

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 11일 (11.12.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/196674 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 35/64 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/005016
- (22) 국제출원일: 2013년 6월 7일 (07.06.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 주식회사 청진바이오텍 (CHUNG JIN BIOTECH CO., LTD.) [KR/KR]; 426-791 경기도 안산시 상록구 한양대학로 55 창업보육센터 309호 (사동, 한양대학교 안산캠퍼스), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 신장철 (SHEN, Chang Zhe); 134-020 서울시 강동구 천호동 191-35 103호, Seoul (KR). 원하영 (WON, Ha Young); 137-951 서울시 서초구 잠원동 신반포한신아파트 334-903, Seoul (KR). 김승주 (KIM, Seung Ju); 426-173 경기도 안산시 상록구 사3동 푸르지오 6차 아파트 613동 1103호, Gyeonggi-do (KR). 이지연 (LEE, Ji Yeon); 426-170 경기도 안산시 상록구 사동 1519-10번지 201호, Gyeonggi-do (KR). 신연희

(SHIN, Yeon Hee); 443-380 경기도 수원시 영통구 원천동 주공아파트 205-1501, Gyeonggi-do (KR). 이선영 (LEE, Seon Young); 305-301 대전시 유성구 봉명동 도안마을아파트 101-1507, Daejeon (KR). 박정근 (PARK, Jung Keun); 150-050 서울시 영등포구 신길동 67-1 경남아파트 102-1403, Seoul (KR). 김의경 (KIM, Eui Kyung); 660-110 경상남도 진주시 평거동 190번지 들밭대경아파트 101동 206호, Gyeongsangnam-do (KR). 김철구 (KIM, Choul Goo); 426-040 경기도 안산시 상록구 성포동 588번지 주공 4단지아파트 404동 908호, Gyeonggi-do (KR).

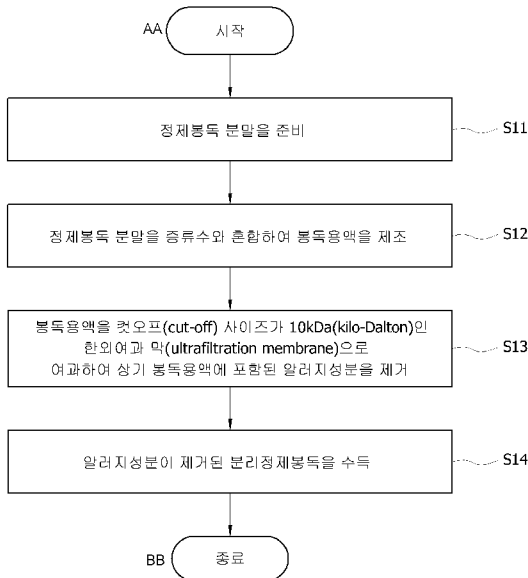
(74) 대리인: 김정수 (KIM, Jung Su); 138-050 서울시 송파구 방이동 35-8 202호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR ISOLATED, PURIFIED BEE VENOM HAVING ALLERGIC COMPONENTS ISOLATED

(54) 발명의 명칭 : 알러지성분이 분리된 분리정제 봉독 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a preparation method for isolated, purified bee venom having allergic components isolated, capable of preparing the isolated, purified bee venom fundamentally blocking allergy induction while maintaining a pharmacological effect by reducing or removing allergy-inducing components in bee venom, as an ultrafiltration method. The present invention comprises: a first step for arranging purified bee venom powder; a second step for preparing a bee venom solution by mixing the purified bee venom powder with distilled water; a third step for removing the allergic components included in the bee venom solution by filtering the bee venom solution through an ultrafiltration membrane having a cut-off size of 10kDa (kilo-Dalton); and a fourth step for harvesting the isolated, purified bee venom having the allergic components removed, wherein, in the second step, the distilled water being mixed with the purified bee venom powder corresponds to 1000ml to 1500ml per 1g of the purified bee venom powder, in the third step, the allergic components removed through the ultrafiltration membrane are A2 (phospholipase A2) and hyaluronidase, and, in the fourth step, the harvested isolated, purified bee venom comprises 4% by weight or more of apamin and 50% by weight or more of melittin.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

- S11 ... Arrange purified bee venom powder
- S12 ... Prepare bee venom solution by mixing purified bee venom powder with distilled water
- S13 ... Remove allergic components included in bee venom solution by filtering same through ultrafiltration membrane having cut-off size of 10kDa (kilo-Dalton)
- S14 ... Harvest isolated, purified bee venom having allergic components isolated
- AA ... Start
- BB ... End

WO 2014/196674 A1



PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 한외여과방법으로 봉독 중 알러지 유발성분을 감축 또는 제거하여 약리 효과를 유지하면서도 알러지유발을 근본적으로 차단한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 알러지성분이 분리된 분리정제봉독 제조방법에 관한 것으로, 정제 봉독 분말을 준비하는 제 1 단계, 상기 정제봉독 분말을 증류수와 혼합하여 봉독용액을 제조하는 제 2 단계, 상기 봉독 용액을 컷오프(cut-off) 사이즈가 10kDa(kilo-Dalton)인 한외여과 막(ultrafiltration membrane)으로 여과하여 상기 봉독용액에 포함된 알러지(allergy)성분을 제거하는 제 3 단계 및 상기 알러지성분이 제거된 분리정제봉독을 수득하는 제 4 단계를 포함하고, 상기 제 2 단계에서, 상기 정제봉독 분말과 혼합되는 증류수는 상기 정제봉독 분말 1g 당 1000ml 내지 1500ml이며, 상기 제 3 단계에서, 상기 한외여과 막을 통해 제거되는 알러지성분은 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2) 및 히알루로니다제(Hyaluronidase)이며, 상기 제 4 단계에서, 수득되는 상기 분리정제봉독은 아파민(apamin)을 4 중량% 이상, 멜리트틴(melittin)을 50 중량% 이상 포함하는 것을 특징으로 한다.

명세서

발명의 명칭: 알러지성분이 분리된 분리정제봉독 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 알러지성분이 분리된 분리정제봉독 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 한외여과방법으로 봉독 중 알러지 유발성분을 감축 또는 제거하여 약리 효과를 유지하면서도 알러지유발을 근본적으로 차단한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 알러지성분이 분리된 분리정제봉독 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 봉독(蜂毒)이란 벌이 가지고 있는 독이며, 관절염 완화, 동맥경화 완화, 요통 완화, 피부상처의 치료, 면역체계를 강화하는 항균작용 및 항염증작용뿐만 아니라, 미용의 목적으로도 피부의 미백작용 및 주름개선작용에 관여한다고 알려져 있다.
- [3] 정제봉독(Purified Bee Venom, PBV)은 봉독채집장치를 이용하여 벌로부터 채집된 봉독이 자연건조, 수용정제, 멸균 및 동결건조 등의 공정을 거친 결과물이며, 정제봉독과 봉독의 생리활성은 유사한 것으로 알려져 있다.
- [4] 정제봉독의 생리활성작용을 가지는 구성성분은 다음의 표 1과 같다.
- [5] [표 1]
- [6]

	성분	약리작용
Peptides	Melittin	세포 용해 작용, 항염증 작용, 면역 작용
	Apamin	신경통 완화 작용, 진통 작용, 항염증 작용, 면역작용
	MCD-peptide 401	항염증 작용
	Adolapin	항염증 작용, 진통 작용, 해열 작용
	Protease inhibitor	단백질과 에스테르 용해 억제 작용, 항염증 작용
	Secapin	저온증 진정작용
	Tertiapin	비만세포 탈과립 작용
	Procamine A, B	방사선 보호성 관련
Proteins (Enzyme)	Hyaluronidase	조직 분해 작용, 항원성 성분
	Phospholipase A2	세포 조직의 파괴성, 응혈 작용, 촉매 작용
	α -glucosidase	항체 역할 증진
	Phosphatase	항체 역할 증진
	Lysophospholipase	포스포리파아제 A2작용 억제
Amines	Histamine	혈압 강화 작용, 장관 수축 작용, 위산 분비 촉진 작용
	Dopamine	신경 전달 물질

