



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월15일  
(11) 등록번호 10-1317668  
(24) 등록일자 2013년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/18 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0097375  
(22) 출원일자 2012년09월03일  
심사청구일자 2012년09월03일  
(56) 선행기술조사문헌  
2011 International symposium and annual meeting\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
재단법인 전라남도생물산업진흥재단  
전라남도 나주시 동수동 산15-12  
(72) 발명자  
최철웅  
광주광역시 서구 풍암순환로 14, 105동 203호(풍암동, 호반중흥1단지)  
반상오  
광주광역시 북구 평교로29번길 23(문흥동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 4 항

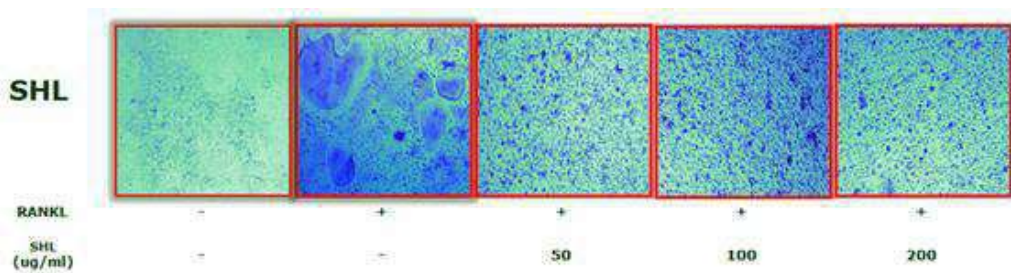
심사관 : 유필

(54) 발명의 명칭 **멸꿀 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 멸꿀 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 상기 멸꿀 잎 추출물은 세포독성이 없을 뿐만 아니라, 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)의 mRNA의 전사수준, NO 분비량 및 염증의 원인이 되는 COX-2 효소의 저해활성을 확인한 결과, 효과적으로 염증을 저해할 수 있을 뿐만 아니라, 관절염과 관련하여 파골세포의 분화를 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 동물실험을 통하여 확인하여 완성한 것으로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 관절염 치료 또는 예방용 의약 조성물 또는 관절염 예방 또는 개선 효과가 있는 식품 조성물 등으로 응용될 수 있다.

**대표도** - 도9



(72) 발명자

**장욱진**

전라남도 장흥군 장흥읍 장흥대로 3492, 1005호 (건산리, 계명아파트)

**설희진**

광주광역시 남구 봉선2로 96-14, 203동 806호(봉선동, 무등2차아파트)

**이규욱**

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 101동 404호(성은연립주택)

**김희숙**

경상남도 고성군 개천면 구만로 337-8

**박가현**

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 102동 103호(우산리, 성은빌라)

**김재용**

전라남도 순천시 삼산로 81, 104동 1707호(용당동, 동아아파트)

**정용기**

전라남도 장흥군 장흥읍 건산남부길 8, 104동 303호 (건산리, 주공1차아파트)

**강후원**

전라남도 나주시 영산포로 203-1

**이동욱**

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호(건산리, 수창아트빌)

**김선오**

광주광역시 북구 양일로 55, 101동 605호(연제동, 현대아파트)

**김재갑**

경기도 부천시 소사구 경인로134번길 51, 2동 507호(송내동, 삼익아파트)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

멸꿀(*Stauntonia Hexaphylla*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 멸꿀 잎 추출물은 멸꿀 잎을 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 3**

멸꿀(*Stauntonia Hexaphylla*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 개선 또는 예방용 식품 조성물.

**청구항 4**

제3항에 있어서,

상기 멸꿀 잎 추출물은 멸꿀 잎을 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 관절염 개선 또는 예방용 식품 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 관절염 치료, 예방 또는 개선 효과가 있는 식물 추출물, 구체적으로 멸꿀 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 염증반응은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 또는 다양한 종류의 알레르기 유발물질 등과 같은 외부감염원을 포함한 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등에 노출되거나 상기 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등에 노출되는 등 여러 요인에 의하여 세포나 조직이 손상을 입거나 파괴되었을 때 그 손상을 최소화하고 손상된 부위를 원상으로 회복시키기 위하여 국소적으로 일어나는 면역반응을 의미한다.

[0003] 또한, 상기 염증을 유발하는 여러 요인으로 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.

[0004] 상기 염증반응은 생체를 보호하고 조직 손상으로 생성된 산물들을 제거하는데 유용한 방어 메카니즘으로, 국소 혈관과 체액에 존재하는 각종 염증 매기인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액침윤, 세포 이동, 조직 파괴, 홍반, 부종, 발열 또는 통증 등의 증상이 나타나며, 상기와 같은 증상에 의해 기능장애가 유발되기도 한다.

[0005] 상기 염증은 정상적인 경우에는 생체 내에서 염증반응을 통하여 외부 감염원을 제거하거나 발병 요인을 중화 또는 제거하고, 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키는 작용을 한다. 하지만, 항원이 계속 제거되지 않거나 특정한 내부 물질이 원인이 되어 염증의 정도가 일정 수준 이상이 되거나 만성화되면, 과민성 질환이나 만성염증과 같은 질병 상태로 진행되는 경우 문제가 된다. 임상질환 가운데 거의 모든 질환에서 염증반응을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 암발생 과정(carcinogenesis)에서도 염증 반응과 관련된 효소들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 수혈, 약물투여 또는 장기이식 등의 치료과정에서도 장애요인이 된다.

[0006] 생체에 있어서 염증반응은 다양한 생화학적인 현상이 관여하고 있으며, 특히, 면역세포에 의해 생산되는 염증반응과 관련된 다양한 효소에 의해 반응이 개시되거나 조절된다.

[0007] 최근 밝혀진 바에 의하면, 체내에서의 염증반응의 진행은 COX(cyclooxygenase) 효소 활성화와 관련된 것으로 알려

져 있다. 상기 COX 효소는 생체 내에 존재하는 프로스타그란딘(prostaglandin)의 생합성에 관련하는 주 효소로서(Smith 등, J. Biol.Chem., 271, 33157(1996)), 두 종류의 이성 효소인 COX-1과 COX-2가 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 COX-1은 위나 신장과 같은 조직에 일정하게 존재하며, 정상적인 항상성을 유지하는데 관여하는 반면, 상기 COX-2는 염증이나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines) 류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현되는 효소이다.

[0008] 또 하나의 강력한 염증 매개물인 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO)는 NO 합성효소(NOS)에 의해 L-알지닌으로부터 생성되며, UV와 같은 외부 스트레스나 엔도톡신 또는 사이토카인과 같은 물질에 의해 많은 종류의 세포에서 생성된다. 상기와 같은 염증 자극들은 세포 내의 유도성 NOS(iNOS)의 발현을 증가시키고, 이를 통하여 세포 내에서 NO 생성을 유도하여, 대식 세포를 활성화시킴으로써 염증 반응을 일으킬 수 있다.

[0009] 따라서, 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염 물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일 예로, 급성 염증 질환 또는 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 비스테로이드성 소염 약물들은 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0010] 한편, 현대 사회에서 인구의 노령화에 따라 치매, 관절염, 동맥경화 등의 퇴행성 질환 환자들이 증가하고 있고, 이로 인해 노령인구의 사회활동 저해는 본인은 물론 가족들에게까지 경제적, 정신적인 어려움을 가져와 사회적 인 문제가 되고 있다.

