

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 5월 22일 (22.05.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/077425 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/80 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/009617
- (22) 국제출원일: 2012년 11월 14일 (14.11.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 한국한의학연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 305-811 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김진숙 (KIM, Jin Sook); 151-050 서울시 관악구 봉천동 1615-17, 반석블레스빌 804 호, Seoul (KR). 김정현 (KIM, Jung Hyun); 150-863 서울시 영등포구 양평동 1가 238-18, Seoul (KR). 김찬식 (KIM, Chan Sik); 302-777 대전시 서구 둔산동 샘머리아파트 208동 403 호, Daejeon (KR). 김영숙 (KIM, Young Sook); 305-308 대전시 유성구 장대동 푸르지오아파트 109동 203 호, Daejeon (KR). 손은진 (SHON, Eun Jin); 305-759 대전시 유성구 하기동 송림마을아파트 510동 1205 호, Daejeon (KR). 정동호 (JUNG, Dong Ho); 300-090 대전시 동구 가양동 569-27, Daejeon (KR). 이윤미 (LEE, Yun Mi); 301-788 대전시 중구 오류동 삼성아파트 24동 1501 호, Daejeon (KR). 유송이 (YU, Song Yi); 142-812 서울시 강북구 미아동 783-19, Seoul (KR). 이

익수 (LEE, Ik Soo); 306-751 대전시 대덕구 범동 주공아파트 129동 305 호, Daejeon (KR). 김온순 (KIM, Ohn Soon); 156-093 서울시 동작구 사당 3동 201, 141-40, Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울특별시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

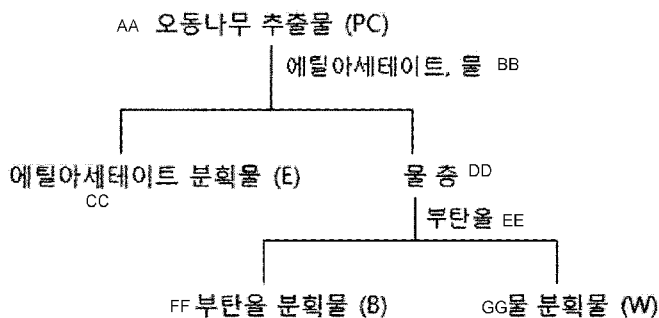
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND FUNCTIONAL FOOD CONTAINING PAULOWNIA EXTRACT FOR PREVENTING OR TREATING DIABETES COMPLICATIONS

(54) 발명의 명칭 : 오동나무 추출물을 포함하는 당뇨병병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품



AA ... Paulownia extract (PC)
BB ... Ethyl acetate, water
CC ... Ethyl acetate fraction (E)
DD ... Water layer
EE ... Butanol
FF ... Butanol fraction (B)
GG ... Water fraction (W)

(57) Abstract: The present invention relates to an agent for treating diabetes complications and a method for treating diabetes complications by using same, in which a Paulownia extract or a fraction thereof inhibits the generation of advanced glycation end-products, which are indicators of an outbreak of diabetes complications, and which can be useful as an agent for preventing or treating diabetic complications by having superior effects on preventing or treating diabetic ophthalmic diseases in animal diabetic model tests.

(57) 요약서: 본 발명은 당뇨병병증 치료제 및 이를 이용한 당뇨병병증 치료 방법에 관한 것으로서, 오동나무 추출물 또는 이의 분획물이 당뇨병병증 발병의 지표인 최종당화산물의 생성을 억제하고, 당뇨병 모델 동물실험에서 당뇨병성 안과관련 질병이 예방 또는 치료되는 효능이 우수하여, 당뇨병병증 예방 또는 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 오동나무 추출물을 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품

기술분야

- [1] 본 발명은 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 당뇨병은 전 세계적으로 중요한 성인병 중의 하나로서, 최근 우리나라에서도 급속한 경제 성장과 더불어 당뇨병 유병률이 10%에 달하며, 현재 전 세계적으로 2억4천만명이 넘었으며, 2025년에는 전 세계적으로 3억8천만명으로 증가하고, 이중 60%가 아시아 지역에서 발병할 것이라고 2009년 미국의사협회(JAMA)에서 발표하였다. 특히, 당뇨병 발병시기가 중장년으로 당겨졌으며, 또한 수명이 연장됨으로서 합병증으로 진전되는 것을 피할 수 없는 상황이 되었다. 일반적으로 당뇨병에 걸린 후 10~20년이 지나면 체내 거의 모든 기관이 손상을 받아 당뇨성 망막병증(diabetic retinopathy), 당뇨성 백내장(diabetic cataract), 당뇨성 신증(diabetic nephropathy), 당뇨성 신경병증(diabetic neuropathy), 심장병, 암, 골다공증 등으로 나타난다. 만성 당뇨성 신증은 혈액 투석 치료 및 말기 신부전의 가장 중요한 원인이 되고 있으며, 당뇨성 백내장과 망막증은 실명을 초래하고 결국엔 죽음에 이르게 한다.

