



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0096415
(43) 공개일자 2019년08월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/0784 (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0688 (2013.01)
C12N 5/0639 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7021488
- (22) 출원일자(국제) 2017년12월26일
심사청구일자 2019년07월22일
- (85) 번역문제출일자 2019년07월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/084583
- (87) 국제공개번호 WO 2018/122219
국제공개일자 2018년07월05일
- (30) 우선권주장
93401 2016년12월27일 룩셈부르크(LU)

- (71) 출원인
룩셈부르크 인스티튜트 오브 사이언스 앤드 테크놀로지 (리스트)
룩셈부르크, 엘-4362 에슈/알제트, 아베뉴 데 오-푸르노, 5
- (72) 발명자
샤리, 알린느
프랑스공화국, 57390 오동-르-띠슈, 바띠망. 조르주 브라쟁스, 튀 데 뽀에뜨, 1
굿트랩, 아르노
룩셈부르크, 5552 레미슈, 루뜨 드 몽도르프, 19
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 15 항

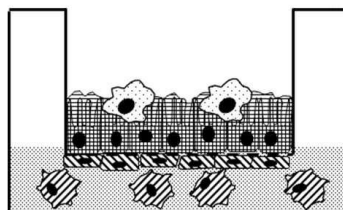
(54) 발명의 명칭 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델, 상기 모델의 제조 방법, 및 흡입성 제품의 민감화 효과를 측정하고/하거나 예측하기 위한 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 다음과 같은 4개의 세포형을 필수적으로 포함하는 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델에 관한 것이다: (폐에 쌓인) 계면활성제를 분비할 수 있는 폐포 II형 상피 세포, 투과성 장벽을 제공하는 모세혈관의 내부 라이닝을 형성하는 내피 세포, 선천성 및 적응성 면역력을 연결하는, 분화되지 않은 THP-1과 같은 수지-유사 세포 및 식균작용에 의해 외부 물질을 섭취함으로써 방어 메커니즘에 관여할 수 있는 대식구-유사 세포.

본 발명은 또한 상기 모델의 제조 방법, 및 폐의 폐포 장벽에서 입자 또는 분자와 같은 흡입성 제품의 자극 가능성 또는 독성을 평가하고, 또한 폐의 폐포 장벽에서 입자 또는 분자와 같은 흡입성 제품의 민감화 효과를 측정하고/하거나 예측하기 위한, 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



- : 수지-유사 세포(THP-1)
- : 내피 세포(EA.hy 926)
- : 폐포 II형 상피 세포(A549)
- : 대식구 (PMA로 분화된 THP-1)
- : 공배양 배지
- : 계면활성제
- : 트랜스웰 삽입물

(52) CPC특허분류

C12N 5/0697 (2013.01)

G01N 33/50 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

C12N 2502/1114 (2013.01)

C12N 2502/1121 (2013.01)

C12N 2502/1157 (2013.01)

C12N 2502/27 (2013.01)

C12N 2502/28 (2013.01)

C12N 2503/04 (2013.01)

(72) 발명자

세리시, 토마쑈

프랑스공화국, 57480 키르슈-레-시에르프, 뒤 생
장, 84

블뢰메케, 브루넬데

독일연방공화국, 54136 플루빅, 암 헤렌가르텐 3

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 4개의 세포형을 주로 포함하는, 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델(three-dimensional *in vitro* alveolar lung model):

- a) 계면활성제를 분비할 수 있는 폐포 II형 상피 세포,
- b) 투과성 장벽을 제공하는 모세혈관의 내부 라이닝(inner lining)을 형성하는 내피 세포,
- c) 수지-유사 세포,
- d) 식균작용에 의해 외부 물질을 섭취함으로써 방어 메카니즘에 관여할 수 있는 대식구-유사 세포,

상기에서, 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델은, 공기-액체 계면에 노출된 정점 구획(apical compartment) 및 배양 배지 속에 침지된 기저측 구획(basolateral compartment)으로 웰을 분리하는 다공성 막이 장착된 배양 웰의 형태이며, 상기 상피 세포 및 상기 대식구는 정점 구획 속에 존재하고, 상기 내피 세포 및 상기 수지-유사 세포는 기저측 구획에 존재하며 배양 배지 속에 침지되어 있고,

상기 다공성 막은 기저측 구획으로부터 정점 구획으로의 수지-유사 세포의 이동이 가능하도록 하는 2 내지 10 μm 사이에 포함되는 세공(pore)을 가짐.

청구항 2

제1항에 있어서, 대식구-유사 세포가 PMA(포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트) 또는 1,25-디하이드록시비타민 D3로 분화된, 바람직하게는 PMA로 분화된 THP-1 세포인 모델.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 모든 세포가 무한증식된(immortalized) 사람 세포주인 모델.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐포 II형 상피 세포가 A549 세포인 모델.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내피 세포가 EA.hy926 세포인 모델.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수지-유사 세포가 분화되지 않은 THP-1 세포인 모델.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 다공성 막이 3 내지 8 μm 사이에 포함된 세공을 갖는 모델.

청구항 8

하기의 단계 순서로, 다공성 막을 갖는 삽입물(insert) 속에서 세포 a) 내지 d)를 공-배양(co-culture)함을 포함하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 정의된 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델을 제조하는 방법:

i) 2 내지 10 μm 에 포함되는 세공을 갖는 막 삽입물의 하부 면(이는 기저측면이 됨)을 0.24×10^5 내지 0.6×10^5 개의 내피 세포/cm²로 씨딩(seeding)하는 단계,

ii) 적어도 4시간 후에, 막 삽입물의 다른 면(정점 면)에 폐포 II형 상피 세포를, 바람직하게는 0.12×10^5 내지

1.2 10^5 개, 바람직하게는 0.5 10^5 내지 1.0 10^5 개의 세포/cm²로 씨딩하는 단계,

iii) 약 4일 후에, 0.1 내지 1백만개의 수치-유사 세포/mL를 함유하는 세포 현탁액을 막 삽입물의 기저측면에 가하는 단계, 및 그 후

iv) 대식구-유사 세포를 폐포 II형 상피 세포 씨드의 상부에, 바람직하게는 0.12 10^5 내지 1.2 10^5 개의 대식구-유사 세포/cm²로 가하는 단계, 및 최종적으로,

v) 막 삽입물을 배지 속에 도입시켜 상기 내피 세포 및 상기 수치-유사 세포가 공-배양 배지 속에 침지되도록 (기저측 구획에 존재) 하고, 상기 상피 세포 및 상기 대식구-유사 세포가 공기-액체 계면에서의 정점 구획 속에 존재하도록 하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 대식구-유사 세포가 PMA(포르볼-12-미리스테인-13-아세테이트)로 분화된, THP-1 세포이고/이거나, 상기 폐포 II형 상피 세포가 A549 세포이고/이거나, 상기 내피 세포가 EA.hy926 세포이고/이거나, 상기 수치-유사 세포가 분화되지 않은 THP-1 세포인 방법.

청구항 10

폐의 폐포 장벽에서 흡입가능한 제품(inhalable product)의 자극 가능성(irritation potential) 또는 독성(toxicity)을 평가하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델의 용도.

청구항 11

폐의 폐포 장벽에서 흡입가능한 제품에 대한 민감화 효과(sensitizing effect)를 측정하고/하거나 예측하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델의 용도.

청구항 12

A) 시험될 흡입가능한 제품을, 2 내지 10 μm 사이에 포함된 세공을 갖는 다공성 막이 장착된 배양 웰의 형태의 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 정의된 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델의 정점 구획에 분쇄/분무함으로써 노출시키는 단계로, 상기 상피 세포 및 상기 대식구가 막의 정점 면에 존재하고, 상기 내피 세포 및 상기 수치-유사 세포가 막의 기저면(basal side)에 존재하며, 상기 내피 세포 및 상기 수치-유사 세포가 공-배양 배지 속에 침지되며, 상기 노출된 수치-유사 세포의 활성화를 초래하는 단계,

B) 상기 활성화된 수치-유사 세포를 T 림프모구 세포주와 공-배양시키는 단계,

를 포함하는, 폐의 폐포 장벽에 대한 흡입가능한 제품의 민감화 효과, 및/또는 자극 가능성 또는 독성을 측정하고/하거나 예측하기 위한 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 시험될 제품이 의심가는 호흡성 민감화제인 경우 T-세포가 헬퍼형 2(TH2) 프로파일을 나타내는 방법.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 호흡성 민감화 가능성에 대한 마커가 FACS(CD40, CD54, CD86, TSLPr, IL-1ra, OX40L)에 의해 및/또는 ELISA(TSLP, IL-33, IL-25, RANTES, MCP-1, MIP-3a, IL-6, IL-7, IL-10 및 GM-CSF)에 의해 측정되는 방법.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 인터루킨의 방출, 유전독성, 민감화의 생물마커, 프로테오믹스(proteomics), 전사체학(transcriptomics), 물질대사 활성화를 포함하는 추가의 생물학적 종점(biological endpoint)이 측정되는 방법.

발명의 설명

기술분야

발명의 분야

- [0001] **발명의 분야**
- [0002] 본 발명은 3차원 시험관 내(*in vitro*) 폐포 폐 모델(alveolar lung model) 및 상피 모델의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0003] 본 발명은 또한 폐의 폐포 장벽(alveolar barrier)에서 입자 또는 분자와 같은 흡입성 제품의 자극 가능성 또는 독성을 평가하고, 또한 폐의 폐포 장벽에서 입자 또는 분자와 같은 흡입성 제품의 민감화 효과를 측정하고/하거나 예측하기 위한, 이의 용도 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

