



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0095512
(43) 공개일자 2017년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0016981

(22) 출원일자 2016년02월15일

심사청구일자 2016년12월09일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김동운

대전광역시 서구 둔산북로 160, 7동 1003호(둔산동, 한마루아파트)

오상하

대전광역시 서구 둔산로 155, 114동 902호(둔산동, 크로바아파트)

이민희

대전광역시 유성구 진잠로149번길 30, 205동 504호(교촌동, 한승미메이드아파트)

(74) 대리인

김순웅

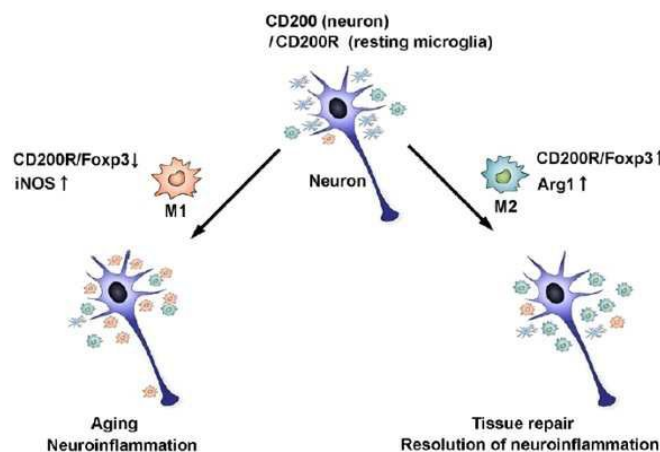
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제를 포함하는 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 발작성 질환 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상은 미세아교세포의 M2로의 분극화를 효과적으로 유도함으로써 항염증 인자를 분비하고 미세아교세포의 지속적 활성을 억제하여 뇌내 염증을 줄이고 뇌전증을 포함하는 다양한 발작성 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있으며, Foxp3를 측정하여 발작성 질환의 진단 및 발작성 질환 치료 물질을 스크리닝에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도14



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

C12Q 1/6883 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2800/2857 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A1A05006966

부처명 미래창조부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구_신진연구

연구과제명 미세아교세포의 활성화절에서 Foxp3신호 전달기전규명

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

Foxp3(forkhead box P3) 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, CD200 수용체 활성화제는 CD200 또는 이의 작용물질(agonist)인 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 발작성 질환은 간질, 비간질성 발작, 뇌전증, 해마경화증, 연속적 간질 발작 및 간질중첩 증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 Foxp3는 미세아교세포의 M2로의 분극화를 촉진하는 것인, 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

Foxp3 를 포함하는 발작성 질환 진단용 조성물.

청구항 6

Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 발작성 질환 진단용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 발현 수준을 측정하는 제제는 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제인, 발작성 질환 진단용 조성물.

청구항 8

제6항의 조성물을 포함하는 발작성 질환 진단용 키트.

청구항 9

- 1) Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현을 측정하는 단계;
- 2) 후보 물질을 처리하는 단계; 및

3) Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현의 변화를 측정하는 단계; 를 포함하는 발작성 질환의 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 발작성 질환 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌전증(epilepsy) 신경세포 중 일부가 발작적으로 짧은 시간에 과도한 전기를 발생시켜 뇌전증 발작(epileptic seizure)이 반복적으로 발생하는 만성화된 질환군으로서, 신경생물학적, 정신적, 인지적, 사회적 변화를 수반하는 심각한 신경 질환이다. 이러한 뇌전증은 알츠하이머병(Alzheimer) 및 뇌졸중(Stroke)에 이어 세 번째로 흔한 신경계 질환으로, 전 세계 인구의 약 0.5%~2%가 뇌전증을 앓고 있다. 또한, 전 세계적으로는 매년 10만명당 45명 정도의 새로운 환자가 발생하고 있고, 우리나라의 경우 약 30~40만명의 뇌전증 환자가 있는 것으로 추정되며 매년 2만명 정도의 새로운 뇌전증 환자가 발생한다고 보고되고 있다. 또한, 전체 뇌전증의 70%가 소아 청소년 연령에서 시작되고, 특히 유아기에 발병률이 높은 것으로 알려져 있다. 발병률과 유병률은 생후 1년 이내에 가장 높았다가 급격히 낮아지고, 60세 이상의 노년층에서 다시 급격히 증가하는 U자 형태를 보이며, 일생동안 발작을 경험하는 유병률은 10-15%에 이른다.

[0003] 뇌전증 중에서 현재까지 개발된 항뇌전증 약물에 반응하지 않는 뇌전증을 난치성 뇌전증(intractable epilepsy)이라고 하며, 전체 뇌전증의 약 20%를 차지하고 있다. 난치성 뇌전증의 가장 흔한 원인은 대뇌피질 발달기형(Malformations of Cortical Developments, MCD)이다. 대뇌피질 발달기형은 신경세포의 이동, 분화 및 성장의 이상으로 인한 대뇌 피질 이상 발육 또는 신경세포 이동장애 등을 특징으로 하는 질환 군으로 뇌전증뿐 만 아니라 발달 장애, 정신 지체, 및 인지 기능 장애 등 여러 신경학적 장애를 초래한다.

[0004] 뇌전증은 보통 약물 요법으로 치료가 어려운 것으로 알려져 있으며, 발작을 조절하는 것을 목표로 하는 질환이다. 그러나 뇌전증 환자의 30% 이상이 여러 가지 작용 기전의 약물을 사용해도 발작이 조절이 되지 않아 새로운 기전에 근거한 조절 및/또는 치료가 가능한 치료제의 개발이 필요하다.

[0005] 특히 뇌전증에서는 해마의 병변이 관찰되는 경우가 많으며, 이러한 병변을 해마 경화증(hippocampal sclerosis)이라고 한다. 해마경화증은 신경세포의 사멸을 주요한 특징으로 하며, 병변부위에서는 간질파가 발생하여 전두엽을 포함한 뇌 전체로 파급되는 경향이 있다.

[0006] 뇌전증 내 해마에서 신경세포의 사멸에도 불구하고 신경 세포의 흥분성이 증가되는 원인으로 미세아교세포를 비롯한 아교세포의 지속적 활성이 최근 원인으로 지적되고 있다. 미세아교세포의 활성은 크게 두 가지로 분류될 수 있으며, 하나는 M1(classical), 다른 하나는 M2(alternative)이다. M1 분극화는 IL-1 베타를 비롯한 염증성 인자를 분비하는 것으로 알려져 있고, M2 분극화는 항염증성 인자를 분비하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 국제특허공보 WO 2013/045652호에는 miR-134의 억제자를 이용한 뇌전증 치료에 대하여 개시하고 있으나, 아직까지 뇌전증과 같은 발작 질환에 있어서, 중추 신경계의 신경 흥분성을 적절하게 조절하여 이를 효과적으로 치료할 수 있도록 하는 새로운 치료제에 대해서는 널리 연구된 바 없고, 특히 미세 아교세포의 활성화 조절을 이용한 발작성 질환 치료제에 대해서는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 뇌전증을 포함하는 발작성 질환을 치료하기 위해 미세아교세포의 활성화 조절을 연구하던 중, Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제에 의한, CD200R/Foxp3 매개 신호전달이 미세아교세포의 분극화를 조절하여 발작성 질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 발작