[4]

- [5] 모든 연령대에서 당뇨병보다는 당뇨합병증 환자 증가율이 높아졌다. 특히 40~50대의 경우 말초순환장애 당뇨합병증 환자 증가율이 당뇨 환자보다 6.5배, 당뇨성 망막병증은 2.2배 높게 보고되고 있다. 말초순환장애 당뇨합병증의 진료비는 2006년 807억원에서 2010년 1530억원으로, 당뇨병성 망막증은 327억원에서 505억원으로 54.4% 증가하였다(중앙일보 2011년 8월 29일자). 이는 평균 수명이 늘어나면서 당뇨병 병력이 오래된 환자가 늘고 있기 때문이다. 따라서, 당뇨병 환자가 당뇨합병증으로 발병되지 않도록 사전에 조치를 취하는 것이 중요하게 고려되고 있다.

[6]

- [7] 미국의 경우 25세에서 74세 연령대의 실명의 원인이 당뇨병이며, 당뇨 발병 후 15년이나 20년이 지나면 60%가 실명으로 이어진다. 따라서, 당뇨 환자에게 당뇨합병증이 발병하는 기간이 5년이나 10년 정도만 지연되더라도, 환자와 그 가족의 삶의 질이 달라질 것이며, 국가재정에도 커다란 영향을 끼칠 것이다.

[8]

- [9] 이러한 당뇨합병증을 유발하는 대표적인 인자 중의 하나로 단백질의 비효소적 당화반응(nonenzymatic glycation of proein)으로 설명되고 있다. 단백질의 비효소적 당화반응(nonenzymatic glycation of protein)이란, 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당이 효소 작용 없는 축합반응, 즉 밀리아드 반응에 의한 것으로, 이 반응의 결과로 최종당화산물(advanced glycation endproducts, AGEs)이 생성된다. 단백질의 비효소적 당화반응은 (1) 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당의 알데히드 또는 케톤이 효소 작용 없이 친핵성 첨가 반응을 하여 초기 단계 산물인 슈프 염기(schiff base)를 형성하고, 상기 슈프 염기와 인접한 케토아민 어닥트(ketoamine adduct)가 서로 축합하여 가역적인 아마도리형의 초기당화산물이 생성되는 단계와, (2) 고혈당 상태가 지속되어 가역적인 아마도리(Amadori)형의 초기당화산물이 분해되지 않고 재배열(rearrangement)되어 비가역산물인 최종당화산물이 생성되는 단계를 포함한다. 이렇게 생성된 최종당화산물들이 단백질 또는 지질등과 결합 또는 교차결합(cross-linking)하여 비가역적인 당화단백질 또는 당화지질 등의 산물이 생성되는 단계로 나눌 수 있다.
- [10]
- [11] 가역적인 아마도리형의 초기 당화산물과 달리, 최종당화산물은 비가역적인 반응 산물이므로, 일단 생성되면 혈당이 정상으로 회복되어도 분해되지 않고, 최종당화산물이 결합한 단백질 또는 지질의 생존기간 동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 조직 곳곳에서 합병증을 유발시킨다(Vinson, J. A. et al., 1996, *J. Nutritinal Biochemistry* 7: 559-663; Smith, P. R. et al., 1992, *Eur. J. Biochem.*, 210: 729-739).
- [12]
- [13] 예를 들면, 포도당과 여러 종류의 단백질이 반응하여 생성된 최종당화산물 중 하나인 당화 알부민은 만성 당뇨병 신증을 일으키는 중요한 요인으로 작용한다. 당화 알부민은 당화가 진행되지 않은 정상 알부민에 비해 더 용이하게 신사구체 세포 내로 유입되고, 고농도의 포도당은 메산지움 세포를 자극하여 세포외 기질(extracellular matrix) 합성을 증가시킨다. 과도하게 유입된 당화 알부민과 증가된 세포외 기질로 인하여 신사구체의 섬유화가 야기된다. 이와 같은 기전으로 신사구체가 계속 손상 받게 되어 혈액투석 또는 장기이식 등의 극단적인 치료방법을 쓸 수밖에 없는 단계에 이르게 되는 것이다. 또한, 만성 당뇨로 인하여 동맥벽에서는 콜라겐이, 신사구체에서는 기저막성 단백질이 최종당화산물과 결합되어 조직에 축적됨이 보고된 바 있다(Brownlee, M., et al., 1986, *Sciences*, 232, 1629-1632).
- [14]
- [15] 이처럼 비효소적 단백질 당화반응에 의하여 기저막, 혈장 알부민, 수정체 단백질, 피브린, 콜라겐 등의 단백질에서 당화가 일어나며, 생성된 최종당화산물이 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 당뇨병

