

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0127025 (43) 공개일자 2012년11월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/24</i> (2006.01) <i>D01D 5/00</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>B82Y 15/00</i> (2011.01) (21) 출원번호 10-2011-0045221 (22) 출원일자 2011년05월13일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 이경미 서울특별시 서초구 서초1동 극동디아망아파트 101-904 김중배 서울특별시 강남구 역삼2동 래미안펜타빌@ 101동 1501호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인충현

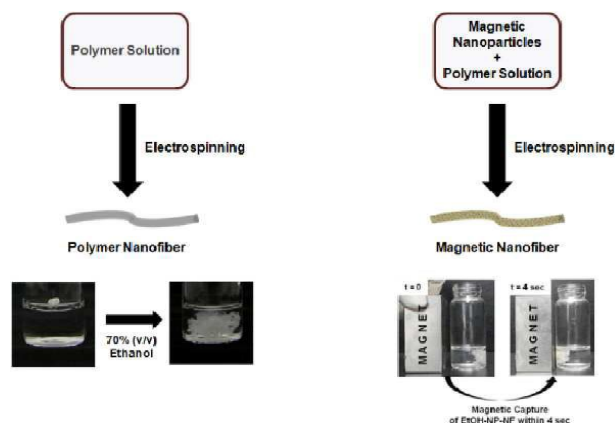
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **음성 세포분리를 위한 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 원하는 세포만을 선택적으로 분리하기 위한 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 제조 및 그 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유 및 자성 나노섬유는 항체와 이에 대한 표적 세포의 결합 및 분리가 신속하고 사용방법이 간단하여 간편하게 사용 할 수 있을 뿐만 아니라, 항체의 조합에 따라 원하는 세포를 분리할 수 있으므로 기존의 비드를 사용한 세포분리 방법의 단점 (약 50%의 세포 손실)을 보완할 수 있는, 높은 함량의 항체 또는 앵타머가 결합된 나노섬유의 제조, 및 간편하고 신속하며 효과적인 음성 세포분리에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 상기방법에 의하여 음성 분리한 세포는 분리에 사용되었던 항체에 의해 자극을 받지 않기 때문에 자연상태를 유지하여 추후 세포 실험시 마치 생체에서 실험하는 것과 같은 유용한 정보를 얻을 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김광희

서울특별시 동대문구 안암로20길 15, 201호 (제기동)

전승현

경기도 양평군 양서면 대심상십길 109-18

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	K2070400000710A050000710
부처명	한국연구재단
연구사업명	(국제)글로벌연구실사업
연구과제명	종양 및 장기이식모델에서 자연 살상세포와 조절 T세포의 면역 방어/조절 연구를 통한 세
포치료기술의 확립	
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.09.01 ~ 2011.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010K001437
부처명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	나노체 기반 바이오메디컬 융합형 항암세포치료 원천기술 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.12.01 ~ 2011.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010K001315
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신기술 융합형 성장동력사업
연구과제명	고활성, 고안정 나노-단백질 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용
주관기관	한국과학기술원
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

1) 의 분산된 나노섬유 및 자성 나노섬유에 2종 이상의 특이적 결합분자를 혼합하여 결합시키는 단계를 포함하는, 음성 세포분리용 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 및 결합분자-자성 나노섬유 복합체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 따른 세포가 결합된 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체를 이용하여 원하는 세포만을 분리시키는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 원하는 세포만을 선택적으로 분리하기 위한 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 제조 및 그 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포의 분리는 질병의 진단이나 치료에 있어서 생물학적 또는 생의 학적인 적용 등의 다양한 분야에 매우 중요한 기술 중 하나로서, 다양한 세포의 혼합으로부터 원하는 특정 세포를 분리하기 위해 사용이 증가하고있다 [McCloskey KE, et al., Anal Chem, 2003, Dec 15;75(24):6868-6874; McCloskey KE, et al., Biotechnol Prog, 2003, May-Jun;19(3):899-907]. 따라서 이러한 중요성 때문에 현재 많은 연구 그룹에서 세포 분리의 기술과 관련한 많은 연구를 진행 중에 있다.

