

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0099309

(43) 공개일자 2020년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/00 (2006.01) C12M 1/12 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0068 (2013.01)

C12M 25/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0017113

(22) 출원일자 2019년02월14일

심사청구일자 2019년02월14일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

박경민

인천광역시 연수구 해송로 143 송도웰카운티1단지
아파트 119동 203호

이동신

경기도 광명시 광일로34번길 27, 202호

(74) 대리인

차준용

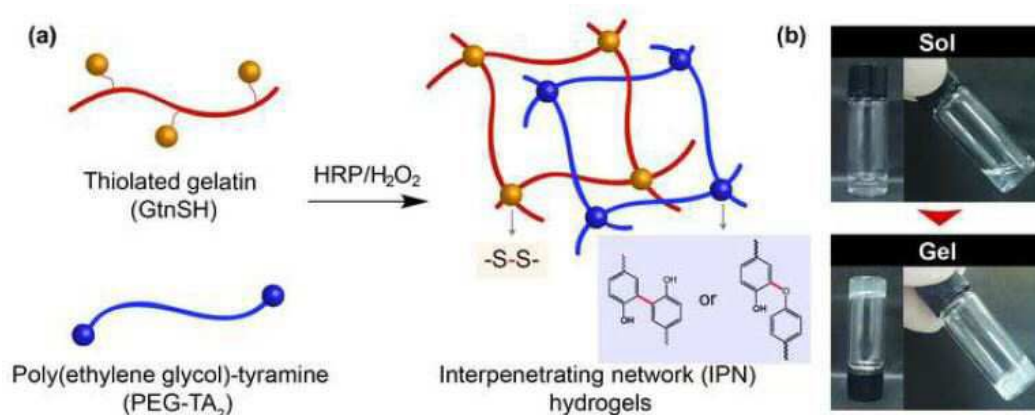
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 티올기가 도입된 천연 고분자; 및 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자가 가교 결합한 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔에 관한 것으로, 본 발명에 따른 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔은 독립적으로 조절 가능한 물리 화학적 특성을 나타내며, 단백질 분해 효소에 대한 저항성 및 인간 섬유 육종(HT1080) 세포의 장기간 배양에 대한 세포 적합성을 나타낸다. 또한 본 발명에 따른 하이드로겔에서 배양된 세포는 항암제인 5-플루오로우라실에 대하여 강한 내성을 가지며, 이는 암세포의 장기 배양을 위해 세포 친화성 세포 미세 환경을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 25/14 (2013.01)

C12N 5/0062 (2013.01)

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

티올기가 도입된 천연 고분자; 및

티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자가 가교 결합한 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고분자에 과산화효소(oxidase) 및 과산화수소(H_2O_2)를 첨가시켜 고분자들이 가교된 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 과산화효소는 호스래디시 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase), 글루타치온 퍼옥시데이즈(glutathione peroxidase), 할로퍼옥시데이즈(haloperoxidase), 미엘로퍼옥시데이즈(myeloperoxidase), 카탈라아제(catalase), 헤모프로틴(hemoprotein), 퍼옥사이드(oxide), 퍼옥시레독신(peroxiredoxin), 동물 헴-의존적 퍼옥시데이즈(animal heme-dependent peroxidases), 티로이드 퍼옥시데이즈(thyroid peroxidase), 바나듐브로모퍼옥시데이즈(vanadiumbromoperoxidase), 락토퍼옥시데이즈(lactoperoxidase), 티로시네이즈(tyrosinase), 및 카테콜 옥시데이즈(catechol oxidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 천연 고분자는 젤라틴, 키토산, 헤파린, 셀룰로스, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라틴, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 콜라겐, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴, 히알루론산, 피브리노젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 수용성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리비닐알콜(PVA) 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 수용성 고분자는 디-티라민(di-tyramine)을 형성하여 가교 결합하는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 디-티라민(di-tyramine)은 오르토(ortho) 위치의 탄소간 결합 또는 오르토(ortho) 위치의 탄소와 페녹시 산소 사이의 결합에 의하여 형성되는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 고분자 농도에 따라서 겔화시간 또는 상기 하이드로겔의 매트릭스의 기계적 강도를 조절할 수 있는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 티올기가 도입된 천연 고분자의 농도가 증가할수록 겔화시간이 증가하는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자의 농도가 증가할수록 겔화시간이 감소하는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 티올기가 도입된 천연 고분자의 농도가 증가할수록 상기 하이드로겔의 매트릭스의 기계적 강도가 감소하는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자의 농도가 증가할수록 상기 하이드로겔의 매트릭스의 기계적 강도가 증가하는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 13

제2항에 있어서,

상기 하이드로겔은 과산화효소 및 과산화수소(H_2O_2) 농도에 따라서 겔화시간 또는 상기 하이드로겔의 매트릭스의

기계적 강도를 조절할 수 있는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔은 단백질 분해효소(proteolytic enzymes)에 대하여 내성을 갖는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 단백질 분해효소는 콜라게나제(collagenase)인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔에서 배양된 세포는 2D(2차원) 환경에서 배양된 세포에 비하여 강한 약물 내성을 가지는 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 세포는 암세포인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 암세포는 섬유육종암, 난소암, 유방암, 위암, 대장암, 직장암, 폐암, 간암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 자궁암, 방광암, 다형성교모아세포종, 피부암, 흑색종, 두경부암, 후두암, 수모세포종, 인후두암, 구아암, 타액선암, 식도암, 골육종, 혈액암, 혀암, 담도암, 신경아교종, 뼈암, 원인불명원발암으로 이루어진 군에서 선택된 고형암세포인 것을 특징으로 하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔.

청구항 19

티올기가 도입된 천연 고분자; 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자; 과산화효소(peroxidase); 및 과산화수소(H_2O_2)를 포함하는 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔 조성물.

청구항 20

티올기가 도입된 천연 고분자; 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자; 과산화효소(peroxidase); 및 과산화수소(H_2O_2)를 혼합하는 단계를 포함하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔 제조방법.

