



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0078962
(43) 공개일자 2020년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)

A61K 49/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5169 (2013.01)

A61K 47/183 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0168360

(22) 출원일자 2018년12월24일

심사청구일자 2018년12월24일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

임용범

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 226호 (신촌동)

권수현

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 225호 (신촌동)

(74) 대리인

특허법인 하나

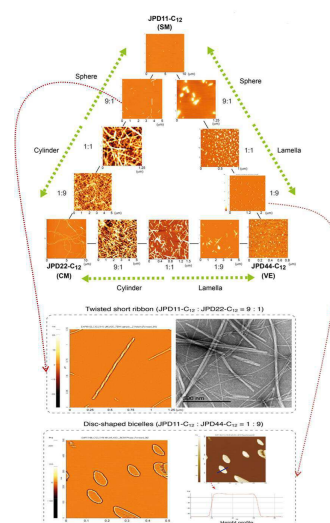
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 야누스 펩타이드 덴드리머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 펩타이드 및 알킬 사슬을 포함하는 덴드리머로서, 구체적으로는 야누스 펩타이드 덴드리머(Janus peptide dendrimer, JPD)에 관한 것이다. 상기 덴드리머는 3차원 구조를 형성하며, 이를 포함하여 자가조립된 나노구조체 역시 3차원 구조를 형성하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 덴드리머 및 이를 포함하는 나노구조체는 약물 전달 및 진단을 포함한 바이오 의학 분야, 구체적으로 바이오 이미징 및 약물 전달 캐리어로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 49/0056 (2013.01)

A61K 49/0082 (2013.01)

C07K 5/0817 (2013.01)

A61K 2123/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2A2A05069773

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 고차원 자기조립 인공단백질 소재의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

친수성 펩타이드 및 알킬 사슬을 포함하는 덴드리머로서,
상기 펩타이드는 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하거나, 아세틸기(-COCH₃)가 결합된 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하는 것인, 덴드리머.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 덴드리머는 야누스(Janus) 형태인 것인, 덴드리머.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 덴드리머는 3차원 구조를 형성하는 것인, 덴드리머.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 덴드리머 내에 1개 내지 10개 포함되는 것인, 덴드리머.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 알킬 사슬은 덴드리머 내에 1개 내지 10개 포함되는 것인, 덴드리머.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 알킬 사슬은 탄소를 1 내지 30개 포함하는 것인, 덴드리머.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 덴드리머는 형광물질을 추가로 포함하는 것인, 덴드리머.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 형광물질은 플루오레신(fluorescein), FAM(carboxyfluorescein), 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 테트라메틸로다민, 카르복시로다민, 카르복시로타민 6G, 카르복시로돌, 카르복시로다민 110, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 캐스케이드 옐로우(Cascade Yellow), 코마린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-크롬, 피코에리트린, PerCP(페리딘 클로로필-a 단백질), PerCP-Cy5.5, JOE(6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레신), NED, ROX(5-(및-6)-카르복시-X-로다민), HEX, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린(Oregon Green) 500, 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 알렉사 플루오어(Alexa Fluor, 상표명) 350, 알렉사 플루오어 430, 알렉사 플루오어 488, 알렉사 플루오어 532, 알렉사 플루오어 546, 알렉사 플루오어 568, 알렉사 플루오어 594, 알렉사 플루오어 633, 알렉사 플루오어 647, 알렉사 플루오어 660, 알렉사 플루오어 680, 7-아미노-4-메틸코마린-3-아세트산, 보디피(BODIPY, 상표명) FL, 보디피 FL-Br2, 보디피 530/550, 보디피 558/568, 보디피 564/570, 보디피 576/589, 보디피 581/591, 보디피 630/650, 보디피 650/665, 보디피 R6G, 보디피 TMR 및 보디피 TR로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것

인, 덴드리머.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 덴드리머를 포함하는, 나노구조체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 나노구조체는 3차원 구조인 것인, 나노구조체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 나노구조체는 구형 미셀, 원통형 미셀 또는 소낭 형태인 것인, 나노구조체.

청구항 12

제11항의 나노구조체를 포함하는 약물 전달체 조성물.

청구항 13

제11항의 나노구조체를 포함하는 조영제 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 조영제 조성물은 폐암 또는 자궁경부암 진단용인 것인, 조영제 조성물.

청구항 15

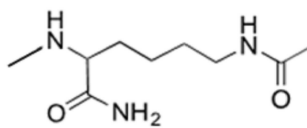
- a) 중심구조를 기준으로 한 측면에는 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하거나, 아세틸기(-COCH₃)가 결합된 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하는 펩타이드를 결합하고, 다른 측면에는 알킬 사슬을 결합시키는 단계; 및
- b) 상기 중심구조를 기준으로 결합된 펩타이드 및 알킬 사슬이 3차원 형태로 자가조립 되도록 하는 단계를 포함하는, 덴드리머 제조방법.

청구항 16

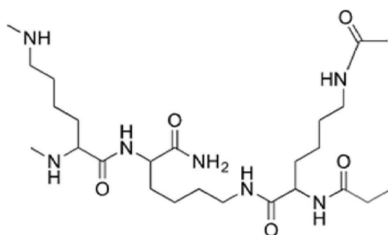
제15항에 있어서,

상기 중심구조는 하기 화학식 1 내지 화학식 3 의 구조 중 어느 하나의 구조를 가지는 것인, 덴드리머 제조방법.

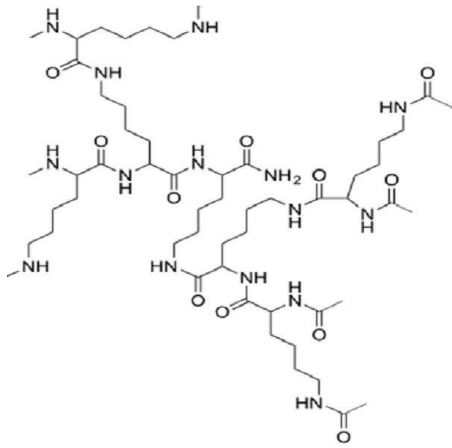
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 17

제15항에 있어서,

상기 펩타이드는 덴드리머 내에 1 개 내지 10개 포함되도록 하는 것인, 덴드리머 제조방법.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 알킬 사슬은 덴드리머 내에 1 개 내지 10개 포함되도록 하는 것인, 덴드리머 제조방법

청구항 19

제15항에 있어서,

상기 덴드리머는 형광물질을 추가로 포함하는 것인, 덴드리머 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 야누스 펩타이드 덴드리머(Janus peptide dendrimer, JPD) 및 이를 포함하는 나노구조체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 펩타이드 자가조립은 최근 의학, 생명 분야에서 뛰어난 생체 적합성과 다양한 응용이 가능해 각광받고 있다. 체 내에 존재하는 물질인 펩타이드를 사용하기 때문에 독성이 없거나 적어 생체에 적합하고, 시간이 지나면 몸속에서 자연분해 되어 부작용을 최소화 할 수 있다.

[0003] 자가조립으로 만들어지는 다양한 펩타이드 구조체들의 응용 가능한 분야는 약물을 특정 세포로 전달하는 약물전달 시스템이나 단백질의 구조를 변형시켜 약을 만드는 등 다양한 방향으로 연구되어 지속적으로 확대되고 있다.

[0004] 자가조립이란 분자들 간의 인력, 반발력 등으로 인해 분자가 특정한 구조를 이루거나, 분자들이 모여 큰 단위체를 이루는 것을 말한다.

[0005] 단백질이나 펩타이드를 이루는 다양한 아미노산 사슬은 소수성, 친수성, 양전하, 음전하 그리고 방향성 등 다양한 특성을 가지고 있어 사슬의 서열에 따라 특정한 구조를 이룬다.

[0006] 아미노산 사슬은 α -나선, β 시트 등의 2차 구조를 형성할 수 있으며, 소수성 결합, 수소결합, 정전기적 인력, 파이-파이 결합 등의 2차 결합을 통해 마이셀, 베시클, 나노파이버, 하이드로젤 등 다양한 구조를 형성할 수 있다.

