

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0023216

(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) *A61K 33/24* (2019.01)*A61K 9/14* (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)*A61P 29/00* (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)*A61K 33/24* (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0104439

(22) 출원일자 2023년08월09일

심사청구일자 2023년08월09일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

기초과학연구원

대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)

(72) 발명자

현택환

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교

김병수

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강문호

전체 청구항 수 : 총 9 항

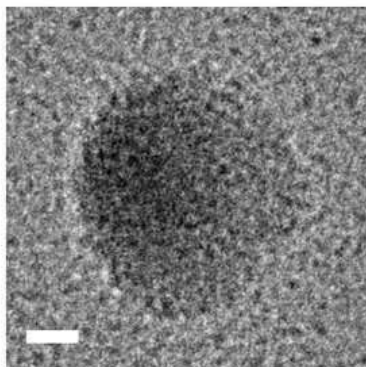
(54) 발명의 명칭 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체

(57) 요약

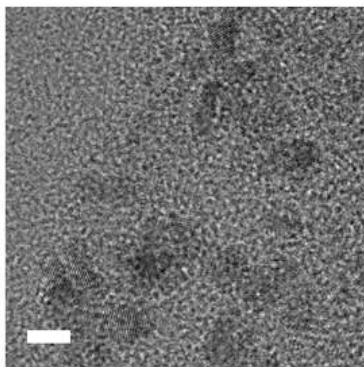
나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체가 제공된다. 상기 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 세포 유래 베지클 및 상기 세포 유래 베지클에 결합된 나노입자를 포함한다. 상기 나노입자는 금속 나노입자 및 금속 산화물 나노입자 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 세리아 나노입자를 포함할 수 있다. 상기 세포 유래 베지클은 줄기 세포를 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 상기 세포 유래 베지클의 표면에 분산되어 있을 수 있다.

대표도 - 도1

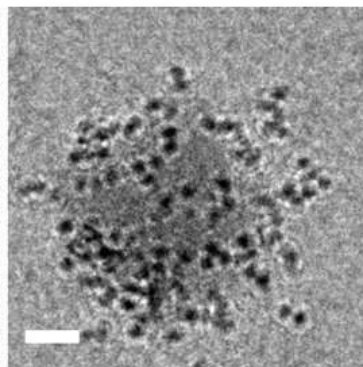
MSCNV



Ce



Ce-MSCNV



(52) CPC특허분류

A61K 9/14 (2013.01)

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

구사강

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교

손희수

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711171007

과제번호 IBS-R006-D1-2022-A00

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 기초과학연구원

연구사업명 기초과학연구원연구운영비지원(주요사업비)

연구과제명 나노입자의 합성과 의료, 에너지 분야 응용

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서울대학교 산학협력단

연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

세포 유래 베지클; 및

상기 세포 유래 베지클에 결합된 나노입자를 포함하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자는 상기 세포 유래 베지클의 표면에 분산되어 있는 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 세포 유래 베지클은 줄기 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자는 금속 나노입자 및 금속 산화물 나노입자 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 나노입자는 세리아 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자는 제1 작용기를 포함하고,

상기 세포 유래 베지클은 상기 제1 작용기와 반응하는 제2 작용기를 포함하며,

상기 제1 작용기와 상기 제2 작용기의 반응에 의해 상기 나노입자는 상기 세포 유래 베지클의 표면에 결합되는 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 제1 작용기는 말레이미드 작용기를 포함하고,

상기 제2 작용기는 티올 작용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자는 PEG로 캡슐화된 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 류마티스 관절염 치료제로 사용되는 것을 특징으로 하는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 류마티스 관절염을 비롯한 자가면역질환은 염증, 사이토카인, 면역 파괴 등 다양한 병인자가 상호작용하여 질병이 발병되고 심화된다. 다양한 병인자 중 한 가지 요인만을 치료하는 기존 치료법의 경우 단기적으로는 효과가 있으나 결국 해결되지 못한 다른 요인에 의해 질병이 재발병 되거나 심화되는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 우수한 성능을 갖는 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체를 제공한다.

[0004] 본 발명의 다른 목적들은 다음의 상세한 설명과 첨부한 도면으로부터 명확해 질 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 실시예들에 따른 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 세포 유래 베지클 및 상기 세포 유래 베지클에 결합된 나노입자를 포함한다.

[0006] 상기 나노입자는 상기 세포 유래 베지클의 표면에 분산되어 있을 수 있다.

[0007] 상기 세포 유래 베지클은 줄기 세포를 포함할 수 있다.

[0008] 상기 나노입자는 금속 나노입자 및 금속 산화물 나노입자 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 세리아 나노입자를 포함할 수 있다.

[0009] 상기 나노입자는 제1 작용기를 포함할 수 있고, 상기 세포 유래 베지클은 상기 제1 작용기와 반응하는 제2 작용기를 포함할 수 있으며, 상기 제1 작용기와 상기 제2 작용기의 반응에 의해 상기 나노입자는 상기 세포 유래 베지클의 표면에 결합될 수 있다. 상기 제1 작용기는 말레이미드 작용기를 포함할 수 있고, 상기 제2 작용기는 티올 작용기를 포함할 수 있다.

[0010] 상기 나노입자는 PEG로 캡슐화될 수 있다.

[0011] 상기 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 류마티스 관절염 치료제로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 실시예들에 따른 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 우수한 성능을 갖는다. 예를 들어, 상기 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 다기능성, 다인자 치료를 통해 염증 완화, 사이토카인 조절과 면역 조절 등을 복합적으로 수행할 수 있어, 치료 효능이 우수하고 치료 지속성이 유지될 수 있다. 상기 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 세리아 나노입자와 중간엽 줄기 세포를 포함하여 류마티스 관절염에 우수한 치료 효과를 가질 수 있다. 또, 상기 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 나노입자와 세포 유래 베지클의 종류를 변경하여 다양한 질병 치료제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 MSCNV, 세리아 나노입자, 및 Ce-MSCNV의 TEM 이미지를 나타낸다.

도 2는 MSCNV 및 Ce-MSCNV의 유체역학적 직경을 나타낸다.

도 3은 MSCNV, 세리아 나노입자, 및 Ce-MSCNV의 제타 전위(좌측 도면) 및 MSCNV와 세리아 나노입자의 공동 위치

를 보여주는 SRM(super-resolution microscopy) 이미지(우측 도면)를 나타낸다.

도 4는 DiI(적색, MSCNV) 및 Cy5(녹색, 세리아 나노입자)로 표시된 Ce-MSCNV의 형광 강도를 나타낸다.

도 5는 세리아 나노입자, MSCNV, 및 Ce-MSCNV의 SOD 모방 활성 및 CAT 모방 활성을 나타낸다.

도 6은 공초점 현미경으로 확인된 Ce-MSCNV의 시험관 내 ROS 소거를 나타낸다.

도 7은 다른 종류의 나노입자로 처리된 대식세포에서 염증(IL-1 β , IL-6, iNOS 및 TNF- α ; M1 대식세포 마커) 및 항염증(Arg1 및 CD206; M2 대식세포 마커) 분자의 상대적 mRNA 발현 수준을 나타낸다.

도 8은 연골 세포에서의 IL-1 β , TGF- β , caspase-3, ADAMTS5 및 COL II의 상대적 mRNA 발현 수준을 나타낸다.

도 9는 연골 세포에 의해 분비된 사이토카인의 수준을 나타낸다.

도 10은 Ce-MSCNV로 처리된 대식세포에 대한 단백질 분석 결과를 나타낸다.

도 11은 다른 종류의 나노입자로 처리된 DC(dendritic cell)에서 염증(IL-1 β 및 TNF- α) 및 항염증(TGF- β 및 IL-10) 분자의 상대적 mRNA 발현 수준을 나타낸다.

도 12는 유동 세포 계측법으로 측정한 MHC II 및 공동 자극 분자(CD40, CD80 및 CD86)의 발현을 나타낸다.

도 13은 Ce-MSCNV로 처리된 DC에 대한 단백질 분석 결과를 나타낸다.

도 14 내지 도 16은 다른 종류의 나노입자로 전처리된 DC와의 공동 배양을 통한 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg의 유도를 나타낸다.

도 17은 면역화 45일 후 무릎 관절의 조직학적 및 면역조직화학적 평가 결과를 나타낸다.

도 18은 면역화 45일 후 무릎 관절의 대표적인 마이크로-CT 이미지 및 BMD(bone mineral density)를 나타낸다.

도 19는 무릎 관절 조직에서 ADAMTS5, MMP13 및 COL II의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸다.

도 20은 나노입자 처리에 대한 반응으로 사타구니 림프절에서 CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Treg 및 CD4⁺ROR γ t⁺IL-17⁺ Th17의 유세포 분석 결과 및 Treg/CD4⁺ T 세포, Th17/CD4⁺ T 세포 및 Th17/Treg 비율을 나타낸다.

도 21은 Ce-MSCNV에 의해 유도된 Treg의 Ag 특이성을 나타낸다.

도 22는 무릎 관절 조직에서 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6 및 IFN- γ) 및 Treg와 Th17 마커(Foxp3 및 IL-17)의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸다.

도 23은 다른 종류의 나노입자로 처리에 따른 혈청 내 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β), IL-17 및 항염증성 사이토카인(IL-10 및 TGF- β 1)의 수준을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 실시예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예들을 통해 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서, 이하의 실시예들에 의하여 본 발명이 제한되어서는 안 된다.

[0015] 본 발명의 실시예들에서 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 세리아 나노입자와 중간엽 줄기 세포를 포함하는 것으로 기재되어 있으나 이에 한정되지 않으며, 질병의 종류나 치료 목적 등에 따라 나노입자와 세포 유래 베지클을 적절하게 선택하여 변경할 수 있다.

[0017] 본 발명의 실시예들에 따른 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 세포 유래 베지클 및 상기 세포 유래 베지클에 결합된 나노입자를 포함한다.

[0018] 상기 나노입자는 금속 나노입자 및 금속 산화물 나노입자 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 세리아 나노입자를 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 PEG로 캡슐화될 수 있다.

