

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 11월 21일 (21.11.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/172525 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 35/60 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/010549
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 6일 (06.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0052092 2012년 5월 16일 (16.05.2012) KR
10-2012-0052084 2012년 5월 16일 (16.05.2012) KR
10-2012-0063626 2012년 6월 14일 (14.06.2012) KR
10-2012-0121144 2012년 10월 30일 (30.10.2012) KR
- (71) 출원인: 주식회사 코씨드바이오팜 (COSEED-BIOPARM CO., LTD.) [KR/KR]; 390-250 충청북도 제천시 바이오밸리 2로 41, 106호, Chungcheongbuk-do (KR). 주식회사 뉴메디온 (NEWMEDION CO., LTD.) [KR/KR]; 363-792 충청북도 청원군 강내면 월곡길 38 창업보육센터 3관 104호, Chungcheongbuk-do (KR).

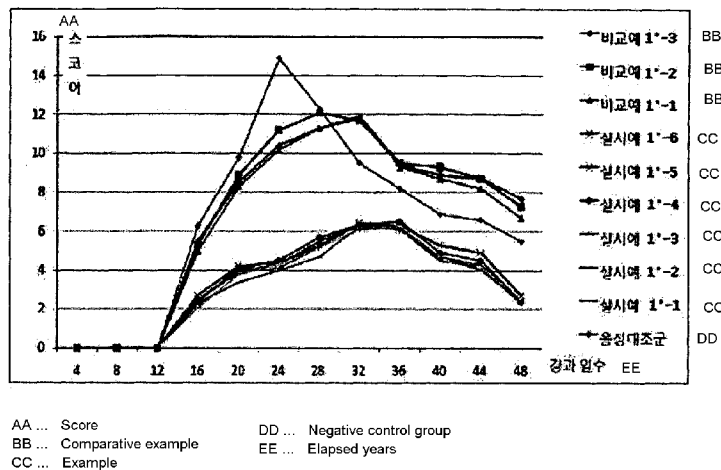
- (72) 발명자: 박성민 (PARK, Sung Min); 363-785 충청북도 청원군 오창읍 오창중앙로 32, 206동 1701호, Chungcheongbuk-do (KR). 박성노 (PARK, Sung No); 442-130 경기도 수원시 팔달구 매산로 104번길 10, 101동 803호, Gyeonggi-do (KR). 서일호 (SEO, Il Ho); 361-807 충청북도 청주시 흥덕구 서원남로 57번길 10, 301호, Chungcheongbuk-do (KR). 박지영 (PARK, Ji Young); 580-721 전라북도 정읍시 샘골로 158, 205동 206호, Jeollabuk-do (KR). 윤미영 (YUN, Mi Young); 500-759 광주광역시 북구 동문대로 86번길 55, 203동 608호, Gwangju (KR). 최수연 (CHOI, Soo Yeon); 306-759 대전광역시 대덕구 동춘당로 178, 110동 1402호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인태동 (TAEDONG INTERNATIONAL PATENT&LAW FIRM); 152-841 서울시 구로구 가마산로 282, 302호, 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, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COSMETICS, PHARMACEUTICALS, AND FOOD COMPOSITION CONTAINING PIECES OR EXTRACT FROM FISH EYES

(54) 발명의 명칭: 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 함유하는 화장료, 약학 및 식품 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a multifunctional cosmetic composition containing pieces or an extract from fish eyes as an active ingredient, which has good skin whitening effects and good skin resiliency improving effects, and has good skin moisturizing effects and cell activation effects, so as to exhibit excellent skin-regenerating and wound healing effects as well as excellent irritation relief effects. Also, the present invention relates to a composition for preventing and treating arthritis, which includes pieces or an extract from fish eyes as an active ingredient. The composition of the present invention promotes immune tolerance in the intestinal immune system without having any side effects so as to prevent and treat arthritis by effectively controlling autoimmune reactions and infections which particularly occur in joints. In addition, the present invention relates to a pharmaceutical composition for treating dry eye, which includes an extract from fish eyes as an active ingredient. The present invention uses fish eye extract to effectively treat eye disorders, such as conjunctival epithelium disorder, without the traditional side effects from the repeated administration of anti-inflammatory drugs.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2013/172525 A1



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.

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

(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,

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물로, 피부 미백 효과, 피부 탄력 개선 효과가 우수하고, 피부 보습효과, 세포활성화 효과가 우수하여 피부 재생 및 상처 치유 효능이 뛰어나며 자극완화 효과가 있는 다기능성 화장품 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 어류 안구 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 장관계 면역 시스템에서 일어나는 면역관용을 유도함으로써 부작용 없이 관절에 특이적으로 일어나는 자가 면역반응 및 염증을 효과적으로 제어하여 관절염을 예방 및 치료할 수 있다. 또한, 본 발명은 어류 안구 추출물을 유효성분으로 포함하는 안구건조증 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 어류 안구 추출물을 사용하여, 기존의 항염증성 약물의 반복 투여에 따른 부작용 없이 각·결막 상피 장애증 등의 안구 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 함유하는 화장료, 약학 및 식품 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 함유한 다기능성 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.
- [3] 또한, 본 발명은 어류 안구 추출물을 유효성분으로 포함하는 안구건조증 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 참다랑어(*Thunnus thynnus*(Linnaeus))는 농어목 고등어과의 바닷물고기이다. 강원도에서는 참치라고 불린다. 북대서양에 서식하는 종의 경우 최대 몸길이 3m, 몸무게 560kg 정도까지 성장한다. 몸은 뚱뚱하고 방추형에 가까우며 몸높이는 약간 높은 편이다. 주둥이는 길고 끝이 뾰족하며 입은 크다. 몸 등 쪽은 짙은 푸른색을 띠며 몸쪽의 중앙과 배 쪽은 은회색 바탕에 여러 개의 폭이 좁은 가느다란 흰색 가로띠와 둥근 무늬가 나타난다. 어릴 때에는 폭이 좁은 가로띠와 둥근 무늬가 희미하게 있다가, 자라면서 점차 없어진다. 작은 둥근 비늘이 몸 전체를 덮고 있다. 백다랑어와 생김새가 비슷하지만, 가슴지느러미가 짧은 것이 참다랑어이다. 해수면 바로 아래에서 헤엄치며, 때때로 연안 가까이에 나타나기도 한다. 봄, 여름에는 북쪽으로 이동하고, 가을에는 남쪽으로 이동한다. 무리지어 다니는 멸치, 꽂치, 청어 등을 주로 먹으며, 새우류, 게류, 오징어류, 해파리류 등을 먹기도 한다. 산란기는 대만 근해에서는 4~6월, 우리나라 동해에서는 8월이며, 주 산란장은 우리나라 동해 남부 해역과 대만 북부 해역이다. 참다랑어에는 단백질과 아미노산이 풍부하고, 불포화 지방산인 오메가-3가 풍부하며 비타민과 셀레늄 등의 미량원소 등도 다량 함유하고 있으며 참다랑어의 눈에도 오메가-3와 단백질, 수분 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.
- [5] 고등어(*Scomber japonicus*)는 농어목의 고등어과의 바닷물고기로 등 쪽은 암청색을 띠고 배 쪽은 은백색을 띠고 있다. 몸은 길고 방추형으로 약간 측편되어 있다. 눈은 크며 기름 눈까풀이 잘 발달되어 있으며 동공부위는 노출되어 있다. 두 눈 사이는 편평하다. 위턱의 뒤끝은 동공 중앙 아래에 달한다. 등지느러미는 2개로 멀리 떨어져 있고, 기저 길이는 비슷하지만 높이는 제1 등지느러미가 더 높다. 가슴지느러미는 체측의 중앙에 위치하며 비교적 작다. 뒷지느러미는 제2 등지느러미와 대칭적인 위치에 있다. 등지느러미와

뿔지느러미 후방으로 5개씩의 토막 지느러미가 있고, 꼬리자루는 매우 잘록하다. 꼬리지느러미는 잘 발달된 가랑이형이다. 제1 등지느러미는 제2가시가 가장 길다. 몸 등 쪽은 암청색을 띠며 중앙에서부터 배쪽으로는 은백색을 띤다. 몸 등 쪽에는 청흑색의 물결무늬가 측선에까지 분포한다. 등지느러미는 투명하지만 흑색소포가 산재하여 어둡게 보이며, 가슴지느러미 기저부는 희지만 기저부의 상반부 윗 가장자리 및 후반부는 검다. 배지느러미와 뿔지느러미는 무색 투명하며, 꼬리지느러미는 회색을 띠지만 바깥쪽 가장자리가 검다. 최대 체장 50cm 까지 성장하나, 일반적으로 30cm 범위이다.

- [6] 한국에는 고등어속 어류 2종이 알려져 있는데 고등어와 유사종으로 망치고등어가 있다. 망치고등어는 체측의 중앙을 따라 둥근 암청색의 무늬가 산재하여 잘 구별되지만 고등어와 망치고등어의 중간 형태를 띤 개체변이가 관찰되어 자세한 연구가 요망된다. 한편 망치고등어는 1번째 등지느러미의 3~4번째 가시가 가장 길어 고등어와 잘 구별된다. 서식 수심은 0~300 m이다. 부어성 어종으로 표층 또는 표층으로부터 300m 이내의 중층에 서식한다. 3cm 이상 성장하면 크기별로 군집을 이루어 생활한다. 북동태평양에서는 다른 어종들과 함께 군집을 이루어 이동하기도 한다. 한국, 전 대양의 열대, 온대 해역 등에 분포한다. 동중국해 등에서 채집된다. 산란은 수온 15~20°C에서 이루어지며, 지역에 따라 약간의 차이를 보인다. 계절회유를 하며, 북반구에 서식하는 종은 수온이 상승하는 여름철에 북쪽으로 이동을 하고 겨울철에는 남쪽으로 이동하여 산란한다. 먹이는 요각류, 갑각류, 어류, 오징어류 등을 먹으며, 군집을 이루어 사는 다른 어종과 먹이 경쟁을 한다. 고등어에는 오메가-3의 일종인 DHA와 EPA가 풍부하며, 칼슘, 철분, 칼륨, 비타민 B2, 비타민 D 등이 다량 함유되어 있고 단백질과 아미노산이 풍부한 것으로 알려져 있다.
- [7] 이와 같이 참다랑어 또는 고등어는 각종 영양이 풍부하지만, 아직까지 이러한 참다랑어 또는 고등어, 특히 참다랑어 또는 고등어의 눈(안구)를 화장품, 약학 또는 식품 조성물의 원료로 이용한 예는 전혀 없는 실정이다.
- [8] 한편, 최근에는 천연물을 소재로 한 화장품이 인체안정성, 피부자극완화 등의 이유로 소비자에게 각광을 받고 있으며, 이에 따라 화장품 원료로서 천연물에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있는 실정이다.
- [9] 이에 따라 어류를 화장품 원료로 이용하려는 연구가 이루어지고 있는데, 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제10-1999-0033721호(어류로부터의 수용성 COLLAGEN 추출방법 및 기능성 COLLAGEN 화장품과 COLLAGEN 발효 음료의 제조 방법)에 어류 껍질, 머리 부분, 뼈, 내장 등에서 콜라겐을 추출, 분리하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-0760875호(멜라닌 생성 억제 피부미백용 화장품 조성물)에 어피로부터 젤라틴을 추출하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-0986603호(어류 정액 또는 알로부터 분리된 DNA 중합체 단편복합체 및 그의 제조방법)에는 어류 정액 또는 알로부터 분리된 DNA 단편 혼합물을 포함하는 화장품 조성물이 개시되어 있다.

그러나 아직까지 어류의 눈(안구)를 화장품 원료로 이용한 예는 전혀 없는 실정이다.

- [10] 한편, 관절염은 우리나라 인구의 5%가 앓고 있는 만성 질환으로서 관절 활액막에 염증이 발생하여 부종과 통증을 유발되는 질환이다. 관절염은 진행성 질병이고 관절 변형 및 장애를 일으켜 치료되지 않을 경우 계속 악화되고 심각한 결과를 초래한다.
- [11] 관절염이 유발되는 직접적 원인은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았으며, 치료를 위해서 코르티손 및 다른 부신피질 호르몬과 같은 스테로이드계, 아스피린, 피록시캄 및 인도메타신과 같은 비스테로이드계 항염증제, 클로로퀸제제 및 D-페니실아민과 같은 항류마티스제, 콜치신과 같은 통풍억제제, 그리고 시클로포스프아미드, 아자티오프린, 메토트렉세이트 및 레바미솔과 같은 면역 억제제를 포함한 다양한 치료제가 일반적으로 사용되고 있다. 그러나 이러한 화학적 치료제들은 근본적인 치료 효과를 나타내지 않으며 스테로이드 호르몬제의 경우에는 부작용으로 인해 사용이 제한되고 있다. 또한, 관절 통증을 완화시키거나 염증을 제거하는 약제로서 널리 사용되고 있는 아스피린제 및 브타졸린제 등은 사람의 위에 치명적인 영향을 주므로 관절염을 치료하는데 필요한 양을 계속적으로 복용하는 것은 불가능하다.
- [12] 기존의 이러한 화학요법적 약제는 약제의 장기간 사용을 어렵게 하는 부작용, 장기 사용 시 항염증 효과의 감소와 같은 결점을 가지고 있었다. 현재는 진통작용이 우수한 인도메타신 및 푸르페낭산과 비스테로이드성의 각종 소염제 정도가 사용되고 있는 실정이다.
- [13] 따라서, 이러한 문제를 해결함과 동시에 염증성 증상과 통증에 대해 효과를 보여주는 관절염 치료제의 개발이 요망되고 있으며, 관절염 치료약제는 장기간 복용이 필요하므로 부작용이 적은 약제를 개발하는 것이 매우 중요하다. 또한, 기존 약제 중 일부는 정맥 주사나 복강 주사로 투여하는 경우가 있는데, 이 경우에는 번거로울 뿐 아니라, 알러지, 쇼크 및 위생상의 문제도 생길 수 있으므로, 복용이 간편하면서 안전한 치료제가 필요한 실정이다.
- [14] 현재까지 관절염 치료를 위한 대부분의 건강식품이 연골 구성성분을 주원료로 하고 있다. 한국특허공개 제2001-0018321호에는 류마티스 관절염 환자를 위한 건강식품 조성물이 개시되어 있으며, 한국특허공개 제2005-0078080호에는 관절염 치료용의 제약학적 조성물 및 그 제조방법이 개시되어 있고, 한국 특허출원 제10-2003-00433119호에는 글루코사민 40-50%, 뮤코 다당 단백질 30%, 비타민 C, 우슬, 모과, 두충 및 상어연골 추출분말을 포함하는 퇴행성관절염 치료용 건강보조식품 조성물에 관한 내용이 기재되어 있다. 그런데 현재까지 관절염의 예방 또는 치료와 관련하여 어류 안구 파쇄물 또는 추출물이 사용된 구체적인 보고는 없는 실정이다.
- [15] 이에, 본 발명자들은 어류 안구 파쇄물 또는 추출물이 콜라겐으로 유발한 동물 모델에서 발적 및 부종을 감소시키고, 관절염의 원인이 되는 것으로 확인된

- 사이토카인 분자들의 혈중 수치를 감소시키는 것을 확인하여 관절염의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.
- [16] 한편, 장기간의 독서, 컴퓨터 사용, 운전 또는 텔레비전 시청 등 눈을 장기간 사용하면 눈꺼풀의 깜박임 비율을 감소시키고, 눈을 눈물로 덮는 깜박임의 감소는 안과 증상을 악화시키는 원인이 된다.
- [17] 고령 인구의 증가, 휴대용 단말기 성능의 개선과 통신기술의 발달, 및 문화 산업의 성장 등으로 인해 현대인의 눈이 수면할 때를 제외하고 쉼 시간 없이 혹사되기 때문에 안과 관련 질환은 지속적으로 늘어나고 있는 추세이다.
- [18] 안구건조증은 협의로는 결막건조증, 저녁루, 건성각결막염 등의 질환을 의미하지만, 광의로는 그 의미가 매우 광범위하여, 결막이 이상적으로 건조된 모든 증상을 의미한다. 이와 같이 안구 건조증은 그 개념이 광범위하고, 원인 또한 다양할 것으로 생각되나, 많은 경우에 있어서 그 원인이 밝혀지지 않았기 때문에, 단일 질병이기 보다는 건조 안구 증후군이라 불리는 질병들을 포함하는 안구 표면의 질병이다.
- [19] 현재, 안구 건조는 각결막염성 장애에 관계없이 눈물의 양 및 질이 비정상적인 상태로 정의된다. 상기 정의에 따르면, 건조 안구의 범주에는 저녁루, 눈물 결핍증, 안구 건조증, 쇼그렌 증후군, 건성 각결막염, 스티븐스-존슨 증후군, 눈 유착포창, 안검연염, 안검 닫힘 부전증, 지각신경 마비 등과 같은 질병이 포함된다.
- [20] 눈을 이루는 조직 중 각막과 결막은 외부에 노출되어있는 상피조직으로 외부요인들에 의하여 손상을 받기 쉽다. 여러 외부 요인들로 인한 국소부위의 손상을 치유하는 방법은 약리적으로 해당 손상 부위에 작용하며, 염증에 의한 조직의 2차 손상 방지와 조직 재생 속도의 증진을 목적으로 한다. 염증의 원인은 병원성미생물 감염과 염증을 일으키는 물질의 화학적 침투, 각종 알레르기, 과민성 자기면역질환 및 물리적 상처 등이 해당된다.
- [21] 건조 안구를 앓는 많은 경우에, 유성층, 수성층 및 뮤신층 중 어느 하나에 눈물이 부족하여 각결막염성 장애를 유발한다. 특히, 눈물이 뮤신층에 부족한 경우, 각막손상이 심각한데, 이는 각막 상피세포 손상으로부터 유래되는 각막 상피 침식, 각막 상피 장애, 뿐만 아니라 각막 궤양(예를 들어, 각막 기질층의 궤양) 및 감염성 안질환을 쉽게 유발한다. 몇몇 경우에 있어서, 각막 이식이 필요하게 된다.
- [22] 이 외에도 소프트 콘택트 렌즈 사용시 안구에 건조 장애가 있을 수 있다. 소프트 콘택트 렌즈는 함수성은 있지만, 렌즈표면에 충분한 두께의 수층을 분포시키기 어렵기 때문에, 지질층의 분산이 나빠져서, 렌즈상의 누액의 증발 향진이 각막 상피 장애의 원인이 될 가능성이 있다.
- [23] 그런데 현재까지 안구건조증 치료와 관련하여 어류 안구 추출물이 사용된 구체적인 보고는 없는 실정이다. 이에, 본 발명자들은 어류 안구 추출물이 안구의 수분 증발을 감소시키고, 각막 상피세포 장애의 치료에 효과적인 것을

확인하여 안구건조증의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[24]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[25] 본 발명은 피부 화장료에 적용이 가능하고 인체에 무해하여 안전성이 우수한 어류 눈의 파쇄물 또는 추출물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[26] 또한, 본 발명은 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 이용하여 피부 미백 효과, 피부 보습 효과, 피부 탄력 개선 효과가 매우 우수한 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[27] 또한, 본 발명은 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 이용하여 세포활성화 효과가 우수하여 피부 재생 및 상처 치유 효능이 뛰어나고 자극완화 효과도 매우 뛰어난 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[28] 또한, 본 발명은 어류 안구 파쇄물 또는 추출물을 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 기능성 식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

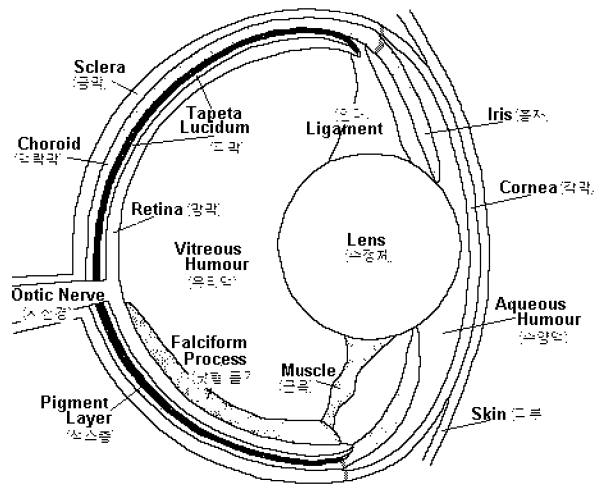
[29] 또한, 본 발명은 어류 안구 추출물을 포함하는 안구건조증 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[30] 본 명세서에서 용어 "어류"는 물에서 사는 아가미가 있는 척추동물을 의미하고, 상기 어류는 예컨대, 홍어, 대구, 고등어, 돛돔, 빙어, 연어, 양미리, 실꼬리돔, 아귀, 백상아리, 망어, 명태, 다금바리, 잉어, 붕어, 청어, 청새치, 참돔, 참다랑어, 송어, 삼치, 물메기, 도루묵, 쾡치, 개복치, 감성돔, 갈치, 쏘가리, 베스, 미꾸라지, 메기, 가물치, 민태, 황성대, 황새치, 황복, 황다랑어, 청상아리, 참조기, 참복, 참가자미, 쥐치, 준치, 조피볼락, 정어리, 전갱이, 자리돔, 임연수어, 옥돔, 장어, 병어, 및 민어로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 어류이다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 이용될 수 있는 어류는 참다랑어 또는 고등어이다.

