

신약개발에서 최근 스크리닝 기술

이우길

한국화학연구원

Tel. 042-860-7028/ Fax.042-861-0307/ E-mail. bigguy@kRICT.re.kr



질병은 생물인 인류가 숙명적으로 겪게 되는 현상으로 이의 퇴치를 위한 노력은 유사 아래 계속되고 있다. 오늘날 신약개발 분야의 최대 노력은 ‘효과적이고 효율적인 치료제의 신속하고 경제적인 발견’이라는 목표에 집중되고 있다. 최근의 신약개발의 승패와 나아가서는 제약기업의 사활은 특정 질병 치료분야에서 누가 신규 치료제를 가장 먼저 시장에 진출 시키느냐에 달려있다고 해도 과언이 아니다. 지금 서열분석 완료 후 이에 대한 심화 연구가 진행됨에 따라 신약 작용점이 현재의 500여 개에서 3,000 이상으로 증가될 것으로 전망하고 있다. 이러한 추세는 신약개발에 있어서 분업화를 유도하고 있으며 실제로 미국의 경우 전문기술기반의 바이오테크 기업을 중심으로 신약 작용점에 대한 스크리닝이 활발히 진행되어 방대한 정보축적이 이루어지고 있으며 이에 따라 바이오테크 기업의 가치 증가와 함께 대형제약사와의 제휴도 급증하고 있는 추세이다. 사람을 포함한 40여종 이상의 지놈 프로젝트 (genome project) 이후 유전자 서열정보의 축적과 제반 주변기술의 발전은 필연적으로 대규모 접근방법과 고속다중 스크리닝시스템 개발을 가속화시키고 있으며 이는 최근 신약개발의 추세라 할 수 있다. 이에 따라 신약개발에 있어서 비교적 초기 단계인 화합물의 스크리닝을 위한 최근의 기술에 대해 논하는 것도 의미 있는 일이라고 생각된다.

1. 신약개발의 개요

1-1. 신약개발이란

신약개발은 통상적으로 10년 이상의 장기간과 8억불 이상의 엄청난 자본이 투입되는 선진국형의 전략적 개발 과정이다. 게다가 이를 수행하기 위해서는 많은 사회적 인프라가 요구된다. 신약개발과정은 크게 기초연구에 의한 작용점 도출 및 선정, 화합물 스크리닝에 의한 유효물질 및 선도물질 선정, 후보물질의 확정, 전임상/임상1상의 임상화 연구과정, 임상2, 3상의 상품화 과정이 있다 (그림 1).

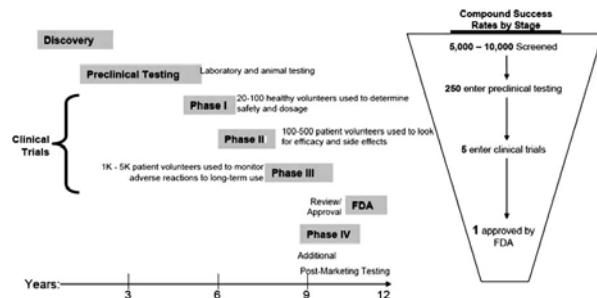


그림 1. 전형적인 신약개발 단계

현재 약 35,000개의 유전자 작용점 중에서 실제로 신약연구의 대상으로 이용되고 있는 것은 약 500종으로 지놈 프로젝트 이후 그 대상이 지속적으로 증가하고 있다. 일단 작용점이 선정되면 가장 적합하고 유효성이 있는 스크리닝 방법이 개발되어야 한다. 스크리닝 방법은 일반적으로 시험관에서 수행하는 *in vitro assay* 방법과 실제 세포를 대상으로 하는 *cell-based assay* 방법으로 구분될 수 있다. 이러한 스크리닝의 대상이 되는 화합물은 거대제약 회사의 경우 작게는 수 만종에서 크게는 수백만 종으로 이것들 모두가 스크리닝 초기과정부터 사용되기도 한다. 이러한 스크리닝 과정은 엄청난 비용이 소요되기 때문에 스크리닝 방법을 효율적으로 설계하고 단시간에 많은 수의 화합물을 스크리닝할 수 있도록 제반 장비와 시약 등을 고속화 및 최소화하려는 노력이 필요하다. 게다가 스크리닝 되는 화합물의 성질을 좀 더 의약품에 가까운 성질을 갖도록 선정하고, 특정 작용점에 초점이 맞추어진 화합물로 구성하려는 시도도 있다. 이처럼 많은 노력에도 불구하고 현재 최종적으로 신약으로 개발되는 화합물의 비율은 극히 낮다. 전임상과 임상에 도달되는 많은 후보 물질들이 체내흡수와 대사과정에서의 예상치 않은 문제와 많은 부작용 등으로 탈락되고 있는 실정이다. 그래서 오히려 많은 신약 개발자들은 개발비용이 적게 투입되는 신약 개발 초기 과정에서 가능성이 낮은 선도물질과 후보물질을 탈락시키는 것을 중요하게 생각하고 있다.

1-2. 신약 작용점의 선정

신약개발과정에서 가장 먼저 할 일은 대상 질병의 선정이다. 각 회사마다 목표로 하는 분야가 다르고 이에 따른 전문성도 다르기 때문에 이는 매우 중요한 과정이다. 예를 들어 미국의 유전체학 관련회사 중 선두적인 벤처회사인 Millennium 사의 경우 암, 감염증 및 대사관련 질환 등 비교적 광범위한 분야를 대상으로 하지만 인간화 단클론 항체 연구로 잘 알려진 Abgenix 사와 Medarex사는 주로 면역관련 질환을 대상으로 하고 있다.

신약개발에 사용되는 많은 타겟 또는 작용점들은 많은 연구자들의 유전체학, 분자생물학, 생화학, 생리학 등의 연구에서 얻어진 사실에 기초하여 선정된다. 현재 유전체학을 이용한 신약 개발에서 대상이 되는 작용점은 단백질이 압도적으로 많지만 많은 생리적 과정의 구성체인 mRNA, DNA, 지질 및 탄수화물 등도 새로운 표적이 될 수 있을 것이다. 작용점 선정에 앞서 특정 유전자와 질병과의 상관성이 증명되어야 하는데 이때 knock-

out, knock-in, RNAi 등의 기법이 이용된다. 이를 기법을 통해 질환과 단백질간의 연관성이 증명되면 이 단백질은 신약 개발을 위한 작용점으로 선정될 요건을 갖추게 된다. 최근의 신약 개발을 위한 기반 학문으로 화학유전체학은 신약 작용점과 신약 유효 또는 선도물질을 동시에 발굴하는 것을 목표로 하고 있다. (1). 표현형을 조절할 수 있는 저분자 화합물을 스크리닝하고 이에 대응하는 단백질과 유전자를 확인하는 과정을 통해 보다 적은 노력으로 신약 유효물질과 작용점의 도출이 가능한 접근으로 향후 신약개발에 중요한 전략이 되리라 기대된다.

1-3. 신약 스크리닝 시스템의 개발

다수의 화합물을 스크리닝하는 과정은 기술적으로 용이하고 재현성이 높아야 한다. 작용점이 효소일 경우 이미 잘 확립된 스크리닝 방법과 시약이 많음으로 비교적 용이한 접근이 가능하다. 그러나 많은 세포 내 과정들이 단백질간의 상호작용에 기인하기 때문에 단백질 상호작용에 기초한 스크리닝은 신약 선도물질 발굴을 위한 분석 방법 중 가장 효율성이 높은 방법이며, 그 중요성이 강조되는 이유는 첫째 생체 내에서 단백질은 다른 단백질과의 결합을 통해 기능을 나타내고, 둘째 유전자 및 단백질발현의 변화, 세포 내 위치의 변화, 번역 후 수식을 통한 구조의 변화는 단백질 결합의 변화를 유도하며, 셋째 이는 궁극적으로 세포 내에서 일어나는 대사 및 신호전달과정의 활성, 제어의 변화를 초래하고, 넷째 유전자변이 (mutation)에 의한 단백질 상호작용의 이상은 질병과 직결된다는 점이다. 이러한 단백질간의 상호작용을 측정하기 위한 기술로는 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 그리고 FP (Fluorescence Polarization) 등의 기법들이 개발되었으며 이를 쉽게 측정할 수 있는 장비들도 많이 개발되었다. 최근에는 자동화된 현미경 장비를 이용한 HCS (High-content Screening) 기법이 도입되고 있는데 96-well, 384-well plate 등에 세포를 배양한 후 화합물을 처리함으로써 세포내 단백질의 양적 변화와 이동과 관련한 많은 현상을 신속하고 정량적인 방법으로 측정할 수 있게 되었다 (2). 이러한 HCS 기법은 기존의 효소측정방법이나 리포터 시스템이 제공하는 효소활성도, 프로모터의 강도, 단백질의 증감 등의 단순한 정보이상으로 단백질의 상호작용이나 Ca⁺⁺ influx 같은 종래의 방법으로 대규모 스크리닝이 어려웠던 생리적 현상마저도 측정할 수 있게 되어 현재 거대제약회사나 연구

소에서 활용중이다.

