



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0139461
(43) 공개일자 2017년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 38/1761 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0071548
(22) 출원일자 2017년06월08일
심사청구일자 2017년06월08일
(30) 우선권주장
1020160071500 2016년06월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이경미
서울특별시 강남구 압구정로 151, 105동 505호 (압구정동, 현대아파트)
김태진
서울특별시 용산구 백범로 260, 106동 602호 (효창동, 효창파크푸르지오아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

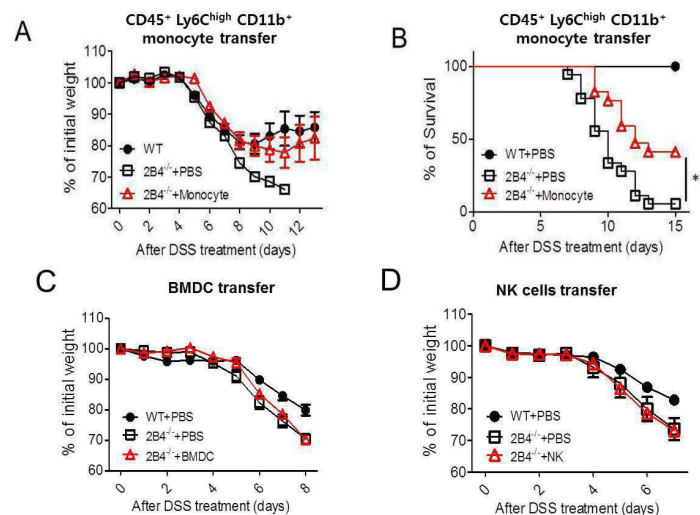
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 면역세포 수용체 2B4(CD244)의 염증성 장질환 진단 및 치료제로서의 용도

(57) 요약

본 발명은 면역세포 수용체인 2B4(CD244)의 염증성 장질환 진단 및 치료제로서의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질을 함유하는 염증성 장질환 진단용 조성물 및 2B4를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합백터 또는 2B4 단백질을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 이용하면 염증성 장질환을 신속하고 정확하게 진단할 수 있고, 빈번한 배변과 출혈, 체중 감소, 결장 길이 감소와 같이 일상 생활에 과도한 고통을 수반하는 염증성 장질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

(72) 발명자

김정민

서울특별시 성북구 안암로5길 54-4 (안암동4가)

박봉규

서울특별시 송파구 올림픽로 374, 411호 (방이동, 올림픽파크뷰)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017004828

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원

연구과제명 염증성 장질환의 조절자로서 SLAMF4의 기능 및 메카니즘 규명

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017000350

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 학문후속세대양성_대통령 Post-Doc 펠로우십

연구과제명 염증성 장질환에서 CD160/HVEM 수용체의 역할규명을 통한 신규 치료타겟발굴

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016928865

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 Human Long-lived NK 세포와 종양 특이적 기억 T 세포 유도기술개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.08.01 ~ 2017.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질을 함유하는 염증성 장질환 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 2B4 유전자의 발현수준은 2B4 유전자의 발현여부 또는 발현양으로 측정하는 것으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 2B4 단백질의 수준은 상기 단백질의 존재 여부 또는 단백질의 발현양으로 측정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 2B4 유전자의 발현수준을 측정할 수 있는 물질은 2B4 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍 또는 2B4 유전자와 혼성화할 수 있는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질은 2B4 단백질에 특이적으로 결합하는 물질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 장형 베체트병, 크론병 및 궤양성 대장염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항의 조성물을 염증성 장질환이 의심되는 환자에게서 채취한 생물학적 시료에 처리하여, 시료 중의 2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정하여 염증성 장질환의 진단 또는 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 대장으로부터 분리된 조직 또는 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

2B4 유전자 또는 그의 단편과 혼성화할 수 있는 프로브; 또는 2B4 단백질 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 물질이 고정되어 있는 염증성 장질환 진단용 마이크로어레이.

청구항 10

2B4 유전자 또는 그의 단편과 혼성화할 수 있는 프로브; 또는 2B4 단백질 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 물질이 고정되어 있는 염증성 장질환 진단용 키트.

청구항 11

2B4를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합백터 또는 2B4 단백질을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 2B4를 코딩하는 유전자는 서열번호 11로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 2B4 단백질은 서열번호 12로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

2B4 단백질을 발현하는 세포를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 치료를 위한 세포치료제.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 세포는 $CD45^{+}$ $Ly6C^{high}$ $CD11b^{+}$ 단핵구인 것을 특징으로 하는 세포치료제.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 단핵구는 골수 유래인 것을 특징으로 하는 세포치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역세포 수용체인 2B4(CD244)의 염증성 장질환 진단 및 치료제로서의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질을 함유하는 염증성 장질환 진단용 조성물 및 2B4를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합백터 또는 2B4 단백질을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난치성 질환인 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD)은 장내의 과도한 면역반응으로 발병하는 질환으로 뚜렷한 발병 원인이 알려지지 않고 있다. 염증성 장 질환 환자의 경우 정상인에 비해 대장암으로 발전할 가능성이 6배 이상 높기 때문에 적기에 치료가 필수적이나, 아직까지 염증성 장질환 (IBD)을 근본적으로 치료할 수 있는 약제는 개발되지 못한 실정이다. 현재까지의 연구를 통해 TNF가 염증성 장 질환의 유도인자임이 밝혀져 있고 대식세포를 포함하는 선천면역 세포에서 TLR 및 인플라마좀(Inflammasome)을 중심으로 많은 연구가 진행되고 있으나, 이미 염증반응이 유발된 후 만성 염증반응을 유지시키는 인자들에 대한 발굴 및 개발은 전무한 실정이다.

[0003] 염증성 장질환은 사이토카인이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 많은 연구가 사이토카인을 분비하는 면역세포에 초점을 맞추고 있다. 만성염증성 장질환의 경우 점막면역시스템의 제어가 불가능하여 지속적인 활성화를 유도하게 되는데, 대표적으로 대식세포, T세포, 그리고 최근에 밝혀진 선천면역세포(innate lymphoid cells, ILC) 등이 관여를 한다고 알려져 있으며, 이 세포들은 공생박테리아로부터 유래된 미생물의 산물과 항원에 반응하여 장내의 만성염증반응을 촉진하는 것으로 보인다(Sonnenberg GF et al, Nature Medicine, 2013).

[0004] 유전학적 접근을 통해 분석한 결과 염증성 장질환에서 사이토카인 혹은 사이토카인을 생산하는 세포들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 기초적인 연구들을 바탕으로 IFN β , IL-10, IL-11에 대한 항체를 환자들에게 투여한 결과 좋은 예후를 보여주지는 못했으나, 인플릭시맵이라는 TNF에 대한 항체의 경우 크론병 환자들에게서 상당히 고무적인 결과를 확인시켜줄 수 있었고, 또한, 항 TNF치료제(아다리뮤맵, 세토리주맵, 골리뮤맵)를 통해 궤양성 대장염에서 긍정적인 효과를 보여 줄 수 있었다.

