(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 5 월 7 일 (07.05.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/064910 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 36/899 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/008654

(22) 국제출원일: 2014 년 9 월 17 일 (17.09.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0129583 2013 년 10 월 29 일 (29.10.2013) KR

(71) 출원인: **경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: **김명옥 (KIM, MyeongOk)**; 660-788 경상남도 진주시 가호로 44 번길 7, 102 동 303 호, Gyeongsangnam-do (KR). **류수노 (RYU, Su Noh)**; 110-791 서울시 종로구 대학로 86 한국방송통신대학교, Seoul (KR).

(74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

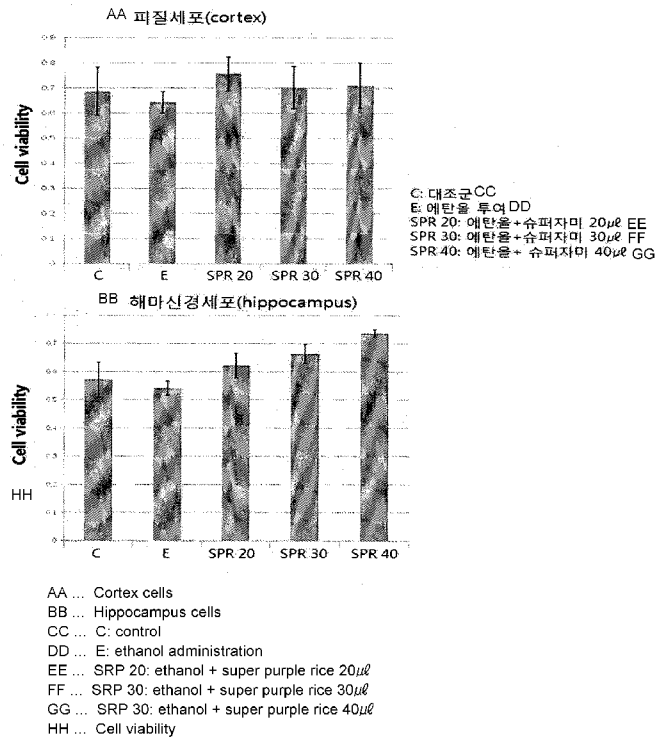
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING, AS ACTIVE INGREDIENT, RICE EXTRACT WITH HIGH CONTENTS OF ANTIOXIDANT POLYPHENOLS FOR PREVENTING AND TREATING DEGENERATIVE BRAIN DISEASES

(54) **발명의 명칭** : 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing, as an active ingredient, a rice extract with high contents of antioxidant polyphenols for preventing and treating degenerative brain diseases. More specifically, extracts of super purple rice, keunnunjamibyeo, and red rice are verified to have high contents of anthocyanin and GABA, which are antioxidative polyphenols, promote protection and differentiation of nerve cells in regression-induced cells and an animal model, and significantly inhibit nerve cell death, and thus the rice extract with high contents of antioxidative polyphenols can be useful as an active ingredient in a pharmaceutical composition for preventing and treating degenerative brain diseases.

(57) **요약서**: 본 발명은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 슈퍼자미(super purple rice), 큰눈자미(keunnunjamibyeo) 및 홍미(red rice) 추출물이 항산화 폴리페놀 성분인 안토시아닌 및 GABA 함량이 높고, 퇴행 유발된 세포 및 동물모델에서 신경세포의 보호 및 분화를 촉진하고, 신경세포사멸을 유의적으로 억제하는 효과를 나타냄을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2015/064910 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

【기술분야】

본 발명은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

쌀은 주로 아시아 국가의 주요 식량자원 중의 하나로서 영양적으로 에너지 공급원으로서 인식되어 왔다. 그러나 최근 쌀의 생리적 효능이 규명되면서, 기능성 쌀 개발에 대한 연구가 활발해지고 있다. 특히 만성질환자가 많은 서구에서는 쌀에 대한 관심이 높아지고 있으며, 미국 암 연구소(NCI)의 Designer Food Program에서는 암 예방 식품 소재 40가지 안에 현미가 선정되기도 하였다(U.S. National Cancer Institute, 1991). 그리고 최근에는 기능성 소재에 대한 관심이 급증하면서 기능성이 부여된 특수미에 대한 관심이 높아지고 있다(Kim et al, 2011). 특수미 중 유색미는 품종이 개량된 고기능성 쌀로서 독특한 향미와 각종 무기질, 비타민 불포화지방산 및 단백질 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 작용과 면역기능을 강화시켜 노화 방지, 특정 질병 예방 등 건강기능성 소재로서의 이용치가 높다(Seo et al., 2008). 유색미의 색소는 적갈색에서 흑자색이 이르는 다양한 안토시아닌 색소이다. 특히, 쌀에 존재하는 안토시아닌은 시아니딘-3-글루코시드(Cyanindin-3-Glucoside) 및 페오니딘-3-글루코시드(Peonidin-3-Glucoside) 등이 많이 보고되고 있다. 유색미의 색소분획은 높은 항산화 활성과 항암 활성, 그리고 염증 발생에 대한 억제 활성 등이 보고되고 있다(Stoclet et al., 2004).

한편, 생명과학 및 의학의 급속한 발전으로 인간의 평균 수명이 늘어나며, 장노년 인구의 비중이 점차 늘어남에 따라 새로운 사회적 문제들이 부각되고 있다. 특히 노인성 신경계 질환들, 특히, 뇌졸증 (stroke), 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD)은 치명적인 신경계의 기능장애로 나타나는데, 이를 막을 수 있는 효과적인 방법이 없는 현 실정에서는 삶의 질저하 및 막대한 의료비의 지출 등으로 주변 가족에게 상당한 정신적인 부담을 주고 있다.

알츠하이머 병의 경우 60세 이상의 노인 중 2%에서 나타나고 있으며 이로 인해 미개발 국가로의 의료기술이 확산되고 있으나 노년인구의 증가로 2025년에는 약 2003 만명의 환자가 발생할 것으로 예상되고 있다(http://www.alz.co.uk/). 뇌졸중의 경우 2025 년에 약 1500 만명의 환자가 발생할 것으로 추정된다. 미국의 경우 1997년에 400 만명의 AD 환자와 300 만명의 뇌졸중 환자가 보고되어 약 $1,300억이 소요되었는데, 이를 토대로 추정해 보면 상기 두 질환으로 인한 의료경비는 2003년에 약 $4,000억 (520조원)이 필요하다. 국내에서도 장노년층에서 발생하는 뇌질환이 사망의 주 원인이 되는데, 국가 경제 및 의학의 발전과 함께 더욱 심각한 경제적 문제로 대두될 것은 명확하다.

뇌신경 질환인 알츠하이머 질환(Alzheimer's Disease: 이하 "AD"라 칭함)은 점진적인 신경세포의 퇴화로 인해 인지능력 상실을 가져오는 치매의 50에서 70%를 차지하는 가장 일반적인 질병이다. AD는 뇌에 존재하는 판단, 기억, 언어기능을 담당하는 부분에 손상이 생겨서 기억력이 없어지고, 의식의 불분명해지며, 사고력, 계산력, 판단력, 상식 등의 대뇌기능이 장애를 나타내기 때문에 직업 및 일상 사회생활을 하기 어려워지게 된다.

AD로 사망한 환자의 두뇌에서는 노인성 플라그(senile plaque)와 신경원섬유의 엉킴(neurofibrillary tangles)이 병리학적 특성으로 나타난다. 노인성 플라그는 세포 외부에 단백질과 죽은 세포 등이 축적되어 형성되는 것으로, 주 구성 성분은 β-아밀로이드(β-amyloid)라는 펩티드이다. 그리고

응집체의 주요 구성 요소는 타우(Tau)라 부르는 단백질의 한 형태이다. 타우 단백질은 중추신경계에서 서로 붙어서 신경세포의 내부구조를 단단하게 하는 구조물 역할을 한다. 하지만, 치매 환자의 뇌에서는 이런 타우 단백질이 화학적으로 변성을 일으키고 마치 실타래기에 얽히듯이 서로 얽혀서 제 역할을 못하게 된다. 이로 인해 타우 단백질은 서로 떨어져 신경세포 사이의 연결을 떨어뜨리게 되고 결국 신경세포는 죽게 된다.

