



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0059877
(43) 공개일자 2022년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/68 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2020-0186130
(22) 출원일자 2020년12월29일
심사청구일자 2020년12월29일
(30) 우선권주장
1020200145339 2020년11월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이지희
서울특별시 강서구 마곡동로2길 25 (이화여자대학교의과대학)
(74) 대리인
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 11 항

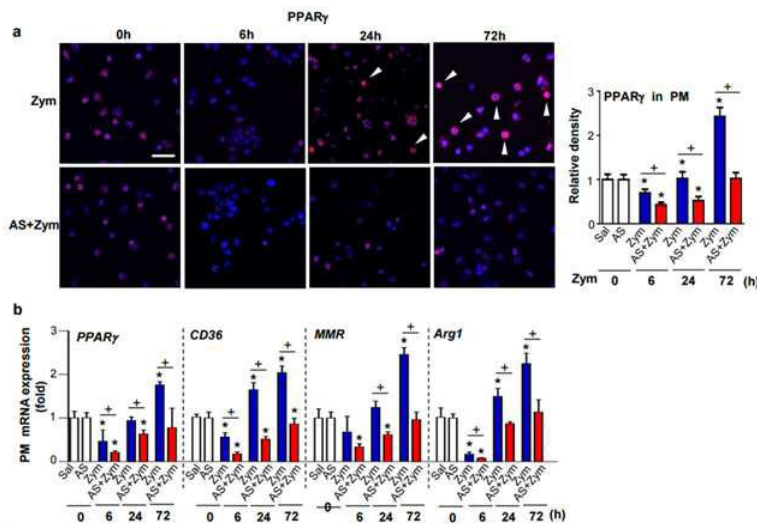
(54) 발명의 명칭 비감염성 염증질환의 치료용 물질 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 복막염 유발 물질을 인간을 제외한 실험동물에게 투여하는 단계; (b) 시험 물질을 상기 실험동물에게 투여하는 단계; 및 (c) 상기 실험동물의 세포에서 STAT6 인산화 정도를 확인하는 단계; 를 포함하는, 복막염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명은 비감염성 염증질환, 특히 복막염 치료용 물질을 스크리닝하는 방법은 다수의 치료 후보 물질 중 복막염 치료에 효과적인 물질을 손쉽게 확인하고 이를 획득할 수 있게 함으로써 신규의 복막염 치료용 약물 개발 및 확인에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2500/04 (2013.01)

G01N 2800/7095 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119402
과제번호	2020R1A5A2019210
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	염증-암 미세환경 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 복막염 유발 물질을 인간을 제외한 실험동물에게 투여하는 단계;
- (b) 시험 물질을 상기 실험동물에게 투여하는 단계; 및
- (c) 상기 실험동물의 세포에서 STAT6 인산화 정도를 확인하는 단계; 를 포함하는, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 복막염 유발 물질은 지모산(Zymosan), 이소니아지드(isoniazid), 프락토콜(practolol), 살리실산 나트륨(sodium salicylate) 및 복강내 화학요법(intraperitoneal chemotherapy)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 복막염 유발 물질은 지모산(Zymosan)인, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 실험동물은 마우스인, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 시험 물질 투여는 경구 또는 비경구 투여인, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 STAT6의 인산화 정도는 효소면역분석법(ELISA), 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qPCR), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 Efferoctosis 분석으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정되는 것인, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 STAT6의 인산화 정도 측정에 따라 인산화가 증가된 시험물질을 선택하는 것인, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, (d) 실험동물의 세포에서 PPAR γ 의 발현 증가를 확인하는 단계;를 더 포함하는, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, (d) 실험동물에서 CD36, MMR 및 arginase-1 (Arg1)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 발현 증가를 확인하는 단계;를 더 포함하는, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, (d) 실험동물의 세포에서 efferoctosis 능력 향상을 확인하는 단계;를 더 포함하는, 복막염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 11

- (a) 복막염 세포에서 시험물질을 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시험물질을 접촉한 복막염 세포에서 STAT6 단백질의 인산화 정도를 측정하는 단계; 및

(c) 대조군 시료와 비교하여 상기 STAT6의 인산화 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 복막염 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비감염성 염증 질환 치료용 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 복막염 치료용 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 복막염은 복강 및 복강 내 장기를 덮고 있는 얇은 막인 복막에 발생한 염증 혹은 자극증상으로, 국소적 혹은 복강 전반에 걸쳐 나타날 수 있다. 이러한 복막염은 복통이 가장 뚜렷한 증상이며 이외의 자각 증상으로는 복부팽창, 구토, 구역질, 호흡장애 등이 있다.

[0003] 복막염은 감염성 복막염 및 비감염성 복막염으로 나눌 수 있는데, 일반적으로 감염성 복막염은 하부 식도, 위(궤양, 위암), 십이지장(궤양), 소장 및 대장(충수염, 대장 게실, 맥켈 게실, 염증성 장 질환, 장허혈, 감돈, 대장 및 직장암, 태변), 담낭 등과 같은 복강 내 장기가 천공된 경우에 의해 유발되거나, 복막의 연속성 소실, 즉 외상, 수술 창상, 복막 투석, 복강 내 항암 치료 등에 의해 정상적으로는 외부와 차단되어 있는 복강 내와 복강 외 사이에 교통이 발생한 경우에 의해 유발되거나, 복수에 세균이 증식하여 발생하는 자발성 복막염 또는 결핵과 같은 전신 감염에 의한 경우를 포함한다.

[0004] 한편, 비감염성 복막염은 혈액(자궁내막증, 외상), 담즙(간 생검), 소변(외상), 체장액(체장염), 난소 낭종 등의 무균성 체액이 복강 내로 유출된 경우, 무균 상태의 복강 내 수술 즉, 수술 후 이물반응(foreign body reaction) 이나 섬유성 유착 등에 의해서 발생하는 경우를 포함한다.

[0005] 복막염은 건강에 대한 관심이 높아지면서 시행 횟수가 급격히 늘고 있는 복부내시경 검사 혹은 위장관계 수술시 빈번히 발생하는 천공으로 인한 복강 내 박테리아 감염에 의해 발생되는데, 환자에게 극심한 고통을 유발하고, 조직유착을 일으킬 수 있으며, 심한 경우 패혈증으로 발전하여 생명을 위협할 수도 있다.

[0006] 복막염은 금식을 비롯한 항생제, 항염증제와 같은 약물 투여, 수액 공급, 내시경적 스텐트 삽입 등의 치료 방법과 같은 비수술적 치료 및 수술적 치료를 통해 치료를 진행하게 되며 발생원인에 따라 치료방법을 달리한다.

[0007] 복막염의 약물 치료에 있어 항염증제에 의한 전신독성(높은 혈중 농도)에도 불구하고 병변부로의 낮은 전달 효율(염증 부위로 혈관의 접근이 용이치 못함, 경구 및 혈관을 통한 항생제 도입 경우); 및 항생제의 적용 부위로부터의 빠른 소실 [대부분의 항생제는 세포 이입물 향상을 위해 수용화 처리된 약물이 사용되며, 상처부위에 항생제를 직접 도입하여도(local delivery) 충분한 시간동안 존재하지 못하고 쉽게 씻겨나감]에 기인되는 낮은 항생효과 등이 해결해야 할 과제로 남아있다.

[0008] 즉, 복막염과 같은 비감염성 염증질환에 있어서, 항염증제를 비롯한 일반적 약물 이외에는 복막염 특이적으로, 질환을 본질적으로 치료할 수 있는 치료 약물이 개발되지 않은 실정이다.