2. 신약 스크리닝에서 사용되는 과학적 원리

신약개발을 위한 스크리닝 기술에는 효소에 의해 생성된 물질이 특정 파장의 빛을 흡수함으로써 효소 반응전후 다른 색을 발색하는 흡광도 측정법이 많이 쓰이지만 세포를 이용한 스크리닝 기술에는 발광이나 형광에 의한 효소작용이 많이 이용된다. 현재 이러한 현상과 관련된 리포터 유전자와 발현시스템이 많이 개발되어 있으며 이를 정량적으로 측정할 수 있는 키트들도 많이 개발되어 있다. 이러한 기술들은 세포 생물학이나 분자 생물학의 *in vitro* 또는 *ex vivo* 실험에서 형광 현미경이나 luminometer를 이용하여 이미 실행되고 있다. 최근에는 효소활성에 의해 발생한 형광이나 발광에 의한 인접 단백질과 형광 프로브의 활성화 정도도 측정할 수 있는 기법이 개발되어 신약 스크리닝기술에 응용되고 있다. 따라서 신약개발연구자는 스크리닝하고자 하는 생리적 현상에 따라 적당한 리포터와 스크리닝 시스템을 선정하여야 한다.

광학적 분석에 의한 스크리닝기술에서 가장 중요한 문제점은 어떻게 샘플로부터 나오는 빛을 감지하여 정량화 또는 영상화 하느냐 하는 문제이다. 이부분에 있어서, 가시광선과 같이 파장이 길어 조직 투과성이 매우 낮은 빛도 감지할 수 있는 검출기들이 개발되어 배양 중인 세포나 반응물로부터 발생한 발광 또는 형광을 정량적으로 측정할 수 있으며 이를 영상으로 전환할 수도 있다. 최근 개발된 전하결합소자 (charged coupled device: CCD) 검출기는 가시광선부터 근 적외선 영역의 빛을 감지하는데 그 예민도가 매우 뛰어나다 (3). 이 장비는 400-1000nm 파장과, 약 2-3 eV의 에너지를 가지고 있는 광자가 CCD 검출기에 부딪히면 광자를 전자로 변환시키며, 반도체로 구성되어 있어 CCD는 변환된 전자를 증폭시키기가 용이하다. CCD 카메라 조절기는 컴퓨터 시스템에 연결되어 영상을 획득하고 분석하는데 사용된다. 이러한 CCD 카메리를 이용한 분석은 분자생물학 연구에서 화학적 발광을 이용한 웨스턴 분석에서 등에서 이용되고 있기도 하지만 가장 중요한 응용은 HCS 기법에서 여러 파장의 형광을 동시에 검출하여 세포내 단백질의 영상화를 가능하게 한 것이다.

2-1. 발광 (Bioluminescence)

발광은 특정 환경에 외부의 빛 에너지 공급이 없이 독자적으로 빛을 발산하는 것을 말한다. 일반적으로 생물학 연구나 신약 개발에서 사용하는 생물발광 (Bioluminescence)이다. 흔히 보는 예로서는 반딧불이 (Firefly) · 조개물벼룩 · 물뚱꼴뚜기 등의 발광을 들 수 있다. 생물발광은 이 외에도 수많은 생물에서 알려져 있다. 식물에서는 벼섯 등 균류에서 50여 종의 발광생물이 알려져 있으며, 쌍편모 조류에서도 약간 발견되고 있다. 동물에서는 하등동물에서 고등동물에 이르기까지 여러 종류에 분포되어 있는데 해양 동물에서 특히 많다. 미생물에서도 세균류에 약 70종이 알려져 있다 (4-7).

생물발광은 어떤 유기화합물이 효소의 작용으로 산화되면 서 그 때 방출되는 에너지가 빛에너지의 형태로 체외로 나오는 현상으로 일종의 광화학반응이다. 세균이나 균류 가운데서 발광을 하는 생물은 일정한 발광기관의 발달이 없고, 세포 속에 있는 발광물질을 산화하여 빛을 내지만, 발광동물은 대개가 특수하게 분화된 발광기관을 가지고 있어서 빛은 여기에서 발생한다. 발광물질은 루시페린 (luciferin)이다. 이 물질의 분자 구조는 발광생물의 종류에 따라 다르지만 산화되면서 빛을 발생하는 기본적 기작은 생물의 종류에 관계없이 공통적이다.

2-2. 형광 (Fluorescence)

물질이 형광을 발생하는 물리적 과정은 빛에너지를 흡수한 형광물질이 그 일부를 다시 빛에너지로서 복사하는 현상으로 취급된다. 일반적으로 빛에너지는 파장이 짧을수록 크기 때문에 자극광보다 에너지가 적은 형광의 파장이 자극광의 파장보다 길다고 하는 스토퍼스의 법칙 (Stokes' law)을 이 현상으로 설명 할 수 있다. 신약개발과정에서 이용되는 형광 발생체는 크게 형광 화합물과 형광 단백질로 구분할 수 있다. 전자의 경우는 FITC, Texas Red, Cy5, Cy3, DAPI 등이 있는데 저분자 화합물로써 외부의 특정 파장의 빛에너지를 흡수하여 그 보다 낮은 에너지의 장파장 빛을 발생시킨다. 이 형광물질들은 DAPI의 경우처럼 단독으로 사용되기도 하지만 항체, 스트렙토아비딘, 또는 일반 단백질에 결합되어 특정 단백질의 세포내 분포, 양적 변화 그리고 단백질간의 상호작용을 측정하는데 이용하고 있다. 후자의 형광단백질은 GFP, RFP와 이것으로부터 유래한 변종 단백질들이 있는데 대부분의 경우 관심 있는 단백질과 융합되어 편입된 세포내 단백질의 이동과 양적 변화를 관찰하는데 이용 한다 (8, 9).

2-3. 형광 공명에너지 전달 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET)

생체 내에서 특정 분자간의 상호작용의 정확한 장소와 성질을 아는 것은 신약개발에서 매우 중요하다. 단백질간의 물리적 상호작용을 이해하기 위해서는 두 분자간의 거리가 광학적 영상화 기법을 제한하는 빛의 회절보다 더 근접해야 한다. FRET는 바로 이러한 현상이 가능할 정도로 서로 다른 색상의 형광을 내는 두 개의 물질이나 화학적 잔기가 10나노미터 (nm)이내로 가까워짐으로써 그 사이에 공명 에너지 전달이 생겨 각자의 형광 스펙트럼이 달라지는 현상을 의미한다 (10). 형광과 마찬가지로 에너지의 전달자인 첫 번째 형광이 수용체에서 발생하는 형광보다 에너지가 높다. 이러한 공명 에너지 전달 현상은 FRET 이란 용어로 1940년대에 Forster에 의해 처음 적용되었으며, 들뜬 상태의 공여체 분자가 수용체 분자에 에너지를 전달하여 수용체 분자의 전달된 에너지양을 측정하는 것이 기본 원리이다 (그림 2). 이러한 현상이 아주 근접한 거리에서만 일어남으로 FRET를 이용해 단백질의 상호작용을 분석하는 시스템의 개발이 가능하다. 그러나 FRET 현상이 단백질간의 에너지 전달에 의해서만 발생하는 것이 아니다. 1998년도에 G. Zlokarnik 등은 β -lactamase의 기질인 CCF2를 이용하여 β -lactamase의 발현에 따라 FRET 현상이 발생하도록 하는 시스템을 개발하였다 (11). 이 시스템에서는 막투과성이 좋은 기질인 CCF2/AM이 β -lactamase의 효소작용에 의해 두개의 분자로 분할되면서 FRET 성질이 여기까지 409nm에 대한 방사파장이 520nm에서 447nm로 성질이 전환된다. 이러한 원리에 따라 살아 있는 세포내에서 특정 프로모터에 의한 유전자의 발현을 실

시간으로 관찰할 수 있게 되었다.

