



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0107934
(43) 공개일자 2016년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/168 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0031554

(22) 출원일자 2015년03월06일

심사청구일자 2015년03월06일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김명욱

경상 진주시 가호로44번길 7 102동 303호 (호탄동, 대동아파트)

(74) 대리인

손민

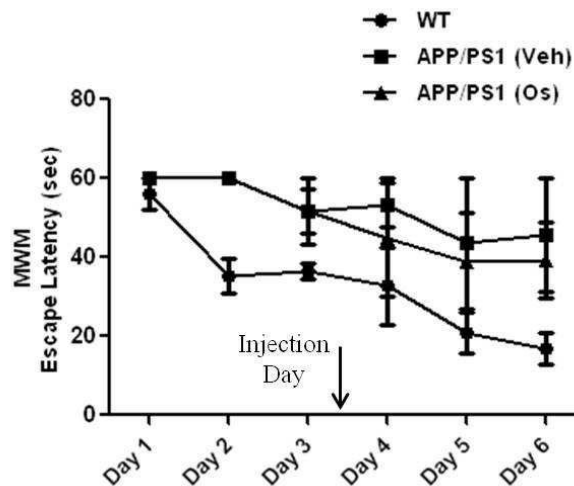
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 조성물

(57) 요약

본 발명은 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 건강기능식품용 조성물 및 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 오스모틴을 포함하는 조성물을 사용하는 경우, AMPK 및 SIRT1의 활성을 증가시켜 기억력 또는 학습능력 결함을 회복시킬 수 있어, 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래 유망 융합기술 파이오니어사업

연구과제명 치매(뇌기능향진 조절) 치료 천연신물질 소재 개발 ; 나노담체 적합형 약물 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 건강기능식품용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 오스모틴이 AMPK 또는 SIRT1의 활성을 증가시키는 것인 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 오스모틴은 10 내지 20 μ g/ml의 양으로 투여되는 것인 건강기능식품 조성물.

청구항 4

오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 건강기능식품용 조성물 및 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

사람의 세포는 분화 성장 및 파괴를 되풀이하고, 자연환경이나 음식, 운동 및 훈련과정을 통하여 세포성장은 촉진될 수 있으며, 세포 파괴를 지연시키는 물질도 우리의 생활 주변에 무수히 존재한다. 이들을 선별하여 섭취하고 활용할 때에는 장수와 함께 건강한 뇌기능을 유지할 수 있으나, 그렇지 못할 때에는 질병을 일으킬 수 있다. 사람에게서 가장 중심이 되는 것은 뇌기능이라 해도 과언이 아니다. 뇌세포의 활성도가 왕성할 때 정신력이 높아지며 의지 및 결단력이 강해지고 얼굴과 전신에 기력이 충만하게 된다. 예컨대 어린이에게서는 뇌세포의 활성도가 왕성할 때 뇌세포의 분화는 물론이고 성장과 판단력이 증강되며 기억력이 증진되고 학습능력이 향상된다. 반면에 사람은 나이가 들어갈수록 뇌기능이 저하되고 집중력이 약화되며, 스트레스 등의 외적 요인에 의하여도 기억력 및 학습능력이 저하된다.

[0003]

현재까지 국내에는 많은 기억력 또는 학습능력을 향상시키는 효능을 갖는 조성물 관련 특허가 공개, 등록되어 있으며, 대표적인 최근 공개 특허는 아래와 같다. 공개번호 제2014-0144785호는 유자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 및 학습능력 증진용 조성물에 관한 것이다. 공개번호 제2014-0142630호는 연근 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 개선 기능성 식품 및 기억력 손상 치료용 약학적 조성물에 관한 것이며, 공개번호 제2014-0132469호는 가시오가피, 당귀, 백복신, 석창포, 녹용으로 이루어진 혼합 추출물을 함유하는 기억력 및 집중력 증진 조성물에 관한 것이다. 하지만, 이러한 화학약제 및 천연 조성물이 시중에 나와 있어도, 아직은 효능이 확실한 우수한 제제가 개발되지 못하고 있는 실정이다. 또한, 시판중인 화학 약제들은 간독성, 불면증, 고혈압, 구토 등의 많은 부작용을 유발하고 있다. 따라서, 부작용이 적으며, 기억력 증진 및 학습능력 향상에 뛰어난 효과를 갖는 제제의 개발이 절실하다.

[0004] 한편, 척추동물의 호르몬 아디포넥틴(adiponectin)은 골격 근 및 간에서 AMPK/SIRT1 경로를 통해 에너지 대사를 조절하는 역할을 하며, 여러 신경 독소에 대하여 신경 보호 능력이 보고되어왔다(X. Shen, *et al. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G364-G374 (2010)). 오스모틴(osmotin)은 척추동물의 아디포넥틴과 구조적, 기능적으로 유사한 담배 단백질이고, 식물에서 오스모틴의 근본적인 역할은 병원체에 대한 방어인 듯하다. 오스모틴의 오솔로그(ortholog)는 식용 과일 및 채소에서 널리 존재하며, 구조적 유사성 및 발병과 관련된 (PR)-5 패밀리에 또는 타우마틴(thaumatin)-유사 단백질처럼 혈청학적 관련성에 의해 분류된다. 이와 관련하여 본 발명자들은 최근 오스모틴이 설치류의 뇌 발달 과정에서 글루타메이트(glutamate) 및 에탄올에 의해 유도된 신경 퇴화를 방어할 수 있다는 보고를 하였다. (대한민국 공개특허 제10-2011-0085260호). 다만, 상기 신경 퇴화는 글루타메이트 및 에탄올에 의해 유도된 제한적인 것이며, 이러한 신경 퇴화에 의하여 기억력 또는 학습능력 결함이 야기될 수도 있으나, 오스모틴이 기억력 및 학습능력에 대한 직접적인 효과를 가지는지에 대하여 확인한 것은 아니었다. 기억력 및 학습능력 저하를 보이는 인지 장애 환자에게서 낮은 수준의 혈청 아디포넥틴이 관찰된 결과에 비추어, 아디포넥틴과 구조적, 기능적으로 유사한 단백질인 오스모틴이 기억력을 증진시키거나 학습능력을 향상시킬 수 있는지 확인해 보고자 하였다.

[0005] 이에 따라 본 발명자들은 기억력 및 학습능력 저하 증상을 보이는 APP^{sw} 및 PS1(presenilin-1)을 발현하는 이중 유전자변형 마우스 라인에서, 오스모틴 처리가 기억력 및 학습능력 결함의 진행을 저지한다는 것을 밝힘으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 상기 결과는 오스모틴이 AMPK/SIRT1 경로를 통해 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 조성물로 이용될 수 있다는 것을 시사한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 건강기능식품용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 하나의 목적은 오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 하나의 양태로서, 본 발명은 오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 건강기능식품용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명에서 용어, "오스모틴(osmotin)"은 포도 등 숙성한 과일에 다량으로 함유되어 있는 단백질로서, 30여년 전 처음 발견되었다. 오스모틴의 기능과 관련하여 인체 내에서 비만 및 당뇨를 억제하는 단백질과 유사한 기능을 한다는 사실이 보고된 바 있으며, 일부 암의 치료용 조성물로 사용될 가능성에 대해 알려진 바 있으나, 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 조성물로 기능할 수 있다는 사실에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.

