



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월07일  
(11) 등록번호 10-2199640  
(24) 등록일자 2020년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/0775 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0662 (2013.01)  
C12N 2501/999 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0001518  
(22) 출원일자 2020년01월06일  
심사청구일자 2020년01월06일  
(56) 선행기술조사문헌  
W02018138352 A1  
W02019053235 A1  
W02020021215 A1  
W02020131578 A2

(73) 특허권자  
브렉소젠 주식회사  
서울특별시 송파구 중대로 109, 601호(가락동, 대동빌딩)  
(72) 발명자  
김수  
서울특별시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수기자  
촌아파트 255동 2002호  
김지민  
서울특별시 송파구 송파대로 111 파크하비오 205  
동 C1044호  
(74) 대리인  
윤대웅

전체 청구항 수 : 총 12 항

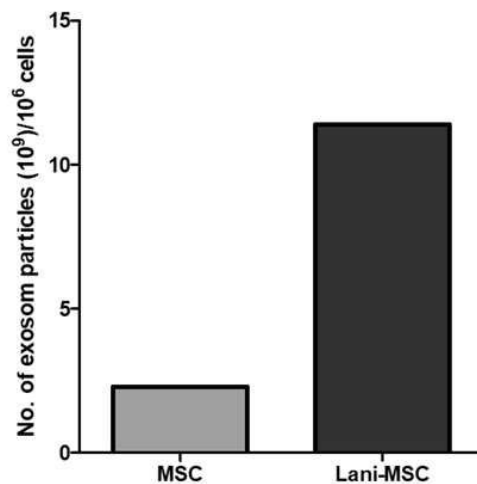
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진 및 줄기세포기능 강화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 라니피브라노르(Lanifibranor)를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀(Exosomes) 생성 촉진 및 줄기세포의 기능 강화용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물을 줄기세포 배양에 이용하는 경우, 줄기세포의 줄기세포능 및 줄기세포 유래 엑소좀의 생산량이 증가되므로, 보다 효율적으로 양질의 줄기세포 및 줄기세포 유래 엑소좀을 생산할 수 있는 바, 이를 관련 연구개발 및 제품화에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도4



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

라니피브라노르 (Lanifibranor)를 포함하는 줄기세포 유래 엑소솜 생성 촉진용 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포, 성체 줄기세포 및 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPSC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 인간 또는 동물 조직 기원의 성체 줄기세포, 인간 또는 동물 조직 유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stromal cell) 및 인간 또는 동물 조직 기원의 유도만능줄기세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 인간 또는 동물 조직은 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

#### 청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 인간 또는 동물 조직 기원의 성체 줄기세포는 조혈모세포, 유선 줄기세포, 장 줄기세포, 혈관내피 줄기세포, 신경 줄기세포, 후각신경 줄기세포 및 정소 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

라니피브라노르 (Lanifibranor)를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능 (stemness) 강화용 조성물.

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

라니피브라노르 (Lanifibranor)로 전처리된, 줄기세포 유래 엑소솜.

#### 청구항 10

라니피브라노르 (Lanifibranor)로 전처리된 줄기세포 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 치료제.

#### 청구항 11

다음 단계를 포함하는 줄기세포 유래 엑소솜의 생산방법:

라니피브라노르 (Lanifibranor)를 포함하는 세포배양 배지에서 줄기세포를 배양하는 배양 단계.

#### 청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 방법은 다음 단계를 더 포함하는, 방법:

배양된 줄기세포를 세척한 후 세포배양 배지에서 추가로 배양하는 추가 배양 단계; 및  
 엑소좀을 분리하는 분리 단계.

**청구항 13**

제 11 항에 있어서, 상기 세포배양 배지는 엑소좀이 제거된 우태아혈청(Fetal bovine serum)이 함유된 것인, 방법.

**청구항 14**

다음 단계를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능 (stemness)을 강화시키는 방법:  
 라니피브라노르 (Lanifibranor)를 포함하는 세포배양 배지에서 줄기세포를 배양하는 배양 단계.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 라니피브라노르 (Lanifibranor)를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 (Exosomes) 생성 촉진 및 줄기세포의 기능 강화용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 줄기세포 배양 시 줄기세포의 줄기세포능 (stemness)을 강화시켜 줄기 세포증식률, 줄기세포능 및 줄기세포 유래 엑소좀의 생산량을 증가시키는 라니피브라노르 포함 줄기세포 유래 엑소좀 (Exosomes) 생성 촉진 및 줄기세포능 강화용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 미세소포체(Extracellular Vesicles)는 마이크로베지클(Microvesicles), 엑소좀(Exosome) 등을 포함하는 30~1000 nm 크기의 구형 지질 이중층(lipid-bilayer)으로 구성된 소포체(vesicle)이다.

[0003] 엑소좀의 지질 이중층은 기원 세포(공여세포)와 같은 인지질 이중막 구조로 되어 있으며, 세포가 세포외로 분비하는 물질의 구성체로 세포-세포간의 커뮤니케이션 및 세포성 면역 중재 등의 기능적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 엑소좀은 기원 세포(공여세포) 특유의 생물학적 기능을 반영하는 세포특이적 구성 성분을 함유하며, 인지질, mRNA, miRNA 외에도 다양한 수용성 단백질, 외재성 단백질 및 막관통 단백질 성분 등을 포함한다.

