



등록특허 10-2275993



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월12일

(11) 등록번호 10-2275993

(24) 등록일자 2021년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/225 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/496 (2006.01) A61K 31/5383 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/225 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0141624

(22) 출원일자 2019년11월07일

심사청구일자 2019년11월07일

(65) 공개번호 10-2021-0055318

(43) 공개일자 2021년05월17일

(56) 선행기술조사문헌

WO2017142855 A1

KR1020180004978 A

Mbio, 10(2), 1-19, 2019.

Trends in cell biology, 24(5), 313-320, 2014.

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신성재

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 건물 ABMRC #304

김이한

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 건물 ABMRC #307

이주미

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 건물 ABMRC #307

(74) 대리인

파도특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 14 항

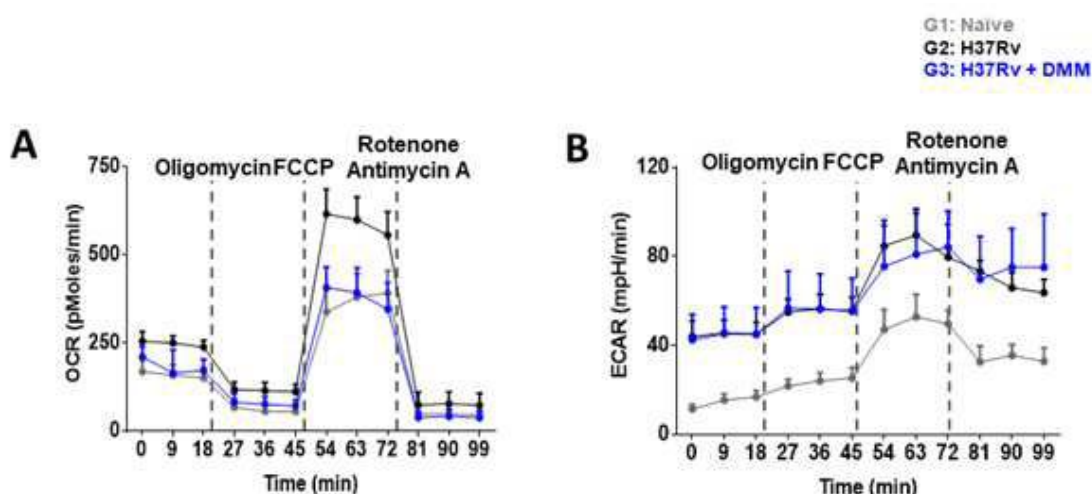
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 숙주지향치료를 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 잠복결핵 억제제를 포함하여 결핵의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 단독으로 사용한 경우에도 결핵균에 감염된 큰포식세포가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라, 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않음으로써 세포내 기생 세균인 결핵균의 성장 및 증식과, 잠복 결핵의 재활성화를 매우 효과적으로 억제시킬 수 있다. 이에 더하여, 결핵균 자체가 아닌 숙주 세포의 대사 반응을 조절함으로써, 결핵 치료제와 함께 병용하여 투여되었을 때 결핵균의 성장 및 증식과, 잠복 결핵의 재활성화 억제에 시너지 효과를 발휘할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/496 (2013.01)
A61K 31/5383 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 31/06 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2019R1A2C2003204
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구
연구과제명	결핵의 병인 면역대사 조절 이해를 통한 치료 극대화 모색과 혁신적 치료증강제 개
발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

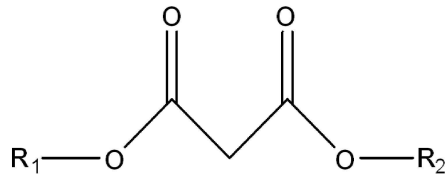
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 C1 내지 C9인 알킬기이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 알킬기는 C1 내지 C3인 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 큰포식세포의 에너지가 빠르게 소모되도록 하는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 잠복 결핵을 예방 또는 치료하는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 잠복 결핵균의 재활성화를 억제하는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 결핵은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(M. tuberculosis), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 보비스(M. bovis) BCG, 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 카네티(M. canetti), 마이코박테리움 카프라에(M. caprae), 마이코박테리움 마이크로티(M. microti) 및 K 균주(Mycobacterium tuberculosis K strain)로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 감염에 의해 유발되는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 리팜피신(rifamycin), 리파펜틴(rifapentine), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴논론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(Cycloserine), 프로치온 아마이드(Prothionamide), 레보플록사신(Levofloxacin), 모시플록사신(Moxifloxacin), 오프록사신(Ofloxacin), 리파부틴(Rifabutin), 카프레오마이신(Capeomycin), 아

미카신(amikacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 프로티오나마이드(protionamide), 에티오나마이드(ethionamide), 사이클로세린(cycloserine), 티오아세트azon(thioacetazone), 클로파지마인(clofazimine), 아목실린/클라불라네이트(amoxicillin/clavulanate), 클라리트로마이신(clarithromycin), 아지트로마이신(azithromycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 더 포함하는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

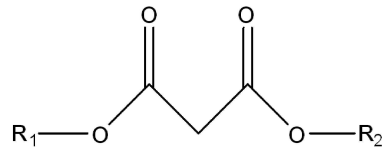
제 1항에 있어서,

상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장 결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장 결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 결핵의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 C1 내지 C9인 알킬기이다.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 결핵은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 보비스 BCG(*M. bovis* BCG), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 카네티(*M. canetti*), 마이코박테리움 카프라에(*M. caprae*), 마이코박테리움 마이크로티(*M. microti*) 및 K 균주(*Mycobacterium tuberculosis* K strain)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 감염에 의해 유발되는 것인, 결핵의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 조성물은 잠복 결핵을 예방 또는 치료하는 것인, 결핵의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제 9항에 있어서,

상기 조성물은 잠복 결핵균의 활성을 억제하는 것인, 결핵의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

