



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0010363

(43) 공개일자 2016년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/532 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/532 (2013.01)

G01N 33/5008 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0101650

(22) 출원일자 2015년07월17일

심사청구일자 2015년07월17일

(30) 우선권주장

1020140090967 2014년07월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

백세환

서울특별시 광진구 아차산로 552, 10동 503호

전진우

서울특별시 마포구 만리재로10길 28

(74) 대리인

한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

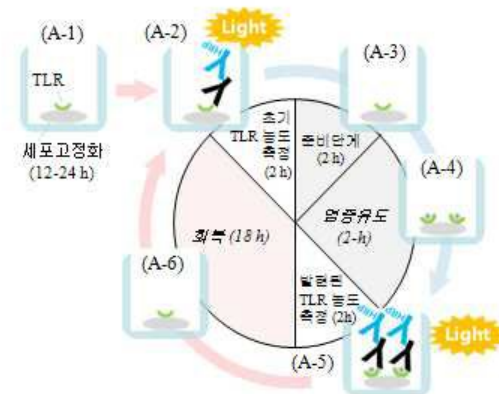
(54) 발명의 명칭 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법

(57) 요약

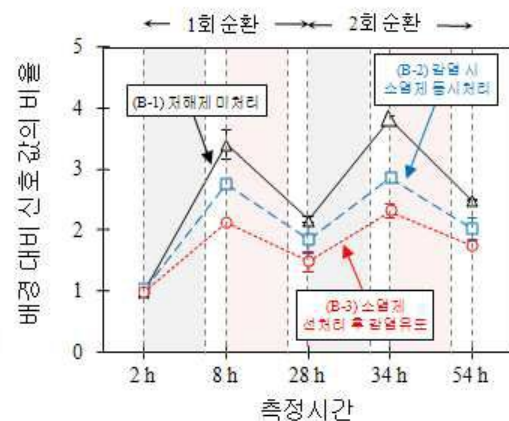
본 발명은 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법, 염증 또는 암 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 키트에 관한 것으로, 동물세포의 세포막 수용체를 염증 및 암의 인식 성분으로 이용하여 기존 분석 방법에 비해 보다 특이적으로 체외에서 염증 및 암을 탐지할 수 있으며, 세포친화적이고, 동일 세포상에서 반복적인 측정이 가능하며, 염증 및 암이 유도되어 억제되는 단계를 지속적으로 관찰 가능한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도11

(A) 세포친화적 소염반응 반연속측정 모식도



(B) 2회에 걸친 소염 반연속측정



(52) CPC특허분류

G01N 33/5011 (2013.01)

G01N 33/533 (2013.01)

G01N 33/535 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 세포막 수용체를 갖는 동물세포가 배양된 배지에 염증 또는 암 유도 인자를 처리하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계 후에, 상기 배지에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하는 단계;
- (3) 상기 복합체 처리 후 광학신호를 획득하는 단계; 및
- (4) 상기 획득된 광학신호 분석을 통해 염증 또는 암을 측정하는 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 표지인자는 루미놀(Luminol) 발광체에 의해 광학신호를 발생하는 효소 또는 형광체인 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 광학신호 분석은 냉각 디지털 카메라에 텔레센트릭 렌즈를 장착시킨 탐지기를 이용하는 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 동물세포는 고체표면에 부착성이 있는 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

화학적 세포 고정화 및 세포막 침투성 증가 과정을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 세포막 수용체는 톨-유사 수용체(Toll-like Receptor, TLRs), 이온채널 수용체(Ion channel receptor), G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor), 리셉터 구아닐일 시클라아제(Receptor guanylyl cyclase), 리셉터 티로신 키나아제(Receptor tyrosine kinase, RTK), 사이토카인 리셉터 슈퍼패밀리(Cytokine receptor superfamily), 티로신 포스파타아제(Tyrosine phosphatases) 및 세린/트레오닌 프로테인 키나아제(Serine/threonine protein kinases)로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법.

청구항 7

- (1) 염증 유도인자 또는 암 유도인자를 세포막 수용체를 갖는 동물세포에 처리하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계 후에 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하고, 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정하는 단계;

- (3) 상기 농도 측정 후에 소염제 또는 항암제 후보물질을 상기 동물세포에 처리하는 단계; 및
- (4) 상기 (3) 단계 후에 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하고, 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정하는 단계를 포함하며,
- 상기 (2) 단계 및 (4) 단계에서 측정된 세포막 수용체의 발현 농도를 비교하여 소염제 또는 항암제를 선별하는 것을 특징으로 하는, 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 8

- (1) 소염제 또는 항암제 후보물질을 세포막 수용체를 갖는 동물세포에 처리하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계 후에, 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하는 단계;
- (3) 상기 탐지체-표지인자 복합체를 처리한 후에, 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정한 후, 염증 유도인자 또는 암 유도인자를 상기 동물세포에 처리하는 단계; 및
- (4) 상기 (3)단계 후에, 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하고 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정하는 단계를 포함하며,
- 상기 (3) 단계 및 (4) 단계에서 측정된 세포막 수용체의 발현 농도를 비교하여 소염제 또는 항암제를 선별하는 것을 특징으로 하는, 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 9

청구항 7 내지 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 탐지체는 항체, 결합 단백질, 핵산, 아타머(Aptamer) 및 펩티드로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 10

청구항 7 내지 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표지인자는 형광체, 발광체, 효소, 금속입자, 플라스틱 입자 및 자성입자로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 11

청구항 7 내지 8 중 어느 한 항에 있어서,

반연속적으로 스크리닝 가능한 것을 특징으로 하는, 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 12

세포막 수용체를 갖는 동물세포 및 상기 세포막 수용체에 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 포함하는 염증 또는 암 진단용 조성물.

청구항 13

청구항 12의 진단용 조성물을 포함하는 염증 또는 암 진단 키트.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법, 염증 또는 암 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 해마다 전 세계적으로 많은 수의 동물들이 인간을 위한 실험에 사용되고 있다. 쥐, 기니피그 등의 설치류부터 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 침팬지 등 다양한 종류의 동물이 의료산업이나 신약 개발은 물론, 학교, 군사시설, 산업시설, 화장품과 생활 용품 등 사회 전반에 걸쳐 이루어지는 실험을 위해 희생된다. 많은 동물실험이 단순한 지적 호기심 충족, 법적 소송에 대한 방어 수단, 또는 경비 절감 등을 이유로 대체실험법이 있음에도 불구하고 윤리적 고려 없이 행해지고 있으며, 그 중 화장품에 대한 동물실험이 가장 대표적인 예이다.
- [0003] 현재는 동물을 이용하지 않는 대체실험의 개발로 인해 동물실험으로만 가능했던 화장품의 안전성을 검증하는 일을 보다 적은 비용으로 더 빠르고 정확하게 진행하고 있다. 그 예시로 토끼의 눈에 반복적으로 약물을 투여했던 안점막 테스트는 유정란을 사용해 혈관의 변화를 평가해 자극 정도를 판단하는 HET-CAM 테스트나 인공 모델을 사용하는 테스트 등으로 대체되었다. 그러나 이와 같이 일회성에 한정시키는 검사법의 경우 대체실험방안들이 있긴 하지만, 여전히 반복적인 투여를 통해 얻어지는 효능이나 독성을 확인하기에는 문제점이 있기 때문에 동물을 이용한 실험이 여전히 선행되고 있다. 또한 화장품과 같은 기능성 제품이 아닌 생사에 관련된 제약분야의 제품의 경우, 인간에게 적용되는 임상실험 전에 동물을 이용한 임상실험이 반드시 수행되어야만 한다. 하지만 동물실험이 선행된 경우라도, 동물과 인간 간의 서로 다른 면역체계에 기인한 면역거부반응 등의 문제점이 여전히 대두되고 있다. 따라서 이와 같은 문제점을 해결 가능한 대체실험방안들의 개발이 매우 시급한 실정이다.
- [0004] 최근 들어 대상물질 분석방법의 핵심 감지체로 사용되던 유전자 또는 항체를 대신해 인간 세포와 동물세포를 이용하여 균, 독소, 환경호르몬 및 유해화합물 등의 분석물질을 탐지할 수 있는 동물세포 기반 바이오센서의 개념이 새롭게 대두되고 있다. 세포를 이용한 바이오센서의 특징은 살아있는 세포를 통해 외부로부터 열, 화학물질, 충격, 감염 등의 자극에 대한 세포의 생리학적인 반응을 관찰할 수가 있다는 점이다. 이런 생리학적인 반응을 통해 세포의 물질대사(cellular metabolism), 세포독성에 대한 세포의 응답(cytotoxic responses) 및 약물의 생리학적인 이용 효능(bioavailability) 등과 같은 유용한 정보를 얻을 수 있음이 보고 되고 있다. 또한 이러한 특징은 대사작용에 의해 순환되기 때문에 지속적으로 생명반응을 관찰하기에 매우 적합하다.
- [0005] 따라서 동물세포 기반의 바이오센서 기반기술은 식품 분야뿐만 아니라, 농업, 국방, 수산 및 축산 등과 같은 환경분야로 확대시킬 수 있는 장점을 가지고 있으며, 특히 화장품과 제약분야 같이 동물실험을 수행하는 분야에서는 실험동물을 대체하기 위한 도구로써 각광받고 있다(Asphahani and Zhang 2007).
- [0006] 하지만 현재까지의 세포 기반 바이오센서 동향은 대부분 외부자극에 대한 세포의 대사 및 형태 변화로부터 야기되는 전기적인 신호변화 또는 pH 변화를 감지하거나, 세포 내외로 분비되는 화학물질 및 효소를 발색, 발광시킴으로써 얻어지는 신호를 감지하는 기술들이 보고되고 있다. 따라서 현재까지 개발된 세포기반의 분석방법은 외부 자극에 대한 세포의 물리적 또는 화학적인 반응에 국한하기 때문에 특이성이 낮고, 적용 가능한 응용분야가 매우 한정적이다.
- [0007] 염증은 생체 조직이 손상을 입었을 때 체내에서 일어나는 방어적 반응으로 외상이나 화상, 세균 침입 따위로 몸의 한 부위에 충혈, 부종, 발열, 통증을 일으키는 증상이다. 최근 들어 염증반응이 암과 노화촉진, 그리고 만성적인 염증성 알러지 질환(천식, 류마티스관절염, 알츠하이머)과 밀접하게 연결되어있다는 연구결과가 다수 보고되고 있어, 체내의 염증반응을 연속적으로 측정하고 제어하는 연구(염증억제), 그리고 이를 치료하는 방법들이 큰 관심을 받고 있다.
- [0008] 기존에 사용 중이던 염증관찰 방법들은 염증성 매개체들의 발현량 변화를 확인하는 방법과 염증반응을 유도하는 전사조절인자인 NF- κ B의 활성을 확인하는 방법이 있다.
- [0009] 염증성 매개체들의 발현량 변화를 확인하는 방법으로는 PCR을 이용해 mRNA의 발현수준을 확인하는 방법, 방사선 동위원소가 포함된 유도체와의 경쟁반응을 통해 확인하는 방법, 화학반응 혹은 Fura2-AM과 같은 형광체를 이용하여 nitric oxide 혹은 cytoplasmic calcium concentration를 측정하는 방법 등이 있다. 또한 염증반응을 유도하는 전사조절인자인 NF- κ B의 활성을 확인하는 방법으로는 유전자 부착활성 검사, NF- κ B의 존재위치(세포질 혹은 핵막 내부)에 따른 활성검사, 사이토카인(cytokine)에 대한 면역분석 등이 있다.
- [0010] 사이토카인을 측정하는 방법을 제외한 나머지 방법들은 세포를 파괴하거나 계면활성제 및 화학시약처리를 통해 세포 손상을 유발하여 일회성으로만 염증을 관찰 가능하다. 또한 세포에서 배출되는 NO의 농도를 측정하는 방법의 경우 측정민감도가 낮으며, 세포 내부의 칼슘농도를 측정하는 방법은 염증반응에만 특이적이지 않다. 따라서 보다 특이적이면서 연속적으로 염증반응 관찰하는 대체 측정법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Asphahani, F., Zhang, M., 2007. Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection. The Analyst 132(9), 835-841.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 감염을 통해 유발되는 염증을 동물세포의 세포막 수용체를 활용하여 탐지함으로써, 체외에서 염증을 유도하고 이를 간편하게 분석할 수 있는 바이오센싱 방법 및 동물세포를 이용한 염증 진단시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한 이를 활용하여 체내에서 염증반응을 억제하는 기작을 유도하는 방법과 이를 반연속적으로 측정하기 위한 세포친화적인 면역분석방법, 이를 측정하기 위한 광학측정기기, 그리고 이를 활용하는 대표적인 소염제 스크리닝 방법을 추가적으로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,
- [0014] (1) 세포막 수용체를 갖는 동물세포가 배양된 배지에 염증 또는 암 유도 인자를 처리하는 단계;
- [0015] (2) 상기 (1) 단계 후에, 상기 배지에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하는 단계;
- [0016] (3) 상기 복합체 처리 후 광학신호를 획득하는 단계; 및
- [0017] (4) 상기 획득된 광학신호 분석을 통해 염증 또는 암을 측정하는 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 세포막 수용체를 갖는 동물세포 및 상기 세포막 수용체에 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 포함하는 염증 또는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 포함하는 염증 또는 암 진단 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은 동물세포의 세포막 수용체를 감염 및 염증의 인식성분으로 이용하여 기존 분석방법에 비해 보다 특이적으로 체외에서 감염 및 염증을 탐지할 수 있다. 또한 세포친화적으로 감염 및 염증을 측정하기 때문에 동일세포 상에서 반복적인 측정이 가능하고, 이를 활용하여 염증이 유도되는 단계부터 억제되는 단계를 지속적으로 관찰 가능하다.
- [0022] 또한, 본 발명의 동물세포를 이용한 바이오센싱 방법을 통해 상기 발명에서 제시한 바와 같이 염증을 치료하는 신약 스크리닝 시스템에 적용 가능할 뿐만 아니라 반연속적으로 반복 감염 및 염증 그리고 소염을 측정 가능하기 때문에 연구가 지속될 경우 실험동물을 이용한 임상실험을 대체 가능하다.
- [0023] 또한 본 발명에서 사용된 세포주를 대신하여 사람에게서 추출한 초대세포(primary cell)를 활용하여, 약을 선별하는 과정을 진행하면 현재 분자 진단 영역에만 국한되어 있는 개개인에 따른 맞춤형 의약품개발 분야에도 적용이 가능하다.
- [0024] 그 외에도 수질 오염물질 탐지 시스템, 독성물질 탐지 시스템, 축산농가에서의 바이러스 탐지 시스템, 생물공정 모니터링 시스템, 식품 생산공정 모니터링 시스템 등 산업 전반에서 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 박테리아 침입을 통해 세포가 감염되는 과정(A)과 이러한 감염과정을 동물세포를 기반으로 체외에서 유도하고 이를 측정하는 모델(B)을 나타낸 그림이다.

도 2는 동물세포 기반의 감염유도 체외모델의 적용가능성을 확인하기 위해 쥐유래 대식세포인 RAW264.7 세포주에 식중독유발균인 *Shigella sonnei*를 감염시켜 세포표면에 존재하는 감염에 대한 수용체인 TLR2의 단백질 수준(A)과 유전자 수준(B)의 변화, 그리고 대표적인 감염마커인 사이토카인(TNF- α 와 IL-6)의 분비량의 변화(C, D)를 측정하여 비교분석한 것이다.

