



(24) 등록일자 2020년07월06일

- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
성학준
서울특별시 강남구 선릉로126길 22, 101동 502호
(삼성동, 롯데캐슬프리미어)
- 강미란
서울특별시 강서구 양천로55길 55, 108동 201호
(가양동, 강서한강자이아파트)
- (74) 대리인
특허법인다나

심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **줄기세포능의 제어가 가능한 고분자 공중합체를 포함하는 줄기세포 배양 조성물**

본 발명은 고분자 공중합체를 포함하는 줄기세포능의 제어를 위한 배양 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 상기 공중합체를 구성하는 소수성이고 세포 접착성을 가지는 고분자 및 친수성이고 세포 반발력을 갖는 고분자의 조성의 변화에 따라 상기 공중합체에서 배양되는 줄기세포의 줄기세포능을 제어할 수 있다.

(A) Chemical structure of the copolymer: $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ and $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ are linked by an amide bond. The structure is labeled with PEG, PCL, and PCL-co-2%PCL.

(B) Bar graph showing VgR Mass (ag) for various samples. The y-axis ranges from 0 to 4. The x-axis categories are: Untreated, 100% PCL, 10% PEG-90% PCL, 25% PEG-75% PCL, 50% PEG-50% PCL, and 75% PEG-25% PCL. The values are approximately: Untreated (2.8), 100% PCL (2.8), 10% PEG-90% PCL (1.2), 25% PEG-75% PCL (1.8), 50% PEG-50% PCL (3.2), and 75% PEG-25% PCL (2.2). Significance markers: ** for 10% PEG-90% PCL, * for 25% PEG-75% PCL, and ** for 50% PEG-50% PCL.

(C) Bar graph showing Critical Aggregation Mass (ag) for various samples. The y-axis ranges from 0 to 100. The x-axis categories are: Untreated, 100% PCL, 10% PEG-90% PCL, 25% PEG-75% PCL, 50% PEG-50% PCL, and 75% PEG-25% PCL. The values are approximately: Untreated (85), 100% PCL (85), 10% PEG-90% PCL (85), 25% PEG-75% PCL (85), 50% PEG-50% PCL (85), and 75% PEG-25% PCL (55). Significance markers: ** for 10% PEG-90% PCL, * for 25% PEG-75% PCL, and ** for 50% PEG-50% PCL.

(D) Fluorescence microscopy images showing cell morphology and fluorescence intensity for TCPS, 100% PCL, 10% PEG-90% PCL, 25% PEG-75% PCL, 50% PEG-50% PCL, and 75% PEG-25% PCL. Scale bars are shown in the bottom right of each image.

(E) Bar graph showing Relative Expression of NANOG for various samples. The y-axis ranges from 0 to 5. The x-axis categories are: Untreated, 100% PCL, 10% PEG-90% PCL, 25% PEG-75% PCL, 50% PEG-50% PCL, and 75% PEG-25% PCL. The values are approximately: Untreated (2.2), 100% PCL (2.2), 10% PEG-90% PCL (3.8), 25% PEG-75% PCL (2.2), 50% PEG-50% PCL (2.2), and 75% PEG-25% PCL (2.2). Significance markers: * for 10% PEG-90% PCL.

(F) Bar graph showing Relative Expression of SOX2 for various samples. The y-axis ranges from 0 to 10. The x-axis categories are: Untreated, 100% PCL, 10% PEG-90% PCL, 25% PEG-75% PCL, 50% PEG-50% PCL, and 75% PEG-25% PCL. The values are approximately: Untreated (2.2), 100% PCL (2.2), 10% PEG-90% PCL (7.8), 25% PEG-75% PCL (2.2), 50% PEG-50% PCL (2.2), and 75% PEG-25% PCL (2.2). Significance markers: ** for 10% PEG-90% PCL, * for 25% PEG-75% PCL, and * for 50% PEG-50% PCL.

(G) Histogram showing Reactive Oxygen Species (ROS) production for various samples. The x-axis is ROS (log scale) and the y-axis is Counts. The curves are: Untreated (blue), 100% PCL (green), 10% PEG-90% PCL (red), 25% PEG-75% PCL (purple), 50% PEG-50% PCL (brown), and 75% PEG-25% PCL (pink). The 10% PEG-90% PCL curve shows the highest peak.

(H) Histogram showing STRO-1 expression for various samples. The x-axis is Fluorescence Intensity (log scale) and the y-axis is Counts. The curves are: Untreated (blue), 100% PCL (green), 10% PEG-90% PCL (red), 25% PEG-75% PCL (purple), 50% PEG-50% PCL (brown), and 75% PEG-25% PCL (pink). The 10% PEG-90% PCL curve shows the highest peak.

(52) CPC특허분류
C12N 2533/30 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
US20100040660 A1
KR1020190002253 A
KR1020160061533 A
KR1020120111380 A
KR101906472 B1
JP2013530792 A
EP01970068 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016M3A9E9941743
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	형상기억 소재 기반 자동 문합형 튜브 그래프트 개발
기 여 율	1/1
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.08.01 ~ 2018.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

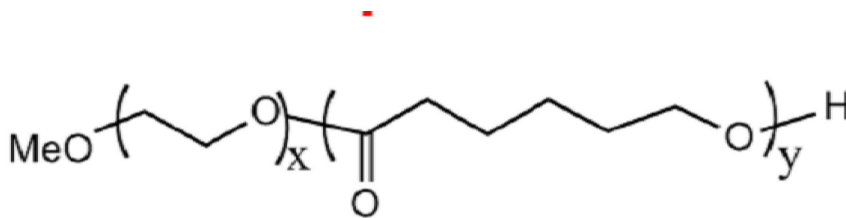
청구항 1

5 mol % PEG(poly(ethylene glycol)) 및 95 mol % PCL(poly(ϵ -caprolactone))으로 이루어진 공중합체를 포함하고, 상기 PEG는 2000Da의 사슬길이를 갖는 것인, 골수 유래 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 향상시키기 위한 배양 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 PEG(poly(ethylene glycol)) 및 PCL(poly(ϵ -caprolactone))으로 이루어진 공중합체는 하기 화학식으로 표시되는 것인, 골수 유래 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 향상시키기 위한 배양 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식에서,

x 및 y는 각각 PEG 및 PCL의 몰분율(mol %)을 의미한다.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

5 mol % PEG(poly(ethylene glycol)) 및 95 mol % PCL(poly(ϵ -caprolactone))을 이용하여 공중합체를 제조하는 단계; 및

상기 제조된 공중합체를 포함하는 배양 조성물에 골수 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하고,

상기 PEG는 2000Da의 사슬길이를 갖는 것인, 골수 유래 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 향상시키는 방법.

청구항 8

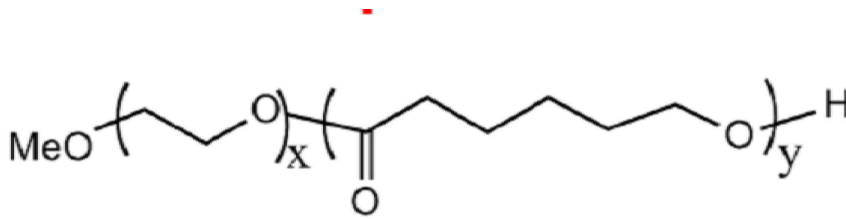
삭제

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 PEG(poly(ethylene glycol)) 및 PCL(poly(ϵ -caprolactone))으로 이루어진 공중합체는

하기 화학식으로 표시되는 것인, 골수 유래 중간엽 줄기세포의 줄기세포능을 향상시키는 방법:

[화학식 1]



상기 화학식에서,

X 및 y는 각각 PEG 및 PCL의 몰분율(mol %)을 의미한다.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고분자 공중합체를 포함하는 줄기세포능을 제어하기 위한 배양 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포를 조직 공학 및 재생 의학에 적용하는 것은 지난 10 년 동안 엄청난 관심을 받았다. 기초 과학 연구의 결과를 고무함으로써 인간의 질병 치료에 대한 hMSC의 사용에 대한 전세계의 관심이 높아졌으며 현재 수백 건의 임상 시험이 진행 중이다. 이러한 치료법으로 가장 많은 혜택을 보는 노인 환자들은 체내 줄기 세포의 수가 적고, 이들의 증식 속도 및 분화 능력에 현저한 감소로 인해 치료 효능을 심각하게 제한한다. 따라서, 이러한 환자들의 생체 내에서 줄기 세포의 수를 증가시키는 것에 한계가 있으며, 줄기 세포 치료를 위한 적정 수의 줄기세포를 확보하기 위한 in vitro로의 확장이 요구된다.

[0003] 그러나 in vitro에서도, 세포 치료나 재생의학에서 최소 필요한 세포의 수는 1×10^9 정도이며, 조건을 잡고 기준을 정하는 실험까지 포함한다면 그 양은 더욱 늘어난다. 기존의 다양한 기원의 줄기세포로 이 정도의 양을 공급하려면 최소 in vitro에서 10번 이상의 계대가 필요하게 된다. 그러면 세포는 노화되고 변형되어 더 이상 치료의 개념에 적합하지 않게 되는 문제점이 있다. 이는 지금의 줄기세포의 배양시스템이 가지고 있는 풀어야 할 큰 문제점이다. 그리고 이러한 세포로 조건과 기준을 잡았다 하더라도 치료에 사용할 시에는 이미 그 세포는 바닥이 나고 다른 인간의 줄기세포를 써야 하는 경우가 발생하며, 그럴 경우 또 다른 세포이용에 따른 부가적인 실험을 다시 거쳐야 하기 때문에 줄기세포를 세포치료제로 사용하기 위해서는, 줄기세포능(stemness)을 증가시켜 상기와 같은 문제점을 해결할 수 있는 새로운 방법의 개발이 절실한 실정이다.

[0004] 이에 본 발명자들은 세포-기질 및 세포-세포간의 상호작용이 줄기세포의 행동을 결정할 것이라는 가정하에, 고분자 조성의 변화를 통한 고분자 표면 반발력의 변화가 상기 줄기세포가 상기 고분자 물질을 인식하여 접촉하는 과정에서 줄기세포의 줄기세포능과 같은 기능상의 변화를 야기함을 확인함으로써, 줄기세포능을 제어할 수 있는

고분자 중합체 기반의 배양 조성물을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개공보 제10-2016-0089110호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Acta Biomater. 2012; 8(2):559-569

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 고분자 공중합체를 포함하는 줄기세포능을 제어하는 줄기세포 배양 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 고분자 공중합체를 포함하는 줄기세포 배양 조성물에 세포를 배양시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 줄기세포능을 제어하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 배경기술에서 전술한 바와 같이, 줄기세포를 세포치료제로 이용하기 위해서는 다량의 줄기세포가 필요할 뿐만 아니라, 줄기세포의 줄기세포능을 조절하여 시기 적절하게 세포 치료제를 유지 및 사용하는 것이 세포 치료에 있어 중요한 부분이다.