제 9항에 있어서,

상기 조성물은 리팜피신(rifamycin), 리파펜틴(rifapentine), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴논론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(Cycloserine), 프로치온 아마이드(Prothionamide), 레보플록사신(Levofloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 오픈플록사신(Ofloxacin), 리파부틴(Rifabutin), 카프레오마이신(Capeomycin), 아미카신(amikacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 프로티오나마이드(protionamide), 에티오나마이드(ethionamide), 사이클로세린(cycloserine), 티오아세트azon(thioacetazone), 클로파지마인(clofazimine), 아목실린/클라불라네이트(amoxicillin/clavulanate), 클라리트로마이신(clarithromycin), 아지트로마이신

(azithromycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 더 포함하는 것인, 결핵의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 14

제 9항에 있어서,

상기 결핵은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 보비스 BCG(*M. bovis* BCG), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 카네티(*M. canetti*), 마이코박테리움 카프라에(*M. caprae*), 마이코박테리움 마이크로티(*M. microti*) 및 K 군주(*Mycobacterium tuberculosis* K strain)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 감염에 의해 유발되는 것인, 결핵의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 숙주지향치료(Host-directed therapy)를 위한 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 숙주 세포인 큰포식세포(Macrophage)가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라, 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않도록 하여 기생 세균인 결핵균의 성장 및 증식과, 잠복 결핵의 재활성화를 매우 효과적으로 억제할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵균은 감염 후 일정 기간 동안 잠복기를 거친 후 발병되거나 또는 잠복기 없이 급성으로 발병하여 폐의 염증과 다양한 질환을 동반하는 합병증을 일으켜 감염자를 결국 사망에 이르게 한다. 특히 결핵균을 단순히 보유하고 있는 보균자의 경우에는 자각증상이 없기 때문에 타인에게 쉽게 결핵균이 전염될 수 있어 결핵의 예방에 어려움이 있다.

[0003] 결핵(TB; Tuberculosis)은 세계보건기구(WHO; World Health Organization)에서 지정한 인류 건강을 위협하는 3대 감염 질병 중 하나이다. 결핵을 발병시키는 주요 원인균으로는 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*; MTB)가 대표적이고, 전 세계 인구 중 4분의 1정도는 감염된 이력이 있다고 보고되고 있다(Global TB reports, WHO, 2017). 2017년 세계보건기구에서 작성한 Global TB report에서는 2016년 기준으로 전 세계에서 새롭게 결핵에 걸린 환자는 약 1,040만명으로 추산하고 있으며 기존의 결핵환자 중 140만명은 결핵으로 인한 사망, 그리고 추가적으로 40만명은 인간 면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency Virus; HIV)와의 동시감염으로 인한 사망이 발생하였다고 보고하고 있다. 현재 WHO에서 권장하는 1차 항결핵제의 종류로써 이소니아지드(isoniazid), 리팜핀(rifampin), 에탐부톨(ethambutol) 및 피라지나미드(pyrazinamide)는 결핵환자에게 2~4개월의 치료기간 동안 매일 복용을 권장하고 있으나, 다제내성(Multi-drug resistant; MDR) 및 광범위 내성(Extensively-drug resistant; XDR)을 지닌 결핵균의 증가로 인하여 결핵 치료가 어려워지고 있다. 이로 인해 결핵의 치료 비용도 증가하였고, 치료 효율마저 낮아져 난치성 결핵으로 발전하는 모습을 보여주고 있다.

[0004] 따라서, 현재 결핵 연구 분야에서 새로운 항결핵제를 개발하기 위해 High-throughput 스크리닝 기법을 이용하여 다양한 화합물 라이브러리에서 항결핵제 활성을 갖는 약 6,800여 종의 화합물을 확인하고 있으며, 항결핵제 활성을 갖는 일부 화합물에 대하여 임상 시험이 진행되고 있다. 그러나, 새롭게 확인된 항결핵제 활성을 갖는 후보물질에 대한 명확한 기전과 약물 병용처리 시 발생하는 교차 저항(cross resistance)에 대해서 밝혀져 있지 않아, 시판할 수 있는 항결핵제로 개발되기까지 많은 비용과 시간이 소요된다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로서, 숙주세포의 대사반응 조절에 의한, 재프로그래밍(metabolic pathway reprogramming)을 가능하게 하는 대사체(metabolite)를 통하여 숙주 면역반응 상승효과에 의한 치료 방법(Host-directed Therapies; HDTs) 및 대사체에 의한 대사반응 변화에 의한 기존 항결핵제에 내성을 갖는 내성균에 대한 치료효과와 대사체와 항결핵제의 시너지 효과를 통한 결핵 치료의 가능성에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.

(특허문헌 1) KR10-2018-0130340 A

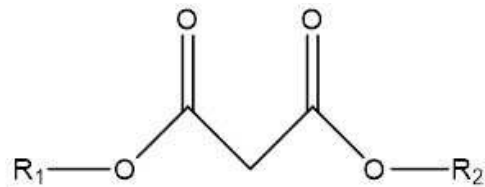
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 결핵의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

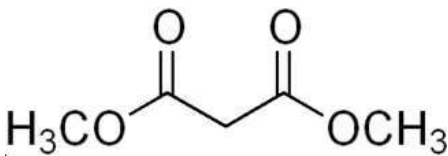
과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 일 구현 예에서는 결핵의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0008] 본 발명의 상기 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함한다:
- [0009] [화학식 1]