[0009] 그런데, 이러한 치료 약물을 개발하기 위해서는 각고의 노력이 필요로 된다. 예컨대, 신약 개발은 통상적으로 5000~2만개의 신약 후보물질을 탐색한 후 그 중 250~10개의 물질을 선별하여 비임상 시험을 거치고, 거기서 다시 10개 미만의 물질을 선별하여 1상, 2상, 3상 임상 시험을 거쳐 최종적으로 1개의 물질을 신약으로 개발하여 신약판매허가를 받고 시판하는 과정으로 이루어진다. 이 과정에서 10년 내지 15년의 시간이 소요되고 많은 인력과 비용이 투입된다.

[0010] 이에 따라, 신약 후보물질 선정단계에서 약물 활성이 명백하게 확인되어, 상기 신약 개발의 단계를 단축시킬 필요가 있다. 일반적으로 신약 후보물질은 컴퓨터상에서 후보물질의 구조를 확인하여 탐색하기도 하고(in-silico), 세포에 후보물질을 처리하여 효과를 확인하여 탐색하는 방법(in-vitro)이 사용된다. 그러나 복막염과 관련한 약물 스크리닝 방법에 관하여 상기와 같은 방법들이 개발된 바가 매우 적다.

[0011] 이에 따라, 새로운 신약 개발에 있어서는 신약 개발 초창기 단계부터 복막염과 같은 비감염성 염증 질환 치료 약물의 효능에 대하여 예측할 수 있는 우수한 스크리닝 방법에 관하여 개발될 필요성이 있으며, 이러한 후보물

질의 스크리닝을 효과적으로 수행한다면, 막대한 비용과 긴 시간이 소요되는 신약 개발 과정이 보다 수월하게 이루어질 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 (a) 복막염 유발 물질을 인간을 제외한 실험동물에게 투여하는 단계; (b) 시험 물질을 상기 실험동물에게 투여하는 단계; 및 (c) 상기 실험동물의 세포에서 STAT6 인산화 정도를 확인하는 단계; 를 포함하는, 복막염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 (a) 복막염 세포에서 시험물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 시험물질을 접촉한 복막염 세포에서 STAT6 단백질의 인산화 정도를 측정하는 단계; 및 (c) 대조군 시료와 비교하여 상기 STAT6의 인산화 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 복막염 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 복막염 또는 급성 복막염 치료 효과를 갖는 물질을 보다 효과적으로 스크리닝하여 복막염 치료제 신약으로 개발할 물질을 발굴하기 위한 것이다.
- [0015] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 복막염 치료제로 이용 가능한 사멸 세포 처리에 따른 치료 메커니즘에 대해 연구 개발한 결과, STAT6 및 관련 유전자의 발현 변화 확인을 통해 복막염에 관한 치료 물질의 스크리닝이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 본 발명은 (a) 복막염 유발 물질을 인간을 제외한 실험동물에게 투여하는 단계;
- [0017] (b) 시험 물질을 상기 실험동물에게 투여하는 단계; 및
- [0018] (c) 상기 실험동물의 세포에서 STAT6 인산화 정도를 확인하는 단계; 를 포함하는, 복막염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 (a) 복막염 유발 물질을 실험동물에게 투여하는 단계를 포함한다. 복막염 유발 물질로 알려진 어떠한 물질이라도 사용하여 상기 질환을 유발한 동물 모델을 제조할 수 있다. 구체적으로, 지모산(Zymosan), 이소니아지드(isoniazid), 프락토콜(practolol), 살리실산 나트륨(sodium salicylate) 또는 복강내 화학요법(intraperitoneal chemotherapy)등을 사용하여 복막염을 유발할 수 있으며, 바람직하게는 지모산(Zymosan) 처리에 의해 유도된 복막염 실험동물일 수 있다. 예컨대, 지모산을 실험동물로 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떤 실험동물에 처리하고, 이로 인해 질환이 유도된 동물 모델 그 자체 또는 이로부터 분리된 세포를 사용할 수 있다. 본 실험 동물모델은 예를 들어 마우스, 햄스터, 랫트, 페렛, 기니피그, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 마우스일 수 있다. 본 실험동물은 인간을 제외할 수 있다.
- [0020] 상기 분리된 복막염 세포는 조직, 복막 세척액(PLF), 세포분쇄액 등의 다양한 시료의 형태로써 이용될 수 있으며, 복막 대식세포(PM), 복막 세포 등의 모든 종류의 복막 세포를 포함한다. 또한, 상기 복막염 세포 외에 비장 및 혈장을 사용할 수 있다.
- [0021] 상기 (a)단계에서 복막염 유발 물질은 특성에 맞는 경로로 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 복강내 주사(Intraperitoneal injection)를 통해 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 생체 내에서 복막염 반응이 유발되지 않은 상태와 복막염 반응이 유발된 상태에서 발현 또는 활성화되는 물질들은 서로 다르다. 따라서 복막염 예방 및 치료용 후보 물질을 스크리닝하기 위해서는 일단 복막염 질환을 유발할 필요가 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 복막염 치료제 스크리닝 방법은 (b) 시험 물질을 상기 실험동물에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0023] 본 발명에 있어서 '시험 물질'이란 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성화에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 이러한 시험물질의 투여는 경구 및 비경구 투여를 포함하여, 통상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 예컨대, 경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0025] 시험 물질의 투여량은 약물의 종류 및 약물 효능에 따라 당업자의 통상의 지식에 따라 적절한 수준의 투여량으로 조절될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 복막염의 스크리닝 방법은 (c) 상기 실험동물의 세포에서 STAT6의 인산화 정도를 확인하는 단계를 포함한다.
- [0027] 상기 인산화 정도의 측정은 인산화 STAT6의 생성 정도를 측정하거나, STAT6의 발현 감소를 측정하거나, 인산화 STAT6와 STAT6의 발현 비율을 측정하는 등의 시험 물질 처리 후 STAT6의 변화를 확인함으로써 확인될 수 있다. 시험 물질 처리에 따라 인산화가 음성 대조군과 대비하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 100%, 2배, 3배 또는 그 이상 증가하게 되면, 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다. 또한, 양성 대조군과 동등 수준의 인산화 정도를 나타내면 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다. 본 발명에 있어서, 대조군 시료는 정상 대조군, 복막염 치료제에 대해 알려진 치료물질 대조군을 포함하여 시험물질 처리에 따라 STAT6의 인산화 정도를 비교 판단할 수 있는 모든 시료 그룹을 의미한다.
- [0028] 상기 STAT6의 인산화 정도는 효소면역분석법(ELISA), 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qPCR), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 Efferocytosis 분석으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 상기 STAT6의 인산화 정도를 확인하여, 시험 물질 처리에 따라 인산화가 증가하게 되면, 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다.
- [0030] 예컨대, 음성 대조군과 대비하여 인산화가 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 100%, 2배, 3배 또는 그 이상 증가하게 되면, 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다. 또한, 양성 대조군과 대비하여 동등 수준의 효과를 나타내는 약물이라면 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다.
- [0031] 본 발명은 또한, 상기 STAT6의 인산화 정도에 추가로 PPAR γ 의 발현 및 활동도 정도를 측정하는 것을 더 포함할 수 있다. PPAR γ 의 발현 정도는 앞서와 마찬가지로 효소면역분석법(ELISA), 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qPCR), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 Efferocytosis 분석으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 시험 물질 처리에 따라 PPAR γ 의 발현 및 활동도가 증가하는 경우 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다.
- [0032] 또한, PPAR γ 표적 유전자로 예컨대, CD36, MMR(macrophage mannose receptor), Arg1(arginase 1) 등에 대한 측정 및 이의 발현 정도를 확인하는 것을 더 포함할 수 있다. CD36, MMR, Arg1 등은 PPAR γ 의 신호 경로에 관여하는 물질에 해당하며, CD36, MMR, Arg1 등이 시험 물질 처리에 따라 그 발현이 증가하게 되면 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다.
- [0033] 또한, 염증을 억제 및 치료에 필요한 사멸 세포를 제거하는 포식능력인 efferocytosis 능력 향상 변화를 확인하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [0034] Efferocytosis 향상은 STAT6 인산화와 관련이 있어, 시험 약물 처리에 따라 efferocytosis이 향상되는 경우 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다.
- [0035] 본 발명은 (a) 복막염 세포에서 시험물질을 접촉시키는 단계;
- [0036] (b) 상기 시험물질을 접촉한 복막염 세포에서 STAT6 단백질의 인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0037] (c) 대조군 시료와 비교하여 상기 STAT6의 인산화 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 복막염 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 복막염 치료제 스크리닝 방법은 복막염 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 상기 복막염 세포는 복막염을 가진 환자의 세포, 동물 세포, 이들의 조직을 모두 포함하는 것이다. 또한, 복막염 유발 물질을 통해 질환이 유도된 세포도 이용 가능하며, 복막염 유발 물질로 알려진 어떠한 물질도 사용 가능하다. 바람직하게는 지모산 처리에 의해 유도된 복막염 세포일 수 있다. 예컨대, 지모산을 실험동물로 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떤 실험동물에 처리하고, 이로 인해 질환이 유도된 동물 모델 그 자체 또는 이로 부터 분리된 세포를 사용할 수 있다. 본 실험 동물모델은 예를 들어 마우스, 햄스터, 랫트, 페렛, 기니피그, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 마우스일 수 있다. 복막염 세포는 세포는 조직, 복막 세척액(PLF), 세포분쇄액 등의 다양한 시료의 형태로써 이용될 수 있으며, 복막 대식 세포 등의 모든 종류의 복막 세포를 포함할 수 있다.