[0010] 본 발명에 사용된 용도 "줄기세포능"은 배아줄기세포와 같이 모든 세포를 생성할 수 있는 능력이 있는 만능성(pluripotency)과, 자기와 닮은 세포들을 무한정 만들어 낼 수 있는 자기재생(self-renewal) 능력을 총칭하는 의미로 당업계에서 통용된다. 즉, 줄기세포능은 줄기세포의 특성을 유지하는 능력을 의미한다. 따라서 줄기세포능이 향상되었다는 것은 텔로머라아제 활성을 증가시키거나, 줄기세포성 인자(stemness acting signals)의 발현을 증가시키거나, 미분화 세포를 미분화 상태를 유지하면서 증식시키거나, 세포 이동 활성을 증가시키는 특징이 나타나는 것을 포함할 수 있다(Pittenger, M. F. et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284(5411), 143-147). 반면에 상기 특징이 정반대라면 줄기세포능이 저하된 것일 수 있다. 따라서 본 발명에서 줄기세포능을 제어한다는 것은 줄기세포능을 유지하거나 향상시킬 수도 있고 줄기세포능을 저하시켜 분화단계로 나아가게 할 수 있다는 것을 의미한다.

[0011] 이에 본 발명자들은 줄기세포들의 세포-기질간 및 세포-세포간 상호작용이 줄기세포의 분화 및 미분화 여부와 같은 줄기세포의 행동을 결정하는데 중요한 역할을 할 것이라는 가정하여, 이러한 상호작용에 영향을 미칠 수 있는 배양 조성물을 개발하던 중에 고분자 중합체의 조성변화에 의한 고분자 중합체의 표면 접착성 및 반발력 변화가 이와 상호작용하는 줄기세포의 행동 및 기능상의 변화를 야기함을 확인하였다. 구체적으로 세포 접착성 도메인을 가진 대표적인 고분자 PCL 및 상기 PCL의 접착성을 차단하는 PEG를 다양한 사슬 길이 및 분자량으로 중합한 고분자 중합체를 포함하는 배양 조성물에 줄기세포를 배양함으로써 줄기세포능의 변화를 확인하였고, 상기 고분자 중합체의 조성의 변화가 줄기세포의 줄기세포능을 변화시킴을 확인하였다.

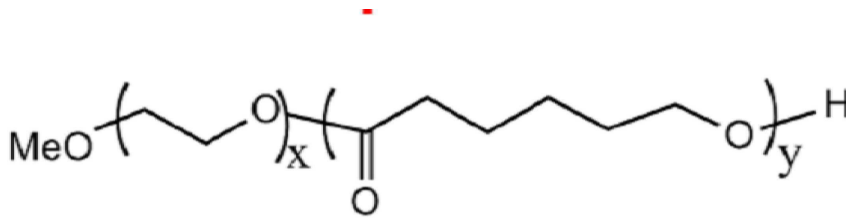
[0012] 이에 따라, 본 발명은 줄기세포의 줄기세포능을 제어하는 고분자 공중합체를 포함하는 줄기세포 배양 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 고분자 공중합체는 소수성이며 세포 접착성 도메인을 가진 고분자 화합물 및 친수성이며 상기 세포 반발력을 갖는 고분자 화합물의 중합으로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 상기 고분자 화합물은 생체 적합성 고분자일 수 있다.

[0014] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 공중합체는 세포 접착성 도메인을 가진 생체 적합성 고분자 화합물인 PCL(poly(ϵ -caprolactone)) 및 PEG(poly(ethylene glycol))의 중합으로 이루어질 수 있다. 보다

구체적으로는, 하기 화학식 1과 같은 구조로 이루어질 수 있다:

[화학식 1]



상기 화학식에서, X 및 y는 각각 PEG 및 PCL의 몰분율(mol %)을 의미할 수 있다.

구체적으로는, 상기 공중합체를 이루는 PEG 및 PCL의 몰분율(mol %)의 변화는 줄기세포의 상기 공중합체에 대한 부착성에 변화를 주고, 이는 줄기세포간의 상호작용에도 영향을 미쳐, 줄기세포능을 변화시킬 수 있음을 본 발명의 실시예에서 확인하였다. 구체적인 실시예에서, 줄기세포의 줄기세포능은 줄기세포로 존재할 때 발현되는 전사인자의 발현량의 변화를 측정하고, REDOX 조절 인자 및 활성산소종(ROS)의 변화를 측정하여 확인하였다. 따라서, 줄기세포능이 향상되었다는 것은 줄기세포로 존재할 때 발현되는 전사인자의 발현량이 증가하고, 세포 내 산화-환원 반응(REDUX) 조절 인자가 활성화되어 세포의 산화적 스트레스를 유발하는 활성산소종(ROS)의 생산이 적음을 의미할 수 있다.

본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 공중합체의 PEG의 몰분율이 증가함에 따라, 줄기세포의 줄기세포능이 향상되지만, 공중합체 중 PEG의 몰분율이 25 mol % 이상인 경우에는, 배양 기질에 세포가 부착할 수 없으므로, NANOG 및 SOX2와 같은 줄기세포에서 발현되는 전사인자의 양이 감소됨을 확인하였다. 바람직하게는, 5 내지 25 mol % 미만의 PEG 및 95 내지 75 mol % 초과의 PCL로 이루어진 공중합체를 포함하는 배양 조성물에서 줄기세포의 줄기세포능이 향상될 수 있다.

본 발명의 구체적인 다른 실시예에서, 상기 PEG의 사슬 길이가 길어짐에 따라 줄기세포능이 향상됨을 확인하였으며, 구체적으로, 500Da 내지 5000Da의 사슬길이를 가질 때, 줄기세포의 줄기세포능이 향상될 수 있다.

보다 구체적인 실시예에서, 상기 공중합체는 750 내지 2000Da의 사슬길이를 가지는 5 내지 10 mol %의 PEG 및 95 내지 90 mol %의 PCL로 이루어질 때, 줄기세포능이 보다 향상될 수 있다.

상술한 고분자 중합체를 포함하는 배양용 조성물에 배양되어 줄기세포능이 향상되는 줄기세포는 중간엽 줄기세포일 수 있고, 구체적으로는 골수 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.

또한, 본 발명은 PEG(poly(ethylene glycol)) 및 PCL(poly(ϵ -caprolactone))의 몰분율을 조절하여 공중합체를 제조하는 단계; 및

상기 제조된 공중합체를 포함하는 줄기세포 배양 조성물에 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 줄기세포능을 제어하는 방법을 제공한다.

상기 제조된 공중합체 및 줄기세포의 구성 및 특징은 전술한 줄기세포 배양 조성물과 동일하므로, 중복기재를 방지하기 위해 그 설명을 생략한다.

발명의 효과

본 발명은 줄기세포의 행동의 변화가 세포와 접촉하는 합성물질(고분자 중합체)의 내재적 특징 변화에 의해 제어될 수 있음을 확인한 것이다. 이에 따라, 합성물질을 이용한 줄기세포 배양 플랫폼 및 세포 치료제 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 (A) 소수성이고 세포 부착성을 나타내는 PCL, 친수성이고 세포 반발력을 나타내는 PEG, 및 친수성이고 세포 부착성을 나타내는 cPCL을 포함하는 공중합체 구조를 나타내는 개략도이다. 각 서브유닛의 몰분율의 변화에 따른 (B) 단백질 흡착 및 (C) 스핀 코팅된 표면상의 접촉각의 변화를 나타낸 것이다. (D) 다양한 기질에서의 세포 성장을 나타낸 것으로, 세포 부착 및 퍼짐의 변화를 확인할 수 있다. 상기 다양한 기질상에서 hMSCs를 배양시 줄기세포능을 나타내는 (E) NANOG 및 (F) SOX2 유전자의 발현량을 측정한 것이다. 세포 배양 기질에 따른

(G) ROS의 변화를 나타낸 것이다. 세포 배양 기질에 따른 hMSCs의 미분화를 나타내는 표지인 STRO-1의 발현량을 측정하는 것이다.

도 2는 (A) 줄기세포능의 조절에 표면 반발력(surface repellency)이 요구된다는 것을 증명하기 위해 배양 전 10 % PEG-90 % PCL을 다양한 농도의 피브로넥틴(fibronectin, FN)으로 미리 코팅한 공중합체의 배양 결과를 나타낸 것이다(녹색, 팔로이딘(phalloidin); 과산화, Hoechst; 스케일 바 = 100 μ m). 표면 발수성에 의해 조절된 (B) NANOG 및 (C) SOX2의 발현을 나타낸 것이다. 모든 막대는 TCPS에 비해 평균 \pm SD * p < 0.05, ** p < 0.01이다.

도 3은 공중합체 내 PEG 사슬 길이 및 물분율의 변화에 따른 세포 부착성의 변화를 (A) 그래프, (B) 형광 사진으로 나타낸 것이며, 줄기세포능의 변화를 (B) NANOG 및 (C) SOX2의 발현량을 측정하여 확인한 것이다. (E) 내지 (H)는 상기 기질 변화에 따른 항산화 관련 유전자들의 발현량을 측정하는 것이며, (I)는 상기 기질 변화에 따른 ROS의 양을 측정하는 것이다.

도 4는 X-ray scattering (XRS)를 사용하여 PEG 사슬 길이 의존하는 나노 및 옹그스트롱 스케일 특징을 나타낸 것이다((A) 작은 각 및 (B) 넓은 각). (C) PEG 사슬 길이 및 환경에 따른(건조 및 젖은 상태) PCL의 결정화율을 나타낸 것이다. (D) PEG 사슬 길이에 따른 PCL-PEG 공중합체의 라멜라 공간을 측정하는 것이다. (E) PEG 사슬 길이에 따른 PCL과 상호관계를 나타내는 개략도이다.

도 5는 (A) PEG 사슬 길이 및 물분율에 따른 hMSCs의 초점 접착 형성(Focal adhesion formation)을 structured illumination microscopy (SIM)을 이용하여 촬영한 것이다. (B) 상기 형성된 초점 접착의 너비를 도시한 그래프이다.

도 6은 (A-C) 5 % PEG_{2k}를 포함하는 기질에 배양된 세 환자로부터 분리된 hMSCs에서 발현되는 NANOG 및 SOX2 발현량을 측정하는 것이다. (D-F) PEG_{2k}를 포함하는 기질에 배양된 세 환자로부터 분리된 hMSCs에서 발현되는 항산화 관련 유전자들의 발현량을 측정하는 것이다. (G) 5 % PEG_{2k}를 포함하는 기질에 배양된 세 환자로부터 분리된 hMSCs에서 발현되는 세포 내 ROS를 측정하는 결과이다.

