



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월10일
 (11) 등록번호 10-1629547
 (24) 등록일자 2016년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61L 27/52 (2006.01) A61L 27/24 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0025712
 (22) 출원일자 2014년03월04일
 심사청구일자 2014년03월04일
 (65) 공개번호 10-2015-0103970
 (43) 공개일자 2015년09월14일
 (56) 선행기술조사문헌
 EGLIN, D. et al., JOURNAL OF MATERIALS
 SCIENCE: MATERIALS IN MEDICIN (2006) Vol.17,
 pp.161-167*
 EL-AHMED, A. et al., NANOSCALE (2012) Vol.4,
 pp.7475-7488*
 KR100791512 B1
 KR1020120017225 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
 충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)
 (72) 발명자
김해원
 충남 천안시 서북구 광장로 260, 106동 101호 (불당동, 불당한화꿈에그린아파트)
엘피키, 아메드
 충남 천안시 동남구 단대로 119, 제3과학관 116-1호 (안서동, 단국대학교천안캠퍼스)
 (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 8 항

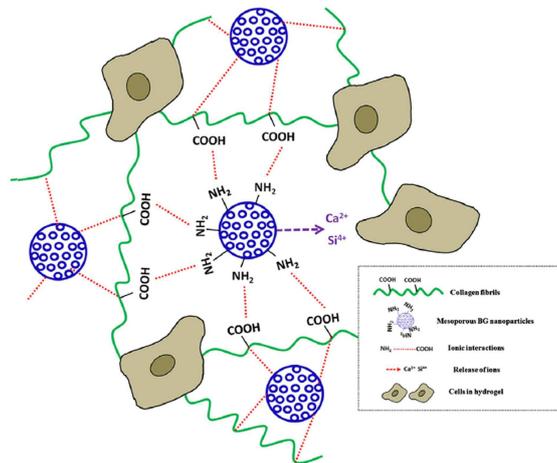
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 **콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 나노유리를 포함하는 하이드로겔**

(57) 요약

본 발명은 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하는 하이드로겔에 관한 것으로, 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하여 콜라겐 분자 간의 결합력을 높여 생체 내 분해속도를 늦추고 기계적 강도를 향상시킬 수 있으며, 이를 통하여 콜라겐의 생체 내 분해 및 수축을 지연시킬 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093829

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 조직재생공학을 위한 소재-세포-인자 융합연구

기 여 율 1/1

주관기관 단국대학교

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하고, 가수분해 및 효소분해에 대한 강화된 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표면-아민화된 생활성 유리는 다공성인 것을 특징으로 하는, 하이드로겔.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표면-아민화된 생활성 유리는 하기의 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔:

- 1) CTAB 용액에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 및 TEOS를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- 2) 상기 혼합물을 교반하고 초음파 처리하여 침전물을 제조하는 단계;
- 3) 상기 침전물을 회수하여 건조하는 생활성 유리를 제조하는 단계;
- 4) 상기 생활성 유리를 APTES 용액에 첨가하고 교반하여 표면-아민화된 생활성 유리를 제조하는 단계; 및
- 5) 상기 표면-아민화된 생활성 유리를 회수하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 APTES 용액은 APTES를 0.5 내지 10 부피%로 포함하는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리의 중량비는 2:1 내지 1:2인 것을 특징으로 하는, 하이드로겔.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 하이드로겔을 포함하는, 조직 재생용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 하이드로겔을 포함하는, 세포 배양용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인 것을 특징으로 하는, 세포 배양용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 나노유리를 포함하는 하이드로겔 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콜라겐은 생체 조직 내에서 가장 흔한 단백질이며, 많은 생체의료용 물질로 각광받고 있으며, 일반적으로, 섬유, 막, 코팅 및 하이드로겔 등의 형태로 사용된다. 특히, 하이드로겔 형태는 조직 세포의 배양 및 조직 공학의 관점에서 많은 관심을 받고 있다.

[0003] 콜라겐 하이드로겔은 세포의 보관 및 배양에 대한 우수한 세포의 기질 조건을 제공할 수 있다. 다양한 세포에 대하여 콜라겐 하이드로겔에서 실험되었고, 대부분 콜라겐 하이드로겔 내에서 잘 성장되는 것이 관찰되었다((a) Noth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. J Biomed Mater Res Part A 2007;83A:626-35, (b) Mason BN, Starchenko A, Williams RM, Bonassar LJ, Reinhart-King CA. Tuning three-dimensional collagen matrix stiffness independently of collagen concentration modulates endothelial cell behavior. Acta Biomater 2013;9: 4635-44, (c) O'Conner SM, Stenger D, Shaffer K, MaW. Survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in three dimensional agarose and collagen gel matrices. Neurosci Lett 2001;2001:189-93, (d) Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. Biotechnol Bioeng 2006;93:1152-63).

[0004] 콜라겐 하이드로겔이 세포 및 조직에 적합한 이상적인 3차원 공간을 제공할 수 있음에도 불구하고, 여러 가지 제한이 있다. 그 중에 하나가 높은 생분해율이다. 콜라겐 하이드로겔은 가수 분해 또는 효소 분해로 인하여 급격히 분해되며, 그 적용에 한계가 있다((a) Sionkowska A, Kozłowska J. Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites. Int J Biol Macromol 2013;52:250-9, (b) Brinkman WT, Nagapudi K, Thomas BS, Chaikof EL. Photo-cross-linking of type I collagen gels in the presence of smooth muscle cells: mechanical properties, cell viability, and function. Biomacromolecules 2003;4:890-5, (c) Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. Int J Pharm 2001;221:1-22). 이는 주로 하이드로겔 매트릭스 내의 약한 가교 결합에 기인한다((a) Potorac S, Popa M, Maier V, Lisa G, Verestiuc L. New hydrogels based on maleilated collagen with potential applications in tissue engineering. Mater Sci Eng C 2012;32:236-43, (b) Kanth SV, Ramaraj A, Rao JR, Nair BU. Stabilization of type I collagen using dialdehyde cellulose. Process Biochem 2009;44:869-74, (c) Sheu MT, Huang JC, Yeh GC, Ho HO. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. Biomaterials 2001;22:1713-9). 하이드로겔이 주로 세포를 포함하기 위한 3차원 구조의 매트릭스로 사용되는 것이므로, 독성을 가지는 가교 결합 방법을 적용할 수 없어 그 적용에 한계가 있다.

[0005] 또한, 콜라겐 하이드로겔은 세포를 배양하는 동안 현저히 수축하는 문제가 있으며, 이는 시간이 지남에 따라, 또한 세포의 수가 증가함에 따라 더욱 두드러진다((a) Galois L, Hutasse S, Cortial D, Rousseau CF, Gossin L, Ronziere MC, et al. Bovine chondrocyte behaviour in three-dimensional type I collagen gel in terms of gel contraction, proliferation and gene expression. Biomaterials 2006;27:79-90, (b) Desimone MF, Helary C, Mosser G, Giraud-Guille MM, Livage J, Coradin T. Fibroblast encapsulation in hybrid silica/collagen hydrogels. J Mater Chem 2010;20:666-8, (c) Velegol D, Lanni F. Cell traction forces on soft biomaterials. I. Microrheology of type I collagen gels. Biophys J 2001;81:1786-92). 나아가, 낮은 기계적 특성은 콜라겐 하이드로겔의 적용 분야를 제한하며, 특히 경조직 재생 분야에서의 적용을 제한한다.

[0006] 이에 본 발명자들은, 상기의 문제점을 해결하여 콜라겐 하이드로겔의 물리-화학적 특성을 개선하기 위하여 예의 노력한 결과, 다공성 생활성 유리를 콜라겐에 첨가할 경우, 기계적 특성이 향상되고 기존의 콜라겐 하이드로겔의 단점을 해소할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하는 하이드로겔을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하는 하이드로겔을 제공한다.

