

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 2월 10일 (10.02.2022)



(10) 국제공개번호
WO 2022/031092 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 36/484 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/010367

(22) 국제출원일:

2021년 8월 5일 (05.08.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0097800 2020년 8월 5일 (05.08.2020) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

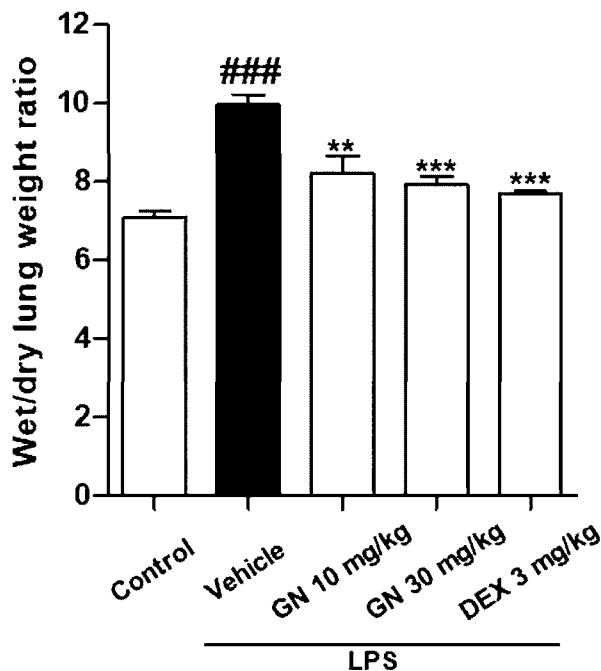
(72) 발명자: 장형진 (JANG, Hyeung Jin); 06275 서울시 강남구 도곡로 306, 105 동 1502호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인(유한) 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로 63길 14, 8층, Seoul (KR).

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

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTION, AMELIORATION, OR TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES OR IMMUNE DISEASES COMPRISING GANCAONIN N AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: GANCAONIN N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for the prevention, amelioration or treatment of inflammatory diseases or immune diseases, the composition comprising as an active ingredient, Gancaonin N, which is a flavonoid ingredient derived from the root and aerial part of *Glycyrrhiza aspera* Pall. According to the present invention, it has been confirmed that Gancaonin N, which is a flavonoid ingredient derived from the root and aerial part of *Glycyrrhiza aspera* Pall, inhibits the production of nitric oxide (NO), which is an important factor in inducing inflammation, inhibits the expression of PGE2, iNOS, and COX-2, which are known factors that induce inflammation, and exhibits no cytotoxicity. Thus, the composition comprising Gancaonin N as an active ingredient, according

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

to the present invention, can be effectively used as a safe and natural therapeutic agent for inflammatory diseases and immune diseases with fewer side effects, particularly as a therapeutic agent for lung inflammation.

(57) 요약서: 본 발명은 감초(*Glycyrrhiza aspera* Pall) 뿌리와 지상부 유래의 플라보노이드 성분인 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 감초(*Glycyrrhiza aspera* Pall) 뿌리와 지상부 유래의 플라보노이드 성분인 Gancaonin N은 염증 유발에 있어 중요한 인자인 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 생성을 억제하고, 염증을 유도하는 인자로 알려진 PGE2, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하며, 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였는바, 본 발명의 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 조성물은 부작용이 적은 안전한 천연 염증질환 및 면역질환 치료제, 특히 폐 염증 치료제로써 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: GANCAONIN N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 감초(*Glycyrrhiza aspera* Pall) 뿌리와 지상부 유래 플라보노이드 성분인 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 염증반응은 다양한 자극에 대한 신체방어 메커니즘으로 만성 염증반응은 다양한 질병을 유발할 수 있다. 유도성 일산화질소 합성효소(iNOS)에 의해 과잉 생성되는 NO는 다양한 염증관련 질병에 연관되며, 효과적인 iNOS의 차단제는 치료제로서의 가치를 지닌다. 생체가 병원균에 감염이 되거나 어떤 원인에 의해서 면역체계가 항진된 경우 대식세포가 작용을 하는데, 대식세포는 병원균과 면역세포인 T-세포의 활성 물질의 도움으로 병원균에 대항해서 숙주를 방어하는 중요한 역할을 하며, 이러한 활성은 몇 개의 중간체에 의해 조절된다. 그 중에서 특히 대식세포에 의한 일산화질소(NO)의 생성은 박테리아, 곰팡이 및 기생세균을 사멸시키거나 성장을 억제하는 중요한 매개체로 작용한다. 아주 불안정한 가스인 일산화질소(NO)는 인체에서 병원균 및 종양세포를 사멸시키거나 면역체계를 조절하는 중요한 대식세포 매개체로 알려져 있다. 그러나, 일산화질소가 과도하게 생성되면, 숙주세포를 죽이고 염증을 일으키는 부작용이 있다. 병원균의 사멸 후에도 계속해서 대식세포가 일산화질소를 과잉 생산하는 경우 패혈증 후 쇼크 또는 심한 염증 질환을 일으키며 자가면역질환을 일으킨다. 즉, 일산화질소의 생성이 부족한 경우는 대식세포의 매개체로서의 역할에 문제가 되지만, 과량으로 생성될 경우는 염증이거나 부작용을 초래하게 되는 것이다. 그러므로, iNOS에서 생성되는 일산화질소의 양은 적절히 조절되어야 한다. 또한, 사이클로옥시게나아제-2(Cyclooxygenase; COX-2)는 다양한 염증유발 물질과 사이토카인들에 의해 발현이 유도되는 효소로서, 여러 종류의 암에서 COX-2의 발현이 비정상적으로 증가된다는 사실이 보고되고 있으며, COX-2에 의해 생성되는 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2; PGE2)는 염증반응과 직접적으로 연관되어 있다.
- [3] 한편, 근래에 들어서 생체내 안전성 등을 고려하여 생약에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 식물로부터 추출한 성분을 유효성분으로 한 치료제에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 생약에는 우리가 미처 인식하지 못한 유효성분이 포함되어 있다고 알려져 있다. 따라서, 유효한 약제 조성성분을 생약으로부터 추출하는 것은 현대 약학에 있어 새로운 연구 대상으로 등장하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 염증질환 및 면역질환의 예방, 개선 또는 치료를 위해 유효한 생약 성분을 연구한 결과, 감초 뿌리와 지상부 유래의 플라보노이드 성분인 Gancaonin N이 염증 유발에 있어 중요한 인자인 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 생성을 억제하고, 염증을 유도하는 인자로 알려진 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하며, 세포 독성이 적음을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [5] 이에, 본 발명은 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [6] 또한, 본 발명은 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [7]
- [8] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [10] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 일산화질소(Nitric Oxide, NO), 프로스타글란딘(Prostaglandin 2, PGE2) 및 사이클로 옥시게나아제(cyclooxygenase-2, COX-2)로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 생성을 억제할 수 있다.
- [11] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 및 이를 암호화하는 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)은 종양괴사인자- α (TNF- α), 인터루킨-1베타(IL-1 β) 및 인터루킨 6(IL-6)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것일 수 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 세포외 신호조절 키나아제(ERK), p38 및 p65로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 발현을 억제할 수 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 염증질환은 여드름, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 알러지성 피부염, 홍반성 루프스, 구진상

두드러기, 건선, 천식, 위염, 부종, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 간염, 식도염, 위궤양, 장염, 궤장염, 십이지장궤양, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선헌관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 방광염, 신장염, 다발성 경화증 및 패혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

- [15] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환, 전신성 홍반성 낭창, 경피증, 쇼그렌 증후군, 다발성 근염, 피부근염, 류마티스 다발성 근육통, 측두동맥염, 결절성 다발 동맥염 및 베체트 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 Gancaonin N은 5 내지 60 μ M 양으로 포함되는 것일 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명은 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 염증질환은 여드름, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 알러지성 피부염, 홍반성 루푸스, 구진상 두드러기, 건선, 천식, 위염, 부종, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 간염, 식도염, 위궤양, 장염, 궤장염, 십이지장궤양, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선헌관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 방광염, 신장염, 다발성 경화증 및 패혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환, 전신성 홍반성 낭창, 경피증, 쇼그렌 증후군, 다발성 근염, 피부근염, 류마티스 다발성 근육통, 측두동맥염, 결절성 다발 동맥염 및 베체트 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명은 상기 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

발명의 효과

- [22] 본 발명에 따르면, 감초(*Glycyrrhiza aspera* Pall) 뿌리와 지상부 유래의 플라보노이드 성분인 Gancaonin N은 염증 유발에 있어 중요한 인자인 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 생성을 억제하고, 염증을 유도하는 인자로 알려진 PGE2, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하며, 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였는바, 본 발명의 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 조성물은 부작용이 적은 안전한 천연 염증질환 및 면역질환 치료제, 특히 폐 염증

치료제로써 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

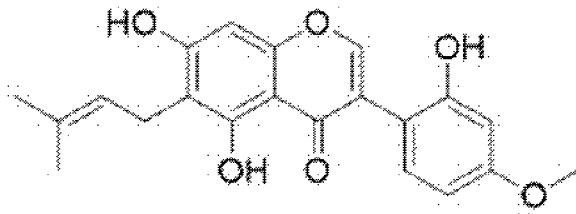
- [23] 도 1a는 Gancaonin N을 다양한 농도로 처리(5, 10, 20, 40 μ M)하고 24시간 동안 배양한 RAW264.7 세포에서 세포 생존율(Cell viability)을 측정한 결과이다.
- [24] 도 1b는 Gancaonin N을 다양한 농도로 처리(5, 10, 20, 40 μ M)하고 24시간 동안 배양한 A549 세포에서 세포 생존율(Cell viability)을 측정한 결과이다.
- [25] 도 2a는 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 일산화질소(NO)의 생성량 변화를 측정한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [26] 도 2b는 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 프로스타글란딘 E2(PGE2) 단백질의 생성량 변화를 측정한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [27] 도 2c는 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 유도성 일산화질소 합성효소(iNOS)의 생성량 변화를 측정한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [28] 도 2d는 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 사이클로 옥시게나아제-2(COX-2)의 생성량 변화를 측정한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [29] 도 3a는 LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 종양괴사인자- α (TNF- α)의 mRNA발현 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [30] 도 3b는 LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 인터루킨-1베타(IL-1 β)의 mRNA발현 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [31] 도 3c는 LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 인터루킨 6(IL-6)의 mRNA발현 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).

- [32] 도 4a는 LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 종양괴사인자- α (TNF- α)의 단백질 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [33] 도 4b는 LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 인터루킨-1베타(IL-1 β)의 단백질 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [34] 도 4c는 LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 인터루킨 6(IL-6)의 단백질 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [35] 도 4d는 LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 사이클로 옥시게나아제-2(COX-2)의 단백질 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [36] 도 5a는 MAPK/NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 Gancaonin N의 역할을 확인하기 위하여, LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 세포외 신호조절 키나아제(ERK)의 단백질 수준 및 이의 활성화 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [37] 도 5b는 MAPK/NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 Gancaonin N의 역할을 확인하기 위하여, LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 p-38의 단백질 수준 및 이의 활성화 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [38] 도 5c는 MAPK/NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 Gancaonin N의 역할을 확인하기 위하여, LPS로 자극한 A549 세포에서 Gancaonin N의 처리 농도(0, 5, 10, 20, 40 μ M)에 따른 p65의 단백질 수준을 확인한 결과이다(####P < 0.001은 음성대조군과 비교하여 유의성을 나타내고, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 는 LPS 단독처리군과 비교했을 때, 유의성을 나타냄).
- [39] 도 5d는 MAPK/NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 Gancaonin N의 역할을 확인하기 위하여, LPS로 자극한 A549 세포에 면역형광염색을 수행하여 NF- κ B p65의 발현을 확인한 결과이다.

