

Phenotype-Based Drug Screening : Oocyte-Based Screening System for Anti-Microtubule Agents

최 태 생

단국대학교 의과대학 미생물학교실

일반적인 신약개발을 위한 활성화 물질의 검색법으로 3단계의 과정이 순차적으로 이루어진다.

1 단계 : *In vitro* screening 법으로 표적 분자를 이용하여 저해 혹은 촉진 효과를 단백질 을 이용하여 그들의 효소활성이나 중합효과 등을 검증하는 것이다. 대부분의 이들 기술 은 현재 자동화 시스템으로 발전되어 있으며, 일일 수만 개 이상의 화합물들을 검색 할 수 있다.

2 단계 : Cell based assay로 일차 *in vitro* screening 에서 선별된 화합물로 배양세포에 처 리하여 그 효과를 세포에서 확인하는 것이다. 이 시스템에서는 그 화합물의 세포에서의 직접적인 효과를 약물의 세포 투과성 및 세포질에서의 안정성, 세포 독성효과와 함께 확 인할 수 있다.

3 단계 : 동물체내에서의 효력 검증 법 (*in vivo* efficacy, toxicity, PK etc.)으로 생체 내 효력 및 생체 독성 등도 함께 검증할 수 있게 된다. (preclinical study)

현재 보편적으로 사용되고 있는 이상의 방법은 기존에 알려져 있는 표적 분자 외의 미 지의 표적분자에 작용하는 활성화합물은 1차 검색 (*in vitro* screening) 단계에서 제외되는 치명적인 한계가 있다. 최근 Harvard Medical School의 Dr. Timothy J. Mitchison은 초기의 *in vitro* screening 과정을 생략하고 바로 cell based assay 시스템을 사용하여 분열기 정지 저해제인 monastrol을 발견하였다 (Science, 1999:286, 971-974). 또한 본 연구에서 cell based assay system의 한계인 시간적인 문제점을 극복할 수 있는 cytooblots이라는 신기술이 개발되었다. 현재 이들의 전 자동화 system의 개발에 관한 연구와 다양한 표적에 관한 연 구가 진행되고 있다. 이상과 같이 현재 이 분야의 세계적인 동향은 초기단계의 *in vitro* assay 과정 없이 cell based assay를 바로 수행하는 방향으로 가고 있다.

이상과 같이 국내외에서 일반적으로 사용되고 있는 세포주기의 분열기 저해제 (Taxol or vinblastine) screening system은 *in vitro* assay system이 현재까지도 사용되고 있다. 이 방 법은 순수 분리된 tubulin을 사용하여 *in vitro*에서 중합반응을 유도하고, 그 과정에 화합 물을 첨가하여 저해 효과나 안정화 효과를 분석하는 방법이다. 이상의 방법의 문제점과 한계는 일차 screening에서 순수 분리된 tubulin 단백질 이외의 분열 기에 관여하는 미지의 단백질을 표적으로 하는 저해 화합물을 잃는다는 점이다. 난자를 사용하는 screening system은 tubulin 이외에도 분열기의 진행에 관련된 모든 단백질을 표적으로 하는 화합물

을 동시에 검색할 수 있으며, 또한 세포 투과율, 세포 내의 안정성 등을 함께 검증할 수 있다는 장점이 있다. 난자를 사용한 assay system에서는 분열기 정지의 화합물에 따라 다양한 표현형으로 표현된다. 예를 들면 배양세포의 사용 시에 동일한 결과(G2/M 저해)로 얻어지는 Taxol과 vinblastine에서 차별화 된 표현형을 얻을 수 있다. 또한 분열기 조절 유전자로 핵심 역할을 하는 것으로 밝혀진 cdk1 유전자 산물의 저해 효과 또한 차별화된 표현형으로 동시에 분석될 수 있다. 이상과 같은 이유로 기존의 방법과 비교하여 본 실험실에서 개발한 난자를 사용한 assay system은 질적인 측면에서 매우 우수하다.

본 특강에서는 일반적인 표현형 기반 신약 스크리닝의 개념에 관한 부분과 아울러 난자를 이용한 동일한 개념의 신약 탐색 시스템에 관하여 소개하고자 한다.

Assay systems for M-phase blocker

	<i>In vitro</i> assay	Cell based assay	장 · 단점
기존의 assay system	Cytokinesis에 관련된 tubulin, actin과 같이 기 밝혀진 표적분자를 사용하여 시행	FACS 분석을 통하여 세포주기의 G2/M 저해효과로 약효 평가	<ul style="list-style-type: none"> · HTS system으로 다량의 화합물을 신속히 분석가능 · 적분자 외의 관련분자를 target하는 저해제는 밝힐 수 없다.
신규 assay system		분열기 정지의 배란난을 사용하여 면역염색법으로 저해능의 평가	<ul style="list-style-type: none"> · 현재의 system은 manual로 시간이 많이 소요된다. · 관련된 모든 분자를 target으로 하는 저해제를 찾아 낼 수 있다.