- [7] 정제봉독은 펩티드, 단백질(eg. 효소) 및 낮은 분자의 활성아민 등을 포함하여 40가지 이상의 물질로 구성되고, 주된 유효성분은 표 1에 나타난 바와 같이, 분자량이 11kDa(kilo-Dalton)이하로 구성되는 펩티드(apamin, melittin, MCD), 활성아민(histamine, dopamin) 및 아미노산 등이다.
- [8] 봉독구성 중 단백질은 약 13kDa 이상의 분자량을 가지고 있는 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2, PLA2), 히알루로니다제(Hyaluronidase), 포스파타아제(phosphatase), α -글루코시다아제(α -Glucosidase) 등의 성분으로 구성되고, 주로 혈액세포막 파괴, 혈액응고, 혈관확장 및 투과, 혈액순환 촉진, 단백질의 가수분해 촉진 등의 생리활성역할이 있다,
- [9] 특히, 포스포리파아제 A2와 히알루로니다제는 강력한 알러지반응을 유도하는 봉독 조성물이며, 봉독에 대한 과민성을 지닌 사용자에게서는 매우 심각한 안전상의 문제를 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다.(Stefan Bogdanov; Bee Venom: composition, Health, Medicine: A Review, *Bee Product Science* (2011))
- [10] 이러한 부작용 때문에 봉독의 효율적인 투입량을 제한하고 있으며, 봉독의 투입량이 제한됨에 따라 봉독의 생리활성 효과 또한 제한되어 완전히 구현되지 못하는 문제가 발생하게 된다.
- [11] 공개특허공보 제10-2012-0003178호는 봉독 추출물을 함유하는 피부 미백 및

보습용 조성물에 관한 것으로, 봉독을 전처리하거나 봉독으로부터 봉독추출물을 추출하고 이를 유효성분으로 하는, 피부 미백 및 피부 보습효과를 나타내는 조성물 또는 화장품 조성물에 대하여 개시하고 있다.

[12] 그러나 상기와 같은 종래의 기술에서는 강력한 알러지반응을 유도하는 포스포리파아제 A2와 히알루로니다제를 제거하는 과정을 포함하지 않아, 종래의 기술에 의해 제조된 봉독추출물을 유효성분으로 하는 조성물 및 화장품 조성물을, 봉독에 대하여 과민성을 지닌 사용자가 사용할 경우 매우 심각한 안전상의 문제를 일으킬 수 있다.

[13] 또한, 종래에 알러지반응을 저해하기 위하여 알러지반응 저해제를 첨가하는 방안이 고안되기도 하였으나, 이는 알러지를 근본적으로 해결하지 못하고, 알러지반응 저해제에 의한 부작용을 유발할 수 있는 문제가 있다.

[14] 또한, 종래의 봉독에서 포스포리파아제 A2와 히알루로니다제를 제거하는 방안으로는 HPLC(high performance liquid chromatography) 또는 젤 여과(gel filtration) 방법이 있지만, 분리 또는 정제 과정이 진행됨에 따라 수율이 급격히 낮아지고, 대량생산을 하기 어려운 문제가 있다.

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 본 발명은 상기한 바와 같은 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 강력한 알러지반응을 유도하는 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2)와 히알루로니다제(Hyaluronidase)를 정제봉독으로부터 한외여과하여 제거함으로써, 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 분리정제봉독 제조방법의 제공을 목적으로 한다.

[17]

[18] 또한, 본 발명은 정제봉독을 한외여과하여 강력한 알러지반응을 유도하는 히알루로니다제를 제거하고, 포스포리파아제 A2를 감축하여 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 분리정제봉독 제조방법의 제공을 목적으로 한다.

[19]

[20] 또한, 본 발명은 정제봉독에 포함된 알러지성분을 한외여과하여 제거함으로써 수율을 높이고, 대량생산이 용이한 분리정제봉독 제조방법의 제공을 목적으로 한다.

[21]

[22] 또한, 본 발명은 본 발명의 분리정제봉독을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리정제봉독 함유 화장품의 제공을 목적으로 한다.

[23]

[24] 그러나 본 발명의 목적은 상기에 언급된 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지

않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[25]

과제 해결 수단

[26]

상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명에 따른 분리정제봉독 제조방법은 정제봉독 분말을 준비하는 제 1단계, 상기 정제봉독 분말을 증류수와 혼합하여 봉독용액을 제조하는 제 2단계, 상기 봉독용액을 컷오프(cut-off) 사이즈가 10kDa(kilo-Dalton)인 한외여과 막(ultrafiltration membrane)으로 여과하여 상기 봉독용액에 포함된 알러지(allergy)성분을 제거하는 제 3단계 및 상기 알러지성분이 제거된 분리정제봉독을 수득하는 제 4단계를 포함하고, 상기 제 2단계에서, 상기 정제봉독 분말과 혼합되는 증류수는 상기 정제봉독 분말 1g 당 1000ml 내지 1500ml이며, 상기 제 3단계에서, 상기 한외여과 막을 통해 제거되는 알러지성분은 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2) 및 히알루로니다제(Hyaluronidase)이며, 상기 제 4단계에서, 수득되는 상기 분리정제봉독은 아파민(apamin)을 4 중량% 이상, 멜리틴(melittin)을 50 중량% 이상 포함하는 것을 특징으로 한다.

[27]

[28]

또한, 본 발명에 따른 분리정제봉독 제조방법은 정제봉독 분말을 준비하는 제 1단계, 상기 정제봉독 분말을 증류수와 혼합하여 봉독용액을 제조하는 제 2단계, 상기 봉독용액을 컷오프 사이즈가 30kDa인 한외여과 막으로 여과하여 상기 봉독용액에 포함된 알러지성분을 제거하는 제 3단계 및 상기 알러지성분이 제거된 분리정제봉독을 수득하는 제 4단계를 포함하고, 상기 제 2단계에서, 상기 정제봉독 분말과 혼합되는 증류수는 상기 정제봉독 분말 1g 당 100ml 내지 200ml이며, 상기 제 3단계에서, 상기 한외여과 막을 통해 제거되는 알러지성분은 히알루로니다제이고, 상기 제 4단계에서, 수득되는 상기 분리정제봉독은 아파민을 2.5 중량% 이상, 멜리틴을 45 중량% 이상, 포스포리파아제 A2를 1 중량% 이하 포함하는 것을 특징으로 한다.

[29]

[30]

또한, 본 발명에 따른 분리정제봉독 함유 화장품은 본 발명의 분리정제봉독을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[31]

발명의 효과

[32]

본 발명의 분리정제봉독 제조방법에 따르면, 강력한 알러지반응을 유도하는 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2)와 히알루로니다제(Hyaluronidase)를 정제봉독으로부터 한외여과하여 제거함으로써, 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 이점이 있다.

[33]

[34] 또한, 본 발명의 분리정제봉독 제조방법에 따르면, 정제봉독을 한외여과하여 강력한 알러지반응을 유도하는 히알루로니다제를 제거하고, 포스포리파아제 A2를 최대한 감축하여 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 이점이 있다.

[35]

[36] 또한, 본 발명의 분리정제봉독 제조방법에 따르면, 정제봉독에 포함된 알러지성분을 한외여과하여 제거함으로써 수율을 높이고, 대량생산이 용이한 이점이 있다.

[37]

[38] 또한, 본 발명의 분리정제봉독 함유 화장품에 따르면, 본 발명의 분리정제봉독 제조방법에 의해 제조된 분리정제봉독을 유효성분으로 포함하여 봉독에 포함된 주름개선효과 및 미백효과를 나타냄과 동시에 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 이점이 있다.

[39]

도면의 간단한 설명

[40] 도 1은 본 발명의 일례에 따른 분리정제봉독 제조방법의 흐름도이다.

[41] 도 2는 본 발명의 다른 예에 따른 분리정제봉독 제조방법의 흐름도이다.

[42] 도 3은 본 발명의 실험예 1에 따른 전기영동 테스트의 결과를 나타내는 이미지이다.

[43] 도 4는 본 발명의 실험예 2에 따른 분리정제봉독의 HPLC(High-performance liquid chromatography) 성분분석 그래프이다.

[44] 도 5는 본 발명의 실험예 3에 따른 분리정제봉독의 주름개선효과 테스트 결과를 나타내는 그래프이다.

[45] 도 6은 본 발명의 실험예 4에 따른 분리정제봉독의 미백효과 테스트 결과를 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[46] 이하, 본 발명의 바람직한 실시 예의 상세한 설명은 첨부된 도면들을 참조하여 설명할 것이다. 하기에서 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다.

[47] 본 발명의 개념에 따른 실시 예는 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있으므로 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 본 명세서 또는 출원에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명의 개념에 따른 실시 예를 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[48] 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "연결되어" 있다거나 "접속되어" 있다고

언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다. 반면에, 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "직접 연결되어" 있다거나 "직접 접속되어" 있다고 언급된 때에는, 중간에 다른 구성요소가 존재하지 않는 것으로 이해되어야 할 것이다. 구성요소들 간의 관계를 설명하는 다른 표현들, 즉 "~사이에"와 "바로 ~사이에" 또는 "~에 이웃하는"과 "~에 직접 이웃하는" 등도 마찬가지로 해석되어야 한다.