- [40] 도 6a는 대조군 및 LPS에 의해 유도된 급성폐손상(Acute Lung Injury, ALI) 마우스 모델에 Gancaonin N 10mg/kg(GN 10mg/kg), Gancanonin 30mg/kg(GN 30mg/kg) 또는 항염증 효과를 가지고 있는 덱사메타손(dexamethasone) 3mg/kg(DEX 3mg/kg)을 처리한 다음, Diff-Quik kit로 염색한 결과이다.
- [41] 도 6b는 대조군 및 LPS에 의해 유도된 급성폐손상(Acute Lung Injury, ALI) 마우스 모델에 Gancaonin N 10mg/kg, Gancanonin 30mg/kg 또는 항염증 효과를 가지고 있는 덱사메타손 3mg/kg을 투여하면서, 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)의 총 세포수를 확인한 결과이다.
- [42] 도 6c는 대조군 및 LPS에 의해 유도된 급성폐손상(Acute Lung Injury, ALI) 마우스 모델에 Gancaonin N 10mg/kg, Gancanonin 30mg/kg 또는 항염증 효과를 가지고 있는 덱사메타손 3mg/kg을 투여하면서, 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)의 호중성 과립구(Neutrophil)의 수를 확인한 결과이다.
- [43] 도 7은 대조군 및 LPS에 의해 유도된 급성폐손상(Acute Lung Injury, ALI) 마우스 모델에 Gancaonin N 10mg/kg, Gancanonin 30mg/kg 또는 항염증 효과를 가지고 있는 덱사메타손 3mg/kg을 투여하면서, 폐의 W/D 비율을 확인한 결과이다.
- [44] 도 8은 대조군 및 LPS에 의해 유도된 급성폐손상(Acute Lung Injury, ALI) 마우스 모델에 Gancaonin N 10mg/kg, Gancanonin 30mg/kg 또는 항염증 효과를 가지고 있는 덱사메타손 3mg/kg을 투여하면서, 염증성 단백질의 수준을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [45] 본 발명자들은 본 발명자들은 염증질환 및 면역질환의 예방, 개선 또는 치료를 위해 유효한 생약 성분을 연구한 결과, 감초 뿌리와 지상부 유래의 플라보노이드 성분인 Gancaonin N이 염증 유발에 있어 중요한 인자인 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 생성을 억제하고, 염증을 유도하는 인자로 알려진 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하며, 세포 독성이 적음을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [46] 이에, 본 발명은 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [47] 본 발명에 있어서, 상기 Gancaonin N은 감초뿌리와 지상부에서 유래한 플라보노이드 성분 중 하나로서, IUPAC 명칭은 5,7-dihydroxy-3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-6-(3-methylbut-2-enyl)chromen-4-one 인 $C_{21}H_{20}O_6$ 의 분자식을 가지는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 하기 화학식의 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [48] [화학식]
- [49]



- [50] 상기 조성물은 일산화질소(Nitric Oxide, NO), 프로스타글란딘(Prostaglandin 2, PGE2) 또는 사이클로 옥시게나아제(cyclo oxygenase-2, COX-2)의 발현을 억제할 수 있다.
- [51] 본 발명에서 사용되는 용어, “일산화 질소(Nitric oxide, NO)는 혈관을 확장시키는 역할을 하는 대표적인 염증에 관련된 인자 중 하나이다. 대식세포가 자극을 받으면 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)라는 효소에 의해 L-알기닌이 L-시트룰린으로 변하는 과정에서 일산화질소(NO)가 생성됨으로써 대식세포로부터 NO가 생성된다.
- [52] 본 발명에서 사용되는 용어, 프로스타글란딘(Prostaglandin 2, PGE2)은 염증 반응의 매개체로 작용할 수 있는 아라키돈산(Arachidonic acid)에서 생합성되는 에이코사노이드(Eicosanoid) 중 하나로서, COX-2의 작용에 의해 합성될 수 있다.
- [53] 본 발명의 약학적 조성물은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 및 이를 암호화하는 유전자의 발현을 억제하는 것일 수 있다. 상기 전염증성 사이토카인은 종양괴사인자- α (TNF- α), 인터루킨-1베타(IL-1 β) 또는 인터루킨 6(IL-6)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 세포외 신호조절 키나아제(ERK), p38 또는 p65의 발현을 억제할 수 있으며, 이는 Gancaonin N을 포함하는, 본 발명의 조성물이 염증 질환과 관련이 있는 MAPK/NF- κ B 신호전달경로를 조절할 수 있음을 의미한다.
- [54] 본 발명에서 사용되는 용어, “염증질환”이란, 여드름, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 알러지성 피부염, 홍반성 루프스, 구진상 두드러기, 건선, 천식, 위염, 부종, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 간염, 식도염, 위궤양, 장염, 궤장염, 십이지장궤양, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 방광염, 신장염, 다발성 경화증 및 패혈증으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 폐렴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [55] 본 발명에서 사용되는 용어, “면역질환”이란, 면역 조절 이상에 의해 발생하는 질환을 의미하며, 자가면역질환, 전신성 홍반성 낭창, 경피증, 쇼그렌 증후군, 다발성 근염, 피부근염, 류마티스 다발성 근육통, 측두동맥염, 결절성 다발 동맥염 및 베체트 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [56] 상기 약학적 조성물은 Gancaonin N을 5 내지 60 μM 양으로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 5 내지 50 μM , 더욱 바람직하게는 5 내지 40 μM 의 양으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [57] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 염증질환 또는 면역질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [58] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 염증질환 또는 면역질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [59] 본 발명의 일실시에 있어서, 본 발명자들은 Gancaonin N을 포함하는, 본 발명의 조성물은 Raw264.7 세포 및 A549 세포에 처리했을 때, 세포독성을 보이지 않으면서(실시예 2), 일산화 질소(실시예 3), 염증관련 인자(실시예 4) 및 전염증성 인자(실시예 5)의 발현을 유의하게 억제할 수 있음을 구체적으로 확인하였다.
- [60] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, LPS에 의해 급성 폐손상이 유도된 마우스 모델에서 Gancaonin N을 처리하는 경우, 염증세포의 침윤이 감소하고, 폐부종의 중증도가 개선되며, 전염증성 인자의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 효과는 기존에 항염증제로 사용되고 있는 덱사메타손의 효과와 유사한 수준이라는 것을 확인할 수 있었다(실시예 7).
- [61] 본 발명자들은 상기와 같은 결과를 통해, 본원발명의 Gancaonin N은 세포독성이 없이도 염증을 유의하게 억제할 수 있음을 구체적으로 확인하였다.
- [62] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [63] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [64] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에

있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [65] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [66] 본 발명자들은 구체적인 실험예를 통해, 본 발명의 Gancaonin N의 신규한 면역질환 또는 염증질환 예방 및 치료용도를 규명하였다.
- [67] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [68] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때 상기 기능성식품 조성물은 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.
- [69] 본 발명에서 사용되는 용어, "건강기능식품 조성물"은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 추출물에 첨가 할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다. 상기 본 발명에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 구으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스 등; 및 폴리사카라이드, 예를

들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명에 따른 조성물은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토오스, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피로리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.

[70] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[71] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[72] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[73]

[74] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[75]

[76] 실시예 1. 재료 준비 및 실험 방법

[77] **1-1. 화학물질 준비**

[78] ChemFaces(China)에서 감초뿌리와 지상부에서 유래한 플라보노이드(flavonoid) 성분인 Gancaonin N을 구입하였다.

MTT((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2[2H]-tetrazolium bromide)는 Invitrogen(Waltham, MA)에서, COX-2, NF- κ B p65, extracellular signal-regulated kinase (ERK), p-ERK, p38, p-p38 및 Lamin B1 에 대한 1차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α)에 대한 1차항체는 Proteintech (Rosemont, IL,

USA)에서, PGE2에 대한 1차항체는 Bioss (Woburn, MA, USA)에서, iNOS에 대한 1차 항체는 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서. β -Actin 1차 항체와 항-토끼 IgG-HRP 및 항-마우스 IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

[79]

[80] **1-2. 실험 세포주 준비 및 배양**

[81] RAW264.7 murin macrophage cell는 Korean Cell Line Bank (Seoul, South Korea)에서 구입하였다. A549 human alveolar basal epithelial cell은 American Type Culture Collection (ATCC, MD, USA)에서 구입하였다. 상기 세포들을 10%의 FBS(Gibco, NY, USA) 및 1x 항생 물질-항진균제 용액(ABAM, Corning Inc., NY, USA)을 함유하는 DMEM 배지(Corning Inc., NY, USA)에서 배양하였고, 37°C 및 5%의 CO₂ 조건에서 배양하였다.

[82]

[83] **1-3. 실험동물 준비**

[84] 6주령의 암컷 BALB/c마우스(18-20g)를 대한 바이오링크(DBL CO., 한국 충청북도 음성)에서 25마리를 구입한 후, 경희대학교의 동물실험실에서 사육되었다. LPS로 유도한 acute lung injury model의 확립을 위해, 모든 쥐들은 각각 5마리를 1그룹으로 한 5개의 그룹으로 나누었으며, 5개의 그룹은 control, vehicle (only LPS), Gancaonin N (10 mg/kg), Gancaonin N (30 mg/kg) 및 Dexamethasone (3 mg/kg)으로 분류하였다. Gancaonin N을 각각 10 또는 30 mg/kg 용량으로 복강내 주사하였으며, 양성대조군으로는 덱사메타손을 3 mg/kg 용량으로 복강내 주사하였다. 또한 control과 vehicle 그룹에는 Gancaonin N을 녹인 4% DMSO를 복강내 주사하였다. 그리고, 한시간 후에 LPS 10 μ g/50 μ l (control 그룹에는 PBS 50 μ l)를 쥐에 기관내 투여하고 12시간 후에 sacrifice하였다.

[85]

[86] **1-4. 세포생존율 분석**

[87] Gancaonin N의 세포독성을 평가하기 위해, RAW264.7 세포와 A549 세포를 96-웰 플레이트(1 $\times$ 10⁴ cells/well)에 접종하고 37°C 및 5%의 CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양한 후, 세포에 Gancaonin N을 24시간 동안 5, 10, 20, 40 μ M 농도로 처리하였고, MTT용액(5 mg/mL)을 각 웰에 첨가하였다. 이어서 100 μ L의 디메틸 설펝 사이드(DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가 한 후, 마이크로 플레이트 리더(Bio-Rad Hercules, CA, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[88]

[89] **1-5. Nitric oxide(NO) 측정**

[90] Raw264.7 세포를 6-웰 플레이트(6 $\times$ 10⁵ cells/well)에 접종하고 37°C 및 5%의 CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양 후 세포에 1 μ g/mL의 lipopolysaccharide(LPS)와

Gancaonin N을 5 내지 40 μM 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 배양 상등액을 이용하여 NO의 생성 농도를 측정하였다. NO의 생성은 Griess reagent를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 Sodium nitrate를 이용해 표준곡선을 그려 nitrate 농도로 결과값을 나타내었다.

[91]

[92] **1-6. 웨스턴 블롯 분석**

[93] RAW264.7 세포와 A549 세포를 6-웰 플레이트(1×10^6 cells/well)에 접종하고 37 °C 및 5%의 CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양 후 Raw 264.7 세포에는 1 $\mu\text{g/mL}$, A549 세포에는 5 $\mu\text{g/mL}$ lipopolysaccharide(LPS)와 Gancaonin N을 5 내지 40 μM 농도로 처리하여 24시간 또는 6시간 동안 배양하였다. 이후 상기 세포를 lysis buffer를 사용하여 용해시켰다. 또한, 마우스에서 적출한 left lung은 RIPA buffer를 사용하여 용해하였다. 세포 및 조직 용해물을 이용해 SDS-PAGE 전기영동을 수행하여 단백질을 크기에 따라 분리하였으며, 5%의 소혈청 알부민은 PGE2 (1:500), IL-1 β (1:500), IL-6 (1:500), TNF- α (1:500), i-NOS (1:500), COX-2 (1:1000), P-ERK1/2 (1:1000), ERK1/2 (1:3000), P-p38 (1:1000), p38 (1:3000), NF- κB p65 (1:1000), Lamin B1 (1:1000) 및 β -actin (1: 5,000)에 대한 항체를 차단하고 배양하는데 사용하였다.

[94]

[95] **1-7. 면역 형광 분석**

[96] A549 세포를 6-웰 플레이트(1×10^4 cells/well)에 접종하고 37 °C 및 5%의 CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양 후 A549 세포에 5 $\mu\text{g/mL}$ lipopolysaccharide(LPS)와 Gancaonin N을 5 내지 40 μM 농도로 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 이후에는 10% 포르말린으로 세포를 고정하고, 0.2% Triton X를 20분간 처리하였다. 그리고, 5%의 소혈청으로 차단하고나서 NF- κB p65 (1:300) 항체를 4°C에서 밤새 배양하였다. 이후 상온에서 Alexa-Fluor-488 항체와 한시간 동안 함께 배양하고나서, 세포 핵의 염색을 위해 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 3분 동안 실온에서 염색하였다. 형광 관찰은 EVOSR Cell Imaging systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였다.

