

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0046543
(43) 공개일자 2023년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/497 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/497 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0129647
(22) 출원일자 2021년09월30일
심사청구일자 2021년09월30일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김희선
서울특별시 양천구 목동동로 177, 2304호(신정동, 삼성체르빌2)
임예현
경상남도 창원시 마산회원구 회원동28길 8(회원동)
김도연
서울특별시 강서구 곰달래로 116-1, 603호(화곡동)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이스스

전체 청구항 수 : 총 12 항

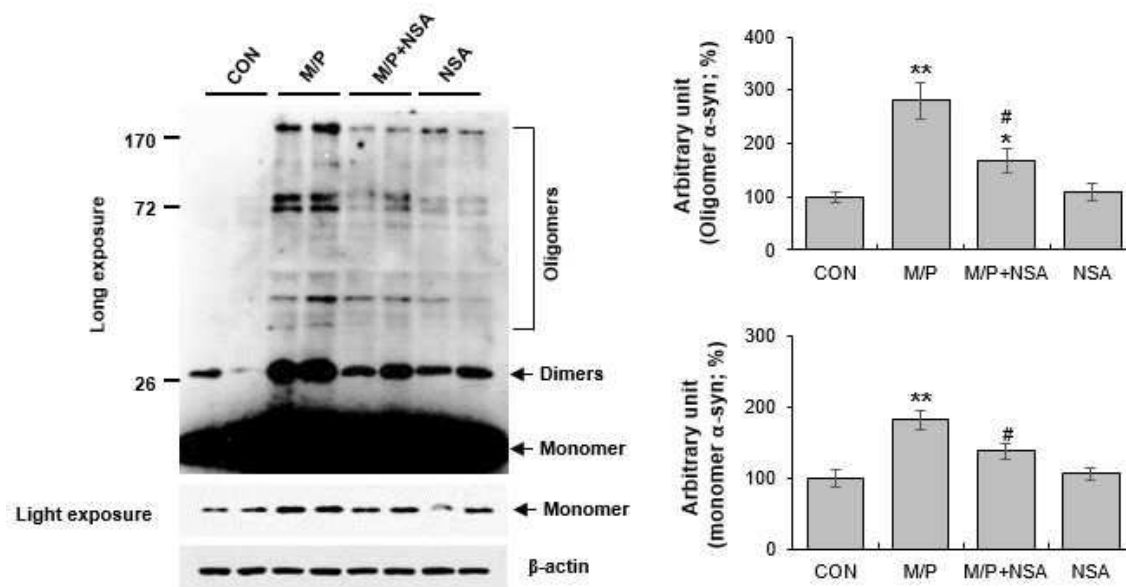
(54) 발명의 명칭 파킨슨병의 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은, 네크로실폰아미드(NSA) 화합물을 함유하는, 파킨슨병 치료용 조성물, 이를 이용한 파킨슨병 치료방법 및 상기 조성물의 파킨슨병 치료 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 네크로실폰아미드(NSA)는, 급성/아급성 파킨슨병 동물모델에서 알파-시뉴클린 응집 억제효과, 신경염증 억제효과, 도파민 신경세포 보호효과, 운동능력 개선효과 등을 나타내었는 바, 급성/아급성 파킨슨병의 예방 또는 치료제로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128000
과제번호	2021R1A2C1006369
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	신경염증 및 파킨슨병 모델에서 네크로토시스 억제제의 치료효과 및 작용기전 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 알파-시뉴클린(α -synuclein)의 발현 및 응집을 억제하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 신경염증 억제효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌 소교세포 활성 억제효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 단백질 응집 억제효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 MLKL(mixed lineage kinase domain-like protein)의 발현 및 응집을 억제하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 MLKL(mixed lineage kinase domain-like protein)의 유비퀴틴화 및 인산화를 억제하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 도파민 신경세포 사멸억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 운동능력 개선효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용가능한 염은, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염, 피리디늄염, 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산 및 아스파르트산으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 11

네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 뇌흑질내 알파-시뉴클린(α -synuclein)의 발현 및 응집 억제용, 약학 조성물.

청구항 12

네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 네크로셀폰아미드(NSA) 화합물을 함유하는, 파킨슨병 치료용 약학 조성물, 이를 이용한 파킨슨병 치료방법 및 상기 조성물의 파킨슨병 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(parkinson's disease; PD)은 알츠하이머 치매와 더불어 대표적인 퇴행성 뇌신경질환의 하나로서, 도파민 호르몬을 분비하는 뇌의 흑질부위 신경세포가 점점 사멸해가면서 발병한다. 도파민은 뇌의 기저핵에 작용하여 우리가 원하는대로 몸을 정교하게 움직일 수 있도록 하는 중요한 신경 전달계 물질인데, 이를 분비하는 신경세포들이 사멸하면서 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 등의 운동성 장애가 생긴다.

[0003] 파킨슨병은 65세 인구에서 약 1% 정도가 발병하며 나이가 들수록 그 발병률이 증가하는 것으로 알려져 있으나, 정확한 원인을 알 수 없는 특발성(idiopathic)인 경우가 대부분이며, 일부 유전적 요인, 환경적 요인이 알려져 있다. 주요 병인으로서는, 중뇌흑질의 도파민 신경세포 사멸, 알파-시뉴클린(α -synuclein) 단백질 응집, 신경염증 등이 있다.

[0004] 현재 초기 파킨슨병의 증상을 완화시키는 약물로는, 레보도파(Levodopa, L-DOPA), 도파민 작용제(agonist), 항콜린 제제, 아만타딘 등이 있으나, 이들 약물은 지속적인 도파민 신경의 손실을 막아내지 못하므로 5-6년 내에는 약물 효과가 급격히 감소하며, 이후에는 이상운동증, 불면, 식욕감소 등의 부작용이 증가한다는 문제가 있다. 따라서, 도파민 세포의 사멸을 막음으로써 파킨슨병을 근본적으로 치료할 수 있는 약물의 개발이 절실한 실정이다.

[0005] 한편, 세포는 외부의 다양한 스트레스로부터 세포를 보호하는 기작을 발달시켰다. 이러한 스트레스는 DNA 손상을 유발할 수 있고, 따라서 세포에 DNA 손상 축적을 방지하기 위해 DNA 합성이 수반되는 세포분열을 계속할지를 결정하는 기작을 가지고 있다. 세포분열이 진행되지 않는 경우 세포는 정해진 프로그램에 따라 네크로토시스(Necroptosis)가 일어나게 되고 조직은 손상될 수 있다.