[0009] 본 발명에서 사용하는 용어 '하이드로겔'은, 물을 포함하여 콜라겐 분자 사이의 치밀한 네트워크 구조를 가지는 물질을 의미한다. 콜라겐은 인체의 조직 내에 가장 많은 단백질 중의 하나이며, 이의 내부 3차원적 구조로 인하여 세포 성장 공간을 제공하고 조직 간의 연결을 돕는 역할을 한다. 이를 이용한 조직 재생이나 세포 배양의 시도가 있어 왔으나, 콜라겐은 생체 내에서 빨리 분해고, 기계적 강도가 약하여 그 적용에 한계가 있다. 이에 본 발명에서는 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하여 콜라겐 분자 간의 결합력을 높여 생체 내 분해속도를 늦추고 기계적 강도를 향상시킬 수 있다.

[0010] 본 발명에서 사용하는 용어 '생활성 유리'란, 생체 조직 내에서 특정 생물학적 작용을 유도할 수 있는 유리 성분을 의미하는 것으로, 일반적으로 무기물로 구성되는 유리를 의미한다. 특히, 본 발명에서는 상기 생활성 유리의 표면을 아민기로 개질한 표면-아민화된 생활성 유리를 사용함으로써, 아민기를 통하여 콜라겐 분자 간의 결합력을 높일 수 있다. 콜라겐 분자에는 하이드록시기가 존재하여 생활성 유리의 표면의 아민기와 결합할 수 있으며, 이의 과정을 통하여 콜라겐 분자 간의 결합력을 높일 수 있다. 이의 원리를 도 1에 도식적으로 나타내었다.

[0011] 도 1에 나타난 바와 같이, 무기 생활성 유리가 포함됨에 따라 콜라겐 하이드로겔의 기계적 강도가 개선되며, 뼈의 구성 이온의 방출과 같이 뼈 형성을 도울 수 있다. 또한, 콜라겐 분자와의 화학 결합을 통하여 하이드로겔의 물리-화학적 안정성을 개선하고, 생활성 유리가 다공성인 경우 이의 내부에 치료 약물을 담지할 수 있다.

[0012] 상기 표면-아민화된 생활성 유리는 다공성인 것이 바람직하다. 다공성으로 인하여 세포 성장 공간 및 치료 약물의 담지 공간을 추가로 제공할 수 있을 뿐만 아니라 다공성이 아닌 것에 비하여 기계적 강도를 보다 향상시킬 수 있다.

[0013] 일례로, 상기 표면-아민화된 생활성 유리는 하기의 방법으로 제조될 수 있다:

- [0014] 1) 헥사데세틸 암모늄 브로마이드(hexadecetyltrimethyl ammonium bromide; CTAB) 용액에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 및 테트라에틸 오쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate; TEOS)를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- [0015] 2) 상기 혼합물을 교반하고 초음파 처리하여 침전물을 제조하는 단계;
- [0016] 3) 상기 침전물을 회수하여 건조하는 생활성 유리를 제조하는 단계;
- [0017] 4) 상기 생활성 유리를 3-아미노프로필 트리에톡시실란(3-aminopropyl triethoxysilane; APTES) 용액에 첨가하

고 교반하여 표면-아민화된 생활성 유리를 제조하는 단계; 및

[0018]

5) 상기 표면-아민화된 생활성 유리를 회수하는 단계.

[0019]

상기 단계 1은 생활성 유리의 구성이 되는 칼슘 전구체와 TEOS를 계면 활성제인 CTAB와 혼합하는 단계이다.

[0020]

상기 단계 2는 상기 단계 1의 혼합물을 교반하고 초음파 처리하여 반응을 일으켜 침전물을 형성하는 단계이다. 상기 침전물은 입자의 형태로 침전되는 생활성 유리 입자이다. 상기 초음파 처리는 상기 반응을 유도할 수 있는 범위에서 주파수와 초음파 처리 시간을 결정할 수 있다.

[0021]

상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조된 침전물을 회수하는 단계이다. 회수의 방식으로는 특별히 제한되지 않으나, 침전물을 회수한다는 점에서 원심분리가 바람직하다. 또한, 침전물을 회수한 다음에는 건조하는 단계를 추가하여 용액 등을 제거할 수 있다. 또한, 생활성 유리 이외의 다른 물질, 예컨대 용매 등을 제거하기 위하여 고온으로 가열하는 것이 바람직하다. 또한, 생활성 유리의 기계적 특성을 부여하기 위하여 고온으로 소결하는 것이 바람직하다.

[0022]

상기 단계 4는 생활성 유리의 표면에 아민기를 개질하는 단계로서, 3-아미노프로필 트리에톡시실란(3-aminopropyl triethoxysilane; APTES) 용액을 사용하여 생활성 유리의 표면에 아민기를 개질한다. 상기 APTES 용액의 농도를 조절하여 아민기 개질 정도를 조절할 수 있으며, APTES를 0.5 내지 10 부피%로 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 아민기가 잘 개질될 수 있도록, 교반 또는 환류하는 것이 바람직하다.

[0023]

상기 단계 5는 상기 표면-아민화된 생활성 유리를 회수하는 단계로서, 원심분리 방식으로 회수할 수 있다. 또한, 회수한 다음에 이를 세척 및 건조하는 것이 바람직하다.

[0024]

본 발명에 따른 하이드로겔에 있어서, 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리의 중량비는 2:1 내지 1:2인 것이 바람직하다.

[0025]

또한, 본 발명에 따른 하이드로겔은 향상된 콜라겐 결합력과 기계적 특성으로 인하여 종래 콜라겐 하이드로겔의 응용 분야에 적용할 수 있으며, 일례로 조직 재생용 조성물 또는 세포 배양용 조성물로 사용할 수 있다. 세포 배양용 조성물의 경우에는 배양하고자 하는 세포에 특별히 제한되지 않으며, 일례로 줄기 세포를 배양하는데 적합하다.

발명의 효과

[0026]

본 발명에 따른 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하는 하이드로겔은, 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하여 콜라겐 분자 간의 결합력을 높여 생체 내 분해속도를 늦추고 기계적 강도를 향상시킬 수 있다. 또한, 이를 통하여 콜라겐의 생체 내 분해 및 수축을 지연시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027]

도 1은, 본 발명의 원리를 도식적으로 나타낸 것이다.

도 2는, 본 발명의 일실시예에 따른 제타-포텐셜 변화를 나타낸 것이다.

도 3은, 본 발명의 일실시예에 따른 mBGN의 물리-화학적 특성을 나타낸 것이다.

도 4a는, 본 발명의 일실시예에 따른 나노복합체의 하이드로겔 형성을 나타내는 사진이고, 도 4b 및 4c는 콜라겐의 SEM 이미지를, 도 4d 내지 도 4f는 mBGn을 포함하는 콜라겐의 SEM 이미지를, 도 4g 내지 4i는 아민화된 mBGn을 포함하는 콜라겐의 이미지를 나타낸다.

도 5는, 본 발명의 일실시예에 따른 나노복합체의 겔화 시간을 나타낸 것이다.

도 6은, 본 발명의 일실시예에 따른 나노복합체의 겔화 시간에 대한 mBGn의 효과를 나타낸 것이다.

도 7은, 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로겔의 분해 결과를 나타낸다.

도 8은, 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로겔의 정적 압축 응력 커브를 나타낸다.

도 9는, 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로겔의 기계적 특성을 나타낸다.

도 10a는 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로겔의 크기를 다른 배양 기간에서 측정하여 나타낸 것이고, 도 10b는 본 발명의 일실시예에 따른 하이드로겔 내에서 배양된 MSCs를 이미지화하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0029] **사용물질**

[0030] 이하의 실시예에서 하기의 물질을 사용하였다.

