

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2015년 7월 30일 (30.07.2015)



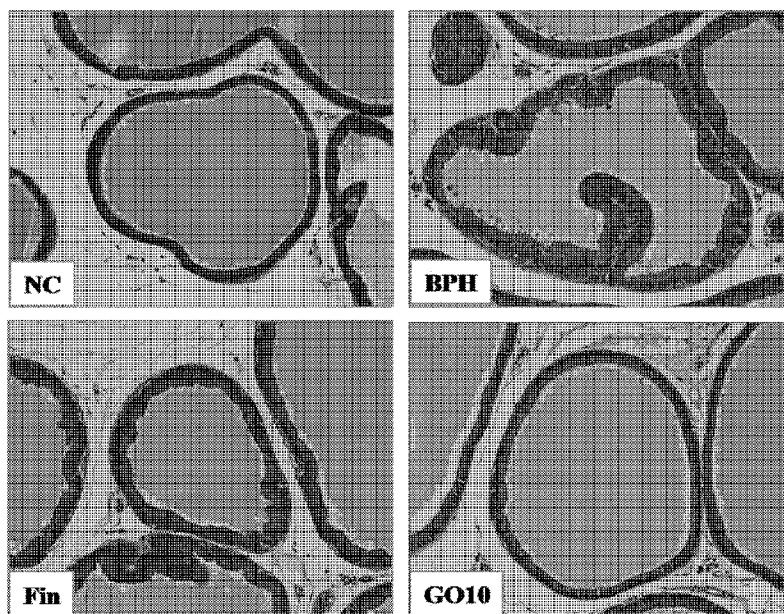
(10) 국제공개번호  
WO 2015/111832 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 36/75* (2006.01) *A61P 13/08* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/011097
- (22) 국제출원일: 2014년 11월 19일 (19.11.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0007384 2014년 1월 21일 (21.01.2014) KR
- (71) 출원인: 한국한의학연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 305-811 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 신현규 (SHIN, Hyeun Kyoo); 305-761 대전시 유성구 엑스포로 448 305 동 703 호, Daejeon (KR). 김은순 (KIM, Ohn Soon); 305-753 대전시 유성구 봉산로 39 205 동 709 호, Daejeon (KR). 서창섭 (SEO, Chang Seob); 305-741 대전시 유성구 배울 2 로 6 106 동 1601 호, Daejeon (KR). 이미영 (LEE, Mee Young); 305-811 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR). 권우영 (JEON, Woo Young); 301-759 대전시 중구 안영로 68 104 동 402 호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울시 강남구 양재천로 163, STX R&D 센터 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, 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: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING PROSTATE-RELATED DISEASES, CONTAINING *PONCIRUS TRIFOLIATE* EXTRACT

(54) 발명의 명칭 : 지실 추출물을 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to: a pharmaceutical composition for preventing or treating prostate-related diseases, containing a *Poncirus trifoliata* extract or a fraction thereof as an active ingredient; a method for preventing or treating prostate-related diseases by using the composition; and a food composition, a feed composition and a quasi-drug composition for preventing or alleviating prostate-related diseases, containing a *Poncirus trifoliata* extract.

(57) 요약서: 본 발명은 지실 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 조성물을 이용한 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료 방법, 지실 추출물을 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 사료용 조성물, 및 의약품 조성물에 관한 것이다.

WO 2015/111832 A1

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

## 명세서

### 발명의 명칭: 지실 추출물을 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 지실 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 조성물을 이용한 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료 방법, 지실 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 사료용 조성물, 및 의약외품 조성물에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 전립선은 샘조직과 섬유근조직으로 구성된 남성의 부속생식선으로, 물혹이나 결석이 생길 수 있으나 전립선염, 전립선 비대증, 및 전립선암이 가장 흔히 발생하는 질병이다. 한국인의 전립선 관련 질환은 서양인에 비해 전립선염이 많은 것이 특징이고, 전립선암의 빈도는 매우 낮으며, 노인인구의 증가로 전립선비대의 빈도는 점차 증가하고 있다. 50세 이상의 환자의 비뇨기계질환은 전립선비대증, 전립선암, 전립선염 순서로 흔하게 나타난다.
- [4] 먼저, 전립선 비대증은 50세 이상의 남성에서 하루 8회 이상 소변을 보는 빈뇨, 야간 빈뇨, 강하고 갑작스런 요의를 느끼면서 소변이 마려우면 참을 수 없는 절박뇨 등의 방광 저장 증상과 지연뇨(소변을 볼 때 땀을 들여야 소변이 나오는 현상), 단절뇨(소변의 흐름이 끊기는 현상), 배뇨 시 힘을 주어야 하는 현상 등 방광의 배출 장애를 나타내는 증상을 통칭한 것으로, 5 $\alpha$ 과환원효소에 의해 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone, T)으로부터 전환되는 디하이드로 테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)이 전립선 비대에 관련되어 있다고 알려져 있다(Urology. 2003 Apr;61(4 Suppl 1):2-7.). 최근 한국 전립선비대증 질환자는 2006년 45만 8955명에서 2011년 84만 2069명으로 83.5%로 가파르게 증가하고 있는 상황이다. 특히 전립선 비대증 환자수는 60세 이상 남성 5명에 2명 비율로 나타나 80세를 넘으면 절반 이상이 전립선 비대증상을 호소하게 된다. 향후 초고령화 사회로의 돌입 및 수진율 향상 등으로 전립선 비대증 환자수는 앞으로 계속 늘어날 것으로 예상되며 이에 따라 전립선 비대증의 예방 및 치료에 대한 요청이 지속적으로 증가할 것으로 예상된다.
- [5] 또한, 전립선염은 전체 비뇨기과 환자의 약 3~12%를 차지하는 질병이나 50세 미만의 비뇨기과 환자에서는 가장 흔한 질환이다. 특히 전립선염의 가장 흔저한 증상인 만성 골반동통은 전립선비대증이나 성기능장애에 의한 고통보다 더 심한 것으로 알려져 있으며, 활동적인 젊은 연령대에 흔히 나타나 삶의 질에 좋지 않은 영향을 준다. 하지만 원인이 확실치 않고 증상이나 검사에서 특징적인

소견이 없어 진단과 치료에 어려움이 있다. 5알파환원효소에 의해 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone, T)으로부터 전환되는 디하이드로 테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)이 전립선염에 미치는 영향이 보고된 바 있다(The Journal of Urology, Volume 170, Issue 6, Part 1, December 2003, Pages 2486-2489)

- [6] 전립선암은 전립선에서 발생하는 악성 종양(malignant tumor)으로, 전립선암 또한 5알파환원효소에 의한 테스토스테론의 디하이드로테스토스테론으로의 전환과 관련이 높은 것으로 알려져 있다(J Steroid Biochem Mol Biol. 2002 Nov;82(4-5):393-400.). 서양의 경우 전립선암은 남성암 중 가장 흔한 암으로서 높은 발생 빈도를 보인다. 그러나 위 전립선암은 특이한 증상이 없어 조기 발견이 어려우므로, 암 조직이 커지면서 배뇨에 지장을 받거나, 전립선암이 뼈 등의 다른 장기로 전이되어 골 동통 등의 증상이 나타난 후에야 병원을 찾는 경우가 많다. 따라서 전립선 암의 예방 및 치료제에 대한 요구가 높아지고 있다.
- [7] 이와 같이 전립선 비대증, 전립선염, 전립선암을 포함하는 전립선 관련 질환의 환자수는 초고령화 사회로의 진입에 따라 꾸준히 증가하여 그 예방 및 치료제에 대한 소비자의 관심이 높아지고 있는바, 본 발명자들은 안전하고 효능이 우수한 전립선 관련 질병 치료제를 찾기 위해 여의 노력한 결과, 천연약제로서 지실 추출물을 포함하는 조성물이 남성호르몬인 테스토스테론을 디하이드로 테스토스테론으로 전환시키는 5알파환원효소의 활성을 감소시켜 전립선 관련 질환을 예방 및 치료할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[8]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [9] 본 발명의 하나의 목적은 지실(Ponciri Fructus) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 하나의 목적은 지실 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 하나의 목적은 지실 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 사료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 하나의 목적은 지실 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[14]