[97]

[98] **1-8. Real-Time PCR 분석**

[99] A549 세포를 6-웰 플레이트(1×10^6 cells/well)에 접종하고 37 °C 및 5%의 CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양 후 A549 세포는 5 $\mu\text{g/mL}$ lipopolysaccharide(LPS)와 Gancaonin N을 5 내지 40 μM 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 Hybrid-RTM (GeneAll, South Korea)을 사용하여 각 세포 처리에서 total RNA를 분리 하였다. 총 RNA (500ng)는 oligo (dT)를 이용하여 55°C에서 60 분 동안 배양한 다음, 85°C에서 5분 동안 배양하여 cDNA로 전환 하였고, 사용될 때까지 4°C에서 보관하였다. 또한, Universal SYBR Green Master Mix (Applied

Biosystems, USA)를 사용하여 실시간 정량 PCR을 수행하였으며, cDNA는 다음 조건을 사용하여 증폭하였다. 95°C에서 15분, 이어서 95°C에서 30초, 59°C에서 30초 및 72°C에서 30초 동안을 40번 반복하였다. Applied Biosystems StepOne system(Applied Biosystems, USA)으로 Real-Time PCR분석이 수행되었으며, 분석에 사용된 프라이머 시퀀스는 하기 표 1에 나타내었다.

[100] [표1]

TNF- α	5'-GCAGGTCTACTTTGGGTCAT TG-3'(Forward)(서열번호 1)	5'-GCGTTTGGGAAGGTTGGA-3' (Reverse)(서열번호 2)
IL-1 β	5'-TCAGCCAATCTTCATTGCTC AA-3'(Forward)(서열번호 3)	5'- TGGCGAGCTCAGGTACTTCTG -3'(Reverse)(서열번호 4)
IL-6	5'-AGGGCTCTTCGGCAAATGTA -3'(Forward)(서열번호 5)	5'- GAAGGAATGCCCATTAACAAC AA-3'(Reverse)(서열번호 6)
GAPDH	5'-GCCACATCGCTCAGACACC-3' '(Forward)(서열번호 7)	5'-CCCAATACGACCAAATCCGT -3'(Reverse)(서열번호 8)

[101] **1-9. 기관지 폐포 세척액 분석**

[102] 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)는 마우스를 비강 내 이소플루란으로 마취한 다음 수득하였다. 기관 절개술을 수행하여 기관을 노출하고 나서, 카테터를 삽입하여 PBS를 1mL 천천히 주입하고 회수하는 방식을 3회 반복하였다. 이후, 회수된 BALF는 4°C에서 10분동안 1,000 g에서 원심분리하여 침전된 세포들은 PBS 500 μ l에 재현탁하였다. 세포들은 Diff-Quik kit (Sysmex, Kobe, Japan)로 염색하여 현미경으로 관찰하여 분류하고 전체세포와 호중구를 계수하였다.

[103]

[104] **1-10. Lung wet/dry ratio 측정**

[105] 폐부중의 중증도를 측정하고자, Right upper lung의 wet weight를 측정하고나서, 60°C에서 72시간동안 조직을 건조시킨 후에 무게를 측정하였다. 이후에, W/D ratio가 계산되었다.

[106]

[107] **1-11. 통계 분석**

[108] GraphPad Prism 5 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA)를 사용하여 결과의 통계적 분석을 수행하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M.으로 표시하였다. 세포실험 데이터의 통계적 분석은 unpaired t-검정(one-tailed)을 수행하였으며, 동물실험 데이터의 통계적 분석은 ANOVA Tukey 분석을 수행하였다. 0.05 미만의 p값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[109]

[110] 실시예 2. Gancaonin N의 세포독성 분석

[111] 본 발명자들은 Gancaonin N의 세포독성을 알아보기 위해, 상기 실시예 1-4의 방법에 따라 Gancaonin N을 Raw264.7 세포 및 A549 세포에 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다.

[112] 그 결과, 도 1a(Raw264.7 세포) 및 도 1b(A549 세포)에 나타낸 바와 같이 대조군과 비교할 때 Gancaonin N을 처리한 경우 세포 생존율이 감소하지 않는 것으로 나타났으며, 이를 통해 Gancaonin N는 처리농도에 관계 없이 세포독성을 유발하지 않는 것을 알 수 있었다.

[113]

[114] 실시예 3. Gancaonin N의 NO 생성 억제 효과 확인

[115] 본 발명자들은 Gancaonin N의 항염증 효과를 조사하기 위해, RAW264.7 세포를 LPS로 자극하기 2시간전에 Gancaonin N을 전처리하였고, 상기 실시예 1-5에 기재한 대로 NO 생성량을 측정하여 Gancaonin N의 처리농도에 따른 NO 생성량 변화를 분석하였다.

[116] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 Gancaonin N의 처리농도가 증가할수록 NO의 생성량이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 Gancaonin N의 NO 생성 억제효과를 알 수 있었다.

[117]

[118] 실시예 4. Gancaonin N의 염증 관련 인자 억제 효과 확인

[119] 본 발명자들은 Gancaonin N의 항염증 효과를 조사하기 위해, 상기 실시예 1-6에 기재한 바와 같이 Raw264.7 세포에 LPS와 Gancaonin N을 처리하고 염증을 유도하는 인자의 발현수준을 확인하여, Gancaonin N의 항염증 관련 인자 억제 효과를 구체적으로 확인하였다. 그 결과, Gancaonin N의 처리농도가 증가할수록 PGE2(도 2b), iNOS(도 2c) 및 COX-2(도 2d) 단백질의 발현수준이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 Gancaonin N이 염증성 반응과 관련이 있는 PGE2, iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 유의하게 억제할 수 있음을 구체적으로 확인하였다.

[120]

[121] 실시예 5. Gancaonin N의 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 발현 억제 효과 확인

[122] 5-1. 전염증성 사이토카인 mRNA 발현 수준 확인

[123] Gancaonin의 전염증성 사이토카인 발현 수준 억제효과를 확인하기 위하여, 전염증성 사이토카인으로 알려진 종양괴사인자- α (이하, TNF- α), 인터루킨-1베타(이하, IL-1 β) 및 인터루킨 6(이하, IL-6)의 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로, A549 세포에 실시예 1-8에 기재한 바와 같이 LPS와 Gancaonin N을 처리하고, mRNA의 발현 수준을 확인하였다.

[124] 그 결과, 도 3a 내지 도 3c에 나타낸 바와 같이, Gancaonin N을 처리하는 경우,

상기 전염증성 인자인 TNF- α (도 3a), IL-1 β (도 3b) 및 IL-6(도 3c)의 mRNA 발현이 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 억제효과는 처리하는 Gancaonin N의 양과 비례함을 구체적으로 확인하였다.

[125] **5-2. 전염증성 사이토카인 단백질 발현 수준 확인**

[126] 상기에서 mRNA 발현 억제를 확인한 전염증성 사이토카인에 대해서, mRNA가 암호화하고 있는 단백질의 발현수준을 추가로 확인하였다. 단백질 발현 수준 확인을 위해 A549 세포에 실시예 1-8에 기재한 바와 같이 LPS와 Gancaonin N을 처리하고, 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[127] 그 결과, 도 4a 내지 도 4c에 나타낸 바와 같이, Gancaonin N을 처리하는 경우, 상기 전염증성 인자인 TNF- α (도 4a), IL-1 β (도 4b) 및 IL-6(도 4c)의 단백질 발현이 유의하게 억제되는 것을 구체적으로 확인할 수 있었으며, 염증과 관련있는 인자인 COX-2의 발현을 추가적으로 확인했을 때에도, 도 4d에 나타낸 바와 같이, COX-2의 단백질 발현 수준이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다.

[128]

[129] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 Gancaonin N을 처리하는 경우, 전염증성 사이토카인의 mRNA 및 mRNA가 암호화하고 있는 단백질의 발현 모두를 유의하게 억제할 수 있으며, 이러한 억제효과는 Gancaonin N의 처리량과 비례한다는 사실 또한 확인할 수 있었다.

[130]

[131] **실시예 6. MAPK/NF- κ B 메커니즘에서 Gancaonin N의 역할 확인**

[132] 상기 실시예 3 내지 5를 통해, Gancaonin N이 염증관련 인자를 유의적으로 억제할 수 있음을 확인하였고, 구체적으로 어떠한 경로를 통해 항염증 반응이 나타나는지를 구체적으로 확인하기 위하여, MAPK/NF- κ B 신호전달경로에서 Gancaonin N의 역할을 확인하였다. 이를 위하여, A549 세포에 LPS를 처리하기 2시간 전에 Gancaonin N의 양을 달리하여 처리한 다음(5 내지 40 μ M), 상기 실시예 1-7에 기재한 바와 같이, MAPK/NF- κ B 신호전달경로와 관련있는 인자인 세포외 신호조절 키나아제(extracellular signal-regulated kinase 이하, ERK), p38 및 p65의 단백질 발현 수준 및 이의 활성 수준을 구체적으로 확인하였다.

[133] 그 결과, 도 5a 내지 5c에 나타낸 바와 같이, ERK(도 5a), p38(도 5b) 및 p65(도 5c)의 활성도/단백질 발현 수준이 Gancaonin N을 처리하는 경우, 유의하게 감소하는 것을 확인하였고, 보다 구체적으로 ERK 및 p65의 경우 40 μ M의 Gancaonin N을 처리했을 때, p38의 경우 20 μ M의 Gancaonin N을 처리했을 때, 가장 큰 억제 효과를 나타냄을 확인하였다. 면역형광을 통해 발현 수준을 확인한 p65의 이미지 촬영 결과는 도 5d에 나타내었다.

[134]

[135] **실시예 7. 폐손상 마우스 모델에서 Gancaonin N의 항염증 효과 확인**

[136] 상기 실시예 1-3에서 기재한 바대로 준비한 마우스 모델에 LPS를 처리하여, 급성 폐손상(Acute lung injury, ALI)을 유발시킨 다음, 준비한 5개의 그룹(control,

vehicle (only LPS), Gancaonin N (10 mg/kg), Gancaonin N (30 mg/kg) 및 Dexamethasone (3 mg/kg))의 마우스에서 Gancaonin N의 항염증 효과를 구체적으로 확인하였다.

[137] **7-1. 염증세포 침윤에 대한 Gancaonin N의 효과 확인**

[138] 염증세포의 침윤효과를 구체적으로 확인하기 위하여 LPS를 마우스에 기관내 투여하기 전에 Gancaonin N을 복강내 주사하였고, 상기 실시예 1-9에 기재된 대로 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, 이하, BALF)에 Diff-Quik kit을 활용하여 염색한 다음, 분석을 수행하였다. 염색 결과는 도 6a에 나타내었으며, 세포수(도 6b) 및 호중구수(도 6c)를 확인해 보았을 때, 모두 Gancaonin N을 처리하는 경우, 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 30mg/kg의 Gancaonin N을 처리하는 경우, 이는 이미 항염증제로 사용되고 있는 덱사메타손(DEX)을 처리한 그룹과 유사한 수준의 세포수 및 호중구수를 보여주는 것으로 확인되었다.

[139] **7-2. 폐부종의 중증도와 Gancaonin N의 관련성 확인**

[140] Gancaonin N의 폐부종 중증도 개선효과를 확인하기 위하여, Gancaonin N을 처리한 다음, 폐부종의 W/D 비율(Wet/Dry lung weight ratio)를 확인하였다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, Gancaonin N을 처리하는 경우, W/D 비율이 유의하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었으며, 30mg/kg의 Gancaonin N을 처리하는 경우, 덱사메타손을 처리한 그룹의 W/D 비율과 유사한 것으로 확인되었다.

[141] **7-3. Gancaonin N의 전염증성 인자 억제 효과 확인**

[142] Gancaonin N이 마우스 모델에서도 전염증성 인자를 억제할 수 있는지 여부를 구체적으로 확인하기 위하여, COX-2, IL-1 β , TNF- α 의 단백질 발현 수준을 상기 실시예 1-6에 개시된 웨스턴 블롯 방식으로 확인하였다. 그 결과, Gancaonin N을 처리하는 경우, 상기 전염증성 인자들의 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 30mg/kg의 Gancaonin N을 처리하는 경우, 덱사메타손을 처리한 그룹과 유사한 수준으로 전염증성 인자의 단백질 수준을 억제하는 것으로 확인되었다.

[143]

[144] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 Gancaonin N을 처리하는 경우, *in vitro* 및 *in vivo* 모두에서 항염증 인자의 발현을 억제하고, 이를 통하여 염증성 질환, 그 중에서도 폐의 염증과 관련된 질환 치료에 유용하게 활용될 수 있음을 구체적인 실험을 통하여 확인하였다.

