

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0120545 (43) 공개일자 2012년11월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/12 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(21) 출원번호	10-2011-0038157	(72) 발명자 정혜광 대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)
(22) 출원일자	2011년04월25일	이광열 광주광역시 북구 매곡동 대성베르힐 104동 904호 (뒷면에 계속)
심사청구일자	2011년04월25일	(74) 대리인 백경업

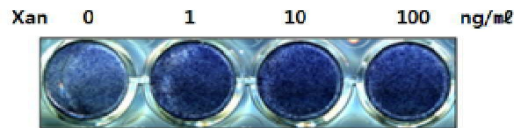
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 잔토희몰을 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 잔토희몰을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 상기 잔토희몰은 조골세포의 분화를 촉진하는 효과가 있어 골다공증을 비롯한 골질환의 치료에 효과적이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

황용필

대전광역시 유성구 문화원로 119, 707호 (봉명동, 봉명시티빌)

한은희

광주광역시 서구 화개1로 33, 호반 리센시빌 APT 206동 2009호 (금호동)

정형민

광주광역시 북구 호동로79번길 75, 석봉빌라 202호 (용봉동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090923

부처명 보건복지가족부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 길경과 갈근을 이용한 골 형성 촉진 및 골다공증 예방 기능성 식품 소재 개발

주관기관 충남대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

잔토휴몰(xanthohumol)을 유효성분으로 함유하는 것으로서 조골세포의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

잔토휴몰과 골흡수 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 골흡수 억제제는 비스포스포네이트(bisphosphonate), 에스트로젠(estrogen), 칼시토닌(calcitonin), 비타민 D(vitamin D), 칼슘(calcium), 불소(fluoride), 단백질 동화 스테로이드(anabolic steroid) 및 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone)으로 이루어진 군에서 한가지 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

잔토휴몰을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료를 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 잔토휴몰을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뼈(骨)는 우리 몸에서 물리적 지지체로서, 몸의 형태와 관절을 유지하고, 중요한 장기를 외부의 충격으로부터 보호하며, 칼슘, 인의 저장소로서 무기질이 몸에서 부족하거나 증가할 때 일정한 농도로 유지시켜주는 역할을 한다. 또한, 뼈도 다른 장기와 마찬가지로 신진대사가 활발하게 일어나는데, 신체가 성장할 때에는 뼈가 길어지고 굽어지며, 성장이 멈춘 후에는 노후된 뼈가 파골세포(破骨細胞)에 의해 제거되고, 뼈가 제거된 곳에서 조골세포(造骨細胞)에 의해 다시 새로운 뼈가 생성되는 반응이 일생동안 진행된다. 이와 같은 뼈의 제거, 뼈의 흡수, 흡수된 뼈의 재생(remodeling) 등의 균형의 신진대사에 의해 우리 몸의 뼈가 유지되는 것이다.

[0003] 그러나, 파골세포와 조골세포의 형성 속도에 균형이 깨져서, 뼈의 재흡수가 뼈의 재생보다 빠르게 되면, 뼈의 증가보다 더 빠른 속도로 뼈 손실이 발생하여, 뼈의 크기가 감소하게 되는데, 이러한 뼈의 신진대사성 질환을 골다공증(osteoporosis)이라 한다.

[0004] 흔히, 골다공증은 점차적으로 골 조직의 석회화 감소되면서, 골밀도가 낮아져 결국 골수강(骨髓腔)이 넓어지는 상태를 말하며, 골조직의 퇴행(micro-architectural deterioration of bone tissue)으로 발생한다(Kumar and Clark, 2002, Kanis and Gluer, 2000). 골다공증 증상이 계속되면 골수강이 넓어진 상태가 계속 진행되어, 뼈가 약해지면서 작은 충격에도 쉽게 골절(骨折)이 되는 증상이 나타나며, 요통, 견통, 등걸림, 관절통 및 무기력 증상이 나타난다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요

인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다. 한편 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준(bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14~18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 에스트로젠 농도가 급속히 감소하는 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다.

[0005] 이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다. 또한, 전세계적으로 골질환 치료와 관련되어 시장 규모가 점차 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.

[0006] 골다공증을 예방 및 치료하기 위해 비스포스포네이트[bisphosphonate](Ferguson, 2004), 에스트로젠(estrogen), 칼시토닌[calcitonin], 비타민 D, 칼슘 등이 사용되며, 불소[fluoride], 단백질 동화 스테로이드[anabolic steroid], 부갑상선 호르몬[parathyroid hormone, teriparatide](Bilezikian *et al.*, 2005) 등의 다양한 단백질 동화제(anabolic agent) 등이 사용되어 왔다(Bilezikian *et al.*, 2005). 그러나 이러한 약제들을 사용하는 치료 방법에는 골다공증 치료효과와 별개로 여러 가지 부작용이 수반되기도 하는데, 예를 들어, 골다공증을 치료하기 위해 장기간에 걸쳐 에스트로젠(estrogen)을 사용하면, 골다공증 증상이 개선되고, 폐경기 증상 및 심혈관계 이상 증상이 완화되지만, 장기간의 호르몬 치료로 인해 유방암과 자궁내막암의 가능성이 증가될 수 있다(Grodstein *et al.*, 1997, Gustafsson and Warner, 2000). 따라서, 고효율의 골밀도 회복 효과가 있으면서도 이러한 부작용이 없는 새로운 치료제가 요구되고 있는 실정이다. 한편, 콩, 홉(hop), 포도, 포도주 등으로부터 분리한 여러 가지의 식물 유래의 화합물이 골다공증 치료효과가 있는 것으로 확인된 바 있으며, 에스트로젠을 사용할 때와 같은 부작용이 거의 없거나 적은 것으로 나타났다. 이에 대한 한 예로, 콩 유래의 이소플라본(isoflavone)은 폐경기 전후의 여성의 골손실을 지연시키는 것으로 잘 알려져 있고(Alekel *et al.*, 2000, Potter *et al.*, 1998, Clifton-Bligh PB *et al.*, 2001), 콩 유래의 이소플라본인 제니스테인(genistein)은 골흡수를 저해하고 골 형성을 자극한다고 알려져 있다(Li and Yu, 2003, Chen *et al.*, 2003). 최근의 연구는 포도 또는 포도주로부터 분리된 시린게틴(syringetin)이 BMP2/ERK 1/2 신호전달을 통해 조골세포의 분화를 유도한다고 제안하였다(Hsu *et al.*, 2009).

