(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 5 월 23 일 (23.05.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/073844 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/009615

(22) 국제출원일: 2012 년 11 월 14 일 (14.11.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0118266 2011 년 11 월 14 일 (14.11.2011) KR

(71) 출원인: **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교 내, Seoul (KR).

(72) 발명자: **손상욱 (SON, Sang-Wook)**; 110-500 서울시 종로구 이화장 1 길 29, Seoul (KR). **정상훈 (JEONG, Sang Hoon)**; 130-720 서울시 동대문구 약령시로 25 벽산아파트 103 동 204 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **김선애 (KIM, Seon Ae)**; 137-860 서울시 서초구 강남대로 309 1813 (서초동 코리아비지니스센타) I.S.A.국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

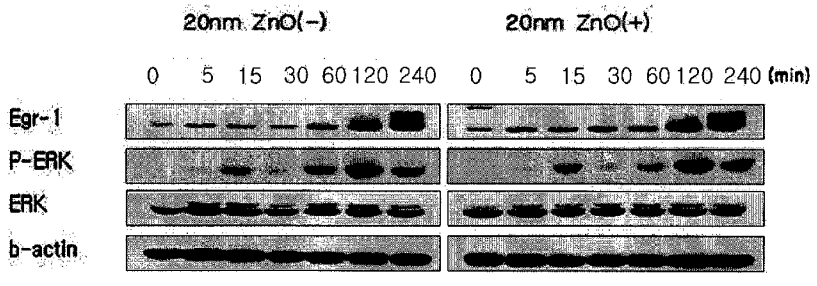
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: NANOMATERIAL-INDUCED CYTOTOXICITY DETECTION COMPOSITION AND KIT, AND NANOMATERIAL-INDUCED CYTOTOXICITY DETECTION METHOD

(54) 발명의 명칭 : 나노 물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물, 키트 및 나노물질에 의한 세포독성 검출방법



(57) Abstract: The present invention concerns a detection marker which is specific to nanomaterial-induced cytotoxicity, and provided are: a nanomaterial-induced cytotoxicity detection composition and kit comprising an ERK gene which is specifically over-expressed when nanomaterial-induced cytotoxicity is present, an Egr-1 gene which is activated by the ERK gene, and an agent for measuring the level of the mRNA thereof or protein of same; and a method for detecting nanomaterial-induced cytotoxicity by using the composition and kit. The composition, the kit and the detection method according to the present invention allow straightforward and accurate detection of cytotoxicity induced by nanomaterials comprised in, for example, the cells of nanomaterials.

(57) 요약서: 본 발명은 나노물질에 의한 세포 독성에 특이적인 검출 마커에 대한 것으로, 나노물질에 의한 세포 독성 존재시 특이적으로 과발현되는 ERK 유전자, 그에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자, 그 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물, 키트 및 이를 이용하여 나노 물질에 의한 세포 독성을 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 조성물, 키트 및 검출방법은 나노 물질의 세포 등에 포함된 나노물질에 의한 세포 독성을 간단하고 정확하게 검출할 수 있다.

WO 2013/073844 A1

명세서

발명의 명칭: 나노 물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물, 키트 및 나노물질에 의한 세포독성 검출방법

기술분야

[1] 본 발명은 생물학적 시료의 나노 물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물, 키트 및 검출방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 생물학적 시료에 포함된 나노 물질에 의한 세포 독성을 빠른 시간 내에 간단하게 검출할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 나노 물질은 최근 들어 그 효용성으로 인하여 사회적으로 과학적으로 많은 이슈가 되고 있다. 세탁기나 세제 등에 은 나노 물질이 첨가되는 것과 같이, 실제 많은 상품들에 나노 물질이 응용되고 있으며, 그 중 형광발산(Fluorescence Emission) 값을 가지는 나노 물질은 의학계에서 새로운 진단 기술로 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나, 나노 물질이 정말 안전한가 하는 물음을 가지기 시작하면서 사회적으로도 나노 물질이 들어간 상품들의 사용권한을 두고 문제가 계속적으로 생기자 나노 물질 독성의 연구가 진행되어 왔다. 그러나, 그 연구 수준이 매우 미비한 상태이며, 특히 나노 물질의 독성을 평가할 수 있는 기준이 없어 더욱 문제가 커지고 있다.

[3] 따라서, 나노 물질의 독성을 평가하는 방법으로 세포를 이용한 실험적 방법으로 세포 노출된 나노 물질의 독성에 따른 단백질 및 RNA를 조사하여 단시간 내에 보다 간단하고, 보다 정확하게 측정할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

[4] 본 발명의 배경이 되는 기술로는 대한민국 특허 KR 2009-0003356 및 대한민국 특허 KR 2008-0094939이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 전술한 종래 기술의 문제를 해결하기 위하여, 본 발명은 세포 내 나노 물질에 의한 세포 독성을 간단하고 정확하게 검출할 수 있는 조성물 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 나노물질 존재 시 특이적으로 과발현되는 ERK 유전자, 그에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물을 제공한다.

[7] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.

[8] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 조직내 Egr-1 단백질의 발현을 확인할 수 있는 면역 조직 화학 염색용 조성물일 수 있다.

[9] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 키트를 제공한다.

[10] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

[11] 또한, 본 발명은 생체 외(ex vivo)에서 생물학적 시료의 ERK 유전자 또는 ERK에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및

[12] 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 발현 수준 또는 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법을 제공한다.

[13] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준은 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 mRNA 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의한 것일 수 있다.

[14] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 단백질 수준을 측정하기 위한 방법은 항체를 이용한 방법, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역 조직 화학 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[15] 본 발명은 나노 물질에 의한 독성을 신속, 간단하고 정확하게 검출할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 ZnO의 특성을 분석한 결과를 보여주는 도이다.

[17] 도 2a 및 도 2b는 ZnO를 농도별 (dose-dependent)로 처리한 세포의 흡광도 측정결과를 나타낸 도이다. 가로축은 농도(Concentration)를 나타내며, 세로축은 세포생존도(Cell Viability)를 나타낸다.

[18] 도 3은 ZnO-NPs를 처리한 세포에서의 산화적 스트레스 형성 특징을 보여주는 도이다.

[19] 도 4는 ZnO를 처리한 세포에서의, 시간에 따른 Egr-1, p-ERK, ERK 및 b-actin 단백질 band를 나타낸 도이다.

[20] 도 5는 ZnO를 처리한 세포에서의 Egr-1의 발현량을 시간대별로 나타낸 도이다.

[21] 도 6은 ZnO를 처리한 세포에서의 P-ERK의 발현량을 시간대별로 나타낸

도이다.

[22] 도 7은 ZnO(-)와 MAPK 억제제를 동시에 처리한 경우 Egr-1의 시간대별 단백질 band를 나타낸 도이다.

[23] 도 8은 ZnO(+)와 MAPK 억제제를 동시에 처리한 경우 Egr-1와 B-actin의 시간대별 단백질 band를 나타낸 도이다.

[24] 도 9는 ZnO(+)와 MAPK 억제제를 동시에 처리한 세포에서의, Egr-1의 발현량을 나타낸 도이다.

[25] 도 10은 ZnO(-)와 MAPK 억제제를 동시에 처리한 세포에서의, Egr-1의 발현량을 나타낸 도이다.

[26] 도 11은 ZnO-NPs를 처리한 세포에서의 Egr-1 단백질의 발현 양상을 보여주는 도이다.

[27] 도 12는 ZnO-NPs를 처리한 세포에서의 P-Erk, Erk, P-JNK, JNK1, P-p38 및 p38의 발현 양상을 보여주는 도이다.

[28] 도 13은 ZnO-NPs와 MAPK 억제제 또는 ROS 억제제를 동시에 처리한 후 Egr-1 발현 양상을 보여주는 도이다.

[29] 도 14 및 도 15는 ZnO-NPs를 처리한 세포에서의 Egr-1 siRNA에 의한 TNF-α 억제 양상을 보여주는 도이다.

[30] 도 16은 마우스 피부에 ZnO를 처리하여 Egr-1 및 TNF-α 발현을 유도한 결과를 보여주는 도면이다.

[31]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[32] 이하에서 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[33] 본 발명은 ERK 유전자 또는 ERK에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자의 나노물질에 의한 세포 독성 검출 마커에 대한 것이다.

[34] 본 발명에서, "검출"은 본 발명의 목적상, 시료에 나노물질에 의한 세포 독성이 있는지 여부를 확인하는 것이다.

[35] 본 발명에서, "나노 물질"은 나노 스케일인 재료의 총칭으로 3차원적으로 볼 때 적어도 한 변의 길이가 100나노미터 이하 크기의 물질을 의미한다. 구체적으로, ZnO, TiO_2, Gold nanoparticle, Silver nanoparticle, Quantum Dots, Polystylene, nano silica 등 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[36] 본 발명에서 "검출용 마커, 검출하기 위한 마커 또는 검출마커"란 '나노물질에 의한 세포 독성이 있는 세포'를 '세포 독성이 없는 세포'와 구분할 수 있는 물질로, 나노물질에 의한 세포 독성을 나타내는 세포에서 증가양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 나노물질 검출 마커는 ERK 유전자 또는 ERK에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자로, 나노물질 존재시 발현이 증가하는 유전자들이다.

[37] 구체적으로, 본 발명은 나노물질에 의한 세포 독성이 있을 경우 특이적으로 ERK 유전자 또는 ERK에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 나노물질 검출용 조성물에 대한 것이다.

[38] 본 발명에서 "mRNA 발현수준 측정"이란 나노물질을 검출하기 위하여 생물학적 시료에서 나노물질 마커 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[39] 본 발명에서 "단백질 발현수준 측정"이란 나노물질에 의한 세포 독성을 검출하기 위하여 생물학적 시료에서 나노물질 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏 등을 사용할 수 있다.

[40] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

[41] 상기한 바와 같이 나노물질 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[42] 다클론 항체는 상기한 나노물질 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

[43] 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Jounral of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature,352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.

[44] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[45] 또한, 본 발명의 면역 조직 화학 염색용 조성물은 Egr-1 또는 이의 가용성 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있다. 상기 2차 항체 접합체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(coloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(fluorescein), 및 색소(dye) 등이 사용될수 있다. 상기 발색 기질 용액은 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB (3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(o-phenylenediamine) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충용액(0.1M NaOAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 세척액은 인산염 완충용액, NaCl 및 트윈 20을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02M 인산염 완충용액, 0.13M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충용액 (PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 가하여 3회 내지 6회 세척한다. 반응 정지용액은 황산 용액이 사용될 수 있다.

