



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0018000
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61K 47/30 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01) A61L 27/58 (2006.01)
B82Y 5/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/56 (2013.01)
A61K 47/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0102823

(22) 출원일자 2016년08월12일
심사청구일자 2017년11월07일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

장재형

서울특별시 마포구 상암산로1길 92, 712동 1202호(상암동, 상암월드컵파크 7단지)

박국인

서울특별시 서초구 잠원로12길 5, 336동 803호(잠원동, 신반포18차아파트)

이슬기림

서울특별시 서대문구 연세로 50, 미르빌 302호 (창천동)

(74) 대리인

특허법인다나

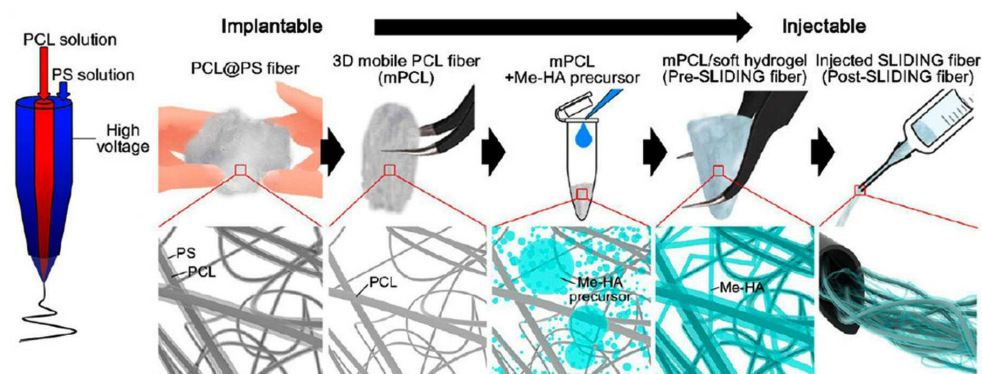
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드는, 3차원 전기방사된 생분해성 고분자 나노섬유에 하이드로젤을 코팅시킴으로써, 3차원적으로 세포를 성장시킴과 동시에, 단순 주사를 통해 이를 생체 내 원하는 부위에 전달 가능하게 하였다. 또한, 상기 스캐폴드를 이용한 세포 또는 약물의 전달 과정에서, 주사에 의한 세포의 이탈을 최소화시키면서, 세포 증식 활성을 높게 유지할 수 있었으며, 하이드로젤 성분에 따라 약물 방출 속도를 효과적으로 조절할 수 있음을 확인하였는바, 본 발명은 세포 또는 약물 치료 분야의 핵심기술로 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0024 (2013.01)
A61L 27/18 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01)
A61L 2400/06 (2013.01)
A61L 2400/12 (2013.01)
A61L 2400/18 (2013.01)
A61L 2430/00 (2013.01)
B82Y 5/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2007-0056558
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 ERC/패턴 직접형 능동 폴리머 소재센터(3/3,3단계)(2007.9.1.~2016.2.29.)
기 여 율 1/4
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A03003553
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 중추신경재생을 위한 신축성-주입형-자기조립 적층형 스마트 나노섬유 스캐폴드 개발(1/3)
기 여 율 1/4
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1564
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 첨단의료기술개발사업
연구과제명 2세부) 인간신경줄기세포 특이적 신개념 아데노부속바이러스(AAV r3.45)를 활용한 유전자-세포치료기술의 임상적용 프로토콜 정립
기 여 율 1/4
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A9D3046431
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 아데노부속바이러스 기반 human NK/T세포 타겟팅 유전자전달 시스템개발
기 여 율 1/4
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2016.08.01 ~ 2017.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 생분해성 고분자 나노섬유 및 하이드로젤 전구체 용액을 혼합하는 단계; 및
- b) 상기 생분해성 고분자 나노섬유 표면에 하이드로젤을 코팅시키는 단계를 포함하는, 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생분해성 고분자 나노섬유는, 코어 부분에 생분해성 고분자 용액을, 셸 부분에는 폴리스티렌 용액을 전기방사하여 코어-셸 구조의 나노섬유 전기방사체를 형성하는 단계; 및

상기 나노섬유 전기방사체에서 셸 부분의 폴리스티렌을 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 생분해성 고분자는, 폴리카프로락톤, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락테이트-co-글리콜산, 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발러레이트) (PHBV), 폴리(L-락타이드-co-카프로락톤), 폴리(L-락타이드-co-D-락타이드), 젤라틴, 콜라겐, 및 엘라스틴 유사 펩타이드 (elastin-like peptide)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤 전구체 용액은, 용액 전체 중량에 대하여, 하이드로젤 전구체를 2 내지 20 중량%로 함유하는 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤을 형성하는 고분자의 탄성계수는 10 내지 100Pa인 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤을 형성하는 고분자의 압축계수는 0.1 내지 2kPa인 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤을 형성하는 고분자는, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 폴리에틸렌옥사이드 (PEO), 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트 (PHEMA), 폴리아크릴산 (PAA), 폴리비닐알코올 (PVA), 폴리 (N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리락트산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리카프로락톤 (PCL), 젤라틴, 히알루론산, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴라아크릴아세테이트, 폴리비닐클로라이드 및 무수말레인산/비닐에테르 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤을 코팅시키는 단계는 가교에 의한 것임을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법.

청구항 9

전기방사된 생분해성 고분자 나노섬유; 및

상기 나노섬유에 코팅된 하이드로젤을 포함하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생분해성 고분자 나노섬유는, 코어 부분에 생분해성 고분자 용액을, 셸 부분에는 폴리스티렌 용액을 전기 방사하여 코어-셸 구조의 나노섬유 전기방사체를 형성하는 단계; 및

상기 나노섬유 전기방사체에서 셸 부분의 폴리스티렌을 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 생분해성 고분자는, 폴리카프로락톤, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락테이트-co-글리콜산, 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발러레이트) (PHBV), 폴리(L-락타이드-co-카프로락톤), 폴리(L-락타이드-co-D-락타이드), 젤라틴, 콜라겐, 및 엘라스틴 유사 펩타이드 (elastin-like peptide)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 생분해성 고분자 나노섬유의 직경은 0.5 내지 5 μ m인 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 하이드로젤을 형성하는 고분자의 탄성계수는 10 내지 100Pa인 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 하이드로젤을 형성하는 고분자의 압축계수는 0.1 내지 2kPa인 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 하이드로젤을 형성하는 고분자는, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 폴리에틸렌옥사이드 (PEO), 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트 (PHEMA), 폴리아크릴산 (PAA), 폴리비닐알코올 (PVA), 폴리 (N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리락트산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리카프로락톤 (PCL), 젤라틴, 히알루론산, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴라아크릴아세테이트, 폴리비닐클로라이드 및 무수말레인산/비닐에테르로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드.

청구항 16

제9항의 3차원 나노섬유 스캐폴드를 포함하는, 세포 전달체.

청구항 17

제9항의 3차원 나노섬유 스캐폴드를 포함하는, 약물 전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 타겟 세포 주위의 환경을 조절하는 것은 생체 내의 조직 재생을 위해 매우 중요한 역할을 한다. 그러므로 조직 공학적 접근법에서는 결과적으로 재생될 조직의 구조와 세포의 분화, 성장 등 세포 기작을 조절하기 위해 타겟 세포 주위의 세포외 기질 (ECM)을 정확히 모사하는 전략이 필요하다. ECM을 모사하기 위해 여러 방법들이 제시되어 왔는데, 대표적인 방법들로는 가스 포밍/침출법 (gas foaming/particulate leaching), 상 분리 (phase separation), 하이드로젤화 (hydrogelation), 자기조립 거대분자 (self-assembled macromolecules)를 이용하는 방법들이 있다. 그러나 이러한 시도들은 다공도 (porosity), 구조적 유연성, 기계적 강도, 세포 침투성, 자연적 ECM을 완전히 모사할 수 있는 가능성 등의 척도에서 부족함을 보여주고 있다.

[0003] 전기방사법 (electrospinning)으로 생성된 섬유성 (fibrous) 스캐폴드는 자연적 ECM의 구조 (섬유 구조)를 모사할 수 있다는 점에서 스캐폴드 제작법으로 큰 주목받아 왔으며, 조직 재생을 유도할 수 있는 매개체로 생각되어 왔다. 특히, 전기방사 스캐폴드 (electrospun scaffold)의 경우, 고분자, 단백질, 금속, 세라믹 등 여러 물질들을 이용해 만들 수가 있고, 부피 대 표면적비가 매우 크며, 섬유를 일정 방향으로 정렬시킴으로써 얻는 세포 패턴화의 기능 또한 가지고 있다. 이러한 이유들로 혈관, 뼈, 말초 및 중추 신경계 등의 조직을 재생하기 위해 전기방사 스캐폴드가 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 장점들에도 불구하고 실제 임상에서 조직 재생을 위한 도구

로 널리 사용되지 못하는 이유로는 부피감이 있는 3차원 구조체로 만들어지지 못하기 때문이다. 즉, 전기 방사법을 통해 만들어진 스캐폴드의 경우 대부분 종잇장 같은 얇은 구조로만 만들어지며 그 내부에는 섬유들이 뽁뽁하게 팩킹(packaging)되어 있어 세포가 스캐폴드 내부로 침투하지 못하고 표면에서만 성장하여 2차원 구조를 띄게 되는데, 3차원적 배양 조건이 요구되는 세포의 전달에 어려움이 있었다.

[0004] 한편, 하이드로젤은 조직공학 및 약물 전달 분야에서 널리 사용되는 물질로서, 하이드로젤에 약물 및 세포를 함께 포함시켜 생물공학 및 의료분야에 널리 사용되고 있다. 종래에는 하이드로젤을 사용하여 세포지지체, 세포캡슐, 약물전달체 등을 제조하여 왔으며, 최근에 이런 하이드로젤의 특성을 활용하여 생체 적용에 용이한 주사형 전달체로의 개발과 응용이 다양하게 시도되고 있다.

[0005] 현재, 세포주사형 하이드로젤은 다양한 물질을 사용하여 제형화되거나 제조되고 있으며, 기본적으로 많이 사용되는 물질은 생체 적합성이 좋은 것으로 알려진 고분자로 PEG, Pluronic F-127 등이 사용되고 있다. 현재, 온도 감응성 하이드로젤인 Pluronic F-127은 polyethylene oxide (PEO)-polypropylene oxide (PPO)-polyethylene oxide (PEO)의 삼원블록공중합체로 16% 이상의 수용액 농도일 때 온도 의존적 (Temperature dependent) 졸-겔 전이 (sol-gel transition) 현상을 나타내는 물질로서, 생체 적합성이 뛰어나며, 경구, 비강, 안구 등의 경로를 통한 다양한 약물전달 및 세포 운반체 (carrier)로 사용되어지고 있으나, 단독으로는 기계적 물성이 약하여 체 내에서 쉽게 분해, 방출되어 장기간 세포를 한 곳에서 지탱해야 할 경우에는 그 사용이 제한적인 실정이다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 외과적인 수술 과정없이 간단하게 세포를 체내로 주사할 수 있고, 세포가 체내의 특정 병변 부위에 안정적으로 머무르게 할 수 있는 지지체의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이나, 아직은 한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은, 하이드로젤이 코팅된 생분해성 고분자 나노섬유를 포함하는, 3차원 나노섬유 스캐폴드를 제조하였으며, 상기 스캐폴드의 주사 가능 (Injectable)하며, 몰더블 (Moldable)한 특성에 따라 세포 또는 약물을 생체 조직에 효율적으로 전달할 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은, 생분해성 고분자 및 하이드로젤로 이루어지는 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드 및 그의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 스캐폴드에 세포 또는 약물을 로딩하는 단계를 포함하는, 세포 또는 약물 전달 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 세포 치료 또는 약물 치료를 위한 상기 스캐폴드의 의약적 용도를 제공하는데 있다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하이드로젤이 코팅된 생분해성 고분자 나노섬유를 포함하는, 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 실시예로서, 상기 생분해성 고분자는 폴리카프로락톤, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락테이트-co-글리콜산, 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발러레이트) (PHBV), 폴리(L-락타이드-co-카프로락톤), 폴리(L-락타이드-co-D-락타이드), 젤라틴, 콜라겐, 및 엘라스틴 유사 펩타이드 (elastin-like peptide)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예로서, 상기 하이드로젤을 형성하는 고분자의 탄성계수는 10 내지 100Pa일 수 있고, 압축계수는 0.1 내지 2kPa일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예로서, 상기 하이드로젤을 형성하는 고분자의 분자량은 6000Da 내지 200000Da일 수 있

다.