[0007] 잔토희몰은 프레닐레이티드 찰콘(prenylated chalcone) 계열의 화합물이며, 홉(hop, *Humulus lupulus L*)에서 추출되는 주요 프레닐플라보노이드(prenylflavonoid) 중의 하나이다.

[0008] 본 발명에서는 상기 잔토희몰이 RUNX2(a member of the Runt family of transcription factors, Van Wijnen *et al.*, 2004)의 발현을 증진시켜 골세포 생성에 영향을 주는 것을 확인한다. RUNX2는 뼈의 생성에 가장 중요한 골형성 마스터 유전자 중의 하나이다. RUNX2의 활성화는 다양한 외부 신호전달로 조절이 된다. 인산화작용, 아세틸화, 단백질 분해작용(ubiquitination) 등이 이에 대한 활성화와 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Bae and Lee, 2006). RUNX2는 조골세포 분화 및 뼈의 생성에 가장 중요한 조절인자이며 RUNX2 유전자를 제거한 마우스(RUNX2 knockout mice)는 조골세포의 성숙과정이 지연되어, 막 내 및 연골의 골화 작용이 중단되는 것이 확인되었다(Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997). 또한 RUNX2는 조골세포에 특이적인 ALP(alkaline phosphatase), OC(osteocalcin), OP(osteopontin), 제1형 콜라겐(type I collagen) 등의 다양한 유전자의 발현을 조절한다(Banerjee *et al.*, 1997; Ducky *et al.*, 1997). 성숙한 조골세포에서 RUNX2의 발현이 억제(expression of a dominant negative RUNX2)되면 조골세포의 활성화하로 뼈의 생성과 뼈의 밀도가 심각하게 줄어드는 것으로 확인되었다(Ducky *et al.*, 1999). 인간 RUNX2 유전자의 돌연변이로는 쇄골두개골 형성이상(cleidocranial dysplasia, CCD), 빗장뼈(clavicle)의 결손, 개방형 솜구멍(open fontanelles), 여분의 치아생성(supernumerary teeth), 단신(short stature) 등으로 대표되는 상염색체우성질환(autosomal dominant disease) 등이 있다(Mundlos *et al.*, 1997). RUNX2[+/-] 이형 접합체의 유전자를 가진 마우스(RUNX2[+/-] heterozygous mice)에서 전형적인 쇄골두개골 형성이상 증상인 빗장뼈의 발육부진(hypoplasia of the clavicle), 막 뼈(membranous bones) 발달의 지연 등이 보고되었으며(Ducky *et al.*, 1997) 사람에게도 비슷한 양상이 나타나는 것이 확인되었다(Mundlos *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997). RUNX2의 타겟유전자로는 전사인자(transcriptional factor)인 OC(osteocalcin), ALP(alkaline phosphatase), OSE(osteoblast specific element), 콜라겐(collagen), BSP(bone sialoprotein) 등이 있으며, 상기 유전자들도 RUNX2와 더불어 대표적인 조골세포분화 마커로 알려져 있다.

[0009] 한편, 잔토희몰은 에스트로제닉 활성(estrogenic activity)이 거의 없다고 알려져 있으며(Milligan *et al.*, 2000), 잔토희몰이 골 흡수 억제 능력을 가지고 있음이 개시된 바 있지만(Tobe *et al.*, 1997, 미국등록특허 제

5679716호, 미국공개특허 제2010-93678호), 상기 잔토휴몰이 골분화에 어떠한 영향을 주는지는 아직 밝혀진 바가 없다.

[0010] 이에 따라, 본 발명자들은 잔토휴몰을 이용하여 연구를 진행하던 중, 잔토휴몰이 조골세포 분화를 유도하는 활성을 나타내며, 상기 잔토휴몰이 기존의 골다공증 치료제와 병용사용시에 기존 치료제 또는 잔토휴몰을 단일로 사용하는 것보다 현저한 골흡수 억제 효과가 있어, 잔토휴몰이 종래와 차별화된 골다공증 예방제 또는 치료제로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

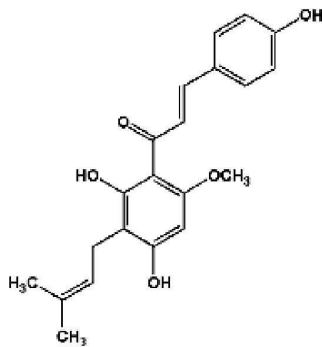
해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 잔토휴몰을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 하기 화학식 1의 잔토휴몰을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 본 발명에서 잔토휴몰은 홉(hop, *Humulus lupulus* L)에서 추출하여 사용할 수 있으며, 화학적으로 합성한 잔토휴몰(xanthohumol)을 사용할 수도 있다.

[0016] 상기 잔토휴몰은 RUNX2(a member of the Runt family of transcription factors)의 발현을 증진시켜 조골세포 분화를 유도하는 활성을 나타낼 수 있다.