[46]

[47] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 키트에 대한 것이며, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

[48] 바람직하게, 상기 나노물질에 의한 세포 독성 검출 키트는 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[49] 상기 진단 키트는 독성 검출에 이용되는 일반적인 키트 일 수 있으며, 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다.

[50] 또한, 본 발명은 상기 나노물질 검출용 조성물 또는 상기 나노물질에 의한 세포 독성 검출키트를 이용한 나노물질에 의한 세포 독성 검출방법을 제공한다.

[51] 구체적인 일 양태로써, 본 발명은 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo)에서 생물학적 시료의 ERK 유전자 또는 ERK에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및

[52] 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 발현 수준 또는 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법에 대한 것이다.

[53] 본 발명에서 용어 "생물학적 시료"란 나노물질에 의해 나노물질 마커의 유전자 발현 수준이 차이나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[54] mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[55] 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 검출대상 시료의 mRNA 발현량을 비교할 수 있고, 나노물질 마커 유전자에서 mRNA로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여 나노물질에 의한 세포 독성을 검출할 수 있다.

[56] mRNA 발현수준 측정은 바람직하게는, 나노물질 마커로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 역전사효소 중합효소반응법 또는 DNA 칩을 이용하는 것이다.

[57] 상기의 역전사효소 중합효소반응은 반응 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 나노물질 검출 마커로 사용되는 유전자의 mRNA 발현 여부와 정도를 확인 가능하고 이를 대조군과 비교함으로써, 시료에 포함된 나노물질이 정상수준 이상인지 간편하게 확인할 수 있다.

[58] 한편, DNA 칩은 상기 나노물질 진단 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 시료에 포함된 나노물질에 의한 세포 독성이 있는지 여부를 판독할 수 있다.

[59] 생물학적 시료에서 단백질을 분리하는 과정은 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있으며 단백질 수준은 다양한 방법으로 측정할 수 있다.

[60] 상기 단백질 수준을 측정하기 위한 방법은 항체를 이용한 방법, 웨스턴 블랏, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역 조직 화학 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[61] 바람직하게는, 상기 나노물질 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용할 수 있다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀루로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 나노물질을 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과 나노물질이 과량 포함된 세포에서의 마커 유전자의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. mRNA 또는 단백질 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: Erg-1/ β-actin) 또는 상대적(예: 시그널의 상대강도) 차이로 나타낼 수 있다.

[62] 또한, 바람직하게는, 상기 나노물질 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역 조직 화학 염색을 실시하는 것이다.

[63] 정상 조직 및 나노물질이 과량 함유되어 있을 것으로 의심되는 조직을 채취 및

고정한 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀 포매 블록을 제조한다. 이들을 수 um 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 상기의 항체 중 선택된 1개와 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출 라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독한다. 이때, TNF-α의 발현도 같이 확인하여 나노물질에 의한 염증 반응도 확인할 수 있다.

[64] 또한, 바람직하게는, 상기 나노물질 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기판 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용하는 것이다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 시료에 나노물질 과량 함유 여부를 확인할 수 있다.

[65]

발명의 실시를 위한 형태

[66] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하지만, 하기 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[67]

[68] **실시예 1. ZnO 나노입자의 영향 측정**

[69] [실험예 1] 전자 현미경을 이용한 ZnO 특성 (ZnO characterization) 분석

[70] 먼저, 나노물질인 ZnO의 특성을 알아보기 위해, 투과 전자 현미경 (transmission electron microscope, TEM) 측정을 위하여 ZnO를 10ng/ml 정도 되도록 PBS에 희석하여 현미경 전용 탄소 코팅을 한 구리 200 격자 그리드 (200 mesh copper grid with carbon coating) 위에 2ul 정도 떨어뜨린 후 60℃ 오븐에 15분간 말린 후에 투과 전자 현미경을 이용하여 측정하였다. 실제 사용된 ZnO가 정확히 ZnO가 맞는지 확인하기 위해 원소 분석기 (Energy dispersion x-ray spectroscopy)를 사용하여 측정하였다. 그 밖의 ZnO의 특성을 도 1에 나타내었다.

[71]

[72] [실험예 2] 세포 독성 측정 실험(cell viability assay)

[73] Human Keratinocyte (HaCaT) 세포와 Human epidermal keratinocyte, neonatal (HEKn, primary keratinocyte)를 96well culture plate에 $1X10^3$ cell/100ul의 농도로 준비하고, HaCaT의 경우 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 배지를 100ul 첨가하고, HEKn의 경우 growth factor가 들어간 전용 배지 100ul를 첨가한 후, CO_2배양기(incubator)에서 24시간 동안 배양한 후, ZnO를 농도별 (dose-dependent)로 처리하였다. 그 후, 세포생존도 (cell viability) 측정 용액 CCK-8(Dojindo 회사 제품)을 각 well에 10ul씩 첨가하고, 4시간 동안 CO_2 배양기(incubator)에서 배양 후 ZnO가 흡광도 측정 시에 측정을 방해하는 것을

감안하여 새로운 96well plate로 50ul씩 조심스럽게 옮긴 후, microplate reader기를 이용하여 450nm 파장 값으로 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[74] 도 2a 및 도 2b를 참고하면, ZnO가 세포에게 있어 독성을 발현하는 것임을 알 수 있다.

[75]

[76] [실험예 3] 나노입자(ZnO-NPs)에 의해 변화된 활성 산소 측정 (ROS measurement)

[77] Human Keratinocyte (HaCaT) 세포를 6well culture plate에 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여, CO_2 배양기(incubator)에서 24시간 동안 배양한 후, 10ul ZnO를 처리하였다. 그 후, ZnO에 의하여 세포내에 생성되어지는 세포질(cytosolic)과 마이토콘드리아(mitochondria) 내의 활성 산소(Reactive oxigen species)를 측정하기 위해 10nM 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Invitrogen)와 5uM MitoSOX™ (Invitroen)를 각각 처리하고 CO_2배양기(incubator)에서 20분간 배양한 후 HBSS로 washing 한 후, 염색하여 유세포분석기(fluorescense activated cell sorter, FACS)를 이용하여 그 파장 값을 측정한다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 a는 10 μg/ml ZnO-NPs로 30분 동안 처리된 HaCaT 세포에서의 세포내 ROS 유세포분석 결과를 나타낸다. 도 3의 b는 DCF-DA 염색에 의한 세포질 ROS (과산화수소) 및 MitoSOX™ 염색에 의한 미토콘드리아 ROS (초과산화물)의 형광강도의 평균값을 나타낸 막대그래프이다(** (P<0.01) indicates a statistically significant difference compared to control (no treatment)).

[78]

[79] **실시예 2. 웨스턴 블랏 분석 (western blot assay)**

[80] HaCaT 세포를 60mm cell culture dish에 분주한 후, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin (P/S)이 첨가한 DMEM 배지를 처리한 후, CO_2 배양기(incubator)에서 24시간 배양하였다. 그 후, FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지(hyclone 회사제품)를 2ml 첨가한 후, 18시간 동안 CO_2 배양기(incubator)에서 배양하였다. 이 후, ZnO를 10ug/ml의 농도로 처리하고 시간대별 (time-dependent; 0, 5, 15, 60, 120, 240 분)로 처리한 후, 정해진 시간에 따라 plate 내의 배지를 제거하고 1x PBS 1ml을 처리한 후 scrapper를 이용하여 plate 내의 세포를 긁어내어 1.5 ml tube에 옮긴 후, 원심분리(centrifuge)하여 상층액은 버리고 침전된 세포(pellet)만 모았다. 시간대 별로 모은 침전된 세포(pellet)에 RIPA cell lysis buffer를 침전된 세포(pellet) 양에 따라 처리를 하고, ice에 10분간 3번씩 voltexing을 한 후 4℃ 14,000rpm에서 30분간 원심분리(centrifuge)하였다. 이때 수득한 상층액을 다른 1.5 ml tube에 옮기고 BCA 정량법(gendepot 회사제품)을 이용하여 정량하였다.

[81] 정량된 샘플은 정량값에 맞추어 동일한 양의 샘플이 되도록 다시 다른 1.5 ml

tube로 만들고, 총량이 동일하도록(total 1X) 로딩버퍼(5X loading buffer)를 첨가한 후, 각 샘플을 95℃에서 5분간 배양(incubation)하였다. 이 후, 단백질 분리를 위한 비스아크릴아미드 겔(bisacrylamide gel)에 상기 샘플을 각각 27 ug씩 로딩(loading)하고, 전기영동 (electrophoresis) 하였다(Bio-rad 회사제품).

[82] 전기영동이 끝난 상기 샘플을 PVDF membrane(bio-rad 회사제품)에 투과시키고(transfer), 탈지유(skim-milk;non-fat 5%) 및 TBST가 1:1의 중량비로 혼합된 혼합물에 20분간 blocking을 하였다. Blocking이 끝난 후, Egr-1, β-actin primary antibody (sigma 제품), p-ERK, ERK primary antibody (cell signaling 제품)를 각각 2000:1로 탈지유(skim-milk;non-fat 5%) 및 TBST가 1:1의 중량비로 혼합된 혼합물에 넣고, 4℃에서 overnight 시켰다. 다음날 1x TBST 에 5분간 3번씩 세척(washing)을 하고, Egr-1, p-ERK, ERK는 2000:1 rabbit secondary antibody를 β-actin은 2000:1 mouse secondary antibody를 탈지유(skim-milk;non-fat 5%) 및 TBST가 1:1의 중량비로 혼합된 혼합물에서 1시간 동안 배양(incubation)한 후 10분간 3번씩 세척(washing) 하고, film을 이용하여 각각의 단백질 band를 얻었다. Egr-1, p-ERK, ERK 및 b-actin에 대한 시간대별 단백질 band를 도 2에 나타내었다. 또한, 도 5 및 도 6에 Egr-1의 발현량 및 P-ERK의 시간대별 발현량을 각각 나타내었다.

[83] 도 4 내지 도 6을 참고하면, 20nm ZnO를 처리한 경우, Egr-1 단백질 및 ERK 단백질의 발현이 시간대별로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 나노물질에 의한 세포 독성 검출의 스크린 단백질로 Egr-1 또는 ERK이 유용함을 확인하였다.

[84]

[85] **실시예 3. MAPK 억제제 분석 (MAPK inhibitor assay)**

[86] ZnO를 처리하기 30분 전에 MAPK (mitogen-activated proteinkinase) 억제제 (U0126: ERK inhibitor, SB600125: p38 inhibitor, SP239063: JNK inhibitor- sigma 제품)를 먼저 처리하고, 30분 후 다시 새로운 FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지를 2ml 처리하고, ZnO를 처리한 후 2시간 후에 배지를 제거하고, 1x PBS를 1ml 처리하여 scrapper를 이용하여 긁어낸 후 1.5ml tube에 옮긴 것을 제외하고, 실시예 2와 같은 방법으로 western blot assay를 시행하였다.

