



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0110127
(43) 공개일자 2021년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0654 (2013.01)

C12N 2506/1346 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0050356

(22) 출원일자 2020년04월24일

심사청구일자 2020년04월24일

(30) 우선권주장

1020200025477 2020년02월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

강희민

서울특별시 강남구 개포로110길 50 래미안루체하임 111동 604호

칸드라카투아

서울특별시 성북구 안암로9가길 9-8 모아원룸 102호 (안암동 4가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최훈식

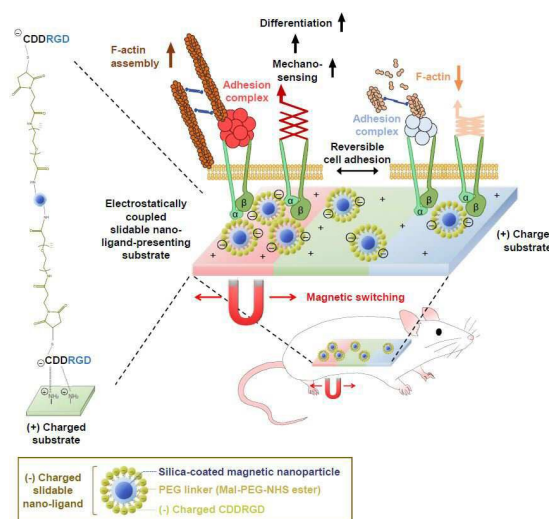
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드 및 이를 이용한 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법

(57) 요약

본 발명은 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드 및 상기 나노리간드를 이용한 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법에 관한 것으로, 본 발명의 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법은 나노리간드를 포함하는 기관에 자기장을 인가함으로써 나노리간드의 슬라이딩을 시간적 및 공간적으로 제어할 뿐만 아니라 가역적인 제어도 가능하며, 상기 자기장 기반 시공간적 제어를 통해 생체 외 및 생체 내에서의 줄기세포 부착 및 분화를 효율적으로 조절할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2529/00 (2013.01)

C12N 2533/10 (2013.01)

C12N 2537/10 (2013.01)

(72) 발명자

배건휴

경기도 화성시 동탄대로시범길 19 동탄역시범더샵
센트럴시티 1402동 2201호

최효준

서울특별시 송파구 양산로8길 24 거여2단지아파트
203동 701호

민선홍

서울특별시 성북구 고려대로 38-1 조은오피스텔
205호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711095810

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 세포와 소재와의 상호작용을 이해하거나 조절하기 위한 거시적인 리간드 역학의 원

격 조종

기 여 율 1/1

과제수행기관명

연구기간 2019.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

자성나노입자를 포함하는 코어;

상기 코어를 감싸도록 구비되고 인테그린 리간드 펩티드를 포함하는 코팅층; 및

상기 코어와 상기 코팅층 사이에 구비되는 링커를 포함하고,

상기 인테그린 리간드 펩티드는 음으로 하전된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 자성나노입자는 실리카가 표면에 결합된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 코어와 코팅층 사이에 링커로 연결된 구조이고,

상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)계 링커인 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나노리간드는 직경이 30nm 내지 60nm이고, 상기 자성나노입자는 직경이 5nm 내지 30nm인 것을 포함하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인테그린 리간드 펩티드는 음으로 하전된 티올화된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하고,

상기 나노리간드의 표면은 음으로 하전된 형태로 구비되는 것을 포함하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드.

청구항 6

자성나노입자를 포함하는 코어를 준비하는 단계;

상기 코어를 링커를 포함하는 제1 현탁액과 혼합하여 링커가 결합된 코어를 제조하는 단계; 및

상기 링커가 결합된 코어를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)를 포함하는 제2 현탁액과 혼합하는 단계;를 포함하는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드의 제조방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드를 포함하는 용액을 표면이 활성화된 기판을 담지하여 나노리간드 제시 기판을 제조하는 단계; 및

상기 나노리간드 제시 기판에 줄기세포를 처리한 후 외부 자기장을 인가하여 줄기세포 부착 및 분화를 조절하는 단계를 포함하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 나노리간드 제시 기관을 제조하는 단계는,

기관의 표면을 산성용액 중에 침지시키는 단계;

침지가 완료된 기관을 아미노실란 용액 중에 담지하여 상기 기관 표면을 활성화시키는 단계; 및

활성화된 기관을 실온에서 초음파를 이용하여 처리하는 단계;를 포함하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

표면이 활성화된 기관은 아미노실란 용액에 기관을 담지하여 표면을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 생체 내 및 생체 외에 상기 나노리간드 제시 기관을 위치시킨 후 100 내지 700mT의 자기장을 12 시간 내지 48 시간 동안 인가하여 수행하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 기관에 인가되는 자기장의 위치를 변화시켜 수행하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 기관에 인가되는 자기장의 위치를 시간에 따라 변화시켜 수행하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드 및 상기 나노리간드를 이용한 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법에 관한 것으로, 구체적으로 상기 나노리간드를 이용하여 줄기세포의 부착과 분화를 원격으로 제어하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포는 자기 재생을 통해 증식이 가능하며, 뼈, 지방, 근육, 심근, 혈관, 연골 등 다양한 세포로 분화할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 최근에는 이러한 특성을 이용하여 손상된 조직, 장기를 재생하기 위하여 줄기세포 혹은 줄기세포로부터 분화된 세포의 체내이식이 많이 연구되고 있다. 이와 더불어, 줄기세포가 특정 세포로 분화할 수 있도록 도움을 줄 수 있는 생체재료 역시 활발하게 연구되고 있다.

[0003] 이와 같이 줄기세포의 재생 효과를 효율적으로 제어하기 위한 방법으로 생체 내에서 리간드의 제시를 통한 기술이 이용되고 있다. 그러나, 기존의 생체 내에서의 나노리간드 제시는 대부분 정적이거나, 동적이어도 실시간 원격제어를 통한 거시적으로 리간드 밀도의 가역적인 변화는 불가능한 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2018-0017704호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 기관과 정전기적으로 결합하여 이동이 가능한 나노리간드를 제공하고, 상기 나노리간드를 이용하여 실시간 원격을 통해 거시적인 나노리간드 밀도를 가역적으로 변화시켜 줄기세포의 부착 및 분화를 촉진하는 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명은 자성나노입자를 포함하는 코어;
- [0007] 상기 코어를 감싸도록 구비되고 인테그린 리간드 펩티드를 포함하는 코팅층; 및
- [0008] 상기 코어와 상기 코팅층 사이에 구비되는 링커를 포함하고,
- [0009] 상기 인테그린 리간드 펩티드는 음으로 하전된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 자성나노입자를 포함하는 코어를 준비하는 단계;
- [0011] 상기 코어를 링커를 포함하는 제1 현탁액과 혼합하여 링커가 결합된 코어를 제조하는 단계; 및
- [0012] 상기 링커가 결합된 코어를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)을 포함하는 제2 현탁액과 혼합하는 단계;를 포함하는 상기 서술한 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 아울러, 본 발명은 상기 서술한 줄기세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드를 포함하는 용액을 표면이 활성화된 기관을 담지하여 나노리간드 제시 기관을 제조하는 단계; 및
- [0014] 상기 나노리간드 제시 기관에 줄기세포를 처리한 후 외부 자기장을 인가하여 줄기세포 부착 및 분화를 조절하는 단계를 포함하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드는 자성나노입자 상에 음으로 하전된 리간드를 코팅된 것으로 기관과 정전기적 결합을 통해 기관 상에서 이동이 용이하다.
- [0016] 또한, 본 발명에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법은 상기 나노리간드를 포함하는 기관에 자기장을 인가함으로써 나노리간드의 슬라이딩을 시간적 및 공간적으로 제어할 뿐만 아니라 가역적인 제어도 가능하며, 상기 자기장 기반 시공간적 제어를 통해 생체 외 및 생체 내에서의 줄기세포 부착 및 분화를 효율적으로 조절할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드 및 이를 이용한 줄기세포의 세포 부착 및 분화 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 방법을 도식화한 도면이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 투과전자 현미경 이미지(TEM)이다. 스케일 바는 20 nm를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 특성을 나타낸 것이다: (a)는 크기 분포를 갖는 자성 나노 입자(MNP) 및 아미노-실리카-코팅된 MNP의 동적 광산란 이미지이고, (b)는 대표적인 아미노-실리

카-코팅된 MNP의 고각 환형 암시야 주사 투과 전자 현미경(High-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy, HAADF-STEM) 이미지이다. 스케일 바는 20 nm를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 진동 샘플 자력계 히스테리시스(Vibrating sample magnetometer hysteresis)이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 푸리에 변환 적외선 스펙트럼 이미지이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 기관과 슬라이딩 가능한 나노리간드의 정전기적 결합(Electrostatic coupling)을 도식화한 이미지이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 거시적인 규모와 및 나노 규모의 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 가역적인 시공간 조작(In situ reversible spatiotemporal manipulation)에 대한 주사전자현미경(SEM) 및 원자간력 현미경(AFM)으로 촬영한 이미지이다: (a) 및 (b)는 양으로 하전된 기관 및 나노리간드의 이미지이고, (c) 및 (d)는 타임-랩스 SEM 이미징(Time-lapse SEM imaging)의 결과이며, (e)는 AFM 스캐닝을 통한 나노리간드의 슬라이딩의 나노스케일 변위를 나타낸 것이다.

도 9는 비교예의 영구 자석의 부재에서 인시투 나노리간드의 슬라이딩의 원자간력 현미경(AFM) 이미지이다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 나노리간드의 인시투 제어의 인테그린 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$) 결합을 조절하는 것을 나타낸다: (a) 기관의 "좌측" 아래에 영구자석이 있는 슬라이딩 나노리간드의 계략도이고, (b) 기관의 "좌측", "중간", 및 "우측"에서 슬라이딩 나노리간드에 결합된 인테그린 $\beta 1$ 클러스터에 대한 면역형광의 공초점 이미지이며, 스케일바는 50 μm 를 의미하고, (c) 기관의 "좌측", "중간" 및 "우측"에서 인테그린 $\beta 1$ 클러스터의 염색 강도를 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 제어 실험 결과를 나타낸 이미지이다: (a)는 인테그린 $\beta 1$ 결합 및 인간 중간엽 줄기 세포(hMSCs)의 초점 부착을 조절할 수 있는지 여부를 조사한 면역형광 이미지이고, (b)는 나노리간드의 슬라이딩의 시간-제어 스위칭이 줄기세포 부착을 조절할 수 있는지 여부를 조사한 면역형광 이미지이다. 스케일 바는 50 μm 이다.

도 12는 본 발명의 일실시예에 따른 기관의 "좌측" 아래에 위치한 영구 자석 하에서 hMSC를 배양한 48시간 후 부착 세포의 밀도, 면적, 초점 부착 수 및 종횡비의 계산한 그래프이다.

도 13은 비교예의 RGD 리간드 부재 및 영구 자석 부재에서의 슬라이딩 가능한 나노리간드 매개 줄기세포 부착 실험 결과이다: (a)는 RGD 또는 영구 자석 없이 줄기세포 배양 48시간 후 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 면역형광의 공초점 이미지이고, (b)는 부착 세포 밀도 및 세포 면적을 계산한 그래프이다.

도 14는 본 발명의 일실시예에 따른 거시 규모 나노리간드 제시의 시간-제어 스위칭(time-regulated switching)에 대한 줄기세포의 면역형광의 공초점 이미지이다.

도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 거시 규모 나노리간드 제시의 시간적 전환에 대한 부착 세포 밀도, 세포의 면적 및 초점 부착 수를 계산한 그래프이다.

도 16은 본 발명의 일실시예에 따른 나노리간드의 슬라이딩의 시공간 가역적 전환에 대한 부착성 세포 밀도, 세포의 면적 및 종횡비를 계산한 그래프이다.

도 17은 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 인시투 자기적 인력(In situ magnetic attraction)은 줄기 세포의 기계감지-매개 분화(mechanosensing-mediated differentiation)에 대한 면역형광 이미지이다: (a) 자석 아래 줄기세포에서 F-액틴 및 핵 및 ALP 발현을 갖는 RUNX2 및 YAP에 대한 면역형광이다. (b) F-액틴 및 핵을 갖는 TAZ, 인테그린 $\beta 1$, FAK 및 RhoA, ROCK 억제 하의 YAP(Y27632), 및 자석 조건 하의 줄기세포에서 미오신 II 억제(블레비스타틴) 하의 빈쿨린에 대한 면역형광이다.

도 18은 비교예의 RGD 리간드 부재 및 영구 자석 부재에서의 면역형광의 공초점 이미지이다.

도 19는 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자기적 인력에 대한 줄기세포의 기계적 형질 도입 및 분화 실험의 결과로, 줄기세포 배양한 후 핵 대 세포질 RUNX2 형광 비율, 알칼리성 포스파타제 양성 세포 및 핵 대 세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다.

도 20은 본 발명의 일실시예에 따른 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 시간적 제어 실험의 면역형광의 공초점 이미지 및 핵 대 세포질 RUNX2 형광 비율을 계산한 그래프이다: (a)는 영구자석을 기관의 좌측 아래에 위치시키거

나("ON") 기관으로부터 제거("OFF")하여 줄기세포 배양 7일 후 RUNX2, F-액틴 및 핵의 면역형광의 공초점 이미지도이다. (b)는 핵 대 세포질 RUNX2 형광 비율을 계산한 그래프이다.

도 21은 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 시간-제어 제어를 통한 기계 형질도입에 대한 실험의 결과이다: (a)는 영구자석을 기관의 좌측 아래에 위치시키거나("ON") 기관으로부터 제거("OFF")하여 배양 2일 후 RUNX2, F-액틴 및 핵의 면역형광의 공초점 이미지도이다. "ON" 및 "OFF" 조건을 (YAP)의 배양 2일 동안 연속적으로 적용하거나 배양 12시간 후에 전환하였다. 줄기세포는 기관의 "좌측"의 중심 및 "우측"의 중심에서 이미지화 하였다. 스케일 바는 50 μm 을 나타낸다. (b)는 핵 대 세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차(n=30)로 표시된다. 통계적으로 중요한 차이는 다른 알파벳으로 표시된다.

도 22는 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이드 가능한 나노리간드에 대해 기관의 "좌측" 아래에 위치하는 영구자석으로 줄기세포 배양 7일 후 RUNX2 및 ALP의 유전자 발현 프로파일이다.

도 23은 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자기 인력(magnetic attraction)에 대한 면역형광 이미지도로부터 계산한 결과를 나타낸 것이다: (a) 도 17b에 나타낸 TAZ에 대한 면역형광의 공초점 이미지도로부터 핵 대 세포질 TAZ 형광 비율의 정량이다. (b) F-액틴 및 핵을 갖는 p-FAK에 대한 면역형광의 공초점 이미지도이다. 도 4b에 나타낸 (c) ROCK 억제(Y27632를 갖는) 하에 핵 대 세포질 YAP 형광 비율 및 (d) 미오신 II 억제(블레비스타틴을 갖는)의 세포 면적을 계산한 그래프이다.

도 24는 본 발명의 일실시예에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 슬라이딩 나노리간드 인력의 자기 제어(magnetic control) 실험을 나타낸 것이다: (a)는 나노리간드의 자기 제어 실험을 도식화한 이미지도이고, (b)는 자석과 함께("ON") 또는 자석없이("OFF")로 피하 이식 후 슬라이딩 가능한 리간드-제시 기관에 주입된 줄기세포의 액틴 및 핵을 갖는 인간-특이적 HuNu에 대한 면역형광 결과이다. (c)는 생체 내 부착된 세포 밀도 및 면적의 정량을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되어지는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다.

