



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0049323
(43) 공개일자 2018년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)
G01Q 60/50 (2010.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57492 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0143341
(22) 출원일자 2016년10월31일
심사청구일자 2016년10월31일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35 (2/9) 용산시티파크 103-603 (한강로3가, 용산시티파크1단지)
김경준
경기도 성남시 분당구 안골로 42 102동 B01호 (서현동, 서현모닝빌)
이원준
서울특별시 성북구 아리랑로19가길 21, 202동 1203호 (정릉제2동, 정릉꿈에그린아파트)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

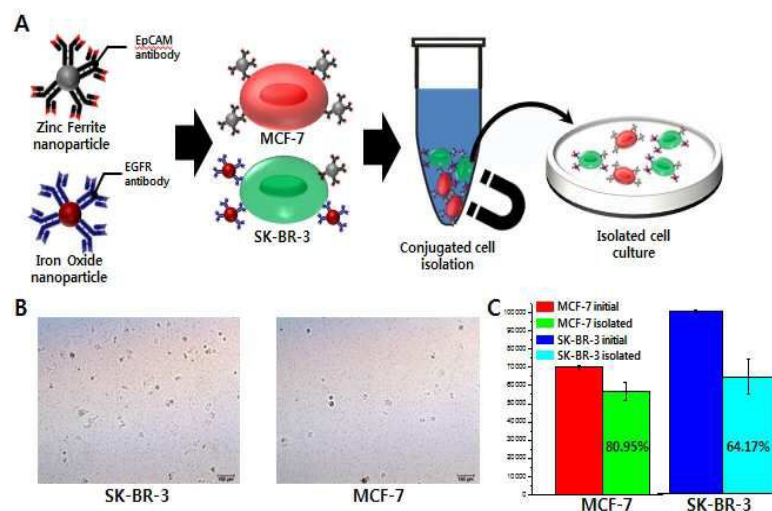
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 자기적-전기화학적 검출기술을 이용한 암세포의 표현형 동정방법

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고 그 표현형에 따라 암세포를 동정할 수 있는 방법 및 특정 암에 유효하게 작용하는 항암제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 암세포의 분리 및 동정방법을 이용하는 경우, 순환종양세포 등 암세포의 분리에 활용된 나노입자를 이용하여 추가적인 암세포 염색 방법 없이 세포의 표현형을 자기적-전기화학적 방법으로 분석할 수 있어 간단한 방법으로 세포의 표현형 분석이 가능하며, 두가지 검출기법을 동시에 적용함으로써 분석 결과의 신뢰성을 높일 수 있다. 또한, 본 발명의 항암제 스크리닝 방법을 이용하는 경우, 특정 암에 유효하게 작용하는 항암제를 판정함으로써 해당 암환자에 대한 최적의 항암제를 선택 적용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/54326 (2013.01)

G01N 33/54346 (2013.01)

G01N 33/553 (2013.01)

G01Q 60/50 (2013.01)

G01N 2500/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A6A1A03012845

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점연구소지원사업

연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발

기 여 율 30/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A10051725

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 뇌질환 약물 스크리닝 기능 나노구조체 기반 뇌 기저핵칩

기 여 율 40/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K1A4A3055268

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수연구기관유치사업

연구과제명 서강-하버드 질병 바이오물리 연구 센터

기 여 율 30/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 암세포의 분리 및 동정방법:

- (a) 암환자로부터 얻은 생물학적 시료에 암세포 표면에 발현되는 마커에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 자성 나노입자를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 자성 나노입자를 접촉시킨 시료에 자기장을 인가하여 암세포를 분리하고 배양하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 분리 및 배양된 암세포의 자기적 신호 및 전기화학적 신호를 각각 탐지하는 단계;
- (d) 상기 (c) 단계에서 탐지된 신호를 생물학적 대조시료로부터 탐지된 신호와 비교하여 암세포를 동정하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 (a)의 생물학적 시료는 암환자의 혈액 또는 조직분쇄물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 암세포는 순환종양세포(Circulating Tumor Cell)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 산화 철(iron oxide), 아연 페라이트(zinc ferrite), 망간(Mn), 니켈(Ni), 코발트(Co), 비스무스(Bi), 백금(Pt), 금(Au), 팔라듐(Pd), 구리(Cu), 이들의 합금 또는 이들의 페라이트(ferrite)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 직경이 2-100 nm 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 자기적 신호의 탐지는 자기력현미경(magnetic force microscope)를 이용하여 탐지하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 전기화학적 신호의 탐지는 LSV(linear sweep voltammetry)를 이용하여 탐지하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 특정 암에 유효한 항암제의 스크리닝 방법:

- (a) 암환자로부터 얻은 생물학적 시료에 암세포 표면에 발현되는 마커에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 자성 나노입자를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 자성 나노입자를 접촉시킨 시료에 자기장을 인가하여 암세포를 분리하고 배양하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 분리 및 배양된 암세포에 항암제를 처리하는 단계; 및
- (d) 상기 항암제를 처리한 암세포의 전기화학적 신호를 탐지하는 단계, 상기 신호가 항암제를 처리하지 않은 암세포의 신호보다 감소하는 경우 상기 항암제는 상기 암의 치료에 유효한 항암제인 것으로 판정된다.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 (a)의 생물학적 시료는 암환자의 혈액 또는 조직분쇄물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 암세포는 순환종양세포(Circulating Tumor Cell)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 산화 철(iron oxide), 아연 페라이트(zinc ferrite), 망간(mn), 니켈(ni), 코발트(co), 비스무스(bi), 백금(pt), 금(au), 팔라듐(pd), 구리(cu), 이들의 합금 또는 이들의 페라이트(ferrite)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 직경이 2-100 nm 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 8 항에 있어서, 상기 전기화학적 신호의 탐지는 LSV(linear sweep voltammetry)를 이용하여 탐지하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고 그 표현형에 따라 암세포를 동정할 수 있는 방법 및 특정 암에 유효하게 작용하는 항암제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암 환자에 대한 조기 진단 기술은 발병 초기에 암을 진단함으로써 치료계획을 수립 및 최적의 약물 처리를 통한 부작용의 최소화와 치료 효과의 극대화를 꾀할 수 있다는 점에서 중요하다.

