



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0039262
(43) 공개일자 2020년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0118964
(22) 출원일자 2018년10월05일
심사청구일자 2018년10월05일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김동규
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 301동 1802호(신천동, 파크리오 아파트)
김대우
서울특별시 양천구 목동로 212, 701동 1401호(목동, 목동7단지 아파트)
이재준
강원도 춘천시 삭주로 77, 춘천성심병원 마취통증의학과(교동)
(74) 대리인
유민규

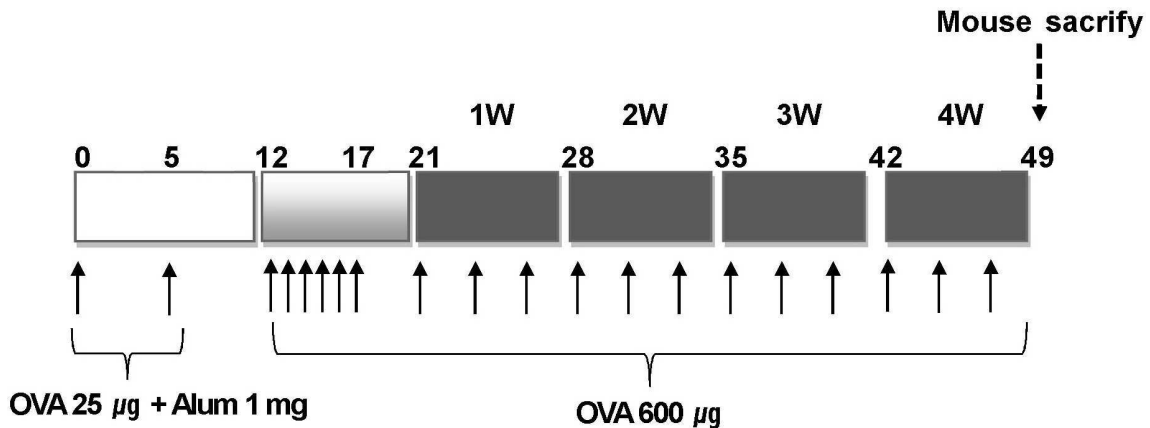
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법

(57) 요약

본원은 실험 당일 및 5 일차에 20 μ g 내지 30 μ g 의 오브알부민(OVA) 및 0.1 mg 내지 2 mg 의 명반(alum)을 동물의 복강에 주사하는 단계; 실험 12 일차부터 6 일 동안 400 μ g 내지 800 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계; 및 실험 21 일차부터 4 주 동안 주 3 회 400 μ g 내지 800 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계를 포함하는, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/10 (2013.01)
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/03 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9E8033231
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 임상과학자 연구역량강화사업
연구과제명 알레르기 비염환자의 후각장애의 병태생리 규명과 후각신경줄기세포 치료제 개발연구
기 여 율 1/2
주관기관 한림대학교산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9E8049714
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 임상과학자 연구역량강화사업
연구과제명 임상과학자 아이디어의 실용화를 위한 인프라 구축
기 여 율 1/2
주관기관 한림대학교산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

실험 당일 및 5 일차에 20 μg 내지 30 μg 의 오브알부민(OVA) 및 0.1 mg 내지 2 mg 의 명반(alum)을 동물의 복강에 주사하는 단계;

실험 12 일차부터 6 일 동안 400 μg 내지 800 μg 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계; 및

실험 21 일차부터 4 주 동안 주 3 회 400 μg 내지 800 μg 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계를 포함하는,

알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 오브알부민은 면역 반응을 일으켜 OVA 특이 면역글로불린E(OVA specific immunoglobulin E; OVA specific IgE)를 생성함으로써 알레르기 비염을 유도하는 것인, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 동물은 인간을 제외한 포유동물인 것인, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 포유동물은 설치류인 것인, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 제조된 알레르기 비염 동물 모델은 상기 비강 점막에서 total IgE 수치, OVA specific IgE 수치, 사이토카인 수치를 측정할 수 있는 것인, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 사이토카인은 인터류킨-4(IL-4), 인터류킨-5(IL-5), 인터류킨-9(IL-9), 인터류킨-13(IL-13) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 것인, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 알레르기 비염 동물 모델을 제조하는 단계;

