



- (51) 국제특허분류:
A61K 36/83 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/009110
- (22) 국제출원일: 2011년 11월 28일 (28.11.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0031614 2011년 4월 6일 (06.04.2011) KR
10-2011-0123848 2011년 11월 24일 (24.11.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국
생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE
OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806
Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 김원곤 (KIM, Won
Gon) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지,
305-806 Daejeon (KR). 한백수 (HAN, Baek Soo)
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806
Daejeon (KR). 김경심 (KIM, Kyoung Shim) [KR/KR];
대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon
(KR). 김광수 (KIM, Kwang Soo) [KR/KR]; 대전광역시

유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 강영미
(KANG, Young Mi) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은
동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 김유진 (KIM, Yu
Jin) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-
806 Daejeon (KR). 김천형 (KIM, Chun Hyung)
[KR/US]; 매사추세츠주 렉싱턴 텍스터 로드 57, 02420
Massachusetts (US). 손미진 (SOHN, Mi Jin) [KR/KR];
대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon
(KR). 정희윤 (JUNG, Hoe Yune) [KR/KR]; 대전광역시
유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9
도심공향타워 6층 한일국제특허사무소, 135-973 Seoul
(KR).

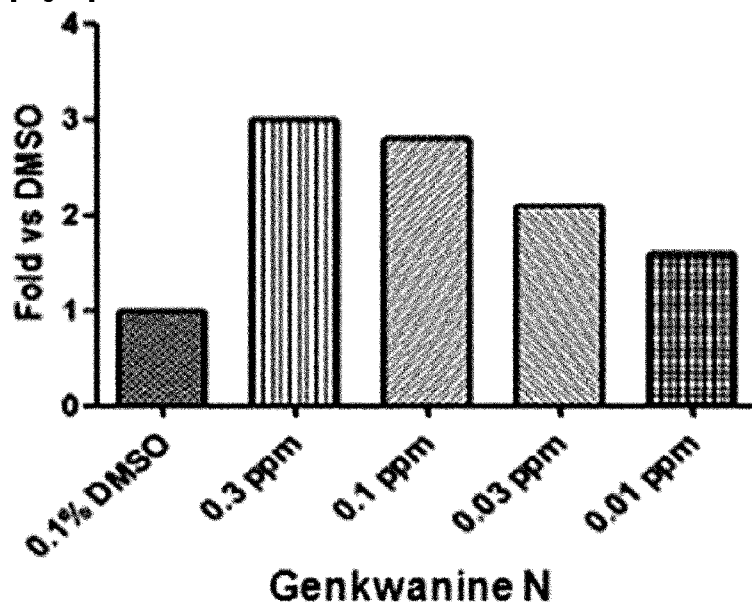
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE PREVENTION OR TREATMENT OF A NEURODEGENERATIVE DISEASE, COMPRISING A *DAPHNE GENKWA* EXTRACT OR A COMPOUND ISOLATED THEREFROM

(54) 발명의 명칭: 팔꽃나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

[Fig. 5]



(57) Abstract: The present invention relates to: a pharmaceutical composition or a Nurrl activating composition for the prevention or treatment of a neurodegenerative disease or a disease induced by impaired Nurrl function, wherein the composition comprises an active ingredient in the form of genkwanine N or yuanhuacine, a *Daphne genkwa* extract comprising one or more of the above compounds, or a fraction thereof; or a functional food additive for preventing or alleviating a neurodegenerative disease or a disease induced by impaired Nurrl function, wherein the additive comprises genkwanine N or yuanhuacine, a *Daphne genkwa* extract comprising one or more of the above compounds, or a fraction thereof; and a method for the prevention or treatment of a neurodegenerative disease or a disease induced by impaired Nurrl function, wherein the method comprises the step of administering the pharmaceutical composition.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



(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, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 겐퀴닌 N(Genkwanine N) 또는 유안후아신(Yuanhuacine), 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 또는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 Nurr1 활성화 조성물, 겐퀴닌 N(Genkwanine N) 또는 유안후아신(Yuanhuacine), 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 신경퇴행성 질환 또는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 첨가물, 및 상기 약학적 조성물들을 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환 또는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 팔꽃나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 겐콰닌 N(Genkwanine N) 또는 유안후아신(Yuanhuacine), 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 또는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 Nurr1 활성화 조성물, 겐콰닌 N(Genkwanine N) 또는 유안후아신(Yuanhuacine), 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 신경퇴행성 질환 또는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 첨가물, 및 상기 약학적 조성물들을 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환 또는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)은 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃고, 그리고 종종 사멸하는 경우의 증상들과 관련된다. 이들은 주로 진행성이기 때문에, 신경퇴행성 질환의 결과는 종종 대단히 파괴적이다. 신경퇴행성 질환을 가진 환자들은 인지(cognitive) 또는 운동(motor) 능력에 있어서의 극심한 퇴화를 겪을 수 있다. 결과적으로, 그들의 삶의 질 및 삶에 대한 기대는 현저히 감소될 수 있다. 인간에게 있어서, 이들 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP), 및 다른 질병들을 포함한다.

[4]

- [5] 한편 상당수의 신경퇴행성 질환에는 Nurr1(nuclear receptor related 1) 단백질이 관련된 것으로 알려져 있다. 상기 Nurr1은 NR4A2(nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2)라고도 알려져 있는 핵수용체 관련 1 단백질을 의미하며, 이는 사람의 NR4A2 유전자에 의해 암호화되는 것으로 알려져 있다. 비록, 상기 Nurr1 단백질은 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor)로서, 아직까지는 상기 단백질에 대한 리간드가 규명되어 있지 않지만, 상기 Nurr1은 세포 내 전사인자의 핵 수용체 패밀리에 속하는 단백질로서, 뇌에서 도파민 시스템(dopaminergic system)을 유지하는 핵심적인 역할을 수행함이 규명되었다. 상기 Nurr1 또는 NR4A2 유전자에 이상이 발생하면, 도파민 시스템의 기능이 손상되어 파킨슨병을 유발시킬 뿐만 아니라, 류마티스 관절염, 정신분열증, 조울증 등의

광범위한 염증성 및 신경성 질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.

- [6] 상기 Nurr1의 기능장애에 의하여 유발되는 대표적인 신경퇴행성 질환인 파킨슨병은 근육운동을 통제하는 뇌신경세포에 영향을 미치는 만성 진행성 신경질환으로서, 중뇌의 흑질(substantia nigra) 부위에 신경전달물질인 도파민을 만들어내는 세포가 갑자기 손상되거나, 퇴화되거나 또는 그 수가 크게 감소할 경우에 발생하는데, 상기 도파민은 신체의 운동을 용이하게 하기 위해 세포 사이에서 신호를 전달하기 위한 중요한 화학물질이기 때문에, 전형적으로 나타나는 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 및 언어능력 손상과 같은 운동성 질환 증상이 야기된다. 이처럼 도파민 생성세포가 손상되는 원인은 명확히 밝혀져 있지 않으나, 뇌의 동맥경화증, 일산화탄소 중독, 약물, 부갑상선 기능저하증 등에 의한 대사성, 외상성 뇌염 후유증 등이 관여하는 것으로 연구되고 있다.
- [7] 이같은 파킨슨병의 치료를 위한 약물로서, 엘도파(l-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘테프릴(Eldepryl=deprenyl) 등이 알려져 있으며, 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것이며, 따라서 꾸준히 지속적인 약물의 복용을 필요로 한다. 그러나, 이러한 약물들의 장기 투여는 약물 부작용의 문제점을 야기하게 된다. 예를 들어, 항콜린 약제들은 자율신경계 이상이나 정신기능의 이상 등이 나타날 수 있어 고령의 환자들에게 지속적으로 투여하는 것에 한계가 있다. 또한, 엘도파 제제의 경우 장기간 동안의 복용에 따라 점차적으로 효과가 떨어지고, 몸이 뒤틀리고 손이나 발이 저절로 움직이는 이상운동이 생기는 등의 부작용이 발생하게 된다.
- [8] 이러한 부작용을 방지하기 위하여, 천연물로부터 유래한 파킨슨병의 치료제를 개발하려는 노력이 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 특허공개 제2001-0081188호에는 신경보호작용을 갖는 황금(Scutellariae Radix) 추출물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 및 노인성 치매를 포함하는 뇌질환 등의 신경계 질환의 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있고, 특허공개 제2004-0012396호에는 백강잠 101A(Beauveria Bassiana 101A)의 추출물을 포함하는 파킨슨병 및 중풍과 같은 퇴행성 뇌질환 치료용 조성물이 개시되어 있으며, 특허공개 제2004-0029072호에는 웅구양구오(wenguanguo) 껍질로부터 얻은 추출물을 포함하는 파킨슨병 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있고, 특허공개 제2010-0060123호에는 생강 추출물 또는 쇼가올을 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있으며, 특허공개 제2010-0060949호에는 복숭아 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 등의 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 신경세포 보호용 조성물이 개시되어 있고, 특허공개 제2011-0013466호에는 포도씨 추출물 또는 이로부터 유래되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있다. 그러나, 이들 천연물로부터 유래된 성분은 부작용이 없는 대신 파킨슨병의 치료효율이 낮다는 단점이 있었다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)의 줄기 및 뿌리로부터 유래된 추출물이 천연물로부터 유래되어 부작용이 없으면서도, Nurr1을 활성화시킴으로써, 도파민성 신경세포의 분화, 성장 및 유지를 증진시키고, 그 결과 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 파킨슨병을 비롯한 다양한 신경퇴행성 질환에 대한 치료효과가 우수함을 확인하였다. 나아가, 상기 팔꽃나무 추출물의 활성성분을 분석하여 추출물 중 Genkwanine N 및 Yuanhuacine 화합물이 Nurr1 단백질 활성화에 우수한 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 하나의 목적은 화학식 1로 표시되는 겐과닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 팔꽃나무 추출물, 이의 분획물 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 팔꽃나무 추출물, 이의 분획물 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 Nurr1 활성화 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 겐과닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 첨가물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 겐과닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 팔꽃나무 추출물, 이의 분획물 또는 화학식 1 또는