청구항 21

티올기가 도입된 천연 고분자, 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자 및 세포를 혼합하여 세포 현탁액을 제조하는 단계; 및

상기 현탁액에 과산화효소(peroxidase); 및 과산화수소(H_2O_2)를 첨가하여 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 티올기가 도입된 천연 고분자; 및 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자가 가교 결합한 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(Interpenetrating Polymer Network, IPN) 하이드로겔에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 의료 기술의 발전에도 불구하고 암은 전세계적으로 주요 사망원인으로 알려져 있는 파괴적인 질병이다. 화학 요법을 위해 많은 신약이 개발되고 있지만, 현재의 전임상 모델(예를 들어, 체외 세포 및 체내 동물 모델)이 임상 시험에서 새로 개발된 약물의 치료 효능을 정확하게 예측할 수 없기 때문에 치료제의 임상 적용에 있어 높은 실패율을 초래하고 있다. 따라서 임상 결과를 정확하게 예측하는 전임상 모델의 개발은 암 치료의 과제로 여전히 남아있다. 진보된 전임상 모델을 개발하기 위해, 우리는 체내 종양 미세 환경을 더 잘 이해할 필요가 있으며, 이는 암 발병 및 전이 과정에서 중요한 요소로 연루된 것으로 알려져 있다. 체내 종양 환경은 비정상적인 세포 외 매트릭스 재구성, 종양-관련 혈관 신생 및 종양 덩어리의 압력을 포함하는 병리학적 상태를 나타낸다. 암 진행 및 전이를 조절하는데 있어 이들 매개 변수가 중요한 역할을 한다는 증거가 증가하고 있다. 따라서 암 연구에서 나타나는 최근 연구 동향은 체내 미세 종양환경을 정확하게 재현할 수 있는 생체 공학적 생체 재료를 사용하는 인공 종양 모델의 설계이다.

[0004] 생체재료 공학의 발전으로, 다양한 생체모방(bio-inspired) 생체 재료는 암 연구를 위한 체내 종양 미세 환경을 재구성하기 위한 인공 세포 미세 환경으로 이용되어 왔다. 이들 중, 고분자 하이드로겔은 체내 종양과 구조적 유사성 및 조정 가능한 특성으로 인해 인공 종양 구조를 형성하는 유망한 재료이다. 폴리머 하이드로겔의 인공 종양 모델의 개발을 위한 가장 기본적인 요건은 1) 매트릭스 내에서 균질하게 세포를 캡슐화하기 위한 적절한 상 전이 시간, 2) 암세포 성장을 지지하는 세포 적합성, 3) 장기간 세포 배양을 위한 하이드로겔 안정성, 4) 독립적으로 조절 가능한 물리 화학적 성질이다. 다양한 유형의 하이드로겔 물질이 조작성 종양 구조물을 생성하는데 사용되었지만, 체내 종양 미세 환경의 중요한 측면을 요점을 정교하게 모사할 수 있는 발전된 형태의 고분자 하이드로겔 물질의 개발은 여전히 과제로 남아있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) K.M. Park, D. Lewis, and S. Gerecht, Annu Rev Biomed Eng, 19, 109 (2017)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 명세서에서, 본 발명자는 3차원(3D) 종양 미세 환경을 제공할 수 있는 젤라틴과 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)로 구성된 새로운 유형의 IPN(interpenetrating polymer network) 하이드로겔을 제공한다. 상기 IPN 하이드로겔은

티올이 결합된 젤라틴과 티라민-컨쥬게이트된 PEG 부분 사이의 호스래디시 퍼옥시다제-매개 이중 가교 결합 반응을 통해 형성된다. 이들은 독립적으로 조절 가능한 겔화 시간과 조절 가능한 기계적 특성을 보여준다. IPN 하이드로겔은 단백질 분해 효소에 대한 내성과 장기간 암세포 배양에 대한 세포 적합성을 나타낸다. 또한 암세포의 활성 및 약물 내성에 미치는 매트릭스 강도(matrix stiffness)의 영향을 연구하기 위한 플랫폼으로 조작된 종양 모델을 사용한다. 본 발명자는 IPN 하이드로겔이 기초 암 생물학 연구와 새로 개발된 항암제 선별을 위한 조작된 종양 미세 환경을 만드는 유망한 재료라고 제안한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 티올기가 도입된 천연 고분자; 및 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자가 가교 결합한 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔을 제공한다.
- [0010] 상기 고분자에 과산화효소(peroxidase) 및 과산화수소(H_2O_2)를 첨가시켜 고분자들이 가교되어 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔을 형성하고, 상기 과산화효소는 호스래디시 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase), 할로퍼옥시다제(haloperoxidase), 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase), 카탈라아제(catalase), 헤모프로틴(hemoprotein), 퍼록사이드(peroxide), 퍼록시레독신(peroxiredoxin), 동물 헴-의존적 퍼옥시다제(animal heme-dependent peroxidases), 티로이드 퍼옥시다제(thyroid peroxidase), 바나듐브로모퍼옥시다제(vanadiumbromoperoxidase), 락토퍼옥시다제(lactoperoxidase), 티로시네이스(tyrosinase), 및 카테콜 옥시데이즈(catechol oxidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 호스래디시 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0011] 또한, 상기 천연 고분자는 젤라틴, 키토산, 헤파린, 셀룰로스, 텍스트란, 텍스트란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 케라틴, 케라탄 설페이트, 더마탄 설페이트, 알지네이트, 콜라겐, 알부민, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 비트로넥틴, 히알루론산, 피브리노겐으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 젤라틴이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 또한, 상기 수용성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리비닐알콜(PVA) 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜(PEG)이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 상기 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔은 상기 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자가 디-티라민(di-tyramine)을 형성하여 가교 결합하며, 상기 디-티라민(di-tyramine)은 오르토(ortho) 위치의 탄소간 결합 또는 오르토(ortho) 위치의 탄소와 페녹시 산소 사이의 결합에 의하여 형성되는 것을 특징으로 한다. 이와 함께 상기 티올기가 도입된 천연 고분자는 디설파이드 결합을 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 상기 하이드로겔은 티올기가 도입된 천연 고분자, 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자, 과산화효소 및 과산화수소(H_2O_2)에 따라서 겔화시간 또는 상기 하이드로겔의 매트릭스 기계적 강도(rigidity)를 조절할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 또한 상기 하이드로겔은 단백질 분해효소(proteolytic enzymes)에 대하여 내성을 갖는 것을 특징으로 하며, 바람직하게 상기 단백질 분해효소는 콜라게나제(collagenase)이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 또한 상기 하이드로겔에서 배양된 세포는 2D(2차원) 환경에서 배양된 세포에 비하여 강한 약물 내성을 가진다.
- [0017] 상기 세포는 암세포인 것을 특징으로 하며, 구체적으로는 섬유육종암, 난소암, 유방암, 위암, 대장암, 직장암, 폐암, 간암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 자궁암, 방광암, 다형성교모아세포종, 피부암, 흑색종, 두경부암, 후두암, 수모세포종, 인후두암, 구아암, 타액선암, 식도암, 골육종, 혈액암, 혀암, 담도암, 신경아교종, 뼈암, 원인불명원발암으로 이루어진 군에서 선택된 고형암세포 중 어느 하나이며, 바람직하게는 섬유육종암이지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0018] 다른 실시 예에 따르면, 본 발명은 티올기가 도입된 천연 고분자, 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자, 과산화효소(peroxidase) 및 과산화수소(H_2O_2)를 포함하는 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔 조성물을 제공한다.