[0010] 본 발명자들은 상기 오스모틴이 기억력 및 학습능력 결함에 대한 방어 기능을 하며, 상기 결함을 개선시킬 수 있음을 최초로 규명하였다. 구체적으로 오스모틴은 기억력 및 학습능력 결함 증상을 보이는 동물 모델인 APP/PS1 마우스에서 기억력 및 학습능력 감소에 대한 방어를 하며, 인비보 및 인비트로에서 기억력 및 학습능력 과 관련하여 에너지 대사에 영향을 미치는 AMPK 및 SIRT1 단백질의 활성을 유도하는 것을 확인하였다. 또한 상기 마우스 모델에서 콜레스테롤 생합성을 억제할 뿐 아니라 기능적 시냅스의 수를 증가시키는 등 기억력 증진 및 학습능력 향상에 우수한 효과가 있음을 구체적 실험을 통하여 입증하기에 이르렀다.

[0011] 오스모틴은 개체에 따라 약 150개 내지 250개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 식물의 종류에 따라 그 이하 또는 그 이상의 아미노산으로 구성되어 있기도 하다. 이러한 오스모틴은 식물체의 숙성한 과일에 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데, 예를 들면 *Nicotiana tabacum*, *Citrus sinensis*, *Rosa roxburghii*, *Solanum tuberosum*, *Piper colubrinum*, *Solanum tuberosum*, *Ricinus communis*, *Arabidopsis thaliana* 등에 존재하는 것으로 알려져 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용되는 오스모틴의 종류가 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 오스모틴은 그 기원에 제한이 없으며, 상기와 같은 다양한 식물체로부터 유래된 오스모틴이 사용될 수 있

고, 공지된 유전 공학적 방법에 따라 인위적으로 합성되어 사용될 수도 있다.

- [0012] 바람직하게 본 발명의 오스모틴은 마우스의 경우 0.001 내지 1000 μ g/g의 양으로 투여될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 500 μ g/g의 양으로 투여될 수 있고, 보다 바람직하게는 1 내지 100 μ g/g의 양으로 투여될 수 있으며, 가장 바람직하게는 10 내지 20 μ g/g의 농도로 투여될 수 있다. 또한 0.001 μ g/g 이하로 투여한 경우에는 인지능력 증진에 대한 효과가 미미하며, 1000 μ g/g 이상으로 투여하더라도 그 이상의 인지능력 증진의 효과를 나타내지는 못한다. 다만 이러한 오스모틴의 투여량을 투여되는 세포 또는 개체의 종류, 부피, 특징, 무게 등의 다양한 요인에 따라 실험에 의해 당업자가 결정할 수 있다.
- [0013] 본 발명에서, 용어 "기억력 증진" 또는 "학습능력 향상"이란 기억력 또는 학습능력이 본 발명에 따른 건강기능식품용 조성물의 투여에 의해서 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0014] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 기억력 및 학습능력 결함 동물모델인 APP/PS1 마우스에 오스모틴을 처리한 경우 상기 결함이 회복되는 것을 확인하였다(도 1).
- [0015] 한편, 본 발명의 건강기능식품용 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0016] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스킵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0017] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0018] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에서는 인지능력 장애 마우스 모델인 APP/PS1 마우스에 MWM(Morris Water Maze) 테스트 및 Y-미로 자발 교대(Y-maze spontaneous alternation) 테스트를 이용하여, 상기 마우스에서 오스모틴의 기억력 및 학습능력 감소에 대한 방어 기능을 확인하였다(도 1 내지 도 3).
- [0020] 한편, AMPK(AMP-activated protein kinase) 및 SIRT1(the NAD⁽⁺⁾-dependent protein deacetylases sirtuin 1)은 세포의 에너지 감지 효소로 이들의 활성화는 에너지 생산을 이끄는 대사 경로의 활성을 이끈다. 뇌의 에너지 대사와 기억력 및 학습능력은 긴밀한 관련성이 있는데, 본 발명의 조성물은 이러한 AMPK 및 SIRT1의 활성을 유도함으로써 기억력 및 학습능력을 증진시킬 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 오스모틴을 처리하였을 때, 감소되었던 AMPK 및 SIRT1의 활성이 회복되는 것을 확인하였다(도 4 내지 7).
- [0021] 더 나아가 본 발명의 다른 일 실시예에서는 DIV21에서 배양한 해마 세포에 오스모틴을 처리하고 AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 수용체-매개 mEPSC(miniature excitatory postsynaptic currents)를 측정 한 결과, 오스모틴이 해마 뉴런에서 시냅스 사이의 결속력(synaptic strength)에 영향을 미치지 않고 기능적 시냅스의 수를 증가시키는 효과를 보이는 것을 확인하였다(도 11).
- [0022] 따라서 본 발명의 오스모틴을 포함하는 조성물은 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 건강기능식품용 조성

물로서 활용될 수 있다.

