Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Gly Pro Ser Pro Gly Val Leu Pro Ser Trp Lys Thr Ala Pro Lys Gly

20 25 30

Ser Glu Leu Leu Gly Thr Arg Gly Ser Gly Gly Pro Phe Gln Gly Arg

35 40 45

Asp Leu Arg Ser Gly Ala His Thr Ser Ser Ser Leu Asn Pro Leu Pro

50 55 60

Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Val Pro Leu Val Met Val Ala Pro

65 70 75 80

Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Ser Pro His Leu Gln Ala Leu Leu Gln

85 90 95

Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His Ala

100 105 110

Gln Thr Pro Val Leu Gln Val Arg Pro Leu Asp Asn Pro Ala Met Ile

115 120 125

Ser Leu Pro Pro Pro Ser Ala Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys Ala

130 135 140

Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp Val

145 150 155 160

Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Arg Ser Gly Thr Pro

165 170 175

Arg Lys Asp Ser Asn Leu Leu Ala Ala Pro Gln Gly Ser Tyr Pro Leu

180 185 190

Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe Glu

195 200 205

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu Asp

210 215 220

Glu Lys Gly Lys Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Val Val Gln Ser

225 230 235 240

 Leu Glu Gln Gln Leu Glu Leu Glu Lys Glu Lys Leu Gly Ala Met Gln
 245 250 255
 Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Ala Lys Ala Pro Ser Val Ala
 260 265 270
 Ser Met Asp Lys Ser Ser Cys Cys Ile Val Ala Thr Ser Thr Gln Gly
 275 280 285
 Ser Val Leu Pro Ala Trp Ser Ala Pro Arg Glu Ala Pro Asp Gly Gly
 290 295 300
 Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Ser

 305 310 315 320
 Phe Pro Glu Phe Phe His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Tyr His Asn Met
 325 330 335
 Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu
 340 345 350
 Ala Pro Glu Arg Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr
 355 360 365
 Arg Met Phe Ala Tyr Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala
 370 375 380

 Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser
 385 390 395 400
 Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Phe Glu Phe Arg Lys Lys
 405 410 415
 Arg Ser Gln Arg Pro Asn Lys Cys Ser Asn Pro Cys Pro
 420 425

 <210> 2
 <211> 1290
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Foxp3 gene
 <400> 2

atgccaacc ctaggccagc caagcctatg gctccttcct tggcccttgg cccatcccca	60
ggagtcttgc caagctggaa gactgcaccc aagggtctag aacttctagg gaccaggggc	120
tctgggggac ctttccaagg tggggacctg cgaagtgggg cccacacctc ttcttccttg	180
aaccccttgc caccatccca gctgcagctg cctacagtgc ccctagtcat ggtggcaccg	240
tctggggccc gactaggtec ctcacccac ctacaggccc ttctccagga cagaccacac	300
ttcatgcatc agctctccac tgtggatgcc catgccaga cccctgtgct ccaagtgcgt	360
ccactggaca acccagccat gatcagctc ccaccacctt ctgctgccac tggggcttct	420
tcctcaagg cccggcctgg cctgccacct gggatcaatg tggccagtct ggaatgggtg	480
tccagggagc cagctctact ctgcacctic ccacgtctcg gtacaccag gaaagacagc	540
aaccttttgg ctgcacccca aggatcctac cactgtctgg caaatggagt ctgcaagtgg	600
cctggttgtg agaaggtctt cgaggagcca gaagagtctc tcaagcactg ccaagcagat	660
catctcttgg atgagaaagg caaggcccag tgctctctcc agagagaagt ggtgcagtct	720
ctggagcagc agctggagct ggaaaaggag aagctgggag ctatgcagc ccacctggct	780
gggaagatgg cgtggccaa ggctccatct gtggcctcaa tggacaagag ctcttgctgc	840
atcgtagcca ccagtactca gggcagtgtg ctcccgccct ggtctgctcc tcgggaggct	900
ccagacggcg gctgtttgc agtgcggagg cacctctggg gaagccatgg caatagtcc	960
ttcccagagt tttccacaa catggactac ttcaagtacc acaatatgcg acccccttc	1020
acctatgcca ccttatccg atgggccaac ctggaagccc cggagaggca gaggacactc	1080
aatgaaatct accattggtt tactcgcatg ttgcctact tcagaaacca ccccgccacc	1140
tggaagaatg ccatccgcca caacctgagc ctgcacaagt gctttgtgcg agtggagagc	1200
gagaaggag cagtgtggac cgtagatgaa tttagatttc gcaagaagag gagccaacgc	1260
ccaacaagt gctccaatcc ctgcccttga	1290