- [49] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 실시된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [50] 도 1은 본 발명의 일례에 따른 분리정제봉독 제조방법의 흐름도이다.
- [51] 본 발명의 일례에 따른 분리정제봉독 제조방법은 도 1에 도시된 바와 같이, 먼저 정제봉독 분말을 준비할 수 있다(S11). 이때, 정제봉독 분말로 준비될 봉독은 서양종 꿀벌(*Apis Mellifera*)로부터 채취될 수 있다.
- [52] 여기서, 정제봉독 분말은 종래의 다양한 방법으로 준비될 수 있는데, 구체적으로는 봉독채집장치에 의해 벌로부터 채집된 봉독이 자연건조, 수용정제, 멸균 및 동결 건조의 공정을 통해 정제봉독 분말로 준비될 수 있고, 이렇게 준비된 정제봉독 분말은 벌로부터 채집된 봉독과 생리활성이 유사할 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [53] 다음으로, 정제봉독 분말을 증류수와 혼합하여 봉독용액을 제조한다(S12). 이때, 혼합되는 증류수는 정제봉독 분말 1g 당 1000ml 내지 1500ml인 것이 바람직하다.
- [54] 여기서, 혼합되는 증류수의 양이 1000ml 미만일 경우, 봉독용액의 점도가 증가되고, 이에 따라 후술할 한외여과 막(ultrafiltration membrane)에 대한 봉독용액의 투과성이 낮아져서, 여과 후의 수득률이 낮아질 수 있는 문제점이 있다. 또한, 혼합되는 증류수의 양이 1500ml 초과일 경우, 봉독용액의 여과 및 건조에 필요한 소요시간이 길어지므로 비경제적인 문제가 있다.
- [55] 더불어, 혼합되는 증류수를 정제봉독 분말 1g 당 1000ml 내지 1500ml로 조절할 경우의 분리정제봉독의 수득률은 60% 이상일 수 있다.
- [56] 그리고 봉독용액을 컷오프(cut-off) 사이즈가 10kDa(kilo-Dalton)인 한외여과 막(ultrafiltration membrane)으로 여과하여 봉독용액에 포함된 알러지성분을 제거한다(S13).
- [57] 정제봉독 분말 주요성분의 대략적인 분자량은 다음의 표 2와 같다.
- [58] [표 2]

[59]

분류	성분	분자량
단백질 효소	Phospholipase A2, B	> 13 KDa
	Hyaluronidase	38 KDa
	Phosphatase	50-160 KDa
	α - Glucosidase	51 KDa
펩티드	Melittin	2.8 KDa
	Apamine	2.0 KDa
	MCD peptide	2.6 KDa
	Procamine, Pamine,	0.4 KDa
	Minimine	\leq 6.0 KDa
	Adolapine	11.5 KDa
	Protease inhibitor	9.0 KDa
	Fertiapine,	\leq 3.0 KDa
활성아민 및 아미노산	Histamine	0.12 KDa
	Dopamine	0.15 KDa
	Noradrenalin	0.17 KDa
	Aminobutyric acid,	0.18 KDa
	α -amino acids	

[60] 표 2에 나타난 바와 같이, 강력한 알러지성분으로 알려져 있는 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2) 및 히알루로니다제(Hyaluronidase)의 분자량은 대략적으로 각각 13kDa과 38kDa이다. 이러한 리보솜, 미토콘드리아, 바이러스 등의 생리활성 물질들의 경우, 분자량을 일반적으로 달톤(Dalton)으로 표시하여 대략적인 분자량을 나타내며, 그 분자량으로 크기(size)를 가늠한다.

[61] 따라서 본 발명의 일례에 따른 분리정제봉독 제조방법은 한외여과 막의 컷오프 사이즈를 10kDa으로 설정하여, 그 이상의 크기를 가지는 물질을 통과 못 하도록 하는 방식으로, 봉독용액에 포함된 알러지성분인 포스포리파아제 A2 및 히알루로니다제를 제거할 수 있다. 또한, 여과 시, 봉독용액에 압력을 가하여 여과가 빠르게 진행되도록 함으로써, 여과 소요시간을 단축할 수 있다.

[62] 그 뒤, 알러지성분이 제거된 분리정제봉독을 수득한다(S14). 이때, 수득되는 분리정제봉독은 아파민(apamin)을 4 중량% 이상, 멜리틴(melittin)을 50 중량% 이상 포함할 수 있다.

[63] 도 2는 본 발명의 다른 예에 따른 분리정제봉독 제조방법의 흐름도이다.

[64] 본 발명의 다른 예에 따른 분리정제봉독 제조방법은 도 2에 도시된 바와 같이, 먼저 정제봉독 분말을 준비한다(S21). 이때, 정제봉독 분말은 본 발명의 일례에 따른 정제봉독 분말과 같은 방식으로 준비될 수 있다.

[65] 다음으로, 정제봉독 분말을 증류수와 혼합하여 봉독용액을 제조한다(S22). 여기서, 혼합되는 증류수는 정제봉독 분말 1g 당 100ml 내지 200ml인 것이 바람직하다.

- [66] 그리고 봉독용액을 컷오프 사이즈가 30kDa인 한외여과 막으로 여과하여 봉독용액에 포함된 알러지성분을 제거한다(S23).
- [67] 특히, 혼합되는 증류수의 양이 100ml 미만일 경우, 봉독용액의 점도가 증가되고 이에 따라 한외여과 막의 투과성이 낮아져서, 여과 후의 수득률이 낮아질 수 있는 문제점이 있다. 또한, 혼합되는 증류수의 양이 200ml 초과일 경우, 표 2를 참고하여, 알러지성분인 포스포리파아제 A2의 농도가 희석되고, 한외여과 막에 대한 포스포리파아제 A2의 투과율이 증가되므로 강력한 알러지성분인 포스포리파아제 A2를 최대한 감축할 수 없는 문제가 있다.
- [68] 따라서 본 발명의 다른 예에 따른 분리정제봉독 제조방법은 봉독용액을 제조하기 위해 혼합되는 증류수가 정제봉독 분말 1g 당 100ml 내지 200ml로, 한외여과 막의 컷오프 사이즈를 30kDa으로 설정하여 히알루로니다제를 제거하고, 포스포리파아제 A2를 최대한 감축할 수 있다. 또한, 여과 시, 봉독용액에 압력을 가하여 여과가 빠르게 진행되도록 함으로써, 여과 소요시간을 단축할 수 있다.
- [69] 그 뒤, 알러지성분이 제거된 분리정제봉독을 수득한다(S24). 이때, 수득되는 분리정제봉독은 아파민(apamin)을 2.5 중량% 이상, 멜리틴(melittin)을 45 중량% 이상, 포스포리파아제 A2를 1 중량% 이하 포함할 수 있다.
- [70] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일례에 따른 분리정제봉독 제조방법에 의하면, 강력한 알러지반응을 유도하는 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2)와 히알루로니다제(Hyaluronidase)를 정제봉독으로부터 한외여과하여 제거함으로써, 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 이점이 있다.
- [71] 또한, 본 발명의 다른 예에 따른 분리정제봉독 제조방법에 의하면, 정제봉독을 한외여과하여 강력한 알러지반응을 유도하는 히알루로니다제를 제거하고, 포스포리파아제 A2를 최대한 감축하여 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 분리정제봉독을 제조할 수 있는 이점이 있다.
- [72] 또한, 본 발명의 분리정제봉독 제조방법에 따르면, 정제봉독에 포함된 알러지성분을 한외여과하여 제거함으로써 수율을 높이고, 대량생산이 용이한 이점이 있다.
- [73] 본 발명의 또 다른 예에 따른 분리정제봉독 함유 화장품은 본 발명의 일례 및 다른 예의 분리정제봉독 제조방법에 따라 제조된 분리정제봉독을 유효성분으로 포함한다.
- [74] 상술한 바와 같이, 본 발명의 또 다른 예에 따른 분리정제봉독 함유 화장품은 본 발명의 분리정제봉독 제조방법에 의해 제조된 분리정제봉독을 유효성분으로 포함하여 봉독에 포함된 주름개선효과 및 미백효과를 나타냄과 동시에 알러지반응으로부터 근본적으로 안전한 이점이 있다.
- [75] 아래에서 본 발명에 대해 실시예를 기초로 하여 상세하게 설명한다. 제시된 실시예는 예시적인 것으로 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

[76] <실시예 1>

[77] 1) 정제봉독 분말의 준비

[78] 서양종 꿀벌(*Apis Mellifera*)로부터 봉독(bee venom)을 전기충격방법으로 채집하고, 채집한 봉독을 증류수에 용해시킨 후, 평균 3.0 μm 의 세공이 형성된 거름종이(filter paper)로 여과하여 흙, 먼지 및 화분(花粉) 등을 제거하였다.

