

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0017901 (43) 공개일자 2014년02월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/36 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0084685 (22) 출원일자 2012년08월02일 심사청구일자 없음 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동) (72) 발명자 김광동 경상남도 진주시 순환로573번길 21, 108동 806호 (평거동, 대경아파트) 박수중 충청남도 당진군 합덕읍 은매미길 111-55 (뒷면에 계속) (74) 대리인 위병갑

전체 청구항 수 : 총 8 항

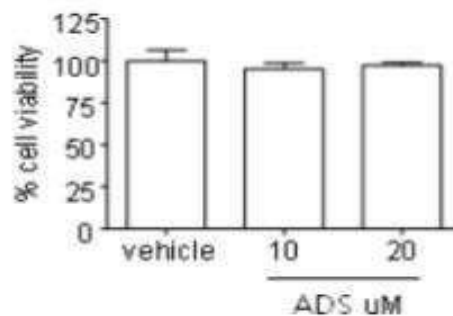
(54) 발명의 명칭 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물

(57) 요약

본 발명은 면역 증강 효과를 나타내는 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)로부터 분리된 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)의 신규한 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 애기똥풀로부터 분리된 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 약학 조성물 또는 건강기능식품에 관한 것이다.

본 발명에 따른 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린은 NF- κ B 활성을 통해 염증 사이토카인의 생성을 유도함으로써 면역 증강 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

오상석

경상남도 진주시 말티고개로 113, 101동 1304호 (초전동, 대림아파트)

이지혜

경상남도 창원시 의창구 봉곡로72번길 7 (봉곡동)

박기훈

경상남도 진주시 초전남로 60, 101동 1402호 (초전동, 현대아파트)

김동혁

경상남도 진주시 진주대로568번길 12, 304동 705호 (가좌동, 가좌주공3차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008107

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 작물의 단백질체, 대사체 및 NBIT 융합기술을 통한 유용 대사체 발굴 및 대사조절시스템 구

축

기 여 율 1/1

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린은 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)로부터 분리 및 정제한 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린은 NF- κ B 활성화를 통해 TNF- α , IL-6 및 IL-8로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 사이토카인의 생성을 유도하는 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

NF- κ B의 활성화는 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린은 1~20 μ M의 농도로 상기 조성물에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 면역증강용 건강기능식품.

청구항 7

(a) 애기똥풀을 분쇄하고 실온에서 에탄올 추출하는 단계;

(b) 에탄올 추출물을 여과하고 산 처리한 후, 중화시키는 단계;

(c) 클로로포름(CHCl_3)으로 추출한 후, 잔여물을 헥산과 에틸아세테이트(EtOAc)를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획물을 수득하는 단계; 및

(d) 상기 분획물은 다시 헥산과 에틸아세테이트가 8:1~1:1의 혼합비(부피비)로 혼합된 용매를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는,

애기똥풀로부터 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)을 분리 및 정제하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

(d) 단계에서 상기 분획물은 (c) 단계에서 헥산과 에틸아세테이트를 9:1의 혼합비(부피비)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획물인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 면역 증강 효과를 나타내는 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)로부터 분리된 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)의 신규한 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] TNF- α , IL-6 및 IL-8과 같은 염증 사이토카인(inflammatory cytokine)은 면역 세포의 항종양 및 항바이러스 활성을 나타내는 중요한 조절인자이다. 이러한 조절인자는 감염이나 암에 대한 면역반응 및 세포제거 기전(cellular clearance mechanisms)의 효능을 증강시킨다. NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 경로는 전염증 사이토카인(proinflammatory cytokin)의 생성, 백혈구의 모집(leukocyte recruitment), 세포의 생존(cell survival)을 조절한다. NF- κ B는 정상적인 상태에서 세포질에 고정되어 있다가 자극을 받게 되면 세포핵 내로 이동하게 된다. 이때, NF- κ B는 다수의 유전자(사이토카인과 면역반응에 중요하게 기여하는 다른 면역반응 유전자)가 전사되는 것을 조절하기 위해 공통 DNA(consensus DNA)의 결합부위에 결합하게 된다.

[0003] O_2^- , H_2O_2 , OH와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 아주 흔하고, 반응성이 높으며, 확산성이 큰 분자이다. 활성산소종은 레독스-센시티브 시그널 트랜스덕션(redox-sensitive signal transduction)의 활성화와 세포의 생존, 사멸, 면역 기전을 조절하는 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 경로의 시발물질이 될 수 있다. MAPK는 세포의 분화와 성장을 조절하는 시그널링 경로의 중요한 구성요소이며, ERK(extracellular signal-regulated kinase), p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinase), JNK(c-Jun NH₂-terminal kinase)이다. MAPK의 활성화는 활성화된 대식 세포 내의 전염증 사이토카인의 생성에 있어서 매우 중요하다.