화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

[19] 본 발명의 팔꽃나무 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물은 천연물 유래 화합물로서 별다른 부작용을 나타내지 않으면서도, 신경손상에 의한 Nurr1 단백질 활성 억제를 회복시키는데 우수한 효과를 나타냄으로써 Nurr1 단백질의 활성 억제로 인해 유발되는 파킨슨병을 비롯한 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 팔꽃나무 메탄올 추출물의 농도에 따른 Nurr1 단백질 활성도의 변화를 루시퍼라제 분석을 통하여 나타낸 그래프이다.

[22] 도 2는 6-OHDA(6-hydroxydopamine)에 의해 유도되는 신경세포 사멸에 대한 팔꽃나무 추출물의 농도에 따른 억제효과를 나타낸 그래프이다.

[23] 도 3은 팔꽃나무 메탄올 추출물의 파킨슨 동물모델에서의 치료효과를 나타낸 그래프이다.

[24] 도 4는 팔꽃나무의 다양한 용매 추출물에 의한 Nurr1 단백질 활성도 변화를 나타낸 그래프이다.

[25] 도 5는 팔꽃나무 추출물로부터 분리된 Genkwanine N과 Yuanhuacine 화합물의 농도에 따른 Nurr1 단백질 활성도 증가를 나타낸 그래프이다.

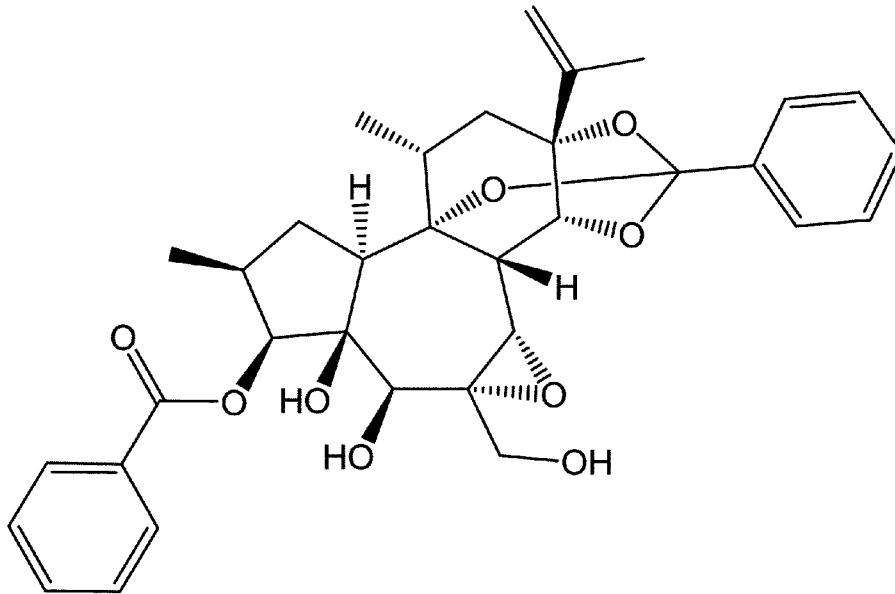
[26]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

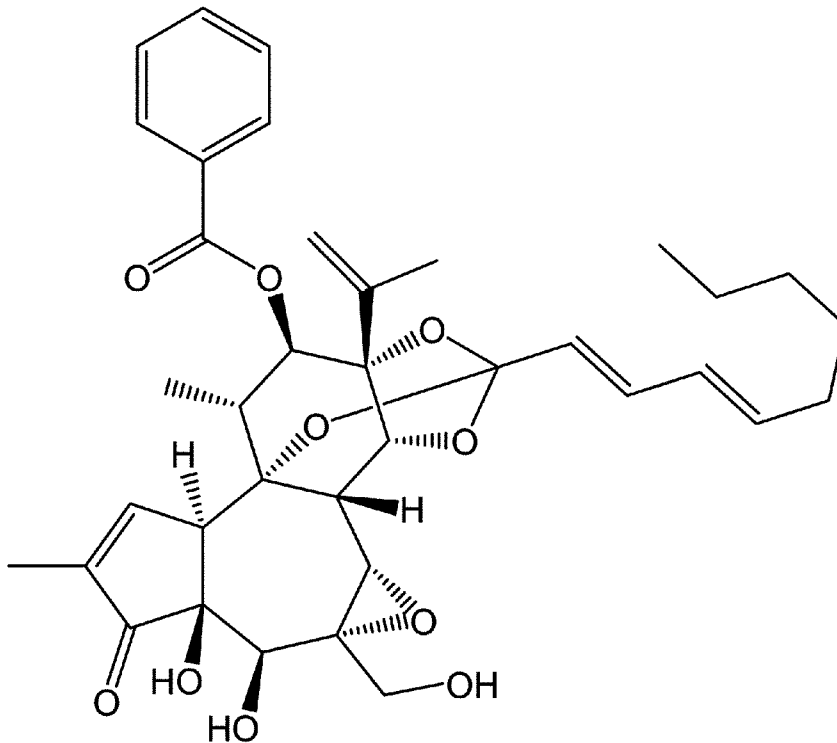
[27] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 겐관닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[28]

[29] 화학식 1



[30] 화학식 2



[31] 본 발명의 Genkwanine N은 상기 화학식 1로 표시되는 테르페노이드, 구체적으로는 다이테르펜 에스테르 화합물로서, 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, Genkwanine N이 포함되어 있는 것으로 당업계에 공지된 식물로부터 극성 또는 비극성 용매를 사용하여 분리 정제할 수 있다. 또는 상업적으로 시판되는 화합물을 구입하거나 합성하여 제조할 수 있다. 바람직하게는 팔꽃나무로부터 추출, 분리할 수 있다.

[32] 본 발명의 Yuanhuacine은 상기 화학식 2로 표시되는 테르페노이드, 구체적으로는 다이테르펜 에스테르 화합물로서, 당업자에게 공지된 방법에

따라 제조될 수 있다. 예를 들어, Yuanhuacine이 포함되어 있는 것으로 당업계에 공지된 식물로부터 극성 또는 비극성 용매를 사용하여 분리 정제할 수 있다. 또는 상업적으로 시판되는 화합물을 구입하거나 합성하여 제조할 수 있다. 바람직하게는 팔꽃나무로부터 추출, 분리할 수 있다.