상기 알레르기 비염 동물 모델에 알레르기 비염 치료제를 투여하는 단계; 및

상기 알레르기 비염 동물 모델의 알레르기 비염 병변의 변화를 관찰하는 단계를 포함하는,

알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 알레르기 비염 치료제를 투여하는 단계는 경구, 비경구, 동맥내, 피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하 또는 비내 투여인 것인, 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 알레르기 비염 병변의 변화를 관찰하는 단계는 육안, 현미경 또는 내시경을 이용한 관찰, 초음파, 외과적 수술, 조직 검사, 조직 염색 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 수행되는 것인, 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법 및 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알레르기 비염은 코 점막이 특정 물질에 대하여 과민반응을 나타내는 것으로, 알레르기를 일으키는 집먼지 진드기, 꽃가루, 곰팡이, 애완동물의 털, 비듬, 바퀴벌레의 허물, 배설물 등의 원인 물질(항원)이 코 점막에 노출된 후, IgE 항체를 매개로 하는 여러 종류의 염증세포에 의하여 염증반응이 발생하는 질환이다. 연속적으로 일어나는 발작적인 재채기, 맑은 콧물, 코막힘 등의 세 가지 주요 증상을 특징으로 한다. 이러한 증상을 나타내며 IgE 매개 염증 반응이 확인되면 알레르기 비염으로 진단할 수 있다.

[0003] 알레르기 비염은 평생 동안 지속되는 예가 많아서 적절한 예방과 치료가 중요하다. 알레르기 비염이 장기간 지속될 경우 만성 비염과 비슷한 변화를 보이게 되고, 중이염, 비염종, 부비동염 후각소실, 만성기침 등을 초래할 수 있으므로, 원인이 되는 물질을 피하는 환경요법(회피요법)은 가장 기본적이고 중요한 치료법으로 인식되고 있다.

[0004] 한편, 지난 수십 년간 알레르기 비염의 병태생리에 대한 연구가 많이 있었음에도 불구하고 아직까지 확실한 원인이 알려져 있지 않다. 이러한 원인으로는 발병에 있어서 유전적 및 환경적 인자가 매우 복잡하게 관여를 한다는 점, 개인에 따른 차이가 크다는 점, 인체에서는 윤리적인 문제로 인하여 함부로 생체실험을 할 수 없다는 점 등이 있을 수 있다. 이에 따라, 인체의 알레르기 비염을 유사하게 모방할 수 있는 동물 모델의 필요성이 발생한다.

[0005] 본원의 배경이 되는 기술인 대한민국 논문 Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg, 2012, 55:609-15 은 알레르기 비염 마우스 모델에 관한 것이다. 상기 논문은 알레르기 비염 마우스 모델의 장단점, 항원감작 기전과 프로토콜 등을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본원은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 본원의 다른 목적은 본원의 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 제조된 알레르기 비염 동물 모델을 이용한 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [0008] 다만, 본원의 실시예가 이루고자 하는 기술적 과제는 상기된 바와 같은 기술적 과제들에 한정되지 않으며, 또 다른 기술적 과제들이 존재할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본원의 제 1 측면은, 실험 당일 및 5 일차에 20 μ g 내지 30 μ g 의 오브알부민(OVA) 및 0.1 mg 내지 2 mg 의 명반(alum)을 동물의 복강에 주사하는 단계; 실험 12 일차부터 6 일 동안 400 μ g 내지 800 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계; 및 실험 21 일차부터 4 주 동안 주 3 회 400 μ g 내지 800 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계를 포함하는, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0010] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 오브알부민은 면역 반응을 일으켜 OVA 특이 면역글로불린E(OVA specific immunoglobulin E; OVA specific IgE)를 생성함으로써 알레르기 비염을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0011] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 동물은 인간을 제외한 포유동물인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 포유동물은 설치류인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 제조된 알레르기 비염 동물 모델은 상기 비강 점막에서 total IgE 수치, OVA 특이 면역글로불린 E(OVA specific IgE) 수치, 사이토카인 수치를 측정할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 사이토카인은 인터류킨-4(IL-4), 인터류킨-5(IL-5), 인터류킨-9(IL-9), 인터류킨-13(IL-13) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본원의 제 2 측면은, 상기 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 알레르기 비염 동물 모델을 제조하는 단계; 상기 알레르기 비염 동물 모델에 알레르기 비염 치료제를 투여하는 단계; 및 상기 알레르기 비염 동물 모델의 알레르기 비염 병변의 변화를 관찰하는 단계를 포함하는, 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0016] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 알레르기 비염 치료제를 투여하는 단계는 경구, 비경구, 동맥내, 피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하 또는 비내 투여인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 알레르기 비염 병변의 변화를 관찰하는 단계는 육안, 현미경 또는 내시경을 이용한 관찰, 초음파, 외과적 수술, 조직 검사, 조직 염색 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 상술한 과제 해결 수단은 단지 예시적인 것으로서, 본원을 제한하려는 의도로 해석되지 않아야 한다. 상술한 예시적인 실시예 외에도, 도면 및 발명의 상세한 설명에 추가적인 실시예가 존재할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 전술한 본원의 과제 해결 수단에 의하면, 본원의 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 제조된 알레르기 비염 동물 모델은 비강 점막에서 total IgE 수치, OVA 특이 면역글로불린 E(OVA specific IgE) 수치, 사이토카인 수치를 측정할 수 있다. 이를 통해 상기 알레르기 비염 동물 모델은 사람의 알레르기 비염의 면역학적 특성을 정확하게 반영할 수 있다.
- [0020] 상기 알레르기 비염 동물 모델은 알레르기 비염의 진단 및 치료제 개발에 있어 동물실험의 획기적인 발전에 기