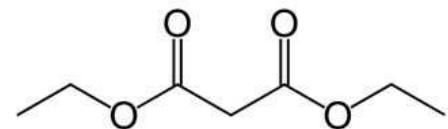


- [0010] R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 C1 내지 C9인 알킬기이다.
- [0011] 본 발명의 상기 "알킬기"는 직쇄 또는 분지쇄일 수 있고, 포화 1가 탄화수소 라디칼을 의미하며, 상기 알킬은 본 발명에 기재되는 하나 이상의 치환체로 임의로 치환되거나, 치환되지 않을 수 있다. 본 발명의 상기 알킬기는 탄소수는 1 내지 9인 것으로서, 예를 들면 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, t-부틸기, n-부틸기, 이소부틸기, sec-부틸기, 또는 헥실기, 헵틸기 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 본 발명의 바람직한 일 실시예에서, 상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 C1 내지 C3인 알킬기일 수 있고, 더욱 바람직하게는 메틸기 또는 에틸기일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 본 발명의 상기 화합물은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것일 수 있다:

- [0014] [화학식 2]



- [0015] [화학식 3]



- [0016] 본 발명의 상기 조성물은 숙주의 면역세포, 특히 큰포식세포에 작용하여 기존의 TCA 사이클 억제제가 아닌 숙주 지향 치료법(Host-directed therapies; HDTs)으로서 사용되어, 단독으로 사용될 경우뿐만 아니라 기존의 치료제와 병용하여 사용하는 경우 치료에 시너지 효과가 발휘되도록 할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 상기 "숙주 지향 치료법"이란, 전통적인 항생제와 같이 병원체에 직접적으로 작용하는 것이 아닌, 병원체에 대하여 숙주-매개 반응을 통해 작용하는 치료법을 의미한다. 이와 같은 숙주 지향 치료법은 병원체가 존재하는 숙주의 환경, 예를 들면 대사반응 등을 변화시킴으로써 병원체가 숙주 내 감염되어 유지되거나, 성장하는데 불리하도록 하는 방법으로서, 면역 반응을 조절하거나, 숙주 세포의 대사반응을 조절하는 등의 작용을 통해 그 기능이 발휘될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 상기 조성물은 큰포식세포가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않음으로써 결핵균의 성장 및 증식을 매우 효과적으로 억제할 수 있도록 한다. 이에 따라, 결

결핵균의 대사 조절에 직접 작용하는 기존의 결핵 치료제와는 상이하게 숙주 세포의 대사반응을 조절하여 결핵균의 성장 및 증식을 매우 효과적으로 억제할 수 있다.

- [0023] 본 발명의 상기 조성물은 잠복 결핵을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 상기 조성물은 또한, 결핵균이 재활성화되는 것을 매우 효과적으로 예방 또는 억제할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 상기 조성물은 큰포식세포가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않음으로써 결핵균의 성장 및 증식뿐만 아니라, 잠복 결핵의 재활성화를 매우 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 상기 "잠복 결핵"은 비활동성 결핵을 의미하는 것으로서, 1차 결핵 감염 이후 휴지기 상태의 결핵을 의미하며, 질병 증상의 발현이 없는 숙주에 감염된 결핵균을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 상기 "결핵균의 재활성화"란, 2차 결핵과 동일한 의미로 해석될 수 있으며, 1차 결핵 감염 이후 휴지기, 비활동성 또는 잠복성 감염된 결핵균의 재활성화를 의미한다. 구체적으로, 상기 결핵의 재활성화는 결핵균 감염 테스트, 예를 들면 투베르쿨린 시험에서 양성인 것으로 판명되나 명확한 질병 증상이 확인되지 않는 개체에서, 추후 질병 증상의 뒤늦은 발현(manifestation)을 의미한다. 상기 개체는 결핵균에 의해 감염되어 있고, 결핵균이 비활동성 또는 잠복 상태가 될 정도로 충분히 치료되어 질병 증상이 활발하지 않았던 경우도 모두 포함되며, 이와 같은 결핵균의 재활성화 억제는 질병 증상이 활발히 발현된 개체에서도 개시될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 조성물은 리팜피신(rifamycin), 리파펜틴(rifapentine), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴놀론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린 (Cycloserine), 프로치온 아마이드(Prothionamide), 레보플록사신(Levofloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 오픈플록사신(Ofloxacin), 리파부틴(Rifabutin), 카프레오마이신(Capeomycin), 아미카신(amikacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 프로티오나마이드(protionamide), 에티오나마이드(ethionamide), 사이클로세린(cycloserine), 티오아세트azon(thioacetazone), 클로파지마인(clofazimine), 아목실린/클라불라네이트(amoxicillin/clavulanate), 다이아미노다이페닐설폰의 유도체(derivative of dianomidiphenylsulphone), 클라리트로마이신(clarithromycin), 아지트로마이신(azithromycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 더 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 리팜피신(rifamycin), 아이소니아지드(isoniazid) 또는 에탐부톨(ethambutol) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 큰포식세포가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라, 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않도록 함으로써, 기존에 사용되고 있는 상기 림팜피신, 리파펜틴 등과 같은 결핵 치료제와 병용하여 사용되었을 때, 결핵균의 사멸 또는 성장과, 잠복 결핵의 재활성화 억제에 현저한 시너지 효과를 발휘할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 상기 결핵은 당 분야에 알려진 결핵균에 의해 발병되는 결핵을 모두 포함하며, 예를 들면, 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 보비스 BCG(*M. bovis* BCG), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 카네티(*M. canetti*), 마이코박테리움 카프라에(*M. caprae*), 마이코박테리움 마이크로티(*M. microti*) 및 K 균주(*M. tuberculosis* K strain)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 감염에 의해 유발되는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 "K 균주"란, 한국형 고병원성 결핵균으로, 베이징 패밀리(Beijing family)에 속하는 균주, 즉 표준 균주인 마이코박테리움 투베르쿨로시스에 비하여 병원성이 높고 치료 후, 재발율이 높은 것을 특징으로 한다. 한국의 결핵 환자로부터 분리되는 결핵 균주의 77%는 베이징 패밀리에 속하는 것으로 알려져 있고 중고등학교에서 집단으로 발생하는 결핵균들의 제한효소 절편 다형(restriction fragment length polymorphism; RFLP) 프로파일을 조사한 결과, 약 18.4%에서 독특한 균주 집단이 발견되어 이를 K 균주로 명명하고, 이와 같은 유사한 특징을 갖는 균주들을 K 패밀리로 명명하였다 (Kim SJ, et al. Int. J. Tuberc. Lung Dis.5:824-830, 2001).
- [0032] 본 발명의 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장 결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 상기 "예방"은 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 결핵으로 인해 발생한 증상을 차단하거나, 그 증상

을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 모두 포함될 수 있다.