망막병증(diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신증(diabetic nephropathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy) 등의 만성 당뇨합병증을 유발시킨다.

[16]

[17] 이에 본 발명자는, 이상과 같은 당뇨합병증을 예방 또는 치료하기 위한 천연 약재를 연구하던 중, 오동나무 추출물 또는 이의 분획물이 최종당화산물의 생성을 억제하고 고혈당으로 인한 제브라피쉬에서 눈혈관이 비후해지는 것을 예방 또는 치료함으로써, 당뇨합병증의 예방 또는 치료 효능이 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[18]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[19] 본 발명은 당뇨합병증을 예방 또는 치료할 수 있는 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하기 위한 것이다.

[20]

과제 해결 수단

[21] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[22]

[23] 본 발명에서 사용되는 용어 "오동나무"는, 학명은 *Paulownia coreana*이며 한국 특산식물이다. 원형 또는 5각형의 잎은 길이가 25 cm 정도이며 뒷면에 별 모양의 갈색 털이 있다. 잎가장자리는 밋밋하다. 자주색의 꽃은 5~6월 가지 끝에 원추 꽃차례로 달리는데, 꽃잎과 꽃받침은 각각 5장이다. 꽃잎의 안팎에는 별 모양의 털과 선모를 가진다.

[24]

[25] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물"은, 오동나무로부터 액체의 용매를 사용하여 분리된 특정 성분을 의미한다. 상기 용매로는 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 유효성분을 효율적으로 추출하기 위하여 메탄올, 에탄올 또는 이들과 물의 혼합물로 추출하는 것이 바람직하다. 메탄올과 에탄올의 농도는 10% 내지 90%가 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[26]

[27] 본 발명의 오동나무 추출물은, 오동나무의 꽃, 가지, 잎 또는 뿌리를 추출한 것을 사용할 수 있다. 추출방식으로는 상온 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 증기 추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느

하나를 사용할 수 있다.

[28]

[29] 또한, 본 발명에서 상기 오동나무 추출물을 추가로 분획할 수 있으며, 오동나무 에탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 에틸아세테이트로 분획하여 얻은 에틸아세테이트 분획물인 것이 바람직하다. 또한, 오동나무 에탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 에틸아세테이트로 분획하여 얻은 물 분획물을, 부탄올로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하다. 또한, 오동나무 에탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 부탄올로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하다.

[30]

[31] 본 발명에서 사용되는 용어 "당뇨합병증"은, 당뇨병이 장기간 지속되는 경우 유발되는 증상을 의미한다. 당뇨합병증은, 당뇨병의 발병 기준 및 판단 기준과 상이하며, 당뇨합병증 치료제는 당뇨병 치료제와는 별개로 사용되고 있다.

[32]

[33] 당뇨합병증 유형의 원인은 알도즈 환원효소(aldose reductase)의 비정상적인 활성화와 가속화된 산화성 스트레스에 의해 유발되므로, 당뇨합병증의 치료제로서의 개발시 알도즈 환원효소의 활성화와 항산화 효능을 측정하여 치료제의 효능을 판단할 수 있다. 또한, 당뇨합병증으로 당뇨성 망막병증, 당뇨성 백내장, 신증, 신경병증, 당뇨병성 심장병 등이 야기되므로, 직접적으로 망막병, 백내장, 신증 및 신경병증 등을 억제하는 것으로 직접적인 치료제의 효능을 나타낸다.