여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1 은 본원의 일 구현예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- 도 2 는 본원의 일 구현예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법의 순서도이다.
- 도 3 의 (a) 내지 (c)는 각각 본원의 일 비교예 및 실시예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 비강 점막에서 OVA 특이 면역글로불린 E(OVA specific IgE), 인터류킨-5(IL-5), 인터류킨-4(IL-4)의 단백질 농도 결과 그래프이다.
- 도 4 의 (a) 및 (b)는 본원의 일 비교예 및 실시예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 비강을 촬영한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다.
- [0023] 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.
- [0025] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에", "상부에", "상단에", "하에", "하부에", "하단에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0026] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 또한, 본원 명세서 전체에서, "~ 하는 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B" 의기재는, "A 또는 B, 또는, A 및 B" 를 의미한다.
- [0030] 본원 명세서 전체에서, "동물 모델"이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 말한다. 사람의 질병 연구에 있어 동물 모델은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의해 의미를 가진다. 생체의학 질환 동물 모델은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 동물 모델의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내고, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약 후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.
- [0031] 본원 명세서 전체에서, "포유동물"은 가축 및 농장 동물, 동물원 동물, 사냥 동물, 또는 애완 동물, 가령 개, 말, 고양이, 소, 랫트, 마우스, 비-인간 영장류 (가령, 원숭이, 유인원) 등을 포함한다.
- [0032] 본원 명세서 전체에서, "설치류"는 척삭동물 포유강의 한 목을 이루는 동물군으로서, 쥐류라고도 말한다.
- [0033] 본원 명세서 전체에서, "점적"은 비강 내에 약액을 적하하는 국소용법을 말한다.
- [0034] 이하에서는 본원의 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법 및 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법에 대하여 구현예 및 실시예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.

