



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2013-0124915

(43) 공개일자

2013년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/14 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2013-0051441

(22) 출원일자

2013년05월07일

심사청구일자

2013년05월07일

(30) 우선권주장

1020120048164 2012년05월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

한양대학교 산학협력단

서울 성동구 행당동 17 한양대학교 내

(72) 발명자

이경미

서울특별시 강남구 압구정로 151 신현대아파트

105동 505호

신홍수

서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 생명

공학과

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 7 항

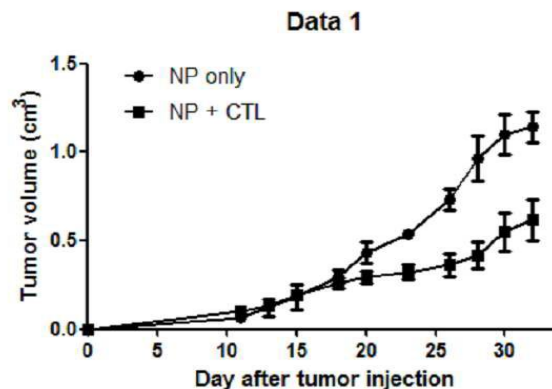
(54) 발명의 명칭 면역세포가 탑재된 항암면역치료용 스캐폴드

(57) 요약

본 발명은 항암면역세포치료를 위해 암 환자에게 이식할 수 있는 면역세포가 탑재된 항암면역치료용 스캐폴드, 그의 제조방법 및 그의 용도를 제공한다.

본 발명에 따른 면역세포가 탑재된 항암면역치료용 스캐폴드는 간단한 공정을 통해 제조될 수 있으며, 이를 암 환자의 종양 부위에 이식하게 되면, 통상 정맥 주사에 의해 이루어지는 종래의 항암면역치료와는 달리 면역세포의 소실 없이 면역세포가 종양 부위에서 국소적으로 서서히 방출되어 우수한 항암면역치료 효과를 거둘 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

손정희

서울특별시 노원구 동일로177길 14 303호

김광희

서울특별시 성북구 안암동5가 미래융합기술관 318호

김태훈

서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 IT/B
T관 1110호

캐시안 이

서울특별시 성북구 안암동 5가 미래융합기술관 318호

조앤 응 페이 지아

서울특별시 성북구 안암동 5가 미래융합기술관 318호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K000815

부처명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 나노체 기반 바이오메디컬 융합형 항암세포치료 원천기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 포항공과대학교

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드에 면역세포가 탑재되어 있는 항암면역치료용 스캐폴드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 PLGA(poly(lactide-co-glycolide)), PLA (poly(lactic acid)), PGA (poly(glycolic acid)) 또는 PCL(poly(caprolactone))인 항암면역치료용 스캐폴드.

청구항 3

제1항에 있어서,

면역세포는 세포독성 T 세포, NK 세포, NKT 세포 및 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포인 항암면역치료용 스캐폴드.

청구항 4

제1항에 있어서,

면역세포 특이적 항체는 항-CD3 항체, 항-CD8 항체, 항-CD44 항체, 항-CD11a 항체, 항-ICAM-1 항체, 항-CD28 항체, 항-CD2, 항-CD58 및 항-CD48로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체인 항암면역치료용 스캐폴드.

청구항 5

면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드에 면역세포를 탑재시키는 것을 포함하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항암면역치료용 스캐폴드의 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항암면역치료용 스캐폴드를 유효성분으로 포함하는 항암면역치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항암면역치료용 조성물은 중앙 부위로의 이식을 위한 것인 항암면역치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 항암면역세포치료를 위해 암 환자에게 이식할 수 있는 면역세포가 탑재된 항암면역치료용 스캐폴드,