**과제 해결 수단**

[15]

상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 지실 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[16]

[17]

본 발명에서의 용어, "지실"은 운향과(Rutaceae)에 속하는 낙엽활엽관목인 탕자나무(*Poncirus trifoliata* Rafinesque)의 익지 않은 열매를 말한다. 지름 3cm의 둥근 모양이다. 탕자나무의 개화기는 3-5월, 결실기는 9-11월이며 채취시기는 9-10월이다. 우리나라 남부의 제주도와 가덕도 등의 섬에서 자생하는 것으로 알려져 있으며, 국내 주요산지인 경주 및 중남부지방에서 재배채취 된다. 익은 열매는 지각이라고 하며, 지실과 지각은 효능이 달라 다른 용도로 사용된다. 또한, 식품의약품안전청에 따르면 지실은 항염증 효능, 위염 및 위궤양에 관한 효능, 대사성 골다공증질환 관련 효능, 및 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나, 전립선 관련 질환의 치료용도로는 알려진바 없으며, 이는 본 발명자들에 의해서 최초로 규명되었다. 본 발명에서 지실은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

[18]

본 발명에서 용어, "추출물"이란 상기 지실의 추출물을 의미한다. 상기 추출물은 각 성분의 분쇄물을 건조 중량의 약 5 내지 30배, 바람직하게는 약 10 내지 20배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 등과 같은 탄소수 1(C1) 내지 4(C4)의 저급 알콜과 같은 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로 용출할 수 있으며, 추출 온도는 20°C 내지 100°C, 바람직하게는 60°C 내지 100°C에서, 추출기간은 약 1시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 여과 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출한 추출물일 수 있으나, 본 발명의 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있는 추출물인 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물을 모두 포함할 수 있다.

[19]

일 예로 상기 추출물은 각각 약학 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.

[20]

본 발명에서 사용되는 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[21]

본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기,

전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법, 및 이의 조합 등이 될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 지질을 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 사용하였다. 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexane), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 분획 용매 중 알코올을 사용하는 경우에는 바람직하게는 C1 내지 C4의 알코올을 사용할 수 있다.

- [22] 일 예로, 상기 분획물은 지질 추출물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획하여 제조한 것일 수 있다. 다른 일 예로, 상기 분획물은 지질 추출물을 물, 헥산, 에틸아세테이트, 또는 부탄올로 분획하여 제조한 것일 수 있다. 본 발명자들은 특히 지질 추출물의 에틸아세테이트 추출물이 5알파환원효소의 활성을 농도의존적으로 유의하게 억제하여 전립선 관련 질환의 치료 효과가 우수함을 확인하였다(도 5 및 도 6).
- [23] 상기 분획물은 각각 약학 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.
- [24]
- [25] 본 발명의 지질 추출물을 포함하는 조성물은 5알파환원효소의 활성 감소 효과를 이용하여, 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료를 수행할 수 있다. 본 발명에서 용어, "5알파환원효소(5 alpha reductase)"는 남성호르몬의 일종인 테스토스테론을 디하이드로테스토스테론(DHT)로 전환시키는 효소를 의미하며, 위 효소에는 1형 및 2형이 존재한다. 5알파환원효소 억제제는 전립선 비대증 등 전립선 관련 질환 치료제로 알려져 있으며, 이는 전립선의 성장을 막는 것으로 알려져 있다.
- [26] 본 발명자들은 지질 추출물이 전립선염, 전립선 비대증, 전립선암 등의 전립선 관련 질환의 유발과 관계가 높은 5알파환원효소의 활성을 현저히 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 1 및 도 1).
- [27] 뿐만 아니라, TP(testosterone propionate)에 의해 유도된 전립선 비대 동물 모델에서도 지질 추출물이 전립선 무게의 증가를 억제하고, 전립선의 발생과 성장과 유지에 필수적인 DHT(디하이드로 테스토스테론) 수치의 증가를 유의하게 억제하였으며, 전립선 상피세포의 과증식을 매우 억제하였다. 특히, 이러한 효과는 현재 전립선 관련 질환에 대한 치료제로 사용되고 있는 피나스테리드에 이를 정도의 효과를 나타냄을 확인하였다(실험예 2, 도 2 내지 4).

[28]

[29] 본 발명에서의 용어, "전립선 관련 질환"은 남성의 생식 및 비뇨기관인 전립선에 발생하는 질환을 의미하며, 그 예로 전립선 비대증, 전립선염, 전립선암, 전립선 농양, 및 전립선 석회화로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 전립선의 문제로 인하여 발생하는 다양한 질환을 모두 포함할 수 있다. 전립선 농양은 세균이 요도를 통해 전립선까지 파고들어가 급성 염증에 이어 고름 주머니를 만들면서 주변의 전립선조직을 급속히 괴사시키는 병으로, 발병 시 갑자기 심한 고열과 함께 오한이 나타나고, 소변을 보고 싶어도 소변을 배출하지 못하는 요폐 증상으로 극심한 배뇨통을 느끼게 된다. 전립선 석회화는 전립선에 석회 결석이 가라앉아 생기는 질환을 말한다. 상기 결석은 소변을 포함한 체액 내에 구성성분이 너무 많아지면 모두 액체화되지 못하고 남는 칼슘, 수산염, 인산염 등이 결정화된 것을 말한다.

[30] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하여 전립선 관련 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[31] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 전립선 관련 질환 발병 의심 개체에 투여하여 전립선 관련 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[32] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[33]

[34] 본 발명에 따른 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체와 함께 제제화되어 식품, 의약품, 사료 첨가제 및 음용수 첨가제 등으로 제공될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다.

[35] 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[36] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.

- [37] 본 발명에 따른 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 상기 전립선 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [38] 본 발명의 약학 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 공인된 전립선 관련 질환 치료 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [39]
- [40] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 전립선 관련 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다.
- [41] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 전립선 관련 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [42] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 상기 추출물을 포함하는 조성물의 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [43] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [44] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본

발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

- [45] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [46] 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [47]
- [48] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [49] 상기 지실은 천연 물질로서 오랫동안 사용되어 안전성이 입증되었으므로, 상식할 수 있으면서도 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.
- [50] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다. 상기 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [51] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [52] 상기 식품 조성물은 건강기능식품인 것일 수 있다. 건강기능식품(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 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [53] 이때, 상기 식품에 포함되는 추출물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다. 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1 내지 30g, 바람직하게는 3 내지 20g의 비율로 포함될 수 있다.
- [54] 상기 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이

뛰어날 수 있다.

[55]

[56] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 사료용 조성물을 제공한다.

[57] 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

[58] 본 발명에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다.

[59] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[60]

[61] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 의약외품 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 의약외품 조성물에 첨가할 수 있다.

[62] 본 발명에서 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염형 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미할 수 있다. 또한 상기 의약외품은 피부외용제 및 개인위생용품을 포함할 수 있다. 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 또는 연고제일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[63] 본 발명에 따른 상기 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[64]

[65] 또 하나의 양태로서, 상기 지질 추출물을 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선용 음용수 첨가제를 제공한다.

- [66] 본 발명의 상기 음용수 첨가제는 상기 지실 추출물을 포함하는 조성물을 음용수 첨가제 형태로 따로 제조하여 음용수에 혼합시키는 방식으로 사용하거나, 음용수 제조시 직접 첨가하는 방식으로 사용할 수 있다.
- [67] 본 발명의 상기 음용수 첨가제는 액상 또는 건조 상태일 수 있으며, 바람직하게는 건조된 분말 형태일 수 있다. 본 발명의 상기 음용수 첨가제를 건조된 분말 형태로 제조하기 위한 건조 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법을 사용할 수 있다. 본 발명의 상기 음용수 첨가제는 필요에 따라 기타 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 사용 가능한 첨가제의 비제한적인 예로는, 음용수의 품질 저하를 방지하기 위하여 첨가하는 결착제, 유화제, 보존제 등; 사료 또는 음용수의 효용 증대를 위하여 첨가하는 아미노산제, 비타민제, 효소제, 생균제, 향미제, 비단백질태질소화합물, 규산염제, 완충제, 착색제, 추출제 또는 올리고당 등이 있으며, 그 외에 사료 혼합제 등을 추가로 포함할 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 함께 첨가될 수 있다.