[0020]

본 발명에 따른 줄기세포의 부착 및 분화용 나노리간드는 원격, 시공간적 및 가역적 제어성을 갖는 물질로 생체 내에서 세포 부착을 조절하기 위해 세포 외 매트릭스(ECM) 리모델링을 모방할 수 있다. 여기서, 상기 나노리간드는 아민-작용기화되고 폴리에틸렌글리콜 링커 및 음으로 하전된 RGD 리간드와 결합된 초상자성체 나노물질을 갖는 슬라이딩 가능한 나노리간드이다. 본 발명에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 촉진 방법은 가역적인 슬라이딩 가능성(slidability)을 나타내기 위해 정전기적 상호작용을 최적화함에 따라 슬라이딩 가능한 나노리간드를 양으로 하전된 기관에 결합시켰다. 이에, 본 발명은 슬라이딩 가능한 나노리간드를 자기적으로 끌어당김으로써 거시 규모의 나노리간드 밀도를 조절하여 거시 규모 및 인시투 나노 규모 나노리간드의 슬라이딩의 전례 없는 이미지를 보여준다. 또한, 본 발명은 슬라이딩 가능한 나노리간드 인력의 인시투 자기의 제어를 통해 시공간적 및 가역적인 제어와 생체 외 및 생체 조건에서의 줄기세포 부착을 용이하게 함을 보여준다. 아울러, 본 발명은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 인시투 자기의 인력을 통해 줄기세포의 기계감지-매개(mechanosensing-mediated) 분화를 자극함을 밝힌다. 이러한 세포 외 매트릭스-모방 시공간 및 가역적인 나노리간드 변이의 원격 제어를 통해 생체 내에서 다양한 회복의 세포과정을 조절하는데 뛰어난 줄기세포 부착 및 분화의 촉진 방법을 제공할 수 있다.

[0022]

본 발명은 자성나노입자를 포함하는 코어; 상기 코어를 감싸도록 구비되고 인테그린 리간드 펩티드를 포함하는 코팅층; 및 상기 코어와 상기 코팅층 사이에 구비되는 링커를 포함하고, 상기 인테그린 리간드 펩티드는 음으로 하전된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드를 제공한다.

[0023]

도 1은 본 발명에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드 및 이를 이용한 줄기세포의 세포 부착 및 분화 방법을 나타낸 모식도이다.

[0024]

도 1을 살펴보면, 본 발명의 나노리간드는 자성나노입자를 포함하는 코어; 및 코어 상에 결합되고 인테그린 리

간드 펩티드(peptide)를 포함하는 코팅층을 포함하며, 상기 인테그린 리간드 펩티드는 음으로 하전된 인테그린 펩티드 인 것을 알 수 있다. 구체적으로, 상기 코어 상에 결합된 인테그린 리간드 펩티드는 코어를 마이셀 구조와 같이 코어를 둘러싸는 형태일 수 있다. 이에 따라 상기 나노리간드의 표면 전하는 음전하를 나타낼 수 있다.

[0025] 또한, 도 3은 본 발명에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드의 투과전자 현미경(TEM) 이미지로, 상기 나노리간드의 크기를 알 수 있다. 구체적으로, 상기 나노리간드는 30 내지 60 nm의 직경을 가질 수 있다. 상기 나노리간드의 직경이 30 nm 미만인 경우, 상기 나노리간드를 이동을 제어하기 어렵고, 60 nm 초과인 경우에는 줄기세포의 부착 효율이 저하되어 문제될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 나노리간드는 30 내지 50 nm 또는 35 내지 45 nm의 직경을 가질 수 있다.

[0026] 상기 자성나노입자는 자성을 띠는 나노입자라면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 자성나노입자는 5 내지 30 nm의 직경을 가질 수 있다. 상기 자성나노입자의 직경이 5 nm 미만인 경우 입자의 크기가 너무 작아 손실(loss)이 많아 효율이 저하되고, 30 nm 초과인 경우에는 나노리간드의 직경이 커지고 이에 의하여 줄기세포의 부착 효율이 저하되는 문제가 발생할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 자성나노입자는 5 내지 15 nm 또는 10 내지 20 nm의 직경을 가질 수 있다. 상기와 같은 자성나노입자를 포함함으로써, 본 발명의 나노리간드는 자기장을 이용하여 줄기세포의 부착 및 분화를 촉진할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 자성나노입자는 실리카가 표면에 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 자성나노입자는 아미노-실리카가 표면에 결합된 것일 수 있다. 상기 실리카의 종류는 테트라에틸오르토실리케이트(TEOS) 및 (3-아미노프로필)트리에톡시실란(APTES) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0028] 예를 들어, 본 발명의 나노리간드는 상기 코어와 코팅층 사이에 링커로 연결된 구조이고, 상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)계 링커일 수 있다. 구체적으로 상기 폴리에틸렌 글리콜계 링커는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜-NHS 에스터(Mal-PEG-NHS ester)일 수 있다. 상기와 같은 링커를 포함하여 코어와 코팅층 사이의 결합력을 높여 나노리간드의 내구성을 높일 수 있다.

[0029] 상기 코팅층은 코어 또는 코어에 결합된 링커에 결합되되, 코어를 둘러싼 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 코팅층은 인테그린 리간드 펩티드(RGD)를 포함하고, 상기 인테그린 리간드 펩티드는 음으로 하전된 형태일 수 있고, 음으로 하전된 티올화된 인테그린 리간드 펩티드를 포함할 수 있다. 상기와 같이 음으로 하전된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하여 본 발명의 나노리간드의 표면은 음으로 하전된 형태를 가지며, 이에 따라 기관과 정전기적 결합을 통해 기관 상의 이동이 자유로울 수 있다. 이러한 특징으로 인해 상기 나노리간드는 '슬라이딩 가능한 나노리간드'라고도 하며, 기관 상에서 나노리간드의 슬라이딩을 통해 줄기세포의 부착 및 분화를 촉진시킬 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 자성나노입자를 포함하는 코어를 준비하는 단계;

[0032] 상기 코어를 링커를 포함하는 제1 현탁액과 혼합하여 링커가 결합된 코어를 제조하는 단계; 및

[0033] 상기 링커가 결합된 코어를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)를 포함하는 제2 현탁액과 혼합하는 단계;를 포함하는 상기 서술한 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드의 제조방법을 제공한다.

[0034] 상기 코어를 준비하는 단계는 자성나노입자를 실란 용액과 교반하여 실란이 코팅된 코어를 형성할 수 있다. 구체적으로, 상기 코어를 준비하는 단계는 자성나노입자를 아미노-실란 용액과 교반하여 아미노-실란이 코팅된 코어를 형성할 수 있다. 상기 실란 용액에 포함된 실란의 종류는 테트라에틸오르토실리케이트(TEOS) 및 (3-아미노프로필)트리에톡시실란(APTES) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0035] 구체적으로, 상기 링커가 결합된 코어를 제조하는 단계는 상기 코어를 링커를 포함하는 현탁액에 암 조건 하에서 10 시간 내지 20 시간 또는 10 시간 내지 15 시간 동안 교반하여 수행할 수 있다. 이에 따라 링커가 결합된 코어를 얻을 수 있다. 이때, 영구자석을 이용하면서 용매로 2회 이상 세척하여 링커가 결합된 코어를 수득할 수 있다. 상기 용매는 디메틸포름알데하이드(DMF) 및 디메틸설폭사이드(DMSO) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0036] 이때, 상기 링커는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)계 링커일 수 있다. 구체적으로 상기 폴리에틸렌 글리콜계 링커는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜-NHS 에스터(Mal-PEG-NHS ester)일 수 있다. 상기와 같은 링커를 코어에 결합시켜, 코어와 코팅층 사이의 결합력을 높여 나노리간드의 내구성을 높일 수 있다.

[0037] 또한, 상기 제2 현탁액과 혼합하는 단계는 링커가 결합된 코어를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)를 포함하는 현탁

액에 압 조건 하에서 10 시간 내지 20 시간 또는 10 시간 내지 15 시간 동안 교반하여 수행할 수 있다. 이때, 영구자석을 이용하면서 용매로 세척하여 음으로 하전된 인테그린 리간드 펩티드가 결합된 자성나노입자(나노리간드)를 수득할 수 있다. 상기 용매는 디메틸포름알데히드(DMF) 및 디메틸설폭시드(DMSO) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0038] 여기서, 상기 인테그린 리간드 펩티드와 교반하는 과정을 통해 코어 상에 코팅층을 형성할 수 있다. 구체적으로, 상기 인테그린 리간드 펩티드는 음으로 하전된 형태일 수 있고, 음으로 하전된 티올화된 인테그린 리간드 펩티드일 수 있다. 상기와 같이 음으로 하전된 인테그린 리간드 펩티드로 코어 상에 코팅층을 형성함으로써 본 발명의 나노리간드의 표면은 음으로 하전된 형태를 가지며, 이에 따라 기관과 정전기적 결합을 통해 기관 상의 이동이 자유로울 수 있다. 이러한 특징으로 인해 상기 나노리간드는 '슬라이딩 가능한 나노리간드'라고도 하며, 기관 상에서 나노리간드의 슬라이딩을 통해 줄기세포의 부착 및 분화를 촉진시킬 수 있다.

[0040] 아울러, 본 발명은 상기 서술한 줄기세포 부착 및 분화 촉진용 나노리간드를 포함하는 용액을 표면이 활성화된 기관을 담지하여 나노리간드 제시 기관을 제조하는 단계; 및 상기 나노리간드 제시 기관에 줄기세포를 처리한 후 외부 자기장을 인가하여 줄기세포 부착 및 분화를 조절하는 단계를 포함하는 줄기세포의 세포 부착 및 분화 촉진 방법을 제공한다.

[0041] 도 1 및 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 줄기세포의 세포 부착 및 분화 방법을 도식화한 도면이다. 도 1 및 도 2를 살펴보면, 양으로 하전된 기관 상에 표면이 음으로 하전된 나노리간드가 정전기적 결합되어 자기장을 인가함으로써 자기장이 인가되는 부분에 줄기세포의 부착 및 분화를 촉진 또는 활성화시키는 것을 알 수 있다. 구체적으로, 상기 기관과 상기 나노리간드가 정전기적 결합을 통해 결합되어 있어 자기장이 인가되는 위치에 따라 나노리간드가 이동하며(슬라이딩하며), 이에 따라 자기장이 인가되는 부분에 상기 나노리간드의 밀도를 조절하여 원하는 부위에 줄기세포의 부착 및 분화를 촉진시킬 수 있는 장점이 있다.

[0042] 구체적으로, 상기 나노리간드 제시 기관을 제조하는 단계는, 기관의 표면을 산성용액 중에 침지시키는 단계; 침지가 완료된 기관을 아미노실란 용액 중에 담지하여 상기 기관 표면을 활성화시키는 단계; 및 활성화된 기관을 실온에서 초음파를 이용하여 처리하는 단계;를 포함할 수 있다. 상기 기관의 표면을 산성용액 중에 침지시키는 단계 염산 및 황산 중 어느 하나 이상을 포함하는 산성 용액에 30분 내지 2시간 또는 30분 내지 1시간 동안 침지시킬 수 있다. 이를 통해, 상기 기관의 표면에 수산화기를 결합시켜 아미노기와 결합을 용이하게 하게 기관의 표면 활성화를 효과적으로 수행할 수 있다.

[0043] 상기 기관 표면을 활성화시키는 단계 압 조건 하에서 아미노-실란 용액에 기관을 담지하여 기관의 표면을 활성화시킬 수 있다. 상기 아미노-실란 용액은 (3-아미노프로필)트리에톡시실란(APTES)을 포함할 수 있다. 이때, 기관의 표면을 활성화시킨다는 것은 기관의 표면을 양으로 하전된다는 것을 의미이고, 구체적으로는 기관 상에 아민기를 결합시켜 활성화시킬 수 있다. 상기와 같이 아미노-실란 용액에 침지하여 기관의 표면을 활성화시켜 기관의 표면이 양으로 하전됨으로써, 상기 기관은 상기 나노리간드와 정전기적 인력으로 결합할 수 있다.

[0044] 또한, 상기 초음파를 이용하여 처리하는 단계는 상기 나노리간드를 포함하는 용액에 표면이 활성화된 기관을 담지하여 나노리간드 제시 기관을 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 나노리간드를 포함하는 용액에 표면이 활성화된 기관을 정제수 중에서 초음파 처리 하에 실온에서 30분 내지 2시간 또는 30분 내지 1시간 동안 담지하여 수행하였다.

[0045] 상기 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 생체 내 및 생체 외에 상기 나노리간드 제시 기관을 위치시킨 후 100 내지 700mT의 자기장을 12 시간 내지 48 시간 동안 인가하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 생체 내 및 생체 외에 상기 나노리간드 제시 기관을 위치시킨 후 100 내지 600mT, 200 내지 600mT 또는 300 내지 550mT의 자기장을 12 시간 내지 36 시간, 24 시간 내지 26 시간 또는 12 시간 내지 24 시간 동안 인가하여 수행할 수 있다. 상기와 같이 상기 나노리간드 제시 기관에 자기장을 인가함으로써, 기관 상에 위치한 나노리간드에 줄기세포의 부착을 촉진시키며, 부착된 줄기세포의 분화도 촉진시킬 수 있다.

[0046] 또한, 상기 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 기관 인가되는 자기장의 위치를 변화시켜 수행할 수 있다. 구체적으로, 100 내지 600mT, 200 내지 600mT 또는 300 내지 550mT의 자기장을 인가하면서 기관 인가되는 자기장의 위치를 변화시켜 줄기세포의 부착 및 분화를 공간적으로 제어할 수 있다. 예를 들어, 기관의 일부분에 자기장을 인가하여 기관 상의 상기 나노리간드의 밀도를 조절하여 기관 상의 원하는 부분에만 줄기세포의 부착

및 분화를 촉진시킬 수 있다.

[0047] 더불어, 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 기관 하단에 인가되는 자기장의 위치를 시간에 따라 변화시켜 수행할 수 있다. 구체적으로, 100 내지 600mT, 200 내지 600mT 또는 300 내지 550mT의 자기장을 인가하면서 기관 인가되는 자기장의 위치를 시간에 따라 변화시켜 줄기세포의 부착 및 분화를 시간적 및 공간적으로 제어할 수 있다. 보다 구체적으로, 기관의 각 부분마다 개별적으로 자기장을 인가하여 기관 상에 위치한 상리 나노리간드의 밀도를 시간에 따라 조절하여 기관 상의 각 부분의 줄기세포의 부착 및 분화의 촉진 정도를 조절할 수 있다. 예를 들어, 기관의 좌측에는 12 시간 내지 24 시간 동안 자기장을 인가하고, 기관의 우측에는 24 시간 내지 36 시간 동안 자기장을 인가한 경우, 기관의 좌측과 우측에 부착되거나 분화된 줄기세포의 양이 달라질 수 있다.

[0049] 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 일 실시예일뿐 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예들에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[제조예]

제조예 1

[0052] 슬라이딩 가능한 나노리간드(slidable nano-ligand)의 제조

[0053] 1)자성 코어 제조(MNP)

[0054] 슬라이딩 가능한 나노리간드의 인시투 가역적 제어를 위해, 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자성 코어를 하기와 같이 제조하였다. 에탄올 약 80mL, 탈이온수(DI) 60 mL 및 헵탄 140 mL를 먼저 혼합하였다. 이 혼합물에, 비활성 환경 하에서 36.5 g(120 mmol)의 올레산 나트륨(sodium oleate) 및 10.8 g(40 mmol)의 염화철(III) 6 수화물(iron (III) chloride hexahydrate)을 70℃에서 4시간 동안 첨가하였다. 완전히 혼합한 후, 철 올레산염(iron-oleate)을 함유하는 헵탄층을 별도로 수집하였다. 탈이온수로 세척한 후, 헵탄을 증발시켰다. 약 5.7 g(20 mmol)의 올레산 및 200 g의 1-옥타데센을 혼합하였고, 여기에 건조된 철 올레산염 36 g(40 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합 용액은 약 5분 동안 100℃, 이어서 약 30분 동안 320℃에서 유지시켰다. 반응 이후, 상기 혼합물 용액은 실온으로 냉각시키고, 영구 자석을 이용한 수집물로 에탄올로 3회 세척한 후, 자성 코어를 저장하기 위해 헵탄에 분산시켰다.