그의 제조방법 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 항암면역치료란 환자의 혈액에서 직접 면역세포를 채취하여, 체외에서의 배양을 통해 암세포만을 선택적으로 살해할 수 있는 면역세포의 수를 늘리거나 기능을 강화시킨 후 다시 체내로 주입하여 암을 치료하는 방법이다.
- [0003] 즉 면역세포를 채취하여 배양하는 과정에서 체내에서 면역세포들 간에 작용하는 신호 전달 물질 등을 이용하여 강력한 활성화 자극을 줌으로써, 원래 체내에서 수행하던 항암면역기능을 더욱 강화하고, 면역세포의 수를 수백 배 내지 수천 배로 늘린 후에 몸으로 되돌려줌으로써 암을 치료하는 것이다.
- [0004] 일반적인 면역세포치료의 경우, 환자의 혈액을 채취하여 세포를 분리하고 체외배양 후 정맥투여를 통해 다시 환자의 체내로 주입하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 체외에서 활성화시킨 면역세포를 환자 몸에 정맥투여할 경우 대부분의 세포가 세망내피계(Reticulo-endothelial system, RES)에 의해 트랩핑되어 종양 부위로 도달하는 세포의 수는 매우 국한되어 있는 것으로 알려져 있다(M Rodrigues, *et al. Journal of Experimental Medicine*, 175:895, 1992). 상기 세망내피계는 간, 폐 등의 세망결합조직(reticular connective tissue)에 있는 세포들로서 주로 단핵식세포(mononuclear phagocyte)로 구성이 되어있으며, 이물질에 대한 생체 면역방어를 담당하고 있다.
- [0005] 또한, 면역세포의 정맥투여에 의한 항암치료는 혈액을 통과하여 전달되기 때문에 최종적으로 종양 부위로 도달하는 면역세포의 수가 매우 적다는 한계점을 지니고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에, 본 발명은 면역세포가 종양 부위에 직접적으로 전달될 수 있는 새로운 항암면역치료법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 용어 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0008] 본 발명자들은 항암면역치료법에 있어서, 면역세포가 종양 부위에 제대로 전달되지 못하는 단점을 극복하기 위하여, 체외에서 활성화시킨 면역세포를 스캐폴드를 이용하여 임플란트 형태로 종양 부위에 이식하는 경우, 면역세포가 종양 부위에서 국소적으로 서서히 방출되어 암 치료 효과가 우수하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0009] 본 발명에서 사용되는 항암면역치료용 스캐폴드를 제조하기 위하여 다음의 요건을 충족시켜야 한다:
- [0010] 1) 생체적합한 스캐폴드;
- [0011] 2) 스캐폴드에 면역세포가 특이적으로 결합해야 함;
- [0012] 3) 스캐폴드에 결합한 면역세포가 활성화가 되어야 함; 및
- [0013] 4) 스캐폴드에 결합한 면역세포가 시간이 경과함에 따라 서서히 방출되어야 함.
- [0014] 본 발명에서는, 1번 요건의 충족을 위해 수종의 소재를 스크린한 결과 생체적합성 고분자 나노섬유로 이루어진 스캐폴드가 가장 적합한 것으로 확인되었다. 또한, 2번과 3번의 스캐폴드 요건을 충족시키기 위해 나노섬유의 표면에 면역세포 특이적 항체를 결합시키고, 면역세포 특이적 항체와 면역세포의 결합에 의하여 스캐폴드에 면역세포를 탑재시켰다.