[0005] 수지상세포와 대식세포는 크론병과 궤양성 대장염에서 IL-12의 분비능을 증가시키게 되는데 이는 항원제시 세포의 활성화로 인해 Th1 세포의 분화와 활성화 증가를 유발하는 것으로 보고되고 있다. 유사하게 이러한 세포에서 분비되는 IL-23도 크론병을 가지고 있는 환자에서 높게 나타나는 것으로 보고되고 있다. IL-12와 IL-23이 공유하고 있는 IL-12p40의 경우 브리키뉴맵(ABT874)로 명명되어 활성화된 크론병환자를 대상으로 임상시험을 수행하였으나, 최근에는 IL-12p40 보다는 IL-23p19에 대한 항체가 염증성 장질환 치료에 좀 더 효과적이라고 알려져 있다(Langley RG et al., J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013). 또한 다른 보고에서는 IL-27이 만성염증성질환에서 염증성 사이토카인으로 사용되며, IL-27에 대한 수용체가 T세포에 없는 경우 장염에 대한 염증정도가 감

소함이 보고되어 있다(Sasaoka T et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2011).

[0006] 또한, 항원제시세포는 IFN- α 와 IFN- β 와 같은 type I Interferon을 대량 분비하고 있는데, 장염모델에서 장내 박테리아는 장내 상피세포 손상 후에 TLR9에 대한 길항제인 CpG의 영향을 받아 IFN- α 와 IFN- β 등을 분비하는 것으로 보고되었다(Fri I et al., World J Gastroenterol. 2013).

[0007] 그러나, 현재까지 2B4 수용체가 염증성 장질환에 관여한다는 보고는 전혀 없는 실정이다.

[0008] 본 발명자들은 면역세포 수용체인 2B4가 염증성 장질환을 조절할 수 있는 주요인자임을 최초로 발견하였고, 여러 염증성 장질환 사이토카인의 관련성을 규명하였으며, 2B4의 염증성 장질환 치료 효과까지 생체 내에서 검증함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 염증성 장질환을 진단 또는 치료하기 위한 신규한 물질을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질을 함유하는 염증성 장질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 염증성 장질환이 의심되는 환자에게서 채취한 생물학적 시료에 처리하여, 시료 중의 2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정하여 염증성 장질환의 진단 또는 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 2B4 유전자 또는 그의 단편과 혼성화할 수 있는 프로브; 또는 2B4 단백질 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 물질이 고정되어 있는 염증성 장질환 진단용 마이크로어레이 및 염증성 장질환 진단용 키트를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, B4를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합벡터 또는 2B4 단백질을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 2B4 단백질을 발현하는 세포를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 치료를 위한 세포치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 염증성 장질환을 신속하고 정확하게 진단할 수 있고, 빈번한 배변과 출혈, 체중 감소, 결장 길이 감소와 같이 일상 생활에 과도한 고통을 수반하는 염증성 장질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 대조군과 2B4 결핍 마우스에서의 장내 염증반응에 대한 민감도를 (A) 체중 변화, (B) 임상 지수, 및 (C) 대장 길이로 관찰한 결과이다.

도 2는 정상 마우스의 장내 염증반응 유발 전후 대장 내 림프구에서의 (A)2B4 RNA 발현 정도, 및 (B) 2B4 단백질 발현 세포 정도를 확인한 결과이다.

도 3은 대조군과 2B4 결핍 마우스에서 장내 염증반응 유발에 따른 (A) 대장 내에서의 항균 펩타이드인 R3g3g와 Reg3 β 의 RNA 발현 정도, (B) 수선 연관 사이토카인인 IL-22의 RNA 발현 정도, 및 (C) 대장 조직 배양 후 IL-22의 분비 정도를 확인한 결과이다.

도 4는 대조군과 2B4 결핍 마우스에서 장내 염증반응 유발에 따른 (A) 대장 내에서의 IL-1 β 의 RNA 발현 정도, 및 (B) 대장 조직 배양 후 IL-1 β 의 분비 정도를 확인한 결과이다.

도 5는 (A) 정상 마우스의 장내 염증반응 유발에 따른 대장의 LPL(lamina propria lymphoid cells)에서 2B4 수용체를 발현하는 세포 중 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺의 분포도, (B) 대조군과 2B4 결핍 마우스에서 장내 염증반응 유발에 따른 대장의 LPL(lamina propria lymphoid cells)에서 2B4 수용체를 발현하는 세포 중 CD45⁺ Ly6C^{high}

CD11b⁺의 분포도, (C) 대조군과 2B4 결핍 마우스에서 장내 염증반응 유발에 따른 대장의 LPL(lamina propria lymphoid cells)에서 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구의 활성화 수용체인 CD86의 발현 정도, 및 (D) 대조군과 2B4 결핍 마우스에서 장내 염증반응 유발에 따른 LPL(lamina propria lymphoid cells)과 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구에서의 IL-1β의 RNA 발현 정도를 확인한 결과이다.

도 6은 2B4 결핍 마우스에 장내 염증반응을 유발한 후, 2B4를 발현하는 골수유래 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구를 투여하고 (A) 체중 변화, 및 (B) 생존률을 관찰하거나, 2B4를 발현하는 (C) BMDC 세포, (D) NK 세포를 투여하고 체중변화를 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 염증성 장질환은 현대인에게 높은 빈도로 발생하는 질환이지만, 아직까지 뚜렷한 진단 및 치료제가 개발되고 있지 않은 문제점이 있었다. 본 발명에서는 면역세포 수용체인 2B4(CD244)가 결핍된 마우스에서 염증성 장질환에 대한 민감도(체중감소, 임상 지수, 대장 길이)와 밀접한 상관관계를 보임을 확인함으로써 2B4가 염증성 장질환 진단용 마커로 활용될 수 있음을 최초로 발견하였다(도 1).
- [0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질을 함유하는 염증성 장질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에서, 2B4 유전자의 발현수준은 2B4 유전자의 발현여부 또는 발현양으로 측정할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서, 2B4 단백질의 수준은 상기 단백질의 존재 여부 또는 단백질의 발현양으로 측정할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서, "진단"이라는 용어는 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 염증성 장질환 진단 마커의 발현 유무를 확인하여 염증성 장질환의 발병 여부 또는 염증성 장질환 발병 가능성을 확인하는 것을 의미하며, 또한, 본 발명에서의 "진단"은 염증성 장질환 진단 마커의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 염증성 장질환의 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함한다.
- [0022] 본 발명에서, 상기 2B4 유전자의 발현수준을 측정할 수 있는 물질은 2B4 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍 또는 2B4 유전자와 혼성화할 수 있는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0023] 본 발명에서, 상기 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질은 2B4 단백질에 특이적으로 결합하는 물질일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0024] 본 발명에서 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0025] 본 발명에서, 상기 "프라이머"란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 2B4 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이다.
- [0026] 상기 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기관 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, 상기 "프로브"라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP

(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 상기 2B4 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질은 2B4 단백질에 특이적인 물질인 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 항체(antibody) 또는 앵타머(aptamer)일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 2B4 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 물질이라면 어느 것이나 제한없이 사용가능하다.

[0029] 본 발명에서 상기 항체는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등을 포함하는 개념으로, 완전한 항체(whole antibody) 뿐 아니라 항체의 단편(antibody fragment)도 포함한다. 본 발명에서의 항체는 면역글로불린 분자의 모든 유형 (예: IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA) 및 이의 하위 부류(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 일 수 있으며, 어떠한 종에서 유래된 것이라도 사용가능하며, 본 발명에서의 '항체의 단편'은 적어도 항원에 대한 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 단쇄 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, Fab 단편, F(ab')₂단편, Fd, scFv, 도메인 항체, 미니바디, 스캐프(single chain antibody, scAb), 항체 불변영역의 유도체들, 단백질 스캐폴드(protein scaffolds)에 기초한 인공항체 등을 포함한다.