[0055] 2)자성 코어의 아미노-실리카의 기능화(functionalization)(아미노-실리카 코팅된 MNP)

[0056] 헵탄에서 약 30 mg의 자성 코어 나노입자를 25 mL의 사이클로헥산에 분산시켰으며, 여기에 5 mL의 트리톤-X(Triton-X), 5 mL의 1-헵산올, 0.5 mL의 NH₄OH 및 1 mL의 탈이온수를 순차적으로 첨가하였다. 이 혼합 용액을 30분 동안 교반하여 에멀전을 안정화시켰다. 상기 에멀전에, 12.5 μL의 테트라에틸 오르토실리케이트(TEOS)를 천천히 첨가하고 10분 동안 교반하였다. 그런 다음, 6.25 mL의 (3-아미노프로필)트리에톡시실란(APTES)을 이 에멀전에 첨가하고 16시간 동안 교반하였다. 상기 반응 후, 25 mL의 아세톤을 상기 에멀전에 빠르게 첨가하고, 영구자석을 이용하여 아세톤 및 디메틸포름아미드(DMF)로 세척하여 나노입자를 수집하였다. 아미노-실리카 코팅된 MNP를 1 mL의 DMF에 분산시켰다.

[0057] 3)슬라이딩 가능한 나노리간드의 제조

[0058] 슬라이딩 가능한 나노리간드의 나노조립체를 완성하기 위해, 아미노-실리카 코팅된 MNP를 폴리에틸렌글리콜(PEG) 링커와 순차적으로 그래프팅하여 나노리간드의 슬라이딩성을 향상시키고, 이어서 음으로 하전된 RGD 리간드로 그래프팅하였다. PEG 링커는 또한 세포 흡수를 방지하는 역할을 하였다. 1 mL의 DMF에서 약 20 mg의 아미노-실리카 코팅된 MNP는 5 mg의 말레이미드-폴리(에틸렌글리콜)-NHS에스터(Mal-PEG-NHS ester; Mn = 5000 Da, Biochempeg)에 첨가하였고, 여기에 2 μL N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA)를 첨가하였다. 상기 현탁액을 암 조건 하에서 16시간 동안 교반하였고, 그런 다음 영구 자석을 사용하여 DMF 및 디메틸설폭시드(DMSO)(각각 3회)로 세척하였다. 1 mL의 DMSO에서 PEG화 된 아미노-실리카 코팅된 MNP를 0.5 mg의 음으로 하전된 티올화된 RGD 펩티드(CDDRGD, GL Biochem)에 첨가하였고, 여기에 0.2% DIPEA 및 10 mM 트리스(2-카복시에틸)포스핀히드로클로라이드(Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, TCEP) 이후에 추가되었다. 상기 혼합 용액을 암 조건 하에서 16시간 동안 교반하고, 영구 자석을 이용하여 수집물로 3회 DMSO로 세척한 다음, 기관에 정전기적 결합 전에 DMSO에 유지시켰다.

- [0059] **비교제조예 1**
- [0060] 음으로 하전된 티올화된 RGD 펩티드(CDDRGD, GL Biochem)를 첨가하지 않은 것을 제외하고 제조예 1과 동일한 방법으로 "No RGD" 나노리간드를 제조하였다.
- [0062] **[실시예]**
- [0063] **실시예 1**
- [0064] 슬라이딩 가능한 나노리간드 및 상기 나노리간드와 기관의 결합
- [0065] 상기 제조예에서 제조한 슬라이딩 가능한 나노리간드를 기관에 가역적으로 결합시키기 위해, 배양 등급 유리 커버슬립(culture-grade glass coverslips, 22 mm x 22 mm)을 사용하였다. 음으로 하전된 슬라이딩 가능한 나노리간드의 결합 전에 유리 기관을 양전하로 나타내도록 아미노화 되었다. 기관을 염산 및 메탄올의 1:1 혼합물에 30분 동안 침지시켜 임의의 유기 오염물을 제거한 다음 탈이온수로 3회 세척하였다. 이어서 상기 기관을 황산에 1시간 동안 침지시켜 표면에 수산화기를 활성화시킨 다음 탈이온수로 3회 세척하였다. 활성화된 기관은 암 조건 하에서 APTES 및 에탄올의 1:1 혼합물로 1시간 동안 처리하여 기관을 작용기화하여 아민기를 제공하였다. 아미노 작용기화 된 기관을 에탄올로 3회 세척하고 100℃에서 1시간 동안 건조시켰다. DMSO에 있는 슬라이딩 가능한 나노리간드의 현탁액을 DMSO로 1:20으로 희석한 다음, 이를 양으로 하전된 아미노 작용기화 된 기관에 첨가하였다. 슬라이딩 가능한 나노리간드를 초음파 처리하여 실온에서 1시간 동안 기관에 정전기적으로 결합시킨 후, DMSO로 3번 세척하고 탈이온수로 3번 세척하여 슬라이딩 가능한 나노리간드가 존재하는 기관을 수득하였다.
- [0067] **[실험예]**
- [0068] **실험예 1**
- [0069] 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 형태를 확인하기 위해서, 슬라이딩 가능한 나노리간드를 대상으로 투과전자현미경(TEM), 동적 광산란 및 고각 환형 암시야 주사 TEM(HAADF-STEM) 분석을 수행하였으며, 그 결과는 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [0070] 또한, 슬라이딩 가능한 나노리간드의 성질 및 화학적 결합 특성을 확인하기 위해서, 슬라이딩 가능한 나노리간드를 대상으로 진동 샘플 자력 측정 및 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR)을 수행하였으며, 그 결과는 도 5 및 도 6에 나타내었다.
- [0071] 구체적으로, 투과 전자 현미경(TEM) 실험은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 크기 및 형태 특성을 확인하기 위해, Tecnai 20 (FEI, USA)을 이용하여 TEM 이미징을 수행하였다.
- [0072] 또한, 고각 환형 암시야 주사 투과 전자 현미경(HAADF-STEM)은 대표적인 슬라이딩 가능한 나노리간드의 크기 및 형태의 특성을 확인하기 위한 것으로, HAADF-STEM 이미징은 1 nm 프로브 크기, 20 μ m 콘덴서 개구(condenser aperture), 및 Z 대비를 위한 80-150 mrad 수집 각도를 갖는 JEOL 2100F를 사용하여 수행되었다.
- [0073] 더불어, 동적 광산란(DLS) 분석은 슬라이딩 나노리간드의 조립 공정에서 크기 분포 프로파일(유체 역학적 직경, hydrodynamic diameter)를 정량하기 위해, DLS 측정(Zetasizer Nano ZS90 Malvern Panalytical, Malvern, UK)을 수행하였다.
- [0074] 또한, 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR)은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 변형에서 연속의 화학적 변화를 특징을 확인하기 위해, FTIR은 GX1(Perkin Elmer Spectrum, USA)을 사용하여 수행되었다. 화학적 결합 특성의 변화에 대한 분석을 거친 샘플을 분석 전에 동결 건조시키고 KBr 펠렛으로 조밀하게 패킹하였다.
- [0075] 진동 샘플 자기측정(Vibrating sample magnetometry, VSM) 측정은 나노리간드의 가역적 슬라이딩 가능(초상자성) 특성을 확인하기 위해, 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자성 코어는 인가된 자기장 하에 실온에서 VSM 측정(EV9; Microsense)에 적용되었다. 상기 대응하는 자기 모멘트(magnetic moment)는 슬라이딩 가능한 나노리간드에서 자성 코어로 건조 중량으로 정규화한 후 히스테리시스 루프(hysteresis loop)에 표시되었다.
- [0076] 도 3은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 나노 규모 이미지로, 투과 전자 현미경 이미지이며, 스케일 바는 20 nm를 나타낸다. 도 4의 (a)는 크기 분포를 갖는 자성 나노입자(MNP) 및 아미노-실리카-코팅된 MNP의 동적 광산란 결

파이고, (b)는 아미노-실리카-코팅된 MNP의 고각 환형 암시야 주사 투과 전자현미경(HAADF-STEM) 이미지이며, 스케일 바는 20 nm를 나타낸다.

[0077] 도 3 및 도 4를 살펴보면, 약 40 ± 5 nm의 슬라이딩 가능한 나노리간드의 균일한 구형 모양을 확인하였다

[0078] 도 5는 슬라이딩 가능한 나노리간드의 진동 샘플 자력계 히스테리시스이고, 도 6은 일실시예의 슬라이딩 가능한 나노리간드의 푸리에 변환 적외선 스펙트럼 이미지이다. 구체적으로, MNP, 실리카 코팅된 MNP 및 RGD 리간드-제시 PEG 그래프팅된 실리카 코팅된 MNP(RGD-PEG-실리카 코팅된 MNP, 슬라이딩 가능한 나노리간드에 해당)의 푸리에 변환 적외선 스펙트럼 이미지이다.

[0079] 도 5를 살펴보면, 20 emu/g의 Ms로 초상자성을 확인했다. 이를 통해, 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드는 초상자성 특성을 나타내어 가역적 슬라이딩이 가능하므로 이 특성은 시간적 및 가역적으로 나노리간드의 슬라이딩의 자기 조작에 매우 중요하다.

[0080] 도 6을 살펴보면, Fe-O 결합은 초상자성 산화철 코어 나노입자에서 699 cm^{-1} 의 흡수 피크 값에서 검출되었다. Si-O 결합은 실리카 셸에서 1168 cm^{-1} 의 흡수 피크 값에서 검출되었다. 슬라이딩 가능한 나노리간드에서, PEG 링커($M_n = 5,000\text{ Da}$)는 이전 문헌에서 입증된 바와 같이 슬라이딩 특성을 향상시킬 뿐만 아니라 세포에 의한 흡수를 억제하고, CDDRGD는 1152 cm^{-1} 의 흡수 피크에서 C=O 결합과 1635 cm^{-1} 의 흡수 피크에서 아마이드(amide) 결합을 나타냈다. 이러한 FTIR 분석은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 성공적인 조립을 확인시켜 주었다.

[0082] 실험예 2

[0083] 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 인시투 가역적 시공간적 제어를 입증하기 위해, 슬라이딩 가능한 나노리간드를 대상으로 주사전자현미경(SEM)으로 촬영하였고, 원자간력 현미경(AFM) 이미징을 수행하였으며, 그 결과는 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[0084] 구체적으로, 도 7에 나타난 바와 같이 본 발명은 정전기적으로 거시 규모의 나노리간드 제시를 제어하기 위해 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 시공간적 제어를 위한 양으로 하전된 기관에 슬라이딩 가능한 리간드를 결합시켰다. 나노리간드와 기관 사이의 정전기적 결합을 통해 나노리간드의 슬라이딩의 가역적인 움직임을 허용했다.

[0085] 여기서, 주사 전자 현미경(SEM)은 슬라이딩 가능한 나노리간드를 기관에 대해 정전기적 결합 및 거시 규모의 나노리간드 제시의 인시투 가역적 및 시공간적 제어에 대한 특징을 확인하기 위해, SEM 이미징(FE-SEM, FEI, Quanta 250 FEG)을 수행하였다. 스퍼터 코터(sputter coater)를 사용하여 기관을 건조시키고 백금 코팅을 하였다. 기관과 결합된 슬라이딩 가능한 나노리간드의 밀도는 10개 다른 이미지로부터 Image J 소프트웨어에 의해 계산되었고, 평균 $\pm$ 표준 오차로 도시되었다. 거시 규모의 리간드 밀도의 인시투 가역적 및 시공간적 제어를 위해, 영구 자석(270 mT)을 12시간 동안 기관의 좌측 아래에 위치시키고, 12시간 동안 우측 아래에 위치시킨 다음, 좌측 아래에 위치시켰다. 거시 규모의 리간드 밀도에서 시공간적 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0086] 또한, 인시투 자기 원자간력 현미경(In situ magnetic atomic force microscopy, AFM)은 기관 상에 슬라이딩 가능한 나노리간드의 인시투 2D 및 3D 이미지에 대한 특징을 확인하기 위해, AFM 이미징(Asylum Research, XE-100 System)이 수행되었다. 상기 이미징은 5-3 N/m의 스프링 상수(spring constant) 및 96-175 kHz의 공명 주파수(resonance frequency)를 갖는 AFM 캔틸레버(cantilever)(Nanosensors, SSS-SEIHR-20)를 사용하여 25°C에서 공기 모드의 AC에서 수행하였다. AFM 이미징은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 인시투 나노 규모의 운동(motion)을 특정하기 위해서 주사 영역의 반대쪽에서 자석의 존재 및 부재 하에 동일한 주사 영역에서 연속적으로 수행되었다. 비교예 실험으로서, 지속적으로 자석이 없는 상태에서의 동일한 주사 영역에서의 연속적인 AFM 이미징은 연속적인 AFM 주사에 의해 슬라이딩 가능한 나노리간드의 무시할 만한 나노 규모의 움직임을 특정하기 위해 수행되었으며, 그 결과는 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[0087] 도 8은 거시적인 규모와 및 나노 규모의 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 가역적인 시공간 조작(In situ reversible spatiotemporal manipulation)에 대한 이미지이다. 도 8a-b를 살펴보면, 양으로 하전된 아미노 작용기화된 기관은 주사전자 현미경(SEM) 및 3D 원자간력 현미경(AFM)에 의해 입증되는 바와 같이 음으로 하전된 슬라이드 가능한 나노리간드와 최적으로 균질하게 결합됨을 확인하였다. 또한, 거시적으로 나노리간드의 밀도는

μm^2 당 대략 17 ± 3 나노리간드 입자인 것으로 계산되었다. 본 발명은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 응집없이 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 시공간적 제어에 최적이기 때문에, 이 거시 규모의 리간드 밀도를 사용했고, 따라서 나노리간드의 가역적인 운동을 가능하게 하여 줄기세포의 초점 부착 및 기계적 형질도입을 현저하게 변화시켰다.

[0088] 도 8c-d는 시공간적 제어 실험의 SEM 이미징 결과로, 영구 자석을 기관의 좌측 아래에 위치시켜 슬라이딩 가능한 나노리간드를 좌측으로 끌어당기고, 우측으로 전환하며, 각각 12시간마다 좌측으로 복귀시켰다. 타임-랩스 SEM 이미징(Time-lapse SEM imaging)은 각각 12시간, 24시간 및 36시간에 각각 좌측, 우측 및 좌측에서 상당히 높은 나노리간드 입자 밀도를 나타냈고, 이로써 나노리간드의 슬라이딩의 시공간 가역성이 완전히 확인되었다.

[0089] 도 8e는 시공간적 제어 실험의 비교예로서 스캐닝 영역의 반대편에서 자석이 있거나 없는 동일한 영역에서 연속의 인시투 자기 AFM 스캐닝을 통한 나노리간드의 슬라이딩의 나노스케일 변위를 보여주었다. 도 8e에서 자석없이 슬라이딩 가능한 나노리간드가 명확하게 확인되었으며, 자석을 따라 이동되었다.

[0090] 도 9는 비교예 실험으로, 동일한 스캐닝에서 자석 없는 상태에서 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 원자간력 현미경(AFM) 이미지도이다. 도 9를 살펴보면, 두 개의 다른 이미지에서 슬라이딩 가능한 나노리간드를 따라 검은 점선이 그려진다. 스케일바는 50 nm를 나타낸다. 자석이 없는 경우 동일한 스캐닝 영역에서 연속 AFM 이미징은 슬라이딩 가능한 나노리간드의 무시할 만한 나노 규모의 움직임을 확인하였다.

