



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0061286
(43) 공개일자 2024년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) C12M 1/42 (2017.01)
C12M 3/06 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01) GOIN 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12M 21/08 (2013.01)
C12M 23/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0142794
(22) 출원일자 2022년10월31일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강대로 100(한강로2가)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박필준
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920(보라동)
김민섭
서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
팬코리아특허법인

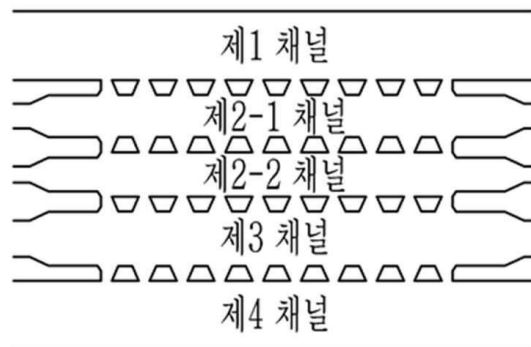
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 생체 외 림프관 신생 유도 장치와 방법, 및 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법

(57) 요약

각질형성세포를 주입하는 제1 채널; 상기 제1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐을 주입하는 제2 채널; 상기 제2 채널과 맞닿아 있고 콜라겐 및/또는 피브린을 주입하는 제3 채널; 및 상기 제3 채널과 맞닿아 있고 림프세포를 주입하는 제4 채널;을 포함하며, 상기 채널들은 각각 양 말단에 각각 시료 유입구 및 시료 유출구를 포함하고, 상기 채널들이 맞닿아 있는 채널 경계부는 이격된 블록으로 구획되어 있는, 생체 외 림프관 신생 유도 장치, 생체 외 림프관 신생 유도 방법 및 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 35/08 (2013.01)

C12N 5/0629 (2013.01)

C12N 5/0634 (2023.05)

C12N 5/0697 (2013.01)

G01N 33/502 (2013.01)

C12N 2501/165 (2013.01)

C12N 2533/50 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

(72) 발명자

정석

서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가)

최시은

서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가)

오수정

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 (보라동)

명세서

청구범위

청구항 1

각질형성세포가 주입되는 제1 채널;
상기 제1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2 채널;
상기 제2 채널과 맞닿아 있고 콜라겐 및/또는 피브린이 주입되는 제3 채널; 및
상기 제3 채널과 맞닿아 있고 림프세포가 주입되는 제4 채널;을 포함하며
상기 채널들은 각각 양 말단에 각각 시료 유입구 및 시료 유출구를 포함하고,
상기 채널들이 맞닿아 있는 채널 경계부는 이격된 블록으로 구획되어 있는,
생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 2

제1항에서,
상기 제2 채널은
상기 제1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2-1 채널; 및
상기 제2-1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2-2 채널
을 포함하는,
생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 3

제2항에서,
상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮은,
생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 4

제3항에서,
상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 미만이고,
상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 이상인,
생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 5

제3항에서,
상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮은,
생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 6

제5항에서,
상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 3mg/ml 미만인,

생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 7

제1항에서,

상기 림프세포는 인간 피부 림프 내피 세포(HDLEC; Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)를 포함하는,
생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 8

제1항에서,

상기 제1 채널은 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합이 더 주입되는,
생체 외 림프관 신생 유도 장치.

청구항 9

(a) 제2 채널 및 제3 채널 각각에 콜라겐 및/또는 피브린을 주입하는 단계;
(b) 제1 채널에 각질형성세포 및 배양배지를 주입하고 상기 각질형성세포를 배양시키는 단계; 및
(c) 상기 (a) 및 (b) 단계 이후에 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계;
를 포함하는,
생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 10

제9항에서,

상기 (c) 단계는,
상기 (a) 및 (b) 단계 직후 하루 이상의 시간이 경과한 후에 실시하는 단계인,
생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 11

제9항에서,

상기 제2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계는,
상기 제1 채널과 맞닿아 있는 제2-1 채널 및 상기 제 2-1 채널과 맞닿아 있는 제2-2 채널에 콜라겐을 주입하여
각질형성세포를 배양시키는 단계인,
생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 12

제11항에서,

상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮은,
생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 13

제12항에서,

상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 미만이고,
상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 이상인,

생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 14

제11항에서,

상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮은,

생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 15

제14항에서,

상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 3mg/ml 미만인,

생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 16

제9항에서,

상기 림프세포는 인간 피부 림프 내피 세포(HDLEC; Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)를 포함하는,

생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 17

제9항에서,

상기 (c) 단계 이후에 상기 제1 채널에 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합을 주입하는 단계를 더 포함하는,

생체 외 림프관 신생 유도 방법.

청구항 18

(a) 제2 채널 및 제3 채널 각각에 콜라겐 및/또는 피브린을 주입하는 단계;

(b) 제1 채널에 각질형성세포 및 배양배지를 주입하고, 상기 각질형성세포를 배양시키는 단계;

(c) (a) 및 (b) 단계 이후에 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계; 및

(d) 제1 채널의 시료 유입구에 후보물질을 처리하는 단계;

를 포함하는

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 19

제18항에서,

상기 (c) 단계는,

상기 (a) 및 (b) 단계 직후 하루 이상의 시간이 경과한 후에 실시하는 단계인,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 20

제18항에서,

상기 제2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계는,

상기 제1 채널과 맞닿아 있는 제2-1 채널 및 상기 제 2-1 채널과 맞닿아 있는 제2-2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계인,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 21

제20항에서,

상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮은,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 22

제21항에서,

상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 미만이고,

상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 이상인,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 23

제20항에서,

상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮은,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 24

제23항에서,

상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 3mg/ml 미만인,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 25

제18항에서,

상기 림프세포는 인간 피부 림프 내피 세포(HDLEC; Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)를 포함하는,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

청구항 26

제18항에서,

상기 (c) 단계 이후에, 상기 제1 채널에 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합을 주입하는 단계를 더 포함하는,

림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 기재는 생체 외 림프관 신생 유도 장치, 생체 외 림프관 신생 유도 방법 및 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피하의 림프관은 피부세포의 대사 과정 중 발생한 노폐물과 독소를 배출하는 역할을 하며, 랑게르한스 세포의 배출 통로이기도 하다. 피하에서 림프관이 제 기능을 하지 못하면 피부의 탄력이 떨어지고 조로가 일어나며 여드름이 생길 수 있다.