[0007] 자가조립에 작용하는 힘은 주로 공유결합이 아닌 소수성, 정전기적 인력이나 수소결합과 같이 간접적이므로, 이

에 간섭하거나 방해하는 외부자극을 주어 자가조립 구조를 변화시킬 수 있다. 최근에는 이런 성질을 응용하여 세포 내부의 다양한 환경, 효소 등에 감응하는 펩타이드 자가조립에 대한 연구들이 진행되고 있다.

- [0008] 야누스 펩타이드 덴드리머(Janus peptide dendrimer, JPD)는 양친매성(amphiphilic)으로, 친수성인 펩타이드 부분 및 소수성인 자가조립 부분의 결합으로 이루어져 있다. 현재까지 알려진 덴드리머는 대부분 1차원X 1차원, 2차원X 2차원 및 부분적 3차원 구조이고, 3차원X 3차원 구조를 가진 JPD에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1861110호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 친수성 펩타이드 및 알킬 사슬을 포함하는 덴드리머를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 덴드리머를 포함하는 나노구조체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노구조체를 포함하는 조영제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 덴드리머의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 친수성 펩타이드 및 알킬 사슬을 포함하는 덴드리머로서, 상기 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하거나, 아세틸기(-COCH₃)가 결합된 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하는 것인 덴드리머에 관한 것이다.
- [0015] 상기 덴드리머는 야누스(Janus) 형태일 수 있으며 더욱 구체적으로 야누스 펩타이드 덴드리머 형태일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서, '덴드리머(dendrimer)'는 규칙적 가지구조를 가지고 있는 분자로서, 일반적으로 구성 단위체를 한 단씩 연결하면서 합성된다. 상기와 같은 덴드리머는 구조 및 특성에 따라 약물전달체, 치료제, 바이오이미징, 조영제 등 다양한 용도로 활용될 수 있다.
- [0017] 본 발명에서, '야누스(Janus)' 형태는 중심구조를 기준으로 서로 다른 방향에 존재하는 물질이 동일한 물질이 아닌 서로 다른 물질들로 구성된 형태를 말한다.
- [0018] '야누스 펩타이드 덴드리머'는 펩타이드 기반의 야누스 형태를 가지는 덴드리머를 의미하며, 중심구조를 기준으로 한 쪽 측면에 펩타이드가 결합되고 다른 측면에 알킬 사슬이 결합된 형태인 본 발명의 덴드리머 역시 야누스 펩타이드 덴드리머 형태라 할 수 있다.
- [0019] 특히 본 발명 일 실시예에서는 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)를 포함하는 펩타이드를 포함하는 야누스 펩타이드 덴드리머 및 Arg-Gly-Asp(RGD)에 아세틸기(-COCH₃)가 추가로 결합된 형태의 야누스 펩타이드 덴드리머 유도체를 합성하였으며, 상기 유도체들의 구조도를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 구체적으로, 상기 아세틸기는 Arg-Gly-Asp(RGD) 중 아미노산 Arg(R)에 결합된 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명 일 실시예에서 합성된 덴드리머들은 모두 3차원 구조를 나타냄을 확인하였는 바, 본 발명의 상기 덴드리머는 3차원 구조를 형성하는 것일 수 있다. 상기 3차원 구조는 전체 3차원 구조 또는 부분 3차원 구조일 수 있으며, 더욱 구체적으로 3차원X 3차원(3D²) 구조를 형성하는 것일 수 있다.
- [0021] 구체적으로, 상기 펩타이드는 덴드리머 내에 1개 내지 10개 포함될 수 있고, 더욱 구체적으로 1개 내지 4개 포함될 수 있다.
- [0022] 또한 구체적으로, 상기 알킬 사슬은 덴드리머 내에 1개 내지 10개 포함될 수 있고, 더욱 구체적으로 1개 내지 4

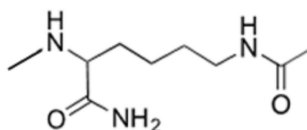
개 포함될 수 있다.

- [0023] 상기 알킬 사슬은 탄소를 1 내지 30개 포함하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로는 10개 내지 20개 포함될 수 있으나, 자가조립된 구조체의 형태는 펩타이드의 수 및 알킬 사슬의 수에 더 큰 영향을 받으므로, 알킬 사슬에 포함되는 탄소수는 상기에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명 일 실시예에서는 2개 이하의 펩타이드 및 2개 이하의 알킬 사슬이 결합된 저수준(low generation)의 덴드리머 뿐 아니라 3개 이상의 고수준(higher generation)의 덴드리머의 안정적인 합성이 가능하도록 합성방법을 개발하였으며, 이를 적용하여 3개 이상의 펩타이드 및 3개 이상의 알킬 사슬이 결합된 고수준의 덴드리머 역시 안정적으로 합성되는 것을 확인하였다.
- [0025] 또한, 구체적으로 상기 덴드리머는 형광물질을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 '형광물질'이란, 특정한 파장의 빛을 흡수하여 검출 가능한 영역의 빛을 방출하는 물질을 통칭하여 의미한다. 상기 검출 가능한 영역이라 함은 육안 또는 다양한 계측기기를 사용하여 방출되는 빛의 수준을 정량할 수 있는 영역을 말한다.
- [0027] 더욱 구체적으로, 상기 형광물질은 상기 덴드리머에 포함되거나 결합되어 덴드리머가 형광을 나타낼 수 있도록 하는 물질들을 말하며, 상기 덴드리머들로 구성된 나노구조체가 형광을 나타낼 수 있도록 하는 물질들도 포함한다.
- [0028] 상기 형광물질은 플루오레신(fluorescein), FAM(carboxyfluorescein), 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 테트라메틸로다민, 카르복시로다민, 카르복시로타민 6G, 카르복시로돌, 카르복시로다민 110, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 캐스케이드 옐로우(Cascade Yellow), 코마린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-크롬, 피코에리트린, PerCP(페리딘 클로로필-a 단백질), PerCP-Cy5.5, JOE(6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레신), NED, ROX(5-(및-6)-카르복시-X-로다민), HEX, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린(Oregon Green) 500, 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 알렉사 플루오어(Alexa Fluor, 상표명) 350, 알렉사 플루오어 430, 알렉사 플루오어 488, 알렉사 플루오어 532, 알렉사 플루오어 546, 알렉사 플루오어 568, 알렉사 플루오어 594, 알렉사 플루오어 633, 알렉사 플루오어 647, 알렉사 플루오어 660, 알렉사 플루오어 680, 7-아미노-4-메틸코마린-3-아세트산, 보디피(BODIPY, 상표명) FL, 보디피 FL-Br2, 보디피 530/550, 보디피 558/568, 보디피 564/570, 보디피 576/589, 보디피 581/591, 보디피 630/650, 보디피 650/665, 보디피 R6G, 보디피 TMR 및 보디피 TR로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 실시예에서는 대표적인 예로 FAM(carboxyfluorescein)을 덴드리머에 부착하더라도 덴드리머 또는 상기 덴드리머를 포함하는 나노구조체의 구조나 특성에는 영향을 미치지 않으면서도 형광을 나타내어 세포 내 분포 위치 등을 확인할 수 있음을 확인하였다.
- [0030] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 덴드리머를 포함하는 나노구조체에 관한 것이다. 구체적으로 상기 나노구조체는 3차원 구조일 수 있으며, 상기 3차원 구조는 전체 3차원 구조 또는 부분 3차원 구조일 수 있으며, 더욱 구체적으로 3차원X 3차원($3D^2$) 구조를 형성하는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서, '나노구조체(nanostructured material)'는 나노미터(nm) 단위의 크기를 가지는 구조체로서, 자가조립체 등 다차원적 구조체 및 이를 응용한 기술을 모두 포함한다. 약물전달시스템, 생체모방소자, 나노센서 소재, 바이오이미징 소재 등으로 활용될 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 상기 나노구조체는 구형 미셀, 원통형 미셀 또는 소낭 형태를 나타내는 것일 수 있다.
- [0033] 상기 나노구조체는 3차원 구조로서 이러한 형태 내에 약물을 담지할 수 있고, 상기 약물은 저분자량 약물, 유전자 약물, 단백질 약물 또는 이의 혼합물일 수 있다.
- [0034] 상기 저분자량 약물은 해열제로서 안티피린(antipyrin), 안티페브린(antifebrin), 아스피린(aspirin) 또는 살리피린(salipyrin)일 수 있고, 항염증제로서 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 플루로비프로펜(Flurobiprofen), 피록시캄(pyroccikam), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 메클로에타민(mechlorethamine), 텍사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 또는 코르티코스테로이드