- [33] 본 발명의 용어 "팔꽃나무(*Daphne genkwa*)"는 쌍떡잎식물 도금양목 팔꽃나무과의 낙엽관목을 의미한다. 조기꽃나무, 이팔나무라고도 하며, 주로 바닷가 근처에서 성장하며, 한의학에서는 이뇨, 수종, 신장염 등의 증상을 치료하는데 사용한다.
- [34] 본 발명의 용어 "팔꽃나무 추출물"은 팔꽃나무로부터 수득한 추출물을 의미하는데, 바람직하게는 팔꽃나무의 줄기 또는 뿌리로부터 수득한 추출물을 의미하며, 보다 바람직하게는 팔꽃나무의 줄기 또는 뿌리를 유기용매 추출하여 수득한 추출물을 의미하고, 구체적으로는 팔꽃나무의 줄기 또는 뿌리를 C1 내지 C5의 저급 알킬알콜로 추출하여 수득한 추출물을 의미한다. 공지된 바에 의하면, 팔꽃나무 추출물은 크게 쿠마린(coumarins)류, 플라보노이드(flavonoids)류, 리그난(lignans)류, 테르페노이드(terpenoids)류 및 이 외 화합물의 크게 5가지 종류의 화합물을 포함하며 총 화합물의 수는 수백 가지에 이른다[Xu, W.-C. *et al.*, *Chem. Biodiversity*, 2011, 8: 1215-1233].
- [35] 본 발명의 일실시예에 의하면, 팔꽃나무의 줄기 및/또는 뿌리 분쇄물을 건조중량의 약 2 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 C1 내지 C5의 저급 알킬알콜 등의 유기용매를 용매로 사용하여 3 내지 5시간 동안 침지하고 여과하여 고형분과 1차 액상성분을 분리하고, 상기 고형분을 동일한 방법으로 침지하고 여과하여 2차 액상성분을 수득하여 혼합하였다. 이후 상기 혼합물을 감압 농축시키고 잔사를 동결건조하여 팔꽃나무 추출물을 수득하였다. 상기 팔꽃나무 추출물은 상기 Genkwanine N 또는 Yuanhuacine 화합물을 포함할 수 있다.
- [36] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 수득한 팔꽃나무 추출물을 헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올, 또는 증류수 등의 유기용매의 혼합용매를 이용하여 각 용매의 분획층을 분리하여 수득하고, 크로마토그래피 등의 당업계에 공지된 분리방법을 이용하여 각각의 분획으로부터 활성성분을 고순도로 분리 정제할 수 있다. 상기 팔꽃나무 추출물의 헥산 분획은 본 발명의 Genkwanine N 또는 Yuanhuacine 화합물을 포함할 수 있다.
- [37] 본 발명자들은 부작용이 없으면서도, Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 파킨슨병을 비롯한 다양한 질환을 예방 또는 치료하는 효과가 우수한 천연물 유래의 성분을 규명하기 위하여, 다양한 천연물로부터 수득한 다양한 형태의 추출물을 대상으로 연구를 수행한 결과, 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)의 유기용매 추출물이 Nurr1 활성도를 증가시킬 수 있음을 확인하였다(도 1).
- [38] 또한, 본 발명자들은 상기 Nurr1 활성도를 증가시키는 팔꽃나무 추출물이 신경세포 사멸을 유도하는 것으로 알려진 화합물(예를 들어, 6-OHDA 등)에 의한

신경세포 손상을 예방하는 효과를 나타냄을 확인하였다(도 2). 뿐만 아니라, 랫트 뇌의 도파민성 신경세포를 사멸시킨 동물모델에 팔꽃나무 추출물을 혼합한 사료로 급이시킨 결과, 사멸된 도파민성 신경세포에 의해 손상된 신경기능이 서서히 개선됨을 확인할 수 있었다(도 3).

[39] 이와 같이, 본 발명자는 팔꽃나무 추출물이 Nurr1 단백질 활성도를 증가시킴으로써, Nurr1 단백질의 활성화에 의하여 직접적으로 영향을 받는 도파민성 신경세포의 손상에 의하여 유발되는 다양한 질환, 예를 들어, 파킨슨병 및 파킨슨병 이외의 Nurr1의 기능장애에 의해 유발되는 다양한 질환의 예방 또는 치료에 효과를 나타냄을 확인하였다.

[40] 본 발명자들은 팔꽃나무 추출물 중 Nurr1 단백질을 활성화 하는 활성분획 및 활성성분을 분석한 결과, 팔꽃나무의 헥산 또는 에틸 아세테이트 분획물이 Nurr1 단백질 활성화에 효과를 보임을 확인하였고(도 4), 그 중 Genkwanine N 및 Yuanhuacine 화합물이 Nurr1 단백질 활성화에 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다(도 5). Nurr1 단백질은 중추신경계의 특정한 신경세포군에서 도파민성 표현형의 확립과 유지에 관여하며, Nurr1의 발현 감소가 파킨슨병을 비롯한 신경퇴행성 질환에 관여한다는 것이 밝혀졌는 바[Chu, Y. *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 2006, 494(3): 495-514], 상기 팔꽃나무의 헥산 또는 에틸 아세테이트 분획물 및 Genkwanine N 또는 Yuanhuacine이 Nurr1 단백질 활성도를 증가시킴으로써, Nurr1 단백질의 활성화에 의하여 직접적으로 영향을 받는 도파민성 신경세포의 손상에 의하여 유발되는 다양한 질환, 예를 들어, 파킨슨병 및 파킨슨병 이외의 Nurr1의 기능장애에 의해 유발되는 다양한 질환의 예방 또는 치료에 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[41] 따라서, Nurr1의 활성화에 효과를 가지는 본 발명의 Genkwanine N 및 Yuanhuacine 화합물은 파킨슨병을 비롯한 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 용어 "신경퇴행성 질환"이란 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃고, 그리고 사멸하는 경우 나타나는 증상들과 관련된 질환을 의미한다. 주로 진행성이어서 그 결과는 매우 파괴적이고, 상기 질환을 가진 환자들은 인지 또는 운동 능력에 있어서 극심한 퇴화를 겪을 수 있다. 상기 신경퇴행성 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)를 포함한다.

[42]

[43] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1의 Genkwanine N 또는 화학식 2의 Yuanhuacine, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 상기 화합물의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 원하지 않는 독물학적 효과는

최소한으로 나타내는 모든 염을 의미한다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸 에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄 술폰산, *p*-톨루엔 술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[44] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[45] 상기 화학식 1의 Genkwanine N 또는 화학식 2의 Yuanhuacine 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, Genkwanine N 또는 Yuanhuacine 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 거의 포함한다. 예를 들어 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[46] 본 발명의 다른 실시양태에 의하면, 본 발명은 상기 Genkwanine N 또는 Yuanhuacine, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하고 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[47] 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를

말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

[48]

[49] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 팔꽃나무 추출물, 이의 분획물 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[50]

본 발명에서 "Nurr1(nuclear receptor related 1)"은 NR4A2(nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2)라고도 알려져 있는 핵수용체 관련 1 단백질을 의미하며, 이는 사람의 NR4A2 유전자에 의해 암호화되는 것으로 알려져 있다. 또한 상당수의 신경퇴행성 질환에는 관련된 것으로 알려져 있다. 비록, 상기 Nurr1 단백질은 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor)로서, 아직까지는 상기 단백질에 대한 리간드가 규명되어 있지 않지만, 상기 Nurr1은 세포 내 전사인자의 핵 수용체 패밀리에 속하는 단백질로서, 뇌에서 도파민 시스템(dopaminergic system)을 유지하는 핵심적인 역할을 수행함이 규명되었다. 상기 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환은 이에 제한되지 않으나 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP) 등의 신경퇴행성 질환과 도파민 기능장애로 유발되는 류마티스 관절염, 정신분열증, 조울증 등의 광범위한 염증성 질환을 포함한다.

[51]

[52] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 팔꽃나무 추출물, 이의 분획물 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 Nurr1 활성화 조성물을 제공한다.

[53]

본 발명의 Nurr1 단백질은 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor)로서, 아직까지는 상기 단백질에 대한 리간드가 규명되어 있지 않지만, 상기 Nurr1은 세포 내 전사인자의 핵 수용체 패밀리에 속하는 단백질로서, 뇌에서 도파민 시스템(dopaminergic system)을 유지하는 핵심적인 역할을 수행함이 규명되었다. 또한 Nurr1 단백질의 이상에 의해 도파민 시스템의 장애를 유발하고 신경퇴행성 질환의 원인이 될 수 있음이 알려져 있어, Nurr1은 신경퇴행성 질환 관련 단백질 타겟으로 연구되고 있다. 따라서, 본 발명의 Genkwanine N 또는 Yuanhuacine 화합물은 Nurr1 기능 연구용 등으로 사용 가능하나 이에 제한되지는 않는다.

[54]

[55] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 겐콰닌 N(Genkwanine N)

및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 첨가물을 제공한다.

- [56] 본 발명의 조성물은 천연물인 팔꽃나무 추출물, 또는 이로부터 분리된 화합물로 안정성이 이미 확인되었으므로, 평소의 식습관에 따라 장기간 동안 상식할 경우, 파킨슨병을 포함하는 다양한 신경퇴행성 질환을 예방함은 물론 발병된 상기 질환의 증상을 개선시키는 효과를 나타낼 수 있다.
- [57] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 화학식 1의 Genkwanine N 또는 화학식 2의 Yuanhuacine 화합물, 또는 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 Nurr1 단백질을 활성화하여 신경퇴행성 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [58] 본 발명에서 용어 "개선"은 상기 화학식 1의 Genkwanine N 또는 화학식 2의 Yuanhuacine 화합물, 또는 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 Nurr1 단백질을 활성화하여 신경퇴행성 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [59] 본 발명의 상기 화학식 1의 Genkwanine N 또는 화학식 2의 Yuanhuacine 화합물, 또는 상기 화합물을 하나 이상 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물들을 식품 첨가물로 사용하는 경우, 식품 또는 음료에 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 또는 다른 식품 첨가물과 함께 조합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 첨가물을 식품 또는 음료의 제조시에 첨가할 경우, 이의 첨가량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종적인 식품의 중량에 대하여 1 내지 5 중량%, 바람직하게는 1 내지 3 중량%의 첨가량으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 첨가량은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [60] 아울러, 상기 식품 또는 음료의 종류는 특별히 이에 제한되지 않으나, 통상적인 의미에서의 식품 또는 음료를 모두 포함하고, 바람직하게는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 포함한다.
- [61] 이때, 본 발명의 팔꽃나무 추출물로부터 분리한 화합물을 포함하는 식품 첨가물을 식품에 첨가할 경우에는, 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜 등의 보조성분과 함께 첨가될 수

있고, 상기 보조성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종적인 식품의 중량에 대하여 0.01 내지 0.1 중량%임이 바람직하다.

