(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109417
(43) 공개일자 2024년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) *C12N 13/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12M 35/06 (2013.01)
C12N 13/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0001183
(22) 출원일자 2023년01월04일
심사청구일자 2023년01월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
강희민
서울특별시 강남구 개포로110길 50 래미안루체하임 111동 604호
탕감 라마
전라남도 화순군 용곡3길 31-2 효림아트빌 205호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최훈식

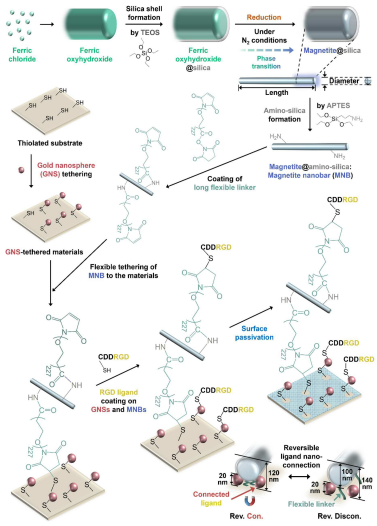
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 티올기가 형성된 기판부; 자성을 가지고 자기장의 인가에 따라 이동하는 자성 막대부; 상기 자성 막대부에 하나 이상 연결되고 리간드를 포함하는 제1리간드부; 상기 자성 막대부 표면의 일부에 결합하여 상기 자성 막대부와 상기 제1리간드부를 연결하는 제1링커부; 상기 티올기의 일부와 결합하여 상기 기판부 및 상기 자성 막대부를 연결하는 제2링커부; 및 상기 티올기의 일부와 결합하고 리간드를 포함하는 제2리간드부;를 포함하고, 상기 제1리간드부 및 제2리간드부의 리간드는 대식세포가 감지할 수 있는 리간드인, 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김성열

서울특별시 성북구 삼선교로24길 58 (삼선동5가) 문화빌 403호

배건휴

경기도 화성시 동탄대로시범길 19 (청계동 동탄역시 범더샵 센트럴시티) 1402동 2201호

강나연

서울특별시 성북구 안암로9가길 54 (안암동5가) 202호

이성규

경기도 시흥시 인선길 63 (장곡동 숲속마을아파트) 231동 802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711162015
과제번호	2020R1C1C1011038
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)우수신진연구
연구과제명	나노 리간드 주기성의 제어와 동적인 제시를 통한 세포의 부착과 재생성 특성의 조절
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

티올기가 형성된 기판부;

자성을 가지고 자기장의 인가에 따라 이동하는 자성 막대부;

상기 자성 막대부에 하나 이상 연결되고 리간드를 포함하는 제1리간드부;

상기 자성 막대부 표면의 일부에 결합하여 상기 자성 막대부와 상기 제1리간드부를 연결하는 제1링커부;

상기 티올기의 일부와 결합하여 상기 기판부 및 상기 자성 막대부를 연결하는 제2링커부; 및

상기 티올기의 적어도 일부와 결합한 금 입자; 및

상기 금 입자에 결합하고 상기 리간드를 포함하는 제2리간드부;를 포함하고,

상기 제1리간드부 및 제2리간드부의 리간드는 대식세포가 감지할 수 있는 리간드인,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

자기장을 인가하여 상기 자성 막대부를 이동을 제어하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 자성 막대부의 종횡비는 5 내지 10 인,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 자성 막대부의 최대 폭은 70 nm 내지 130 nm인,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제1리간드부는 0.7 입자/μm^2 내지 1.5 입자/μm^2의 밀도를 가지는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제2리간드부는 25 입자/㎛^{2} 내지 40 입자/㎛^{2}의 밀도를 가지는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 리간드는 CDDRGD 리간드인,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 8

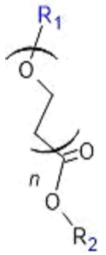
제1항에 있어서,

상기 제1링커부 및 제2링커부 중 적어도 어느 하나는,

플렉서블한 특성을 가지고, 식 1의 화합물이 결합하여 형성되는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체;

[식 1]



여기에서 n은 10 내지 1000일 수 있고, R1 및 R2는 각각 하이드록실, 아민, 티올, 말레이미드, 메톡시, 아자이드, 카르복실산, 아크릴레이트, 사이아닌, n-하이드록시숙신이미드, 알데하이드, 아크릴아마이드, 에폭사이드, 하이드라자이드, 할라이드, 메타크릴레이트 및 실란 중 어느 하나이다.

청구항 9

제1항에 있어서,

자기장을 인가하여 상기 자성 막대부의 이동을 제한하고,

상기 자성 막대부를 기판부가 있는 쪽으로 이동시켜 상기 리간드의 밀도를 높여 대식세포의 부착을 촉진하고 M2 분극화를 촉진하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서,

자기장을 인가하지 않아 상기 자성 막대부가 자유롭게 움직이고,

상기 리간드의 밀도를 낮추어 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극화를 촉진하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 자성 막대-기판 복합체를 제조하는 방법에 있어서,

기판부를 세척하여 불순물을 없앤 후 표면에 티올기를 도입하는 단계;

티올기가 도입된 상기 기판부를 금 입자를 포함하는 용액에서 인큐베이팅하여 상기 티올기의 일부에 금 입자를 결합시키는 단계;

제1링커부 및 제2링커부를 포함하는 자성 막대부의 상기 제2링커부를 상기 금 입자가 결합하지 않은 상기 티올기의 적어도 일부에 결합시키는 단계;

리간드를 포함하는 용액에 인큐베이팅하여 상기 금 입자에 상기 리간드를 결합시켜 제2리간드부를 형성하고, 상기 제1링커부에 상기 리간드를 결합시켜 제1리간드부를 형성하는 단계; 및

상기 금 입자 또는 자성 막대부가 결합하지 않은 티올기를 불활성화시키는 단계;를 포함하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 자성 막대부는,

막대 형태의 옥시수산화철(ferric oxyhydroxide)을 세척한 후 실리카를 포함하는 용액에서 교반하여 옥시수산화철의 표면에 실리카를 코팅하는 단계;

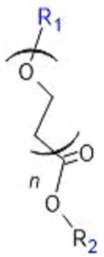
실리카가 코팅된 옥시수산화철을 환원하여 실리카가 코팅된 마그네타이트를 형성하는 단계;

상기 자성 막대의 표면에 아미노기를 도입하는 단계; 및

하기 식 1의 화합물을 상기 아미노기에 결합시켜 제1링커부 도는 제2링커부를 형성하는 단계;를 포함하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체의 제조방법.

[식 1]



여기에서 n은 10 내지 1000일 수 있고, R1 및 R2는 각각 하이드록실, 아민, 티올, 말레이미드, 메톡시, 아자이드, 카르복실산, 아크릴레이트, 사이아닌, n-하이드록시숙신이미드, 알데하이드, 아크릴아마이드, 에폭사이드, 하이드라자이드, 할라이드, 메타크릴레이트 및 실란 중 어느 하나이다.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 금 입자를 포함하는 용액의 농도를 조절하여 상기 제1리간드부의 밀도를 조절하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체의 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 실리카가 코팅된 옥시수산화철은 (200)면에서 밝은 부분의 평균 면간 간격이 5.2Å이고,

상기 실리카가 코팅된 마그네타이트는 (220)면에서 밝은 부분의 평균 면간 간격이 3.1Å인,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체의 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 실리카가 코팅된 마그네타이트는 역 스피넬 구조에서 (110)면에 대하여 단위 세포 격자 상수가 8.4Å인,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체의 제조방법.

청구항 16

제1항 및 제10항 중 어느 한 항에 의한 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하여 대식세포의 부착을 제어하여 M1 또는 M2 분극화를 조절하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 기판부의 일면에 자기장을 인가하여 상기 자성 막대부를 기판이 있는 방향으로 끌어당겨 상기 자성 막대부의 이동을 제한하고,

상기 제1리간드부 및 제2리간드부의 거리를 가깝게 형성하여 상기 리간드의 밀도를 높여 대식세포의 부착을 촉진하고 M2 분극화를 촉진하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 자기장을 인가하지 않아 상기 자성 막대부가 자유롭게 움직이고,

상기 리간드의 밀도를 낮추어 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극화를 촉진하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절 방법.

청구항 19

제16항에 있어서,

상기 자기장은 100mT 내지 1T로 인가되는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하여 상기 자성 막대를 제어함으로써 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 기술에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 세포외기질(ECM)에서 발생하는 물리적 스크린은 생체 분자 운반과 세포 침투를 제어함으로써 항상성 및 조직 재생 조절을 돕기 위해 조직들의 다양한 구획을 분리시킨다. 특정 조직들은 다양한 세포들의 상호작용에 관련된 조직 복구 메커니즘을 조절하기 위해 물리적 스크린 역할을 할 수 있다. 그러나 생체 활성 표면을 분산적이고 동적으로 조절할 수 있는 ECM을 모방한 인위적 재료는 흔하지 않다.

[0004] 인테그린은 생체활성을 가지고 있는 리간드가 표출되어 있는 ECM과의 연결을 동적으로 형성하고, RGD 리간드가 세포의 초점 부착(focal adhesion) 및 세포 내 기계적 변환(mechanotransduction)을 매개한다. 빛 또는 자기장은 리간드의 차단을 원격 조절함으로써 세포의 부착을 조절할 수 있으며, 종래에 자외선(UV), 가시광선 및 근적외선(NIR)와 같은 빛들이 리간드의 차단을 광화학적으로 조절하기 위하여 사용되어 왔다. 예를 들어, UV는 세포 부착을 활성화하기 위한 리간드가 접목된 금 나노입자의 차단을 조절하는 감광성 폴리에틸렌글리콜 기반의 브러쉬를 화학적으로 분해하는데 적용되어 왔다. 아조벤젠 유도체와 같은 광 이성질체를 이용하여, 자체-조립된 브러쉬를 통한 리간드의 차단을 UV 및 가시광선 또는 세포 내 기계적 변환을 자극할 수 있는 기능을 가진 단일파장을 조명함으로써 조절할 수 있다.

[0005] 또한 자기장은 생체 내에서 조직을 쉽게 투과할 수 있는 특징이 있어 물리적 스크린의 비침습적 제어가 가능하다. 예를 들어 자기적 성질을 가지는 입자를 조절하여 리간드의 밀도를 제어함으로써 세포 부착을 원격으로 조절할 수 있다.

[0006] 종래 선행문헌인 Anisotropic Ligand Nanogeometry Modulates the Adhesion and Polarization State of Macrophages(Nano Lett. 2019, 19, 3, 1963-1975)에서는 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 내용을 개시하고 있으나, 자성 입자 및 리간드를 조절하여 대식세포의 부착을 유도하지 않는다는 점에서 차이가 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Anisotropic Ligand Nanogeometry Modulates the Adhesion and Polarization State of Macrophages(Nano Lett. 2019, 19, 3, 1963-1975)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는 자성 막대-기판 복합체를 제공하기 위한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는 자성 막대-기판 복합체의 제조방법

을 제공하기 위함이다.

[0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는 자성 막대-기판 복합체를 이용하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 방법을 제공하기 위함이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은 티올기가 형성된 기판부; 자성을 가지고 자기장의 인가에 따라 이동하는 자성 막대부; 상기 자성 막대부에 하나 이상 연결되고 대식세포가 감지하는 리간드를 포함하는 제1리간드부; 상기 자성 막대부 표면의 일부에 결합하여 상기 자성 막대부와 상기 제1리간드부를 연결하는 제1링커부; 상기 티올기의 일부와 결합하여 상기 기판부 및 상기 자성 막대부를 연결하는 제2링커부; 및 상기 티올기의 일부와 결합하고 대식세포가 감지하는 리간드를 포함하는 제2리간드부;를 포함하는, 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체를 포함할 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 자기장을 인가하여 상기 자성 막대부를 이동을 제어하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 것일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 막대부의 종횡비는 5 내지 10 인 것일 수 있다.

[0016] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 막대부의 지름은 70 nm 내지 130 nm인 것일 수 있다.

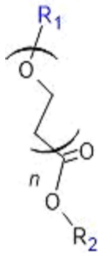
[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 제1리간드부는 0.7 입자/μm^2 내지 1.5 입자/μm^2의 밀도를 가지는 것일 수 있다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 제2리간드부는 25 입자/μm^2 내지 40 입자/μm^2의 밀도를 가지는 것일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 대식세포가 감지하는 리간드는 CDDRGD 리간드인 것일 수 있다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 제1링커 및 제2링커 중 적어도 어느 하나는, 플렉서블한 특성을 가지고, 식 1의 화합물이 결합하여 형성되는 것일 수 있다.

[0021] [식 1]

[0022] 

[0023] 여기에서 n은 10 내지 1000이고, R1 및 R2는 각각 하이드록실, 아민, 티올, 말레이미드, 메톡시, 아자이드, 카르복실산, 아크릴레이트, 사이아닌, n-하이드록시숙신이미드, 알데하이드, 아크릴아마이드, 에폭사이드, 하이드라자이드, 할라이드, 메타크릴레이트 및 실란 중 어느 하나이다.

[0024] 일 실시예에 있어서, 자기장을 인가하여 상기 자성 막대부의 이동을 제한하고, 상기 자성 막대부를 기판이 있는 쪽으로 이동시켜 상기 리간드의 밀도를 높여 대식세포의 부착을 촉진하고 M2 분극화를 촉진하는 것일 수 있다.

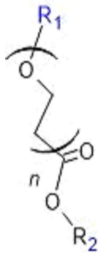
[0025] 일 실시예에 있어서, 자기장을 인가하지 않아 상기 자성 막대부가 자유롭게 움직이고, 상기 리간드의 밀도를 낮추어 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극화를 촉진하는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은 상기의 특징 중 적어도 어느 하나를 가지는 자성 막대-기판 복합체를 제조하는 방법에 있어서, 기판부를 세척하여 불순물을 없앤 후 표면에 티올기를 도입하는 단계; 티올기가 도입된 상기 기판부를 금 입자를 포함하는 용액에서 인큐베이팅하여 상기 티올기의 일부에 금 입자를 결합시키는 단계; 제1링커부 및 제2링커부를 포함하는 자성 막대부의 상기 제2링커부를 상기 금 입자가 결합하지 않은 상기 티올기의 적어도 일부에 결합시키는 단계; 리간드를 포함하는 용액에 인큐베이팅하여 상기 금 입자에 상기 리간드를 결합시켜 제2리간드부를 형성하고, 상기 제1링커부에 상기 리간드를 결합시켜 제1리간드부를 형성하는 단계; 및 상기 금 입자 또는 자성 막대부가 결합하지 않은 티올기를 불활성화시키는 단계;를 포함하는,

대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체의 제조방법을 포함할 수 있다.

[0027] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 막대부는, 막대 형태의 옥시수산화철(ferric oxyhydroxide)을 세척한 후 실리카를 포함하는 용액에서 교반하여 옥시수산화철의 표면에 실리카를 코팅하는 단계; 실리카가 코팅된 옥시수산화철을 환원하여 실리카가 코팅된 마그네타이트를 형성하는 단계; 상기 자성 막대의 표면에 아미노기를 도입하는 단계; 및 하기 식 1의 화합물을 상기 아미노기에 결합시켜 제1링커부 도는 제2링커부를 형성하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0028] [식 1]

[0029] 

[0030] 여기에서 n은 10 내지 1000이고, R1 및 R2는 각각 하이드록실, 아민, 티올, 말레이미드, 메톡시, 아자이드, 카르복실산, 아크릴레이트, 사이아닌, n-하이드록시숙신이미드, 알데하이드, 아크릴아마이드, 에폭사이드, 하이드라자이드, 할라이드, 메타크릴레이트 및 실란 중 어느 하나이다.

[0031] 일 실시예에 있어서, 상기 금 입자를 포함하는 용액의 농도를 조절하여 상기 제1리간드부의 밀도를 조절하는 것일 수 있다.

[0032] 일 실시예에 있어서, 상기 실리카가 코팅된 옥시수산화철은 (200)면에서 밝은 부분의 평균 면간 간격이 5.2Å이고, 기 실리카가 코팅된 마그네타이트는 (220)면에서 밝은 부분의 평균 면간 간격이 3.1Å인 것일 수 있다.

[0033] 일 실시예에 있어서, 상기 실리카가 코팅된 마그네타이트는 역 스피넬 구조에서 (110)면에 대하여 단위 세포 격자 상수가 8.4Å인 것일 수 있다.

[0034] 또한 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은, 상기와 같은 특징 중 적어도 어느 하나를 가지는 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하여 대식세포의 부착을 제어하여 M1 또는 M2 분극화를 조절하는, 대식세포의 부착 및 분극화 조절 방법을 포함할 수 있다.

[0035] 일 실시예에 있어서, 상기 기판부의 일면에 자기장을 인가하여 상기 자성 막대부를 기판이 있는 방향으로 끌어당겨 상기 자성 막대부의 이동을 제한하고, 상기 제1리간드부 및 제2리간드부의 거리를 가깝게 형성하여 상기 리간드의 밀도를 높여 대식세포의 부착을 촉진하고 M2 분극화를 촉진하는 것일 수 있다.

[0036] 일 실시예에 있어서, 상기 자기장을 인가하지 않아 상기 자성 막대부가 자유롭게 움직이고, 상기 리간드의 밀도를 낮추어 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극화를 촉진하는 것일 수 있다.

[0037] 일 실시예에 있어서, 상기 자기장은 100mT 내지 1T로 인가되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명에 의하면 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는 자성 막대-기판 복합체를 제공할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명에 의하면 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는 자성 막대-기판 복합체의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는 자성 막대-기판 복합체를 이용하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 막대-기판 복합체를 제조하는 과정 및 제조된 자성 막대-기판 복합체

를 조절하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 것을 모식적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 기판에 묶인(tethered) 금 입자의 평균 면간 간격 및 직경을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 금 나노입자를 다양한 밀도로 구비시킨 후 제조된 자성 막대-기판 복합체를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 HAADF-STEM 및 EDS 이미지이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 (a)옥시수산화철, 옥시수산화철@실리카 및 마그네타이트@실리카의 XRD 결과, (b)옥시수산화철@실리카 및 마그네타이트@실리카의 자기 모멘트, (c)마그네타이트@실리카의 원소들에 대한 HAADF-STEM 및 EDS 매핑, (d)마그네타이트@실리카의 HR-STEM 및 FFT, (e)마그네타이트@실리카의 SAD 패턴, (f)금 입자의 FE-SEM, (g)자성 막대-기판 복합체의 AFM 및 높이 변화 측정, (h)자기장의 인가에 따른 자성 막대의 높이 변화 그래프 및 (i)자기장 인가 또는 비인가시에 자성 막대의 최대 높이를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 마그네타이트@아미노-실리카, 링커가 결합한 마그네타이트@아미노-실리카 및 링커를 통해 기판에 묶인(tethered) 마그네타이트@아미노-실리카의 FTIR 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 마그네타이트@아미노-실리카, 링커가 결합한 마그네타이트@아미노-실리카 및 링커를 통해 기판에 묶인(tethered) 마그네타이트@아미노-실리카의 제타전위 측정 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 금 입자의 밀도가 다른 자성 막대-기판 복합체들에서 대식세포의 부착 정도를 실험한 결과이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 면역 나노 라벨링(immune nano-labeling, INL)된 입자에 대식세포가 부착되는 이미지 및 INL 입자의 특성을 나타낸다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 금 입자의 밀도를 가진 자성 막대-기판 복합체에서 "Con.", "Discon." 및 "Irrev. Con." 상태에 따라 대식세포의 부착 정도를 실험한 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 고정된 자성 막대-기판 복합체("Irrev. Con." 상태)가 자기장의 인가에 따라 대식세포의 부착이 달라지는지 확인하기 위한 실험 결과이다.

도 12 내지 17은 본 발명의 일 실시예에 따라 리간드 종류를 변경하여 금 입자 또는 자성 막대-기판 복합체에 대식세포의 부착이 달라지는지 확인하기 위한 실험 결과이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따라 "Con." 및 "Discon." 상태를 일정 시간마다 변경하면서 대식세포의 부착이 달라지는지 확인하기 위한 실험 결과이다.

도 19 내지 도 25 본 발명의 일 실시예에 따라 "Con.", "Discon." 및 "Irrev. Con." 상태를 원격으로 조절하여 전염증성 배지 조건 또는 전치유성 배지 조건에서 대식세포의 마커 단백질이 발현되는지 실험한 결과이다.

도 26 및 27a-c는 발명의 일 실시예에 따라 리간드와 인테그린의 연결(리간드 나노 연결)을 확인하기 위하여 자성 막대와 금 입자를 형광 염료로 염색한 후 리간드 나노 연결을 관찰한 결과이다.

도 27d-g 및 도 29는 발명의 일 실시예에 따라 자성 막대-기판 복합체를 마우스에 이식한 후 원격으로 조절하여 대식세포의 부착 및 단백질의 발현이 이루어지는지 관찰한 결과이다.

도 30은 발명의 일 실시예에 따라 자성 막대-기판 복합체가 생체의 각 조직에서 독성이 있는지 여부를 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 기타 실시예들의 구체적인 사항들은 상세한 설명 및 도면들에 포함되어 있다.

[0045] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 이하의 설명에서 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에 성분, 반응 조건, 성분의 함량을 표현하는 모든 숫자, 값 및/또는 표현은, 이러한 숫자들이 본질적으로 다른 것들 중에서 이러한 값을 얻는 데 발생하는 측정의 다양한 불확실성이 반영된 근사치들이므로, 모든 경우 "약"이라는 용어에 의해

수식되는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 기재에서 수치범위가 개시되는 경우, 이러한 범위는 연속적이며, 달리 지적되지 않는 한 이러한 범위의 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지의 모든 값을 포함한다. 더 나아가, 이러한 범위가 정수를 지칭하는 경우, 달리 지적되지 않는 한 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지를 포함하는 모든 정수가 포함된다

[0046] 또한, 본 발명에서 범위가 변수에 대해 기재되는 경우, 상기 변수는 상기 범위의 기재된 종료점들을 포함하는 기재된 범위 내의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "5 내지 10"의 범위는 5, 6, 7, 8, 9, 및 10의 값들뿐만 아니라 6 내지 10, 7 내지 10, 6 내지 9, 7 내지 9 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 5.5, 6.5, 7.5, 5.5 내지 8.5 및 6.5 내지 9 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "10% 내지 30%"의 범위는 10%, 11%, 12%, 13% 등의 값들과 30% 까지를 포함하는 모든 정수들 뿐만 아니라 10% 내지 15%, 12% 내지 18%, 20% 내지 30% 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 10.5%, 15.5%, 25.5% 등과 같이 기재된 범위의 범주 내의 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0047] 본 명세서 및 도면에서 사용되는 용어는 아래와 같을 수 있다. "Rev.", "reversible" 및 "가역적"은 자성 막대-기판 복합체에서 자성 막대부가 가역적으로 움직일 수 있다는 것을 의미할 수 있다. "Irrev.", "고정된", "비가역"은 자성 막대부가 금 입자에 결합하여 고정되고 가역적으로 움직이지 못하는 것을 의미할 수 있다. "Con.", "connection", "connected", "연결" 및 "연결 상태"는 자기장을 인가하여 자성 막대부를 기판부와 가깝게 이동시켜 리간드의 밀도가 높아진 상태를 의미할 수 있다. "Discon.", "disconnection", "disconnected", "비연결" 및 "비연결 상태"는 자기장을 인가하지 않아 자성 막대부가 유동성을 가져 리간드의 밀도가 낮아진 상태를 의미할 수 있다. "리간드 나노 연결"은 자성 막대에 결합된 리간드와 금 입자에 결합된 리간드가 "Con." 상태로 연결되고 이들이 대식세포의 인테그린과 연결되는 것을 의미할 수 있다. "리간드 나노 비연결"은 "Discon." 상태에서 리간드가 대식세포의 인테그린과 연결되지 않는 것을 의미할 수 있다.

[0049] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 자성 막대-기판 복합체를 제조하고, 제조된 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 방법을 나타낸 모식도이다.

[0051] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은 티올기가 형성된 기판부; 자성을 가지고 자기장의 인가에 따라 이동하는 자성 막대부; 상기 자성 막대부에 하나 이상 연결되고 리간드를 포함하는 제1리간드부; 상기 자성 막대부 표면의 일부에 결합하여 상기 자성 막대부와 상기 제1리간드부를 연결하는 제1링커부; 상기 티올기의 일부와 결합하여 상기 기판부 및 상기 자성 막대부를 연결하는 제2링커부; 상기 티올기의 적어도 일부와 결합한 금 입자; 및 상기 금 입자에 결합하고 상기 리간드를 포함하는 제2리간드부;를 포함하고, 상기 제1리간드부 및 제2리간드부의 리간드는 대식세포가 감지할 수 있는 리간드인, 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체를 포함할 수 있다.

[0052] 상기 자성 막대-기판 복합체는 상기 리간드의 밀도를 조절하여 대식세포의 부착을 조절함으로써 대식세포의 분극을 조절할 수 있다. 상기 리간드의 밀도가 높으면 인테그린의 밀집도가 높아지고 대식세포의 부착이 촉진될 수 있다. 또한 상기 리간드의 밀도가 낮으면 인테그린이 밀집되지 않아 대식세포의 부착이 억제될 수 있다. 상기 자성 막대부의 자성 막대는 자성을 가지고 자기장의 방향에 따라 움직임이 제어될 수 있다. 따라서 상기 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하여 상기 자성 막대부를 이동을 제어하여 수행될 수 있다.