[145]

[146] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서

예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

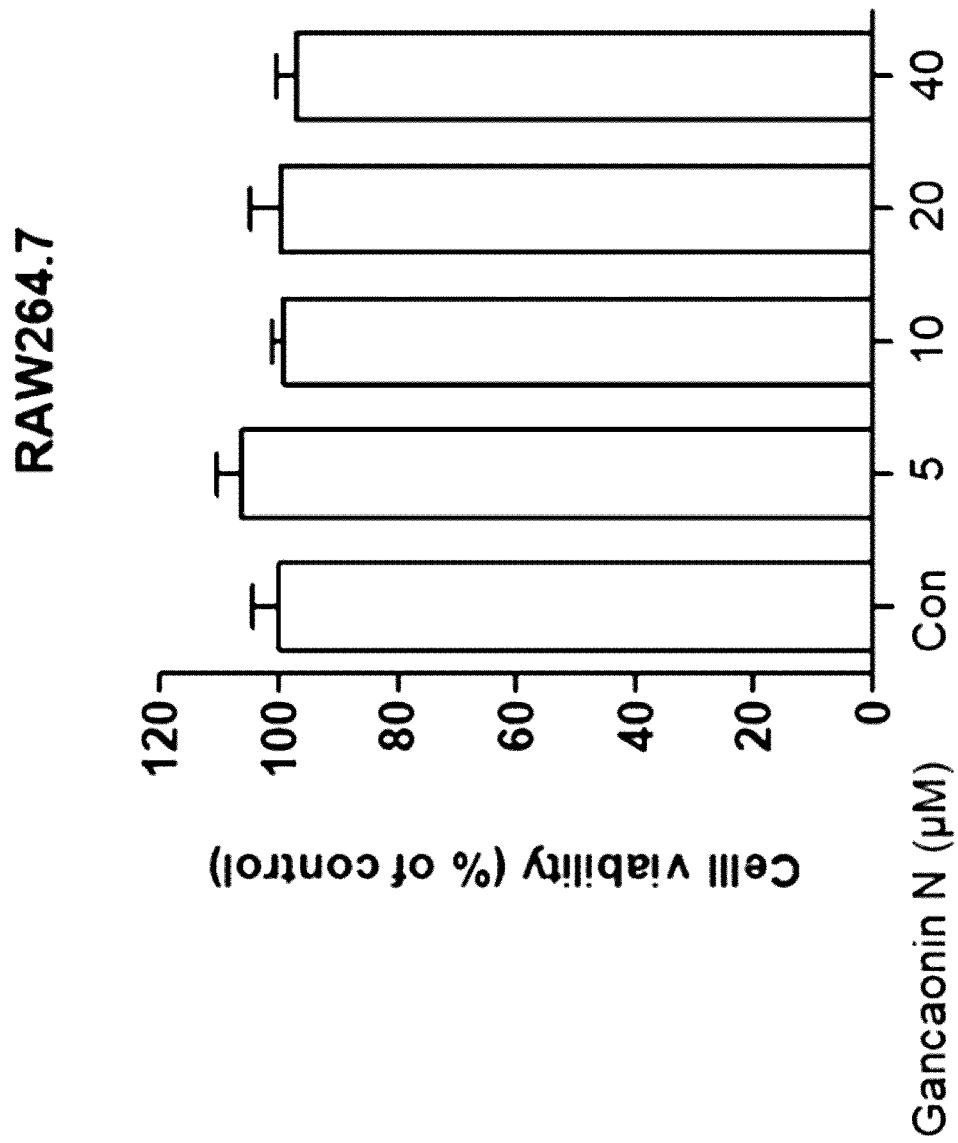
- [147] 본 발명에 따른 감초(*Glycyrrhiza aspera* Pall) 뿌리와 지상부 유래의 플라보노이드 성분인 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 염증 유발에 있어 중요한 인자인 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 생성을 억제하고, 염증을 유도하는 인자로 알려진 PGE2, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하며, 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였는바, 본 발명의 Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는 조성물은 부작용이 적은 안전한 천연 염증질환 및 면역질환 치료제, 특히 폐 염증 치료제로써 관련 분야에서 폭 넓게 활용될 수 있을 것이다.

청구범위

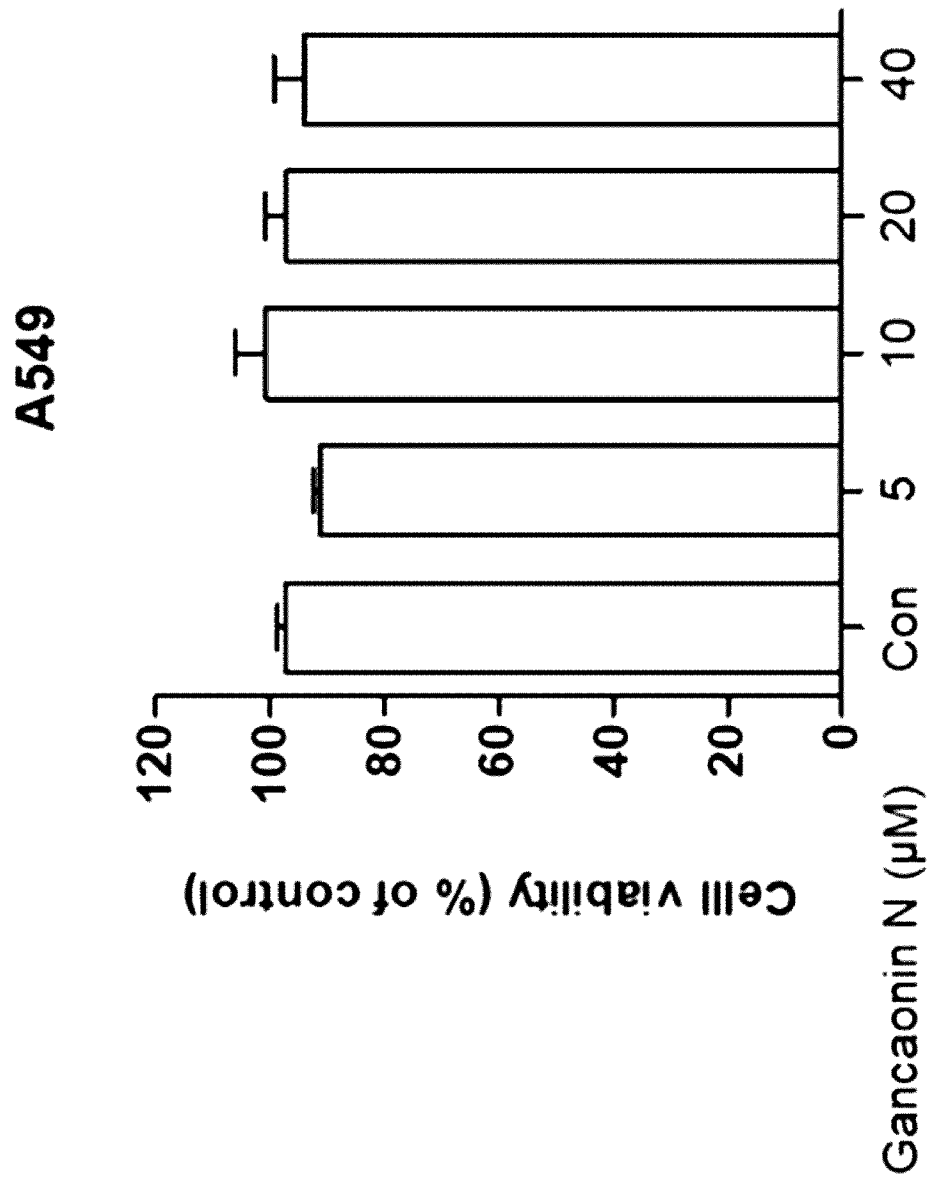
- [청구항 1] Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는, 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 일산화질소(Nitric Oxide, NO),
프로스타글란딘(Prostaglandin 2, PGE2) 및 사이클로 옥시게나아제(cyclooxygenase-2, COX-2)로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 및 이를 암호화하는 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)은
종양괴사인자- α (TNF- α), 인터루킨-1베타(IL-1 β) 및 인터루킨 6(IL-6)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 세포외 신호조절 키나아제(ERK), p38 및 p65로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 염증질환은 여드름, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 알러지성 피부염, 홍반성 루프스, 구진상 두드러기, 건선, 천식, 위염, 부종, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 간염, 식도염, 위궤양, 장염, 궤장염, 십이지장궤양, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 방광염, 신장염, 다발성 경화증 및 패혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 면역질환은 자가면역질환, 전신성 홍반성 낭창, 경피증, 쇼그렌 증후군, 다발성 근염, 피부근염, 류마티스 다발성 근육통, 측두동맥염, 결절성 다발 동맥염 및 베체트 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 Gancaonin N이 5 내지 60 μ M 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

- [청구항 9] Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는, 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 염증질환은 여드름, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 알러지성 피부염, 홍반성 루프스, 구진상 두드러기, 건선, 천식, 위염, 부종, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 간염, 식도염, 위궤양, 장염, 췌장염, 십이지장궤양, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 방광염, 신장염, 다발성 경화증 및 패혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 면역질환은 자가면역질환, 전신성 홍반성 낭창, 경피증, 쇼그렌 증후군, 다발성 근염, 피부근염, 류마티스 다발성 근육통, 측두동맥염, 결절성 다발 동맥염 및 베체트 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.
- [청구항 12] Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는, 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 13] Gancaonin N을 유효성분으로 포함하는, 약학적 조성물의 염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용도.

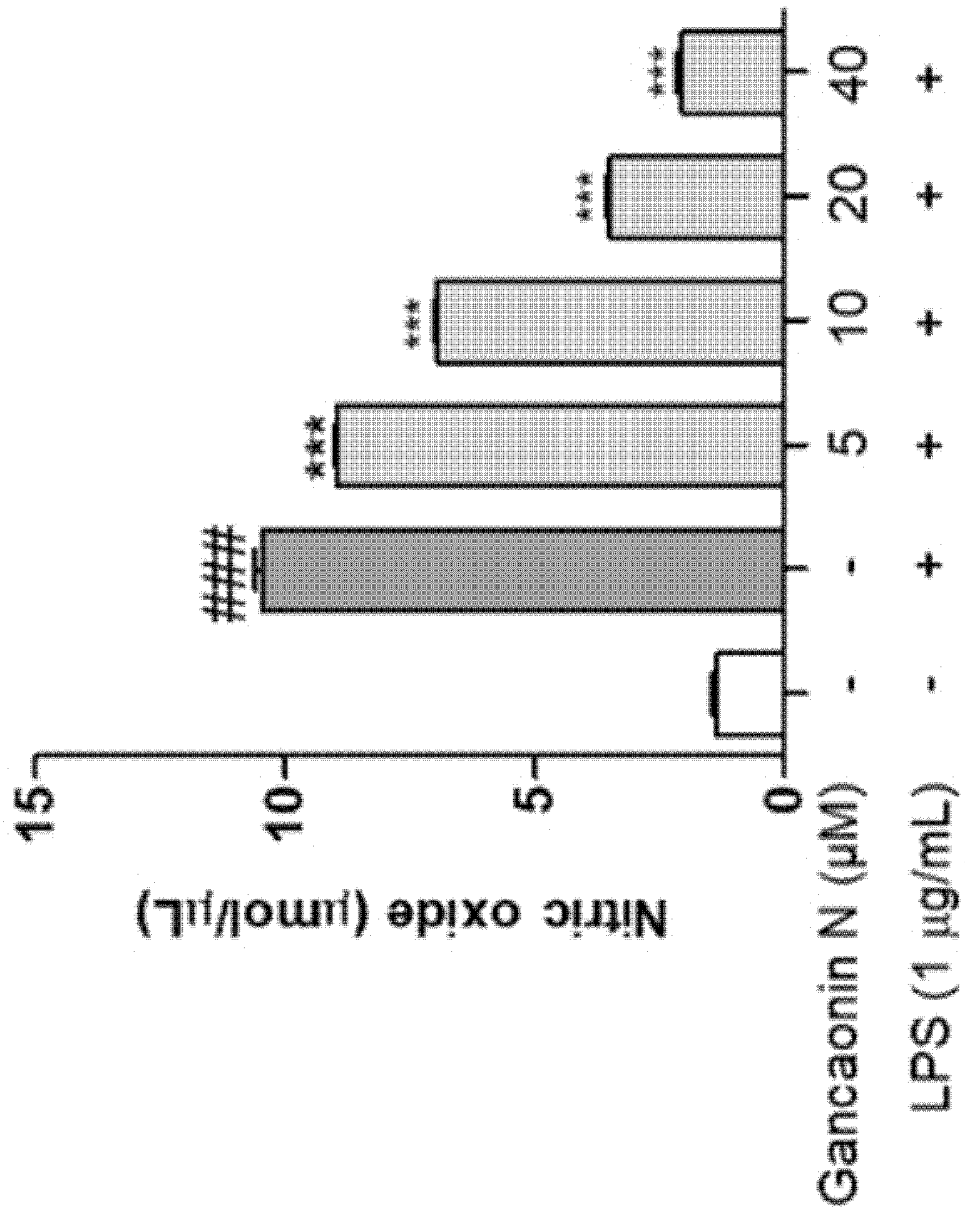
[도 1a]