[87] ZnO와 MAPK 억제제의 동시 처리에 따른 Egr-1 및 b-actin의 시간대별 단백질 band를 도 7 및 도 8에 나타내었다. 또한, ZnO와 MAPK 억제제의 동시 처리에 따른 Egr-1의 발현량을 도 9 및 도 10에 나타내었다.

[88] 도 7 내지 도 10을 참고하면, ERK 억제제인 U0126을 처리한 군의 Egr-1 단백질 발현이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 스크린 단백질인 Egr-1 발현 증가는 ERK 시그널에 의한 것임을 알 수 있다.

[89]

[90] **실시예 4. ZnO-NPs 유도 Erg-1 단백질 발현양상 추가 확인**

[91] **[실험예 1] 루시퍼레이스 활성 측정 분석(Luciferase activity assay)**

[92] 1000베이스 페어(base pair, bp)의 Egr-1 프로모터(promoter)를 중합 연쇄 반응을 하여 유전체 DNA클론(genomic DNA)로부터 합성을 하고 luciferase 유전자를 가진 pGL4.17 luciferase reporter vector에 제한효소를 이용하여 결합시키고 대장균(E. coli)에 형질 도입(transformation)시켜 다량으로 얻었다. Human Keratinocyte (HaCaT) 세포를 60mm cell culture dish에 분주한 후, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin (P/S)을 첨가한 DMEM 배지를 처리한 후, CO_2 배양기(incubator)에서 24시간 배양하였다. 그 후, FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지(hyclone 회사제품)를 2ml 첨가하고, 100ul의 OPTI-MEM 배지에 1ug의 합성 벡터를 첨가하고, 마찬가지로 97ul의 OPTI-MEM 배지에 형질주입제제(transfection reagent)인 lipofectamine 2000(invitrogen 회사 제품)을 3ul 섞은 후 5분이 지난 후에 둘을 각각 섞고 20분간 기다렸다. 그 후, 합성 벡터 mixture를 준비된 60mm cell culture dish에 분주하고 잘 흔들어 주었다. 5시간 후에 기존의 배지를 제거하고, 10% FBS만 들어있는 DMEM배지를 2ml 처리하고 48시간 후에 ZnO를 농도별로 처리하고 24시간 후에 배지를 제거하고 1x PBS 1ml을 처리한 후 scrapper를 이용하여 plate 내의 세포를 긁어내어 1.5 ml tube에 옮긴 후, 원심분리(centrifuge)하여 상층액은 버리고 침전된 세포(pellet)만 모았다. 침전된 세포(pellet)에 luciferase 전용 cell lysis buffer를 처리를 하고, ice에 10분간 3번씩 voltexing을 한 후 4℃ 14,000rpm에서 30분간 원심분리(centrifuge)하였다. 그 후, 샘플 50ul에 200ul의 luciferase에 의하여 빛을 낼 수 있는 luciferin을 처리하고 luciferase reader기(Glomax2000, promega 제품)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 도 11의 c의 결과로 농도에 따라 Egr-1의 전사조절이 이루어지고 있음을 확인하였다. 도 11의 c에서 ZnO-NPs에 의해 pEGR(-998/+170)/Luc의 프로모터가 활성화되었고, 세포는 pEGR(-998/+170)/Luc로 형질전환된 후, 1, 5 및 10 μg/ml ZnO-NPs 로 24시간 동안 처리되었고, 루시페라제 활성은 루미노미터로 측정되었다.

[93]

[94] **[실험예 2] 면역형광 분석(immunoflourescense assay)**

[95] HaCaT 세포를 cover glass가 들어간 6 well culture plate에 분주한 후, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin (P/S)를 첨가한 DMEM 배지를 처리한 후, CO_2 배양기(incubator)에서 24시간 배양하였다. 그 후, FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지(hyclone 회사제품)를 2ml 첨가한 후, 18시간 동안 CO_2 배양기(incubator)에서 배양하였다. 그 후, 배지를 모두 제거하고 1XPBS로 3번 washing 한 후에 1ml 3.8% formaldehyde를 10분간 처리하고 다시 제거한 후 다시 같은 방법으로 3번 washing하고 0.1% triton-X100을 1ml 처리하고 제거 washing 후 2% BSA를 첨가하여 1시간동안 37℃에서 blocking하였다. 다시 제거 washing 후에 1:500이 되도록 Egr-1 primary a항체를 1% BSA가 들어간 0.1% triton-X100에 1시간 37℃에서 incubation하고 제거 washing 후에 1:500이 되도록 secondary 항체를 처리하고 37℃에서 30분간 처리 후, 다시 제거 washing 후에 cover glass의

물기를 전부 말리고 slide glass 위에 mount solution을 이용하여 고정시켰다. 그리고 형광 현미경을 이용하여 결과를 확인하였다. 도 11의 d에서 Egr-1이 세포핵에서 많이 발현하고 있음을 통하여 Egr-1의 전사조절 작용이 일어나고 있음을 알 수 있었다. 도 11의 d에서 Egr-1 발현은 HaCaT 세포를 2시간 동안 ZnO-NPs로 자극한 후 검출한 결과를 보여주며, 세포들은 Egr-1 항체와 함께 배양되었고, 신호는 Cy3 anti-rabbit (red) 면역형광에 의해 검출되었다. DAPI (blue)는 핵을 표지하기 위해 2차 항체와 함께 첨가되었다 (**P<0.01, ***P<0.001 compared with untreated samples).

[96]

[97] **[실험예 3] 웨스턴 블랏 분석(western blot assay)**

[98] 실시예 2와 같은 방법으로 실시하였다. 즉 세포는 1 ~ 50 μg/ml 농도의 ZnO-NPs로 2시간 동안 처리되었고, ZnO-NPs 자극 후 Egr-1 발현이 anti-Egr-1 항체를 이용하여 웨스턴 블럿으로 측정되었고, 그 결과를 도 11의 a 및 b에 나타냈다. 따라서 농도별 및 시간별로 ZnO 처리에 따른 Egr-1의 단백질 밴드의 발현은 도 11의 a, b에서 각각 확인할 수 있다. 또한, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38 및 b-actin에 대한 시간대별 단백질 band를 도 12의 a, b, c에 각각 나타내었다. 도 12의 a, b, c에서 HaCaT 세포에서 MAP 키나아제 발현 수준은 전체 단백질 추출물 및 항체를 이용하여 웨스턴 블럿으로 분석되었다.

[99]

[100] **[실험예 4] MAPK 억제제 분석 (MAPK inhibitor assay)**

[101] ZnO를 처리하기 30분 전에 MAPK(mitogen-activated proteinkinase) 억제제 (U0126: ERK inhibitor, SB600125: p38 inhibitor, SP239063: JNK inhibitor- sigma 제품)를 먼저 처리하고, ZnO를 처리한 후 30분 후 다시 새로운 FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지를 2ml 처리하고, ZnO를 처리한 후 2시간 후에 배지를 제거하고, 1x PBS를 1ml 처리하여 scrapper를 이용하여 긁어낸 후 1.5ml tube에 옮긴 것을 제외하고, 실시예 2와 같은 방법으로 western blot assay를 시행하였다.

[102] ZnO와 MAPK 억제제의 동시 처리에 따른 Egr-1 및 b-actin의 시간대별 단백질 band를 도 13의 A에 나타내었다. 도 13의 A를 참고하면, ERK 억제제인 U0126을 처리한 군의 Egr-1 단백질 발현이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, JNK, p38 억제제는 Egr-1 단백질 발현에 영향을 미치지 않았다 (*P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 compared with no treated samples). 따라서, 스크린 단백질인 Egr-1 발현 증가는 ERK 시그널에 의한 것임을 알 수 있다.

[103]

[104] **[실험예 5] ROS 억제제 분석 (ROS inhibitor assay)**

[105] ZnO를 처리하기 2시간 전에 먼저 배양된 세포에 항산화 물질인 N-acetyl cystein(NAC)을 10uM/ml의 농도로 먼저 처리하고, 새로운 FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지를 2ml 처리하고, ZnO를 처리한 후 1시간 후에 배지를 제거하고, 1x PBS를 1ml 처리하여 scrapper를 이용하여 긁어낸 후 1.5ml tube에

옮긴 것을 제외하고, 실시예 2와 같은 방법으로 western blot assay를 시행하였다. 항산화 물질인 NAC를 처리 하였을 때, 도 13의 B와 C에서 Egr-1과 p-ERK의 단백질 발현 밴드가 현저하게 감소하였다. 따라서, 스크린 단백질인 Egr-1과 p-ERK의 발현이 ROS에 의하여 증가하는 것임을 알 수 있다 (B: HaCaT, C: HEKn). 이때 데이터 포인트는 Two-way Anova를 이용하여 비교된 3회 반복 실험의 β-actin-정규화된 평균값 및 ERK-정규화된 평균값을 나타낸다 (***P<0.001).

[106]

[107] **[실험예 6] 작은 간섭 RNA (small interfering RNA, siRNA) 분석 (siRNA assay)**

[108] Human Keratinocyte (HaCaT) 세포와 Human epidermal keratinocyte, neonatal (HEKn, primary keratinocyte)를 60mm cell culture dish에 분주한 후, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin (P/S)를 첨가한 DMEM 배지를 처리한 후, CO_2 배양기(incubator)에서 24시간 배양하였다. 그 후, FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지(hyclone 회사제품)를 2ml 첨가하고, 100ul의 OPTI-MEM 배지에 10nM의 농도가 되도록 Egr-1 siRNA와 비교 control인 scambled siRNA를 섞고, 마찬가지로 97ul의 OPTI-MEM 배지에 형질주입제제(transfection reagent)인 lipofectamine 2000(invitrogen 회사 제품)을 3ul 섞은 후 5분이 지난 후에 둘을 각각 섞고 20분간 기다렸다. 그 후, siRNA mixture를 준비된 60mm cell culture dish에 분주하고 잘 흔들어 주었다. 5시간 후에 기존의 배지를 제거하고, 10% FBS만 들어있는 DMEM배지를 2ml 처리하고 48시간 후에 ZnO를 Egr-1의 경우는 1시간 처리하고, TNF-α의 경우는 12시간 처리 한 후에 배지를 제거하고, TRiZol(invitrogen 제품)을 500ul 처리하고 scrapper를 이용하여 긁어낸 후 1.5ml tube에 옮겼다. 그 후, 각각의 tube에 100ul의 chloroform을 처리하고 강하게 흔들어 준 후 원심분리기를 이용하여 12,000rpm에서 15분간 처리한 후 위쪽은 맑은 용액을 다른 tube에 옮기고, 250ul의 isopropanol을 처리 한 후 상온에서 10분간 두었다. 그 후, 다시 원심분리기를 이용하여 12,000rpm에서 10분간 처리한 후 용액을 전부 제거하고 DEPC-water에 70% 에탄올을 첨가한 용액을 500ul 처리하고 다시 같은 방법으로 5분간 원심분리하였다. 그 후, 침전물(RNA)이 투명해 질 때까지 말린 후 DEPC-water를 30ul씩 첨가하였다. 이후 1ug이 되도록 계산하여 RNA를 넣고 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하고 Taq polymerase를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 하고, 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 한 후, 밴드를 확인하였다.