(corticosteroid)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

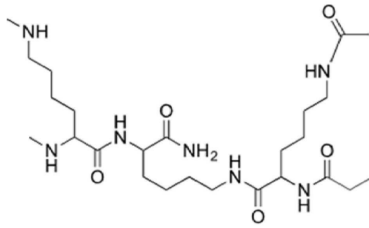
- [0035] 상기 유전자(gene) 약물은 작은 간섭 리보핵산(small interfering RNA, siRNA), 작은 헤어핀 리보핵산(small hairpin RNA, shRNA), 마이크로 리보핵산(microRNA, miRNA) 또는 플라스미드 데옥시리보핵산(plasmid DNA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 단백질(protein) 약물은 단일클론 항체(monoclonal antibody)계열의 트라스트주맵(trastuzumab), 리투시맵(rituximab), 베바시주맵(bevacizumab), 세투시맵(cetuximab), 보테조밍(bortezomib), 엘로티닙(erlotinib), 제피티닙(gefitinib), 이매티닙 메실레이트(imatinib mesylate), 수니티닙(sunitinib); 효소(enzyme)계열의 L-아스파라지나제(L-asparaginase); 호르몬(hormone)계의 트리톨레린 아세테이트(triptorelin acetate), 메게스트롤 아세테이트(megestrol acetate), 플루타미드(flutamide), 비카루타마이드(bicalutamide), 고세레린(goserelin); 시토크롬 c(cytochrome c) 또는 p53 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 나노구조체를 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 상기 조영제 조성물은 폐암 또는 자궁경부암 진단용일 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 조영제 조성물은 추가적으로 약학적으로 허용 가능한 담체를 더욱 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 조영제 조성물에 사용되는 담체는 의학 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이온나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조영제 조성물은 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 조영제 조성물을 생체 또는 시료에 투여하고, 상기 생체 또는 시료로부터 형광을 나타내는 나노구조체에 의해 발산되는 신호를 감지하여 영상을 획득할 수 있으며, 생체 또는 시료 내에서 발광되는 형태를 분석하여 질환에 대한 진단용도로 활용할 수 있다.
- [0041] 본 발명 일 실시예에서는 폐암 세포주인 A549 세포 및 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주에서 FAM(carboxyfluorescein)이 결합된 JPD11-FAM, JPD22-FAM 및 JPD44-FAM 덴드리머가 세포 내재화 되는 것을 확인하였는 바, 상기 덴드리머 및/또는 이를 포함하는 나노구조체를 폐암 및 자궁경부암의 형태를 관찰하여 진단할 수 있는 조영제의 일 구성요소로서 활용할 수 있다.
- [0042] 상기 '시료'는 진단하고자 하는 대상으로부터 분리한 조직 또는 세포를 의미한다. 또한 상기 조영제 조성물을 생체 또는 시료에 주입하는 단계는 의학 분야에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 예를 들어 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 국부 경로 등의 비경구 투여를 이용할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 중심구조를 기준으로 한 측면에는 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하거나, 아세틸기(-COCH₃)가 결합된 아미노산 서열 Arg-Gly-Asp(RGD)을 포함하는 펩타이드를 결합하고, 다른 측면에는 알킬 사슬을 결합시키는 단계; 및 b) 상기 중심구조를 기준으로 결합된 펩타이드 및 알킬 사슬이 3차원 형태로 자가조립 되도록 하는 단계를 포함하는, 덴드리머 제조방법에 관한 것이다.
- [0044] 구체적으로, 상기 중심구조는 하기 화학식 1 내지 화학식 3의 구조 중 어느 하나의 구조를 가지는 것일 수 있다.

[0045] [화학식 1]



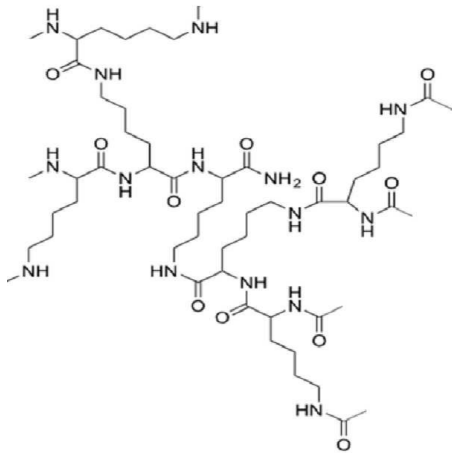
[0046]

[0047] [화학식 2]



[0048]

[0049] [화학식 3]



[0050]

[0051] 또한 구체적으로, 상기 펩타이드는 덴드리머 내에 1개 내지 10개 포함될 수 있고, 더욱 구체적으로 1개 내지 4개 포함될 수 있다.

[0052] 또한 구체적으로, 상기 알킬 사슬은 덴드리머 내에 1개 내지 10개 포함될 수 있고, 더욱 구체적으로 1개 내지 4개 포함될 수 있다. 상기 알킬 사슬은 탄소를 3 내지 30개 포함하는 것일 수 있으나, 알킬 사슬에 포함되는 탄소수는 이에 제한되지 않는다.

[0053] 펩타이드 및 알킬 사슬의 수, 알킬 사슬에 포함되는 탄소수, 펩타이드의 아미노산 서열 등에 관한 설명은 상기 서술한 바와 같다.

발명의 효과

[0054] 본 발명의 자기조립 펩타이드 나노구조체는 3차원X 3차원 구조의 야누스 펩타이드 덴드리머를 포함하므로, 종래의 1차원, 2차원 내지 부분적 3차원 구조의 자기조립 펩타이드보다 복잡하면서도 정교한 기능을 수행할 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명의 JPD는 형광물질이 결합되더라도 구조나 특성에는 영향을 미치지 않음을 확인하였는 바, 형광표지자를 부착하여 조영제, 바이오 이미징 분야 등에 활용될 수 있으며, 3차원 구조체의 특성을 이용하여 약물 운반체로서 활용될 수 있다.

[0056] 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

[0057] 도 1은 고수준의 야누스 펩타이드 덴드리머인 JPD44-C₁₂의 합성방법이 모식도를 나타낸 것이다(a: 20 % 피페리딘(DMF), b: SPPS, c: 2 % 하이드라진(hydrazine)/DMF, d: SPPS, e: 20 % 피페리딘(DMF), f: 도데칸산, HCTU, HOBt, DIPEA 및 NMP, g: 2 % 하이드라진(DMF), h: 도데칸산, HCTU, HOBt, DIPEA 및 NMP, i: 수지로부터 절단 및 최종 탈보호작용(deprotection)).

도 2는 저수준 야누스 펩타이드 유도체의 구조도를 나타낸 것이다.

도 3은 고수준 야누스 펩타이드 유도체의 구조도를 나타낸 것이다.

