



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0081938
(43) 공개일자 2018년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/167 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/167 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0002870
(22) 출원일자 2017년01월09일
심사청구일자 2017년01월09일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
육종인
서울특별시 강남구 압구정로 201, 82동 1104호 (압구정동, 현대아파트)
김현실
서울특별시 종로구 사직로8길 20, 102동 1504호 (내수동, 경희궁파크팰리스)
(74) 대리인
이처영, 장제환

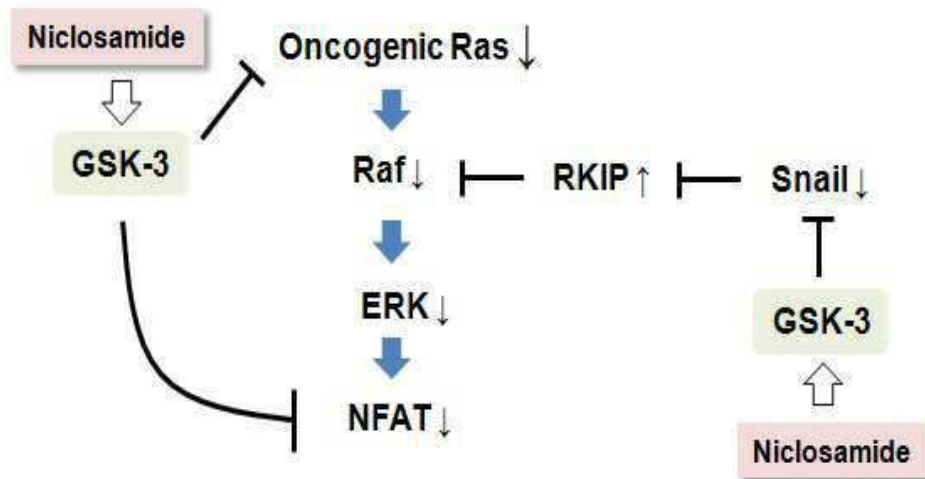
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 니클로사미드를 함유하는 Ras 암유전자 표적치료 관련 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 억제용 조성물 및 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 활성화에 의해 재발되는 암에 대한 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, FDA에서 승인받은 안전한 약물인 니클로사마이드를 이용하여, Ras에 의하여 재발되는 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

김남희

서울특별시 종로구 사직로8길 20, 103동 1302호 (내수동, 경희궁파크팰리스)

노경태

서울특별시 마포구 백범로 205, 102동 104호 (신공덕동, 마포펜트하우스)

최지원

서울특별시 노원구 공릉로34길 62, 1018동 1504호 (공릉동, 태강아파트)

안성용

서울특별시 서대문구 연희로28길 35-28, 202동 104 (연희동, 성원상떼빌팰리스아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A05004670

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 EMT 조절 RNA 네트워크 연구

기 여 율 1/4

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9B2052523

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발

연구과제명 EMT에 의한 미세환경 조절

기 여 율 1/4

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1E1A1A01942724

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 전략과제

연구과제명 치주조직 및 악골에서 염증과 암 사이의 링크 조절기전 및 제어전략

기 여 율 1/4

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A6A3A04055110

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 microRNA에 의한 EMT 관련 RNA 네트워크 조절

기 여 율 1/4

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 억제 또는 Ras 표적 치료용 조성물.

청구항 2

니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 활성화에 의해 재발되는 암에 대한 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 Ras 활성화에 의해 재발되는 암은 대장암, 폐암, 췌장암, 담도암, 혈액암, 악성 흑색종, 혈관 육종 및 갑상선암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

Ras 암유전자 활성화에 의하여 발생하는 암이나 구강 전암병소의 비특이적 치료법이나 표적치료제와의 병용치료용 약학조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 Ras 활성화에 의해 발생하는 암은 대장암, 폐암, 췌장암, 담도암, 혈액암, 악성 흑색종, 혈관 육종, 구강 전암병소 및 갑상선암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 니클로사미드(Niclosamide)를 함유하는 Ras 암유전자 표적치료 용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 암유전자 표적치료용 조성물 및 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 암유전자 활성화에 의해 재발되는 암이나 Ras 암유전자 돌연변이가 동반되는 전암병소에 대한 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Ras 단백질은 정상적인 세포 분화 및 증식에 관여하는 주요 신호전달 경로의 활성을 제어하는데 필수적인 역할을 한다. Ras 유전자의 N-말단에 주로 위치한 돌연변이는 사람 암의 발암과정에서 공통적인 현상이다 (Parada LF et al., Nature., 297(5866):474, 1982; Downward J. et al., Nat Rev Cancer., 3:11, 2003). 스크리닝된 모든 암의 25-30%에서 K-Ras의 발암 돌연변이가 발견되었다. 특히 K-Ras 유전자의 경우 담도암 (35%), 대장암 (36%), 대장용종 (22%), 폐암 (21%), 췌장암 (69%), 혈관육종 (49%)에서 돌연변이가 발견되며, N-Ras 유전자의 경우 백혈병이나 혈액 종양 (10-19%), 악성 흑색종 (20%), 갑상선 암 (17%)가 돌연변이가 존재한다 (Fernandez-Medarde A & Santos E et al., Genes Cancer 2(3): 344-358, 2011). Ras 암유전자의 돌연변이나 다양한 이유에 의한 Braf/MAPK/ERK 경로 활성화는 치료적인 관점에서 다음과 같은 중요한 의미를 가진다. 첫째, Ras 돌연변이