성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 발작성 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 Foxp3 를 포함하는 발작성 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 Foxp3 의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 발작성 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 Foxp3 의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 발작성 질환 진단용 조성물을 포함하는 발작성 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 1) Foxp3 발현을 측정하는 단계; 2) 후보 물질을 처리하는 단계; 및 3) Foxp3 의 발현의 변화를 측정하는 단계; 를 포함하는 발작성 질환 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 Foxp3 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상은 미세아교세포의 M2로의 분극화를 효과적으로 유도함으로써 항염증 인자를 분비하고 미세아교세포의 지속적 활성을 억제하여 뇌 내 염증을 줄이고 뇌진증을 포함하는 다양한 발작성 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있으며, Foxp3를 측정하여 발작성 질환의 진단 및 발작성 질환 치료 물질을 스크리닝에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 카인산 주입 후 미세아교세포에서의 Foxp3 발현의 변화를 카인산 주입 1 내지 7일 동안 면역염색(A) 및 면역블랏(B), 면역 염색(C)를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 1의 A: 스케일 바, 100 μ m(a-d) 또는 20 μ m (e-f).
 도 1의 B: ***<0.001 vs. 대조군.
 도 1의 C: 스케일 바, 100 μ m(a-c) 또는 50 μ m (d-f).
 도 2는 Foxp3^{EGFP} 마우스를 이용한 면역 염색을 통해 Foxp3의 발현이 미세아교세포에서 증가됨을 확인한 결과를 나타낸 도이다(스케일 바, 2 μ m).
 도 3은 공초점 현미경을 이용한 Foxp3의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 4의 A는 Foxp3 및 CD200R의 공동 발현을 면역염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 4의 B 및 C는 재조합 CD200 처리에 따른 Foxp3, CD200R 및 Arginase 1 (Arg1)의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (***<0.001 vs. 대조군).
 도 5는 CD200 처리 및 si_CD200R 처리에 따른 CD200R 및 Foxp3 의 발현 변화를 면역블랏을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다 (***<0.001 vs. 대조군).
 도 6은 IL-4, LPS, CD200 처리 및 si_CD200R 처리에 따른 TNF- α (A), IL-10(B)의 발현 변화를 ELISA로 확인한 결과를 나타낸 도이다 (***<0.001 vs. 대조군).
 도 7은 CD200 처리에 따른 Arg1의 mRNA 발현 배수의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다 (***<0.001 vs. 대조군).
 도 8은 Foxp3 가 직접적으로 Arg1의 수준을 조절하는지 여부를 Foxp3-GFP 형질감염을 통해 면역 블랏 및 면역 세포화학법 (A) 및 실시간 PCR을 통한 정량화(B)로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 9는 STAT6 의 잠재적인 결합 부위를 확인하기 위한 Foxp3 프로모터 부위의 모식도이다.
 도 10은 Foxp3 프로모터에 결합한 STAT6의 상대적인 양 측정을 위한 PCR을 수행하기 위하여 사용되는 PCR 프라이머의 위치를 나타낸 모식도 및 PCR 증폭 결과를 나타낸 도이다.
 도 11은 재조합 CD200 단백질 처리 후 pSTAT6 및 tSTAT6 의 단백질 발현에 대한 면역블랏 결과를 나타낸

도이다.

도 12는 si_CD200R의 처리에 따른 STAT6의 인산화 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 IL-4(10 ng/ml, 3 h), CD200 (500 ng/ml, 3 h) 또는 Foxp3-GFP 과발현 (24h) 전처리에 따른 LPS 유도 뉴런 사멸 억제 효과 (A) 및 이에 따른 LDH 방출 억제(B), 산화질소 생산 억제(C)를 나타낸 도이다(***<0.001 vs. 대조군).

도 14는 CD200R/Foxp3 매개된 미세아교 세포의 M2로의 분극화 매커니즘의 개략적인 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 Foxp3(forkhead box P3) 및 CD200 수용체 활성화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 Foxp3 또는 CD200 수용체 활성화제는 미세아교세포의 M2로의 분극화를 촉진하여 항염증성 물질의 분비를 촉진하며, 미세아교세포의 지속적 활성을 억제하여 뇌내 염증을 줄일 수 있으므로, 뇌전증을 포함하는 다양한 발작성 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 Foxp3(forkhead box P3)는 scurf in 으로도 알려져 있으며, 면역계 반응에 관여하는 단백질이다. 인간인 경우 이의 단백질의 NCBI 참조 서열은 NP_001107849.1 이며, 마우스의 경우 NP_001186276.1 이다.
- [0020] 본 발명의 CD200은 매우 보존된 면역글로블린 슈퍼패밀리의 일원이며, 뉴런을 포함하는 다양한 세포 유형에서 발현된다.
- [0021] 본 발명의 CD200 수용체 활성화제는 CD200 수용체와 결합하여 CD200 수용체(CD200 R) 이하의 신호전달 및 이에 따른 매커니즘을 활성화시키는 물질을 말하며, 이는 CD200 또는 이의 작용물질(agonist)인 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명에 있어서 CD200의 작용물질은 CD200 수용체에 결합하여 CD200 이 CD200 수용체에 결합했을 때 유도되는 작용과 같은, 유사한, 동등한 정도의 작용을 하는 물질, 또는 약제, 또는 분자를 말한다. 상기 CD200의 작용물질은 CD200 수용체에 결합하여 미세아교세포의 M2로의 분극화를 효과적으로 유도할 수 있으며, 과적으로 뇌전증을 포함하는 발작성 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 발작성 질환은 완전한 중추신경계에서 신경세포들이 과도하게 흥분하여 뇌세포막 전압의 변화에 의해 “흥분과 억제의 정상적인 균형”이 변화하여 나타나는 현상에 의한 것이며, 이에 따른 경련을 수반하는 질환을 제한없이 포함할 수 있다. 본 발명의 발작성 질환은 부분 발작 및 전신 발작을 모두 포함한다. 바람직하게 본 발명의 발작성 질환은 비간질성 발작, 뇌전증, 해마경화증, 연속적 간질발작 및 간질중첩증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0024] 상기 비간질성 발작은 뇌의 비정상적인 전기 방전이 동반되지 않는 발작을 말하며, 가성발작(정신성 발작), 실신, 심장 부정맥, 뇌졸중, 편두통, 혈관이 꼬인 경우, 수면 발작, 저혈당 또는 어떤 약물을 갑자기 끊어서 생기는 금단 증상 및 극도의 스트레스나 불안감 등에 기인한 발작을 의미할 수 있다.
- [0025] 상기 뇌전증은 간질과 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 단일한 뇌전증 발작을 유발할 수 있는 원인 인자, 즉 전해질 불균형, 산-염기 이상, 알코올 금단현상, 심한 수면박탈상태 등 발작을 초래할 수 있는 신체적 이상이 없음에도 불구하고, 뇌전증 발작이 반복적으로(24시간 이상의 간격을 두고 2회 이상) 발생하여 만성화된 질환군을 의미한다. 또는, 뇌전증 발작이 1회만 발생하였다고 하더라도 뇌 영상검사(뇌 MRI 등)에서 뇌전증을 일으킬 수 있는 병리적 변화가 존재하면 뇌전증으로 분류한다. 본 발명에 따른 뇌전증은 뇌전증 발작, 부분 발작, 전신 발작, 급성 증상성 발작, 특발성 뇌전증, 증상성 뇌전증, 잠재성 뇌전증을 모두 포함한다.
- [0026] 상기 해마경화증은 측두엽의 내측에 위치하는 해마에서 아교세포 증식 및 신경세포 사멸이 일어나 결과적으로 해마의 크기가 작아지는 증상을 말한다. 이와 같은 해마경화증에 의하여 측두엽 간질이 일어날 수 있다.
- [0027] 상기 간질 중첩증은 전신형 간질 발작이 반복적으로 나타나며, 개개의 발작 사이에 의식회복이 없는 상태를 의미하며, 상기 연속적 간질 발작은(serial epilepsy) 개개의 발작 사이에 의식회복이 있는 상태를 의미한다. 간질 중첩증은 특히 발작이 10분 이상 지속되거나, 2회 이상의 발작이 의식 회복없이 이어서 발생하는 것을 의미한다.
- [0028] 또한 발명은 Foxp3는 미세아교 세포의 M2로의 분극화를 촉진하는 것인, 발작성 질환 예방 또는 치료용 약학적