[0092] 실험예 3

[0093] 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드를 이용한 원격제어방법은 거시 규모의 나노리간드 제시의 시공간적인 가역적 조절을 통한 줄기세포 부착을 조절에 미치는 영향을 확인하기 위해, 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 제어가 인테그린 $\alpha 1$ 결합 및 인간 중간엽 줄기 세포(hMSCs)의 초점 부착을 조절할 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0094] 슬라이딩 가능한 나노리간드에 대한 인테그린 $\beta 1$ 의 결합 실험은 다음과 같이 수행하였다. 인테그린 $\beta 1$ 와 인시투 슬라이딩 나노리간드의 결합 효율을 평가하기 위해, 슬라이딩 나노리간드-제시 기관은 기관의 "좌측" 아래에 위치한 영구 자석으로 12시간 동안 4°C에서 인산염-완충 식염수(PBS) 내 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 인테그린 $\beta 1$ 에서 배양하였다. 배양된 기관은 10분 동안 실온에서 4%(w/v) 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시키고, 슬라이딩 나노리간드에 결합된 인테그린 $\beta 1$ 을 검사하기 위해 인테그린 $\beta 1$ (Santa Cruz Biotechnology)에 대해 면역형광적으로 염색하였으며, 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0095] 또한, 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 제어 하에서 줄기세포의 부착 및 분화의 시험관 내 조절 실험은 다음과 같이 수행하였다. 줄기세포의 부착에 대해 나노리간드의 슬라이딩 인시투의 영향을 조사하기 위해, 본 발명의 슬라이딩 가능한 나노리간드를 포함하는 기관은 UV 광으로 멸균한 다음 1% 소 혈청 알부민(BSA, Sigma-Aldrich)으로 37°C에서 1시간 동안 차단하여 비특이적 세포 부착을 최소화하였다. 인간 중간엽 줄기세포(hMSCs, passage 5, Lonza)를 5000 cell/ cm^2 의 밀도로 처리된 기관 상에 위치시키고, 37°C 및 5% CO₂에서 고농도의 포도당 DMEM, 10%(v/v) 태아 소 혈청, 4mM L-글루타민, 및 50 U/mL 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 기초 배지에서 배양하였다. 줄기세포의 부착은 기관의 "좌측" 아래에 위치한 영구 자석(270 mT)으로 조사되어 좌측으로 향하는 나노리간드의 슬라이딩을 촉진시켰다. 부착된 줄기세포를 기관의 다양한 쪽(좌측, 중간, 및 우측)의 중심에서 이미지화 하였으며, 그 결과를 도 11 및 도 12에 나타내었다.

[0096] 도 10은 슬라이딩 나노리간드의 인시투 제어의 인테그린 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$) 결합을 조절하는 것을 나타낸다. (a)는 기관의 "좌측" 아래에 영구자석이 있는 슬라이딩 나노리간드의 계략도이고, (b)는 기관의 "좌측", "중간", 및 "우측"에서 슬라이딩 나노리간드에 결합된 인테그린 $\beta 1$ 클러스터에 대한 면역형광의 공초점 이미지이며, 스케일바는 50 μm 를 의미하고, 면역형광의 공초점 이미지는 적색 화살표로 표시된다. (c)는 기관의 "좌측", "중간" 및 "우측"에서 인테그린 $\beta 1$ 클러스터의 염색 강도를 나타낸 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차(n=30)로 표시된다. 통계적으로 유의한 차이가 있는 비교 그룹은 다른 알파벳 문자로 기재하였다.

[0097] 도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 제어 실험 결과를 나타낸 이미지로, 슬라이딩 가능한 나노리간드의 시공간 가역적 인력(attraction)은 줄기세포 부착을 촉진하는 것을 나타냈다. 자석의 정적 위치(a) 및 스위칭 위치(b)에서 줄기세포의 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 면역형광 이미지이다. 스케일 바

는 50 μm 이다.

- [0098] 도 12는 기관의 "좌측" 아래에 위치한 영구 자석 하에서 hMSC를 배양한 48시간 후 부착 세포의 밀도, 면적, 초점 부착 수 및 종횡비의 계산한 그래프로서, 슬라이딩 나노리간드의 인력에 의해 거시 규모의 리간드 제시의 인시투 조작(in situ maneuvering)은 줄기 세포의 초점 부착을 촉진하는 것을 알 수 있다. 도 3a에 표시된 면역형광의 공초점 이미지를 사용하여 계산을 수행하였으며, 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차($n=30$)로 표시된다. 통계적으로 유의한 차이가 있는 비교 그룹에 다른 알파벳 문자가 할당되었다.
- [0099] 도 11a-c, 도 11a 및 도 12를 살펴보면, 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자기 인력에 의해, 면역형광 염색은 좌측(자석)의 FA 복합체에서 뚜렷한 빈쿨린(vinculin) 발현을 포함하면서 상당히 높은 인테그린 $\beta 1$ 의 결찰 효능과 높은 밀도를 갖는 줄기세포 부착과 더 넓은 형태를 갖는 초점 부착(focal adhesion)이 나타남을 보여주었다.
- [0100] 또한, 비교실험으로 비교제조에 1의 나노리간드를 자기장이 위치한 기관에서 실험하였고("No RGD" 그룹) 제조에 1의 나노리간드를 자기장이 없는 기관에서 실험하였으며("No magnet" 그룹), 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [0101] 도 13은 비교예의 RGD 리간드 부재 및 영구 자석 부재에서의 슬라이딩 가능한 나노리간드 매개 줄기세포 부착 실험 결과로, (a)는 RGD 또는 영구 자석 없이 줄기세포 배양 48시간 후 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 면역형광의 공초점 이미지이다. 부착된 줄기세포는 기관의 "좌측", "중간" 및 "우측"의 중심에서 이미지화 하였다. 스케일바는 50 μm 을 나타낸다. (b)는 부착 세포 밀도 및 세포의 면적을 계산한 그래프로, 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차($n=30$)로 표시된다. 동일한 알파벳은 비교된 그룹 사이의 비통계적 차이를 나타낸다.
- [0102] 도 13을 살펴보면, 줄기세포 부착의 나노리간드-슬라이딩-매개 조절의 이러한 제시는 "No RGD" 및 "No magnet" 그룹에 대해 효과적이지 않은 반면, "No RGD" 그룹은 효율적인 차단에 의해 줄기세포의 최소 비-RGD-특이적 부착성을 나타냈다. 이를 통해 슬라이딩 가능한 나노리간드 매개 줄기세포 부착의 인시투 제어에는 RGD 리간드 및 자기장(영구자석)이 필요하다는 것을 알 수 있다.
- [0103] 또한, 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드가 나노리간드의 슬라이딩의 시간-제어 스위칭을 통해 줄기세포 부착을 조절할 수 있는지 여부를 조사하였다.
- [0104] 줄기세포의 부착에 대한 거시 규모의 나노리간드 제시의 시간-제어 스위칭 효과는 "ON" 및 "OFF"로 전환으로 영구 자석을 기관의 좌측 아래에 영구자석을 위치시키거나("ON"), 기관으로부터 영구자석을 제거("OFF")함으로써 연구되었다. 줄기세포의 부착에 대한 나노리간드의 슬라이딩의 시공간 가역적 조정의 효과는 기관의 "좌측" 아래에서 "우측"으로, 이어서 "좌측"으로 영구자석의 위치를 두 개의 반대쪽으로 전환하여 수행하였다.
- [0105] 도 14는 일실시예에서 거시 규모 나노리간드 제시의 시간-제어 스위칭(time-regulated switching)에 대한 줄기세포의 면역형광의 공초점 이미지이다. 구체적으로, 좌측(자석 쪽) 및 우측(자석이 아닌쪽)인 경우, 기관의 좌측 아래 위치하거나("ON") 기관으로부터 제거된("OFF") 영구자석으로 배양 줄기 세포의 2시간 또는 48시간 후 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 면역형광의 공초점 이미지이다. "ON" 및 "OFF" 조건을 배양의 48시간 동안 연속적으로 적용하거나 배양 후 12시간에 전환하였다. 상기 이미지는 기관의 좌측의 중앙에서 획득되었다. 스케일바는 50 μm 을 나타낸다. 이를 통해, 본 발명의 슬라이딩 가능한 나노리간드는 거시적인 시간-제어 스위칭(time-regulated switching)을 통해 줄기세포의 부착력을 조정하는 것을 알 수 있다.
- [0106] 도 15는 일실시예에서 거시 규모 나노리간드 제시의 시간적 전환에 대한 부착 세포의 밀도, 세포의 면적 및 초점 부착 수를 계산한 그래프이다. 구체적으로, 영구 자석을 기관 좌측 아래에 놓거나("ON") 기관에서 제거하여("OFF") 12시간 또는 48시간 배양 줄기세포 후 기관의 좌측에 있는 부착 세포 밀도, 세포의 면적 및 초점 부착 수를 계산하였다. "ON" 및 "OFF" 조건을 배양 48시간 동안 연속적으로 적용하거나 배양 12시간 후에 전환시켰다. 도 14에 표시된 좌측(자석 쪽) 및 우측(자석이 아닌 쪽)에 대한 면역형광의 공초점 이미지를 사용하여 계산하였으며, 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차($n=30$)로 표시되었다. 통계적으로 유의한 차이가 있는 비교 그룹에 다른 알파벳 문자가 할당되었다.
- [0107] 도 14 및 도 15를 살펴보면, 영구자석을 기관의 왼쪽 아래에 놓거나("ON"), 48시간 동안 기관 근처에 놓지 않았다("OFF"). 또한, 자석을 먼저 배치하고 12시간 후에 자석을 제거했거나("ON-OFF") 자석을 먼저 배치하지 않고 12시간 후에 자석을 배치했다("OFF-ON"). 그 결과 기관의 좌측(자석 쪽)에서, 줄기세포 부착은 "ON" 조건 하에서 두드러졌다. 놀랍게도, 12시간 후에 자석을 놓았을 때, 부착 세포 밀도가 66%, 세포 면적이 51%, 초점 부착 수가 59%로 크게 증가하여 줄기세포 부착은 48시간("OFF-ON")에서 급격히 향상되었고, 이는 나노리간드는 선택된 시점에서 자석쪽으로 끌릴 수 있음을 시사한다. 또한, 12시간 후에 자석이 제거되었을 때, 줄기세포 부착은

48시간에 추가 증가없이 유사하게 유지되었고("ON-OFF"), 이는 자석쪽으로 끌어당겨진 나노리간드가 기관과 같은 쪽에 남아있을 수 있음을 나타낸다.

[0108] 더불어, 본 발명은 줄기세포 부착을 조절하기 위해 나노리간드의 슬라이딩의 시공간적 가역적인 조절을 조사하였다. 도 8c-d에서 알 수 있듯이, 12시간 마다 자석의 위치를 바꾸고 각각 12시간, 24시간 및 36시간에 좌측, 우측 및 좌측에서 더 높은 세포 부착을 관찰하였다.

[0109] 도 16은 일실시예에서 나노리간드의 슬라이딩의 시공간 가역적 전환에 대한 부착성 세포 밀도, 세포의 면적 및 중형비를 계산한 그래프이다. 도 11b에 나타난 기관의 "좌측 및 "우측"에서 12시간, 24시간 및 36시간의 줄기세포 배양 후 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 면역형광의 시간 경과 공초점 이미지를 사용하여 기관의 "좌측" 및 "우측"에서 부착성 세포의 밀도, 면적 및 중형비를 계산하였다. 영구자석의 위치는 기관의 "좌측" 아래에서, "우측" 아래에서, 이어서 "좌측" 아래에서 각각 3시간 동안 12시간에 걸쳐 2개의 반대 쪽 사이에서 전환되었으며, 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차(n=30)로 표시된다. 이를 통해, 나노리간드의 슬라이딩의 시공간 가역적 전환은 줄기세포의 부착을 제어할 수 있음을 알 수 있다.

[0110] 도 11b 및 도 16를 살펴보면, 나노리간드의 슬라이딩의 시공간 가역적 전환은 줄기세포의 부착을 제어한 것으로, 도 11b에 표시된 바와 같이, 기관의 "좌측 및 "우측"에서 12시간, 24시간 및 36시간의 줄기세포 배양 후 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 면역형광의 시간 경과 공초점 이미지를 사용하여 기관의 "좌측" 및 "우측"에서 부착성 세포의 밀도, 면적 및 중형비를 계산한다. 영구자석의 위치는 기관의 "좌측" 아래에서, "우측" 아래에서, 이어서 "좌측" 아래에서 각각 3시간 동안 12시간에 걸쳐 2개의 반대 쪽 사이에서 전환되었다. 이를 통해, 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드를 슬라이딩함으로써 세포 부착의 시공간 가역성을 입증하였고, 세포 부착의 조직-침투-자기장-매개 시공간 및 가역적인 제어는 빛의 사용을 통해 생체 내 적용에 대한 매우 유망한 전략을 제시할 수 있다.

[0112] 실험예 4

[0113] 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드는 인시투 시간적 제어를 통한 기계감지-매개 줄기세포 분화의 변화를 확인하기 위해서, 하기와 같은 실험을 진행하였다.

[0114] 인테그린 결찰-매개 부착 및 성숙한 FA 형성을 갖는 줄기세포의 확산은 줄기세포 분화를 촉진할 수 있는 기계감지 신호 전달을 활성화시킨다. 이에, 본 발명은 기계감지-매개 분화의 모델로 줄기세포의 골형성 분화를 조사하였다. 줄기세포 분화의 원격 제어는 조직 재생 용법의 생체 내 적용에서 이점을 제공한다.

[0115] 줄기세포의 기계적 형질도입-매개 분화는 ROCK 억제제(50 μ M의 Y27632) 또는 미오신 II 억제제(10 μ M의 블레비스타틴) 하에서 기관의 "좌측 아래에 영구자석을 위치시킴으로써 조사하였다. 자석의 적용 없이 RGD 리간드 또는 나노리간드가 없는 나노입자를 갖는 기관은 줄기세포 부착에 대한 자기(magnetically) 제어된 나노리간드의 슬라이딩의 효과를 추가로 확인하기 위해 사용되었다. 나노리간드의 슬라이딩 하에서 부착 줄기세포의 분화는 골형성 유도 배지 배양에서 수행하였다(10 mM β -글리세로포스페이트(β -glycerophosphate), 50 μ M 아스코르브산-2-포스페이트(ascorbic acid-2-phosphate), 및 100 nM 덤사메타손(dexamethasone)이 보충된 기본 성장 배지).

[0116] 또한, 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 제어 하에서 줄기세포의 분화의 분석에 대한 알칼리성 포스파타제(ALP) 염색-기반 분석은 다음과 같이 수행하였다. 골 형성 분화 배지 하에서 배양 후 줄기세포를 PBS로 세척하고, 암조건 하에서 실온에서 30분 동안 BCIP/NBT 액체(Sigma-Aldrich)로 처리하고, 그런 다음 PBS로 세척하였다. 상기 처리된 줄기세포를 이어서 4%(w/v) 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시키고 광학 현미경을 사용하여 가시화하였다. 상기 ALP-양성 세포는 핵(DAPI)-염색으로부터의 총 세포 수로부터 계산하였다.

[0117] 도 17은 일실시예에서 슬라이딩 가능한 나노리간드의 인시투 자기적 인력(In situ magnetic attraction)은 줄기세포의 기계감지-매개 분화(mechanosensing-mediated differentiation)에 대한 면역형광 이미지이다: (a) 자석 아래 줄기세포에서 F-액틴 및 핵 및 ALP 발현을 갖는 RUNX2 및 YAP에 대한 면역형광이다. (b)F-액틴 및 핵을 갖는 TAZ, 인테그린 β 1, FAK 및 RhoA, ROCK 억제제 하의 YAP(Y27632), 및 자석 조건 하의 줄기세포에서 미오신 II 억제제(블레비스타틴) 하의 빈쿨린에 대한 면역형광이다. 스케일 바는 50 μ m이다. 도 17을 살펴보면, 슬라이딩 가능한 나노리간드는 인시투 자기적 인력(In situ magnetic attraction)을 통해 줄기 세포의 기계감지-매개 분화(mechanosensing-mediated differentiation)를 촉진하는 것을 알 수 있다.