도 3은 TLR 조절기작을 통해 염증을 연속적으로 관찰하는 모델이다.

도 4는 TLR1 조절기작을 통해 제한적으로 염증을 반연속적으로 관찰한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 동일세포에 대해 반연속적으로 염증을 관찰하기 위해, 세포를 과쇄하는 세포고정화 과정을 배제한 TLR 면역분석결과(A)와 세포고정화 과정이 포함된 TLR 면역분석결과(B)를 비교한 그래프이다.

도 6은 세포친화적으로 염증신호를 검출하기 위한 광학측정기기(A)와 측정된 광학신호 값을 분석하는 처리방법(B), 그리고 이를 통해 세포가 손상 없이 배양되는 모습(C)을 제시한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 동일세포에 대한 세포친화적인 염증 연속측정 모델(A)과 이를 통해 2회에 걸친 염증유도를 관찰한 결과(B)를 나타낸 그래프이다.

도 8은 동일세포에서 3회에 걸쳐 염증반응을 유도하고, 이러한 반응을 TLR 면역분석법(A)과 사이토카인 측정법(B)을 통해 측정한 그래프이다.

도 9는 NF- κ B 신호전달과정을 통해 염증신호가 전달되는 모식도(A,B)와 해당기전을 활용한 염증억제 전략(C)을 나타낸 구성도이다.

도 10은 도 9에서 제시된 소염모델을 증명하고자, NF- κ B 활성저해제인 CAPE와 sodium salicylate 그리고 진통해열제인 acetaminophen을 처리하여 소염을 유도한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 동물세포에서 세포친화적으로 소염반응을 반연속적으로 측정하는 방법(A)과 그에 대한 실험결과(B)를 나타낸 그래프이다.

도 12는 동물세포를 통해 세포독성과 약효 지속성을 검사하는 방안을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

세포의 면역계는 각각 기능과 역할이 다른 선천성(innate)과 적응성(adaptive) 면역계로 나누어진다. 톨-유사 수용체(Toll-like Receptor, TLR)는 선천성 면역계를 담당하는 세포막 수용체로서, 감염 후 즉각적으로 활성화되어 감염 미생물의 증식을 재빨리 조절할 수 있으므로 림프구가 감염을 담당할 때까지의 감염 초기를 담당한다. 최근 인체의 방어 기전에서 선천성 면역계가 매우 중요하며, 근본적 기능을 한다는 것이 점차 분명해지고 있으며 선천성 면역계의 상호작용과 적응성 면역계에 대한 선천성 면역계의 조절 기능이 더욱 중요한 임상적 의미를 갖게 되었다.

[0027]

이중에서도 TLR과 같은 세포막 수용체들은 미생물들만 보유하고 있는 특이한 병원체연관 분자패턴(pathogen associated molecular patterns(PAMPs))을 인식해 염증성 사이토카인을 포함하는 다양한 종류의 면역반응 유전자를 표현하도록 유도하는 신호전달 경로를 활성화하는 것으로 알려져 있다. 이러한 신호전달 경로는 세포막 수용체들의 발현량을 증가시키기 때문에 수용체들의 발현량을 통해 염증 신호전달 경로가 활성화되었는지를 간접적으로 확인 가능하며, 이러한 신호전달 경로를 활용할 경우 사이토카인 측정방법에서와 같이 염증반응을 억제하는 소염제 후보군들의 선별이 가능하다.

[0028]

또한 세포막 수용체들은 체내의 조절기작에 의해 자극의 세기에 따라 발현되는 양이 증가하거나 감소하기 때문에 이를 측정 마커로 활용할 경우, 체내에서 연속적으로 일어나는 대사작용을 지속적으로 관찰할 수 있다. 따라서 사이토카인 분비 혹은 세포막 수용체 발현을 기반으로 하는 바이오센서는 체내에서 발생하는 염증반응의 측정이 가능할 뿐만 아니라, 이에 대한 연속적인 관찰이 가능하기 때문에 염증이 유도되었다가 억제되는 소염기작의 관찰 및 이를 통한 소염제의 성능평가가 가능하다. 또한 체내의 조절기작을 활용할 경우, 반복적인 염증유도와 그에 대한 반복적인 소염제 처리를 통해 동물세포의 연속적인 반응관찰이 가능하게 된다. 따라서 기존에 개발되어 사용중인 일회성에 한정된 검사법에서는 불가능한 소염제 반복투여를 통한 효능이나 독성을 확인하는 실험 등을 실시하는 것이 가능하게 된다.

[0029]

더 나아가, TLR에 대한 agonist를 활용하여 선천성 면역계를 활성화시킬 때 암이 억제된다는 연구결과와 antagonist를 활용하여 선천성 면역계의 활성을 저하시킬 때는 알츠하이머와 류마티스 관절염을 포함한 만성염

중 억제효과가 있다는 연구결과가 다수 보고되고 있다. 따라서 선천성 면역계의 활성을 조절에 주요인자인 TLR 연구를 지속할 경우 새로운 타입의 항암제와 항염증제의 개발 가능성이 있다.

[0030] 또한 본 발명에서 사용된 세포주를 대신하여 사람에게서 추출한 조대세포(primary cell)를 활용하여, 약을 선별하는 과정을 진행하면 현재 분자진단영역에만 국한되어 있는 개개인에 따른 맞춤형 의약품개발 분야에도 적용이 가능하다.

[0031] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명은 체외에서 염증의 측정을 가능하게 하고자 감염원이 동물세포가 배양된 배지에 접촉되는 단계와 염증 억제물질을 감염된 동물세포에 처리하는 단계, 상기 동물세포의 세포막 수용체가 표지인자가 부착된 탐지체와 반응되는 단계, 그리고 상기 세포막 수용체가 회복되는 과정을 동일 동물세포에서 표지인자가 부착된 탐지체를 통해 확인하는 단계가 포함되는 면역분석방법, 염증 및 암 억제 물질을 선별하는 방법, 그리고 이를 측정하는 광학측정기기를 제공한다.

[0033] 보다 상세하게 본 발명은,

[0034] (1) 세포막 수용체를 갖는 동물세포가 배양된 배지에 염증 또는 암 유도 인자를 처리하는 단계;

[0035] (2) 상기 (1) 단계 후에, 상기 배지에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하는 단계;

[0036] (3) 상기 복합체 처리 후 광학신호를 획득하는 단계; 및

[0037] (4) 상기 획득된 광학신호 분석을 통해 염증 또는 암을 측정하는 것을 특징으로 하는 세포친화적인 면역분석방법을 제공한다.

[0038] 상기 세포막 수용체는 일례로서 TLR일 수 있는데, 살아있는 세포의 TLR 발현(expression) 변화를 연속적으로 탐지하기 위해서는 세포 손상을 유발하는 화학적 세포 고정화와 세포막 침투성 증가과정을 배제시킨 새로운 세포 면역분석방법의 고안이 필요하였다. 일반적인 세포 기반의 면역분석법은 포르말데히드(formaldehyde)를 통해 세포를 플레이트(plate)의 바닥에 고정시키는 과정과 detergent(Tween20 or Triton X-100)를 통해 세포 외막에 구멍을 뚫어 대상 마커에 대한 항체의 접근성을 향상시키는 과정이 포함된다. 이와 같은 과정들은 사용되는 화학시약들의 특성에 의해 세포가 손상되어 세포사멸로 이어지게 된다.

[0039] 상기 동물세포는 고체 표면에 부착성이 있는 것일 수 있는데, 일례로서 플레이트(plate) 표면에 부착되어 생장하는 세포주로서 폐상피세포주인 A549일 수 있다. 이는 추가적인 고정화 과정이 없이 배양이 가능한 세포이다. 또한 면역분석에 사용되는 세포막 수용체 TLR에 대한 특이항체는 세포막 외부에 존재하는 TLR의 특정부분을 결합 자리(binding site)로 인식하여 결합하기 때문에 세포막을 훼손시켜 침투성을 증가시키지 않아도 면역반응이 유도된다. 따라서 본 발명자는 세포 손상을 가져오는 두 가지 과정을 배제시킨 방법을 고안할 수 있었고 따라서 세포친화적인 면역분석방법을 제공할 수 있다.

[0040] 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법은 일실시예로서 항체가 포함된 배양액을 공급할 때 필요한 세척과정을 3번으로 제한하여 파이프팅(배양액 공급기기)에 의한 전단 응력(shear stress)을 최소화하고자 하였고, 10% FBS가 포함된 세포배양액을 버퍼(buffer)로 활용하여 면역반응 동안 세포에 영양분 공급이 원활하게 되도록 하였다. 이때 포함된 FBS는 면역반응에서 비특이한 신호를 감소시키는 역할을 동시에 수행하기 때문에 추가적인 차단제(blocking agent)가 필요하지 않았다. 단 이때 적용되는 항체 농도는 기존의 면역분석법보다 2배 높은 농도를 활용해야 한다.

[0041] 상술한 세포친화적인 면역분석방법은 동일세포에서 반연속적으로 염증과 소염 반응 등을 관찰하기 위한 방안으로 이용될 수 있으며, 후술하는 본 발명의 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법에 이러한 면역분석방법의 설명을 동일하게 적용할 수 있다.

[0042] 상기 면역분석방법은 세포의 손상을 최소화하기 위해 상기 (1) 단계의 동물세포에 화학처리를 통한 고정화를 실시하지 않으며, 이후 표지인자가 부착된 탐지체를 결합시킨다. 이후, 세포 안정화를 도모하는 FBS가 포함된 배

양액을 통해 세척을 하는 과정을 포함할 수 있다. 이때, 상기 표지인자는 특별히 한정하지 않으나 일례로서 루미놀(Luminol) 발광체에 의해 광학신호(이하 '광신호'라고도 함)를 발생하는 효소일 수 있다. 즉, 상기 세척 과정 후에 발광체, 일례로서 루미놀을 첨가하여 광학신호를 획득할 수 있다. 상기 발광체는 약 3 분 이하의 매우 짧은 시간 동안 첨가하는 것이 바람직하다.

[0043] 살아있는 세포의 TLR 발현(expression) 변화를 연속적으로 탐지하기 위해서는 세포 손상을 유발하는 화학적 세포 고정화와 세포막 침투성 증가과정을 배제시킨 새로운 세포 면역분석방법의 고안이 필요하였다. 일반적인 세포 기반의 면역분석법은 포르말데히드(formaldehyde)를 통해 세포를 플레이트(plate)의 바닥에 고정시키는 과정과 detergent(Tween20 or Triton X-100)를 통해 세포 외막에 구멍을 뚫어 대상 마커에 대한 항체의 접근성을 향상시키는 과정이 포함된다. 이와 같은 과정들은 사용되는 화학시약들의 특성에 의해 세포가 손상되어 세포사멸로 이어지게 된다.

[0044] 본 발명에서 도입된 폐상피세포주인 A549는 플레이트(plate) 표면에 부착되어 성장하는 세포주로서, 추가적인 고정화 과정이 없이 배양이 가능한 세포이다. 또한 면역분석에 사용되는 TLR에 대한 특이항체는 세포막 외부에 존재하는 TLR의 특정부분을 결합 자리(binding site)로 인식하여 결합하기 때문에 세포막을 훼손시켜 침투성을 증가시키지 않아도 면역반응이 유도된다. 따라서 본 발명자는 세포 손상을 가져오는 두 가지 과정을 배제시킨 면역분석방법을 고안하였으며, 이러한 세포친화적인 면역분석법의 적용가능성을 확인하고자 기존의 면역분석법과 동시에 실험을 진행하여 TLR의 반응성을 비교하였다.

[0045] 도 5는 동일세포에 대해 반연속적으로 염증을 관찰하기 위해, 세포를 과쇄하는 세포고정화 과정을 배제한 TLR 면역분석결과(A)와 세포고정화 과정이 포함된 TLR 면역분석결과(B)를 비교한 것이다. 그 결과 세포고정화 과정을 배제한 경우에서도 TLR 분석이 가능하며, 해당 조건에서의 배경 대비 신호 값의 비율이 세포고정화 과정을 포함한 조건보다 더 높은 것을 확인하였다.

[0046] 도 5에서와 같이 100배 희석시킨 세포 분쇄액을 4시간 동안 반응시킨 이후, 세포 면역분석을 실시할 경우(A), 기존의 면역분석을 실시한 경우(B) 대비 signal-to-noise ratio값이 25% 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과 값의 차이는 낮은 배경신호 값에 의한 것으로, 이러한 배경신호를 유발하는 것은 세포를 고정화시킬 때 사용되는 포르말데히드(formaldehyde) 시약이다. 포르말데히드 시약은 단백질과 그 주변에 위치한 다른 단백질 혹은 DNA와의 교차 결합을 유도하는 화학 링커(chemical linker)로서, 일부 단백질 잔기들의 형태를 변형시킨다. 이와 같이 변형된 단백질들은 TLR 항체와의 비특이적인 결합을 유도하며, 이를 통해 높은 배경신호 값을 나타낸다. 하지만 세포친화적인 면역분석법의 경우 이러한 시약을 분석과정에서 배제하였기 때문에 낮은 배경신호를 얻게 되었으며, 이를 통해 상대적으로 높은 signal-to-noise ratio값을 지닌다.

[0047] 추가적으로 세포의 손상 없이 TLR을 측정하고자, horseradish peroxidase(HRP)의 광기질 촉매반응을 이용하여 신호를 생성하는 기술을 도입하는 것도 가능하다. 앞서 서술된 발명조건에서 사용된 발색면역분석법은 탐지항체에 중합되어 있는 효소인 HRP를 통해 환원제인 과산화수소가 기질인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)을 산화시키는 작용을 촉진시켜 색상이 변하는 원리를 이용한다. 이와 같은 원리는 분석시료 내의 대상물질의 존재 여부를 확인하는 방법으로 널리 사용된다. 하지만 기질의 경우 시간이 지남에 따라 반응과 상관없이 지속적인 산화작용이 발생하기 때문에 적절한 시간(효소에 의한 반응이 포화되는 시점)에서 효소반응을 정지(황산과 같은 강산을 처리함)시켜야 한다. 이와 같은 과정은 누적되어 발생하는 배경신호의 증가를 방지하는 역할을 한다. 하지만 반응정지를 위해 사용되는 시약들은 강한 산성을 지니기 때문에 세포의 손상이 유발된다.

[0048] 도 6은 세포친화적으로 염증신호를 검출하기 위한 광학측정기기(A)와 측정된 광학신호 값을 분석하는 처리방법(B), 그리고 이를 통해 세포가 손상 없이 배양되는 모습(C)을 제시한 결과이다.

[0049] 즉, 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법에서, 획득된 광학 신호 분석을 위해 광학측정기기를 이용할 수 있으며, 상기 광학측정기기는 냉각 디지털 카메라(cooled-CCD)에 텔레센트릭(telecentric) 렌즈를 부착하여 원근감과 초점을 조절하도록 설계할 수 있다(A). 상술한 광학측정기기는 냉각 디지털 카메라(cooled-CCD)와 텔레센트릭(telecentric) 렌즈를 기반으로 구축하였지만, 이는 본 발명의 기술적 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0050] 상기 광학측정기기를 통해 촬영된 세포 영상(B-1)은 염증 정도에 따라 발광하는 빛의 세기가 다르기 때문에(B-2, B-3), 상용화된 프로그램을 통해 빛의 밀도차이를 수치 값으로 환산하여 그래프로 작성하였다(B-4). 또한 현미경을 통한 세포관찰을 통해 발광신호검출방법 기반의 염증면역분석이 세포 손상을 유도하지 않는다는 결과를 얻을 수 있었다(C-1, C-2, C-3). 반면에 기존에 사용되었던 발색기반의 염증면역분석법은 세포의 손상을 유도하여 세포가 유실되는 결과를 얻었다(C-4). 이와 같은 현상은 도 6의 (C)에서와 같이 현미경을 통해서도 쉽게 관

찰 가능하다(도 6).

