



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0144504
(43) 공개일자 2021년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 13/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 13/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0068518
(22) 출원일자 2020년06월05일
심사청구일자 2020년06월05일
(30) 우선권주장
1020200061704 2020년05월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
강희민
서울특별시 강남구 개포로110길 50 래미안루체하
임 111동 604호
김영근
서울특별시 강남구 압구정로61길 37 한양아파트
72동 1109호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최훈식

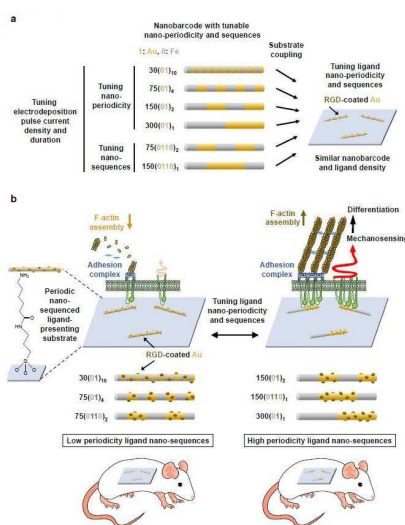
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 나노바코드를 이용한 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법

(57) 요약

본 발명은 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드 및 상기 나노바코드를 이용한 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법에 관한 것으로, 본 발명의 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법은 나노바코드의 리간드 펩티드(RGD)의 주기성 및 배열순서를 제어함으로써 생체 외 및 생체 내에서의 줄기세포의 부착 및 분화를 효율적으로 조절할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2500/42 (2013.01)

(72) 발명자

민선홍

서울특별시 성북구 고려대로 38-1 조은오피스텔
205호

전유상

서울특별시 송파구 동남로 225 래미안파크팰리스
103동 1301호

최효준

서울특별시 송파구 양산로8길 24 거여2단지아파트
203동 701호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711091868
과제번호	2019R1A2C3006587
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	금속 및 금속산화물 기반 항암 면역치료용 복합스캐폴드 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2020R1C1C1011038
과제번호	2020R1C1C1011038
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	나노 리간드 주기성의 제어와 동적인 제시를 통한 세포의 부착과 재생성 특성의 조
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2023.02.28

절

명세서

청구범위

청구항 1

철(Fe)을 포함하는 제1 세그먼트, 및 금(Au)을 포함하는 제2 세그먼트가 반복적으로 형성된 나노바코드; 및
상기 나노바코드의 제2 세그먼트에 결합된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노바코드는 하기 식 1 또는 식 2을 만족하는 막대형태로 구비되는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드:

[식 1]

$$[L(M_1M_2)_q]$$

[식 2]

$$[L(M_1M_2M_2M_1)_q]$$

여기에서,

M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트이고,

q 는 제1 및 제2 세그먼트의 반복횟수이고,

L 는 제1 및 제2 세그먼트의 길이이다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 식 1 및 2는 $[30(M_1M_2)_{10}]$, $[75(M_1M_2)_4]$, $[75(M_1M_2M_2M_1)_2]$, $[150(M_1M_2)_2]$, $[150(M_1M_2M_2M_1)_1]$ 및 $[300(M_1M_2)_1]$ 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1 세그먼트와 상기 제2 세그먼트는 각각 막대형태로 구비되되, 상기 제1 세그먼트의 길이와 상기 제2 세그먼트의 길이는 동일하게 구비되는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제1 세그먼트는 카르복실산염이 치환된 구조인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노바코드는 직경이 50nm 내지 100nm이고, 길이는 200 내지 1000nm인 단면이 원형인 막대형태로 구비되는 것을 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 인테그린 리간드 펩티드는 티올화된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하고,

상기 인테그린 리간드 펩티드의 티올기와 제2 세그먼트가 화학적으로 결합된 구조인 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드.

청구항 8

철(Fe)을 포함하는 제1 세그먼트, 및 금(Au)을 포함하는 제2 세그먼트가 반복적으로 형성되는 나노바코드를 준비하는 단계;

상기 나노바코드와 제1 현탁액과 혼합하여 제1 세그먼트에 카르복실산염 치환기를 치환하는 단계; 및

상기 나노바코드를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)을 포함하는 제2 현탁액과 혼합하는 단계;를 포함하는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제1 현탁액은 카르복실산염 치환기를 포함하는 아미노산 유도체를 포함하고,

상기 인테그린 리간드 펩티드는 티올화된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드의 제조방법.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드를 포함하는 용액에 표면이 활성화된 기관을 담지하여 나노바코드 제시 기관을 제조하는 단계; 및

상기 나노바코드 제시 기관에 줄기세포를 처리한 후 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 나노바코드 제시 기관을 제조하는 단계는,

기관의 표면을 산성용액 중에 침지시키는 단계; 및

침지가 완료된 기관을 아미노실란 용액 중에 담지하여 상기 기관 표면을 활성화시키는 단계;를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

나노바코드 제시 기관은 폴리에틸렌글리콜 유도체를 포함하는 용액에 담지하여 나노바코드가 결합되지 않은 기관의 표면을 비활성화시키는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 나노바코드 제시 기관의 나노바코드에 결합된 리간드 펩티드의 주기 및 배열 순서 중 어느 하나 이상을 변화시켜 생체 내 및 생체 외의 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계에서, 하기 식 1을 만족하는 막대형태의 나노바코드를 포함하는 기판을 사용하는 경우 줄기세포의 부착 및 기계감지 분화가 저하됨을 나타내는 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법:

[식 1]

$$[L(M_1M_2)q]$$

여기에서,

M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트이고,

q 는 제1 및 제2 세그먼트의 반복횟수이고, q 는 2 내지 10의 정수이며,

L 는 제1 및 제2 세그먼트의 길이이다.

청구항 15

제10항에 있어서,

줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계에서, 하기 식 2를 만족하는 막대형태의 나노바코드를 포함하는 기판을 사용하는 경우 줄기세포의 부착 및 기계감지 분화가 촉진됨을 나타내는 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법:

[식 2]

$$[L(M_1M_2M_2M_1)q]$$

여기에서,

M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트이고,

q 는 제1 및 제2 세그먼트의 반복횟수이고, q 는 1 내지 5의 정수이며,

L 는 제1 및 제2 세그먼트의 길이이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 부착 및 분화 조절을 위한 나노바코드 및 상기 나노바코드를 이용한 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법에 관한 것으로, 구체적으로 상기 나노바코드를 이용하여 줄기세포의 부착 및 분화를 제어하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포는 자기 재생을 통해 증식이 가능하며, 뼈, 지방, 근육, 심근, 혈관, 연골 등 다양한 세포로 분화할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 최근에는 이러한 특성을 이용하여 손상된 조직, 장기를 재생하기 위하여 줄기세포 혹은 줄기세포로부터 분화된 세포의 체내이식이 많이 연구되고 있다. 이와 더불어, 줄기세포가 특정 세포로 분화할 수 있도록 도움을 줄 수 있는 생체재료 역시 활발하게 연구되고 있다.

[0003] 이와 같이 줄기세포의 재생 효과를 효율적으로 제어하기 위한 방법으로 생체 내에서 리간드의 제시를 통한 기술이 이용되고 있다. 그러나, 기존의 마이크로 규모의 인테그린 리간드 펩티드(RGD) 탈착(uncaging)이 숙주 줄기세포의 부착을 조절하지만 줄기세포의 분화에 대한 조절은 하지 않는 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 2018-0039724

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 리간드가 결합된 나노바코드를 제공하고, 상기 나노바코드에 결합된 리간드의 주기성과 배열순서를 제어하여 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 철(Fe)을 포함하는 제1 세그먼트, 및 금(Au)을 포함하는 제2 세그먼트가 반복적으로 형성된 나노바코드; 및

[0007] 상기 나노바코드의 제2 세그먼트에 결합된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 철(Fe)을 포함하는 제1 세그먼트, 및 금(Au)을 포함하는 제2 세그먼트가 반복적으로 형성되는 나노바코드를 준비하는 단계;

[0009] 상기 나노바코드와 제1 현탁액과 혼합하여 제1 세그먼트에 카르복실레이트 치환기를 치환하는 단계; 및

[0010] 상기 나노바코드를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)을 포함하는 제2 현탁액과 혼합하는 단계;를 포함하는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드의 제조방법을 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 상기 서술한 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드를 포함하는 용액에 표면이 활성화된 기판을 담지하여 나노바코드 제시 기판을 제조하는 단계; 및

[0012] 상기 나노바코드 제시 기판에 배양액을 처리한 후 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드는 나노바코드에 코팅된 리간드의 주기성과 배열 순서를 제어하여 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하기 용이하다.

[0014] 또한, 본 발명에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법은 상기 나노바코드를 포함하는 기판에 자기장을 인가함으로써 가역적인 제어도 가능하며, 생체 내 및 생체 외에서의 줄기세포의 부착 및 분화를 효율적으로 조절할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드, 이를 포함하는 기판 및 이를 이용한 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드의 고각 환경 암시야 주사 투과 전자현미경(HAADF-STEM) 이미지, 에너지 분산 분광법(EDS) 맵핑 및 전계방출 주사전자 현미경(FE-SEM) 이미지를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드의 모식도(a) 및 HAADF-STEM의 결과로부터 계산된 각각의 Fe/Au 나노바코드의 총 길이(b), 직경(c) 및 표면적(d)을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드의 X선 회절 분석 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드의 진동 샘플 자력계 측정 결과 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 포함하는 기판을 제조하는 단계를 도식화한 이미지이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드의 푸리에 변환 적외선 분광(FT-IR) 분석한 결과이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용하여 배양된 줄기세포(48시간 후)의 F-액틴, 핵, 빈쿨린 및 YAP에 대한 공초점 면역 형광 이미지이고, 스케일 바는 20 μ m를 나타낸다.

도 9는 공초점 면역 형광 이미지 데이터로부터 줄기세포 배양 48시간 후에 부착세포 밀도, 세포 면적, 초점 부착 수, 중형비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 비율을 정량적으로 계산한 그래프이다.

도 10은 공초점 면역 형광 이미지 데이터로부터 줄기세포 배양 48시간 후에 부착세포 밀도, 세포 면적, 초점 부착 수, 중형비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 비율을 정량적으로 계산한 그래프이다.

도 11은 본 발명의 비교예에 따른 스크램블된 RAD 리간드를 이용하여 배양된 줄기세포(48시간 후)의 F-액틴, 핵, 빈쿨린 및 YAP에 대한 나노-주기성 조절한 경우의 공초점 면역 형광 이미지(a)이고, 스케일 바는 50 μ m를 나타낸다. (b)는 상기 공초점 면역 형광 이미지 데이터로부터 줄기세포 배양 48시간 후에 부착세포 밀도, 세포 면적, 초점 부착 수, 중형비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 비율을 정량적으로 계산한 그래프이다.

도 12는 나노바코드를 이용하여 리간드 서열에서 나노-주기성의 조절에 의해 시험관 내 및 생체 내 줄기세포의 기계적 형질도입에 대한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 공초점 면역 형광 이미지를 토대로 나노-주기성을 갖는 나노바코드를 포함하는 기관 상에 줄기세포를 7일 동안 배양한 후 핵/세포질 RUNX2 형광 비 및 알칼리성 포스파타제-양성 세포를 정량적으로 분석한 그래프이다.

도 14는 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용하여 공초점 면역 형광 이미지를 토대로 나노-주기성을 갖는 나노바코드를 포함하는 기관 상에 줄기세포를 7일 동안 배양한 후 핵/세포질 RUNX2 및 ALP 유전자 발현 프로파일을 정량적으로 분석한 그래프이다.

도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용하여 리간드 서열에서 나노-주기성 및 리간드 서열 순서의 조절에 의해 시험관 내 줄기세포의 기계적 형질도입에 대한 실험 결과를 나타낸 것이다.

16은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용하여 줄기세포 배양 48시간 후에 인테그린 β 1, FAK, p-FAK, RhoA, F-액틴 및 핵에 대한 공초점 면역 형광 이미지이다.

도 17은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용하여 액틴 중합 억제제(사이토칼라신 D)를 갖는 줄기세포를 48시간 배양 후에 TAZ, 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 공초점 면역 형광 이미지(a)이고, 스케일바는 50 μ m이다. (b)는 상기 공초점 면역 형광 이미지로부터 계산된 핵/세포질 TAZ 형광 비율을 계산한 그래프이다.

도 18은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용하여 액틴 중합 억제제(사이토칼라신 D) 및 미오신 II 억제제(블레비스타틴)을 갖는 줄기세포 배양 48시간 후에 YAP, F-액틴 및 핵에 대한 공초점 면역 형광 이미지(a)이고, 스케일바는 50 μ m이다. (b)는 상기 공초점 면역 형광 이미지로부터 계산된 Y27632, 사이토칼라신 D 및 블레비스타틴의 억제제에 의한 핵/세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다.

도 19는 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용한 생체 내 숙주 줄기세포 부착 조절에 대한 실험 결과이다.

도 20은 본 발명의 일실시예에 따른 나노바코드를 이용하여 생체 내 숙주 줄기세포의 초점 부착 매개 기계적 형질도입에 대한 실험 결과로, 도 12c에 나타낸 공초점 면역 형광 이미지로부터 피하 이식된 기관 상에 HmSc가 주사된 6시간 후의 세포 확산 면적, 초점 부착수, 중형비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되어지는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다.
- [0018] 본 발명은 철(Fe)을 포함하는 제1 세그먼트, 및 금(Au)을 포함하는 제2 세그먼트가 반복적으로 형성된 나노바코드; 및
- [0019] 상기 나노바코드의 제2 세그먼트에 결합된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드를 제공한다.
- [0020] 도 1은 본 발명에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드, 상기 나노바코드와 결합된 기관 및 이를 이용한 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법을 나타낸 모식도이다.
- [0021] 도 1을 살펴보면, 본 발명의 나노바코드는 철(Fe)을 포함하는 제1 세그먼트, 및 금(Au)을 포함하는 제2 세그먼트

트가 반복적으로 형성된 나노바코드; 및 상기 나노바코드의 제2 세그먼트에 결합된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하며, 상기 인테그린 리간드 펩티드는 인테그린 펩티드인 것을 알 수 있다.

[0022] 구체적으로, 상기 나노바코드는 식 1 또는 식 2를 만족하는 막대형태로 구비될 수 있다:

[0023] [식 1]

[0024] $[L(M_1M_2)_q]$

[0025] [식 2]

[0026] $[L(M_1M_2M_2M_1)_q]$

[0027] 여기에서,

[0028] M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트이고,

[0029] q 는 제1 및 제2 세그먼트의 반복횟수이고,

[0030] L 는 제1 및 제2 세그먼트의 길이이다.

[0031] 구체적으로, L 은 10 내지 500, 10 내지 100, 30 내지 75 또는 150 내지 500의 정수이고, M_1 및 M_2 는 독립적으로 숫자로 나타내며, q 는 1 내지 10, 2 내지 10 또는 1 내지 2의 정수일 수 있다.