- [0015] 따라서, 본 발명은 면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드에 면역세포가 탑재되어 있는 항암면역치료용 스캐폴드를 제공한다.
- [0016] 나노섬유는 적은 공간에 넓은 표면적을 지니고 있으며, 내구성이 강하고, 다루기가 매우 간편하고, 다양한 형태로 제작이 가능하며 또한, 다양한 물질을 화학적으로 결합시키는 것이 용이하다는 특징이 있을 뿐만 아니라 생체적합성 소재를 이용하여 제작가능하기 때문에 의료 분야에 활용하기 적합하다. 특히, 생체적합성 고분자 나노섬유의 경우 독성이 없고 생체 내에서 분해가 가능하여 이미 상처치료, 인공피부, 혈액투석, 인대 등 다양한 생의학적 분야에 널리 상용화가 되어 있는 상태이다.
- [0017] 본 발명의 한 구체예에서, 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드의 제조를 위해 사용되는 상기 생체적합성 고분자는 PLGA(poly(lactide-co-glycolide)), PLA (poly(lactic acid)), PGA (poly(glycolic acid)), PCL(poly(caprolactone)) 등일 수 있다. 이 중 PLGA, PLA 및 PGA는 미국 식품의약청(FDA)으로부터 인체에 사용가능한 생분해성 고분자로 승인되어 사용되고 있는 것이므로 바람직하게 이용될 수 있다. 본 발명에서 사용하는 생체적합성 고분자는 이에 제한되는 것은 아니나, 수평균 분자량이 10,000 내지 1,000,000, 예컨대, 50,000 내지 500,000의 범위인 것을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 이 중 PLGA를 이용하여 나노섬유 스캐폴드를 제작하여 항암면역치료용 스캐폴드로서 사용하였다.
- [0018] 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드는 당업계에 공지된 방법을 통하여 제조할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드는 전기방사법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0020] 상기 전기방사법은 통상의 나노섬유 제조시 사용되는 방법으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 생체적합성 고분자를 용매에 용해시켜 고분자 용액을 제조한 후, 상기 고분자 용액을 전기방사 장치에 주입하고 토출시켜 다공성 구조를 갖는 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드를 제조한다. 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드의 제조를 위해 사용되는 고분자 용액의 제조시 사용되는 용매, 고분자 용액의 농도, 전기방사에 사용되는 전압, 방사거리, 유속 등은 사용되는 고분자의 종류나 목적하는 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드의 물성 등에 따라 당업자가 적절히 조절할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 사용하는 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드에 있어서, 나노섬유의 직경, 공극의 크기, 공극률 등은 이식을 원하는 면역세포의 크기 등을 고려하여 필요에 따라 고분자 용액의 농도, 전기방사의 조건 등을 적절히 조절함으로써 제어할 수 있다.
- [0022] 마찬가지로, 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드의 크기와 두께는 이식될 종양 부위의 크기, 탑재될 면역세포의 양 등을 고려하여 당업자가 적절히 선택하여 제조할 수 있다.
- [0023] 제조된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드는 친수성을 갖도록 하거나 항체와의 결합력을 향상시키기 위해 추가적으로 표면개질될 수 있다. 이러한 표면개질의 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 필요에 따라 적절히 선택하여 적용가능하다.
- [0024] 본 발명에서 사용하는 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드는 면역세포 특이적 항체가 결합되어 있다. 면역세포의 종류에 따른 표적 특이적 리간드에 대해서는 당업계에 공지되어 있다.
- [0025] 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드에 면역세포 특이적 항체를 결합하는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 별도의 표면 개질을 수행하거나 결합제를 사용하지 않더라도 단순한 혼합에 의해서도 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드에 항체를 결합시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 딥코팅을 통해 항체를 스캐폴드에 결합시킨다.
- [0026] 한편, 본 발명에 따라 종양부위에 이식되어 항암면역치료 효과를 나타내는 면역세포는 세포독성 T 세포, NK 세포, NKT 세포 및 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포일 수 있다. 항암면역치료에 적절한 세포의 선택은 환자의 건강상태, 종양의 종류 및 병기 등을 고려하여 당업자가 선택할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 면역세포는 세포독성 T 세포(CTL)일 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 면역세포를 스캐폴드에 고정시켜주는 역할을 하는 면역세포 특이적 항체로는 항-CD3 항체, 항-CD8 항체, 항-CD44 항체, 항-CD11a 항체, 항-ICAM-1 항체, 항-CD28 항체, 항-CD2, 항-CD58 및 항-CD48로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체를 사용할 수 있다. 상기 면역세포 특이적 항체는 면역세포의 종류에 따라 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 면역세포로서 세포독성 T 세포(CTL)를 사용할 경우 항-CD3 항체

및/또는 항-CD8 항체를 사용할 수 있다.

