

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 2월 22일 (22.02.2018) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2018/034465 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/20 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) A23K 10/30 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008784
- (22) 국제출원일: 2017년 8월 11일 (11.08.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0103745 2016년 8월 16일 (16.08.2016) KR
- (71) 출원인: 한국한의학연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 마진열 (MA, Jin Yeul); 34155 대전시 유성구 덕명로 63, 102동 1803호, Daejeon (KR). 박광일 (PARK, Kwang Il); 41064 대구시 동구 이노밸리로29길 34, 104동 1303호, Daegu (KR). 김연희 (KIM, Yeoun-

Hee); 41524 대구시 북구 감단로 34, 103동 205호, Daegu (KR). 오태우 (OH, Tae Woo); 41062 대구시 동구 침단로 70, Daegu (KR). 조원경 (CHO, Won Kyung); 41064 대구시 동구 이노밸리로29길 56, 202동 903호, Daegu (KR). 김동건 (KIM, Dong-Gun); 42285 대구시 수성구 고산로 70, 215동 1201호, Daegu (KR). 박은희 (PARK, Eun Hee); 03997 서울시 마포구 성미산로6길 39, 302호, Seoul (KR).

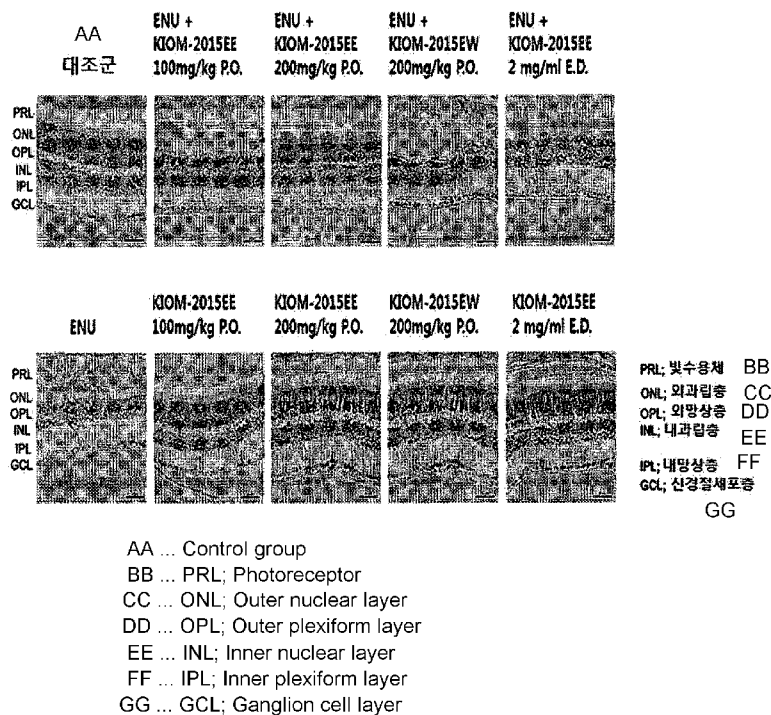
(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING MAPLE LEAF EXTRACT FOR PREVENTING OR TREATING RETINAL DISEASE

(54) 발명의 명칭: 단풍나무 잎 추출물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising a maple leaf extract or a fraction thereof for preventing or treating a retinal disease, a method for preventing or treating a retinal disease using the pharmaceutical composition, and a food composition comprising a maple leaf extract or a fraction thereof for alleviating a retinal disease. The pharmaceutical composition according to the present invention, which is effective for a retinal disease, can be pharmaceutically used as a composition for preventing or treating a retinal disease and also be advantageously used as a health functional food.

[다음 쪽 계속]

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, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(57) 요약서: 본 발명은 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 약학 조성물을 이용하여 망막 질환을 예방 또는 치료하는 방법 및 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 망막 질환에 효과적인 것으로서, 망막 질환의 예방 또는 치료 조성물로 약학적으로 이용 가능할 뿐 아니라, 건강기능식품으로서도 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 단풍나무 잎 추출물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 단풍나무 잎 추출물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 약학 조성물을 이용하여 망막 질환을 예방 또는 치료하는 방법 및 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 단풍나무는 높이 100m에, 작은 가지는 털이 없으며, 붉은 빛을 띤 갈색 나무이다. 또한 단풍나무의 잎은 마주나고 손바닥 모양으로 5-7개로 깊게 갈라진다. 갈라진 조각은 넓은 바소 모양이고, 끝이 뾰족하며, 가장자리에 겹톱니가 있고, 길이가 5-6cm이다. 잎자루는 붉은 색을 띠고 길이가 3-5cm이다. 꽃은 수꽃과 양성화가 한 그루에 핀다. 5월에 검붉은 빛으로 피고 가지 끝에 산방꽃차례를 이루며 달린다. 꽃받침 조각은 5개로 부드러운 털이 있고, 꽃잎도 5개이다. 수술은 8개이다.
- [4] 이러한 단풍나무는 한방에서 뿌리 껍질과 가지를 계조축이라는 약재로 쓰는데, 무릎관절염으로 통증이 심할 때 물에 달여서 복용하고, 골절상을 입었을 때 오가피를 배합해서 사용하며, 소염작용과 해독 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [5] 한편, 망막은 안구의 가장 안쪽을 덮고 있는 투명한 신경조직으로 안구 내로 들어온 빛은 망막의 내층을 지나 망막의 시세포에 감지된다. 시세포는 빛 정보를 다시 전기적 정보로 전환하고 이 정보는 망막 내층의 세포를 통해 시신경을 지나서 뇌로 전달된다. 망막은 안구의 바깥쪽에서부터 안쪽까지 10개의 층으로 구성된다. 10개의 구성층은 망막색소상피층, 광수용체층, 바깥경계막, 바깥핵층, 바깥얼기층, 속핵층, 속얼기층 신경절세포층, 신경섬유층, 속경계막이 이에 해당한다. 또한 황반은 시신경 유두 (optic disc)의 외측 약간 아래 부위에 존재하는 타원형의 함몰 부위로 망막의 시신경 세포가 밀집되어 있는 부위이다. 망막의 시각적 자극 인지 기능의 대부분을 황반부에서 담당하게 되므로 황반부에 병변이 생기거나 황반부의 시신경세포 손상 및 결손이 생기는 경우에는 실명하거나 심각한 시력 장애를 겪게 된다.
- [6] 이러한 망막 또는 황반의 손실로 인해 유발되는 질환들은 모두 망막 질환(retina disorder)에 포함된다. 이러한 망막 질환의 구체적인 예에는 다음과 같은 것들이 있다.
- [7] 망막 질환 중 망막순환장애에 속하는 질환으로서 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄,

- 망막정맥주위염, 고혈압망막병증, 당뇨망막병증, 미숙아망막병증 등이 있다.
- [8] 또한 망막염(retinitis)은 세균이나 진균에 의한 감각신경망막염증, 풍진에 감염된 모체에서 태어난 신생아에서 확인되는 망막색소상피염증 등이 대표적인 질환인데, 이들도 모두 망막 손상에 의한 망막 질환에 속한다.
- [9] 또한 망막변성(retinal degeneration)을 유발하는 질환에는 망막색소변성, 혈관무너병증, 드루젠 등이 있는데 이들도 모두 망막 손상에 의한 망막 질환에 속한다.
- [10] 또한 망막박리(retinal detachment)는 망막의 안쪽의 감각신경층과 바깥쪽의 색소상피층 사이가 떨어지면서 발생한다. 크게 망막열공이 원인이 되었는지에 따라 열공망막박리와 비열공망막박리로 나누게 되며, 이들 또한 망막 손상에 의한 망막 질환에 속한다.
- [11] 기타의 망막 질환으로서 황반변성, 황반이상증, 당뇨망막병증, 망막동정맥폐쇄, 고혈압성 망막병증, 망막대동맥류, 안허혈증후군, 방사선망막병증, 미숙아망막병증, 급성망막괴사, 망막염, 망막맥락막염, 망막박리, 망막종양, 외상에 의한 망막 손상, 빛에 의한 망막 손상 등의 망막 질환을 들 수 있다.
- [12] 이러한 망막 질환의 치료법에 대한 연구가 활발하게 진행 중이기는 하나, 현재까지 완전한 치료법은 보고된 바가 없다. 특히 상기 망막 질환에 대하여는 수술적 치료법만이 존재하고 있을 뿐, 망막 질환에 대해 예방 또는 치료 효과가 있는가 약학 조성물 및 약물 치료법에 대하여는 현재까지 어떠한 기술도 보고되지 않고 있는 문제점이 있다.
- [13] 한편, 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 공개특허 제2012-0068432호(특허문헌 1)가 개시되어 있으나, 상기 특허문헌 1에서는 돌단풍 잎 에탄올 추출물을 포함한 당뇨, 비만의 예방 및 치료용 조성물에 관한 내용이 개시되어 있을 뿐, 단풍나무 잎 추출물을 이용하여 망막 질환을 예방 또는 치료하는 효과에 관하여는 어떠한 내용도 개시되어 있지 않다.

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명자는 신규한 망막 질환에 예방 또는 치료 효과가 있는 신규한 물질을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 단풍나무 잎 추출물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[16]

과제 해결 수단

- [17] 본 발명의 주된 목적은 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는

망막 질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 다른 목적은 단풍나무 잎 추출물을 포함하는 망막 질환 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 다른 목적은 단풍나무 잎 추출물을 포함하는 망막 질환 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 발명에 따른 약학 조성물은 망막 질환에 효과적인 것으로서, 망막 질환의 예방 또는 치료 조성물로 약학적으로 이용 가능할 뿐 아니라, 건강기능식품으로서도 유용하게 이용될 수 있다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 단풍나무 잎 추출물을 경구 또는 안구 투여한 후, 면역조직염색법으로 관찰한 결과로서, 단풍나무 잎 추출물을 경구 투여하였을 때 유의적인 보호 효과가 나타나는 것을 확인한 것이다.

[25] 도 2는 단풍나무 잎 추출물을 경구 또는 안구 투여한 후, 면역조직염색법으로 관찰한 결과로서, OPN1SW를 사용하여 염색하였을 때 단풍나무 에탄올 추출물에 의해 보호되는 것을 확인한 것이다.

[26] 도 3은 단풍나무 잎 추출물을 경구 또는 안구 투여한 후, 면역조직염색법으로 관찰한 결과로서, GFAP로 염색하였을 때 단풍나무 에탄올 추출물을 처리한 그룹에서 GFAP 발현이 감소됨을 확인한 것이다.

[27] 도 4는 단풍나무 잎 추출물을 경구 또는 안구 투여한 후, 터널 어썬이한 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다.

[28] 도 5는 단풍나무 잎 추출물을 경구 또는 안구 투여한 후, 웨스턴 블랏한 결과를 나타내는 사진이다.

[29] 도 6은 단풍나무 잎 추출물을 점안 또는 경구 투여한 후, 시신경절세포의 세포사를 확인한 실험 결과로서, (a)는 형광현미경 사진이고, (b)는 선택된 이미지와 양성반응한 세포수를 계산하여 대조군에 대한 평균값으로 전환된 결과를 나타내는 그래프이다.

[30] 도 7은 단풍나무 잎 추출물을 점안 또는 경구 투여한 후, 시신경절세포섬유 감소의 억제를 확인한 실험의 결과로서, (a)는 형광현미경 사진이고, (b)는 Tuj-1 양성 반응한 신경 섬유 발현량 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

[31] 도 8은 단풍나무 잎 추출물을 점안 또는 경구 투여한 후, 신경교세포 및 성상세포 활성의 억제를 확인한 실험의 결과로서, (a)는 형광현미경 사진이고, (b)는 KIOM-2015E에 의해 모든 그룹에서 유의하게 그 발현이 감소하는 결과를 나타내는 그래프이다.

