



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0038468
(43) 공개일자 2024년03월25일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 21/41</i> (2006.01) <i>G01N 21/64</i> (2006.01)
 <i>G01N 21/84</i> (2006.01) <i>G01N 33/483</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 21/41</i> (2013.01)
 <i>G01N 21/6428</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0117375
 (22) 출원일자 2022년09월16일
 심사청구일자 2022년09월16일</p> | <p>(71) 출원인
 재단법인 아산사회복지재단
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
 울산대학교 산학협력단
 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)</p> <p>(72) 발명자
 백찬기
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)
 김준기
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)
 김인기
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인더웨이브</p> |
|---|---|

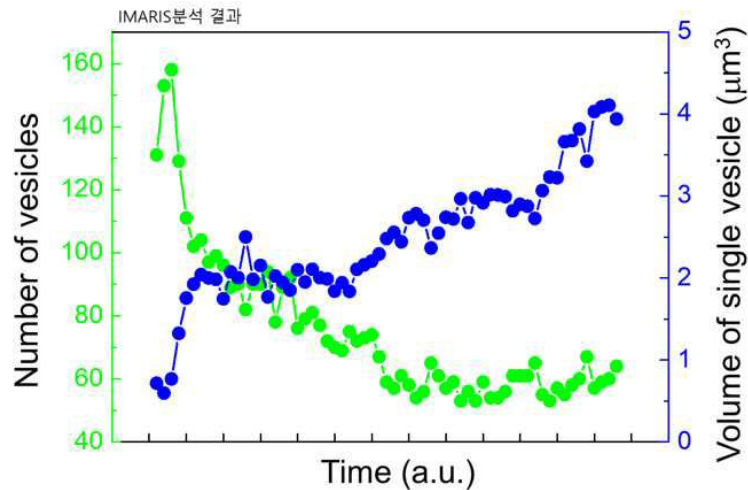
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법

(57) 요약

자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 스크리닝하는 방법에 의하면, 단일 세포만으로도 정확하게 자가포식 조절제를 스크리닝할 수 있다. 또한 형광 표지를 사용하지 않으면서도 스크리닝할 수 있어, 형광 표지 분석법을 사용하는 경우 발생하는 세포독성, 및 광표백현상을 방지할 수 있으며, 형광표지된 마커만 모니터링할 수밖에 없다는 한계점을 개선할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 21/6456 (2013.01)

G01N 21/6486 (2013.01)

G01N 21/8483 (2013.01)

G01N 33/483 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345343801

과제번호 2020R1I1A1A01068185

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 바이러스감염으로 발생하는 소포체 특이적 자식작용 (ER Phagy)의 무표지 이미징 측
정 기술 구축 및 검증

기 여 율 1/1

과제수행기관명 울산대학교 산학협력단

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 샘플을 후보 물질과 접촉시키는 단계;

상기 후보 물질과 접촉된 생물학적 샘플의 세포소기관(organelle)의 굴절률(refraction index: RI) 분포를 측정하는 단계; 및

상기 측정된 굴절률 분포를 이용하여 세포소기관의 물리량을 추출하는 단계를 포함하는 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 세포인 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 스크리닝하는 방법은 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포소기관의 물리량을 시간의 흐름에 따라 측정하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 물리량은 세포소기관의 부피, 세포소기관의 밀도, 및 세포소기관의 개수 중 적어도 하나 이상의 물리량인 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 자가포식 조절제는 자가포식 활성화제(activator) 또는 자가포식 억제제(inhibitor)인 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 세포소기관은 소포체(endoplasmic reticulum: ER), 소포(vesicle), 지방구(lipid droplet), 미토콘드리아(mitochondrial), 리보솜(ribosome), 골지체(golgi apparatus), 엔도솜(endosome), 핵소체(nucleolus) 및 리소솜(lysosome)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 굴절률 분포를 측정하는 단계는 간섭계 기반의 정량위상이미징기법(quantitative phase imaging: QPI)을 이용하여 복수의 2차원 홀로그램을 생성하는 단계; 및

상기 복수의 2차원 홀로그램을 분석하여 3차원 굴절률 분포를 측정하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝 하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 간섭계 기반의 정량위상이미징기법은 광학회절홀로그래피(optical diffraction tomography: ODT)인 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 스크리닝하는 방법은 상기 3차원 굴절률 분포를 이용하여 세포의 세포소기관의 물리량을 추출하기 위한 이미지를 생성하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 10

청구항 6에 있어서,

상기 세포소기관은 소포이고, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 소포의 부피가 증가하는 경우, 상기 소포의 개수가 감소하는 경우, 또는 상기 소포의 밀도가 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 11

청구항 6에 있어서,

상기 세포소기관은 소포이고, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 소포의 부피가 변화가 없거나 감소하는 경우, 상기 소포의 개수가 변화가 없거나 증가하는 경우, 또는 상기 소포의 밀도가 변화가 없거나 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 스크리닝하는 방법은 상기 추출된 세포소기관의 물리량을 후보 물질과 접촉되지 않은 생물학적 샘플의 세포소기관의 물리량과 비교하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 후보 물질과 접촉된 생물학적 샘플의 세포소기관의 물리량은 후보 물질과 접촉된 직후에 추출한 물리량인 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 스크리닝하는 방법은 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 소포의 부피가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 소포의 부피 대비 증가하는 경우, 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 소포의 밀도가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 소포의 밀도 대비 증가하는 경우, 또는 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 소포의 개수가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 소포의 개수 대비 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서,

상기 스크리닝하는 방법은 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 소포의 부피가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 소포의 부피 대비 변화가 없거나 감소하는 경우, 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 소포의 밀도가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 소포의 밀도 대비 변화가 없거나 감소하는 경우, 또는 상기 후보 물질과 접

측된 직후의 세포의 소포의 개수가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 소포의 개수 대비 변화가 없거나 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 16

청구항 10, 11, 14 및 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소포는 소포체를 포함하는 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 17

청구항 1에 있어서,

상기 상기 자가포식 조절제는 암, 신경퇴행성 질환, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 대사질환, 또는 유전성 근육 질환의 예방 또는 치료용인 것인, 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포내 발생한 불필요한 성분을 제거하고 세포의 항상성을 유지하는데 필요한 작용으로 자가포식작용 (autophagy)이 잘 알려져 있다. 그러나 이와 같은 자가포식작용에 문제가 발생하면 분해되지 않은 세포내 단백질 등 다양한 생체 구성성분의 응집체가 쌓이면서 다양한 질환이 발생할 수 있다.