[68]

### 발명의 효과

- [69] 본 발명의 지실 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 5알파환원효소의 활성을 저해하여, 전립선 비대증, 전립선염, 전립선암 등 전립선 관련 질환을 효과적으로 예방, 개선, 및 치료할 수 있는 효과가 있다.
- [70] 또한 상기 본 발명의 지실 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 천연 약제로서 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물, 가축 사료용 조성물, 화장료 조성물, 및 의약외품 조성물을 포함한 다양한 제품에 응용될 수 있다.
- [71] 또한, 본 발명의 조성물은 천연물로부터 유래된 것이어서 전립선 관련 질환의 예방, 치료, 및 개선 효능 이외에 체내에 심각한 자극을 가한다거나 유해한 작용을 유발함이 없이 안전하게 사용할 수 있다.

[72]

### 도면의 간단한 설명

- [73] 도 1은 지실 추출물의 농도에 따른 5알파환원효소의 활성의 저해 효과를 나타낸 것이다.
- [74] 도 2는 전립선 비대 유도된 동물 모델에서 지실 추출물 처리에 따른 전립선 무게를 측정하여 나타낸 것이다.
- [75] 도 3은 전립선 비대 유도된 동물 모델에서 지실 추출물 처리에 따른 DHT (디하이드로 테스토스테론)의 변화를 측정하여 나타낸 것이다.
- [76] 도 4는 전립선 비대 유도된 동물 모델에서 지실 추출물 처리에 따른 전립선의 조직병리학적 변화를 나타낸 것이다.
- [77] 상기 도면에 표시된 NC는 정상군, BPH는 전립선 비대증 유발군, Fin는 전립선

비대증 유발균 + 피나스테리드 투여군, GO-10은 전립선 비대증 유발균 + 지실추출물 투여군을 나타낸다.

[78] 도 5는 지실 추출물의 분획물의 농도에 따른 5알파환원효소의 활성의 저해 효과를 나타낸 것이다.

[79] 도 6은 전립선 비대 유도된 동물 모델에서 지실 추출물의 분획물의 처리에 따른 전립선 무게를 측정하여 나타낸 것이다(NC: 정상군, BPH: 전립선 비대증 유발균, Fin: 전립선 비대증 유발균 + 피나스테리드 투여군, Hexane: 전립선 비대증 유발균 + 지실 헥산 분획물 투여군, EA: 전립선 비대증 유발균 + 지실 에틸아세테이트 분획물 투여군, BuOH: 전립선 비대증 유발균 + 지실 부탄올 분획물 투여군, Water: 전립선 비대증 유발균 + 지실 물 분획물 투여군).

[80]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[81] 이하, 실시예 및 실험예들을 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[82]

#### [83] 실시예 1: 지실 추출물의 제조 (실험예 1에 사용)

[84]

[85] 시판되는 지실을 구입하여 분쇄한 후, 분쇄물 1 kg에 70% 에탄올 10 L를 넣고 초음파 추출기를 이용하여 1시간 동안 3회 초음파 추출하였다. 상기 초음파 추출액을 와트만 (Whatman, 46 x 57 cm) 여과지를 이용하여 여과하여 불용성 물질을 제거한 후, 냉각 콘덴서가 장착된 농축 장치로 40 °C에서 감압 농축하였다. 감압 농축된 추출물의 용매를 완전히 제거하기 위하여 정제수 1500 mL을 넣어 현탁시킨 후 동결건조기를 이용하여 152.2 g의 추출물을 얻었다 (수율: 15.22%).

[86]

#### [87] 실시예 2: 동물 실험용 지실 추출물의 제조 (실험예 2에 사용)

[88]

[89] 시판되는 지실을 입수하여 분쇄한 후, 분쇄물 10 kg에 대하여 70% 에탄올 100 L를 가하였다. 그 후 초음파 추출기를 이용하여 1시간 동안 3회 초음파 추출하였다. 상기 초음파 추출액을 어드벤티크 2호(Advantec No. 2, 110 mm) 여과지를 이용하여 여과하여 불용성 물질을 제거한 후, 냉각 콘덴서가 장착된 농축 장치로 60°C에서 감압 농축하였다. 감압 농축된 추출물의 용매를 완전히 제거하기 위하여 정제수 1000 mL을 넣어 현탁시킨 후 동결건조기를 이용하여 1368.6g의 추출물을 얻었다(수율 13.69%).

[90]

[91] 실시예 3: 지실 추출물의 분획물의 제조 (실험예 3, 4에 사용)

[92]

[93] **3-1. 지실 헥산 분획물 제조**

[94]

[95] 상기 실시예 2의 지실 추출물 1.3 kg을 3.0 L의 증류수에 현탁시킨 다음, 헥산(hexane) 4.5 L를 넣어 용매분획을 3회 실시하였다. 헥산 분획물을 수득하여 감압 농축 후 동결건조하여 헥산 분획물 62.5 g을 수득하였다 (수율: 4.81%).

[96]

[97] **3-2. 지실 에틸아세테이트 분획물(GO10-EA) 제조**

[98]

[99] 상기 실시예 3-1의 헥산 분획 후 남은 물 분획물에 에틸아세테이트 4.5 L를 넣어 용매분획을 3회 실시하였다. 에틸아세테이트 분획물을 수득하여 감압 농축 후 동결건조하여 에틸아세테이트 분획물 213.3 g을 수득하였다 (수율: 16.41%).

[100]

[101] **3-3. 지실 부탄올 분획물(GO10-B) 제조**

[102]

[103] 상기 실시예 3-2의 에틸아세테이트 분획 후 남은 물 분획물에 부탄올 4.5 L를 넣어 용매분획을 3회 실시하였다. 부탄올 분획물을 수득하여 감압 농축 후 동결건조하여 부탄올 분획물 545.5 g을 수득하였다 (수율: 41.96%).

[104]

[105] **3-4. 지실 물 분획물(GO10-W) 제조**

[106]

[107] 상기 실시예 3-3의 부탄올 분획 후 남은 물 분획물을 감압 농축 후 동결건조하여 물 분획물 421.4 g을 수득하였다 (수율: 32.42%).

[108]

[109] 실험예 1: 지실 추출물에 의한 5알파환원효소의 활성 억제 효과 확인

[110]

[111] 5알파환원효소는 테스토스테론을 디하이드로 테스토스테론으로 전환하는 역할을 하며, 5알파환원효소의 활성 저해가 전립선 관련 질환의 원인으로 지목되고 있다. 이에, 상기 조성물이 전립선 관련 질환의 치료효과가 있는지 확인하기 위하여, 대표적인 질환 치료 마커인 5알파환원효소의 활성억제 효과를 확인하고자 하였다.

[112] 상기 실시예 1에서 제조한 지실 추출물의 상기 5알파환원효소에 대한 활성 억제 효과를 확인하기 위하여, 테스토스테론에서 디하이드로 테스토스테론으로 전환될 때 사용되는 NADPH 양의 변화를 흡광도 변화를 이용하여 측정하여 5알파환원효소의 활성을 계산하였다. 이는 하기 문헌에 개시된 방법을 응용하여 실시한 것이다(Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1998;20(4):283-7, Bioorg Med Chem Lett. 2011;21(11):3439-42).