[0005] 이러한 엑소좀은 비만세포, 림프구, 성상세포, 혈소판, 신경세포, 내피세포, 상피세포 등 모든 동물 세포에서 배출되며 혈액, 소변, 점액, 타액, 담즙액, 복수액, 뇌척수액 등의 다양한 체액에서 발견된다. 엑소좀은 뇌혈관 장벽(Blood-Brain Barrier, BBB)도 통과할 수 있으며, 표피 세포와 내피세포의 세포막 투과가 가능할 정도로 선택적 투과성이 높아 특정 약물의 나노캐리어(nanocarrier)인 DDS(drug delivery system) 개발에도 활용되고 있다.

[0006] 중간엽 줄기세포에서 분비하는 엑소좀 및 마이크로베지클(microvesicle)은 세포-세포간 커뮤니케이션(cell-to-cell communication)에 관여하며 줄기세포가 가지는 재생의학적 치료 효능을 보인다고 알려져 있다.

[0007] 줄기세포를 체내에 이식한 후에 장기간의 생존 없이 세포에서 분비되는 파라크린 인자(paracrine factors)에 트로픽 효과(trophic effect)를 가져오는 것이 알려져 있고, 이러한 인자에는 성장인자(growth factor), 케모카인(chemokine), 사이토카인(cytokine) 등과 같은 저분자가 엑소좀과 같은 세포외 소포체(extracellular vesicle)에 의하여 분비되며, 이러한 엑소좀은 줄기세포에서 유래한다. 따라서 엑소좀은 줄기세포의 특성을 규명하고 이의 치료적 효능을 평가하는데 활용되고 있다.

[0008] 최근에는 중간엽 줄기세포 자체를 사용하지 않고 중간엽 줄기세포가 분비하는 엑소좀을 이용하여 다양한 질환의 치료효과에 대한 연구가 활발하게 진행 중이며, 학계 및 산업계에서는 이를 통해 기존의 줄기세포 치료법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 대안이 될 수 있을 것으로 예상된다.

[0009] 이러한 엑소좀을 상업적으로 이용하기 위해서는 다량의, 그리고 양질의 엑소좀이 필요하다. 그러나 현재 줄기세포로부터 얻을 수 있는 엑소좀의 양은 매우 소량에 불과하고, 줄기세포 유래 엑소좀의 생산량을 증가시킬 수 있는 물질에 대한 개발도 아직까지 미비한 실정이다.

[0010] 한편, 중간엽 줄기세포는 배양 기간이 길어지는 동시에, 여러 번의 계대배양을 거치면서 증식능력과 다양한 계

통으로의 분화능력이 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한, 초기 계대(passage)의 중간엽 줄기세포에 비해, 후기 계대의 중간엽 줄기세포에서 콜로니 형성 능력이 현저히 감소되는 것으로 알려져 있다. 중간엽 줄기세포의 노화는 골수 공여자의 나이보다는 오랜 배양기간 동안의 약화된 증식능력과 관련이 있으며, 텔로머라아제 활성 (telomerase activity)의 감소와도 연관이 있는 것으로 보인다.

[0011] 이렇듯, 현재 사람에서 얻을 수 있는 중간엽 줄기세포의 양은 제한되어 있으며, 이렇게 얻은 세포를 특정 계통으로의 분화 유도를 위해선 계대배양에 따른 분화능력의 감소와 같은 문제점들이 따라올 수밖에 없다. 이러한 단점들은 정확한 타겟 세포로의 분화 유도과 그를 위해 적절한 줄기세포를 대량으로 확보해야 하는 임상적용에 있어서는 비현실적이다. 따라서, 오랜 기간 동안 증식물을 유지하고 여러 계통으로의 분화능력을 유지할 수 있는 방법의 필요성이 대두되고 있다.

[0012] 이에 따라, 줄기세포 유래 엑소좀의 생산을 촉진할 뿐만 아니라, 오랜 기간 동안 줄기세포의 증식물 및 분화능력을 유지할 수 있는 신규한 방법 및 물질 개발에 대한 필요성이 제기되었다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0013] (특허문헌 0001) 국내등록특허 제10-1439074호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0014] 이에 본 발명자들은 줄기세포 유래 엑소좀의 생산을 촉진할 뿐만 아니라, 오랜 기간 동안 줄기세포의 증식물 및 분화능력을 유지할 수 있는 방법 및 물질을 개발하였고, 라니피브라노르 (Lanifibranor)를 줄기세포에 전처리하는 경우 줄기세포의 줄기세포능(Stemness) 및 증식능(Proliferation)이 증가할 뿐만 아니라, 줄기세포 유래 엑소좀의 수, 엑소좀 내 단백질 및 RNA의 함량을 증가하는 시키는 효과가 월등히 우수한 것을 확인하였다.

[0015] 이에, 본 발명의 목적은, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진용 줄기세포 치료제를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능 (stemness) 강화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능 강화용 줄기세포 치료제를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은, 라니피브라노르로 전처리된, 줄기세포 유래 엑소좀을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은, 라니피브라노르로 전처리된 줄기세포 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 치료제를 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은, 본 발명의 또 다른 목적은 라니피브라노르를 포함하는 세포배양 배지에 줄기세포를 배양하는 전처리 단계를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은, 라니피브라노르를 포함하는 세포배양 배지에 줄기세포를 배양하는 전처리 단계를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능을 강화시키는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0023] 본 발명은 라니피브라노르 (Lanifibranor)를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 (Exosomes) 생성 촉진 및 줄기세포의 줄기세포능 (stemness) 강화용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 라니피브라노르를 포함하는 조성물을 통해 배양된 줄기세포는 엑소좀 생성이 촉진되고 줄기세포의 기능이 강화된다.