- [0034] 본 발명의 상기 "개선" 및 "치료"는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 결핵으로 인해 발생한 증상이 호전되거나 이롭게 되는 행위라면 제한없이 모두 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0039] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 유효제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0041] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 상기 조성물의 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제,

방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 더 포함될 수 있다.

[0047] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 단독으로 사용한 경우에도 결핵균에 감염된 큰포식세포가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라, 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않음으로써 세포 내 기생 세균인 결핵균의 성장 및 증식과, 잠복 결핵의 재활성화를 매우 효과적으로 억제시킬 수 있다. 이에 더하여, 결핵균 자체가 아닌 숙주 세포의 대사 반응을 조절함으로써, 결핵 치료제와 함께 병용하여 투여되었을 때 결핵균의 성장 및 증식과, 잠복 결핵의 재활성화 억제에 시너지 효과를 발휘할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1의 A 내지 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 큰포식세포에서 디메틸 말로네이트(Dimethyl malonate; DMM) 또는 디에틸 말로네이트(Diethyl malonate; DEM)를 처리하였을 때 결핵균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2의 A 내지 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 큰포식세포에서 결핵 치료제로 사용되는 아이소니아지드(INH), 리팜피신(RIF) 또는 에탐부톨(EMB)와 DMM을 병용하여 처리하였을 때 결핵균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3의 A 및 B와, 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 결핵균이 감염된 큰포식세포에서 DMM에 의한 OCR(Oxygen consumption rate)과 ECAR(Extracellular Acidification Rate) 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 결핵균이 감염된 마우스에서 DMM 단독 또는 결핵 치료제와 DMM을 병용하여 처리하고 조직에서의 염증 억제 및 결핵균의 성장 억제 정도를 확인하기 위한 실험 프로세스를 모식도로 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 결핵균이 감염된 마우스에서 DMM 단독 또는 결핵 치료제와 DMM을 병용하여 처리하고, 조직에서의 염증 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 결핵균이 감염된 마우스에서 DMM 단독 또는 결핵 치료제와 DMM을 병용하여 처리하고, 결핵균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 결핵균이 감염된 마우스에서 DMM 단독 또는 결핵 치료제와 DMM을 병용하여 처리하고 조직에서의 염증 억제 및 결핵균의 성장 억제 정도를 확인하기 위한 실험 프로세스를 모식도로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 결핵균이 감염된 마우스에서 DMM 단독 또는 결핵 치료제와 DMM을 병용하여 처리하고, 조직에서의 염증 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 결핵균이 감염된 마우스에서 DMM 단독 또는 결핵 치료제와 DMM을 병용하여 처리하고, 결핵균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] 실시예

[0054] [준비예 1] 골수유래 큰포식세포(BM-derived Macrophage) 분화 방법

[0055] 마우스의 골수로부터 골수세포를 분리하였다. 그런 다음, 10% 우태아혈청(Biowest, 프랑스)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(Biowest, 프랑스)이 포함된 글루코스 함량이 높은 DMEM(Biowest, 프랑스) 배양 배지에, 10%의 L929 세포주 배양액을 넣어 분화 배지를 제조하였다. 그런 다음, 10 ml의 상기 분화 배지를 90×15 mm 펠트리접시

(SPL life science, 한국)에 넣고, 5% CO₂ 및 37 °C의 조건의 인큐베이터에서 3일 동안 배양하였다. 그런 다음, 10 ml의 상기 분화 배지를 추가로 상기 페트리접시에 넣은 뒤 6 또는 7일 동안 더 배양하는 과정을 통해 큰포식 세포를 얻었다. 추후 실시예에서 사용될 때에는, 트립신-EDTA(Biowest, 프랑스)를 이용하여 상기 큰포식세포를 분리한 뒤, 48웰 세포 배양 플레이트의 각 웰에 1.5×10^5 세포의 수로 분주하고, 24시간 동안 배양하는 과정을 통해 충분히 플레이트에 상기 큰포식세포가 부착될 수 있도록 하였다.

[0057] **[준비에 2] 결핵균 배양을 위한 7H10 고체 배지 준비 방법**

[0058] 1 L 크기의 삼각 플라스크 안에 9.5 g의 Difco™ Middlebrook 7H10 아가(BD bioscience, 미국) 가루를 넣고, 증류수 450 mL을 넣은 뒤에 충분히 섞어주었다. 그런 다음, 121 °C의 고압증기멸균기를 이용하여 15분 동안 멸균하고, 60 °C가 될때까지 충분히 식힌 뒤, 50 mL OADC (Oleic Acid + Albumin + Dextrose + Catalase; BD bioscience, 미국)를 추가하고 23 mL씩 90 × 15 mm 페트리접시 (SPL life science, 한국)에 붓고, 상온에서 하루 동안 방치하여 충분히 굳힌 뒤 추후 실험에 사용될 때까지 냉장보관 하였다.

[0060] **[실시에 1] 큰포식세포 활성화에 의한 결핵균 성장 억제 효과 확인**

[0061] 상기 제조예 1에서 48웰 플레이트에 부착된 큰포식세포의 각 웰에 1:1의 MOI(Multiplicity of infection)로 M. 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*; H37Rv ATCC 27294)를 넣고 4시간 동안 배양하고, 상기 M. 투베르쿨로시스가 포함된 배양액을 제거하였다. 그런 다음, 0.19, 0.38, 0.75, 1.5 또는 3 mM/ml의 디메틸 말로네이트(dimethyl malonate, 이하, 'DMM'이라 함; Sigma-Aldrich, 미국) 또는 1.5 mM/ml의 디에틸 말로네이트(diethyl malonate, 이하, 'DEM'이라 함; Sigma-Aldrich, 미국)가 포함된 상기 플레이트의 상기 제조예 1의 분화 배지를 각각의 웰에 처리하고 4시간 또는 72시간 동안 배양하였다. 여기서, 대조군으로는 상기 DMM 또는 DEM이 포함되지 않은 분화 배지만을 사용하였다.