[0003] 한편, 특정 암세포에서 활성화되어 있는 자가포식작용을 저해하는 것이 항암치료에 유효할 수도 있다는 사실이 최근 밝혀지고 있다. 따라서, 이러한 세포작용을 인위적으로 활성화 혹은 억제시키는 자가포식 조절제의 개발이 중요해지고 있다.

[0004] 그러나, 현재 자가포식 조절제의 약물 개발이나 약물 기전연구에 있어, 자가포식작용의 바이오마커인 LC3B에 유전공학적 기법으로GFP혹은 RFP와 같은 형광단백질을 태깅하여 과발현시킨 세포를 형광으로 관찰하는 방법에만 의존하고 있으며, 이러한 침습적인 방법은 모니터링 진행 시 형광에 의한 세포독성 발생, 형광분자의 광표백 (photobleaching)에 의한 분석결과에 대한 신뢰도 감소, 3차원이미지 취득시간의 비효율성, 모니터링이 형광표지된 마커분자에만 국한된다는 점 등 많은 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 등록특허 10- 2279295

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 생물학적 샘플을 후보 물질과 접촉시키는 단계; 상기 후보 물질과 접촉된 생물학적 샘플의 세포소기관(organelle)의 굴절률(refraction index: RI) 분포를 측정하는 단계; 및 상기 측정된 굴절률 분포를 이용하여 세포소기관의 물리량을 추출하는 단계를 포함하는 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 생물학적 샘플을 후보 물질과 접촉시키는 단계; 상기 후보 물질과 접촉된 생물학적 샘플의 세포소기관의 굴절률 분포를 측정하는 단계; 및 상기 측정된 굴절률 분포를 이용하여 세포소기관의 물리량을 추출하는 단계를 포함하는 자가포식 조절제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

- [0008] 상기 생물학적 샘플은 조직(tissue), 또는 세포일 수 있다. 상기 세포는 세포 집단 또는 단일 세포일 수 있으며, 상기 세포 집단은 단일 세포로 이루어지거나, 복수의 동종 세포를 포함하거나, 복수의 이종 세포를 포함할 수 있다.
- [0009] 일 구체예에 있어서, 상기 세포는 체세포 또는 암세포일 수 있다.
- [0010] 본 명세서에서 용어, "체세포"는 생식세포를 제외한 모든 세포를 의미할 수 있다. 상기 체세포는, 예를 들면, 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 것 또는 포유 동물로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0011] 일 구체예에 있어서, 상기 체세포는 근육세포, 간세포, 섬유아세포, 상피세포, 신경세포, 지방세포, 골세포, 혈액세포, 점막세포 및 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 상기 암세포는 간암, 편평상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 방광암, 난소암, 담관암 또는 담낭암의 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 본 명세서에서 용어, "세포소기관(organelle)"은 세포를 구성하는 기관을 의미할 수 있다. 상기 세포소기관은 나노미터 또는 마이크로미터 사이즈의 크기(직경)를 갖는 것일 수 있으며, 예를 들어, 0.1 내지 100 μm , 0.1 내지 50 μm , 0.1 내지 25 μm , 0.1 내지 15 μm , 0.1 내지 10 μm , 0.1 내지 5 μm , 또는 0.1 내지 3 μm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 일 구체예에 따르면, 상기 세포소기관은 소포체(endoplasmic reticulum: ER), 소포(vesicle), 지방구(lipid droplet), 미토콘드리아(mitochondrial), 리보솜(ribosome), 골지체(golgi apparatus), 엔도솜(endosome), 핵소체(nucleolus) 및 리소솜(lysosome)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 소포체는 조면소포체(rough endoplasmic reticulum: rER) 또는 활면소포체(smooth endoplasmic reticulum: sER)일 수 있다.
- [0015] 상기 소포는 지방 이중층으로 이루어진 구조를 갖는 것일 수 있으며, 상기 소포는 자가포식체(autophagosome)일 수 있다.
- [0016] 본 명세서에서 "굴절률(refraction index: RI)"은 광(light)이 물질을 통과하면서 속도가 감속하는 정도를 나타내는 물질 자체의 고유한 광학적 물리량을 의미할 수 있다. 또한 굴절률은 물질의 밀도와 반비례하기 때문에 세포나 소기관의 밀도를 반영하는 생물학적 정보를 의미할 수 있다.
- [0017] 일 구체예에 있어서, 상기 굴절률 분포를 측정하는 단계는 회절 간섭계 기반의 정량위상이미징기법(quantitative phase imaging: QPI)을 이용하여 복수의 2차원 홀로그래를 생성하는 단계; 및 상기 복수의 2차원 홀로그래를 분석하여 3차원 굴절률 분포를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 정량위상이미징기법은 간섭계를 이용하여 생물학적 샘플에 의해 광이 회절됨에 따라, 회절 및 투과된 광의 진폭 및 위상 지연을 형성하는 복소 광학장(complex optical field)을 측정하여 3차원 굴절률 분포를 측정하는 것일 수 있다. 상기 복소 광학장은 다양한 입사각 별로 형성되어 측정될 수 있으며, 복소 광학장에 기초하여 각 세포소기관의 농도에 해당하는 생물학적 샘플의 3차원 굴절률 분포가 측정될 수 있다.
- [0019] 일 구체예에 있어서, 상기 간섭계 기반의 정량위상이미징기법은 광학회절홀로그래피(optical diffraction tomography: ODT)일 수 있다.
- [0020] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 상기 3차원 굴절률 분포를 이용하여 세포의 세포소기관의 물리량을 추출하기 위한 이미지를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 이미지는 3차원 이미지일 수 있다. 상기 3차원 이미지는 세포소기관과 세포질의 굴절률의 차이를 기반으로 세포소기관의 2차원 굴절률 분포로부터 복수개의 2차원 홀로그래를 생성하고, 생성된 복수의 2차원 홀로그래를 이용하여 생성된 3차원 굴절률 분포를 이용하여 생성할 수 있다. 상기 3차원 이미지를 생성함으로써, 세포소기관을 3차원 영상화할 수 있으며, 영상화된 3차원 이미지를 기반으로 세포소기관의 물리량을 정량화할 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 있어서, 상기 물리량은 세포소기관의 부피, 세포소기관의 굴절률, 세포소기관의 밀도, 및 세포소기

관의 개수 중 적어도 하나 이상의 물리량일 수 있다.