현재까지 AD에 관한 연구는, 주로 β-아밀로이드 생성 억제제 또는 항산화제 같은 신경세포 독성 저해제들을 이용한 AD 예방 및 치료제가 개발되었다. 현재 니코틴 수용체 작용제(Nicotin receptor agonist)인 ABT-418; 무스카린 수용체 작용제(Muscarin receptor agonist)인 자노멜린(Xanomeline), YM-976; 아세틸콜린 전구체인 레시틴(Lecithin), 아세틸-L-카니틴(Acetyl-L-carnitine); 금속 킬레이터(Metal chelator)인 데스페리옥사민(Desferrioxamine), 리오퀴놀(Lioquinol); 베타-시트 차단제(Beta-sheet breaker)인 iAβ5, iAβ11; 항산화제(Antioxidant)인 비타민 E(Vitamine E), 은행잎추출물(Ginkgo Biloba), 멜라토닌(Melatonin), 아이디비논(Idebenone); sAPP 방출제(releasing agent)인 니코틴(Nicotine), 아세틸콜린(Acetylcholine), 카바콜(Cabachol); β 세크레타제 또는 γ 세크레타제 억제제(inhibitor)인 OM99-1, OM99-2, OM99-3, Z-VLL-CHO; 항염증제(Anti inflammary agent)인 NSAID(Iburofen, Indomethacine); 호르몬(Horemone)인 에스트로겐(Estrogen); 백신인 AN-1792; 콜레스테롤(Cholesterol) 저하제인 심바스타틴(Simvastatin), 아트로바스타틴(Atrovastatin) 등이 개발되고 있으나, 아직 효과가 약간의 병리적 증상을 완화 또는 진행 정도를 늦추는 정도로만 있거나, 자체의 독성 때문에 실제 적용이 어려운 물질이 대부분이어서 안정적이며 효과적인 AD 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

이에 본 발명자들은 안정적이며 효과적인 뇌질환 치료 물질을 찾기 위해 노력한 결과, 슈퍼자미(super purple rice), 큰눈자미(keunnunjamibyeo) 및

홍미(red rice) 추출물이 항산화 폴리페놀인 안토시아닌 및 GABA 함량이 높고, 퇴행 유발된 세포 및 동물모델에서 신경세포의 보호 및 분화를 촉진하고, 신경세포사멸을 유의적으로 억제하는 효과를 나타냄을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

또한, 유효한 양의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환 치료 방법을 제공한다.

또한, 유효한 양의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환 예방 방법을 제공한다.

또한, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 제공한다.

아울러, 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강 식품의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명은 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 슈퍼자미(super purple rice), 큰눈자미(keunnunjamibyeo) 및 홍미(red rice) 추출물이 항산화 폴리페놀인 안토시아닌 및 GABA 함량이 높고, 퇴행 유발된 세포 및 동물모델에서 신경세포의 보호 및 분화를 촉진하고, 신경세포사멸을 유의적으로 억제하는 효과를 나타내므로, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물의 GABA 함량을 나타낸 도이다.

도 2는 퇴행된 사람 신경세포에서 항산화 폴리페놀 고함유 쌀인 슈퍼자미(super purple rice), 큰눈자미(keunnunjamibyeo) 및 홍미(red rice) 추출물의 신경보호 효과를 나타낸 도이다:

C: 대조군;

E: 에탄올을 처리한 신경세포군;

E + 20 ㎕: 에탄올을 포함한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 20 ㎕를 처리한 신경세포군;

E + 30 ㎕: 에탄올을 포함한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 30 ㎕를 처리한 신경세포군; 및

E + 40 ㎕: 에탄올을 포함한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 40 ㎕를 처리한 신경세포군.

도 3은 퇴행된 사람 신경세포에서 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물의 신경세포사멸 억제 효과를 나타낸 도이다:

1: 대조군;

2: 에탄올을 처리한 신경세포군;

3: 에탄올을 포함한 큰눈자미 추출물을 처리한 신경세포군;

4: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 추출물을 처리한 신경세포군; 및

5: 에탄올을 포함한 홍미 추출물을 처리한 신경세포군.

도 4는 퇴행된 사람 신경세포에서 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물의 혼합물의 신경세포사멸 억제 효과를 나타낸 도이다:

1: 대조군;

2: 에탄올을 처리한 신경세포군;

3: 에탄올을 포함한 큰눈자미 및 슈퍼자미 추출물의 혼합물을 처리한 신경세포군;

4: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 및 홍미 추출물의 혼합물을 처리한 신경세포군; 및

5: 에탄올을 포함한 홍미 및 큰눈자미 추출물의 혼합물을 처리한 신경세포군.

도 5는 태아 랫트의 피질세포(cortex) 및 해마 신경세포(hipoccampus)에서 슈퍼자미 추출물의 신경 보호 효과를 나타낸 도이다:

C: 대조군;

E: 에탄올을 처리한 세포군;

SPR 20: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 추출물 20 ㎕를 처리한 세포군;

SPR 30: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 추출물 30 ㎕를 처리한 세포군; 및

SPR 40: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 추출물 40 ㎕를 처리한 세포군.

도 6은 태아 랫트의 피질세포에서 슈퍼자미 추출물의 세포사멸 억제 효과를 나타낸 도이다:

1: 대조군;

2: 에탄올을 처리한 태아 랫트의 피질세포군;

3: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 400 ㎕를 처리한 피질세포군;

4: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 600 ㎕를 처리한 피질세포군; 및

5: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 800 ㎕를 처리한 피질세포군.

도 7은 태아 랫트의 해마 신경세포에서 슈퍼자미 추출물의 세포사멸 억제 효과를 나타낸 도이다:

1: 대조군;

2: 에탄올을 처리한 태아 랫트의 해마 신경세포군;

3: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 400 ㎕를 처리한 태아 랫트의 해마 신경세포군;

4: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 600 ㎕를 처리한 태아 랫트의 해마 신경세포군; 및

5: 에탄올을 포함한 슈퍼자미 800 ㎕를 처리한 태아 랫트의 해마 신경세포군.

도 8은 퇴행성 뇌질환 랫트에서 슈퍼자미 및 큰눈자미 추출물에 의한 세포사멸 관련 단백질 발현 억제 효과를 나타낸 도이다:

C: 대조군;

E: 에탄올을 투여한 군;

Su1: 슈퍼자미 1:1 군;

Su2: 슈퍼자미 1:5 군;

Bi1: 큰눈자미 1:1 군; 및

Bi2: 큰눈자미 1:5 군.

도 9는 치매유발 랫트에서 슈퍼자미 추출물에 의한 세포사멸 억제 효과를 나타낸 도이다:

대조군: 정상 랫트군;

β-아밀로이드(β-amyloid): 치매유발 랫트군; 및

β-아밀로이드+슈퍼자미 추출물: 슈퍼자미 추출물 투여한 치매유발 랫트군.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 쌀은 슈퍼자미(super purple rice), 큰눈자미(keunnunjamibyeo) 및 홍미(red rice)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 유효성분인 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

1) 항산화 폴리페놀 고함유 쌀에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

3) 단계 2)의 여과물을 감압 농축하는 단계; 및

4) 단계 3)의 농축물을 건조하는 단계.

본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 1)의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀은 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한없이 사용할 수 있다. 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀은 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhelt 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 분량의 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출 온도는 20℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며, 20℃ 내지 50℃인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한 추출시간은 1 내지 48시간이 바람직하며, 2 내지 10시간이 더욱 바람직하고, 2 내지 5시간이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러

추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 조성물은 신경세포 사멸을 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미에서 각각 슈퍼자미 에탄올 추출물, 큰눈자미 에탄올 추출물 및 홍미 에탄올 추출물을 제조하고 HPLC 분석을 수행한 결과, 상기 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물에서 항산화 폴리페놀 성분인 안토시아닌 및 GABA 함량이 높음을 확인하였다(도 1 참조).

또한, 본 발명자들은 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경세포 독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 에탄올을 처리한 퇴행된 사람 HT22 세포주에 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 처리하고 MTT 분석을 수행한 결과, 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 처리한 세포군의 세포 생존 능력이 증가하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물이 에탄올성 중독 및 신경퇴행을 억제하여 신경세포 보호 및 분화를 촉진함을 확인하였다(도 2 참조).

또한, 본 발명자들은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 에탄올을 처리한 퇴행된 사람 HT22 세포주에 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 단독 처리, 또는 큰눈자미 및 슈퍼자미, 슈퍼자미 및 홍미, 및 홍미 및 큰눈자미를 동시

처리하고 annexin-V/PI 염색법을 수행한 결과, 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물 단독 처리 세포군, 및 큰눈자미 및 슈퍼자미, 슈퍼자미 및 홍미 동시 처리 세포군에서 세포 사멸이 현저하게 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경 퇴행으로부터 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과가 있음을 확인하였다(도 3 및 도 4 참조).