발명의 배경

- [0004] **발명의 배경**
- [0005] 화학 제품에 대한 노출의 결과로서 호흡 민감화(respiratory sensitization)가 지난 수십년에 걸쳐 증가되면서, 이환율의 증가를 초래하여 왔다. 합성 화합물, 예컨대, 향료 및 산업적 용매의 보다 광범위한 사용은 우리들이 잠재적으로 매일 노출되는 물질의 기하급수적인 성장을 야기하였다. 이들 물질중 일부는 호흡 민감화를 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이는 이들이 잠재적인 전신계 부작용과 함께, 시간에 걸쳐 알레르기의 발달을 개시할 수 있음을 의미한다.
- [0006] 이는 천식, 알레르기성 비염, 비-결막염(rhino-conjunctivitis) 및 부비강염과 같은 호흡성 질환을 초래할 수 있다.
- [0007] 이러한 화학물질의 잠재적인 위험을 특성화하기 위하여, 폐 민감화에 관련된 메카니즘을 완전히 이해하는 것이 필수적이다.
- [0008] 과거에, 동물 연구는 호흡 알레르기의 발달에 연루된 메카니즘을 이해하기 위한 유용한 결과를 제공하였다. 그러나, 관련된 세포 효과의 기계론적 이해는 여전히 제한되어 있다. 수개의 방법이 알레르겐(allergen)의 기능적 및 구조적 특징을 구별하고 확인하기 위해 제안되어 왔지만, 이러한 연구 중 어느 것도 생물기원의(biogenic) 및 환경적 교란 보조인자로 인하여 주로 결정적인 결과를 이끌지 못하였다. 이러한 지식의 결여는 예측성의 시험관 내(*in vitro*) 모델의 발달을 방해하여 생체내 모델(*in vivo*)을 호흡 알레르겐을 특성화용의 유일한 도구로 남겼다. 그러나, 호흡 민감화제를 확인하고 특성화하는 입증된 방법의 결여에도 불구하고 REACH(화학물질의 등록, 평가, 허가 및 규제)와 같은 규정이 독성 평가를 위한 비-동물 방법의 사용을 요구하고 고무시키고 있다.
- [0009] 현재, 생체내 시험에 대한 대안으로서 사용될 수 있는, 승인된 시험관 내 방법은 존재하지 않는데, 이러한 방법은 생체내 시험에 대한 대안으로서 사용될 수 있고, 호흡 민감화제로서 작용하는 화학물질의 가능성을 확인하고 특성화할 수 있다.
- [0010] 2013년도 공보(Klein *et al Particle and Fibre Toxicology*, 2013, 10:31)에서 저자는 폐포 II형 상피 세포주(A459), 분화된 대식구-유사 세포(THP-1), 비만 세포(HMC-1) 및 내피 세포(EA.hy 926)로 구성된 테트라컬처 모델(tetraculture model)을 제안하였으며, 이는 모델을 이후 공기-액체 계면(air-liquid interface: ALI)에 노출시킬 수 있는 것이 가능하도록 하였다. 그러나, 세포는 침지 조건 하에서 이중 콜로니를 형성하였음이 관찰되었으며: 이는 예를 들면, ROS(반응성 산소 중) 생산 및 IL-8 분비를 위한 결과에서 관찰된 효과의 과대평가를 야기한다. 더욱이, 클라인 모델(Klein's model)은 관련된 적격성 세포(competent cell)의 결여로 인하여 민감화 효과의 평가에 사용될 수 없으며 감소된 세포 크기로 인하여, 막을 통한 세포 이동을 허용하지 않는다. ALI에서의 노출은 배양물에서 프라이밍 효과(priming effect)를 가지며, 이는 인큐베이터 대조군과 비교하여, 보다 높은 기본 수준의 산화 스트레스를 나타낸다. 이는 독성 효과의 보다 실제적인 평가를 제공하는 외부 과제에 대한 보다 생리학적인 답을 생성한다. 또한, ALI에 대한 노출은 세포 배양 배지 속에서 사전 희석없이 외인성 화합물에 대한 실제적인 노출을 허용하며, 이러한 배지는 시험 하에서 화학물질과 반응할 많은 생물학적 분자를 함유하므로, 될 수 있는 한, 생물학적 효과의 판독을 변경시켜 생물학적 효과의 평가 하에 또는 평가에 걸쳐서 예측 불가능하도록 한다.
- [0011] 호흡 독성을 위해 지금까지 제안된 앞서의 모델 모두는 일반적으로 호흡 민감화의 맥락에서 관련이 없는, 기관지 세포주를 사용하도록 하였다. 따라서, 호흡 민감화를 연구하기 위한 관련된 도구에 대한 및 흡입가능한 화학물질 및 소 입자의 호흡 가능성을 예측하기 위한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] **발명의 목적**

[0013] 본 발명의 제1 목적은 흡입가능한 제품, 화학물질 및 입자의 호흡 민감화 가능성을 평가하기 위하여, 폐의 폐포 표면을 모사(mimic)하기 위한 시험관 내(*in vitro*) 모델을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] **발명의 요약**

[0015] 본 발명은 다음과 같은 4개의 세포형을 주로 포함하는 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델에 관한 것이다:

[0016] a) (폐에 쌓인) 계면활성제(surfactant)를 분비할 수 있는 폐포 II형 상피 세포,

[0017] b) 투과성 장벽을 제공하는 모세혈관의 내부 라이닝(inner lining)을 형성하는 내피 세포,

[0018] c) 수지-유사 세포(선천성 및 적응성 면역 연결),

[0019] d) 식균작용에 의해 외부 물질을 섭취함으로써 방어 메커니즘에 관여할 수 있는 대식구-유사 세포, 여기서:

[0020] 상기 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델은 배양 웰(culture well)을 공기-액체 계면에 노출된 정점 구획(apical compartment) 및 배양 배지 속에 침지된 기저측 구획(basolateral compartment)으로 분리하는 다공성 막이 장착된 배양 웰의 형태이며, 상기 상피 세포 및 상기 대식구는 정점 구획 속에 존재하고, 상기 내피 세포 및 상기 수지-유사 세포는 기저측 구획에 존재하며 배양 배지 속에 침지되어 있고,

[0021] 상기 다공성 막은 기저측 구획으로부터 정점 구획으로의 수지-유사 세포의 이동이 가능하도록 하는 2 내지 10 μm 사이에 포함되는 세공(pore)을 가진다.

[0022] "주로(mainly)"는 상기 폐포 폐 모델이 상기 4개의 세포형을 필수적으로 포함함을 의미하며, 특히 상기 폐포 폐 모델은 거짓 결과를 초래할 수 있는 비만 세포를 포함하지 않는다.

[0023] "필수적으로(essentially)"는 특히 상기 모델이 흡입가능한 제품의 독성 또는 민감화 효과의 평가시 거짓 결과를 초래할 수 있는, 비만 세포를 포함하지 않음을 의미한다.

[0024] **발명의 상세한 설명,**

[0025] 보다 특히, 대식구-유사 세포는 PMA(포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트) 또는 1,25-디하이드록시비타민 D3 로 분화된, 바람직하게는 PMA로 분화된 THP-1 세포이다. 이러한 분화는 바람직하게는 수일 동안: 유리하게는 3 내지 10일, 및 바람직하게는 5일 동안 수행된다.

[0026] 본 발명의 모델에서, 모든 세포는 무한증식 포유동물 세포주이고, 이는 원발성 세포보다 더 안정한 세포이며, 바람직하게는 무한증식된 사람 세포주이다.

[0027] "바람직하게는", 상기 폐포 II형 상피 세포는 A549 세포이다.

[0028] 또한 "바람직하게는", 상기 내피 세포는 EA.hy926 세포이다.

[0029] 또한 "바람직하게는", 상기 수지-유사 세포는 분화되지 않은 THP-1 세포이며, 이는 사람 수지 세포에 대해 잘 확립된 모델이다.

[0030] 수지 세포는 항원을 인식 및 포획 항원으로 위임되어, 면역 반응을 개시(trigger)하므로, 민감화 방법에서 가장 중요하다.

[0031] 유리하게는, 본 발명의 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델은:

[0032] a) 폐포 II형 상피 세포로서 A549 세포,

[0033] b) 내피 세포로서, EA.hy926 세포,

[0034] c) 수지-유사 세포로서 분화되지 않은 THP-1 세포,

- [0035] d) 대식구-유사 세포로서 PMA로 분화된 THP-1 세포를 포함하며,
- [0036] 비만 세포는 배제한다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델은 전적으로 다음의 테트라컬처 (tetraculture)로 이루어진다:
- [0038] a) 폐포 II형 상피 세포로서 A549 세포,
- [0039] b) 내피 세포로서 EA.hy926 세포,
- [0040] c) 수지-유사 세포로서 분화되지 않은 THP-1 세포,
- [0041] d) 대식구-유사 세포로서 PMA로 분화된, THP-1 세포.
- [0042] Klein 2013의 테트라컬처 모델과 비교하여, 본 발명의 모델은 국소 미세환경을 변화시킬 수 있고 수지-유사 세포의 반응에 영향을 미칠 수 있는 비만 세포를 배제한다. 따라서, 본 발명의 모델은 생체내 상황을 보다 정밀하게 모사하며, 여기서 비만 세포는 알레르기 염증의 단계(유발기) 동안에만 존재하지만 알레르기 염증을 선행하는 민감화기 동안에는 존재하지 않는다. 비만 세포는 다양한 생물학적 자극에 대해 반응하며, 이들 중 가장 중요한 것은 B-림프구에 의한 면역글로불린 E(IgE)의 방출이다. B-림프구는 본 발명의 모델에서 존재하지 않으며, 더욱이, HMC-1 세포는 IgE의 기능성 수용체를 나타내지 않으므로, 본 모델 속에 비만 세포의 혼입은 임의의 추가의 값을 야기하지 않고 단지 불필요한 복잡성을 부가할 수 있다.
- [0043] 정점 구획 및 기저층 구획을 분리하는 다공성 막은 예를 들면, Transwell® 삽입물(insert)의 일부일 수 있다.
- [0044] 유리하게는, 다공성 막은 3 내지 8 μm , 보다 바람직하게는 4 내지 6 μm 로 포함된 세공을 갖는다. 클라인 모델(Klein's model)에서, 수지 세포는 테트라컬처가 부재하며, 물론, 정점 구획 속에 존재할 수 없다. 클라인 모델 속에서 수지 세포의 부재는 이러한 모델이 호흡성 민감화를 예측할 수 없도록 한다. 수지 세포는 민감화 방법의 유도기에서 중심이 되며 이들의 부재하에서 전체 방법은 연구될 수 없다.
- [0045] 기저층 구획으로부터 정점 구획으로 이동하는 수지-유사 세포의 능력은 또한 모델의 중요한 특징이다(이는 클라인 모델에서는 가능하지 않았다). 수지 세포는 폐포내에서 천연적으로 존재하지 않으며, 이에 대해 이들은 외인성 자극의 결과로서만 보충된다. 또한, 민감화 가능성의 실제적인 평가를 얻기 위해서, 수지-유사 세포를 민감화제에 직접 노출되지 않도록 하는 것이 중요한데, 이는 상피 및 잔류성 대식구와 접촉시 먼저 도입되어야 한다. 이러한 접촉은 상피 세포 또는 대식구에 의한 대사 공정으로 인하여 흡입된 물질의 민감화 가능성을 향상시키거나 감소시킬 수 있다.
- [0046] 본 발명은 또한 다음의 단계 순서로, 다공성 막을 갖는 삽입물 속의 세포 a) 내지 d)를 공-배양(co-culture)함을 포함하는, 상기 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델을 제조하기 위한 방법에 관한 것이다:
- [0047] i) 2 내지 10 μm 사이에 포함되는 세공을 갖는 막 삽입물의 하부 면(이는 바닥가쪽이 됨)을 0.24×10^5 내지 0.6×10^5 개의 내피 세포/ cm^2 로 씨딩(seeding)하는 단계,
- [0048] ii) 적어도 4시간 후에, 막 삽입물의 다른 면(정점 면)을 폐포 II형 상피 세포, 바람직하게는 0.12×10^5 내지 1.2×10^5 개, 바람직하게는 0.5×10^5 내지 1.0×10^5 개의 세포/ cm^2 로 씨딩하는 단계,
- [0049] iii) 약 4일 후에, 0.1 내지 1백만개의 수지-유사 세포/mL를 함유하는 세포 현탁액을 막 삽입물의 기저층면에 가하는 단계, 및 이후에
- [0050] iv) 대식구-유사 세포를 폐포 II형 상피 세포 씨드, 바람직하게는 0.12×10^5 내지 1.2×10^5 개의 대식구-유사 세포/ cm^2 의 상부에 가하는 단계 및 최종적으로,
- [0051] v) 상기 내피 세포 및 상기 수지-유사 세포가 공-배양 배지 속에 침지되도록(기저층 구획에 존재하도록) 하고, 상기 상피 세포 및 상기 대식구-유사 세포가 공기-액체 계면에서, 상기 정점 구획 속에 존재하도록 하기 위해, 막 삽입물을 배지 속에 도입시키는 단계.
- [0052] 바람직하게는 상기 방법에서, 상기 대식구-유사 세포는 PMA(포르볼-12-미리스테인-13-아세이트)로 분화된, THP-1 세포이고/이거나, 상기 폐포 II형 상피 세포는 A549 세포이고/이거나 상기 내피 세포는 EA.hy926 세포이

고/이거나 상기 수치-유사 세포는 분화되지 않은 THP-1 세포이다.