[0030] 본 발명에서, 상기 기술한 바와 같이 염증성 장질환을 진단할 수 있는 마커 단백질로서 2B4 단백질이 규명되었으므로, 상기 단백질을 이용하여 항체를 생성하는 방법은 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 2B4 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., European Journal of Immunology, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있거나 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al., Nature, 352, 624-628, 1991, Marks et al., J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0031] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 조성물을 염증성 장질환이 의심되는 환자에게서 채취한 생물학적 시료에 처리하여, 시료 중의 2B4 유전자의 발현수준 또는 2B4 단백질의 수준을 측정하여 염증성 장질환의 진단 또는 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 염증성 장질환의 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 2B4 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 정상 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있고 바람직하게는 대장으로부터 분리된 조직 또는 세포일 수 있다.

[0033] 상기 2B4 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블롯 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 상기 2B4 단백질 수준의 측정은 2B4 단백질에 특이적으로 결합하는 물질, 바람직하게는 2B4 단백질 특이적 항체 또는 앵타머를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 2B4 마커 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전

분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

- [0035] 본 발명에서는 염증성 장질환 동물모델에서 야생형 마우스는 항균 펩타이드인 Reg3 β , Reg3 γ 와 사이토카인 IL-22, IL-1 β 의 발현이 증가하였으나, 2B4 발현을 억제한 마우스의 경우 항균 펩타이드인 Reg3 β , Reg3 γ 와 사이토카인 IL-22, IL-1 β 의 발현양이 증가하지 않는 것으로 확인된바, 염증성 장질환 진단용 조성물에는 Reg3 β , Reg3 γ , IL-22, IL-1 β 유전자의 발현수준 또는 Reg3 β , Reg3 γ , IL-22, IL-1 β 단백질의 발현 또는 분비 수준을 측정할 수 있는 물질을 추가로 함유할 수 있다.
- [0036] 또 다른 관점에서 본 발명은 2B4 유전자 또는 그의 단편과 혼성화할 수 있는 프로브; 또는 2B4 단백질 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 물질이 고정되어 있는 염증성 장질환 진단용 마이크로어레이에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 2B4 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling) 될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0039] 또 다른 관점에서, 본 발명은 2B4 유전자 또는 그의 단편과 혼성화할 수 있는 프로브; 또는 2B4 단백질 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 물질이 고정되어 있는 염증성 장질환 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에서 염증성 장질환 진단용 키트에 포함되는 조성물은 2B4 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.
- [0041] 본 발명의 염증성 장질환 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 thermophilus* (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 염증성 장질환 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0043] 한편, 본 발명자들은 B4 결핍 마우스에 PBS만 처리한 그룹은 체중이 급격히 감소하였으나, 2B4 결핍 마우스에 2B4를 발현하는 단핵구를 투여한 그룹은 체중이 야생형 마우스에 근접하게 증가함을 확인할 수 있었고(도 6A), 생존율에 있어서도 2B4 결핍 마우스에 PBS만 처리한 그룹에 비해 2B4 결핍 마우스에 2B4를 발현하는 단핵구를 투여한 그룹이 유의미하게 생존율이 증가함을 확인할 수 있었다(도 6B).
- [0044] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 2B4를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합백터 또는 2B4 단백질을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명에서, 상기 2B4를 코딩하는 유전자는 서열번호 11로 표시될 수 있으며, 이와 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 핵산 서열을 가지는 유전자를 의미한다.
- [0046] 본 발명에서, 상기 2B4 단백질은 서열번호 12로 표시될 수 있으며, 이와 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 의미한다.
- [0047] 본 발명은 또 다른 관점에서 본 발명에서 2B4 단백질을 발현하는 세포를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 치료를 위한 세포치료제를 제공할 수 있다..

- [0048] 본 발명에서, 본 발명은 또 다른 관점에서 본 발명에서 2B4 단백질을 발현하는 세포를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 치료를 위한 세포치료제를 제공할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 2B4 세포는 BMDC 세포, NK 세포, $CD45^{+} Ly6C^{high} CD11b^{+}$ 단핵구 일수 있으나, $CD45^{+} Ly6C^{high} CD11b^{+}$ 단핵구를 사용하였을 때 염증성 장질환 치료 효과가 가장 우수한 것으로 확인된 바, 상기 세포치료제는 $CD45^{+} Ly6C^{high} CD11b^{+}$ 단핵구인 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0050] 본 발명에서, 상기 단핵구는 골수 유래일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 용어, "염증성 장질환(inflammatory bowel disease)"은 장에 발생하는 원인불명의 만성적인 염증을 뜻하는 것으로, 통상적으로 특발성 염증성 장질환인 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론병(Chron's disease)을 지칭하지만, 우리나라에서 비교적 흔하게 발병하는 장형 베체트병(intestinal Bechet's disease)도 이에 포함될 수 있다. 보다 넓은 의미로는 세균성, 바이러스성, 아메바성, 결핵성 장염 등의 감염성 장염과 허혈성 장질환, 방사선 장염 등 모든 장에서 발생하는 염증성 질환을 모두 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 상기 넓은 의미의 염증성 장질환, 예컨대, 세균성, 바이러스성, 아메바성, 결핵성 장염 등의 감염성 장염과 허혈성 장질환, 방사선 장염 등 모든 장에서 발생하는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크론병, 궤양성 대장염 및 장형 베체트병의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 상기한 바와 같이 염증성 장질환의 원인은 아직까지 규명되지 못하고 있으나, 유전적 및 환경적 영향을 받으며, 면역학적 이상에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 원인이 명확히 규명되지 못하였으므로 뚜렷한 치료제도 개발되지 못하였다. 따라서, 현재로서는 약물을 이용한 염증성 장질환의 치료를 위하여 일반적인 항염증제, 부신피질 호르몬제, 면역억제제 또는 항생제 등을 단독으로 또는 혼합하여 사용함으로써 치료효과는 극대화하고 부작용은 최소화할 수 있는 범위에서 치료제의 종류 및 용량 등을 선택하는 방법을 택하고 있다.
- [0053] 상기 염증성 장질환의 증상은 구체적인 질병에 따라 차이는 있으나, 일반적으로 복통, 하복부 불쾌감, 결장의 단축(shortening of colon), 체중감소, 출혈지수 상승(출혈) 또는 배변지수 상승(설사)의 증상을 나타낼 수 있다. 동일한 질병이라도 병변의 범위나 위치 또는 중증도에 따라 다른 양상을 나타낼 수 있다.
- [0055] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 염증성 장질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 염증성 장질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0056] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기체, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 사용가능한 계면활성제로는 스테로이드에서 유도된 것이나, N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드](DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트 등이 있다.
- [0058] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 2B4를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합백터 또는 2B4 단백질과 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 펩티드 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 용어 "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정

성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체 리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 펩티드 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 화합물을 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0062] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 장질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0063] 본 발명에서, 용어 "개체"란 염증성 장질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 염증성 장질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 염증성 장질환 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0064] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물 이외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스, 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 펩티드는 소화가 되기 쉽기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 펩티드의 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스, 텍스트란 등의 카보하이드레이트, 아스코르빅산, 글루타치온 등의 항산화제, 킬레이팅 물질, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제들을 사용할 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0066] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 활성물질을 약 0.01 mg/kg/일 내지 1000 mg/kg/일의 용량으로 투여할 수 있다. 경구 투여하는 경우, 50 내지 500 mg/kg의 범위가 적합할 수 있으며, 1일 1회 이상 투여할 수 있다.