[0011] 이 중, 관절염은 인류가 앓고 있는 질환 중 유병률 1위의 다발성 질환으로, 특히 퇴행성 관절염은 65세 이상 인구 중 70% 내지 80%가 가지고 있고, 75세 이상 인구의 경우에는 거의 100%가 가지고 있는 대표적인 노인성 질환이다.

[0012] 최근 조사에 의하면, 우리나라는 전체 인구의 10% 이상이 퇴행성 관절염을 앓고 있으며, 이러한 유병률은 한국 사회의 급속한 고령화 추세로 인해 매우 빠르게 증가하고 있다. 구체적으로, 우리나라의 경우, 55세 이상의 인구에서는 80%가 골관절 질환을 앓고 있고, 75세 이상의 경우 거의 대부분이 골 관절 질환을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

[0013] 또한, 전 세계적으로는 약 5억 명 이상의 퇴행성 관절염 환자가 있는 것으로 추정되며, 인간 평균수명의 연장과 함께 인간의 사회활동 기간이 늘어남에 따라, 인류 생활의 질적 측면에서 시급히 극복해야 할 노인성 질환 중에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 특히, 무릎 골관절염은 발병률이 매우 높고 염증이 계속되면 주위 근육의 위축을 유발하여 관절의 기형까지도 초래할 수 있으며, 치료경비뿐만 아니라 이로 인한 노령인구의 사회활동 저해 등 여러 가지 사회적 손실이 큰 질환이다.

[0014] 상기 관절염, 구체적으로, 골관절염 또는 퇴행성관절염은 관절연골의 퇴행성 변화를 기반으로 병변이 시작되어 운동 시 통증과 부종, 관절 강직감 및 점진적인 운동장애를 일으킬 수 있다.

[0015] 상기 골관절염의 치료에는 현재 체중감소, 근육강화운동, 단순진통제, 비스테로이드 소염제, 관절 내 스테로이드 주사 및 수술 등의 운동요법, 약물요법, 수술요법이 실시되고 있다. 하지만 스테로이드 소염제는 위장관 장애 등의 합병증을 일으킬 수 있고, 그 외에 스테로이드계의 관절 내 주사요법은 전신부작용 및 스테로이드의 반복주사에 따른 연골의 파괴, 감염의 위험성이 따르게 되므로 적극적인 치료법으로 한계를 가진다.

[0016] 한편, 파골세포의 조절은 골 리모델링, 즉 파골세포에 의한 골 흡수 및 조골세포에 의한 골 형성의 균형을 유지하는데 필수적이며, 골 질병의 치료와 관련해서도 중요하다.

[0017] 구체적으로, 골-흡수(bone-resorbing) 파골세포는 단핵구-대식 세포 계통의 조혈 세포로부터 유래하여 다수의 과정을 거쳐 다핵 세포로 분화한다. 상기 파골세포의 형성 및 활성화는 골 내에서 국소(local) 인자들 또는 기질 및 조골세포에 의해 조절된다.

[0018] 상기 파골세포의 분화와 관련하여, 골형성(osteotropic) 인자 및 파골세포 형성(osteoclastogenic) 인자들의 발현 증가 또는 에스트로겐의 결핍 같은 전신성 변형은 파골세포 수 및 활성의 증가를 유발할 수 있으며, 이러한 파골세포의 수 및 활성의 증가는 결과적으로 류마티스 관절염이나 치주염과 같은 염증 질환 및 골다공증 같은 골 질환을 야기할 수 있다.

[0019] 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일 예로, 급성 염증 질환 또는 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 비스테로이드성 소염 약물들은 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소

도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

- [0020] 또한, 별도의 부작용 없이, 효과적으로 골관절염과 같은 관절염의 진행을 억제시키거나 차단시켜 줄 수 있는 치료 약물은 부족하고, 예방적 차원의 건강기능성식품도 거의 없는 실정이다.
- [0021] 일 예로, 현재 흔히 사용되고 있는 항류머티스염 치료제 중 안전성과 효능이 입증된 부시라민(bucillamine)의 경우에도 투여 후 4주째부터 유효한 질병 억제 효과를 나타내어 초기에 효과가 늦게 나타나므로 환자의 순응도가 떨어지고 진통효과가 없어, 당장 괴로운 발열, 부종, 동통성 증상을 억제하지 못한다는 단점이 있으며, 부작용으로 피부 부작용, 소화기계, 혈액, 근골격계, 간장, 신장 및 내분비계에 이상반응이 올 수 있다.
- [0022] 또한, 2008년 식품의약품안전청 자료에 의하면, 노인계층에서 꾸준히 판매되고 있는 글루코사민 함유 제품의 경우에도 관절염의 예방치료에 대한 효능과 관련하여, 의학계의 의견과 관련 업계의 의견이 상이한 것이 현실이다.
- [0023] 그러므로, 천연물질 유래 물질로 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없으면서도, 효과적으로 NO의 생성을 억제할 수 있고, iNOS 및 TNF- $\alpha$  발현도 억제할 수 있으며, COX-2 효소의 활성을 유효하게 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 과골세포의 분화를 억제하여, 관절염 치료, 예방 또는 개선 효과가 우수한 물질의 개발이 요구되고 있다.
- [0024] 본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 특허문헌 또는 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

- [0025] (특허문헌 0001) KR 0530843 B
- (특허문헌 0002) KR 0614465 B
- (특허문헌 0003) KR 0941133 B
- (특허문헌 0004) KR 0954984 B
- (특허문헌 0005) KR 1023487 B
- (특허문헌 0006) KR 1150900 B
- (특허문헌 0007) KR 1150528 B
- (특허문헌 0008) KR 1162336 B

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0026] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 부작용과 관련된 문제가 발생될 가능성이 적은 식물 추출물을 유효성분으로 하는 관절염 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0027] 또한, 기존의 항염 물질과 달리 식용으로 사용될 수 있는 천연식물에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수할 뿐만 아니라, 염증과 관련된 NO 생성을 억제할 수 있고, COX-2 효소를 효과적으로 저해할 수 있으며, 과골세포의 분화를 억제할 수 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

- [0028] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다. 상기 관절염 치료 또는 예방용 조성물은 의약품 조성물일 수 있다.
- [0029] 상기 멸균 및 추출물은 NO의 생성과 관련된 iNOS의 발현을 억제하여 NO 분비를 효과적으로 억제할 수 있고, 생체 내에 존재하는 프로스타그란딘(prostaglandin)의 생합성에 관련하여 염증 반응을 진행시키는 COX-

2(cyclooxygenase-2)의 합성을 저해할 수 있을 뿐만 아니라, 관절염과 관련하여 동물실험결과 파골세포의 분화를 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 확인되었다.