[0031] 테트라에틸 오쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate; TEOS; $C_8H_{20}O_4Si$, 98%), 칼슘 니트레이트 테트라하이드레이트(calcium nitrate tetrahydrate; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 99%), 헥사데세틸트리메틸 암모늄 브로마이드(hexadecetyltrimethyl ammonium bromide; CTAB; $C_{19}H_{42}BrN$, $\geq 98\%$), 암모늄 하이드록사이드(ammonium hydroxide; NH_4OH ; 28.0% NH_3 in water, $\geq 99.99\%$ metal basis), 무수 메탄올(anhydrous methanol; CH_3OH ; 99.8%), 무수 톨루엔(anhydrous toluene; C_7H_8 , 99.8%), 3-아미노프로필 트리에톡시실란(3-aminopropyl triethoxysilane; APTES; $C_9H_{23}NO_3Si$, $\geq 98\%$), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate), 소듐 하이드록사이드(sodium hydroxide), 1N HCl(hydrochloric acid) 및 PBS(phosphate-buffered saline)을 Sigma-Aldrich 사에서 구입하여 추가 정제 없이 사용하였다. 콜라겐 용액(Rat-tail tendon type I collagen solution with a concentration of 2.05 mg/ml in 0.6% acetic acid)은 First Link Ltd.(UK) 사에서 구입하였고, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)은 Invitrogen Corporation (USA) 사에서 구입하였다. 또한, 이하의 실시예 및 실험예에서 초순수 워터(Ultrapure water; 18.2 M Ω cm; Millipore Direct-Q)를 사용하였다.

[0032] **실시예: 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하는 콜라겐 하이드로겔의 제조**

[0033] **단계 1) 표면 아민화된 생활성 유리의 제조**

[0034] 120 mL의 무수 메탄올에 5 g의 CTAB를 교반하면서 용해시키고, 상기 용액에 약 30 mL의 NH_4OH 를 첨가하여 pH를 12.5로 조절하였다. 상기 용액에 0.179 g의 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 를 용해시켰다. 별도의 용기에 0.895 g의 TEOS를 30 mL의 메탄올에 희석한 다음, 상기 pH 12.5의 용액에 격렬히 교반하면서 적가하고 동시에 고-전력 초음파 처리기로 20분 동안 처리하였다. 24시간 동안 교반한 후, 침전된 흰색 침전물을 세 번의 원심분리 및 재분산(5000 rpm, 5분)하고 물/에탄올로 세척한 다음 50°C에서 밤새 건조시켰다. CTAB를 제거하기 위하여, 건조 분말을 1°C/분의 승온속도로 600°C까지 열처리하고, 시료를 대기 하에 5시간 동안 600°C에서 소결하였다. 이를 'mBGn'이라 명명하였다.

- [0035] 100 mg의 소결된 나노입자를 50 ml의 무수 톨루엔에 분산시키고, 80°C에서 6시간 동안 교반 하에 환류하면서, APTES 용액(0.5 내지 10 부피%)을 첨가하였다. 표면-아민화된 나노입자를 원심분리로 회수하고 톨루엔으로 세척한 다음, 진공 하에 80°C에서 24시간 동안 건조시켰다. 이를 '아민화된 mBGn' 또는 'mBGn(A)'로 명명하였다.
- [0036] **단계 2) 콜라겐 및 표면-아민화된 생활성 유리를 포함하는 콜라겐 하이드로겔의 제조**
- [0037] 5 mL의 콜라겐 용액을 0.5 mL의 10× DMEM과 혼합하여 콜라겐 하이드로겔을 제조한 다음, 1M NaOH로 중화하였다. 상기 단계 1에서 제조된 표면-아민화된 생활성 유리와 비교를 위하여 표면-아민화되지 않은 생활성 유리 각각 5 mg, 10 mg 및 20 mg를 0.5 mL의 10× DMEM에 잘 분산시키고, 상기 5 mL의 콜라겐 용액과 혼합하여 콜라겐과 생활성 유리가 2:1, 1:1 및 1:2의 중량비로 혼합하고, 1M NaOH로 다시 중화하였다. 상기 하이드로겔을 실린더 몰드에 넣고 상온에 두어 겔이 형성되도록 하였다.
- [0038] **실시예 1: 실시예의 특성 분석**
- [0039] **1) 실험방법**
- [0040] 상기 실시예에서 제조된 물질의 특성을 SEM(Tescan, Mira II LMH, Czech Republic) 및 TEM(JEM-3010 microscope (JEOL, Japan), 300 kV)으로 확인하였다. 상기 실시예의 화학 결합 구조는 GladiATR diamond crystal accessory(PIKE Technologies, USA)를 사용하여 ATR-FTIR(Varian 640-IR, Australia)로 분석하였다 (resolution: 4 cm⁻¹ in the range 4000-400 cm⁻¹). 실시예의 열적 안정성은 TGA N-1500 analyzer(Scinco, South Korea)를 사용하여 분석하였다(heating rate: 10°C/min, nitrogen flow: 40 ml/min). 실시예의 기공 특성은 automated surface area and pore size analyzer (Quadrasorb SI, Quantachrom Instruments, USA)을 사용하여 -196.15°C에서 N₂의 흡착-탈착 측정으로 분석하였다. 실시예의 표면적은 BET(Brunauer-Emmett-Teller) 방법으로 계산하였고, 기공 크기 분포는 NLDFT(non-local density functional theory) 방법에 근거하여 N₂ 탈착 가지로부터 결정하였다.
- [0041] 실시예의 나노입자로부터 방출된 칼슘과 실리콘 이온의 축적된 양을 37°C에서 14일까지 측정하였다. 구체적으로, 20 mg의 나노입자를 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 및 1N 염산(Tris-HCl buffer)로 pH 7.4로 조절된 10 ml의 탈이온수에 침지하였다. 특정 시점에서 나노입자를 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상층액을 회수하여 ICP-AES(OPTIMA 4300 DV, Perkin-Elmer, USA)로 분석하였다. 상기 과정을 각각 세 번씩 하여 이의 평균값을 기록하였다.
- [0042] 실시예의 표면 기능기는 ESCA 2000 spectroscope (V.G. Microtech, UK, monochromatic Al K α source (1486.6 eV))를 사용하여 약 10⁻¹⁰ tor의 진공 하에 XPS로 확인하였다. 광전자는 실시예의 표면에 대해 56°의 각도에서 수집하였다.
- [0043] 실시예의 전기적 표면 전하 특성은 Laser Doppler electrophoresis instrument (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK)를 사용하여 제타(ζ) 포텐셜 측정으로 확인하였다. 상기 제타-포텐셜은 25°C 및 pH 7의 물에서 측정하였다(applied field strength: 20 V/cm, 5번 측정, 각 측정마다 평균 40회). 상기 측정 기기에 의해 electrophoretic mobility (U)가 자동으로 계산되었고, 제타-포텐셜은 Helmholtz-Smoluchowsky 식($\zeta = U\eta/\epsilon$, 여기서 η 은 dispersing medium viscosity이고, ϵ 는 dielectric constant이다).
- [0044] 실시예의 하이드록시아파타이트 형성 정도는 Kokubo's SBF에서 37°C에서 측정하였다(Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity, Biomaterials 2006;27:2907-15) SBF는 NaCl(142.0 mM), NaHCO₃(4.2 mM), KCl(5.0 mM), K₂HPO₄·3H₂O(1.0 mM), MgCl₂·6H₂O(1.5 mM), CaCl₂(2.5 mM) 및 Na₂SO₄(0.5 mM)를 Tris-HCl buffer로 pH 7.4로 조절된 탈이온수에 용해하여 제조하였다.

[0045] 2) 실험결과

[0046] mBGn의 표면은 APTES와의 반응으로 아민기로 개질되었다. mBGn을 다양한 양의 APTES(0.5-10%)로 처리하고 표면의 제타-포텐셜 변화를 도 2에 나타내었다.

[0047] 도 2에 나타난 바와 같이, 아민화되지 않은 mBGn은 음의 제타-포텐셜을 나타내었으나(-22 mV), APTES로 처리된 경우 제타-포텐셜이 양의 값으로 변화하였다. APTES가 2%까지 증가하는 경우 제타-포텐셜이 +25 mV로 급격히 증가하였고, 이더 APTES가 5%까지 증가하는 경우 완만히 증가하였다. 상기 결과로부터, 2% APTES가 표면 아민화에 가장 적절한 수준의 농도로 판단된다.

[0048] mBGn의 물리-화학적 특성은 도 3에 나타내었다. 다공성을 가진 약 100 nm 크기의 구형의 나노입자가 제조되었다(도 3a). 표면 아민화 과정 후에도, 유사한 다공성 구조를 가지는 것으로 확인되었다(도 3b).