도 4는 펩타이드와 알킬 사슬의 수를 달리 합성한 여러 야누스 펩타이드 텐드리머 자가조립 나노구조체의 형태를 원자력 현미경(AFM)을 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 JPD22-C₁₂ 자가조립 나노구조체 및 JPD44-C₁₂ 자가조립 나노구조체의 형태를 투과전자 현미경(TEM)을 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 야누스 펩타이드 텐드리머의 조합 비율에 따른 나노구조체의 형태 변화를 원자력 현미경(AFM)을 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 A549 세포주 및 HeLa 세포주 각각에서의 JPD 내재화 정도를 유동 세포 계측법(flow cytometry)으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 JPD44-C₁₂를 처리한 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)을 이용하여 세포 내부의 JPD 자가조립 나노구조체가 세포 내에 위치함을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0059] 실시예 1. 재료 및 분석방법

[0060] 링크 아미드 MBHA수지 LL은 Novabiochem(Germany)에서 구입하였다. Fmoc-아미노산은 Novabiochem, Anaspec(U.S.A.) 및 AAPPTec(U.S.A.)에서 구입하였다. 디클로로메테인(Dichloromethane, DCM), *N*-메틸-2-피롤리돈(*N*-Methyl-2-Pyrrolidone, NMP), *N,N*-디메틸포름아마이드(*N,N*-dimethylformamide, DMF), 아세토니트릴(acetonitrile, ACN) 및 트리플루오로 아세트산(trifluoroacetic acid, TFA) 같은 용매는 Sigma-Aldrich(U.S.A.)와 Fisher Scientific(U.S.A.)에서 구입하였다. RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute medium 1640) 배지, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 및 Opti-MEM은 Gibco (U.S.A.)에서 구입한 것을 사용하였다.

[0061] 원자력 현미경 (Atomic Force Microscopy, AFM)

[0062] AFM측정을 위하여, 준비된 실시예의 펩타이드 샘플을 각각 2 μ L씩 새로 절단된 운모 표면에 침착시키고 완전히 건조시켰다. 상기 샘플의 이미지는 NX10 기기 (Park Systems, Korea)를 사용하여 비접촉 모드에서 획득하였다. AFM 스캔은 1.0Hz의 스캔 속도로 수행되었고, 데이터는 XEN 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0063] 투과전자현미경 측정(TEM)

[0064] 2 μ L의 펩타이드 용액을 새롭게 배출된 탄소 코팅 구리 그리드 상에 놓고 공기중에서 완전히 건조시켰다. 이후, 1%(w/v) 우라닐 아세테이트 용액 2 μ L를 첨가하고 1분 후에 여과지를 사용하여 과량의 용액을 제거한 후, 공기 중에서 그리드를 완전히 건조시켰다. 샘플은 120kV에서 작동하는 JEOL-JEM 2010장비 (JEOL Ltd., Japan)를 사용하여 관찰하였다. 이미지는 OneView CMOS 카메라(Gatan Inc., CA, U.S.A.)를 사용하여 기록하였고 Digital Micrograph 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0065] 형광 활성화 세포 분류 (FACS)

[0066] A549 세포 및 HeLa 세포를 각각 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 하에서 10 % FBS(fetal bovine serum) 및 1 % Pen-Strep을 갖는 RPMI 1640 및 DMEM 배지에서 배양하였다. 각 세포마다 1 \times 10⁵ 개씩 24-웰 플레이트에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 Opti-MEM에 JPD 어셈블리 용액을 혼합하여 처리하였다. 이후 세포를 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)으로 세척하고 트립신 처리한 후 10 % 세포 해리 완충액(Gibco) 및 1% FBS가 보충된 DPBS에 재부유시켰다. 세포는 CELLQuest 소프트웨어를 사용하여 FACS Calibur(BD Bioscience, U.S.A.)로 분석하였다.

[0067] 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM)

[0068] 현미경 관찰을 위해, A549 세포 1 \times 10⁴ 개를 10% FBS 및 1% Pen-Strep가 함유된 RPMI 1640 배지에서 8-웰 Lab-Tek II 챔버 커버 유리시스템(Nunc, USA)에 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 5% 이하의 CO₂ 조건에서 밤새 배양하였다. 이후 세포를 DPBS로 세척하고 4시간 동안 Opti-MEM에 JPD 어셈블리 용액을 혼합하여 처리하였다. 이후, 공초점 현미경

(LSM 880, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 세포를 시각화하였다.

[0069] **실시예 2. 야누스 펩타이드 덴드리머(Janus peptide dendrimer, JPD)의 합성**

[0070] **2-1. 저수준(low generation) JPD 합성**

[0071] 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc)과 4-메톡시트리틸(4-methoxytrityl, Mmt)그룹으로 보호된 라이신으로부터 고체상 펩타이드 합성법(SPPS)에 의해 야누스 펩타이드 덴드리머(JPD)를 합성하였다. 구체적으로, Fmoc-기반 SPPS를 사용하여 펩타이드 사슬을 먼저 성장시키고, Mmt 탈 보호로부터 생성된 아민에 지방산 알킬 사슬을 커플링 시키는 방법을 사용하였다.

[0072] JPD는 링크 아마이드 MBHA(4-Methylbenzhydrylamine) LL(low loading) 수지 상에서 합성하였으며, 펩타이드 합성은 4-메톡시트리틸(4-methoxytrityl, Mmt) 또는 4,4-디메틸-2,6-디옥시시클로헥스-1-일리덴 에틸(4,4-dimethyl-2,6-dioxycyclohex-1-ylidene)ethyl, Dde)로 보호된 라이신을 제외하고는 표준 Fmoc 고체상 펩타이드 합성(SPPS) 프로토콜과 동일하게 수행하였다.

[0073] Mmt 그룹의 탈 보호 과정은, 수지를 디클로로메테인에서 1% 트리플루오로 아세트산으로 여러 차례 (1분 X 최대 8 회) 처리하고 도데칸산(dodecanoic acid), 옥타데칸산(octadecanoic acid), 도코산(docosanoic acid) 및 5(6)-carboxyfluorescein(FAM)을 NMP에 용해된 O-(6-chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate(HCTU), Hydroxybenzotriazole(HOBt) 및 N,N-diisopropylethylamine (DIPEA)를 이용하여 1차 아민에 커플링 시키는 과정을 통해 이루어졌다.

[0074] JPD22-C₁₂ 및 이의 유도체(JPD11-C₁₂, JPD11-C₁₈, JPD11-C₂₂, JPD22-C₁₈ 및 JPD22-FAM)의 합성은 Fmoc-Lys(Mmt)-OH 및 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH를 연속적으로 커플링 시키고 Mmt 기를 탈 보호시켜 진행하였다. JPD 분자의 소수성 부분은 도데칸산, 옥타데칸산 또는 도코산을 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH와 커플링시켜 아마이드화하여 합성하였으며, JPD의 비대칭 소수성 부분 합성을 위해 도데칸산 및 5(6)-carboxyfluorescein(FAM) 및 Fmoc-Lys(Dde)-OH를 사용하였다.

[0075] 상기 합성방법을 통해 JPD11-C_n (하나의 펩티드 사슬과 n개의 탄소를 갖는 하나의 알킬 사슬) 및 JPD22-C_n (2개의 펩타이드 사슬 및 n개의 탄소를 갖는 2개의 알킬 사슬)과 같은 저수준 JPD의 합성을 용이하게 수행하였다. 합성된 JPD22-C₁₂ 및 이의 유도체들의 구조도는 도 2에 나타난 바와 같다.

[0076] **2-2. 고수준(higher generation) JPD 합성**

[0077] 고체상 펩타이드 합성반응(SPSS)은 펩타이드를 간편하게 합성할 수 있는 방법이지만, 응집되는 경향이 있는 소수성 서열은 그 자체의 소수성 및 수소 결합에 의해 응집반응이 통제되지 않아 합성이 어렵다는 한계점이 존재한다.

[0078] 이러한 종래의 방식으로는 소수성 분자를 많이 함유한 고수준 JPD 및 수소 결합 능력을 갖는 아마이드기를 합성하기 어려웠다. 이에 본 발명자들은 편리한 고체상 형식을 유지하면서, 고수준 JPD의 안정적인 합성이 가능한 신규한 합성방법을 개발하였다.

[0079] JPD44-C₁₂ 및 그 유도체(JPD44-C₁₈, JPD44-FAM)의 합성은 피페리딘에 의한 2개의 Fmoc기의 선택적인 탈 보호 과정 및 SPPS에 의해 새로 생성된 2개의 아민으로부터 단계적으로 성장하는 2개의 펩티드 사슬을 이용하였으며, 과정은 도 1의 모식도에 나타난 바와 같다.