[0003] 비중이 서로 다른 세포를 분리하는 경우에는 속도침강법에 의해 분리할 수 있다. 한편, 감각(感作)한 세포와 미 감각의 세포를 분별하는 것과 같이, 세포의 차이가 거의 없는 경우에는 형광항체로 염색한 정보 또는 직접 현미경 관찰을 통한 정보로 세포를 분리할 필요가 있다. 예를 들어, 형광색소로 표지하여 표지의 강약에 따라 세포를 분획하여 특정의 세포집단을 분리하여 채취하는 세포분별장치(cell sorter)[Kamarck, M.E., Methods Enzymol. Vol. 151, p150-165, 1987]가 이용되고, 최근에는 마이크로 가공기술을 이용해서 만든 미세한 유로에 생긴 층류(層流)층을 흐르는 미립자를 직접 현미경 관찰하면서 분리하는 세포분별장치[Micro Total Analysis, 98, pp.77-80, Kluwer Academic Publishers, 1998; Analytical Chemistry, 70, pp.1909-1915, 1998]가 개발되어 있다.

[0004] 현재 많이 사용되고 있는 세포 분리 방법 중 하나인 형광활성세포분류기(fluorescence activated cell sorter, FACS)는 레이저 광선을 사용하여 림프구 등 유세포의 표면 항원을 해석하거나 표면 항원의 유무 등에 의해 세포를 분리하는 장치로서, 유액 상태의 입자나 세포가 일정 감지 지역을 통과할 때 각각의 입자나 세포를 신속하게 측정하여, 각각의 세포가 갖는 형광의 세기를 측정하고, 수치화된 형광의 세기를 이용하여, 특정 세포를 선택적으로 분리할 수 있다. 형광염료(fluorescent dye) 또는 단일클론 항체(monoclonal antibodies)를 사용하여 세포의 표면 및 내부가 갖는 면역상태를 파악하여 세포를 분리할 수 있다. 그러나, 장치의 복잡한 조작 기술, 고도로 숙련된 기술자, 많은 시간의 소요, 및 고가의 기계가 필요하다는 단점이 있다[Lancioni CL, et al., J Immunol Methods, 2009, May 15;344(1):15-25].

[0005] 또한, 현재 사용되고 있는 또 다른 방법 중 하나인 자기활성세포분류기(magnetic activated cell sorter)는 자기 입자(magnetic particle)가 붙어있는 항체나 또는 그에 상응하는 물질을 이용하여 자기장의 힘으로 원하는 특정 세포를 분리하는 것으로, 이때, 세포 분리시 필요한 비드(bead)가 세포와 결합하여 세포 내로 들어감으로써 세포의 상태에 변화가 발생한다는 단점이 있다.

[0006] 한편, 항체(antibody)는 항원에 대한 특이성(specificity) 때문에 세포 표면 항원에 대해 특이적인 항체를 사용하여 생물학적 물질의 검출, 분리 및 측정에 널리 이용되고 있다. 세포 치료를 위한 특정 세포의 분리 또는 특정 세포의 검출을 위해서는 동일한 세포 특성을 갖는, 보다 간편하고 용이하게 안정적인 고순도 세포를 분리하

는 방법의 확립이 필요하다. 음성 세포분리(negative selection)은 여러 세포 중에서 원하는 세포를 제외한 나머지 세포를 결합시키고, 원하는 세포만을 얻을 수 있는 분리 방법이다. 음성 세포분리의 장점은 분리 과정에서 원하는 세포에 불필요한 자극을 주지 않아 활성화 또는 독성이 부여되지 않은 자연상태(natural state)의 세포를 얻을 수 있기 때문에, 음성 세포분리를 통해 얻은 세포는 실제 실험에서 수행하고자 하는 원하는 자극을 줄 수 있으므로 양성 세포분리법에 비하여 우월함을 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 2종 이상의 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체 및 이를 이용한 음성 세포분리 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명에서는 음성 세포분리를 위하여 전기방사된 폴리머 나노섬유(PS-PSMA-full name 기입바람)를 도입하였다. 나노파이버는 작은 공간에 넓은 표면적을 지니고 있으며, 내구성이 강하고, 다루기가 매우 간편하고, 다양한 형태로 제작이 가능하며 또한, 다양한 물질을 화학적으로 결합시키는 것이 용이하다는 특징을 가지고 있기 때문에 세포분리의 적용에 있어서 매우 좋은 접근을 제공한다. 또한 PS-PSMA 나노파이버는 표면에 maleic anhydride기를 지니고 있어서 별도의 공유결합 (covalent linking) 과정을 거치지않고 거대한 바이오분자들을 결합시킬 수 있는 장점이 있다.

