

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0127024 (43) 공개일자 2012년11월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/24 (2006.01) D01D 5/00 (2006.01) B82Y 15/00 (2011.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0045220	(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	

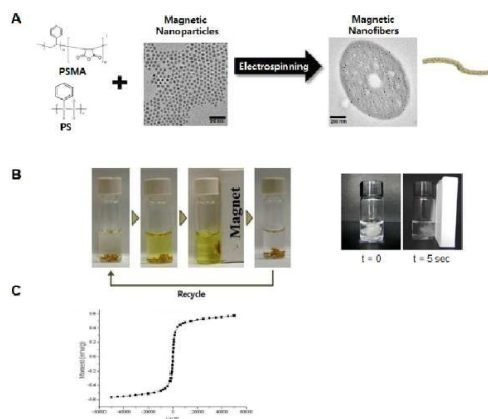
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체 및 이를 이용한 세포활성화 방법

(57) 요약

본 발명은 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체 및 이를 이용한 면역세포 활성화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 자성 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 이용 하여 바로 활성화를 시킴으로써 세포활성 실험에 매우 간편하게 사용할 수 있는 장점이 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) 자성 나노파티클이 포함된 고분자 용액을 전기방사하여 나노섬유를 제조하는 단계;
- 2) 상기 1)단계의 자성 나노섬유에 20 내지 100%(v/v) 농도의 알코올을 처리하여, 분산된 자성 나노섬유를 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 2)단계의 분산된 자성 나노섬유에 특이적 결합분자를 혼합하여 결합시키는 단계를 포함하는, 세포분리용 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체의 제조방법.

청구항 2

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

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 특이적 결합분자-자성 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 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] 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].

[0004] 또한, 현재 사용되고 있는 또 다른 방법 중 하나인 자기활성세포분류기(magnetic activated cell sorter)는 자기 입자(magnetic particle)가 붙어있는 항체 등을 이용하여 자기장의 힘으로 원하는 특정 세포를 분리하는 것으로, 자기 입자가 세포와 결합하여 세포 내로 들어감으로써 세포의 상태에 변화를 준다는 단점이 있다.

[0005] 본 발명자는 자성의 성질을 지니면서 동시에 세포분리와 세포활성화를 하나의 플랫폼에서 이루어질 수 있도록 고안하여, 보다 간편하고 효과적이면서 자기 영향에 의한 세포 형질 변화를 최소화한 자성 나노섬유를 고안하였다. 제조한 자성 나노섬유는 알코올을 처리하였을 때 섬유 사이의 공간이 증가하여 결합하는 항체의 함량이 향상되었고, 항체가 결합된 분산된 자성 나노섬유는 자성의 성질을 유지하면서 항체에 대한 표적세포가 효과적이며 특이적으로 결합함을 확인하였다.

[0006] 자성의 나노입자와 결합된 나노섬유는 자석을 이용함으로써 쉽게 포착되고, 일반적인 나노섬유에 적용되는 유사 프로토콜로 생체 분자를 제조할 수 있다. 그러므로 자기적 나노입자-나노섬유는 세포 혼합물에서 표적 세포를 포착할 수 있고, 생체 분자, 약물, 치료적 유전자, 또는 세포를 전달할 수 있는 고체상 스카폴드를 제공한다. 또한 자성 나노입자를 나노섬유에 결합을 시킴으로써 자성 나노입자가 세포와 결합하여 세포내로 들어갔을 때 생길 수 있는 독성은 낮추고 자성은 이용할 수 있다는 장점이 있다.

[0007] 한편, 항체(antibody)는 항원에 대한 특이성(specificity) 때문에 세포 표면 항원에 대해 특이적인 항체를 사용

하여 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 분리하는 방법의 확립이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체 및 이를 이용한 면역세포 활성화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자는 항체의 종류에 따라 자성 나노파이버에 결합된 면역세포의 활성화 및 서방형 방출을 조절할 수 있다는 사실을 발견하였고, 자성을 지니지 않는 나노섬유에 비하여 활성화된 면역세포의 방출이 훨씬 빠르고 수율이 높다는 점을 발견하였다. 예를 들어 일반 나노섬유에 CD3 항체를 결합시켜 세포를 분리할 경우와 비교했을 때, CD3 항체가 결합된 자성 나노섬유에 의해 분리된 CD3+T 세포들이 활성화 마커들을 월등히 많이 발현하였으며 수율도 매우 뛰어나는 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0011] 1) 고분자 용액을 전기방사하여 자성 나노섬유를 제조하는 단계;