[0024] 본 발명자들은 이에 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진 및 줄기세포능 강화용 조성물

은, 줄기세포 배양에 전처리 시 줄기세포의 줄기세포능 및 증식능 (Proliferation)이 증가할 뿐만 아니라, 줄기세포 유래 엑소좀의 수, 엑소좀 내 단백질 및 RNA의 함량이 크게 증가하는 것을 확인하였다.

- [0025] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0026] 본 발명의 일 양태는, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진용 조성물이다.
- [0027] 본 발명의 라니피브라노르는 peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) 작용제(agonist)로 PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\delta$  and PPAR  $\gamma$  로 알려진 3가지 PPAR isoforms을 각각 활성화시켜서 신체 내에서 항섬유화, 항염 그리고 유익한 대사 변화를 유도하는 것으로 알려져 있는 small molecule다. PPAR은 유전자의 발현을 조절하는 핵 호르몬 수용체 패밀리에 속하는 리간드-활성화된 전사 인자이다. PPAR은 세포 분화, 발달 및 종양 형성의 조절에 필수적인 역할을 한다. 섬유증을 조절하는 PPAR을 활성화하여 결합 조직의 비정상적인 성장을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 라니피브라노르는 전신 경화증 치료제, 특발성 폐 섬유증 치료제 등의 용도로서 임상적으로 사용되어 왔다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에서, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진용 조성물은, 라니피브라노르 외의 공지된 엑소좀 생성 촉진 물질을 더 포함할 수 있다.
- [0029] 본 명세서상의 용어 "엑소좀(Exosome)"은 세포 유래성 소포체로, 거의 모든 진핵 생물의 체액에 존재하는 것으로, LDL 단백질보다는 크지만, 적혈구보다는 훨씬 작은 30-100nm 정도의 직경을 갖는 소포체를 의미한다. 엑소좀은 다중소포체 (multivesicular bodies)가 세포막과 융합될 때 세포로부터 방출되거나, 세포막으로부터 곧바로 방출될 수 있고, 응고, 세포간 신호전달 등과 같은 중요하면서도 특화된 기능을 수행한다는 점이 잘 알려져 있다.
- [0030] 본 명세서상의 용어 "줄기세포(Stem cell)"는 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기 세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있고, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있으며, 성체로부터 유래된 줄기세포일 수 있고, 배아로부터 유래된 줄기세포일 수 있다. 예를 들어, 줄기세포는 배아 줄기세포, 성체 줄기세포 및 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPSC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에서, 성체 줄기세포는 인간 또는 동물 조직 기원의 성체 줄기세포, 인간 또는 동물 조직 유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stromal cell) 및 인간 또는 동물 조직 기원의 유도만능줄기세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 본 명세서상의 용어 "배아 줄기세포 (embryonic stem cell)"는 배아의 발생과정에서 추출한 세포로, 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 포배기 배아에서 내세포괴 (inner cell mass)를 추출하여 체외에서 배양한 것을 의미한다.
- [0034] 배아 줄기세포는 개체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 다능성 (多能性, pluripotent)이거나 전능성 (全能性, totipotent)이 있는 자가재생능 (selfrenewal)을 갖는 세포를 의미하며, 넓은 의미로는 배아 줄기세포로부터 유래한 배아체 (embryoid bodies)도 포함하는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등의 모든 유래의 배아 줄기세포를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 명세서상의 용어 "성체 줄기세포(adult stem cell)"는 체대혈이나 다 자란 성인의 골수, 혈액 등에서 추출되는 세포로 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 세포를 의미하며, 필요한 때에 신체 내 조직으로 발달할 수 있는 능력을 보유한 미분화 상태의 세포를 의미한다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에서, 성체 줄기세포는 인간 또는 동물의 다양한 조직 기원의 성체 줄기세포, 인간 또는 동물 조직 유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stromal cell), 인간 또는 동물의 다양한 조직 기원의 유도만능줄기세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포 및 다분화능 줄기세포를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에서, 인간 또는 동물 또는 동물 조직은 체대, 체대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예에서, 인간 또는 동물의 다양한 조직 기원의 줄기세포는 조혈모세포, 유선 줄기세포, 장 줄