- [0030] 구체적으로, 본 발명자들은 멸꿀 잎 추출물은 상기 NO의 분비 및 염증을 유발하는 염증과 관련된 사이토카인의 mRNA 전사를 효과적으로 억제할 수 있으므로 항염 효과가 있을 뿐만 아니라, 관절염과 관련하여 동물실험(*In vivo*)에서 파골세포의 분화를 효과적으로 억제할 수 있고, 콜라겐 유도 관절염 실험동물 모델에서 관절 부종을 억제할 수 있다는 실험결과를 통하여, 멸꿀 잎 추출물은 관절염의 치료, 개선 또는 예방 효과도 우수하다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0031] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0032] 본 발명은 멸꿀 추출물, 바람직하게는 멸꿀 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.
- [0033] 상기 멸꿀(*Stauntonia hexapillya*)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 으름덩굴과의 상록 덩굴 식물으로, 멸꿀나무라고도 한다. 상기 멸꿀은 암수 한 그루로 원줄기는 약 5 m 정도 뻗어가고, 잎은 어긋나며 5개 내지 7개의 작은잎으로 된 손바닥모양 겹잎이다. 작은 잎은 두껍고 달걀모양 또는 타원형이며, 가장자리가 밋밋하다. 잎자루는 길이가 6 cm 내지 8cm 정도이고, 작은 잎자루는 약 3 cm 정도이다. 꽃은 5월에 피고, 황백색이며 총상꽃차례에 달린다. 암꽃의 작은 꽃 가지는 가을에 적갈색으로 되고, 많은 피복이 있어 거칠다. 열매는 장과로 달걀모양 또는 타원형이고 길이가 5 cm 내지 10 cm이며, 10월에 적갈색으로 익고 과육은 으름보다 맛이 좋다. 종자는 달걀모양의 타원형으로 흑색이다. 상기 멸꿀은 주로 한국, 일본, 타이완 또는 중국 등지에 분포한다. 우리나라에서는 주로 전라남도, 경상남도 및 충청남도 등의 남쪽지방의 계곡이나 숲 속에서 잘 생육한다.
- [0034] 상기 멸꿀 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 멸꿀의 잎, 가지, 줄기, 뿌리 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 염증 치료 효과의 측면에서 바람직하게는 멸꿀의 잎에 추출용매를 가하여 추출함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.
- [0035] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 희석수 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산, 에틸아세테이트 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 희석수는 알코올을 50%(v/v) 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 멸꿀 잎 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 물일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 50℃ 내지 150℃, 또는 75℃ 내지 120℃, 또는 90℃ 내지 115℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 또는 30분 내지 8시간, 또는 2시간 내지 6시간일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 멸꿀 잎 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 열수추출법을 포함한 열추출법, 냉침추출법, 온침추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파 분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 아세톤, 부탄올, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다.
- [0039] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.
- [0040] 상기 관절염 치료, 개선 또는 예방용 조성물은 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용될 수 있고, 이러한 측면에서 상기 관절염 치료 또는 예방용 조성물은 의약용 조성물일 수 있으며, 일 예로 약학 조성물일

수 있다.

- [0041] 관절염은 관절에서 흔히 일어날 수 있는 질환으로, 일 예로 골관절염 (osteoarthritis), 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis), 퇴행성 관절염(degenerative arthritis) 또는 다발성 관절염 (polyarthritis) 등을 포함한다.
- [0042] 상기 골관절염은 동통과 경직으로 인해 중년기 이후 만성적인 무능력의 가장 흔한 원인이며, 기본적인 병리학적 과정은 염증성인 류마티스 관절염과 달리 만성적이다.
- [0043] 상기 류마티스 관절염의 발병률은 인종 및 지리적 위치에는 차이가 없으나, 여자가 남자보다 발병률이 높으며, 특히 35 세에서 45 세 사이에 발병률이 가장 높고, 나이가 들어감에 따라 남녀 차가 감소된다.
- [0044] 상기 관절염 치료 또는 예방용 조성물이 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 관절염 치료 또는 예방용 조성물은 염증을 억제하거나 염증을 치료 또는 예방하고, 특히 관절염을 치료, 개선, 예방 또는 완화하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0045] 이러한 측면에서, 본 발명은 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것일 수 있다. 상기 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 관절염을 억제하거나 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0046] 상기 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 조성물 또는 상기 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증제에 있어서, 상기 멸균 및 추출물은 멸균 및 열수 추출물일 수 있다.
- [0047] 상기 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0048] 상기 멸균 및 추출물은 상기 관절염 치료 또는 예방용 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0049] 보다 상세하게는, 상기 멸균 및 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 멸균 및 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.
- [0050] 이 경우 상기 조성물 내 멸균 및 추출물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 추출물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.
- [0051] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다. 담체 또는 부형제는 2종 이상 사용될 수 있다.
- [0052] 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 율활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 멸균 및 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명의 관절염 치료 또는 예방용 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 관절염 치료, 예방 또는 개선 효과가 있는 것으로 인정된 물질, 일 예로 관절염 치료제, 파골세포 분화 억제제, 항염증제, NO 저해제 또는 COX-2 저해제 등으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.
- [0054] 또한 본 발명의 관절염 치료 또는 예방용 조성물은, 상기 유효성분 이외에 공지의 관절염 치료, 예방 또는 개선 효과를 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 유효성분 100 중량부에 대하여 각각 0.1 중량부 내지 99.9 중량부 또는 0.5 중량부 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

- [0055] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0057] 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0058] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.
- [0059] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.
- [0060] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성물 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0061] 또한, 본 발명의 관절염 개선 또는 예방용 조성물은 관절염의 예방 또는 개선용 식품조성물로 응용될 수 있다. 상기 식품조성물은 일 예로 상기 관절염의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0062] 이러한 측면에서, 본 발명은 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 개선 또는 예방용 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0063] 상기 건강기능식품은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상기 멸균 및 추출물을 전체 식품 중량의 0.001 중량% 내지 99.9 중량% 또는 0.01 중량% 내지 50 중량% 또는 0.1 중량% 내지 30 중량% 또는 0.1 중량% 내지 15 중량% 포함될 수 있다.
- [0065] 따라서, 상기 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 개선 또는 예방용 조성물 또는 멸균 및 추출물은 관절염 개선 및 완화효과를 갖는 식품 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

**발명의 효과**

- [0066] 본 발명의 멸균 및 추출물은 식용으로 사용되는 식물 유래 추출물로서 부작용이나 안전성에 대한 문제가 없고, MTT 분석 결과, 세포 독성이 없을 뿐만 아니라, 멸균 열매에 비하여 수확량이 많으므로 생산이 용이하고, 염증과 관련된 항염 효과, 구체적으로 NO 분비량을 억제하고, iNOS의 발현을 효과적으로 억제하며, COX-2 효소의 활성도 현저하게 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 관절염 치료, 개선 또는 예방 효과와 관련하여 파골세포의 분화 억제 즉, 파골세포의 TRAP 활성 억제 및 분화 억제를 할 수 있음을 확인하였다.
- [0067] 이러한 측면에서, 상기 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료, 개선 또는 예방용 조성물은 염증을 억제하고, 파골세포의 분화를 억제하여 관절염을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물 또는 관절염을 개선



또는 예방하기 위한 기능성 식품 조성물로 사용될 수 있다.