- [0028] 본 발명은 또한 면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드에 면역세포를 탑재시키는 것을 포함하는 상기 항암면역치료용 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [0029] 면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드는 면역세포의 종류에 따라 미리 제작되어 상용화된 제품으로 제공될 수 있다. 한편, 면역세포는 항암면역치료용 스캐폴드의 이식 직전에 환자로부터 채취하거나 미리 채취해 둔 자가 또는 동종의 타가 유래의 면역세포를 증식시킨 후 사용할 수도 있다. 면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드는 면역세포 특이적 항체에 의해 스캐폴드에 대한 면역세포의 부착력을 높여주고 있기 때문에 장기간의 배양에서도 안정성을 제공하며, 면역세포들 간의 적절한 공간 확보를 통해 효율적인 세포 증식을 가능하게 한다.
- [0030] 본 발명에서 의미하는 “탑재”는 단순히 스캐폴드 상에 면역세포가 존재하는 것을 의미하는 것이 아니라 면역세포 특이적 항체와 면역세포 간의 결합을 통한 스캐폴드 내 면역세포의 고정을 의미한다. 본 발명에서는 면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드를 사용하기 때문에 면역세포의 탑재를 위한 특별한 공정을 필요로 하지 않는다. 면역세포 특이적 항체와 면역세포 간에는 특이적이고도 자발적인 결합이 일어나므로, 면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드와 면역세포를 접촉시키면 상기 스캐폴드에 결합된 면역세포 특이적 항체에 의해 면역세포가 결합되어 스캐폴드 내에 탑재되게 된다.
- [0031] 하기 실시예에서는 항암면역치료를 위한 생체 이식형 세포탑재 나노스캐폴드로서 PLGA 기반 나노섬유 스캐폴드를 제작하였고 여기에 항-CD3 mAb를 결합시켰으며, 이러한 시스템을 사용하여 세포독성 T세포를 스캐폴드 상에서 배양하고 활성화시킨 결과를 보여준다.
- [0032] 본 발명은 또한 상기 항암면역치료용 스캐폴드를 유효성분으로 포함하는 항암면역치료용 조성물을 제공한다.
- [0033] 앞서 설명한 바와 같이 상기 항암면역치료용 스캐폴드는 종양 부위의 이식을 통해 항암면역치료를 수행하기 위한 유효성분으로서 사용된다.
- [0034] 본 발명에 따른 항암면역치료용 스캐폴드는 면역세포가 스캐폴드에 탑재된 즉시 이식할 수도 있고, 일정 기간의 배양을 통해 스캐폴드 상에서 면역세포를 증식시킨 후 생체 내로 이식하여도 좋다.
- [0035] 상기 항암면역치료용 조성물은 본 발명에 따른 항암면역치료용 스캐폴드뿐만 아니라 이를 이식에 적절한 상태로 유지하기 위한 수용액, 예를 들어 완충액 또는 주사제용 수용액 등을 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 항암면역치료용 스캐폴드 내 면역세포의 양은 암의 종류, 암의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 종류 및 함량, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 항암면역치료용 스캐폴드 내에 탑재되는 면역세포는 1×10^6 cells/kg 내지 1×10^{11} cells/kg, 예컨대 1×10^6 cells/kg 내지 1×10^8 cells/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명에 따른 면역세포가 탑재된 항암면역치료용 스캐폴드는 간단한 공정을 통해 제조될 수 있으며, 이를 암 환자의 종양 부위에 이식하게 되면, 통상 정맥 주사에 의해 이루어지는 종래의 항암면역치료와는 달리 면역세포의 소실 없이 면역세포가 종양 부위에서 국소적으로 서서히 방출되어 우수한 항암면역치료 효과를 거둘 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 세포독성 T 세포(CTL)-특이적 항체가 결합된 스캐폴드에 대한 CTL의 결합 정도를 나타낸 것으로, a는 반응온도와 반응용액에 따른 결합 정도를 결합하지 않고 남아있는 세포수를 통해 측정한 것이고, b는 스캐폴드에 고정된 항-CD3 mAb (클론명 OKT3)와 항-CD8 mAb (클론명 OKT8)의 조합에 의한 CTL의 결합 정도를 결합하지 않고 남아있는 세포의 수를 통해 측정한 것이다.

도 2는 CTL-특이적 항체가 결합된 스캐폴드에 CTL을 탑재시키고 4일 동안 배양한 결과를 나타낸 것으로, a는 배

양 3일 및 4일째 세포배양액에 존재하는 세포의 수를 측정한 것이고, b는 4일 동안 배양한 후 DAPI 염색 (핵 염색)을 한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 CTL-특이적 항체가 결합된 스캐폴드에 CTL을 탑재시키고 3일 동안 배양시킨 후, 타겟 세포를 넣어주어 1일 더 배양한 후, FACS 분석한 결과를 나타낸 것으로, a는 CD3 수용체와 CD8 수용체의 발현을 나타낸 결과이고, b는 Ki 67 (세포증식 마커)과 CD25 (세포증식 마커) 수용체의 발현을 나타낸 것이며, c는 세포살상 능력 마커인 Granzyme b의 발현을 나타낸 결과이다.

도 4는 CTL-특이적 항체가 결합된 스캐폴드에 CTL을 탑재시키고 3일동안 배양시킨 후, 세포배양액 내에 있는 CTL을 수확하여 타겟 세포와 6시간 동안 공동배양을 하여 세포살상 능력 마커인 CD107a와 IFN γ 발현을 FACS 분석한 그림이다.