[0004] 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)은 서양 철학 및 전통 중국 의학에서 진통제, 이뇨제, 진해제, 항종양제, 항바이러스제, 골다공증 치료제, 방사능 보호제(radioprotective) 등으로 광범위하게 사용되어왔다. 애기똥풀의 주요 구성성분은 이소퀴놀린 알칼로이드(isoquinoline alkaloids), 플라보노이드(flavonoids), 페놀산(phenolic acid) 등이며, 이소퀴놀린 알칼로이드의 대표적인 화합물로는 상귀나린(sanguinarine), 켈리도닌(chelidonine), 켈레리트린(chelerythrine), 베르베린(berberine), 프로토피핀(protopine), 콕티신(coptisine) 등이 있다. 애기똥풀 추출물 및 이로부터 분리된 화합물들은 항바이러스, 항종양 효과 등의 다양한 생리활성을 나타낸다.

[0005] 그러나 애기똥풀이 갖는 다양한 생리활성에 대해 구체적으로 어떠한 성분들이 어떠한 약리효과를 갖는지에 대한 연구는 미비하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제849,488호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)로부터 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)을 분리하고, 활성산소종, MAPK(mitogen-activated protein kinase) 및 NF- κ B 경로의 상관관계를 통해 상기 화합물의 면역 증강 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 다른 목적은 애기똥풀로부터 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)을 분리 및 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린은 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)로부터 분리 및 정제한 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린은 NF- κ B 활성화를 통해 TNF- α , IL-6 및 IL-8로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 사이토카인의 생성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, NF- κ B의 활성화는 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 통해 이루어지는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린은 1~20 μ M의 농도로 상기 조성물에 포함되어 있는 것일 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 면역증강용 건강기능식품을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은,
- [0017] (a) 애기똥풀을 분쇄하고 실온에서 에탄올 추출하는 단계;
- [0018] (b) 에탄올 추출물을 여과하고 산 처리한 후, 중화시키는 단계;
- [0019] (c) 클로로포름(CHCl_3)으로 추출한 후, 잔여물을 헥산과 에틸아세테이트(EtOAc)를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획물을 수득하는 단계; 및
- [0020] (d) 상기 분획물은 다시 헥산과 에틸아세테이트가 8:1~1:1의 혼합비(부피비)로 혼합된 용매를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는, 애기똥풀로부터 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)을 분리 및 정제하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, (d) 단계에서 상기 분획물은 (c) 단계에서 헥산과 에틸아세테이트를 9:1의 혼합비(부피비)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획물일 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)로부터 분리된 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)은 NF- κ B 활성을 통해 염증 사이토카인의 생성을 유도함으로써 면역 증강 효과를 나타낼 수 있다. 따라서, 상기 화합물을 면역 증강용 약학 조성물 또는 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 천연물로부터 분리된 합성 유도체를 사용하여 독성으로 인한 각종 부작용을 유발하지 않을 수 있다. 따라서, 종래의 면역 증강용 약학 조성물에 비해 생체 안정성이 우수한 의약품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 ^1H -NMR 측정 결과이다.
- 도 2는 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 대한 세포독성 결과이다.
- 도 3은 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 TNF- α 생성 및 IL-8 프로모터 활성 결과이다(RAW 264.7의 대식 세포).
- 도 4는 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 IL-6, MCP-1 및 TNF- α 생성 결과이다(C57BL/6 마우스의 수지상 세포).
- 도 5는 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 NF- κ B 루시퍼라제 활성 결과이다.
- 도 6은 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 의한 NF- κ B의 전좌 결과이다.

도 7은 NF- κ B 억제제가 처리된 세포에 있어서 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 TNF- α , IL-6 생성 및 IL-8 프로모터 활성 결과이다.

도 8은 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 활성산소종 유도 결과이다.

도 9는 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 TNF- α , IL-6 생성 및 IL-8 프로모터 활성의 활성산소종 유도 결과이다.

도 10은 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 활성산소종의 NF- κ B 루시퍼라제 활성 결과이다.

도 11은 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 의한 NF- κ B의 전좌 결과이다.

도 12는 JNK, ERK1 및 ERK2 억제제가 처리된 세포에 있어서 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 TNF- α 및 IL-6 생성 결과이다.

도 13은 JNK, ERK1 및 ERK2 억제제가 처리된 세포에 있어서 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 JNK 및 ERK 인산화에 미치는 영향 측정 결과이다.

도 14는 N-아세틸시스테인이 처리된 세포에 있어서 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 JNK 및 ERK 인산화에 미치는 영향 측정 결과이다.

도 15는 JNK, ERK1 및 ERK2 억제제가 처리된 세포에 있어서 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 NF- κ B 루시퍼라제 활성 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 애기똥풀(*Chelidonium majus L.*)로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린(6-acetonyl-5,6-dihydrosanguinarine)을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0026] 애기똥풀은(*Chelidonium majus L.*)은 서양 철학 및 전통 중국 의학에서 진통제, 이뇨제, 진해제, 항종양제, 항바이러스제, 골다공증 치료제, 방사능 보호제(radioprotective) 등으로 광범위하게 사용되어왔다. 애기똥풀의 주요 구성성분은 이소퀴놀린 알칼로이드(isoquinoline alkaloids), 플라보노이드(flavonoids), 페놀산(phenolic acid) 등이며, 이소퀴놀린 알칼로이드의 대표적인 화합물로는 상귀나린(sanguinarine), 켈리도닌(chelidonine), 켈레리트린(chelerythrine), 베르베린(berberine), 프로토피핀(protopine), 콕티신(coptisine) 등이 있다. 애기똥풀 추출물 및 이로부터 분리된 화합물들은 항바이러스, 면역조절, 항종양 효과 등의 다양한 생리활성을 나타낸다. 특히, 애기똥풀의 물 추출물은 NF- κ B를 활성화시킴으로써 TNF- α 의 생성을 증강시키는 면역 증강제로 잘 알려져 있다. 그러나 애기똥풀로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 면역 증강 효과에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