[0049] mBGn의 기공 구조를 N₂ 흡착-탈착 측정으로 평가하였으며, N₂ 흡착-탈착 등온선은(도 3c) IUPAC 분류에 따른 Type IV의 기공물질의 특성을 나타내었다(Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, et al. Physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. Pure Appl Chem 1985;57:603-19). BET 방법으로 계산된 표면적은 아민화되지 않은 mBGn은 830 m²/g, 아민화된 mBGn은 710 m²/g였다.

[0050] NLDFT 방법으로 측정한 기공 크기 분포는 도 3d에 나타내었으며, 좁고 균일한 기공 크기 분포를 나타내었다. 기공 크기와 기공 부피는 아민화되지 않은 mBGn의 경우 각각 3.2 nm 및 0.415 cm³/g이었고, 아민화된 mBGn의 경우 2.94 nm 및 0.343 cm³/g이었다. 2% APTES로 아민화한 결과, 약 14.5%의 표면적 감소, 8% 기공 크기 감소, 17%의 기공 부피 감소를 나타내었다.

[0051] 아민화된 mBGn의 표면에 아민기의 존재 여부는 XPS 분석으로 확인하였다(도 3e). 아민화되지 않은 mBGn의 경우 XPS 스펙트럼은 Si(2p: 104 eV, 2s: 155 eV), Ca(2p: 347 eV, 2s: 439 eV), O(1s: 530 eV) 및 C(1s: 285 eV)의 피크를 나타내었고, 반면 아민화된 mBGn의 경우 N 1s에 해당하는 400 eV의 추가 피크를 나타내었으며, 이는 표면에 아민기가 존재함을 의미한다. 아민화된 mBGn의 FTIR 스펙트럼은 아민화되지 않은 mBGn과 비교하여 추가 밴드(N-H at 695 cm⁻¹ vibration, 1570 cm⁻¹ bending mode)를 나타내었다(도 3f).

[0052] SBF 내에서의 mBGn의 아파타이트-형성 능력을 평가하였다. 3일 동안 SBF 내에 침지한 후, 아민화된 mBGn의 표면에 아파타이트 나노결정이 형성됨을 TEM으로 확인하였다(도 3g). XRD 분석에서 하룻 동안 SBF에의 침지로 아파타이트 피크가 존재하는 것으로 확인되었고(2θ ~32°의 주 피크 포함), 7일까지 침지 시간이 증가함에 따라 피크의 강도와 결정성 또한 증가하였다. 표면에 아민기를 가지는 mBGn과 아민기를 가지지 않는 mBGn의 물리-화학적 특성, 즉 제타-포텐셜 및 기공 특성을 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

[0053]	아민화되지 않은 mBGn	아민화된 mBGn
ζ-potential (mV)	-22	+25
Surface area, BET (m ² /g)	830	710
Pore size, NLDFT (nm)	3.2	2.94
Pore volume, NLDFT (cm ³ /g)	0.415	0.343

[0054] 다공성 나노입자로부터 방출되는 Si 및 Ca 이온의 축적된 방출 프로파일을 ICP-AES로 14일까지 모니터링하였고,

이의 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Release Period	1 day	3 day	7 day	14 day
Ca ion	7.96	8.66	9.94	13.9
Si ion	5.00	5.20	5.26	5.33

Ca 이온의 방출이 Si 이온의 방출보다 높게 관찰되었다. 시간이 증가함에 따라 Ca 이온의 방출량이 증가한 반면, Si의 방출은 초기에 높게 방출된 이후 시간이 증가하여도 큰 변화가 없었다.

실험예 2: 겔화 시간 측정

1) 실험방법

하이드로겔의 겔화가 급격히 진행되므로, 잘 알려진 vial inversion test(또한, flow test로도 알려져 있다)를 수행하였다. 구체적으로, 바이알을 뒤집었을 때 제조된 콜라겐 용액이 흐르지 않는 시점을 겔화 시간으로 측정하였다. 겔화 시간은 상온에서 대기 하에 측정하였으며, 각각 세 번의 실험으로 측정된 값의 평균 값을 기록하였다.

2) 실험결과

산성의 콜라겐 용액이 중성 pH로 바뀔 경우(중화), 콜라겐의 물리적 겔화가 자발적으로 일어나고, 분자 간의 물리적 가교가 되어 상당량의 물을 포함하는 겔 매트릭스로 응집된다. 상기 실험에서는, 제조된 나노입자를 콜라겐 용액과 다양한 비율로 혼합하고, 중화한 다음 겔이 형성되도록 하였다. 하이드로겔이 겔화된 상태를 시각적으로 도 4a에 나타내었다.

콜라겐과 콜라겐-mBGn 나노복합체 하이드로겔의 동결 건조된 시료의 매트릭스 형태를 SEM으로 관찰하여 도 4b 내지 도 4i에 나타내었다. 동결 건조 과정으로 인하여, 높은 다공성 구조가 가능하였다(도 4b, 4d 및 4g). 순수한 콜라겐의 경우에는, 부드러운 표면이 확인되었다(도 4c). 콜라겐-mBGn 나노복합체의 경우에는 많은 나노 입자가 내장된 콜라겐 섬유(약 100 nm 직경)와 함께 거친 표면을 나타내었고(도 4e 및 4h), 나노입자가 콜라겐 섬유에 잘 분포되어 있었다(도 4f 및 4i). SEM 이미지는 아민화된 mBGn과 아민화되지 않는 mBGn 간에 큰 차이를 나타내지 않았다.

하이드로겔(콜라겐 및 이의 mBGn과의 나노복합체(1:1))의 화학 결합 구조는 ATR-FTIR로 분석하였다. 콜라겐의 전형적인 결합들(N-H stretching at 3310 cm^{-1} for the amide A band, C-H stretching at 3063 cm^{-1} for amide B, C=O stretching at 1657 cm^{-1} for amide I, N-H deformation at 1555 cm^{-1} for amide II 및 N-H deformation at 1239 cm^{-1} for amide III band)이 관찰되었다(도 5a)(Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. Biomaterials 2002;23:4811-8). 일반적으로, 아미드 I 밴드는 강하고, 아미드 II 밴드는 약하고, 아미드 III 밴드는 중간 정도이다. mBGn과 결합된 콜라겐의 스펙트럼에서, mBGn의 Si-O-Si 밴드는 470, 790 및 1080 cm^{-1} 에서 관찰되었다. 도 5b에서와 같이, 아미드 II 범위는 아미드 II 밴드 위치에 1555 cm^{-1} (순수 콜라겐 및 Col-mBGn)에서 1562 cm^{-1} (Col-mBGn(A))로의 청색 편이를 나타내었다. 나노입자 및 나노복합체 하이드로겔의 열적 거동은 800℃까지 가열하면서 질량 손실을 모니터링 하면서 TGA로 실험하였다(도 5c). mBGn(A)의 경우, 21%의 질량 손실이 관찰되었고, 이는 mBGn(6.2%, 흡착된 물과 잔류 템플레이트에 기인함)에 비하여 높았으며, 이러한 추가적인 질량 손실(250 내지 550℃)은 표면 아민기의 존재에 의한 것이다.

[0064] 콜라겐의 경우, 90.7%의 질량 손실 및 9.3%의 잔류가 800℃에서 관찰되었다. 1:1 조성물의 나노복합체의 경우, 50-51%의 질량 손실이 관찰되었고, 이는 주로 콜라겐의 손실에 의한 것이다. TGA 그래프(도 5c)는 세 개의 주요 열적 구간으로 나눌 수 있다: 30-200℃(결합된 물의 손실), 200-430℃(콜라겐 분자의 분해) 및 430-750℃(잔류 콜라겐 유기 매트릭스의 분해); 200-430℃의 구간에서는 두 개의 열적 단계를 포함(200-300℃ 및 300-430℃). 나노복합체는 200-550℃의 열적 분해 거동에서 순수 콜라겐과 분명한 차이를 나타내었다. 일반적으로, 콜라겐에서 나타나는 열적 전이 및 질량 손실 거동은 200-430℃에서 빠르고 급격하고, 반면에 나노복합체는 유사한 구간에서 느리고 점진적이고 더 높은 온도에서 열적 단계의 편이가 나타나며(즉, 콜라겐의 430℃의 종점이 나노복합체에서 550℃로 편이된다), 이는 나노복합체의 더 높은 열적 안정성을 나타낸다.