[0012] 2) 단계 1)의 나노섬유에 20 내지 100%(v/v) 농도의 알코올을 처리하여, 분산된 자성 나노섬유를 제조하는 단계; 및

[0013] 3) 단계 2)의 분산된 자성 나노섬유에 특이적 결합분자를 혼합하여 결합시키는 단계를 포함하는, 세포분리용 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된, 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체를 제공한다.

[0015] 아울러, 본 발명은

[0016] 1) 상기 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체에 세포를 혼합하여 배양하는 단계; 및

[0017] 2) 단계 1)의 혼합물로부터 복합체에 결합된 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 특이적 결합분자가 결합된 자성 나노섬유를 이용한 세포 분리 방법을 제공한다.

[0018] 3) 단계 2)의 세포가 결합된 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체를 이용하여 세포를 활성화시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 특이적 결합분자가 결합된 자성 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 제족, 및 간편하고 신속하며 효과적인 세포 분리에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 이렇게 분리한 세포를 이용 하여 바로 활성화를 시킴으로써 세포활성 실험에 매우 간편하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 자기적 나노입자-나노섬유의 준비 과정을 도식적으로 보여준다.

도 2는 실시예 3의 실험 결과를 나타내고 있으며, 생쥐로부터 수집한 림프절이 항 CD4 단클론 항체와 결합된 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체와 배양되기 위해서 균질화됨을 보여준다.

도 3은 실시예 4의 실험 결과를 나타내고 있으며, 항- CD4 또는 항 CD3 단클론 항체와 결합된 자성 나노섬유 복합체로부터 방출된 세포의 광학 현미경 이미지를 보여준다.

도 4a 및 4b는 실시예 5의 실험 결과를 나타내고 있으며, CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체 혹은 CD3 MACs로부터 분리된 T 세포의 시간에 따른 활성화와 증가를 보여준다.

도 5a 및 5b는 실시예 6의 실험 결과를 나타내고 있으며, CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체에 의한 CD8+ T 세포의 특이적인 증식을 보여준다.

도 6a 및 6b는 실시예 6의 실험 결과를 나타내고 있으며, 플레이트에 항 CD3 단일 클론 항체를 코팅한 다음 T 세포를 배양하였을 때 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 분배를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