- [0019] 다른 실시 예에 따르면, 티올기가 도입된 천연 고분자, 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자, 과산화효소(peroxidase) 및 과산화수소(H_2O_2)를 혼합하는 단계를 포함하는, 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔 제조방법을 제공한다.
- [0020] 다른 실시 예에 따르면, 티올기가 도입된 천연 고분자, 티라민(tyramine)을 포함하는 수용성 고분자 및 세포를 혼합하여 세포 현탁액을 제조하는 단계; 및
- [0021] 상기 현탁액에 과산화효소(peroxidase); 및 과산화수소(H_2O_2)를 첨가하여 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 세포배양 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 3차원 세포 배양용 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔은 독립적으로 조절 가능한 물리화학적 특성을 나타내며, 단백질 분해 효소에 대한 저항성 및 인간 섬유 육종(HT1080) 세포의 장기간 배양에 대한 세포 적합성을 나타낸다. 또한 본 발명에 따른 하이드로겔에서 배양된 세포는 항암제인 5-플루오로우라실에 대하여 강한 내성을 가지며, 이는 암세포의 장기 배양을 위해 세포 친화성 세포 미세 환경을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명에 따른 (a) 상호침투 중합체 네트워크(IPN) 하이드로겔 형성의 개략도, (b) 하이드로겔 상 전이에 대한 디지털 사진이다.
- 도 2는 (a) PEG-TA₂, (b) GtnSH, (c) HRP 및 (d) H_2O_2 의 농도 변화에 따른 하이드로겔 겔화 시간을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 단백질 분해 효소에 내성을 갖는 본 발명의 하이드로겔의 특성을 나타낸 그래프이다; 상이한 GtnSH 함량에서 (a) 1 wt% PEG-TA₂ 및 (b) 2 wt% PEG-TA₂.
- 도 4는 (a) PEG-TA₂, (b) GtnSH, (c) HRP 및 (d) H_2O_2 의 농도 변화 및 (e) 세포 캡슐화에 따른 하이드로겔의 탄성률(elastic modulus)(G')의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 종양 미세 환경으로서 본 발명의 하이드로겔 매트릭스의 기계적 강도에 따른 HT1080 세포 증식 효과를 나타낸 것으로, (a) 하이드로겔 내에서 배양된 세포의 광학 및 형광 이미지 및 (b) 매트릭스의 기계적 강도에 따라 세포 증식의 정량 분석 (c) 2D와 3D 모델 사이의 5-FU에 대한 약물 내성의 비교 (d) 5-FU에 대한 약물 내성에 대한 매트릭스의 기계적 강도의 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0028] 실험방법

- [0029] (1) 티올이 결합된 젤라틴(GtnSH) 및 티라민(tyramine)-컨쥬게이트된 PEG(PEG-TA₂)의 합성 및 특성화

[0030] 1) 티올이 결합된 젤라틴(GtnSH) 합성

- [0031] 이전에 보고된 바와 같이 2-이미노티올란 하이드로클로라이드(Traut's reagent, TR)를 사용하여 티올이 결합된 젤라틴(Thiolated gelatin, GtnSH)을 합성하였다. 40℃에서 질소(N_2) 대기하에 젤라틴(Gtn)(500 mg)을 50 mL 무수 DMSO에 용해시켰다. TR(50 mg, 0.36 mmol)을 5 mL의 무수 DMSO에 용해시켰다. 그 다음, TR 용액을 Gtn 용액에 첨가하고, N_2 대기하에 40℃에서 24시간 동안 반응을 진행하였다. 접합 반응(conjugative reaction) 후, 미접합 TR 분자를 제거하기 위하여 상기 용액을 5 mM HCl 용액에 대해 48시간 동안, 그 다음 1 mM HCl 용액에서 24시간 동안 투석하였다(분자량 컷-오프 = 3,500 Da). 투석 후, GtnSH 폴리머는 동결 건조에 의해 수득되었고,

상기 생성물은 사용 전에 건조기에 보관하였다. 고분자의 화학 구조는 양성자 핵 자기 공명(^1H NMR) 분광기(Agilent 400-MR, Agilent Technologies, CA)를 사용하여 특성화하였다. 본 발명자는 ^1H NMR 측정을 위해 10 mg/mL D_2O 에서 GtnSH 용액을 준비했다. 폴리머 내의 티올 함량은 제조자의 지시에 따라 엘만(Elman) 분석법으로 측정하였다. GtnSH 용액(100 μL , 탈 이온수에 1 mg/mL)을 엘만 시약(100 μL)과 혼합하였다. 25°C에서 20분간 인큐베이션한 후 자외선 흡광 광도계(Multiskan EX, Thermo Scientific, Rockford, IL)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정했다. 티올 함량은 공지된 농도의 시스테인(0.005 내지 0.05 mg/mL)의 흡광도를 모니터링함으로써 수득한 검정 곡선을 사용하여 결정하였으며 GtnSH 폴리머 그램 당 자유 티올 그룹의 μg 으로 표시하였다.