[34]

[35] 본 발명에서는 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물이 당뇨합병증 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하였다. 본 발명의 일실시에 따르면, 당뇨합병증 치료의 지표가 되는 알도즈 환원효소의 활성화 억제효능을 확인함으로써, 당뇨합병증의 예방 또는 치료 효능이 있음을 확인하였다.

[36]

[37] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[38]

[39] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐

피콜리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[40]

[41] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[42]

[43] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물의 일일 투여량은 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[44]

[45] 또한, 본 발명은 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[46]

[47] 상기 건강기능식품은 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 있다. 그 밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면,

컴류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[48]

[49] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[50]

[51] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[52]

[53] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량%에 1 내지 15 중량% 포함되도록 첨가하는 것이 바람직하다.

[54]

발명의 효과

[55] 본 발명은 당뇨합병증의 예방 또는 치료에 효과적인 천연 추출물로서, 당뇨합병증 예방 또는 치료 조성물로 약학적으로 이용 가능할 뿐 아니라 건강기능식품으로서도 유용하게 이용될 수 있다.

[56]

도면의 간단한 설명

[57] 도 1은, 본 발명의 일실시예에 따른 오동나무 추출물의 계통분획 단계를 나타낸 것이다.

[58]

도 2는, 본 발명의 일실시예에 따른 오동나무 에탄올 추출물 및 이의 분획물의 제브라피쉬에서의 혈관두께 변화를 나타낸 것이다. 도 2a는 형광이미지를 나타낸 것이고, 도 2b는 혈관두께의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. 이때, HG는 고혈당군, PC는 오동나무 에탄올 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용한 것, PCE-1 및 PCE-5는 오동나무 에틸아세테이트 분획물을 각각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용한 것, PCB-1 및 PCB-5는 오동나무 부탄올 분획물을 각각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용한 것, PCW-1 및 PCW-5는 오동나무 물분획물을 각각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용한 것을 의미한다.

[59]

발명의 실시를 위한 형태

[60] 이하, 하기 제조에 및 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자

한다. 단, 하기 제조예 및 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[61]

[62] **실시예: 오동나무 추출물, 및 이의 분획물 제조**

[63] 충청북도 옥천 금강에서 채집 및 동정한 오동나무(*Paulownia coreana*)의 꽃으로 이하의 추출물 및 분획물을 제조하였다.

[64]

[65] 1) 추출단계

[66] 음건·세절한 오동나무(*Paulownia coreana*)의 꽃을 분쇄한 후 1.0 ℓ의 80% 에탄올을 넣고, 추출용기에서 상온상태로 48 시간 동안 3 시간 반복 추출한 후, 40°C에서 감압 하에 농축시켜 에탄올 추출물을 얻었다.

[67]

[68] 2) 농축, 건조단계

[69] 상기 추출액을 여과한 후 감압 상태에서 농축하였다. 이때, 구성성분의 분해 및 가수분해를 방지할 수 있도록 농축 시 온도를 40°C 내지 45°C로 유지하였다.

[70]

[71] 3) 계통분획 단계

[72] 도 1에 도시된 바와 같이, 오동나무의 분획물을 제조하였다. 먼저, 오동나무 에탄올 추출물에 500 ml의 물과 에틸아세테이트 500 ml를 넣고, 분액깔때기를 이용하여 물층과 에틸아세테이트층으로 분리하여 얻은 에틸아세테이트 분획물을 감압증류기를 이용하여 감압농축시켜 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다.

[73]

[74] 또한, 상기 물층은 다시 n-부탄올 500 ml를 넣고, 분액깔때기를 이용하여 물층과 부탄올층으로 분획하고, 얻은 부탄올층 분획물과 물분획물을 각각 감압증류기를 이용하여 감압농축시켜 n-부탄올 분획물과 물분획물을 수득하였다.

[75]

[76] **실험예 1: 최종당화산물 생성억제 효능 평가**

[77] 상기 실시예 1에서 제조한 오동나무 추출물과 이의 계통분획물들을 시험관내에서 최종당화산물 생성 억제 효능을 하기와 같이 분석하였다.

[78]

[79] 1) 실험방법

[80] 단백질원으로 소혈청알부민(bovine serum albumin(BSA); 미국 시그마 제품)을 사용하였다. BSA를 10 mg/ml의 농도가 되도록 50 mM 인산 완충 용액(phosphate buffer; pH 7.4)에 가하여 제조하였다. 당원으로는 0.2 M 과당과 0.2 M 글루코스가 혼합된 용액을 사용하였다.