[0053] 예를 들어 상기 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하여 상기 자성 막대부의 이동을 제한하고, 상기 자성 막대부를 기판부가 있는 쪽으로 이동시켜 상기 리간드의 밀도를 높여 대식세포의 부착을 촉진하고 M2 분극화를 촉진하는 것일 수 있다. 즉 상기 자성 막대부는 상기 제1리간드부와 결합될 수 있고, 상기 자성 막대부가 기판부와 가까이 고정되면 상기 제1리간드부와 기판부에 결합한 제2리간드부가 가깝게 밀집되어 상기 리간드의 밀도가 높아질 수 있다. 이 경우를 연결 상태라고 표현할 수 있다.

[0054] 또한 예를 들어, 상기 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하지 않으면 상기 자성 막대부가 고정되지 않고 자유롭게 움직이고, 상기 리간드의 밀도를 낮추어 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극화를 촉진하는 것일 수 있다. 즉 상기 제1리간드부의 위치가 고정되지 않고 상기 제2리간드부와의 거리가 가까워지지 않아 상기 리간드의 밀도가 낮아질 수 있다. 이 경우를 비연결 상태라고 표현할 수 있다.

[0055] 상기 자성 막대부는 고 종횡비를 가지고 자성을 가지는 막대 형태일 수 있다. 상기 자성 막대부의 종횡비는 긴

변의 길이 대 최대 폭의 길이로 정해질 수 있으며, 5 내지 10 일 수 있다. 상기 자성 막대부의 종횡비는 대식세포의 크기 및 최적의 리간드 밀도를 형성할 수 있는지 여부 등을 고려한 것일 수 있다.

[0056] 상기 자성 막대부의 길이는 예를 들어 400nm 내지 1500nm일 수 있다. 또한 상기 자성 막대부의 길이는 예를 들어 700nm 내지 1000nm일 수 있다. 상기 자성 막대부의 길이가 400nm 미만이면 연결 상태일 때 대식세포의 부착이 촉진될 정도로 충분하지 않을 수 있다. 또한 상기 자성 막대부의 길이가 1500nm를 초과하면 상기 자성 막대부의 길이에 비하여 대식세포 부착의 효과가 크기 증가하지 않고 비효율적일 수 있고 연결 상태와 비연결 상태가 명확하게 구분되지 않을 수 있다.

[0057] 상기 자성 막대부의 최대 폭은 예를 들어 70 nm 내지 130 nm인 것일 수 있다. 또한 상기 자성 막대부의 최대 폭은 예를 들어 80 nm 내지 120 nm인 것일 수 있다. 상기 자성 막대부의 최대 폭이 70nm 미만이면 연결 상태일 때 상기 제1리간드부의 밀도가 작아져 대식세포의 부착이 촉진될 정도로 충분하지 않을 수 있다. 또한 상기 자성 막대부의 최대 폭이 130nm를 초과하면 높이가 너무 높아져 대식세포의 부착이 어려울 수 있다. 상기 상기 자성 막대부의 최대 폭은 상기 자성 막대부가 원통형인 경우에는 지름을 의미하는 것일 수 있다.

[0058] 상기 자성 막대부는 마그네타이트의 표면에 실리카가 코팅된 것일 수 있다. 상기 자성 막대부의 표면에는 아미노기가 결합될 수 있다. 상기 자성 막대부 표면의 아미노기는 상기 제1링커부 및 제2링커부를 결합시키기 위한 것일 수 있다.

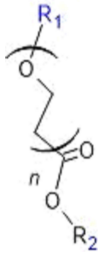
[0059] 상기 제1링커부는 상기 제1리간드부를 상기 자성 막대부에 결합시키고, 상기 제1리간드부가 이탈되지 않도록 하는 것일 수 있다.

[0060] 상기 제2링커부는 상기 자성 막대부와 상기 기판부를 연결하여 상기 자성 막대부가 상기 기판부에 묶여 이탈되지 않도록 하는 것일 수 있다. 상기 자성 막대부는 비연결 상태에서 상기 제2링커부의 길이의 범위에서 자유롭게 유동할 수 있다.

[0061] 상기 제1링커 및 제2링커 중 적어도 어느 하나는 플렉서블한 특성을 가져 연결 상태에서는 압축되고 비연결 상태에서는 신장될 수 있다.

[0062] 상기 제1링커 및 제2링커 중 적어도 어느 하나는 식 1의 화합물이 결합하여 형성되는 것일 수 있다.

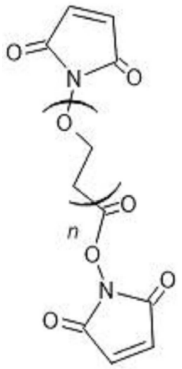
[0063] [식 1]

[0064] 

[0065] 여기에서 n은 10 내지 1000일 수 있고, 또는 n은 180 내지 300일 수 있다. R1 및 R2는 각각 하이드록실, 아민, 티올, 말레이미드, 메톡시, 아자이드, 카르복실산, 아크릴레이트, 사이아닌, n-하이드록시숙신이미드, 알데하이드, 아크릴아마이드, 에폭사이드, 하이드라자이드, 할라이드, 메타크릴레이트 및 실란 중 어느 하나이다.

[0066] 상기 식 1은 예를 들어 식 2의 화합물일 수 있다.

[0067] [식 2]



[0068]

[0069] 상기 식 1의 화합물은 상기 금 입자의 직경보다 길게 형성되어, 비연결 상태에서는 상기 자성 막대부와 상기 제2리간드부가 인접하지 않을 수 있다.

[0070] 상기 제1리간드부 및 제2리간드부 중 적어도 어느 하나에 있는 상기 리간드는 일단에 티올기를 가지는 것일 수 있다. 상기 제1리간드부에서 티올기는 상기 제1링커부의 일단에 결합하여 상기 제1링커부를 통해 상기 자성 막대부에 결합할 수 있다. 상기 제1리간드부의 티올기는 상기 제1링커부와 티올-엔 반응(thiol-en reaction)으로 결합하는 것일 수 있다.

[0071] 또한 상기 제2리간드부는 상기 리간드를 포함할 수 있고, 상기 리간드에 있는 티올기는 상기 금 입자에 결합하는 것일 수 있다. 상기 금 입자는 상기 기판부에 형성된 티올기와 결합하여 상기 제2리간드부와 기판부를 연결할 수 있다.

[0072] 상기 제1리간드부는 상기 자성 막대부의 표면에서 0.7 입자/μm^2 내지 1.5 입자/μm^2의 밀도를 가지고 상기 자성 막대부에 결합된 것일 수 있다.

[0073] 상기 제2리간드부는 상기 기판부의 표면에서 25 입자/μm^2 내지 40 입자/μm^2의 밀도를 가지고 결합되는 것일 수 있다. 상기 제2리간드부의 밀도는 상기 기판부에 결합한 금 입자의 밀도에 따라 결정될 수 있다.

[0074] 상기 리간드는 대식세포의 인테그린이 감지하여 부착되는 리간드일 수 있다. 상기 리간드는 예를 들어 CDDRGD 리간드인 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 상기 CDDRGD 리간드는 "RGD 리간드", "RGD" 또는 "리간드"로 표시될 수 있다.

[0076] 또한 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은 상기의 특징 중 적어도 어느 하나를 가지는 자성 막대-기판 복합체를 제조하는 방법에 있어서, 기판부를 세척하여 불순물을 없앤 후 표면에 티올기를 도입하는 단계; 티올기가 도입된 상기 기판부를 금 입자를 포함하는 용액에서 인큐베이팅하여 상기 티올기의 일부에 금 입자를 결합시키는 단계; 제1링커부 및 제2링커부를 포함하는 자성 막대부의 상기 제2링커부를 상기 금 입자가 결합하지 않은 상기 티올기의 적어도 일부에 결합시키는 단계; 리간드를 포함하는 용액에 인큐베이팅하여 상기 금 입자에 상기 리간드를 결합시켜 제2리간드부를 형성하고, 상기 제1링커부에 상기 리간드를 결합시켜 제1리간드부를 형성하는 단계; 및 상기 금 입자 또는 자성 막대부가 결합하지 않은 티올기를 불활성화시키는 단계;를 포함하는, 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체의 제조방법을 포함할 수 있다.

[0077] 상기 기판부 표면의 티올기는 티올기를 포함하는 용액에 세척된 기판부를 인큐베이션하여 형성될 수 있다. 상기 기판부에 도입된 티올기는 이후 상기 기판부에 상기 제2링커부 및 상기 금 입자를 결합시키기 위한 것일 수 있다.

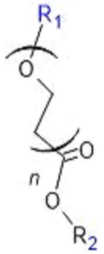
[0078] 상기 금 입자는 금 나노입자를 포함하는 용액에 표면에 티올기가 형성된 상기 기판부를 인큐베이션하여 도입될 수 있다. 상기 금 나노입자를 포함하는 용액의 농도에 따라 상기 기판부에 형성되는 금 입자의 밀도가 달라질 수 있다. 상기 금 입자는 티올-금 반응으로 상기 티올기와 직접 결합하여 상기 기판부에 묶일(tethered) 수 있다. 상기 금 입자가 상기 기판부에 묶인 다는 것은 상기 금 입자가 상기 기판부의 표면에서 결합된 위치가 달라지거나 이탈하지 않는 것을 의미할 수 있다.

[0079] 상기 자성 막대부는 상기 제1링커부 및 제2링커부를 포함하는 상태에서 상기 기판부의 표면에 결합하여 묶일(tethered) 수 있다. 상기 제2링커부는 상기 기판부에서 상기 금입자와 반응하지 않은 티올기와 결합하여 상기 자성 막대부를 결합시킬 수 있다. 상기 자성 막대부는 상기 제2링커부가 상기 티올기와 티올-엔 반응으로 결합함으로써 상기 기판부에 묶일(tethered) 수 있다. 상기 자성 막대부는 자성을 가지고 있어 상기 제2링커부의 길이 범위 내에서 자기장이 인가되는 방향으로 움직일 수 있다.

[0080] 상기 제1리간드부 또는 제2리간드부는 특정 서열을 가진 리간드가 상기 제1링커부 또는 상기 금 입자와 결합하여 형성될 수 있다. 상기 리간드는 일단에 티올기가 형성되어 있어 티올-엔 반응 또는 티올-금 반응을 통해 결합할 수 있다. 상기 리간드는 예를 들어 CDDRGD 리간드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0081] 상기 자성 막대부는, 막대 형태의 옥시수산화철(ferric oxyhydroxide)을 세척한 후 실리카를 포함하는 용액에서 교반하여 옥시수산화철의 표면에 실리카를 코팅하는 단계; 실리카가 코팅된 옥시수산화철을 환원하여 실리카가 코팅된 마그네타이트를 형성하는 단계; 상기 자성 막대의 표면에 아미노기를 도입하는 단계; 및 하기 식 1의 화합물을 상기 아미노기에 결합시켜 제1링커부 또는 제2링커부를 형성하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

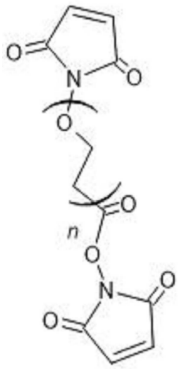
[0082] [식 1]

[0083] 

[0084] 여기에서 n은 10 내지 1000일 수 있고, 또는 n은 180 내지 300일 수 있다. R1 및 R2는 각각 하이드록실, 아민, 티올, 말레이미드, 메톡시, 아자이드, 카르복실산, 아크릴레이트, 사이아닌, n-하이드록시숙신이미드, 알데하이드, 아크릴아마이드, 에폭사이드, 하이드라자이드, 할라이드, 메타크릴레이트 및 실란 중 어느 하나이다.

[0085] 상기 식 1은 예를 들어 식 2의 화합물일 수 있다.

[0086] [식 2]

[0087] 

[0088] 상기 제2리간드부는 상기 금 입자와 상기 리간드가 결합되어 형성되는 것일 수 있다. 상기 리간드는 상기 금 입자 또는 상기 제1링커부에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서 상기 기판부에 상기 금 입자가 많이 결합하여 있을수록 상기 제2리간드부의 밀도가 커질 수 있다. 상기 금 입자를 상기 기판부에 결합시키는 단계에서 상기 금 입자를 포함하는 용액의 농도가 클수록 상기 금 입자가 많이 결합될 수 있다. 결국 상기 금 입자를 포함하는 용액의 농도를 조절하여 상기 제1리간드부의 밀도를 조절할 수 있다.

[0089] 상기 식 1의 화합물은 상기 금 입자의 직경보다 길게 형성될 수 있다. 따라서 상기 제2링커부에 의하여 상기 기판부와 결합한 상기 자성 막대부는 자기장이 인가되지 않을 때에는 상기 금 입자와 일정 거리를 두고 이격될 수 있다. 이 이격된 거리에 의하여 상기 제1리간드부 및 제2리간드부는 서로 인접하지 않을 수 있다.

[0090] 상기 자성 막대부는 상기 옥시수산화철을 환원시켜 형성된 상기 마그네타이트를 포함할 수 있다. 상기 마그네타이트는 환원되는 과정에서 결정 구조가 달라질 수 있고, 이는 상기 자성 막대부의 자성을 비롯한 특성을 형성하

는 것일 수 있다. 예를 들어 상기 실리카가 코팅된 옥시수산화철은 (200)면에서 밝은 부분의 평균 면간 간격이 5.2Å이고, 상기 실리카가 코팅된 마그네타이트는 (220)면에서 밝은 부분의 평균 면간 간격이 3.1Å인 것일 수 있다. 또한 예를 들어 상기 실리카가 코팅된 마그네타이트는 역 스피넬 구조에서 (110)면에 대하여 단위 세포 격자 상수가 8.4Å인 것일 수 있다.

[0092] 또한 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은, 상기와 같은 특징 중 적어도 어느 하나를 가지는 대식세포의 부착 및 분극화 조절을 위한 자성 막대-기판 복합체에 자기장을 인가하여 대식세포의 부착을 제어하여 M1 또는 M2 분극화를 조절하는, 대식세포의 부착 및 분극화 조절 방법을 포함할 수 있다.

[0093] 예를 들어 상기 기판부의 일면에 자기장을 인가하여 상기 자성 막대부를 기판이 있는 방향으로 끌어당겨 상기 자성 막대부의 이동을 제한하고, 상기 제1리간드부 및 제2리간드부의 거리를 가깝게 형성하여 상기 리간드의 밀도를 높여 대식세포의 부착을 촉진하고 M2 분극화를 촉진하는 것일 수 있다. 상기 대식세포의 인테그린은 상기 리간드와 연결될 수 있다. 이 경우 상기 자기장이 인가되어 상기 리간드의 밀도가 높아지면, 상기 리간드와 결합하는 인테그린의 국소적 밀도가 높아질 수 있고, 이는 대식세포의 M2 분극화로 이어질 수 있다.

[0094] 또한 예를 들어 상기 자기장을 인가하지 않아 상기 자성 막대부가 자유롭게 움직이고, 상기 리간드의 밀도를 낮추어 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극화를 촉진하는 것일 수 있다. 이 경우 상기 리간드의 밀도가 낮기 때문에 상기 리간드와 결합하는 인테그린의 국소적 밀도도 낮아지고, 이는 대식세포의 M1 분극화로 이어질 수 있다.

[0095] 상기 자기장은 100mT 내지 1T로 인가되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0097] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 일 실시예일뿐 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예들에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0099] **[제조예]**

[0100] 1. 금 입자가 결합된 기판부의 제조

[0101] 수소 테트라클로로아우레이트(III) ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, 1mM)를 초순수(80mL)에 용해시키고, 이 용액을 100℃에서 약 30분 동안 격렬하게 흔들어 전구체 용액을 형성하였다. 그 후 이 전구체 용액을 시트르산삼나트륨($Na_3C_6H_5O_7$, 38.8 mM)을 포함하는 초순수(6.4mL)와 혼합하고 약 15분동안 격렬하게 교반하였다. 이 용액이 버건디 레드 색상(burgundy red color)을 띄면 25℃까지 냉각시켜 약 20nm 크기의 금 입자를 수득하였다.

[0102] 세포 배양 등급(cell-culture-grade)의 유리 기판을 50% 염산(HCl) 및 50% 메탄올(MeOH)을 혼합한 용액으로 약 40분 동안 세척한 후 초순수(DI water)를 이용해 헹구었다. 기판의 표면을 황산(H_2SO_4)에 50분 동안 침지시켜 하이드록실기(hydroxyl group)를 활성화시킨 후, 메탄올과 초순수를 차례대로 이용해 세척하였다. 활성화된 기판의 표면은 머캅토프로필실라트란(mercaptopropylsilatrane, 0.5mM)을 포함하는 메탄올에서 인큐베이션하여 티올화하고, 그 후 초순수와 메탄올을 차례대로 이용해 세척하였다.

[0103] 티올화된 기판은 다양한 농도(0.43, 0.85 및 1.7nM)의 금 입자를 포함하는 현탁액에서 밤새 어두운 조건에서 인큐베이션하여 기판의 표면에 다양한 밀도로 금 입자를 도입하였다. 이후 금 입자가 도입된 기판을 초순수와 $Na_3C_6H_5O_7$ 용액을 차례대로 이용하여 세척하였다.

[0104] 2. 자성 막대-기판 복합체 제조

[0105] 높은 종횡비를 가지는 옥시수산화철@실리카 나노 막대(ferric oxyhydroxide@silica nanobar)를 준비하였다. 실리카 쉘은 옥시수산화철(아카가네이트, akaganate)가 마그네타이트로 상 변환되는 동안 쉘 내에 자성 나노구조를 가두는데 이용되었다. 초순수(40ML)에 염화철(III) 6 수화물($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 15 g)을 첨가하고 85℃에서 밤새 용해시켰다. 수득한 옥시수산화철 나노 막대를 에탄올(EtOH)로 세척하고 초순수(20mL)에 분산시켰다. 그 후 2% 폴리(비닐피롤리돈)(PVP, poly(vinylpyrrolidone), 분자량 10kDa)을 포함하는 초순수(20mL)를 이용해 밤새 안정화시켰다. 안정화된 옥시수산화철 나노 막대를 초순수(24mL)에 분산시켰다. 안정화된 옥시수산화철 분산액

(2mL)은 에탄올(50mL), 암모니아(2.5mL) 및 초순수(7.5mL)가 혼합된 혼합 용액에 분산시킨 후 약 15분 동안 격렬하게 저어주었다. 그 후 테트라에틸 오소실리케이트(TEOS, tetraethyl orthosilicate, 20 μL)와 혼합하고 약 2시간 동안 격렬하게 저어주었다. 에탄올로 세척하여 옥시수산화철@실리카 나노 막대를 수득하고, 이를 초순수(6mL)에 분산시켰다.

[0106] 위에서 제조된 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 옥시수산화철을 환원 반응을 통해 마그네타이트로 상 전이시켰다. 옥시수산화철@실리카 나노 막대(6mL)를 트라이에틸렌 글리콜(TEG, triethylene glycol, 40mL)에 분산시키고 N_2 조건 하에서 약 2시간 동안 340℃에서 열처리를 수행하였다. 상 전이 결과로 형성된 마그네타이트@실리카 나노 막대를 에탄올로 세척한 후 에탄올(12mL)에 분산시켰다.

[0107] 수득된 마그네타이트@실리카 나노 막대는 원격 조절이 가능하도록 기판에 플렉서블하게 묶어놓을 수 있고, 이를 위해 마그네타이트@실리카 나노막대를 아미노기로 기능화하였다. 마그네타이트@실리카 나노 막대(10mL)를 3-아미노프로필 트라이에톡시실란(APTES, 3-aminopropyl triethoxysilane, 1mL)이 첨가된 에탄올(60mL)에 분산시키고, 분산액을 밤새 격렬하게 저어주었다. 이 후 마그네타이트@아미노-실리카 나노 막대를 에탄올로 세척한 후 초순수(10mL)에 분산시켰다.

[0108] 3. 리간드가 결합된 나노 막대-기판 복합체 형성

[0109] 길고 유연한 링커 분자인 말레이미드-폴리(에틸렌 글리콜)-숙신이미딜 카르복시메틸에스터(maleimide-poly(ethylene glycol)-succinimidyl carboxymethyl ester, 분자량: 10 kDa, Biopharma PEG Scientific Inc.)를 N,N-다이아이소프로필-에틸아민(DIPEA, 8 μL)를 포함하는 초순수(1mL)에 용해시키고, 이를 마그네타이트@아미노-실리카 나노막대를 포함하는 초순수(1mL)에 첨가한 후 이어서 어두운 조건에서 밤새 격렬하게 저어주었다. 그러고나서 티올-엔 반응(thiol-ene reaction)을 유도하기 위하여 금 입자가 묶여있는 티올화된 기판을 유연한 링커가 코팅된 마그네타이트@아미노-실리카 나노 막대를 포함하는 초순수(4mL)에서 밤새 인큐베이션하였다. 마그네타이트@아미노-실리카 나노 막대는 길고 유연한 링커 분자를 통해 금 입자가 묶여 있는(tethered) 기판에 유연하게 묶이고, 링커 분자의 길이는 금 입자의 지름보다 더 길게 형성되어 기판에 묶여있는 금 입자와 마그네타이트@아미노-실리카 나노 막대 사이에 가역적인 비연결("Discon.") 상태를 형성하였다.

[0110] RGD 펩타이드 리간드는 마그네타이트@아미노-실리카 나노 막대 및 금 입자 모두에 대하여 각각 티올-엔 반응 및 티올-금 반응(thiol-gold reaction)를 통해 유연하게 결합하였다. 금 입자와 마트네타이트@아미노-실리카 나노 막대가 묶여있는 기판을 RGD 트리펩타이드 리간드(CDDRGD, GL Biochem, 0.2 nM) 및 트리스(2-카르복실에틸)포스핀 하이드로클로라이드(tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, 10mL)를 포함하는 초순수(4mL)를 0.2% DIPEA와 함께 어두운 조건에서 밤새 인큐베이션하고, 이 후 초순수로 세척하였다.

[0112] **[실시예]**

[0113] 기판 위에 결합한 금 입자의 밀도를 다양하게 하여 상기 제조예의 방법에 따라 자성 막대-기판 복합체를 제조하였다.

표 1

[0114]

	금 입자의 밀도	표시
실시예 1-1	4.1±2.4 입자/μm^2	Low
실시예 1-2	33.4±7.5 입자/μm^2	Medium
실시예 1-3	99.4±12.0 입자/μm^2	high

[0115] **[비교예]**

[0116] 1. 비교예 1

[0117] 기판에 묶인 금 입자에 직접 나노 막대를 결합하여 비가역적인 나노 막대-기판 복합체를 제조하였다. 금 입자가 묶인 기판을 길고 유연한 링커 분자가 없는 마그네타이트@아미노-실리카 나노 막대(4mL)와 함께 밤새 인큐베이션한 후 세척하여 아미노-금 반응(amino-gold reaction)을 유도하였다. 생성물은 고정된 나노 막대-금 입자-기

판으로 연결되어(비가역적 연결, "Irrev. Con.") 원격으로 조절할 수 없게 형성되었다.

[0118] 2. 비교예 2

[0119] 자성 막대 및 금 입자에 결합하는 리간드를 RGD 리간드가 아닌 RAD 리간드(RGD 리간드의 스크럼블된 구조)를 결합시켜 자성 막대-기판 복합체를 제조하였다.

표 2

[0120]

	결합된 리간드 종류	표시
비교예 2-1	자성 막대 : RAD금 입자 : RGD	RAD-MNB RGD-GNS
비교예 2-2	자성 막대 : RGD금 입자 : RAD	RGD-MNB RAD-GNS
비교예 2-3	자성 막대 : RAD금 입자 : RAD	RAD-MNB RAD-GNS

[0121] 3. 비교예 3리간드 나노 연결을 확인하기 위하여 금 입자의 표면에는 리간드 대신 Cy3 형광 염료를 코팅하고, 자성 막대의 표면에는 리간드 대신 Cy5 형광 염료를 코팅하여 자성 막대-기판 복합체를 제조하였다.

[0123] **[실험방법]**

[0124] 1. 마그네타이트@실리카 및 그 전구체의 X선 회절(XRD)

[0125] D/MAX-2500V/PC(Rigaku, Cu Kα radiation)를 이용하여 20° 에서 70° 까지의 회절각(2Θ) 범위에서 XRD 분석을 수행하였다. 옥시수산화철(akageneite) 및 마그네타이트의 각 결정상의 참조 데이터를 이용하여 옥시수산화철(akaganeite) 나노 막대, 옥시수산화철@실리카 나노 막대 및 마그네타이트@실리카 나노 막대의 결정 상을 확인하였다.