도 7은 (A-B) 세포-기질 및 세포-세포간의 접착에 관여하는 신호 전달 단백질들의 발현량을 기질에 따라 측정하는 것이다. (C-D) 세포-기질 및 세포-세포간의 접착에 관여하는 단백질들의 억제제가 줄기세포능 및 Redox 조절에 관여하는 유전자들의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실험 재료 및 방법

고분자 기질 제조

모든 고분자 및 고분자들의 공중합체는 Acta Biomater. 2012; 8(2):559-569에 기술된 바와 같이 합성하였다. 달리 명시하지 않는 한, 모든 인비트로 실험은 시판되는 스핀 코터(Laurell Technologies, North Wales, PA)로 제조된 스핀-코팅된 고분자 필름상에서 수행하였다. 15 mm 원형 유리 커버 슬립 (Fisher Scientific, Waltham, MA) 또는 10 cm Pyrex 배양 접시 (Corning, Inc., Corning, NY)를 먼저 100 % 에탄올 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 씻고, dH₂O로 희석시키고, 약 20 분 동안 80 $^{\circ}$ C로 가열하여 건조시켰다. 테트라하이드로푸란 (THF, Sigma-Aldrich)에 혼합된 특정 고분자의 1 % 중량/부피 (w/v) 용액을 유리 커버 슬립 (50 μ L 용액/샘플)에서 3000 rpm으로 30초 또는 또는 페트리 접시 (1 ML 용액/샘플)에서 1500 rpm로 2 분 동안 회전시켰다. 그런 다음 모든 샘플을 30 분 이상 동안 일정한 콜드 트랩 진공(cold-trap vacuum)에 노출시켜 과량의 용매를 제거하고 사용하기 전까지는 건조기에 보관하였다. 세포 실험을 위해, 기질은 사용하기 전에 각면에 대해 30-60 분 동안 자외선 멸균 처리하였다. 15 mm 커버 글래스에 대해, 샘플을 24-웰 플레이트에 놓고 오토 클레이브 실리콘 O-링 (McMaster Carr, Atlanta, GA)으로 고정시켰다.

단백질 사전 코팅 실험을 위해, 원하는 양의 인간 피브로넥틴(fibronectin) (Fisher Scientific)을 무혈청 α MEM으로 희석하고 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 이상 물질 표면에 흡착시켰다. 샘플을 PBS로 두 번 헹구고 배양 실험에 사용했다.

고분자 표면의 물리화학적 특성

단백질 흡착은 QCM-D (quartz crystal microbalance with dissipation)에 의해 측정되었다. 고분자는 스핀 코

터를 사용하여 3000rpm에서 10 mg/mL 용액의 ~50 μ L를 사용하여 30 초 동안 금 코팅된 수정 결정 (5MHz, QSX 301, QSense AB, Goetenberg, Sweden)에 스핀 코팅하였다 (Headway Research Inc., TX). 표준 프로토콜에 따라 10 % FBS가 포함된 37.5 ° C에서 Q-Sense E4 장비 (Q-Sense AB, Goetenberg, Sweden)를 사용하여 QCM-D 측정을 수행하였다. 데이터는 Q-Sense, Inc.에서 제공한 Q 도구 소프트웨어에서 Voigt 모델을 사용하여 분석하였다. 접착력은 10 μ L의 탈이온수를 사용하여 각도계 (Ram ι -Hart, Succasunna, NJ)로 수행하였다. 3 개의 독립적인 샘플 각각에 대해 3 회의 측정을 수행하였다 (n = 9).

[0034] 때로는 표면 계수 또는 탄성 계수라고도 하는 표면 근처의 탄성 표면 계수(Elastic surface modulus)는 사각 단면 (MLCT 팁 B; Bruker AFM Probes)을 갖는 캔틸레버(cantilever)를 사용하는 Veeco NanoScope V (Bruker Corporation, Billerica, MA)를 사용하여 측정하였다. 유리 커버 슬립을 대조 샘플로 사용하였고, 모든 스핀-코팅된 커버 슬립은 동일한 프로토콜을 사용하여 시험하였다. 샘플을 시험하기 전에 37 °C 공기 중에서 밤새 PBS에서 배양하였다. 5 μ m X 5 μ m 영역의 지형 스캔은 30 μ m/s 스캔 속도의 512 라인에 대해 512 샘플/라인을 샘플링하는 접촉 모드에서 수행하였다. 5 μ m의 z-제한은 팁 손상을 방지하기 위해 사용되었다. 샘플의 면적 평균 탄성 계수의 계산을 위해 힘의 볼륨 스캔(force volume scan)을 수행하였다. 지형 스캔과 동일한 영역에 걸친 16 X 16 그리드는 1.54 μ m/s에서 750 nm의 최대 모터 움직임으로 자국내졌다. 캔틸레버 빔의 휨-전압 곡선 d(V)의 보정은 커버슬립의 강성을 가정하여 유리 커버슬립 내로 일련의 자국을 사용하여 계산하였다. 상기 보정은 다음의 형태를 가진다:

$$d(\text{nm})=0.0000113V^2+0.00836V-12.3$$

[0035]

[0036] 상기 V는 단위 전압을 갖는다(n = 3; R2 = 0.997). Sader 방법은 힘이 F = kd와 같이 계산될 수 있도록 캔틸레버 강성 k(대략 0.02N/m)를 계산하는데 사용된다. 상기 자국의 깊이 u는 다음과 같이 계산된다:

$$u=(P-P_c)-(d-d_c)$$

[0037]

[0038] 상기 P는 스테이지의 절대 위치이고, P_c는 팁과 샘플 사이의 접촉점에서의 절대 위치이고, d_c는 접촉 지점에서의 캔틸레버의 편향이다. 이것은 힘-부피 이미지에서 각 샘플 포인트에 대해 힘-변위 F(u) 다이어그램을 생성하도록 한다. 이러한 데이터는 그 다음 실제 탐침 형상(true probe geometry)에 대해 수정된 원추형 인덴터 이론(conical indenter theory)을 사용하여 분석하였다. 이 결과는 Levenberg-Marquadt 피팅 알고리즘의 파라미터로 처리하여 최소 제곱법 센스(least-squares sense)로 탄성 계수 E를 계산하는데 사용하였다. F(u) 데이터의 예상 형태는 다음과 같다:

$$F(u)=\frac{2\beta\tan\alpha}{\pi}\frac{E}{1-\nu^2}u^2$$

[0039]

[0040] 여기서 α 는 자국 프로브(indentation probe)의 반각 (공칭 평균 71.25°)이고 $\beta = 1.023$ 은 비 압축성 (즉, 포아송 비 $\nu = 0.5$) 및 자국 프로브의 강성을 가정한 사각베이스를 갖는 프로브의 비대칭 보정 계수이다. 지역 평균 탄성 계수는 지형 스캔 중에 특정 지어지는 5 μ m X 5 μ m 영역 내에서 동일한 간격의 256개 위치 각각에 대해 결정된 계수를 평균화하여 구했다. 분석은 NanoScope Analysis v1.50 (Bruker)을 사용하여 수행되었다. 무작위로 선택된 10 개의 위치를 이 소프트웨어 패키지의 자국 분석 도구를 사용하여 분석하였다. 전체 힘 크기에 대한 10~70 %의 데이터가 분석에 포함되었다.

[0041]

¹H NMR은 CDCl₃ 중 1 % w/v 용액을 사용하여 400 MHz AV-400 콘솔 (Bruker Instruments, Inc.)상에서 수행하였다. 각각의 공중합체에 대한 몰 % 조성은 PEG ($\delta = 3.65$ ppm)의 CH₂CH₂ 양성자 및 $\delta = 4.05$ ppm에서의 PCL 피크의 ϵ -탄소를 나타내는 OCH₂ 양성자의 통합을 비교함으로써 결정되었다.

[0042]

분자량은 겔 투과 크로마토그래피로 측정하였다. 10 % w/v의 THF에 공중합체를 용해시킨 후, 중합체 용액을 이진 HPLC 펌프, 굴절률 검출기, 듀얼 λ 흡광도 검출기 및 시리즈로 연결된 4 개의 5 mm Waters 컬럼(300 mm X 7.7 mm)이 장착된 Waters 크로마토그래피 시스템을 통해 1 mL/분 속도로 주사하였다(Waters Corporation, Milford, MA).

[0043]

PEG 부피 %는 3 개의 방정식을 사용하여 계산되었다. 먼저, 각 공중합체에 대한 PCL 분자량은 다음과 같이 계산

되었다:

$$PCL M_w = \text{copolymer } M_w - \frac{(PEG \text{ mol}\% \times PEG M_w)}{100}$$

PEG 분자량은 겔 투과 크로마토그래피에 의해 보고된 제조자의 데이터 시트 및 공중합체 분자량으로부터 취하였다. 각 공중합체 중의 PEG 또는 PCL의 중량 %는 다음과 같이 계산하였다:

$$PEG \text{ wt}\% = \frac{100 (PEG \text{ mol}\% \times PEG M_w)}{(PEG \text{ mol}\% \times PEG M_w + PCL \text{ mol}\% \times PCL M_w)}$$

마지막으로, 각각의 공중합체의 PEG 부피 %는 다음과 같이 계산하였다:

$$PEG \text{ vol}\% = \frac{100 \left(\frac{PEG \text{ wt}\%}{1.234} \right)}{\left(\frac{PEG \text{ wt}\%}{1.234} + \frac{PCL \text{ wt}\%}{1.146} \right)}$$

상기 1.234 및 1.146은 각각 PEG 및 PCL의 밀도 (g/cm³)이다.

X 선 산란 실험(X-ray scattering experiments)에서 Pyrex 페트리 접시는 THF 중 40 % w/v 공중합체 용액으로 스핀 코팅하였다. 각 페트리 접시를 두 번 돌려서 접시 표면으로부터 손으로 떼어낼 수 있고 운반을 위해 쉽게 처리할 수 있는 필름을 생성하였고 2mm 석영 모세관에 삽입하기 위한 크기로 절단하였다. X-선 산란을 고분자를 PBS에 적어도 6 시간 동안 노출시킴으로써 (건조 조건) 전 및 습윤 후에 수행하였다. 작은- 및 중간각 X-선 산란을 뉴욕 Ithaca 소재 Cornell High Energy Synchrotron Source (CHESS) 시설에서 수행하였다. 파장은 1.055 Å이고, 시료 대 검출기 거리는 각각 작은- 및 중간각 산란에 대해 1479 및 416 mm이다. 방사선 손상은 각각 4 초 동안 10 회의 노출을 수집하여 모니터링 되었으며 방사선 손상은 관찰되지 않았다. BioXTAS RAW 0.99.14b 소프트웨어 (sourceforge.net의 오픈 소스)를 사용하여 작은 및 중간각 X-선 산란 데이터를 분석하였다. 넓은 각 X-선 산란 데이터를 회전 양극으로부터의 Cu Kα 방사선 및 88mm의 샘플 대 검출기 거리를 사용하여 브루커 (Bruker) 영역 검출기에서 수집하였다. 이 데이터를 JADE 소프트웨어 (Materials Data Inc., Livermore, CA)를 사용하여 분석하였다.