- [0019] 상기 세포 유래 베지클은 줄기 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell)를 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 나노입자는 제1 작용기를 포함할 수 있고, 상기 세포 유래 베지클은 상기 제1 작용기와 반응하는 제2 작용기를 포함할 수 있으며, 상기 제1 작용기와 상기 제2 작용기의 반응에 의해 상기 나노입자는 상기 세포 유래 베지클의 표면에 결합될 수 있다. 상기 제1 작용기는 말레이미드 작용기를 포함할 수 있고, 상기 제2 작용기는 티올 작용기를 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 상기 세포 유래 베지클의 표면에 분산되어 있을 수 있다.
- [0021] 상기 나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체는 류마티스 관절염 치료제로 사용될 수 있다.
- [0022] 세리아 나노입자는 2개의 가역적 이온 상태인 Ce^{3+} 와 Ce^{4+} 사이를 순환하여 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 제거하는 능력으로 인해 항산화제 역할을 하며 류마티스 관절염이 발생한 무릎 관절에서 과잉 생산된 ROS를 제거하고 염증 및 증상 완화를 위해 M1에서 M2 대식세포 분극화를 유도할 수 있다. 다량의 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell, MSC) 유래 물질을 포함하는 중간엽 줄기 세포 유래 나노베지클(mesenchymal stem cell-derived nanovesicle, MSCNV)은 연골 세포를 보호하여 뼈와 연골의 파괴를 방지할 수 있다. 또 MSCNV는 표적 세포에 면역 조절 물질을 전달하여 면역 세포의 표현형 및 특성을 변경하고, Treg 생성을 위한 tDC(tolerogenic dendritic cell)를 유도하여 적응 면역 조절제 역할을 한다. 세리아 나노입자-중간엽 줄기 세포 유래 나노베지클 나노복합체(Ce-MSCNV)의 두 가지 핵심 요소인 세리아 나노입자와 MSCNV는 개별적으로 그리고 협력하여 시너지 효과를 만들어 손상된 관절을 빠르게 치료하고 면역 세포를 조절하며 Th17/Treg 비율을 정상적인 수준으로 재조정한다. 전반적으로 Ce-MSCNV는 세밀하고 차별화된 면역 조절 기능을 갖춘 나노하이브리드 치료 시스템으로서 단일 치료 요법과 비교하여 우수한 난치성 질환 치료 효과를 나타낸다.
- [0024] **[세리아 나노입자의 제조예]**
- [0026] 세륨 아세테이트 수화물(1mM) 및 올레일아민(12mM)을 15ml의 자일렌에 용해시킨다. 이 혼합물을 40분 동안 초음파 처리하고 2℃/min의 가열 속도로 20℃에서 90℃까지 가열한다. 상기 혼합물에 탈이온수 1ml를 주입한다. 상기 혼합물이 백색에서 황색으로 변하는 것은 반응이 일어났다는 것을 의미한다. 상기 혼합물을 90℃에서 3시간 숙성시킨 후 실온으로 냉각시키고 원심분리를 사용하여 아세톤으로 여러 번 세척한다. 생성된 세리아 나노입자를 클로로포름에 재분산시킨다.
- [0027] 물 분산 및 말레이미드 기능화를 위해 세리아 나노입자를 PEG(phospholipid-polyethylene glycol)로 캡슐화한다. 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]) 20mg 및 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌 글리콜)-2000](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000]) 10mg을 클로로포름 10ml에 용해한 다음 클로로포름(10mg/ml)에서 세리아 나노입자 2ml와 혼합한다. 이 혼합물을 5분 동안 초음파 처리한다. 회전 증발기를 사용하여 상기 혼합물에서 클로로포름을 제거하고 진공 오븐에서 60℃에서 3시간 동안 추가로 건조하여 클로로포름을 완전히 제거한다. 상기 혼합물에 4ml의 탈이온수를 첨가하고 초음파 처리하여 투명한 콜로이드 현탁액을 얻는다. 원심분리를 사용하여 과량의 PEG를 제거하고 세리아 나노입자를 분리 및 세척한 다음 0.2μm 필터를 사용하여 정제한다.
- [0028] Cy5-표지된 세리아 나노입자는 PEG 캡슐화 공정에 1 mg의 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N-(시아닌 5.5)(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]-N-(Cyanine 5.5))를 첨가하는 것에 의해 같은 방법으로 제조된다.
- [0030] **[세포 유래 베지클의 제조예]**
- [0032] 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기 세포(Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCBMSCs)를 150mm 배양 접시에 시딩하고 10% 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, PS)이 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 저(low) 글루코스에서 배양

한다. 컨플루언시가 80%에 도달하면 세포를 트립신-EDTA(0.25%) 용액으로 수확한다. 세포를 1500rpm에서 5분 동안 원심분리기에서 회전시키고 세포 펠렛을 수집한다. MSCNV(mesenchymal stem cell nanovesicle)는 10 μ m, 5 μ m, 1 μ m 및 400nm 크기의 기공 멤브레인을 통해 세포 펠렛을 압출하여 제조된다. 압출 후 용액을 27000g에서 30분 동안 원심분리하여 MSCNV를 수집한다.

[0034] [나노입자-세포 유래 베지클 나노복합체의 제조예]

[0036] Ce-MSCNV 나노복합체는 MSCNV와 세리아 나노입자 사이의 화학 반응에 의해 제조될 수 있다. 세리아 나노입자는 말레이미드-기능화되어 그 표면에 말레이미드 작용기를 가지며, MSCNV는 티올-기능화되어 그 표면에 티올 작용기를 갖는다. 말레이미드-기능화된 세리아 나노입자는 티올-말레이미드(thiol-maleimide) 반응을 통해 티올-기능화된 MSCNV의 표면과 결합된다(conjugated). pH 8 PBS에 재현탁된 MSCNV를 트라우트 시약(Traut's reagent)과 함께 배양한다. 상온에서 30분 동안 부드럽게 교반한 후 MSCNV를 티로드 완충액(Tyrode's buffer)으로 3회 세척한다. 티로드 완충액 내 티올-기능화된 MSCNV를 과량의 말레이미드-기능화된 세리아 나노입자와 혼합하고, 상온에서 3시간 동안 부드럽게 교반한다. PBS로 여러 번 세척한 후 생성된 Ce-MSCNV를 PBS 용액에 분산시킨다.

[0038] 도 1은 MSCNV, 세리아 나노입자, 및 Ce-MSCNV의 TEM 이미지를 나타내고, 도 2는 MSCNV 및 Ce-MSCNV의 유체역학적 직경을 나타낸다.

[0039] 도 1을 참조하면, Ce-MSCNV는 세리아 나노입자(Ce NP)와 지지체 물질인 중간엽 줄기 세포 나노베지클(MSCNV) 사이의 화학 반응에 의해 제조될 수 있다. 균일한 크기의 세리아 나노입자(Ce NP)는 수정된 역미셀 방법을 사용하여 합성될 수 있다. MSCNV는 다공성 멤브레인을 통한 MSC의 연속 압출에 의해 제조될 수 있다. 약 3nm 크기를 갖는 말레이미드-기능화된 세리아 나노입자는 티올-말레이미드 반응을 통해 티올-기능화된 MSCNV의 표면에 결합된다. 투과 전자 현미경(TEM) 이미지는 여러 세리아 나노입자(Ce NP)가 모든 방향에서 MSCNV의 표면을 둘러싸고 있으며, MSCNV의 표면을 조밀하게 덮고 있음을 보여준다.

[0040] 도 2를 참조하면, 세리아 나노입자(Ce NP)가 MSCNV에 결합함에 따라 유체역학적 직경이 121.4nm에서 139.4nm로 증가한다.

[0042] 도 3은 MSCNV, 세리아 나노입자, 및 Ce-MSCNV의 제타 전위(좌측 도면) 및 MSCNV와 세리아 나노입자의 공동 위치를 보여주는 SRM(super-resolution microscopy) 이미지(우측 도면)를 나타내고, 도 4는 DiI(적색, MSCNV) 및 Cy5(녹색, 세리아 나노입자)로 표시된 Ce-MSCNV의 형광 강도를 나타낸다.

[0043] 도 3 및 도 4를 참조하면, Ce-MSCNV의 ζ 전위 값은 -23mV이며, 이는 세리아 나노입자(Ce NP)가 MSCNV 표면에 결합한 후 음전하가 약해진다는 것을 나타낸다. DiI로 표시된 MSCNV와 Cy5로 표시된 세리아 나노입자(Ce NP)의 공동 위치를 SRM으로 조사하면 세리아 나노입자(Ce NP)와 MSCNV 사이의 결합을 확인할 수 있다.

[0045] 도 5는 세리아 나노입자, MSCNV, 및 Ce-MSCNV의 SOD 모방 활성 및 CAT 모방 활성을 나타낸다.

[0046] 도 5를 참조하면, 세리아 나노입자 또는 MSCNV와 비교하여 Ce-MSCNV는 세리아 나노입자의 우수한 ROS 소거 특성으로 인해 SOD(superoxide dismutase) 및 CAT(catalase) 모방 활성 모두에서 높은 성능을 보인다. 세리아 나노입자의 촉매 활성은 MSCNV와 화학적 결합 후에도 유지된다.

[0048] Ce-MSCNV에서 MSC 함량이 보존되는지 여부를 조사하였다. MSC는 면역 세포에 면역 조절 효과를 발휘할 수 있다. MSC에 함유된 면역 조절 인자(예: 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO) 및 간세포 성장 인자(HGF)) 및 항염증 사이토카인(예: 인터루킨-10(IL-10) 및 형질전환 성장 인자- β (TGF))은 수지상 세포(DC) 성숙을 억제하고 tDC를 유도하여 선천 면역과 적응 면역 모두에 대한 관용원성 효과를 나타낸다.