- [0053] 본 발명의 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델에서 특히, 흥미있는 적용이 발견된다:
- [0054] - 폐의 폐포 장벽에서 입자 또는 분자와 같은 흡입가능한 제품의 자극 가능성 또는 독성을 평가하기 위한 용도;
- [0055] - 폐의 폐포 장벽에서 입자 또는 분자와 같은 흡입가능한 제품의 민감화 효과를 측정하고/하거나 예측하기 위한 용도.
- [0056] 본 발명은 또한
- [0057] A) 시험될 흡입가능한 제품을 2 내지 10 μm 사이에 포함된 세공을 갖는 다공성 막이 장착된 배양 웰의 형태인 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델의 정점 구획에 걸쳐서 분쇄/분무함으로써 노출시키는 단계로서, 상기 상피 세포 및 상기 대식구가 막의 정점 면에 존재하고, 상기 내피 세포 및 상기 수치-유사 세포가 막의 기저면에 존재하며, 상기 내피 세포 및 상기 수치-유사 세포가 공-배양 비지 속에 침지되며, 상기 노출이 수치-유사 세포의 활성화를 초래하는 단계,
- [0058] B) 상기 활성화된 수치-유사 세포와 T 림프모구 세포주를 공-배양시키는 단계,
- [0059] 를 포함하여, 폐의 폐포 장벽에서 입자 또는 분자와 같은 흡입가능한 제품의 민감화 효과, 및/또는 자극 가능성 또는 독성을 측정하고/하거나 예측하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0060] 바람직하게는, 시험될 제품이 의심가는 호흡성 민감화제인 경우 T-세포는 헬퍼형 2(TH2) 프로파일을 나타내어야 한다.
- [0061] 호흡성 민감화 가능성에 대한 마커는 FACS(예를 들면, CD40, CD54, CD86, TSLPr, IL-1ra, OX40L와 같은)에 의해 및/또는 ELISA(TSLP, IL-33, IL-25, RANTES, MCP-1, MIP-3a, IL-6, IL-7, IL-10 및 GM-CSF)에 의해 측정할 수 있다.
- [0062] 인터루킨의 방출, 유전독성, 민감화의 생물마커(biomarker), 프로테오믹스(proteomics), 전사체학(transcriptomics), 물질대사 활성화와 같은 추가의 생물학적 종점(end point)이 또한 측정될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델은 다음의 주요 장점을 나타낸다:
- [0064] - 거짓 결과를 유도할 수 있는, 비만 세포의 부재;
- [0065] - 시험할 물질로서 가스, 액체 또는 분말을 사용하는, 공기-액체 계면(ALI)에서의 노출 가능성;
- [0066] - 자극 가능성에 대해서만 사용될 수 있는 Klein *et al.* 2013 모델과는 대조적으로, 이들의 염증 또는 민감화 가능성의 측면 둘 다에 대한 화학물질 및 입자의 시험 가능성;
- [0067] - 다양한 생물학적 종점(예컨대, 인터루킨의 방출, 유전독성, 민감화의 생물마커, 프로테오믹스, 전사체학, 물질대사 활성화 등)의 측정 가능성.

도면의 간단한 설명

- [0068] **도면**
- 본 발명의 폐 모델의 추가의 장점 및 양태는 첨부된 도면을 참고로, 하기 실시예 부분에 나타난 구현예의 설명으로부터 유추할 수 있으며, 여기서:
 - 도 1은 폐 모델을 나타내는 본 발명의 테트라컬처를 지닌 Transwell® 삽입물의 개략도이고;
 - 2a 내지 2e는 HDM에 24시간 노출 후 테트라컬처 폐 모델에서 THP-1 세포의 세포 표면에서 각각의 세포 표면 마커 CD86, CD40, IL7ra, CD54 및 OX40L의 발현을 나타내는 막대그래프이며;
 - 도 3a 및 3b는 상이한 농도의 화학적 호흡 민감화제인 트리멜리트릭 무수물(Trimellitic Anhydride: TMA) 및 프탈릭 무수물(Phthalic Anhydrid: PA) 각각에 대한 24시간 및 48시간 노출 후 생존능%를 나타내는 도해이고;
 - 도 4a, 4b 및 4c는 상이한 농도의 화학적 호흡 자극물인 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 아크롤레인(Acr) 및 메틸 살리실레이트(MeSa) 각각에 대한 24시간 및 48시간 노출 후 생존능%를 나타내는 도해이며;
 - 도 5a 및 5b는 본 발명에 따른 테트라컬처 시험관 내 폐 모델(A)에서, 및 24시간 동안의 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 본 발명(B)의 일부를 형성하지 않는 모노컬처(monoculture) 모델에서 THP-1 세포에 대한

CD54의 세포 표면 마커 발현을 나타내는 도해이며(평균 +/- 표준 오차);

- 도 6a 및 6b는 본 발명에 따른 테트라컬처 시험관 내 폐 모델(A)에서, 및 24시간 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 본 발명의 일부를 형성하지 않는 모노컬처 모델에서 THP-1 세포에 대한 CD86의 세포 표면 마커 발현을 나타내는 도해이며(평균 +/- 표준 오차);

- 도 7은 24시간 동안의 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 본 발명에 따른 테트라컬처 시험관 내 폐 모델에서, THP-1 세포에 대한 IL1ra의 세포 표면 마커 발현을 나타내는 도해이며(평균 +/- 표준 오차);

- 도 8은 24시간 동안의 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 본 발명에 따른 테트라컬처 시험관 내 폐 모델에서, THP-1 세포에 대한 OX40L의 세포 표면 마커 발현을 나타내는 도해이며(평균 +/- 표준 오차);

- 도 9는 24시간 동안의 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 본 발명에 따른 테트라컬처 시험관 내 폐 모델에서, THP-1 세포에 대한 TSLPr의 세포 표면 마커 발현을 나타내는 도해이며(평균 +/- 표준 오차);

- 도 10a 및 10b는 24시간 및 48시간 동안의 화학적 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 본 발명에 따른 테트라컬처 시험관 내 폐 모델에서 방출된 사이토킨을 나타내는 도해이다. (A): IL-7 기저 수준: 24시간에 대한 DMSO 기저 수준: 18,2 ± 0,0 pg/mL; 48시간의 경우: 19,5 ± 1,2 pg/mL; 24시간에 대한 물: 18,6 ± 0,3 pg/mL; 48시간의 경우: 18,2 ± 0,0 pg/mL (B) GM-CSF 기저 수준: DMSO 기저 수준: DMSO: 24시간의 경우: 32,4 ± 6,0 pg/mL; 48시간의 경우: 31,0 ± 3,7 pg/mL; 물: 24시간의 경우: 47,0 ± 9,2 pg/mL; 48시간의 경우: 43,1 ± 5,4 pg/mL(평균 +/- SE)(문자는 유의적인 차이를 나타낸다(P<0,05 수준의 유의성에서 팩토리얼(Factorial) ANOVA + 피셔 LSD 사후 검증(Fisher LSD post hoc test), n=6).

- 도 11a 및 11b는 침지 조건에서 모노컬처내 PA(도 11a) 및 TMA(도 11b)에 대한 24시간 노출 후 THP-1 세포의 생존능을 나타내는 도해이다. 당해 도에서, 최대로 시험한 농도는 0.2%의 DMSO를 함유하는 배지 속에서 화합물의 최대 용해도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 실시예:

[0070] 실시예 1

[0071] 본 실시예에서 다음의 세포주가 사용된다: A549, EA.hy926, THP-1 및 MΦ-THP-1. 이들의 각각의 특성은 다음과 같다:

[0072] 세포주 A549는 계면활성제를 생산하는 능력을 지닌 사람 기관지 상피 세포에 상응하고;

[0073] EA.hy926 세포주는 내피 특성을 지닌 체세포 하이브리드이며;

[0074] THP-1은 사람 단핵세포 백혈병 세포주이고;

[0075] MΦ-THP-1은 PMA(포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트) 또는 1,25-디하이드록시비타민 D3로 분화된, THP-1 세포로부터 유래된 대식구이다.

[0076] 상이한 배지의 제조:

[0077] 사용된 프로토콜은 다음과 같다:

[0078] EA.hy926 배지:

[0079] - 60 mL의 DMEM(둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium)) 배지를 새로운 병(500 mL)으로부터 제거하고 50 mL의 FBS(10%)를 가한 후, 5 mL의 HEPES 스톡 용액(250 mM; 멸균, 여과됨)을 가하여 HEPES 완충된 배지(25 mM)를 수득.

[0080] - 5 mL의 Pen/Strep(페니실린/스트렙토마이신)을 사용한 보존.