세포 배양

hMSC는 Lonza (Walkersville, MD)에서 구입하였고 Vanderbilt University Medical Center에서 65 세 이상의 환자로부터 Pampee P. Young 박사와 함께 이전에 발표된 방법 (표면 마커 표현형 데이터의 경우 그림 S9)에 따라 구입하였다. hMSCs는 16.7 %의 태아 소 혈청 (Life Technologies)을 갖는 뉴클레오사이드 (αMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA), 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (Life Technologies) 및 4 μg/mL plasmocin (InvivoGen, San Diego, CA)을 갖는 α 최소 필수 배지로 구성된 완전 배지(CM)에서 보관하였다. 세포를 37 °C 및 5 % CO₂에서 가습된 배양기에 보관하고 배지를 매주 2 회 교체하였다. ~ 80 % 융합(confluent) 때, hMSCs를 0.05 % 트립신-EDTA로 분리하고, 100-500 세포/cm²의 밀도로 다시 접종하고 융합에 도달하기 전에 7-14 일 동안 배양하였다. 모든 실험에서, hMSCs (6회 미만)는 Trypan blue 배제에 의해 결정된 바와 같이 10000 생존 세포/cm²의 밀도로 접종하고 마지막 실험 전에 3-4 일 동안 배양하였다.

억제제 연구

최적의 농도를 결정하기 위해 hMSCs를 다양한 농도의 억제제에 48 시간 동안 노출시켰다. 다음의 억제제 및 농도가 사용되었다: 30 μM BTT 3033 (인테그린 α2β1 억제제, Tocris, Avonmouth, Bristol, 영국), 30 μM P11 (인테그린 αvβ3/αvβ5 억제제, Tocris) 및 1 mg/mL GAP26 (Connexin-기반 억제제). 표준 고체상 플루오레닐 메틸옥시카보닐 클로라이드 화학에 의해 Rink amide-MBHA 수지상에서 PS3 합성기(Protein Technologies, AZ, Tucson)를 사용하여 GAP26 (Val-Cys-Tyr-Asp-Lys-Ser-Phe-Pro-Ile-Ser-His-Val-Arg)을 합성하였다. 이들 펩타이드를 절단하고 트리플루오로 아세트산/티오아니솔/에탄디티올/아니솔 (90/5/3/2) 중에서 탈보호시켰다. 펩타

이드의 형성은 액체 크로마토 그래피-질량 분석기 (LC-MS)에 의해 특징화되었다.

[0055] 억제 실험을 위해, 지시된 농도의 억제제를 hMSC 현탁액에 첨가하여 세포를 기질 위에 접종하였다. 유전자 발현 분석을 위해 RNA를 수확하기 전에 세포를 4 일간 배양하였다.

[0056] **세포 내 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)의 레벨 측정**

[0057] hMSCs는 제조업체의 지침에 따라 30 분 동안 무혈청 DMEM에서 10 μ M 5-(및 -6)-클로로메틸-2', 7'-디클로로디히드로플루오레신 디아세테이트 아세틸 에스테르 (DCFDA) (Life Technologies)로 배양하였다. 세포를 트립신 처리하고 적절한 무 염색 대조구를 갖는 FACS Calibur 유동 세포 계측기 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 상에서 작동시켰다. N=3 생물학적 복제가 기질 조건마다 수행되었다. FlowJo 소프트웨어 (Tree Star Inc., Ashland, OR)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0058] **초 고해상도 이미징**

[0059] hMSCs를 실온에서 15 분 동안 4 % 파라포름알데히드 (PFA, Sigma-Aldrich)로 고정시키고, 1X PBS로 3 회 세척한 후, 실온에서 5 분 동안 0.3 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich)로 투과시켰다. 1 차 anti-paxillin (카탈로그 번호 610051, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ) 및 2 차 AlexaFluor 568 염소 항-마우스 (카탈로그 번호 A11004, Life Technologies) 항체를 10 % 소 혈청 알부민 (Sigma-Aldrich)에 1 : 200 및 1 : 100으로 각각 희석하고 사용 전에 13000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 샘플을 실온에서 20 분 동안 10 % 소 혈청 알부민에서 차단하고, 실온에서 1 시간 및 45분 동안 1 차 항체 배양을 실시하고, 1X PBS로 3 회 세척한 다음, 실온에서 1 시간 동안 2차 항체 배양한 후 1X PBS로 3 회 세척하였다. 세포를 Vectashield (H-1000, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) 장착 배지에 장착하였다. 60 X 1.42 NA 오일 대물 렌즈 및 sCMOS 카메라가 장착된 GE Healthcare DeltaVision OMX에서 SIM 이미징(Structured illumination microscopy imaging)을 수행하였다. 이미지는 복제당 n = 3 이미지로 N = 3 생물학적 복제로부터 수집되었다. 3D 획득의 최대 투사 (Z)를 갖는 SIM 이미지는 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD)를 사용하여 분석되었다. 초점 접촉 너비(Focal adhesion width)는 ImageJ 1D 선 도구 (너비 = 10)를 사용하여 세포의 리딩 엣지를 가로지르는 선을 그리면서 계산되었다. 플롯(plot) 내 초점 접촉 영역을 식별하기 위해 선을 그린대로 픽셀 강도의 1D 플롯이 생성되었다. 반경 최대의 전폭(fwhm)을 각 초점 접촉의 너비 측정과 같이 사용하였다. 3 개의 이미지에서 최소 40 개의 세포 평균치를 각 그룹별로 나타내었다.

[0060] **웨스턴 블랏**

[0061] 웨스턴 블랏 분석은 기본 프로토콜에 따라 수행되었다. 이 연구에서 사용된 1 차 항체는 다음과 같다: Integrin- α 2 (1 : 200, sc-6586r, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), Integrin- β 3 (1 : 200, D7X3P, (1 : 200, D24A5, Cell Signaling Technologies), Connexin-43 (1 : 200, # 3512, Cell Signaling Technologies) Integrin- β 5 (1:200, D24A5, Cell Signaling Technologies), Connexin-43 (1:200, #3512, Cell Signaling Technologies), and GAPDH (1:5000, 14C10, Cell Signaling Technologies). Li-COR (Lincoln, NB)의 적절한 2 차 항체를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 오딧세이 이미징 시스템상에 블랏을 이미지화 하였다.

[0062] **유동 세포 계측법(Flow Cytometry)에 의한 면역 세포학 및 면역 표현형 분석**

[0063] hMSC를 15 분 동안 4 % 파라포름알데히드 (PFA, Sigma-Aldrich)로 고정시키고, 세포 내 표적을 탐침할 때 15 분 동안 0.3 % Triton-X (Sigma-Aldrich)로 투과시키고 10 % 염소 혈청 (Sigma-Aldrich)으로 2 시간 이상 동안 차단하였고, 모두 상온에서 수행되었다. 이어서 hMSCs를 1 % 소 혈청 알부민의 1 차 항체와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 인큐베이트한 후 실온에서 2 시간 동안 5 % 염소 혈청에서 1:500으로 적절한 2 차 항체와 인큐베이트 한 후 Hoechst (2 μ g/mL, Sigma-Aldrich)로 대조 염색하였다. 액틴 세포 골격을 염색하기 위해, 세포를 10 분 동안 Alexa488-phalloidin (1:40 v/v in PBS, Life Technologies)과 함께 인큐베이트한 다음, Hoechst (2 μ g / mL, Sigma-Aldrich)로 실온에서 20 분간 대조 염색하였다. 이미징은 Nikon Ti inverted 현미경 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) 또는 Zeiss LSM 710 공 초점 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 으로 수행하였고 이미지는 ImageJ (National Institutes of Health)로 처리하였다.

[0064] 유동 세포 계측법의 경우 염색되지 않은 hMSC를 사용하여 형광 및 산란 채널의 전압을 설정하였다. 단일 염색 hMSC를 사용하여 보상값을 결정하여 한 채널 내의 형광 신호가 양성으로 염색된 세포에서 명확하게 나타났다. 이어서, 세포를 FACS Calibur 유동 세포 계측기 (BD Biosciences)상에서 측정하였다. 각 실험은 10000개의 계

이트 셀을 나타내며, 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (Tree Star Inc., Ashland, OR)에 의해 분석되었다.

[0065] **정량 실시간 PCR (cPCR 및 qRT-PCR)**

[0066] 스핀 코팅된 기질상의 hMSCs를 Trizol reagent (Life Technologies)로 균질화하고 클로로포름 (1 : 5 Trizol : 클로로포름)과 혼합하고 원심 분리 (12000g, 15 분, 4 °C)하였다. 수용액상에 함유된 RNA를 RNeasy 컬럼 (Bio-Rad, Hercules, CA)으로 제조자의 지시에 따라 분리하였다. 키트(Applied Biosystems, Life Technologies)를 사용하여 cDNA를 합성하고, 15-20 ng cDNA 및 정방향 및 역방향 프라이머 각각 500 Nm를 가지고 SYBR Green 마스터 믹스 (Bio-Rad)로 CFX 실시간 PCR 시스템 (Bio-Rad)를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR 프로토콜은 95 °C에서 3 분간, 이어서 95 °C에서 30 초간 변성, 58 °C에서 30 초간 어닐링, 72 °C에서 30 초간 변성을 40 회 반복하였다. 해당 유전자의 발현을 하우스 키핑 유전자인 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 발현으로 정규화하여 $\Delta C(t)$ 값을 산출하였다. 본 발명에서 PCR에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1에 나열되어 있으며, 단일의 특정 앰플리콘을 나타내는 것들만 qRT-PCR 실험에 사용되었다.

표 1

[0068]

Gene	Accession Number	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (3' - 5')	Amplicon (bp)
<i>SOX2</i>	NM_003106.3	ATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG (서열번호 1)	CGCCGCCGATGATTGTTATT (서열번호 2)	172
<i>Nanog</i>	NM_024865.2	AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG (서열번호 3)	TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC (서열번호 4)	148
<i>SESN1</i>	NM_001199933	CGACCAGGACGAGGAAGTT (서열번호 5)	CCAATGTAGTGACGATAATGTAGG (서열번호 6)	273
<i>SOD2</i>	NM_000636	GCTGACGGCTGCATCTGTT (서열번호 7)	CCTGATTGGACAAGCAGCAA (서열번호 8)	101
<i>TRX</i>	NM_003329	TGAAGCAGATCGAGAGCAAGAC (서열번호 9)	TTCATTAATGGTGGCTTCAAGC (서열번호 10)	305
<i>APE/REF-1</i>	NM_001641	GCAGATACGGGTTGCTCTT (서열번호 11)	TTTACCGCGTTGCCCTACT (서열번호 12)	136
<i>CX43</i>	NM_000165.3	TCATTAGGGGAAGGCGTGA (서열번호 13)	GGGCACCACTCTTTTGCTTAAA (서열번호 14)	164
<i>ICAM-1</i>	NM_000201.2	TGTGACCAGCCCAAGTTGTT (서열번호 15)	TGGAGTCCAGTACACGGTGA (서열번호 16)	186
<i>N-Cadherin</i>	NM_001792	CGAGCCGCCTGCGTGCCAC (서열번호 17)	CGCTGCTCTCCGCTCCCCGC (서열번호 18)	199
<i>ITGA1</i>	NM_181501.1	ACGCTGCTGCGTATCATTC (서열번호 19)	CACCTCTCCCACTGGACAC (서열번호 20)	194
<i>ITGA2</i>	NM_002203.3.	TTAGCGCTCAGTCAAGGCAT (서열번호 21)	CGGTCTCAGGAAAGCCACT (서열번호 22)	179
<i>ITGA3</i>	NM_002204.2	GCTGACCGACGACTACTGAG (서열번호 23)	CTGGTCAACCAGTGCTTCTT (서열번호 24)	178