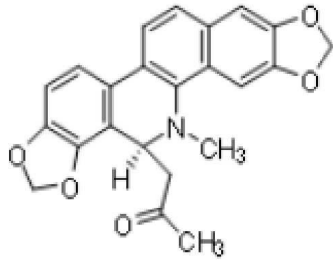
[0027] 이에, 본 발명에서는 알칼로이드 종류인 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 NF- κ B 활성을 통해 염증 사이토카인의 생성을 유도함으로써 면역 증강 효과를 나타낸다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0028] 본 발명의 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 애기똥풀로부터 분리하는 방법은 다음과 같다.

[0029] 애기똥풀을 분쇄하고 이를 실온에서 에탄올로 추출한 후에 여과한다. 여과액을 산 처리하여 여과하고, 여과 케이크(filter cake)를 염기로 중화한 후, 클로로포름(CHCl_3)으로 추출한다. 클로로포름 층을 농축하여 어두운 갈색의 잔여물을 수득한다. 잔여물을 헥산과 에틸아세테이트(EtOAc)를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행함으로써 4개의 분획물을 얻는다. 이 중 헥산과 에틸아세테이트 비율 9:1을 이용하여 얻은 분획물을 헥산과 에틸아세테이트 비율 8:1에서 1:1까지를 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여, 최종적으로 무색 침상 형태의 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 획득한다.

[0030] 상기의 방법에 의해 애기똥풀로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린은 무색의 침상 형태의 화합물이다. 화학식은 $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ 이며, 그 구조는 하기 화학식 1과 같다.

[0031] [화학식 1]



[0032]

[0033]

본 발명에 따라 애기똥풀로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 NF- κ B를 활성화켜 TNF- α 의 생성을 유도함으로써 면역력을 증강시키는 효과를 나타낸다는 사실은 아직 보고된 바가 없다.

[0034]

이에, 본 발명자들은 본 발명에 따른 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 면역 증강 효과를 다음과 같이 확인하였다.

[0035]

본 발명의 일실시예에 따르면, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 세포독성 실험을 MTS 평가를 통해 진행하였다. 그 결과, RAW 264.7 세포는 상기 화합물의 20 μ M의 농도까지 세포 생존에 어떠한 영향도 미치지 않았다(실험예 1 참조).

[0036]

본 발명의 일실시예에 따르면, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 따른 염증 사이토카인의 생성 유도 효과를 확인하였다. 그 결과, 상기 화합물은 RAW 264.7 쥐 대식 세포에 대한 TNF- α 의 생성 및 IL-8 프로모터의 활성을 농도 의존적으로 증가시켰으며, C57BL/6 마우스의 골수 유래 수지상 세포에 대한 TNF- α , IL-6 및 MCP-1 생성을 유도하였다. 따라서, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 면역 사이토카인의 생성을 유도함을 확인하였다(실험예 2 참조).

[0037]

본 발명의 일실시예에 따르면, 염증 사이토카인의 생성이 NF- κ B 활성을 통해 유도됨을 확인하였다. 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 처리한 RAW 264.7 세포에 대한 NF- κ B 루시퍼라제의 활성이 농도 의존적으로 증가하였다. 또한, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 NF- κ B p65가 RAW 264.7 세포의 세포질로부터 세포핵 내로 이동하였다. 또한, NF- κ B 억제제인 Bay 11-7085를 처리한 RAW 264.7 세포에 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 처리한 결과, TNF- α , IL-6의 생성 및 IL-8 프로모터의 활성이 감소하였다. 따라서, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 NF- κ B를 활성화시키고, 이를 통해 염증 사이토카인의 생성을 유도함을 확인하였다(실험예 3 참조).

[0038]

본 발명의 일실시예에 따르면, 활성산소종이 염증 사이토카인의 생성을 유도함을 확인하였다. 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 활성산소종의 생성을 유도하였으며, 상기 유도된 활성산소종이 NF- κ B 경로를 활성화시켰다. 또한, RAW 264.7 세포에 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 처리한 결과, TNF- α , IL-6의 생성 및 IL-8 프로모터의 활성이 유도되었으며, 유도된 염증 사이토카인이 N-아세틸시스테인을 억제하였다. 또한, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 NF- κ B p65가 RAW 264.7 세포의 세포질로부터 세포핵 내로 이동하였다. 따라서, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 활성산소종-NF- κ B 활성 경로를 통해 염증 사이토카인의 생성을 유도함을 확인하였다(실험예 4 참조).

