

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0117845

(43) 공개일자 2022년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 9/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0019774

(22) 출원일자 2022년02월15일

심사청구일자 2022년02월15일

(30) 우선권주장

1020210021175 2021년02월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

최종일

서울특별시 서초구 신반포로 270(반포동, 반포자이아파트)

한기훈

서울특별시 서초구 신반포로33길 66, 101동 1107호(잠원동, 신반포청구아파트)

(74) 대리인

특허법인 무한

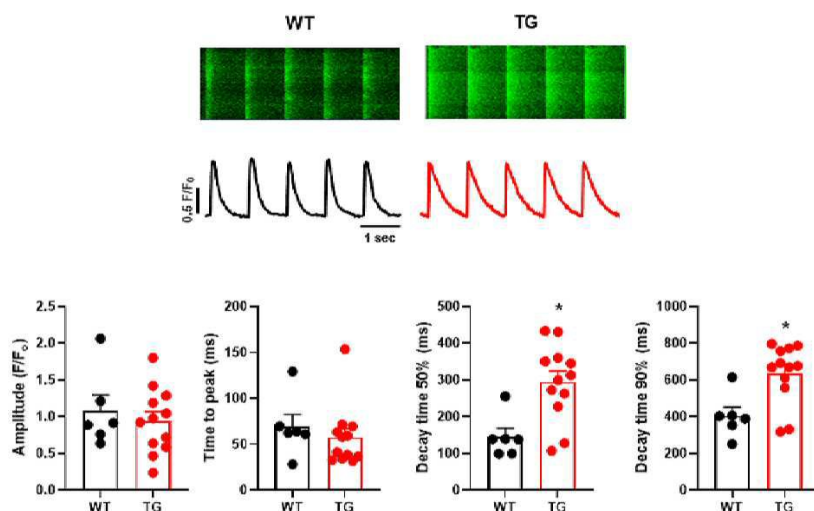
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 SHANK3 과발현 억제 물질을 포함하는 심장 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따르면, SHANK3의 과발현을 억제할 수 있는 물질을 유효성분으로 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 스크리닝 방법이 제공되며, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 L-type Ca^{2+} 채널(LTCC)의 Ca^{2+} 을 조절하거나 심장 섬유화를 감소시켜, 돌연 심장사 등의 심장 질환을 예방하거나 치료 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61P 9/06 (2018.01)

G01N 33/5061 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질을 유효성분으로 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SHANK3 는 심장에서 Ca^{2+} 사이클을 조절하는 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질은 L-type Ca^{2+} 채널(LTCC)의 Ca^{2+} 을 조절하는 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 심장 질환은 심장 섬유화, 심장 기능 저하, 심전도 이상 및 부정맥으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 심장 질환은 뇌전증 환자로부터 발생하는 질환인 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질은, 심장 세포 내에서의 칼슘 이온의 양을 감소시키고, 세포 내 칼슘 이온의 유입을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질은, Cav1.2 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제 및 방부제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상 및 제1항에 기재된 약학적 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 제제.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제제는 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 제제.

청구항 10

- (1) SHANK3가 과발현된 세포를 준비하는 단계;
- (2) 상기 세포에 시험물질을 처리하는 단계;
- (3) 상기 시험물질이 처리된 세포와, 처리되지 않은 SHANK3과발현 세포에서 하기 (a) 내지 (c) 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- (a) 세포의 SHANK3 발현 수준
- (b) 세포 내의 칼슘 이온의 양
- (c) 세포의 CaV1.2 의 발현 수준
- (4) 상기 시험물질이 처리된 세포가 시험물질을 처리하지 않은 세포보다 SHANK3의 발현 수준이 감소되거나, 세포 내의 칼슘 이온 양이 증가하거나, CaV1.2 의 발현 수준이 감소하는 경우 상기 시험물질을 심장 질환의 예방 또는 치료 약물 후보물질로 선정하는 단계;를 포함하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 심장 질환은 심장 섬유화, 심장 기능 저하, 심전도 이상 및 부정맥으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 심장 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 스크리닝 방법에 관한 것이며, 보다 상세하게는 돌연사 유발 뇌-신경계 단백질인 SHANK3의 과발현을 억제하여 칼슘 이온 채널 조절 기반 부정맥 치료용 약학적 조성물 및 스크리닝 방법을 제공하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 마스터 스캐폴드(master scaffold) 단백질인 SHANK3 는 glutamatergic 시냅스의 후시냅스 치밀질(post-synaptic density)에 위치하며, 시냅스 발달 및 기능에 중요한 역할을 한다. SHANK3 는 Ca_v1.3 포함한 여러 신호 단백질과 관련된 다양한 상호 작용 도메인을 포함한다. SHANK3 의 결실, 복제, 점 돌연변이는 자폐 스펙트럼 장애(ASDs), 조울증, 지적 장애 및 정신 분열증을 포함한 많은 질병을 유발한다. 흥미롭게도, 이전까지의 연구에서는 과발현된 SHANK3 마우스가 5주 출생 후 긴장 간대 발작과 비정상적인 일주기 리듬을 동반한 돌연사를 포함한 다양한 병리학적 증상을 나타내었다. 심장 돌연사는 짧은 시간 내에 예상치 못한 자연사를 의미하며 심장 부정맥은 돌연사의 가장 흔한 원인이다. 악성 심장 부정맥이 발생하면 심장 기능이 비정상적이며 뇌와 같은 중요한 기관에 혈액 공급이 부족해지고, 부정맥이 5분 이상 지속되면 환자에게 치명적일 수 있다.

[0004] 돌연사 및 부정맥은 이온 채널 돌연변이와 관련이 있다. 특히, 이온 채널 중 L-type Ca²⁺ 채널(LTCC)은 막 탈분극에 반응하여 칼슘 이온이 흥분성 세포로 유입되는 주요 경로이다. 심장에서 LTCC 는 4개의 서브유닛($\alpha 1$, β , $\alpha 2\beta$ 및 γ 서브유닛)으로 구성된 다중 서브유닛 단백질 복합체이며 LTCC의 돌연변이는 심장 부정맥을 유발하여 돌연 심장사(Sudden Cardiac Death; SCD) 를 유발한다.