[0006] 네크로토시스(Necroptosis)란 프로그램화되어 나타나는 세포괴사(programmed necrosis)로서, 세포사멸(apoptosis)과는 달리 케스페이즈(caspase) 활성화 없이 일어나는 세포 죽음이다. 그 원인은 다양할 수 있지만, 네크로토시스가 일어나는 기전으로는, 세포가 외부로부터 죽음의 신호(death signaling)를 인식하면 RIPK1 단백질이 RIPK3 단백질을 활성화 시키고, 활성화된 RIPK3는 이어서 MLKL(mixed lineage kinase domain-like protein) 단백질을 인산화시키고, 인산화된 MLKL은 세포막에서 pore를 형성함으로써 세포를 죽음에 이르게 한다.

[0007] 이때, 네크로셀폰아미드(necrosulfonamide, NSA) 화합물은 네크로토시스의 최종 실행인자인 MLKL의 억제제로서 피부세포 괴사성 질환을 치료할 수 있다고 알려져 있으며(한국특허등록 10-1640068), 최근에는 알츠하이머, 뇌허혈, 척수손상 동물모델에서 신경보호 가능성이 제시되고 있으나, 아직까지 알파-시뉴클린 응집 억제효과, 신경염증 억제효과 등을 통하여 파킨슨병을 치료할 수 있음을 구체적으로 제시한 문헌은 없는 실정이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 NSA 화합물이 파킨슨병의 치료에 유의적인 효과가 있다는 가정하에, 도파민 신경세포의 네크로토시스를 어떻게 조절하는지 연구한 결과, NSA 화합물이 알파-시뉴클린의 발현/올리고머화/응집을 억제하고, 신경염증을 억제하고, MLKL의 발현/올리고머화를 억제하고, MLKL의 유비퀴틴화/인산화를 감소시킴으로서, 도파민 신경세포의 네크로토시스(사멸)를 차단하여 파킨슨병을 근본적으로 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은, 알파-시뉴클린의 응집을 억제하고 신경염증을 억제하여, 도파민 신경세포의 네크로토시스를 차단함으로써 파킨슨병을 근본적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 알파-시뉴클린(α -synuclein)의 발현 및 응집을 억제하는 효과를 가질 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 신경염증 억제효과를 가질 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌 소교세포(microglia) 활성 억제효과를 가질 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 단백질 응집 억제효과를 가질 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 MLKL(mixed lineage kinase domain-like protein)의 발현 및 응집을 억제하는 효과를 가질 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 뇌흑질내 MLKL(mixed lineage kinase domain-like protein)의 유비퀴틴화 및 인산화를 억제하는 효과를 가질 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 도파민 신경세포 사멸억제효과를 가질 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 운동능력 개선효과를 가질 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적으로 허용가능한 염은, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아민늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염, 피리디늄염, 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산 및 아스파르탄산으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 뇌흑질내 알파-시뉴클린(α -synuclein)의 발현 및 응집 억제용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 주입하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은, 상기 약학 조성물의 파킨슨병 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

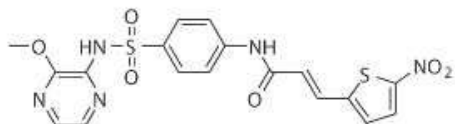
[0024] 본 발명에 따른 네크로셀폰아미드(NSA)는, 급성/아급성 파킨슨병 동물모델에서 알파-시뉴클린 응집 억제효과, 신경염증 억제효과, 도파민 신경세포 보호효과, 운동능력 개선효과 등을 나타내었는 바, 급성/아급성 파킨슨병의 예방 또는 치료제로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 도파민 신경세포 사멸 억제효과를 tyrosine hydroxylase(TH) 면역조직화학염색법으로 확인한 결과이다.
- 도 2는 급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 소교세포 활성화 억제효과를 CD11b (Iba-1) 면역조직화학염색법으로 확인한 결과이다.
- 도 3은 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 행동 개선효과를 rotarod test와 pole test로 확인한 결과로서, 도 3a는 이를 위한 실험설계도이고, 도 3b는 그 정량분석 결과이다.
- 도 4는 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 도파민 신경세포 사멸 억제효과를 tyrosine hydroxylase(TH) 면역조직화학염색법으로 확인한 결과이다.
- 도 5는 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 항염증 효과를 확인한 결과로서, 도 5a는 CD11b(Iba-1) 면역조직화학염색법으로 확인한 것이고, 도 5b는 iNOS, IL-1 β , TNF- α 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.
- 도 6은 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 α -synuclein 단백질 발현 및 응집 억제효과를 확인한 결과로서, α -synuclein monomer 발현 억제 및 α -synuclein oligomer 형성(응집) 억제 효과를 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.
- 도 7은 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 흑질내 단백질 응집 억제효과를 확인한 결과로서, 도 7a는 thioflavin S 형광염색법으로 확인한 것이고, 도 7b는 이의 고배율 확대사진이다.
- 도 8은 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 MLKL 단백질 발현 및 응집 억제효과를 확인한 결과로서, MLKL monomer 발현 억제 및 MLKL oligomer 형성(응집) 억제 효과를 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.
- 도 9는 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 MLKL 단백질의 유비퀴틴화 및 인산화 억제효과를 확인한 결과로서, 도 9a는 pMLKL⁺/ubiquitin⁺ 이중형광염색법으로 확인한 것이고, 도 9b는 이의 고배율 확대사진이다.
- 도 10은 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 도파민 세포의 pMLKL 발현 억제효과를 확인한 결과로서, 도 10a는 pMLKL⁺/TH⁺ 이중형광염색법으로 확인한 것이고, 도 10b는 이의 고배율 확대사진이다.
- 도 11은 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA의 도파민 신경세포 보호 효과의 작용기전을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은 네크로셀폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 네크로셀폰아미드(NSA)는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이며, 본 발명의 조성물은 유효성분으로서 NSA 또는 이의 유도체를 포함할 수 있다.
- [0029] [화학식 1]