[109] 도 14의 A, B에서 Egr-1 siRNA를 처리한 샘플에서 TNF-α 발현이 현저하게 줄어든 것으로 TNF-α의 발현이 Egr-1에 의하여 조절되는 것임을 확인하였다 (A: HaCaT, B: HEKn). 도 14에서 Egr-1 siRNA 또는 scrambled siRNA는 Lipofectamine ™ 2000을 이용하여 HaCaT 세포로 도입되었고, TNF-α mRNA 발현 수준은 12시간 동안 10 μg/ml ZnO-NPs로 자극한 후 RT-PCR (a) 및 ELIZA (b)로

측정되었다. (***P<0.001 indicates a statistically significant difference compared to no treated sample (a, b))

[110]

[111] **[실험예 7] 효소 결합 면역흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)**

[112] Human Keratinocyte (HaCaT) 세포와 Human epidermal keratinocyte, neonatal (HEKn, primary keratinocyte)를 60mm cell culture dish에 분주한 후, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin (P/S)을 첨가한 DMEM 배지를 처리한 후, CO_2 배양기(incubator)에서 24시간 배양하였다. 그 후, FBS와 P/S가 들어있지 않은 DMEM배지(hyclone 회사제품)를 2ml 첨가하고, 100ul의 OPTI-MEM 배지에 10uM의 농도가 되도록 Egr-1 siRNA와 비교 control인 scambled siRNA를 섞고, 마찬가지로 97ul의 OPTI-MEM 배지에 형질주입제제(transfection reagent)인 lipofectamine 2000(invitrogen 회사 제품)을 3ul 섞은 후 5분이 지난 후에 둘을 각각 섞고 20분간 기다렸다. 그 후, siRNA mixture를 준비된 60mm cell culture dish에 분주하고 잘 흔들어 준다. 5시간 후에 기존의 배지를 제거하고, 10% FBS만 들어있는 DMEM배지를 2ml 처리하고 48시간 후에 ZnO를 12시간 처리 한 후에 배지를 15ml tube에 모은 후 사용 전까지 -70℃에 보관한다. 96well plate에 coating buffer를 이용하여 24시간 동안 coating을 하고 TNF-α 항체를 coating buffer처리된 plate에 처리하고 2시간 동안 두었다. 그 후, washing을 하고 농축을 시킨 샘플을 50ul 처리하여 2시간동안 두고, 이후 washing을 하여 기질을 넣은 후 색의 변화를 확인하고 micro reader기를 이용하여 흡광도를 분석하였다. 도 15의 A, B는 흡광도를 그래프화 한 것으로 Egr-1 siRNA 처리 샘플에서 그 발현이 현저하게 줄어드는 것을 통하여 세포 외로 분비되는 TNF-α 발현이 Egr-1에 의하여 조절되는 것임을 확인하였으며, 염증 반응이 발현되는 것임을 확인하였다.(***P<0.001 indicates a statistically significant difference compared to no treated sample ZnO-NPs + Scrambled siRNA. (** indicates a statistically significant difference compared to ZnO-NPs + Scambled siRNA (P<0.01)).

[113]

[114] **[실험예 8] 면역 조직 화학 분석(immunohistochemostry assay)**

[115] 구입한 누드마우스에 1% citrate/HEPES buffer (pH 7.3)에 80% glycerol이 첨가된 용액에 50mg/ml ZnO을 첨가하고 누드마우스 등에 매일 3주간 처리를 하였다. 그 후, 마우스에서 피부를 채취하고 업체(한국CFC 병리연구소)를 통하여 면역 조직 화학 염색을 실시하여 Egr-1과 TNF-α의 발현을 현미경으로 확인하였다. 도 16에 나타난 바와 같이, ZnO를 처리한 그룹의 마우스 피부에서 처리하지 않은 그룹의 마우스보다 Egr-1과 TNF-α의 발현이 현저하게 증가된 것을 확인하여 세포 실험뿐만 아니라 실제 적용되는 마우스 실험에서도 염증반응이 일어나는 것임을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] ERK 유전자 또는 ERK에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 조직내 Egr-1 단백질의 발현을 확인할 수 있는 면역 조직 화학 염색용 조성물인 것인 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 조성물.

[청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 키트.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출용 키트.

[청구항 6] 생체 외(ex vivo)에서 세포 내 ERK 유전자 또는 ERK에 의해 활성화되는 Egr-1 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 발현 수준 또는 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 세포 내 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법.

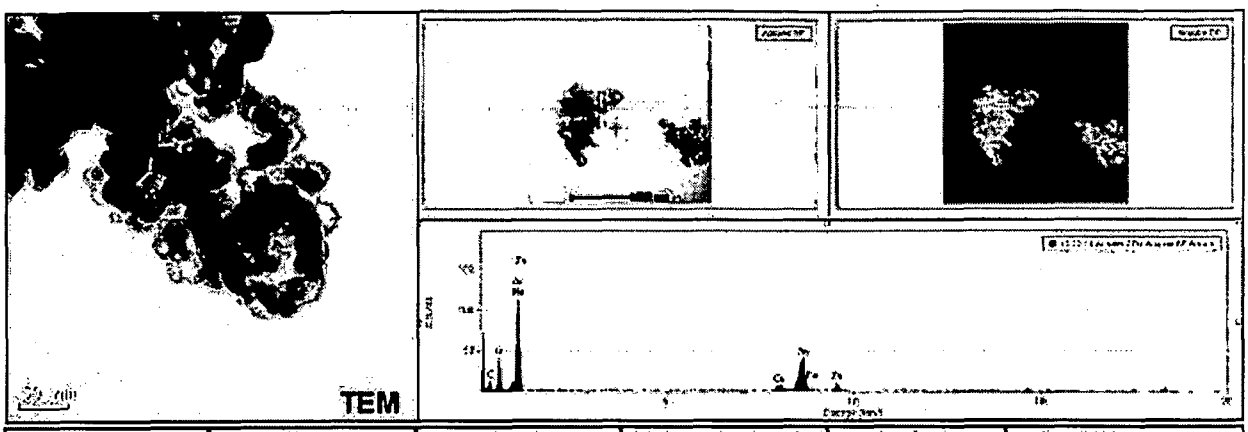
[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 유전자의 발현 수준은 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 것인 세포 내 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 mRNA 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의한 것인 세포 내 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법.

[청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 단백질 수준을 측정하기 위한 방법은 항체를 이용한 방법, 웨스턴 블랏, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역 조직 화학 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것인 세포 내 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법.

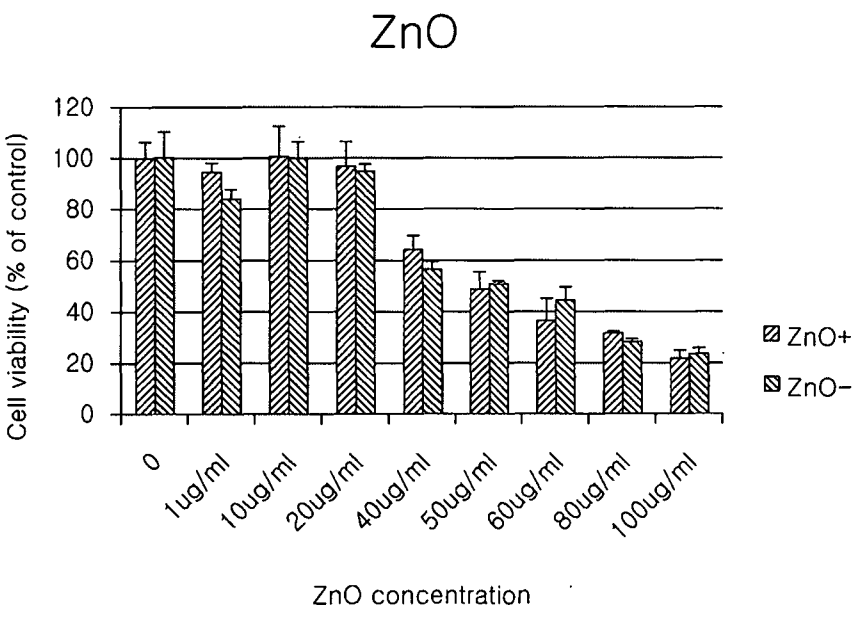
[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 단백질을 측정하기 위한 방법은 면역 조직 화학 염색법이고, TNF-α의 발현도 같이 확인하는 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법.

[Fig. 1]

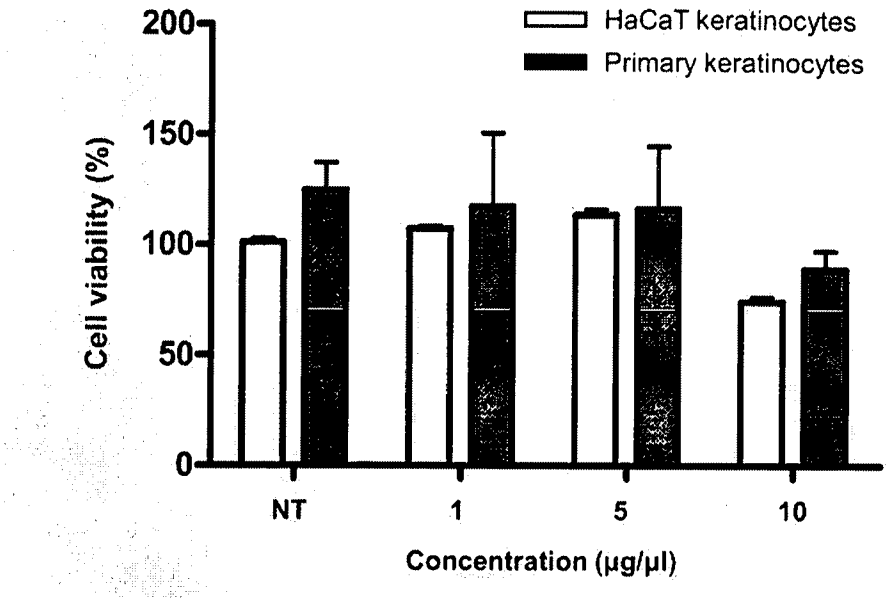


Source	Form	Average TEM size (nm±sd)	Hydrodynamic diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Surface charge modification
Sumitomo	Spherical	21.20±5.72	181	-40	Citrate

