



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0050674
(43) 공개일자 2019년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/216 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0146301
(22) 출원일자 2017년11월03일
심사청구일자 2017년11월03일

(71) 출원인
영진약품 주식회사
서울특별시 송파구 올림픽로35다길 13 (신천동)
재단법인 전남생물산업진흥원

(72) 발명자
이용남
경기도 용인시 수지구 포은대로313번길 7-10, 10
3동 2902호(풍덕천동, e편한세상 수지)

이동구
경기도 수원시 영통구 권광로304번길 92-3, 102
호(매탄동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
유미특허법인

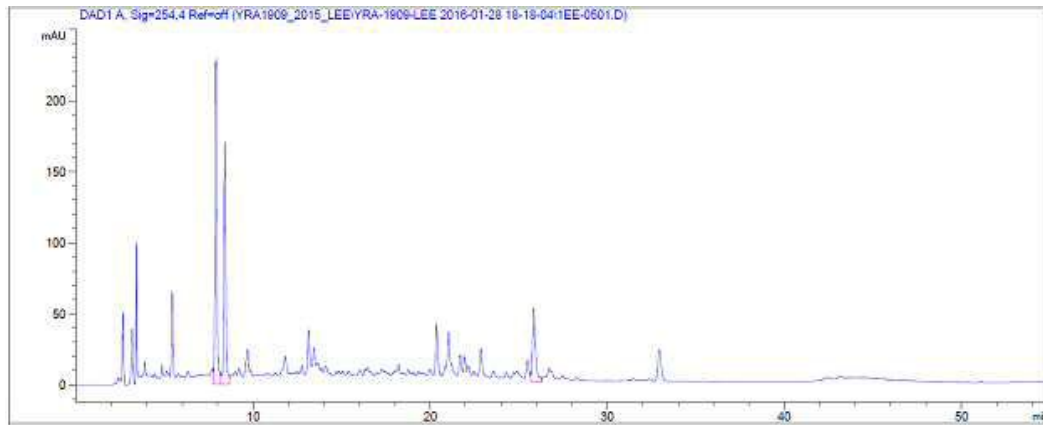
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **멸꿀 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물 또는 이로부터 분리된 신규 플라보노이드 화합물 및 카페인산 화합물을 유효성분으로 포함하는 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*) 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물의 제조방법, 상기 제조방법으로 제조한 멸꿀 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물, 및 상기 멸꿀 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/216 (2013.01)
A61K 31/35 (2013.01)
 A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2200/306 (2013.01)
 A61K 2236/30 (2013.01)

(72) 발명자

김재룡

경기도 수원시 장안구 금당로39번길 33, 106동
 1101호(조원동, 주공뉴타운)

유지석

경기도 수원시 팔달구 일월로18번길 4-26, 171동
 1306호(화서동, 꽃피버들마을 코오롱아파트)

최철용

광주광역시 서구 풍암순환로 14, 105동 203호(풍암
 동, 호반·중흥아파트)

반상오

전라남도 화순군 화순읍 대리길 41, 101동 1805호
 (화순광신프로그램스)

강후원

전라남도 나주시 영산포로 205-7(영산동)

김재용

전라남도 순천시 왕궁길 60, 304동 207호(조례동,
 중흥3차아파트)

이규욱

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

김재갑

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10051145
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오의료기기산업핵심기술개발사업
연구과제명	관절질환치료용 글로벌천연물신약개발
기여율	1/1
주관기관	(주)노바셀테크놀로지
연구기간	2014.12.01 ~ 2019.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%을 함유함을 특징으로 하는, 멸균 및 추출물 또는 분획 정제물.

청구항 2

멸균(Stauntonia hexaphylla) 잎에 용매를 가하여 추출하는 단계를 1 내지 20회 반복하여 수행하는 것을 특징으로 하는 멸균 및 추출물의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것인, 멸균 및 추출물의 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 추출은 10℃ 내지 100℃의 온도 및 30분 내지 72시간 동안, 냉침 추출법, 초음파 추출법, 환류 냉각 추출법, 열수 추출법, 상온 추출법, 및 환류추출법로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 방법을 사용하는 것인, 멸균 및 추출물의 제조방법.

청구항 5

(a) 멸균(Stauntonia hexaphylla) 잎에 용매를 가하여 추출하는 단계를 1 내지 20회 반복하여 수행하여 멸균 및 추출물을 수득하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 수득된 멸균 추출물을 정제하는 단계를 포함하는

멸균 및 추출물의 분획 정제물의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 멸균 추출물을 정제하는 단계는 (a) 역상 분배 크로마토그래피법(Reverse phase partition chromatography), (b) 순상 흡착 크로마토그래피법(Normal phase adsorption chromatography), (c) 이온교환 크로마토그래피법(ion exchange chromatography), (d) 크기 배제 크로마토그래피법(size exclusion chromatography) 또는 이들의 하나 이상의 조합에 의해 수행되는 것인, 멸균 및 추출물의 분획 정제물의 제조방법.

청구항 7

멸균 및 유래 추출물, 이의 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 멸균 및 유래 추출물 또는 이의 분획 정제물은

전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내

지 30 중량%, 및 크립토클로로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%을 함유함을 특징으로 하는 것인, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물.

청구항 9

멸꿀 잎 유래 추출물, 이의 분획 정제물, 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 멸꿀 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물은

전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%을 함유함을 특징으로 하는 것인, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품조성물.

청구항 11

멸꿀 잎 유래 추출물, 이의 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 건강기능식품.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 멸꿀 잎 유래 추출물 또는 이의 분획 정제물은

전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%을 함유함을 특징으로 하는 것인, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 건강기능식품.

청구항 13

멸꿀 잎 유래 추출물, 이의 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 이의 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 주성분으로 함유하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품 첨가물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 멸꿀 잎 유래 추출물 또는 이의 분획 정제물은

전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%을 함유함을 특징으로 하는 것인, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품 첨가물.

청구항 15

전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%을 함유함을 특징으로 하는, 류마티스 관절염 또는 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 멸골(Stauntonia hexaphylla) 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물의 제조방법, 상기 제조방법으로 제조한 멸골 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물, 및 상기 멸골 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 항염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골 조직은 대체로 뼈의 표면이 튼튼한 치밀골질로 이루어지고, 중심부 또는 장골(長骨)의 양 끝은 골질이 그물눈같이 연합된 해면골질(海綿骨質)로 되어 있다. 대부분의 뼈는 처음에 결합조직 중의 연골로서 발생하여 이것이 나중에 골조직으로 바뀌는데, 일부 뼈는 결합조직 중에서 직접 만들어진다. 골단(骨端)에서는 이웃뼈와 접하는 부분에 관절면이 있고, 그 표면은 초자연골(硝子軟骨)인 관절연골로 덮여 있다. 해면질 가운데의 해면소주(海綿小柱)는 일정한 배열로 되어 있는 것이 특징이다. 골 간부(骨幹部)의 넓은 수강(髓腔)은 해면소주로 된 소강(小腔)과 연속되어 있고 모두 골수로 채워져 있다. 조혈작용을 하는 골수는 혈관이 많이 분포되어 붉은색을 띠며, 적색골수라고 한다. 골질의 구조는 치밀질이나 해면질 모두 두께 5~12 μ m의 골판이 겹쳐 있는데, 치밀질에서는 동심원상으로 몇 층이 겹친 골층판(하버스층판)이 여러 방향으로 배열되어 있고, 각 층판의 중심에는 하버스관이 있어 혈관이 통한다. 골세포는 골층판 사이에 배열되어 있으며, 불규칙한 별 모양으로 가는 원형질 돌기로 인접한 다른 골세포와 연결되어 있다. 뼈의 표면에는 질긴 결합조직성 골막이 있으며, 신경과 혈관이 분포되어 뼈의 보호와 영양을 맡고 있다. 골막이 결손되면 뼈의 생존, 신생 및 재생 등이 곤란하게 된다. 골질의 성분은 수분 20%, 세포를 포함한 유기질 35%, 무기질 45%인데, 뼈의 일정한 탄력성은 유기질이 있기 때문이다. 연령이 증가함에 따라 무기질(주로 인산칼슘)이 증가하여 뼈의 경도도 증가한다.

[0003] 만성염증인 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)의 정확한 발병원인과 기작은 아직까지 잘 알려져 있지 않지만, 현재까지 밝혀진 유력한 발병원인 중 한 가지는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)와 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)의 수적 불균형으로 인해 뼈의 항상성이 무너져서 발생하는 것으로 알려져 있다. 정상적인 상태의 파골세포는 단핵구 및 대식세포에서 분화되어 오래된 뼈를 파괴시키거나 손상된 뼈를 제거하는 역할을 하지만, 류마티스 환자에서 발견되는 파골세포의 양상은 파골세포 생성(osteoclastogenesis)으로 인한 수적 증가와 지속적인 생존 및 과도한 활성이 확인되며, 이로 인해 뼈가 크게 손상되는 병리학적 형태를 보인다. 파골세포는 뼈를 분해시키기 위한 다양한 효소를 생성하는데, 뼈를 산화시켜 분해시키는 산성인산화 효소인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)과 뼈와 연골의 세포지지조직을 분해하는 MMP-9(matrix metalloproteinase-9), 콜라겐을 분해하는 cathepsin K등이 주 효소로 알려져 있으며, 이 효소들은 성숙한 파골세포의 특별한 표지자로 사용되고 있다. 파골세포의 전구체인 대식세포에 RANKL을 처리하였을 때, NF- κ B와 MAPK kinase의 활성화를 보여 염증매개물질을 생성한다.

[0004] 최근 밝혀진 바에 의하면, 체내에서의 염증반응의 진행은 COX(cyclooxygenase) 효소 활성화와 관련된 것으로 알려져 있다. 상기 COX 효소는 생체 내에 존재하는 프로스타글란딘(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. 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. 따라서, 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0005] 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일례로 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. 또한 최근 위염과 관련한 치료제의 기전은 2번째 히스타민 수용체(H2 receptor)를 막아서 위벽세포에서 위산의 분비를 감소시키는 H2 저해

제(H2-Blockers)가 주를 이룬다. 위산이 줄어들므로 인해 이미 손상된 위벽세포(위궤양 등)의 추가적인 손상을 방지하게 된다. 이러한 H2 저해제는 간에서의 다른 약들의 대사를 방해하기 때문에(potent inhibitors of P-450) 다른 약과 같이 복용할 경우 주의가 필요하고, 항안드로젠(Anti-Androgen) 효과가 있어서 남성에게서 여성형 유방(gynecomastia), 발기부전(impotence), 성욕 감소 등의 부작용이 발생할 수 있다. 또한 태반과 뇌혈관장벽을 통과하므로 임신부나 노인에게 부작용이 더 위험할 수 있고, 두통이나 혼동, 혼미, 어지럼증 등을 일으킬 수 있다.