[0067] 본 발명의 2B4를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합백터, 2B4 단백질을 발현하는 세포를 유효성분

으로 포함하는 조성물을 투여함으로써, 짧아진 결장, 감소된 체중, 상승된 출혈지수 또는 상승된 배변지수를 회복시켜 염증성 장질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

[0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0071] 본 실시예에서는 서열번호 1의 핵산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 마우스 2B4를 이용하여 실험을 진행하였으며, 이에 대응하는 인간 2B4의 핵산 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시될 수 있다.

[0074] 실시예 1. 2B4가 장내 염증반응에 대한 민감도에 미치는 영향 분석

[0075] 본 발명에서는 장내 염증반응이 유발된 마우스 동물모델에서 야생형 마우스에 비해 2B4의 발현이 감소되는 것을 확인한 바, 2B4를 염증성 장염의 바이오마커로 활용 가능하다고 예측되었다. 2B4가 장내 염증반응에 대한 민감도에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 성별과 주령이 같은 야생형 마우스(C57BL/6, 오리엔트바이오, 한국)와 2B4 결핍 마우스(The University of Chicago, Dr. Kumar 연구실에서 도입하여 고려대학교 계림동물실에서 자체 breeding)를 각각 2 그룹씩, 총 4 그룹으로 분류하였다. 야생형 마우스 한 그룹과 2B4 결핍 마우스 한 그룹에는 2% DSS(Dextran sodium salt)를 멸균된 멸균수에 녹인 형태로 5일간 음용수로 자유 투여하여 장내 염증반응을 유도하였고 이후에는 멸균수를 음용수로 자유 투여하였다. 나머지 야생형 마우스 한 그룹과 2B4 결핍 마우스 한 그룹에는 멸균수를 동일한 조건으로 투여하였다.

[0076] 체중변화는 매일 확인하였으며, DSS 투여 시점의 체중을 100으로 설정하고 이를 기준으로 체중을 환산하여 표기하였으며, 통계적 유의성은 t-test를 사용하였다. 그 결과, 장내 염증반응을 유발시킨 마우스는 모두 체중이 감소되는 경향을 나타내었으나, 특히 2B4 결핍 마우스에서 야생형에 비해 체중 감소가 두드러지게 유발되는 것을 관찰할 수 있었다(도 1A).

[0077] 한편, 체중감소, 혈변, 변의 강직도를 하기 표 1과 같은 기준으로 임상 점수(clinical score)를 평가해 본 결과, 2B4 결핍 마우스에서 장내 염증반응 유발에 따른 임상 점수가 현저히 증가되는 것으로 나타났다(도 1B).

표 1

[0079] 임상 점수 기준표

점수 증상	0	1	2	3	4
체중변화	체중감소 1% 미만	체중감소 1-5%	체중감소 5-10%	체중감소 10-20%	체중감소 20% 이상
혈변	혈변 없음	-	혈변 있음	-	혈변과 항문에 혈액 관찰
변의 강직도	정상변	부드러운 변	변의 형태가 없음	-	설사

[0081] 마지막으로, 대장염의 임상 증상인 대장의 길이 변화를 측정해 보았는데, 장내 염증반응을 유발시킨 마우스의 대장 길이가 많이 짧아진 것으로 관찰되었고, 특히 2B4 결핍 마우스에 장내 염증반응을 유발시켰을 때 대장의 길이가 현저히 짧아진 것을 관찰할 수 있었다(도 1C).

[0082] 상기 결과를 통하여, 2B4가 결핍된 경우 장내 염증반응에 대한 민감도가 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0084] 실시예 2. 장내 염증반응에 따른 2B4 발현량 변화

[0085] 장내 염증반응 유도에 따른 2B4의 발현량 변화를 RNA와 단백질 수준에서 관찰해 보고자 하였다. 이를 위하여 야생형 마우스에 멸균수로만 음용한 마우스를 대조군으로 하고, 실시예 1에서와 동일한 방법으로 DSS를 5일간 처리하고 멸균수로 교체한 마우스 그룹을 실험군으로 하여 2B4의 발현량을 비교하였다.

[0086] 우선 RNA 발현량을 확인하기 위하여, DSS를 처리하고 멸균수로 교체한지 8일째 되는 날 마우스 대장에서 Trizol을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 총 RNA 1 μ g으로 cDNA로 합성한 후 SYBR을 이용한 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR을 위한 마우스 2B4 프라이머는 Biorad에서 구입하여 사용하였다(Bio-rad cat.No. 10025636).

[0087] 장내 염증반응 유도에 따른 2B4 RNA 분석 결과, 염증반응을 유발한 마우스의 대장에서 염증반응을 유발하지 않은 마우스의 대장에 비하여 2B4 RNA의 발현이 3배 가량 증가하는 것으로 관찰되었다(도 2A).

[0088] 한편, DSS를 처리하고 멸균수로 교체한지 8일째 되는 날 마우스 대장을 PBS로 세척한 후 수술용 가위로 0.5cm이하로 자른 후 20분간 EDTA (10mM) 용액을 이용하여 장상피세포를 제거하고 LPL(lamina propria leukocyte)을 collagenaseII와 DispaseII를 이용하여 분리한 후 Collagenase type II (1mg/ml), Dispase II (1mg/ml)를 37℃에서 45분간 반응하여 percoll gradient 방법을 이용하여 Lamina propria의 림프구를 분리하였다. 형광이 부착되어 있는 항-2B4 항체((Biolegend, USA)로 염색하여 유세포 분석기를 이용하여 CD45⁺ 혈구 세포 중 2B4의 발현 정도를 분석하였다.

[0089] 그 결과, 장내 염증반응 유발에 따라 대장 내에 존재하는 림프구 내에서 2B4 발현량이 6.1%에서 13%까지 증가되는 것으로 확인되었다(도 2B).

[0090] 상기 결과를 통하여, 장내 염증반응이 일어나면 대장의 림프구에서 2B4의 발현이 현저히 증가되는 것을 알 수 있었다.

[0092] 실시예 3. 장내 염증반응에 따른 관련 신호전달 기전 확인

[0094] 면역세포 수용체인 2B4와 관련된 신호전달 기전을 확인하기 위하여 야생형과 B24 결핍 마우스의 장내 염증반응 유도에 따른 관련 항균 펩타이드와 사이토카인의 발현량 변화를 관찰하였다.