또한, 본 발명자들은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 퇴행성 뇌질환 랫트의 신경세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 에탄올을 투여한 임신한 랫트의 태아 뇌 피질세포(cortex) 및 해마세포(hipoccampus)에 슈퍼자미 추출물을 처리하고 MTT 분석 및 annexin-V/PI 염색법을 수행한 결과, 슈퍼자미 추출물 처리한 태아 뇌 피질세포군 및 해마세포군의 생존 능력이 증가하고, 세포사멸이 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경세포 파괴 및 신경세포사멸을 억제함을 확인하였다(도 5 내지 도 7 참조).

또한, 본 발명자들은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 퇴행성 뇌질환 랫트에서 신경세포사멸 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 퇴행성 뇌질환 랫트에 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 경구투여 후, 뇌 조직 용해물을 수득하여 웨스턴 블럿팅(western blotting)을 수행한 결과, 슈퍼자미 및 큰눈자미 투여 퇴행성 뇌질한 랫트군에서 Bax 및 Cyt-C 단백질 발현 감소, 및 Bcl-2 단백질 발현 증가를 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 신경세포의 사멸을 억제하여 신경퇴행을 완화함을 확인하였다(도 8 참조).

또한, 본 발명자들은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 치매유발 랫트의 신경세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 치매유발 랫트에 슈퍼자미 추출물을 경구투여 후, 뇌의 해마를 이용해 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색을 수행한 결과, 슈퍼자미 추출물을 투여한 치매유발 랫트 뇌의 해마에서 신경세포사멸이 억제되는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 치매 진행을 완화함을 확인하였다(도 9 참조).

따라서, 본 발명의 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물은 항산화 폴리페놀 성분인 안토시아닌 및 GABA 함량이 높고, 퇴행 유발된 세포 및 동물모델에서 신경세포의 보호 및 분화를 촉진하고, 신경세포사멸을 유의적으로 억제하는 효과를 나타내므로, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

상기 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 혼합생약재에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

상기 쌀은 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 조성물은 신경세포 사멸을 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물은 항산화 폴리페놀 성분인 안토시아닌 및 GABA 함량이 높고, 퇴행 유발된 세포 및 동물모델에서 신경세포의 보호 및 분화를 촉진하고, 신경세포사멸을 유의적으로 억제하는 효과를 나타내므로, 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물의

유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 건강식품은 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스켓, 떡, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

본 발명에 따른 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다.

상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(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 본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환 예방 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 제공한다.

아울러, 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강 식품의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 제공한다.

이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물 제조

<1-1> 쌀 추출물 제조

슈퍼자미(super purple rice)(국립종자원 등록번호 제 01-0001-270호), 큰눈자미(keunnunjamibyeo)(국립종자원 등록번호 제 01-0001-268호) 및 홍미(red rice)를 건조 후 곱게 마쇄하였다. 2.4 kg의 상기 쌀 조말을 80% 에탄올(DUKSAN, Korea) 60 ℓ로 20 분 동안 초음파처리(sonication)하여 2회 추출한 후 감압 농축하여 각각 슈퍼자미 에탄올 추출물, 큰눈자미 에탄올 추출물 및 홍미 에탄올 추출물을 제조하였다.

<1-2> HPLC를 이용한 쌀 추출물 성분 확인

상기 실시예 <1-1>에서 제조한 쌀 추출물의 성분을 확인하기 위하여, HPLC 분석을 수행하여 안토시아닌 및 GABA의 함량을 정량하였다.

그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 일반 흰쌀에 비해 슈퍼자미 및 홍미에서 기능성 물질인 안토시아닌 및 GABA 함량이 현저히 높은 것을 확인하였다(도 1).

<실시예 2> 실험동물 준비

<2-1> 퇴행성 뇌질환 랫트의 제조

수컷(n=40) 스프래그-돌리(Sprague-Dawley) 랫트(350 내지 380 g 몸무게, 경상대, 신경생물학 실험실)는 온도-통제 환경 6 시에서부터 20 시까지 사료와 함께 광선하에 적응시켰다. 상기 랫트는 10% 에탄올(처리군, n=30) 또는 식염수(대조군, n=10)를 구강으로 8 주 동안 투여하여 퇴행성 뇌질환 랫트를 제작하였다.

<2-2> 치매동물모델의 제조

수컷(n=40) 스프래그-돌리(Sprague-Dawley) 랫트(350 내지 380 g 몸무게, 경상대, 신경생물학 실험실)는 온도-통제 환경 6 시에서부터 20 시까지 사료와

함께 광선하에 적응시켰다. 상기 랫트는 β-아밀로이드(β-amyloid) 또는 식염수(대조군, n=10)를 주입하여 치매유발 랫트를 제작하였다.

<2-3> 임신한 17.5일에 태아 랫트의 뇌로부터 피질(cortex) 세포 및 해마(hippocampus) 신경세포 분리 및 배양

암컷(n=40) 스프래그-돌리(Sprague-Dawley) 랫트(350 내지 380 g 몸무게, 경상대, 신경생물학 실험실)는 온도-통제 환경 6시에서부터 20 시까지 사료와 함께 광선하에 적응시켰다. 임신한 랫트는 10% 에탄올(처리군, n=30) 또는 식염수(대조군, n=10)를 구강으로 섭취하였다. 시간에 맞춰 임신한(임신 0.5일과 같은 수정한 날) 랫트는 임신 17.5일에 희생시키고 태아의 두개골을 해부하여 페니실린/스트랩토마이신(penicillin/streptomycin)을 포함한 미리 데운(pre-warmed) L-15 배지(Sigma, Saint Louis, USA)로 2 번 세척하고, 상기 두개골에서 뇌를 적출하였다.

적출한 뇌는 2 번 세척하고 뇌척수막을 벗겨냈다. 해마(hippocampus) 및 피질(cortex)은 분리하여 코니칼 튜브(conical tube)에 옮겨 담고, L-15 배지를 첨가한 후, 파이펫(pipette)을 이용해 분쇄하였다. 상기 분쇄된 피질은 1200 rpm, 3 분 동안 원심분리한 후, 세포가 포함되어 있는 상층액은 새로운 코니칼 튜브에 옮겨 담고, 덩어리(pellet)는 새로운 L-15 배지를 첨가하여 상기 과정을 2 번 반복하였다. 최종 상층액을 1400 rpm, 5 분 동안 원심분리하여 덩어리를 획득하고, 획득한 덩어리는 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS), 1 mM L-글루타민(L-glutamine), 1 mM 피루부산나트륨(sodium pyruvate), 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 혼합하여 세포배양 디쉬(dish)로 옮겨 해마 신경세포 및 피질세포를 배양하여 분리하였다.

<실시예 3> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 신경세포에 미치는 영향

<3-1> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 처리한 신경세포에서 신경보호 효과 확인

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경세포 독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 퇴행된 사람 HT22 세포주를 이용하여 MTT 분석을 수행하였다.

구체적으로, 96 웰 플레이트에 10^5 세포/100 ㎕의 퇴행된 사람 HT22 세포로 배양하고 100 mM 에탄올을 24 시간 전 처리한 후, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 농도별로 하루 동안 처리하였다. 이후, 웰에 15 ㎕의 염색용액(dye solution, 3-[4,5-dimethyl thiaxol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide: MTT)을 첨가하여 37℃, CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위하여 100 ㎕씩의 정지용액(stop solution)을 각 웰에 첨가하고 다시 1시간 동안 37℃에 방치한 후 상기 웰 플레이트를 ELISA 판독기(reader)에 옮겨 570 nm에서 OD 값을 측정하였다.

그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 처리한 세포군은 에탄올만 처리한 세포군에 비해 세포 생존능이 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올성 중독 및 신경퇴행을 억제하여 신경세포 보호 및 분화를 촉진함을 확인하였다(도 2).

<3-2> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 처리한 신경세포에서 세포사멸 억제 효과 확인

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 퇴행된 사람 HT22 세포주를 이용하여 annexin-V/PI 염색법을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HT22 세포주에 100 mM 에탄올을 전 처리한 후, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 처리하고 annexin-V/PI 염색법을 수행하였다(도 3). 또한, 상기와 같이 에탄올을 전 처리한 후, 큰눈자미 및 슈퍼자미, 슈퍼자미 및 홍미,

및 홍미 및 큰눈자미를 동시에 처리하고 annexin-V/PI 염색법을 수행하였다(도 4). 상기 염색법은 이론상으로 세포가 죽을 때 세포막에 존재하고 있는 phosphatidic serin(PS)이 외부로 뒤집어져 돌출되는 것을 이용하여 PS과 annexin-V가 결합되는 것을 이용한 방법이다. PI의 경우에는 핵에 결합되는 물질인데 세포가 심하게 죽으면 세포막에 구멍이 생기고 핵이 외부에 노출되어 PI가 결합하게 되는 것이다. annexin-V/PI는 세포의 사멸상태를 상세하게 확인할 수 있다.