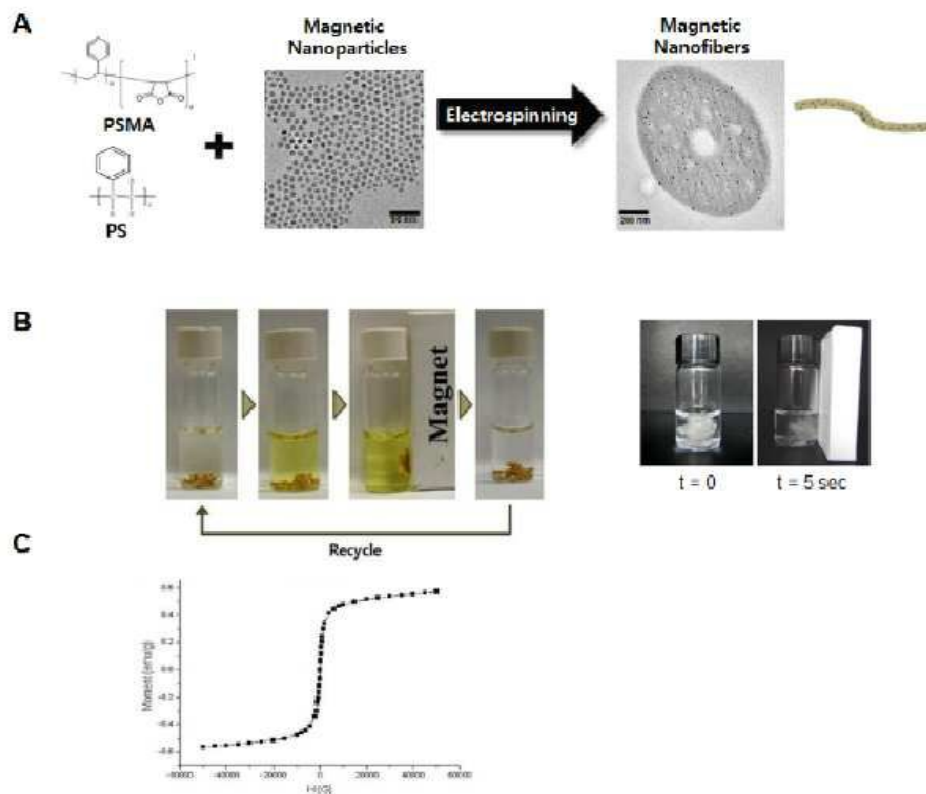
- [0021] 하기 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위해서 제시하는 것일 뿐, 이에 의해서 본 발명의 범위나 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다.
- [0022] [실시예 1] 재료의 준비
- [0023] 4-니트로페닐 부틸레이트(4-nitrophenyl butyrate, 4-NPB), N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide, DMF)는 Sigma(ST Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 폴리스티렌(polystyrene, PS, MW=950,400) 및 스티렌말레익 안하이드라이드 공중합체{poly(styrene-co-maleic 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 실험동물윤영위원회(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.
- [0024] [실시예 2] 자성 나노섬유의 제조
- [0025] 도 1은 자기적 나노입자-나노섬유의 준비 과정을 도식적인 그림으로 나타내고 있다. 자기적 나노입자는 iron oleate-complex에 쓰이는 열 분해 방식에 의해 합성하였다. 나노입자의 크기는 투과 전자 현미경 이미지에 보여지듯이, 평균 지름 7 nm로 동일하다. 테트라히드로퓨란-헥산에서 PS, PSMA, 자기적 나노입자의 2:1:0.023 무게비를 가진 균일한 혼합물은 고압 공급을 이용해 8-10 kV에서 전기 방사되었다.
- [0026] 박편된 자기적 나노입자-나노섬유의 투과 전자 현미경 이미지는 중합체 나노섬유에서 고르게 묶여 분포된 자기적 나노입자를 보여준다. 자기적 나노입자-나노섬유는 5초 안에 자석을 이용해서 포착될 수 있고, 용질로부터 쉽게 회수될 수 있고, 실온에서 초상자성 성질을 지님을 확인하였다.
- [0027] [실시예 3] 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체를 이용한 CD4+ T 림프구의 특이적 분리
- [0028] As-spun 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체는 70% 에탄올에 분산되었고, 점진적으로 항-CD4 단클론 항체와 고정된다. 생쥐로부터 수집한 림프구는 항 CD4 단클론 항체와 결합된 특이적 결합분자-자성 나노섬유 복합체와 배양되기 위해서 균질화됨을 확인하였다(도 2).
- [0029] [실시예 4] 항-CD4 또는 항 CD3 단클론 항체와 결합된 자성 나노섬유 복합체로부터 방출된 세포의 광학 현미경 이미지
- [0030] 도 3에서 보는 바와 같이, CD3, CD4 결합분자-나노섬유 및 자성 나노섬유에 부착된 세포가 활성화되거나, 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 나노섬유, 자성 나노섬

유 복합체가 7일간 배양되었을 때, 대부분의 세포는 나노입자 나노섬유 스카폴드에 부착되어 배양 배지에서 적은 세포들이 수집되었다. 대조적으로 CD3 결합분자-나노섬유 복합체에 결합되어 배양된 세포들은 CD4 나노섬유 또는 자성 나노섬유 복합체에 결합된 세포보다 많이 분리되어 나오는 것을 볼 수 있었으며, CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체에 결합되어 배양된 세포는 가장 많이 분리되어 나오는 것을 볼 수 있었으며, 더욱 커진 표현형을 나타냈다.