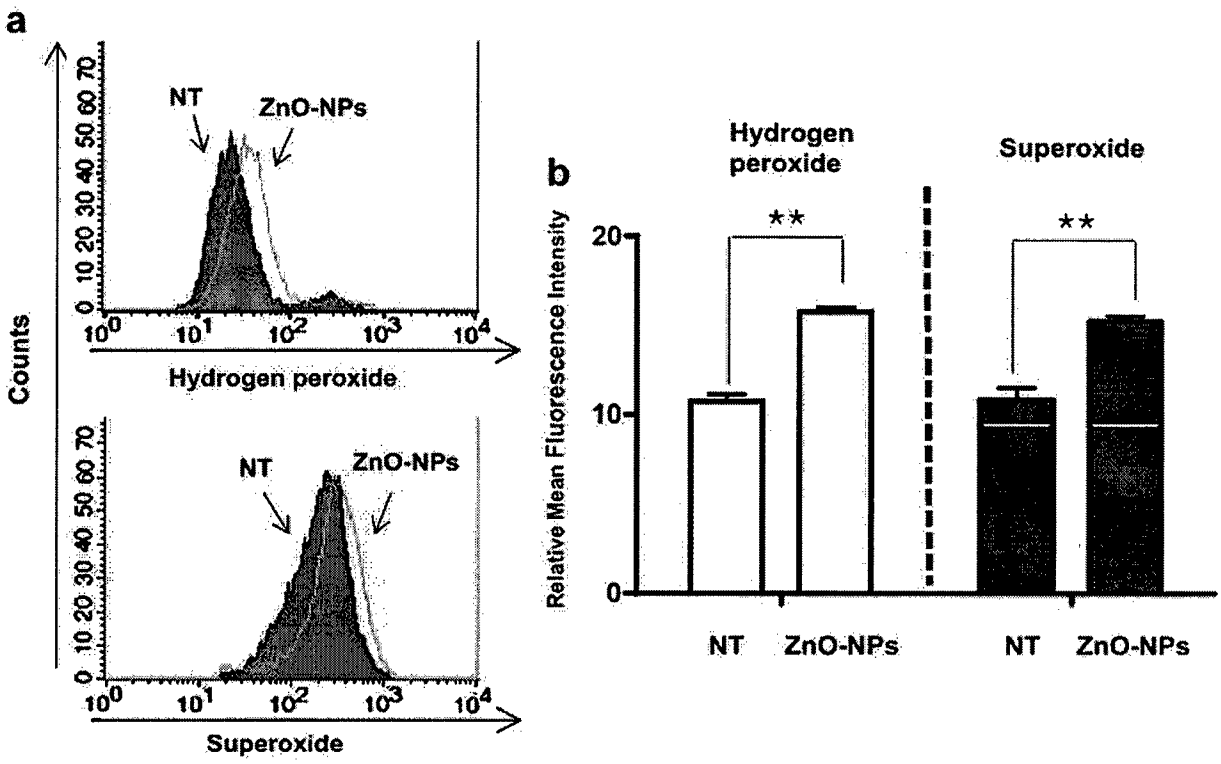
[Fig. 2a]



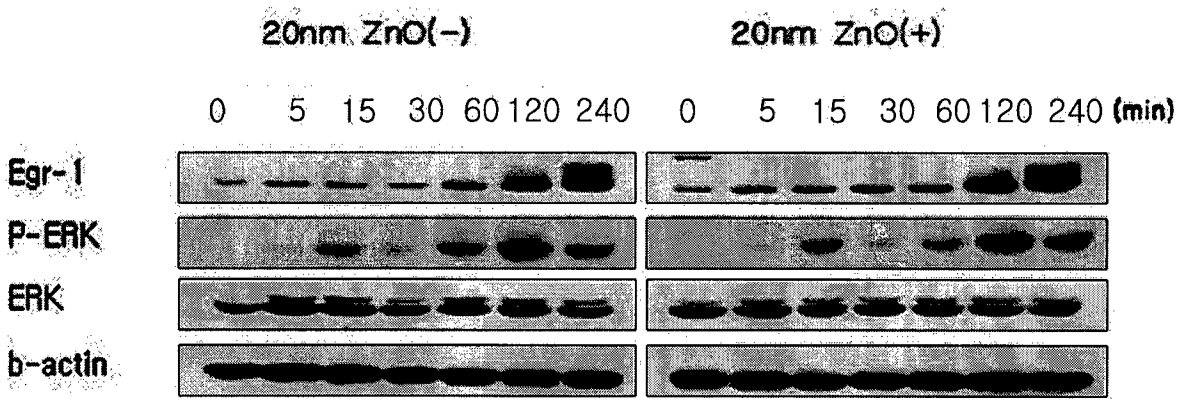
[Fig. 2b]


HaCaT keratinocytes
Primary keratinocytes
Cell viability (%)
200
150
100
50
0
NT
1
5
10
Concentration (μg/μl)

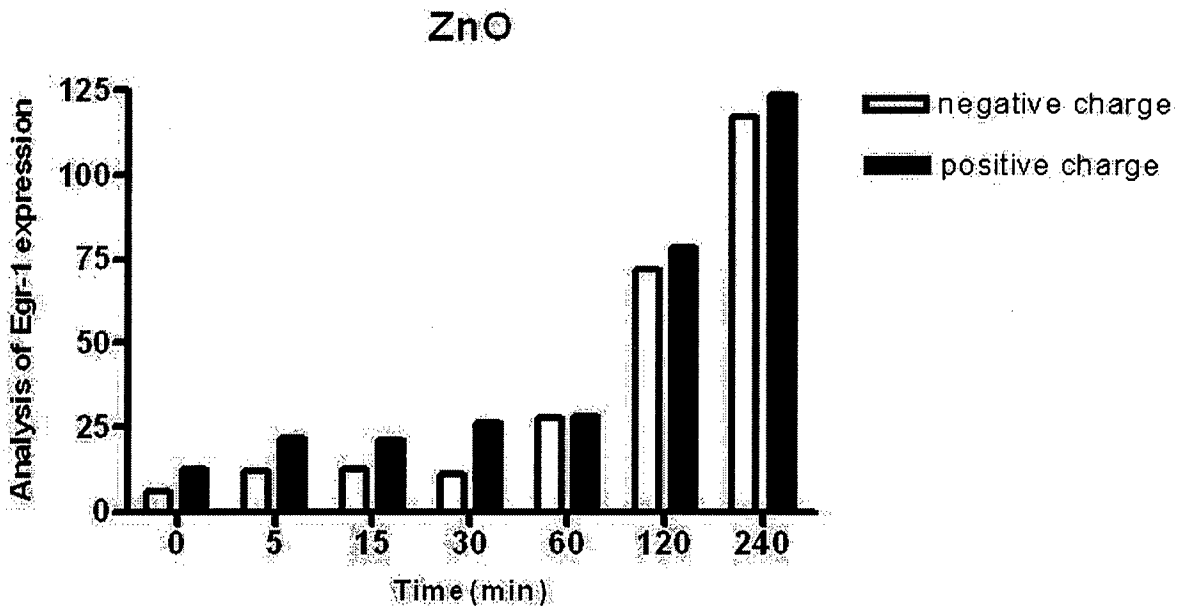
[Fig. 3]


a
Counts
NT
ZnO-NPs
Hydrogen peroxide
Superoxide
b
Hydrogen peroxide
Superoxide
Relative Mean Fluorescence Intensity
**
NT
ZnO-NPs

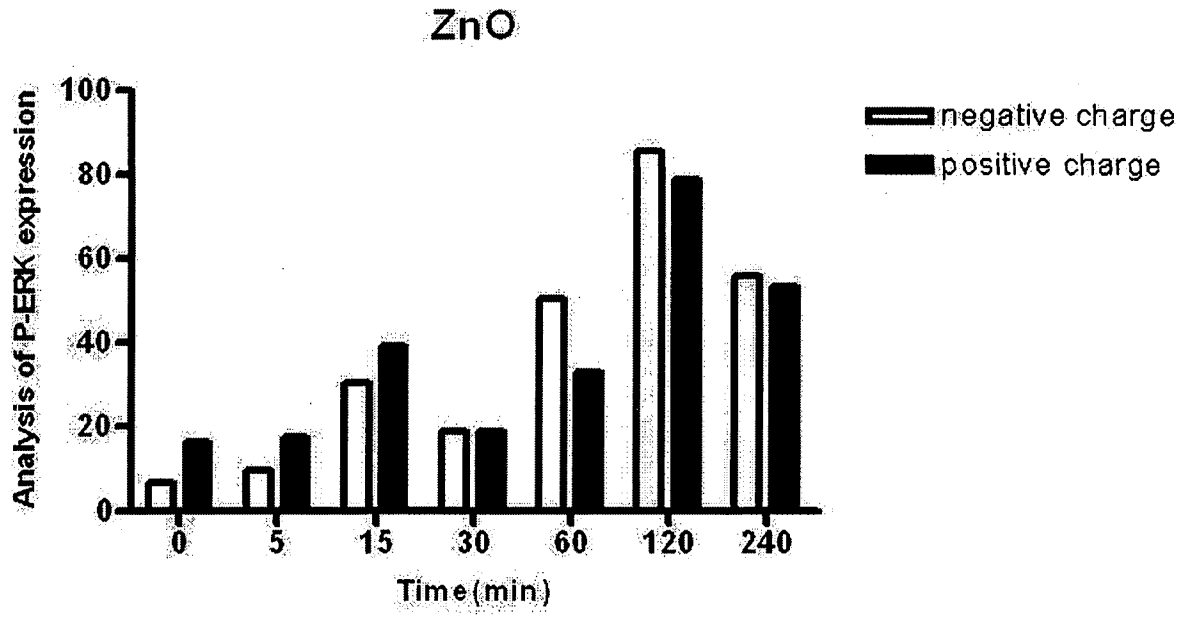
[Fig. 4]