[0126] 2. HAADF-STEM(High-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy) 및 에너지 분산 스펙트럼 및 마그네타이트@실리카 나노 막대 및 그 전구체의 매핑

[0127] HAADF-STEM 이미징은 200kV 가속 전압, 1024 X 1024 픽셀 영역, 3 μs 픽셀 드웰 시간, 38-200 mrad 수집 반각, 11.8 mrad 수렴 반각 조건, 0.2nm 전자 프로브 크기, 185pA 프로브 전류 범위 및 185 μA 방출 전류에서 Talos G2(Thermo Fisher)를 사용하여 수행되었다. 에너지 분산형 X-선 스펙트럼 및 매핑은 SuperEDS, EDAX(Bruker)를 사용하여 마그네타이트 코어의 Fe 원소(Fe_3O_4), 실리카 쉘의 Si 원소(SiO_2) 및 마그네타이트@실리카 나노 막대의 마그네타이트(Fe_3O_4) 코어와 실리카(SiO_2) 쉘 모두에 있는 O 원소의 분포를 가시화하였다. 에너지 분산형 X-선 맵핑은 옥시수산화철(FeOOH akaganeite)의 코어에 있는 Fe 원소, 실리카 껍질(SiO_2)에 있는 Si 원소, 및 옥시수산화철@실리카 나노 막대 내의 옥시수산화철(FeOOH akaganeite) 코어와 실리카(SiO_2) 껍질 모두에 있는 산소에 대하여 수행되었다. 에너지 분산형 X-선 분광법 측정 조건은 가속 전압 200kV 및 2.13nA에서 약 15분 동안 픽셀당 5ms의 체류 시간(dwell time)으로 하였다. 마그네타이트@실리카 나노 막대의 길기, 직경 및 길이/직경은 Image J 소프트웨어를 이용하여 HAADF-STEM 이미지(n=5)를 분석하여 계산하였다. 또한 TEM 이미징은 Talos G2 and a TM80-300 (Thermo Fisher, USA)를 이용하여, 마그네타이트@실리카 나노 막대 및 그 전구체인 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 대표 이미지를 보여주기 위하여 수행하였다.

[0128] 3. 마그네타이트@실리카 나노막대와 그 전구체에 대한 원자 결정 구조 분석

[0129] 고해상도 투과 전자 현미경(HR-TEM), 고속 푸리에 변환(FFT), 선택적 영역 전자 회절(SAED) 및 고해상도 주사 투과 전자 현미경(HR-STEM)을 사용하여 마그네타이트@실리카 나노 막대 및 그 전구체인 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 원자 결정 구조를 분석했다.

[0130] HR-TEM은 옥시수산화철@실리카 나노 막대(5.2Å)의 옥시수산화철(FeOOH akageneite), 마그네타이트@실리카 나노 막대(3.1Å)의 마그네타이트 및 금 나노입자(2.4Å)의 격자 줄무늬 사이의 평균 면간 간격을 계산하기 위하여 300kV의 가속 전압으로 Titan, TM80-300을 이용해 수행되었다.

[0131] FFT 분석은 옥시수산화철@실리카 나노막대((200)면)의 옥시수산화철(FeOOH akageneite) 및 마그네타이트@실리카

나노 막대((220)면)의 마그네타이트의 결정원자 면을 시험하기 위하여 영역 축을 따라 정렬된 저배율의 HR-TEM 이미지를 이용하여 수행하였다.

[0132] SAED 분석은 6cm 길이의 카메라를 이용하여 수행하였고 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 옥시수산화철((200), (103), (112) 및 (301) 평면) 및 마그네타이트@실리카 나노 막대의 마그네타이트((220), (311), (400), (511) 및 (440) 평면)를 무작위 방향으로 배치하여 결정 원자 평면을 여러 동심 회절 링에 대하여 분석하였다.

[0133] HR-STEM 이미지는 역스피넬 구조의 (110) 면에 대하여 8.4Å의 평균 단위 세포 격자 상수를 가지는 마그네타이트@실리카 나노 막대의 마그네타이트 및 금 나노입자의 결정질 원자 구성을 분석하기 위하여 수행되었다. HR-STEM 이미지 조건은 가속 전압 300kV, Cs-보정 TM 80-300 프로브를 이용하여 1,000만 배율, 픽셀 영역 2048 X 2048, 픽셀 체류 시간 8μs, 수집 반각 47.5-200mrad, 수렴 반각 12mrad, 전자 프로브 크기 0.08Å, 프로브 전류 범위 62.5pA 및 방출 전류 197μA 였다.

[0134] 4. 푸리에 변환 적외선(FTIR) 분광 측정

[0135] FTIR 측정은 KBr과 혼합된 건조된 샘플들을 가지고 Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific)을 가지고 수행하였다. 나노 막대의 표면 개질에 따라 각각의 그룹에 일어나는 특정 공유 결합을 각 흡수 피크에 지정하였다.

[0136] 5. 동적 광산란(DLS) 및 제타 전위 측정

[0137] DLS는 금 입자의 직경을 특성화하기 위하여 Zetasizer Nano ZS90 Malvern Panalytical를 이용하여 수행하였다. 제타 전위 측정은 금 입자가 묶여있는 기판이 나노 막대가 유연하게 묶여 표면 개질됨에 따라 표면 전하가 변하는 것을 특성화하기 위하여 수행되었다.

[0138] 6. 전계 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM) 이미징

[0139] FE-SEM는 다양한 금 입자의 밀도에 따라 금 입자가 묶여있는 기판에 나노 막대가 균일한 분포로 결합하는지 확인하기 위하여 Quanta 250 FEG scanning electron microscope (FEI)를 가지고 수행되었다. 건조된 백금 코팅된 샘플들을 가지고 이미징하였다. Image J 소프트웨어는 기판에 묶인 리간드가 결합한 금 입자 및 리간드가 결합한 나노 막대의 밀도를 정량화하기 위하여 여러 이미지에 대하여 사용되었다.

[0140] 7.AFM(Atomic Force Microscopy) 이미징 인 시투

[0141] Asylum Research, XE-100 시스템은 Nanosensors(SSS-SEIHR-20)의 캔틸레버(5-37 N/m)를 사용하여 AC(에어 모드)에서 가역적인 리간드 연결의 원격 조절을 이미지화하고 정량화하기 위해 사용되었다. 영구 자석(자기장 강도: 260mT)을 사용하여 자기장을 켜고 끄는 조건을 형성하여 금 입자가 묶여있고 나노 막대가 유연하게 묶여 있는 기판의 영역을 스캔하였다. 일정한 높이에 있고 자기장에 의해 높이가 변하지 않는 금 입자에 대해 나노 막대는 자기적으로 높이가 변화하고, 이런 변화와 높이를 이미지화하고 정량화하였다. 자기장을 인가시킬 때, 나노 막대는 길고 유연한 링커 분자가 압축되어 기판 바닥에 있는 금 입자에 가깝게 위치가 낮아지고, 금 입자와 나노 연결(연결, "Con.")을 형성한다. 반대로 자기장을 인가하지 않으면, 길고 유연한 링커 분자가 압축되지 않고 나노 막대는 금 입자와 거리를 유지하여 비연결을 형성(비연결, "Discon.")을 형성한다. 나노 막대와 금 입자에 각각 결합한 리간드 사이의 나노 연결 부위에 대한 선형 높이 프로파일은 높이 프로파일 사이의 변화 및 자기장이 인가되지 않을 때의 최대 높이와 인가되었을 때의 높이 변화를 결정하기 위하여 측정되었다.

[0142] 8. 리간드 나노 연결의 원격 제어를 통한 대식세포 부착의 시험관 내(in vitro) 조절

[0143] RAW 264.7 세포주 (ATCC의 계대 5)의 대식세포를 자성 막대-기판 복합체와 함께 배양하였다. 세포 배양 전에 기판에서 나노 막대 또는 금 입자와 결합하지 않은 티올기를 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-말레이미드(methoxy-poly(ethylene glycol)-maleimide, 1.5 mg, 분자량: 0.75 kDa) 및 DIPEA(0.2%)를 포함하는 초순수(4mL)에서 어두운 조건에서 약 2시간 동안 인큐베이션하여 불활성화시켰다. 이후 초순수로 헹군 후, 불활성화된 기판을 약 1.5시간 동안 자외선 처리하여 멸균하였다. 배양 0시간에, 대식세포를 자성 막대-기판 복합체 위에 대식세포를 약 90,000 cells/cm_2의 밀도로 시딩(seeding)하였고, high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium, heat-inactivated fetal bovine serum(10%) 및 페니실린/스트렙토마이신 항생제(50U/mL)를 포함하는 기본 배지 조건에서 37℃ 및 5% CO_2 배양 조건으로 수행되었다.

[0144] 다양한 밀도의 금 입자를 갖는 자성 막대-기판 복합체에 대한 대식세포 부착 실험은 영구 자석(자기장 강도: 260mT)를 기판의 아래에 위치시키거나 자기장을 가하지 않도록 하여 가역적으로 리간드의 나노 연결("Con.") 또는 비연결("Discon.")을 유도하였고, 각각의 상태를 48시간 동안 지속하거나 24시간 후에 전환되는 방식으로 수

행하였다. 고정된 나노 막대-금 입자-기판에 대한 대식세포 부착은 비가역적인 리간드 나노 연결("Irrev. Con.") 상태로 시험하였다. 몇몇 음성 대조군은 RGD 리간드 특이적 나노 연결이 대식세포의 부착을 촉진하는지 시험하기 위하여 수행되었다.

[0145] 9. 리간드 나노 연결의 원격 제어를 통한 대식세포 표현형의 시험관 내(in vitro) 조절

[0146] 대식세포의 전염증성(pro-inflammatory) 또는 항염증성(pro-healing) 표현형 획득은 전염증성 또는 항염증성 배지 조건 중 어느 하나에서 가역적 리간드 나노 연결("Con."), 비연결("Discon.") 또는 비가역적 리간드 나노 연결("Irreve. Con.") 상태로 36시간 동안 배양하여 시험하였다. 전염증성 배기 조건은 기본 배지, 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, 10ng/mL) 및 재조합 인터페론-감마(recombinant interferon-gamma, 10 ng/mL)를 포함하고, 항염증성 배지 조건은 기본 배지, 인터루킨-4(interleukin-4, 20 ng/mL) 및 인터루킨-13(interleukin-13, 20 ng/mL)를 포함한다. 대식세포의 부착이 매개된 전염증성 또는 항염증성 표현형 획득은 액틴 중합에 대한 사이토칼라신 D 억제제(cytochalasin D inhibitor, 2 μg/mL), ROCK(rho-associated protein kinase)에 대한 Y27632 억제제(50 μM) 및 미오신 경사슬 키네이스(myosin light-chain kinase, MLCK)에 대한 ML-9 억제제(0.1 μM)가 있거나 없는 조건의 전염증성 배지 또는 항염증성 배지에서 "Con," 및 "Discon."상태에서 36시간 동안 조사되었다.

[0147] 10. 대식세포 조절의 면역 염색 기반의 정량화 특성

[0148] 대식세포 조절을 특성화하기 위하여 면역 형광 염색된 공초점 이미징을 수행하였다. 대식세포를 배양한 후, 고정, 투과화, 차단하고 팔로이딘(phalloidin)과 DAPI와 함께 1차 및 2차 항체들로 처리한 후 동일한 조건의 레이저 노출에서 LSM700 공초점 현미경(Carl Zeiss)를 이용하여 글래스 슬라이드 위에서 이미징하였고, 모든 그룹들에서 유사한 이미지를 얻었다. 면역 염색된 공초점 이미지들에서 DAPI는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 부착 세포 밀도를 계산하기 위하여 카운트되었다. 면역 염색된 공초점 이미지에서 팔로이딘은 퍼진 세포의 면적과 신장 인자를 계산하기 위해 사용되었다. 면역 염색되 공초점 이미지에서 형광 강도는 각각의 관련있는 단백질에 대하여 계산되었다. 웨스턴 블로팅(Western blotting)은 전염증성 iNOS 단백질 수준(135kDa) 및 항염증성 Arg-1 단백질 수준(37kDa)를 통해 대식세포 표현형을 특성화하기 위하여 수행되었고, 이 단백질들은 Linear Image Quant LAS 4000 미니 화학 발광 이미징 시스템을 통해 얻은 이미지를 이용하여 GAPDH의 하우스키핑 단백질 수준(36kDa)에 대하여 정규화한 후에 제시된 것이다.

[0149] 11. 나노 연결 리간드 부위에 결합된 인테그린 수용체에 대한 면역 나노 라벨링(Immuno nano-labeling, INL)

[0150] INL 후 FE-SEM 이미징은 나노 수준에서 리간드 나노 연결된 부위에 대식세포의 인테그린 수용체-리간드 결합을 표시하는데 이용되었다. 대식세포를 배양한 후 1,4-피페라진 비스(2-에타노설폰산)(1,4 piperazine bis (2-ethanosulfonic acid, PIPES, 0.1 M) 버퍼로 약 3분간 세척하고 4% 파라포름알데하이드(4% paraformaldehyde)로 약 15분 동안 고정하였다. 이것들을 초순수, 트리톤 X-100(triton X-100, 0.5%), HEPES, NaCl, MgCl2 및 수크로오스를 포함하는 차단 버퍼로 약 50분간 투과화하였다. 이 후 1차 항체(인테그린 β1, 마우스)를 포함하는 차단 버퍼에서 37℃에서 약 1.5시간 동안 처리하고, 이어서 소 혈청 알부민(BSA, 1%)로 세척하였다. 그 후 염소 혈청(goat serum, 5%)으로 약 15분 동안 차단시키고, 2차 항체가 코팅된 INL 나노 입자를 포함하는 PIPES 버퍼에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0151] 12. 숙주 대식세포 부착 및 표현형의 생체 내(in vivo) 조절을 위한 리간드 나노 연결의 원격 조절

[0152] 자성 막대-기판 복합체를 조절하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 개념을 증명하기 위하여, 자성 막대-기판 복합체를 마우스의 피하 주머니(subcutaneous pocket)에 이식하였다. 총 48balb/c의 마우스(생후 2-3개월)를 고려대학교 동물실험위원회의 정식 승인을 받아 수술하였다. 알팍산(Alfaxan, 15 μL) 및 롬푼(rompun, 5 μL)을 혼합하고 각각의 마우스에 복강내 주사하였다. 생체 내 Fϕrster resonance energy transfer (FRET) 이미징은 나노 연결 및 비연결의 원격 조절이 살아있는 마우스에서 일어날 수 있는지 시험하기 위하여 수행되었다. 분석을 위해, 나노 막대를 Cy3(donor) 형광 염색과 유연한 링커 중 어느 하나로 코팅하고, 반면 금 입자는 Cy5(acceptor) 형광 염색으로 코팅하였다. 구체적으로, 나노 막대는 티올화한 후 Cy3-말레이미드와 Cy3 라벨링된 폴리(에틸렌 글리콜)-말레이미드(Cy3-PEG-Mal., 분자량: 10 kDa, Nanocs Inc.)으로 차례대로 코팅되었고, 이들은 모두 티올-엔 반응을 통해 형성되었다. 금 입자는 아민-금 반응을 통해 Cy5-아민을 이용하여 Cy5로 코팅되었다. 이런 길고 유연한 링커/Cy3-코팅된 나노 막대 및 Cy5-코팅된 금 입자들은 마트리겔(Matrigel, 0.5 μg/mL)에서 준비되었고, FRET 이미징을 위하여 마우스의 피하 주머니에 50 μL가 주입되었다. 이식된 자성 막대-기판 복합체는 각각 영구 자석(자기장 강도: 260mT)을 마우스의 복부에 놓거나 놓지 않은 상태에 의하여 가역

적으로 연결("Con.") 또는 비연결("Discon.") 상태를 형성시켰다. 생체 내 FRET 이미징은 생체 내 이미징 시스템(PerkinElmer, USA)에서 Cy3의 여기를 위하여 550nm 파장을 이용하거나, IVIS lumina를 통해 Cy5의 여기된 신호를 수집하기 위하여 700nm 방출 필터를 이용하여 수행되었다. 획득된 이미지 및 관련 신호 변화들은 Aura Imaging Software ver. 4.0.0를 이용하여 정량적으로 분석하였다.

[0153] 숙주 대식세포 부착 및 표현형의 조절을 조사하기 위하여, 마취된 마우스의 등을 약 1.8cm 정도 절개하여 자성 막대-기판 복합체를 이식하고 봉합하였다. 숙주 포기 반응 동안 우세한 전염증 신호를 보상하기 위하여, 치료 촉진/항염증 인터루킨-4 및 인터루킨-13(각각 40ng)를 이식한 복합체 위에 주입하였다. 자성 막대-기판 복합체는 마우스의 복부에 영구 자석(자기장 세기: 260mT)을 놓거나 놓지 않음으로써 각각 가역적인 리간드 나노 연결("Con.") 또는 비연결("Discon.") 상태를 형성할 뿐 아니라, 비가역적인 리간드 나노 연결("Irrev. Con.") 상태를 형성하였다.

[0154] 24시간 후, 모집된 숙주 대식세포의 생체 내 조절을 특성화하기 위한 면역 형관-염색된 공초점 이미징를 위해 자성 막대-기판 복합체를 회수하였다. 유동세포계측 측정(Flow cytometry measurement)은 숙주 대식세포의 표현형(전염증성 iNOS 단백질 수준 및 항염증성 CD 163 단백질 수준)을 특성화하기 위하여 수행되었고, 이는 형광 활성화 단일 세포 분류(fluorescence-activated single cell sorting, FACS) Calibur를 통하여 분석하였다. 유세포분석 결과는 BD CellQuest Pro sofrware(BD Biosciences)를 이용하여 정량화하고 평균 형광 강도로 표시하였다. 자성 막대-기판 복합체의 생체 내 무독성은 국소 무독성(피하 조직) 및 전신 무독성(간, 심장, 비장 및 신장 기관)에 대하여 피하 이식 후 7일 째에 세포 조직을 파라핀 포매(paraffin embedding) 및 헤마톡실린과 에오신(hematoxylin and eosin, H&E) 염색 기반의 조직학적 분석함으로써 확인하였다.

[0155] 13. 통계 처리

[0156] 여기에서 수행된 모든 실험들은 일관된 데이터 세트를 제시하기 위하여 적어도 2회를 독립적으로 수행하였다. GraphPad Prism software(ver. 8.0.2)는 데이터세트의 정량화된 특성화에 사용되었다. 모든 통계적 처리는 Tukey-Kramer 사후 테스트(Tukey-Kramer post hoc test)와 함께 일원 분산 분석(ANOVA)를 통해 다중 그룹 비교를 위해 수행되었다. p 값에 표시된 별표는 통계적으로 유의미한 차이를 나타낸다(*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

[0158] **[실험결과]**

[0159] 1. 각 구성별 특성 분석

[0160] 금 입자가 묶인 기판을 형성한 후 금 입자의 밀도를 다양하게 하여(low, medium 및 high) 리간드가 결합한 자성 막대와 리간드가 결합한 금 입자의 상대적인 비율을 조정하였다. 고해상도 주사 투과 전자 현미경(HR-TEM) 및 고해상도 투과 전자 현미경(HR-TEM) 이미징을 통한 금 입자의 원자 결정 구조 분석은 금 입자의 인접한 격자 줄무늬 사이의 평균 면간 간격이 약 2.4 Å인 것을 나타낸다(도 2). 도 2에서 동적 광산란(DLS) 분석은 금 입자의 직경이 19.5 ± 2.0 nm(약 20 nm)으로 균일하게 형성된 것을 보여준다. 도 2에서 기판에 묶인 금 입자의 평균 면간 간격을 측정한 이미지와 이를 그래프로 나타낸 것이고, HR-STEM의 스케일 바는 10nm, DLS의 스케일 바는 1nm이다.

[0161] FE-SEM 이미징은 자성 막대-기판 복합체에서 금 입자가 다양한 밀도(low, medium 및 high)로 기판에 균일하게 형성되어 있는 것을 보여준다(도 3). 도 3에서 금 입자의 밀도는 각각 low (4.1 ± 2.4 입자 / μm^2), medium (33.4 ± 7.5 입자 / μm^2) 및 high (99.4 ± 12.0 입자/ μm^2)이다. 도 3a는 다양항 밀도의 자성 막대-기판 복합체의 모식도 및 FE-SEM 이미지이고, 스케일 바는 200nm이다. 도 3b에서 금 입자의 밀도에 따라 금 입자에 결합한 리간드의 밀도 역시 다르게 나타나고, 반면 자성 막대에 결합한 리간드는 균일하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 도 3b에서 데이터는 평균 ± 표준 오차(n=20)를 나타내고, p에 표시된 별표는 통계적으로 유의미한 차이를 나타내고 N.S.는 비교 그룹 간에 통계적으로 유의미한 차이가 없는 것을 나타낸다. 도 3에서의 모든 실험은 3번 실험되었다.

[0162] 고각 환형 암시야 STEM(HAADF-STEM), 에너지 분산 스펙트럼(EDS) 및 매핑은 옥시수산화철(FeOOH, akaganeit)의 철(Fe) 원소, 실리카의 실리콘(Si) 원소 및 옥시수산화철@실리카 나노 막대에서의 산소(O) 원소의 균일한 분포를 나타낸다(도 4). 도 4a에서 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 철, 산소 및 실리콘 원소에 대한 HAADF-STEM 및 EDS 이미지를 나타내고, 스케일 바는 200nm이다. 도 4b는 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 HR-TEM, 고속 푸

리에 변환(스케일 바: $2nm^{-1}$) 및 선택 영역 회절(스케일 바: $1nm^{-1}$)를 나타낸다. 또한 도 4b는 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 (200) 면에서의 평균 격자 간격 (약 5.2 Å)과 동심원 고리의 각각의 회절 면에 대하여 인덱스된 것이다.

[0163] 도 5c는 또한 마그네타이트(Fe_3O_4)에서의 Fe 및 실리카에서의 Si가 마그네타이트@실리카 나노 막대에서의 O원소와 함께 균일하게 분포되어 있는 것을 보여준다. 도 5c는 마그네타이트@실리카 나노 막대의 철, 산소 및 실리콘 원소에 대한 HAADF-STEM 및 EDS 매핑 및 스펙트럼을 나타내고, 여기에서 스케일 바는 20nm이다.

[0164] 마그네타이트@실리카 나노 막대의 길이와 직경은 각각 831 ± 124 nm 및 101 ± 18 nm으로 계산되었고, 따라서 길이/직경의 비율이 8.23인 것을 나타낸다.

[0165] 또한 도 4에서는 옥시수산화철@실리카 나노 막대의 원자 규모의 특성화는 HR-TEM을 통해 아카가네이트 상에서 (200) 면의 평균 면간 간격이 약 5.2Å인 것을 보여주고, FFT를 통해 (200) 면을 나타내는 밝은 점을 보여주고, SAD를 통해 아카가네이트 상의 각 회절 면을 가리키는 동심원 고리를 보여준다.

[0166] 도 5d는 마그네타이트@실리카 나노 막대의 원자 구조 특성화에서 HR-TEM을 통한 마그네타이트의 역 스피넬 구조 및 FFT를 통해 (220) 면을 가리키는 밝은 점에서 (200) 면의 평균 면간 간격이 약 3.1Å인 것을 보여준다. 도 5d에서 스케일 바는 $5nm^{-1}$이다.

[0167] 도 5e에서는 SAD에서 마그네타이트 상의 각 회절면을 가리키는 동심원 고리가 마그네타이트@실리카 나노 막대에서도 나타나는 것을 보여주고, HR-TEM을 통해 역스피넬 구조에서 (110)면의 단위 세포 격자 상수의 평균 값이 약 8.4Å인 것을 나타낸다. 도 5e에서 SAD 이미지의 스케일 바는 $2nm^{-1}$이다.

[0168] 마그네타이트@실리카 나노 막대는 아미노 그룹으로 활성화된 후 길고 유연한 링커 분자(말레이미드-폴리(에틸렌글리콜)-숙신이미딜 카르복시메틸 에스터, 분자량: 10kDa)을 통해 기판에 티올-엔 반응으로 묶였다(도 1). 티올화된 RGD 트리펩타이드 리간드는 각각 티올-엔 반응을 통해 자성 막대에 코팅된 링커에 결합하고, 티올-금 반응을 통해 금 입자에 결합하였다. 도 5f, 도 3a 및 도 3b는 기판에 금 입자가 다양한 밀도로 묶여 있고, 자성 입자가 균일한 밀도(0.98 - 1.02 입자/μm^2)로 기판에 묶여 금 입자를 덮고 있는 것을 보여준다. 도 5f에서 스케일 바는 100nm이다.

[0169] 도 6는 마그네타이트@아미노-실리카가 특정 Fe-O 및 Si-O-Si 결합을 포함하는 것을 보여주고(왼쪽), 마그네타이트@아미노-실리카가 기판에 유연하게 묶인 후에는 C-O 및 O=C-NH 결합이 있는 것을 보여주고(가운데), 기판에 묶인 마그네타이트@아미노-실리카에 리간드가 결합한 후에는 C-S 결합이 특이적으로 나타나는 것(오른쪽)을 보여준다. 여기서의 실험은 모두 두 번 수행되었다.

[0170] 도 7는 자성 막대의 표면을 개질해감에 따라 제타 전위가 변화하는 것을 나타내는 것이다. 마그네타이트@아미노-실리카(도면에서 MNB)보다 기판에 묶인 후에 제타 전위가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 데이터는 평균±표준 오차(n=3)로 나타냈고, 모든 실험은 두 번 수행되었다.

[0171] 2. 자성 막대-기판 복합체의 원격 조절 실험

[0172] 자성 막대-기판 복합체가 성공적으로 형성된 것을 확인한 후, 리간드의 가역적 나노 연결을 원격으로 조절하는 실험을 수행하였다.