[0003] 그러나, 피하 림프관 생성 및 활성화에 대한 중요성을 인식하고 있음에도 불구하고, 실제 피하 림프관의 생성

및 활성화를 위한 방법에 대해서는 연구의 진전이 거의 전무한 상태이다. 그 원인으로는 예전에는 동물실험을 통해 림프관 신생 및 활성화 여부를 확인하였으나, 동물실험 금지법에 의해 동물실험이 수행이 매우 어려워진 상황도 한 몫을 하지만, 무엇보다도 현재까지 림프세포는 바닥에 부착된 2차원 형태로만 배양시켰기에, 실제 인간의 림프세포를 그대로 모방하는 데 한계가 있었기 때문이다. 즉, 2차원으로 배양된 림프세포에는 실제 인간 림프세포에서 발견되는 3차원 조직 및 세포 표현형이 없기에, 실험실에서의 연구 결과가 그대로 인간에게도 적용되지 못하는 경우가 대부분이다. (기존 2차원 시스템에서 림프 세포를 배양하면 3차원 구조의 내강을 이루는 온전한 림프관을 구현하기가 어렵다.)

[0004] 나아가, 기술이 진보함에 따라 복잡한 세포 배양 방법들이 개발되었음에도 불구하고, 아직도 3차원 구조의 내강을 이루는 온전한 형태의 림프관을 형성하지 못하고 있으며, 뿐만 아니라 2종 이상의 세포를 동시에 배양하면서, 특정 소재가 배양되는 세포에 미치는 영향 등을 함께 확인할 수 있는 방법과 장치는 전무하다 해도 과언이 아니다.

[0005] 이에 본 발명자들은 동물을 이용한 실험없이도 제품의 안전과 효능을 신뢰할 수 있도록 동물 모델을 대체하는 플랫폼의 개발이 매우 시급하다는 점을 명확하게 인식한 후, 수년에 걸친 각고의 노력 끝에, 실제 인간의 신체, 즉 인간 림프관 유사성이 높은 복잡하고 고도화된 모델, 다시 말해 생체 외 림프관 신생 유도 장치 및 방법을 개발하고, 나아가 상기 장치 및 방법을 이용하여 림프관 신생 활성화 소재를 스크리닝하는 방법까지 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 구현예는 생체 외 림프관 신생 유도 장치를 제공하려는 것이다.

[0007] 다른 일 구현예는 생체 외 림프관 신생 유도 방법을 제공하려는 것이다.

[0008] 또 다른 일 구현예는 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법을 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 구현예에 따르면, 각질형성세포가 주입되는 제1 채널; 상기 제1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2 채널; 상기 제2 채널과 맞닿아 있고 콜라겐 및/또는 피브린이 주입되는 제3 채널; 및 상기 제3 채널과 맞닿아 있고 림프세포가 주입되는 제4 채널;을 포함하며, 상기 채널들은 각각 양 말단에 각각 시료 유입구 및 시료 유출구를 포함하고, 상기 채널들이 맞닿아 있는 채널 경계부는 이격된 블록으로 구획되어 있는, 생체 외 림프관 신생 유도 장치를 제공한다.

[0010] 상기 제2 채널은 상기 제1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2-1 채널; 및 상기 제2-1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2-2 채널을 포함할 수 있다.

[0011] 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있다.

[0012] 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 미만이고, 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 이상일 수 있다.

[0013] 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있다.

[0014] 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 3mg/ml 미만일 수 있다.

[0015] 상기 림프세포는 인간 피부 림프 내피 세포(HDLEC; Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)를 포함할 수 있다.

[0016] 상기 제1 채널은 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합이 더 주입될 수 있다.

[0017] 다른 일 구현예에 따르면, (a) 제2 채널 및 제3 채널 각각에 콜라겐 및/또는 피브린을 주입하는 단계; (b) 제1 채널에 각질형성세포 및 배양매지를 주입하고 상기 각질형성세포를 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b) 단계 이후에 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계;를 포함하는, 생체 외 림프관 신생 유도 방법을 제공한다.

[0018] 상기 (c) 단계는, 상기 (a) 및 (b) 단계 직후 하루 이상의 시간이 경과한 후에 실시하는 단계일 수 있다.