조성물을 제공한다.

- [0029] 상기 Foxp3는 미세아교 세포의 활성화 형태인 M1 및 M2 중 M2로의 분극화를 유도 및 촉진하는 것을 특징으로 한다. 상기 M2로의 분극화 촉진은 뇌전증의 epileptogenesis를 억제하는 것을 의미할 수 있으며, Foxp3 처리에 의하여 미세아교세포에서 Arg1의 발현이 증가될 수 있으며, Foxp3는 CD200-CD200R-매개된 신호전달에 의존적이다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에도 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가성분, 즉, 약학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 통상의 것을 모두 사용 가능하고, 예를 들어 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 칼슘카보네이트, 텍스트린, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 성분들은 유효성분에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0032] Foxp3는 카인산(kainic acid)-유도된 해마 흥분독성에 의해 미세아교세포에서 발현이 증가하는 물질이다. 따라서 Foxp3를 타겟으로 하거나 Foxp3의 발현 수준을 측정하는 경우, 해마 흥분 독성에 따른 발작성 질환의 가능성을 효과적으로 진단할 수 있다.
- [0033] 이에 따라 본 발명은 Foxp3 를 포함하는 발작성 질환 진단용 조성물 및 Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 발작성 질환 진단용 조성물, 이를 포함하는 발작성 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0034] 본 발명에 있어, 진단은 발작성 질환의 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명에 있어서 상기 Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현 수준을 측정하는 제제는 mRNA 또는 단백질의 수준을 측정하는 제제일 수 있으며, mRNA 수준을 측정하는 제제는 Foxp3 에 특이적인 프라이머 또는 프로브일 수 있고, 예컨대 올리고머, 디옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, PNA 등 일 수 있다. 또한 단백질 수준을 측정하는 제제는 Foxp3 에 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 항체를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 발작성 질환 진단용 키트에 포함되는 조성물은 앞서 기술한 바와 같이 Foxp3 의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함할 수 있다. 상기 mRNA를 측정할 수 있는 물질로는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있고, 상기 단백질을 측정할 수 있는 물질로는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.
- [0037] 본 발명의 발작성 질환 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophiles* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 발작성 질환 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.
- [0038] 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있으며, 상기 본 발명에서 제작될 수 있는 키트의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [0039] 또한 본 발명은 1) Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현을 측정하는 단계; 2) 후보 물질을 처리하는 단계; 및 3) Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현의 변화를 측정하는 단계; 를 포함하는 발작성 질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 따른 발작성 질환의 치료제 스크리닝 방법에 따르면, 먼저 베이스 라인이 되는 Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현을 측정하는 1단계 이후, 발작성 질환의 치료제로 가능성이 있는 다양한 후보물질들을 처리하는 2단계, 후보물질의 처리에 따른 Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현의 변화를 측정하는 3단계를 수행하고, 후보물질의 처리에 의하여 Foxp3 또는 CD200 수용체의 발현이 베이스 라인의 발현양에 비하여 증가하였다면 이를 발작성 질환의 치료제로 선별하도록 할 수 있다.
- [0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실험 재료**

[0043] 항체 및 시약

[0044] 모든 상업적 항체 및 시약은 하기에서 구입하여 사용하였다 : 항-Foxp3 (ab22510, 1:200 (IHC, IF), 1:1000 (WB) dilution) 항체 (Abcam) ; antiactin (A5316, 1:5,000 dilution), 항 -Flag (F7425, 1:5000 dilution) 항체 (Sigma-Aldrich); 항-Iba-1 (019-19741, 1:400 dilution) 항체(Wako); 항-CD200R(AF2554, 1:500 dilution) 항체 R&D Systems; Hoechst (33342, 1:1000 dilution) 항체 (Invitrogen) ; 항-Arg1 (sc-20150, 1:1000, dilution), 항-phospho-STAT6 (sc-11762, 1:1000 dilution), 항-STAT6 (sc-621, 1:1000 dilution) 항체 (Santa Cruz Biotechnology); CD200 재조합 단백질 (2554-CD, 500 ng/ml) (R&D Systems); 및 박테리아 LPS (Sigma-Aldrich).

[0045] 미세아교세포의 배양

[0046] 일차 미세아교세포의 배양을 위해서, 1일령 신생아 SD 랫트 pup (Samtako, Osan, Korea) 를 ice-chilled dish 에서 뇌를 제거하였다. 수막 제거 후, 뇌 피질을 해부하고 5.5 mM 글루코오스, 20.4 mM 수크로오스, 및 4.2 mM 중탄산 나트륨을 포함하는 HBSS 에서 해리시켰다. 원심분리 후, 세포들을 poly-L-lysine-coated T75 플라스크에 위치시키고, 20% FBS, 100 μ m 비필수 아미노산 용액, 2 mM L-글루타민 및 항생제를 포함하는 MEM 배지에서 유지시켰다. 7일 후, 상기 플라스크를 2시간 동안 200rpm으로 37도에서 orbital shaker 로 교반하고, 부유 세포를 갖는 상청액을 수집하였다. 분주 후, 디쉬에 미세아교세포가 부착될 수 있도록 하기 위하여 1시간 동안 배양하고, 비-부착 세포(아스트로사이트)를 제거하기 위하여 배양 배지로 다시 한번 세척하였다. 미세아교세포를 계수하고 10% FBS, 100 μ M 비필수 아미노산 용액, 1.4 mM L-글루타민 및 항생제를 포함하는 MEM 성장 배지에 분주하였다. 이들 조건 하에서, 미세아교세포 집단의 순도는 95% 이며, 이는 미세아교세포를 검출하기 위한, 항-Iba-1을 이용한 면역형광분석법에 의해 확인되었다.