[0080] 구체적으로, 분기 합성법(bifurcation synthesis method)에 의해 수지상에서 Fmoc-Lys(Mmt)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH 및 Fmoc-Lys(Dde)-OH를 순차적으로 커플링 시키는 방법으로 진행하였으며, Fmoc기를 20 % 피페리딘으로 제거하고, 2 개의 친수성 펩타이드 가닥을 SPPS를 사용하여 순차적으로 합성하였다. 그런 다음 DMF 중 2 % hydrazine monohydrate 용액으로 Dde 그룹을 제거하고, 다른 2 개의 친수성 펩타이드 가닥을 SPPS로 연장시켰다.

[0081] 소수성 부분에 해당하는 지방산 알킬 사슬인 도데칸산, 옥타데칸산 및 5(6)-FAM의 커플링도 상기 방법과 유사한 방법으로, 2개의 알킬 사슬의 커플링에 이어 Dde 탈보호 및 다른 2개의 알킬 사슬의 커플링하는 방법으로 수행하였다.

[0082] 펩타이드 사슬의 성장 또는 지방산 결합이 완료된 후, 상기 소수성 사슬이 소수성 수지 물질(일반적으로 폴리스티렌)과 강하게 상호작용하여 소수성 사슬의 대부분이 다공성 수지의 내부에 위치함에 따라, 추가적인 펩타이드

사슬 성장 및 지방산 커플링을 방해하지 않고 고수준의 JPD가 성공적으로 합성되도록 하는 것을 확인하였다. 합성된 JPD44-C₁₂ 및 이의 유도체들의 구조도는 도 3에 나타난 바와 같다.

상기 JPD 합성에 포함된 펩타이드 사슬은 세포 표면의 인테그린 수용체에 선택적으로 결합하는 펩타이드 모티프인 Arg-Gly-Asp(RGD) 서열로 구성하였다. RGD는 하나의 양전하와 하나의 음전하를 포함하기 때문에 RGD 서열로 구성된 펩타이드는 높은 전하도(highly charged) 및 친수성을 나타내면서도 전체 전하(overall charge)는 중성(neutral)을 나타내는 것을 하나의 특징으로 한다.

실험예 1. JPD 형태에 따른 자가조립 나노구조체 비교

상기 실시예 2에 기재된 방법에 따라 합성된 각 JPD 형태에 따른 자가조립 나노구조체를 비교하였다.

구체적으로, 상기 실시예에 따라 합성된 각 JPD 및 자가조립된 나노구조체의 형태는 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

JPD 구분	펩타이드 수	알킬사슬 수 (탄소 수)	중량%	JPD 자가조립 나노구조체 형태
JPD11-C ₁₂	1	1 (12)	45	구형 미셀(SM)
JPD11-C ₁₈	1	1 (18)	68	구형 미셀
JPD11-C ₂₂	1	1 (22)	83	구형 미셀
JPD22-C ₁₂	2	2 (12)	45	원통형 미셀(CM)
JPD22-C ₁₈	2	2 (18)	68	원통형 미셀
JPD44-C ₁₂	4	4 (12)	45	소낭(vesicle, VE)
JPD44-C ₁₈	4	4 (18)	68	소낭(vesicle)

또한, 원자력 현미경(AFM) 및 투과전자 현미경(TEM)을 사용하여 JPD 자가조립 나노구조체의 형태를 관찰하였으며, JPD11-C_n 자가조립 나노구조체는 구형 미셀(SM)로 자가조립되며, JPD22-C_n 자가조립 나노구조체는 원통형 미셀(CM)로, JPD44-C_n는 소낭(VE) 형태로 자가조립되는 것을 확인하였다(도 4 및 도 5).

일반적으로 양친매성 분자의 자가조립은 소수성 상호작용과 수화력 사이의 균형에 의해 좌우되기 때문에, 소수성 부분과 친수성 부분 간의 상대적인 중량비가 조립체의 형태를 결정하는데 매우 중요한 요소이다. 그러나 본 발명의 JPD 자가조립 펩타이드는 상기 결과에 나타난 바와 같이 JPD11-C₁₂, JPD22-C₁₂, JPD44-C₁₂는 중량%가 45로 동일하고, JPD11-C₁₈, JPD22-C₁₈, JPD44-C₁₈는 중량%가 68로 동일함에도 자가조립체의 형태가 전혀 상이함을 확인하였다. 따라서 본 발명의 JPD는 종래의 양친매성 펩타이드와 분명한 차이점을 가지며, 이는 JPD의 수상 돌기 기하학(dendritic geometry)에 기인하는 것으로 볼 수 있다.

나아가, 본 발명자들은 FAM(carboxyfluorescein)이 결합된 JPD11-FAM, JPD22-FAM 및 JPD44-FAM 덴드리머에 대해서도 상기와 동일한 실험을 수행하였으며, FAM이 결합되더라도 각각 JPD11-C_n, JPD22-C_n 및 JPD44-C_n과 동일한 형태의 나노구조체를 형성하는 것을 확인하였다.

실험예 2. 자가조립 단위체의 공동조립(co-assembly)에 의한 나노구조체 형태 확인

JPD자가조립 나노구조체의 형태는 덴드리머 생성과정에 크게 의존하기 때문에, 본 발명자들은 공동조립(co-assembly) 방법을 이용해 나노구조체의 형태를 더 다양화할 수 있는지 확인하였다.

자가조립 단위체인 두 종류의 JPD를 물:아세트니트릴 1:1(v/v) 혼합물에 녹인 후 수 시간 동안 항온 처리하여 유기 용매가 자가조립 된 상태를 파괴하고 분자 혼합이 촉진되도록 하였다. 이후, 아세트니트릴을 천천히 증발시켜 점진적인 자가조립을 유도하고, 원자력 현미경을 사용하여 100% 물에 용해된 응집된 샘플의 형태를 관찰하였다.

그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 공동조립된 나노구조체의 형태는 구성하는 자가조립 단위체(JPDs)의 상대적

인 비율에 의해 결정되며, 나아가 비율에 따라 형성되는 나노구조체의 형태는 예측 가능성을 확인하였다.

[0095] 예를 들어, JPD11-C₁₂ 로 이루어진 구형 미셀의 나노구조체는 JPD22-C₁₂의 비율이 증가함에 따라 점진적으로 원통형 미셀로 변형되었고, JPD22-C₁₂ 로 이루어진 원통형 미셀의 나노구조체는 JPD44-C₁₂의 비율이 증가함에 따라 점진적으로 소낭 형태의 나노구조체로 변형되었다. 또한, JPD44-C₁₂ 로 이루어진 소낭 형태의 나노구조체는 다시 JPD11-C₁₂의 비율이 증가함에 따라 구형 미셀 형태의 나노구조체로 변형되는 것을 확인하였다. 나아가, 본 발명자들은 FAM(carboxyfluorescein)이 결합된 JPD11-FAM, JPD22-FAM 및 JPD44-FAM 덴드리머에 대해서도 상기와 동일한 실험을 수행하였으며, FAM이 결합되더라도 동일한 패턴의 나노구조체 변형을 나타냄을 확인하였다.

[0096] 이는 펩타이드 가닥 및 알킬 사슬의 수에 의해 나노구조체의 형태가 변화되는 것으로서, 알킬 사슬 내의 탄소 수가 변화하더라도 동일한 규칙성 및 예측 가능성을 나타낼 수 있다.

[0097] 상기와 같은 결과는 자가조립 단위체가 되는 JPD를 적절히 조합하여 필요한 형태의 나노구조체를 수득 및 활용할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0098] 실험예 3. 이중 다가성(dual multivlency) 확인

[0099] JPD 자가조립 나노구조체는 두 가지 관점에서 다가성을 갖는다. 우선 비공유 상호 작용을 통해 다수의 RGD서열을 포함하는 JPD의 자가조립(self-assembly)으로 인해 초분자 다가성(supramolecular multivalency)을 갖고, 두 번째로 JPD22-C_n 및 JPD44-C_n 자가조립 나노구조체의 경우 가지형 분자 구조로 인해 단일 분자 다가성(unimolecular multivalency)을 갖는다.