에 의한 Braf/MAPK/ERK 경로 활성화가 동반된 경우 다양한 항암치료의 효과가 낮고 치료 저항성을 가진다는 점이다 (Sklar MD, Science 239; 645-647, 1988; Weinstein IB, Science 297:63-64, 2001). 둘째, Ras 활성화가 없는 암 환제에 대한 다양한 표적치료가 실패한 경우를 분석해 보면 새로운 치료과정에서 Ras 돌연변이와 활성화가 나타난다는 점이다 (Karapetis CS et al., N Engl J Med. 359:1757, 2008; Diaz LA, Jr. et al., Nature, 486:537, 2012). 이러한 결과는 Ras 암유전자를 효과적으로 조절할 수 있는 표적 치료약물이 필요함을 제시한다. 마지막으로, 동남아시아에는 씹는 담배나 betel quid와 같은 습관으로 구강암과 전암병소 발병율이 매우 높으며, 이때 Ras 유전자의 돌연변이와 활성화가 매우 빈번하게 관찰된다는 것이다 (Saranath D et al., Br J Cancer, 63, 573-578, 1991; Kuo MYP et al., J Oral Pathol Med 23, 70-74, 1994; Das N et al., Oral Oncol 36, 76-80, 2000). 따라서 가글이나 젤형태로 Ras 활성을 억제할 수 있는 약물은 구강 암이나 전암병소의 진행을 억제할 수 있을 가능성을 제시한다.

[0003] Ras 암유전자의 돌연변이가 인간 암에서 유망한 치료 표적이지만, 약물 결합에 적합한 구조적으로 확인된 표면 포켓이 없기 때문에 Ras에 직접 작용하는 Ras 억제제를 개발하는 효과적인 전략은 지금까지 없었다. 최근에는 돌연변이 특이적인 Ras-GTP-Raf 결합이 Ras의 치료 표적으로 등장하였으나, Ras 활성을 약화시키는 약물은 아직 이용가능하지 않다(Ostrem JM et al., Nature., 503(7477):548, 2013; Shima F et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 110:8182, 2013).

[0004] 흥미롭게도, BRAF와 같은 다른 MAPK / ERK 신호전달 경로의 발암성 Ras 돌연변이와 유전적 변형은 인간 암에서 상호 배타적인 사건으로, Ras 활성화가 종양 형성에 필수적임을 나타낸다(Fernandez-Medarde A, et al., Genes Cancer., 2:344, 2011). 더욱이, Ras 활성화와 표준 Wnt 경로 사이의 상호 규제는 특별한 주의를 끌만하며, 실제로, K-Ras 돌연변이는 GSK-3의 억제를 통해 표준 Wnt 활성을 자극한다. 표준 Wnt 경로에서 Snail과 β -catenin과 유사하게, Ras는 GSK-3에 의해 인산화되고, 이어서 분해되는 고도로 보존된 파괴 모티프를 가지고 있다(Yook JI et al., J Biol Chem., 280:11740, 2005). Ras 신호 전달 경로의 내인성 억제제인 RKIP(Raf-1 kinase inhibitory protein)은 상피-중간엽 변이(EMT)의 주요 유도 인자인 Snail에 의해 직접적으로 억제된다(Shin SY et al., J Cell Sci. 122(Pt 3):425, 2009; Beach S et al., Oncogene., 27:2243, 2008). 또한, NFAT(nuclear facotr of T cell, T 세포의 핵 인자)의 전사활성은 Ras/Raf 경로에 의해 활성화되고 GSK-3 활성화에 의해 길항된다(Flockhart RJ et al., Br J Cancer., 101:1448, 2009). Snail매개 EMT 프로그램과 표준 Wnt 경로를 포함하여 발암 신호에서 GSK-3의 중요한 역할을 감안할 때, 소분자에 의한 GSK-3 활성의 조절이 암의 발암적 Ras를 약화시키기 위한 대체 전략이 될 수 있다고 판단된다.

[0005] 한편, 니클로사미드는 다양한 기생충 감염 치료에 사용하기 위해 1960년 이래 FDA 승인을 받은 경구형 살리실 아닐리드 유도체로, 최근에는 다양한 종류의 암에 대한 항암 요법으로 니클로사미드가 등장했다(Osada T, et al., Cancer Res., 71:4172, 2011; Sack U et al., J Natl Cancer Inst., 103:1018, 2011).

[0006] 니클로사미드가 Wnt, NF- κ B, ROS, Notch, mTOR 및 autophagy와 같은 다양한 발암 신호에 관여한다는 많은 연구가 있지만, 분자 표적과 작용 방식은 잘 알려져 있지 않다.

[0007] 이에, 본 발명에서는 Ras에 의해 유발되는 암 또는 전암의 치료법을 찾고자 예의 노력한 결과, 대장암 세포를 피하접종한 마우스에 니클로사미드를 투여하는 경우, 종양형성을 억제하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 암유전자의 표적치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 활성화에 의해 재발되는 암에 대한 표적 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 돌연변이 또는 그 외 유전적 원인에 의한 RAF/MAPK/ERK 활성화와 RKIP 불활성화 암에 대한 표적 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명이 또 다른 목적은 Ras 활성화에 의하여 발생하는 암이나 구강암 전암 병소 치료를 위한 병용치료용 약