[0095] RNA 발현량 변화를 관찰하기 위하여 야생형 마우스와 2B4 결핍 마우스에 DSS를 음용수로 투여한 후 각각 0, 5, 8일에 대장을 분리하고 Trizol로 총 RNA를 분리하여 총 RNA 1 μ g으로 cDNA로 합성한 후 항균 펩타이드인 Reg3 β , Reg3 γ 와 사이토카인 IL-22, IL-1 β 의 RNA 발현량을 RT-PCR로 분석하였다. 이 때 사용한 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0097] Reg3 β Foward Primer: 5'- GGC TTC ATT CTT GTC CTC CA -3'(서열번호 5)

[0098] Reg3 β Reverse Primer: 5'- TCC ACC TCC ATT GGG TTC T -3'(서열번호 6)

[0099] Reg3 γ Foward Primer: 5'- CAA GGT GAA GTT GCC AAG AA -3'(서열번호 7)

[0100] Reg3 γ Reverse Primer: 5'- CCT CTG TTG GGT TCA TAG CC -3'(서열번호 8)

[0101] IL-22 Foward Primer: 5'- CAT GCA GGA GGT GGT ACC TT -3'(서열번호 9)

[0102] IL-22 Reverse Primer: 5'- CAG ACG CAA GCA TTT CTC AG -3'(서열번호 10)

[0103] IL-1 β Foward Primer: 5'- CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G -3'(서열번호 11)

[0104] IL-1 β Reverse Primer: 5'- GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA -3'(서열번호 12)

[0106] 그 결과, 항균 펩타이드인 Reg3 β , Reg3 γ 의 RNA 발현량이 야생형 마우스에서는 장내 염증반응이 유도됨에 따라 현저히 증가하였으나, 2B4 결핍 마우스에서는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다(도 3A). 사이토카인 IL-22와 IL-1 β 의 RNA 발현양도 야생형 마우스에서는 장내 염증반응이 유도됨에 따라 현저히 증가하였으나, 2B4 결핍 마우스에서는 그 변화가 매우 작게 나타났다(도 3B, 도 4A).

[0108] 한편, 상기 발현이 증가한 사이토카인의 분비량 변화를 확인해 보고자, 야생형 마우스와 2B4 결핍 마우스에 DSS를 음용수로 투여한 후 0일과 8일에 대장을 분리하여 젠타마이신이 포함된 DPBS에 3~4회 세척하고 0.5cm 크기로 자른 후, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 10% FBS가 첨가된 RPMI 배지에 24시간 배양하고 상등액을 얻어 IL-22와 IL-1 β 를 ELISA 키트(E-bioScience, USA)를 이용하여 제조사 방식에 따라 분석하였다.

[0110] 그 결과, 야생형 마우스에서는 장내 염증반응을 유도함에 따라 IL-22와 IL-1 β 의 분비량이 현저히 증가하였으나, 2B4 결핍 마우스에서는 그 분비량이 거의 증가하지 않는 것으로 나타났다(도 3C, 도 4B).

[0111] 상기 결과를 통하여, 항균 펩타이드인 Reg3 β , Reg3 γ 와 사이토카인 IL-22, IL-1 β 의 발현이 면역세포 수용체인 2B4에 의해 조절된다는 것을 알 수 있었다.

[0113] 실시예 4. 장내 염증반응에 따른

[0114] 2B4 수용체는 CD45를 발현하고 있는 혈구세포 중 NK세포, T세포, 수지상세포, 대식세포, 단핵구 등에서 발현하고 있다. 또한, 도1의 결과를 통해 장내염증반응 유발시 결장에서 2B4의 발현 정도가 현저히 변화됨을 확인한 바, 어떠한 세포에서 발현하는 2B4 수용체가 장내염증반응에 핵심 세포군으로 작용하는지 알아보려고 하였다.

[0115] 정상 마우스에 DSS를 처리하여 장내 염증반응을 유도하고, 대장의 LPL(lamina propria lymphoid cells)을 분리한 후 CD45 혈구 세포 중 2B4를 발현하는 세포에서 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺의 분포를 유세포 분석기를 이용하여 분석해 보았다. 그 결과, 장내 염증반응 유도에 의해 증가하는 2B4를 발현하는 세포에서 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구가 급격히 증가함을 확인할 수 있었다(도 5A).

[0116] 한편, 야생형 마우스와 2B4 결핍 마우스에 DSS를 처리하고 8일이 지나, 대장의 LPL(lamina propria lymphoid cells)을 분리한 후, hematocytometer와 유세포 분석기를 이용하여 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺의 세포수와 분포도를 확인해 본 결과, 야생형 마우스는 장내 염증반응을 유도함에 따라 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 세포수가 급격히 증가하였으나, 2B4 결핍 마우스는 장내 염증반응을 유도하여도 상대적으로 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 세포수가 크게 증가하지 않음을 확인할 수 있었다(도 5B). 또한, CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구 중 단핵구 활성화 마커인 CD86 발현 정도를 분석해 본 결과, 야생형은 장내 염증반응 유도에 의해 CD86 발현이 현저히 증가하였으나, 2B4 결핍 마우스에서는 오히려 CD86 발현이 미미하게 감소하는 경향을 나타내었다(도 5C). 마지막으로, 염증반응 유발 후 8일째 대장에서 LPL(lamina propria lymphoid cells)과 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구를 각각 분리하여 IL-1 β 의 발현을 RNA 수준에서 분석해 본 결과, 야생형 마우스 LPL(lamina propria lymphoid cells)과 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구에서의 IL-1 β RNA 발현량에 비해 2B4 결핍 마우스 LPL(lamina propria lymphoid cells)과 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구에서의 IL-1 β RNA 발현이 매우 낮게 나타남을 확인할 수 있었다(도 5D).

[0118] 실시예 5. 2B4 투여에 따른 장내 염증 치료효과 확인

[0119] 예비 실험을 통하여 야생형 마우스에 장내 염증반응을 유도한 후, 2B4 단백질의 발현을 증가시킨 결과 장내 염증반응이 완화되어 2B4를 염증성 장질환의 치료용 단백질로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이에, 2B4를 발현하는 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구를 야생형 마우스 골수에서 MACS 단핵구 분리 키트 (Miltenyi Biotec, USA)를 이용하여 분리하고, DSS를 3일간 음용수로 처리하여 장내 염증반응을 유도한 야생형 마우스에 상기 단핵구를 2×10^6 개 PBS에 현탁한 후 안구 뒤로 투여 (retro-orbital injection) 하고 이후 2일간 DSS를 더 처리하

여, PBS만 투여한 그룹과 체중변화 및 생존율을 비교 관찰하였다. 그 결과, 상기 CD45⁺ Ly6C^{high} CD11b⁺ 단핵구를 처리한 그룹에서 체중감소가 완화되고 생존율이 증가되는 것을 확인하였다.

