



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0112094
(43) 공개일자 2016년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/4823 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0036992

(22) 출원일자 2015년03월17일

심사청구일자 2015년03월17일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

양덕춘

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

김연주

경기도 성남시 분당구 동판교로 275 봇들마을 1단지 107동 801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 14 항

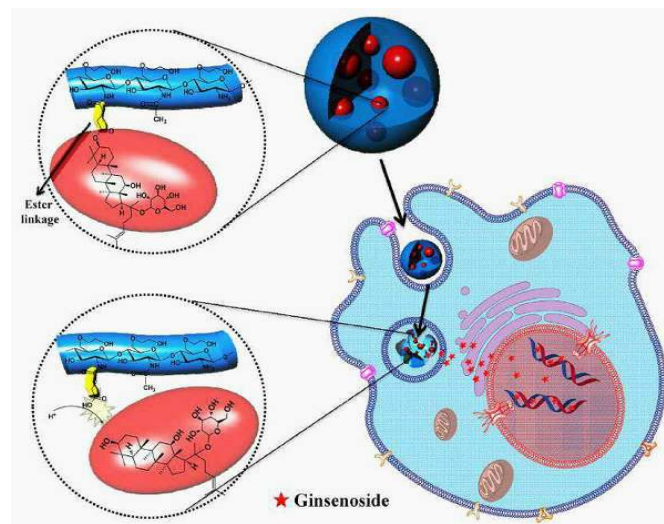
(54) 발명의 명칭 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체 및 이의 항암 용도

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체, 상기 결합체의 제조방법, 및 상기 결합체를 약학적으로 허용가능한 담체 내에 포함하는 암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체는 진세노사이드 화합물 K에 비해 수용성이 증가하고, 수용액에서 나노 크기의 자기 집합체를 형성하며, pH 민감성을 가져 중성 pH에서 안정적이고 산성 pH에서 진세노사이드 화합물 K를 방출하여 암 세포 특이적 항암 활성을 가지므로, 암 치료용 조성물로서 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

(72) 발명자

람야

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교
애지원 한방바이오연구실 (서천동)

양동욱

대전광역시 유성구 엑스포로 448 509동 701호 (전민동, 엑스포아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KIPET NO: 313038-03-2-SB010

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품 기술기획평가원

연구사업명 고부가가치 식품기술개발

연구과제명 한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SSAC PJ00952903

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 차세대바이오그린21사업-시스템합성 농생명사업단

연구과제명 Probiotic(LAB) 을 이용한 신규 유용사포닌의 생합성 및 핵심 GT유전자 pool 구축

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

진세노사이드 화합물 K(ginsenoside Compound K) 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드 화합물 K는 카르복실화된 것인, 결합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 결합체는 카르복실화된 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산이 아마이드결합(amide bond)된 것인, 결합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 결합체는 결합 부위에 에스터 연결(ester linkage)을 포함하는 것인, 결합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 결합체는 수용액에서 자기 집합체(self-aggregate)를 형성하는 것인, 결합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 결합체는 pH 4.0 내지 pH 6.0에서 진세노사이드 화합물 K를 방출하는 것인, 결합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 결합체는 pH 7.0 내지 pH 8.0에서 8일 이상 분해되지 않고 유지되는 것인, 결합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 결합체를 포함하는 암 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 암은 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁 경부암, 자궁 내막체암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피

부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종, 및 다발성 골수종혈액암으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 약학 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 암은 대장암, 간암 및 뇌암으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 약학 조성물.

청구항 12

(a) 진세노사이드 화합물 K(Compound K)를 카르복실화 시키는 단계; 및

(b) 카르복실화 된 진세노사이드 화합물 K와 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 결합시키는 단계를 포함하는, 화합물 K(Compound K) 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 카르복실화는 석신산 무수물(succinic anhydride)을 이용하여 유도된 것인, 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 결합은 아마이드결합(amide bond)인 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체, 상기 결합체의 제조방법, 및 상기 결합체를 약학적으로 허용가능한 담체 내에 포함하는 암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전세계적으로 대표적인 사망 원인 중 하나이다. 암 치료를 위한 높은 활성을 가지는 항암제가 존재하나, 낮은 암 세포 특이성, 낮은 수용성, 세포 독성, 혈액 내에서 짧은 반감기로 인한 항암제 전달의 어려움 등의 문제로 항암화학요법의 이용이 제한된다.

[0003] 효과적인 약물전달을 위해 중합체와 약물의 결합체, 미셀, 나노입자, 스텔스 리포솜(stealth liposome)과 같은 수많은 약물 전달체들이 보고되었다(Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2013, 13(11), 7312-7318). 예를 들어, 나노크기의 약물 운반체로 캡슐화된 항암제는 처리되지 않은 항암제와 비교하였을 때 효과가 향상되었다(International Journal of Pharmaceutics, 2012, 423(2), 452-460). 또한, 스쿠알레노일 기반 천연 트리테르펜(triterpene) 약물 결합체는 자기조립화된 나노입자를 형성하여 항암 활성이 향상되었다(ACS Nano, 2014, 8(3), 2018-2032).

[0004] 이 중에서도, 특히 상기 항암화학요법의 문제점들을 해결하기 위한 방안으로 수용성 중합체와 항암제를 결합하는 방식이 제안되었다(Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2), 1280-1293). 수용성 중합체를 항암제에 결합시키면 소수성을 띠는 약물에 수용성을 강화할 수 있으며, 혈액에서 약물의 체류 시간이 연장될 뿐만 아니라, 정상 세포에 대한 세포독성이 감소되고, 약물의 불활성을 막고, EPR(enhanced permeation and retention) 효과로 종양 조직에 축적이 향상되는 등의 효과를 기대할 수 있다.