[0032] 예를 들어, 상기 나노바코드에서 식 1 및 식 2는 $[30(M_1M_2)_{10}]$, $[75(M_1M_2)_4]$, $[75(M_1M_2M_2M_1)_2]$, $[150(M_1M_2)_2]$, $[150(M_1M_2M_2M_1)_1]$ 및 $[300(M_1M_2)_1]$ 중 어느 하나로 나타낼 수 있다. 이때, M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트를 의미한다. 구체적으로, 상기 나노바코드는 $[30(01)_{10}]$, $[75(01)_4]$, $[75(0110)_2]$, $[150(01)_2]$, $[150(0110)_1]$ 및 $[300(01)_1]$ 중 어느 하나를 만족하는 막대형태로 구비될 수 있다.

[0033] 상기 식 1을 만족하는 나노바코드는 제1 및 제2 세그먼트의 길이(L)을 조절함으로써 제2 세그먼트에 결합된 리간드 펩티드의 주기성을 조절할 수 있고, 식 2를 만족하는 나노바코드는 식 1을 만족하는 나노바코드와 비교하여 제2 세그먼트에 결합된 리간드 펩티드의 주기성 및 배열 순서 중 어느 하나 이상을 조절할 수 있다.

[0034] 상기 제1 세그먼트는 카르복실산염이 치환된 구조일 수 있다. 상기 카르복실산염 치환기는 아미노산 유도체, 구체적으로 아미노카프론산일 수 있다. 상기와 같이 제1 세그먼트가 카르복실산염이 치환된 구조를 가짐으로써, 기관과의 결합력을 향상시켜 우수한 내구성을 나타낼 수 있다.

[0035] 상기 제2 세그먼트에 결합된 인테그린 리간드 펩티드는 티올화된 인테그린 리간드 펩티드를 포함하고, 상기 인테그린 리간드 펩티드의 티올기와 제2 세그먼트가 화학적으로 결합된 구조일 수 있다. 상기와 같이 제2 세그먼트에 인테그린 리간드 펩티드를 결합시켜, 상기 리간드 펩티드의 주기성과 배열순서를 제어함으로써 줄기세포의 부착 및 분화를 효율적으로 제어할 수 있다.

[0036] 또한, 도 2(a)는 본 발명에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드의 고각 환경 암시야 주사전자 현미경 및 전계방출 주사전자 현미경 이미지로, 상기 나노바코드의 크기를 알 수 있다. 구체적으로, 상기 나노바코드는 단면이 원형인 막대형태로 50nm 내지 100nm의 직경을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 나노바코드는 60 내지 90 nm 또는 50 내지 80 nm의 직경을 가질 수 있다. 또한, 상기 나노바코드는 막대형태로 200nm 내지 1000nm의 길이를 가질 수 있다. 상기 나노바코드의 직경이 200 nm 미만인 경우, 인테그린 리간드 결합 효율이 저하될 수 있고, 1000 nm 초과인 경우에는 기관 상에 결합 시 분산도가 저하될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 나노바코드는 500 내지 800 nm 또는 600 내지 900 nm의 직경을 가질 수 있다. 상기와 같은 나노바코드를 포함함으로써, 나노바코드의 구조에 따라 줄기세포의 부착 및 분화를 조절할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 철(Fe)을 포함하는 제1 세그먼트, 및 금(Au)을 포함하는 제2 세그먼트가 반복적으로 형성되는 나노바코드를 준비하는 단계;

[0039] 상기 나노바코드와 제1 현탁액과 혼합하여 제1 세그먼트에 카르복실산염 치환기를 치환하는 단계; 및

[0040] 상기 나노바코드를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)을 포함하는 제2 현탁액과 혼합하는 단계;를 포함하는 제1항 내

지 제5항 중 어느 한 항에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드의 제조방법을 제공한다.

- [0041] 상기 나노바코드를 준비하는 단계는 양극산화 나노틀을 이용하여 제1전류를 사용하여 철을, 상기 제 1 전류보다 낮은 제 2 전류를 사용하여 금을 상기 나노틀의 세공(Pore)으로 서로 번갈아 충전시켜 철-금 다층 나노선을 형성하는 전기도금 공정 및 상기 양극산화 나노틀을 에칭하는 공정을 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 나노틀로는 양극산화 알루미늄(Anodic Aluminum Oxide, AAO) 나노틀, 무기재료(Inorganic) 나노틀 또는 고분자 나노틀을 사용한다. 여기에서는 양극 산화 알루미늄 나노틀을 사용하는 경우를 도시한다. 양극산화 알루미늄 나노틀 세공(Pore)의 지름에 따라 나노선의 크기가 정해지며, 나노선의 형성 시간 및 속도에 따라 나노선 길이가 결정된다.
- [0043] 사용한 양극산화 알루미늄 나노틀은 직경이 200 나노미터 크기인 세공을 다수 갖는다.
- [0044] 전기도금 전에 전자빔 증착법(Electron Beam Evaporation)으로 양극산화 알루미늄 나노틀의 밑면에 250 nm 두께의 은(Ag) 전극층을 형성한다. 이 전극층은 전기도금 시 음극 전극 역할을 한다. 여기서 전극층으로 다른 금속 또는 다른 전도성 물질층을 사용할 수 있다.
- [0045] 높은 전압이나 전류에서는 Fe 층이 합성되고, 낮은 전압이나 전류에서는 Au 층이 합성되도록 번갈아 전압이나 전류를 인가하는 펄스 도금법으로 양극산화 알루미늄 나노틀 세공 안에 Fe/Au 바코드 나노선이 합성되도록 한다.
- [0046] 한 개의 도금조 내에 Iron (II) Sulfate Heptahydrate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 278.02 g/mol)와 Potassium dicyanoaurate (I)($\text{KAu}(\text{CN})_2$ 288.10 g/mol)을 일정 비율을 가지도록 몰(mole) 농도를 맞추어 전구체(precursor)로 사용하는 전기도금을 위한 전해액을 만든다. 전류의 항상성을 유지하기 위해 붕산(H_3BO_3)을 버퍼솔루션으로 추가한다.
- [0047] 여기에서 한 개의 도금조 안에 두 종류의 전구체를 같이 넣고 두 개의 원소가 각각 한 층을 이루는 나노선을 합성해야 하기 때문에 전구체의 선택 시 두 종류의 전구체가반응을 해서 합성물을 생성하지 않아야 한다.
- [0048] 또한, 환원성이 좋은 원소의 이온 함량과 환원성이 좋지 못한 원소 함량의 비율 조절을 통해, 다층의 구조에서 각각의 원소를 분리할 수 있도록 해야 한다. 사용한 용액의 철 대 금 이온의 몰 농도의 비는 40:1에서 4:1 범위(바람직하게는 16:1)로 귀한(Noble)한 금속인 금의 농도를 상대적으로 낮게 첨가하여 두 종류의 원소가 각각 한 층을 이루는 나노선을 합성할 수 있다.
- [0049] 전해액은 초순수(Deionized Water)를 이용하여 제조하고, 수소이온화 농도(pH Value)를 붕산(H_3BO_3)을 이용하여 일정하게 유지하여 전류의 항상성을 유지할 수 있게 한다.
- [0050] 나노틀에 펄스 전기도금을 실행하여 Fe/Au 다층구조 바코드형 나노선을 형성한다. 철 이온의 전기도금을 위하여 10 mA/cm^2 의 전류를 가하였고, 금 이온의 전기도금을 위하여 1.0 mA/cm^2 의 전류를 인가하였다.
- [0051] 철과 금은 각각 서로 다른 표준 환원 전위(Standard Reduction Potential)를 갖는데, 이러한 환원 전위의 차이를 이용하여, 위에 기술한 바와 같이 상대적으로 높은 전류에서는 철을, 상대적으로 낮은 전류를 인가하였을 경우에는 금의 도금이 가능하다. 이렇게 함으로써 Fe/Au 다층박막 나노선 제조가 가능하다.
- [0052] 다음으로, 개별의 다층박막 나노선을 획득하기 위하여, 양극산화 나노틀을 상온에서 1 시간동안 1 M의 수산화나트륨(NaOH) 용액 처리를 하면 나노틀과 전극층이 모두 녹고 바코드형 철/금의 다층박막 나노선을 분리할 수 있다.
- [0053] 나노선의 직경은 세공의 크기가 다른 양극 산화 알루미늄 나노틀을 사용함으로써 제어가 가능하고, 나노선의 철과 금의 각 층의 두께는 전기도금 시간을 변경함으로써 제어 가능하다.
- [0054] 또한, 상기 제1 세그먼트에 카르복실산염(carboxylate) 치환기를 치환하는 단계는 상기 나노바코드와 제1 현탁액을 혼합하여 8 내지 20시간 또는 10 내지 15시간 동안 반응시켜 수행할 수 있다. 상기 제1 현탁액은 카르복실산염 치환기를 포함하는 아미노산 유도체를 포함할 수 있고, 구체적으로, 상기 아미노산 유도체는 아미노카프론산일 수 있다. 상기와 같은 제1 현탁액과 반응시켜 철 세그먼트의 산화물 층에 카르복실레이트 치환기가 치환되어 기관과의 결합이 용이할 수 있다.
- [0055] 아울러, 상기 제2 현탁액과 혼합하는 단계는 나노바코드를 인테그린 리간드 펩티드(RGD)을 포함하는 제2 현탁액에 1 시간 내지 5 시간 또는 1 시간 내지 3 시간 동안 교반하여 수행할 수 있다. 이때, 나노바코드의 제2 세그

먼트에 티올화된 RGD 펩티드 리간드가 결합될 수 있다. 상기 용매는 디메틸포름알데히드(DMF) 및 디메틸설폭시드(DMSO) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기와 같이 제2 세그먼트에 인테그린 리간드 펩티드가 결합되어 나노바코드의 리간드의 주기성과 배열 순서를 제어할 수 있다. 이에 따라 상기 나노바코드를 이용하여 줄기세포의 부착 및 분화를 용이하게 조절할 수 있다.

- [0057] 아울러, 본 발명은 상기 서술한 줄기세포의 부착 및 분화 조절용 나노바코드를 포함하는 용액에 표면이 활성화된 기판을 담지하여 나노바코드 제시 기판을 제조하는 단계; 및 상기 나노바코드 제시 기판에 배양액을 처리한 후 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계를 포함하는 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법을 제공한다.
- [0058] 도 1b는 본 발명의 일실시예에 따른 줄기세포의 부착 및 분화 조절 방법을 도식화한 도면이다. 도 1b를 살펴보면, 나노바코드의 제2 세그먼트에 결합된 인테그린 리간드 펩티드의 주기 및 배열 순서를 조절하여 줄기세포의 부착 및 기계감지를 촉진하여 분화를 조절하는 것을 알 수 있다.
- [0059] 구체적으로, 상기 나노바코드 제시 기판을 제조하는 단계는, 기판의 표면을 산성용액 중에 침지시키는 단계; 및 침지가 완료된 기판을 아미노실란 용액 중에 담지하여 상기 기판 표면을 활성화시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 기판의 표면을 산성용액 중에 침지시키는 단계는 염산 및 황산 중 어느 하나 이상을 포함하는 산성 용액에 30분 내지 2시간 또는 30분 내지 1시간 동안 침지시킬 수 있다. 이를 통해, 상기 기판의 표면에 수산화기를 결합시켜 아미노실란 용액의 아미노기와 결합이 용이하도록 기판의 표면 활성화를 효과적으로 수행할 수 있다.
- [0061] 상기 기판 표면을 활성화시키는 단계는 아미노-실란 용액에 기판을 담지하여 기판의 표면을 활성화시킬 수 있다. 상기 아미노-실란 용액은 (3-아미노프로필)트리에톡시실란(APTES)을 포함할 수 있다. 이때, 기판의 표면을 활성화시킨다는 것은 기판의 표면을 양으로 하전된다는 것을 의미이고, 구체적으로는 기판 상에 아민기를 결합시켜 활성화시킬 수 있다. 상기와 같이 아미노-실란 용액에 침지하여 기판의 표면을 활성화시켜 기판의 표면이 양으로 하전됨으로써, 상기 기판은 상기 나노바코드의 철 세그먼트와 화학적으로 결합할 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 상기 나노바코드 제시 기판은 폴리에틸렌글리콜 유도체를 포함하는 용액에 담지하여 나노바코드가 결합되지 않은 기판의 표면을 비활성화시킨 것일 수 있다.
- [0063] 상기 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계는 나노바코드 제시 기판의 나노바코드에 결합된 리간드의 주기 및 배열 순서 중 어느 하나 이상을 변화시켜 수행할 수 있다.
- [0064] 구체적으로, 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계에서, 하기 식 1을 만족하는 막대형태의 나노바코드를 포함하는 기판을 사용하는 경우 줄기세포의 부착 및 기계감지 분화가 저하될 수 있다:
- [0065] [식 1]
- [0066] $[L(M_1M_2)_q]$
- [0067] 여기에서,
- [0068] M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트이고,
- [0069] q 는 제1 및 제2 세그먼트의 반복횟수이고, q 는 2 내지 10의 정수이며,
- [0070] L 는 제1 및 제2 세그먼트의 길이이다.
- [0071] 또한, 줄기세포의 부착 및 분화를 조절하는 단계에서, 하기 식 2를 만족하는 막대형태의 나노바코드를 포함하는 기판을 사용하는 경우 줄기세포의 부착 및 기계감지 분화가 촉진될 수 있다:
- [0072] [식 2]
- [0073] $[L(M_1M_2M_2M_1)_q]$
- [0074] 여기에서,
- [0075] M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트이고,
- [0076] q 는 제1 및 제2 세그먼트의 반복횟수이고, q 는 1 내지 5의 정수이며,

