

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 30일 (30.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/052033 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/45 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006084
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 9일 (09.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0135411 2015년 9월 24일 (24.09.2015) KR
- (71) 출원인: 동아에스티 주식회사 (DONG-A ST CO., LTD.) [KR/KR]; 02587 서울시 동대문구 천호대로 64, Seoul (KR). 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 손미원 (SON, Mi Won); 16822 경기도 용인시 수지구 동천로 113번길 10, 1201동 1402호, Gyeonggi-do (KR). 이태호 (LEE, Tae Ho); 16971 경기도 용인시 기흥구 신구로 42번길 15, 207호, Gyeonggi-do (KR). 백남준 (BAEK, Nam Joon); 17064 경기도 용인시 기흥구 중부대로 375, 101동 606호, Gyeonggi-do (KR). 권용삼 (KWON, Yong Sam); 17072 경기도 용인시 기흥구 금

화로 58번길 10, 408동 1501호, Gyeonggi-do (KR). 이상진 (LEE, Sang Jin); 16516 경기도 수원시 영통구 광교호수공원로 45, 1008동 2002호, Gyeonggi-do (KR). 이봉경 (LEE, Bong Gyeong); 14581 경기도 부천시 원미구 조마루로 278, 1324동 503호, Gyeonggi-do (KR). 정세영 (CHOUNG, Se Young); 02448 서울시 동대문구 천장산로 11길 17, 204동 1503호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 안소영 (AHN, So-Young); 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).

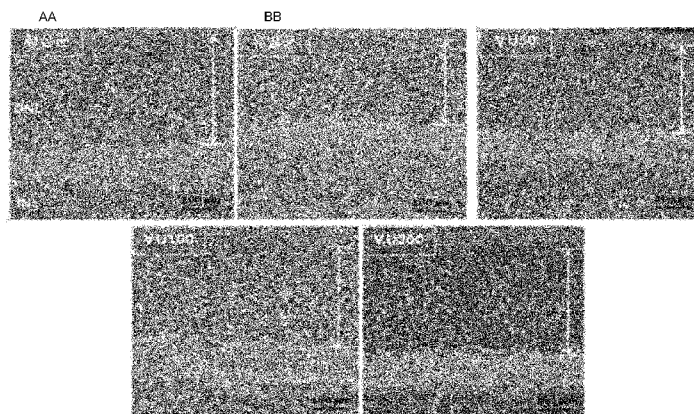
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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, SA, 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, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING MACULAR DEGENERATION CONTAINING BLUEBERRY EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 들쭉 추출물을 유효성분으로 함유하는 황반변성증 치료용 조성물



AA ... Normal group
BB ... Induction group

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing a novel blueberry extract or fraction extract, and to a composition for preventing, treating, or ameliorating macular degeneration containing the blueberry extract and/or fraction extract prepared by the method. The method for preparing a novel blueberry extract or fraction extract of the present invention provides a blueberry extract or a blueberry fraction extract, which can be commercially mass-produced while increasing the total polyphenol content, and is suitable as a food material due to the non-use of an organic solvent. The produced blueberry extract or fraction extract, which is a novel blueberry extract or fraction extract having an increased content of a polyphenol compound as an active ingredient, has a remarkable effect on the prevention, treatment, or amelioration of macular degeneration by inhibiting the A2E accumulation in retinal pigment epithelial cells, the photo-oxidation, and the damage to the outer nuclear layer of visual cell.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2017/052033 A1



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, **공개:**

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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 신규한 들쭉 추출물 또는 분획 추출물의 제조 방법, 및 이로부터 제조된 들쭉 추출물 및/또는 분획추출물을 포함하는 황반 변성증의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 들쭉 추출물 또는 분획 추출물의 제조 방법은 총폴리페놀 함량을 증가시키면서도 상업적으로 대량생산이 가능하고, 유기용매를 사용하지 않아 식품 소재로 적합한 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물을 제공한다. 또한 제조된 들쭉 추출물 또는 분획 추출물은 유효 성분으로 폴리페놀류 화합물의 함량이 증가된 신규한 들쭉 추출물 또는 분획 추출물으로써 망막 색소 상피 세포 내 A2E 축적 억제, 광산화 억제, 시세포 외핵층 손상 억제 등을 통해 황반 변성증의 예방, 치료 또는 개선에 현저한 효과를 보인다.

명세서

발명의 명칭: 들쭉 추출물을 유효성분으로 함유하는 황반변성증 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 들쭉 추출물 또는 분획 추출물의 제조 방법, 및 이로부터 제조된 들쭉 추출물 및/또는 분획추출물을 포함하는 황반 변성증의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 눈의 안쪽 망막의 중심부에 위치한 신경조직을 황반이라고 하는데, 시세포의 대부분이 이곳에 모여 있고 물체의 상이 맺히는 곳도 황반의 중심이므로 시력에 대단히 중요한 역할을 담당하고 있다. 시력이란 대상의 존재와 형태를 인식하는 능력을 말하는데, 물체의 상이 황반의 중심와에 맺어질 때 가장 예민하고 (중심시력), 망막 주변으로 갈수록 저하된다(주변시력). 어떤 물체를 볼 때는 망막의 중심부인 황반부를 통해서 보게 되는 것으로 일반적으로 중심 시력을 시력이라고 말한다. 이러한 황반은 노화, 유전적인 요인, 독성, 염증 등 여러 가지 원인에 의해 시력장애를 일으킬 수 있는데, 이를 황반변성증이라고 한다.
- [3] 이러한 황반변성증은 중심 시력에 영향을 주어 시야 가운데가 흐릿하게 보이게 하고, 중심 암점, 변시증 또는 국소 부분의 시력 상실 등을 통해 독서, 운전 등의 정교한 활동 수행을 곤란하게 할 수 있으며, 심할 경우 실명으로까지 이어지는 매우 심각한 질병이다.
- [4] 황반변성증은 크게 비삼출성(건성)과 삼출성(습식)으로 구분하게 된다. 망막하 출혈이나 망막하액, 색소상피박리 등이 나타나는 삼출성의 경우, 병변의 위치가 황반 아래 또는 황반에 바로 연하여 있어 초기부터 시력저하가 나타난다. 반면, 비삼출성 황반변성증은 전체 황반변성증의 80-90%를 차지하고 있으며 급격한 시력상실의 결과를 초래하지는 않지만 삼출성 황반변성증으로 진행할 수 있어 주의가 필요하다. 삼출성 황반변성증의 경우 전체 황반변성증의 10-20% 정도를 차지하지만, 만일 삼출성 황반변성증을 치료하지 않고 그대로 방치해두면, 시력이 빠르게 저하되어 많은 환자들이 진단 후 2년 내에 실명에 이르게 된다.
- [5] 이러한 황반변성증의 근원적인 메커니즘은 여전히 알려져 있지 않다. 황반변성증의 일종인 노인성 황반 변성증은 광수용체 세포의 사멸에 따른 중심시력의 상실로 특징 지어지며, 다인성의 병인기전을 가지고 있을 것으로 여겨지고 있다. 최근에 다양한 요소들(예를 들면, 흡연, 비만, 식습관, 혈중 내 콜레스테롤 증가, 청색광 조사 등)이 노인성 황반 변성증의 축진을 야기한다고 보고되고 있고, 이는 광수용체 세포의 손상과 그에 따른 세포사멸이 망막색소상피의 퇴화(변성)를 야기한다.
- [6] 또한, 눈 망막 중심부에 지방갈색소(리포푸신)의 축적이 망막 중심부 아래에