도 5의 a는 CTL이 탑재된 스캐폴드의 항암 효과를 규명하기 위한 마우스 xenograft 모델을 선별하기 위한 시험관 내 종양세포 살상 능력을 측정한 결과를 나타낸 것이고, b는 선별된 마우스 xenograft 모델에서 CTL의 수에 따른 주입된 종양세포의 살상효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0040] 실시예 1. 면역세포 결합용 나노스캐폴드의 제조

[0041] 면역세포 특이적 항체가 결합된 생체적합성 고분자 나노섬유 스캐폴드의 제조에 사용할 나노섬유로는 PLGA{poly(lactic-co-glycolic acid)}(RESOMER LG857S)를 사용하였다. PLGA를 HFP(1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-methyl-2-propanol, Wako Chemical, Ltd.)에 2중량%로 녹여, PLGA 용액을 만들고, 실린더 모양 컬렉터(diameter, r=9cm)를 알루미늄 포일로 감싼 후 상기 PLGA 용액을 담은 주사기로 고정시켜서 17.5kv의 전압을 걸어주었다. 에탄올에 건조시킨 PLGA 나노섬유를 스웰링하여 사각접시에 나노섬유를 고정시킨 후, 증류수로 세척하였다. 세척된 나노섬유를 Tris-HCl(10mM, pH 8.5) 버퍼에 5분 동안 담근 후, 건조시키고, 건조한 나노섬유를 에탄올로 적시고 시트(sheet) 형태의 스캐폴드를 제작하고, 멸균하였다.

[0042] 항-인간 CD3(OKT3, eBioscience, San Diego, CA) 또는 항-인간 CD8(OKT8, eBioscience, San Diego, CA) 항체를 함유하는 Tris-HCL 완충용액에 멸균된 스캐폴드를 담겨 4℃에서 스캐폴드에 항체를 코팅시켰다.

[0043] 실시예 2: 항체가 코팅된 스캐폴드와 세포독성 T 세포의 결합

[0044] 스캐폴드에 결합, 탑재시키는 항암 특이적 세포독성 T 세포(CTL) 클론은 방사선 조사된 antigen presenting cells(APC)로서 lymphoblastoid cell line(LCL) 세포와 말초혈액세포 유래의 것을 사용하였으며, 50 U/ml의 IL-2, 30 ng/ml의 항-CD3 mAb (OKT3, eBioscience, San Diego, CA) 항체를 넣어주어 2주간 배양을 유지하였다.

[0045] 실시예 1을 통해 얻은 항체가 코팅된 스캐폴드에 일정 수의 CTL을 넣어주고, 210xg(gravity)의 속도로 1분간 원심분리하고 37℃ 혹은 4℃에서 30분간 반응시켜주었다. 반응용액인 MACS buffer의 조성은 5% fetal bovine serum이 들어있는 phosphate buffered saline(PBS) 용액이며, CTL의 배지(CTLm로도 표시)로는 10% fetal bovine serum이 들어있는 RPMI 1640(Thermo Scientific, 미국)를 사용하였다.

[0046] 2-1: 반응조건에 따른 스캐폴드에 대한 CTL의 결합능 분석

[0047] 항체가 코팅된 스캐폴드와 CTL의 결합은 37℃와 4℃의 조건에서 반응용액 (MACS 또는 CTLm)으로 30분 또는 1시간의 조건에서 수행되었다.

[0048] OKT3 항체로 코팅된 스캐폴드의 경우, CTLm 반응용액에서 37℃로 반응시켰을 때 가장 높은 T세포 결합 정도를

결합하지 않고 남아있는 세포의 수를 측정하여 나타내었으며, OKT8 항체로 코팅된 스캐폴드의 경우, 반응용액이나 온도에 따른 차이는 크지 않은 것으로 나타났다(도 1의 a).

[0049] 2-2: 스캐폴드에 결합된 항체에 따른 스캐폴드에 대한 CTL의 결합능 분석

[0050] 항-CD3 mAb (클론명 OKT3)와 항-CD8 mAb (클론명 OKT8)의 조합에 의한 CTL의 결합 정도를 결합하지 않고 남아있는 세포의 수를 통해 측정하였다. 그 결과, OKT3와 OKT8을 복합적으로 조합시킨 경우, 세포가 가장 많이 결합되어 있음을 확인하였다(도 1의 b).

[0051] 2-3: 스캐폴드에 결합된 T 세포의 배양

[0052] 항체가 코팅된 스캐폴드에 CTL을 결합시키고 4일 동안 배양하면서, 3일째, 4일째 세포배양액에 존재하는 세포의 수를 측정하였다 (도 2a). OKT8 항체가 코팅된 경우 가장 많이 세포 수가 측정되었으며, 두 번째로는 OKT3+OKT8 항체가 코팅된 경우이었으며, OKT3 항체로만 코팅된 경우에는 음성대조군인 no Ab 인 경우와 유사한 세포수가 측정되었다.