- [0036] 본원의 제 1 측면은, 실험 당일 및 5 일차에 20 μg 내지 30 μg 의 오브알부민(OVA) 및 0.1 mg 내지 2 mg 의 명반(alum)을 동물의 복강에 주사하는 단계; 실험 12 일차부터 6 일 동안 400 μg 내지 800 μg 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계; 및 실험 21 일차부터 4 주 동안 주 3 회 400 μg 내지 800 μg 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적하는 단계를 포함하는, 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0037] 상기 동물에서는 자연발생적으로 비염이 생기지 않기 때문에 인위적인 조작을 통해서 알레르기 비염 모델을 제작해야 한다. 이 때 비강을 포함한 기도에서 경험하지 못한 단백질을 투여해야 하는데, 오브알부민(OVA)을 투여할 수 있다. 따라서, 상기 동물은 알레르기 비염 동물 모델 제작을 위해 오브알부민이 포함되지 않은 먹이로 사육된 것이어야 한다.
- [0038] 오브알부민은 시판되는 제품을 일정한 농도의 PBS 를 희석하여 용액을 만들어 사용한다. 이때 지질다당류(lipopolysaccharide; 이하 'LPS' 이라 한다) 제거과정 없이 그대로 사용할 수도 있고, 실험의 목적에 따라 LPS 를 제거한 후 사용할 수도 있다. LPS 를 제거한 순수한 오브알부민으로는 염증반응이 잘 유도되지 않기 때문에 항원보강제(adjuvant)를 사용할 수 있다. 상기 항원보강제로는, 예를 들어, 명반(aluminium hydroxide; alum), 죽은 백일해균(heat killed Bordetella pertussis), 완전프로인트항원보강제(complete Freund's adjuvant), LPS 등이 있다. 명반과 백일해균은 Th2 보강제, 완전프로인트항원보강제는 Th1 유도체로 알려져있고, LPS 는 농도에 따라서 Th1/Th2 모두 유발할 수 있다.
- [0039] 명반은 인체용 백신제작에도 사용되는 물질로서 작용기전은 주로 항원의 노출기간을 증가시켜 항원이 잘 감작될 수 있게 해주며, 예를 들어, 1 mg 내지 40 mg 을 사용할 수 있다. 명반 그 자체가 선천성 면역계를 활성화시켜 매우 강한 Th2 염증반응을 유도할 수 있다.
- [0040] 도 1 은 본원의 일 구현예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법을 개략적으로 나타낸 모식도이고, 도 2 는 본원의 일 구현예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법의 순서도이다. 이하, 도 1 및 도 2 를 참조하여 상기 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 대해 설명하도록 한다.
- [0041] 먼저, 실험 당일 및 5 일차에 20 μg 내지 30 μg 의 오브알부민(OVA) 및 0.1 mg 내지 2 mg 의 명반(alum)을 동물의 복강에 주사한다 (S100).
- [0042] 예를 들어, 상기 오브알부민은 20 μg 내지 30 μg , 20 μg 내지 29 μg , 20 μg 내지 28 μg , 20 μg 내지 27 μg , 20 μg 내지 26 μg , 21 μg 내지 30 μg , 21 μg 내지 29 μg , 21 μg 내지 28 μg , 21 μg 내지 27 μg , 21 μg 내지 26 μg , 22 μg 내지 30 μg , 22 μg 내지 29 μg , 22 μg 내지 28 μg , 22 μg 내지 27 μg , 22 μg 내지 26 μg , 23 μg 내지 30 μg , 23 μg 내지 29 μg , 23 μg 내지 28 μg , 23 μg 내지 27 μg , 23 μg 내지 26 μg , 24 μg 내지 30 μg , 24 μg 내지 29 μg , 24 μg 내지 28 μg , 24 μg 내지 27 μg , 24 μg 내지 26 μg 인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 오브알부민은 25 μg 인 것일 수 있다.
- [0043] 예를 들어, 상기 명반은 0.1 mg 내지 2 mg, 0.1 mg 내지 1.9 mg, 0.1 mg 내지 1.8 mg, 0.1 mg 내지 1.7 mg, 0.1 mg 내지 1.6 mg, 0.1 mg 내지 1.5 mg, 0.1 mg 내지 1.4 mg, 0.1 mg 내지 1.3 mg, 0.1 mg 내지 1.2 mg, 0.1 mg 내지 1.1 mg, 0.2 mg 내지 2 mg, 0.2 mg 내지 1.9 mg, 0.2 mg 내지 1.8 mg, 0.2 mg 내지 1.7 mg, 0.2 mg 내지 1.6 mg, 0.2 mg 내지 1.5 mg, 0.2 mg 내지 1.4 mg, 0.2 mg 내지 1.3 mg, 0.2 mg 내지 1.2 mg, 0.2 mg 내지 1.1 mg, 0.3 mg 내지 2 mg, 0.3 mg 내지 1.9 mg, 0.3 mg 내지 1.8 mg, 0.3 mg 내지 1.7 mg, 0.3 mg 내지 1.6 mg, 0.3 mg 내지 1.5 mg, 0.3 mg 내지 1.4 mg, 0.3 mg 내지 1.3 mg, 0.3 mg 내지 1.2 mg, 0.3 mg 내지 1.1 mg, 0.4 mg 내지 2 mg, 0.4 mg 내지 1.9 mg, 0.4 mg 내지 1.8 mg, 0.4 mg 내지 1.7 mg, 0.4 mg 내지 1.6 mg, 0.4 mg 내지 1.5 mg, 0.4 mg 내지 1.4 mg, 0.4 mg 내지 1.3 mg, 0.4 mg 내지 1.2 mg, 0.4 mg 내지 1.1 mg, 0.5 mg 내지 2 mg, 0.5 mg 내지 1.9 mg, 0.5 mg 내지 1.8 mg, 0.5 mg 내지 1.7 mg, 0.5 mg 내지 1.6 mg, 0.5 mg 내지 1.5 mg, 0.5 mg 내지 1.4 mg, 0.5 mg 내지 1.3 mg, 0.5 mg 내지 1.2 mg, 0.5 mg 내지 1.1 mg, 0.6 mg 내지 2 mg, 0.6 mg 내지 1.9 mg, 0.6 mg 내지 1.8 mg, 0.6 mg 내지 1.7 mg, 0.6 mg 내지 1.6 mg, 0.6 mg 내지 1.5 mg, 0.6 mg 내지 1.4 mg, 0.6 mg 내지 1.3 mg, 0.6 mg 내지 1.2 mg, 0.6 mg 내지 1.1 mg, 0.7 mg 내지 2 mg, 0.7 mg 내지 1.9 mg, 0.7 mg 내지 1.8 mg, 0.7 mg 내지 1.7 mg, 0.7 mg 내지 1.6 mg, 0.7 mg 내지 1.5 mg, 0.7 mg 내지 1.4 mg, 0.7 mg 내지 1.3 mg, 0.7 mg 내지 1.2 mg, 0.7 mg 내지 1.1 mg, 0.8 mg 내지 2 mg, 0.8 mg 내지 1.9 mg, 0.8 mg 내지 1.8 mg, 0.8 mg 내지 1.7 mg, 0.8 mg 내지 1.6 mg, 0.8 mg 내지 1.5 mg, 0.8 mg 내지 1.4 mg, 0.8 mg 내지 1.3 mg, 0.8 mg 내지 1.2 mg, 0.8 mg 내지 1.1 mg, 0.9 mg 내지 2 mg, 0.9 mg 내지 1.9 mg, 0.9 mg 내지 1.8 mg, 0.9 mg 내지 1.7 mg, 0.9 mg 내지 1.6 mg, 0.9 mg 내지 1.5 mg,