[0050] [항염증 및 면역 조절 효과]

[0052] 류마티스 관절염 초기에는 면역세포가 활액막에 침투하고 특히 대식세포가 전염증성 고전(M1) 표현형으로 활성화되어 종양괴사인자- α (TNF- α), IL-6, 및 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인의 방출을 유발한다. 이 M1 대식세포는 활액막의 인접 세포뿐만 아니라 스스로를 더욱 활성화하고 염증을 촉진하여 결국 관절 손상과 연골 파괴에 기여한다. 따라서 대식세포에 대한 Ce-MSNV의 항염증 및 면역 조절 효과를 조사하고 앞서 언급한 Ce-MSNV의 활성을 기반으로 결과적인 연골 보호 효과를 평가하였다.

[0054] 도 6은 공초점 현미경으로 확인된 Ce-MSNV의 시험관 내 ROS 소거를 나타내고, 도 7은 다른 종류의 나노입자로 처리된 대식세포에서 염증(IL-1 β , IL-6, iNOS 및 TNF- α ; M1 대식세포 마커) 및 항염증(Arg1 및 CD206; M2 대식세포 마커) 분자의 상대적 mRNA 발현 수준을 나타낸다.

[0055] 도 6을 참조하면, Ce-MSNV가 다른 그룹에 비해 대식세포에서 과잉 생산된 ROS를 효율적으로 제거할 수 있는 것으로 나타났다.

[0056] 도 7을 참조하면, 류마티스 관절염과 같은 염증 상태에서 M1에서 M2로 대식세포 표현형 변화를 평가하였는데, qRT-PCR 결과 M1 특이 마커(IL-1 β , IL-6, iNOS(inducible nitric oxide synthase), TNF- α)가 유의하게 감소한 반면, M2 특이 마커(Arg1(arginase 1) 및 CD206(cluster of differentiation 206))는 PBS(Phosphate Buffered Saline) 처리 그룹과 비교하여 Ce-MSNV 처리 그룹에서 유의하게 증가하였다.

[0057] 또, Ce-MSNV는 대식세포에 심각한 독성을 나타내지 않는다. ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 결과에서도 염증성 사이토카인의 분비가 감소한 반면 항염증성 사이토카인은 다른 그룹에 비해 Ce-MSNV 처리된 대식세포에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다.

[0059] 도 8은 연골 세포에서의 IL-1 β , TGF- β , caspase-3, ADAMTS5 및 COL II의 상대적 mRNA 발현 수준을 나타내고, 도 9는 연골 세포에 의해 분비된 사이토카인의 수준을 나타낸다.

[0060] 도 8 및 도 9를 참조하면, M1 대식세포는 상이한 유형의 나노입자로 전처리되었고 연골세포와 함께 배양되었다. qRT-PCR 결과는 염증성 IL-1 β 의 수준이 유의하게 감소한 반면 항염증성 TGF- β 는 Ce-MSNV로 전처리된 대식세포와 함께 배양된 연골 세포에서 증가하였다. 이는 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제의 하향 조절뿐만 아니라 연골 세포 사멸 마커인 caspase-3의 발현 감소와 관련이 있다. 그 결과, 연골의 주요 ECM(cartilage extracellular matrix) 성분인 II형 콜라겐(COL II)의 수준이 크게 증가하였다. ELISA 데이터에서도 연골 세포가 Ce-MSNV로 전처리된 대식세포와 함께 배양되었을 때 염증성 사이토카인(IL-1 β 및 IL-6)보다 더 많은 항염증성 사이토카인(IL-10)을 분비하는 유사한 경향을 보였다.

[0061] 이와 같이, Ce-MSNV는 세리아 나노입자의 촉매 활성화와 MSNV의 항염증성 사이토카인이 협력하여 세포의 선천 면역을 조절할 수 있다. 세리아 나노입자 또는 MSNV 처리군도 항염증 효과를 보였지만 Ce-MSNV보다 효능이 낮았다. 또, Ce-MSNV를 연골 세포와 직접 배양했을 때 세포 사멸 감소와 보호 효과가 관찰되었다.

[0063] 도 10은 Ce-MSNV로 처리된 대식세포에 대한 단백질 분석 결과를 나타낸다.

[0064] 도 10을 참조하면, Ce-MSNV로 처리된 대식세포에 대하여 총 1887개의 단백질이 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석법에 의해 확인되었으며, 그 중 227개의 단백질이 PBS 처리군과 비교하여 유의한 차이를 보였다(Ce-MSNV 처리로 2배 변화, p -값 < 0.05, 3회 수행). M2 대식세포(MRC1 및 COL4A1) 및 M2 대식세포 관련 단백질(NT5E, COP1 및 H2-AA)의 마커는 Ce-MSNV 처리군에서 풍부해졌다. Ce-MSNV 처리는 M2 분극화를 촉진하는 것으로 알려진 CAVIN1, C3AR1, NAMPT, PLGRKT, IGF2 및 TIMP3를 상향 조절하였고, M1 분극화 관련 PDK1을 하향 조절하였다. 또, 산화 스트레스 관련 단백질(INF2 및 USP15)이 하향 조절되었으며 이는 ROS 소거의 결과로 해석될 수 있다. Ce-MSNV 처리는 또한 항염증 단백질(HSPB1 및 CAV1)을 상향 조절하고 염증 관련 MNDAL을 하향 조절하였다. M2 대식세포 침윤 및 조직 리모델링 관련 단백질(COL12A1, KIFC1 및 FN1)도 류마티스 관절염 치료에 유익한 방식으로 중요한 변화를 보였다.

- [0066] [tDC(tolerogenic dendritic cell) 매개 Treg 유도]
- [0068] DC는 선천 면역과 적응 면역을 연결하여 면역 체계에서 중심적인 역할을 한다. DC는 이펙터 응답(effector responses)을 촉진하는 면역원성 표현형과 면역 관용을 유도하는 면역 억제 표현형의 두 가지 상반되는 표현형을 가지고 있다. 후자는 tDC라고 하며 여러 경로를 통해 Treg를 유도할 수 있다.
- [0070] 도 11은 다른 종류의 나노입자로 처리된 DC(dendritic cell)에서 염증(IL-1 β 및 TNF- α) 및 항염증(TGF- β 및 IL-10) 분자의 상대적 mRNA 발현 수준을 나타내고, 도 12는 유동 세포 계측법으로 측정된 MHC II 및 공동 자극 분자(CD40, CD80 및 CD86)의 발현을 나타낸다.
- [0071] 도 11을 참조하면, 염증성 사이토카인(IL-1 β 및 TNF- α)의 수준은 상당히 억제되었고, 항염증성 사이토카인(IL-10 및 TGF- β)은 다른 그룹보다 Ce-MSCNV로 처리된 DC에서 더 높았다.
- [0072] 도 12를 참조하면, Ce-MSCNV로 처리된 DC는 다른 처리군 및 성숙한 DC(mDC)보다 발현 수준이 현저히 낮았지만, iDC보다 발현 수준이 높았다.
- [0074] 도 13은 Ce-MSCNV로 처리된 DC에 대한 단백질 분석 결과를 나타낸다.
- [0075] 도 13을 참조하면, Ce-MSCNV로 처리된 DC에 대하여 총 1912개의 단백질이 액체 크로마토그래피-탠덤 질량분석법에 의해 확인되었으며, 그 중 174개의 단백질이 PBS 처리군과 비교하여 유의한 차이를 보였다(Ce-MSCNV 처리로 2배 변화, p-값 < 0.05, 3회 수행). Ce-MSCNV 처리는 tDC(THBS1) 및 tDC 유도 관련 단백질(C1QC)의 마커를 상향 조절하였고, DC 성숙 관련 단백질(MAOA, CTSB, HMGB1 및 SPI1)을 하향 조절하였다. 또, Ce-MSCNV 처리는 항염증 관련 단백질(PEX14, MCU 및 CYRAB)을 상향 조절하였고, 염증 관련 IGF2R을 하향 조절하였다. 특히 Ce-MSCNV는 선천 및 적응 면역 응답을 연결하는 역할을 하는 SPPL2A의 수준 및 Treg의 수를 증가시키거나 기능을 강화시키는 것으로 알려진 TLR9, APOB, 및 IGF2의 수준을 증가시켰다. 이러한 데이터는 Ce-MSCNV에 의해 조절된 DC가 Treg 유도 능력을 발휘할 수 있음을 의미한다.
- [0077] 도 14 내지 도 16은 다른 종류의 나노입자로 전처리된 DC와의 공동 배양을 통한 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg의 유도를 나타낸다. 다른 종류의 나노입자로 처리된 DC는 야생형 마우스로부터 분리된 CD4⁺ T 세포와 공동 배양되었다.
- [0078] 도 14 내지 도 16을 참조하면, Ce-MSCNV가 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺(forkhead box p3) Treg를 가장 효율적으로 유도한다. Ce-MSCNV에 의해 유도된 Treg의 면역 억제 효과를 확인하기 위해 qRT-PCR 및 ELISA 분석을 수행하였고, Ce-MSCNV 및 MSCNV 처리군에서 TNF- α 의 mRNA 발현 수준이 감소하였다. 염증성 사이토카인(TNF- α 및 IFN- γ)의 분비도 Ce-MSCNV 및 MSCNV 처리군에서 감소하였다. 이와 같이, MSCNV에 존재하는 면역 조절 분자가 tDC와 Treg를 효율적으로 유도할 수 있다.
- [0079] 또, 항원(Ag) 및 Ce-MSCNV로 처리된 DC가 트랜스제닉 마우스에서 분리된 CD4⁺ T 세포와 공동 배양되는 추가 실험에서, Treg 유도는 Ag의 존재 하에서 현저하게 향상되는 것으로 나타났다.
- [0081] [콜라겐 유발 관절염 마우스 모델에서의 치료 효과]
- [0083] 생체 내에서 류마티스 관절염에 대한 Ce-MSCNV의 치료 효과를 조사하기 위해 콜라겐 유발 관절염(collagen-induced arthritis, CIA) 마우스 모델을 구축하였다. 이 모델은 질병 발병 및 진행에서 Treg 및 Th17과 같은 면역 세포의 역할을 포함하여 류마티스 관절염과 병리학적 특징 및 면역병인을 공유하도록 설계되었다. Ce-MSCNV의 생체 내 독성 결여는 처리 전에 확인되었다. 다회 투여 요법의 시간 간격은 관절 내(IA) 주사를 통해

투여된 Ce-MSCNV의 시간의존적 생체 분포를 분석하여 결정되었다.