- [0019] 상기 제2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계는, 상기 제1 채널과 맞닿아 있는 제2-1 채널 및 상기 제 2-1 채널과 맞닿아 있는 제2-2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계일 수 있다.
- [0020] 상기 생체 외 림프관 신생 유도 방법은 상기 (c) 단계 이후에 상기 제1 채널에 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합을 주입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 생체 외 림프관 신생 유도 방법에서, 각 채널에 주입되는 콜라겐 농도 및 림프세포에 대한 것은 전술한 것과 동일할 수 있다.
- [0022] 또 다른 일 구현예는 (a) 제2 채널 및 제3 채널 각각에 콜라겐 및/또는 피브린을 주입하는 단계; (b) 제1 채널에 각질형성세포 및 배양배지를 주입하고 상기 각질형성세포를 배양시키는 단계; (c) (a) 및 (b) 단계 이후에 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계; 및 (d) 제1 채널의 시료 유입구에 후보물질을 처리하는 단계;를 포함하는 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 (c) 단계는, 상기 (a) 및 (b) 단계 직후 하루 이상의 시간이 경과한 후에 실시하는 단계일 수 있다.
- [0024] 상기 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법은 상기 (c) 단계 이후에, 상기 제1 채널에 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합을 주입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법에서, 각 채널에 주입되는 콜라겐 농도 및 림프세포에 대한 것은 전술한 것과 동일할 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 및 방법에 의하면, 하나의 플랫폼 내에서 림프 세포를 배양하여 3차원 림프관을 구성한 후, 자극에 따른 새로운 림프관 형성 여부와 림프 구조의 변화 등을 3차원으로 관찰할 수 있다. 또한, 상기 생체 외 림프관 신생 유도 장치를 이용하면 새로이 형성된 림프관의 3차원 형성 평가 외에도 림프 단일층의 특성 변화 평가, 세포내 특정 RNA 및 단백질 분비 여부 평가가 모두 가능하므로, 림프관 신생 활성화 소재를 스크리닝하는 장치 및 방법으로도 얼마든지 전용할 수 있다.
- [0027] 즉, 일 구현예에 따르면, 각질형성세포(Keratinocytes, KC) 및 인체 유래 림프 세포(Human dermal lymphatic endothelial cells, HDLECs)의 랩온어칩(Lab on a Chip) 상 공배양 시스템 확립 및 이를 통한 인체 유래 림프 세포의 활성화 소재 스크리닝 시스템 확보가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치를 구성하는 제1 채널, 제2 채널, 제3 채널 및 제4 채널을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치를 나타낸 모식도이다. 도 2에서 시료 유입구와 시료 유출구는 서로 뒤바뀔 수도 있다.
- 도 3은 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치에서 신생되고 있는 림프관의 Lymphangiogenesis area 관찰 사진이다.
- 도 4는 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 내에 주입되는 물질의 종류에 따라 영향을 받는 림프관의 Lymphangiogenesis area를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치에서 신생되고 있는 림프관의 Lymphangiogenesis Branch Number 관찰 사진이다.
- 도 6은 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 내에 주입되는 물질의 종류에 따라 영향을 받는 림프관의 Lymphangiogenesis Branch Number를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치에서 신생되고 있는 림프관의 Lymphangiogenesis Separated Branch 관찰 사진이다.
- 도 8은 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 내에 주입되는 물질의 종류에 따라 영향을 받는 림프관의 Lymphangiogenesis Separated Branch를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명의 구현예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예에 한정되지 않는다.
- [0030] 본 명세서에서 별도의 정의가 없는 한, "조합"이란 혼합 또는 공중합을 의미한다. 또한 "공중합"이란 블록 공중합 내지 랜덤 공중합을 의미하고, "공중합체"란 블록 공중합체 내지 랜덤 공중합체를 의미한다.
- [0031] 본 명세서에서 "미세유체칩"이란, 마이크로미터 지름의 미세한 관 안에 시료를 주입하여 림프 세포의 림프관 신생 유도 여부를 확인할 수 있는 플랫폼을 의미한다.
- [0032] 종래에도 림프 세포를 배양하는 기술은 있었으나, 모두 2차원으로 바닥에 부착된 림프 세포를 배양하는 정도에 불과하여, 특정 물질의 림프 세포에 대한 영향과 독성 등 다양한 기전을 평가하는 데는 한계가 있었다.
- [0033] 구체적으로, 종래에는 림프 활성화에 관한 실험은 인체 유래 림프 세포(HDEL C)를 이용한 단일 배양법을 주로 적용하다, 최근에는 각질형성세포의 배양액을 이용한 공배양 실험을 통해 림프 활성화 실험을 수행하기도 하지만, 이는 실시간 반응성을 볼 수도 없으며, 각질형성세포에서 발생하는 다양한 요인들에 대한 인체 유래 림프 세포(HDEL C)의 명확한 영향력을 드러내는데 한계가 있을 수 밖에 없었다.
- [0034] 그러나, 본 발명자들은 미세유체칩을 이용하여, 인체 유래 각질형성 세포(KC)와 림프 세포(HDEL C)을 공배양할 수 있는 시스템을 세계 최초로 구현하였을 뿐만 아니라, 이를 유의적으로 활용할 수 있도록 다양한 물질(천연물 및 합성 화합물 등의 후보물질; 예컨대 발효인삼 추출물, 타우린, 베타시토스테롤, 감초산 등)의 lymphangiogenesis 확인이 가능한 시스템(또는 lymphangiogenesis 검증을 위한 스크리닝 시스템)을 확보하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0035] 일 구현예에 따른 생체 외(in vitro) 림프관 신생 유도 장치는 내부에 세포외기질(Extracellular matrix; ECM) 환경을 조성하고, 각종 케모카인(chemokine) 등을 조절하여 3차원 구조의 내강을 이루는 온전한 형태의 림프관 단일층(lymphatic monolayer)을 구현할 수 있어, 천연물 등 특정 물질에 의해 림프관 단일층이 변화하는 현상, 특히 3차원 림프 모세관(intact lymphatic capillaries)의 형성 여부와 림프관 구조의 변화 여부에 대해 정확하게 평가할 수 있다. 즉, 천연물 등의 후보물질이 림프관(lymphatic monolayer) 신생(3D lymphangiogenesis, 3D lymphatic network)에 미치는 영향을 정확하게 확인할 수 있다는 점에서, 본원 발명은 2차원 형태로 림프 세포를 배양하던 종래 기술 등과 분명한 차이가 있다.
- [0036] 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치에서, 상기 “유도”는 분석, 측정, 관찰 또는 모니터링이란 용어로 대체되어도 무방할 수 있다.
- [0037] 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치에서, 상기 “장치”는 디바이스, 랩온어칩(lap on a chip), 시스템, 플랫폼 또는 미세유체칩이란 용어로 대체되어도 무방할 수 있다.
- [0038] 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치는 각질형성세포가 주입되는 제1 채널; 상기 제1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2 채널; 상기 제2 채널과 맞닿아 있고 콜라겐 및/또는 피브린(콜라겐, 피브린 또는 이들의 조합)이 주입되는 제3 채널; 및 상기 제3 채널과 맞닿아 있고 림프세포가 주입되는 제4 채널;을 포함하며, 상기 채널들은 각각 양 말단에 각각 시료 유입구 및 시료 유출구를 포함하고, 상기 채널들이 맞닿아 있는 채널 경계부는 이격된 블록으로 구획되어 있다.
- [0039] 예컨대, 상기 제2 채널은 상기 제1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2-1 채널; 및 상기 제2-1 채널과 맞닿아 있고 콜라겐이 주입되는 제2-2 채널을 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 콜라겐이 주입되는 제2 채널을 상기와 같이 2개의 서로 다른 채널(제2-1 채널 및 제2-2 채널)로 나눌 경우, 상기 콜라겐이 하나의 채널에만 주입되는 경우 대비, 제1 채널에 주입된 각질형성세포가 제2 채널 및 제3 채널을 거쳐 제4 채널로 이동하는 속도 및 시간을 제어하는 것이 용이해져, 제4 채널에 주입되는 림프 세포의 신생에 유리할 수 있다. 예컨대, 상기 콜라겐이 하나의 채널에만 주입되는 경우에는 상기 제1 채널에 주입된 각질형성세포의 이동속도가 너무 빨라 제4 채널에 주입된 림프 세포의 신생에 악영향을 미칠 수 있기에, 상기 콜라겐은 서로 상이한 2개의 채널에 각각 주입되는 것이 림프관 신생 유도 측면에서 유리할 수 있다.
- [0041] 예컨대, 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있다. 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도가 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 경우, 제4