[113]

[114] **1-1. 랫트 간에서 분리한 5알파환원효소를 포함하는 효소 조성물 제조**

[115]

[116] 12주령의 암컷 SD 랫트(중앙실험동물, 대한민국)를 디에칠에테르로 마취한 후 해부하여 간을 적출하고 4배 용량의 완충용액(10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 132 mM Sucrose, 0.004% 2-mercaptoethanol)을 첨가하여 세포파쇄기로 균질화하였다. 상기 간세포 파쇄액을 원심분리(10,000 x g) 하여 얻은 상등액을 다시 초원심분리(105,000 x g)하여 마이크로솜 분획을 얻고 상기 완충용액에 현탁하여 -80 °C에 보관하였다.

[117]

[118] **1-2. 5알파환원효소에 대한 효소 저해율 측정**

[119]

[120] 본 발명의 지질 추출물의 5알파환원효소 활성 저해 효과를 확인하기 위하여, 지질 추출물의 농도를 달리한 하기의 5개 그룹에 대하여 각각 3번에 걸쳐 흡광도 변화를 측정하였다.

[121]

[122] -그룹 1: 상기 실험에 1-1의 5알파환원효소 조성물 25 µg

[123] -그룹 2: 그룹 1에 50 µg의 테스토스테론(T0028, TCI, 일본)을 첨가한 조성물

[124] -그룹 3: 그룹 2에 실시예 1의 지질 추출물 60 µg/ml을 반응시킨 조성물

[125] -그룹 4: 그룹 2에 실시예 1의 지질 추출물 70 µg/ml을 반응시킨 조성물

[126] -그룹 5: 그룹 2에 실시예 1의 지질 추출물 80 µg/ml을 반응시킨 조성물

[127]

[128] 그룹 1 내지 5에 50 µM의 NADPH 용액(N1630, Sigma-aldrich, 미국)을 첨가하였다. 그 후 37°C에서 60분간 반응시키면서 ELISA 측정기(Benchmark Plus, Bio-Rad, USA)를 이용하여 5분 간격으로 340nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

[129] 측정된 흡광도 변화 값을 바탕으로 하기의 식에 의하여 5알파환원효소의 활성을 계산하고, 그 결과를 하기도 1과 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[130]

$$\text{5알파환원효소의 활성 (unit/ml)} = \frac{\Delta OD_{340} \times A}{6.22 \times B \times C}$$

[131]

[132] (단, ΔOD<sub>340</sub>: 분당 340nm에서의 흡광도 변화, A: 총 반응 부피(ml), B: 효소액 부피(ml), C: 반응 용기의 광학측정 길이(cm). 6.22는 NADPH의 분자흡광계수)

[133] 통계학적인 분석은 ANOVA로 수행하였으며, \*\* P<0.01는 그룹 1과 비교 시 유의한 차이가 있을 경우, # P<0.05, ## P<0.01는 그룹 2와 차이가 유의한 경우를 고려하였다.

[134]

[135] 표 1

[Table 1]

	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 4	그룹 5
활성-1	<b>2.53</b>	<b>4.47</b>	<b>4.34</b>	<b>3.71</b>	<b>3.34</b>
활성-2	2.48	4.51	4.52	3.70	3.16
활성-3	2.71	4.74	4.43	3.97	3.11
평균	<b>2.57</b>	<b>4.57</b>	<b>4.43</b>	<b>3.79</b>	<b>3.20</b>
표준편차	0.12	0.15	0.09	0.15	0.12

[136] (단위: mU/ml, U=unit)

[137]

[138] 표 2

[Table 2]

	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 4	그룹 5
활성(%)-1	<b>-2.3</b>	<b>94.7</b>	<b>88.3</b>	<b>57.0</b>	<b>38.3</b>
활성(%)-2	-4.5	97.0	97.3	56.4	29.3
활성(%)-3	6.8	108.3	92.8	69.9	27.1
평균	<b>0.00</b>	<b>100.00</b>	<b>92.79</b>	<b>61.11</b>	<b>31.58</b>
표준편차	<b>5.97</b>	<b>7.25</b>	<b>4.51</b>	<b>7.64</b>	<b>5.97</b>

[139] (단위: %)

[140]

[141] 상기 표 2는 지실 추출물을 첨가하지 않은 그룹 1 및 그룹 2에 대하여, 표 1의 활성값을 토대로 5알파환원효소의 기질인 테스토스테론이 포함되지 않은 그룹 1의 활성은 0%로, 5알파환원효소의 기질인 테스토스테론이 포함된 그룹 2의 활성은 100%로 환산한 것이다. 따라서 어떠한 저해제도 없을 경우 기질인 테스토스테론에 대한 5알파환원효소의 활성값인 100%를 기준으로 지실 추출물 첨가 시의 효소 활성을 비교할 수 있다.

[142]

[143]

[144] 상기와 같이 그룹 2 조성물에 각기 다른 농도의 지실 추출물을 첨가한 그룹 3 내지 5에서의 5알파환원효소의 활성(%)을 측정하여, 농도에 따른 지실 추출물의 5알파환원효소 활성 저해 효과를 알아보았다. 실험 결과, 5알파환원효소의 활성(%)은 지실 추출물의 농도가 높아짐에 따라 100에서 92.79, 61.11로, 그룹 5에 이르러서는 31.58(%)로 매우 급격하게 저해됨을 확인하였다.

[145] 이와 같이 본 발명에서 지실 추출물은 5알파환원효소에 대한 저해제로서,

테스토스테론(T)를 디하이드로 테스토스테론(DHT)로 전환시켜 전립선 관련 질환에 관여하는 중요한 효소인 5알파환원효소를 억제하는 효능이 있는 것으로 나타났다. 또한 지실 추출물의 농도가 높아질수록 5알파환원효소의 활성(%)이 급격히 감소하여 5알파환원효소의 작용을 현저하게 억제함을 확인하였다. 특히 본 발명에서 지실 추출물은 0.1 $\mu$ g/ml 이상 90 $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 5알파환원효소의 활성 저해효과가 뛰어난 것으로 확인되었다.

[146]

[147]

[148] **1-3. 5알파환원효소에 대한 효소 저해율 측정(대조군: 피나스테라이드)**

[149]

[150] 양성 대조군(positive control)인 피나스테라이드(finasteride)를 시료로 이용하여 5알파환원효소의 활성 억제 효과를 대조하였다. 피나스테라이드는 현재 당업계에서 널리 사용되고 있는 제2형 5알파환원효소의 저해제이다.

[151]

[152] 상기 실험에 1-2의 그룹 3 내지 5에서 측정한 지실의 효소 저해율 및 이를 바탕으로 5알파환원효소의 활성을 50% 억제하는 농도인 IC50을 계산하였다.

[153] 또한, 상기와 같은 방법으로 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 및 1  $\mu$ M 농도의 피나스테라이드(F1293, Sigma-aldrich, 미국)의 효소 저해율 및 IC50을 계산하였다.

[154] 상기 결과를 하기의 표 3에 나타내었다. \* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01은 그룹 1과 비교시 유의한 경우, # P&lt;0.05, ## P&lt;0.01은 그룹 2와 비교시 차이가 유의한 경우를 고려하였다.

[155]

[156] 표 3

[Table 3]

시료	농도	효소 저해율 (%)	IC50
지실( $\mu$ g/ml)	607080	7.21 $\pm$ 4.5138.89 $\pm$ 7.6468.42 $\pm$ 5.97	73.92 $\pm$ 0.63
피나스테라이드( $\mu$ M)	0.250.51	10.53 $\pm$ 2.6060.90 $\pm$ 15.3578.20 $\pm$ 12.42	0.60 $\pm$ 0.12

[157]

[158] 상기 표 3의 결과를 통해 알 수 있듯이 지실 추출물의 농도가 높아질수록 5알파환원효소의 활성 억제율(%)이 급격히 증가하여 5알파환원효소의 작용이 현저하게 억제됨을 확인하였다.

[159] 또한, 본 발명에서 지실 추출물의 IC50은 73.92  $\pm$  0.63 ( $\mu$ g/ml), 현재 당업계에서 널리 사용되는 5알파환원효소의 억제제인 피나스테라이드의 IC50은 0.60  $\pm$  0.12

( $\mu\text{M}$ )로 나타났다. 이는 지실 추출물이 천연 추출물인 것을 고려할 때, 그 5 $\alpha$ -환원효소 활성 저해 효과가 우수한 것임을 알 수 있다.

