

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2018/208128 A1

2018 년 11 월 15 일 (15.11.2018) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

A61K 36/65 (2006.01) A61K 36/744 (2006.01)
A61K 36/234 (2006.01) A61K 36/53 (2006.01)
A61K 36/232 (2006.01) A61K 36/61 (2006.01)
A61K 36/233 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

NAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주
주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR). 동광제약 주식회
사 (DONGKWANG PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
[KR/KR]; 04535 서울시 중구 퇴계로 97, 12층, Seoul
(KR).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/005458

(22) 국제출원일: 2018 년 5 월 11 일 (11.05.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0059517 2017 년 5 월 12 일 (12.05.2017) KR

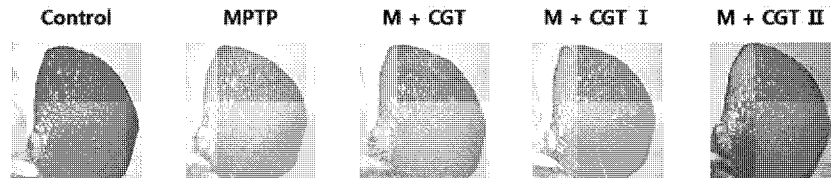
(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-IN-
INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE
UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥
구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR). 전남대학교 산
학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHON-

(72) 발명자: 박성욱 (PARK, Seong Uk); 05278 서울시 강
동구 동남로 892 중풍뇌질환센터, Seoul (KR). 박희준
(PARK, Hi-Joon); 05270 서울시 강동구 동남로71길 41,
11동 104호, Seoul (KR). 전송희 (JEON, Song Hee);
58328 전라남도 나주시 그린로 153, 105동 1104호, Je-
ollanam-do (KR). 김영만 (KIM, Young Man); 06936 서
울시 동작구 장승배기로19라길 19, Seoul (KR). 조승연
(CHO, Seung Yeon); 05278 서울시 강동구 동남로 892
경희대학교병원 한방내과, Seoul (KR). 안소라 (AHN,
Sora); 07283 서울시 영등포구 문래로4길 6, 201동 511
호, Seoul (KR). 김동희 (KIM, Dong Hee); 18133 경기도
오산시 운암로 89, 206동 202호, Gyeonggi-do (KR). 정구
원 (JEONG, Guwon); 06793 서울시 서초구 염곡안1길

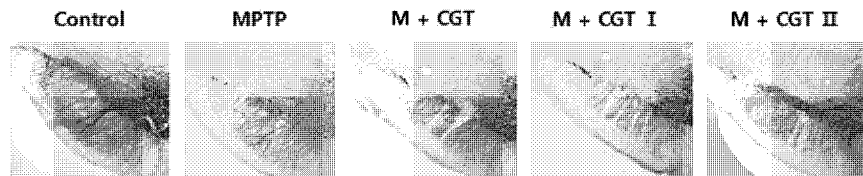
(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING TILIANIN AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR
TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE

(54) 발명의 명칭: 티리아닌을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

Striatum (ST)



Substantia nigra (SN)



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition and health functional food for prevention or treatment of Parkinson's disease, each containing a composite extract composed of *Agastachis Herba* containing tilianin, *Paeonia lactiflora*, *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica gigas*, *Bupleurum falcatum*, *Gardenia jasminoides*, *Paeonia suffruticosa*, and *Eugenia caryophyllata*. The composition of the present invention improves behavioral disorders induced by MPTP and restores the loss of dopaminergic neurons, and thus has excellent effects in the prevention, alleviation, and treatment of Parkinson's disease.

(57) 요약서: 본 발명은 티리아닌을 함유하는 곽향(*Agastachis Herba*) 및 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 정향(*Eugenia caryophyllata*) 으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 건강기능식품에 대한 것으로, 본 발명의 조성물은 MPTP 에 의해 유도된 행동 장애를 개선시키고, 도파민성 뉴런의 손실을 회복시키므로 파킨슨병의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2018/208128 A1

32, 201호, Seoul (KR). 오승택 (OH, Seung Tack); 06097
서울시 강남구 선릉로 112길 54-2, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 법원로
135 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 티리아닌을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides), 목단피(Paeonia suffruticosa), 곽향(Agastachis Herba) 및 정향(Eugenia caryophyllata)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 파킨슨병(Parkinson disease, PD)은 흔한 신경병성 장애로, 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 등의 증상이 나타난다(Parkinsonism IN: Merritt's neurology, 2000, Ed 10, 679-693). 또한 파킨슨병은 미세아교세포증(microgliosis), 성상교세포증(astrogliosis), 도파민성 뉴런의 진행적인 퇴화, 도파민성 뉴런에서 루이 소체(Lewy bodies)의 존재, 및 뇌흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta)에서 알파-시누클레인(α -synuclein)이 축적되는 특징을 가진다(Neuron, 2003, 39, 889-909). 파킨슨병의 증상을 경감시키는 약물이 다 수 있으나, 약물의 만성적인 사용은 심신을 약화시키는 부작용을 초래하고(Neurology, 1991, 41, 202-205), 현재까지는 병의 진행을 막을 수 있는 약물은 개발되지 않은 실정이다. 파킨슨병의 정확한 원인은 알려지지 않았지만, 환경적인 독소, 유전적인 요인, 미토콘드리아의 기능 장애가 관련되어 있는 것으로 파악된다.
- [4] 파킨슨병의 모델로서, 신경독소인 6-히드록시도파민(6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 또는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)이 주로 이용된다(Nat Rev Neurosci, 2001, 2(5), 325-334). 6-OHDA는 도파민 수송체(DAT)에 의해 흡수되고, 자유 라디칼(free radical)을 만들어낸다. MPTP는 파킨슨병에 관련된 도파민성 뉴런을 특정 표적으로 하기보다는 인간과 비인간영장류에서 도파민성 뉴런을 감소시키고, 성상교세포증을 일으키며, 뇌흑질 치밀부에서 소교세포를 활성화시켜(Nat Med, 1999, 5(12), 1403-1409), 파킨슨병의 전형적인 생화학적 또는 병리학적인 증상을 야기한다(Neurosci, 2000, 16(2), 135-142).
- [5] 전통의학에서 파킨슨병은 몸의 떨림, 무감각, 흐느적거림, 사지가 약해지는 증상 때문에 중풍(shaking palsy)이라고도 일컬어진다. 동아시아 전통 의학의 이론에 따르면, 파킨슨병의 가장 중요한 병리학적인 특징은 기(Qi)의 침체와 혈액의 정지, 간-음(liver-Yin)의 부족과 콩팥-음(liver-Yin)의 부족, 및 기와 혈액

모두가 부족한 것이다(Behav Pharmacol, 2006, 17(5-6), 403-410).

- [6] 파킨슨병의 치료를 위한 약물로서, 엘-도파(l-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘테프릴(Eldepryl) 등이 알려져 있다. 그러나, 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것이며, 따라서 꾸준히 지속적인 약물의 복용을 필요로 한다. 이러한 약물들의 장기 투여는 약물 부작용의 문제점을 야기하게 된다. 예를 들어, 항콜린 약제들은 자율 신경계 이상이나 정신기능의 이상 등이 나타날 수 있어 고령의 환자들에게 지속적으로 투여하는 것에 한계가 있다. 또한, 엘-도파 제제의 경우 장기간 동안의 복용에 따라 점차적으로 효과가 떨어지고, 몸이 뒤틀리고 손이나 발이 저절로 움직이는 이상운동이 생기는 등의 부작용이 발생하게 된다. 기타, 고주파를 이용한 신경자극술 즉, 고주파 파괴술 또는 심부 뇌자극술 등의 수술 치료도 행해지고 있으나, 침습적인 수술을 필요로 하고 또한 많은 비용이 소모되는 문제가 있다.
- [7] 한편, 중국에는 많은 양의 식물 자원이 존재한다. 146,900종 이상의 식물 종이 중국에서 발견되었고, 이 중 22,500종 이상이 약용 식물로 밝혀졌으며(Fitoterapia, 2013, 84, 273-285), 현재 파킨슨병을 치료할 수 있는 약용 식물은 많은 연구가 진행중에 있으나 아직도 효과적인 천연물 치료제가 필요한 실정이다.
- [8] 이에, 본 발명자들은 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides), 목단피(Paeonia suffruticosa), 곽향(Agastachis Herba) 및 정향(Eugenia caryophyllata)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 조성물이 파킨슨병에 효능이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides), 목단피(Paeonia suffruticosa), 곽향(Agastachis Herba) 및 정향(Eugenia caryophyllata)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [11] 또한, 본 발명은 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides), 목단피(Paeonia suffruticosa), 곽향(Agastachis Herba) 및 정향(Eugenia caryophyllata)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[12]