[0047] 쥐와 미세아교세포라인인 BV2 및 해마 뉴런세포주 HT22는 5% 열 불활성화된 FBS 및 항생제가 보충된 DMEM/F12 (PAA)에서 유지되었다. 모든 배양은 37도, 5% 이산화탄소 가습화 대기에서 유지시켰다. 처리전 세포를 PBS로 세척하였고 무혈청 배지를 추가하였다. 안정화 후, 세포들을 대장균 026:B6 유래 100 ng/ml, 10 ng/ml 재조합 랫트 IL-4 및 500 ng/ml 재조합 CD200로 처리하였다.

[0048] **실시예 1. 카인산 주입 미세아교세포에서의 Foxp3 발현 증가**

[0049] Foxp3 이 카인산(kainic acid, 이하 'KA')-유도된 해마 흥분독성에 관여하는지 여부를 확인하기 위하여, KA 처리된 마우스의 동측성(ipsilateral) 해마 내의 Foxp3의 발현을 면역 염색법을 이용하여 KA 주입 후 1, 3, 7 일차에 측정하였다. 보다 구체적으로 23 내지 25 g 의 수컷 ICR (imprinting control region) 마우스(Samtako, Osan, Korea) 를 이용하였다. 실험 동물은 23도에서 명/암 조절된(12 h light/12 h dark) 환경에서 지내게 하였으며, 식음료는 자유롭게 이용할 수 있도록 하였다. 모든 동물 실험은 충남 대학교의 윤리위원회의 승인된 가이드라인에 따랐다(CNU-00151). KA는 멸균 0.1M의 인산완충용액 내에 5 mg/ml 스탁 용액으로 제조되었고, 필요할 때까지 -20도에서 분별물을 저장하였다. KA의 주입은 0.1 mg/5 ml, i.c.v 로 수행하였으며, 대조군은 동일한 용량의 식염수를 주입하였다. KA 주입된 마우스(n=8/group) 및 식염수 주입된 대조군 마우스(n=6)은 4개의 그룹으로 다시 나누었으며, KA 투여 후 희생시켰다. Foxp3 면역활성을 확인한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0050] 도 1의 A 에 나타난 바와 같이, 약한 Foxp3 면역활성(IR)이 식염수를 주입한 대조군 마우스에서 관찰되었으나(a, e), KA를 0.1 mg/5 ml, i.c.v 로 주입하고 하루가 지난 마우스에서는 강한 Foxp3 IR이 동측 해마 내 신경교세포에서 관찰되었다(b, f). 새롭게 확인된 Foxp3-양성 세포는 CA3 영역을 포함하는 전체 해마에서 관찰되었다. 도 1의 B에 나타난 바와 같이 면역 블랏을 이용한 Foxp3 단백질 발현양 확인에 따르면 주입 후 시간이 흐름에 따라, Foxp3 의 발현이 감소하며, 7일 이후에는 대조군 수준으로 돌아가는 것이 관찰되었다.

[0051] KA 주입 1 일 후, Foxp3-양성 세포는 위축성의/아메바성(pseudopodic/ameboid) 형태를 주로 나타내었으며, 이는 활성화된 미세아교세포를 나타내는 것이다. 이러한 결과는 Foxp3 및 미세아교세포의 마커로 알려진 이온화된 칼슘-결합 어댑터 분자(Iba-1)의 이중-표지를 이용한 면역 염색을 이용하여 추가적으로 확인하였다. 도 1의 C에 나타난 바와 같이 Foxp3은 Iba-1 양성 미세아교세포에서 관찰되었으며, astroglial Foxp3 는 관찰되지 않았다.

[0052] Foxp3의 발현이 미세아교세포에서 확인되는 것인지 추가적으로 확인하기 위해서, B6. Cg-FOXP3^{tm2Tch/J} (Foxp3^{EGFP}) 마우스를 이용하였으며, 이는 Jackson Laboratory로부터 구입하여 사용하였다. Foxp3^{EGFP} 마우스는

내생적 프로모터 18의 조절 하에서 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein) 및 Foxp3를 공동 발현한다. KA 주입 1일 후, Foxp3^{EGFP} 마우스를 희생시켰으며, Iba-1 을 붉은색으로 면역 염색하고 결과를 도 2 에 나타내었다.

[0053] 도 2에 나타난 바와 같이, 약하게 표지된 EGFP-양성 세포들이 대조군의 해마에서 검출되었다. 반대로 KA-주입된 해마 내 Iba-1 양성 미세아교 내에서 강한 EGFP 신호가 KA 주입 1일 후에 관찰되었으며, 특히 EGFP(녹색)와 Iba-1가 공동 위치되어 있음이 확인되었다 (황색, merge).

[0054] EGFP-양성 세포를 3D 재건을 이용한 공초점 현미경(LSM 700; Zeiss, Thornwood, NY USA) 으로 고 해상도에서 관찰하였으며, 세포의 형태를 분석하고 이를 도 3에 나타내었다.

[0055] 도 3에 나타난 바와 같이, KA 주입 1일 후에 EGFP 양성 세포가 거대화된 세포체에서 확인되었으며, 두꺼운 프로세스(processes)를 나타내고 활성화된 미세아교의 전형적인 형태를 나타내었다. 대조군에서 Foxp3-EGFP IR(녹색)은 핵 내에 주로 위치하였고, 일부는 세포질에 존재하였다. 반면 KA 주입 후 EGFP IR은 대부분 미세아교 프로세스에서 관찰되었다.

[0056] 상기와 같은 결과는 Foxp3 가 해마의 미세아교세포에서 발현되고, 이들의 발현이 병리학적인 미세환경, 즉, KA 처리에 의해 유도되는 환경에서 상향 조절된다는 것을 보여준다.

[0057] 실시예 2. CD200-CD200R-매개된 신호전달에 의존적인 Foxp3 발현 확인

[0058] CD200 및 이의 수용체의 상호작용은 미세아교세포의 활성화에 중요한 조절자로 알려져 있다. 따라서 Foxp3 발현을 CD200-CD200R 매개된 신호전달이 조절하는지 여부를 확인하기 위하여, 면역염색을 수행하였으며, KA 주입 1일 후에 마우스를 희생시켰다. CD200R 및 Foxp3 항체를 이용하여 해마를 이중-표지하였고, 이를 면역염색을 통해 확인한 결과를 도 4의 A 에 나타내었다.

[0059] 도 4의 A에 나타난 바와 같이, Foxp3 IR은 KA 주입 1일 후에 CD200R 과 공동 위치하는 것이 확인되었다.