- [0005] 한편, 다당류는 이상적인 물리화학적, 생물학적 특성을 가져 효과적인 약물 전달 운반체로 주목받고 있다(Drug Development and Industrial Pharmacy, 1998, 24(11), 979-993). 특히, 상기 다당류 중 키토산(Chitosan)은 훌륭한 생물분해성, 생체적합성, 장 점막접착 상호작용, 항박테리아 활성, 항진균 활성, 및 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 키토산은 β -1,4 연결 N-아세틸-D-글루코사민(β -1,4 linked N-acetyl-D-glucosamine)과 D-글루코사민(D-glucosamine)으로 구성된 천연 생체고분자물질이고 키틴(Chitin)의 탈아세틸화로 제조된다. 키틴은 가장 풍부하게 존재하는 천연 다당류 중 하나로, 갑각류, 연체동물의 껍데기, 곤충의 큐티클, 균류의 세포벽 등을 구성한다(Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2), 995-1012). 키토산을 용해시키기 위해 유기산을 사용하는 것은 약물 전달 용도로 이용함에 있어서 부작용을 야기하므로, 이산화탄소와 알칼리성 NH_4HCO_3 가 얇은 막 또는 겔을 얻으면서 키토산을 용해시키는데 사용된다(Carbohydrate Polymers, 2014, 102(0), 901-911).
- [0006] 상기 키토산과 관련하여 글리콜 키토산(glycol chitosan, GC)과 카복시메틸 키토산(carboxymethyl chitosan)과 같은 친수성 키토산 유도체가 개발되었다. 특히, 생체적합성과 넓은 pH 범위에서의 좋은 수용성때문에, GC는 다양한 약물과 단백질에 대한 친수성 전달체로 널리 연구되었다(Colloid and Polymer Science, 2006, 284(7), 763-770).
- [0007] 인삼(*Panax ginseng*)은 한국, 중국, 일본의 동양의학에서 전통적으로 약초로 사용되었으며, 인삼의 주요 활성 성분으로 트리테르펜 사포닌(triterpene saponins)인 진세노사이드(ginsenoside)가 있다(Journal of Ginseng Research, 2013, 37(2), 227-247). 진세노사이드는 넓게는 프로토파낙시디올(protopanaxadiols, PPD)과 프로토파낙사트리올(protopanaxatriols, PPT)로 분류되며, 더 구체적으로는 화합물의 다양한 생활성에 영향을 미치는 스테로이드 사포게닌(steroidal sapogenin) 및 당 사슬과 연결의 수를 기반으로 하여 메이저 및 마이너 진세노사이드로 분류된다. 진세노사이드는 항암 효과, 항염 효과뿐만 아니라, 알츠하이머, 당뇨병에도 효과가 있는 것으로 보고되었다(Choi, 2008; Sathishkumar et al., 2012).
- [0008] 특히, 상기 진세노사이드 중에서도 진세노사이드 화합물 K(compound K, 20-O- β -(D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol)는 특별한 생물학적 특성 때문에 주목받았다(Hasegawa, Sung, Matsumiya, & Uchiyama, 1996). 진세노사이드 화합물 K는 PPD 타입 진세노사이드의 경구투여 후 장내 효소에 의해 얻어지는 초기 대사물질의 하나이며, 인간 대장암 세포 및 인간간모세포종(hepatoblastoma) HepG2 세포의 세포사멸 유도와 증식의 억제 등 다양한 약물학적 특성을 가진다(Oh & Lee, 2004; Zhang et al., 2013). 또한, 진세노사이드 화합물 K는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)로 활성화된 대식세포에서 염증유발 사이토카인을 억제한다.
- [0009] 이와 같이 진세노사이드 화합물 K의 유용한 특성이 보고되었으나, 수용성이 떨어지고, 종양이 위치하는 곳으로 특이적인 전달이 어려워 정상 세포에도 독성을 나타냄으로써 부작용이 발생할 수 있다는 문제가 있다. 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위해 예의 노력한 결과, 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체를 제조하였으며, 상기 결합체가 진세노사이드 화합물 K에 비해 수용성이 증가하고 암 세포 특이적 활성을 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

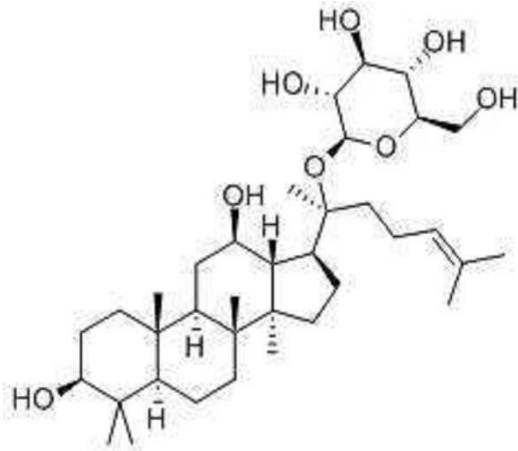
- [0010] 본 발명은 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체, 상기 결합체의 제조방법, 및 상기 결합체를 약학적으로 허용가능한 담체 내에 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체를 제공한다.

[0012] 본 발명에서 용어, "진세노사이드 화합물 K (ginsenoside compound K)"는 인삼 자체에는 존재하지 않으나, 인삼 또는 홍삼에 존재하는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd 등의 사포닌이 비피더스 균과 같은 장내 미생물 또는 토양미생물의 작용에 의하여 체내에서 흡수가능한 형태로 전환된 사포닌으로 하기 화학식 1로 표시된다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 본 발명에서 진세노사이드 화합물 K는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나 또는 자연계에서 채배 또는 채취한 인삼으로부터 분리된 진세노사이드로부터 전환한 것을 사용할 수 있다. 또는 합성방법에 의해 합성된 진세노사이드 화합물 K를 사용할 수 있으나, 본 발명의 암 치료 효과를 나타내는 진세노사이드 화합물 K라면 제한없이 사용할 수 있다.

[0016] 지금까지 연구된 바에 의하면 진세노사이드 화합물 K는 항염작용(Park EK, et al., Biol. Pharm. Bull., 28:652-656, 2005), 간 보호작용(Lee HU, et al., Liver Int., 25:1069-1073, 2005), 간 섬유종 치료작용(Park EJ, et al., Planta Med., 72:1250-1253, 2006), 종양 증식 억제작용(Jung SH, et al., Int. J. Cancer, 118:490-497, 2006), 항산화 작용(Bae EA, et al., Arch. Pharm. Res., 27:1136-1140, 2004), 항알레르기 작용(Choo MK, et al., Planta Med., 69:518-522, 2003), 신경퇴행성질환 예방작용(Tohda C., et al., Neuropsychopharmacology, 29:860-868, 2004), 피부보호 작용(Shin YW, et al., J. Pharmacol. Sci., 99:83-88, 2005) 등을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 진세노사이드 화합물 K는 수용성이 떨어지고, 암 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 독성을 가져 항암제로 사용되는데 한계가 있었다. 따라서 본 발명에서는 진세노사이드 화합물 K의 수용성을 증가시키고, 암 세포 특이적 활성을 가지도록 글리콜 키토산(glycol chitosan)과의 결합체를 제조하여 본 발명을 완성하였다. 진세노사이드 화합물 K는 수용성이 낮고, 암세포 특이성이 없으며, 글리콜 키토산은 항암 활성이 없으나, 상기 두 화합물의 결합에 의해 이와 같은 단점을 모두 극복한 것이다.