과제 해결 수단

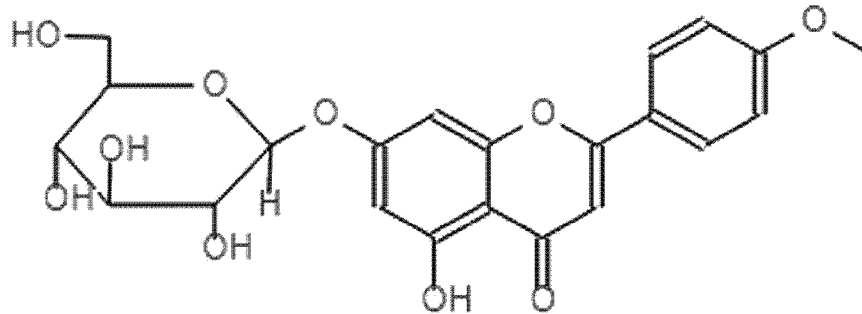
- [13] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 곽향(*Agastachis Herba*) 및 정향(*Eugenia caryophyllata*)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [14]
- [15] 본 발명에서 사용된 용어 '작약'은, 학명 '*Paeonia lactiflora*'로 일컬어지는 식물로서, 미나리아재비과에 속하는 여러해살이 쌍떡잎식물로 한국, 몽골 및 동시베리아 등에 분포한다. 꽃이 아름다워 원예용으로 쓰며, 뿌리는 진통, 복통, 월경통, 무월경, 토혈, 빈혈, 타박상 등의 약제로 쓰인다.
- [16] 본 발명에서 사용된 용어 '천궁'은, 학명 '*Ligusticum chuanxiong*'으로 일컬어지는 식물로서, 미나리과에 속하는 쌍떡잎식물로 중국 원산이며 약용 식물로 재배한다. 진정, 진통, 강장 등에 효능이 있어 두통, 빈혈증, 부인병 등을 치료하는데 쓰인다.
- [17]
- [18] 본 발명에서 사용된 용어 '당귀'는, 학명 '*Angelica gigas*'로 일컬어지는 식물로서, 한국에서는 참당귀의 뿌리를 사용한다. 당귀의 효능은 피가 부족할 때 피를 생성해 주는 보혈작용이다. 약리학적으로 당귀는 관상동맥의 혈류량을 촉진시키고, 적혈구 생성을 왕성하게 한다.
- [19] 본 발명에서 사용된 용어 '시호'는, 학명 '*Bupleurum falcatum*'으로 일컬어지는 식물로서, 쌍떡잎 식물 산형화목 미나리과의 여러해살이 풀로 북시호 또는 뿔미나리라고도 한다. 뿌리에는 사포닌과 지방유 등이 함유되어 있어, 한방에서는 해열, 진통, 강장제나 호흡기, 소화기, 순환기 질환 치료 약제로 사용되고 있다.
- [20] 본 발명에서 사용된 용어 '치자인'은, 학명 '*Gardenia jasminoides*'로 일컬어지는 식물로서, 꼭두서니과에 속하는 사철 푸른 떨기나무무로 양혈, 이뇨, 제변, 청열, 해독 효과가 있다.
- [21] 본 발명에서 사용된 용어 '목단피'는 모란(*Paeonia Suffruticosa*)의 뿌리껍질로, 한의학에서 약제로 사용되고 있는 인체에 무해한 식물이다. 항염증, 항균 및 비만세포에서 히스타민 유리 억제 작용 등이 알려져 있다.
- [22] 본 발명에서 사용된 용어 '곽향'은, 배초향(*Agastache rugosa*)의 지상부를 이용하여 만든 약제로, 한국에서만 쓰이며 북부창만, 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 설사 등을 치료한다. 소화장애를 동반한 감기, 여름철 식체로 인한 구토, 설사, 구취, 옴이나 버짐 등에 효과가 있다.
- [23] 본 발명의 곽향은 티리아닌(tilianin)을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [24] 상기 '티리아닌(tilianin)'은 하기 화학식 1의 구조를 가진 플라보노이드로

곽향의 주요 성분중 하나이며 체내의 콜레스테롤 축적을 억제해 동맥경화를 개선하는 효과가 있다.

[25]

[26] [화학식 1]

[27]



[28] 구체적인 일 실험예에 있어서, 본 발명의 복합추출물(CGT II)을 HPLC 분석한 결과, 다른 복합 추출물(CGT, CGT I)과 비교하여 특이한 피크를 발견하였고, 추가 분석을 통해 해당 피크가 티리아닌이라는 것을 확인하였다. 또한, 해당 티리아닌이 곽향에는 함유되어 있으나 광곽향에는 함유되어 있지 않는 것을 확인하였다 (도 4 내지 6).

[29] 본 발명에서 사용된 용어 '정향'은, 학명 '*Eugenia caryophyllata*'로 일컬어지는 식물로서, 열대 상록성 아교목으로 몰루카 제도가 원산지이며 탄자니아의 잔지바르 섬, 인도네시아의 수마트라, 브라질, 말레이시아 등에서 생산된다. 구토, 위암, 복통, 소화불량과 성기능 증대, 잇몸염증 및 잇몸통증 등에 쓰인다.

[30] 본 발명에서 상기 곽향, 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피 및 정향은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[31] 본 발명에서 사용된 용어 '추출물'이란 상기 곽향, 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피 또는 정향으로부터 분리하여 얻은 물질을 의미하며, 당업계에서 공지된 통상적인 분획 용매, 예를 들어 물, 에탄올, 메탄올과 같은 C1-C4 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 부탄올 등) 등의 극성 용매, 및 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분리할 수 있다.

[32] 구체적으로 본 발명의 추출물은 곽향, 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피 또는 정향을 음건하여 세절한 것을 그 중량의 약 1 내지 10배, 바람직하게는 약 2 내지 5배 부피의 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:3의 혼합비를 갖는 혼합용매로 20°C 내지 100°C, 바람직하게는 30°C 내지 70°C의 추출 온도에서 약 1 시간 내지 2일, 바람직하게는 2 시간 내지 1일 동안 열수 추출, 환류냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 환류냉각 추출의 추출방법으로 1회 내지 5회, 바람직하게는 2회 내지 3회 반복하여 추출물을 수득한 후, 감압여과하고 여과한 추출물을

혼합하여 회전진공농축기로 20°C 내지 100°C, 바람직하게는 50°C 내지 70°C에서 감압 농축하여 유기용매를 제거하여 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매에 따른 가용추출물인 조추출물을 얻을 수 있다.

- [33] 또한, 극성 용매 가용추출물은 비극성 용매 가용성분 추출과정을 거친 수가용성 분획부에 약 1 내지 10배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 에탄올을 가하여 1 내지 5회, 바람직하게는 2 내지 4회 분획하여 에탄올 가용성 분획부와 수가용성 분획부를 수득할 수 있으며, 용매 분획부를 회전 진공 농축기로 감압농축시켜 용매를 제거하여 각각의 추출물을 얻을 수 있다.
- [34] 구체적으로, 본 발명의 추출물은 수 가용 추출물 또는 에탄올 가용 추출물일 수 있고, 더욱 구체적으로는 30% 에탄올 추출물일 수 있다.
- [35] 구체적인 일 실시예에 있어서, 본 발명에 따른 추출물은, 곽향, 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피, 정향의 혼합물 100g을 100°C에서 30% 에탄올로 환류 응축기를 이용하여 추출한 후, 필터를 이용하여 여과한 다음 감압 농축하고 동결 건조하여 에탄올 추출물 15.47g을 제조하였다(CGT II, 실시예 1).
- [36] 본 발명에서 사용된 용어 '파킨슨' 질환은 뇌의 흑질(substantia nigra)에 분포하는 도파민의 신경세포가 점차 소실되어 발생하며 안정떨림, 경직, 운동완만 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환을 의미한다.
- [37] 본 발명에서 사용되는 용어 '예방'은 상기 CGT II를 포함하는 조성물의 투여로 파킨슨 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 '치료'는, 상기 CGT II를 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [38] 본 발명의 조성물은 곽향 및 정향 추출물의 첨가로 인해 파킨슨 병 개선 효과가 향상되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [39] 구체적인 일 실험예에서 상기 CGT II는 MPTP-유도 파킨슨병 모델 마우스에서 CGT 및 CGT I과 비교하여 우수한 행동능력의 향상 및 흑질 선조체 도파민성 세포를 보호 효과를 확인하였다(도 2 및 도 3).
- [40] 따라서 본 발명의 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 항산화 효과 및 신경세포 보호 효과를 가지므로 파킨슨 질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있는 것을 알 수 있었다.
- [41]
- [42] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어 '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 CGT II는 유효성분으로 1일 0.01 내지 500mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 100mg/kg의 용량으로 투여할 수

있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 0.001 내지 50% 중량백분율로 포함할 수 있다.

[43] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[44]

[45] 본 발명의 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 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 광물유를 들 수 있다.

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

[47] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[48]

- [49] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 괄향(*Agastachis Herba*) 및 정향(*Eugenia caryophyllata*)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [50] 상기 추출물 및 파킨슨 질환의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [51]
- [52] 본 발명에서 사용된 용어, '건강기능식품'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [53] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [54] 또한 상기 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, '식품첨가물'로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [55] 상기 '식품첨가물공전'에 수제된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.
- [56] 상기 건강기능식품 조성물을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.
- [57]
- [58] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 괄향(*Agastachis Herba*) 및 정향(*Eugenia caryophyllata*)으로 구성되는 복합 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [59] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 파킨슨 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [60] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 파킨슨 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [61] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [62]
- [63] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 파킨슨의 예방, 치료, 또는 개선을 위한 조성물의 제조를 위한, 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides), 목단피(Paeonia suffruticosa), 곽향(Agastachis Herba) 및 정향(Eugenia caryophyllata)으로 구성되는 복합 추출물의 용도를 제공한다.
- [64] 상기 조성물은 전술한 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물일 수 있으며, 상기 추출물 및 파킨슨 질환의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[65]

발명의 효과

- [66] 본 발명의 티리아닌을 유효성분으로 포함하는 조성물은 MPTP에 의해 유도된 행동 장애를 개선시키고, 도파민성 뉴런의 손실을 회복시키므로 파킨슨병의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과가 있다.