- [0030]
- [0031] 본 발명에서 '약학적으로 허용가능한 염'은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택된 염기성 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 또한, 본 발명에서 '약학적으로 허용가능한 염'은 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페르손산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산 및 아스파르트산으로 이루어진 군에서 선택된 산성 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0033] 본 발명에 따른 약학 조성물은 '약학적으로 허용 가능한 담체'를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제, 또는 경구 섭취제 등으로 제제화할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강, 기도)에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명에서 '개체'란 질병의 예방, 조절 또는 치료방법을 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 네크로실폰아미드(NSA) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0040] 상기 건강식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품 조성물은 상기 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1. 급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 도파민 신경세포 사멸 억제효과

[0045] 1-1. 급성 파킨슨병 마우스 모델 구축 및 샘플 수득

[0046] MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)는 신체내에서 MPP+로 변환된 후 도파민을 분비하는 뉴런 내에 축적되어 뉴런을 파괴시킴으로서, 파킨슨병과 유사한 증상을 일으키는 것으로 알려진 환경호르몬이므로, 이를 이용하여 급성 파킨슨병 마우스 모델을 구축하였다.

[0047] 구체적으로, 7주령의 C57BL/6N 생쥐(Orient Bio, Korea)를 구입 후 사용하였으며, 전 실험기간 동안 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 낮밤 주기는 12시간 (light/dark cycle)으로 조절되는 실험실 환경에서 유지하였다. 실험동물들 무작위로 대조군(control)과 MPTP군(20 mg/kg/injection, 4 injection/day, 2 hour-

interval of injection, i.p.), MPTP+NSA군 (1, 5 mg/kg)으로 나누었다.

[0048] 사육실(이화여대 의과대학 동물실)에서 1주일간 순화시킨 후, NSA를 3일간 복강 주입하였다. NSA 처치 종료 다음날 MPTP 처치하였으며, MPTP 처치 7일 후 샘플 수득을 위해 마취(sodium pentobarbital, 80 mg/kg) 및 전신 관류(0.9% saline) 후 뇌를 적출하였다.

[0050] 1-2. 흑질내 도파민 신경세포 사멸 정도 측정

[0051] 상기 실시예 1-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 고정(4% paraformaldehyde, 4 °C, 16 hours) 및 동결보호(30% sucrose, 4°C, 48 hours) 후 cryotome을 이용하여 40 µm 두께로 절편하였다.

[0052] 도파민 신경세포 사멸 정도는, 동결조직 절편에 도파민 신경세포 특이적인 tyrosine hydroxylase(TH)에 대한 항체를 처리하여 면역조직화학염색법으로 확인하였다. 구체적으로, 동결조직을 0.01M PBS로 세척 후 0.3% 과산화수소 처리로 조직내 과산화수소의 비특이성 반응을 비활성시켰다. 이후, 1시간 동안 5% Bovine serum albumin 처리 후 1차 항체 rabbit polyclonal TH (1:2000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 로 16시간 이상 4°C에서 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체 (biotinylated anti-rabbit, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 25°C에서 1시간 반응 후 Avidin-biotin peroxidase (Vector laboratories) 방법으로 표지시켰다. 이후, 0.01% H₂O₂를 포함하는 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, St.Louis, MO, USA)로 발색 및 탈수화 과정을 거친 후 mounting 처리하였다. 염색된 조직은 현미경 (Leica DM-750, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)으로 관찰하여 ImageJ software (NIH Image Engineering, Bethesda, MD, USA)를 활용하여 정량적 분석을 실시하였다.

[0053] 그 결과, NSA 처치군은, MPTP에 의해 사멸된 흑질 도파민 신경세포를 회복시키고, MPTP에 의해 감소된 선조체 도파민 신경전달을 회복시킴을 확인하였다 (도 1).

[0055] 실시예 2. 급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 소교세포 활성화 억제효과

[0056] 2-1. 흑질내 소교세포 활성화 정도 측정

[0057] 소교세포(microglia)는 원래 뇌에서 파편(손상된 뉴런, 감염 미생물 등)을 제거하게끔 하는 면역 관련 세포이나, 소교세포가 지나치게 활성화되면 신경세포의 염증이나 사멸을 유도한다는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 실시예에서는 NSA에 의해 소교세포 활성화가 억제되는지 확인하는 실험을 진행하였다.

[0058] 상기 실시예 1-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 고정 (4% paraformaldehyde, 4 °C, 16 hours) 및 동결보호 (30% sucrose, 4°C, 48 hours) 후 cryotome을 이용하여 40 µm 두께로 절편하였다.

[0059] 소교세포(microglia) 수 및 활성화 정도는 동결조직 절편에 소교세포 특이적인 CD11b (Iba-1)에 대한 항체를 처리하여 면역조직화학염색법으로 확인하였다. 구체적으로, 동결조직을 0.01M PBS 로 세척 후 0.3% 과산화수소 처리로 조직내 과산화수소의 비특이성 반응을 비활성시켰다. 이후, 1시간의 5% Bovine serum albumin 처리 후 1차 항체 rabbit polyclonal Iba-1 (1:500, Wako, Osaka, Japan)로 16시간 이상 4°C 에서 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체 (biotinylated anti-rabbit, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 25°C 에서 1 시간 반응 후 Avidin-biotin peroxidase (Vector laboratories) 방법으로 표지시켰다. 이후, 0.01% H₂O₂를 포함하는 0.02% 3,3' tetrahydrochloride (DAB; Sigma, St.Louis, MO, USA)로 발색 및 탈수화 과정을 거친 후 mounting 처리하였다. 염색된 조직은 현미경(Leica DM-750, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)으로 관찰하여 ImageJ software (NIH Image Engineering, Bethesda, MD, USA)를 활용하여 정량적 분석을 실시하였다.

[0060] 그 결과, NSA 처치군은, MPTP에 의해 흑질 및 선조체에서 증가된 소교세포의 수 및 활성화를 감소시킴을 확인하였다 (도 2).