[0005] 지금까지의 연구에서는 SHANK3 는 C- 말단 PDZ 도메인을 통해 Ca_v1.3 과 상호 작용하며 D2 도파민성 및 M1 무스카린 수용체에 의해 선조체 중간 가지 뉴런에서 LTCC 전류의 G- 단백질 억제를 매개하여 SHANK3 가 LTCC 를 매개하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 심장에서 LTCC 와 관련된 SHANK3 의 정확한 분자 메커니즘은 조사된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) 1. David R. Grubb, Peter Iliades, Nicola Cooley, Yen Lin Yu, Jieting Luo, Theresa M. Filtz, and Elizabeth A. Woodcock. Phospholipase C β 1b associates with a Shank3 complex at the cardiac sarcolemma. FASEB J. 25, 1040-1047 (2011).
- (비특허문헌 0002) 2. David R. Grubb, Jieting Luo, Elizabeth A. Woodcock. Phospholipase C β 1b directly binds the SH3 domain of Shank3 for targeting and activation in cardiomyocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 461 (2015) 519-524.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 SHANK3 과발현 마우스 모델에서 돌연 심장사(SCD)와 관련된 LTCC 의 조정(modulation)을 통해 SHANK3 가 심장 기능을 조절하는지 여부를 연구하였으며, 그 결과, 돌연사 유발 뇌-신경계 단백질인 SHANK3 의 과발현을 억제하여 칼슘 이온 채널 조절 기반 부정맥 치료에 사용될 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 본 발명의 일 목적은 SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질을 유효성분으로 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 SHANK3 가 과발현된 세포를 시험물질과 접촉시키는 단계;
- [0011] 상기 시험물질과 접촉된 SHANK3 가 과발현된 세포의 발현을 결정하는 단계; 및
- [0012] 상기 시험물질과 접촉된 세포의 SHANK3 발현 수준을, 시험물질이 접촉되지 않은 과발현된 세포의 SHANK3 발현 수준과 비교하여,
- [0013] 상기 접촉된 세포에서의 SHANK3 의 발현은 감소하며, 세포 내에서의 칼슘 이온의 양이 증가하는 경우, 이를 심장 질환의 예방 또는 치료용 후보물질로 선별하는 단계;를 포함하는, 심장 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질을 유효성분으로 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0017] 본 발명에서 'SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질'이란 SHANK3을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 뉴클레오티드(antisense nucleotide), miRNA, siRNA 또는 shRNA 이거나 SHANK3 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드(peptide), 압타머(aptamer), 펩타머(peptamer), 또는 화합물일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 SHANK3는 심장에서 칼슘 이온 사이클을 조절하는 것으로서, 상기 'SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질'은 심장세포에서 L-type Ca $^{2+}$ 채널(LTCC)의 Ca $^{2+}$ 의 유입을 조절하여 심장 질환의 예방 또는 치료에 적용될 수 있으며, 보다 구체적으로 심장 세포 내에서 휴지기 칼슘 이온의 양을 감소시키고, 세포 내 칼슘 이온의 유입을 증가시킴으로서 심장 질환의 예방 또는 치료 용도로 제공될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 심장 질환이란 심장 섬유화, 심장 기능 저하, 심전도 이상 및 부정맥으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환일 수 있으며, 특히 뇌전증 환자로부터 발생하는 심장질환일 수 있다.
- [0020] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 뇌전증 환자를 대상으로 심장 질환의 예방 또는 치료 용도일 수 있다.

- [0021] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제 및/또는 방부제를 포함하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제의 제형의 제제로 제공될 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 하기 (1) 내지 (4) 단계를 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0023] (1) SHANK3가 과발현된 세포를 준비하는 단계;
- [0024] (2) 상기 세포에 시험물질을 처리하는 단계;
- [0025] (3) 상기 시험물질이 처리된 세포와, 처리되지 않은 SHANK3과발현 세포에서 하기 (a) 내지 (c) 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- [0026] (a) 세포의 SHANK3 발현 수준
- [0027] (b) 세포 내의 칼슘 이온의 양
- [0028] (c) 세포의 CaV1.2 의 발현 수준
- [0029] (4) 상기 시험물질이 처리된 세포가 시험물질을 처리하지 않은 세포보다 SHANK3의 발현 수준이 감소되거나, 세포 내의 칼슘 이온 양이 증가하거나, CaV1.2 의 발현 수준이 감소하는 경우 상기 시험물질을 심장 질환의 예방 또는 치료 약물 후보물질로 선정하는 단계.
- [0030] 한편, 상기 방법으로 스크리닝된 후보물질은 뇌정증 환자를 대상으로 심장질환의 예방 또는 치료 약물일 수 있다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명의 SHANK3 의 과발현 억제 물질을 포함하는 심장 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 L-type Ca^{2+} 채널(LTCC) 의 Ca^{2+} 을 조절하거나 심장 섬유화를 감소시켜, 돌연 심장사 등의 심장 질환을 근본적으로 예방하거나 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0034] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1 은 SHANK3 과발현이 마우스의 생존율에 미치는 영향을 나타내는 실험 결과에 대한 도면이다.
- 도 2 는 SHANK3 과발현이, 상승된 J 웨이브(J wave)와 함께 서맥을 유도하여, 사망 전에 높은 수준의 방실 차단(AV block)으로 이어지는 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 3 은 SHANK3 가 과발현된 마우스에서 서맥의 진행이 J 웨이브를 높이는 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 4 는 SHANK3 과발현 유전자 이식(TG) 마우스에서 심실 부정맥이 악화되는 것을 나타낸 도면이다.
- 도 5 는 SHANK3 과발현이 심장 전기 생리학적 기능 장애를 나타내는 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 6 은 SHANK3 과발현이 심장 수축 감소를 일으키는 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 7 은 SHANK3 과발현이 위축(atrophy)을 나타내는 도면에 관한 것이다.
- 도 8 은 SHANK3 과발현이 심장 섬유증을 야기하는 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 9 는 SHANK3 과발현에 따른 변화된 세포 내 Ca^{2+} 농도를 나타내는 도면이다.
- 도 10 은 SHANK3 과발현이 L-type 칼슘 채널(LTCC)의 전류를 상승시키는 결과를 나타낸 도면이다.

도 11 은 SHANK3 과발현이 Ca^{2+} 의 흐름을 상승시키는 결과를 나타낸 도면이다.

도 12 는 SHANK3 가 심장에 미치는 영향을 나타낸 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0038] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0039] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0040] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 따르면, SHANK3 의 과발현을 억제할 수 있는 물질을 유효성분으로 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0043] 본 명세서에서 사용된 용어, "예방" 이란 조성물의 투여로 심장 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료" 란 조성물의 투여로 심장 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0044] 상기 SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3) 는 기존에 뇌전증 조절 단백질로 알려져 있으며, 뇌전증 환자의 경우 돌연사를 일으키는 경우가 종종 발생하였으나, SHANK3와 심장 기능, 부정맥 또는 돌연사와의 연관성에 대해서는 알려진 바가 없었다. 이에 본 발명 및 하기 실험에서는, 상기 SHANK3 가 심장에서 Ca^{2+} 사이클에 영향을 미치는 것을 확인하였으며, 특히, SHANK3 의 과발현은 심장 세포 내 L-type Ca^{2+} 채널(LTCC), $Ca_v1.2$ 의 발현을 증가시키고, 세포 내 Ca^{2+} 의 양을 감소시키는 현상을 확인하였는바, SHANK3 의 발현 조절을 통해 Ca^{2+} 등의 양을 조절함으로써, 심장 질환의 예방 또는 치료용으로 활용할 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 심장 질환은 심장 섬유화, 심장 기능 저하, 심전도 이상 및 부정맥으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 부정맥에 해당할 수 있다.
- [0046] 상기 SHANK3 가 뇌전증 조절 단백질이라는 점에서, 상기 심장 질환은 뇌전증 환자로부터 발생하는 질환에 해당할 수 있다.
- [0048] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따라 제공되는 약학적 조성물이 제제(약제)로 이용되기 위해서, 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제, 방부제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성성분 외에 서방성 목적으로 사용되는 기제를 포함하여 활성성분의 방출이 천천히 일어나도록 서방형 제제로 제조될 수 있다.
- [0049] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다.