- [0039] 상기 시험 물질의 접촉은 *In vitro* 및 *In vivo* 상의 모든 접촉을 의미하며, 시험물질이 *In vitro* 상에서 세포에 처리되거나 *In vivo* 상에서 동물 등에 투여되는 것을 모두 포함한다.
- [0040] 본 발명의 복막염 치료제 스크리닝 방법은 상기 시험물질을 접촉한 복막염 세포에서 STAT6 단백질의 인산화 정도를 측정하는 단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 STAT6의 인산화 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함한다.
- [0041] 바람직하게는, 상기 STAT6 단백질의 인산화 정도는 효소면역분석법(ELISA), 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qPCR), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 Efferocytosis 분석으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 STAT6은 사람, 소, 염소, 양, 돼지, 마우스, 토끼 등의 포유류를 포함하는 STAT6을 가지는 모든 진핵 생물 유래의 단백질일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 대조군 시료는 정상 대조군(예를 들어, 야생형(WT) 마우스), 복막염 치료제에 대해 알려진 치료물질 대조군을 포함하여 시험물질 처리에 따라 STAT6의 인산화 정도를 비교 판단할 수 있는 모든 시료 그룹을 의미한다.
- [0043] 음성 대조군과 대비하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 100%, 2배, 3배 또는 그 이상 증가하게 되면, 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다. 또한, 양성 대조군과 대비하여 동등 수준의 효과를 나타내는 약물이라면 복막염에 대한 치료 효능을 가지는 약물로 판단될 수 있다. 즉, STAT6의 인산화를 증진시키는 시험물질은 치료 약물로써 선별될 수 있다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명은 비감염성 염증질환, 특히 복막염 치료용 물질을 스크리닝하는 방법은 다수의 치료 후보 물질 중 복막염 치료에 효과적인 물질을 손쉽게 확인하고 이를 획득할 수 있게 함으로써 신규의 복막염 치료용 약물 개발 및 확인에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 STAT6 약리학적 억제에 따른 STAT6 활성화 변화 확인 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 STAT6 활성화 및 IL-4와 IL-13의 관련성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 STAT6 약리학적 억제에 따른 항염증 효과 감소를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 STAT6 약리학적 억제에 따른 항염증 효과 및 세포 재생 효과 감소를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 STAT6 약리학적 억제에 따른 복막 대식세포에서의 PPAR γ 발현 및 PPAR γ 표적 유전자 발현 억제를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 STAT6 약리학적 억제에 따른 비장에서의 PPAR γ 발현 및 PPAR γ 표적 유전자 발현 억제를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 STAT6 유전적 결핍에 따른 STAT6가 발현되지 않음을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 STAT6 유전적 결핍에 따른 항염증 효과 감소를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 STAT6 유전적 결핍에 따른 복막 대식세포에서의 PPAR γ 발현 및 PPAR γ 표적 유전자 발현 저하를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 STAT6 유전적 결핍에 따른 비장에서의 PPAR γ 발현 및 PPAR γ 표적 유전자 발현 저하를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 STAT6 약리적 억제에 따른 efferocytosis 능력 감소를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 STAT6 유전적 결핍에 따른 efferocytosis 능력 저하를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0048] <실시예>
- [0049] **동물 모델**
- [0050] Zymosan 단독 투여 마우스(zym), STAT6 억제제 투여된 마우스(AS+zym), STAT6 결핍 마우스(STAT6^{-/-}) 및 WT 대조군 마우스(WT)
- [0051] 6-8주령의 19 내지 21 g의 무병원성(Pathogen-free) 수컷 BALB/C 마우스 (Orient Bio, Sungnam, Korea), STAT6^{-/-}(STAT6 결핍) 및 WT 대조군 마우스(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)는 이화여자대학교 의학연구소의 동물관리위원회 승인된 실험 프로토콜 하에 사용되었다.
- [0052] 급성 무균 염증을 유도하기 위해, 500 μ l PBS에 1 mg 지모산(zymosan)이 용해된 용액을 복강내 주사 투여(i.p.) 하였다.
- [0053] 또한, 약리학적 억제 실험을 위해, STAT6 억제제인 AS1517499 (10 mg/kg, i.p.; dissolved in 20% DMSO in saline)를 지모산 주사 한 시간 전에 마우스에 투여하였다. 초기 투여 후, AS1517499 또는 이의 비히클을 이틀 후에 한 번 더 투여하였다.
- [0054] 모든 마우스는 지모산 주사 후 6, 24 또는 72시간째에 희생되었다.
- [0055] 희생된 마우스를 이용하여, 복막 세척(peritoneal lavage)이 수행되고, 호중구 및 복막 대식세포의 카운팅은 electronic Coulter Counter fitted with a cell sizing analyzer (Coulter Model ZBI with a channelizer 256; Coulter Electronics, Bedfordshire, UK)로 수행되었다. 복막 세척 후, 비장은 적출되고, 즉시 액체 질소에서 얼려졌고 -70℃에 저장되었다.
- [0056] 한편, 복막 대식세포를 60분 동안 무혈청 X-VIVO 배지(serum-free X-VIVO medium)에서 배양하였다 (5X10⁵ per well in 6-well plates). 총 RNA 및 단백질을 분리하기 전에 비부착 세포를 제거했다. 대략 플라스틱 부착 세포의 약 90-95%는 형태학적 대식세포였다.
- [0057] 또한, 세척액에서의 총 단백질 농도는 표준으로 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 사용하여 Hartree가 고안한 방법으로 측정되었다.
- [0059] **분석 방법**
- [0060] (1) ELISA
- [0061] 혈청 사이토카인 정량화를 위해 심장 천자를 통해 마우스로부터 수집된 혈액을 4℃에서 5 분 동안 1600 x g에서 원심 분리하여 혈청을 분리했습니다. TNF- α , IL-6, MIP-2, IL-10 및 HGF의 양을 ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) 지시에 따라 혈청 및 1차 무세포 PLF(cell-free PLF)에서 정량화하였다.
- [0062] (2) 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 분석
- [0063] 비장 조직 호모제네이트 시료는 10% SDS 폴리아크릴아마이드 겔에서 분리되었다. 분리된 단백질은 전기영동을 통해 니트로셀룰로오스 페이퍼에 옮겨졌다. 멤브레인은 phospho-STAT6/STAT6, CD36, MMR, Arg1 또는 β -actin (1 : 1000 희석)에 대한 특정 항체로 처리된 후 30분 동안 2차 항체(1:1000)를 추가하고, 화학 발광 검출 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 화학 발광을 통해 확인되었다.
- [0065] (3) 면역세포화학(Immunocytochemistry)
- [0066] 복막 대식세포에서의 STAT6의 활성 변화를 면역형광법을 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 4% 파라포름알데히드로 복막 대식세포를 고정하고, Triton X-100로 투과처리(permeabilized) 후, 마우스 단클론 항-인산화 STAT6(monoclonal anti phospho-STAT6), 항-STAT6(anti-STAT6) 또는 항-PPAR γ 항체로 4℃에서 밤새 염색하였다.
- [0067] 그 다음, 세포를 인산 완충액으로 3회 세척하고, 형광 이소티오시아네이트(isothiocyanate)-결합 donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 함께 배양하였다. 슬라이드를 DAPI(4',6-diamidino-2-