[0060] CD200 이 Foxp3 의 발현을 미세아교세포에서 특이적으로 조절하는지 여부 및 미세아교세포의 M1 또는 M2로의 분극화(polarization) 에서 CD200 의 역할을 확인하기 위하여, 신생 랫트로부터 수득한 일차 미세아교 세포를 재조합 CD200(500ng/ml) 으로 처리하였다. Foxp3 및 Arginase 1 (Arg1)의 발현을 5시간 동안 측정하였고, 그 결과를 도 4의 B 및 C에 나타내었다.

[0061] 도 4 의 B 에 나타난 바와 같이, CD200의 처리는 Foxp3의 발현을 일차 미세아교세포에서 자극하였으며, 3시간 후 가장 높은 발현을 나타내었으나, CD200R 발현에는 영향을 미치지 않았다. 도 4의 C에 나타난 바와 같이, CD200의 처리는 M2 분극화의 마커인 Arg1 의 발현 역시 상향 조절하였다.

[0062] Foxp3 의 발현과 CD200-CD200R 매개된 신호전달 의존성을 추가적으로 확인하기 위하여, BV2 미세아교 배양에서 CD200R 의 짧은 간섭 RNA(siRNA, siCD200R) 를 이용한 기능 결실 방법을 수행하였다. BV2 세포는 대조군 (scr) siRNA 또는 CD200R 표적화 siRNA(si_CD200R)로 24시간 동안 형질감염 되었고, 이후 CD200으로 3시간 동안 처리하였다. 결과를 도 5에 나타내었다.

[0063] 도 5에 나타난 바와 같이, si_CD200R 은 뚜렷하게 대조군(scr) 과 비교하여 Foxp3 발현을 감소시켰다. 또한 CD200 에 의한 자극 이후 Foxp3 의 발현 역시 si_CD200R 처리에 의하여 감소되었다.

[0064] 상기와 같은 결과를 통해 CD200이 Foxp3 발현을 미세아교 세포에서 유도하며, 이러한 발현은 CD200R 신호전달에 의존적임을 확인하였다.

[0065] 실시예 3. CD200R의 억제에 따른 M2 로의 미세아교 분극화 저해

[0066] 배양 세포 미세아교 분극화에서의 CD200-CD200R-매개된 신호전달의 역할을 확인하기 위하여, 이러한 신호전달이 미세아교의 항-염증성 활성화에 영향을 미치는지 여부를 확인하였다. BV2 세포를 스크램블 RNA 또는 si_CD200R 과 함께 배양하였으며, IL-4(10ng/ml), LPS(100ng/ml) 또는 CD200(500ng/ml) 로 3시간 동안 처리하였다.

[0067] siRNA 의 형질감염을 위해서, BV2 세포를 트립신화하였고 60% 컨플루언스로 60mm 디쉬에 접종하였다. si_CD200R (센스 서열: CCAAUUAAUAGGAUCAUACAUCAA, NM_023953) 은 IntegratedDNA Technologies, Inc에서 구입하여 사용하였다. 각 siRNA, 올리고펙타민 및 Opti-MEM(Invitrogen, MD) 을 혼합하고 실온에서 20분 동안 배양하였다. siRNA-올리고펙타민 복합체를 10% FBS를 갖는 Opti-MEM에서 5시간 동안 세포와 함께 배양하였다(siRNA 최종 농도 20nM). siRNA 올리고펙타민 복합체를 제거하고 세포들은 24시간동안 성장배지에 위치시켰다. CD200 재조합

단백질을 처리하고 3시간 후 세포들에 대하여 면역블랏 및 ELISA((R&D system, #558534 및 #555252) 및 실시간 PCR을 수행하였다.

[0068] 상청액을 수집하고 ELISA를 이용하여 TNF- α 및 IL-10을 측정하였고, 결과를 도 6에 나타내었다.

[0069] 도 6의 A에 나타난 바와 같이, LPS 처리 후 TNF- α 의 발현이 BV2 세포에서 뚜렷하게 증가하였으며, IL-4의 처리는 M2로의 분극화를 뚜렷하게 유도하고 TNF- α 의 발현을 증가시켰다. CD200의 처리는 IL-4 처리와 비교할 만한 정도로 TNF- α 의 발현 수준을 증가시켰다. 반면, 도 6의 B에 나타난 바와 같이, 항-염증성 사이토카인인 IL-10의 발현은 IL-4 및 CD200의 처리 후에 증가하였으나, 이러한 상향 조절은 CD200R의 발현이 억제되는 경우 약화되었다.

[0070] IL-4 및 이와 밀접하게 관련된 사이토카인인 IL-13은 Arg1의 상향 조절, NK- κ B isoform의 억제, 식세포 작용의 소거 수용체 생산을 포함하는 항-염증성 활성을 유도하는 하위 단계를 유도한다. 그러므로, CD200R 억제에 의한 Arg1 발현의 변화를 mRNA 정량화를 통해 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0071] 도 7에 나타난 바와 같이, 대조군 상태(cont) 및 CD200 처리 하에서 scr 및 si-CD200R의 처리는 Arg1 mRNA의 뚜렷한 변화를 나타내었다. 3시간 후 총 RNA를 실시간 PCR을 이용하여 정량화한 결과 CD200은 대조군과 비교하여 약 30 배 정도의 Arg1 mRNA 발현 증가를 유도하였고, si-CD200R의 처리는 이를 약 1/3 수준으로 감소시켰다.

[0072] 상기와 같은 결과는, CD200R이 미세아교 세포의 M2로의 분극화에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0073] 실시예 4. Foxp3의 과다발현에 따른 M2로의 미세아교 분극화 강화

[0074] Foxp3가 직접적으로 Arg1의 수준을 조절하는지 여부를 확인하였다. BV2 세포를 mock(pcDNA) 또는 FLAG-tagged Foxp3-GFP (Foxp3-GFP) 플라스미드로 24시간 동안 형질감염시켰으며, IL-4 (10 ng/ml) 및 CD200 (500ng/ml)으로 3시간 동안 자극하고 면역블랏 및 DAPI를 이용한 면역세포화학법을 이용하여 분석하고 결과를 도 8에 나타내었다. 총 RNA는 정량적 실시간 PCR로 분석하였다.

[0075] 도 8의 A에 나타난 바와 같이, Arg1 발현은 뚜렷하게 Foxp3의 과다 발현과 함께 강화되었다. 도 8의 B에 나타난 바와 같이 Arg1 mRNA 수준은 IL-4 및 CD200의 처리 후 추가적으로 증가하였고 Foxp3-매개된 Arg1 발현이 M2로의 분극화 유도에 의해서 증가된다는 것을 나타낸다. 또한, CD200은 IL-4보다 더 강하게 Foxp3-매개된 M2로의 분극화를 유도한다. 이러한 결과에 따라 Foxp3는 CD200-CD200R 매개 신호전달 의존적이며, 미세아교세포의 선택적인 활성화, 특히 M2로의 분극화에 필수적이라는 것을 확인하였다.