- [62] 또한, 본 발명의 팔꽃나무 추출물로부터 분리한 화합물을 포함하는 식품 첨가물을 음료에 첨가할 경우에는, 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 감미제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있고, 상기 천연 탄수화물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 단당류(예를 들어, 포도당, 과당 등), 이당류(예를 들어, 말토스, 수크로스 등), 다당류(예를 들어, 덱스트린, 사이클로덱스트린 등), 또는 당알콜(예를 들어, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등) 등을 사용할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 음료제품 100 ml 당 약 0.01 내지 0.04 g 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03 g의 비율로 포함됨이 바람직하다.

[63]

- [64] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 겐콰닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [65] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 팔꽃나무 추출물, 이의 분획물 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [66] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 겐콰닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 신경퇴행성 질환 치료제 제조를 위하여 사용되는 용도를 제공한다.

- [67] 또한, 본 발명은 팔꽃나무 추출물, 이의 분획물 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환 치료제 제조를 위하여 사용되는 용도를 제공한다.

- [68] 본 발명의 용어 "개체"란 신경퇴행성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 신경퇴행성 질환 또는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별

치료제로 투여하거나, 기존의 신경퇴행성 질환 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

- [69] 본 발명의 용어 "투여"란 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물 이외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스, 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 천연물로부터 유래된 상기 팔꽃나무 추출물의 활성성분은 소화로 인하여 손실될 수 있으므로, 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [70] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

- [71] 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 예방 또는 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는

약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[72]

발명의 실시를 위한 형태

[73]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[74]

[75]

실시예 1: 팔꽃나무 추출물의 제조

[76]

[77]

팔꽃나무(*Daphne genkwa*)의 줄기 1,260.93 g과 뿌리 1,487.17 g을 세절한 다음, 13 L 메탄올에 4시간 동안 침지하고, 여과하여 고형분과 1차 액상성분을 분리하였다. 상기 분리된 고형분을 다시 13 L 메탄올에 4시간 동안 침지하고, 여과하여 2차 액상성분을 수득하였다. 상기 수득한 1차 액상성분과 2차 액상성분을 혼합하고, 상기 혼합물을 감압하에서 농축시킨 다음, 잔사를 동결건조하여 172.71 g의 팔꽃나무 추출물을 제조하였다.

[78]

[79]

실시예 2: 팔꽃나무 추출물로부터 다양한 용매에 의한 활성성분의 분리

[80]

[81]

상기 실시예 1에서 수득한 팔꽃나무 뿌리 및 줄기를 메탄올 추출하여 감압농축하여 건조시킨 추출물에 다양한 용매를 차례로 가하여 각 용매에 대한 분획의 Nurr1 단백질 활성에 대한 효과를 확인하였다. 이때, 사용된 용매는 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate; EtOAc), 증류수(distilled water; dH₂O), 및 부탄올(butanol; BuOH)이다.

[82]

먼저 건조 팔꽃나무 추출물을 2 L의 증류수와 헥산의 1:1 혼합용매에 녹여 분획하여 헥산 층을 얻었다. 남은 증류수 층에 다시 2 L의 증류수와 에틸 아세테이트의 1:1 혼합용매를 가하여 분획하여 에틸 아세테이트 층을 얻고, 동일한 방법으로 부탄올 층과 증류수 층을 수득하였다. 상기 분리 수득한 각 용매 층의 분획에 대하여 Nurr1 활성실험을 실시한 결과, 헥산 및 에틸 아세테이트 분획이 높은 활성을 갖는 것을 확인하였다. 따라서, 해당 활성 분획에 대한 대량분리를 진행하기 위하여 실시예 1의 방법과 유사하게 팔꽃나무 뿌리, 줄기 건조시료 2.75 kg을 메탄올 용매에 13 L씩 2회 반복하여 냉침하고 농축하여 172.71 g의 메탄올 추출물을 수득하였다. 이 중 30.1 g을 증류수에 현탁하여 헥산, 에틸 아세테이트 순으로 분획하였다. 두 분획 중 더 높은 활성을 가진 것으로 확인된 헥산 분획물(3 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 헥산과 에틸 아세테이트의 구배(gradient) 혼합용매(10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10)로 용리시켜 총 50개의 분획을 얻었다. 이 중 헥산:에틸 아세테이트의 1:2 용매조건에서 용리된 32 내지 38 분획(268 mg)에서 Nurr1

활성이 관찰되었다. 따라서, 상기 32 내지 38 분획을 모아 감압 농축하고, 85% 아세토니트릴 조건으로 역상 실리카겔 프랩 TLC(reverse phase silica gel prep TLC)를 실시하여 총 11개의 밴드를 얻었다. 이 중 밴드 6(Rf=0.44)과 밴드 8(Rf=0.33)에서 Nurr1 활성화가 관찰되어, 상기 두 개의 밴드로부터 메탄올로 활성물질을 추출하고 감압 농축하여 각각 B6과 B8의 두 화합물을 얻었다. 최종적으로 80% 아세토니트릴(0.025% 트리플루오로아세트산; trifluoroacetic acid; TFA)을 용출액으로하여 ODS HPLC를 수행하여 이 두 화합물로부터 99% 이상의 순도로 두 가지의 활성성분 겐콰닌 N(Genkwanine N)과 유안후아신(Yuanhuacine)을 단일물질로 성공적으로 분리하였다.

[83]

[84] 실시예 3: Nurr1 단백질 활성화에 대한 팔꽃나무 추출물의 효과

[85]

[86] GLA4 유전자가 결합할 수 있는 염기서열(5'-CTCGGAGGACAGTACTCCG-3, 서열번호 1)이 8회 반복된 유전자를 리포터 유전자인 루시퍼라제에 결합시킨 벡터를 합성한 후, Nurr1-LBD를 포함한 DNA와 베타-갈락토시다제(β -galactosidase)를 가진 DNA 등 3종의 플라스미드 DNA를 BE(2)C 세포에 주입(transfection)한 뒤 6시간 후, 팔꽃나무 추출물을 1 내지 200 ppm의 농도로 처리하였다. 이렇게 처리한 세포를 20시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양한 후, 루시퍼라제 분석을 수행하였다(도 1).

[87] 도 1은 팔꽃나무 메탄올 추출물의 농도에 따른 Nurr1 단백질 활성화도의 변화를 루시퍼라제 분석을 통하여 나타낸 그래프이다. 대조군으로는 0.1% DMSO를 사용하였고, 이때의 활성화에 배수로 활성화도의 증가를 나타내었다. 팔꽃나무 추출물을 20 ppm의 농도로 처리하였을 때, 최대의 활성을 나타내었고 이때의 값은 대조군의 약 3배에 달하였다. 도 1에서 보듯이, 인간 유래 신경모세포(neuroblast)인 BE(2)C 세포에서 팔꽃나무 추출물에 의한 Nurr1 단백질의 활성화가 증가함을 확인하였다.

[88]

[89] 실시예 4: SH-SY5Y 세포에 대한 팔꽃나무 추출물의 효과

[90]

[91] 인간 유래 신경모세포종(neuroblastoma)인 SH-SY5Y 세포를 5×10^5 세포수/웰의 세포농도로 24-웰 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 상기 배양된 세포에 세포사멸을 유도하는 6-OHDA(6-hydroxydopamine)(50 μ M)를 단독으로 또는 서로 다른 농도(5 내지 20 ppm)의 팔꽃나무 추출물과 함께 처리하고, 다시 24시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 24시간 경과 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 1 mg/ml의 농도로 각 웰에 처리하고, 1시간 동안 5% 이산화탄소 배양기에 보관한 다음, MTT 추출용액(extraction solution)을 가하였다. 이어 37°C에 24시간 동안

보관하고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 2).

- [92] 도 2는 6-OHDA에 의해 유도되는 신경세포 사멸에 대한 팔꽃나무 추출물의 농도에 따른 효과를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 6-OHDA에 의해 유도되는 신경세포 사멸이 팔꽃나무 추출물에 의해 저해되어 팔꽃나무 추출물 처리군의 세포 생존률이 대조군의 70% 이상의 수준까지 회복되는 것을 확인하였다.

[93]

[94] 실시예 5: 신경세포를 손상시킨 랫트에 대한 팔꽃나무 추출물의 효과

[95]

- [96] 6주령 SD 랫트(코아텍 사)의 중뇌의 흑질 부위에 존재하는 도파민성 신경세포를 특이적으로 사멸시키기 위하여, 정위고정성 도구(stereotaxic tool)를 이용하여 뇌의 AP(-4.3), ML(-1.8), DV(-8.2) 부위와 AP(-5.0), ML(-1.8), DV(-8.2) 부위에 6-OHDA(1 µg/µl)를 1 µl/min의 속도로 4 µg을 직접 주입하였다. 이때, 데시프라민(desipramine)을 25 mg/kg의 용량으로 상기 6-OHDA 투여 30분 전에 투함으로써, 도파민성 신경세포 이외의 세포사는 억제시켰다.