[79] 그리고 0.45 μm 내지 0.2 μm 의 세공을 가지는 막 필터(membrane filtration)로 여과하여 불순물 및 균을 제거하였고, 동결 건조하여 정제봉독 분말을 준비하였다.

[80] 2) 알러지성분 분리

[81] 앞서 준비한 정제봉독 분말과 0.2 μm 의 막 필터로 여과한 증류수를 1:1000(g/ml)의 비로 혼합하여 봉독용액을 제조하였다.

[82] 그리고 Millipore series 8400 stirred cell을 이용하여, 컷오프 사이즈가 10kDa인 한외여과 막(Ultracel PL regenerated cellulose, 76 mm)으로 봉독용액을 여과하여 알러지성분을 제거함으로써, 분리정제봉독을 수득하였다. 이때, 0.4 MPa의 압력으로, cell 내의 봉독용액이 약 5 ml 내지 10 ml로 농축될 때까지 여과하였다.

[83] 수득된 분리정제봉독은 동결 건조방법으로 분말형태로 건조되었다.

[84] <실시예 2>

[85] 1) 정제봉독 분말의 준비

[86] 본 발명의 실시예 2에서는 본 발명의 실시예 1에서와 같은 방법으로 정제봉독 분말을 준비하였다.

[87] 2) 알러지성분 분리

[88] 앞서 준비한 정제봉독 분말과 0.2 μm 의 막 필터로 여과한 증류수를 1:100(g/ml)의 비로 혼합하여 봉독용액을 제조하였다.

[89] 그리고 Millipore series 8400 stirred cell을 이용하여, 컷오프 사이즈가 30kDa인 한외여과 막(Ultracel, RC 76 mm)으로 봉독용액을 여과하여 알러지성분을 제거함으로써, 분리정제봉독을 수득하였다. 이때, 0.4 MPa의 압력으로, cell 내의 봉독용액이 약 5 ml 내지 10 ml로 농축될 때까지 여과하였다.

[90] 수득된 분리정제봉독은 동결 건조방법으로 분말형태로 건조되었다.

[91] <실험예 1>

[92] 전기영동 테스트

[93] 18% 또는 20%의 겔(gel) 조성((i) 18%의 겔 조성: 증류수 1.3 ml, 30%

아크릴아미드 믹스(acrylamide mix) 6.0 ml, 1.5 M

Tris-HCl(tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl) (pH8.8) 2.5 ml, 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) 100 μl , 10% 암모늄 퍼설페이트(ammonium persulfate) 100 μl ,

TEMED(tetramethylethylenediamine) 4 μl ; (ii) 20%의 겔 조성: 증류수 700 μl , 30%

아크릴아미드 믹스 6.6 ml, 1.5 M Tris-HCl (pH8.8) 2.5 ml, 10% SDS 100 μl , 10%

암모늄 퍼설페이트(ammonium persulfate) 100 μl , TEMED 4 μl)을 만들고, 유리

플레이트에 약 10 ml정도 분주하였다.

- [94] 평형을 맞춰 separating gel을 굳혔고, 그 뒤, staking gel 조성물 약 5 ml(staking gel 조성물: 증류수 3.4 ml, 30% 아크릴아미드 믹스 830 μ l, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 630 μ l, 10% SDS 50 μ l, 10% 암모늄 퍼설페이트 50 μ l, TEMED 5 μ l)을 분주 후, 겔이 굳기 전에 comb를 끼워 굳혔다. Staking gel이 굳은 다음, comb를 제거하여 SDS page gel을 완성시켰다.
- [95] SDS page로 확인하고자 하는 분획과 샘플 버퍼(Laemmli 2x Concentrate, sigma, S3401)를 1:1 비율로 혼합하였고, 90°C의 water bath에서 5분 동안 증탕시켰다. 그리고 겔의 comb에 마커를 5 μ l, 기준 정제붕독, 실시예 1 및 2에 의한 분리정제붕독, 아파민, 포스포리파아제 A2 및 멜리틴을 각 30 μ l씩 로딩하고, 겔을 SDS page 탱크에 끼워서 running buffer(25 mM Tris, 192 mM 글리신, 0.1% SDS, pH 8.3)를 채웠다.
- [96] SDS page power supply 통하여 staking gel에서 60V로 약 30min동안 running시켰고, separating gel에서 120V로 약 60-90 min동안 running시켰다.
- [97] 시료의 성분은 power supply에서 흘려주는 전류를 따라 겔에서 분자량 별로 분리되었고, coomassie brilliant blue R-250 염료와 destaining solution으로 염색 후 탈색 처리한 결과를 도면 3에 나타내었다.
- [98] 도 3은 본 발명의 실험예에 따른 전기영동 테스트의 결과를 나타내는 이미지이다.
- [99] 도 3에 나타난 바와 같이, 기준 정제붕독, 본 발명의 실시예 1 및 2의 분리정제붕독(10kDa, 30kDa), 아파민(apamin 99.9%, STDA), 포스포리파아제 A2(PLA2 90.7%, STDP) 및 멜리틴(melittin 96%, STDM)이 각 전기영동 테스트에서 나타내는 밴드를 비교하였다.
- [100] 분자량 15-20kDa에 나타나는 포스포리파아제 A2 밴드는 실시예 1의 분리정제붕독에서는 제거됨을 확인할 수 있고, 실시예 2의 분리정제붕독에서는 감축되어 거의 존재하지 않는 것을 확인할 수 있다. 또한, 50kDa에 나타내는 히알루로니다제의 밴드는 본 발명의 실시예 1 및 2의 분리정제붕독에서 모두 제거되었음을 확인할 수 있다.
- [101] <실험예 2>
- [102] HPLC 정량분석
- [103] 실시예 1의 분리정제붕독 및 실시예 2의 분리정제붕독을 각각 1.0 mg/ml의 농도로 만들고, HPLC(High-performance liquid chromatography)장치와 펩티드 분석 전용 컬럼(150 X 4.6 mm 4.0 μ m, 90Å, phenomenex®)을 이용하고, HPLC용 물(0.2% TFA in water)과 acetonitrile(0.22% TFA in ACN)을 용매로 하여 각각 분석하였다.
- [104] 도 4는 본 발명의 실험예 2에 따른 분리정제붕독의 HPLC(High-performance liquid chromatography) 성분분석 그래프이다.
- [105] 실시예 1 및 실시예 2의 분리정제붕독을 각각 HPLC 정량분석한 결과는 도 4에 도시된 바와 같이, 기준 정제붕독과 비교하여 성분분석을 확인할 수 있다.

[106] 보다 구체적으로, 기준 정제봉독에 대한 HPLC 정량분석 결과에 의하면, 아파민(apamin)과 멜리틴(melittin)의 피크(peak)는 각각 10.4 min와 21.3 min에서 나타나고, 포스포리파아제 A2(phospholipase A2, PLA2)의 피크는 16.3 min에 나타남을 확인할 수 있다.

[107] 이러한 피크의 면적으로 함량을 구할 수 있는데, 구체적으로는 다음의 [식 1]과 같다.

[108] [식 1]

$$[109] \text{함량(\%)} = \text{표준물채취량(mg)} \times \frac{\text{표준물순도(\%)}}{100} \times \frac{\text{검액의 피크면적}}{\text{표준물의 피크면적}} \times \frac{100}{\text{검체의 채취량}}$$

[110] 식 1의 검액에 실시예 1의 분리정제봉독과 실시예 2의 분리정제봉독에 해당하는 값을 각각 대입하여 계산한 결과는 다음의 표 3과 같다.

[111] [표 3]

[112]

성분 시료분획	Apamin(%)	PLA2(%)	Melittin(%)
기준 정제봉독	2.4	12.52	58.25
분리정제봉독(실시예 1)	4.05	-	54.5
분리정제봉독(실시예 2)	2.81	≤1.0	46.77

[113] 따라서 실시예 1의 분리정제봉독에서는 표 3에 나타난 바와 같이, PLA2가 없는 것을 알 수 있다. 또한, 실시예 2의 분리정제봉독에서는 PLA2가 1 중량% 이하로 존재하여 최대한 감축되었음을 알 수 있다.

[114] <실험예 3>

[115] 주름개선효과(Elastase inhibitory effect)

[116] 본 발명의 실험예 3에서는 기질인 0.1 mM의 N-succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide 200 μ l에 기준 정제봉독과 실시예 1 및 2의 분리정제봉독을 각각 20 μ l 첨가하고, 또한, 0.1 mg/ml의 Elastase(Porcine pancreas solution) 10 μ l을 첨가하여 25°C에서 10분 동안 반응시킨 후, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) reader로 410 nm에서의 흡광도를 측정하여 Elastase에 대한 저해율(%)을 계산함으로써, 주름개선효과를 확인한다.