- [0017] 본 발명의 또 다른 실시예로서, 상기 하이드로젤을 형성하는 고분자는 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 폴리에틸렌옥사이드 (PEO), 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트 (PHEMA), 폴리아크릴산 (PAA), 폴리비닐알코올 (PVA), 폴리 (N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리락트산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리카프로락톤 (PCL), 젤라틴, 히알루론산, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴라아크릴아세테이트, 폴리비닐 클로라이드 및 무수말레인산/비닐에테르로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 실시예로서, 상기 생분해성 고분자 나노섬유의 직경은 0.5 내지 5 μ m일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 복수 개의 상기 3차원 나노섬유 스캐폴드를 포함하는, 세포 또는 약물 전달체를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 a) 생분해성 고분자 나노섬유 및 하이드로젤 전구체 용액을 혼합하는 단계; 및 b) 상기 생분해성 고분자 나노섬유 표면에 하이드로젤을 코팅시키는 단계를 포함하는, 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예로서, 상기 생분해성 고분자 나노섬유는, 코어 부분에 생분해성 고분자 용액을, 셸 부분에는 폴리스티렌 용액을 전기방사하여 코어-셸 구조의 나노섬유 전기방사체를 형성하는 단계; 및 상기 나노섬유 전기방사체에서 셸 부분의 폴리스티렌을 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 실시예로서, 상기 하이드로젤 전구체 용액은, 용액 전체 중량에 대하여, 하이드로젤 전구체를 2 내지 20 중량%로 함유할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 실시예로서, 상기 하이드로젤을 코팅시키는 단계는 가교에 의한 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 스캐폴드에 세포 또는 약물을 로딩하는 단계를 포함하는, 세포 또는 약물 전달 방법을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 세포 치료, 특히 줄기세포 치료를 위한 일 구성성분으로 적용될 수 있는 상기 스캐폴드의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따른 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드는, 3차원 전기방사된 생분해성 고분자 나노섬유에 하이드로젤을 코팅시킴으로써, 3차원적으로 세포를 성장시킴과 동시에, 단순 주사를 통해 이를 생체 내 원하는 부위에 전달 가능하게 하였으며, 이를 통해 수술 등을 통해 이식해야 하는 종래의 3차원 스캐폴드와 달리 최소 침습적 방법으로 전달함으로써 수술 중 부작용 및 수술 후 환자의 회복에 도움을 줄 수 있다. 또한 상기 스캐폴드를 이용한 세포 또는 약물의 전달 과정에서, 주사에 의한 세포의 이탈을 최소화시키면서, 세포 증식 활성을 높게 유지할 수 있었으며, 하이드로젤 성분에 따라 약물 방출 속도를 효과적으로 조절할 수 있음을 확인하였는바, 본 발명은 세포 또는 약물 치료 분야의 핵심기술로 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은, 본 발명에 따른 Sliding fiber의 제조 과정을 개략적으로 나타낸 도이다.
- 도 2는, 본 발명에 따른 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 주사 가능성을 카테터 (Inner diameter: 1.0mm)를 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 3은, 본 발명에 따른 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 몰더블 (moldable)한 특성을 확인하기 위한 것으로, (a) 앞 뒷면의 모양이 각기 다른 Lego 주형에 Sliding fiber를 주사한 결과, (b) 다이아몬드 또는 별 모양의 주형에 Sliding fiber를 주사한 뒤, 동결 건조시킨 결과, 및 (c) 돼지 피부 조직 또는 (d) 고무 조각의 V자 홈에 Sliding fiber, mPCL, 및 Me-HA를 주사하거나 올려둔 후, 물리적 자극을 가한 경우, 이들의 변화를 확인한 결과이다.
- 도 4는, 판 형태 (sheet-like)인 cPCL/Me-HA의 주사 과정에서, cPCL 및 Me-HA의 정렬 여부를 전계방사형 주사 전자현미경 (Field emission scanning electron microscope; FE-SEM)을 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 5는, 본 발명에 따른 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 주사 과정에서, (a) 정렬되는 Sliding fiber를 관찰한 결과, 및 (b) Sliding fiber의 방향성 분포를 확인한 결과이다.

도 6은, 본 발명에 따른 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 주사 과정에서, (a) 주사전자현미경 분석 (scanning electron microscopy, SEM), 및 (b) 에너지 분산 분석 (Energy-dispersive spectroscopy)을 통해 Sliding fiber의 표면 및 내부 단면의 특성을 확인한 결과이다.

도 7은, mPCL 섬유와 글리세롤을 혼합하여 주사한 경우, (a) 저장 탄성률 (G')과 손실 탄성률 (G'')을 측정된 결과, 및 (b) 카테터 내 이동능을 관찰한 결과로서, 노란색 화살표는 카테터 내 mPCL 섬유를 나타낸 것이다.

도 8은, 나노섬유만 주사한 군의 카테터 내 이동능을 관찰한 결과로서, 붉은색 화살표는 카테터 내 나노섬유를 나타낸 것이다.

도 9는, 하이드로겔만 주사한 군의 카테터 내 이동능을 관찰한 결과로서, 노란색 화살표는 카테터 내 하이드로겔을 나타낸 것이다.

도 10은, 나노섬유/하이드로겔을 주사한 군의 카테터 내 이동능을 관찰한 결과로서, 붉은색 화살표는 엉킴 현상에 의해 주사되지 않은 나노섬유 또는 Sliding fiber, 노란색 화살표는 주사된 Sliding fiber를 나타낸 것이다.

도 11은, 다양한 Oscillating stress frequency에서, Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 (a) 탄성계수, 및 (b) 점성계수 값 변화를 유변물성 측정기를 이용하여 측정된 결과이다.

도 12는, mPCL@PS fiber 질량/ Me-HA 전구체 용액의 부피 변화에 따른 Sliding fiber의 (a) 탄성계수, 및 (b) 점성계수 값 변화를 유변물성 측정기를 이용하여 측정된 결과이다.

도 13은, Me-HA 전구체 용액 농도 변화에 따른 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 (a) 탄성계수, 및 (b) 점성계수 값 변화를 유변물성 측정기를 이용하여 측정된 결과이다.

도 14는, 본 발명에 따른 Sliding fiber (mPCL/P8000 (20%w/v), 및 mPCL/Gelatin(7.5%w/v))의 (a) 탄성계수와 점성계수 값 변화를 유변물성 측정기를 이용하여 측정된 결과, 및 (b) 돼지 피부 조직의 V자 홈에 상기 Sliding fiber를 주사한 후, 물리적 자극을 가한 경우, 이들의 변화를 확인한 결과이다.

도 15는, 하이드로겔만 주사한 군 (Me-HA, P8000, P575, Gelatin Hydrogel), cPCL만 주사한 군, 나노섬유/하이드로겔을 주사한 군 중 cPCL/Me-HA 및 mPCL/P575 군 등의 (a) 탄성계수, 및 (b) 점성계수 값 변화를 유변물성 측정기를 이용하여 측정된 결과이다.

도 16은, mPCL, Pre-Sliding fiber (mPCL/Me-HA), 및 Post-Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 (a) 인장 응력 (tensile stress), (b) 최대 인장 강도 (ultimate tensile strength; UTS), (c) 세로 탄성률 (Young's modulus), (d) 신장률 (elongation at break)를 비교한 결과이다.

도 17은, 본 발명에 따른 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)를 PBS에 침지시킨 후, 부피 팽창 정도를 mPCL 섬유, 및 Me-HA 하이드로겔과 비교한 결과이다.

도 18은, 본 발명에 따른 Sliding fiber를 제조할 수 있는 하이드로겔의 탄성계수 및 압축계수를 도출한 결과이다.

도 19는, 본 발명에 따른 Sliding fiber에 세포를 담지하기 위한 (a) Static seeding, 및 (b) Dynamic seeding 과정을 개략적으로 나타낸 도이다.

도 20은, Dynamic seeding 및 Static seeding의 차이에 따른 (a) loading efficiency를 비교한 결과 및 (b) Sliding fiber 내 세포의 분포를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.

도 21은, 본 발명에 따른 인간 신경 줄기세포가 담지된 Sliding fiber의 주사 전 후, (a) loading efficiency를 비교한 결과, 및 (b) 세포가 담지된 Sliding fiber의 모습을 이미지화한 결과이다.

도 22는, 본 발명에 따른 인간 신경 줄기세포가 담지된 Sliding fiber의 주사 전 후, (a) 세포 증식율을 비교한 결과, 및 (b) 공초점 현미경으로 형광 염색한 세포를 관찰한 결과이다.

도 23은, MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 동물모델에 인간 신경 줄기세포가 담지된 Sliding fiber를 주사하는 과정을 개략적으로 나타낸 도이다.

도 24는, MCAO 동물모델에 인간 신경 줄기세포가 담지된 Sliding fiber를 주사한 후, (a) Luciferase의 형광 세기를 측정된 결과, 및 (b) 시간의 경과에 따른 형광 세기의 변화를 나타낸 결과이다.

도 25는, MCAO 동물모델에 인간 신경 줄기세포가 담지된 Sliding fiber를 주사한 후, 면역염색을 통해 뇌 조직

내 세포의 분포를 확인한 결과이다.