[81]

- [82] 상기 제조된 BSA 용액에 과당과 글루코스 혼합용액을 가하였다. 오동나무 추출물 및 이의 분획물은 각각 $1 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ 및 $10 \mu\text{g/ml}$ 농도로 제조한 후(오동나무 추출물 및 이의 분획물을 각각 DMSO에 녹인 후 15% tween 80을 가하였다. 이때, 총 DMSO의 함량은 0.2%로 조절하였다), 이를 상기 BSA와 당의 혼합액에 첨가하고 37°C에서 7일간 배양하였다.
- [83]
- [84] 이때, 0.02% 소듐아자이드(sodium azide)와 안티마이코틱스 (antimycotics)를 각각 항 박테리아제 및 항진균제로서 첨가하였다. 대조군은 BSA와 당 혼합액을 배양한 것이며, 시험군과 대조군의 공시험군(blank)은 각각 조제한 후 배양하지 않은 것이다. 한편 효능의 우수함을 비교할 수 있는 지표인 양성 대조군으로서 아미노구아니딘을 사용하였다. 모든 배양액은 4개씩 준비하여 오차를 최대한 줄였다. 7일 후 배양액에서 생성된 최종당화산물의 함량을 분석하여 그 결과를 측정하였다. 최종당화산물은 형광, 갈색을 띠고 있으며 교차결합을 할 수 있는 물리화학적인 특성을 지니고 있을 뿐 아니라 세포막 수용체가 인지할 수 있는 배위자를 지니고 있다. 이러한 특성을 지닌 최종당화산물의 양을 Microplate reader(Excitation: 350 nm, Emission: 450 nm)로 측정하여 그 생성 억제 정도를 분석하였으며(Vinson, J.A. et al., *J. Nutr. Biochem.*, 7: 659-663, 1996), 억제 정도는 하기의 식을 사용하였다.
- [85]
- [86]
$$\text{AGE-BSA (\%)} = (100 - (\text{시료군의 형광강도} - \text{시료 공시험군의 형광강도})) / (\text{대조군의 형광강도} - \text{대조군 공시험군의 형광강도}) \times 100$$
- [87]
- [88] 한편, 양성대조군인 아미노구아니딘의 최종당화산물 생성억제 효능분석 실험은, 아미노구아니딘을 증류수에 용해하여 상기에 기재한 방법으로 37°C에서 $55.5 \mu\text{g/ml}$, $74 \mu\text{g/ml}$, $92.5 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 7일 동안 각각 배양한 후, 각각 배양액에서 생성된 최종당화산물의 양을 마이크로플레이트 검출기(Microplate reader) (Excitation: 350 nm, Emission: 450 nm)로 측정하였다.
- [89]
- [90] 2) 실험결과
- [91] 오동나무 추출물 및 이의 분획물들을 상기 실험방법에 따라 시험관 내에서 최종당화산물 생성 억제 효능을 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.
- [92] 표 1

[Table 1]

	사용농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibition(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	배양기간 7일	배양기간 7일	배양기간 7일
오동나무 에탄올 추출물	1	0.96 $\pm$ 3.59	8.72 $\pm$ 0.51
	5	27.72 $\pm$ 3.85	
	10	57.49 $\pm$ 2.96	
에틸아세테이트 분획물	1	18.93 $\pm$ 1.09	6.63 $\pm$ 0.24
	5	38.53 $\pm$ 4.36	
	10	70.34 $\pm$ 1.00	
부탄올 분획물	1	1.31 $\pm$ 5.96	7.81 $\pm$ 0.37
	5	24.34 $\pm$ 2.57	
	10	68.37 $\pm$ 2.60	
물 분획물	1	13.87 $\pm$ 4.52	>100
	5	28.71 $\pm$ 2.09	
	10	46.02 $\pm$ 2.15	
아미노구아니딘	55.5	39.93 $\pm$ 1.74	77.04 $\pm$ 3.23
	74	49.97 $\pm$ 3.22	
	92.5	56.62 $\pm$ 2.25	