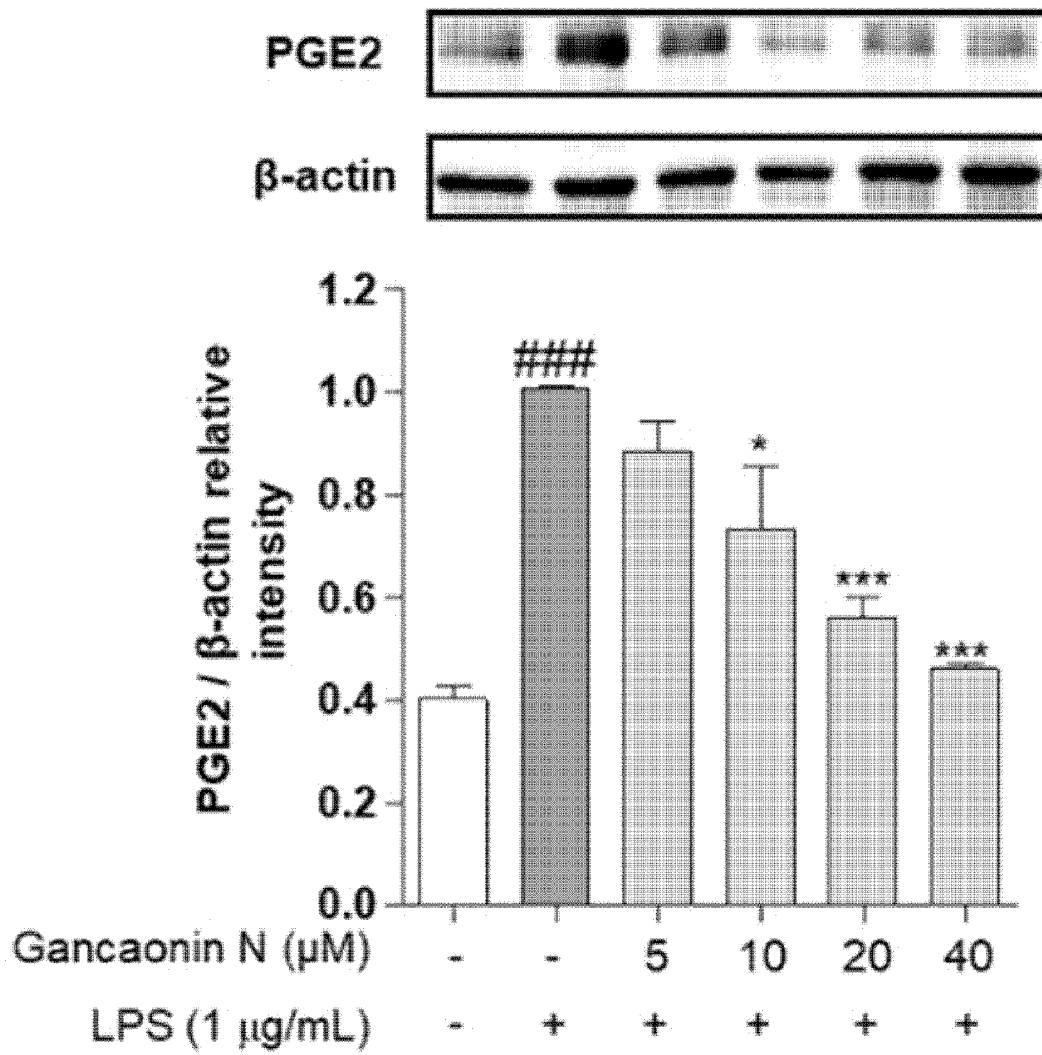
[도 1b]



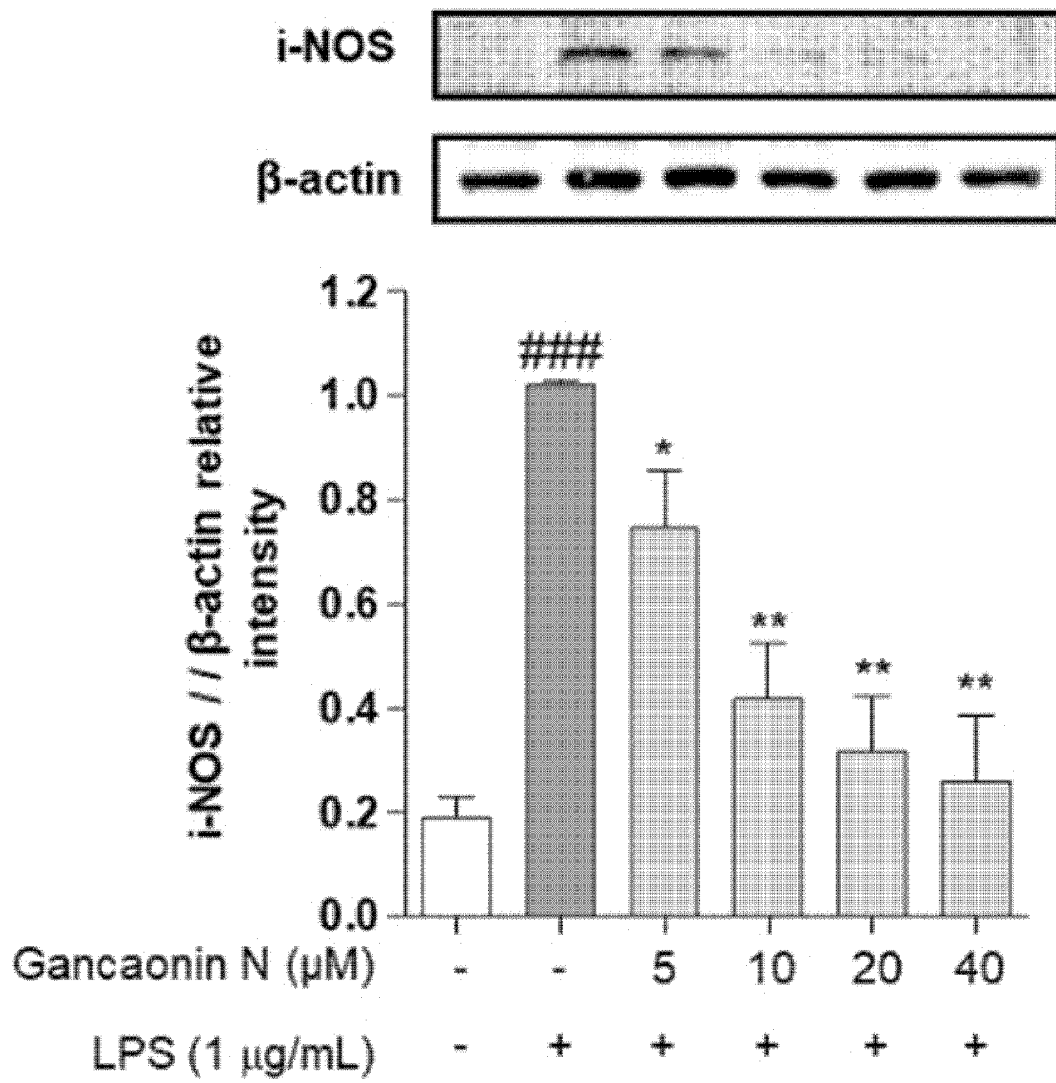
[도2a]



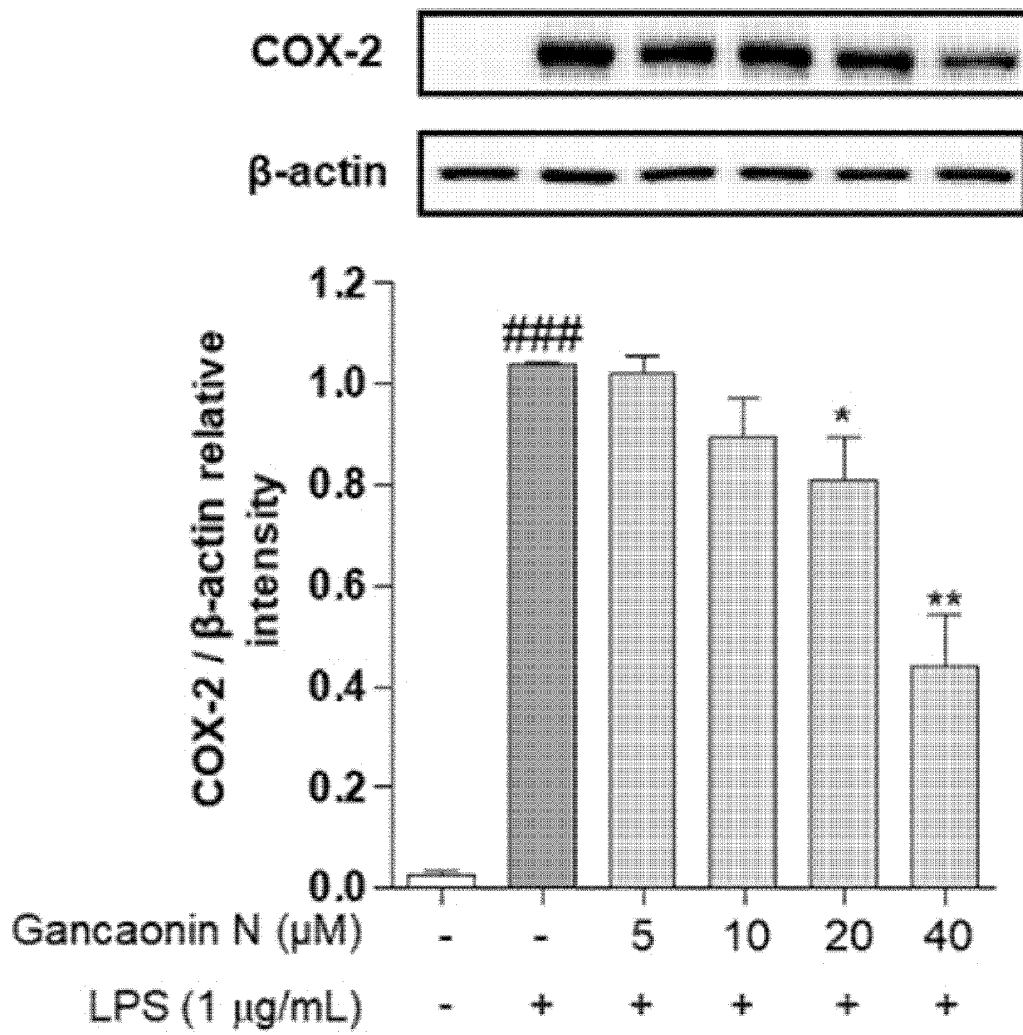
[도2b]