[0100] 본 발명자들은 JPD 자가조립 나노구조체가 세포 표면의 수용체와 상호 작용할 때, 상기 두 가지 다가성이 어떠한 효과를 가지는지 확인하기 위해 두 가지 다른 세포주인 A549 세포 및 HeLa세포 각각에 JPD11-C₁₂, JPD22-C₁₂ 및 JPD44-C₁₂의 자가조립 나노구조체를 각각 처리하고 결과를 분석하였다.

[0101] 구체적으로, 상기 두 가지 세포주 각각에 JPD11-C₁₂, JPD22-C₁₂ 및 JPD44-C₁₂ 각각의 자가조립 나노구조체를 처리하고 4시간 동안 배양한 후, 세포를 트립신으로 처리하여 표면 결합된 JPD를 제거하고, JPD 자가조립 나노구조체의 내재화 정도를 유동 세포 계측법(flow cytometry)으로 측정하였다(도 7).

[0102] 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이, A549 세포주에서의 세포 내재화 정도는 JPD11-C₁₂ 및 JPD22-C₁₂ 조립체가 유사하고, JPD44-C₁₂ 조립체는 상기 두 조립체에 비해 약 2 배 정도 많았다.

[0103] 반면, 도 7b에 나타난 바와 같이, HeLa 세포주에서의 세포 내재화 정도는 내재화의 순서와 정도가 완전히 바뀌어, JPD44-C₁₂의 내재화가 가장 낮았으며 JPD11-C₁₂ 및 JPD22-C₁₂는 JPD44-C₁₂보다 약 2 내지 10 배 높은 내재화도를 보이는 것을 확인하였다.

[0104] 또한, A549 세포에 JPD44-C₁₂를 처리한 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)을 이용하여 세포 내부의 JPD 자가조립 나노구조체가 세포 내에 위치함을 확인하였다(도 8).

[0105] 나아가, 본 발명자들은 FAM(carboxyfluorescein)이 결합된 JPD11-FAM, JPD22-FAM 및 JPD44-FAM 덴드리머에 대해서도 상기와 동일한 실험을 수행하였으며, FAM이 결합되더라도 동일한 패턴의 이중 다가성 및 내재화도를 나타냄을 확인하였다.

[0106] 본 발명자들은 상기와 같이 JPD에 기초하여 3 차원 구조를 갖는 자가조립 펩타이드를 발명하였다. JPD는 덴드리머 생성과정이 분자 조립체의 형태를 결정하고, JPD의 공동조립시 자가조립 단위체의 비율에 따라 나노구조체의 형태가 변한다는 점에서 종래의 양친매성 펩타이드와 분명한 차이점을 보이는 것을 알 수 있다. 또한, JPD는 이중 다가성, 즉 초분자 및 단분자 다가성을 가지므로, JPD 자가조립 단위체의 조합 방식으로 친화도가 높은 펩타이드 리간드를 선택하는 수단으로서 사용될 수 있다.

[0107] 또한, 본 발명의 JPD는 형광물질이 결합되더라도 구조나 특성에는 영향을 미치지 않음을 확인하였는 바, 형광표지자를 부착하여 조영제, 바이오 이미징 분야 등에 활용될 수 있으며, 3차원 구조체의 특성을 이용하여 약물 운반체로서 활용될 수 있다.

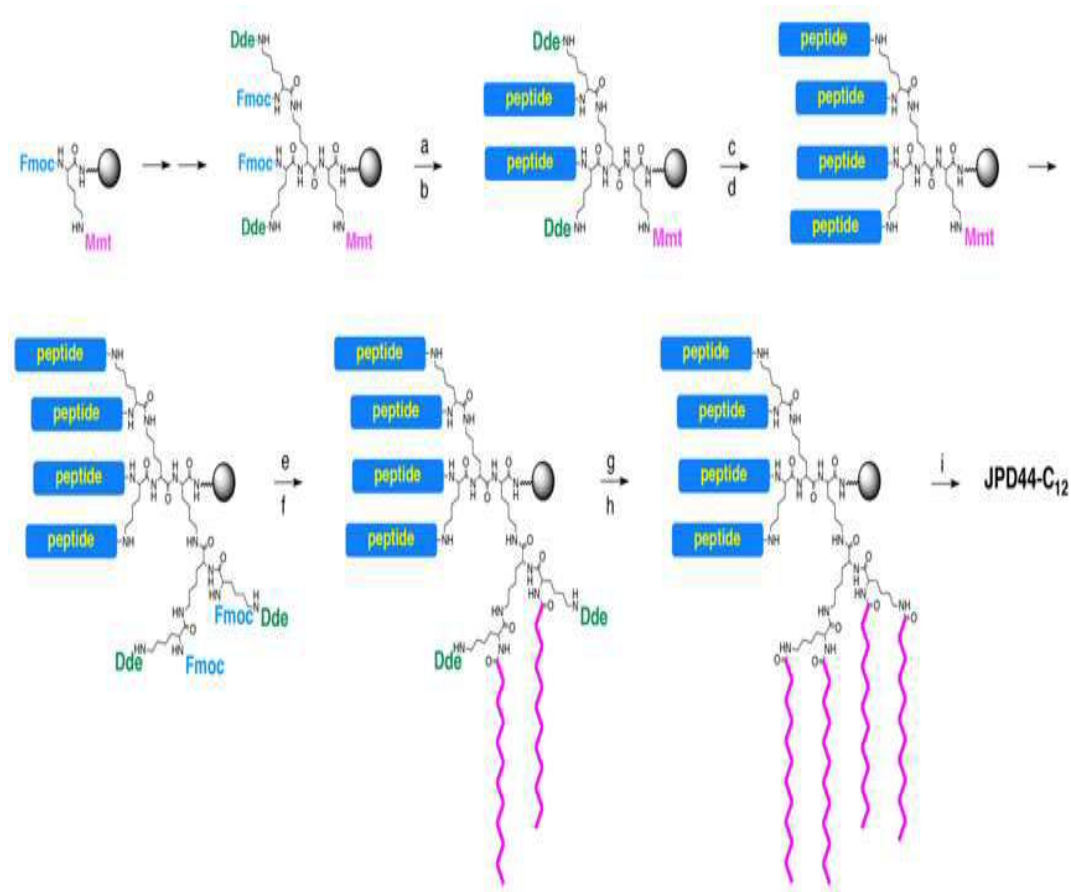
[0108] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해