phenylindole)를 함유한 배지가 장착된 Vectashield(Vector Laboratories, Youngstown, OH)에 장착하였다. 모든 슬라이드를 488 / 543 nm 여기(excitation)로 설정된 필터가 장착된 공초점 현미경(LSM5 PASCAL; Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 이미지화하였다.

또한, phosphor-STAT6, STAT6 (녹색) 및 PPAR γ (적색 또는 녹색) 염색은 마스크를 생성하여 정량화되었으며, LSM 이미지 검사 소프트웨어(Carl Zeiss)를 이용하여 평균 형광 강도를 측정하였다.

(4) 정략적 실시간 PCR 분석(qPCR)

PPAR γ 의 발현 변화는 q-PCR을 이용하여 확인하였다. 유전자 발현을 StepOnePlus system (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA)의 real-time qPCR을 사용하여 분석하였으며, qPCR 검정을 위해 50 ng의 cDNA가 사용되었다. 사용된 프라이머는 다음과 같다:

표 1

Target gene(Mouse)	Primer	Sequence (5' to 3')
PPAR γ	forward	GCCCTTGGTGACTTTATGG (서열번호 1)
	reverse	CAGCAGTTGTCTTGGATGT (서열번호 2)
CD36	forward	TTGTACCTATACTGTGGCTAAATGAGA (서열번호 3)
	reverse	CTTGTGTTTGAACATTCTGCTT (서열번호 4)
MMR	forward	AGAAAATGCACAAGAGCAAGC (서열번호 5)
	reverse	GGAACATGTGTCTGCGTTG (서열번호 6)
Arg1	forward	GTGGGGAAGCCAATGAAG (서열번호 7)
	reverse	GCTTCCAAGTCCAGACTGT (서열번호 8)
IL-4	forward	CGAGCTCACTCTGTGGTG (서열번호 9)
	reverse	TGAACGAGGTCACAGGAGAA (서열번호 10)
IL-13	forward	CCTGGCTCTTGCTTGCCTT (서열번호 11)
	reverse	GGTCTTGTGTGATGTGCTCA (서열번호 12)
HPRT	forward	CAGACTGAAGAGCTACTGTAATG (서열번호 13)
	reverse	CCAGTGTCATTATATCTTCAAC (서열번호 14)

mRNA 수준은 HPRT mRNA를 기준으로 정규화되었으며 대조군에 대한 발현의 Fold change로서 보고되었다.

(5) Efferocytosis 분석

복막 세척 세포(Peritoneal lavage cells)를 분리하고 식세포 지수를 평가하기 위해 세포 방사(cytospun)하였으며, 식세포 지수는 하기 식으로부터 계산되었다:

식세포 지수 : (사멸세포(apoptotic bodies) 수) / (총 대식세포 200 개)X100.

<실시예 1> STAT6 인산화의 약리학적 억제에 따른 STAT6 활성 변화 및 항염증 효과 확인

실시예 1-1: STAT6 인산화의 약리학적 억제에 따른 Zymosan 주입 후 복막 대식세포 및 비장에서의 STAT6 활성 변화 확인

급성 무균 염증 동안 STAT6 활성화가 유도되는지 여부를 확인하기 위해, zymosan를 복강내 주사로 투여 후 복막에서 제거된 대식세포에서의 STAT6 인산화를 분석하였다.

공초점 현미경에 의한 면역세포화학분석 결과는 도 1a과 같다. 도 1a에서 확인할 수 있는 바와 같이 복막 대식세포의 STAT6 인산화가 지모산 주입 후 72시간 까지 시간이 지남에 따라 향상되는 것으로 나타났다.

그러나, 지모산 주사 전에 STAT6 억제제인 AS1517499 투여(AS+Zym)는 zymosan 주사 후 각 시점에서 복막 대식세포에서 STAT6 인산화가 일어나지 않는 것으로 나타났다.

또한, 면역 기관인 비장의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 도 1b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 비장에서도

복막 대식세포에서의 결과와 유사한 경향이 나타났다.

- [0085] 즉, STAT6 인산화는 복막 대식세포 및 비장에서 식염수, AS1517499로 처리된 마우스에서 거의 검출되지 않았다.
- [0086] 이러한 결과가 의미하는 것은 지모산으로 생체 내 처리 후 STAT6 활성화가 상대적으로 낮은 시점에 향상되고, STAT6 억제제가 복막 대식세포 및 비장에서 STAT6 활성화를 억제하기 때문이다.
- [0087] **실시예 1-2: Zymosan 주입 후 복막 대식세포 및 비장에서의 STAT6 활성화 및 IL-4와 IL-13의 관련성 확인**
- [0088] 일반적으로 STAT6 활성화는 사이토카인 IL-4와 IL-13이 수용체에 결합하여 시작되며, M2 유형 대식세포의 발달을 유도하여 항염증 과정을 촉진하는 것으로 알려져 있다.
- [0089] 그러나, 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각 시점에서 지모산 단독 처리 마우스(Zym)와 STAT6 억제제 투여된 마우스(AS+Zym)의 복막 대식세포 및 비장에서 IL-4 및 IL-13 mRNA 및 복막 세척액 (PLF)에서 단백질 수준은 기저 수준인 것으로 나타났다.
- [0090] 이러한 결과로부터, 지모산 주입 후 STAT6의 활성화는 IL-4 / IL-13에 독립적인 방식으로 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

[0092] **실시예 1-3: STAT6 인산화의 약리학적 억제에 따른 지모산에 의한 염증에 대한 항염증 효과 감소 확인**

- [0093] STAT6 신호가 억제되는 경우에 항염증 효과가 감소함을 확인함으로써, STAT6 신호를 억제하는 약물을 피해야 함을 확인하였다.
- [0094] 실시예의 동물 모델을 기초로 하여, 제조된 복막 세척액(PLF)에서의 TNF- α , IL-6 및 MIP-2 단백질 수준, 호중구 수 및 총 단백질 수준의 변화를 분석하였으며 그 결과는 도 3과 같다.
- [0095] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 지모산 투여된 마우스에서 6시간 후 염증 인자인 TNF- α , IL-6 및 MIP-2 단백질 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, STAT6 억제제인 AS1517499 투여 후 지모산이 투여된 마우스(AS+Zym)가 지모산 단독 투여된 마우스(Zym)보다 염증 인자 단백질 수준이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 3의 a).
- [0096] 또한 PLF에서 호중구 수 및 총 단백질 양도 STAT6 억제제인 AS1517499 투여된 마우스(AS+Zym)에서 더 높은 것으로 나타났다.
- [0097] 또한, 실시예의 동물 모델을 기초로 하여, 제조된 복막 세척액(PLF)에서의 세포 항염증 및 재생 관련 인자인 IL-10 및 HGF 단백질의 수준의 변화를 확인하였으며, 그 결과는 도 4와 같다.
- [0098] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 지모산 단독 투여 마우스(Zym)에서 IL-10 및 HGF와 같은 pro-resolving 분자의 증가 양은 STAT6 억제제인 AS1517499 투여된 지모산 투여 마우스(AS+Zym)에서 더 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0099] 이러한 결과로부터 염증 관련 인자들의 변화가 STAT6 신호와 관련성이 있음을 확인하였다.