- [0084] 관절 활액에 주사되는 물질은 연골 조직의 무혈성 특성으로 인해 제한된 전신 순환을 경험하는 것으로 알려져 있다. 특히, 나노 크기의 물질은 관절 부위에 비교적 오랜 시간 동안 남아 있을 수 있으며, 활막 대식세포에 의한 림프 배수나 식균작용을 통해 제거가 일어난다. 실제로, 무릎 관절에서 DiR 표지된 Ce-MSCNV의 신호는 3일째부터 점차 감소한 다음 10일째에 완전히 사라졌지만, 이식된 주요 장기에서는 신호가 관찰되지 않았다. 슬와 림프절로의 이동도 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 CIA 치료를 위한 Ce-MSCNV의 최적 투여 간격을 결정하였다.
- [0085] Ce-MSCNV를 비롯한 다양한 물질의 치료 효능을 CIA의 주요 증상인 염증 반응으로 인한 발 부종 및 고열의 변화 측면에서 평가하였다. 접종 45일 후 임상점수는 7점 이상의 차이를 보였고, 발두께와 체온은 대조군에서 천연군에 비해 각각 1.44배, 1.32배 증가하였다. 대조적으로, Ce-MSCNV 처리군에서는 발 부종과 고열이 모두 현저히 감소하였다. 또 류마티스 관절염의 또 다른 임상 징후인 통각과민을 측정하기 위해 통증 행동을 조사하였고, Ce-MSCNV 처리군은 다른 군에 비해 통각 과민이 현저히 감소한 것으로 나타났다.
- [0086] 또, 시간 경과에 따른 증상 완화 경향은 각 군마다 다르게 나타났다. 세리아 나노입자는 치료 직후 증상을 완화시켰으나 시간이 지남에 따라 그 효과는 점차 감소하였다. 이에 반해 MSCNV는 치료 초기에는 약효를 보였으나 치료 후 약효가 약간 개선되었다. 이것은 세리아 나노입자와 MSCNV 사이의 치료 메커니즘의 차이에서 비롯된다. 세리아 나노입자는 무릎 관절에서 ROS를 직접 제거하여 염증 반응을 억제하는 반면 MSCNV는 면역 세포를 조절하여 간접적으로 작용한다. 전자는 전자 교환 반응을 통해 지속적으로 작용하지만 제거 후 즉시 그 효능을 잃는다. 후자는 그 안에 포함된 사이토카인을 통해 다른 세포에 영향을 주지만 단독으로 사용하면 치료 효과가 약하다. 이와 대조적으로, Ce-MSCNV는 모든 시점에서 우수한 효능을 보였다. 치료 효과의 지속성을 확인하기 위해 최대 60일 동안 장기 임상 점수를 추적하였는데, 대조군의 점수는 점차 증가하는 경향을 보인 반면, Ce-MSCNV 처리군의 점수는 60일째까지 유지되어 Ce-MSCNV의 치료 효과가 장기간 지속될 수 있었다.
- [0088] 도 17은 면역화 45일 후 무릎 관절의 조직학적 및 면역조직화학적 평가 결과를 나타낸다. 연골 손상은 safranin-O 염색으로 검사하고 Mankin 점수를 사용하여 정량화하였다
- [0089] 도 17을 참조하면, 심하게 손상된 대조군과 달리 Ce-MSCNV 처리군에서는 연골 구조가 잘 보존되었다. 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 결과 세리아 나노입자(Ce) 처리군, MSCNV 처리군 및 Ce-MSCNV 처리군은 모두 중증 활막염을 피한 반면, 대조군에서는 호중구와 같은 염증 세포가 넓은 영역에 걸쳐 관찰되었다. Ce-MSCNV 처리군에서는 대조군 및 다른 처리군에 비해 염증 세포의 수가 현저하게 감소하였다.
- [0090] 염증에 의해 촉진되는 혈관신생은 vWF(von Willebrand factor)로 혈관을 면역형광염색하여 분석하였다. vWF-양성 영역의 비율은 대조군에서 가장 높았고, MSCNV 처리군 및 세리아 나노입자 처리군이 그 뒤를 이었으며, Ce-MSCNV 처리군에서 현저히 낮아 Ce-MSCNV가 활액막에서 혈관신생을 현저하게 감소시켰음을 확인할 수 있다.
- [0092] 도 18은 면역화 45일 후 무릎 관절의 대표적인 마이크로-CT 이미지 및 BMD(bone mineral density)를 나타낸다.
- [0093] 도 18을 참조하면, 대조군, 세리아 나노입자 처리군, MSCNV 처리군 및 Ce-MSCNV 처리군의 BMD 값은 각각 527.34, 549.99, 542.39 및 562.27mg/cm³이다. Ce-MSCNV 처리군은 가장 높은 골밀도와 정상 형태의 무릎 구조를 보였다.
- [0095] 도 19는 무릎 관절 조직에서 ADAMTS5, MMP13 및 COL II의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸다.
- [0096] 도 19를 참조하면, 연골 분해 마커인 ADAMTS5 및 매트릭스 MMP13(matrix metalloproteinase 13)은 하향 조절되었고, 관절 연골의 기초인 COL II는 상당히 상향 조절되었다.
- [0098] [면역 회복 및 CIA(collagen-induced arthritis) 악화 예방]

- [0100] CIA에서 교란된 면역 체계의 회복을 확인하기 위해 생체 내에서 Ce-MSCNV에 의한 선천 및 적응 면역 조절을 분석하였고, CIA 무릎 관절의 활액막에서 대식세포의 M1에서 M2로의 표현형 이동을 분석하였다. Ce-MSCNV 처리군에서 M1 특이 iNOS⁺ 대식세포의 발현 수준은 현저하게 감소한 반면, M2 특이 CD206⁺ 대식세포는 대조군에 비해 상향 조절되었다. 세리아 나노입자 처리군 및 MSCNV 처리군은 대조군과 Ce-MSCNV 처리군 사이의 결과를 보였다. 이러한 경향은 시험관 내에서 관찰된 것과 유사하며 Ce-MSCNV가 세리아 나노입자 또는 MSCNV 단독보다 더 효율적으로 활액막 대식세포의 M2 분극화를 촉진한다는 것을 나타내며, 이는 세리아 나노입자와 MSCNV의 시너지 효과에 기인한다.
- [0102] 도 20은 나노입자 처리에 대한 반응으로 사타구니 림프절에서 CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Treg 및 CD4⁺RORγt⁺IL-17⁺ Th17의 유세포 분석 결과 및 Treg/CD4⁺ T 세포, Th17/CD4⁺ T 세포 및 Th17/Treg 비율을 나타낸다.
- [0103] 도 20을 참조하면, 림프절의 유세포 분석에 따르면 Ce-MSCNV가 Treg를 성공적으로 유도할 수 있다. CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Treg 대 CD4⁺ T 세포의 비율은 대조군보다 Ce-MSCNV 처리군에서 1.91배 더 높았고, MSCNV 처리군 및 세리아 나노입자 처리군이 그 뒤를 이어 미미한 효과를 보였다. CD4⁺ 레티노산 관련 고아 수용체 γt(RORγt)⁺IL-17⁺ Th17 발현은 Ce-MSCNV 처리군, 세리아 나노입자 처리군 및 MSCNV 처리군에서 상당히 하향 조절되었다.
- [0104] 류마티스 관절염 발병 및 진행 지표인 Th17/Treg 비율은 Ce-MSCNV 처리군이 0.04로 가장 낮았고, MSCNV 처리군, 세리아 나노입자 처리군 순으로 나타났으며, 대조군이 1.60을 가장 높았다. 이러한 결과는 Ce-MSCNV가 Th17/Treg 균형을 효과적으로 복원하여 면역 관용을 회복할 수 있음을 보여준다. 또 Ce-MSCNV에 의한 Th17/Treg 균형의 회복이 장기적으로 유지되었다.
- [0106] 도 21은 Ce-MSCNV에 의해 유도된 Treg의 Ag 특이성을 나타낸다. Ce-MSCNV로 처리된 마우스에서 분리한 비장 세포를 다른 종류의 Ag(PBS, 대조군인 OVA(ovalbumin), COL II 펩타이드)로 재자극하고 그 결과를 유동 세포 계측법으로 분석하였다.
- [0107] 도 21을 참조하면, Treg는 다른 군에 비해 COL II 펩타이드 재자극으로 Ce-MSCNV 처리군에서 상당히 증가한 것으로 나타났다. 이는 Ce-MSCNV에 의해 유도된 Treg가 Ag 특이적 면역 억제를 보인다는 것을 나타낸다.
- [0109] 도 22는 무릎 관절 조직에서 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6 및 IFN-γ) 및 Treg와 Th17 마커(Foxp3 및 IL-17)의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸다.
- [0110] 도 22를 참조하면, 대조군에서 높은 수준을 보였던 염증 마커(TNF-α, IL-6 및 IFN-γ)는 Ce-MSCNV 처리군에서 크게 감소하였다. Treg 마커인 Foxp3는 Ce-MSCNV로 처리된 무릎 관절에서만 유의미하게 상향 조절되었다. Th17 마커(IL-17)도 Ce-MSCNV 처리군에서 유의미하게 감소했으며, 세리아 나노입자 처리군 및 MSCNV 처리군이 그 뒤를 이었다.
- [0112] 도 23은 다른 종류의 나노입자로 처리에 따른 혈청 내 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β), IL-17 및 항염증성 사이토카인(IL-10 및 TGF-β1)의 수준을 나타낸다.
- [0113] 도 23을 참조하면, 마우스 혈청의 ELISA 분석에서 Ce-MSCNV 처리군은 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β) 및 IL-17의 수준이 유의미하게 낮아지고, 높은 수준의 항염증성 사이토카인(IL-10 and TGF-β1)을 보였다.
- [0114] 도면에 도시되지 않았지만, CIA에서 질병 유발 및 지속의 핵심 인자인 항-COL II IgG2a 및 IgG2b 아형 항체는 대조군에서는 시간이 지남에 따라 증가하는 경향이 있지만, Ce-MSCNV 처리군에서는 감소하는 경향이 있다.
- [0116] 세리아 나노입자와 MSCNV가 물리적으로 혼합된 Ce+MSCNV 처리군을 Ce-MSCNV 처리군과 비교하여 Ce-MSCNV의 상승 작용을 명확하게 구분하였다. 임상 점수 측면에서 Ce+MSCNV 처리군은 일시적인 감소 후 가파른 증가를 보였으며