기세포, 혈관내피 줄기세포, 신경 줄기세포, 후각신경 줄기세포 및 정소 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0040] 본 명세서상의 용어 "유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPSC)"는 분화된 세포들로부터 인위적인 역분화 과정을 통해 다능성 분화능을 가지도록 유도된 세포들을 의미하며, "역분화줄기세포"와 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0041] 인위적인 역분화 과정은 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 센다이바이러스를 이용한 바이러스-매개 또는 비바이러스성 벡터 이용, 단백질 및 세포 추출물 등을 이용하는 비바이러스-매개 역분화 인자의 도입에 의해 수행되거나, 줄기세포 추출물, 화합물 등에 의한 역분화 과정을 포함할 수 있다.
- [0042] 유도만능줄기세포는 배아 줄기세포와 거의 동일한 특성을 가지며, 구체적으로는, 유사한 세포 모양을 가지고, 유전자, 단백질 발현이 유사하며, *in vitro* 및 *in vivo*에서 전분화능을 가지고, 테라토마 (teratoma)를 형성하며, 생쥐의 배반포 (blastocyst)에 삽입시켰을 때, 키메라 (chimera) 생쥐를 형성하고, 유전자의 생식선 전이 (germline transmission)가 가능하다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에서, 유도만능줄기세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등의 모든 유래의 유도만능줄기세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 명세서상의 용어, "생성 촉진"이란 대조군에 비하여 특정물질의 생산, 생성, 방출 등이 동일한 시간 내에서 증가되는 것을 의미하며, 구체적으로는, 줄기세포로부터 엑소솜이 생산되는 수량과, 엑소솜 내 단백질, RNA 등의 함량이 증가되는 것을 의미한다.
- [0045] 본 발명의 다른 양태는, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능 강화용 조성물이다.
- [0046] 본 명세서상의 용어 "줄기세포능"이란 모든 세포를 생성할 수 있는 능력이 있는 만능성 (pluripotency) 및 자기와 닮은 세포들을 무한정 만들어 낼 수 있는 자기재생능 (self-renewal)을 의미하고, 예를 들어, 미분화 세포를 미분화 상태를 유지하면서 줄기세포의 증식능 (Proliferation)을 증가시키거나, 텔로머라제 활성을 증가시키거나, 줄기세포성 인자 (stemness acting signals)의 발현을 증가시키거나 세포 이동 활성을 증가시키는 것을 말하며, 이들 특징 중 하나 이상이 나타나는 것을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 배지조성물로서 줄기세포 배양에 사용될 수 있고, 생체 내 (*in vivo*) 엑소솜 생성 촉진용도의 약제학적 조성물로서 줄기세포와 함께 생체 내로 병행 투여되거나, 선행 또는 후행적으로 투여되어 줄기세포의 *in vivo* 효능을 강화할 수 있다.
- [0048] 본 명세서 상의 용어 "줄기세포의 *in vivo* 효능 강화"는, 관절염이나 신경병증 등 특정 질환에 대한 치료목적 (*in vivo* 효능)을 가진 줄기세포의 효능이 줄기세포가 방출하는 엑소솜에 의해 매개됨을 전제로, 본 발명의 상기 조성물을 줄기세포 투여와 함께 투여시 줄기세포로부터 엑소솜의 생성이 촉진되는 결과 줄기세포의 질환 치료 효과 (*in vivo* 효능)를 강화시키는 용도를 의미한다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에서, 배지조성물은 생체 외 (*in vitro*)에서 세포의 성장과 생존 및 증식에 필요한 필수성분을 포함하는 조성물을 의미하는 것으로, 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 줄기세포 배양용 배지를 모두 포함하며, 예를 들어 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12),  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -Minimal essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium), KnockOut DMEM, E8 (Essential 8 Medium) 등의 상업적으로 제조된 배지 또는 인위적으로 합성한 배지가 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에서, 배지조성물은 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함하며, 아미노산, 항생제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에서, 배지조성물은 본 발명의 구성성분 라니피브라노르를 종래의 줄기세포 배양용 배지 내에 첨가하여 제조될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에서, 라니피브라노르 (Lanifibranor)는 배지 내에 1 내지 1000  $\mu$ M, 1 내지 500  $\mu$ M, 1 내지 100  $\mu$ M, 1 내지 90  $\mu$ M, 1 내지 80  $\mu$ M, 1 내지 70  $\mu$ M, 1 내지 60  $\mu$ M, 1 내지 50  $\mu$ M, 1 내지 40  $\mu$ M, 1 내지 30  $\mu$ M, 1 내지 20  $\mu$ M, 5 내지 1000  $\mu$ M, 5 내지 500  $\mu$ M, 5 내지 100  $\mu$ M, 5 내지 90  $\mu$ M, 5 내지 80  $\mu$ M, 5 내지 70  $\mu$ M



M, 5 내지 60 μM, 5 내지 50 μM, 5 내지 40 μM, 5 내지 30 μM, 5 내지 20 μM 첨가될 수 있고, 예를 들어 10 μM의 농도로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0053] 본 발명의 일 구현예에서, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능 강화용 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있고, 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 운환제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0056] 본 발명의 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 경구 및 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여, 비강 내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 경막 내 투여, 안구 투여, 피부 투여 및 경피 투여 등으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 투여량이 정해질 수 있으며, 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량으로 결정 또는 처방될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-1000 mg/kg이다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 양태는, 라니피브라노르로 전처리된, 줄기세포 유래 엑소솜이다.
- [0060] 본 발명에 따른 조성물 및 상기 줄기세포 유래 엑소솜 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 양태는, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 유래 엑소솜 생성 촉진용 줄기세포 치료제이다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양태는, 라니피브라노르를 포함하는 줄기세포 줄기세포능 강화용 줄기세포 치료제이다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 양태는, 라니피브라노르로 전처리된 줄기세포 유래 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 치료제이다.
- [0064] 본 명세서상의 용어 "세포 치료제"는 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포를 체외에서 증식·선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0065] 이러한 세포치료제는 크게 두 가지로 분류할 수 있으며, 그 첫 번째는 조직 재생, 장기기능 회복 또는 면역세포의 기능조절을 위한 "줄기세포 치료제"이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 "면역세포 치료제"이다.
- [0066] 본 발명에 따른 조성물은 줄기세포의 줄기세포능을 증가시키고 줄기세포 유래 엑소솜의 생성을 촉진하며, 이를 통해 줄기세포의 치료적 효능을 강화시키는 효과를 가지므로, 본 명세서 내에서 "세포치료제"는 "줄기세포 치료제"를 의미한다.
- [0067] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포 치료제는 심근경색, 심부전 등의 심혈관 질환, 간암, 위암, 대장암, 전립선암, 방광암, 폐암 등의 암 질환, 아토피성 피부염, 관절염, 자가면역성 뇌척수염, 전신성 홍반성 루푸스, 대장염 및 다발성 경화증과 같은 염증성 질환, 또는 자가면역성 질환 등의 치료대상 질병을 치료하는 용도로 사용될