[0006] 그러므로, 천연물질 유래 물질로 효과적으로 NO의 생성을 억제할 수 있고, iNOS 및 TNF- α 발현도 억제할 수 있으며, COX-2 효소의 활성을 유효하게 억제할 수 있어 항염효과, 조골세포 ALP 활성 및 조골세포 분화 촉진 및 골 또는 연골조직의 생성이 우수할 뿐만 아니라, 천연물질 유래 물질로 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적어 그 사용 함량의 제한이 거의 없는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*)은 남부해안지역이 자생지인 으름덩굴과의 상록덩굴식물로 키가 15 m까지 자라며 4 월 중순에서 5월 중순에 흰색의 꽃이 피고 가을에는 어린이 주먹 크기의 검붉은 색의 열매가 매달리는 식물이다 (Ikuta, 1989; Lee, 1996). 이름이 ‘꿀같이 달다’ 라는 뜻에 유래되었을 만큼 열매가 맛있는 과일로 알려져 있으나 껍은 씨앗이 많고 과육이 적어 과일은 상품화되지 못하고 있다. 잎은 남부지방에서 월동이 가능하고 육질이 두꺼우며 관상가치가 높아 정원용, 피콜라용 등으로 이용이 증가하고 있으며, 그에 따라 묘목 생산이 증가하고 있는 자원식물이다.

[0008] 멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*) 잎 식물 중 포함된 카페인산 화합물과 플라보노이드 화합물들의 함량은 매우 소량이기 때문에, 산업상 이용되기 매우 부적절한 측면이 있었다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*) 잎 식물 중 포함된 고함량의 플라보노이드 화합물들과 카페인산 화합물을 포함하는 추출물의 제조방법을 연구하여, 보다 활성성분, 특히 고함량의 플라보노이드 화합물들과 카페인산 화합물을 다량 함유한 멸꿀 (*Stauntonia hexaphylla*) 유래 추출물 및 이의 분획 정제물이 탁월한 항염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 활성이 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 대한민국특허공개번호 제1992-0005995호
 (특허문헌 0002) [특허문헌 2] 대한민국특허공개번호 제1994-0006596호
 (특허문헌 0003) [특허문헌 3] 대한민국특허공개번호 제0465778호
 (특허문헌 0004) [특허문헌 4] 대한민국특허공개번호 제2004-0108265호
 (특허문헌 0005) [특허문헌 5] 대한민국특허공개번호 제0514916호
 (특허문헌 0006) [특허문헌 6] 대한민국특허공개번호 제2005-0074753호
 (특허문헌 0007) [특허문헌 7] 대한민국특허공개번호 제10-2010-0043882호
 (특허문헌 0008) [특허문헌 8] 대한민국특허공개번호 제10-0930927호
 (특허문헌 0009) [특허문헌 9] 대한민국특허공개번호 제10-2016-0047665호
 (특허문헌 0010) [특허문헌 11] 대한민국특허공개번호 제10-2011-0021252호
 (특허문헌 0011) [특허문헌 12] 대한민국특허공개번호 제10-2010-0079786호
 (특허문헌 0012) [특허문헌 13] 대한민국특허공개번호 제10-2016-0182923호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에, 본 발명의 하나의 목적은

- [0012] 전체 추출물 중량 대비, (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%를 함유함을 특징으로 하는, 멸균 및 추출물 및 이의 분획 정제물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 건조 상태의 멸균(*Stauntonia hexaphylla*) 잎에 용매를 가하여 추출하는 단계를 1 내지 20회 반복하여 수행하는 것을 특징으로 하는 멸균 및 추출물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0014] 또 다른 본 발명의 목적은, 상기 멸균 및 추출물을 크로마토그래피에 처리하는 것을 특징으로 하는 멸균 및 추출물의 분획 정제물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 주성분으로 함유하는 건강보조식품을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 주성분으로 함유하는 식품첨가물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 멸균 및 유래 추출물, 이의 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염 또는 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- 과제의 해결 수단**
- [0021] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0022] 하나의 양태로서, 본 발명은 신규한 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 그리고 상기 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물 또는 이로부터 분리된 신규 플라보노이드 화합물 또는 카페인산 화합물을 유효성분으로 포함하는 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 명세서에서 사용한 멸균(*Stauntonia hexaphylla*) 잎은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 추출 및 정제 전에 적절하게 건조되고, 세절, 분쇄하여 효과적으로 추출 및 정제 공정을 거칠 수 있게 전처리 할 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 정의되는 상기 신규 추출물 또는 분획 정제물은 멸균(*Stauntonia hexaphylla*) 잎을 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1개 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 추출 방법은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 분획 정제물로 제조될 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명의 멸균(*Stauntonia hexaphylla*) 잎으로부터 분리된 추출물 또는 분획 정제물은 추가적으로 감압 농축, 동결 건조 또는 열풍 건조 등과 같은 건조 등과 같은 농축 및 건조 과정, 또한 정제 과정을 거친 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 추출물 또는 분획 정제물은 신규 플라보노이드 화합물인 (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-

3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one), 및 카페인산 화합물인 클로로제닉산(Chlorogenic acid)과 크립토클로로제닉산(Cryptochlorogenic acid)을 특정 범위 내로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 구체적으로, 상기 추출물 또는 분획 정제물은 전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%를 함유함을 특징으로 할 수 있고,

[0028] 바람직하게는 전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), 신규화합물 (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 5 중량%, 클로로제닉산(Chlorogenic acid) 0.5 내지 20 중량%, 크립토클로로제닉산(Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 20 중량%를 함유함을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 본 발명에 따른 멸꿀 잎 추출물은 지표성분으로서 신규 플라보노이드 화합물 (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.56 중량%, 클로로제닉산 1.61 중량% 및 크립토클로로제닉산 1.07 중량%를 포함하며, 이러한 추출물의 분획 정제물은 신규 플라보노이드 화합물 (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 1.14 중량%, 클로로제닉산 5.34 중량% 및 크립토클로로제닉산 3.85 중량%를 포함하는 것을 확인하였다.

[0030] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 멸꿀(Stauntonia hexaphylla) 잎에 용매를 가하여 추출하는 단계를 1 내지 20회 반복하여 수행하는 것을 특징으로 하는 멸꿀 잎 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

[0031] 상기 제조방법에서, 멸꿀(Stauntonia hexaphylla) 잎은 적절히 공지의 방법에 따라 세척, 건조, 절단 또는 분쇄 공정을 거치는 등 전처리된 것일 수 있고, 바람직하게는 건조 형태인 멸꿀 잎을 사용할 수 있다. 이러한 멸꿀 잎을 적절한 추출 용매를 사용하여 추출하는데, 이러한 추출 용매로는 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매를 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 물을 사용할 수 있다. 추출 온도는 구체적으로는 10℃ 내지 100℃, 바람직하게는 20℃ 내지 100℃의 온도일 수 있고, 추출 시간은 30분 내지 72시간, 바람직하게는 6시간 내지 48시간 동안 처리할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 추출방법은 냉침 추출법, 초음파 추출법, 환류 냉각 추출법, 열수 추출법, 상온 추출법, 환류추출법 또는 이들의 하나 이상의 추출법 조합으로부터 선택된 추출법을 사용할 수 있으나, 공지의 천연물의 추출법을 제한없이 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는 10℃ 내지 60℃, 바람직하게는 20℃ 내지 50℃의 온도에서 30분 내지 72시간, 바람직하게는 6시간 내지 48시간 동안 냉침 추출 후, 40℃ 내지 120℃, 구체적으로는 60℃ 내지 100℃의 온도에서 30분 내지 72시간, 바람직하게는 6시간 내지 48시간 동안 환류 냉각 추출법을 약 1 내지 20회, 바람직하게는 2 내지 10회 반복 수행하는 것일 수 있다.

[0032] 바람직하게, 상기 멸꿀 잎 추출물은 상기 추출 공정 후 추가적으로 감압 농축한 것을 더 포함할 수 있다.

[0034] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 멸꿀 잎 추출물을 크로마토그래피에 처리하는 것을 특징으로 하는 멸꿀 잎 추출물의 분획 정제물의 제조방법에 관한 것이다.

[0035] 구체적인 양태에서, 멸꿀 잎 추출물의 분획 정제물은 우선 멸꿀 잎을 사용하여 추출물을 제조한 후 이를 크로마토그래피로 처리하여 분획 정제하는 것에 의해 제조될 수 있으며, 이때 멸꿀 잎 추출물의 제조방법은 상기 멸꿀 잎 추출물 제조방법에 관한 사항을 동일하게 적용할 수 있다.

[0036] 상기 정제 과정에서 사용되는 크로마토그래피는 (a) 역상 분배 크로마토그래피법(Reverse phase partition chromatography), (b) 순상 흡착 크로마토그래피법(Normal phase adsorption chromatography), (c) 이온교환 크로마토그래피법(ion exchange chromatography), (d) 크기 배제 크로마토그래피법(size exclusion chromatography) 또는 이들의 하나 이상의 조합, 바람직하게는, 역상 분배 크로마토그래피법 또는 극성 물질들을 먼저 용리되고, 비-극성 화합물이 정지상에 보유됨을 특징으로 하는 모든 수지를 이용한 크로마토그래피법,

보다 바람직하게는, 세파덱스(Sephadex), 세파덱스 LH20, 세파덱스 G-25, 세파덱스 G-10, 세파로스(Sepharose), 슈퍼덱스(Superdex), 메틸아크릴레이트 수지, 카복시메틸 셀룰로스, 설포프로필 셀룰로스, 카복시메틸 세파덱스, 설포프로필 세파덱스, 설포프로필 세파로스 및 카복시메틸 세파로스를 포함하는 세파덱스 계열 수지; 폴리머(Polymer) X, HP20, PRP-h1 Polymer 등의 스티렌-디비닐벤젠 공중합체 (Styrene-divinylbenzen co-polymer) 제품군, 메타아크릴레이트 (Methacrylate) 지지체 제품군 등을 이용한 역상폴리머 수지; 머크(Merck)사의 흡착 BPC(Bonded phase Chromatography) 제품군, YMC사의 Silica 제품군, DAISO사의 Silica 제품군, ASAHI사의 Silica 제품군, COSMOSYL사의 Silica 제품군 등의 순상 실리카겔; 주로 HPLC 충전제로 사용되는 YMC사의 ODS 제품군, DAISO사의 ODS 제품군, ASAHI사의 ODS 제품군, CHEMCO사의 ODS 제품군, Merck사의 ODS 제품군, COSMOSYL사의 ODS 제품군, FUJI사의 ODS 제품군 등의 역상 실리카겔군으로부터 선택된 수지를 정지상을 이용한 크로마토그래피법을 수행하는 방법을 포함한다.

[0037] 구체적으로는 상기 (a) 역상 분배 크로마토그래피법에서, 정지상은 역상 컬럼 물질로서, 극성 물질들을 먼저 용리되고, 비-극성 화합물이 정지상에 보유됨을 특징으로 하는 모든 고정상으로서, 소수성 물질이 부착될 수 있는 고정상, 바람직하게는, 실리카겔(Silica Gel) 기반 고정상 또는 폴리스티렌(Polystyrene) 등의 고분자 기반 고정상, 보다 바람직하게는 C2, C4, C6, C8, C10, C12, C14, C16, 또는 C18 또는 이의 실리카겔 유도체 또는 PS-2, Oasis HLB, 등의 고분자 기반 고정상, 보다 바람직하게는, 역상 실리카겔 (C18(IV)-D), (YMC사의 ODS-A/ODS-AQ 제품군, CHMECO사의 SP-C-ODS 제품군, DAISO사의 SP-ODS-RPS 제품군, COSMOSYL사의 5C18 제품군, FUJI사의 Chromatorex 제품군) 을 사용함을 특징으로 한다.

[0038] 이동상은 증류수, 아세트니트릴, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 알콜 용매, 테트라히드로퓨란 또는 이의 혼합용매, 바람직하게는, 증류수 및 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 알콜 용매의 혼합용매, 보다 바람직하게는, 물 및 메탄올 혼합용매를 90:10 (v/v)을 시작하여 60:40의 비율을 조절하여 극성 물질을 용리함을 특징으로 한다.