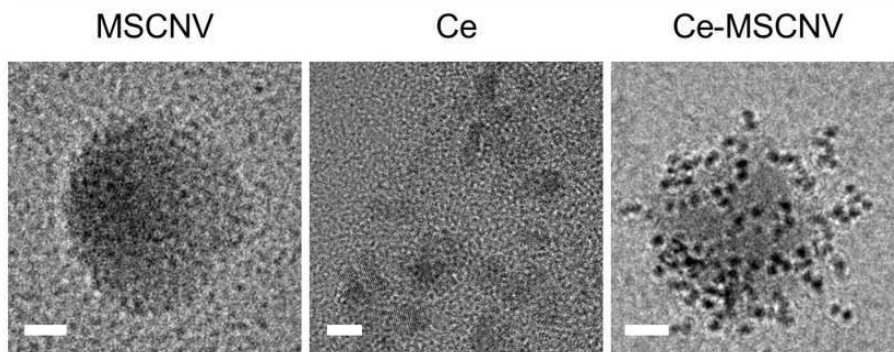
이는 Ce-MSCNV 처리군과 유의미한 차이를 보였다. 또, 림프절에서 Treg 및 Th17 분화 측면에서 면역 조절을 비교하였는데, Ce+MSCNV 처리군이 대조군과 차이를 보였지만, Ce+MSCNV 처리군의 Th17/Treg 비율은 Ce-MSCNV 처리군보다 8.0배 높았다. 비장, 활막 내 대식세포의 M1에서 M2 표현형 이동, 무릎 관절 조직 및 혈청의 ELISA의 분석에서도 유사한 결과가 얻어졌다. 세리아 나노입자와 MSCNV 사이의 긴밀한 접합이 없으면 크기와 표면 전하가 다르기 때문에 두 구성 요소의 이동 경로, 위치 및 면역학적 특성이 서로 다를 수 있다. 상기 데이터로부터 세리아 나노입자와 MSCNV의 물리적 혼합이 약간의 시너지 효과를 가져올 수 있지만 Ce-MSCNV 하이브리드 시스템을 사용할 때 시너지 효과가 더 오래 지속될 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

[0118] Ce-MSCNV의 예방 가능성을 조사하였는데 CIA의 불활성화 단계에서 Ce-MSCNV를 투여하면 3회 주사로도 질병 예방에 충분한 효능을 보였다. 임상, 조직학적 및 면역학적 평가에서, 대조군은 부스터 주사 후 임상 점수와 발의 두께와 온도가 극적으로 증가함에 따라 CIA의 높은 발병률을 보였으나, Ce-MSCNV로 전처리된 마우스는 부스터 주사 후에도 약간의 증가만을 보였고, 적어도 45일까지 대조군에 비해 현저하게 낮은 발 온도, 두께 및 임상 점수를 유지하여 낮은 CIA 발병률을 나타냈다. 연골 파괴, 활액막염 및 혈관신생과 같은 CIA 악화의 특징은 Ce-MSCNV로 전처리된 마우스에서 예방되었다. 면역 조절의 관점에서 Ce-MSCNV 전처리 마우스의 활액막에서 M1 마커의 수준은 대조군의 해당 수준보다 5.1배 낮았고 M2의 수준은 3.6배 높았다. 림프절과 비장의 유세포 분석 결과 Ce-MSCNV가 $CD4^+ROR\gamma^+IL-17^+$ Th17을 효과적으로 억제하고 $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ Treg를 유도하여 낮은 Th17/Treg 비율을 유지하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Th17/Treg 균형이 Ce-MSCNV의 전처리에 의해 국소 및 전신 모두에서 유지되었음을 의미한다. 또, 염증성 사이토카인(IL-1 β , IFN- γ 및 IL-17)의 mRNA 발현 수준은 Ce-MSCNV 전처리군의 무릎 관절 조직에서 유의하게 감소한 반면, Foxp3의 발현 수준은 증가하였다. 마우스 혈청에 포함된 사이토카인을 정량한 결과 대조군과 비교하여 Ce-MSCNV 전처리군에서 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , 및 IL-17)은 소량 검출되었고, 항염증성 사이토카인(IL-10 및 TGF- β 1)은 다량 검출되었다. 또 각 관절에서 류마티스 관절염 증상과 관련된 마커를 분석한 결과 Ce-MSCNV는 두 관절 모두에서 COL II를 유의미하게 상향 조절하고 MMP13, TNF- α 및 IL-17을 하향 조절함을 확인하였다.

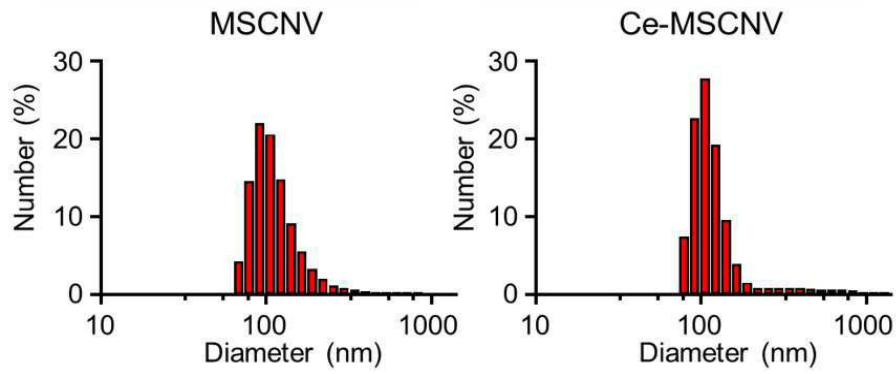
[0120] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