2-4. 생물발광 공명에너지 전달 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer: BRET)

BRET 기법은 살아있는 세포에서 신호전달 기작을 연구하는 분야를 포함하여 단백체 및 기능유전체학 연구분야에 매우 유용한 새로운 실험기술이다. 일반적으로 단백질 상호 결합을 확인하기 위하여 두 가지 형광 물질간에 형광에너지가 전달되는 현상을 이용한다. 그러나 FRET은 예상하지 않았던 다른 물질에서 발생하는 자가형광 (autofluorescence)이나, 광반응(photoresponsive)을 하는 망막 세포를 대상으로는 사용할 수 없을 뿐만 아니라, 공여체로서 사용하는 형광물질이 광표백 (photo-bleaching) 되어 장시간 사용할 수 없다는 한계점이 있어서 이러한 단점을 보완 개발된 방법이 BRET이다. BRET 방법 또한 공여체 분자와 수용체 분자 사이에서 공명 에너지 (Resonance Energy)가 전달되는 현상을 이용한다. 다만 BRET는 FRET와는 달리 공여체로써 형광물질이 아닌 발광물질 (luminescent material)을 이용한다는 점에서 구분할 수 있다 (12).

예를 들어 즉, Perkin Elmer 사에서 특허화한 BRET2 시스템은 *Renilla luciferase* (Rluc) 이란 유전자를 포함한 단백질이 공여체 분자로써, GFP2 유전자를 포함한 단백질이 수용체 분자로써 역할을 하고, 공여체 분자의 들뜬 상태는 FRET에서 사용되는 빛 에너지를 사용하지 않고, 열의 발생을 수반하지 않는 기질인 DeepBlueC에 의해 유도되는 발광에너지를 이용한다. 예를 들어, 상호 결합 여부를 알고자 하는 단백질 A와 B가 있다면, Rluc 단백질과 GFP2 단백질에 A, B 단백질의 유전자를 클로닝한 후 세포에 발현시켜, 최종 발생하는 형광 에너지의 차이를 관찰한다 (그림 3). 만약 이들 A, B 단백질이 상호결합한다면, 공여체 분자 에너지가 수용체 분자에 전달되어, 전달된 수용체 분자의 에너지양을 측정할 수 있고, 상호 결합하지 않는다면 공여체 분자가 수용체 분자에 에너지를 전달하지 못하여, 수용체 분자의 에너지의 양을 측정할 수 없게 된다. 이 시스템을 이용하여 살아있는 세포에서 단백질들 간의 상호결합을 확인할 수 있으며 수용체와 리간드 사이의 기능적인 assay가 가능하다.

본 시스템에서는 기존 BRET에 사용했던 기질과는 다른, DeepBlueC (DBC)를 사용하여 보다 Rluc과 GFP2에서 발생하는 emission 파장의 거리가 넓고, DBC가 화학적 기질이기

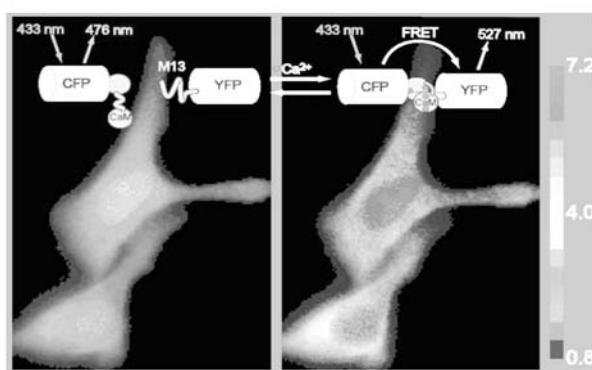


그림 2. 세포내 칼슘 이온 농도를 분석할 수 있는 FRET 시스템

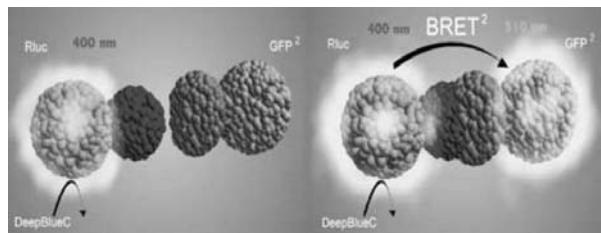


그림 3. BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)의 원리

에 형광물질에서 발생되는 자가형광이 없어 결과가 보다 정확하다. 또한 DBC가 membrane 통과할 수 있으므로, 반응의 신호 측정을 위해 세포를 분해하는 과정 없이, 한 시료용기 안에서 모든 반응을 마무리할 수 있어 반응 시간이 단축되며, 실험 과정이 간단하여 세포내 단백질간의 상호작용을 측정하거나 이를 억제하는 화합물의 스크리닝에 매우 효율적인 방법이 될 수 있다.

2-5. 형광 편광도분석 (Fluorescence Polarization; FP)

형광 편광도분석은 리간드-수용체 결합, 단백질 분해, 단백질-DNA 상호작용, 생체막 유동성, 근육수축과 같은 분자의 운동성과 방향성에 관련된 물리적 정보를 분석할 수 있는 유용한 기법이다. 편광은 형광성 분자의 일반적 성질이기 때문에 편광에 기초한 판독은 다소 염료시약에 덜 의존적이고 분석 시 이용되는 환경 (예를 들면, 산성도)에도 덜 영향을 받는다. 실험적으로 편광도는 직선적으로 편광된 여기광의 단면에 대하여 수평적이거나 수직적인 형광의 강도에 의해 결정되는데 이를 형광 편광도 또는 비등방성 (Anisotropy)라고 한다. 작고 빠르게 회전하는 분자들은 초기의 광선택적인 방향 분포가 방사전에 무작위화되어 낮은 형광편광도를 보인다. 이와 반대로 크지만 느리게 회전하는 분자에 추가적인 질량이 결합되면 높은 편광도를 나타내게 된다 (그림 4). 그러므로 형광분석은 단백질, 핵산, 생체 거대중합체에 결합하는 탐침의 양을 판독할 수 있는 수단을 제공한다. 원리적으로 FP값은 분자량과 용매의 점성도가 증가하면 비례적으로 증가하며, 사용된 염료의 흥분기가 증가하면 감소하는 특징을 갖는다. FP측정은 전통적으로 생체막 지질의 역동성, 마이오신의 재방향성, 단백질-단백질 상호작용을 검증하는 생물물리적인 기법이었다. 임상분석을 위해 개발 및 사용 중인 면역분석방법도 이러한 기법의 유형에 속한다. 최근에 개

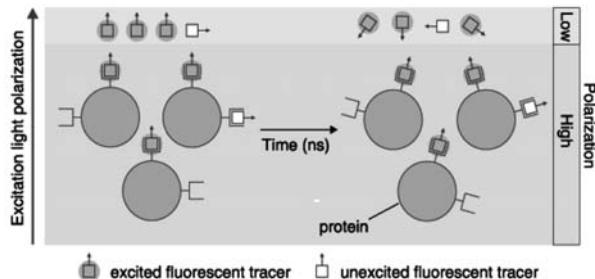


그림 4. FP (Fluorescence Polarization)의 원리

발된 편광도분석이 가능한 광학도구를 장착한 마이크로플레이트 리더는 이러한 분석을 HTS의 수준으로 옮겨 일반적인 분석 기법으로 사용할 수 있게 되었다 (13).

3. Cell-based assay 와 리포터 유전자 시스템

약물을 스크리닝하는 방법으로써 기존의 방법은 표적 단백질의 효소적 성질과 면역학적 방법에 기초하여 주로 시험관에서 화합물을 스크리닝하는 것이었다. 이러한 방법은 원리적으로 간단하고 시간적으로 신속하지만 스크리닝하고자 하는 생물학적 범위가 매우 제한적이었고 나아가 화합물의 물성이 신약으로 부적합하거나 작위적인 결과를 보여주기도 하였다. 이에 따라 화합물을 스크리닝환경을 좀 더 생체적으로 유사하고 좀 더 다양한 생물학적 형질을 규명하기 위하여 cell-based assay 방법을 개발하였다. 기존의 방법이 특정 단일 표적분자의 기능을 조절 할 수 있는 약물을 *in vitro* 환경에서 찾는 것이었다면 cell-based assay의 경우 세포 내의 모든 단백질의 기능이 존재하는 세포 환경에서 스크리닝하고자 하는 특정 단백질의 기능을 부가하여 약물을 스크리닝함으로써 보다 선택적이며 생리적 활성이 있는 약물을 확보할 수 있게 된다.