[67]

도면의 간단한 설명

- [68] 도 1은 신경 세포주 SH-SY5Y에서 복합추출물의 투여에 의한 신경세포 보호 효과를 확인한 그래프이다.
- [69] 도 2는 파킨슨 병 동물 모델에서 복합추출물 투여에 의한 행동능력 저하 억제 효과를 확인하기 위한 행동분석 결과를 나타낸 그래프이다. a) Rotarod test, b) Rearing test, c) Open field test.
- [70] 도 3은 선조체(Striatum, ST) 및 흑질(Substantia nigra, SN)에서 TH(Tyrosine Hydroxylase)의 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다.
- [71] 도 4는 복합추출물 CGT, CGT I 및 CGT II의 HPLC 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- [72] 도 5는 CGT II 내 특이 피크의 확인을 위한 HPLC 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[73] 도 6은 곽향 및 광곽향에서 티리아닌의 함유 확인을 위한 HPLC 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[74] 도 7은 파킨슨 질환 세포모델에서 곽향 및 티리아닌의 신경보호효과를 나타낸 그래프이다; a) 곽향의 신경보호효과, b) 티리아닌의 신경보호효과.

[75]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[76] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[77]

[78] 실시예 1. 곽향 첨가 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II)의 제조

[79] 건조한 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자, 정향, 목단피 및 곽향을 6:4:4:3.2:1.6:6:1.6:6 비율로 324g으로 혼합한 후 환류추출기에 30% 에탄올 10배수와 함께 넣고 95°C에 가열하여 탱액이 끓기 시작하는 시점부터 4시간 동안 더 가열하였다. 가열을 중지하고 30분간 냉각시킨 다음, 상기 추출액을 여과지 2장을 사용하여 감압 여과한 후, 동결건조기를 사용하여 분말시료를 만들어 실험에 사용하였다.

[80]

[81] 비교예 1. 30% 에탄올 복합추출물 (CGT)의 제조

[82] 건조한 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자 및 목단피를 6:4:4:3.2:1.6:1.6 비율로 324g으로 혼합한 후 환류 추출기에 30% 에탄올 10배수와 함께 넣고 95°C에 가열하여 탱액이 끓기 시작하는 시점부터 4시간 동안 더 가열 추출 하였다. 가열을 중지하고 30분간 냉각 시킨 다음, 상기 추출액을 여과지 2장을 사용하여 감압 여과한 후, 동결건조기를 사용하여 분말시료를 만들어 실험에 사용하였다.

[83]

[84] 비교예 2. 광곽향 첨가 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-I)의 제조

[85] 건조한 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자, 정향, 목단피 및 광곽향을 6:4:4:3.2:1.6:6:1.6:6 비율로 324g으로 혼합한 후 환류 추출기에 30% 에탄올 10배수로 95°C에 가열하여 탱액이 끓기 시작하는 시점부터 4시간 동안 더 가열하였다. 가열을 중지하고 30분간 냉각한다음, 상기 추출액을 여과지 2장을 사용하여 감압 여과한 후, 동결건조기를 사용하여 분말시료를 만들어 실험에 사용하였다.

[86]

[87] 실시예 2. SH-SY5Y 신경세포주의 준비

[88] 인간신경아세포종 SH-SY5Y cell은 10% 소 태아 혈청 및 항생제 (Gibco-BRL, USA)가 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (Hyclone, Thermo, USA) 배지 하에서 배양하였다. 배양기는 37°C 온도를 유지했고 95% 공기와 5% CO₂가 혼합된 기체가 계속 공급되어 세포 배양의 적절한 조건을 갖추었다. 세포는 96-웰 플레이트에 1x10⁶이 되도록 실험 24시간 전에 배양하였다.

[89]

[90] 실시예 3. 동물

[91] 22-26g의 무게를 갖는 12주 된 수컷 C57BL/6 마우스(Central Lab. Animal Inc., Seoul Republic of Korea)를 이용하였다. 동물들은 NIH(NIH publication No.85-23, revised 1985)와 한국의료과학아카데미(KHUASP(SE)-14-052)의 가이드라인을 따라 12시간의 낮, 12시간의 밤의 사이클을 갖는 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 실내 온도에서 유지하였다.

[92] 생체 내 시험을 위해 마우스를 무작위적으로 5개의 그룹으로 나누었다: (1) 대조군 (n=6; 복강내 식염수 주사), (2) MPTP(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (n=5; 복강내 30mg/kg/일 농도로 MPTP 주사) (3) CGT (n=5; 복강내 MPTP+CGT 주사), (4) CGT I (n=5; 복강내 MPTP+ CGT I 주사). (5) CGT II (n=5; 복강내 MPTP+ CGT II 주사)

[93]

[94] 실험예 1. 신경 세포주 SH-SY5Y에서 복합추출물의 6-하이드록시도파민 독성에 의한 세포보호 활성 분석

[95] 6-하이드록시도파민 처리에 의한 신경세포 손상을 보호하는 효과를 확인하기 위하여, 실시예 2의 SH-SY5Y세포주를 이용하여 MTT reduction assay를 진행하였다. SH-SY5Y세포주가 배양되어있는 96-웰 플레이트에 각 복합추출물(CGT, CGT I, CGT II)을 녹인 DMSO를 30분간 처리한 후, 6-하이드록시도파민(6-OHDA) 200 μM 을 처리하였다. 6-OHDA 처리 24시간 후 96-웰 플레이트의 최종농도가 0.5 mg/ml이 되도록 MTT 용액을 각 well에 넣었다. 배양기에서 2시간 동안 반응시키고 배지와 MTT 용액을 제거한 후 DMSO를 넣어 교반하였다. 완전히 용해되었을 때 마이크로 플레이트 리더 (Molecular device, USA)를 이용하여 540 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

[96] 측정된 흡광도 값은 다음 수학적 식 1을 이용하여 세포생존율(cell viability)을 계산하였다.

[97]

[98] [수학적 식 1]

[99] 세포 생존율 (%) = [(대조군 O.D.- 시험군 O.D.)/대조군 O.D.] $\times 100$

[100]

[101] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 신경독소인 6-OHDA의 존재 하에 CGT 또는 CGT I과 비교하여 CGT II가 각 농도에서 가장 우수한 세포생존율을 나타내었다. 이를 통해 본 발명의 조성물이 in vitro에서 신경세포 보호 활성을 가지는 것을 확인하였다.

[102]

[103] 실험예 2. MPTP 유도 파킨슨병 동물모델에서 복합추출물의 행동 능력 향상 효과

[104] 일반적으로, MPTP 주사 후 수분 이내에 도파민이 고갈되며, 강직, 경련 및

운동완서(bradykinesia)를 포함하는 심각한 파킨슨병의 증상이 나타난다. 먼저, 운동 기능성을 테스트하기 위해 하기와 같은 실험을 진행하였다.

[105]

[106] **2-1. rotarod test**

[107] 이 실험은 돌아 가는 원으로 된 막대 위에서 달리는 시간을 측정하는 검사로서, 마우스가 막대 위에서 달리다가 밑으로 떨어지는 시간을 측정하였다. 총 측정 시간은 480초로 측정하였으며 막대가 돌아가는 속도는 0에서 35rpm으로 점점 속도가 증가하도록 설정하여 측정하였다

[108]

[109] **2-2. rearing test**

[110] 높이 20 cm, 원지름 12cm의 원통형 플라스틱 실린더에 실험동물을 넣고 카메라를 설치하여 5분 동안 촬영하였다. 실린더 벽면과 양측 앞발 모두 접촉하는 횟수를 기록하였다.

[111]

[112] **2-3. open field test**

[113] Open field test는 실험동물의 보행 능력을 평가하기 위한 실험방법으로 실험동물이 activity cage 내 중앙 영역을 지나가는 횟수를 측정하였다.

[114] Activity cage 규격은 40 X 40 X 30 cm³ 으로 하얀 색상의 cage를 사용하였다. Activity cage 상에서 한 마리씩 5분간 실험동물의 자유로운 움직임을 카메라를 통해 촬영하였고 프로그램을 이용하여 촬영한 영상을 분석하여 움직인 거리를 수치화 하였다. 평가가 끝난 후 70% ethyl alcohol를 이용해 activity cage를 닦고 충분히 말린 후 다음 실험동물을 평가하였다.

[115]

[116] 행동 실험 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 세 종류의 행동실험 모두 정상군에 비해 MPTP 투여군의 행동능력이 감소한 것을 확인할 수 있었으며 CGT, CGT-I, CGT-II를 투여한 실험군은 rotarod test 및 rearing test에서 유의적인 행동능력의 회복 효과를 나타냈다. 특히, CGT-II는 모든 행동실험에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내는 동시에 CGT 및 CGT-I과 비교하여 가장 우수한 행동능력 회복효과를 나타내어 CGT-II의 우수한 파킨슨 질환의 치료효과를 확인할 수 있었다.