[0068] 그러므로, 본 발명은 관절염에 대한 치료와 관련된 의료산업 및 관절염 개선 또는 예방과 관련된 기능성 식품과 관련된 산업의 분야에서 널리 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0069] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물과 상기 열수추출물의 용매 분획물을 제조하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 멸균의 부위별 추출물의 세포독성을 MTT assay법으로 측정된 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 가로축은 멸균 부위별 추출물의 투여량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 나타내는 수치이고, 세로축은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군 대비 세포 수를 나타낸 수치(%)이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증관련 사이토카인 iNOS mRNA 수준을 측정된 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 또는 용매 분획물을 처리한 것을 의미하고, -는 시료를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축의 수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 의미한다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, iNOS 및 COX-2의 발현 정도를 측정된 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 또는 용매 분획물을 처리한 것을 의미하고, -는 시료를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축의 수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 의미한다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 각 용매별 분획물의 항염효과를 확인하기 위하여, COX-2의 활성을 통하여 COX-2의 저해활성을 측정된 결과를 나타낸 그래프로, 각 그래프를 구분한 용매는 분획용매를 의미하고, 가로축은 처리 후 경과 시간을 세로축은 COX-2의 활성을 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 부위별 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, COX-2의 활성을 통하여 COX-2의 저해활성을 측정된 결과를 나타낸 그래프로, 각 그래프를 구분한 용매는 분획용매를 의미하고, 가로축은 처리 후 경과 시간을 세로축은 COX-2의 활성을 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 부위별 추출물의 항염효과를 추출물의 g당 수율에 따른 약리효능을 나타낸 그래프로, COX-2의 활성을 통하여 측정된 COX-2의 저해활성으로부터 계산된 결과를 나타낸 그래프이며, 가로축은 부위 별 추출물 종류를, 세로축은 가장 효과가 우수한 멸균 및 열수 추출물 대비 약리효능을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 관절염 치료효과를 확인하기 위하여, 과골세포의 TRAP 활성을 측정된 그래프로, 상기 그래프에서 가로축은 멸균 및 열수추출물의 투여량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 나타내는 수치이고, 세로축은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군 대비 활성을 나타낸 수치(%)이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 관절염 치료효과를 확인하기 위하여, 과골세포의 분화도를 측정된 사진으로, 상기 사진의 하단에 기재된 수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 나타내는 수치이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 관절염 치료효과를 확인하기 위하여, 콜라겐 및 멸균 및 열수 추출물의 투여 여부에 따른 실험동물의 관절염 치료 효과를 나타낸 사진으로, +는 약물 또는 시료를 투여한 것을 의미하고, -는 약물 또는 시료를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 의미한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0070] 이하, 본 명의 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 보다 명확하게 이해시키기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 보호범위는 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하고, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0071] <실시예 1> 멸균 및 추출물 및 분획물의 제조

- [0072] 1-1. 멀꿀 잎 추출물 제조
- [0073] 멀꿀(*Stauntonia hexaphylla*)의 잎 10 kg을 열수를 이용하여 110℃에서 열수추출법을 수행하여 열수추출물을 제조하였다.
- [0074] 보다 구체적으로, 증류수로 수세한 멀꿀 잎 건조물 10 kg에 증류수 200 L를 가한 후, 전기약탕기를 이용하여 110℃에서 4시간 동안 가열하면서, 열수추출을 수행하였다. 상기 추출을 수행한 후, 400 메쉬 여과포로 여과한 다음, 수득한 여액을 감압회전농축기를 이용하여 농축하였다. 여과 후, 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일 과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압과정을 수행하였다.
- [0075] 상기 과정을 통해 제조된 멀꿀 잎 열수 추출액을 동결건조기(Freeze dryer)에서 동결건조하였다. 상기 동결건조를 통하여, 1 kg의 멀꿀 잎 열수추출물을 수득하였으며, 이로 인해 상기 멀꿀 잎 열수 추출법에 의한 수율이 19.56%인 것으로 확인되었다.
- [0076] 또한, 동일한 방법으로 멀꿀의 다른 부위 즉, 멀꿀 열매, 멀꿀 뿌리 및 멀꿀 가지를 수득하여 세수하고 건조한 후, 상기와 동일한 방법으로 추출물을 제조하였다. 상기 방법으로 제조한 결과, 멀꿀 열매의 경우 상기 열수추출법에 의한 수율이 7.05%이고, 줄기의 경우 7.91%이며, 뿌리의 경우 3.05%인 것으로 확인되었다.
- [0077] 1-2. 멀꿀 잎 추출물의 분획물 제조
- [0078] 멀꿀 잎 열수추출물의 분획물 제조는 도 1에 나타난 제조방법에 의해 수행하였다.
- [0079] 구체적으로, 상기 열수 추출물 250 g을 5 L의 증류수에 완전히 용해시킨 후, 분획여두에 넣고 헥산(Hexane) 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 헥산 가용성층인 헥산층과 헥산 불용성층인 수층을 분리하고, 헥산층만을 수득함으로써, 헥산 분획액을 제조하였다.
- [0080] 나머지 용액(수층)에 클로로포름 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 클로로포름 가용성층인 클로로포름층과 클로로포름 불용성층인 수층을 분리하고, 클로로포름층만을 수득함으로써, 클로로포름 분획액을 제조하였다.
- [0081] 나머지 용액(수층)에 에틸아세테이트 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 에틸아세테이트 가용성층인 에틸아세테이트층과 에틸아세테이트 불용성층인 수층을 분리하고, 에틸아세테이트층만을 수득함으로써, 에틸아세테이트 분획액을 제조하였다.
- [0082] 나머지 용액(수층)에 부탄올 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 부탄올 가용성층인 부탄올층과 부탄올 불용성층인 수층을 분리하고, 부탄올층만을 수득함으로써, 부탄올 분획액을 제조하였다.
- [0083] 상기 부탄올 가용성층을 분획 분리 후 남은 부탄올 불용성층을 농축하여 남아있는 유기용매를 제거함으로써, 물 분획액을 제조하였다.
- [0084] 상기 얻어진 각각의 분획액을 감압여과장치로 여과하여 농축한 후, -20℃에서 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다. 상기 과정을 통하여 0.02 g의 헥산 분획물(0.015%), 0.67 g의 클로로포름 분획물(0.27%), 2 g의 에틸아세테이트 분획물(1.05%), 68.75 g의 부탄올 분획물(27.5%) 및 150.14 g의 물 분획물(60.06%)을 얻어 시료로 사용하였다. 상기 제조과정에서 부탄올 분획과 물 분획의 경우에는 우수한 수율이 확인되어, 분획물 제조의 효율에 있어서 높은 수율로 인해 경제성이 인정되므로 산업적으로 효과가 우수할 것으로 평가된다.
- [0085] 상기 수득한 추출물 및 분획물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.
- [0086] **<실시예 2> 추출물의 세포독성 실험**
- [0087] 상기 실시예 1에서 제조된 멀꿀의 각 부위별 열수추출물의 세포 독성을 측정하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다.
- [0088] 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium / Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-글루타민(L-glutamine) 및 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.
- [0089] 상기 RAW264.7 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린스트렙토마이신 및 1% L-글루타민을 첨가한 배양액

을 사용하여 배양하였고, 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub> /95% air)에서 배양하였다.

[0090] 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양시킨 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.

[0091] 상기 배양한 세포는, 50,000 cells/well의 밀도로 48 well-plate에 분주하여, 24시간 더 배양하였다. 상기 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않고 LPS만 처리한 대조군과 LPS와 상기 실시예 1의 멸균 각 부위별 열수추출물을 세포 생존에 별 다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 DMSO를 사용하여 다양한 농도로 제조된 멸균 각 부위별 열수추출물을 처리한 실험군으로 나누어, 24시간 동안 더 배양 시킨 후, 배양액을 제거하고 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 상기 MTT 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0092] 우선, 세포배양배지를 제거한 후 MTT를 1 mg/ml로 포함하는 DMEM/F12 배지를 웰당 1 ml씩 처리하고, 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 더 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후, tetrazoliumbromide salt를 제거하고, DMSO 200 μl를 분주하여 각 웰에 생성된 포르마잔 크리스탈을 용해시키고, 마이크로 플레이트 리더(BIO-RAD)에서 540 nm 파장으로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.