[0033] 2) 티라민(tyramine)-컨쥬게이트된 PEG(PEG-TA₂) 합성

[0034] PEG-TA₂는 이전에 보고된 바와 같이 2단계 반응에 의해 합성되었다. 먼저 PEG(poly(ethylene glycol))의 말단 하이드록실기(hydroxyl group)에 PNC(p-nitrophenyl chloroformate) 분자를 결합시켜 아민-반응성 PEG를 합성하였다. 간단히, PEG(2.0 g, 0.5 mmol)를 40 mL의 무수 MC(dichloromethane)에 용해시키고 DMAP(4-(dimethylamino)pyridine)(183.3 mg, 1.5 mmol) 및 TEA(Triethylamine)(209.2 μL , 1.5 mmol)와 25°C에서 15분 동안 반응시켜 PEG의 말단 하이드록실기를 활성화 하였다. 활성화된 PEG 용액을 30 mL의 무수 MC에 용해된 PNC(302.3 mg, 1.5 mmol)에 적하 방식으로 적용하였다. 반응은 N_2 대기 하 4°C에서 24시간 동안 수행되었다. 결합 반응 후, 중합체 용액을 회전 증발기(Rotavapor R-215, BUCHI)를 사용하여 40°C에서 농축시킨 후, 차가운 에틸 에테르에 침전시켰다. 생성물을 진공 오븐에 보관하여 용매를 제거하여 PEG-PNC₂ 접합체의 백색 분말을 얻었다. PNC의 화학 구조 및 접합 효율은 ^1H NMR에 의해 결정되었다. ^1H NMR 측정을 위해, 중합체를 CDCl_3 (10 mg/mL)에 용해시켰다.

[0035] PEG-TA₂를 합성하기 위해, PEG-PNC₂(2.0g, 0.5mmol)를 25°C에서 DMSO 40mL에 용해시켰다. 2mL의 DMSO에 용해된 TA 용액(205.8 mg, 1.5 mmol)을 PEG-PNC₂ 용액과 혼합하였다. 25°C에서 24시간 동안 접합 반응을 수행하고 용액을 증류수에 대한 투석에 의해 3일 동안 정제하였다. 중합체 분말을 동결 건조에 의해 수득하고 사용하기 전에 드라이 키퍼에 보관하였다. TA의 화학 구조 및 치환도는 ^1H NMR 분광학에 의해 특성화되었다. ^1H NMR 측정을 위해, 중합체를 D_2O (10 mg/mL)에 용해시켰다.

[0037] (2) IPN 하이드로겔의 제조

[0038] IPN 하이드로겔은 폴리머, HRP 및 H_2O_2 의 간단한 혼합물에 의해 제조되었다. 100 μL 의 IPN 하이드로겔을 제조하기 위해, 80 μL 의 폴리머(PEG-TA₂의 최종 농도: 0.5-3 wt% 및 GtnSH: 0-2 wt%), 10 μL 의 HRP(0.087-1.375 U/mL) 및 10 μL 의 H_2O_2 (1.25-7.5 mM)을 혼합하고 부드럽게 교반하였다. 모든 용액은 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)에서 준비되었다.

[0040] (3) 겔화 시간의 측정 및 유동학적 분석

[0041] IPN 하이드로겔의 상전이 시간은 이전에 보고된 바와 같이 바이알 틸팅 방법에 의해 결정되었다. 하이드로겔(100 μL)을 1.5 mL 마이크로튜브에서 제조하고 부드럽게 혼합하였다. 겔화 시간은 용액을 뒤집은 후 유동이 관찰되지 않는 시점으로 결정되었다. 겔화 시간은 중합체, HRP 및 H_2O_2 의 상이한 농도로 측정되었다.

[0042] IPN 하이드로겔의 탄성률(elastic modulus)(G')은 평행 판(직경 20 mm) 및 37°C에서 0.1 Hz의 주파수 및 0.1%의 변형률을 갖는 진동 모드에서 600 μm 의 갭(gap)이 있는 레오미터(DHR-1, TA Instruments, New Castle, DE)를 사용하여 측정하였다. 유동학적 실험을 위해, 하이드로겔(200 μL)을 플레이트에 준비했다. 본 발명자는 폴리머, HRP 및 H_2O_2 농도(GtnSH의 최종 농도, 0-2.0 wt%; PEG-TA₂, 0.5-2.0 wt%; HRP, 0.087-1.375 U/mL; H_2O_2 , 2.5-8.0 mM)에 따라 다양한 조건에서 하이드로겔 샘플에 대해 동적 시간 스위프(dynamic time sweep)를 수

행했다. 본 발명자는 HT1080 암세포(2.0×10^6 cells/mL)를 캡슐화한 IPN 하이드로겔의 G'도 동일하게 관찰하였다.

[0044] (4) 시험관 내 단백질 분해(proteolytic degradation) 연구

[0045] 이전에 보고된 바와 같이, IPN 하이드로겔의 시험관 내 단백질 분해는 콜라게나 제II형(collagenase type II)을 사용하는 중량 측정법에 의해 결정되었다. 하이드로겔(100 μ L)을 1.5-mL 마이크로튜브에서 제조하고 37°C에서 콜라게나제(0.01 mg/mL)를 포함 또는 포함하지 않은 DPBS 200 μ L에서 배양하였다. 소정의 시점에서, 배지를 마이크로튜브에서 제거하고 하이드로겔(M_d)의 중량을 측정한 후, 새로운 배지를 첨가하였다. 나머지 하이드로겔의 중량을 다음 식에 따라 계산하였다: 하이드로겔의 중량(%) = $(M_d/M_i) \times 100\%$; 여기서, M_d 는 나머지 하이드로겔의 중량이고, M_i 는 초기 하이드로겔의 중량이다.