[0017] 본 발명에서는 잔토휴몰과 기존의 골다공증 치료제를 병용사용함으로써 골흡수 억제 효과를 증강시킬 수 있다.

[0018] 상기 기존의 골다공증 치료제로는 파골세포의 골흡수 억제제로 사용되는 비스포스포네이트(bisphosphonate), 에스트로젠(estrogen), 칼시토닌(calcitonin), 비타민 D(vitamin D), 칼슘(calcium), 불소(fluoride), 단백질 동화 스테로이드(anabolic steroid) 및 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone)으로 이루어진 군에서 한가지 이상 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명에 따른 잔토휴몰을 포함하는 약학조성물은, 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. 잔토휴몰을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0020] 상기 잔토휴몰의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 잔토휴몰 화합물은 쥐, 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 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 잔토휴몰 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 건강기능식품으로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품 등이 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 잔토휴몰을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 상기 잔토휴몰이 조골세포 분화를 촉진하는 효과가 있고 기존 골다공증 치료제와 병용사용함으로써 골다공증을 비롯한 골질환의 치료 효과가 증강되는 것이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 MC3T3-E1 세포에 잔토휴몰을 처리하여 ALP 활성을 측정한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2는 MC3T3-E1 세포에 BMP2와 잔토휴몰을 처리하여 미네랄이 생성되는 것을 본 코사 염색법으로 측정한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 MC3T3-E1 세포에 BMP2와 잔토휴몰을 처리하여 미네랄이 생성되는 것을 알리자린 레드 S 염색법으로 측정한 결과를 나타내는 사진이다.

도 4는 C2C12 세포에 BMP2와 잔토휴몰을 처리하여 ALP, 콜라겐, BSP, OC에 대한 RT-PCR을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 OC-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토휴몰을 처리한 후 OC의 활성을 루시퍼레이스 어레이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 ALP-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토휴몰을 처리한 후 ALP의 활성을 루시퍼레이스 어레이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 BSP-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토휴몰을 처리한 후 BSP의 활성을 루시퍼레이스 어레이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 OSE-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토휴몰을 처리한 후 OSE의 활성을 루시퍼레이스 어레이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 OC-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토휴몰을 처리한 후 OC의 활성을 루시퍼레이스 어레이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토휴몰을 처리하여 HA(hemagglutinin)의 발현을 확인(RUNX2의 발현 확인)한 웨스턴 블롯 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드 및 ALP-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토휴몰을 처리한 후 ALP의 활성을 루시퍼레이스 어레이를 이용하여 확인한 결과를 나타

내는 그래프이다.

도 12는 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드 및 OC-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토희몰을 처리한 후 OC의 활성을 루시퍼레이즈 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드 및 BSP-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토희몰을 처리한 후 BSP의 활성을 루시퍼레이즈 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드 및 OSE-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 잔토희몰을 처리한 후 OSE의 활성을 루시퍼레이즈 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0025] <실시예 1 : 잔토희몰의 조골세포 분화능 확인>

[0026] 1-1. 세포배양 및 시료처리

[0027] 본 발명에서 사용한 잔토희몰(xanthohumol)은 시그마알드리치사(Sigma Aldrich Co. [St. Louis, MO, USA])에서 구입한 것을 사용하였다.

[0028] 본 발명에서는 조골세포의 분화, 증식 및 활성을 확인하기 위해 통상적으로 사용되는 C2C12 세포(마우스 간엽줄기세포, mesenchymal stem cell line)와 MC3T3-E1 세포(조골세포주)를 사용하였다.

[0029] C2C12 세포와 MC3T3-E1는 10% 또는 20%의 FBS(Fetal Bovine Serum), 항생제(100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin), 항진균제(amphotericin B)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여, 37℃ 및 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 본 발명에 사용된 C2C12 세포는 간엽줄기세포로서, 태아의 중배엽 결합조직에 해당되는 간엽줄기세포는 조골세포, 지방세포 등으로 분화가능한 것으로 알려져 있다.

[0030] 뼈 결절(bone nodule)의 형성을 확인하기 위해, MC3T3-E1 세포는 무기인산(inorganic phosphate)이 제공되도록 400 µM의 아스코르브산(ascorbic acid), 5mM β-글리세로포스파테이트(β-glycerophosphate)가 첨가된 분화촉진 배지(osteogenic medium)에 배양하였다.

[0031] 1-2 : ALP 염색

[0032] 잔토희몰의 조골세포 분화능력을 확인하기 위해 MC3T3-E1 세포를 분화촉진 배지에서 배양하면서 잔토희몰(1, 10, 100ng/ml)을 처리하여 7일 동안 배양한 후, ALP 염색(alkaline phosphatase staining, Promega[Sunnyvale, CA]제품 사용)을 수행하였다. 대조군에는 잔토희몰의 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 잔토희몰과 동일한 부피로 처리하였다.

[0033] ALP 염색을 하기 위해서 Promega에서 제조한 BCIP/NBT 용액(BCIP/NBT color development substrate)을 이용하여 으며 이에 대한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0034] 도 1의 결과를 참고하면 대조군보다 잔토희몰을 처리한 세포에서 ALP의 발현이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있다.

[0035] * ALP(alkaline phosphatase) : 조골세포의 초기 분화 마커(marker)

[0036] 1-3 : 본 코사 염색

[0037] 잔토희몰의 조골세포 분화능력을 확인하기 위해 뼈 생성을 위한 무기질의 침착(mineralization) 현상을 확인할 수 있는 본 코사 염색(von Kossa staining)을 수행하였다.