도 26은, (a) PBS 또는 (b) 세포 배양 배지에서, 하이드로젤 성분 및 가교 방법의 차이에 따른 Sliding fiber의 약물 방출 양상을 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 a) 생분해성 고분자 나노섬유 및 하이드로젤 전구체 용액을 혼합하는 단계; 및 b) 상기 생분해성 고분자 나노섬유 표면에 하이드로젤을 코팅시키는 단계를 포함하는, 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명에 따른 스캐폴드 제조방법에 따르면, 윤활유와 같은 역할을 수행하는 하이드로젤을 나노섬유 표면에 코팅시킴으로써, 나노섬유 기반의 스캐폴드에서 세포를 3차원적으로 성장시킴과 동시에, 단순 주입 주사를 통해 이를 생체 내 원하는 부위에 손쉽게 전달 가능하게 하였다는 점에 기술적 특징이 있다. 또한, 주사 과정에서 가해지는 인장 및 압축 스트레스 하에서도 세포 이탈을 최소화시키고, 세포의 높은 증식 활성을 유지할 수 있었는바, 세포 치료제 분야에 폭넓게 활용될 수 있을 것이다.
- [0031] 이하에서는, 본 발명에 따른 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드 제조방법의 각각 단계에 대하여 상세히 설명하기로 한다.
- [0032] 단계 a)에서는, 생분해성 고분자 나노섬유 및 하이드로젤 전구체 용액을 혼합한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, "생분해성 고분자"는 생체적합성을 띄며 가수분해 등 화학 반응이나 효소에 의한 작용으로 분해가 가능한 고분자를 의미하며, 구체적으로, 폴리카프로락톤, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락테이트-co-글리콜산, 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발러레이트) (PHBV), 폴리(L-락타이드-co-카프로락톤), 폴리(L-락타이드-co-D-락타이드), 젤라틴, 콜라겐, 및 엘라스틴 유사 펩타이드 (elastin-like peptide)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 한 구체예로서, 상기 생분해성 고분자는 50 ~ 150 kDa의 수평균 분자량을 가질 수 있다. 고분자의 분자량이 너무 크면 용액의 점도가 높아져 유속을 조절하기 어렵고 나노섬유의 두께가 증가하여 생체의 기질 (ECM)을 정확히 모사하기 힘든 문제가 있고, 너무 작으면 나노섬유의 두께가 너무 얇아 기계적 성질이 약해지는 문제가 있다.
- [0035] 또한, 상기 생분해성 고분자 나노섬유는, 코어 부분에 생분해성 고분자 용액을, 쉘 부분에는 폴리스티렌 용액을 전기방사하여 코어-쉘 구조의 나노섬유 전기방사체를 형성하는 단계; 및 상기 나노섬유 전기방사체에서 쉘 부분의 폴리스티렌을 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 종래의 전기방사법을 통해 만들어진 스캐폴드의 경우, 종잇장 같은 얇은 구조로만 만들어지며 그 내부에는 섬유들이 뽁뽁하게 팩킹 (packing)되어 있어 세포가 스캐폴드 내부로 침투하지 못하고 표면에서만 성장하는 반면, 상기 방법에 의해 제조된 나노섬유로 이루어진 스캐폴드는 세포가 표면뿐만 아니라 내부에도 존재할 수 있으므로, 세포마다 지니는 표현형 모폴로지를 잃지 않은 채로 3차원 배양할 수 있다는 장점이 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, "하이드로젤"은 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트(PHEMA), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA) 및 폴리카프로락톤 (PCL), 젤라틴, 히알루론산, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴라아크릴아세테이트, 폴리비닐클로라이드, 및 무수말레인산/비닐에테르로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 친수성 고분자이거나, 둘 이상의 친수성 고분자의 복합체 또는 혼합물로부터 제조될 수 있으며, 가교 반응 또는 물성의 변화를 위하여 메틸크릴레이트 또는 카테콜 등과 결합되어 있을 수 있다.
- [0037] 한 구체예로서, 하이드로젤 전구체 용액은, 상기 하이드로젤과 용매가 혼합되어 있는 물질을 일컬으며, 상기 스캐폴드의 주사 가능한 물성을 유지하기 위하여 상기 전구체 용액 전체 중량에 대하여, 하이드로젤 전구체 (성분)를 2 내지 20 중량 %로 함유할 수 있으며, 필요한 경우, 상기 생분해성 고분자 나노섬유와의 가교를 위한 가교제를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0039] 단계 b)에서는, 상기 생분해성 고분자 나노섬유 표면에 하이드로젤을 코팅시킨다.
- [0040] 상기 하이드로젤을 코팅시키는 단계는 하이드로젤 전구체 용액의 가교 반응에 의해 진행될 수 있다. 이러한 가교는 UV 조사에 의한 화학적 가교, 물리학적 가교 또는 생물학적 가교에 의해 하이드로젤로 형성될 수 있다. 여기서, UV 조사에 의한 화학적 가교로는 광가교 (photo-crosslinking) 또는 반응성 가교제 (reactive crosslinker)를 활용한 가교 등이 있고, 생물학적 가교로는 헤파린과 성장인자의 결합력을 활용한 가교 또는 DNA 등의 상보적 결합을 이용한 가교 등이 있으며, 물리적 가교로는 수소결합에 의한 가교, 소수성 (hydrophobic) 상호작용에 의한 가교 또는 정전기적 상호작용을 활용한 가교 등이 있으나, 하이드로젤로 경화시킬 수 있는 방법이라면, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0041] 특히, 카테터를 이용한 주사 과정에서, 생분해성 고분자 나노섬유는 엉킴 (clogging) 현상, 하이드로젤은 약한 기계적 성질에 의한 부스러짐에 따라, 이들의 단독 사용만으로는 주사를 통한 주입이 어려웠던 반면 (실험예 3 참조), 상기 하이드로젤의 코팅을 통해 주사 가능성이라는 새로운 물성을 스캐폴드에 부여하여 생체 내 원하는 부위에 손쉽게 최소 침습적으로 전달 가능하게 하였다는 점에 기술적 의의가 있다.
- [0043] 한편, 본 발명의 일 양태로서, 하이드로젤이 코팅된 생분해성 고분자 나노섬유를 포함하는, 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드를 제공한다.
- [0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "스캐폴드"는 세포가 부착되어 배양 및 증식될 수 있는 공간을 제공할 뿐만 아니라, 이식 과정에서는 분화가 진행된 타겟 세포 또는 약물의 담체 (carrier)와 같은 역할을 수행하는 지지체로서, 이러한 기능을 구현하기 위하여, 섬유 (fiber) 구조로 이루어질 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 3차원 나노섬유 스캐폴드는 생분해성 고분자 나노섬유 및 나노섬유 표면에 코팅된 하이드로젤로 구성된다.
- [0046] 전술한 바와 같이, 상기 나노섬유 표면에 코팅된 하이드로젤은 윤활유와 같은 역할을 수행하여 주사 가능성이라는 새로운 물성을 스캐폴드에 부여하고, 상기 생분해성 고분자 나노섬유는 이중노즐 전기방사 (Co-axial electrospinning) 및 선택적 침출 (Selective leaching)법을 통해 제조된 것으로서, 종래의 sheet 형태 또는 나노 섬유 분절 (Segment)와는 달리, 연속적인 (Continuous) 섬유들로 구성됨에 따라 세포외 기질 (ECM)과 유사한 조건을 제공하는 역할을 하여 세포마다 지니는 표현형 모폴로지를 잃지 않은 채로 3차원 배양할 수 있다는 장점이 있다.
- [0047] 이를 위하여, 본 발명에 따른 3차원 나노섬유 스캐폴드 내 하이드로젤을 형성하는 고분자의 탄성계수는 10 내지 100Pa일 수 있고, 압축계수는 0.1 내지 2kPa일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 또한, 본 발명은 상기 3차원 나노섬유 스캐폴드를 포함하는, 세포 전달체, 및 상기 3차원 나노섬유 스캐폴드에 세포를 로딩하는 단계를 포함하는, 세포의 전달 방법을 제공한다.
- [0050] 이러한 세포로는, 세포 및 조직의 기능 복원, 즉, 세포 치료를 위한, 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포 그 자체나 이들의 생물학적 특성이 변이된 세포들을 모두 포함할 수 있고, 바람직하게는, 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포, 즉, 줄기세포일 수 있으며, 분화능에 따라 만능 줄기세포 (totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포 (multipotent stem cells)로 분류할 수 있고, 줄기세포의 유래조직에 따라 성체 줄기세포, 배아 줄기세포 및 역분화 줄기세포로 분류할 수 있다. 본 발명에서, 상기 줄기세포는 본 발명에서 제공하는 지지체에 부착 및 배양되어 분화될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게 성체로부터 유래된 중간엽 줄기세포일 수 있고, 보다 바람직하게 골수, 지방조직, 치아, 치아조직, 혈액, 제대혈, 간장, 피부, 위장관, 태반, 자궁, 태아로부터 유래한 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명에서, 세포를 로딩하는 단계는, 세포가 담긴 배지를 스캐폴드 내로 떨어뜨리는 Static seeding 방법은 충분한 양의 세포가 스캐폴드 내부 공간으로 침투하기 어렵기 때문에, 세포가 담긴 배지에 스캐폴드를 침지시킨 후, 흔들어주는 Dynamic seeding 방법을 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0052] 또한, 본 발명은 상기 3차원 나노섬유 스캐폴드를 포함하는, 약물 전달체 및 상기 3차원 나노섬유 스캐폴드에 약물을 로딩하는 단계를 포함하는, 세포의 전달 방법을 제공한다.

[0054] 한편, 본 발명의 다른 양태로서, 세포 치료, 특히 줄기세포 치료를 위한 일 구성성분으로 적용될 수 있는, 상기 지지체의 용도를 제공한다.

[0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0058] [제조예]

[0059] 제조예 1. 주사 가능한 3차원 나노섬유 스케폴드의 제조

[0060] 1-1. 생분해성 고분자 나노섬유의 제조

[0061] 이중노즐 전기방사 (Co-axial electrospinning) 및 선택적 침출 (Selective leaching)을 통해 생분해성 고분자 나노섬유를 제조하였다 (한국 공개특허 10-2015-0113248 참조). 구체적으로, 폴리카프로락톤 (PCL, $M_n = 80,000\text{Da}$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 또는 폴리스티렌 (PS, $M_n = 150,000\text{Da}$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 THF (Tetrahydrofuran) 및 DMF (Dimethylformamide) 혼합용액 (1:1)에 15% (w/v) 농도로 용해시켰다. 이후, PCL 용액 및 PS 용액을 각각 내부 노즐 (23G, inner diameter = 0.337mm), 및 외부 노즐 (17G inner diameter=1.067mm)로 옮긴 뒤, PCL 용액은 2ml/h, PS 용액은 4ml/h의 공급속도로, 알루미늄 호일로 이루어진 콜렉터에 흘러주면서 전기방사 (14kV)하여 Core-Shell 구조의 PCL@PS 나노섬유를 제조하였다. 이후, PCL@PS 나노섬유에 DMF (Dimethylformamide) 용매를 처리한 뒤, vortex하여 표면부를 구성하는 폴리 스티렌만을 선택적으로 제거하였으며, 이러한 과정은 5회 반복 실시하였다. 결과물로 얻어진 PCL 섬유 (이하, 3D moldable PCL fiber, mPCL로 명명함.) 는 에탄올 및 증류수로 3회 세척한 뒤, 밤새도록 동결 건조하고, 사용되기 전까지 데시케이터 (Desiccator)에 보관하였다.

[0063] 1-2. 하이드로젤 전구체 용액의 제조

[0064] 0.5g의 히알루론산 (HA, $M_n = 200,000\text{Da}$, Lifecore Co, Chaska, MN, USA)을 PBS 용액에 완전히 용해시킨 뒤, 상기 용액을 1.875g의 글리시딜 메타크릴레이트 (Sigma-Aldrich) 및 0.935g의 트릴에틸아민 (Sigma-Aldrich)과 혼합하였다. 상기 혼합 용액을 암실에서 10일 동안 반응시키고, 3일 동안 투석하여 Me-HA 전구체 용액을 제조하였다. 또한, 상기 제조예 1-1의 mPCL 표면에 Me-HA 전구체 용액을 하이드로젤화시키기 위하여, PBS 용액 내에서 Me-HA 전구체 용액을 코모노머인 N-비닐피롤리돈 (NVP, 25mg/mL, Sigma-Aldrich), 광가교제인 Irgacure 2959 (I2959, 25mg/mL, Ciba, Tarrytown, NY)와 혼합하였다. 또한, 상기과 마찬가지로, 하기 표 1의 조성으로 이루어진 고분자량 PEG (P8000; $M_n = 8000\text{g/mol}$) 또는 저분자량 PEG (P575; $M_n = 575\text{g/mol}$)로 이루어진, PEG-DA 하이드로젤 전구체 용액 (광가교제 포함), 및 Gelatin 하이드로젤 전구체 용액을 제조하였다.

표 1

	Me-HA			P8000			P575	Gelatin		
Polymer (%)	8	4	2	50	30	20	50	25	15	7.5
NVP (mM)	17.995	17.995	8.998	-	-	-	-	-	-	-
I2959 (mM)	0.892	0.892	0.446	7.133	7.133	7.133	44.58	-	-	-

[0066]

1-3. 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드의 제조

제조예 1-1의 mPCL과 제조예 1-2의 하이드로젤 전구체 용액을 블렌딩한 후, UV를 조사하거나 (Me-HA, P8000, P575) 실온에 두어 (Gelatin) 본 발명의 주사 가능한 3차원 나노섬유 스캐폴드 (이하, Sliding fiber로 명명함.)를 제조하였다. 상기 제조된 Sliding fiber를 멸균시키기 위하여, 70% (v/v) 에탄올에 30분간 침지시키고, 고압증기로 멸균된 PBS로 4회 세척하였다. 하이드로젤 형성을 위해 사용된 모든 수용성 용액들은 멸균 여과되었다.

