

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2012-0087487 2012년08월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/50 (2006.01) G01N 27/26 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0008706 (22) 출원일자 2011년01월28일 심사청구일자 2011년01월28일	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 최정우 서울특별시 용산구 서빙고로 35, 103동 603호 (한강로3가, 용산 시티파크) 김태형 경기도 용인시 수지구 동천로 93, 동문3차아파트 303동 401호 (동천동) 압둘 카피 서울특별시 마포구 대흥동 대흥로 25길 14번지 (74) 대리인 양부현		

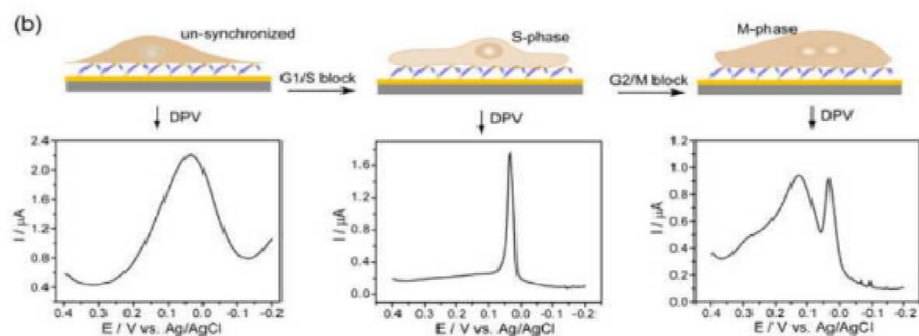
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 전기화학적 방법을 기반으로 한 세포 주기 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 말단에 있는 광가교결합 가능한(photo-crosslinkable) 작용기를 통하여 가교결합되어 있는 수용성의 생체적합성 중합체에 키토산이 결합된 생체중합체-개질 나노운반체로서, 상기 키토산-개질 나노운반체는 온도 변화에 따라 직경이 변화되며 키토산이 결합되지 않은 bare 나노운반체와 비교하여 피부 투과도 또는 세포 유입도(cellular uptake) 및 암조직으로의 선택적 전달이 증가되고, 광열치료에 유리한 특성을 나타낸다. 본 발명의 키토산-개질 나노운반체는 키토산이 없는 bare 나노운반체와 비교하여 매우 놀라운 수준으로 피부 투과도가 개선되어, 경피 운반체로서 매우 우수한 효능을 발휘한다. 본 발명의 키토산-개질 나노운반체는 종양세포 및 암세포로의 세포 유입도가 크게 개선되어, 종양세포 및 암세포의 이미징 및 광열 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	101-081-034
부처명	환경부
연구사업명	차세대 핵심환경기술개발사업
연구과제명	나노구조가 패터닝된 기관 표면에 고정화된 신경세포를 이용하여 환경유해물질을 검출하는
신경세포칩 개발	
주관기관	서강대학교
연구기간	2010.03.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0000845
부처명	교육과학기술부
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	나노 신경줄기세포 전자칩 기술 개발
주관기관	서강대학교
연구기간	2010.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 세포 주기 측정 방법:

- (a) 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처(capture)를 기관에 결합시키는 단계; 상기 세포막 단백질은 캡처에 결합하는 카운터파트너(counterpartner)이고;
- (b) 상기 카운터파트너를 세포막 단백질로 갖는 세포를 상기 캡처에 결합시키는 단계; 및
- (c) 상기 세포의 산화환원(redox) 전위를 측정하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 카운터파트너로서의 세포막 단백질은 인테그린(integrin)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 캡처(capture)는 펩타이드, 단백질, 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 기관은 금(Au)으로 표면 증착된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 작동전극(working electrode), 레퍼런스 전극(reference electrode) 및 카운터전극(counter electrode)로 이루어진 삼극 전극을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 DPV(differential pulse voltammetry)에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 단계 (b) 및 (c) 사이에 세포주기에 영향을 미치는 지 여부를 분석하고자 하는 시험물질을 세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 단계 (b) 이전에 세포주기에 영향을 미치는 지 여부를 분석하고자 하는 시험물질을 세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 단계 (b) 및 (c) 사이에 세포주기 동기화제(cell cycle synchronizing agent)를 상기 세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 세포주기 동기화제는 티미딘, 아피디콜린, 콜치신, 노코다졸 또는 5-플루오로디옥시우리딘인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 세포 주기에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법:

- (a) 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처(capture)를 기관에 결합시키는 단계; 상기 세포막 단백질은 캡처에 결합하는 카운터파트너(counterpartner)이고;
- (b) 상기 카운터파트너를 세포막 단백질로 갖는 세포를 상기 캡처에 결합시키는 단계;
- (bc) 시험물질을 상기 세포에 처리하는 단계; 및
- (c) 상기 세포의 산화환원(redox) 전위를 측정하는 단계.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 카운터파트너로서의 세포막 단백질은 인테그린(integrin)인 것을 특징으로 하는 세포 주기에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 캡처(capture)는 펩타이드, 단백질, 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 세포 주기에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 기관은 금(Au)으로 표면 증착된 것을 특징으로 하는 세포 주기에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 작동전극(working electrode), 레퍼런스 전극(reference electrode) 및 카운터전극(counter electrode)로 이루어진 삼극 전극을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 세포 주기에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 16

제 11 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 DPV(differential pulse voltammetry)에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 11 항에 있어서, 상기 세포주기 동기화제는 티미딘, 아피디콜린, 콜치신, 노코다졸 또는 5-플루오로디옥시우리딘인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 11 항에 있어서, 상기 방법은 상기 단계 (bc) 및 (c) 사이에, 세포주기 동기화제(cell cycle synchronizing agent)를 상기 세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 11 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 주기에 영향을 주는 물질은 세포 주기를 정지(arrest)시키는 항암제 후보물질인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포 주기를 측정하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포 주기는 유기체의 발달에 필수적인 세포의 성장과 증식을 포함하는 어디서든 일어나게 되는 자발적인 과정이다. 세포는 주기-의존적 특성을 보여주려는 경향이 있으며, 여러 특정한 핵 변화가 일어나는 결과의 서열에 의해 특성이 나타난다(1). 많은 복합체 단계는 세포 주기를 구성한다; 그러나 형태적 변화에 기초하여, 세포 주기는 넓게 간기(inter-phase)와 유사 분열기(Mitotic phase, (M)-phase)로 세분화할 수 있다(2). 유사 분열기는 여러 세부 시기를 포함하여, 예컨대 전기(prophase), 중기(metaphase), 후기(anaphase), 말기(telophase)가 있다(2). 비슷하게, 간기는 G1, S 그리고 G2기를 포함하며, G1 및 G2기는 세포 주기에서 DNA 합성과 유사분열기 사이에서 일어나는 “휴지(pause)”를 의미한다(3). G1기는 DNA 합성을 준비하는 세포에서 일어나는 첫 번째 휴지단계이다. S기에서, 세포는 DNA를 합성하고, 이에 2N개와 4N개의 이수체(aneuploidic)의 DNA 양을 갖는다(4). 반대로 G2기는 유사 분열(M기)을 준비하는 단계에서 세포 주기의 두 번째 휴지기이다. 세포 주기 단계에 기초하여, DNA 손상에 대한 체크포인트는 G1/S (G1), Intra-S기 및 G2/M 체크포인트인 세 단계로 분류한다(5).

[0003] 세포 주기의 인위적인 조절은 세포 기반의 조사에 매우 중요한데, 각 다른 단계들은 동일한 환경 조건이 유지되더라도 다르게 반응하기 때문이다. 세포는 자연 상태에서는 동시적이지 않기 때문에, 독성이 없는 특이 물질이 세포 주기 동시화에 필수적이다. 티미딘 및 노코다졸은 세포 주기를 정지시키는 조절자이며(6-10), 형광활성 세포 분류 장치(FACS)에 의한 분석(11-13)으로 세포의 다른 단계를 구분하고 분리하였고, 분자 탐침을 이용하여 영상화하고(9-10) 세포 주기-의존적 단백질을 이용하여 웨스턴 블로팅 분석을 하였다(14). 그러나, 이러한 모든 분석방법들은 불가피하게 세포 분류를 위한 형광 탐침의 컨쥬게이션을 필요로하는데, 이는 시간 소모가 많고, 고되며, 비용이 많이 따른다. 이러한 이유로 전기화학적 임피던스 판독(electrochemical impedance sensing)이 최근에 세포 주기 진행을 모니터링하는 새로운 도구로 소개되었다(22). 이 임피던스 기반의 기술은 외부 염료나 전통적인 방법에 필요한 장치를 제거함으로써 간단하고 쉽게 세포 주기 진행에서 티미딘의 효과를 발견하는데 유용한 방식임이 증명되었다. 그러나 다른 세포 주기 단계에 있는 세포는 세포 및 기관 표면 사이의 임피던스 기술의 한계로 명확하게 구분할 수 없었다. 따라서, 높은 감도를 가진 간단하고 고속의 방법은 세포 주기 고정화를 확정하는데 매우 중요하다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명