[0081] 공배양 10% 배지:

[0082] · 5 mL의 DMEM 배지를 새로운 병(500 mL)으로부터 제거하고 5 mL의 HEPES 스톡 용액(250 mM; 멸균, 여과됨)을 제거하여 HEPES 완충된 배지(25 mM)를 수득,

[0083] · 혼합 및 125 mL를 제거,

- [0084] · 50 mL의 IMDM을 가한 후, 75 mL의 RPMI 배지를 가함,
- [0085] · 혼합 및 55 mL를 제거,
- [0086] · 이후에, 50 mL의 FBS(10%)를 배지 및 5 mL의 Pen/Strep에 가함.
- [0087] 공배양 1% 배지:
- [0088] · 5 mL의 DMEM 배지를 새로운 병으로부터 제거하고 5 mL의 HEPES 용액(250 mM; 멸균, 여과됨)에 가하여 HEPES 완충된 배지(25 mM)를 수득,
- [0089] · 혼합 및 125 mL를 제거,
- [0090] · 50 mL의 IMDM을 가한 후 75 mL의 RPMI를 가함,
- [0091] · 혼합 및 10 mL를 제거,
- [0092] · 5 mL의 FBS(1%) 및 5mL의 Pen/Strep을 배지내로 가함.
- [0093] THP-1 완전 배지:
- [0094] - 57.5 mL의 RPMI 배지를 새로운 병(500 mL)으로부터 제거함. 이러한 52.5 mL로부터, 10 mL를 팔콘 튜브 (falcon tube) 속으로 이동시키고 나머지 배지를 버림,
- [0095] - 7 μ L의 시판 용액을 10 mL의 RPMI에 가함으로써 RPMI 배지 속의 10 mM β -머캅토 에탄올의 작업 용액을 제조 하고, 혼합하며, 2.5 mL를 배지의 병으로 이동,
- [0096] - 50 mL의 FBS(10%)를 배지로 가한 후, 5 mL의 Pen/Strep을 가함.
- [0097] **3차원 시험관 내 폐포 폐 모델의 제조:**
- [0098] 본 실시예에서, 상이한 단계의 순서는 다음과 같았다:
- [0099] **1. -2일**
- [0100] 대식구 세포의 분화(밤새):
- [0101] - THP-1 세포를 PMA(포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트) 또는 1,25-디하이드록시비타민 D3(플라스크 T125당 80 μ L PMA + 40mL 배지 + 1600만개의 세포)로 밤새 분화시킨 후 플라스크 속에서 1 내지 5일 동안 유지시킴, 배지는 밤새 갈아줌.
- [0102] **2. 0일: 삽입물의 씨딩(seeding)**
- [0103] EA.hy926 세포의 제조:
- [0104] - 삽입물 당 11만개 내지 54만개의 세포($0.24 \cdot 10^5$ 내지 $0.6 \cdot 10^5$ 개의 세포/cm², 바람직하게는 $0.24 \cdot 10^5$ 개의 세포 /cm²),
- [0105] - 삽입물에서 씨딩에 필요한 용적은 여기서 700 μ L임,
- [0106] - 모든 삽입물에 대한 세포 현탁액을 우선 제조(피펫팅 실수를 위해 +2의 여분의 삽입물)하고, 혼합하여 세포 현탁액을 잘 균질화시킴,
- [0107] - 플레이트의 웰 내부에 삽입물을 적절히 둠,
- [0108] - 플레이트를 가져와서 삽입물 하에서 700 μ L의 EA.hy926을 온화하게 넣음,
- [0109] - 이후에 플레이트를 인큐베이터내에 둠.
- [0110] 적어도 4시간 후:
- [0111] A549 세포의 제조:
- [0112] - 삽입물 속의 씨딩을 위해 필요한 용적은 여기서 2 mL이고,
- [0113] - A549 세포의 펠렛을 EA.hy926 배지 속에 재현탁하고: 삽입물 당 27 만개 내지 54만개의 세포($0.12 \cdot 10^5$ 내지

1.2 10^5 개의 세포/cm², 바람직하게는 0.6 10^5 개의 세포/cm²),

[0114] - 모든 삽입물에 대해 A549 세포의 세포 현탁액을 먼저 제조(EA.hy926 배지내로, 피펫팅 오류를 위해 2개의 여분의 삽입물을 계수함). 세포 현탁액을 잘 혼합/균질화함.

[0115] 씨딩을 위해 삽입물을 사용하여 플레이트를 제조하고 삽입물 위에 세포를 씨딩하는 경우 때때로 세포 현탁액을 균질화하여, 튜브내에 세포가 정착하는 것을 방지함:

[0116] - 플레이트를 가져와서 1.5 mL의 EA.hy926 배지를 웰에 가함,

[0117] - 내피 세포 층을 현미경 하에서 점검함,

[0118] - 삽입물중 2 mL의 A549 세포를 가함,

[0119] **3. 3일:**

[0120] 삽입물의 플레이트의 배지 교환:

[0121] - 삽입물의 구 배지(old medium)를 제거하고 2 mL의 공배양 10% 배지를 가함,

[0122] - 웰의 구 배지를 제거하고 2 mL의 공배양 10% 배지를 가함,

[0123] **4. 4일:**

[0124] 6-웰 플레이트 속에서 DC-THP-1의 제조:

[0125] - 본 실시예에서 1 백만개의 DC-THP-1 세포/mL의 세포 현탁액을 제조(mL당 10만개의 세포 내지 1백만개의 세포).

[0126] - 새로운 플레이트를 가져와서 새로운 플레이트의 6 웰 속의 1 mL(즉, EA.hy926 세포를 회수하기에 충분한 용적)의 DC-THP-1 세포 현탁액을 가하고 삽입물을 구 플레이트로부터 새로운 플레이트로 이동시킴.

[0127] 분화된 THP-1 세포(MΦ-THP-1):

[0128] - 세포를 PBS로 세척,

[0129] - 아큐타제(acutase)를 분화된 THP-1 세포에 가하여 세포를 분리시키고, 플라스크를 인큐베이터내로 15분 동안 둠,

[0130] - 5분 동안 300 g에서 원심분리하고, 상층액을 버림,

[0131] - 펠렛(pellet)을 공배양물 1% 속에 용해함,

[0132] - 세포를 계수하고 700 μL 공배양 1% 배지 속에 본 실시예에서의 삽입물당 27만개 내지 54만개의 MΦ-THP-1 세포(0.12 내지 1.2 10^5 개의 세포/cm², 바람직하게는 0.6 10^5 개의 세포/cm²)를 삽입물에 가함.

[0133] 적어도 4시간 후: 배지를 삽입물로부터 버려서 ALI에 대해 스위치(switch)함. 밤새 향온처리.

[0134] 상기 프로토콜 하에 제조된, 본 발명의 3-차원 모델에서 시험할 흡입가능한 제품(입자 또는 분자)에 대한 삽입물의 노출을 10 내지 12시간(세포가 계면활성제를 생산하는데 요구되는 시간) 후 도 1에 나타낸 바와 같은 시험관 내 폐 모델을 사용하여 수행할 수 있다.

[0135] **5. 5일:**

[0136] 삽입물의 노출 예는 멸균 조건 하에서 미리 세정한, Vitrocell® 클라우드 장치(Cloud device)(독일 발트키르흐 소재)에서 수행하고, 37°C에서 유지시킨다. 삽입물을 장치내에 둔다. 클라우드(200 내지 500 μL의 시험될 제품)를 이후에 챔버(chamber) 내부에 균질하게 분포시키고 표면에 정착하도록 개시한다. 약 10 내지 30분 후(주입된 제품에 따라), 클라우드를 단일 소적 침강에 의해 정착시킨다. 삽입물에 침착된 농도는 g/cm²로 계산할 수 있다.

[0137] 노출 후, 삽입물을 다시 이들의 플레이트로 이동시키고, 향온처리(시험할 화합물에 따라 일반적으로 24 시간 또는 48 시간)한 후, 다음의 측정을 수행할 수 있다.

[0138] **6. 5, 6 또는 7일: 측정**

- [0139] 예측된 시간- 및 종점에 따라 노출 후 0 내지 48시간으로부터 생물학적 종점을 수행할 수 있다.
- [0140] 측정될 가능한 생물학적 종점은 예를 들면: 세포 생존능 또는 세포독성, 사이토킨 분비, DC 이동, DC 활성화, 대식구 식세포작용, EC 활성화, 대식구 식세포작용, 면역-세포화학 또는 면역-형광성을 위한 염색, 또는 RNA 추출. 당해 목록은 제한되지 않는다.
- [0141] **7. 5일: DC 단리의 예 및 T-세포와의 공배양**
- [0142] **다음을 사용한 DC 단리:**
- [0143] - MHCII, CD86, CD54(활성화된 THP-1 세포를 회수하기 위해) 및 CD11a(EA.hy.926 세포로부터 세포를 단리하기 위해)와 같은 T 세포 활성화를 위해 필요한 상이한 마커를 사용함에 의한 FACS(예컨대, BD FACS Aria)를 사용한 세포 분류. T-세포와의 공배양을 위해 충분한 세포를 갖도록 하기 위하여 상이한 웰을 혼주시키는 것이 필수적일 수 있다.
- [0144] - MHCII, CD86, CD54 및 CD11a와 같은 상이한 표면 마커를 사용한 양성 또는 음성 단리를 사용하는 자기 비드(예컨대, 다이아나비드(Dynabeads)).
- [0145] **T-세포와의 활성화된 DC 공배양:**
- [0146] - T-세포는 세포 활성화(TCR 및 CD4), 생존(B7.1 또는 CD80 및 B7.2 또는 CD86을 결합시키는 CD28) 및 분화,
- [0147] - 배지 속에서 세포의 공배양:
- [0148] o 1% FBS(테트라컬처-DC의 노출을 위해 사용됨)와 함께 공배양
- [0149] o 또는 10% FBS(THP-1 및 T-세포주 둘 다를 위해 사용됨)를 지닌 RPMI 1640
- [0150] o 제2 림프 기관의 복잡한 조직 환경을 모사하기 위해 수개의 화합물(예컨대, T 세포 분화에 필요한 사이토킨)의 첨가가 고려되어야만 한다.
- [0151] - 세포 비: 단지 소수의 나이브(naïve) T 세포로서 시험된 수개의 세포비는 임의의 제공된 에피토프(epitope)를 인식할 수 있다(10^6 중 1개). DC는 이의 표면에서 항원내에서 인식되는 T 세포에 의해 발견된다는 희망으로 많은 T 세포와 상호작용할 수 있다:
- [0152] o 10만개의 T 세포에 대해 1만개의 DC(1/10)
- [0153] o 1백만개의 T 세포에 대해 1만개의 DC(1/100)
- [0154] o 1000만개의 T 세포에 대해 1만개의 DC(1/1000)
- [0155] - 선택된 T 세포주에 따라서, 배지는 새것으로 바꾸거나 신선한 배지(20% 내지 30% 용적으로 2 또는 3일마다)를 가함으로써 ATCC/공급업자 아배양(subculturing) 추천서에 따라 보충할 수 있다.
- [0156] **종점 측정:**
- [0157] 사이토킨 분비(IL-4, IL-5 및 IL-13) 및 표면 마커 발현은 24시간 마다, 24시간(1일) 공배양으로부터 120시간(5일) 공배양까지 측정하여야 한다. T-세포는 화합물이 호흡 민감화제인 경우 헬퍼형(Helper type) 2(TH2) 프로파일을 나타낼 수 있다.
- [0158] **실시예 2:**
- [0159] 실시예 1에 따라 제조된 삽입물을 화학적 화합물 및 양성 대조군에 Vitrocell® 클라우드 시스템(Vitrocell, 독일 발트키르흐 소재)을 사용하여 노출시켰다. 모든 화합물을 멸균 염수 용액 및 PBS의 1/1(v/v) 용액 속에서 희석시켰다.
- [0160] **HDM(집 먼지 진드기)에 대한 노출:**
- [0161] 집 먼지 진드기는 천식 및 알레르기성 비염과 관련된 매우 일반적인 알레르겐이다. 시험관 내 노출에 대한 데이터는 발견되지 않았으므로, 본 발명의 폐 모델의 세포가 노출될 농도를 생체내 연구를 기반으로 측정하였다. 생체내에서, 마우스는 일반적으로 1 µg의 Der p1(HDM의 주요 단백질 알레르겐)에 비강내 노출시킨다. 마우스의 폐포 표면이 $82,2 \text{ cm}^2$ 인 것으로 알고, 0.01 µg/cm²의 농도가 삽입물에 대한 노출을 위해 계산되었다(45 µg/삽

입물이 됨).