있는 망막색소상피세포에서 가장 크다고 알려져 있다. 이는 이 부분이 간상세포 광수용체가 많이 밀집되어 있다는 사실을 반영한다. N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine (A2E)는 리포푸신의 주요 발색단이며, 청색광에 노출되었을 때 활성산소종의 생성을 야기한다. 청색광은 440nm 정도의 상대적으로 고에너지량을 가진 빛으로 이에 단시간 노출되었을 때, 세포의 손상은 증가하며 이는 단파장의 빛일수록 더 증가한다. 즉, 계속적인 빛의 노출이 노인성 황반 변성증의 망막색소상피세포의 사멸을 더욱 촉진시키며, 이는 결국 광수용체 세포의 변성을 야기하는 주된 원인 중 하나가 된다.

- [7] 또한, 망막세포 기능장애에 의한 시력저하는 A2E의 산화와 밀접한 관련이 있고 따라서 노화 관련 황반변성증의 주된 원인이 될 수 있다.
- [8] 그런데, 현재까지 이러한 황반변성증에 대해 이용 가능한 치료제가 매우 드물다. 더욱이 습식 황반변성증에 대해서는 anti-VEGF 등 일부 치료법이 있으나, 건성 황반변성증에 대해서는 알려진 치료제는 없는 상황이다.
- [9] 한편, 들쭉(Bog bilberry, *Vaccinium uliginosum*)은 진달래과(Ericaceae)의 낙엽 활엽 작은 관목(*Vaccinium uliginosum*), 줄기는 높이가 1미터 정도이고 암갈색이다. 열매는 둥근장과로 가을에 검게 익으며, 들쭉이라고 하여 식용한다. 높은 산과 고원의 추운 지역에 흔히 나며, 한국, 만주, 몽고, 일본, 유럽, 북미 등지에 분포한다. 들쭉의 성분으로는 플라보노이드류, 안토시아닌류를 함유하고 있다.
- [10] 대한민국 공개특허 제2011-0102246호에는 들쭉 추출물의 황반변성증의 치료 효과를 개시하고 있다. 그러나, 상기 특허의 분획방법은 고체상 추출법(Solid Phase Extrction:SPE)으로 분획하는 방법으로써 에틸아세테이트와 같은 유기용매를 사용하므로 식품 소재로서 적합하지 못하며, C18 Sep-Pak 카트리지를 제조 공정에 사용하여 대량생산공정에 적합하지 않는 분획방법을 사용하고 있다.
- [11] 이러한 배경 하에, 상업적으로 대량생산이 가능하고, 유기용매를 사용하지 않으면서 일반적인 들쭉 추출 방법에 의해 추출된 추출물보다 들쭉의 유효성분 및 지표성분의 함량을 크게 증가시킨 신규한 들쭉 추출물 내지 분획 추출물에 대한 연구 개발이 필요하며, 이를 통해 근본적으로 황반변성증을 치료 또는 예방할 수 있는 치료제 개발될 필요가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 및 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하의 들쭉에 효소를 처리하고 가열하여 추출하는 단계를 포함하는, 들쭉 추출물의 제조 방법을 제공한다.
- [13] 본 발명은 (a) 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 및 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하의 들쭉에 효소를

처리하고 가열하여 추출하는 단계;

- [14] (b) 상기 (a) 단계의 추출물을 레진에 통과시키는 단계를 포함하는, 들쭉 분획 추출물의 제조 방법을 제공한다.
- [15] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 유효성분으로 포함하는 황반변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [16] 본 발명은 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반 변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [17] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 유효성분으로 포함하는 황반변성증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명은 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반 변성증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명은 황반 변성증 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 제공한다.
- [20] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물의 황반 변성증 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [21] 본 발명은 황반 변성증 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- [22] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하여 황반 변성증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [23] 본 발명자들은 들쭉 추출물 및 들쭉 분획 추출물을 인체 적합하게 상업적으로 대량생산하며 그 효능을 높이하고자 예의 노력한 결과, 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및 들쭉 분획 추출물이 유효성분 및 지표성분인 총폴리페놀(Total Polyphenol)의 함량이 크게 증가하여 황반 변성증의 예방 및 치료에 현저한 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [24] 본 발명은 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 및 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하의 들쭉에 효소를 처리하고 가열하여 추출하는 단계를 포함하는, 들쭉 추출물의 제조 방법을 제공한다.
- [25] 본 발명에 따른 들쭉 추출물의 제조 방법에 의하면 당성분이 제거되고 총 폴리페놀 함량이 크게 증가한 들쭉 추출물을 제공할 수 있다.