채널에 주입된 림프 세포 배양에 보다 적절한 조건을 갖출 수 있어, 림프관 신생 유도 측면에서 유리할 수 있다.

[0042] 예컨대, 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 미만이고, 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 이상일 수 있다. 상기 제2-1 채널 및 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도가 상기와 같을 경우, 제4 채널에 주입된 림프 세포 배양에 최적화된 조건을 갖출 수 있어, 림프관 신생 유도 측면에서 유리할 수 있다. 구체적으로, 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 약 0.1mg/ml 내지 3.9mg/ml, 예컨대 약 0.5mg/ml 내지 3.5mg/ml, 예컨대, 약 1mg/ml 내지 3mg/ml, 예컨대 약 3mg/ml 정도이고, 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 약 4mg/ml 내지 7mg/ml, 예컨대 약 4.5mg/ml 내지 6.5mg/ml, 예컨대 약 5mg/ml 내지 6mg/ml, 예컨대 약 5mg/ml 정도이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 예컨대, 상기 제3 채널에 콜라겐이 주입될 경우, 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있다. 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도가 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 경우, 제4 채널에 주입된 림프 세포 배양에 보다 적절한 조건을 갖출 수 있어, 림프관 신생 유도 측면에서 유리할 뿐만 아니라, 후술하는 후보물질 처리 시의 림프관 신생에 미치는 영향을 보다 정확하게 판단하는 데 유리할 수 있다.

[0044] 예컨대, 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 약 3mg/ml 미만, 예컨대 약 0.1mg/ml 내지 2.9mg/ml, 예컨대 약 0.5mg/ml 내지 2.5mg/ml, 약 1mg/ml 내지 2mg/ml, 예컨대 약 2mg/ml 정도이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 예컨대, 상기 림프세포는 인간 피부 림프 내피 세포(HDLEC; Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 예컨대, 상기 각질형성세포는 인체 유래 각질형성세포를 포함할 수 있으며, 또한 각질 세포 또는 케라틴 세포를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 예컨대, 상기 제1 채널은 VEGF-A, VEGF-C, LYVE-1, Prox-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Occludin, VE-Cadherin, ZO-1, CD31, Reelin 또는 이들의 조합이 더 주입될 수 있다. 상기 VEGF-A, VEGF-C, LYVE-1, Prox-1, VEGFR-3, Occludin, VE-Cadherin, ZO-1, CD31 및 Reelin은 PCR 마커로서 mRNA 발현을 정량적으로 확인할 수 있기에 후술하는 후보물질 처리 시 상기 후보물질이 림프관 신생 유도에 미치는 영향을 보다 정확하게 확인할 수 있으며, 상기 LYVE-1, Prox-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Occludin, VE-Cadherin, ZO-1, CD31 및 Reelin은 면역 염색 마커로서 형광 염색이 가능해 단백질 발현을 시각적으로 확인할 수 있기에 역시 후술하는 후보물질 처리 시 상기 후보물질이 림프관 신생 유도에 미치는 영향을 보다 정확하게 확인할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 VEGF-A, VEGF-C, LYVE-1, Prox-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Occludin, VE-Cadherin, ZO-1, CD31, Reelin 또는 이들의 조합은 제1 채널에 주입됨으로써, 상기 콜라겐 및/또는 피브린과 함께 상기 각질형성세포의 이동속도를 적절하게 제어하는 역할도 수행할 수 있다.

[0048] 예컨대, 상기 콜라겐 대신 알지네이트(Alginate), 피브린(Fibrin), 히알루론산(Hyaluronic Acid), 아가로스(Agarose), PHEMA(Polyhydroxyethylmethacrylate), PVA(Polyvinyl alcohol), PEG(Poly(ethylene glycol)), PEO(Poly(ethylene oxide)), PEGDA(Poly(ethylene glycol) diacrylate), 젤라틴(Gelatin), 매트릭젤(Matrigel), PLLA(poly(L-lactic acid)), 카복시메틸셀룰로오스(Carboxymethylcellulose), 덱스트란(Dextran), 키토산(Chitosan) 또는 이들의 혼합물을 사용할 수도 있으나, 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치에서의 림프관 신생 유도 측면을 고려할 때, 콜라겐을 사용하는 것이 가장 바람직할 수 있으며, 상기 제3 채널에는 콜라겐 대신 피브린을 주입하여도 무방할 수 있다. 콜라겐은 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 내에 세포의 기질(extracellular matrix) 환경을 조성하여, 제1 채널에 주입된 각질형성세포가 채널 경계부의 이격된 블록들 사이를 통해 다른 채널로 이동하도록 도울 수 있으며, 이 때, 각 채널별로 콜라겐의 주입 농도를 상이하게 하여, 수두차(waterhead pressure) 등과 무관하게 상기 각질형성세포의 이동속도와 시간을 제어할 수 있고, 궁극적으로 제4 채널에 주입된 림프 세포로부터 림프관의 신생 유도를 도울 수 있다.

