

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0127023 (43) 공개일자 2012년11월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/24 (2006.01) D01D 5/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) B82Y 15/00 (2011.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0045219	(72) 발명자 이경미 서울특별시 서초구 서초1동 극동디아망아파트 101-904	
(22) 출원일자 2011년05월13일 심사청구일자 없음	김중배 서울특별시 강남구 역삼2동 래미안펜타빌@ 101동 1501호 (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인충현	

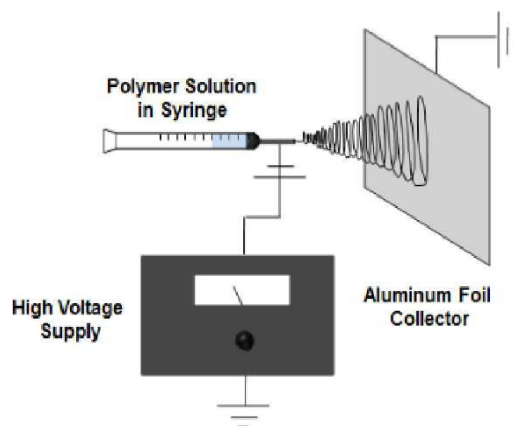
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **특이적 결합분자?나노섬유 복합체 및 이를 이용한 세포활성화 방법**

(57) 요약

본 발명은 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 및 이를 이용한 면역세포 활성화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유는 항체와 이에 대한 표적 세포의 결합 및 분리가 신속하고 사용방법이 간단하여 간편하게 사용 할 수 있을 뿐만 아니라 표적 세포를 특이적이고 효율적으로 분리할 수 있고, 특히 세포수의 소실 없이 나이브(naive)한 상태의 세포를 약 95% 이상 수득할 수 있으므로 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유는 기존의 비드를 사용한 세포분리 방법의 단점 (약 50%의 세포 손실)을 보완할 수 있는, 높은 함량의 항체 또는 앵타머가 결합된 나노섬유의 제죽, 및 간편하고 신속하며 효과적인 세포 분리에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 이렇게 분리한 세포를 이용하여 바로 활성화를 시킴으로써 세포활성 실험에 매우 간편하게 사용할 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) 고분자 용액을 전기방사하여 나노섬유를 제조하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 나노섬유에 20 내지 100%(v/v) 농도의 알코올을 처리하여, 분산된 나노섬유를 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 분산된 나노섬유에 특이적 결합분자, anti-CD4 또는 anti-CD4 항체를 혼합하여 결합시키는 단계를 포함하는, 세포분리용 특이적 결합분자-나노섬유 복합체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 따른 세포가 결합된 특이적 결합분자-나노섬유 복합체를 이용하여 세포를 체외 활성화시키는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 및 이를 이용한 면역세포 활성화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[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 증가하고 있다 [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 속도 침강법에 의해 분리할 수 있다. 한편, 감각(感作)한 세포와 미감작의 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 분류하여 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 유리세포의 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. 또한 분리한 세포를 별도의 공정과정이 없이 체외 활성화시켜 암 및 자가면역질환 환자에 적용할 수 있는 체외 나노플랫폼을 개발하는 기술은 현재 전 세계적으로 채동 단계에 있는 기술이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 특이적 결합분자-나노섬유 복합체 및 이를 이용한 면역세포 활성화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 전기방사된 나노섬유는 적은 공간에 넓은 표면적을 지니고 있으며, 내구성이 강하고, 다루기가 매우 간편하고, 다양한 형태로 제작이 가능하며 또한, 다양한 물질을 화학적으로 결합시키는 것이 용이하다는 좋은 특징을 가지고 있기 때문에 세포분리의 적용에 있어서 매우 좋은 방향의 접근을 제공한다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 세포분리와 세포활성화를 하나의 플랫폼에서 이루어질 수 있도록 고안하여 보다 간편하고 효과적인 one-step 세포 분리 및 활성화 플랫폼을 구축하였다. 나노섬유에 알코올을 처리하여 제조한 분산된 나노섬유는 섬유 사이의 공간이 증가하여 결합하는 항체의 함량이 향상되었고, 항체가 결합된 분산된 나노섬유는 항체에 대한 표적세포가 효과적이며 특이적으로 결합할 뿐만 아니라 사용이 간편하고 신속함을 확인하였다.