20nm ZnO(-)
20nm ZnO(+)
0 5 15 30 60 120 240 (min)
Egr-1
P-ERK
ERK
b-actin

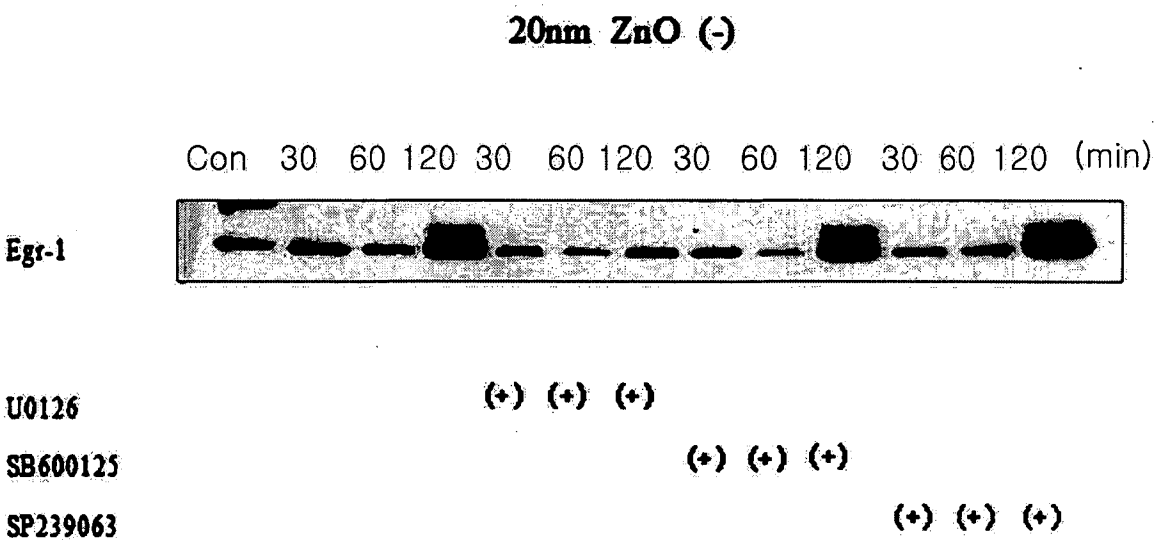
[Fig. 5]


ZnO
Analysis of Egr-1 expression
125
100
75
50
25
0
0
5
15
30
60
120
240
Time (min)
negative charge
positive charge

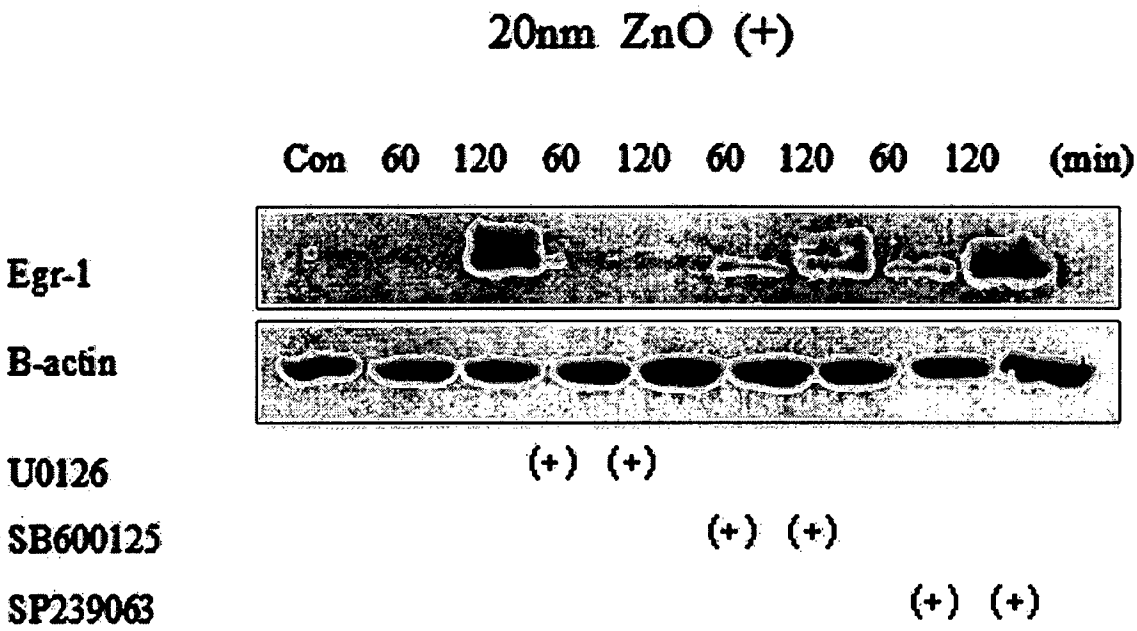
[Fig. 6]


ZnO
Analysis of P-ERK expression
100
80
60
40
20
0
0
5
15
30
60
120
240
Time (min)
negative charge
positive charge

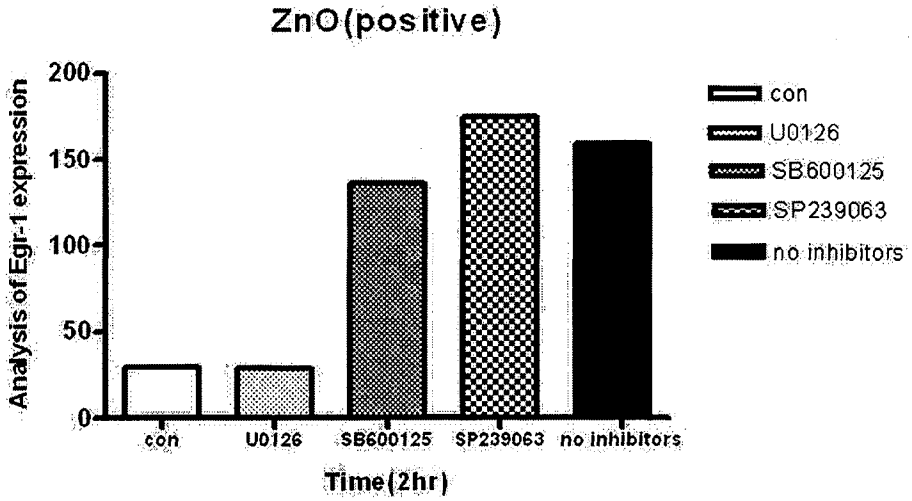
[Fig. 7]


20nm ZnO (-)
Con 30 60 120 30 60 120 30 60 120 30 60 120 (min)
Egr-1
U0126
SB600125
SP239063
(+) (+) (+)
(+) (+) (+)
(+) (+) (+)

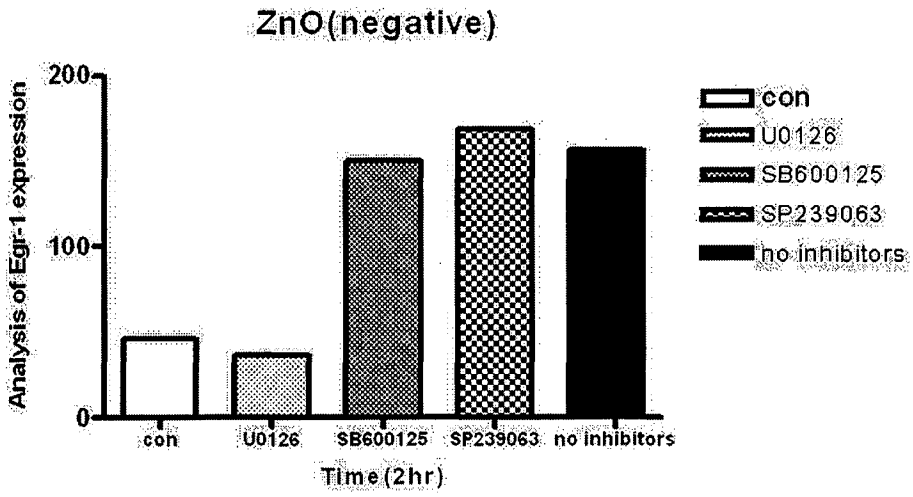
[Fig. 8]


20nm ZnO (+)
Con 60 120 60 120 60 120 60 120 (min)
Egr-1
B-actin
U0126 (+) (+)
SB600125 (+) (+)
SP239063 (+) (+)

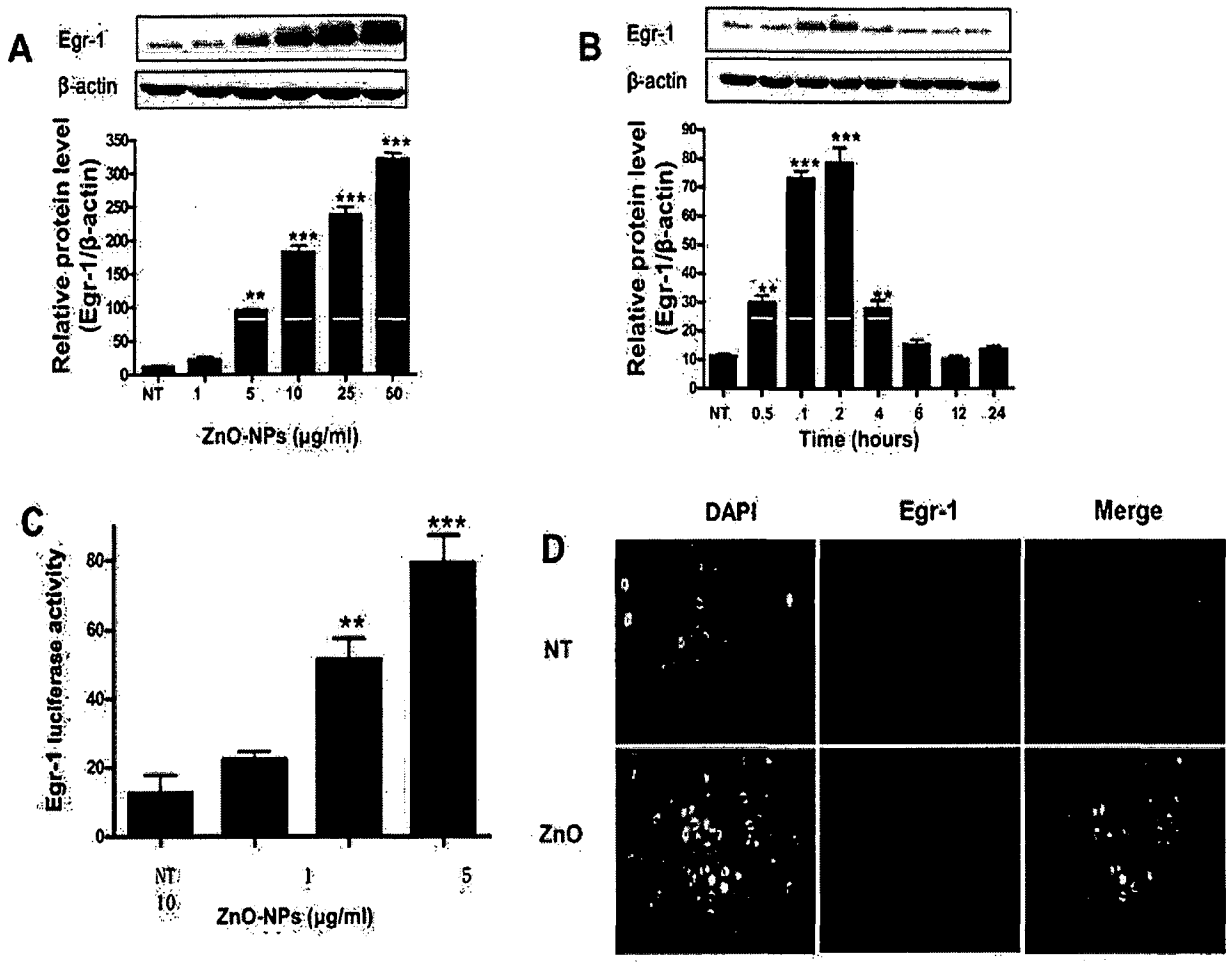
[Fig. 9]