- [0077] L는 제1 및 제2 세그먼트의 길이이다.
- [0078] 보다 구체적으로, 상기 식 1에서, L은 10 내지 100 또는 30 내지 75의 정수일 수 있다. 또한, 상기 식 2에서 L은 150 내지 500 또는 150 내지 300의 정수일 수 있고, q는 1 내지 2의 정수일 수 있다.
- [0079] 예를 들어, 상기 나노바코드에서 식 1 및 식 2는 $[30(M_1M_2)_{10}]$, $[75(M_1M_2)_4]$, $[75(M_1M_2M_2M_1)_2]$, $[150(M_1M_2)_2]$, $[150(M_1M_2M_2M_1)_1]$ 및 $[300(M_1M_2)_1]$ 중 어느 하나로 나타낼 수 있다. 이때, M_1 은 제1 세그먼트이고, M_2 는 제2 세그먼트를 의미한다. 구체적으로, 상기 나노바코드는 $[30(01)_{10}]$, $[75(01)_4]$, $[75(0110)_2]$, $[150(01)_2]$, $[150(0110)_1]$ 및 $[300(01)_1]$ 중 어느 하나를 만족하는 막대형태로 구비될 수 있다.
- [0080] 상기와 같은 구조식을 가지는 나노바코드의 제2 세그먼트에 인테그린 리간드 펩티드를 결합시켜, 나노바코드 상에 인테그린 리간드 펩티드의 주기와 배열순서를 제어함으로써 줄기세포의 부착성과 분화를 효과적으로 조절할 수 있다.
- [0082] 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 일 실시예일뿐 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예들에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0083] **[제조예]**
- [0084] **제조예 1 내지 6**
- [0085] 나노바코드의 제조
- [0086] Fe/Au 나노바코드는 기판 상에 다양한 리간드 나노주기 및 리간드 서열을 나타내기 위해 제조하였다. 펄스 전착 공정의 주형으로 기공 직경이 70nm인 다공성 폴리카보네이트 막(PCM)을 사용하였다. 전자빔 증발기를 사용하여 다공성 폴리카보네이트 막 기공 내에 Ag(은)을 침착시켰다. PCM 세공을 나노바코드로 충전하기 위해, 0.06M 황산 제1 철 수화물($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.01M 칼륨 디시아노오레이트(Potassium dicyanoaurate, $KAu(CN)_2$) 및 0.6M 붕산(H_3BO_3)으로 전구체 용액을 제조하였다. 다공성 폴리카보네이트 막의 세공이 전구체 용액으로 채워진 후, 백금(Pt) 플레이트를 상대 전극으로 사용하면서 전기화학적 반응을 유발하기 위해 펄스 전류가 인가되었다.
- [0087] Fe 및 Au의 현저하게 상이한 환원 전위로 인해 뚜렷하게 다른 전류밀도를 갖는 인가된 펄스 전류에 반응하여 Fe 및 Au가 미리 결정된 순서로 개별적으로 감소되었다. 펄스 지속 시간을 조절함으로써 Fe 및 Au 세그먼트(segment)의 길이를 제어하였다.
- [0088] 조절 가능한 나노-주기성을 갖는 6개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드 및 총 Fe 및 Au 세그먼트의 크기를 조절하지 않은 서열(sequence)은 펄스 전류 밀도 및 지속 시간을 최적화함으로써 정확하게 제조하였다. 4개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드가 동일한 나노-서열을 갖는 조정가능한 Fe 및 Au 나노-주기성을 나타내도록 제조되었다.
- [0089] 10개의 반복된 서열을 갖는 30nm 길이의 Fe 및 Au 세그먼트로 형성된 나노바코드 $[30(01)_{10}]$ (제조예 1)는 먼저 각각 0.7초 동안 $4mA/cm^2$ 및 9초 동안 $0.25 mA/cm^2$ 을 교대로 적용하여 제조하였다. 나노바코드의 구조의 명명 규칙은 다음과 같다: Au 및 Fe 세그먼트는 각각 1 및 0으로 지칭되었다. $[30(01)_{10}]$ 나노바코드에서, 각 세그먼트의 길이(nm)는 30으로 지칭되는 반면, 각 세그먼트의 반복되는 시퀀스는 10으로 지칭되었다. 4개의 반복 서열을 갖는 75nm 길이의 Fe 및 Au 세그먼트로 형성된 나노바코드 $[75(01)_4]$ (제조예 2)는 각각 1.7초 동안 $4mA/cm^2$ 및 22초 동안 $0.25 mA/cm^2$ 을 교대로 적용하여 제조하였다. 2개의 반복 서열을 갖는 150nm 길이의 Fe 및 Au 세그먼트로 형성된 나노바코드 $[150(01)_2]$ (제조예 3)는 각각 3.6초 동안 $4mA/cm^2$ 및 45초 동안 $0.25 mA/cm^2$ 을 각각 교대로 적용하여 제조하였다. 300nm 길이의 Fe 및 Au 세그먼트 $[300(01)_1]$ (제조예 4)는 각각 7.2초 동안 $4mA/cm^2$ 및 90초 동안 $0.25 mA/cm^2$ 을 각각 교대로 적용하여 제조하였다.
- [0090] 나노-주기성 및 서열 순서를 조정하기 위해 2개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드를 제조하였다. 2개의 반복된 서열을 갖는 75nm 길이의 Fe 세그먼트, 150nm 길이의 Au 세그먼트 및 75nm 길이의 Fe 세그먼트로 형성된

나노바코드 [75(0110)₂](제조예 5)는 각각 1.7초 동안 4mA/cm², 44초 동안 0.25 mA/cm² 및 1.7초 동안 4mA/cm²을 순차적으로 교대로 적용하여 제조하였다. 150nm 길이의 Fe 세그먼트, 300nm 길이의 Au 세그먼트 및 150nm 길이의 Fe 세그먼트로 형성된 나노바코드 [150(0110)₁](제조예 6)는 각각 3.6초 동안 4mA/cm², 90초 동안 0.25 mA/cm² 및 3.6초 동안 4mA/cm²을 순차적으로 적용하여 제조하였다. 조정 가능한 나노 나노-주기성을 갖는 6개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드 및 서열은 다공성 폴리카보네이트 막(PCM)으로부터 Ag 층을 물리적으로 분리하고 디클로로 메탄 및 클로로포름으로 각각 1.5 시간 및 0.5 시간 동안 다공성 폴리카보네이트 막을 화학적으로 제거함으로써 획득하였다. 이어서, 나노바코드를 아세톤 및 에탄올로 3회 세척하고 이를 기관 결합(conjugation)을 위해 기능화하기 전에 저장을 위해 1mL의 탈이온수(DI)에 분산시켰다.

[0091] **비교제조예 1**

[0092] 음으로 하전된 티올화된 RGD 펩티드(CDDRGD, GL Biochem)를 첨가하지 않은 것을 제외하고 제조예 1과 동일한 방법으로 나노바코드를 제조하였다.

[0094] **[실시예]**

[0095] **실시예 1 내지 6**

[0096] 나노바코드 제시된 기관 제조

[0097] 상기 제조예 1 내지 6에서 제조한 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드를 화학적으로 기능화하고, 리간드 서열의 다양한 나노-주기성을 나타내기 위해 기관에 그래프팅 하였다. 아민기가 천연 산화물층에 커플링될 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에 아미노카프로산(aminocaproic acid)의 아민기는 표면 기능화 후 카르복실레이트기를 나타내기 위해 나노바코드에서 철(Fe) 세그먼트의 천연 산화물층에 커플링하는데 사용되었다. 1mL의 나노바코드 및 1mL의 6mM 아미노카프로산 용액의 혼합용액을 12시간 동안 실온에서 교반한 후, 원심분리하고 탈 이온수로 세척하였다. 22mm×22mm의 평면의 세포 배양 등급 유리 기관을 아민화시켜서 6개의 상이한 나노바코드의 표면에 카르복실레이트기가 기관 상의 아민기에 결합되도록 한다. 기관을 먼저 30분 동안 염산 및 메탄올을 1:1로 혼합한 혼합물로 세척하고 탈이온수로 행구었다. 기관에 수산화기를 황산에서 1시간 동안 활성화시키고 탈이온수로 세척하였다. 기관을 암실에서 3-아미노프로필 트리에톡시 실란(APTES) 및 에탄올(1:1)에서 1시간 동안 아민화하고 에탄올로 세척한 후, 100℃에서 1시간 동안 건조시켰다. 1mL의 탈이온수에서 아미노카프로산이 결합된 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드를 0.5mL의 20mM N-에틸-N'-(3-(디메틸아미노프로필)카보디이미드)(EDC) 및 0.5mL의 20mM N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS)에서 3시간 동안 EDC/NHS 반응을 통해 활성화시키고, 그런 다음 탈이온수로 세척하였다.

[0098] 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드를 아민화된 기관에 결합시켜 기관 결합된 나노바코드 및 리간드의 밀도를 조절하지 않고 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드에서 나노바코드 농도(1-2mL)와 반응 시간(2-3시간)을 정확하게 최적화함으로써 조정가능한 리간드 나노-주기성 및 서열을 제시한다. 티올화된 RGD 펩티드 리간드(thiolated RGD peptide ligand)는 나노바코드 결합 기관에서 Au 세그먼트에 그래프팅 되었다. 0.25% N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA) 및 10mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀히드로클로라이드(TCEP)를 갖는 디메틸설폭시드(DMSO) 중에 0.2 mM 티올화된 RGD 펩티드 리간드(GCGYCFCDSPG, GLBiochem)을 사용하여 2시간 동안 나노바코드 결합된 기관을 배양하고, 이후 탈이온수로 세척하였다. 어둠 속에서 2시간 동안 탈이온수 중에 0.2% N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA)를 갖는 100mM 메톡시-폴리(에틸렌글리콜)-숙신이미딜카르복시메틸에스터(methoxy-poly(ethylene glycol)-succinimidyl carboxymethyl ester)로 기관의 비-나노바코드-코팅된 영역을 차단한 후 탈이온수로 세척함으로써 비-RGD 리간드-특이적 줄기세포의 부착성을 최소화하였다.

[0099] **비교예 1**

[0100] 상기 비교제조예 1에서 제조한 나노바코드를 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 나노바코드 제시된 기관을 제조하였다.

[0102] **[실험예]**

[0103] 실험예 1

[0104] 본 발명에 따른 나노바코드의 형태와 화학적 특성을 확인하기 위해서, 제조된 나노바코드를 대상으로 고각 환형 암시야 주사전자 현미경(HAADF-STEM), 에너지분산형 분광분석(Energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS), X선 회절분석(X-ray diffraction, XRD), 진동 샘플 자력계 측정(Vibrating-sample magnetometry, VSM) 및 푸리에 변환 적외선 분광분석(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)을 수행하였으며, 그 결과는 도 2 및 도 6에 나타내었다.

[0105] 구체적으로, 조정가능한 나노-주기성 및 서열을 갖는 6개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드의 크기 및 형상을 특성화하기 위해, 고각 환형 암시야 주사 투과 전자 현미경(HAADF-STEM) 이미징을 이전에 입증된 절차에 따라 수행하였다. HAADF-STEM 이미징은 0.5-1.0 μ m의 구면 수차(spherical aberration, C3)에서 프로브 Cs 보정된 JEM ARM200CF(JEOL Ltd.)를 사용하여 200kV에서 수행되어 27~28 mrad의 상을 얻었다. HAADF의 수집 반각은 90~370 mrad인 반면, 이미징을 위한 수렴 반각은 21 mrad이다. 8C&9C(JEOL로 정의)의 전자 프로브 크기에서 각각 1.28 및 1.2 Å로 측정하고 2048×2048 픽셀 영역에 대해 10-15 μ s의 픽셀 채류 시간에서 현미경 사진을 획득했다. 8-13Ma의 방출 전류를 사용하면 10-20Pa의 프로브 전류 범위가 산출된다. 40 μ m의 조리개를 사용하면 $\alpha=27.5$ mrad의 빔 수렴 반각이 생성된다. 이미지 당 도입된 전자 선량은 배율에 따라 약 1000-2000e/ $\text{\AA}^2$ 로 다양하다. 획득한 이미지에서 더 어둡고 밝은 음영은 각각 Fe 및 Au 세그먼트를 나타낸다. HAADF-STEM 이미지를 사용하여 나노바코드에서 날카로운 계면을 갖는 각각의 또는 전체 Fe 및 Au 세그먼트의 나노 스케일 치수(길이, 직경 및 표면적)를 계산하였다. 이 계산은 조정가능한 나노-주기성 및 서열을 갖는 6개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드가 총 Fe 및 Au 세그먼트의 유사한 치수를 나타내는 것을 확인하였다. 6개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드에서 날카로운 인터페이스를 갖는 Fe 및 Au 세그먼트는 2개의 SOD 검출기(Thermo Fisher Scientific)를 사용하는 EDS 맵핑을 통해 구체적으로 식별되었다. Fe 및 Au 원소 맵핑은 개별적으로 펄스 및 전류 세그먼트 및 제조 시간을 엄격하게 조절함으로써 얻어진 조정가능한 나노-주기성 및 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드에서 Fe 및 Au 세그먼트를 식별하기 위해 개별적으로 사용되었다.

[0106] 아울러, X선 회절분석(D/MAX-2500V/PC, Rigaku) 측정을 수행하여 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드에서 반복되는 Fe 및 Au 세그먼트의 공존을 확인하였다. Fe 상(PDF #870722) 및 Au 상(PDF #040784)의 분말 회절 파일(Powder diffraction file, PDF) 데이터를 사용하여, 피크는 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드에 존재하는 Fe 및 Au 상의 결정면으로 색인화되었다.

[0107] 진동 샘플 자력계 측정(Vibrating sample magnetometry, VSM) 측정은 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드에서 Fe 세그먼트의 자기 특성을 적용된 자기장(H) 하에 실온에서 VSM 측정(EV9, Microsense)을 통해 분석하였다. 해당하는 자기모멘트(M)은 각 나노바코드에서 자기 모멘트의 최대 값으로 정규화한 후 히스테리시스 곡선으로 표시된다.

[0108] 도 2는 본 발명에 따른 나노바코드의 고각 환형 암시야 주사 투과 전자현미경(HAADF-STEM) 이미지, 에너지 분산 분광법(EDS) 맵핑 및 전계방출 주사전자 현미경(FE-SEM) 이미지를 나타낸 것이다. 도 2를 살펴보면, HAADF-STEM 이미지에서 교대되는 Fe 및 Au 세그먼트는 각각 어둡고 밝은 음영 영역으로 식별되었으며, Fe 및 Au 요소 별 EDS 맵핑 이미지로 합금 형성이 없는 날카로운 인터페이스를 갖는 것을 확인하였다.

[0109] 도 2의 (b)를 보면, 나노바코드에서 각각 또는 전체의 Fe 및 Au 세그먼트의 나노 크기(길이, 직경 및 표면적)를 정확하게 정량화하였다. 구체적으로, 나노바코드에서 각각의 Fe/Au 세그먼트의 길이는 [30(01) $_{10}$] 그룹에서 30.8 $\pm$ 0.3 nm/28.1 $\pm$ 1.8 nm, [75(01) $_{41}$] 그룹에서 72.3 $\pm$ 1.4 nm/74.6 $\pm$ 4.3 nm, [150(01) $_{21}$] 그룹에서 132.7 $\pm$ 19.2 nm/142.5 $\pm$ 6.1 nm, [300(01) $_{11}$] 그룹에서 310.7 $\pm$ 13.0 nm/294.7 $\pm$ 9.5 nm, [75(0110) $_{21}$] 그룹에서 69.3 $\pm$ 3.0 nm/149.7 $\pm$ 13.7 nm, [150(0110) $_{11}$] 그룹에서 154.2 $\pm$ 1.3 nm/302.1 $\pm$ 3.6 nm를 나타내었다. 이를 통해, 나노-주기성 및 서열이 합성되는 동안 펄스 전류 및도 및 지속 시간을 정확하게 조절하여 6개의 상이한 나노바코드에서 체계적으로 조절되었음을 알 수 있다.