경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 캡티드 제제에 대한 경구 투여용으로 사용되는 다양한 약물 전달 물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 팜콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 텍스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있으며, 예를 들어 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여 방법으로는 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화될 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 요법에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 이는 제제화 방법, 투여경로 치료 횟수 뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 증상, 투여시간 및 방법 등 다양한 요인들을 고려하여 결정될 수 있다. 이러한 점을 고려할 때, 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 있어 특별히 제한되지 아니한다.

[0058] 한편, 본 발명의 또 다른 측면에 따라, SHANK3 가 과발현된 세포를 시험물질과 접촉시키는 단계; 상기 시험물질과 접촉된 SHANK3 가 과발현된 세포의 발현을 결정하는 단계; 및 상기 시험물질과 접촉된 세포의 발현을, 시험물질이 접촉되지 않은 과발현된 세포의 발현과 비교하여, 상기 접촉된 세포에서의 SHANK3 의 발현은 감소하며, 세포 내에서의 칼슘 이온의 양이 증가하고, $Ca_v1.2$ 의 발현 수준이 감소하는 경우, 이를 후보물질로 선별하는 단계; 를 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0059] 상기 심장 질환은 심장 섬유화, 심장 기능 저하, 심전도 이상 및 부정맥으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 부정맥에 해당할 수 있다.

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] <실험 방법 및 결과>

[0064] 1 : 동물 모델 및 SHANK3 의 과발현 확인

[0065] SHANK3 과발현 유전자 이식(TG) 마우스는 고려대학교 의과대학으로부터 제공받았으며, 야생형(wild-type; WT) 마우스를 대조군으로 사용하였다. 상기 마우스들은 18℃- 25℃에서 12시간 명암 사이클(light는 오전 8시부터 오후 8시까지)을 갖는 표준화된 조건 하에서, 먹이와 물을 자유롭게 이용할 수 있는, 특정 병원체가 존재하지 않는(SPF) 고려대학교 의과대학 동물 시설에 보관되었다. 모든 실험 절차들은 대한민국 실험 동물의 관리 및 사용에 관한 지침에 따라 수행되었으며, 고려대학교 의과대학 동물 연구위원회의 승인을 받았다.

[0066] SHANK3 의 과발현을 확인하기 위하여, primer(Forward: 5'TGGTTGGCAAGAGATCCAT3', Reverse: 5'TTGCCCCATAGAACAAAAG3)를 사용하여 지노타이핑(genotyping) PCR 을 수행하였다.

[0068] 2 : 면역블러팅법(Immunoblotting)

[0069] 심장 조직을 절개하고 프로테아제 억제제와 포스파타제 억제제 각테일을 첨가한 저온 용해 완충액(NP-40(a Nonidet P-40 buffer))에서 균질화한 후, 용해물을 초음파 처리하고 간헐적인 와류로 얼음에서 5 ~ 15분 동안 배양하였다. 그 후, 상기 용해물을 4℃에서 25분 동안 14,000 rpm 의 속도로 원심 분리하였다. 상청액을 오토 클레이브 e-튜브로 옮기고, 총 단백질을 Bradford 단백질 분석으로 정량화하였다. 그런 다음 단백질을 아크릴아 미드 겔 전기영동으로 크기 분리하고, 셀룰로오스 블로팅 막 상에 옮긴 후, TBS-T 에서 5% 탈지유로 차단하고, rabbit anti-SHANK3 항체, 대조군으로 토끼 anti-beta actin 항체를 조사하였다. ECL(enhanced chemiluminescence) 용액으로 검출하기 위해, horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 이차 anti-rabbit goat 항체를 사용하였다. Blots 의 검출 및 분석은 Chemidoc 및 ImageJ 소프트웨어로 수행하였다.

[0071] 3 : 심장 초음파 검사(Echocardiography)

[0072] 100% 산소(흡입 마취)에서 2% 이소플루란을 사용하여 마우스를 마취시켰다. VIVID 7 Dimension System(General Electric-Bingmed Ultrasound)을 사용하여 심장 초음파 연구를 수행하였다. 10S 변환기(5.5 - 12 MHz)를 사용하여 높은 공간 및 시간 해상도로 이미지를 얻었다. 변환기는 흉벽에 직접 배치하였으며, 완전한 2차원 M-모드 심장 초음파도를 얻었다. American Society of Echocardiography 의 표준을 준수하였으며, 하기의 데이터가 기록되었다:

[0073] 이완기 및 수축기의 좌심실(LV) 내부 치수(각각 LVEDd 및 LVESd), 이완기 및 수축기에서의 LV 부피(LVEDV 및 LVESV), 구출분획(EF), 및 LV 단축분획률(FS).

[0075] 4 : 염색 및 분석

[0076] 생후 9 ~ 10 개월된 마우스의 심장을 분리하여 4% 파라포름알데히드(Biosesang)에 보관하고 파라핀에 묻힌 후 연속적으로 절편하였다. 절편은 H&E 염색 용액, Mason-Trichrome(MT) 염색으로 염색하고, 광학 현미경으로 평가 하였다. 샘플의 검출 및 분석은 슬라이드 스캐너(Zeiss) 및 ImageJ 소프트웨어로 수행하였다.

[0078] 5 : 심전도 및 원격 측정(ECG and Telemetry)

[0079] 4개의 25 게이지 피하 limb 전극을 사용하여 심전도(ECG)를 기록하였다. 9주 및 10주경에, Avertin(2,2,2-Tribromoethanol)(Sigma-Aldrich)로 마취된 마우스에서 심전도를 기록하였다. 10주에 Avertin(12 μ l/g)으로 복강내 마취를 하였다.

[0080] 원격 측정 실험은 확립된 프로토콜로 수행되었다. 심전도 데이터는 Lab Chart Pro 소프트웨어(AD Instrumnets)에 의해 기록되고 분석되었으며, 하기의 데이터가 기록되었다:

[0081] 심박수(HR), RR 간격, 및 QT 간격, 및 QT 간격(QTc)은 Bazett's formula ($QTc=QT/(RR/100)^{1/2}$)에 따른 RR 간격을 위해 수정되었다.

[0083] 6 : 심근 세포 분리(Cardiomyocyte Isolation)

[0084] 마우스를 10주에 Avertin($12\mu\text{l/g}$)(Sigma-Aldrich)으로 복강 내 마취하고 심장을 Ca^{2+} 가 없는 Normal Tyrode(NT) 용액[(NaCl:143 mmol/L, KCl:5.4 mmol/L, NaH_2PO_4 :0.33 mmol/L, MgCl_2 :0.5 mmol/L, glucose:5.5 mmol/L, 및 HEPES:5 mmol/L)(pH 7.4 with NaOH)]에서 실온에서 20 게이지 니들 상에 대동맥으로 캐놀러를 삽입 하였다. 심장은 Langendorff 장치에서 관류되었고, 처음에는 37°C 에서 5분 30초 동안 Ca^{2+} 가 없는 NT 용액을 사용한 다음, soft해질 때까지(~30분) 150 U/ml type II 콜라게나아제가 보충된 Ca^{2+} 가 없는 NT 용액으로 전환 되었다. 마지막으로, 용액을 KB 용액[(KOH:70 mmol/L, EGTA:0.5 mmol/L, HEPES:10 mmol/L, KCl:50 mmol/L, L-Glutamic Acid:50 mmol/L, MgCl_2 :3 mmol/L, Taurin:20 mmol/L, glucose:20 mmol/L, 및 KH_2PO_4 :20 mmol/L)(pH7.3 with KOH)]으로 바꾸었다. 모든 용액은 95% 산소/5% CO_2 혼합물로 지속적으로 aerated 되었다. Digestion 이후, 심방과 대동맥을 제거하고, 심실 조직을 절제하고, 다진 다음, KB 용액에서 피펫으로 분리하였다. 중력에 의해 세포를 펠렛화하고 세포 현탁액을 버렸다. 이러한 절차를 통해 얻은 단일 세포만을 사용하였다.