[31] 그리고 본 명세서에서 용어 "안구"는 시각정보를 수집하고 이를 전기화학정보로 변환하여 시신경이라는 통로를 통하여 뇌로 전달하는 기관을 의미한다. 하기에 나타나는 바와 같이, 어류의 안구는 가장 바깥쪽에 공막(수정체 앞쪽에서는 각막으로 존재함)이 있고, 그 안쪽에는 맥락막, 또 그 안쪽에는 망막이 있으며, 앞 부분에는 수정체와 홍채가 있으며, 수정체의 앞쪽에는 수양액, 뒤쪽에는 유리액으로 채워져 있으며, 그 밖에 닛 돌기(사람의 모양체와 유사한 역할을 함), 근육, 색소층 등으로 이루어져 있다.

[32]



[33] [어류의 안구 구조]

[34] 그리고 본 명세서에서 용어 "파쇄물"은 본 발명의 어류 안구를 파쇄한 결과물을 의미한다. 구체적으로는 어류의 머리부분에서 안구를 떼어내고 안구의 공막 부분에 붙어 있는 근육조직을 분리하여 깨끗하게 분리된 안구를 준비한 후, 안구 내부에 존재하는 수정체 등 안구의 하부 기관이나 그 기관을 구성하고 있는 물질들을 외부에 노출시키는 것이며, 당업계에서 일반적으로 사용되는 믹서나 호모게나이저를 이용하여 파쇄한 것이다. 이때, 바람직하게는 인체내부에 흡수가 용이한 1 μ m 내지 5mm크기로 균질하게 처리되는 것이 좋다. 또한, 본 발명의 어류 안구 파쇄물은 어류의 안구를 상기와 같이 균질하게 파쇄한 후 여과시킨 여과액일 수도 있다.

[35]

[36] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 제1실시형태는 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물을 제공한다.

[37] 이하에서는 본 발명의 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물, 및 이를 함유하는 화장품 조성물에 대하여 자세히 설명하겠다.

[38] 본 발명은 화장품 조성물의 유효성분으로서 어류의 눈, 즉, 안구를 사용하는 것을 특징으로 한다. 이와 같이 본 발명은 효율적으로 활용되지 못하고 폐기물로 버려지는 참다랑어 또는 고등어의 안구를 이용하기 때문에 폐자원을 활용할 뿐만 아니라 2차적인 환경문제를 예방할 수 있다는 이점이 있다.

[39] 여기서, 어류의 안구는 참다랑어 또는 고등어 중 1종 이상의 어류의 눈(안구)을 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 신선한 참다랑어 또는 고등어를 급냉한 후 육질과 분리하여 얻어진 냉동된 어류 눈(안구)을 사용한다.

[40] 본 발명은 상기 어류 안구의 파쇄물을 유효성분으로 함유하는데, 여기서 어류 안구의 파쇄물을 얻는 방법은 특별히 한정되는 것은 아니며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상 사용되는 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 냉동된 어류 안구를 파쇄기, 예를 들면 믹서나 호모게나이저를 이용하여 파쇄시킨 것을

사용할 수 있는데, 바람직하게는 인체 내부에 흡수가 용이한 1 μ m 내지 5mm크기로 균질하게 처리되는 것이 좋다.

[41] 또한, 본 발명은 상기 어류 안구의 추출물을 유효성분으로 함유하는데, 여기서 어류 안구의 추출물을 얻는 방법은 특별히 한정되는 것은 아니며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 다양한 추출 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산의 용매를 각각 단독으로 또는 이들을 2종 이상 혼합한 용매를 추출 용매로 이용하여 추출할 수 있다.

[42] 또한, 본 발명의 어류 안구의 추출물은 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라 다른 방법으로 추출된 추출물도 포함한다. 예컨대, 초고압 추출법에 의한 추출; 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 이용한 분리; 다양한 크로마토그래피, 예를 들어 크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 크로마토그래피에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 어류 안구의 추출물에 포함되는 것이다.

[43] 본 발명은 어류의 안구를 초고압 추출법을 이용하여 초고압 추출하는 경우, 바람직하게는 압력 100~3000MPa, 온도 40~90°C에서 5~60분간 처리하며, 더욱 바람직하게는 압력 500~1000MPa, 온도 40~60°C에서 10~30분간 처리하는 것이 좋다. 또한, 초고압 추출시 pH는 특정 pH에 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 초고압기 내부 물의 pH를 1~6으로 낮춰 처리하는 것이 좋다. 또한, 본 발명은 이와 같이 초고압 처리한 참다랑어 또는 고등어의 안구 추출물을 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산 및 그의 혼합물로부터 선택된 추출용매를 이용하여 환류 추출하고 냉침한 후, 여과시킨 여과액을 농축조로 이송하여 50°C 이하에서 감압농축 및 동결 건조하는 것이 바람직하다. 본 발명은 이렇게 얻어진 감압농축물 및 동결건조물이 0.001 ~ 70.0 중량% 함유되게 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 중에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 추출물을 제조할 수 있다.

[44] 또한, 본 발명의 어류 안구의 추출물은 상기 추출물을 일부 또는 전부 농축하여 얻은 농축물, 또는 다시 그 농축물을 건조시켜 제조한 추출 엑기스 및 추출물 중에 함유되고 있는 주 효과를 발휘하는 화학물질 그 자체를 포함한다.

[45] 이와 같이 얻어진 본 발명의 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물은 멜라닌 생성 억제 효과, 항콜라게나제/젤라티나제 활성효과, 자외선 조사 후 MMP-1 발현억제효과, 자외선 조사에 의한 세포독성 완화효과, 피부 보습효과, 피부 탄력효과, 자극완화효과, 상처치유효과가 매우 뛰어나 피부 미백, 피부 탄력강화 또는 피부 보습효과를 복합적으로 나타내는 다기능성 화장품 조성물로 이용될 수 있다.

[46] 본 발명의 화장품 조성물은 상기 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 조성물 총중량에 대해 0.0001 ~ 90중량% 함유하는 것이 좋는데, 0.0001중량% 미만으로

첨가하는 경우에는 그 효과를 기대하기 힘들고, 90중량%를 초과하여 첨가되는 경우에는 뚜렷한 효능 효과의 상승이 보이지 않는다.

[47] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 상기 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물 외에 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 바람직하게는 주 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유하는 것도 무방하다. 예를 들면, 노화방지 성분, 주름개선 성분, 미백 성분, 보습 성분 및 향균 성분 등을 더욱 함유할 수 있다.

[48] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 화장 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제 예컨대 친수성 또는 친유성 겔화제, 친수성 또는 친유성 활성제, 보존제, 향산화제, 용매, 방향제, 충전제, 차단제, 안료, 흡취제, 염료 등을 함유할 수 있다. 이들 다양한 보조제의 양은 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 양이며, 예컨대 조성물 총중량에 대해 0.0001 내지 30중량%이다. 다만, 어떠한 경우라도 보조제 및 그 비율은 본 발명에 따른 화장료 조성물의 바람직한 성질에 악영향을 미치지 않도록 선택될 것이다.

[49] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 제형은 특징의 종류에 한정되는 것은 아니나, 일례로 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형으로 이루어진 기초 화장료 제형과 수중유형 및 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우 펜슬류로 이루어진 색조 화장료 제형 중에서 선택되는 어느 하나의 외관을 가질 수 있다. 또한, 이는 선택적으로 에어로졸 형태로 피부에 적용될 수도 있고, 고체 형태 예컨대, 스틱의 형태일 수도 있다. 이는 피부용 케어 제품 및/또는 메이크업 제품으로서 사용될 수도 있다.

[50] 이와 같이 제조된 본 발명의 화장료 조성물은 피부 미백 효과, 피부 탄력 개선 효과, 피부 보습효과가 매우 우수하고, 세포활성화 효과가 우수하여 피부 재생 및 상처 치유 효능이 뛰어나며 자극완화 효과가 있어 다기능성 화장료 조성물로 이용될 수 있다.

[51]

[52] 한편, 본 발명의 제2실시형태에 따르면, 본 발명은 어류 안구 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[53] 본 발명자들은 관절염 예방 치료 효능이 우수하면서도 부작용이 크게 감소된 관절염 예방 및 치료용 조성물을 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 관절염의 발병에서 어류 안구 파쇄물 또는 추출물을 투여하는 경우에는 면역관용(tolerance) 반응이 크게 증대되어, 관절염 특이적 염증반응이 크게 감소됨으로써, 결국 관절염 예방 및 치료 효능을 달성할 수 있음을 확인하였다.

[54] 본 발명의 조성물에서, 기본적인 유효성분은 어류 안구 파쇄물 또는 추출물이다.

[55] 본 발명의 유효성분인 어류 안구 파쇄물 또는 추출물은 비타민 A, B2 등이 많이

함유되어 있고, 특히 안구 뒤쪽에는 비타민 B1이 많이 들어있어 당질대사를 도와주는 있는 것으로 알려져 있다. 한편, 본 발명자들은 콜라겐에 의해 유도되는 면역관용 반응을 어류 안구 파쇄물 또는 추출물이 상승적(synergic)으로 증가시키는 작용을 한다는 것을 발견하였다. 본 발명의 조성물은 이러한 신규한 발견에 기초하여 조성된 것이다. 또한, 본 발명의 조성물에서 어류 안구 파쇄물 또는 추출물은 IL-10과 TGF- β 와 같은 항염증 사이토카인의 생성을 촉진하는 작용을 한다.

[56] 본 발명에서 어류 안구 파쇄물은 냉동된 어류 안구를 파쇄기, 예를 들면 믹서나 호모게나이저를 이용하여 파쇄시킨 것을 사용할 수 있는데, 바람직하게는 인체 내부에 흡수가 용이한 1 μ m 내지 5mm크기로 균질하게 처리되는 것이 좋다. 본 발명에서 어류 안구 파쇄물은 그 자체로 관절염 특이적 염증반응이 크게 개선시켜 결국 관절염 예방 및 치료 효능을 달성할 수 있으며, 예방 및 치료 효능을 높이기 위해 유효성분을 추출한 추출물 형태로 사용할 수도 있다.

[57] 본 발명에서 어류 안구 추출물은 어류 안구 파쇄물에 2배 내지 20배, 바람직하게는 약 2배 내지 5배의 물, 메탄올 또는 에탄올 등의 저급(C1-C4)알코올의 극성용매 또는 이들의 혼합용매로 10°C 내지 30°C 추출온도에서 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 초고압 추출 등의 추출방법을 이용하여 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 동결건조 하여 극성용매에 가용한 추출물을 수득 가능하다.

[58] 본 발명에서 상기 추출에 초고압 추출 방식을 사용하는 경우, 어류 안구 세포 조직 파괴로 인한 유용 성분의 용출이 쉬워지고, 에너지 수준이 제한된 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스 결합과 같은 약한 결합들에 의한 결합은 분리되어 신물질 용출이 가능하며, 세포독성 물질이 파괴되고, 중요 구성 성분을 단시간 내에 추출이 가능하며, 추출물은 거의 불순물이 없고, 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다.

[59] 본 발명에서 상기 초고압 추출은 압력 100 내지 3000MPa, 40 내지 90°C 온도에서 5 내지 60분간 처리하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 압력 500~1000MPa, 온도 40~60°C에서 10~30분간 처리한다. 상기 압력조건이 100MPa 이하의 낮은 압력 조건이거나, 추출시간이 5분 이내인 경우에는 어류 안구 세포 조직 파괴가 충분히 이루어지지 않아 유용 성분의 용출 효율이 떨어지고, 압력조건이 3000MPa 이상의 높은 압력 조건이거나, 추출시간이 60분 이상인 경우는 추출에 소모되는 에너지 효율이 떨어지므로 상기 범위에서 추출하는 것이 바람직하고, 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스 결합과 같은 약한 결합들을 효과적으로 제거하기 위해 40 내지 90°C 온도 조건에서 수행하는 것이 바람직하다. 또한, 초고압 추출시 pH는 특정 pH에 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 초고압기 내부 물의 pH를 1~6으로 낮춰 처리하는 것이 좋다. pH를 상기 범위 내로 맞춰주는 경우 유용성분의 용출 효율이 증대된다.

[60] 또한, 본 발명은 이와 같이 초고압 처리한 어류의 안구 추출물을 정제수,

메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산 및 그의 혼합물로부터 선택된 추출용매를 이용하여 환류 추출하고 냉침한 후, 여과시킨 여과액을 농축조로 이송하여 50°C 이하에서 감압농축 및 동결 건조하는 것이 가장 바람직하다.

- [61] 또한, 본 발명은 이렇게 얻어진 감압농축물 및 동결건조물이 0.001 ~ 70.0 중량% 함유되게 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 중에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 추출물을 제조할 수 있다.
- [62] 본 발명의 어류 안구 파쇄물 또는 추출물은 면역관용 반응을 유도하는 자가 항원으로 작용한다. 관절염은 면역반응에 관계되는 자가 항원의 종류가 매우 다양하여 특이적인 치료제 개발이 불가능하였다. 본 발명의 핵심 원리는 생체 내 장 관계 면역 시스템(Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT)에서 일어나는 면역관용을 이용하는 것이다. 면역관용이란, 경구를 통해 전달된 물질에 대해 소장 상피세포 아래에 존재하는 면역시스템(GALT)이 선택적인 면역 억제 반응을 일으키는 것이다.
- [63] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 글루코사민, 콘드로이틴 또는 이의 조합을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 글루코사민 및 콘드로이틴은 모두 연골 구성성분이다. 따라서, 어류 안구 파쇄물 또는 추출물 이외에 자가 항원으로 작용할 수 있는 다른 연골 구성성분(글루코사민 및 콘드로이틴)을 이용하면 보다 향상된 면역관용 반응을 유도할 수 있다. 또한, 글루코사민은 연골형성과 재생을 촉진하는 작용을 한다. 콘드로이틴은 면역관용 반응을 유도하는 것뿐만 아니라 연골을 파괴하는 효소들을 억제하여 연골 보호 작용을 한다.
- [64] 본 발명의 관절염 예방 또는 치료 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있으며, 이 경우 유효성분으로서의 상기 성분들 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [65] 본 발명의 약제학적 조성물은, 면역관용 반응을 유도하여 효능을 발휘하여야 하기 때문에 경구로 투여된다.
- [66] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응

감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 0.01 내지 2000mg/kg(체중)이다.

[67] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 대용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[68] 본 발명의 관절염 예방 또는 치료 조성물은 식품, 특히 기능성 식품 조성물로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분으로서의 어류 안구 파쇄물 또는 추출물 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프룩토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[69] 식품에 대한 용이한 접근성을 고려한다면, 본 발명의 식품은 관절염의 치료 또는 예방에 매우 유용하다.

[70] 여기서, 본 발명의 식품 조성물은 상기 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 조성물 총중량에 대해 0.0001 ~ 90중량% 함유하는 것이 좋은데, 0.0001중량% 미만으로 첨가하는 경우에는 그 효과를 기대하기 힘들고, 90중량%를 초과하여 첨가되는 경우에는 뚜렷한 효능 효과의 상승이 보이지 않는다.

[71] 하기의 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 면역관용 반응을 유도함으로써 친염증 사이토카인(proinflammatory cytokines), 예컨대, TNF- α , IL-1 β 및 IL-12의 발현량을 감소시키고, 항염증 사이토카인(antiinflammatory cytokines), 예컨대, IL-10, Foxp3 및 TGF- β 의 발현량을 증가시켜, Th2 타입 면역반응을 증가시키며 이는 Th1 타입 면역반응을 감소시키게 된다. 결국, 관절 특이적으로 발생하는 자가 면역반응 및 염증반응이 격감됨으로써 관절염 예방 또는 치료 효능을 발휘한다.

[72] 본 발명의 조성물은 관절염(골관절염 및 류마티스성 관절염), 바람직하게는 자가면역 질환의 일종으로서 염증성 질환인 류마티스성 관절염의 예방 또는 치료에 매우 우수한 효능을 발휘한다. 또한, 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 이용되는 성분들은 이미 안전성이 인정된 것이기 때문에 본 발명의 조성물의

인체에 대한 안전성도 매우 우수하다. 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분들은 식품 원료로서 인정된 안전성이 우수한 것으로서, 이러한 성분들에 의해 종래의 의약(예컨대, 메토틱세이트)보다 우수한 관절염 예방 또는 치료 효능을 발휘하는 것은 놀라운 것이다.