의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 상술한 바와 같이, 본 발명자들은 세포주 종류에 따라 각기 다른 전기화학적 신호를 보이는 성질을 이용하여 세포 주기를 전기화학적 신호로 측정하되 높은 감도를 가지며 효율적이고 신속히 측정하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처(capture)를 기관에 결합시키고, 이를 캡처와 결합하는 카운터파트너인 세포막 단백질과 결합시키고, 산화환원 전위를 측정하여 세포 주기를 보다 편리한 방식으로 높은 민감도로 측정할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0006] 따라서, 본 발명의 목적은 세포 주기 측정 방법을 제공하는데 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 세포 주기에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 산화환원(redox) 전위를 측정하는 방법을 이용하여 약물, 시약 등을 투여하였을 때 세포 주기에 영향을 끼치는지 여부를 확인하는 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포 주기 측정 방법을 제공한다:
- [0011] (a) 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처(capture)를 기관에 결합시키는 단계; 상기 세포막 단백질은 캡처에 결합하는 카운터파트너(counterpartner)이고;
- [0012] (b) 상기 카운터파트너를 세포막 단백질로 갖는 세포를 상기 캡처에 결합시키는 단계; 및
- [0013] (c) 상기 세포의 산화환원(redox) 전위를 측정하는 단계.
- [0014] 본 발명자들은 간단하고 빠른 전기화학적 기술에 입각하여 여러 종류의 환경 독소(15, 16) 또는 항암제(17, 18)에 노출시 세포의 생존도의 변화를 효율적으로 측정할 수 있는 세포 칩 기술을 개발하였다. 이러한 전기적 방식 또는 전기화학적 방식도 또한 성장 배지(20, 21)에 있는 세포에서 형성된 신호 주파수 패턴을 찾기 위한 전자 센서 장치처럼 세포를 기반으로 하는 센서 어레이(19)와 함께 합체시켰다. 지난 연구에 기초하여 본 발명자들은 타겟 세포의 전기 생리적 특성을 결정짓는 세포-전극 인터페이스(15)에서 산화 환원 반응 현상을 발견하였는데, 이는 세포주의 종류에 따라 다양하다(15-18). 다른 종류의 세포주는 각기 다른 전기화학적 신호를 나타내기 때문에, 본 발명자들은 다른 세포 주기 단계에 있는 동일한 세포주는 다른 전기화학적 신호를 보일 것으로 가정하였고, 이는 잠재적 바이오 기술로서 세포 주기 고정화를 결정하는데 사용될 수 있을 것으로 판단하였다.
- [0015] 상술한 바와 같이, 본 발명자들은 세포주 종류에 따라 각기 다른 전기화학적 신호를 보이는 성질을 이용하여 세포 주기를 전기화학적 신호로 측정하되 높은 감도를 가지며 효율적이고 신속히 측정하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처(capture)를 기관에 결합시키고, 이를 캡처와 결합하는 카운터파트너인 세포막 단백질과 결합시키고, 산화환원 전위를 측정하여 세포 주기를 보다 편리한 방식으로 높은 민감도로 측정할 수 있음을 확인하였다.
- [0016] 본 발명의 각각의 단계에 따라 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0017] 단계 (a): 기관에 캡처(capture)의 결합
- [0018] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처를 기관에 결합시킨다.

- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 “캡처”는 세포의 세포막 단백질에 특이적으로 결합하여 세포를 기관 상에 고정화시키는 물질을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 캡처는 단백질, 펩타이드, 항체 또는 앵타머(예컨대, 펩타이드 앵타머)이다.
- [0021] 특정 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처로서의 항체는 바람직하게는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 보다 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 또한, 특정 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처로서의 항체는 항체의 일부분으로서 항원 결합 부위(antigen binding fragment)를 포함한다.
- [0022] 특정 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 세포막 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.
- [0023] 특정 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처로서의 앵타머는 바람직하게는 펩타이드 앵타머이다. 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 이러한 앵타머는 SELEX(Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 방법에 의해 얻을 수 있다 (Tuerk and Gold, *Science*, 249:505-510(1990)).
- [0024] 상기 캡처는 고상의 기관에 결합한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “기관”은 금, 은, 동, 백금, 알루미늄, 상기 금속의 합금(예컨대, 금과 구리의 합금) 또는 금속 옥사이드 기관, 실리콘을 포함하는 포괄하는 의미를 갖는 금속 기관, 금속 박막 기관, 유리기관, 초박형 유리 기관, 올리이미드(PI) 기관, 폴리에틸렌나프탈레이트(PEN) 기관, 폴리에스터(PET) 기관, 폴리카보네이트(PC) 기관, 폴리설펜(PES) 기관을 포함하는 포괄하는 의미를 갖는 플라스틱 기관을 포함한다. 바람직하게는 금속 기관이며, 가장 바람직하게는 금(Au)기관이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “금 기관”은 금으로 표면 코팅된 기관을 포괄하는 의미를 갖는다. 다른 금속들과 비교하여 금 기관은 보다 효과적으로 캡처와의 결합이 가능하다.
- [0025] 단계 (b): 카운터파트너로서의 세포막 단백질을 갖는 세포와 캡처의 결합
- [0026] 기관에 캡처를 결합시킨 다음 카운터파트너로서의 세포막 단백질을 갖는 세포를 캡처에 결합시킨다.
- [0027] 캡처는 세포의 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 친화성 분자이기 때문에, 기관에 결합된 캡처에 세포를 처리하면 상기 결합이 이루어진다.
- [0028] 상기 캡처와 세포 사이의 결합을 중재하는 세포막 단백질은 당업계에 공지된 어떠한 세포막 단백질도 포함한다.
- [0029] 본 발명에서 바람직한 구현예에 따르면, 상기 세포막 단백질은 막 수용체(membrane receptor)이며, 가장 바람직하게는 인테그린이다. 인테그린은 두 개의 구분되는 α (alpha) and β (beta) 서브 유닛으로 구성되는 헤테로 이합체이다. 구조적으로 동물은 18개의 α -서브유닛과 8개의 β -서브유닛이 존재하는 것으로 규명되어 있다. 이에 반하여 초파리(Drosophila) 유전자에서는 5개의 α -서브유닛과 2개의 β -서브유닛만이 존재하고 있다. 인테그린의 생물학적 작용은 세포의 기질과의 결합, 신호 전달로 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째로 세포의 기질과의 결합으로 인테그린의 리간드와의 결합을 의미한다. 인테그린의 리간드는 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 콜라겐(collagen) 및 라미닌(laminin)이 있으며, 세포와 세포의 기

질 사이의 연결로 인하여 외부의 충격에 대하여 세포외 기질이 터지지 않고 견뎌낼 수 있도록 한다. 둘 째로 신호 전달과 관련하여 인테그린은 세포 신호에 중요한 역할을 한다. 세포외 기질과의 결합은 신호가 단백질 인산화에 의해 세포 내로의 전달을 초래하여, 이후 반응의 활성화를 초래하는데 세포 성장, 세포 분열, 세포 생존, 세포 분화 및 세포 사멸 등의 신호를 전달하는 역할을 한다.

[0030] 본 발명에서 인테그린은 상기 인테그린의 생물학적 역할 중 리간드와의 결합적인 성격을 이용하는 것으로, 기관에 결합된 캡처와의 결합으로 세포들을 기관에 고정시킴으로서 이후 시약을 처리하거나 전기화학적 측정을 보다 안정적이면서 효과적으로 수행할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 인테그린을 세포막 단백질로 갖는 세포를 이용하는 경우, 캡처는 바람직하게는 인테그린에 특이적으로 결합하는 펩타이드이다. 보다 바람직하게는, 상기 캡처는 "Arg-Gly-Asp(RGD)"를 필수적으로 포함하는 펩타이드이다. 보다 더 바람직하게는, 상기 캡처는 대한민국 특허 제894703호에 개시된 일반식 3 및 4로 표시되는 RGD 포함 펩타이드이고, 가장 바람직하게는 도 9에 기재된 RGD 포함 펩타이드이다.

[0032] 단계 (c): 세포의 산화환원(redox) 전위 측정

[0033] 최종적으로, 세포 주기를 분석하기 위하여 기관에 고정된 세포의 산화환원 전위를 측정한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 “산화환원 전위”는 ORP(Oxidation-Reduction Potential), Redox Potential 이라고도 하며, 물질이 전자를 상실하여 산화하거나, 반대로 전자를 수용하여 환원되려는 경향의 정도를 나타낸다. 산화환원 전위의 측정은 산화환원 가역 평형상태에 있는 수용액에 반응이 없는 전극을 주입하여 발생하는 전위를 측정한다. 산화 물질과 환원 물질이 존재하는 용액(예컨대, 철(III)이온 Fe^{3+} 과 철(II)이온 Fe^{2+} 또는 산소와 물) 속에, 침식되지 않는 전극(예컨대, 백금, 금 및 그래파이트)을 담글 때, 해당 전극과 용액 사이에 생기는 전위를 말한다. 절대적인 전위를 측정하기 어려우므로, 표준 수소 전극을 넣어, 두 전극의 전위차를 측정하여 판단한다.

[0035] 산화환원 전위를 측정하는 척도에는 표준 전극 전위(Standard Electrode Potential), 표준 환원 전위(Standard Reduction Potential) 및 전기 화학적 전위(Electrochemical Potential)를 포함한다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 측정한 산화환원 전위는 전기화학적 전위이다.