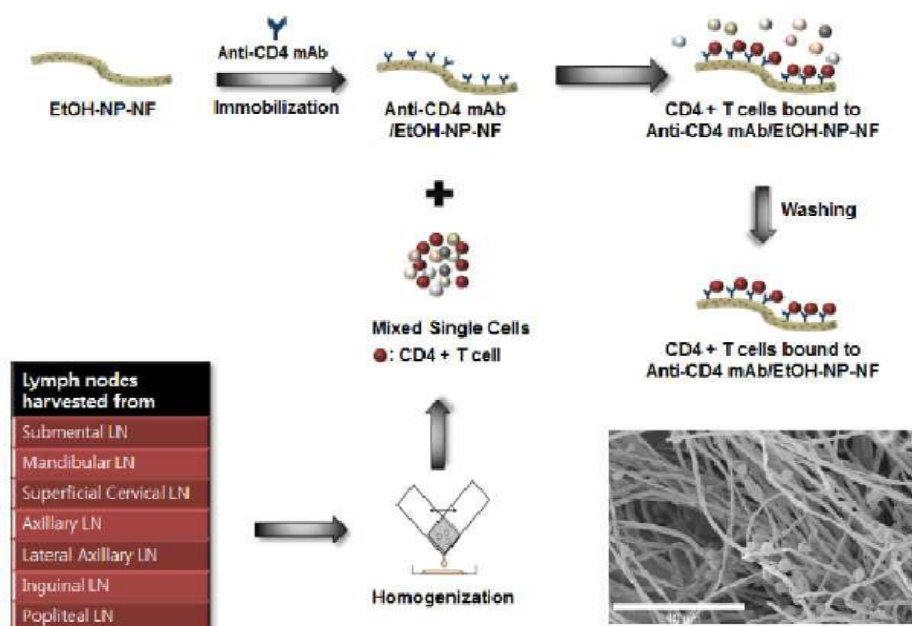
- [0031] [실시예 5] CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체 혹은 CD3 MACs로부터 분리된 T 세포의 시간에 따른 활성화와 증가
- [0032] CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체로부터 방출된 T 세포, MACs로부터 양성적으로 분리된 T 세포(오른쪽) 광학 현미경 이미지. 항 CD3 단클론 항체 1 mg/mL, 항-CD28 단클론 항체 1 mg/mL의 자극제를 처리하였다.
- [0033] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체로부터 분리되어 나온 세포는 7 일째 CD3 MACs로 분리된 세포나 혹은 결합되지 않은 세포와 비교해서 대략 8배 가량의 높은 세포 수를 나타냈다. 또한, 도 4b에 나타난 바와 같이, 세포의 CD69, B220, CD25 활성화 마커의 표면 발현은 유세포 분석기로 분석되었다. 또한, CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체로부터 방출된 세포들은 CD3 MACs로 분리된 세포들에 비해 표면 활성화 마커, CD69, B220, CD25가 높은 레벨로 나타났다.
- [0034] [실시예 6] CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체에 의한 CD8+ T 세포의 특이적인 증식
- [0035] CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체, 항 CD3를 이용한 자성분리 세포, 아무것도 처리하지 않은 세포를 6일동안 배양한 다음 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 비율을 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다.
- [0036] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 특히 CD3 자성 나노섬유에서 방출된 세포에서의 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포의 비율을 보면, CD4+ T 세포는 14.9%인데 반해 CD8+ T 세포는 79%를 넘었다. 이러한 결과는 CD8+ T 세포의 초기 비율인 29%에 비해 CD4+ T 세포의 초기 비율인 43%가 두드러지게 나타났다. MACs positive 선택법을 통해 분리된 세포들은 CD8+ T 세포 58%, CD4+ T 세포 34.2%로 두 가지 세포들이 중간 비율을 나타냈다.
- [0037] 또한, 도 5b에 나타난 바와 같이, CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체로부터 분리된 CD8+ T 세포들은 항 CD3 MACs 혹은 결합하지 않은 T 세포 그룹으로부터 분리된 세포들과 대조하여 상당히 높은 레벨의 표면 CD25를 나타냈다. 대조적으로 CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체로부터 분리된 CD4+ T 세포들은 항 CD3 MACs 혹은 결합하지 않은 T 세포 그룹으로부터 분리된 세포들에 비해 CD25의 낮은 발현을 보여주었고, 이것은 CD3 결합분자-자성 나노섬유 복합체 그룹에서 발견된 CD4+ T 세포들이 적게 활성화되었다는 것을 의미한다.
- [0038] [실시예 6] 플레이트에 항 CD3 단일 클론 항체를 코팅한 다음 T 세포를 배양하였을 때 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 분배
- [0039] 림프노드 세포를 나일론 울 컬럼에 통과시켜 CD3+ T 세포를 풍부하게 하고, 항 CD3 단일클론 항체를 0.1, 0.5, 1 μ g이 코팅된 플레이트에 세포를 넣어준 다음. 항 CD3, 항 CD28 단일클론 항체를 각각 1 μ g/mL로 넣고 5일 동안 배양하였다. 5일 동안 배양한 세포를 수거하여 CD4+, CD8+ T 세포의 퍼센트를 측정하였다.
- [0040] 그 결과, 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이, 항 CD3 단클론 항체 낮은 농도(0.1 mg/mL)에서 배양된 T 세포들은 CD3 자성 나노섬유로부터 얻어진 결과와 비슷하게 CD8+ T 세포의 높은 퍼센트(75.9%)를 보여주었다. 증가된 항 CD3 단클론 항체의 농도에 따라, CD8+ T 세포의 퍼센트는 감소했다. 각각 농도 0.5 mg/mL에서 67.8%, 농도 1 mg/mL에서 48.7%를 나타냈다.