[0062] 실시예 3. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 행동 개선효과

[0063] 3-1. 아급성 파킨슨병 마우스 모델 구축 및 샘플 수득

[0064] 7주령의 C57BL/6N 생쥐(Orient Bio, Korea)를 구입 후 사용하였으며, 사육실(이화여대 의과대학 동물실)에서 1

주일 간 순화시킨 후 실험을 실시하였다. 전 실험기간 동안 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였으며 낮 밤주기는 12시간 (light/dark cycle)으로 조절되는 실험실 환경에서 유지하였다. 실험동물을 무작위로 대조군 (control), MPTP/probenecid (MPTP/P)군, MPTP/P+NSA군, NSA군으로 나누었다. MPTP 처치는 5일간 복강 주사하였으며 (day 1-2: 25 mg/kg, 2 injection/day, 7 hour-interval of injection; day 3-5: 25 mg/kg/day), probenecid (250 mg/kg, s.c.)는 MPTP 주사 30분 전에 처치하였다. MPTP/probenecid 처치 종료 후 NSA는 격일로 10회(0.5 mg/kg x 3회, 1 mg/kg x 7회) 처치하였다. NSA 처치 완료 1일 후 행동검사를 실시하였으며, 행동 검사 종료 2일 후에 마취 (sodium pentobarbital, 80 mg/kg) 및 전신관류 (0.9% saline) 후 뇌를 적출하였다.

3-2. 행동검사

생쥐의 운동 협응성을 측정하기 위해 가속 rotarod test (accelerated rotarod test)를 실시하였다. 본 가속 rotarod test 실시 전에 사전 적응훈련은 MPTP 처치 1주일 전에 4일간 실시하였다(5 min/trial, 3 trial/day, 15 min-interval of session). 본 rotarod test는 정지된 rotarod 드럼 (3 cm-diameter, Harvard Apparatus, MA, USA)에 최소 1분간 머물게 한 후 4-40 rpm/300 sec. 속도로 회전시켜 드럼에서 떨어지는 시간을 측정하였다. 각 생쥐 당 3회 실시하여 평균 시간을 산출하였다(도 3a).

생쥐의 이동성을 측정하기 위해 pole test를 실시하였다. 본 pole test 실시 전에 사전 적응훈련은 MPTP 처치 1주일 전에 1일 실시하였다. 지면에서 50 cm 높이의 원통형 막대 (0.5 cm-diameter) 꼭대기에서 지면으로 내려오는 시간을 측정하였다. 각 생쥐 당 3회 실시하여 평균 시간을 산출하였다(도 3a).

그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid 처치에 의해 감소되었던 rotarod 머뭇 시간을 회복시켰으며, MPTP/probenecid 처치에 의해 증가되었던 pole에서의 하강 시간을 회복시킴을 확인하였다 (도 3b).

실시예 4. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 도파민 신경세포 사멸 억제효과

4-1. 흑질내 도파민 신경세포 사멸 정도 측정

상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 고정 (4% paraformaldehyde, 4 °C, 16 hours) 및 동결보호 (30% sucrose, 4°C, 48 hours) 후 cryotome을 이용하여 40 µm 두께로 절편하였다.

도파민 신경세포 사멸 정도는 동결조직 절편에 도파민 신경세포 특이적인 TH 항체를 처리하여 면역조직화학염색 방법으로 확인하였다. 구체적으로, 동결조직을 0.01M PBS 로 세척 후 0.3% 과산화수소 처리로 조직내 과산화수소의 비특이성 반응을 비활성시켰다. 이후, 1시간의 5% Bovine serum albumin 처리 후 1차 항체 rabbit polyclonal TH (1:2000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)로 16시간 이상 4°C에서 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체 (biotinylated anti-rabbit, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 25°C 에서 1시간 반응 후 Avidin-biotin peroxidase (Vector laboratories) 방법으로 표지시켰다. 이후, 0.01% H₂O₂를 포함하는 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, St.Louis, MO, USA)로 발색 및 탈수화 과정을 거친 후 mounting 처리하였다. 염색된 조직은 현미경 (Leica DM-750, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)으로 관찰하여 ImageJ software (NIH Image Engineering, Bethesda, MD, USA)를 활용하여 정량적 분석을 실시하였다.

그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 사멸되었던 흑질 도파민 신경세포를 회복시켰으며, MPTP/probenecid에 의해 감소되었던 선조체 도파민 신경전달을 회복시킴을 확인하였다(도 4).

실시예 5. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 항염증 효과

5-1. 흑질내 소교세포 수 및 활성화 정도 측정

상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 고정 (4% paraformaldehyde, 4 °C, 16 hours) 및 동결보호 (30% sucrose, 4°C, 48 hours) 후 cryotome을 이용하여 40 µm 두께로 절편하였다.

흑질에서 소교세포의 수 및 활성화 정도는 동결조직 절편에 소교세포 특이적인 CD11b (Iba-1) 항체를 처리하여 면역조직화학염색방법으로 확인하였다. 구체적으로, 동결조직을 0.01M PBS 로 세척 후 0.3% 과산화수소 처리로 조직내 과산화수소의 비특이성 반응을 비활성시켰다. 이후, 1시간의 5% Bovine serum albumin 처리 후 1차 항체

rabbit polyclonal Iba-1 (1:500, Wako, Osaka, Japan) 로 16시간 이상 4℃ 에서 반응시켰다. PBS 로 세척 후 2차 항체 (biotinylated anti-rabbit, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 로 25℃ 에서 1시간 반응 후 Avidin-biotin peroxidase (Vector laboratories) 방법으로 표지시켰다. 이후, 0.01% H₂O₂를 포함하는 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, St.Louis, MO, USA)로 발색 및 탈수화 과정을 거친 후 mounting 처리하였다. 염색된 조직은 현미경(Leica DM-750, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)으로 관찰하여 ImageJ software (NIH Image Engineering, Bethesda, MD, USA)를 활용하여 정량적 분석을 실시하였다.

[0081] 그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 흑질 및 선조체에서 증가되었던 소교세포의 수 및 활성화를 감소시킴을 확인하였다 (도 5a).