[0110] 도 3은 본 발명에서 제조된 나노바코드의 모식도(a) 및 HAADF-STEM의 결과로부터 계산된 각각의 Fe/Au 나노바코드의 총 길이(b), 직경(c) 및 표면적(d)을 나타낸 그래프이다. 도 3 살펴보면, 대조적으로 각 나노바코드에서 Fe 대 Au 세그먼트의 총 길이는 6개의 상이한 나노바코드에서 각각 270.7 내지 306.2nm 대 279.9 내지 289.1nm의 범위로 유의한 차이가 없었다. 각각의 Fe/Au 나노바코드의 직경은 6개의 상이한 나노바코드에서 63.2 내지 66.9nm의 범위로 큰 차이가 없었다. 각각의 나노바코드에서 Fe 대 Au 세그먼트의 총 표면적을 6개의 상이한 나

노바코드에서 각각 57500 내지 61420nm² 및 56270 내지 60330nm²의 범위에서 유의한 차이가 없었다. 이를 통해, 6개의 주기적으로 Fe/Au 나노바코드가 총 Fe 및 Au 세그먼트의 치수를 조절하지 않고 조정가능한 리간드 나노-주기성 및 서열을 표시하도록 정확하게 제조되었음을 나타낸다. 이때, Au 및 Fe 세그먼트는 각각 괄호 안에 1 및 0으로 언급되었고, 각 Au 및 Fe 세그먼트의 길이(nm)는 30, 75, 150 및 300으로 지정되었다.

[0111] 도 4는 본 발명에 따른 나노바코드의 X선 회절 분석 그래프이다. 도 4를 살펴보면, 나노바코드에서 Fe 및 Au 세그먼트의 결정상을 X선 회절을 통해 분석하였고, 이는 Fe 및 Au 상에 해당하는 회절 피크가 6개의 상이한 나노바코드에서 유사하게 공존하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 6개의 주기적으로 시퀀싱된 Fe/Au 나노바코드가 유사한 특성을 나타내는 것을 알 수 있다.

[0112] 도 5는 본 발명에 따른 나노바코드의 진동 샘플 자력계 측정 결과 그래프이다. 구체적으로, Fe 세그먼트의 존재로 인한 나노바코드의 자기 특성을 분석하였고, 이는 6개의 상이한 나노바코드 모두 명백한 히스테리시스 없이 유사한 자기거동을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 자기 특성으로 인해 외부 자기장을 이용하여 본 발명의 나노바코드는 가역적 원격 제어에 이용할 수 있다.

[0114] 실험예 2

[0115] 본 발명에 따른 나노바코드를 포함하는 기관의 특성을 확인하기 위해, 나노바코드 포함 기관을 대상으로 전계방출 주사전자 현미경으로 촬영하였고, 푸리에 변환 적외선 분광분석(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)을 수행하였으며, 그 결과는 도 2b 및 도 7에 나타내었다.

[0116] 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR)은 나노바코드의 화학적 결합 특성을 확인하기 위해, FTIR은 GX1(Perkin Elmer Spectrum, USA)을 사용하여 수행되었다. 화학적 결합 특성의 변화에 대한 분석을 거친 샘플을 분석 전에 동결 건조시키고 KBr 펠렛으로 조심하게 패킹하였다.

[0117] 도 6은 본 발명에 따른 나노바코드를 포함하는 기관을 제조하는 단계를 도식화한 이미지이다. 도 6을 살펴보면, 6개의 주기적으로 시퀀싱된 나노바코드는 기관에 그래프팅 되기 전에 화학적으로 기능화되었다. 아미노카프론산의 아민기는 표면에 카르복실레이트기를 표시하기 위해 나노바코드의 Fe 세그먼트의 천연산화물 층에 커플링되었다. 상기 아미노카프론산이 코팅된 나노바코드에서 카르복실레이트기를 활성화시키고 아민화된 기관에 이식하여 나노바코드 농도 및 반응 시간을 정확하게 최적화하여 기관에 결합된 나노바코드 및 리간드의 밀도를 조절하지 않고 리간드 서열의 다양한 나노-주기성을 확인하였다. 이어서, 티올화된 RGD 리간드를 나노바코드 결합된 기관에서 Au 세그먼트에 그래프팅 되었다. 전체 Fe 및 Au 세그먼트의 치수뿐만 아니라 기관-결합 리간드 제시 나노바코드의 밀도는 유사하게 유지되어 기관에 대한 리간드 밀도의 효과는 분리시킨다.

[0118] 도 2b를 살펴보면, 기관에 결합된 리간드 제시 나노바코드는 전계방출 주사전자 현미경을 사용하여 확인하였으며, 이는 단층에서 균일한 분포를 나타냈다. 이의 밀도는 μm^2 당 0.026-0.029 범위이며, 모든 기관 결합 리간드 제시 나노바코드에서 큰 차이 없이 유사하게 유지됨을 알 수 있다. 하기 실험을 통해 상기 밀도는 세포 부착 및 줄기세포의 분화를 효율적으로 조절할 수 있는 것으로 확인하였다.

[0119] 도 7은 본 발명에 따른 나노바코드의 푸리에 변환 적외선 분광(FT-IR) 분석한 결과이다. 도 7를 살펴보면, 아미노카프론산이 코팅된 나노바코드의 화학적 결합 특성을 알 수 있다. 구체적으로, 1560 - 1565 cm⁻¹ 및 1387 - 1389 cm⁻¹에서 COO⁻ 결합을 확인하였고, 3432 - 3448 cm⁻¹에서 NH 결합을 확인하였다. 이를 통해, 아미노카프론산이 6개의 상이한 나노바코드에 성공적으로 결합되었음을 알 수 있다.

[0121] 실험예 3

[0122] 본 발명에 따른 나노바코드의 나노-주기성 및 리간드 서열이 줄기세포의 부착에 미치는 영향을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과는 도 8 내지 도 11에 나타내었다.

[0123] 줄기세포의 초점 부착, 기계감지(mechanosensing) 및 분화에 대한 리간드 나노-주기성 및 배열 순서를 조절하는 것의 효과를 상기 나노바코드 제시 기관을 이용하여 평가하였다. 기관을 사용하기 전에 자외선 하에서 1시간 동안 멸균시켰다. 인간 중간엽 줄기세포(hMSC, Lonza로부터의 계대 5)을 약 9,500 cell/cm²의 밀도로 멸균된 기관

상에 플레이팅 하고, 5% CO₂ 하에 37℃에서 배양하였다. 본 발명의 따른 [30(01)₁₀], [75(01)₄], [150(01)₂] 및 [300(01)₁] 리간드 서열의 나노바코드에서 나노-주기성만을 조절하면서 줄기세포의 초점 부착성 및 기계감지를 평가하였다. 또한, [75(01)₄], [75(0110)₂], [150(01)₂], 및 [150(0110)₁] 리간드 서열의 나노바코드를 이용하여 나노-주기성 및 리간드 배열 순서를 모두 조정한 상태에서 줄기세포의 초점 부착성 및 기계감지를 평가하였다. 더불어, 스캐램블 리간드(scrambled ligand, RAD)에서 조정가능한 나노 주기성을 갖는 기판을 사용하여 줄기세포의 초점 부착을 조절함에 RGD 리간드 서열에서의 나노 주기성이 미치는 영향에 대해 평가하였다.

[0124] 줄기세포의 기계적 형질전환-매개 분화는 ROCK (50 μM Y27632), 미오신 II(10 μM 블레비스타틴), 또는 액틴 중합(2 μg/mL 사이토칼라신 D) 억제제를 갖는 [75(01)₄], [75(0110)₂], 및 [300(01)₁]의 그룹을 사용하여 나노-주기성의 조절에 대해 평가하였다. 부착 줄기 세포의 분화는 골 형성 유도 배지 배양 후 높은 나노 주기성 및 리간드 서열을 모두 조절하는 조건에서 평가하였다.

[0125] 도 8은 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 배양된 줄기세포(48시간 후)의 F-액틴, 핵, 빈쿨린 및 YAP에 대한 공초점 면역 형광 이미지이고, 스케일 바는 20μm를 나타낸다. (a)는 나노-주기성 조절한 경우이고, (b)는 나노-주기성 및 리간드 배열 순서를 조절한 경우의 결과이다.

[0126] 도 9는 도 8a의 공초점 면역 형광 이미지 데이터로부터 줄기세포 배양 48시간 후에 부착세포 밀도, 세포 면적, 초점 부착 수, 종횡비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 비율을 정량적으로 계산한 그래프이다.

[0127] 도 8a 및 도 9를 살펴보면, 공초점 면역 형광 이미지는 리간드 서열에서 나노-주기성이 증가할수록(30에서 300으로)더 강한 부착성 및 줄기 세포의 확산을 촉진한 것을 알 수 있다. 이는 세포 밀도, 확산 면적, 초점 부착수 및 빈쿨린 발현에 의해 확인되었다. 이를 통해, 본 발명에 따른 나노바코드의 높은 리간드 나노-주기성을 가지는 그룹은 초점 부착을 촉진시켜 줄기세포에서 YAP 기계적 형질변환의 핵 전위를 자극한 것을 알 수 있다.

[0128] 도 10은 도 8b의 공초점 면역 형광 이미지 데이터로부터 줄기세포 배양 48시간 후에 부착세포 밀도, 세포 면적, 초점 부착 수, 종횡비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 비율을 정량적으로 계산한 그래프이다.

[0129] 도 11는 본 발명의 비교예의 스캐램블된 RAD 리간드를 이용하여 배양된 줄기세포(48시간 후)의 F-액틴, 핵, 빈쿨린 및 YAP에 대한 나노-주기성 조절한 경우의 공초점 면역 형광 이미지(a)이고, 스케일 바는 50μm를 나타낸다. (b)는 상기 공초점 면역 형광 이미지 데이터로부터 줄기세포 배양 48시간 후에 부착세포 밀도, 세포 면적, 초점 부착 수, 종횡비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 비율을 정량적으로 계산한 그래프이다. 도 11을 살펴보면, 스캐램블된 RAD 리간드 서열에서 나노-주기성을 조절하는 것은 줄기세포 부착에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0130] 도 8b 및 도 11을 살펴보면, 나노-주기성 및 리간드 서열 순서 모두 조절한 4개의 상이한 나노바코드 그룹을 준비하였다:[75(01)₄], [75(0110)₂], [150(01)₂], 및 [150(0110)₁]. 높은 나노-주기성을 갖는 나노바코드는 줄기세포의 초점 부착 및 기계감지 능력을 촉진시켰다: [150(0110)₁] 대 [75(0110)₂]와 [150(01)₂] 대 [75(01)₄]. 이로 인해 높은 리간드 나노-주기성을 갖는 나노바코드는 리간드 밀도를 조절하지 않고 더 근접한 리간드 제시로 향상된 세포 부착성을 나타내는 것을 확인하였다. 구체적으로, 동일한 나노-주기성을 갖는 나노바코드에서 리간드 서열만을 변화시킴으로써, 리간드가 나노바코드의 말단 서열에만 이용가능한 [150(01)₂]은 리간드가 나노바코드의 내부 서열에만 이용가능한 [75(0110)₂]와 비교하여 줄기세포의 초점 부착 및 기계감지를 자극하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 서로 다른 리간드 배열 순서를 갖는 나노바코드 리간드 간격의 조절을 통해 세포의 부착성 조절이 가능함을 알 수 있다.

[0131] 따라서, 나노바코드의 서열 리간드의 위치와 리간드의 간격을 조절하여 줄기세포의 부착성을 조절할 수 있다.

[0133] 실험예 4

[0134] 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 리간드 서열의 나노-주기성 조절이 줄기세포의 표현형 분극 매개 부착을 제어하는지에 대한 실험을 다음과 같이 수행하였으며, 그 결과는 도 12 내지 18에 나타내었다.

[0135] 줄기세포의 초점 부착 및 기계감지는 이들의 골 형성 분화를 조절하는 것으로, 리간드 서열에서 나노-주기성을 갖는 그룹들을 대상으로 평가하였다: [75(01)₄], [75(0110)₂], 및 [300(01)₁].

- [0136] 도 12은 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 리간드 서열에서 나노-주기성의 조절에 의해 시험관 내 및 생체 내 줄기세포의 기계적 형질도입에 대한 실험 결과를 나타낸 것이다. 도 12(a)는 ROCK 억제(Y27632) 및 ALP 염색을 갖는 RUNX2, F-액틴, 핵 및 YAP의 공초점 면역 형광 이미지로, 스케일 바는 50 μ m이다. 생체 내에서 리간드 나노-주기성을 갖는 나노바코드를 포함하는 기관이 피하에 이식된 후 hMSC가 주입된 것을 도식화한 이미지(b)이고, 상기 hMSC가 주입된 경우의 빈쿨린, F-액틴, 핵 및 YAP의 공초점 면역 형광 이미지로, 스케일 바는 20 μ m이다.
- [0137] 도 13은 도 12a의 공초점 면역 형광 이미지를 토대로 나노-주기성을 갖는 나노바코드를 포함하는 기관 상에 줄기세포를 7일 동안 배양한 후 핵/세포질 RUNX2 형광 비 및 알칼리성 포스파타제-양성 세포를 정량적으로 분석한 그래프이다.
- [0138] 도 14는 도 12a의 공초점 면역 형광 이미지를 토대로 나노-주기성을 갖는 나노바코드를 포함하는 기관 상에 줄기세포를 7일 동안 배양한 후 핵/세포질 RUNX2 및 ALP 유전자 발현 프로파일을 정량적으로 분석한 그래프이다.
- [0139] 도 12a, 도 13 및 도 14를 살펴보면, 리간드 서열의 높은 나노-주기성은 시험관 내 및 생체 내의 줄기세포의 기계적 형질도입을 용이하게 하여 이들의 분화를 조절하는 것을 알 수 있다.
- [0140] 도 15 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 리간드 서열에서 나노-주기성 및 리간드 서열 순서의 조절에 의해 시험관 내 줄기세포의 기계적 형질도입에 대한 실험 결과를 나타낸 것이다. (a)는 ROCK 억제(Y27632) 및 RUNX2, F-액틴, 핵 및 YAP의 공초점 면역 형광 이미지와 ALP 염색 이미지로, 스케일 바는 50 μ m이다. (b)는 상에 줄기세포를 7일 동안 배양한 후 핵/세포질 RUNX2 형광 비 및 알칼리성 포스파타제-양성 세포를 정량적으로 분석한 그래프이다. 도 15를 살펴보면, 줄기 세포 분화는 리간드 서열에서 높은 나노-주기성에 의해 촉진되는 것을 알 수 있다: [30(01)₁₀], [150(0110)₁] 및 [150(01)₂].
- [0141] 도 16은 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 줄기세포 배양 48시간 후에 인테그린 β 1, FAK, p-FAK, RhoA, F-액틴 및 핵에 대한 공초점 면역 형광 이미지이다. 도 16을 살펴보면, 높은 나노-주기성을 갖는 나노바코드를 포함하는 경우, 인테그린 β 1을 활성화시켰으며, 이는 초점 부착 키나제(FAK)와 RhoA 및 TAZ 기계적 형질도입을 활성화시키는 인산화(p-FAK)를 통해 세포 내 기계감지 신호를 연속적으로 자극하였다.
- [0142] 도 17은 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 액틴 중합 억제제(사이토칼라신 D)를 갖는 줄기세포를 48시간 배양 후에 TAZ, 빈쿨린, F-액틴 및 핵에 대한 공초점 면역 형광 이미지(a)이고, 스케일바는 50 μ m이다. (b)는 상기 공초점 면역 형광 이미지로부터 계산된 핵/세포질 TAZ 형광 비율을 계산한 그래프이다.
- [0143] 도 18 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 액틴 중합 억제제(사이토칼라신 D) 및 미오신 II 억제제(블레비스타틴)을 갖는 줄기세포 배양 48시간 후에 YAP, F-액틴 및 핵에 대한 공초점 면역 형광 이미지(a)이고, 스케일바는 50 μ m이다. (b)는 상기 공초점 면역 형광 이미지로부터 계산된 Y27632, 사이토칼라신 D 및 블레비스타틴의 억제제에 의한 핵/세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다.
- [0144] 도 17 및 도 18을 살펴보면, 가장 높은 나노-주기성을 갖는 [300(01)₁] 나노바코드는 사이토칼라신 D에 의한 액틴 중합, rho-관련 단백질 키나제(ROCK), 및 미오신 II의 억제제 빈쿨린 발현 및 YAP의 핵 전위가 현저하게 감소되었다. 이를 통해, 나노바코드의 나노-주기성이 높은 경우 줄기세포의 기계적 형질도입-매개 분화를 유도하여 초점 부착 어셈블리를 용이하게 하는 것을 알 수 있다.
- [0146] **실험예 5**
- [0147] 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 생체 내 줄기세포의 부착 및 기계적 형질도입을 조절한다는 것을 확인하기 위해 실험을 수행하였으며, 그 결과는 도 19 내지 도 20에 나타내었다.
- [0148] 도 12b와 같이 hMSC가 주입된 누드 마우스의 피하에 나노바코드를 포함하는 기관을 이식하여 실험을 진행하였다.
- [0149] 도 19은 본 발명에 따른 나노바코드를 이용한 생체 내 숙주 줄기세포 부착 조절에 대한 실험 결과이다:(a)는 피하 이식된 기관 상에 hMSC가 주입된지 6시간 후 서로 다른 나노-주기성을 갖는 나노바코드를 포함한 경우의 인간 특이적 핵 항원(HuNu), F-액틴 및 핵에 대한 공초점 면역 형광 이미지이며, 스케일바는 20 μ m를 나타낸다. (b)는 상기 공초점 면역 형광 이미지로부터 부착성 세포의 밀도를 계산한 그래프이다. 도 19를 살펴보면, 인간