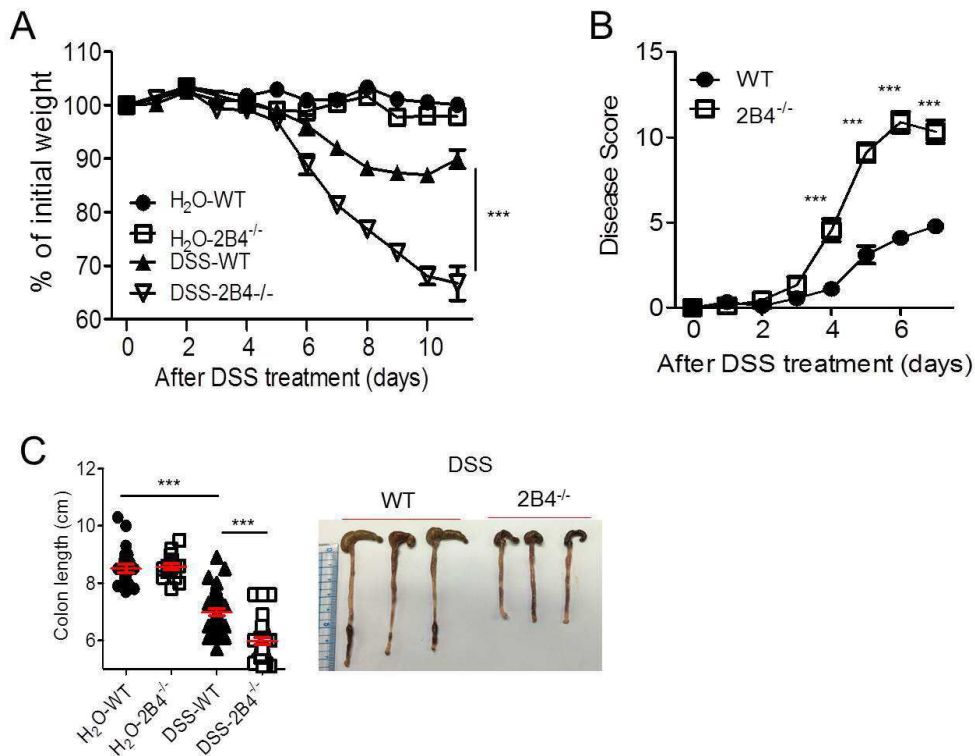
[0120] 이후, 본 발명에서는 추가로 야생형 마우스와 2B4 결핍 마우스에 DSS를 3일간 음용수로 처리하여 장내 염증반응을 유도하였다. 이 후 2B4 결핍 마우스 중 한 그룹에는 PBS만을 투여하고, 다른 한 그룹에는 2B4를 발현하고 있는 상기 단핵구를 2×10^6 개 PBS에 현탁한 후 안구 뒤로 투여 (retro-orbital injection) 하고 이후 2일간 DSS를 더 처리하여 각 그룹의 체중변화 및 생존율을 관찰하였다.

[0121] 그 결과, 2B4 결핍 마우스에 PBS만 처리한 그룹은 체중이 급격히 감소하였으나, 2B4 결핍 마우스에 2B4를 발현하는 단핵구를 투여한 그룹은 체중이 야생형 마우스에 근접하게 증가함을 확인할 수 있었고(도 6A), 생존율에 있어서도 2B4 결핍 마우스에 PBS만 처리한 그룹에 비해 2B4 결핍 마우스에 2B4를 발현하는 단핵구를 투여한 그룹이 유의미하게 생존율이 증가함을 확인할 수 있었다(도 6B).

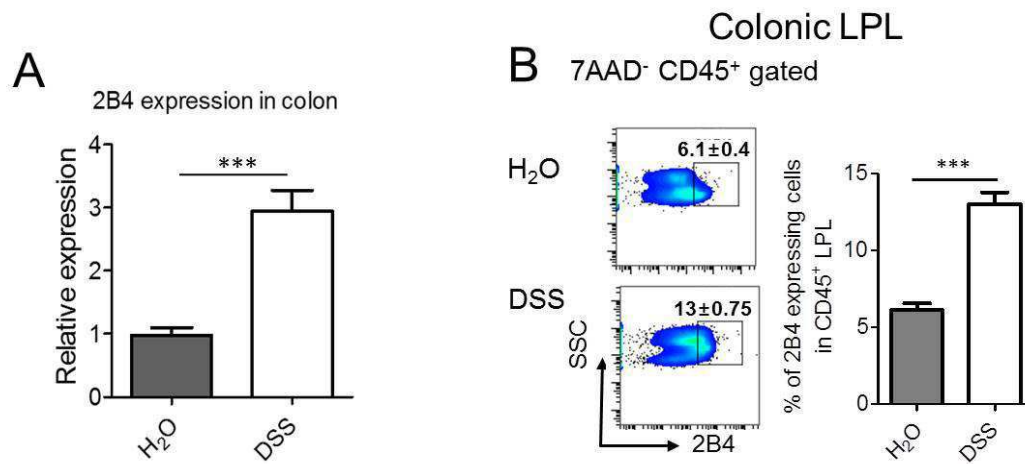
[0123] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