[32] 도 9는 단풍나무 잎 추출물을 점안 또는 경구 투여한 후, 망막조직학적 변화를

확인한 실험의 결과로서, (a)는 형광현미경 사진이고, (b)는 선택된 이미지에서 신경절세포층에 남아있는 세포수를 센 다음, 대조군에 대한 평균 값을 나타내는 그래프이다.

[33] 도 10은 단풍나무 잎 추출물을 점안 또는 경구 투여한 후, 망막조직의 세포사 억제제를 확인한 실험의 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다.

[34]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[35] 본 발명자들은 안전하면서도 효과적으로 망막 질환을 치료할 수 있는 천연물 유래의 제제를 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중 단풍나무 잎 추출물이 망막 질환을 치료하는 효과를 나타냄을 발견하였다. 대체로 단풍나무는 다양한 약리활성을 나타낸다고 알려져 있다. 그러나 단풍나무의 망막 질환 치료효과에 관한 용도에 대하여는 보고되지 않았다. 또한 침습적 치료법만이 존재하고 있을 뿐, 망막 질환에 대해 예방 또는 치료 효과가 있는가 약학 조성물 및 약물 치료법에 대하여는 현재까지 어떠한 기술도 보고되지 않고 있다.

[36] 본 발명자들은 단풍나무 잎 추출물로부터 망막 질환의 치료효과가 나타날 것이라고 예측하고, 이로부터 망막 질환의 치료효과를 나타내는 유효성분을 규명하고자 다양한 연구를 수행하였으며, 이의 결과로 단풍나무 잎 추출물이 망막 질환을 치료하는 효과를 나타냄을 확인하였다. 즉, 단풍나무 잎 추출물은 Cleaved PARP, GFAP 및 네스틴(Nestin)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 감소시키고, OPN1SW, Bm3a 및 Tuj-1로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시켜 망막 질환의 치료효과를 나타냄을 확인하였다.

[37] 이처럼, 단풍나무 잎 추출물이 망막 질환을 치료하는 효과를 나타낸다는 사실은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명자에 의해 최초로 규명되었다. 또한 망막 질환에 대해 예방 또는 치료 효과가 있는가 약학 조성물에 대하여도 본 발명자들에 의해 최초로 발명되었다.

[38]

[39] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[40] 또한, 본 발명은 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물의 망막 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[41] 이하, 본 발명에서의 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 구체적으로 설명한다.

[42] 본 발명에서 용어 "단풍나무"는 높이 100m에, 작은 가지는 털이 없으며, 붉은 빛을 띤 갈색 나무로서, 상기 단풍나무의 잎은 마주나고 손바닥 모양으로 5-7개로 깊게 갈라져 있는 것을 의미한다. 한편, 상기 단풍나무는 크게 뿌리,

줄기, 잎으로 나눌 수 있으며, 본 발명의 약학 조성물은 상기 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함할 수도 있다. 이때 상기 단풍나무의 부위별 추출물 또는 그의 분획물은 부위별로 특별한 제한 없이 망막 질환에 대한 예방 또는 치료효과가 달성될 수 있다.

- [43] 본 발명에서 용어 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 단풍나무 잎으로부터 추출한 것이며, 예를 들어 단풍나무 잎의 열수추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성 용매 가용 추출물을 모두 포함할 수 있다.
- [44] 단풍나무 잎으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 당업계에 허용되는 용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [45] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 단풍나무 잎 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [46] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 단풍나무 잎 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [47] 따라서 본 발명에 있어서 단풍나무 잎 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [48] 이러한 단풍나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 약학 조성물일 수 있다.
- [49] 본 발명의 용어 "분획물"이란, 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [50] 본 발명에서 상기 분획물은 상기 단풍나무 잎 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물이 될 수

있다.

- [51] 상기 분획물을 수득하는 방법 역시 망막 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 나타내는 분획물을 수득할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 일 예로서, 용매 분획법을 이용하여 단풍나무 잎수 추출물로부터 분획물을 수득하는 방법을 사용할 수 있다.
- [52] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데 사용되는 분획 용매의 종류 역시 망막 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 나타내는 분획물을 수득할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 일 예로서, 상기 분획 용매로는 물, 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매 등을 단독으로 또는 1종 이상 혼합한 것을 사용할 수 있다.
- [53] 본 발명에서 용어, "망막 질환"은 망막 또는 황반의 손상, 또는 이들의 변성으로 인하여 시력의 감소 및 손상이 발생하는 질환을 총칭하여 의미한다.
- [54] 한편, 상기 약학 조성물은 상기 망막 질환을 개선하는 것인데, 상기 망막 질환의 구체적인 예로는 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 망막정맥주위염, 고혈압망막병증, 당뇨망막병증, 미숙아망막병증, 감각신경망막염증, 망막색소상피염증, 망막색소변성, 혈관무너병증, 드루젠, 열공망막박리, 비열공망막박리, 황반변성, 황반이상증, 당뇨망막병증, 망막동정맥폐쇄, 고혈압성 망막병증, 망막대동맥류, 안허혈증후군, 방사선망막병증, 미숙아망막병증, 급성망막괴사, 망막염, 망막맥락막염, 망막박리, 망막종양, 외상에 의한 망막 손상 또는 빛에 의한 망막 손상을 들 수 있다.
- [55] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 망막 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 본 발명의 조성물에 의해 망막 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [56] 본 발명의 단풍나무 잎 추출물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 망막 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체(구체적인 예로 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)가 이에 해당할 수 있다), 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [57] 또한, 상기 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 구체적으로는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 1-80 중량부로 포함될 수 있으며, 더욱 구체적으로는 20-60 중량부로 포함될 수 있다. 상기 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물이 1 중량부 미만으로 포함되는 경우에는 본 발명에서 달성하려는 망막 질환의 예방 또는 치료 효과를 충분히 발현시키기 어려워 본 발명의 일실시예에 해당할 수 없으며, 상기 단풍나무 잎 추출물 또는 그의

분획물이 80 중량부를 초과하는 경우에는 약학적인 응용 제품으로 제조하기 위한 나머지 물질들의 함량을 제한할 수 있어 본 발명의 일실시예에 해당할 수 없다.

- [58] 한편, 상기 망막 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 구체적으로는 동맥 또는 정맥 내로 투입하거나, 피하로, 직장으로, 비강으로, 임의의 다른 비경구로도 투입될 수 있으며, 더욱 구체적으로는 동맥 또는 정맥 내로 투입하거나 경구 투여하거나 또는 근육 세포에 직접 투입할 수 있다.
- [59] 또한 상기 조성물로부터 선택되는 투여 수준은 화합물의 활성, 투여 경로, 치료되는 병태의 중증도 및 치료되는 환자의 병태 및 이전 병력에 따를 것이다. 그러나 원하는 치료 효과의 달성을 위해 요구되는 것보다 낮은 수준의 화합물의 용량에서 시작하여, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 서서히 증가시키는 것은 당업계의 지식 내에 있으며, 바람직한 투여량은 나이, 성별, 체형, 체중에 따라 결정될 수 있다. 상기 조성물은 약제학상 허용 가능한 제약 제제로 제제화되기 전에 추가로 가공될 수 있으며, 구체적으로는 더 작은 입자들로 분쇄 또는 연마될 수 있다. 또한 상기 조성물은 병태 및 치료되는 환자에 따라 달라질 것이지만, 이는 비-독창적으로 결정할 수 있다.
- [60] 또한 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [61] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [62] 본 발명에서 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, 질병의 종류, 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. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 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. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르며, 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으나, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 구체적으로는 0.05 내지 500 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 500 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 특히 본 발명에서의 약학 조성물은 100 내지 300 mg/kg의 투여량인 것이 망막 질환의 예방 또는 치료 효과를 우수하게 달성할 수 있다. 상기 조성물은 망막 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물 및 인간 등 어느 개체에나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한 없이 포함한다. 예를 들어, 복강투여, 안구투여 또는 경구투여 등의 방식을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[63] 한편, 상기 약학 조성물은 Cleaved PARP, GFAP 및 네스틴(Nestin)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[64] 또한 상기 약학 조성물은 OPN1SW, Brn3a, Tuj-1 등의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[65]

[66] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 질환 치료방법을 제공한다.

[67] 본 발명에서 상기 망막 질환의 의심 개체는 망막 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 약학 조성물을 망막 질환이 의심되는 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.

[68] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 망막 질환이 의심되는 개체에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 복강투여, 안구투여 또는 경구투여의 방식으로 투여될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[69]

[70] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을

포함하는 망막 질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.

- [71] 상기 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물은 상식할 수 있으면서도 망막 질환 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다. 이때, 상기 식품에 포함되는 상기 망막 추출물 또는 그의 분획물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%, 보다 바람직하게는 0.1 내지 1 중량%로 포함될 수 있다. 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1 내지 10g, 바람직하게는 2 내지 7g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.
- [72] 한편, 상기 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 개선용 식품 조성물을 이용하여 망막 질환 개선용 건강기능성 식품을 제조할 수 있다.
- [73] 구체적인 예로, 상기 식품 조성물을 이용하여 망막 질환의 증상을 개선시킬 수 있는 가공식품을 제조할 수 있는데, 예를 들어, 과자, 음료, 주류, 발효식품, 통조림, 우유가공식품, 육류가공식품 또는 국수가공식품의 형태인 건강기능성 식품으로 제조될 수 있다. 이때, 과자는 비스킷, 파이, 케익, 빵, 캔디, 젤리, 껌, 시리얼(곡물푸레이크 등의 식사대용품류 포함) 등을 포함한다. 음료는 음용수, 탄산음료, 기능성이온음료, 주스(예들 들어, 사과, 배, 포도, 알로에, 감귤, 복숭아, 당근, 토마토 주스 등), 식혜 등을 포함한다. 주류는 청주, 위스키, 소주, 맥주, 양주, 과일주 등을 포함한다. 발효식품은 간장, 된장, 고추장 등을 포함한다. 통조림은 수산물 통조림(예들 들어, 참치, 고등어, 꽁치, 소라 통조림 등), 축산물 통조림(쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 칠면조 통조림 등), 농산물 통조림(옥수수, 복숭아, 파일애플 통조림 등)을 포함한다. 우유가공식품은 치즈, 버터, 요구르트 등을 포함한다. 육류가공식품은 돈까스, 비프까스, 치킨까스, 소세지, 탕수육, 너겟류, 너비아니 등을 포함한다. 밀봉포장생면 등의 국수를 포함한다. 이 외에도 상기 조성물은 레토르트식품, 스프류 등에 사용될 수 있다.

[74]

[75] 본 발명의 용어 "건강기능성 식품(functional food)"이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 망막 질환의 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[76]

[77] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[78] 상기 사료 조성물은 망막 질환이 의심되는 개체의 사료에 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하여 섭취시킴으로써 망막 질환을 예방 또는 개선하게 된다.

[79]

발명의 실시를 위한 형태

[80] 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.

[81]

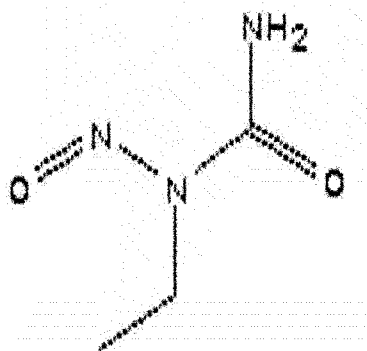
[82] 실시예 1: 경구 또는 안구 투여

[83] <실시예 1-1: 실험동물 및 처리방법>

[84] Balb/c 마우스(6주령)을 실험동물로 하였으며, 이중 1그룹에 하기 화학식 1과 같은 N-ethyl-N-nitrosourea(ENU) 600 mg/kg을 처리하였고, 2그룹에는 상기 ENU에 더하여 단풍나무 에탄올 추출물과 열수 추출물을 처리하여 망막 질환에 대한 보호 작용을 확인하였다.