[0038] 이를 위해 MC3T3-E1 세포를 분화촉진 배지에서 배양하면서 BMP2(5ng/ml)와 잔토희몰(1, 10, 100ng/ml)을 처리한 후 18일 동안 배양하였다. 대조군 및 BMP2만을 처리한 군에는 잔토희몰의 용매인 DMSO를 잔토희몰과 동일부피로

처리하였으며, BMP2의 용매인 DMEM 세포배양 배지를 대조군에 BMP2와 동일한 부피로 처리하였다.

- [0039] 이 후, 본 코사 염색을 위해서는 세포는 2% PFA(2% paraformaldehyde)로 세포 고정(fixation)을 하고, 수화시킨 후, 5% 질산화은 용액(5% Silver nitrate solution)으로 1시간 동안 반응시키고 다시 물로 씻어냈으며, 이후 티오황산용액(thiosulfate solution)을 5분간 반응시켰다. 마지막으로 핵 염색(nuclear fast red stain)을 한 뒤 물로 세척하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0040] 상기 도 2의 결과를 참조하면, 대조군 또는 BMP2만을 처리한 세포보다 잔토크몰 및 BMP2를 동시에 처리한 세포에서 뼈 생성을 위한 무기질의 침착(mineralization) 현상이 활발하게 진행되고 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0041] * von Kossa staining : 뼈의 칼슘 노즐(nodule)을 염색함
- [0042] * BMP2(bone morphogenetic protein 2) : 뼈의 생성을 촉진함
- [0043] **1-4 : 알리자린 레드 S 염색**
- [0044] 상기 본 코사 염색 이외에도, 뼈 생성을 위한 무기질의 침착(mineralization) 현상을 확인할 수 있는 알리자린 레드 S 염색(Alixarin red S staining)을 수행하였다.
- [0045] 알리자린 레드 S 염색을 위해 MC3T3-E1 세포를 분화촉진 배지에서 배양하면서 BMP2(5ng/ml)와 잔토크몰(1, 10, 100ng/ml)을 14일 동안 처리하였다. 대조군 및 BMP2만을 처리한 군에는 잔토크몰의 용매인 DMSO를 잔토크몰과 동일부피로 처리하였으며, BMP2의 용매인 DMEM 세포배양 배지를 대조군에 BMP2와 동일한 부피로 처리하였다.
- [0046] 본 코사 염색을 위해서는 세포는 4% PFA(4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4)로 세포 고정(fixation)을 하고, 고정된 세포는 0.1% 알리자린 레드 S 용액으로 60분간 염색하였고, 상기 결과는 도 3에 나타내었다. ALP 염색, 본 코사 염색, 알리자린 레드 S 염색 결과의 모든 이미지는 니콘 카메라로 촬영하였다.
- [0047] 도 3의 결과를 참조하면, 대조군 또는 BMP2만을 처리한 세포보다 잔토크몰 및 BMP2를 동시에 처리한 세포에서 뼈 생성을 위한 무기질의 침착(mineralization) 현상이 활발하게 진행되고 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0048] **1-5 : RT-PCR**
- [0049] 잔토크몰이 골생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 조골세포 분화 및 발현 유전자인 ALP(alkaline phosphatase), 콜라겐(collagen I-a), BSP(bone sialoprotein), OC(osteocalcin)의 발현을 확인하였다.
- [0050] 이를 위해 C2C12 세포에 하기 조건으로 BMP2(5ng/ml)와 잔토크몰(1, 20 μ g/ml)을 3일 동안 처리하였다. 대조군 및 BMP2만을 처리한 군에는 잔토크몰의 용매인 DMSO를 잔토크몰과 동일부피로 처리하였으며, BMP2의 용매인 DMEM 세포배양 배지를 대조군에 BMP2와 동일한 부피로 처리하였다.
- [0051] C2C12 세포의 총 RNA는 트라이졸 용액(TRIZOL reagent, Invitrogen, [Carlsbad, CA, USA])을 이용하여 추출하였으며, Invitrogen에서 제조된 랜덤 프라이머(Random primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 1 μ g의 RNA로 cDNA를 합성하였다.
- [0052] PCR 증폭은
- [0053] ① [denaturation] : 94 $^{\circ}$ C, 1분
- [0054] ② 28-30 사이클(cycle)
- [0055] [denaturation] : 94 $^{\circ}$ C, 30초
- [0056] [annealing] : 각각의 프라이머마다 다른 온도로 30초
- [0057] [extension] : 72 $^{\circ}$ C, 30초
- [0058] ③ [extension] : 72 $^{\circ}$ C, 5분
- [0059] 의 조건으로 수행하였으며, 프라이머(primer)의 염기서열 조건은 하기와 같았고, 상기 RT-PCR 결과는 도 4에 나타냈다.
- [0060] * ALP
- [0061] forward 5' -GAT CAT TCC CAC GTT TTC AC-3'