[0173] 시험관 내에서(in situ) AFM 이미징은 자기장을 켜고 끄는 스위치를 조작하여 특정 금 입자의 밀도에서 기판 위의 동일한 영역에 대하여 가역적인 리간드 나노 연결을 이미지화하고 정량화하기 위하여 수행되었다. 리간드가 결합한 자성 막대는 자기장의 스위치가 꺼졌을 때 리간드가 결합한 금 입자로부터 비연결되는 것으로 간주되었다("Discon."). 시험관 내에서(in situ) AFM 이미지는 자기장 스위치를 켤 때의 선형 높이 프로파일을 확인한 것이고, 유연하게 묶여서 자기장에 따라 반응하는 자성 막대는 길고 유연한 링커가 압축되어 금 입자에 나노 연결을 형성함으로써 자기장에 따라 반응하지 않는 금 입자에 더 가깝게 위치되었다("Con."). 이와 같은 실험은 도 5g-h에 나타냈다. 도 5g에서는 자성 막대의 높이를 색상의 채도에 따라 나타냈고, 스케일 바는 100nm이다. 도 5h에서는 도 5g에서 자성 막대의 높이를 그래프로 나타낸 것이다.

[0174] 동시에 자성 입자의 최대 높이는 141.5nm에서 121.3nm로 상대적으로 낮아졌고, 이는 자기장의 스위치를 껐을 때 링커 분자의 압축이 펴지면서 원래의 값으로 회복되었다. 따라서 자성 막대 및 금 입자 사이의 가역적인 나노 연결이 되는 것을 입증한다(도 5i). 도 5i에서는 자기장 스위치의 온("Con.") 및 오프("Discon.")에 따른 최대

높이를 보여준다. 도 5h 및 i에서 데이터는 평균 ± 표준 오차(n=3)로 나타냈다.

[0175] "Con." 상태에서 자성 막대의 최대 높이(121.3nm)와 자성 막대의 직경(101nm) 사이의 차이가 20.3nm이기 때문에, 자성 막대와 금 입자는 거의 연결 상태("Con.")인 것으로 간주된다. 반면에 "Discon." 상태에서 자성 막대의 최대 높이(141.5nm)와 자성 막대의 직경(101.0nm)의 차이는 40.5nm이기 때문에, 자성 막대와 금 입자는 비연결("Discon.")된 것으로 간주된다. 20.5nm의 차이는 인테그린 수용체의 분자 크기(약 10nm)보다 매우 크기 때문에, 우리는 자성 막대와 금 입자 사이에 약 20.5nm에 의한 리간드 비연결이 인테그린 수용체 결합 및 비연결된 리간드 부위의 클러스터링을 상당히 억제할 것이라는 가설을 세웠다. 반대로, 나노 연결 리간드 부위는 인테그린 수용체의 크기 내에서 간격을 가지기 때문에, 우리는 리간드 나노 연결이 인테그린 수용체 결합 및 연결된 리간드 부위의 클러스터링을 상당히 자극할 것이라는 가설을 세웠다.

[0176] 우리는 우선 리간드-나노 연결이 조절된 대식세포 부착의 최적의 원격 조작 가능성을 결정하기 위하여 자성 막대의 밀도는 고정하고 금 입자의 밀도를 다양하게 하여 시험하였다. 이를 위해 금 입자가 다양한 밀도(low, medium 및 high)로 형성된 자성 막대-기판 복합체(도 1)에 대식세포를 놓고 0시간에서 관찰하였다. 자성 막대-기판 복합체는 자기장의 스위치를 온(영구 자석을 기판의 바닥에 위치시킴) 또는 오프(영구 자석을 제거함)시켜 각각 리간드 나노 연결("Con.") 또는 비연결("Discon.") 상태를 형성하였다. 24시간 동안 배양한 후 medium 금 입자 밀도에서 부착된 면역 염색된 대식세포의 대표적인 공초점 이미지는 "Discon."그룹 보다 "Con." 그룹에서 매우 높은 인테그린 β1 발현과 매우 큰 부착 수, 퍼짐 및 신장을 갖는 F-액틴 및 빈쿨린 조직을 나타냈다(도 8a, b). 도 8a는 기본 성장 배지에서 24시간 동안 배양한 후 부착된 대식세포에서 F-액틴 및 핵(DAPI)이 있는 인테그린 β1 또는 빈쿨린 및 빈쿨린/F-액틴/핵 오버레이의 이미지를 나타낸다. 여기에서 스케일 바는 20㎛이다. 도 8b는 부착된 대식세포의 부착된 세포 밀도, 퍼진 세포 면적 및 세포 신장 인자의 정량화된 특성을 나타내고, 데이터는 평균 ± 표준 오차(n=10)를 나타낸다. 가장 대표적으로 medium 밀도에서 리가드의 연결/비연결에 따라 단백질들의 발현 및 세포의 모양에 큰 변화가 있는 것을 확인할 수 있다. 반대로 금 입자 밀도가 low인 경우에는, 대식세포의 부착 정도에 있어서 "Con."과 "Discon." 그룹 사이에 통계적으로 상당한 차이 없이 부착 정도가 낮게 나타났다. 또한 금 입자 밀도가 high인 경우에는, 대식세포의 부착 정도에 있어서 "Con."과 "Discon." 그룹 사이에 통계적으로 상당한 차이는 없이 부착 정도가 크게 나타났다(도 8). 이러한 발견들은 금 입자의 밀도가 medium인 경우에 원격으로 활성화된 리간드 나노 연결 상태가 더 효과적으로 대식 세포를 자극하는 것을 나타내고, 이 때 금 입자의 밀도는 33.4 입자/μm^2이고 평균 자성 막대의 밀도는 0.98 입자/μm^2이었다(도 3a, b). 이번 연구에서 이용된 총 리간드 밀도는 이전에 리간드가 결합된 금 입자를 이용하는 연구에 비하여 매우 낮았다. 우리는 리간드 부위가 대식세포 부착이 억제된 인테그린 수용체의 분자 크기보다 훨씬 더 큰 거리(20.5nm)이기 때문에 비연결되었다고 여겨진다. 대조적으로, 우리는 종래 연구보다 더 낮은 리간드 밀도를 이용하였음에도, 인테그린 수용체의 크기 범위 내에 있는 원격적으로 활성된 나노 연결 리간드 부위가 인테그린 수용체 결합 및 연결된 리간드 부위의 클러스터링을 상당히 자극한다고 생각한다. 놀랍게도, 기판의 표면과 자성 막대의 아래에 위치하여 나노 연결이 가능한 영역이 매우 작은 부분임에도 불구하고, 리간드 부위에서 이러한 나노 연결은 대식세포 부착을 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

[0177] 3. 인테그린 나노 연결된 리간드 결합의 원격 활성화는 대식세포 부착을 동적으로 자극함

[0178] 우리는 나노 연결된 리간드 부위에 결합된 인테그린 수용체에 대해 면역 나노 라벨링(INL, immuno nano-labeling)을 통해 분자 규모에서 나노 연결된 리간드 부위에 인테그린 수용체가 직접 결합하는 것을 확인하였다.

[0179] 도 9에서 INL의 FE-SEM 이미징은 40nm 직경을 가진 INL 나노입자(파란색으로 표시)이 대식세포의 인테그린 수용체(빨간색으로 표시)에 부착하는 것을 보여주고, INL 나노입자는 기판에 묶인 금 입자(20nm, 초록색으로 표시)보다 매우 커서 쉽게 구별된다. 도 9는 INL 입자의 이미지, 인접한 격자 줄무의 사이의 평균 면간 간격(2.4Å) 및 직경 분포 그래프를 나타낸다. 도 9는 인테그린 β1-리간드의 나노 연결 부위에서 대식세포와 리간드의 결합을 나타내고, 스케일 바는 200nm이다. 도 9의 HR-STEM의 스케일 바는 10nm이고, HR-TEM의 스케일 바는 1nm이다.

[0180] "Con." 그룹에서 유연한 링커 분자의 압축을 통한 리간드 나노 연결의 원격 조절은 부착된 대식세포에서 모집된 인테그린 β1 및 매우 발현된 인테그린 β1을 라벨링하는 더 많은 INL 나노입자의 수를 가지고 리간드 나노 연결 부위에 대하여 인테그린 수용체의 모집을 촉진했다(도 10a, b). 대조적으로, "Discon." 그룹에서 유연한 링커 분자의 압축 해제를 통한 리간드 비연결은 인테그린 β1-INL 나노입자가 낮은 수로 모집된 인테그린 및 부착된 대식세포에서 적게 발현된 인테그린 β1을 보여준다(도 10a-c). 대조군으로, 자성 막대가 고정된 그룹("Irrev. Con." 그룹)은 유연한 링커 분자 없이 아민-금 반응을 통해 기판의 표면에서 자성 막대가 금 입자에

직접 묶이도록(즉 비가역적으로) 제작되었다. 리간드 나노 연결 부위에 결합하는 인테그린 수용체의 정도 및 부착하는 대식세포의 인테그린 β1 발현은 "Con." 및 "Irrev. Con." 그룹에서 비슷하게 나타났고, 이는 인테그린 수용체 모집의 리간드 나노 연결 특이적인 자극을 증명하는 것이다(도 10a-c). 동시에 대표적인 면역 염색된 공초점 이미지는 "Con." 및 "Irrev. Con." 그룹이 "Discon." 그룹에서보다 부착된 대식세포에서 더 매우 더 높은 부착 수, 퍼짐 및 신장을 가지는 F-액틴과 빈쿨린 복합체를 보여준다(도 10a-c). 도 10a는 유연한 링커 분자를 압축하여 리간드 나노 연결 부위로 인테그린 수용체를 모집하는 것을 원격으로 조절하는 모습을 나타내는 모식도 및 INL 입자와 대식세포의 모습을 나타내는 FE-SEM 이미지이고, 스케일 바는 200nm이다. 도 10b는 "Con.", "Discon." 및 “Irrev. Con.” 상태로 기본 성장 배지에서 24시간 동안 배양한 대식세포의 부착을 알아보기 위하여 F-액틴, 핵(DAPI) 및 빈쿨린/F-액틴/핵 오버레이를 나타내는 면역 염색 공초점 이미지이고, 스케일 바는 20㎛이다. 도 10c는 자성 막대당 인테그린-리간드 결합 수, 부착 세포 밀도, 퍼진 세포 면적 및 신장 인자를 나타내는 그래프이고, 데이터는 평균 ± 표준 오차(n=10)를 나타낸다.

[0181] 우리는 RGD 리간드 특이적인 나노 연결이 자극하는 대식세포 부착을 증명하기 위하여 몇 가지 음성 대조군 실험을 수행하였다. 또한 "Irrev. Con." 그룹에서 고정된 자성 막대의 원격 자극은 대식세포 부착에 영향을 미치지 않았고, 이는 제조 과정에서 자성 막대와 금 입자의 리간드 부위가 이미 나노 연결되어 있기 때문이다(도 11a, b). 도 11a에서 스케일 바는 20㎛이고, 도 11b에서 데이터는 평균 ± 표준 오차(n=10)를 나타낸다.

[0182] 자성 입자 또는 금 입자가 RGF 리간드가 아닌 RAD(RGD 리간드의 스크램블된 서열)로 코팅된 경우는 원격으로 조정한 경우에도 대식세포의 강력한 부착이 이루어지지 않았다(도 12a, b 및 도 13a, b). 대식세포 부착은 자성 막대 및 금 입자가 RGD로 코팅되지 않거나 RAD로 코팅되었을 때에는 쉽게 일어나지 않았다(도 14a, b). 또한 RGD로 코팅된 자성 막대 또는 RGD로 코팅된 금 입자 중 어느 하나가 존재할 때에는, 대식세포의 부착은 효과적으로 원격 조정되지 않았다(도 15a, b 및 도 16a, b). RAD 코팅된 금 입자와 RGD 코팅된 자성 막대가 함께 있는 경우 또는 RAD 코팅된 자성 막대와 RGD 코팅된 금 입자가 함께 있는 경우에는 대식세포 부착의 원격 조정이 효과적으로 일어나지 않았다(도 17a, b). 종합하면, RGD 리간드가 결합한 자성 막대가 RGD 리간드가 결합한 금 입자가 묶여있는 기판을 덮고 있는 구조, 즉 본 발명의 자성 막대-기판 복합체의 구조가 리간드 나노 연결을 원격으로 조정하여 대식세포 부착을 촉진하는 시너지 효과를 낼 수 있는 것을 의미한다. 도 12 내지 도 17에서 a에서 스케일 바는 20㎛이고, b에서 데이터는 평균 ± 표준 오차(n=10)를 나타낸다.

[0183] 우리는 AFM 이미징을 통하여 시험관에서(in situ) 가역적인 리간드 나노 연결의 원격 조절 가능성은 이미 입증했기 때문에, 시간적으로 조절한 리간드 나노 연결 및 비연결 상태의 전환을 시험하였다. 우리는 0시간에서 48시간 동안 리간드 나노 연결 상태("C-C") 또는 비연결 상태("DC-DC")를 지속적으로 적용하였다. 다른 실험에서는, 우리는 0-24시간 동안 리간드 나노 연결 상태를 적용한 다음, 24-48시간 동안 리간드 비연결 상태로 전환("C-DC")하거나 그 반대로("DC-C") 수행하였다. 대표적인 면역 염색된 공초점 이미지는 48시간 후 대식세포 부착의 정도가 "DC-DC" 그룹과 비교하여 "C-C" 그룹에서 상당히 증가하는 것으로 나타났다(도 18a, b). 놀랍게도, "DC-C" 그룹에서 24시간 후에 잘 부착되지 않은 대식세포는 48시간 후에는 쉽게 부착되는 것이 발견되었고, "DC-DC" 그룹에서는 48시간 후에도 잘 부착되지 않고 남아있었다. 이는 일시적으로 활성화된 리간드 나노 연결이 대식세포 부착을 효과적으로 자극하는 것을 가리킨다(도 18a, b). 반대로,"C-DC" 그룹에서 24시간 후에 쉽게 부착된 대식세포는 48시간 후에는 잘 부착되지 않도록 억제되었고, "C-C" 그룹에서는 48시간 후에 쉽게 부착되는 상태로 남아있었다. 이는 일시적으로 비연결된 리간드 부위가 대식세포 부착을 효과적으로 방해하는 것을 의미한다(도 18a, b). 도 18a는 기본 성장 배지에서 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후 부착된 대식세포에서 빈쿨린(빨간색) 또는 F-액틴(초록색)과 핵(DAPI, 파란색)을 가진 인테그린 β1(빨간색)의 대표적인 면역 염색된 공초점 이미지이다. 각 그룹들은 순서대로 0-48시간 연결("C-C"), 0-48시간 비연결("DC-DC"), 0 - 24시간 연결 후 24 - 48시간 비연결("C-DC") 또는 0 - 24시간 비연결 후 24 - 48시간 비연결 ("DC-C")을 나타낸다. 여기에서 "C"는 연결 상태, "DC"는 비연결 상태를 나타낸다. 도 18a에서 스케일 바는 20㎛이다. 도 18b는 부착된 대식세포에서 부착 세포 밀도, 세포 면적, 세포 시장 인자 및 인테그린 β1 형광 강도를 정량화하여 특성화한 것이다. 데이터는 평균±표준 오차(n=10)를 나타내고, p 값에 달린 별표(*p < 0.05; **p < 0.01; ***: p < 0.001)는 통계적으로 유의한 차이를 나타내고, N.S.는 비교 그룹 간에 통계적으로 유의하지 않은 차이를 나타낸다.

[0184] 4. 대식세포 부착이 매개된 전치유성 표현형 획득을 촉진하는 원격 조작된 리간드 나노 연결

[0185] 대식세포 부착에서 인테그린 수용체-리간드 결합은 ROCK2 및 MLCK가 관련된 부착 구조 조립을 자극하고, 이는 전치유/항염증성 표현형 획득을 유도한다. 대식세포에서 전염증성 또는 전치유성 표현형 획득은 전염증성 또는 전치유성 배지 조건 중 어느 하나를 이용하여 가역적인 리간드 나노 연결("Con."), 비연결("Discon.") 또는 비

가역적인 리간드 나노 연결("Irrev. Con.")의 조건 하에서 36시간 동안 시험하여 수행되었다. 대표적인 면역 염색된 공초점 및 웨스터 블로팅 이미지들은 전염증성 배지 조건에서 "Discon." 그룹과 비교하여 "Con." 그룹 및 "Irrev. Con." 그룹에서 배양된 대식세포의 iNOS 발현이 상당히 억제된 것을 보여준다(도 19a, b). 또한 전치유성 Arg-1 발현은 전치유성 배지 조건에서 "Discon." 그룹과 비교하여 "Con." 그룹 및 "Irrev. Con." 그룹에서 배양된 대식세포에서 상당히 촉진되었다(도 19a, b). 이러한 발견은 "Con." 및 "Irrev. Con." 그룹들이 그것들의 전치유성/항염증성 표현형 획득을 유도하는 대식세포에서 강력한 부착 구조 조립을 형성하는 것을 나타낸다. 게다가 고정된 리간드 나노 연결을 가진 "Irrev. Con." 그룹에 대한 원격 조정은 대식세포 표현형에 영향을 미치지 않았다(도 20a, b). 나노 연결 또는 비연결 리간드 부위에 의한 대식세포 표현형 획득 조절은 이런 결과를 산출하기 위해 해당되는 배지 조건을 필요로 하는 것으로 밝혀졌다(도 21a, b). 도 19는 전염증성 배지 조건(a) 또는 전치유성 배지 조건(b)에서 36시간 동안 배양한 후 부착 대식세포의 iNOS 및 Arg-1의 면역 염색된 공초점 이미지와 웨스턴 블로팅 이미지이다. 도 19의 면역 염색된 공초점 이미지에서 iNOS(빨간색), Arg-1(초록색) 및 iNOS/Arg-1/핵(DAPI, 파란색) 오버레이 이미지를 나타내고, 스케일 바는 20㎛이다. 웨스턴 블로팅 이미지는 대조군인 GAPDH에 대하여 정규화한 후 정량화되었다. 데이터는 평균±표준 오차(n=3)를 나타내고, p값에 표시된 별표(***: $p < 0.001$)는 통계적으로 유의미한 차이를 나타낸다. 도 20는 전염증성 배지 조건(a) 및 전치유성 배지 조건(b)에서 "Irrev. Con." 에 자기장을 인가하거나 인가하지 않는 조건에서 변화가 있는지 관찰한 것이고, 자성 막대가 고정되었기 때문에 눈에 띄는 변화가 없는 것을 확인할 수 있다. 여기에서 스케일 바는 20㎛이다. 도 21은 적절한 배지 조건이 아닌 경우에 리간드 나노 연결 여부와 무관하게 대식세포의 각 표현형에 대한 단백질이 발현되지 않는 것을 나타내고, 여기에서 데이터는 평균 ± 표준 오차(n=3)를 나타내고, N.S. 비교 그룹 간에 통계적으로 유의하지 않은 차이를 나타낸다.

[0186] 우리는 다음으로 부착 구조 형성에 관련된 분자가 원격으로 조절된 리간드 나노 연결 하에서 대식세포 부착이 매개된 전치유성/항염증성 표현형 획득에 관여하는지 고려하였다. 대표적인 면역 염색된 공초점 이미지는 "Irrev. Con." 그룹에서보다 "Con." 및 "Discon." 그룹에서 매우 더 높은 형광 강도를 가지는 RhoA의 현저한 발현을 나타냈다(도 22a, b). 도 22에서 RhoA의 발현은 리간드 나노 연결이 원격으로 조작될 때 자극되는 것을 나타내고, "Con." 또는 "Irrev. Con." 상태에서 현저하게 많이 발현되는 것을 볼 수 있다. 도 22에서 스케일 바는 20㎛이고, 데이터는 평균±표준 오차(n=10)를 나타내고, p값에 표시된 별표(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)는 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다.

[0187] RhoA 발현의 상향 조절은 ROCK를 활성화하기 때문에, 대표적인 면역 염색된 공초점 이미지는 또한 "Irrev. Con." 그룹에서보다 "Con." 및 "Discon." 그룹에서 현저한 ROCK2 발현 및 매우 더 높은 형광 강도가 나타나는 것을 확인했다(도 23a, b). 도 23은 리간드 나노 연결에 따른 ROCK2의 발현을 관찰한 것이다. 전염증성 또는 전치유성 배지 조건에서 24시간 동안 배양한 후 "Discon.", "Con." 및 "Irrev. Con." 상태에 대하여 관찰한 것이고, 리간드 나노 연결이 형성된 경우 및 전치유성 배지에서 발현이 현저하게 많이 일어나는 것을 볼 수 있다. 도 23에서 스케일 바는 20㎛이고, 데이터는 평균±표준 오차(n=10)를 나타내고, p값에 표시된 별표(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)는 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다.

[0188] 또한 웨스턴 블로팅 이미지는 사이토칼라신 D의 사용에 의한 액틴 중합 억제, Y27632의 사용에 의하 ROCK의 억제 및 ML-9의 사용에 의한 MLCK의 억제가 "Con." 그룹에서 항염증성 배지 조건에서 배양된 대식세포에서 iNOS 발현의 억제 및 전치유성 배지 조건에서 배양된 대식세포의 Arg-1 발현의 촉진을 상당히 무효화하는 것을 보여준다(모든 차이는 통계적으로 유의미함)(도 24a, b). 이런 결과들은 액틴 중합, ROCK 및 MLCK의 모든 것들이 대식세포에서 부착 구조 조립이 매개된 전치유성/항염증성 표현형 획득에 관여하는 것을 가리키고, 이는 리간드 나노 연결에 의하여 원격으로 활성화되었다. 이런 약리학적 치료들은 부착 구조 조립이 자극되지 않은 "Discon." 그룹 또는 적절한 배지 자극이 없는 경우 중 어느 하나에서 배양된 대식세포에서의 iNOS 및 Arg-1 발현에는 영향이 없었다(도 24a, b 및 도 25a, b). 도 24는 리간드 나노 연결을 원격으로 조절하여 부착 구조 형성이 보조된 대식세포의 표현형의 획득을 보여준다. iNOS 및 Arg-1의 웨스턴 블로팅 이미지는 각 단백질의 억제제가 있는 전염증성 배지 조건(a)과 전치유성 배지 조건(b)에서 각각 36시간 동안 배양한 후의 결과이다. 자성 막대-기판 복합체는 각각 "Con." 또는 "Discon." 상태를 형성하였다. 단백질 발현 수준은 대조군인 GAPDH에 대하여 정규화한 후 정량되었다. 데이터는 평균±표준 오차(n=3)를 나타내고, p값에 표시된 별표(***: $p < 0.001$)는 통계적으로 유의미한 차이를 나타내고, N.S. 비교 그룹 간에 통계적으로 유의하지 않은 차이를 나타낸다. 도 25는 적절한 배지 조건이 없는 경우에 리간드 나노 연결이 잘 일어나지 않는다는 것을 보여주는 데이터이고, 데이터는 평균±표준 오차(n=10)를 나타내고, N.S. 비교 그룹 간에 통계적으로 유의하지 않은 차이를 나타낸다.

[0189] 5. 시험관에서(in situ) Fϕrster 공명 에너지 전달(FRET) 이미징을 통한 리간드 나노 연결의 생체 내(in vivo)

원격 제어

[0190] AFM 이미징을 통하여 자성 막대-기판 복합체를 원격으로 조절하여 가역적인 리간드 나노 연결 가능성을 확인한 후, 우리는 살아있는 동물에서도 이러한 리간드 나노 연결 또는 비연결이 이루어지는지 확인하였다. 이를 위해, 금 입자를 Cy5(acceptor) 형광 염료로 코팅하고, 자성 막대는 Cy3(donor) 형광 염료로 코팅하여 표시하였다(도 26).

[0191] 우리는 염료 코팅된 자성 막대-기판 복합체를 마우스의 피하 주머니에 이식하고, 마우스의 복부에 영구자석을 위치시켜 리간드 나노 연결을 형성하거나("Con."), 영구자석을 분리하여 리간드 나노 비연결을 형성("Discon.")하거나, 고정된 자성 막대-기판 복합체를 이식("Irrev. Con.")하였다(도 27a). 영구자석을 마우스의 복부에 위치시키면, 유연한 링커가 압축되어 Cy3-라벨링된 자성 막대가 압축되었다. 결과적으로 Cy3-라벨링된 자성 막대는 Cy5-라벨링된 금 입자에 가깝게 끌려가 Cy3(donor)-라벨링된 자성 막대와 Cy5(acceptor)-라벨링된 금 입자 사이에 리간드 나노 연결("Con")을 형성하게 되고, 이는 FRET 신호를 증폭시킨다(도 27b, c). 이와 대조적으로, 영구자석이 제거되면, 유연한 링커가 압축되지 않고 Cy3-라벨링된 자성 막대도 압축되지 않는다. 따라서 Cy3-라벨링된 자성 막대와 Cy5-라벨링된 금 입자 사이에 리간드 나노 비연결("Discon.")이 형성되고, FRET 신호는 현저히 감소한다. 이러한 실험에 의하여 생체 내에서 원격으로 리간드 나노 연결 및 비연결을 조절할 수 있는 것을 확인하였다.

[0192] 6. 숙주 대식세포에서 리간드 나노 연결 활성이 매개된 부착에 의하여 전치유성 표현형 획득을 위한 원격 조절 가능성

[0193] ECM 단백질은 이방성(섬유질) 및 등방성(비섬유질) 구조를 포함하는 피브로넥틴-콜라겐 및 라미닌-콜라겐 복합체를 형성하기 위하여 동적 연결을 형성할 수 있으며, 이는 숙주 대식세포에서 모집, 부착 구조 조립 및 전염증성 또는 전치유성 표현형을 지속적으로 조절한다. 따라서 이러한 개념을 증명하기 위한 실험으로, 우리는 천연 섬유질 및 비섬유질 ECM 구조를 모방하는 자성 막대-기판 복합체에서 이러한 동적 리간드 분자 규모의 연결이 생체 내에서 숙주 대식세포를 조절할 수 있는지 조사하였다. 우리는 자성 막대-기판 복합체를 생체 내에 이식하고 24시간 후 면역 형광 염색된 공초점 이미지 및 유세포 분석을 통하여 모집된 숙주 대식세포의 생체 내 조절을 특성화하였다.