[85] [화학식 1]

[86]



[87] 하기 표 1과 같이 단풍나무 잎 추출물 중, 열수 추출물은 200 mg/kg을, 에탄올 추출물은 100 mg/kg, 200 mg/kg로 나누어 경구 투여하는 방법으로 진행하였다. 또한 이와 별도로 에탄올 추출물 2 mg/kg을 안구에 직접 투여하는 방법으로 진행하였다(5일).

[88] [표 1]

	Condition (Population)	Protein prep.	Whole eye
1	Normal (6)	6	6
2	ENU 600mg/kg (6)	6	6
3	ENU 600mg/kg + KIOM-2015EE 100mg/kg (6) - P.O.	6	6
4	ENU 600mg/kg + KIOM-2015EE 200mg/kg (6) - P.O.	6	6
5	KIOM-2015EE 100mg/kg (6) - P.O.	6	6
6	KIOM-2015EE 200mg/kg (6) - P.O.	6	6
7	ENU 600mg/kg + KIOM-2015EW 200mg/kg (6) - P.O.	6	6
8	KIOM-2015EW 200mg/kg (6) - P.O.	6	6
9	ENU 600mg/kg + KIOM-2015EE 2mg/ml (6) - E.D.	6	6
10	KIOM-2015EE 2mg/ml (6) - E.D.	6	6

KIOM-2015EW; water extract, KIOM-2015EE; 25% EtOH extract, E.D.; topical eye drop (점안), P.O.; oral administration (경구투여).

점안의 경우 하루에 세 번 오전 9:00, 오후 1:00, 5:00, 경구 투여의 경우 하루에 한 번, 오후 3:00에 실시

[89]

[90] <실시예 1-2: 면역조직염색법>

[91] 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 씩 연속적으로 박절하여 1장은 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-Eosin, H&E) 염색을 시행하고 나머지는 면역조직화학염색을 위해 슬라이드에 부착시켰다. 내인성 퍼옥시다제(oxidase)를 없애기 위해 H₂O₂ 로 30분간 처리하였다. 면역조직화학염색에 사용할 항-PKCalpha(anti-PKCalpha), 항-GFAP(anti-GFAP), 항-GFAP 항체(anti-GFAP antibody)는 1:50, 항-OPN1SW(anti-OPN1SW)는 1:50으로 각각 희석한 후 4°C에서 하룻밤 동안 배양(overnight incubation) 한 후 세척(washing)하였으며, 그 후 2차 항체(secondary antibody)로 표지하여 현미경으로 관찰하였다.

[92]

[93] 면역조직염색법의 실험결과

- [94] 조직 염색하였을 (H&E) 각 추출물의 독성은 나타나지 않았으며, ENU를 투여한 그룹은 망막의 두께가 얇아지고 외과립층(out nuclear layer) 및 간추층(Layer of rods and cones) 부위가 소실된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 단풍나무의 에탄올 추출물을 200 mg/kg로 투여한 그룹은 조직학적으로 대조군(control)군과 비슷한 수준의 구조를 유지하는 것을 확인 하였다(도 1).
- [95] 또한 면역염색법을 사용하여 OPN1SW(photoreceptor cell 항체)를 사용하여 염색하였을 때 ENU그룹에서는 나타나지 않았지만 단풍나무의 에탄올 추출물을 200 mg/kg로 투여한 그룹에서는 보호되는 것을 확인할 수 있었으며, bipolar cells 지표인 PKCalpha로 염색 하였을 때 세포(cell) 바디와 액손(axon)에 데미지를 막아주는 것을 확인 할 수 있었다(도 2).
- [96] 또한 물러 세포(Muller cell) 지표 단백질인 GFAP로 염색하였을 때 단풍나무의 에탄올 추출물을 200 mg/kg를 처리한 그룹에서는 GFAP 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 3).
- [97]
- [98] <실시예 1-3: 터널 어썬이(TUNEL assay)>
- [99] 터미널 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제-Dutp Nick End Labeling 어썬이 키트(Terminal deoxynucleotidyl Transferase(TdT)-dUTP nick end labeling assay kit, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)을 사용하여 인사이투(in situ) 방식으로 분석하였다.
- [100] 면역조직염색법에 사용된 조직을 이용하여 탈파라핀 과정을 거친 후, 터널 리액션 믹스처(TUNEL reaction mixture, terminal deoxynucleotidyl Transferase(TdT)-dUTP)로 37°C 암실 조건하에서 1시간 동안 반응시키고 형광현미경(515-565nm, green, Olympus optical, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.
- [101]
- [102] 터널 어썬이의 실험결과
- [103] 터널 어썬이(Tunel assay)로 세포사멸을 확인 하였을 때 단풍나무의 에탄올 추출물 200mg/kg이 세포 사멸을 막는 것을 확인 하였다(도 4).
- [104]
- [105] <실시예 1-4: 웨스턴 블랏(Western blot)>
- [106] 안구에서 망막을 적출하여 RIPA 버퍼(buffer)로 단백질을 추출하여 12,000rpm에서 약 10분간 원심 분리하여 침전시킨 후 상층액을 얻었다. 이를 브래드포드(Bradford, Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)로 단백질 정량하여 7-12% SDS PAGE로 전기 영동하여 분리한 후, 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)에 이동시켰다. 각 항체를 사용하여 1차로 처리하고, 퍼옥시다제(oxidase)가 접합(conjugation)된 2차 항체와 반응 후 ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham biosciences, England)를 시행하여 분석하였다.
- [107]

[108] 웨스턴 블랏의 실험결과

[109] 웨스턴 블랏(Western blot)으로 단백질의 발현량을 조사하였을 때, 단풍나무 에탄올 추출물을 투입한 경우(좌측으로부터 5, 6(200 mg/kg)번째 레인) Cleaved PARP, GFAP, 네스틴(Nestin)의 발현량이 감소하는 것을 확인하였으며, 반대로 OPN1SW의 발현량은 ENU를 처리한 그룹에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[110]

[111] 실시예 2: 점안 또는 경구 투여

[112] <실시예 2-1: fMCAO 수술 방법>

[113]

[114] 중뇌대동맥폐쇄(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)에 의한 허혈성 뇌졸중 흰쥐모델은 마취 상태를 유지하며 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 과정 동안 37.0 ± 0.5 를 유지시켰다. 마취된 흰쥐의 전경부 중앙의 피부를 절개하고 경부의 근육층을 드러낸 후 좌측 총 경동맥을 찾아 미주신경이 손상되지 않도록 조심스럽게 분리 및 박리하였다. 총경동맥을 고정시킨 후 외경동맥과 내경동맥의 분지를 조심스럽게 분리하고 외경동맥을 차단한 후, 총경동맥의 혈류를 일시적으로 차단한 상태에서 총경동맥을 일부 절개하여 나일론 수술실을 진입시켜 중뇌대동맥이 폐쇄되도록 하였다. 혈류의 재개통을 위하여 90분 후 나일론 수술실을 조심스럽게 제거하여 혈류를 재개통시켜 동물모델을 유발하였다.

[115]

[116] <실시예 2-2: 실험조건 및 계획>

[117] [표2]

	Condition (Population)	5 D Harvested	Flat mount	Whole eye
1	Normal (3)	0	5	6
2	fMCAO + sham (3)	0	5	6
3	fMCAO + vehicle (PBS) (11) - E.D.	0	5	6
4	fMCAO + KIOM-2015EW 2mg/ml (11) - E.D.	0	5	6
5	fMCAO + KIOM-2015EE 1mg/ml (11) - E.D.	0	5	6
6	fMCAO + KIOM-2015EE 2mg/ml (11) - E.D.	0	5	6
7	fMCAO + KIOM-2015EE 100mg/kg(11) - P.O.	0	5	6
8	fMCAO + KIOM-2015E 200mg/kg(11) - P.O.	0	5	6
9	fMCAO + 기넥신F 20mg/kg(11) - P.O.	0	5	6
	Immunofluorescence/H&E staining		Bm3a/Tuj-1/GFAP	Paraffin embedding

KIOM-2015EW; water extract, KIOM-2015EE; 25% EtOH extract, E.D.; topical eye drop (점안), P.O.; oral administration (경구투여).

점안의 경우 하루에 세 번 오전 9:00, 오후 1:00, 5:00, 경구 투여의 경우 하루에 한 번, 오후 3:00에 실시

[118]

[119] 상기 표 2(KIOM-2015EW; 단풍나무 물 추출물, KIOM-2015EE; 25% 단풍나무에탄올 추출물, E.D.; topical eye drop(점안), P.O.; oral administration(경구투여))은 실험 조건별 약물투여 양상을 나타내는 것이다.

[120] 한편, 점안의 경우 하루에 세 번 오전 9:00, 오후 1:00, 5:00, 경구 투여의 경우 하루에 한 번, 오후 3:00에 실시하였다. 총 5일 동안 약물에 노출시켰으며, 5일째 마지막 약물 투여 후 희생하였다.

[121] 허혈로 인한 시신경세포 손상 모델에 알맞은 양성대조군 약제로는 현 임상에서 허혈성 망막병증환자에게 처방되는 SK케미칼의 기넥신 F정을 사용하였고, 복용량은 몸무게 대비 하루에 한 번 먹는 양으로 환산하여 투여하였다(Rat 300g 기준, 6 mg/ml).

[122]

[123] <실시예 2-3: 실시예 2의 실험결과>

- [124] 허혈성 망막신경변성 동물모델에서 KIOM-2015E에 의한 시신경절세포의 세포사 억제 확인 실험의 결과(KIOM-2015E-mediated protection of RGC degradation after fMCAO-induced ischemic damage)
- [125] 5일째 희생된 Rat의 안구를 적출하여, 4% PFA에 10분간 고정하고, 해부현미경하에서 망막조직만을 분리하고 망막의 가장자리를 4군데 절개하여 망막을 편평하게 펴서 메탄올에 고정 및 저장하여 사용하였다. 염색을 위해 메탄올을 제거하고, TBS에 5분간 두 번 수세하고, 항체가 세포막을 잘 투과하고 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 0.3% Triton X-100+0.2% BSA + 5% normal goat serum/TBS로 60분간 상온에서 반응시킨 다음, 이어서 1차 항체인 Brn3a (ganglion cell marker(신경절세포 표지자))를 상온에서 1시간 반응시키고 제거한 후, 2차 항체인 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG와 상온에서 1시간 추가 반응하였다. DAPI로 핵 염색 10분간 수행하고 형광현미경으로 관찰하여 이미지화 하였다.
- [126] 도 6은 이의 결과인데, 구체적으로 도 6a는 망막 조직의 구성세포 중 신경절 세포(Retinal Ganglion Cell(RGC))의 특이 항체인 Brn3a를 반응시켜 획득한 이미지이며, 도 6b는 각 이미지 중에서 임의로 5개를 선택하고, 선택된 이미지에 Brn3a와 양성반응한 세포수를 마운팅하여 대조군에 대한 % 평균값으로 전환된 것이다. 도 6b를 통해 단풍나무 에탄올 추출물이 물 추출물의 경우보다 시신경 세포의 사멸이 억제되는 것을 확인할 수 있으며, 단풍나무 에탄올 추출물의 경우 양성대조군과도 거의 유사한 결과를 나타냄을 알 수 있다. 사진은 100x의 배율로 촬영되었다.
- [127]
- [128] 허혈성 망막신경변성 동물모델에서 KIOM-2015E에 의한 시신경절세포섬유의 감소 억제 확인 실험(KIOM-2015E-mediated blockade of RGC nerve fiber degradation after fMCAO-induced ischemic damage)
- [129] 상기 실험에 2-1과 같은 방법으로 면역형광 염색하였다. 도 7a는 신경세포 및 신경섬유 표지자인 Tuj-1(Neuron-specific Class III β -tubulin) 항체를 이용한 면역형광 염색의 결과이다. 형광현미경으로 관찰하여 이미지화하였다.
- [130] 도 7b에서 Tuj-1 양성 반응한 신경 섬유의 발현은 MCAO 수술 5일째 50% 이상의 수준으로 감소하였으나, KIOM-2015EE의 농도 1 mg/ml의 점안보다는 2 mg/ml의 점안에서, 그리고 KIOM-2015EW의 2 mg/ml보다는 KIOM-2015EE의 점안에서 그 효과가 더 증가함을 확인할 수 있고, 점안의 경우보다 경구투여의 경우 더 효과적으로 시신경섬유의 분해를 억제함을 확인할 수 있었다. 도 7B의 그래프는 각 이미지 중에서 임의로 5개를 선택하고, Tuj-1과 양성 반응한 형광 밀도를 ImageJ 프로그램을 이용하여 픽셀 값으로 얻은 뒤, 대조군에 대한 % 평균값으로 나타내었다. 사진은 100x의 배율로 촬영되었다.
- [131]
- [132] 허혈성 망막신경변성 동물모델에서 KIOM-2015E에 의한 신경교세포 및