도면

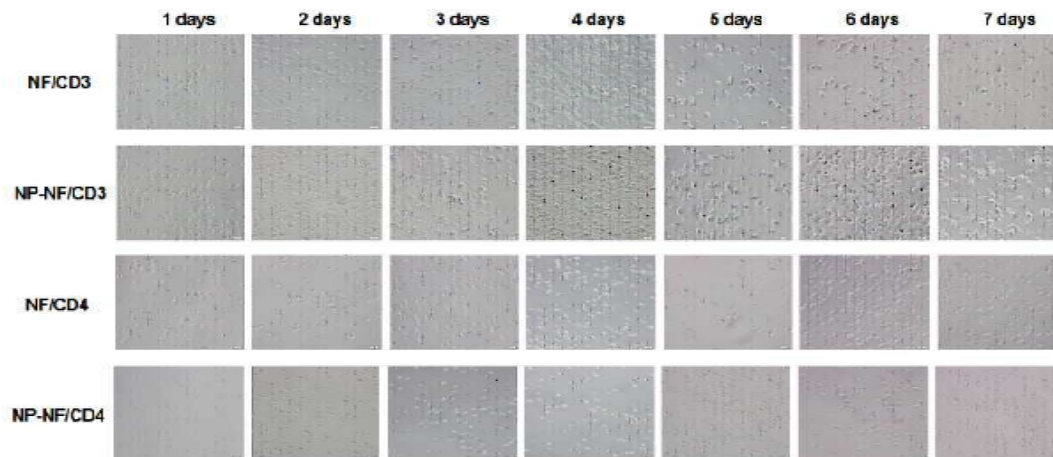
도면1



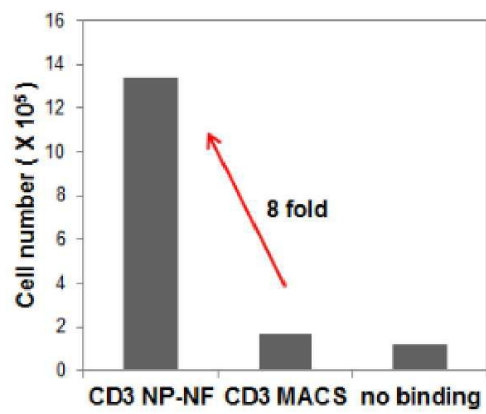
도면2



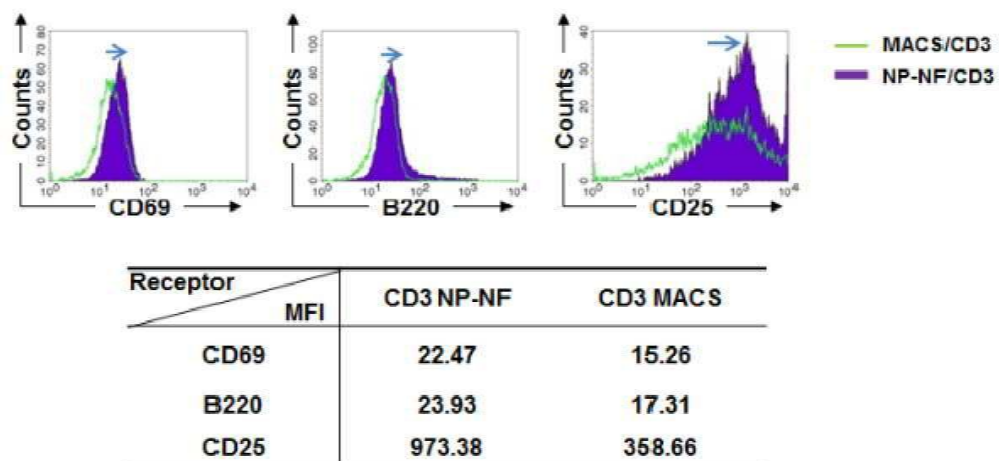
도면3