<i>ITGA5</i>	NM_002205.2	AGACTTCTTTGGCTCTGCCC (서열번호 25)	CGCTCCTCTGGGTGAACAT (서열번호 26)	174
<i>ITGA6</i>	NM_001079818.1	TCATGGATCTGCAAATGGAA (서열번호 27)	AGGGAACCAACAGCAACATC (서열번호 28)	135
<i>ITGA11</i>	NM_001004439	GCCTACTGAAGCTGAGGGAC (서열번호 29)	TGTGATTGAGCTGTGGAGCA (서열번호 30)	129
<i>ITGA_v</i>	NM_002210.4	TCCGATTCCAACTGGGAGC (서열번호 31)	AAGGCCACTGAAGATGGAGC (서열번호 32)	137
<i>ITGB1</i>	NM_002211.3	GCGCGGAAAAGATGAATTTACAAC (서열번호 33)	ATCTGGAGGGCAACCCTTCT (서열번호 34)	245
<i>ITGB3</i>	NM_000212.2	ACCAGTAACCTGCGGATTGG (서열번호 35)	TCCGTGACACACTCTGCTTC (서열번호 36)	208
<i>ITGB5</i>	NM_002213.3	TACCTGGAACAACGGTGGAG (서열번호 37)	GCTTCGGGCCTCCAATGATA (서열번호 38)	242
<i>GAPDH</i>	NM_002046.4	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC (서열번호 39)	TGGTGAAGACGCCAGTGA (서열번호 40)	138

[0069] 세포 증식 측정

[0070] hMSCs는 96 시간 배양 기간이 완료되기 전에 12 시간 동안 무혈청 배지에서 10 μ M 5-에티닐-2'-데옥시우리딘 (EDU) (Life Technologies, Carlsbad, CA)로 배양하였다. 세포를 4 % 파라포름알데히드 (PFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 고정시키고 제조자의 지시에 따라 처리하였다. Zeiss LSM 710 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 이미지를 촬영하고 이미지를 Zeiss Zen 소프트웨어 및 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD)로 처리하였다. N = 6 생물학적 복제가 기질 조건마다 사용되었다.

[0072] 결과

[0073] 공중합체 라이브러리의 합성

[0074] 우리는 소수성 및 단백질 흡착성을 갖는 PCL; 친수성 및 세포-반발력을 갖는 PEG; 및 친수성이지만 단백질과 친화력을 갖는 cPCL(carboxylated-PCL) 중 둘 이상을 중합한 공중합체 기질을 제조하였다. 구체적으로, 화학식 1로 표시되는 PEG-PCL 공중합체 및 도 1A에 도시된 PEG-PCL-cPCL 공중합체 기질을 중합하였으며, 공중합체를 이루는 각 고분자의 물분율을 변화시키고, 특히, PEG의 경우 다양한 사슬 길이(분자량)를 가진 PEG를 이용하여 공중합체를 제조하였다.

[0075] cPCL은 PEG의 세포 반발력이 줄기세포의 행동에 어떤 영향을 미치는지를 확인하기 위해 PEG의반발력에 대한 "구조(rescue)" 물질로 도입하였다.

[0076] 공중합체의 구성이 인간 유래 중간엽 줄기세포(hMSC)의 줄기세포능 및 Redix 표현형에 미치는 영향

[0077] 우리는 제조된 공중합체로 이루어진 기질에 hMSC를 배양하여 hMSC의 행동을 관찰하였다. 그 결과, 단백질 흡착성(도 1B) 및 접촉각(도 1C)은 공중합체 내 PEG 몰 %에 따라 변하는 것을 확인하였다. 이는 PEG 함량이 증가하면 더 많은 친수성 및 단백질-반발 표면을 야기하므로, 공중합체 내 PEG 몰 %가 증가하면 단백질 흡착성 및 접촉각이 감소함을 확인하였다. 그러나 이러한 효과들은 친수성이지만 단백질과 친화력을 갖는 cPCL(carboxylated-PCL)을 도입함으로써 정반대의 효과를 보였다.

[0078] 또한, hMSCs는 PEG-PCL 공중합체 기질상에서는 응집체를 형성하였지만 100 % PCL 및 cPCL 포함 공중합체(도 1D) 기질에서는 넓게 퍼져나감을 확인함으로써 PEG의 기능적 반발력 및 PCL 및 cPCL의 접착성을 입증하였다.

- [0079] 우리는 다음으로 자가 재생 및 분화 능력을 유지하는 두 가지 기본 줄기세포능(stemness) 유전자 인 *NANOG*와 *SOX2*의 공중합체 매개 조절을 평가했다. 반발력이 줄기세포를 조절할 것이라는 우리의 가설을 뒷받침할 때, 한 공중합체 10 % PEG-90 % PCL는 세포 내 ROS 감소와 함께 TCPS 대조군에 비해 *NANOG*와 *SOX2*의 발현을 유의하게 증가시켰다 (도 1E, 1F 및 도 1G).
- [0080] 또한, 미분화 hMSCs의 가장 일반적으로 사용되는 생체 내 마커인 STRO-1의 발현은 TCPS에서 체외 배양 동안 점차적으로 손실되지만 10 % PEG-90 % PCL에서 복원되었다 (도 1H). mol % PEG를 추가로 25 % PEG-75 % PCL로 증가시키면 줄기세포의 발현이 감소함을 확인하였고 이는 25 % PEG의 높은 반발 표면(데이터는 나타나지 않음)으로 인해 세포 부착이 없는 큰 영역이 생성되었기 때문인 것으로 판단되었고, 상기 PEG의 물분율을 세포 반발력의 상한선으로 정하였다.
- [0081] **공중합체 필름 화학이 hMSC의 행동에 미치는 영향의 검증**
- [0082] 공중합체 조성을 변화시키지 않고 반발력 영역을 마스킹하기 위해 공중합체 표면을 다양한 농도로 접착성 피브로넥틴 (FN)으로 미리 코팅하였다. FN은 응집을 줄이면서 세포 부착과 퍼짐을 수행하였다 (도 2A). 8 시간 후, 코팅되지 않은 공중합체 및 $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ FN가 코팅된 10 % PEG-90 % PCL상의 hMSC는 독립적인 응집체 (적색 화살표)를 형성하였고, 72 시간 후 세포는 신장되었지만 여전히 응집된 상태로 세포-세포 상호작용을 보였다. qPCR의 경우 TCPS 및 HD는 각각 반발력이 없는 대조군으로 사용하였다. 10 % PEG-90 % hMSCs는 HD와 비슷한 수준의 *NANOG* 및 *SOX2* 발현을 보였으나 FN 농도가 증가함에 따라 이 효과는 감소하였다 (도 2B 및 C). 참고로, 재료의 강성의 효과를 평가하는 것을 목표로 하는 대부분의 공지된 생체 재료 시스템에서 재료는 재료 파생 효과를 저해하지 않는 접착성 단백질 층으로 코팅된다. 따라서 FN 사전 코팅 또한 아래에 있는 재료의 강성이 변하지 않고 관찰된 줄기세포능의 변화가 없어지기 때문에 기질의 강성의 변화는 우리 시스템의 표면 반발력보다 줄기세포의 행동변화에 덜 효과적임을 시사한다.
- [0083] **PEG 사슬 길이 및 물분율의 변화에 따른 hMSC의 표현형 평가**
- [0084] 공중합체 내 PEG의 사슬 길이 및/또는 몰 %를 조절하여 세포 반응을 추가로 확인하였다. (i) 5-20mol %의 PEG 및 (ii) 750Da, 2kDa 또는 5kDa의 블록 길이 (아래 첨자 번호로 표시됨)를 포함하는 공중합체를 전술한 바와 같이 합성하고 특성화하였다. 배양 4 일 후에, PEG₇₅₀ 공중합체는 부착을 허용하였으나, PEG의 몰 %가 증가함에 따라 감소하였다 (도 3A).
- [0085] 이러한 경향은 10 몰 % PEG가 세포 부착을 억제하는 것과 같은 PEG_{2k} 공중합체에서 더욱 명백하였고, PEG_{5k} 공중합체에서는 사실상 부착이 관찰되지 않았다. 두 가지 변수에 대한 추가 연구를 위해 (1) 일정한 몰 %에서 증가된 PEG 사슬 크기 및 (2) 일정한 PEG 사슬크기에서 증가된 몰 %와 같은 변수에 대한 추가 연구를 위해 4 개의 공중합체 (5 % PEG₇₅₀, 20 % PEG₇₅₀, 5 % PEG_{2k} 및 10 % PEG_{2k})를 선별하였다 (도 3A, B, 빨간색 문자).
- [0086] PEG₇₅₀ 공중합체상의 hMSC는 표면과 상호작용하고 연장되었지만, PEG_{2k} 공중합체상의 세포는 보다 고립된 응집체를 생성하였다 (도 3B). *NANOG* (도 3C) 및 *SOX2* (도 3D)의 발현은 PEG 사슬 길이 및 mol % 모두에 의해 크게 영향을 받았다. *NANOG* 발현은 모든 공중합체에서 TCPS 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 10 % PEG_{2k}에서도 계속 증가하였다. 더 긴 PEG 사슬 (2 kDa 대 750 Da)으로 구성된 공중합체는 *SOX2* 유전자의 발현을 더 자극하였고, 각 그룹 내의 PEG의 몰 % 증가 (10%/20% 대 5%)는 이 효과를 더욱 강화시켰다. 모든 공중합체에서 sestrin 1 (SESN1), thioredoxin (TRX), superoxide dismutase 2 (SOD2), apurinic endonuclease/redox-factor 1 (APE/Ref-1)을 포함한 주요 항산화 매개체의 발현이 증가했다. (도 3E-H) 및 세포 내 ROS 부하 (도 3I)는 TCPS에 비해 유의하게 감소하였다.
- [0087] **PEG 및 PCL 상 분리의 나노 및 용스트림 레벨에서의 조사**
- [0088] 세포-물질 계면에서 고분자 구조가 세포 기능에 어떻게 영향을 미치는지 이해하기 위해, 공중합체 표면의 나노 스케일 특성을 X-선 산란 (X-ray scattering, XRS)으로 조사하였다. PEG가 PCL 라멜라의 형성을 방해하지 않는다는 것을 확인하는 작은 각 XRS 층상 피크 (도 4A) 및 PCL 도메인과 관련된 광각 XRS 결정 피크 (도 4B)가 모든 샘플에 존재한다. PEG가 결정화될 것으로 기대되는 PEG_{2k} 및 PEG_{5k}의 모든 샘플에서 PEG 결정 피크의 부재는 PEG 결정화가 공중합체에서 중단됨을 시사한다. 또한, 이 두 관찰 결과는 PEG 사슬이 반결정성 PCL의 비결정성 도메인 내에 비결정성 분절로서 매립된다고 결론내릴 수 있다. 그러나, 공중합체의 형태에 대한 PEG 분절의 영향은 그의 사슬 길이에 의존한다. 예를 들어, 수화시 PEG₇₅₀ 공중합체의 PCL 결정성은 변하지 않았지만 (도 4C),

중간각 XRS는 넓어졌으며, 이것은 공중합체의 PCL 사슬은 수화되면 덜 정렬됨을 가리킨다. 대조적으로, 100 % PCL 및 PEG_{2k} 및 PEG_{5k}의 공중합체에서의 PCL 결정화도는 수화시 증가하고, 중간각 XRS 피크는 가파르며 수화시 PCL 결정 열이 증가하거나 변화하지 않는 것을 나타낸다.