할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

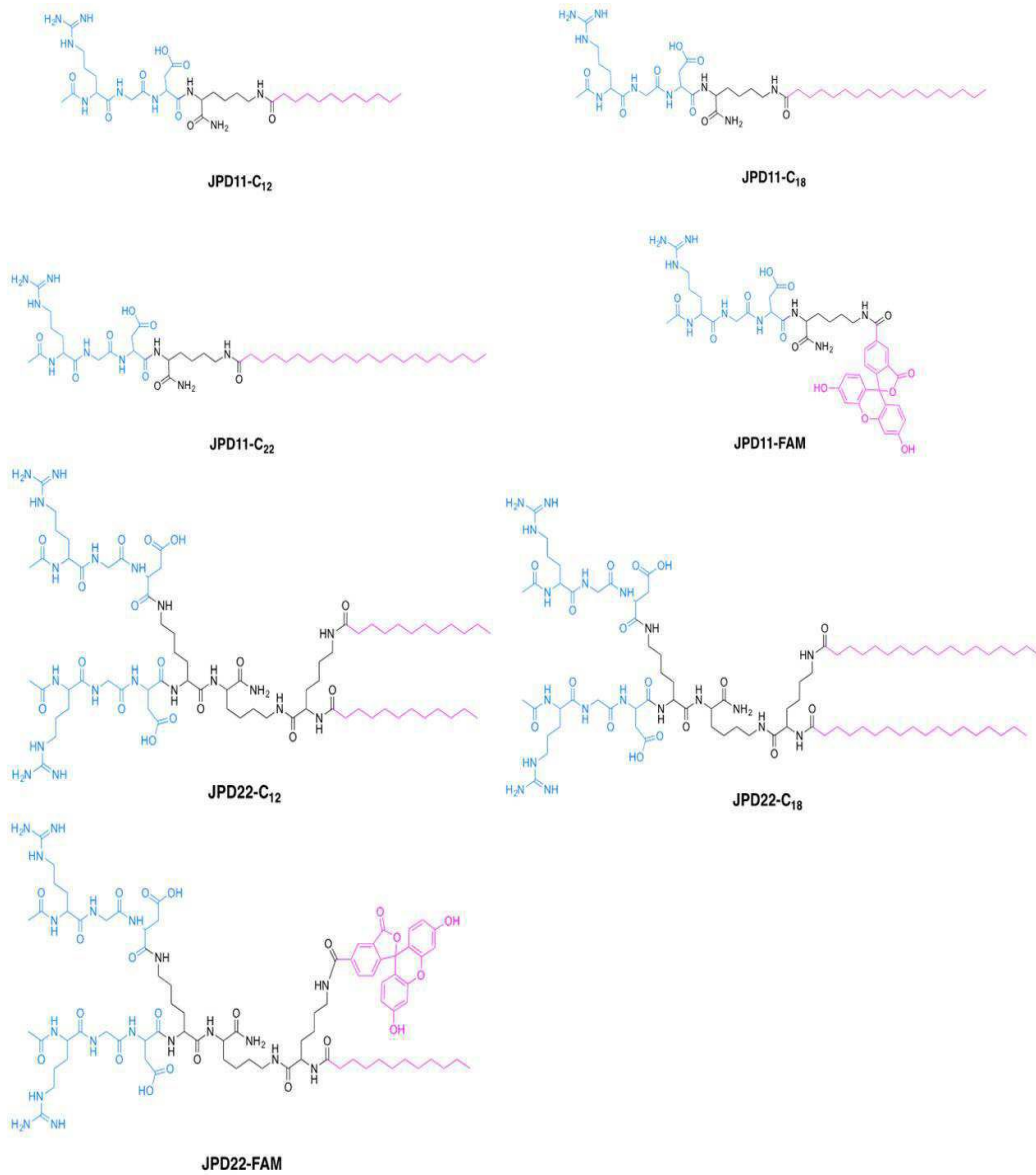
[0109] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