[0086] 7 : 전기 생리학(Electrophysiology)

[0087] 전기 생리학 시험은 patch-clamp 기술의 전체 세포 구성을 사용하여 심근 세포에 대해 수행하였다. 챔버의 심근 세포를 도립 현미경에 올린 후, 세포와 용액(5ml/분)으로 지속적으로 superfuse하였다. 실험이 진행되는 동안, 심근 세포는 정상적인 Tyrode 용액[(NaCl:143 mmol/L, KCl:5.4 mmol/L, CaCl_2 :1.8 mmol/L, MgCl_2 :0.5 mmol/L, glucose:5.5 mmol/L, 및 HEPES:5 mmol/L)(pH 7.4 with NaOH)]으로 지속적으로 superfuse하였다. 피펫을 피펫 용액[(CsOH:125 mmol/L, BAPTA:10 mmol/L, aspartic acid:125 mmol/L, MgATP:5 mmol/L, 및 MgCl_2 :5 mmol/L)(pH 7.2 with KCl)]으로 채웠다. Gigaseal 이 형성되고 패치가 파열된 후, Axopatch-700B 패치 클램프 증폭기(Axon Instrumnets, Union City)를 전압 클램핑에 사용하고 L형 Ca^{2+} 전류를 0 mV에서 전압 클램프 단계로 얻었다. 실험 동안, myocytes 는 -40 mV 의 유지 전위에서 전압 클램핑되었다.

[0089] 8 : 세포 내 Ca^{2+} 분석

[0090] 폴리-L-라이신 코팅된 커버슬립에 부착된 분리된 심근 세포에서 세포 내 Ca^{2+} 를 검출하였다. 두 그룹의 KB 용액에서 분리된 세포를 37°C 에서 30분 동안 10mM의 최종 농도에서 Fluo-8AM(Abcam)과 함께 배양하기 전에 PBS로 두 번 세척하였다. 배양 후 세포를 PBS 로 2회 세척하였다. Ca^{2+} 농도를 나타내는 Fluo-8AM의 형광 강도는 LSM-800 공초점 현미경(Zeiss)를 사용하여 검출하였다. Fluo-8AM의 여기 및 방출 파장은 488 nm 및 525 nm 로 설정되었으며, 약 9 개의 세포가 데이터 분석을 위해 무작위로 선택되었으며, Fluo-8AM 의 형광 밀도는 ImageJ 소프트웨어로 계산하였다.

[0092] 9 : 면역 조직 화학(Immunohistochemistry)

[0093] 심장 조직의 단면을 커버 슬립에 배치하고, 커버 슬립이 부착된 조직을 antigen retrieval 로 수행하고 15-20분 동안 4% PFA 로 고정하였다. 고정된 세포를 PBS 로 5분(3회) 세척하고, PBS 함유 3% BSA 로 1시간동안 블로킹하였다(블로킹 완충액(blocking buffer)에 0.3% Triton X-100 을 첨가하였다). 이후 커버 슬립을 데이터 시트의 권장 역가(titer)를 갖는 각 블로킹 완충액에 혼합된 1차 항체($\text{Ca}_v1.2$)와 함께 배양하였다. 그런 다음 커버 슬립을 1X PBS 완충액으로 3회 세척하고, Alexa Fluor 488(Abcam)로 표지된 2차 항체와 함께 배양하였다. 커버 슬립을 1X PBS로 3회 세척하고, 디아미노-2-페닐인돌(DAPI)로 대조 염색한 후, 슬라이드 글라스에 올렸다. 슬라이드 샘플의 관찰은 공초점 현미경을 사용하여 수행하였다. 이미지 분석은 ImageJ 소프트웨어로 수행하였으며, 총 형광 강도를 측정하고 ImageJ 로 분석하였다.

[0095] 10 : 정량 PCR(Quantitative PCR(qPCR))

[0096] $\text{Ca}_v1.2$ mRNA 레벨은 RT-qPCR에 의해 결정되었다. 전체 조직 RNA 분리는 TRizol 시약을 사용하여 수행하였다.

RNA 농도는 ND-1000 NanoDrop 을 사용하여 결정하였다. 1 μ g 의 RNA 를 총 부피 20 μ l의 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)를 사용하여 cDNA로 전환하였다. 역전사 단계는 초기 단계로서 Bio-Rad C1000 Thermal Cycler에서 65℃에서 10분동안 수행하였고, 25℃에서 10분, 이어서 55℃에서 30분 및 85℃에서 5분동안 랜덤 6량체(hexamer)를 사용하여 수행하였다. RT-qPCT 분석은 QPCR green master mix LRox 를 사용하여 CFX 96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System에서 수행하였으며, 초기 단계로 95℃에서 3분 수행하였으며, 95℃에서 30초, 이어서 50℃에서 30초 및 72℃에서 30초동안 Ca_v1.2 프라이머(Cosmogenetech으로부터 구매)를 사용하여 수행하였다. 증폭된 단편의 퀄리티는 용융 곡선 분석 및 아가로스-젤-전기영동을 사용하여 모니터링 하였다. 정량적 값은 PCR 산물에 대한 신호의 증가가 기하 급수적인 시점에서 PCR 정량화 사이클 번호(Cq)로부터 얻었다. 각 샘플의 표적 mRNA abundance는 GAPDH mRNA 레벨로 정규화하였다.