- [0023] 본 명세서에서, 용어 "자가포식(autophagy)"은 세포 내 불필요하거나 변성된 단백질을 포함하는 세포구성성분을 제거하는 이화작용을 의미할 수 있다. 따라서 자가포식 조절제 및 조절방법은 상기와 같은 자가포식 조절 이상으로 인한 다양한 질환의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서, 용어 "조절(modulation)"은 생물학적 기능의 활성화, 자극 또는 상향 조절, 또는 저하 또는 하향 조절, 또는 양쪽 모두를 포함할 수 있으며, 인비트로 상태에서의 조절, 인비보 상태에서의 조절, 엑스비보 상태에서의 조절을 포함할 수 있다. 따라서 상기 조절제는 자가포식 활성화제(activator) 또는 향상제, 또는 자가포식 억제제(inhibitor)를 모두 포함할 수 있다.
- [0025] 일 구체예에 있어서, 상기 자가포식 조절제는 자가포식 활성화제 또는 자가포식 억제제일 수 있다. 상기 자가포식 활성화제 또는 자가포식 억제제는 자가포식 활성능 또는 억제능을 가진 약물, 나노입자(nanoparticle) 또는 상기 약물이 포접된 나노입자를 포함할 수 있다. 상기 자가포식 활성능 또는 억제능을 가진 약물은 탐시가르긴(Thapsigargin), 시클로피아존산(Cyclopiazonic acid), 튜니카마이신(Tunicamycin), 토린(Torin), 발포산(Valproic acid), 베라파밀 히드로클로라이드(Verapamil hydrochloride), 카르바마제핀(Carbamazepine), 텍사메타손(Dexamethasone), 니클로사마이드(Niclosamide), 니모디핀(Nimodipine), 니트리디핀(Nitrendipine), 라파마이신(Rapamycin) 또는 콜히친(Colchicine)을 포함할 수 있다.
- [0026] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포소기관의 물리량을 시간의 흐름에 따라 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0027] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포의 부피가 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포의 부피가 변화가 없거나 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포의 개수가 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0030] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포의 개수가 변화가 없거나 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0031] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포의 밀도가 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0032] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 시간의 흐름에 따라 상기 후보 물질과 접촉된 세포의 세포의 밀도가 변화가 없거나 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0033] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 상기 추출된 세포소기관의 물리량을 후보 물질과 접촉되지 않은 생물학적 샘플의 세포소기관의 물리량과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 후보 물질과 접촉된 생물학적 샘플의 세포소기관의 물리량은 후보 물질과 접촉된 직후에 추출한 물리량일 수 있다.
- [0034] 일 구체예에 있어서, 상기 스크리닝하는 방법은 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 세포의 부피가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 세포의 부피 대비 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0035] 일 구체예에 있어서, 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 세포의 부피가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 세포의 부피 대비 변화가 없거나 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0036] 일 구체예에 있어서, 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 세포의 개수가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 세포의 개수 대비 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0037] 일 구체예에 있어서, 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 세포의 개수가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 세포의 개수 대비 변화가 없거나 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0038] 일 구체예에 있어서, 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 세포의 밀도가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의

소포의 밀도 대비 증가하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 활성화제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0039] 일 구체예에 있어서, 상기 후보 물질과 접촉된 직후의 세포의 소포의 밀도가 후보 물질과 접촉되지 않은 세포의 소포의 밀도 대비 변화가 없거나 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 자가포식 억제제로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0040] 상기 소포는 다른 세포소기관 또는 세포소기관 성분을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 소포는 소포체 또는 소포체 성분을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 소포체 또는 소포체 성분은 소포에 포접된 상태일 수 있다.

[0041] 일 구체예에 따르면, 상기 스크리닝하는 방법은 세포소기관의 바이오마커의 발현을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 세포소기관의 바이오마커의 발현의 측정은 면역형광염색기법(immunofluorescence: IF), 웨스턴블랏(western blot), 또는 형광이미징을 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 세포소기관의 바이오마커의 발현을 측정하는 단계는 간접적 기반의 정량위상이미징기법과 동시 또는 이시에 수행될 수 있다. 이를 통해, 간접적 기반의 정량위상이미징기법에 대한 신뢰도를 향상시킬 수 있다.

[0042] 일 구체예에 따르면, 상기 세포소기관의 바이오마커는 자가포식과정에 대한 바이오마커일 수 있다. 상기 자가포식과정에 대한 바이오마커는 LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha)일 수 있다. 그 외 소포체(ER) 특이적인 자가포식과정에 대한 바이오마커는 SEC62(translocation protein SEC62), RTN3(reticulon-3), FAM134B(reticulophagy regulator 1), CCPG1(cell-cycle progression gene 1) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 일 구체예에 있어서, 상기 세포소기관의 바이오마커의 발현을 측정하는 단계는 형광 트래커(fluorescent tracker)를 세포에 처리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 형광 트래커는 세포소기관에 특이적인 형광 트래커일 수 있으며, 형광 트래커를 통해 세포소기관의 변화를 특이적으로 확인할 수 있다. 상기 형광 트래커는 예를 들면, 소포체에 특이적인 소포체-트래커(ER-tracker), 라이소좀에 특이적인 라이소좀-트래커(lysosome-tracker), 또는 미토콘드리아(mitochondria)에 특이적인 미토콘드리아-트래커(mito-tracker)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 일 구체예에 있어서, 상기 자가포식 조절제는 암, 신경퇴행성 질환, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 대사질환, 또는 유전성 근육 질환의 예방 또는 치료용일 수 있다.

발명의 효과

[0045] 일 양상에 따른 스크리닝하는 방법에 의하면, 단일 세포만으로도 정확하게 자가포식 조절제를 스크리닝할 수 있다. 또한 형광 표지를 사용하지 않으면서도 스크리닝할 수 있어, 형광 표지 분석법을 사용하는 경우 발생하는 세포독성, 및 광표백현상을 방지할 수 있으며, 형광표지된 마커만 모니터링할 수밖에 없다는 한계점을 개선할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 SNU475 세포에 탐시가르긴(thapsigargin)을 처리한 후, 고밀도의 소포가 생성되고 소멸되는 과정을 시간의 흐름에 따라 나타낸 광학회절홀로그래피(optical diffraction tomography: ODT) 이미지이다.