[0076] 실시예 5. STAT6의 인산화 및 Foxp3 발현 조절

[0077] IL4 및 IL-4R을 통한 신호전달은 STAT6(signal transducer 및 activator of transcription 6)의 인산화를 유도하고, 이는 M2-분극화된 대식세포에서 전사 인자로 작용한다. 또한 STAT6는 직접적으로 Foxp3 프로모터에 결합한다. 그러므로, CD200 및 IL-4가 미세아교세포 활성화를 유도하는 신호전달 경로를 공유하는지 여부를 확인하였다. M2로의 분극화 동안 STAT6 전사적 활성화에 대한 타겟이 Foxp3인지 여부를 확인하기 위하여, STAT6가 직접적으로 Foxp3 프로모터에 결합하는지 여부를 확인하였다. 먼저 STAT6의 잠재적인 결합 부위(consensus site [TTT...GAA])를 Foxp3 프로모터에서 동정하였다. 서열분석은 STAT6 콘센서스 부위가 murine Foxp3 전사 시작 부위의 상류 2295 bp, -2098 bp, -1981 bp, 및 -1388 bp임을 나타내으며, 이를 도 9에 나타내었다.

[0078] BV2 세포를 CD200으로 1시간 동안 처리하고 Foxp3 프로모터의 STAT6 결합을 평가하기 위한 ChIP 분석을 ChIP 키트 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)를 이용하여 수행하였다. Foxp3 프로모터에 결합한 STAT6의 상대적인 양은 PCR을 통해 확인하였으며, 도 10에 나타난 바와 같이, PCR 프라이머는 -1467 내지 -1442 및 -1328 내지 -1304에 위치시켰다. 결과물 DNA를 Foxp3 프로모터를 특이적 타겟 부위로 하는 프라이머를 이용한 ChIP-PCR 분석을 이용하여 분석하였다. 예상 크기인 163bp의 단일 밴드가 PCR 증폭 후 관찰되었으며, 서열 분석은 이들 밴드가 STAT6 결합 부위를 포함하고 있음을 확인시켜주었다. 총 앰플리콘(amplicon)의 길이는 163bp였으며 이는 잠재적 STAT 결합 부위(-1388 내지 -1379, TTC...GAA)를 포함한다. 항-인산화 STAT6(anti-pSTAT6) 항체가 IgG를 치환한 경우 CD200 처리 또는 미처리에서 어떠한 신호도 검출되지 않았다. 또한 CD200 처리 후 Foxp3 프로모터에 대한 pSTAT6 결합이 증가하였다. 이러한 결과는 STAT6의 Foxp3 프로모터에 대한 결합이 대조군보다 M2로의 분극화 동안 더 쉽게 이루어진다는 것을 의미한다.

[0079] CD200-CD200R 매개된 신호전달이 미세아교세포에서 STAT6의 인산화에 관여되어 있는지 여부를 평가하였다. 제조한 CD200 단백질 500ng/ml로 처리된 BV200 세포를 1, 3, 5 시간 동안 pSTAT6 및 tSTAT6의 단백질 발현에 대

해 면역블랏으로 분석하였으며, 결과를 도 11에 나타내었다.

- [0080] 도 11에 나타낸 바와 같이, BV2 세포를 CD200으로 처리한 경우, STAT6 의 인산화는 1시간 이후, *Foxp3* 의 발현 전에, 증가하였다.
- [0081] STAT6 의 인산화가 CD200R 신호전달 의존적인지 여부를 확인하였다. BV2 세포를 스크램블 RNA 또는 si_CD200R 로 24시간 동안 형질감염시키고, 1시간 동안 CD200을 처리한 후, 면역 블랏을 수행하고 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [0082] 도 12에 나타낸 바와 같이, si_CD200R의 처리는 뚜렷하게 STAT6의 인산화를 감소시켰다.
- [0083] 상기와 같은 결과를 통해, CD200으로 미세아교세포를 처리하는 것은 STAT6의 인산화를 자극하고, 이러한 인산화는 *Foxp3* 인산화 발현 조절에 요구된다는 것을 확인하였다.
- [0084] **실시예 6. CD200R/*Foxp3* 매개 신호전달에 따른 HT22 해마 뉴런의 생존률 증가**
- [0085] M1 에서 M2 표현형으로의 미세아교세포의 변이가 뉴런의 생존에 영향을 미치는지 여부를 확인하였다. 대조군, IL-4 처리군, CD200 처리군 및 *Foxp3*-GFP 형질감염 미세아교 배양으로부터 수득한 HT22 해마 뉴런 (hippocampal neurons)을 조건화 배지를 이용하여 배양하였다. 양성대조군으로 트리톤 X-100을 이용하였다. HT22 세포의 생존률은 MTT 어세이를 통해 확인하였고, 그 결과를 도 13 의 A 에 나타내었다.
- [0086] 도 13의 A 에 나타낸 바와 같이, LPS (100 ng/ml) 와 함께 HT22를 전배양한 경우 뉴런의 생존률은 뚜렷하게 감소되었으나, LPS 와 함께 전배양하고 IL-4(10 ng/ml, 3 h), CD200 (500 ng/ml, 3 h) 또는 *Foxp3*-GFP 과발현 (24h)에 의해 전처리된 BV2 세포 유래의 조건화 배지(CM) 로 처리된 세포는 효과적으로 LPS 에 의한 영향이 반전되었다.
- [0087] HT22 뉴런에서 LPS-유도된 세포 사멸 동안의 세포 독성을 평가하기 위하여, LDH 분석(lactate dehydrogenase)을 Cytotoxicity Detection kit, LDH (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 이용하여 수행하였다. HT22 세포를 96 웰 (1×10^5 cells/well) 로 접종하고 조건화된 배지로 24시간 동안 처리하였다. 배양 후, 상기 상청액을 신선한 플레이트로 이동시키고, 염색 용액 및 촉매의 혼합물(100 μ l)을 각 웰의 상청액에 추가하였다. 490nm 에서의 흡광도를 마이크로플레이트 리더를 이용하여 측정하였고 세포사멸은 대조군 세포를 100%로 한 총 LDH 방출의 백분율로 결정하였다. 산화질소 농도 측정 분석은 Griess reagent (Sigma, #G4410, USA)을 이용하여 세포 배양 배지에서 결정하였으며, 540nm에서 분광분석을 통해 측정하였다. 이들 결과를 도 13 에 나타내었다.
- [0088] 도 13에 나타낸 바와 같이 HT22 세포의 세포 사멸은 LPS 단독 처리된 HT22 세포와 비교하여 IL-4(10 ng/ml, 3 h), CD200 (500 ng/ml, 3 h) 또는 *Foxp3*-GFP 과발현 (24h)에 의해 전처리된 BV2 세포 유래의 조건화 배지(CM) 로 처리한 경우 강하게 억제되었다. *Foxp3*- 양성 Treg 세포가 골수 유래 수지상 세포에서 *Arg1* 의 전사를 유도하는 것으로 밝혀졌으므로, *Arg1*은 *Foxp3* 에 의한 잠재적인 전사 표적이다. *Arg1* 및 iNOS는 모두 L-아르기닌을 기질로 이용하기 때문에, 염증 동안 *Arg1*의 역할은 iNOS 와 경쟁하는 것이다. *Foxp3*가 *Arg1* 및 iNOS의 활성화 균형을 조절하는지 여부를 확인하고 이러한 기능이 뉴런의 생존에 영향을 주는지 여부를 확인하였다. HT22 세포를 LPS 로 처리하고 IL-4, CD200, or *Foxp3*-GFP 로 처리된 BV2 세포 유래의 CM를 추가하였다.
- [0089] 도 13의 B 및 C 에 나타낸 바와 같이, LPS의 전처리는 산화질소의 생산을 증가시켰으나, CM의 적용은 이러한 효과를 역전시켰다. 이러한 결과는 CD200R/*Foxp3* 매개된 미세아교세포에서의 신호전달이 배양된 뉴런에서 뉴런 보호 효과를 부여하며, 이는 iNOS 에 대한 반대작용에 의한 것임을 보인다.
- [0091] 상기와 같은 결과를 통해, CD200R/*Foxp3* 매개 신호전달은 M1 보다 상대적으로 M2 로의 분극화를 적극적으로 유도하고 *Arg1*의 발현이 증가되며 결과적으로 HT22 해마 뉴런의 생존률을 증가시킬 수 있음을 확인하였으며, 이를 통해, CD200R/*Foxp3*을 표적으로 하여 신경 흥분성을 조절할 수 있으므로, 뇌전증과 같은 각종 뇌염증성 질환의 표적이 될 수 있음을 확인하였다. 이와 같은 매커니즘의 개략적인 모식도를 도 14에 나타내었다.
- [0092] **제제예 - 의약품의 제조**
- [0093] **산제의 제조**
- [0094] *Foxp3* 또는 CD200 수용체 활성화제 100mg