[0039] 구체적으로는 상기 (b) 순상 크로마토그래피법에서는 정지상은 순상 컬럼 물질로서, 비극성 물질들을 먼저 용리되고, 극성 화합물이 정지상에 보유됨을 특징으로 하는 모든 고정상으로서, 친수성 물질이 부착될 수 있는 고정상, 바람직하게는, 실리카겔(Silica Gel), 후로리실(Fluorosyl), 알루미늄 기반 고정상, CN, 디올, NH₂ 성 고정상, 보다 바람직하게는 역상 실리카겔 또는 이의 실리카겔 유도체, 보다 더 바람직하게는, 역상 실리카겔 (C18(IV)-D), (YMC사의 ODS-A/ODS-AQ 제품군, CHMECO사의 SP-C-ODS 제품군, DAISO사의 SP-ODS-RPS 제품군, COSMOSYL사의 5C18 제품군, FUJI사의 Chromatorex 제품군)을 사용함을 특징으로 한다.

[0040] 이동상은 헥산, 헵탄, 초산에틸, 에탄올, 디에틸에테르, 2-프로판올 또는 이의 혼합용매를 사용함을 특징으로 한다.

[0041] 구체적으로는 상기 (c) 이온교환 수지 컬럼크로마토그래피법(Ion Exchange resin column Chromatography)에서는 "이온 교환 크로마토그래피 물질"은 크로마토그래피 작용기로서 공유 결합된 하전된 기를 갖는 부동의 모든 고분자량 고형상을 사용가능하며; 바람직하게는, 양이온교환수지, 음이온교환수지, 또는 합성 흡착제를 사용한 크로마토그래피법, 보다 바람직하게는, AG 50W-x8, 앰버라이트 (Amberlite) IR-120, 도웁스(Dowex) 50W-x8 및 SK1B 등과 같은 강산성 양이온 교환수지; 앰버라이트(Amberlite) IRC-50, 바이오-렉스(Bio-Rex) 70, 듀올라이트 (Duolite)-436 및 WK40 등과 같은 약산성 양이온 교환수지; 앰버라이트(Amberlite) IRA-67 및 도웁스(Dowex) 3-x4A 등과 같은 약염기성 양이온 교환수지; DIAION SK1B, DIAION PK216, DIAION CR11, DIAION CR20, DIAION UBK555(Mitsubishi Chemical co.), TRILITE SPC 160H, TRILITE SPC 180H, TRILITE SPC 400LH(Samyang co.), AMBERLITE 200C Na, AMBERLITE CG50, AMBERLITE CR1310 Na, AMBERJET 200H, AMBERLYST 131 WET, AMBERLYST 232 WET(ROHM and HAAS co.), Lewatit VP OC 1800, Lewatit VP OC 1812, Lewatit MDS1368 Na, Lewatit K1221(Bayer co.), PUROLITE PCR833CA, PUROLITE C145(Purolite co.), MFG 210, MFG 250(Finex co.) 등의 강염기성 양이온 교환 수지; 바람직하게는 강산성 양이온 교환수지인 SK1B형 교환수지를 사용할 수 있으며; 음이온교환수지는 SA11A, SA20A 및 SA21A 등과 같은 강염기성 음이온 이온교환수지, CaptoQ (GE Healthcare로부터 구입가능), 또는 유사한 특징을 갖는 수지, 예를 들어, ToyoPearl QEA(Tosoh로부터 구입가능), Q Sepharose FF(GE Healthcare로부터 구입가능) 또는 Fractogel EMD, Fractogel TMAE 또는 Fractogel HICAP(Merck KGaA, Darmstadt Germany로부터 구입가능), 바람직하게는 SA21A를 사용할 수 있으며; 합성흡착제는 SP207, HP20SS, HP20 등으로, 바람직하게는 HP20을 사용할 수 있다.

[0042] 구체적으로는 상기 (d) 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에서는, 겔은 전형적으로 텍스트란-기반 겔, 예를 들어, Sephadex(예를 들어, Sephadex G-25) 또는 폴리아크릴아미드 겔, 예를 들어, Sephacryl(예를 들어, Sephacryl-S400), 아가로오스-기반 겔, 예를 들어, Superose 또는 Sepharose(예를 들어,

Sepharose CL-4B), 및 2 종류의 겔로부터 제조된 복합 겔, 예를 들어, Superdex 200 조합 Dextran(Sephadex™) 및 가교된 Agarose(Superose™) 겔을 포함하나 이에 제한되지는 않는 중합 겔 군으로부터 선택되며; 바람직한 구체예에서, 완충액은 소듐 포스페이트, 암모늄 아세테이트, MES (2-(N-모르폴리노)에탄설펜산), Bis-Tris (2-비스(2-히드록시에틸)아미노-2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올), ADA (N-(2-아세트아미도) 이미노디아세트산), PIPES (피페라진-N,N'-비스(2-에탄설펜산), ACES (N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄설펜산), BES (N,N-비스(2-히드록시에틸)-2-아미노에탄설펜산), MOPS (3-(N-모르폴리노) 프로판설펜산), TES (N-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄설펜산), HEPES (N-2-히드록시에틸-피페라진-N'-2-에탄설펜산), 바람직하게는 소듐포스페이트 또는 암모늄 아세테이트, 더욱 바람직하게는 암모늄 아세테이트로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0043] 또한 본 발명은 추가적으로 상기 (a) 역상 분배 크로마토그래피법(Reverse phase partition chromatography), (b) 순상 분배 크로마토그래피법(Normal phase partition chromatography), (c) 이온교환 크로마토그래피법(ion exchange chromatography), (d) 크기 배제 크로마토그래피법 (size exclusion chromatography) 또는 이들의 하나 이상의 조합이외에 유기용매의 사용이 가능한 Sephadex LH-20이나 Toyopearl HW-40을 이용한 (e) 겔 침투 (Gel permeation) 또는 겔 여과 크로마토그래피 (Gel filtration chromatography)을 추가적으로 사용가능하다.

[0044] 상기 합성흡착제는 상기 현탁하는 용매 부피의 0.5 내지 20배 부피(v/v)의 HP20일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 항염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0047] 본 발명에 따른 약학적 조성물 중 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물에 관한 사항은 상기 추출물 또는 분획 정제물에 관한 내용을 그대로 적용할 수 있다.

[0048] 상기 카페인산 화합물은 클로로제닉산(Chlorogenic acid) 및 크립토크로로제닉산(Cryptochlorogenic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상이 바람직하다.

[0049] 상기 플라보노이드 화합물은 (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one)이 바람직하다.

[0050] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 제조방법으로 제조된 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물이 파골세포의 분화 억제 활성을 저해함을 확인 (실시예 3)하였다.

[0051] 상기 결과를 통해서, 상기 제조방법으로 제조된 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것은 류마티스 관절염환자의 활막세포의 염증관련 물질들의 분비량 및 발현을 감소시켜 항염증 치료효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0052] 또한, 상기 결과를 통해서, 상기 제조방법으로 제조된 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것은 관절염에 의한 관절과 뼈의 손상 및 관절의 기능 소실을 지연시키는 활성이 있고, 이를 통해서 상기 제조방법으로 제조된 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물은 파골세포 활성 억제효과, 및 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진효과가 있음을 알 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명은 골조직 또는 연골조직을 파괴 또는 손상시키는 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 상기 골조직 또는 연골조직을 파괴 또는 손상시키는 질환은, 이에 제한되는 것은 아니나, 관절염, 자가 면역 질환에 의한 관절의 파괴질환, 다발성 근육염, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 전신홍반성루푸스, 다발성근육염, 류마티스다발근육통(polymyalgia rheumatica), 골다공증, 골전이암 또는 파제트병(Paget's disease)를 들 수 있다. 또한 상기 관절염은, 다양한 형태의 관절염, 예를 들어 골관절염, 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 건선관절염, 응성관절염(reactive arthritis) 등과 같은 질환을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 류마티스 관절염이다.

- [0055] 본 발명에 따른 추출물 또는 분획 정제물 또는 화합물을 포함하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 추출물 및 분획 정제물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다.
- [0056] 상기한 제제에는 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 추출물 또는 분획 정제물 또는 화합물을 포함하는 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물 또는 분획 정제물을 포함하는 약학적 조성물은 1일 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 500 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 추출물 또는 분획 정제물 또는 화합물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0059] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품조성물에 관한 것이다.
- [0060] 상기 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물에 대한 사항은 이하 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품조성물, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 건강기능식품, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 건강보조식품, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품첨가물에 대하여 동일하게 적용될 수 있다.
- [0061] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0062] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 주성분으로 함유하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 건강보조식품에 관한 것이다.
- [0063] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 멸균 및 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 주성분으로 함유하는, 향염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 식품첨가물에 관한 것이다.
- [0064] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