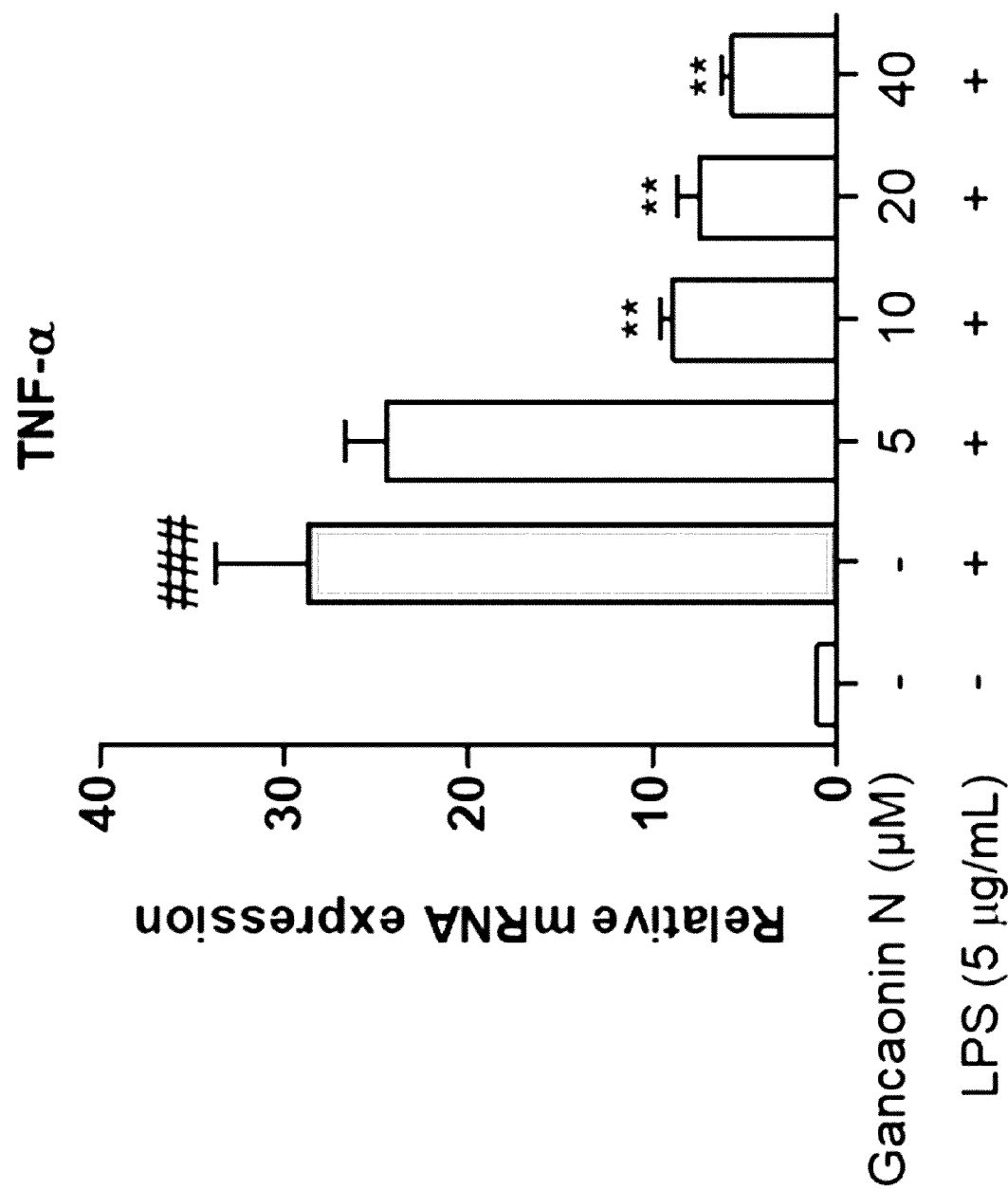
[도2c]



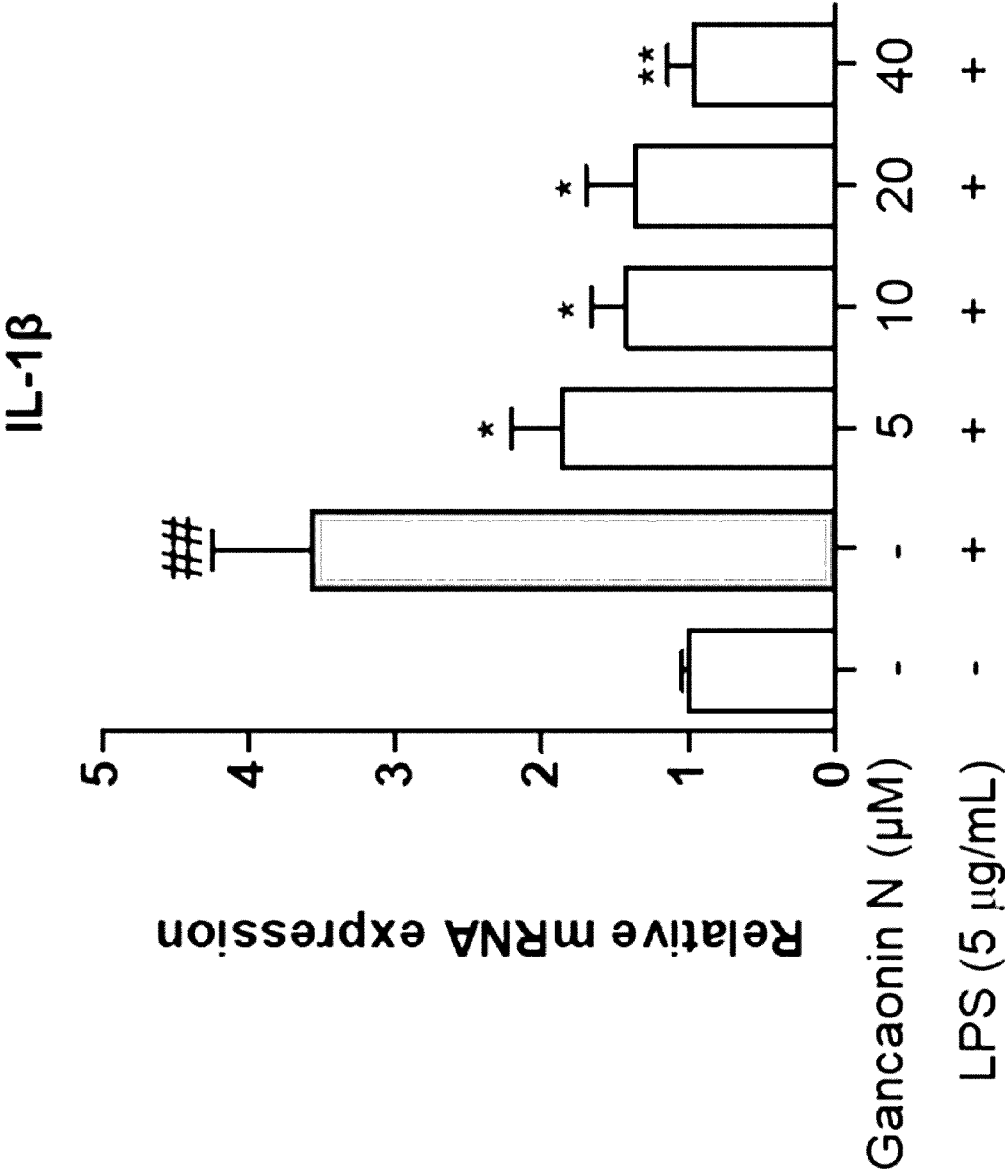
[도2d]



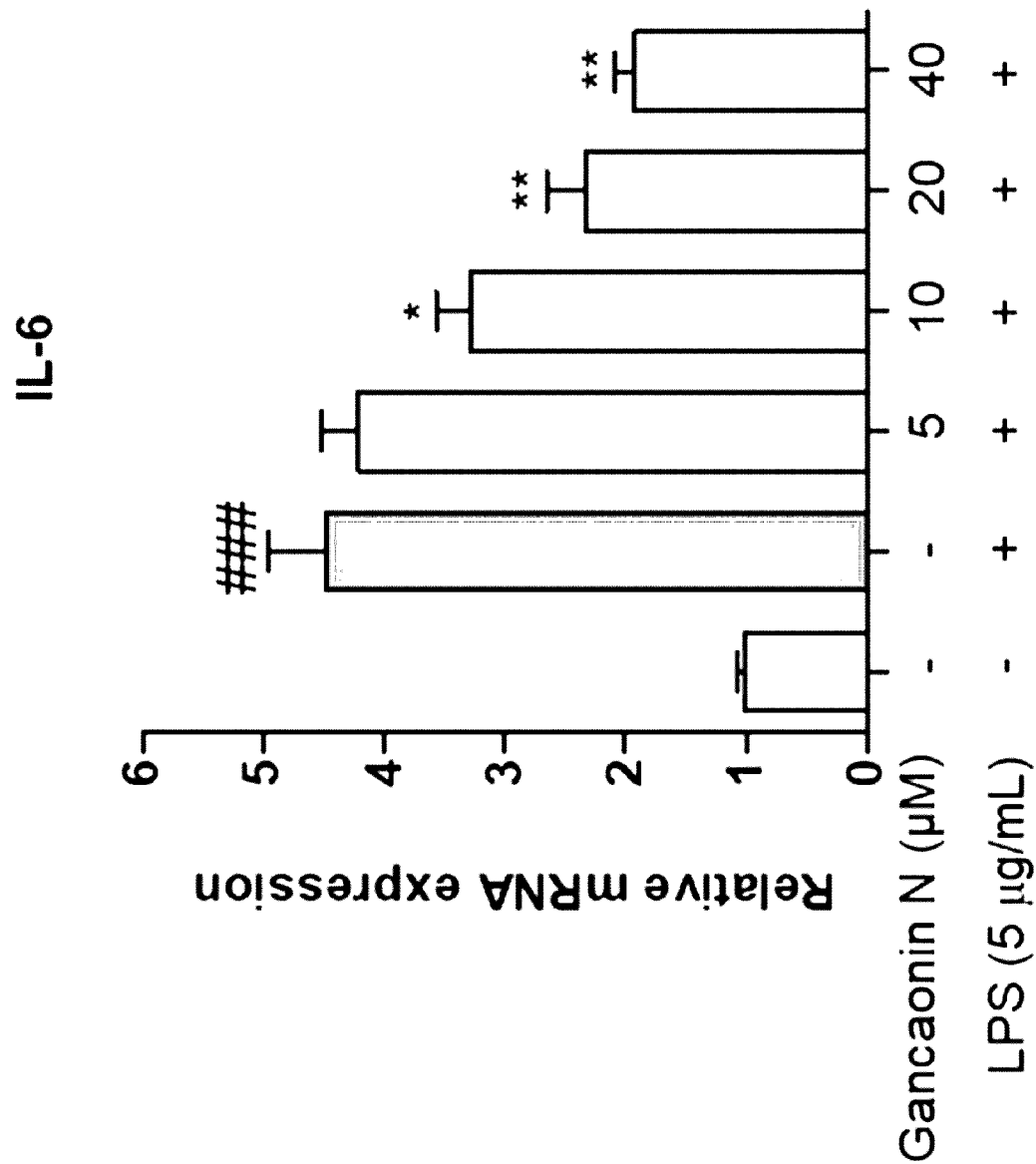
[도3a]



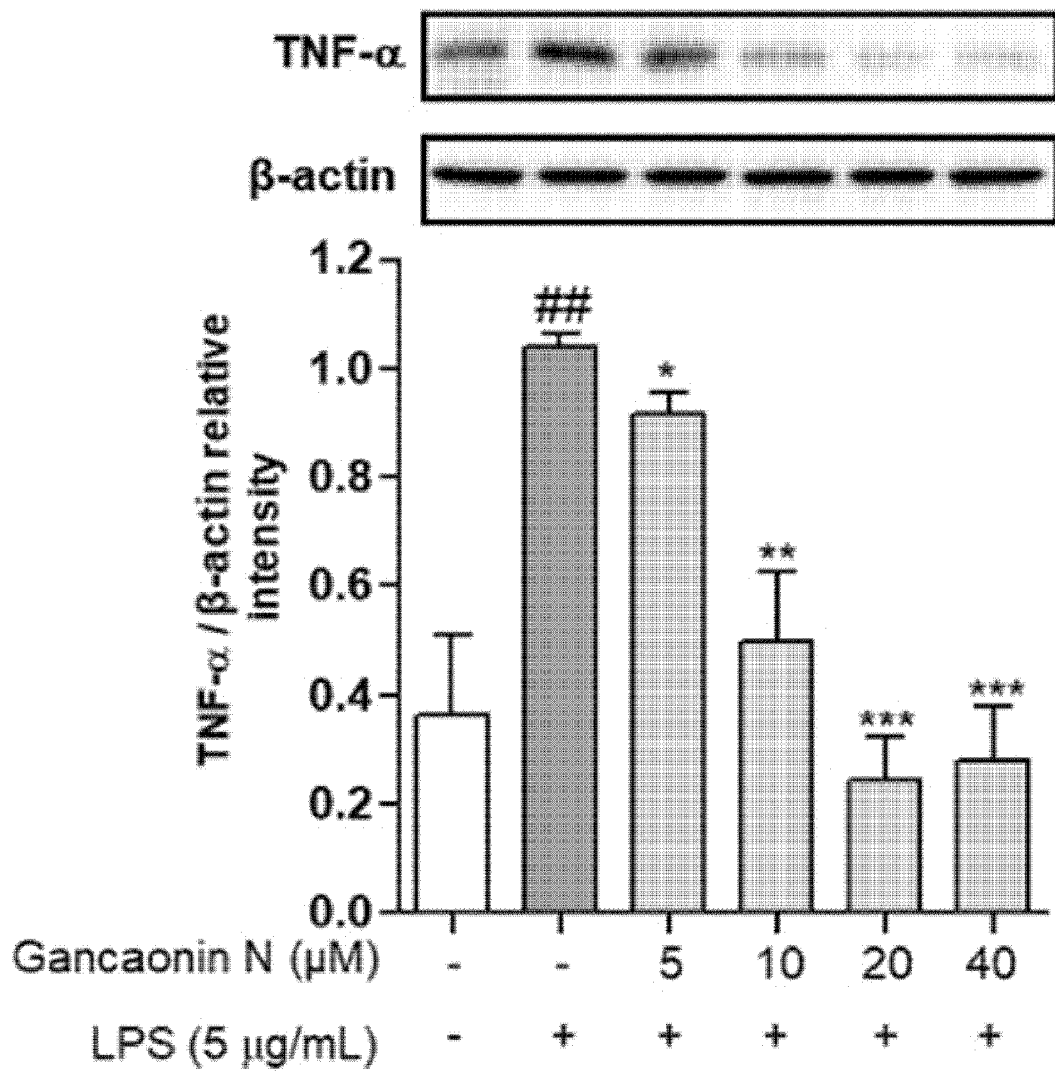
[도3b]