도 2는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포의 소포의 굴절률 및 반지름의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이다:

도 2a는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포의 소포의 굴절률의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이고, 도 2b는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포의 소포의 반지름의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이다.

도 3은 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 소포의 총 수의 변화 및 소포당 부피의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이다.

도 4는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 발생한 소포의 개수와 굴절률에 따라 분류한 이미지 및 그래프, 및 SNU475 세포에 탐시가르긴을 처리하기 전과 후의 세포소기관의 굴절률의 변화를 나타낸 그래프이다:

도 4a는 탐시가르긴이 처리된 세포에서 SNU475 세포에서 생성된 소포의 개수와 이에 대한 굴절률을 비교한 이미지이고, 도 4b는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 생성된 소포를 소포의 굴절률을 나타낸 그래프이고, 도 4c는 탐시가르긴의 처리에 따른 SNU475 세포의 세포소기관의 굴절률을 나타낸 그래프이다.

도 5는 SNU475 세포에 탐시가르긴(10 μ M)을 처리한 후, ER-tracker 또는 Lysosome-tracker로 염색하여, 소포체 및 라이소좀의 변화를 나타낸 이미지이다:

도 5a는 탐시가르긴의 처리에 따른 소포체의 변화를 ER-tracker로 염색하여 관찰한 이미지이고, 도 5b는 탐시가르긴의 처리에 따른 라이소좀의 변화를 Lysosome-tracker로 염색하여 관찰한 이미지이다.

도 6은 탐시가르긴의 처리에 따른 미토콘드리아의 변화를 mito-tracker로 염색하여 관찰한 이미지이다.

도 7은 탐시가르긴의 처리에 따라 ER-phagy 수용체인 CCPG1, FAM134B, RTN3, 및 SEC62가 활성화되는지 여부를 확인한 그래프이다.

도 8은 시클로피아존산(CPA) 또는 튜니카마이신(TC)을 SNU475 세포에 처리하고 소포의 변화를 관측한 ODT 이미지이다:

도 8a는 시클로피아존산(CPA)의 처리에 따른 소포의 변화를 나타낸 ODT 이미지이고, 도 8b는 튜니카마이신(TC)의 처리에 따른 소포의 변화를 나타낸 ODT 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 실시예 1. 탐시가르긴(thapsigargin: TG)이 처리된 SNU475 세포에서 소포의 변화 확인

[0050] 자가포식 조절제의 처리에 의한 소포의 변화를 확인하기 위해, 자가포식 활성화제인 탐시가르긴 10 μ M을 인간 간암 세포주인 SNU475 세포에 처리한 후 상기 세포에서의 소포의 변화를 확인하였다.

[0051] 보다 구체적으로, SNU475 세포주를 토모디쉬에 준비하고 탐시가르긴 10 μ M을 상기 SNU475 세포에 처리한 후 HT-2H 형광 홀로토토포그래피(holotomography, Tomocube)를 사용하여 광학회절홀로토포그래피(optical diffraction tomography: ODT) 이미지를 생성하였다. 그리고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0052] 도 1은 탐시가르긴을 SNU475 세포에 처리한 후, SNU475 세포에서 발생한 소포의 변화를 나타낸 시간별 ODT 이미지이다.

[0053] 도 1에 나타난 바와 같이, 자가포식 활성화제인 탐시가르긴의 처리에 따라 고밀도의 소포가 생성되는 것을 확인하였다.

[0055] 실시예 2. 탐시가르긴이 처리된 SNU475 단일세포에서 소포의 굴절률 및 반지름의 변화 확인

[0056] 탐시가르긴(10 μ M)을 SNU475 세포에 처리하여 ER 스트레스를 유도한 뒤, 상기 세포에서 생성된 소포의 굴절률 및 반지름의 변화를 실시예 1에서 확인한 이미지를 기반으로 측정하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 또한, SNU475 세포에 탐시가르긴(10 μ M)을 처리하고, 상기 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 소포의 수 및 부피를 2시간 동안 시간의 흐름에 따라 관찰하고, 이를 도 3에 나타내었다.

[0058] 도 2는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포의 소포의 굴절률 및 반지름의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이다:

[0059] 도 2a는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포의 소포의 굴절률의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이고, 도 2b는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포의 소포의 반지름의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이다.

[0060] 도 3은 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 소포의 총 수의 변화 및 소포당 부피의 변화를 시간의 흐름에 따라 나타낸 그래프이다.

[0062] 도 2에 나타난 바와 같이, 자가포식 활성화제인 탐시가르긴의 처리에 따라 생성된 소포의 굴절률이 시간의 흐름에 따라 감소함을 확인하였다. 또한, 탐시가르긴의 처리에 따라 생성된 소포의 반지름이 시간의 흐름에 따라 증

가함을 확인하였다.

[0063] 도 3에 나타난 바와 같이, 자가포식 활성화제인 탐시가르긴의 처리에 따라 생성된 소포의 총 수가 소포간 융합으로 인해 시간의 흐름에 따라 감소함을 확인하였다. 또한, 탐시가르긴의 처리에 따라 생성된 소포의 부피가 시간의 흐름에 따라 증가함을 확인하였다.

[0064] 이와 같은 결과는 특정 자가포식 조절제 후보물질을 세포에 처리하였을 때, 세포의 소포의 밀도가 감소하거나, 소포의 반지름 또는 부피가 증가하거나, 소포의 총 수가 감소하는 경우, 상기 특정 자가포식 조절제 후보물질을 자가포식 활성화제로 결정할 수 있음을 의미한다.

[0066] **실시예 3. 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 소포 및 세포소기관의 굴절률 및 반지름의 통계적인(혹은 계통적인) 변화 확인**

[0067] 탐시가르긴의 처리에 따라 소포 및 세포소기관의 밀도와 이에 따른 굴절률의 통계적인 변화를 확인하기 위해, 탐시가르긴($10\ \mu\text{M}$)을 SNU475세포에 처리하기 전과 처리하고 난 후의 세포의 밀도 및 굴절률을 비교하였다. 또한, 탐시가르긴의 처리에 따른 세포소기관의 밀도의 변화를 확인하기 위해, 핵소체(nucleolus: No), 소포체(ER), 시토졸(cytosol: Cyt), 및 형질막(plasma membrane: PM)의 굴절률을 측정하였다. 그리고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0069] 도 4는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 발생한 소포의 개수와 굴절률에 따라 분류한 이미지 및 그래프, 및 SNU475 세포에 탐시가르긴을 처리하기 전과 후의 세포소기관의 굴절률의 변화를 나타낸 그래프이다:

[0070] 도 4a는 탐시가르긴이 처리된 세포에서 SNU475 세포에서 생성된 소포의 개수와 이에 대한 굴절률을 비교한 이미지이고, 도 4b는 탐시가르긴이 처리된 SNU475 세포에서 생성된 소포의 굴절률을 나타낸 그래프이고, 도 4c는 탐시가르긴의 처리에 따른 SNU475 세포의 세포소기관의 굴절률을 나타낸 그래프이다.