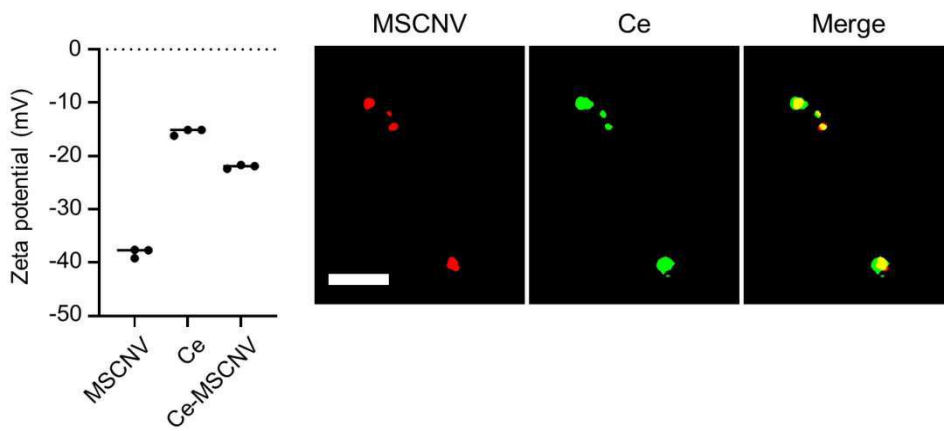
도면1



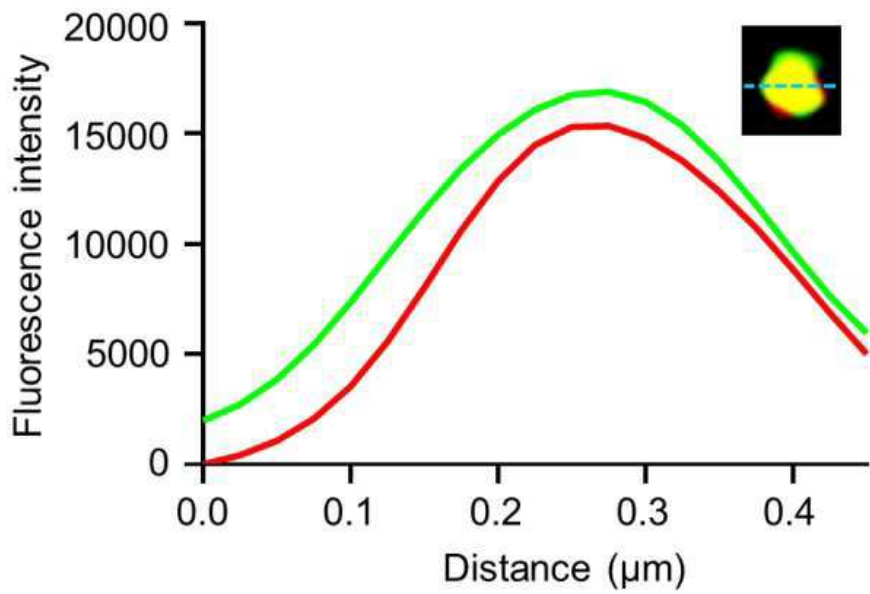
도면2



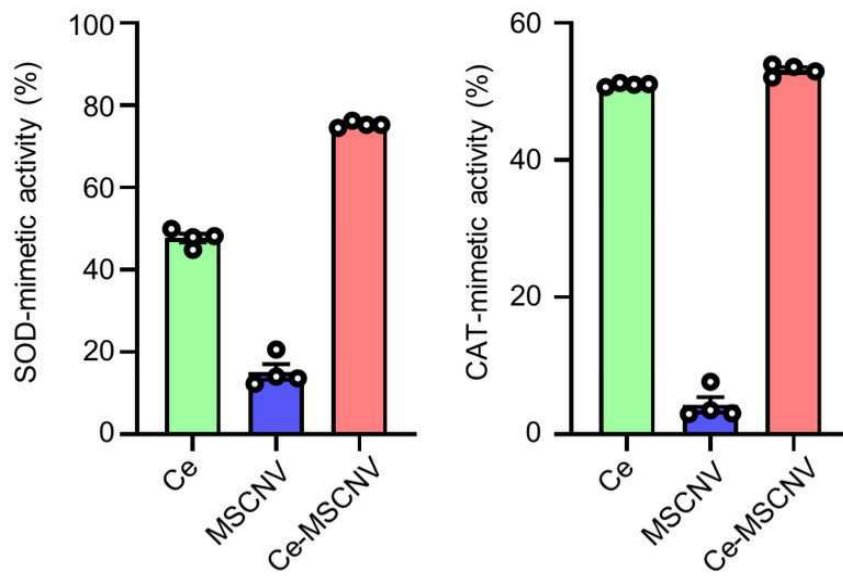
도면3



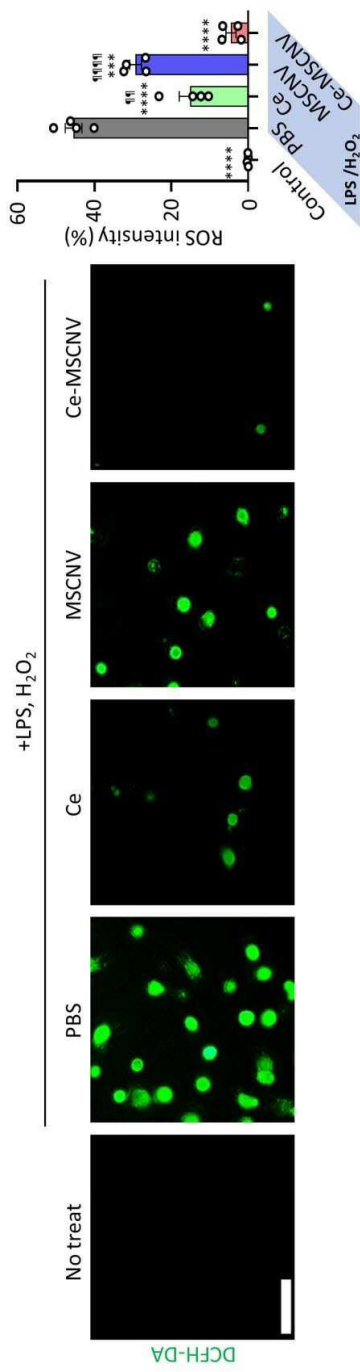
도면4



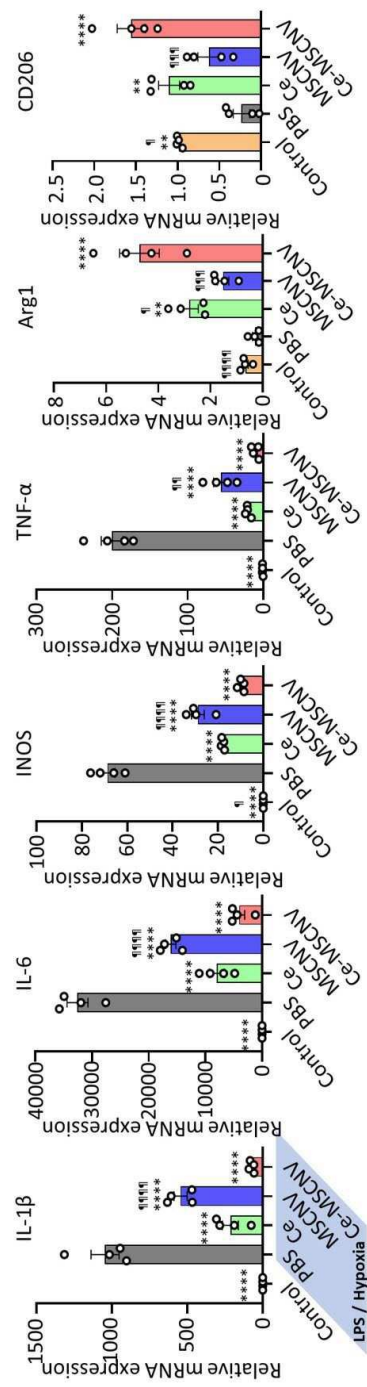
도면5



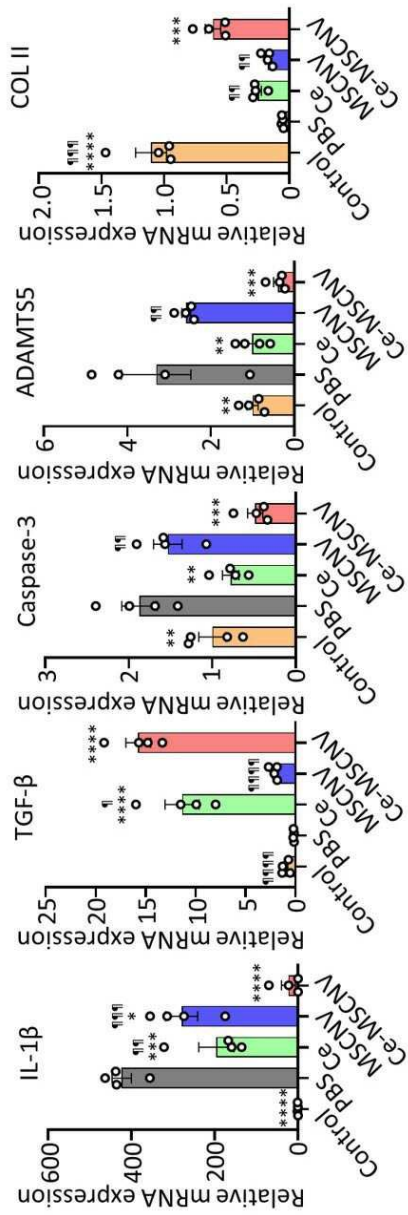
도면6



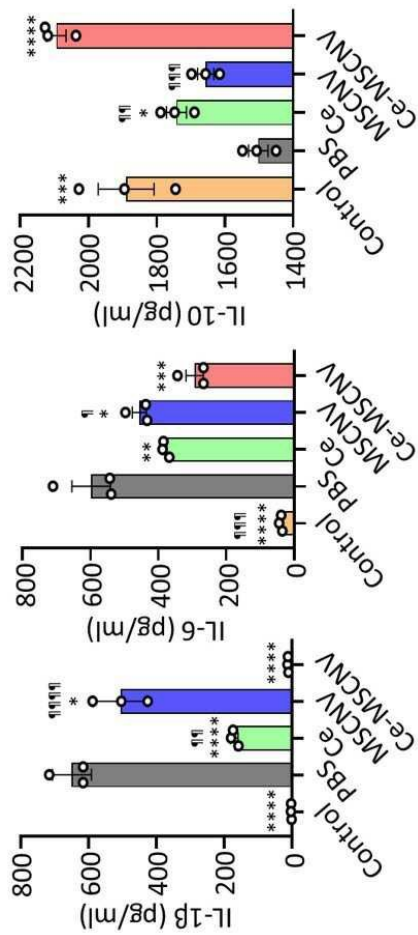