[160]

[161] 이와 같은 결과들은 본 발명에서 지실 추출물이 5 $\alpha$ -환원효소를 억제하여 5 $\alpha$ -환원효소가 중요하게 작용하는 전립선 관련 질환을 예방 및 치료, 개선할 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

[162]

[163] **실험예 2: 동물 모델에서의 전립선 비대증 치료 효과 확인 (추출물)**

[164]

[165] **2-1. 동물모델 제작**

[166]

[167] 10 주령의 수컷 wistar 랫트(중앙실험동물 구입, 한군당 6마리)를 1주일간 순화시킨 후, TP(testosterone propionate)를 3 mg/kg으로 피하에 4주간 주입하여 전립선 비대 유도군을 제작하였다.

[168] TP 주입 한 시간 전에 실시예 2의 지실 추출물을 200 mg/kg으로 4주간 경구 투여하여 실험군을 제작하였다. 전립선 비대증 치료제로 사용되고 있는 5 $\alpha$ -환원 효소 억제제(reductase inhibitor)인 피나스테리드(finasteride)를 10 mg/kg으로 경구투여 하여, 양성대조군을 제작하였다. 용매 대조군에는 옥수수 기름(corn oil)을 피하에 주입하였다.

[169]

[170] **2-2. 전립선 무게 측정**

[171]

[172] 실험예 2-1에서 제작한 동물 모델로부터 전립선을 적출한 후 그 무게를 측정하여 도 2에 나타내었다(NC: 정상군, BPH: 전립선 비대증 유발군, Fin: 전립선 비대증 유발군 + 피나스테리드 투여군, GO-10: 전립선 비대증 유발군 + 지실추출물 투여군, 이하 동일). 통계학적인 분석은 ANOVA로 수행하였으며, \* P<0.05, \*\* P<0.01는 정상군(NC)과 비교 시 유의한 차이가 있을 경우, # P<0.05, ## P<0.01는 유발군(BPH)과 차이가 유의한 경우를 고려하였다.

[173]

[174] 그 결과, 도 2에서 보는 것 같이 정상군(NC)에 비하여 전립선 비대증 유발군(BPH)의 전립선 무게가 2배 이상 증가하였으나, 지실 추출물을 투여한 군(GO-10)의 경우 전립선 무게 증가를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다. 상기 억제 효과는 현재 치료제로 사용되고 있는 피나스테리드(Fin)과 매우 유사하게 나타났는바, 이는 지실 추출물의 효과가 매우 우수함을 시사하는 것이다.

[175]

[176] **2-3. 전립선의 DHT 변화 측정**

[177]

[178] 전립선의 발생과 성장과 유지에 필수적인 DHT(디하이드로 테스토스테론)의 변화를 측정하기 위하여, 4주 간의 약물투여를 종료한 후 희생시킨 마우스에서 분리한 전립선 조직에서 단백질을 분리하였다. 추출 완충용액[구성: 50 mM 트리스(Tris) pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% 아지드화나트륨(sodium azide), 0.2% SDS, 1 mM PMFS, 10  $\mu$ l/ml 아프로티닌(aprotinin), 1% 이가펠 630(igapel 630, Sigma Chem.Co. USA), 10 mM 불화소다(Sodium Fluoride, NaF), 0.5mM 에틸렌디아민 사초산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 0.1 mM 에틸렌 글라이콜 테트라산(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA) 및 0.5% 소듐옥시콜레이트(sodium deoxycholate)]을 이용해 전립선을 균질화하였다. 균질액을 20분 동안 14000 rpm에서 원심분리 한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다.

[179]

[180] 상기 분리한 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다. 상등액에서 DHT의 함량을 측정하기 위하여, DHT에 특정 반응하는 ELISA kit(Dakara, Japan)를 사용하였으며, 제조사의 방법에 따라 각 DHT의 함량을 측정하였다. 측정된 값은 단백질 정량값 대비(relative units)로 환산하였다. 통계학적인 분석은 ANOVA로 수행하였으며, \* P<0.05, \*\* P<0.01는 정상군(NC)과 비교 시 유의한 차이가 있을 경우, # P<0.05, ## P<0.01는 유발군(BPH)과 차이가 유의한 경우를 고려하였다.

[181]

[182] 그 결과, 도 3에서 보는 것 같이 정상군(NC)에 비하여 전립선 비대증 유발군(BPH)의 DHT 수치가 매우 증가되었으나, 지실 추출물을 투여한 군(GO-10)의 경우 상기 DHT 수치의 증가를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다. 상기 억제 효과는 현재 치료제로 사용되고 있는 피나스테리드(Fin)과 매우 유사하게 나타났는바, 이는 지실 추출물의 효과가 매우 우수함을 시사하는 것이다.

[183]

[184] **2-4. 전립선의 조직병리학적 변화 비교**

[185]

[186] 조직병리학적 실험을 위해서, 전립선 비대증 유발군에 지실 추출물을 투여한 군(GO-10)을 대상으로 복측 전립선 조직을 10% 중성완충-포르말린으로 24시간 고정 후 파라핀 포매(paraffin embedding)를 실시하였다. 포매 조직을 4  $\mu$ m 두께로 절단하여 절편을 만들고, 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신 와이(Eosin Y; ThermoShandon, USA)로 염색하였다. 그 후 바로 절편을 봉입액으로 봉입하였으며, 염색과 봉입이 끝난 슬라이드는 광학현미경으로 검사하였다.

[187]

[188] 그 결과, 도 4에 도시된 것과 같이, 정상군(NC)에 비하여 전립선 비대증 유발군(BPH)에서 상피세포의 높이와 수가 과증식된 결과를 확인하였다. 그러나,

지실 추출물을 투여한 군(GO-10)의 경우 상피세포의 과증식이 매우 감소하였다. 특히, 이러한 효과는 현재 치료제로 사용되고 있는 피나스테리드(Fin)에 비하여 우수한 것으로 나타났는바, 이는 지실 추출물의 효과가 매우 우수함을 시사하는 것이다.

[189]

[190] **실험예 3: 지실 추출물 분획물에 대한 5알파환원효소에 대한 효소 활성 측정**

[191]

[192] 지실 추출물의 분획물에 대한 5알파환원효소 활성 저해 효과를 확인하기 위하여, 지실 분획물의 농도를 달리한 하기의 5개 그룹에 대하여 실험예 1-2에 기재된 방법으로 각각 3번에 걸쳐 흡광도 변화를 측정하고, 5알파환원효소의 활성을 계산하였다. 통계학적인 분석은 ANOVA로 수행하였으며, \* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01은 그룹 1과 비교시 유의한 경우, # P&lt;0.05, ## P&lt;0.01은 그룹 2와 비교시 유의한 경우로 고려하였다.

[193]

[194] -그룹 1: 상기 실험예 1-1의 5알파환원효소 조성물 25 µg

[195] -그룹 2: 그룹 1에 50 µg의 테스토스테론(T0028, TCI, 일본)을 첨가한 조성물

[196] -그룹 3: 그룹 2에 실시예 3-2의 에틸아세테이트 분획물 (GO10-EA), 실시예 3-3의 부탄올 분획물 (GO10-B), 실시예 3-4의 물 분획물 (GO10-W) 각각을 50 µg/mL의 농도로 반응시킨 조성물

[197] -그룹 4: 그룹 2에 GO10-EA, GO10-B, GO10-W 각각을 100 µg/mL의 농도로 반응시킨 조성물

[198] -그룹 5: 그룹 2에 GO10-EA, GO10-B, GO10-W 각각을 200 µg/mL의 농도로 반응시킨 조성물

[199]

[200] 그 결과, 도 5에 도시된 것과 같이, 특히 에틸아세테이트 분획물의 경우 5알파환원효소의 활성을 농도의존적으로 유의하게 억제하였으며, 200 µg/mL 이상의 농도에서 특히 현저한 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[201]

[202] **실험예 4: 동물 모델에서의 전립선 비대증 치료 효과 확인 (분획물)**

[203]

[204] **4-1. 동물모델 제작**

[205]

[206] 10 주령의 수컷 wistar 랫트(중앙실험동물 구입, 한군당 6마리)를 1주일간 순화시킨 후, TP(testosterone propionate)를 3 mg/kg으로 피하에 4주간 주입하여 전립선 비대 유도군을 제작하였다.