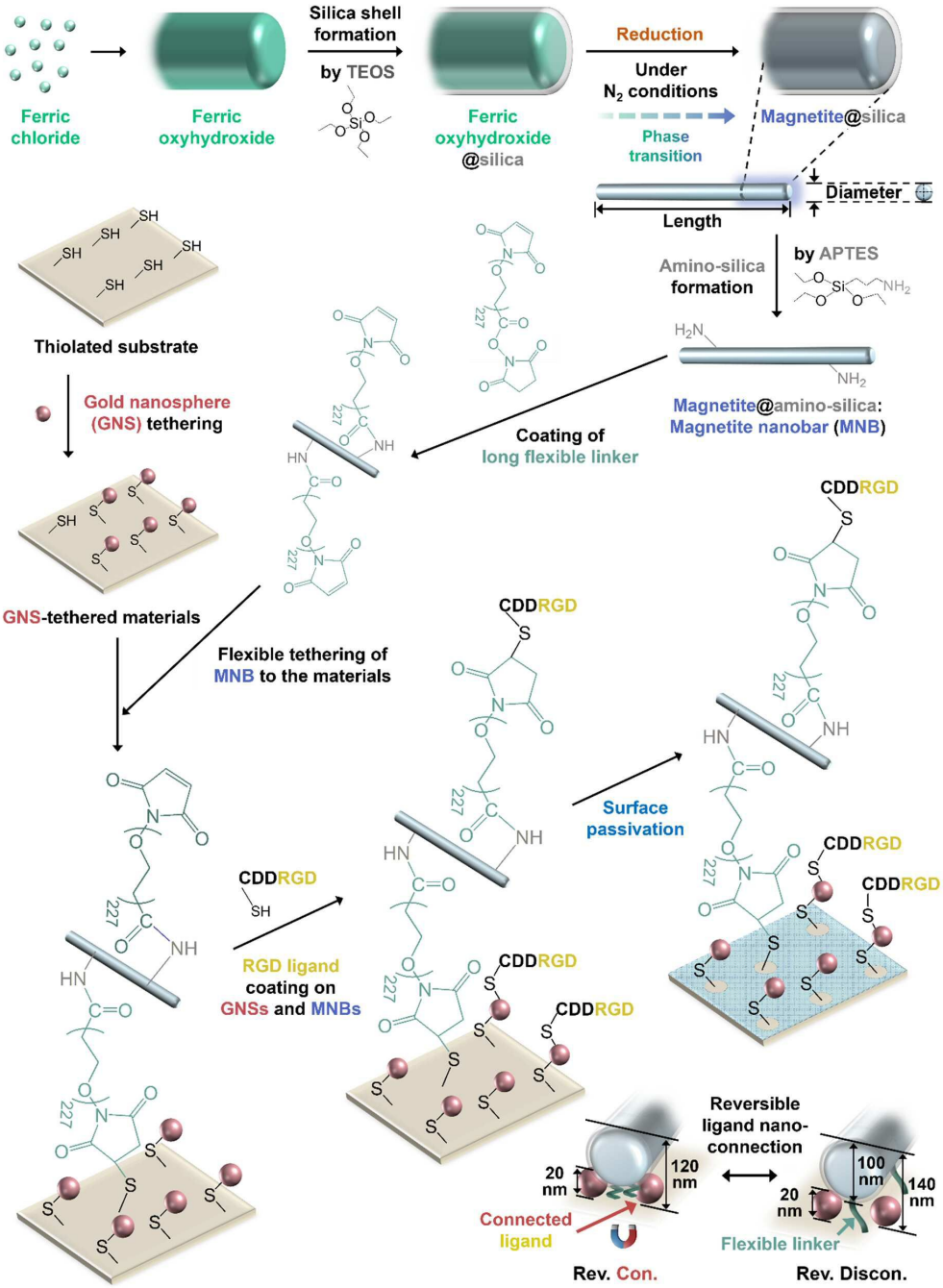
[0194] 이식하고 24시간 후에, 대표적인 면역 염색된 공초점 이미지는 "Discon." 상태 보다 "Con." 및 "Irrev. Con." 상태에서 부착 대식세포의 부착 수, 퍼짐 및 신장이 크게 나타나고 F-액틴 조립이 현저하게 많이 형성되는 것을 보여준다(도 27d-e 및 도 28). 도 28에서 데이터는 평균±표준 오차(n=6)를 나타내고, p값에 표시된 별표(***: $p < 0.001$)는 통계적으로 유의미한 차이를 나타낸다. 동시에 대표적인 면역 염색된 공초점 이미지 및 유세포 분석 히스토그램은 "Discon." 상태 보다 "Con." 및 "Irrev. Con." 상태에서 전염증성 iNOS 발현이 현저히 비활성화되고, 전치유성 Arg-1 및 CD163 발현이 현저히 활성화되는 것을 보여준다(도 27d-g). 초기 숙주 반응에서, NIMP-R14(호중구 마커)를 발현하는 숙주 호중구 또한 모집되고 이식된 자성 막대-기판 복합체에 부착되었다(도 29a, b). 도 29에서 스케일 바는 20㎛이고, 데이터는 평균±표준 오차(n=10)를 나타내고, p값에 표시된 별표(***: $p < 0.001$)는 통계적으로 유의미한 차이를 나타낸다.

[0195] 이러한 발견은 생체 내에서 모집된 숙주 대식세포의 리간드 나노 연결 활성화 부착이 매개된 전치유성/항염증성 표현형 획득이 원격 조절이 가능하다는 것을 증명한다. 반대로 비연결 리간드 부위는 숙주 대식세포의 부착의 비활성화하고, 전염증성 반응을 유발했다. 이러한 발견은 마그네이트 기반의 재료들에 따른 고강도 자기장이 환자에 비독성으로 적용되기 때문에, 면역 조절 재료로서 유망하다는 것을 의미하고, 이는 임상 실험으로 확인되었다. 실제로, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 기반의 조직학적 분석은 마우스에 자성 막대-기판 복합체를 피하 이식 전 및 이식 후 일주일 후를 관찰하여 수행되었다. 도 30은 해당 조직의 이미지이고, 마우스의 피하 조직(국소 비독성을 가리킴) 및 간, 심장, 비장 및 신장 기관(전신 무독성을 가리킴)의 세포 조직에서 이식 전과 후(일주일 후)에 차이가 없는 것을 확인할 수 있다. 도 30에서 스케일 바는 20㎛이다.

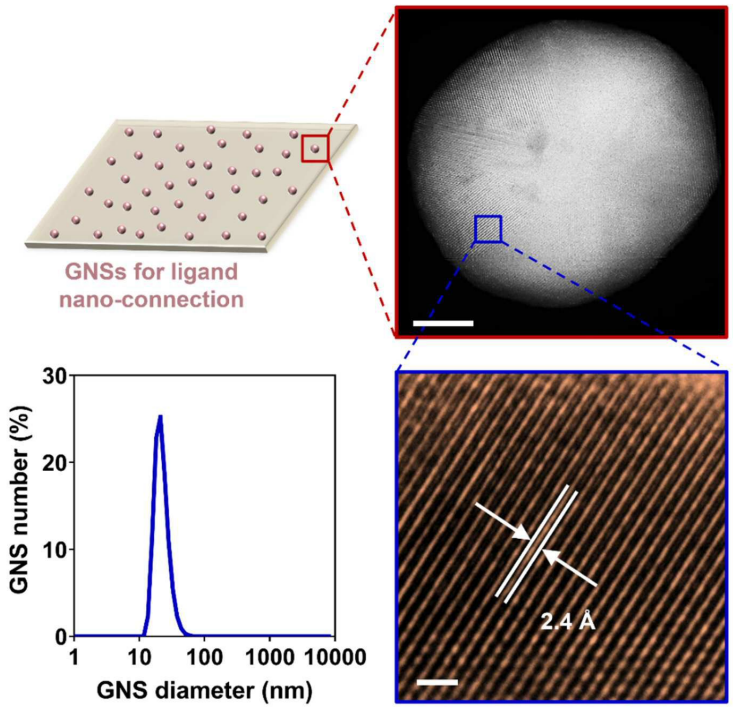
[0197] 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

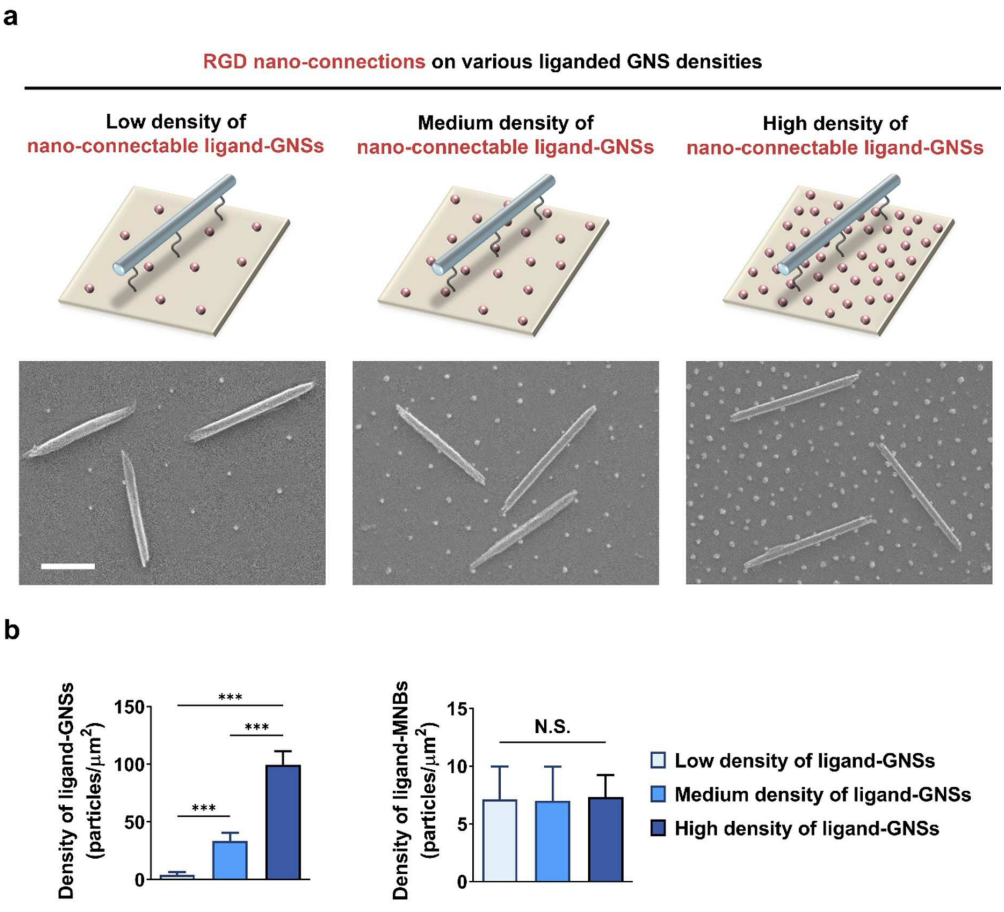
도면1


Ferric chloride
Ferric oxyhydroxide
Silica shell formation
by TEOS
Ferric oxyhydroxide @silica
Reduction
Under N_2 conditions
Phase transition
Magnetite@silica
Diameter
Length
Amino-silica formation
by APTES
Magnetite@amino-silica: Magnetite nanobar (MNB)
Thiolated substrate
Gold nanosphere (GNS) tethering
GNS-tethered materials
Coating of long flexible linker
Flexible tethering of MNB to the materials
CDDRGD
RGD ligand coating on GNSs and MNBs
Surface passivation
Reversible ligand nano-connection
20 nm
120 nm
100 nm
140 nm
Connected ligand
Flexible linker
Rev. Con.
Rev. Discon.

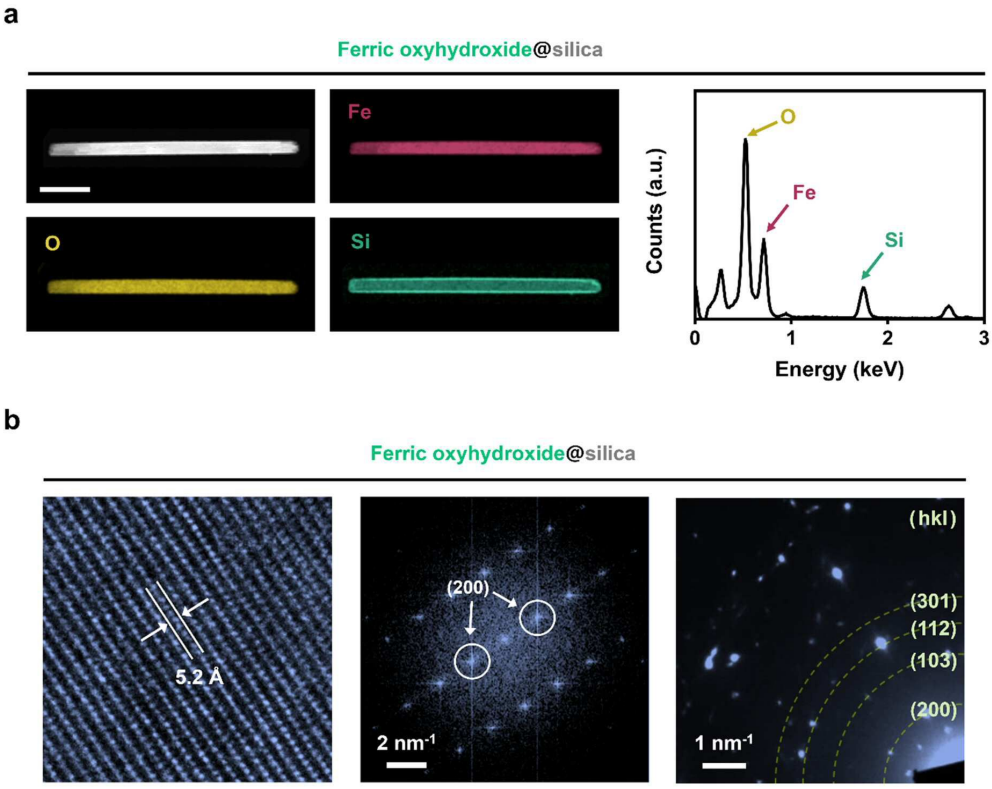
도면2


GNSs for ligand
nano-connection
GNS number (%)
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
GNS diameter (nm)
2.4 Å

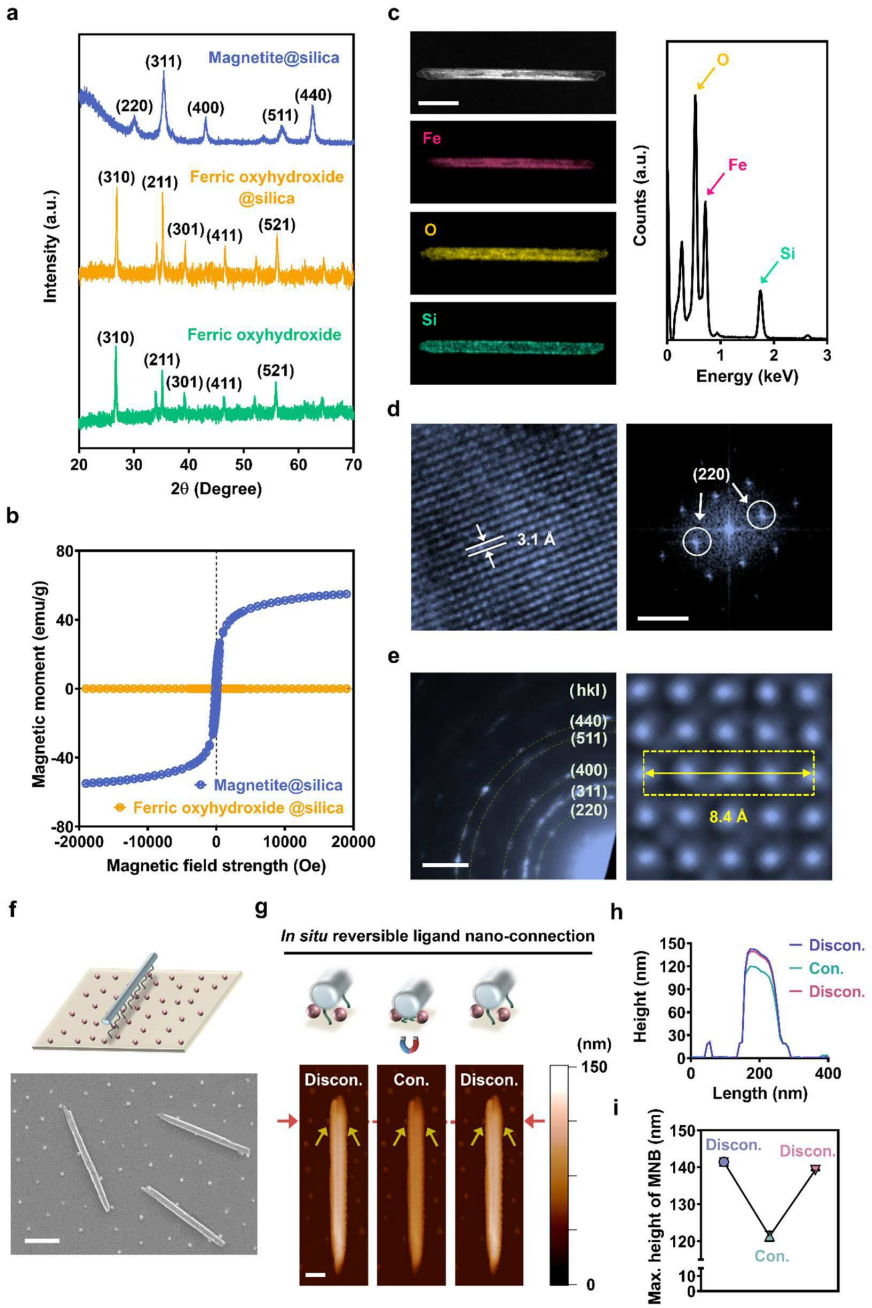
도면3


a
RGD nano-connections on various liganded GNS densities
Low density of
nano-connectable ligand-GNSs
Medium density of
nano-connectable ligand-GNSs
High density of
nano-connectable ligand-GNSs
b
Density of ligand-GNSs (particles/μm²)
150
100
50
0
***
***
***
Density of ligand-MNBs (particles/μm²)
15
10
5
0
N.S.
Low density of ligand-GNSs
Medium density of ligand-GNSs
High density of ligand-GNSs

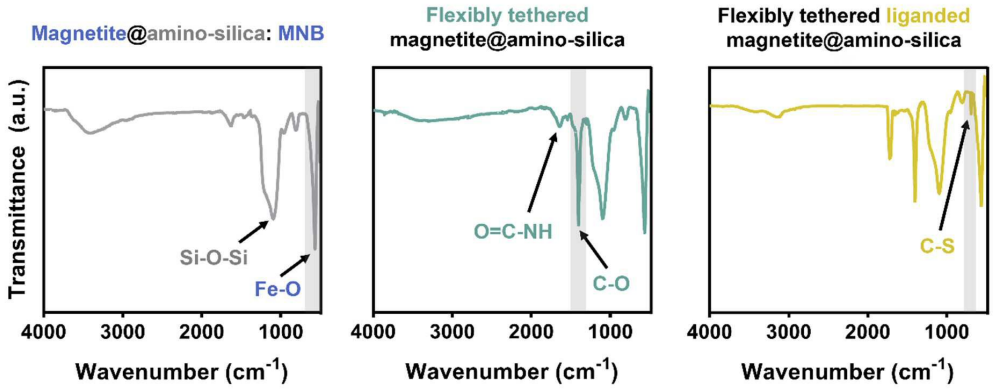
도면4


a
Ferric oxyhydroxide@silica
Fe
O
Si
Counts (a.u.)
O
Fe
Si
0
1
2
3
Energy (keV)
b
Ferric oxyhydroxide@silica
5.2 Å
(200)
2 nm-1
(hkl)
(301)
(112)
(103)
(200)
1 nm-1

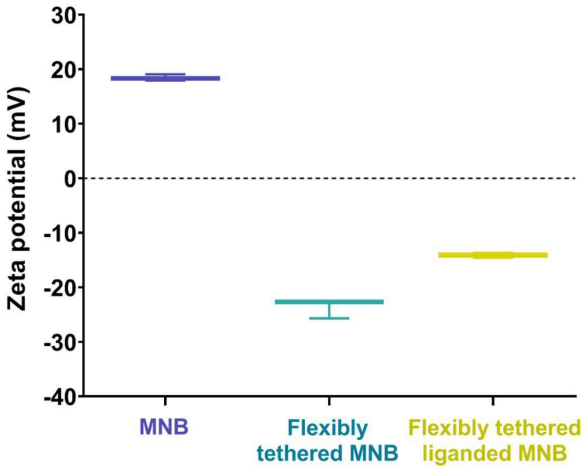
도면5


a
Magnetite@silica
(311)
(220)
(400)
(511)
(440)
Ferric oxyhydroxide @silica
(310)
(211)
(301)
(411)
(521)
Ferric oxyhydroxide
Intensity (a.u.)
2θ (Degree)
b
Magnetic moment (emu/g)
Magnetite@silica
Ferric oxyhydroxide @silica
Magnetic field strength (Oe)
c
Fe
O
Si
Counts (a.u.)
Energy (keV)
d
3.1 Å
(220)
e
(hkl)
(440)
(511)
(400)
(311)
(220)
8.4 Å
f
g
In situ reversible ligand nano-connection
Discon.
Con.
Discon.
(nm)
150
0
h
Discon.
Con.
Discon.
Height (nm)
Length (nm)
i
Max. height of MNB (nm)
Discon.
Discon.
Con.

