



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0077124
(43) 공개일자 2019년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 47/69 (2017.01)
C07K 14/47 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
A61K 47/6923 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2019-7018256(분할)

(22) 출원일자(국제) 2012년10월22일
심사청구일자 2019년06월24일

(62) 원출원 특허 10-2014-7010620
원출원일자(국제) 2012년10월22일
심사청구일자 2016년11월16일

(85) 번역문제출일자 2019년06월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/061391

(87) 국제공개번호 WO 2013/059831
국제공개일자 2013년04월25일

(30) 우선권주장
61/550,213 2011년10월21일 미국(US)

(71) 출원인
스텝제닉스 인코포레이티드
미국 워싱턴주 98103 시애틀 스위트 100, 454 노스 34번가

(72) 발명자
애프리키언 앤드라닉 앤드류
미국 98028 워싱턴주 켄모어 노스이스트 200 플레이스 5619
딜 킬리언
미국 98121 워싱턴주 시애틀 웨스턴 애비뉴 3131 스위트 526

(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **생물학적 활성 분자의 세포내 전달을 위한 작용화 나노입자**

(57) 요약

세포 기능을 조정하기 위한 복수의 생물활성 분자를 세포내 전달할 수 있고 포유동물 세포막을 관통할 수 있는 작용화 생체적합성 나노입자가 본원에 개시된다. 작용화 생체적합성 나노입자는 하기를 포함한다: 크기 범위가 약 5 내지 약 50 nm 인 중심의 나노입자로서, 그에 중합체 코팅을 갖는 중심의 나노입자, 중합체 코팅에 공유 부착된 복수의 작용기로서, 이때 복수의 생물활성 분자가 복수의 작용기에 부착되고, 복수의 생물활성 분자는 하나 이상의 펩티드 및 단백질을 포함하고, 펩티드는 포유동물 세포막을 관통해 세포 내로 진입할 수 있고, 단백질은 세포 내에 새로운 작용성을 제공할 수 있는, 복수의 작용기. 단백질은 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, cMyc, 및 Klf4 로 이루어진 군으로부터 선택된 전사 인자일 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6939 (2017.08)

C07K 14/4702 (2013.01)

G01N 33/54353 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

C07K 2319/60 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세포 기능을 조정하기 위한 하나 이상의 생물활성 (bioactive) 분자를 포유동물의 세포막을 관통하여 세포 내로 전달하기 위한 작용화 생체적합성 나노입자로서, 상기 작용화 생체적합성 나노입자는:

크기 범위가 5 내지 50 nm 이고, 그에 중합체 코팅을 갖는 중심 나노입자 및

상기 중합체 코팅에 공유결합으로 부착된 하나 이상의 작용기를 포함하고,

상기 하나 이상의 생물활성 분자는 상기 하나 이상의 작용기에 부착되고,

상기 하나 이상의 생물활성 분자는 상기 포유동물의 세포막을 관통하여 상기 세포 내로 진입하기 위한 하나 이상의 세포 관통 펩티드 및 상기 세포 내 세포 기능을 조정하기 위한 하나 이상의 전사 인자를 포함하고,

각각의 상기 세포 관통 펩티드는 상기 중합체 코팅에 공유결합으로 부착된 첫 번째 작용기에 첫 번째 링커 분자를 통해 부착되고,

각각의 상기 전사 인자는 상기 중합체 코팅에 공유결합으로 부착된 두 번째 작용기에 두 번째 링커 분자를 통해 부착되고,

각각의 세포 관통 펩티드는 각각의 상기 전사 인자로부터 독립적으로 상기 나노 입자에 부착되는, 작용화 생체적합성 나노입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 나노입자가 철을 포함하는, 작용화 생체적합성 나노입자.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 하나 이상의 상기 세포 관통 펩티드가 5 내지 9 개의 염기성 아미노산을 포함하는, 작용화 생체적합성 나노입자.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 하나 이상의 상기 세포 관통 펩티드가 9 개 이상의 염기성 아미노산을 포함하는, 작용화 생체적합성 나노입자.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 하나 이상의 상기 전사 인자가 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, cMyc, 및 Klf4 로 이루어진 군으로부터 선택되는, 작용화 생체적합성 나노입자.

청구항 6

유효량의 제 1 항의 작용화 생체적합성 나노입자를 세포에 투여하고, 세포 내 세포 작용성을 변경하는 것을 포함하는, 분리된 포유동물의 세포 내 세포 작용성의 변경 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 세포 작용성의 상기 변경이 세포의 물리-화학적 특성의 변경을 포함하는, 분리된 포유동물 세포 내 세포 작용성의 변경 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 세포 작용성의 상기 변경이 상기 세포의 증식 특성의 변경을 포함하는, 분리된 포유동물 세포 내 세포 작용성의 변경 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 세포 작용성의 상기 변경이 상기 세포의 생존능의 변경을 포함하는, 분리된 포유동물 세포 내 세포 작용성의 변경 방법.

청구항 10

제 6 항에 있어서, 상기 세포 작용성의 상기 변경이 상기 세포의 형태적 표현형 특성의 변경을 포함하는, 분리된 포유동물 세포 내 세포 작용성의 변경 방법.

청구항 11

제 6 항에 있어서, 상기 세포 작용성의 상기 변경이, 줄기 세포 또는 보다 분화된 세포 유형을 비롯한 새로운 세포 유형을 생성하도록 하는 세포의 획득된 능력과 관련된, 분리된 포유동물 세포 내 세포 작용성의 변경 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 첫 번째 링커 분자가 상기 두 번째 링커 분자와 다른 길이를 갖는, 작용화 생체적합성 나노입자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 모든 목적을 위해 본원에 그 전문이 참조로서 포함되어 있는 미국 가출원 제 61/550,213 호 (2011년 10월 21일 출원) 의 이점을 우선권 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 유기 합성 및 나노생명공학, 더욱 특히 세포 기능의 조절을 위해 생물활성 분자를 세포로 전달하기 위한 작용화 나노입자, 및 이와 관련된 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 다양한 유전성 질환 또는 후천성 질환에서 조혈계 및/또는 심혈관계 세포를 포함하는 (이에 한정되지는 않음) 세포가 정상적으로 증식하고, 이동하고 다양한 세포형으로 분화하는 능력은 배발생 및 성숙 세포의 기능에서 결정적인 것이다. 줄기 세포 및/또는 더욱 분화된 특정 세포 유형의 이러한 작용성 능력은 다양한 병리학적인 병태에서 변경되나, 이는 생물학적 활성 성분의 세포내 도입시 정상화될 수 있다. 예를 들어, 골수 줄기 세포/조상 세포의 호중구로의 분화 및/또는 생존 손상과 같은 비정상 세포 기능은, 생명에 위협적인 중증 감염을 앓고 있고 급성 골수성 백혈병 또는 다른 악성물로 진행될 수 있는 주기성호중구감소증 또는 중증 선천성 백혈구감소증을 앓고 있는 환자에서 관찰된다 [Aprikyan et al, Impaired survival of bone marrow hematopoietic progenitor cells in cyclic neutropenia. Blood, 97, 147 (2001); Goran Carlsson et al, Kostmann syndrome: severe congenital neutropenia associated with defective expression of Bcl-2, constitutive mitochondrial release of cytochrome C, and excessive apoptosis of myeloid progenitor cells. Blood, 103, 3355 (2004)]. 유전적 장애 또는 후천적 장애, 예컨대 선천적 호중구감소증 또는 바스 증후군 (Barth syndrome) 은 다양한 유전자 돌연변이에 의해 촉발되며 이는 환자의 혈액 세포 및/또는 심장 세포의 생산 결핍 및 기능 결핍으로 인한 것이며, 이로 인해 백혈구감소증, 심근증 및/또는 심부전이 야기된다 [Makaryan et al., The cellular and molecular mechanisms for neutropenia in Barth syndrome. Eur J Haematol. 88: 195-209 (2012)]. 중증 선천적 호중구감소증 질병 표현형은 호중구 엘라스타아제 유전자, HAX1 유전자, 또는 Wiskott-Aldrich 증후군 단백질 유전자에서의 상이한 치환, 결손, 삽입 또는 절단 돌연변이에 의해 야기될 수 있다 [Dale et al, Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. Blood. 96:2317-2322 (2000); Devriendt et al, Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. Nat Genet. 27:313-7 (2001); Klein et al, HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease) Nat Genet. 39:86-92 (2007)].