[0118] 도 18는 비교예의 RGD 리간드 부재 및 영구 자석 부재에서의 면역형광의 공초점 이미지이다. 구체적으로, 7일

줄기세포 배양 후의 RUNX2, F-액틴 및 핵뿐만 아니라 알칼리성 포스파타제(ALP)에 대한 면역형광 또는 배양 2일 후 YAP, F-액틴 및 핵에 대한 면역형광의 공초점 이미지이다. 부착성 줄기세포는 개략적인 도면에서 적색 점선 사각형으로 표시된 바와 같이 기관이 좌측 중앙에서 이미지화 되었다. "RGD 없음(No RGD)" 및 "자석 없음(No Magnet)" 그룹을 비교군으로 사용하였다. 스케일 바는 50 μm 을 나타낸다. 도 18을 살펴보면, RGD 리간드를 포함하지 않거나(No RGD) 자기 제어가 없는 상태(No Magnet)에서 나노리간드의 슬라이딩에 의한 줄기세포의 분화를 효과적으로 조절되지 않는 것을 알 수 있다.

[0119] 도 17a 및 도 18를 살펴보면, 면역형광 및 알칼리성 인산가수분해효소(phosphatase) 양성 세포에서 RUNX2의 현저히 높은 핵 국소화(nuclear localization)는 기관의 좌측(자석 쪽)에서 관찰되었다. 동시에, 기계민감성(mechanosensitive) 전사 조절제인 YAP의 핵 국소화가 좌측에서 상당히 향상되었다. 기관의 좌측(자석 쪽)에서, 도 14 및 도 15에서의 줄기세포 부착의 시간적 전환과 일치한다.

[0120] 도 19는 일실시예에서 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자기적 인력에 대한 줄기세포의 기계적 형질도입 및 분화 실험의 결과로, 줄기세포 배양한 후 핵 대 세포질 RUNX2 형광 비율, 알칼리성 포스파타제 양성 세포 및 핵 대 세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다. 구체적으로, 기관의 “좌측” 아래에 영구자석이 위치하여 줄기세포 배양한 후 핵 대 세포질 RUNX2 형광 비율, 알칼리성 포스파타제 양성 세포 및 핵 대 세포질 YAP 형광 비율을 계산한 것이고, 상기 계산은 도 17a 및 도 18에 표시된 면역형광의 공초점 이미지를 사용하여 이루어졌다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차($n=30$)로 표시된다. 통계적으로 중요한 차이는 다른 알파벳으로 표시된다. 도 19를 살펴보면, 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자기적 인력은 줄기세포의 기계적 형질도입 및 분화를 촉진하는 것을 알 수 있다.

[0121] 도 20은 일실시예에서 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 시간적 제어 실험의 면역형광의 공초점 이미지 및 핵 대 세포질 RUNX2 형광 비율을 계산한 그래프이다. (a)는 영구자석을 기관의 좌측 아래에 위치시키거나("ON") 기관으로부터 제거("OFF")하여 줄기세포 배양 7일 후 RUNX2, F-액틴 및 핵의 면역형광의 공초점 이미지이다. "ON" 및 "OFF" 조건을 (RUNX2)의 배양 7일 동안 연속적으로 적용하거나 배양 12시간 후에 전환하였다. 줄기세포는 기관의 "좌측"의 중심 및 "우측"의 중심에서 이미지화 하였다. 스케일 바는 50 μm 을 나타낸다. (b)는 핵 대 세포질 RUNX2 형광 비율을 계산한 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차($n=30$)로 표시된다. 통계적으로 중요한 차이는 다른 알파벳으로 표시된다. 도 20을 살펴보면, 본 발명의 슬라이딩 가능한 나노리간드는 자기장을 이용하여 시간적 줄기세포의 분화를 조절할 수 있다.

[0122] 도 21은 일실시예에서 슬라이딩 가능한 나노리간드의 시간-제어 제어를 통한 기계 형질도입에 대한 실험의 결과이다. (a)는 영구자석을 기관의 좌측 아래에 위치시키거나("ON") 기관으로부터 제거("OFF")하여 배양 2일 후 RUNX2, F-액틴 및 핵의 면역형광의 공초점 이미지이다. (b)는 핵 대 세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다. 도 21을 살펴보면, 본 발명의 슬라이딩 가능한 나노리간드는 시간 제어를 통해 줄기세포의 기계적 형질도입을 조절할 수 있다.

[0123] 도 20a-b, 도 21a-b를 살펴보면, 줄기세포 분화 및 기계적 형질도입은 “ON” 조건 하에서 RUNX2 및 YAP의 보다 현저한 핵 국소화로 자극되었다.

[0124] 도 22는 일실시예에서 슬라이드 가능한 나노리간드에 대해 기관의 “좌측” 아래에 위치하는 영구자석으로 줄기세포 배양 7일 후 RUNX2 및 ALP의 유전자 발현 프로파일이고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차($n=30$)로 표시된다. 통계적으로 중요한 차이는 다른 알파벳으로 표시된다.

[0125] 도 22를 살펴보면, 유전자 발현 분석은 “ON” 조건 하에서 좌측(자석 쪽)에서 RUNX2 및 ALP의 발현이 현저하게 높게 나타났다. 흥미롭게도, 좌측(자석 쪽)에서, “OFF-ON” 및 “ON-OFF” 조건은 “ON” 조건과 비교할 만한 RUNX2 및 YAP의 현저한 핵 국소화를 보여주었다. 이는 나노리간드가 자석 쪽으로 끌려당겨 미리 정해진 시점에서 이들 세포 신호 전달 이벤트를 활성화시킬 수 있기 때문에, 줄기세포의 기계적 형질도입 및 줄기세포의 분화를 촉진하기 위해 자석이 초기 또는 차후에 배치될 수 있음을 나타낸다. 이를 통해, 슬라이드 가능한 나노리간드를 자기적으로 끌여당기는 인시투 제어를 통해 줄기세포의 분화를 자극하는 것을 알 수 있다.

[0126] 또한, 본 발명은 기계적 형질도입(mechanotransduction) 신호의 인테그린 결찰-매개 활성화를 인시투 나노리간드의 슬라이딩 하에서 줄기세포 분화를 촉진하는 방법을 조사하였다. 본 발명은 기관의 좌측 아래에 자석을 배치하였고, 다양한 세포내 기계민감성 경로를 조사하였다.

[0127] 도 23은 일실시예에서 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자기 인력(magnetic attraction)에 대한 면역형광 이미지로부터 계산한 결과를 나타낸 것이다: (a) 도 4b에 나타낸 TAZ에 대한 면역형광의 공초점 이미지로부터 핵 대

세포질 TAZ 형광 비율의 정량이다. (b) F-액틴 및 핵을 갖는 p-FAK에 대한 면역형광의 공초점 이미지이다. 도 17b에 나타난 (c) ROCK 억제제(Y27632를 갖는) 하에 핵 대 세포질 YAP 형광 비율 및 (d) 미오신 II 억제제(블레비스타틴을 갖는)의 세포 면적을 계산한 그래프이다. 줄기세포를 기관의 "좌측" 아래에 위치한 영구자석으로 2일 동안 배양하였다. 부착성 줄기세포를 기관의 "좌측" 및 "우측"의 중심에서 이미지화 하였다. 스케일 바는 50 μm 을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차(n=30)로 표시된다. 통계적으로 중요한 차이는 다른 알파벳으로 표시된다. 도 23을 살펴보면, 본 발명의 슬라이딩 가능한 나노리간드는 자기 인력을 제어할 통해 줄기세포의 초점 부착 및 기계 감각을 용이하게 하는 것을 알 수 있다.

[0128] 도 17b, 도 23a-d를 살펴보면, 면역형광에서 TAZ, 전사 공동 활성화, 및 인테그린 $\beta 1$ 활성화의 더 높은 핵 위치는 기관의 좌측(자석 쪽)에서 관찰되었다. FA 복합체의 안정한 형성은 기계민감성 RhoA를 활성화시키기 위해 인산화하는 초점 부착 키나제(focal adhesion kinase, FAK)를 포함한다. 좌측(자석 쪽)에서, FAK가 높게 발현되었고, 이는 pFAK를 자극하기 위해 인산화되고 활성화되었다. 기계적 형질도입의 초점 부착-매개 활성화는 좌측에서 RhoA를 자극하였고, 이는 Y27632에 의한 ROCK 억제제에 의해 밝혀진 바와 같이, YAP의 핵 국소화를 유도하기 위해 rho-연관 단백질 키나제(ROCK)를 활성화시켰다. 또한, 블레비스타틴(blebbistatin)에 의한 미오신 II 억제제는 좌측의 세포 확산 면적을 상당히 감소시켰다. 이러한 결과를 통해 슬라이딩 가능한 나노리간드 인력의 인시투 제어는 줄기세포의 기계감지-매개 분화를 활성화하는 FA 조립체를 형성하는 인테그린 결합을 용이하게 함을 알 수 있다.

[0130] 실험예 5

[0131] 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드는 인시투 제어를 통해 생체 내 줄기세포 부착을 공간적으로 조절한다는 것을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0132] 본 발명의 슬라이딩 가능한 나노리간드를 이용한 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 원격 제어는 생체 내에도 적용시킬 수 있다. 최근에, UV 광은 생체 내에서 세포 부착의 공간적 조절을 위해 이용되었다. 그러나, 이 연구에서, UV 광은 생체 내 살아있는 조직에 의해 고도로 흡수되어 심각한 세포 독성을 유발할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로 생체 내에 세포 부착의 공간 조절의 외부 자기장-기반 제어는 유망한 조직 침투성 및 세포적합성(cytocompatible) 제어 전략을 제시한다.

[0133] 생체 내에서 줄기세포의 부착에 대한 나노리간드의 슬라이딩 인시투의 효과를 조사하기 위해, 슬라이딩 가능한 나노리간드를 포함하는 기관을 2개월 된 누드 마우스 14마리에게 피하 이식하였다. 이식하기 전에, 누드 마우스를 5 mL의 졸레틸(zoletil), 2 mL의 롬퐀(rompun) 및 3 mL의 식염수의 혼합물의 복강 내 주사에 적용하였다. 마우스의 뒷면에 2 cm 길이의 절개가 이뤄졌다. 이식 후, hMSC를 100k/mL로 기관에 주입하고 영구 자석을 기관의 좌측(복부측)아래에 부착하여 나노리간드가 좌측을 향해 미끄러지는 것을 촉진시켰다. 면역형광의 공초점의 이미지화를 위해 기관이 수집될 때까지 마취를 유지시켰다.

[0134] 도 24는 일실시예에서 슬라이딩 가능한 나노리간드의 슬라이딩 나노리간드 인력의 자기 제어(magnetic control) 실험을 나타낸 것이다: (a)는 나노리간드의 자기 제어 실험을 도식화한 이미지이고, (b)는 자석과 함께(“ON”) 또는 자석없이(“OFF”)로 피하 이식 후 슬라이딩 가능한 리간드-제시 기관에 주입된 줄기세포의 액틴 및 핵을 갖는 인간-특이적 HuNu에 대한 면역형광 결과이다. (c)는 생체 내 부착된 세포 밀도 및 면적의 정량을 나타낸 것이다. 스케일 바는 50 μm 이다. 도 24를 살펴보면, 슬라이딩 가능한 나노리간드는 자기 제어를 통해 생체 내에서 줄기 세포 부착을 용이하게 하는 것을 알 수 있다.

[0135] 본 발명에서는 도 24a에 나타난 바와 같이 hMSC가 주입된 누드 마우스의 등에 슬라이딩 가능한 나노리간드를 나타내는 기관을 피하에 이식했다. 그런 다음, 기관의 좌측(마우스 복부) 아래에 자석을 놓았고(“ON”), 이의 비교실험으로 자석을 배치하지 않았다(“OFF”). 그 결과 도 24b-c를 살펴보면, 액틴 및 핵을 갖는 인간-특이적 핵 항원(antigen)(HuNu)에 대한 면역형광의 공초점 이미지는 모든 부착성 세포가 hMSC이며, 이는 “ON” 조건 하에서 기관의 좌측(자석 쪽)에 75% 만큼 상당히 높은 밀도로 부착되고 세포 면적을 우측보다 44% 만큼 확산시켰다. 뚜렷한 대조적으로, 줄기세포는 “OFF” 조건 하에서 호환 가능한 세포 밀도 및 면적에서 좌측 및 우측에 부착되었다. 이러한 결과를 통해 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 원격 제어는 줄기세포 부착을 공간적으로 조절하기 위해 복잡한 생체 내 환경으로 전환될 수 있음을 알 수 있다. 또한, 이러한 인시투 원격 제어는 생체 내에서 다양한 호스트 세포(host cell)의 공간 조절에 효과적임을 확인했다.

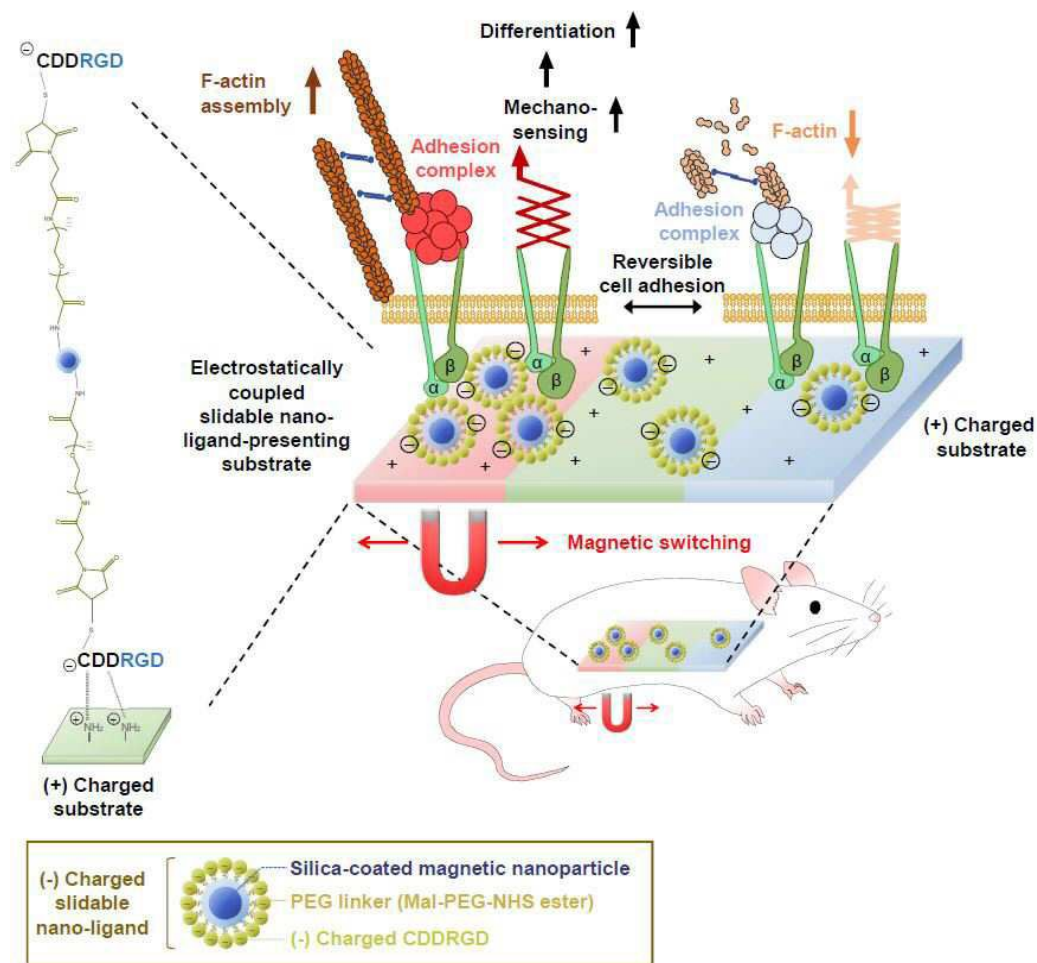
[0136] 따라서, 본 발명에 따른 슬라이딩 가능한 나노리간드의 자기장 기반 시공간적 제어는 생체 외 및 생체 내에서

줄기세포 부착과 기계적 형질도입-조절 분화 결과를 효과적으로 제어할 수 있다.