이러한 cell-based assay 방법을 위하여 현재 많은 리포터 유전자 시스템이 개발되어 발현벡터로써 상용화되고 있는데 리포터 시스템뿐만 아니라 FITC와 같은 형광화학물질을 이용한 스크리닝 시스템의 개발도 가능하다. 지금까지 개발되어 사용되고 있는 리포터 유전자는 파이어풀라이 루시퍼라아제 (14), 레닐라 루시퍼레이즈 (15), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제 (16), β -갈اكتоз이다아제 (17), 사람 성장 호르몬 (18), β -락타메이즈 (11), 각종 형광단백질 (fluorescent protein) (19), 분비성 태반

알칼린 포스파테이즈 (Secreted placental Alkaline Phosphatase, SEAP) (20) 등의 유전자가 대표적이다. 이러한 리포터 유전자들은 분석에 사용되는 시약의 발전과 그 케를 같이하기 때문에 앞으로도 더 좋은 시스템들이 계속 개발될 것으로 보인다. 각 리포터 시스템으로 분석이 가능한 생물학적인 활성으로는 전사활성, 단백질의 안정성과 양적 변화 등이 있으며 HCS 기법을 이용하면 단백질의 이동 및 분포, 단백질간의 상호작용 뿐만 아니라 거의 모든 생리적 활성을 측정하는 것이 가능하다. 예를 들면 암 억제인자인 p53 전사활성 및 혈관 신생촉진인자인 VEGF 프로모터의 전사 활성평가를 위한 리포터 시스템 등이 실제 활용되고 있다. 한편 단백질의 번역 후 수식과정인 인산화, 아세틸화, 유비키틴화 과정을 감지하는 감도 높은 항체를 활용하면 이를 반응에 관여하는 효소조절물질의 스크리닝계의 개발도 가능하다.

리포터 시스템을 개발하기 위해서는 여러 가지 필요 요건이 있으며 이상적인 리포터 유전자 시스템은 다음의 특징을 가져야 한다.

- ① 리포터 유전자는 세포 내 바탕활성 (background activity)에 의한 오류를 피하기 위해 사용될 동물의 세포에 존재하지 않아야 하며 유사한 활성을 나타내는 활성도 없어야 한다.
- ② 리포터 유전자가 발현되지 않을 때는 리포터 단백질의 세포 내 축적이 적어야 한다.
- ③ 리포터 유전자 생산물에 의해 세포독성이나 생리적 변화를 유도하지 않아야 한다.
- ④ 리포터 단백질은 생명체 내에 안정적이어서 다른 형태로 전환되지 않아야 한다.
- ⑤ 리포터 단백질 시스템은 정량을 위하여 방사성 동위원소 등을 사용하지 않아야 한다.
- ⑥ 리포터 유전자의 크기는 매개체에 삽입할 수 있을 정도의 크기를 유지해야 한다. 예를 들면 재조합 아데노바이러스에 삽입할 경우 7 Kb 이하가 적당하다.
- ⑦ 리포터 단백질은 정량하고자 하는 세포의 위치에 주로 존재하여야 한다. 대부분의 리포터 단백질이 세포내에 있거나 세포 밖 배양액에 존재하여야 한다.
- ⑧ 리포터 단백질의 광학적 신호는 리포터 유전자의 mRNA 와 단백질의 발현 정도에 높은 상관관계를 가져야 한다. 모든 리포터 유전자 시스템이 이런 조건을 다 충족할 수는 없

다. 각각의 시스템마다 장, 단점이 있으므로 활용 목적에 따라 적절한 시스템의 선택이 이루어져야 한다. 아래에는 현재까지 연구되어온 리포터 유전자 시스템을 간단히 설명하고자 한다.

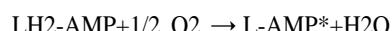
3-1. Firefly luciferase 리포터 유전자

생물학적 연구나 약물 스크리닝에 사용 중인 루시페레이즈 유전자는 반딧불이 루시페레이즈, 레닐라 루시페레이즈, 가우시아 루시페레이즈, 세균성 루시페레이즈 등이 있다. 이 중 가장 많이 사용되는 것은 반딧불이 루시페레이즈, 레닐라 루시페레이즈인데 이 두 가지 리포터 시스템이 작동하는 반응조건이 상이하기 때문에 하나의 시험관 내에서 두 가지 리포터 단백질 양을 순차적으로 분석할 수 있는 시스템도 개발되어 상용화되고 있다. 여러 종류의 루시페레이즈 중에서 북아메리카 반디인 *Photinus Pyralis*의 firefly luciferase (Fluc)는 매우 넓은 스펙트럼의 방출 파장을 만들어낼 수 있는데, 560nm에서 정점을 이루고 상당한 양의 600nm 이상의 스펙트럼에 포함되어 있다.

Fluc은 그 특이적인 기질인 D-luciferin과 반응하여 oxyluciferin으로 산화시킨 뒤 빛을 방출한다. 이 반응은 산소, 마그네슘, ATP의 존재 하에 가능하다. 이 발광 기구는 반딧불이에서 많이 연구되었는데 그 개요는 다음과 같다. 즉 발광물질인 루시페린은 ATP와 결합하여 루시페린-ATP의 복합물을 형성하면서 무기인산 H_3PO_4 두 분자를 생성한다. 이때 루시페린은 환원형이어서 LH2와 같이 표기된다.



이 반응에서 생긴 LH2-AMP는 산소와 반응하여 산화되면서 불안정한 에너지 상태에 있게 된다. 따라서 불안정한 상태의 산화 신물은 곧 분해되어 산화형 루시페린과 AMP를 생성하면서 빛 (hv)을 낸다.



위 식에서 L은 산화형 루시페린, L-AMP*는 불안정한 에너지 상태의 루시페린-AMP복합물을 가리킨다. LH2-AMP가 산소 (1/2 O_2)와 반응하여 산화되는 과정은 루시페레이즈라는 효소의 촉매작용에 의하여 이루어진다. 따라서, 생물발광은 루시페린 · ATP · 루시페라아제 및 산소의 존재 하에서 일어난다. ATP가 반드시 필요한 반응이기 때문에 카이네이즈의 활성을 평가하는데 이 반응을 이용하기도 한다. 이 밖에도 2가 양이온 중에서 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 등이 있어야 한다는 것도 알려

져 있다. 루시페린 한 분자의 산화에서 1 광량자가 방출되는 것으로 계산되고 있으므로, 생물발광은 광효율이 매우 높아서 열의 발생을 거의 수반하지 않는다. 따라서 생물발광에서 나오는 빛을 냉광이라고도 한다.

Fluc은 효소-기질의 반응이 매우 안정적이어서, *in vivo*에서 복강으로 luciferin을 주입해 체내의 특정 장기에서의 영상을 얻는데도 사용할 수 있다. 복강 내 주입 후 약 20분 후에 반응의 정점에 도달한다. 동물을 이용한 실험에서 안정적으로 영상을 쉽게 얻을 수 있다는 장점이 있으나, 반응속도가 느리므로 1시간 이내에는 또 다른 영상을 얻을 수 없다는 단점도 있다. 또한 빛을 생성하는데 ATP가 필수적이어서 세포 밖에서 벌어지는 생물학적 반응을 관찰하는 데는 적합하지 않다 (4).

3-2. *Renilla luciferase* 리포터 유전자

바다의 갑각류 생물인 *Renilla reniformis*는 Fluc과 유사한 루시페레이즈를 발현하는데 이를 *renilla luciferase* (Rluc)라고 한다. 이 효소는 coelenterazine이라는 물질을 산화시키고 그 엔탈피 차에 의해 빛이 생성된다. 이 반응은 Fluc 반응보다 더 단순해서 산소, 마그네슘, ATP가 없어도 빛을 만들 수가 있으므로 ATP가 없는 세포 외부에서의 반응을 관찰하는데 사용될 수 있다. 반응 역학은 Fluc보다 반응속도가 빨라서 효소-기질 반응시작 후 수초 내에 최고 정점에 도달하므로 *in vivo*에서 반복하여 동영상은 얻는 것이 어느 정도 가능하다. 반응 속도가 빨라서 동물 실험 시 기질 coelenterazine을 복강 내로 주사해서 충분한 영상을 얻을 수가 없고 혈관 내로 주사하여야 한다. 빛 생산은 파장 480 nm에서 최고 정점을 이루나, 정점을 이루는 파장대가 넓어서 600 nm 이상의 영역에서도 일부 빛을 생산할 수 있다 (5, 6). 이 루시페레이즈의 반응조건이 반딧불이 루이서레이즈 효소의 반응조건과 상이하므로 이 두 가지 루시페레이즈 리포터를 결합하여 한번의 실험으로 두 가지의 리포터 정보를 얻을 수 있는 시스템이 상업화되어 시판되고 있다. 또한 레닐라 루시페레이즈 효소에서 방사하는 빛의 파장이 480nm에서 최고 정점을 나타내기 때문에 BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 시스템에도 사용되고 있다.