[0083] 5-2. 흑질내 염증성 사이토카인 (iNOS, IL-1 β , TNF- α) 발현 변화 측정

[0084] 상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 300 μ L의 세포용해 완충액 (lysis buffer: 20 mM Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; protease inhibitor cocktail: 2 mM PMSF) 으로 균질화 후 15,000 rpm 으로 20분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 70 μ g의 세포 추출물을 12% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후 니트로셀룰로오스막으로 옮겨주었다. 이후, 비특이적 결합을 방지를 위해 5% non-fat skim milk가 섞인 TBST 용액 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20)으로 1시간 배양 후 동일 용액에 iNOS (1:500, Cell signaling Technology), IL-1 β (1:1000, Cell Signaling Technology), TNF- α (1:1000, Cell Signaling Technology)에 특이적으로 결합하는 1차 항체를 4℃ 에서 16시간 이상 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 2차 항체 (Horseradish peroxidase conjugate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 반응 및 Chemiluminescence detection 키트 (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용한 발색을 실시하였다.

[0085] 그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 염증성 사이토카인(iNOS, IL-1 β , TNF- α) 발현을 감소시킴을 확인하였다 (도 5b).

[0087] 실시예 6. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 α -synuclein 단백질 발현 및 응집 억제효과

[0088] 6-1. 흑질내 α -synuclein 단백질 발현 및 응집 변화 측정

[0089] 상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직을 300 μ L의 세포용해 완충액 (lysis buffer: 20 mM Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; protease inhibitor cocktail: 2 mM PMSF) 으로 균질화 후 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 50 μ g의 세포 추출물을 12% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후 니트로셀룰로오스 막으로 옮겨주었다. 이후, 비특이적 결합을 방지를 위해 5% non-fat skim milk가 섞인 TBST 용액 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20)으로 1시간 배양 후 동일 용액에 α -synuclein (1:1000, Cell signaling Technology)에 특이적으로 결합하는 1차 항체를 4℃에서 16시간 이상 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 2차 항체 (Horseradish peroxidase conjugate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 반응 및 Chemiluminescence detection 키트 (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용한 발색을 실시하였다.

[0090] 그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 α -synuclein 단백질 monomer의 발현을 감소시켰으며, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 α -synuclein oligomer 형성(응집체 생성)을 감소시킴을 확인하였다 (도 6).

[0092] 실시예 7. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 단백질 응집 억제효과

[0093] 7-1. 흑질내 단백질 응집 변화 측정

[0094] 상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 고정 (4% paraformaldehyde, 4 °C, 16 hours) 및 동결보호 (30% sucrose, 4℃, 48 hours) 후 cryotome을 이용하여 40 μ m 두께로 절편하였다.

[0095] 흑질에서 단백질 응집화 정도는, 동결조직 절편에 단백질 응집체 탐색 방법인 thioflavin-S 형광염색법으로 확인하였다. 구체적으로, 동결조직을 0.01M PBS 로 세척 후 0.005% thioflavin-S (Sigma, St. Louis, MO, USA)/80% EtOH 용액에 8분간 암실에서 반응시켰다. 이 후 50% EtOH 세척 및 증류수 세척 후 mounting 처리하였

다. 염색된 조직은 현미경(Leica DM-750, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)으로 관찰하여 ImageJ software (NIH Image Engineering, Bethesda, MD, USA)를 활용하여 정량적 분석을 실시하였다.

그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 thiolf flavin-S⁺ particle 형광강도를 감소시킴을 확인하였다 (도 7a 및 7b).

실시예 8. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 MLKL 단백질 발현 및 응집 억제효과

8-1. 흑질내 MLKL 단백질 발현 및 응집 변화 측정

상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직을 300 μ L의 세포용해 완충액 (lysis buffer: 20 mM Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; protease inhibitor cocktail: 2 mM PMSF) 으로 균질화 후 15,000 rpm 으로 20분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 70 μ g의 세포 추출물을 12% SDS-polyacrylamide gel 을 이용하여 전기영동 후 니트로셀룰로오스막으로 옮겨주었다. 이후, 비특이적 결합을 방지를 위해 5% non-fat skim milk가 섞인 TBST 용액 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20)으로 1시간 배양 후 동일 용액에 MLKL (1:1000, Cell Signaling Technology)에 특이적으로 결합하는 1차 항체를 4 $^{\circ}$ C 에서 16시간 이상 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 2차 항체 (Horseradish peroxidase conjugate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 반응 및 Chemiluminescence detection 키트 (Thermo Scientific, MA, USA) 를 이용한 발색을 실시하였다.

그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 MLKL 단백질 monomer의 발현을 감소시켰으며, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 MLKL oligomer 형성(응집체 생성)을 감소시킴을 확인하였다 (도 8).

실시예 9. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 유비퀴틴화 (ubiquitination) 및 인산화 (phosphorylation) 억제효과

9-1. 흑질내 MLKL 단백질 유비퀴틴화 및 인산화 변화 측정

상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 고정 (4% paraformaldehyde, 4 $^{\circ}$ C, 16 hours) 및 동결보호 (30% sucrose, 4 $^{\circ}$ C, 48 hours) 후 cryotome을 이용하여 40 μ m 두께로 절편하였다.

흑질에서 pMLKL(인산화된 MLKL) 발현 및 MLKL의 ubiquitination 정도는 동결조직 절편에 pMLKL 특이적 항체와 ubiquitin 특이적 항체를 처리하여 이중형광염색법으로 확인하였다. 구체적으로, 동결조직을 0.01M PBS 로 세척 후 비특이적 반응을 막기 위해 5% Bovine serum albumin 처리하였다. 이후, 1차 항체 mouse polyclonal pMLKL (1:500, Cell Signaling Technology)와 rabbit polyclonal ubiquitin (1:1000, Cell Signaling Technology)으로 16시간 이상 4 $^{\circ}$ C 에서 반응시켰다. PBS로 세척 후 형광이 표지된 2차 항체 (anti-rabbit Alexa 594, anti-mouse Alexa 488, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 25 $^{\circ}$ C 에서 1시간 반응 후 mounting 처리하였다. 염색된 조직은 현미경(Leica DM-750, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)으로 관찰하여 ImageJ software (NIH Image Engineering, Bethesda, MD, USA)를 활용하여 정량적 분석을 실시하였다.

그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 ubiquitin⁺ 및 ubiquitin⁺/pMLKL⁺ 형광강도를 감소시킴을 확인하였다 (도 9a 및 9b).