[0047] (5) 인간 섬유 육종(HT1080)의 3차원(3D) 캡슐화

[0048] 3D 세포 배양을 위해, DPBS에 용해된 모든 용액을 200 nm의 구멍 크기를 갖는 주사기 필터를 사용하여 여과하여 멸균시켰다. 폴리머 용액(GtnSH, 2 wt%; PEG-TA₂, 2 wt%)을 HT1080 세포와 혼합하여 세포 현탁액(2.0×10^6 cells/mL)을 제조하고, HRP(1.375 U/mL) 및 H₂O₂(6.0~8.0 mM)을 8:1:1(폴리머 용액/HRP/H₂O₂)의 부피비로 첨가하였다. 이 혼합물(60 μ L)을 원통형(직경=5mm, 두께=1mm)에 넣고 25°C에서 하이드로겔을 형성시켰다. 세포를 캡슐화한 하이드로겔 디스크를 48-웰 플레이트에 넣고 표준 배양 조건(37°C, CO₂ 5%)에서 배양 배지(고-포도당 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 10% NBCS(newborn calf serum), 1% P/S(penicillin streptomycin)) 500 μ L에 최대 7일 동안 배양하였다. 세포 형태는 광학 현미경(inverted phase-contrast microscope, Eclipse TS100, Nikon)을 사용하여 관찰하였다. 세포 생존능을 평가하기 위해, 3일 및 7일 배양 후 하이드로겔을 2 μ M 아세토메톡시 유도체와 4 μ M의 ethidium homodimer-1을 함유한 DPBS 200 μ L로 처리하고 30분간 배양하였다. 염색된 샘플을 DPBS로 세척하고 형광 현미경(inverted microscope, Eclipse Ti-E system, Nikon)을 사용하여 관찰하였다. 정량적 세포 증식 분석을 위해, WST-1 분석을 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 간략하게, 세포를 캡슐화한 하이드로겔을 10% WST-1 용액을 함유하는 배양 배지 150 μ L에서 10분 동안 배양하였다. 그 후, 100 μ L의 배지를 96-웰 플레이트에 넣고 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm의 파장에서 광학 밀도를 측정 하였다.

[0050] (6) 항암제(5-FU)를 이용한 약물 내성 검사

[0051] 2D 약물 내성 시험의 경우, HT1080 세포를 96-웰 플레이트(5×10^3 cells/well)에 접종하고 24시간 후에 5-플루오로우라실(5-FU, 5-fluorouracil)(0, 0.01, 0.1, 1, 5 및 10 mg/mL)로 처리하고, 24시간 동안 추가 배양하였다. 3D 약물 내성 시험의 경우, 하이드로겔(최종 농도 GtnSH, 2 wt%, PEG-TA₂, 2 wt%, HRP, 1.375 U/mL, H₂O₂, 6, 7, 8 mM) 내에서 배양된 HT1080 세포를 동일한 용량의 5-FU로 처리하였다. WST-1 분석법을 사용하여 세포 생존능을 평가하고 GraphPad Prism 5(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA)를 사용하여 비선형 용량-반응 곡선으로부터 IC50 값을 계산하였다.

[0053] (7) 통계 분석

[0054] 세포 증식 및 약물 내성은 각 데이터 포인트에 대해 4개 샘플을 사용하여 평가되었다. 통계 분석은 GraphPad Prism 5를 사용하여 수행되었다. 각 그룹 간의 유의성을 결정하기 위해 양측 t-테스트를 사용했다. 유의 수준은 *P<0.05, **P<0.01 및 ***P<0.001로 설정되었다.

[0056] 실험결과

- [0057] (1) 조절 가능한 겔화 시간을 갖는 IPN 하이드로겔 형성
- [0058] 1) IPN 하이드로겔 형성
- [0059] 이전에 보고된 바와 같이 GtnSH 및 PEG-TA₂가 합성되었다. 본 발명자는 GtnSH와 PEG-TA₂ 접합체가 HRP-매개 산화 가교 반응을 통해 IPN 하이드로겔을 형성할 수 있다고 가정했다.
- [0060] 이 반응에서, HRP는 오르토(ortho) 위치의 탄소와 페녹시 산소 사이의 탄소-산소 결합 및 페녹시 라디칼로부터의 라디칼 이동에 의해 형성된 티일 라디칼(thiyl radical) 간의 디설파이드 결합을 통해 디-티라민(di-tyramine) 형성을 촉매하여, 폴리머 백본(backbones)으로서 젤라틴과 PEG로 구성된 IPN 하이드로겔을 생성시킨다(도 1a).
- [0061] 본 발명자는 하이드로겔 형성 동안 디설파이드 결합을 통해 GtnSH 폴리머 백본의 반결정질(semi-crystalline) 형성으로 인한 불투명한 하이드로겔을 관찰하였다(도 1b).
- [0062] 본 발명자는 인공 세포 미세 환경을 설계하는데 중요한 매개 변수인 세포 접착 부위(cell-adhesive site)와 단백질 분해성 잔기(proteolytic degradable moieties)를 포함한 세포 활동을 위한 생체 활성 중합체 사슬로 젤라틴을 선택했다. 본 발명자는 또한 친수성과 비-단백질 분해성 때문에 PEG를 다른 폴리머 백본으로 선택했다. 이러한 방식으로, 젤라틴은 세포 활동을 조절하고, PEG는 IPN 하이드로겔 내의 세포 성장을 지원하기 위한 안정한 구조적 프레임을 제공할 것이다.
- [0064] 2) 하이드로겔 조성에 따른 겔화시간 분석
- [0065] 하이드로겔 내에서의 3D 세포 캡슐화의 경우 상전이 시간(phase transition time)이 가장 중요한 요소 중 하나이다. 느린 겔화 시간(>5분)은 세포가 중력 때문에 바닥에 가라앉도록 하는 반면, 빠른 겔화 시간(<10초)은 균일한 세포 캡슐화에 부적합하다.
- [0066] 본 발명자는 하이드로겔 조성이 IPN 하이드로겔 형성 시간에 미치는 영향을 조사했다. 이를 위해 폴리머(GtnSH, 0-2.0 wt%, PEG-TA₂, 0.5-2.0 wt%), HRP(0.173-1.375 U/mL) 및 H₂O₂(1.25-7.0 mM)의 농도에 따른 상전이 시간을 측정하였다. 하이드로겔은 30초에서 6분 사이의 조절 가능한 겔화 시간을 보였다.
- [0067] PEG-TA₂와 HRP 농도가 증가함에 따라 상전이 시간은 감소했다(PEG-TA₂, 51초에서 30초; HRP, 343초에서 67초)(도 2a와 2c). 이 결과는 PEG-TA₂와 HRP의 증가된 농도가 페녹시 라디칼을 촉진시킴으로써 빠른 3D 하이드로겔 네트워크 형성을 유도한다는 사실에 의해 설명될 수 있다.
- [0068] H₂O₂는 HRP-매개 교차 가교 반응에서 기질로서 중요한 역할을 한다. 많은 연구에서 H₂O₂ 농도의 증가가 보다 빠른 하이드로겔 형성을 유도하지만 과량의 H₂O₂는 HRP의 효소 활성을 억제함으로써 하이드로겔 형성의 동역학을 감소시킬 수 있음을 보여주었다. 본 발명자는 5.5 mM H₂O₂ 이상에서 상전이 시간에 유의한 차이가 없다는 것을 발견했으며, 이는 본 가교 결합 반응에서 H₂O₂ 농도(5.5 mM에서 7.0 mM)가 포화되었다는 것을 의미한다(도 2d).
- [0069] 흥미롭게도, 본 발명자는 증가된 GtnSH 함량이 62초에서 133초의 범위에서 더 느린 하이드로겔 형성을 유도한다는 것을 발견하였다(도 2b). 이 현상은 HRP의 효소 활성이 자유 티올 그룹에 의해 억제되어 티올 교환 반응에 의한 효소의 구조 변형을 유도할 수 있기 때문에 발생하였다.
- [0070] 이러한 결과를 바탕으로 본 발명자는 3D 세포 연구를 위해 적절한 겔화 시간(60-90초)으로 하이드로겔 조성을 최적화했다.
- [0071] 요약하자면, 본 발명자는 하이드로겔 조성에 따라 조절 가능한 겔화 시간을 갖는 HRP-매개 이중 가교 결합 반응을 통해 젤라틴과 PEG로 구성된 IPN 하이드로겔을 제조하였다. 이러한 독특한 성질은 쉬운 제조 및 제어가 가능한 겔화 시간은 하이드로겔 매트릭스 내의 표적 세포를 균질하게 캡슐화하여 조작된 중앙 구조를 만들 수 있기 때문에 본 발명의 IPN 하이드로겔의 장점이다.
- [0073] (2) 단백질 분해 효소에 대한 하이드로겔 매트릭스의 내성