[0039]

본 발명의 일실시예에 따르면, 염증 사이토카인의 생성과 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 경로의 관련성을 확인하기 위해 MAPK 억제제의 존재 하에서 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 MAPK 활성을 측정하였다. MAPK는 JNK(c-Jun NH₂-terminal kinase) 또는 ERK(extracellular signal-regulated kinase)일 수 있다. 그 결과, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 TNF- α 및 IL-6의 생성이 JNK 억제제(SP600125) 및 ERK 억제제(U0126)를 감소시켰다. 또한, 세포가 염증 사이토카인과 같은 자극에 노출되면 빠르게 인산화 된다. 이에, 인산화된 JNK와 총 JNK의 발현 및 인산화된 ERK와 총 ERK의 발현을 웨스턴 블릿으로 측정하였다. JNK와 ERK 억제제인 SP600125와 U0126을 각각 처리한 RAW 264.7 세포에 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 처리한 결과, 각 키나제의 인산화 반응이 억제되었다. 또한, 활성산소종이 JNK 및 ERK의 인산화반응을 완전히 억제하였다. 또한, 각 키나제 억제제의 존재 하에서 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 NF- κ B 루시퍼라제 활성을 측정한 결과, 각 키나제 억제제가 상기 유도된 NF- κ B 활성을 효과적으로 억제하였다. 따라서, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 활성산소종-JNK/ERK-NF- κ B 활성 경로를 통해 염증 사이토카인의 생성을 유도함을 확인하였다(실험예 5 참조).

- [0040] 따라서, 본 발명에 따른 애기똥풀로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린은 면역 증강에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0041] 이에, 본 발명에 따른 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린은 면역 증강용 약학 조성물로 사용할 수 있으며, 상기 조성물에 포함될 수 있는 상기 화합물의 농도는 세포 독성을 유발시키지 않는 1~20 μ M의 농도로 함유하는 것이 바람직하다.
- [0042] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양의 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0043] 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란 상기 생리활성성분이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기 위해 충분한 양을 말한다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 투여 대상의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0044] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다.
- [0045] 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 현탁액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [0047] 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화 될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 섭취형 정제, 협착 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명의 조성물은 방부제, 수화제, 유화 프로모터, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화 될 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 애기똥풀로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린은 또한 면역 증강용 건강기능식품으로 사용할 수 있다.
- [0050] 그러므로 본 발명에 따른 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린은 면역 증강에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.
- [0051] 상기에서 "식품"이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [0052] 본 발명에 따른 면역 증강 효과를 갖는 기능성 건강식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수 영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이

에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

- [0053] 상기에서 “기능성 식품”이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체 방어리듬 조절, 질병 방지와 회복 등에 관한 체내 조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0054] 상기에서 “음료”란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명에 따른 상기 면역 증강용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0055] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명에 따른 면역 증강 효과를 갖는 기능성 건강식품용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 면역 증강용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001 내지 2g, 바람직하게는 0.01 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 그러므로 본 발명은 본 발명에 따른 애기똥풀로부터 분리된 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린을 유효성분으로 함유하는 면역 증강을 위한 건강기능 식품을 제공할 수 있으며, 상기 식품의 형태는 이에 제한되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태일 수 있다.
- [0058] 이하, 본 발명을 실시예 및 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] <실시예 1>

[0060] 애기똥풀로부터 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린(ADS)의 분리

[0061] 분쇄한 애기똥풀(500mg)을 실온에서 5일 동안 90% 에탄올(10L×3)로 추출한 후에 여과하였다. 여과액을 200ml로 농축하여 여과하였다. 여과액을 1N의 HCl로 처리하고 여과하였다. 여과 케이크(filter cake)를 1N의 NH₄OH로 중화시키고, CHCl₃로 추출하였다. CHCl₃층을 농축하여 어두운 갈색의 잔여물(9.2g)을 수득하였다. 수득물을 헥산과 에틸아세테이트(EtOAc)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행함으로써 4개의 분획물을 얻었다(헥산과 에틸아세테이트 비율 9:1(S1), 7:3(S2), 5:5(S3), 에틸아세테이트(S4)). 분획물 S1을 헥산과 에틸아세테이트(8:1 비율에서 1:1 비율까지)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행함으로써 얻은 화합물(35mg)이 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린임을 확인하였다. 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 구조는 스펙트럼 데이터의 분석 및 선행연구의 비교를 통하여 특정하였다. 하기에 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 스펙트럼 데이터를 기재하였으며, 도 1에 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 ¹H NMR 데이터를 나타내었다.

[0062] 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린: 무색 침상; m.p. 209~210℃; [α]_D²⁵ +25.3° (c 0.02, CHCl₃); EIMS, m/z 389[M]⁺; HREIMS, m/z 389.1246(C₂₃H₁₉NO₅ 389.1245); ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 2.07(1H, s, H-3'), 2.38(1H, dd, J=15.5, 10.5Hz, H-1'b), 2.62(1H, dd, J=15.5, 3.5Hz, H-1'a), 2.65(3H, s, N-CH₃-5), 4.88(1H, dd,

J=10.5, 3.5Hz, H-6), 6.04(1H, s, H-19), 6.04(1H, s, H-20), 6.81(1H, d, J=8.5Hz, H-9), 6.85(1H, d, J=8.2Hz, H-12), 7.13(1H, s, H-1), 7.42 (1H, d, J=8.2Hz, H-11), 7.58(1H, s, H-4), 7.71(1H, d, J=8.5Hz, H-10).