- [26] 본 발명의 제조 방법에 따른 들쭉 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 폴리페놀을 2 내지 60 중량%, 바람직하게 3 내지 15 중량%, 보다 바람직하게 4 내지 12 중량%로 함유할 수 있다.
- [27] 본 발명에 있어서 들쭉 (*Vaccinium uliginosum*)은 들쭉나무의 꽃, 열매, 잎 또는 수피 등으로부터 추출될 있으며, 바람직하게는 들쭉나무의 열매로부터 추출될 수 있다. 또한, 채취한 것이나 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [28] 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올은 물을 함유하지 않은 저급 알코올로써 에칸대 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소부탄올을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올은 물과 혼합된 저급 알코올로 에칸대 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소부탄올과 물의 혼합용매이며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 상기 용매는 물일 수 있다.
- [29] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 들쭉의 폴리페놀 함량 증진을 위해 들쭉에 처리될 수 있다. 바람직하게, 상기 효소는 아밀라아제(amylose), 글루고아밀라제, 프로테아제, 옥시다아제, 폴리메틸갈락투로나아제(polymethylgalacturonase), 폴리갈락투로나아제(polygalacturonase), 글루코시다아제(glucosidase), 셀룰라아제(cellulose) 및 펙티나아제(pectinase)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 보다 바람직하게 펙티나아제가 사용될 수 있다.
- [30] 추출방법으로는 진탕추출, Soxhelt 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [31] 상기 효소 처리 후 가열은 1시간 내지 10시간, 바람직하게는 1시간 내지 4시간 동안 수행될 수 있으며, 반응 온도는 40 내지 65 °C, 바람직하게 45 내지 60 °C로 반응이 수행될 수 있다.
- [32] 본 발명의 들쭉 추출물의 제조 방법은 상기 들쭉에 효소를 처리하고 가열하여 추출하는 단계 후에 추출물을 여과, 농축 및 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [33] 상기 여과는 당업계의 통상의 방법에 따라 용액을 여과하거나 원심분리를 통해 여액 또는 상등액을 수득할 수 있다.
- [34] 상기 농축은 바람직하게 감압 농축이며, 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [35] 본 발명은 (a) 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 및 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하의 들쭉에 효소를 처리하고 가열하여 추출하는 단계;
- [36] (b) 상기 (a) 단계의 추출물을 레진에 통과시키는 단계를 포함하는, 들쭉 분획 추출물의 제조 방법을 제공한다.
- [37] 본 발명에 따른 들쭉 추출물의 제조 방법에 의하면 당성분이 제거되고 총 폴리페놀 함량이 크게 증가하며 인체에 유해한 유기용매를 사용하지 않아 인체

- 적용에 적합한 들쭉 분획 추출물을 산업적으로 대량 생산 및 제공할 수 있다.
- [38] 본 발명의 제조 방법에 따른 들쭉 분획 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 폴리페놀을 2 내지 60 중량%, 바람직하게 3 내지 15 중량%, 보다 바람직하게 4 내지 12 중량%로 함유할 수 있다.
- [39] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 앞서 살핀바와 같으며, 상기 (a) 단계 후에 추출물을 여과, 농축 및 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 상기 (a) 단계의 추출물을 레진에 통과시키는 단계를 포함한다.
- [41] 상기 추출물을 레진에 통과시키는 단계는 흡착수지를 이용하여 레진 여과 방식 또는 레진 컬럼 이용 방식이 바람직하다. 상기 레진은 XRD 레진, XDA 레진, 엠버라이트 XAD 레진, 다우엑스 레진, 수페라이트, DAX 레진, 다이아이온 HP-10, HP-20, HP-30, HP-40 및 HP-50 레진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게 XDA 레진, XRD 레진, HP-20 레진 또는 이의 혼합 레진을 사용할 수 있다.
- [42] 본 발명의 일실시양태에 따른 레진 여과 방식에 따르면, 레진에 상기 (a) 단계의 추출물을 loading하고, 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 또는 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올, 바람직하게 20 내지 99% 메탄올 또는 20 내지 99% 에탄올로 1 내지 3회 여과하여 들쭉 분획 추출물을 제조할 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 또는 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올은 0.01 % 내지 1 % 아세트산을 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로 여과 전 물로 여과하여 당을 비롯한 다양한 불순물을 제거할 수 있다.
- [43] 본 발명의 일실시양태에 따른 레진 컬럼 이용 방식에 따르면, 컬럼관 내 레진에 상기 (a) 단계의 추출물을 loading하고 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 또는 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올, 바람직하게 20 내지 99% 메탄올 또는 20 내지 99% 에탄올로 1 내지 3회 용출하여 들쭉 분획 추출물을 제조할 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 또는 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올은 0.01 % 내지 1 % 아세트산을 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로 여과 전 물로 여과하여 불순물을 제거할 수 있다.
- [44] 상기 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 또는 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로 여과 또는 용출된 분획 추출물은 농축 및 건조될 수 있다. 바람직하게 감압 농축될 수 있으며, 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [45] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 유효성분으로 포함하는 황반변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [46] 본 발명에 따른 황반변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 기존에

알려진 추출방식에 의해 제조된 추출물보다 높은 총폴리페놀 함량을 함유하여, 현저한 리포푸신 축적 억제, A2E 광산화에 의한 망막색소상피세포 사멸 억제 및 시세포 외핵층 보호 효과를 가짐으로써 습식 황반변성증 및 건조 황반변성증을 포함하는 황반변성증 예방 또는 치료에 우수한 효과를 보인다.

- [47] 본 발명에 따른 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물은 앞서 기재된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조되어 높은 총 폴리페놀 함량을 가진다.
- [48] 본 발명의 약제학적 조성물은 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.
- [49] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 안연고제, 점안제, 파스타제 또는 카타플 라스마제의 약제학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 국소 투여의 조성물은 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [50] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1~99.9 중량부 포함되는 것이 바람직하다.
- [51] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 환자의 연령, 성별 및 비만의 정도에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수

있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [52] 본 발명의 황반변성증 예방 또는 치료용 조성물은 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [53] 본 발명은 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반 변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [54] 본 발명에서 상기 효소는 들쭉의 폴리페놀 함량 증진을 위해 들쭉에 처리될 수 있는 것으로 아밀라아제(amyase), 글루고아밀라제, 프로테아제, 옥시다아제, 폴리메틸갈락투로나아제(polymethylgalacturonase), 폴리갈락투로나아제(polygalacturonase), 글루코시다아제(glucosidase), 셀룰라아제(cellulose) 및 펙티나아제(pectinase)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게 펙티나아제가 사용될 수 있다.
- [55] 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물에 효소의 처리는 상기 들쭉 추출물의 제조 방법 및 들쭉 분획물의 제조방법에서 살핀 바와 같으며, 약제학적 조성물에 대하여도 상기와 같다.
- [56] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 유효성분으로 포함하는 황반변성증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [57] 본 발명에 따른 식품 조성물은 그 사용 목적에 따라 기능성 식품 또는 건강기능식품일 수 있다.
- [58] 본 발명에 따른 황반변성증 예방 또는 개선용 식품 조성물은 높은 총폴리페놀 함량을 함유하여, 현저한 리포푸신 축적 억제, A2E 광산화에 의한 망막색소상피세포 사멸 억제 및 시세포 외핵층 보호 효과를 가짐으로써 황반변성증 예방 또는 개선에 우수한 효과를 보인다.
- [59] 본 발명의 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물을 식품 조성물 (예컨대 기능성 식품, 건강 기능 식품 또는 건강 기능 음료 첨가물)로 사용할 경우, 상기 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물의 혼합량은 그의 사용목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우, 상기 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에, 장기간 복용이 가능하다.