[0065] 겔화 시간에 대한 mBGn의 효과를 도 6에 나타내었다. 순수 콜라겐의 겔화 시간은 130초였으며, 이는 콜라겐:mBGn이 1:2의 비율로 혼합된 경우 80초로 감소하였으며, 이는 아민화된 mBGn이 겔화 시간을 40초 정도 감소시켰음을 의미한다. 또한, 다양한 비율 모두에서 겔화 시간이 감소되었다.

[0066] **실험예 3: 하이드로겔의 가수 분해**

[0067] **1) 실험방법**

[0068] 제조된 하이드로겔의 가수분해를 PBS(pH 7.4)에서 37℃에서 평가하였다. 하이드로겔 시료(-80℃에서 동결되고, -60℃에서 동결건조됨)를 정확하게 칭량하여 10 ml의 PBS에 다른 시점에서 28일까지 침지하고, 2일마다 배지를 교체하였다. 시료를 특정 침지 시점에서 회수하여 탈이온수로 세척하고, 동결건조하였다. 분해 정도를 침지 전후로 건조 중량으로부터 계산하였다((침지전 건조 중량-침지후 건조 중량)/침지전 건조 중량). 각각 세 번의 실험을 진행하여, 이의 평균 값을 기록하였다.

[0069] **2) 실험결과**

[0070] 상기 실험의 결과인 시료의 질량 손실 결과를 도 7a에 나타내었다. 나노복합체의 질량 손실은 콜라겐과 나노복합체의 질량 손실의 합을 의미한다. 순수 콜라겐의 경우, 실험 시간에 따라 점차 질량 손실이 증가하였다. 나노복합체 하이드로겔의 경우에는 순수 콜라겐에 비하여 낮은 분해율을 나타내었고, 아민화된 mBGn을 포함하는 나노복합체에서 분해의 감소가 보다 두드러졌다.

[0071] **실험예 4: 콜라게나아제에 의한 분해**

[0072] **1) 실험방법**

[0073] 제조된 하이드로겔 시료의 효소 분해 정도를 Collagenase type I(270 U/mg, Clostridium histolyticum (Worthington Biochemical, USA))를 사용하여 평가하였다. 하이드로겔을 동결건조하고(-80℃에서 동결되고, -60℃에서 동결건조됨), 분해 실험 전에 정확히 칭량하였다. 각 시료를 50 mM의 CaCl₂을 포함하는 1 ml의 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 침지하고, 37℃에서 30분 동안 배양한 다음, collagenase type I (200 µg/ml, equivalent to 54 U/ml)를 포함하는 1 ml의 0.1 M Tris-HCl buffer를 각 시료에 첨가하였다. 다른 시점에서 시료를 회수하여 즉시 얼음으로 시료를 냉각하여 분해 반응을 억제한 다음, 0.2 ml의 0.25 M EDTA를 첨가하였다 (Wahl D, Sachlos E, Liu C, Czernuszka J. Controlling the processing of collagen hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. J Mater Sci Mater Med 967 2007;18:201-9). 상기 시료를 탈이온수로 세 번 세척하고, 에탄올에 3시간 동안 침지하였다. 에탄올을 제거한 다음, 시료를 다시 탈이온수로 세척하고 동결건조하였다. 분해 정도를 침지 전후로 건조 중량으로부터 계산하였다((침지전 건조 중량-침지후 건조 중량)/침지전 건조 중량). 각각 세 번의 실험을 진행하여, 이의 평균 값을 기록하였다.

[0074] **2) 실험결과**

[0075] 상기 효소에 의한 하이드로겔의 분해 결과를 도 7b에 나타내었다. 여기서, 나노입자는 짧은 실험 기간(3-4일) 동안에는 분해되지 않는 것으로 가정하고, 콜라겐의 분해만을 고려하였다. 상기 결과에 따르면, 모든 복합체에

서 시간이 지남에 따라 점진적인 질량 손실의 증가가 확인되었다. 효소 분해율은 다음과 같은 순서로 높았다: Col > Col-mBGn > Col-mBGn(A).

[0076] 실험예 5: 점탄성 특성 평가

[0077] 1) 실험방법

[0078] 제조된 하이드로겔의 점탄성 특성을 측정하였다. Dynamic mechanical analyzer (DMA 25N, 01dB-Metravib, France)로 tension-compression mode로 측정하였고, compression rod-plate configuration도 사용하였다. 상기 장치(configuration)은 movable cylindrical rod (9 mm 직경)을 상층부로, fixed plate (40 mm 직경)을 하층부로 가진다. 15 mm 높이 및 20 mm 직경의 원통형의 샘플을 상기 상층부와 하층부 사이에 넣고, 상층 rod를 상기 샘플의 표면에 접촉하도록 하였다. 두 종류의 압축 시험-고정 및 이동 시험-을 수행하였다. Creep 테스트의 일종인 고정 시험은, 일정한 0.5 kPa의 고정 압축(constant static compressive stress)이 상기 원통형 하이드로겔 시료 표면에 주어지고, 샘플의 변형 정도를 시간에 대한 함수로 상온에서 450초 동안 기록하였다.

[0079] 이동 압축 응력 시험의 경우, 상층 rod가 변형률(100 μm)로 유동 진동하게 하였고, 상기 변형률은 상기 시료의 점탄성의 선형 범위 내였다. 샘플에 증가하는 주기(0.5에서 10 Hz)로 이동 압축 응력 주기를 상온에서 10분 동안 부여하였다. 각 조건에서 세 번의 실험을 수행하여 평균 값의 storage modulus (E') 및 loss (E'') modulus를 측정하였다. Tan δ (loss (damping) factor)는 E''/E'로부터 계산하였다.

[0080] 2) 실험결과

[0081] 상기 점탄성 관련 결과를 도 9a 및 9b에 나타내었다. 모듈 값은 모든 주파수 범위에서 주파수에 독립적인 거동을 나타내었다. Storage modulus 값(E')은 loss modulus 값(E'') 보다 높았다. 주파수에 대한 E' 및 E''의 평균값은 도 9c에 나타내었다. 하이드로겔의 E' 및 E'' 값 모두 mBGn의 함량이 증가함에 따라 증가하였고, 아민화된 mBGn의 경우 보다 증가하였다. 특히, 콜라겐의 E' 값(75 kPa)는 Col-mBGn에서 130-160 kPa로 증가하였고, Col-mBGn(A) 하이드로겔에서는 150-280 kPa로 증가하였다. 또한, mBGn(A)를 포함하는 하이드로겔은 E'' 값보다 더욱 현저히 증가된 E' 값을 나타내었다. 따라서, E' 및 E'' 간의 차이는 mBGn(A)가 첨가된 하이드로겔에서 더욱 현저하였고, 이는 mBGn(A)는 하이드로겔에 점성 보다 탄성을 부여하는 것을 의미한다((a) Kim M, Mun SC, Lee CS, Lee MH, Son Y, Park OO. Electrical and rheological properties of polyamide 6,6/c-ray irradiated multi-walled carbon nanotube composites. Carbon 2011;49:4024-30; (b) Dankers PY, van Luyn MJ, Huizinga-van der Vlag A, van Gemert GM, Petersen AH, Meijer EW, et al. Development and in vivo characterization of supramolecular hydrogels for intrarenal drug delivery. Biomaterials 983 2012;33:5144-55, (c) Perez RA, Kim HW. Core-shell designed scaffolds of alginate/alpha-tricalcium phosphate for the loading and delivery of biological proteins. J Biomed Mater Res Part A 2013;101A:1103-12). E''/E'로부터 계산되는 loss factor, tan δ를 도 9에 나타내었고, mBGn의 첨가, 특히 아민화된 mBGn의 첨가는 tan δ를 현저히 감소시키는 것을 확인되었으며, Tan δ의 값이 작을수록 보다 탄성인 물질임을 의미한다. 상기 E', E'' 및 tan δ를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0082]