그 결과, 도 3 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 에탄올을 처리한 세포군의 세포사멸이 증가하는 반면, 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미 추출물을 단독 처리한 세포군, 큰눈자미 및 슈퍼자미를 동시에 처리한 세포군 및 슈퍼자미 및 홍미를 동시에 처리한 세포군의 세포사멸이 현저하게 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 및 쌀 추출물의 혼합물이 에탄올에 의한 신경세포사멸을 억제함을 확인하였다(도 3 및 도 4). 따라서 상기 <실시예 3>의 결과들을 통해 상기 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경 퇴행으로부터 신경세포를 보호하고 신경세포의 사멸을 억제함을 확인하였다.

<실시예 4> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 퇴행성 뇌질환 랫트에 미치는 영향

<4-1> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 처리한 퇴행성 뇌질환 랫트에서 신경보호 효과 확인

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 퇴행성 뇌질환 랫트의 신경세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 에탄올을 투여한 임신한 랫트의 태아 뇌세포를 이용하여 MTT 분석을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-3>에 기재된 방법으로 획득한 태아 피질세포 및 해마 신경세포에 상기 실시예 <3-1>과 같이 슈퍼자미 추출물을 농도별로 하루 동안 처리하고 MTT 분석을 수행하였다.

그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 슈퍼자미 추출물을 처리한

피질세포군 및 해마 신경세포군 모두 에탄올만 처리한 세포군에 비해 세포 생존능이 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올에 의한 신경세포 파괴를 완화하는 것을 확인하였다(도 5).

<4-2> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 처리한 퇴행성 뇌질환 랫트에서 신경세포사멸 억제 효과 확인

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 퇴행성 뇌질환 랫트의 신경세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 에탄올을 투여한 임신한 랫트의 태아 뇌세포를 이용하여 annexin-V/PI 염색법을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <4-1>과 같이 태아 피질세포(도 6) 및 해마 신경세포(도 7)에 슈퍼자미 추출물을 농도별로 처리하고, 상기 실시예 <3-2>와 같이 annexin-V/PI 염색법을 수행하였다.

그 결과, 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 에탄올을 투여한 임신한 랫트의 태아 피질세포군 및 해마 신경세포군의 세포사멸이 증가하는 반면, 슈퍼자미 추출물을 처리한 피질세포군 및 해마 신경세포군 모두 세포사멸이 현저하게 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 퇴행성 뇌질환에 의한 신경세포사멸을 억제함을 확인하였다(도 6 및 도 7).

<4-3> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 처리한 퇴행성 뇌질환 랫트에서 세포사멸 관련 단백질 발현 억제 효과 확인

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 신경세포사멸 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 퇴행성 뇌질환 모델을 이용하여 웨스턴 블럿팅(western blotting)을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에 기재된 방법으로 획득한 퇴행성 뇌질환 랫트에 슈퍼자미 1:1 및 1:5 또는 큰눈자미 1:1 및 1:5로 8 주 동안 경구투여한 후, 상기 랫트를 희생시키고 뇌를 적출하여 뇌조직 용해물(lysate)을 수득하였다. 상기 수득한 뇌조직 용해물에 단백질의 농도는

BCA 단백질 분석 키트(Protein Assay Kit)(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 측정하였다. 30 내지 60 ㎍의 단백질 시료를 12% SDS-PAGE 겔(gel)을 이용하여 분리한 후, Immobilon-P Transfer Membrane(Millipore Corporation, Billerica, MA)으로 전달시켰다. 5% 탈지분유(skim milk)로 30분간 블라킹(blocking)한 후, 각 인자의 일차 항체를 4℃에서 하루 동안 처리하였다. 상기 막에 붙은 일차 항체(primary antibody)에 HRP가 접합된 이차 항체(HRP-conjugated secondary antibody)를 붙이고, 이를 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore Corporation)을 이용하여 확인하였다. 일차 항체로 Bax, Bcl-2, Cyt-C 및 β-actin를 사용하였다.

그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 슈퍼자미를 처리한 군 및 큰눈자미를 투여한 군에서 Bax 및 Cyt-C 단백질의 발현이 감소하고, Bcl-2 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 신경세포의 사멸을 억제하여 신경 퇴행을 완화함을 확인하였다(도 8). 따라서 상기 <실시예 4>의 결과들을 통해 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 에탄올성 중독 및 신경 퇴행으로부터 신경세포를 보호하고 신경세포의 사멸을 억제함을 확인하였다.

<실시예 5> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 투여한 치매유발 랫트에서 세포사멸 억제 효과 확인

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 치매유발 랫트의 신경세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 투여한 치매유발 랫트의 뇌 조직을 이용해 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에 기재된 방법으로 제조된 치매유발 랫트에 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 슈퍼자미 에탄올 추출물을 구강으로 투여한 후, 뇌조직을 적출하였다. 상기 적출한 뇌의 해마를 이용해 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색하여 현미경으로 관찰하고

촬영하였다.

그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 치매유발 랫트 뇌의 해마에 비해 슈퍼자미 추출물을 투여한 치매유발 랫트 뇌의 해마에서 신경세포 사멸이 억제되는 것을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물이 신경세포 사멸을 억제하여 β-아밀로이드 단백질 축적으로 인한 치매 진행을 완화하는 것을 확인하였다(도 9).

하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

<제조예 1> 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조

<1-1> 산제의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물	2 g
유당	1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

<1-2> 정제의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물	100 mg
옥수수전분	100 mg
유 당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<1-3> 캡슐제의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물	100 mg
옥수수전분	100 mg
유 당	100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<1-4> 환의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물	1 g
유당	1.5 g
글리세린	1.0 g
자일리톨	0.5 g

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

<1-5> 과립의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 성분 고함유 쌀 추출물	150 mg
대두 추출물	50 mg
포도당	200 mg
전분	600 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

<제조예 2> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강식품의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

<2-1> 밀가루 식품의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를

제조하였다.

<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물의 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

<2-4> 유제품(dairy products)의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물의 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<2-5> 선식의 제조

현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 누에 체액을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

본 발명의 누에 체액(3 중량부),

영지(0.5 중량부),

지황(0.5 중량부)

<제조예 3> 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강음료의 제조

<3-1> 건강음료의 제조

액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

<3-2> 야채 주스의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

<3-3> 과일 주스의 제조

본 발명의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

【산업상 이용가능성】

상술한 바와 같이, 본 발명은 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 슈퍼자미(super purple rice), 큰눈자미(keunnunjamibyeo) 및 홍미(red rice) 추출물이 항산화 폴리페놀 성분인 안토시아닌 및 GABA 함량이 높고, 퇴행 유발된 세포 및 동물모델에서 신경세포의 보호 및 분화를 촉진하고. 신경세포사멸을 유의적으로 억제하는 효과를 나타냄을 확인함으로써, 상기 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 쌀은 슈퍼자미(super purple rice), 큰눈자미(keunnunjamibyeo) 및 홍미(red rice)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_2 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 6】

항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성

뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 쌀은 슈퍼자미, 큰눈자미 및 홍미로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물.

【청구항 8】

제 6항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물.

【청구항 9】

제 6항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물.

【청구항 10】

유효한 양의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환 치료 방법.

【청구항 11】

유효한 양의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환 예방 방법.