[0071] 도 4에 나타난 바와 같이, 소포의 개수가 높은 경우 굴절률 역시 높은 것을 확인하였다. 즉, 소포의 개수와 굴절률이 비례하는 것을 확인하였다. 또한, 탐시가르긴에 의해 유도된 소포가 소포체 보다 높은 밀도를 갖는 것을 확인하였으며, 탐시가르긴의 처리에 따라 소포체의 밀도가 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 탐시가르긴의 처리에 따라 ER-phagy가 유도되어 고밀도의 ER 성분을 포함하는 소포가 생성되는 것을 확인하였다.

[0073] **실시예 4. 형광 트래커(fluorescent tracker)를 이용하여 ER 특이적 변화에 대한 확인**

[0074] **4.1. ER-tracker 및 lysosome-tracker를 이용한 이미지 분석**

[0075] 공초점현미경 및 형광트래커를 사용하여, 소포체 및 라이소좀의 변화를 측정하였다. 형광트래커로는 소포체만 특이적으로 관찰할 수 있는 ER-tracker, 및 라이소좀만 특이적으로 관찰할 수 있는 lysosome-tracker를 사용하였다.

[0076] 구체적으로, SNU475 세포에 탐시가르긴($10\ \mu\text{M}$)을 처리한 후, ER-tracker 또는 Lysosome-tracker로 염색하여, 소포체 및 라이소좀의 동태(kinetics)를 super-resolution microscopy(AiryScan)으로 분석하고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0077] 도 5는 SNU475 세포에 탐시가르긴($10\ \mu\text{M}$)을 처리한 후, ER-tracker 또는 Lysosome-tracker로 염색하여, 소포체 및 라이소좀의 변화를 나타낸 이미지이다:

[0078] 도 5a는 탐시가르긴의 처리에 따른 소포체의 변화를 ER-tracker로 염색하여 관찰한 이미지이고, 도 5b는 탐시가르긴의 처리에 따른 라이소좀의 변화를 Lysosome-tracker로 염색하여 관찰한 이미지이다.

[0079] 도 5에 나타난 바와 같이, 탐시가르긴의 처리에 따라 SNU475 세포에서 ER성분을 포함하는 소포 및 라이소좀이 생성되는 것을 확인하였다. 이는 ODT를 통해 확인한 것과 동일한 결과이며, 즉, ODT를 통해 세포소기관의 물리량을 확인함으로써 자가포식 조절제를 효과적으로 스크리닝할 수 있음을 의미한다.

[0081] 또한 추가로, 3차원 ODT이미징과 2차원형광을 연계할 수 있는 ODT셋업을 이용하여, 탐시가르긴이 처리된 SNU475

세포의 소포체 및 라이소좀의 변화를 분석하였다. 그 결과, 탐시가르킨을 처리한 후, 세포질에서 발생하는 고밀도의 소포의 구조는 소포체와 라이소좀에 특이적으로 공동국지화(colocalization)됨을 확인하였다. 또한, 소포체 영역에서 소포가 생성되고, 그 이후 라이소좀과 결합하는 것을 확인하였다.

[0082] 이러한 결과는, 탐시가르킨의 처리에 따라 세포의 소포가 소포체 성분을 포함하게 되고, 소포체 성분을 포함하는 소포가 라이소좀과 결합하여 분해됨으로써, 소포의 밀도 변화가 발생하게 되는 것을 의미한다.

[0084] 4.2. Mito-tracker를 이용한 이미지 분석

[0085] 탐시가르킨의 처리에 따라 생성된 고밀도의 소포가 소포체 특이적임을 확인하기 위해, 미토콘드리아에 특이적인 트래커인 mito-tracker를 사용하여 상기 4.1과 동일한 방법으로 미토콘드리아의 동태를 분석하고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0086] 도 6은 탐시가르킨의 처리에 따른 미토콘드리아의 변화를 mito-tracker로 염색하여 관찰한 이미지이다.

[0087] 도 6에 나타난 바와 같이, 탐시가르킨의 처리에 따라 생성된 고밀도의 소포는 미토콘드리아의 성분은 포함하지 않는 것을 확인하였다.

[0088] 이러한 결과는 탐시가르킨의 처리에 따라 유도된 고밀도의 소포는 소포체 특이적임을 의미한다.

[0090] 4.3. ER-phagy 수용체의 colocalization 측정

[0091] 탐시가르킨을 처리한 후 autophagy marker 및 ER-phagy maker의 활성화도를 측정하기 위해, ER-phagy 수용체의 colocalization을 측정하였다.

[0092] 보다 구체적으로, 탐시가르킨(10 μ M)을 처리한 후 ER-phagy 수용체인 CCPG1, FAM134B, RTN3, 및 SEC62가 활성화되는지 면역형광염색기법(immunofluorescence: IF) 분석으로 검토한 후, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0093] 도 7은 탐시가르킨의 처리에 따라 ER-phagy 수용체인 CCPG1, FAM134B, RTN3, 및 SEC62가 활성화되는지 여부를 확인한 그래프이다.

[0094] 도 7에 나타난 바와 같이, 탐시가르킨의 처리에 따라 ER-phagy 수용체인 CCPG1, FAM134B, RTN3, 및 SEC62가 LC3와 colocalization하면서 활성화됨을 확인하였다.

[0095] 이러한 결과는, 탐시가르킨을 처리한 후 ODT를 통해 관측한 고밀도의 소포는 ER-phagy에 의한 것임을 의미한다.