	Pure Col	Col-mBGn			Col-mBGn(A)		
		2:1	1:1	1:2	2:1	1:1	1:2
E' (kPa)	7319	12220	13916	16324	14912	21715	28321
E'' (kPa)	23.61.3	28.82.2	34.22.8	44.72.2	26.51.7	31.51.9	382.4
tan	0.320.07	0.240.02	0.250.01	0.270.03	0.180.003	0.150.001	0.130.002

[0083] 제조된 하이드로겔의 정적 변형 거동(static strain behavior)을 시간에 따른 함수로 평가하여, 도 8에 나타내었다. 0.5 kPa의 고정 정적 압축 응력이 샘플에 적용하고, 변형의 변화를 450초 동안 모니터링 하였다. 콜라겐 하이드로겔은 실험이 종료될 때까지 점진적이나 실질적으로 정적 변형 증가(최대 변형: 0.038)를 나타내었고, 콜라겐에 나노입자(아민화 또는 비-아민화)를 첨가한 경우 현저히 감소된 변형 변화를 나타내었다(도 8a). 450

초에서 기록된 최대 변형을 조성물 간에 비교한 결과(도 8b), mBGn의 첨가에 따라 정적 변형에서 주목할 만한 감소가 확인되었고, 특히 그 정도가 아민화된 mBGn의 첨가에서 두드러졌다. 콜라겐의 곡선에서는 어떠한 변형도 나타나지 않았으나, 나노복합체 하이드로겔은 두 단계의 거동을 나타내었다: 초기 급격한 변형 증가 및 이어 완만한 곡선(도 8c). 두 번째 구간에서는 각 시료 간에 변형률 증가에 뚜렷한 차이가 있었다. 변형률을 계산한 결과(도 8d), mBGn이 포함된 경우 현저히 낮았고, 아민화된 경우에는 더욱 낮았다.

[0084] **실험예 6: 하이드로겔 내에서의 세포 배양 및 수축 평가**

[0085] **1) 실험방법**

[0086] 세포를 하이드로겔 내에서 배양하여 하이드로겔의 세포 배양 능력을 평가하고, 또한 나노입자의 추가에 따른 하이드로겔의 수축 정도를 평가하였다. 쥐로부터 유래한 MSCs(Mesenchymal stem cells)를 분리하고 기존의 보고에 따라 준비하였다(Oh SA, Lee HY, Lee JH, Kim TH, Jang JH, Kim HW, et al. Collagen three-dimensional hydrogel matrix carrying basic fibroblast growth factor for the cultivation of mesenchymal stem cells and osteogenic differentiation. Tissue Eng Part A 2012;18:1087-100). 세포는 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco) 및 10% 소태아혈청(Gibco)이 공급된 α -minimal essential medium (Gibco)에서, 5% CO₂의 대기 하에 보관하였다. 배양 배지는 2-3일마다 교체하였다. 상기와 같이 보관된 MSCs를 하이드로겔 용액에 붓고(용액 1 ml당 30,000 cells), 적은 양(1 ml)를 2-3초간 격렬히 피펫팅하여 교반한 다음, 24-배양 플레이트의 각 웰에 넣고 겔화되도록 두었다. 하이드로겔 내의 MSCs를 배양하기 위하여 정상배지를 사용하였다. 배양하는 동안 세포 증식에 따른 하이드로겔 붕괴를 눈으로 모니터링하였고, 특정 배양 시점에서 하이드로겔의 크기(직경)를 측정하였다. 또한, 세포 형태를 confocal laser scanning microscopy (LSM 510, Zeiss)로 확인하였다. 각 배양 시점에서, 세포를 4% 파라포름알데하이드 용액으로 고정하고, Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (Molecular Probes) 및 Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes)로 염색하고, 형광신호를 관찰하였다.

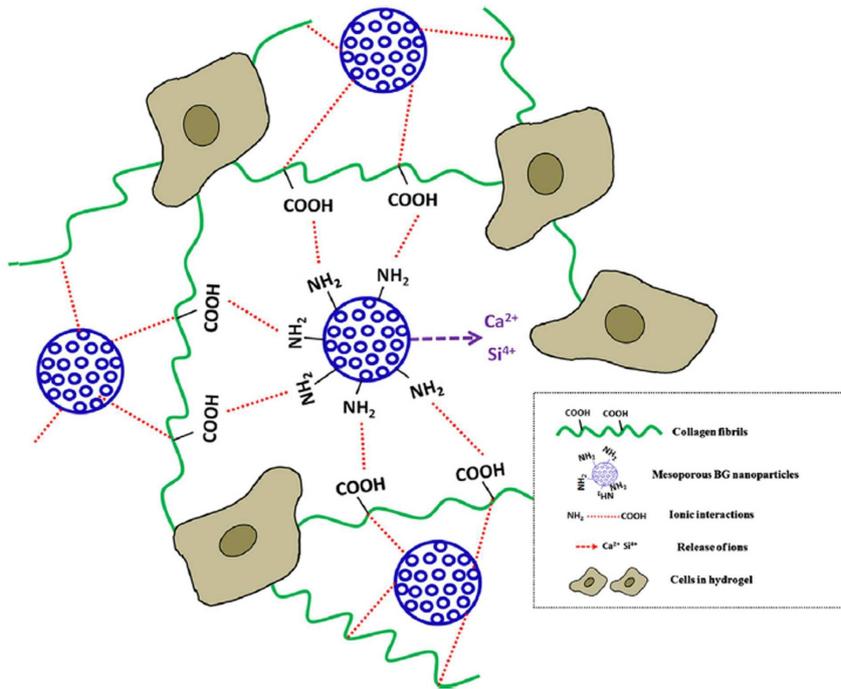
[0087] **2) 실험결과**

[0088] 조성물에 따라 하이드로겔의 크기(직경)를 다른 배양 기간에서 측정하여 도 10a에 나타내었다. 순수 콜라겐의 경우 7일이 경과한 시점에서 약 40%가 수축하였고, 14일이 경과한 시점에서 약 80%가 수축하였다. mBGn의 첨가한 경우, 수축의 정도가 감소하였고, 마지막 기간에서 급격히 수축하였으며, 순수 콜라겐 하이드로겔(약 20%의 최종 크기)에 비하여 최종 크기가 더 컸다(약 30-50%로 유지). 그러나, 비-아민화된 mBGn이 첨가된 하이드로겔의 경우 모든 조성물에서 수축의 문제를 극복하지 못하였다. 아민화된 mBGn이 첨가된 경우, Col-mBGn(A) 2:1에서 약간의 수축이 발견되었으나, Col-mBGn(A) 1:1 및 1:2의 경우 14일 동안 수축이 거의 일어나지 않았다. 21일 간 배양한 하이드로겔의 대표적인 예를 도 10a 내의 이미지에 나타내었다.

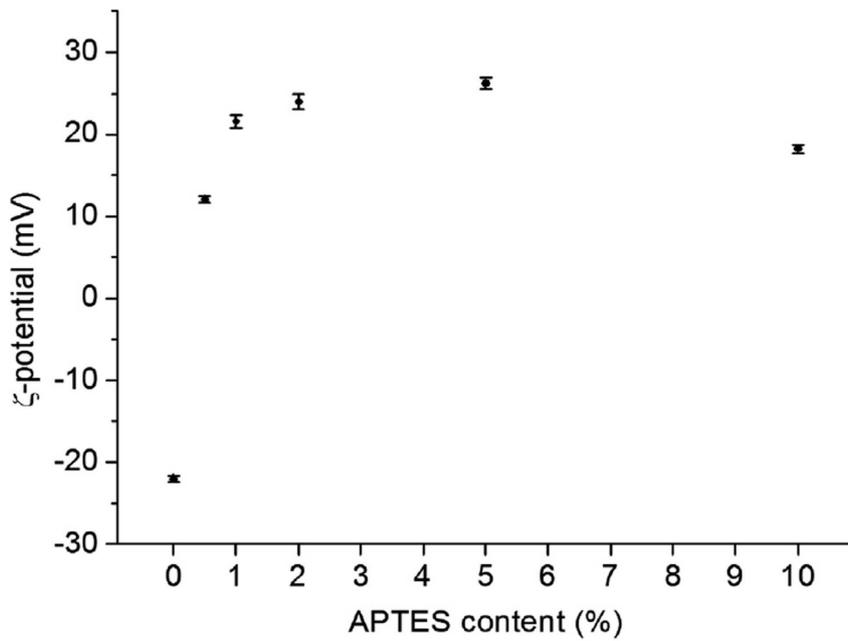
[0089] 하이드로겔 내에서 배양된 MSCs를 이미지화하여 도 10b에 나타내었으며, 세포 골격의 확장을 나타내었다. 모든 조성물에서 세포가 넓게 분포하였으며, 순수 콜라겐과 비교하여, mBGn이 포함된 경우 그 정도가 두드러졌으며, 아민화된 mBGn의 경우 더욱 두드러졌다. 세포 골격의 확장 정도는 다음의 순서로 두드러졌다: Col-mBGn(A) 1:1 > Col-mBGn(A) 2:1 ~ Col-mBGn 1:1 > Col-mBGn 2:1 > Col.