도면7



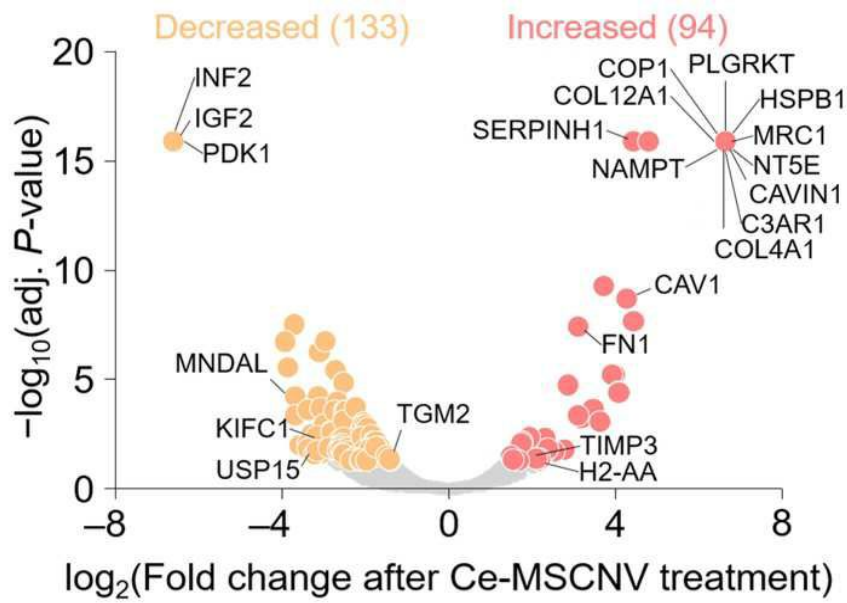
도면8



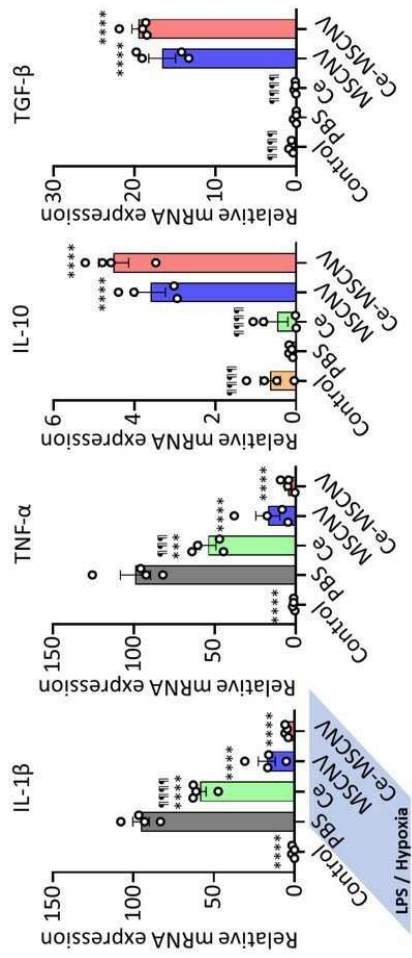
도면9



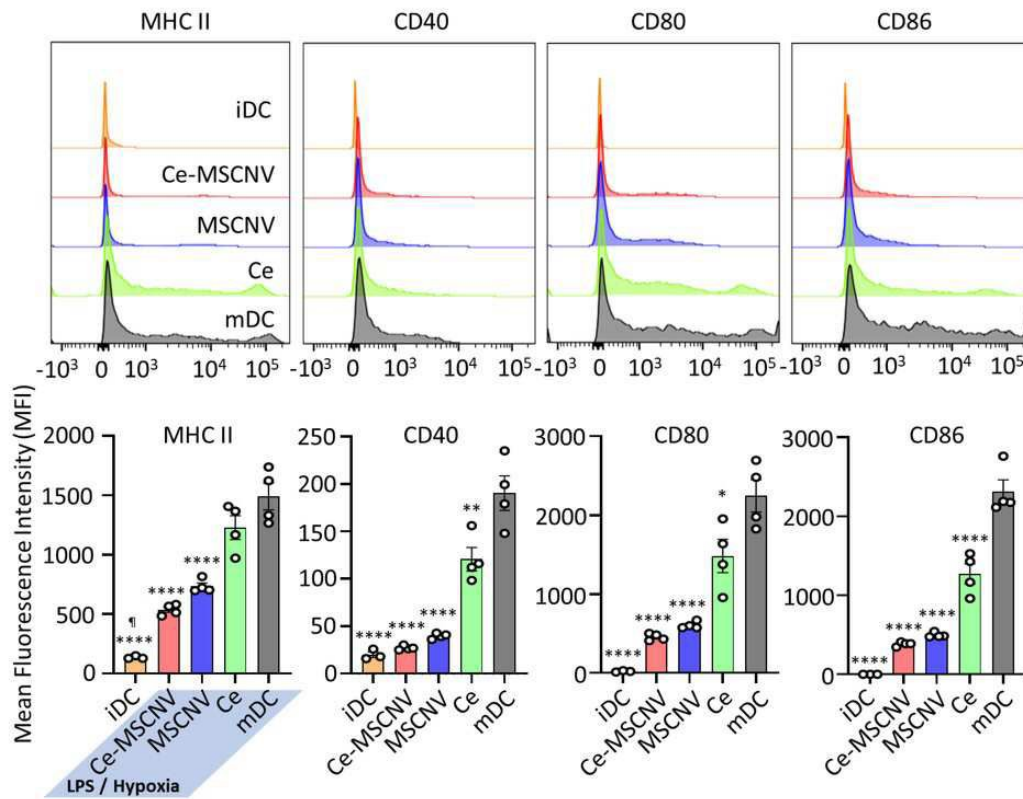
도면10



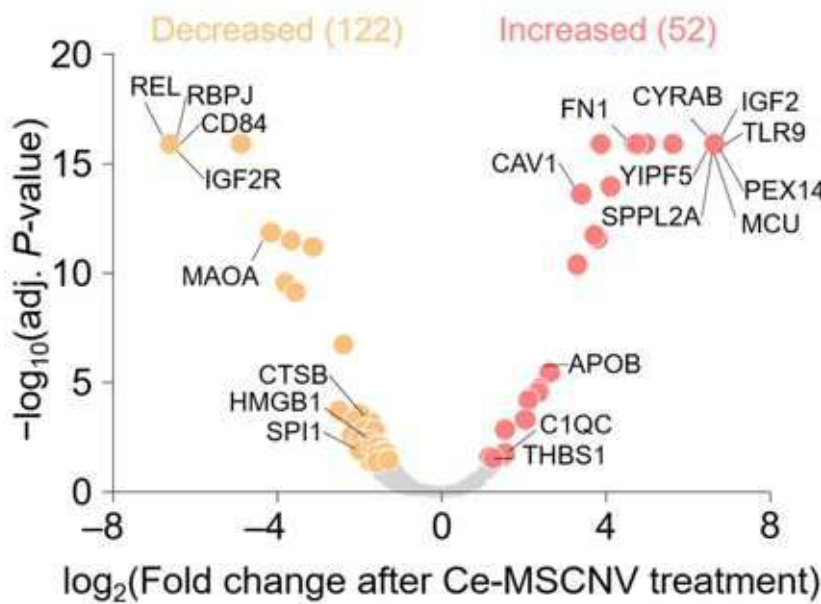
도면11



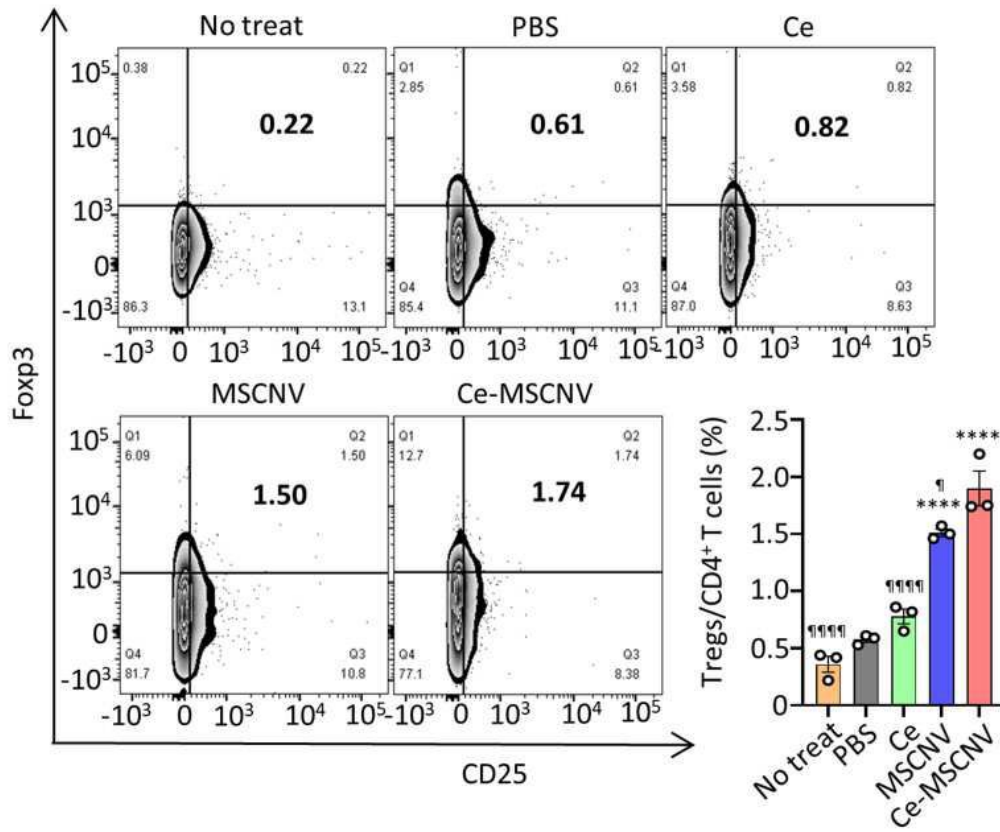
도면12



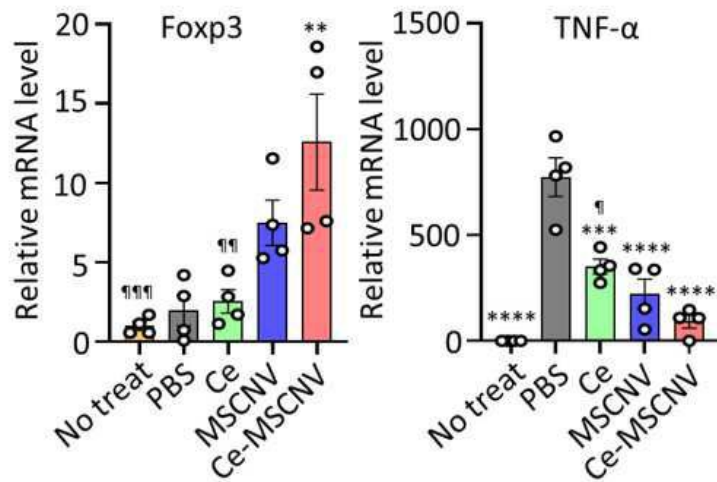
도면13



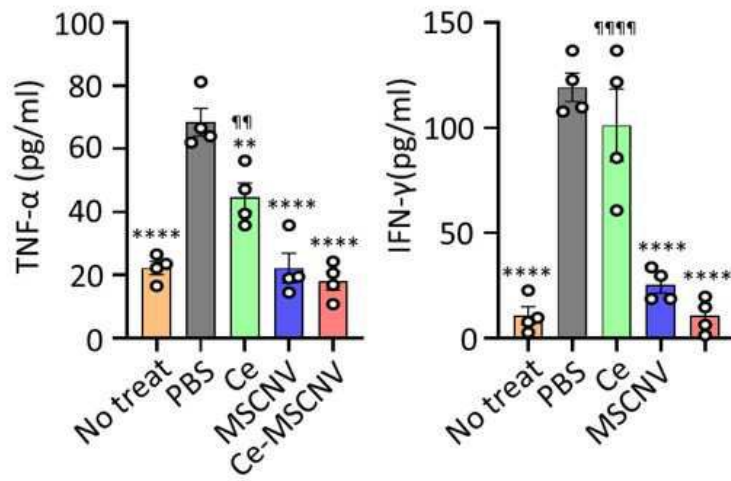