수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0068] 본 발명에 따른 줄기세포 치료제는 상술한 본 발명의 각 조성물과 구성성분을 공통으로 하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법이다:
- [0070] 라니피브라노르를 포함하는 세포배양 배지에서 줄기세포를 배양하는 배양 단계.
- [0071] 본 발명의 일 구현예에서, 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법은 다음 단계를 더 포함할 수 있다:
- [0072] 배양된 줄기세포를 세척한 후 세포배양 배지에서 추가로 배양하는 추가 배양 단계; 및
- [0073] 엑소좀을 분리하는 분리 단계.
- [0074] 이하, 본 발명의 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법에 대하여 상세히 설명한다.
- [0075] 본 발명에 따른 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법의 배양 단계는, 줄기세포를 라니피브라노르로 전처리하여 줄기세포에 자극을 가하는 과정이다. 본 과정에 의해 줄기세포는 상기 물질로 전처리 되지 않은 줄기세포에 비하여 더 많은 수의 엑소좀을 생산하고, 엑소좀 내 단백질 및 RNA의 함량도 증가된다.
- [0076] 본 발명에 따른 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법의 추가 배양 단계는, 본 발명에 따른 라니피브라노르로 전처리된 줄기세포를 세척하여 전처리 물질을 제거하고, 새로운 세포배양 배지에서 배양함으로써 줄기세포로부터 엑소좀의 분비 또는 생산을 유도하는 과정이다. 배양 단계의 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르)은 상기 추가 배양 단계의 세척 과정에 의해 제거되고, 세척 이후의 줄기세포, 줄기세포에서 생산된 엑소좀 또는 배양배지 내에 잔류하지 않는다. 따라서 배양 단계에서 본 발명의 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르)로 처리된 줄기세포와 줄기세포에서 생산된 엑소좀 및 배양배지는 전처리 물질의 잔류에 의한 영향 없이 후속적 연구 또는 질병의 치료 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일 구현예에서, 추가 배양 단계의 세포배양 배지는 엑소좀이 제거된 우태아혈청 (Fetal bovine serum; FBS)을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0078] 세포배양 배지에 엑소좀을 제거한 FBS를 사용하는 이유는 일반적으로 사용하는 FBS에는 소 혈청유래의 엑소좀이 매우 많이 포함되어 있기 때문에, 줄기세포가 분비하는 엑소좀 외에 FBS에서 유래된 엑소좀이 혼입되는 것을 방지하기 위함이다.
- [0079] 본 발명의 일 구현예에서, 추가 배양 단계의 추가 배양은 추가 배양은 12시간 내지 120 시간, 24시간 내지 96시간, 48시간 내지 96시간, 또는 60시간 내지 84시간, 예를 들어, 72시간 동안 배양될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명에 따른 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법의 분리 단계에서, 추가 배양 단계에서 추가 배양한 줄기세포의 배양 배지를 200-400xg에서 5 내지 20분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포 잔여물을 제거한 뒤, 상층액을 취하여 9,000-12,000xg로 60-80분간 고속원심분리한 후, 다시 상층액을 취하여 90,000-120,000xg로 80-100분간 원심분리하고 상층액을 제거함으로써 하층에 남아 있는 엑소좀을 얻을 수 있다.
- [0081] 예를 들어, 중간엽 줄기세포 배양 배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하고, 상층액을 취하여 0.22 μm 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4℃에서 70분간 원심분리하고, 원심분리된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4℃에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거함으로써 하층에 남아 있는 엑소좀을 분리할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 줄기세포의 줄기세포능을 강화시키는 방법이다:
- [0083] 라니피브라노르를 포함하는 세포배양 배지에서 줄기세포를 배양하는 배양 단계.
- [0084] 줄기세포의 줄기세포능을 강화시키는 방법은 상술한 본 발명의 줄기세포 유래 엑소좀의 생산방법과 각 단계를 공통으로 하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

**발명의 효과**



[0085] 본 발명은 라니피브라노르 (Lanifibranor)를 포함하는 줄기세포 유래 엑소솜 (Exosomes) 생성 촉진 및 줄기세포의 기능 강화용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물을 줄기세포 배양에 이용하는 경우, 줄기세포의 줄기세포능 및 줄기세포 유래 엑소솜의 생산량이 증가되므로, 보다 효율적으로 양질의 줄기세포 및 줄기세포 유래 엑소솜을 생산할 수 있는 바, 이를 관련 연구개발 및 제품화에 유용하게 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0086] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라, 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르(Lanifibranor)) 처리에 따른 줄기세포 증식률 (Proliferation) 증가를 확인한 그래프이다.

도 2a 및 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라, 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르(Lanifibranor)) 처리에 따른 줄기세포의 줄기세포능 (Stemness) 증가를 확인한 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라, 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르(Lanifibranor)) 처리에 따른 엑소솜의 크기에 따른 분포를 확인한 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라, 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르(Lanifibranor)) 처리에 따른 엑소솜 수 증가를 확인한 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라, 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르(Lanifibranor)) 처리에 따른 엑소솜 유래 단백질 양 증가를 확인한 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라, 줄기세포 전처리 물질(라니피브라노르(Lanifibranor)) 처리에 따른 엑소솜 유래 RNA 양 증가를 확인한 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0087] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

**실시예: Lanifibranor 처리에 따른 줄기세포 유래 엑소솜 분리**

**Lanifibranor 전처리**

[0091] LANIFIBRANOR 10 μM이 포함된 배양배지[high glucose DMEM(Gibco, Cat no.11995-065); 10% Fetal bovine Serum (HyClone), 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (Gibco, Cat no.11140-050)]에서 제대 조직 유래 중간엽 줄기세포 (Primary Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells, ATCC No. PCS-500-010; Lot No. 63822428)를 1주일간 배양하였다.