- [0006] 미토콘드리아 TAZ 유전자에서 기능손실 돌연변이에 의해 유도되는 것으로 추정되는 다중시스템 줄기 세포 장애 인 바스 증후군과 같은 다른 유전성 질환은, 백혈구감소증과 연계되어 있으며 (혈액 호중구의 수준이 감소됨), 이는 재발성 중증 감염 및 종종 생명에 위협적인 치명적인 감염 및/또는 심근증을 야기할 수 있으며, 이는 심장 이식에 의해서 해결될 수 있는 심부전을 야기할 수 있다. 대부분의 경우, 돌연변이체 유전자 산물 (유전적 또는 후천적 인간 질병의 진행 및 발병학과 관련) 은 별개의 세포 내 사건에 영향을 미치며, 이는 비정상 세포 기능을 초래하고 특정 질병의 표현형을 야기한다.
- [0007] 과립성 백혈구 콜로니-자극 인자 (G-CSF) 를 갖는 이들 환자의 치료는, 세포 표면 상에 위치한 G-CSF 수용체 분자에서 형태학적 변화를 유도하며, 이는 후속적으로 세포 내 사건의 사슬을 촉발하며, 결과적으로 호중구의 생산을 정상 수준 가까이 회복시키고 환자의 삶의 질을 개선시킨다 [Welte and Dale. Pathophysiology and treatment of severe chronic neutropenia. Ann. Hematol. 72, 158 (1996)]. 그럼에도 불구하고, G-CSF 로 치료된 환자는 백혈병이 진행될 수 있다 [Aprikyan et al., Cellular and molecular abnormalities in severe congenital neutropenia predisposing to leukemia. Exp Hematol. 31, 372 (2003); Philip Rosenberg et al, Neutrophil elastase mutations and risk of leukaemia in severe congenital neutropenia. Br J Haematol.140, 210 (2008); Peter Newburger et al, Cyclic Neutropenia and Severe Congenital Neutropenia in Patients with a Shared ELANE Mutation and Paternal Haplotype: Evidence for Phenotype Determination by Modifying Genes. Pediatr.Blood Cancer, 55, 314 (2010)] (이는 대안적인 신규 접근법이 왜 연구되었는지에 대한 것임).
- [0008] 세포내 이벤트는 뚜렷하게 작용화된 나노입자를 사용하여 상이한 생물학적 활성 분자의 세포내 전달할 때, 보다 효과적으로 영향을 받으며 조절될 수 있다. 이들 생물활성 (bioactive) 분자는 세포 기능을 정상화시킬 수 있거나 필요시 원치않는 세포를 제거할 수 있다. 그러나, 세포막은 외인성 자극에 의해 영향받는 것으로부터 세포내 이벤트의 캐스케이드를 보호하는 활성 배리어로서 역할한다.
- [0009] 따라서, 세포막을 관통할 수 있고 관심사인 세포내 이벤트를 발생시킬 수 있는 새로운 유형의 생물활성 분자에 대한 필요성이 당업계에 존재한다. 본 발명은 이러한 필요를 충족시키며 추가적인 관련 이점을 제공한다.

발명의 내용

- [0010] 발명의 개요
- [0011] 일부 구현예에서 본 발명은 세포 기능을 조정하기 위한 생체적합성 나노입자에 단백질 및/또는 펩티드를 연결하는 작용화 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 작용화된 생체적합성 나노입자 자체에 관한 것이다.
- [0012] 한 구현예에서, 세포 기능을 조정하기 위한 복수의 생물활성 분자를 세포내 전달할 수 있고 포유동물 세포막을 통해 관통할 수 있는 작용화된 생체적합성 나노입자는 하기를 포함한다: 크기가 5 내지 50 nm 이고 그에 코팅된 중합체를 갖는 중심의 나노입자 (central nanoparticle), 중합체 코팅에 공유 결합된 복수의 작용기 (이때, 복수의 생물활성 분자는 복수의 작용기에 부착되고, 복수의 생물활성 분자는 하나 이상의 펩티드 및 단백질을 포함하고, 펩티드는 포유동물 세포막을 통해 관통할 수 있고 세포 내로 진입할 수 있으며, 단백질은 세포 내에서 새로운 작용성을 제공할 수 있음).
- [0013] 중심의 나노입자는 철을 포함할 수 있으며 자성일 수 있다. 본 발명의 펩티드는 단백질에 부착될 수 있다 (나노입자에 부착되는 바와 반대로). 펩티드 및 단백질은 각각 하나 이상의 개재 (interposing) 링커 분자에 의해 나노입자에 부착될 수 있다. 일부 구현예에서 펩티드는 5 내지 9 개의 염기성 아미노산을 포함할 수 있는 한편, 다른 구현예에서 펩티드는 9 개 이상의 염기성 아미노산을 포함한다. 단백질은 예를 들어 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, cMyc 및 Klf4 로 이루어지는 군에서 선택되는 전사 인자와 같은 전사 인자일 수 있다.
- [0014] 또 다른 양상에서, 본 발명은 포유동물 세포 내의 세포 작용성을 변경시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 신규 방법은 유효량의 작용화된 생체적합성 나노입자를 세포에 투여하고, 세포 내 세포 작용성을 변경시키는 것을 포함한다. 세포 작용성의 변경은 세포의 물리화학적 특성의 변경, 세포의 증식 특성의 변경, 세포의 생존 능력의 변경 또는 세포의 형태적 표현형 특성의 변경을 포함할 수 있다. 세포 작용성 변경은 줄기 세포 또는 보다 특수화된 세포 유형을 포함하는 새로운 세포 유형이 생성되도록 하는 세포의 획득된 능력을 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 이들 양상 및 기타 양상은 하기의 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조로 하여 보다 명백해질 것이다. 그러나 본질적 취지 및 범주에서 벗어나지 않고, 다양한 변화, 변경 및 대체가 본원에 개시된 특정 구현예에 가해질 수 있다는 것이 이해된다. 마지막으로, 본원에 인용된 다양한 참고문헌 모두는 참조로 본원에 명백히 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1 은 본 발명의 구현예에 따른 나노입자에 펩티드 및 단백질 분자를 동시에 부착시키는 것을 기반으로 하는 나노입자의 다단계 작용화 모식도를 나타낸다.

도 2A 는 본 발명의 구현예에 따른 아민기를 함유하는 나노입자와 등몰비의 장쇄 LC1-SPDP 및 요오도아세트산 나노입자와의 반응을 나타낸다.

도 2B 는 본 발명의 구현예에 따른 자유 SH 기 나노입자가 제공되도록 하는 PDP 의 디숄파이드 결합의 환원을 나타낸다.

도 2C 는 본 발명의 구현예에 따른 단백질 나노입자의 리신기와 장쇄 LC1-SMCC 와의 반응을 나타낸다.

도 2D 는 본 발명의 구현예에 따른 말단 반응성 말레이미드기 나노입자를 함유하며 SMCC 와 반응한 단백질과 다작용성 나노입자와의 반응을 나타낸다.

도 2E 는 펩티드의 아미노기와 LC2-SMCC 와의 반응을 나타낸다. 본 발명의 구현예에 따라 상기 반응 이후 메르캅토에탄올과의 반응이 이어져 말단 말레이미드가 알코올 나노입자로 전환된다.

도 2F 는 본 발명의 구현예에 따른 나노입자 위의 자유 카르복실 기에 대한 개질된 펩티드와 기능성 비드 (및 부착된 단백질) 와의 반응을 나타낸다.

도 3A 는 본 발명의 구현예에 따른 LC1-SPDP 나노입자와 아민 기를 함유하는 나노입자와의 반응을 나타낸다.

도 3B 는 본 발명의 구현예에 따른 자유 SH 기 나노입자를 제공하도록 하는 PDP 의 디숄파이드 결합의 환원을 나타낸다.

도 3C 는 본 발명의 구현예에 따른 단백질 나노입자의 리신 기와 장쇄 LC2-SMCC 와의 반응을 나타낸다.

도 3D 는 본 발명의 구현예에 따른 말단 반응성 말레이미드 기 나노입자를 함유하며 SMCC 와 반응한 단백질과 다작용성 나노입자와의 반응을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 이들 및 기타 양상은 하기 상세한 설명과 첨부된 도면을 참조할 때 통상의 기술자에게 더욱 명백해질 것이다.