도면

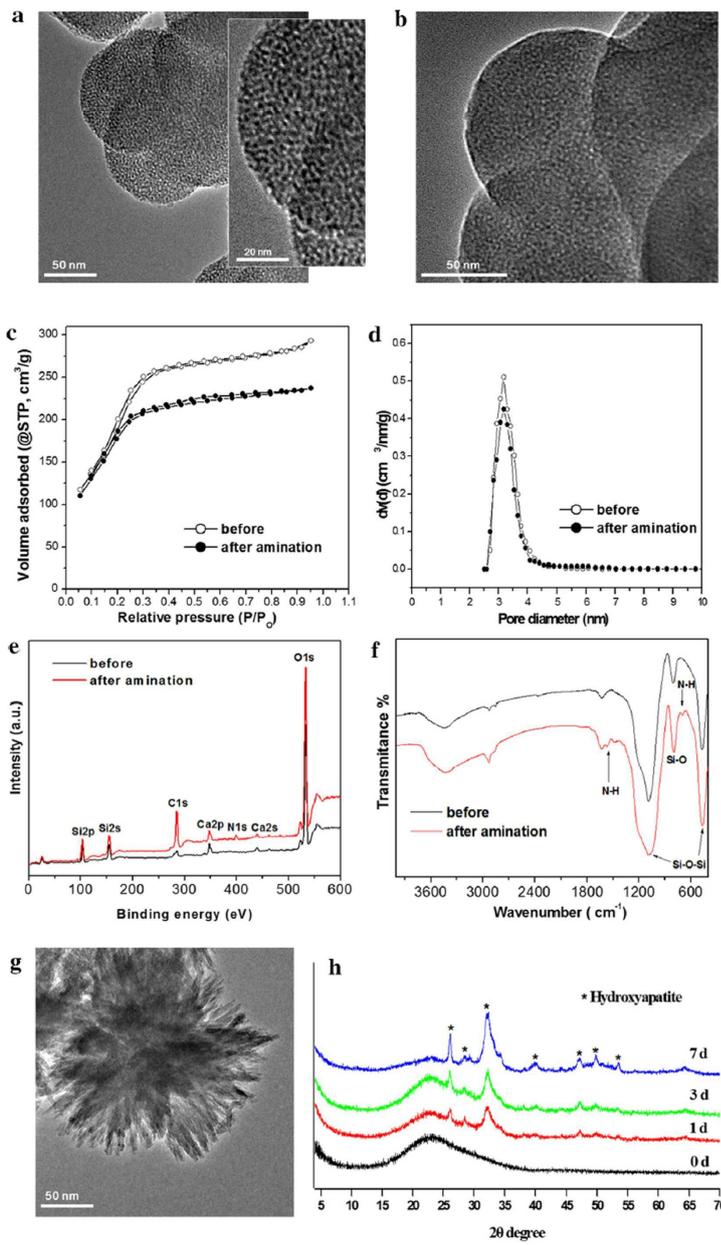
도면1



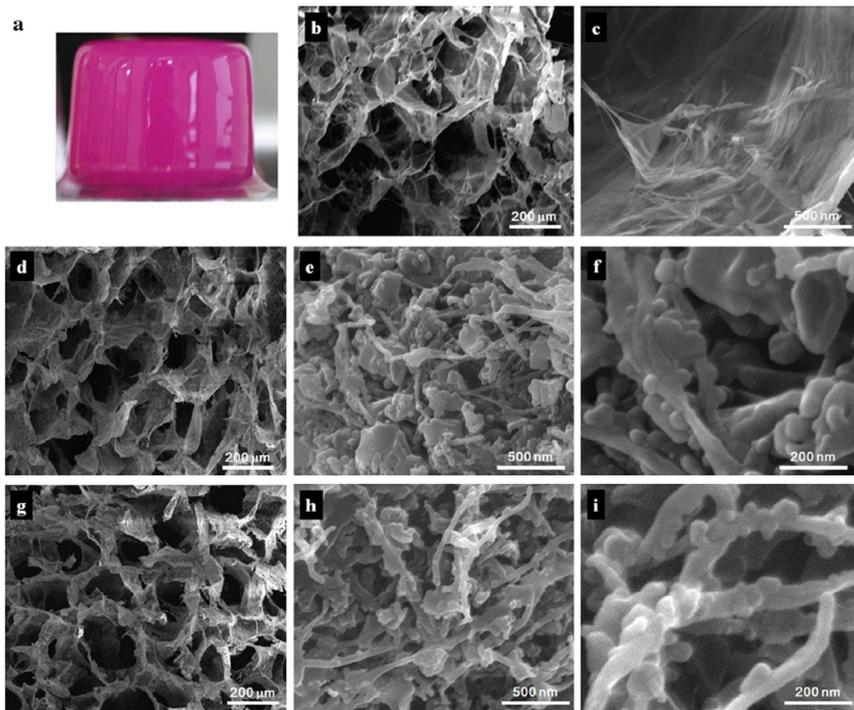
도면2



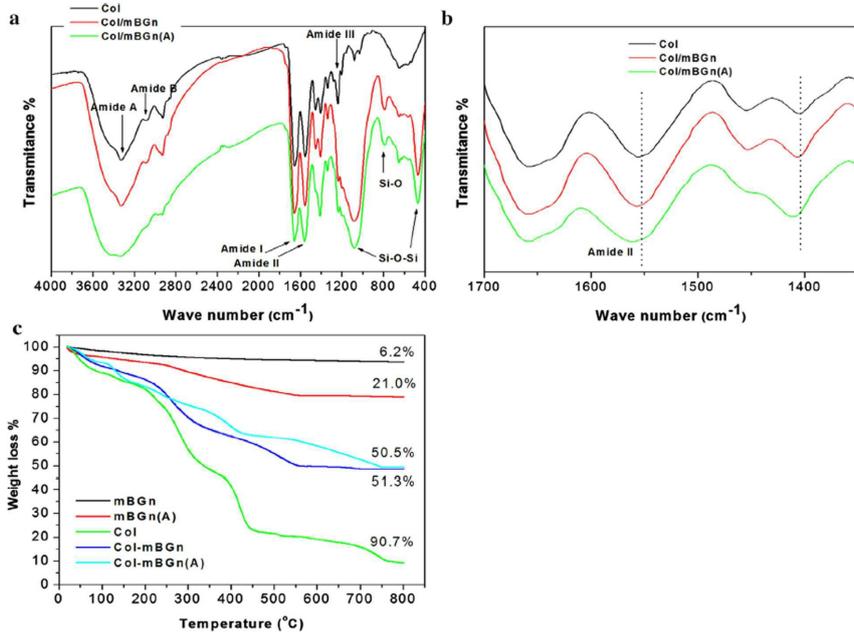
도면3



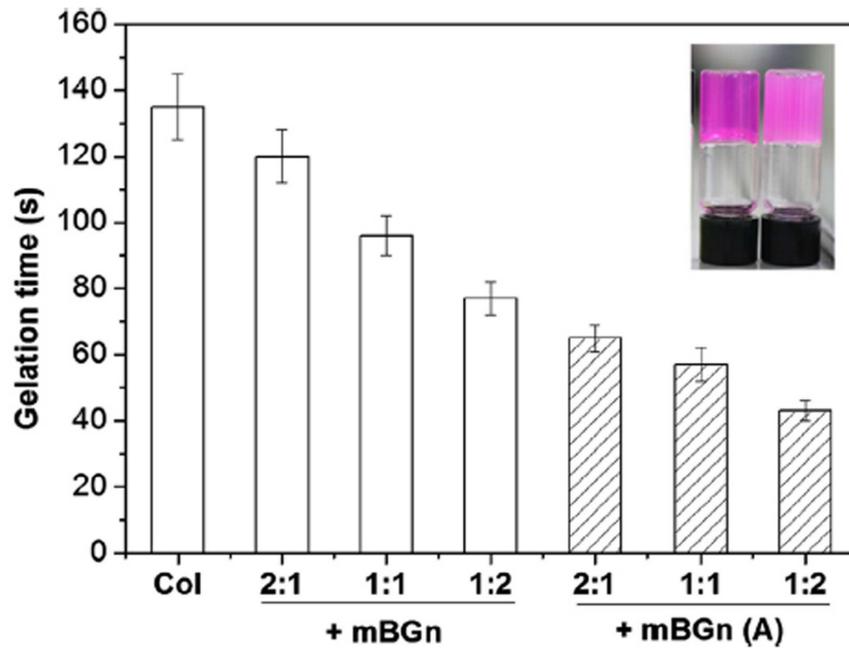
도면4