- [73] 종래 관절염 치료의 한계성은 면역 반응에 관여하는 자가 항원의 종류가 매우 다양하여 관절염 특이적인 치료제 개발이 어렵고, 개발되어 있는 종래의 관절염 치료제는 단순히 염증 반응만을 억제하는 의약들이며 이들은 장기간 복용 시 안전성 문제와 같은 여러 부작용이 존재하는 문제점이 있었다. 또한, 대부분의 관절염 치료용 건강식품들은 연골구성 성분 중의 하나인 글루코사민 복합체 및 상어 연골 추출물 등을 주원료로 하는 단편적인 기능을 갖고 있었다. 이에 반해, 본 발명의 조성물은 장 관계 면역 시스템에서 일어나는 면역관용을 유도함으로써 부작용 없이 관절에 특이적으로 일어나는 자가 면역 반응 및 염증을 효과적으로 제어하여 관절염을 예방 및 치료할 수 있다.

[74]

- [75] 한편, 본 발명의 제3실시형태에 따르면, 본 발명은 어류 안구 추출물을 포함하는 안구건조증 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

- [76] 본 발명자들은 안구건조증 치료 효능이 우수하면서도 부작용이 크게 감소된 안구건조증 치료용 조성물을 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 어류 안구추출물을 안구건조증에 사용하는 경우에 보습 효과 및 각막 상피세포 장애가 신속하게 치료되어, 결국 안구건조증을 치료할 수 있음을 확인하였다.

- [77] 본 발명의 조성물에서, 기본적인 유효성분은 어류 안구 추출물이다. 본 발명에서 어류 안구 파쇄물은 그 자체로 안구 보습 효과, 각막 상피세포 장애의 치유 효과 등을 나타내지만, 눈에 이물감이 느껴지지 않고 안구건조증 치료 및 예방 효능을 높이기 위해 유효성분을 추출한 추출물 형태로 사용하는 것이 바람직하다.

- [78] 본 발명에서 어류 안구 추출물은 어류 안구 파쇄물에 2배 내지 20배, 바람직하게는 약 2배 내지 5배의 물, 메탄올 또는 에탄올 등의 저급(C1-C4) 알코올의 극성용매 또는 이들의 혼합용매로 10°C 내지 30°C 추출온도에서 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 초고압 추출 등의 추출방법을 이용하여 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 동결건조 하여 극성용매에 가용한 추출물을 수득 가능하다.

- [79] 본 발명에서 상기 추출에 초고압 추출 방식을 사용하는 경우, 어류 안구 세포 조직 파괴로 인한 유용 성분의 용출이 쉬워지고, 에너지 수준이 제한된 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스결합, 수소결합과 같은 약한 결합들에 의한 결합은 분리되어 신물질 용출이 가능하며, 세포독성 물질이 파괴되고, 중요 구성 성분을 단시간 내에 추출이 가능하며, 추출물은 거의 불순물이 없고, 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다.

- [80] 본 발명에서 상기 초고압 추출은 압력 100 내지 3000MPa, 40 내지 90°C

온도에서 5 내지 60분간 처리하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 압력 500 ~ 1000MPa, 온도 40~60°C에서 10 ~ 30분간 처리한다. 상기 압력조건이 100MPa 이하의 낮은 압력 조건이거나, 추출시간이 5분 이내인 경우에는 어류 안구 세포 조직 파괴가 충분히 이루어지지 않아 유용 성분의 용출 효율이 떨어지고, 압력조건이 3000MPa 이상의 높은 압력 조건이거나, 추출시간이 60분 이상인 경우는 추출에 소모되는 에너지 효율이 떨어지므로 상기 범위에서 추출하는 것이 바람직하고, 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스결합과 같은 약한 결합들을 효과적으로 제거하기 위해 40 내지 90°C 온도 조건에서 수행하는 것이 바람직하다. 또한, 초고압 추출시 pH는 특정 pH에 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 초고압기 내부 물의 pH를 1 ~ 6으로 낮춰 처리하는 것이 좋다. pH를 상기 범위 내로 맞춰주는 경우 유용성분의 용출 효율이 증대된다.

- [81] 또한, 본 발명은 이와 같이 초고압 처리한 어류의 안구 추출물을 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산 및 그의 혼합물로부터 선택된 추출용매를 이용하여 환류 추출하고 냉침한 후, 여과시킨 여과액을 농축조로 이송하여 50°C 이하에서 감압농축 및 동결 건조하는 것이 더욱 바람직하다.
- [82] 본 발명의 안구건조증 치료용 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 점안제 형태로 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 대용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [83] 이때, 상기 어류 안구 추출물은 전체 조성물 기준으로 0.01 내지 10%(w/v)로 포함되어 제조될 수 있는데, 0.01 미만인 경우에는 안구건조증 치료 효과를 충분히 달성할 수 없고, 10%(w/v) 이상인 경우 안구건조증 치료 효과 증가가 미미하므로 상기 범위가 바람직하다.
- [84] 본 발명의 안구건조증 치료용 조성물에서 점도의 설정은 약리활성물질의 종류와 약물 중 농도, 안구내의 전해질의 농도 및 그 용도에 따라 이상적인 조성물의 양 및 투약 범위가 달라진다. 안구 상의 수술 또는 이물에 의한 상처 치유 및 외부 물질 염증 또는 과민성 면역 반응의 경감을 위하여, 상대적으로 중·고농도의 약물이 이상적이며, 투여 횟수는 치료되는 안구건조증의 중증도에 따라 어느 정도 변할 수 있으나, 일반적으로 하루(예를 들어, 24시간)에 2회 내지 4회 안구에 점적 투여될 것이다.
- [85] 또한, 본 발명의 안구건조증 치료용 조성물은 항염증성 약물 및 스테로이드계 또는 비스테로이드계 소염성 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [86] 본 발명에서 사용할 수 있는 소염성 약물로는 덱사메타손, 플루오로메톨론, 프레드니솔론, 브롬페낙, 디클로페낙, 프루비프로펜, 케토로락, 및 그의 염 등이 있다. 바람직하게는 상기 소염성 약물은 덱사메타손 0.01 내지 2.0%(w/v), 플루오로메톨론 0.01 내지 2.0%(w/v), 프레드니솔론 0.01 내지 5.0%(w/v),

브롬페낙 0.001 내지 1.0%(w/v), 디클로페낙 0.05 내지 1.0%(w/v), 프루비프로펜 0.005 내지 0.5%(w/v), 케토로락 0.005 내지 1.0%(w/v), 및 그의 염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 더욱 바람직하게는 플루오로메톨론과 디클로페낙을 사용할 수 있다.

[87] 한편, 본 발명의 조성물은 보존제, 등장화제, 안정화제, 완충제 및 pH 조절제로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

[88] 상기 보조제는 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 것들로서, 각각의 목적에 따라서 달라지므로 특별한 제한이 없으며, 안과용 조성물의 일반적인 pH, 삼투압 및 점도의 범위를 따른다. 다만, 유효 성분들에 미치는 영향을 고려하여, 전체 조성물을 기준으로 0.001 내지 20%(w/v)의 함량으로, 바람직하게는 0.01 내지 10%(w/v)의 함량으로 추가하는 것이 좋다.

[89] 또한, 눈물은 고분자 물질이나 당단백질류, 무기질류(vitamine 등)와 무기염류를 포함하여 생리 식염액에 상당하는 0.9%(w/v) 염화나트륨 용액의 삼투압과 동일하다. 본 발명의 점안용 조성물은 안구에 투여 시 생리 식염액의 삼투압인 290 mOsmol/kg 근처로 조정하는 것이 바람직하며, 그 범위는 270 내지 310 mOsmol/kg이다.

[90] 본 발명에서 쓰인 안구건조증 치료용 조성물의 삼투압 조절 물질은 D-소르비톨, 글리세린, 농글리세린, 만니톨 및 말티톨 시럽 및 이온성 물질로 이루어진 군 중에서 선택된 한 가지 이상의 것이며 그 조성비는 한 가지 등장화제 사용 시 부피에 대한 중량비로 0.5 내지 20% 정도이며, 바람직하게는 1 내지 10% 사이가 된다.

[91] 특히, 천연 고분자를 수성 점안액으로 조성하기 위해 첨가되는 안정화제로서 에테트산 나트륨 0.05 내지 0.2%(w/v) 및 ϵ -아미노카프론산 0.01 내지 0.05%(w/v), 무수황산나트륨 0.01 내지 0.2%(w/v), 아스코르브산 0.02 내지 0.5%(w/v), 구연산 0.3 내지 2.0%(w/v) 등으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[92] 본 발명에서 보존제로서는 염화벤잘코늄 0.002 내지 0.1%(w/v), 세트리미드 0.002 내지 0.01%(w/v), 치메로살 0.001 내지 0.01%(w/v), 클로로부탄올 0.25 내지 0.5%(w/v), 폴리헥사메틸렌비구아니드 0.002 내지 0.1%(w/v), 파라옥시안식향산 알킬 메칠, 파라옥시안식향산 에칠, 파라옥시안식향산 프로필 또는 파라옥시안식향산 부틸 0.001 내지 0.05%(w/v), 디히드로초산 0.001 내지 0.1%(w/v), 클로로크레졸 0.0001 내지 0.05%(w/v), 및 클로로헥시딘 0.001 내지 0.01%(w/v)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[93] 한편, 망막으로 빛을 전달하는 경로 중, 투명한 조직인 각막은 빛의 굴절과 전달에 주요한 기능을 하고, 혈관이 존재하지 않는 대신 풍부한 신경이 분포되어 있는 조직이다. 각막 세포의 성장은 바닥세포(basal cell)에서 표면세포(superficial cell)로 분화되며, 정상 안구의 경우 표면세포의 탈락까지 약 1~2주 경과하는 것으로 알려져 있다. 전안부 외상(anterior segment trauma)의 발생 분포는 주로

각막, 눈꺼풀이 대상이 되고, 그 원인은 화학적 손상, 물리적 손상으로 나뉠 수 있으며, 물리적 손상에는 외부 이물에 의한 손상과 수술에 의한 손상으로 나뉠 수 있다.

- [94] 각막상피(corneal epithelium)의 탈락은 주로 표면 세포와 날개세포층이 대상이 되며, 인접한 상피세포가 미끄러져 이동해 오면서 상피 결손 부위를 덮어주고 바닥세포의 유사분열에 의하여 치유되는 메커니즘을 갖는다. 이와 같은 치유 메커니즘 중 염증 반응은 윤부를 통해 손상 부위로 백혈구가 침윤하여 생기는 알려져 있으며, 과도한 염증반응을 억제하는 약물로서 스테로이드계가 처방되고 있다. 일반적으로 스테로이드계 상처 치유 점안액의 경우 초기 10일간 사용하여 염증세포 침윤을 줄이는 동시에 단백질분해효소의 유리를 막는 것으로 알려져 있으나, 10일 이상의 상처가 치유되지 않는 경우, 지속적인 스테로이드계 상처 치유제의 투약 시 아교질섬유의 파괴를 조장하고, 손상 부위 회복과정을 저해하여 각막 기질 층의 괴사가 진행되는 것으로 알려져 있다. 특히, 장기 투여 시에는 녹내장이나 백내장, 세균성 결막염 등을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다.

- [95] 본 발명의 어류 안구 추출물을 안과 치료를 위한 약리활성물질(유효성분)로 포함하는 점안용 조성물로 사용하면, 각·결막 상피세포에 손상 부위에 접합성이 좋은 겔을 형성함으로써, 안구내의 조직, 특히 각막 상피세포층을 보호하고 생장 촉진을 유도할 수 있으며, 세포의 피브린(Fibrin) 생성을 촉진시킴으로써, 안구 손상부위의 조직생성을 촉진하여 손상부위를 수복하는 데 도움을 준다.

- [96] 따라서, 본 발명의 어류 안구 추출물을 유효성분으로 포함하는 점안용 조성물은 각·결막 상피 장애에 대한 예방 또는 치료 효과를 갖는다. 특히, 기존의 스테로이드제 또는 비스테로이드제 약물의 장기 사용에 의한 부작용을 경감시키는 각·결막 상피 장애증 약물로서 특별한 가치가 있다.

[97]

발명의 효과

- [98] 본 발명에 의하면 피부 화장료에 적용이 가능하고 인체에 무해하여 안전성이 우수한 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 제공할 수 있다.

- [99] 또한, 본 발명은 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 이용하여 피부 미백 효과, 피부 보습 효과, 피부 탄력 개선 효과가 매우 우수한 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

- [100] 또한, 본 발명은 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 이용하여 세포활성화 효과가 우수하여 피부 재생 및 상처 치유 효능이 뛰어나고 자극완화 효과도 매우 뛰어난 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

- [101] 또한, 본 발명은 장관계 면역 시스템에서 일어나는 면역관용을 유도함으로써 부작용 없이 관절에 특이적으로 일어나는 자가 면역반응 및 염증을 효과적으로 제어하여 관절염을 예방 및 치료할 수 있는 조성물을 제공할 수 있다.

[102] 또한, 본 발명은 어류 안구 추출물을 포함하는 점안용 조성물을 제공함으로써, 안구 내 작은 상처와 소수술, 화학적 손상으로 인한 상처에 우수한 치유 효과를 가진 안구건조증 치료용 약물을 제조할 수 있다.

[103]

도면의 간단한 설명

[104] 도 1은 본 발명의 어류 안구 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 관절염 예방 효능을 AIA(adjutant induced arthritis) 유도된 래트를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[105] 도 2는 본 발명의 어류 안구 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 관절염 치료 효능을 AIA 유도 래트를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[106] 도 3은 본 발명의 어류 안구 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 관절염 치료 효능을 각각의 조성물, 본 발명의 혼합조성물 및 관절염 치료제(메토트렉세이트:MTX)와 비교한 실험 결과를 보여준다.

[107] 도 4는 본 발명의 어류 안구 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 친염증(proinflammatory) 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 혼합 림프구를 이용하여 실시간 PCR 방법으로 분석한 결과이다.

[108] 도 5는 본 발명의 어류 안구 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 세포 증식에 미치는 영향을 관절 주위 혼합 림프구를 이용하여 분석한 결과이다.

[109] 도 6은 본 발명의 어류 안구 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 관절염 예방 효능을 AIA(adjutant induced arthritis) 유도된 래트를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[110] 도 7은 본 발명의 어류 안구 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 관절염 치료 효능을 AIA 유도 래트를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

[111] 도 8은 본 발명의 어류 안구 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 관절염 치료 효능을 각각의 조성물, 본 발명의 혼합조성물 및 관절염 치료제(메토트렉세이트:MTX)와 비교한 실험 결과를 보여준다.

[112] 도 9는 본 발명의 어류 안구 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 친염증(proinflammatory) 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 혼합 림프구를 이용하여 실시간 PCR 방법으로 분석한 결과이다.

[113] 도 10은 본 발명의 어류 안구 파쇄물을 유효성분으로 함유하는 조성물의 세포 증식에 미치는 영향을 관절 주위 혼합 림프구를 이용하여 분석한 결과이다.

[114] 도 11은 본 발명의 어류 안구 추출물을 포함하는 조성물 첨가후 시간 경과에 따른 한천 배지의 수분 증발량을 보여주는 그래프이다.

[115] 도 12는 본 발명의 어류 안구 추출물을 포함하는 조성물의 각막 상피 손상 유발 후 시간 경과에 따른 손상깊이 비를 나타낸 그래프이다.

[116]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[117] 이하, 본 발명에 대해 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지 모두 포함한다.

[118]

[119] **실시예 1, 6 : 참다랑어 또는 고등어 안구의 파쇄물 제조**

[120] 신선한 참다랑어 또는 다랑어를 급냉한 후 육질과 분리하여 안구를 얻은 후 냉동시켰다. 냉동된 참다랑어 안구를 호모게나이저를 이용하여 균질하게 파쇄하였다.

[121]

[122] **실시예 2, 7 : 참다랑어 또는 고등어 안구의 추출물 제조**

[123] 신선한 참다랑어 또는 고등어를 급냉한 후 육질과 분리하여 얻어진 냉동된 안구를 70% 에탄올 수용액을 이용하여 100 ~ 120°C에서 약 2 ~ 3시간 동안 추출하였다.

[124]

[125] **실시예 3, 8 : 참다랑어 또는 고등어 안구의 추출물 제조**

[126] 신선한 참다랑어 또는 고등어를 급냉한 후 육질과 분리하여 얻어진 냉동된 안구에 초고압처리기를 이용하여 압력 1000MPa 하에서 온도를 50°C로 승온시키고 30분간 처리한 후 실온으로 냉각시켰다. 초고압 처리한 참다랑어 안구 추출물을 정제수를 이용하여 5시간씩 3회 환류 추출하고 냉침한 후, 와트만(whatman) #10 여과지로 여과하였다. 이렇게 얻은 여과액을 다시 0.25uM의 여과기를 이용하여 최종 여과하였다. 여과가 완료되면 얻어진 여과액을 농축조로 이송하여 50°C 이하에서 감압농축 및 동결 건조하였다. 얻어진 감압농축물 및 동결건조물이 0.001~70.0 중량% 함유되게 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 중 1종 이상의 용매를 사용하여 최종 추출물을 제조하였다.

[127]

[128] **실시예 4, 9 : 참다랑어 또는 고등어 안구의 추출물 제조**

[129] 초고압 처리한 참다랑어 안구 추출물을 70%(v/v) 에탄올 수용액으로 환류 추출하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3, 8과 동일하게 참다랑어 안구의 추출물을 제조하였다.

[130]

[131] **실시예 5, 10 : 참다랑어 또는 고등어 안구의 추출물 제조**

[132] 초고압 처리한 참다랑어 안구 추출물을 30%(v/v) 부틸렌글리콜로 환류 추출하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3, 8과 동일하게 참다랑어 안구의 추출물을 제조하였다.

[133]

[134] **비교예 1 : 소 안구의 파쇄물의 제조**

[135] 참다랑어 또는 고등어 대신에 소 안구를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예

1과 동일하게 소 안구의 파쇄물을 제조하였다.

[136]

[137] **비교예 2 : 소 안구의 추출물의 제조**

[138] 참다랑어 또는 고등어 대신에 소 안구를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일하게 소 안구의 추출물을 제조하였다.

[139]

[140] **비교예 3 : 소 안구의 추출물의 제조**

[141] 참다랑어 또는 고등어 대신에 소 안구를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 3과 동일하게 소 안구의 파쇄물을 제조하였다.

[142]

[143] **비교예 4 : 소 안구의 추출물의 제조**

[144] 참다랑어 또는 고등어 대신에 소 안구를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 4과 동일하게 소 안구의 파쇄물을 제조하였다.

[145]

[146] **비교예 5 : 소 안구의 추출물의 제조**

[147] 참다랑어 또는 고등어 대신에 소 안구를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 5와 동일하게 소 안구의 파쇄물을 제조하였다.