[0018] 발명의 상세한 설명

[0019] 생물 활성 분자를 세포 내로 전달하기 위해, 본 발명의 발명자들은 공유 결합된 생물 활성 분자를 갖는 세포 막-관통성 나노입자에 기반하는 범용 장치를 제시한다. 이러한 목적을 위해, 본 발명의 발명자들은 본원에서 나노입자에 단백질 및 펩티드를 공유 결합시킬 수 있는 신규한 작용화 방법을 제시한다. 본 발명의 개질된 세포-투과성 나노입자는 세포 기능 조절 및/또는 정상화를 위해 생물 활성 분자를 세포내 전달하는 범용 메커니즘을 제공한다.

[0020] 각종 선천적 또는 후천적 질환에서의 조절 및 심혈관계의 줄기/전구 (progenitor) 및 더욱 분화된 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는, 세포의 정상적 증식, 이주 및 다양한 세포 유형으로의 분화 능력은 배발생 및 성숙 세포의 기능에서 매우 중요하다. 줄기 세포 및/또는 더욱 분화된 특수화된 세포 유형의 이러한 기능적 능력은 다양한 병리 상태에서 세포내 이벤트의 비정상적 변경으로 인해 변경되나, 생물 활성 성분의 세포내 도입시 정상화될 수 있다. 예를 들어, 중증 생명 위협적 감염을 겪는 백혈병으로 진행할 수 있는 주기성 또는 중증 선천적 호중구감소증 환자에서 관찰되는 인간 골수 전구 세포의 감소된 생존 및 호중구로의 분화는, 비정상적 세포내 이벤트를 간섭하고 정상 표현형을 명백히 복구하는, 호중구 엘라스타제 세포 막-침투성 소분자 저해인자에 의해 정상화될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 질환을 야기하는 표적 돌연변이 산물에 특이적인 그러한 소분자는 입수하기가 매우 힘들며, 이것이 세포 기능 조정 능력을 갖는 생물 활성 분자의 세포내 전달을 위한 대

안적인 효율적 세포 막-관통성 장치가 필요한 이유이다.

- [0021] 본원에 공개된 방법은, 예를 들어, 이전에 과학 문헌에 기재된 것들과 유사한 초상자성 (superparamagnetic) 산화 철 입자를 포함하는, 생체적합성 나노입자를 이용한다. 이러한 유형의 나노입자는 임상 현장에서 골수 세포, 림프절, 비장 및 간의 자기 공명 영상화를 위해 사용될 수 있다 [예를 들어, Shen et al, Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION); physicochemical properties. Magn. Reson. Med., 29, 599 (1993); Harisinghani et. al, MR lymphangiography using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in patients with primary abdominal and pelvic malignancies. Am. J. Roentgenol. 172, 1347 (1999) 참조]. 이들 자성 산화 철 나노입자는 가교된 텍스트란으로 코팅된 ~5 nm 핵을 함유하고, 전체 입자 크기가 ~45 nm 이다. 중요하게, 가교된 세포 막-투과성 Tat-유래 펩티드를 함유하는 이들 나노입자가 조혈 및 신경 전구 세포 내로 세포 1 개 당 초상자성 철 나노입자 30 pg 이하의 양으로 효율적으로 내부화한다는 사실이 입증되었다 [Lewin et al, Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. Nat. Biotechnol. 18, 410 (2000)]. 게다가, 나노입자 함유는 골수-유래 CD34+ 원시 전구 세포의 증식 및 분화 특성 또는 세포 생존력에 영향을 미치지 않는다 [Maite Lewin et al, Nat. Biotechnol. 18, 410 (2000)]. 이들 나노입자는 생체 내에서 라벨링된 세포를 추적하기 위해 사용될 수 있다.
- [0022] 라벨링된 세포는 그들의 분화 능력을 보유하고, 또한 조직 샘플 내에서 자기 공명 영상화를 사용하여 탐지될 수 있다. 본원에서 본 발명의 발명자들은 표적 세포내 이벤트를 표적화하고 세포 기능 및 특성을 조정하는 세포 재프로그래밍 해법에서 생물 활성 분자의 세포내 전달을 위한 우수한 비히클로서 작용할 수 있는 펩티드 및 단백질을 운반하도록 작용화된 신규한 나노입자-기반 장치를 제시한다.
- [0023] 나노입자-펩티드/단백질 컨쥬게이트의 일반적인 상세사항:
- [0024] X/Y 작용기를 이용한 생체적합성 코팅 (예를 들어, 텍스트란 다당류) 에, 다양한 길이의 링커가 결합되어 있고, 이에 따라 상기 X/Y 작용기를 통해 단백질 및/또는 펩티드 (또는 여타 소형 분자들) 가 공유 결합되어 있는 철 또는 여타 재료 기재의 나노입자.
- [0025] 다양한 길이의 링커가 결합되어 있는 X/Y 작용기, 이에 따라 그 X/Y 작용기를 통해 단백질 및/또는 펩티드 (또는 여타 소형 분자들) 이 공유결합되는 상기 X/Y 작용기를 이용한 생체적합성 코팅 (예를 들어, 텍스트란 다당류) 을 함유하는 철 또는 여타 재료 기재의 나노입자.
- [0026] 가교에 이용될 수 있는 작용기에는 하기의 것이 포함된다:
- [0027] -NH₂ (예를 들어, 리신, α-NH₂);
- [0028] -SH,
- [0029] -COOH,
- [0030] -NH-C(NH)(NH₂),
- [0031] 탄수화물,
- [0032] -히드록실 (OH),
- [0033] - 링커 상의 아지도기의 광화학을 통한 결합.
- [0034] 가교제는 하기의 것을 포함할 수 있다:
- [0035] SMCC [숙신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸) 시클로hex산-1-카르복실레이트]. 아미노 및 티올기를 가교하기 위한 술포숙신이미딜 유도체인 Sulfo-SMCC 도 이용가능하다.
- [0036] LC-SMCC (장쇄 SMCC). 또한 Sulfo-LC-SMCC.
- [0037] SPDP [N-숙신이미딜-3-(피리딜티오)-프로프리오네이트] 또한, Sulfo-SPDP. 아민과 반응하여 티올기 제공.
- [0038] LC-SPDP (장쇄 SPDP). 또한 Sulfo-LC-SPDP.
- [0039] EDC [1-에틸 히드록로라이드-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드] -COOH 기를 -NH₂ 기로 연결하기

위해 이용되는 시약.