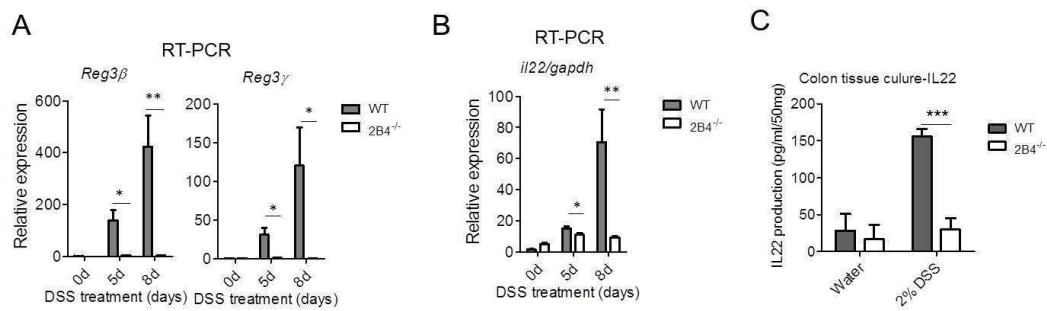
도면1



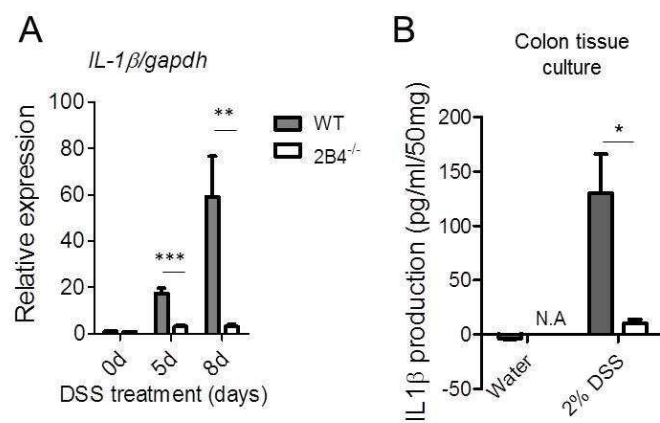
도면2



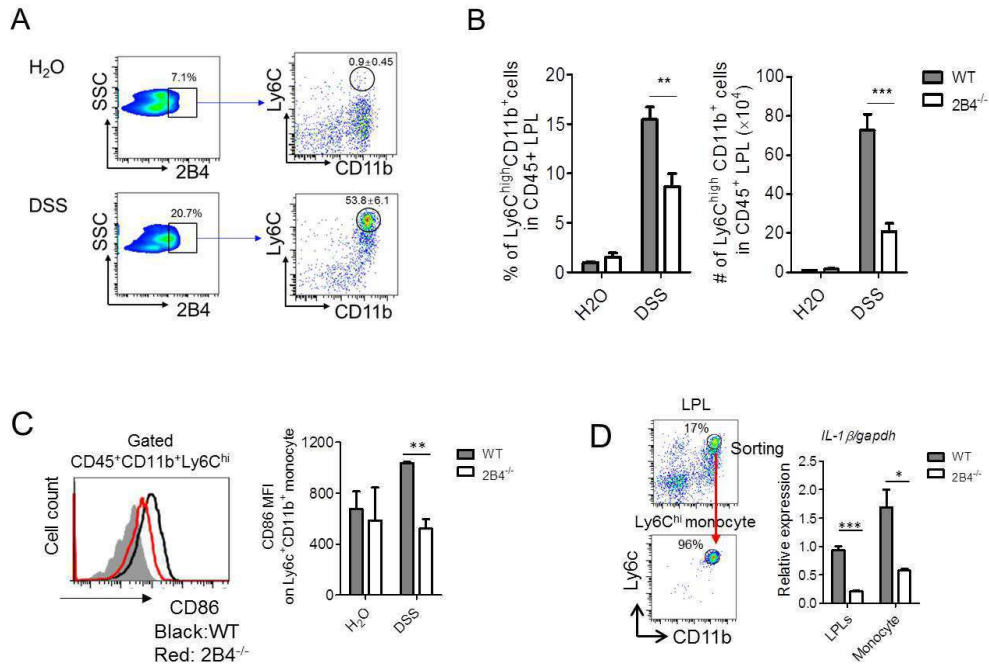
도면3



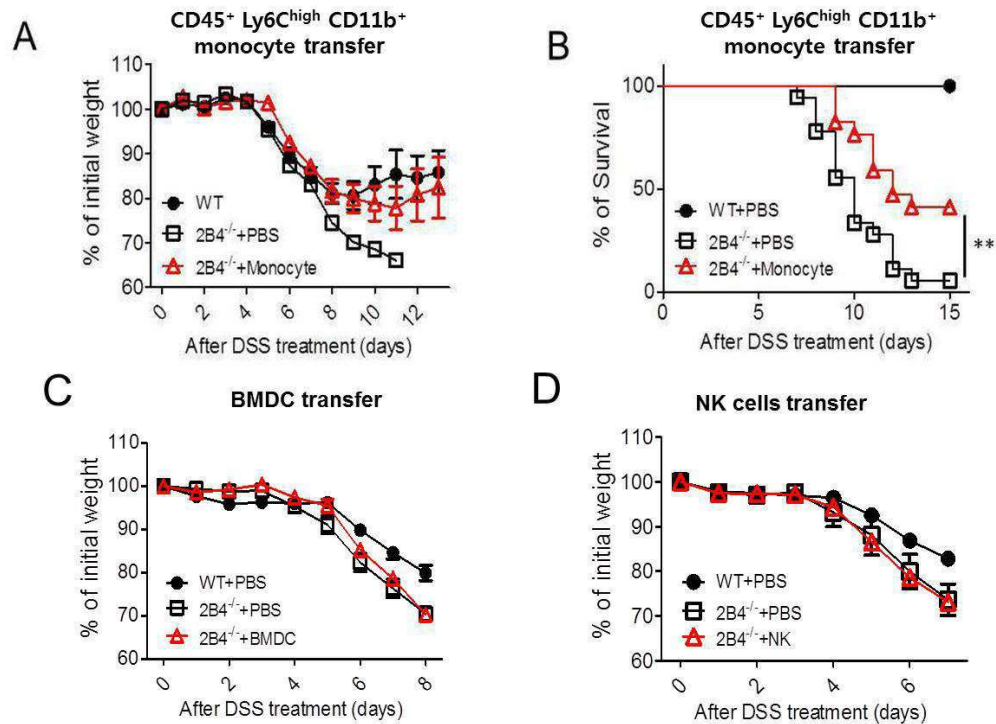
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Use of 2B4(CD244) for Diagnosing and Treating Inflammatory Bowel Disease

<130> P17-B111

<150> KR 1020160071500

<151> 2016-06-09

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1194

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atgttggggc aagctgtcct gttcacaacc ttctgtctcc tcagggtca tcagggccaa 60

gactgccag attcttctga agaagtgggt ggtgtctcag gaaagcctgt ccagctgagg 120

ccttccaaca tacagacaaa agatgtttct gttcaatgga agaagacaga acagggtca 180

cacagaaaaa ttgagatcct gaattgggtat aatgatggtc ccagttggtc aaatgtatct 240

tttagtgata tctatgggtt tgattatggg gattttgtct ttagtatcaa gtcagctaag 300

ctgcaagaca gtggtcacta cctgtctggag atcaccaaca caggcggaaa agtgtgcaat 360

aagaacttcc agcttcttat acttgatcat gttgagacc ctaacctgaa ggcccagttg 420

aagccctgga ctaatgggac ttgtcaactg tttttgtcct gcttgggtgac caaggatgac 480

aatgtgagct acgctttgta cagagggagc actctgatct ccaatcaaag gaatagtacc 540

cactgggaga accagattga cgccagcagc ctgcacacat acacctgcaa cgttagcaac 600

agagccagct gggcaaacca caccctgaac ttcacccatg gctgtcaaag tgtcccttcg 660

aatttcagat ttctgccctt tgggggtgac atcgtgatc tagttacatt atttctcggt 720

gccatcattt gtttctgtgt gtggactaag aagaggaagc agttacagtt cagccctaag 780

gaacctttga caatatatga atatgtcaag gactcacgag ccagcaggga tcaacaagga 840

tgctctaggg cctctggatc tccctcggt gtccaggaag atgggagggg acaaagagaa 900

ttggacaggc gtgtttctga ggtgtctggag cagttgccac agcagacttt ccctggagat 960

agaggcacca tgtactctat gatacagtgc aagccttctg attccacatc acaagaaaaa 1020

tgtacagtat attcagtagt ccagccttcc aggaagtctg gatccaagaa gaggaaccag 1080

aactcttct taagttgtac cgtgtacgag gaggttgga acccatggct caaagctcac 1140

aacctgcca ggetgagccg cagagagctg gagaactttg atgtctactc ctag 1194

<210> 2

<211> 397

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Leu Gly Gln Ala Val Leu Phe Thr Thr Phe Leu Leu Leu Arg Ala

1 5 10 15

His Gln Gly Gln Asp Cys Pro Asp Ser Ser Glu Glu Val Val Gly Val

20 25 30

Ser Gly Lys Pro Val Gln Leu Arg Pro Ser Asn Ile Gln Thr Lys Asp

35 40 45

Val Ser Val Gln Trp Lys Lys Thr Glu Gln Gly Ser His Arg Lys Ile

50 55 60

Glu Ile Leu Asn Trp Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Trp Ser Asn Val Ser

65 70 75 80

Phe Ser Asp Ile Tyr Gly Phe Asp Tyr Gly Asp Phe Ala Leu Ser Ile

85 90 95

Lys Ser Ala Lys Leu Gln Asp Ser Gly His Tyr Leu Leu Glu Ile Thr

100 105 110

Asn Thr Gly Gly Lys Val Cys Asn Lys Asn Phe Gln Leu Leu Ile Leu

115 120 125

Asp His Val Glu Thr Pro Asn Leu Lys Ala Gln Trp Lys Pro Trp Thr

130 135 140

Asn Gly Thr Cys Gln Leu Phe Leu Ser Cys Leu Val Thr Lys Asp Asp

145 150 155 160

Asn Val Ser Tyr Ala Leu Tyr Arg Gly Ser Thr Leu Ile Ser Asn Gln

165 170 175

Arg Asn Ser Thr His Trp Glu Asn Gln Ile Asp Ala Ser Ser Leu His

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Ser Asn Arg Ala Ser Trp Ala Asn His Thr