[0062] 배양이 완료된 후, 상기 플레이트의 각 웰을 1×PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 씻어준 뒤, 0.05% 트리톤 X-100을 상기 각 웰에 200 μl씩 넣고 10분 동안 배양하여 상기 큰포식세포의 막을 충분히 용해시켰다. 이후, 큰포식세포로부터 방출된 용해물을 1/100 또는 1/1000의 배율로 희석하고, 상기 희석된 용해물을 상기 준비예 2의 7H10 고체 배지의 페트리접시에 50 μl씩 분주한 뒤 미생물 인큐베이터에서 2주 동안 배양하였다. 배양이 완료된 뒤, 페트리접시에 발생된 박테리아 개수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 1의 A 내지 C에 나타내었다.

[0063] 도 1의 A 내지 C에서 보는 바와 같이, 1.5 mM의 DMM 또는 DEM을 4시간 또는 72시간 처리하였을 때, 대조군(Ct 1)과 비교하여 박테리아(M. 투베르쿨로시스)의 성장이 현저하게 감소되었으며, 이와 같은 박테리아(M. 투베르쿨로시스)의 성장 억제는 DMM의 농도에 의존적으로 증가되었다.

[0064] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 DMM 및 DEM은 큰포식세포에 감염된 결핵균의 성장을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0066] **[실시에 2] 병용 투여에 따른 결핵균 성장 억제 효과 확인**

[0067] 기존의 결핵 치료제와의 병용 투여에 따른 결핵균의 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 M. 투베르쿨로시스가 감염된 큰포식세포에 1.5 mM의 DMM과, 5 μg/ml의 아이소니아지드(isoniazid; INH, I3377; Sigma-Aldrich, 미국), 10 μg/ml의 리팜피신(rifamycin; RIF, R3501; Sigma-Aldrich, 미국), 5 μg/ml의 에탐부톨(ethambutol; EMB, E4630; Sigma-Aldrich, 미국)를 병용하여 처리한 뒤, 3일 동안 배양하고 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 페트리접시에 발생된 박테리아 개수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0068] 도 2에서 보는 바와 같이, DMM을 단독으로 처리한 경우 아이소니아지드(INH), 리팜피신(RIF) 및 에탐부톨(EMB) 모두에 비하여 매우 높은 수준으로 박테리아(M. 투베르쿨로시스)의 성장을 억제하였다. 이에 더하여, 상기 아이소니아지드(INH), 리팜피신(RIF) 또는 에탐부톨(EMB)에 DMM을 추가로 처리한 경우에는 상기 약물들을 각각 단독으로 처리한 경우와 비교하였을 때, 박테리아(M. 투베르쿨로시스)의 성장 억제에 시너지 효과가 발휘되었다.

[0069] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 DMM 및 DEM은 결핵균 자체의 TCA 사이클이 아닌, 큰포식세포의 대사반응에 작용하여 기존의 결핵 치료제와 병용하여 사용된 경우, 숙주에 감염된 결핵균의 성장을 매우 효과적으로 억제할 수 있어 결핵의 치료에 시너지 효과가 발휘되도록 할 수 있다.

[0071] **[실시에 3] 큰포식세포의 대사조절 변화 확인**

[0072] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 M. 투베르쿨로시스가 감염된 큰포식세포의 배양액을 5%의 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지로 교체한 뒤, 1.5 mM/ml의 DMM을 처리하고 5% CO₂ 및 37 °C의 조건의 인큐베이터에서 3일 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 DMEM 배지를 D-글루코스, 소듐 피루베이트(sodium pyruvate) 및 L-글루타민이 포함된 XF 어세이 배양액으로 교체한 뒤, CO₂가 존재하지 않는 37 °C의 조건의 인큐베이터에서 한시간 동안 배양하였다. 이후, 8 μM의 올리고마이신(Oligomycin), 9 μM의 FCCP 및 10 μM의 로테논(Rotenone)을 XF24 세포 외 플럭스 어세이 키트(Extracellular Flux kit)에 각각 넣고, 분석 장비(Agilent)를 이용하여 OCR(Oxygen consumption rate)과 ECAR(Extracellular Acidification Rate)을 측정하여, 그 결과를 도 3의 A 및 B와, 도 4에 나타내었다. 여기서, 대조군으로는 큰포식세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 사용하였다(naive).

[0073] 도 3의 A 및 B 및 도 4에서 보는 바와 같이, DMM이 처리되지 않은 대조군(H37Rv)에서는 산소 소비량(OCR)이 매우 높은 수준으로 증가되었으나, 1.5 mM/ml의 DMM이 처리되었을 때에는 M. 투베르쿨로시스가 감염되었음에도 불구하고 큰포식세포의 산소 소비량이 100 pMoles/min 정도 감소되었다. 반면, ECAR은 산소 소비량 변화와는 무관하게 DMM 처리에 의해 변화가 없는 것을 확인하였다.

[0074] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 DMM은 결핵균에 감염된 큰포식세포가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라, 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않음으로써, 이에 따라 세포 내 기생 세균인 결핵균의 성장 및 증식을 매우 효과적으로 억제시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0076] **[실시예 4] 동물 모델에서의 효과 확인(1)**

[0077] 도 5에 도시된 바와 같이, C57BL/6 마우스에 M. 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*; H37Rv ATCC 27294)를 공기주입 방식을 통해 주입하고, 아래 표 1에 기재된 대로 비히클(vehicle), 결핵 치료제 및 DMM을 투여하였다.