- [0074] 암세포는 원시(native) 종양 미세 환경을 개조하여 종양 이동 및 전이를 촉진할 수 있는 프로테아제를 과발현 및 분비한다. 분해 가능한 효소 중 콜라게나제(collagenase)를 포함한 매트릭스 메탈로프로테나제(matrix metalloproteinases)는 종양의 침투(invasion)와 전이에 중요한 요소로 알려져 있다.
- [0075] 따라서 암세포 또는 종양 조직의 장기 배양을 위한 하이드로겔 물질을 사용하여 인공 종양 모델을 설계할 때 단백질 분해 효소(proteolytic enzymes)에 대한 내성은 고려해야 할 중요한 매개 변수 중 하나이다.
- [0076] 본 발명자는 젤라틴과 PEG 부분으로 구성된 IPN 하이드로겔이 조작된 종양 미세 환경과 같이 장기간 안정한 매트릭스로 작용할 수 있다고 가정했다. 이를 위해, 본 발명자는 콜라게나제를 사용하여 IPN 하이드로겔의 프로테아제에 민감한 분해를 조사했다.
- [0077] 젤라틴만으로 구성된 하이드로겔은 5일 이내에 완전히 분해되지만 IPN 하이드로겔은 30일 후에도 무게의 20-25%를 유지하였다(도 3).
- [0078] 본 발명자는 또한 증가된 폴리머 함량이 하이드로겔 무게를 증가시킨다는 것을 알아냈다. 예를 들어, 낮은 폴리머 함량(P1G1, 1% PEG-TA₂ 및 1% GtnSH)을 갖는 IPN 하이드로겔의 중량은 7일째 원래 중량의 39-76%였다.
- [0079] 한편, 높은 농도(P2G2, 2% PEG-TA₂ 및 2% GtnSH)를 갖는 하이드로겔의 중량은 동일한 시점에서 원래 무게의 178-348%였다.
- [0080] 이 결과는 친수성 중합체(예를 들어 PEG 및 젤라틴)의 높은 농도가 하이드로겔 분해 동안 더 많은 물을 흡수할 수 있기 때문이다. 이와 함께, 본 발명자는 IPN 하이드로겔이 단백질 분해 효소에 대한 내성을 가지고 있다는 것을 보여 주었는데, 매트릭스가 암세포 또는 종양 조직의 장기 배양을 위한 인공 종양 미세 환경을 제공할 수 있음을 시사한다.
- [0082] **(3) IPN 하이드로겔의 조절 가능한 매트릭스의 기계적 강도(stiffness)**
- [0083] 축적된 증거는 매트릭스의 강도가 암의 진행과 전이에 결정적인 요소임을 보여준다. 본 발명자는 IPN 하이드로겔이 매트릭스의 기계적 강도(rigidity)를 조절할 수 있는 3D 공학 종양 구조를 만들 수 있는지 여부를 추측했다.
- [0084] 탄성률(elastic modulus)(G')을 평가하기 위해, 본 발명자는 다양한 PEG-TA₂, HRP, GtnSH 및 H₂O₂ 농도와 하이드로겔의 동적 시간 스위프(dynamic time sweep)와 관련된 유변학 분석을 수행했다. 도 4는 상이한 조성을 갖는 IPN 하이드로겔의 G' 프로파일을 나타낸다.
- [0085] 교차 결합 밀도의 증가로 인해 PEG-TA₂, HRP 및 H₂O₂의 농도가 증가함에 따라 G' 값이 증가했다. H₂O₂의 경우, 6.0mM보다 큰 H₂O₂ 농도로 형성된 하이드로겔은 하이드로겔 형성에 대한 H₂O₂의 포화로 인해 유사한 탄성 특성을 나타냈다.
- [0086] 흥미롭게, 본 발명자는 높은 GtnSH 함량이 하이드로겔 형성 동안 감소된 HRP 활성 때문에 더 연한 매트릭스를 유도한다는 것을 발견하였다. 이러한 결과는 G'가 하이드로겔 조성에 따라 다양함을 입증했다(PEG-TA₂, 0.01-810 Pa, GtnSH, 5-900 Pa, HRP, 0.03-1000 Pa, H₂O₂, 2-3800 Pa).
- [0087] 하이드로겔 강도에 대한 세포 캡슐화 효과를 조사하기 위해, 본 발명자는 HT1080 세포를 캡슐화한 IPN 하이드로겔(PEG-TA₂, 2wt%; GtnSH, 2 wt%, HRP; 1.375 U/mL)의 G' 값을 측정했다. 본 발명자는 H₂O₂의 농도를 변화시킴으로써 매트릭스 강도를 조절했다.
- [0088] H₂O₂의 양은 하이드로겔 형성을 위해 포화되었기 때문에 세포가 없는 IPN 하이드로겔에서는 탄성 계수가 유사했다(2400-2700 Pa). 흥미롭게도, G' 값은 세포가 IPN 하이드로겔 매트릭스 내에 캡슐화될 때 극적으로 감소했다(도 4e).
- [0089] 이 결과는 세포가 3D 네트워크 형성을 방해하고, H₂O₂를 제거하며, 하이드로겔 형성 동안 효소 활성을 억제할 수 있기 때문에 가교 결합 밀도가 감소함으로써 야기될 수 있다.
- [0090] 이 결과를 바탕으로, 본 발명자는 시험관 내 세포 연구를 위해 서로 다른 매트릭스 강도(High, 8 mM H₂O₂,