[207] TP 주입 한 시간 전에 실시예 3에서 제조한 4종류의 분획물 각각을 100 mg/kg으로 4주간 경구 투여하여 실험군을 제작하였다. 전립선 비대증 치료제로 사용되고 있는 5α-환원 효소 억제제(reductase inhibitor)인

피나스테리드(finasteride)를 10 mg/kg으로 경구투여 하여, 양성대조군을 제작하였다. 용매 대조군에는 옥수수 기름(corn oil)을 피하에 주입하였다.

[208]

[209] 이하, 상기 제작된 동물 모델 그룹은 다음과 같이 표시한다. NC: 정상군, BPH: 전립선 비대증 유발군, Fin: 전립선 비대증 유발군 + 피나스테리드 투여군, Hexane: 전립선 비대증 유발군 + 지실 헥산 분획물(실시예 3-1) 투여군, EA: 전립선 비대증 유발군 + 지실 에틸아세테이트 분획물(실시예 3-2) 투여군, BuOH: 전립선 비대증 유발군 + 지실 부탄올 분획물(실시예 3-3) 투여군, Water: 전립선 비대증 유발군 + 지실 물 분획물(실시예 3-4) 투여군.

[210]

[211] **4-2. 전립선 무게 측정**

[212]

[213] 실험에 4-1에서 제작한 각 그룹으로부터 전립선을 적출한 후 그 무게를 측정하여 도 6에 나타내었다. 통계학적인 분석은 ANOVA로 수행하였으며, \* P<0.05와 \*\* P<0.01는 정상군(NC)과 비교 시 유의한 차이가 있을 경우, # P<0.05와 ## P<0.01는 유발군(BPH)과 차이가 유의한 경우를 고려하였다.

[214]

그 결과, 도 6에 도시된 것과 같이, 정상군(NC)에 비하여 전립선 비대증 유발군(BPH)의 전립선 무게가 2배 이상 증가하였으나, 지실 추출물의 분획물의 경우 전립선 무게 증가를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다. 특히, 부탄올 분획물(BuOH)과 물 분획물(Water)의 효과가 우수하게 나타났다. 상기 억제 효과는 현재 치료제로 사용되고 있는 피나스테리드(Fin)과 매우 유사하게 나타났는바, 이는 지실 추출물의 분획물의 효과가 매우 우수함을 시사하는 것이다.

[215]

[216] 이와 같이, 지실 추출물과 이의 분획물은 전립선염, 전립선 비대증, 전립선암 등의 전립선 관련 질환의 유발과 관계가 높은 5 $\alpha$ 알파환원효소의 활성을 현저히 감소시킬 뿐만 아니라, TP에 의해 유도된 전립선 비대 동물 모델에서도 지실 추출물이 전립선 무게의 증가를 억제하고, 전립선의 발생과 성장과 유지에 필수적인 DHT(디하이드로 테스토스테론) 수치의 증가를 유의하게 억제하였으며, 전립선 상피세포의 과증식을 매우 억제하였다. 특히, 이러한 효과는 현재 전립선 관련 질환에 대한 치료제로 사용되고 있는 피나스테리드에 이를 정도의 효과를 나타냄을 확인하였다.

[217]

따라서 지실 추출물 또는 이의 분획물은 전립선 관련 질환의 예방 및 치료, 개선을 위하여 효과적으로 사용할 수 있다.

[218]

[219] 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 실시

예들은 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.

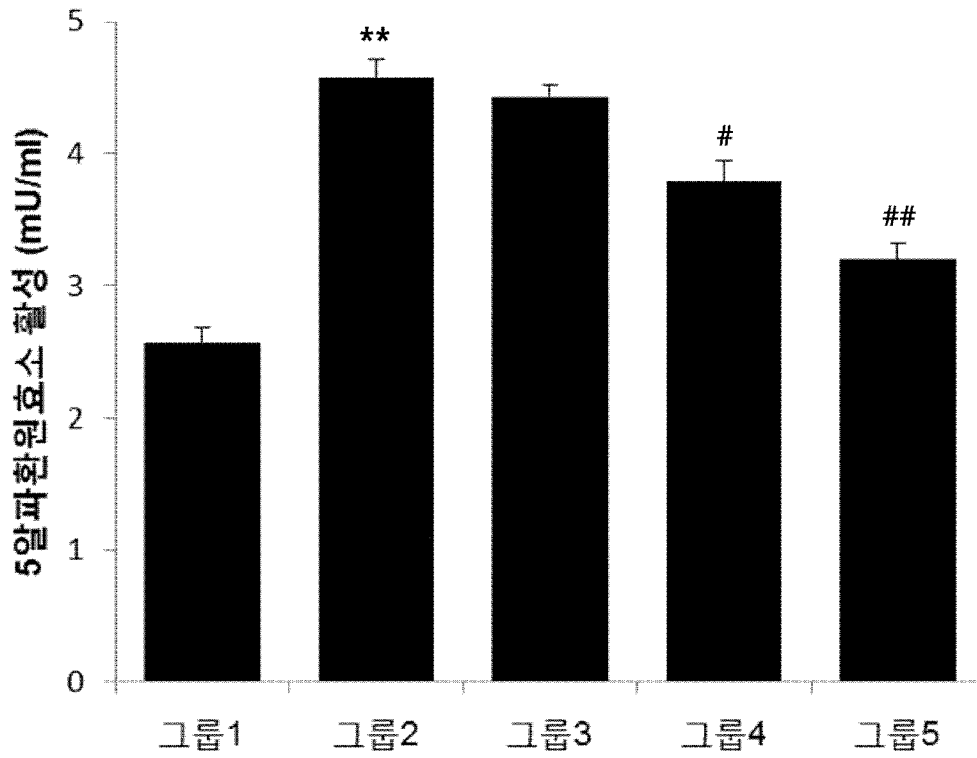
[220]

[221]