성상세포의 활성화 억제 확인 실험(KIOM-2015E-mediated blockade of Astrocyte activation after fMCAO-induced ischemic damage)

- [133] 상기 실험에 2-1과 같은 방법으로 면역형광 염색하였다. 도 8a는 신경교세포 및 성상세포 표지자인 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 항체를 이용한 면역형광염색 결과이다. 형광현미경으로 관찰하여 이미지화 하였다.
- [134] 손상 주위에 활성화되는 교세포에는 성상세포와 신경교세포가 있는데, 보통 조직에 상처가 생기면 빈번히 활성화되는 것으로, 성상교세포의 표지자인 GFAP의 증감을 확인하였다. MCAO 수술 후 5일째, GFAP의 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였고, 도 8b를 통해 KIOM-2015E에 의해 모든 그룹에서 유의하게 그 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 도 8B의 그래프는 각 이미지 중에서 임의로 5개를 선택하고, GFAP와 양성 반응한 형광 밀도를 ImageJ 프로그램을 이용하여 픽셀 값으로 얻은 뒤, 대조군에 대한 % 평균값으로 나타내었다. 사진은 100x의 배율로 촬영되었다.

[135]

- [136] 허혈성 망막신경변성 모델에서 KIOM-2015E에 의한 망막조직학적 변화 확인 실험(Representative photomicrographs of hematoxylin and eosin stained retinal sections)

- [137] 망막의 조직학적 변화를 확인하기 위하여 수확한 안구를 4% PFA용액에 고정한 후 최종적으로 파라핀을 침투시켜 조직을 포매한 다음 마이크로톰(microtome)을 이용하여 3 μ m의 두께로 절단하였다. 건조 오븐(Drying oven)에서 1시간 동안 파라핀을 제거 및 수화 후, 헤마톡실린 용액으로 5분, 에오신 용액으로 염색시키고 수세한 다음, 마운팅(mounting)하고, 마이크로스코피(microscopy)를 이용하여 각막의 형태학적 조직학적 변화를 획득하였다.
- [138] 도 9a를 통해 MCAO 수술 후 5일째, 대조군과 비교하여 내망상층(IPL) 팽윤으로 망막 조직의 두께가 증가하고, 신경절세포층(GCL)의 세포수가 현저하게 감소함을 관찰하였다. 뿐만아니라 광수용체 세포층 및 바깥쪽 부분(segment)의 구조가 탈락하거나 불규칙한 것을 확인하였다. 그러나 KIOM-2015E의 점안 및 경구투여를 포함한 모든 그룹에서 이러한 변화가 억제되어 있음을 관찰하였다(도 9b). 도 9b의 그래프는 각 이미지 중에서 임의로 5개를 선택하고, 신경절세포층에 남아있는 세포수를 셀 다음, 대조군에 대한 % 평균값으로 나타내었다. 사진은 100x의 배율로 촬영되었다.

[139]

- [140] 허혈성 망막신경변성 모델에서 KIOM-2015E에 의한 망막조직의 세포사 억제 확인 실험(Representative images of retinas after TUNEL assay and counterstaining with DAPI)

- [141] MCAO 수술로 인한 세포 독성 및 세포사에 따른 KIOM-2015E의 효과를 확인하기 위해 TUNEL 어세이(Roche Diagnostics, Cat. No. 11 684 795 910)을

매뉴얼에 따라 수행하고, TUNEL-양성반응 세포들은 형광현미경으로 이미지를 획득하였다.

- [142] 도 10에서 MCAO 수술 후 5일째, 신경절 세포층 외, 내핵층 및 외핵층에서도 TUNEL 양성 반응을 나타내는 것을 관찰할 수 있으며, KIOM-2015E의 점안 및 투여한 모든 그룹에서 TUNEL 양성 반응 세포수가 감소함을 확인할 수 있다. 사진은 100x의 배율로 촬영되었다.

[143]

- [144] 이를 통해 단풍나무 잎 추출물이 망막의 손상을 막고 망막 질환을 일으키는 단백질의 발현량을 감소시키면서, OPN1SW, Brn3a, Tuj-1의 발현량은 증가시킴을 확인하였으며, 이는 본 발명에 따른 약학 조성물을 이용하여 망막 질환을 예방 또는 치료할 수 있음을 확인한 것이다.

[145]

- [146] 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.

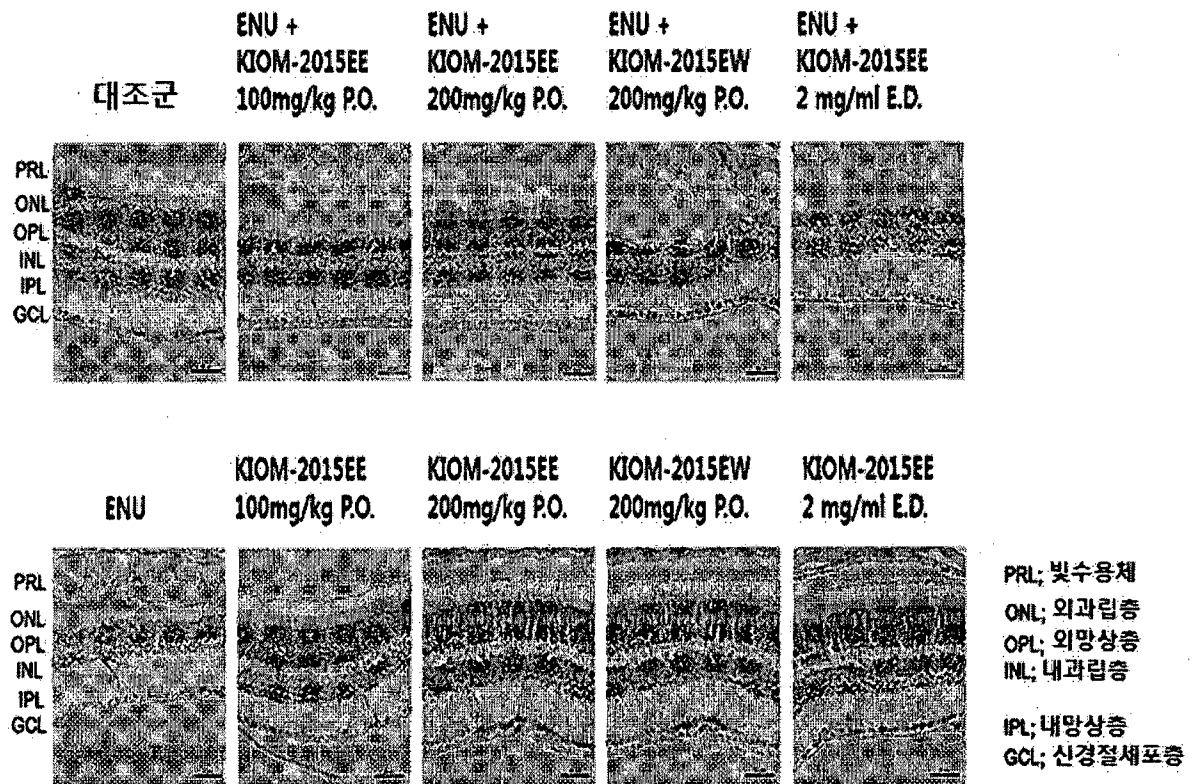
[147]

[148]

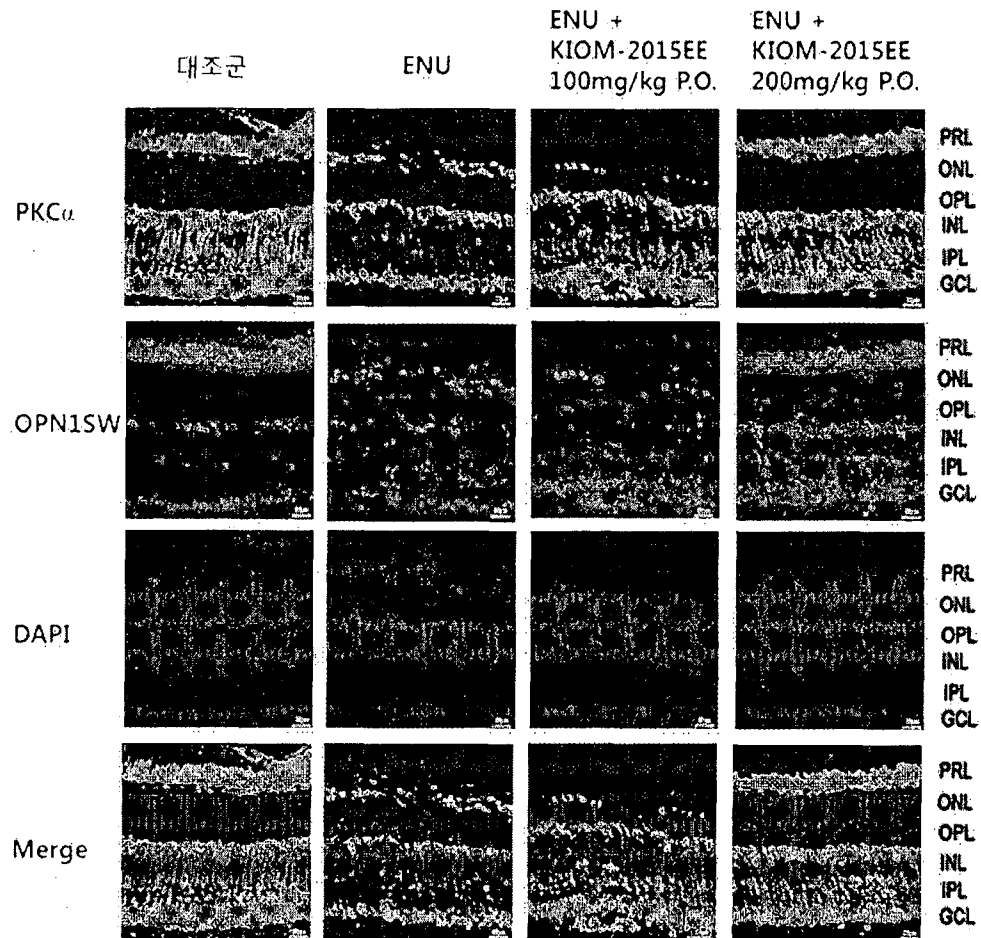
청구범위

- [청구항 1] 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 망막 질환은 망막동맥폐쇄, 망막정맥폐쇄, 망막정맥주위염, 고혈압망막병증, 당뇨망막병증, 미숙아망막병증, 감각신경망막염증, 망막색소상피염증, 망막색소변성, 혈관무너병증, 드루젠, 열공망막박리, 비열공망막박리, 황반변성, 황반이상증, 당뇨망막병증, 망막동정맥폐쇄, 고혈압성 망막병증, 망막대동맥류, 안허혈증후군, 방사선망막병증, 미숙아망막병증, 급성망막괴사, 망막염, 망막맥락막염, 망막박리, 망막종양, 외상에 의한 망막 손상 및 빛에 의한 망막 손상으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 Cleaved PARP, GFAP 및 네스틴(Nestin)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 감소시키는 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 OPN1SW, Brn3a 및 Tuj-1로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 질환 치료방법.
- [청구항 6] 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 개선용 식품 조성물.
- [청구항 7] 단풍나무 잎 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 망막 질환 개선용 사료 조성물.