- [93] 상기 표 1과 같이, 본 발명에 따라 오동나무 추출물의 최종당화산물 생성억제효능의 IC₅₀값은 8.72 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 확인하였다. 이는 양성대조 합성 단일화합물인 아미노구아니딘(IC₅₀ 값: 77.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 약 9배 효능이 월등히 우수함이 증명되었다. 또한 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물의 효능도 아미노구아니딘보다 각각 약 12배, 약 10배 더 우수함이 증명되었다.
- [94]
- [95] 따라서, 오동나무 추출물 및 이의 분획물이 단백질과 당의 결합을 억제하여 최종당화산물의 생성을 강력하게 저해함을 확인하였다.
- [96]
- [97] 실험예 2: 오동나무 추출물 및 이의 분획물의 *in vivo* 시스템에서 항당뇨 합병증 효능 실험
- [98]
- [99] 제브라피쉬(Zebrafish)는 척추동물 중의 하나이며 신속하게 효능여부를 확인할 수 있으며 또한 설치류에 비해 비교적 저렴한 가격으로 구입할 수 있는 장점으로 *in vivo* 효능 검색 시스템으로 각광받고 있다(Disease models & Mechanism, 3, 236-245(2010); *Journal of Molecular Endocrinology*, (2007) 38, 433-440).
- [100]
- [101] 제브라피쉬를 30일 동안 고혈당 상태에서 배양하였을 때, 사람의 비증식성 망막증(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)의 초기 단계에서 보여지는 여러 가지 병태 생리학적 특징들이 유사하게 나타나는 것으로 확인되었다(Disease Models & Mechanisms(2010) 3, 236-245). 즉 고혈당상태에서 제브라피쉬의 망막은 정상군의 망막에 비해 표면혈관이 두꺼워지고, 혈관내피 세포간의 세포연접(cell junction)이 약해지고, 혈관기저막(vessel basement membrane)도 두꺼워지는 비정상적인 병적증세로 변화되었다. 이에, 이하에서 제브라피쉬를 이용하여 오동나무 추출물 및 이의 분획물의 *in vivo* 시스템에서

항당뇨 합병증 효능을 측정하였다.

[102]

[103] 1) 실험방법

[104] ① 제브라피쉬 발생배 준비

[105] 혈관내피세포에 특이적으로 형광단백질(green fluorescence protein)이 발현하는 형질전환 제브라피쉬(Tg(kdr:EGFP)) 암수를 교배하여 발생배(embryo)를 획득하였다.

[106]

[107] ② 고혈당 유도 및 약물처리

[108] 수정 후 24시간 켜 형광을 발현하는 발생배를 선별하여 24 well plate에 5 개체씩 분주한 후 30 mM glucose를 이용하여 고혈당을 유도하였다. 이때 각각 1 μ g/ml 오동나무 에탄올 추출물(PC)과 에틸아세테이트 분획(PCE), 부탄올 분획(PCB) 및 물분획(PCW)들을 glucose 용액에 같이 희석하여 처리하였다. 약물 처리 후 3일 켜 새로운 용액으로 교체하였다.

[109]

[110] ③ 유리체 혈관 변화 분석

[111] 고혈당 조건에서 5일간 처리한 후 4% 파라포름알데하이드를 이용하여 하루 동안 고정하였다. 고정된 개체에서 수정체를 분리하여 형광실체현미경 하에서 유리체혈관(hyaloid vasculature)의 변화를 분석하였다.

[112]

[113] 2) 실험결과

[114] 오동나무 에탄올 추출물 및 이의 분획물을 처리한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 30 mM glucose 용액에서 5일간 배양한 고혈당군(HG)의 유리체 혈관은 대조군(Control)에 비해 유의적으로 확장되었다. Glucose와 오동나무 추출물(PC)을 각각 1 μ g/ml와 5 μ g/ml 씩 처리한 실험군(PC-1, PC-5)에서는 고혈당에 의한 혈관 확장이 유의성 있게 억제되었다(** p<0.01). 뿐만 아니라 에탄올 추출물에서 계통분획한 에틸아세테이트 분획물(PCE)과 부탄올 분획물(PCB)도 혈관확장 억제(예방) 효능이 우수함이 증명되었다.