[0097] 실시예 5. 시클로피아존산(Cyclopiazonic acid: CPA) 또는 튜니카마이신(Tunicamycin: TC)이 처리된 SNU475 세포에서 소포의 굴절률 및 반지름의 변화 확인

[0098] 탐시가르킨 이외의 자가포식 조절제를 처리한 경우 탐시가르킨과 동일한 결과를 얻을 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 시클로피아존산(20 μ M) 및 튜니카마이신(60 μ g/mL)을 각각 SNU475 세포에 처리하여 ER 스트레스를 유도한 뒤, 상기 세포에서 생성된 소포의 변화를 HT-2H 형광 홀로토토포그래피(Tomocube 사)를 사용하여 관찰하였다. 관찰을 위해, 시클로피아존산을 처리한 후 10 시간 경과 후의 광학회절홀로그래피(ODT) 이미지 및 튜니카마이신을 처리한 후 2 시간 경과 후의 ODT 이미지를 생성하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

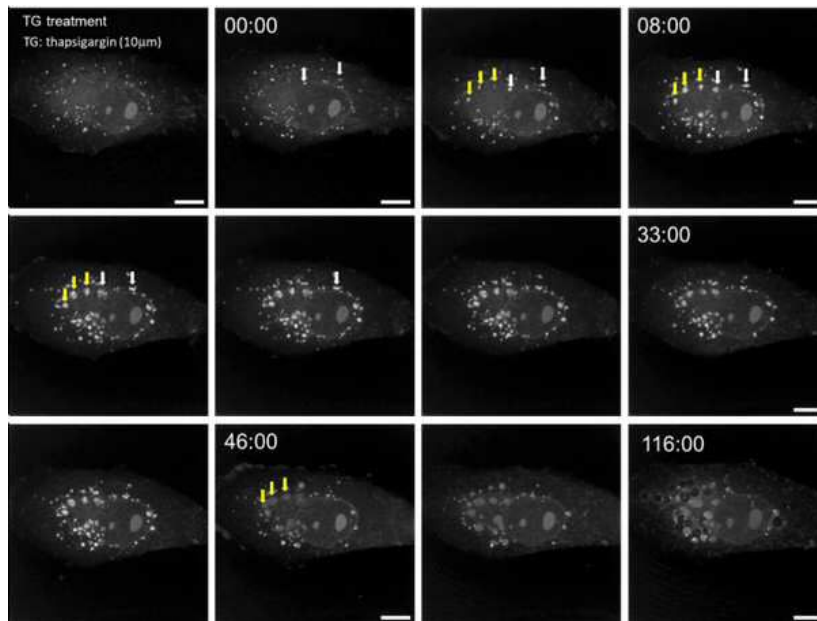
[0099] 도 8은 시클로피아존산(CPA) 또는 튜니카마이신(TC)을 SNU475 세포에 처리하고 소포의 변화를 관측한 ODT 이미지이다:

[0100] 도 8a는 시클로피아존산(CPA)의 처리에 따른 소포의 변화를 나타낸 ODT 이미지이고, 도 8b는 튜니카마이신(TC)의 처리에 따른 소포의 변화를 나타낸 ODT 이미지이다.

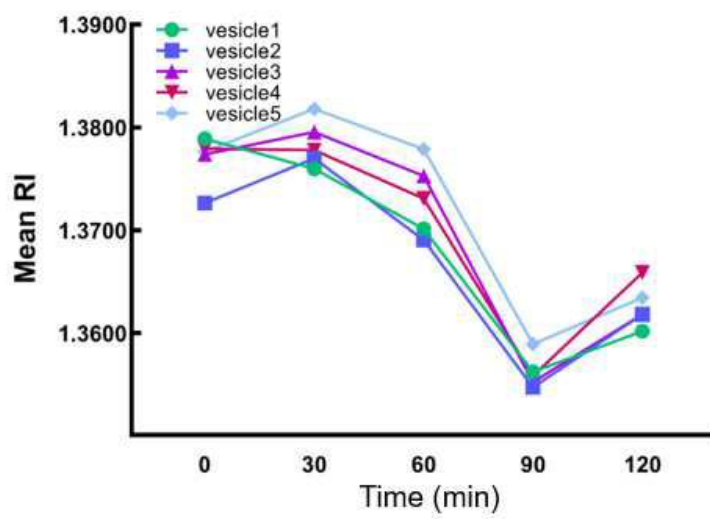
[0101] 도 8에 나타난 바와 같이, 시클로피아존산, 및 튜니카마이신을 처리한 경우 탐시가르킨을 처리한 경우와 동일한 소포의 변화가 나타남을 확인하였다. 이는 탐시가르킨의 경우와 마찬가지로 세포에 생겨난 소포에 대한 특성 및 세포소기관의 굴절률 분포를 이용하여 추출한 세포소기관의 물리량을 통해 자가포식 조절제를 효과적으로 스크리닝할 수 있음을 의미한다.