[0010] 또한 본 발명자는 항체의 종류에 따라 나노파이버에 결합된 면역세포의 활성화 및 서방형 방출을 조절할 수 있다는 사실을 발견하였다. 예를 들어 일반 나노섬유에 CD4 항체를 결합시켜 세포를 분리할 경우에는 나노섬유와 분리된 CD4+T 세포의 결합이 너무 강하여 활성화된 세포가 나노파이버 매트릭스 내에서 주로 머물러 있으며 매우 적은 양의 세포가 시간에 따라 서서히 방출되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 나노섬유에 CD3 항체를 결합시켜 CD3+T 세포를 분리한 후 배양하였을 때에는 CD3 항체와 면역세포 간의 친화력이 낮아 보다 빠르게 많은 양의 활성화된 면역세포가 나노섬유로부터 분리되어 나오는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0012] 1) 고분자 용액을 전기방사하여 나노섬유를 제조하는 단계;

[0013] 2) 단계 1)의 나노섬유에 20 내지 100%(v/v) 농도의 알코올을 처리하여, 분산된 나노섬유를 제조하는 단계; 및

[0014] 3) 단계 2)의 분산된 나노섬유에 특이적 결합분자를 혼합하여 결합시키는 단계를 포함하는, 세포분리용 특이적 결합분자-나노섬유 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된, 특이적 결합분자-나노섬유 복합체를 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은

[0017] 1) 상기 특이적 결합분자-나노섬유 복합체에 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 및

[0018] 2) 단계 1)의 혼합물로부터 복합체에 결합된 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유를 이용한 세포 분리 방법을 제공한다.

[0019] 3) 단계 2)의 세포가 결합된 특이적 결합분자-나노섬유 복합체를 이용하여 세포를 활성화시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유는 항체와 이에 대한 표적 세포의 결합 및 분리가 신속하고 사용 방법이 간단하여 간편하게 사용 할 수 있을 뿐만 아니라 표적 세포를 특이적이고 효율적으로 분리할 수 있고, 특히 세포수의 소실 없이 나이트(naive)한 상태의 세포를 약 95% 이상 수득할 수 있으므로 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 나노섬유는 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 세포 분리에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 이렇게 분리한 세포를 이용하여 바로 활성화를 시킴으로써 세포활성 실험에 매우 간편하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021]

도 1은 나노섬유의 제조 과정을 도식적으로 보여준다.

도 2는 실시예 3의 결과를 보여주는 것으로서, 항- CD4 또는 항 CD3 단클론 항체와 결합된 나노섬유 복합체로부터 방출된 세포의 광학 현미경 이미지이다.

도 3은 실시예 4의 결과로서, CD3 결합분자-나노섬유복합체로부터 분리된 T 세포의 시간에 따른 활성화와 증가를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022]

하기 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위해서 제시하는 것일 뿐, 이에 의해서 본 발명의 범위나 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다.

[0023]

[실시예 1] 재료의 준비

[0024]

4-니트로페닐 부틸레이트(4-nitrophenyl butyrate, 4-NPB), 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(145-2C11), CD4(GK1.5, RM4-4), CD8(53-6.7), NK1.1(PK136) 및 CD25(PC61.5) 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 and Aldrich로부터 구입하였다.

[0025]

[실시예 2] 나노섬유의 제조

[0026]

도 1에 나타난 것처럼, 폴리머 용액은 상온에서 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF)에 PS : PSMA 혼합물을 2:1 중량비로 넣고 용해를 위해 유기 용매인 테트라하이드로퓨란을 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 0.1 mL/시간으로 공급하였다. 전기방사된 나노섬유를 바늘끝으로부터 적절한 거리(7-10 cm)에 놓인 깨끗한 알루미늄 박 위(바닥에 연결된)에 모아놓았다.