[148]

[149] **시험예 1 : B16F1 멜라노사이트를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 측정**

[150] 본 시험예는 상기 실시예 1 내지 10 및 비교예 1 내지 5에서 수득한 파쇄물 또는 추출물들의 미백효과를 확인하기 위해, B16F1 멜라노사이트에 대한 멜라닌 생성 억제 정도를 측정하였다.

[151] 본 시험예에 사용된 B16F1 멜라노사이트는 마우스에서 유래한 세포균주이며, 멜라닌이라는 흑색색소를 분비하는 세포이다. 이 세포의 인공배양 중에 시료를 처리하여 멜라닌 흑색색소가 감소하는 정도를 비교 평가하였다. 본 시험예에 사용된 B16F1 멜라노사이트는 ATCC (American Type Culture Collection, 기탁번호 : 6323)로부터 분양받아 사용하였다.

[152] B16F1 멜라노사이트의 멜라닌 생합성 억제효과 측정은 다음과 같이 행하였다. B16F1 멜라노사이트를 6-웰 플레이트에 각 웰당 2×10^6 농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후 독성을 유발하지 않는 농도로 시료를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 세포를 trypsin-EDTA로 떼어낸 후 세포수를 측정한 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다.

[153] 세포 내 멜라닌의 정량은 로탄(Lotan : *Cancer Res.*, 40: 3345-3350, 1980)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 셀 펠릿을 PBS로 1회 세척한 후 균질화 버퍼액(50 mM 소듐 포스페이트, pH 6.8, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF) 1 ml를 첨가하여 5분간 와류하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 얻은 세포 여액에 1N NaOH (10% DMSO)를 첨가하여 추출된 멜라닌을 용해한 후 마이크로 플레이트 판독기로 405 nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정한 다음

멜라닌을 정량하여 시료의 멜라닌 생성 저해율(%)을 측정하였다. B16F1 멜라노사이트의 멜라닌 생성 저해율(%)은 수학적 식 1에 의하여 계산하였으며, IC₅₀ 값은 멜라닌 생성을 50% 저해하는 물질의 농도이다.

[154] 수학적 식 1

$$\text{저해율 (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

[155] A : 시료를 첨가하지 않은 웰의 멜라닌 양

[156] B : 시료를 첨가한 웰의 멜라닌 양

[157] B16F1 멜라노사이트의 멜라닌 생성 억제효과를 시험한 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[158] 표 1

[Table 1]

	멜라닌 생성 억제효과(IC ₅₀)
실시예 1(참다랑어 안구의 파쇄물)	0.30
실시예 2(참다랑어 안구의 추출물)	0.31
실시예 3(참다랑어 안구의 추출물)	0.38
실시예 4(참다랑어 안구의 추출물)	0.25
실시예 5(참다랑어 안구의 추출물)	0.32
실시예 6(고등어 안구의 파쇄물)	0.35
실시예 7(고등어 안구의 추출물)	0.34
실시예 8(고등어 안구의 추출물)	0.40
실시예 9(고등어 안구의 추출물)	0.33
실시예 10(고등어 안구의 추출물)	0.36
비교예 1(소 안구의 파쇄물)	0.51
비교예 2(소 안구의 추출물)	0.50
비교예 3(소 안구의 추출물)	0.75
비교예 4(소 안구의 추출물)	0.42
비교예 5(소 안구의 추출물)	0.55
알부틴	0.33

[159] 상기 표 1에 나타나는 바와 같이, 참다랑어 또는 고등어 안구의 파쇄물 또는 추출물은 소 안구의 파쇄물 또는 추출물에 비해 월등하게 높은 멜라닌 생성 억제효과를 나타냈으며, 기존의 미백제인 알부틴과 동등 이상의 멜라닌 생성 억제효과를 나타내었다.

[160]

[161] **시험예 2 : *in vitro* MMP-1 inhibition assay**

- [162] 본 시험예에서는 상기 실시예 1 내지 10, 비교예 1 내지 5의 파쇄물 또는 추출물에 대하여 기질 금속단백질분해효소(MMP-1) 저해 활성을 생화학적 모델에서 측정하였는데, 이는 정제된 콜라게나제 및 이의 기질인 플루오레세인에 접합된 콜라겐과 젤라틴의 이용을 기초로 한다(EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트, 몰쿨라 프루브).
- [163] 클로스트리디움 히스토리티컴으로부터 정제된 콜라게나제를 상기 EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트내에 공급하였다. 돼지 피부로부터 정제하고 플루오레세인에 접합된 DQ-콜라겐과 0.05M 트리스-HCl, 0.15M NaCl, 5mM CaCl₂ 및 0.2mM 나트륨 아지드(pH 7.6)로 이루어지는 반응 완충액은 EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트(몰쿨라 프로브스)를 이용하였다. 상기 실시예 1 내지 10, 비교예 1 내지 5의 파쇄물 또는 추출물들은 상기 반응 완충액 내에 용해시켰다. 이를 0.02; 0.04%(w/v)에서 테스트하였다. 테스트의 희석액은 25ug/ml의 DQ-콜라겐 및 0.1U/ml의 콜라게나제와 함께 실온에서 15분, 45분, 120분 동안 항온처리하였다.
- [164] 각각의 실험조건에서 콜라게나제와 DQ-콜라겐 혼합물에 상응하는 대조용 혼합물(control)도 동일하게 항온처리하였다.
- [165] 또한 각각의 실험 조건에서 Blank, 이하 '효소 비함유 blank'이라 칭하는 샘플은 DQ-콜라겐의 존재 및 콜라게나제의 부재하에서 항온처리하였다. 각각의 실험은 3회 수행하였다.
- [166] 15분, 45분, 120분 경과 후 DQ-콜라겐의 분해에 상응하는 신호는 형광측정기 (여기:485nm, 방출 505nm)로 측정하였다.
- [167] '효소 비함유 blank' 형광값을 기준으로 하여 각각의 샘플의 형광값을 측정하였다. 결과는 샘플당 형광 단위 및 대조군에 대한 변이율(%)로 나타냈다.
- [168] 표 2

[Table 2]

	저해율(%)처리농도 0.02%	저해율(%)처리농도 0.04%
실시예 1(참다랑어 안구의 파쇄물)	50	60
실시예 2(참다랑어 안구의 추출물)	53	62
실시예 3(참다랑어 안구의 추출물)	42	51
실시예 4(참다랑어 안구의 추출물)	60	68
실시예 5(참다랑어 안구의 추출물)	54	61
실시예 6(고등어 안구의 파쇄물)	50	58
실시예 7(고등어 안구의 추출물)	51	59
실시예 8(고등어 안구의 추출물)	44	52
실시예 9(고등어 안구의 추출물)	58	65
실시예 10(고등어 안구의 추출물)	51	60
비교예 1(소 안구의 파쇄물)	37	43
비교예 2(소 안구의 추출물)	38	44
비교예 3(소 안구의 추출물)	34	40
비교예 4(소 안구의 추출물)	41	47
비교예 5(소 안구의 추출물)	38	44
레티놀	0	5
녹차 추출물	46	55

[169] 상기 표 2에 의하면, 0.02, 0.04%(v/v)에서 테스트된 안구의 파쇄물 또는 추출물들은 투여량 의존성으로 항콜라게나제/젤라티나제 활성을 보유하였다. 또한, 참다랑어 또는 고등어 안구의 파쇄물 또는 추출물은 0.04% 처리 시 각각 클로스트리디움 콜라게나제의 콜라겐 분해활성의 약 52% ~ 68%를 억제하였으며 이는 녹차추출물의 저해 효과보다 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[170]

[171] 시험예 3 : 자외선 조사 후 MMP-1 발현억제 평가

[172] 본 시험예에서는 상기 실시예 1 내지 10 및 비교예 1 내지 5의 파쇄물 또는 추출물들의 UV 조사 및 시료 첨가 후 MMP-1 농도를 측정하기 위해서 ELISA를 실시하였다.

[173] UV 챔버를 이용하여 인간 진피 섬유아세포에 UVA를 5J/cm²의 에너지로 조사하였다. 자외선 조사량과 배양시간은 예비 실험을 통하여 섬유아세포에서

MMP 발현량이 최대가 되는 조건을 확립하였다. 음성 대조군은 은박지로 싸서 UVA의 환경에 같은 시간 유지하였다. UVA 방출량은 UV 라디오미터를 이용하여 측정하였다. UVA가 조사되는 동안의 세포는 이전에 분주된 배지 그대로이고 UVA를 조사한 후 샘플이 들어간 배지로 교환하여 24시간 배양 후 배지를 회수하여 96-웰 플레이트에 코팅하였다. 일차항체(MMP-1 (Ab-5) 단일클론항체와 MMP-2(Ab-3) 단일클론항체)를 처리하고 37°C 에서 60분 반응시켰다. 이차항체인 안티마우스 IgG(whole mouse, alkaline phosphatase conjugated)를 다시 60분 정도 반응시킨 후, 알카린 포스파타제 기질 용액(1mg/mlp-nitrophenyl phosphate in diethanolamine 완충용액)을 상온에서 30분간 반응시키고 마이크로플레이트 리더로 405nm 에서 흡광도를 측정한다. 대조군으로는 시료를 첨가하지 않은 것을 사용하였다.

[174] 표 3

[Table 3]

	처리농도(%)	MMP-1 발현 억제율(%)
실시예 1(참다랑어 안구의 파쇄물)	0.1	20
실시예 2(참다랑어 안구의 추출물)	0.1	21
실시예 3(참다랑어 안구의 추출물)	0.1	18
실시예 4(참다랑어 안구의 추출물)	0.1	24
실시예 5(참다랑어 안구의 추출물)	0.1	21
실시예 6(고등어 안구의 파쇄물)	0.1	20
실시예 7(고등어 안구의 추출물)	0.1	21
실시예 8(고등어 안구의 추출물)	0.1	16
실시예 9(고등어 안구의 추출물)	0.1	23
실시예 10(고등어 안구의 추출물)	0.1	20
비교예 1(소 안구의 파쇄물)	0.1	13
비교예 2(소 안구의 추출물)	0.1	14
비교예 3(소 안구의 추출물)	0.1	11
비교예 4(소 안구의 추출물)	0.1	16
비교예 5(소 안구의 추출물)	0.1	14
레티놀	0.1	21
대조군	-	-

[175] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 자외선 조사시에 발현이 유도되는 MMP-1에

대하여 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 참다랑어 또는 고등어 안구의 파쇄물 또는 추출물은 높은 억제율을 보였으며 이는 양성 대조군으로 사용한 레티놀의 억제율과 동등 이상의 결과였다.

[176]

[177] **시험예 4 : 자외선조사에 의한 세포독성 완화 효과**

[178] 본 시험예는 상기 실시예 1 내지 10, 비교예 1 내지 5의 파쇄물 또는 추출물의 자외선 조사에 의한 세포독성의 완화효과를 평가하기 위하여 실시되었다.

[179] 섬유아세포(fibroblast)를 24-웰 시험 플레이트에 1×10^5 개씩 넣고 24시간 동안 부착시켰다. 각 웰을 PBS로 1회 세척하고 각 웰에 500 μ l의 PBS를 넣었다. 이 섬유아세포에 자외선 B(UVB) 램프(Model : F15T8, UV B 15W, Sankyo Dennki사, Japan)를 이용하여 자외선 10mJ/cm²를 조사한 후 PBS를 덜어내고 세포배양 배지(DMEM에 10% FBS가 첨가된 것) 1ml을 첨가하였다. 여기에 평가하고자 하는 안구 초고압 추출물을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간이 지나면 배지를 제거하고, 각 웰 당 세포배양 배지 500 μ l 배지와 MTT 용액(2.5mg/ml) 60 μ l를 넣은 후 2시간 동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거하고 이소프로판올-HCl(0.04 N)을 500 μ l씩 넣어주었다. 5분간 진탕하여 세포를 용해시키고 상등액 100 μ l씩을 96-웰 시험 플레이트에 옮긴 후, 마이크로플레이트 판독기에서 565nm 흡광도를 측정하였다. 수학식 2에 의해 세포생존율(%)을 측정하고 자외선에 의한 세포독성 완화율은 수학식 3에 의하여 계산하였다.

[180] 수학식 2

$$\text{세포생존율}(\%) = [(St-Bo)/(Bt-Bo)] \times 100$$

[181] Bo : 세포배양배지만을 발색 반응한 웰의 565 nm 흡광도

[182] Bt : 시료를 처리하지 않은 웰을 발색 반응한 웰의 565 nm 흡광도

[183] St : 시료를 처리한 웰을 발색 반응한 웰의 565 nm 흡광도

[184] 수학식 3

$$\text{자외선에 의한 세포독성 완화율}(\%) = [1 - (St-Bo)/(Bt-Bo)] \times 100$$

[185] Bo : 자외선 조사하지 않고 시료 처리하지 않은 웰의 세포 생존율

[186] Bt : 자외선 조사하고 시료를 처리하지 않은 웰의 세포생존율

[187] St : 자외선 조사하고 시료를 처리한 웰의 세포생존율

[188] 표 4

[Table 4]

	처리농도(%)	세포독성 완화율(%)
실시예 1(참다랑어 안구의 파쇄물)	0.01	38
	0.02	60
실시예 2(참다랑어 안구의 추출물)	0.01	39
	0.02	61
실시예 3(참다랑어 안구의 추출물)	0.01	33
	0.02	54
실시예 4(참다랑어 안구의 추출물)	0.01	41
	0.02	63
실시예 5(참다랑어 안구의 추출물)	0.01	38
	0.02	60
실시예 6(고등어 안구의 파쇄물)	0.01	37
	0.02	60
실시예 7(고등어 안구의 추출물)	0.01	37
	0.02	60
실시예 8(고등어 안구의 추출물)	0.01	31
	0.02	50
실시예 9(고등어 안구의 추출물)	0.01	39
	0.02	62
실시예 10(고등어 안구의 추출물)	0.01	36
	0.02	59
비교예 1(소 안구의 파쇄물)	0.01	29
	0.02	45
비교예 2(소 안구의 추출물)	0.01	29
	0.02	46
비교예 3(소 안구의 추출물)	0.01	22
	0.02	38
비교예 4(소 안구의 추출물)	0.01	31
	0.02	47

비교예 5(소 안구의 추출물)	0.01	30
	0.02	45

- [189] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 참다랑어 또는 고등어 안구의 파쇄물 또는 추출물은 자외선에 의한 세포 독성을 0.02% 농도에서 50 ~ 62% 정도 완화하여 자외선에 의한 세포독성을 낮은 농도에서도 효과적으로 방어함을 알 수 있었다.
- [190]
- [191] **시험예 5 : 세포 배양기술을 이용한 자극완화 효과 평가**
- [192] 본 시험예는 상기 실시예 1 내지 10, 비교예 1 내지 5의 파쇄물 또는 추출물의 피부 자극완화 효과를 평가하기 위하여 세포배양 기술을 이용하여 피부자극을 유발하는 물질인 소듐라우릴설페이트(Sodium Lauryl Sulfate; SLS)에 의한 세포사멸을 저해시키는 정도로 자극완화 효과를 평가하였다.
- [193] SLS는 화장품 기재의 피부자극 평가의 기준이 되는 물질로 세포막에 결합되어 세포대사 억제와 세포막을 파괴하여 피부자극을 유발하는 물질이다.
- [194] 본 시험예는 사람 섬유아세포에 SLS와 초고압 안구 추출물들을 동시에 첨가하였을 때 SLS에 의한 세포사멸을 감소시키는 효과를 평가한 것이다.
- [195] 본 시험예에 사용된 Hs68 섬유아세포는 사람의 피부 진피세포로 ATCC (American Type Culture Collection, 기탁번호 : 1635)에서 분양받아 사용하였다.
- [196] 세포배양기술을 이용한 자극완화 평가실험은 다음과 같이 행하였다.
- [197] 사람 유래의 섬유아세포를 96공 평판 배양기에 각 웰당 1×10^5 농도로 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 0.002% SLS 단독, 0.002% SLS와 상기 실시예 1 내지 10, 비교예 1 내지 5의 파쇄물 또는 추출물을 0.1% 동시에 처리하고 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후 MTT(Sigma) 시약을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 1N NaOH/이소프로판올용액을 첨가하여 20분간 교반한 후 흡광광도계로 565nm에서 흡광도를 측정하여 초고압 안구 추출물들이 SLS에 의한 세포사멸을 저해하는 효과를 측정하여 표 5에 나타내었다.
- [198] 표 5

[Table 5]

시료명	섬유아세포 생존율(%)
0.002% SLS	41
0.002% SLS + 실시예 1(참다랑어 안구의 파쇄물)	76
0.002% SLS + 실시예 2(참다랑어 안구의 추출물)	77
0.002% SLS + 실시예 3(참다랑어 안구의 추출물)	74
0.002% SLS + 실시예 4(참다랑어 안구의 추출물)	80
0.002% SLS + 실시예 5(참다랑어 안구의 추출물)	77
0.002% SLS + 실시예 6(고등어 안구의 파쇄물)	75
0.002% SLS + 실시예 7(고등어 안구의 추출물)	75
0.002% SLS + 실시예 8(고등어 안구의 추출물)	72
0.002% SLS + 실시예 9(고등어 안구의 추출물)	78
0.002% SLS + 실시예 10(고등어 안구의 추출물)	75
0.002% SLS + 비교예 1(소 안구의 파쇄물)	69
0.002% SLS + 비교예 2(소 안구의 추출물)	70
0.002% SLS + 비교예 3(소 안구의 추출물)	66
0.002% SLS + 비교예 4(소 안구의 추출물)	73
0.002% SLS + 비교예 5(소 안구의 추출물)	70

[199] 상기 표 5에 나타나는 바와 같이, 참다랑어 또는 고등어 안구의 파쇄물 또는 추출물은 SLS에 의해서 유발되는 세포사멸을 효과적으로 억제시킴으로써 화장품 기재와 함께 처방하였을 때 화장품 기재로 일어날 수 있는 피부 자극을 감소시키는 자극완화 물질임을 알 수 있었다.

[200]

[201] 실시예 11, 12 및 비교예 6: 화장품 제조

[202] 본 실시예에서는 상기 실시예 4, 9 및 비교예 4에서 수득한 추출물을 이용하여化妆原料를 제조하였다. 제조된 化妆原料는 크림 형태이고, 그 조성은 표 6에 나타난 바와 같다.

[203] 표 6에 기록되어 있는 '나'상을 가열하여 70°C 에 보존하였고, 보존된 '나'상에 '가'상을 가하여 예비 유화를 시킨 후, 호모믹서로 균일하게 유화한 다음 서서히 냉각하여 각각의 크림(실시예 11, 12 및 비교예 6)을 제조하였다.