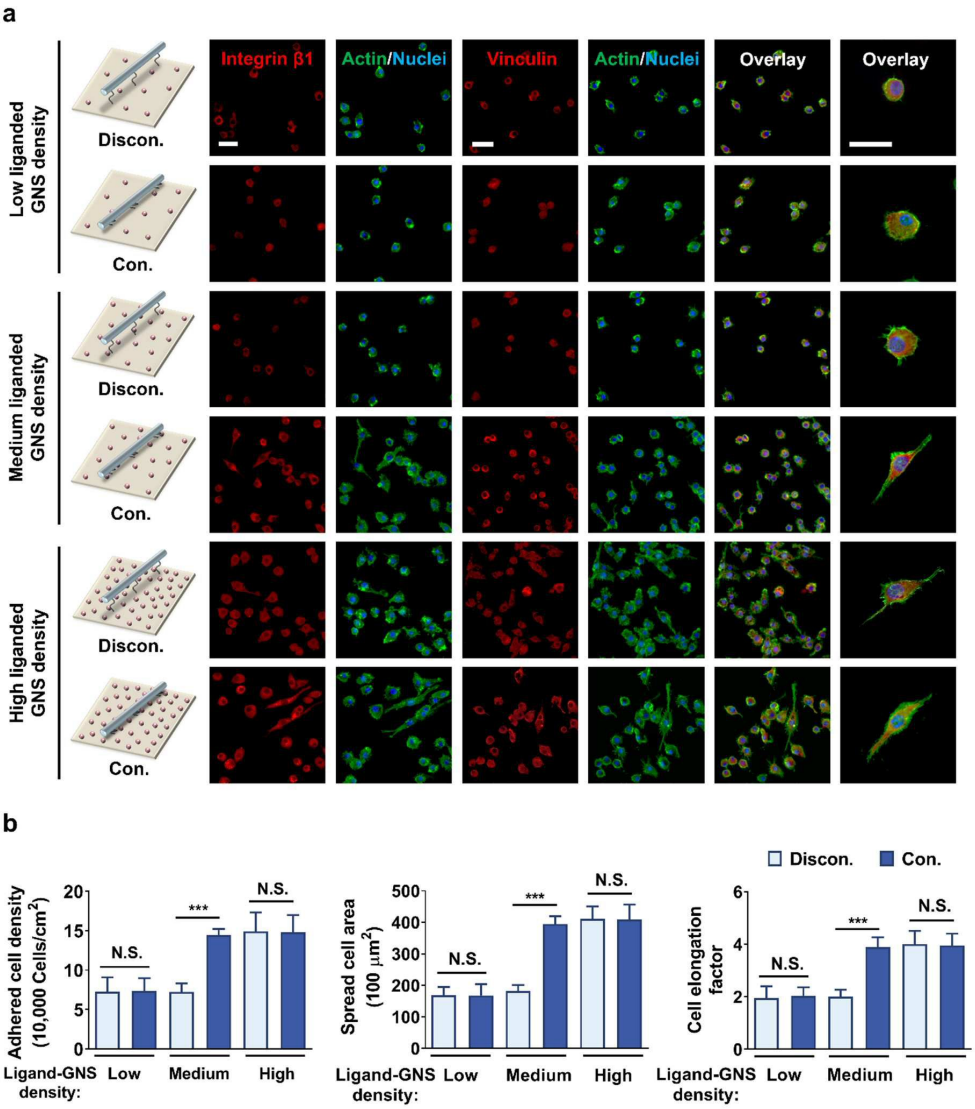
도면6


Magnetite@amino-silica: MNB
Flexibly tethered
magnetite@amino-silica
Flexibly tethered liganded
magnetite@amino-silica
Transmittance (a.u.)
Si-O-Si
Fe-O
O=C-NH
C-O
C-S
4000
3000
2000
1000
Wavenumber (cm-1)

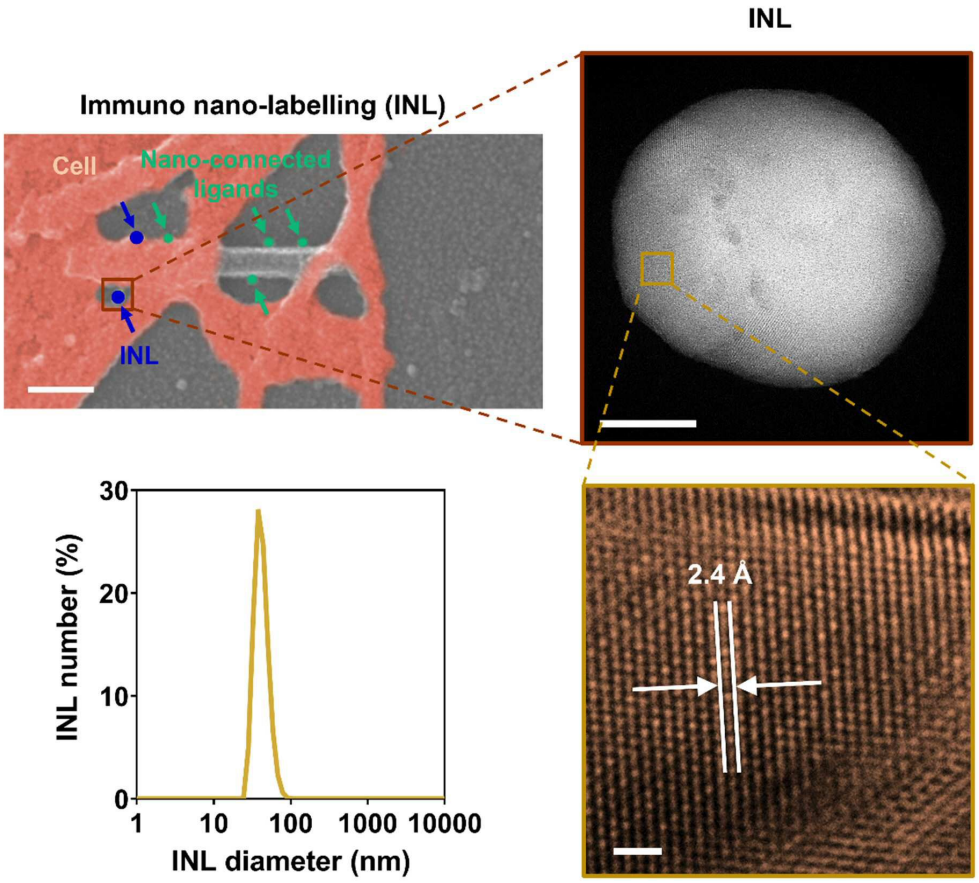
도면7


Zeta potential (mV)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
MNB
Flexibly
tethered MNB
Flexibly tethered
liganded MNB

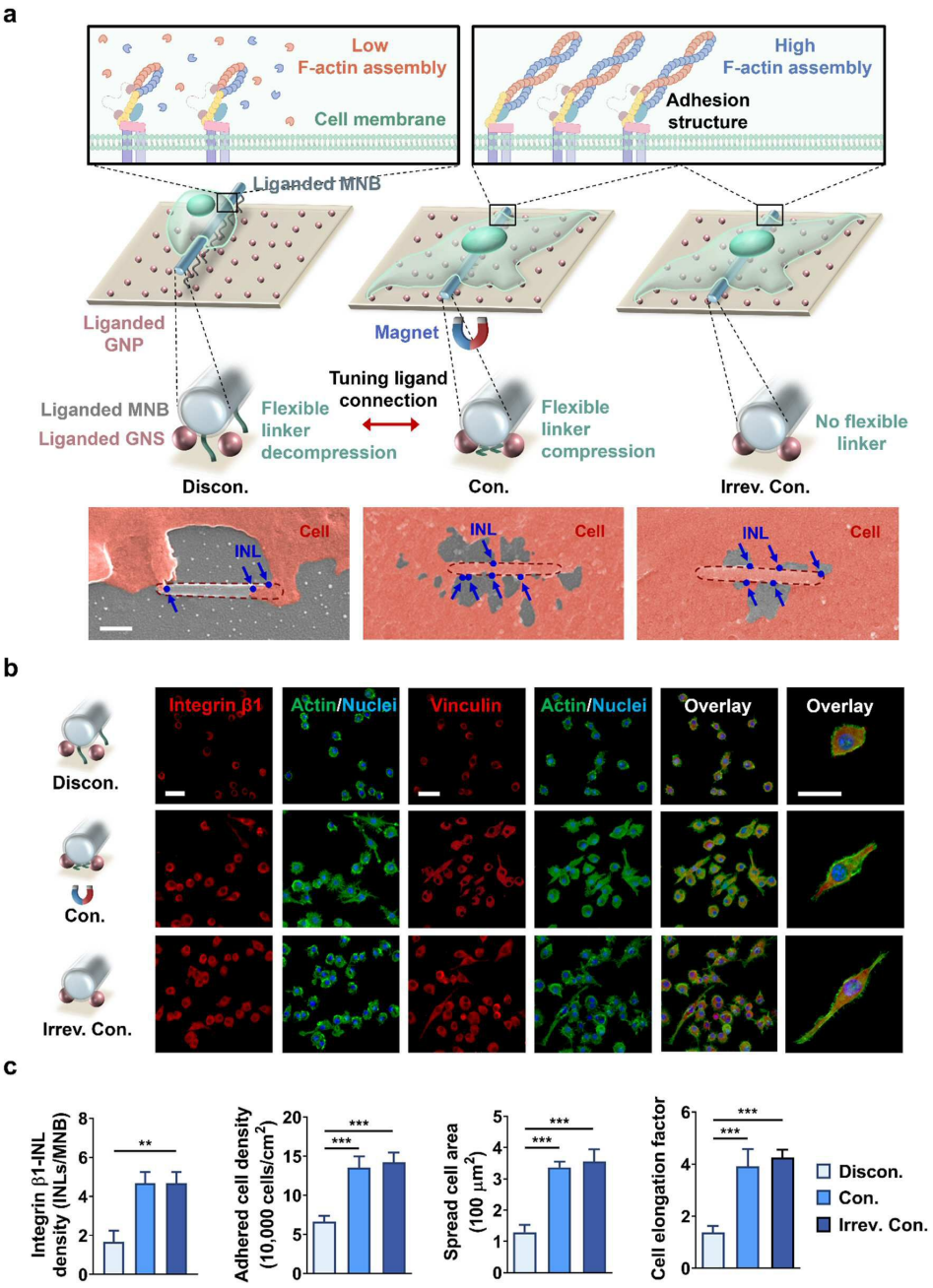
도면8


a
Integrin β1
Actin/Nuclei
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
Overlay
Low liganded GNS density
Medium liganded GNS density
High liganded GNS density
Discon.
Con.
b
Discon.
Con.
Adhered cell density (10,000 Cells/cm²)
Spread cell area (100 μm²)
Cell elongation factor
N.S.
***
Ligand-GNS density:
Low
Medium
High

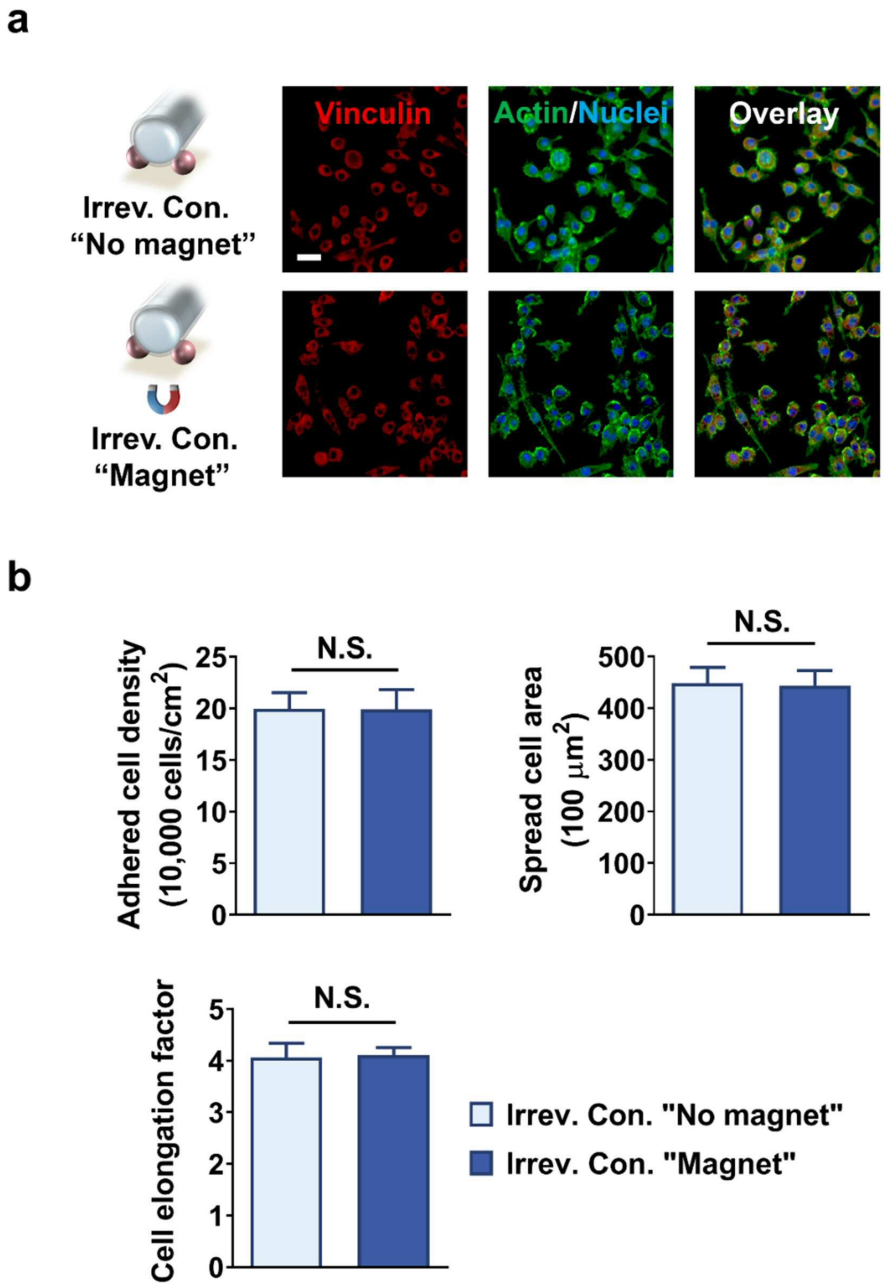
도면9


Immuno nano-labelling (INL)
Cell
Nano-connected ligands
INL
INL
2.4 Å
INL number (%)
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
INL diameter (nm)

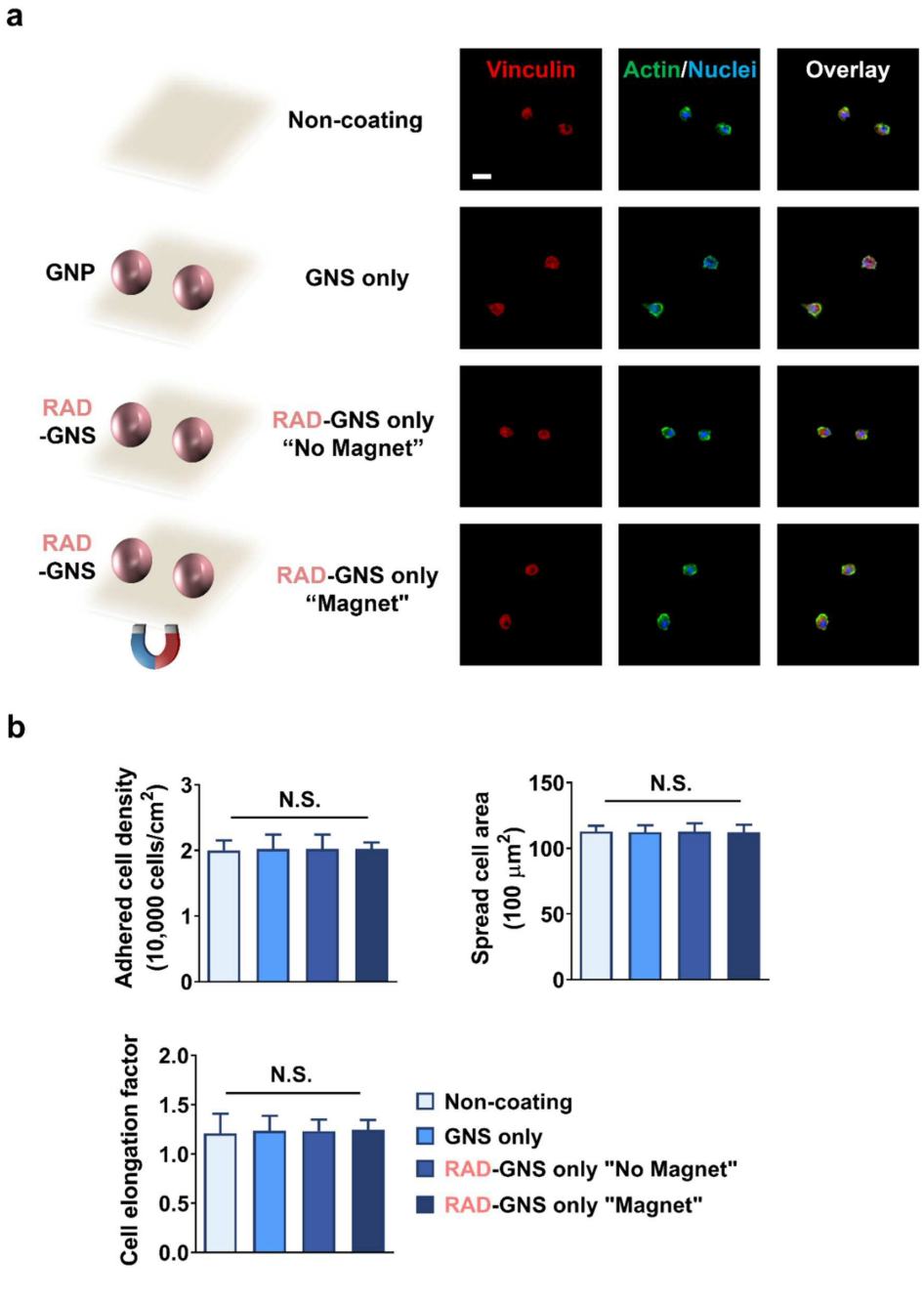
도면10


a
Low
F-actin assembly
Cell membrane
High
F-actin assembly
Adhesion
structure
Liganded MNB
Liganded
GNP
Magnet
Liganded MNB
Liganded GNS
Flexible
linker
decompression
Tuning ligand
connection
Flexible
linker
compression
No flexible
linker
Discon.
Con.
Irrev. Con.
Cell
INL
b
Integrin β1
Actin/Nuclei
Vinculin
Overlay
Discon.
Con.
Irrev. Con.
c
Integrin β1-INL
density (INLs/MNB)
Adhered cell density
(10,000 cells/cm²)
Spread cell area
(100 μm²)
Cell elongation factor
Discon.
Con.
Irrev. Con.

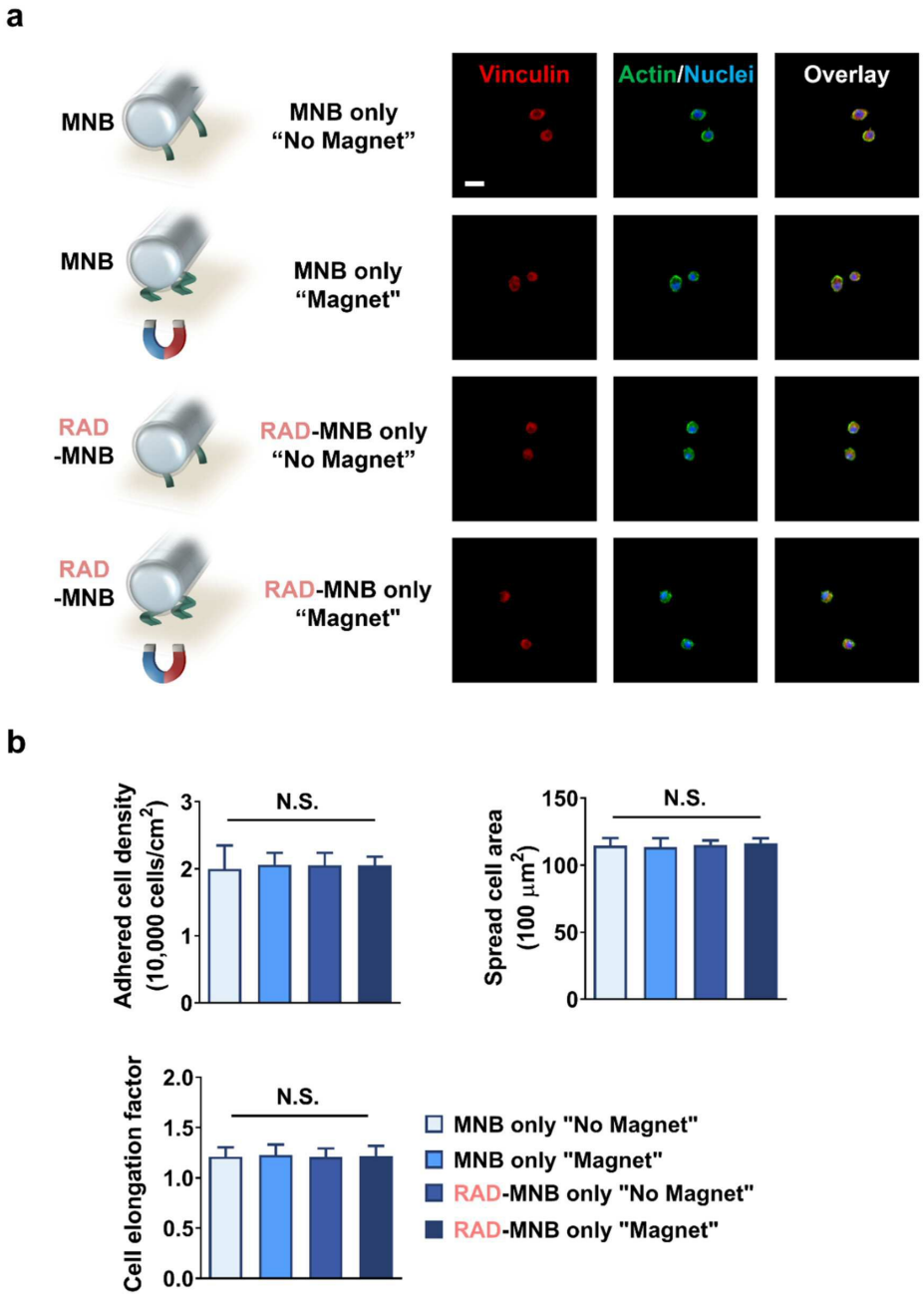
도면11


a
Irrev. Con.
"No magnet"
Irrev. Con.
"Magnet"
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
b
Adhered cell density
(10,000 cells/cm2)
N.S.
Spread cell area
(100 μm2)
N.S.
Cell elongation factor
N.S.
Irrev. Con. "No magnet"
Irrev. Con. "Magnet"

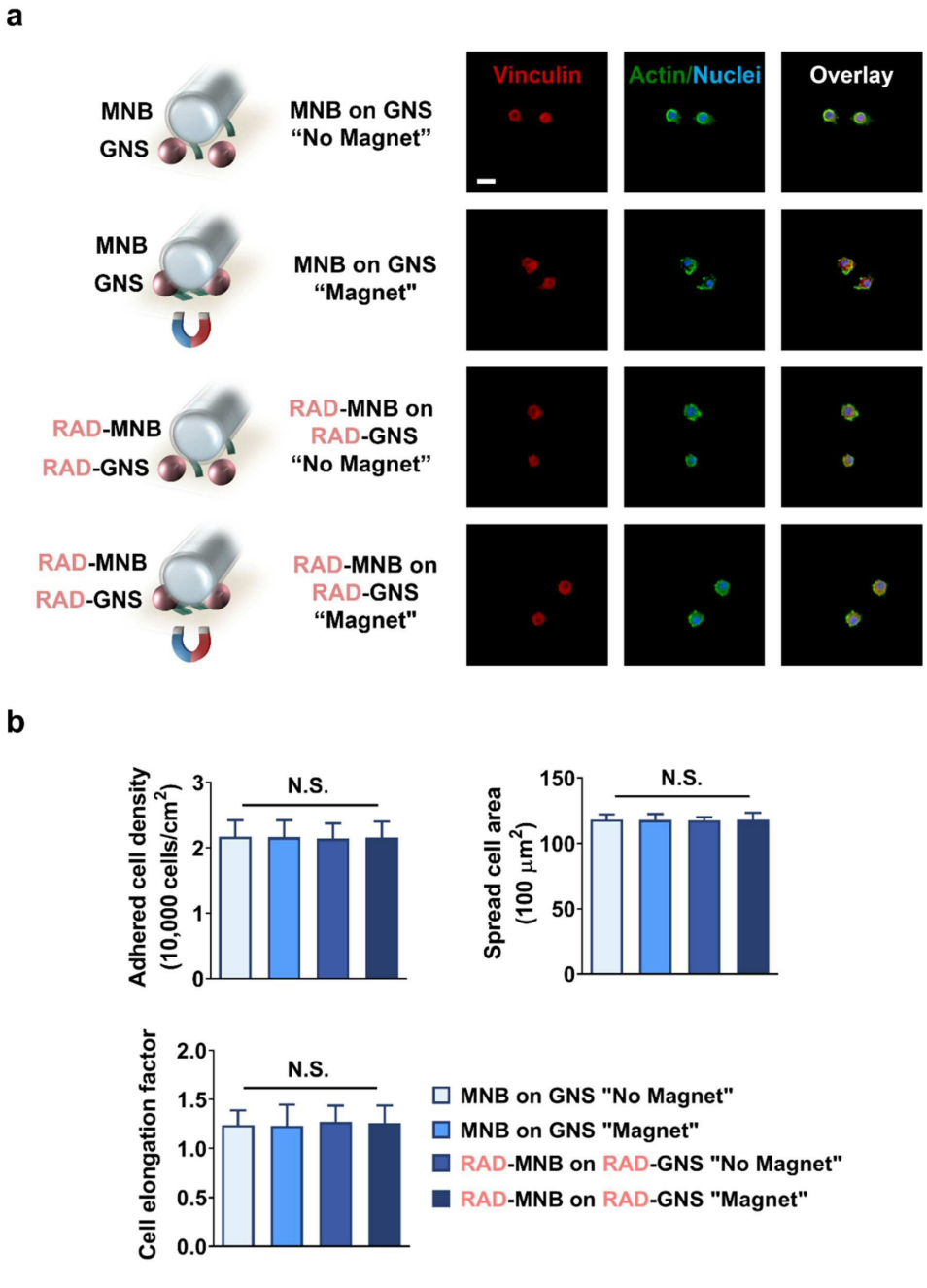
도면12


a
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
Non-coating
GNP
GNS only
RAD
-GNS
RAD-GNS only
"No Magnet"
RAD
-GNS
RAD-GNS only
"Magnet"
b
Adhered cell density
(10,000 cells/cm2)
N.S.
Spread cell area
(100 μm2)
N.S.
Cell elongation factor
N.S.
Non-coating
GNS only
RAD-GNS only "No Magnet"
RAD-GNS only "Magnet"