[0027]

[실시예 3] 항- CD4 또는 항 CD3 단클론 항체와 결합된 나노섬유 복합체로부터 방출된 세포의 광학 현미경 이미지

[0028]

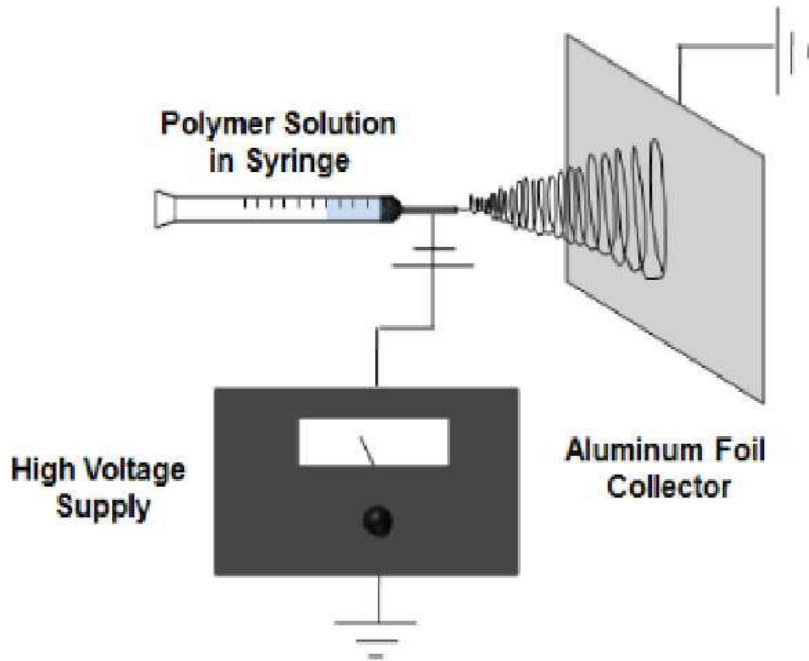
도 2에 나타난 것과 같이, 특이적 결합분자-나노섬유 복합체에 결합된 세포는 광학 현미경으로 사진을 찍기 위해 7일간 항- CD3 단클론 항체 1mg/ml 항 CD28 단클론 항체 1 mg/mL와 배양되었다. 다음으로 CD4 및 CD3 나노입자- 나노섬유에 부착된 세포가 활성화되거나, 스캐폴드로부터 방출될 수 있는지에 대한 실험을 진행했다. 부착된 T 세포는 항체- 매개 수용체 교차반응에 의해 T 세포 수용체/CD3 복합체와 보조 자극제 CD28의 자극을 통해 T 세포의 활성화를 이끄는 항 CD3, 항 CD28 1 mg/mL의 첨가로 활성화될 수 있다. 하지만, 용해성의 항 CD3, 항 CD28 단클론 항체의 존재하에서 세포와 CD4 결합분자-나노섬유 복합체는 7 일간 배양되었을 때, 대부분의 세포는 CD4 결합분자-나노섬유에 부착되어 배양 배지에서 적은 세포들이 수집되었다. 대조적으로 CD3 결합분자-나노섬유 복합체는 7 일간 배양하였을 때, 세포가 CD3 결합분자-나노섬유 복합체로부터 분리되어 나오는 것이 관찰되었으며, 현미경 상에서 더욱 활성화되어있는 형태를 보여주었다.

[0029] [실시예 4] CD3 결합분자-나노섬유복합체로부터 분리된 T 세포의 시간에 따른 활성화와 증가

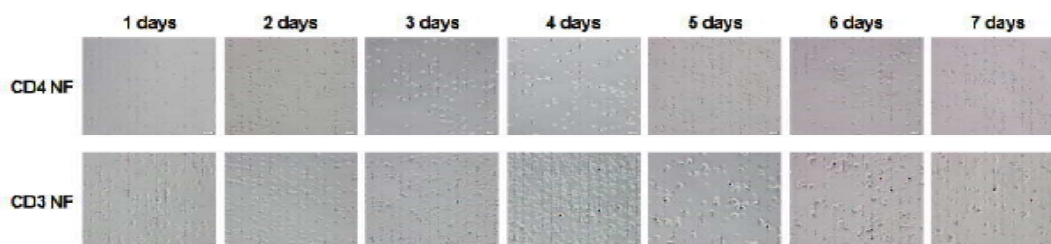
[0030] CD3 결합분자-나노섬유복합체로부터 방출된 T 세포의 활성화 정도를 확인하기 위하여 7 일간 배양 후 세포의 활성화 마커인 CD25 수준을 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 것과 같이, CD3 결합분자-나노섬유복합체로부터 분리된 T 세포의 활성화 마커인 CD25의 수준이 매우 올라가 있는 것을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