[0004] 순환종양세포(circulating tumor cell, CTC)는 원발종양(primary tumor)으로부터 혈관이나 림프관으로 떨어져 나온 종양세포로서 순환계를 통하여 종양환자의 체내를 순환하는 세포이다. 순환종양세포는 원발종양으로부터 먼 장기에까지도 도달하여 추가적 종양 성장의 종자(seed)가 되며, 암-관련 사망의 대다수를 차지하는 메커니즘

을 유발한다. 순환종양세포의 중요성은 암 발병 초기에도 존재하기 때문에 영상의학적으로 발견할 수 없는 미세전이암(micrometastasis)이나 암의 크기 변화가 확인되지 않더라도 체내에서 암세포가 증가하고 있는 상태를 말초혈액 검사와 같은 최소 침습적인 검사를 통해 양적, 질적으로 확인할 수 있다는 점이다. 종양의 성장곡선(gompertian curve)을 고려한다면, 현재의 표준 지침에서 제시하듯이 영상학적으로 암이 커진 것을 확인한 후에야 비로소 새로운 치료를 시작하는 지금의 관행은 종양의 크기도 커져서 항암제의 투과력도 떨어지고, 이미 암의 성격도 외래성(heterogenous)으로 변한 후라 치료적 효과가 떨어지게 된다. 따라서, 암 환자의 혈관에 존재하는 순환 종양 세포(Circulating Tumor Cells, CTCs)를 분리하여 분석하는 기술은 암 환자가 앓고 있는 암의 종류에 대한 정보를 제공하여 효과적인 치료계획 수립을 가능케 하는 등 의료적으로 활용가치가 높은 기술이다. 그러나 환자의 혈액 중 순환종양세포는 혈액 샘플 1 ml당 1-10개만이 존재할 뿐이어서 고효율의 분리 기술이 필요하며 분리된 적은 수의 세포를 분석할 수 있는 고감도의 검출기술의 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 대부분의 순환 종양 세포 분리 기술은 항원-항체 반응을 기본으로 정상세포는 발현하지 않고 암세포만 발현하는 세포 표면 단백질을 표적으로 하는 입자를 처리하고 처리된 입자의 특성을 통해 분리된 세포를 분석하는 유세포 분석기술(Fluorescence active cell sorting, FACS, Magnetic activated cell sorting, MACS)이 주로 활용된다. 그러나 전통적인 방법의 순환 종양세포 분석기술은 신뢰성을 갖는 분석 결과를 도출하기 위해서는 분석 샘플의 양이 절대적으로 많이 필요하며 분석 장비의 가격이 고가이며 복잡한 과정을 거쳐야 한다는 한계점을 가지고 있다.

[0006] 대한민국특허출원 제10-2013-0010766호는 순환종양세포 시료와 자성비드를 튜브에 넣어 교반하여, 자성비드를 순환종양세포에 부착하고, 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 순환종양세포 시료를, 다수의 공극을 가진 필터로 이루어진 미세유체칩을 통과시켜, 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포획하고, 포획된 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 미세유체칩으로, 레이저를 조사하며, 자성비드가 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해, 순환종양세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되는 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법에 관하여 개시하고 있다.

[0007] 또한, 대한민국특허출원 제10-2013-7019896호는 환자에서 인슐린-유사 성장 인자 수용체(IGF-1R) 길항제 치료의 효능을 예측하기 위해 환자의 샘플을 분석하는 방법을 개시하고 있다.

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고 그 표현형을 분석할 수 있는 기술을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 암세포의 표면에 발현되는 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 부착한 자성 나노입자를 부유상태의 암세포와 접촉시키고 자기장을 인가함으로써 암세포를 분리하고, 분리된 암세포의 자기적 신호 및 전기화학적 신호의 차이를 통해 암세포의 표현형을 추가적으로 확인할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고 그 표현형의 특징을 분석하여 암세포를 동정할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고, 분리된 암세포에 항암제 처리 후 표현형을 확인함으로써 특정 암에 유효하게 작용하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고 그 표현형에 따라 암세포를 동정할 수 있는 방법을 제공한다.
- [0019] 상기 암세포의 분리 및 동정 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:
- [0020] (a) 암환자로부터 얻은 생물학적 시료에 암세포 표면에 발현되는 마커에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 자성 나노입자를 접촉시키는 단계;
- [0021] (b) 상기 자성 나노입자를 접촉시킨 시료에 자기장을 인가하여 암세포를 분리하고 배양하는 단계;
- [0022] (c) 상기 (b) 단계에서 분리 및 배양된 암세포의 자기적 신호 및 전기화학적 신호를 각각 탐지하는 단계;
- [0023] (d) 상기 (c) 단계에서 탐지된 신호를 생물학적 대조시료로부터 탐지된 신호와 비교하여 암세포를 동정하는 단계.
- [0025] 본 발명의 상기 방법을 단계별로 자세히 설명한다.
- [0026] (a) 암환자로부터 얻은 생물학적 시료에 암세포 표면에 발현되는 마커에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 자성 나노입자를 접촉시키는 단계.
- [0028] 상기 (a) 단계는 암환자로부터 암세포를 포함하는 생물학적 시료를 채취하고, 시료 내에 포함되어 있는 암세포를 암세포에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 자성 나노입자를 접촉시킴으로써 항원-항체반응에 의해 서로 결합시키는 단계이다.
- [0029] 본 발명에서 상기 암환자로부터 얻은 생물학적 시료는 암환자의 혈액, 구체적으로 전혈, 혈장, 혈청 또는 조직 분쇄물일 수 있으며, 암세포 또는 종양세포를 포함하는 암환자로부터 얻은 생물학적 시료를 제한 없이 포함할 수 있다. 상기 시료가 혈액일 경우, 상기 암세포는 혈액 내에 순환되는 순환종양세포(circulating tumor cell)일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 암세포는 유방암, 폐암, 직장암, 결장암, 췌장암, 간암, 위암, 뇌암, 자궁경부암, 난소암, 인두암, 후두암, 방광암, 전립선암, 피부암, 흑색종 등의 암세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어 “암세포 표면에 발현되는 마커”는 특정 암세포를 진단할 수 있는 물질 또는 특정 암세포에서 정상 세포에 비해 증가되어 발현되는 물질로 생체분자를 말하며, 구체적으로는 단백질/펩타이드일 수 있고, 본 발명의 목적상 암세포의 세포 표면에 발현되는 단백질을 의미한다.
- [0032] 상기 암세포 표면에 발현되는 마커는 암세포의 종류마다 동일하거나 상이할 수 있으며, 예컨대 Aminopeptidase N, BMI-1, CD19, CD20, CD24, CD34, CD38, CD44, CD90, CD133, E-cadherin, EGFR(epithelial growth factor receptor), EpCAM/TROP1, ErbB2/Her2, STRO-1 등이 있으며 암세포의 표면에 발현되는 마커라면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 사용된 용어, “항체”란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적 상 상기 항체는 본 발명의 마커 또는 상기 마커의 구성 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [0034] 상기한 바와 같이, 암세포 표면에 발현되는 마커를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.
- [0035] 상기 다클론 항체는 상기한 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다.
- [0036] 상기 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein,