- [0065] 본 발명의 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물 또는 분획 정제물을 0.01 내지 95%, 바람직하게는 1 내지 80% 중량백분율로 포함한다.
- [0066] 또한, 향염, 또는 과일세포 활성 억제를 위한 목적으로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 약학 투여형태 또는 티백제, 침출차, 건강 음료 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.
- [0067] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0068] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.
- [0069] 본 발명의 추출물 또는 분획 정제물 또는 화합물이 포함된 기능성 식품으로는 빵, 떡류, 건과류, 캔디류, 초콜릿류, 츄잉검, 잼류와 같은 과자류 아이스크림류, 빙과류, 아이스크림 분말류와 같은 아이스크림 제품류 우유류, 저지방 우유류, 유당분해우유, 가공우유, 산양유, 발효우유, 버터우유, 농축우유, 유크림류, 버터유, 자연치즈, 가공치즈, 분유류, 유청류와 같은 유가공품류 식육가공품, 알가공품, 햄버거와 같은 식육제품류 어묵, 햄, 소세지, 베이컨 등의 어육가공품과 같은 어육제품류 라면류, 건면류, 생면류, 유탕면류, 호화건면류, 개량숙면류, 냉동면류, 파스타류와 같은 면류 과일음료, 채소류음료, 탄산음료, 두유류, 요구르트 등의 유산균 음료, 혼합음료와 같은 음료 간장, 된장, 고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 식초, 소스류, 토마토케첩, 카레, 드레싱과 같은 조미식품 마가린, 쇼트닝 및 피자를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물 또는 분획 정제물 또는 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, (예를 들어, 포도당, 과당 등); 디사카라이드, (예를 들어 말토스, 슈크로스 등); 및 폴리사카라이드, (예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등)과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1~20 g, 바람직하게는 약 5~12 g이다.
- [0071] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0072] 또한, 본 발명의 추출물 또는 분획 정제물, 또는 이로부터 분리된 신규 플라보노이드 및 카페인산 화합물은 목적 질환의 예방 또는 개선 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물 또는 분획 정제물 또는 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml을 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0073] 상기 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물 또는 분획 정제물 또는 화합물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.
- [0074] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 전체 추출물 또는 분획 정제물 100% 중량 대비(w/w), (7-(((2,3,4,5,6)-4,5-dihydroxy-6-methyl-3-(((2,3,4,5)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one) 0.1 내지 10 중량%, 클로로제닉산 (Chlorogenic acid) 0.5 내지 30 중량%, 및 크립토클로로제닉산 (Cryptochlorogenic acid)를 0.5 내지 30 중량%을 함유함을 특징으로 하는, 류마티스 관절염 또는 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0075] 본 발명은 멸꼴(*Stauntonia hexaphylla*) 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물의 제조방법, 상기 제조방법으로 제조한 멸꼴 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물, 및 상기 멸꼴 잎 유래 추출물 또는 분획 정제물, 또는 상기 추출물 또는 분획 정제물에서 분리된 카페인산 화합물 및 신규 플라보노이드 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 포함하는 것을 유효성분으로 포함하는, 항염, 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 멸꼴 잎 유래 추출물로부터 분리된 신규 추출물 또는 분획 정제물 또는 이로부터 분리된 신규 플라보노이드 화합물들과 카페인산 화합물들은 세포독성이 없을 뿐만 아니라, 염증과 관련된 사이토카인(cytokine) 즉, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, CXCL10, IL-8, VEGF, MMP의 분비를 감소시키며, NF- κ B의 활성화를 감소시켜 NO 분비량 및 염증의 원인이 되는 COX-2 효소의 저해활성을 확인함으로써 효과적으로 염증을 저해할 수 있고, 류마티스 관절염과 같은 골조직 또는 연골조직 파괴와 관련된 다양한 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료제, 또는 기능성 식품으로서 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0076] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 멸꼴 잎 조추출물 (ATC1)의 HPLC 분석 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 멸꼴 잎 분획 정제물 (ATC2)의 HPLC 분석 결과이다.
- 도 3는 본 발명의 실시예에 따른 멸꼴 잎 추출물(ATC1), 이의 분획 정제물(ATC2)의 파골세포의 TRAP 활성측정 실험 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 멸꼴 잎 추출물(ATC1), 이의 분획 정제물(ATC2)에 의한 파골세포 분화 억제 실험 결과이다.
- 도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2)의 류마티스 관절염 활막세포에서의 세포사멸 영향을 확인한 실험 결과이다.
- 도 6는 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리 시 류마티스 관절염 활막세포의 이동성 변화를 확인한 실험 결과이다.
- 도 7는 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리시 염증성 분비 인자(사이토카인, 케모카인, MMPs)의 분비량 변화를 확인한 실험 결과이다.
- 도 8는 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2)의 처리 시 세포 내 NF- κ B의 발현변화를 확인한 실험 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리 시 억제되는 NF- κ B의 활성화 부위의 규명 및 활성화 정도를 확인한 실험 결과이다.
- 도 10는 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리 시 NO 생성억제를 확인한 실험 결과이다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리 시 gelatinase의 효소활성도 변화 및 발현정도를 확인한 실험 결과이다.
- 도 12은 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리 시 염증 및 세포 골격관련 단백질의 발현 위치 및 정도를 확인한 실험 결과이다.
- 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리 시 분비량 차이가 확인되는 염증관련인자 스크리닝 결과이다.
- 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 분획 정제물(ATC2) 처리 시 억제되는 신호전달경로를 확인한 결과이다.
- 도 15은 본 발명의 일 실시예에 따른 파골세포분화에 분획 정제물(ATC2)가 미치는 영향을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0079] **참고예 1: 멸꼴 잎 조추출물의 제조 및 지표성분의 확인**

[0080] 멀꿀(*Stauntonia hexaphylla*) 잎(GAP 재배, 전라남도 장흥군 부산면 부준리 565-2) 1.0 kg을 건조, 절단한 후, 멀꿀 잎 시료에 물 10 L를 가하여 상온에서 24시간 동안 냉침 추출하였다. 그 후, 80 ~ 100 °C에서 12시간 교반 하면서 환류 추출을 수행한 후 진공 여과하여 상층액을 회수하였다. 상기 과정을 2회 반복하여 상층액을 회수하고 이 추출액을 감압농축기(EYELA, N-2100, JAPAN)로 감압 농축하여 멀꿀 잎 물 조추출물 300 g을 수득하였다 (이하, ATC1이라 함).

[0081] 상기 수득한 멀꿀 잎 조추출물 중에 포함된 지표성분들을 확인하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, Agilent 1260, USA)를 하기 표 1 및 표 2 (이동상 조건)와 같은 조건으로 수행하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0082] 표 2에서 이동상 A는 0.025 M 인산염완충용액 (pH = 3.0)이고, 이동상 B는 90% (w/v) ACN (Acetonitrile)이다.

표 1

고속액체크로마토그래피 분석조건	
펌프(Pump)	Agilent 1260 Series, 1260 quart pump
검출기(Detector)	Agilent 1260 Series, 1260 DAD
컬럼(Column)	INNO column C18 (2.3 × 250 mm, 5 μm)
유속(Flow rate)	0.5 mL/min
검출과장(UV absorbance)	266 nm
Injection volume	10 μL

표 2

시간	이동상 A (%)	이동상 B (%)
0 ~ 20	89	11
20 ~ 30	79	21
30 ~ 40	75	25
40 ~ 45	60	40
45 ~ 50	30	70
50 ~ 56	30	70
56 ~ 70	89	11

[0085] 그 결과, 도 1에 나타난 것과 같이, 8.67분에 클로로제닉산, 9.15분에 크립토크로로제닉산, 26.89분에 신규 화합물이 검출되었다.

[0086] 도 1에 나타난 HPLC의 패턴(머무름 시간)을 바탕으로 하기 수학적 식 1에 따라 지표성분들의 함량(%)을 분석하였다.

[0087] [수학적 식 1]

$$\text{지표성분의 함량(\%)} = \frac{\text{표준액 농도(mg/mL)}}{\text{검액 농도(mg/mL)}} \times \frac{A_T}{A_S} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

[0088]

[0089] A_T : 검액에서의 지표성분 면적

[0090] A_S : 표준액에서의 지표성분 면적

[0091] 단, 검액과 표준액의 지표성분에 대한 취한 양이 동일할 때 사용함.

[0093] 그 결과, 참고예 1의 제조방법으로 제조한 멀꿀 잎 조추출물은 하기 표 3과 같이 클로로제닉산 1.61 %(w/w), 크립토크로로제닉산 1.071 %(w/w), 신규화합물 0.56% (w/w)을 함유하고 있음을 확인하였다.

표 3

[0094]

지표성분	ATC1	
	머무름시간(분)	함량(w/w%)
클로로제닉산	8.67	1.61
크립토클로로제닉산	9.15	1.07
신규 플라보노이드 화합물	26.89	0.56
합계		3.24

[0095]

실시에 1. 멸균 및 추출물의 유기용매 가용 분획 정제물 제조 및 지표성분의 확인

[0096]

상기 참고예 1에서 제조한 멸균 및 물 추출물을 증류수에 녹여서 23 brix 로 조정하고, 역상 실리카겔 (HP20, Mitsubishin Co., Ltd. JAPAN) 700 mL을 컬럼관에 충전 시킨 후, 충전된 컬럼에 상기 23 brix 멸균 및 조추출물 700 mL 을 통과시켜 2차적으로 멸균 및 분획 정제물(ATC2)을 분리하였다. 분리를 위한 이동상 조성은 증류수:메탄올 (100:0 부터 30:70)의 비율을 조절하여 분리를 실시하였다. 먼저 증류수:메탄올 (100:0) 용리액 2.1 L 를 분리한 후, 증류수:메탄올 (30:70) 용리액 5.6 L를 같은 조건에서 분리진행 후, 증류수 용리액 2-3배수(1.4L)와 70% (v/v) 메탄올 용리액 1-4배수 2.8 L를 합한 후 감압농축과정을 통한 용매 제거 후, 최종적으로 정제된 멸균 분획 추출물 또는 분획 정제물을 55 g을 분리하였다. (이하, ATC2라 함).

[0097]

상기 멸균 HP20 칼럼 추출물 또는 분획 정제물 중에 포함된 지표성분들을 확인하기 위하여 참고예 1과 같은 방법으로 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0098]

그 결과, 도 2에 나타나듯이 8.67분에 클로로제닉산, 9.15분에 크립토클로로제닉산, 26.89분에 신규화합물 이 검출되는 것을 확인되었다.

[0099]

도 2에 나타난 HPLC의 패턴(머무름 시간)을 바탕으로 참조예 1의 수학적식에 따라 지표성분들의 함량(%)을 분석하였다. 그 결과, 실시에 1의 제조방법으로 제조한 멸균 분획 추출물 또는 분획 정제물은 하기 표 3와 같이 클로로제닉산 5.34% (w/w), 크립토클로로제닉산 3.85% (w/w), 신규 플라보노이드 화합물 1.14 % (w/w)를 함유하고 있음을 확인하였다.

표 4

[0100]

지표성분	ATC2	
	머무름시간(분)	함량(%)
클로로제닉산	8.67	5.34
크립토클로로제닉산	9.15	3.85
신규 플라보노이드 화합물	26.89	1.14
합계		10.33

[0101]

실시에 2. 카페인산 화합물과 플라보노이드 화합물들의 분리 및 구조분석

[0102]

화합물의 NMR테이터를 기존 문헌에 기재된 물성치를 비교하여 실시에 1에서 확인한 화합물의 구조를 동정하였다.

[0104]

1. 클로로제닉산; Chlorogenic acid

[0105]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 7.42(1H, d, J =16 Hz, H-7'), 7.03 (1H, d, J =2 Hz, H-2'), 6.98 (1H, dd, J =2 and 8 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, J =8 Hz, H-5'), 6.15 (1H, d, J =16 Hz, H-8'), 5.08 (1H, br d, J =5 Hz, H-3), 3.94 (1H, br s, H-5), 3.55 (1H, br d, J =4 Hz, H-4), 1.7-2.1 (2H, m, H-6), 1.98 (2H, br d, J =5 Hz, H-2).

[0106]

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ : d 174.9 (C-7'), 165.7 (C-9'), 148.3 (C-4'), 145.5 (C-3'), 144.8 (C-7'), 125.6 (C-1'), 121.2 (C-6'), 115.7 (C-5'), 114.7 (C-2'), 114.3 (C-8'), 73.6 (C-1), 70.9 (C-3), 70.6 (C-4), 68.3 (C-5), 37.2 (C-6), 36.5 (C-2).

[0108] **2. 크립토크로로제닉산; Cryptochlorogenic acid**

[0109] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 2.00 (1H, dd, J=11, 13 Hz, H-6ax), 2.06 (1H, ddd, J=3, 4, 14 Hz, H-2eq), 2.17 (1H, dd, J=4, 14 Hz, H-2ax), 2.20 (1H, ddd, J=3, 5, 13 Hz, H-6eq), 4.27 (1H, ddd, J=4, 9, 11 Hz, H-5), 4.28 (1H, ddd, J=3, 3, 4 Hz, H-3), 4.79 (1H, dd, J=3, 9 Hz, H-4), 6.37 (1H, d, J=16 Hz, H-8'), 6.77 (1H, d, J=8 Hz, H-5'), 6.96 (1H, dd, J=2, 8 Hz, H-6'), 7.06 (1H, d, J=2 Hz, H-2'), 7.65 (1H, d, J=16 Hz, H-7').

[0110] ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 38.4 (C-2), 42.7 (C-6), 65.5 (C-5), 69.6 (C-3), 76.6 (C-1), 79.3 (C-4), 115.1 (C-2'), 115.4 (C-8'), 116.5 (C-5'), 123.0 (C-6'), 127.8 (C-1'), 146.8 (C-3'), 147.1 (C-7'), 149.6 (C-4'), 169.0 (C-9'), 177.3 (C-7').