- [0023] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 오스모틴을 포함하는 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 약학 조성물을 제공한다.
- [0024] 오스모틴의 기억력 증진 또는 학습능력 향상에 관하여는 상기 기술한 바와 같다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "약학 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0026] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제, 자연적 담체 또는 비자연적 담체 등 당업계에 공지된 담체를 추가로 포함하여 제조할 수 있다.
- [0027] 한편, 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하고 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 내혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 따른 오스모틴을 포함하는 조성물을 사용하는 경우, AMPK 및 SIRT1의 활성을 증가시켜 기억력 및 학습능력 결함을 회복시킬 수 있어, 기억력 증진 또는 학습능력 향상용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 MWM 테스트의 훈련 기간(물에 잠긴 플랫폼)에서 탈출 시간을 보여준다. 화살표는 처리 시간을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값을 나타낸다($n=10/\text{군}$).
- 도 2는 훈련 후 이틀 동안 마우스를 쉬게 하고 MWM 프로브 테스트를 수행한 것이다. MWM 프로브 테스트(플랫폼이 제거된) 동안 플랫폼이 있었던 사분면에서 백분율로 표현된, 시간 소비를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값을 나타낸다($n=10/\text{군}$). 유의성; *** $p < 0.001$.
- 도 3은 이중 형질전환 APP/PS1 AD-모델 마우스에서 단기 기억력에 대한 오스모틴 처리의 효과를 평가하기 위해 수행된 Y-미로 자발 교대 테스트의 결과를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값($n=10/\text{군}$)을 나타낸다. 유의성; *** $p < 0.001$.
- 도 4는 9- 및 12-개월 된 미처리 WT, 및 운반체(Veh)- 또는 오스모틴(Os)-처리한 APP/PS1 및 APP^{sw} 마우스의 해마 및 피질 추출물에서 p-AMPK 및 SIRT1 수준의 웨스턴블랏 분석을 보여준다. 오스모틴($15\mu\text{g/g}$ of b.w.)은 이틀 동안 복강으로 두 번 투여하였다. β -액틴 신호를 로딩 대조군으로 보여준다. 그래프는 상기 웨스턴블랏에서 WT의 띠에 상대적인 띠 밀도를 나타낸다. 막대는 평균 $\pm$ SEM 값($n=5/\text{군}$)이다. 유의성; *** $p < 0.001$.
- 도 5는 WT 및 APP/PS1 마우스의 뇌 호모제네이트에서 AMPK 활성의 측정치를 나타낸 것이다. 상기 실험은 세 번씩 수행하였으며 세 번의 반복된 실험 중 하나의 대표적인 데이터를 보여준다. 유의성; *** $p < 0.001$.
- 도 6은 WT 및 APP/PS1 마우스의 뇌 호모제네이트에서 SIRT 활성의 측정치를 나타낸 것이다. 상기 실험은 세 번씩 수행하였으며 세 번의 반복된 실험 중 하나의 대표적인 데이터를 보여준다. 유의성; *** $p < 0.001$.

도 7은 9개월 된 WT 및 운반체(Veh) 또는 오스모틴(Os)을 처리한 APP/PS1 마우스의 해마 추출물에서 p-AMPK α (Thr¹⁷²) 및 AMPK α 및 β -액틴 (로딩 대조군)의 웨스턴블랏 분석을 보여준다.

도 8은 9개월 된 미처리 WT 및 운반체(Veh) 또는 오스모틴(Os)을 처리한 APP/PS1 마우스 해마 추출물에서 NMDAR1, NMDAR2, 시냅스 전부 마커(presynaptic marker)인 SNAP25 및 시냅토파이신 및 시냅스 후부 마커인 SNAP23 및 PSD95 수준의 웨스턴블랏 분석을 보여준다. 대표 사진 및 WT의 띠에 상대적인 띠 밀도를 나타내는 그래프를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ SEM 값(n=5/군)이다. 유의성: **P<0.01, ***P<0.001.

도 9는 8개월 된 미처리 WT 및 운반체(Veh) 또는 오스모틴(Os)을 처리한 APP/PS1 마우스 뇌 해마의 DG 및 CA1 지역에서 SNAP23(녹색, FITC 표지), 시냅토파이신(빨간색, TRITC-표지) 및 DAPI(파란색)의 위치를 나타내는 면역형광 사진이다. 그래프는 상응하는 형광 신호의 정량분석을 나타낸다. 유의성; **P<0.01, ***P<0.001.

도 10은 8개월 된 미처리 WT 및 운반체(Veh) 또는 오스모틴(Os)을 처리한 APP/PS1 마우스 뇌 피질에서 SNAP23 (녹색, FITC 표지), 시냅토파이신(빨간색, TRITC-표지) 및 DAPI(파란색)의 위치를 나타내는 면역형광 사진이다. 그래프는 상응하는 형광 신호의 정량분석을 나타낸다. 유의성; **P<0.01, ***P<0.001.

도 11은 운반체를 처리 및 오스모틴(8, 16, 32nM)을 처리한 군에서 배양한 해마 뉴런에서의 기록이다. (a)는 자발적인 통합된(spontaneous unitary) EPSC의 대표 기록이다. (b)에서는 mEPSC의 누적 진폭 분포(b, 좌측) 및 모든 기록된 뉴런으로부터 간략한 mEPSC 진폭(b, 우측)을 보여준다. (c)에서는 mEPSC의 누적 진동수 분포(c, 좌측) 및 모든 기록된 뉴런으로부터 간략한 mEPSC 진동수(c, 우측)를 보여준다. 오스모틴을 처리한 군과 대조군의 평균 mEPSC 진폭 사이에는 P>0.05이다. 유의성; **, P < 0.01.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하 본 발명을 실험에 및 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 실시예 1: 오스모틴

[0033] 본 발명에 사용된 오스모틴은 *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 세포를 NaCl에 적응시켜 배양한 것으로부터 명백한 균질성(apparent homogeneity, = 99 %)으로 정제하였고, 그 후 반복된 재결정화에 의해 더 정제하였다. 오스모틴의 내독소 함량은 내독소 평가 키트(LAL assay kit, Genescript)로 측정하였을 때 <0.03 EU/mg 단백질이었다.

[0034] 실시예 2: 마우스 종(strain) 및 약물처리

[0035] 잭슨 래보러토리(Jackson Laboratory)로부터 수컷 C57BL/6J 마우스(WT) 및 유전자가 도입된 이중 형질전환 B6.Cg-Tg(APPswe, PSEN Δ E9)85Dbo/Mmjax 기억력 및 학습능력 장애 마우스를 구입하였다. 상기 이중 형질전환 마우스는 CNS 뉴런에 인간 프레세닐린(Presenilin) 1 단백질(PS1-dE9) 돌연변이 뿐 아니라 키메라(chimeric) 마우스-인간 아밀로이드(amyloid) 전구체 단백질을 함유하는 스웨디쉬(Swedish) 돌연변이(Mo/HuAPP695swe)를 발현한다. 뉴런-특이적 에놀라아제(enolase) 프로모터에 인간 아밀로이드 전구체 단백질의 돌연변이형을 함유하는 스웨디쉬(K670N/M671L) 돌연변이를 과발현하는 형질전환 C57BL/6J-Tg(NSE-APPsw) KLAR 마우스는 대한민국 식품의약품안전청에서 구입하였다. 상기 두 종류의 형질전환 마우스는 모두 기억력 및 학습능력 장애 증상이 나타나므로, 본 발명의 모델로 사용되었다. 마우스는 임의로 사료와 물을 주며 25 °C에서 12시간 명/12시간 암 조건에서 사육하였다. 실험 과정은 대한민국 경상국립대학교 응용생명과학과의 동물 윤리 위원회 승인을 받았다.

[0036] 마우스는 처리 전에 다음과 같이 군을 나누었다: WT 마우스는 무작위로 2 개의 군으로 나누었다-식염수 처리군 및 오스모틴 처리군. 형질전환 마우스(단일 또는 이중)는 무작위로 3 개의 하위군으로 나누었다-식염수 처리군, 2회 오스모틴 처리군(이틀 연속) 및 4회 오스모틴 처리군(격일로 처리). 오스모틴(체중 g 당 15 mg)은 식염수에 녹여 복강을 통해 투여하였다. 상기 마우스는 8, 9, 11 및 12개월의 연령이 되었을 때 희생시켰다.