[204] 표 6

[Table 6]

원료		실시 예 11	실시예 12	비교예 6	참조예
가	스테아릴알콜	8	8	8	8
	스테아린산	2	2	2	2
	스테아린산콜레스테롤	2	2	2	2
	스쿠알란	4	4	4	4
	2-옥틸도데실알콜	6	6	6	6
	폴리옥시에틸렌(25몰부가) 알콜에스테르	3	3	3	3
	글리세릴모노스테아린산에스테르	2	2	2	2
나	실시예 4(참다랑어 안구의 추출물)	5	-	-	-
	실시예 9(고등어 안구의 추출물)	-	5	-	-
	비교예 4(소 안구의 추출물)	-	-	5	-
	Na-히알루론산염	-	-	-	5
	프로필렌글리콜	5	5	5	5
	정제수	100에 대한 잔량	100에 대한 잔량	100에 대한 잔량	100에 대한 잔량

[205] 단위 : 중량%

[206]

[207] 시험예 6 : 피부 보습 효과 측정

[208] 본 시험예는 상기 실시예 11, 12, 비교예 6, 참조예에서 제조한 화장료에 대하여 사람을 대상으로 피부 보습 효과를 비교실험을 행하여 평가하였다.

[209] 실험자(30대-40대의 여성) 30명을 대상으로 이중 10명의 얼굴 오른쪽 부위에는 실시예 11에서 제조된 크림을, 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 6에서 제조된 크림을, 다른 10명의 얼굴 오른쪽 부위에는 실시예 12에서 제조된 크림을, 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 6에서 제조된 크림을 바르고 나머지 10명의 얼굴 오른쪽 부위에는 참조예에서 제조된 크림을, 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 6에서 제조된 크림을 각각 1일 2회씩 연속 4주간 도포하였다. 제품 도포 전(0주), 제품 도포 2주, 4주 후에 피험자의 시험 부위의 보습을 Corneometer를 이용하여 측정하였다. 4주간 시험에 참여한 모든 피험자들에게서 이상반응은 없었다.

[210] Corneometer는 피부 표면에 Probe를 접촉 시 probe의 head에 내재된 센서에 전도되는 미미한 전류의 용량(Capacitance)을 계측하여 수분 함유량의 수치를

나타내며, 수치가 높게 측정될수록 피부의 수분 함유량이 많은 것을 의미한다.

[211] 표 7는 실시예 11, 12 비교예 6 및 참조예에서 제조된 크림을 사용한 피험자의 피부보습 결과이다.

[212] 표 7

[Table 7]

시료명	제품 도포 기간(주)		
	0	2	4
실시예 11	64.17	73.54	77.65
실시예 12	63.94	72.25	76.88
비교예 6	63.96	70.12	73.78
참조예	63.84	68.96	72.60

[213] $n=30, p<0.05$

[214] 피부보습 개선율은 수학적 4에 의하여 산출하였으며, 결과는 표 8과 같다.

[215] 수학적 4

$$\text{피부 보습 개선율} = [(B-A)/A] \times 100$$

[216] A : 0일 보습 측정결과

[217] B : 2, 4주 보습 측정결과

[218] 표 8

[Table 8]

시료명	제품 도포 기간(주)	
	2	4
실시예 11	14.60	21.01
실시예 12	13.00	20.24
비교예 6	9.63	15.35
참조예	8.02	13.72

[219] $n=30, p<0.05$

[220] 상기 표 8에 의하면, 참다랑어 또는 고등어 안구의 추출물은 소 안구의 추출물보다 우수한 피부 보습 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[221]

[222] 시험예 7 : 피부탄력 개선 효과의 평가

[223] 본 시험예에서는 상기 실시예 11, 12 및 비교예 6의 크림에 대하여 인체에서의 피부탄력 개선 효과를 다음과 같이 평가하였다.

[224] 실험자(30대-40대의 여성) 30명을 대상으로 이중 15명의 얼굴 오른쪽 부위에는

실시에 11에서 제조된 크림을, 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 6에서 제조된 크림을, 나머지 15명의 얼굴 오른쪽 부위에는 실시에 12에서 제조된 크림을, 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 6에서 제조된 크림을 각각 1일 2회씩 연속 2개월간 도포하였다.

- [225] 실험완료 후 피부 탄력 개선 효과는 제품 사용 전과 2개월간 사용 후에 피부탄력측정기(cutometer SEM 575, C+K Electronic Co., Germany)를 이용하여 측정하였다. 실험결과는 하기 표 9에 Cutometer SEM 575의 $\Delta R8$ 값으로 기재하였는데 R8값은 피부의 점탄성(viscoelasticity)의 성질을 나타낸다.

- [226] 표 9

[Table 9]

시료명	피부탄력효과($\Delta R8$)
실시예 11	0.37
실시예 12	0.35
비교예 6	0.23

- [227] $n=30, p<0.05$

- [228] 상기 표 9에서 나타난 바와 같이, 참다랑어 또는 고등어 안구의 추출물이 소안구의 추출물에 비하여 피부 탄력개선 효과가 훨씬 우수함을 알 수 있었다.

- [229]

- [230] **시험예 8 : 피부 전층 결손 모델에서의 상처치유 효과**

- [231] 본 시험예에서는 실시예 11, 12 및 비교예 6의 크림에 대하여 실험용 쥐를 대상으로 피부 전층 결손 모델에서의 상처 치유 효과를 비교실험을 행하여 평가하였다.

- [232] 각 날짜별로 5 마리로 무작위 체중에 의해 군 분리 한 후 시험 1일째에 전층결손창상 모델을 제작하였다. 창상 유발은 시험동물의 배부에 술자시선에 따라 왼쪽 위부터 아래 순으로 창상 1, 2를 지정하고 오른쪽 위부터 아래 순으로 창상 3, 4로 지정하였다.

- [233] 실험용 쥐 배부에 가로, 세로 10mm의 피부 전층 결손창을 만든 후 시험물질 Patch를 붙이고 1, 3, 7, 9, 14일 각각의 창상수축율을 시행하여 피부 전층 결손창상 모델에서의 치유효과를 평가하였다.

- [234] 표 10과 같이 군 분리 하고 시료를 투여하였다.

- [235] 표 10

[Table 10]

시료명	투여용량	동물별 적용부위
대조군	blank patch	full-thickness wound 1
양성대조군 (마데카솔)	500 mg/cm ²	full-thickness wound 2
실시예 11	500 mg/cm ²	full-thickness wound 3
실시예 12	500 mg/cm ²	full-thickness wound 4
비교예 6	500 mg/cm ²	full-thickness wound 5

[236] 창상치유 효과를 정량하기 위해 초기 창상면적을 100으로 하여 14일 부검군에서 1일 후, 3, 7, 9, 11, 14일째의 창상면적을 디지털 이미지화하여 창면수축율을 구하였다. 창상 수축률은 수학식 5에 의하여 산출하였으며, 결과는 표 12에 나타내었다.

[237] 표 11

[Table 11]

	1 일	4 일	7 일	9 일	11 일	14 일
대조군	1.05	0.77	0.59	0.44	0.21	0.15
양성대조군 (마데카솔)	1.06	0.90	0.73	0.59	0.33	0.15
실시예 11	1.02	0.72	0.42	0.20	0.10	0.03
실시예 12	1.02	0.75	0.45	0.23	0.12	0.08
비교예 6	1.05	0.76	0.52	0.36	0.18	0.10

[238] 단위 : cm², n=5, p<0.05

[239] 수학식 5

$$\text{창상 수축률} = [(B-A)/A] \times 100$$

[240] A : 1일 창상면 측정결과

[241] B : 4, 7, 9, 11, 14일 창상면 측정결과

[242] 표 12

[Table 12]

	4 일	7 일	9 일	11 일	14 일
대조군	26.67	43.81	58.10	80.00	90.48
양성대조군 (마데카솔)	15.09	31.13	44.34	68.87	85.85
실시예 11	29.41	58.82	80.39	90.20	97.06
실시예 12	26.47	55.88	77.45	88.24	92.16
비교예 6	27.62	50.47	65.71	82.86	90.48

[243] $n=5$, $p < 0.05$

[244] 상기 표 11, 12에 나타나는 바와 같이, 창상 유발 후 14일 동안의 창상 수축률을 측정함에 있어 모든 창상은 시험기간(14일) 동안 점차적으로 창면 수축에 의해 창면이 점차적으로 감소하였으며, 실시예 11, 12의 참다랑어 또는 고등어 안구의 추출물을 함유하는 크림은 소 안구의 추출물을 함유하는 크림과 양성대조군에 비하여 탁월하게 창면이 감소하였음을 알 수 있었다.

[245]

[246] 실시예 1' : 어류 안구 추출물 제조

[247] 신선한 참다랑어를 급랭하여 육질과 분리한 후 어류 안구를 준비하였다. 준비된 어류 안구를 식염수로 깨끗하게 세척한 후, 호모게나이저를 이용하여 균질하게 파쇄하여, 어류 안구 파쇄물을 준비하였다.

[248] 이렇게 준비된 어류 안구 파쇄물을 초고압처리기(Ilshin autoclave, Korea)에 넣고, 압력 1000MPa 하에서 온도를 50°C로 승온시키고, 30분간 처리한 후 실온으로 냉각시켰다.

[249] 초고압 처리한 참다랑어 안구 추출물을 각각 정제수(실시예 1'-1), 최종 70%(V/V) 에탄올 수용액(실시예 1'-2), 최종 30%(V/V) butylene glycol(실시예 1'-3)이 되도록 첨가하여 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(whatman) No 10 여과지로 여과하였다. 이렇게 얻은 여과액을 다시 0.25uM의 여과기를 이용하여 최종 여과하고, 다시 50°C에서 감압농축 및 동결 건조하였다. 이렇게 제조된 감압농축물 및 동결건조물 10g에 각각 정제수 100g, 에탄올 100g, 부틸렌글리콜 100g을 용매로 첨가하여 최종적으로 참다랑어 안구추출액을 제조하였다.

[250] 참다랑어 안구를 대신하여 고등어 및 소 안구를 사용한 것을 제외하고 상기 참다랑어 안구추출액 제조방법과 동일한 방법을 사용하여 고등어 안구 추출액(실시예 1'-4 내지 1'-6) 및 소 안구 추출액(비교예 1'-1 내지 1'-3)을 제조하였다.

[251] 표 13

[Table 13]

	안구 종류	추출용매
실시예 1'-1	참다랑어	정제수
실시예 1'-2	참다랑어	70%에탄올
실시예 1'-3	참다랑어	30%부틸렌글리콜
실시예 1'-4	고등어	정제수
실시예 1'-5	고등어	70%에탄올
실시예 1'-6	고등어	30%부틸렌글리콜
비교예 1'-1	소	정제수
비교예 1'-2	소	70%에탄올
비교예 1'-3	소	30%부틸렌글리콜

[252]

[253] **시험예 1' : 본 발명 조성물의 관절염 예방 및 치료 효능 분석**

[254] 콜라겐 유도 관절염(collagen induced arthritis: CIA) 동물 모델은 관절 구성성분인 II형 콜라겐에 의해서 유도되는 관절염으로 사람의 류마티스 관절염과 병리학적, 임상적 및 면역학적으로 여러 측면에서 유사함을 보인다. 이 동물모델은 콜라겐 특이적인 면역 반응을 가지는 T 세포와 콜라겐과 같은 자가 항원에 대한 항체에 의해 자가면역 질환을 나타낸다.

[255] 아주번트 유도 관절염(adjuvant induced arthritis: AIA) 동물 모델은 자가 항원이 아닌 결핵균에 의해서 유도되는 관절염으로 만성 관절염의 병리학적 상태를 보인다. 정확한 자가 항원으로 작용하는 것은 알려져 있지 않지만, 면역반응 T 세포에 의해 관절의 염증이나 조직 파괴와 같은 자가면역 질환을 나타낸다. 이 동물모델은 사람에게서 자연적으로 일어나는 관절염과 비슷하다.

[256] 류마티스 관절염의 직접적인 원인이 정확히 알려져 있지 않기 때문에 이 2가지의 동물 모델을 가지고 실험을 함으로써 효능을 더욱 효과적으로 평가할 수 있다.

[257]

[258] **시험예 1'-1: 콜라겐 유도 관절염 동물 모델의 제조**

[259] 콜라겐 유도 관절염(collagen induced arthritis, CIA) 동물 모델은 류마티스 관절염의 원인으로 여겨지는 콜라겐을 주입하여 하기와 같이 제조하였다.

[260] 닭의 II 형 콜라겐(Sigma) 4mg을 100mM 아세트산 1ml에 혼합하여 4°C에서 하루 동안 용해시켰다. 이를 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) 4mg/ml이 들어있는 프로인트 완전 아주번트(Freund's complete adjuvant, DIFCO) 1ml에 혼합하여 에멀전화한 후, 6 내지 8주령의 Lewis 래트의 꼬리 부위에 150 μ l(300 μ g)을 피내 주사하여 면역시켰다. 1차 면역 후 7일째에 닭의 II형

콜라겐 4mg을 100mM 아세트산 1ml에 혼합하여 4°C에서 하루 동안 용해한 후 이를 프로인트 불완전 아쥬번트(Freund's incomplete adjuvant, DIFCO) 1ml에 혼합하여 에멀전화 시켰다. 상기 에멀전의 150 μ l(300 μ g)를 꼬리 부위에 피내 주사하여 2차 면역(boosting) 반응을 유도하였고, 2차 면역 후 1-2주가 경과하자 관절염 증상인 홍반이나 부풀어 오름이 점차적으로 나타나기 시작하였다.

[261]

[262] **시험예 1'-2: 아쥬번트 유도 관절염 동물 모델의 제조**

[263] 아쥬번트 유도 관절염(adjuvant induced arthritis, AIA) 동물 모델 역시 사람의 류마티스 관절염과 유사한 병리적 특성을 보이는 동물 모델로서 콜라겐 유도 관절염 동물 모델과 같이 널리 사용되고 있다.

[264] 결핵균 10mg을 분쇄기로 분말상태로 분쇄한 후, 1ml의 프로인트 불완전 아쥬번트(Freund's incomplete adjuvant, DIFCO)에 혼합하였다. 이 중 100 μ l(1mg)를 6-8 주령의 Lewis 래트의 꼬리 부위에 피내 주사하여 면역시켰다. 면역 후 1주가 지나자 관절염 증상이 점차적으로 나타나기 시작하였다.

[265]

[266] **시험예 1'-3: 본 발명 조성물의 관절염 예방 및 치료 효능 분석**

[267] 면역 반응 유도 익일부터 매일 식이용 거치대를 이용하여 실험물질을 경구 투여하였다. 그룹 당 10 마리의 Lewis 래트를 선택한 후, 한 그룹은 아쥬번트 유도 관절염 동물 모델을 이용하여 분말 상태의 사료와 실시예 및 비교예의 혼합물을 하루 25 g씩(11.5 g/kg) 투여하였고, 또 다른 그룹은 음성대조군으로는 분말 사료만을 투여한 아쥬번트 유도 관절염 동물 모델을 사용하였다. 이 후 관절 부위 종창(joint swelling), 관절의 붓기 정도(paw thickness), 홍반과 같은 육안적 소견을 통한 관절염의 진행 정도, 몸무게 변화 추이를 측정하여 각각의 그룹을 비교하였다.

[268] 관절염 예방 효과를 확인하기 위하여, 실시예 및 비교예의 조성물을 경구투여한 후 2주 경과한 시점에서 AIA 유도 면역화 반응을 실시하였다. 실험은 총 9주를 실시하였다. 또한, 관절염 치료 효과를 확인하기 위하여, AIA 유도 1차 면역화 반응을 실시한 바로 직후 실시예 1의 조성물을 경구 투여하였다. 실험은 총 9주를 실시하였다. 그룹 당 10 마리의 래트를 이용하였다.

[269] 각각의 그룹에 속하는 래트의 각 발마다 관절과 마디의 붓기 정도, 홍반 등을 관찰하고, 표 14와 표 15에 기재된 점수체계(scoring index)에 따라 임상점수를 계산하였다.

[270] 표 14

[Table 14]

점수	병의 경과 상태
0	홍반과 부풀어 오름이 나타나지 않음
1	발 중간부분 또는 발목관절에 한해 홍반과 약간의 부풀어 오름이 나타남
2	발목관절로부터 발 중간부분에 걸쳐 홍반과 약간의 부풀어 오름이 나타남
3	발목관절에서 종족골관절에 걸쳐 홍반과 중간정도의 부풀어 오름이 나타남
4	발목, 발 및 발가락을 포함하여 홍반과 심한 부풀어 오름이 나타남

[271] 표 15

[Table 15]

점수	병의 경과 상태
0	홍반과 부풀어 오름이 나타나지 않음
1	발가락이나 손가락 중 하나에 약간의 홍반이나 부풀어 오름이 나타남
2	발가락이나 손가락 중 하나 이상에 홍반이나 부풀어 오름이 나타남
3	발목 또는 손목에 홍반이나 부풀어 오름이 나타남
4	발가락 또는 손가락 및 발목 또는 손목에 완전한 홍반 및 부풀어 오름이 나타나고 발목 또는 손목을 구부릴 수 없음

[272] 관절염 예방 효과에 대한 실험 결과인 도 1의 임상점수를 보면, 음성 대조군은 아췌번트 유도 관절염 모델로서, 면역반응을 유도한 후 약 2주부터 관절염 증상이 나타나는 것을 알 수 있으며, 약 4주가 지나면 점차 증세가 약해지는 것을 확인할 수 있다. 본 발명의 조성물을 투여한 실시예 1'-1 내지 1'-6 군에서는 대조군과 달리 그 증세가 많이 억제 되어있는 것을 알 수 있었고, 음성 대조군에 비해 발이 부풀어 오르는 것이 많이 억제 되어 있는 것을 알 수 있다. 그러나 이러한 억제 효과는 소의 안구 추출물을 투여한 비교예 1'-1 내지 1'-3 군에서는 뚜렷하게 완화됨을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 어류 안구 추출물을 포함하는 조성물은 관절염에 대한 우수한 예방 효능을 발휘하고 있음을 알 수 있었다.

[273] 관절염 치료 효과에 대한 실험 결과인 도 2의 임상점수를 보면, 대조군은 아췌번트 유도 관절염 모델로서, 면역반응을 유도한 후 약 2주부터 관절염 증상이 나타나는 것을 알 수 있으며, 약 5주가 지나면 점차 증세가 약해지는 것을 확인할 수 있다. 본 발명의 조성물을 투여한 실시예 1'-1 내지 1'-6 군에서는 관절염 증세가 많이 억제 되어있는 것을 관찰할 수 있었고, 발이 부풀어 오르는 것도 많이 억제 되어 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 이러한 억제 효과는 소의 안구 추출물을 투여한 비교예 1'-1 내지 1'-3 군에서는 뚜렷하게 관찰되지 않음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 어류 안구 추출물을 포함하는 조성물은 관절염에 대한 우수한 치료 효능을 발휘하고 있음을 알 수 있다.

[274]

[275] 시험예 2' : 관절염 치료 효능 비교 실험

[276] 상기 시험예 1'에서 효능이 우수한 것으로 판명된 실시예 1'-1 및 1'-4의 조성물을 이용하여, 보다 정밀하게 관절염 예방 또는 치료 효능을 분석하였다.