[0112] **3. 신규 플라보노이드 화합물**

[0113] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 13.65 (1H, s, 5-OH), 7.46 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6'), 7.42 (1H, dd, J=8.5, 2.0 Hz, 2'), 6.89 (1H, d, J=8.5 Hz, H-3'), 6.76 (1H, s, H-3), 6.72 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.35 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 5.20 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1'''), 5.0 (1H, d J=4.5 Hz, H-1''), 4.29 (1H, H-5''').

[0114] ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 175.8 (C-4), 164.0 (C-7), 161.0 (C-5), 156.1 (C-9), 148.0 (C-5'), 147.0 (C-4'), 145.0 (C-2), 135.7 (C-3), 121.9 (C-1'), 120.0 (C-6'), 115.6 (C-3'), 115.0 (C-2'), 105.3 (C-1'''), 103.0 (C-10), 100.5 (C-1''), 98.2 (C-6), 93.3 (C-8), 77.6 (C-3'''), 75.4 (C-2'''), 71.8 (C-4''), 70.4 (C-3'', C-4'''), 68.3 (C-2''), 66.0(C-5''), 18.0 (C-6'').

[0116] **실시예 3. 멸균 추출물 및 분획 정제물의 파골세포 분화 억제 생리활성 확인**

[0117] **3-1. 골수세포의 분리 및 파골세포 분화**

[0118] 4-5주령 된 ICR 마우스의 경골(tibia)을 적출하여, 양끝을 절단하고 α-MEM essential medium을 통과시켜 골수 세포를 수집하고, 50 ng/mL M-CSF(macrophage-colony stimulation factor)를 처리하여 24시간 배양하였다. 미 부착 세포를 α-MEM으로 세척한 후 48-well에 5×10⁵ 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 배양하여 파골세포로 분화시켰다.

[0120] **3-2. 멸균 및 추출물(ATC1), 분획 정제물(ATC2)에 의한 파골세포의 TRAP 활성 변화 측정**

[0121] 파골세포는 특징적으로 타르트레이트 (tartrate)에 대해 저항성을 나타내는 산성 포스파타제 (acid phosphatase)인 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)을 발현하며, 상기 특징은 다른 골조직 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다 (Minkin, C., Calcif. Tissue Int., 34: 285-290, 1982).

[0122] 본 발명의 멸균 및 추출물(ATC1) 및 이의 분획 정제물(ATC2)에 의한 파골세포의 TRAP 활성의 변화를 확인하기 위해서, 하기 실험을 수행하였다.

[0123] 구체적으로, 실시예 3-1에서와 같은 방법으로, 48-well에 5×10⁵ cells/well이 되게 세포를 접종하고 분화인자 (RANKL, MCSF)와 시료를 처리하여 4일간 배양 후, TRAP 활성의 변화를 측정하였다.

[0124] TRAP 활성 측정을 위해서, TRAP activity assay kit(AK04F, COSMO BIO CO., LTD)를 이용하여 상기 4일간 배양 후 반응 후 배양 상층액 30ul/well을 새로운 96-plate에 분주하고, 준비된 kit의 Chromogenic substrate/Tartrate-containing buffer 170 ul/well를 넣어 37°C에서 30분 내지 3시간 동안 반응 후 540 nm에

서 흡광도를 측정하였다.

[0125] 음성 대조군은 RNAKL 및 ATC1 또는 ATC2를 처리하지 않은 것으로서, 파골세포로 분화되지 않은 골수세포 상태의 세포이고, 양성 대조군은 RANKL 을 처리하여 파골세포로 분화시킨 후, 시료를 처리하지 않고 COX2 저해제인 Celecoxib (5 μ M, 또는 20 μ M)를 처리하고 4일간 배양한 것이다.

[0126] TRAP 활성은 시료의 흡광도를 음성 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

[0127] 실시예 3-1에서 얻어진 멸골 및 추출물(ATC1), 2차 분획추출물 또는 분획 정제물(ATC2)들을 각각 농도별로 즉, 멸골 및 추출물 ATC1(1, 10, 50, 100 μ g/ml), 멸골 및 2차 분획추출물 또는 분획 정제물 ATC2(0.1, 1, 10, 및 50 μ g/ml)을 파골세포에 처리하고, 4일간 배양한 다음 파골세포의 TRAP 활성 (TRAP 활성은 타르트레이트에 대해 저항성을 나타내는 산성 포스파타제 활성을 의미한다)에 미치는 영향을 측정하고 그 결과를 도3에 그래프로 나타냈다.

[0128] 도3에 나타난 결과를 통해서, 본 발명의 멸골 및 추출물(ATC1), 2차 분획추출물 또는 분획 정제물(ATC2)의 농도의 의존적으로 파골세포의 활성을 억제함을 확인하였다.

[0129] 더 구체적으로, 분획정제 공정을 통해 추출한 ATC2 추출물의 경우, 양성 대조군(100%) 대비 멸골 및 추출물의 분획 정제물인ATC2 (0.1, 1, 10, 및 50 μ g/ml)에서 각각 71.7% (0.1 μ g/ml), 36.4% (1 μ g/ml), 21.9% (10 μ g/ml) 그리고 221.1% (50 μ g/ml)의 TRAP 활성을 나타냈으며, 공정을 거치지 않는 조추출물(ATC1) 보다 1/10 더 낮은 농도를 처리했음에도 2 내지 3배 이상의 현저한 TRAP 활성 억제 효과를 나타냈다.

[0130] 특히, 멸골 및 추출물의 분획 정제물(ATC2)의 농도 1 μ g/ml을 처리했을 때 대조군 대비 TRAP 활성(activity) 억제율이 63.6% (억제율: 100%-36.4% = 63.6%) 였으며, 이는 멸골 및 추출물(ATC1)의 농도 50 μ g/ml를 처리했을 때의 TRAP 활성(activity) 억제율인 66.4%(억제율: 100%-33.4% = 66.4%)와 동등한 결과를 나타냈다. 즉 멸골 및 추출물 분획 정제물(ATC2)이 멸골 및 추출물(ATC1)에 비해 50배 활성이 증대되었음을 나타냈다.

[0132] **3-3. 멸골 및 추출물(ATC1), 또는 분획 정제물(ATC2)에 의한 파골세포 분화 억제 효과**

[0133] 실시예 3-1과 같은 방법으로, 48-well에 5×10^5 cells/well이 되게 세포를 접종하고 분화인자(RANKL, MCSF)와 멸골 및 추출물(ATC1), 이의 분획 정제물(ATC2)을 처리하여 4일간 배양했다. 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% (w/v) formaldehyde로 고정된 세포에 기질용액 (1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer pH 4.6)을 100 μ L씩 분주하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% (w/v) formaldehyde로 15분 동안 세포를 고정시키고, PBS로 cell을 3번 세척했다. TRAP 염색은 50 mM tartrate acid를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer 10 mL에 1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate와 N,N-dimethylformamide 100 μ L를 첨가하여 염색액을 제조한 후 10% (w/v) formaldehyde로 고정된 세포에 염색액을 45 μ L씩 분주하고 37°C에서 30분간 염색 후 현미경으로 관찰하여 도 4에 그 결과를 나타냈다.

[0134] 도 4에 나타난 것과 같이, 음성 대조군 세포에서는 TRAP 양성 다핵형 파골세포가 형성되었지만, 멸골 및 추출물(ATC1), 또는 분획 정제물(ATC2)을 처리한 경우 농도 의존적으로 파골세포의 분화가 억제되었음을 확인할 수 있었다.

[0135] 더 구체적으로, 1차 추출 및 2차 분획정제 공정을 통해 추출한 ATC2 추출물의 경우, 공정을 거치지 않는 추출물(ATC1) 보다 1/10 더 낮은 농도를 처리했음에도 2 내지 3배 이상의 현저한 파골세포 분화(differentiation) 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0137] **실시예 4. In vitro 류마티스 관절염 예방 및 치료 활성**

[0138] **4-1. 활막섬유모세포의 분리 및 일차배양**

[0139] 미국 류마티스학회의 진단기준을 만족하는 류마티스 관절염환자 중에서 무릎관절의 수술적 치료가 필요한 환자에서 얻은 활막조직을 PBS로 씻은 후 2-3 mm로 잘게 썰고, 혈청 (serum)이 없는 DMEM에 용해시킨 2 mg/mL의 collagenase (type I)를 처리한 후 37°C 배양기에서 2시간 반응시킨 뒤 FBS가 포함된 DMEM에 중화시킨 후 strainer를 이용해 거르고 분리된 세포는 DMEM (10% (v/v)FBS, 1% (w/v) P/S)에서 배양해 류마티스 관절염 활

막섬유모세포를 얻었다.

[0141] **4-2. 류마티스 관절염 활막세포의 세포 생존율 측정**

[0142] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 0 ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간 동안 처리한 뒤, LPS를 처리하지 않거나 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하고 37°C에서 24시간 배양하고 CCK-8 assay 방법으로 세포 생존율 (cell viability)을 측정하여 도 5에 나타냈다.

[0143] 그 결과, 도5에 나타난 것과 같이, ATC2를 고농도로 처리할수록 세포 생존율은 감소하고, 세포독성은 높아지는 경향을 나타냄을 확인했다. 또한, LPS를 처리한 경우 LPS를 처리하지 않았을 경우에 비해서 세포수가 20% 정도 증가하였고, ATC2 처리 농도가 높을수록 세포 생존율이 점차 감소되는 양상을 나타냄을 확인하였다. LPS 처리한 경우에는 ATC2의 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도까지는 세포 생존률이 80% 이상 나타난다는 것을 확인하였다.

[0145] **4-3. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 이동 억제능 측정**

[0146] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리한 후, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 24시간 배양하고, 상기 배양액 제거 후 crystal violet으로 염색하여 활막세포 이동 억제능을 측정하였고, 그 염색 사진과 이동한 세포의 수를 계산한 그래프를 각각 도6에 나타냈다.

[0147] 그 결과, 도 6에 나타난 것과 같이, LPS 단독 처리 시 류마티스 관절염 발병 시 나타나는 활막세포의 이동성이 증가되었으나 ATC2 처리 시 세포의 이동이 관찰되지 않았고, 대조군 (LPS와 ATC2 모두 처리하지 않음)과 유사한 정도의 이동성을 나타냈고, 이동한 세포들의 수를 정량화 도 6 오른쪽의 그래프에서도 상기 이동성 경향은 유사하게 나타났다 (*; $p < 0.05$).

[0149] **4-4. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 염증성 물질 분비량 억제능력 측정**

[0150] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리한 후, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 24시간 배양하고 배양액 내 사이토카인과 케모카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-8, VEGF, MCP-1, CXCL10, MMP-1,2,3,9,13) 농도를 ELISA 방법으로 측정하고 그 결과를 도7으로 나타내었다.

[0151] 그 결과, 도 7에 나타난 것과 같이, 류마티스 관절염 활막세포에 LPS 처리 시 염증성 관련 물질들 (TNF- α , IL-6, IL-17A, MCP-1, CXCL10, IL-8, VEGF, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, 및 MMP-13)의 분비량이 현저히 증가함을 확인하였다. 또한, ATC2를 처리한 세포에서는 LPS를 동시에 처리하여도 류마티스와 관련된 염증성 물질들의 분비량은 ATC2 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다.