[117] 도 5는 본 발명의 실험예 3에 따른 분리정제봉독의 주름개선효과 테스트 결과를 나타내는 그래프이다.

[118] 기준 정제봉독과 실시예 1 및 실시예 2의 분리정제봉독에 대한 주름개선효과를 확인하면, 도 5에 도시된 바와 같이, 실시예 1 및 실시예 2의 분리정제봉독의 주름개선효과가 0.2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml 및 3 mg/ml 각 농도에서 모두 기준 정제봉독보다 우수한 활성도를 나타내는 것을 알 수 있다.

[119] <실험예 4>

- [120] 미백효과(Tyrosinase inhibitory effect)
- [121] 본 발명의 실험에 4에서는 기질액을 46.8 ml 0.1 M PBS(Phosphate buffered saline) (pH6.8)에 21.2 mg tyrosine을 용해하여 만들고, 또한, 기준 정제봉독과 실시예 1 및 2의 분리정제봉독을 각각 증류수와 혼합하여 실험액을 준비하였다.
- [122] 이러한 각 실험액 300 μ l을 기질액 225 μ l과 혼합시키고, tyrosinase 효소(tyrosinase 효소는 210 U/ml(in PBS)로 희석시키고 사용)를 107 μ l 첨가(PBS로 900 μ l까지 채움)하여 37°C로 인큐베이터(incubator)에서 15분간 반응을 시킨 후, microplate reader와 ELISA를 이용하여 480nm에서 흡광도를 측정함으로써, 미백효과를 확인하였다.
- [123] 도 6은 본 발명의 실험에 4에 따른 분리정제봉독의 미백효과 테스트 결과를 나타내는 그래프이다.
- [124] 기준 정제봉독과 실시예 1 및 실시예 2의 분리정제봉독에 대한 미백효과를 확인하면, 도 6에 도시된 바와 같이, 실시예 1 및 실시예 2의 분리정제봉독의 미백효과가 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 8 mg/ml 및 10 mg/ml의 각 농도에서 모두 기준 정제봉독보다 우수한 활성도를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [125] <실험에 5>
- [126] 디스크 확산법(Disc diffusion method)
- [127] 실험균주를 배양한 디스크(disc)에 다양한 농도의 기준 정제봉독, 실험에 1 및 2의 분리정제봉독을 흡수시킨 후 균주가 배양된 고체배지위에 디스펜서(dispenser)로 접종하였다. 16 내지 18시간 배양 후, 균 억제대(inhibition zone)의 크기를 관찰하여 대조군인 기준 정제봉독을 사용했을 경우와 항균여부를 비교한다.
- [128] 본 발명의 실험에 5에 따라 실험에 1 및 2의 분리정제봉독의 항균 효과를 검증하기 위하여, 한국미생물보존센터로부터 지시균(그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* 와 그람 음성균인 *Salmonella typhimurium*) 3종을 분양 받아 사용하였다.
- [129] 구체적으로, 액체 배지에 균을 계대하여 24시간 배양 후, 지시균을 활성화시킨다. 지시균의 수가 660 nm에서 O.D값 0.5 내지 0.7으로 확인되면, 고체배지에 일정한 양을 분주하고 멸균된 삼각 유리봉으로 배지에 도말한다. 지시균을 도말한 배지 위에 페이퍼 디스크(paper disc)를 올려놓고, 기준 정제봉독, 실험에 1 및 2의 분리정제봉독을 농도별로 40 μ l 로딩시킨다.
- [130] 페트리디쉬(petri dish)를 배양기에서 18-24시간 동안 배양하고, 균억제대(clear zone)의 크기를 비교한 결과를 표 4에 나타내었다.
- [131] [표 4]
- [132]

균주	기준 정제봉독	분리정제봉독 (실시에 1)	분리정제봉독 (실시에 2)
S.aureus	10 mm	10 mm	10 mm
S.mutans	13 mm	12 mm	12 mm
S.typhimurium	10 mm	10 mm	10 mm

- [133] (이때, S.aureus는 Staphylococcus aureus이고, S.mutans는 Streptococcus mutans이며, S.typhimurium은 Salmonella typhimurium이다)
- [134] 표 4를 참조하면, 본 발명의 실시예 1 및 2의 분리정제봉독의 유효성분은 기준 정제봉독과 비교하여 동일한 정도의 항균 효과를 나타냄을 확인할 수 있으므로, 본 발명에 따른 분리정제봉독은 알려지 유발을 근본적으로 차단하면서도 유의한 항균 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.
- [135] <실험예 6>
- [136] 최소억제발육 농도검사법- MIC(Minimum Inhibitory Concentration)
- [137] Salmonella typhimurium과 Staphylococcus aureus 균주는 LB(Luria-bertani) broth에서 24시간 배양시키고, Streptococcus epidermidis 균주는 BHI(brain heart infusion) broth에서 24시간 배양시켜 사용하였고, 기준 정제봉독과 실시예 1 및 2의 분리정제봉독은 각각 증류수에 1/2로 희석하여 다양한 농도로 실험액을 준비하였다.
- [138] 균주를 접종하기 전에 650 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 초기농도를 측정하고 튜브에 순수 액체 배지와 각 농도별로 기준 정제봉독과 실시예 1 및 2의 분리정제봉독을 첨가한 후 일정 양의 균주를 접종시켰다.
- [139] 37°C에서 24시간 배양 후, 650nm에서 O.D를 측정하여 순수 액체 배지와 같은 결과를 나타내는 시료의 농도를 최소농도 MIC로 결정하고 균의 저해율을 $[1 - (\text{시료처리균 흡광도} / \text{대조균 흡광도})] \times 100$ 의 계산식으로 계산하여 그 결과를 다음의 표 5에 나타내었다.

[140] [표 5]

[141]

	저해율(%) / MIC($\mu\text{g/mL}$)		
	기준 정제봉독	분리정제봉독 (실시에 1)	분리정제봉독 (실시에 2)
S. typhimurium	99.9%; > 64	99.9%; > 2	99.9%; > 2
S. aureus	99.5%; > 16	74.7%; > 4	99.9%; > 8
S. epidermidis	97.1%; > 64	99.9%; > 8	99.9%; > 4

- [142] (이때, S.typhimurium은 Salmonella typhimurium(S.T)이고, S.aureus는 Staphylococcus aureus(S.A)이며, S.epidermidis는 Staphylococcus epidermidis(S.E)이다)
- [143] 표 5를 참조하면, 본 발명의 실시예 1 및 실시예 2에 따른 분리정제붕독은 기준정제붕독과 비교하여 동일한 정도의 균 저해율을 보임과 동시에, 최소억제발육 농도검사법(MIC)에 대한 효과는 기준 정제붕독보다 더 우수한 결과를 나타냄을 알 수 있다.
- [144] 따라서 본 발명의 실시예 1 및 실시예 2에 따른 분리정제붕독은 알레르기 유발을 차단하면서도 유의한 항균 효과나타냄을 확인할 수 있다.
- [145] 상기 본 발명의 내용은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의해 정해져야 할 것이다.
- 산업상 이용가능성**
- [146] 본 발명의 분리정제붕독은 붕독을 재료로하는 의약, 식품 및 화장품의 산업에 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1]

정제봉독 분말을 준비하는 제 1단계;
 상기 정제봉독 분말을 증류수와 혼합하여 봉독용액을 제조하는 제 2단계;
 상기 봉독용액을 컷오프(cut-off) 사이즈가 10kDa(kilo-Dalton)인 한외여과 막(ultrafiltration membrane)으로 여과하여 상기 봉독용액에 포함된 알러지(allergy)성분을 제거하는 제 3단계; 및
 상기 알러지성분이 제거된 분리정제봉독을 수득하는 제 4단계;를 포함하고,
 상기 제 2단계에서, 상기 정제봉독 분말과 혼합되는 증류수는 상기 정제봉독 분말 1g 당 1000ml 내지 1500ml이며,
 상기 제 3단계에서, 상기 한외여과 막을 통해 제거되는 알러지성분은 포스포리파아제 A2(Phospholipase A2) 및 히알루로니다제(Hyaluronidase)이고,
 상기 제 4단계에서, 수득되는 상기 분리정제봉독은 아파민(apamin)을 4 중량% 이상, 멜리틴(melittin)을 50 중량% 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 분리정제봉독 제조방법.