<실험 결과>

실시예 1 : SHANK3 가 과발현된 유전자 이식 마우스의 생존율

지노타이핑(genotyping) 및 면역블로팅(immunoblotting)법을 수행하여 유전자 이식(TG) 마우스가 WT 마우스에 비해 SHANK3 가 과발현되는지 여부를 확인하였다. 도 1A 내지 도 1C에 나타난 바와 같이, 유전자 이식 마우스가 대조군에 비해 더 높은 SHANK3 를 발현하는 것을 확인할 수 있고, 도 1D에 나타난 바와 같이, 유전자 이식 마우스가 10 마리 중 4 마리가 6주가 지났을 때 갑작스럽게 죽는 결과를 낳았다. 이러한 결과는 SHANK3 과발현이 저조한 생존율을 야기하는 것을 나타낸다.(n=10 for genotyping, SHANK3 = 260bp)(n=7 for IB, TG 마우스에서의 상대 발현율:209.77% 상승. P<0.05 vs. WT 마우스)

실시예 2 : 원격 측정 모니터링 결과

돌연사의 메커니즘을 확인하기 위하여, 갑작스런 사망률을 나타내는 6주된 마우스에 대해 원격 측정 및 모니터링을 하였다. 총 5쌍의 마우스를 실험하였으며, 그 결과 3 마리의 유전자 이식(TG) 마우스가 죽었고, 이들을 ECG 데이터 분석하였다. 놀랍게도, 2 마리의 유전자 이식(TG) 마우스는 동일한 ECG 패턴을 나타냈고, 특히, 유전자 이식 마우스는 보통의 ECG 패턴을 보였으나, WT 마우스에 비해 빠른 심박수 및 간헐적 조기 심실 수축(VPC)을 나타내었다. 또한, 돌연사 전 10시간 이내에 가속된 심실 고유 리듬(AIVR) 또는 느린 심실 빈맥(VT)이 관찰되었다. 특히, 유전자 이식 마우스는 P-R 간격이 길어지고 J 웨이브가 증가하여 돌연사 전 약 1시간 만에 심 블록(heart block)으로 이어졌다(도 2, 도 3 및 하기 표 1 참조).(분석 데이터 중 n=3(dead)/n=5)

표 1

	0day		3day	
	WT	TG	WT	TG
Heart rate(BPM)	612.56 ± 32.64	680.13 ± 46.38	693.60 ± 26.55	158.24 ± 5.22
PR interval(ms)	35.90 ± 0.78	34.09 ± 0.46	30.43 ± 0.61	81.40 ± 0.08
QTc(ms)	157.30 ± 12.70	171.40 ± 12.70	136.64 ± 2.31	386.86 ± 80.52
J wave amplitude(mV)	-0.06 ± 0.07	0.16 ± 0.07	-0.03 ± 0.06	0.76 ± 0.00

실시예 3 : SHANK3 과발현에 의한 심장 전기생리학적 기능 장애 유발

원격 심전도 모니터링(telemetry)상 정상 마우스에 비해 SHANK3 과발현 마우스에서 돌연심장마비(sudden cardiac death) 및 심실빈맥(ventricular tachycardia)의 발생이 유의하게 높았다(도 4).

부정맥은 ECG 를 통해 측정되는 비정상적인 QT 간격, 심박수, PR 간격 등에 의해 발생하는 것으로 알려져 있는 바, 심전도를 사용하여 SHANK3 의 과발현이 심전도에 영향을 미치는지 여부를 확인하여 마우스의 돌연사가 부정맥과 관련이 있는지 확인하였다. ECG 의 결과는 TG 마우스에서 심박수(HR)의 통계적으로 유의한 증가를 나타내

었으며, 이는 RR 간격의 감소를 가져왔다. 이에 반해, QTc 간격은 TG 마우스에서 증가하였으며(도 5 참조), 이러한 결과는 SHANK3 과발현이 전기생리학적 기능 장애를 유발함을 나타낸다.

[0110] 실시예 4 : SHANK3 과발현에 의한 심장 수축 감소

[0111] 추가로 SHANK3 과발현된 마우스의 기능적 병리학적 표현형을 더 자세히 연구하기 위해, 심장 초음파를 통해 심장 기능을 분석하였다. 심장 초음파 분석에서 유전자 이식(TG) 마우스 및 WT 마우스는 LVEDd 가 유사하지만, TG 마우스가 LVESd 가 더 컸다. FS(LV fractional shortening) 및 EF(Ejection fraction)와 EDV(LV end diastolic volume) 및 ESV(LV end systolic volume)도 관찰하였으며, 이러한 결과는 대조군 마우스(WT)에 비해 TG 마우스에서 수축력이 감소하고 1회 박동으로 심실에서 구출되는 혈액량이 감소하였음을 나타낸다. 이러한 결과는 SHANK3 과발현이 감소된 심장 수축을 유도한다는 것을 나타낸다(도 6 참조).

[0113] 실시예 5 : SHANK3 과발현 유전자 마우스에서의 심장 위축

[0114] 심장 질환은 구조적, 전기적, 교감적 및 부교감적 리모델링을 수반한다. SHANK3 의 과발현이 심장의 형태학적 특징에 변화를 일으키는지 확인하였다. 생후 9주의 두 마우스의 체중을 측정하고 희생 후 심장 무게를 측정하였다. 또한, 분리된 심장의 단면을 H&E 염색하여 심방, 심실 또는 조직의 크기에 차이가 있는지 확인하였다.

[0115] 그 결과, WT 마우스와 비교하여 TG 마우스의 체중에는 유의한 차이는 없었으나, 심장 중량은 상대적으로 감소하여, 심장 중량/체중 비율이 통계적으로 유의하게 감소하였다(도 7 참조). 신체에 대한 심장의 크기와 관련된 특징 중, 신체 크기에 비해 작은 심장 크기를 갖는 위축(atrophy)과 신체 크기에 비해 큰 심장 크기를 갖는 비대(hypertrophy)와 관련하여, 본 실험의 결과는 TG 마우스에서 위축(atrophy)이 나타났다(도 7A 및 7B 참조). 그러나, H&E 염색 결과를 고려할 때, SHANK3 의 과발현은 심장의 전체 크기를 줄였을 뿐이며 특정 조직 변화나 심방 또는 심실의 크기 차이를 나타내지 않았다(도 7B 참조). 이러한 결과로부터 SHANK3 과발현이 위축(atrophy)을 유도한다는 것을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

[0117] 실시예 6 : SHANK3 과발현 유전자 이식 마우스에서 증가된 심장 섬유증

[0118] 증가된 콜라겐은 부정맥의 원인으로 알려진, 심근 섬유증을 특징으로 한다. 따라서, SHANK3 과발현이 심장 콜라겐 수준을 증가시키는지 여부를 평가하였다. 심장 조직의 콜라겐은 MT 염색으로 식별되며 염색 결과는 ImageJ 프로그램으로 분석하였다(도 8A 및 8B 참조). 또한, 심장조직에서 웨스턴 블롯을 통해 콜라겐의 발현 수준을 분석하였다(도 8C 및 8D 참조). 분석 결과, WT 마우스와 비교하였을 때, 전체, LV(좌심실), 및 RV(우심실) 모두에서 청색 영역/적색 영역의 비율이 TG 마우스에서 증가하였으며, TG 마우스의 심장조직에서 WT 마우스와 비교하여 유의한 콜라겐 수준 증가를 확인할 수 있었다. 이 결과는 SHANK3 과발현이 심장의 섬유증을 유발한다는 것을 나타낸다(심장의 단면은 중 심실(mid ventricle)이다.)

[0120] 실시예 7 : SHANK3 과발현에 의한 세포 내 Ca^{2+} 레벨 감소

[0121] 심장 초음파 검사 결과, 수축력이 감소하여 심장 수축에 중요한 역할을 하는 이온인 칼슘의 양의 변화가 발생하였다. Fluo-8 은 심근 세포의 Ca^{2+} 농도를 조사하기 위해 세포 내 free 칼슘 프로브로 사용하였다. 그 결과, WT 마우스의 Ca^{2+} 레벨은 TG 마우스보다 높은 결과를 나타내었다(도 9 참조). 이러한 결과로부터 SHANK3 과발현이 세포 Ca^{2+} 수준을 감소시킨다는 것을 알 수 있다.