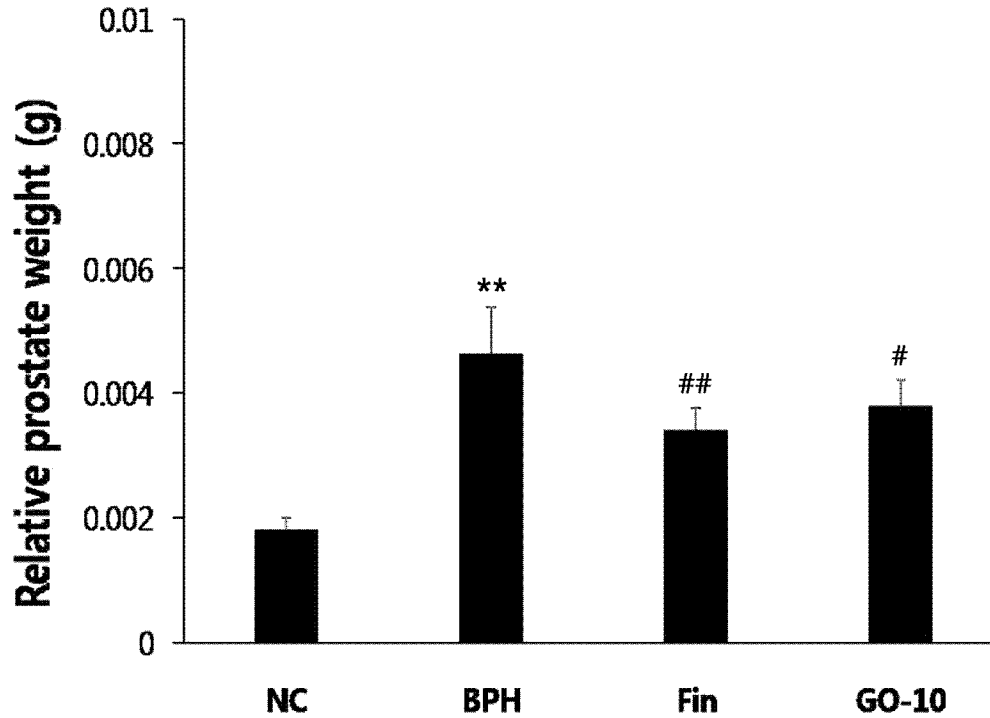
## 청구범위

- [청구항 1] 지실(Ponciri Fructus) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 지실 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 제조되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 분획물은 지실 추출물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획하여 제조한 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,  
상기 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료는 5 $\alpha$ 환원효소의 활성 감소에 의해 이루어지는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,  
상기 전립선 관련 질환은 전립선 비대증, 전립선염, 전립선암, 전립선 농양, 및 전립선석회화로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 7] 지실(Ponciri Fructus) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,  
상기 식품 조성물은 건강기능식품인 것인, 식품 조성물.
- [청구항 9] 지실(Ponciri Fructus) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 의약외품 조성물.

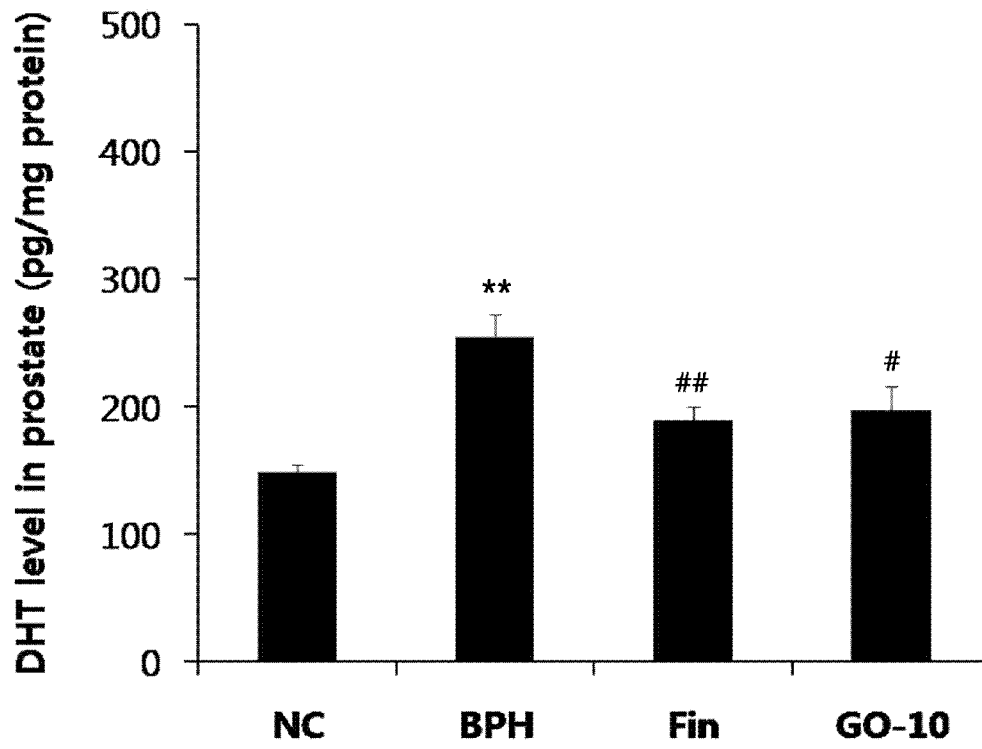
[Fig. 1]



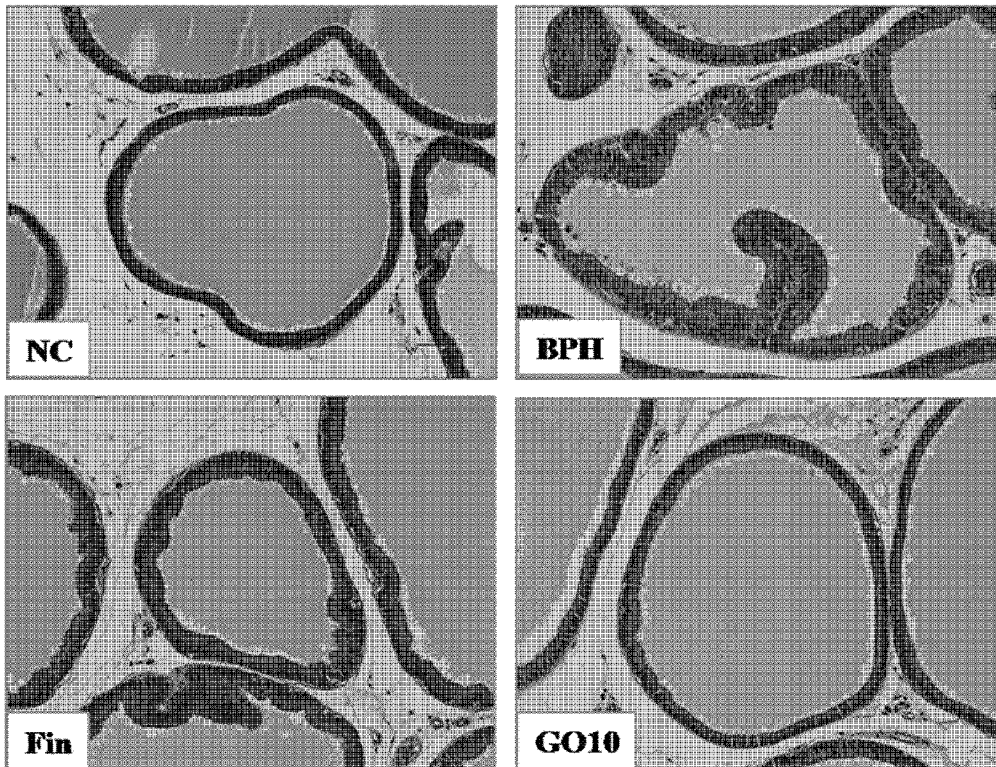
[Fig. 2]



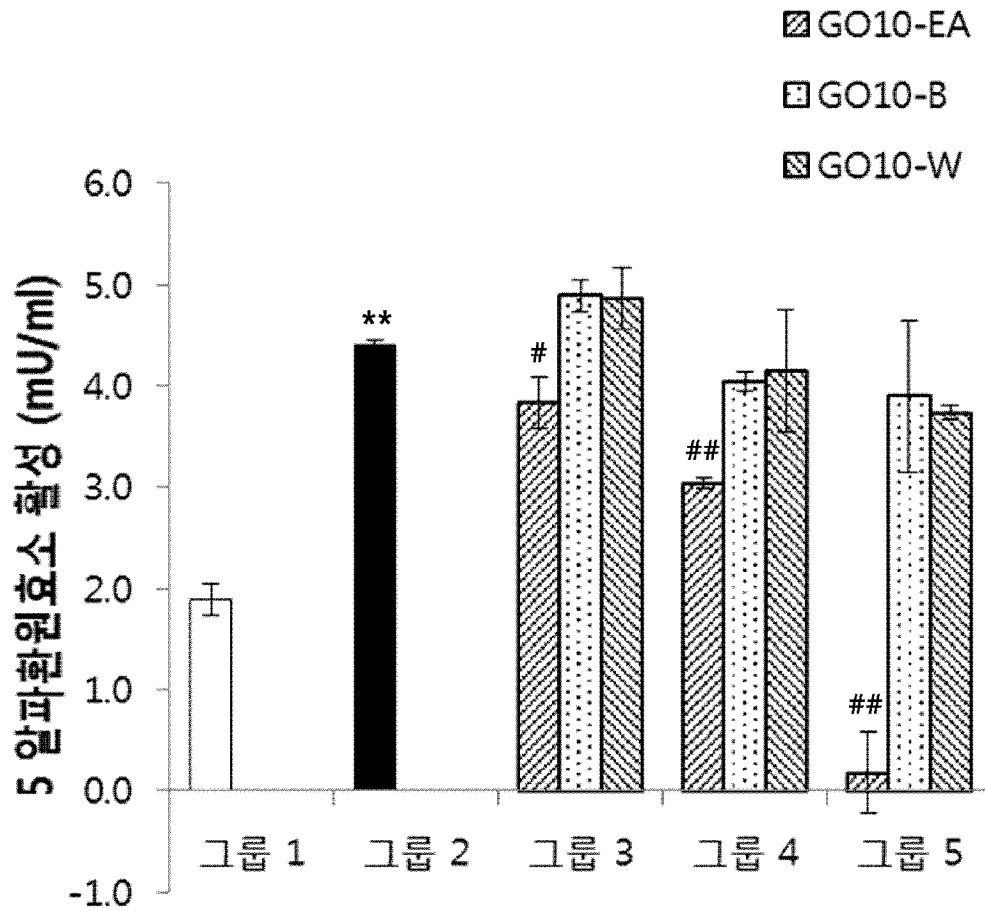
[Fig. 3]