[0017] 본 발명에서 용어, "글리콜 키토산(glycol chitosan)"은 수용성 키토산 유도체 중 하나로, 친수성 에틸렌글리콜기의 도입에 따라 중성 pH에서 수용성을 나타낸다. 키토산은 키틴을 고농도의 알칼리로 처리함으로써 N-탈아세틸화하여 제조되는 염기성 다당류로서, 세포 흡착능, 생체적합성, 생분해성 및 성형성 등에서 다른 합성고분자들에 비해 우수함이 알려져 있다. 또한, 글리콜 키토산은 비세포 독성, 생체적합성을 나타내고, 낮은 농도에서 연골세포의 성장을 자극할 수 있다. 본 발명에서 사용하는 글리콜 키토산은 200,000 내지 600,000의 분자량을 갖는 것일 수 있고, 탈아세틸화 수준이 60 % 내지 90%인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에서 용어, "결합체(conjugate)"란 진세노사이드 화합물 K와 글리콜 키토산을 화학적으로 연결한 형태를 지칭한다.

[0019] 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체를 제조하기 위하여, 본 발명의 진세노사이드 화합물 K는 카르복실화 된 것일 수 있으며, 결합체는 상기 카르복실화 된 진세노사이드 화합물 K가 글리콜 키토산과 아마이드 결합(amide bond)을 형성하여 제조된 것일 수 있다.

- [0020] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 진세노사이드 화합물 K(ginsenoside Compound K)를 카르복실화 시키는 단계; 및 (b) 카르복실화 된 진세노사이드 화합물 K와 글리콜 키토산(glycol chitosan)을 결합시키는 단계를 포함하는, 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 및 글리콜 키토산(glycol chitosan)의 결합체 제조방법을 제공한다.
- [0021] 진세노사이드 화합물 K, 글리콜 키토산 및 이들의 결합체는 상기 설명한 바와 같다.
- [0022] 상기 (a) 단계는 진세노사이드 화합물 K가 글리콜 키토산과 공유결합하도록 하기 위해 진세노사이드에 변형을 가하는 단계로서, 진세노사이드 화합물 K의 사이클로헥산 고리에 존재하는 알콜기를 말단에 카르복시기를 가진 탄화수소로 치환하는 과정일 수 있다. 특히 상기 카르복실화는 석신산 무수물(succinic anhydride)을 이용하여 유도된 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 (b) 단계는 상기 카르복실화 된 진세노사이드 화합물 K를 글리콜 키토산과 결합시키는 단계로, 글리콜 키토산의 아민기가 상기 카르복실화된 진세노사이드 화합물 K의 카르복실기와 반응하여 아마이드결합(amide bond)을 형성하는 단계이다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 진세노사이드 화합물 K에 석신산 무수물을 처리하여, 카르복실화 된 진세노사이드 화합물 K를 제조하고, 이를 글리콜 키토산과의 반응을 통해 아마이드결합을 형성하도록 함으로써 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체를 제조하였다(도 1a 내지 도 1b).
- [0025] 본 발명의 구체적인 다른 일 실시예에서는 ^1H NMR(도 3) 및 FT-IR(도 4)을 통해 상기 제조방법으로 제조된 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체가 성공적으로 제조되었음을 확인하였다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "자기 집합체(self-aggregate)"란, 분자들이 각각 자발적으로 질서정연한 구조를 가져 전체적으로 특정 형태를 가지는 것을 의미한다. 일반적으로 분자들이 자기 집합체를 형성하기 위해서는 분자 각각이 구조적인 특징을 가져야하며, 분자간의 비공유 결합력이 존재하여야 한다. 상기 결합체는 수용액에서 자기 집합체(self-aggregate)를 형성하는 것일 수 있으며, 이는 진세노사이드 화합물 K는 소수성(hydrophobic)을 가지고, 글리콜 키토산은 친수성(hydrophilic)을 가져 형성되는 것일 수 있다. 즉, 수용액에서 분자 내 소수성을 가지는 부위는 안쪽으로 뭉치고, 친수성을 가지는 부위는 수용액과 만나는 외부로 정렬함으로써 구 형태의 자기 집합체를 형성할 수 있다.
- [0027] 상기 자기 집합체는 이에 제한되는 것은 아니나 특히 100 내지 700 nm의 직경을 가지는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 TEM 사진을 통해 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체가 수용액 내에서 자기집합체를 형성하여 구 형태로 존재하는 것을 확인하였으며, 입자 분석기를 통해 진세노사이드 화합물 K의 몰 비율에 따른 자기 집합체의 크기를 확인하였다(도 5a 및 도 5b).
- [0029] 상기 결합체는 결합 부위에 에스터 연결(ester linkage)을 포함하는 것일 수 있다. 에스터(-COO-)는 산 조건에서 분해될 수 있으므로, 상기 결합체는 pH 4.0 내지 pH 6.0에서 진세노사이드 화합물 K를 방출하는 특성을 가질 수 있으며, pH 7.0 내지 pH 8.0에서 8일 이상 분해되지 않고 유지되는 안정성을 가질 수 있다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 pH에 따른 상기 결합체의 안정성을 확인한 결과, pH 5.0에서는 결합체의 크기가 시간에 따라 점점 증가하였으나, pH 7.4에서는 8일 동안 결합체가 안정적인 형태를 유지하는 것을 확인하였다(도 6).
- [0031] 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는 pH에 따른 상기 결합체에서 진세노사이드 화합물 K의 방출 양상을 확인한 결과, pH 7.4에서는 4일이 경과할 때까지 거의 방출이 없었지만, pH 5.0에서는 시간에 따라 현저하게 방출량이 증가되는 것을 확인하였다(도 7).
- [0032] 따라서, 본 발명의 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산 결합체는 에스터 연결을 포함하여 pH 민감성을 가지므로, 중성 pH에서는 안정성을 가지며 산성 pH에서는 에스터 결합이 분해되어 진세노사이드 화합물 K를 방출하는 특성을 가질 수 있다. 결과적으로, 상기 결합체는 중성인 혈액에서 순환 시 안정성을 가지고 장기간 순환할 수 있으며, 또한 암 세포는 세포 내 pH가 정상 세포에 비해 산성을 띄므로 암 세포 특이적으로 진세노사이드 화합물 K를 방출할 수 있는 특이성을 가질 수 있다. 따라서 본 발명의 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산

의 결합체는 암 표적 치료용 조성물로 우수한 효능이 있다.