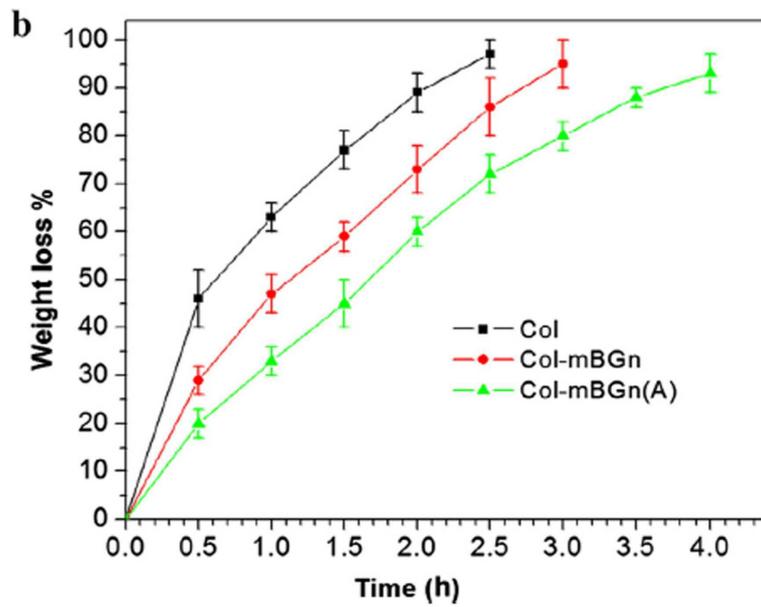
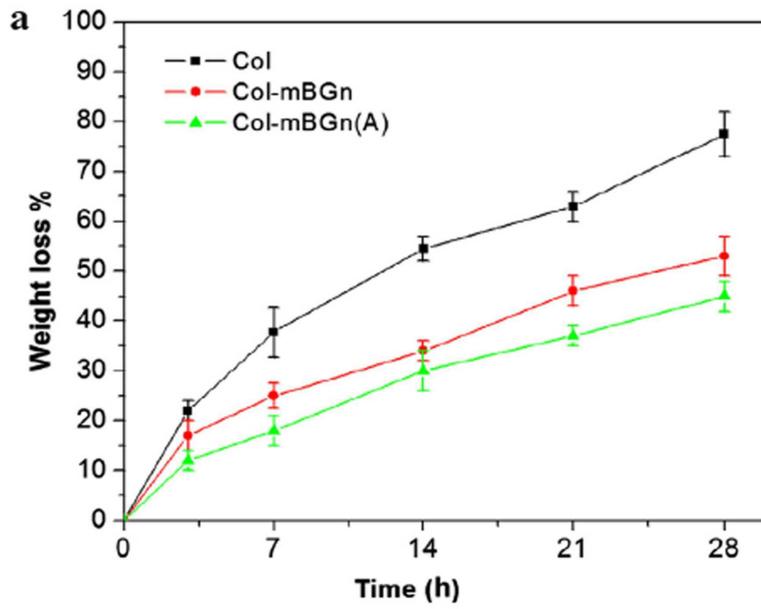
도면5



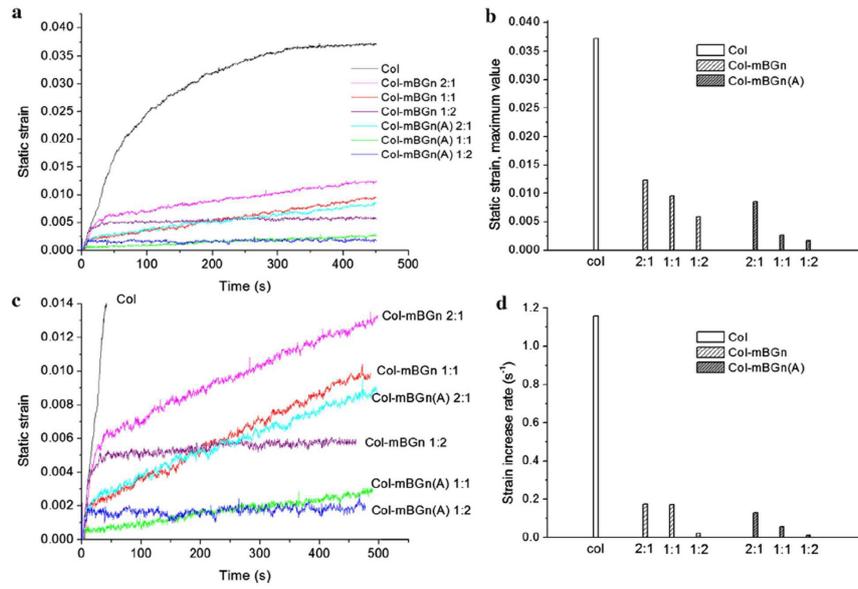
도면6



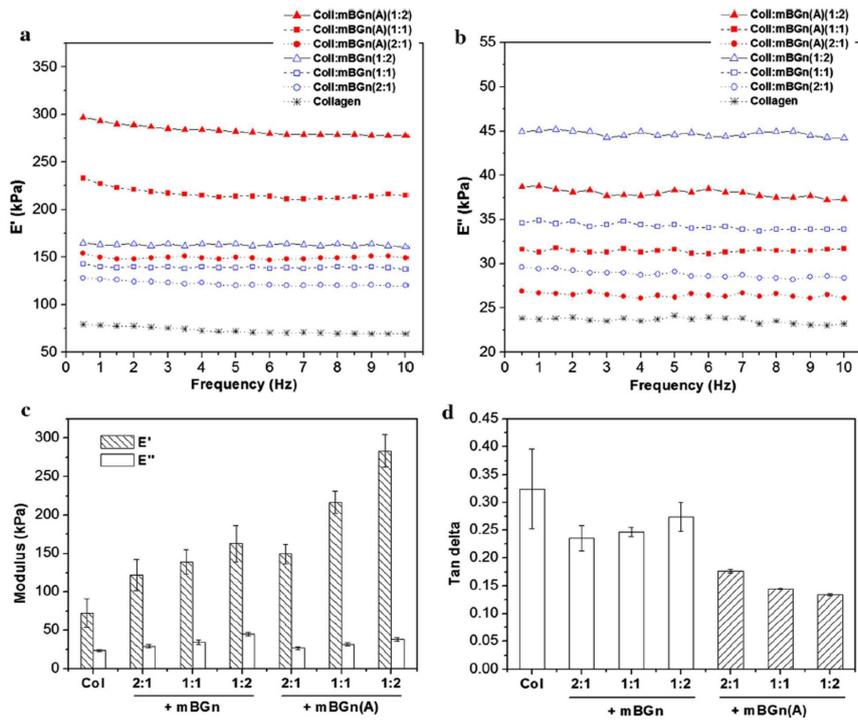
도면7



도면8



도면9



도면10