- [97] 이후, 팔꽃나무 추출물의 1일 투여량이 500 mg/kg이 되도록 상기 추출물이 혼합된 사료를 상기 랫트에게 2주일간 급이시켰다. 이때, 대조군으로는 상기 추출물이 혼합되지 않은 먹이를 급이시킨 랫트를 사용하였다.

- [98] 약물학적 시험의 오차를 보강하기 위한 비약물학적 검사방법인 스텝 테스트(steping test)를 수행하였다. 구체적으로, 길이 90 cm의 탁자 위에서 손으로 쥐의 세 다리를 제어한 상태에서 탁자면 위를 15초 동안 이동시키며 제어되지 않은 다리가 탁자 표면을 딛는 수를 각 다리별로 3회 반복하여 측정하였다. 상기 스텝 테스트의 측정 시점은 6-OHDA를 주입하기 3일 전, 6-OHDA 주입 후 2주, 4주 및 6주가 경과된 시점이었다(도 3).

- [99] 도 3은 도파민성 신경세포가 사멸된 랫트에 대한 팔꽃나무 추출물의 효과를 스텝 테스트를 통하여 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 3에서 보듯이, 팔꽃나무 추출물이 투여된 랫트는 투여되지 않은 랫트에 비하여 스텝 수가 증가함을 알 수 있었다.

[100]

[101] 실시예 6: 다양한 용매에 의한 팔꽃나무 추출물의 효과

[102]

- [103] 상기 실시예 2에서 다양한 용매를 이용하여 수득한 팔꽃나무 추출물의 분획물의 Nurr1 단백질 활성화에 대한 효과를 실시예 3에 기재된 방법과 유사한 방법에 따라 확인하였다. 용매로는 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate; EtOAc), 증류수(distilled water; dH₂O), 및 부탄올(butanol; BuOH)을 사용하였다.

- [104] 도 4에 나타낸 바와 같이, 헥산 분획물에서 강한 Nurr1 단백질 활성화 효과가 나타났으며, 1 ppm의 헥산 분획물은 Nurr1 단백질의 활성을 380%까지 증가시켰다.

[105]

[106] 실시예 7: 활성성분 Genkwanine N과 Yuanhuacine의 효과

[107]

[108] 실시예 3과 유사한 방법으로, Nurr1 단백질의 활성화에 대한 Genkwanine N과 Yuanhuacine 효과의 농도의존성을 실험하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

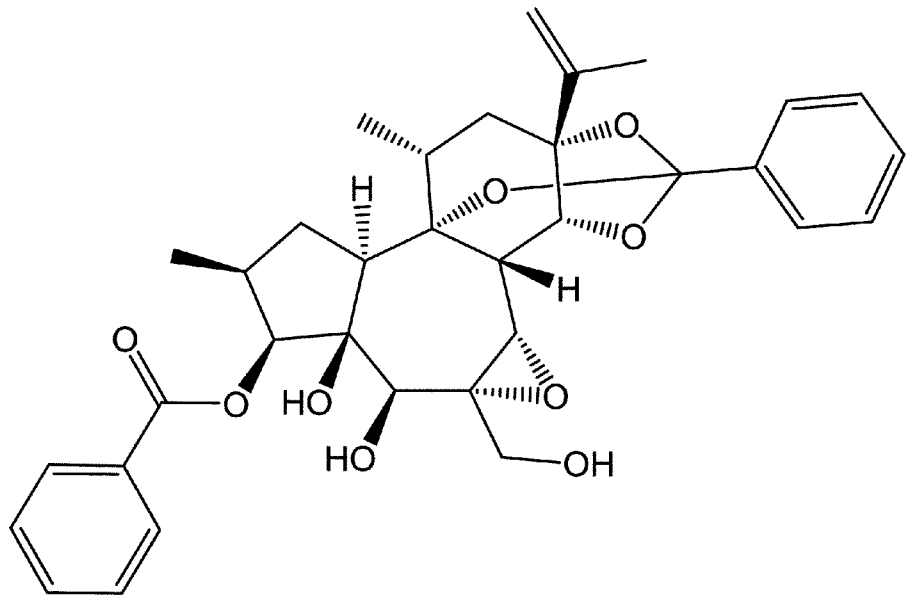
[109] 도 5에 나타낸 바와 같이, Genkwanine N과 Yuanhuacine은 두가지 화합물 모두 0.3 ppm에서 300%가 넘는 활성을 보였고, 특히 0.01 ppm 즉, 각각에 대하여 16 nM과 15 nM의 낮은 나노몰랄 수준의 농도에서도 Nurr1 단백질의 활성을 각각 60 및 70% 향상시켰다.

청구범위

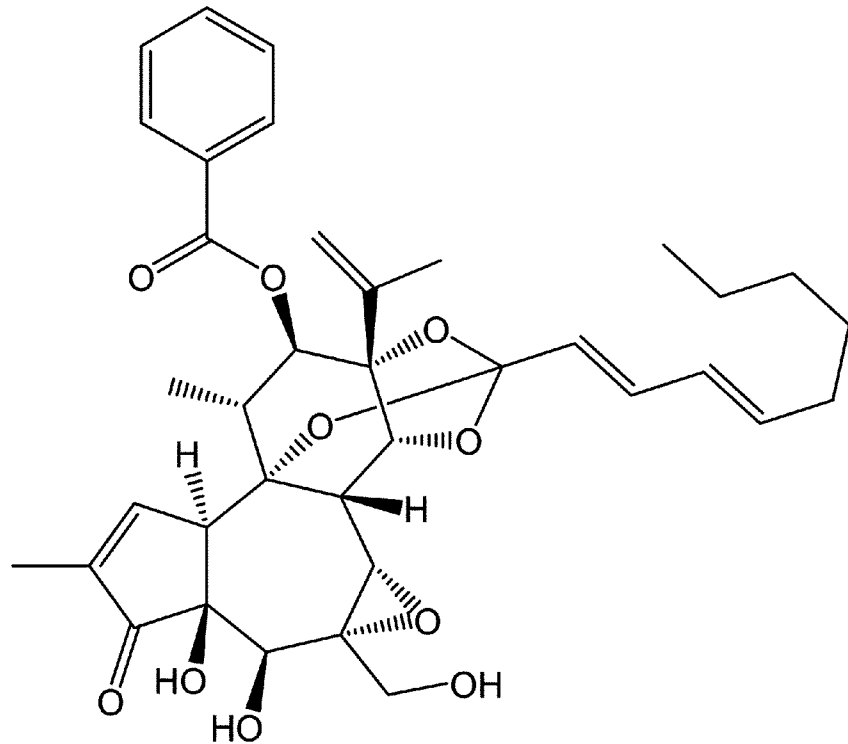
[청구항 1]

화학식 1로 표시되는 겐콰닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



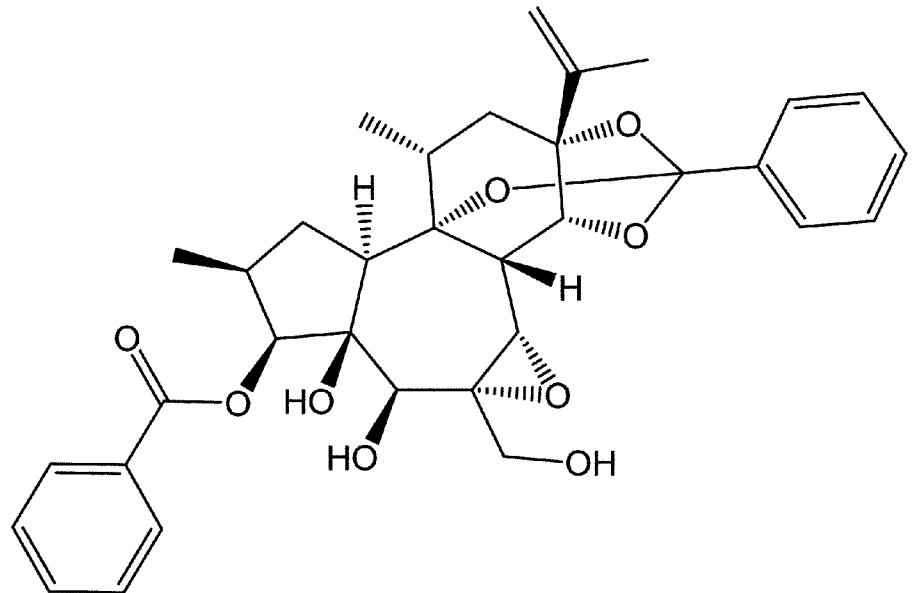
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD)인 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 겐퀴닌 N(Genkwanine N) 또는 유안후아신(Yuanhuacine)은 팔꽃나무 추출물로부터 분리된 화합물인 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 추출물은 물, C1 내지 C5의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,