[0093] 상기 멸균 각 부위별 열수 추출물로 처리한 결과는 상기 실험을 동일하게 3회 수행하여, 측정된 값의 평균값으로도 도 2에 나타내었다.

[0094] 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1-1에서 제조된 멸균 및 열수추출물을 다양한 농도, 구체적으로 멸균 및 열수추출물을 10 μg/ml 내지 200 μg/ml까지 농도 별로 처리하고 24시간을 경과한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않고, LPS만 처리한 대조예와 비교하여 모두 세포의 증식에 별 다른 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 결과로부터 멸균 및 추출물은 200 μg/ml까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0095] 또한, 다른 부위별 추출물의 경우에도 50 μg/ml 처리시까지는 별다른 독성을 나타내지 아니하였고, 100 μg/ml 및 200 μg/ml의 경우에는 열매와 가지에서 약한 독성이 나타났으나, 이는 미비한 정도로 세포의 증식에 큰 영향을 나타내는 것은 아닌 것으로 확인되었다.

[0096] <실시예3> 염증관련 사이토카인 mRNA 수준 측정을 통한 항염효과 확인

[0097] 상기 실시예 2에서 독성이 문제되지 않는 것으로 확인된 멸균 및 열수 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine), 구체적으로 iNOS의 mRNA 함량의 변화를 대식세포(primary cell)를 이용하여 확인하였다.

[0098] 상기 대식세포(primary cell)를 수득하기 위하여, 체중이 15 g 내지 20 g된 4주령의 수컷생쥐(ICR mouse, male)와 Sprague-Dawley 쥐를 샘타코사(대한민국)에서 각각 32마리씩 구입하여, 각각 16군으로 나누고, 각 군당 4마리씩 배치하여 사육하였다. 상기 실험동물의 사육은 20°C 내지 24°C의 온도조건, 60% 내지 70%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고품 사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

[0099] 상기 실험동물로부터 수득한 대식세포(Macrophage primary cell, 2 X 10<sup>6</sup> cells/ml)를 serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, LPS(0.5 mg/ml) 또는 LPS(0.5 mg/ml)와 다양한 농도의 멸균 및 열수 추출물로 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 상기 24시간 후, 상기 배양된 각각의 세포로부터 RNA를 분리하였다. 상기 RNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0100] 구체적으로, 상기 배양한 세포를 GIT solution(easy BLUE Total RNA extraction kit, (주)인트론바이오테크놀러지, 대한민국)으로 용해(lysis)시키고, 실온에서 10,000 rpm 조건으로 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 펠렛(pellet)을 수득하였다. 상기 펠렛에 0.1% DEPC solution(Sigma, USA) 1 ml를 첨가하고, 12,000 rpm 조건으로 2분간 다시 원심분리를 하여 상등액을 제거한 후, 펠렛을 수득하였다. 상기 수득한 펠렛에 구아니디늄(guanidinium) 0.5 ml을 첨가하여 볼텍싱(vortexing)하였다. 추가로, phenol/chloroform/iso-amylalchol 혼합용액(25:24:1)을 0.5 ml 첨가하고, 볼텍싱한 후, 12,000 rpm의 조건으로 3분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 상기 상등액과 동량의 이소프로필알코올(iso-propylalcol)을 첨가하고 잘 혼합한 후, -20°C에서 30분간 방치시켰다. 이 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 후, 펠렛을 70% 에탄올 수용액으로 씻어 내고(washing), 진공하에 건조시켜 RNA를 분리하였다.

- [0101] 상기 분리된 RNA는 0.1% DEPC용액 1 ml에 녹여 염증 관련 사이토카인의 mRNA함량을 측정하기 위해 사용하였다. 상기 염증관련 사이토카인인 iNOS의 mRNA 함량 측정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- [0102] 상기 분리된 RNA 3 µg에 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하고, 42℃에서 1시간 45분 동안 incubation한 후, 70℃에서 15분 동안incubation하여, cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA는 real-time PCR법으로 정량하였다. 상기 real-time PCR을 수행하기 위한 Primer의 서열과 실험조건은 하기 표 1에 기재하였다.

**표 1**

확인대상 mRNA	primer sequence		Annealing Tm(℃)
iNOS	sense	CAGAGGACCCAGAGACAAG	50.8
	anti-sense	ACCTGATGTTGCCATTGTTG	

- [0104] 상기 real-time PCR 결과는 β-actin 함량과 함께 비교하여 사진으로 촬영한 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0105] 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)인 iNOS의 mRNA가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 iNOS의 mRNA가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 및 열수추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 iNOS의 mRNA 함량이 감소되는 것이 확인되었다. 상기 멸균 및 열수추출물이 처리되는 경우 농도 의존적으로 iNOS의 mRNA 함량이 감소된 결과로부터, 상기 멸균 및 열수 추출물은 우수한 항염 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

**[0106] <실시예4> 염증 관련 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성확인**

- [0107] 상기 실시예 3에서 iNOS의 mRNA 함량 감소효과를 통하여 항염효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, iNOS 및 COX2 발현 억제 활성을 확인하였다.
- [0108] 구체적으로, 상기 실시예 3에서 수득한 대식세포(Macrophage primary cell)를 DMEM 배지를 이용하여 1 X 10<sup>5</sup> cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전 배양하였다. 상기 배양 후, 멸균 및 열수추출물을 농도별(0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml 및 200 µg/ml)별로 처리하고, 1시간 배양 후 LPS(1 µg/ml)를 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 phosphate buffered saline(PBS)로 세척 한 후 세포 용해버퍼(50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 µg/ml aprotinin, 25 µg/ml leupeptin)를 첨가하여 30분간 4℃에서 용해시킨 후 4℃ 및 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다.

- [0109] 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 분리된 단백질 20 µg를 10% mini gel SDS-PAGE에 로딩하고 변성 분리하여, 이를 nitrocellulose 멤브레인(membrane, BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 350 mA 조건에서 1시간 동안 이동(transfer)시켰다. 상기 단백질을 이동시킨 멤브레인(membrane)의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다.

- [0110] iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (Calbiochem, La Jolla, USA)를, COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2(BD Biosciences Pharmingen, SanJose, USA)를 TTBS 용액에서 1:1000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech, LittleChalfont, UK)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 30초간 반응 후 화학발광이미지 시스템(Chemiluminescence imaging system, ATTO AE-9150 EZ-Capture II, Japan)을 이용하여 발현 양을 측정하였다. 상기 발현량을 측정한 결과를 도 4에 나타내었다.

- [0111] 상기 도 4에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 단백질 즉, iNOS 및 COX-2가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 iNOS 및 COX-2가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 및 열수 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 iNOS 및 COX-2 함량이 감소되는 것이 확인되었다. 상기 멸균 및 열수 추출물이 처리되는 경우 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2 함

량이 감소된 결과로부터, 상기 멸균 및 열수 추출물은 우수한 항염 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

[0112] <실시예5> 분획물의 COX-2(시클로옥시게나아제효소-2) 저해효과 확인

[0113] 상기 실시예 3 및 실시예 4에서 항염효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 및 열수추출물의 각 분획용매 별 분획물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, COX-2 효소 저해활성을 확인하였다.