[0037] 실시예 3: 행동 실험

[0038] 행동 실험은 9개월 된 마우스로 수행하였다. 기억력 및 학습능력을 확인할 수 있는 해마-의존적 장기 공간 학습을 평가하기 위해 MWM(Morris water maze) 실험을 수행하였다. 상기 MWM 장치는 비독성 수용성 백색 잉크의 첨가로 불투명하게 만든 물($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 깊이 26 cm)이 채워진 원형 물탱크(100 cm 직경 X 40 cm 높이)로 이루어진다. 마우스를 적응시키고 훈련 및 실험을 하는 동안 위험 요소를 막기 위해 실험 장비는 행동 실험 방에 두었다. 각 마우스(n=10/군)는 훈련 기간당 두 가지 다른 사분면으로부터 마우스를 출발시키며 6일 동안 하루에 두 번의 훈련 기간을 가졌다. 물에 잠긴 탈출 플랫폼을 찾는 것에 의한 물로부터의 탈출 시간은 60초 동안 계산되었다. 만약 마우스가 60초 내에 물에 잠긴 플랫폼을 찾지 못한다면, 마우스를 플랫폼에 두고, 플랫폼 위에 10초 동안 머무르도록 했다. 훈련 3일째에, 마우스에 운반체 또는 오스모틴(15 mg/g b. w.)을 복강 주사하고 6일째까지 상기 훈련을 계속하였다. 상기 마우스는 그 후 이틀간의 휴식을 주고 9일째에 물에 잠긴 플랫폼이 없는 프로브 실험을 수행하였다. 플랫폼이 존재했었던 사분면에서 시간 소비를 기록하였다.

[0039] 기억력 및 학습능력을 평가하기 위하여 오스모틴 처리 전 또는 처리 후 3일 지난 마우스로 해마-의존적 공간 기억력에 대한 Y-미로 실험을 수행하였다. 본 실험의 골자는 마우스를 120° 각도의 세 개의 팔(50cm 길이 X 10cm 넓이 X 20cm 높이)을 가진 백색 Y-미로에 돌아다니도록 하는 것이다. 각 마우스를 Y-미로에 두고 실험 시작 전 최소 10분간 새로운 환경에 적응하도록 한다. 적응 기간 후, 상기 마우스를 무작위로 선택한 두 개의 팔의 교차점을 바라보도록 하여 Y-미로의 중앙에 두고 8분 동안 미로를 돌아다니도록 한다. 팔에 들어간 전체 횟수 및 세 팔에 모두 들어간 횟수를 행동 소프트웨어 시스템으로 기록하였다. 교대 백분율을 [세 팔에 모두 들어간 횟수 / 팔에 들어간 전체 횟수 - 2] $\times 100$ 으로 계산하였다. 교대 백분율은 공간 작업 기억 기능과 긍정적인 상관관계가 있다.

[0040] 실시예 4: 웨스턴블랏

[0041] 본 발명에서 단백질 발현 정도를 측정하기 위한 웨스턴블랏 실험의 구체적인 방법은 다음과 같다. 세포 용해물의 단백질 농도를 바이오래드(Bio-Rad) 단백질 분석 키트(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)로 각각 측정하였다. 동량(20 mg)의 단백질을 4-12% BoltTM 미니 겔(Novex, Life technologies)로 SDS-PAGE를 수행하였으며 PVDF 막으로 이동시켰다. 비특이적 결합을 줄이기 위해 상기 막을 5% 탈지 우유로 블락킹(blocking)하고 일차 항체로 4°C 에서 밤새 반응시켰다. 사용한 일차 항체는 다음과 같다: 항- β -액틴, 항-PSD95, 항-케스파아제-3, 항-p-Akt(Ser⁴⁷³), 항-AMPK, 항-p-AMPK(Thr¹⁷²) 및 항-아세틸 p53 (Cell Signaling Technology, Inc.), 항-아밀로이드 C-말단, 항-BACE-1, 항-SREBP1 & 2, 항-NMDAR1 & 2, 항-p-타우(Ser⁴¹³), 항-PARP-1, 항-시냅토파이신, 항-SNAP-25, 항-SIRT1, 항-ADAM10, 항-p-GSK3 β (Ser⁹), 및 항-SNAP23 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 항-APP, 항-sAPP- α 및 항-ADAM17 (Abcam technologies). 세척을 하고 호랑무과산화소(horseradish peroxidase)가 결합된 이차 항체와 반응시킨 후, 제조사의 지침(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 따라 ECL 시약을 이용하여 단백질 띠를 검출하였다. X-레이 필름을 현상하고 시그마 겔(Sigma Gel) 소프트웨어(SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용한 밀도측정으로 띠 강도를 분석하였다.

[0042] 실시예 5: 면역 형광 및 조직화학 분석

[0043] 조직에서의 단백질 발현을 확인하기 위하여 면역 형광 또는 조직화학 분석을 수행하였다. 마우스 뇌 조직 절편을 얻기 위하여, 먼저 얼음으로 차갑게 한 4% 파라포름알데히드로 경심 관류(transcardial perfusion)에 의해 마우스 뇌를 고정하였다. 4% 파라포름알데히드로 72시간 동안 뇌를 고정한 후 4°C , 72시간 동안 20% 수크로스(sucrose)로 옮겼다. 상기 뇌를 OCT(Optimal Cutting Temperature) 컴파운드(compound)(A.O, USA)로 고정시키고, 액체 질소로 얼린 후, CM3050C 크라이오스탯(cryostat)(Leica, Germany)으로 관상면으로 절단하였다(14 mm). 상기 조직 절편을 ProbeOn Plus 충전 슬라이드(Fisher, USA)에 두었다.

[0044] 면역형광 분석의 구체적인 실험 방법은 다음과 같다. 조직 절편을 포함하는 슬라이드를 0.01M PBS에서 15분 동안 2회 세척하였다. 프로테이나아제(proteinase) K를 절편 위에 붓고 슬라이드를 37°C 에서 5분간 항온처리하였다. 그 후 조직 절편을 블로킹 용액[5% 표준 염소 혈청, 0.3% 트리톤 X-100, PBS]에 1시간 동안 항온처리하였다. 상기 슬라이드를 일차 항체(상기 '웨스턴블랏'에서 기술한 바와 같음)와 함께 밤새 항온처리한 후 상온에서 90분간 2차 TRITC- 또는 FITC-결합 항체(PBS에서 1:50 희석; Santa Cruz)와 함께 항온처리하였다. 이중 염색을 위해, 항온처리는 동시에 수행하였다. 상기 슬라이드는 Prolong Antifade 시약(Molecular Probe,

Eugene, OR, USA)과 함께 고정시켰다. 모든 염색된 슬라이드를 공초점 레이저주사현미경(Fluoview FV 1000)을 이용하여 확인하였다.