[도1]

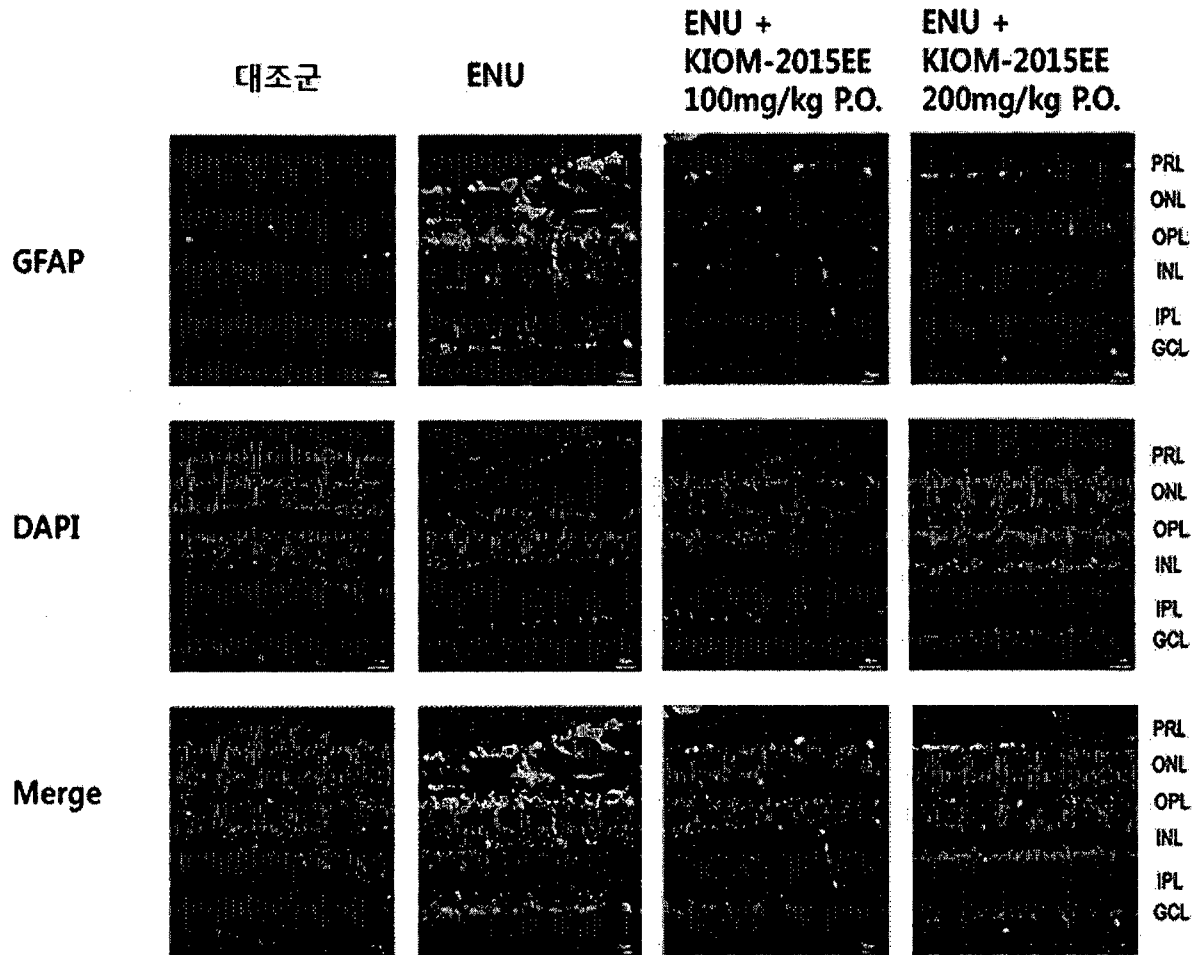


[도2]

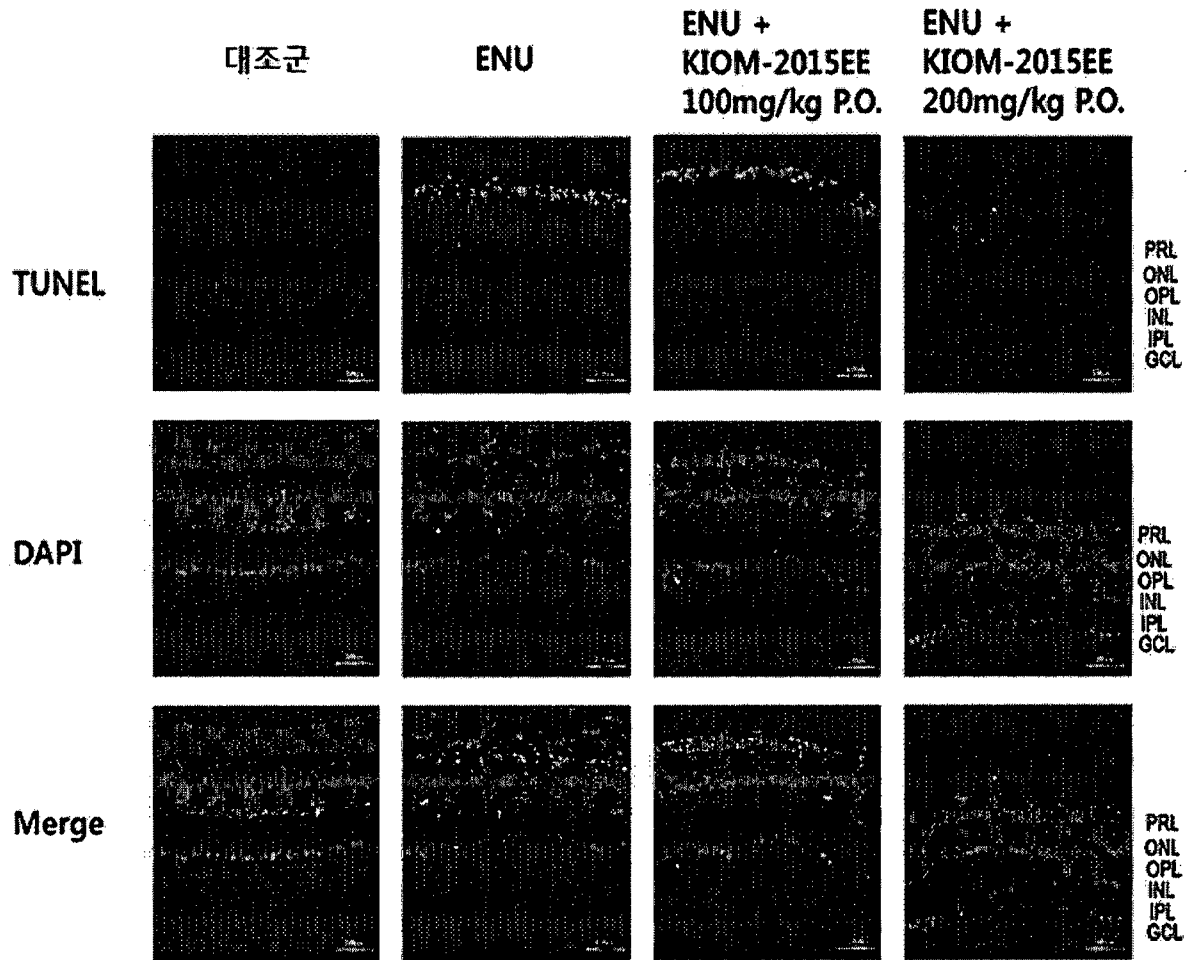
PKC α ; 간상 양극세포(rod bipolar cell)

OPN1SW; 빛수용체 세포 항체 (outer segment of cones)

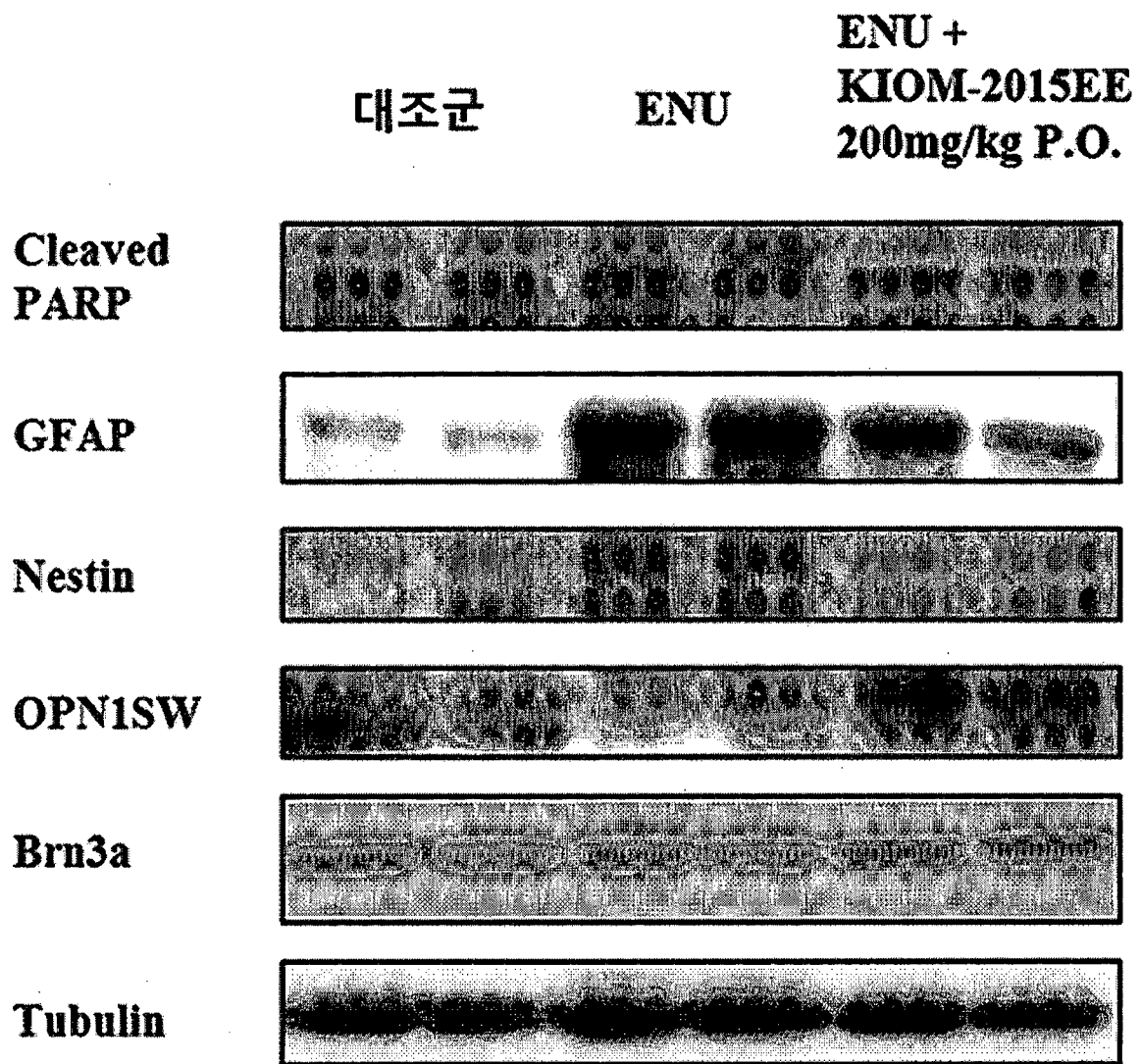
[도3]