[277] 실험 방법은 상기 시험예 1'-3과 유사하다. 각각의 군에 대하여 10 마리의 래트를 이용하였다.

[278] 음성 대조군은 비투여군이고, 양성대조군에 투여된 MTX는 종래에 관절염 치료제로 이용되고 있는 메토틱렉세이트 처리군이며, 래트 1마리 당 약 60 μ g씩 일주일에 두 번 투여하였다.

[279] 각 조성물을 2주간 먼저 경구투여한 후, 콜라겐을 이용한 1차 면역반응을 유도하였다. 일주일후 2차 면역반응을 유도하였고 임상 점수 및 발두께를 측정하여 각각의 그룹을 비교하였다. 도 3 및 도 4에서 볼 수 있듯이, CIA 유도 면역반응 후 약 20일부터 관절염 증상이 나타났고, 35일까지의 급성단계에서는 MTX의 효과가 본 발명의 조성물보다 뛰어났지만 그 이후의 만성단계(chronic phase)에서는 오히려 본 발명의 조성물의 치료 및 예방 효능이 더 우수하였다(도 3).

[280] 따라서, 본 발명의 조성물은 종래의 관절염 치료제인 MTX 보다 동등한 또는 우수한 관절염 치료 효능을 발휘한다는 것을 알 수 있다.

[281]

[282] 시험예 3' : 친염증·항염증 사이토카인 발현에 미치는 영향분석(관절주위 림프구 이용)

[283] 상기 시험예 2'와 같이 관절염 치료 효능 실험을 진행하였다. 관절염 유도 면역화 반응 후 75일째 각 실험군에서 평균값의 임상점수를 보이는 래트를 희생시켜 관절 주위에 있는 슬와부(popliteal) 림프노드와 서혜부(inguinal) 림프노드만 분리한 후, 이들 조직을 그라인딩하여 혼합 림프구(mixed lymphocytes)를 얻었다.

[284] 그런 다음, 혼합 림프구를 24-웰 플레이트에 5×10^6 세포/웰로 분주한 후 타입 II 콜라겐 40 μ g/웰을 첨가하여 24시간 동안 자극을 주었다. 그리고 나서, 세포를 수집하고, 여기에 Trizol을 처리하여 총 RNA를 수득하였다. 각 실험군의 RNA 1 μ g으로부터 oligo dT 프라이머와 역전사효소(Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이어, 합성된 cDNA를 주형으로 하여, 각 사이토카인에 대한 10pmol의 프라이머 및 SYBR premix를 이용하여 정량적 실시간 PCR를 실시하여, 사이토카인 발현 수준을 분석 및 비교하였다(도 4). 정량적 실시간 PCR은 95°C 10분간 인큐베이션한 후, 95°C 30초, 62°C 30초 및 72°C 30초의 40 사이클을 거치면서 매 사이클마다 정량을 하였다.

[285] 도 4의 데이터는, 하우스 키핑 유전자인 β -액틴에 대한 값을 정량한 후 대조군인 비처리군의 값을 100으로 하였을 때 그에 대한 상대적인 값이다. 친염증 사이토카인인 IL-12, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현량이 본 발명 조성물의 투여군에서 낮은 것을 확인할 수 있다. 특히, IL-12 및 IL-1 β 의 경우, 본 발명

조성물 투여군은 음성 대조군보다 50% 이상 발현이 감소하는 것을 알 수 있다. 또한 항-염증 기능을 가지고 있는 Foxp3, IL-10 및 TGF- β 의 발현량을 보면, 본 발명 조성물 투여군이 대조군보다 높은 것을 알 수 있다.

- [286] 따라서, 본 발명 조성물에 의해 관절 주위의 림프구에서 경구 면역관용이 유도되었음을 알 수 있다. 특히 조절 T 세포 마커인 Foxp3의 발현량이 증가되었을 뿐만 아니라, 억제(suppression) 기능을 가지고 있는 사이토카인인 TGF- β 의 발현량도 크게 증가하였다.
- [287] 위의 결과들을 종합하면, 관절염에 직접적으로 연관되어 있는 관절 주위의 림프노드에서 본 발명의 조성물은 경구 면역관용을 유도하고, 이는 Foxp3, IL-10 및 TGF- β 같은 항염증 사이토카인의 발현량을 증가시키고, IL-12, TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 친염증 사이토카인의 발현량을 억제한다는 것을 파악할 수 있다.

[288]

[289] **시험예 4' : 세포 증식 분석**

- [290] 상기 시험예 2'와 같이 관절염 치료 효능 실험을 진행하였다. 관절염 유도 면역화 반응 후 75일째 각 실험군에서 평균값의 임상점수를 보이는 래트를 희생시켜 관절 주위에 있는 슬와부(popliteal) 림프노드와 서혜부(inguinal) 림프노드만 분리한 후, 이들 조직을 그라인딩하여 혼합 림프구(mixed lymphocytes)를 얻었다. 그런 다음, 혼합 림프구를 96-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 분주한 후 타입 II 콜라겐 40 μ g/웰을 첨가하여 56시간 동안 자극시켰다.

- [291] 그런 다음, 0.5 μ Ci [3 H]티미딘(Perkin Elmer)을 첨가하여 16시간 동안 펄스를 준 후 티미딘 혼입량을 측정하였다(도 5). 도 5의 데이터는 음성대조군을 10으로 하였을 때 그에 대한 상대적인 수치로 표시한 것이다.

- [292] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 조성물을 투여한 군에서, 가장 낮은 티미딘 혼입량을 나타내었다. 이 결과는, 관절염에 직접적으로 연관되어 있는 관절 주위의 림프노드에서 본 발명의 조성물은 경구 면역관용을 유도하고, 결국 콜라겐에 대한 면역반응이 크게 억제된다는 것을 파악할 수 있다.

[293]

[294] **실시예 1'' : 어류 안구 파쇄물 제조**

- [295] 신선한 참다랑어를 급랭하여 육질과 깨끗하게 분리한 후 어류 안구를 준비하였다. 준비된 어류 안구를 식염수로 깨끗하게 세척한 후, 호모게나이저를 이용하여 균질하게 파쇄하여, 와트만(whatman) No. 10 여과지로 여과하였다. 이렇게 얻은 여과액을 다시 0.25 μ M의 여과기를 이용하여 최종 여과하여 최종적으로 참다랑어 안구 파쇄물을 제조하였다(실시예 1''-1).

- [296] 참다랑어 안구를 대신하여 고등어 및 소 안구를 사용한 것을 제외하고 상기 참다랑어 안구 파쇄물 제조방법과 동일한 방법을 사용하여 고등어 안구 파쇄물(실시예 1''-2) 및 소 안구 파쇄물(비교예 1'')을 제조하였다.

[297]

- [298] **시험예 1'' : 본 발명 조성물의 관절염 예방 및 치료 효능 분석**

[299] 시험예 1''-1: 콜라겐 유도 관절염 동물 모델의 제조

- [300] 콜라겐 유도 관절염(collagen induced arthritis, CIA) 동물 모델은 류마티스 관절염의 원인으로 여겨지는 콜라겐을 주입하여 하기와 같이 제조하였다.
- [301] 닭의 II 형 콜라겐(Sigma) 4mg을 100mM 아세트산 1ml에 혼합하여 4°C에서 하루 동안 용해시켰다. 이를 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) 4mg/ml이 들어있는 프로인트 완전 어쥬번트(Freund's complete adjuvant, DIFCO) 1ml에 혼합하여 에멀전화한 후, 6 내지 8주령의 Lewis 래트의 꼬리 부위에 150 μ l(300 μ g)을 피내 주사하여 면역시켰다. 1차 면역 후 7일째에 닭의 II형 콜라겐 4mg을 100mM 아세트산 1ml에 혼합하여 4°C에서 하루 동안 용해한 후 이를 프로인트 불완전 어쥬번트(Freund's incomplete adjuvant, DIFCO) 1ml에 혼합하여 에멀전화 시켰다. 상기 에멀전의 150 μ l(300 μ g)를 꼬리 부위에 피내 주사하여 2차 면역(boosting) 반응을 유도하였고, 2차 면역 후 1-2주가 경과하자 관절염 증상인 홍반이나 부풀어 오름이 점차적으로 나타나기 시작하였다.

[302]

[303] 시험예 1''-2: 어쥬번트 유도 관절염 동물 모델의 제조

- [304] 어쥬번트 유도 관절염(adjuvant induced arthritis, AIA) 동물 모델 역시 사람의 류마티스 관절염과 유사한 병리적 특성을 보이는 동물 모델로서 콜라겐 유도 관절염 동물 모델과 같이 널리 사용되고 있다.
- [305] 결핵균 10mg을 분쇄기로 분말상태로 분쇄한 후, 1ml의 프로인트 불완전 어쥬번트(Freund's incomplete adjuvant, DIFCO)에 혼합하였다. 이 중 100 μ l(1mg)를 6-8 주령의 Lewis 래트의 꼬리 부위에 피내 주사하여 면역시켰다. 면역 후 1주가 지나자 관절염 증상이 점차적으로 나타나기 시작하였다.

[306]

[307] 시험예 1''-3: 본 발명 조성물의 관절염 예방 및 치료 효능 분석

- [308] 면역 반응 유도 익일부터 매일 식이용 거치대를 이용하여 실험물질을 경구 투여하였다. 그룹 당 10 마리의 Lewis 래트를 선택한 후, 한 그룹은 어쥬번트 유도 관절염 동물 모델을 이용하여 분말 상태의 사료와 실시예 및 비교예의 혼합물을 하루 25 g씩(11.5 g/kg) 투여하였고, 또 다른 그룹은 음성대조군으로는 분말 사료만을 투여한 어쥬번트 유도 관절염 동물 모델을 사용하였다. 이 후 관절 부위 종창(joint swelling), 관절의 붓기 정도(paw thickness), 홍반과 같은 육안적 소견을 통한 관절염의 진행 정도, 몸무게 변화 추이를 측정하여 각각의 그룹을 비교하였다.

[309]

- [310] 관절염 예방 효과를 확인하기 위하여, 실시예 및 비교예의 조성물을 경구투여한 후 2주 경과한 시점에서 AIA 유도 면역화 반응을 실시하였다. 실험은 총 9주를 실시하였다. 또한, 관절염 치료 효과를 확인하기 위하여, AIA 유도 1차 면역화 반응을 실시한 바로 직후 실시예 1의 조성물을 경구 투여하였다. 실험은 총 9주를 실시하였다. 그룹 당 10 마리의 래트를 이용하였다.

- [311] 각각의 그룹에 속하는 래트의 각 발마다 관절과 마디의 붓기 정도, 흥반 등을 관찰하고, 상기 표 14와 표 15에 기재된 점수체계(scoring index)에 따라 임상점수를 계산하였다.
- [312] 관절염 예방 효과에 대한 실험 결과인 도 6의 임상점수를 보면, 음성 대조군은 어쥬먼트 유도 관절염 모델로서, 면역반응을 유도한 후 약 14일부터 관절염 증상이 나타나는 것을 알 수 있으며, 약 28일이 지나면 점차 증세가 약해지는 것을 확인할 수 있다. 본 발명의 조성물을 투여한 실시예 1"-1 내지 1"-2 군에서는 대조군과 달리 스코어가 매우 낮아 그 관절염 증세가 많이 억제되어있는 것을 알 수 있었고, 음성 대조군에 비해 발이 부풀어 오르는 것이 많이 억제되어 있는 것을 알 수 있다. 그러나 소의 안구 파쇄물을 투여한 비교예 1"군에서는 음성대조군과 큰 차이가 없으며 오히려 32일 경과 후에는 음성대조군에 비하여 관절염 증상이 높음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 어류 안구 파쇄물을 포함하는 조성물은 관절염에 대한 우수한 예방 효능을 발휘하고 있음을 알 수 있었다.
- [313] 관절염 치료 효과에 대한 실험 결과인 도 7의 임상점수를 보면, 대조군은 어쥬먼트 유도 관절염 모델로서, 면역반응을 유도한 후 약 14일부터 관절염 증상이 나타나는 것을 알 수 있으며, 약 35일이 지나면 점차 증세가 약해지는 것을 확인할 수 있다. 본 발명의 조성물을 투여한 실시예 1"-1 내지 1"-2 군에서는 음성 대조군과 달리 스코어가 매우 낮아 관절염 증세가 많이 억제 되어있는 것을 관찰할 수 있었고, 발이 부풀어 오르는 것도 많이 억제되어 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 소의 안구 파쇄물을 투여한 비교예 1"군에서는 음성대조군과 큰 차이가 없으며 오히려 32일 경과 후에는 음성대조군에 비하여 관절염 증상이 높음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 어류 안구 파쇄물을 포함하는 조성물은 관절염에 대한 우수한 치료 효능을 발휘하고 있음을 알 수 있다.
- [314]
- [315] **시험예 2" : 관절염 치료 효능 비교 실험**
- [316] 상기 시험예 1"에서 효능이 우수한 것으로 판명된 실시예 1"-1 및 1"-2의 조성물을 이용하여, 보다 정밀하게 관절염 예방 또는 치료 효능을 분석하였다.
- [317] 실험 방법은 상기 시험예 1"-3과 유사하다. 각각의 군에 대하여 10 마리의 래트를 이용하였다.
- [318] 음성 대조군은 비투여군이고, 양성대조군에 투여된 MTX는 종래에 관절염 치료제로 이용되고 있는 메토타렉세이트 처리군이며, 래트 1마리 당 약 60 μ g씩 일주일에 두 번 투여하였다.
- [319] 각 조성물을 2주간 먼저 경구투여한 후, 콜라겐을 이용한 1차 면역반응을 유도하였다. 일주일후 2차 면역반응을 유도하였고 임상 점수 및 발두께를 측정하여 각각의 그룹을 비교하였다. 도 7 및 도 8에서 볼 수 있듯이, CIA 유도 면역반응 후 약 2주 후부터 관절염 증상이 나타났고, 실시예 1"-1, 1"-2는 음성대조군, 비교예에 비하여 스코어가 내무 낮아 관절염 치료 및 예방 효능이

우수함을 알 수 있었다. 한편, 5주까지의 급성단계에서는 MTX의 효과가 실시예 1"-1, 1"-2보다 뛰어났지만 그 이후의 만성단계(chronic phase)에서는 오히려 실시예 1"-1, 1"-2가 더 뛰어나 본 발명의 조성물은 만성 관절염의 치료 및 예방 효능이 매우 우수함을 알 수 있었다(도 7).

[320] 따라서, 본 발명의 조성물은 종래의 관절염 치료제인 MTX 보다 동등한 또는 우수한 관절염 치료 효능을 발휘한다는 것을 알 수 있다.

[321]

[322] 시험예 3" : 친염증·항염증 사이토카인 발현에 미치는 영향분석(관절주위 림프구 이용)

[323] 상기 시험예 2"와 같이 관절염 치료 효능 실험을 진행하였다. 관절염 유도 면역화 반응 후 75일째 각 실험군에서 평균값의 임상점수를 보이는 래트를 희생시켜 관절 주위에 있는 슬와부(popliteal) 림프노드와 서혜부(inguinal) 림프노드만 분리한 후, 이들 조직을 그라인딩하여 혼합 림프구(mixed lymphocytes)를 얻었다.

[324] 그런 다음, 혼합 림프구를 24-웰 플레이트에 5×10^6 세포/웰로 분주한 후 타입 II 콜라겐 $40 \mu\text{g}$ /웰을 첨가하여 24시간 동안 자극을 주었다. 그리고 나서, 세포를 수집하고, 여기에 Trizol을 처리하여 총 RNA를 수득하였다. 각 실험군의 RNA $1 \mu\text{g}$ 으로부터 oligo dT 프라이머와 역전사효소(Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이어, 합성된 cDNA를 주형으로 하여, 각 사이토카인에 대한 10pmol 의 프라이머 및 SYBR premix를 이용하여 정량적 실시간 PCR를 실시하여, 사이토카인 발현 수준을 분석 및 비교하였다(도 9). 정량적 실시간 PCR은 95°C 10분간 인큐베이션한 후, 95°C 30초, 62°C 30초 및 72°C 30초의 40 사이클을 거치면서 매 사이클마다 정량을 하였다.

[325] 도 9의 데이터는, 하우스 키핑 유전자인 -액틴에 대한 값을 정량한 후 대조군인 비처리군의 값을 100으로 하였을 때 그에 대한 상대적인 값이다. 친염증 사이토카인인 IL-12, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현량이 실시예 1"-1, 1"-2의 투여군에서 현저히 낮은 것을 확인할 수 있다. 특히, IL-12 및 IL-1 β 의 경우, 실시예 1"-1, 1"-2 투여군은 음성 대조군보다 50% 이상 발현이 감소하는 것을 알 수 있다. 또한 항-염증 기능을 가지고 있는 Foxp3, IL-10 및 TGF- β 의 발현량을 보면, 실시예 1"-1, 1"-2 투여군이 현격하게 높음을 알 수 있다.

[326] 따라서, 본 발명 조성물에 의해 관절 주위의 림프구에서 경구 면역관용이 유도되었음을 알 수 있다. 특히 조절 T 세포 마커인 Foxp3의 발현량이 증가되었을 뿐만 아니라, 억제(suppression) 기능을 가지고 있는 사이토카인인 TGF-의 발현량도 크게 증가하였다.

[327]

[328] 위의 결과들을 종합하면, 관절염에 직접적으로 연관되어 있는 관절 주위의 림프노드에서 본 발명의 조성물은 경구 면역관용을 유도하고, 이는 Foxp3, IL-10 및 TGF- β 같은 항염증 사이토카인의 발현량을 증가시키고, IL-12, TNF- α 및

IL-1 β 와 같은 친염증 사이토카인의 발현량을 억제한다는 것을 파악할 수 있다.

[329]

[330] 시험예 4'' : 세포 증식 분석

[331] 상기 시험예 2''와 같이 관절염 치료 효능 실험을 진행하였다. 관절염 유도 면역화 반응 후 75일째 각 실험군에서 평균값의 임상점수를 보이는 래트를 희생시켜 관절 주위에 있는 슬와부(popliteal) 림프노드와 서혜부(inguinal) 림프노드만 분리한 후, 이들 조직을 그라인딩하여 혼합 림프구(mixed lymphocytes)를 얻었다. 그런 다음, 혼합 림프구를 96-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 분주한 후 타입 II 콜라겐 40 μ g/웰을 첨가하여 56시간 동안 자극시켰다.

[332] 그런 다음, 0.5Ci[3 H]티미딘(Perkin Elmer)을 첨가하여 16시간 동안 펄스를 준 후 티미딘 혼입량을 측정하였다(도 10). 도 10의 데이터는 음성대조군을 10으로 하였을 때 그에 대한 상대적인 수치로 표시한 것이다.