ZnO(positive)
Analysis of Egr-1 expression
200
150
100
50
0
con
U0126
SB600125
SP239063
no inhibitors
Time(2hr)
con
U0126
SB600125
SP239063
no inhibitors

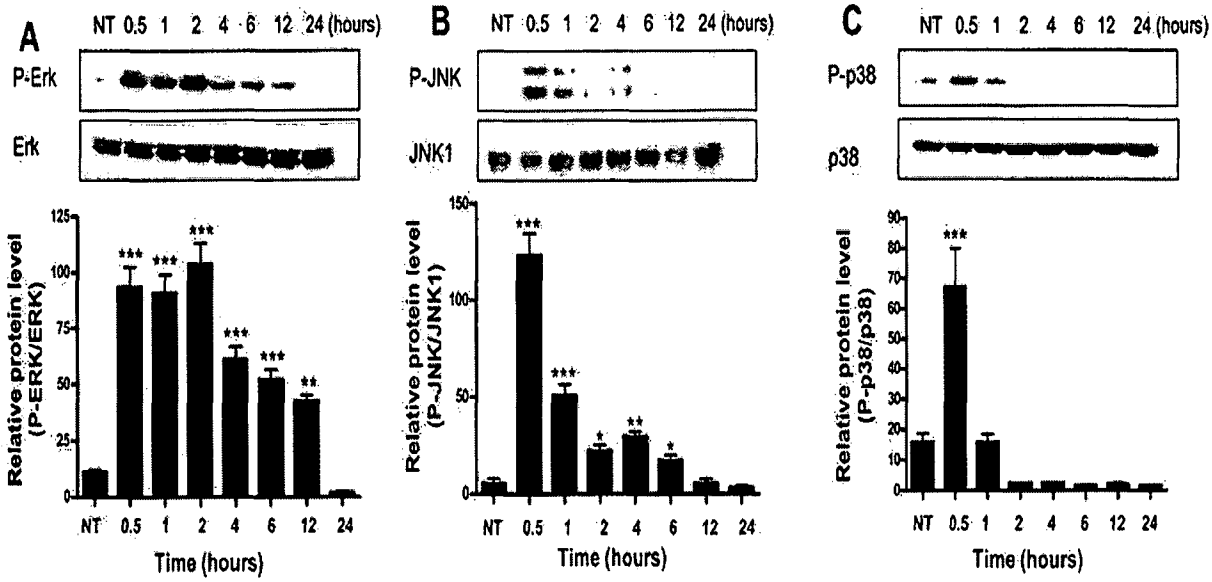
[Fig. 10]


ZnO(negative)
Analysis of Egr-1 expression
200
100
0
con
U0126
SB600125
SP239063
no inhibitors
Time(2hr)
con
U0126
SB600125
SP239063
no inhibitors

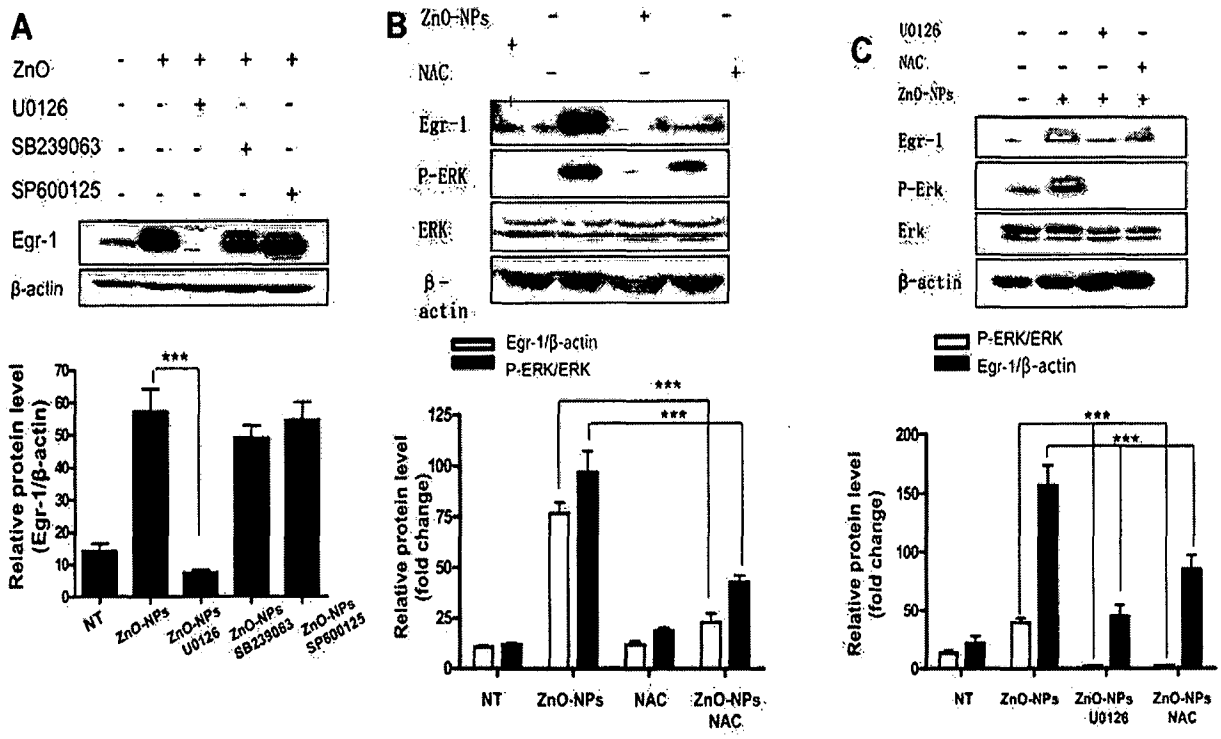
[Fig. 11]


A
Egr-1
β-actin
Relative protein level (Egr-1/β-actin)
ZnO-NPs (μg/ml)
B
Egr-1
β-actin
Relative protein level (Egr-1/β-actin)
Time (hours)
C
Egr-1 luciferase activity
ZnO-NPs (μg/ml)
D
DAPI
Egr-1
Merge
NT
ZnO

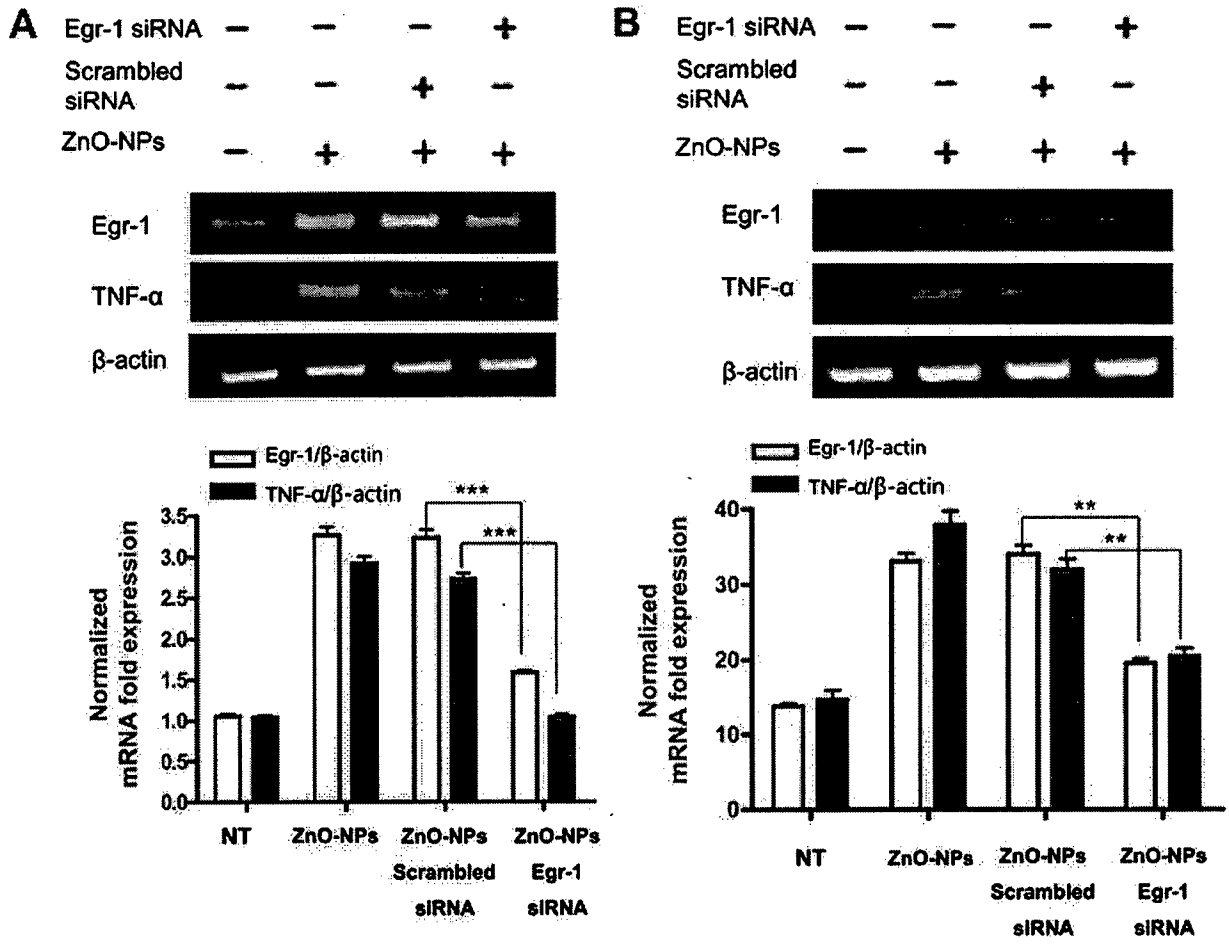
[Fig. 12]