- [0033] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체를 약학적으로 허용 가능한 담체 내에 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0034] 진세노사이드 화합물 K, 글리콜 키토산 및 이들의 결합체는 상기 설명한 바와 같다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어, "암"은 암의 종류에 제한없이 포함되나, 그 예로, 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종 또는 다발성 골수종 혈액암일 수 있고, 보다 바람직하게 상기 암은 대장암, 간암 또는 뇌암일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 대장암 세포주인 HT-29, 간암 세포주인 HepG2 및 뇌암 세포주인 HT22를 사용하여 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체의 세포 독성을 확인하여(도 8b 내지 8d), 상기 결합체가 항암 활성을 가지는 것을 확인하였다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 암 질환 의심 개체에 투여하여 암의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 다른 치료학적 요법 또는 공인된 암 치료 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 또한, 치료 방법에 있어서 다른 치료학적 요법 또는 제제와의 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.001 내지 1000mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로

투여할 수 있으며, 구체적으로 경구, 두개 내, 척수 내, 소화관 또는 비경구 투여를 목적으로 할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[0044] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 결합체의 암 특이적 치료효과를 확인하기 위해, 다양한 종류의 세포주에 글리콜 키토산, 진세노사이드 화합물 K 또는 이들의 결합체를 처리했을 때 세포의 생존율을 확인하였다. 그 결과, 글리콜 키토산을 처리한 것은 세포 생존율에 영향이 없었으며(도 8a), 상기 결합체는 암 세포주에 대하여 세포 독성을 가져 생존율을 현저하게 감소시키는 효과를 보였으나(도 8b 내지 8d), 정상 세포주에서는 생존율에 영향을 미치지 않고(도 9a), LPS(lipopolysaccharide) 처리로 발생하는 NO를 감소시키는 효과를 보이는 것을 확인하였다(도 9b). 따라서, 본 발명의 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체는 암 세포에 특이적 활성을 보이므로, 암 표적 치료용 조성물로서 우수한 효과를 가진다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 결합체는 진세노사이드 화합물 K에 비해 수용성이 증가하고, 수용액에서 나노 크기의 자기 집합체를 형성하며, pH 민감성을 가져 중성 pH에서 안정적이고 산성 pH에서 진세노사이드 화합물 K를 방출하여 암 세포 특이적 항암 활성을 가지므로, 암 치료용 조성물로서 우수한 효과가 있다.

[0046]

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1a 내지 1b는 GC-CK 결합체의 제조를 위한 합성 경로를 나타낸다. (a)는 CK를 CK-COOH로 만드는 과정이고, (b)는 CK-COOH를 이용하여 GC-CK를 만드는 과정이다.

도 2는 세포 내부에서 GC-CK 결합체로부터 CK를 방출하는 과정의 모식도이다.

도 3은 GC-CK 결합체와 GC의 ^1H NMR 스펙트럼이다.

도 4는 (a) GC, (b) CK-COOH, (c) GC-CK4, (d) GC-CK9의 FT-IR 스펙트럼이다.

도 5a 내지 5b는 GC-CK 결합체의 입자 크기를 나타낸 것이다. (a) GC-CK4, (b) GC-CK9. 구모양의 GC-CK 결합체는 TEM 이미지로 관찰하였다. 스케일 바는 200nm를 나타낸다.

도 6은 완충용액의 pH에 따른 GC-CK 결합체 안정성을 나타낸 것이다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다(n=3)

도 7은 완충용액의 pH에 따른 GC-CK 결합체로부터 CK 방출을 나타낸 것이다. 에러바는 표준편차를 나타낸다(n=3).

도 8a 내지 8d는 GC 및 GC-CK 결합체의 세포독성을 확인한 것이다. (a) HT29 세포주, (b) HT29 세포주, (c) HepG2 세포주, 및 (d) HT22 세포주에 대한 GC 및 GC-CK 결합체의 세포독성을 확인하였다. 에러바는 표준편차를 나타낸다.(n=3) ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01. 커큐민(Curcumin, 20 μM), 트롤록스(Trolox)는 양성 대조군으로 사용하였고 t-BHP와 GA는 음성 대조군으로 사용하였다.

도 9a 내지 9b는 RAW264.7(뮤린 대식세포) 세포에서 (a) 세포 독성과 (b) LPS 유도 산화질소 생산억제를 확인한 것이다. 에러바는 표준편차를 나타낸다(n=3). ***P<0.001. 설퍼레틴(surfuretin, 20 μM)은 양성 대조군으로 사용하였다. t-BHP, t-부틸 하이드로퍼옥사이드(tert-butyl hydroperoxide); GA, 글루타메이트(glutamate); LPS, 지질다당류(lipopolysaccharide); NO, 산화질소(nitric oxide)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되

어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0049] 실시예 1 : 재료

[0050] GC(glycol chitosan, Mw = 4.3×10^5 , 탈아세틸화 수준 = 75.2%), N-하이드록실 석신이미드(N-hydroxyl succinimide, NHS), 석신산 무수물(succinic anhydride), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드·하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide·hydrochloride, EDC·HCl)는 시그마알드리치(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. CK(compound K)는 인삼 유전자 자원 은행(경희대학교, 용인, 한국)에서 구입하였다.

[0051] 실시예 2 : GC-CK 결합체 합성

[0052] 소수성인 진세노사이드 CK(compound K)의 용해도와 암 세포 특이성을 증가시키고, 치료 목적으로 CK를 방출할 수 있도록 산성 조건에서 가수분해되는 에스터 결합을 통해 진세노사이드 CK와 GC(glycol chitosan)의 결합체를 제조하였다. 이를 위해 사용한 합성과정을 도 1a 내지 도 1b에 나타내었다. 또한, GC-CK 결합체의 작동 원리는 도 2에 나타내었다.

[0053] 구체적으로 GC-CK의 합성은 카르복실화된 CK(CK-COOH)를 준비하고, 이를 아마이드 결합으로 GC와 결합시키는 두 단계의 과정을 통해서 이루어졌다(도 1a 및 도 1b). CK(0.01g, 0.016mmol)를 2mL 피리딘/디클로로메탄(1:1) (pyridine/dichloromethane)에 용해시켰고 석신산 무수물(succinic anhydride)을 첨가하여 24시간 상온에서 반응시켰다. 그 다음 CK-COOH의 분말을 얻기 위해 진공상태에서 증발, 침전, 여과, 세척 후 건조시켰다. 그 다음 GC(0.1g, 0.53mmol)를 8 mL의 증류수에 용해시키고 24mL의 메탄올로 희석시켰다. 그 후 CK-COOH(0.038g, 0.053mmol), EDC(0.04g, 0.21mmol) 및 NHS(0.024g, 0.21mmol)를 첨가하고 24시간 동안 상온에서 교반하였다. 상기 혼합물을 투석막(dialysis membrane, MWCO: 14,000)에 옮기고 하루 동안 과량의 메탄올/증류수(75:25, v/v)에서, 그 다음 이틀 동안 증류수에서 투석시켰다. 그 다음, GC-CK 결합체를 얻기 위해 투석된 용액을 동결 건조하였다.