[0009] 또한 나노섬유의 빠른 분리 기능을 향상시키기 위하여 PS-PSMA와 자성 나노입자를 이용하여 전기방사를 실시하여 자성 나노입자를 제작하였다. 자성 나노입자와 결합된 나노섬유는 자석을 이용함으로써 쉽게 포착되고, 일반적인 나노섬유에 적용되는 유사 프로토콜로 생체 분자를 제조하는 데에 사용된다. 그러므로 자기적 나노입자-나노섬유는 세포 혼합물에서 표적 세포를 포착할 수 있고, 생체 분자, 약물, 치료적 유전자, 또는 세포를 전달할 수 있는 고체상 스카폴드를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명자들은 나노섬유와 자성 나노섬유에 알코올을 처리하여 각 섬유 사이의 공간을 증가시켜 이에 결합하는 항체의 함량을 증가시켰다. 항체가 결합된 분산된 나노섬유는 항체에 대한 표적세포가 효과적이며 특이적으로 결합할 뿐만 아니라 사용이 간편하고 신속함을 확인하였다.

[0011] 본 발명에서는 림프절에 존재하는 B 세포를 음성 분리하기 위하여 나노섬유에 2종 이상의 항체(anti-CD4 항체와 anti-CD43 항체)를 결합시켜 B세포만을 선택적으로 분리하는 실험을 진행한 결과 B세포의 분리 수율이 월등히 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0013] 1) 고분자 용액을 전기방사하여 자성 나노섬유 및 나노섬유를 제조하는 단계;

[0014] 2) 단계 1)의 자성 나노섬유 및 나노섬유에 20 내지 100%(v/v) 농도의 알코올을 처리하여, 분산된 나노섬유를 제조하는 단계; 및

[0015] 3) 단계 2)의 분산된 자성 나노섬유 및 나노섬유에 2종 이상의 특이적 결합분자를 혼합하여 결합시키는 단계를 포함하는, 음성 세포분리용 특이적 결합분자-나노섬유 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된, 특이적 결합분자-나노섬유 복합체를 제공한다.

[0017] 아울러, 본 발명은

[0018] 1) 상기 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 및 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체에 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 및

[0019] 2) 단계 1)의 혼합물로부터 복합체에 결합된 세포를 분리하고 원하는 세포만을 얻는 단계를 포함하는, 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유 및 자성 나노섬유를 이용한 음성 세포분리 방법을 제공한다.

[0020] 3) 단계 2)의 세포가 결합된 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체를 이용하여 원하는 세포만을 음성 세포분리 방법으로 분리할 수 있는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유 및 자성 나노섬유는 항체와 이에 대한 표적 세포의 결합 및 분리가 신속하고 사용방법이 간단하여 간편하게 사용 할 수 있을 뿐만 아니라, 항체의 조합에 따라 원하는 세포를 분리할 수 있으므로 기존의 비드를 사용한 세포분리 방법의 단점 (약 50%의 세포 손실)을 보완할 수 있는, 높은 함량의 항체 또는 앵타머가 결합된 나노섬유의 제조, 및 간편하고 신속하며 효과적인 음성 세포분리에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 상기방법에 의하여 음성 분리한 세포는 분리에 사용되었던 항체에 의해 자극을 받지 않기 때문에 자연상태를 유지하여 추후 세포 실험시 마치 생체에서 실험하는 것과 같은 유용한 정보를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 나노섬유 및 자성 나노입자-나노섬유의 준비과정을 도식적으로 보여주며, 또한 나노섬유를 에탄올 처리를 하였을 때 나노섬유가 에탄올 상에서 분산되어 표면적이 증가하는 것을 보여주고 있다.

도 2a 및 2b는 실시예 4에서 언급한 바와 같이 특이적 결합분자-나노섬유 복합체를 이용한 B 세포의 특이적 분리를 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] [실시예 1] 재료의 준비