학조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 암유전자의 표적치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 활성화에 의해 재발되는 암에 대한 표적치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, Ras 활성화에 의하여 발생하는 암이나 구강 전암병소 치료를 위한 병용치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, FDA에서 승인받은 안전한 약물인 니클로사마이드를 이용하여, Ras 암유전자의 활성화에 의해 발생하거나 재발되는 암이나 전암병소를 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 니클로사미드에 의한 GSK-3 의존성 Ras 억제를 확인한 결과를 나타낸 것으로, A는 니클로사미드를 처리한 대장암 세포에서 GSK-3 키나아제의 활성을 측정된 결과를 나타낸 것이고, B는 Ras의 구조 도메인의 도식 다이어그램으로, GSK-3에 의한 보존된 인산화 잔기를 빨간색 글자로 표시하였다.
- 도 2의 A는 K-Ras 변이 대장암 세포에서, 니클로사미드 처리에 의한, K-Ras(myc), 총 Erk 1/2 (Erk) 및 인산화 - Erk 1/2 (pErk) 단백질의 변화를 면역블로팅한 결과를 나타낸 것이고, B는 사이클로헥시마이드 처리된 K-Ras 변이 대장암 세포에 니클로사미드 또는 BIO와의 병용 투여의시 K-Ras 변이체의 반감기는 맥박 추적 분석 및 면역 블로팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이며, C는 K-Ras G13D 변이를 가진 대장암 세포를 18시간 동안 BIO와 함께 니클로사미드를 처리하고, 면역 블로팅으로 Ras, 총 Erk 1/2 (Erk) 및 인산화- Erk 1/2 (pErk)의 존재를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3의 A는 K-Ras G12V변이 및 K-Ras-G13D 변이를 가지는 대장암 세포에 니클로사미드를 처리한 후 Ras, 총 Erk1 / 2 (Erk), 인산-Erk 1 / 2 (pErk) 및 RPIP의 존재량을 면역블로팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이고, B는 대장암 세포에 니클로사미드와 K-Ras-G12V를 처리한 후 NFAT 리포터 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이고, C는 다양한 농도의 니클로사미드 처리 후 NFAT 리포터 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4의 A는 소프트 아가 배지에서 변이 K-Ras가 과발현된 세포에서 니클로사미드를 처리한 경우의 세포 콜로니 형성을 확인한 결과를 나타낸 것이고, B는 변이 K-Ras를 가지는 대장암 세포를 마우스에 접종한 후, 니클로사미드를 처리하여, 니클로사미드가 종양 형성에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 니클로사미드에 의한 GSK-3 활성 증가가 대장암 세포의 GSK-3 활성 증가를 통하여, Ras의 변이 상태에 관계없이 Ras 활성을 효과적으로 억제한다는 것을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 많은 종류의 암에서 Ras 발암유전자들(oncogenes)이 치료적 타겟이지만, Ras 단백질은 약물이 타겟팅 되기 어려운 4차 구조를 가지고 있어, 임상적으로 효용성이 있는 항-Ras 약물은 제한되어 있다. 종래 알려진 Wnt 시그널링 C- 말단에서의 glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) 의존성 인산화와 그 후의 분해에 의해 Ras 활성화에 기여한다. 본 발명에서는 항 기생충제인 니클로사미드가 GSK-3에 직접 결합하여 결장암 세포에서 Axin 기능을 억제함으로써 Snail 매개 상피-중간엽 변이(EMT)를 회복시킨다는 것을 확인하였다.
- [0018] 본 발명에서는 니클로사미드가 대장암 세포에서 Ras의 변이 상태에 관계없이 Ras 활성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 니클로사미드는 내인성 GSK-3 활성을 증가시켜 돌연변이 Ras의 반감기를 단축시키는 것을 확인하였으며, 니클로사미드는 Snail 억제제의 하류 타겟(downstream target)인 Raf-1 kinase 억제 단백질(RKIP)을 활성화시키지만 대장암 세포에서는 nuclear NFAT 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 대장암 세포를 피하접종한 마우스에 니클로사미드를 경구투여하는 경우, 종양형성을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0019] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는

Ras 억제용 조성물에 관한 것이다.