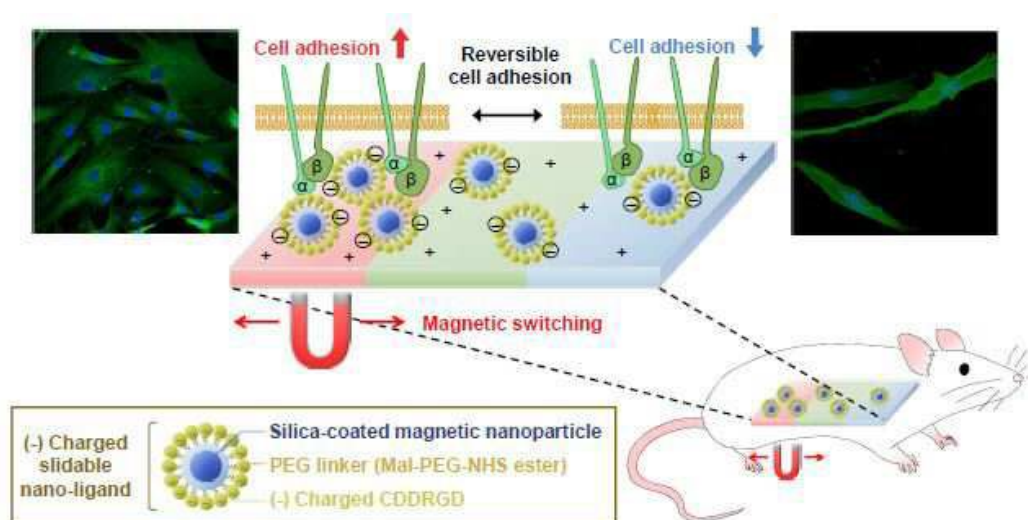
- [0138] 상기 실험예에서, 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 제어 하에서 줄기세포의 부착 및 분화의 면역형광 염색-기반 분석은 다음과 같이 실험하였다. 배양 후 줄기세포를 4%(w/v) 파라포름알데히드로 실온에서 10분 동안 고정시키고 PBS로 세척하였다. 상기 고정된 세포를 30분 동안 실온에서 PBS 중 3%(w/v) BSA 및 0.1%(v/v) 트리톤-X(Triton-X, Sigma Aldrich)으로 차단하였다. 상기 차단된 세포는 1차 항체(integrin α 1, vinculin, RUNX2, YAP, TAZ, p-FAK, FAK, RhoA, 및 HuNu)로 4℃에서 16시간 동안 처리하고 PBS로 세척하였다. 상기 세포를 2차 항체, 팔로이딘(phalloidin) 및 DAPI로 실온에서 30분 동안 처리하고 PBS로 세척하였다. 면역형광 염색된 세포를 모든 비교군에 대해 동일한 노출 조건에서 공초점 현미경(LSM700, Carl Zeiss) 하에서 이미지화 하였고, 그런 다음 이전에 표시된대로 ImageJ 소프트웨어로 분석하였다.
- [0139] 또한, 나노리간드의 슬라이딩 하에서 줄기세포의 부착, 분화 및 기계감지를 정량화하기 위해, 면역형광 염색된 이미지는 ImageJ 소프트웨어에 의해 분석하였다. 인테그린 β 1의 경우, 히스토그램(histogram) 기능에 의해 5개의 다른 이미지로부터 염색 강도를 계산하였다. 부착성 세포 밀도의 경우, 5개의 다른 DAPI-염색된 이미지로부터 세포 핵의 수를 계산하였다. 부착성 세포 면적 및 종횡비(주축, 부축)의 경우, 5개의 다른 팔로이딘-염색 이미지를 계산에 사용하였다. 초점 부착의 수를 위해서, 이전에 보고된 바와 같이 5개의 다른 빈쿨린(vinculin)-염색된 이미지는 1 μ m²보다 큰 크기를 갖는 클러스터를 계산하기 위해 사용하였다. 줄기세포의 분화(RUNX2) 및 기계적 형질도입(YAP)의 경우, 5개의 다른 이미지로부터 줄기세포의 핵과 세포질의 형광 비율을 계산에 사용하였다.
- [0140] 더불어, 나노리간드의 슬라이딩의 인시투 제어 하에서 줄기세포의 분화에 대한 역전사-중합 효소 연쇄 반응(qRT-PCR)기반 분석은 다음과 같이 수행하였다. 골 형성 분화 배지 하에서 배양 후 줄기세포는 RNA를 추출하기 위해 기관(좌측과 우측으로 분리)에 적용한 트리졸(그룹 당 1mL)에 의해 수집하였다. 각 그룹에 대해, 1 μ g의 RNA를 고용량 RNA-to-cDNA 키트를 사용하여 cDNA로의 역전사에 사용하였다. StepOne Plus 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)은 Sybr Green assays을 통한 실시간 PCR 반응에 사용되었다. 표적 유전자(RUNX2 및 ALP)의 발현을 GAPDH의 발현으로 정규화 되었고, 그런 다음 접합 발현으로 표시되었다.