- [0040] SM(PEG)_n, 여기서 n=1, 2, 3, 4,.....24 글리콜 단위체. 또한 Sulfo-SM(PEG)_n 유도체.
- [0041] SPDP(PEG)_n, 여기서 n=1, 2, 3, 4,.....12 글리콜 단위체. 또한 Sulfo-SPDP(PEG)_n 유도체.
- [0042] 카르복실 및 아민기를 모두 포함하는 PEG 분자.
- [0043] 카르복실 및 술폰히드릴기를 모두 포함하는 PEG 분자.
- [0044] 캡핑 및 블로킹제는 하기를 포함한다:
- [0045] 시트라콘산 무수물 --- NH 에 특이적임
- [0046] 에틸 말레이미드 --- SH 에 특이적임
- [0047] 메르캅토포에탄올 --- 말레이미드에 특이적임
- [0048] 상기의 관점에서, 생체적합성 나노입자를 처리하여 표면 상에 작용성 아민을 제공하고, 이어서 단백질 및 짧은 펩티드를 화학적으로 결합하는데 이용했다.
- [0049] 단백질 결합의 경우, 예를 들어 녹색 형광 단백질 또는 전사 인자를 초상자성 또는 대안적으로 나노입자에 결합 시키는 경우, 하기의 프로토콜이 이용될 수 있다: 외부에 아미노 작용기를 포함하는 초상자성 비드가 다양한 제조사로부터 시판되어 구입가능하다. 이들은 크기가 20 내지 50 nm 범위일 수 있고, 나노입자 당 10 개 이상의 아민기가 있는 10¹⁵ 내지 10²⁰ 개의 나노입자가 ml 당 존재할 수 있다. 나노입자는 분자량 컷오프가 10,000 달톤인 Amicon 원심분리 여과 단위체 (마이크로컬럼) 을 이용하여 올바른 반응 완충액 (0.1 M 의 포스페이트 완충액, pH 7.2) 에 넣는다. 적절한 완충 시스템을 보장하기 위해서는 보통 약 4 회의 세정이 필요하다. 제조사에서 권장한 바와 같이 필터 단위체로부터 나노입자를 제거한다 (저속에서 스피닝하여 컬럼/필터 기기를 반전시킴).
- [0050] SMCC (Thermo Fisher 사 제조) 를 1 mg/ml 농도로 ACROS (밀봉된 바이알이며 무수성) 로부터 입수되는 디메틸 포름아미드 (DMF) 에 녹였다. 시료를 밀봉하고, 거의 즉시 이용한다.
- [0051] 10 마이크로리터의 용액을 200 마이크로리터 부피 중의 나노입자에 첨가한다. 이는 존재하는 이용가능한 아민기에 과량의 SMCC 를 제공하게 되며, 반응이 1 시간 동안 진행되도록 한다. 과량의 SM 및 DMF 는 컷오프가 3,000 달톤인 Amicon 원심분리 필터 컬럼을 이용해 제거할 수 있다. 적절한 완충액 교환을 보장하기 위해 보통 5 회의 등부피 교환이 필요하다. 과량의 SMCC 는 본 단계에서 제거되어야 한다는 점이 중요하다.
- [0052] 예를 들어 시판되어 입수가 가능한 녹색 형광 단백질 (GFP) 또는 정제된 재조합 GFP 또는 여타 단백질과 같은, 임의의 펩티드 기체의 분자를 -30 °C 에서 냉동한 특정양의 에틸렌 글리콜을 포함하는 용액에 첨가한다. 14 마이크로리터 중의 단백질 3 마이크로그램에, PBS 중의 10 마이크로리터의 새로 제조한 DTT (디티오프레이트, Cleland's 시약) 용액을 세계 볼텍싱 (vortexing) 시키며 첨가한다. 단백질은 일반적으로 1 개 초과분의 시스테인을 포함하기 때문에, 상이한 GFP 분자들을 가교시키는 경향이 있다. 따라서, 과량의 DTT 는 디티올 연결 및 유리된 GFP 를 환원시킨다. 반응을 2 시간 동안 4°C 에서 진행되도록 하고, 이어서 3,000 MW 컷오프의 Amicon 원심분리 필터 단위체로 과량의 시약을 제거한다.
- [0053] 활성화된 나노입자 및 단백질 용액을 결합하고, 두 시간 동안 반응시키고, 이후 반응하지 않은 단백질을 적절한 MW 컷오프 (GFP 를 사용하는 예에서, 이는 50,000 달톤 컷오프임) 를 갖는 Amicon 원심분리기 유닛에 의해 제거한다. 샘플을 -80°C 에서 저장한다. Amicon 회전 여과 컬럼을 사용하는 대신, 고체 크기 필터링 성분을 함유하는 작은 회전 컬럼, 예를 들어 Bio Rad P 컬럼이 또한 사용될 수 있다. 이들은 크기 배제 컬럼이다. SMCC 가 또한 술폰 유도체 (Sulfo-SMCC) 로서 구입되어, 이를 보다 수용성으로 만들어 줄 수 있다는 점에 또한 주목해야 한다. DMSO 는 또한 라벨링 시약을 위한 용매 담체로서 DMF 에 대해 치환될 수 있고; 또한, 이는 무수이어야 한다.
- [0054] 모든 다른 가교제는 유사한 방식으로 적용될 것이다. SPDP 는 또한 SMCC 와 동일한 방식으로 단백질/적용가능한 펩티드로 적용된다. 이는 DMF 에서 쉽게 용해될 수 있다. 디티올은 1 시간 이상 동안 DTT 와의 반응에 의해 제공된다. 부산물 및 반응하지 않은 물질의 제거 후, 3,000 MW 컷오프를 갖는 Amicon 원심분리기 컬럼을 사용하여 정제한다.

- [0055] 펩티드 및 단백질로 나노입자를 라벨링하는 또 다른 더 직접적인 그리고 제어된 방법은 두 개의 상이한 이관능성 커플링화제를 사용하는 것이다. 반응 순서는 도 1 의 순서와 다소 유사하다. 요오드아세트산은 나노입자 표면 상에서 "카르복실" 기의 선택 수를 도입하기 위해 사용된다.
- [0056] LC-SMCC 를 함유하는 펩티드는 아미노메르캅토에탄올로 처리한다. 이는 술폰히드릴 기를 통해서 연결을 만들고, 유리 아미노 기를 제공한다. 상기 아미노 기는 그 후 EDC 를 사용하여 나노입자 상에서 커플링된다. EDC 는 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필] 카르보디이미드 하이드로클로라이드로서 공지되어 있다. 상기 커플링 단계를 반응식 중 마지막에 수행한다.
- [0057] 도 1 은 자기 나노입자---단백질/펩티드 부가물의 일반적인 설명을 나타낸다. 자기 나노입자는 다당류로 코팅되고, 그 후 작용화된다. 이는 표면 상에서 아민을 가진채로 구입될 수 있다. 이들은 또한 임의의 다른 작용 형태로 바뀌거나/변경될 수 있다. 연장제/커넥터는 물리적으로 두 개의 유닛 서로간에 결합한다.
- [0058] 가교 반응을 통해서 나노입자를 단백질에 화학적으로 부착하기 위해 다양한 작용기기가 사용될 수 있다. 이 용가능한 다양한 작용기는 점진적으로 나노입자에 부착될 많은 단백질/펩티드를 허용한다.
- [0059] 유사하게, 다양한 가교제 또는 반응성 촉매는 헤테로-이관능성 시약을 통해서 나노입자를 단백질/펩티드와 가교시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 가교제가 다양한 길이를 갖는다는 점에 또한 주목해야 한다. 예를 들어, 대부분은 연장제 또는 "장쇄" 로 지칭되는 LC 노테이션을 함유한다. 폐길화 화합물은 또한 다양한 길이로 이용가능하다. 이러한 방식으로, 다양한 길이의 링커는 나노입자로 첨가될 수 있고, 큰 분자, 예를 들어 단백질 및 작은 분자, 예를 들어 펩티드에 대해 상이한 부착 길이를 제공한다.
- [0060] 시간 차 (time different) 단백질은 흔히 동일한 작용기를 함유하여, 다양한 단백질을 갖는 나노입자를 라벨링하는 것을 어렵게 만들 수 있다. 작용기에 대해서 변화를 하게 해주는 시약이 존재하고; 따라서 본 발명자들은 단백질 상에서 작용기를 변화시킬 수 있고, 그에 따라 다른 단백질로부터의 간섭 없이 단계적인 방식으로 선택성을 본 발명자들에게 제공한다. 이는 단백질 상에서 작용기를 변화시키는 것을 필요로 한다.
- [0061] 작용기와 같이 단백질에 부착하기 위해 상이한 화학물질이 사용될 수 있도록 다양한 시약이 단백질을 변경하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, SPDP 와 같은 화합물은 아민을 술폰히드릴로 전환하기 위해 사용될 수 있고, 이는 그 후 말레이미드 부분과의 반응에 대하여 수용성을 갖는다.
- [0062] 단계적인 방식으로 단백질을 비드 (나노입자) 에 부착하는 경우에, 종종 사전에 부착된 단백질의 잔류물 및 활성 기는 커플링 화학물질을 간섭할 수 있다. 따라서, 영구적이거나 또는 가역적인 캡핑된 시약은 나노입자에 2차 또는 3 차 단백질을 부착하기 위해 사용하고자 하는 시약의 간섭으로부터 이들 활성 부분을 차단하기 위해 사용될 수 있다.
- [0063] 많은 상이한 캡핑된 화합물이 반응하지 않는 부분을 차단하기 위해 사용될 수 있다. 이들은 단백질 활성을 간섭할 수도 있는 캡핑된 화합물로서 적절하게 사용될 필요가 있다. 2 차 화학적 부착 단계가 필요한 경우가 흔히 사용되고, 상기 작용기가 간섭할 것이다.
- [0064] 상기 언급한 화학물질을 사용하여 단백질이 비드 (나노입자) 에 부착할 수 있다는 것을 나타내기 위하여, 본 발명자들은 자기 나노입자의 합성을 제공하고, 이는 해파리로부터 유래된 녹색 형광 단백질을 함유하였다. LCC-SMCC 를 본 합성 식에서 사용하였다.
- [0065] 화학적 결합을 형성하기 위해 N-히드록시숙신이미드를 나노 입자 상에서 유리 아미 기와 화학적으로 반응시킨다. 이는 GFP 와 반응할 수 있는 말레이미드 말단기를 제공한다. GFP 가 두 개의 시스테인을 갖고, 다양한 GFP 분자로부터의 시스테인은 반응하여 디설파이드 결합을 형성할 수 있다는 것이 공지되어 있다. 상기 간섭을 제거하기 위해, 분자는 우선 클리랜드 (Cleland's) 시약으로 환원된다.
- [0066] 단백질을 정제한 후, LC-말레이미드기를 포함하는 비드와 반응시킨다. 반응을 1 시간 동안 진행시키고, Amicon 스핀 필터 (50K 컷오프) 에서 반응물을 정제하였다. 형광 전자 현미경으로 사진을 찍었다.
- [0067] 다유형의 작용기를 나노입자 상에 만들 수 있다. 이는 부착되는 3 개 이상의 상이한 단백질의 첨가를 가능하게 한다.
- [0068] 우선, 표면 상의 아민으로 개시한다.
- [0069] Traut 시약을 이들 아민의 일부를 술폰히드릴로 전환시키는데 사용할 수 있다. 추가로, 요오도아세트산을