[0045] 아밀로이드 플라크는 티오플라빈 S 염색 후 뇌 절편에서 시각화하였다. 뇌 절편을 0.01M PBS에서 10분간 2회 세척한 후, 상온에서 10분간 신선한 1% 티오플라빈 S 용액에 담겼다. 절편은 그 후 70% 에탄올에 5분간 담그고, 물에서 2회 씻어내고, PI(propidium iodide)로 대비염색하고 커버슬립으로 덮었다.

[0046] 형태학적 분석에서, 신호는 이미지 J 소프트웨어(미국 국립보건원에서 제공되는 공개 자원 소프트웨어)로 분석했고 IOD(Integral Optical Density)로서 표현하였다. 주어진 지역 내에 아밀로이드 플라크 지역의 백분을 또한 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0047] 실시예 6: 전기 생리학

[0048] 뉴런에서 기능적 시냅스를 확인하기 위하여 전기 생리학적 분석을 수행하였다. 먼저 E19 스프라구-돌리(Sprague-Dawley) 래트로부터 분리한 초대 해마 뉴런을 150 세포/mm² 밀도로 배양하였다. mEPSC(AMPA receptor(AMPA)-mediated miniature excitatory postsynaptic currents)는 통상적인 전체-세포(whole-cell) 기술을 이용하여 기록하였다. 내부 용액을 채웠을 때 전극 저항은 3 내지 5MΩ으로 하였다. 악소패치 200A 패치-클램프 증폭기(Axopatch 200A patch-clamp amplifier, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정을 수행하였다. 전압, 명령, 막 전압 및 전류의 디지털화는 IBM-호환 컴퓨터에서 pClamp 소프트웨어 패키지의 Clampex 0.2(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)와 함께 Digidata 1322A 인터페이스를 이용하여 조절하였다. Clampfit(Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 및 Prism 4.0(GraphPad, San Diego, CA)를 이용하여 데이터를 분석하였다. 전류는 증폭기에서 4-극 베셀(Bessel) 필터를 이용하여 2 kHz에서 저주파 통과(low-pass) 필터를 하였다. AMPAR-mEPSC는 1mM 테트로독소틴(tetrodotoxin)을 첨가하고 내부 및 외부 용액 조성에서 Cl⁻ 평형 포텐셜인 막 포텐셜이 -70mV를 유지하게 함으로써 전기 생리학적으로 분리하였다. 세포 내 기록 용액(패치 전극)은 다음을 포함한다(mM): 125 Cs 메탄설포네이트, 8 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP 및 5 QX-315 Cl (pH 7.25 with CsOH, 285 mosmol⁻¹). 세포 외 기록 용액은 다음을 포함한다(mM): 134 NaCl, 5.4 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 D-글루코스, 및 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). 각각의 세포에 대하여, 데이터는 2KHz에서 필터하고 Clampfit 9.0 소프트웨어(Molecular Devices, Union City, CA)에서 실행되는 템플레이트-기반 소형 시냅스 전류 탐지 알고리즘을 이용하여 분석하였다. 상기 소프트웨어에 의해 검출된 각각의 추정 mEPSC는 그 대략적인 형상이 시냅스에서 일어나는 양상으로 기대되는 것인지에 따라 시각적으로 채부를 결정하였다. 상승 시간 표준(rise time criteria)을 만족시키는 300 개의 연속적인 mEPSC를 각 세포로부터 분석하였다. AMPAR 매개 EPSC 진폭은 -70mV 전류 피크에서 측정하였다. 데이터는 괄호 안에 주어진 실험 횟수와 함께 평균 ± SEM 값으로 제공된다. mEPSC의 누적확률 곡선(cumulative probability curves)은 Clampfit 9.0 소프트웨어 및 Prism 4.0(GraphPad, San Diego, CA)를 이용하여 계산하였다. 두 군의 비교를 위해 스튜던트 t-테스트를 사용하였다. 통계적 유의성은 p<0.05이다.

[0049] 실시예 7: 효소 분석

[0050] 형질전환 마우스 뇌 호모제네이트 및 SHSY5Y 세포 용해물에서 활성화된 AMPK 수준을 측정하기 위하여 제조사의 지침에 따라 CycLex AMPK 카이나아제 분석 키트를 사용하였다. 뇌 호모제네이트 및 세포 용해물의 AMPK 활성화는 흡광도 450nm에서 기록하였다.

[0051] 제조사의 지침에 따라 HDAC Fluorimetric 분석 키트(Enzo Lifesciences)를 사용하여 마우스 뇌 호모제네이트 및 SHSY5Y 세포 용해물에서 SIRT 활성을 측정하였다. 효소 활성은 440/460nm의 형광 방출, 350/380nm의 여기(excitation) 파장에서 측정하였다.

[0052] 실험예 1: APP/PS1 마우스에서 오스모틴의 기억력 및 인지 감소에 대한 방어 기능 확인

[0053] 본 발명자들은 먼저 MWM(Morris Water Maze) 테스트 및 Y-미로 자발 교대(Y-maze spontaneous alternation) 테스트를 이용하여 이중 유전자변형 APP/PS1 기억력 및 학습능력 결함 모델 마우스에서 해마-의존적 기억력 및 학

습능력에 대한 오스모틴의 효과를 확인하였다(도 1 내지 도 3). 물에서 플랫폼으로 탈출 시간은 훈련 1일째에는 유전자가 변형되지 않은 야생형(WT) 마우스보다 APP/PS1 마우스가 약간 더 걸린 정도로 차이가 미미하였으나, 2 일째부터는 그 차이가 크게 증가하였다. 이러한 결과를 통해 APP/PS1 마우스에서는 야생형에 비해 공간 기억력 및 학습능력 결함이 일어난다는 것을 알 수 있었다. 이때, 오스모틴의 영향을 확인하기 위하여 훈련 테스트 3일째부터 오스모틴을 APP/PS1 마우스에 투여하였다. 그 결과, 오스모틴을 투여한 APP/PS1(0s) 마우스는 4일째에 탈출 시간의 급격한 감소가 있었고, 그 이후(4일 및 5일)에도 지속적으로 APP/PS1 마우스에 오스모틴을 처리한 그룹과 미처리 그룹 사이에 탈출시간의 차이가 생긴 것을 확인할 수 있었다(도 1). 이를 통해 오스모틴을 처리하는 경우 공간 기억력 및 학습능력 결함을 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0054] 또한, 상기 테스트 이후에 플랫폼이 제거된 프로브(probe) 테스트를 수행하기 위하여, 상기 테스트를 거친 마우스에게 훈련 기간 후 2일의 휴식기간을 주었다. 프로브 테스트에서, WT, 오스모틴 미처리 및 오스모틴을 처리한 APP/PS1 마우스가 플랫폼이 존재했던 사분면에서 소요한 시간은 각각 35.80%, 17.60% 및 24.58%였으며(도 2), 이는 오스모틴 처리가 APP/PS1 마우스의 장기간 공간 기억력 및 학습능력 결함을 감소시켰다는 것을 의미한다.