- [0095] 유당 100mg
- [0096] 탈크 10mg
- [0097] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0098] **주사제의 제조**

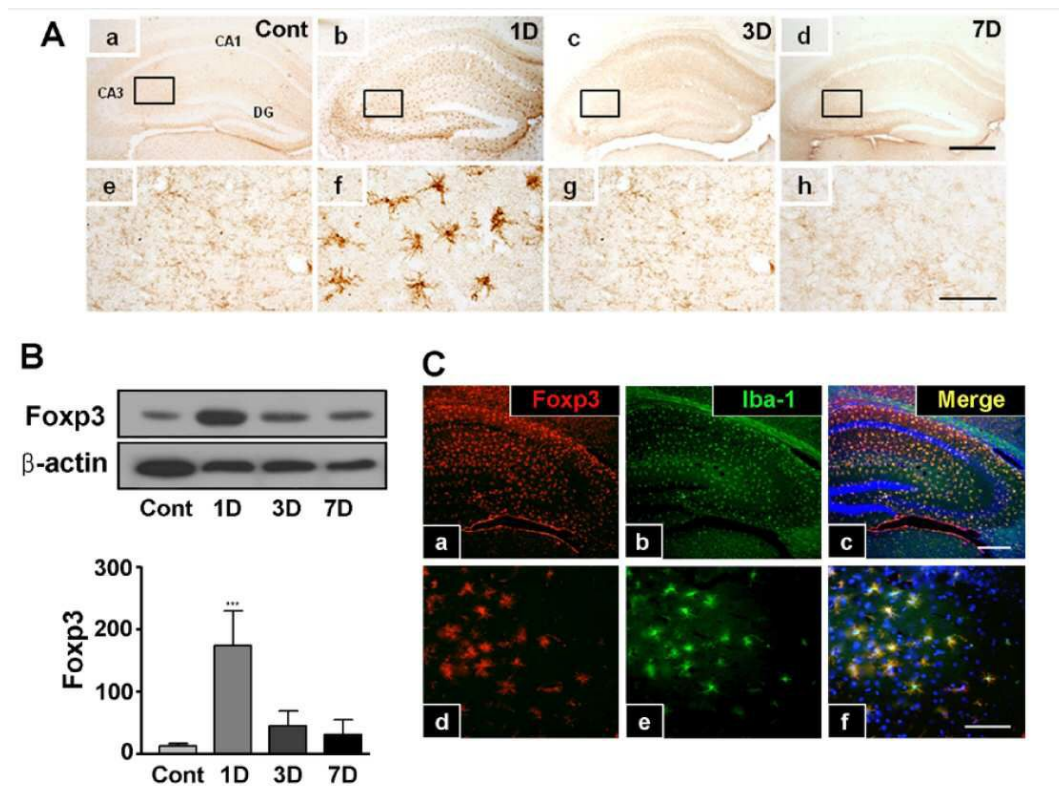
- [0099] Fxp3 또는 CD200 수용체 활성화제 100mg
- [0100] 주사용 멸균 증류수 적량
- [0101] pH 조절제 적량
- [0102] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0103] **액제의 제조**

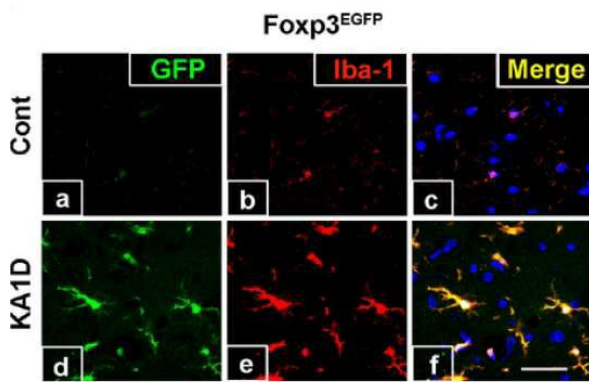
- [0104] Fxp3 또는 CD200 수용체 활성화제 100mg
- [0105] 설탕 20g
- [0106] 이성화당 20g
- [0107] 레몬향 적량
- [0108] 정제수를 가하여 전체 100ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