3-3. Secreted placental alkaline phosphatase (SPAP) 리포터 유전자

SPAP는 태반의 세포막에 결합되어 있는 Placental alkaline

phosphatase의 카르복실 말단부의 아미노산 30개가 제거된 돌연변이형 단백질이다. 이러한 돌연변이는 SPAR 단백질이 세포막을 통과하여 배양액 또는 체액으로 분비될 수 있다 (21). 이 유전자의 발현은 기질인 p-nitrophenol phosphate을 이용하여 빛색 반응으로 확인할 수 있거나, CSPD를 이용하여 화학 발광 반응으로 정량적 분석이 가능하다 (22). 이 효소는 열에 대한 안정성이 매우 높기 때문에 65°C까지의 가열로 세포내 비특이적인 endogenous alkaline phosphatases에 의한 바탕 활성을 제거할 수 있다. 그러나 이러한 열처리 과정이 HTS 스크리닝 과정에서는 매우 번거로운 일이기 때문에 세포배양에 사용되는 소태아 혈청 (FBS, Fetal Bovine Serum)을 열처리된 것으로 사용하는 것이 권장된다. 그렇다 하더라도 이것의 바탕 활성이 비교적 높은 수준이기 때문에 약한 프로모터의 전사활성 분석에는 이 리포터 시스템을 사용하지 않는 것이 좋다. 이 시스템은 세포를 파괴하지 않는 비파괴적인 분석이기 때문에 하나의 세포 샘플에서 장시간 동안의 반복적 분석에 매우 유용하다. 또한 루시페레이즈 시스템과 혼합할 경우 한번에 세 가지 생리적 활성의 분석에 사용할 수 있어서 HTS 시스템으로의 응용에 매우 적합하다.

3-4. Green fluorescence protein 리포터 유전자

Green fluorescence protein (GFP)는 *Aequorea victoria*라는 해파리에서 추출한 것으로 오랜 기간동안 생물학 실험실에서 리포터 유전자로 사용되어 왔다. 이는 빛을 발생하는데 기질이나 cofactor가 필요 없이 여기 파장 (excitation wavelength)의 빛으로 형광이 가능하여 세포 생물학 실험실에서 각종 형광 분석기와 현미경 등을 이용하여 측정되어 왔다. 450-490 nm의 빛에 의해 여기되어 510-570 nm의 빛을 발생한다. 형광이 생체영상에 사용되기에 몇 가지 장애가 있는데, 여기 파장의 빛에 의해 피부 세포 등이 빛을 반사하여 배후 잡신호가 높다는 점, 포유세포에 따라 GFP를 발현 못하는 세포주가 있다는 점 등이다. 이를 개선하기 위해 원래 단백질보다 약 30배의 강한 형광을 발산하는 돌연변이 EGFP가 개발되었다. 또한 녹색 형광뿐만 아니라 청색, 황색의 형광을 발산하는 돌연변이체가 개발되어 세포나 생체 내에서 다양한 단백질 지표를 동시에 관찰할 수 있게 되었다 (그림 5). 이러한 형광 단백질을 이용한 화합물의 스크리닝 시스템도 많이 개발되었는데 주로 관심 있는 단백질에 융합 발현되어 세포내 단백질의 이동과 안정성에 관

련한 형질 분석에 적합하다. 전사 활성에 의한 리포터 활성을 분석에는 형광단백질보다 루시퍼레이즈 계통의 리포터가 적합한데 이는 형광 단백질이 루시퍼레이즈에 비해 세포내 안정성이 매우 높아 바탕 활성을 증가시키기 때문이다.

3-5. Red fluorescence protein (RFP) 리포터 유전자

R. Tsien 등은 Discosoma라는 산호로 부터 적색으로 광대가 이동된 DsRed라는 단백질을 합성하는 유전자를 클로닝하였다. 500-550 nm에 의해 여기되어 575-650 nm의 빛을 발사한다 (그림 5). 600nm 이상 영역을 많이 포함하고 있어서 세포 내 영상 분석에 적합하다. 원래 DsRed는 tetramer여서 단백질이 성숙되는데 시간이 많이 걸리는 등 약점이 있었으나 최근 같은 연구팀에 의해 monomeric red fluorescence protein이 개발되었다 (9).

이러한 형광단백질을 이용한 영상 분석은 한 가지 색의 형광을 이용하는 것보다는 두 가지 이상이 형광 단백질을 이용하는 유리한데 이는 관심 있는 단백질의 영상과 함께 내부 표준으로 써 비특이적인 단백질의 영상을 얻을 수 있거나 두 가지 이상 단백질간의 세포내 상호작용을 분석하는데 매우 유리하기 때문이다.

4. 고속 다중 스크리닝법 (High Throughput Screening; HTS)

약효 스크리닝의 통상적인 작업과정은 화합물의 분주, 희석, 스크리닝 성분 혼합, 배양 및 검출, 스크리닝 데이터의 분석 및 결과 보고로 구성되며, 이 일련의 과정을 신속하고 효율적으로 처리하기 위해 소형화 및 자동화된 고속 다중스크리닝 (High Throughput Screening, 이하 HTS) 시스템을 활용하고 있다. 통상 선진제약사의 경우 현재 수 백만종의 화합물 라이브러리를 보유하고 있으며, 신규 작용점 도출시마다 HTS 시설을 활용하여 전체 화합물에 대한 생물활성 데이터를 확보하고 있다 (23). 향후 도출되는 수천종의 신약 작용점에 대해 보유 라이브러리를 보다 신속하고 효율적으로 스크리닝하기 위해서는 QC 기능, 중복된 데이터에 대한 오류 검사, 상대적 활성 (% Activity)의 계산 및 IC_{50} , K_i , K_m 와 같은 생화학적 수치를 산출하기 위한 curve-fitting 도구를 제공해야 한다. 이를 위해서는 한번의 스크리닝을 통해 많은 데이터를 얻을 수 있는 HTS가

Table I: Characteristics of all Living Colors^a Fluorescent Proteins

	Excitation max (nm)	Emission max (nm)	Extinction coefficient	Quantum yield
DsRed	558	583	22,500	0.29 ^a
EVFP	514	527	84,000	0.61
EGFP	489	508	55,000	0.60
ECFP	434	477	26,000	0.40
EBFP ^b	380	440	31,000	0.18

^a Relative to EGFP

^b Rapid photo bleaching

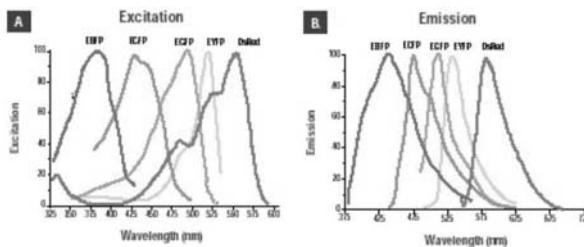


그림 5. 형광단백질의 여기 (Excitation)와 방사 (Emission) 스펙트럼.

필요한 것이다. 이 신기술의 기본 개념은 전통적인 방식에서 벗어나 실험실 자동화를 통하여 무작위의 합성 화합물을 대량으로, 신속하게 효능을 평가하는 것으로, 신물질 합성 자동화 (CCL), 분자설계 및 체계적 정보 관리와 접목되어 신약개발 후보 물질 도출을 위한 소요 시간을 최소한으로 축소시킬 수 있다. 이 분야는 1990년도 이후 미국에서부터 폭발적으로 확산되어 현재는 신약개발을 하는 모든 다국적 제약기업에서 표본적, 정형적인 신약개발 수단으로 정립되어 가고 있다. 그러므로 HTS는 경쟁력이 심화되고 있는 신약 분야에 있어서 필수불가결하며 이를 통해 연구기간의 단축, 연구의 효율성 제고 및 경쟁력 강화를 기대할 수 있다.

하루에 1만종이상의 화합물에 대한 스크리닝이 이루어지는 HTS 기술을 위해서는 여러 가지 전제요건이 필요한데 이를 요약하면 다음과 같다.

- ① 신속성: 신속한 스크리닝은 하루에 스크리닝할 수 있는 화합물의 수를 증가시킴으로써 결과적으로 단시간에 스크리닝 과정을 중요시키고 이로 인해 경비를 절감할 수 된다.
- ② 스크리닝 경비: 스크리닝에 이용되는 시약은 전체 스크리닝 과정에서 소요되는 경비 중 매우 큰 부분을 차지함으로 좀 더 경제적인 스크리닝 방법을 고안해야 한다.
- ③ 소형화: 소형화는 시약 경비를 절감시킬 수 있는 가장 좋은 방법일 뿐만 아니라 스크리닝 소요시간을 단축할 수 있는 방법이다. 그리고 실험실의 공간을 줄일 수 있다.