[0114] 우선, 5주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐((주)샘타코, 대한민국)를 1주일간 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 상기 실험동물의 사육은 20℃ 내지 24℃의 온도조건, 50% 내지 55%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고휘사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

[0115] 상기 실험동물(SD 수컷 흰쥐)의 복강에 4% thioglycolate 10 ml를 투여하고 3일 동안 복강대식세포를 증식시킨 후, 경추탈골하였다. 경추탈골하여 준비된 SD 수컷 흰쥐로부터 복강 대식세포를 수집하였다.

[0116] 구체적으로, 복강에 HBSS 10 ml를 주입한 다음 시린지(syringe)를 이용하여 복강 대식세포를 취한 다음 코니칼 튜브(conical tube)에 옮겼다. 복강 대식세포를 13,000rpm 조건에서 5분간 원심분리하고 DMEM 배지로 2회 세척 후 직경 60 mm petri dish에 분주한 다음 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 후, 부유 세포들을 제거하고 부착된 세포들을 24시간 안정화시킨 후, 단백질을 분리하여 사용하였다.

[0117] 상기 실시예 1에서 얻어진 멸균 및 열수추출물의 분획물 각각 50 mg/ml을 분리된 단백질에 처리하고, 30분 동안 안정화시킨 후, COX Fluorescent Activity Assay Kit(Cayman Chemiacpmpny, Item No. 700200)에 준하는 방법으로 시클로옥시게나아제 효소 활성을 측정하였다. 상기 측정된 효소 활성 측정 결과를 도 5에 나타내었다.

[0118] 상기 도 5에 나타낸 바와 같이, 멸균 및 열수 추출물의 물 분획물의 경우에는 저해 효과가 낮은 것으로 확인되었고, 핵산 분획과 부탄올 분획의 경우에도 저해활성이 떨어지는 것으로 확인된 반면, 에틸아세테이트 분획 및 클로로포름 분획은 저해 활성이 현저하게 우수한 것으로 확인되었다. 특히, 시간이 경과함에 따라 그 저해 활성의 차이가 현저하게 나타나는 것으로 확인되었다. 특히, 멸균 및 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 COX-2 저해활성이 가장 뛰어난 것으로 확인되었다.

[0119] <실시예6> 부위별 추출물의 COX-2(시클로옥시게나아제효소-2) 저해효과 확인

[0120] 상기 실시예 3 및 실시예 4에서 항염효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 및 열수추출물과 관련하여, 다른 부위와 항염 효과를 비교하기 위하여, COX-2 효소 저해활성을 확인하였다.

[0121] 5주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐((주)샘타코, 대한민국)의 사육 및 상기 실험동물로부터 복강 대식세포를 수집하는 방법은 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0122] 상기 실시예 1에서 얻어진 멸균 각 부위별 열수추출물 각각 10 mg/ml 또는 100 mg/ml을 분리된 단백질에 처리하고, 30분 동안 안정화시킨 후, COX Fluorescent Activity Assay Kit(Cayman Chemiacpmpny, Item No. 700200)에 준하는 방법으로 시클로옥시게나아제 효소 활성을 측정하였다. 상기 측정된 효소 활성 측정 결과를 도 6에 나타내었다. 또한, 상기 결과로부터 항염 효과와 관련된 효능을 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내어, 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

추출물 대상 부위	IC 50(ug/ml)
열매(Fruit)	70.41
잎(Leaf)	8.46
줄기(Stem)	49.74
뿌리(Root)	66.04

[0124] 상기 도 6 및 표 2에 나타낸 바와 같이, 멸균 및 열수 추출물은 다른 부위에 비하여 현저하게 항염 효과가 우수한 것으로 확인되었고, 특히 기존 항염 효과가 알려진 멸균 뿌리 추출물은 물론 다른 부위에 비해서도 현저하게

우수한 항염 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0125] 구체적으로, COX-2 효소의 활성 억제를 IC<sub>50</sub> 값으로 환산한 결과, 멸균 및 열수 추출물은 멸균 열매 열수 추출물에 비해서 8.3배, 멸균 줄기 열수 추출물에 비해서 5.8배 및 멸균 뿌리 열수 추출물에 비해서도 7.8배 효과가 높은 것으로 확인되었다.

[0126] 상기 실시예 1에서 확인된 추출물 제조 수율을 고려하여 비교하면, 멸균 잎의 효능을 100%로 할 때, 각 부위별 동일한 항염증 효능을 나타내기 위하여 필요한 원물 양을 멸균 각 부위의 부위별 원물 g당 생리효능으로 환산한 결과를 도 7에 나타내었다. 상기 도 7에 나타낸 바와 같이, 멸균 잎이 다른 부위에 비해 약리 효능이 8배 이상 높게 나타나는 것을 확인되어, 멸균 잎의 경우 다른 부위에 비하여 항염 효과만 우수한 것이 아니라 원물 요구량이나 제조원가 등 산업적 측면에서도 그 효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[0127] <실시예7> 파골세포를 이용한 관절염 치료효과 확인

[0128] 상기 실시예에서 항염효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 및 열수추출물의 관절염 치료효과를 확인하였다.

[0129] 구체적으로, 관절염의 원인과 밀접하게 관련이 있는 파골세포에는 특징적으로 타르트레이트(tartrate)에 대해 저항성을 나타내는 산성 포스파타제(acid phosphatase)인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)을 가지며, 이는 다른 골조직 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다고 알려져 있다. 따라서, 상기 파골세포의 TRAP의 활성 저해 여부를 통해 관절염 치료 효과를 확인하였다.

[0130] 우선, 5주령의 ICR Mouse((주)샘타코, 대한민국)를 1주일간 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 상기 실험 동물의 사육은 20℃ 내지 24℃의 온도조건, 50% 내지 55%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고품사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

[0131] 상기 ICR 마우스(ICR Mouse)의 경골(tibia)을 적출하여, 양끝을 절단하고 α-MEM essential medium을 통과시켜 골수세포를 수집하고, 50 ng/mL M-CSF(macrophage-colony stimulation factor)를 처리하여 24시간 배양하였다. 미부착 세포를 α-MEM으로 세척한 후 96 well에 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 분주하고, 50 ng/mL의 M-CSF가 첨가된 α-MEM 배지에 3일간 배양하였다. 그 후 50 ng/mL의 MCSF와 100 ng/mL의 RANKL(Receptor Activator for Nuclear Factor κB Ligand)을 함께 처리하고, 시료를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다.

[0132] 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde로 고정된 cell에 기질용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer pH 4.6)을 100 μL씩 분주하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 옮기고 0.1 N NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하여 도 8에 나타내었다.

[0133] 상기 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 멸균 및 추출물들이 각각 농도 의존적으로 파골세포의 생성 억제 작용을 한다는 것을 확인하였다. 구체적으로, RANKL를 처리하지 않아 분화가 진행되지 않은 대조군에서는 TRAP 활성이 거의 확인되지 않은 반면, RANKL 처리를 통해 분화된 경우 현저하게 높은 TRAP 활성이 확인되었다. 또한, RANKL 처리를 통해 분화시킨 경우에도, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 및 열수추출물이 처리되는 경우 농도 의존적으로 TRAP 활성을 감소시키는 것이 확인되었고, 특히, 100 ug/ml만 처리한 경우에도 대조군과 거의 유사한 정도로 TRAP 활성을 감소시키는 것으로 확인되어, 상기 결과로부터, 상기 멸균 및 열수 추출물은 우수한 관절염 치료 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

[0134] <실시예8> 파골세포 분화억제를 통한 관절염 치료효과 확인

[0135] 상기 실시예 7에서 분화인자와 시료를 처리하고 배양하여 분화를 유도한 파골세포에 멸균 및 열수 추출물을 처리한 후, 세포의 분화정도를 확인하여, 파골세포의 분화억제를 통한 관절염 치료효과를 확인하였다.