[0055] 다음으로 APP/PS1 마우스에서 단기 공간 기억력 상실에 대한 오스모틴의 효과를 확인하기 위해 Y-미로 테스트를 수행하였다. 자발적 변화는 세 팔에 모두 들어간 횡수와 각 팔에 들어간 전체 횡수를 기록하여 계산하였다. 처리 3일 후, WT, 오스모틴 미처리 및 오스모틴을 처리한 APP/PS1 마우스의 변화 백분율을 각각 도 3의 그래프에 나타내었다. 오스모틴 미처리 마우스는 WT에 비하여 자발적 변화가 감소되었으나, 오스모틴을 처리한 마우스에서는 자발적 변화율이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 3). 이는 상기 오스모틴 처리가 APP/PS1 마우스의 단기 공간 기억력 결함을 감소시켰다는 것을 나타낸다.

[0056] 결론적으로 오스모틴 처리는 APP/PS1 마우스의 장기 공간 기억력, 단기 공간 기억력 및 학습능력의 감소를 회복시키므로, 기억력 증진 또는 학습능력 향상을 위한 건강기능식품용 조성물로 우수한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0057] 실험예 2: 오스모틴의 AMPK 및 SIRT1 활성 유도 효과 확인

[0058] AMPK(AMP-activated protein kinase) 및 SIRT1(the NAD^{+} -dependent protein deacetylases sirtuin 1)는 세포의 에너지 감지 효소로서 이들의 활성은 에너지 생산에 관련된 대사 경로의 활성을 이끈다. 오스모틴 처리가 뇌에서 에너지 대사에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 AMPK 및 SIRT1의 활성에 대한 웨스턴블랏 분석을 수행하였다. 분석 결과 해마와 피질 모두에서 활성화된 AMPK(p-AMPK α (Thr¹⁷²)) 및 SIRT1의 수준이 WT에 비해 APP/PS1 및 APP^{sw} 마우스에서 낮다는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 마찬가지로, 효소 분석 키트를 이용하여 마우스의 뇌 호모제네이트에서 AMPK 및 SIRT1의 활성을 조사한 결과, WT에 비하여 APP/PS1 마우스의 뇌 조직에서 각 효소의 활성이 더 낮은 것으로 확인되었다(도 5 및 도 6). 이러한 결과는 기억력 및 학습능력 결함 모델인 APP/PS1 및 APP^{sw} 마우스에서 뇌의 에너지 대사에 결함이 있다는 것을 의미한다.

[0059] 하지만, 오스모틴을 처리하였을 때 9개월 된 WT 마우스의 해마에서 p-AMPK α 수준이 증가되었다(도 7). 또한 오스모틴 처리는 오스모틴 미처리군과 비교하여 9개월 및 12개월 된 APP/PS1 및 APP^{sw} 마우스의 피질 및 해마에서 p-AMPK α 및 SIRT1의 수준 증가를 이끌었다(도 4).

[0060] 마찬가지로, 본 발명자들은 오스모틴 미처리군과 비교하여 오스모틴을 처리한 9 및 12개월 된 APP/PS1 마우스의 뇌 호모제네이트(homogenate)에서도 AMPK 및 SIRT1의 활성 증가를 관찰하였다(도 5 및 도 6).

[0061] 종합하면 오스모틴이 AMPK 및 SIRT1의 활성 감소를 막는 상기와 같은 결과들은 오스모틴이 뉴런에서 에너지를 촉진시키거나 또는 에너지 대사 감소를 방어할 수 있다는 것을 시사한다. 그리고 뉴런에서 에너지를 촉진함으로써 기억력 및 학습능력 결함을 회복할 수 있으므로, 본 발명의 오스모틴을 포함한 조성물은 기억력 증진 및 학습능력 향상에 우수한 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] 실험예 3: APP/PS1 마우스에서 NMDA 수용체의 상실 및 NMDAR 활성의 상실에 대한 오스모틴의 효과 확인

[0063] 기억력 및 학습능력과 관련하여 시냅스 가소성(synaptic plasticity), 시냅스 형성 및 기억력 기능을 조절하는 N-메틸-D-아스파테이트(aspartate) 수용체 NMDAR(NR1) 및 NMDAR2(NR2)의 발현 수준을 웨스턴블랏으로 측정하였는데, 오스모틴을 미처리한 APP/PS1 마우스의 뇌 조직에서는 낮은 수준으로 관찰된 반면 오스모틴을 처리한

APP/PS1_(OS) 마우스에서는 수준이 증가하였다. SNAP-23(synaptosomal-associated protein of 23 kDa) 및 SNAP-25는 세포 표면에 NMDAR의 트래피킹(trafficking)에 중요한 역할을 하는데, 오스모틴을 미처리한 APP/PS1 마우스 뇌의 해마 및 피질 조직 추출물의 웨스턴블랏 분석(도 8) 및 조직 절편의 면역형광 분석(도 9 및 도 10)으로 SNAP23, SNAP25, 시냅토파이신(synaptophysin) 및 PSD95의 수준이 WT에서보다 낮고 오스모틴 처리는 이러한 감소에 대하여 APP/PS1 마우스를 보호한다는 것을 확인하였다. 상기 경향은 8 내지 9개월 사이의 마우스에서 관찰되었다. 특히 해마에서, 시냅토파이신 및 SNAP23에 대한 이러한 경향은 DG 및 CA1 지역에서 관찰되었다(도 9). 결과적으로 오스모틴은 APP/PS1 마우스에서 NMDA 수용체의 상실 및 NMDAR 활성 상실을 막는다는 것을 확인하였으며 이는 오스모틴이 기억력을 증진시키고 학습능력을 향상시키는 효과가 있음을 의미한다.