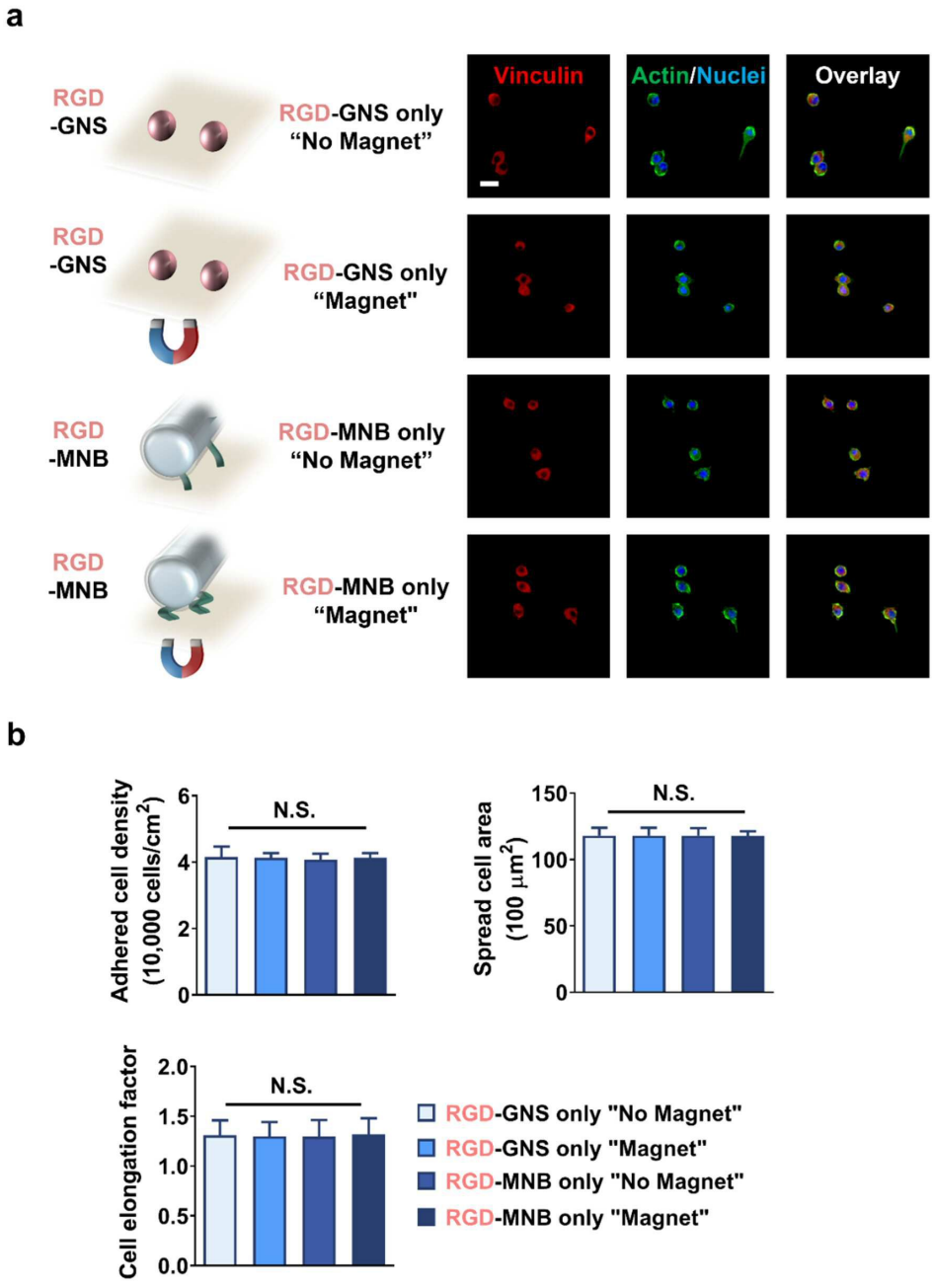
도면13


a
MNB
MNB only
"No Magnet"
MNB
MNB only
"Magnet"
RAD
-MNB
RAD-MNB only
"No Magnet"
RAD
-MNB
RAD-MNB only
"Magnet"
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
b
Adhered cell density
(10,000 cells/cm2)
N.S.
Spread cell area
(100 μm2)
N.S.
Cell elongation factor
N.S.
MNB only "No Magnet"
MNB only "Magnet"
RAD-MNB only "No Magnet"
RAD-MNB only "Magnet"

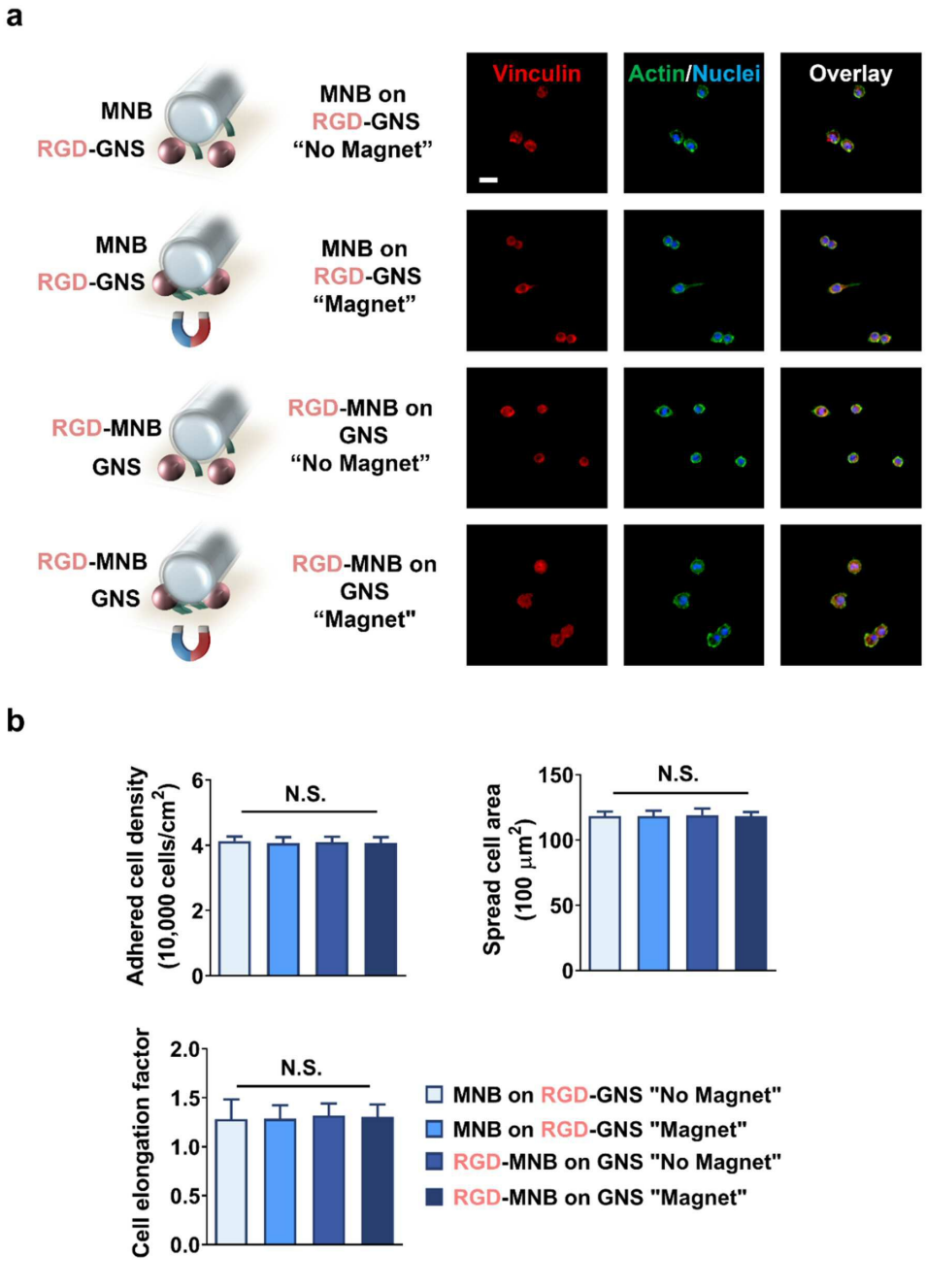
도면14


a
MNB
GNS
MNB on GNS
"No Magnet"
MNB on GNS
"Magnet"
RAD-MNB
RAD-GNS
RAD-MNB on
RAD-GNS
"No Magnet"
RAD-MNB on
RAD-GNS
"Magnet"
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
b
Adhered cell density
(10,000 cells/cm2)
Spread cell area
(100 μm2)
Cell elongation factor
N.S.
MNB on GNS "No Magnet"
MNB on GNS "Magnet"
RAD-MNB on RAD-GNS "No Magnet"
RAD-MNB on RAD-GNS "Magnet"

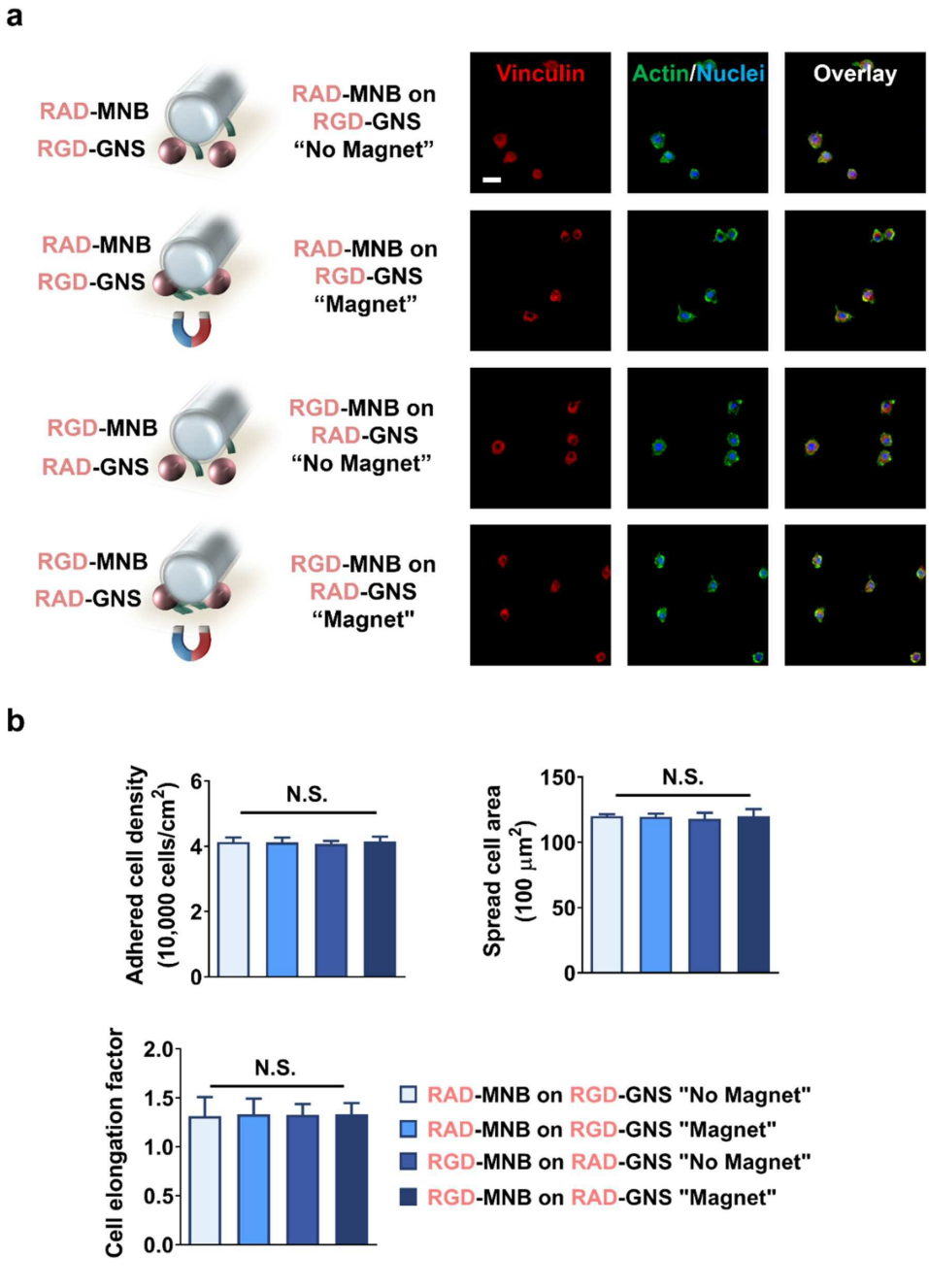
도면15


a
RGD
-GNS
RGD-GNS only
"No Magnet"
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
RGD
-GNS
RGD-GNS only
"Magnet"
RGD
-MNB
RGD-MNB only
"No Magnet"
RGD
-MNB
RGD-MNB only
"Magnet"
b
Adhered cell density
(10,000 cells/cm2)
N.S.
Spread cell area
(100 μm2)
N.S.
Cell elongation factor
N.S.
RGD-GNS only "No Magnet"
RGD-GNS only "Magnet"
RGD-MNB only "No Magnet"
RGD-MNB only "Magnet"

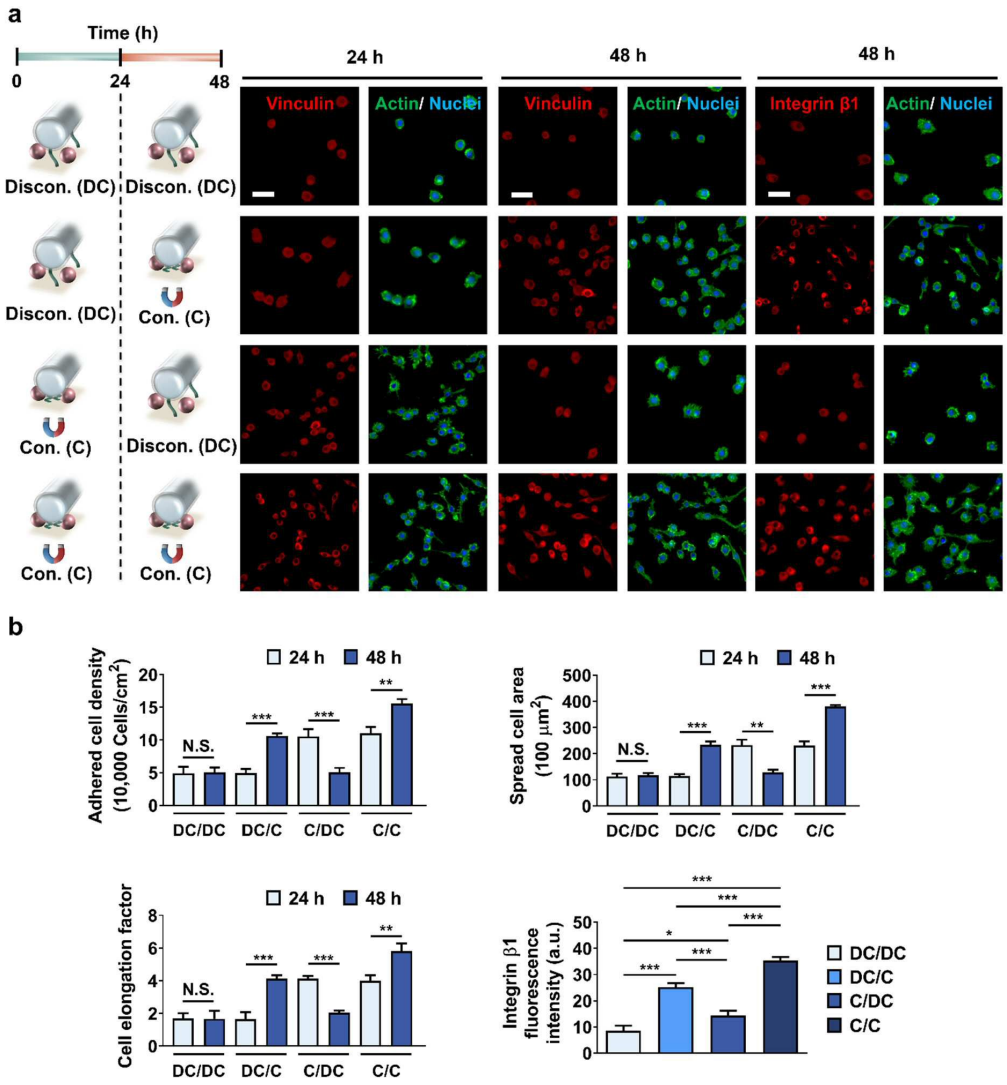
도면16


a
MNB
RGD-GNS
MNB on
RGD-GNS
"No Magnet"
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
MNB
RGD-GNS
MNB on
RGD-GNS
"Magnet"
RGD-MNB
GNS
RGD-MNB on
GNS
"No Magnet"
RGD-MNB
GNS
RGD-MNB on
GNS
"Magnet"
b
Adhered cell density
(10,000 cells/cm2)
N.S.
Spread cell area
(100 μm2)
N.S.
Cell elongation factor
N.S.
MNB on RGD-GNS "No Magnet"
MNB on RGD-GNS "Magnet"
RGD-MNB on GNS "No Magnet"
RGD-MNB on GNS "Magnet"

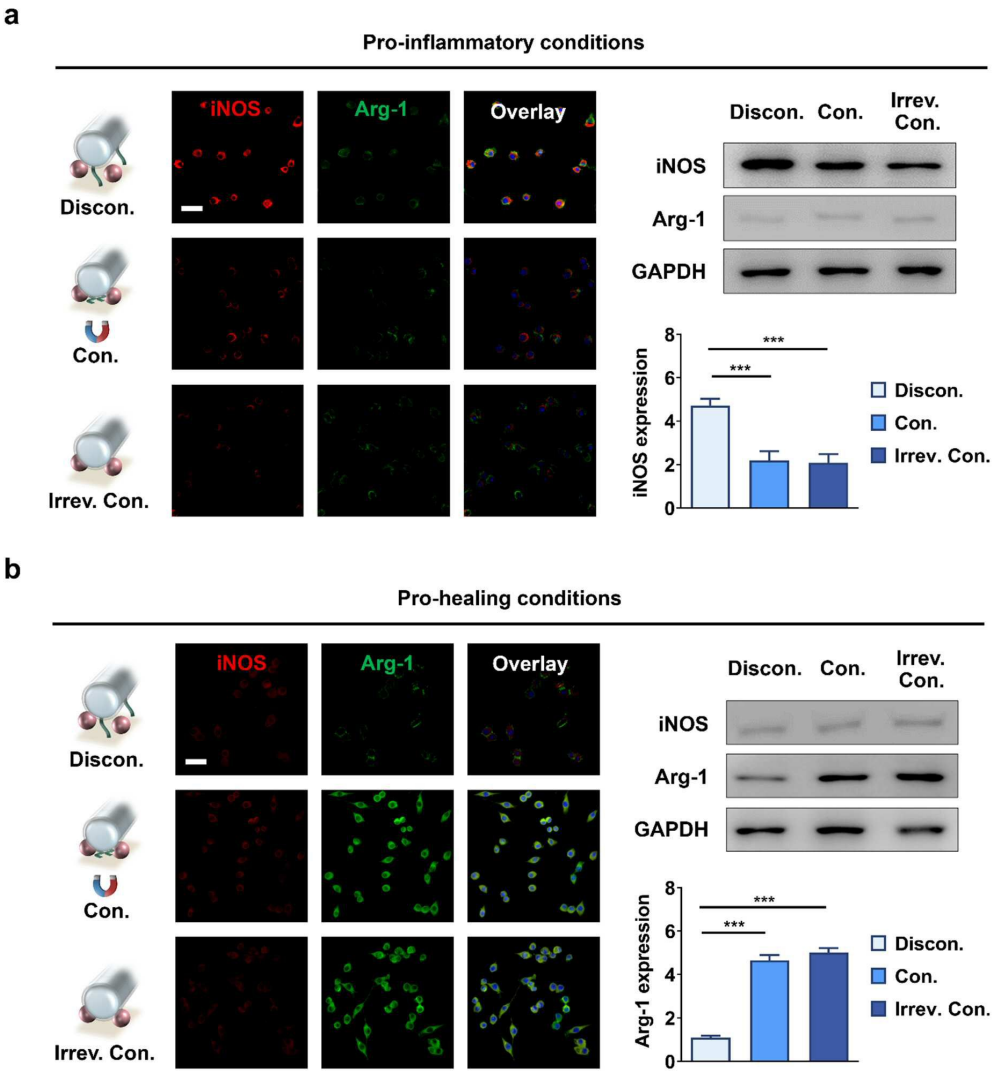
도면17


a
RAD-MNB
RGD-GNS
RAD-MNB on
RGD-GNS
"No Magnet"
RAD-MNB
RGD-GNS
RAD-MNB on
RGD-GNS
"Magnet"
RGD-MNB
RAD-GNS
RGD-MNB on
RAD-GNS
"No Magnet"
RGD-MNB
RAD-GNS
RGD-MNB on
RAD-GNS
"Magnet"
Vinculin
Actin/Nuclei
Overlay
b
Adhered cell density
(10,000 cells/cm2)
N.S.
Spread cell area
(100 μm2)
N.S.
Cell elongation factor
N.S.
RAD-MNB on RGD-GNS "No Magnet"
RAD-MNB on RGD-GNS "Magnet"
RGD-MNB on RAD-GNS "No Magnet"
RGD-MNB on RAD-GNS "Magnet"

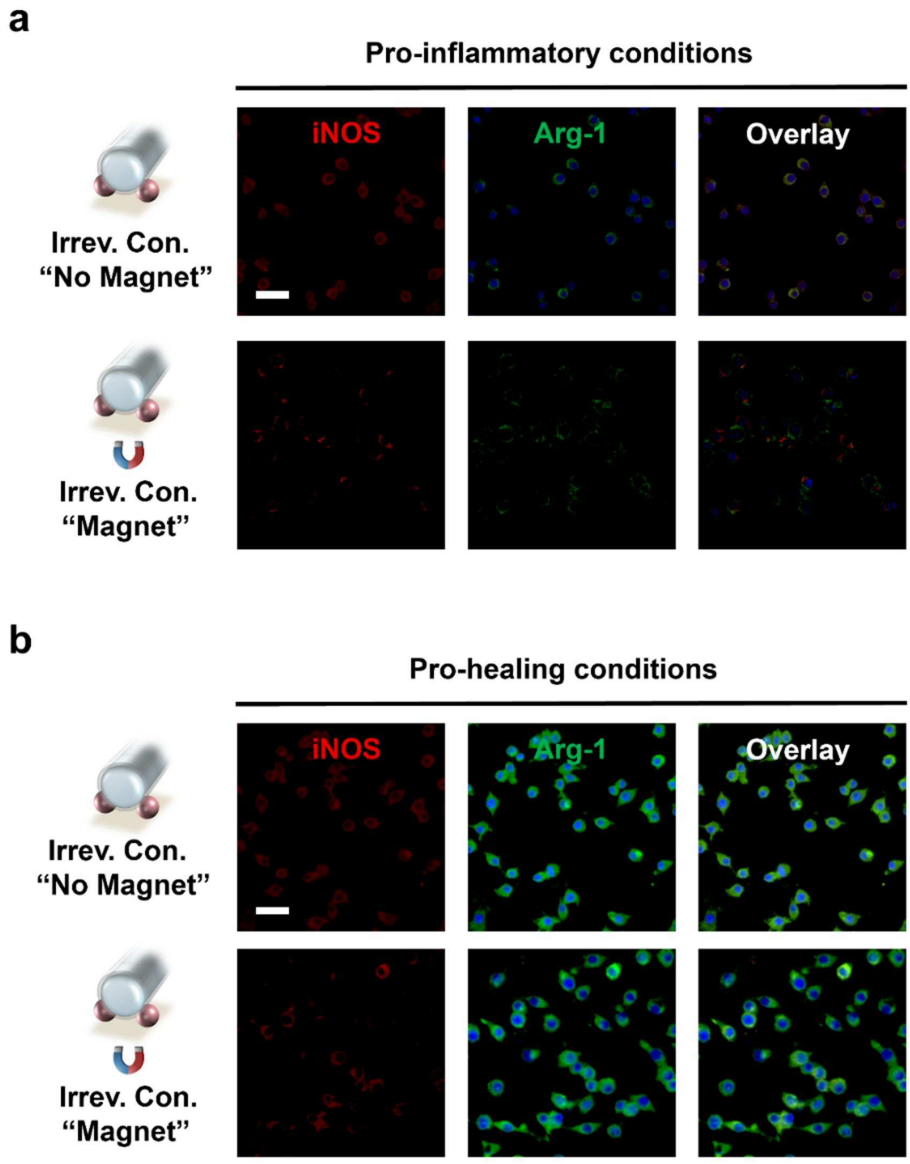
도면18


a
Time (h)
0
24
48
24 h
48 h
48 h
Vinculin
Actin/ Nuclei
Vinculin
Actin/ Nuclei
Integrin β1
Actin/ Nuclei
Discon. (DC)
Discon. (DC)
Discon. (DC)
Con. (C)
Con. (C)
Discon. (DC)
Con. (C)
Con. (C)
b
Adhered cell density (10,000 Cells/cm²)
Spread cell area (100 μm²)
Cell elongation factor
Integrin β1 fluorescence intensity (a.u.)
24 h
48 h
N.S.
DC/DC
DC/C
C/DC
C/C

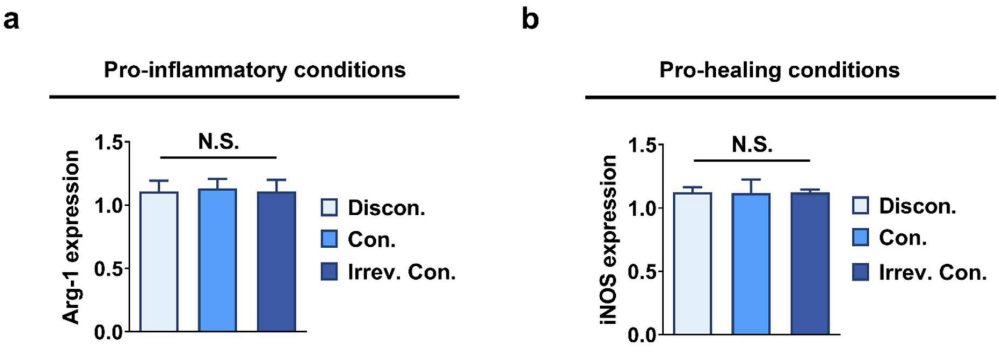
도면19


a
Pro-inflammatory conditions
iNOS
Arg-1
Overlay
Discon.
Con.
Irrev. Con.
Discon. Con. Irrev. Con.
iNOS
Arg-1
GAPDH
iNOS expression
***
***
Discon.
Con.
Irrev. Con.
b
Pro-healing conditions
iNOS
Arg-1
Overlay
Discon.
Con.
Irrev. Con.
Discon. Con. Irrev. Con.
iNOS
Arg-1
GAPDH
Arg-1 expression
***
***
Discon.
Con.
Irrev. Con.