0.9 mg 내지 1.4 mg, 0.9 mg 내지 1.3 mg, 0.9 mg 내지 1.2 mg, 0.9 mg 내지 1.1 mg 인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 명반은 1 mg 인 것일 수 있다.

- [0044] 바람직하게는, 실험 당일 및 5 일차에 25 μ g 의 오브알부민(OVA) 및 1 mg 의 명반(alum)을 동물의 복강에 주사할 수 있다.
- [0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 오브알부민은 면역 반응을 일으켜 OVA 특이 면역글로불린 E(OVA specific immunoglobulin E; 이하 'OVA specific IgE' 이라 한다)를 생성함으로써 알레르기 비염을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] IgE 는 항체단백질의 하나로서, 천식이나 화분증(꽃가루병, pollinosis), 아나필락시스반응(초과민반응, anaphylactic reaction) 등의 알레르기 질환에 관여한다. 특히 알레르기 비염, 아토피 피부염, 기관지 천식 등의 알레르기 질환 환자에게서 높은 농도의 IgE 가 존재하기 때문에 알레르기 질환을 진단하기 위해 혈청 내의 IgE 의 양을 측정하는 방법을 이용한다.
- [0047] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 동물은 인간을 제외한 포유동물인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 포유동물은 설치류인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 포유동물은 마우스인 것일 수 있다. 알레르기 비염 동물 모델로서 마우스는 가장 이상적인 대상이다. 그 이유는 값이 싸고, 유전자에 대한 상세한 정보가 알려져 있고, 유전자 조작기법에 의해 특정 유전자 결실(knock out) 혹은 도입(transgenic) 마우스 제작이 쉽고, 상업화하여 판매되는 다양한 실험용 프로브가 개발되어 있고, 마우스 실험에 대한 많은 선행연구가 있다는 점 등이 있다.
- [0049] 이어서, 실험 12 일차부터 6 일 동안 400 μ g 내지 800 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적한다(S200).
- [0050] 예를 들어, 상기 오브알부민은 400 μ g 내지 800 μ g, 400 μ g 내지 750 μ g, 400 μ g 내지 700 μ g, 400 μ g 내지 650 μ g, 450 μ g 내지 800 μ g, 450 μ g 내지 750 μ g, 450 μ g 내지 700 μ g, 450 μ g 내지 650 μ g, 500 μ g 내지 800 μ g, 500 μ g 내지 750 μ g, 500 μ g 내지 700 μ g, 500 μ g 내지 650 μ g, 550 μ g 내지 800 μ g, 550 μ g 내지 750 μ g, 550 μ g 내지 700 μ g, 550 μ g 내지 650 μ g 인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 실험 12 일차부터 6 일 동안 상기 600 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적할 수 있다.
- [0051] 상기 오브알부민은 10 μ l 내지 30 μ l 의 인산염 완충 식염수(PBS)에 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 오브알부민은 20 μ l 의 인산염 완충 식염수에 혼합된 것일 수 있다.
- [0052] 이어서, 실험 21 일차부터 4 주 동안 주 3 회 400 μ g 내지 800 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적한다(S300).
- [0053] 예를 들어, 상기 오브알부민은 400 μ g 내지 800 μ g, 400 μ g 내지 750 μ g, 400 μ g 내지 700 μ g, 400 μ g 내지 650 μ g, 450 μ g 내지 800 μ g, 450 μ g 내지 750 μ g, 450 μ g 내지 700 μ g, 450 μ g 내지 650 μ g, 500 μ g 내지 800 μ g, 500 μ g 내지 750 μ g, 500 μ g 내지 700 μ g, 500 μ g 내지 650 μ g, 550 μ g 내지 800 μ g, 550 μ g 내지 750 μ g, 550 μ g 내지 700 μ g, 550 μ g 내지 650 μ g 인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 실험 21 일차부터 4 주 동안 주 3 회 상기 600 μ g 의 오브알부민을 상기 동물의 비강에 점적할 수 있다.
- [0054] 상기 오브알부민은 10 μ l 내지 30 μ l 의 인산염 완충 식염수(PBS)에 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 오브알부민은 20 μ l 의 인산염 완충 식염수에 혼합된 것일 수 있다.
- [0055] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 제조된 알레르기 비염 동물 모델은 상기 비강 점막에서 total IgE 수치, OVA specific IgE 수치, 사이토카인 수치를 측정할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 종래의 알레르기 비염 동물 모델을 이용하여 혈청 농도에서 알레르기 비염의 주요한 면역학적 특징인 total IgE 수치, OVA specific IgE 수치를 측정하거나, 비강 조직에서 RNA 를 측정하여 사이토카인, 예를 들어 인터류킨-4(IL-4), 인터류킨-5(IL-5), 인터류킨-9(IL-9), 인터류킨-13(IL-13)을 측정하여 알레르기 비염 모델의 면역학적 검증을 시행하였다. 그러나, 알레르기 비염은 몸의 전체에서 일어나는 질환이 아니라 비강(코)에 국소적으로 발생하는 질환이기 때문에 동물의 혈청 농도의 total IgE 수치, OVA specific IgE 수치는 알레르기 비염의 면역학적 상태를 제대로 반영하지 못하는 문제점이 있었다. 또한, 비강 점막에서 RNA 농도의 사이토카인 수치를 측정