표 1

군	감염 주수	투여 약물	투여 주수**
대조군(G1)	6주	비히클(vehicle)	-
1군(G2)	6주	결핵 치료제*	2주
2군(G3)	6주	10 mg/mouse의 DMM	2주
3군(G4)	6주	결핵 치료제 및 10 mg/mouse의 DMM	2주
* 결핵 치료제는 0.2 mg/mouse의 아이소니아지드(INH), 0.2 mg/mouse의 리팜피신(RIF) 또는 2 mg/mouse의 에탐부톨(EMB)임			
** 약물의 투여는 감염 시작 4주 후부터, 각 군별로 2주 동안 진행하였음.			

[0081] 상기 군들의 마우스의 1/3의 폐 조직을 멸균된 PBS를 이용하여 폐 관류(lung perfusion)한 뒤 떼어내고, 4 ~ 10%의 파라포름알데히드에 넣어 고정하였다. 이후, 상기 고정된 조직을 파라핀화하고, 절편을 얻어 통상의 방법에 따라 H&E 염색하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 또한, 상기 군들의 마우스의 폐, 비장 및 간을 적출하고, 멸균된 PBS에 넣고 충분히 갈아 조직의 용해물을 제조하였다. 상기 조직의 용해물을 1/100, 1/1000 또는 1/10000의 배율로 희석하여 희석된 용해물을 상기 준비예 2의 7H10 고체 배지의 페트리접시에 50 μl씩 분주한 뒤 미생물 인큐베이터에서 2주 동안 배양하였다. 배양이 완료된 뒤, 페트리접시에 발생된 박테리아 개수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0082] 도 6에서 보는 바와 같이, 대조군(G1)과 비교하여, 결핵 치료제만이 처리된 1군(G2), DMM이 단독으로 처리된 2군(G3) 및 결핵 치료제와 DMM이 병용하여 처리된 3군(G4)에서 폐에 발생된 염증이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다. 특히, 상기 3군에서는 다른 대조군, 1군 및 2군과 달리 폐에 발생된 염증이 더욱 현저하게 억제되었다.

[0083] 도 7에서 보는 바와 같이, 대조군(G1)과 비교하였을 때, 1군(G2, Tx) 및 2군(G3, 10 mg의 DMM)의 폐에서 결핵균의 성장이 억제되었고, 결핵 치료제와 10 mg의 DMM이 함께 처리된 3군(G4, Tx+DMM)에서는 1군 및 2군과 비교하여 결핵균의 성장이 더욱 현저하게 억제되었다.

[0085] **[실시예 5] 동물 모델에서의 효과 확인(2)**

[0086] 도 8에 도시된 바와 같이, 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 폐 조직의 H&E 염색과, 조직의 용해물로부터 생성된 박테리아 개수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 9 및 10에 나타내었다. 단, 결핵균의 감염 주수 및 투여 주수

는 하기 표 2에 기재된 대로 진행하였다.

표 2

군	감염 주수	투여 약물	투여 주수**
대조군(G1)	8주	비히클(vehicle)	-
4군(G2)	8주	결핵 치료제*	4주
5군(G3)	8주	20 mg/mouse의 DMM	4주
6군(G4)	8주	결핵 치료제 및 20 mg/mouse의 DMM	4주
*결핵 치료제는 0.2 mg/mouse의 아이소니아지드(INH), 0.2 mg/mouse의 리팜피신(RIF) 또는 2 mg/mouse의 에탐부톨(EMB)임			
** 약물의 투여는 감염 시작 4주 후부터, 각 군별로 4주 동안 진행하였음.			

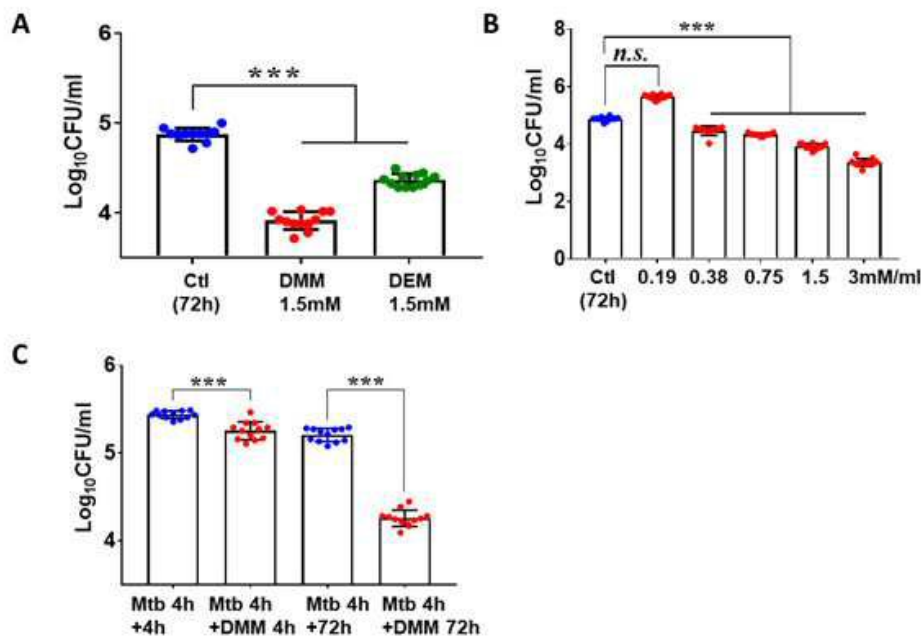
도 9 및 10에서 보는 바와 같이, 대조군(G1)과 비교하였을 때, 4군(G2, Tx) 및 5군(G3, 20 mg의 DMM)의 폐에서 염증 발생 및 결핵균의 성장이 억제되었고, 결핵 치료제와 20 mg의 DMM이 함께 처리된 6군(G4, Tx+DMM)에서는 4군 및 5군과 비교하여 염증 발생 및 결핵균의 성장이 더욱 현저하게 억제되었다.