[0049] 예컨대, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I을 사용할 수 있다. 이 경우, 콜라겐 타입 II를 사용하는 경우 대비 림프관의 신생 유도 측면에서 유리할 수 있다.

[0050] 다른 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 방법은 (a) 제2 채널 및 제3 채널 각각에 콜라겐 및/또는 피브린을 주입하는 단계; (b) 제1 채널에 각질형성세포 및 배양매지를 주입하고 상기 각질형성세포를 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b) 단계 이후에 상기 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계;를

포함한다.

- [0051] 상기 (a) 단계 및 (b) 단계는 동시에 진행할 수도 있고, 또는 상기 (a) 단계 이후에 상기 (b) 단계를 실시할 수도 있고, 그 반대의 경우일 수도 있다. 다만, 상기 (c) 단계는 상기 (a) 단계 및 (b) 단계 이후에 진행해야 하며, 상기 순서에 의하지 않을 경우, 림프관 신생 유도가 잘 일어나지 않을 수 있다. 여기서, 동시에 진행한다는 것은 동시간대에 진행하는 것을 의미할 수도 있고, (a) 단계를 먼저 실시한 후, 이어서 곧바로 (b) 단계를 실시하는 것을 의미할 수도 있고, (b) 단계를 먼저 실시한 후, 이어서 곧바로 (a) 단계를 실시하는 것을 의미할 수도 있다. 또한, (a) 단계를 먼저 실시한 후, 이어서 하루 안에(같은 날에) (b) 단계를 실시하는 것을 의미할 수도 있고, (b) 단계를 먼저 실시한 후, 이어서 하루 안에(같은 날에) (a) 단계를 실시하는 것을 의미할 수도 있다.
- [0052] 예컨대, 상기 (c) 단계는, 상기 (a) 및 (b) 단계 직후 하루 이상의 시간이 경과한 후에, 상기 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계일 수 있다. 상기 (a) 및 (b) 단계 직후 하루 이내의 시간에 상기 제4 채널에 림프세포를 주입할 경우, 역시 림프관 신생 유도 측면에서 조금 불리할 수 있다.
- [0053] 예컨대, 상기 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계는, 상기 제4 채널에 림프세포 및 배양배지를 주입하고 상기 림프세포를 배양시키는 단계일 수 있다. 이 때, 상기 제4 채널에 주입되는 배양배지는 상기 제1 채널에 주입되는 배양배지가 상이할 수 있다.
- [0054] 예컨대, 상기 제2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계는, 상기 제1 채널과 맞닿아 있는 제2-1 채널 및 상기 제2-1 채널과 맞닿아 있는 제2-2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0055] 예컨대, 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있다.
- [0056] 예컨대, 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 미만이고, 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 이상일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0057] 예컨대, 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있다.
- [0058] 예컨대, 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 3mg/ml 미만일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0059] 예컨대, 상기 림프세포는 인간 피부 림프 내피 세포(HDLEC; Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)를 포함할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0060] 예컨대, 상기 (c) 단계 이후에 상기 제1 채널에 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합을 주입하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0061] 또 다른 일 구현예에 따른 림프관 신생 활성화 소재 스크리닝 방법은 (a) 제2 채널 및 제3 채널 각각에 콜라겐 및/또는 피브린을 주입하는 단계; (b) 제1 채널에 각질형성세포 및 배양배지를 주입하고 상기 각질형성세포를 배양시키는 단계; (c) (a) 및 (b) 단계 이후에 제4 채널에 림프세포를 주입하여 배양시키는 단계; 및 (d) 제1 채널의 시료 유입구에 후보물질을 처리하는 단계;를 포함한다.
- [0062] 예컨대, 상기 (c) 단계는, 상기 (a) 및 (b) 단계 직후 하루 이상의 시간이 경과한 후에, 상기 제4 채널에 림프세포를 주입하는 단계일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0063] 예컨대, 상기 제2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계는, 상기 제1 채널과 맞닿아 있는 제2-1 채널 및 상기 제2-1 채널과 맞닿아 있는 제2-2 채널에 콜라겐을 주입하여 각질형성세포를 배양시키는 단계일 수 있고, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0064] 예컨대, 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있고, 구체적으로 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 미만이고, 상기 제2-2 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 4mg/ml 이상일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0065] 예컨대, 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 상기 제2-1 채널에 주입되는 콜라겐 농도보다 낮을 수 있고, 구체적으로 상기 제3 채널에 주입되는 콜라겐 농도는 3mg/ml 미만일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.