하는 것 역시 실제 면역반응은 RNA 농도가 아니라 단백질 농도에서 이루어지기 때문에 정확한 알레르기 비염의 면역학적 상태를 반영하지 못한다. 즉, 종래의 알레르기 비염 동물 모델은 비강 점막에서 total IgE 수치, OVA specific IgE 수치, 사이토카인 수치가 측정되지 않는 문제점이 있었다. 본 발명자들은 이러한 문제점을 인식하고, 이를 해결하기 위하여 본원의 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법을 개발하였다. 본원의 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 제조된 알레르기 비염 동물 모델은 비강 점막에서 total IgE 수치, OVA specific IgE 수치, 사이토카인 수치를 측정할 수 있으므로 사람의 알레르기 비염의 면역학적 특성을 정확하게 반영할 수 있다.

[0057] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 사이토카인은 인터류킨-4(IL-4), 인터류킨-5(IL-5), 인터류킨-9(IL-9), 인터류킨-13(IL-13) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 상기 사이토카인은 신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 신호물질로 사용되는 당단백질이며, 펩타이드 중 하나이다. 상기 사이토카인은 물에 약간 녹는 물질로 이루어져 있으며, 화학적 신호는 신경전달물질 및 호르몬과 유사하다. 상기 사이토카인은 많은 종류의 세포에서 방출되며 선천성 면역반응 및 적응 면역반응 모두에서 특히 중요하다. 이것은 상기 사이토카인이 면역체계에서 중심역할을 하기 때문이다. 상기 사이토카인은 증세가 특이한 세포 표면의 수용기에 붙어있으며, 분자 신호물질을 강화하여 호르몬과 같이 세포 내의 신호를 다음 단계로 전달하고 세포기능을 바꾼다. 대부분의 면역기능은 한가지 사이토카인이 아니라 여러가지 조정자가 조합되어야 좋은 효과를 나타낼 수 있다. 상기 사이토카인의 조합은 첨가제 효과, 억제효과, 협력적인 상승효과를 가지고 있다. 다른 사이토카인의 영향과 더불어 사이토카인의 효과는 호르몬과 사이토카인 수용체 길항작용에 의해 억제되거나 촉진될 수 있다. 상기 사이토카인은 면역, 감염병, 조혈기능, 조직회복, 세포의 발전 및 성장에 중요한 기능을 하며, 항원에 대해 항체의 생성을 유도하고 외부의 침입에 대해서 인체의 방어체계를 제어하고 자극한다. 즉, 항원 분자에 대해서 중성화 작용을 하고 그들에 대항하는 면역인자를 생성한다. 건강한 기능을 발휘하는 면역체계는 외부의 항원을 기억하고 있다가 다음에 같은 항원이 침입하면 좀 더 빠르게 반응할 수 있게 된다. 가장 중요한 면역기능은 인터루킨(IL-1, IL-6, IL-12), 인터페론 감마(Interferon gamma), 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)로 알려진 사이토카인의 집단에 의해 수행된다.

[0059] 본원의 제 2 측면은, 상기 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에 따라 알레르기 비염 동물 모델을 제조하는 단계; 상기 알레르기 비염 동물 모델에 알레르기 비염 치료제를 투여하는 단계; 및 상기 알레르기 비염 동물 모델의 알레르기 비염 병변의 변화를 관찰하는 단계를 포함하는, 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0060] 본원의 제 2 측면에 따른 알레르기 비염 치료제의 스크리닝 방법에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 2 측면에 동일하게 적용될 수 있다.