[333] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 실시예 1''-1, 1''-2 투여군에서 가장 낮은 티미딘 혼입량을 나타내었다. 이 결과는, 관절염에 직접적으로 연관되어 있는 관절 주위의 림프노드에서 본 발명의 조성물은 경구 면역관용을 유도하고, 결국 콜라겐에 대한 면역반응이 크게 억제된다는 것을 파악할 수 있었다.

[334]

[335] 실시예 I 내지 VI : 어류 안구 추출물을 포함하는 조성물의 제조

[336] 신선한 참다랑어를 급랭하여 육질과 분리한 후 어류 안구를 준비하였다. 준비된 어류 안구를 식염수로 깨끗하게 세척한 후, 호모게나이저를 이용하여 균질하게 파쇄하여, 어류 안구 파쇄물을 준비하였다.

[337] 이렇게 준비된 어류 안구 파쇄물을 초고압처리기(Ilshin autoclave, Korea)에 넣고, 압력 1000MPa 하에서 온도를 50°C로 승온시키고, 30분간 처리한 후 실온으로 냉각시켰다.

[338] 초고압 처리한 참다랑어 안구 추출물 10g에 정제수 100 mL를 첨가하여 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(whatman) No 10 여과지로 여과하였다. 이렇게 얻은 여과액을 다시 0.25 μ M의 여과기를 이용하여 최종 여과하고, 다시 50°C에서 감압농축 및 동결 건조하여, 참다랑어 안구 추출물을 제조하였고, 상기 방법과 동일한 방법을 사용하여 고등어 안구 추출물을 제조하였다.

[339] 실시예 I에서는 멸균정제수 90 mL에 염화벤잘코늄 0.01 g, 에테트산 나트륨 0.1 g을 각각 차례대로 완전히 용해시키고, 참다랑어 안구 추출물 0.1g을 넣어 충분히 수화시켰다. 인산일수소나트륨 0.6 g과 인산이수소나트륨 0.06 g을 투여하여 pH 및 삼투압을 조정하였다. 이후 멸균정제수로 100 mL가 되도록 하고 0.2 μ m 필터로 무균 여과하였다.

[340] 상기 실시예 I과 동일한 방법을 사용하여 하기 표 16의 조성으로 실시예 II 내지 VI, 비교예 I의 조성물을 제조하였다.

[341] 표 16

[Table 16]

		총 조성물 100mL 중의 각 성분의 함량						
		실시 예 I	실시예 II	실시예 III	실시예 IV	실시예 V	실시예 VI	비교예 I
주성 분	참다랑어 안구추출 물	0.1g	0.2g	0.3g	-	-	-	-
	고등어안 구추출물	-	-	-	0.1g	0.2g	0.3g	-
	소안구추 출물	-	-	-	-	-	-	0.3g
보존 제	염화벤잘 코늄	0.01g	0.01g	0.01g	0.01g	0.01g	0.01g	0.01g
안정 화제	에테르산 나트륨	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g
pH조 절제	인산일수 소나트륨	0.6g	0.6g	0.6g	0.6g	0.6g	0.6g	0.6g
	인산이수 소나트륨	0.06g	0.06g	0.06g	0.06g	0.06g	0.06g	0.06g
용제	멸균정제 수	잔량	잔량	잔량	잔량	잔량	잔량	잔량

[342]

[343] **시험예 I: 보습 효과**

[344] 상기 실시예 I 내지 VI 및 비교예 I에서 제조된 조성물을 1.5% 한천평판 배지에 적하하였을 때, 수분 증발에 의한 한천 중량의 감소를 상호 비교 하였다. 1.5%의 한천배지를 고압 멸균한 다음, 지름이 60 mm인 유리 플레이트에 분주하여 굳힌 후, 각각의 점안용 조성물이 배지에 넓게 분포될 수 있는 최소량인 300uL를 적하하였다(Masatsugu N. et al. Cornea 12(5):433-436, 1993).

[345] 무첨가 균의 1.5% 한천평판 배지의 시간에 따른 수분 증발량을 대조군으로 하였고, 실시예 I 내지 VI 및 비교예 I의 조성물 첨가에 따른 한천배지의 수분 증발량을 비교하여 하기의 표 17 및 도 11에 나타내었다. 표 17은 시간경과에 따른 한천배지의 상대중량(%)을 나타낸다.

[346] 표 17

[Table 17]

시간	0	0.5	1	2.5	4	6	12	24
대조군	100	96.6	95.6	94.2	92.1	90.8	89.6	81.9
비교예 I	100	97.8	96.9	96.2	95.1	94.2	92.7	88.4
실시에 I	100	96.7	95.9	94.7	92.9	91.4	89.5	84.7
실시에 II	100	96.8	96.7	95.4	93.7	93.0	92.5	87.9
실시에 III	100	98.1	97.4	96.7	95.6	94.5	93.6	89.4
실시에 IV	100	96.4	96.0	95.1	93.0	91.7	90.1	85.1
실시에 V	100	96.7	96.1	95.1	93.3	92.4	90.5	85.5
실시에 VI	100	98.0	97.5	96.9	95.2	94.0	92.9	89.7

[347] 상기 표 17와 도 11에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 및 비교예의 안구 추출물을 첨가한 군에서는 아무것도 첨가하지 않은 대조군에 비해 수분 증발이 적게 나타남을 알 수 있었다.

[348] 또한, 실시예 I 내지 VI의 어류 안구 추출물을 첨가한 군에서는 첨가량이 많아질수록 수분 증발이 억제됨을 알 수 있어, 어류 안구 추출물의 첨가량의존적으로 보습효과도 증가함을 알 수 있었다.

[349] 같은 양의 안구 추출물을 첨가한 비교예 I와 실시예 III 및 실시예 VI의 군들을 비교하면, 거의 유사한 패턴으로 수분의 증발이 이루어졌는데, 어류 안구 추출물을 첨가한 실시예 III 및 실시예 VI에서 경미하게나마 소 안구 추출물을 투여한 비교예에 비해 수분 증발이 억제되었다.

[350]

[351] **시험예 II: 각막 상피세포 장애에 대한 상처 치유 효과**

[352] 실험 동물로서 2.3~3.0 kg의 뉴질랜드 화이트 토끼 중 건강하며 안구에 안질환 및 이상이 없는 수컷 6 마리를 선택하여 총 12안을 대상으로 실험을 실시하였다. 실험에 이용되는 토끼는 사육장 내에서 사육하고 물과 토끼용 건사료를 사용하였으며, ‘실험 동물 사용 및 사육관리 규정 (2004. 10. 15 식품의약품안전청 예규 제 116호)’에 따라 관리하였다.

[353] 토끼에 적용되는 실험군으로서, 가장 실험 결과가 좋게 나온 상기 실시예 III(참다랑어 안구추출물 0.3%), 실시예 VI(고등어 안구추출물 0.3%)에 따라 제조된 조성물을 사용하였고, 대조군으로 비교예 I(소 안구추출물 0.3%)에 따라 제조된 조성물을 사용하였다. 또한, 음성대조군으로 식염수(0.9% NaCl)만을 처리하는 군을 두었다. 음성대조군은 각막의 자연치유능력을 측정하기 위해 설정하였으며, 여타 실험약을 투약하지 않았다('Effect of Topical Na-Hyaluronan on Hemidesmosome Formation in n-Heptanol-Induced Corneal Injury', J.H. Chung, et

al.,(1998) Ophthalmic Res. 30, 96-100).

- [354] 상처치유 효과 실험을 위해서 일정한 온도 (23°C)와 습도 (50%)로 설정한 사육 환경 하에서, 2주간 순화시킨 뉴질랜드 화이트 토끼에 0.4% 염산베녹시네이트를 점안하여 국소 마취한 후, 오른쪽 안구에 n-헵탄올을 충분히 적신 등근 여과지(filter paper, 5.5mm diameter)를 각막 중앙부에 2분간 접촉하여 각막 상피를 박리하여 손상을 유발하였다. 2 분간 2mL의 생리식염수로 세척한 후, 각각 0.9% NaCl 식염수(대조군), 실시예 III, 실시예 VI, 및 비교예 I의 조성물을 각막 손상 유발 후 5분 후에 점안하고, 이후로부터 1일 3회(50 μ l/ 1회) 점안하였다. 손상 후 1일 두 번째 실험액의 점안 전에 1일 1회씩 1% 로즈벵갈 염색액으로 염색하고, 0.9% 멸균 생리식염수로 세정하였으며, 각막 상피 손상부분의 면적은 디지털 카메라로 촬영하여 측정하였고, 총 7일간 관찰하였다.
- [355] 각막 손상 비율은 염색액으로 염색된 부분의 면적 값과 동공의 전체 넓이의 비로 계산하여, 그 회복력을 관찰 1 일의 손상 넓이 비에 대한 상대치로 표시하여 하기의 표 18에 나타내었다. 또한, 실시예 및 비교예의 실험군들에 대한 측정결과를 도 12에 그래프로 도시하였다.

[356] 표 18

[Table 18]

	손상 넓이 비율(%)							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
대조군	100	74	65	60	46	22	9	0
비교예 I	100	72	62	55	37	18	7	0
실시예 III	100	76	32	13	2	0	0	0
실시예 VI	100	75	34	14	7	1	0	0

- [357] 상기 표 18 및 도 12에서 알 수 있는 바와 같이, n-헵탄올에 의한 안구 각·결막의 손상 유발 직후에는 모든 군의 모든 개체에서 유사한 정도의 손상 부위가 발생되었으며, 이후에 각각 식염수, 실시예 및 비교예의 조성물을 처리함에 따라 손상 부분의 면적이 감소됨이 관찰되었다.
- [358] 그러나, 손상 부분의 면적 감소 속도를 비교한 상처 치유 효능을 비교해 볼 때, 본 발명의 실시예에 따라 제조된 조성물이 식염수를 처리한 대조군 및 소 안구 추출물을 포함하는 조성물 보다 우수한 상처 치유 효능을 갖는 것으로 관찰되었다. 특히, 실험기간이 3일, 4일 이상 경과할수록 상처 치유효과는 우수한 성능으로 지속되는 것이 확인되어 장기 투약 시에도 부작용 없이 효과적으로 안구 질환 치료가 가능함을 알 수 있었다.

청구범위

- [청구항 1] 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 어류 안구는,
홍어, 대구, 고등어, 돛돔, 빙어, 연어, 양미리, 실꼬리돔, 아귀, 백상아리, 망어, 명태, 다금바리, 잉어, 붕어, 청어, 청새치, 참돔, 참다랑어, 송어, 삼치, 물메기, 도루묵, 쾡치, 개복치, 감성돔, 갈치, 쏘가리, 베스, 미꾸라지, 메기, 가물치, 민태, 황성대, 황새치, 황복, 황다랑어, 청상아리, 참조기, 참복, 참가자미, 쥐치, 준치, 조피볼락, 정어리, 전갱이, 자리돔, 임연수어, 옥돔, 장어, 병어, 및 민어로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 어류의 안구인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 조성물 전체에 대하여 동결건조중량 기준으로 0.0001 내지 90.0 중량% 함유하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
피부 미백용인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
피부탄력 강화용인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
피부 보습용인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형으로 이루어진 기초화장료 제형과 수중유형 및 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨케어, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우 펜슬류로 이루어진 색조화장료 제형 중에서 선택되는 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 8] 어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 조성물은 생체 내 장 관계 면역 시스템(Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT)에서 일어나는 면역 관용을 유도하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제 8 항에 있어서,

상기 조성물은 사이토카인인 IL-12, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

[청구항 11]

제 8 항에 있어서,

상기 조성물은 사이토카인인 Foxp3 및 TGF- β 의 발현을 촉진하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

[청구항 12]

제 8 항에 있어서,

상기 조성물은 글루코사민, 콘드로이틴 또는 이의 조합을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

[청구항 13]

제 8 항에 있어서,

상기 어류는 홍어, 대구, 고등어, 돛돔, 빙어, 연어, 양미리, 실꼬리돔, 아귀, 백상아리, 방어, 명태, 다금바리, 잉어, 붕어, 청어, 청새치, 참돔, 참다랑어, 숭어, 삼치, 물메기, 도루묵, 쾡치, 개복치, 감성돔, 갈치, 쏘가리, 베스, 미꾸라지, 메기, 가물치, 민태, 황성대, 황새치, 황복, 황다랑어, 청상아리, 참조기, 참복, 참가자미, 쥐치, 준치, 조피볼락, 정어리, 전갱이, 자리돔, 임연수어, 옥돔, 장어, 병어, 및 민어로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 어류인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

[청구항 14]

제 8 항에 있어서,

상기 어류 안구 추출물은,

압력 100~3000MPa, 온도 40~90°C에서 5~60분간 처리하여 추출된 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

[청구항 15]

제 8 항에 있어서,

상기 어류 안구 파쇄물은,

어류의 안구를 믹서 또는 호모게나이저로 파쇄한 후 여과시킨 여과액인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 16]

어류 안구의 파쇄물 또는 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 개선용 식품 조성물.

[청구항 17]

제 15 항에 있어서,

상기 조성물은 생체 내 장 관계 면역 시스템(Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT)에서 일어나는 면역 반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 관절염 개선용 식품 조성물.

[청구항 18]

제 16 항에 있어서,

상기 어류는 홍어, 대구, 고등어, 돛돔, 빙어, 연어, 양미리, 실꼬리돔, 아귀, 백상아리, 방어, 명태, 다금바리, 잉어, 붕어, 청어, 청새치, 참돔, 참다랑어, 숭어, 삼치, 물메기, 도루묵, 쾡치, 개복치,

감성돔, 갈치, 쏘가리, 베스, 미꾸라지, 메기, 가물치, 민태, 황성대, 황새치, 황복, 황다랑어, 청상아리, 참조기, 참복, 참가자미, 쥐치, 준치, 조피볼락, 정어리, 전갱이, 자리돔, 임연수어, 옥돔, 장어, 병어, 및 민어로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 어류인 것을 특징으로 하는 관절염 개선용 식품 조성물.

[청구항 19]

제 16 항에 있어서,
상기 어류 안구 추출물은,
압력 100~3000MPa, 온도 40~90°C에서 5~60분간 처리하여 추출된 것을 특징으로 하는 관절염 개선용 식품 조성물.

[청구항 20]

제16항에 있어서,
상기 어류 안구 파쇄물은,
어류의 안구를 믹서 또는 호모게나이저로 파쇄한 후 여과시킨 여과액인 것을 특징으로 하는 관절염 개선용 식품 조성물.

[청구항 21]

어류 안구 추출물을 유효성분으로 포함하는 안구건조증 치료용 조성물.

[청구항 22]

제 21 항에 있어서,
상기 어류 안구 추출물은 전체 조성물 기준으로 0.01 내지 10%(w/v)인 것을 특징으로 하는 안구건조증 치료용 조성물.

[청구항 23]

제 21 항에 있어서,
보존제, 등장화제, 안정화제, 항산화제, 및 pH 조절제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 보조제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 안구건조증 치료용 조성물.

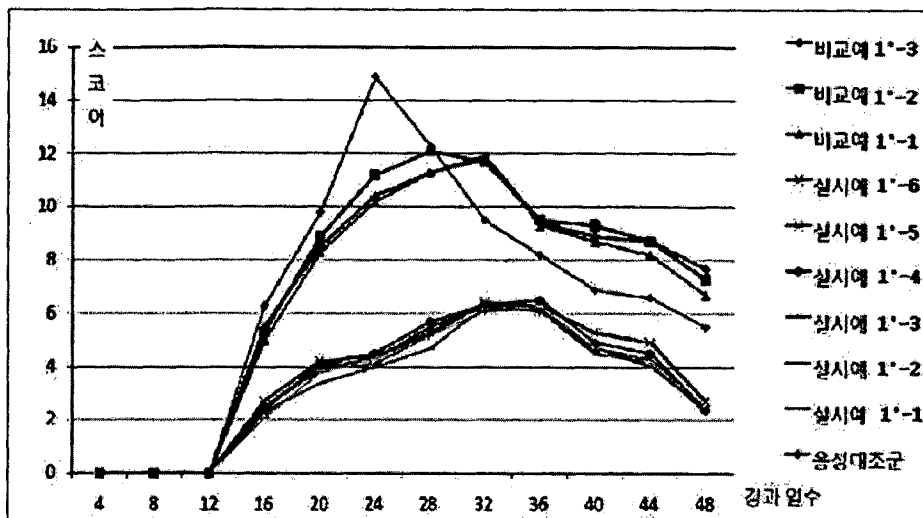
[청구항 24]

제 21 항에 있어서,
상기 어류는 홍어, 대구, 고등어, 돛돔, 빙어, 연어, 양미리, 실꼬리돔, 아귀, 백상아리, 방어, 명태, 다금바리, 잉어, 붕어, 청어, 청새치, 참돔, 참다랑어, 숭어, 삼치, 물메기, 도루묵, 쾡치, 개복치, 감성돔, 갈치, 쏘가리, 베스, 미꾸라지, 메기, 가물치, 민태, 황성대, 황새치, 황복, 황다랑어, 청상아리, 참조기, 참복, 참가자미, 쥐치, 준치, 조피볼락, 정어리, 전갱이, 자리돔, 임연수어, 옥돔, 장어, 병어, 및 민어로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 어류인 것을 특징으로 하는 안구건조증 치료용 조성물.

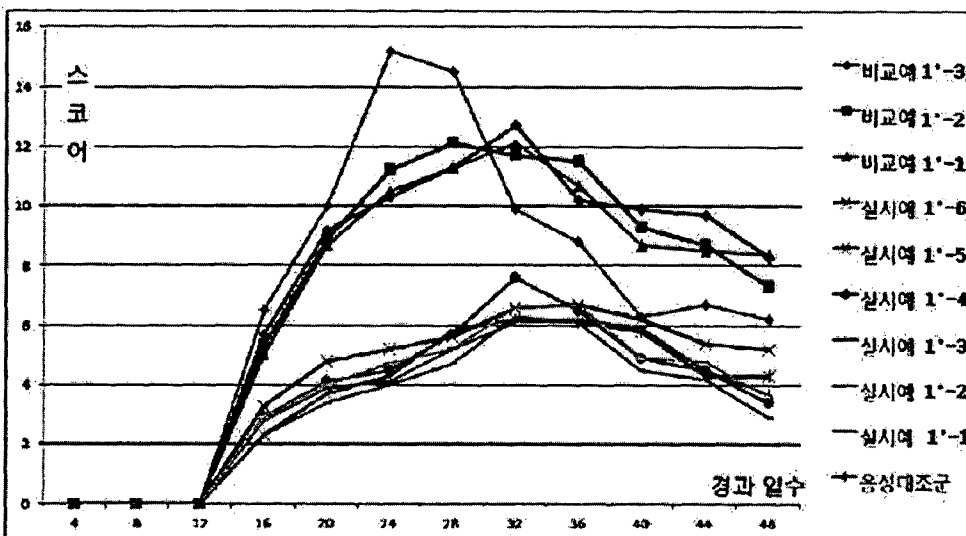
[청구항 25]

제 21 항에 있어서,
상기 어류 안구 추출물은 압력 100~3000MPa, 온도 40~90°C에서 5~60분간 처리하여 추출된 것을 특징으로 하는 안구건조증 치료용 조성물.