상기 분획물은 헥산 분획물 또는 에틸 아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

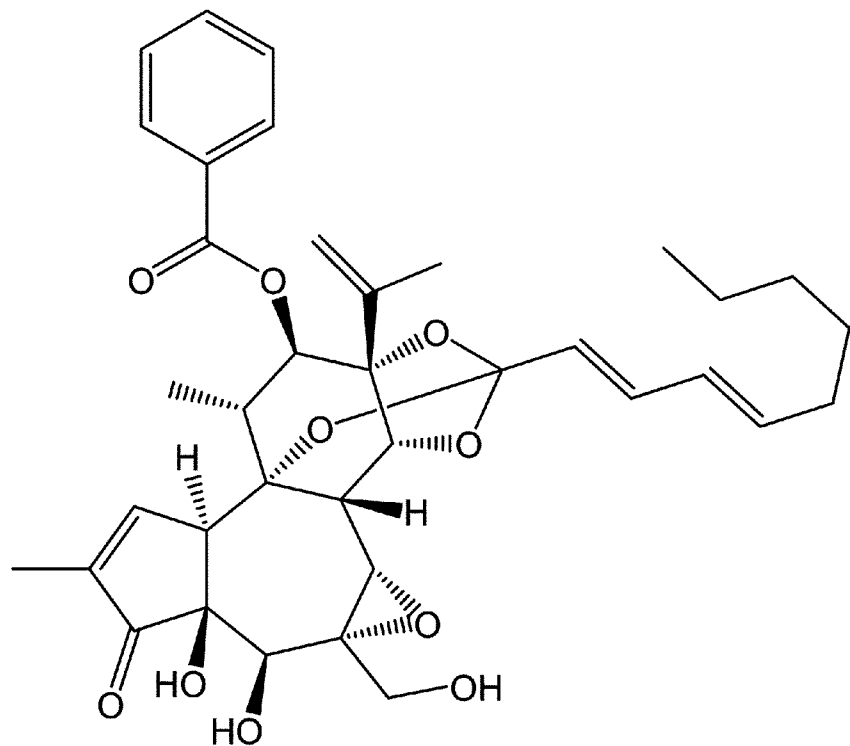
[청구항 8]

팔꽃나무 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



[청구항 9]

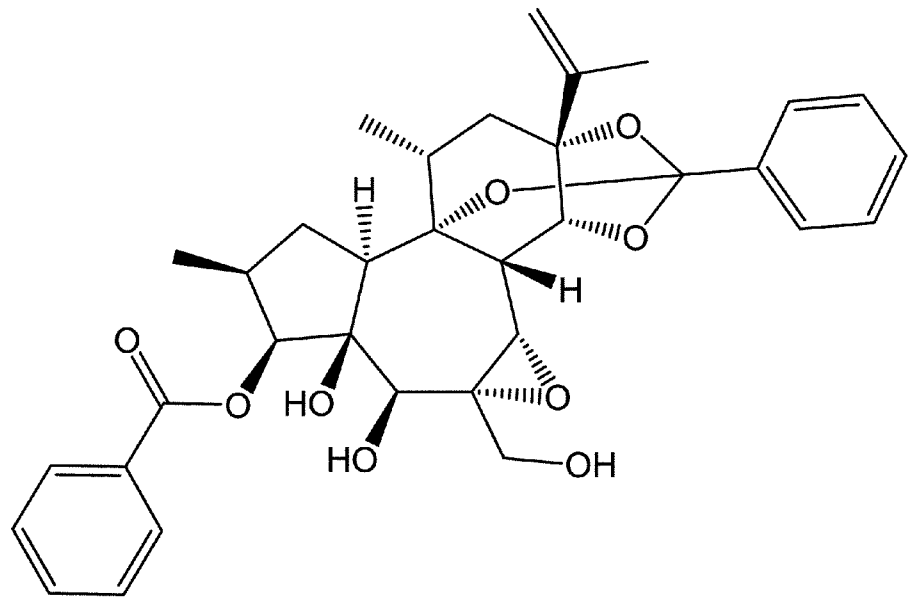
제8항에 있어서,
상기 Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 질환은

파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP), 류마티스 관절염, 정신분열증(schizophrenia) 및 조울증(manic depression)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

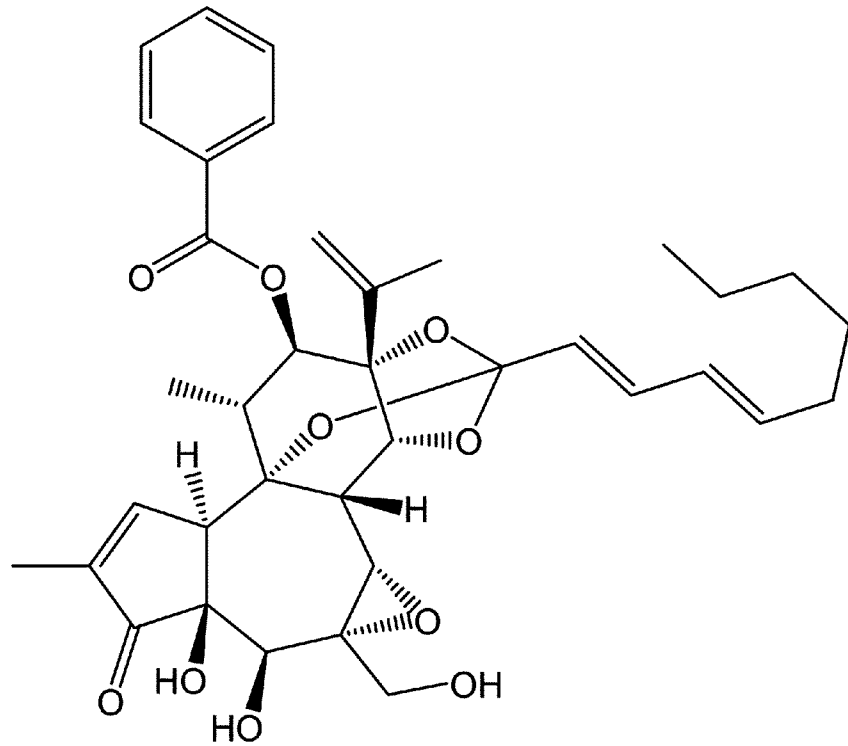
[청구항 10]

팔꽃나무 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 Nurr1 활성화 조성물.

[화학식 1]



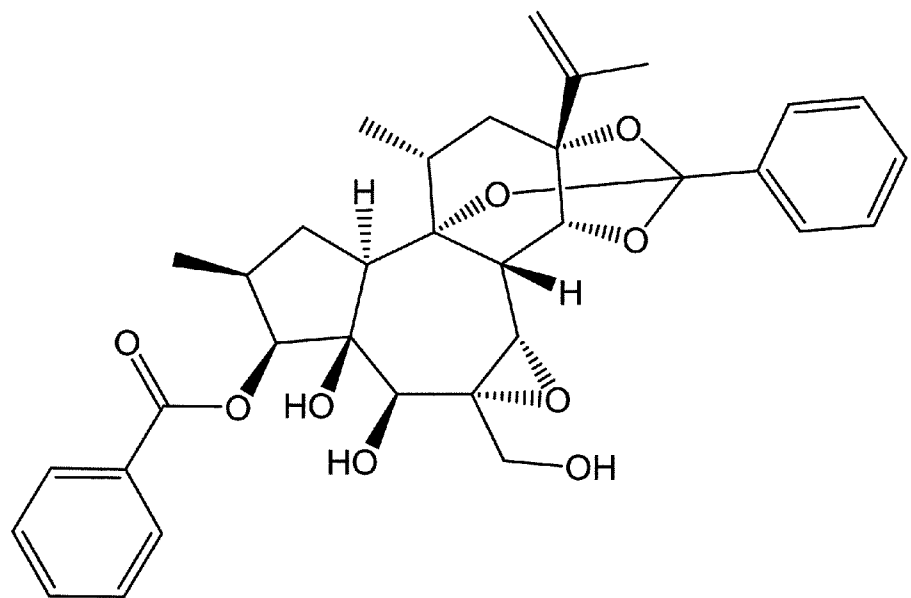
[화학식 2]