[0089] 우리의 데이터와 관련하여, 비록 PEG가 PCL 라멜라(lamellae)의 형성을 방해하지는 않지만, 그것의 사슬 길이 의존적 분포는 라멜라의 특성에 영향을 미친다 (도 4D): PEG₇₅₀ 공중합체 내의 더 짧은 PEG 분절은 비결정성 기질에 분산되고, 습윤시 PCL 결정질을 감소시킨다. 대조적으로, PEG_{2k} 및 PEG_{5k} 공중합체에서 보다 긴 PEG 분절은 비결정성 PCL로부터 배제되므로 습윤시 증가된 PCL 결정성을 허용한다. 이러한 배제된 PEG 분절은 수화시에 팽창하고, 물질 표면에서 버섯 모양을 만들고, 세포 부착을 중단시키는 루프를 형성한다 (도 4E). 이러한 루프는 수화시 100% PCL과 비교하여 PEG₇₅₀ 및 PEG_{2k}에서 라멜라 간격의 증가를 설명한다; 즉, 즉 팽윤된 PEG 도메인은 물리적으로 젖은 상태에서 결정성 PCL 라멜라를 밀어낸다 (도 4D). 사실, 고분자 표면에 형성된 PEG 루프는 PEG_{2k} 및 PEG_{5k} 공중합체의 향상된 세포 반발 효과를 설명하는 방어 표면을 만든다. 따라서, PEG 사슬은 hMSC 행동 조절에서 사슬 길이 의존성 효과를 나타낸다. 삽입된 PEG₇₅₀ 사슬은 중합체-공기/물 계면으로 집합적으로 확산할 수 없으므로 주어진 물 %에서 반발력이 감소한다. PEG_{2k} 및 PEG_{5k} 공중합체는 수화시 상분리된 PEG 사슬이 재료 표면에 고리를 형성하여 접착성, 비결정성 PCL를 마스크하여 각 mol %에서 효과를 증가시키기 때문에 심지어 5mol %에서도 증가된 반발력을 나타낸다.

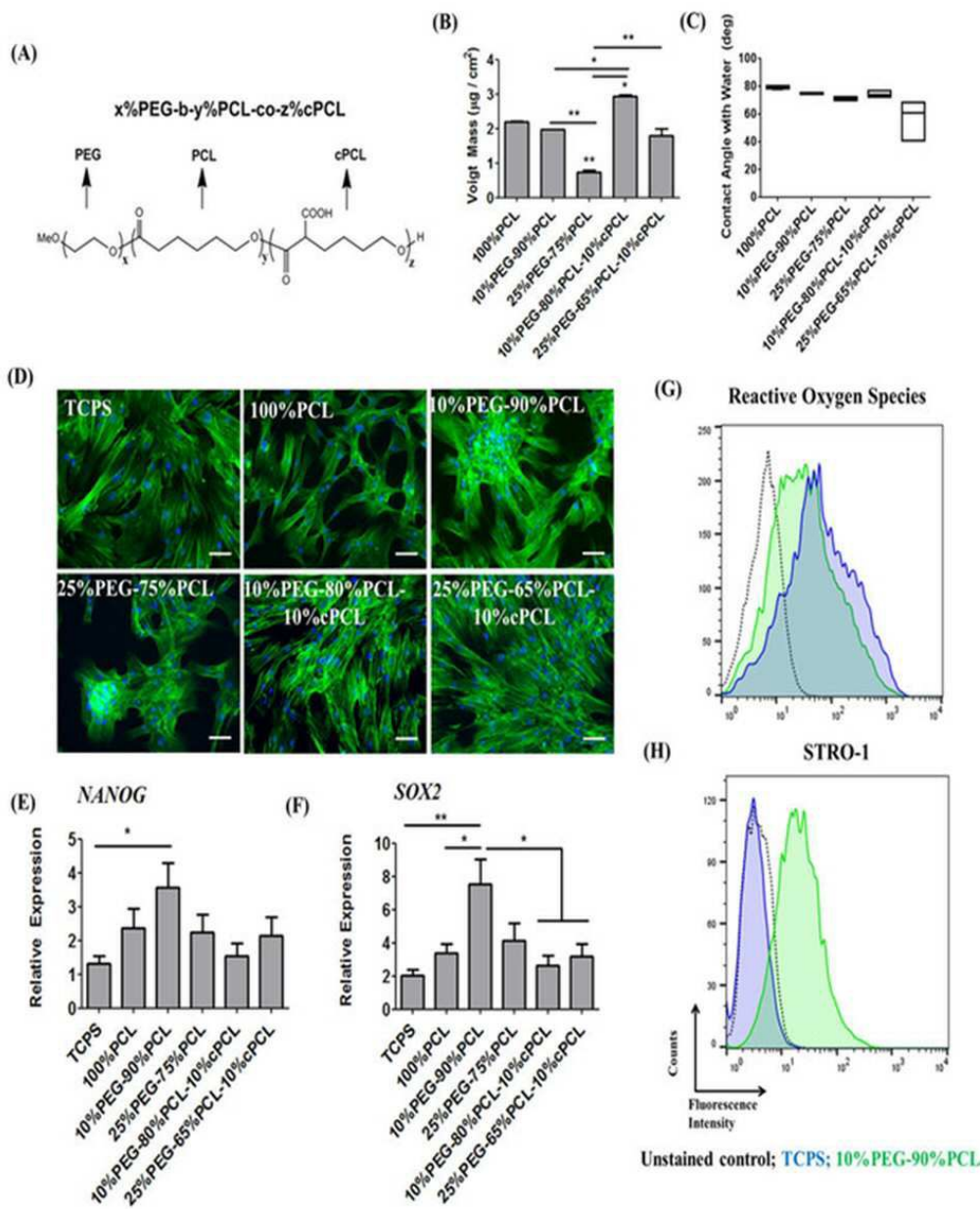
[0090] hMSC가 PEG 사슬 길이에 따라 다르게 세포-물질 계면을 인지하는 것을 증명하기 위해, 우리는 초 해상도, 구조화된 조명 현미경을 사용하여 세포-물질 계면에서 국소 부착(focal adhesion, FA) 형성을 시각화했다. 주요 FA 단백질인 paxillin은 물질 표면에서 비 일시적인 접착착물을 형성하기 위해 선택되었다 (도 5). 유리 및 100 % PCL 기질에서 배양된 세포는 큰 FA 부위를 가지며, 5 % PEG₇₅₀ 및 20 % PEG₇₅₀ 공중합체는 유사한 형태를 나타내는 FA를 형성하고, 짧은 PEG 사슬은 물질 표면에서 세포 부착을 방해하지 않음을 확인하였다 (도 5A). 대조적으로, 5 % PEG_{2k} 및 10 % PEG_{2k}에서는 FA 영역의 크기 및 수가 감소하였다. FA 폭 감소 및 장축 연장은 약한 세포-기질 결합과 관련이 있으며, PEG_{2k} 공중합체에서 관찰된 FA는 약한 세포-물질 상호 작용을 나타낸다. 정량화한 경우, FA 폭은 유리 및 100 % PCL과 비교하여 PEG₇₅₀ 공중합체에서는 유사하지만 PEG_{2k} 공중합체에서 표면 결정성이 유의적으로 감소하였다 (도 5B). 기질은 표면 거칠기에 영향을 미쳐서 FA 형성에 영향을 미칠 수 있다. 그러나, 도 4C에 제시된 데이터에 기초하여, 모든 공중합체에 대한 젖은 표면이 동일한 결정화도를 갖기 때문에, 결정성에 의해 야기되는 표면 조도의 차이는 작다. 따라서, FA 형태의 차이는 공중합체 골격 화학 반응 (PEG 입체 장애 효과)에 기인한 것으로 판단할 수 있었다.

[0091] **hMSC 공여자에 따른 줄기세포의 줄기세포능 및 Redox 표현형에 대한 공중합체의 효과 입증**

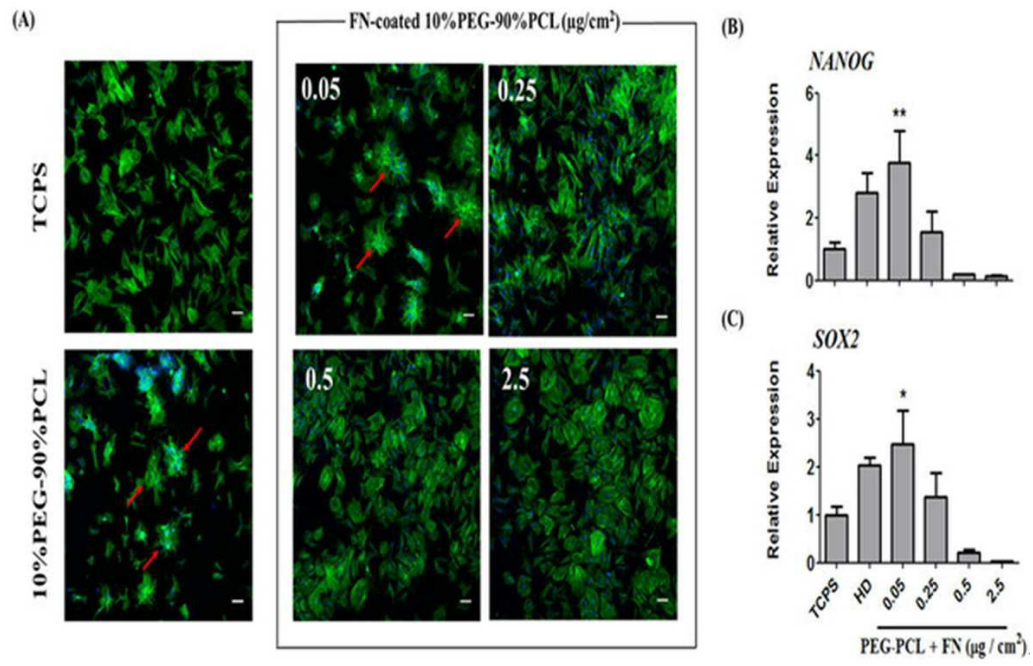
[0092] 물질의 효과가 공여자 의존성에 의한 것인지 여부를 입증하기 위해 전술한 실험과정에서 강한 세포 반응이 5 % PEG_{2k} 공중합체에서 일관되게 관찰되었기 때문에 3 개의 환자로부터 유래된 hMSC를 5 % PEG_{2k} 공중합체에서 시험하였다. 모든 공여자에 대해 TCPS와 비교하여 5 % PEG_{2k}에서 *NANOG* 및 *SOX2*의 발현이 유의하게 증가했으며 (도 6A-C) 거의 모든 경우 항산화 유전자의 발현이 증가했다 (도 6D-F). 세포 내 ROS 수준은 TCPS 대조군에 비해 공중합체에서 배양된 모든 환자 세포에서 감소했다 (도 6G). 세포-세포 및 세포-기질 접착의 균형이 이러한 효과를 유도하기 위해 가정되었기 때문에, 우리는 다중 세포 부착 분자 및 인테그린 아형의 유전자 발현을 측정하였고 (도 7A), CX43, 인테그린 $\alpha 2$ (ITGA2) 및 인테그린 $\beta 3/\beta 5$ (ITGB3/B5)를 물질 유도 효과의 후보 조절자로 선정하였다. 억제제 처리를 통한 단백질 수준의 발현 증가를 웨스턴 블롯으로 확인하였다 (도 7B). 상기 조절자를 억제하자, 특히 CX43의 억제가 줄기세포능 (도 7C) 및 항산화 관련 유전자 (도 7D)의 발현을 가장 강력하게 억제함을 확인하였다.