실시예 10. 아급성 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA에 의한 도파민 신경세포의 MLKL 단백질 인산화 (phosphorylation) 억제효과

10-1. 흑질내 도파민 신경세포의 MLKL 인산화(phosphorylation) 변화 측정

상기 실시예 3-1의 방법으로 적출한 뇌조직은 고정 (4% paraformaldehyde, 4 $^{\circ}$ C, 16 hours) 및 동결보호 (30% sucrose, 4 $^{\circ}$ C, 48 hours) 후 cryotome을 이용하여 40 μ m 두께로 절편하였다.

흑질 도파민 신경세포에서 pMLKL 발현 정도는, 동결조직 절편에 pMLKL 특이적 항체와 도파민신경 세포 표지물질인 TH 특이적 항체로 처리하여 이중형광염색법으로 확인하였다. 구체적으로, 동결조직을 0.01M PBS 로 세척 후 비특이적 반응을 막기 위해 5% Bovine serum albumin 처리하였다. 이후, 1차 항체 mouse polyclonal pMLKL

(1:500, Cell Signaling Technology)와 rabbit polyclonal TH (1:500, Cell Signaling Technology)으로 16시간 이상 4℃ 에서 반응시켰다. PBS 로 세척 후 형광이 표지된 2차 항체 (anti-rabbit Alexa 594, anti-mouse Alexa 488, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 25℃ 에서 1시간 반응 후 mounting 처리하였다. 염색된 조직은 현미경(Leica DM-750, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)으로 관찰하여 ImageJ software (NIH Image Engineering, Bethesda, MD, USA)를 활용하여 정량적 분석을 실시하였다.

[0113] 그 결과, NSA 처치군은, MPTP/probenecid에 의해 흑질에서 증가되었던 pMLKL⁺ 및 TH⁺/pMLKL⁺ 형광강도를 감소시킴을 확인하였다 (도 10a 및 10b).

[0115] 실시예 11. 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA의 도파민 신경세포 보호효과에 대한 작용기전

[0116] 상기 실시예 1 내지 10에서 획득한 결과를 바탕으로, 파킨슨병 마우스 모델에서 NSA의 도파민 신경세포 보호 효과에 대한 작용 기전을 다음과 같이 규명하였다.

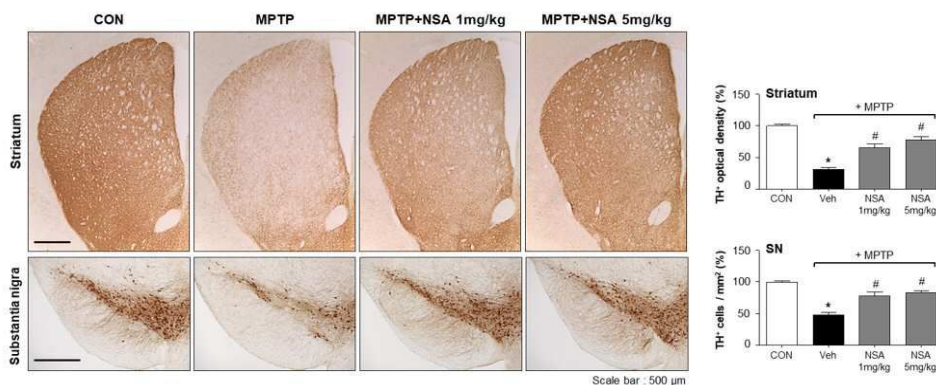
[0117] MPTP 처리시, 흑질의 만성적 염증뿐만 아니라 α-synuclein 단백질의 발현 증가 및 올리고머화(응집)를 유도하며(두 현상은 상호 호혜적 작용임; reciprocal action), 이러한 변화는 흑질 도파민 신경세포의 MLKL 단백질 발현 및 올리고머화(응집)를 촉진시킨다. 이후, MLKL 단백질의 유비퀴틴화(ubiquitination)와 인산화(phosphorylation)에 의한 활성 증가는, 도파민 신경세포의 necroptosis를 실행시켜 흑질 도파민 신경세포 소실을 유발하고, 이러한 일련의 악순환(vicious circle)은 점진적이고 지속적인 운동 수행력 장애를 초래한다.

[0118] 반면, NSA의 작용 기전은, 이러한 일련의 각 단계에서 항염증, α-synuclein 발현 및 올리고머화 억제, MLKL 발현 및 올리고머화 억제, 그리고 MLKL 유비퀴틴화 및 인산화를 감소시킴으로써, 도파민 신경세포의 necroptosis를 억제한다(도 11).

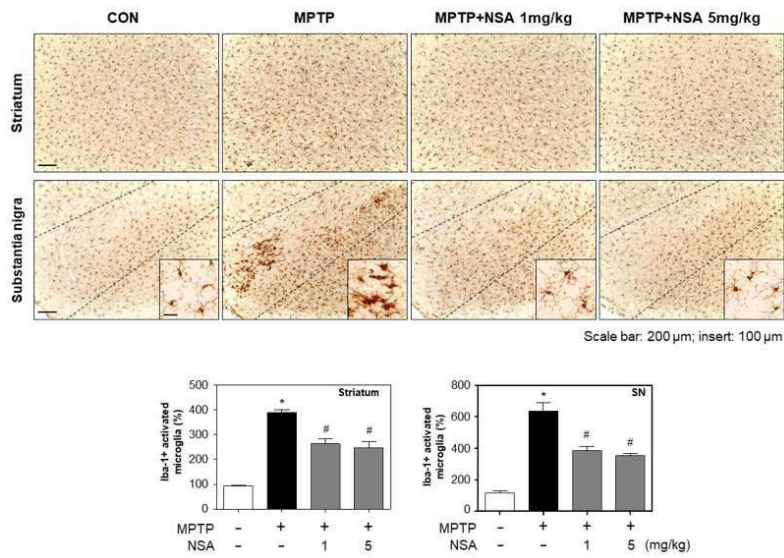
[0120] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