- [0062] reverse 5' -TGC GGG CTT GTG GGA CCT GC-3'
- [0063] * 콜라겐
- [0064] forward 5' -TCT CCA CTC TTC TAG GTT CCT-3'
- [0065] reverse 5' -TTG GGT CAT TTC CAC ATG C-3'
- [0066] * BSP
- [0067] forward 5' -ACA CTT ACC GAG CTT ATG AGG-3'
- [0068] reverse 5' -TTG CGC AGT TAG CAA TAG CAC-3'
- [0069] * OC
- [0070] forward 5' -CTC CTG AGT CTG ACA AAG CCT T-3'
- [0071] reverse 5' -GCT GTG ACA TCC ATT ACT TGC-3'
- [0072] * GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - housekeeping gene으로 internal control로 사용됨)
- [0073] forward 5' -ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
- [0074] reverse 5' -TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
- [0075] 도 4를 참고하면, C2C12 세포에 BMP2와 잔토크몰을 처리한 세포는 조골세포 발현 마커들이 모두 강하게 발현하고 있는 것으로 확인되었다.
- [0076] **1-6 : 루시퍼레이즈 어세이 - I**
- [0077] 잔토크몰의 조골세포에 대한 분화능력을 확인하기 위해 루시퍼레이즈 어세이를 이용하여, 조골세포 분화 마커인 OC, ALP, BSP, OSE의 활성을 확인하였다(상기 조골세포 분화 마커는 RUNX2 유전자의 타겟 유전자이기도 함).
- [0078] 루시퍼레이즈 유전자를 세포내로 삽입(트랜스펙션 수행함)하기 위한 OSE-promotor(luc pGL3-12-OS- luc) 플라스미드는 pGL3-luciferase(Promega)의 다중 클로닝 사이트(multiple cloning site)에 RUNX 결합 사이트(12 tandem repeats of the RUNX binding site, AACCACA)를 삽입하여 제작하였으며 OC-promoter-Luc 플라스미드와 BSP-promoter-Luc 플라스미드는 전남대학교에서 제공받았다.
- [0079] 루시퍼레이즈 어세이(luciferase assay)를 위해 C2C12 세포는 유전자(reporter construct)의 트랜스펙션 전 24 시간 동안 24-웰 플레이트에서 배양하였다.
- [0080] ALP-promoter-Luc, OC-promoter-Luc, BSP-promoter-Luc, OSE-promoter-Luc 플라스미드의 트랜스펙션(transient transfection)은 인산화칼슘(calcium phosphate)이나 리포펙타민 플러스(Lipofectamine PLUS)를 이용하여 수행하였고, 트랜스펙션 효율은 pCMV β -갈락토시다아제(pCMV β -galactosidase)로 보정하였다.
- [0081] 잔토크몰(10, 100, 1000ng/ml)은 트랜스펙션 후 C2C12 세포에 36시간 동안 처리하였다. 대조군에는 잔토크몰의 용매인 DMSO를 잔토크몰과 동일한 부피로 처리하였다(도 5 내지 도 8 참조). 또한 잔토크몰 1 μ g/ml을 시간별(0.5, 1, 4, 6, 8시간)로 처리하기도 하였다(도 9 참조)
- [0082] 이 후, 트랜스펙션을 수행한지 36시간 이후 세포를 용해하여 Promega에서 제작된 키트를 이용하여 각각의 유전자에 대한 루시퍼레이즈의 활성을 확인하였고 각각의 결과는 도 5 내지 도 9에 나타내었다.
- [0083] 도 5 내지 도 9를 참고하면, 잔토크몰의 처리로 C2C12 세포에서 각각의 조골세포 마커들의 활성이 잔토크몰의 처리 농도 또는 시간 의존에 의존해서 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [0084] **1-7 : 웨스턴 블롯**
- [0085] 잔토크몰이 RUNX2의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화를 유도하는 것을 확인하기 위해, RUNX2 유전자를 삽입한 세포를 제작하였다. RUNX2 발현 플라스미드는 pCS4-3HA(CMV promoter-derived mammalian expression vector)에 RUNX2 전체 유전자를 삽입하여 제작하였다. 또한 상기 플라스미드로 유입되는 RUNX2가 잘 발현하는지 확인하기 위해 RUNX2 전체 유전자에 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)을 결합시켜 상기 플라스미드를 제작하였다.
- [0086] 이 후, HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드를 이용하여 트랜스펙션을 수행하였으며, 잔토크몰(20 μ g/ml)은 트랜스펙션 직후 C2C12 세포에 48시간 동안 처리하였다. 대조군에는 잔토크몰의 용매인 DMSO

를 잔토평물과 동일한 부피로 처리하였다.

[0087] 웨스턴 블롯을 수행하기 위해, 잔토평물을 처리한 세포를 파쇄하여 단백질을 추출한 후, 이를 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하고, PVDF 멤브레인으로(PVDF membrane) 이동시켰다. 이후 트랜스페션으로 외부에서 주입된 RUNX(HA-tag) 유전자의 발현을 확인하기 위해 멤브레인을 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 1차 항체와 반응시키고 다시 2차 항체와 반응시켰으며 이에 대한 결과는 전용키트(chemiluminescence kit, Bio-Rad)를 이용하여 확인하였고 상기 결과는 도 10에 나타내었다.

[0088] 도 10을 참조하면, HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드를 트랜스페션하고 동시에 잔토평물을 처리한 C2C12 세포에서 RUNX2 단백질의 발현이 현저하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었으며(tubulin은 housekeeping gene으로 internal control로 사용됨), 이로 인해 잔토평물이 RUNX2의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화를 유도한다는 것을 알 수 있었다.

[0089] 1-8 : 루시퍼레이즈 어세이 - II

[0090] 잔토평물이 RUNX2의 타겟유전자인 ALP, OC, BSP, OSE의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해, 상기 실시예 1-6의 조건과 동일하게 트랜스페션을 수행하되, HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 실시예 1-6의 RUNX2 발현 플라스미드와 OC-promoter-Luc, ALP-promoter-Luc 또는 OSE-promoter-Luc의 플라스미드를 각각 C2C12 세포에 트랜스페션하였다. 여기에 잔토평물(10, 100, 1000ng/ml)을 처리하여 RUNX2가 발현된 상태에서의 조골세포 분화 마커인 ALP, OC, BSP, OSE의 루시퍼레이즈 활성을 확인하였다. 대조군 및 RUNX2 비교군에는 조사포닌 분획물의 용매인 DMSO를 잔토평물과 동일한 부피로 처리하였다. 또한 대조군에는 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드가 없는 빈 벡터인 pCS4-3HA(CMV promoter-derived mammalian expression vector)를 트랜스페션하였다.