도면

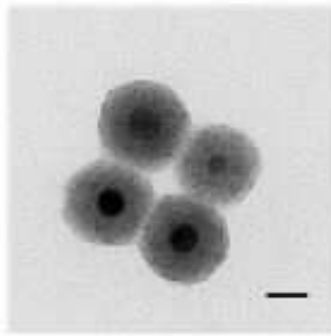
도면1



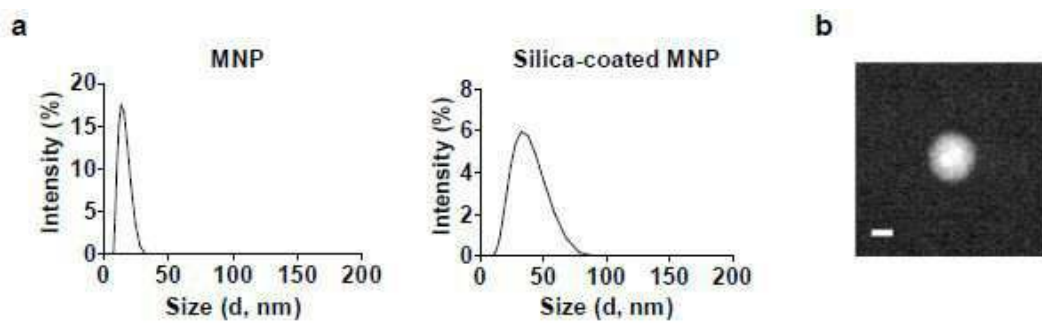
도면2



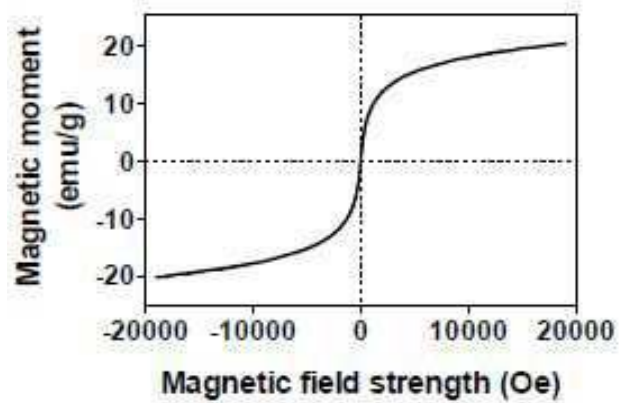
도면3



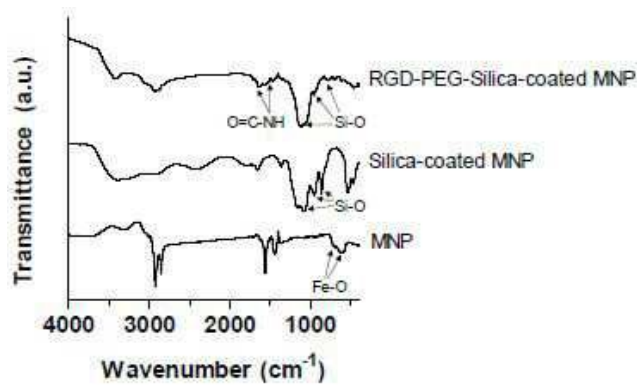
도면4



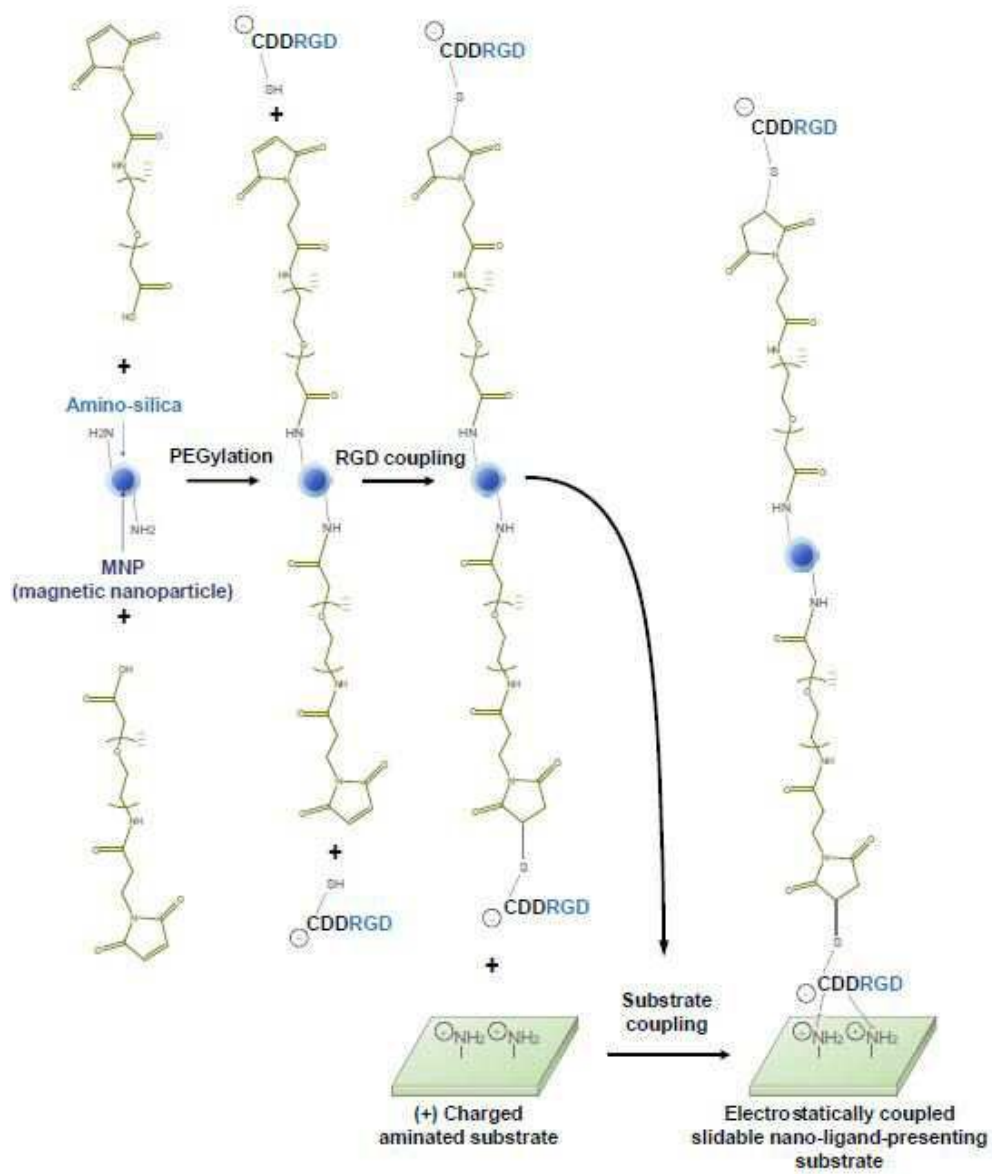
도면5



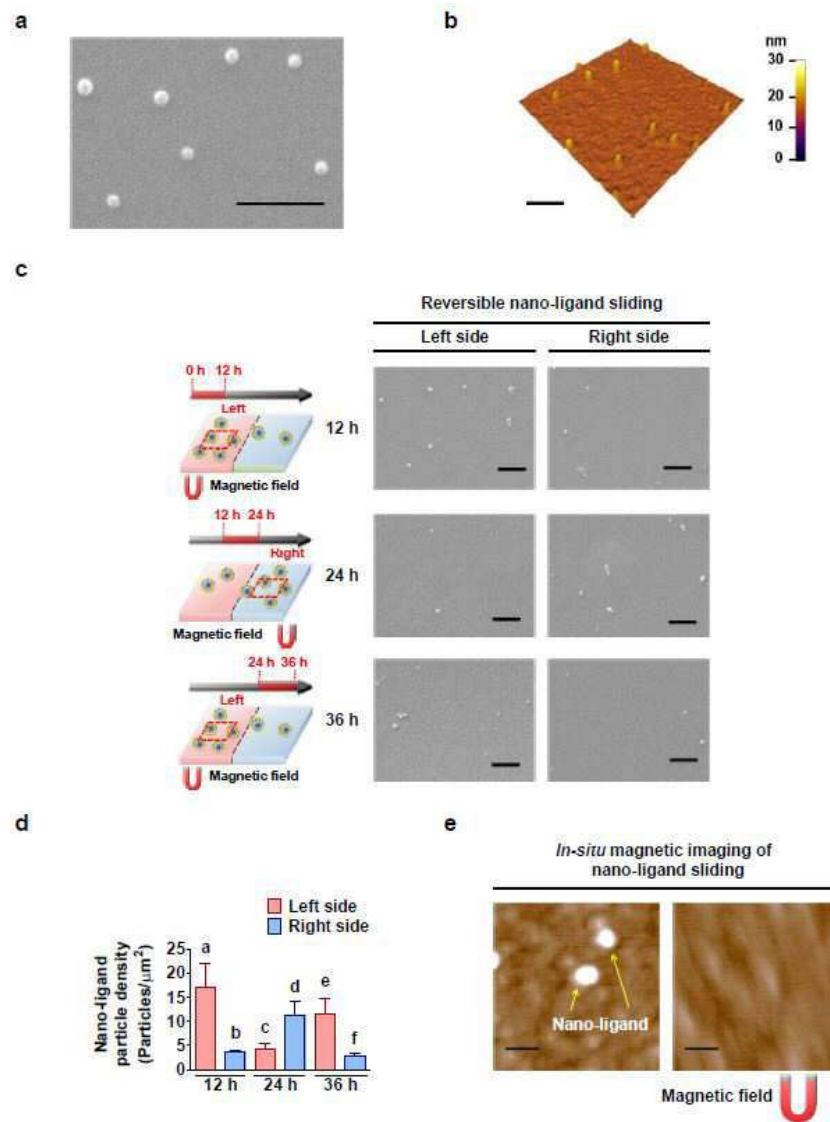
도면6



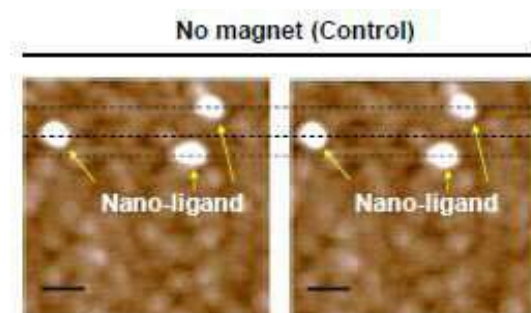
도면7



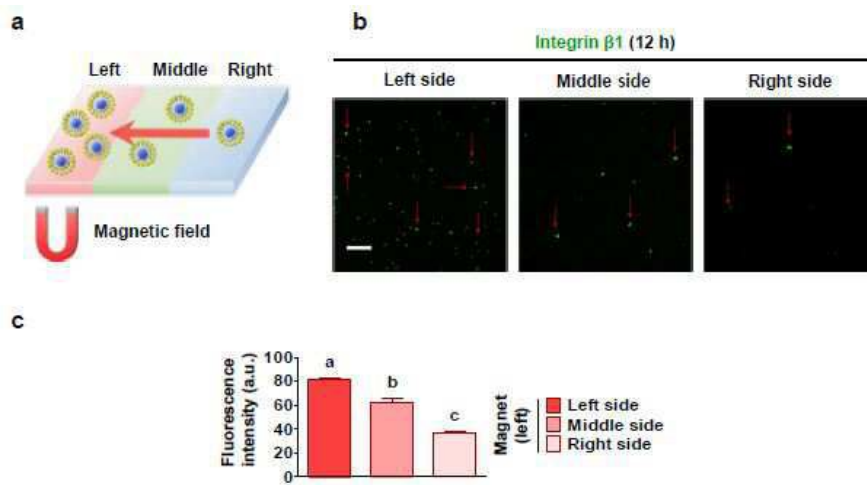
도면8



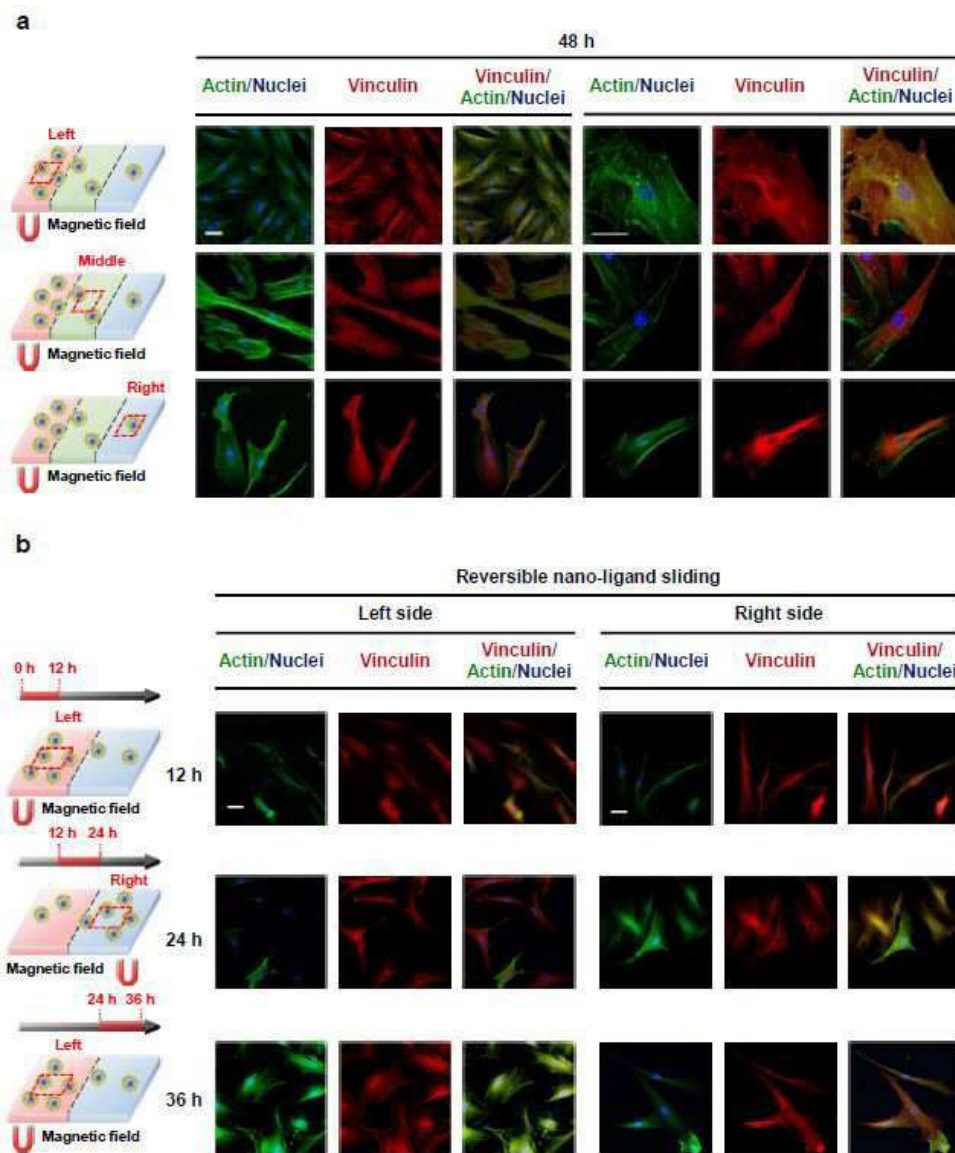
도면9



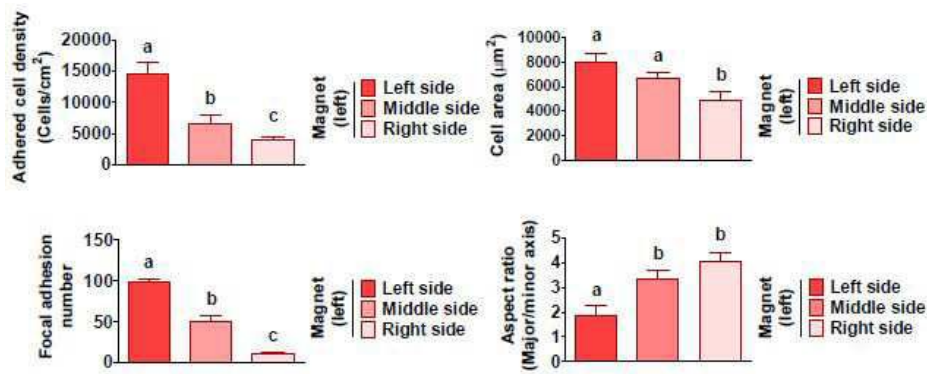
도면10



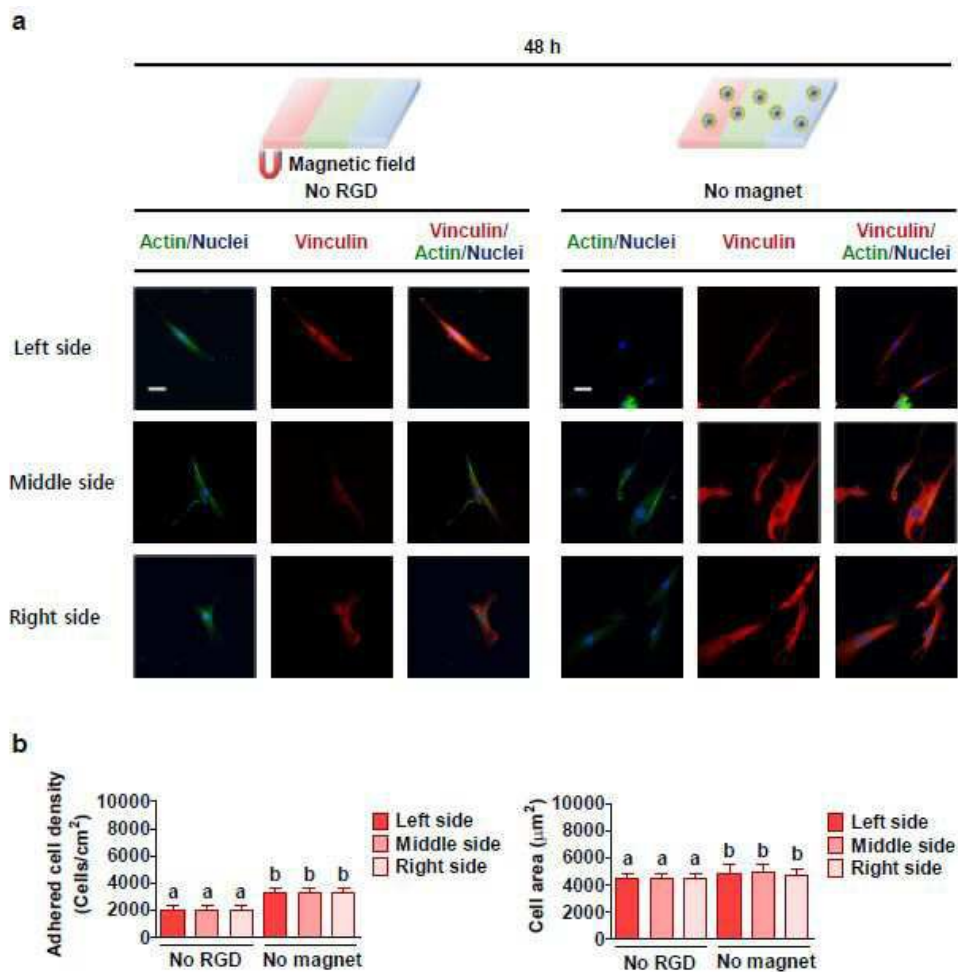
도면11