[117]

[118] **실험예 3. MPTP 유도 파킨슨병 동물모델의 흑질 및 선조체에서 복합추출물의 도파민성 세포 보호 효과**

[119] 실시에 3에서 실시한 마지막 MPTP 주사 후, 7일 째 되는 날 마우스를 희생시키고, 경심관류로(transcardially) 0.2 M 인산 완충액에 들어있는 차가운 4% PFA(paraformaldehyde)를 뿌렸다. 각각의 뇌를 분리하여 4% PFA를 이용하여 4°C에서 하루 종일 고정시켰고, 동결 방지를 위해 30% 수크로스 용액에 담갔다. 냉동된 뇌는 동결박편제작기(CM1850; Leica, Germany)를 이용하여 40μm

절편으로 잘랐고, 사용할 때까지 4°C 크라이오펙턴트(cryoprotectant, 30% 에틸렌 글리콜, 30% 글리콜, 0.02M PB)에 보관하였다. 면역 조직 화학(Immunohistochemistry)에서, 뇌 절편을 PBS와 3% H₂O₂가 들어간 0.05 M PBS로 씻어내었고, 1% BSA와 표준 염소 혈청을 이용하여 블로킹하였다. 래빗 항-티로신 히드록실레이스(rabbit anti-tyrosine hydroxylase)에 TH(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 넣고 하루 종일 실내 온도에서 인큐베이션하였다. 1시간 동안 비오틴(biotin)이 부착된 항-래빗(anti-rabbit) IgG(Vector Laboratories Inc., CA, USA)를 이용하여 뇌 조직을 인큐베이션한 후, 마지막으로 실내 온도에서 1시간 동안 ABC 시약(Vector Laboratories Inc., CA, USA)을 처리하였다. 퍼옥시다제(peroxidase) 활성을 1 M TBS(tris-buffered saline, pH7.5)에 0.02% 디아미노벤지딘(diaminobenzidine)과 0.003% 히드로젠 퍼옥사이드(hydrogen peroxide)가 들어간 용액에서 2분 동안 인큐베이션했다. 절편을 젤라틴이 코팅된 슬라이드 위에 올리고, 건조하여 수분을 뺀 후, 커버슬립(coverlip)으로 덮었다. 명시야 현미경(BX51; Olympus, Japan)을 이용하여 선조체(striatum)와 흑질(substantia nigra)의 사진을 찍었다. 선조체에서 TH-면역양성반응(immunopositivity)은 Image Pro version 6.0 for Window(Media Cybernetics Inc., MD, USA)를 이용해 측정하였다. SN에서 TH-양성반응인 세포의 수를 세었다.

[120] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 선조체에서 TH의 광학적 활성을 대조군과 비교했을 때, MPTP의 투여는 도파민성 섬유의 극적인 퇴화를 야기하였다. 하지만, CGT II의 투여는 MPTP에 의해 유발된 섬유의 손실을 보호하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 다른 복합추출물(CGT 및 CGT I)과 비교하여 더욱 현저한 효과를 나타내었다.

[121] 흑질 또한 대조군과 비교하여 MPTP의 투여에 의해 손상된 뉴런을 확인할 수 있었으나 CGT II의 투여에 의해 신경 독성으로부터 뉴런 세포의 사멸을 보호하는 것을 확인할 수 있었다.

[122] 종합하면, CGT II는 흑질과 선조체의 도파민성 신경세포 손실을 억제하여 파킨슨 질환의 치료효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[123]

[124] 실험예 4. 복합추출물 CGT, CGT-I, CGT-II의 성분 확인

[125] 4-1. 복합추출물의 검액 제조

[126] 구체적으로, 실시예 1 및 비교예 1, 2와 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 복합추출물 0.1g을 Volumetric flask에 넣고 9 mL의 100% 메탄올을 넣어 60분간 초음파 추출한다. 초음파 추출 후 100% 메탄올로 10mL을 맞추고 60분간 magnetic stirrer로 잘 혼합해주고 0.2um PVDF(polyvinylidene difluoride) 필터로 여과하였다. 이것을 검액 1로 하고, 동일한 방법으로 100% 메탄올 대신 70% 에탄올을 넣어 얻은 시약을 검액 2로 한다.

[127]

[128] **4-2. 복합추출물의 성분 HPLC 패턴 분석**

[129] 30% 에탄올로 추출한 복합추출물의 성분에 대하여 HPLC(고속 액체 크로마토그래피, high-performance liquid chromatography)를 수행하였다.

[130] 복합추출물의 정성분석에 사용되는 표준물질은 게니포시드(Geniposide)(치자), 페오니플로린(Paeoniflorin)(작약), 티리아닌(Tilianin)(곽향), 페오놀(Paeonol)(목단피), 유게놀(Eugenol)(정향), 사이코사포닌(Saikosaponin A)(시호), 리구스틸라이드(Ligustilide)(천궁), 데쿠르신(Decursin)(당귀)이다. 표준 저장용액은 티리아닌을 제외한 표준품 게니포시드(Geniposide)부터 데쿠르신(Decursin)까지 메탄올에 용해시켜 차례대로 0.15mg/mL, 0.15mg/mL, 0.1mg/mL, 0.25mg/mL, 0.1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.15mg/mL의 농도로 하였다. 티리아닌은 70% 에탄올에 녹여 60분간 초음파 추출 후 잘 용해시킨 다음 최종농도 0.05mg/mL 로 하여 정량 분석하였다.

[131] 시료는 30°C에서 YMC Pack Pro C18 (250 x 4.6 mm, 5um)(Kyoto, 일본)으로 분리하였다. 검출 파장은 UV 210 nm (사이코사포닌 A, 리구스틸라이드) 및 230 nm(게니포시드, 페오니플로린, 티리아닌, 페오놀, 유게놀, 데쿠르신)이다. 이동상은 (A) 아세토나이트릴(acetonitrile), (B) 물로 표 1의 gradient 조건으로 구성하여, 유속 1.0 mL/분으로 하였다.

[132]

[133] [표1]

Time	A (Acetonitrile)	B (Water)
단위	(%)	(%)
0	15	85
15	15	85
30	40	60
45	40	60
90	100	0
95	15	85
110	15	85

[134] 그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II)에서 타 복합추출물 (CGT, CGT-I)과 차별되게 Retention Time (RT) 31분에서 특이 Peak가 검출되었다. PDA (Photodiode Array) detector를 통하여 spectrum을 확인한 결과, CGT-II 혼합추출물의 고유 특이 Peak는 CGT 및 CGT-I 혼합추출물에서는 발견되지 않았다.

[135]

[136] 실험예 5. 복합추출물 (CGT-II)의 특이 Peak 유래생약 확인

[137] **5-1. 복합추출물 (CGT-II) 및 단일 생약 추출물 (곽향) 검액 제조**

[138] 실시예 1과 동일한 추출법으로 제조한 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 및

30% 에탄올 단일생약추출물 (곽향)을 실험예 4-1의 검액 2 제조법에 따라 검액을 제조하였다.

[139]

[140] **5-2. 복합추출물 (CGT-II) 및 단일 생약 추출물 (곽향) 구성성분 HPLC 분석**

[141] 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 에서 검출되는 특이 Peak의 유래를 확인하기 위해서 HPLC(고속 액체 크로마토그래피, high-performance liquid chromatography)를 수행하였다.

[142] 실험예 4-2의 방법과 동일하게 티리아닌을 70% 에탄올에 넣어 잘 용해한 다음 0.05mg/mL 최종농도로 하여 표준액으로 하였고, 실험예 5-1과 동일하게 제조한 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 및 30% 에탄올 단일생약 추출물 (곽향) 검액을 함께 분석하였다.

[143] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 복합추출물 (CGT-II)에서 검출된 특이 Peak의 RT가 Tilianin 및 30% 에탄올 단일 생약 추출물 (곽향)에서도 동일하다는 것을 확인하였다.

[144] 또한, PDA (Photodiode Array) detector를 통하여 spectrum을 검사한 결과, 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II)의 특이 Peak가 곽향에서 유래되는 Tilianin 성분임을 확인하였다.

[145]

[146] **실험예 6. 광곽향에서의 Tilianin 함유 여부 확인**

[147] **6-1. 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 및 단일생약 추출물 (곽향, 광곽향) 검액 제조**

[148] 구체적으로, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조한 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 및 단일생약추출물 0.1g 각각을 Volumetric flask에 넣고 9 mL의 70% 에탄올을 넣어 60분간 초음파 추출한다. 초음파 추출후 70% 에탄올로 10mL을 맞추고 60분간 magnetic stirrer로 잘 혼합해주고 0.2um PVDF(polyvinylidene difluoride) 필터로 여과하였다. 이 것을 검액으로 한다.

[149]

[150] **6-2. 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 및 단일생약 추출물 (곽향, 광곽향) 구성성분 HPLC 분석**

[151] 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 에서 검출되는 티리아닌의 함유 유무를 광곽향에서 확인하기 위해서 HPLC(고속 액체 크로마토그래피, high-performance liquid chromatography)를 수행하였다.

[152]

[153] 실험예 4-2의 방법과 동일하게 티리아닌을 70% 에탄올에 넣어 잘 용해한 다음 0.05mg/mL 최종농도로 하여 표준액으로 하였고, 실험예 5-1과 동일하게 제조한 30% 에탄올 혼합추출물 (CGT-II) 및 30% 에탄올 단일생약 추출물 (곽향, 광곽향) 검액을 함께 분석하였다.

[154] 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 30% 에탄올 복합추출물 (CGT-II) 및 30%

에탄올 단일 생약추출물 (곽향)에서 검출된 티리아닌이 30% 에탄올 단일생약추출물 (광곽향)에서 확인되지 않았다.