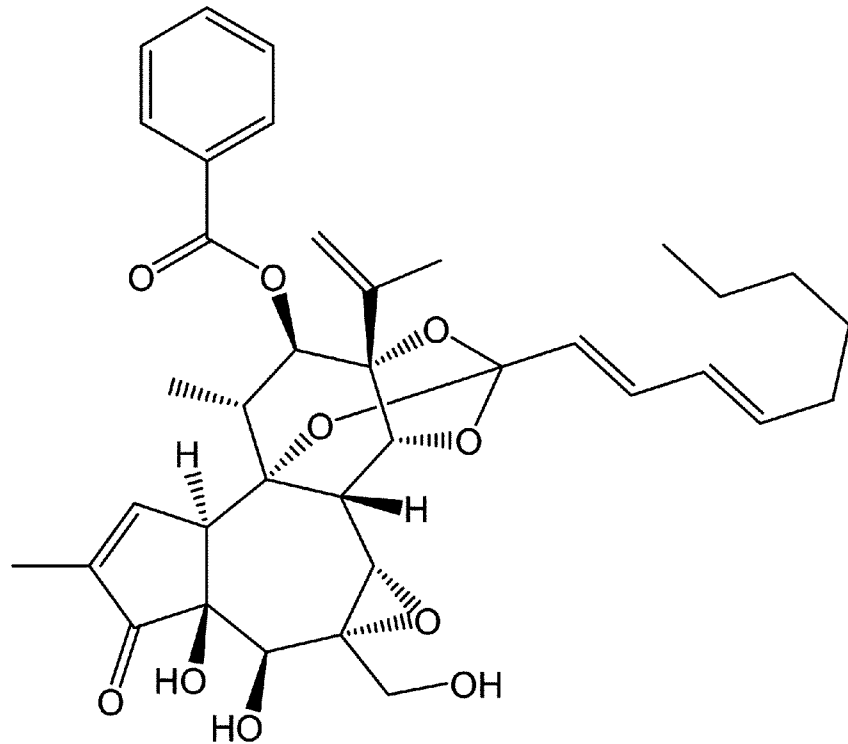
[청구항 11]

화학식 1로 표시되는 겐과닌 N(Genkwanine N) 및 화학식 2로 표시되는 유안후아신(Yuanhuacine)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 테르페노이드(terpenoid) 화합물, 또는 상기 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물을 포함하는 팔꽃나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 첨가물.

[화학식 1]



[화학식 2]



[청구항 12]

제11항에 있어서,
 상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD),
 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic
 lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD),
 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵
 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 및 진행성 핵상마비(progressive
 supranuclear palsy; PSP)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느
 하나인 것인 기능성 식품 첨가물.

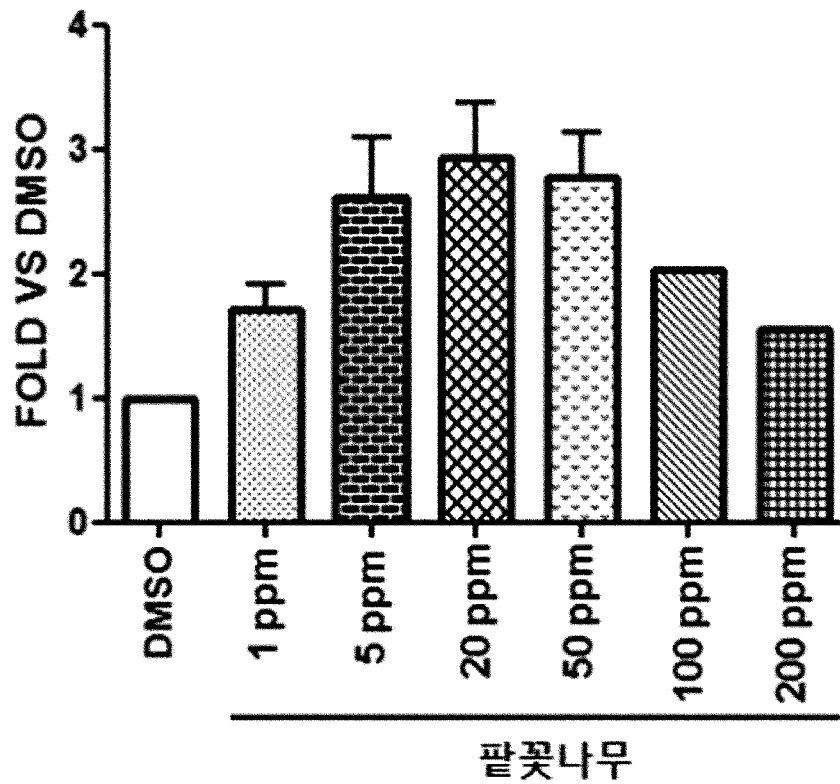
[청구항 13]

제1항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성
 질환의 예방 또는 치료 방법.

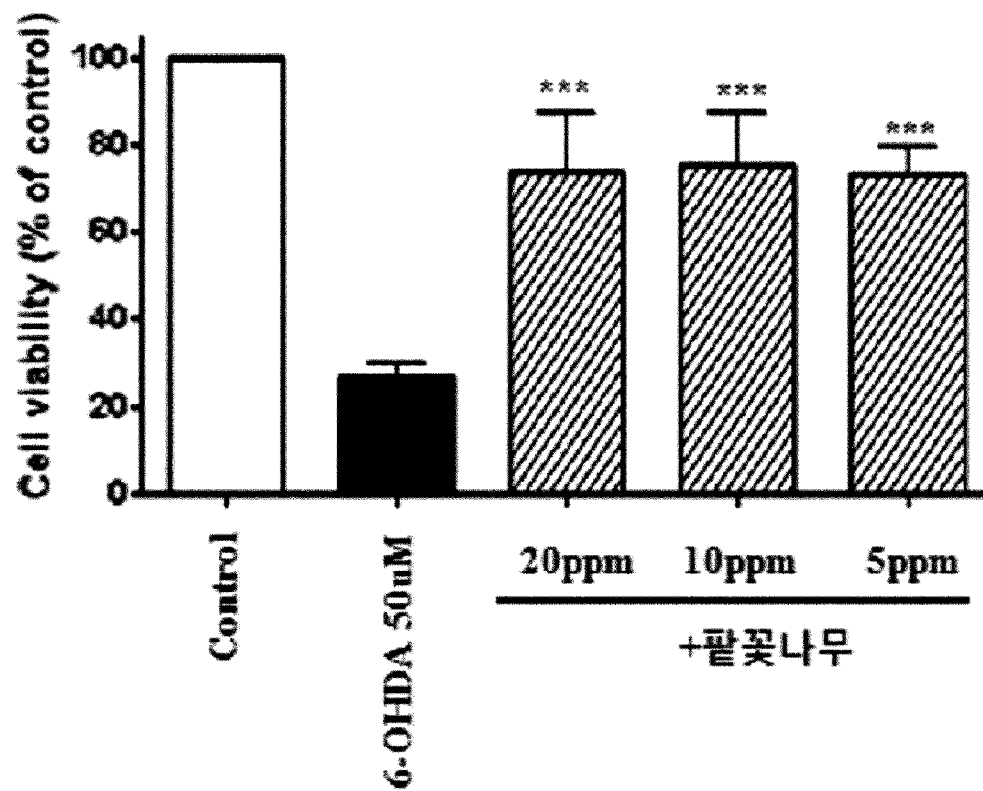
[청구항 14]

제8항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 Nurr1
 기능장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 방법.

[Fig. 1]

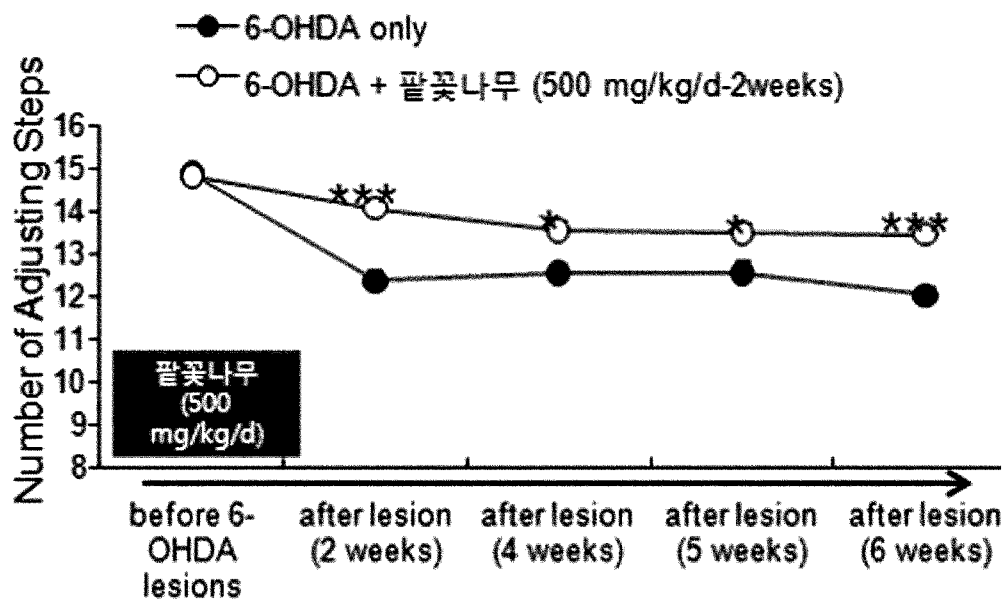


[Fig. 2]