[0123] 실시예 8 : SHANK3 과발현에 의한 LTCC 전류 농도 및 발현 증가

[0124] Ca^{2+} 채널은 심근 세포의 Ca^{2+} 유입에서 중심 역할을 하기 때문에, 세포는 SHANK3 의 과발현이 Cav1.2의 기능 변화를 유도하는지 확인하였다. WT 마우스와 TG 마우스에서 랜덤으로 분리된 심근 세포에서 활동 전위 지속 시간과 $I_{Ca,L}$ 을 측정하였다. 그 결과, SHANK3 의 과발현은 연장된 활동 전위 기간(도 10C) 와 $I_{Ca,L}$ 의 증가를 야기하

었다(도 10C 내지 10E). 이러한 결과는 SHANK3 과발현이 세포 내 Ca^{2+} 유입 증가를 유도함을 나타낸다(패치 클램프에서 WT(n=19 cells of 4 hearts), TG(n=23 cells of 6 hearts)). 이 후, $I_{Ca,L}$ 에서 유의한 차이가 발생하였기 때문에, $Ca_v1.2$ 의 발현 수준이 변화하는지 여부는 중-심실(mid-ventricle)과 qPCR의 단면에서 IHC(Immuno Histo Chemistry)에 의해 확인되었다. 그 결과, WT 마우스에 비해 TG 마우스에서 $Ca_v1.2$ 의 발현 수준이 증가함을 확인하였다(도 10A 및 10B). 이러한 결과는 SHANK3 과발현이 $Ca_v1.2$ 증가를 유도한다는 것을 나타낸다. 한편, Ca^{2+} transient 실험 결과는 SHANK3의 과발현에 의한 $I_{Ca,L}$ 의 증가와 세포내 Ca^{2+} 유입 증가를 뒷받침하였다(도 11).

[0125]

[0126]

상기 실시예들의 결과들은, 본 발명에 있어서, SHANK3의 발현을 억제 및/또는 조절하고, $Ca_v1.2$ 의 발현 수준을 감소시킴으로써 심장 질환 특히, 부정맥의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있음을 시사한다.

[0128]

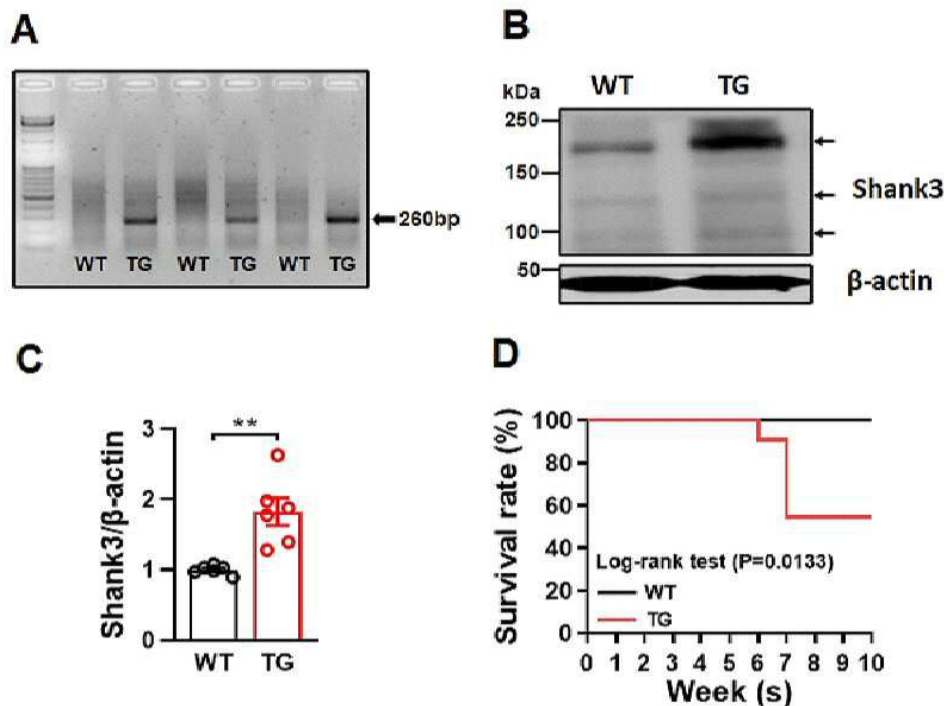
이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0129]

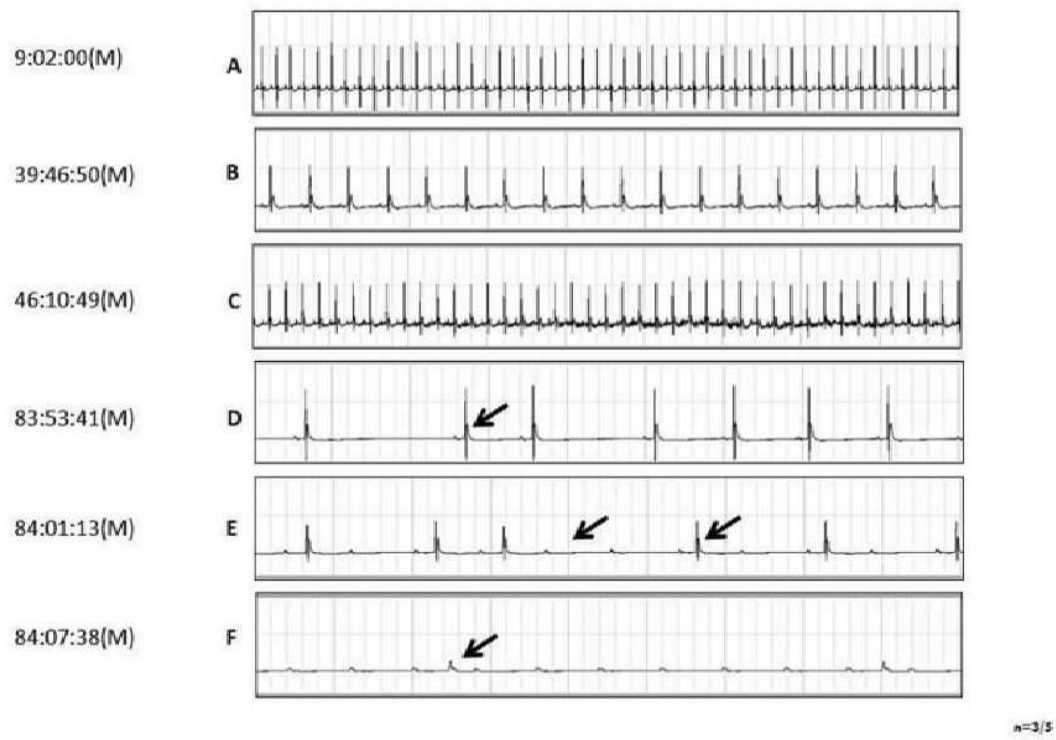
그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