[155]

[156] 실험예 7. 파킨슨병 세포모델에서 곽향 및 티리아닌의 신경보호 효과

[157] 6-하이드록시도파민 처리에 의한 곽향추출물 (30% 에탄올) 및 티리아닌의 신경세포 손상을 보호하는 효과를 확인하기 위하여, 실시예 2의 SH-SY5Y세포주를 이용하여 MTT reduction assay를 진행하였다. SH-SY5Y세포주가 배양되어있는 96-웰 플레이트에 곽향추출물 및 티리아닌을 녹인 DMSO를 단독 혹은 30분간 처리한 후, 6-하이드록시도파민(6-OHDA) 200 μ M을 처리하였다. 6-OHDA 처리 24시간 후 96-웰 플레이트의 최종농도가 0.5 mg/ml이 되도록 MTT 용액을 각 well에 넣었다. 배양기에서 2시간 동안 반응시키고 배지와 MTT 용액을 제거한 후 DMSO를 넣어 교반하였다. 완전히 용해되었을 때 마이크로 플레이트 리더 (Molecular device, USA)를 이용하여 540 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

[158] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 신경독소인 6-OHDA의 존재 하에 50 ug/ml의 곽향 및 1 μ M의 티리아닌 농도에서 가장 우수한 세포생존율을 나타내었다. 이를 통해 본 발명 조성물의 활성성분이 곽향의 티리아닌이 in vitro에서 신경세포 보호 활성을 가지는 것을 확인하였다.

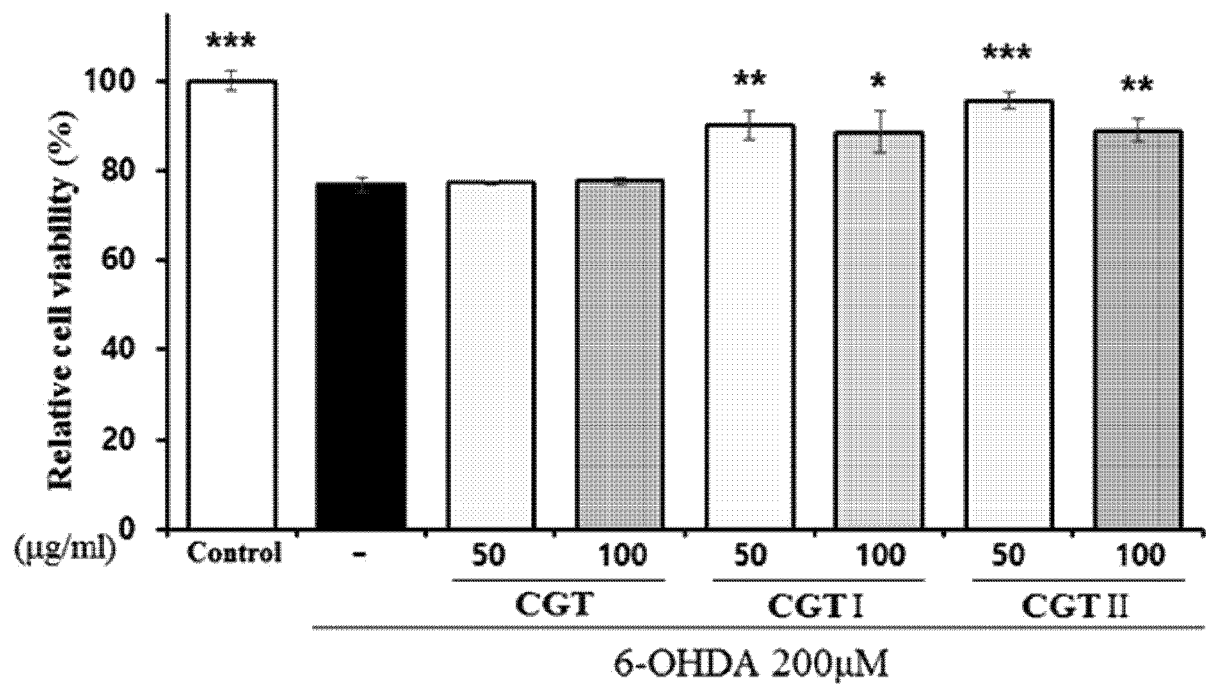
[159]

[160] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

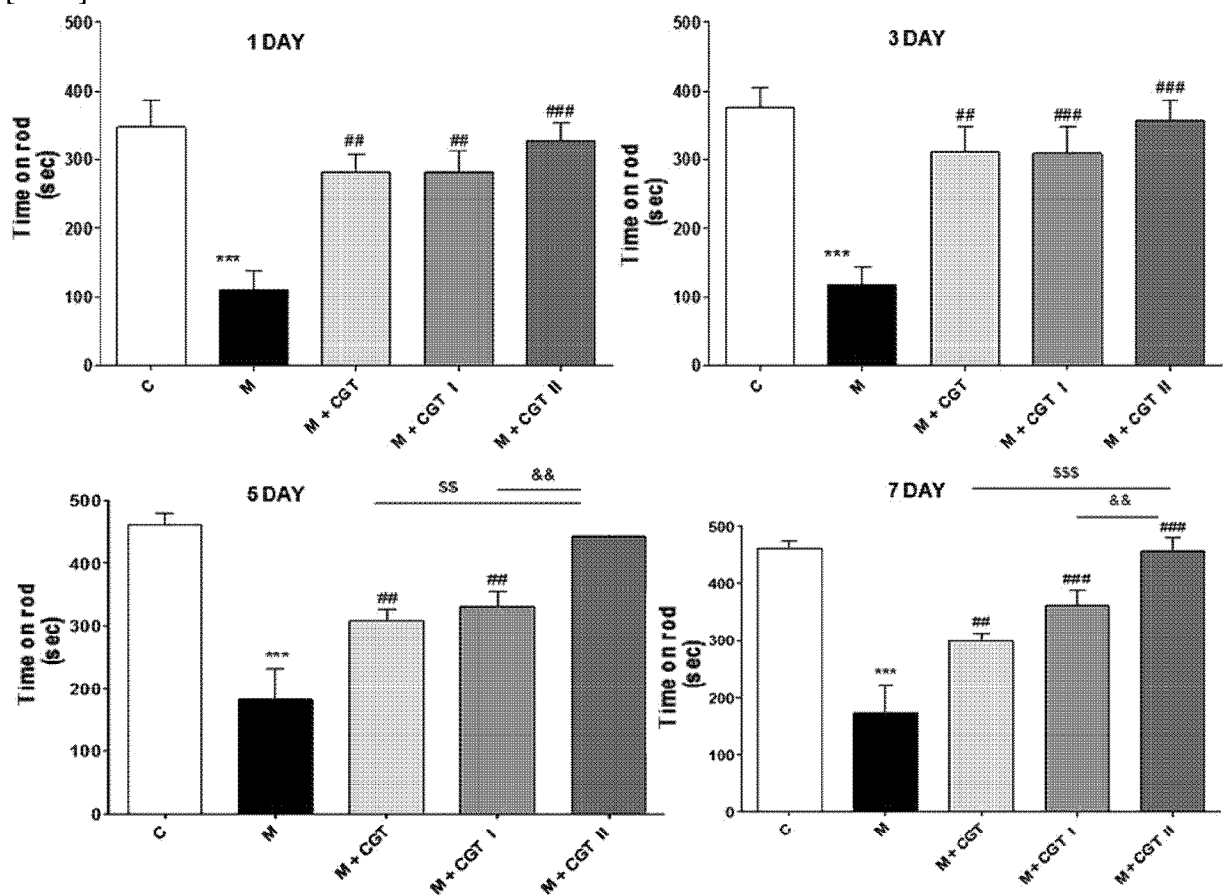
청구범위

- [청구항 1] 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 곽향(*Agastachis Herba*) 및 정향(*Eugenia caryophyllata*)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 곽향은 티리아닌을 유효성분으로 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 곽향 및 정향 추출물의 첨가로 인해 파킨슨 병 치료 효과가 향상되는 것을 특징으로 하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁-C₄ 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 곽향(*Agastachis Herba*) 및 정향(*Eugenia caryophyllata*)으로 구성되는 복합 추출물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 곽향은 티리아닌을 유효성분으로 포함하는 것인, 건강기능식품 조성물.
- [청구항 7] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 조성물은 곽향 및 정향 추출물의 첨가로 인해 파킨슨 병 개선 효과가 향상되는 것을 특징으로 하는 것인, 건강기능식품 조성물.
- [청구항 8] 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁-C₄ 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 건강기능식품 조성물.
- [청구항 9] 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 곽향(*Agastachis Herba*) 및 정향(*Eugenia caryophyllata*)으로 구성되는 복합 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료방법.