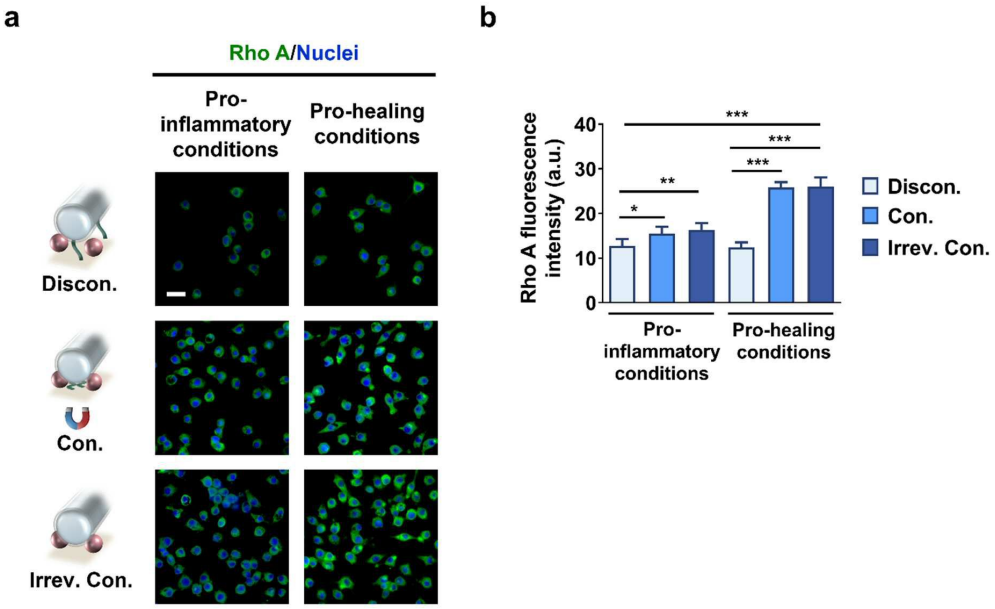
도면20


a
Pro-inflammatory conditions
iNOS
Arg-1
Overlay
Irrev. Con.
“No Magnet”
Irrev. Con.
“Magnet”
b
Pro-healing conditions
iNOS
Arg-1
Overlay
Irrev. Con.
“No Magnet”
Irrev. Con.
“Magnet”

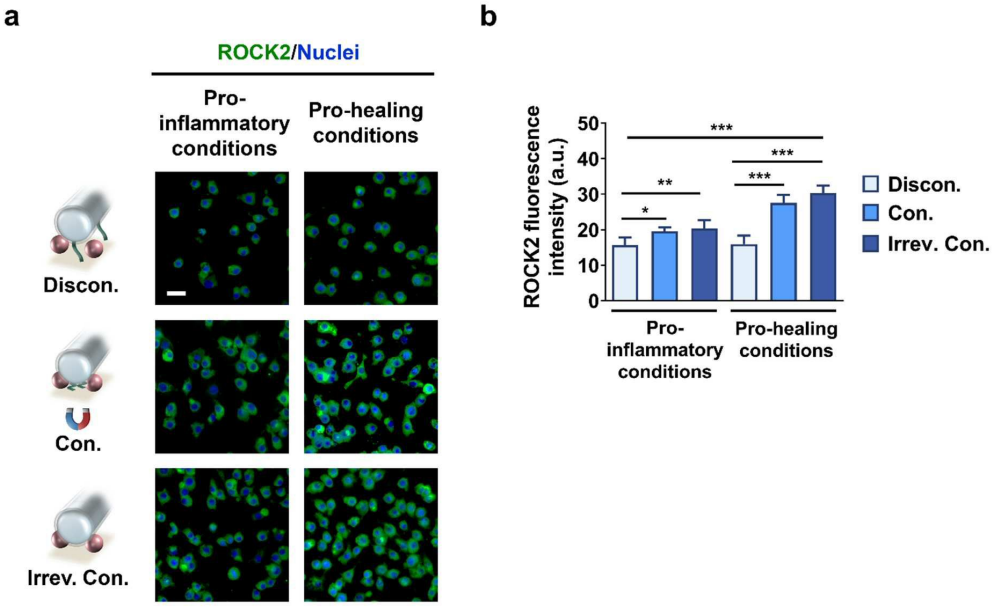
도면21


a
Pro-inflammatory conditions
Arg-1 expression
1.5
1.0
0.5
0.0
N.S.
Discon.
Con.
Irrev. Con.
b
Pro-healing conditions
iNOS expression
1.5
1.0
0.5
0.0
N.S.
Discon.
Con.
Irrev. Con.

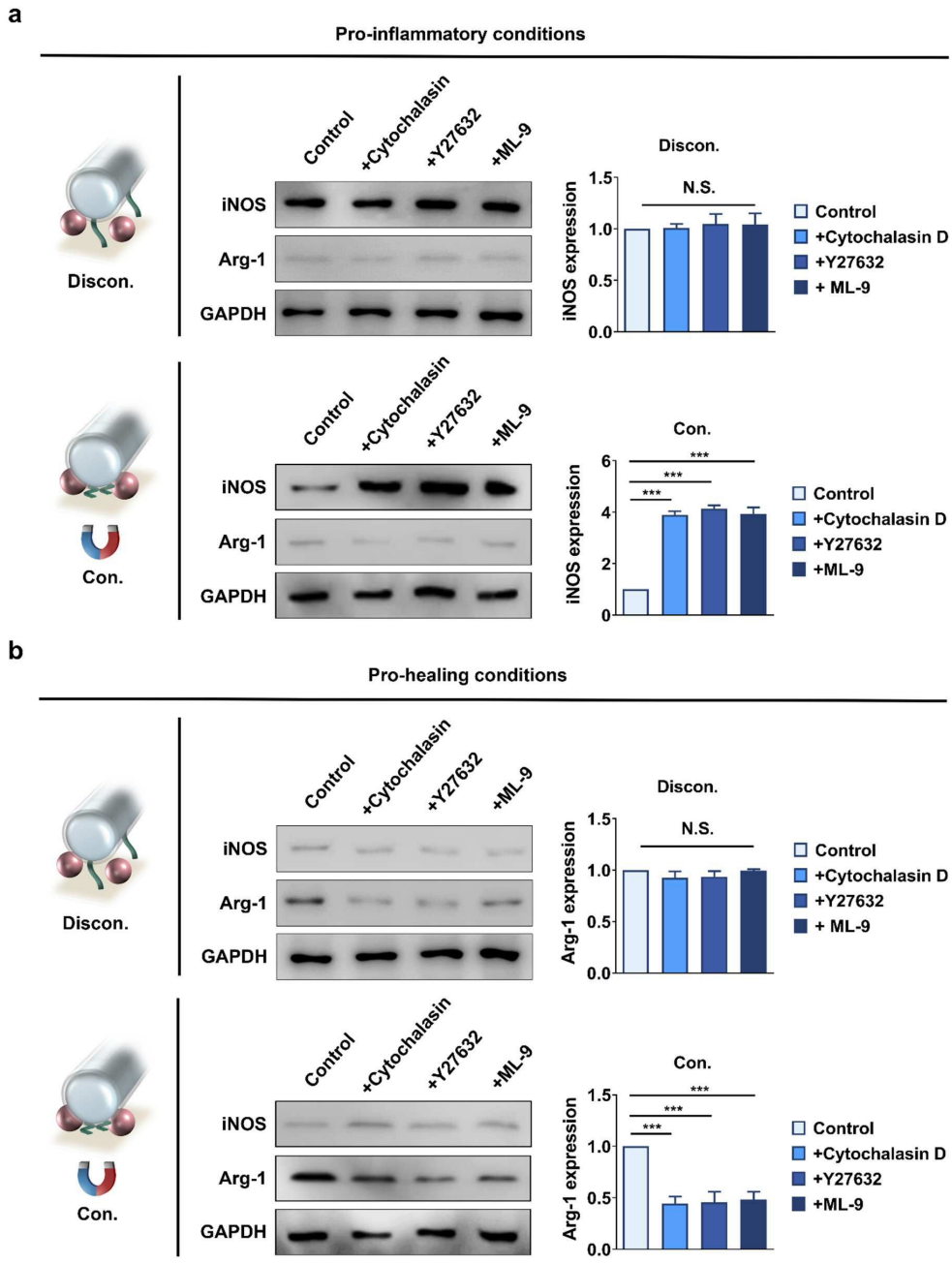
도면22


a
Rho A/Nuclei
Pro-inflammatory conditions
Pro-healing conditions
Discon.
Con.
Irrev. Con.
b
Rho A fluorescence intensity (a.u.)
0
10
20
30
40
*
**
***
***
***
Pro-inflammatory conditions
Pro-healing conditions
Discon.
Con.
Irrev. Con.

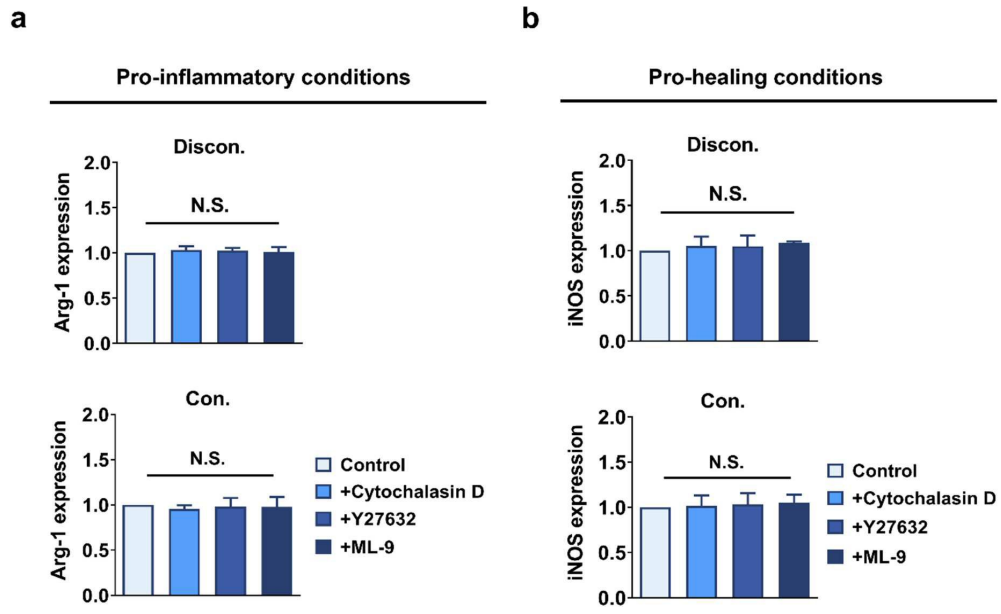
도면23


a
ROCK2/Nuclei
Pro-inflammatory conditions
Pro-healing conditions
Discon.
Con.
Irrev. Con.
b
ROCK2 fluorescence intensity (a.u.)
0
10
20
30
40
50
*
**
***
***
***
Pro-inflammatory conditions
Pro-healing conditions
Discon.
Con.
Irrev. Con.

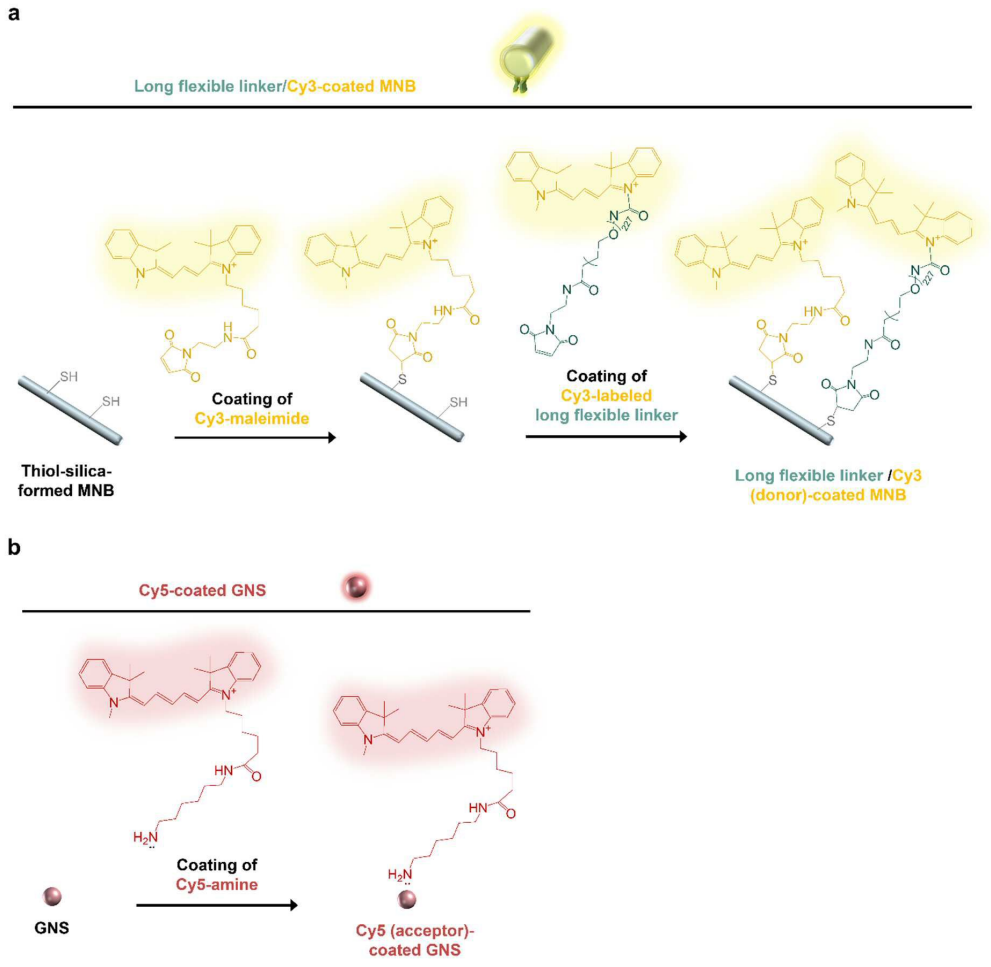
도면24


a
Pro-inflammatory conditions
Discon.
Control
+Cytochalasin
+Y27632
+ML-9
iNOS
Arg-1
GAPDH
Discon.
N.S.
iNOS expression
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
+Cytochalasin D
+Y27632
+ ML-9
Con.
***
***
***
6
4
2
0
+ML-9
b
Pro-healing conditions
Arg-1 expression

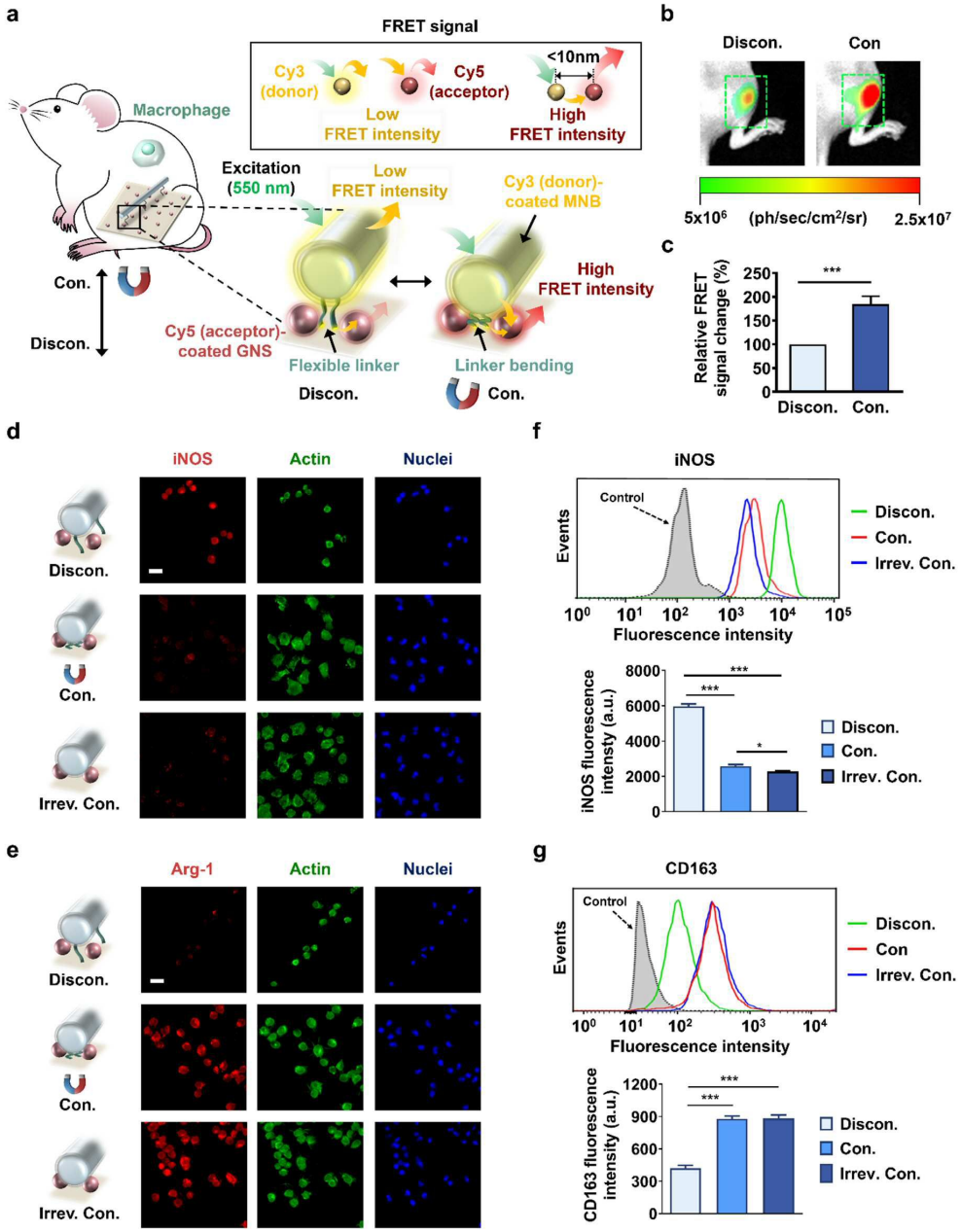
도면25


a
Pro-inflammatory conditions
Discon.
N.S.
Arg-1 expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Con.
N.S.
Control
+Cytochalasin D
+Y27632
+ML-9
b
Pro-healing conditions
Discon.
N.S.
iNOS expression
Con.
N.S.
Control
+Cytochalasin D
+Y27632
+ML-9

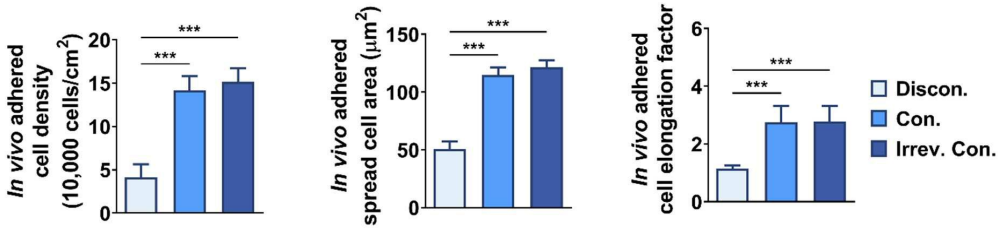
도면26


a
Long flexible linker/Cy3-coated MNB
SH
SH
Thiol-silica-formed MNB
Coating of Cy3-maleimide
Coating of Cy3-labeled long flexible linker
Long flexible linker /Cy3 (donor)-coated MNB
b
Cy5-coated GNS
GNS
Coating of Cy5-amine
Cy5 (acceptor)-coated GNS

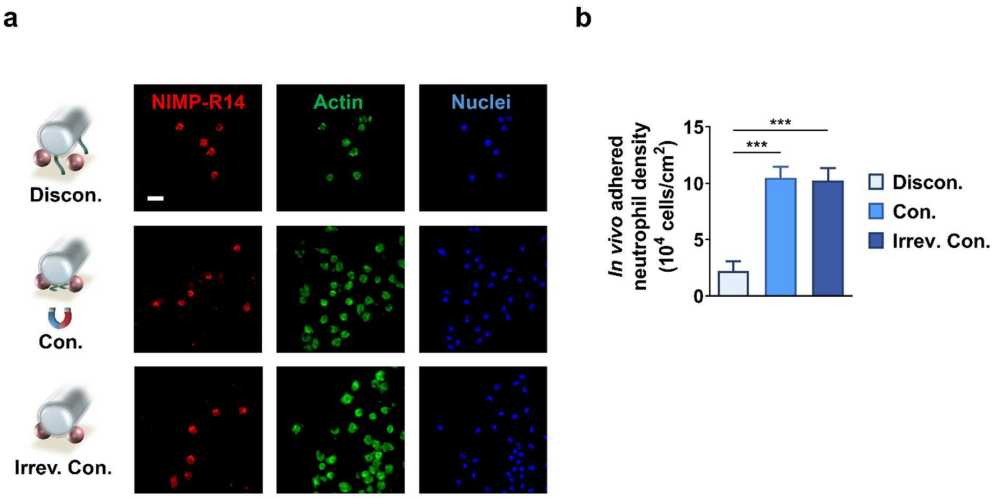
도면27


a
FRET signal
Cy3 (donor)
Cy5 (acceptor)
<10nm
Low FRET intensity
High FRET intensity
Macrophage
Excitation (550 nm)
Low FRET intensity
Cy3 (donor)-coated MNB
High FRET intensity
Con.
Discon.
Cy5 (acceptor)-coated GNS
Flexible linker
Linker bending
Discon.
Con.
b
Discon.
Con
5x10⁶ (ph/sec/cm²/sr) 2.5x10⁷
c
Relative FRET signal change (%)
Discon. Con.
d
iNOS
Actin
Nuclei
Discon.
Con.
Irrev. Con.
e
Arg-1
Actin
Nuclei
Discon.
Con.
Irrev. Con.
f
iNOS
Control
Events
Fluorescence intensity
Discon.
Con.
Irrev. Con.
iNOS fluorescence intensity (a.u.)
g
CD163
Control
Events
Fluorescence intensity
Discon.
Con
Irrev. Con.
CD163 fluorescence intensity (a.u.)

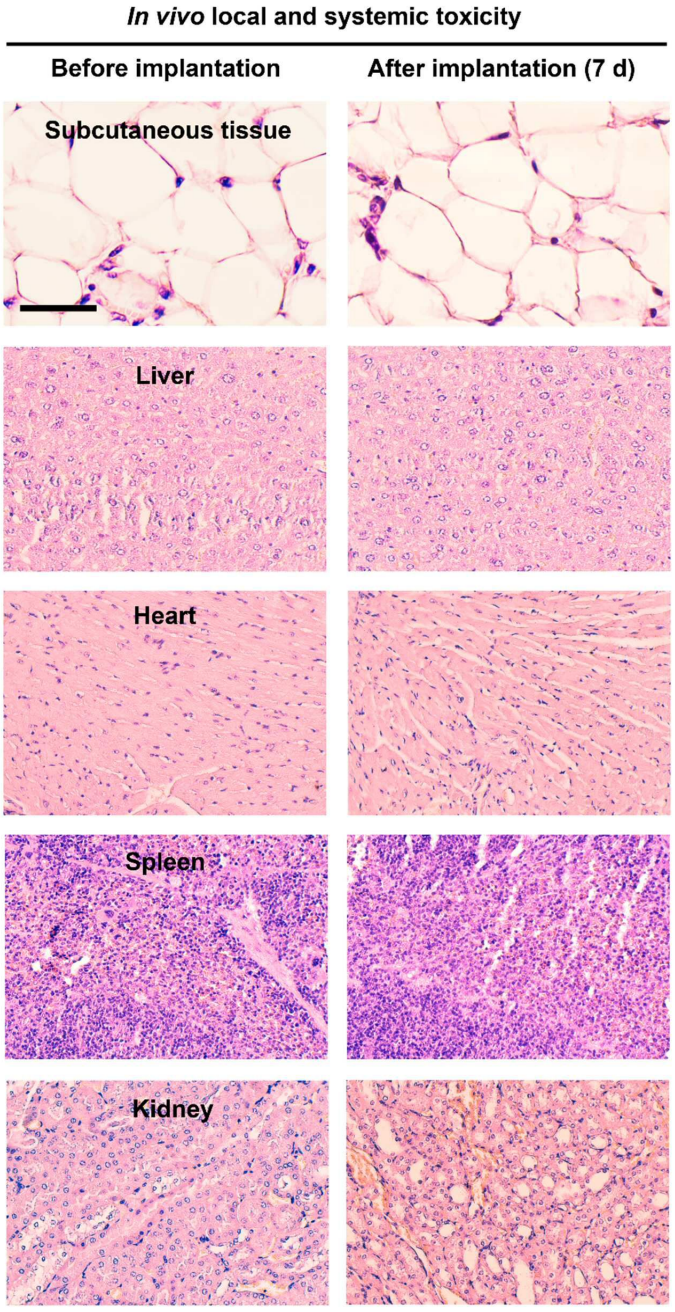
도면28


In vivo adhered cell density (10,000 cells/cm²)
In vivo adhered spread cell area (μm²)
In vivo adhered cell elongation factor
Discon.
Con.
Irrev. Con.

도면29


a
NIMP-R14
Actin
Nuclei
Discon.
Con.
Irrev. Con.
b
In vivo adhered neutrophil density (10^4 cells/cm^2)
15
10
5
0
***
***
Discon.
Con.
Irrev. Con.

도면30


In vivo local and systemic toxicity
Before implantation
After implantation (7 d)
Subcutaneous tissue
Liver
Heart
Spleen
Kidney