- [0020] 아울러, 본 발명은 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 Ras 억제제로서의 용도에 관한 것이다.
- [0021] 니클로사마이드(niclosamide, 또는 Niclocide(상표명))는 50년 가까이 구충제로 사용되어온 약물로, 잠재적으로 항종양 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 경구적으로 이용가능한 약이다.
- [0022] 니클로사미드에 의한 Ras 조절 확인
- [0023] GSK-3은 정상세포에서 높게 발현되며, 외인성 성장인자와 종양신호 전달을 비활성화시키는 키나제이다 (Kaidanovich-Beilin O *et al.*, Front Mol Neurosci. ,4:40, 2011). 표준 Wnt는 multivesicular endosome으로 용해성 GSK-3의 격리를 통해 GSK-3 활동을 억제하고 Axin2의 너다운(knockdown)은 핵의 GSK3 활동을 증가시켰다. 반대로, 유방 상피의 세포질 GSK-3 불활성화는 전암성 상태와 선암 발생을 초래했다. 니클로사미드가 내인성 GSK-3 활성에 영향을 미치는지 직접 조사하기 위해, 대장 암 세포는 니클로사미드(Niclosamide) 처리 후 GSK-3 키나아제 분석을 수행하였다. 실제로, nM 수준의 니클로 사드는 대장 암 세포에서 내인성 GSK-3 활성을 증가시키기에 충분하고 (도 1A), Axin-GSK3 결합의 파괴가 세포 GSK-3 키나아제 활성을 증가시킨다는 것을 나타낸다.
- [0024] β -catenin과 Snail과 유사하게 Ras 단백질은 GSK-3에 의해 인산화되는 고도로 보존된 파괴 모티프를 가지며, 인산화된 Ras는 β -TrCP 유도 ubiquitination과 proteasomal 활성에 의해 분해된다. 중요한 것은 인간 암의 돌연변이 핫스팟은 N- 말단에 있는 반면, Ras의 파괴 모티프는 C- 말단에 있어, GSK-3의 조절에 의해 돌연변이 Ras를 조절할 수 있는 가능성을 나타낸다(도 1B).
- [0025] 이를 확인하기 위해, 본 발명에서는 니클로사미드에 의하여 증가된 GSK-3 활성이 돌연변이 Ras를 억제할 수 있는 가능성을 시험하기 위하여, K-Ras-G12V 변이체를 선택하였다. 293 세포에서 myc-tagged Ras 돌연변이를 과발현시키고, GSK-3 특이적 억제제 BIO와 함께 니클로사미드를 처리하였다. 니클로사미드에 의하여 K-Ras 변이체의 단백질과 내인성 인산화-ERK(extracellular signal-regulated kinase)는 억제된 반면, GSK-3 억제제인 BIO는 니클로사미드의 효과를 약화시켰다(도 2A). 이러한 결과는 GSK-3의 상향 조절을 통하여, 니클로사마이드가 Ras의 안정성을 조절할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명에서는 Niclosamide와 GSK-3 키나아제 활성이 Ras 안정성에 영향을 미치는지 더 조사하기 위하여, K-Ras 변이체 발현 벡터를 형질감염된 세포를 cycloheximide 처리 하에서 Ras 단백질을 추적하였다. 그 결과, K-Ras 변이체 단백질의 반감기가 니클로사미드 처리에 의해 상당히 단축되었으며, 이러한 효과는 GSK-3 키나아제 억제제인 BIO에 의해 크게 복구되는 것을 확인하였다(도 2b).
- [0027] 본 발명에서는 K-Ras 변이를 가지는 대장암 세포에 BIO와 함께 니클로사미드를 처리한 결과, 0.125 μ M 니클로사미드가 대장암 세포에서 Ras-Erk 경로를 충분히 억제하는 반면, BIO는 Ras 활성을 재활성화시킨다는 것을 확인하였다(도 2c). 이러한 결과는 니클로사미드가 대장암 세포에서 GSK-3 의존성 방식으로 Ras 안정성을 조절한다는 것을 의미한다.
- [0028] 니클로사미드는 변이 상태에 관계없이 대장암 세포에서 RAS 활성을 억제한다.
- [0029] GSK-3는 표준 Wnt 경로에서 잘 알려진 키나아제이지만, 키나아제 활성은 여러 Ras 경로에서 밀접하게 관련되어 있다. 예를 들어, Snail 단백질의 안정성과 발현량은 GSK-3 매개 순차적 인산화 및 후속되는 단백질 분해에 의해 엄격하게 제어된다. 흥미롭게도, Snail 억제제는 Raf-1 키나아제 억제 단백질(RKIP)을 직접 억제하여, Raf-1/Mek/Erk 경로와 EMT 진행을 활성화시킨다(Beach S *et al.*, Oncogene., 27:2243, 2008; Yeung K *et al.*, Nature.,401(6749):173, 1999; Shin SY *et al.*, Cancer Res.,70(17):6715, 2010).
- [0030] 또한, 활성화-T 세포의 핵 인자(NFAT)의 핵으로의 수송 및 전사 활성은 Ras/Raf 경로에 의해 조절되며, GSK-3에 의해 억제된다(Beals CR *et al.*, Science., 275(5308):1930, 1997; Ichida M *et al.*, J Biol Chem.,276(5):3524, 2001). 이는 GSK-3가 Ras/Raf/Erk 신호 전달의 여러 측면에 관여하는 것을 의미한다.
- [0031] Ras/Raf/Erk 경로와 NFAT 전사 활성에 대하여 확인하기 위하여, 본 발명에서는 여러 상태의 K-Ras를 가지는 대장암 세포에 니클로사미드를 처리하였다. 앞에서 나타난 바와 같이, Ras 단백질 존재량과 ERK 인산화는 Ras 돌연변이에 관계없이 니클로사미드 처리에 의해 유의하게 감소하였다 (도 3A). 니클로사미드는 대장암 세포에서 Snail 단백질을 지속적으로 억제하면서 Snail 억제자 표적 RKIP 농도를 용량 의존적으로 증가시켰다.
- [0032] 본 발명에서는 니클로사미드가 K-Ras 의존성 NFAT 전사 활성을 억제하는지를 확인하기 위하여, IL-2 프로모터

및 K-Ras 변이를 갖는 NFAT 리포터가 공동 형질감염된 293 세포에 니클로사미드를 처리하였다. 실제로, K-Ras 변이의 과발현에 의해 리포터 활성이 증가되었으며, 활성은 니클로사미드 처리에 의해 크게 감소되었다 (도 3B). 이러한 NAFT 억제제는 다른 대장암 세포에서도 확인되었다(도 3C). 이러한 결과는 니클로사미드가 Ras/Raf/Erk 경로 및 Ras에 의한 전사 프로그램을 효율적으로 억제하는 것을 나타낸다.

- [0033] 니클로사미드는 Ras에 의한 형질전환을 억제한다.
- [0034] Ras 억제에 대한 니클로사미드의 기능적 관련성을 확인하기 위하여, K-ras 변이를 일시적으로 형질감염시키고 앵커리지 독립적인 성장을 분석했다. 변이 K-Ras의 과발현은 대조군의 벡터 형질 감염체보다 소프트 아가에서 현저하게 많은 수의 더 큰 콜로니를 생성시켰고, 니클로사미드는 투여량 의존적으로 앵커리지 독립적인 배양에서 성장을 억제하였다 (도 4A).
- [0035] Ras 종양 유전자에 대한 니클로사미드의 기능적 역할을 더 확인하기 위하여, 변이 K-Ras를 293 세포에 일시적으로 형질감염하고, 니클로사미드를 처리하여, 생체 내 종양 형성 가능성을 평가하였다. 실제로, 변이 K-Ras에 의해 유발된 종양 개시능은 니클로사미드 투여에 의해 약화되었다(도 4B). 이러한 결과는 니클로사미드가 in vitro 및 in vivo에서 Ras 활성을 효율적으로 억제하는 것을 나타낸다.
- [0036] 표준 Wnt 경로의 활성화와 함께, 작은 GTPase Ras 이소형의 체세포 돌연변이가 인간 암에서 빈번하게 발견되며, 이러한 유전적 변형은 표준 또는 표적 치료법에 대한 내성과 관련이 있다. 항암제로서의 중요성에도 불구하고, Ras 단백질은 그 표면에 약물이 결합할 수 있는 포켓이 없어 소분자에 의해서 거의 표적화될 수 없다. 본 발명에서는 니클로사미드에 의한 GSK-3 활성 증가가 대장암 세포의 GSK-3 활성 증가를 통하여, 변이 상태에 관계없이 Ras 활성을 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였다(도 5). 따라서, 본 발명은 인간 암에서 Ras를 조절하기 위한 임상적으로 이용 가능한 약물뿐만 아니라 대안적인 전략을 제시하였다.
- [0037] 다른 관점에서, 본 발명은 니클로사미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Ras 활성화에 의해 재발되는 암이나 전암병소에 대한 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명의 일 양태에서는 암 환자의 치료과정에서 항암제 투여 후, 호전되던 암이 Ras 시그널 활성화에 의하여, 재발하는 경우에 니클로사미드를 처리하여 Ras를 억제하는 경우, 재발하는 암을 치료하는 것이 가능하다.
- [0039] 상기 Ras 활성화에 의해 재발되거나 기존 치료에 저항성을 가지는 암은 대장암, 폐암, 췌장암, 담도암, 혈액암, 악성 흑색종, 혈관 육종, 구강 전암병소 및 갑상선암 으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 또 다른 관점에서, 본 발명은 Ras 활성화에 의하여 발생하는 암 치료를 병용치료용 약학조성물에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명의 일 양태에서는 암 환자에 대한 항암치료 중 Ras 활성화를 억제하기 위하여, 니클로사미드를 병용투여하는 것을 제안한다.
- [0042] 상기 Ras 활성화에 의해 발생하는 암은 대장암, 폐암, 췌장암, 담도암, 혈액암, 악성 흑색종, 혈관 육종, 구강 전암 병소 및 갑상선암 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 병용투여 하는 항암제로는 저분자 화합물을 이용한 기존의 비특이적 세포독성 항암제나 최근에 개발된 저분자, 또는 항체를 이용한 다양한 표적 치료제들을 들 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용된 담체는 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 “약제학적으로 허용되는 담체” 라고 한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이소나트륨, 인산 수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.
- [0044] 본 발명에 따른 의약 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다.
- [0045] 경구 및 비경구 투여가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 “비경구” 는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