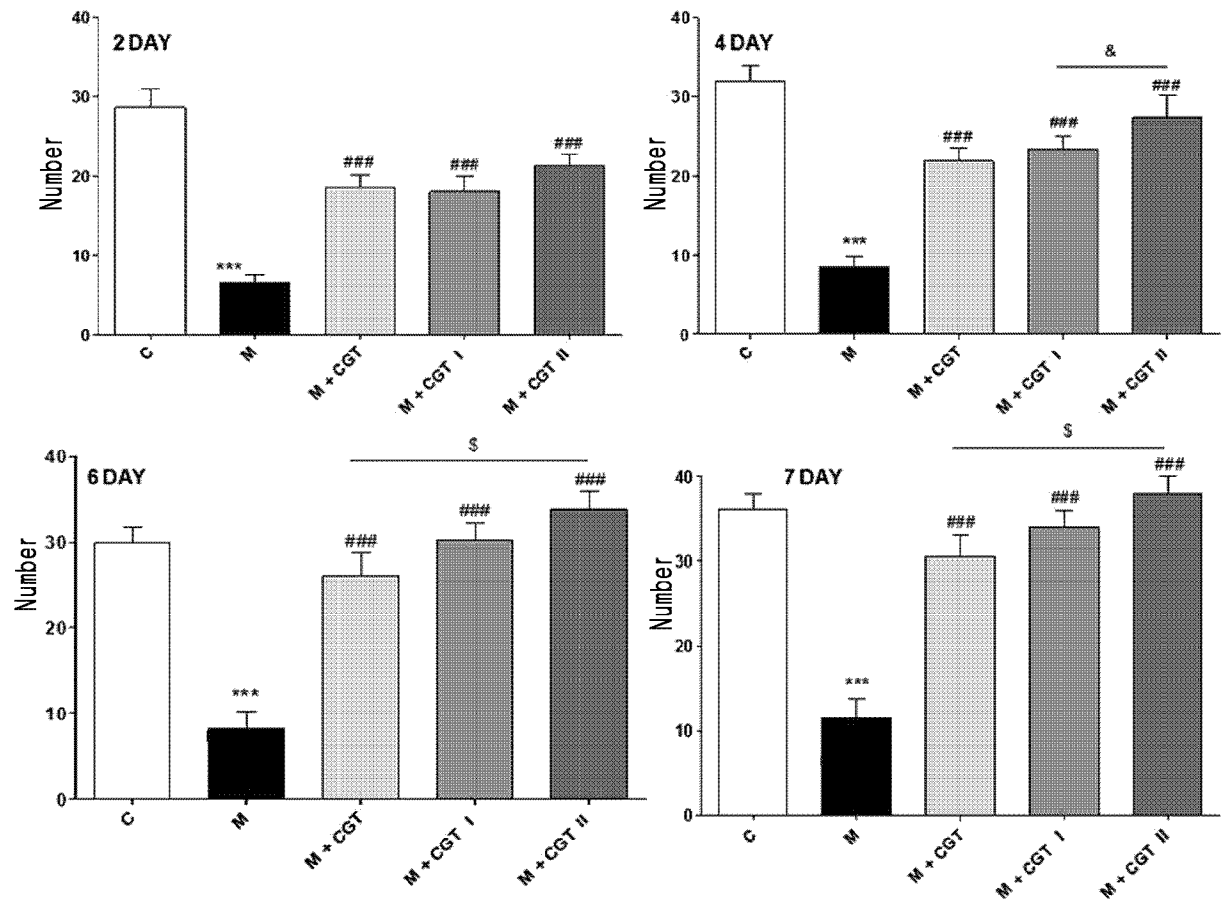
[도1]



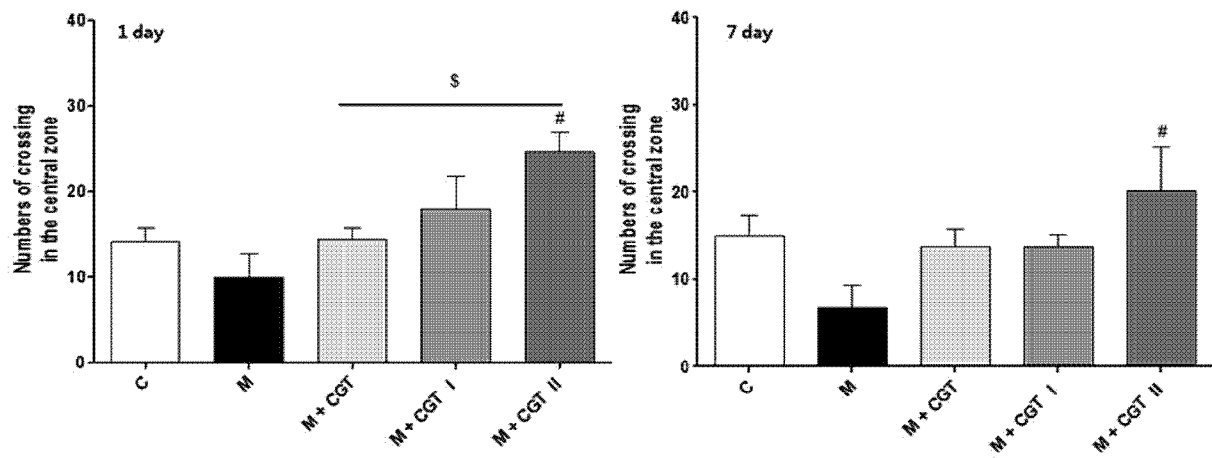
[도2a]



[도2b]

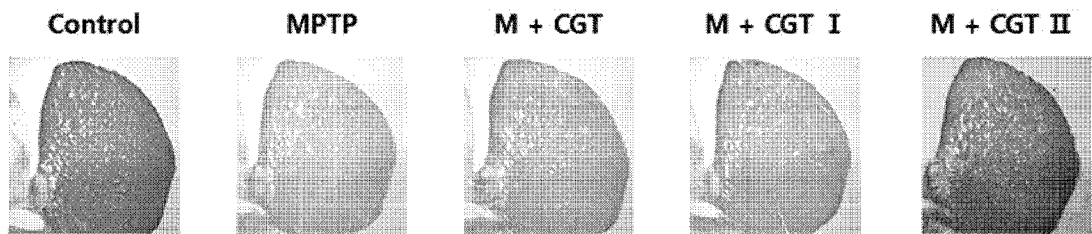


[도2c]

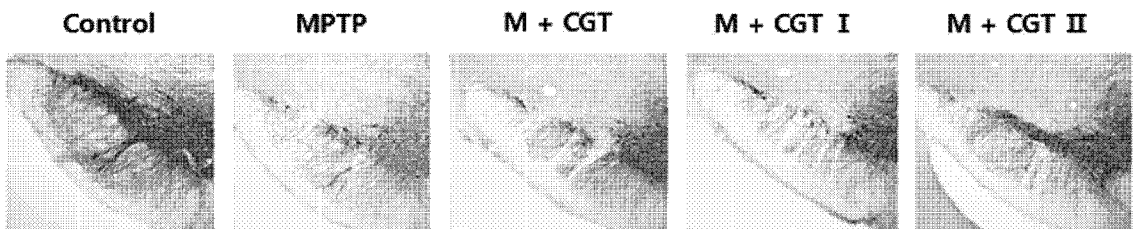


[도3]

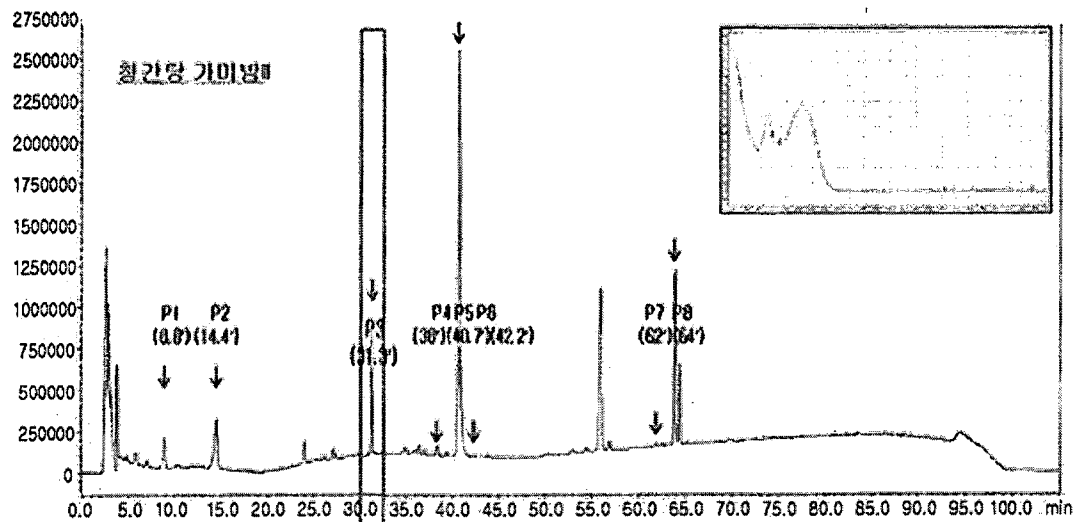
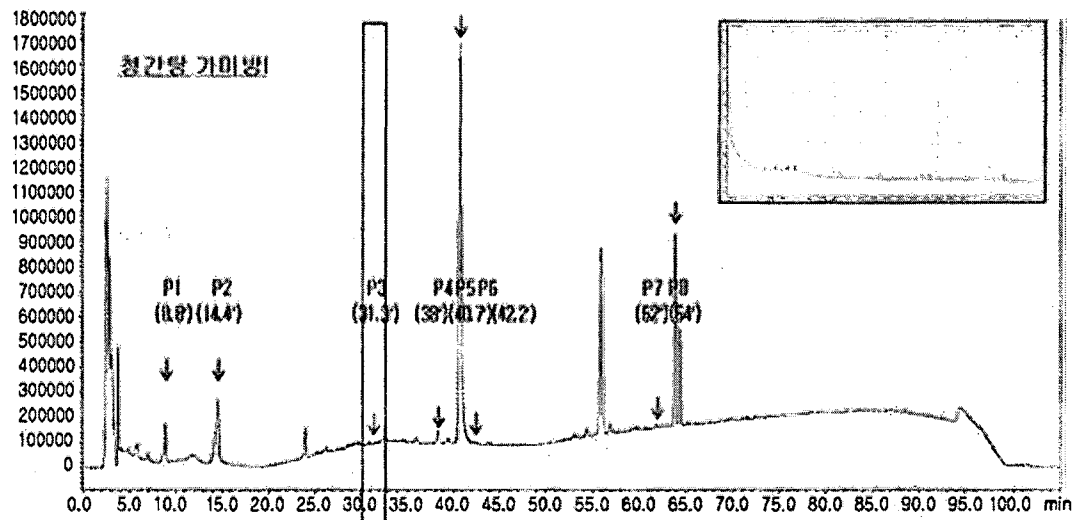
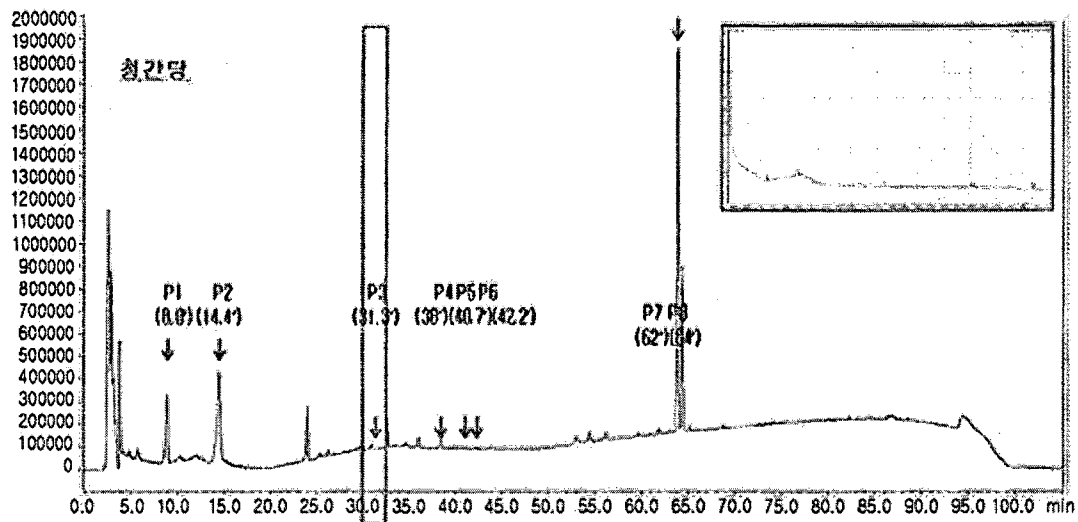
Striatum (ST)