[실험예]

실험예 1. Sliding fiber의 주사 가능성 및 구조적 특성 확인

본 실험예에서는, 상기 제조예 1에서 제조된 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 주사 가능성 및 몰더블 (moldable)한 특성을 확인하고자 하였다. 구체적으로, 상기 Sliding fiber를 주사하기 위하여, Sliding fiber를 PBS 용액 내에서 Swelling시켰으며, 이를 카테터 (Inner diameter: 1.0mm)와 연결된 10mL 시린지로 옮긴 뒤, 시린지 펌프를 이용하여 주사하였다. 또한, 이와 동일한 과정을 통하여, 앞 뒷면의 모양이 각기 다른 Lego 주형에 Sliding fiber를 주사하였고, 다이아몬드 또는 별 모양의 주형에 Sliding fiber를 주사한 뒤, 동결 건조시켜 그 형태를 관찰하였다. 이 뿐만 아니라, 돼지 피부 조직 또는 고무 조각의 V자 홈에 Sliding fiber, mPCL, 및 Me-HA를 주사하거나 올려둔 후, 상기 조직 또는 고무 조각에 물리적 자극을 가한 경우, 이들의 변화를 관찰하였다.

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 카테터 (Inner diameter: 1.0mm)를 이용하여, 중간에 끊어지거나 엉킴 (clogging) 없이, Sliding fiber를 연속적 (Continuous)으로 주사할 수 있음을 확인할 수 있었다.

또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 주사된 Sliding fiber는 십자 또는 곡면의 모양과 관계없이 Lego 주형의 빈 공간을 모두 채웠으며, 동결 건조시켜 관찰한 경우에도, 주형의 모양 그대로 Sliding fiber가 채워져 있음을 확인할 수 있었다 (도 3a 및 3b 참조). 아울러, 돼지 피부 조직 또는 고무 조각을 잡아 당기거나 비트는 등의 물리적 자극을 가한 결과, mPCL 및 Me-HA와 달리, Sliding fiber는 각각의 계면과 complete contact가 유지됨을 확인할 수 있었다 (도 3c 및 도 3d 참조).

상기 결과로부터, Sliding fiber는 카테터 등을 통해 용이하게 주사 가능할 뿐만 아니라, 이의 몰더블한 특성을 이용하여 스캐폴드 제작에 사용되는 바이오 잉크 등으로 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

실험예 2. Sliding fiber의 주사 과정에서의 구조 변화 확인

카테터를 이용한 주사 과정에서, Sliding fiber의 정렬 (alignment)은 이동성 획득에 있어 매우 중요한 요소 중 하나이다. 즉, 주사 과정에서, Sliding fiber가 주사 방향으로 재정렬되면 이동성이 증가하게 되고, 이는 결국 주입 가능한 특성으로 이어진다. 본 실험예에서는, 종래 판 형태 (sheet-like)의 cPCL/Me-HA, mPCL, 주사 전 Sliding fiber (Pre-Sliding fiber), 및 주사 후 Sliding fiber (Post-Sliding fiber)에 대한 주사 과정에서의 방향성 (Orientation) 변화를 비교하였다. 또한, 주사전자현미경 분석 (scanning electron microscopy, SEM)을 통하여 Me-HA, mPCL, Pre-Sliding fiber, 및 Post-Sliding fiber의 표면과 내부 단면을 관찰하였으며, 에너지 분산 분석 (Energy-dispersive spectroscopy)을 통하여, Me-HA에 의한 mPCL 표면의 코팅 여부를 확인하였다.

그 결과, 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 주사 과정에서 카테터의 벽면이 일종의 틀 (die) 역할을 함에 따라 카테터 내부 물질에 인장 (tensile) 및 압축 (compressive) 스트레스를 가함에도 불구하고, cPCL/Me-HA는 주사 방향으로의 정렬이 관찰되지 않았고 (도 4 참조), 이에 따라 카테터 입구에서 엉킴 현상이 관찰되었던 반면, Sliding fiber (mPCL/Me-HA)는 신장 및 정렬됨을 관찰하였으며 (도 5a), 실제로, mPCL 및 Pre-Sliding fiber에 비해, Post-Sliding fiber에서 특정 각도 (0도)로 정렬된 섬유가 다수 존재함을 확인할 수 있었다 (도 5b 참조).

[0083] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, Me-HA는 일반적인 하이드로젤과 마찬가지로, Honeycomb 구조를 보였던 반면, Sliding fiber는 주사 전후 모두 mPCL의 표면에 Me-HA가 코팅되어 있었으며, Sliding fiber 사이에 빈 공간이 독립적으로 존재함을 확인할 수 있었다 (도 6a 참조). 또한 상기 결과와 마찬가지로, 하이드로젤 (Me-HA)에 포함된 질소 (N) 성분이 Pre-Sliding fiber 및 Post-Sliding fiber의 표면에서 거의 고르게 관찰되었는바, mPCL 표면이 Me-HA에 의해 균질하게 코팅됨을 알 수 있었다 (도 6b 참조).

[0084] 한편, 상기 섬유들의 직경은 본 발명의 제조과정에 의해 큰 영향을 받지 않았던 반면 (mPCL= $1.441 \pm 0.415 \mu\text{m}$, pre-sliding fiber: $1.393 \pm 0.240 \mu\text{m}$, post-Sliding fiber= $1.391 \pm 0.291 \mu\text{m}$), Me-HA 전구체와의 혼합 및 주사 과정을 통해 Me-HA는 본래의 Honeycomb 구조를 유지하기 보다는 mPCL fiber 주변을 코팅하도록 형성되며, Sliding fiber는 카테터의 진행 방향으로 정렬되도록 함을 확인할 수 있었는바, 상기 결과로부터, mPCL 섬유의 표면에 코팅되는 하이드로젤 (Me-HA)은 윤활유와 같은 역할을 함으로써, Sliding fiber의 주사 가능한 성질을 부여함을 알 수 있었다.

[0086] 실험예 3. 나노섬유의 조성에 따른 카테터 내 이동능 변화 확인

[0087] 본 실험예에서는, 주사 가능한 Sliding fiber를 제조하기 위한 구체적인 조건을 도출하고자 하였다. 이를 위하여, 우선, mPCL 섬유와 점액성 액체 또는 액체성 윤활제인 글리세롤 (glycerol)을 혼합한 뒤, 시린지 펌프를 이용하여 50ml/h의 공급속도로 주입한 경우, 이들의 진동수 변화에 따른 유동학적 특성 및 카테터 내 이동능 변화를 시간의 경과 (0s, 10s, 16s, 17s, 20s, 30s)에 따라 관찰하였다.

[0088] 또한, 하기 표 2에 나타난 실험군 각각을 카테터 (Inner diameter: 2.0mm)를 이용하여 50ml/h의 공급속도로 주사하였으며, 이후, 각 실험군들의 카테터 내 이동능 변화를 시간의 경과 (0s, 15s, 25s, 35s)에 따라 관찰하였다.

표 2

대분류	소분류 (약어)	주요 구성
나노섬유만 주사한 군	cPCL/PBS	2차원 전기방사 나노섬유를 PBS와 혼합하여 주사한 군
	mPCL/PBS	mPCL를 PBS와 혼합하여 주사한 군
하이드로젤만 주사한 군	P575/PBS	UV로 경화된 PEG-DA (polyethylene glycol diacrylate, molecular weight=575Da)를 PBS와 혼합하여 주사한 군
	P8000/PBS	UV로 경화된 PEG-DA (polyethylene glycol diacrylate, molecular weight=8000Da)를 PBS와 혼합하여 주사한 군
	Me-HA/PBS	UV로 경화된 Me-HA를 PBS와 혼합하여 주사한 군
나노섬유 /하이드로젤을 주사한 군	cPCL/Me-HA	Me-HA로 코팅된 2차원 전기방사 나노섬유를 PBS와 혼합하여 주사한 군
	mPCL/P575	Sliding fiber (P575로 코팅된 mPCL)를 PBS와 혼합하여 주사한 군
	mPCL/P8000	Sliding fiber (P8000로 코팅된 mPCL)를 PBS와 혼합하여 주사한 군
	mPCL/Me-HA	Sliding fiber (Me-HA로 코팅된 mPCL)를 PBS와 혼합하여 주사한 군

[0089]

[0090] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, mPCL 섬유와 글리세롤을 혼합하여 주사한 경우, 진동수 변화에 따른 저장

및 손실 탄성율의 변화가 미미하였으며 (도 7a 참조), mPCL 섬유와 글리세롤간 상호결합이 강하지 못하여, 초기에는 점액성의 글리세롤만 이동되었고, 결국에는 높은 압력하에서 mPCL 섬유만 갑작스럽게 분출되었는바 (도 7b 참조), 주사 가능한 나노섬유로 사용함에는 무리가 있었다.

[0091] 또한, 도 8 및 도 9에 나타난 바와 같이, 나노섬유만 주사한 군들 (sPCL/PBS, mPCL/PBS)은 엉킴 현상 (clogging)에 의해 카테터 내에서 이동이 불가능하였고, 하이드로젤만 주사한 군들 (P575/PBS, P8000/PBS, Me-HA/PBS)은 주사 과정 중 부서져 여러 개의 단편으로 주사되었다. 한편, 나노섬유/하이드로젤을 주사한 군에서도, 도 10에 나타난 바와 같이, 나노섬유의 종류 또는 하이드로젤의 분자량 차이에 따라 cPCL/Me-HA 및 mPCL/P575 군은 카테터 내 이동이 미약하였던 반면, mPCL/P8000 및 mPCL/Me-HA군은 원래의 형상을 유지한 채로 카테터 내에서 원활하게 이동 가능함을 확인할 수 있었다.

[0092] 상기 결과로부터, 점액성 액체와의 단순 혼합, 나노섬유 또는 하이드로젤 단독 성분만으로는 주사 가능한 나노섬유를 제조할 수 없음을 확인할 수 있었으며, 이들을 모두 사용한 경우라 할지라도, 주사 가능성은 나노섬유 및 하이드로젤의 특성에 따라 가변적임을 알 수 있었다. 즉, 본 발명의 Sliding fiber를 제조하기 위한 조건으로서, i) 2차원 전기방사 나노섬유가 아닌, 제조에 1-1의 방법에 따라 제조된 나노섬유, 및 ii) 나노섬유와 하이드로젤의 충분한 상호결합을 위한, 일정 범위의 분자량 (약 6000-200000Da)을 지니는 하이드로젤을 사용하여야 함을 알 수 있었다.

[0094] 실험예 4. Sliding fiber의 유동학적 분석

[0095] 본 실험예에서는, 다양한 oscillating stress frequency에서 Sliding fiber의 탄성, 점성, 압축 탄성율과 같은 유동학적 특성을 회전식 유변물성 측정기 (RheoStress HAAKE, Karlsruhe, Germany)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, Sliding fiber 제조 과정에서, i) 제조에 1의 mPCL@PS fiber 질량/ Me-HA 전구체 용액의 부피 (mPCL/Me-HA= 1.5mg/10 μ L, 1.5mg/20 μ L, 1.5mg /40 μ L) 및 ii) Me-HA 전구체 용액의 농도 (2%, 4%, 8%)가 Sliding fiber의 유동학적 특성, 즉 주사 가능성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[0096] 또한 이러한 결과에 기초하여, Me-HA 하이드로젤이 아닌, P8000 및 Gelatin 하이드로젤을 이용하여 각각 mPCL/P8000 (20% w/v), 또는 mPCL/Gelatin (7.5% w/v)를 제조하였으며, 참고로, mPCL/Gelatin은 별도의 평가교제를 사용하지 않고 코팅하였다. 이후, 이들의 유동학적 특성을 확인하였으며, 돼지 피부 조직의 V자 홈에 상기 Sliding fiber를 주사하여 물리적 자극에 따른 이들의 변화를 관찰하여 물더블 (moldable)한 특성을 확인하였다. 아울러, 상기 실험예 3의 결과에 기초하여 주사가 불가능한 군, 예를 들어, 하이드로젤만 주사한 군 (Me-HA, P8000, P575, Gelatin Hydrogel), cPCL만 주사한 군, 나노섬유/하이드로젤을 주사한 군 중 cPCL/Me-HA 및 mPCL/P575 군의 유동학적 특성을 본 발명의 Sliding fiber와 비교하였다.