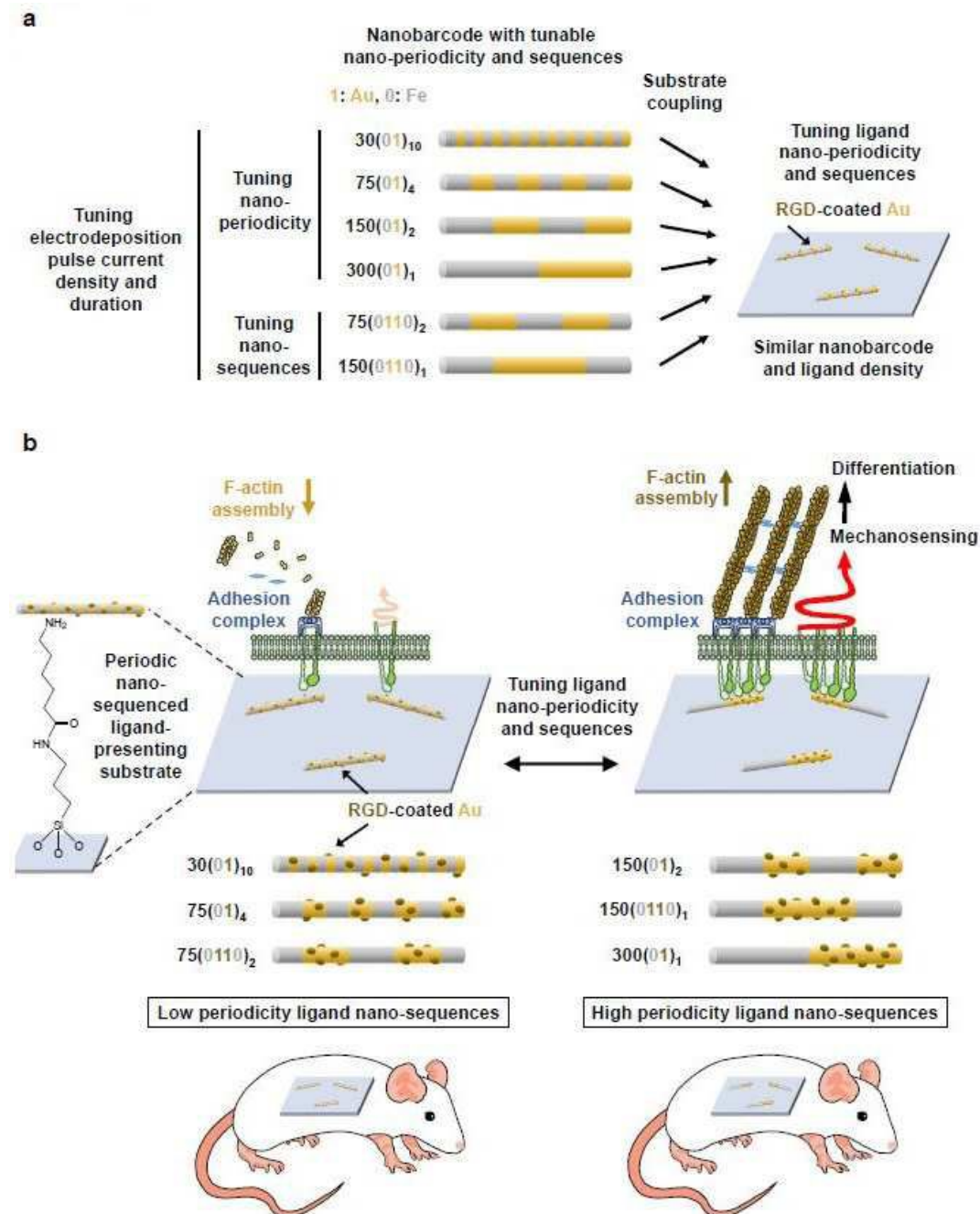
특이적 핵 항원(HuNu)에 대한 면역 형광은 $[75(01)_4]$, $[75(0110)_2]$, 및 $[300(01)_1]$ 의 나노바코드를 포함하는 경우에서 HuNu 및 dapi-염색된 핵의 공동 국소화에 의해 Hmsc가 생체 내에서 기관에 부착됨을 확인하였다. hMSC는 리간드 서열에서 나노-주기성이 증가할수록 상당히 더 높은 부착성 세포 밀도로 부착되었다. 또한, 이식 후 연장된 시간에 걸쳐 리간드 서열에서 나노-주기성이 증가함에 따라 숙주 면역 세포를 모집하여 더 높은 부착성 세포 밀도로 기관에 부착시켰다.

[0150] 도 20은 본 발명에 따른 나노바코드를 이용하여 생체 내 숙주 줄기세포의 초점 부착 매개 기계적 형질도입에 대한 실험 결과로, 도 12c에 나타난 공초점 면역 형광 이미지로부터 피하 이식된 기관 상에 Hmsc가 주사된 6시간 후의 세포 확산 면적, 초점 부착수, 종횡비(주축/부축 비율) 및 핵/세포질 YAP 형광 비율을 계산한 그래프이다.

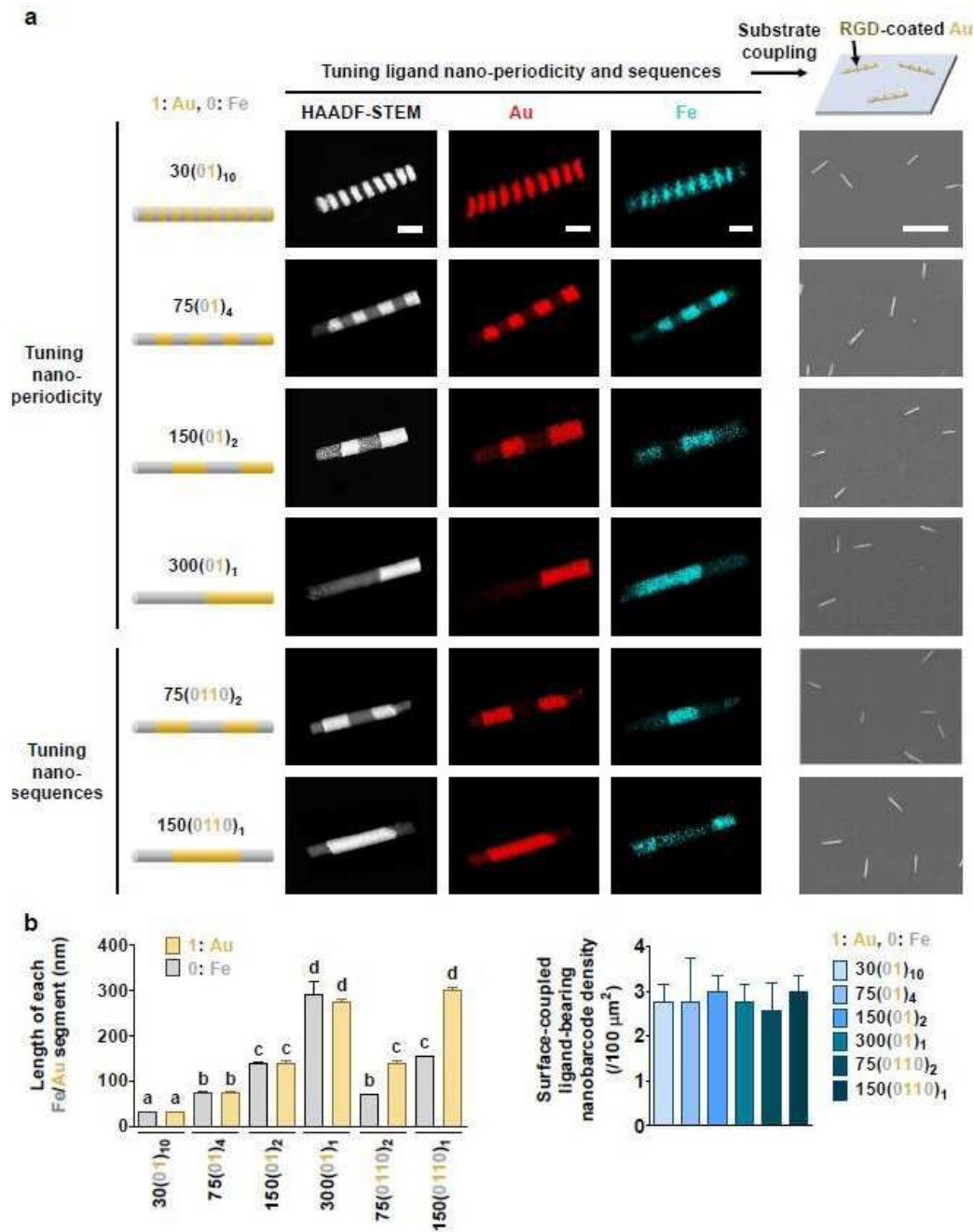
[0151] 도 12c 및 도 20를 살펴보면, 면역 형광 이미지는 생체 내에서 리간드 서열에서 높은 나노-주기성을 갖는 경우 줄기세포의 초점 부착, 확산 및 기계적 형질 도입을 용이하게 하는 것을 알 수 있다. 이는 상당히 높은 부착성 세포 확산 면적, 초점 부착 수, FA 복합체에서의 빈쿨린 발현 및 YAP 기계적 형질도입의 핵 전위를 통해 알 수 있다. 이를 통해, 리간드 서열에서 나노-주기성 조절을 통해 생체 외 및 생체 내 조건에서의 줄기세포의 초점 부착과 기계감지를 효과적으로 제어할 수 있음을 알 수 있다.