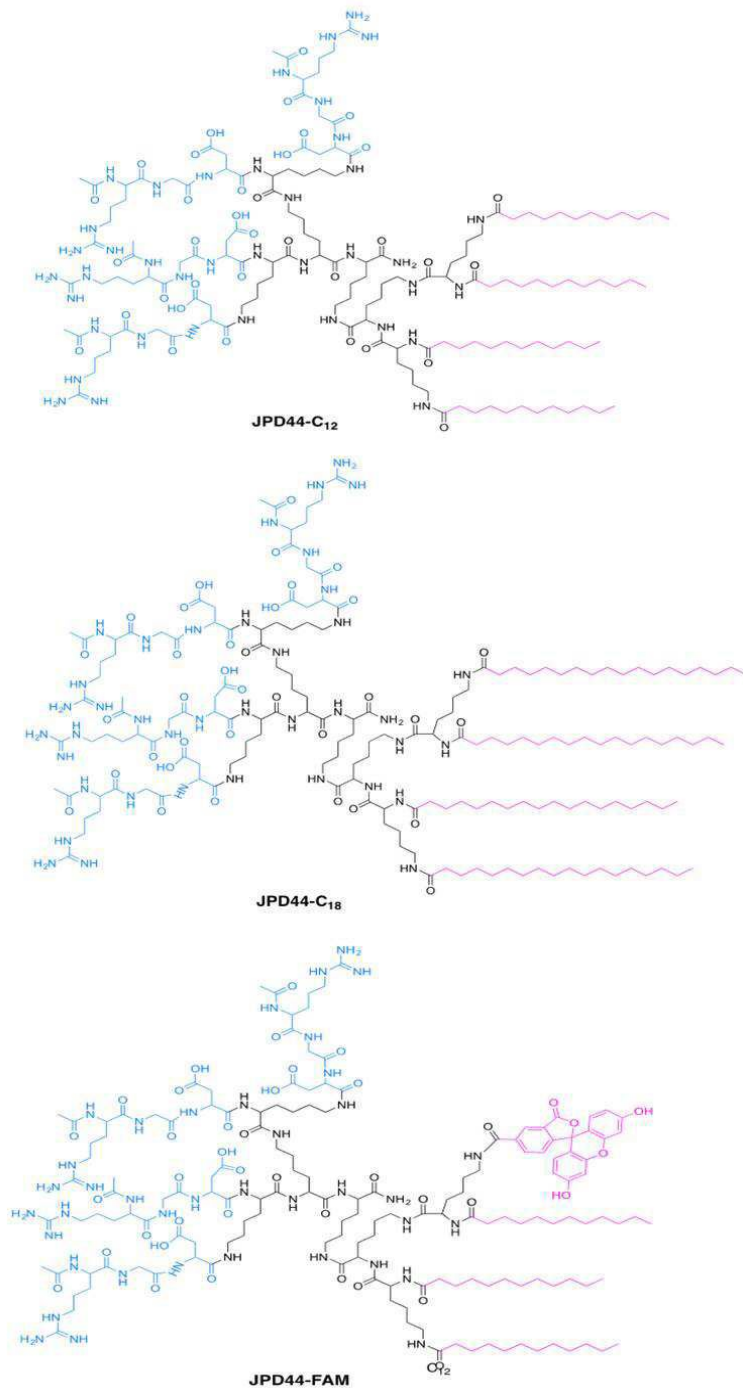
도면1



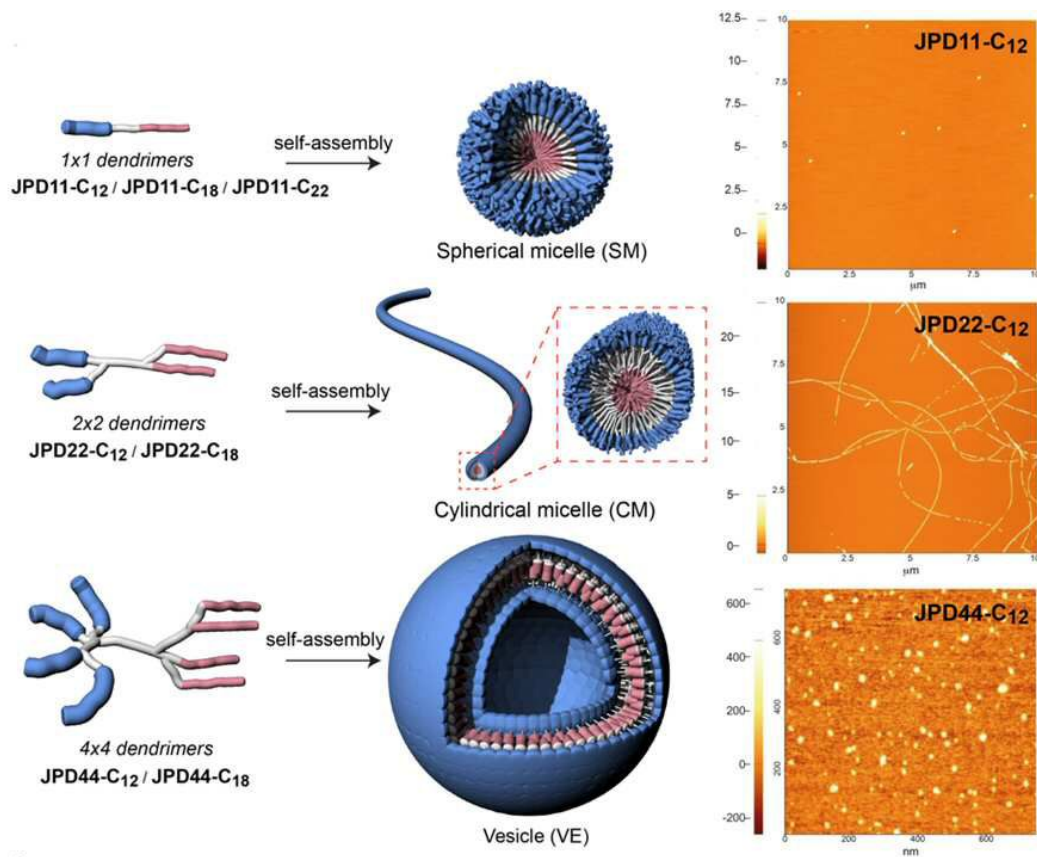
도면2



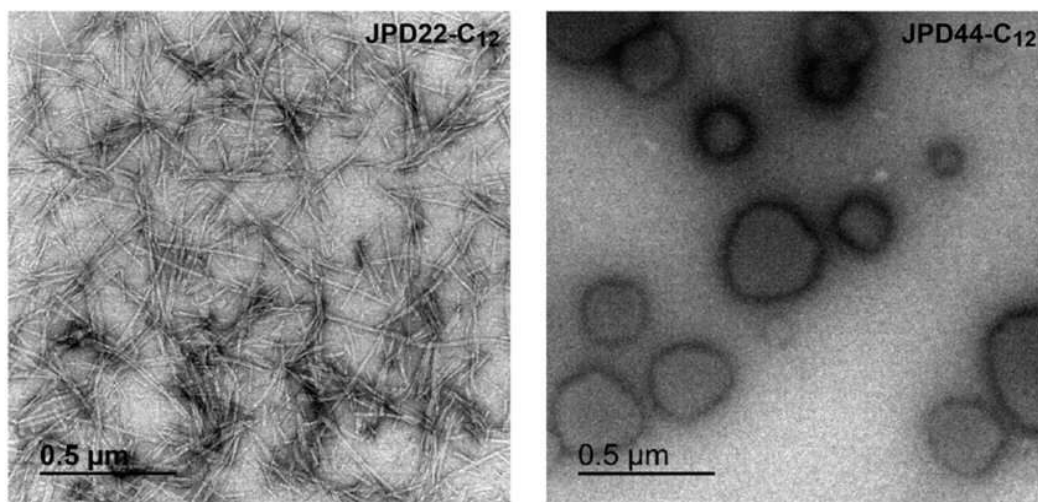
도면3



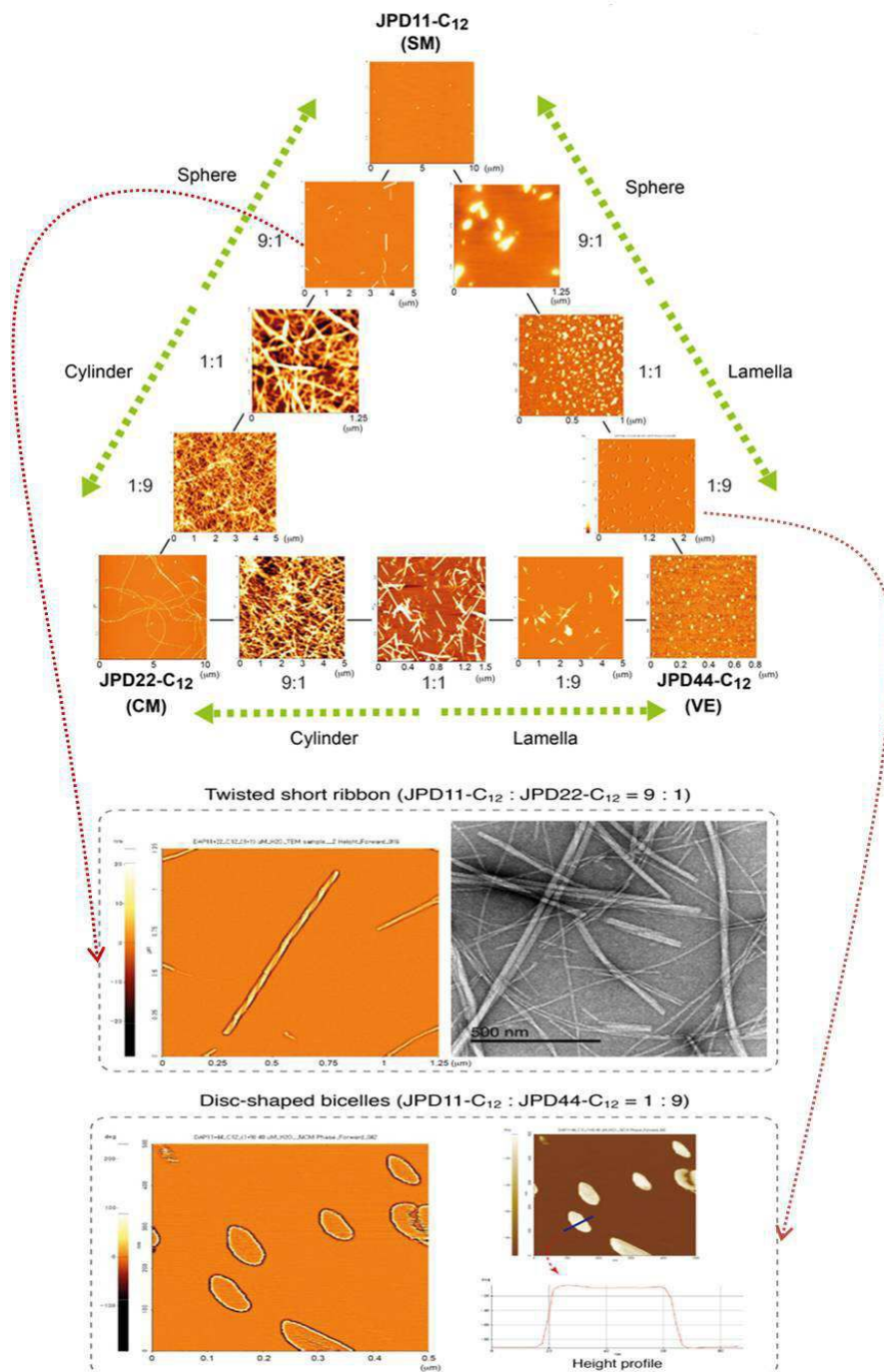
도면4



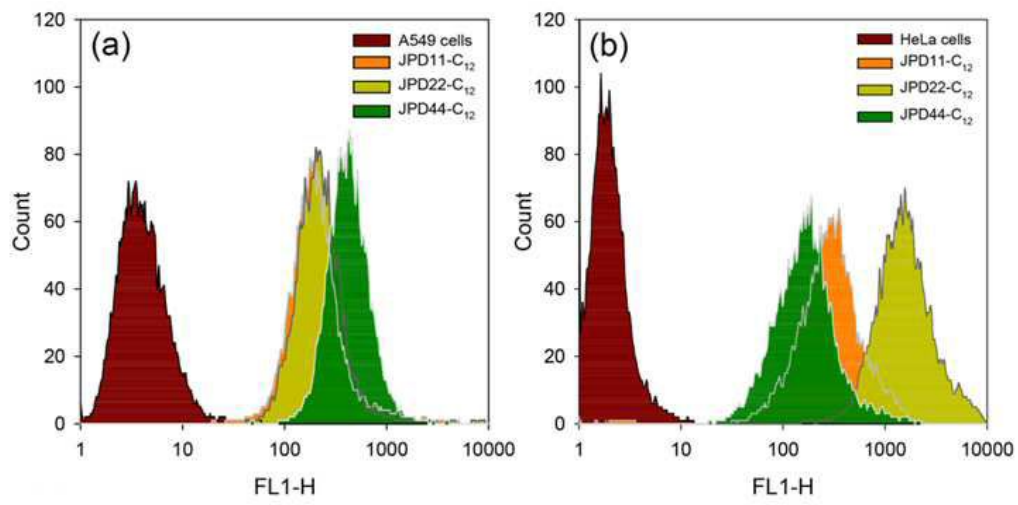
도면5



도면6



도면7



도면8