[0053] 항체가 코팅된 스캐폴드에 CTL을 결합시키고 4일 동안 배양한 후 DAPI 염색 (핵 염색)을 하였다 (도 2b). DAPI로 염색한 결과 스캐폴드 위에 결합되어 있는 세포의 수는 OKT3+OKT8인 경우가 가장 많았다. OKT8인 경우에는 세포가 항체와의 결합을 오래 하지 않음을 보여주며 OKT3 항체와의 결합이 CTL의 결합 상태를 잘 유지시켜주는 것을 관찰하였다.

[0054] 실시예 3: 스캐폴드에 결합된 CTL의 기능분석

[0055] 항체가 코팅된 스캐폴드에 CTL을 결합시키고 3일 동안 배양시킨 후, 표적 세포인 526mel 세포주(미국 Fred Hutchinson Cancer Center의 Dr Cassian Yee로부터 얻었으며, human metastatic melanoma 환자 기원의 멜라노마 세포주로서, 이 세포주를 확립한 연구자는 미국 National Institute of Health National Cancer Institute의 Surgery Branch에 있는 Steve Rosenberg 그룹임, H Sumimoto *et al.*, *International Journal of Cancer* 118:472, 2006)를 넣어주어 1일 더 배양한 후, 세포를 모아서 CD3 수용체와 CD8 수용체의 발현을 FACS 분석하였다 (도 3a). 각 항체로 코팅된 스캐폴드에 결합되거나 혹은 증식하고 떨어져 나온 세포주의 세포표면에 발현하고 있는 CD3와 CD8 분자의 발현 정도를 측정한 결과, 항-CD3 항체로 코팅되어있는 경우, 세포 표면에 발현하고 있는 CD3의 발현이 농도 대비 감소하였으며, 항-CD8 항체로 코팅되어 있는 경우에도 세포 표면에 발현하고 있는 CD8의 발현이 농도 대비 감소함을 볼 수 있었다. 이는 스캐폴드에 코팅되어 있는 각 항체에 의해 CTL이 100% 결합하고 있지 않음을 보여주는 결과이다.

[0056] 항체가 코팅된 스캐폴드에 CTL을 결합시키고 3일 동안 배양시킨 후, 표적 세포를 넣어주어 1일 더 배양한 후, 세포를 모아서 Ki 67 (세포증식 마커)과 CD25 (세포증식 마커) 수용체의 발현을 FACS 분석하였다 (도 3b). OKT3 항체가 코팅된 경우에는 OKT3 항체 단독이나 OKT8 조합인 경우 모두 증양의 유무 없이 세포 분열이 높음을 볼 수 있었다.

[0057] 항체가 코팅된 스캐폴드에 CTL을 결합시키고 3일 동안 배양시킨 후, 타겟 세포를 넣어주어 1일 더 배양한 후, 세포를 모아서 세포살상 능력 마커인 Granzyme b의 발현을 FACS 분석하였다 (도 3c). 그 결과, 항-CD3 항체로 코팅되어 있는 경우, 여기에서 증식된 T세포주가 세포살상 능력마커인 Granzyme b의 발현이 증가된 것을 확인하였다.

[0058] 항체가 코팅된 스캐폴드에 CTL을 결합시키고 3일 동안 배양시킨 후, 세포배양액 내에 있는 T세포를 수확하여 타겟 세포와 6시간동안 공동배양을 하여 세포살상 능력 마커인 CD107a와 IFN γ 발현을 FACS 분석하였다 (도 4).

[0059] 그 결과, OKT8 항체가 코팅된 스캐폴드에서 자란 CTL도 양성대조군인 수용액 상의 CTL의 세포 살상 정도를 유지하는 것을 확인하였다.

[0060] 실시예 4: Xenograft 모델에서의 항암효과 확인

[0061] CTL이 탑재된 스캐폴드의 항암효과를 규명하기 위해, 7 내지 10주령의 SCID 마우스(Narabiotech(Seoul, Korea

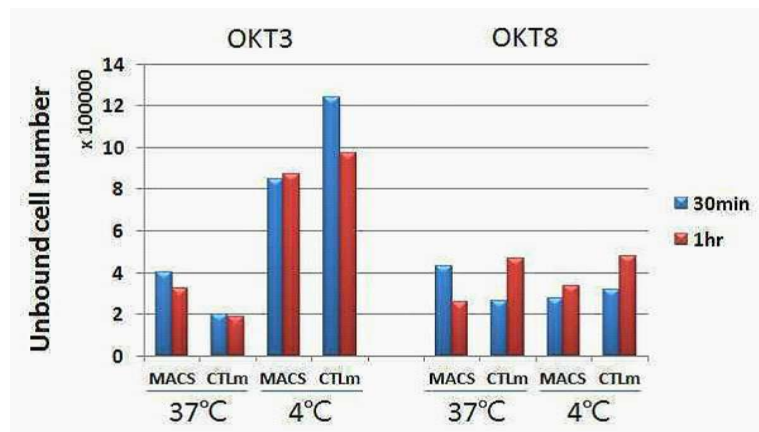
a)를 사용하여 CTL의 수에 따른 주입된 종양세포의 살상 효과를 측정하였다. 모든 과정은 고려대학교 실험동물 운영위원회(KUIACUC-2009-105)의 승인하에 실시하였다.