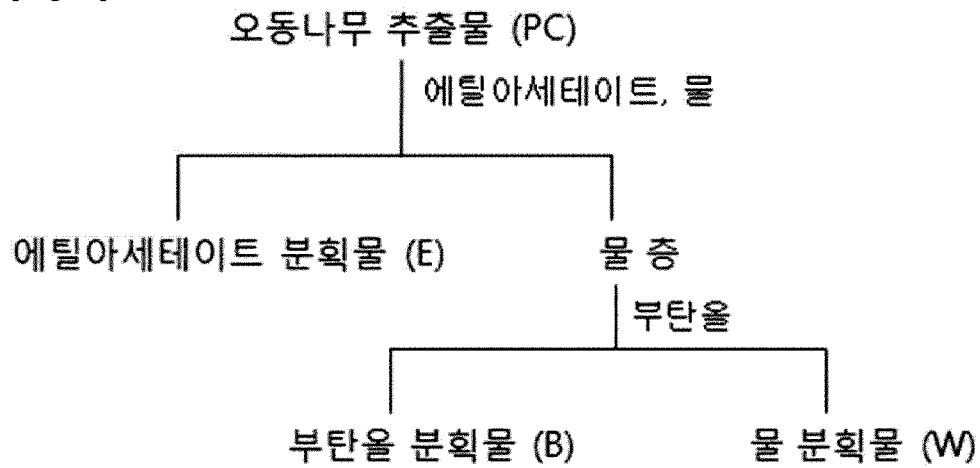
[115]

[116] 따라서, 오동나무 추출물과 이의 분획물이 고혈당으로 인해 발병되는 사람의 비증식성 망막증(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)의 초기 단계에서 나타나는 병리적인 증세인 혈관확장을 억제(치료 또는 예방)하는 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