A
NT 0.5 1 2 4 6 12 24 (hours)
P-Erk
Erk
Relative protein level (P-ERK/ERK)
Time (hours)
B
NT 0.5 1 2 4 6 12 24 (hours)
P-JNK
JNK1
Relative protein level (P-JNK/JNK1)
Time (hours)
C
NT 0.5 1 2 4 6 12 24 (hours)
P-p38
p38
Relative protein level (P-p38/p38)
Time (hours)

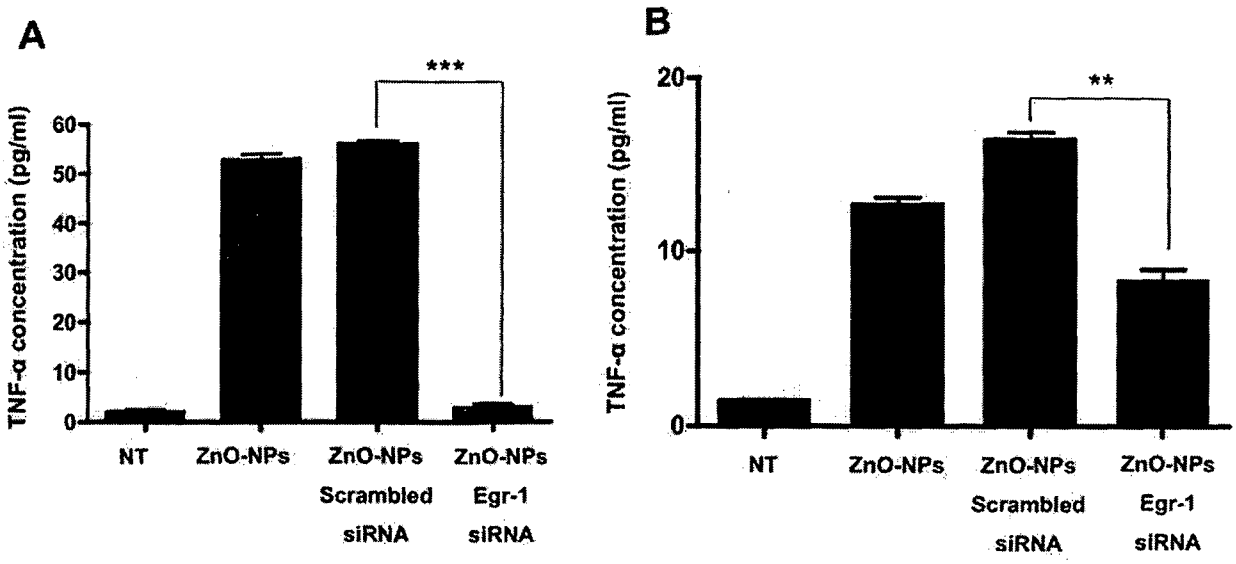
[Fig. 13]


A
ZnO
U0126
SB239063
SP600125
Egr-1
β-actin
Relative protein level (Egr-1/β-actin)
NT
ZnO-NPs
ZnO-NPs U0126
ZnO-NPs SB239063
ZnO-NPs SP600125
B
ZnO-NPs
NAC
Egr-1
P-ERK
ERK
β-actin
Egr-1/β-actin
P-ERK/ERK
Relative protein level (fold change)
NT
ZnO-NPs
NAC
ZnO-NPs NAC
C
U0126
NAC
ZnO-NPs
Egr-1
P-Erk
Erk
β-actin
P-ERK/ERK
Egr-1/β-actin
Relative protein level (fold change)
NT
ZnO-NPs
ZnO-NPs U0126
ZnO-NPs NAC

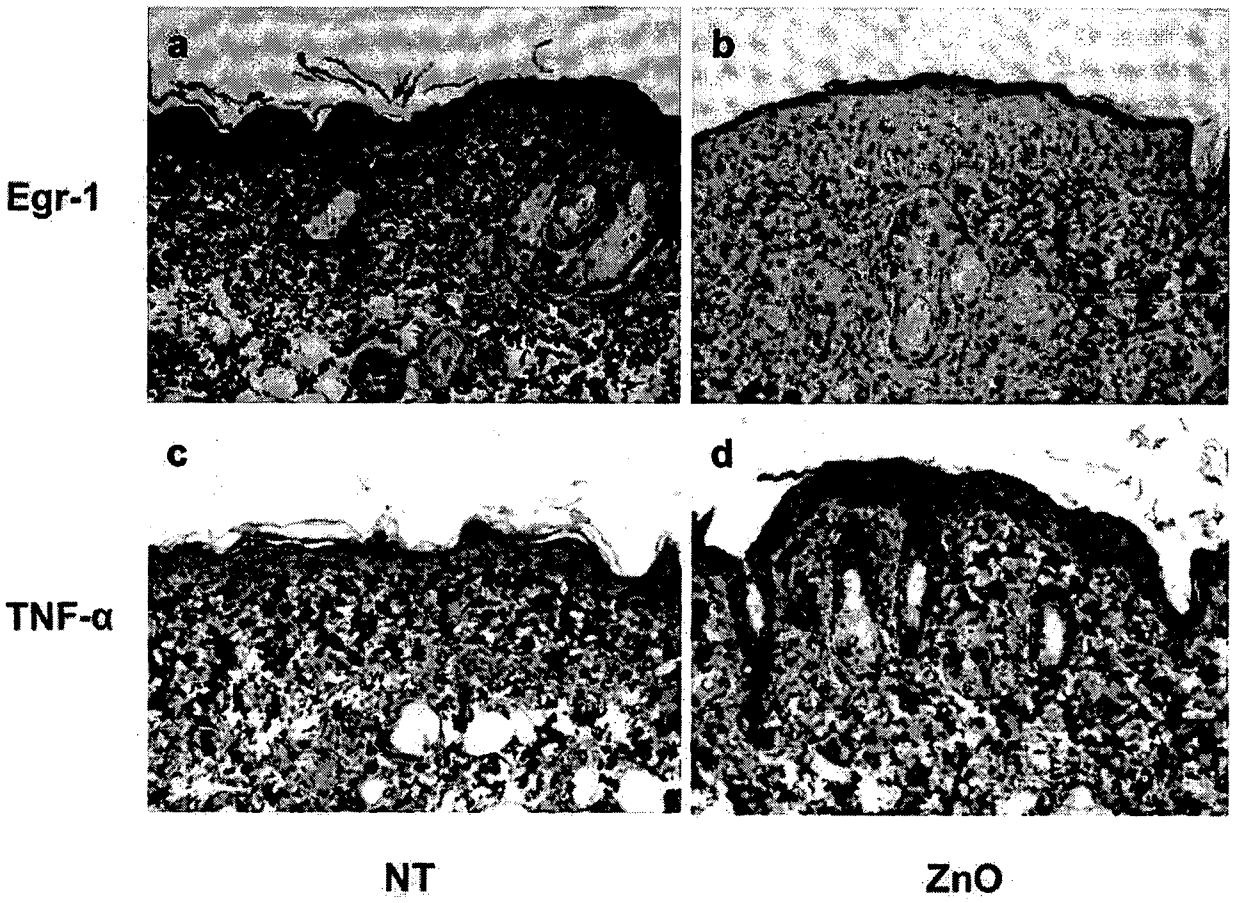
[Fig. 14]


A
Egr-1 siRNA
Scrambled siRNA
ZnO-NPs
Egr-1
TNF-α
β-actin
Egr-1/β-actin
TNF-α/β-actin
Normalized mRNA fold expression
***
***
NT
ZnO-NPs
ZnO-NPs Scrambled siRNA
ZnO-NPs Egr-1 siRNA
B
Egr-1 siRNA
Scrambled siRNA
ZnO-NPs
Egr-1
TNF-α
β-actin
Egr-1/β-actin
TNF-α/β-actin
Normalized mRNA fold expression
**
**
NT
ZnO-NPs
ZnO-NPs Scrambled siRNA
ZnO-NPs Egr-1 siRNA

[Fig. 15]


A
TNF-α concentration (pg/ml)
60
50
40
30
20
10
0
***
NT
ZnO-NPs
ZnO-NPs Scrambled siRNA
ZnO-NPs Egr-1 siRNA
B
TNF-α concentration (pg/ml)
20
10
0
**
NT
ZnO-NPs
ZnO-NPs Scrambled siRNA
ZnO-NPs Egr-1 siRNA

[Fig. 16]


Egr-1
TNF-α
a
b
c
d
NT
ZnO

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/009615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cell, toxicity, ERK, Egr-1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hyun-Jeong Eom et al. Toxicology in Vitro. 2009, 23, pages 1326-1332 See abstract; 3.Results; 4.Discussion.	1-5
Y	Katrin Kaufmann et al. Journal of the Neurological Sciences. 2001, 189, pages 83-91 See abstract; pages 86-90.	1-5
A	A.EI-Ansary et al. Journal of Toxicology. 2009 See the entire document.	1-5
A	Veronica I. Shubayey et al. Advanced Drug Delivery Reviews. 2009, Vol. 61, pages 467-477 See the entire document.	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 MARCH 2013 (22.03.2013)	**26 MARCH 2013 (26.03.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/009615

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **6-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6-10 pertain to a method for detecting cytotoxicity by intracellular nanomaterials but do not indicate that the human body is excluded. Therefore, said claims correspond to a diagnostic method for the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2012/009615

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/009615

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세포, 독성, ERK, Egr-1

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	Hyun-Jeong Eom et al. Toxicology in Vitro. 2009년, 23, 1326-1332쪽 요약; 3.Results; 4.Discussion 참조.	1-5
Y	Katrin Kaufmann et al. Journal of the Neurological Sciences. 2001년, 189, 83-91쪽 요약; 86-90 쪽 참조.	1-5
A	A.EI-Ansary et al. Journal of Toxicology. 2009년 문헌 전체 참조.	1-5
A	Veronica I. Shubayev et al. Advanced Drug Delivery Reviews. 2009년, 61권, 467-477쪽 문헌 전체 참조.	1-5

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 03월 22일 (22.03.2013)	**2013년 03월 26일 (26.03.2013)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
강연무
전화번호 82-42-481-5516

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/009615

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 **2**의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 6-10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제6항 내지 제10항은 세포 내 나노물질에 의한 세포 독성 검출 방법에 관한 것으로 그 적용대상에서 인간을 제외한다는 기재도 없으므로 청구항 제6항 내지 제10항은 인간을 적용 대상으로 하고 있는 진단 방법의 발명에 해당되어 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 **3**의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2012/009615

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음