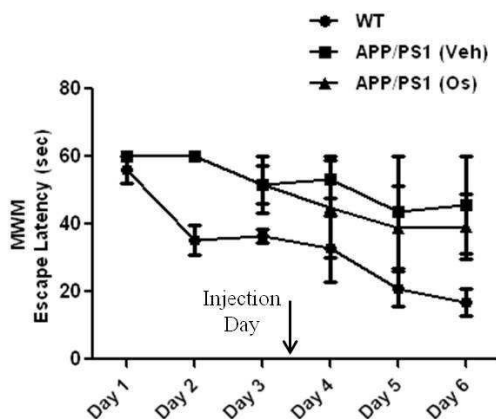
[0064] **실험예 4: 해마 뉴런에서 시냅스 사이의 결속력(synaptic strength)에 영향을 미치지 않고 기능적 시냅스의 수를 증가시키는 오스모틴의 효과 확인**

[0065] 기능적 시냅스는 기억력 및 학습능력에 영향을 미치므로 오스모틴이 기능적 시냅스의 가소성에 효과를 가질 수 있는지 조사하기 위해, 본 발명자들은 오스모틴(8에서 32nM)을 24시간 처리하거나 오스모틴을 미처리하고, DIV 21에서 배양한 해마 세포에서 AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 수용체-매개 mEPSC(miniature excitatory postsynaptic currents)를 측정하였다. 오스모틴(16 및 32nM)은 오스모틴 미처리 대조군과 비교하여 AMPAR을 통해 mEPSC의 평균 진동수(frequency)를 증가시켰다; (오스모틴 미처리, 15.6 ± 3.2 Hz; 오스모틴 8 nM, 17.1 ± 1.0 Hz; 오스모틴 16 nM, 25.0 ± 2.1 Hz; 오스모틴 32 nM, 34.0 ± 2.0 Hz; 모든 군에 대해 n=7). 하지만, 모든 오스모틴을 처리한 군에서 AMPAR-매개 mEPSC의 평균 진폭에 대해서는 효과가 거의 없었는데, 이는 오스모틴 처리가 시냅스 후부의 결속력(postsynaptic strength)에는 변화를 유도하지 않는다는 것을 의미한다(오스모틴 미처리, 9.7 ± 0.4 pA; 오스모틴 8 nM, 10.3 ± 1.5 pA; 오스모틴 16 nM, 10.8 ± 1.5 pA; 오스모틴 32 nM, 10.5 ± 0.4 Hz; 모든 군에 대하여 n=7) (도 11). 결론적으로 오스모틴의 처리는 시냅스 후부의 결속력에 상당한 변화를 유도하지 않으면서도, 기능적 시냅스의 수를 증가시킴으로써 인지능력을 증진시킬 수 있다.

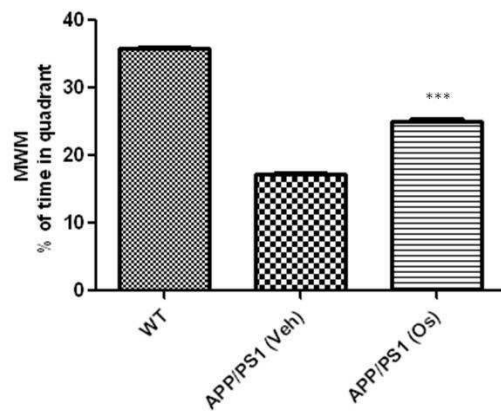
[0066] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