[0037] 생체는 세포막이나 세포소기관 등의 막 계에 내재하는 막 단백질에 의해 전기화학 전위차와 다른 형태의 에너지 사이의 교환을 통하여 여러 가지생체에 유용한 작업을 할 수 있다. 전기화학 전위차는 전자전달계(Electron Transfer System), 각종 ATPase, 박테리오톱신 등에 의해 화학반응 에너지나 광 에너지로부터 변환되어 형성된다. 전기화학전위차가 생성되면 생체는 수송체라는 일군의 막 단백질에 의해 이것을 다른 이온의 전기화학 전위차나 중성분자의 화학퍼텐셜차로 변환하여 생체에 있어 유용한 물질의 능동수송이나 생체의 항상성(예: 세포내 이온조성) 유지를 하게 한다. 또한 형성되는 전기화학전위차의 크기는 약 200 mV까지 이르는데 이것은 수 $kcal/mol^{-1}$ 정도에 이르고, 생체는 산화적 인산화나 광인산화처럼 전기화학전위차를 이용하여 에너지 화합물을 합성할 수 있게 된다. 생체막 양쪽에는 여러 가지 이온(특히 양이온)의 전기화학전위차가 형성되며 이들 중 생물계에서 가장 널리 이용하는 것은 수소이온의 전기화학적 전위차이다.

[0038] 본 발명에서 측정하고자 하는 산화환원 전위 중 전기화학적 전위차를 측정하기 위한 장치는, 시차펄스전압전류법(Differential Pulse Voltammetry, DPV), 폴라로그래피(Polarography), 순환전압전류법(Cyclic voltammetry), 선형 스위프 방식(Linear sweep techniques), 일정전류 전위차법(chronoamperometry), 대시간 전위차법(Chronopotentiometry), 네모파 전압전류법(Square wave voltammetry)을 포함하며, 가장 바람직하게는 시차펄스전압전류법이다. 시차펄스전압전류법은 일반적으로 펄스 전압전류계와 비교하여 펄스의 연속성을 살피는 측면에 차이가 있다. 전위의 변화를 감지하여 그 차이를 함수적으로 나타내는 것이 특징이다.

[0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, DPV는 작동전극(working electrode), 레퍼런스 전극(reference electrode) 및 카운터전극(counter electrode)로 이루어진 삼극 전극을 이용하여 실시된다. 작동 전극은 전기화학적 시스템 중 실제 관심이 되는 대상에서 반응이 일어날 때 나타나는 전극을 말하며, 보통 카운터 전극과 같이 컨주게이션 하여 사용한다. 이 때 작동 전극은 양전하적 또는 음전하적으로 이용가능하다. 작동 전극에 이용하는 금속은 금, 은 및 백금과 같은 불활성 금속 또는 유리상 탄소 및 열처리된 탄소와 같은 불활성 탄소 및 수은 방울을 사용한다.

- [0040] 레퍼런스 전극은 이미 알려진 전극 전위를 가지는 전극으로 전위차 측정을 하는데 있어 기준이 되어 작동 전극과의 전위차를 측정하는데 사용된다. 전위의 기준으로 표준 수소 전극의 전위를 0 V로 하여 그 상대적인 전위 차이를 측정한다. 상대 전극은 또한 보조 전극(Auxiliary electrode)로도 불리는데, 이는 전류의 흐르는 만큼 형성되는 저항의 크기가 정확한 전위를 측정하는데 무시할 수 없어 저항을 최소화시키기 위해서 금, 백금, 흑연과 같은 안정한 물질을 이용한다.
- [0041] 상술한 바와 같이, 기관에 고정된 세포의 산화환원 전위를 측정함으로써, 분석 대상의 세포가 어떤 세포 주기에 있는지를 파악할 수 있다. 즉, 세포 주기마다 고유의 산화환원 전위를 나타내기 때문에, 기관에 고정된 세포의 산화환원 전위를 측정함으로써 세포 주기를 분석할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 및 (c) 사이에 세포주기 동기화제(cell cycle synchronizing agent)를 상기 세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함한다. 본 발명에서 G1/S기 및 G2/M기에서 측정되는 고유의 신호를 측정하여 세포 주기 중 어느 단계를 진행하는지 판단하는데 있어 세포주기 동기화제(cell cycle synchronizing agent)를 상기 세포에 처리하여야 한다. 본 발명에서 용어 “세포 동기화(Cell Synchronization)”는 세포 주기의 다른 단계들을 가지는 세포들을 동일한 단계로 통일화시키는 것을 의미하며, 세포 동기화는 세포 주기를 연구하는데 있어 반드시 필요한 과정이다. 용어 “세포 동기화제(cell cycle synchronizing agent)”는 세포 주기를 동일한 단계로 통일화시키는데 사용되는 시약을 의미한다.
- [0043] 일반적으로 조직은 수 많은 세포를 포함하며 각 세포들은 독립적으로 세포 주기를 가지고 있어 간기, 중기, 후기 및 말기의 단계를 가지는 통일되지 않은 형태의 세포를 보인다. 따라서 세포주기 동기화제를 처리하지 않은 상태에서 DPV로 전기화학적 신호를 측정하면 모든 세포 주기 단계가 구분 없이 신호를 나타나게 되므로 각 단계의 특징적인 신호를 검출하기 어렵다. 본 발명에서 G1/S기 및 G2/M기에서 특징적으로 나타나는 신호를 검출하기 위해서는 해당 배지에서 배양하는 세포들의 대다수를 G1/S기로 동기화시킬 수 있는 시약을 처리하고 상기 단계를 고정화시켜야 하고, G2/M기로 동기화시키는 것도 마찬가지이다. 세포를 동기화시키기 위해 세포 주기의 억제 대사경로를 이용한다. 억제 대사경로는 두 가지 방식으로 이용되는데, 첫 번째는 특정 세포 주기 단계를 억제하는 방식이다. 예컨대, 영양 부족 상태(serum starvation), 티미딘 또는 아피디콜린을 처리하면 G1 기에서 멈추고, 콜치신 및 노코다졸을 처리하면 M 기에서 멈추고, 5-플루오로디옥시우리딘을 처리시 S 기에서 멈춘다. 본 발명에서 G1/S기 및 G2/M 기에서 동기화시키기 위해 각각 티미딘과 노코다졸을 처리하여 해당 단계에서 세포 주기가 더 이상 진행하지 못하게 조절하였다. 따라서 본 발명에서 G1/S 기에서 대부분의 세포가 동기화 되는 경우에 상기 단계에서 특이적인 신호가 검출되고, G2/M 기에서 세포가 동기화되면 해당 단계의 특이적인 신호를 검출하는데 해당 시약이 이용할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 세포주기 동기화제는 티미딘, 아피디콜린, 콜치신, 노코다졸 또는 5-플루오로디옥시우리딘이다.
- [0045] 종래 세포 주기에 영향을 주는지 그 효과를 알아보기 위해 형광활성 세포 분류 장치(FACS)에 의해 단계를 분리하고, 분자 탐침을 이용하여 영상화하고, 세포 주기-의존적 단백질을 이용하여 웨스턴 블로팅 분석을 하는 방식을 이용할 경우, 이는 시간 소모가 많고, 비용이 많이 따르는 단점을 가지고 있었다. 그러나 DPV 방식은 세포의 동기화가 충분히 일어날 시간이 경과한다면, 탐침을 이용하여 즉시 해당 신호를 측정할 수 있으므로 매우 신속하고, 용이하며, 경제적인 장점을 가질 수 있다.
- [0046] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 DPV를 이용한 세포 주기 측정 방법은 기존의 세포 주기 측정 방법과 비교하여 매우 신속하고, 경제적인 측정 결과를 나타낸다. 이러한 특성을 이용하면, 상기 측정 방법을 이용하여 즉시 세포 주기에 대한 측정 결과를 얻을 수 있다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 및 (c) 사이에 세포주기에 영향을 미치는 지 여부를 분석하고자 하는 시험물질을 세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함한다. 택일적으로, 상기 단계 (b) 이전에 세포주기에 영향을 미치는 지 여부를 분석하고자 하는 시험물질을 세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함한다. 이러한 시험물질 처리에 의해 시험물질이 세포주기에 영향을 미치는 지 여부를 신속하면서도 효율적으로 분석할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포 주기에 영향을 주는 물질의 스크리닝

방법을 제공한다:

- [0049] (a) 세포막 단백질에 특이적으로 결합하는 캡처(capture)를 기관에 결합시키는 단계; 상기 세포막 단백질은 캡처에 결합하는 카운터파트너(counterpartner)이고;
- [0050] (b) 상기 카운터파트너를 세포막 단백질로 갖는 세포를 상기 캡처에 결합시키는 단계;
- [0051] (bc) 시험물질을 상기 세포에 처리하는 단계; 및
- [0052] (c) 상기 세포의 산화환원(redox) 전위를 측정하는 단계.
- [0053] 본 발명의 방법은 시험물질을 처리하는 것을 제외하고는 상기 세포 주기 분석 방법과 거의 동일하기 때문에, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0054] 본 방법에서 분석 대상이 되는 시험물질은 다양한 물질을 포함한다. 예를 들어, 본 발명에서 이용될 수 있는 시험물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스를 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0055] 본 발명의 방법에 따르면, 세포 주기 진행에 영향을 미치는 물질을 스크리닝 함으로써, 특정 의약 후보물질을 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 세포 주기 진행을 억제하는 물질을 스크리닝 하면, 이는 암 치료제 후보물질로 이용할 수 있다.
- [0056] 종래 세포 주기에 영향을 주는지 그 효과를 알아보기 위해 형광활성 세포 분류 장치(FACS)에 의해 단계를 분리하고, 분자 탐침을 이용하여 영상화하고, 세포 주기-의존적 단백질을 이용하여 웨스턴 블로팅 분석을 하는 방식을 이용할 경우, 이는 시간 소모가 많고, 비용이 많이 따르는 단점을 가지고 있었다. 그러나 DPV 방식은 세포의 동기화가 충분히 일어날 시간이 경과한다면, 탐침을 이용하여 즉시 해당 신호를 측정할 수 있으므로 매우 신속하고, 용이하며, 경제적인 장점을 가질 수 있다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포 주기에 영향을 주는 물질은 세포 주기를 정지(arrest)시키는 항암제 후보물질인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- [0058] 악성 종양이라고도 불리는 암세포는 정상적인 조직 세포가 암원성 물질의 작용 또는 요인에 의해 돌연변이를 일으켜서 형성되는 세포로, 무제한적인 세포분열로 증식하여 주위 조직을 파괴 침식하는 작용을 한다.
- [0059] 이에 악성 종양의 치료를 위한 화학 요법제의 총칭인 항암제는 암세포의 각종 대사경로에 개입하여 항암 활성을 나타내는 약제로 사용된다. 현재 암치료를 사용되고 있는 항암제는 생화학적인 작용기전에 따라, 알킬화제(alkylating agent), 대사 길항제(antimetabolites), 항생물질(antibiotics), 유사분열억제제(vinca alkaloid), 호르몬제 등으로 분류된다.
- [0060] 본 발명에서 세포 주기를 정지시키는 항암제 후보 물질을 세포에 처리하였을 때, 각 단계에서 특이적으로 나타나는 신호를 분석하여 항암제 후보 물질이 어느 단계에서 효과적으로 대사 경로를 차단하는지 손쉽게 판단할 수 있으므로 이 후 항암제의 효과를 판단하는데 신속하고 용이하며, 경제적으로 측정이 가능하다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다.
- [0062] (a) 본 발명의 세포 주기 측정 방법은 세포 주기를 측정하는 종래 기술보다 빠르고 경제적으로 측정이 가능하다.
- [0063] (b) 본 발명의 세포 주기 측정은 세포 주기의 동기화를 시킨 후 즉시 확인이 가능하므로 결과를 측정하기 위해 오랜 시간을 들이는 동안 나타날 수 있는 오차를 최소화할 수 있다.
- [0064] (c) 본 발명의 세포 주기에 영향을 주는 물질을 스크리닝하는 방법으로 세포 주기에서 밝혀지지 않은 단계별 메커니즘을 판단하는데 신속하고 정확하게 연구를 진행시킬 수 있다.
- [0065] (d) 본 발명의 세포 주기에 영향을 주는 세포 주기를 정지시키는 항암제 후보 물질이 무엇인지 판단함으로써, 향후 항암제를 개발하는 과정에서 보다 효율적으로 세포 주기에 미치는 효과를 판단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1a는 실험에 사용되는 RGD-MAP-C 기반 세포칩의 제작 방법을 나타낸 그림이다.
- 도 1b는 동기화하지 않은(Unsynchronized) 세포(왼쪽), G1/S기에서 동기화(Synchronized)한 세포(가운데), G2/M기에서 동기화한 세포(오른쪽) 및 각 단계에서 DPV로 측정된 상대적인 신호에 대한 그래프이다.
- 도 1c는 G1/S기(i), G2/M기(ii)를 동기화하기 위해 세포에 시약 처리하는 시간 그래프 및 G1/S기에서 G2/M기로의 시간의 흐름(iii)을 보여주는 시간 그래프이다.
- 도 2는 제작된 세포 기반 칩의 전기화학적 특성으로, 패널(a)는 bare 금(Au), 펩타이드가 결합된 금 및 세포를 고정시킨 펩타이드가 결합된 금을 DPV로 측정하여 나타난 신호를 보여주는 그래프이며, 패널(b)는 G1/S기 및 G2/M기에서 동기화된 세포칩을 DPV로 측정하여 나타난 각 단계의 신호를 보여주는 그래프이다. DPV는 PBS(0.01 M, pH 7.4), 100 mVs⁻¹의 속도로 스캔한 전해질에서 측정하였고, 50 mV의 전압, 50 ms의 펄스폭(pulse width)이며, 전체 실험은 27±1℃에서 백금을 상대 전극으로, 은/염화은을 레퍼런스 전극으로 사용하였다.
- 도 3은 티미딘 및 노코다졸에 의해 G1/S기, G2/M기에서 세포 주기가 정지되는지 FACS 데이터로 확인하는 그래프로, 패널(a)는 비동기화된 세포의 DNA 양을 측정(대부분은 G1기에 분포), 패널(b)는 G1/S기에서 동기화한 세포로 대부분은 G1/S기에서 나타나며 M기와 다른 단계에서는 줄어들어 있음을 보이고, 패널(c)는 G2/M기에서 동기화한 경우 대부분 G2와 M기에서 나타나며, G1/S기 및 다른 단계에서는 줄어들어 있음을 보여주는 그래프이고, 패널(d)는 포스포-히스톤 H³(pHH³)의 발현량이 G2/M기에서만 나타나며, 사이클린 B1의 발현량은 G2/M기에서 동기화한 세포가 G1/S에서 동기화되거나, 비동기화 된 세포보다 많이 발현되었음을 보여주는 웨스턴 블로팅 분석 사진이다.
- 도 4는 티미딘 제거 후 G1/S기에서 G2/M기로의 시간 별 주기(2시간-10시간)로, 패널(a)는 PC12 세포에서의 피크 전류의 강도의 변화를 보여주며, 시간이 지날수록 화살표(↓)는 G1/S기에서 보이는 신호 값이 점차 줄어드는 추세를, 화살표(↑)는 G2/M기에서 보이는 신호 값이 점차 증가하고 있는 추세를 보여주는 그래프이며, 패널(b)는 티미딘 제거 후 G1/S기에서의 피크 전류 값이 줄어들고(검은선), G2/M기에서의 피크 전류 값이 증가하는 추세(붉은선)를 보여주는 그래프이다. 데이터는 모두 3번 실험하여 측정하였으며 표준 편차를 감안한 평균값이다.
- 도 5a는 G1/S기로 고정을 해제한 후 G2/M기로 이동하는 동안 FACS(왼쪽)와 DPV(오른쪽)로 수 시간 동안 측정한 데이터로, 전기화학적 결과의 유효성을 보여주는 그래프이다.
- 도 5b는 두 번 티미딘 처리하여 G1/S기로 고정된 상태를 해제한 후에 시간 변화 동안 G2/M기에서의 DPV 피크 전류의 세기를 측정하고, FACS로 G2/M 기 세포수를 측정한 추세 그래프이다. 데이터는 모두 3번 실험하여 측정하였으며 표준 편차를 감안한 평균값이다.
- 도 6은 세포 개수를 달리하였을 때, 세포 주기 전기화학적 결과의 재현성:
- 패널(a)는 세포 칩 표면에 존재하는 PC12 세포의 여러 가지 농도에 대응하는 DPV 피크 전류 세기의 변화(0.5×10^5 - 3.5×10^5 cells/ml)를 보여주는 그래프로 화살표(↑)는 세포수가 증가할 때마다 피크 전류가 증가함을 보여준다. 전기화학적 측정을 위해 G1/S기에서 고정이 풀린 후에 10시간 후 세포를 G2/M기로 동기화 하였고,

패널(b)는 세포수가 증가하면서 피크 전류가 증가하는 농도 의존적($R^2=0.99$)인 경향을 보이는 전형적인 시그모이드 곡선을 가리키는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 세포 주기 과정을 전기화학적 방식으로 측정하기 위해 제작된 세포칩과 삼전극 시스템을 보여주는 사진이다.

도 8은 본 발명에서 이용된 비동기화 세포(a), G1/S기에 동기화된 세포(b) 및 G2/M기에 동기화된 세포(c)의 현미경 사진이다.

도 9는 본 발명에서 인테그린에 특이적으로 결합하는 펩타이드로 Arg-Gly-Asp(RGD)를 필수적으로 포함하는 펩타이드를 표시한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0068] 실시예

[0069] 실험 재료 및 실험 방법

[0070] 화학약품

[0071] 티민과 니코다졸은 Sigma에서 구입하였으며, 추가적인 정제 없이 사용하였다. 올리고 펩타이드 RGD-MAP-C(참조: 도 9)는 Pepton (Daejeon, 305-340, South Korea)에서 구입하였다. RPMI 1640 배지(RPMI 1640, media, Daegu, 704-230, South Korea), 소 혈청 배아(FBS), 항생제(페니실린-스트렙토마이신, 0.83% 생리 식염수 내에 10,000 U/ml의 페니실린 소듐 및 10,000 /ml의 스트렙토마이신 설페이트), 트립신(0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA-4Na)은 Gibco(Invitrogen, Grand Island, USA)에서 구입하였다. 인산완충식염수(PBS) (pH 7.4, 10 mM)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 다른 화학제품들은 모두 분석용 품위이다. 모든 용액은 2차 증류수로 만들어졌고, Milli-Q 정제 시스템(Branstead)을 이용하여 18 MΩ cm보다 큰 고유저항을 갖도록 정제하였다.