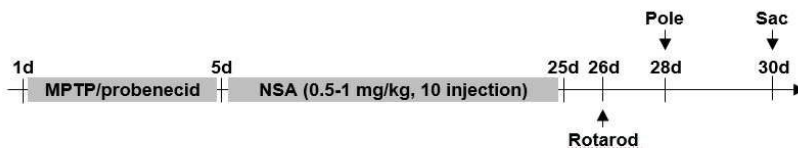
도면1



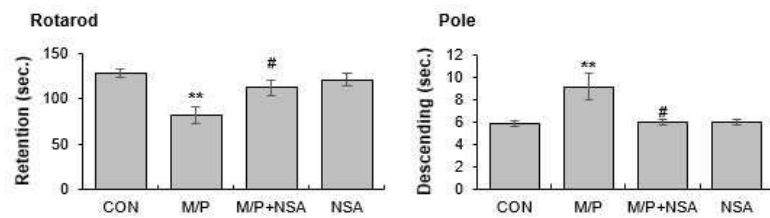
도면2



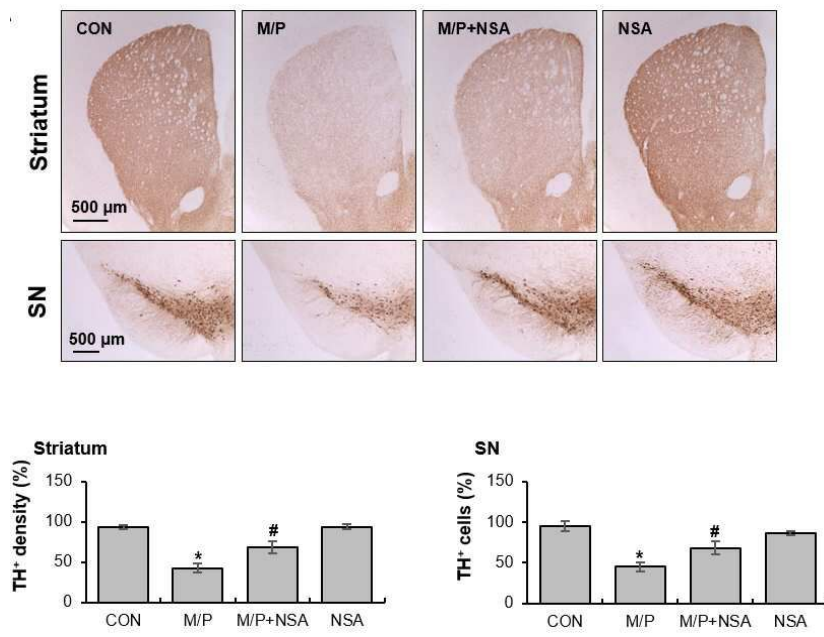
도면3a



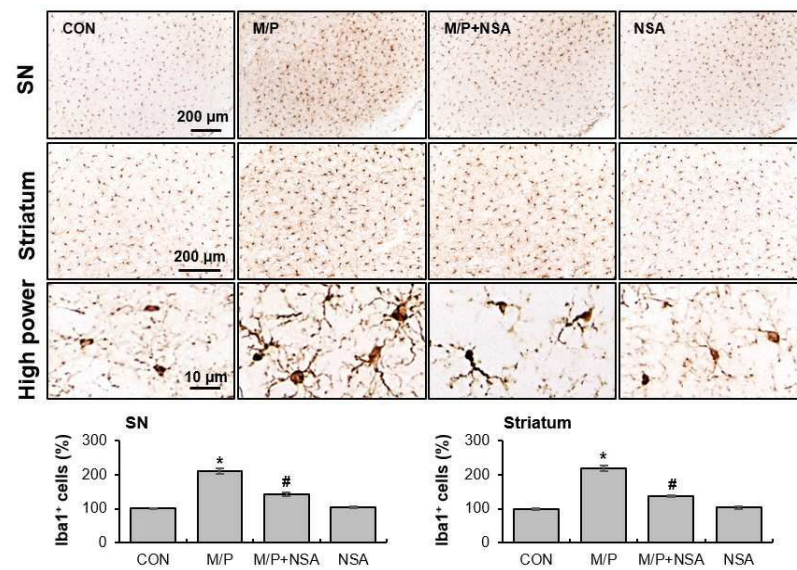
도면3b



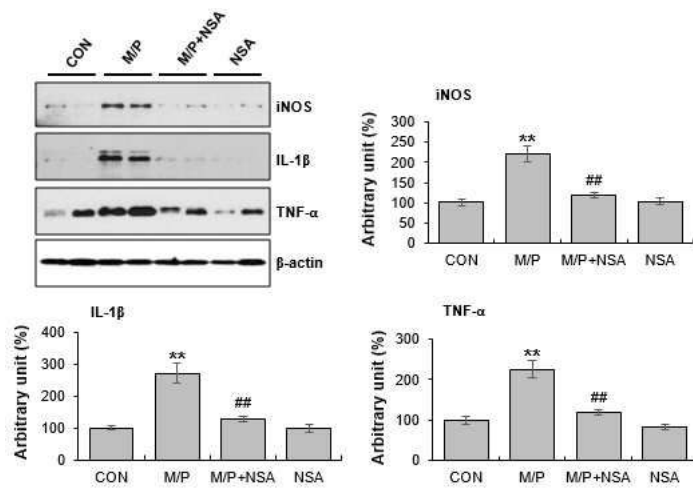
도면4



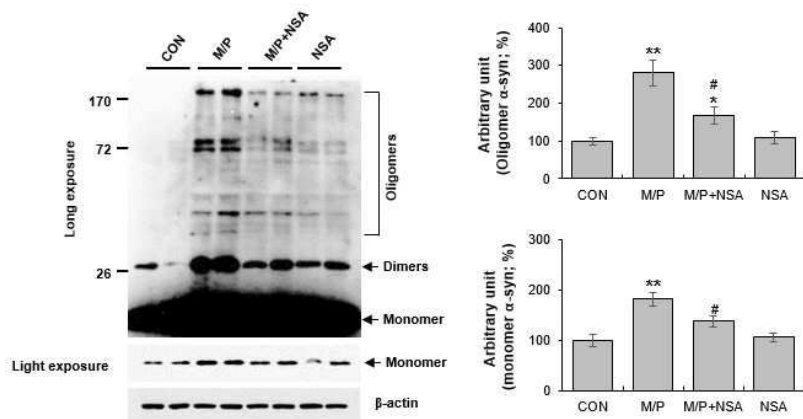
도면5a



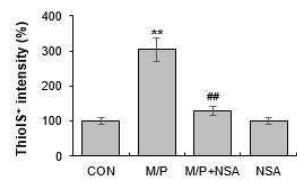