European Journal of Immunology 6:511-519, 1976 참조) 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al. Nature 352:624-628, 1991; Marks et al. J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

- [0037] 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0039] 본 발명에서 사용된 용어, “자성 나노입자”는 자기장 인가시 자화되어 자기력에 의해 일정한 방향으로 끌어당길 수 있는 상자성체 또는 강자성체 입자를 말한다. 상기 자성 나노입자는 구체적으로 산화 철(iron oxide), 아연 페라이트(zinc ferrite), 망간(Mn), 니켈(Ni), 코발트(Co), 비스무스(Bi), 백금(Pt), 금(Au), 팔라듐(Pd), 구리(Cu), 이들의 합금 또는 이들의 페라이트(ferrite)로 이루어진 군으로부터 선택되는 자성 나노입자일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 자성 나노입자는 직경이 2-200 nm, 구체적으로는 5-150, 5-120, 5-100, 5-80, 가장 구체적으로는 5-50 nm 일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 자성 나노입자의 표면에는 상기 암세포에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 부착되어 “항체-나노입자” 형태의 입자를 형성한다. 상기 항체-나노입자는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조가 가능하다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 항체-나노입자는 EDC/NHS 커플링 반응(Anthony J. Di pasqua et al., Materials Letters 63 (2009), 1876-1879)을 통하여 제조되었으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] (b) 상기 자성 나노입자를 접촉시킨 시료에 자기장을 인가하여 상기 시료 중 암세포를 분리하고 배양하는 단계.
- [0046] 상기 (b) 단계는 상기 (a) 단계에서 시료 내에 포함된 암세포와 항원-항체반응에 의해 결합한 항체-나노입자에 대하여 자기장을 인가함으로써, 나노입자와 함께 암세포를 분리하는 단계 및 분리된 암세포를 배양하는 단계이다.
- [0048] 본 명세서에서 상기 암세포의 배양은 당업계에 널리 공지된 배양배지 및 조건을 이용하여 용이하게 배양이 가능하며, 배양목적에 따라서 배양용기 및 배양 위치를 달리할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 배양이 분리된 암세포의 자기적 신호를 탐지하기 위한 것일 경우, 일반 세포배양용기에서 30-40℃의 온도조건에서 배양될 수 있고, 상기 배양이 분리된 암세포의 전기화학적 신호를 탐지하기 위한 것일 경우 금 기관 위에서 30-40℃의 온도조건에서 배양될 수 있다.
- [0051] (c) 상기 (b) 단계에서 분리 및 배양된 암세포의 자기적 신호 및 전기화학적 신호를 각각 탐지하는 단계.
- [0052] 상기 (c) 단계는 본 발명에서 상기 (b) 단계에서 자기장을 이용해 분리하고 배양한 암세포에 부착된 자성 나노입자의 종류에 따라 나타나는 자기적 표현형 및 암세포의 표면 단백질 마커의 차이에 따라 나타나는 전기적 표현형을 탐지하는 단계이다.
- [0053] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 자기적 신호의 탐지는 자기력현미경(magnetic force microscope, MFM)을 이용하여 탐지한다.
- [0054] 본 명세서에서 용어, “자기력 현미경”은 자성체를 입힌 탐침을 사용하여 시료의 자기적(磁氣的) 성질을 알아내는 장치이다. 자기력 현미경은 비접촉식으로 작동되며, 탐침을 코팅하는 자성체로는 코발트, 크롬, 니켈 등이 사용된다. 캔틸레버는 원자간력(原子間力)과 자기력(磁氣力)에 의해 동시에 영향을 받는데 이 두 가지 힘의 성질이 다르기 때문에 구별이 가능하다. 즉, 원자간력은 짧은 범위힘(short-range force)이어서 시료 가까

이에서만 크게 작용하며 힘의 경사도(force gradient)가 큰 반면, 자기력은 긴 범위힘(long-range force)이기 때문에 멀리까지 작용하지만 힘의 경사도는 아주 작다. 따라서 비접촉식 원자 현미경(Atomic force microscopy, AFM)을 시료 가까이에서 동작시키면 시료의 형상(topography)이 얻어지고, 멀리 떨어져서 동작시키면 자기분포도가 얻어진다. 또 다른 방법으로는 lock-in amp로 힘의 경사도(force gradient)를 측정한 값을 z 방향으로 피드백하여 시료의 형상을 얻고, 캔틸레버의 휘어진 정도로부터 자기분포도를 얻는 방법이 있다.