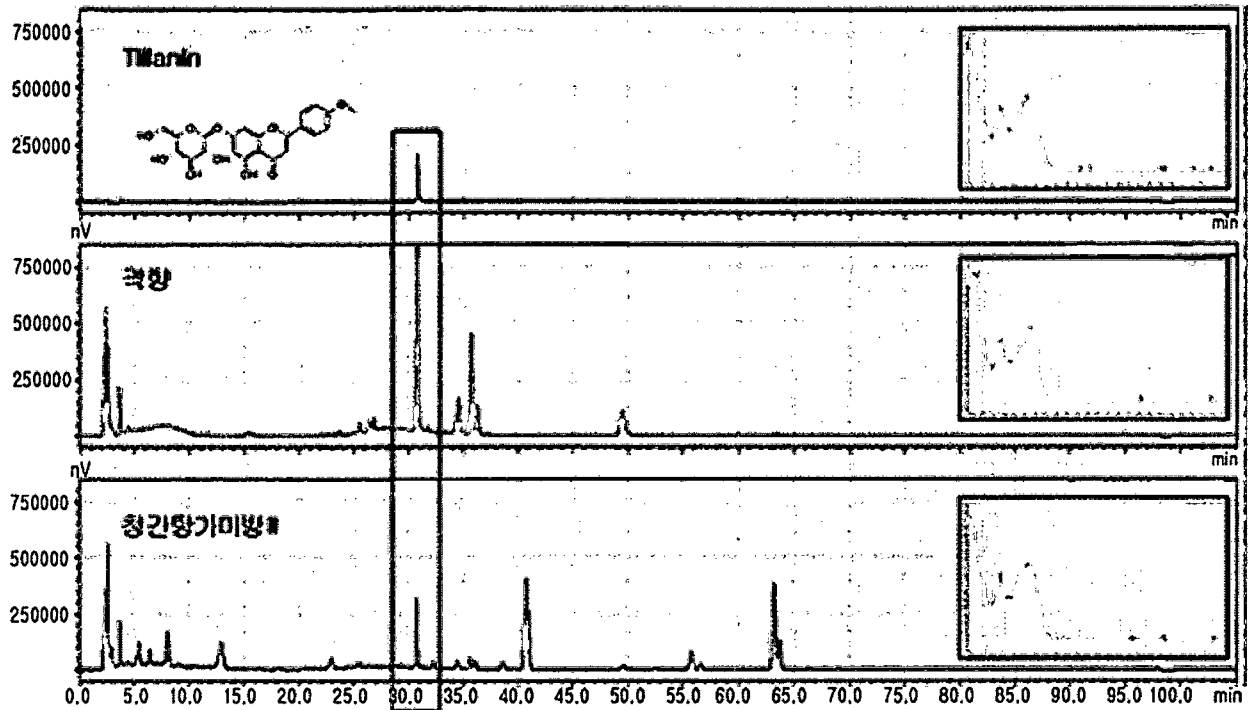
Substantia nigra (SN)



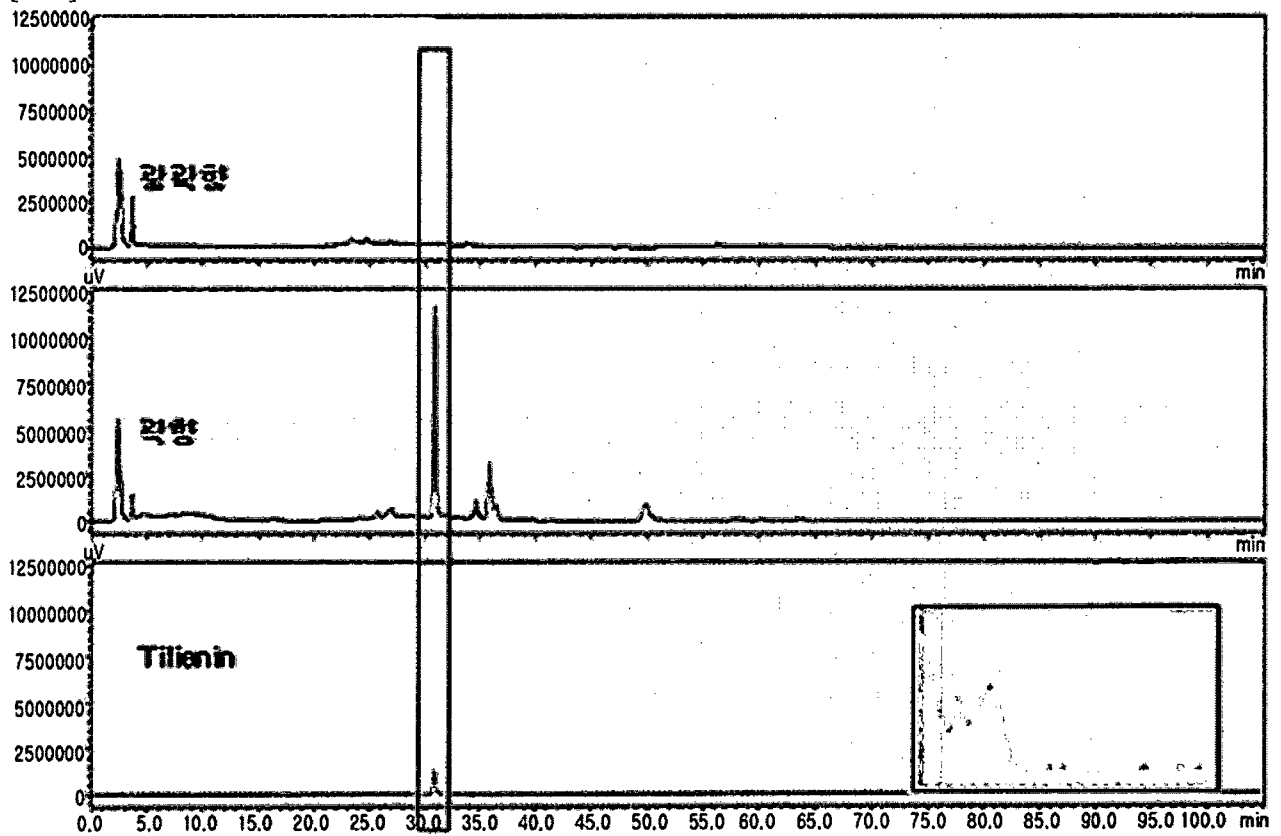
[도4]



[도5]