[0061] 상기 알레르기 비염 치료제는 특별히 제한되지 않으며, 알레르기 비염 치료 효능을 나타낼 가능성이 있거나 나타낼 것으로 기대되는 화합물, 조성물, 천연물 등을 포함하는 물질일 수 있다.

[0062] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 알레르기 비염 치료제를 투여하는 단계는 경구, 비경구, 동맥내, 피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하 또는 비내 투여인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 알레르기 비염 치료제를 투여하는 단계는 경구 또는 비경구적으로 투여될 수 있으며, 투여량은, 이에 제한되지는 않으나 물질의 성질, 독성, 투여 대상의 종류, 연령, 체중 및 건강 등의 조건을 기초로 당업자가 판단하여 적절하게 결정할 수 있다.

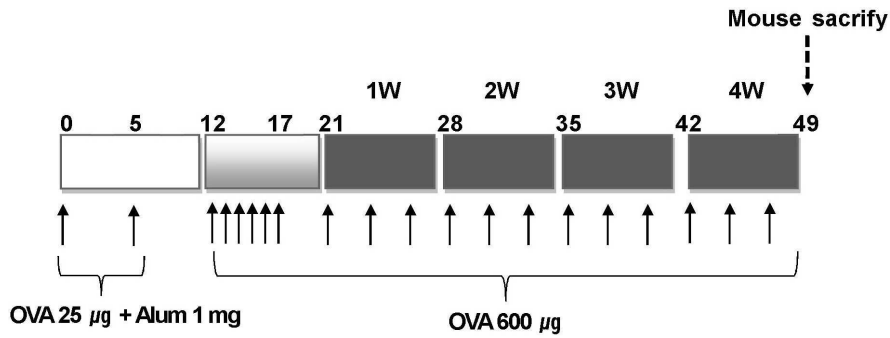
[0063] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 알레르기 비염 병변의 변화를 관찰하는 단계는 육안, 현미경 또는 내시경을 이용한 관찰, 초음파, 외과적 수술, 조직 검사, 조직 염색 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 알레르기 비염 병변의 변화를 관찰하는 단계는 육안, 현미경 또는 내시경을 이용한 관찰, 초음파, 외과적 수술, 조직 검사 또는 조직 염색을 포함하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의해 수행될 수 있으며, 구체적인 목적에 따라 당업자가 판단하여 적절하게 결정할 수 있다.