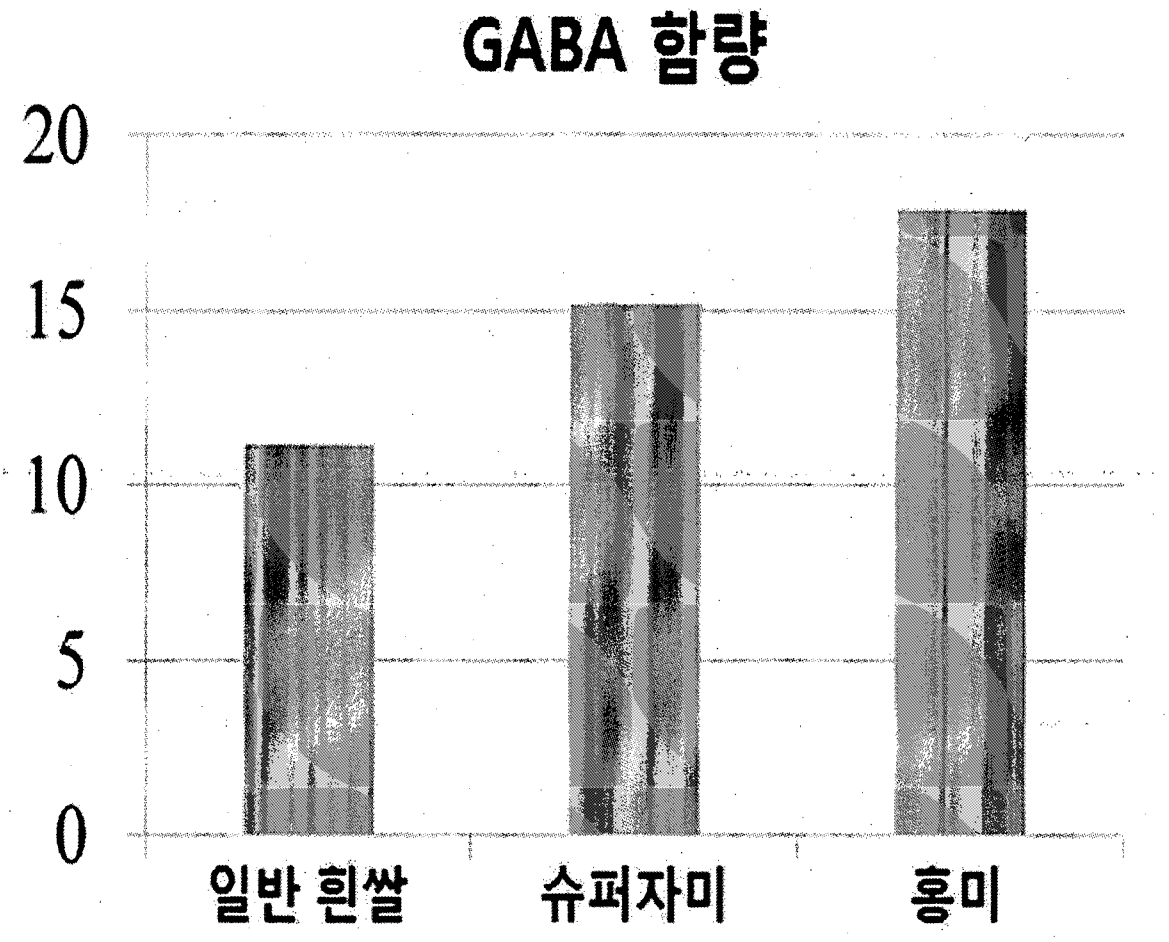
【청구항 12】

퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물.

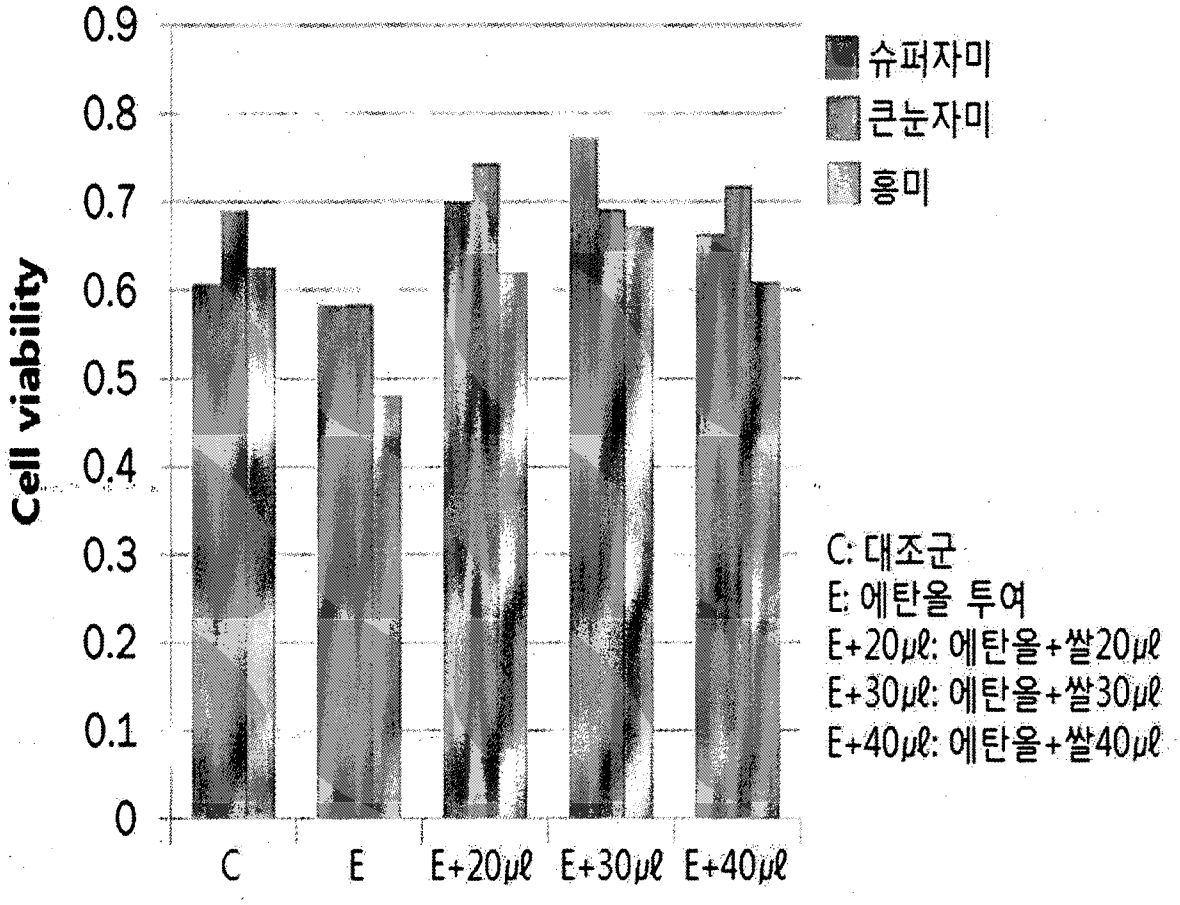
【청구항 13】

퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강 식품의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물.

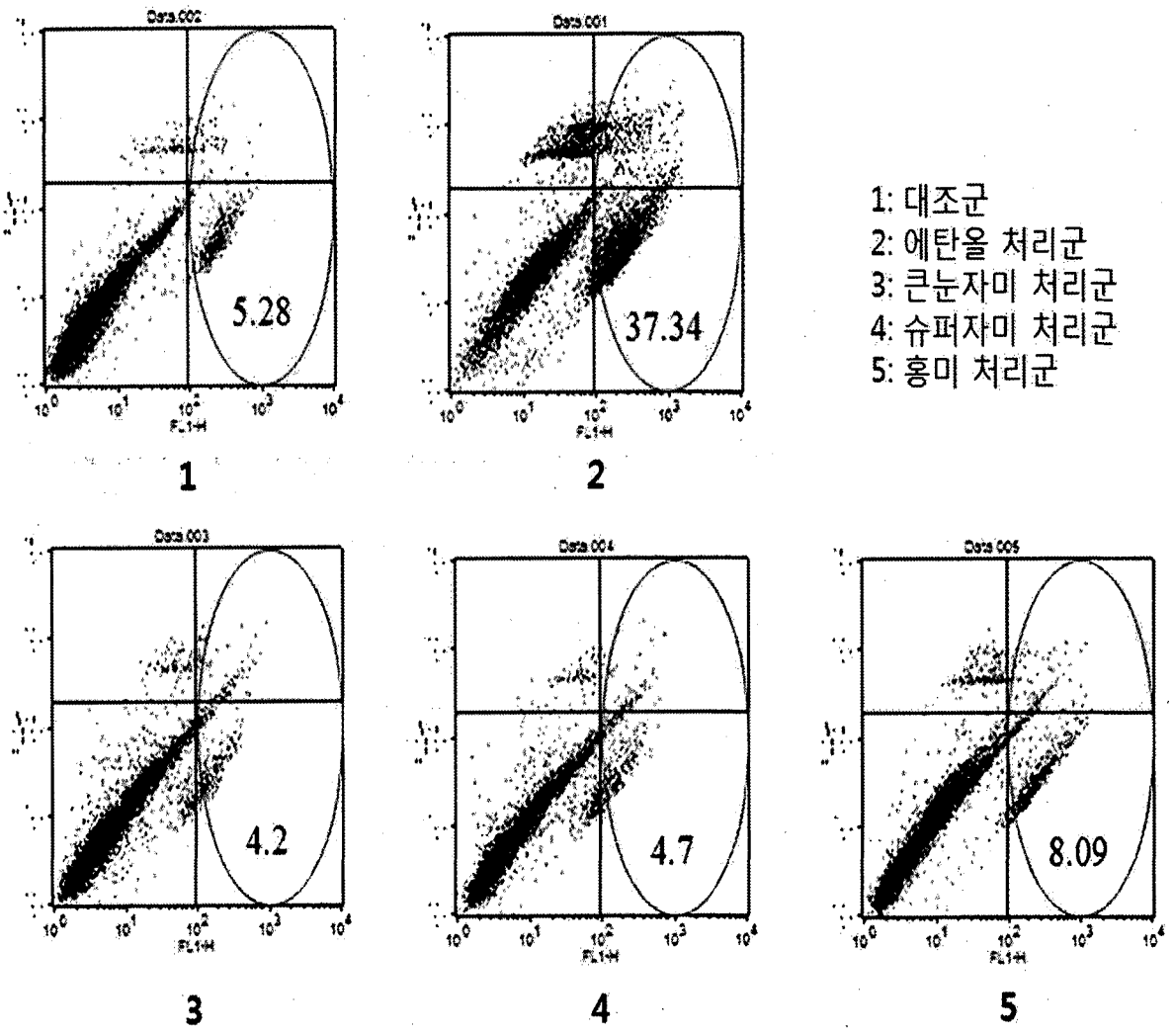
[도 1]