[0136] 우선, 상기 실시예 7에서 분리된 세포에 분화인자와 시료를 처리하고 4일간 배양한 후, 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde로 고정된 cell에 기질용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer pH 4.6)을 100 μL씩 분주하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이후, 배

지를 제거하고, PBS로 세척한 다음 10% 포름알데하이드(formaldehyde)로 15분 동안 세포를 고정하고, PBS로 cell을 3번 세척하였다.

[0137] 상기 고정된 세포에 대해 TRAP 염색을 수행하였다. 상기 TRAP 염색은 50 mM tartrate acid를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer 10 mL에 1 mg/mL naphtol AS-MX phosphate와 N,N-dimethylformamide 100  $\mu$ L를 첨가하여 염색액을 제조한 후, 10% formaldehyde로 고정된 세포에 염색액을 45  $\mu$ L씩 분주하고 37°C에서 30분간 방치하는 방법으로 수행하였다. 상기 염색을 수행한 후, 염색된 세포를 현미경으로 관찰하여 촬영한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0138] 상기 도 9에 나타난 바와 같이, 대조군 세포에서는 TRAP 양성 다핵형 파골세포가 형성되었지만, 멸꿀 잎 열수 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 파골세포의 분화가 억제되었음을 알 수 있다. 상기 결과로부터, 본 발명의 멸꿀 잎 열수 추출물이 농도 의존적으로 파골세포의 생성 억제 작용을 한다는 것을 확인할 수 있다.

[0139] <실시예> 콜라겐 유발 관절염 유발 실험동물을 이용한 관절염 치료효과 확인

[0140] 상기 실시예에서 파골세포와 관련하여 관절염 치료효과도 우수한 것으로 확인된 멸꿀 잎 열수 추출물을 이용하여 콜라겐 II(Collagen II)의 처리에 의해 유도된 실험동물의 관절염 치료 효과를 확인하였다.

[0141] 우선, 8주령의 수컷 DBA1/J mouse(중앙실험동물실, 대한민국)를 1주일간 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 상기 실험동물의 사육은 20°C 내지 24°C의 온도조건, 60% 내지 70%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고형사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 상기 실험동물은 총 3군으로 나누어 실험을 수행하였다.

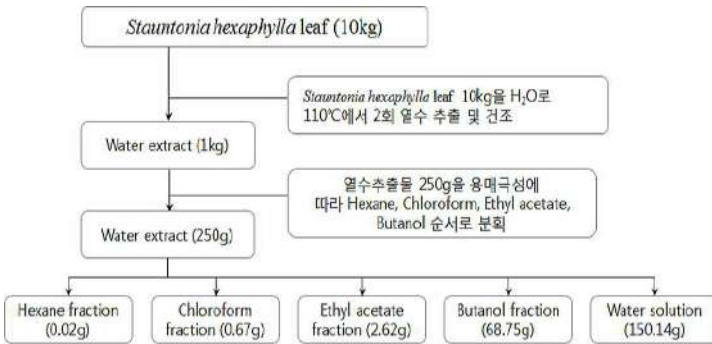
[0142] 콜라겐 유발 관절염(CIA)은 제2형 콜라겐(bovine typeII collagen)를 100 mM의 acetic acid 및 complete Freund's adjuvant(CFA)와 혼합한 후, 각 실험동물 마다 100  $\mu$ L(1.5 mg/ml)씩 피하 주사하고, 21일 후에 100  $\mu$ L 동량을 다시 피하주사(boosting)하는 방법으로 유발하였다. 상기 콜라겐 유발 관절염 유발여부에 따라, 관절염을 유발하지 않은 5마리 실험군, 관절염을 유발하고, 아무런 시료를 처리하지 않은 5마리 및 관절염 유발 후, 멸꿀 잎 열수 추출물 200 mg/kg 투여한 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다. 시료를 투여하지 않은 실험동물에 대해서는 생리식염수를 매일 1회 각각 매일 경구 투여하였고, 실험군은 매일 멸꿀 잎 열수추출물 200 mg/kg 농도로 24일 동안 매일 오전 10시에 경구투여 하였다. 상기 실험동물에 대해서 42일이 경과된 후에 관절염의 진행정도 여부를 관찰하였으며, 그 결과를 촬영하여 도 10에 나타내었다.

[0143] 상기 도 10에 나타난 바와 같이, 멸꿀 잎 열수추출물을 매일 구강투여(200 mg/kg)한 경우, 콜라겐 투여에 의해 관절염이 유발된 군에 비하여 부종이 거의 발생되지 아니하였고, 관절염을 유발시키지 않은 실험동물과 유사한 정도로 확인되어, 본 발명의 멸꿀 잎 열수추출물이 관절염을 억제하는 작용을 한다는 것을 확인하였다.

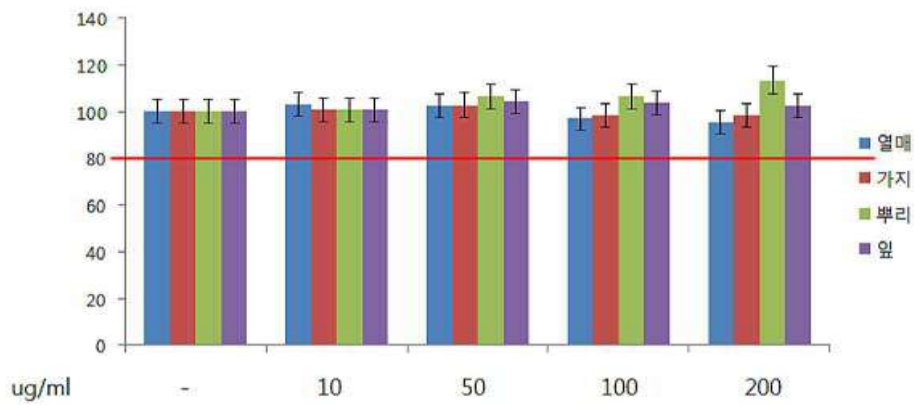
[0144] 상기 실험결과에 의하면, 식용으로 사용가능한 멸꿀 잎의 추출물은 예상한 바와 같이 MTT 분석결과 세포독성이 전혀 없는 것으로 확인되었고, 항염 효과와 관련하여 염증을 유발하는 iNOS의 mRNA 전사량과 NOS 발현량과 관련된 결과를 고려하면, 효과적으로 염증을 저해할 수 있을 것으로 확인되었고, 특히, 다른 부위에 비하여 멸꿀 잎의 경우 항염 효과가 매우 우수하며, 추가로 관절염 치료 효과와 관련하여, 파골세포의 TRAP 저해활성 및 파골세포의 분화억제활성이 우수하고, 실험동물을 통해 콜라겐으로 유도된 관절염을 효과적으로 억제하는 것이 확인되어, 현저하게 우수한 관절염 치료, 예방 또는 개선 효과를 가지는 것으로 확인되어, 상기 멸꿀 잎 추출물은 기존 염증치료를 대체하여 항염증제, 특히 관절염의 치료, 예방 또는 개선을 위한 용도로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