[0162] 화학물질에 대한 노출:

[0163] 삼입물을 광범위한 농도로 화학적 호흡 자극인자 및 민감화제에 노출시켜 알라마 블루 검정(Alamar Blue assay)을 사용하여 조직의 생존능을 우선 측정하였다. 알라마 블루 검정의 활성 성분인, 레사주린은 세포 투과성 블루 비-형광성 화합물이다. 세포내로 도입시, 레사주린은 핑크색의 고도로 형광성인 레소루핀으로 환원된다. 생존 세포는 레사주린을 레소루핀으로 연속적으로 전환시킨다. 형광성은 세포 생존능에 비례한다.

[0164] Vitrocell 클라우드를 통해 화합물에 대한 24 시간 및 48 시간 노출 후, 세포를 1 시간 동안 공배양 1% 배지 속에 희석된 400 μM의 알라마 블루에 대해 항온처리하였다.

[0165] 일단 세포 생존능이 각각의 화합물에 대해 측정되면, 대략 75%의 생존능의 농도를 THP-1 DC에서 세포 표면 마커의 발현의 측정을 위해 선택하였다.

[0166] 테트라컬처 폐 모델을 수개 농도의 2개의 공지된 화합물 호흡 민감화제에 노출시켰다: 프탈릭 무수물(PA) 또는 트리멜리틱 무수물(TMA) 및 2개의 공지된 호흡 자극인자: 아크롤레인(Acr), 메틸 살리실레이트(MeSa), 또는 나트륨 도데실 설페이트(SDS).

[0167] 유동 세포분석 측정:

[0168] Vitrocell 클라우드에 대한 노출 후 24시간 및 48시간째에, THP-1 DC를 웰 속의 배지 속에서 회수하였다. 300g에서 5분 동안 원심분리한 후, 세포를 PBS로 세척하고 염색을 하기 표 1에 나열된 항체(제조사사의 추천된 희석에 따라서) 및 항체의 비특이적인 결합을 측정하기 위한 상응하는 동형 대조군을 사용하여 수행하고 관찰된 염색이 인공물보다는 특이적인 결합에 기인함을 보증한다.

표 1

민감화

표면 마커	항체	여기 (nm)	방출 (nm)
TSLPr	APC 마우스 IgG1 (Biolegend)	645	660
OX40L	PE 마우스 IgG1 k 할-사람 OX40L(BD)	496	578
IL-7Ra	알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647 마우스 IgG1(Biolegend)	650	668
CD86	PE 마우스 IgG1 (BD)	496	578
CD54	APC 마우스 IgG1 (BD)	645	660
CD40	FITC 마우스 IgG1 (BD)	493	525

[0169]

[0170] 세포 독성의 경우:

[0171] SYTOX 블루 사용시, 여기 파장은 444 nm이고, 방출 파장은 480이다.

[0172] 상대 형광 강도(RFI)를 OX40L, IL7ra, CD40 및 CD86 및 CD54 발현의 지시인자로서 사용하여 다음 식 I로 계산하였다:

$$RFI \% = \frac{\text{처리된 세포의 MFI} - \text{처리된 동형 대조군 세포의 MFI}}{\text{비히클 대조군 세포의 MFI} - \text{비히클 동형 대조군 세포의 MFI}} \times 100$$

- [0173]
- [0174] 도 2a 내지 2e는 각각 HDM에 24시간 노출 후 테트라컬처 폐 모델에서 THP-1 세포의 세포 표면에서 세포 표면 마커 CD86, CD40, IL7ra, CD54 및 OX40L의 발현을 나타낸다. 생존 세포의 세포 표면 마커의 발현은 유동 세포분석으로 측정하였다.
- [0175] 모든 마커는 대조군과 비교하여 HDM에 대해 24시간 노출 후 상향조절되는 것으로 관찰된다. 따라서, 테트라컬처 폐 모델에서 THP-1 세포의 세포 표면에서 마커 IL7ra, OX40L, CD86, CD40, 및 CD54를 사용하여 화학적 화합물의 호흡 민감화 가능성을 측정할 수 있다.
- [0176] 도 3a 및 3b의 도해는 상이한 농도의 화학적 호흡 민감화제인, 트리멜리틱 무수물(TMA) 및 프탈릭 무수물(PA) 각각에 24시간 및 48시간 노출 후의 생존능을 나타낸다.
- [0177] 용량 반응이 폐포 조직 모델의 세포 생존능에 대해 관찰된다.
- [0178] 도 4a, 4b 및 4c의 도해는 상이한 농도의 화학적 호흡 자극인자인, 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 및 아크롤레인(Acr) 및 메틸 살리실레이트(MeSa) 각각에 대해 24시간 및 48시간 노출 후의 생존능을 나타낸다.
- [0179] 용량 반응을 또한 폐포 조직 모델의 세포 생존능에 대해 관찰한다.
- [0180] **실시예 3:**
- [0181] Vitrocell® 클라우드 시스템(Vitrocell, 독일 발트키르흐 소재)를 PBS 속에 희석된 화합물을 분무하기 위해서 및 비히클 대조군, 멸균수 또는 멸균수 + DMSO에 따라 세포의 전달 및 노출에 사용하였다.
- [0182] 집 먼지 진드기(HDM), 단백질 Bet v1(추가로 공지된 단백질 민감화제) 및 아크롤레인(Acr)을 멸균수 속에 희석시켰다. 프탈릭 무수물(PA), 트리멜리틱 무수물(TMA) 및 메틸 살리실레이트(MeSa)를 DMSO 속에 희석시켰다.
- [0183] 생존능을 상기 실시예 2에 상세히 설명된 프로토콜에 따라 노출 24시간 및 48시간 후 알라마 블루 검정을 사용하여 평가하였다.
- [0184] 비히클 대조군과 상대적으로 비교된 25%의 세포독성(75%의 생존능을 의미: CV75)을 초래하는 농도를 실시예 2에 나타낸 그래프를 사용하여 측정하였다.
- [0185] 세포 표면 마커의 발현 및 상이한 사이토킨의 방출을 측정하기 위하여, 상기 실시예 1에 따라 제조한 삽입물의 세포를 CV75에 노출시키거나, 75%의 생존능에 도달하기 불가능한 경우, 세포를 최대 용해도의 화합물에 노출시켰다.
- [0186] **Bet v1 노출:**
- [0187] 시험관 내 노출에 대해 발견된 데이터가 없으므로, 본 발명의 폐 모델의 세포가 노출되게 되었던 농도를 생체내 연구를 기반으로 측정하였다. 생체내에서, 마우스를 2 µg의 bet v1(꽃가루의 중요한 단백질 알레르겐)에 노출시켰다. 마우스의 폐포 표면이 82,2 cm² 이라는 지식을 사용하여, 0.024 µg/cm²의 농도를 계산하였다.
- [0188] 24 시간 및 48시간 후, THP-1 세포를 회수하고, 염색하며, 상기 실시예 2에 상세히 기재된 프로토콜에 따라 유동 세포분석기를 사용하여 분석하였다. 상층액을 사이토킨 측정을 위해 회수하였다.
- [0189] 생존능에 있어서의 효과는 HDM 및 Bet v1에 대한 노출 후 관찰되지 않았다.
- [0190] Bet v1에 대한 노출은 대조군과 상대적으로 비교하여 24시간 째에 100.7 % +/- 1.2% 및 48시간째에 89.5% +/- 4.2%의 생존능을 생성하였다. HDM에 대한 노출은 대조군과 비교하여 24시간 째에 100.0 % +/- 0.03% 및 48시간 째에 95.7% +/- 0.03%의 생존능을 생성하였다.
- [0191] 동시에, h-CLAT(사람 세포주 활성화 시험) 검정을 사용하여 수득된 데이터를 재생하기 위하여 THP-1 세포를 모노클로날로 침지된 조건 하에 노출시켰다. h-CLAT 검정은 수지 세포를 활성화시키는 화합물질의 특성을 기반으로 하며, 이러한 특징은 피부 및 호흡기 민감화제 둘 다에 대해 일반적이다. h-CLAT는 유럽 수준(ECVAM 기준)에서 유효한 시험관 내 모델이다.

- [0192] 비교 목적으로, CD86 및 CD54 세포 표면 마커의 발현을 또한 h-CLAT에서 평가하였다. h-CLAT를 사용하여 화학물질의 피부 민감화 가능성을 평가한다. 피부 및 폐는 DC 활성화 특징을 공유하므로, h-CLAT는 화학물질의 호흡 민감화 가능성을 또한 평가하기 위해 사용하는 것이 고려된다. 상기하면, 시장에서 아직까지 이용가능한 호흡 민감화를 평가하기 위해 비준된 모델은 존재하지 않는다.
- [0193] 상이한 항체로서, 플루오로크롬 및 장비를 사용하여 CD 발현을 측정하였으므로, h-CLAT에 대해 문헌에서 수득된 역치 수준(threshold level)은 본 실시예에서 측정된 것과 비교될 수 없었다.
- [0194] 그러나, 도 5는 테트라컬처(A) 및 모노컬처(B) 속의 THP-1 세포에서 CD54의 발현을 나타낸다. 화학적 호흡 자극인자(PA 및 TMA)에 대한 노출 후 증가가 관찰되었지만 비히클 대조군(물 및 DMSO) 및 화학적 자극인자(아크롤레인)에 대해서는 증가가 관찰되지 않았다(도 5a). 도 5b에서와는 대조적으로, 호흡 민감화제에 대한 노출 후 모노컬처에서 증가는 관찰되지 않았으며 CD54 발현의 증가는 민감화제로서 화학적 아크롤레인을 잘못분류하는 자극인자에 대한 노출 후 측정되었다.
- [0195] 도 6은 테트라컬처(A) 및 모노컬처(B)에서 THP-1 세포에 대한 CD86의 발현을 나타낸다. 화학적 호흡 자극인자(PA 및 TMA)에 대한 노출 후 증가가 관찰되었지만 비히클 대조군(물 및 DMSO) 및 화학적 자극인자(아크롤레인)에 대해 증가가 관찰되지 않았다(도 6a). 대조적으로, 호흡 민감화제에 대한 노출 후 모노컬처에서 증가는 관찰되지 않았으며 TMA 노출 후 CD86 발현은 심지어 비히클 대조군보다 더 낮다(도 6b).
- [0196] 이후에, 본 발명에 따른(테트라컬처) 3차원 시험관 내 폐포 폐 모델은 화학적 호흡 민감화제 및 자극인자의 구별에 대한 개선을 나타낸다. 시스템의 구별 특성을 강화하기 위하여, 추가의 마커를 사용하고 호흡 단백질 민감화제를 또한 시험한 화합물의 세트에 가하였다.
- [0197] 도 7은 24시간 동안 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 테트라컬처속의 THP-1 세포에서 IL7ra의 세포 표면 마커 발현을 나타낸다. 아크롤레인 노출 후 IL7ra 발현의 감소는 화학적 자극인자와 민감화제(유형, 화학물질 또는 단백질과 무관) 사이의 구별되는 마커로서 사용될 수 있었다.
- [0198] 도 8은 24시간 동안 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 테트라컬처 속의 THP-1 세포에서 OX40L의 세포 표면 마커 발현을 나타낸다. 아크롤레인 노출 후 OX40L 발현의 증가는 단백질 민감화제와 화학적 자극인자/민감화제 사이의 구별되는 마커로서 사용될 수 있었다.
- [0199] 도 9는 24시간 동안 민감화제 및 자극인자에 대한 노출 후 테트라컬처 속의 THP-1 세포에서 TSLPr의 세포 표면 마커 발현을 나타낸다. 화학적 민감화제 노출 후 TSLPr 발현의 증가는 화학적 민감화제와 화학적 자극인자/단백질 민감화제 사이의 구별되는 마커로서 사용될 수 있었다.
- [0200] 다른 매개변수를 아크롤레인 및 화학적 호흡 민감화제 PA 및 TMA 둘 다의 노출 후 시스템에서 평가하였다.
- [0201] 하기 표 2는 측정된 모든 사이토킨에 대해 수득된 결과의 요약을 제공하며, 여기서, \searrow 는 비히클 대조군과 비교한 사이토킨 방출의 감소를 나타내고, \nearrow 는 비히클 대조군과 비교한 사이토킨 방출의 감소를 나타내며, =는 노출과 비히클 대조군 사이에 관찰된 변화가 없음을 나타낸다:

표 2

	아크론티인		PA		TMA	
	24 시간	48 시간	24 시간	48 시간	24 시간	48 시간
MCP-1	↘	=	=	↗	=	=
MIP-3a	↘	↘	↗	↗	↗	↗
IL-6	↘	↘	↗	↗	↗	↗
IL-7	↗	↗	=	=	=	=
RANTES	=	↗	↗	↗	↗	↗
GM-CSF	↘	↘	↗	↗	↗	↗
IL-10	↘	↘	↗	↗	↗	=

[0202]

[0203]

이러한 결과는 또한 비히클 대조군과 상대적으로 비교하여 IL-7(도 10a) 및 GM-CSF(도 10b) 농도에 대해 보다 더 통찰력을 제공하는 도 10에 나타낸다. MCP-1, MIP-3a, IL-6 RANTES, GM-CSF 및 IL-10 방출의 증가는 호흡 민감화제에 대한 마커로서 사용될 수 있었다. MCP-1, MIP-3a, IL-6, GM-CSF 및 IL-10 방출의 감소는 IL-7 사이토킨 방출의 증가와 함께 호흡 자극인자에 대한 마커로서 사용될 수 있었다.

[0204]

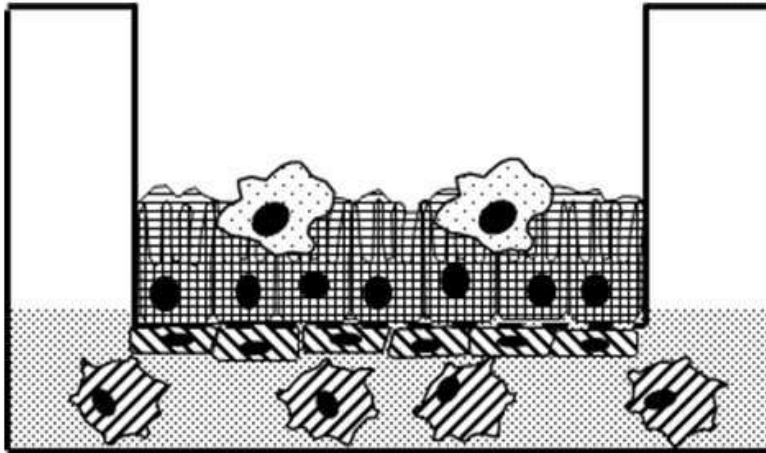
최종적으로, 및 도 11에 나타낸 바와 같이, TMA 및 PA의 낮은 용해도로 인하여, 침지 조건에서 모노컬처 속의 THP-1 세포의 임의의 세포독성에 도달하는 것이 가능하지 않지만(도 11a 및 11b) 생존능에 있어서의 감소가 이러한 화합물에 대한 노출후 테트라질처 시스템에서 관찰된다(도 3a 및 3b).

[0205]

본 발명의 특징의 특징만을 본원에 나타내고 설명하였지만, 이제는 많은 변형, 치환, 변화 또는 등가물이 당해 분야의 기술자에게 이제 일어날 것이다. 따라서, 본 출원이 본 발명의 실제 취지내에 속한 모든 이러한 변형 및 변화를 포함하는 것으로 의도된다.

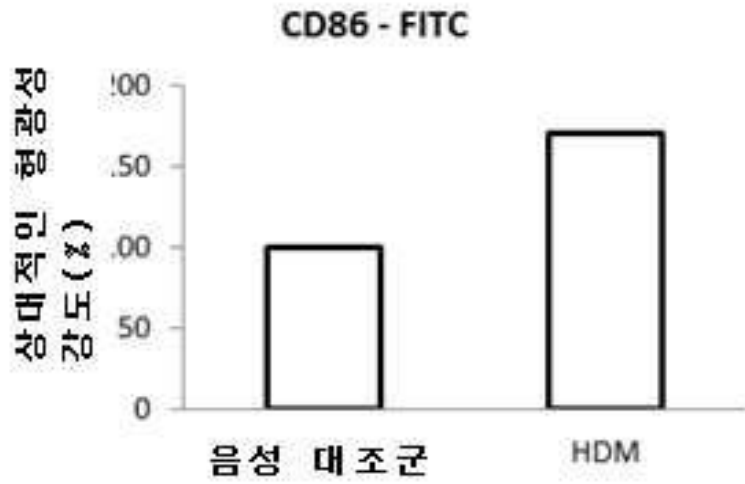
도면

도면1

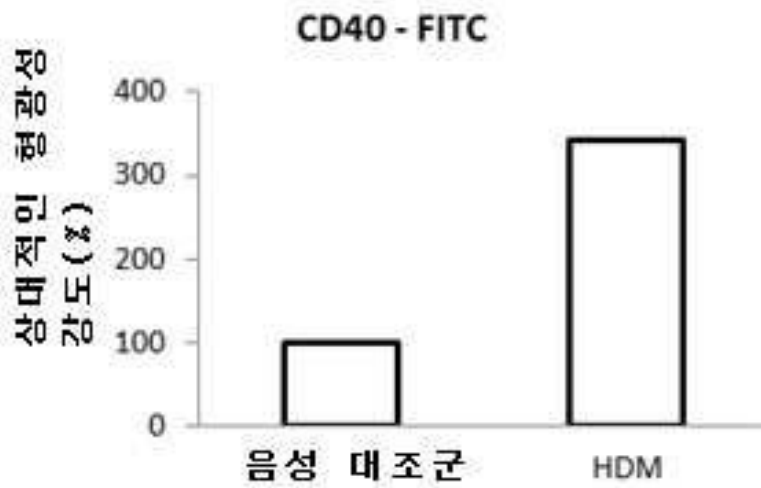


- 
: 수지-유사 세포 (THP-1)
- 
: 내피 세포 (EA.hy 926)
- 
: 폐포 II 형 상피 세포 (A549)
- 
: 대식구
(PMA로 분화된 THP-1)
- 
: 공배양 배지
- 
: 계면활성제
- 
: 트랜스웰 삽입물