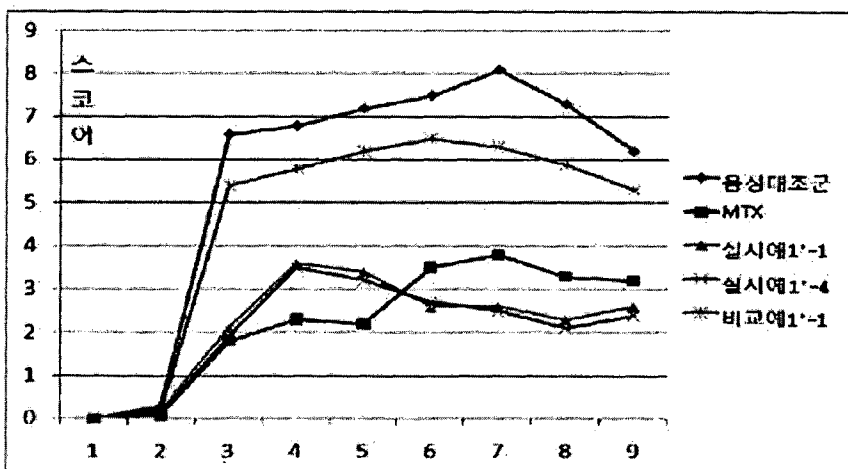
[Fig. 1]



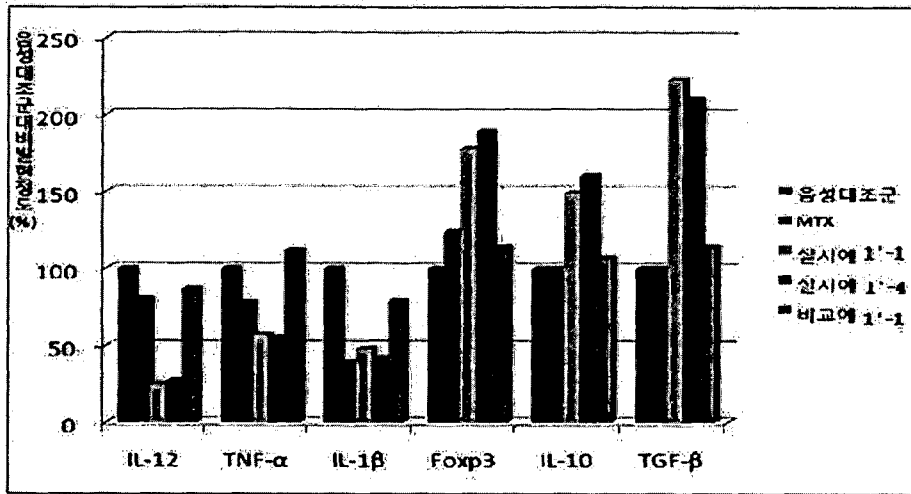
[Fig. 2]



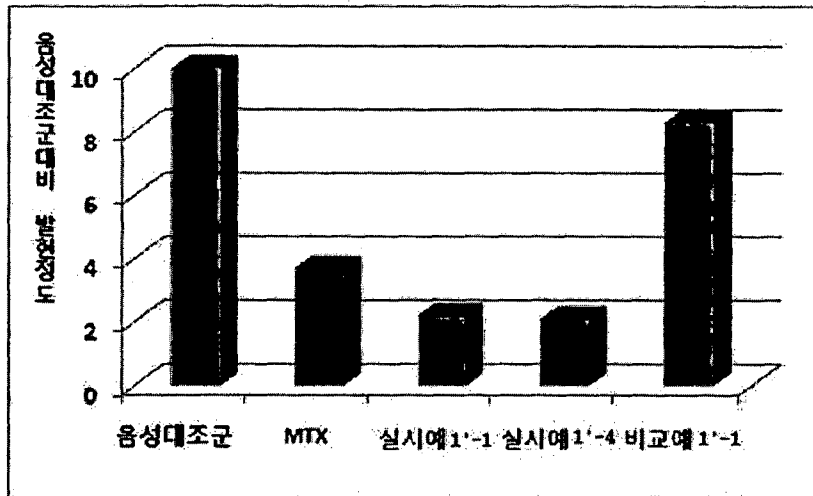
[Fig. 3]



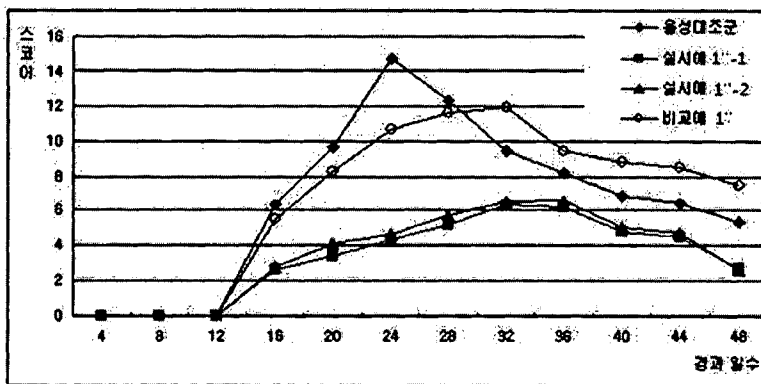
[Fig. 4]



[Fig. 5]



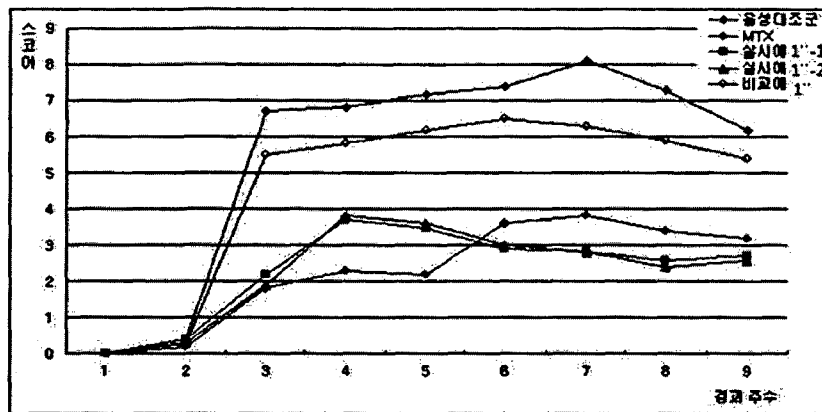
[Fig. 6]



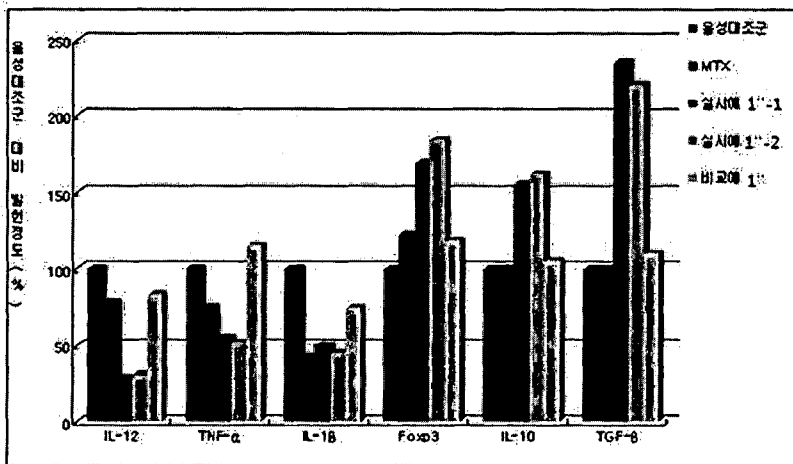
[Fig. 7]



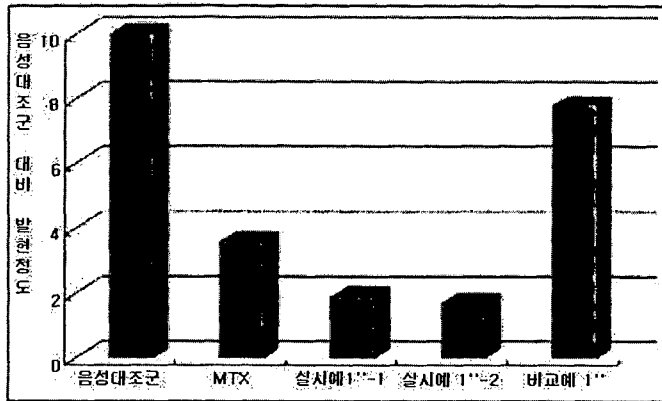
[Fig. 8]



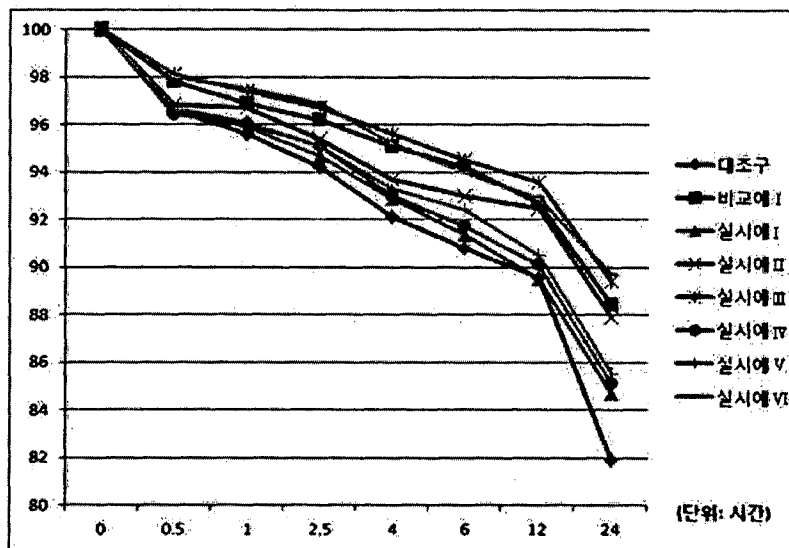
[Fig. 9]



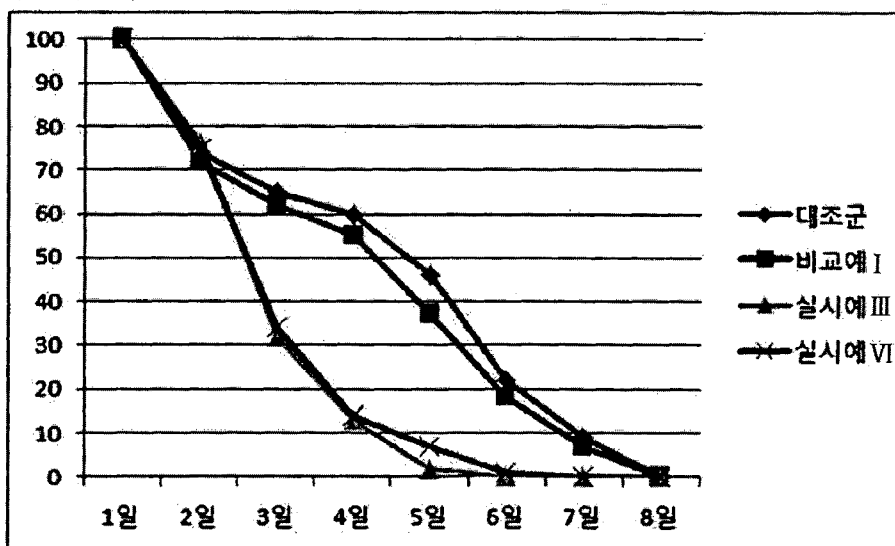
[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/010549**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 8/98(2006.01)i, A61K 35/60(2006.01)i, A61Q 19/00(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 8/98; A61K 8/64; A61K 35/60; A61Q 19/00; A61K 8/96; A61P 35/00; A23L 1/325; A61K 31/198; A23L 1/30; A61K 31/401; A61K 7/00; A61K 7/48

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 aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal), PubMed, NCBI, Esp@snet, PAJ, USPTO, Google**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2010-0006601 A (GANGNEUNG-WONJU NATIONAL UNIVERSITY	8-11,13-20
Y	INDUSTRY ACADEMY COOPERATION GROUP) 21 January 2010	12
A	See abstract, paragraphs [0019]-[0022], claims 1 to 6	1-7,21-25
Y	JP 2009-504663 A (HILL'S PET NUTRITION, INC.) 05 February 2009	12
A	See abstract, claims 1 to 4	1-11,13-25
A	KR 10-2008-0059066 A (NIPPON BARRIER FREE CO., LTD.) 26 June 2008	1-25
	See the entire document	
A	JP 10-218729 A (NISSHIN OIL MILLS LTD:THE) 18 August 1998	1-25
	See the entire document	
A	JP 2001-029040 A (NISSHIN OIL MILLS LTD:THE et al.) 06 February 2001	1-25
	See the entire document	
A	JP 10-218730 A (NISSHIN OIL MILLS LTD:THE) 18 August 1998	1-25
	See the entire document	



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

29 MARCH 2013 (29.03.2013)

Date of mailing of the international search report

29 MARCH 2013 (29.03.2013)

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

International application No.

PCT/KR2012/010549

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-026223 A (NOEVIR CO LTD) 10 February 2011 See the entire document	1-25
A	JP 2006-232693 A (NITTA GELATIN INC) 07 September 2006 See the entire document	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/010549

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0006601 A	21.01.2010	NONE	
JP 2009-504663 A	05.02.2009	AU 2005-212370 A1	25.08.2005
		AU 2006-278269 A1	15.02.2007
		CA 2554099 A1	25.08.2005
		CA 2618108 A1	15.02.2007
		CN 101282731 A0	08.10.2008
		CN 1917869 A	21.02.2007
		CN 1917869 C0	21.02.2007
		EP 1713464 A2	25.10.2006
		EP 1928472 A2	11.06.2008
		EP 1928472 A4	29.04.2009
		JP 2007-522232 A	09.08.2007
		JP 2009-504663 T	05.02.2009
		RU 2008109024 A	20.09.2009
		US 2005-0176807 A1	11.08.2005
		US 2006-0029647 A1	09.02.2006
		WO 2005-077356 A2	25.08.2005
		WO 2005-077356 A3	25.08.2005
		WO 2007-019550 A2	15.02.2007
		WO 2007-019550 A3	15.02.2007
		WO 2007-019550 A3	29.11.2007
		ZA200801646A	27.05.2009
KR 10-2008-0059066 A	26.06.2008	CN 101204363 A	25.06.2008
		CN 101204363 C0	25.06.2008
		EP 1938866 A2	02.07.2008
		EP 1938866 A3	08.04.2009
		EP 1938866 B1	21.09.2011
		JP 03-981397 B1	26.09.2007
		JP 04-005113 B1	07.11.2007
		JP 04-792588 B2	05.08.2011
		JP 2008-156272 A	10.07.2008
		JP 2008-156273 A	10.07.2008
		JP 2009-062323 A	26.03.2009
		JP 4792588 B2	12.10.2011
		US 2008-0152683 A1	26.06.2008
JP 10-218729 A	18.08.1998	NONE	
JP 2001-029040 A	06.02.2001	NONE	
JP 10-218730 A	18.08.1998	NONE	
JP 2011-026223 A	10.02.2011	NONE	
JP 2006-232693 A	07.09.2006	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 8/98(2006.01)i, A61K 35/60(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 8/98; A61K 8/64; A61K 35/60; A61Q 19/00; A61K 8/96; A61P 35/00; A23L 1/325; A61K 31/198; A23L 1/30; A61K 31/401; A61K 7/00; A61K 7/48

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(KIPO internal), PubMed, NCBI, Esp@snet, PAJ, USPTO, Google

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	KR 10-2010-0006601 A (강릉원주대학교산학협력단) 2010.01.21. 요약, 단락 [0019]-[0022], 청구항 제1항 내지 제6항 참조	8-11, 13-20 12 1-7, 21-25
Y A	JP 2009-504663 A (HILL'S PET NUTRITION, INC.) 2009.02.05. 요약, 청구항 제1항 내지 제4항 참조	12 1-11, 13-25
A	KR 10-2008-0059066 A (가부시키가이샤 니폰 배리어 프리) 2008.06.26. 문서 전체 참조	1-25
A	JP 10-218729 A (NISSHIN OIL MILLS LTD:THE) 1998.08.18 문서 전체 참조	1-25
A	JP 2001-029040 A (NISSHIN OIL MILLS LTD:THE 외 1명) 2001.02.06 문서 전체 참조	1-25
A	JP 10-218730 A (NISSHIN OIL MILLS LTD:THE) 1998.08.18 문서 전체 참조	1-25

☒ 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 03월 29일 (29.03.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 03월 29일 (29.03.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

김범수

전화번호 82-42-481-5412



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2011-026223 A (NOEVIR CO LTD) 2011.02.10 문서 전체 참조	1-25
A	JP 2006-232693 A (NITTA GELATIN INC) 2006.09.07 문서 전체 참조	1-25

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0006601 A	2010.01.21	없음	
JP 2009-504663 A	2009.02.05	AU 2005-212370 A1	2005.08.25
		AU 2006-278269 A1	2007.02.15
		CA 2554099 A1	2005.08.25
		CA 2618108 A1	2007.02.15
		CN 101282731 A0	2008.10.08
		CN 1917869 A	2007.02.21
		CN 1917869 C0	2007.02.21
		EP 1713464 A2	2006.10.25
		EP 1928472 A2	2008.06.11
		EP 1928472 A4	2009.04.29
		JP 2007-522232 A	2007.08.09
		JP 2009-504663 T	2009.02.05
		RU 2008109024 A	2009.09.20
		US 2005-0176807 A1	2005.08.11
		US 2006-0029647 A1	2006.02.09
		WO 2005-077356 A2	2005.08.25
		WO 2005-077356 A3	2005.08.25
		WO 2007-019550 A2	2007.02.15
		WO 2007-019550 A3	2007.02.15
		WO 2007-019550 A3	2007.11.29
		ZA200801646A	2009.05.27
KR 10-2008-0059066 A	2008.06.26	CN 101204363 A	2008.06.25
		CN 101204363 C0	2008.06.25
		EP 1938866 A2	2008.07.02
		EP 1938866 A3	2009.04.08
		EP 1938866 B1	2011.09.21
		JP 03-981397 B1	2007.09.26
		JP 04-005113 B1	2007.11.07
		JP 04-792588 B2	2011.08.05
		JP 2008-156272 A	2008.07.10
		JP 2008-156273 A	2008.07.10
		JP 2009-062323 A	2009.03.26
		JP 4792588 B2	2011.10.12
		US 2008-0152683 A1	2008.06.26
JP 10-218729 A	1998.08.18	없음	
JP 2001-029040 A	2001.02.06	없음	
JP 10-218730 A	1998.08.18	없음	
JP 2011-026223 A	2011.02.10	없음	
JP 2006-232693 A	2006.09.07	없음	