일부 아민을 카르복실산으로 전환시키는데 사용할 수 있다.

- [0070] 단백질 및 펩티드 둘 모두를 위해, 아민을 하기에 더 상세히 기재된 바와 같은 상이한 링커를 갖는 작용기로 전환시킨다. 이는 단백질 및 펩티드를 부착하기 위한 일반화기로서 기여할 것이다.
- [0071] 도 1 은 나노입자 작용화 및 펩티드 및 단백질의 나노입자에의 결합을 나타내는 개략도이다.
- [0072] 합성 및 코팅을 하기와 같이 수행한다: Thermo Fisher 를 통해 시판되는 NHS-LC-SPDP 는 둘 중 한쪽에 2 작용성 커플링 시약을 포함하는 장쇄 연장제이며, 이는 술포이드로 전환될 수 있는 디술포이드 및 아민에 대해 특이적이다.
- [0073] 한쪽 말단은 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 갖지만, 연장제의 다른 한쪽 말단은 피리딜디티올기를 포함한다. 상기 디티올기를 환원시켜 술포히드릴을 생성할 수 있다. NHS-LC-SPDP 를 나노입자와 반응시키고, 미혼입된 NHS-LC-SPD 로부터 반응을 클리어 (cleared) 할 수 있다. 이후, 커플링된 나노입자를 도 1 에 나타낸 바와 같이 환원시킨다.
- [0074] 커플링된 단백질의 제조: 친화 컬럼을 사용해 정제한 생물학적 활성 단백질은 나노입자에의 결합을 촉진시키기 위해 첨가되는 카르복시-말단 리신 잔기로부터의 유리 엡실론-아민기를 포함한다. NHS-LC-SMCC 는 이작용성 커플링 시약으로서 사용된다. 분자는 LC1 사슬 연장제를 갖는다. 한쪽 말단은 아민에 대해 특이적인 N-히드록시숙신이미드 시약을 갖는다. 다른 한쪽 말단은 술포히드릴기에 매우 특이적인 말레이미드기를 포함한다. 일단 물질을 단백질에 커플링시키고 반응 혼합물로부터 분리시키면, 말레이미드 커플링된 단백질을 술포히드릴 함유 나노입자에 첨가할 것이다. 수득한 물질을 겔 여과에 의해 분리시킨다.
- [0075] 나노입자에의 펩티드 커플링: 상기 경우에, 펩티드는 또한 NHS 에스테르-LC-말레이미드 커플링을 위한 염기로서 기여하는 카르복시-말단 리신을 포함한다. 분자는 LC2 사슬 연장제를 갖는다. 모든 절차는 단백질에 대해 상기 기재된 것들과 유사하다.
- [0076] 최적화 동안, 막-투과성 펩티드 및 단백질을 나노입자에 커플링되는 분자의 최대수에 도달하도록 상이한 비로 혼합할 것이다. 이전에 공개된 연구를 기준으로, 나노입자 당 표면-지향 세포-투과 펩티드의 3-4 개의 분자는 초상자성 나노입자의 효율적인 세포내 전달에 충분하다.
- [0077] LC2-연장제 암 (arm) 의 사용은 지향된 펩티드-기재 분자의 수를 증가시키는 중요한 수단을 제공한다. 상이한 농도의 NHS-LC-SPDP 의 사용은 나노입자의 표면에 정착된 펩티드 및 단백질 분자의 수를 증가시키는 것을 가능하게 하고, 따라서 더 효율적인 투과를 가능하게 하고, 결과적으로 더 강건한 세포 재프로그래밍 활성을 가능하게 한다.
- [0078] 하나의 나노입자 상의 펩티드 및 단백질의 부착: 이는 도 1 에 나타낸 절차를 사용해 달성될 수 있다. 상기 경우에, 소정비의 SMCC 라벨링된 단백질 및 펩티드를 비드에 첨가하고, 반응시킨다.
- [0079] 펩티드 및 단백질로 나노입자를 라벨링하는 또 다른 더 직접적이고 조절되는 방식은 2 개의 상이한 2 작용성 커플링 시약을 사용하는 것일 것이다 (도 2A-F). 반응 순서는 하기 기재된 일부 변형법과 함께 도 1 의 순서와 약간 유사하다.
- [0080] 요오도아세트산을 나노입자 표면에 선택된 수의 "카르복실"기를 도입시키는데 사용한다. 상기를 단계 I 에서 수행한다; 도2A-F, 단계 (I-VII) 을 참조.
- [0081] NH-LC-SMCC 를 포함하는 펩티드를 아미노에탄올로 처리한다. 이는 술포히드릴기를 통한 연결부를 만들고, 유리 아미노기를 제공한다. 이후, 상기 아미노기를 EDAC (EDC) 를 사용해 나노입자 상의 카르복실기에 커플링시킨다. EDAC 는 1-에틸-3[3-디메틸아미노프로필] 카르보디이미드 히드로클로라이드로서 공지되어 있다. 상기 커플링 단계를 반응식의 마지막에 수행한다.
- [0082] 또 다른 양상에서, 본 발명은 또한 세포내 활성의 조절을 위한 작용화 나노입자에 부착되는 생물활성 분자의 전달 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 시판되거나, 또는 표준 또는 개질된 실험 절차를 사용해 수득한 인간 세포, 섬유아세포 또는 기타 세포 유형을 우선 멸균 조건 하에 고체 표면 상에 세포가 부착되는 기질 (공급자 세포, 젤라틴, 마티겔 (matrigel), 파이브로넥틴 등) 의 유무 하에 플레이팅한다. 플레이팅된 세포를 세포 분화/증식 또는 허용가능한 세포 생존력의 유지를 가능하게 하는 특정 인자 조합으로 소정 시간 동안 배양한다. 예는 혈청 및/또는 각종 성장 인자이며, 이는 이후에 철회되거나, 리프레싱될 수 있어 배양 지속될 수 있다. 플레이팅된 세포를 자기장의 유무 하에 본원에 기재된 각종 방법을 사용해 부착되는 생물활성 분자와 함께

작용화 생체적합한 세포-투과성 나노입자의 존재 하에 배양한다. 초상자성 나노입자의 경우에 자석의 사용은 세포 및 나노입자 사이의 접촉 표면적의 중요한 증가를 가능하게 하고, 이로써 세포막을 통한 작용화 나노입자의 추가로 개선된 투과를 강화한다. 필요시에, 세포 집단을 작용화 나노입자로 반복적으로 처리하여 생물활성 분자를 세포내로 전달한다.