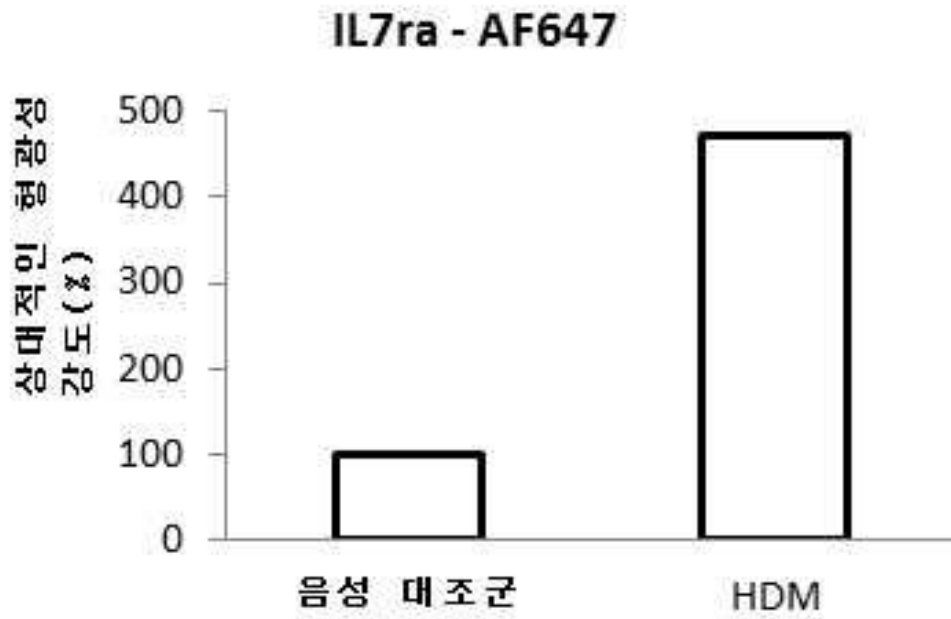
도면2a



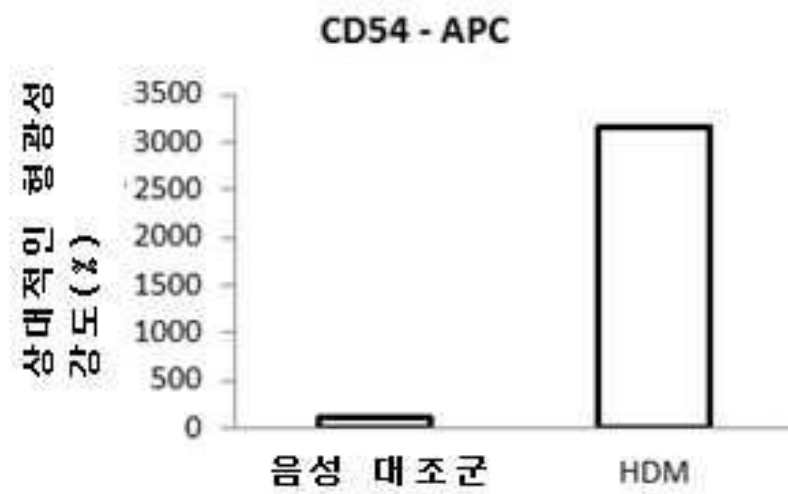
도면2b



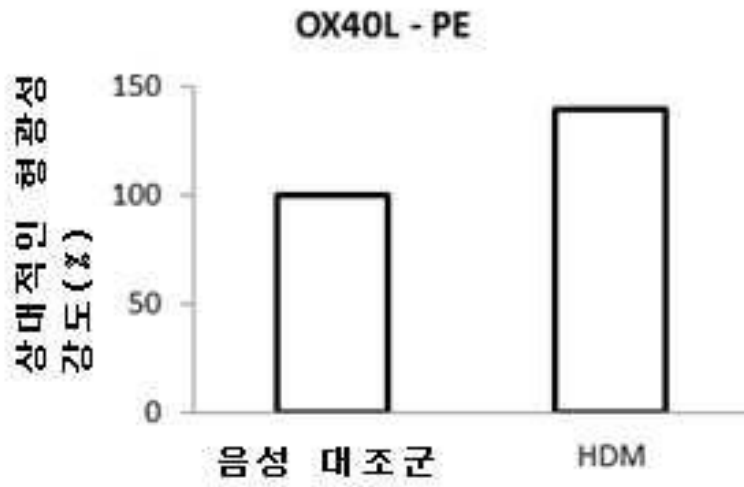
도면2c



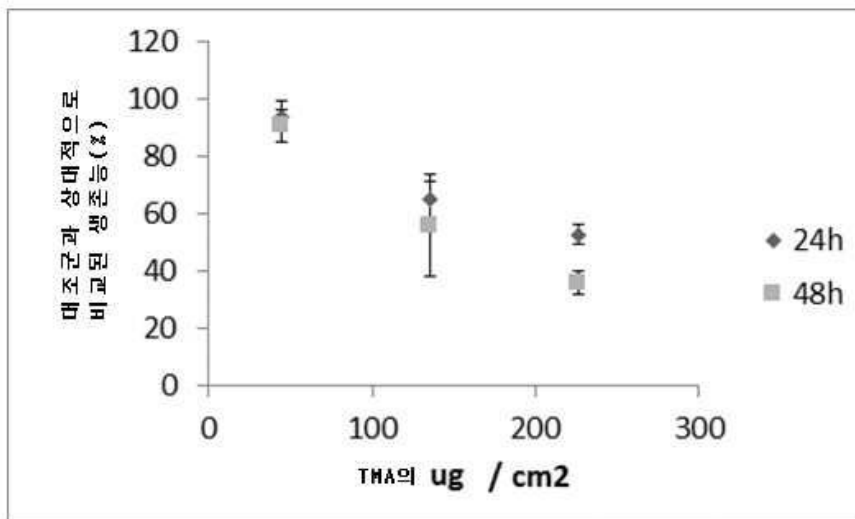
도면2d



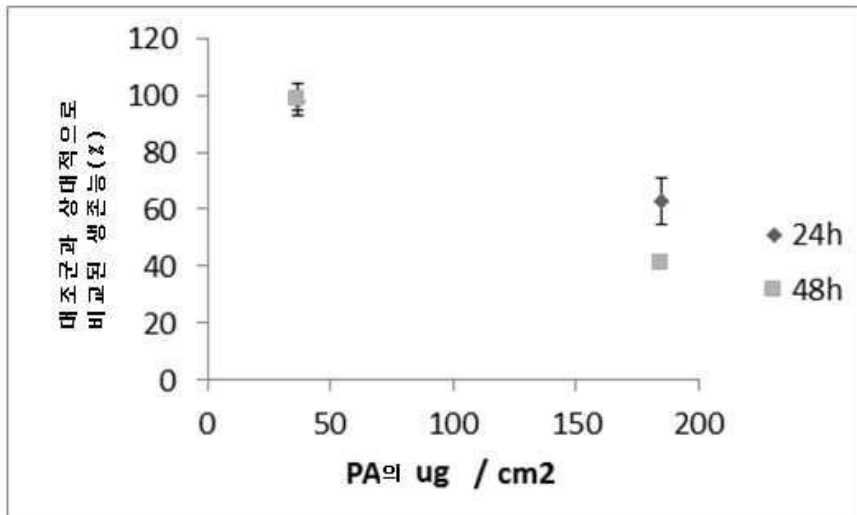
도면2e



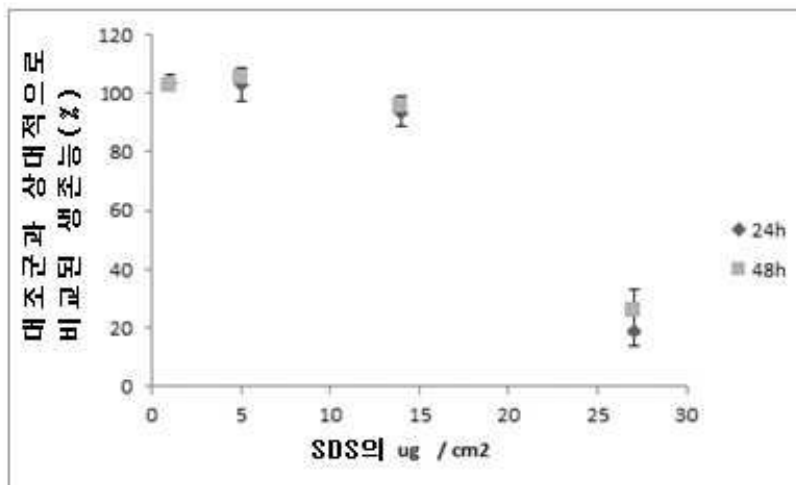
도면3a



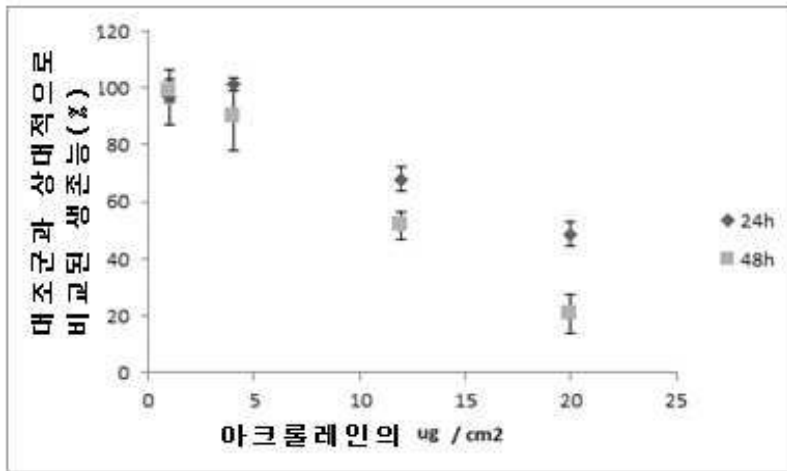
도면3b



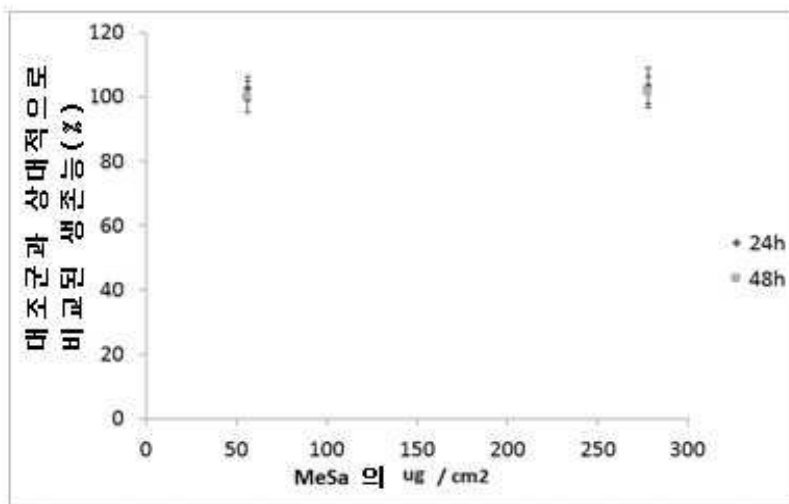
도면4a



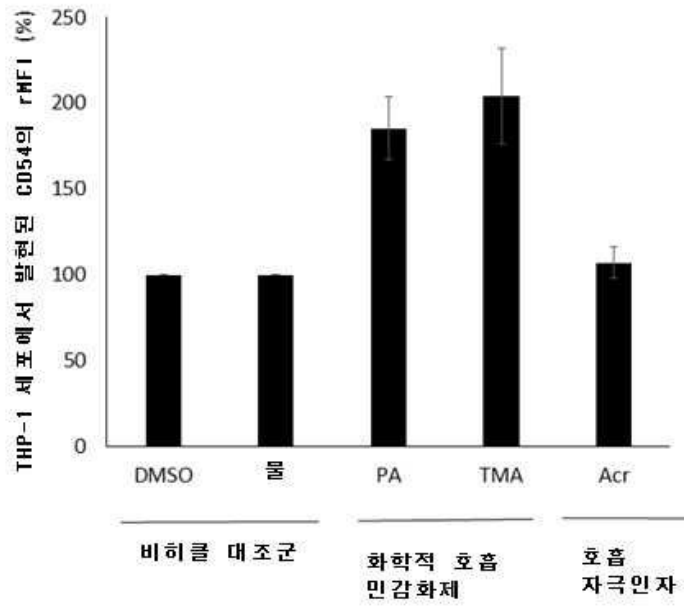
도면4b