도면

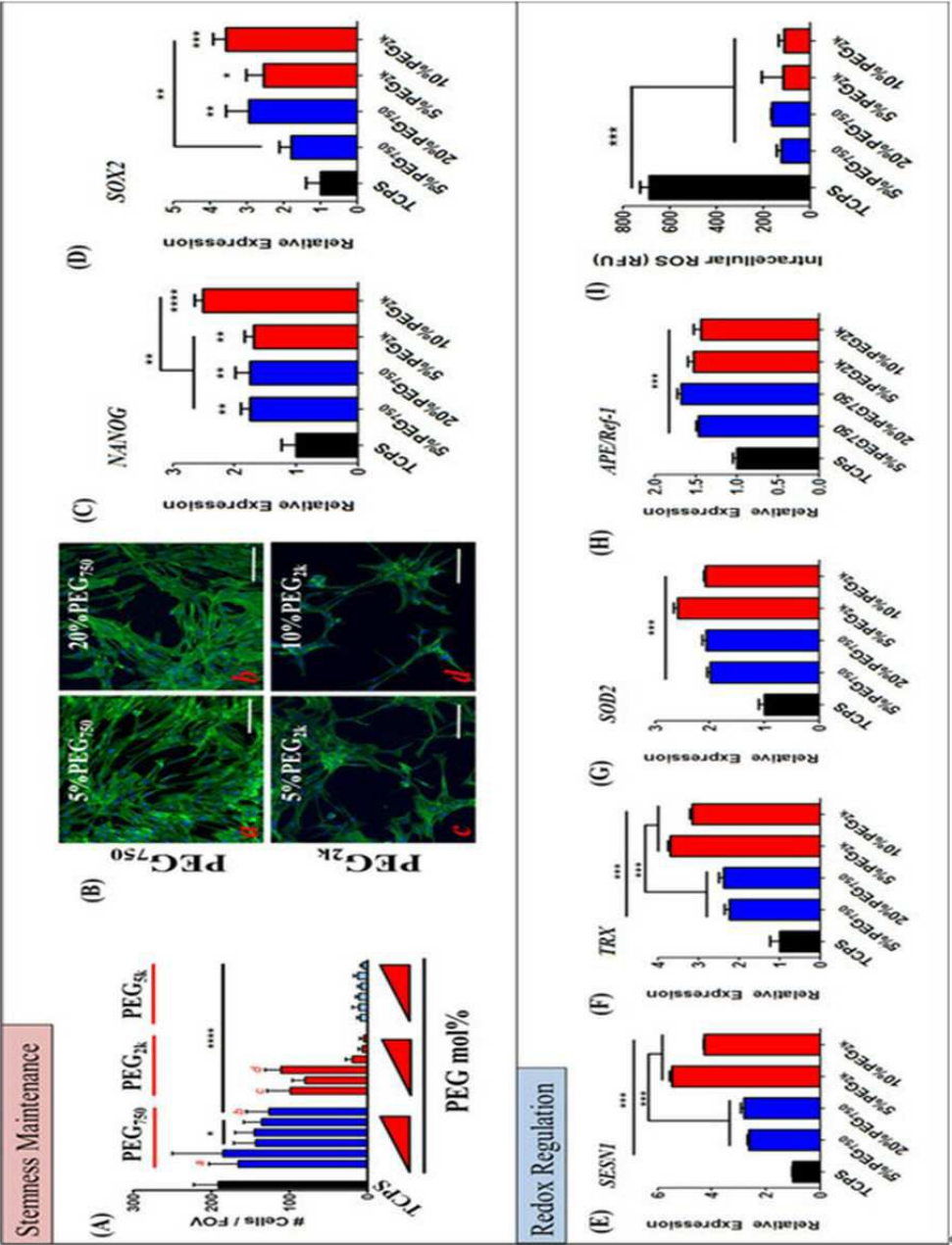
도면1



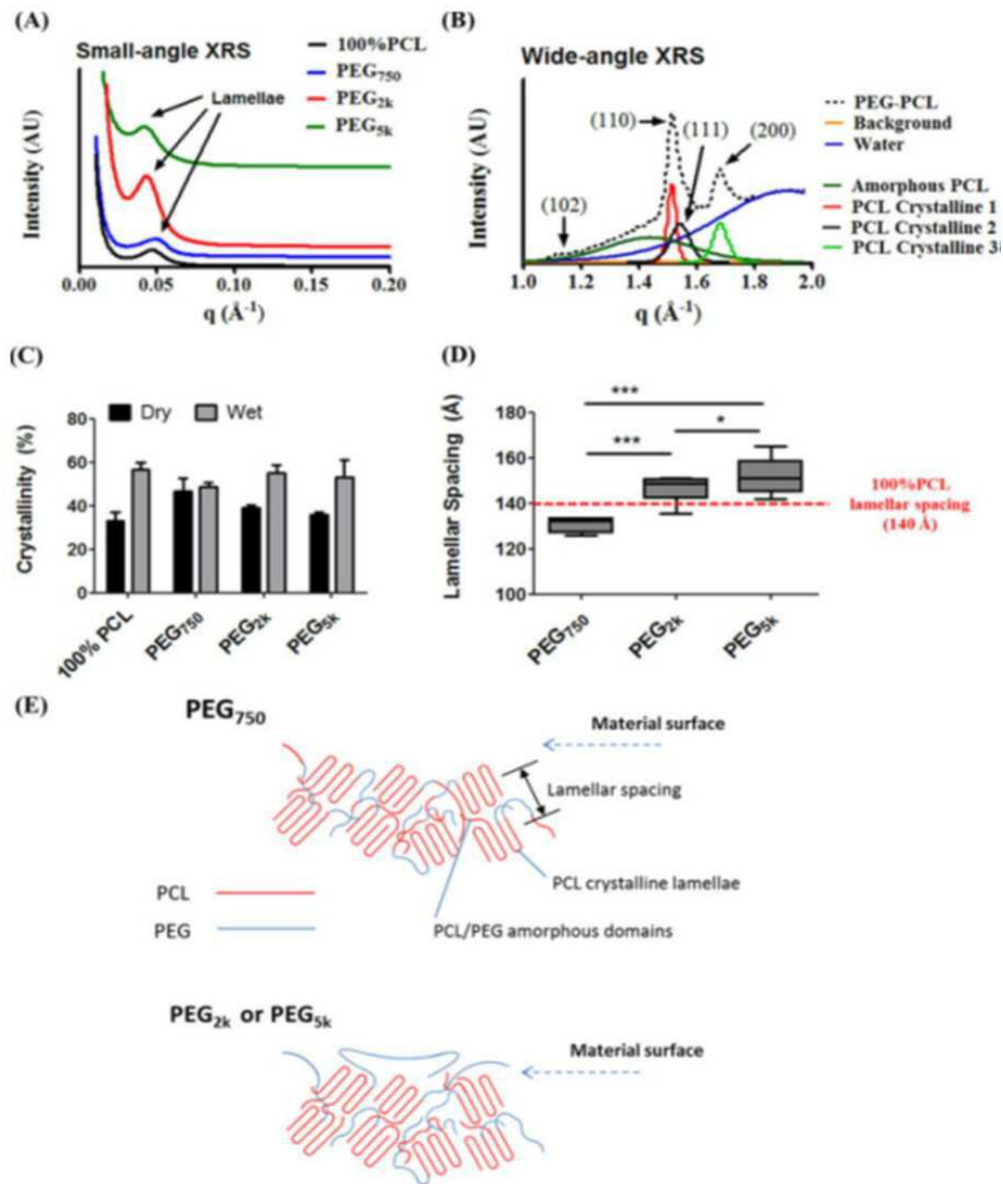
도면2



도면3



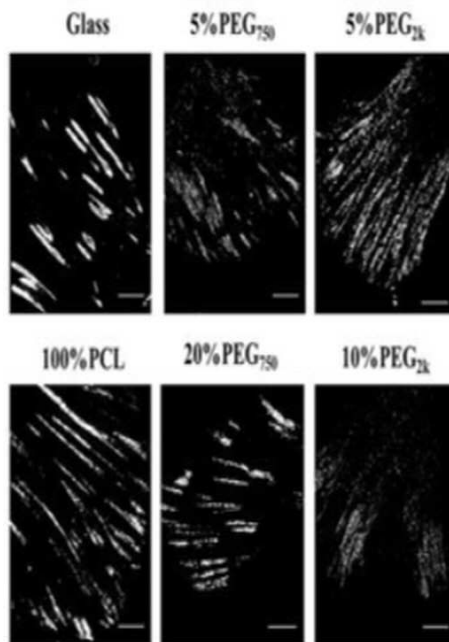
도면4



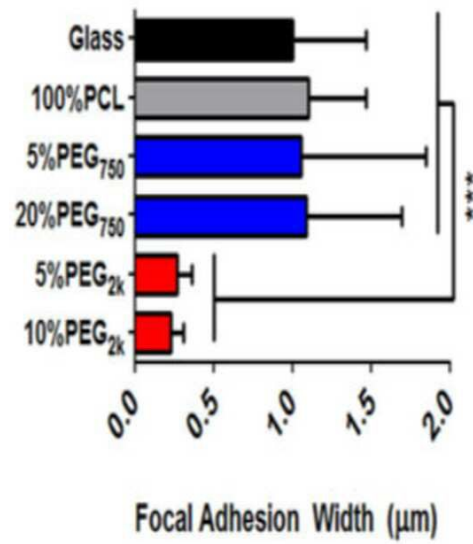
도면5

(A)