[0024] N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide, DMF)는 Sigma (ST Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 폴리스티렌(polystyrene, PS, MW=950,400) 및 스티렌말레익 안하이드라이드 공중합체{poly(styrene-co-maleic anhydride), PSMA, MW=224,000}, 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran, THF)은 Aldrich (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였으며, 에탄올은 Deajung(Siheung, Korea)으로부터 구입하였다. 7주령 C57BL/6 마우스는 Narabiotech(Seoul, Korea)로부터 구입하여 고려대학교 동물실에서 사육하였다. 실험에 사용된 모든 마우스는 7-10주령이었다. 모든 과정은 고려대학교 실험동물운영위원회(KUIACUC-2009-105)의 승인하에 실시하였다. 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)가 결합 또는 결합되지 않은 항-마우스 CD3 (2C11), CD4 (GK1.5, RM4-4), CD43 (BioR2/60) 단일클론 항체(mAbs), 피코에리트린(phycoerythrin, PE), 또는 알로피코시아닌(allophycocyanin, APC)은 eBioscience (San Diego, CA)로부터 구입하였다. 페리딘인 클로로필 단백질 복합체(Peridinin Chlorophyll Protein Complex, PerCP)가 결합된 항-마우스 CD19(6D5) mAb는 BioLegend (San Diego, CA)로부터 구입하였다. 모든 다른 시약들은 상업적으로 구입가능한 가장 높은 등급으로 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[0025] [실시예 2] 전기방사법(electrospinning)을 이용한 고분자 나노섬유의 제조

[0026] 폴리머 용액은 상온에서 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF)에 PS : PSMA 혼합물을 2:1 중량비로 넣고 용해를 위해 유기 용매인 THF를 이용하여 용해함으로써 제조하였다. 혼합된 용액을 자석교반기를 사용하여 3시간 동안 PS 및 PSMA 혼합물을 완전히 녹였다. 그런 다음, 폴리머 용액의 점성을 감소시키기 위하여 상기 폴리머 용액에 아세톤 용액을 넣었다. 상기 폴리머 용액을 30 게이지 스테인리스강 주사 바늘이 장착된 5 mL의 플라스틱 주사기에 채워 넣었다. 고전압 공급기를 사용한 전압의 작동 조건은 7 kV이었고, 상기 용액은 주사기 펌프(PHD-2000 Infusion, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)를 사용하여 0.15 mL/시간으로 공급하였다. 전기 방사된 나노섬유를 바늘끝으로부터 적절한 거리(7-10 cm)에 놓인 깨끗한 알루미늄 박 위(바닥에 연결된)에 모아 놓았다. 나노섬유를 에탄올에 담가 불태워 혼탁한 뒤 알코올이 완전히 제거될 때까지 이를 세척하였다. 도 1은 나노섬유를 에탄올 처리를 하였을 때 나노섬유가 에탄올 상에서 분산되어 표면적이 증가하는 것을 보여주고 있다.

[0027] [실시예 3] 자성 나노섬유의 제조

[0028] 도 1은 나노섬유 및 자성 나노입자-나노섬유의 준비과정을 도식적인 그림으로 나타내고 있다. 자성 나노입자는 iron oleate-complex에 쓰이는 열 분해 방식에 의해 합성된다. 나노입자의 크기는 투과 전자 현미경 이미지에 보여지듯이, 평균 지름 7 nm로 동일하다. 테트라하이드로퓨란-헥산에서 PS, PSMA, 자기적 나노입자의 2:1:0.023 무게비를 가진 균일한 혼합물은 고압 공급을 이용해 8-10 kV에서 전기 방사되었다. 자성 나노입자가 함유된 나

노섬유는 4초 안에 자석을 이용해서 포착될 수 있고, 용질로부터 쉽게 회수될 수 있다.

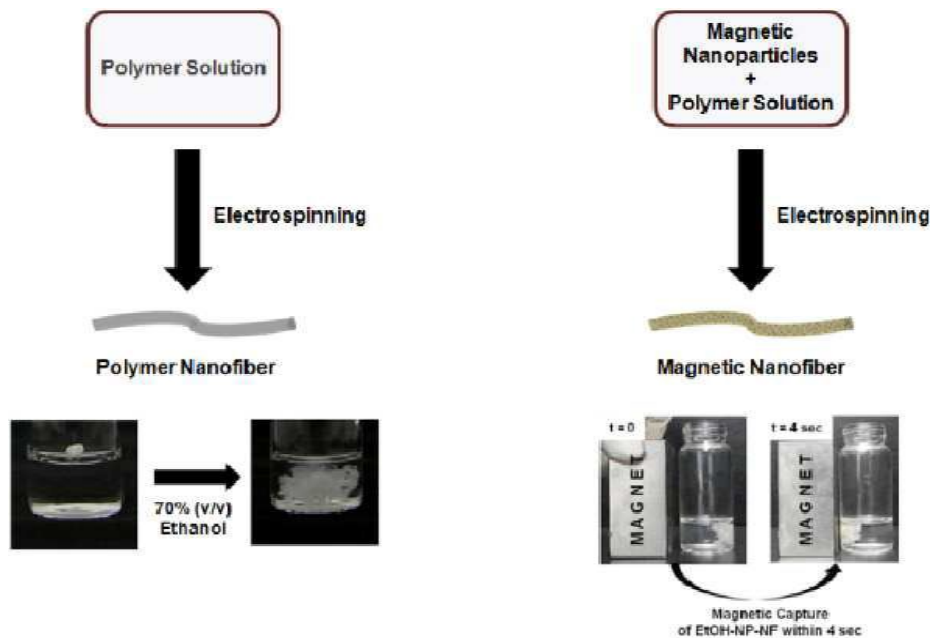
[0029] [실시예 4] 특이적 결합분자-나노섬유 복합체를 이용한 B 세포의 특이적 분리