상기 실시예 4 및 5의 결과를 통해 본 발명에 따른 DMM 및 DEM은 단독으로 사용한 경우에도 결핵균에 감염된 큰 포식세포가 산소를 잘 이용하지 못함에 따라, 큰포식세포 내에서 에너지 생성이 효율적으로 일어나지 않음으로써 세포내 기생 세균인 결핵균의 성장 및 증식과, 잠복 결핵의 재활성화를 매우 효과적으로 억제시킬 수 있다. 이에 더하여, 결핵균 자체가 아닌 숙주 세포의 대사 반응을 조절함으로써, 결핵 치료제와 함께 병용하여 투여되었을 때 결핵균의 성장 및 증식과, 잠복 결핵의 재활성화 억제에 시너지 효과를 발휘할 수 있다.

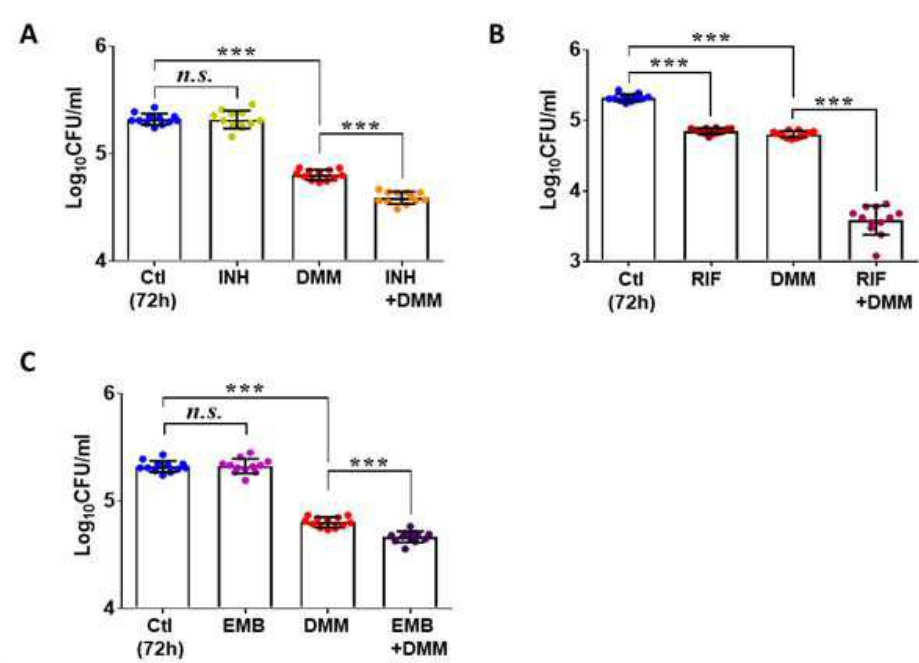
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