- [60] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿류, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 들쭉 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올이다. 이외에도 감미제로서 천연 감미제[타우마린, 스테비아 추출물(예, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 감미제(예, 사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [61] 다른 실시양태로서, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한 본 발명의 식품 조성물은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [62] 다른 실시양태로서, 본 발명의 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제 또는 음료일 수 있다.
- [63] 본 발명은 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반 변성증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [64] 본 발명에서 상기 효소는 들쭉의 폴리페놀 함량 증진을 위해 들쭉에 처리될 수 있는 것으로 아밀라아제(α-amylase), 글루코아밀라제, 프로테아제, 옥시다아제, 폴리메틸갈락투로나아제(polymethylgalacturonase), 폴리갈락투로나아제(polygalacturonase), 글루코시다아제(glucosidase), 셀룰라아제(cellulase) 및 펙티나아제(pectinase)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게 펙티나아제가 사용될 수 있다.
- [65] 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물에 효소의 처리는 상기 들쭉 추출물의 제조 방법 및 들쭉 분획물의 제조방법에서 살핀 바와 같으며, 식품 조성물에 대하여도 상기와 같다.
- [66] 본 발명은 황반 변성증 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 제공한다.
- [67] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된

들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물의 황반 변성증 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[68] 본 발명은 황반 변성증 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.

[69] 본 발명은 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물을 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하여 황반 변성증 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[70] 본 발명의 용도 및 방법에 있어서, 상기 들쭉 추출물 및/또는 들쭉 분획 추출물, 이들의 제조방법, 및 약제학적 조성물은 앞서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[71] 본 발명의 신규한 들쭉 추출물 또는 분획 추출물의 제조 방법은 총폴리페놀 함량을 증가시키면서 상업적으로 대량생산이 가능하고 유기용매를 사용하지 않아 식품 소재로 적합한 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물을 제공한다. 또한 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 또는 분획 추출물은 당성분이 현저히 제거되고 유효 성분으로 폴리페놀류 화합물의 함량이 크게 증가된 신규한 들쭉 추출물 또는 분획 추출물로서 망막 색소 상피 세포 내 A2E 축적 억제, 광산화 억제, 시세포 외핵층 손상 억제 등을 통해 황반 변성증의 예방, 치료 또는 개선에 현저한 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

[72] 도 1은 들쭉추출물 및 들쭉 분획 추출물을 망막상피세포에 처리시 A2E 축적 억제 효과를 형광표지된 리포푸신(lipofuscin(A2E))을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

[73] 도 2는 청색광에 의해 유발된 황반 변성증 동물 모델에 들쭉추출물 및 들쭉 분획 추출물 투여에 따른 망막의 시세포층 손상 억제를 확인한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

[74] 이하, 하기 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로 이들 실시예 및 실험예에 의하여 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[75] <실시예 1> 들쭉추출물의 제조

[76] 냉동된 들쭉 원재료 (열매, 원산지: 중국 흑룡강성) 600 kg를 상온에서 녹였다. 물 1,200 L를 넣고, 펙티나아제 (Nanning Longbo (China, No.15030506)) 0.6 kg를 넣은 후, 50~55 °C에서 2시간 동안 가열 교반하였다. 그리고 나서, 여과하고, 여과액을 65 brix까지 농축하여 들쭉 추출물을 45 kg을 수득하였다.

[77] <실시예 2> 레진 컬럼을 이용한 들쭉 분획 추출물의 제조

[78] 에탄올 10L로 레진 (HP-20 레진) 10 kg을 세척하고, 컬럼관에 넣었다. 물 10 L로 레진을 다시 세척하고, 실시예1에서 얻은 들쭉 추출물 1 kg를 loading하였다. 물 10 L를 elution하고, 50% 에탄올 (0.1% Acetic acid 용액) 25L를 elution한 후.

에탄올 10 L를 elution하였다, 50% 에탄올(0.1% Acetic acid 용액) 분획에 해당하는 들쭉 분획 추출물 용액을 45~60 °C로 감압 농축한 후, 말토덱스트린를 첨가하고 분무건조하여, 들쭉 분획 추출물 180 g을 얻었다.

[79] <실시예 3> 레진 여과를 이용한 들쭉 분획 추출물의 제조

[80] 레진 (HP-20 레진) 10 kg를 여과기에 넣고 물로 세척하고, 실시예 1에서 얻은 들쭉 추출물 4kg를 loading 한 후, 물 35 L로 여과하여 폐기하였다. 50% 에탄올 (0.1% Acetic acid 용액) 50 L를 가하여 여과하고, 여과액을 45~60 °C로 감압농축한 후, 말토덱스트린를 첨가하고 분무건조하여, 들쭉 분획 추출물 790 g을 얻었다.

[81] <실시예 4> 들쭉 분획 추출물의 대량 제조

[82] 냉동된 들쭉 원재료(원산지: 중국 흑룡강성) 600kg를 상온에서 녹였다. 물 1,200 L를 넣고, 펙티나아제 0.6 kg를 넣은 후, 50~55 °C에서 2시간 동안 가열 교반한다. 교반액을 여과하고, 3300 내지 3600 rpm에서 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 그리고 나서, 레진 (HP-20 레진) 600 kg을 컬럼관에 넣고 상기 분리된 상층액을 넣은 후, 10~12L/min의 유속으로 흘러내렸다. 그 후, 물 600 L를 넣고 10~12 L/min의 유속으로 흘러내렸다. 마지막으로 50~55% 에탄올 (0.1% Acetic acid 용액) 1,800 L를 넣고 5~6 L/min의 유속으로 흘러내리며 상기 분획액을 수득하였다. 또한 90~95% 에탄올을 넣고, 5~6 L/min의 유속으로 흘러내리며 95% 에탄올 분획액을 수득하였다, 상기에 수득된 50 % 에탄올 분획액과 95 % 에탄올 분획액을 모아 45~55 °C로 감압농축한 후, 말토덱스트린를 첨가하고 분무건조하여 들쭉 분획 추출물 30 kg을 얻었다.