[0072] 작업 전극의 제작

[0073] 실리콘 위에 증착한 금 기판을 피라냐 용액(1:3의 30% 과산화수소와 진한 황산의 혼합물)으로 5분간 세척 후 초순수로 2회 세척하였다. 남아 있을 수 있는 불순물 제거를 위하여 에탄올 및 초순수로 각 5분씩 초음파 세척하였다. 마지막으로, 작업 전극을 다시 0.5 M 황산 용액에 담그고 순환 전류법(sonication)을 이용하여 전기화학적으로 세척하였고 질소로 건조시켰다. 전극의 세척 작업 후, 세포를 고정화시키기 위하여 본 연구진이 개발한 올리고펩타이드인 RGD-MAP-C 펩타이드를 자가조립법을 이용하여 고정화하였다(15). 펩타이드 고정화 후, 전기화학 측정을 위하여 2 cm × 1 cm × 0.5 cm (너비×길이×높이) 크기의 플라스틱 챔버(Lab-Tek(R), Thermo fisher scientific, USA)를 세포에 무해한 고분자인 PDMS(Polydimethylsiloxane)로 기판 위에 고정화하였다. 이렇게 생성된 챔버에 위에서 추출한 신경 암세포(PC12 cell)를 2 × 10⁵ cells/chip 농도로 분주하여 24시간 동안 배양기에서 배양시켰다.

[0074] 세포 주기의 G1/S기 및 G2/M기 고정화 방법

[0075] 세포칩 내에서 배양된 세포에 배양액(RPMI 1640) 속에 2 mM 농도로 티미딘을 첨가한 후 18시간 동안 배양시키고, 다시 배양액을 티미딘이 첨가되지 않은 일반 배양액으로 교체한 후 8시간 동안 배양, 마지막으로 다시 2 mM 농도로 티미딘을 첨가한 배양액으로 교체 후 18시간을 배양시켜 세포를 G1/S 로 고정시켰다(도 1c). 마찬가지로, 다른 세포칩에 고정된 세포를 2 mM 농도로 티미딘이 첨가 된 배양액으로 18시간 배양시키고, 4시간 동안 일반 배양액에서 배양, 마지막으로 100 ng/ml의 노코다졸을 첨가한 배양액에서 10시간 동안 배양시켜 G2/M 주기로 고정된 세포를 얻었다(도 1c). 이렇게 각각 다른 세포 주기에 고정 된 세포칩을 제작함으로써,

세포 주기에 따른 세포의 전기화학적 특성을 분석할 수 있다. 시간에 따른 세포 주기 변화 (G1/S에서 G2/M) 측정하기 위해, G1/S로 고정된 세포를 10% FBS가 첨가된 일반 배양액으로 교체 한 후 각 시간 마다 전기화학 측정을 실시하였다.

[0076] 전기화학적 측정 방법

[0077] 전기화학적 측정은 CHI660C Potentiostat(CH Instruments)으로 사용하였다. 표준 은(Ag/AgCl)이 레퍼런스로 백금선이 상대 전극으로 작용하는데 반하여 주로 사용하는 삼-전극형은 전기화학적 측정을 위해 사용하였다(도 7). 전기화학적 측정에 앞서, G1/S기 및 G2/M기 세포가 있는 금 기판을 10 mM PBS 완충용액(pH 7.4)에 두 번 세척하였다. 마지막으로 전기화학적 측정은 전해질인 동일한 PBS 용액 2 ml를 분주하여 사용하였다. 측정 전에, 완충 용액은 처음 순도 높은 질소로 30분 동안 충분히 거품을 냈다. 이후 실험 전체에 걸쳐 호기성 산소에 노출을 막기 위해 질소 가스를 서서히 용액 표면에 분사하였다. 스캔효과를 최소화하기 위해, 몇 번 반복된 스캐닝을 하였고, 본 발명을 통한 모든 측정치를 위해 세 번째 스캔에서 나온 시차펄스전압전류법(Differential Pulse Voltammetry, DPV)을 사용하였으며, DPV 측정이 세포에 주는 영향을 최소화 하기 위하여 DPV를 3번 측정 후 마지막 주기를 세포의 전기화학적 신호 분석에 이용하였다.

[0078] 형광-활성 세포 분류 장치(FACS) 분석법

[0079] 티미딘 및 노코다졸로 처리한 동기 세포를 모아, 70% 에탄올 0.5 ml에서 30분 간 재현탁하여 고정하였고, 그 다음 10분 간 1,000 rpm으로 원심분리하고, 아이스 콜드 PBS에서 세척하였다. 그 결과로 얻은 세포 펠렛을 50 /ml 프로피딘아이오다이드(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) 및 RNase(Invitrogen, Carlsbad, CA) 100 /ml이 포함된 PBS 0.5 ml에서 재현탁시키고, 이후에 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 세포 주기 분포는 예전에 설명한 것과 같이 형광활성 세포 분류 장치(flow cytometer)(FACS Caribur flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 DNA 양을 측정함으로써 조사하였다(24). 측정점 당 최소 10^4 개 세포가 실험에 사용되어야 한다. 이러한 세포 주기는 M1, M2, M3로 분류하였는데 이는 각 각 G1, S, G2/M 주기에 해당 된다.

[0080]

[0081] 단백질 분석기법

[0082] 세포 주기가 고정 된 PC12 세포 세포 알갱이는 분해 완충용액에서 4°C 조건에서 15 분간 용해하였다. 불용해성 물질을 제거하기 위해 용해질을 4°C에서 30분 간 13,000g로 원심분리 하였다. 그리고 나서 상층액을 모으고, BCA 단백질 분석 시약(Pierce Chemicals)을 이용하여 단백질 정량을 분석하였다. 웨스턴 블로팅 분석을 위해, 샘플(각각 25)을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(12% for actin and cyclin B1, 16% for p-HH³)에서 전기영동 하여 분리하였고, 이후 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 막(BioRad)으로 전이시켰다. 막은 항-p-HH³(1:2000; Cell Signaling), 항-사이클린 B1(1:2000; Abchem) 및 항-β-actin(A-5441, 1:10,000)로 표지하였다. 이렇게 준비된 막을 상보적인 항체를 이용하여 4°C에서 밤새 배양하였다. 0.015%(vol/vol)의 Tween-20이 포함된 PBS로 매회 10분 동안 3회 세척한 후에, 막은 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP for actin, anti-rabbit IgG-HRP for cyclin B1 and p-HH³)를 달고 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 막을 다시 3회 세척하였고, 다시 향상된 화학 발광(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 사용하였다.

[0083] 결과 및 토의

[0084] 도 1a는 금기판/RGD-MAP-C 펩타이드/세포 복합체로 구성 된 세포칩 기판을 제작하는 과정 및 세포 주기 고정화와 그에 따른 전기화학적 측정 방법을 보여 준다. 펩타이드 말단에 Cysteine기를 함유하는 RGD-MAP-C 펩타이드는 시스테인기 내에 존재하는 황화물을 통하여 Au-S 공유결합으로 금 기판 위에 자가 조립 된다(14, 15). RGD 펩타이드는 세포 표면과 결합하여 세포의 고정화 율을 향상시키므로(15, 25), 전기화학 측정 및 세포 주기 고정화를 위한 다양한 세척 과정 및 배양액 교체 과정에서 세포가 바닥에서 떨어지지 않게 세포를 효과적으로 고정 시킨다(16). 세포 주기가 고정화 되지 않은 일반 세포를 이중 티미딘 처리(각 18시간 씩) 후 8시간 동안

의 일반 배양액에서의 세포 배양을 통하여 G1/S 주기로 고정 한다(도 1c). 또 다른 세포는 티미딘이 첨가 된 배양액으로 18시간 배양시키고, 4시간 동안 일반 배양액에서 배양, 마지막으로 100 ng/ml의 노코다졸이 첨가된 배양액에서 10시간 동안 배양시켜 G2/M 주기 고정 된다. 이렇게 주기가 고정 된 세포의 전기화학적 특성을 DPV법을 이용하여 분석하였다(도 1b).

[0085] 제작 된 세포칩의 전기화학적 특성

[0086] 단계적 금 기관의 개질 과정 및 DPV를 이용한 분석 과정을 도면1a 와 도면 2a에 나타내었다. 매우 강한 전류 봉우리가 +75 mV 정도의 퍼텐셜에서 관측되었으며(도 2 패널a), 이러한 현상은 일반적인 금 기관 또는 세포가 고정화 되지 않은 RGD-MAP-C/금 복합체에서도 나타나지 않았다(도 2 패널a). 이러한 현상으로부터, 검출된 전기화학 신호는 세포칩을 전기화학적으로 분석할 시 나타나는 세포의 전기화학적 특성으로부터 기인한다는 것을 알 수 있다. 티미딘을 이용하여 세포를 G1/S 주기로 고정할 경우, 일반적인 세포와는 다르게 +50 mV 퍼텐셜에서 뾰족한 형태의 전류 봉우리를 얻을 수 있으며(도 2 패널 b), 또한 티미딘/노코다졸 모두를 이용하여 세포를 G2/M 주기에 고정할 경우 또 다른 형태의 전류 봉우리를 +150 mV 부근에서 얻을 수 있음이 밝혀졌다(도 2 패널 b). 이러한 전류 봉우리의 형태 및 위치의 변화는 세포 주기에 따른 세포 내 전기화학적 특성을 보이는 물질의 변화로부터 기인하는 것으로 보인다(26). 이 중 티미딘 처리는 세포를 합성 주기에 고정시키는데(27, 28), 이것은 DNA 복제(29)를 비롯한 세포 핵 내(30)의 많은 변화를 야기하게 된다. 또한 티미딘/노코다졸 처리는 세포를 M주기로 고정시키는데(28, 31, 32), 이 때 세포의 핵은 2개의 딸 세포로 분리된다(33). 현재 세포 주기 확인은 형광인자 부착, 단백질 분석 등 매우 복잡하고 값 비싼 전처리 과정 및 기자재를 필요로 하므로, 본 발명은 세포 주기를 효과적으로 확인할 수 있는 비표지 방식의 도구로써 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0087] 세포 주기 고정화의 확인