[0091] ALP-promoter-Luc, OC-promoter-Luc, BSP-promoter-Luc, OSE-promoter-Luc의 플라스미드는 실시예 1-6의 플라스미드를 트랜스페션에 사용하였으며, RUNX2 발현 플라스미드는 실시예 1-7의 플라스미드를 사용하였다. 트랜스페션은 실시예 1-6의 방법으로 수행하였다. 잔토평물(10, 100, 1000ng/ml)은 트랜스페션 후 C2C12 세포에 36시간 동안 처리하였고, 트랜스페션 수행 36시간 후에 세포를 파쇄하여 루시퍼레이즈 어세이를 수행하였으며 이에 대한 결과는 도 11 내지 도 14에 나타내었다.

[0092] 도 11 내지 도 14의 결과를 참고하면 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드를 트랜스페션하고 동시에 잔토평물을 처리한 C2C12 세포에서는 대조군에 비해 OC, ALP, OSE의 활성이 각각 현저하게 증가하였기에, 잔토평물이 RUNX2의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화에 영향을 주는 것임을 확인할 수 있다.

[0093] <실시예 2 : 잔토평물과 기존 골다공증 치료제와의 병용사용 효과 확인>

[0094] 2-1 : 난소절제 쥐의 골밀도에 미치는 효과

[0095] 10주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫트([주] 샘타코 바이오 코리아)를 구입하여 사용하였고, 랫트(rat)는 4일간의 환경 적응을 시킨 후에 난소를 절제한 후 봉합하였다(난소 적출군). 수술 후에는 실내 온도를 25℃로 유지하여 회복을 빠르게 하였다.

[0096] 난소 비적출군은 상기 난소 적출군과 같은 스트레스를 주기 위하여 개복 후 난소를 복강 외부로 노출시킨 후, 난소 적출 시 소요되는 시간이 경과 후 다시 봉합하였다(겉보기 수술군). 수술 후 4일간 회복기간을 후 난소 적출군과 난소 비적출군(각 15두)은 각각의 처리군에 배치하였다. 잔토평물 및 비타민 D와 비스포스포네이트는 4-8 mmol/kg을 4일 간격으로 복강 투여하였다.

[0097] 총 시험기간은 46일로 수술 후 회복기간 4일과 실험기간 6주로 구성하였다. 실험기간의 종료 후 경추 분리하여 랫트를 희생시키고, 대퇴골을 채취하였으며 110℃ 건조 오븐에서 3일간 건조하였다. 대퇴골의 무게와 길이는 저울과 버니어캘리퍼스(vernier calipers)를 이용하여 측정하였으며 BMD(bone mineral density)와 BMC(bone mineral content)는 dual energy X-ray absorptionmetry(DEXA, Norland, USA)를 이용하여 측정하였으며, 상기 분석 결과는 표 1에 나타내었다. 표 1에서 나타나는 바와 같이, 난소 적출군은 겉보기 수술군보다 유의적으로 낮은 골밀도를 나타내어 골다공증이 유발되었음을 나타냈다. 한편, 잔토평물과 비타민 D 및 비스포스포네이트를 병용투여한 군에서 골밀도가 겉보기 수술군과 유사한 수준으로 유지되는 것을 확인함으로써, 잔토평물과 기존 골다공증 치료제인 비타민 D 또는 비스포스포네이트의 병용사용 효과가 입증되었다. 그러나, 비타민 D 및 비스포스포네이트를 병용사용한 군에서는 각각의 화합물을 단일로 사용한 군보다 유의적인 증가효과가 나타나지 않았기에 이러한 병용사용으로 인한 상승효과는 잔토평물의 특징인 것으로 사료된다.

표 1

[0098]

투여 조건	BMD(mg/cm ²)	BMC(mg)
겔보기 수술군	115.9	151.6
난소 적출군	102.7	131.5
잔토휴물 8mmol/kg	109.6	137.4
비타민 D 8mmol/kg	107.5	135.5
비스포스포네이트 8mmol/kg	108.8	134.3
잔토휴물 8mmol/kg + 비타민 D 8mmol/kg	114.4	150.4
잔토휴물 4mmol/kg + 비타민 D 4mmol/kg	115.5	145.5
잔토휴물 8mmol/kg + 비스포스포네이트 8mmol/kg	114.6	149.6
잔토휴물 4mmol/kg + 비스포스포네이트 4mmol/kg	113.7	147.7
비타민 D 8mmol/kg + 비스포스포네이트 8mmol/kg	108.3	137.3
비타민 D 4mmol/kg + 비스포스포네이트 4mmol/kg	107.2	138.2

[0099]

2-2 : 난소절제 쥐의 골강도에 미치는 효과

[0100]

실시에 2-1에서 설명된 방법에 따라 동물실험을 실시한 후 대퇴골의 파괴 강도를 Texture analyzer(Stable microsystem, TA-XT2, USA)로 측정하였다. 골강도 측정은 3부분 지지 굴곡시험(three point bending test)법을 이용하였으며 골에 힘이 가해져 골절된 부분의 파단강도와 파단변위를 분석하였다. 대퇴골을 파단할 때는 지점 간의 길이를 1cm로 하였으며, 대퇴골 길이의 1/2 지점에 골전면 및 골중심부로 압력이 가해지도록 하였다.