- ④ 자동화: 자동화는 스크리닝의 속도를 높일 뿐만 아니라 결과의 재현성도 제고시킬 수 있다. 특히 384-well이나 1536-well 마이크로플레이트를 이용한 스크리닝 과정에서 실험자의 오류를 줄이기 위해서는 자동화가 필요하다(그림 6).
- ⑤ 스크리닝 감도: 검출방법의 감도는 사용될 샘플의 양과 직접적으로 관계된다. 감도가 낮은 샘플을 스크리닝하기 위해서는 더 많은 시간이 요구되므로 검출감도가 높아야 한다.
- ⑥ 비방사능 방법: 현재까지 HTS 방법 중 50% 가량이 방사능 물질을 사용한다. 그러나 방사능 물질은 특별한 관리가 요구되는 폐기물을 발생시키며 시간적, 공간적, 비용적인 면에서 비경제적이다.
- ⑦ 단순화: 여과, 분리, 세척, 소멸, 고체상태를 요구하는 방법은 추가적인 경비와 공정을 필요로 하기 때문에 스크리닝 과정은 액체상태에서 최대한 단순화되어야 한다.
- ⑧ 용이한 이전: 새롭게 개발된 스크리닝 방법은 쉽게 HTS 환경으로 이전될 수 있어야 한다.
- ⑨ 융통성: 가장 좋은 스크리닝 방법은 작용점의 생물학에 기초해야지 스크리닝 기술의 한계에 기초해서는 안 된다. 제약회사는 다른 방법으로도 응용될 수 있는 기술과 장비를 선호한다.

이러한 HTS 기술을 뒷받침하기 위해서는 화합물관리, 로봇시스템에 의한 대량 약효 스크리닝 과정, 스크리닝 데이터의 분석 및 결과 보고 등의 추가적인 작업을 수행할 수 있는 체계가 필요하다. 이를 위해 첫째, 여러 가지 경로로 입수한 대량의 화합물들 (Chemical Inventory)의 체계적인 관리 보관이 필요하며, 이를 위해서 화합물 관리 소프트웨어와 화합물 보관 정보에 대한 데이터베이스는 필수적이다. 특히 바코드 시스템을 이용한 화합물 관리는 후속 작업들을 자동화할 수 있게 한다. 둘째, 로봇시스템이나 자동화 장비를 이용한 약효 스크리닝에 맞는 형태로 대량의 화합물들을 전처리와 분배작업이 필요하다. 화합물 전처리 작업은 화합물의 무게를 재고 일정한 농도로 화합물 용액을 만들고 일정한 농도로 희석하는 과정을 말하며, 분배 작업을 통하여 로봇시스템이나 자동화 장비를 이용한 약효 스크리닝에 사용하기 적합한 형태로 재구성한다. 셋째, 특정 질병에 관련된 여러 가지 효소나 수용체 등의 활성을 측정하는 일련의 실험 과정을 로봇 시스템에 적용하여 치료제 선도화합물의 스크리닝을 수행한다. 이를 통해 많은 연구 인력 및 소요시간을 절

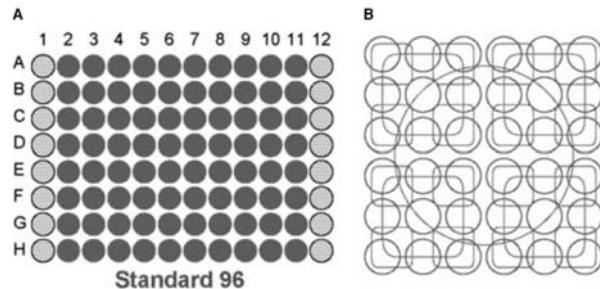


그림 6. HTS에서 사용되는 96-well과 고밀도 마이크로플레이트

약할 수 있으며 단순 반복적인 일에서 벗어나 더 창조적인 일을 할 수 있게 된다. 넷째, 자동 처리 소프트웨어를 이용하여 실험 결과로 얻어진 대량의 데이터를 처리한다. 이 과정을 거치면서 대량의 유용하고 체계적인 정보가 획득된다. 이처럼 HTS 기술은 단순히 스크리닝 속도에 국한된 개념이 아니라 신약 개발 과정 중 성공적인 스크리닝 과정을 위한 핵심요소 기술이며, 나아가 신약개발의 성공을 위한 전략적 초석임을 알 수 있다.

5. 하이컨텐트 스크리닝 기술 (High-content Screening; HCS)

제약회사들은 그동안 화합물 화학적 접근법과 기존의 HTS 기술에 막대한 투자를 해왔으며, 결과적으로 신약후보물질의 수가 급격히 증가하였고, 이렇게 발굴된 후보물질은 1차 스크리닝 과정 (표적 발굴 및 검증, 후보물질 발굴)보다 수율이 낮은 2차 스크리닝 과정 (후보물질 최적화)을 거쳐야 한다. 1차와 2차 스크리닝 과정의 효율 차이는 신약개발 과정에서 심각한 병목 현상을 초래하게 된다. 따라서 경제적인 비용 지출을 통해 2차 스크리닝에서 발생시키는 데이터의 품질을 일정 수준 이상으로 유지하면서도 효율을 높여서 1차 스크리닝 과정과의 조화를 맞추는 것이 신약개발 과정에서 주요한 도전 과제가 되었다.

하이컨텐트 스크리닝 (HCS)은 “살아있는 세포 내의 다양한 표적을 시간적, 공간적으로 분해능이 높은 고감도 형광 영상을 기반으로 해서 복합적이고 기능적으로 스크리닝하는 기술”로 정의할 수 있다 (24). HCS의 근간이 되는 기술은 세포를 기반으로 하는 분석법, 시간 및 공간적으로 고분해능을 지니는 형광 측정을 통한 실시간 생체세포 이미징, 고속 및 하이컨텐트 자동화 분석법 등의 세부기술로 이루어진다. HCS의 분석 대상은 세



그림 7. HCS 검색장비, Evotec 사의 Opera 시스템

포자별, 분자 이동, 세포 생활성, 세포 분열, 리간드-수용체 상호작용, 유전자 발현, 단백질 국재와 활성, 효소 활성, 수용체 내입 등이다. 이러한 스크리닝을 통해 연구자들이 방대한 양의 생물학적 또는 화학적 정보를 얻을 수 있으므로, 기존의 스크리닝 방법에 비해 여러 장점을 제공할 수 있다. 특히, 이러한 분석에서 얻은 풍부한 정보를 바탕으로 부적절한 화합물을 신속하게 배제하고 보다 효율적으로 가장 효과적인 약을 개발할 수 있게 됨으로써, 시간과 비용을 획기적으로 절감할 수 있으며 이러한 분석은 신약개발 과정의 모든 단계에 활용될 수 있다.

21세기 생물학의 궁극적인 목표는 살아있는 세포의 생리현상을 밝히는 것으로 이 목표를 달성하기 위해서는 HTS의 경우처럼 좀 더 체계적인 방법으로 생체세포로부터 대량의 복합적인 정보를 추출할 수 있는 실험적 도구와 방법 그리고 방대한 정보를 효율적으로 분석할 수 있는 컴퓨터정보처리 기술이 요구된다(그림 7). 따라서 HCS는 형광 이미징, 세포 및 분자 생물학, 약리학, 공학, 응용 광학 및 물리학, 데이터베이스 설계, 소프트웨어 등이 모두 포함되는 융합 기술이라 할 수 있다.

6. 각종 칩을 이용한 신약 스크리닝기술

신약개발에서 칩이란 생물에서 유래한 효소, 단백질, 항체, DNA(유전자), 미생물, 동식물세포, 신경세포 등과 같은 생체 유기물과 실리콘 등의 무기물 기반체를 조합하여 기존의 반도체칩 형태로 만든 소자(device)이다. 사용 용도와 응용 분야에 따라 다양한 종류가 있지만, 생체의 기능을 모방한 인위적인 소자로써 전기적인 신호처리 또는 광학적 신호처리가 장치의 개

념에 내포되어 있다. 바이오칩은 많은 종류의 단백질, 유전자(DNA) 같은 물질을 고체 기질 위에 고밀도로 붙여 놓은 것으로, 생물학적 스크리닝이나 정보 처리를 높이는 방법이다. 바이오칩은 사용되는 생체물질의 용도, 시스템화 정도 등에 따라 바이오센서, DNA Chip(유전자칩), Protein Chip(단백질칩), Cell Chip(세포칩), Neuron Chip(신경세포칩), 생체삽입용 Chip, Lab-on-a-Chip 등으로 구분할 수 있다. 케미컬칩의 경우 무기물 기반체 위에 화합물을 공유결합에 의해 고착화시킨 칩 형태의 소자라는 점에서 바이오칩과 이와 유사하지만 기본적으로 칩에 이식한 물질이 저분자 화합물이라는 점에서 다르다. 현재 케미컬칩을 이용한 신약 스크리닝 기술개발은 초기 단계로 차후에 고속 신약 스크리닝 기술로써 각광받을 것이다.