[0088] 세포의 칩상에서의 세포 주기 정지 확인에는 일반적인 형광활성세포분류장치(FACS)(34, 35), 웨스턴 블롯 분석 기법이 이용되었다. 도면 3에서 볼 수 있듯이, PC12 세포는 티미딘 및 노코다졸을 이용하여 매우 효과적으로 각 주기에 맞게 고정화 되었으며, 그 비율은 G1/S(도 3 패널b)의 경우 75%, G2/M(도 3 패널 c)의 경우 72%에 달했다. 이러한 세포 주기 고정 정도는 추가적인 웨스턴 블롯 기법을 이용하여 재확인 하였는데, 이를 위하여 G2/M 주기에 특이적인 protein phosphohistone(p-HH³)(36-38) 및 cycline B1(39-41)을 이용하였다. 도면3d에서 볼 수 있듯이, cyline B 및 p-HH³는 G2/M 주기에 고정화 된 세포에서 나타나지만 주기가 고정화 되지 않은 세포 및 G1/S에 고정 된 세포의 경우에는 발현되지 않은 것을 볼 수 있다(39, 41). 이러한 결과는 세포가 칩상에서 효과적으로 각 주기에 정지해 있음을 나타낸다.

[0089]

[0090] 세포 주기의 전기화학적 측정

[0091] 일반적인 방법을 이용한 세포 주기 고정을 확인한 후, 칩 상에 부착 된 세포의 세포 주기 진행 정도에 따른 전기화학적 특성을 확인하였다. 티미딘을 이용하여 G1/S 상에 고정된 세포의 경우, 티미딘을 제거한 후 6, 7, 8, 9, 10 시간 후에 각 시간에서의 세포의 전기화학적 특성을 DPV법을 이용하여 분석하였으며, 이를 도 4 패널 a에 나타내었다. G1/S 상에 고정 된 세포의 경우 +50 mV 퍼텐셜에서 뾰족한 전류 봉우리를 나타내었으며, G2/M의 경우 +150 mV 부근에서 또 하나의 전류 봉우리를 나타내었으며, +150 mV에서 나타난 봉우리의 경우 2중 티미딘 처리 후 시간이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는, 세포의 주기가 G1/S 상에서 G2/M 상으로 이동한 것을 나타낸다. 한 가지 특이한 점은, G1/S 상에서 나타난 +50 mV 부근의 전류 봉우리는 세포의 주기가 G2/M으로 이동할 때 나타나는 새로운 전류 봉우리의 세기가 +150 mV로 증가함에 따라 감소했다는 점이다. 따라서 이러한 점으로 미루어 볼 때, +150 mV에서 새롭게 나타나는 전류 봉우리는 G2/M 상으로 이동한 세포의 수를 나타낸다고 할 수 있다. 도 4 패널 b에서 볼 수 있듯이, 이러한 세포 주기 이동에 따른 두 전류 봉우리의 관계를 도식화 하면 역선형 관계가 성립함을 알 수 있으며, 이러한 점은 G1/S에서 G2/M으로의 세포 주기 이동에는 약 9-10시간 정도가 걸린다는 기존 연구 결과와 일치 한다(6, 42). G1/S 주기는 M 주기에서의 핵 분열 및 세포 분열에 반드시 필요한 과정인데(14), 이 때 세포는 전기, 전중기, 중기, 후기, 말기의 매우 복잡한 과정을 거친다(6, 43). 이러한 주기 변화가 세포 핵 및 세포질에 변화를 야기하고, 이러한 변화가 측정 가능한 수준의 세포 내 전기화학적 성질 변화를 유도하여, G2/M 상에 특이적인 +150 mV 퍼텐셜 부근의 새로

은 전류 봉우리를 형성 시킨 것으로 보인다. 따라서 특정 주기에 고정된 세포는 전류 봉우리의 퍼텐셜 및 전류의 세기를 DPV 방법을 이용하여 분석함으로써, 간접적으로 정확하게 측정 가능하다.

[0092] 전기화학적 세포 주기 모니터링 방법 검증

[0093] 시간에 따른 G2/M 상으로의 세포 주기 변화는 전통적인 FACS법(34)으로 확인하였다. 도 5에서 볼 수 있듯이, G1/S에서 G2/M 상으로의 이동을 나타내는 DPV 전류 봉우리는, 세포를 G1/S 고정시킨 상태에서 티미딘을 제거함에 따라 세포 주기가 이동하며 점점 증가하게 되며, 반대로 G1/S 상에서 나타났던 전류 봉우리는 감소하게 된다. 이러한 현상은 전기화학 기법이 아닌 FACS를 이용한 G1/S 상의 세포 수 및 G2/M 상의 세포 수 분석 결과에서도 나타났다. 놀라운 점은, FACS를 이용하여 확인한 티미딘 제거 후 시간에 따른 G2/M 상으로의 세포 이동 변화 그래프와 DPV법을 이용하여 나타나는 +150 mV 퍼텐셜에서의 전류 봉우리 세기를 정량화한 그래프가 오차 범위 내에서 일치한다는 점이다. 이러한 사실은, DPV를 이용한 세포집의 전기화학적 분석법이 FACS를 이용한 방법과 매우 유사한 결과를 보인다는 점에서, 세포집을 이용한 전기화학적 세포 주기 모니터링 방법이 매우 효과적인 지표지 방식의 세포 주기 확인 및 주기 별 세포 수 확인을 위한 방법이 될 수 있음을 시사한다.

[0094] 세포 수 측정을 통한 전기화학적 세포 주기 확인법의 재현성 검증

[0095] 최종적으로, DPV법을 이용한 전기화학적 세포 주기 확인법을 검증하기 위하여, 세포집 위에 고정화 시키는 세포 농도를 0.5×10^5 cells/ml에서 3.5×10^5 cells/ml까지 변화를 주어 주기가 정지 된 세포의 숫자 측정을 측정하는 실험을 수행하였다. 도 6 패널 a는 세포 수 증가에 따른 전류 봉우리의 세기 증가 정도를 나타낸다. 세포 수와 전기화학적 전류 세기의 관계는 시그모이드 곡선($r^2 = 0.99$) 형태를 띄며, 1×10^5 cells/ml에서 3×10^5 cells/ml 구간이 가장 큰 전류 세기의 증가를 보이는 것으로 나타났다. 3×10^5 cells/ml 이상의 구간에서는 세포 숫자의 증가로 인하여 세포 주기 고정화가 잘 이루어지지 않는 것으로 나타났으며(44), 이러한 현상 때문에 4.5×10^5 cells/ml 농도에서는 세포수는 증가했지만 전기화학 신호는 크게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험은 3×10^5 cells/ml 를 최적의 세포 농도를 설정하였으며(도 6 패널 a), DPV 전류 봉우리 세기와 세포 수의 관계는 표준 편차가 5.6%에 불과했으므로, 전기화학적 세포 주기 확인법은 높은 재현성을 보이는 것으로 나타났다.

[0096] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0097] 참고문헌

- [0098] (1) Hartwell, L. H. et al., Science 1989, 246, 629-634.
- [0099] (2) Alberts, B. et al., The molecular biology of the cell. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2002.
- [0100] (3) Smith, J. A.; Martin, L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973, 70, 1263-1267.
- [0101] (4) Nelson, D. M. et al., Mol. Cell. Biol. 2002, 22, 7459-7472.
- [0102] (5) Nyberg, K. A. et al., Annu. Rev. Genet. 2002, 36, 617-656.
- [0103] (6) Cude, K. et al., Cell Biol. 2007, 177, 253-264.
- [0104] (7) Li, F. et al., Nature 1998, 396, 580-584.
- [0105] (8) Leung, B. S. et al., J. Cell. Biochem. 1987, 34, 213-225.
- [0106] (9) Bowen, W. P. et al., Assay Drug Dev. Technol. 2006, 4, 209-221.