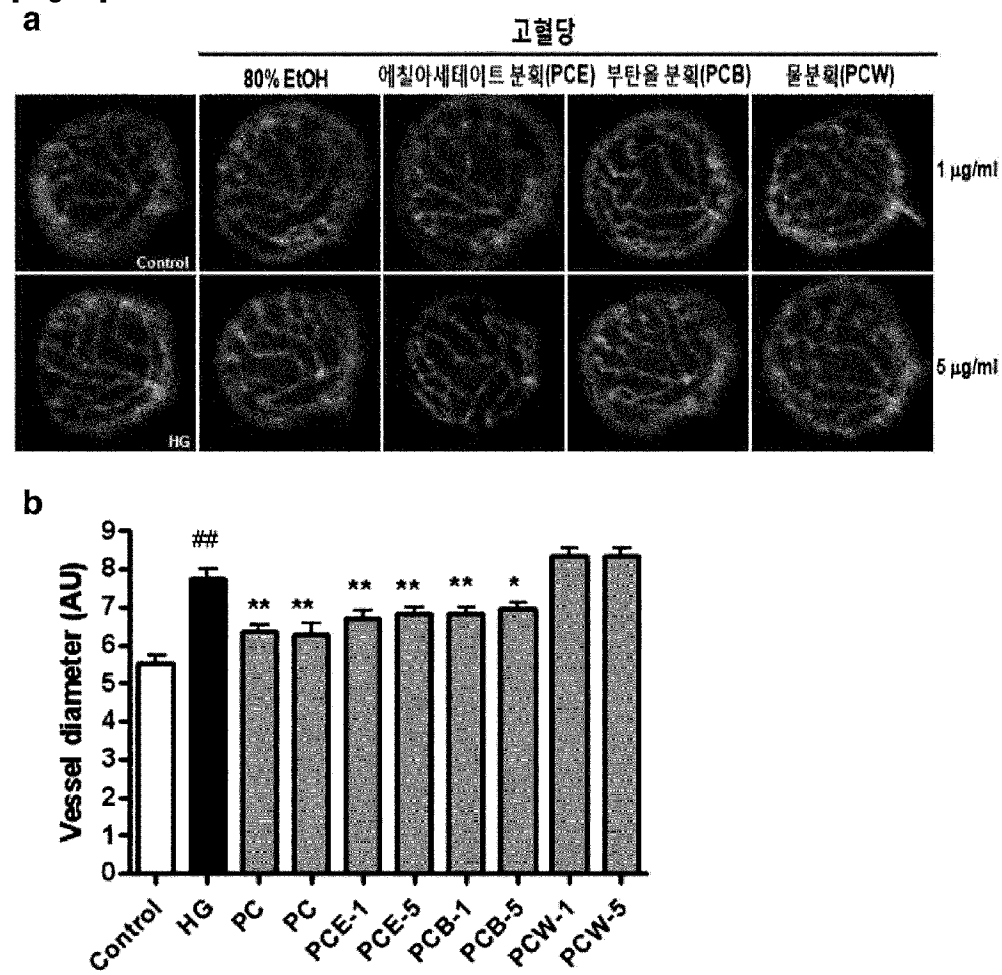
청구범위

- [청구항 1] 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 오동나무 추출물은 오동나무의 꽃, 가지, 잎 또는 뿌리를 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 오동나무 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합물로 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 추출은, 상온 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 증기 추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 분획물은 오동나무 에탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 에틸아세테이트로 분획하여 얻은 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 분획물은 오동나무 에탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 에틸아세테이트로 분획하여 얻은 물 분획물을, 부탄올로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 분획물은 오동나무 에탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 부탄올로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 당뇨병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 신증, 신경병증 또는 당뇨병성 심장병인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 9] 오동나무 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/009617**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 36/80(2006.01)i, A23L 1/29(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/80; A61P 39/06; A61K 36/50; C07D 311/62; A01N 65/08; C09K 15/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Paulownia coreana, extract, diabetic complications, retinopathy, cataract, nephropathy, neuropathy, heart disease, pharmaceutical composition, food

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, H.-Y. et al. "Screening of Korean Forest Plants for Rat Lens Aldose Reductase Inhibition" Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, vol. 63, no. 1, pages 184-188. See abstract; page 184; table 1.	1-9
A	KR 10-2003-0016706 A (GARLIC SALT CO., LTD.) 03 March 2003 See abstract; page 2; claim 1.	1-9
A	KR 10-2005-0117974 A (KIM, Jin Soo) 15 December 2005 See abstract; page 2; claim 1.	1-9
A	KR 10-2005-0117975 A (KIM, Jin Soo) 15 December 2005 See abstract; pages 2-3; claim 1.	1-9
A	KR 10-2004-0087818 A (PARK, Keun Hyung) 15 October 2004 See abstract and claims 1-3.	1-9
A	KR 10-0502566 B1 (CHOI, Sun Hwa et al.) 20 July 2005 See abstract and claim 2.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 MAY 2013 (30.05.2013)

Date of mailing of the international search report

30 MAY 2013 (30.05.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/009617

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2003-0016706 A	03.03.2003	NONE	
KR 10-2005-0117974 A	15.12.2005	NONE	
KR 10-2005-0117975 A	15.12.2005	NONE	
KR 10-2004-0087818 A	15.10.2004	KR 10-0533768 B1	06.12.2005
KR 10-0502566 B1	20.07.2005	KR 10-2003-0093040 A	06.12.2003

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/80(2006.01)i, A23L 1/29(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류 기재)

A61K 36/80; A61P 39/06; A61K 36/50; C07D 311/62; A01N 65/08; C09K 15/34

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 오동나무, 추출물, 당뇨합병증, 망막병증, 백내장, 신증, 신경병증, 심장병, 약학조성물, 식품

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, H.-Y. 외 1명. `Screening of Korean Forest Plants for Rat Lens Aldose Reductase Inhibition` Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999년, 63권, 1호, 페이지 184-188. 요약; 페이지 184; 표 1 참조.	1-9
A	KR 10-2003-0016706 A (주식회사 가릭솔) 2003.03.03. 요약; 페이지 2; 청구항 1 참조.	1-9
A	KR 10-2005-0117974 A (김진수) 2005.12.15. 요약; 페이지 2; 청구항 1 참조.	1-9
A	KR 10-2005-0117975 (김진수) 2005.12.15. 요약; 페이지 2-3; 청구항 1 참조.	1-9
A	KR 10-2004-0087818 A (박근형) 2004.10.15. 요약 및 청구항 1-3 참조.	1-9
A	KR 10-0502566 B1 (최순화 외 1명) 2005.07.20. 요약 및 청구항 2 참조.	1-9

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 05월 30일 (30.05.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 05월 30일 (30.05.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 82-42-481-8740



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2003-0016706 A	2003.03.03	없음	
KR 10-2005-0117974 A	2005.12.15	없음	
KR 10-2005-0117975 A	2005.12.15	없음	
KR 10-2004-0087818 A	2004.10.15	KR 10-0533768 B1	2005.12.06
KR 10-0502566 B1	2005.07.20	KR 10-2003-0093040 A	2003.12.06