[0097]

[0098] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, mPCL 및 Me-HA는, 진동수의 변화에도 불구하고 탄성 및 점성계수의 변화가 미약했던 반면, 본 발명의 Sliding fiber (mPCL/Me-HA)는 진동수가 증가함에 따라 탄성 및 점성계수가 증가함을 확인할 수 있었다. 한편, 도 12 및 도 13에 나타난 바와 같이, mPCL에 비해 Me-HA 전구체 용액의 양이 적으면, mPCL의 유동학적 성질과 유사한 경향을 나타내므로, 1.5mg의 mPCL@PS fiber당 적어도 20 μ L 이상의 Me-HA 전구체 용액을 처리하여야 함을 알 수 있었으며 (도 12 참조), Me-HA 전구체 용액의 농도가 증가할수록 하이드로젤이 단단해지므로, 상기 농도가 8% 이하인 Me-HA 전구체 용액을 사용하는 것이 바람직함을 알 수 있었다 (도 13 참조).

[0099] 또한 도 14에 나타난 바와 같이, mPCL/P8000 (20%w/v), 또는 mPCL/Gelatin (7.5%w/v)는 상기 Me-HA 전구체 용액을 사용했던 것과 마찬가지로, 진동수가 증가함에 따라 탄성 및 점성계수가 증가하는 경향을 보였을 뿐만 아니라 (도 14a 참조), 강한 물리적 자극에도 불구하고, V자 계면과 complete contact가 유지됨을 확인할 수 있었다 (도 14b 참조). 아울러, 도 15에 나타난 바와 같이, 상기 실험예 3에서 주사가 불가능 했던 군들은 모두 본 발명의 Sliding fiber와 달리, 진동수의 변화에도 불구하고 탄성 및 점성계수의 변화가 미약하였으며, 전단 속도에 비의존적인 경향을 보여주었다.

[0101] 실험예 5. 주사 과정에서 Sliding fiber의 강도 증가 확인

[0102] 본 실험예에서는, mPCL/Me-HA (1.5mg mPCL/20 μ L, 2% Me-HA)를 이용하여 Sliding fiber, 특히 Post-Sliding

fiber의 기계적 특성을 조사하고자 하였으며, 이를 위하여 mPCL, Pre-Sliding fiber, 및 Post-Sliding fiber의 인장 응력 (tensile stress), 최대 인장 강도 (ultimate tensile strength; UTS), 세로 탄성률 (Young's modulus), 신장률 (elongation at break)을 측정하여 비교하였다.

[0104] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 및 단방향 신장에 따른 Post-Sliding fiber의 최대 인장 강도는 $153.5 \pm 74.98 \text{ kPa}$ 로 측정되어 Pre-Sliding fiber ($40.25 \pm 26.76 \text{ kPa}$)에 비해 증가되었으며, Pre-Sliding fiber의 신장률은 $2090 \pm 611.5\%$ 로 측정되어 mPCL ($2420 \pm 228.9\%$) 및 Pre-Sliding fiber ($2722 \pm 406.8\%$)에 비해 감소되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 주사 과정에서의 재정렬에 의한 것으로, Sliding fiber의 강도가 증진되었음을 알 수 있었다.

[0106] 실험예 6. Sliding fiber 제조를 위한 하이드로젤의 물성 파라미터 도출

[0107] 상기 실험예의 Sliding fiber들은 진동수-의존적인 유동학적 특성을 보였다. 구체적으로, 높은 진동수에서 윤활 유, 미셀 (miscelles), 용융된 폴리머와 같은 점액성 특성을 나타내었던 반면, 완전히 가교된 하이드로젤을 사용하는 경우, 높은 진동수에서 상기와 같은 점액성 특성을 나타내지 못하였으며, 부서러지는 성질에 (brittleness)에 따라 분리됨을 알 수 있었다. 이에, 본 실험예에서는, Sliding fiber (mPCL/Me-HA) 부피의 팽창 (swelling) 정도를 Me-HA 하이드로젤 및 mPCL 섬유와 비교함으로써, 가교의 정도가 Sliding fiber의 점액성 성질에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[0108] 또한, 본 발명의 Sliding fiber 제조에 있어서, 높은 탄성계수를 갖는 하이드로젤의 이동성은 하이드로젤의 시스템 내에 제한됨으로써, 높은 가압조건의 카테터 입구에서의 반응이 제한적이며, 이와 반대로 높은 압축 계수를 갖는 하이드로젤은 본래의 모양을 유지하려는 경향이 강하여 카테터 내 엉킴현상을 유발할 수 있다. 이에, 본 실험예에서는 Sliding fiber의 제조가 가능한 하이드로젤의 탄성계수 및 압축계수 값을 도출하고자 하였으며, 이를 위하여 10 mm/s 의 속도로 신장 또는 압축시킨 경우, 이들의 변화를 관찰하였다.

[0110] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, PBS에 각각을 침지시킨 경우, Me-HA 하이드로젤의 부피는 종전에 비해 3배 이상 증가했던 반면, Sliding fiber (mPCL/Me-HA)의 부피는 약 2배 가량 증가함에 불과하였다. 즉, slinding fiber (mPCL)의 3D 섬유성 구조의 공간적 형태는 Me-HA와의 완전한 가교를 방해하는 입체적 방해 요인으로 작용하고, 이는 점액성 특성을 유지하는데 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

[0111] 또한, 도 18에 나타난 바와 같이, Me-HA, P3000, 및 Gelatin 하이드로젤을 대상으로 실험한 결과, 100 Pa 이하의 탄성 계수, 2 kPa 이하의 압축 계수를 나타내는 하이드로젤을 이용한 경우, 본 발명의 주사 가능한 Sliding fiber를 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

[0113] 실험예 7. Sliding fiber의 세포 전달 효과 및 세포 증식에 미치는 영향 확인

[0114] 본 실험예에서는, 인간 신경 줄기세포 (hNSCs)가 씨딩 (Seeding)된 Sliding fiber를 주사한 경우, 세포의 담지 방법 (Dynamic seeding, 및 Static seeding)의 차이 및 주사 전후의 세포 로딩효율 (loading efficiency)를 비교하였다. 또한 Tissue culture plate (TCP), mPCL, Pre-Sliding fiber, Post-Sliding fiber에서의 세포 증식 정도를 정량화하여 비교하였을 뿐만 아니라, 증식된 세포 및 죽은 세포들을 각각 형광 염색 (FDA, PI)한 후, 공초점 현미경으로 관찰하였다. 한편, 제조 과정에서의 자외선 조사 또는 잔존하는 광개시제 (Photoinitiator)에 의한 유해한 효과를 피하기 위하여 Sliding fiber의 모든 제조과정을 마친 뒤, hNSCs의 씨딩이 진행되었으며, Sliding fiber의 표면에 hNSCs를 담지시키는 과정을 통해 진행되었다. 특히, 도 19에 나타난 바와 같이, 3D 구조를 가지는 Sliding fiber 내부로 세포들을 균질하고 효과적으로 담지시키기 위하여, 세포가 담긴 배지에 완성된 Sliding fiber를 넣고 흔들어주는 Dynamic seeding 방법과 비교군으로서 이러한 과정없이 단순 혼합시킨 Static seeding 방법을 각각 실시하였다. 또한 보다 손쉽게 세포 증식 정도를 정량화하고, 생체 내 국소부위에서 hNSCs의 분포를 모니터링하기 위하여, hNSCs는 렌티 바이러스의 형질도입을 통해 루시페라제 (luciferase)가 발현되도록 변이시켰다.

[0116] 그 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이, 하이드로젤의 친수성 및 닫힌 구조의 중심에 따라 Me-HA의 세포 로딩 효율을 30%에 불과했던 반면, 본 발명의 Pre-Sliding fiber 및 post-Sliding fiber는 약 78%의 높은 세포 로딩 효율을 보여주었다. 특히, Static seeding에 비해 Dynamic seeding에 의한 경우, 현저히 높은 로딩 효율을 확인할 수 있었으며 (도 20a 참조), 실제로, 공초점 현미경을 이용하여 Sliding fiber 내 hNSCs의 분포를 확인한 결과, Static seeding 방법에 의한 경우는 외곽 또는 가장자리에 hNSCs가 주로 존재했던 반면, Dynamic seeding 방법에 의한 경우, Sliding fiber 내부에도 고르게 존재하였는바, 이러한 차이가 세포 로딩효율에 영향을 미침을 알 수 있었다 (도 20b 참조).

[0117] 한편, 도 21에 나타낸 바와 같이, 주사 전 후의 loading efficiency의 유의적인 변화를 관찰할 수 없었는바, 주사 과정에서 가해지는 전단력, 압축력과 같은 조건들이 Sliding fiber 내 담지된 세포에 미치는 영향은 미미함을 알 수 있었다. 또한 도 22에 나타낸 바와 같이, 대조군인 TCP를 이용한 군에 비해 Sliding fiber를 이용한 군은 hNSCs의 증식에 선호되는 3차원적 공간을 제공함에 따라 세포 증식 활성이 보다 우수하였으며, 상기와 마찬가지로, Pre-Sliding fiber와 Post Sliding fiber간 증식 활성의 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다. 아울러, 공초점 현미경상 이미지를 관찰한 결과, 주사 후에도 대부분의 세포가 살아 있는 세포 (붉은색)로 관찰되었으며, 인간 신경 줄기세포의 특성 중 하나인 Neurosphere의 형성을 확인할 수 있었다.

[0118] 즉, 세포 전달용 스캐폴드로서, 본 발명의 Sliding fiber는 보다 우수한 3차원 배양 환경을 제공할 수 있으며, 특히, 주사 과정에서 가해지는 인장 및 압축 스트레스에도 불구하고, Sliding fiber 사이에 존재하는 세포의 증식 활성은 높게 유지됨을 알 수 있었다.

[0120] 실험예 8. 동물모델을 이용한 Sliding fiber의 세포 전달 효과

[0121] 본 실험예에서는, MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) 동물모델을 이용하여 Sliding fiber의 우수한 세포 전달 효과를 확인하고자 하였다. 구체적으로, Luciferase가 도입된 인간 신경 줄기세포를 Sliding fiber를 이용하여 전달한 뒤 (hNSC@Sliding fiber), Luciferase의 형광 세기를 측정하여 동물모델 체내에서의 인간 신경 줄기세포의 전달 및 활성을 평가하였다 (in vivo imaging system; IVIS). 이후, 동물모델을 희생시키고 뇌를 적출한 뒤, 면역염색을 통해 뇌 조직 내 인간 신경 줄기세포의 분포를 관찰하였다. 본 실험예에서 대조군으로 인간 신경 줄기세포를 PBS에 분산시킨 일반적인 세포 주사를 실시한 군 (hNSC@PBS), 인간 신경 줄기세포를 mPCL에 담지하여 세포 이식을 실시한 군 (hNSC@mPCL)을 이용하였으며, 이들의 주사 또는 이식 과정은 도 23에 개략적으로 나타내었다. 특히, hNSC@mPCL군은 병변 부위에 이식하기 위해서, 적어도 5mm 직경으로 이루어진 구멍의 두께가 필요하였던 반면, hNSC@Sliding fiber 및 hNSC@mPCL은 주사 가능한 특성에 의해 1-2mm의 직경으로 이루어진 구멍만으로도 충분히 실시 가능하였는바, 최소 침습적인 방법으로 세포를 전달할 수 있었다.

[0123] 그 결과, 도 24에 나타낸 바와 같이, Sliding fiber를 이용한 군 (hNSCs@Sliding fiber)은 다른 대조군들에 비해 주사된 부위에서 다량의 인간 신경 줄기세포 (붉은색 형광)가 관찰되었다 (도 24a 참조). 상기의 실험 결과를 정량적으로 분석한 결과, Sliding fiber를 이용한 군 (hNSCs@Sliding fiber)은 주사 후 3일이 경과한 시점에서의 형광 세기가 약 2주 동안 가장 안정적으로 유지되었고, 이러한 효과는 hNSC@mPCL 보다 높게 검출되었던 반면, hNSC@PBS 군에서 검출된 형광 세기는 시간의 경과에 따라 급격하게 감소하여 3주 후에는 거의 관찰되지 않았다 (도 24b 참조).