- [0083] 상기 세포는 배양 매질 중에 현탁되고, 비(非)혼입된 나노입자는 원심분리 또는 세포 분리에 의해 제거되어, 남아있는 세포는 균집으로서 존재한다. 그 후, 상기 균집된 세포는 새로운 매질 중에 적합한 기간 동안 재현탁 및 재배양된다. 상기 세포는 세포내에서 유래된 특정한 생물활성 분자에 의해 야기되는 결과적인 생물학적 효과가 관찰될 때까지, 분리, 재현탁 및 재배양의 복수의 사이클을 거칠 수 있다.
- [0084] 본 발명의 일 목적은 세포 재프로그래밍에 영향을 미치는 화합물 (또는 화합물들)의 스크리닝이다. 이는 나노입자에 부착된 화합물을 본원에 개시된 하나 이상의 방법을 사용하여 관심있는 세포군과 조합하고, 적합한 기간 동안 배양한 후, 상기 화합물(들)에서 야기된 임의의 조절 효과를 측정하는 것을 포함한다. 이에 는 세포 재프로그래밍의 개시 및 다분화성 줄기 세포의 생성, 보다 특정화된 또는 상이한 특정화 세포 유형으로의 분화 또는 전환분화, 독성, 대사 변화 또는 수축 작용 및 기타 기능에 대한 영향에 대한 세포의 시험이 포함될 수 있다.
- [0085] 본 발명의 또 다른 용도는 인간 또는 동물 신체의 치료를 위해 의도된 전달 장치에서의 또는 약제로서의 특정화된 세포의 제형이다. 이는 임상의가 손상된 조직 (심장, 근육, 간 등) 내 또는 주변의 세포를 맥관구조로부터 또는 직접적으로 근육 또는 기관벽 내로 투여하는 것을 가능하게 하여, 특정화된 세포가 융합하고, 손상을 제한하고, 조직의 근육계의 재생 및 특정화된 기능의 복구에 참여하는 것을 가능하게 한다.
- [0086] 본 발명의 용도는 원래의 계능을 보존하면서 세포 재프로그래밍 및 줄기 또는 더욱 분화된 세포 유형의 생성을 보장하기 위하여, 나노입자를 Oct4 및 Sox2 전사 인자와 같은 기타 단백질과 관능화시키는 것을 포함한다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 용도는 세포 재프로그래밍에 영향을 미치는 화합물 (또는 화합물들)의 스크리닝이다. 이는 나노입자에 부착된 화합물을 본원에 개시된 방법을 사용하여 관심있는 세포군과 조합하고, 적합한 기간 동안 배양한 후, 상기 화합물(들)에서 야기된 임의의 조절 효과를 측정하는 것을 포함한다. 이에 는 세포 재프로그래밍의 개시 및 다분화성 줄기 세포의 생성, 보다 특정화된 또는 상이한 특정화 세포 유형으로의 분화 또는 전환분화, 독성, 대사 변화 또는 수축 작용 및 기타 기능에 대한 영향에 대한 세포의 시험이 포함될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 다른 용도는 인간 또는 동물 신체의 치료를 위해 의도된 전달 장치에서의 또는 약제로서의 특정화된 세포의 제형이다. 이는 임상의가 손상된 조직 (심장, 근육, 간 등) 내 또는 주변의 세포를 맥관구조로부터 또는 직접적으로 근육 또는 기관벽 내로 투여하는 것을 가능하게 하여, 특정화된 세포가 융합하고, 손상을 제한하고, 조직의 근육계의 재생 및 특정화된 기능의 복구에 참여하는 것을 가능하게 한다.
- [0089] 추가적인 예시의 방법으로, 본 발명의 기타 측면을 하기 실시예에서 개시하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 실시예
- [0091] 실시예 1
- [0092] GFP 를 가교제 (비드의 아민기에 부착됨) 로서 LC-SMM 를 사용하여 초상자성 입자와 연결한 후, GFP 상에 술포히드릴기와 직접적으로 커플링하였다. LC-SMCC (Thermo Fisher 사) 를 1 mg/ml 의 농도로 ACROS (밀봉된 바이알 및 무수) 의 디메틸포름아미드 (DMF) 중에 용해시켰다. 샘플을 밀봉하고, 바로 거의 즉시 사용하였다.
- [0093] 십 (10) μl 의 상기 용액을 200 μl 부피 중의 나노입자에 첨가하였다. 이는 존재하는 가능한 이용가능한 아민기에 대하여 과량의 SMCC 를 제공한 것으로, 상기 반응을 1 시간 동안 진행하였다. 과량의 SMCC 및 DMF 를 Amicon 스핀 여과기를 사용하여 3,000 달톤의 컷오프로 제거하였다. 적절한 완충액 교환을 보장하기 위하여 5 회의 부피 교환이 요구되었다. 과량의 SMCC 가 상기 단계에서 제거되는 것이 중요하였다.
- [0094] 임의의 펩티드 기반 분자 (예를 들어, 시판되는 Green Fluorescent Protein (GFP) 또는 정제된 재조합 GFP 또는 기타 단백질) 을 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 동결시키기 위하여 일정량의 에틸렌 글리콜을 함유하는 용액에 첨가하였다. 14 μl 중 3 μg 의 단백질에, PBS 중 10 μl 의 새로 제조된 DTT (디티오프레이톨, 클리랜드 (Cieland) 시약) 용액을 격렬한 볼텍싱 하에서 첨가하였다. 단백질이 통상적으로 하나 이상의 시스테인을 함유하기 때문에, 상이한 GFP 분자가 가교결합하는 경향이 있었다. 따라서, 과량의 DTT 는 디티올 연결을 감소시키고, GFP 를 유리시켰다. 반응을 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간 동안 진행한 후, 과량의 시약을 Amicon 스핀 여과기를 사용하여

3,000 MW 컷오프로 제거하였다.

[0095] 활성화된 나노입자 및 단백질 용액을 수합하고, 2 시간 동안 반응하게 두고, 그 후 미반응된 단백질을 적절한 MW 컷오프 (GFP 의 예에서는, 50,000 달톤 컷오프임) 를 갖는 Amicon 원심분리 필터 장치에 의해 제거하였다. 샘플을 -80 °C 에서 보관하였다. 또한, 보다 수 용해성을 지닌 SMCC (술포-SMCC) 의 술포 유도체가 사용될 수 있다는 것에 주목해야 한다. DMSO 는 또한 라벨링제에 대해 용매 담체로서의 DMF 로 대체될 수 있으며; 또, 이것은 무수물이어야 한다.

[0096] 실시예 2

[0097] 이 방법에서는, 리신의 아미노기가 비드 상에서의 술히드릴기와의 커플링 반응에 사용되었다. pH 7.2 의 0.1 M 인산염 완충액으로 새로 평형화시킨 비드가 이들 시험에 사용되었다. 1 mg/ml (DMF 중) 의 LC-SPDP 를 새로 제조하였다. 10 마이크로리터의 SPDP 용액을 격렬한 볼텍싱 하에 비드 현탁액에 첨가하고, 1 시간 동안 반응하게 두었다. 이후, 미반응된 물질을 원심분리에 의해 제거하고, 나노입자를 10K 의 컷오프를 갖는 Amicon Spin 필터를 이용하여 인산염 완충액으로 세정하였다. SPDP 의 디술포이드 결합을 Clelands 시약을 이용해 끊었다; 1 mg 을 상기 용액에 첨가하고, 반응을 1 시간 동안 진행하게 두었다. 부산물 및 미반응된 Clelands 시약을 10K 의 컷오프를 갖는 Amicon spin 필터를 통해 제거하였다.

[0098] 상기 반응이 진행되면서, GFP 는 N-에틸말레이미드를 이용해 블록킹되었다. 과잉의 에틸말레이미드를 GFP 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 1 시간 동안 진행시키고, 원치않는 물질을 3K 의 컷오프를 갖는 Amicon Spin 필터를 이용해 제거하였다. 이후, GFP 를 과잉의 SMCC 와 1 시간 동안 반응하게 두었다. 그 후, GFP 를 스핀 칼럼 상에서 정제한 후, PDP-나노입자와 반응시켰다. 반응을 1 시간 동안 진행시키고, 최종 산물을 50K 의 컷오프를 갖는 Amicon spin 필터를 이용해 정제하였다.