[0054] 실시예 3 : GC-CK 결합체의 구조 분석

[0055] GC-CK 결합체가 성공적으로 제조되었는지 확인하기 위해, 상기 GC-CK 결합체의 구조를 ^1H NMR과 FT-IR을 사용하여 확인하였다. NMR 스펙트럼은 300 MHz에서 기록하였다(JEOL, Tokyo, Japan). 각 샘플은 D_2O 또는 CD_3OD 에 용해시켰다. 결합체에 대한 FT-IR의 스펙트럼은 KBr 펠렛(pellet)을 사용한 퍼킨-엘머 FT-IR 분광 광도계(Perkin-Elmer FT-IR spectrophotometer)를 이용하여 기록하였다.

[0056] 도 3은 GC와 CK의 특징적 피크를 나타내는 GC-CK 결합체의 ^1H NMR 데이터이다. 100개의 반복되는 당 유니트(100 repeating sugar units)에서 CK의 수로 정의되는 DS(degree of substitution)는 CK의 메틸기 0.68ppm 내지 GC의 N-아세틸 2ppm까지 나타나는 양성자 피크의 통합 비율(integration ratios)을 기반으로 계산하였다. GC에 대한 CK의 공급 몰비율(feed molar ratio)을 다양하게 하여 두 종류의 GC-CK 결합체를 제조하였다. 예상대로, CK 공급 몰비율이 증가하면 DS가 증가하였다(즉, 0.1과 0.2 CK 몰 비율에 대하여 각각 DS 4와 9의 결합체를 얻음). 합성된 GC-CK 결합체를 DS 수치에 따라 코드화하였다. 예를 들어, GC-CK4는 CK의 DS가 4인 결합체를 나타낸다.

[0057] 도 4a는 GC의 FT-IR 스펙트럼을 나타내며, 3441 cm^{-1} (N-H 신축(stretch)과 겹치는 O-H 신축), 2880 cm^{-1} (지방족의 C-H 신축), 1659 cm^{-1} (아마이드 1 밴드, 아세틸기의 C=O 신축), $1470\text{--}1382\text{ cm}^{-1}$ (C-H 밴드), 1066 cm^{-1} (C-O 신축과 관련된 skeletal vibration)에서의 특징적 피크를 포함한다. CK-COOH의 FT-IR 스펙트럼은 1740 cm^{-1} 에서 매우 강렬한 카르복실기의 C=O 결합이 존재한 것을 확인하였으며, 이를 통해 CK가 에스테르화되었음을 알 수 있

었다(도 4b). GC와 비교하여 GC-CK 결합체에서의 1733 cm^{-1} 에 해당하는 피크가 증가된 것(도 4c와 도 4d)으로 카르보닐 결합이 존재함을 알 수 있었다. 이외에도 1558 cm^{-1} (아마이드 II 밴드, N-H 밴딩)와 1653 cm^{-1} (아마이드 I 밴드)의 피크 증가는 CK-COOH와 GC 사이의 아마이드 결합이 형성되었음을 나타낸다.

[0058] 결론적으로 CK-COOH와 GC 사이의 아마이드 결합을 통해 GC-CK 결합체를 성공적으로 제작하였음을 확인하였다.

[0059] 실시예 4 : GC-CK 결합체의 크기, 형태 및 안정성 분석

[0060] GC-CK 약물 결합체는 양쪽친매성(amphiphilic) 성질 때문에 수용액 환경에서 자기조립화된 나노입자(self-assembled nanoparticle)를 형성할 수 있다. 따라서, GC의 친수성 외부구조는 소수성을 가지는 CK 중심을 덮을 수 있고, 혈류에서 장시간 순환하도록 단백질 분해 소화를 막는다. 이러한 GC-CK 결합체의 특성을 확인하기 위해, 상기 결합체의 크기, 형태 및 안정성 분석을 수행하였다.

[0061] 결합체의 형태는 200 kV 가속전압에서 FE-TEM을 이용하여 관찰하였다. TEM 표본을 제조하기 위해, 탄소로 코팅한 200-메쉬 구리 격자판위에 표본 용액 한 방울을 두고 건조시켰다. 음성 대조군으로 사용하기 위해 포스포튕스틱산(phosphotungstic acid) 한 방울을 떨어뜨렸다. 결합체의 크기 분포(distribution)와 안정성은 각 샘플을 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) 또는 아세트이트완충용액(acetate buffer, pH 5.0)에 확산시켜 입자분석기(particle analyzer)를 사용하여 확인하였다.

[0062] 먼저 결합체의 크기를 확인한 결과, 수용액 배지에서 GC-CK4와 GC-CK9 결합체의 평균 지름은 각각 296 nm와 255 nm이었다(도 5a 및 도 5b). 나노입자의 크기는 소수성을 가지는 CK의 양이 증가할수록 감소하였는데 강한 소수성 상호작용에 의한 것으로 판단된다.

[0063] 다음으로 결합체들의 형태는 FE-TEM을 사용하여 확인한 결과, 결합체들이 외부의 친수성 GC와 내부의 소수성 CK 구조로 수용액 배지에서 구모양의 입자를 형성하는 것을 확인하였다(도 5a 및 도 5b).

[0064] 한편, 분자량, 입자 크기, 혈액 순환 시간, 안정성과 같은 다양한 특성은 종양 조직으로 나노입자가 전달되는데 모두 중요한 역할을 한다. 따라서 GC-CK 결합체의 안정성을 시간에 따라 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, PBS(pH 7.4)에서 입자 크기를 측정하여 확인하였다. GC-CK4 결합체의 안정성은 8일 동안 유지되었으며, 이는 수용성 배지에서 열역학적 안정성을 가짐을 의미한다. 또한, 나노입자 크기는 산성 조건(pH 5.0)에서 증가하였는데, 이는 근본적으로 결합체로부터 CK가 가수분해되기 때문이며, 소수성 상호작용을 통해 가수분해된 CK가 큰 응집체를 형성하게 된다(도 6).