[0063] <실시예 2>

[0064] 세포의 배양

[0065] RAW 264.7 쥐(murine)의 대식 세포를 ATCC(American type culture collection)에서 구입하였다. 8주된 C57BL/6 마우스(mice)의 골수 유래 수지상 세포(bone marrow derived dendritic cell)를 경골(tibias) 및 대퇴골(femurs)로부터 준비하였다. RBC 세포 용해 후에 남아 있는 세포의 수를 세고, 페트리 디쉬에 3×10^6 세포를 10 일 동안 배양하였다. RAW 264.7 세포 및 수지상 세포를 10% FBS, 100U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 충분히 공급된 RPMI1640에서 37°C, 5% CO₂ 분위기로 배양하였다.

[0066] <실험예 1>

[0067] 세포독성 실험

[0068] 애기뿔풀로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 생리활성 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 실험을 진행하였다. 세포독성 실험은 MTS 평가(promega, Madison, WI, USA)를 통해 진행하였다. RAW 264.7 세포를 96-웰 플레이트(well plate)에 1×10^4 세포/웰의 농도로 24시간 동안 배양하였다. 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 각 농도별(10, 20 μ M)로 처리하고, 24시간 후에 MTS 용액을 처리하고, 4시간 동안 배양하였다. 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 490nm 파장에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린은 20 μ M의 농도까지 세포 생존에 어떠한 영향도 미치지 않음을 확인하였다(도 2 참조).

[0069] <실험예 2>

[0070] 염증 사이토카인 생성의 유도

[0071] 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 염증 사이토카인 생성의 유도 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 쥐 대식 세포에 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린을 처리하고 TNF- α 의 생성 및 IL-8 프로모터의 활성을 측정하였다. 배지 내에 존재하는 TNF- α 의 생성은 TNF- α ELISA 키트(BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 측정하였다. IL-8 프로모터의 활성은 IL-8 프로모터-루시페라제 컨스트럭트(pIL-8-Luc) 분석을 통해 측정하였다. 그 결과, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린은 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성 및 IL-8 프로모터의 활성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[0072] 세포주에 따른 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린의 면역 자극 활성을 평가하기 위해 수지상 세포를 이용하여 염증 사이토카인의 생성을 측정하였다. 배지 내에 존재하는 TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 및 MCP-1의 생성은 cytometric bead array mouse inflammation 키트(CBA) 또는 TNF- α ELISA 키트(BD Biosciences, San Jose, CA)를 통해 측정하였다. 그 결과, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 수지상 세포 내에서 IL-6, MCP-1 및 TNF- α 생성을 유도하는 것을 확인하였으며(도 4 참조), IFN- γ , IL-10 및 IL-12의 생성에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0073] 이러한 결과들을 통해, 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 대식 세포 및 수지상 세포의 면역 세포 내에 존재하는 염증 사이토카인 생성을 유도함을 확인할 수 있었다.

[0074] <실험예 3>

[0075] NF- κ B의 활성을 통한 염증 사이토카인 생성의 유도

[0076] 애기뿔풀로부터 분리된 6-아세트닐-5,6-디히드로상귀나린이 염증 사이토카인의 생성을 유도하는 효과가 있음을

확인하기 위해 NF- κ B 루시퍼라제의 활성을 측정하였다. NF- κ B는 염증 사이토카인의 생성에 있어서 중요한 인자로 알려져 있다. RAW 264.7 세포에 우선 NF- κ B 루시퍼라제 리포터 플라스미드와 p-Null-Renilla 플라스미드를 처리한 후, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린을 처리하였다. 그리고 24시간 후에 NF- κ B 루시퍼라제의 활성을 측정하였다. NF- κ B 루시퍼라제 활성은 듀얼 루시퍼라제 키트(Promega)를 이용하여 측정하였다. LPS(lipopolysaccharide)를 양성 대조구로 사용하였다. 그 결과, RAW 264.7 세포에 대한 NF- κ B 루시퍼라제 활성은 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다(도 5 참조).

[0077] NF- κ B가 세포질로부터 세포핵 내로 이동하는지를 확인하였다. RAW 264.7 세포에 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린 20 μ M을 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 그리고 항 P-65 항원(anti-P65 antibody)과 DAPI(4',6'-diamidine-2'-phenylindole)를 처리하고, NF- κ B의 세포핵 내로의 이동을 확인하였다. 그 결과, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린이 처리된 RAW 264.7 세포의 핵으로 NF- κ B p65가 이동됨을 확인하였다(도 6 참조).

[0078] 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 염증 사이토카인 생성에 대한 NF- κ B의 영향을 확인하기 위해 NF- κ B 억제제인 Bay 11-7085를 사용하였다. RAW 264.7 세포를 1시간 동안 Bay 11-7085로 전처리하고, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린 20 μ M를 처리한 후에 24시간 동안 배양하였다. TNF- α 의 생성은 ELISA 키트로, IL-6의 생성은 cytometric bead array mouse inflammation 키트(CBA)로, IL-8 프로모터 활성은 루시퍼라제 리포터 평가로 측정하였다. 그 결과, TNF- α , IL-6 및 IL-8 프로모터 활성의 생성이 감소됨을 확인하였다(도 7 참조).

[0079] 이러한 결과들을 통해, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린이 NF- κ B의 활성을 통해 RAW 264.7 세포 내의 염증 사이토카인의 생성을 유도함을 확인할 수 있었다.