- [0055] 본 발명에 따른 방법으로 항체가 부착된 자성 나노입자를 암세포와 결합하여 분리한 후, 이의 자기적 신호를 자기력 현미경으로 탐지하는 경우, 자성 나노입자의 종류 및 자성 나노입자에 부착한 항체의 종류에 따라서, 자성 나노입자가 암세포의 표면에 발현되는 마커에 따라 다른 비율로 부착되게 된다.
- [0056] 따라서, 상기 암세포에 결합가능한 항체 및 자성 나노입자를 각각 2종 이상으로 제작하여 자기적 신호를 탐지할 경우, 암세포의 종류, 정확히는 암세포의 표면에 발현되는 마커의 종류에 따라서 서로 다른 자성 나노입자가 부착되어 서로 다른 자기적 신호(표현형)를 나타내게 된다.
- [0057] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 산화철 나노입자에는 EpCAM 결합 항체를 부착하고, 아연 페라이트 나노입자에는 EGFR에 결합하는 항체를 부착할 경우 세포 표면에 EGFR 보다 EpCAM을 더욱 많이 발현하는 MCF-7 암세포에는 아연 페라이트 나노입자가 더 많이 결합되고, EpCAM보다 EGFR을 더욱 많이 발현하는 SK-BR-3 세포에는 산화철 나노입자가 더 많이 결합되어 자기력 현미경 상의 이미지가 서로 다르게 나타난다.
- [0059] 또한, 상기 (d) 단계는 본 발명에서 상기 (b) 단계에서 자기장을 이용해 분리하고 배양한 암세포에 부착된 자성 나노입자의 종류에 따라 나타나는 전기화학적 표현형을 탐지하는 단계이다.
- [0060] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전기화학적 신호의 탐지는 LSV(linear sweep voltammetry)를 이용하여 탐지한다.
- [0062] 본 명세서에서 사용된 용어, “sweep voltammetry”)는 전기화학 분석법의 일종으로 “선형주사전압전류법”이라고도 하며, 전기적 자극에 대하여 물질이 수반하는 전자의 이동(산화 또는 환원)에 따른 신호를 해석하는 방법의 하나이며 순환전압전류법(cyclic voltammetry)과 함께 전기화학 분석에서 흔히 사용된다.
- [0063] 본 발명에 따른 방법으로 항체가 부착된 자성 나노입자를 암세포와 결합하여 분리한 후, 이의 전기화학적 신호를 LSV로 탐지하는 경우, 암세포의 표면에 발현되는 표면 단백질 마커의 차이에 의해 서로 다른 전기화학적 신호(표현형을 나타내게 된다.
- [0064] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전기화학적 신호는 전위에 따른 산화전류의 크기 및 위치가 다르게 나타나는 것이다.
- [0065] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 MCF-7 유방암 세포주와 SK-BR-3 유방암 세포주는 각각의 암세포가 가진 표면 단백질의 차이에 의해 전위에 따른 산화전류의 크기 및 위치가 다르게 나타난다.
- [0067] 본 발명에서 상기 (c) 단계의 자기적 신호 탐자와 전기화학적 신호의 탐지는 서로 순서에 무관하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 전기화학적 신호를 먼저 탐지한 다음 자기적 신호의 탐지를 실시하여도 무방하다.
- [0069] (d) 상기 (c) 단계에서 탐지된 신호를 생물학적 대조시료로부터 탐지된 신호와 비교하여 암세포를 동정하는 단계.
- [0070] 상기 (d) 단계는 상기 (c) 단계에서 탐지한 자기적 신호 및 전기화학적 신호를 대조군 시료의 자기적 신호 및 전기화학적 신호와 비교하여 암세포의 종류 등 표현형을 분석하고 동정하는 단계이다.
- [0071] 본 명세서에서 사용된 용어, “생물학적 대조시료”는 상기 (a) 단계의 시료와 마찬가지로 암환자로부터 얻은 혈액 또는 조직분쇄물 등으로부터 분리한 특정 종류의 암세포일 수 있으며, 당업계에서 분양 또는 판매되는 공지된 암세포주(cancer cell line)일 수도 있다.
- [0072] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 생물학적 대조시료로는 공지된 암세포주인 MCF-7 또는 SK-BR-3 암

세포이다. 상기 MCF-7 암세포는 SK-BR-3 암세포와 표면에 발현되는 마커가 서로 상이하므로 상술한 바와 같이 각각의 자기적 신호 및 전기화학적 신호가 서로 상이하게 나타난다. 따라서, 이러한 결과를 생물학적 대조군 시료의 결과로 하여, 미지의 시료 내에 포함된 암세포가 MCF-7 인지, SK-BR-3 인지를 구별할 수 있다.

[0073] 본 발명의 방법에 따르면 상술한 것과 동일한 원리를 이용하여, 예컨대 유방암환자로부터 얻은 혈액에 포함된 유방암 유래의 순환종양세포를 분리하고 유방암 유래의 암세포임을 동정할 수 있다.