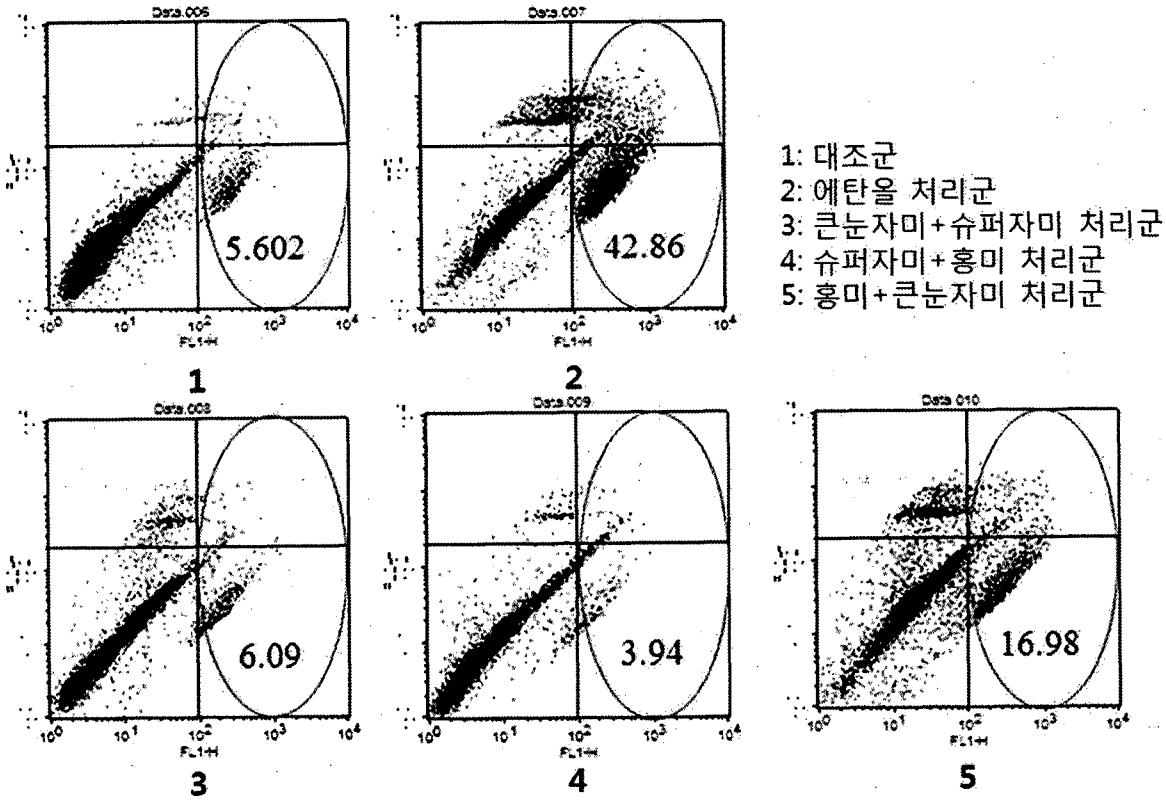
[도 2]


0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Cell viability
C
E
E+20μℓ
E+30μℓ
E+40μℓ
슈퍼자미
큰눈자미
홍미
C: 대조군
E: 에탄올 투여
E+20μℓ: 에탄올+쌀20μℓ
E+30μℓ: 에탄올+쌀30μℓ
E+40μℓ: 에탄올+쌀40μℓ

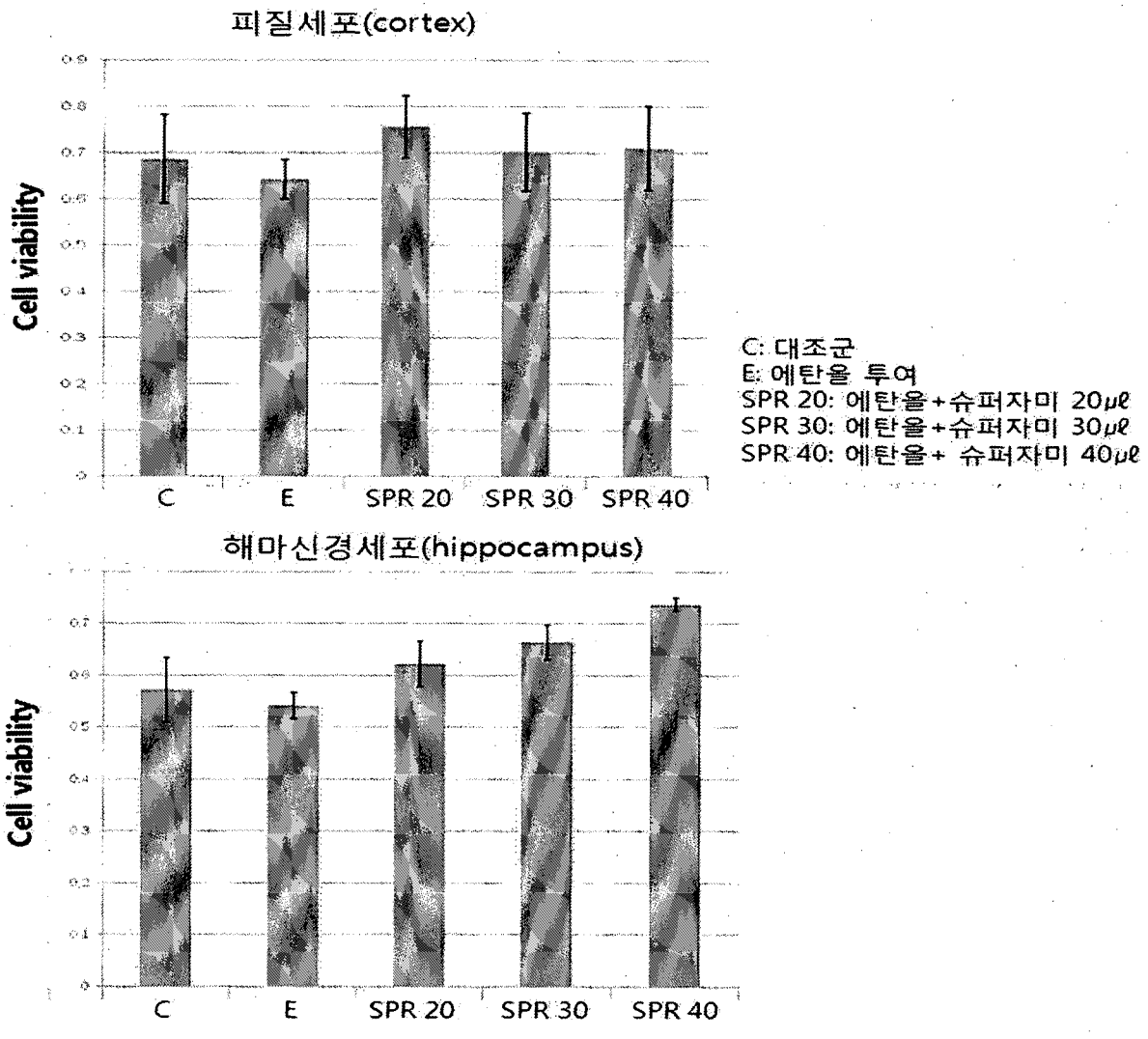
[도 3]


Data 002
5.28
Data 001
37.34
1: 대조군
2: 에탄올 처리군
3: 큰눈자미 처리군
4: 슈퍼자미 처리군
5: 홍미 처리군
1
2
Data 003
4.2
Data 004
4.7
Data 005
8.09
3
4
5