[0065] 상기 실험을 통해, 본 발명의 GC-CK 결합체는 구 모양의 나노입자를 형성하며, 생리적 완충용액에서 GC-CK 결합체가 높은 안정성을 가짐을 알 수 있었다. 이는 상기 결합체가 생체 내에서 장기간 순환할 수 있음을 의미한다.

[0066] 실시예 5 : GC-CK 결합체로부터 pH에 따른 CK 방출 확인

[0067] 고분자의 전구약물(prodrug)을 결합한 중합체는 새는 맥관구조(leaky vasculature) 때문에 암 조직에 도달할 수 있다. 나아가, 표적 약물은 세포 내 자극에 노출됨에 따라 암 조직에서 방출될 수 있다. 특히, 일반 세포와 암 세포간의 pH의 차이 때문에 pH 반응성 약물 결합체에 대한 관심이 증가되고 있다. 구체적으로, 암 세포의 내부의 pH(pH 5.0-6.5)는 생리적인 pH 조건(pH 7.4)보다 훨씬 낮다. GC-CK 결합체로부터 CK 방출 양상은 pH 7.4(생리적 조건) 및 pH 5.0(병리생리적 조건)에서 표본을 인큐베이션하여 시간에 따라 관찰하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[0068] GC-CK 결합체(3 mg/ml)를 1 ml 의 증류수에 혼합하고 셀룰로오스 막 튜브(MWCO: 14,000)로 옮겼다. 그 다음 투석막을 30 ml 의 PBS(pH 7.4) 또는 아세트이트 완충용액(pH 5.0)에 두고 표본을 120 rpm으로 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 부드럽게 교반하였다. 일정한 시간 간격으로 5 ml 씩 표본을 제거하고 신선한 배지로 교체해주었다. 가수분해된 CK의 양을 관찰하기 위해, 용액을 수포화된(water-saturated) n-BuOH으로 세 번 추출하고 증발시켰다. 그 다음, 표본에 존

재하는 CK 양은 이동상으로 0분 동안 81 % B 및 19 % A, 7분 동안 81 % B 및 19 % A, 11분 동안 71 % B 및 29 % A, 14분 동안 71 % B 및 29 % A, 25분 동안 60 % B 및 40 % A, 28분 동안 44 % B 및 56 % A, 30분 동안 30 % B 및 70 % A, 31.5분 동안 10 % B 및 90 % A, 34분 동안 10 % B 및 90% A, 34.5분 동안 81 % B 및 19 % A, 40 분 동안 81 % B 및 19 % A로 아세토니트릴(용액 A)과 증류수(용액 B)를 이용하여 HPLC 통해 확인하였고 [Agilent, C18 column (3.0 × 50 mm, particle size 2.7 μm)], 유속은 모두 1.0 ml/min로 하였다. 각 표본의 투입량은 5μl였다. UV 검출은 203 nm에서 수행하였다.

[0069] 상기 HPLC 결과, CK 방출 비율은 pH 7.4에 비해 pH 5.0에서 높은 것을 확인하였다(도 7). GC-CK 결합체가 산에 불안정한 에스터 결합을 통해 제조되었기 때문에, 약산성 완충용액에서 일어나는 가수분해를 통해 고형암 조직과 엔도솜 및 리소솜에서도 가수분해가 일어날 것이라는 것을 알 수 있었다. 따라서, GC-CK 결합체에 존재하는 에스터 결합에 의한 CK의 pH 선택적 방출은 암과 같은 병리생리학적 위치로 CK를 표적전달하는데 효과적일 수 있다.

[0070] 실시예 6 : 정상 세포 및 암 세포에 대한 세포독성 확인

[0071] GC-CK 결합체의 항암 활성을 관찰하기 위해, MTT 분석을 통해 항암 세포에서 순수 GC, CK 및 GC-CK 결합체의 세포독성을 확인하였다.

[0072]

[0073] 구체적으로, HT-29(인간 대장암) 세포주는 한국 세포주 은행(서울, 한국)에서 구입하였고, 5% CO₂, 습도 95 %, 37 °C로 1% (w/v)페니실린-스트렙토마이신(Welgene, Inc.)과 10% (v/v) FBS(Welgene, Inc.)를 포함하는 RPMI 1640 배지(Welgene, Inc.)를 이용하여 배양하였다. 상기 세포는 96-웰 플레이트 한 웰 당 2×10^4 세포 밀도로 접종하였다(SPL Life Sciences, Korea). 24시간 동안 배양한 후, 배양 배지를 100 μl의 다양한 농도의 GC, 기본 GC, GC-CK를 포함한 배지로 교체하였고 24시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 다음으로 10 μl의 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazolium bromide)를 추가하고 3시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 그 다음 배양배지를 제거하고 100 μl DMSO로 blue formazan crystals을 용해시켰다. 흡광도는 Synergy HT multide-tection microplate reader (Molecular Devices, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm에서 확인하였다. HepG2 와 HT22 세포주에서도 상기 기술한 바와 같이 MTT 분석을 수행하였다. 세포독성 LPS(lipopolysaccharide) 유도 NO 분석은 RAW264.7(murine macrophage) 세포에서 수행하였다.

[0074] GC를 HT29 세포주에 처리하였을 때, 대부분의 세포들은 살아있었으며 세포독성이 나타나지 않았다(도 8a). 상기 결과를 통해 GC가 생체적합성을 가짐을 알 수 있다. 반면에, GC-CK 결합체는 HT29 세포(도 8b), HepG2 세포(도 8c) 및 HT22 세포(도 8d)에서 CK 처리와 비교하여 그와 유사하거나 높은 세포독성을 나타냈다.

[0075] 나아가, GC-CK 결합체를 RAW264.7 세포에 처리했을 때, CK를 처리한 것에 비해 낮은 세포독성을 가지며(도 9a), LPS로 유발된 산화질소 생산을 억제하였다(도 9b). 이를 종합하면, GC-CK 결합체는 암 세포에서는 세포 독성을 나타내나 정상 세포(RAW264.7)에서는 세포 독성을 나타내지 않으며, LPS에 의해 유도되는 산화스트레스를 억제하는 것을 알 수 있다. 따라서, GC-CK 결합체는 부작용 없이 암 세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있는 특성을 가지므로, 표적 항암제로 사용될 수 있다.