[0075] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고, 분리된 암세포에 항암제 처리 후 표현형을 확인함으로써 특정 암에 유효하게 작용하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0077] 상기 항암제의 스크리닝 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:

[0078] (a) 암환자로부터 얻은 생물학적 시료에 암세포 표면에 발현되는 마커에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 자성 나노입자를 접촉시키는 단계;

[0079] (b) 상기 자성 나노입자를 접촉시킨 시료에 자기장을 인가하여 암세포를 분리하고 배양하는 단계;

[0080] (c) 상기 (b) 단계에서 분리 및 배양된 암세포에 항암제를 처리하는 단계; 및

[0081] (d) 상기 항암제를 처리한 암세포의 전기화학적 신호를 탐지하는 단계, 상기 신호가 항암제를 처리하지 않은 암세포의 신호보다 감소하는 경우 상기 항암제는 상기 암의 치료에 유효한 항암제인 것으로 판정된다.

[0082] (c) 상기 (b) 단계에서 분리 및 배양된 암세포에 항암제를 처리하는 단계.

[0083] 상기 (c) 단계는 상기 (b) 단계에서 분리 및 배양된 암세포에 항암제를 처리하는 단계이다.

[0084] 본 명세서에서 사용된 용어 “항암제”는 암, 악성종양의 치료를 위하여 사용되는 화학요법제를 총칭하는 것으로, 알킬화제, 대사길항제, 항생물질, 유사분열억제제, 호르몬제 등을 포함하며 현재까지 개발되어 시판되는 항암제뿐만 아니라 개발중이거나 개발예정인 항암제를 포함한다. 상기 항암제 중 현재 시판되는 항암제의 종류의 예로는 리툽시맵(Rituximab), 베바시주맵(Bevacizumab, Avastin®), 트라스투주맵(Herceptin®), 이마티닙, 세톡시맵, 류프로렐린 등이 있다.

[0086] (d) 상기 항암제를 처리한 암세포의 전기화학적 신호를 탐지하는 단계.

[0087] 상기 (d) 단계는 상기 (c) 단계에서 암세포에 항암제를 처리한 후의 분리된 암세포에서 나타나는 전기화학적 신호를 탐지하는 단계이다. 이때 상기 신호가 항암제를 처리하지 않은 분리된 암세포의 신호보다 감소하는 경우, 상기 항암제는 상기 암의 치료에 유효한 항암제인 것으로 판정된다.

[0088] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전기화학적 신호의 탐지는 상술한 암세포의 분리 및 동정방법에서와 마찬가지로 LSV 방법을 이용하여 탐지한다.

[0090] 상기 항암제의 스크리닝 방법에 있어서, 상기 (a) 내지 (b) 단계의 나노입자와 암세포를 접촉시키고, 암세포를 분리 및 배양하는 과정에 관한 내용은 상술한 암세포의 분리 및 동정 방법과 동일하게 적용되므로, 과도한 중복 기재를 피하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

[0092] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0093] (a) 본 발명은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고 그 표현형에 따라 암세포를 동정할 수 있는 방법을 제공한다.

[0094] (b) 본 발명은 암환자의 시료에서 암세포를 분리하고, 분리된 암세포에 항암제 처리 후 표현형을 확인함으로써

특정 암에 유효하게 작용하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0096] (i) 본 발명의 암세포의 분리 및 동정방법을 이용하는 경우, 순환종양세포 등 암세포의 분리에 활용된 나노입자를 이용하여 추가적인 암세포 염색 방법 없이 세포의 표현형을 분석할 수 있어 암 환자의 치료와 관련한 의학 분야에 있어서 다양하게 활용될 수 있다.

[0097] (ii) 또한, 본 발명의 항암제의 스크리닝 방법을 이용하는 경우, 특정 암에 유효하게 작용하는 항암제를 판정함으로써 해당 암환자에 대한 최적의 항암제를 선택 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0099] 도 1의 (a)는 시그마 알드리치사의 산화철 나노입자의 투과 전자현미경 사진이며(TEM), (b)는 합성한 아연 페라이트 나노입자의 투과 전자현미경 사진을 나타낸 도이다.

도 2의 (a)는 자성 나노입자를 처리하여 부유 암세포를 분리하는 기술에 대한 모식도이며, (b)는 분리된 세포를 배양접시에 키운 광학 현미경 사진, (c)는 부유 암세포의 분리 효율 그래프를 나타낸 도이다.

도 3의 (a)는 MCF-7의 원자현미경 사진, (b)는 3차원 사진이며, (c)는 MCF-7의 자기력 현미경 사진, (d)는 그 3차원 사진이다. (e)는 SK-BR-3의 원자현미경 사진이며, (f)는 그 3차원 사진이며, (g)는 SK-BR-3의 자기력 현미경 사진, (h)는 그 3차원 사진이다.

도 4는 분리된 MCF-7 세포와 SK-BR-3의 linear sweep voltammetry 결과이다.

도 5의 (a)는 특이적인 항암제 처리를 통한 약물 효용성 검출 기술에 대한 모식도이며, (b)는 MCF-7과 SK-BR-3가 동시에 배양되고 있는 금 기판에 허셉틴(Herceptin)을 농도별로 처리했을 때의 linear sweep voltammetry 결과, (c)는 (b)의 I_{pa} 값, (d)는 허셉틴(Herceptin) 처리에 따른 MCF-7과 SK-BR-3의 사멸율을 확인한 MTT 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0100] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0102] 실시예

[0104] 실시예 1: 산화 철, 아연 페라이트 나노입자를 이용한 부유 암세포의 분리

[0106] 1-1. 산화철 및 아연페라이트 나노입자의 합성

[0107] 산화 철 나노입자와 아연 페라이트 나노입자에 각각 EGFR(epidermal growth factor receptor) 항체, EpCAM(epithelial cell adhesion molecule) 항체를 부착한 뒤 유방암 세포주인 MCF-7과 SK-BR-3 세포를 분리해 내는 실험을 진행하였다.