[83] <실시예 5> 들쭉추출물의 총폴리페놀(Total polyphenol) 농도 분석

[84] 상기 <실시예 1> 내지 <실시예 4>에서 제조된 들쭉 추출물 및 들쭉 분획 추출물의 총폴리페놀(Total polyphenol) 농도를 분석하기 위하여 자외선분광광도계(UV/visible Spectrophotometer) 분석을 수행하였으며, 표준 물질로는 탄닌산(Tannic acid)을 사용하는 Association of Official Analytical Chemists (AOAC)법을 따라 분석을 진행하였다.

[85] 상기 AOAC 분석을 위하여 표준 물질(용액)으로 탄닌산 표준용액을 제조하였다. 상기 표준 용액은 탄닌산 약 100 mg을 정밀하게 측정하여 1,000 ml의 용량플라스크에 넣고 증류수를 가하여 잘 섞은 후 정용하였다. 그리고 나서, 상기 표준용액을 적정농도로 희석하여 0.1 ~ 0.5 mg/ml의 표준용액을 조제하였다.

[86] 또한, AOAC 분석을 위하여 시험용액으로 들쭉추출물 및 들쭉 분획 추출물 시료 약 30 mg을 정밀하게 측정하여 10 ml 용량플라스크에 넣고 증류수를 넣어 20분간 초음파 진탕하였다. 상기 용액에 증류수로 표선을 맞추고 잘 흔들어 시험용액으로 사용하였다.

[87] 분석을 위해 증류수 75 ml를 용량플라스크에 넣고, 상기에서 제조된 표준용액 및 시험용액을 각각 1 ml씩 가하였다. 상기 시험관에 Folin-denis 시약 5 ml와 35% 탄산나트륨 10 ml를 가하여 혼합하고 증류수로 정용하였다. 그리고 나서,

실온에서 30분간 방치 후 760 nm에서 흡광도를 SPWCTRAmax PLUS (Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

- [88] 함량 농도 계산을 위하여, 표준물질의 농도별 흡광도와 각 공시험의 흡광도의 차를 이용하여 표준물질의 검량선을 작성하였고, 시료의 흡광도와 시료의 공시험 흡광도의 차를 검량선에 적용시켜 시험용액의 총폴리페놀(total polyphenol)의 농도를 구하였다.

- [89] 그 결과를 표 1에 나타내었다.

- [90] **[표 1] 들쭉추출물 및 분획 추출물의 총폴리페놀의 함량**

	총 폴리페놀의 함량
들쭉추출물 (65brix, 실시예 1)	1.5 % (w/w)
들쭉 분획 추출물 (컬럼, 실시예2)	6.0 % (w/w)
들쭉 분획 추출물 (여과, 실시예3)	5.7 % (w/w)
들쭉 분획 추출물 (scale-up, 실시예4)	5.6 % (w/w)

- [92] 상기 표 1에서 확인되는 바와 같이, 실시예 1 내지 4의 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및 들쭉 분획 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 크게 증가된 것이 확인되었고, 특히 들쭉 분획 추출물에서 보다더 현저한 총 폴리페놀 함량 증가가 확인되었다.

- [93] **<실시예 6> 들쭉 분획 추출물의 A2E의 축적에 대한 억제 효과**

- [94] 상기 상기 <실시예 1> 및 <실시예 3>에서 수득한 들쭉 추출물 및 들쭉 분획 추출물을 이용하여 인간망막상피세포(ARPE-19 세포)에 정해진 농도로 처리한 다음 형광표지된 A2E (A2E-BDP)를 각각 20 μ M 농도로 인간망막색소상피세포(ARPE-19 세포)에 축적시킨 후 형광현미경(Nikon NIS-Elements, AR, Japan)으로 관찰하고 형광도를 분석하였다.

- [95] 그 결과를 하기 표 2 및 도 1에 나타내었다.

- [96] **[표 2] 들쭉추출물 및 분획 추출물의 A2E축적에 대한 억제효과 (음성대조군 100%기준)**

실험군	형광도 분석결과(%)
Normal (D.W)	0
Control (음성대조군)	100
루테인 (17 ug/ml)	37.3
들쭉추출물 250ug/ml	12.6
들쭉추출물 500ug/ml	10.3
들쭉 분획 추출물 10ug/ml	25.6
들쭉 분획 추출물 25ug/ml	22.1
들쭉 분획 추출물 50ug/ml	7.6
들쭉 분획 추출물 100ug/ml	7.5
들쭉 분획 추출물 250ug/ml	3.7
들쭉 분획 추출물 500ug/ml	2.7

[98] 상기 표 2 및 도 1에서 확인되는 바와 같이, 상기 실시예 1 및 실시예 3의 제조방법에 따라 제조된 들쭉 추출물 및 분획 추출물은 A2E 축적 억제에 현저한 효과를 보였다. 특히, 들쭉 분획 추출물은 제법에 따른 높은 총폴리페놀 함량에 의해 더욱 현저한 A2E 축적 억제 효과를 보였다.

[99] <실시예 7> 청색광 유발 광산화에 대한 세포보호능 및 세포생존을 측정

[100] 인간망막색소상피세포(ARPE-19 세포)에 축적된 A2E는 청색광(BL) 조사시 세포독성을 유발하는 것으로 알려져 있는바, 청색광 유발 광산화에 대한 세포 보호능 및 세포 생존을 분석을 수행하였다. 인간 망막색소 상피세포(ARPE-19 세포)를 4×10^3 세포/웰 밀도로 96-웰 조직 배양 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>의 들쭉 추출물 및 들쭉 분획 추출물 및 D.W를 각각 군별로 처리하고 A2E를 20 μ M 농도로 처리한 후에 청색광(BL, 430 nm, 6000 lux)을 15분간 조사하여 세포사멸 여부를 현미경으로 관찰하였다.