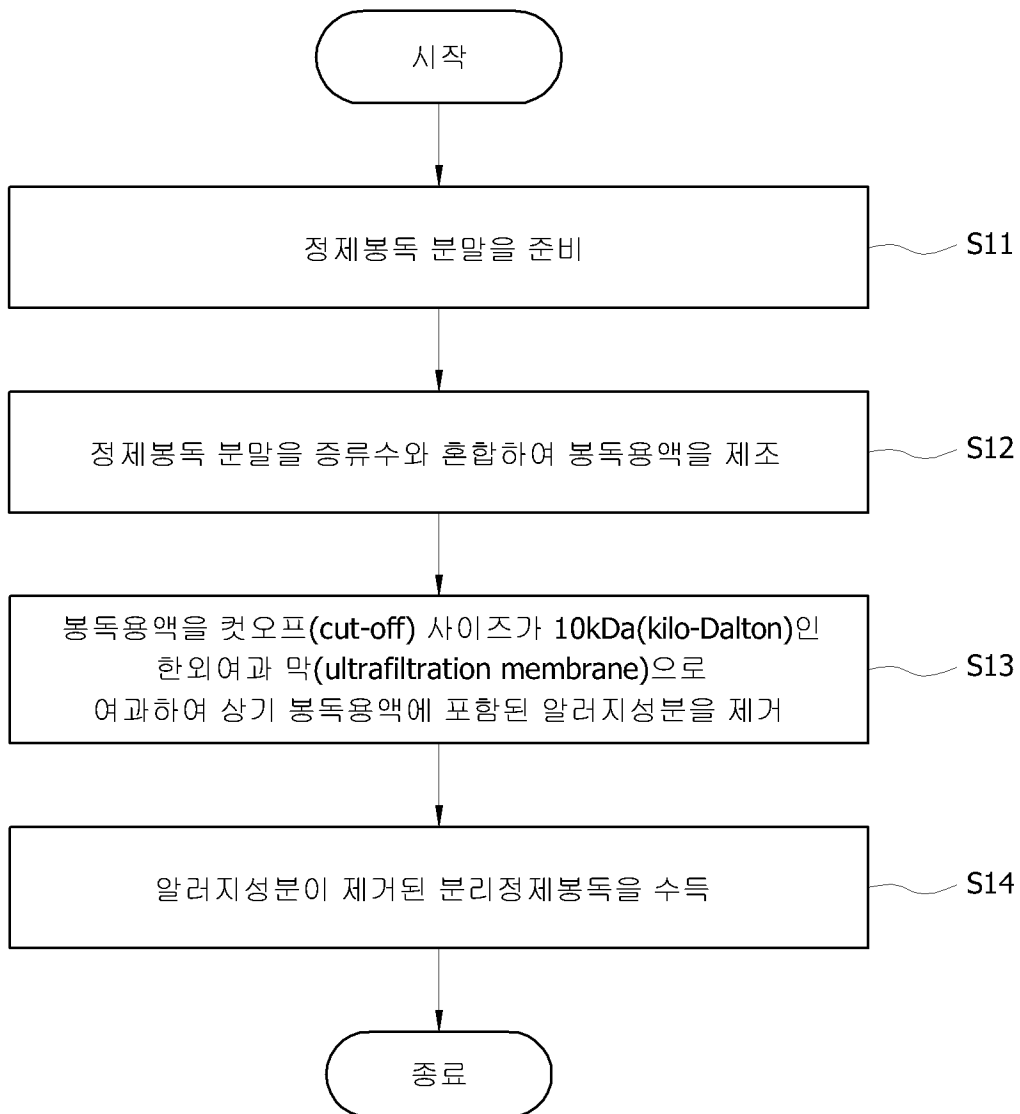
[청구항 2]

정제봉독 분말을 준비하는 제 1단계;
 상기 정제봉독 분말을 증류수와 혼합하여 봉독용액을 제조하는 제 2단계;
 상기 봉독용액을 컷오프 사이즈가 30kDa인 한외여과 막으로 여과하여 상기 봉독용액에 포함된 알러지성분을 제거하는 제 3단계; 및
 상기 알러지성분이 제거된 분리정제봉독을 수득하는 제 4단계;를 포함하고,
 상기 제 2단계에서, 상기 정제봉독 분말과 혼합되는 증류수는 상기 정제봉독 분말 1g 당 100ml 내지 200ml이며,
 상기 제 3단계에서, 상기 한외여과 막을 통해 제거되는 알러지성분은 히알루로니다제이고,
 상기 제 4단계에서, 수득되는 상기 분리정제봉독은 아파민을 2.5 중량% 이상, 멜리틴을 45 중량% 이상, 포스포리파아제 A2를 1 중량% 이하 포함하는 것을 특징으로 하는 분리정제봉독 제조방법.

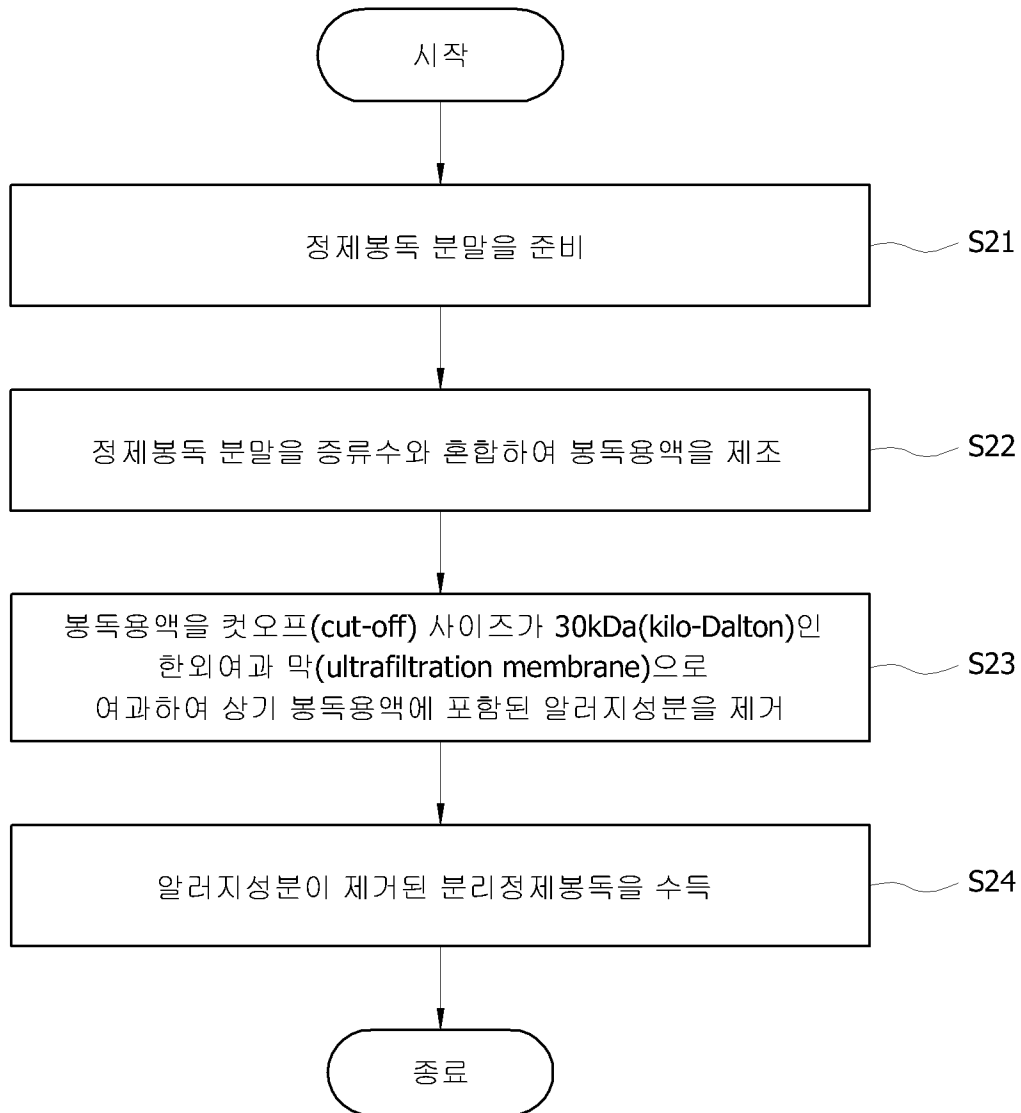
[청구항 3]

제 1항 또는 제 2항의 제조방법에 의해 제조된 분리정제봉독을 유효성분으로 포함하는 분리정제봉독 함유 화장품.