도면

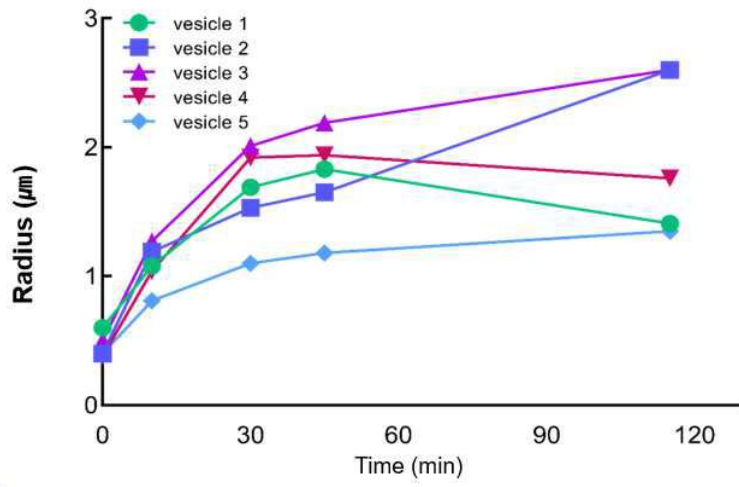
도면1



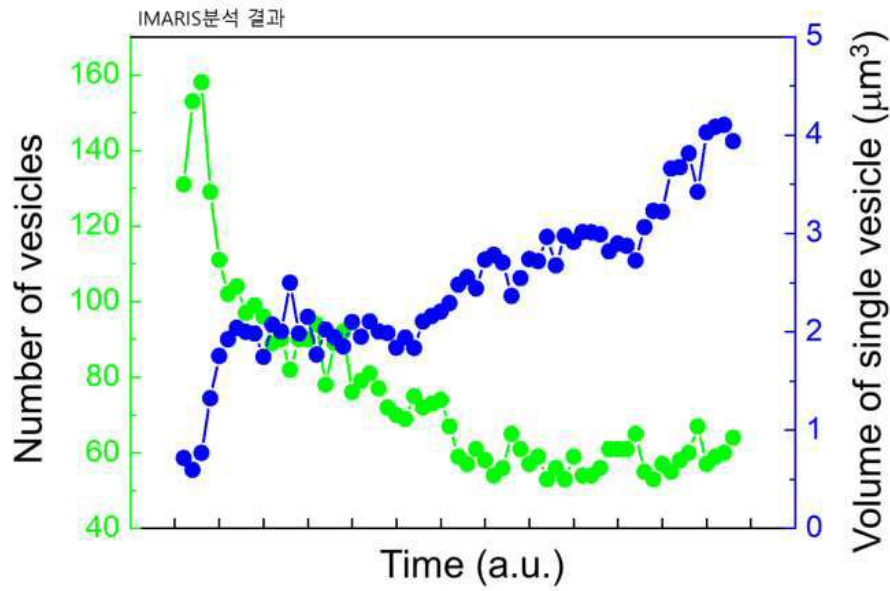
도면2a



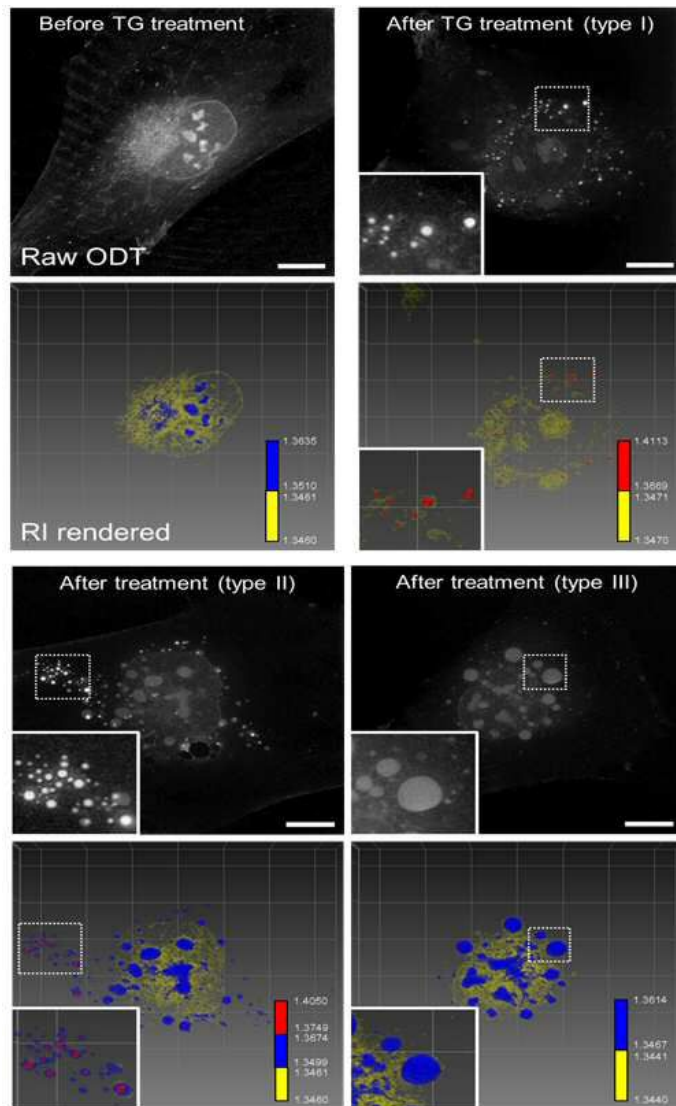
도면2b



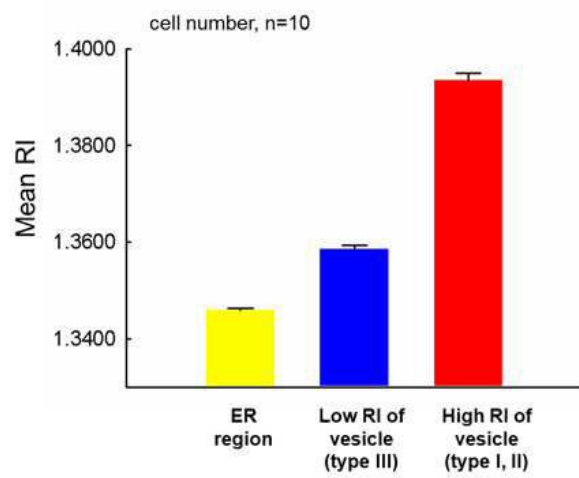
도면3



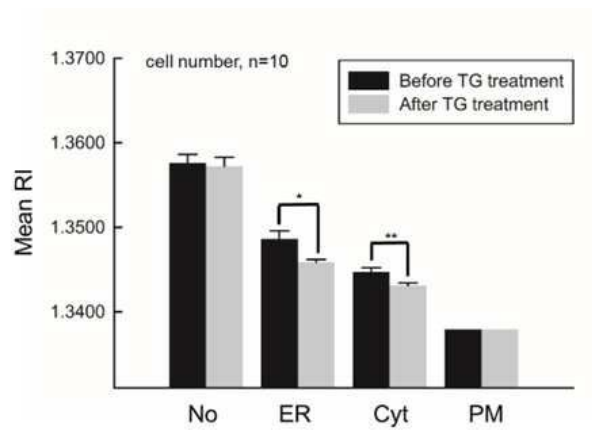
도면4a



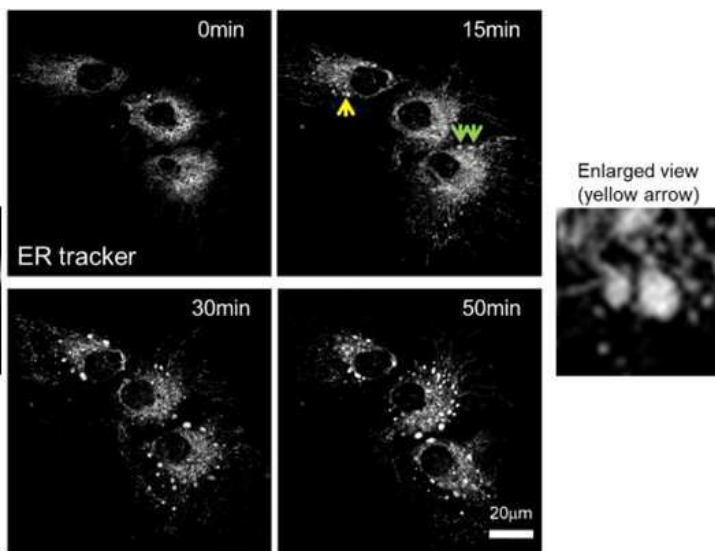