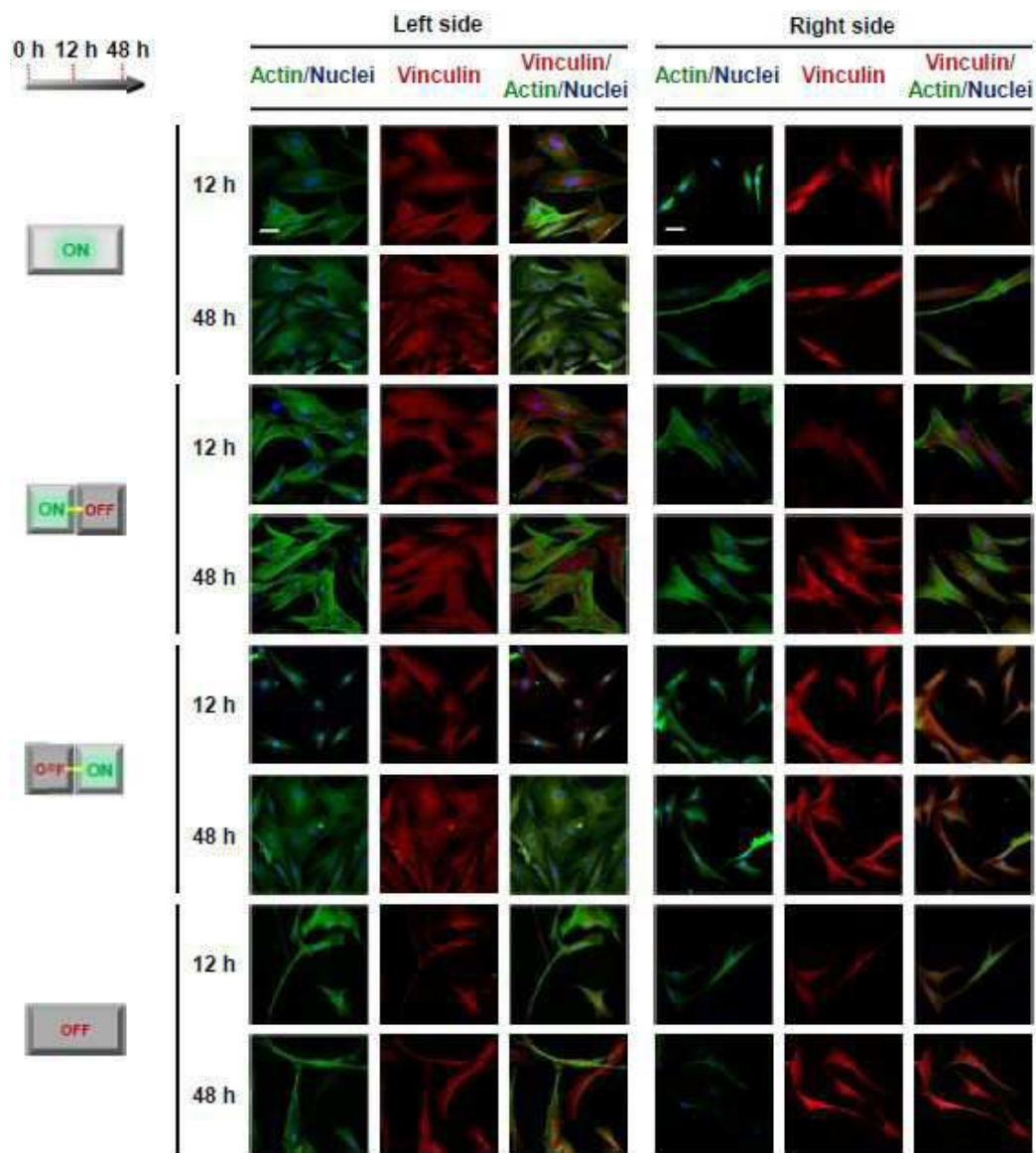
도면12



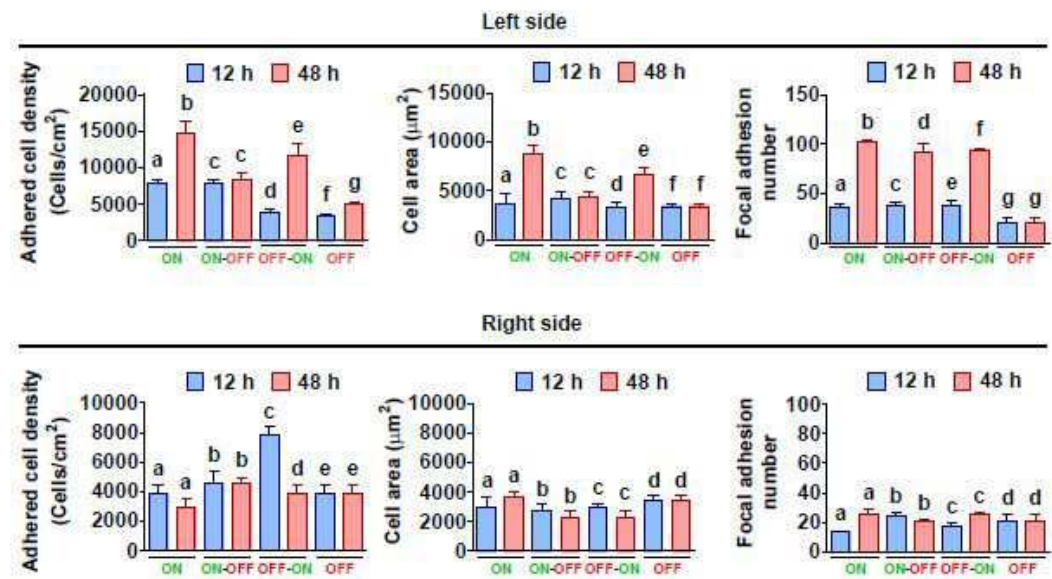
도면13



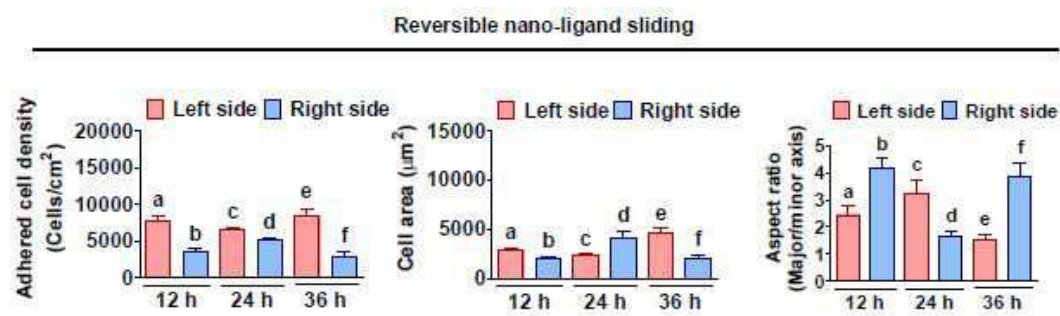
도면14



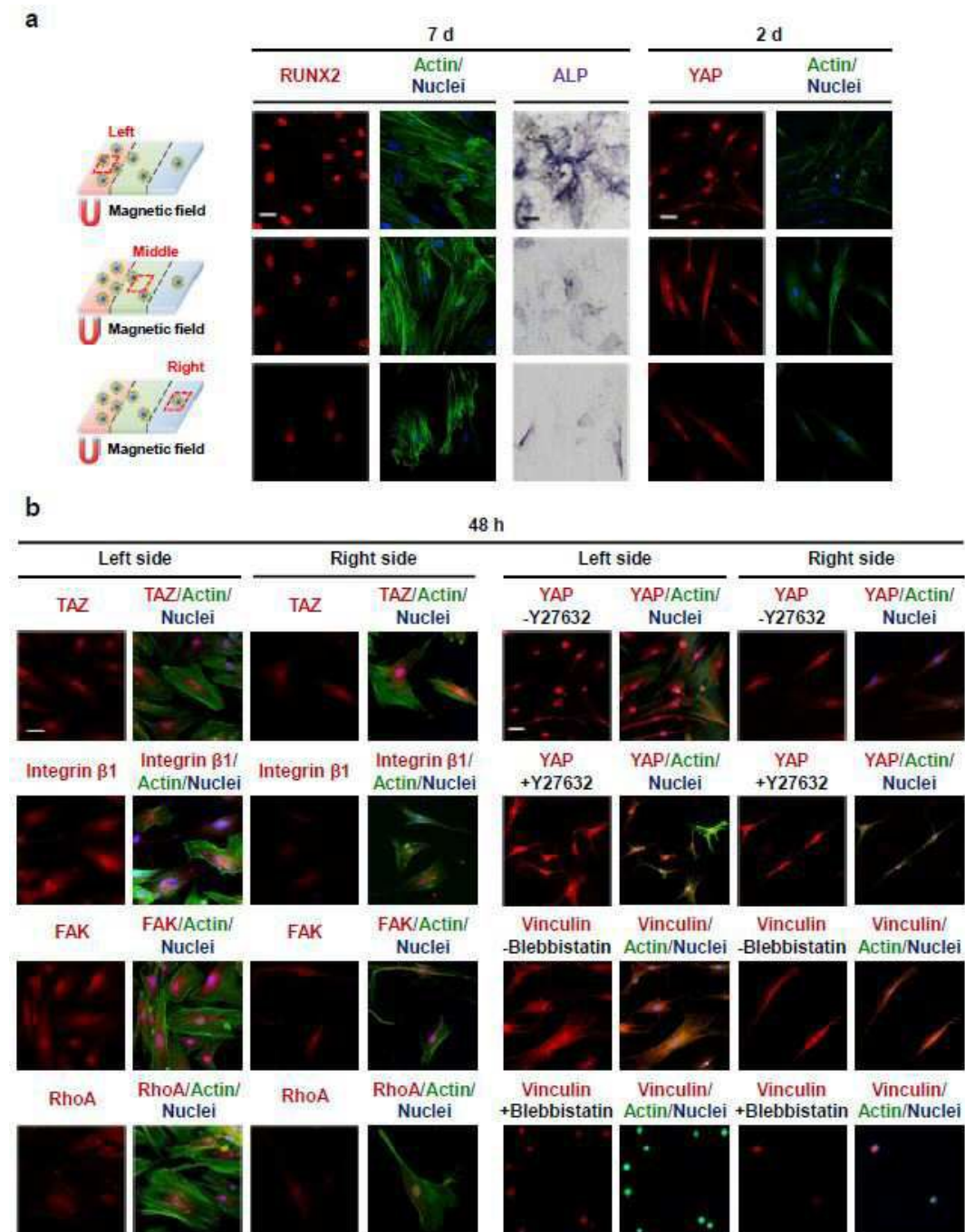
도면15



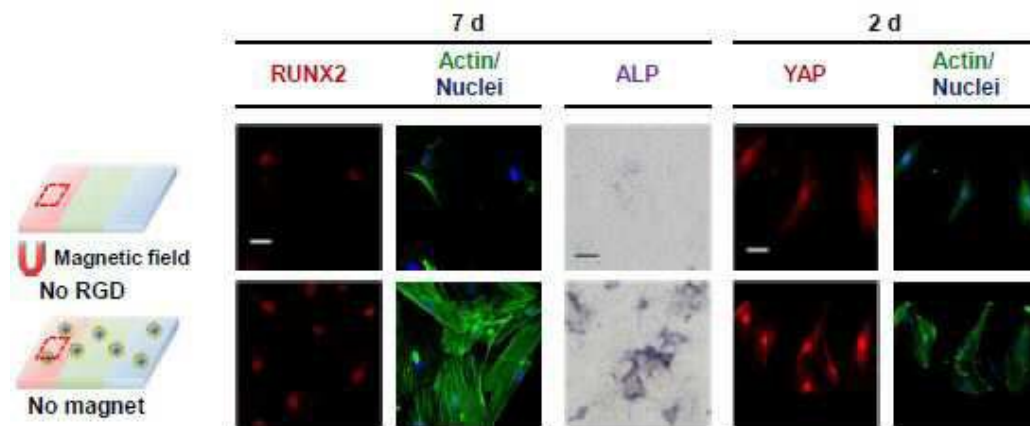
도면16



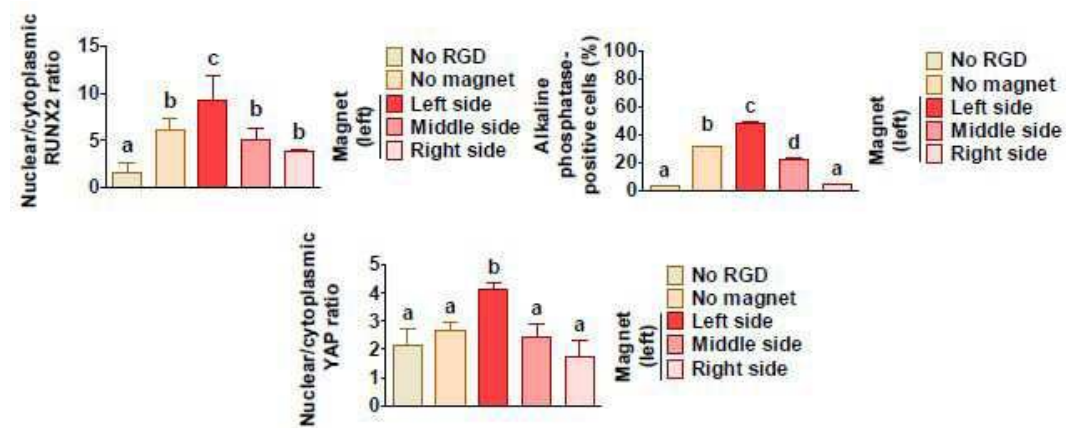
도면17



도면18

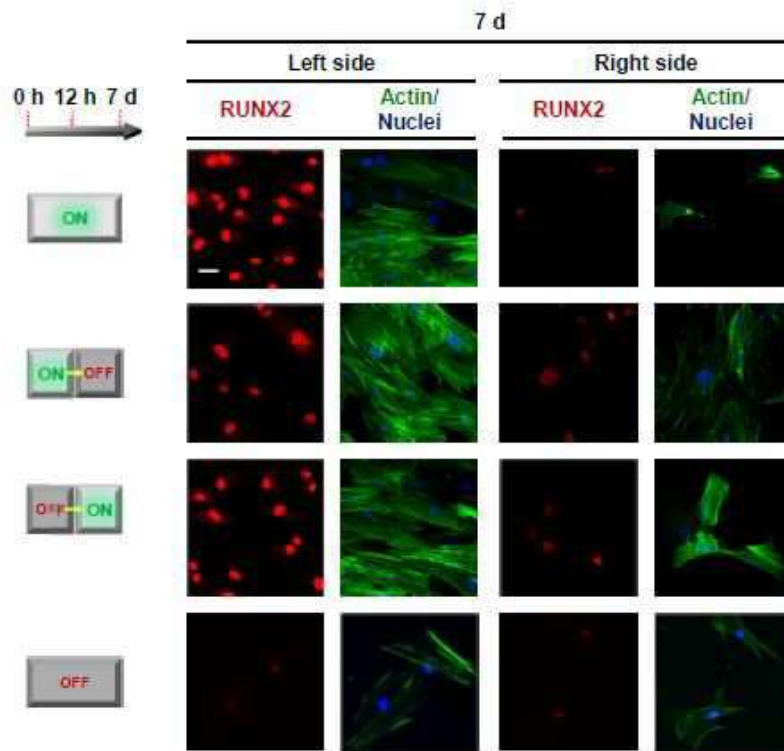


도면19

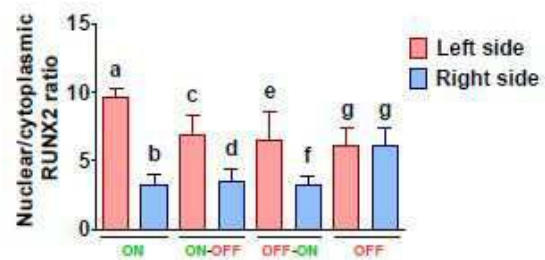


도면20

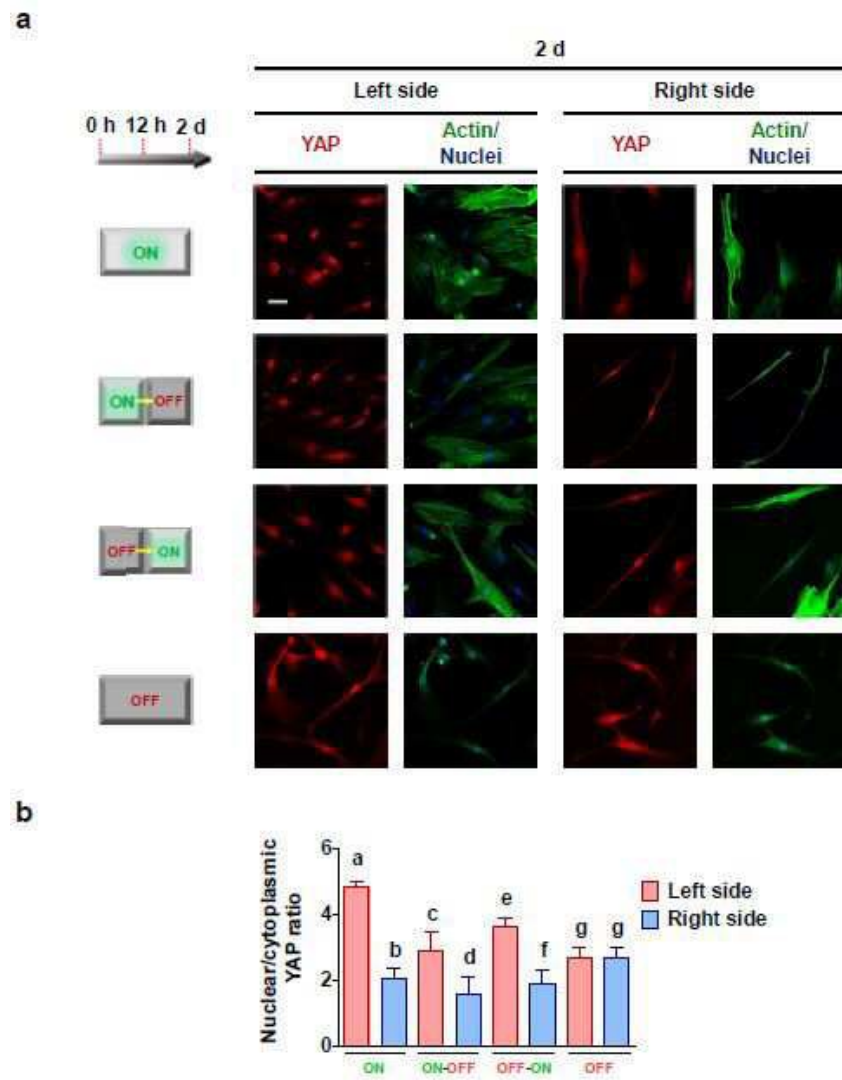
a



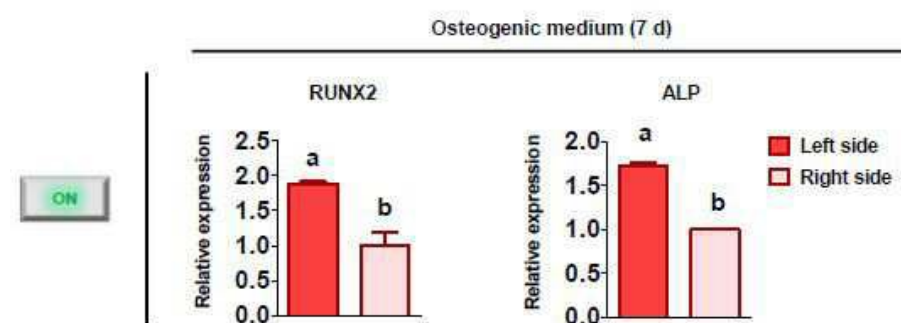
b



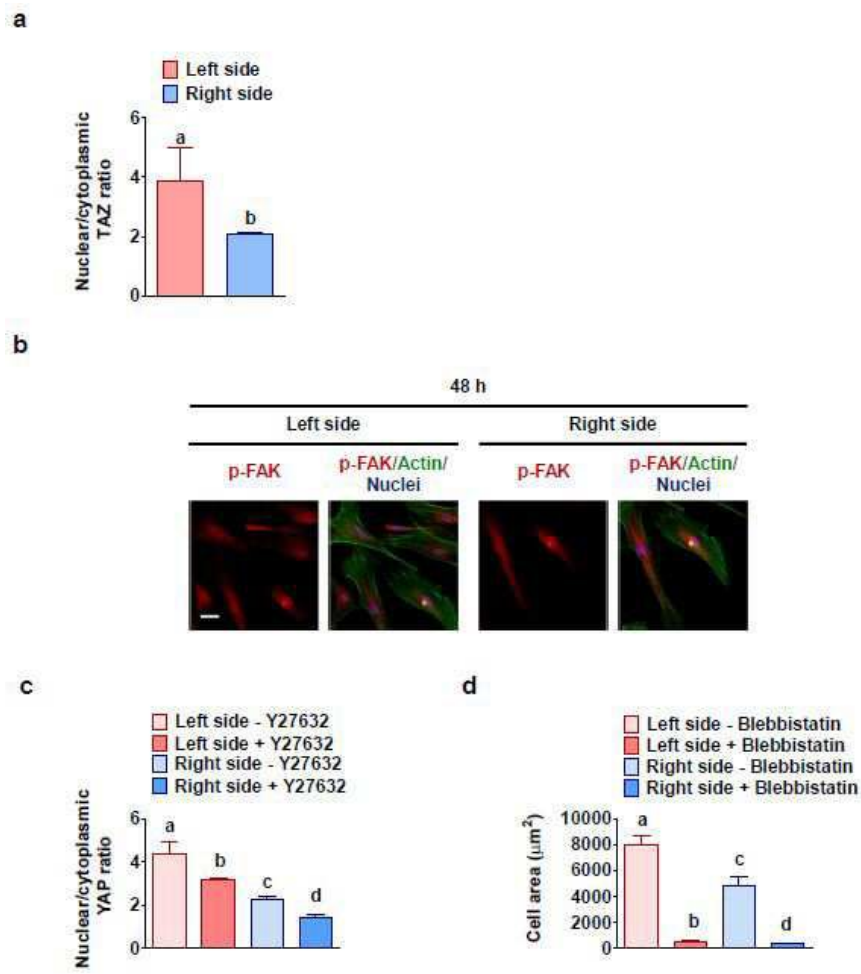
도면21



도면22



도면23



도면24