[0108] 50 nm 이하의 크기를 가진 산화 철 나노입자는 시그마알드리치(sigma-aldrich)사에서 구매하였으며, 아연 페라이트 나노입자는 다음의 합성과정을 통해 합성하였다.

[0109] 먼저 $Fe(acac)_3$ (2 mM), $ZnCl_2$ (1 mM), 올레일아민(Oleylamine) (6 mM), 올레산(oleic acid) (6 mM), 1,2-헥사데카네다이올(1,2-hexadecanediol) (10 mM) 그리고 트리옥틸아민(trioctylamine) (20 mL)을 섞어 200℃까지 2 시간 동안 가열한 다음, 1시간 동안 300℃로 가열하고, 상온에서 냉각하였다. 합성된 아연 페라이트 나노입자는 자석을 이용해 분리하고, 헥산(Hexane)에 분산시킨 뒤 투과 전자현미경을 통해 합성 결과를 확인하였다.

[0110] 결과는 도 1에 나타내었다.

[0112] 1-2. 산화철 및 아연페라이트 나노입자에 항체의 고정화

[0113] 다음으로, 자성 나노입자에 EGFR 항체와 EpCAM 항체를 고정화하기 위하여 다음과 같은 과정으로 실험을 진행하였다. 상기에서 구입 또는 합성한 각각의 자성 나노입자를 에탄올에 1 mg/mL의 농도로 분산한 뒤, 1% 아미노프로필트리에톡시실란(aminopropyltriethoxysilane)을 8시간 동안 처리하여 나노입자 표면에 아민기를 생성하였다. EDC((1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide)/NHS(N-hydroxysuccinimide) 커플링 법을 이용해 산화 철 나노입자에는 EGFR 항체(R&D systems, AF 231)를 부착하고, 아연페라이트 나노입자에는 EpCAM 항체(R&D systems, AF 960)를 부착하였다.

[0115] 1-3. 항체부착 산화철 및 아연 페라이트 나노입자를 이용한 부유 암세포의 분리

[0116] 상기 1-2에서 EGFR 또는 EpCAM 항체를 부착시킨 자성 나노입자를 MCF-7 세포와 SK-BR-3 세포의 표면 단백질과 상기 항체가 부착된 자성 나노입자가 결합할 수 있도록 2시간 동안 처리하였다. 그 다음, 상기 자성 나노입자가 결합한 암세포주가 담긴 코니칼 튜브의 하단에 네오디움 자석을 이용해 30분간 자기장을 인가하여 암세포를 분리하였다.

[0117] 결과는 도 2에 나타내었다.

[0118] 도 2의 A의 모식도에 나타난 바와 같이, EpCAM 항체가 부착된 아연 페라이트 나노입자는 MCF-7 세포주에, EGFR 항체가 부착된 산화철 나노입자는 SK-BR-3 세포주에 결합하여 각 세포의 분리가 가능하다.

[0119] 도 2의 B에 나타난 바와 같이, MCF-7 및 SK-BR-3는 각각 본 발명의 EpCAM 항체-아연 페라이트 나노입자, EGFR 항체-산화철 나노입자와 결합하였고, 자기장에 의해 분리가 가능함을 확인하였다.

[0120] 도 2의 C에 나타난 바와 같이, 본 발명의 자성 나노입자는 MCF-7 세포는 80.95%의 회수율을 나타내었고, SK-BR-3 세포는 64.17%의 회수율을 나타내었다.

[0122] 실시예 2: 자기적 검출기술을 이용한 분리된 암세포의 표현형 확인

[0123] 분리된 암세포주의 자기적 신호를 측정하여 암세포의 표현형을 분석하기 위하여, 상기 실시예 1-3에서 분리한 부유 암세포를 일반 배양접시에 RPMI 1640 배지 (Welgene, LM-011-01)를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 Scanning Probe Microscope의 일종인 자기력 현미경(Magnetic Force Microscopy, MFM)으로 관찰하기 위해 4% 클로로포름으로 고정하였으며, 세포 내부의 수분을 제거하기 위해 에탄올을 처리해 암세포 내부의 수분을 완전히 제거하였다.

[0124] MCF-7 암세포는 세포 표면에 EGFR 보다 EpCAM을 더욱 많이 발현하고, SK-BR-3 세포는 반대로 EpCAM보다 EGFR을 더욱 많이 발현하는 것으로 알려져 있다. 따라서 상기 각각의 암세포에는 자성 나노입자가 다른 비율(MCF-7 세포주: 산화 철 < 아연 페라이트, SK-BR-3 세포주: 산화 철 > 아연 페라이트)로 부착되게 되며, 이를 자기력 현미경 (NT-MDT, NTEGRA Spectra)을 통해 확인하였다.

[0125] 분리된 MCF-7 암세포주의 자기력 현미경상 이미지는 도 3의 A 내지 D에, 분리된 SK-BR-3 암세포주의 자기력 현미경상 이미지는 도 3의 E 내지 H에 나타내었다.

[0126] 상기 산화 철 나노입자는 초 상자성체 (superparamagnetic)의 성질을 띄며, 상기 아연 페라이트 나노입자는 강자성체 (ferromagnetic)의 성질을 띄어, 자기력 현미경 상의 이미지에 있어 차이를 나타내게 된다. 즉, 자기력 현미경 상에서 산화철 나노입자의 신호는 약한 양의 신호를 나타내며, 아연 페라이트 나노입자는 강한 음의 신호를 보인다.

[0127] 도 3에 나타난 바와 같이, 산화 철 보다 고정된 아연 페라이트의 양이 많은 MCF-7의 경우, 아연 페라이트에 의한 강한 음의 신호가 주로 나오게 되며(도 3의 A 내지 D), 아연 페라이트 보다 고정된 산화 철의 양이 많은 SK-BR-3의 경우, 산화 철 나노입자에 의한 약한 양의 신호가 주로 검출됨을 확인할 수 있었다(도 3의 E 내지 H).