[0030] 에탄올에 의해 분산된 나노섬유를 이용한 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체는 점진적으로 CD4⁺ T 세포와 결합할 수 있는 항-CD4 단클론 항체 및 T, resting 상태가 아닌 B 세포 등과 결합할 수 있는 항-CD43 단클론 항체와 고정된다. 생쥐로부터 수집한 림프절은 항 CD4 단클론 항체 및 항-CD43 단클론 항체와 결합된 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체와 배양되기 위해서 균질화된다. 항 CD4 단클론 항체는 림프절 세포에서 CD4 T 세포와 결합하며, 항-CD43 단클론 항체는 T세포, 자연살해세포 및 그 외의 세포와 결합하게 된다. 따라서 항 CD4 단클론 항체 및 항-CD43 단클론 항체와 결합된 나노섬유 복합체에 림프절 세포를 배양하게 되면 B세포만을 얻을 수 있게 된다[도 2a 및 2b].

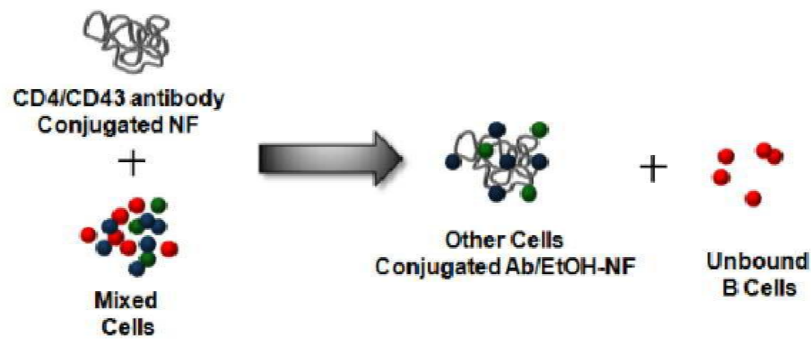
[0031] 항-CD4 단클론 항체 및 항-CD43 단클론 항체와 결합된 나노섬유 복합체에 림프절 세포를 1시간 동안 배양한 후, B세포의 분리정도를 확인하기 위해 상등액을 FACs를 통해 분석하였다. 그 결과 초기의 림프절 세포에서의 B 세포의 비율인 43%에서 76%로 증가한 것을 확인할 수 있었다[도 3]. 추가적인 최적화 실험을 진행할 경우, MACs의 분리수율인 95% 이상을 얻을 수 있을 것으로 보인다.

도면

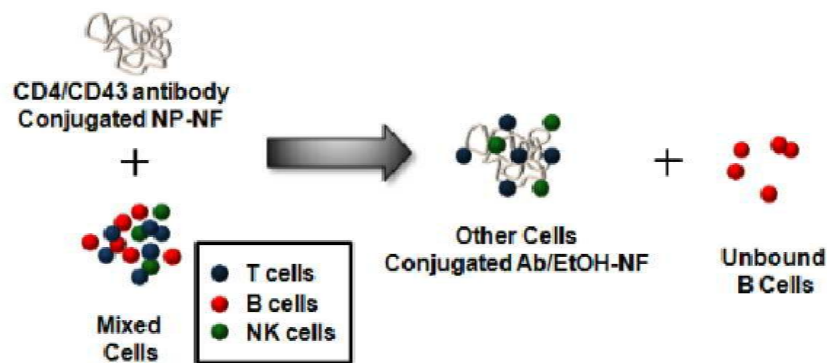
도면1



도면2a



도면2b



도면3