- [0051] 따라서 본 발명에서는 다른 종류의 기질을 선별하여 세포의 손상 없이 신호를 생성하는 발광기술을 도입하게 되었다. 루미놀(Luminol)은 산화작용을 통해 광을 생성하는 발광체로서, pH 8.5에서 최적의 반응성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 루미놀(Luminol) 발광체는 250 내지 1000 μ M 농도 수준에서 poly(ADP-ribose) polymerase 활성을 저해한다고 알려져 있지만, 이는 염증과 관련된 TLR의 발현에는 관여하지 않는다. 또한 발광 반응 시 사용되는 루미놀의 양은 극소량(60 pM)이기 때문에 세포 손상 및 변형을 유발할 가능성이 적을 것으로 예상된다.
- [0052] 부가적으로 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발하는 것으로 알려진 환원제인 과산화수소의 경우, 세포에 매우 짧은 시간 (3분 이내) 노출시키고, HRP의 촉매반응에 의해 기질과 매우 빠르게 반응하여 H_2O 로 변환되기 때문에 세포 손상을 유도할 가능성은 매우 희박하다. 실제로 도 6의 (C)와 같이 현미경과 Janus green B method(미토콘드리아 염색법)를 통해 발광시약과 반응한 이후의 세포활성(C-3)을 측정한 결과 정상세포(C-1, C-2)와 동일한 것으로 확인되었다.
- [0053] 나아가, 본 발명에서는 톨-유사 수용체(TLRs)와 같은 세포막 수용체와 결합되는 탐지체에 효소를 이용한 효소면역분석법의 다단계 절차가 아닌, 형광체 및 양자점(Quantum dot) 등의 표지를 통하여 실시간 세포막 수용체의 모니터링을 구현하여 감염을 인지하는데 소요되는 시간을 더욱 단축시킬 수 있다.
- [0054] 즉, 상기 탐지체에 표지인자인 형광체 및 양자점을 화학적 방법을 통해 상호결합을 시킨 후, 동물세포가 배양된 곳에 감염원 접종 전 미리 최적화된 양을 첨가하여 준다. 접종 초기에는 상기 탐지체와 표지인자는 동물세포의 세포막 수용체와 반응을 거의 하지 않지만, 감염원 접종 후 시간이 지남에 따라 세포 표면에 발현되는 세포막 수용체에 비례하여 탐지체의 결합이 증가하게 된다. 기존 효소면역분석에서는 단계별로 세척을 하여 미반응 탐지체의 제거가 필수적으로 요구되었다. 그러나 형광체 및 양자점 등을 이용한 복합체의 적용 시에는 세척/분리 등의 공정이 없이 특정 파장대의 빛을 지속적으로 조사하여 세포막 수용체와 결합된 탐지체의 형광체 및 양자점 등을 여기(excitation)시킨다. 이로써 감지되는 형광신호를 측정하여 추가적인 탐지체를 이용하지 않고도 실시간으로 세포막 수용체의 변화를 감지할 수 있는 시스템을 구축할 수 있다. 따라서, 감염원의 접종만으로도 세포막 수용체인 톨-유사 수용체(TLRs) 등의 발현 양상을 실시간으로 관찰하는 것이 가능하게 됨으로써, 기존의 복잡한 식중독 발병 박테리아 등의 분석법을 동물세포를 기반으로 한 분석방법으로 변화시킬 수 있다.
- [0055] 상기 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법에서 세포막 수용체는 톨-유사 수용체(Toll-like Receptor, TLRs), 이온채널 수용체(Ion channel receptor), G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor), 리셉터 구아닐 일 시클라아제(Receptor guanylyl cyclase), 리셉터 티로신 키나아제(Receptor tyrosine kinase, RTK), 사이토카인 리셉터 슈퍼패밀리(Cytokine receptor superfamily), 티로신 포스파타아제(Tyrosine phosphatases) 및 세린/트레오닌 프로테인 키나아제(Serine/threonine protein kinases)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하며, 상기 톨-유사 수용체는 톨-유사 수용체 1(TLR 1), 톨-유사 수용체 2(TLR 2) 및 톨-유사 수용체 4(TLR 4)로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게 상기 세포막 수용체는 톨-유사 수용체(Toll-like Receptor, TLRs)일 수 있다.
- [0056] 상기 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법에서 상기 탐지체는 동물세포의 표면에서 발현되는 세포막 수용체와 결합하며, 탐지체에 부착되는 표지인자에 의하여 세포막 수용체의 발현 정도를 확인할 수 있고, 궁극적으로 감염원으로부터 동물세포가 감염되어 염증 반응이 일어나는지 여부를 확인할 수 있는 역할을 한다. 이때, 상기 탐지체는 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합되는 항체, 결합 단백질, 핵산, 앵타머(Aptamer) 및 펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다. 상기 탐지체는 보다 바람직하게는 항체일 수 있다.
- [0057] 상기 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법에서 상기 표지인자는 탐지체에 부착되어 상기 탐지체의 세포막 수용체에 대한 결합 여부를 나타내는 물질로, 형광체, 발광체, 효소, 금속입자, 플라스틱 입자 및 자성입자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 효소 또는 형광체일 수 있다. 구체적으로 상기 형광체는 FITC(fluorescein isothiocyanate:황녹색 형광), TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate:적등색 형광), 양자점 (Quantum dot) 등이 있고, 상기 발광체는 디페닐옥살레이트(Diphenyl oxalate, Cyalume), 루미놀(Luminol), 루시페린(Luciferin) 등이 있고, 상기 효소는 퍼옥시다아제(Peroxidase, Horseradish(서양고추냉이) 등), 산성포스파타아제(acid phosphatase), 알칼리성포스파타아제(alkaline

phosphatase), 글루코오스옥시다아제(glucose oxidase) 등이 있고, 상기 금속입자는 콜로이드골드(colloidal gold) 등이 있고, 상기 플라스틱 입자는 라텍스 비드(Latex bead) 등이 있고, 자성입자는 철 산화물 나노입자 등이 있으며, 이에 한정하는 것은 아니다.

또한 본 발명은

- (1) 염증 유도인자 또는 암 유도인자를 세포막 수용체를 갖는 동물세포에 처리하는 단계;
 - (2) 상기 (1) 단계 후에, 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하고, 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정하는 단계;
 - (3) 상기 농도 측정 후에 소염제 또는 항암제 후보물질을 상기 동물세포에 처리하는 단계; 및
 - (4) 상기 (3) 단계 후에, 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하고, 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정하는 단계를 포함하며,
- 상기 (2) 단계 및 (4) 단계에서 측정된 세포막 수용체의 발현 농도를 비교하여 소염제 또는 항암제를 선별하는 것을 특징으로 하는, 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 스크리닝 방법은, 동물세포에 염증 또는 암 유도인자를 처리하는 단계가 선행되며, 이후 소염제 또는 항암제 후보물질을 처리한다.

즉, 일례로서 염증 유도인자로 염증을 유도하고, 이를 통해 발현된 세포막 수용체의 농도를 탐지체-표지인자 복합체를 통해 측정한다. 이후 소염제 후보물질로서 sodium salicylate를 처리하고, 발현된 세포막 수용체의 농도를 탐지체-표지인자 복합체를 통해 측정한다. 상기에서 얻어진 세포막 수용체의 발현 농도 두 가지를 비교하여 소염제를 선별 가능하다.

또한, 본 발명은

- (1) 소염제 또는 항암제 후보물질을 세포막 수용체를 갖는 동물세포에 처리하는 단계;
 - (2) 상기 (1) 단계 후에, 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하는 단계;
 - (3) 상기 탐지체-표지인자 복합체를 처리한 후에, 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정한 후, 염증 유도인자 또는 암 유도인자를 상기 동물세포에 처리하는 단계; 및
 - (4) 상기 (3) 단계 후에, 상기 동물세포에 상기 세포막 수용체와 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 처리하고 상기 세포막 수용체의 발현 농도를 측정하는 단계를 포함하며,
- 상기 (3) 단계 및 (4) 단계에서 측정된 세포막 수용체의 발현 농도를 비교하여 소염제 또는 항암제를 선별하는 것을 특징으로 하는, 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 스크리닝 방법은, 동물세포에 소염제 또는 항암제 후보물질을 처리하는 단계가 선행되며, 이후 염증 또는 암 유도인자를 처리하는 단계를 진행한다.

즉, 일례로서 소염제 후보 물질인 sodium salicylate를 동물세포에 처리하고, 상기 동물세포에 탐지체-표지인자 복합체를 처리하여 이를 통해 발현된 세포막 수용체의 농도를 측정한다. 이후 염증 유도인자를 동물세포에 처리하여 염증을 유도한 뒤, 탐지체-표지인자 복합체를 처리해 발현된 세포막 수용체의 농도를 측정한다. 상기에서 얻어진 세포막 수용체의 발현 농도 두 가지를 비교하여 소염제를 선별 가능하다.

상술한 설명에서 알 수 있듯이 소염제 또는 항암제 후보 물질 처리 시기를 달리함으로써, 후보 물질 처리 시기에 따른 소염 또는 항암 작용의 정도를 확인할 수 있다.

- [0075] 상술한 본 발명의 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법에서 세포막 수용체, 탐지체 및 표지인자의 종류는 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법의 설명을 동일하게 적용할 수 있다.
- [0076] 또한, 상술한 본 발명의 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법에서 동물세포는 배지에서 배양되는 것일 수 있다.
- [0077] 또한, 상술한 본 발명의 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법에서 상기 세포막 수용체의 발현 농도 측정은 광학신호를 획득하고, 상기에서 획득된 광학 신호 분석을 통해 수행 가능할 수 있다.
- [0078] 즉, 상기 세포친화적인 면역분석방법에서 핵심 역할을 하는 세포막 수용체를 이용한 면역분석방법은 기존의 감염원에 대한 면역분석방법에서 주로 이용하였던 디옥시리보핵산(DNA), 항체 등과 같은 특이적인 생체물질을 이용한 것이 아닌, 체내 선천성 면역반응 시스템을 감염 센서로서 직접적으로 이용했다는 점에 그 특징이 있다.
- [0079] 본 발명의 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법은, 동물세포의 세포막 수용체에 특이적이고 친화도가 높은 탐지체를 통해 신속하게 감염원으로부터의 감염 여부를 탐지하는 본 발명의 면역분석방법을 이용함으로써, 소염제 및 항암제의 효능을 판별하기 위한 기존의 복잡한 공정들을 간편화할 수 있다. 또한 세포친화적인 방법의 적용이 가능하므로 염증과정과 소염과정을 동일세포에서 반연속적으로 탐지할 수 있도록 하여, 염증 반응 및 소염 효과가 나타나는 시점, 약효 지속성까지도 분석이 가능하다. 즉, 본 발명의 스크리닝 방법은 기존의 일회성 약효 분석 방법이 아니며, 소염제 또는 항암제의 독성 분석도 가능할 수 있다.
- [0080] 상기 동물세포는 조직에서 분리한 일차세포(primary cell) 또는 세포주(cell line)이며, 상기 일차세포 또는 세포주는 부착형 세포 또는 부유형 세포인 것이 바람직하다. 상기 부착형 세포는 상피세포(epithelial cell), 섬유아세포(fibroblast) 및 내피세포(endothelial cell) 등이 있고, 상기 부유형 세포는 T-세포, B-세포, 수지상세포(dendritic cell), 단구(monocyte) 및 대식세포(macrophage) 등이 있으며, 이에 한정하지 않는다.
- [0081] 상기 소염제는, 본 발명의 일례로서 sodium salicylate와 CAPE를 사용할 수 있으나 이는 단지 예시적인 것일 뿐, 본 발명의 기술적 범위를 한정하는 것은 아니다. 상기 소염제는 염증억제물질로서, 소염 목적으로 새로 개발된 약, 소염 역할이 부가적으로 기대되는 약, 천연물 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0082] 상기 염증유도인자는, 본 발명의 일례로서 활성이 억제된 형태의 병원성 미생물일 수 있으나 이는 단지 예시적인 것일 뿐, 본 발명의 기술적 범위를 한정하는 것은 아니다. 따라서, 상기 염증유도인자는 살아있는 병원성 미생물, 열로 활성을 억제한 병원성 미생물, 고주파로 활성을 억제한 병원성 미생물, 그리고 병원성 미생물에서 분리정제시켜 얻은 병원균-연관 분자패턴으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0083] 본 발명에서 상기 세포막 수용체의 농도 분석으로 설명되는 정량 분석은 통계분석방법(one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc multiple range tests)을 사용할 수 있으며, 유효값인 P-value값의 분포범위에 따라 구별할 수 있다. 예컨대 *** very highly significant ($P < 0.001$), ** highly significant ($P < 0.01$), * significant ($P < 0.05$), No significance (ns) ($P > 0.05$)으로 구분할 수 있다.
- [0084] 또한, 본 발명은 세포막 수용체를 갖는 동물세포 및 상기 세포막 수용체에 특이적으로 결합하는 탐지체-표지인자 복합체를 포함하는 염증 또는 암 진단용 조성물을 제공한다. 상기, 염증 또는 암 진단용 조성물은 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법, 또는 소염제 또는 항암제 스크리닝 방법에 기반하여 제조되는 것일 수 있다.
- [0085] 또한, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 포함하는 염증 또는 암 진단 키트를 제공한다. 상기 염증 또는 암 진단 키트는 동물세포를 수용한 웰 및 표지인자가 부착되어 있고, 동물세포의 세포막 수용체를 탐지할 수 있는 탐지체를 포함하는 것일 수 있다. 즉, 동물세포를 이용한 감염 진단과 염증 및 소염반응을 관찰하는 키트를 제공한다. 이때, 상기 키트는 감염원을 인식하는 포획인식 성분을 더 포함하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0086] 이하, 첨부된 도면을 토대로 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0087] 도 1은 일례로서, 박테리아 침입을 통해 세포가 감염되는 과정(A)과 이러한 감염과정을 동물세포를 기반으로 체외에서 유도하고 이를 측정하는 모델(B)이다. 병원체가 침입하게 되면(A-1), 세포막 수용체인 TLR와 병원체의

PAMP와의 특이결합(A-2)을 통해 염증반응을 유도하는 전사인자인 NF- κ B가 활성화된다(A-3). 활성화된 NF- κ B는 염증반응을 유도하면서 TLR의 발현을 유도(A-4)하거나, 염증유도물질인 사이토카인을 분비시켜(A-5), 이를 재인식하여 염증반응을 지속적으로 유도하거나 주변 세포의 염증반응을 유도한다(A-6). 이와 같은 감염과정을 체외에서 유도하고 측정하는 방법은 다음과 같다(B).