- [0066] 예컨대, 상기 림프세포는 인간 피부 림프 내피 세포(HDLEC; Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)를 포함할 수 있고, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0067] 예컨대, 상기 (c) 단계 이후에, 상기 제1 채널에 VEGF-A, VEGF-C 또는 이들의 조합을 주입하는 단계를 더 포함할 수 있고, 이에 대해서는 전술한 바와 같을 수 있다.
- [0068] 본원 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본원 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0070] **(실시예)**
- [0071] **생체 외 림프관 신생 유도 장치 제조**
- [0072] 생체 외 림프관 신생 유도 장치는 4 개의 유닛을 가지며, 각 유닛은 각질형성세포가 주입되는 제1 채널, 콜라겐이 주입되는 제2-1 채널, 콜라겐이 주입되는 제2-2 채널, 콜라겐 및/또는 피브린이 주입되는 제3 채널 및 림프세포가 주입되는 제4 채널로 구성되었다. 각 채널에는 배지와 시료를 공급하고, 또 배지와 시료를 유출시킬 수 있는 2 개의 저장소(reservoir; 시료 유입구 및 시료 유출구)가 있으며 이격된 블록을 통해 서로 구획되어 있다. 제1 채널, 제2-1 채널, 제2-2 채널, 제3 채널 및 제4 채널을 일련의 순서로 배치하였다.
- [0073] 구체적으로, PDMS base와 경화제를 10:1 비율로 섞은 mixture를 만든 후, 웨이퍼에 상기 mixture를 붓고 진공 챔버에서 20분간 둔 후, blower를 이용해 기포를 제거하였다. 이 후, 80℃ 건조 오븐에서 2시간 동안 경화하고, 생검 펀치(Biopsy punch)로 뚫어 저장소(reservoir)를 만들고, 시린지(syringe)로 gel port 뚫어 칩을 제조하였다. 3차 증류수에 준비된 상기 칩을 넣고 autoclave로 멸균하고, 별도로 먼지를 제거한 cover glass를 autoclaving jar에 넣어 autoclave로 멸균하였다. 물기를 제거한 뒤, 상기 칩과 cover glass를 80℃ 건조 오븐에서 말리고, 잘 마른 칩과 cover glass를 플라즈마 챔버(plasma chamber)에 넣어 플라즈마 처리한 후 접합(bonding)시켜, 도 2에 도시된 형상의 장치를 제조하였다. 상기 접합(Bonding) 직후, 2mg/ml PDA solution으로 2시간 동안 코팅하고, 3차 증류수로 3회 세척(washing) 후, 건조 오븐에서 24시간 이상 건조(over-night)하여, 최종적으로 생체 외 림프관 신생 유도 장치를 제조하였다.
- [0074] **3차원 형태로 세포 공배양**
- [0075] (Day 1; gel filling + NHEK seeding)
- [0076] 1) 제2-1 채널에 3mg/ml의 collagen type I 을, 제2-2 채널에 5mg/ml의 collagen type I 을, 제3 채널에 2mg/ml의 collagen type I 을 주입(filling)하고, 제4 채널에는 공기가 주입된 상태로 유지하여, humid chamber 안에서 37℃, 24시간 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0077] 2) 75T flask에 3ml의 Accutase를 넣고 37℃, 10분간 인큐베이터에서 배양하여 NHEK(각질형성세포)를 떼어냈다. 이 후, 12ml의 PBS로 harvest하여 1300rpm, 5분간 원심분리하였다. 이어서, KGM medium을 넣어주어 1.2x10⁶ cells/ml 농도로 cell suspension을 만들고, 제1 채널에 40ul의 cell suspension을 넣고 좌우로 잘 기울여 각질형성세포가 고르게 분포되도록 하였다. 각질형성세포가 제1 채널에 잘 쌓인 것을 확인한 후 37℃, 이틀 간 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0078] (Day 3; NHEK differentiation + gel filling + HDLEC seeding)
- [0079] 75T flask에 3ml의 Accutase를 넣고 37℃, 10분간 인큐베이터에서 배양하여 림프 세포(HDLEC)를 떼어냈다. 이 후, 12ml의 PBS로 harvest하여 1300rpm, 5분간 원심분리하였다. 이어서, 제 1채널에 있는 KGM medium을 제거한 후, 제 4채널에 EGM-2MV medium을 넣어주어 2x10⁶ cells/ml 농도로 cell suspension을 만들고, 40ul의 cell suspension을 넣고 좌우로 잘 기울여 림프 세포가 고르게 분포되도록 하였다. 림프 세포가 제4 채널에 잘 들어간 것을 확인한 후 37℃, 2시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 이후, 림프 세포가 잘 부착된 것을 육안으로 확인한 후, 제 1채널이 위로 가도록 림프관 신생 유도 장치를 45° 이상 기울여 37℃, 3일간 인큐베이터에서 배양하면서 각질형성세포의 분화를 유도하였다.
- [0080] (Day 6; 마커 및/또는 후보물질 처리)

[0081] 제1 채널에 VEGF-C 및 후보물질을 처리하였으며, 구체적인 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

	실험예 1	실험예 2	실험예 3	실험예 4	실험예 5	대조군(Negative Control)
VEGF-C (ng/ml)	100	-	-	100	100	-
발효인삼 추출물(μ g/ml)	-	50	250	50	250	-

[0084] 후보물질로 발효인삼 추출물을 사용하였으며, 구체적으로 하기 방법을 통해 발효인삼 추출물을 얻었다.

[0085] 수삼을 물로 2~3회 세척한 후, 30분 동안 유념하고, 1~2cm 크기로 절단/파쇄한 뒤, 밀봉(50℃)시켜 혐기 조건에서 3주 동안 발효시켰다. 이 후, 하루동안 60℃의 열풍으로 건조시켜, 발효인삼을 얻었다.

[0086] 상기 발효인삼을 50~80% EtOH에 넣고 1~5시간 동안 50~80℃에서 1~3회 반복하여 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(Whatman) 1번 여과지로 감압여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후, 정제하여 발효인삼 추출물을 제조하였다.

[0087] Lymphangiogenesis 분석

[0088] 도 3을 보면, 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 내에서 림프관 신생이 일어나고 있음을 분명히 확인할 수 있는데, 그 면적이 클수록 림프관 신생 유도가 잘 이루어지고 있는 것이다. 도 4에서 마커 및/또는 후보물질의 처리 조성에 따라 림프관 신생에 미치는 영향이 상이해짐을 알 수 있다. 실험예 4 및 실험예 5의 경우 림프관 신생이 매우 잘 유도됨이 확인되는 반면, 실험예 2 및 실험예 3의 경우 림프관 신생이 잘 유도되지 않음을 알 수 있다. 이로부터, 후보물질을 단독으로 처리하기 보다는, 후보물질과 마커를 동시에 처리하는 것이 림프관 신생 유도 측면에서 바람직하며, 상기 마커 농도 대비 상기 후보물질의 농도를 높이는 것이 림프관 신생 유도 측면에서 더욱 바람직한 것도 확인할 수 있다.