[0101]

압력이 가해지는 속도는 0.1mm/sec로 하였으며 가해지는 하중은 20 Kg으로 하였다. 대퇴골의 강도는 대퇴골이 절단 될 때의 최대 힘(N)으로 표현하였으며, 상기 분석의 결과를 표 2에 나타내었다. 표 2에서 나타나는 바와 같이, 난소 적출군은 겔보기 수술군보다 유의적으로 낮은 파괴강도를 나타내어 골의 약화 경향을 나타냈다. 이와 같은 경향은 골다공증의 유발시 골밀도가 감소함으로써 골절이 일어나기 쉬워지는 현상을 반영하는 것이다. 난소적출 후 잔토휴물, 비타민 D, 비스포스포네이트를 실시에 2-1과 동일한 조건으로 6주간 복강주사하였다. 상기 결과는 표 2에 나타내었는데, 표 2를 참고하면, 잔토휴물과 비타민 D 및 비스포스포네이트를 병용투여한 군에서 골강도가 겔보기 수술군과 유사한 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 한편, 비타민 D 및 비스포스포네이트를 병용사용한 군에서는 각각의 화합물을 단일로 사용한 군보다 유의적인 증가효과가 나타나지 않았기에 이러한 병용사용으로 인한 상승효과는 잔토휴물의 특징인 것으로 사료된다.

표 2

[0102]

투여 조건	골 파괴 강도(N)
겔보기 수술군	12323.3
난소 적출군	9434.3
잔토휴물 8mmol/kg	10234.6
비타민 D 8mmol/kg	10023.4
비스포스포네이트 8mmol/kg	10063.5
잔토휴물 8mmol/kg + 비타민 D 8mmol/kg	12132.2
잔토휴물 4mmol/kg + 비타민 D 4mmol/kg	12043.6
잔토휴물 8mmol/kg + 비스포스포네이트 8mmol/kg	12245.6
잔토휴물 4mmol/kg + 비스포스포네이트 4mmol/kg	12135.5
비타민 D 8mmol/kg + 비스포스포네이트 8mmol/kg	10978.6
비타민 D 4mmol/kg + 비스포스포네이트 4mmol/kg	10954.6

[0103]

<실시에 3 : 독성시험>

[0104]

3-1 : 경구투여

[0105]

ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 5개의 군으로 나누어 잔토휴물을 각각 0, 2, 10, 20 및 50μg/kg의 용량으로 경구 투여한 후 2주간 독성여부를 관찰한 결과, 5개의 군에서 모두 생존하였다.

[0106]

3-2 : 복강투여

[0107]

ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 5개의 군으로 나누어 잔토휴물을 각각 0, 2, 10, 20 및 50μg/kg의 용량으로 복강

투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰한 결과 5개의 군에서 모두 생존하였다.

[0108] 이상의 결과에서 잔토휴물은 급성독성이 거의 없음을 확인하였다.

[0109] <사용예 1 : 약학적 제제예>

[0110] 1-1 : 정제의 제조

[0111] 잔토휴물 20g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0112] 1-2 : 주사액제의 제조

[0113] 잔토휴물 2g을 증류수에 용해시켜서 100mℓ를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0114] <사용예 2 : 식품 제제예>

[0115] 2-1 : 조리용 양념의 제조

[0116] 잔토휴물을 0.2~10 중량%로 하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0117] 2-2 : 밀가루 식품의 제조

[0118] 잔토휴물을 0.1~5.0 중량%로 하여 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0119] 2-3 : 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0120] 잔토휴물을 0.1~1.0 중량%로 하여 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0121] 2-4 : 유제품(dairy products)의 제조

[0122] 잔토휴물을 0.1~1.0 중량%로 하여 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0123] <사용예 3 : 음료 제제예>

[0124] 3-1 : 야채주스 제조

[0125] 잔토휴물 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000mℓ에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0126] 3-2 : 과일주스 제조

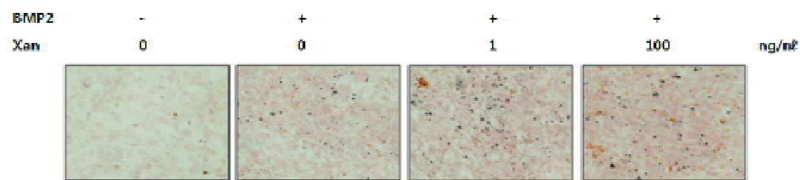
[0127] 잔토휴물 0.1g을 사과 또는 포도 주스 1,000mℓ에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