[0088] 한정적인 공간에 고정화시킨 동물세포(감염체)에 감염성병원체를 투입하여 배양한다(B-1). 투입된 감염성병원체는 동물세포 막표면에 존재하는 TLR을 통해 특이적으로 인식되고, 그에 대한 감염신호로서, TLR의 발현량이 증가된다(B-2). 세포막에 발현된 TLR의 농도는 TLR에 대한 특이항체와 효소가 중합된 2차 항체를 순차적으로 반응시켜 측정하며(B-3), 정상세포와의 비교분석을 통해 TLR의 발현량 변화를 확인한다.

[0089] 상기 도 1의 (A)에서 제시한 바와 같이 상기 배지에 감염원을 접종하여 동물세포를 감염시키면 동물세포 표면에 일정량 노출된 세포막 수용체 중 하나인 톨-유사 수용체(TLRs)는 침입한 감염원의 특정 병원체연관 분자패턴(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 부위를 인지하게 되어, 그 결과로서 세포내부로 외부 침입에 대한 경고를 알리는 신호전달이 일어나게 된다.

[0090] 세포 내 신호전달에 의해 활성화된 전사인자 (NF- κ B)는 감염원의 추가적인 자극에 대응하기 위해 동물세포의 톨-유사 수용체(TLRs)와 같은 세포막 수용체의 발현량을 증가시키게 된다. 상기 증가된 세포막 수용체, 즉 일례로서 톨-유사 수용체(TLRs)는 세포 내로 감염에 대한 경고신호를 더욱 강하게 전달하며, 이를 통해 염증반응 유도를 가속화시키게 된다. 감염시간이 경과할수록 해당 감염에 대해 염증반응을 유발하는 톨-유사 수용체(TLRs)가 세포 외막으로 발현되는 양은 지속적으로 증가하게 되는데, 이와 같은 세포반응은 감염원의 세기와 감염시간에 비례하여 일어나게 된다.

[0091] 또한 활성화된 전사인자 (NF- κ B)는 염증관련 유전자의 전사를 통해 전-염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)인 인터루킨-1(Interleukin-1), 종양괴사인자- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터페론- γ (Interferon- γ)등을 세포 외부로 분비하는데, 이들은 다른 세포를 자극하여 추가적인 염증반응을 유도함으로써 다른 세포에서도 톨-유사 수용체(TLRs)의 추가적인 발현을 유발하게 된다.

[0092] 따라서 본 발명에서는 위에서 언급된 감염과정을 체외에서 유도하기 위해 도 1의 (B)와 같이 동물세포를 감염체로 활용하고, 여기에 감염원을 접종하여 감염을 모사하는 동물세포기반의 체외모형을 수립하였다. 해당 모델은 감염을 통해 발현량이 변하는 톨-유사 수용체를 세포막 수용체로 선택하였으며, 선택된 세포막 수용체를 측정하고자 톨-유사 수용체에 대해 특이적인 항체와 효소가 부착된 2차 항체, 그리고 상기 효소에 대한 기질을 순차적으로 반응시켰다.

[0093] 도 2는 동물세포 기반의 감염유도 체외모형의 적용가능성을 확인하기 위해 쥐 유래 대식세포인 RAW264.7 세포주에 식중독유발균인 *Shigella sonnei*를 감염시켜 세포표면에 존재하는 감염에 대한 수용체인 TLR2의 단백질 수준(A)과 유전자 수준(B)의 변화, 그리고 대표적인 감염마커인 사이토카인(TNF- α 와 IL-6)의 분비량의 변화(C,D)를 측정하여 비교 분석한 것이다. 그 결과, 감염원의 농도와 반응시간에 따라 TLR의 발현량이 단백질 수준과 유전자 수준에서 모두 증가되었으며(A, B), 살아있는 감염원을 사용하였을 때 좀 더 강한 신호를 나타냈다(A의 실선 그래프). 두 가지 종류의 사이토카인을 분석할 때도 TLR과 동일한 결과를 얻을 수 있었다((C)와 (D)). 이를 통해 감염유도 체외모형의 적용가능성을 증명할 수 있었다.

[0094] 그 결과, 도 2의 (A)에서와 같이 쥐 유래 대식세포에 식중독균을 일으키는 박테리아인 *S. sonnei*를 처리하여 감염을 유도하였을 경우, TLR2의 발현량이 변화되는 것을 관찰 가능하였다. 박테리아가 접종된 시간에 따라 그리고 접종된 박테리아의 개체 수에 따라 발현되는 TLR2의 수준이 높아졌으며, 이와 같은 결과는 전사조절인자인 NF- κ B에 의해 염증신호가 지속적으로 증가한다는 것을 증명한다. 추가적으로 살아있는 *S. sonnei*를 접종시킨 경우, 세포 배지 내에서 동물세포와 박테리아가 동시에 배양되기 때문에 TLR2의 발현량이 더욱 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0095] 동물세포에서의 단백질의 발현량 변화는 해당 단백질에 대한 전사유전자인 mRNA의 발현량 변화를 통해서도 증명 가능한데, 도 2의 (B)에서와 같이 mRNA의 발현량이 접종시킨 박테리아의 농도에 비례하여 증가되는 것을 확인 가능하였다. 또한 도 2의 (C)와 (D)에서처럼, 감염신호를 통해 활성화되는 전사조절인자인 NF- κ B의 반응산물인 전구염증 사이토카인의 분비량을 측정하였을 때도, 접종시킨 박테리아의 농도와 활성유무 그리고 접종하여 반응시킨 시간에 따라 사이토카인의 분비량이 변화되는 것을 확인하였다. 이를 통해 상기 발명자가 수립한 동물세포 기반의 체외 실험모델이 체내에서와 유사하게 감염을 유도하고, 이를 TLR 면역분석을 통해 관찰가능하다는 사실을 증명할 수 있었다.

- [0096] 도 3은 TLR 조절기작을 통해 염증을 연속적으로 관찰하는 모델이다. 도 1과 2에서 언급한 바와 같이, 체내에 병원체가 침입하면 TLR에 의해 세포 내부로 신호가 전달되며(A-1), 이러한 신호전달을 통해 활성화된 전사조절인사에 의해 사이토카인이 분비되거나(A-2) TLR의 발현량이 증가하게 된다(A-3). 이와 같은 과정은 상향조절(up-regulation)이라 한다(A). 감염원이 제거된 이후, up-regulation 과정을 통해 과발현된 TLR은 하향조절(down-regulation) 과정(B)을 통해 정상수준으로 조절되며, 그 과정은 다음과 같다. 우선적으로 과발현된 TLR의 신호전달을 저해시키기 위해 β -아레스틴(β -arrestin)이 결합한다(B-1). β -arrestin과 결합된 TLR은 AP2-클라트린(AP2-clathrin) 구조체에 의해 세포내부로 유입되는 엔도시토시스(endocytosis)이 진행된다(B-2). 세포 내부로 들어온 TLR 구조체는 분해를 유도하는 신호표지체인 유비퀴틴(ubiquitin)과 결합되며(B-3), 최종적으로 단백질 분해 소기관인 리소좀(lysosome)에 의해 분해된다(B-4).
- [0097] 톨-유사수용체와 같은 세포막 수용체는 정상시에는 세포막 표면에 최소농도 수준으로 존재하여 병원체에 의한 감염을 지속적으로 감시한다. 도 3의 (A)에서와 같이 병원체 침입을 통한 감염이 발생할 경우 최소농도 수준으로 존재하던 각각의 톨-유사수용체들은 병원체와 특이결합을 통해 체내에 감염신호를 전달하게 된다(A-1). 체내에 전달된 신호는 NF- κ B를 활성화시켜 세포 내의 염증반응을 유도하고, 사이토카인을 분비를 통해 주변세포의 염증반응을 유도한다(A-2). 또한 세포막 표면에 수용체의 농도를 증가시켜(A-3)(up-regulation) 추가적인 감염에 대비한다. 병원체에 의한 감염이 소멸된 이후에는 상승되었던 수용체의 농도를 정상수준으로 회복시키는 과정(down-regulation)이 일어나게 되는데, 이와 같은 기작은 과발현된 톨-유사수용체에 의해 지속적인 염증반응이 유발되는 것을 방지하기 위함이다. Down-regulation 과정은 톨-유사수용체의 신호전달을 방해하는 β -arrestin이 부착되면서부터 시작되며(B-1), 둔감화된 톨-유사수용체를 AP2-clathrin 구조체가 둘러싸아 세포질 내부로 유입시키는 엔도시토시스(endocytosis)가 유도된다(B-2). 세포질 내부로 유입된 구조체는 단백질분해를 유도하는 신호표지체인 유비퀴틴(ubiquitin)과 결합되고(B-3), 이로 인해 단백질분해 소기관인 리소좀(lysosome)에 의해 분해된다(B-4). 따라서 본 발명자는 염증반응 유도 및 밀접한 관계를 맺고 있는 톨-유사수용체의 세포막 농도를 지속적으로 측정할 경우, 체내에서 일어나는 염증반응을 연속적으로 관찰 가능할 것이라는 가능성을 가지고 가설을 세웠으며, 이를 증명하기 위해 TLR 조절기작을 통한 염증 연속관찰모델을 수립하게 되었다.
- [0098] 도 3에서 제시된 염증 연속관찰모델을 구현하기 위해 감염원으로 폐렴 유발균인 *Pseudomonas aeruginosa* 균의 파쇄액을, 감염의 주체로 사람 유래 폐세포주인 A549를 선정하여 염증반응을 체외에서 유발하였으며, 이때의 세포의 반응을 TLR의 변화를 통해 관찰하였다(도 4). 도 4의 (A)에서와 같이 4시간에 걸친 감염과정 이후, 감염원을 제거와 동시에 회복용액을 공급한 이후 6시간마다 TLR의 농도를 관찰한 결과, 감염과정을 통해 상승되었던 TLR의 농도가 정상수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(A). 이와 같은 현상은 감염시킨 감염원의 농도에 상관없이 유도되는 과정임을 확인하였으며, 감염원의 농도가 높을수록 회복되는 비율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 그 중, 100 배 희석시킨 균을 감염시킨 조건에서 가장 높은 회복률을 보였으며, 이때의 회복률은 80%에 다다른다(B). 또한 이와 같은 세포의 반응성은 일회성으로 끝나는 것이 아니라 2회, 3회에 걸쳐 실시하였을 때도 공통적으로 유도되었다. 이와 같은 실험 결과는 도 3에서 세운 가설을 뒷받침할 수 있는 중요한 증거가 되었다. 하지만 도 4에서 제시된 실험결과는 여러 묶음의 세포를 준비하여, 각각의 해당 시간에 따라 TLR을 관찰하기 위해 세포를 파쇄하면서 측정한 제한적인 반연속 측정 결과이기 때문에, 동일세포에서 연속적인 감염과 회복 그리고 이때의 TLR의 농도를 세포 손상 없이 측정하는 기술이 필요하게 되었다.
- [0099] 도 4는 TLR1 조절기작을 통해 제한적으로 염증을 반연속적으로 관찰한 결과이다. 감염의 주체로 사람 유래 폐세포주인 A549를, 폐렴 유발균인 *Pseudomonas aeruginosa* 균의 파쇄액을 감염원으로 활용하였다. 4시간에 걸친 감염 이후, 감염원을 제거하여 회복용액과 함께 24시간에 걸쳐 관찰한 결과 TLR의 농도가 정상수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(A). 이와 같은 현상은 100배 희석시킨 균을 감염시켰을 때 80%에 가까운 회복률을 보였다(B). 또한 최적화된 조건에서는 최대 3회에 걸친 반복감염을 관찰할 수 있었다(C, D). 하지만 이와 같은 실험 결과는 여러 묶음의 세포를 시간에 따라 파쇄하면서 측정한 제한적인 반연속 관찰결과이다.
- [0100] 세포친화적인 발광법 기반의 TLR 면역분석을 실시하고, 그 신호 값을 측정하기 위해 도 6의 (A)에서와 같이 냉각 디지털 카메라에 텔레센트릭 렌즈를 장착시킨 탐지기를 제작하였다. 렌즈를 포함하는 광측정 장비는 기준이 되는 초점에 따라 신호측정감도가 달라진다. 하지만 동물세포의 경우 표면에 부착되어 성장하기 때문에 상단부에서 세포의 표면을 측정해야 하는 본 시스템에서는 각 세포의 표면에 대한 초점을 맞추는 것이 매우 제한적이다. 따라서, 이를 해결하기 위해 세포가 배양되는 표면의 바닥은 투과성이 높은 유리재질로, 테두리 부분은 빛이 반사되지 않는 검정색 플라스틱 재질로 된 세포 웰 플레이트를 도입하였다,
- [0101] 탐지기의 초점은 반사되는 빛들이 플레이트의 테두리부분에 집중되도록 바닥 부분에 맞추도록 하였다. 그 결과

도 6의 (B)에서와 같이 유리재질 바닥으로 반사된 광신호들이 웰 테두리의 표면부분으로 집중되는 원형 타입의 신호 패턴을 얻을 수 있었다. 발광 탐지기를 통해 측정된 영상(도 6의 B-1)은 자바기반의 Image J 프로그램을 통해 디지털신호로 변환하고(B-2와 B-3), 그 변환된 신호 값은 그래프로 도식화하였다(B-4). 그 결과 도 6의 B-2와 B-3과 같이 세균 분쇄액을 통해 감염시킨 세포는 발현량이 증가된 TLR에 의해 광신호가 나타나는 것을 관찰할 수 있었고, 감염시키지 않은 정상세포의 경우 기본 농도수준의 TLR만이 측정되는 것을 확인하였다.

[0102] 상기에서 언급된, 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법, 광학신호 획득 및 분석을 통한 염증 측정기술의 응용으로 동일세포에서 반연속적으로 염증을 유도하고 이를 측정하는 실험을 진행하였다.

[0103] 도 7은 동일세포에 대한 세포친화적인 염증 반연속측정 모델(A)과 이를 통해 2회에 걸친 염증유도를 관찰한 결과(B)이다. 세포친화적인 염증 반연속측정은 세포고정화 단계(A-1)와 초기 세포의 TLR 농도측정 단계(A-2), 세포준비 단계(A-3), 염증유도 단계(A-4), 염증유도를 통해 발현된 TLR 측정 단계(A-5), 그리고 회복단계(A-6)로 나누어진다. 세포 고정화 단계를 제외한 과정은 순차적으로 순환되어 반복염증을 유도한다. 그 결과, 동일세포에서 2회에 걸쳐 염증이 유도되어 회복되는 것을 관찰 가능하였다(B).

[0104] 실험결과는 감염원을 처리한 실험군과 감염원을 처리하지 않은 대조군의 TLR을 면역분석하여 나온 결과 값을 배경신호(정상세포의 TLR 발현량) 대비 염증신호(염증이 유발된 세포의 TLR 발현량) 비율로 환산하여 선형그래프로 도식화하였다(도 7의 B와 도 8의 A). 이와 같은 과정은 도 1에서 제시한 폐렴 체외모델(폐상피세포인 A549에 폐렴원인균인 *P. aeruginosa*를 감염시킨 모델)에 적용시켰다. 그 결과 도 7의 B에서 제시된 바와 같이, 감염을 통해 염증을 유발시키는 단계에서는 배경신호 대비 염증신호가 상승하였으며, 배양액 교체를 통해 감염원을 제거하고 회복을 시키는 단계에서는 신호 값이 정상수치 부근으로 하락하는 것을 확인할 수 있었다.