**추가 배양**

[0093] 배양을 완료한 후 LANIFIBRANOR 가 전처리 된 중간엽 줄기세포를 세척하고 엑소솜이 제거된 우태아혈청 (FBS)을 10% 첨가한 배양배지에서 추가적으로 72시간 배양하였다. 엑소솜이 제거된 FBS를 사용하는 이유는 일반적으로 사용하는 FBS에는 소 혈청유래의 엑소솜이 매우 많이 포함되어 있기 때문에, 세포가 분비하는 엑소솜 외에 FBS 유래 엑소솜이 혼입되는 것을 방지하기 위함이다.

**엑소솜 분리**

[0095] 72시간 배양 후 전처리 물질이 처리된 중간엽 줄기세포 배양배지를 수거하여 300xg에서 10분간 원심분리하여 남아있는 세포와 세포잔여물을 제거하였다. 상층액을 취하여 0.22 μm 필터를 이용하여 여과한 다음, 고속원심분리기 (high speed centrifuge)를 이용하여 10,000xg, 4℃에서 70분간 원심분리하였다. 원심분리 된 상층액을 다시 취하여 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용하여 100,000xg, 4℃에서 90분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 하층에 남아있는 엑소솜을 PBS (phosphate bufferd salin)에 희석하여 이하의 실험에 사용하였다.

**실험예1: Lanifibranor 처리에 따른 줄기세포 기능 강화**

**1-1. Lanifibranor 처리에 따른 줄기세포 증식률(Proliferation) 증가**

[0099] 100uL 배양배지[high glucose DMEM(Gibco, Cat no.11995-065), 10% Fetal bovine Serum (HyClone), 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)(Gibco, Cat no.11140-050)]가 포함된 96-웰 플레이트에 중간엽 줄기세포 및 상기 실시예의 Lanifibranor가 전처리 된 중간엽 줄기세포를 각각 웰당 3000 세포씩 접종 (seeding)

한 후, 24시간 동안 CO2 배양기에서 배양하였다. 그 다음, CCK 용액 (10 uL/웰)을 첨가하고 CO2 배양기 (incubator)에서 4시간 동안 배양한 후, 450nm (420~480nm) 파장에서 흡광도를 측정하여 증식률을 확인하였다.

[0100] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 아무 물질도 처리하지 않은 중간엽 줄기세포에 비하여, 줄기세포 전처리 물질 [Lanifibranor]을 전처리한 중간엽 줄기세포의 세포 증식률이 1에서 1.81으로 약 181% 증가하였다.

[0102] **1-2. Lanifibranor 처리에 따른 줄기세포의 줄기세포능 (Stemness) 증가**

[0103] 10mL 배양배지[high glucose DMEM(Gibco, Cat no.11995-065), 10% Fetal bovine Serum (HyClone), 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (Gibco, Cat no.11140-050)]가 포함된 100mm 세포배양 디쉬 (dish)에 중간엽 줄기세포 및 상기 실시예의 Lanifibranor이 전처리 된 중간엽 줄기세포를 각각 디쉬당 1000 세포씩 접종하고 21일 동안 배양하였다. 배양된 세포가 부착된 디쉬를 PBS로 2회 세척하고 상온에서 약 2분간 95% 메탄올로 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 3회 세척한 후, 0.5% 크리스탈 바이올렛 용액 [crystal violet (sigma, C-3886, USA) 5g, 메탄올 100ml]을 첨가한 후 5분 동안 염색하고 물로 세척 후 실온에서 건조하였다. 각 디쉬에서 50개 이상의 세포로 구성된 콜로니의 수를 계수하여 비교하였다.

[0104] 도 2a 및 2b에서 확인할 수 있듯이, 아무 물질도 처리하지 않은 중간엽 줄기세포 (40개)에 비하여, 줄기세포 전처리 물질[Lanifibranor]을 전처리한 중간엽 줄기세포의 세포 (56.7개)의 CFU-F 콜로니 수가 약 142% 증가하였다.

[0106] **실험예 2. Lanifibranor 처리에 따른 엑소좀 생산 효율 증가**

[0107] **2-1. Lanifibranor 처리에 따른 엑소좀 수 증가**

[0108] 나노파티클 트래킹 어세이 (NanoSight NS300, Malvern)를 통하여, 상기 실시예에서 분리된 엑소좀 수를 확인하였다. 이때, 비교를 위하여, 아무 전처리 물질도 처리하지 않은 것을 제외하고 실시예와 동일한 방법으로 분리된 엑소좀의 수를 확인하였다. 결과를 하기 표 1, 도 3 및 도 4에 나타내었다.

**표 1**

[0109]	Yield(per 10 <sup>6</sup> Cells)	MSC-Exo	Lani-MSC-Exo
	No. of exosome particles(10 <sup>9</sup> )	2.30	11.4

[0110] (MSC: 미처리 중간엽 줄기세포, Lani-MSC-Exo: Lanifibranor-처리 중간엽 줄기세포)

[0111] 상기 표 1 및 도 4에서 확인할 수 있듯이, 아무 물질도 처리하지 않은 중간엽 줄기세포에 비하여, 줄기세포 전처리 물질(Lanifibranor)을 전처리한 중간엽 줄기세포에서 약 4.95배 많은 수의 엑소좀이 생산되었다.

[0112] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 상기 줄기세포 전처리 물질을 중간엽 줄기세포에 처리시, 중간엽 줄기세포가 생산하는 엑소좀의 수가 증가함을 알 수 있다.