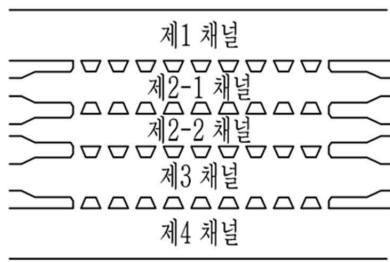
[0089] 도 5를 보면 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 내에서 림프관 신생이 일어나고 있음을 분명히 확인할 수 있는데, 가지수(branch number)가 많을수록 림프관 신생 유도가 잘 이루어지고 있는 것이다. 도 6에서 마커 및/또는 후보물질의 처리 조성에 따라 림프관 신생에 미치는 영향이 상이해짐을 알 수 있다. 실험예 5의 경우 림프관 신생이 매우 잘 유도됨이 확인되며, 실험예 1 내지 실험예 4 또한 실험예 5보다는 못하지만, 역시 림프관 신생이 잘 유도됨을 알 수 있다. 이로부터, 후보물질을 단독으로 처리하기 보다는, 후보물질과 마커를 동시에 처리하되, 상기 마커 농도 대비 상기 후보물질의 농도를 높이는 것이 림프관 신생 유도 측면에서 바람직한 것을 확인할 수 있다.

[0090] 도 7을 보면 일 구현예에 따른 생체 외 림프관 신생 유도 장치 내에서 림프관 신생이 일어나고 있음을 분명히 확인할 수 있는데, 분리된 가지수(seperated number)가 적을수록 림프관 신생 유도가 잘 이루어지고 있는 것이다. 도 8에서 마커 및/또는 후보물질의 처리 조성에 따라 림프관 신생에 미치는 영향이 상이해짐을 알 수 있다. 실험예 3 및 실험예 5의 경우 림프관 신생이 매우 잘 유도됨이 확인되며, 실험예 1, 실험예 2 및 실험예 4 또한 실험예 3 및 실험예 5보다는 못하지만, 역시 림프관 신생이 잘 유도됨을 알 수 있다. 이로부터, 후보물질을 단독으로 처리할 경우에는 후보물질의 농도를 높이는 것이 림프관 신생 유도 측면에서 바람직하고, 후보물질과 마커를 동시에 처리할 경우에는 상기 마커 농도 대비 상기 후보물질의 농도를 높이는 것이 림프관 신생 유도 측면에서 바람직한 것을 확인할 수 있다.

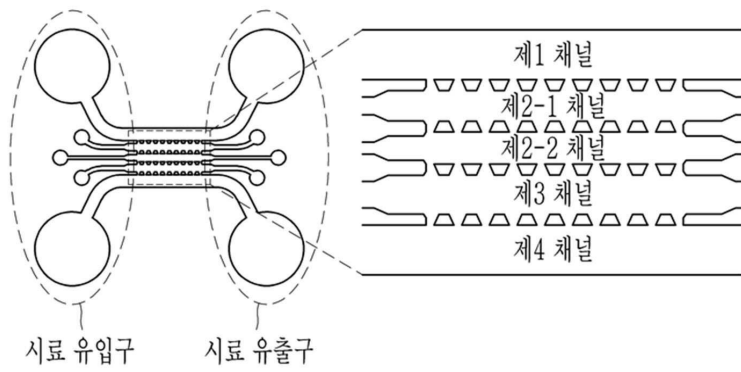
[0091] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예들에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리 범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구 범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리 범위에 속하는 것이다.