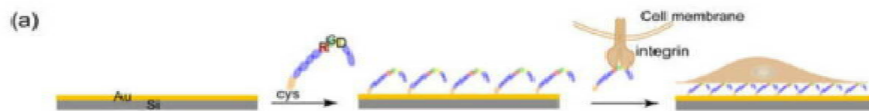
- [0107] (10) Samak, S.; Smith, L.C. *Theriogenology* 1997, 48, 969976.
- [0108] (11) Xiang, Y. et al., *Nature Methods* 2009, 6, an2-an3.
- [0109] (12) Wong, J. T. Y. et al., *Exp. Marine Biol. and Ecol.* 1996, 197, 91-99.
- [0110] (13) Nunez, R. *Mol. Biol.* 2001, 3, 6770.
- [0111] (14) Jin H. S.; Lee, T. H. *Biochem. J.* 2006, 399, 335342.
- [0112] (15) Kafi, M. A.; Kim, T. -H.; Yea, C. -H.; Kim, H.; Choi, J. -W. *Biosens. Bioelectron.* 2010, 26, 13591365.
- [0113] (16) Kafi, M. A.; Kim, T. -H.; Yagati, A. K.; Kim, H.; Choi, J. -W. *Biotechnol. Lett.* 2010, 32, 17971802.
- [0114] (17) El-Said, W. A.; Yea, C.; Kim, H.; Oh, B. K.; Choi, J. -W. *Biosens. Bioelectron.* 2009a, 24, 1259-1265.
- [0115] (18) El-Said, W. A.; Yea, C. -H.; Kwon, I. -K.; Choi, J. -W. *Biochip J.* 2009b, 3, 105-112.
- [0116] (19) Choi, J. W.; Nam, Y. S.; Fujihira, M. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2004, 9, 76-85.
- [0117] (20) May, K. M.; Wang, Y.; Bachas, L. G.; Anderson, K. W.; *Anal. Chem.* 2004, 76, 4156.
- [0118] (21) Yea, C. H.; Min, J.; Choi, J. W. *Biochip J.* 2007, 1, 219-227.
- [0119] (22) Wang, L.; Wang, L.; Yin, H.; Xing, W.; Yu, Z.; Guo, M.; Cheng, J.; *Biosens. Bioelectron.* 2010, 25, 990-995.
- [0120] (23) Gutierrez, G. J. et al., *Biol. Chem.* 2010, 285, 1421714228,
- [0121] (24) Zhu, H. et al., *Cancer Res.* 2000, 60, 12831289.
- [0122] (25) Ruoslahti, E. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996, 12, 697715.
- [0123] (26) Mitchison, T. J.; Salmon, E. D. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3, E17E21 doi:10.1038/35050656
- [0124] (27) Huberman, J.A. *Cell* 1981, 23, 647648.
- [0125] (28) Zhu, H.; and Nigel, J. *Toxicol. Sci.* 2006, 91, 132139.
- [0126] (29) McCulloch, S. D.; Kunkel T. A. *Cell Res.* 2008, 18, 148161.
- [0127] (30) Lengronne, A.; Pasero, P.; Bensimon, A.; Schwob, E. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 14331442.
- [0128] (31) Krek, W.; DeCaprio, J. A. *Methods Enzymol.* 1995, 254, 114124.
- [0129] (32) Zieve, G. W.; Turnbull, D.; Mullins, J. M.; McIntosh, J. R. *Exp. Cell Res.* 1980, 126, 397405.
- [0130] (33) Reddy, G. P. J. *Cell. Biochem.* 1994, 54, 379-386.
- [0131] (34) Resnitzky, D. et al., *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14, 1669-1679.
- [0132] (35) Futcher, B. *Methods in Cell Science* 1999, 21, 7986.
- [0133] (36) Kaitna, S. et al., *Biol.* 2002, 12, 798812.
- [0134] (37) Cortez, D. et al., *Science* 2001, 294, 17131716.
- [0135] (38) Crosio, C. et al., *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22, 874885.
- [0136] (39) Cogswell, J. P. et al., *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15, 27822790.
- [0137] (40) Norbury, C.; Nurse, P. *Annu. Rev. Biochem.* 1992, 61, 441470.
- [0138] (41) Pines, J.; Hunter, T. *Cell* 1989, 58, 833846.
- [0139] (42) Langan, T. J.; Slater, M. C.; Kelly, K. *Glia.* 1994, 10, 30-39.

[0140] (43) Huang, J. N.; Park, I.; Ellingson, E.; Littlepage, L. E.; Pellman D. J. Cell Biol. 2001, 154, 8594.

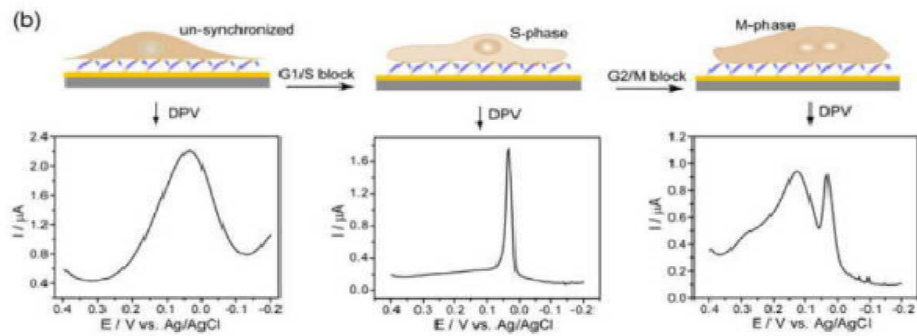
[0141] (44) Bartholomew, J. C.; Neff, N. T.; Ross, P. A. J. Cell Physiol. 1976, 89, 251258.