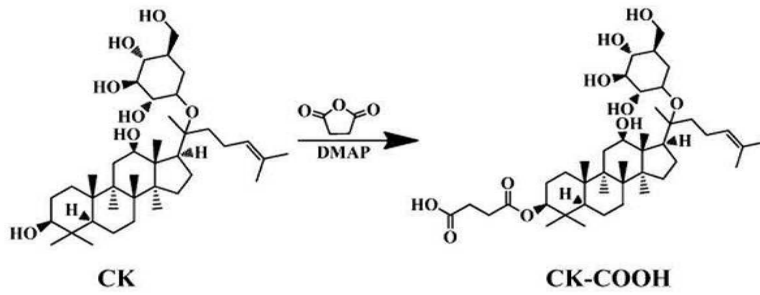
[0076] 종합하면, 본 발명의 GC-CK 결합체는 나노입자로 수용액 상에서 구를 형성하며, 혈액 내에서 장기간 순환할 수 있는 안정성을 갖는다. 또한, pH가 낮아지면 CK를 방출하는 특성을 가져 암 조직에서 특이적으로 CK를 방출할 수 있도록 하며, 결과적으로 정상 세포에서는 세포독성을 띄지 않으나, 암 세포에서는 높은 세포 독성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 GC-CK 결합체는 높은 수용성을 가지고, 암 세포 특이성을 가지는 항암제로 이용될 수 있다.

[0077]

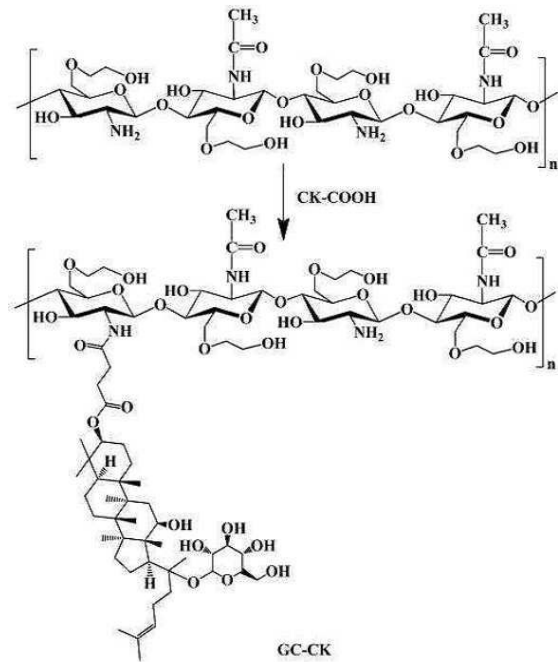
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 다른 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