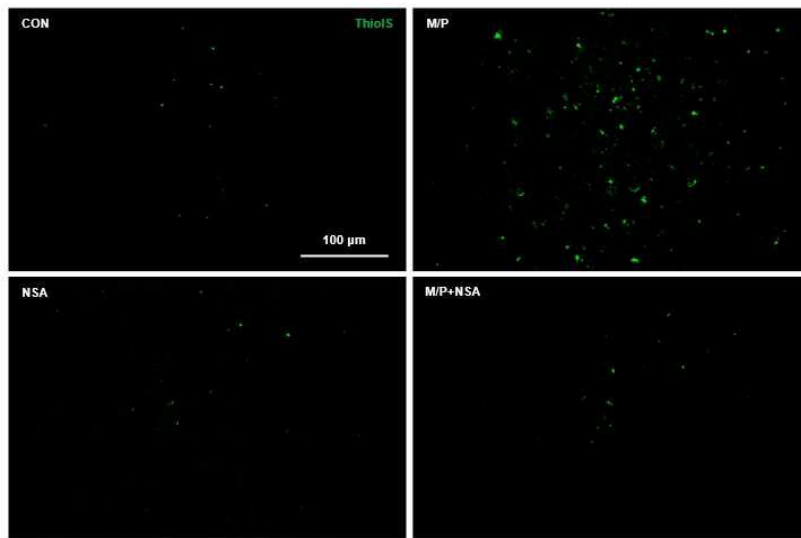
도면5b



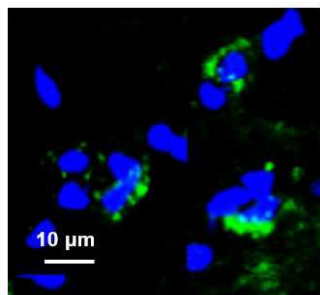
도면6



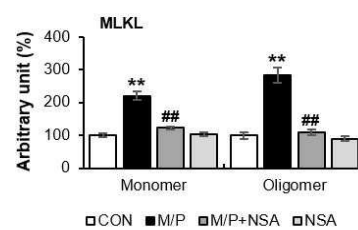
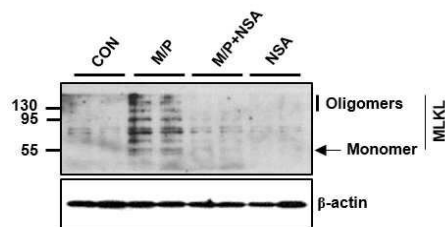
도면7a



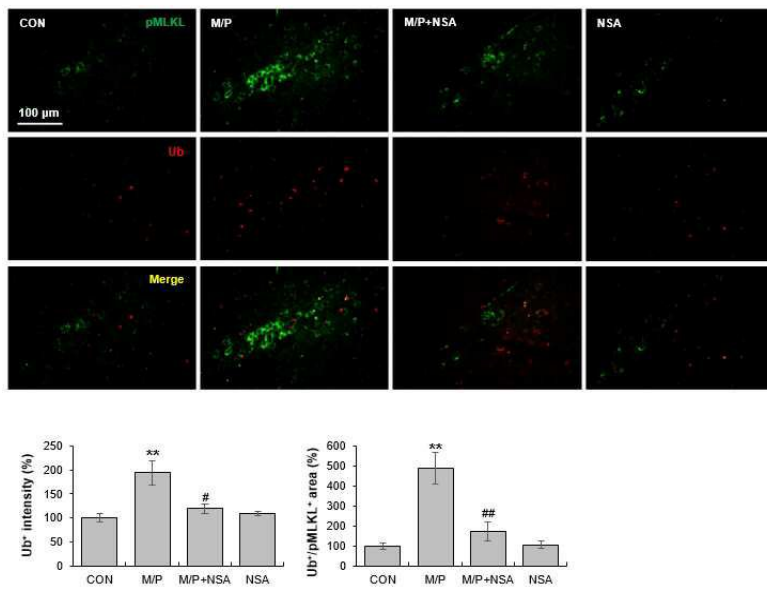
도면7b



도면8



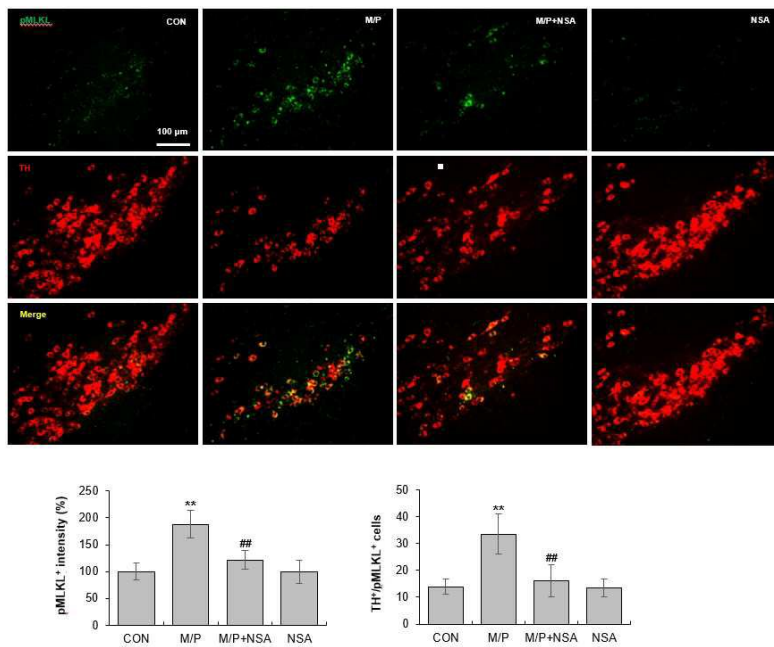
도면9a



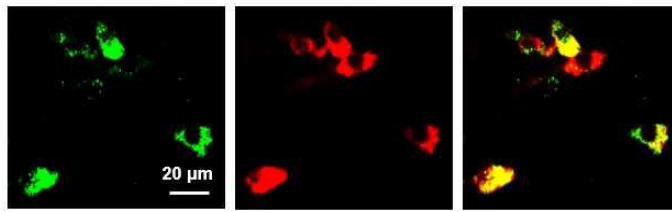
도면9b



도면10a



도면10b



도면11