[0101] **실시예 1-4: STAT6 인산화의 약리학적 억제에 따른 PPAR γ 및 표적 유전자의 발현 억제 확인**

- [0102] 실시예와 동일한 동물 실험 모델을 기초로 하여, STAT6 억제제 처리에 따른 복막 대식세포 및 비장에서의 PPAR γ 및 표적 유전자의 발현을 확인하였다.
- [0103] PPAR γ 및 표적 유전자의 발현 변화는 공초점 현미경에 의한 면역세포화학분석, qPCR 분석을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 5 및 6과 같다.
- [0104] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 지모산 투입 후 복막 대식세포에서의 PPAR γ 단백질 발현 및 PPAR γ mRNA 수준이 72 시간까지 시간 의존적으로 점차 증가하는 것으로 나타났다. 반면, AS1517499의 투여된 마우스에서 (AS+Zym)는 지모산 투여 후 각 시점에서 복막 대식세포에서의 PPAR γ 단백질 발현 및 PPAR γ mRNA 발현 양이 감소하는 것으로 나타났다(도 5의 a).
- [0105] 또한, 도 5의 b에서 확인할 수 있는 바와 같이, PPAR γ 와 관련성 높은 표적 유전자인 CD36, MMR, Arg1의 mRNA 발현은 PPAR γ mRNA 발현과 유사한 패턴으로 나타났다.

- [0106] 또한, 비장에서의 PPAR γ 단백질 발현 및 PPAR γ mRNA 발현, PPAR γ 와 관련성 높은 표적 유전자인 CD36, MMR, Arg1의 mRNA 발현은 복막 대식세포에서와 나타난 것과 동일한 경향으로 나타나는 것으로 확인되었다(도 6).
- [0107] 이러한 결과로부터, STAT6 인산화는 PPAR γ 발현 증가에 영향을 미칠 뿐만 아니라 PPAR γ 의 표적 유전자들의 발현 증가에도 영향을 미치는 것이 확인되었다. 이에 따라, STAT6 인산화 확인을 통해 치료 물질의 스크리닝이 가능함을 확인하였다.
- [0109] <실시예 2> STAT6 유전적 결핍에 따른 STAT6 활성 변화 및 항염증 효과 확인
- [0111] 실시예 2-1: STAT6의 유전적 결핍(STAT6 $^{-/-}$)에 따른 지모산 주입 후 복막 대식세포 및 비장에서의 STAT6 활성 변화 확인
- [0112] STAT6 $^{-/-}$ 마우스 모델 및 야생형(WT) 대조군 마우스 모델을 이용하여 지모산 주사 후 복막 대식세포(PM) 및 비장에서의 염증 반응을 면역세포화학분석 및 웨스턴블롯 분석을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 7과 같다.
- [0113] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, STAT6 결핍(STAT6 $^{-/-}$) 마우스의 복막 및 비장에서는 STAT6 단백질 발현이 확인되지 않은 바, STAT6 단백질이 결핍되어 있음을 확인하였다.
- [0115] 실시예 2-2: STAT6의 유전적 결핍(STAT6 $^{-/-}$)에 따른 지모산에 의한 염증 악화 확인
- [0116] STAT6 $^{-/-}$ 마우스 모델 및 야생형(WT) 대조군 마우스 모델을 이용하여 지모산 주사 후 복막 세척액(PLF)에서의 TNF- α , IL-6 및 MIP-2 단백질 수준, 호중구 수 및 총 단백질 수준의 변화를 분석하였으며 그 결과는 도 8과 같다.
- [0117] 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 지모산 주사 후 염증 인자들의 양은 WT 대조군과 비교하여 STAT6 $^{-/-}$ 마우스의 복막 세척액에서 더 증가한 것으로 나타났다(도 8의 a). 또한, STAT6 $^{-/-}$ 마우스의 복막 세척액에서 호중구 수 및 단백질 함량이 WT 대조군과 대비하여 증가한 것으로 나타났다(도 8의 b).
- [0118] 이러한 결과로부터, STAT6 결핍(STAT6 $^{-/-}$)은 염증 반응을 현저히 악화시키는 것으로 확인되었다.
- [0120] 실시예 2-3: STAT6의 유전적 결핍(STAT6 $^{-/-}$)에 따른 PPAR γ 및 표적 유전자의 발현 감소 확인
- [0121] STAT6 $^{-/-}$ 마우스 모델 및 야생형(WT) 대조군 마우스 모델을 이용하여 지모산 주사 후 복막 대식세포 및 비장에서의 PPAR γ 및 표적 유전자의 발현을 확인하였다. PPAR γ 및 표적 유전자의 발현 변화는 공초점 현미경에 의한 면역세포화학분석, qPCR 분석을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 9 및 10과 같다.
- [0122] 도 9를 참조하면, WT 마우스에 대비하여 STAT6 $^{-/-}$ 마우스의 복막 대식세포에서 PPAR γ 단백질 발현 수준이 지모산 주사 후 각 시점에서 보다 현저히 낮은 것으로 나타났다(도 9의 a). 또한, 이와 유사하게 PPAR γ 와 관련성 높은 표적 유전자인 CD36, MMR, Arg1의 mRNA 발현이 WT 마우스에 대비하여 STAT6 $^{-/-}$ 마우스의 복막 대식세포에서 더 낮은 것으로 나타났다(도 9의 b).
- [0123] 도 10을 참조하면, WT 마우스에 대비하여 STAT6 $^{-/-}$ 마우스의 비장에서도 PPAR γ mRNA 및 단백질과 표적 유전자인 CD36, MMR, Arg1의 mRNA 발현이 발현 수준이 지모산 주사 후 각 시점에서 보다 현저히 낮은 것으로 나타났다.
- [0125] <실시예 3> STAT6 활성화가 대식세포에서의 efferocytosis 능력 향상에 미치는 영향 확인
- [0126] 염증을 억제하는데 있어서 사멸 세포를 제거하는 대식세포의 포식능력(efferocytosis)이 중요하다. 따라서, 지모산에 의한 급성 복막염의 복막 대식세포에서 efferocytosis 능력에 STAT6가 미치는 영향을 확인하기 위해, 실시예와 동일한 동물 실험 모델을 기초로 하여 복막의 대식세포의 efferocytosis 능력을 현미경을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 11 및 12와 같다.
- [0127] 도 11 및 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, WT 마우스에서 대식세포에 의해 검출 가능한 efferocytosis는 지모

산 주사 후 72 시간까지 점진적으로 증가하였다(도 12). Zymosan 주사 후 efferocytosis는 지모산 단독 처리 (Zym), 또는 야생형 마우스(WT)의 대식세포에 비해 STAT6 억제제가 투여된 마우스(AS+Zym) 및 STAT6 결핍 마우스(STAT^{-/-})의 복막 대식세포에서 현저히 낮은 것으로 나타났다.