[0114] **2-2. Lanifibranor 처리에 따른 엑소좀 유래 단백질 양 증가**

[0115] 엑소좀 단백질 분리 키트 (Total exosome RNA and protein isolation kit, Invitrogen)를 이용하여 상기 실시예에서 분리된 엑소좀으로부터 단백질을 분리하고, 브래드포드 분석 (bradford analysis)을 통하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 이때, 비교를 위하여, 아무 전처리 물질도 처리하지 않은 것을 제외하고 실시예와 동일한 방법으로 분리된 엑소좀으로부터 단백질을 분리하여 정량하였다. 결과를 하기 표 2 및 도 5에 나타내었다.

**표 2**

[0116]	Yield(per 10 <sup>6</sup> Cells)	MSC-Exo	Lani-MSC-Exo
	Exosomal protein(ug)	2.0	9.2

[0117] (MSC: 미처리 중간엽 줄기세포, Lani-MSC-Exo: Lanifibranor-처리 중간엽 줄기세포)

[0118] 상기 표 2 및 도 5에서 확인할 수 있듯이, 아무 물질도 처리하지 않은 중간엽 줄기세포에 비하여, 줄기세포 전처리 물질(Lanifibranor)을 전처리한 중간엽 줄기세포에서 약 4.6배 많은 양의 엑소좀 유래 단백질이 생산되었

다.

[0119] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 상기 줄기세포 전처리 물질을 중간엽 줄기세포에 처리시, 엑소좀의 수뿐만 아니라 엑소좀 유래 단백질 (exosomal protein)의 함량 또한 증가함을 알 수 있다.

[0121] **2-3. Lanifibranor 처리에 따른 엑소좀 유래 RNA 양 증가**

[0122] RNA 분리용 키트 (Total exosome RNA and protein isolation kit, Invitrogen)를 이용하여 상기 실시예에서 분리된 엑소좀으로부터 전체 엑소좀 RNA를 분리하고, 나노드롭 (nanodrop)을 이용하여 RNA의 농도를 측정하였다. 이때, 비교를 위하여, 아무 전처리 물질도 처리하지 않은 것을 제외하고 실시예와 동일한 방법으로 분리된 엑소좀으로부터 전체 엑소좀 RNA를 분리하여 농도를 측정하였다. 결과를 하기 표 3 및 도 6에 나타내었다.

**표 3**

[0123]	Yield(per 10 <sup>6</sup> Cells)	MSC-Exo	Lani-MSC-Exo
	Exosomal RNA(ng)	27.00	110.34

[0124] (MSC: 미처리 중간엽 줄기세포, Lani-MSC-Exo: Lanifibranor-처리 중간엽 줄기세포)

[0125] 상기 표 3 및 도 6에서 확인할 수 있듯이, 아무 물질도 처리하지 않은 중간엽 줄기세포에 비하여, 줄기세포 전처리 물질(Lanifibranor)을 전처리한 중간엽 줄기세포에서 약 4.1배 많은 양의 엑소좀 유래 RNA가 생산되었다.

[0126] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 상기 줄기세포 전처리 물질을 중간엽 줄기세포에 처리시, 엑소좀의 수뿐만 아니라 엑소좀 유래 RNA (exosomal RNA)의 함량 또한 증가함을 알 수 있다.

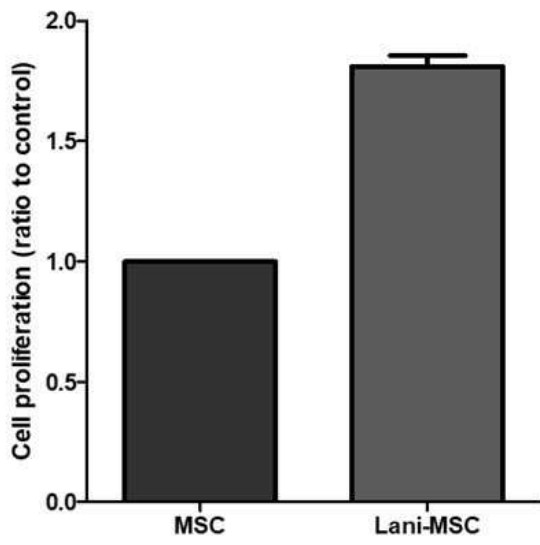
[0128] **소결**

[0129] 본 발명에 따른 줄기세포 전처리 물질 (Lanifibranor)을 중간엽 줄기세포에 처리시 줄기세포의 줄기세포능 (Stemness)이 증가함을 알 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 줄기세포 전처리 물질 (Lanifibranor)을 중간엽 줄기세포에 처리시 엑소좀의 수뿐만 아니라 엑소좀 유래 단백질 (exosomal protein)의 생산량 또한 증가하며, 엑소좀 유래 RNA (exosomal RNA)의 함량도 증가함을 알 수 있다.