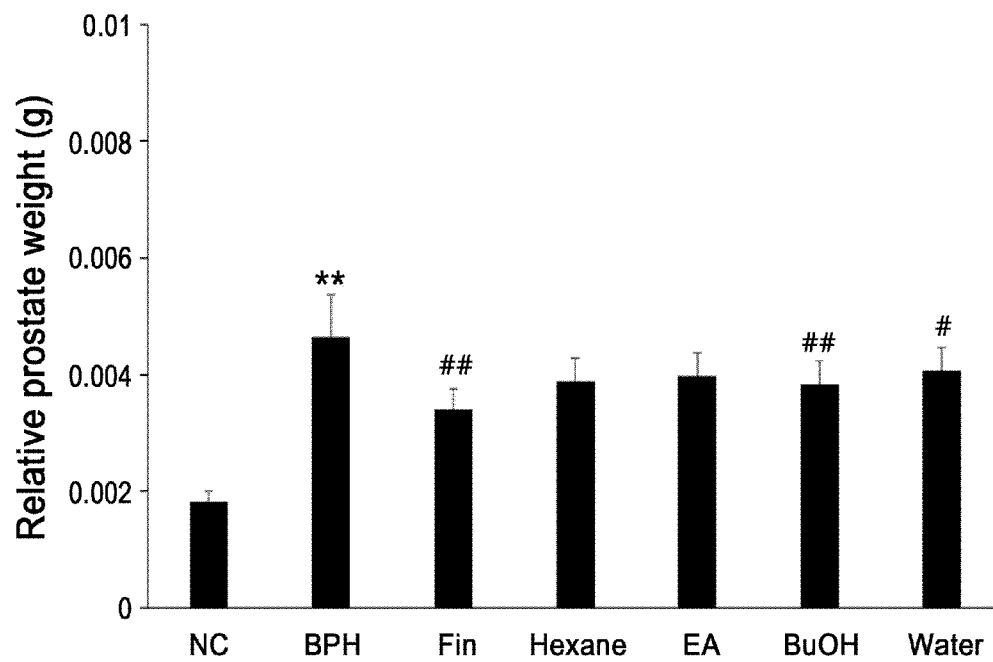
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2014/011097**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K 36/75(2006.01)i, A61P 13/08(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 36/75; A23L 1/29; A61P 19/10; A61P 13/08

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) &amp; Keywords: ponciri Fructus, prostate, extract, Ponciri Fructus, prostatitis, prostate cancer, anti-inflammatory, anti-cancer

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POKHAREL, Y. R. et al.. "Screening of potential chemopreventive compounds from Poncirus trifoliata Raf". Pharmazie. 2006. Vol. 61, No. 9, pp. 796-798 See abstract, page 796 etc..	1-5,7-9
A	SHIN, T-Y. et al.. "Anti-infammatory effect of Poncirus trifoliata fruit through inhibition of NF-kB activation in mast cells". Toxicology in Vitro. 2006. Vol. 20, pp. 1071-1076 See the entire document.	1-5,7-9
A	YI, J-M. et al.. "Poncirus trifoliata fruit induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells". Clinica Chimica Acta. 2004. Vol. 340, pp. 179-185 See the entire document.	1-5,7-9
A	KR 10-2013-0023174 A (KOREA BIO MEDICAL SCIENCE INSTITUTE CO., LTD et al.) 07 March 2013 See the entire document.	1-5,7-9
A	KR 10-2008-0100557 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-AC et al.) 19 November 2008 See the entire document.	1-5,7-9
A	KR 10-2001-0100548 A (BRAINTROPIA CO., LTD.) 14 November 2001 See the entire document.	1-5,7-9



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 MARCH 2015 (26.03.2015)

Date of mailing of the international search report

26 MARCH 2015 (26.03.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011097

**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.: 6  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 6 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, or to a diagnostic method, 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/KR2014/011097**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIN, E. M. et al. "Anti-inflammatory activity of hispidol A 25-methylether, a triterpenoid isolated from <i>Ponciri Immaturus Fructus</i> ". <i>European Journal of Pharmacology</i> . 2010. Vol. 627, pp. 318-324 See the entire document.	1-5,7-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2014/011097**

<b>Patent document cited in search report</b>	<b>Publication date</b>	<b>Patent family member</b>	<b>Publication date</b>
KR 10-2013-0023174 A	07/03/2013	NONE	
KR 10-2008-0100557 A	19/11/2008	KR 10-0872108 B1	05/12/2008
KR 10-2001-0100548 A	14/11/2001	KR 10-0378734 B1	31/03/2003

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>A61K 36/75(2006.01)i, A61P 13/08(2006.01)i</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/75; A23L 1/29; A61P 19/10; A61P 13/08 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: 지실, 전립선, 추출물, Poncirus Fructus, 전립선염, 전립선암, 항염증, 항암		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	POKHAREL, Y. R. 외 5명. "Screening of potential chemopreventive compounds from Poncirus trifoliata Raf". Pharmazie. 2006. Vol. 61, No. 9, pp. 796-798 초록, 페이지 796 등 참조.	1-5,7-9
A	SHIN, T-Y. 외 6명. "Anti-inflammatory effect of Poncirus trifoliata fruit through inhibition of NF-kB activation in mast cells". Toxicology in Vitro. 2006. Vol. 20, pp. 1071-1076 전문 참조.	1-5,7-9
A	YI, J-M. 외 5명. "Poncirus trifoliata fruit induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells". Clinica Chimica Acta. 2004. Vol. 340, pp. 179-185 전문 참조.	1-5,7-9
A	KR 10-2013-0023174 A (주식회사한국전통의학연구소 외 2명) 2013. 03. 07. 전문 참조.	1-5,7-9
A	KR 10-2008-0100557 A (아주대학교산학협력단 외 2명) 2008. 11. 19. 전문 참조.	1-5,7-9
A	KR 10-2001-0100548 A (주식회사 브레인트로피아) 2001. 11. 14. 전문 참조.	1-5,7-9
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 2015년 03월 26일 (26.03.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 03월 26일 (26.03.2015)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 7140	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-8741	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SHIN, E. M. 외 5명. "Anti-inflammatory activity of hispidol A 25-methyl ether, a triterpenoid isolated from Poncirus Immaturus Fructus". European Journal of Pharmacology. 2010. Vol. 627, pp. 318-324 전문 참조.	1-5, 7-9

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: 6  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 제6항은 수술 또는 치료에 의한 인체의 치료 및 진단방법에 관한 것이므로 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당하는 것으로 인정됩니다[PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)].
- 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0023174 A	2013/03/07	없음	
KR 10-2008-0100557 A	2008/11/19	KR 10-0872108 B1	2008/12/05
KR 10-2001-0100548 A	2001/11/14	KR 10-0378734 B1	2003/03/31