[0080] <실험예 4>

[0081] 활성산소종에 의한 염증 사이토카인 생성의 유도

[0082] 염증 사이토카인은 활성산소종에 의한 NF- κ B의 활성화로 유도된다. 따라서, 활성산소종이 염증 사이토카인 생성에 관여하는지를 실험을 통해 확인하였다.

[0083] 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린이 활성산소종의 생성을 유도하는지에 대한 실험을 진행하였다. RAW 264.7 세포를 1시간 동안 10mM N-아세틸시스테인(N-acetylcystein, NAC)으로 전처리하고, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린 20 μ M를 처리한 후에 6시간 동안 배양하였다. 그리고 여기에 H₂DCF-DA(Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 처리한 한 후에 FACS 칼리버(Calibur)(BD biosciences)로 분석하였다. 그 결과, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린이 활성산소종의 생성을 유도함을 확인하였다(도 8).

[0084] 활성산소종이 염증 사이토카인을 생성시키는지에 대한 실험을 진행하였다. RAW 264.7 세포를 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린 20 μ M로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, TNF- α , IL-6 및 IL-8 프로모터 활성을 측정하였다. 그 결과, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 TNF- α , IL-6의 생성 및 IL-8 프로모터의 활성이 N-아세틸시스테인의 존재를 억제함을 확인할 수 있었다(도 9). 또한, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 활성산소종은 NF- κ B 경로를 활성화시키는 NF- κ B 루시퍼라제 리포터 평가를 통해 확인하였다(도 10).

[0085] NF- κ B가 세포질로부터 세포핵 내로 이동하는지를 확인하였다. RAW 264.7 세포에 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린 20 μ M을 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 그리고 항 P-65 항원(anti-P65 antibody)과 DAPI(4',6'-diamidine-2'-phenylindole)를 처리하였다. 그 결과, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린이 처리된 RAW 264.7 세포의 핵으로 NF- κ B p65가 이동됨을 확인하였다(도 11).

[0086] 이러한 결과들을 통해, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린이 활성산소종-NF- κ B의 활성 경로를 통해 염증 사이토카인을 유도함을 확인할 수 있었다.

[0087] <실험예 5>

[0088] MAPK 활성화에 의한 염증 사이토카인 생성의 유도

[0089] 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린으로 유도된 염증 사이토카인 생성과 MAPK 경로의 관련성을 확인하기 위해 MAPK 억제제의 존재 하에서 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 MAPK 활성을 평가하였다.

[0090] RAW 264.7 세포 각각에 JNK 억제제인 SP600125 2.5 μ M과 ERK1 및 ERK2 억제제인 U0126 0.5 μ M를 1시간 동안 전

처리하고, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린 20 μ M를 처리한 후에 24시간 동안 배양하였다. 그리고 TNF- α 및 IL-6의 생성을 측정하였다. 그 결과, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 TNF- α 및 IL-6의 생성은 JNK 억제제, ERK1 및 ERK2를 감소시키는 것을 확인하였다(도 12).

RAW 264.7 세포 각각을 SP600125와 U0126으로 1시간 동안 전처리한 후에 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린를 처리하고 2시간 동안 배양하였다. 인산화된 JNK 와 총 JNK의 발현 및 인산화된 ERK 와 총 ERK의 발현을 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 그 결과, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 키나제가 인화반응의 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 13).

활성산소종이 JNK 및 ERK의 인산화반응에 필요한지를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 N-아세틸시스테인 존재 하에 6-아세토닐-5,6-디히드로사쿠나린을 처리하고, 키나제의 인산화반응을 측정하였다. 그 결과, 활성산소종 스캐빈저(scavengers)는 JNK 및 ERK의 인산화반응을 완벽하게 억제함을 확인하였다(도 14).

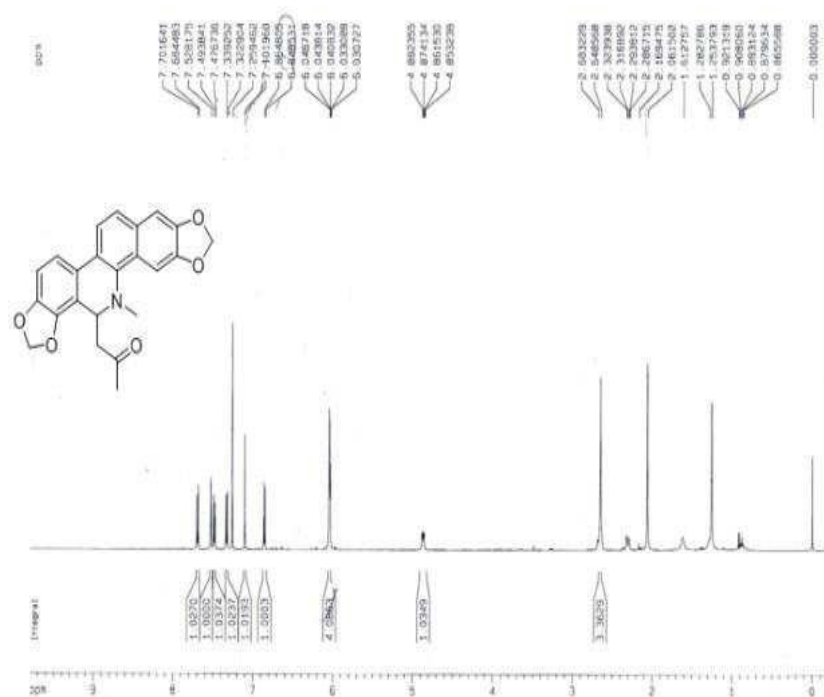
활성산소종이 전염증 사이토카인을 유도하기 위한 NF- κ B 활성화에 필요하다는 결과를 토대로, 활성산소종-JNK/ERK 경로가 어떻게 NF- κ B의 활성화에 영향을 미치는지 확인하였다. 각각의 키나제 억제제의 존재 하에서 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 NF- κ B 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 그 결과, SP600125 및 U0126는 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린에 의해 유도된 NF- κ B 활성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다 (도 15).