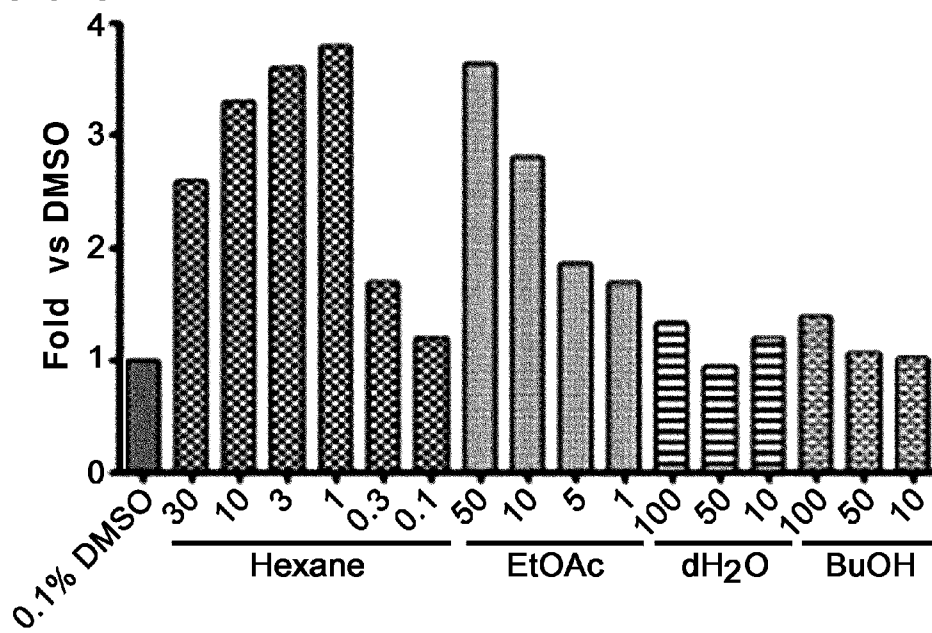
[Fig. 3]

Contralateral hindlimb adjusting steps

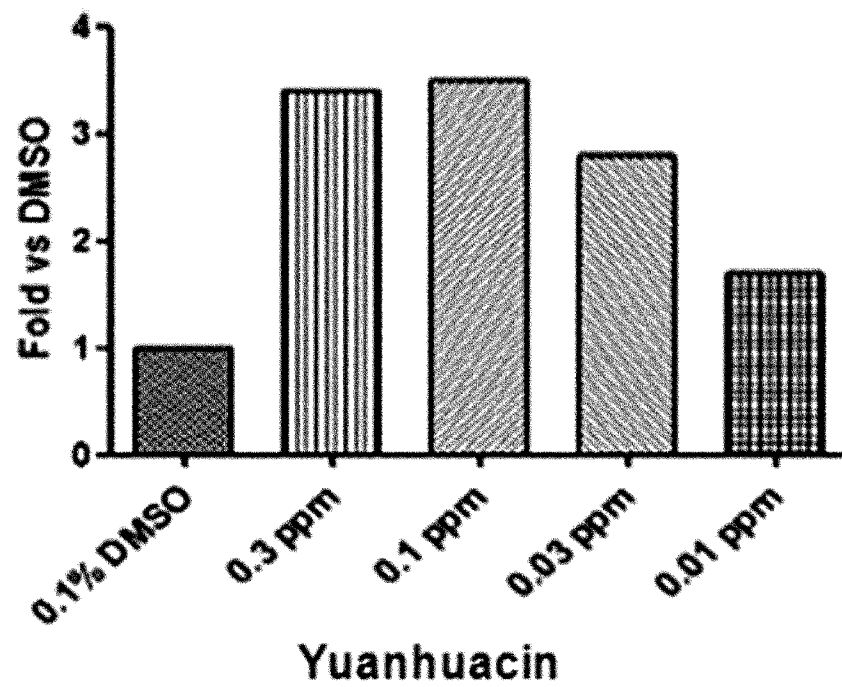
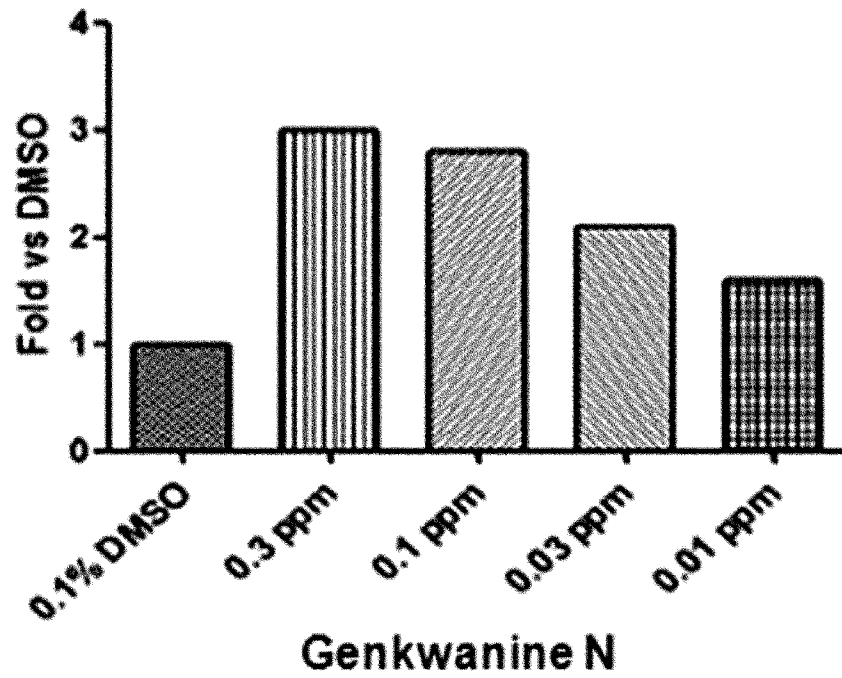


$P < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***

[Fig. 4]



[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/009110

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.: **13 and 14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 and 14 pertain to a method for treatment of diseases by the administration of a therapeutic agent to 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

International application No.

PCT/KR2011/009110**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 36/83(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 36/83; A61K 31/36; A61K 31/357; A61K 31/343

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) & Keyword : Daphne genkwa, Daphne genkwa, Genkwacine, Genkwacine, Yuanhuacine, Yuanhuacine, extract, nuerodegenerative, parkinson, alzheimer's disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2009-0084130 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 05 August 2009 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2006-0028076 A (LEE, SANG KOOK) 29 March 2006 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2004-0013675 A (KT&G LIFE SCIENCES CORPORATION) 14 February 2004 See the entire document.	1-12
A	H. KAI et al., "Pharmacological effects of Daphne genkwa and chinese medical prescription, Jyu-So-To", Yakugaku Zasshi, Vol. 124, No. 6, pp. 349-354, 2004 See the entire document.	1-12
A	S. ZHANG et al., "Evaluation of Daphne genkwa diterpenes: Fingerprint and quantitative analysis by high performance liquid chromatography", Phytochemical Analysis, Vol. 18, pp. 91-97, 2007 See the entire document.	1-12



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

05 JULY 2012 (05.07.2012)

Date of mailing of the international search report

09 JULY 2012 (09.07.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2011/009110

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0084130 A	05.08.2009	WO 2009-096655 A1	06.08.2009
KR 10-2006-0028076 A	29.03.2006	NONE	
KR 10-2004-0013675 A	14.02.2004	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/83(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/83; A61K 31/36; A61K 31/357; A61K 31/343

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: 팔꽃나무, Daphne genkwa, 겐꽂닌, Genkwacine, 유안후아신, Yuanhuacine, 추출물, 신경퇴행성, 파킨슨, 알츠하이머

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2009-0084130 A (이화여자대학교 산학협력단) 2009.08.05 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-2006-0028076 A (이상국) 2006.03.29 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-2004-0013675 A (주식회사 엠디바이오알파) 2004.02.14 전체 문헌 참조.	1-12
A	H. KAI 외 3명, "Pharmacological effects of Daphne genkwa and chinese medical prescription, Jyu-So-To", Yakugaku Zasshi, Vol. 124, No. 6, pp. 349-354, 2004 전체 문헌 참조.	1-12
A	S. ZHANG 외 5명, "Evaluation of Daphne genkwa diterpenes: Fingerprint and quantitative analysis by high performance liquid chromatography", Phytochemical Analysis, Vol. 18, pp. 91-97, 2007 전체 문헌 참조.	1-12

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2012년 07월 05일 (05.07.2012)

국제조사보고서 발송일

2012년 07월 09일 (09.07.2012)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

이선화

전화번호 82-42-481-5606



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: 제13항 및 제14항
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제13항 및 제14항은 사람에게 치료제를 투여하여 질병을 치료하는 치료 방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 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 10-2009-0084130 A	2009.08.05	WO 2009-096655 A1	2009.08.06
KR 10-2006-0028076 A	2006.03.29	없음	
KR 10-2004-0013675 A	2004.02.14	없음	