[0105] 도 8은 동일세포에서 3회에 걸쳐 염증반응을 유도하고, 이러한 반응을 TLR 면역분석법(A)과 사이토카인 측정법(B)을 통해 측정한 결과이다. TLR 면역분석법의 경우 3회에 걸친 염증반응 측정 동안 배경 대비 신호 값의 비율이 규칙적으로 상승하는 패턴을 나타냈다(A). 이와는 다르게 사이토카인인 TNF- α 의 경우, 신호 값이 일정하게 감소하는 패턴을 보였으며(B, 상단곡선), IL-6의 경우 신호 값이 일정하게 유지되는 패턴이 관찰되었다(B, 하단곡선).

[0106] 추가적으로 도 8의 (A)에서 제시된 바와 같이, 반연속적인 염증 측정이 일회성이 아닌 2회 또는 3회에 걸친 재감염 조건에서도 재현된다는 것을 증명할 수 있었다. 이는 도 4에서 제시한 TLR 조절기작을 통한 제한적인 염증 반연속관찰 결과와 동일한 결과로서, 본 발명에서 제안하는 면역분석방법이 동일세포상에서 손상 없이 염증을 반연속적으로 측정 가능하다는 것을 증명한다.

[0107] 세포의 손상 없이 반연속적으로 염증반응을 측정할 수 있는 방법은 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법 이외에도 도 1의 A-5에서 언급한 바와 같이 염증을 통해 분비되는 사이토카인을 측정하는 방법이 있다. 사이토카인 측정방법은 세포를 배양하는 용액을 도 7의 (A)에서의 과정마다 획득하여 면역분석을 하는 방법으로, 세포 손상 없이 염증반응을 관찰할 수 있는 매우 간편한 기법이다. 하지만 사이토카인의 경우 인간유래 세포의 경우 극저농도(10 pg/mL 이하)로 분비되기 때문에 염증반응을 관찰하기에는 매우 제한적이다. 이와는 다르게 도 8의 (B)와 같이 쥐 유래 세포의 경우 측정 가능한 수준의 사이토카인이 분비되는데, 그마저도 사이토카인의 종류에 따라 그 경향이 다르다. 쥐 유래 세포에서 사이토카인을 통해 염증을 반연속적으로 측정한 결과 TNF- α 의 경우 분비되는 양이 반복되는 회차에 따라 감소하는 반면에, IL-6의 경우에는 일정하게 분비되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 사이토카인을 측정하는 실험방법은 간편하기는 하지만 분석물질(사이토카인의 종류)에 따라 측정결과가 다르고 또한 인간 유래세포에서는 적용할 수 없다는 문제가 있다.

[0108] 따라서 반연속적으로 염증을 측정하는 방안은 두 가지로 나누어질 수 있다. 첫번째 모델은 인간 유래세포주인 A549에서의 TLR의 발현량 변화를 측정하는 것이고, 두번째 모델은 쥐유래 세포주인 RAW264.7에서 사이토카인(IL-6)을 측정하는 것이다. 첫번째 모델의 경우 인간 유래세포주를 활용하기 때문에 사람에게 적용 가능한 신약 스크리닝 분야(약의 효능 및 지속성 그리고 독성검사)에 매우 적절하다는 장점이 있다. 반면, 쥐유래 세포주를 활용하는 두번째 모델의 경우 분석이 매우 간편하기 때문에 환경이나 유해세균 그리고 바이러스 모니터링에 더욱 적절할 것이다.

[0109] 또한 본 발명에서는, 염증 또는 암을 반연속적으로 측정 가능하도록 하는 본 발명의 세포친화적인 면역분석방법을 이용하여 소염제 또는 항암제 후보물질로부터 염증반응 및 발암을 억제하는 소염제 또는 항암제를 선별하는 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0110] 도 9는 NF- κ B 신호전달과정을 통해 염증신호가 전달되는 모식도(A, B)와 해당기전을 활용한 염증억제 전략(C)

이다. 도 1 및 2에서 언급한 바와 같이 병원체의 침입은 전사조절인자인 NF- κ B를 활성화시키고, 그 반응결과로서 TLR의 발현(A-1)과 사이토카인을 분비한다(A-2). 이와는 다르게 감염 외 자극에 의해 염증이 유발되는 경우는 다음과 같다(B). 외부자극(B-1)을 통해 체내에 존재하는 염증유도 물질인 브래디키닌(bradykinin)이 합성된다(B-2). 합성된 브래디키닌은 브래디키닌 수용체(bradykinin receptor)에 의해 인식되어 NF- κ B를 자극한다(B-3). 자극된 NF- κ B는 브래디키닌 수용체를 발현시켜 지속적으로 염증을 유도(B-4)시키는 한편, 또 다른 염증유도 물질인 프로스타글란딘(prostaglandin)을 합성시켜(B-5), 혈관 확장을 통해 염증을 유발한다(B-6). 따라서 상기 발명자는 염증 유도에 중추적인 역할을 하는 NF- κ B의 활성을 저해시켜(C-1), TLR과 사이토카인, 그리고 브래디키닌 수용체의 발현을 억제하고(C-2), 이를 통해 소염을 유발(C-3)하는 전략을 구상하였다.

[0111]

도 9에서 보는 바와 같이 TLR 인지를 통한 선천성 면역반응은 TLR이 감염원의 침입을 인식하면서부터 시작된다. TLR은 감염원의 병원체연관 분자패턴(PAMP)과 특이결합을 하여 세포 내부로 외래물질의 침입신호를 전달하고, 이때 전달된 신호는 전사조절인자인 NF- κ B를 활성화시킨다. 활성화된 NF- κ B는 세포 간의 신호전달물질인 사이토카인을 발현시켜 인접한 세포들에게 감염 여부를 전파하는 한편, TLR과 같은 염증관련 수용체들의 개체 수를 증가시키는 기작을 통해 신호전달과정이 지속적으로 반복되도록 유도한다(감염과정). 이와 같이 NF- κ B는 염증성 신호전달 물질인 사이토카인과 염증관련 단백질수용체의 발현을 담당하는 조절인자로서, 감염이 아닌 염증을 유발하는 외부자극(예시: 화상, 동통 등)에 의해서도 활성화되는 것으로 알려져 있다. 감염을 포함한 염증을 유발하는 외부 자극에 세포가 노출될 경우, kinin-kallikrein system에 의해 체내에 브래디키닌(혈관확장을 유도하는 염증마커)이 합성되게 되고, 이를 염증관련 수용체인 브래디키닌 수용체가 인식하는 과정이 일어나게 된다. 브래디키닌과 수용체 간의 결합은 NF- κ B를 활성화시키며, 활성화된 NF- κ B 경로(pathway)는 브래디키닌 수용체의 개체 수를 증가시키는 한편, 또 다른 염증마커인 프로스타글란딘을 합성하는 기작을 유도한다(염증과정). 이와 같이 체내에서 일어나는 감염과정과 염증과정은 NF- κ B 경로(pathway)를 통해 유도되며, 그 중 NF- κ B의 활성은 염증이 유발되는 기작에서 중추적인 역할을 한다. 따라서 본 발명자는 NF- κ B의 활성이 염증 관련 단백질과 관련 수용체들의 발현에 큰 영향을 준다는 이론적 배경을 통해 도 9의 (C)에서 제시된 바와 같이 NF- κ B의 활성억제를 통해 염증반응을 제어하는 물질을 선별하는 기술을 제안하고자 한다.

[0112]

일례로서, 상기에서 언급한 소염제를 선별하는 기술의 성능을 증명하기 위해, 감염을 통해 염증을 유발시킨 A549세포(폐 상피세포)에 NF- κ B의 활성을 억제하는 시약(예시: CAPE와 sodium salicylate)을 처리하여 염증반응이 억제되는 동물모델을 구축하였고, 이때의 염증억제(NF- κ B의 활성 저해) 여부를 TLR의 발현량 변화를 통해 예측하는 실험을 진행하였다. 이와 같은 세포기반의 염증측정시스템은 소염제 후보군들을 스크리닝하는 시스템으로 사용가능할 뿐만 아니라, 동물실험을 대체할 수 있는 실험모델의 기반기술이 될 수 있다.

[0113]

NF- κ B는 DNA와 결합 가능한 P60 단백질과 핵막을 통과할 수 있도록 하는 P50 단백질, 그리고 앞선 두 단백질과 결합하여 그 활성을 억제하는 I κ B α 등의 소단위 단백질로 구성된 전사조절 단백질이다.

[0114]

도 10은 도 9에서 제시된 소염모델을 증명하고자, NF- κ B 활성저해제인 CAPE와 sodium salicylate 그리고 진통해열제인 acetaminophen을 처리하여 소염을 유도한 결과이다. 실험에 사용된 CAPE는 핵막내부로 들어간 NF- κ B가 DNA와 결합하여 전사시키는 것을 저해하고(A-1), sodium salicylate는 NF- κ B를 활성화시키는 효소의 활성을 저해시켜(A-2), NF- κ B의 기작을 저해하는 것으로 알려져 왔다. 이와 같은 현상은 TLR을 기반으로 하는 염증측정방법을 통해서도 관찰 가능하였으며(B, C), 특히 sodium salicylate를 처리하는 시점에 따라 저해되는 정도가 달라지는 결과도 얻을 수 있었다(B-1, B-2). 또한 소염을 유도하지 못하는 것으로 알려진 acetaminophen의 경우 염증신호와 비교하였을 때 아무런 차이점이 나타나지 않았다(C).

[0115]

도 10의 (A)와 같이 세포질 내부에서의 NF- κ B 활성은 I κ B α 에 의해 억제된다. 하지만 감염에 의해 TLR과 PAMP가 결합할 경우 I κ B α 키나아제(kinase)가 활성화되게 되고, 이를 통해 I κ B α 가 제거된다. 제거된 I κ B α 에 의해 활성화된 NF- κ B는 핵막을 통과하여 핵막내부에 존재하는 DNA와 결합하여 염증관련 단백질을 생산한다. 실험에 사용된 CAPE는 벌집에서 추출된 성분으로 P65 단백질과 결합하여 핵막내부로 들어간 NF- κ B가 DNA와 결합하여 전사하는 것을 방해하는 것(A-1)으로 알려진 소염후보물질이다. 또 다른 시약인 sodium salicylate는 I κ B kinase의 활성을 억제(A-2)하여 I κ B α 의 결합을 유지시키는 salicylate 계열의 시약으로, 소염제로 널리 알려진 아스피린(aspirin)이 이에 포함된다. 추가적으로 TLR 기반의 염증측정 방법이 NF- κ B의 활성 정도에 국한되어 반응한다는 사실을 입증하기 위해 소염효과가 없는 acetaminophen(진통해열제)을 음성 대조군으로 선정하였다.

[0116]

도 10의 (B)에서와 같이 농도별로 희석시킨 염증억제물질(sodium salicylate)과 폐렴유발균인 *P. aeruginosa*을 폐상피세포인 A549에 처리한 다음, TLR의 발현량을 면역 분석한 결과, 처리된 소염제의 농도에 따라 발현되는

TLR의 양이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 감염 이전에 소염제를 먼저 처리한(B-2) 경우가 감염과 동시에 소염제를 처리한 경우(B-1) 보다 더 강하게 TLR의 발현을 억제하였다. 이는 소염제를 처리하는 시기에 따라 소염효과가 다르다는 것으로 이와 같은 현상을 이용할 경우, 적절하게 소염제를 복용하는 시기를 결정할 수 있을 것이다. TLR 발현량을 통한 소염반응 측정은 도 10의 (C)와 같이 CAPE를 농도 별로 처리한 조건(C-1)에서도 관찰 가능하였다. 특히 180 μ M 농도의 CAPE를 처리한 조건에서 95%에 가까운 TLR 발현량 억제효과(소염효과)가 관찰되었다. 이와는 다르게 진통해열제를 처리한 경우(C-2), 처리되는 시약의 농도와 상관없이 일정하게 TLR이 발현되는 것을 확인하였고, 실험결과를 통해 TLR의 발현이 NF- κ B의 활성화에 국한된다는 것을 증명할 수 있었다.

[0117]

도 10에서 제시한 소염반응을 1회에 한정시키지 않고 동일세포에서 반복적으로 구현시키고자 세포친화적으로 염증을 반응속 측정하는 실험을 진행하였다.

[0118]

도 11은 동물세포에서 세포친화적으로 소염반응을 반응속측정하는 방법(A)과 그에 대한 실험결과(B)이다. 세포친화적인 소염 반응속측정방법은 도 7의 서술된 방법과 동일하게 세포고정화(A-1)와 초기 세포의 TLR 농도측정(A-2), 세포준비단계(A-3) 및 소염제처리, 염증유도(A-4), 발현 억제된 TLR 농도측정(A-5) 및 회복단계(A-6)로 나누어진다. 소염제를 처리하지 않은 경우 염증이 유도되거나 회복될 때의 배경 대비 신호 값의 비율이 소염제를 처리한 경우 대비 높게 형성되었으며, 이러한 신호 값은 2번째 순환에서도 누적되어 가파른 상승곡선을 형성하였다(B-1). 그와는 다르게 소염제를 처리한 경우 완만한 상승곡선이 형성되었으며, 도 10의 결과와 동일하게 소염제를 처리한 시점에 따라 곡선의 완만한 기울기 정도가 다르게 나타났다(B-2, B-3).

[0119]

세포친화적인 소염반응 반응속측정은 도 11 (A)의 모식도처럼 세포고정화 단계(A-1)와 초기 세포의 TLR 농도측정 단계(A-2), 세포준비 단계(A-3), 염증유도 단계(A-4), 염증유도를 통해 발현된 TLR 농도 측정 단계(A-5), 그리고 회복단계(A-6)로 나누어지며, 세포 고정화 단계를 제외한 과정은 순차적으로 순환되어 반복적으로 염증유도와 억제 및 회복과정이 진행된다. 또한 세포준비 단계 혹은 염증유도 단계에서 염증억제제인 sodium salicylate를 처리하여, 도 10의 (C)에서와 같이 처리시기에 따른 소염작용의 정도를 확인하였다. 그 결과 도 11의 (B)와 같이 소염제 처리 후 염증을 유도시킨 경우가 소염제 처리와 염증유도를 동시에 실시한 경우보다 강하게 소염반응을 나타냈으며, 이와 같은 현상은 동일세포에서 2회까지 관찰가능하였다. 이를 통해 상기 발명자가 고안한 시스템을 활용할 경우 동일세포에서 반응속적으로 염증이 유도되고 억제되는 현상을 관찰 가능함을 증명하였고, 이에 대한 응용으로 소염제를 선별하는 실험 예시를 추가적으로 제시하고자 하였다.

[0120]

동일세포에 대해서 반응속적으로 염증을 측정하는 기술의 응용성 및 적용가능성을 확인하기 위해 반복적으로 소염제를 처리했을 때의 약효 지속성 및 독성을 확인하는 실험을 진행하였다. 현재 개발된 대부분의 소염제 스크리닝 시스템들은 높은 처리량(high-throughput)으로 많은 종류의 신약 후보군들의 성능을 확인하는 일회성 검사법이다. 이러한 검사시스템들은 1회에 한정해서 소염작용을 하는지 여부만을 확인하기 때문에 해당 시약 후보군을 처리하였을 때, 약효가 지속되는 시기나 세포에 대한 독성 등을 확인하기 위해서는 추가적인 세포독성실험이나 동물을 이용한 비임상실험이 반드시 보완되어야 한다. 하지만 본 발명의 동물 세포막 수용체 기반의 반응속염증측정시스템의 경우 동일세포에 대해 재감염을 유도하고 그 상태를 반응속적으로 모니터링하기 때문에 소염제를 처리한 이후 약효가 지속되는 기간을 확인하거나 소염제 처리에 따른 일차적인 세포 독성 그리고 반복적인 소염제처리에 따른 누적 세포독성을 검사하는데 적용 가능하다. 따라서 세포막 수용체 기반의 소염제스크리닝 시스템의 응용성을 증명하고자 3회에 걸친 재감염과 회복을 유도하는 염증표준모델을 선정하고, 해당 모델에 3종의 소염제를 다양한 방법으로 처리하는 실험을 진행하였다.