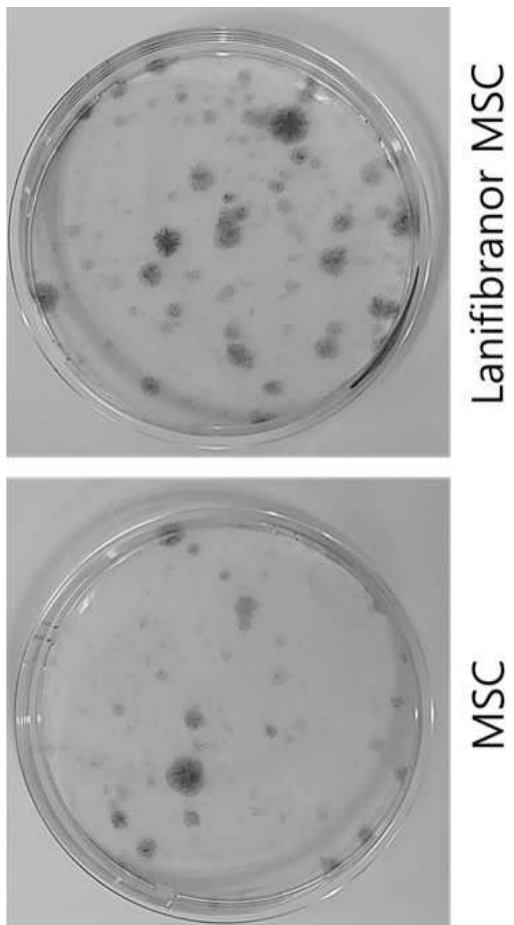
[0130] 따라서, 본 발명에 따른 줄기세포 전처리 물질 (Lanifibranor)은 줄기세포의 줄기세포능을 증가시킬 뿐만 아니라, 줄기세포 유래 엑소좀 생성을 촉진시키므로, 우수한 기능성을 가진 줄기세포의 생산 및 엑소좀의 대량 생산 용도로의 사용이 기대된다.

도면

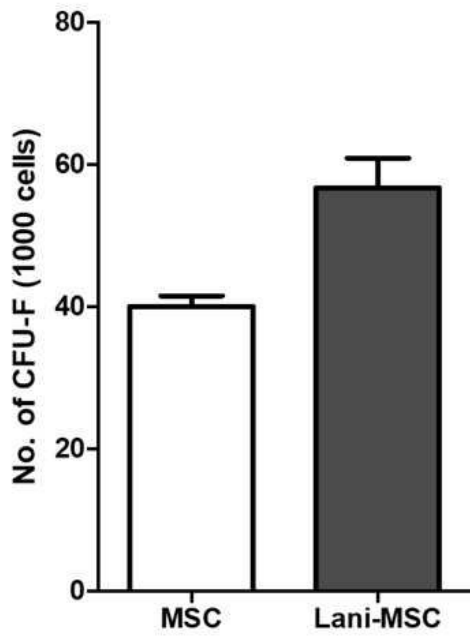
도면1



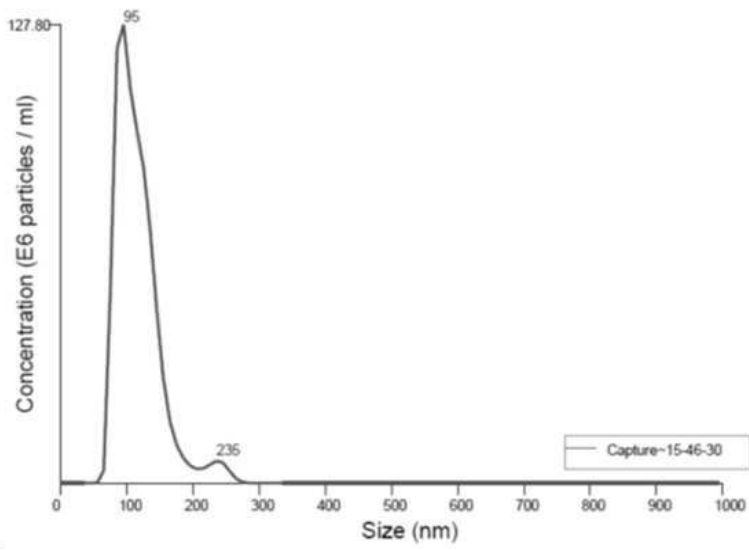
도면2a



도면2b

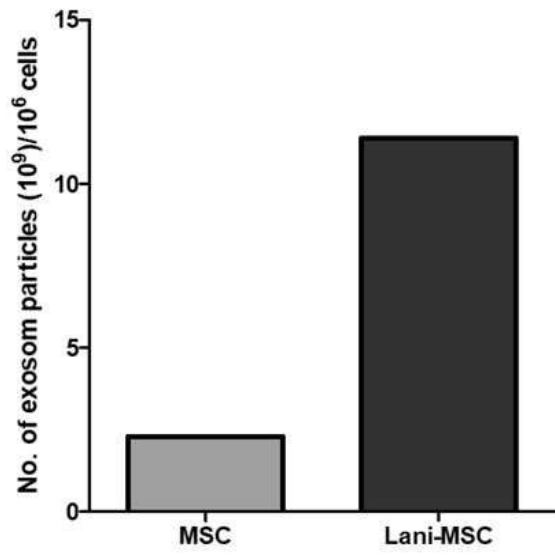


도면3

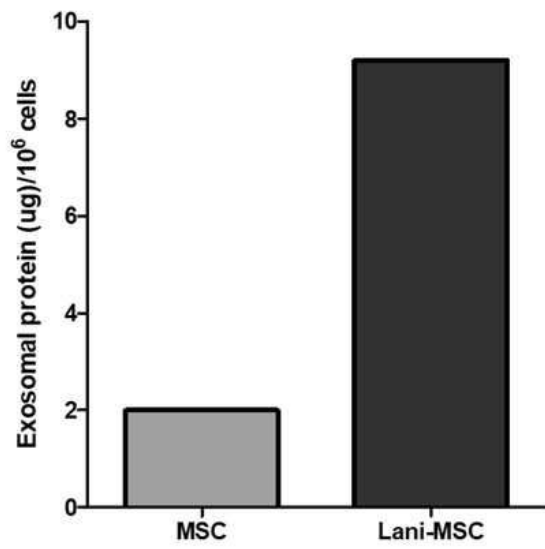




도면4



도면5



도면6