6-1. SPR (surface plasmon resonance) 기술

최근에 바이오칩을 이용한 신약개발의 방법으로 BIOCORE사가 처음으로 개발한 SPR(surface plasmon resonance) 기법이 도입되어 유효물질의 최적화와 관련하여 사용되고 있다. SPR은 광이 두 매질의 경계면에서 전반사 될 때 계면에 있는 금속 층 전자들에 의한 표면 플라즈몬의 진동이 계면 근처의 유전 상수에 의해 영향을 받아 유전 층의 두께나 굴절률 변화에 민감하게 반응하는 현상이다. 즉 형광 표식 과정 처리가 없이 광학적 원리만으로 분자간의 상호 작용을 측정 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 농도로는 피코 몰 수준까지 측정이 가능하며 분자량으로는 180 Da(Dalton)의 저분자부터 세포수준까지 측정할 수 있다. 저분자 화합물과의 상호작용도 검출이 가능하고, 이러한 상호작용을 해소하는 과정을 이용하면 리간드와 수용체 간의 결합력을 측정할 수 있기 때문에 작용점이 잘 알려진 유효물질의 최적화에 이상적이라 할 수 있다(그림 8). 현재 다수의 단백질이 집적된 단백질칩상에서도 SPR 신호를 검출하려는 시도가 이루어지고 있다.

SPR 시스템을 활용하면 신약개발에 필수적인 저분자의 스크리닝과 새로운 단백질의 발견, 면역센서에 사용되는 분석방법개발, 세포내 물질간의 조절 기작 연구 등 다양한 생화학적인 연구를 수행할 수 있다. 이러한 SPR의 장점 때문에 1990년 후반에 처음 유럽에서 개발되어 현재 제약회사들을 선두로 산업체와 연구소에서 이 시스템의 이용이 점차 활발하게 진행되고 있는 실정이다. HTS 분야의 응용에서도 SPR의 접목이 활발하게 이루어지고 있으며, 결과적으로 단백질 칩처럼 집적화 개념이

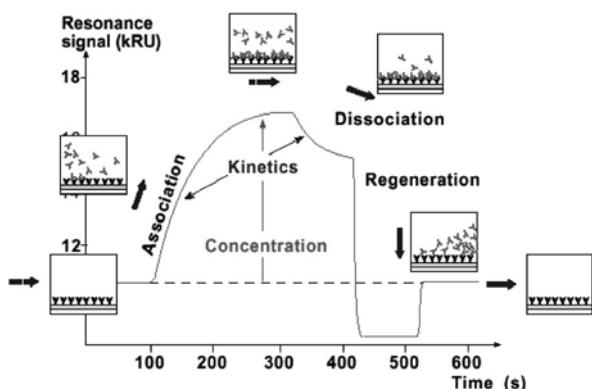


그림 8. 단백질과 리간드간의 결합을 분석하는 SPR Sensorgram

도입된 2차원적 신호처리가 가능한 SPR을 이용하여 SPR image system이 구현되었다. 현재 SPR sensor system은 초고속, 대량으로 단백질을 분석하는 HTS 분야의 응용성이외에도 다양한 응용 분야를 가진 생체물질 분석기기로서 그 활용성이 높게 평가되고 있다 (25).

6-2. 케미컬칩 (Chemical chip) 기술

저분자화합물 라이브러리를 선택적으로 무기물 기반체에 고착할 수 있는 기술을 바탕으로 약 1만여 개의 서로 다른 저분자 화합물이 이식된 케미컬칩을 이용하여 관심 있는 표적 단백질과 저분자 화합물간의 상호작용을 단일 실험을 통하여 규명 할 수 있는 유용한 방법이다 (26). 화합물과 단백질간의 결합은 각종 형광 표지물질이나 효소를 이용한 방법으로 쉽게 확인할 수 있으므로 한번에 많은 수의 저분자 화합물을 스크리닝해야 하는 신약개발에 유용하다 (그림 9). 또한 특정 단백질군과 상호작용 패턴 연구를 통한 화학유전체학 연구 및 시스템생물학 연구에 공헌을 할 것으로 기대된다. Schreiber 교수 연구팀은 이러한 기술을 이용하여 3,780개의 화합물을 고착한 케미컬칩의 단백체 스크리닝을 통하여 효모의 전사조절 단백질인 Ure2p에 선택적으로 결합할 수 있는 저분자 화합물을 찾아내었고, Ure2p 단백질의 여러 가지 기능 중 탄소태사 조절기능만을 선택적으로 저해할 수 있는 Uretupamine이란 신규 기능 조절물질을 성공적으로 개발하였다 (27).

7. 컴퓨터를 이용한 가상 스크리닝 기술

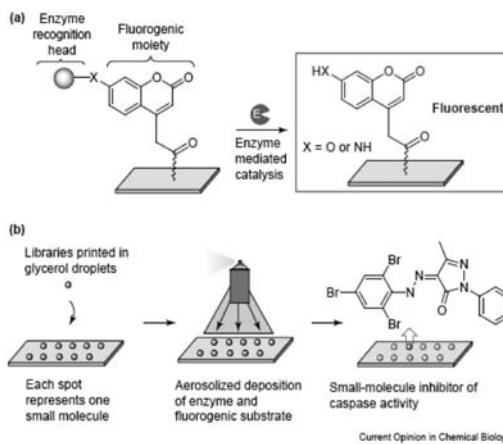


그림 9. 저분자 화합물 접적 기술과 caspase 저해제의 스크리닝

(Virtual Screening)

과거 화합물을 하나씩 합성하여 스크리닝하는 방법으로는 실폐화률이 높은 신약개발에서 경쟁성을 확보할 수 없다는 문제점을 극복하고자 1990년대 초 등장한 분자조합 기술은 몇 주내에 수백 만개의 화합물을 제조하여 신속하게 신약후보물질을 도출할 수 있다는 희망을 주었다. 그러나, 초기의 분자조합기술이 화합물 수에 치중하여 약물로서 개발하기에 취약성이 있는 물질이 유효물질로 도출되는 문제점과 화합물의 약효 스크리닝에 막대한 시간과 경비의 투자가 현실적 문제로 대두되었다. 이러한 문제점을 극복하고자 현재의 분자조합기술은 특정 질병표적을 겨냥한 소규모의 저분자 라이브러리를 지향하고 있다. 이를 위하여 실제 화합물 라이브러리 제조 이전에 컴퓨터상에서 작용점에 대한 예상 화합물의 친화력 등을 예측하는 가상 스크리닝기술이 조합화학 기술에 접목되었다 (28).

가상 스크리닝 기술의 첫째 단계는 컴퓨터상에서 설계할 수 있는 모든 화학구조로 구성된 가상 라이브러리의 제작이며, 두 번째는 천문학적 숫자의 라이브러리로부터 분자 다양성과 유사성을 판단하여 실제로 합성 가능한 규모의 라이브러리로 축소하는 선별작업이다. 선별작업 시 우선적으로 고려해야 할 사항은 관능기, 시약 공급사 및 가격, 약물로서 개발 가능한 물리화학적 성질의 범주 등이며, 다음으로는 분자의 2차원 또는 3차원적 유사성에 따른 라이브러리의 분류작업이다. 유사성 분석에 의해 동질성이 높은 화합물을 배제하여 약효 스크리닝 효율을 증대하고자 하는 것이다. 이러한 접근으로 화합물 제조 시 소요

되는 엄청난 인원과 시간을 절약할 수 있게 된다. 컴퓨터상에서 활성부위의 3차원적 공간 적합성 및 결합성을 감안한 선별 작업을 통해 필요한 화합물 라이브러리 규모가 대폭 축소할 수 있으며 이를 조합화학 기법으로 제작하는데 무리가 없게 된다. 이러한 작업을 64개의 CPU 프로세서가 장착된 고성능 컴퓨터로 가상 스크리닝을 실시할 경우 큰 비용부담 없이 단지 10일 이내에 완료할 수 있다.