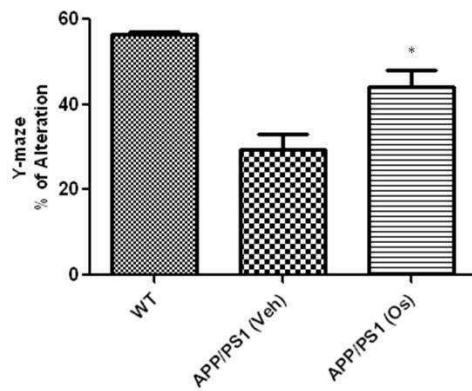
도면1



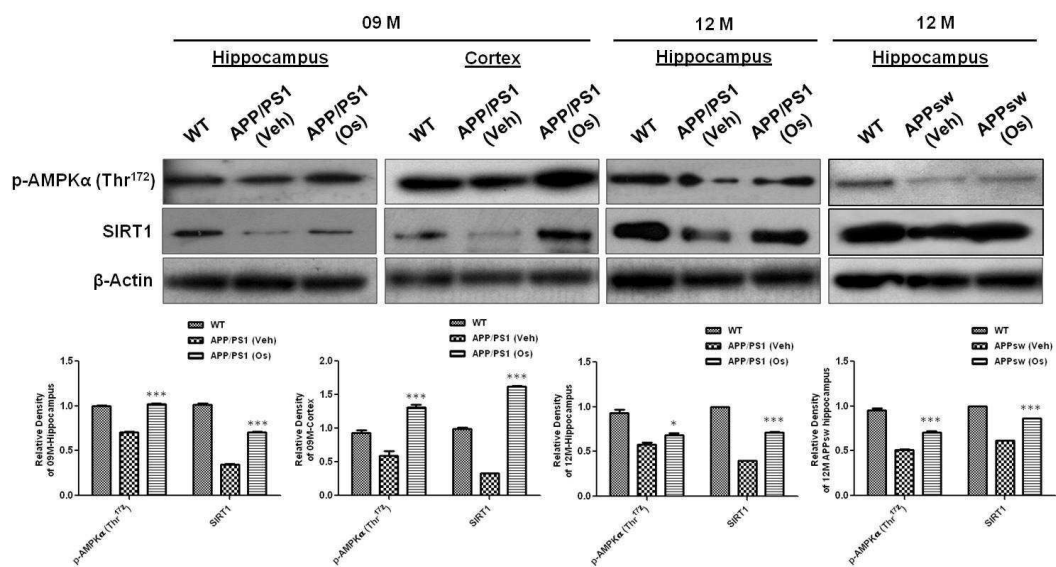
도면2



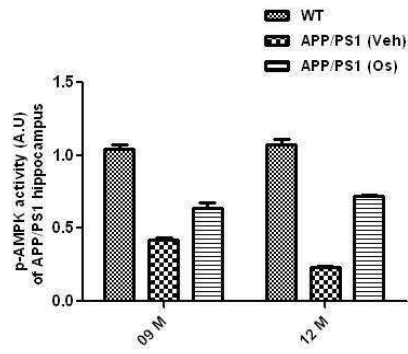
도면3



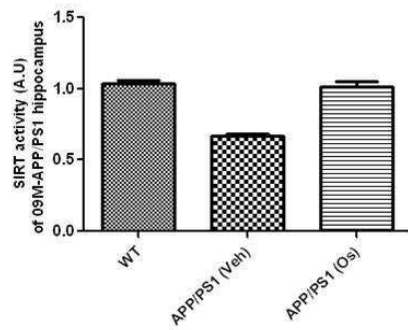
도면4



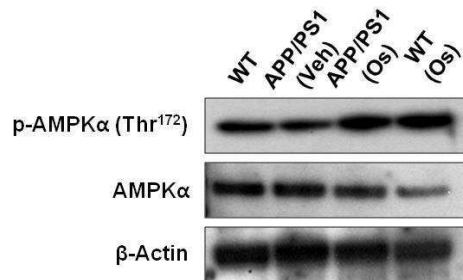
도면5



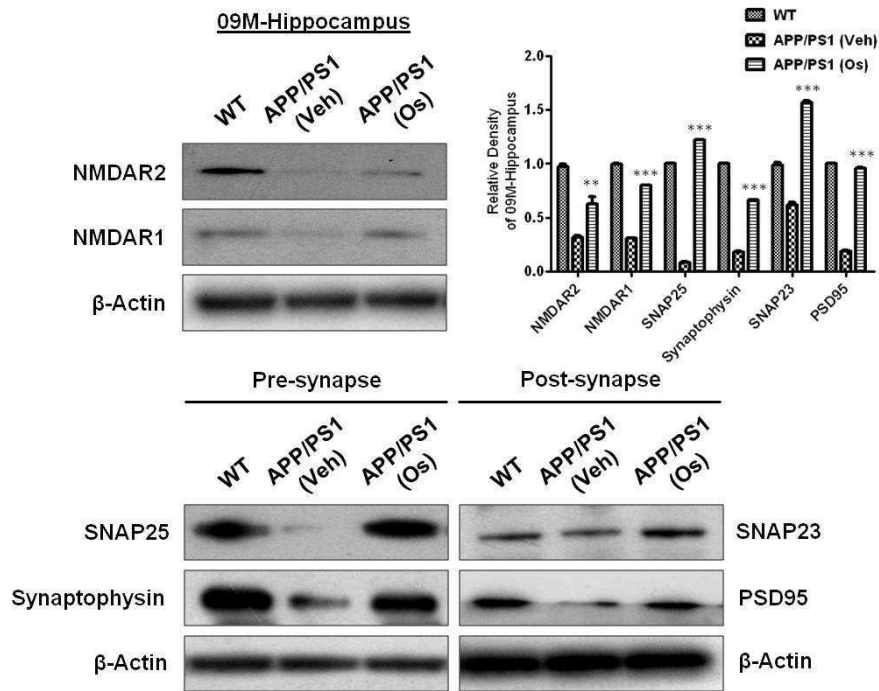
도면6



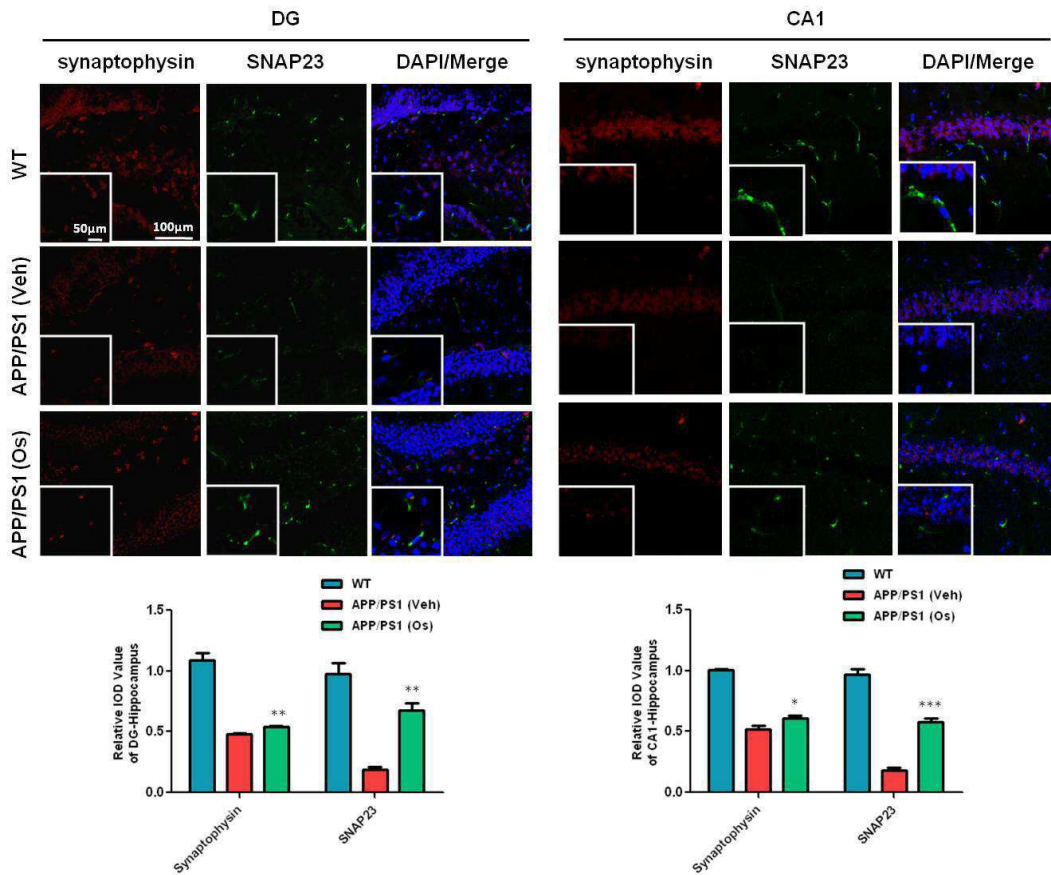
도면7



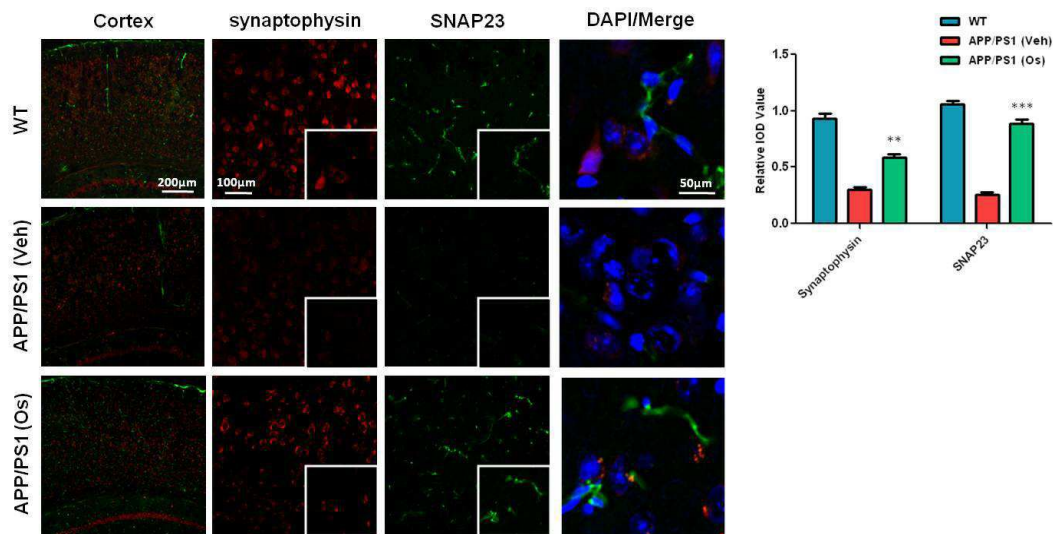
도면8



도면9



도면10



도면11