Medium, 7 mM H₂O₂, Low, 6 mM H₂O₂)로 최적화된 하이드로겔 매트릭스를 선택했다. 세포-캡슐화 하이드로겔의 매트릭스 강도는 폴리머 농도를 변화시키지 않고 H₂O₂를 변화시킴으로써 독립적으로 조절할 수 있다는 것을 알아야 한다.

[0092] (4) IPN 하이드로겔을 사용하여 조작된 종양 모델

[0093] 본 발명자는 IPN 하이드로겔을 암세포의 증식 활성을 연구하고 상업적으로 이용 가능한 항암제에 대한 저항성을 시험하기 위한 플랫폼으로 활용했다. 공학적으로 제작된 종양 구조를 만들기 위해 HT1080 세포를 다양한 강도 (High, 1300 Pa, Medium, 900 Pa, Low, 270 Pa)으로 최적화된 하이드로겔 매트릭스에 캡슐화하고 최대 7일 동안 배양했다.

[0094] 본 발명자는 그 다음 매트릭스의 강도에 따라 세포 생존력과 증식 활성을 분석했다. 본 발명자는 매트릭스 강도에 따라 세포의 형태학적 변화없이 하이드로겔 내에서 대부분의 생존 가능한 세포를 관찰했다(도 5a).

[0095] 이 결과는 IPN 하이드로겔이 세포적합성(cytocompatible) 매트릭스를 제공하여 조작된 종양 구조를 생성하였음을 보여준다. 흥미롭게도, 더 경직된(stiffer) 기질 내에서 배양된 세포는 더 부드러운 기질 내에서 배양된 세포보다 낮은 증식을 보였다(도 5b).

[0096] 종양 미세 환경의 강도는 암의 진행과 전이를 조절하는 데 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자는 모든 기계적 강도를 조사하지는 않았지만, 부드러운 매트릭스가 경직된 미세 환경에 비해 HT1080 세포의 증식을 향상시키는 것을 발견했다.

[0097] 항암제에 대한 내성은 종양의 치료에서 가장 큰 문제로 간주된다. 따라서 많은 연구자들은 상업적으로 이용 가능하거나 새로 개발된 항암제에 대한 종양의 내성을 평가할 수 있는 고급 전임상 모델을 개발하기 위해 노력해 왔다.

[0098] 본 발명자는 모델 항암제로서 시판중인 5-FU에 대한 세포의 저항성을 평가하기 위한 플랫폼으로 본 엔지니어링 구조를 활용했다. 본 발명자는 먼저 우리의 3D 종양 모델의 약물 내성을 암 연구를 위한 최적 표준(gold standard)으로서 일반적인 2D 배양의 약물 내성과 비교했다. 조작된 3D 종양 구조는 2D 배양법(5.05±0.78 mg/mL)과 비교하여 더 높은 IC50 값(12.64±3.1 mg/mL)을 나타냈다(도 5c).

[0099] 본 발명자는 약물 저항에 대한 매트릭스 강도의 효과를 조사했다. 이 목적으로, 본 발명자는 종양 구조에 1일 배양 후 약물(10mg/ml)을 투여했다. 흥미롭게도 부드러운(soft) 기질은 경직된 기질에 비해 약물 내성이 높았으며 이는 세포 증식의 결과와 일치한다(도 5d). 이와 함께, 본 발명자는 IPN 하이드로겔이 기초 암 생물학을 연구하고 새로운 치료 표적과 새로 개발된 항암제를 밝혀내는 고급 플랫폼으로 활용될 수 있음을 제안한다.