- [0046] 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매중의 멸균 주사용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올중의 용액)일 수 있다. 허용적으로 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링겔 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 불휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 불휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.
- [0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 캡슐, 정제 및 수성 현탁액 및 용액을 포함하여 경구적으로 허용되는 어떠한 용량형으로도 경구 투여될 수 있다. 경구용 정제의 경우, 흔히 사용되는 담체로는 락토즈 및 옥수수 전분이 포함된다. 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제가 또한 전형적으로 첨가된다. 캡슐 형으로 경구 투여하는 경우 유용한 희석제로는 락토즈 및 건조된 옥수수 전분이 포함된다. 수성 현탁액이 경구 투여될 때 활성 성분은 유화제 및 현탁화제와 배합된다. 필요한 경우, 감미제 및/또는 풍미제 및/또는 착색제가 첨가될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다. 이들 조성물은 본 발명의 화합물을 실온에서 고형이지만 직장 온도에서는 액상인 적합한 비자극성 부형제와 혼합하여 제조할 수 있다. 이러한 물질로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 코코아 버터, 밀랍 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다.
- [0049] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 경구 투여는 목적하는 치료가 국소 적용으로 접근이 용이한 부위 또는 기관과 관련이 있을 때 특히 유용하다. 피부에 국소적으로 적용하는 경우, 약제학적 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 성분을 함유한 적합한 연고로 제형되어야 한다. 본 발명의 화합물을 국소 투여하기 위한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 유동 파라핀, 백색 와셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물이 포함된다. 다른 방도로서, 약제학적 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 화합물을 함유한 적합한 로션 또는 크림으로 제형될 수 있다. 적합한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 솔비탄 모노스테아레이트, 폴리솔베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물이 포함된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 직장 좌제에 의해 또한 적합한 관장제로 하부 장관으로 국소 적용할 수 있다. 국소 적용된 경피 패치가 또한 본 발명에 포함된다.
- [0050] 본 발명의 약제학적 조성물은 비내 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 약제의 분야에 잘 알려진 기술에 따라 제조하며 벤질 알코올 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용율을 증강시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 기타 본 분야에 알려진 가용화제 또는 분산제를 사용하여 염수중의 용액으로서 제조할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 화합물은 통상적인 항염증제와 혼합하거나 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제, 리폭시게나제 억제제 및 IL-1 β 외의 사이토킨의 억제제와 혼합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 염증과 같은 IL-1 매개된 질환 증세를 예방 또는 퇴치하기 위해 면역조절제(예, 브로피리민, 항-사람 알파 인터페론 항체, IL-2, GM-CSF, 메티오닌 엔케팔린, 인터페론 알파, 디에틸디티오키바메이트, 종양 괴사 인자, 나트렉손 및 rEPO) 또는 프로스타글란딘과 배합하여 투여할 수 있다. 본 발명의 화합물이 다른 치료 제제와 배합하여 투여될 때 이들은 환자에게 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0052] 용어 “치료학적 유효량”은 사람의 경우 상기 증세의 치료에 사용하기 위해 일일당 체중 kg 당 약 1 mg 내지 약 100 mg의 용량 수준(전형적으로 약 60 mg 내지 약 6g/환자/일)을 가리킨다.
- [0053] 용어 “예방학적 유효량”은 사람의 경우 상기 증세의 예방에 사용하기 위해 일일당 체중 kg 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg의 용량 수준(전형적으로 약 6 mg 내지 약 6g/환자/일)을 가리킨다.
- [0054] 그러나, 특정 환자에 대한 특정 유효량은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 규정 식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 변할 수 있음은 이해될 것이다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 의약 조성물을 어류의 피하세포에 투입할 경우 새낭 또는 소화관에 투여할 수 있다. 주사는 근육조직내의 근육세포 또는 다른 세포에 주사할 수 있으며 복강내의 내장세포에 주사할 수 있다.