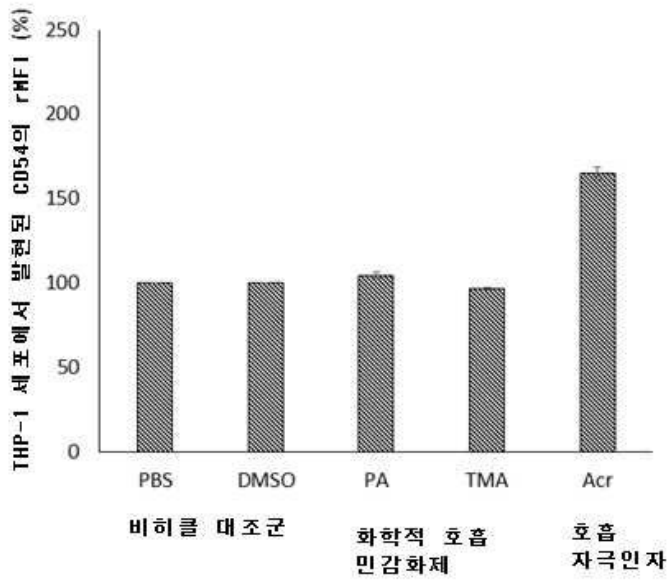
도면4c



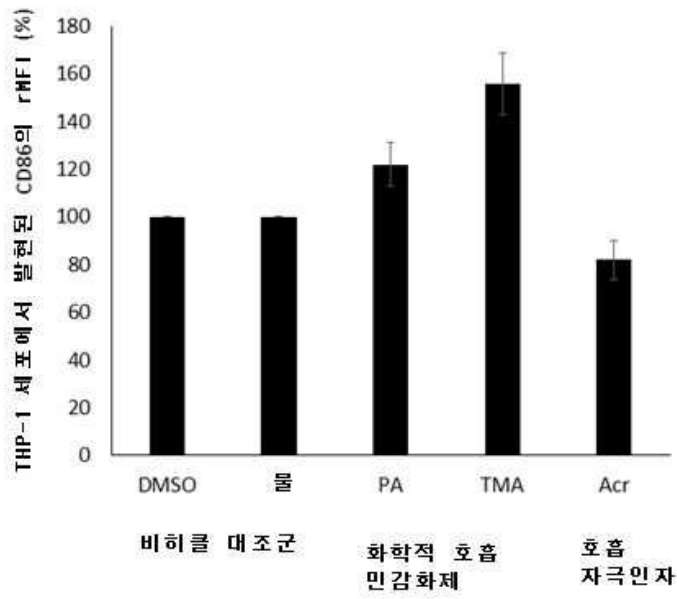
도면5a



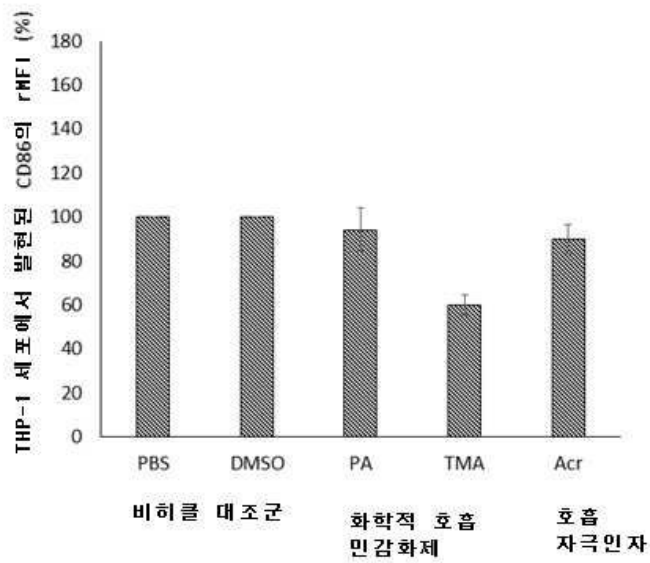
도면5b



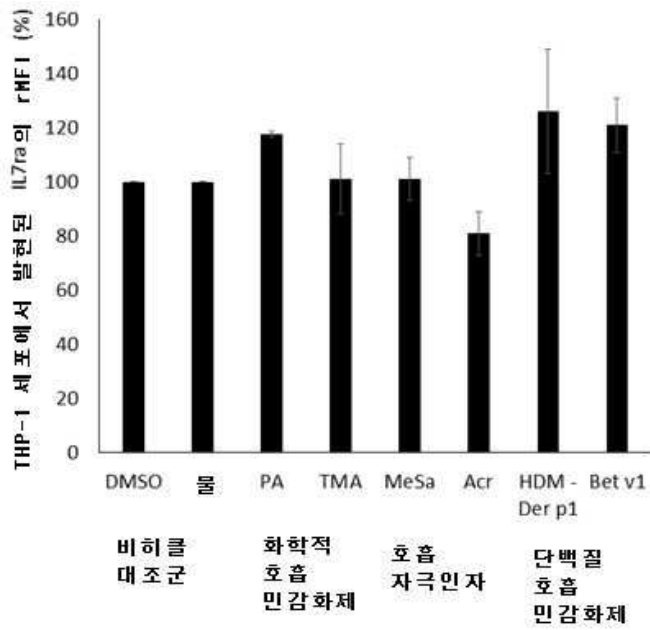
도면6a



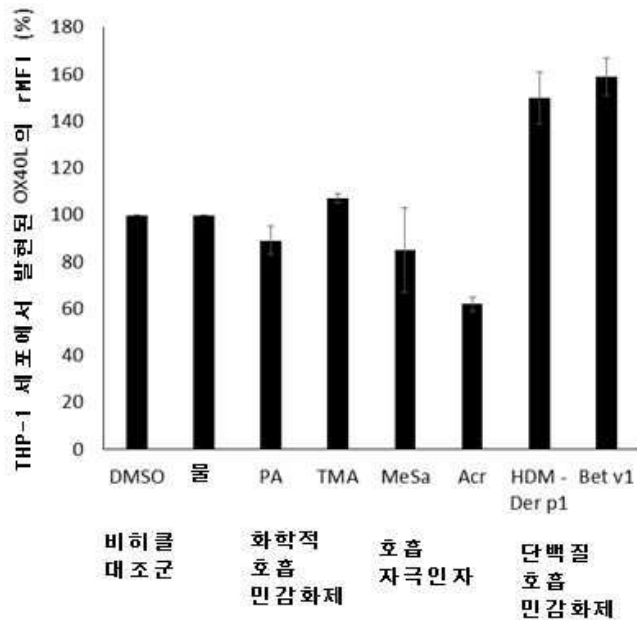
도면6b



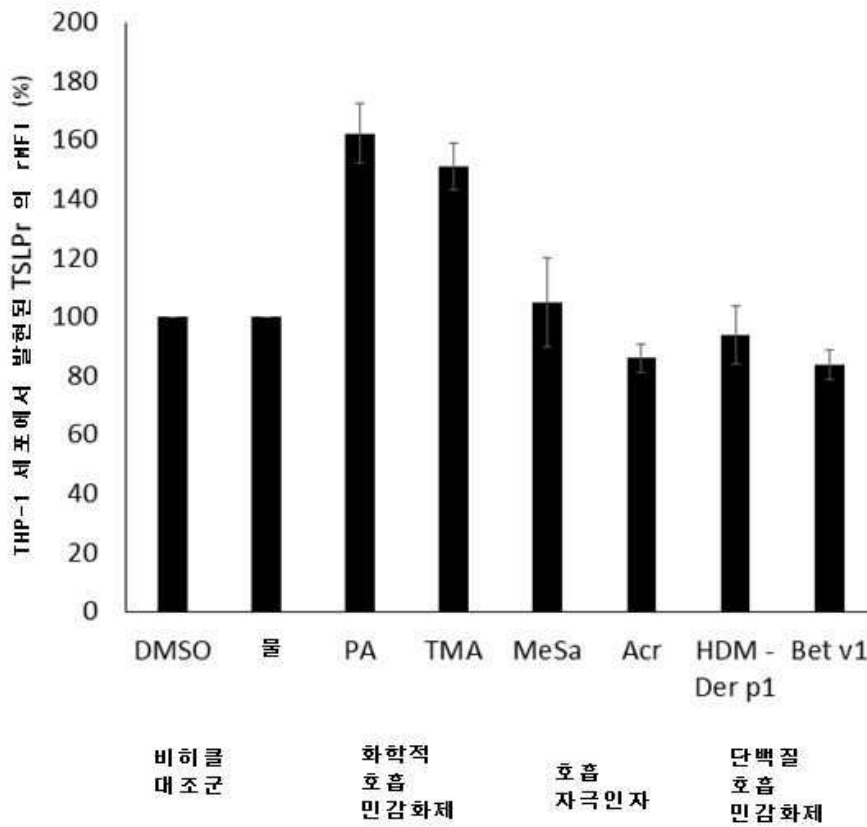
도면7



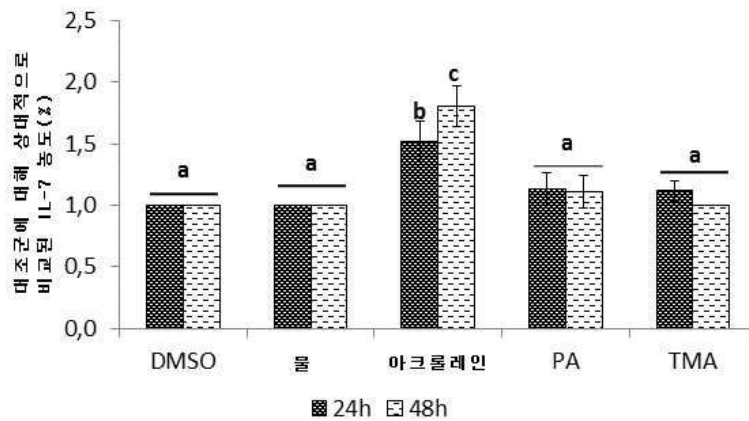
도면8



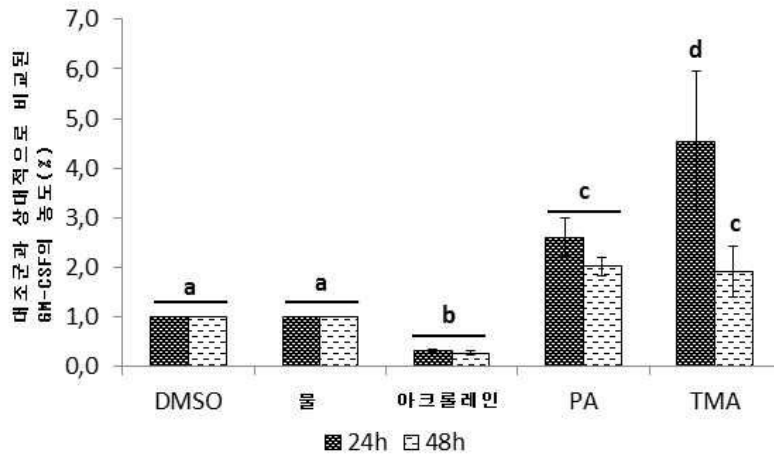
도면9



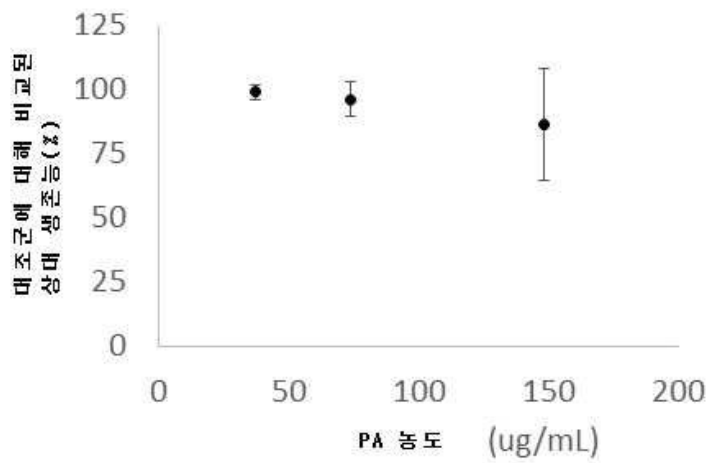
도면10a



도면10b



도면11a



도면11b