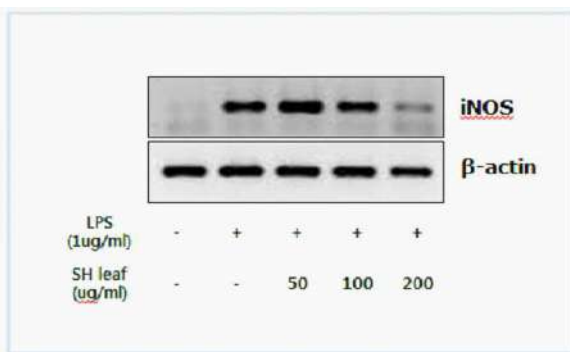
도면1



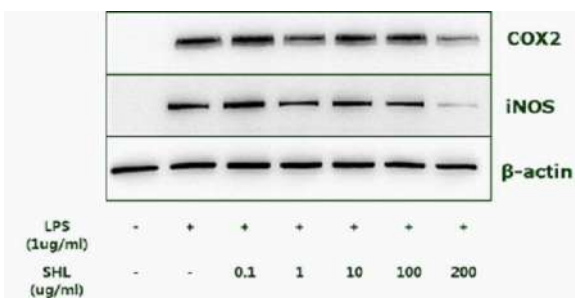
도면2



도면3

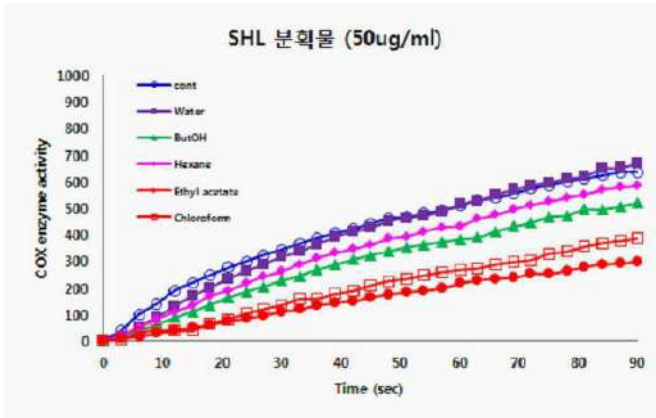


도면4

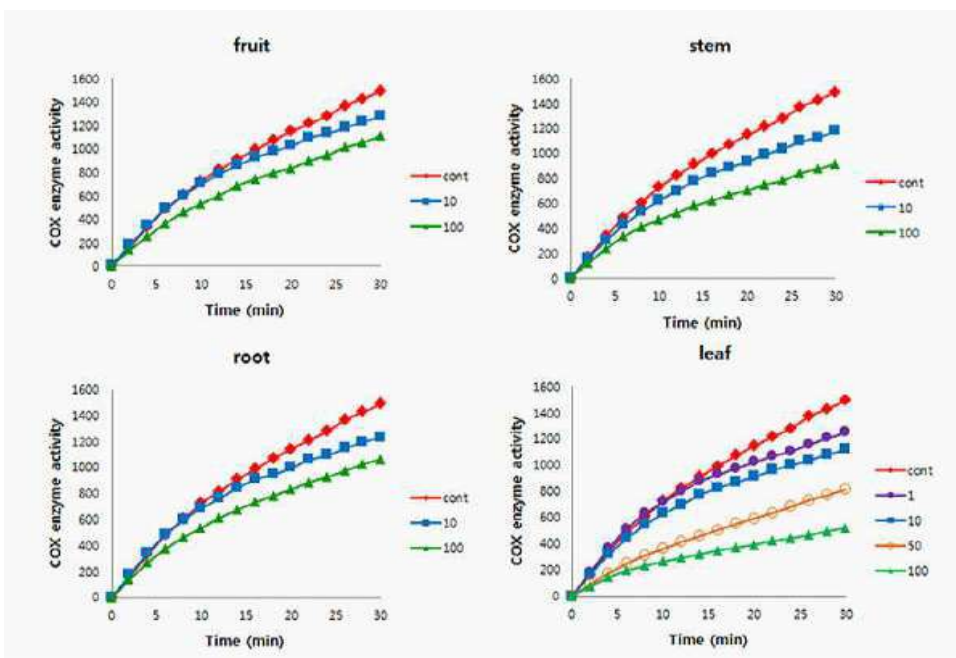




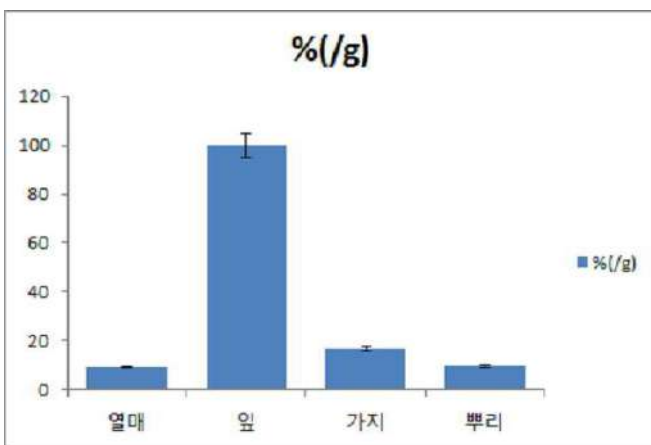
도면5



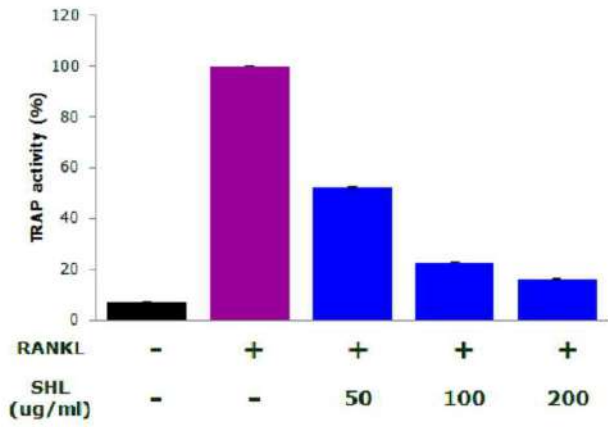
도면6



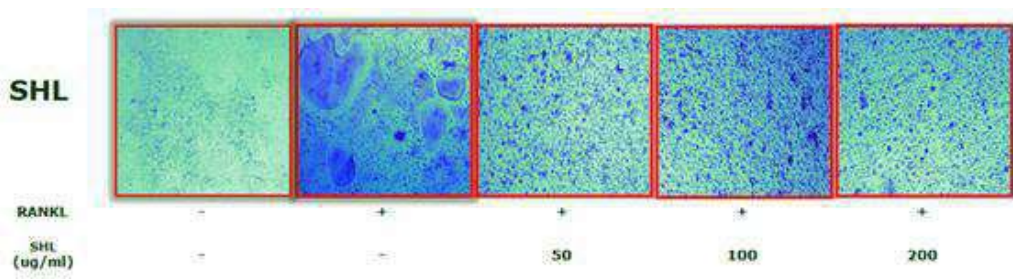
도면7



도면8



도면9



도면10