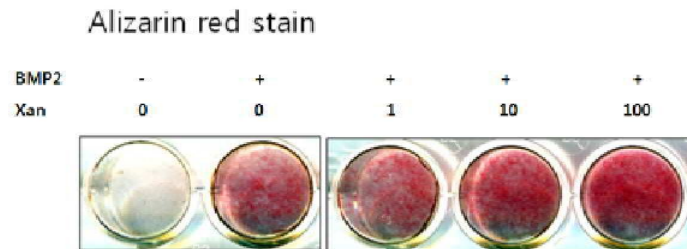
도면1



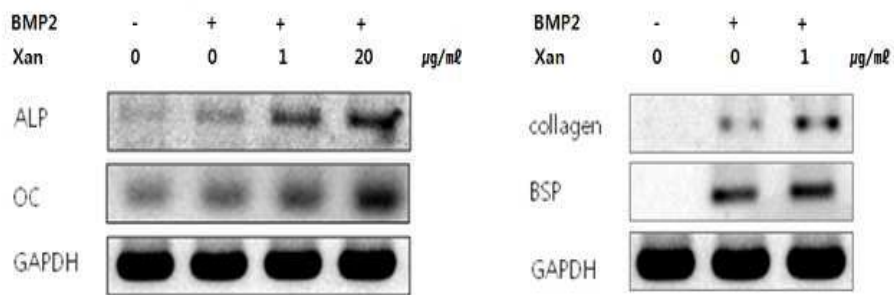
도면2



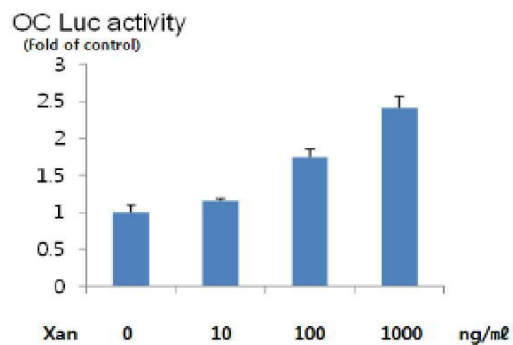
도면3



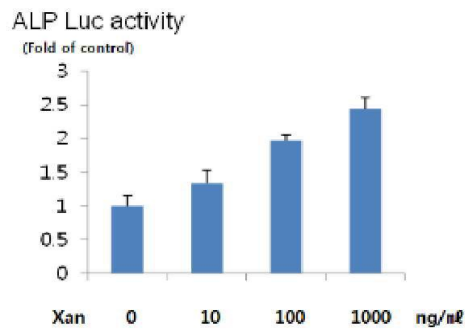
도면4



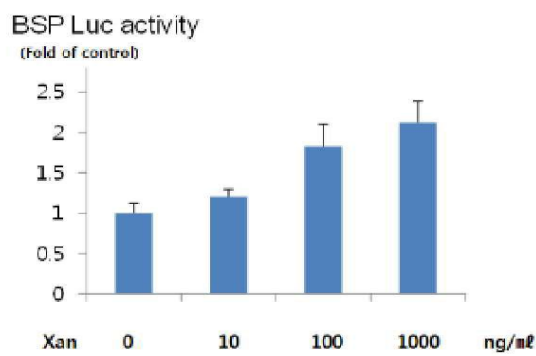
도면5



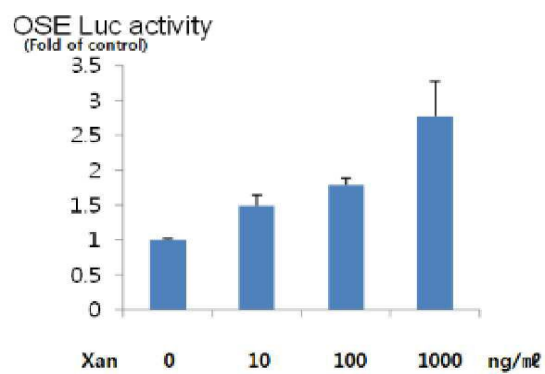
도면6



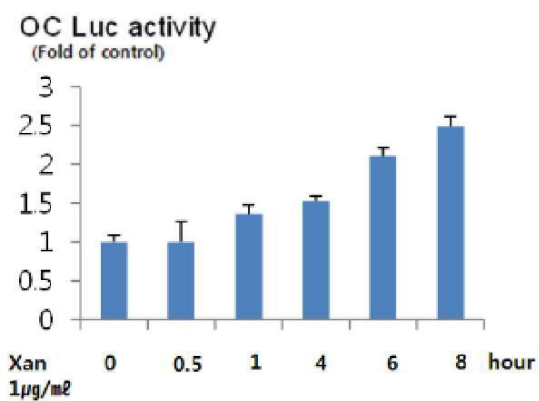
도면7



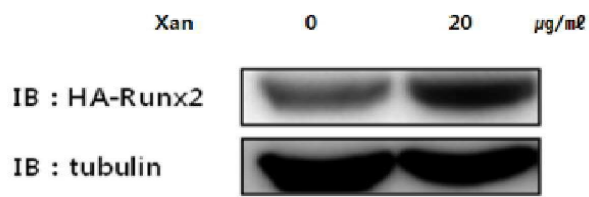
도면8



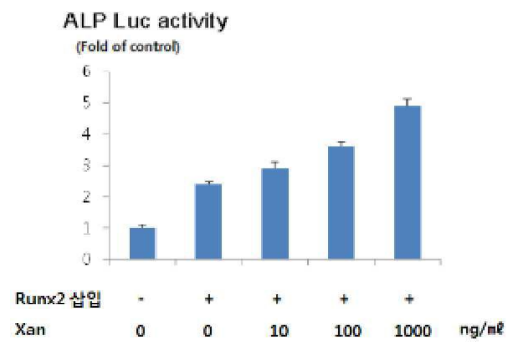
도면9



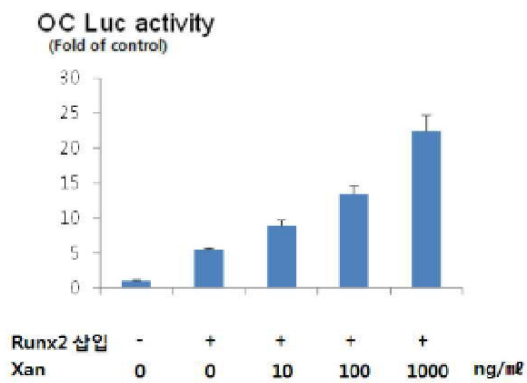
도면10



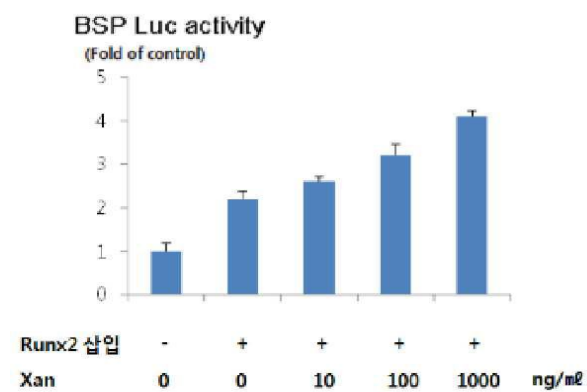
도면11



도면12



도면13



도면14