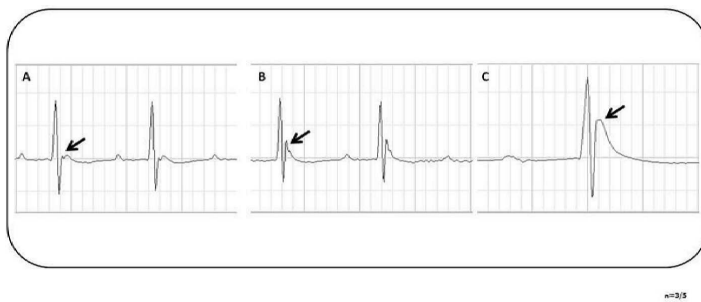
도면1



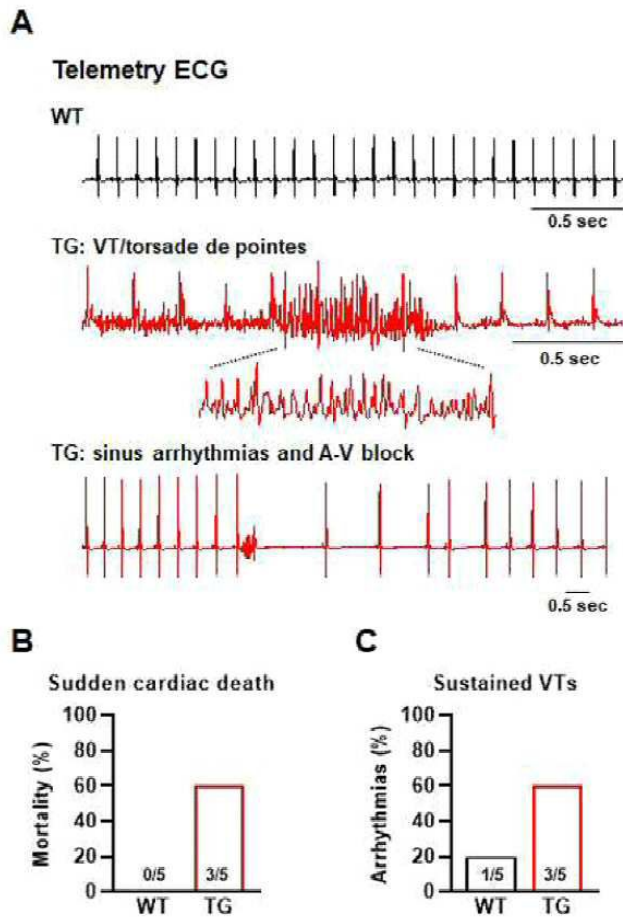
도면2



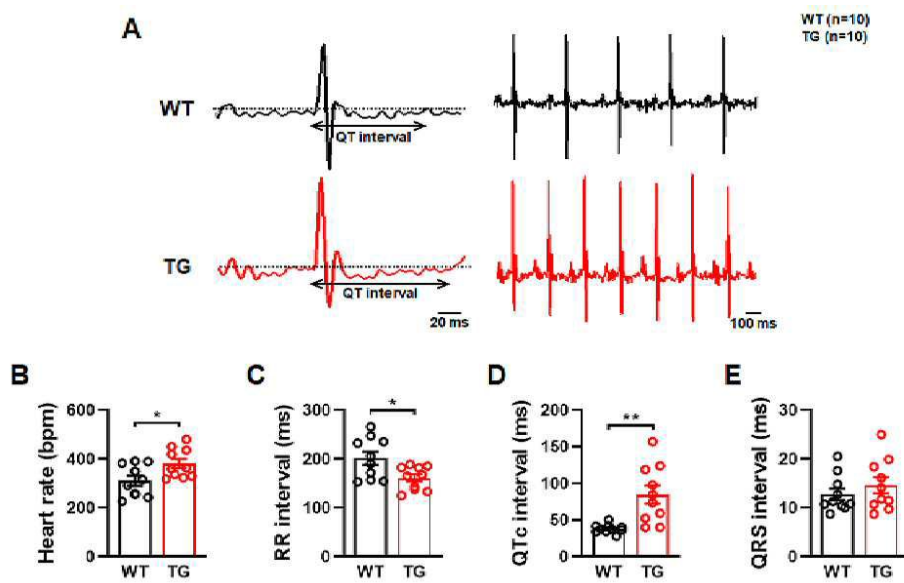
도면3



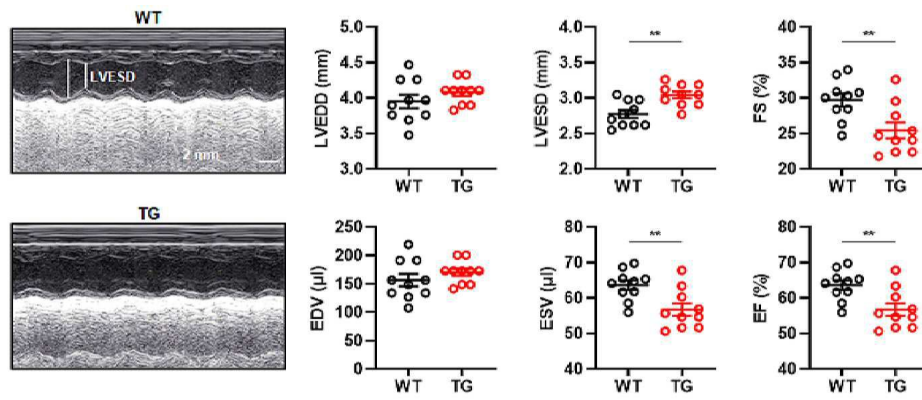
도면4



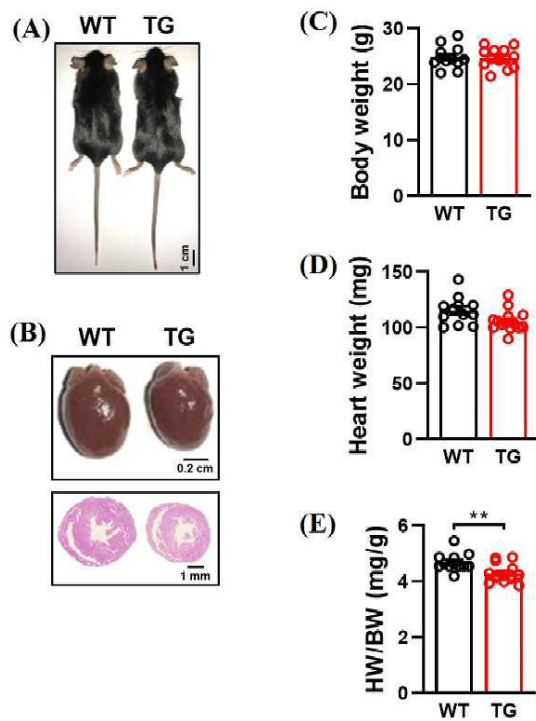