[0153] **4-5. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 p65 NF- κ B의 발현 및 위치 변화 조사 실험**

[0154] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리하고 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 1시간 배양한 후, 상기 배양액을 제거 후 면역형광염색법을 이용하여 p65 NF- κ B 발현 유무 및 발현 위치를 관찰한 결과를 도 8로 나타냈다.

[0155] 그 결과, 도 8에 나타난 것과 같이, 류마티스 관절염 활막세포에 LPS를 처리한 경우 세포질 내에만 존재하던 p65 NF- κ B의 발현이 세포핵에서 관찰되었는데, 이는 세포질 내의 p65 NF- κ B가 세포핵으로 이동하였음을 의미한다. ATC2 처리한 경우 p65 NF- κ B의 핵 내로의 이동이 관찰되지 않았다.

[0156] NF- κ B는 류마티스 관절염 발현에 주요하게 작용하는 요소이므로, 상기 결과를 바탕으로, ATC2가 NF- κ B의 핵내 이동을 억제하므로 ATC2가 류마티스 관절염의 예방 및 치료 효과가 있음을 알 수 있다.

[0158] **4-6. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 NF- κ B의 활성화부위 확인 실험**

- [0159] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리하고 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 15분동안 반응 후 4% (w/v) formaldehyde 로 세포를 고정하고 Cell-based ELISA를 수행하여, 그 결과를 도 9에 나타냈다.
- [0160] 그 결과, 도 9에 나타난 것과 같이, 류마티스 관절염 활막세포에 LPS를 처리한 경우 NF- κ B의 Ser468번과 Ser536번 잔기가 인산화(phosphorylation)됨을 확인할 수 있었다. 그러나, ATC2를 처리한 경우 상기 NF- κ B의 두 잔기 인산화가 감소 (NF- κ B의 활성화가 감소)되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0161] 상기 결과를 통해서, ATC2가 류마티스 관절염 치료에 효과가 있음을 알 수 있다.
- [0163] **4-7. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 NO 생성능력 확인 실험**
- [0164] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리한 뒤 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액 내 NO (Nitric oxide, Nitrate) 농도를 Griess assay 방법으로 측정하여, 그 결과를 도 10에 나타냈다.
- [0165] 그 결과, 도 10에 나타난 것과 같이, 류마티스 관절염 활막세포에서 LPS를 처리한 경우 정상군에 비해 NO 생성이 약2배 이상 증가되었으나, 반면 LPS 처리 후 ATC2 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 경우 두 조건 모두에서 현저하게 NO 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0166] 상기결과를 통해서 ATC2은 우수한 항염증효과를 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.
- [0168] **4-8. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 gelatinase의 효소활성도 변화 및 발현정도 확인**
- [0169] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리하고 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 24시간 배양해 배양액을 회수하고 원심분리하여 상층액 내 MMP-2의 활성화 확인용 gelatin zymography assay 실시하여 도11에 그 결과를 나타냈다.
- [0170] gelatinase의 효소는 류마티스 관절염 환자에서 활성이 증가된 것으로 알려져 있으며, gelatinase의 효소에는 MMP-2, MMP-9등이 대표적으로 알려져 있다.
- [0171] 그 결과, 도 11에 나타난 것과 같이, 류마티스 관절염 환자의 활막세포에 LPS를 처리한 경우 활성화 형태의 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)가 증가한 반면 ATC2를 처리한 경우 MMP-2의 활성도가 사라짐을 확인할 수 있었고, 단백질 발현 정도를 측정한 결과, MMP-2의 발현정도가 LPS를 처리에 의해서 증가하지만, 상기 증가한 MMP-2의 발현이 LPS와 ATC2의 처리에 의해서 그 발현이 감소하였고, MMP-9의 경우 LPS와 ATC2의 처리에 의해서 그 발현이 완전히 사라짐을 확인할 수 있었다.
- [0173] **4-9. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 염증 및 세포골격 관련 단백질 발현유무 및 발현위치 확인 실험**
- [0174] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리한 뒤 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 24시간 배양해 배양액을 제거하고 세포를 acetone으로 고정 후 면역형광염색법을 이용하여 염증관련단백질 (COX-2, MMP-2, IL-1beta, Vimentin and fibronectin) 발현 유무 및 발현 위치를 확인하여 도 12에 나타냈다.
- [0175] 그 결과, 도 12에 나타난 것과 같이, LPS 처리 시 증가되었던 COX-2, MMP-2, IL-1beta, vimentin, 및 fibronectin의 발현이 ATC2 처리에 의해서 현저히 감소됨을 확인했으나, LPS 및 ATC2의 처리에 의해서 상기 염증 관련 단백질 발현위치의 변화는 관찰되지 않았다.
- [0177] **4-10. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 염증인자 확인 실험**
- [0178] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간동안 처리하였다. 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리하여 37°C에서 24시간 배양하고 배양액 내 염증관련 인자 screening을 위해 antibody array kit (ab134003; Abcam)를 이용하여 관찰하고, 그 결과를 도 13에 나타냈다.

[0179] 그 결과, 도 13에 나타난 것과 같이, Antibody array 결과 활막세포에 LPS 처리 시 IL-6, CXCL8, CCL2 그리고 CCL5의 분비량이 증가됨이 확인 되었고, LPS 및 ATC2를 동시에 세포에 처리했을 때 LPS 처리 시 증가했던 류마티스 관련 염증인자인 CCL5가 통계적으로 유의한 정도로 다시 감소되는 것을 확인하였다. (*; p<0.05)

[0181] **4-11. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 염증관련 단백질 발현 실험**

[0182] 실시예 4-1과 동일한 방법으로 얻은 류마티스 관절염 활막세포에 실시예 3에서 사용한 ATC2를 100 µg/mL의 농도로 1시간동안 처리하였다. 1 µg/mL의 LPS를 5 분, 15 분, 30 분 그리고 60 분 각각 처리한 후 세포의 단백질을 얻은 후 Western blot analysis 방법으로 p-Erk, p-p38, p-JNK 및 p-Akt 단백질 발현양을 측정하여 도 14에 나타냈다.

[0183] 그 결과, 도 14에 나타난 것과 같이, LPS 자극 후 60 분이 경과한 시점에서 류마티스 관절염과 관련된 p38, JNK 그리고 Akt의 단백질 발현이 증가하였지만, ATC2처리 시 류마티스 관절염과 관련된 p38, JNK 그리고 Akt의 신호 전달 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0185] **4-12. 류마티스 관절염 활막세포를 이용한 파골세포 분화 억제능 확인**

[0186] 정상인의 buffy coat 혈액에서 PBMC를 Ficoll 분리하여 MACS 방법으로 얻은 CD14⁺ cell을 96 well plate에 1 X 10⁵ cells/well 의 농도로 분주하고 20 ng/mL의 M-CSF 처리하여 3일 동안 배양하였다. 4일째에 40 ng/mL의 RANKL 및 실시예 3에서 사용한 ATC2를 농도별로 처리하여 5일 간 파골세포 분화를 유도하여 TRAP 염색 후 파골세포수를 측정하여 도 15에 나타냈다.

[0187] 그 결과, 도 15에 나타난 것과 같이, ATC2를 농도별로 처리한 경우, 50 µg/ml 이상의 농도부터 파골세포분화 감소가 현저하게 나타남을 확인하였다.

[0188] 상기 결과로부터, 본원발명에서 사용한 ATC2는 농도 의존적으로 파골세포의 분화 억제 작용을 함을 알 수 있다.

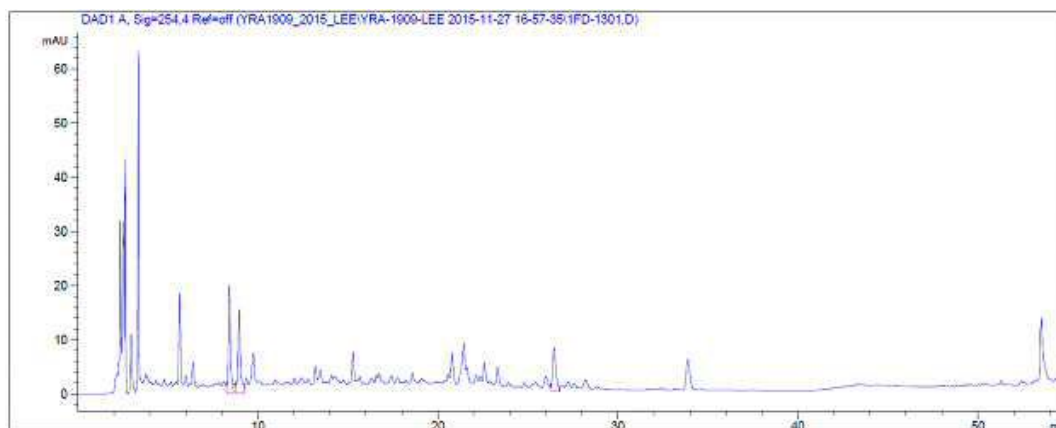
[0190] **4-13. ATC2의 In vitro 류마티스 관절염 예방 및 치료 활성**

[0191] 상기의 연구 결과를 종합하였을 때, 본원발명에서 사용한 ATC2는 류마티스 관절염환자의 활막세포의 염증관련 물질들의 분비량 및 발현을 감소시켜 항염증 치료효과를 나타냄을 알 수 있다.

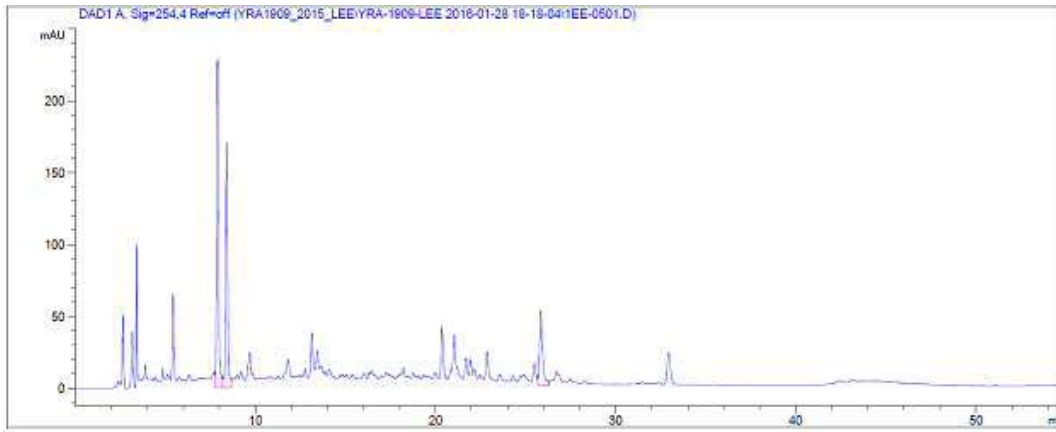
[0192] 또한, 상기 ATC2는 연골 및 뼈 파괴를 야기할 수 있는 MMPs의 분비량, 발현 및 활성도를 감소시켰고, 파골세포 분화 억제능을 나타내므로, 이는 관절염에 의한 관절과 뼈의 손상 및 관절의 기능 소실을 지연시키는 활성이 있음이 알려진 DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drug) 제제의 특성과 유사하며, 이를 통해서 상기 ATC2는 관절염에 의한 관절과 뼈의 손상 및 관절의 기능 소실을 지연시키는 활성이 있음을 알 수 있다.