[101] 또한, 세포생존율을 MTT 검정법을 이용하여 측정하였다. MTT 검정은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액이 살아있는 세포의 미토콘드리아의 디하이드로게나아제(dehydrogenases)에 의해서 포르마잔(formazan)으로 변화하는 것을 측정함으로써 세포의 생존여부를 확인하는 방법이다. 상기 청색광을 조사한 인간망막색소상피세포에 MTT 용액(5 mg/mL)을 20 μ L씩 넣고 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 뒤 100 μ L DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 넣고 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다(BioTeK Instrument, USA)

[102] 상기 결과를 표 3에 나타내었다.

[103] [표 3] 들쭉추출물 및 분획 추출물의 청색광 유발 광산화 보호능

[104]

실험군	청색광 조사	세포 사멸률(%)
Normal	X	0
Control (음성대조군)	○	100
루테인 (17 ug/ml)	○	37.3
들쭉추출물 250ug/ml	○	12.6
들쭉추출물 500ug/ml	○	10.3
들쭉 분획 추출물 10ug/ml	○	25.6
들쭉 분획 추출물 25ug/ml	○	22.1
들쭉 분획 추출물 50ug/ml	○	7.6
들쭉 분획 추출물 100ug/ml	○	7.5
들쭉 분획 추출물 250ug/ml	○	3.7
들쭉 분획 추출물 500ug/ml	○	2.7

[105] 상기 표 3에서 확인되는 바와 같이, 청색광 조사에 따른 세포 사멸은 들쭉 추출물 또는 들쭉 분획 추출물 투여에 따라 감소되었다. 특히, 들쭉 분획 추출물은 제법에 따른 높은 총폴리페놀 함량에 의해 더욱 현저한 세포 사멸 억제 효과를 보였다.

[106] <실시예 8> 청색광 유발 황반변성증 동물모델에서 치료 효과 확인

[107] Balb/C 마우스(구입처: 포텍)를 일주일간 순화사육 후 상기 실시예 2에서 제조된 들쭉 분획 추출물을 5일간 1일 1회 주기로 투여하였고, 24시간 암순응을 거친 후 2주 동안 청색광을 10000lux로 1일 1시간으로 조사하였고, 시험물질을 1일 1회 투여한 다음 7일 후 부검하여 안구를 시신경을 포함하여 적출하였다. 적출한 안구조직은 데이빗슨 고정액 (Davidson solution)에 10일간 고정 후 포르말린으로 1~2일간 고정 한 다음 파라핀 블록을 제작하고 H&E 염색을 진행하였다.

[108] 염색이 수행된 안구 조직을 관찰하여 시세포 외핵층 두께 및 외핵층의 핵수를 확인하여 그 결과를 표 4 및 도 2에 나타내었다.

[109] [표 4] 들쭉 분획 추출물의 청색광 유발 시세포 외핵층 보호효과

실험군	시세포	시세포
	외핵층 두께(%)	외핵층 핵수(%)
Normal	100	100
Control (음성대조군)	59.5	67.4
들쭉 분획 추출물(V.U 50) 50ug/ml	79.2	81.6
들쭉 분획 추출물(V.U 100) 100ug/ml	83.6	82.9
들쭉 분획 추출물(V.U 200) 200ug/ml	84.8	87.3

[111] 상기 표 4 및 도 2에서 확인된 바와 같이, 들쭉 분획 추출물 처리에 따라 시세포의 외핵층 두께 및 외핵층 핵수가 현저히 회복되는 것이 확인되었다.

[112] <제조예 1> 주사제제의 제조

[113] 본 발명의 들쭉 추출물 또는 분획 추출물 100 mg

[114] 일염기인산나트륨 6.0 mg

[115] 벤질알콜 00.02 mL

[116] 염화나트륨 15 mg

[117] 주사용 멸균증류수 적량

[118] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 2 mL로 한 후, 2 mL 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다

[119] <제조예 2> 정제의 제조

[120] 본 발명의 들쭉 추출물 또는 분획 추출물 200 mg

[121] 유당수화물 100 mg

[122] 미결정 셀룰로오스 50 mg

[123] 크로스포비돈 15 mg

[124] 스테아린산 마그네슘 적량

[125] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[126] <제조예 3> 캡슐제의 제조

[127] 본 발명의 들쭉 추출물 또는 분획 추출물 100 mg

- [128] 유당 50 mg
- [129] 치환도히드록시프로필셀룰로오스 20 mg
- [130] 이산화규소 5 mg
- [131] 탈크 2 mg
- [132] 스테아린산 마그네슘 적량
- [133] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [134] <제조예 4> 액상제의 제조
- [135] 본 발명의 들쭉 추출물 또는 분획 추출물 1000 mg
- [136] 백당 20 g
- [137] 무수구연산 3 g
- [138] 과당 20 g
- [139] 체리향 적량
- [140] 정제수를 가하여 전체 100 ml
- [141] 상기의 성분을 통상의 액제의 제조방법에 따라서 혼합하고 100 ml의 갈색병에 충전하고 멸균시켜서 액제를 제조하였다.