[0121]

도 12는 동물세포를 통해 세포독성과 약효 지속성을 검사하는 방안이다. 저해제의 세포독성은 정상적으로 배양되는 세포와 저해제의 독성에 의해 손상을 입은 세포의 배경 대비 신호 값의 차이를 통해 확인 가능하며(A), 이러한 세포독성검사법을 통해 적절한 수준의 저해제 농도를 선별 가능하였다. 이와 같은 반응성은 3회에 걸친 약효지속성 검사에 도입되어 80시간 동안 누적되는 독성 없이 약효가 지속되는 것을 확인하였다(B, C). 추가적으로 처리횟수를 다르게 한 실험의 결과를 통해 이러한 패턴이 20시간이 지난 시점에서는 적용되지 않는다는 것을 확인할 수 있었다 (D).

[0122]

도 12의 (A)와 같이 소염제(CAPE) 처리 없이 3회에 걸친 재감염과 회복을 유도할 경우, 감염 시에는 3 정도의 배경신호 대비 염증신호 값을 나타냈으며, 회복 시에는 2 정도의 수치를 나타냈다. 이와는 다르게 염증이 유도되기 전에 소염제(90 μ M CAPE와 50 salicylate)를 처리한 경우, 염증 유도과정에서 2 정도의 신호값을, 회복과정에서는 1.5 정도의 신호 값을 나타냈다. 도 10에서 제시한 바와 같이 소염제 처리시 TLR 신호 값이 비정상적으로 상승하거나 감소하지 않는 것을 통해 해당 소염제 조건이 세포에 독성 띠지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이와는 다르게 도 12의 (B)와 같이 높은 농도의 소염제를 처리한 경우(180 μ M CAPE), 세포의 손상이 유발되

어 염증유도과정부터 배경 대비 신호 값의 비율이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 현상은 세포 손상으로 인해 비특이적인 배경신호의 상승과 고정화된 세포의 유실 때문이다. 두 가지의 세포특성은 세포가 손상되었다는 객관적인 지표이기 때문에 세포수용체 기반의 소염제스크리닝 시스템을 활용할 경우 소염제의 효능뿐만 아니라 약에 의한 독성까지도 동시에 검사 가능하였다. 90 μ M CAPE와 50 mM sodium salicylate를 3회에 걸쳐 처리하는 기간 동안 배경신호 대비 염증신호의 비율이 일정하게 유지된다는 것은 해당 시약들이 제시된 농도에서는 세포에 대한 독성이 없이 소염작용을 한다는 것을 의미한다. 또한, 도 11의 (C)에서와 같이 acetaminophen의 경우, 10 mM 농도로 처리하여도 소염작용뿐만 아니라 독성도 없다는 것을 확인할 수 있었다.

[0123]

추가적으로 약 효능의 지속성 및 내성을 확인하기 위해 소염제를 처리하는 시기를 각각 다르게 하여 각 조건상에서의 소염양상을 비교분석 하였다. 도 12의 (D)에서와 같이 3회에 걸친 염증유도 반응을 각각 회차에 따라 구분하여 1회와 2회차 순환반응에서만 소염제를 처리한 경우, 3회차 순환반응을 제외한 염증유도 과정에는 배경 대비 신호 값의 비율이 2를 나타내었고, 회복과정에서는 1.5를 나타내었다. 소염제가 처리되지 않은 3회차 순환반응에서는 염증유도과정에서는 2.5, 회복과정에서 2의 비율이 나타났다. 마찬가지로 1회와 3회차 순환반응에서 소염제를 처리한 경우, 2차 감염에서만 정상 감염 치에 가까운 신호 값 비율이 나타났다. 특히 2차 회복 시에는 정상 감염 후 회복되는 양상과 동일한 2에 가까운 배경신호 대비 염증신호 값의 비율이 나타났는데, 이는 높은 수준으로 발현된 TLR이 잔여하기 때문이다. 또한 앞서 (B)에서 제시된 바와 같이 3회에 걸친 반복반응 동안 일정한 신호 값의 비율이 나타났기 때문에 실험에 사용된 소염제의 농도는 반복적으로 사용하여도 독성이 없다는 것을 증명한다. 이와 같은 현상은 동일세포에서 1회성으로 소염반응을 관찰하는 기존반응에서는 시도할 수 없는 실험으로 실험동물을 통해서만 가능한 약효지속성 검사와 독성검사를 세포수용체 기반의 시스템을 통해 대체할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 상기 시스템을 활용할 경우 동시에 약의 효능을 확인하는 선별 검사뿐만 아니라 약의 지속성 및 독성검사 그리고 이와 같은 검사들을 반복적으로 확인하는 반복투여검사를 한번에 진행 가능할 것이다. 이와 같은 세포수용체 기반의 복합 검사법은 실험동물을 활용하는 기존의 검사법들을 대체 가능할 것으로 기대된다.

[0124]

상기 세포의 염증유발 시스템에 핵심 역할을 하는 세포막 수용체를 이용한 바이오센싱 방법은 기존의 감염원에 대한 바이오센싱 방법에서 주로 이용하였던 디옥시리보핵산(DNA), 항체 등과 같은 특이적인 생체물질을 이용한 것이 아닌, 체내 선천성 면역반응 시스템을 감염 센서로서 직접적으로 이용했다는 점에 그 특징이 있다. 이를 통해, 단지 해당 감염원의 접촉만으로 대량의 감염원 배양 등의 복잡한 절차를 배제시킬 수 있어 공정의 단축 및 간편화를 구현할 수 있다.

[0125]

본 발명은 동물세포의 세포막 수용체에 특이적이고 친화도가 높은 탐지체를 통해 신속하게 감염원으로부터의 감염여부를 탐지하는 바이오센싱 방법을 제공함으로써, 기존의 감염 및 염증반응을 측정하기 위한 공정들을 간편화하고, 이를 통해 염증과정과 소염과정을 동일세포에서 반연속적으로 탐지할 수 있도록 한다.

[0126]

즉, 병원체에 대한 동물세포의 물리적 또는 화학적 변화를 측정하는 것이 아닌, 세포의 염증유발 시스템에 핵심 역할을 하는 톨-유사 수용체(TLRs)와 같은 세포막 수용체를 도입하여 이를 직접적으로 탐지함으로써 감염원에 대한 특이성과 민감도를 향상시키는 한편, 동물실험을 통해서만 얻을 수 있는 실험결과들을 체외에서 간접적으로 도출할 수 있다.

[0127]

나아가, IT 기술을 도입하여 소형화된 측정장비를 보강하고, 이를 통해 실험실 밖의 현장에서도 본 발명의 바이오센싱 방법을 사용하는 것이 가능하다.

[0128]

본 발명을 하기의 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시적인 것일 뿐, 본 발명의 기술적 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0129]

<실시예>

[0130]

실시예 1. 세포 배양 및 부착화

[0131]

RPMI1640 medium에 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS) (10% (v/v), 최종농도)과 페니실린-스트렙토마이신 용액(Penicillin-streptomycin, 1% (v/v), 최종농도)를 혼합한 배지를 이용하여, 인간 폐 상피세포주인 A-549 (ATCC CCL-185)가 각 웰(well) 당 6×10^4 cells의 개수로 유지할 수 있도록 96-웰 세포 배양 플레이트(96-well

cell culture plate)에 각각 200 μ l씩 주입한 후, 온도 37°C 및 이산화탄소(CO₂) 5%가 유지되는 조건하에서 24시간 동안 배양을 하였다. 배양을 통해 A-549가 웰 표면에 고착화 된 것을 광학현미경으로 확인(100X)한 후, 상기 페니실린-스트렙토마이신 용액, 즉 항생제 제거를 위하여 흡입기로 배지를 제거한 후, DPBS (+/+)를 200 μ l로 첨가하여 세척하였다. 세척 후 다시 흡입기로 잔여 항생제를 제거한 뒤 RPMI1640 medium 무혈청 배지를 200 μ l로 첨가하여 1시간을 경과시켜 세포기아(starvation)상태로 만들었다. 상기 바이오센싱 방법에 있어서 사용되는 동물세포가 세포기아(Starvation)상태인 것이 바람직하다. 이는 96-웰 마이크로틸터 플레이트(96-well microtiter plate) 등과 같은 세포배양 기관에 동물세포주를 배양하여 부착 및 세포기아(starvation)상태를 거쳐 감염원으로 인한 외부 자극에 대하여 동물세포가 민감하게 반응할 수 있도록 하는 역할을 한다. 마우스 대식세포주인 RAW264.7 (KCLB 40071)를 활용할 경우, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 대체하여 사용하였다.

[0132] **실시예 2. 감염원을 통한 염증유도**

[0133] RPMI1640 medium과 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 FBS (10% (v/v), 최종농도)와 페니실린-스트렙토마이신 용액(1% (v/v), 최종농도)을 혼합한 배지를 사용하고, A-549와 RAW264.7를 각 웰 당 6 x 10⁴ cells의 개수로 유지할 수 있도록 96-well cell culture plate에 각각 200 μ l씩 주입한 후, 온도 37°C 및 이산화탄소(CO₂) 5%로 유지되는 조건하에서 표면에 부착시켜 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 상기 페니실린-스트렙토마이신 용액, 즉 항생제 제거를 위하여 배지를 흡입기로 제거한 다음, DPBS (+/+)를 200 μ l로 첨가하여 세척하고, 다시 흡입기로 잔여 항생물질을 제거한 다음 각 세포별 무혈청 배지를 200 μ l로 첨가하여 1시간 동안 세포기아(starvation)상태로 만들었다.

[0134] 감염을 위하여 살아있는 식중독균(*Shigella sonnei*)과 고주파로 분쇄시켜 사멸된 세균과쇄액(*Pseudomonas aeruginosa*)을 각 동물세포에 사용된 무혈청 배지에 제시된 농도로 희석하여 각 웰에 200 μ l씩 접종을 실시하여 상기한 조건과 동일한 상태에서 감염을 제시된 시간 동안 수행하였다. 감염원을 전혀 첨가하지 않는 웰은 대조구로서 사용되었다. 각 감염시간 종료 후 흡입기를 통해 배지와 대장균을 제거하였고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified with Calcium and Magnesium (DPBS(+/-))를 200 μ l로 첨가하여 1회 세척하였다.

[0135] **실시예 3. 세포기반 효소발색면역 분석(세포 손상이 유도되는 경우)**

[0136] 감염된 세포는 4% 포르말린 용액을 100 μ l로 첨가하여 실온에서 30분 동안 처리하여 감염세포를 웰(well)에 고정시켰으며(fixation), 다음 흡입기로 4% 포르말린 용액을 제거 후 고정화가 이루어지지 않은 잔여표면을 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified without Calcium and Magnesium (DPBS(-/-))에 0.5% (w/v) 농도로 용해되어 있는 카제인단백질-인산완충용액(Casein-PBS)을 200 μ l로 분주하여 습도가 100% 유지되고 온도 37°C 조건에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0137] 다음 TLR과 특이적으로 결합되는 TLR 토끼 복합클론 항체 (rabbit polyclonal antibody)를 0.1% (v/v) tween 20이 포함된 Casein-PBS (Casein-PBS-Tw)를 사용하여 1/300의 비율로 희석하여 100 μ l씩 분주하여 동일조건에서 1시간 동안 반응시킨 후, 반응액을 버리고 0.1% tween 20이 포함된 인산완충용액(PBST)를 이용하여 200 μ l씩 3회 세척을 통해 반응되지 않은 항체를 제거하였다. 다음, 이차항체인 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG도 0.1% (v/v) tween 20이 포함된 Casein-PBS (Casein-PBS-Tw)를 사용하여 1/5000의 비율로 희석하여 100 μ l씩 분주하여 동일 조건에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBST로 같은 방법으로 3회 세척하였다. 50mM acetate, 1% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (w/v) 및 3% 과산화수소(v/v)를 1000 : 10 : 1의 비율로 혼합하여 신호발생을 위한 발색기질용액을 제조하고, 상기 발색기질용액을 200 μ l 분주하여 15분 동안 발색반응을 관찰한 후 2M 황산 50 μ l를 분주하여 반응을 정지시켰다. 최종적으로 발색된 신호는 450nm 파장에서 ELISA plate reader (Versamax; Molecular Device, 미국)로 탐지하였다. 탐지된 결과는 도 2의 (A)에서와 같이 MS excel 프로그램을 통해 그래프로 도식화하였다.

[0138] **실시예 4. 분자생물학적 마커분석**

[0139] 분자생물학적으로 TLR의 발현량을 확인하고자, 감염된 세포를 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified without Calcium and Magnesium (DPBS(-/-))을 이용하여 200 μ l씩 3회 세척한 다음 Invitrogen 사의 TRIzol 시약을 통해 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA에 Abcam 사의 TaqMan 역전사 시약을 반응시켜 complementary DNA (cDNA)로 합성하였다. 역전사 과정은 Bio-Rad사의 MJ Mini Thermal Cycler를 통해 유도하였다. 그 유도 조건은 25℃에서 10분간 냉각, 37℃에서 1시간 그리고 42℃에서 1시간 연장, 마지막으로 95℃에서 5분간 불화성화이다. 합성된 cDNA는 Thermo Fisher Scientific사의 NanoDrop을 통해 정량하였다.

[0140] 실시간 중합효소 연쇄 반응을 위해 TLR에 대한 두 가지의 유전자시퀀스(5-TTGCTCCTGCGAACTCTAT-3와 5-AGCCTGGTGACATTCCAAGA-3)를 각각 설계하였고, 실시간으로 연장되는 DNA를 관찰하기 위해 Abcam 사의 SYBR Green PCR Master Mix를 통해 표지물질을 삽입하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 Applied Biosystems 사의 ABI 7500 Real-Time PCR System를 이용하였으며, 사용조건은 다음과 같다. 과정 1: 2분간 50℃ 그리고 10분간 95℃, 과정 2: 15초간 95℃ 그리고 1분간 60℃. 과정 1과 2는 40번 반복하였다. 또한 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (mGAPDH)을 대조군으로 사용하기 위해 두 가지의 유전자시퀀스(5-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3와 5-CCTGCTCACCACCTTCTTGAT-3)를 추가적으로 제작하였으며, 대조군 대비 상대적으로 증가된 TLR의 mRNA비율을 threshold cycle 방법을 통해 수치화하였다. 해당 결과는 도 2의 (B)와 같이 MS excel 프로그램을 통해 도식화하였다.