- [0056] 바람직한 양태로서, 구강내 투여를 위한 의약 조성물은 고체상의 부형제와 함께 활성 성분을 혼합함으로써 제조할 수 있으며 정제 또는 당의정 형태로 제조하기 위해 과립형태로 제조할 수 있다. 적합한 부형제로는 락토스, 수크로스, 만니톨 및 소비톨과 같은 슈가 형태 또는 옥수수, 밀가루, 쌀, 감자 또는 다른 식물로부터 전분, 메틸 셀룰로스, 하이드로시프로필메틸-셀룰로스 또는 나트륨 카복시메틸셀룰로스와 같은 셀룰로스, 아라빅 검, 타가칸스 검을 포함하는 검류와 같은 카보하이드레이트 또는 젤라틴, 콜라겐과 같은 단백질 필러를 사용할 수 있다. 필요한 경우에는, 교차결합된 폴리비닐피롤리돈, 아가 및 알긴산 또는 나트륨 알긴산과 같은 각각의 염 형태의 붕해제 또는 용해제를 첨가할 수 있다.
- [0057] 바람직한 양태로서, 비경구적 투여의 경우 본 발명의 의약 조성물은 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액 (Hank's solution), 링거 용액 (Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 물리적으로 적절한 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입 (injection) 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성 성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액 (oily injection suspensions)으로 제조될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.
- [0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0059] **실시예 1: 니클로사미드에 의한 Ras 암유전자 조절 확인**
- [0060] 대장암 세포를 이용하여, 니클로사미드가 GSK-3의존적으로 Ras를 억제하는 것인지 확인하였다.
- [0061] 대장암 세포주는 HCT116, SW480 및 DLD1과 293 세포는 ATCC로부터 분양하여 사용하였으며, 상기 세포주들은 short tandem 반복 마커를 사용한 DNA 지문 분석으로 확인하였다.
- [0062] 니클로사미드 처리 후, 대장암 세포에서의 내인성 GSK-3 키나아제 활성 변화를 측정하였다.
- [0063] 각 대장암 세포는 250 nM의 니클로사마이드를 16시간 처리하여 세포의 내인성 GSK-3 활성을 측정하였다.
- [0064] 카이네이즈 활성은 GSK-3 카이네이즈 키트(ENZO Biochem)을 사용하여 공지의 방법으로 측정하였으며(Lee DG, et al., Nat Commun., 5:4423, 2014), 키나아제 활성은 3 배수 실험을 수행하여, 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시하였으며, 이중 별표는 학생의 t-검정에 의해 $p < 0.01$ 를 나타내었다.
- [0065] 그 결과 도 1A에 나타난 바와 같이, 니클로사미드를 처리한 대장암 세포에서 GSK-3 키나아제의 활성이 증가한 것으로 확인되었다.
- [0066] 아울러, 니클로사미드에 의하여 증가된 GSK-3 활성이 변이 Ras를 억제할 수 있는지 확인하기 위하여, K-Ras-G12V 변이체를 선택하여, 293 세포를 myc-tagged K-Ras G12V 발현벡터로 형질감염시키고, 니클로사미드(0.25 μ M)와 GSK-3 특이적 억제제인 BIO(6-bromoindirubin-3'-oxim, B1686) 1 μ M의 존재 또는 부존재 하에서 배양하였다. 세포를 회수하여 항 K-Ras (myc), 총 Erk 1/2 (Erk) 및 phospho-Erk 1/2 (pErk)의 단백질 존재를 면역블로팅을 수행하여 확인하였다. 사용된 항체는 Pan Ras(sc16691, Santa Cruz, 1 : 2,000), Erk1 / 2 (4695S, Cell Signaling, 1 : 1,000), pErk1 / 2 (4377S, Cell Signaling, 1 : 1,000)이다.
- [0067] 그 결과, 니클로사미드에 의하여 K-Ras 변이체의 단백질과 내인성 인산화-ERK(extracellular signal-regulated kinase)는 억제된 반면, GSK-3 억제제인 BIO는 니클로사미드의 효과를 약화시키는 것으로 나타났다(도 2A). 이러한 결과는 GSK-3의 상향 조절을 통하여, 니클로사마이드가 Ras의 암유전자의 안정성을 조절할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0068] 본 발명에서는 니클로사미드와 GSK-3 키나아제 활성이 Ras 안정성에 영향을 미치는지 더 조사하기 위하여, 상기 형질감염된 세포를 사이클로헥시마이드(50 μ g/mL)로 처리한 후, Ras 단백질을 추적하였다. 대조군 또는 니클로사미드 또는 BIO와의 병용 투여의시 K-Ras 변이체의 반감기는 맥박 추적 분석 및 면역 블로팅으로 확인하였다(도 2B). K-Ras 돌연변이의 맥박 추적 분석은 종래 기술로 수행하였다(Yook J et al., Nat Cell Biol., 8:1398, 2006).