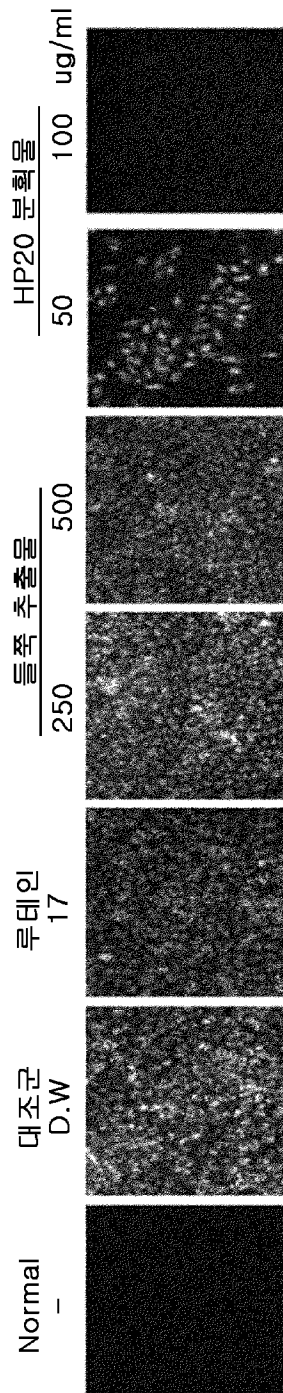
청구범위

- [청구항 1] 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 및 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하의 들쭉에 효소를 처리하고 가열하여 추출하는 단계를 포함하는, 들쭉 추출물의 제조 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소부탄올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 들쭉 추출물의 제조 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 효소는 아밀라아제(amylose), 글루코아밀라제, 프로테아제, 옥시다아제, 폴리메틸갈락투로나아제(polymethylgalacturonase), 폴리갈락투로나아제(polygalacturonase)글루코시다아제(glucosidase), 셀룰라아제(cellulose) 및 펙티나아제(pectinase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 들쭉 추출물의 제조 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 추출은 40 내지 65 °C에서 1시간 내지 10시간 동안 수행되는 들쭉 추출물의 제조 방법.
- [청구항 5] (a) 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 및 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로부터 선택되는 어느 하나의 용매 하의 들쭉에 효소를 처리하고 가열하여 추출하는 단계;
(b) 상기 (a) 단계의 추출물을 레진에 통과시키는 단계를 포함하는, 들쭉 분획 추출물의 제조 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소부탄올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 들쭉 분획 추출물의 제조 방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 효소는 아밀라아제(amylose), 글루코아밀라제, 프로테아제, 옥시다아제, 폴리메틸갈락투로나아제(polymethylgalacturonase), 폴리갈락투로나아제(polygalacturonase), 글루코시다아제(glucosidase), 셀룰라아제(cellulose) 및 펙티나아제(pectinase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 들쭉 분획 추출물의 제조 방법.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 추출은 40 내지 65 °C에서 1시간 내지 10시간 동안 수행되는 들쭉 분획 추출물의 제조 방법.
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 (b) 단계의 레진은 XRD 레진, XDA 레진, 엠버라이트 XAD 레진, 다우엑스 레진, 수페라이트, DAX 레진, 다이아이온 HP-10, HP-20, HP-30, HP-40 및 HP-50 레진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 들쭉 분획 추출물의 제조 방법.
- [청구항 10] 제5항에 있어서, 상기 (b) 단계의 레진에 통과시키는 단계는 탄소수 1 내지 4의 무수 저급 알코올 또는 탄소수 1 내지 4의 함수 저급 알코올로

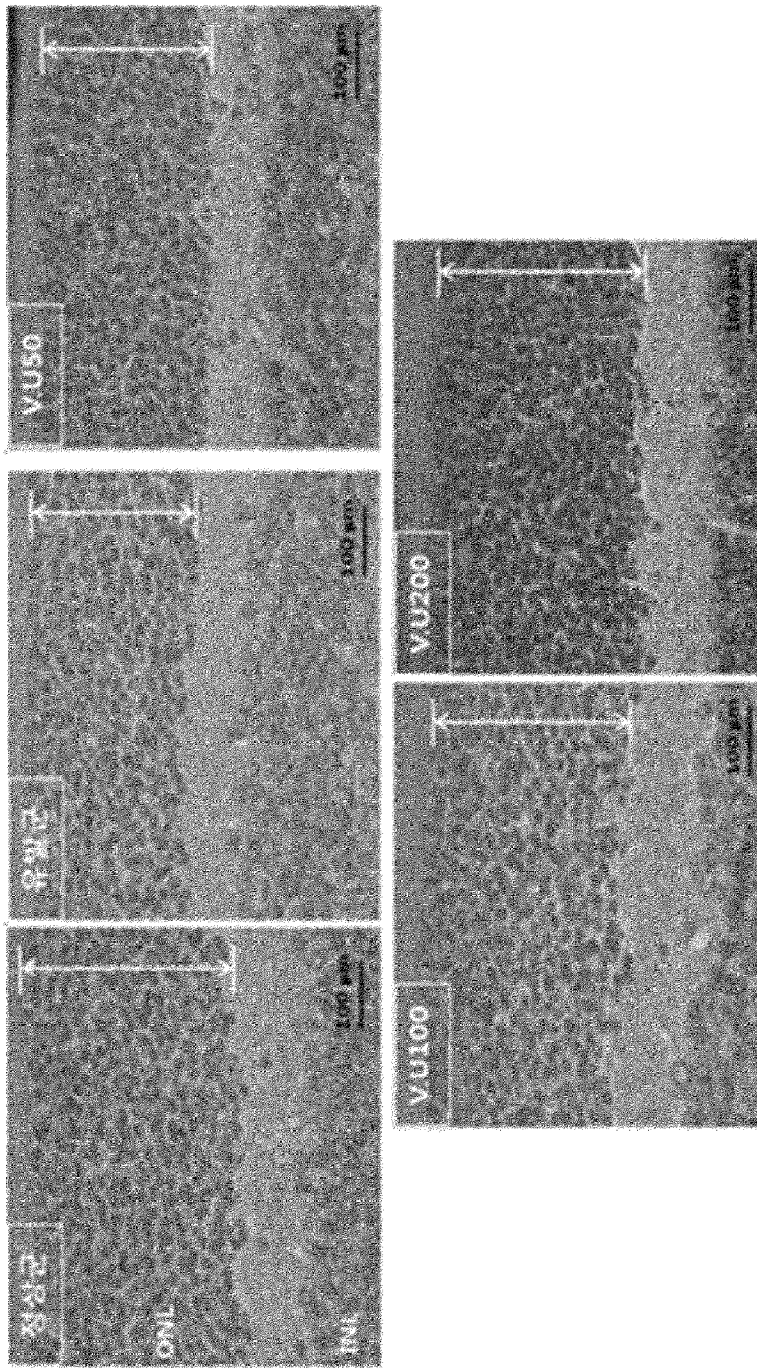
- 용출 또는 여과하는 것인 들쭉 분획 추출물의 제조 방법.
- [청구항 11] 제1항 내지 제4항에 따라 제조된 들쭉 추출물, 제5항 내지 제10항에 따라 제조된 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 황반변성증은 습식 황반변성증 또는 건성황반변성증인 황반변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 황반변성증의 예방 또는 치료는 리포푸신의 축적 억제, 망막색소상피세포의 사멸 억제 및 시세포 외핵층 손상 억제에 의한 것인 황반변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 들쭉 추출물, 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물은 폴리페놀을 조성물 총 중량에 대하여 2 내지 60 중량%로 포함하는 것인 황반변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 15] 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반 변성증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 16] 제1항 내지 제4항에 따라 제조된 들쭉 추출물, 제5항 내지 제10항에 따라 제조된 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반변성증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 황반변성증은 습식 황반변성증 또는 건성황반변성증인 황반변성증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 황반변성증의 예방 또는 개선은 리포푸신의 축적 억제, 망막색소상피세포의 사멸 억제 및 시세포 외핵층 손상 억제에 의한 것인 황반변성증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 19] 제16항에 있어서, 상기 들쭉 추출물, 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물은 폴리페놀을 조성물 총 중량에 대하여 2내지 60중량%로 포함하는 것인 황반변성증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 20] 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 황반 변성증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 21] 제1항 내지 제4항에 따라 제조된 들쭉 추출물, 제5항 내지 제10항에 따라 제조된 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하여 황반 변성증을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 22] 황반 변성증 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제4항에 따라 제조된 들쭉 추출물, 제5항 내지 제10항에 따라 제조된 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물.
- [청구항 23] 제1항 내지 제4항에 따라 제조된 들쭉 추출물, 제5항 내지 제10항에 따라 제조된 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물의 황반 변성증 예방 또는 치료 용도.