도면4b



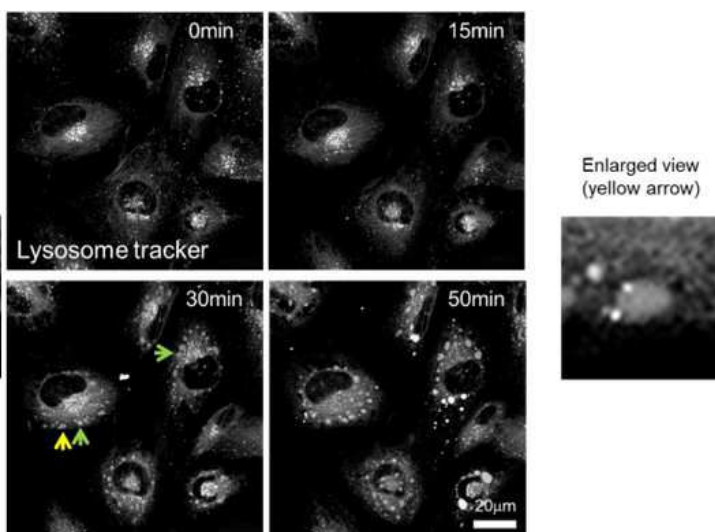
도면4c



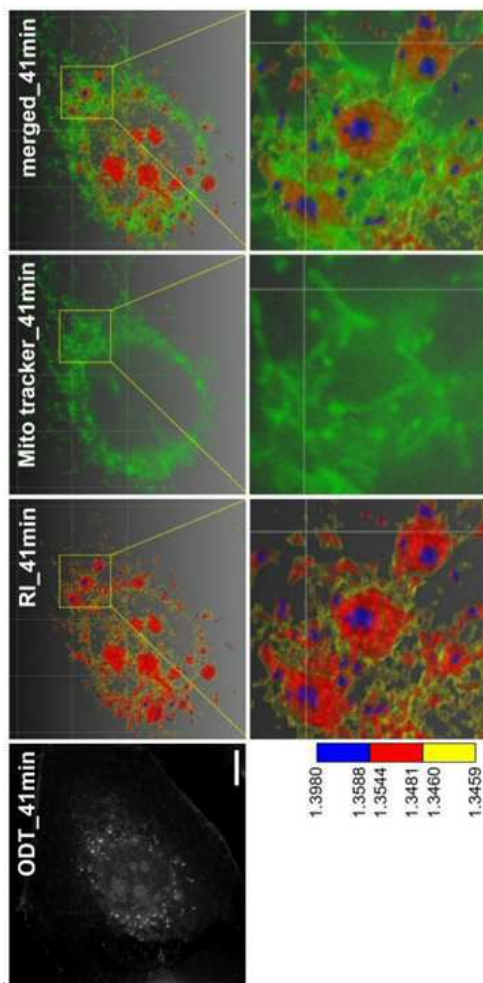
도면5a



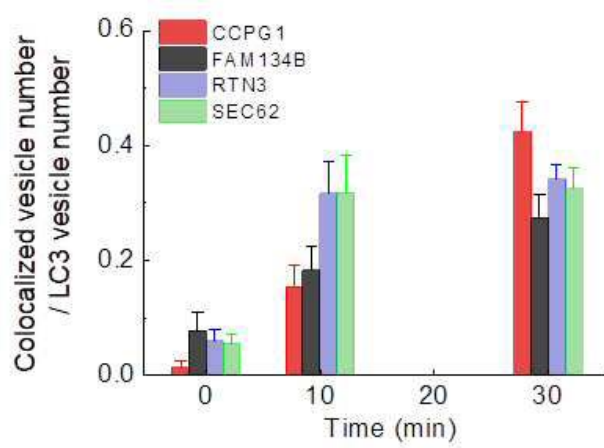
도면5b



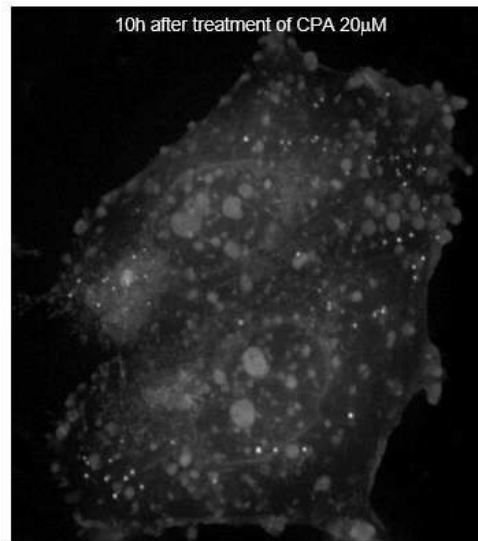
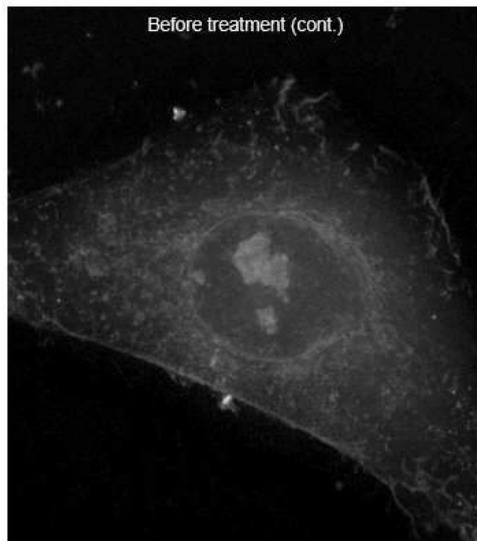
도면6



도면7



도면 8a



도면 8b