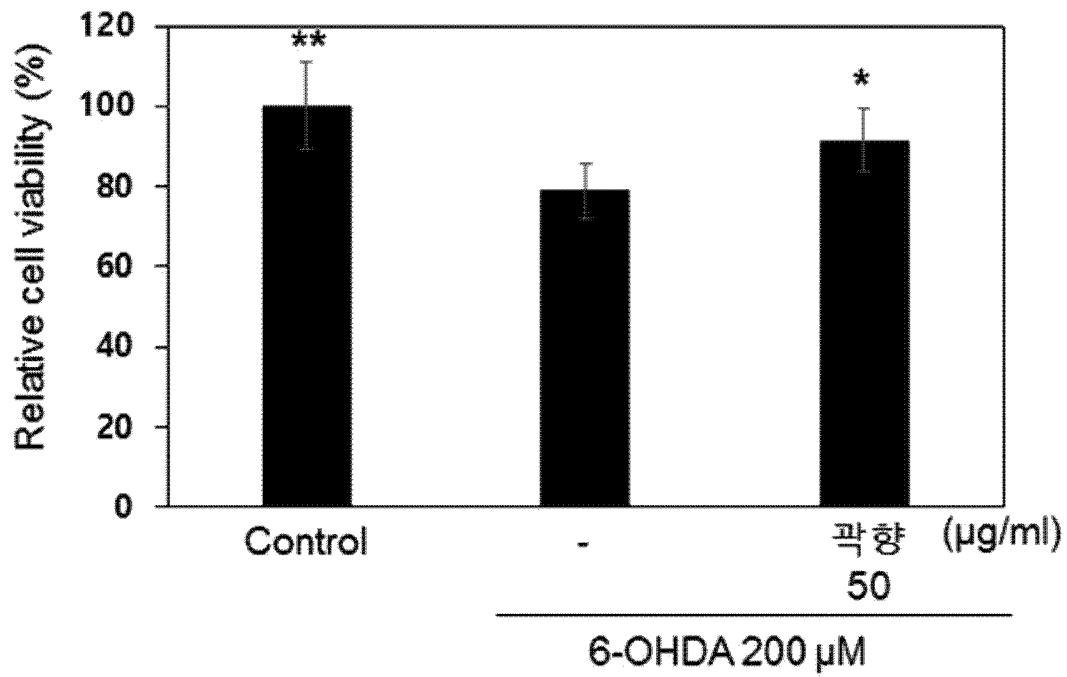


[도6]

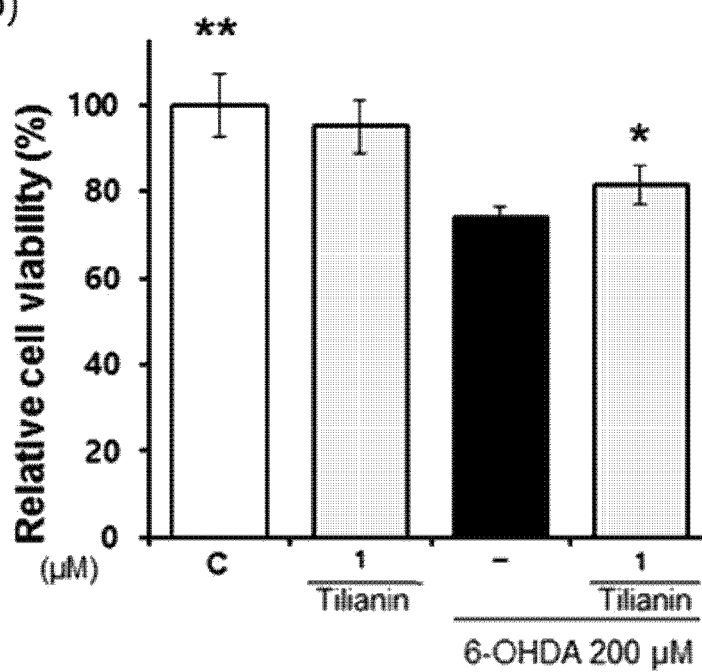


[도7]

a)



b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/005458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/65(2006.01)i, A61K 36/234(2006.01)i, A61K 36/232(2006.01)i, A61K 36/233(2006.01)i, A61K 36/744(2006.01)i, A61K 36/53(2006.01)i, A61K 36/61(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)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 36/65; A61K 36/185; A61K 36/8905; A61K 36/20; A61P 25/16; A61K 36/233; A61K 36/71; A23L 1/30; A23L 33/105; A61K 36/234; A61K 36/232; A61K 36/744; A61K 36/53; A61K 36/61

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: Paeonia lactiflora, Lingustieun chuangxiong, Angelica gigas, Bupleurum falcatum, Gardenia jasminoides, Paeonia suffruticosa, Agastachis Herba, Eugenia caryophyllata, tilianin, parkinson, tremor, torpidity, bradykinesia, bradykinesia, bradykinesia, rigor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0104824 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 06 September 2016 See claims 1, 2, 4, 5.	1-3,5-7
A	KR 10-2013-0039561 A (SIM, Jae Jong et al.) 22 April 2013 See the entire document.	1-3,5-7
A	CN 102755490 A (YANG, Zhengang) 31 October 2012 See the entire document.	1-3,5-7
A	KR 10-2011-0125706 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 22 November 2011 See the entire document.	1-3,5-7
A	KR 10-2002-0092147 A (EUGENBIO INC. et al.) 11 December 2002 See the entire document.	1-3,5-7
PX	KR 10-1805801 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY et al.) 13 December 2017 See claims 1-9.	1-3,5-7



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

24 AUGUST 2018 (24.08.2018)

Date of mailing of the international search report

24 AUGUST 2018 (24.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/005458

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.: 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 9 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.:
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:
3. ☒ Claims Nos.: 4, 8
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/KR2018/005458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0104824 A	06/09/2016	KR 10-1667873 B1	20/10/2016
KR 10-2013-0039561 A	22/04/2013	KR 10-1310285 B1	24/09/2013
CN 102755490 A	31/10/2012	CN 102755490 B	23/10/2013
KR 10-2011-0125706 A	22/11/2011	KR 10-1166481 B1	19/07/2012
KR 10-2002-0092147 A	11/12/2002	NONE	
KR 10-1805801 B1	13/12/2017	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/65(2006.01)i, A61K 36/234(2006.01)i, A61K 36/232(2006.01)i, A61K 36/233(2006.01)i, A61K 36/744(2006.01)i, A61K 36/53(2006.01)i, A61K 36/61(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/65; A61K 36/185; A61K 36/8905; A61K 36/20; A61P 25/16; A61K 36/233; A61K 36/71; A23L 1/30; A23L 33/105; A61K 36/234; A61K 36/232; A61K 36/744; A61K 36/53; A61K 36/61 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: 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Lingustieun chuangxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides), 목단피(Paeonia suffruticosa), 괘향(Agastachis Herba), 정향(Eugenia caryophyllata), 딜리아닌, 파킨슨, 델립증, 무감각, 운동완서, 서동증, 운동느림, 경직																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2016-0104824 A (경희대학교 산학협력단) 2016.09.06 청구항 1, 2, 4, 5 참조.</td> <td>1-3,5-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2013-0039561 A (심재종 등) 2013.04.22 전체 문헌 참조.</td> <td>1-3,5-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102755490 A (YANG ZHENGANG) 2012.10.31 전체 문헌 참조.</td> <td>1-3,5-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2011-0125706 A (경희대학교 산학협력단) 2011.11.22 전체 문헌 참조.</td> <td>1-3,5-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2002-0092147 A (주식회사 유젠바이오 등) 2002.12.11 전체 문헌 참조.</td> <td>1-3,5-7</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>KR 10-1805801 B1 (경희대학교 산학협력단 등) 2017.12.13 청구항 1-9 참조.</td> <td>1-3,5-7</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-2016-0104824 A (경희대학교 산학협력단) 2016.09.06 청구항 1, 2, 4, 5 참조.	1-3,5-7	A	KR 10-2013-0039561 A (심재종 등) 2013.04.22 전체 문헌 참조.	1-3,5-7	A	CN 102755490 A (YANG ZHENGANG) 2012.10.31 전체 문헌 참조.	1-3,5-7	A	KR 10-2011-0125706 A (경희대학교 산학협력단) 2011.11.22 전체 문헌 참조.	1-3,5-7	A	KR 10-2002-0092147 A (주식회사 유젠바이오 등) 2002.12.11 전체 문헌 참조.	1-3,5-7	PX	KR 10-1805801 B1 (경희대학교 산학협력단 등) 2017.12.13 청구항 1-9 참조.	1-3,5-7
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
A	KR 10-2016-0104824 A (경희대학교 산학협력단) 2016.09.06 청구항 1, 2, 4, 5 참조.	1-3,5-7																					
A	KR 10-2013-0039561 A (심재종 등) 2013.04.22 전체 문헌 참조.	1-3,5-7																					
A	CN 102755490 A (YANG ZHENGANG) 2012.10.31 전체 문헌 참조.	1-3,5-7																					
A	KR 10-2011-0125706 A (경희대학교 산학협력단) 2011.11.22 전체 문헌 참조.	1-3,5-7																					
A	KR 10-2002-0092147 A (주식회사 유젠바이오 등) 2002.12.11 전체 문헌 참조.	1-3,5-7																					
PX	KR 10-1805801 B1 (경희대학교 산학협력단 등) 2017.12.13 청구항 1-9 참조.	1-3,5-7																					
☐ 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 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2018년 08월 24일 (24.08.2018)		국제조사보고서 발송일 2018년 08월 24일 (24.08.2018)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 이기철 전화번호 +82-42-481-3353 																					

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: 9
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제9항은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에
의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 4, 8
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 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2018/005458

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0104824 A	2016/09/06	KR 10-1667873 B1	2016/10/20
KR 10-2013-0039561 A	2013/04/22	KR 10-1310285 B1	2013/09/24
CN 102755490 A	2012/10/31	CN 102755490 B	2013/10/23
KR 10-2011-0125706 A	2011/11/22	KR 10-1166481 B1	2012/07/19
KR 10-2002-0092147 A	2002/12/11	없음	
KR 10-1805801 B1	2017/12/13	없음	