[청구항 24] 황반 변성증 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 효소 처리 들쭉 추출물, 효소 처리 들쭉 분획 추출물, 또는 이들의 혼합물의 용도.

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006084**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 36/45(2006.01)i, A23L 1/30(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 36/45; A61P 27/02; A23L 1/30; C09K 15/34; A61P 17/18

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: vaccinium uliginosum L. extract, enzyme, heating, extraction, resin, macular degeneration

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1330850 B1 (CHOUNG, Su-Young) 18 November 2013 See abstract; claims 1-3, 9; paragraphs [0038]-[0045], [0064]-[0076]; and figures 1-2.	1-10,15,20,24
Y	JP 2007-112852 A (POKKA CORP.) 10 May 2007 See claims 1, 2; paragraphs [0015], [0020], [0022], [0028]-[0032], [0091]-[0096]; and table 11.	1-10,15,20,24
A	KIM, Sun Mi et al., "Protective Effect of Vaccinium Uliginosum L. Extract on Age-related Macular Degeneration", Journal of Pharmaceutical Society of Korea, 2012, vol. 56, no. 5, pages 314-319 See the entire document.	1-10,15,20,24
A	US 8591964 B2 (MCKENZIE, M.) 26 November 2013 See the entire document.	1-10,15,20,24
A	KR 10-2006-0066866 A (HALLYM UNIVERSITY) 19 June 2006 See the entire document.	1-10,15,20,24



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

12 OCTOBER 2016 (12.10.2016)

Date of mailing of the international search report

12 OCTOBER 2016 (12.10.2016)

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/KR2016/006084

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 21 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: **12-14, 17-19**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 12-14 and 17-19 are unclear since claims 12-14 and 17-19 refer to claims which do not meet the requirement of PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: **11, 16, 21-23**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1330850 B1	18/11/2013	CN 102821773 A	12/12/2012
		CN 102821773 B	03/09/2014
		JP 2013-522188 A	13/06/2013
		JP 5860418 B2	16/02/2016
		KR 10-2011-0102246 A	16/09/2011
		WO 2011-112002 A2	15/09/2011
		WO 2011-112002 A3	12/01/2012
JP 2007-112852 A	10/05/2007	JP 4589858 B2	01/12/2010
US 8591964 B2	26/11/2013	AU 2003-223427 A1	20/10/2003
		CA 2519028 A1	16/10/2003
		US 2005-0175720 A1	11/08/2005
		US 2013-0266662 A1	10/10/2013
		WO 03-084559 A1	16/10/2003
KR 10-2006-0066866 A	19/06/2006	KR 10-0616068 B1	28/08/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/45(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/45; A61P 27/02; A23L 1/30; C09K 15/34; A61P 17/18

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: 들쭉 추출물, 효소, 가열, 추출, 레진, 황반 변성증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1330850 B1 (정수영) 2013.11.18 요약; 청구항 1-3, 9; 단락 [0038]-[0045], [0064]-[0076]; 및 도면 1-2 참조.	1-10, 15, 20, 24
Y	JP 2007-112852 A (POKKA CORP.) 2007.05.10 청구항 1, 2; 단락 [0015], [0020], [0022], [0028]-[0032], [0091]-[0096]; 및 표 11 참조.	1-10, 15, 20, 24
A	김선미 등, '들쭉 추출물의 노인성 황반변성증 예방 효과', 약학회지, 2012, 제56권, 제5호, 페이지 314-319 전체 문헌 참조.	1-10, 15, 20, 24
A	US 8591964 B2 (MCKENZIE, M.) 2013.11.26 전체 문헌 참조.	1-10, 15, 20, 24
A	KR 10-2006-0066866 A (학교법인 한림대학교) 2006.06.19 전체 문헌 참조.	1-10, 15, 20, 24

☐ 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

2016년 10월 12일 (12.10.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 10월 12일 (12.10.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제21항은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☒ 청구항: 12-14, 17-19
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제12항-제14항 및 제17항-제19항은 PCT 규칙 6.4(a) 규정을 충족시키지 않는 청구항을 인용하고 있으므로 불명료합니다.
3. ☒ 청구항: 11, 16, 21-23
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1330850 B1	2013/11/18	CN 102821773 A CN 102821773 B JP 2013-522188 A JP 5860418 B2 KR 10-2011-0102246 A WO 2011-112002 A2 WO 2011-112002 A3	2012/12/12 2014/09/03 2013/06/13 2016/02/16 2011/09/16 2011/09/15 2012/01/12
JP 2007-112852 A	2007/05/10	JP 4589858 B2	2010/12/01
US 8591964 B2	2013/11/26	AU 2003-223427 A1 CA 2519028 A1 US 2005-0175720 A1 US 2013-0266662 A1 WO 03-084559 A1	2003/10/20 2003/10/16 2005/08/11 2013/10/10 2003/10/16
KR 10-2006-0066866 A	2006/06/19	KR 10-0616068 B1	2006/08/28