도면14



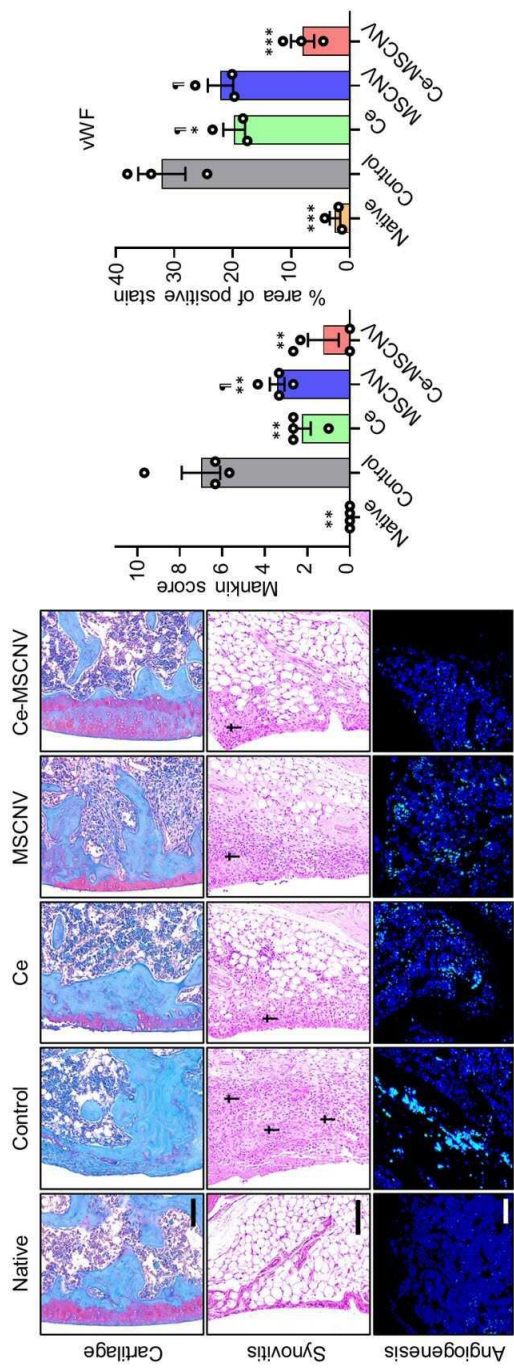
도면15



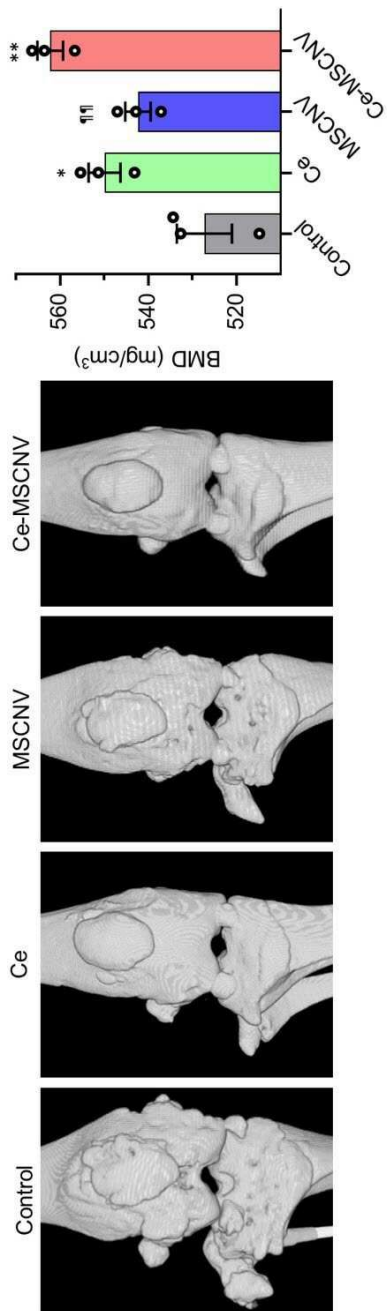
도면16



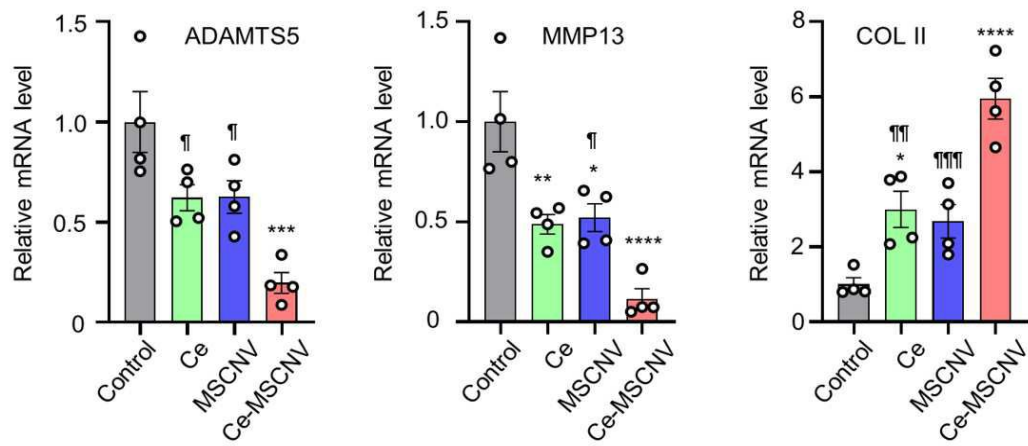
도면17



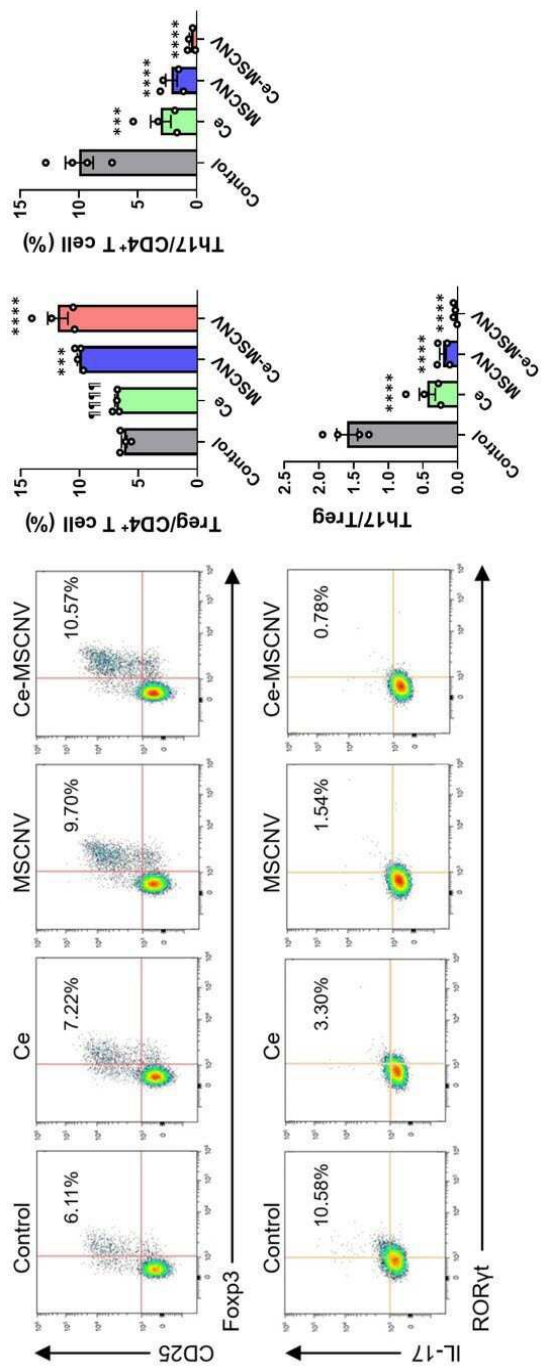
도면18



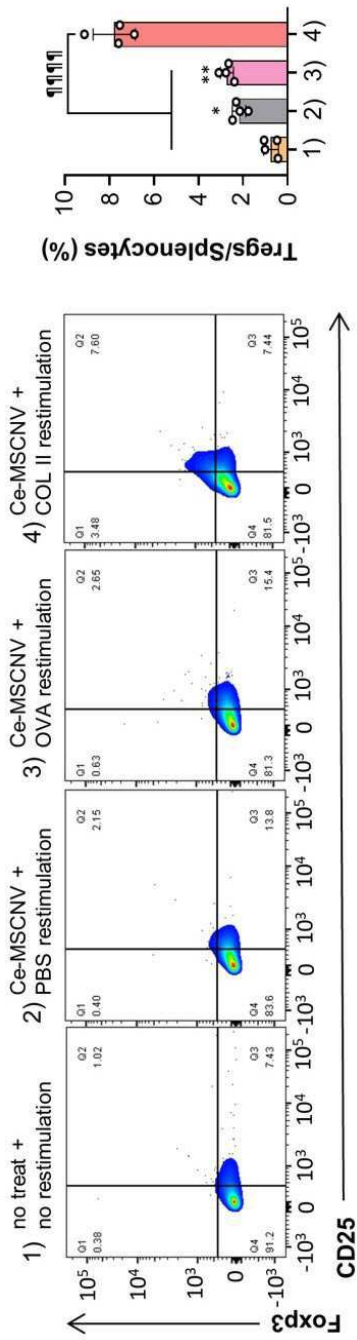
도면19



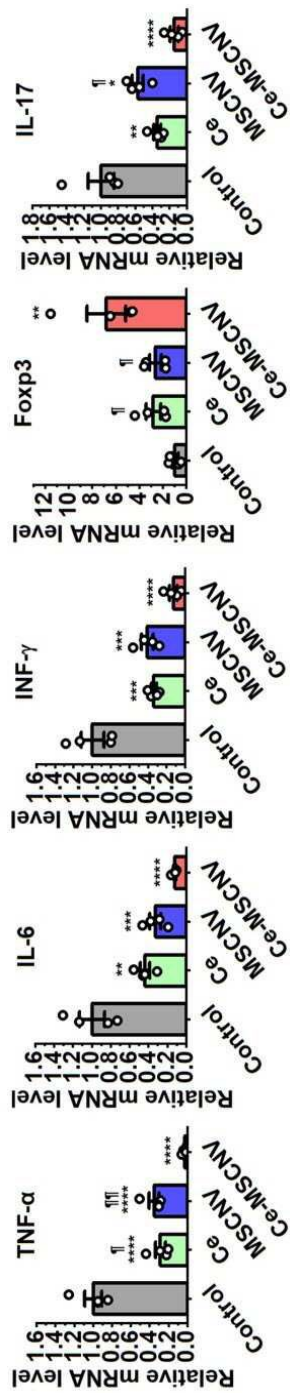
도면20



도면21



도면22



도면23