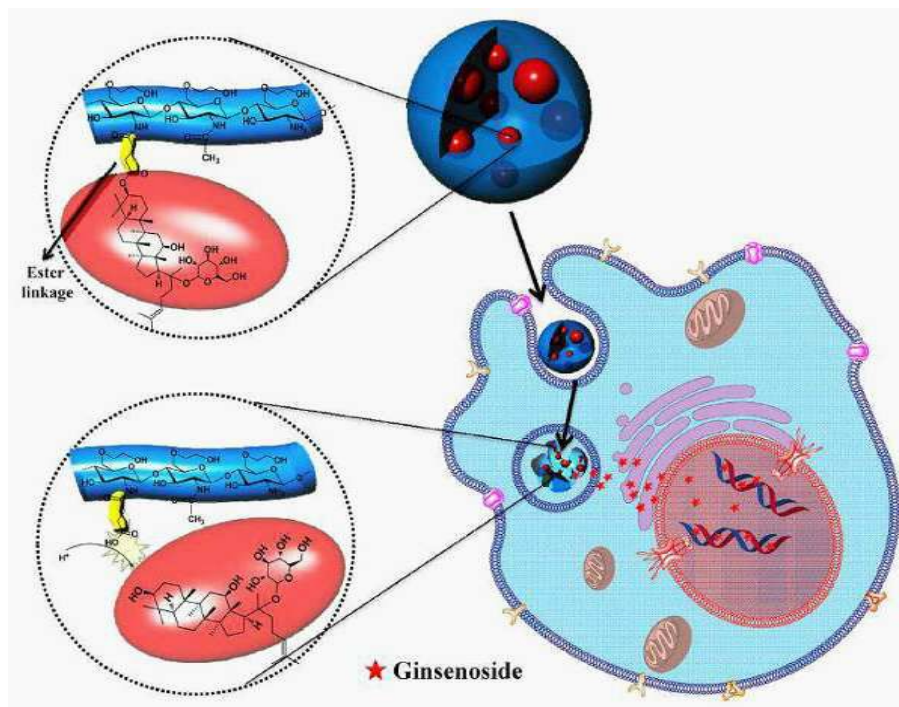
도면1a



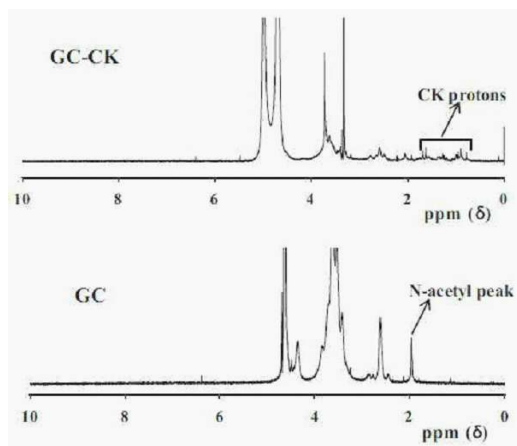
도면1b



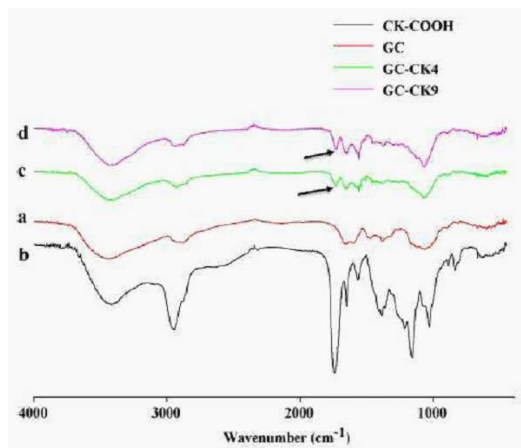
도면2



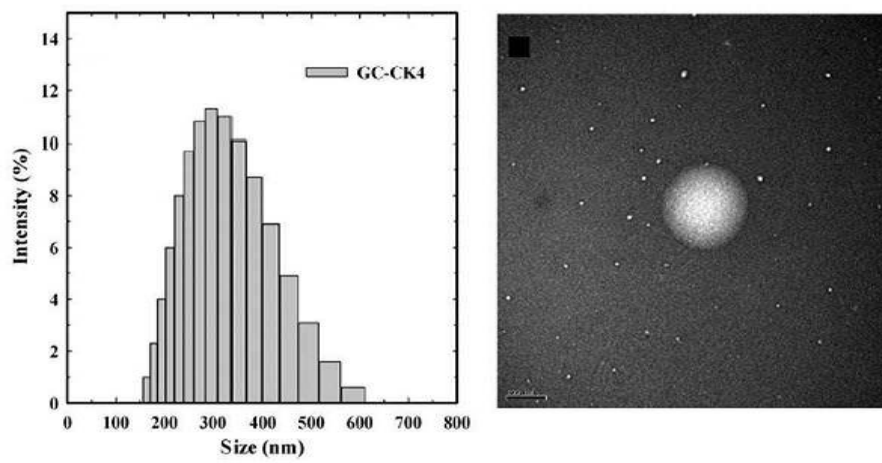
도면3



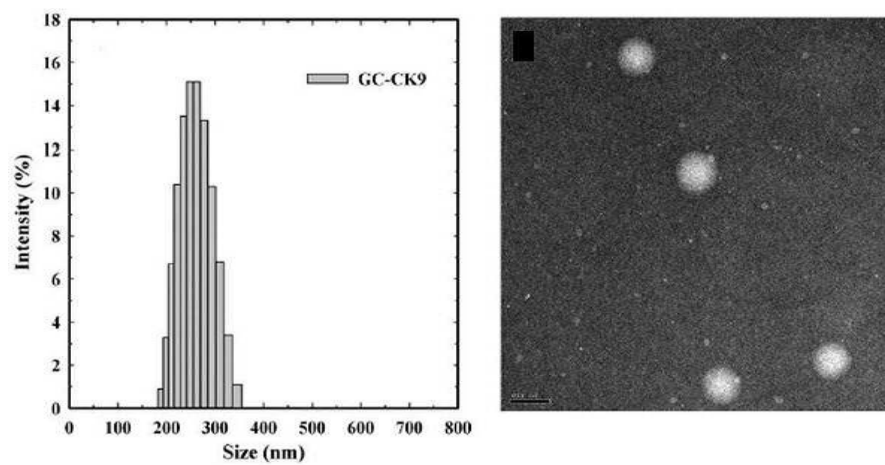
도면4



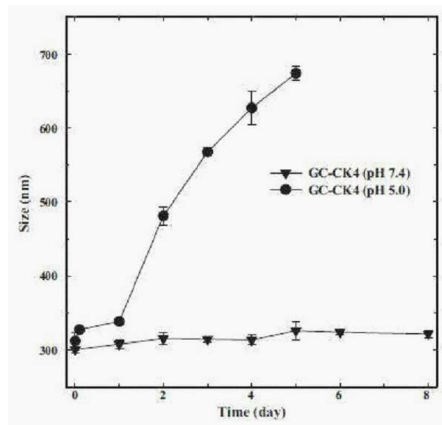
도면5a



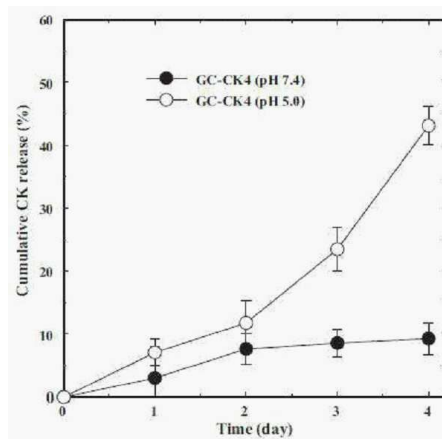
도면5b



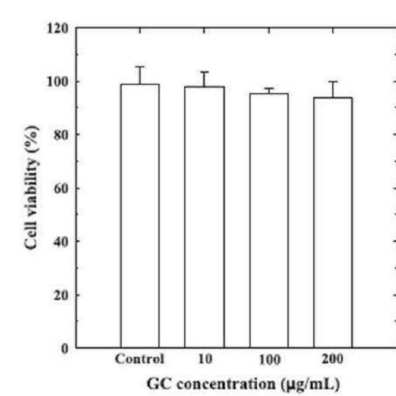
도면6



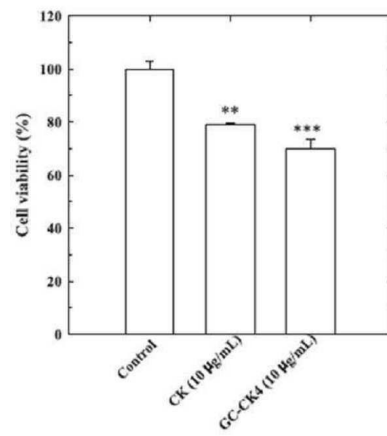
도면7



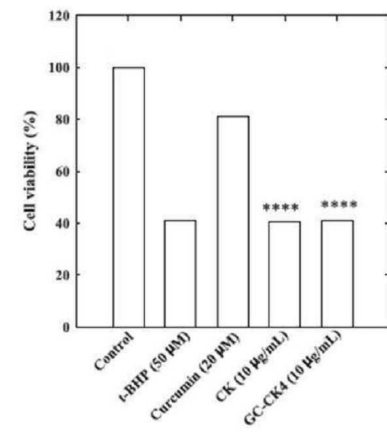
도면8a



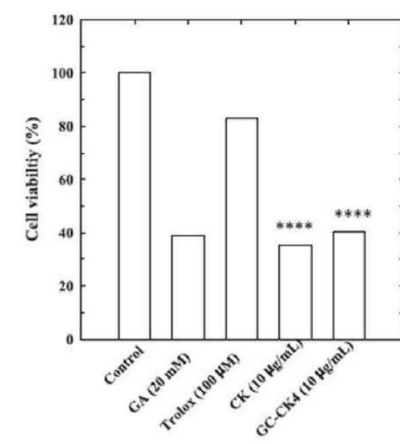
도면8b



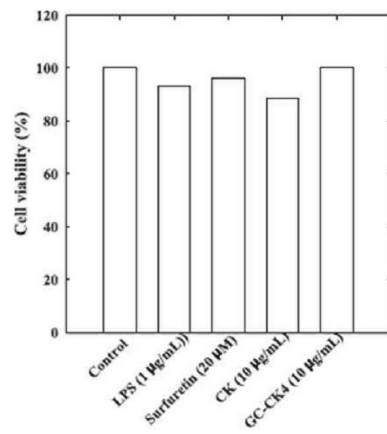
도면8c



도면8d



도면9a



도면9b