[0141] 실시예 5. 염증유도시 분비되는 사이토카인 측정

[0142] 감염된 세포에서 분비되는 TNF- α 와 IL-6를 측정하기 위해 R&D system사에서 판매하는 사이토카인 면역분석키트를 사용하였다. 살아있는 *S. sonnei*균과 항균제인 proclin300을 처리하여 불활성화시킨 균을 DMEM medium을 통해 희석하고 실시예 2에서 언급한 바와 같이 마우스 대식세포주인 RAW264.7에 정해진 시간 동안 처리하여 염증 반응을 유도하였다. 균 감염을 통해 분비된 사이토카인을 측정하고자, 배양액을 분석키트에서 제공되는 희석버퍼를 통해 희석(1/5 TNF- α 와 1/2 IL-6)하여 사이토카인에 대한 항체가 고정되어있는 웰에 넣어 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 이후, 키트에서 제공되는 세척버퍼를 통해 5회 세척을 실시하였고, 효소가 중합된 탐지 항체를 100 μ l 분주하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 한번 세척한 이후, 실시예 3에서 명시된 바와 같이 발색기질을 통해 발색반응을 유도하고 이를 측정한다. 측정된 결과는 도 2의 (C)와 (D)와 같이 그래프로 도식화하였다.

[0143] 실시예 6. TLR 조절기작을 통한 제한적인 염증 반연속관찰

[0144] 도 3에 제시된 TLR 조절기작을 활용하여 염증을 반연속적으로 관찰하기 위해, 우선적으로 실시예 1에서와 같이 여러 묶음의 동물세포주를 배양한 세포배양 웰에 FBS가 포함되지 않은 배지를 200 μ l씩 분주하여 온도 37℃ 및 이산화탄소(CO₂) 5% 로 유지되는 조건하에서 2시간 동안 세포기아상태를 유도하였다. 세포기아상태가 유도된 일부의 세포주 묶음은 실시예 3과 같이 세포고정화 이후, TLR에 대한 발색면역반응을 실시하였다. 나머지 세포주 묶음은 세포를 기아상태로 만든 준비기간 이후, 반응한 배지를 제거한 하여 감염원을 농도별로 희석시킨 무혈청 배지를 200 μ l씩 분주하여 온도 37℃ 및 이산화탄소(CO₂) 5% 로 유지되는 조건하에서 4시간 동안 감염시켰다. 감염된 일부의 세포주 묶음은 실시예 3과 같이 세포고정화 이후, 발색면역반응을 실시하였다. 나머지 세포주 묶음은 감염 이후, 10% FBS가 포함된 배지를 통해 3회에 걸쳐 세척을 하였고, 세척이 완료된 웰은 10% FBS가 포함된 배지를 200 μ l씩 분주하여 온도 37℃ 및 이산화탄소(CO₂) 5%로 유지되는 조건하에서 24시간 동안 회복반응을 유도하였다. 각각의 세포주 묶음은 도 4의 (A)와 같이 6시간 단위로 실시예 3에서와 같이 발색면역반응을 실시하였다. 대조군으로 감염을 유도하지 않은 세포주 묶음을 준비하였고, 이를 기반으로 배경신호 값 대비 염증 신호 값의 비율을 산출하여 (B)에 도식화하였다. 최대치의 회복률은 감염과정 동안 증가된 TLR의 발현수준 대비 회복 과정 동안 감소된 TLR의 발현수준의 비율을 환산한 것이다. 이와 같은 제한적인 염증의 반연속적관찰은 2회 3회 반복하였으며, 그 결과를 도 4의 (C)와 (D)에 그래프로 도식화하였다.

[0145] 실시예 7. 세포친화적인 효소발광면역 분석

[0146] 세포친화적인 효소발광면역 분석의 경우 감염된 세포를 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/modified

without Calcium and Magnesium (DPBS(-/-))을 이용하여 200 μ l씩 3회 세척한 다음, TLR과 특이적으로 결합되는 TLR 토기 복합클론 항체 (rabbit polyclonal antibody)를 10% FBS가 포함된 medium(A549의 경우는 RPMI1640, RAW264.7의 경우 DMEM)을 사용하여 1/100의 비율로 희석하여 100 μ l씩 분주하여 동일조건에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 반응액을 버리고 동일한 medium을 이용하여 200 μ l씩 3회 세척을 통해 반응되지 않은 항체를 제거하였다. 다음, 이차항체인 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG도 5% FBS가 포함된 medium을 사용하여 1/2500의 비율로 희석하여 100 μ l씩 분주하여 동일 조건에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 같은 방법으로 3회 세척하였다.

[0147] Thermo Fisher Scientific사에서 판매하는 발광기질(Supersignal West Femto) 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 발광신호발생을 위한 용액을 제조하였고, 상기 발광기질용액을 200 μ l 분주하여 3분이 지난 시점에서 본 발명자가 고안한 cooled CCD camera기반의 광학측정기기(도 6의 (A))를 통해 측정하였다. 발광측정이 완료된 이후에는 10% FBS가 포함된 medium을 이용하여 200 μ l씩 3회 세척을 통해 잔여된 기질을 제거하였다.

[0148] 실시예 8. 동일세포에 대한 세포친화적인 염증 반응속측정

[0149] 도 7의 (A)에서 제시된 바와 같이 동일한 세포(A549)에서 세포친화적으로 염증을 반응속적으로 측정하고자, 실시예 2에서와 같이 염증반응을 유도하였고, 실시예 7에 제시된 바와 같이 TLR에 대한 세포친화적인 효소발광면역분석을 실시하였다. 초기에 발현된 TLR을 측정하기 위해 세포 부착과정 이후(세포준비기간 전), 우선적으로 세포친화적인 효소발광면역분석을 실시하였고, 세포준비과정과 염증반응유도 이후, 그리고 회복과정 이후에 순차적으로 효소발광면역분석을 실시하였다. 대조군으로 감염원을 반응시키지 않은 세포에 대한 순차적인 효소발광면역분석을 실시하였다.

[0150] 해당 순환과정은 2회 또는 3회까지 진행하여 도 7의 (B)와 도 8의 (A)에 그래프로 도식화하였다. 추가적으로 RAW264.7 세포에 동일한 과정을 적용시켜 분비되는 사이토카인의 패턴을 실시예 5와 같이 측정하여 분석하였고 이를 도 8의 (B)에 도식화하였다.

[0151] 실시예 9. NF- κ B 저해제를 통한 소염반응 유도 및 관찰

[0152] 체외에서 염증이 유도되고 억제되는 소염기작을 모사하기 위해, 실시예 2에서와 같이 염증반응이 유도된 세포에 NF- κ B 저해제를 처리하여 소염반응을 유도하고, 이를 측정하였다. NF- κ B 저해제로는 sodium salicylate와 CAPE를 선정하였으며, sodium salicylate의 경우 무혈청 배지에 희석하여 500 mM 농도의 표준용액을, CAPE는 DMSO에 희석하여 180 mM 농도의 표준용액을 준비하였다.

[0153] 실시예 2에서 제시한 바와 같이 24시간 동안 세포배양 웰 표면에 고정된 세포를 DPBS (+/+)를 200 μ l로 첨가하여 세척하고, 다시 흡입기로 잔여 항생물질을 제거한다. 저해제를 선처리 하는 경우, 무혈청 배지에 농도별로 희석된 저해제를 200 μ l로 첨가하여 2 시간 동안 처리한다. 저해제를 선처리 한 이후에는 실시예 2에서 제시된 것과 동일하게 세균 파쇄액을 반응시키고 실시예 3에서 제시한 발색면역분석을 통해 신호 값을 측정하였다. 추가적으로 음성대조군으로 염증을 유도하지 않은 경우를, 양성대조군으로 저해제를 처리하지 않고 염증을 유도한 경우를 선정하여 동일조건상에서 동시에 실험을 실시하였다. 그 결과는 도 10의 (B-1)과 (C-1)에 막대그래프로 제시하였다. 또한 NF- κ B 저해제가 아닌 acetaminophen을 처리하여 동일한 실험을 실시하였고, 그 결과를 (C-2)에 제시하였다.

[0154] 염증 유도시 저해제를 동시에 처리하는 경우, 염증을 유도하기 전에 저해제가 포함되지 않은 무혈청배지를 2시간 동안 처리하여 세포기아상태를 만든 다음에 염증유도를 일으키는 세균 파쇄액과 염증을 억제하는 저해제를 동시에 혼합하여 처리하였다. 그 결과는 도 10의 (A)에 제시하였다.

[0155] 실시예 10. 동일세포 상에서의 반응속적인 소염반응 유도 및 측정

[0156] 동일세포 상에서 도 10에서 제시한 바와 같은 소염작용을 반복적으로 관찰하기 위해 실시예 7에서 제시한 세포친화적인 발광면역분석을 적용시켰다.

[0157] 동일세포 상에서 소염작용을 반응속적으로 측정하는 과정은 도 7의 (A)에 제시된 방법과 동일하게 초기에 발현된 TLR을 측정하기 위해 세포 부착과정 이후(세포준비기간 전), 우선적으로 세포친화적인 효소발광면역분석을 실시하였고, 세포준비과정(혹은 저해제 처리과정)과 염증반응유도 이후, 그리고 회복과정 이후에 순차적으로 효

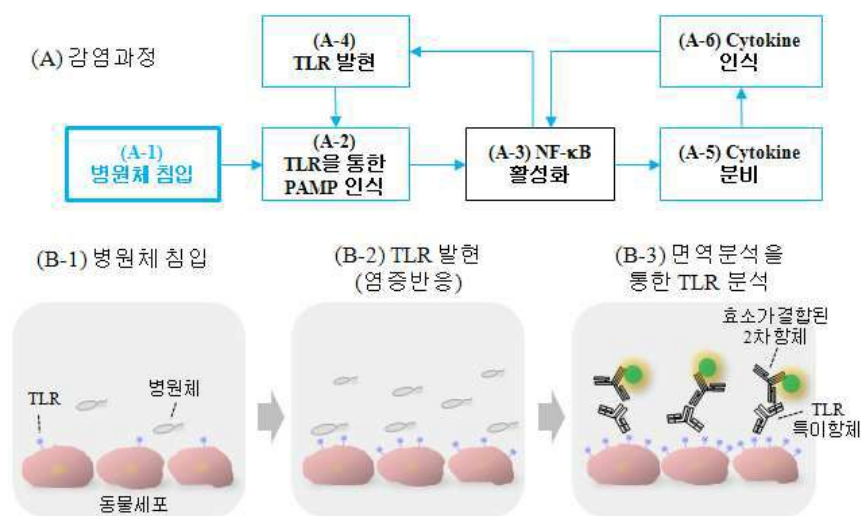
소발광면역분석을 실시하였다. 앞서 언급한 바와 같이 저해제는 세포준비과정에서 선처리 하였으며, 그 농도는 sodium salicylate의 경우 50mM, CAPE의 경우는 90uM이다. 음성대조군으로 감염원을 반응시키지 않은 세포에 대하여, 양성대조군으로는 저해제를 처리하고 감염원을 반응시킨 세포에 대하여 순차적인 효소발광면역분석을 실시하였다. 얻어진 결과는 배경 대비 신호 값의 비율로 환산하여 시간에 따른 선형그래프로 도식화하였다. 2회에 걸친 소염반연속측정은 도 11의 (B)에, 3회에 걸친 소염반연속측정은 도 12에 제시되어 있다.

[0158]

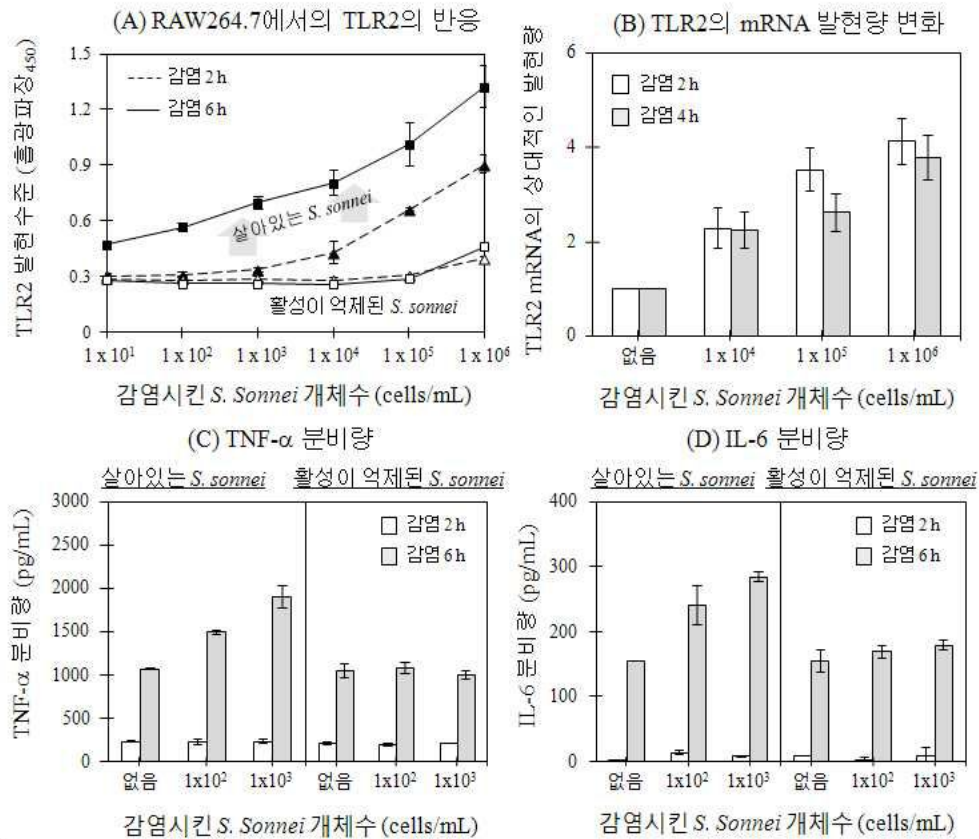
추가적으로 저해제 처리횟수에 따른 약효지속성을 확인하기 위해 미리 정해놓은 각각의 순환횟수에 따라 저해제를 처리하였으며, 그 결과는 도 12의 (D)에 제시하였다.