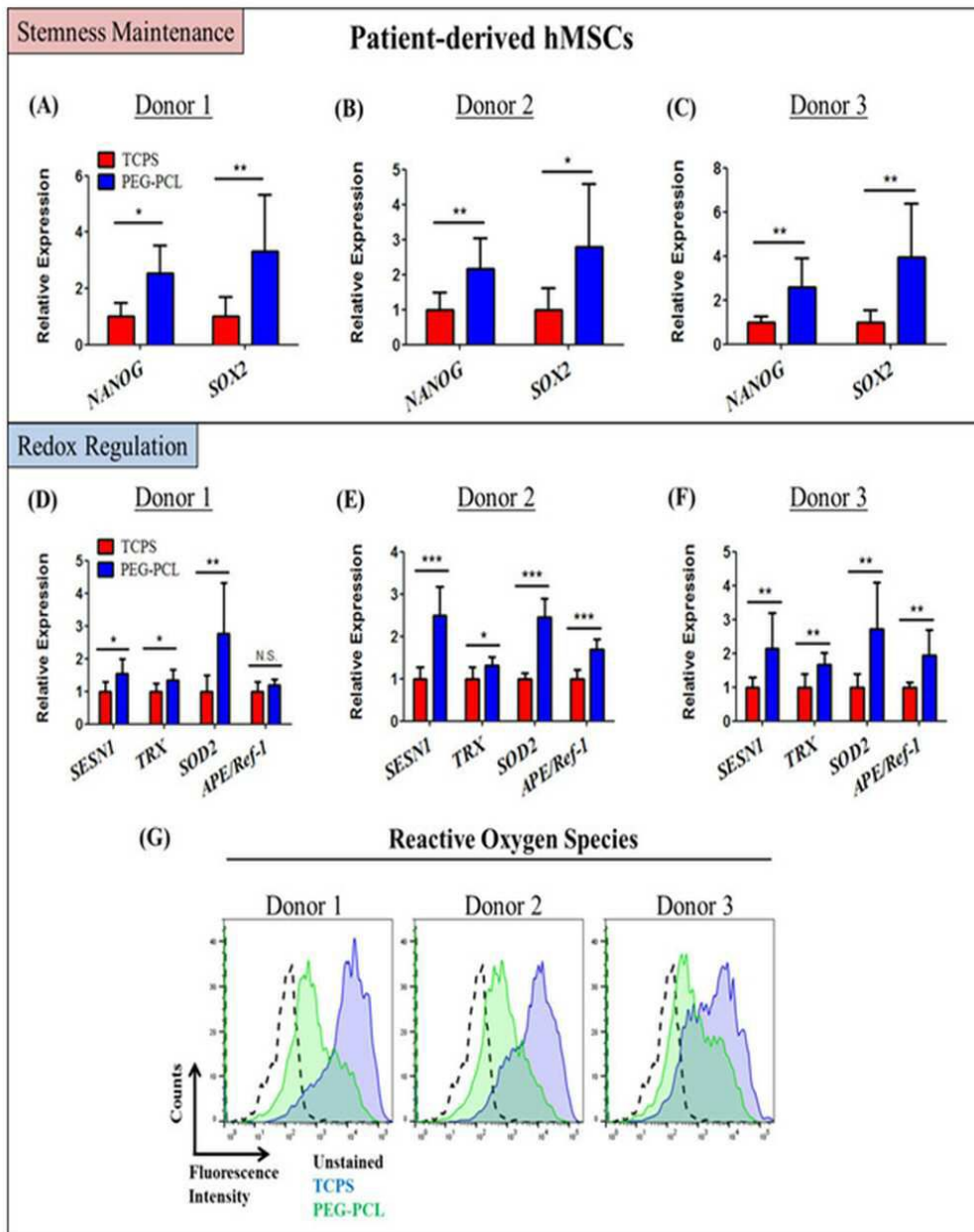
Paxillin – Super-resolution microscopy



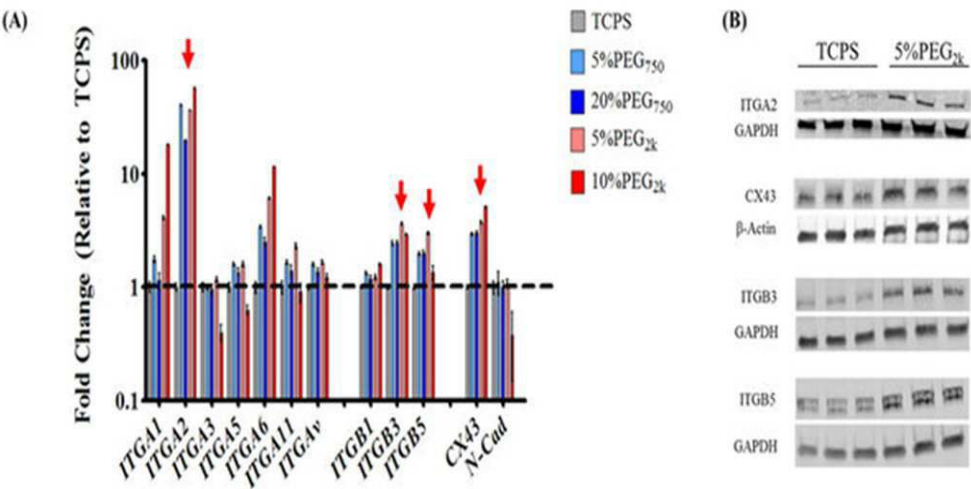
(B)



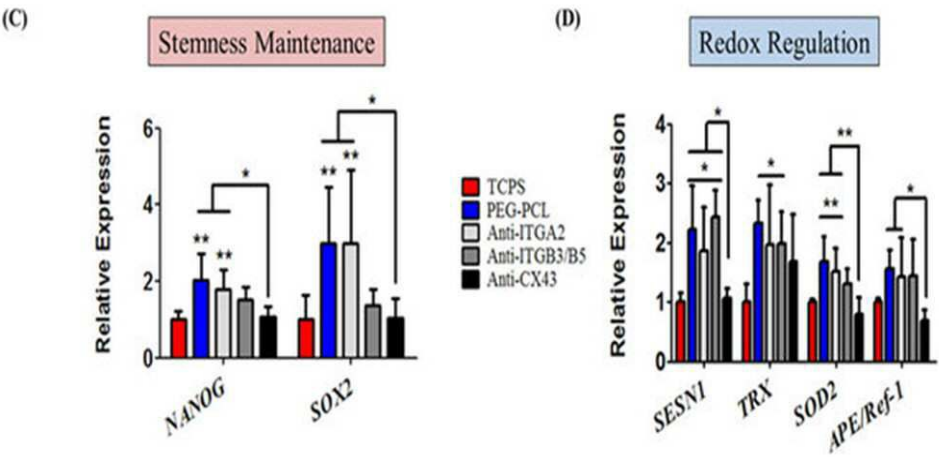
도면6



도면7



Adhesion molecule inhibition



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A stem cell culture composition comprising a copolymer capable of controlling stemness
- <130> P18U18C1818
- <150> KR 10-2017-0171216
- <151> 2017-12-13
- <160> 40
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX2 Forward Primer

<400> 1

atcaggagtt gtcaaggcag ag 22

<210> 2

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX2 Reverse Primer

<400> 2

cgccgccgat gattgttatt 20

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanog Forward Primer

<400> 3

aatacctcag cctccagcag atg 23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanog Reverse Primer

<400> 4

acgctgctgc gtatcattca 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SESN1 Forward Primer

<400> 5

cgaccaggac gaggaactt 19

<210> 6

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SESN1 Reverse Primer
 <400> 6
 ccaatgtagt gacgataatg tagg 24
 <210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SOD2 Forward Primer

 <400> 7
 gctgacggct gcatctgtt 19
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SOD2 Reverse Primer
 <400> 8
 cctgatttgg acaagcagca a 21
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TRX Forward Primer
 <400> 9
 tgaagcagat cgagagcaag ac 22
 <210> 10
 <211> 22

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TRX Reverse Primer
 <400> 10

ttcattaatg gtggcttcaa gc	22
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> APE/REF-1 Forward Primer	
<400> 11	
gcagatacgg ggttgctctt	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> APE/REF-1 Reverse Primer	
<400> 12	
ttttaccgcg ttgccctact	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CX43 Forward Primer	
<400> 13	
tcattagggg gaaggcgtga	20
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CX43 Reverse Primer	
<400> 14	
gggcaccact cttttgctta aa	22
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> ICAM-1 Forward Primer

<400> 15

tgtgaccagc ccaagttgtt 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICAM-1 Reverse Primer

<400> 16

tggagtccag tacacggtga 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-Cadherin Forward Primer

<400> 17

cgagccgcct gcgctgccac 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-Cadherin Reverse Primer

<400> 18

cgctgctctc cgctccccgc 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITGA1 Forward Primer

<400> 19

acgctgctgc gtatcattca 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA1 Reverse Primer
 <400>
 > 20
 cacctctccc aactggacac 20
 <210> 21
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA2 Forward Primer
 <400> 21
 ttagcgctca gtcaaggc 18
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA2 Reverse Primer
 <400> 22
 cggttctcag gaaagccac 19
 <210> 23
 <211>
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA3 Forward Primer
 <400> 23
 gctgaccgac gactactgag 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA3 Reverse Primer
 <400> 24
 ctggtcaccc agtgcttctt 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA5 Forward Primer
 <400> 25

agacttcttt ggctctgccc 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA5 Reverse Primer
 <400> 26

cgctcctctg ggttgaacat 20

<210> 27
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA6 Forward Primer
 <400> 27

tcatggatct gcaaatgg 18

<210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA6 Reverse Primer
 <400> 28

agggaaccaa cagcaaca 18

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGA11 Forward Primer

<400> 29
gcctactgaa gctgaggac 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ITGA11 Reverse Primer
<400> 30
tgtgattcag ctgtggagca 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ITGA1 Forward Primer
<400> 31
tccgattcca aactgggagc 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ITGA1 Reverse Primer
<400> 32
aaggccactg aagatggagc 20

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ITGB1 Forward Primer

<400> 33
gcgcggaaaa gatgaattta caac 24

<210> 34
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGB1 Reverse Primer
 <400> 34
 atctggaggg caacccttct 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGB3 Forward Primer
 <400> 35
 accagtaacc tgcggattgg 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGB3 Reverse Primer
 <400> 36
 tccgtgacac actctgcttc 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGB5 Forward Primer
 <400> 37
 tacctggaac aacggtggag 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ITGB5 Reverse Primer
 <400> 38
 gcttcgggcc tccaatgata 20
 <210> 39

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH Forward Primer	
<400>	39	
	gcaccgtcaa ggctgagaac	20
<210>	40	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH Reverse Primer	
<400>	40	
	tggatgaagac gccagtgga	19