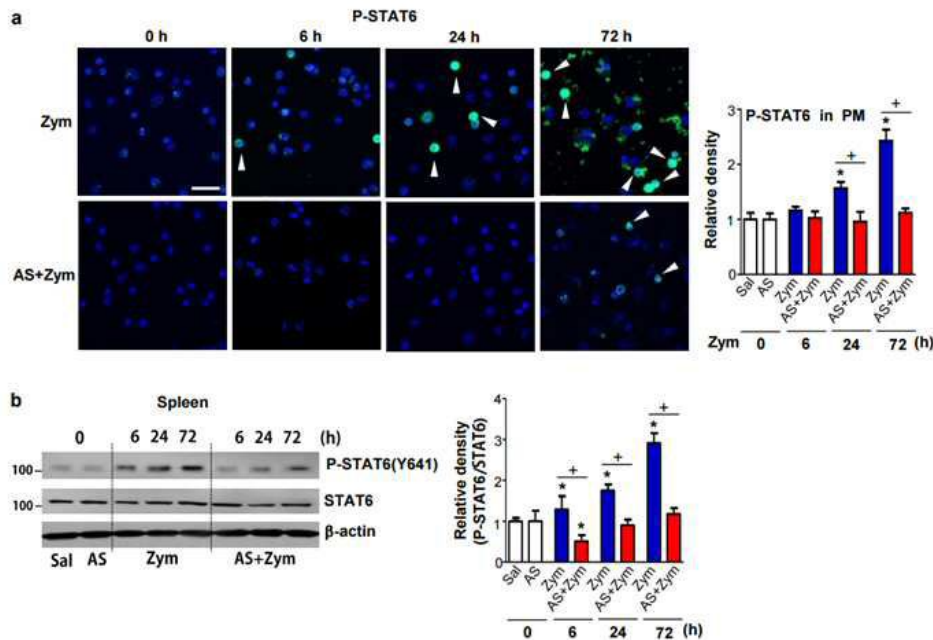
[0128] 따라서, STAT6의 활성화는 지모산에 의한 급성 복막염에서 복막 대식세포의 efferocytosis 작용을 강화시키는 것으로 확인되었다.

[0130] 이러한 결과로부터, i)지모산에 의해 유발된 복막염의 복막 대식세포 및 비장에서 STAT6가 활성화되고, ii) STAT6 억제제는 지모산 유도 염증 반응을 악화시키고 PPAR γ 발현을 감소시키고, iii) STAT 결핍은 염증 반응 악화 및 PPAR γ 발현을 감소시키고, iv) STAT6 활성화는 복막염의 복막 대식세포의 efferocytosis를 강화시키는 작용기전을 확인하였다. 이에, STAT6가 손상된 PPAR γ 활성화 및 복막염 치료의 표적이 될 수 있으므로, 복막염 치료용 물질 개발에 있어서 STAT6가 주요 치료적 표적이 될 수 있음을 확인하였다. 아울러, STAT6 인산화를 활성화시키는 약물이 급성 복막염 치료용 물질로 적절하며, STAT6 인산화를 억제하는 약물을 피해야함을 확인하였다.

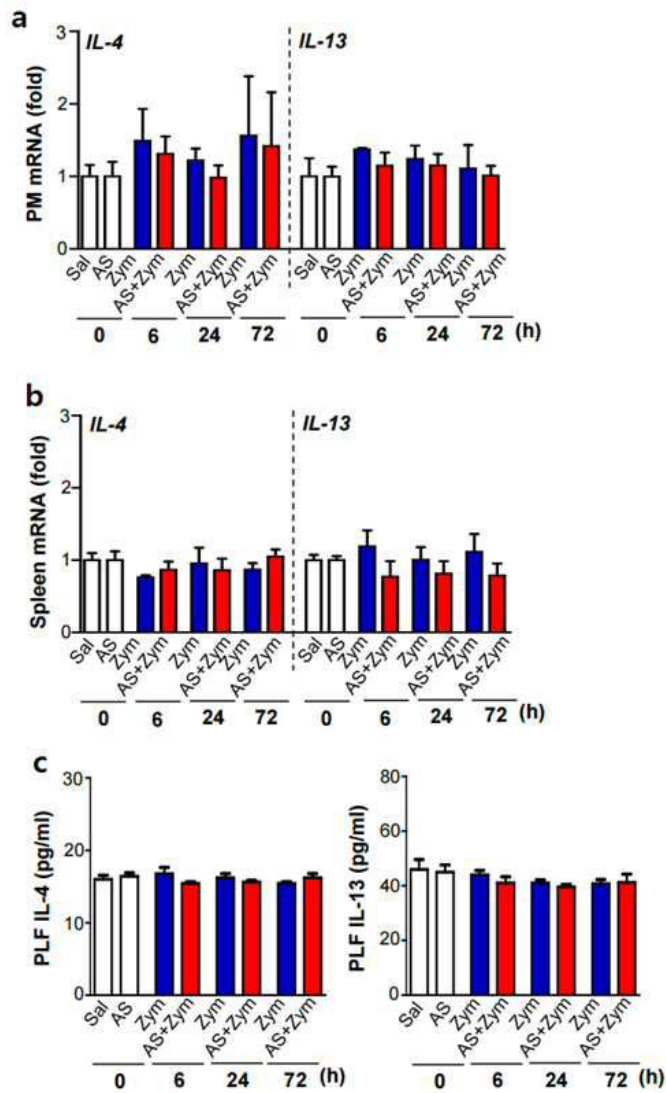
[0132] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