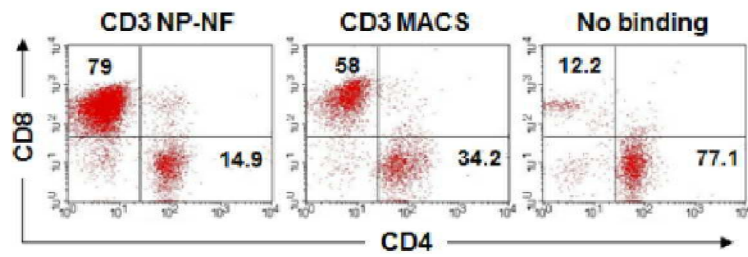
도면4a



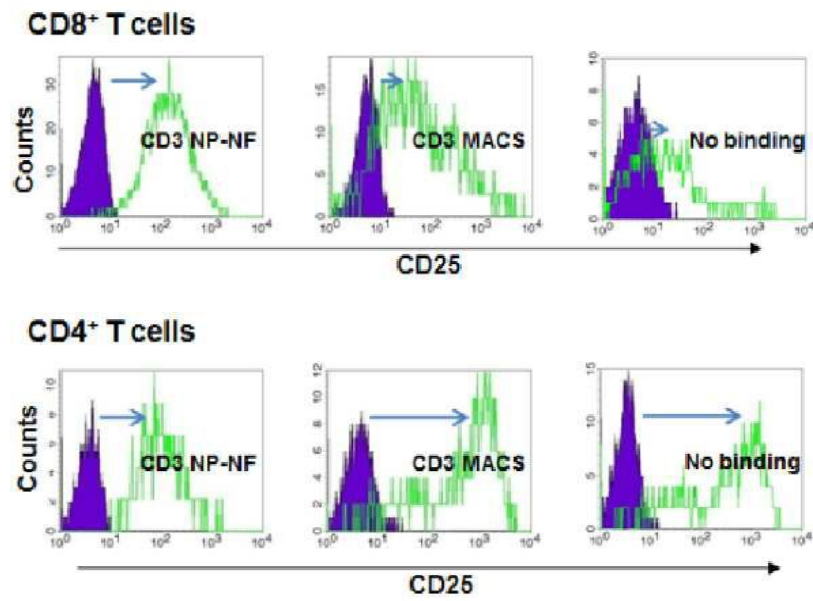
도면4b



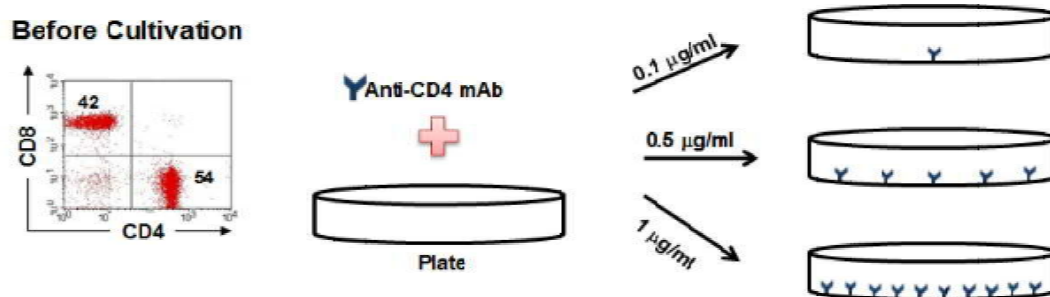
도면5a



도면5b



도면6a



도면6b