[0129] 실시예 3: 전기화학적 검출기술을 이용한 분리된 암세포의 표현형 확인 및 유효 항암제의 스크리닝 방법

[0130] 3-1. LSV(linear sweep voltammetry)를 이용한 암세포의 표현형 확인

[0131] 분리된 암세포의 전기적 신호를 측정하여 암세포의 표현형 분석을 수행하기 위하여, 상기 실시예 1-3에서 자성 나노입자를 이용해 분리한 부유 암세포를 금 기관 위에 RPMI 1640 배지 (Welgene, LM-011-01)로 37℃, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS(Sigma aldrich)를 채워 LSV를 측정하였다. 상기 금 기관은 1.3cm x 2.8cm 크기의 유리 기관 위에 크롬 (5 nm 두께)과 금(20 nm 두께)이 증착된 것을 사용하였고, 금 기관 상의 암세포의 전기화학적 신호는 LSV(linear sweep voltammetry) 측정기(CH instrument, CHI660A)로 측정하였다.

[0132] 결과는 도 4에 나타내었다.

[0133] 각각의 암세포가 가진 표면 단백질의 차이에 의해 전위에 따른 산화전류의 크기 및 위치는 다르게 나타난다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 각각의 암세포의 표면 단백질의 차이에 의해 산화 전류의 피크(peak)는 서로 다르게 나타남을 알 수 있었다.

[0135] 3-2. LSV(linear sweep voltammetry)를 이용한 항암제에 따른 반응성 확인

[0136] 본 발명의 자성 나노입자를 통하여 분리된 암세포에 적절한 항암제를 처리하고 암세포주에 따른 특이적인 약물의 효용성을 전기적 검출기술(LSV)로 확인하고자, 상기 3-1에서와 같이 MCF-7 세포와 SK-BR-3세포가 동시에 배양된 금 기관 상에, RPMI 1640 배지 (Welgene, LM-011-01)로 금 기관 위에서 37℃, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후, SK-BR-3에 특이적으로 작용하는 항암제인 허셉틴(Herceptin)을 농도별($\mu\text{g/ml}$)로 24시간 처리하였다. 마지막으로 배지를 제거하고 PBS(Sigma aldrich)를 채워 LSV를 측정하였다

[0137] 결과는 도 5의 B 및 C에 나타내었다.

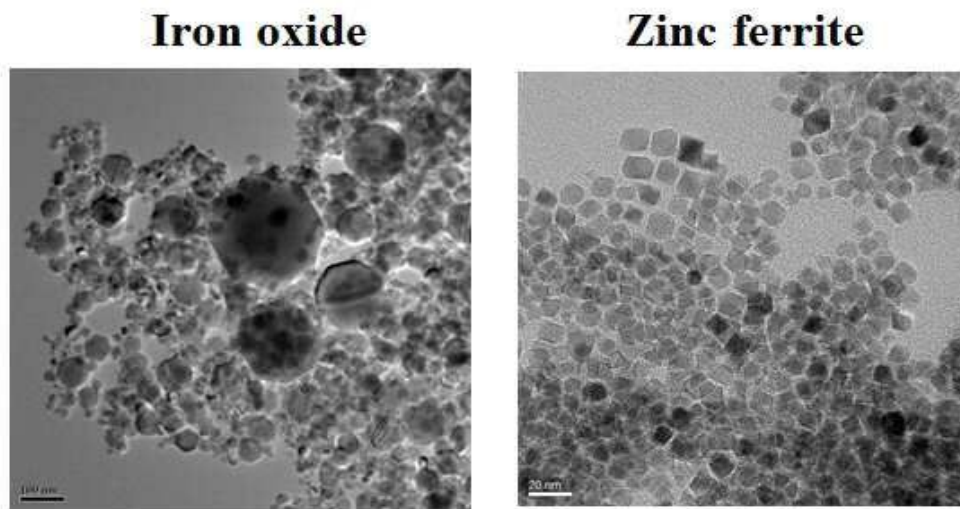
[0138] 도 5의 B 및 C에 나타낸 바와 같이, 허셉틴의 농도에 의존적으로 SK-BR-3 세포의 전기화학적 신호(산화전류, I_{pa})만이 감소되었다.

[0139] 도 5의 D는 SK-BR-3 암세포주에만 허셉틴이 특이적으로 작용함을 보여주기 위한 허셉틴의 농도별 처리에 따른 MCF-7과 SK-BR-3 암세포주의 세포 생존율을 확인한 MTT 시험 결과이다. 도 5 D에 나타낸 바와 같이, 허셉틴은 SK-BR-3 세포주에만 특이적으로 작용하였음을 알 수 있다.