[0124] 또한 면역염색을 실시한 결과, 도 25에 나타낸 바와 같이, hNSC@PBS 군은 별도의 스캐폴드 구조가 없어 세포들이 주사된 이후, 주사 부위 주변으로 세포가 퍼져 나감을 관찰할 수 있었으며, hNSC@mPCL 군은 세포들이 이식한 부위에 대부분 존재하나, 체내의 Microglia cell과 같은 염증세포 (Iba+ cell, 초록색)들이 mPCL에 침윤되어 이식된 세포들과 혼재되어 있음을 확인할 수 있었던 반면, hNSCs@Sliding fiber 군은 세포들이 주사 부위에 국소적으로 존재할 뿐만 아니라, 하이드로젤의 친수성 성분이 외부 세포의 침입을 막아 이식된 세포와 Sliding fiber간의 뚜렷한 경계를 확인할 수 있었다.

[0125] 상기 결과로부터, 본 발명의 Sliding fiber는 주사 과정을 통해 세포를 병변 부위에 손쉽게 주입할 수 있을 뿐만 아니라, 안정적이면서도 높은 세포 전달 효율을 얻을 수 있는바, 본 발명은 세포 전달용 스캐폴드 분야의 핵심기술로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0127] **실험예 9. Sliding fiber를 이용한 약물 전달 효과 확인**

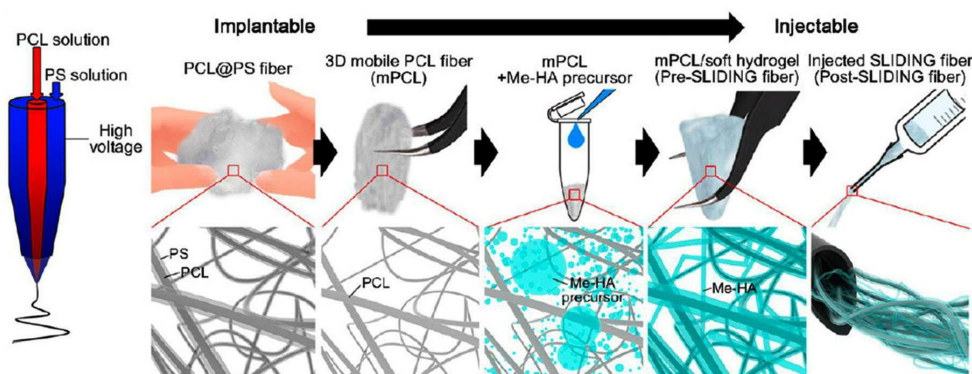
[0128] 상기 실험예 7 및 8에서는, Sliding fiber를 이용한 세포 전달 효과를 확인했었던 반면, 본 실험예에서는 Sliding fiber를 이용한 약물 전달 및 하이드로젤 성분 변화에 따른 방출 속도 조절 효과를 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 하이드로젤과 형광 물질인 FITC (Fluorescein isothiocyanate)과 혼합한 후, 가교를 실시하였으며, 이후, UV로 가교시킨 메타크릴레이티드 히알루론산 (HA-M), 산화반응을 통해 가교시킨 카테콜이 결합된 히알루론산 (HA-C)에서, 시간의 경과에 따라 방출되는 FITC의 양을 측정하였다.

[0130] 그 결과, 도 26에 나타낸 바와 같이, 하이드로젤을 구성하는 고분자 물질 또는 가교시키는 방법에 따라 Sliding fiber에 담지된 약물의 방출 속도를 조절할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 상기 결과로부터, 본 발명의 Sliding fiber는 세포 전달뿐만 아니라, 약물 전달을 위한 스캐폴드로 폭 넓게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

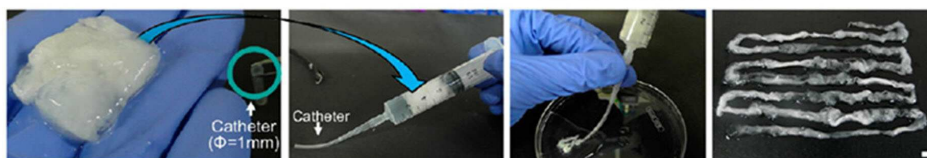
[0132] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