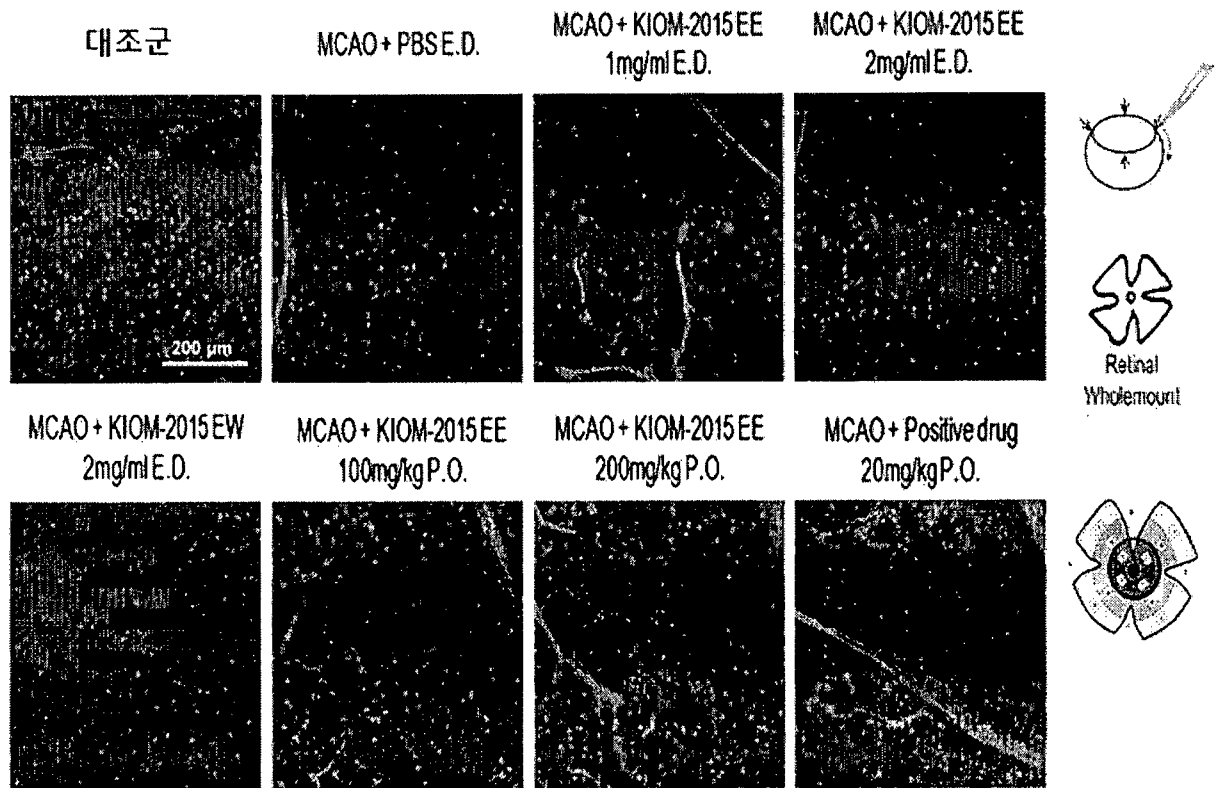
[도4]



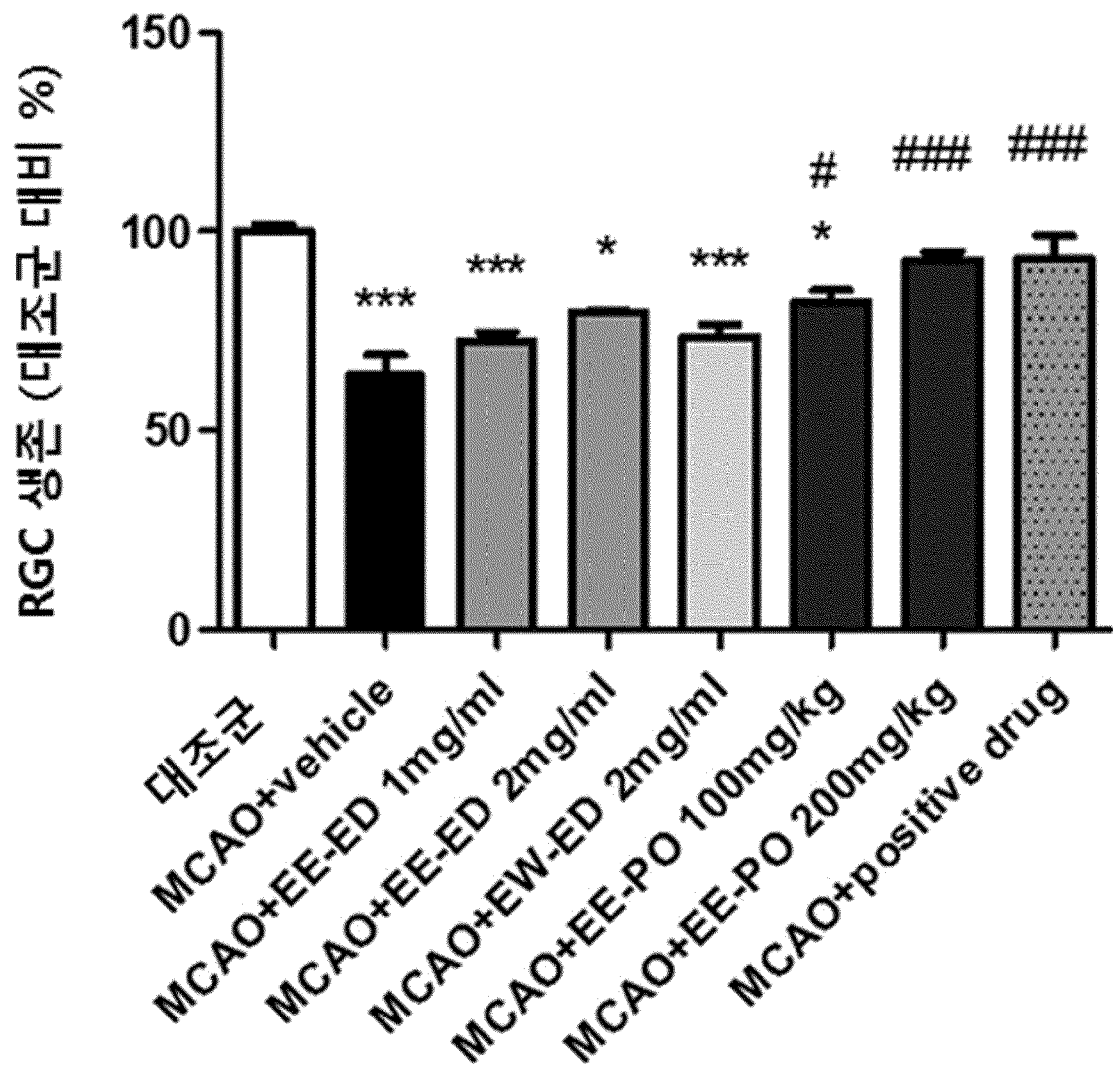
[도5]



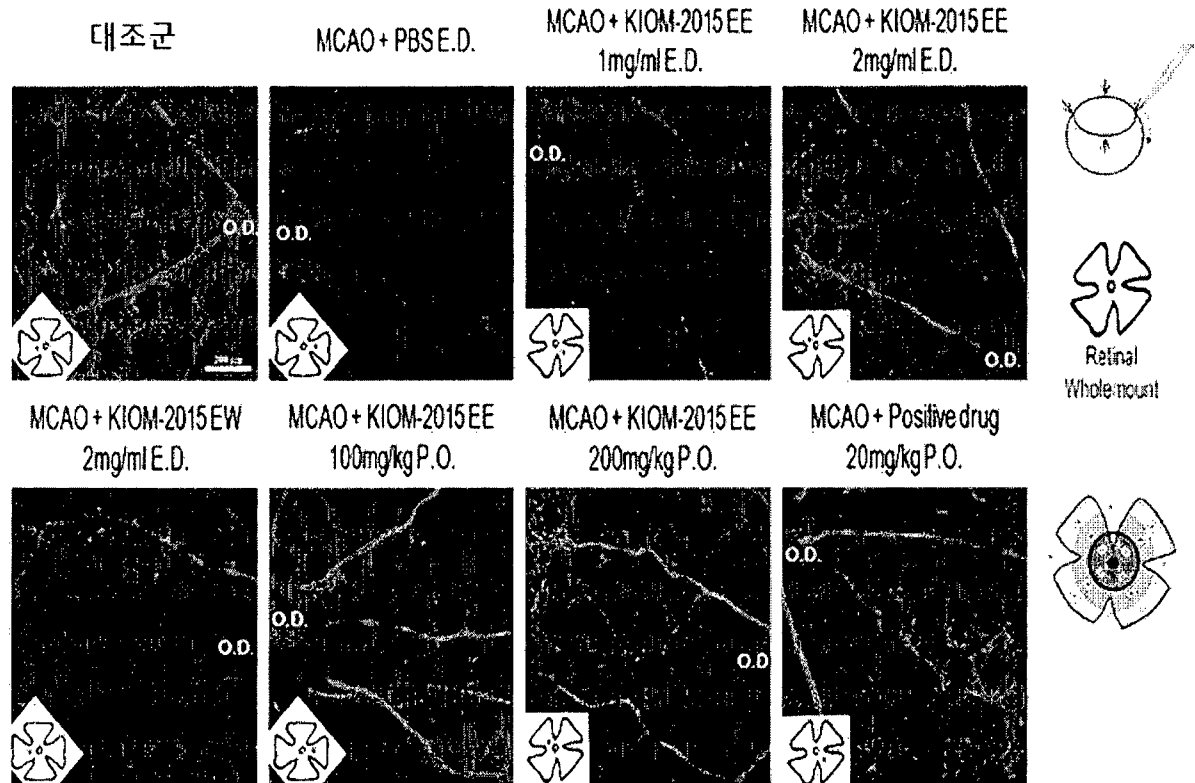
[도6a]