이러한 결과들을 통해, 6-아세토닐-5,6-디히드로상귀나린의 전염증 효과가 가 활성산소종-JNK/ERK-NF- κ B 활성 경로를 통해 나타남을 확인할 수 있었다.

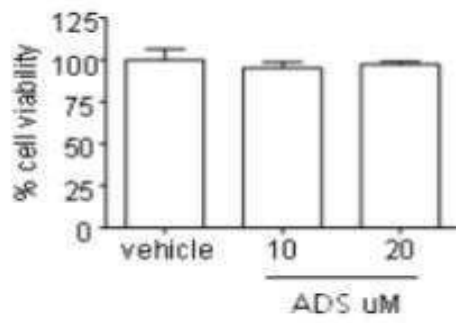
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

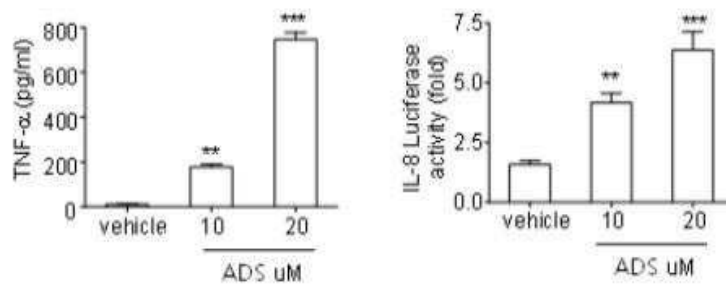
도면1



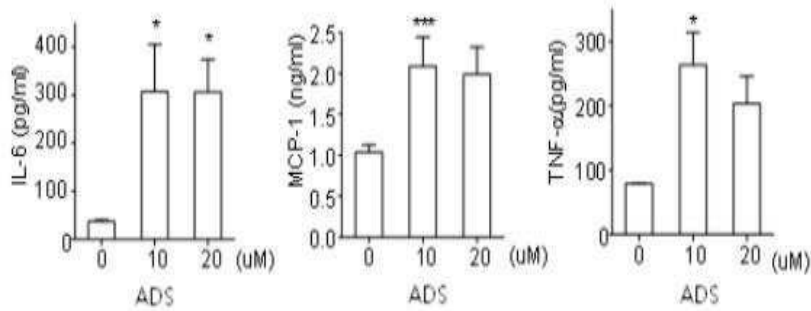
도면2



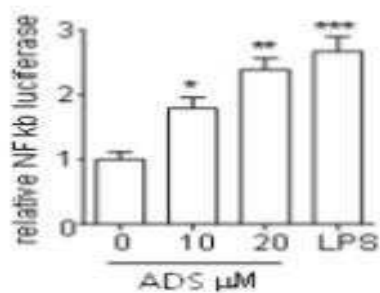
도면3



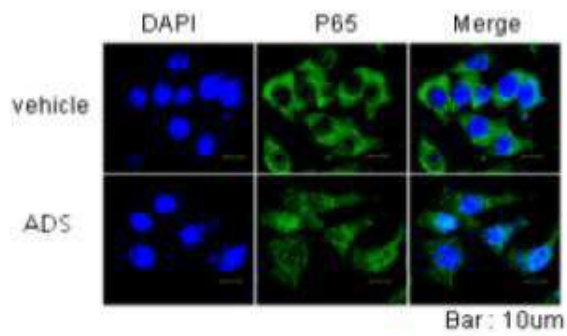
도면4