195 200 205

Leu Asn Phe Thr His Gly Cys Gln Ser Val Pro Ser Asn Phe Arg Phe

210 215 220

Leu Pro Phe Gly Val Ile Ile Val Ile Leu Val Thr Leu Phe Leu Gly

225 230 235 240
Ala Ile Ile Cys Phe Cys Val Trp Thr Lys Lys Arg Lys Gln Leu Gln

 245 250 255
Phe Ser Pro Lys Glu Pro Leu Thr Ile Tyr Glu Tyr Val Lys Asp Ser

 260 265 270
Arg Ala Ser Arg Asp Gln Gln Gly Cys Ser Arg Ala Ser Gly Ser Pro

 275 280 285
Ser Ala Val Gln Glu Asp Gly Arg Gly Gln Arg Glu Leu Asp Arg Arg

 290 295 300
Val Ser Glu Val Leu Glu Gln Leu Pro Gln Gln Thr Phe Pro Gly Asp

305 310 315 320

Arg Gly Thr Met Tyr Ser Met Ile Gln Cys Lys Pro Ser Asp Ser Thr

 325 330 335
Ser Gln Glu Lys Cys Thr Val Tyr Ser Val Val Gln Pro Ser Arg Lys

 340 345 350
Ser Gly Ser Lys Lys Arg Asn Gln Asn Ser Ser Leu Ser Cys Thr Val

 355 360 365
Tyr Glu Glu Val Gly Asn Pro Trp Leu Lys Ala His Asn Pro Ala Arg

 370 375 380
Leu Ser Arg Arg Glu Leu Glu Asn Phe Asp Val Tyr Ser

385 390 395

<210> 3

<211> 1098

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgctggggc aagtggcac cctcactc ctctgtctcc tcaagtgta tcagggcaaa 60

ggatgccagg gatcagctga ccatgtggtt agcatctcgg gagtgcctct tcagttacaa 120

ccaaacagca tacagacgaa ggttgacagc attgcatgga agaagttgct gcctcaciaa 180

aatggatttc atcacatatt gaagtgggag aatggctctt tgccttccaa tacttccaat 240

gatagattca gttttatagt caagaacttg agtcttctca tcaaggcagc tcagcagcag 300

gacagtgcc tctactgcct ggaggtcacc agtatacttg gaaaagttca gacagccacg 360
 ttccaggttt ttgtatttga taaagttgag aaaccccgcc tacaggggca ggggaagatc 420
 ctggacagag ggagatgcca agtggctctg tcttgcttgg tctccaggga tggcaatgtg 480
 tcctatgctt ggtacagagg gagcaagctg atccagacag cagggaacct cacctacctg 540
 gacgaggagg ttgacattaa tggcactcac acatatacct gcaatgtcag caatcctgtt 600
 agctgggaaa gccacacct gaatctcact caggactgtc agaatgccca tcaggaattc 660
 agattttggc cgtttttggg gatcatctg attctaagcg cactgttctt tggcacctt 720

gcctgcttct gtgtgtggag gagaaaggagg aaggagaagc agtcagagac cagtccaag 780
 gaatttttga caatttacga agatgtcaag gatctgaaaa ccaggagaaa tcacgagcag 840
 gagcagactt ttcttgagg ggggagcacc atctactcta tgatccagtc ccagtcttct 900
 gctcccacgt cacaagaacc tgcatatata ttatattcat taattcagcc ttccaggaag 960
 tctggatcca ggaagaggaa ccacagccct tccttcaata gcactatcta tgaagtgatt 1020
 ggaaagagtc aacctaaagc ccagaacct gctcgattga gccgcaaaga gctggagaac 1080
 ttgatgttt attcctag 1098

<210> 4

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Gly Gln Val Val Thr Leu Ile Leu Leu Leu Leu Lys Val

1 5 10 15

Tyr Gln Gly Lys Gly Cys Gln Gly Ser Ala Asp His Val Val Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Val Pro Leu Gln Leu Gln Pro Asn Ser Ile Gln Thr Lys Val

35 40 45

Asp Ser Ile Ala Trp Lys Lys Leu Leu Pro Ser Gln Asn Gly Phe His

50 55 60

His Ile Leu Lys Trp Glu Asn Gly Ser Leu Pro Ser Asn Thr Ser Asn

65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Phe Ile Val Lys Asn Leu Ser Leu Leu Ile Lys Ala

85 90 95

Ala Gln Gln Gln Asp Ser Gly Leu Tyr Cys Leu Glu Val Thr Ser Ile

100	105	110	
Ser Gly Lys Val Gln Thr Ala Thr Phe Gln Val Phe Val Phe Asp Lys			
115	120	125	
Val Glu Lys Pro Arg Leu Gln Gly Gln Gly Lys Ile Leu Asp Arg Gly			
130	135	140	
Arg Cys Gln Val Ala Leu Ser Cys Leu Val Ser Arg Asp Gly Asn Val			
145	150	155	160
Ser Tyr Ala Trp Tyr Arg Gly Ser Lys Leu Ile Gln Thr Ala Gly Asn			
165	170	175	
Leu Thr Tyr Leu Asp Glu Glu Val Asp Ile Asn Gly Thr His Thr Tyr			
180	185	190	
Thr Cys Asn Val Ser Asn Pro Val Ser Trp Glu Ser His Thr Leu Asn			
195	200	205	
Leu Thr Gln Asp Cys Gln Asn Ala His Gln Glu Phe Arg Phe Trp Pro			
210	215	220	
Phe Leu Val Ile Ile Val Ile Leu Ser Ala Leu Phe Leu Gly Thr Leu			
225	230	235	240
Ala Cys Phe Cys Val Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu			
245	250	255	
Thr Ser Pro Lys Glu Phe Leu Thr Ile Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu			
260	265	270	
Lys Thr Arg Arg Asn His Glu Gln Glu Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly			
275	280	285	
Ser Thr Ile Tyr Ser Met Ile Gln Ser Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser			
290	295	300	
Gln Glu Pro Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys			
305	310	315	320
Ser Gly Ser Arg Lys Arg Asn His Ser Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile			
325	330	335	
Tyr Glu Val Ile Gly Lys Ser Gln Pro Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg			
340	345	350	

Leu Ser Arg Lys Glu Leu Glu Asn Phe Asp Val Tyr Ser

355 360 365

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reg3beta Foward Primer

<400> 5

ggcttcattc ttgtctcca 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reg3beta Reverse Primer

<400> 6

tccacctcca ttgggttct 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reg3gamma Foward Primer

<400> 7

caaggtgaag ttgccaagaa 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reg3gamma Reverse Primer

<400> 8

cctctgttgg gttcatagcc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-22 Foward Primer:

<400> 9

catgcaggag gtggtacctt 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-22 Reverse Primer

<400> 10

cagacgcaag catttctcag 20

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1beta Foward Primer

<400> 11

caaccaacaa gtgatattct ccatg 25

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1beta Reverse Primer

<400> 12

gatccacact ctccagctgc a 21