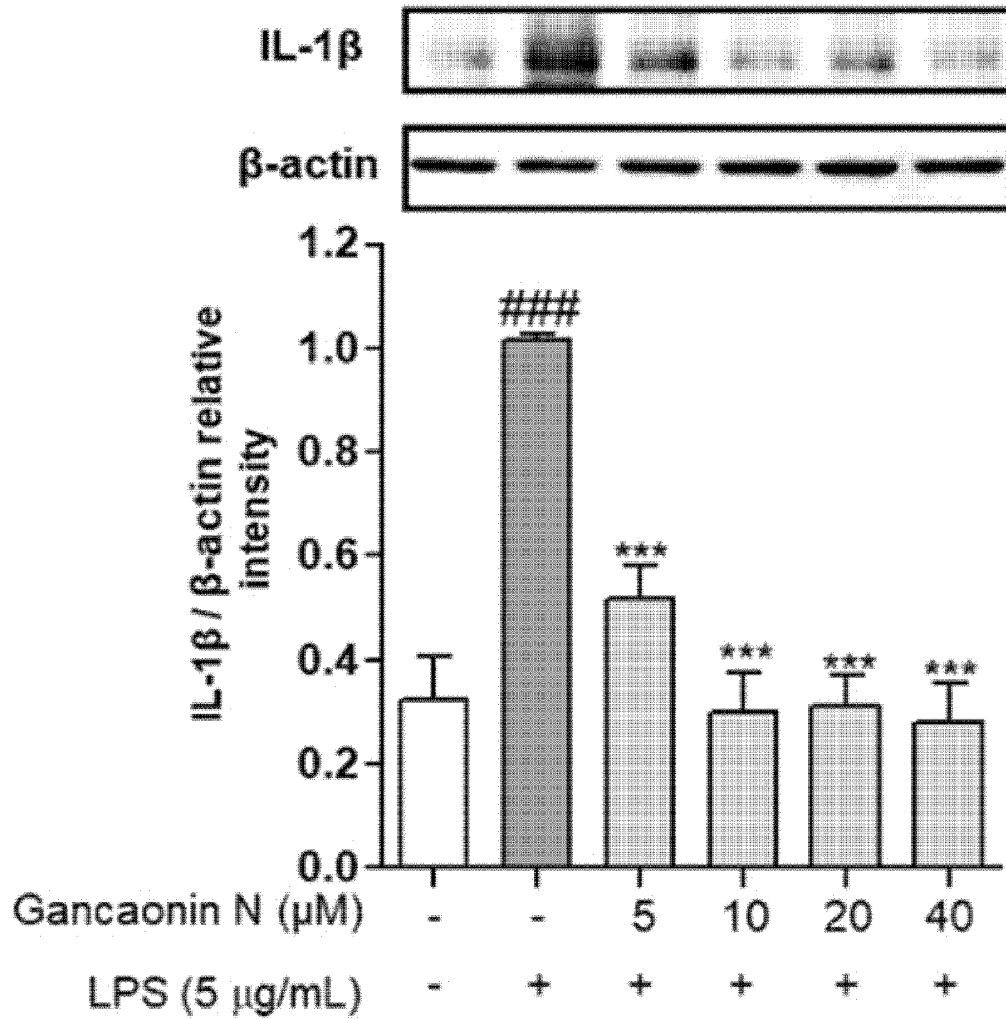
[도3c]



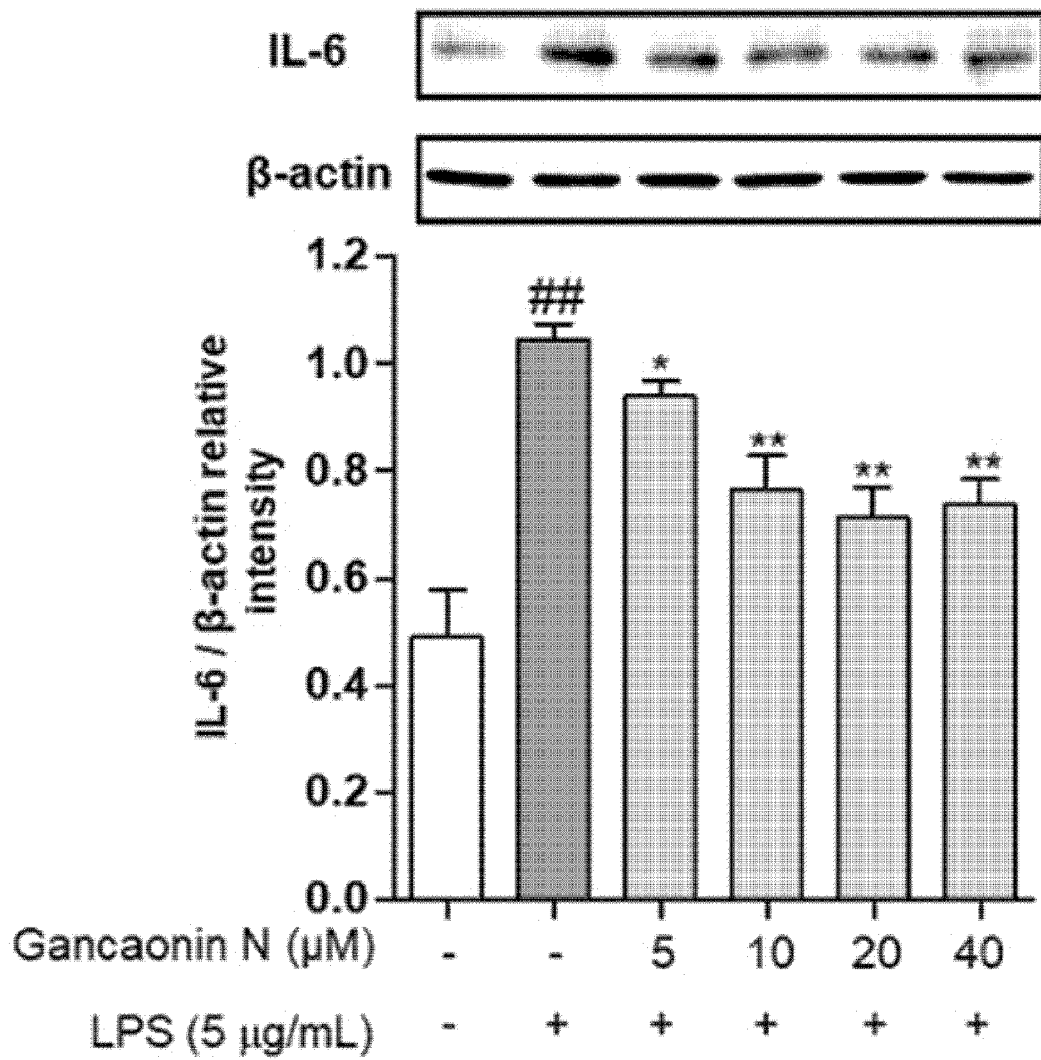
[도4a]



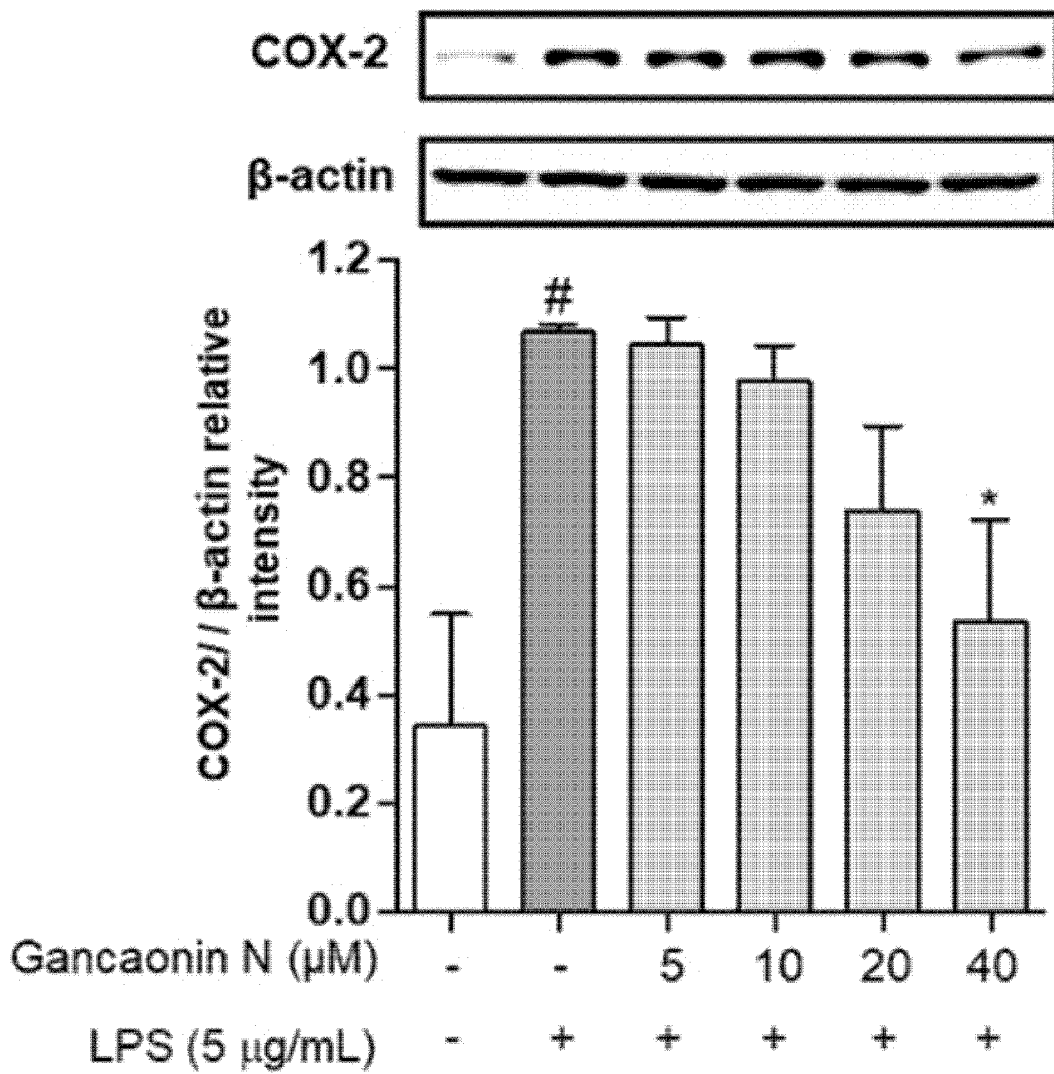
[도4b]