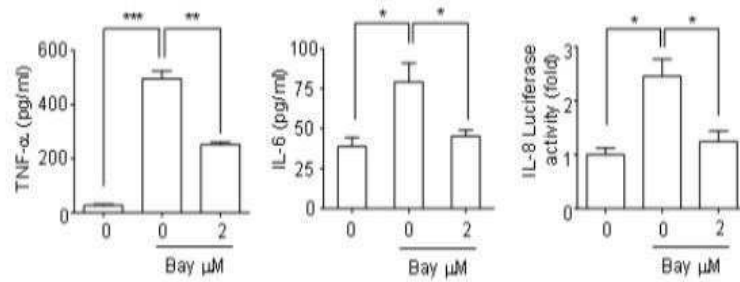
도면5



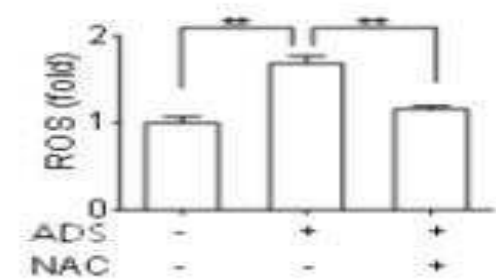
도면6



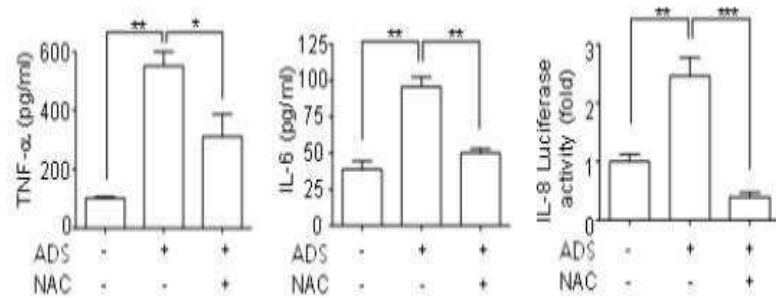
도면7



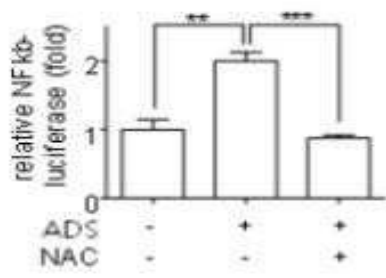
도면8



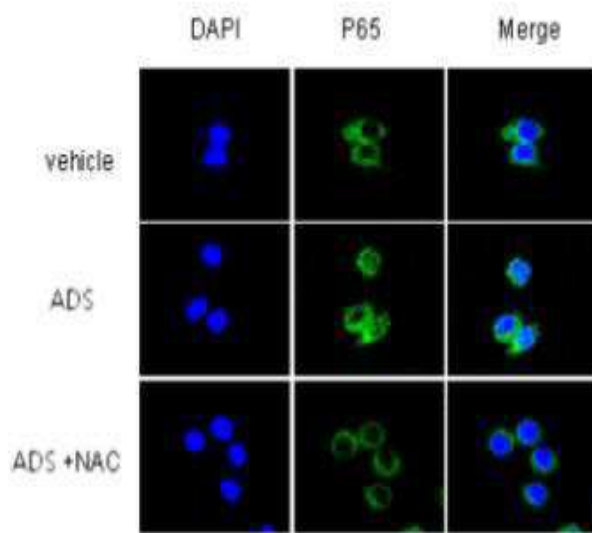
도면9



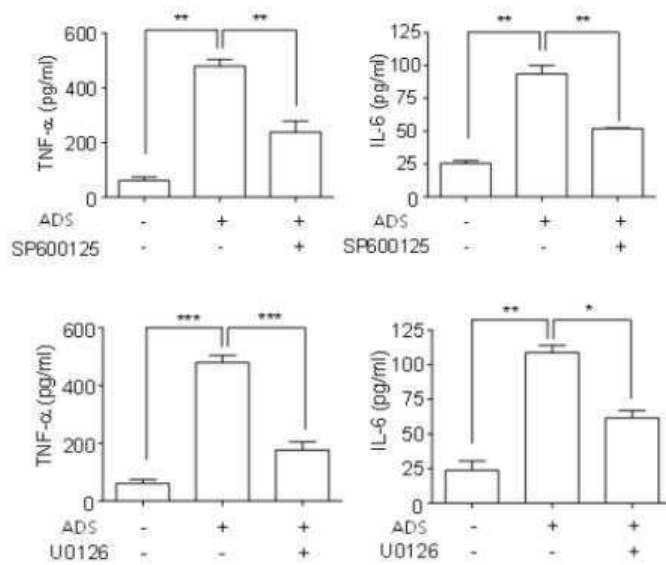
도면10



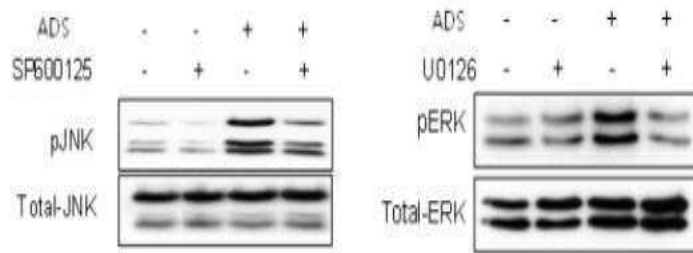
도면11



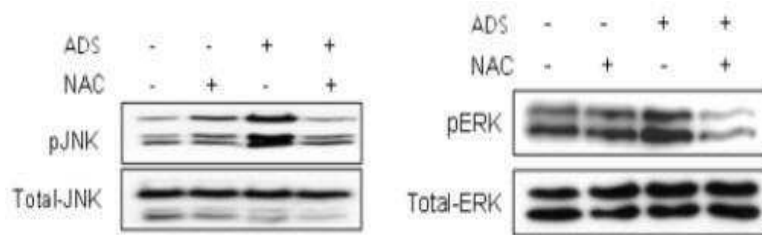
도면12



도면13



도면14



도면15