[0062] 마우스에 526mel 흑색종 세포주를 넣어주어 종양을 형성시켰으며, 종양이 만져질 때 CTL 미탐재 스캐폴드 및 CTL 탐재 스캐폴드를 마우스의 종양 부위에 이식하여 시간에 따른 종양의 크기 변화를 측정하였다. 마우스 종양 부위의 스킨을 절개한 다음 세포가 결합되어 있는 스캐폴드를 종양부위에 이식하였다. 스캐폴드의 직경은 약 1.5 cm 정도가 되며, 스캐폴드 당 약 $0.1-1 \times 10^6$ 개의 세포를 포함한다.

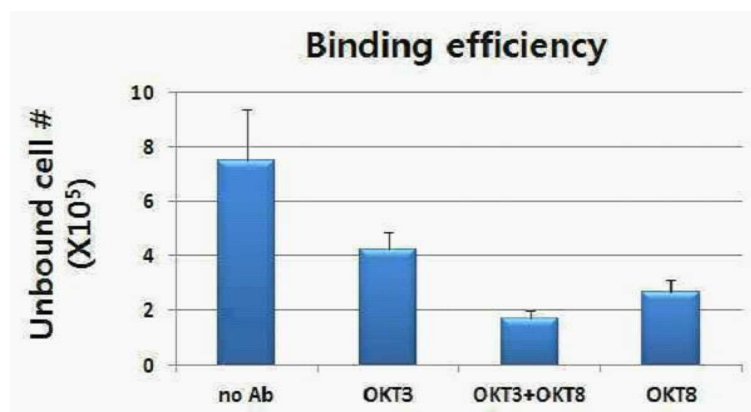
[0063] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 스캐폴드에 CTL이 탐재되어 있을 경우 마우스 종양의 크기의 증가가 둔화되는 것을 관찰하였다.