도면

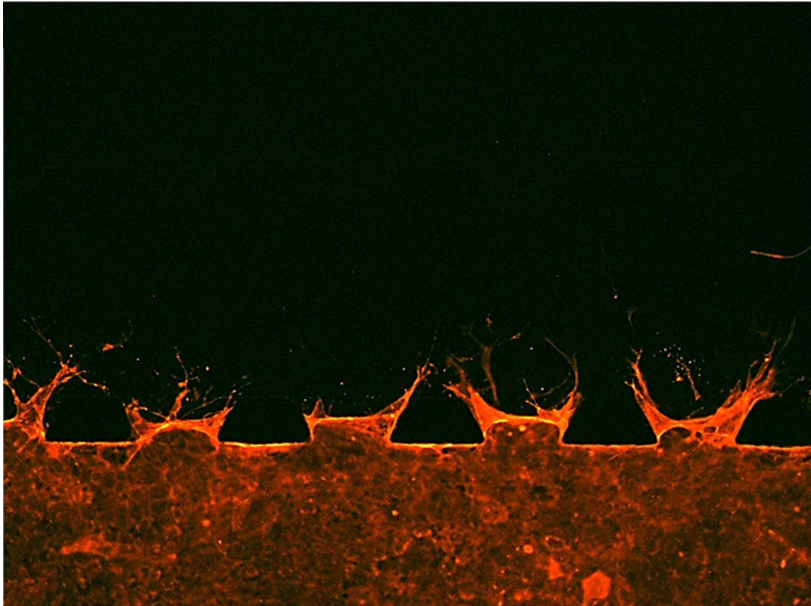
도면1



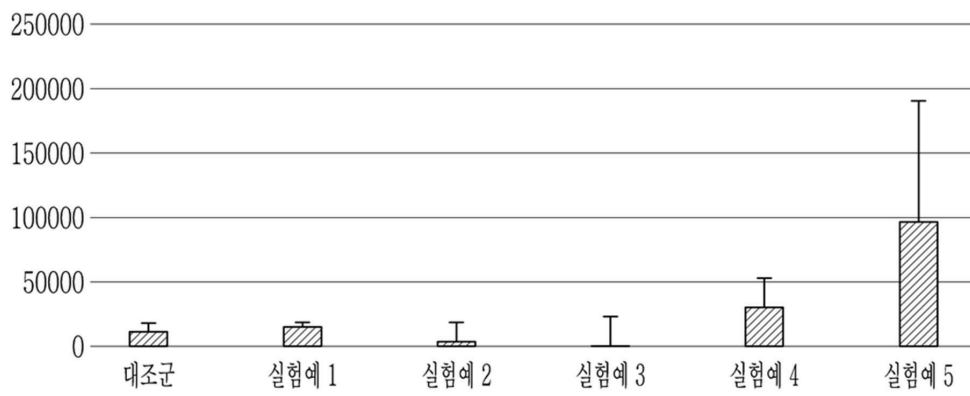
도면2



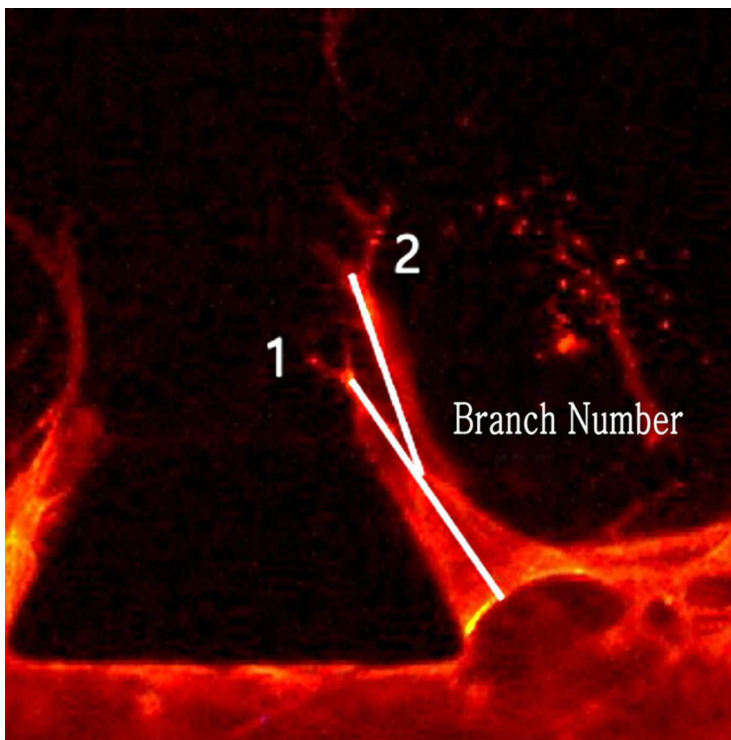
도면3



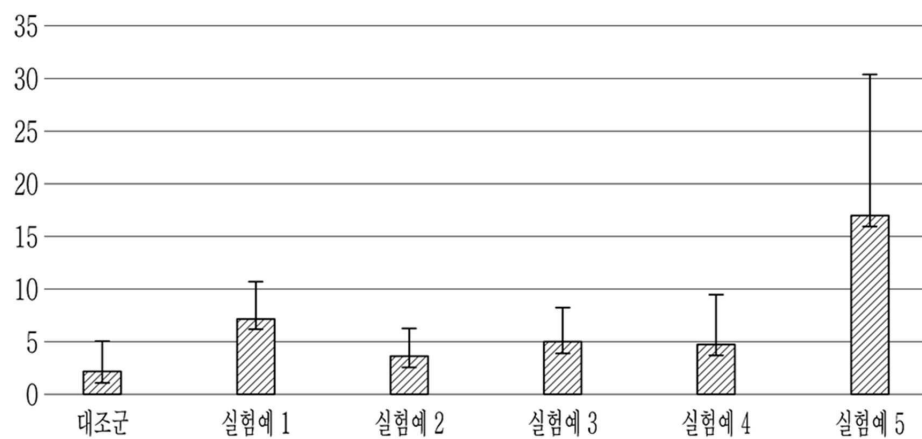
도면4



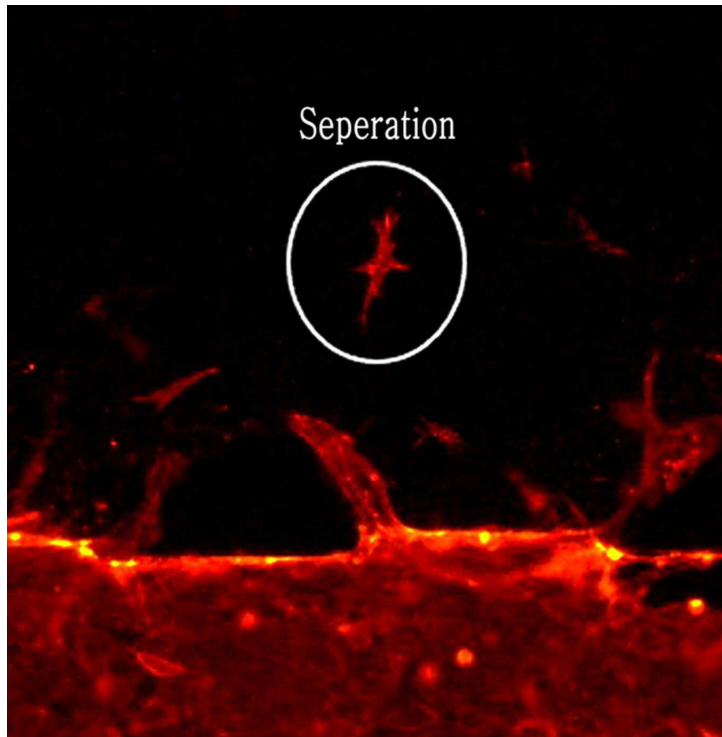
도면5



도면6



도면7



도면8