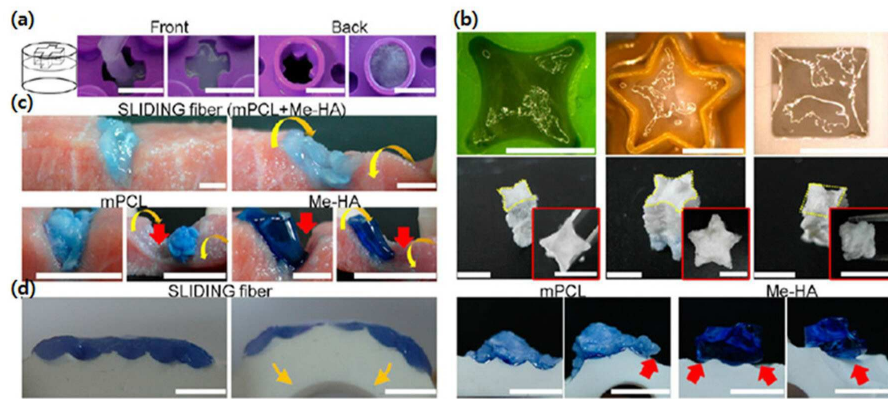
도면1



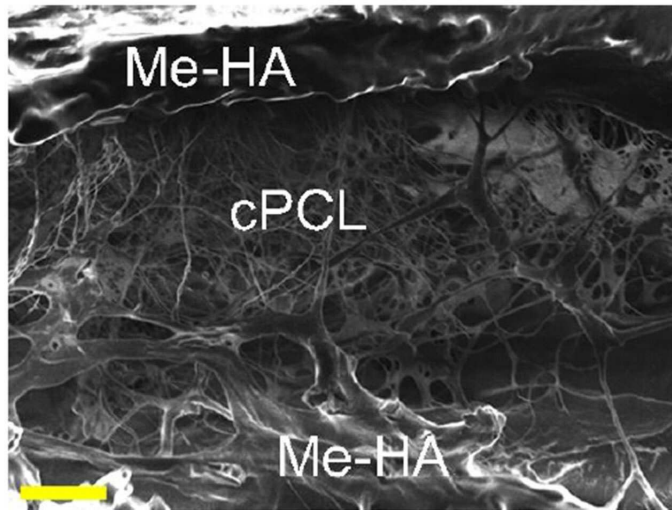
도면2



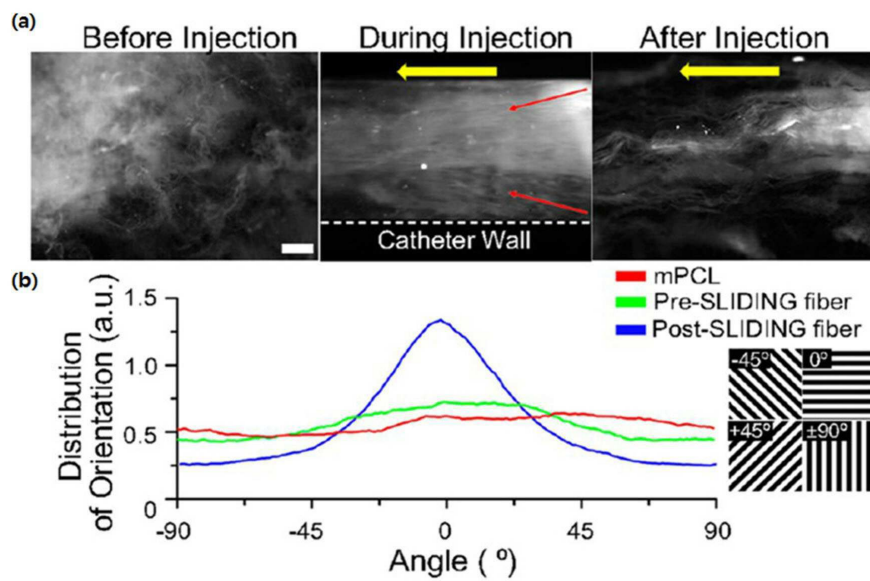
도면3



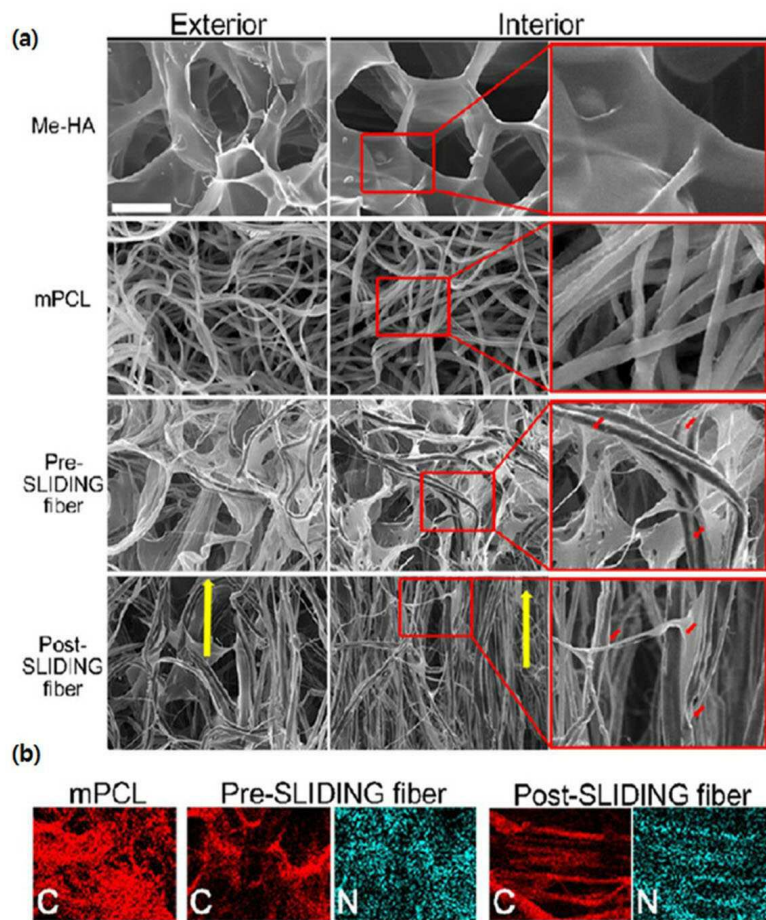
도면4



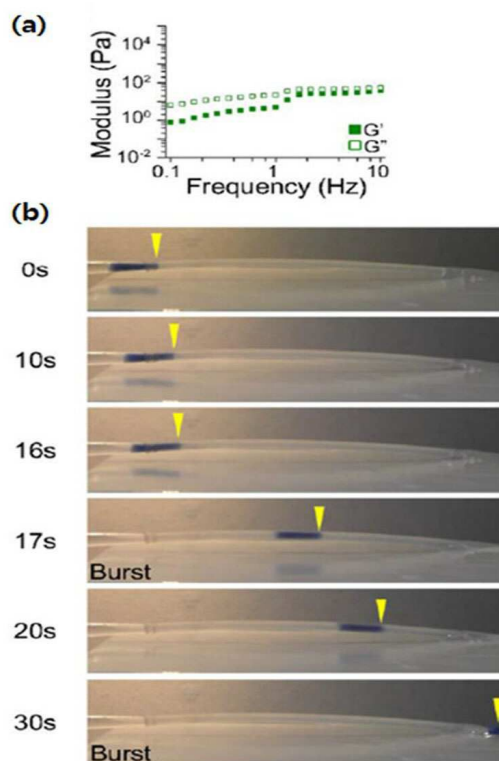
도면5



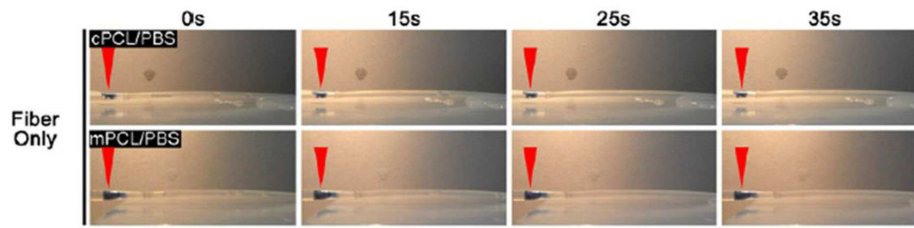
도면6



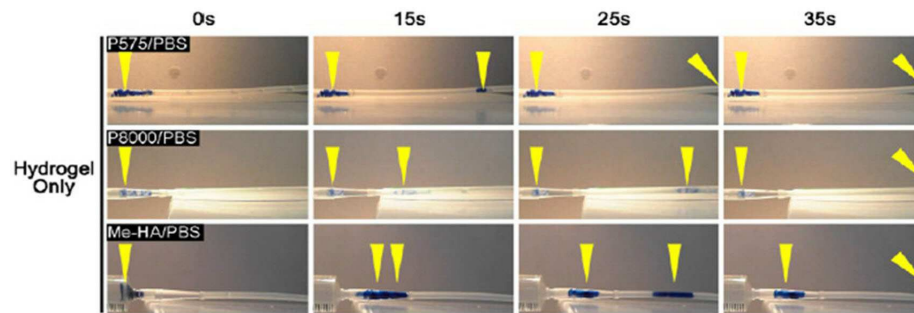
도면7



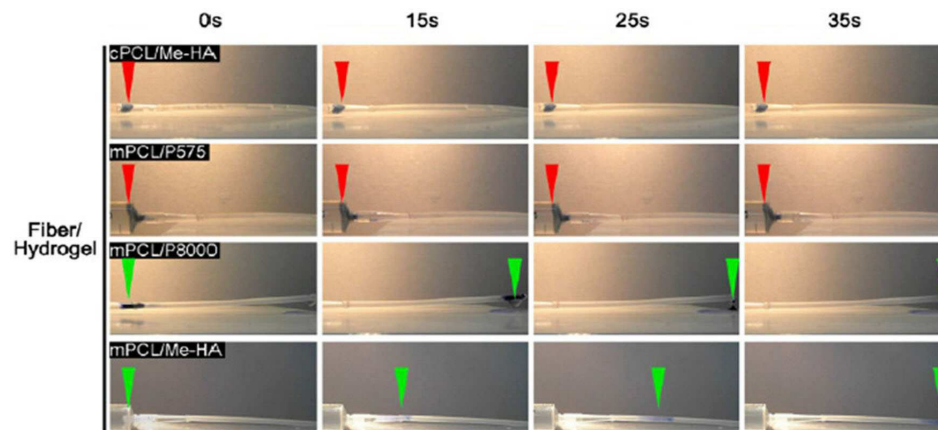
도면8



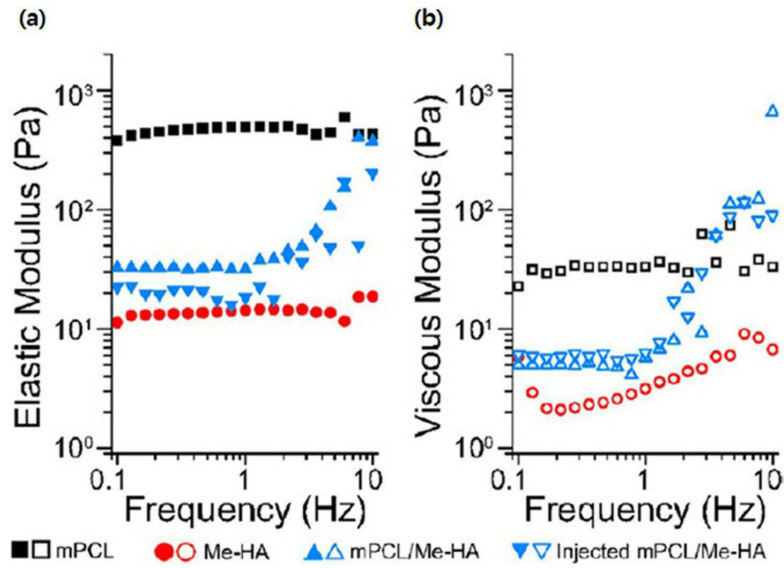
도면9



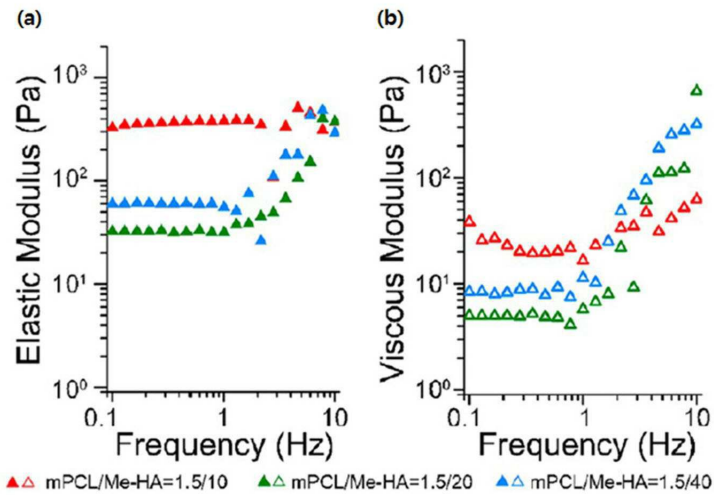
도면10



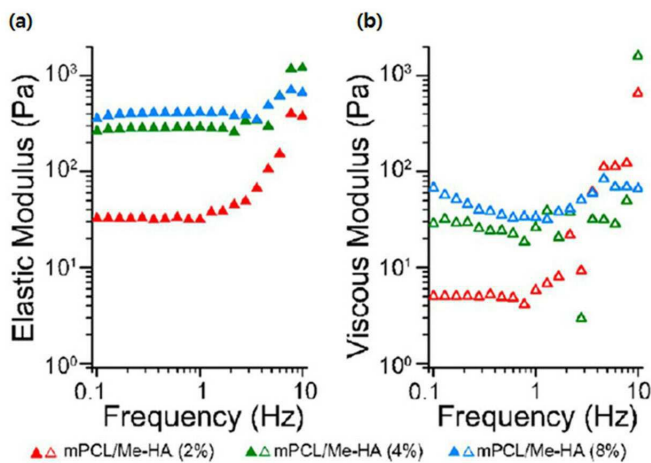
도면11



도면12

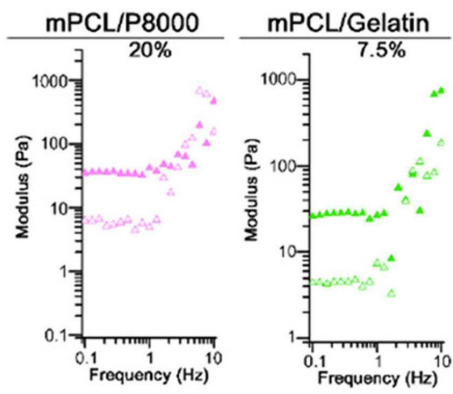


도면13

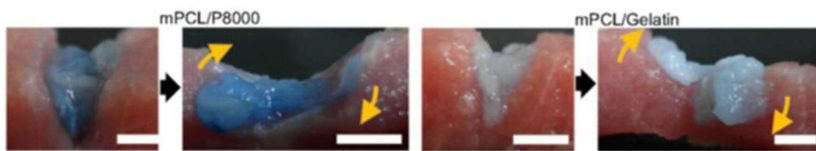


도면14

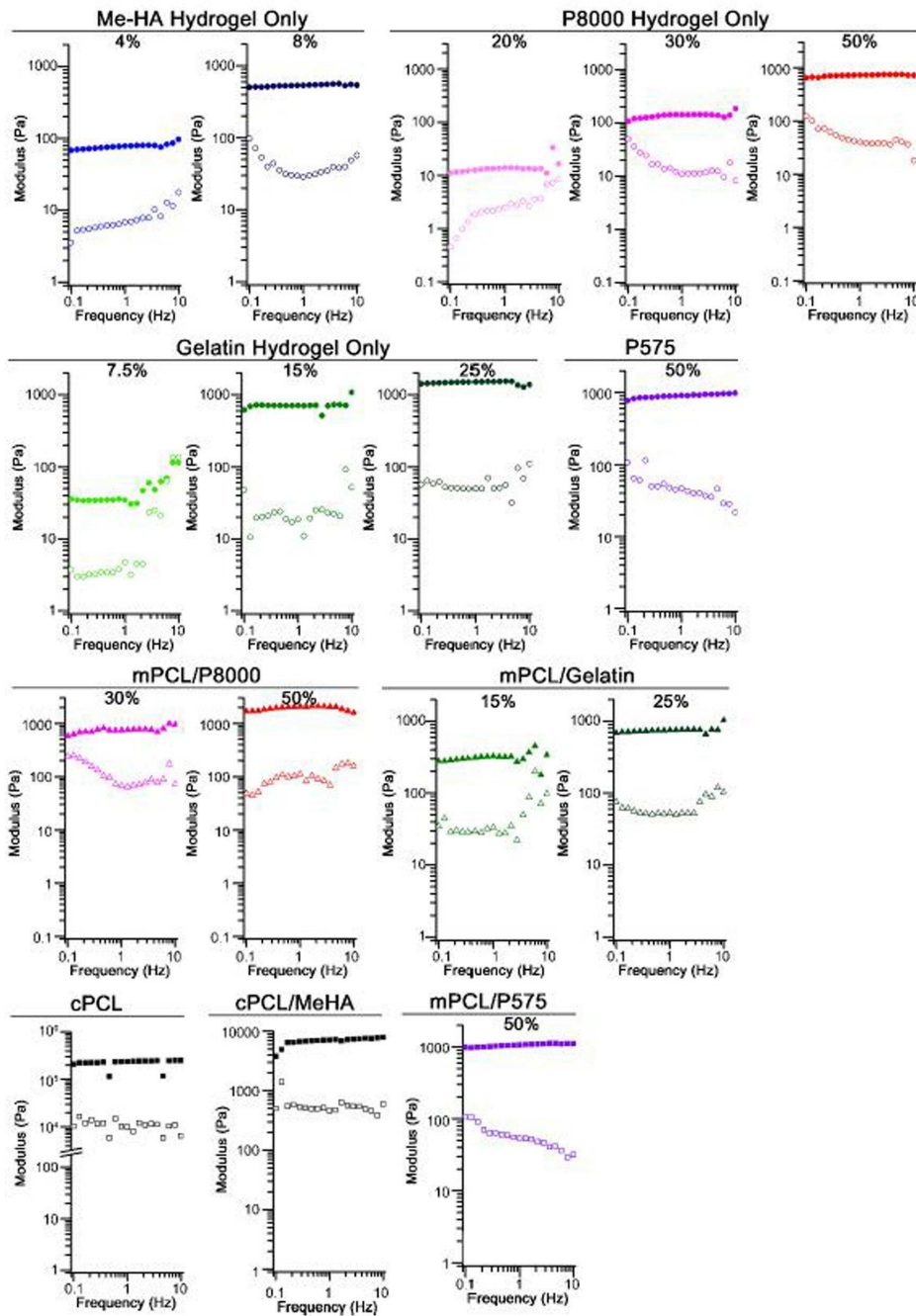
(a)