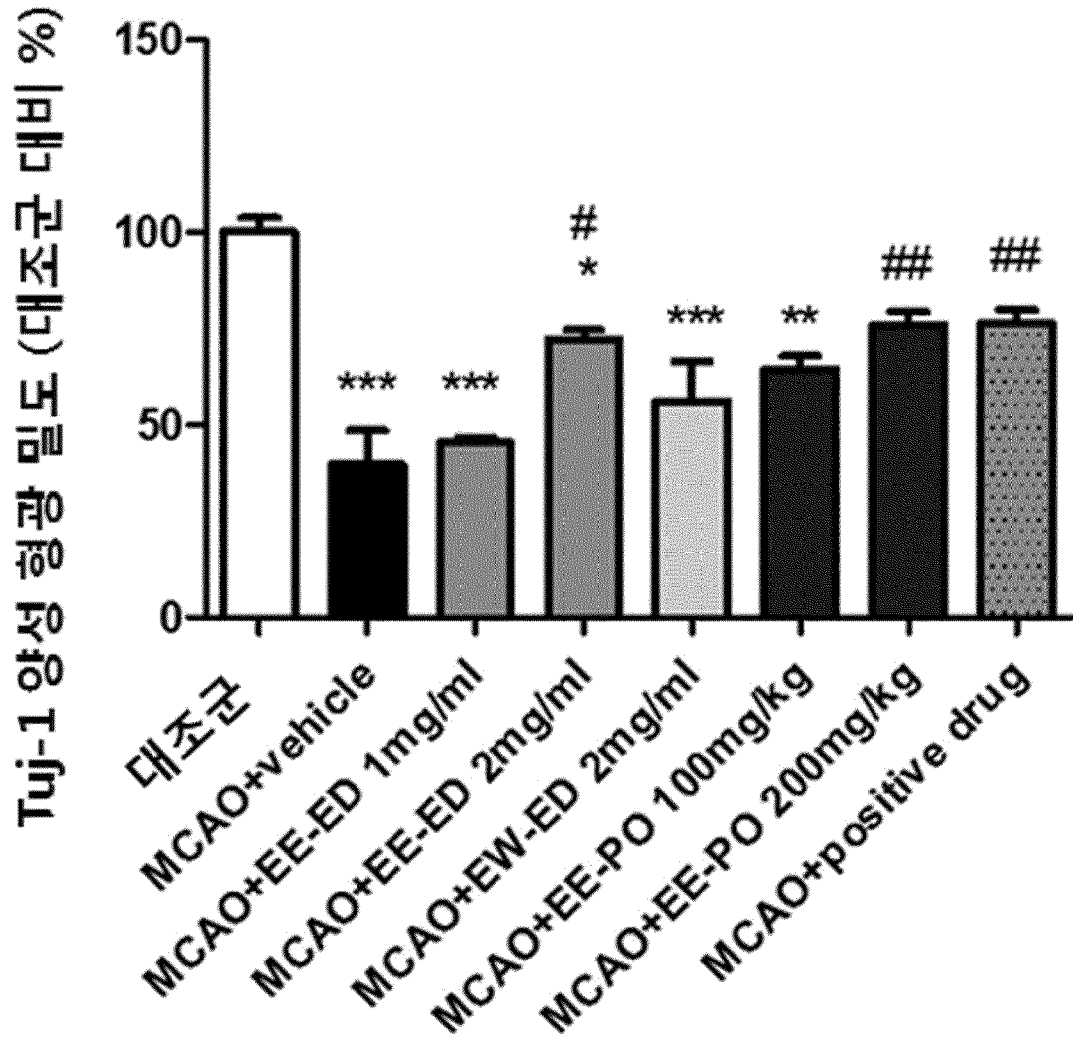
[도6b]



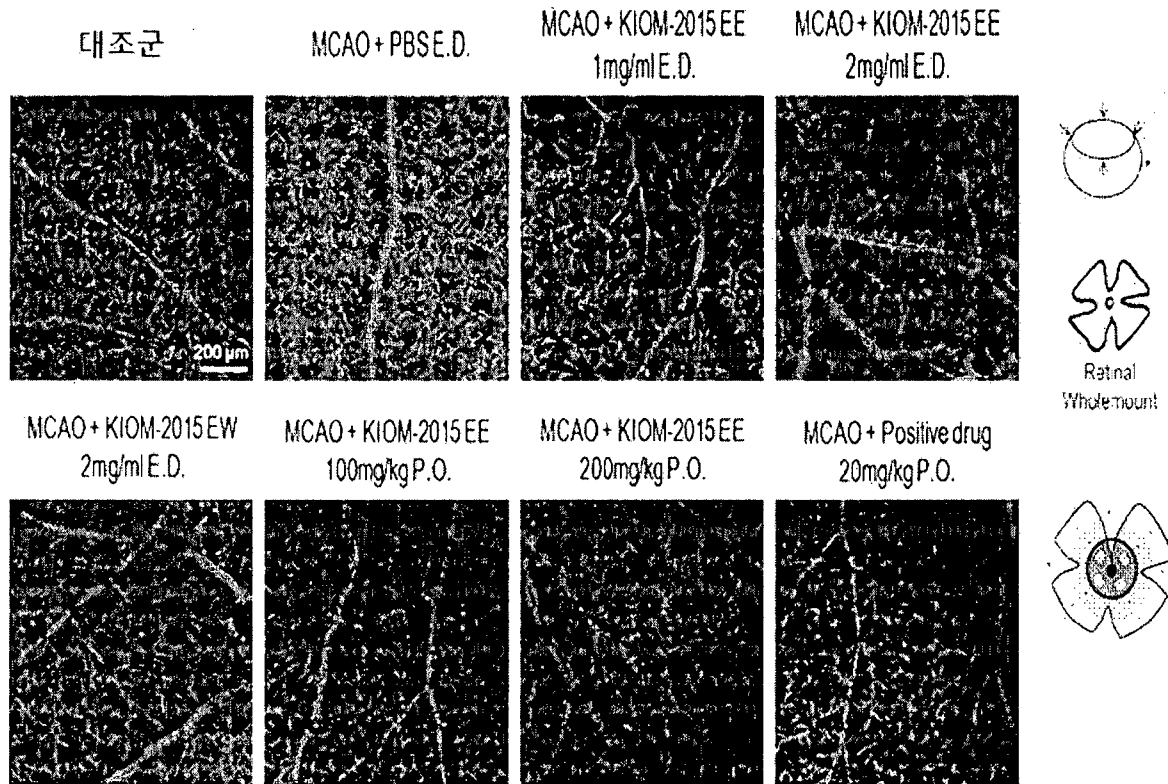
[도 7a]



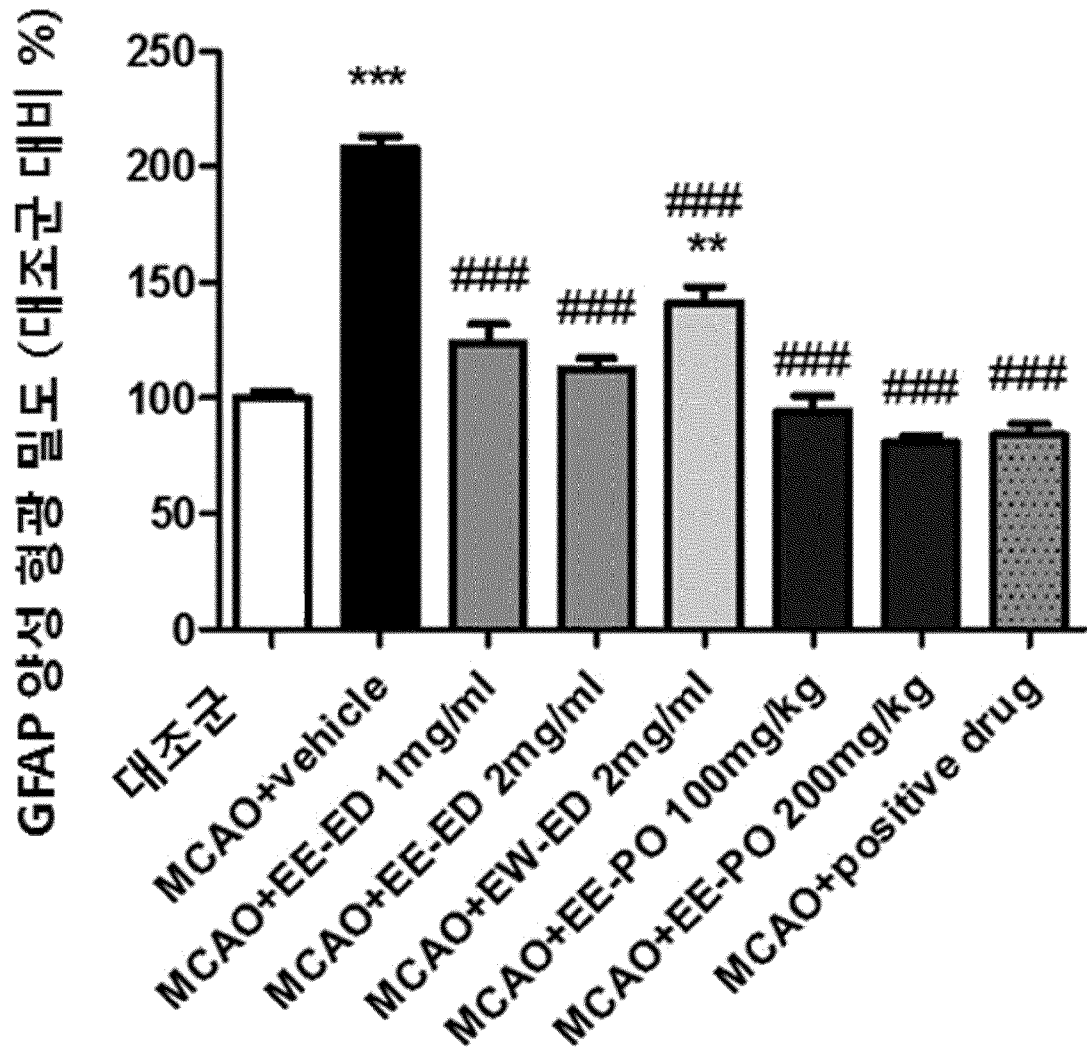
[도7b]



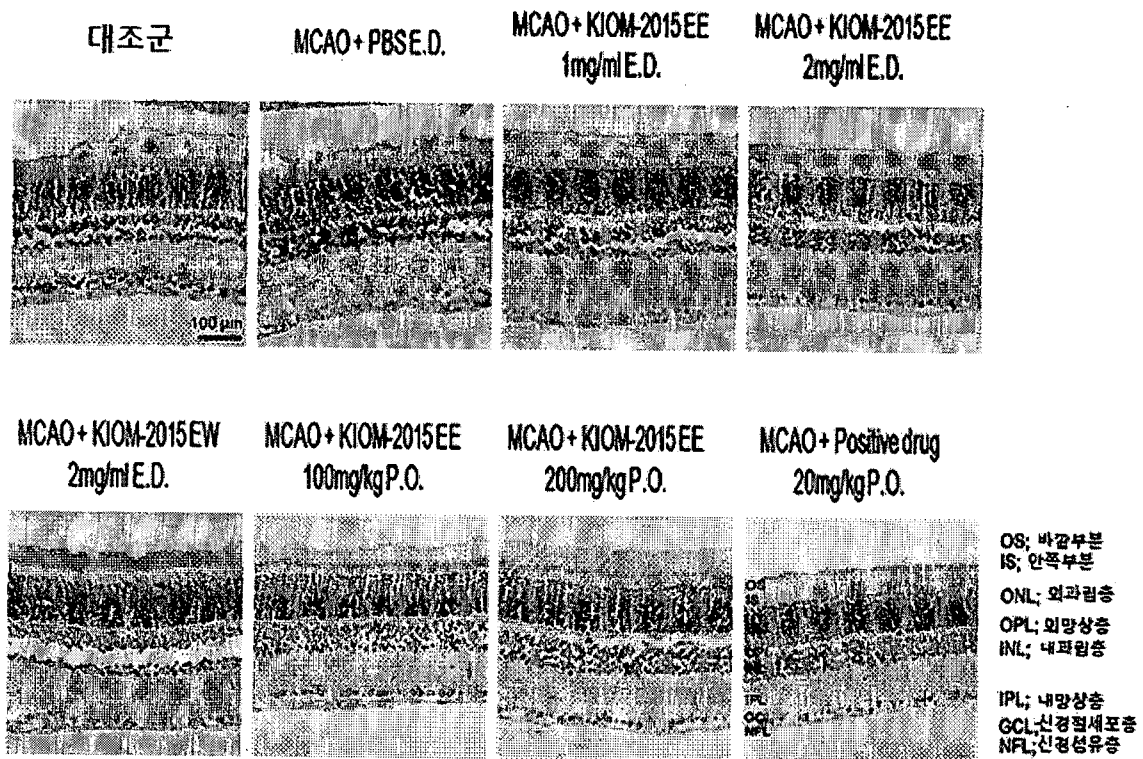
[도 8a]