- [0069] K-Ras의 반감기는 농도 측정 단백질 존재량의 기울기로 확인하였다(도 2B). 그 결과, K-Ras 변이체 단백질의 반감기가 니클로사미드 처리에 의해 상당히 단축되었으며, 이러한 효과는 GSK-3 키나아제 억제제인 BIO에 의해 크게 복구되는 것을 확인하였다.
- [0070] 또한, K-Ras G13D 변이를 가진 대장암 세포를 18시간 동안 BIO와 함께 니클로사미드를 처리하고, 면역 블로팅으로 Ras, 총 Erk 1/2 (Erk) 및 포스 포 - Erk 1/2 (pErk)의 존재를 확인하였다. 그 결과, 0.125 μ M 니클로사미드가 대장암 세포에서 Ras-Erk 경로를 충분히 억제하는 반면, GSK-3 억제제인 BIO는 Ras 활성을 재활성화시키는 것을 확인하였다(도 2C).
- [0071] **실시예 2: 대장암 세포에서 니클로사미드의 RAS 암유전자 활성 억제능 확인**
- [0072] Ras/Raf/Erk 경로와 NFAT 전사 활성화에 대하여 확인하기 위하여, 각각 K-Ras G12V변이 및 K-Ras-G13D 변이를 가지는 대장암 세포에 니클로사미드로 18시간 처리한 후, Ras, 총 Erk1 / 2 (Erk), 포스 포 - 1 / 2 (pErk) 및 RPIP의 존재량을 면역블로팅으로 확인하였다. 항 RKIP는 RKIP (sc376925, Santa Cruz, 1 : 1,000) 를 사용하였다.
- [0073] 그 결과, Ras 단백질 존재량과 ERK 인산화는 Ras 돌연변이에 관계없이 니클로사미드 처리에 의해 유의하게 감소하였다 (도 3A). 니클로사미드는 대장암 세포에서 Snail 단백질을 지속적으로 억제하면서 Snail 억제자 표적 RKIP 농도를 용량 의존적으로 증가시켰다.
- [0074] 본 발명에서는 니클로사미드가 K-Ras 의존성 NFAT 전사 활성을 억제하는지를 확인하기 위하여, IL-2 프로모터 및 K-Ras 변이를 갖는 NFAT 리포터가 공동 형질감염된 293 세포에 니클로사미드를 처리하였다.
- [0075] NFAT 리포터 분석을 위해, 세포를 1 ng의 pRL-SV40-Renilla 벡터(Addgene)로 100 ng의 리포터 유전자로 형질감염시켰다. 리포터 활성은 트랜스펙션 후 48시간 동안 이중 루시퍼라제 분석시스템 (Promega)으로 측정하고 동시 형질전환된 renilla 활성을 측정하여 정상화시켰다. 리포터 유전자 활성은 음성 DMSO 대조군으로부터 수득된 결과에 대한 상대적인 빛 단위로서 확인하였다. 면역블로팅을 위해, Triton X-100 용해 완충액에서 단백질 추출물을 제조하였다. 튜블린 항체는 튜블린(LF-PA0146A, Ab Frontier, 1 : 5,000)을 이용하였다.
- [0076] 실제로, K-Ras 변이의 과발현에 의해 리포터 활성이 증가되었으며, 활성은 니클로사미드 처리에 의해 크게 감소되었다 (도 3B). 이러한 NFAT 억제는 다른 대장암 세포에서도 확인되었다(도 3C). 이러한 결과는 니클로사미드가 Ras/Raf/Erk 경로 및 Ras에 의한 전사 프로그램을 효율적으로 억제하는 것을 나타낸다.
- [0077] **실시예 3: Ras 암유전자에 의한 형질전환을 니클로사미드가 억제하는지 확인**
- [0078] Ras 억제에 대한 니클로사미드의 기능적 관련성을 확인하기 위하여, K-ras 변이를 일시적으로 형질감염시키고 앵커리지 독립적인 성장을 하는지 소프트 아가배양을 통하여 확인하였다.
- [0079] 빈 벡터 또는 K-Ras G12V 변이체를 형질감염시킨 293 세포를 20% FBS를 함유하는 2X DMEM에서 0.3 % 저용점 한천 1ml로 6 웰 플레이트 당 1×10^4 세포농도로 현탁시키고, 1 % 한천을 함유하는 동일한 배지 1ml을 층 위에 겹쳐 놓았다. 2 주 후, 콜로니를 30분 동안 10% 에탄올에서 0.05 % 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 눈으로 확인하여, 50개 이상의 생존 가능한 세포를 함유하는 콜로니를 현미경으로 5개 필드에서 계수하였다. 대표적 콜로니를 촬영하였으며, 2번의 독립적인 실험을 수행하였다.
- [0080] 그 결과, 변이 K-Ras의 과발현은 대조군의 벡터 형질 감염체보다 소프트 아가에서 현저하게 많은 수의 더 큰 콜로니를 생성시켰고, 니클로사미드는 투여량 의존적으로 앵커리지 독립적인 배양에서 성장을 억제하였다 (도 4A).
- [0081] 아울러, 동물실험을 통하여 in vivo에서 니클로사미드가 Ras의 활성을 억제하는 지를 확인하였다.
- [0082] 모든 동물 실험은 연세대학교의 동물 실험 및 사용위원회에 따라 수행되었으며 연세대 학교 치과 대학 동물 관리위원회의 승인을 받고 수행하였다. 암컷 흥선 누드 마우스(6 주령)를 이중 이식 시험법으로 사용하였다. 293 세포를 접종 48 시간 전에 대조군 벡터 또는 변이 K-Ras G12V로 일시적으로 형질감염시켰다. 5×10^5 개의 세포를 100 μ l의 PBS에 현탁하고, 마우스 피하조직의 측면에 주사하였다. 복강 내 투여를 위해, 비히클 (10 % Cremophor EL 및 0.9 % NaCl) 또는 니클로사미드(비히클 (50 mg / kg, 200 mg / kg)를 매일 주사하고 (6 일 / 주), 매일 모니터하고, 매주 두 번씩 체중을 측정하였다.
- [0083] 그 결과, 변이 K-Ras에 의해 유발된 종양 개시능은 니클로사미드 투여에 의해 약화되었다(도 4B). 이러한 결과

는 니클로사미드가 in vitro 및 in vivo에서 Ras 활성을 효율적으로 억제하는 것을 나타낸다.