도면

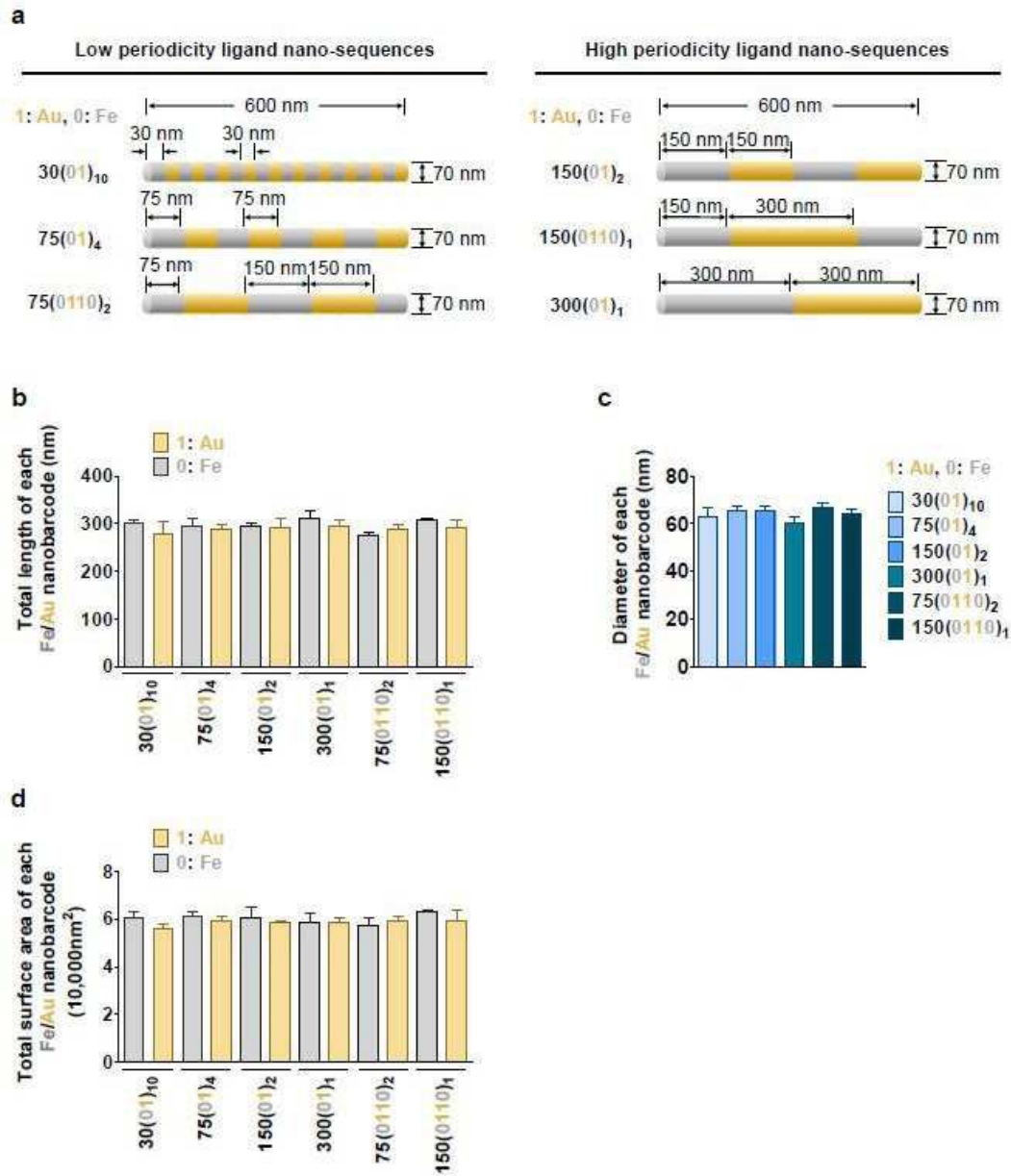
도면1



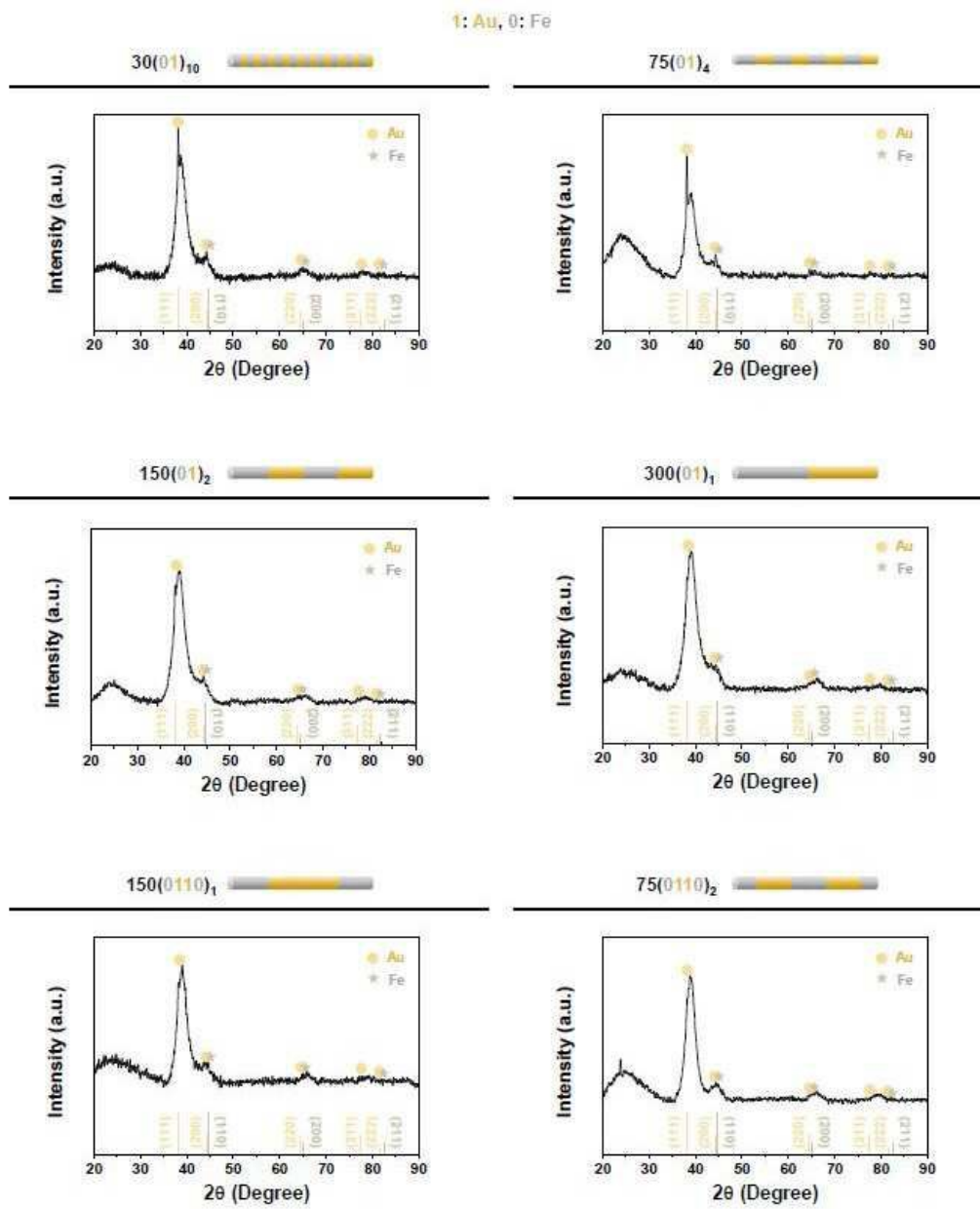
도면2



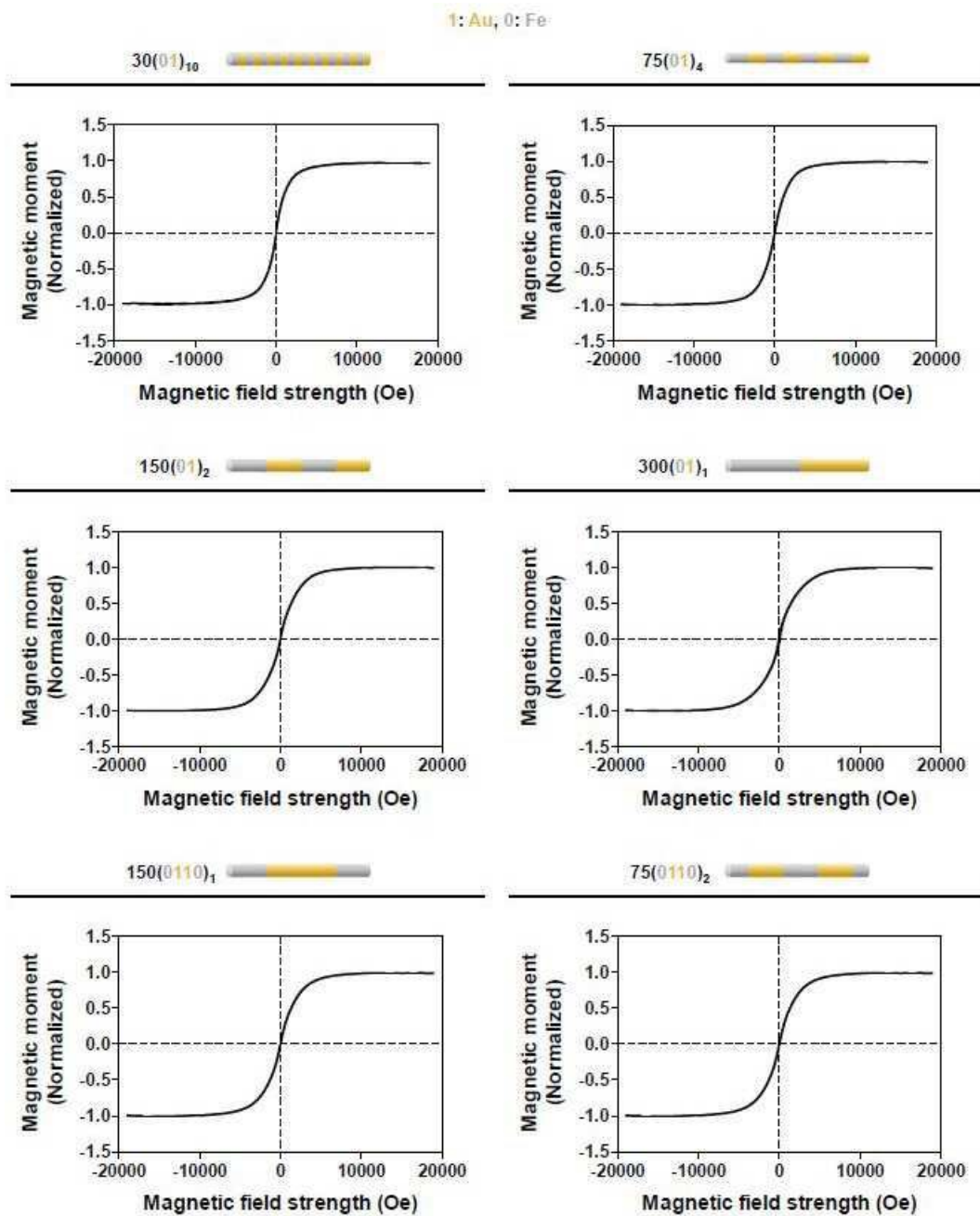
도면3



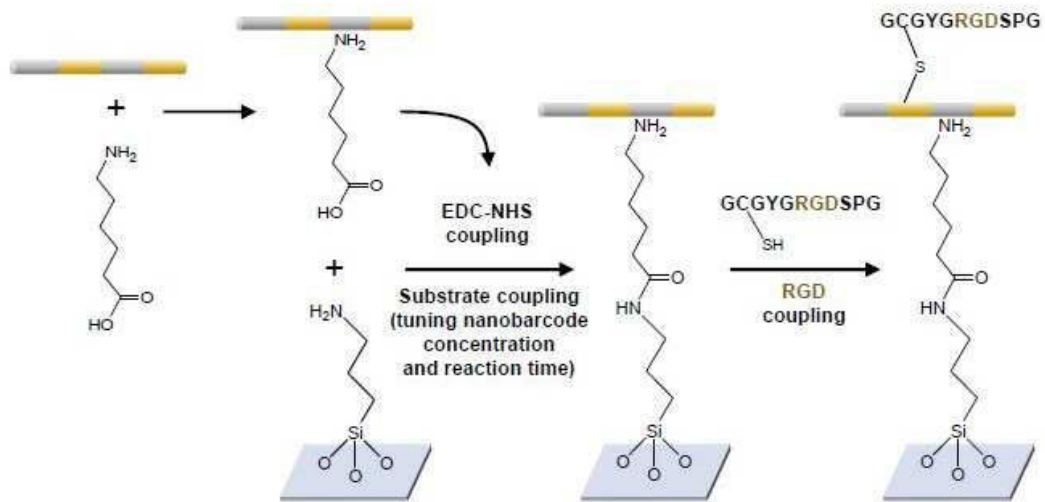
도면4



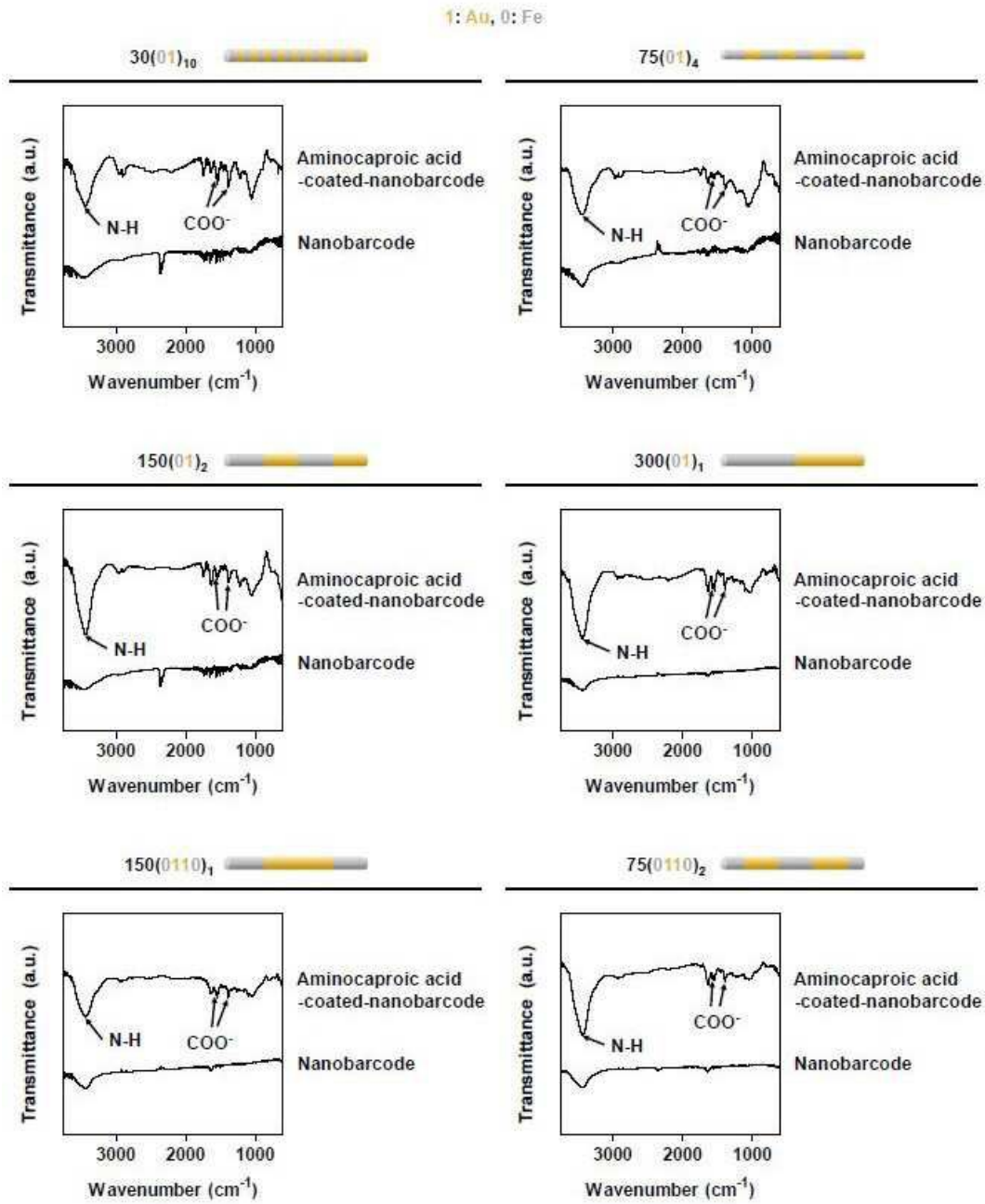
도면5



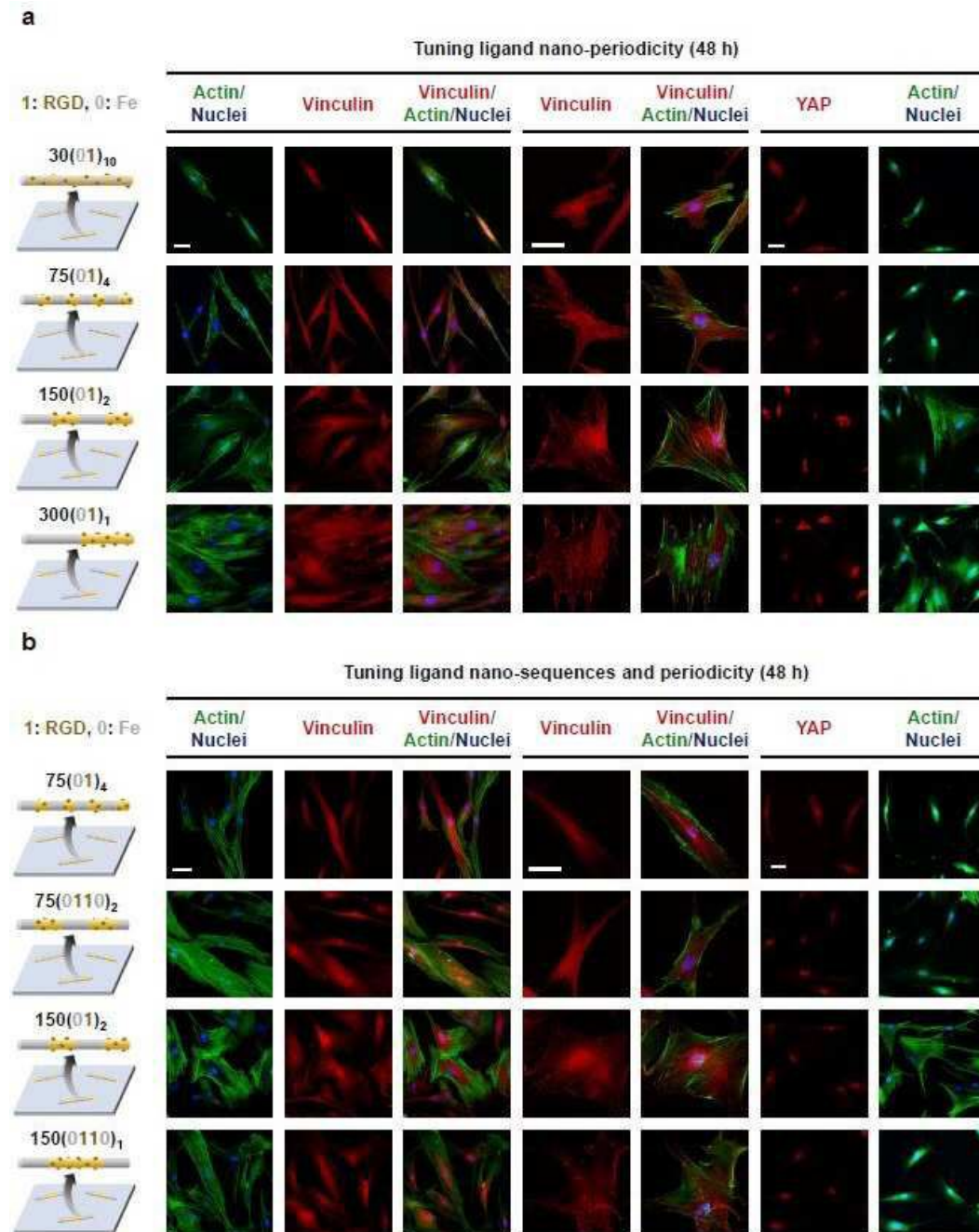
도면6



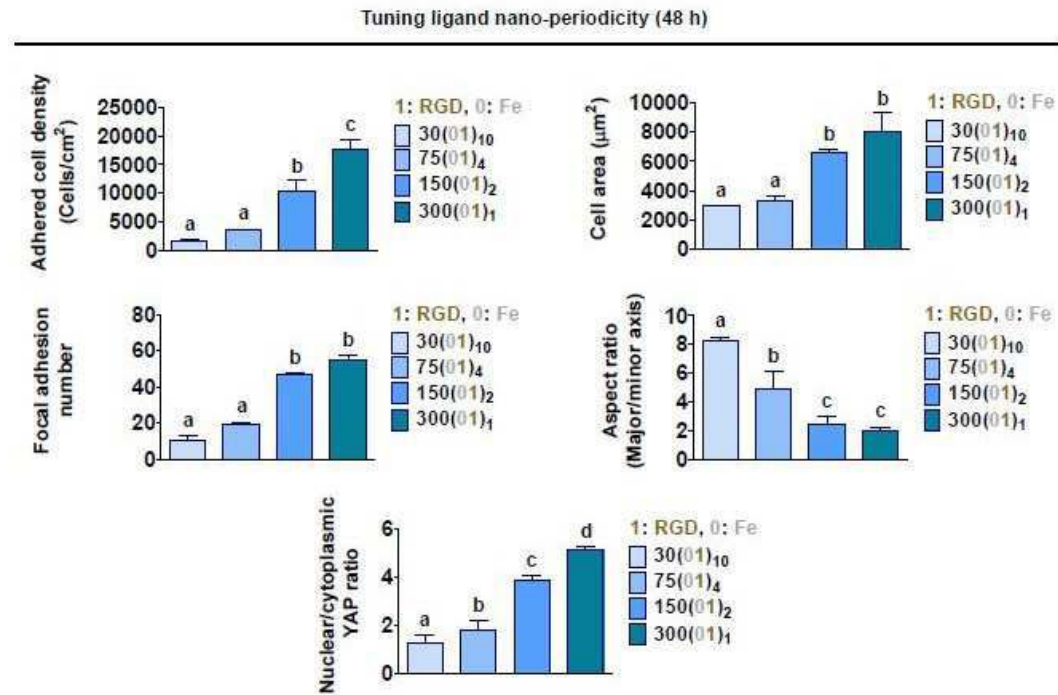