[0099] 실시예 3

[0100] 시판되거나 또는 기재되어 있는 바와 같은 표준 실험 절차 [Moretti et al, Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1 cardiovascular progenitors. FASEB J. 24:700 (2010)] 를 이용하여 수득한 인간 섬유아세포를, 공급자 세포를 6-웰 플레이트 내 150,000 - 200,000 밀도로 예비플레이트하거나 또는 예비플레이트하는 일 없이, 고체 표면 상에서 무균 조건 하에 150,000 세포 밀도로 플레이트한다. 상기 공급자 세포는 상업적으로 또는 표준 실험실 절차에 의해 수득하였다. 상기 플레이트한 세포를 혈청-함유 배양 배지에서 세포 분할/증식 또는 허용가능한 세포 생존력의 유지를 가능하게 하는 특정 인자의 조합에 의해 어느 정도 시간 동안 배양하고, 이후 상기 배지를 철수하거나 새롭게 하여 배양을 5% CO₂ 및 대기 O₂ 에 의해 적신 인큐베이터에서 무균 조건 하에 지속하였다.

[0101] 원뿔형 튜브의 바닥에서 수집한 세포 또는 플레이트된 세포를, 자기장의 존재 또는 부재 하에 본원에 개시된 각종 방법을 이용하여, 생물활성 분자가 부착되어 있는 작용화된 생체적합성 세포-침투성 나노입자를 함유하는 50 마이크로리터의 현탁액으로 처리한다.

[0102] 초상자성 나노입자의 경우 자기장의 이용은 세포와 나노입자 사이의 접촉 표면적의 증대한 증가를 제공함으로써, 세포막을 통한 작용화된 나노입자의 개선된 침투를 확보할 수 있다. 중요하게, PEG 가 부착되어 있는 수 개의 단백질-기재 약물 (PEG-GCSF, Amgen, CA; PEG-Interferon, Schering-Plough/Merck, NJ) 의 폴리(에틸렌 글리콜) PEG-매개의 보호와 유사하게, 커플링된 펩티드와 함께 사용된 나노입자는 폴리펩티드의 크기를 증대시키고 단백질의 표면을 마스킹함으로써, 단백질분해 효소에 의한 단백질 분해를 저감시키고 그 결과 사용된 단백질 분자의 안정성을 연장시킨다. 필요에 따라, 세포 집단을 작용화된 나노입자로 반복 처리하여 세포내에서 생물활성 분자를 전달시킨다.

[0103] 상기 세포를 배양 배지에 현탁시키고, 비-혼입된 나노입자를 대략 1200 x g 에서의 10 분 동안의 원심분리에 의해 제거하여, 펠릿 내 군집으로서 존재하는 세포를 이탈시킨다. 이후, 군집된 세포를 재현탁시키고, 유사한 절차를 이용해 다시 세정하고, 적절한 기간 동안 새로운 배지에서 재배양한다. 세포내에서 전달된 특정 생물활성 분자에 의해 촉발된 결과적인 생물학적 효과가 관찰될 때까지 다수의 분리, 재현탁 및 재배양 사이클을 통해 세포를 취할 수 있다.

[0104] 녹색 형광 단백질에 관한 상기 특정 실시예에서, 세포-침투 나노입자는 세포 내부에서 단백질을 전달하고, 이것은 표적 세포에 의한 새로운 녹색 형광성의 획득을 부여한다. 이러한 새로 획득된 특성은 각종 적용에 추가로 사용될 수 있는 고도의 동종성으로 세포내 전달된 단백질을 갖는 세포의 후속적인 분류 및 분리를 가능하게

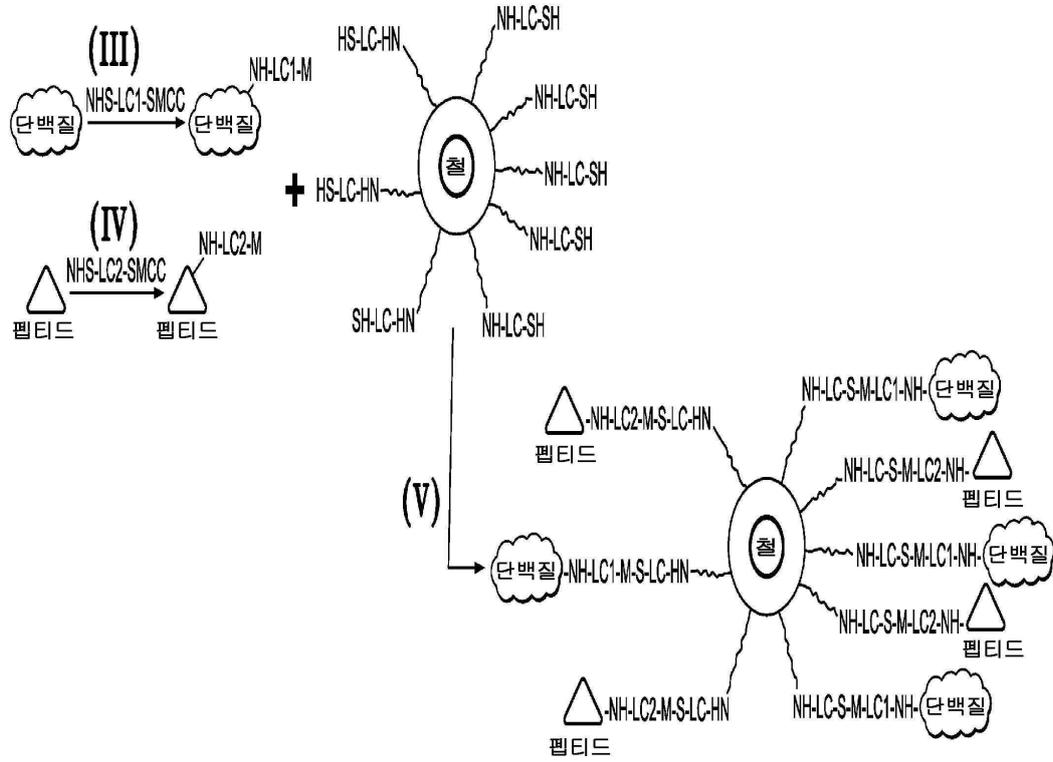
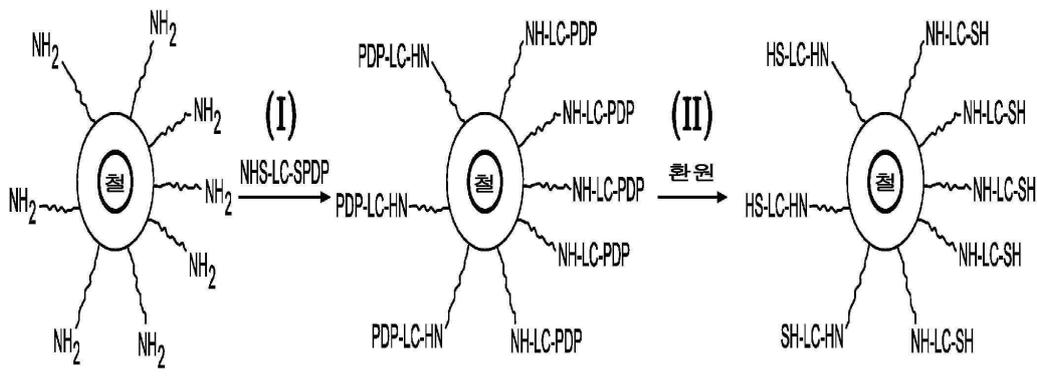
한다. 중요하게는, 단백질 부착된 세포-침투성 작용화된 나노입자의 이용은 세포 계층 내로의 어떠한 통합도 없으며, 이에 의해 신규한 (이 경우에는 형광) 특성을 갖는 모든 세포가 무결점 계층을 확실하게 유지하고 세포 DNA 의 완전성을 보존하는 것이 보장된다.