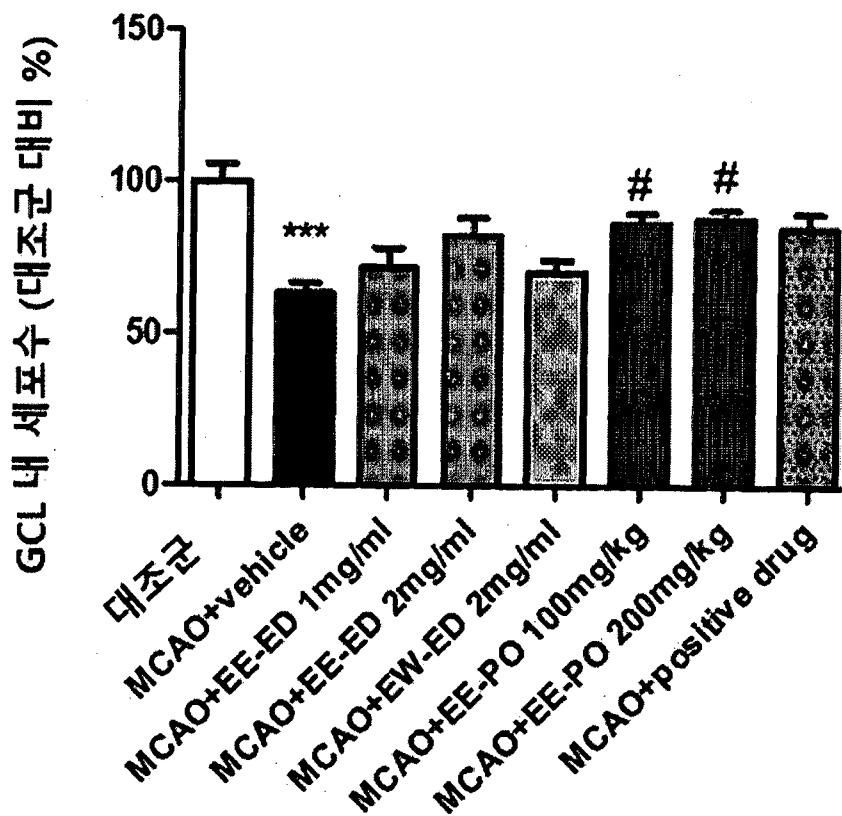
[도8b]



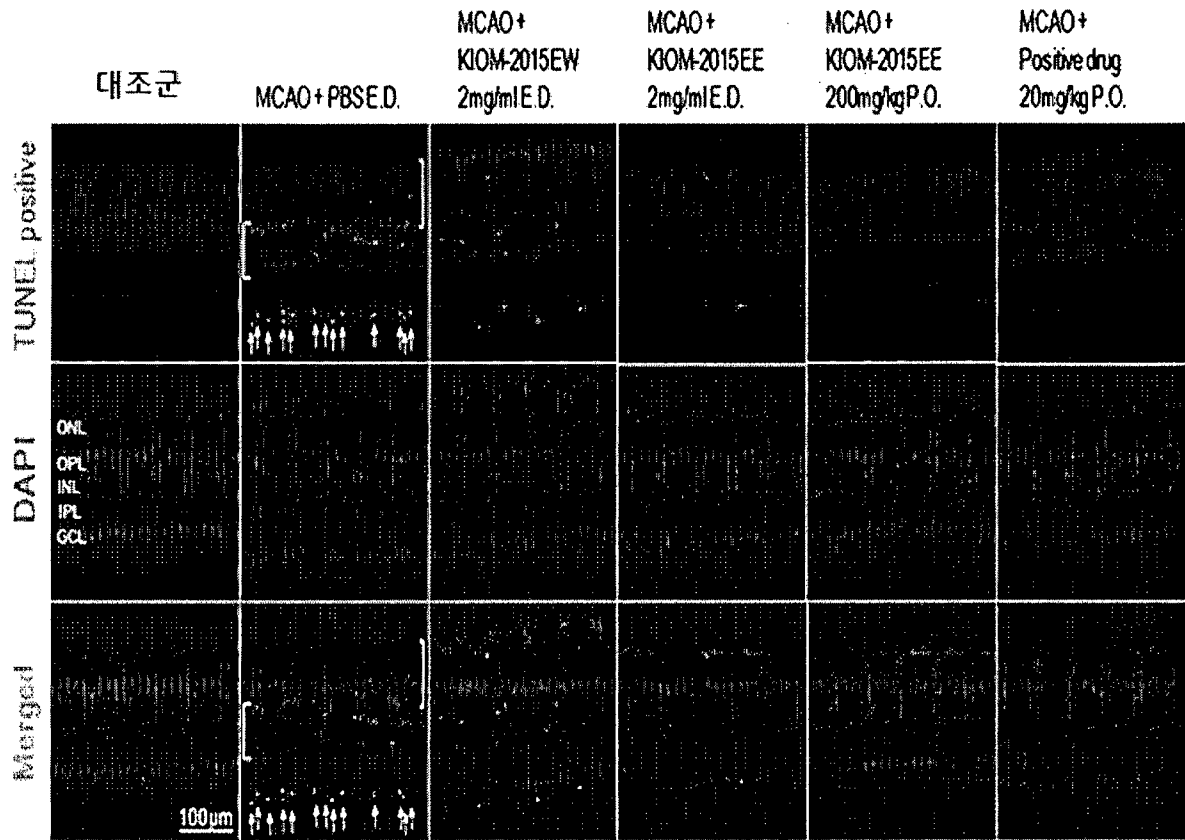
[도9a]



[도9b]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/20(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A23K 10/30(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 36/20; A61K 36/906; A61K 36/44; A23L 33/105; A61K 9/00; A23K 10/30

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: palmate maple, Acer amoenum, retina, retinal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HONMA, A. et al., "Antihyperglycemic Effects of Japanese Maple Acer Amoenum Leaf Extract and Its Constituent Corilagin", Journal of Wood Science, 2010, vol. 56, pages 507-512 See abstract; and pages 508-509.	1-4,6-7
A	KIM, J. H. et al., "The Isolation and Antioxidative Effects of Vitexin from Acer Palmatum", Archives of Pharmacal Research, 2005, vol. 28, no. 2, pp. 195-202 See the entire document.	1-4,6-7
A	ZHU, Q. et al., "Antinociceptive Effects of Vitexin in a Mouse Model of Postoperative Pain", Scientific Reports, 14 January 2016., vol. 6, thesis no. 19266, internal pages 1-10 See the entire document.	1-4,6-7
A	WANG, J. et al., "Purified Vitexin Compound 1 Inhibits Growth and Angiogenesis through Activation of FOXO3a by Inactivation of Akt in Hepatocellular Carcinoma", International Journal of Molecular Medicine, 2014, vol. 33, pages 441-448 See the entire document.	1-4,6-7



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

06 DECEMBER 2017 (06.12.2017)

Date of mailing of the international search report

07 DECEMBER 2017 (07.12.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008784

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.: **5**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 5 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.:
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

International application No.

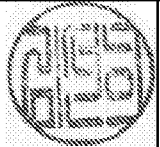
PCT/KR2017/008784

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0133338 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 December 2013 See the entire document.	1-4,6-7

Information on patent family members

PCT/KR2017/008784

14/08/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/20(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A23K 10/30(2016.01)i																	
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/20; A61K 36/906; A61K 36/44; A23L 33/105; A61K 9/00; A23K 10/30 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: 단풍나무, Acer amoenum, 망막, retinal																	
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>HONMA, A. 등, 'Antihyperglycemic effects of Japanese maple Acer amoenum leaf extract and its constituent corilagin' Journal of Wood Science, 2010년, 56권, 페이지 507-512 초록; 및 페이지 508-509 참조.</td> <td>1-4,6-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KIM, J. H. 등, 'The isolation and antioxidative effects of vitexin from Acer palmatum' Archives of Pharmacal Research, 2005, 28권, 2호, pp. 195-202 전체 문헌 참조.</td> <td>1-4,6-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ZHU, Q. 등, 'Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain' Scientific Reports, 2016.01.14., 6권, 논문번호 19266, 내부페이지 1-10 전체 문헌 참조.</td> <td>1-4,6-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WANG, J. 등, 'Purified vitexin compound 1 inhibits growth and angiogenesis through activation of FOXO3a by inactivation of Akt in hepatocellular carcinoma' International Journal of Molecular Medicine, 2014년, 33권, 441-448 전체 문헌 참조.</td> <td>1-4,6-7</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	HONMA, A. 등, 'Antihyperglycemic effects of Japanese maple Acer amoenum leaf extract and its constituent corilagin' Journal of Wood Science, 2010년, 56권, 페이지 507-512 초록; 및 페이지 508-509 참조.	1-4,6-7	A	KIM, J. H. 등, 'The isolation and antioxidative effects of vitexin from Acer palmatum' Archives of Pharmacal Research, 2005, 28권, 2호, pp. 195-202 전체 문헌 참조.	1-4,6-7	A	ZHU, Q. 등, 'Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain' Scientific Reports, 2016.01.14., 6권, 논문번호 19266, 내부페이지 1-10 전체 문헌 참조.	1-4,6-7	A	WANG, J. 등, 'Purified vitexin compound 1 inhibits growth and angiogenesis through activation of FOXO3a by inactivation of Akt in hepatocellular carcinoma' International Journal of Molecular Medicine, 2014년, 33권, 441-448 전체 문헌 참조.	1-4,6-7
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항															
A	HONMA, A. 등, 'Antihyperglycemic effects of Japanese maple Acer amoenum leaf extract and its constituent corilagin' Journal of Wood Science, 2010년, 56권, 페이지 507-512 초록; 및 페이지 508-509 참조.	1-4,6-7															
A	KIM, J. H. 등, 'The isolation and antioxidative effects of vitexin from Acer palmatum' Archives of Pharmacal Research, 2005, 28권, 2호, pp. 195-202 전체 문헌 참조.	1-4,6-7															
A	ZHU, Q. 등, 'Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain' Scientific Reports, 2016.01.14., 6권, 논문번호 19266, 내부페이지 1-10 전체 문헌 참조.	1-4,6-7															
A	WANG, J. 등, 'Purified vitexin compound 1 inhibits growth and angiogenesis through activation of FOXO3a by inactivation of Akt in hepatocellular carcinoma' International Journal of Molecular Medicine, 2014년, 33권, 441-448 전체 문헌 참조.	1-4,6-7															
☒ 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 신구성 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 2017년 12월 06일 (06.12.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 12월 07일 (07.12.2017)															
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김선희 전화번호 +82-42-481-5405 															

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2017/008784

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2013-0133338 A (한국과학기술연구원) 2013.12.09 전체 문헌 참조.	1-4, 6-7

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: 5
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제5항은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의
규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 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:
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/KR2017/008784

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2013-0133338 A

2013/12/09

KR 10-1426356 B1

2014/08/14