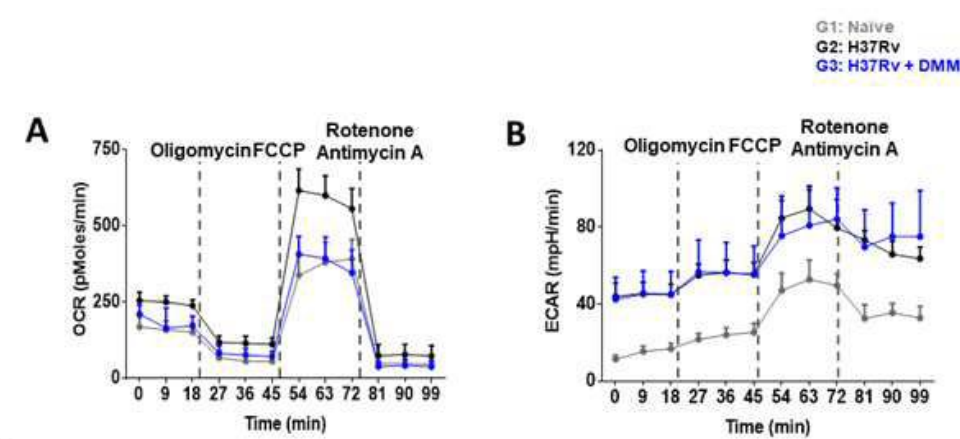
도면1



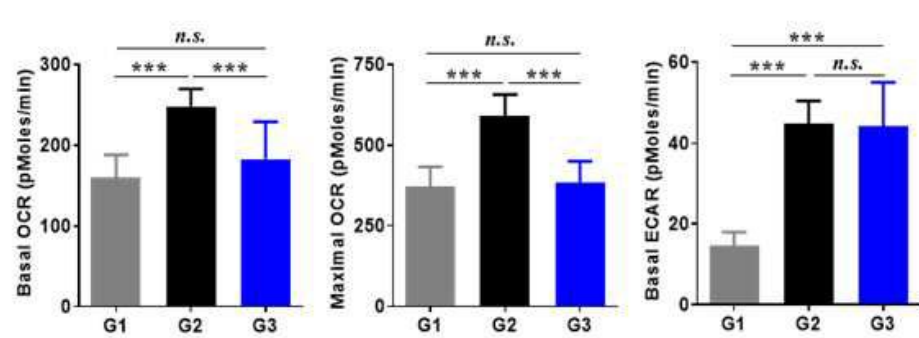
도면2



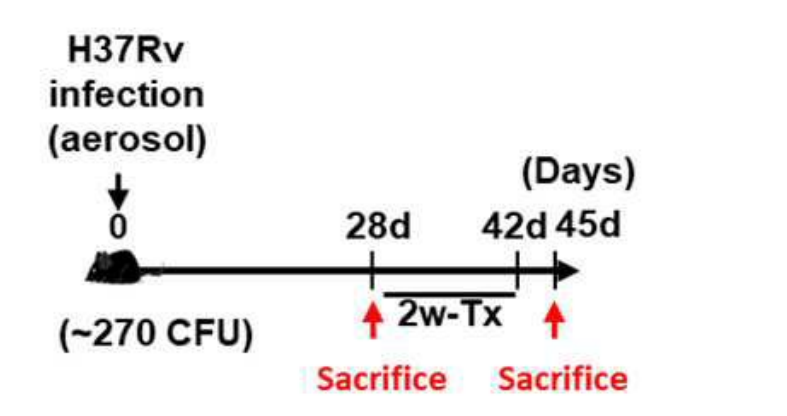
도면3



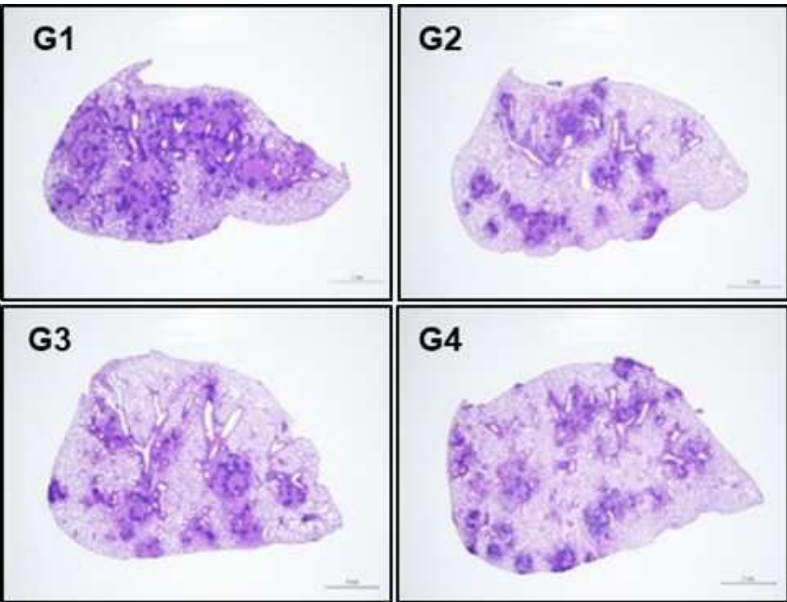
도면4



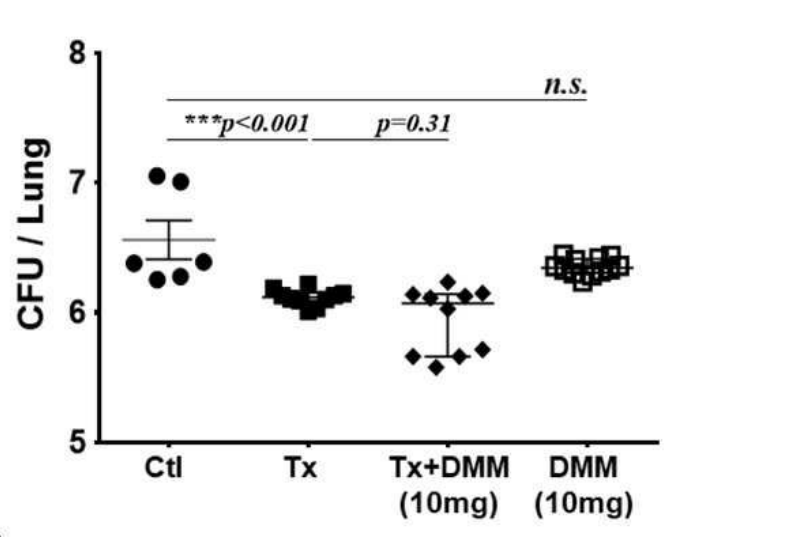
도면5



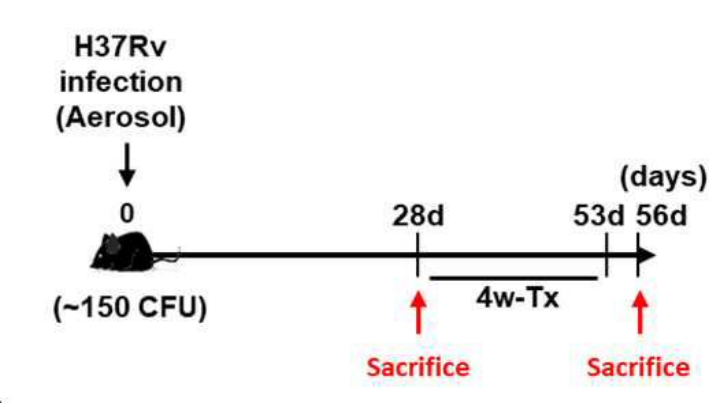
도면6



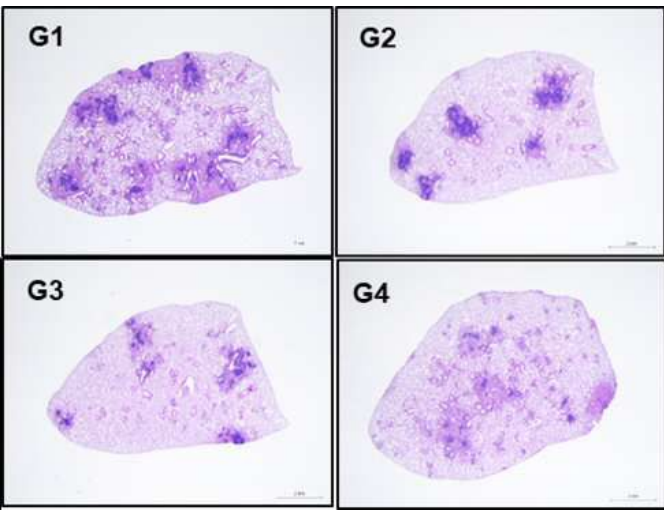
도면7



도면8



도면9



도면10