도면7



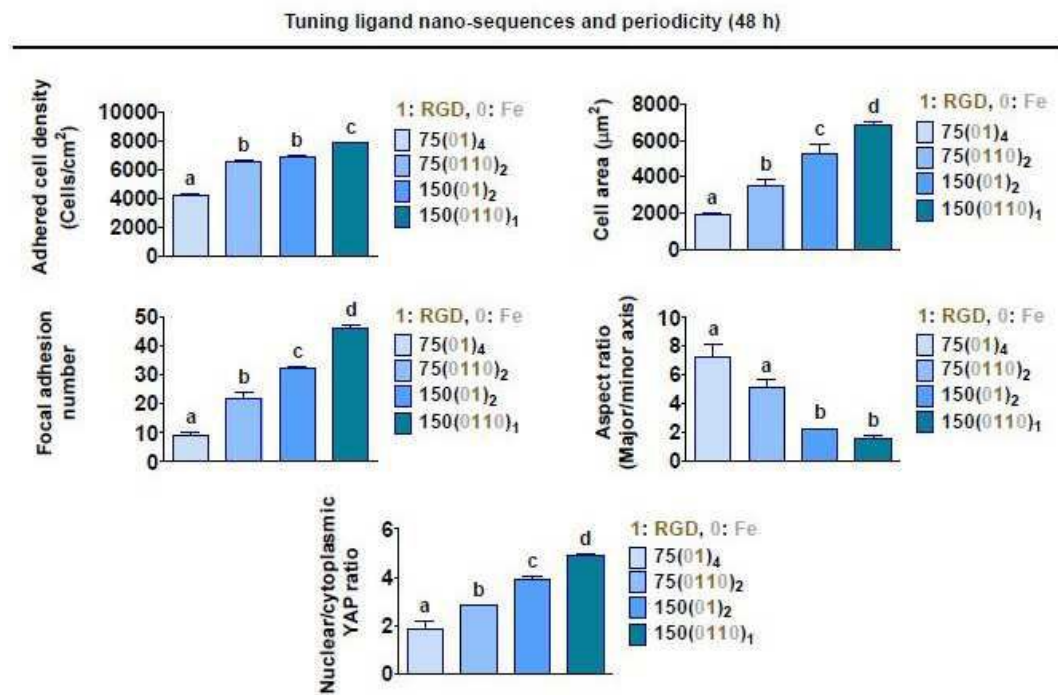
도면8



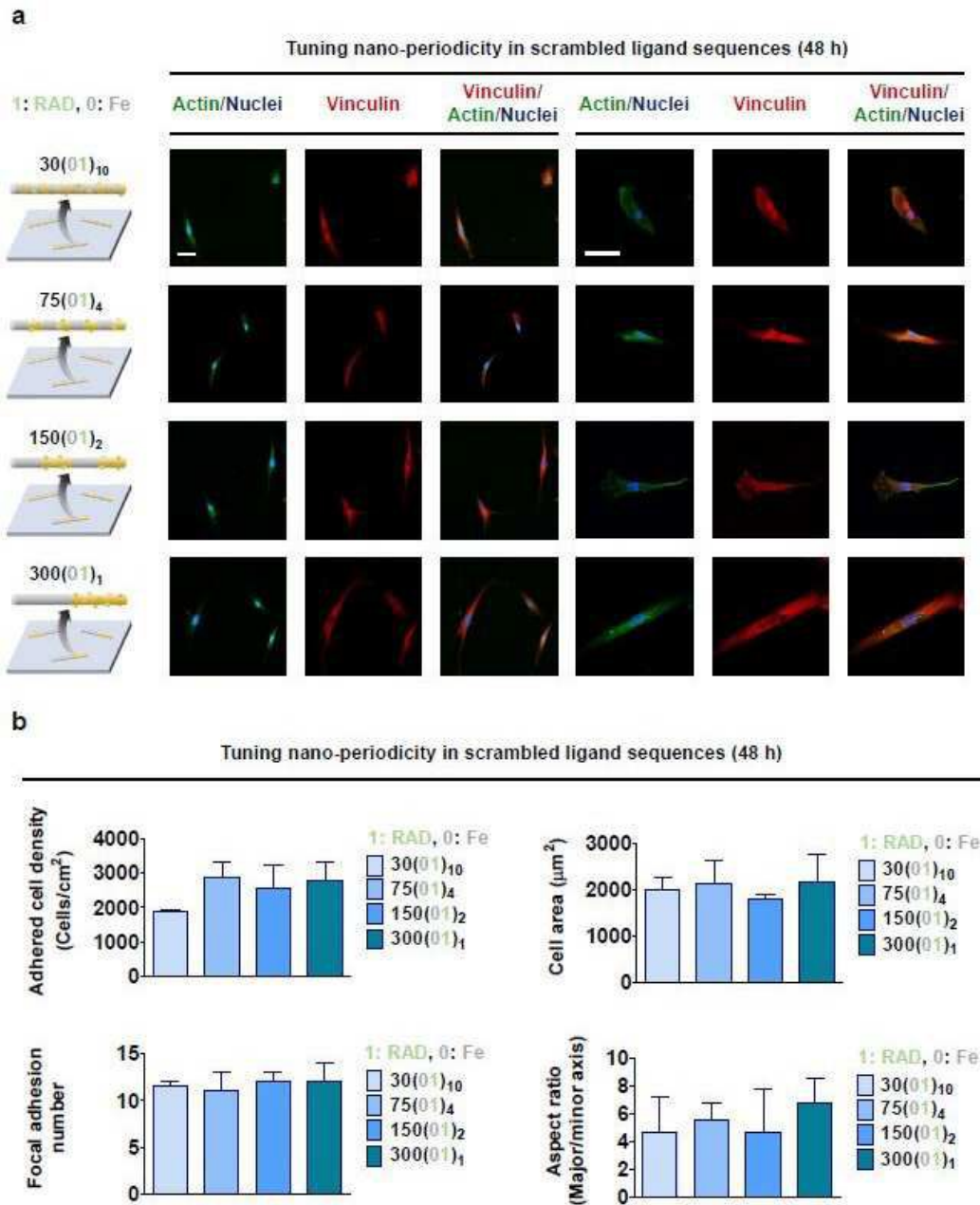
도면9



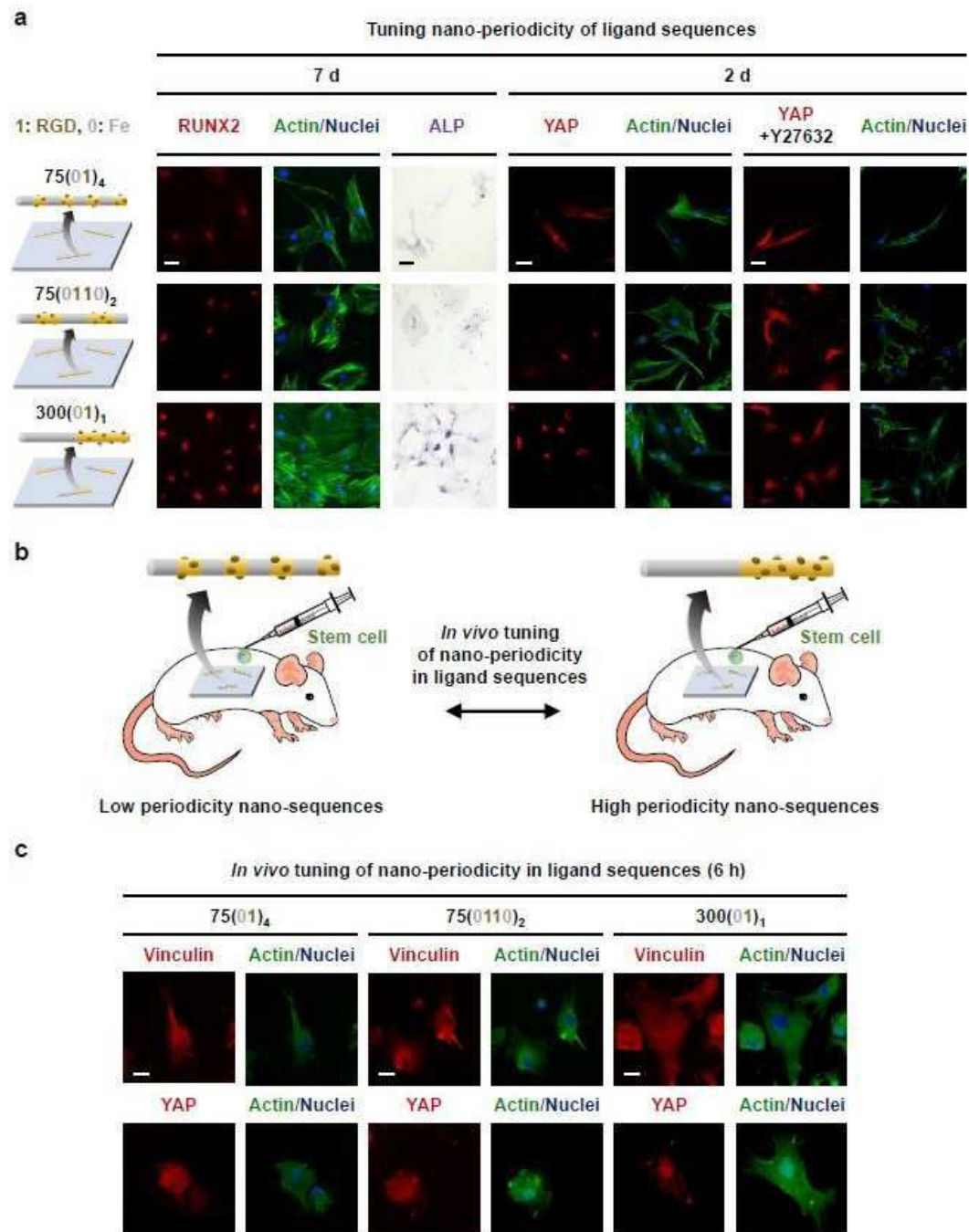
도면10



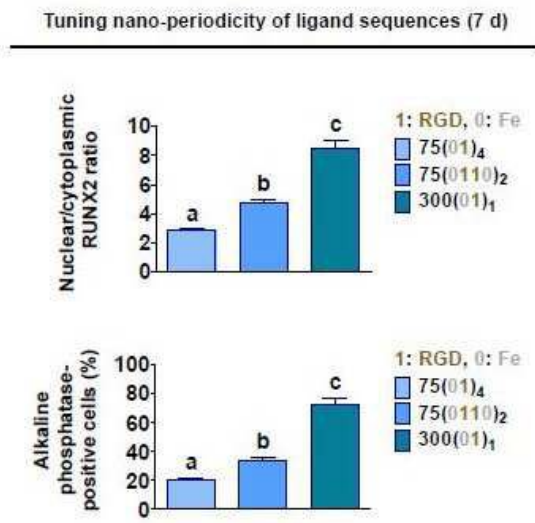
도면11



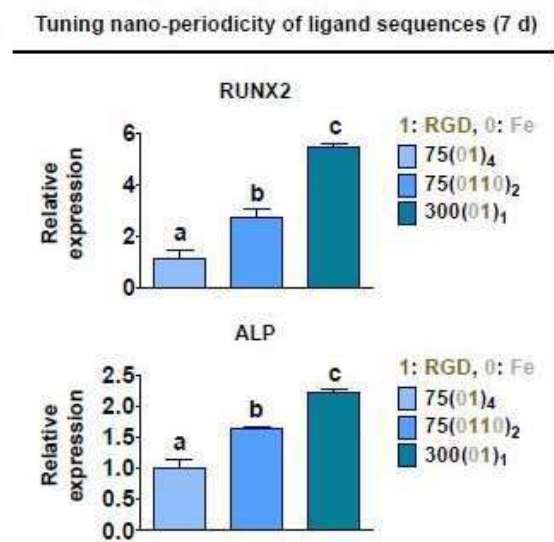
도면12



도면13

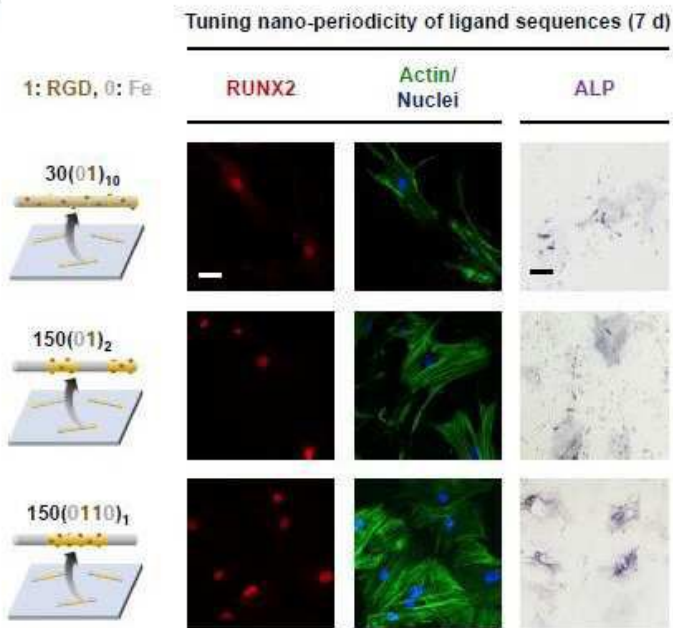


도면14

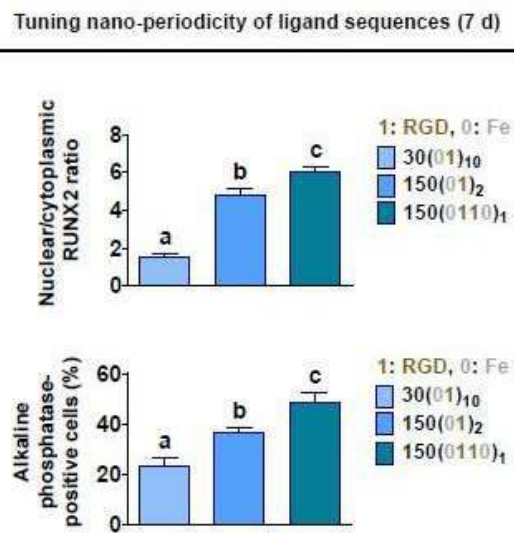