가상 스크리닝 기술은 라이브러리의 제작뿐만 아니라 실제 존재하는 라이브러리와 특정 작용점에 대한 활성 스크리닝에도 활용될 수 있다(그림 10). 실제 라이브러리를 스크리닝하는 비용이 매우 클 경우에는 가상 스크리닝을 적절히 이용하면 매우 경제적이다. 물론 이 방법은 모든 작용점에 대해서 적용할 수 있지는 않지만, 최근에 많은 연구에서 가상 스크리닝 방법을 이용하여 성공적인 결과를 얻은 것으로 보고하고 있고, 대형제약 회사들의 경우 이들을 기본적으로 수용하고 있다. 실제 이러한 연구의 성공비율은 작용점에 대한 정확한 정보, 즉 활성부위의 결정구조, 정확하게 정의된 약물특이분자단(pharmacophore) 모델과 도킹 프로그램의 정확도, 계산시간 그리고 수행자의 생물학적 지식 등에 좌우된다. 이러한 가상 스크리닝 방법이 신약개발과정에서 성공적으로 사용되고 있지만, 아직도 false-positive 즉 가상 스크리닝으로 hit는 되었지만 실제로는 약효가 없는 화합물에 대한 비율은 상당히 높은 편이다. 하지만 실제로 테스트 또는 합성을 하여야 할 화합물의 수를 수십 만개에서 단지 수백~수천 개로 줄여줄 수 있으므로, 이러한 단점을 감수하면서도 수행할 필요성은 충분히 있다. 현재의 연구는 가상 스크리닝에 사용되는 스코어링 기능의 질을 개선하고 다양한 유연성을 고려하여 실제 hit될 비율을 높이는 것과 가상 스크리닝을 수행한 뒤에 이루어져야 할 다양한 분석방법에 대하여 진행되고 있다.

결론적으로 향후 신약개발을 위한 분자조합 기술은 숫자에 의존한 경쟁에서 누가 보다 우수한 라이브러리 설계 알고리즘을 보유하고 있는지 여부로 경쟁력이 결정될 것이며 이러한 가상 스크리닝 기술은 향후 신약개발을 위한 스크리닝 기술에서 있어서 실제 스크리닝과 상호보완적인 면에서 많은 긍정적 영향을 줄 것으로 기대되고 있다.

8. 결론과 전망

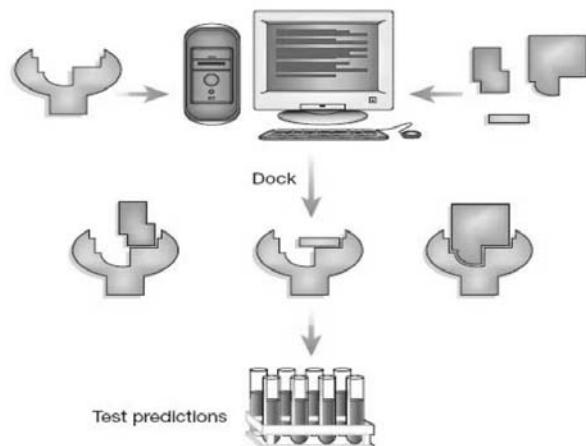


그림 10. 새로운 리간드의 가상 스크리닝

신약에 대한 인류의 요구는 높아지고 신약개발을 위한 잠재적 작용점의 수는 증가하고 있는 이 시점에서 신약개발에 소요되는 비용은 점증하고 있다. 이로 인해 신약개발 단계 전반에 대한 효율성을 극대화하고, 선도물질과 후보물질의 탈락율을 최소화해야한다는 피할 수 없는 선택의 기로에 있다. 신약개발에 필요한 제반기술도 과학의 발전에 따라 점점 자동화 및 소형화되어 신약 스크리닝 기술의 효율성을 제고시키고 있으며 컴퓨터를 이용한 가상 스크리닝 방법도 날로 발전하고 있다. 또한 대량의 스크리닝을 가능하게 만든 HTS 기술, 좀 더 생체에 근접한 스크리닝 시스템을 제공하는 HCS 스크리닝 시스템은 향후 신약개발의 성공률을 크게 높여줄 것으로 기대하고 있다.

9. 참고문헌

- Schreiber, S. L. (1998) Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1127-1152.
- Kapur, R. (2002) Fluorescence imaging and engineered biosensors: functional and activity-based sensing using high content screening. *Ann N Y Acad Sci.* **961**, 196-197.
- Massoud, T. F. and Gambhir, S. S. (2003) Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* **17**, 545-580.

4. Contag, C. H., Spilman, S. D., Contag, P. R., Oshiro, M., Eames, B., Dennery, P., Stevenson, D. K., and Benaron, D. A. (1997) Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol* **66**, 523-531.
5. Bhaumik, S. and Gambhir, S. S. (2002) Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 377-382.
6. Bhaumik, S., Lewis, X. Z., and Gambhir, S. S. (2004) Optical imaging of Renilla luciferase, synthetic Renilla luciferase, and firefly luciferase reporter gene expression in living mice. *J Biomed Opt* **9**, 578-586.
7. Tannous, B. A., Kim, D. E., Fernandez, J. L., Weissleder, R., and Breakefield, X. O. (2005) Codon optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* **11**, 435-443.
8. Hoffman, R. M. (2004) Imaging tumor angiogenesis with fluorescent proteins. *Apmis* **112**, 441-449.
9. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572.
10. Wallrabe H., and Periasamy A. (2005) Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol.* **16**. 19-27.
11. Zlokarnik G., Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burres N, Feng L, Whitney M, Roemer K., and Tsien RY. (1998) Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* **279**, 84-88.
12. Boute N, Jockers R., and Issad T. (2002) The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci.* **23**, 351-354.
13. Kakehi K., Oda Y., and Kinoshita M. (2001) Fluorescence polarization: analysis of carbohydrate-protein interaction. *Anal Biochem.* **297**, 111-116.
14. de Wet J. R., Wood K.V., DeLuca M., Helinski D. R., and Subramani S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **7**, 725-737.
15. Lorenz W. W., McCann R.O., Longiaru M., and Cormier M.J. (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4438-4442.
16. Gorman C.M., Moffat L.F., and Howard B. H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **2**, 1044-1051.
17. Hall C. V., Jacob P. E., Ringold G. M., and Lee F. (1983) Expression and regulation of Escherichia coli lacZ gene fusions in mammalian cells. *J Mol Appl Genet.* **2**, 101-109.
18. Selden R. F., Howie K. B., Rowe M. E., Goodman H. M., and Moore D.D. (1986) Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol.* **6**, 3173-3179.
19. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., and Prasher D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
20. Berger J., Hauber J., Hauber R., Geiger R., and Cullen B. R. (1988) Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* **66**, 1-10.
21. Cullen B. R. and Malim M. H. (1992) Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods Enzymol.* **216**, 362-368.
22. Bronstein I., Fortin J. J., Voyta J. C., Juo R. R., Edwards B., Olesen C. E., Lijam N., and Kricka L. J. (1994) Chemiluminescent reporter gene assays: sensitive detection of the GUS and SEAP gene products. *Biotechniques* **17**, 172-174, 176-177.
23. Beske O. E. and Goldbard S. (2002) High-throughput cell analysis using multiplexed array technologies. *Drug Discov Today* **7**, S131-S135.
24. Milligan G. (2003) High-content assays for ligand regulation of G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* **8**, 579-585.
25. McDonnell J. M. (2001) Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr Opin Chem Biol.* **5**, 572-577.
26. Uttamchandani M., Walsh D. P., Yao S. Q., and Chang Y. T. (2005) Small molecule microarrays: recent advances and applications. *Curr Opin Chem*

- Biol.* **9**, 4-13.
27. Kuruvilla F. G., Shamji A. F., Sternson S. M., Hergenrother P.J., and Schreiber S. L. (2002) Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays. *Nature* **416**, 653-657.
 28. Shoichet B. K. (2004) Virtual screening of chemical libraries. *Nature* **432**, 862-865.

저자약력

이우길

1984-1988	서울대학교 동물학과 학사
1988-1990	서울대학교 동물학과 석사
1990-1998	서울대학교 분자생물학과 박사
1991-1994	LG바이오텍연구소 신약개발 연구원
1998-2000	하바드의대 ICCB 화학유전체학 Post-doc
2001-2002	한국과학기술원 화학유전체학 Post-doc
2003-현재	한국화학연구원 화학유전체학 선임연구원