도면

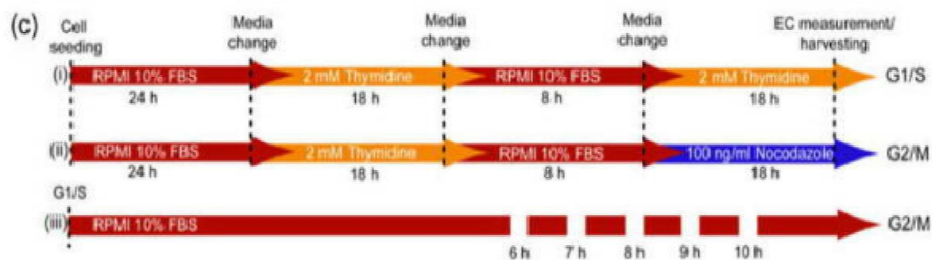
도면1a



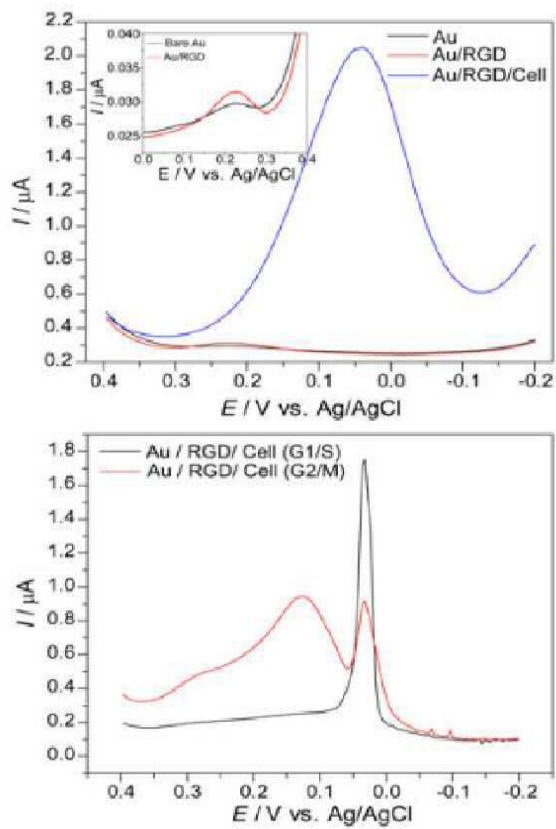
도면1b



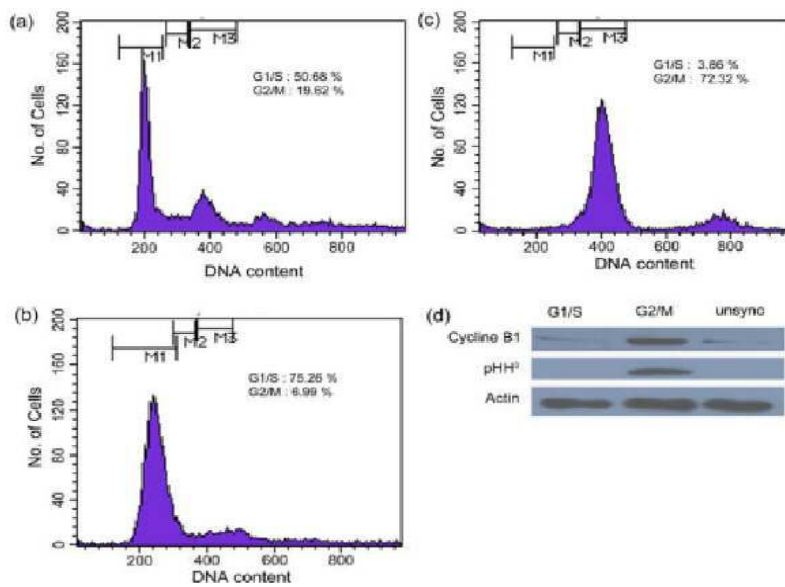
도면1c



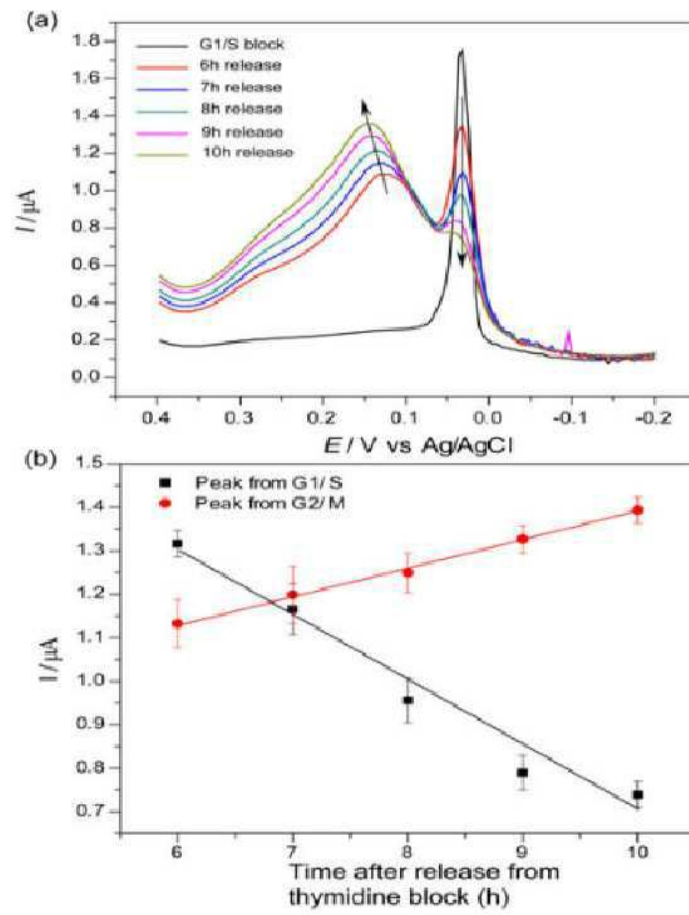
도면2



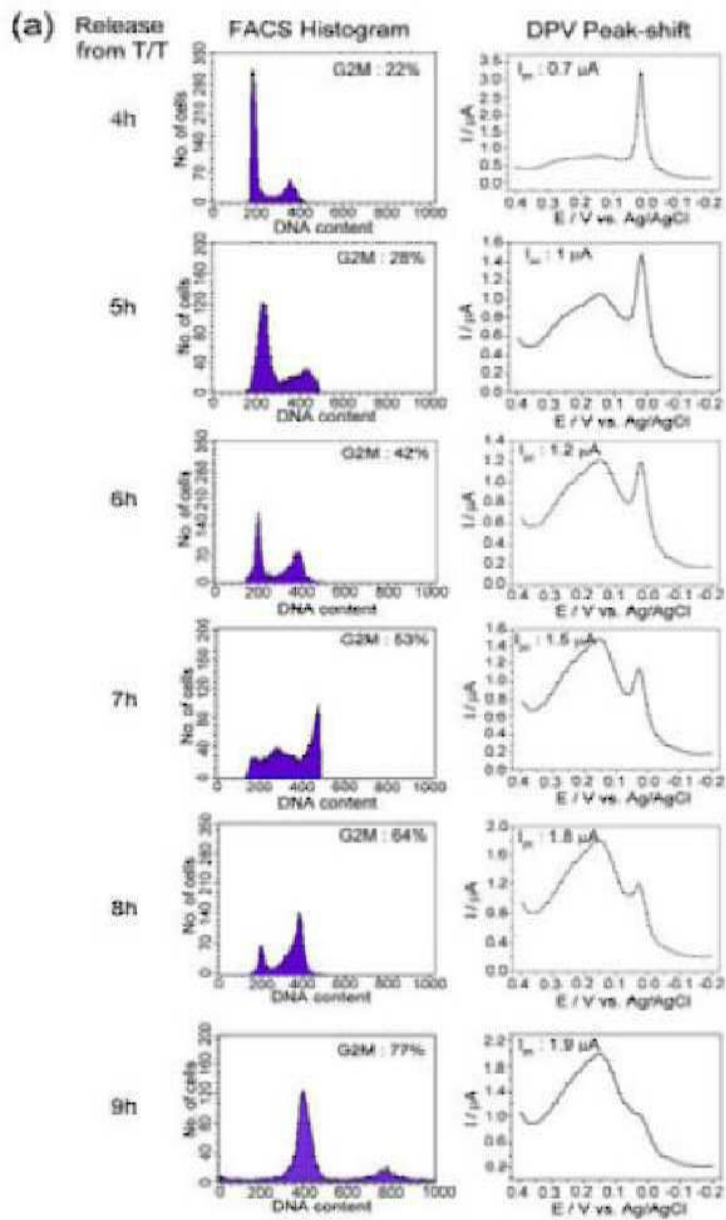
도면3



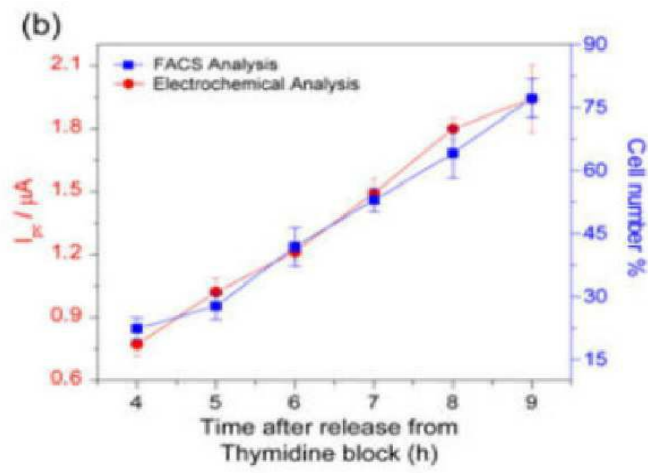
도면4



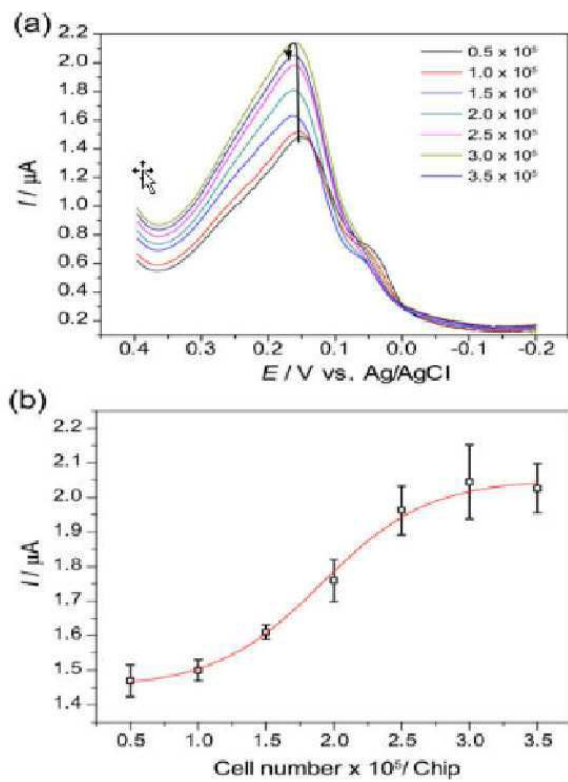
도면5a



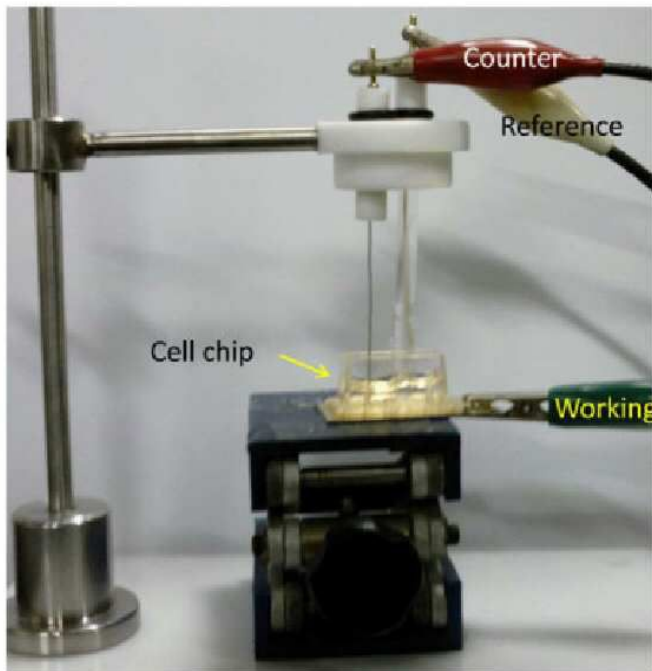
도면5b



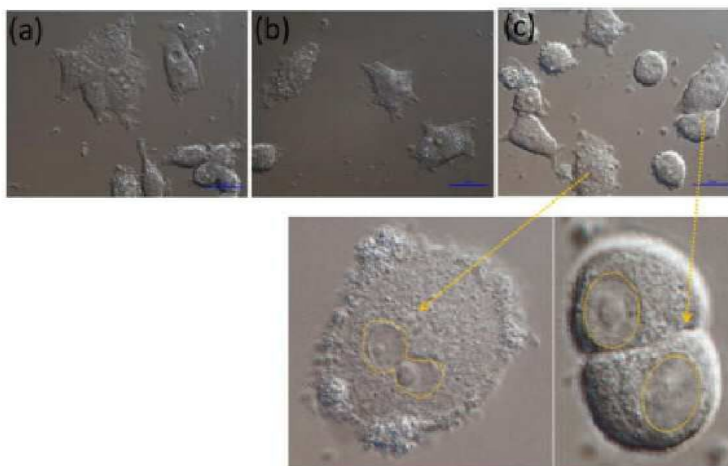
도면6



도면7



도면8



도면9