도면

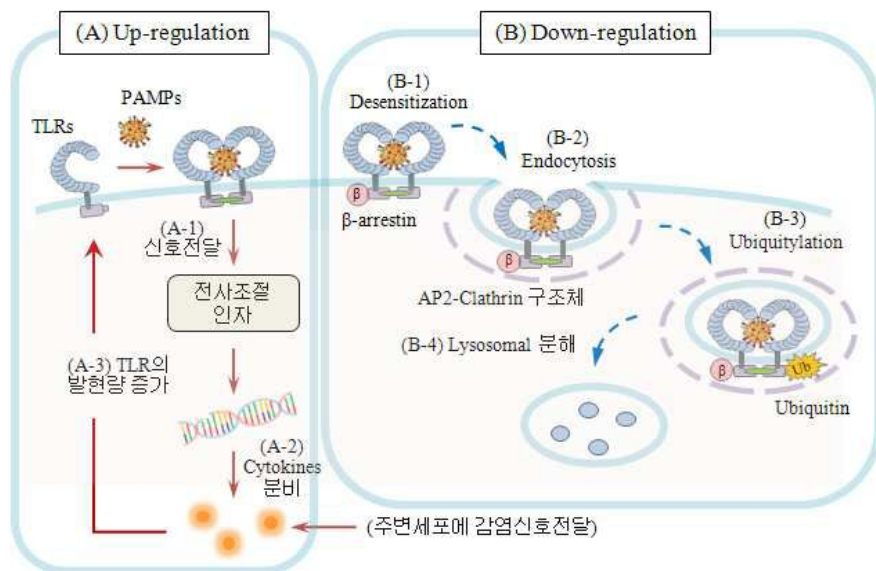
도면1



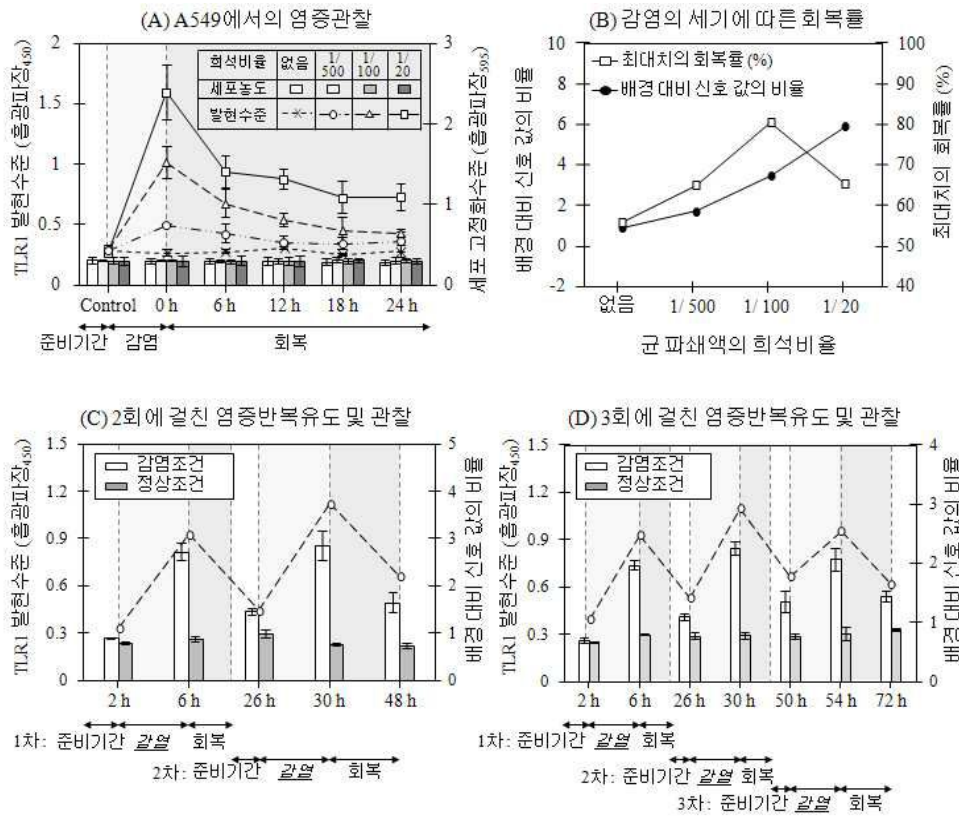
도면2



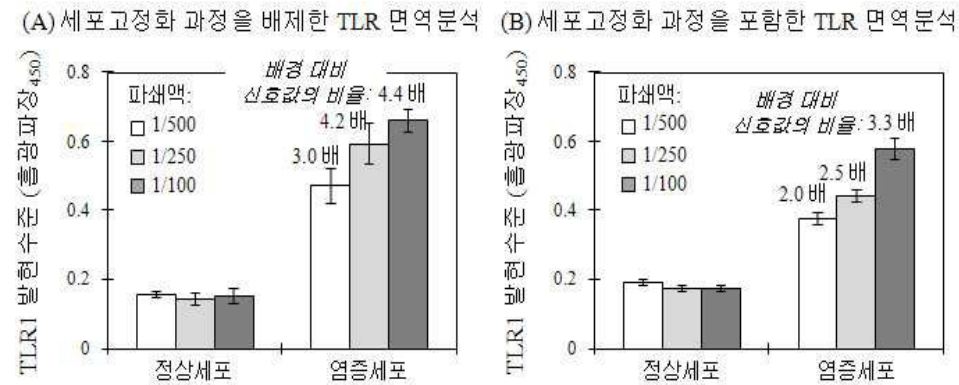
도면3



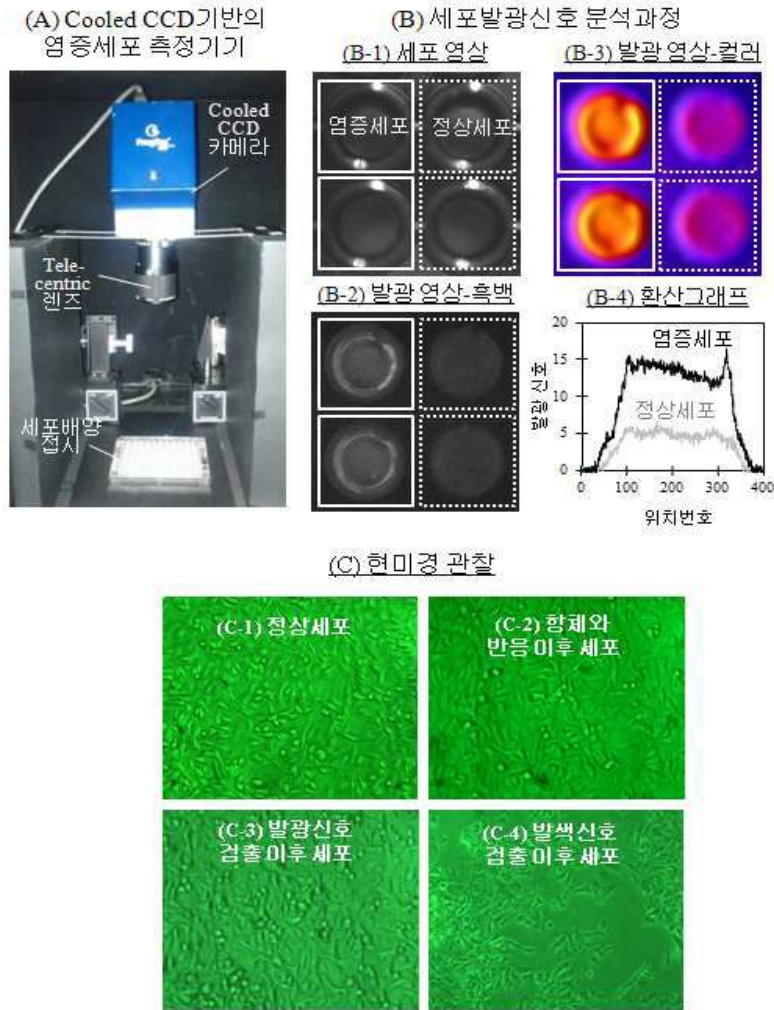
도면4



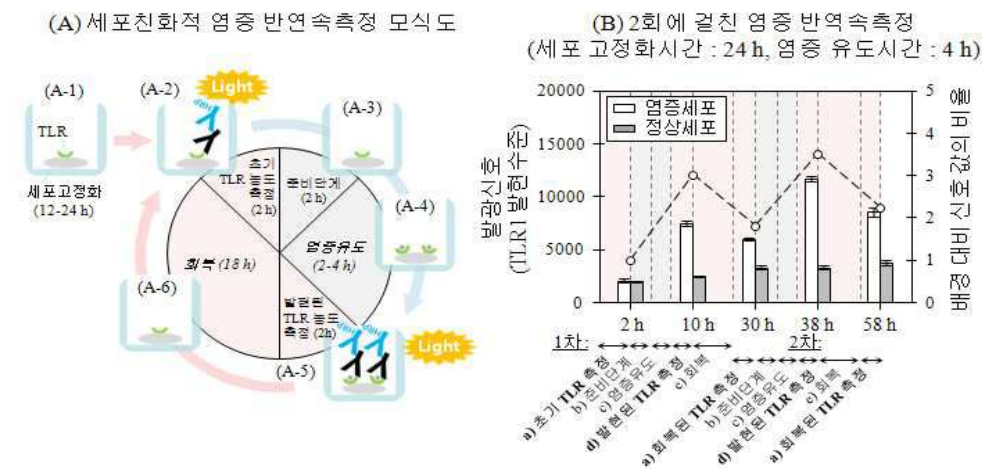
도면5



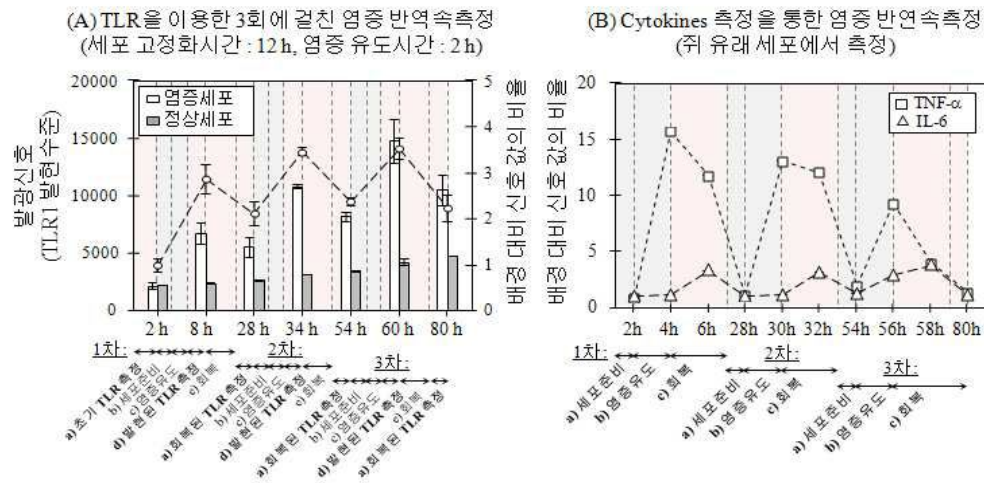
도면6



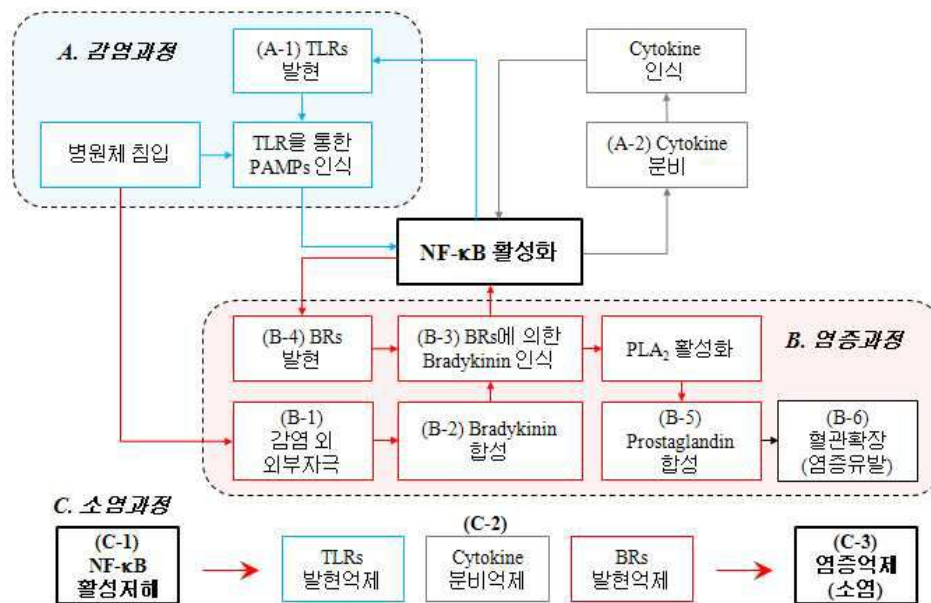
도면7



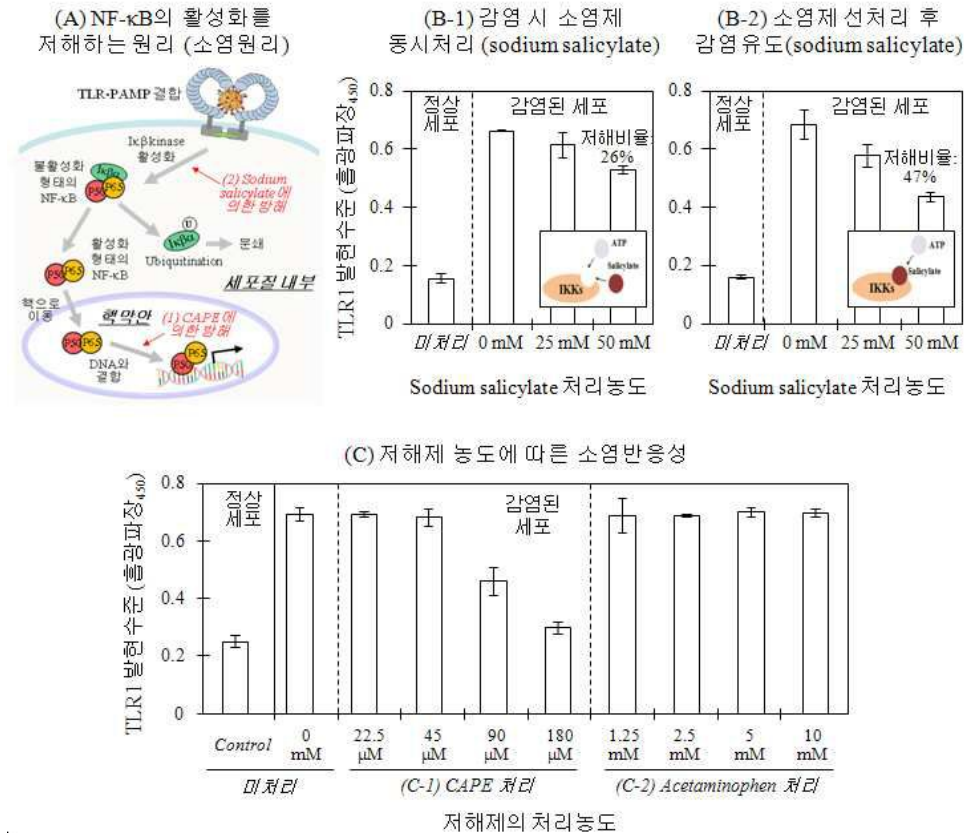
도면8



도면9

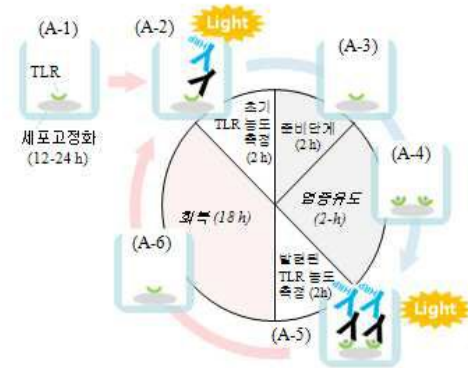


도면10

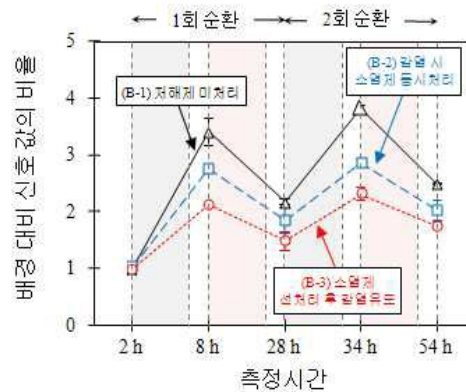


도면11

(A) 세포친화적 소염반응 반연속측정 모식도



(B) 2회에 걸친 소염 반연속측정



도면12