도면

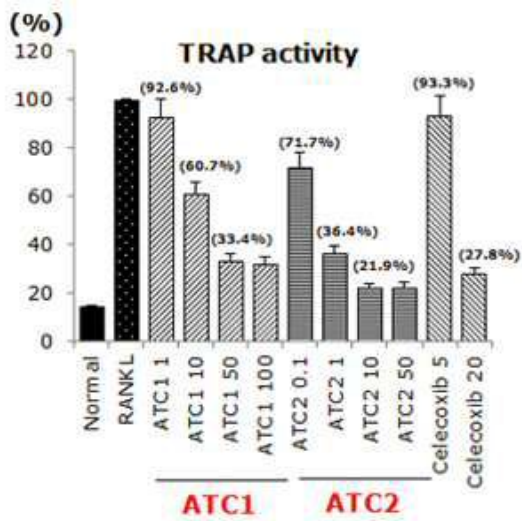
도면1



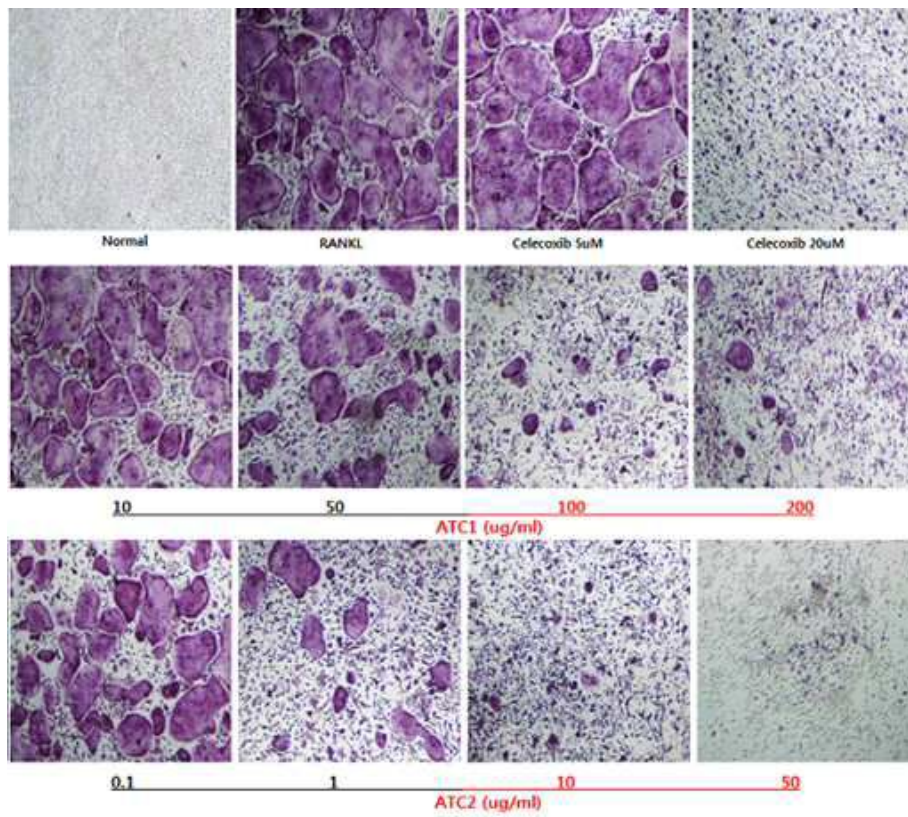
도면2



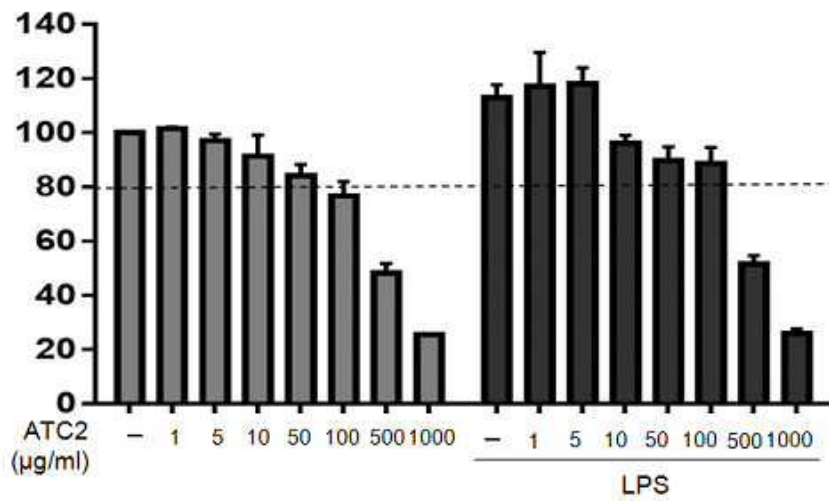
도면3



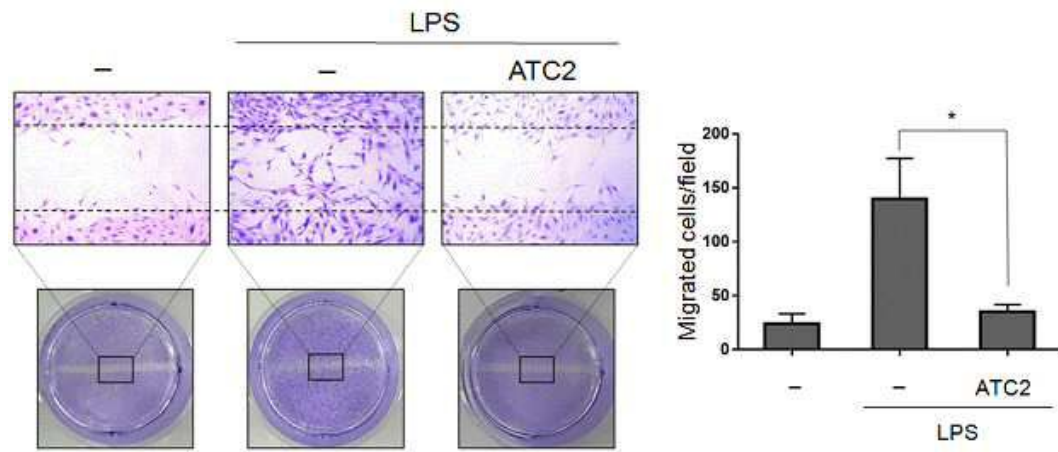
도면4



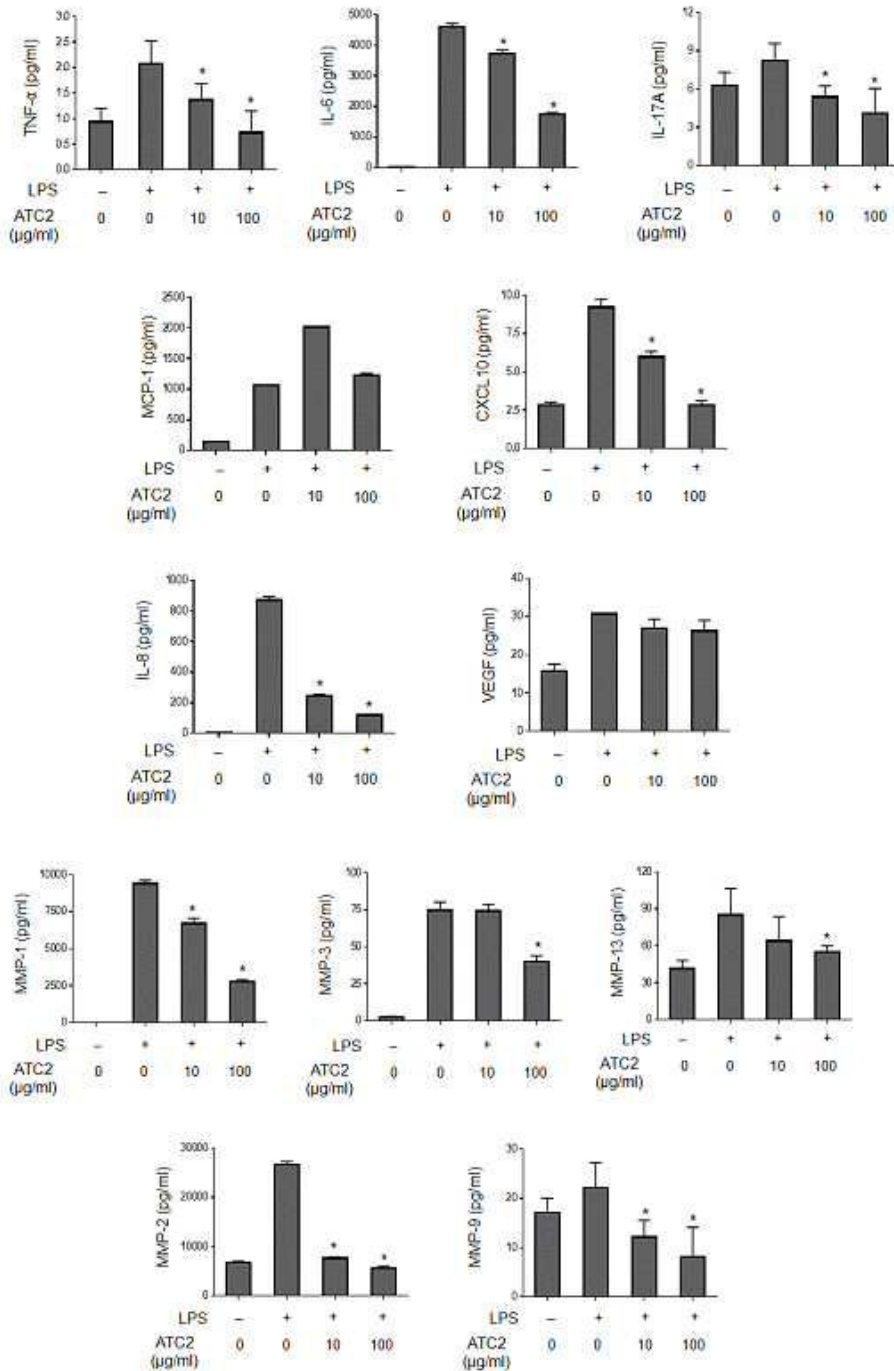
도면5



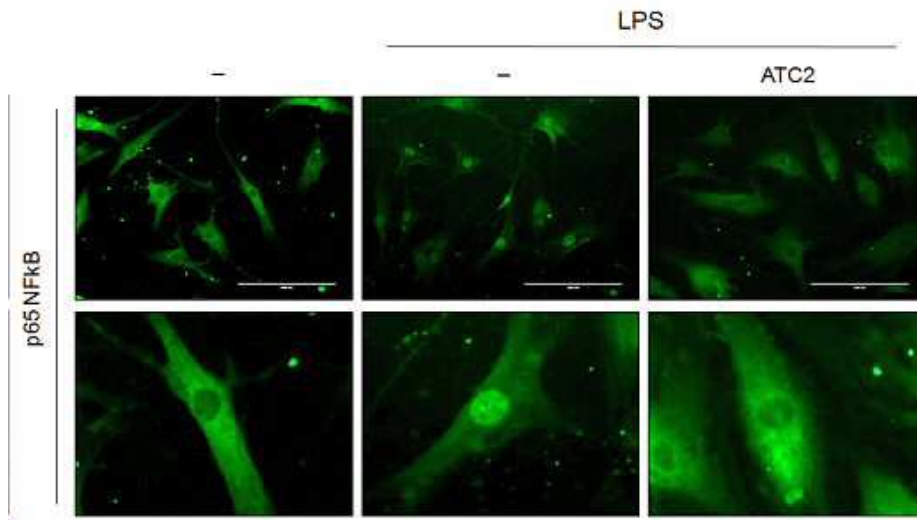
도면6