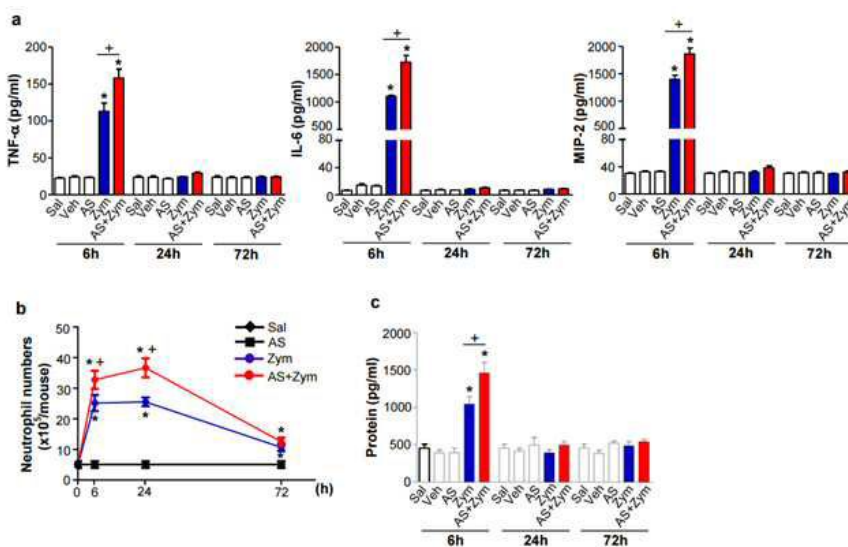
도면1



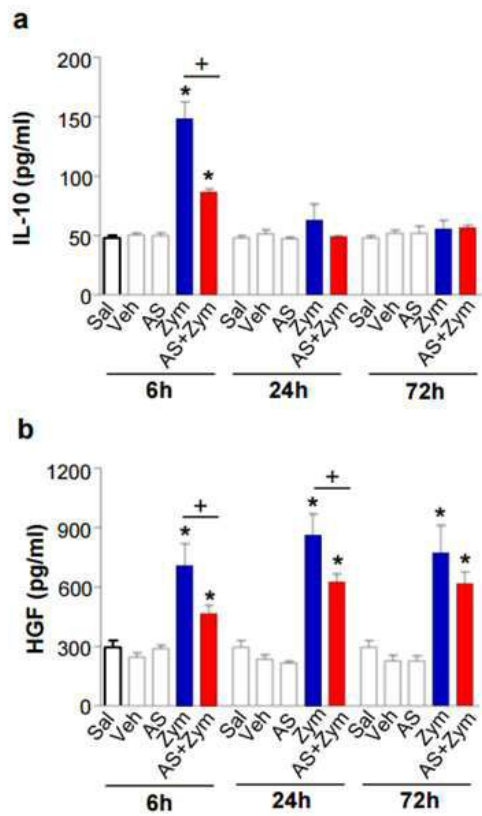
도면2



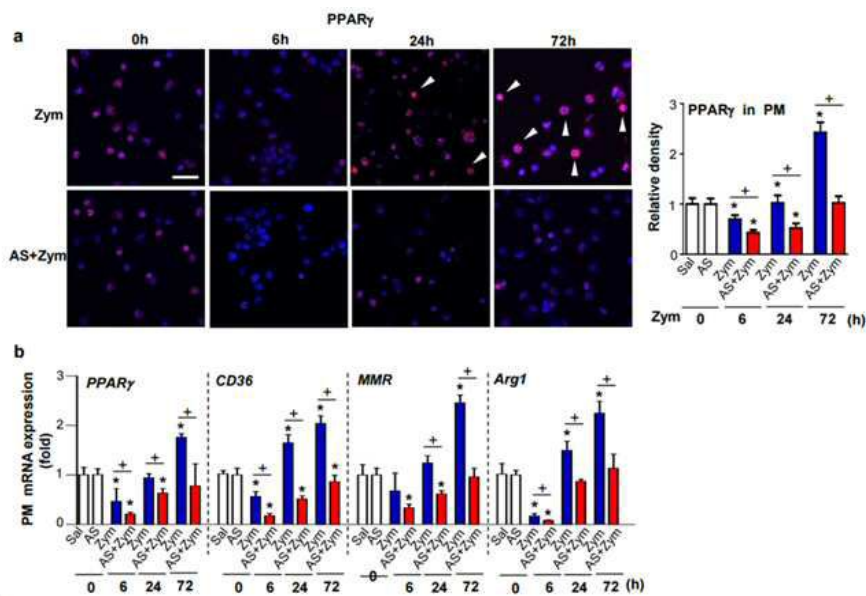
도면3



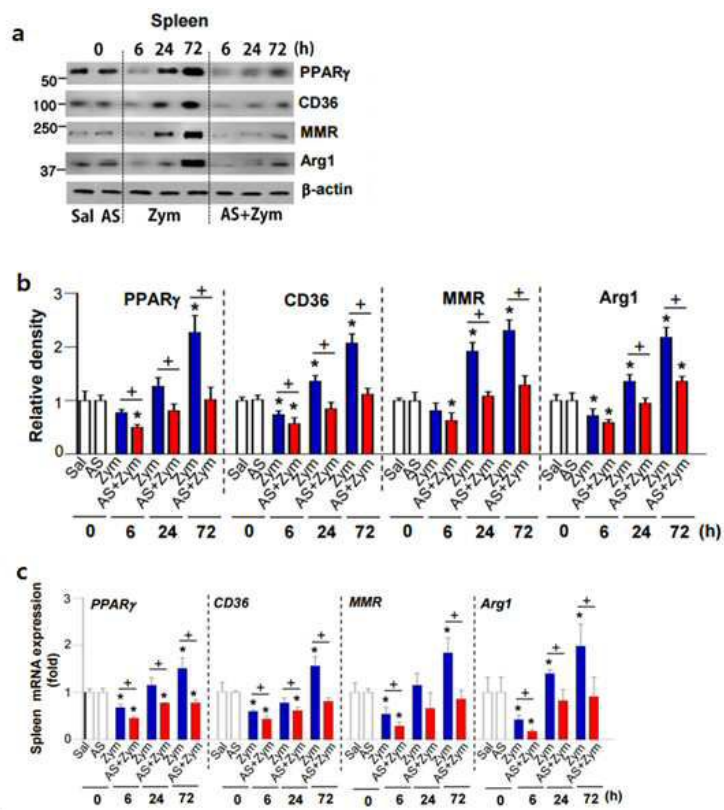
도면4



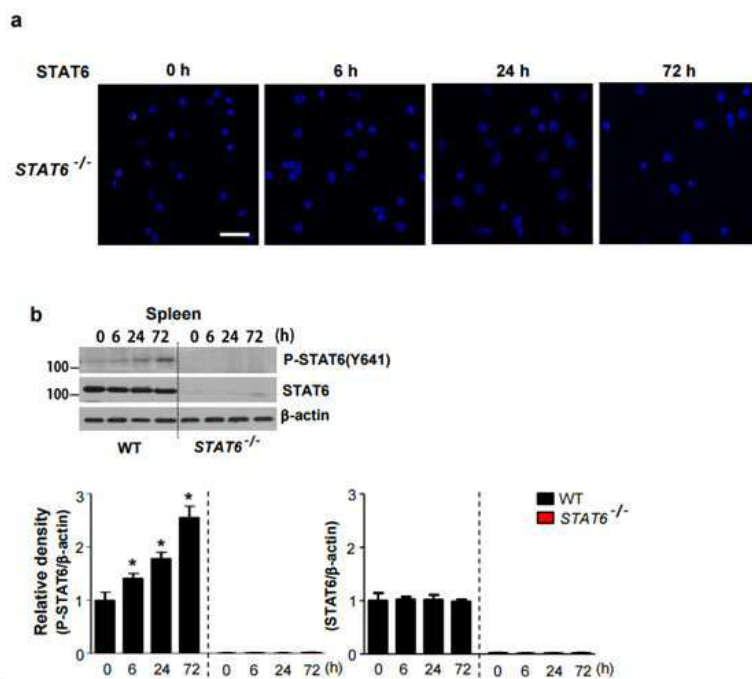
도면5



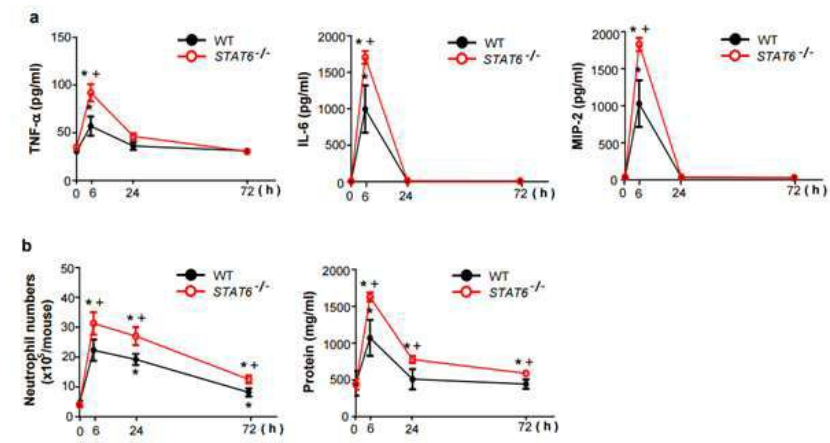
도면6



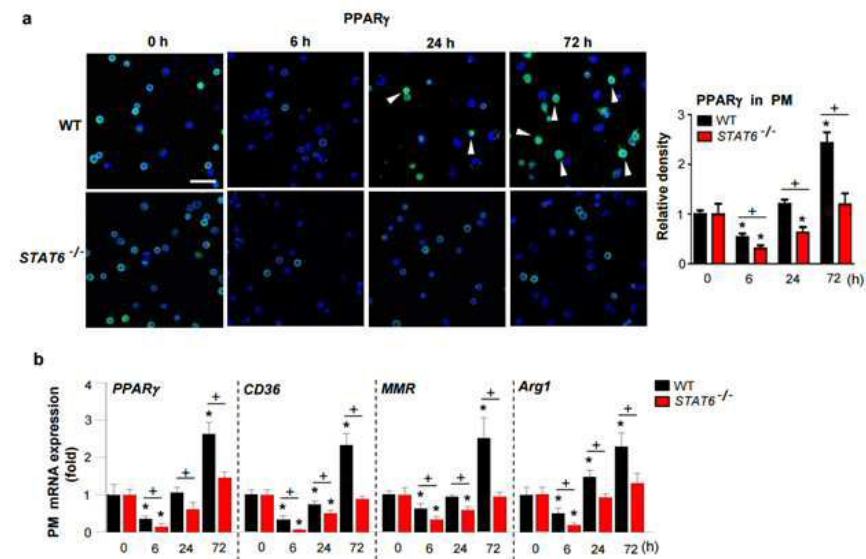
도면7



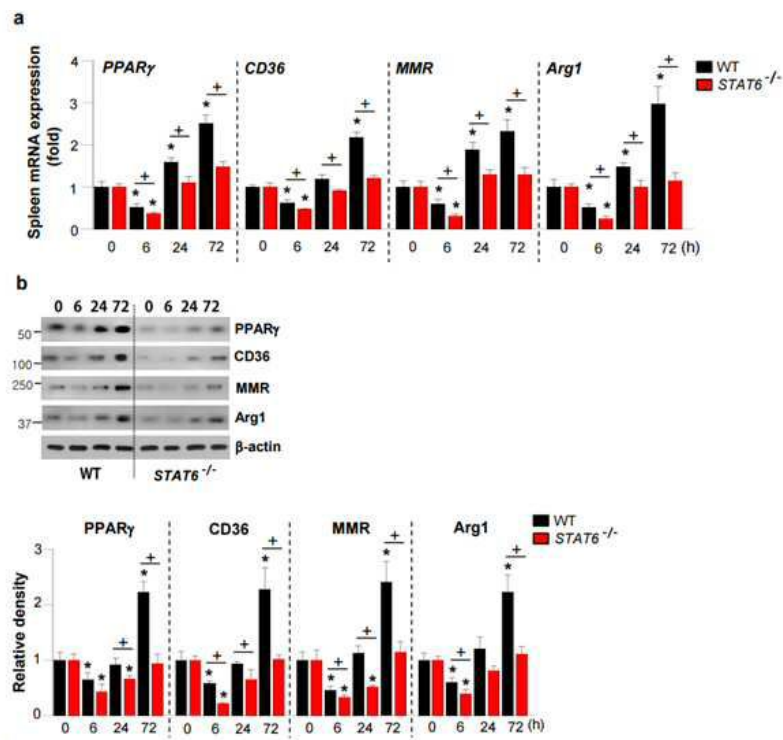
도면8



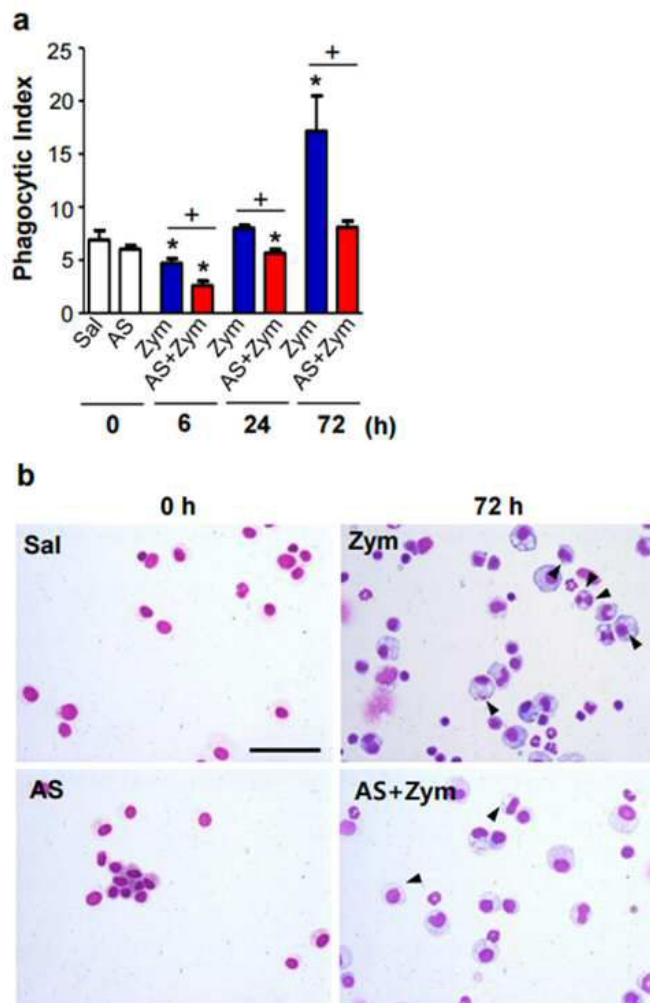
도면9



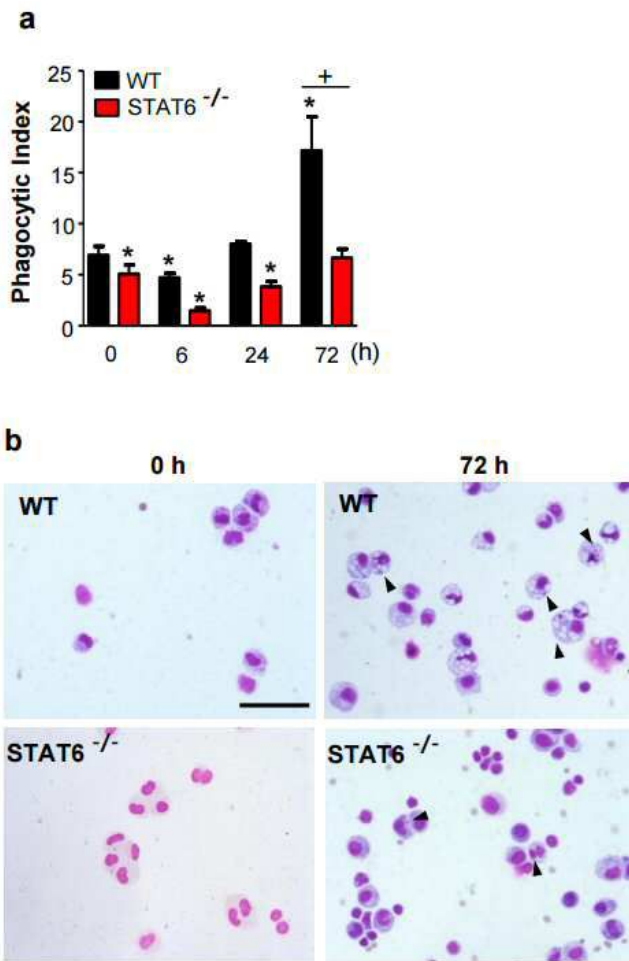
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Screening Method of a substance for treating noninfectious inflammatory diseases
- <130> EWWHA198P-1
- <150> KR 10-2020-0145339
- <151> 2020-11-03
- <160> 14
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PPARgamma Forward Primer
- <400> 1

gcccttttgt gactttatgg	20
<210> 2	
<211> 20	
<	
212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PPARgamma Reverse Primer	
<400> 2	
cagcaggttg tcttggatgt	20
<210> 3	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD36 Forward Primer	
<400> 3	
ttgtacctat actgtggcta aatgaga	27
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD36 reverse Primer	
<400> 4	
cttgtgtttt gaacatttct gctt	24
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MMR Forward Primer	
<400> 5	
agaaaatgca caagagcaag c	21
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> MMR Reverse Primer
 <400> 6
 ggaacatgtg ttctgcgttg 20
 <210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Arg1 Forward Primer
 <400>
 > 7
 gtggggaaag ccaatgaag 19
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Arg1 Reverse Primer
 <400> 8
 gcttccaact gccagactgt 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-4 Forward Primer
 <400> 9
 cgagctcact ctctgtggtg 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-4 Reverse Primer
 <400> 10
 tgaacgaggt cacaggagaa 20
 <210> 11
 <211> 19

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-13 Forward Primer	
<400>	11	
	cctggctctt gcttgcctt	19
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-13 Reverse Primer	
<400>	12	
	ggtcttgtgt gatgttctc a	21
<210>	13	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HPRT Forward Primer	
<400>	13	
	cagactgaag agctactgta atg	23
<210>	14	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HPRT Reverse Primer	
<400>	14	
	ccagtgtaa ttatatcttc aac	23