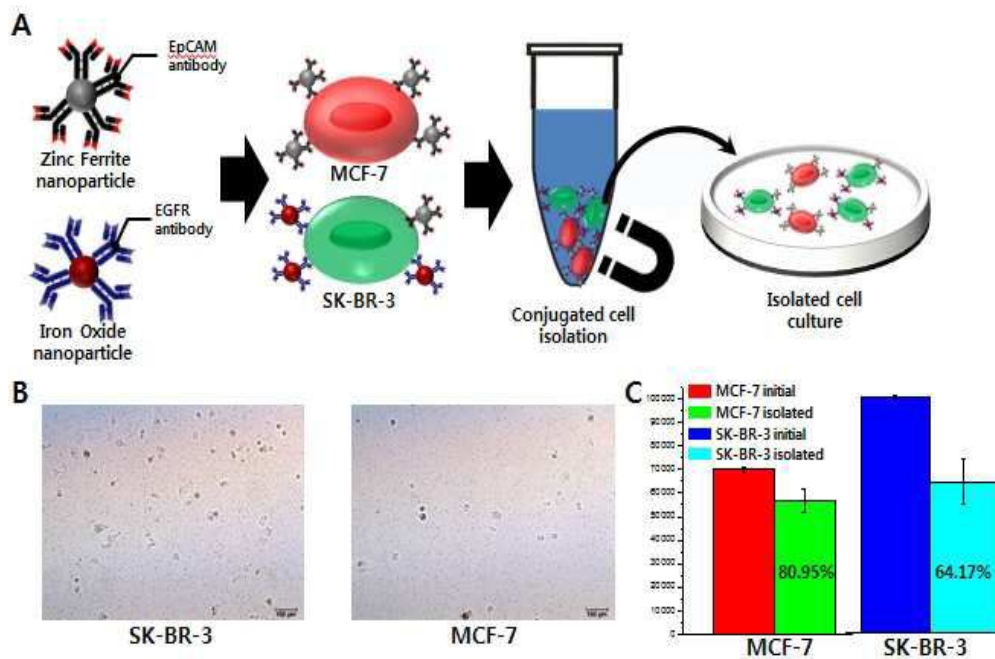
[0141] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

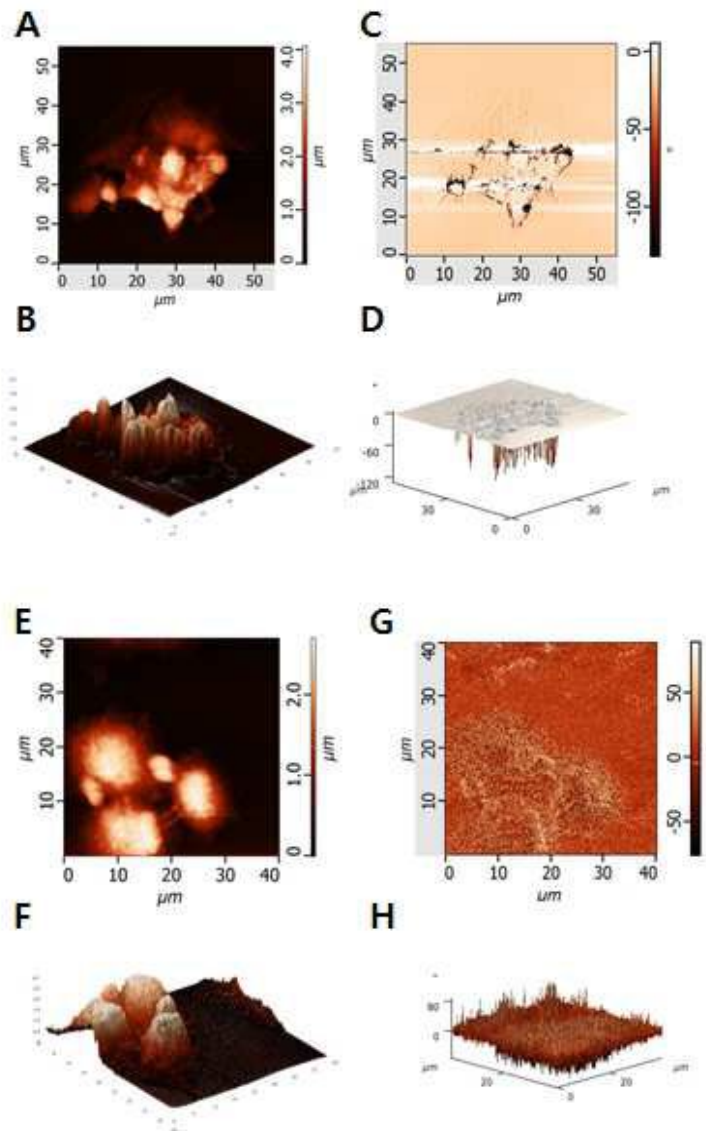
도면1



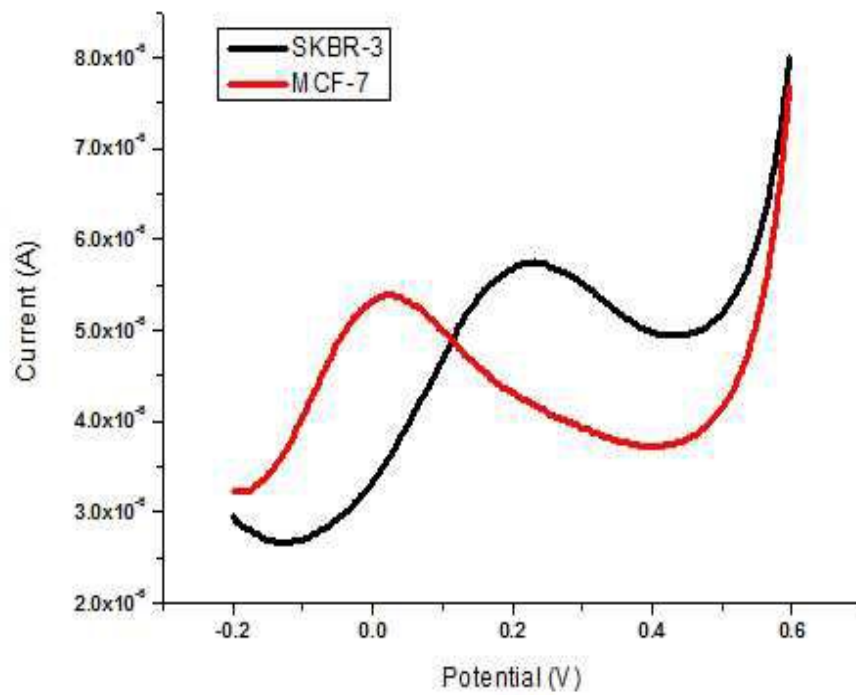
도면2



도면3



도면4



도면5