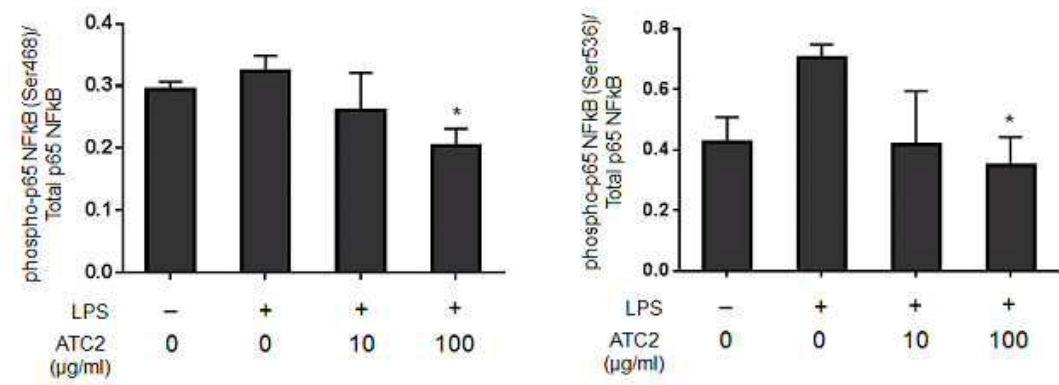
도면7



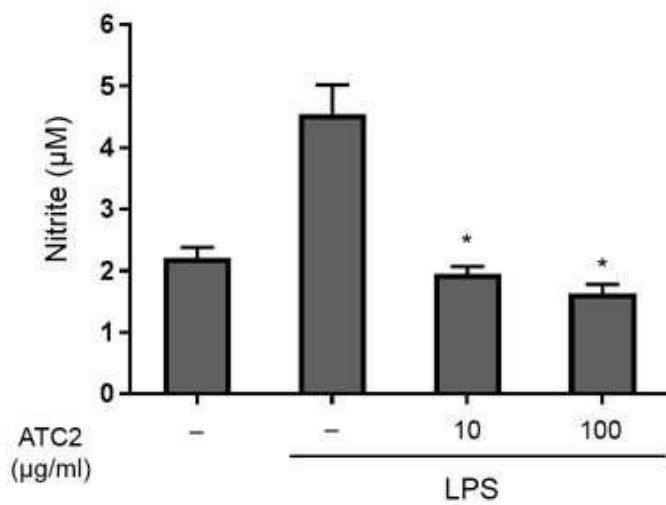
도면8



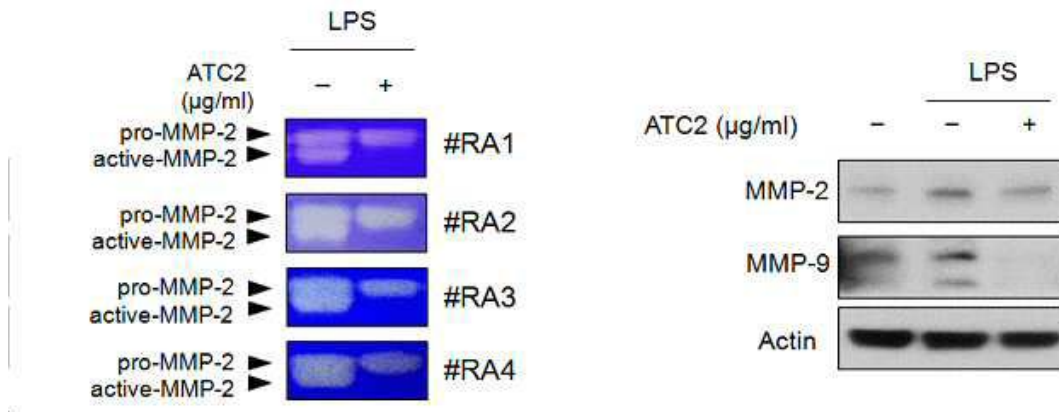
도면9



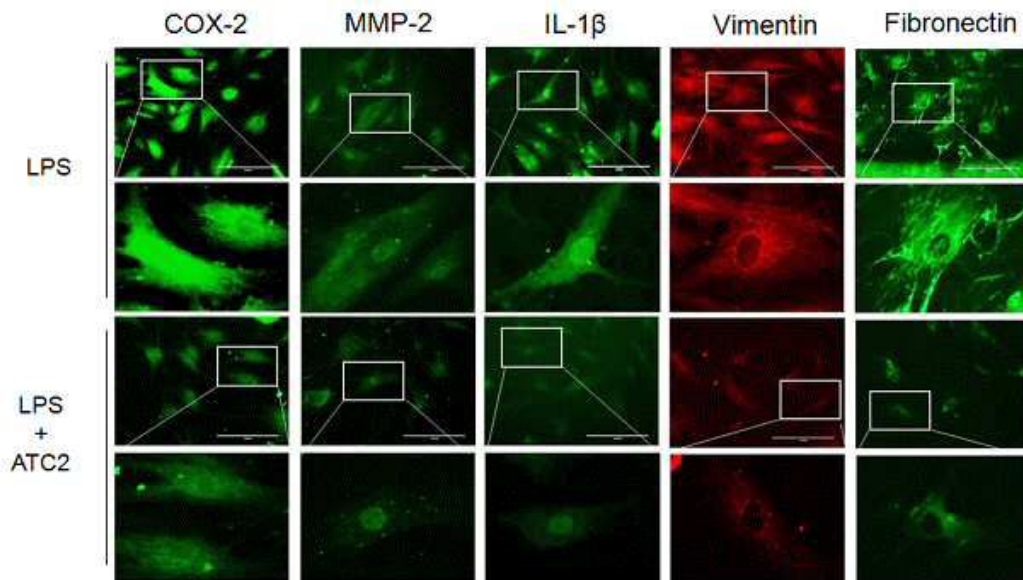
도면10



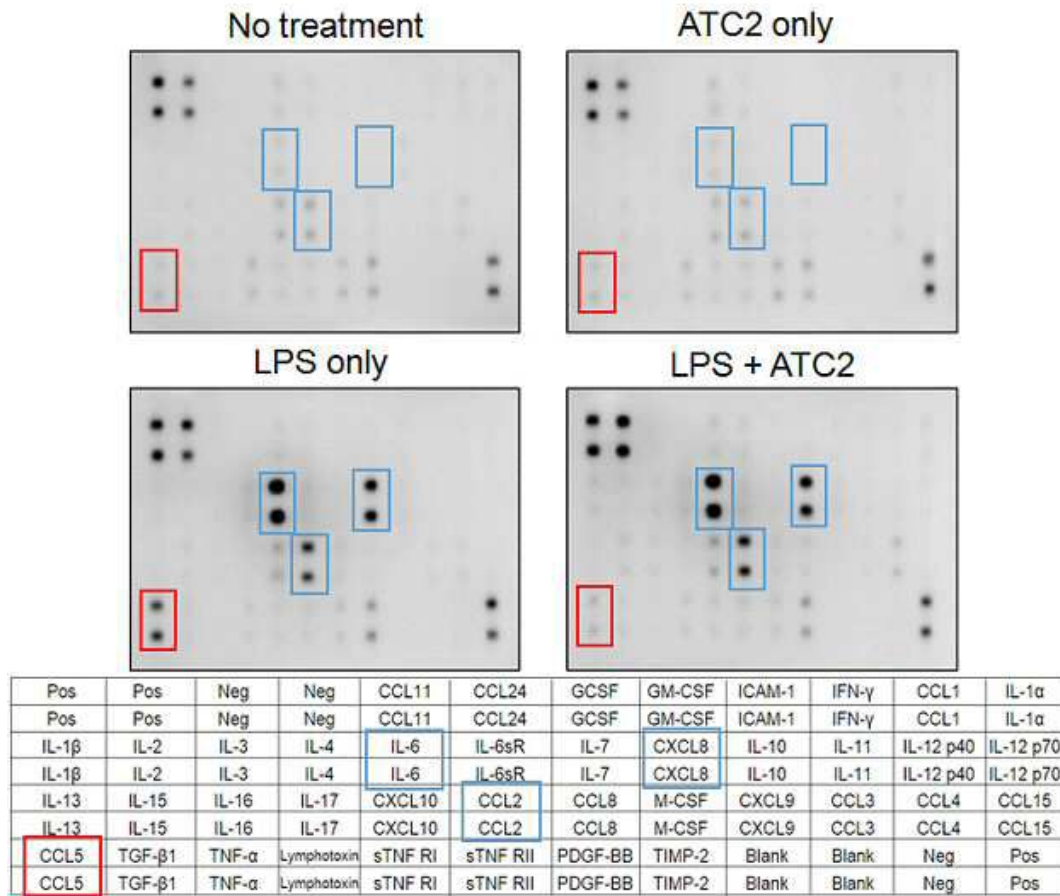
도면11



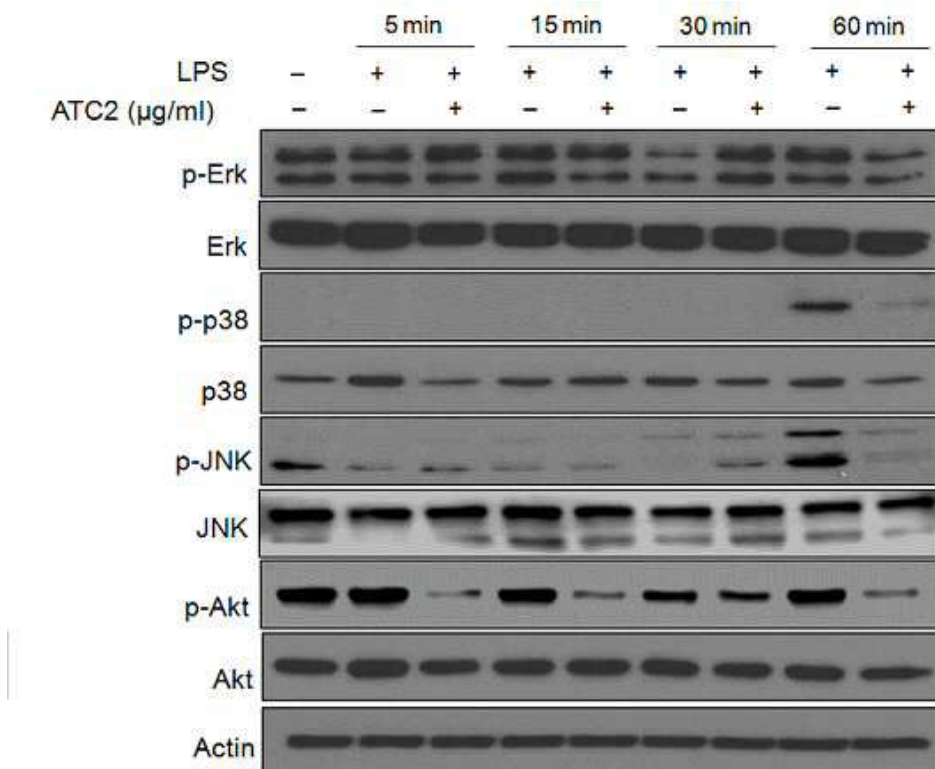
도면12



도면13



도면14



도면15