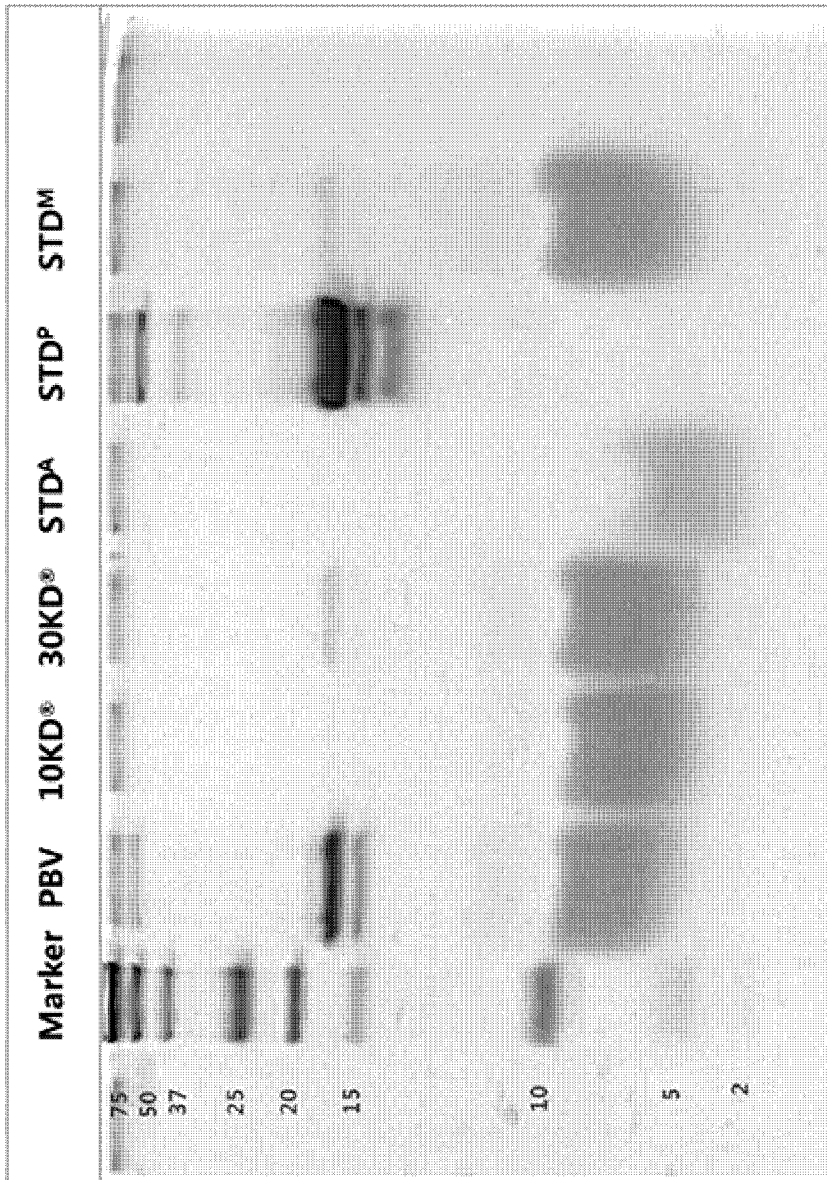
[Fig. 1]



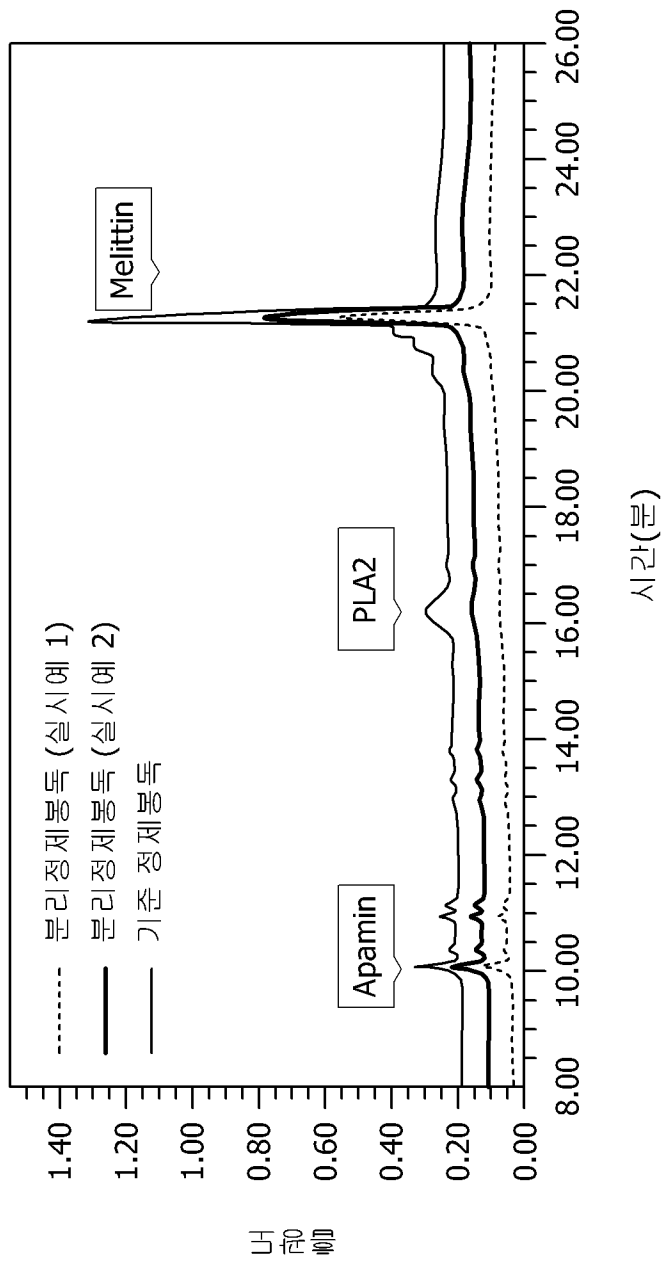
[Fig. 2]



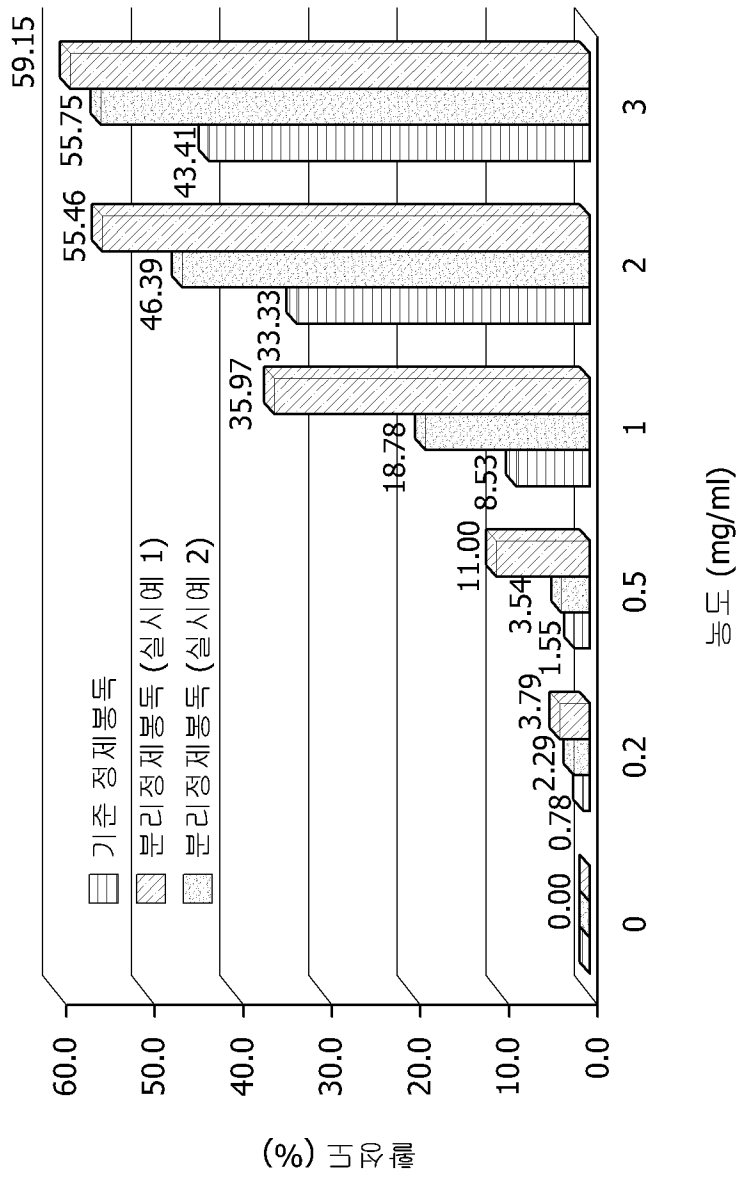
[Fig. 3]