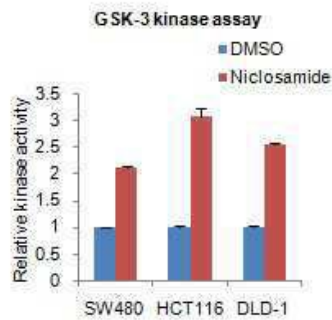
[0084]

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

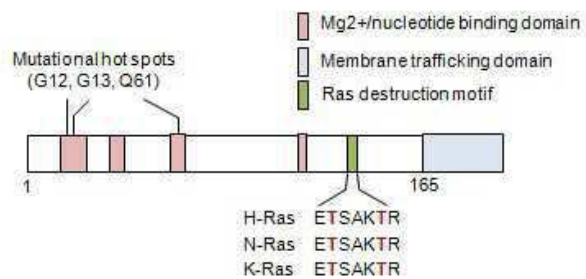
도면

도면1

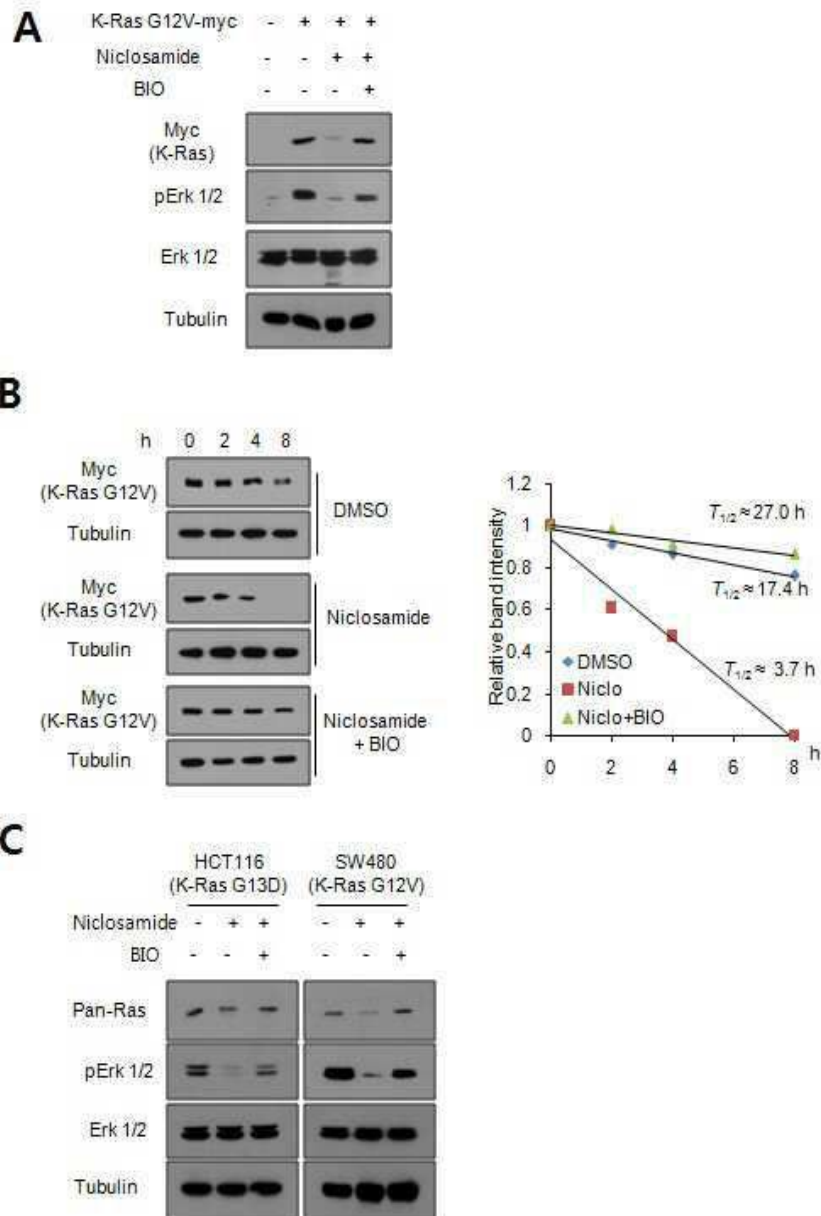
A



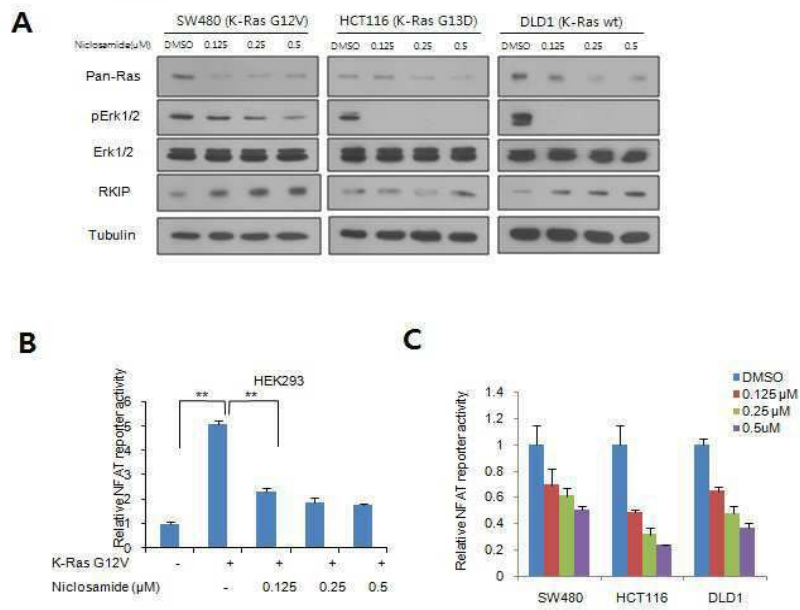
B



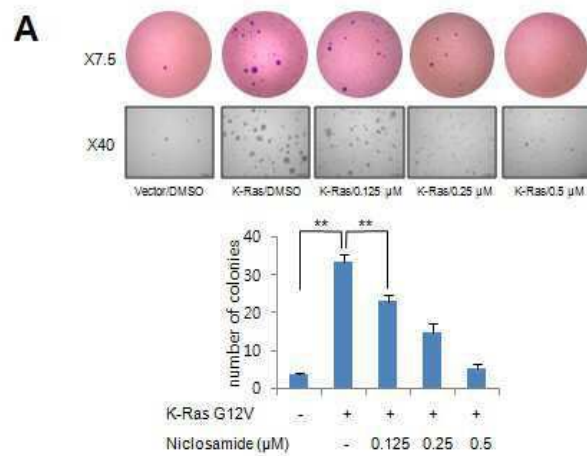
도면2



도면3



도면4



도면5