도면15

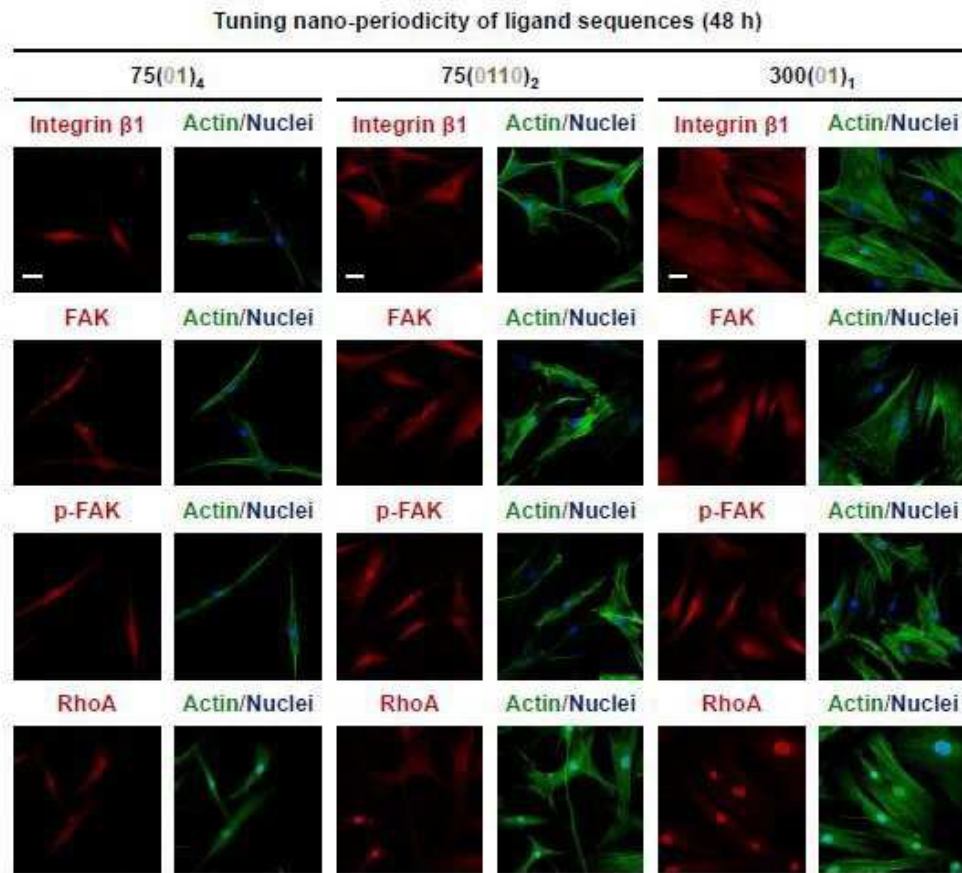
a



b

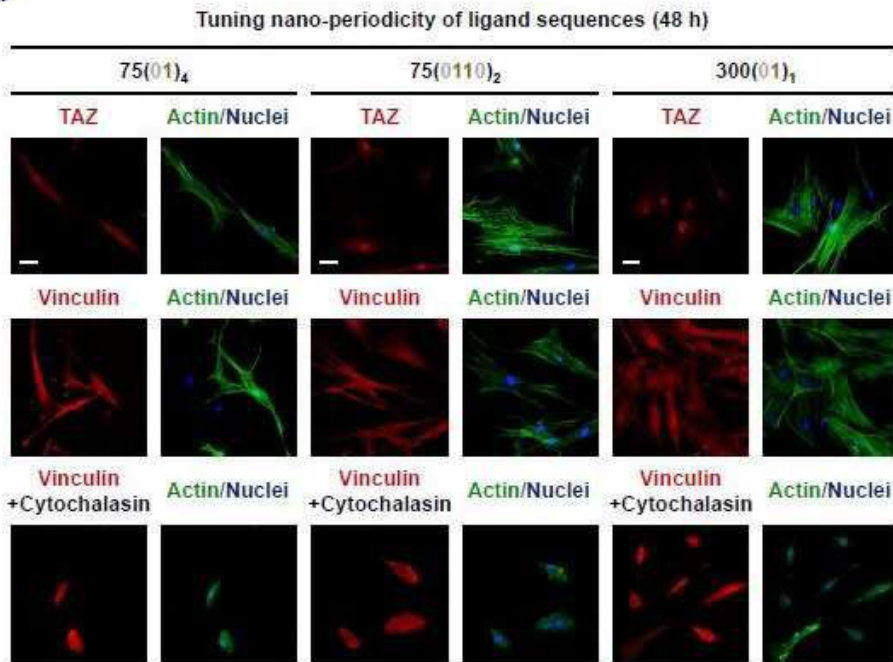


도면16

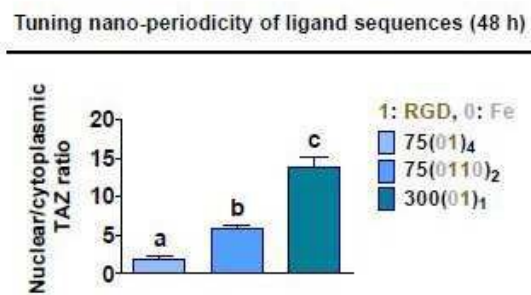


도면17

a

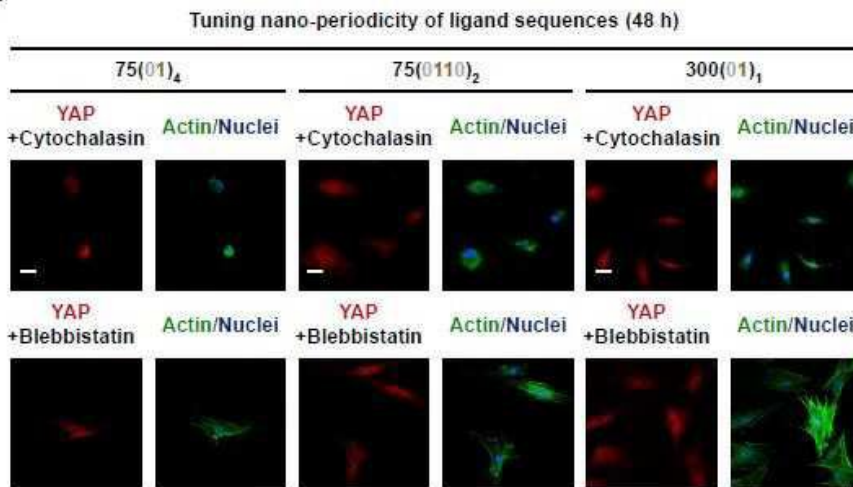


b

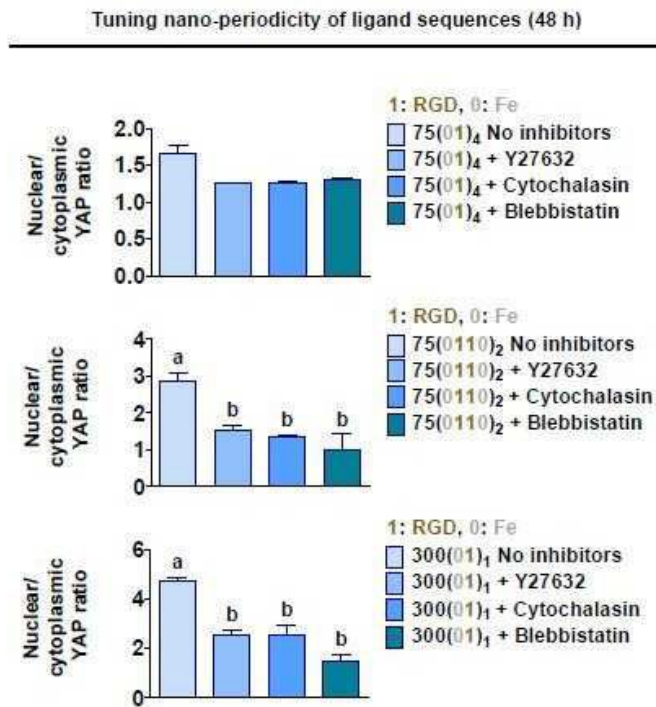


도면18

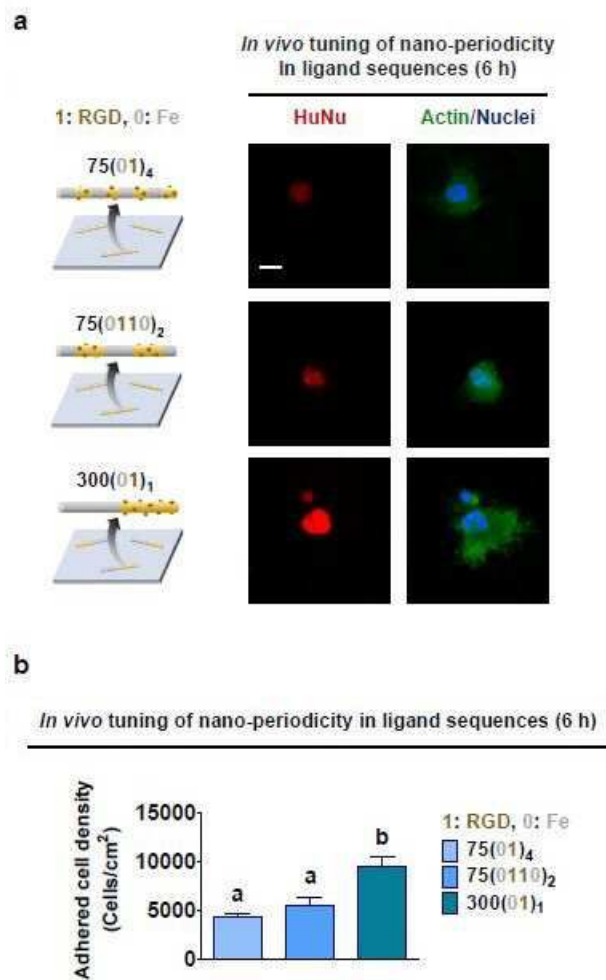
a



b



도면19



도면20