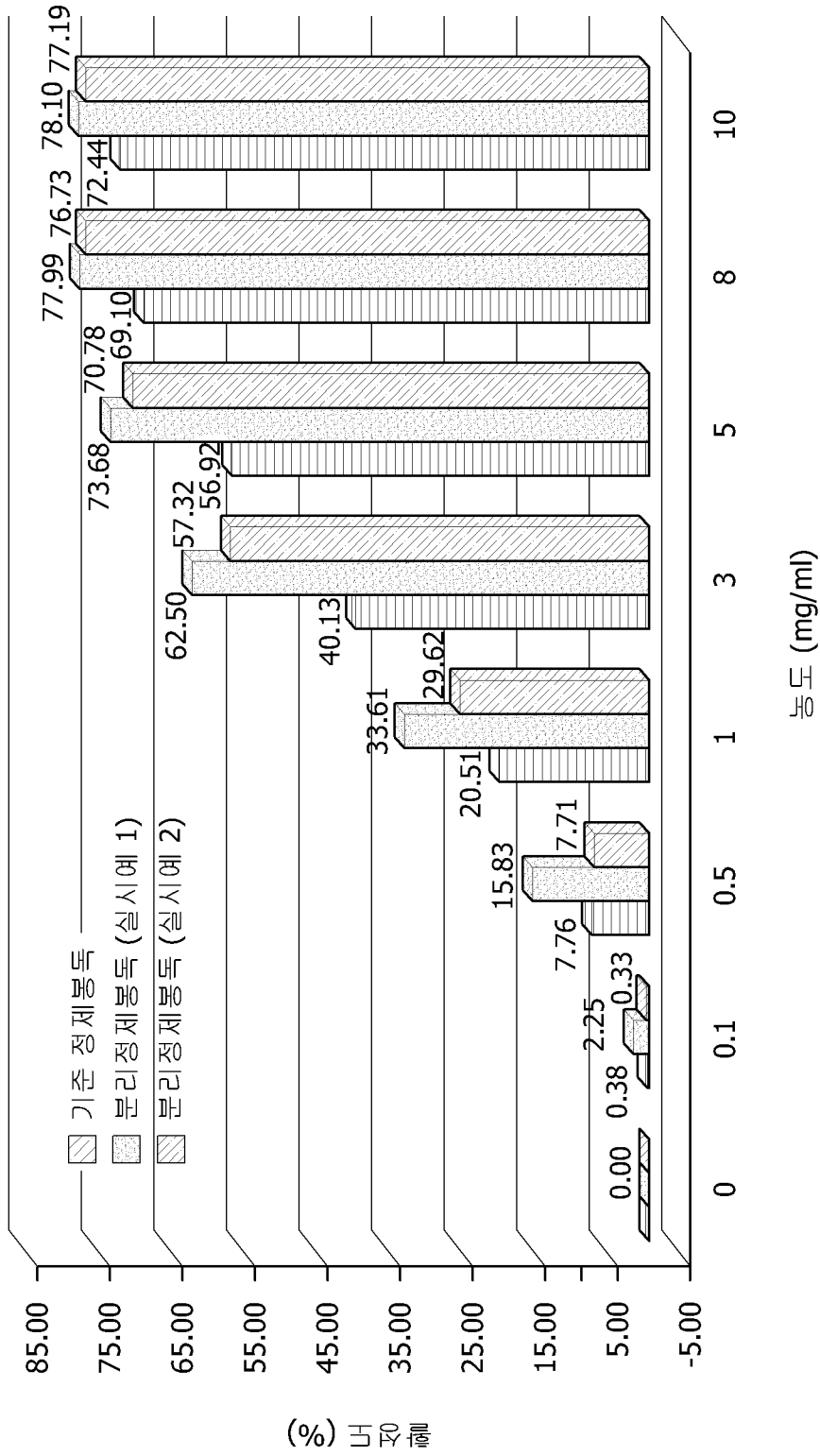
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/005016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 8/98(2006.01)i, A61K 35/64(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 8/98; C12M 1/00; A23J 1/20; A61K 38/36; A61K 38/37; A61Q 19/02; A61K 35/64; A61Q 19/00

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: bee venom, ultrafilter membrane, allergy, phospholipase A2, hyaluronidase, apamine, melittin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0744755 B1 (KWON, Ki Rok et al.) 01 August 2007 See abstract and claim 5.	1-3
A	KR 10-2012-0003178 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 10 January 2012 See abstract and claims 1-5.	1-3
A	KR 10-1994-0003938 B1 (SAMUELSSON ERNST-GUNNAR et al.) 09 May 1994 See claim 1.	1-3
A	KR 10-2005-0057127 A (HAYASHIBARA, Ken) 16 June 2005 See page 2, lines 9-22 and claims 1-4.	1-3
A	KR 10-1127127 B1 (GREEN CROSS CORPORATION) 21 March 2012 See abstract and claims 1-5.	1-3

 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

"I" 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

25 FEBRUARY 2014 (25.02.2014)

Date of mailing of the international search report

27 FEBRUARY 2014 (27.02.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/005016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0744755 B1	01/08/2007	KR 10-0744755 B1 WO 2007-114575 A1	25/07/2007 11/10/2007
KR 10-2012-0003178 A	10/01/2012	WO 2012-002730 A2 WO 2012-002730 A3	05/01/2012 03/05/2012
KR 10-1994-0003938 B1	09/05/1994	EP 0226221 A1 EP 0226221 B1 EP 0250501 A1 EP 0250501 B2 JP 08011039 B2 US 5112812 A WO 87-03785 A1 WO 87-03786 A1	24/06/1987 03/07/1991 07/01/1988 01/06/1994 07/02/1996 12/05/1992 02/07/1987 02/07/1987
KR 10-2005-0057127 A	16/06/2005	BR 0306294 A CN 1688209 A EP 1547472 A1 EP 1547472 A4 JP 04384981 B2 US 2006-0159834 A1 WO 2004-021803 A1	28/09/2004 26/10/2005 29/06/2005 26/04/2006 16/12/2009 20/07/2006 18/03/2004
KR 10-1127127 B1	21/03/2012	WO 2013-062305 A1	02/05/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 8/98(2006.01)i, A61K 35/64(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 8/98; C12M 1/00; A23J 1/20; A61K 38/36; A61K 38/37; A61Q 19/02; A61K 35/64; A61Q 19/00

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: 봉독, 한외여과막, 알리지, 포스포리파아제 A2, 하일루로니다제, 아파민, 멜리틴

C. 관련 문헌

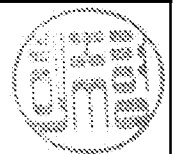
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-0744755 B1 (권기록 외 1명) 2007.08.01. 요약 및 청구항 5 참조.	1-3
A	KR 10-2012-0003178 A ((주)아모레퍼시픽) 2012.01.10. 요약 및 청구항 1-5 참조.	1-3
A	KR 10-1994-0003938 B1 (어언스트-건나아 사무엘슨 외 1명) 1994.05.09. 청구항 1 참조.	1-3
A	KR 10-2005-0057127 A (하야시바라 겐) 2005.06.16. 페이지 2, 라인 9-22 및 청구항 1-4 참조.	1-3
A	KR 10-1127127 B1 (주식회사 녹십자) 2012.03.21. 요약 및 청구항 1-5 참조.	1-3

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 특허문헌
 “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 2014년 02월 25일 (25.02.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 02월 27일 (27.02.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0744755 B1	2007/08/01	KR 10-0744755 B1 WO 2007-114575 A1	2007/07/25 2007/10/11
KR 10-2012-0003178 A	2012/01/10	WO 2012-002730 A2 WO 2012-002730 A3	2012/01/05 2012/05/03
KR 10-1994-0003938 B1	1994/05/09	EP 0226221 A1 EP 0226221 B1 EP 0250501 A1 EP 0250501 B2 JP 08011039 B2 US 5112812 A WO 87-03785 A1 WO 87-03786 A1	1987/06/24 1991/07/03 1988/01/07 1994/06/01 1996/02/07 1992/05/12 1987/07/02 1987/07/02
KR 10-2005-0057127 A	2005/06/16	BR 0306294 A CN 1688209 A EP 1547472 A1 EP 1547472 A4 JP 04384981 B2 US 2006-0159834 A1 WO 2004-021803 A1	2004/09/28 2005/10/26 2005/06/29 2006/04/26 2009/12/16 2006/07/20 2004/03/18
KR 10-1127127 B1	2012/03/21	WO 2013-062305 A1	2013/05/02