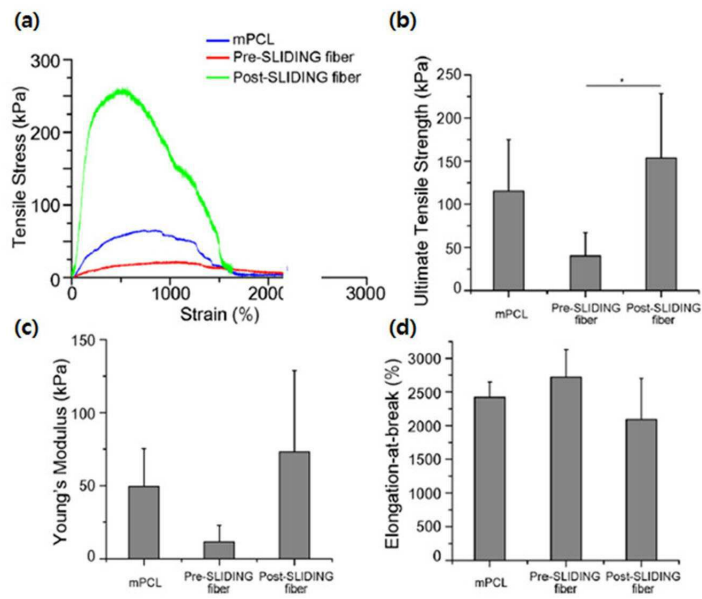
(b)



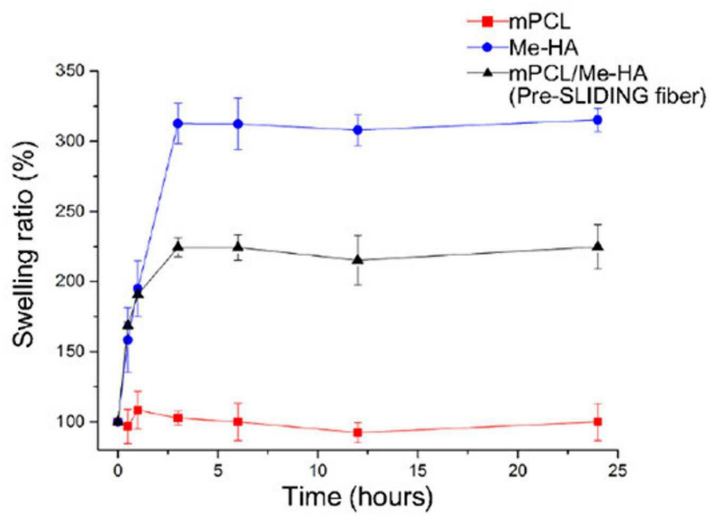
도면15



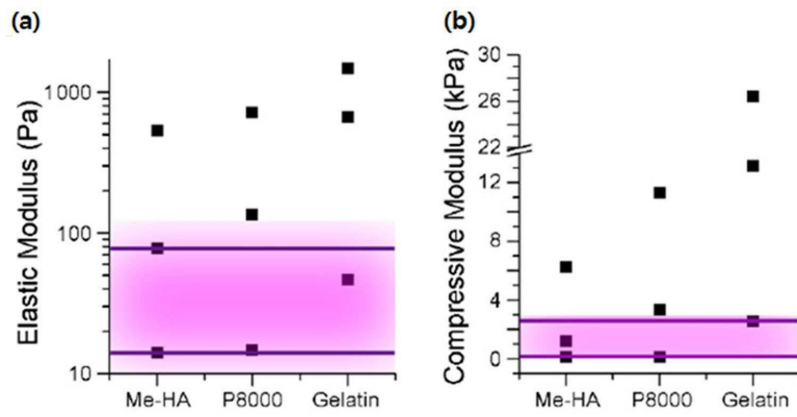
도면16



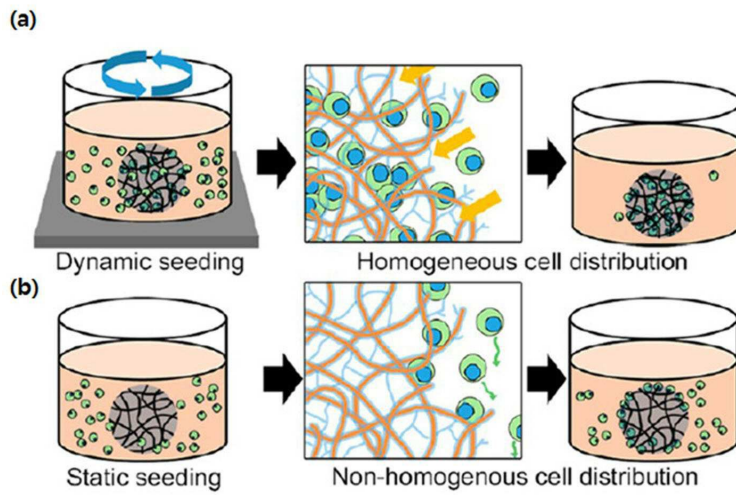
도면17



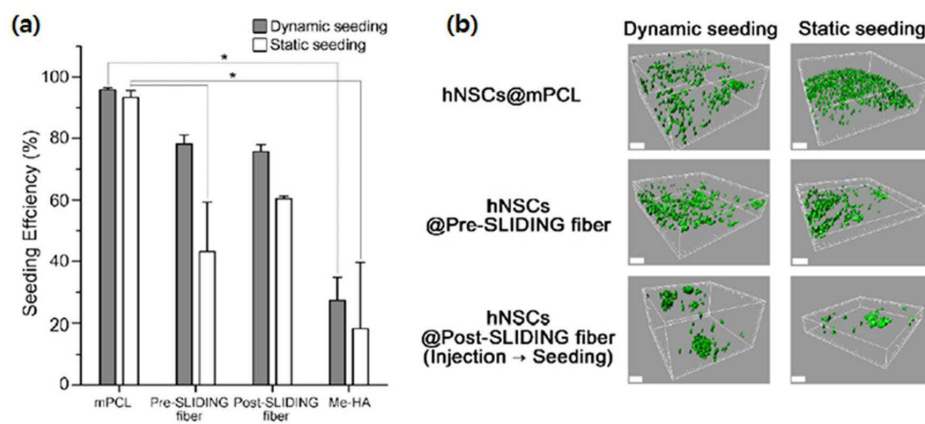
도면18



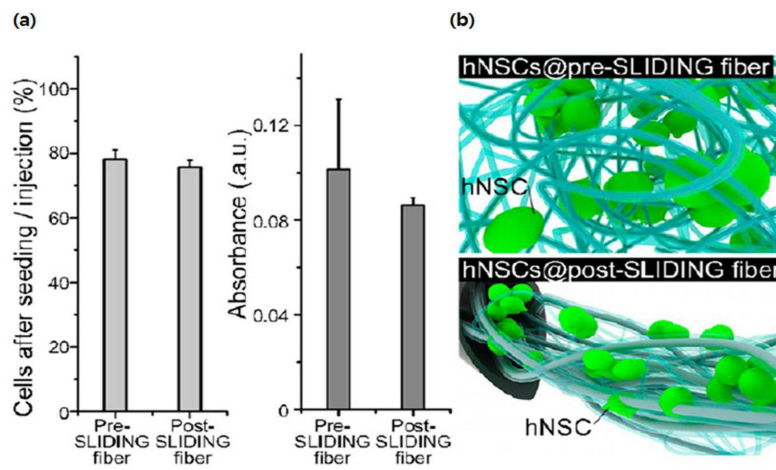
도면19



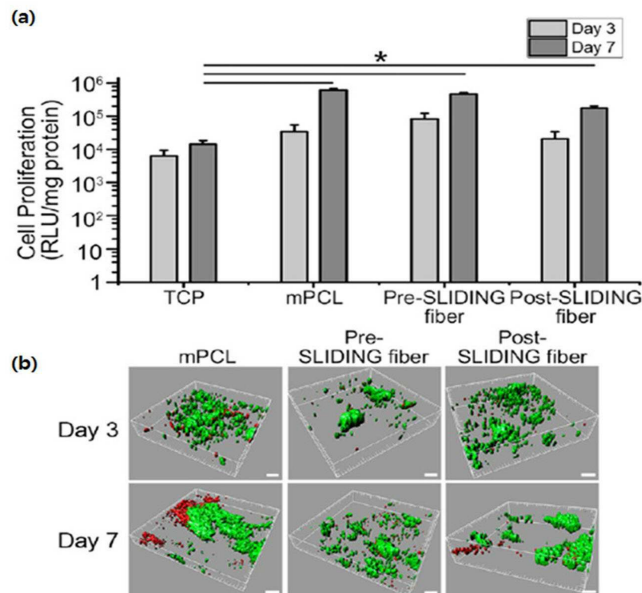
도면20



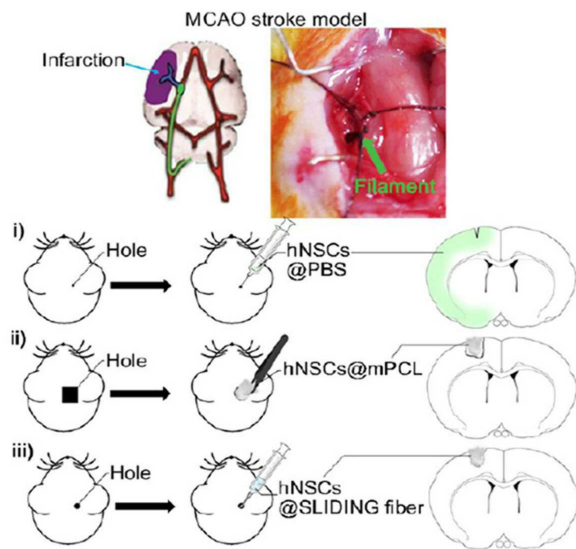
도면21



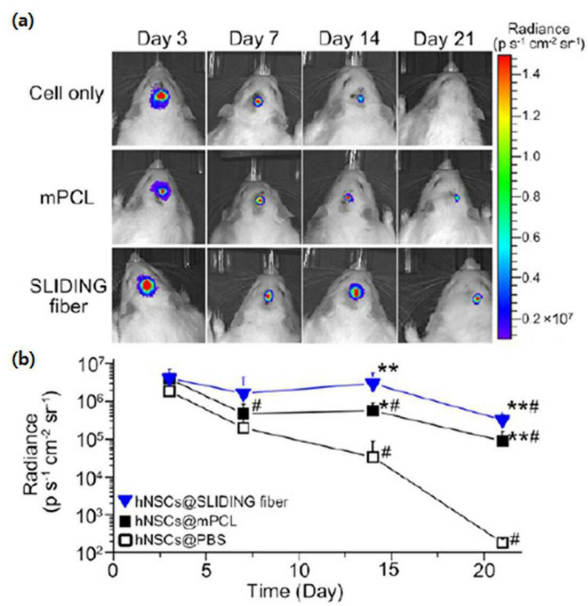
도면22



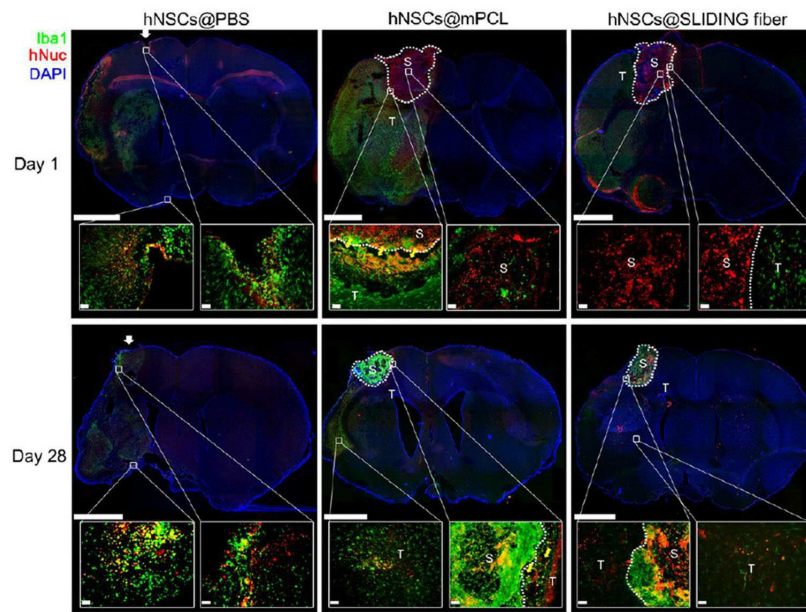
도면23



도면24



도면25



도면26