도면

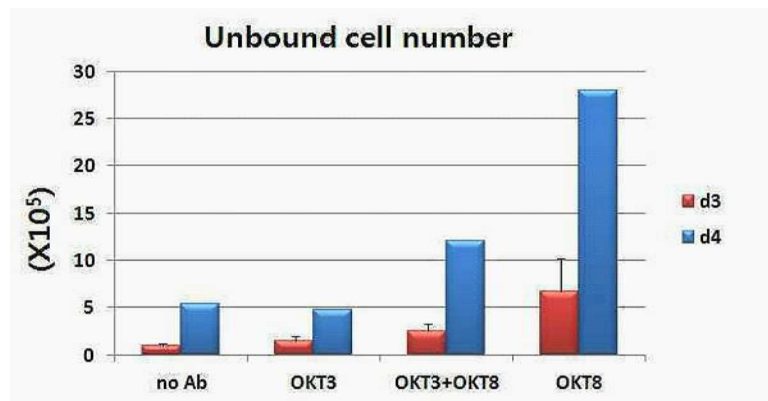
도면1a



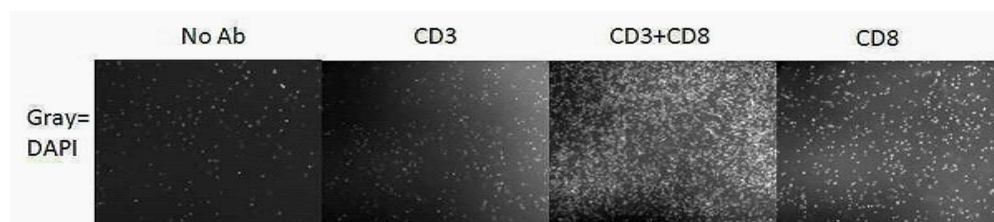
도면1b



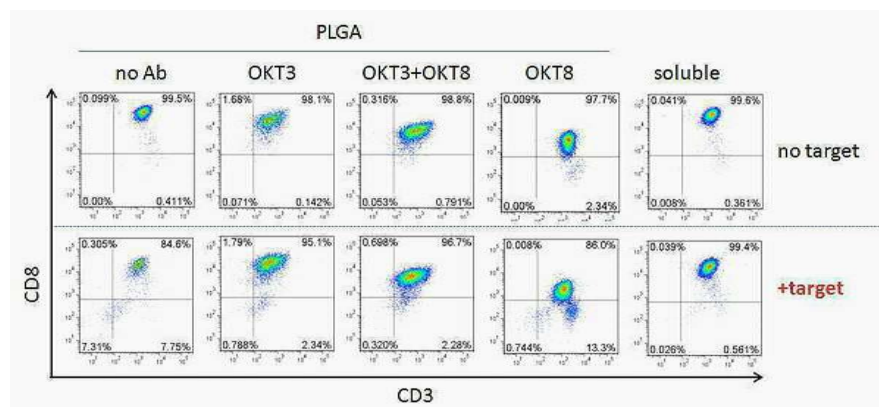
도면2a



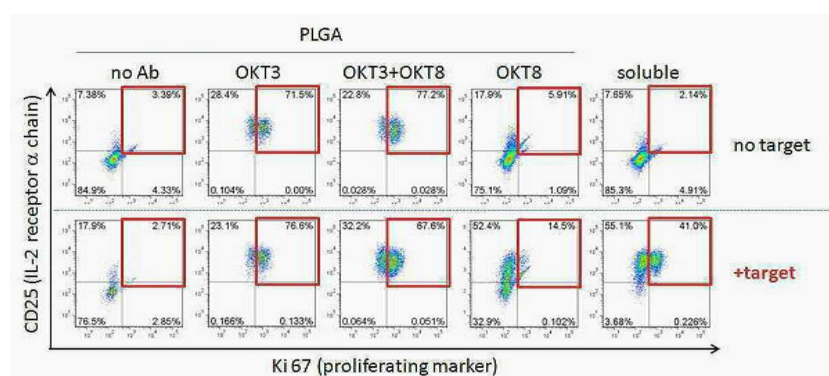
도면2b



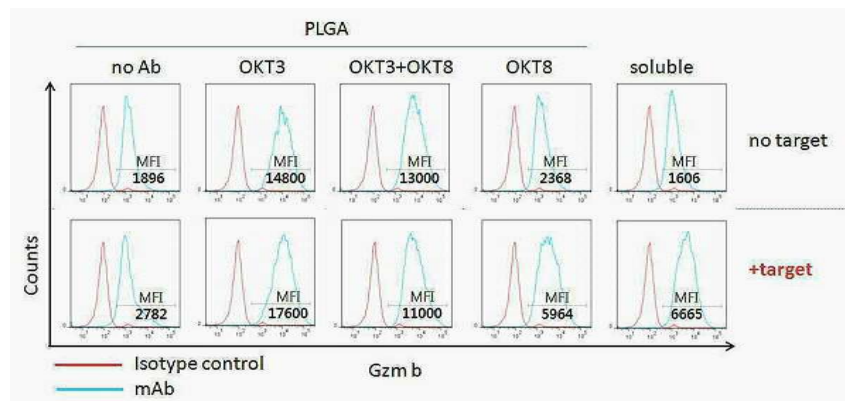
도면3a



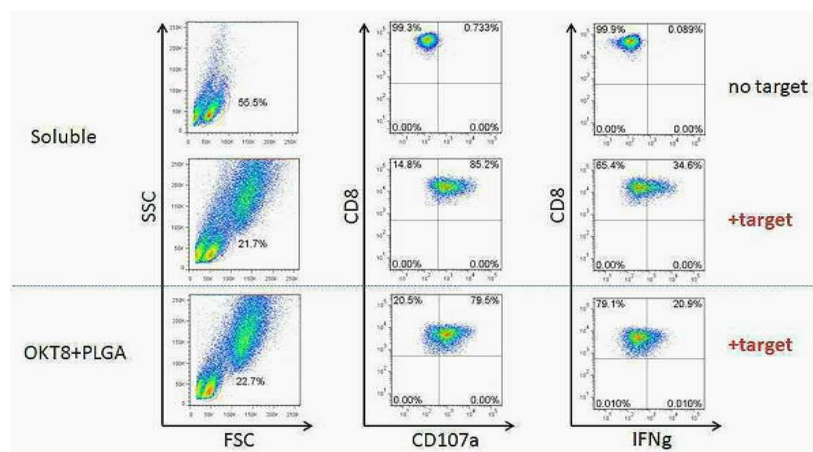
도면3b



도면3c



도면4



도면5