도면5



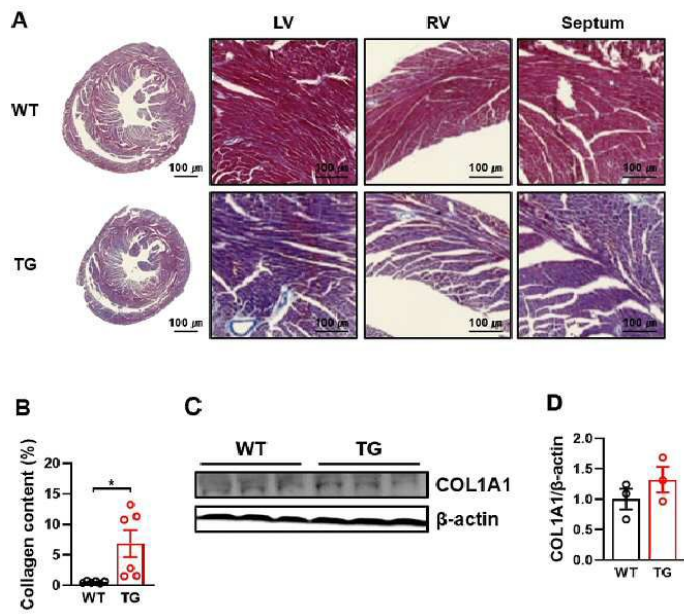
도면6



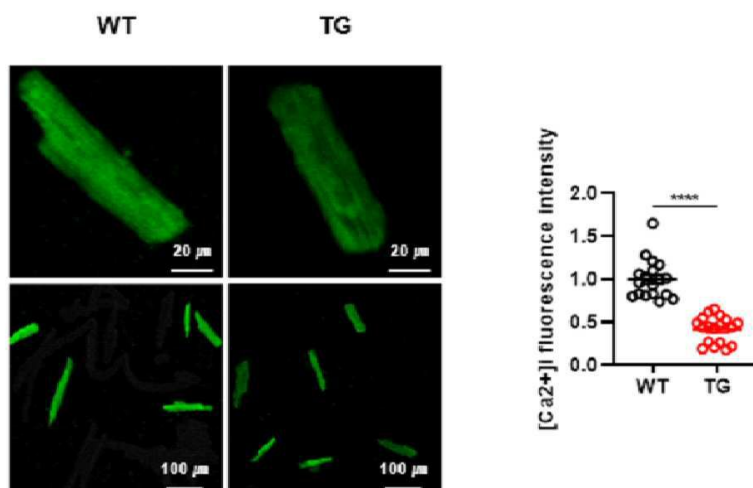
도면7



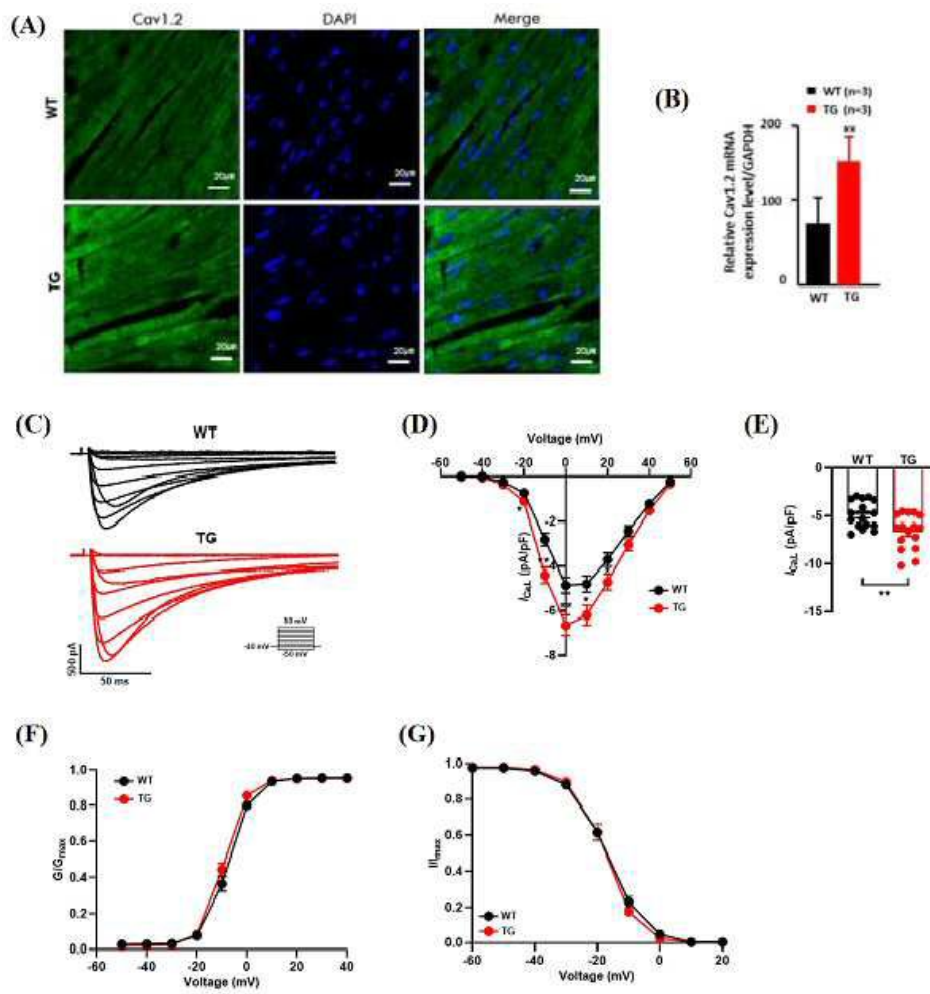
도면8



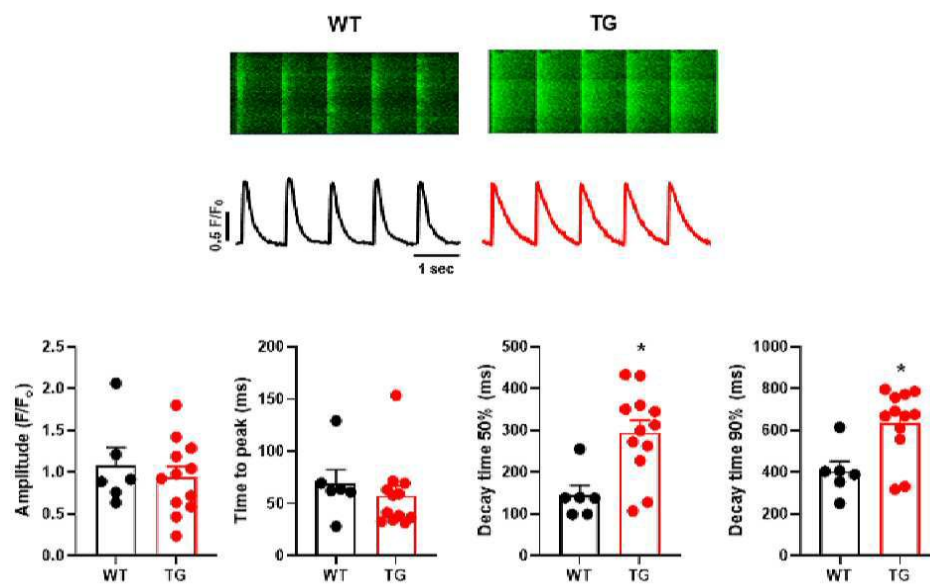
도면9



도면10



도면11



도면12