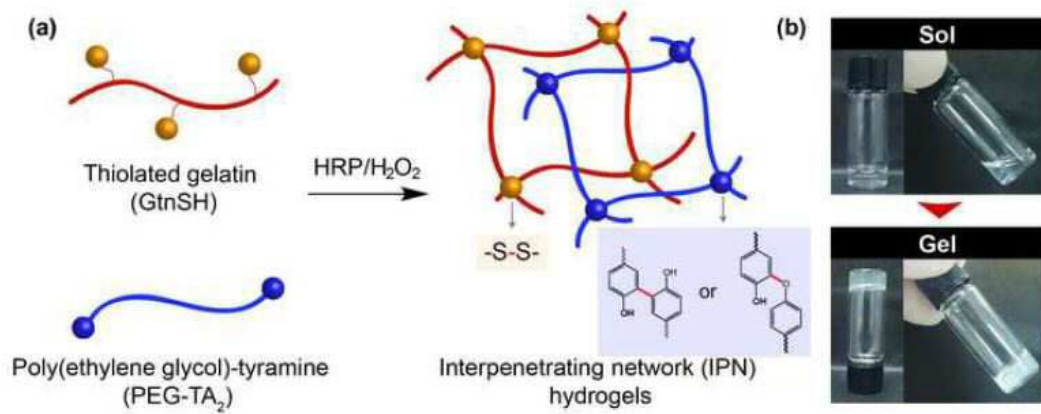
[0101] 결론

[0102] 이 발명에서, 본 발명자는 조작된 종양 미세 환경으로 작용할 수 있는 새로운 유형의 IPN 하이드로겔을 제시한다. IPN 하이드로겔은 HRP-매개 이중 가교 결합 반응을 통해 제조되었다. 겔화 시간 및 매트릭스의 기계적 강도는 중합체 조성을 변화시키지 않고 HRP 및 H₂O₂의 농도를 변화시킴으로써 독립적으로 제어될 수 있다. IPN 하이드로겔은 암세포의 장기 배양을 위해 세포 친화성 세포 미세 환경을 제공하여 조작된 종양 구조를 만들었다. 고급 전임상 모델을 사용하여 암세포 증식과 약물 내성에 미치는 인공 미세 환경의 강도 효과를 조사했다. 본 발명자는 IPN 하이드로겔이 기초 암 생물학의 연구와 더 나은 임상 결과를 위한 잠재적인 치료제의 스크리닝을 포함하여 광범위한 암 연구를 위해 조작된 종양 미세 환경을 만드는 유망한 재료라고 제안한다.

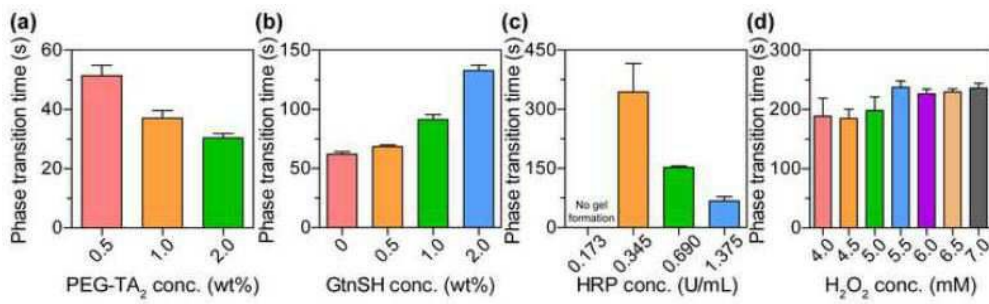
[0104] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

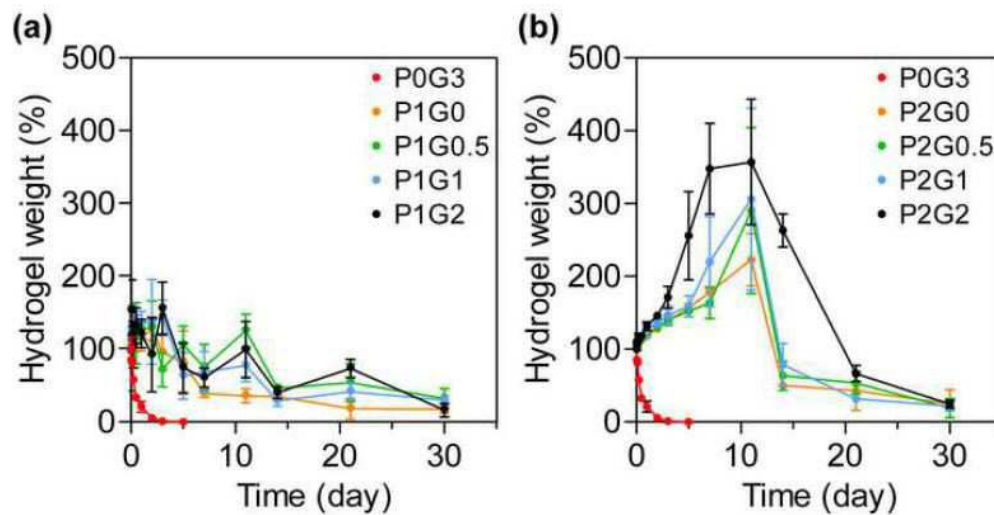
도면1



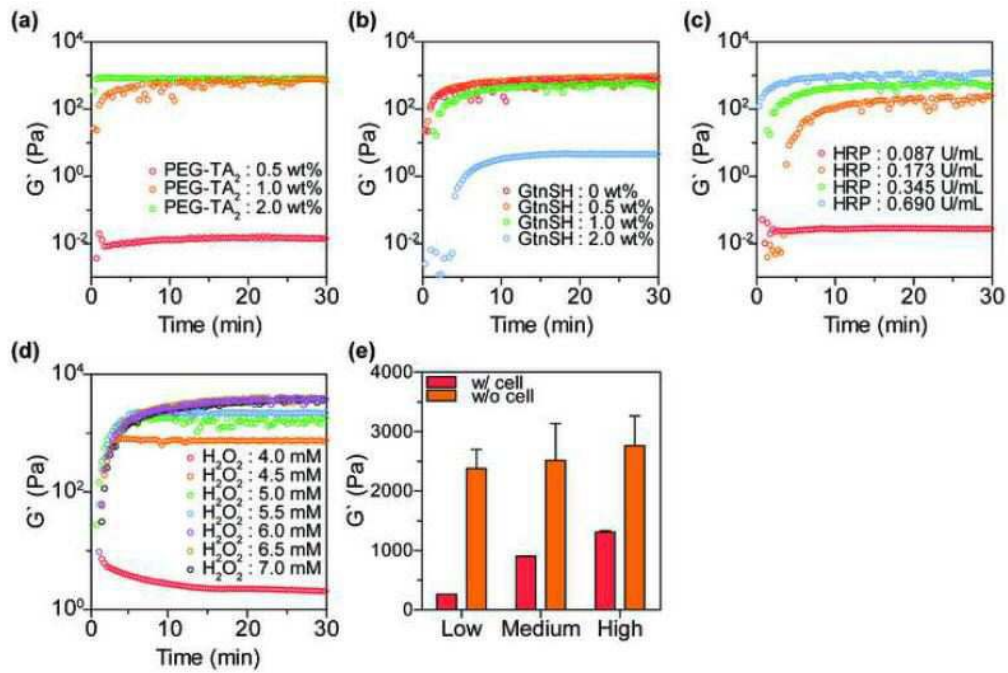
도면2



도면3



도면4



도면5