[0064] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

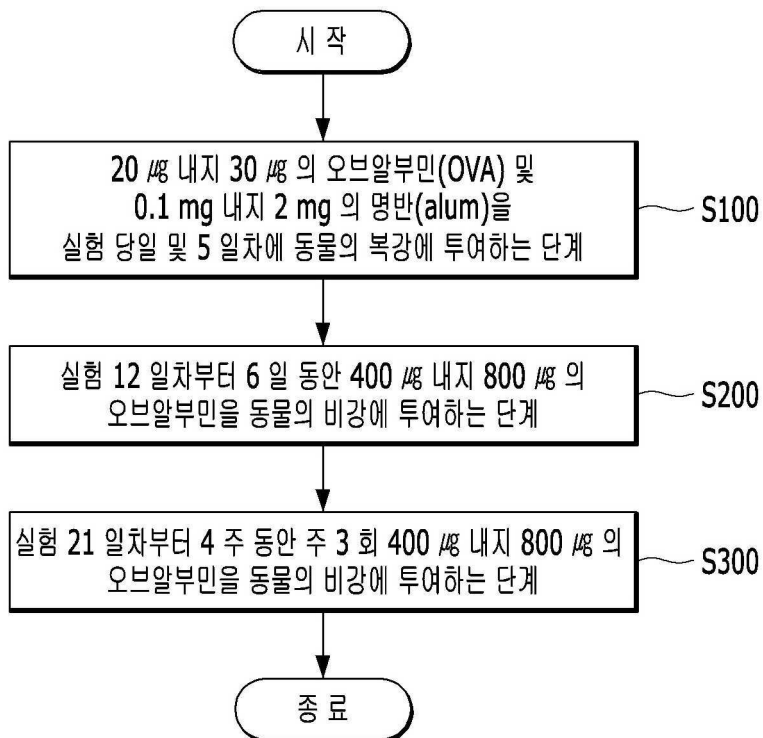
- [0066] [실시예] 알레르기 비염 동물 모델의 제조
- [0067] 실험 당일 및 5 일차에 25 μg 의 오브알부민(OVA, Sigma) 및 1 mg 의 명반(alum, Thermo)을 300 μl 의 인산염 완충 식염수(이하 'PBS' 이라 한다) 용액에 혼합하여 마우스(4 주령, 20 g 내지 25 g, 코아텍)의 복강에 투여하였다. 이후, 실험 12 일차부터 6 일 동안 600 μg 의 오브알부민을 20 μl 의 PBS 용액에 혼합하여 3% 오브알부민을 제조하여 상기 마우스의 비강에 투여하였다. 이후, 실험 21 일차부터 4 주 동안 주 3 회 600 μg 의 오브알부민을 20 μl 의 PBS 용액에 혼합하여 3% 오브알부민을 제조하여 추가로 상기 마우스의 비강에 투여하였다.
- [0068] [비교예]
- [0069] 실험 당일, 7 일차 및 14 일차에 25 μg 의 오브알부민(OVA) 및 1 mg 의 명반(alum)을 300 μl 의 PBS 용액에 혼합하여 마우스의 복강에 투여하였다. 이후, 실험 21 일차부터 7 일 동안 600 μg 의 오브알부민을 20 μl 의 PBS 용액에 혼합하여 3% 오브알부민을 제조하여 상기 마우스의 비강에 투여하였다.
- [0070] [실험예]
- [0071] 도 3 의 (a) 내지 (c)는 각각 본원의 일 비교예 및 실시예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 비강 점막에서 OVA 특이 면역글로불린 E(OVA specific IgE), 인터류킨-5(IL-5), 인터류킨-4(IL-4)의 단백질 농도 결과 그래프이다.
- [0072] 도 3 의 (a) 내지 (c)를 참조하면, 실시예의 비강 점막에서 알레르기 비염의 대표적인 면역학적 특징인 OVA specific IgE, IL-4, IL-5 의 단백질 농도가 비교예에 비해 의미 있게 증가함을 확인할 수 있다. 종래의 알레르기 비염 동물 모델의 제조 방법에서는 비강 점막에서 단백질 농도로 확인할 수 없었고, mRNA 수준에서만 면역학적 차이가 확인될 수 있었다. 그러나, 실제로 몸 안에서 면역반응을 유발하는 것은 mRNA 가 아니라 단백질이기 때문에 단백질 발현의 차이가 실제 면역 상황을 보다 정확하게 반영할 수 있다. 또한, 알레르기 비염은 몸의 전체에서 일어나는 질환이 아니라 코에 국소적으로 발생하는 국소염증질환이다. 그로 인해, 동물의 혈청 농도의 차이가 아닌 비강 점막에서 측정된 단백질 농도의 차이가 실제로 사람에서 코에 국소적으로 발생하는 알레르기 비염의 면역학적 상태를 가장 유사하게 반영할 수 있다.
- [0073] 도 4 의 (a) 및 (b)는 본원의 일 비교예 및 실시예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 비강을 촬영한 이미지이다.
- [0074] 도 4 의 (a) 및 (b)를 참조하면, 비교예에 따른 알레르기 비염 동물 모델에 비해 실시예에 따른 알레르기 비염 동물 모델의 비강 점막이 두꺼워져 있으며, 호산구가 많이 침윤 되어 있음을 알 수 있다.
- [0076] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0077] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

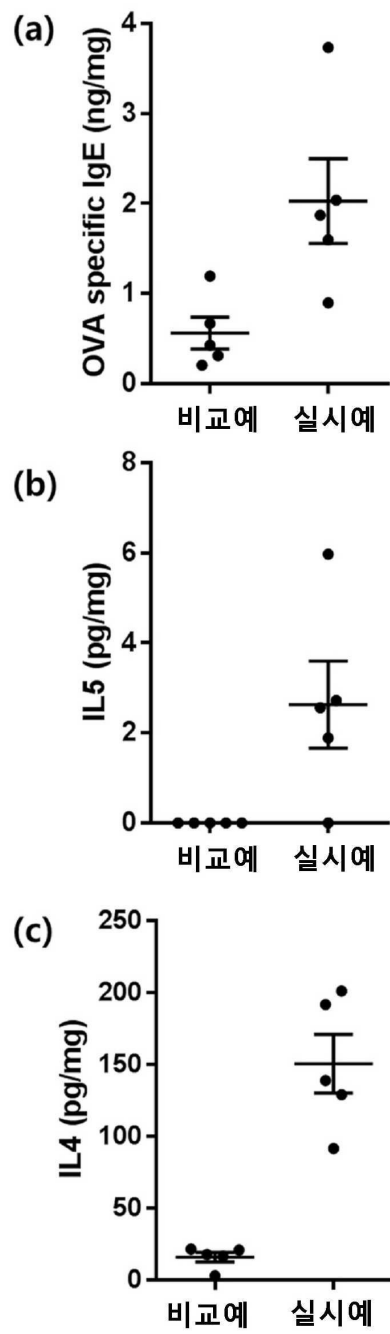
도면1



도면2



도면3



도면4

(a) 비교예

(b) 실시예