도면

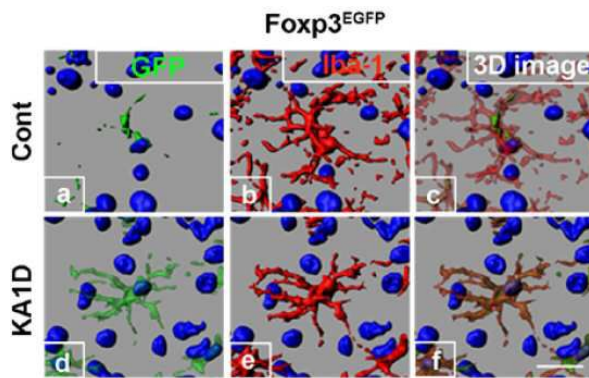
도면1



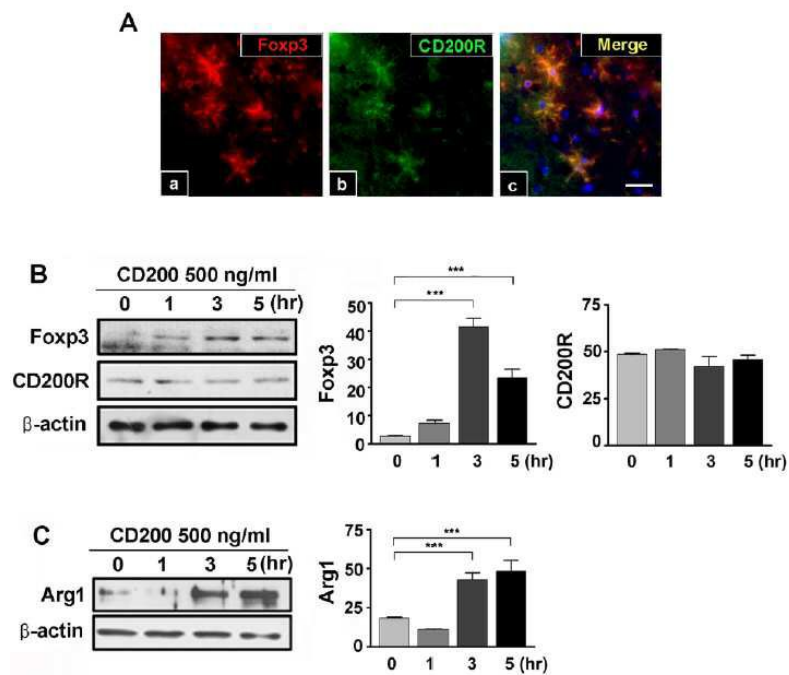
도면2



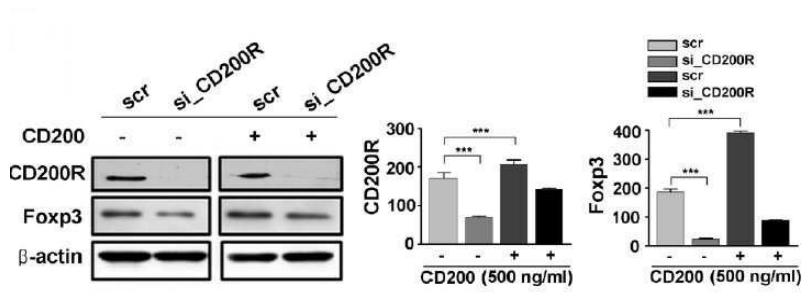
도면3



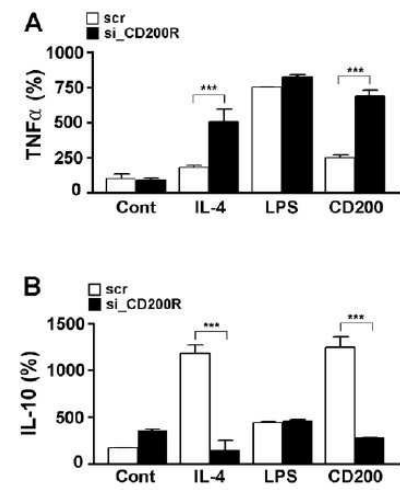
도면4



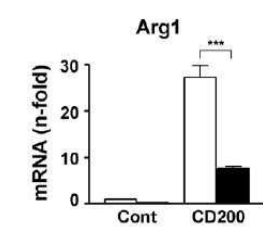
도면5



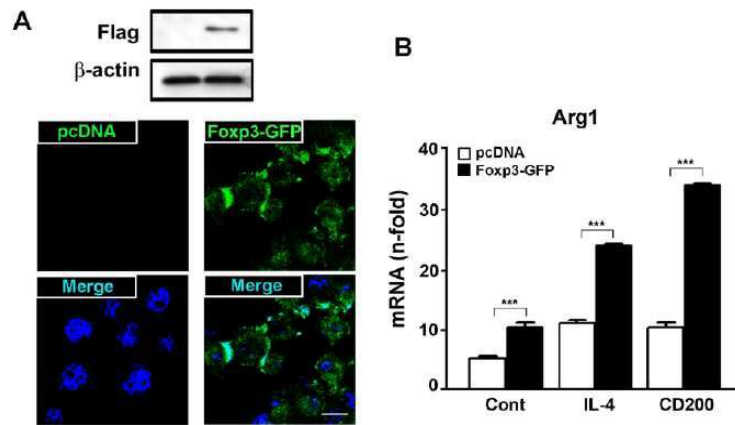
도면6



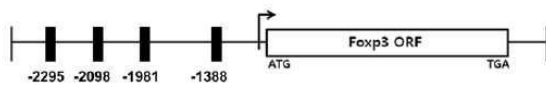
도면7



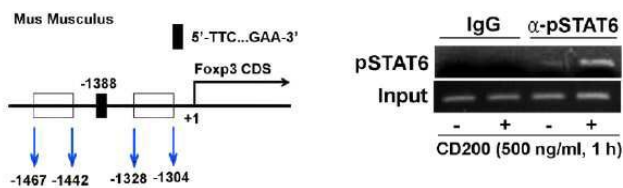
도면8



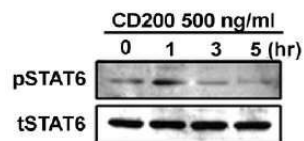
도면9



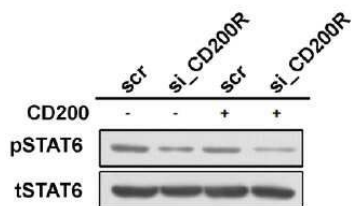
도면10



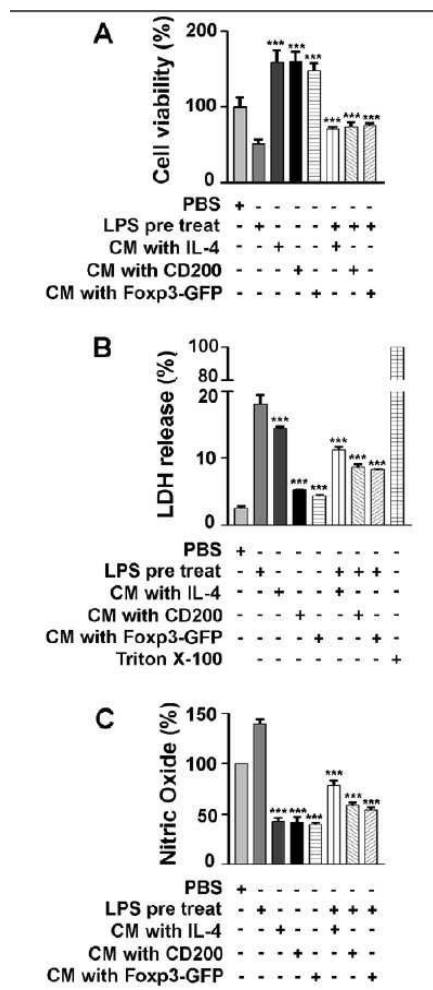
도면11



도면12



도면13



도면14