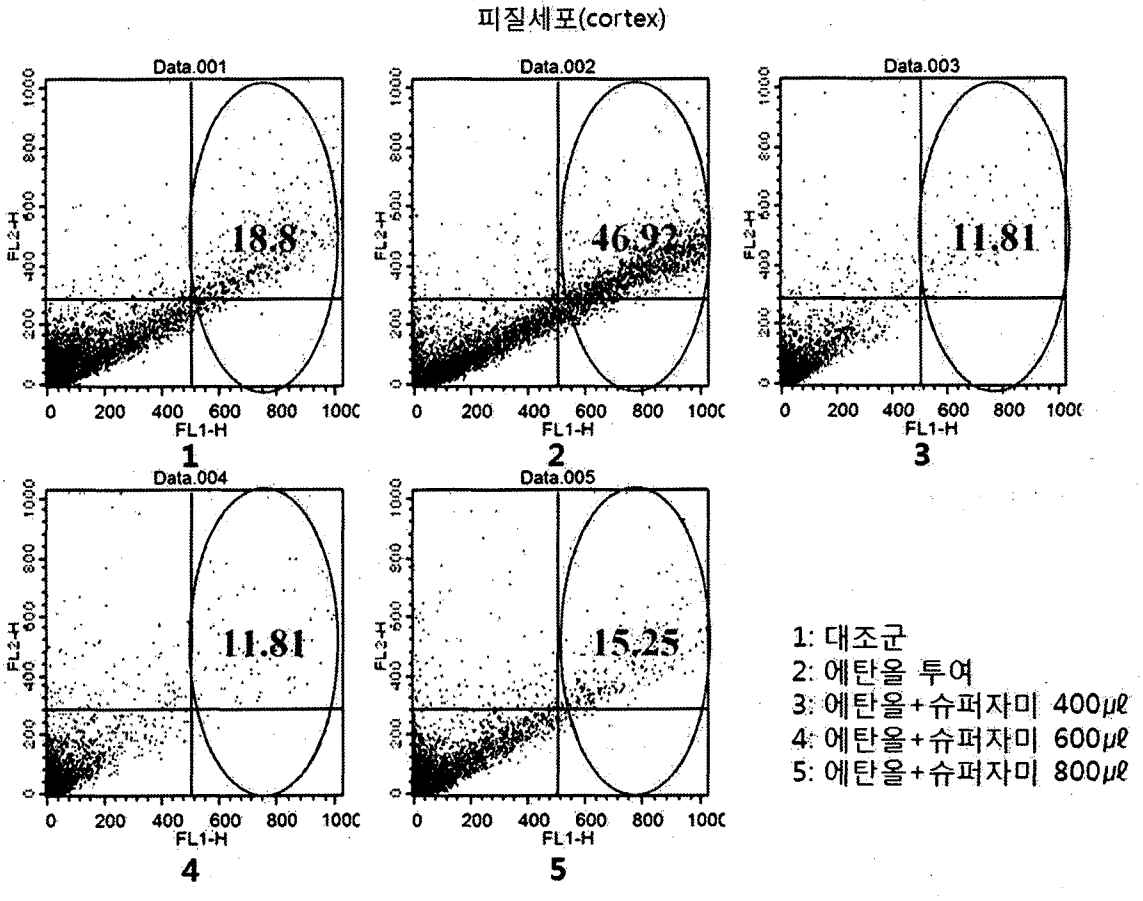
[도 4]


Data.006
5.602
FL1-H
1
Data.007
42.86
FL1-H
2
Data.008
6.09
FL1-H
3
Data.009
3.94
FL1-H
4
Data.010
16.98
FL1-H
5
1: 대조군
2: 에탄올 처리군
3: 큰눈자미+슈퍼자미 처리군
4: 슈퍼자미+홍미 처리군
5: 홍미+큰눈자미 처리군

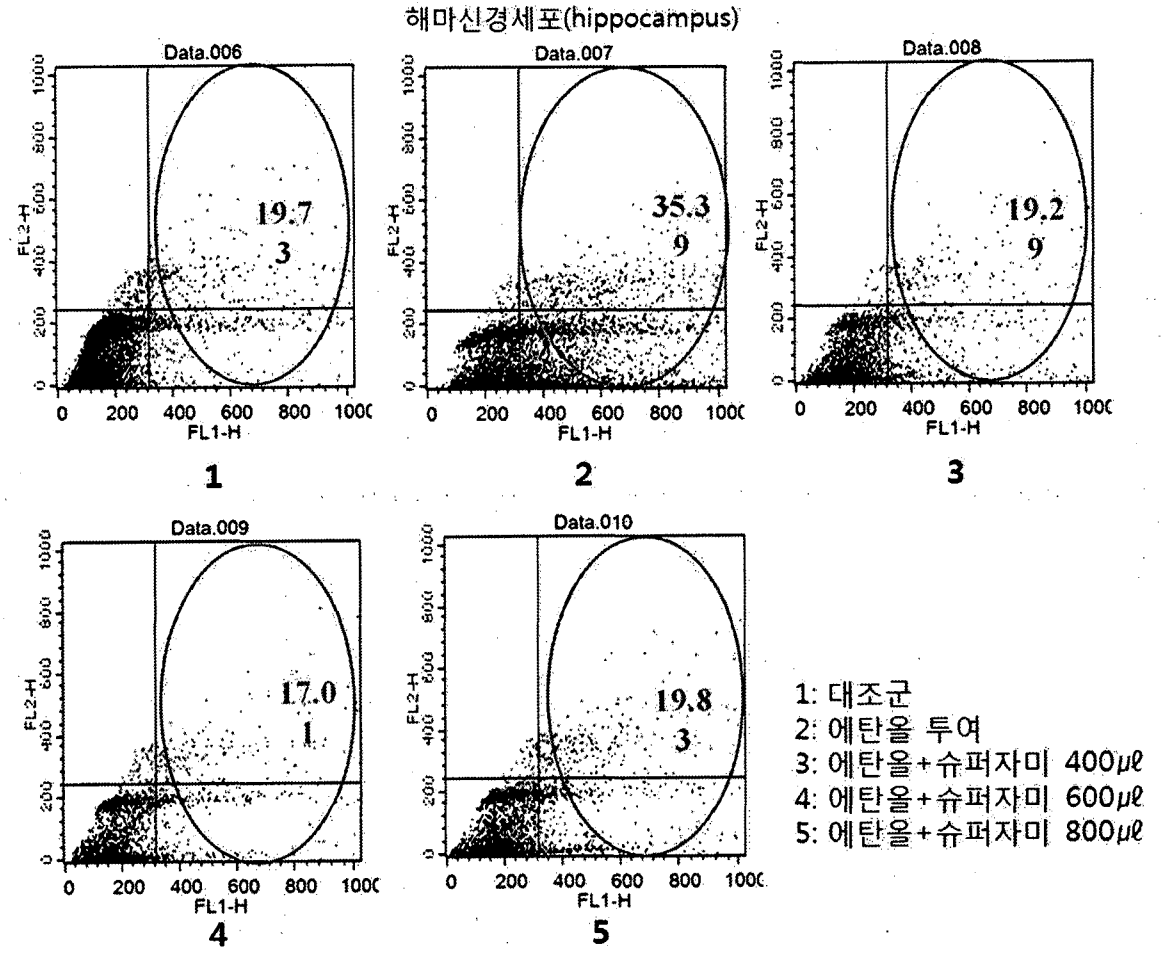
[도 5]


피질세포(cortex)
Cell viability
C
E
SPR 20
SPR 30
SPR 40
C: 대조군
E: 에탄올 투여
SPR 20: 에탄올+슈퍼자미 20μℓ
SPR 30: 에탄올+슈퍼자미 30μℓ
SPR 40: 에탄올+ 슈퍼자미 40μℓ
해마신경세포(hippocampus)
Cell viability
C
E
SPR 20
SPR 30
SPR 40

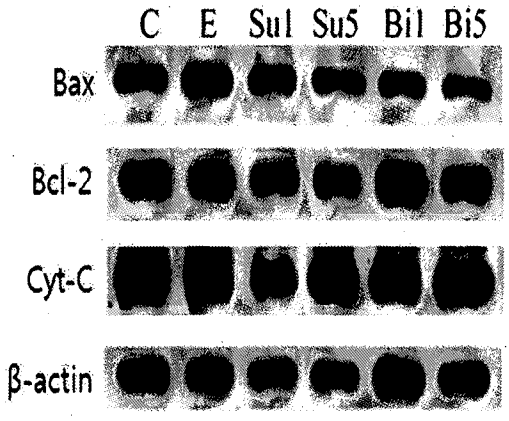
[도 6]