[0105]

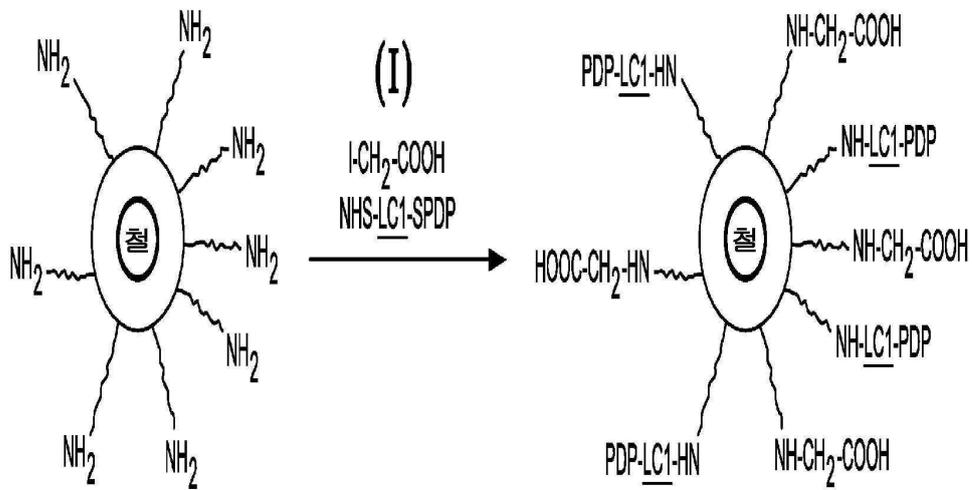
본 발명은 그의 취지 및 필수적인 특징으로부터 벗어나지 않으면서 다른 특정한 형태로 구현될 수 있다. 상기 구현예는 따라서 본원에 기재된 발명을 제한하기보다는 예시하는 것으로서 고려된다. 즉, 본 발명의 범위는 상기 설명에 의해서라기 보다는 첨부된 청구범위에 의해 제시되며, 청구범위의 균등성의 의미 및 범위 내에 들어오는 모든 변경들은 본원에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

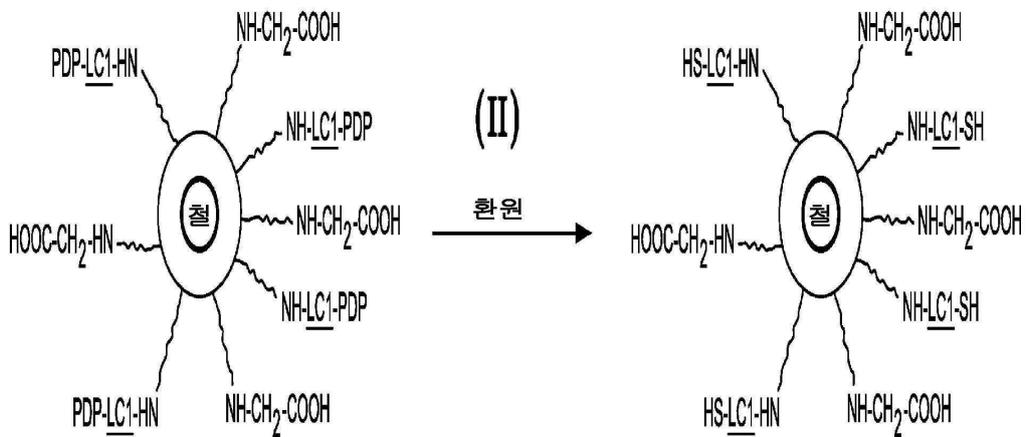
도면1



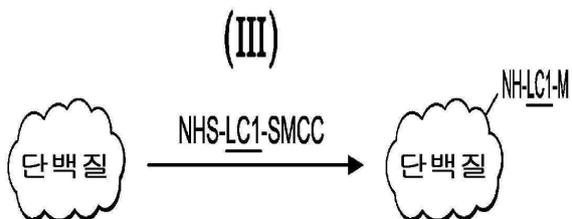
도면2a



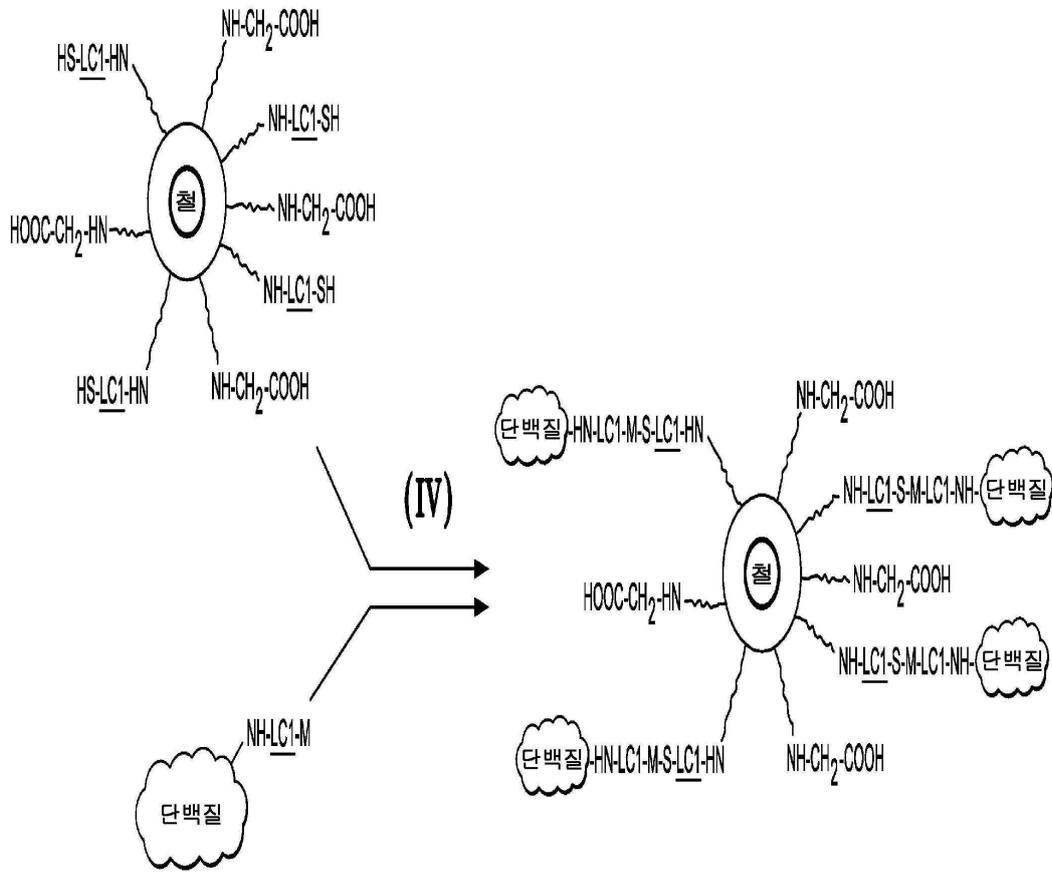
도면2b



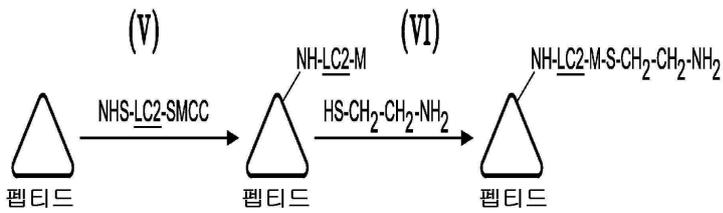
도면2c



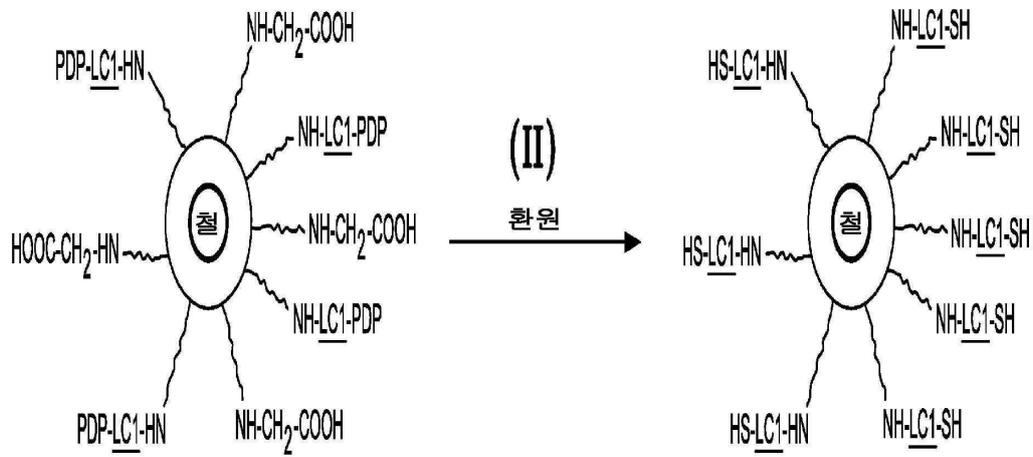
도면2d



도면2e



도면3b



도면3c