피질세포(cortex)
Data.001
18.8
1
Data.002
46.92
2
Data.003
11.81
3
Data.004
11.81
4
Data.005
15.25
5
FL2-H
FL1-H
1: 대조군
2: 에탄올 투여
3: 에탄올+슈퍼자미 400㎕
4: 에탄올+슈퍼자미 600㎕
5: 에탄올+슈퍼자미 800㎕

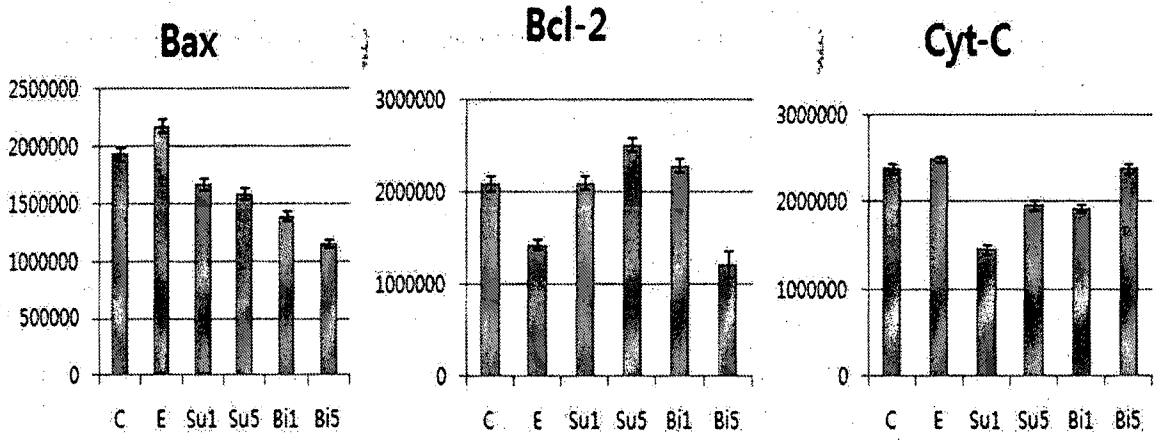
[도 7]


해마신경세포(hippocampus)
Data.006
19.7
3
FL2-H
FL1-H
1
Data.007
35.3
9
2
Data.008
19.2
9
3
Data.009
17.0
1
4
Data.010
19.8
3
5
1: 대조군
2: 에탄올 투여
3: 에탄올+슈퍼자미 400㎕
4: 에탄올+슈퍼자미 600㎕
5: 에탄올+슈퍼자미 800㎕

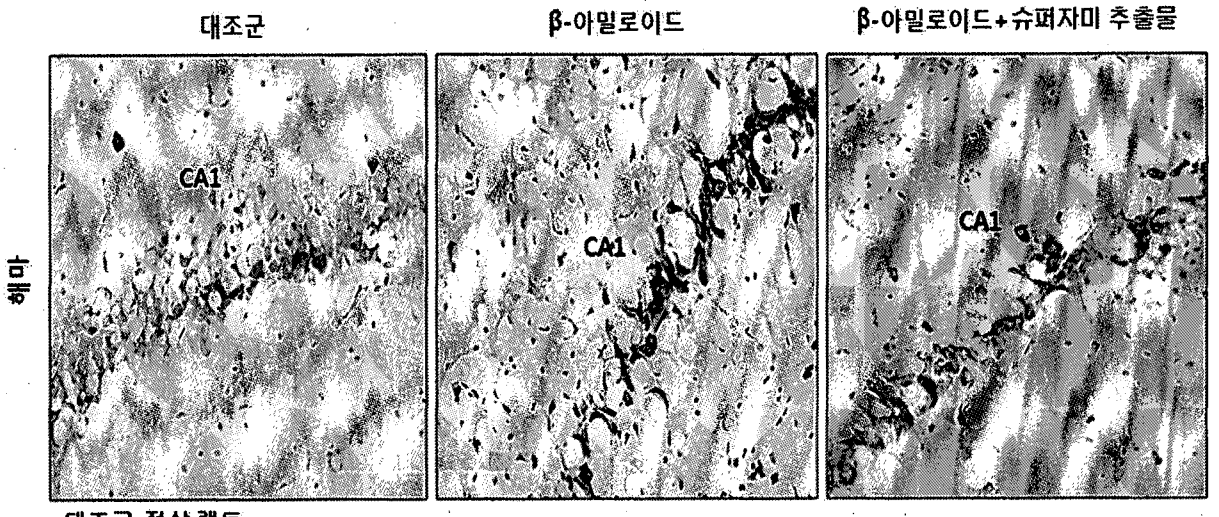
[도 8]



C : 대조군
E : 에탄올 처리
Su1 : 슈퍼자미 1:1
Su2 : 슈퍼자미 1:5
Bi1 : 큰눈자미 1:1
Bi2 : 큰눈자미 1:5



[도 9]



대조군: 정상 랫트

β-아밀로이드: 치매유발 랫트군

β-아밀로이드+슈퍼자미 추출물: 슈퍼자미 추출물 투여한 치매유발 랫트군

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/008654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/899(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/00(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 36/899; A23L 1/182; A23L 1/29; A61P 25/28; A61P 25/00

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: antioxidant, polyphenol, anthocyanin, GABA, rice extract, super purple rise, keunnunjamibyeo, methanol, ethanol, degenerative brain diseases, dementia, stroke

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RYU, Su - Noh, "Quality Characteristics of Colored Rice Variety, 'Keunnunjamibyeo'", Journal of the Korean Society of International Agricultue, 2012, vol. 24, no. 2, pp. 207-211. See abstract; and pages 207-210.	1-9
X		12,13
Y	DREISEITEL, A. et al., "Berry anthocyanins and their aglycons inhibit monoamine oxidases A and B", Pharmacological Research, 2009, vol. 59, pp. 306-311 See abstract; and pages 306 and 310.	1-9
A	US 2010-0221366 A1 (PAN, T.-M.) 02 September 2010 See abstract; paragraphs [0003]-[0018] and [0044]-[0073]; and claims 1-20.	1-9,12,13
A	SUTHARUT, J. et al., "Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice", International Food Research Journal, 2012, vol. 19, no. 1, pp. 215-221. See abstract; and pages 215-220.	1-9,12,13
A	KR 10-2012-0097814 A (LEE, Kyung Jin) 05 September 2012 See abstract; paragraphs [0013]-[0038]; and claims 1-4.	1-9,12,13

☐ 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	Date of mailing of the international search report
18 DECEMBER 2014 (18.12.2014)	**19 DECEMBER 2014 (19.12.2014)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/008654

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.: **10, 11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10 and 11 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain 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
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/008654

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0221366 A1	02/09/2010	US 2009-0162456 A1	25/06/2009
		US 2010-0221239 A1	02/09/2010
		US 8097259 B2	17/01/2012
KR 10-2012-0097814 A	05/09/2012	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/008654

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/899(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/899; A23L 1/182; A23L 1/29; A61P 25/28; A61P 25/00

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: 항산화, 폴리페놀, 안토시아닌, GABA, 쌀 추출물, 슈퍼자미, 큰눈자미, 메탄올, 에탄올, 퇴행성 뇌질환, 치매, 뇌졸중

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	류수노, '큰눈자미벼의 품질특성', 한국국제농업개발학회지, 2012년, 24권, 2호, 페이지 207-211. 요약; 및 페이지 207-210 참조.	1-9
X		12,13
Y	DREISEITEL, A. 외, `Berry anthocyanins and their aglycons inhibit monoamine oxidases A and B`, Pharmacological Research, 2009, 59권, 페이지 306-311 요약; 및 페이지 306 및 310 참조.	1-9
A	US 2010-0221366 A1 (PAN, T.-M.) 2010.09.02 요약; 단락 [0003]-[0018] 및 [0044]-[0073]; 및 청구항 1-20 참조.	1-9,12,13
A	SUTHARUT, J. 외 1명, 'Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice', International Food Research Journal, 2012년, 19권, 1호, 페이지 215-221. 요약; 및 페이지 215-220 참조.	1-9,12,13
A	KR 10-2012-0097814 A (이경진) 2012.09.05 요약; 단락 [0013]-[0038]; 및 청구항 1-4 참조.	1-9,12,13

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2014년 12월 18일 (18.12.2014)	2014년 12월 19일 (19.12.2014)

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

심사관
최승희
전화번호 +82-42-481-8740

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/008654

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: 10, 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제10항 및 제11항은 사람의 치료방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 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 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/008654

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0221366 A1	2010/09/02	US 2009-0162456 A1 US 2010-0221239 A1 US 8097259 B2	2009/06/25 2010/09/02 2012/01/17
KR 10-2012-0097814 A	2012/09/05	없음	