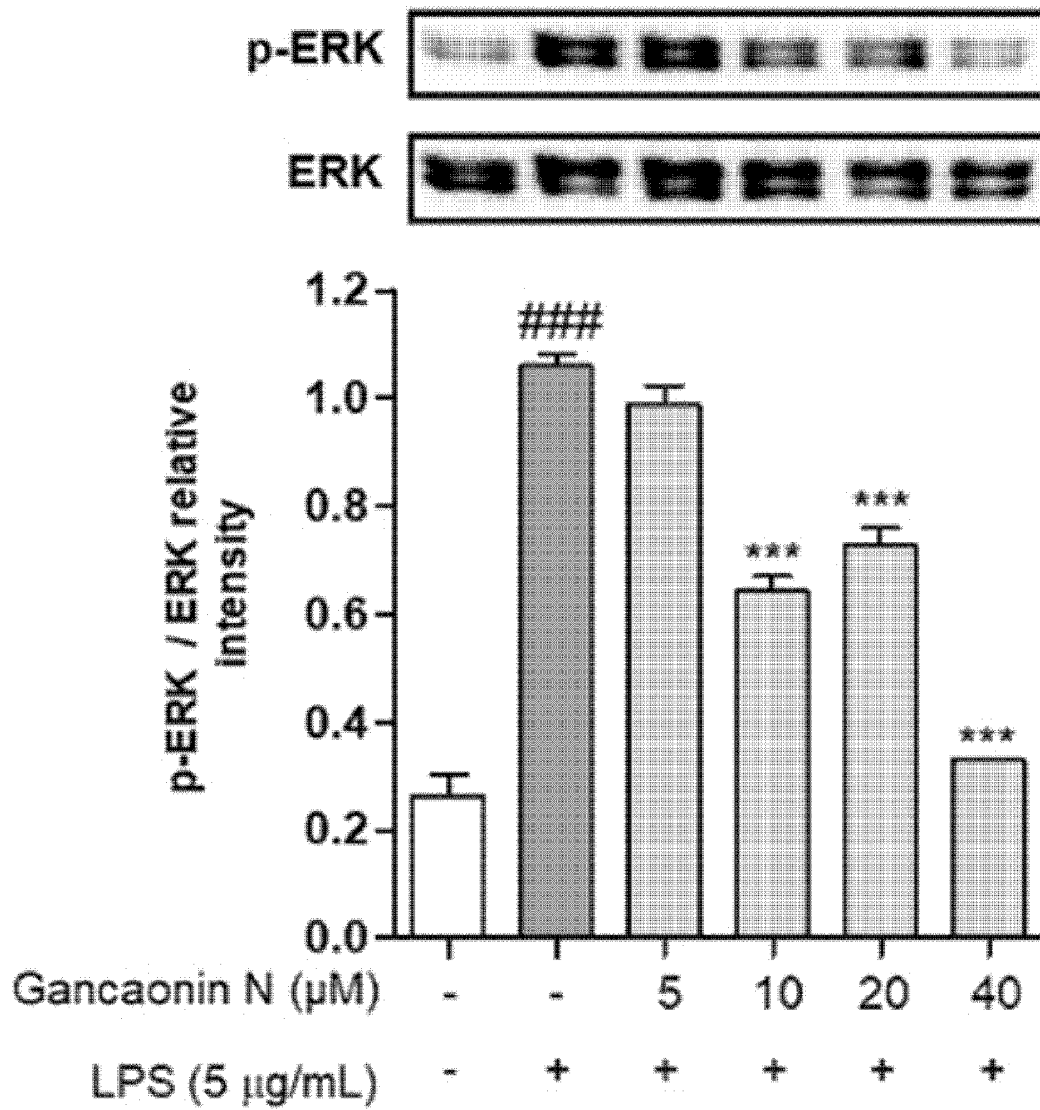
[도4c]



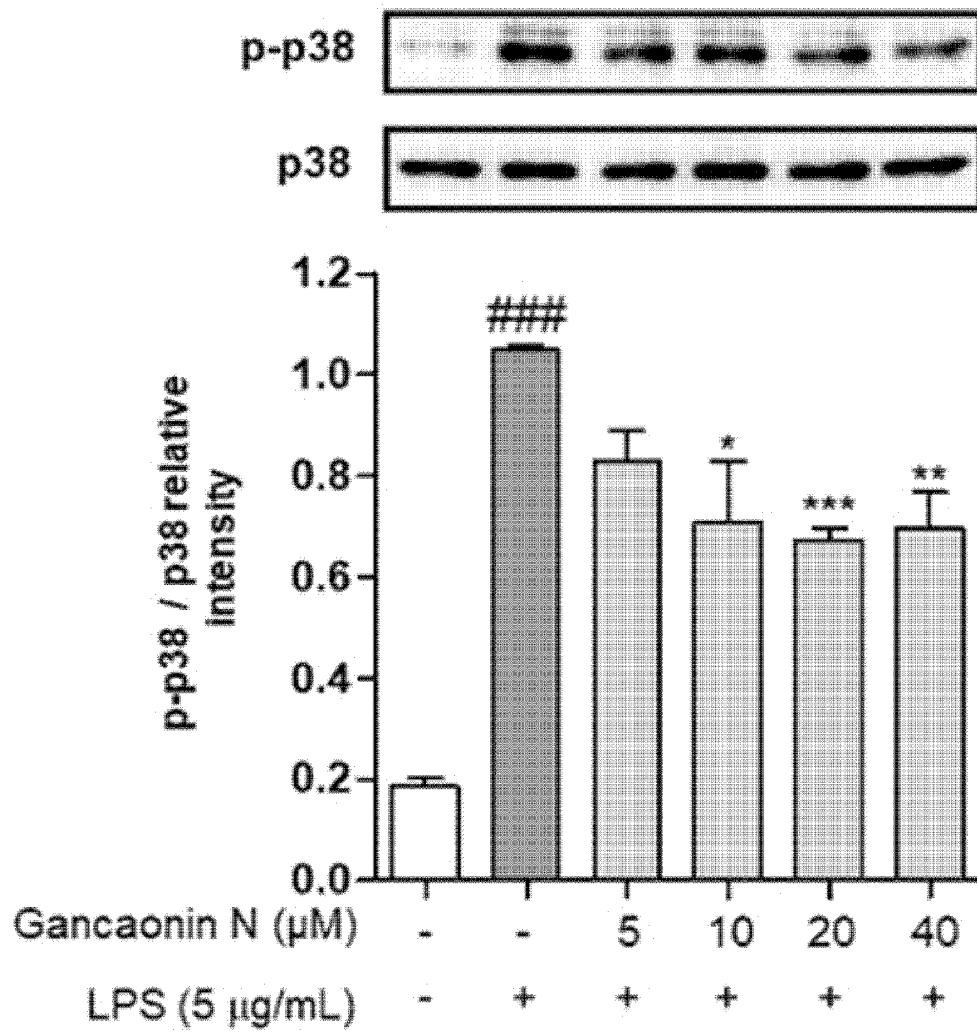
[도4d]



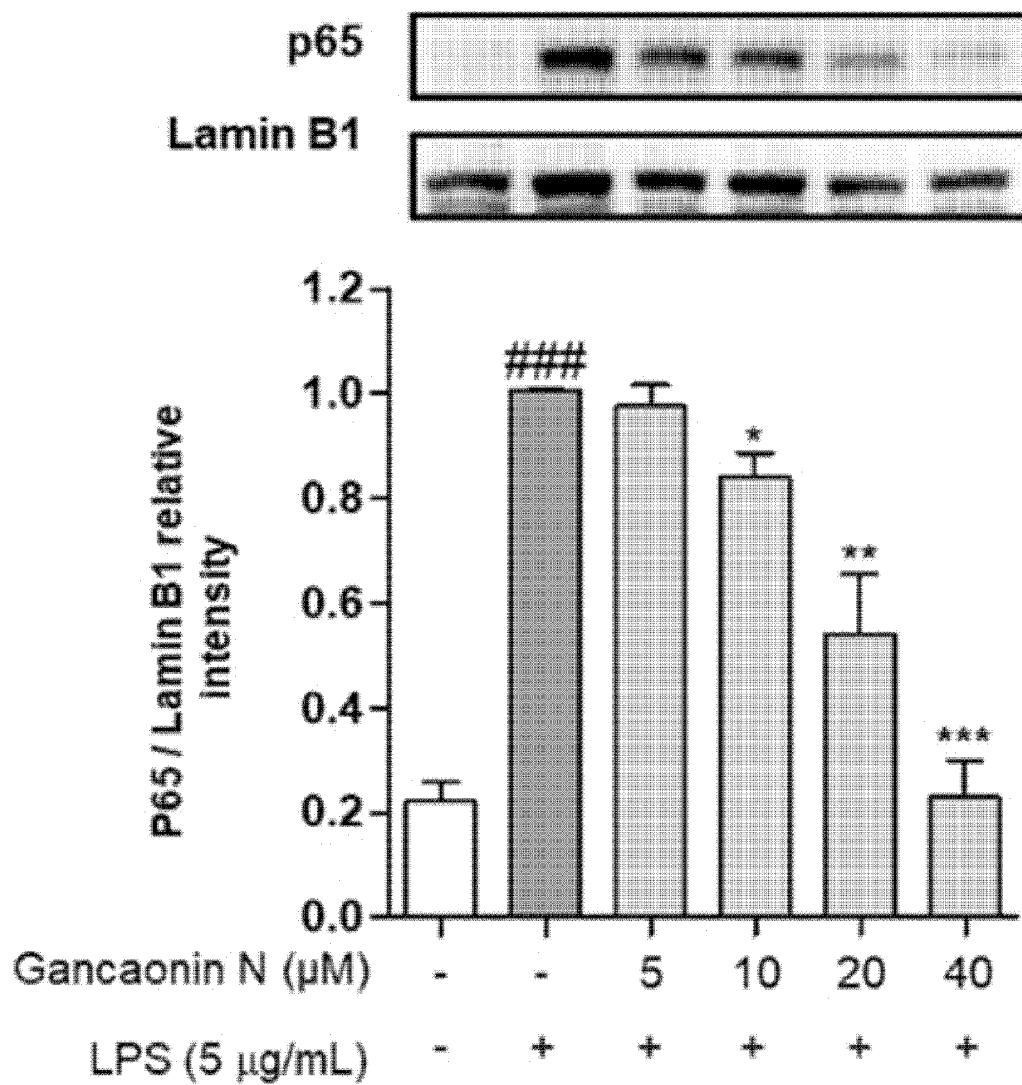
[도5a]



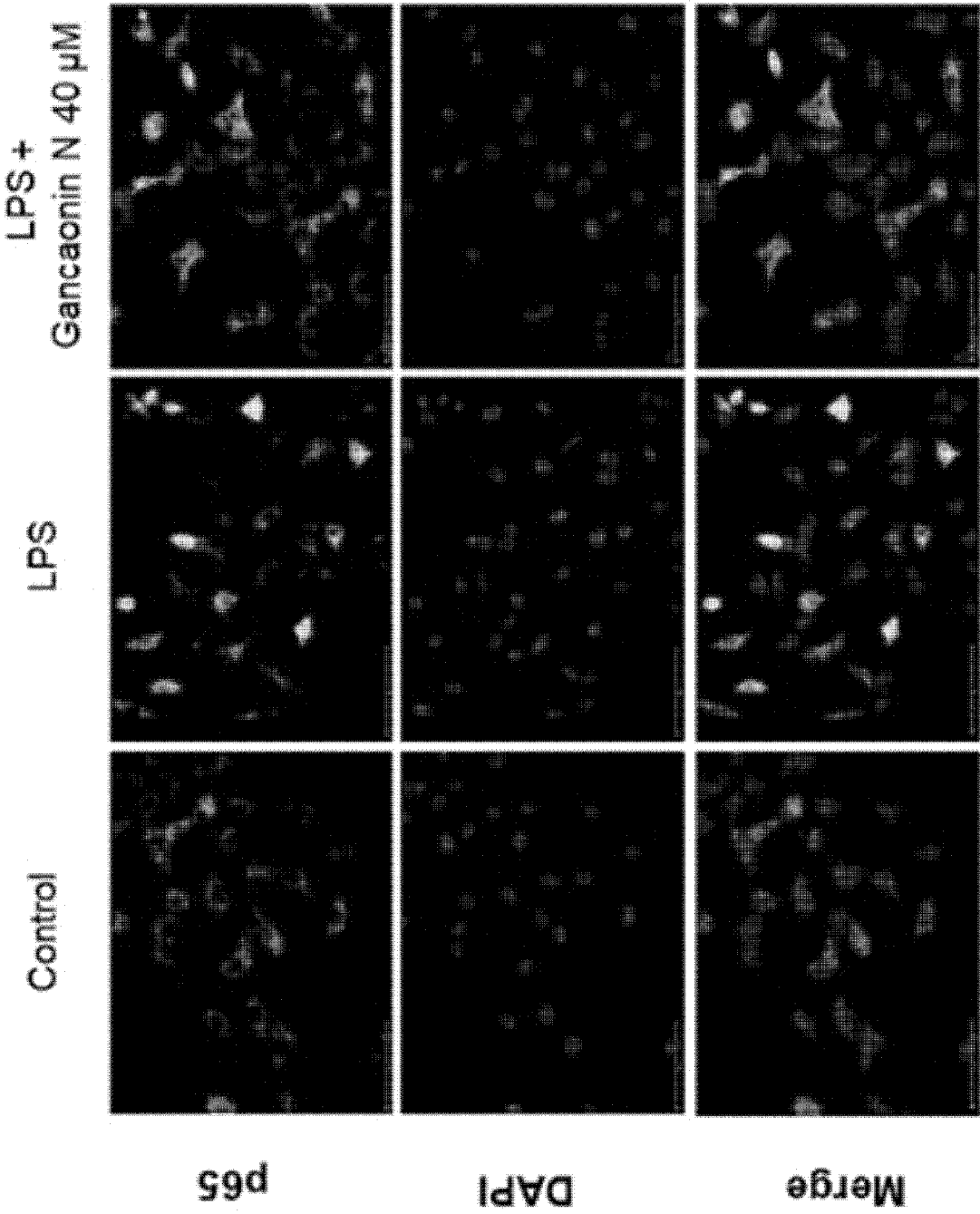
[도5b]



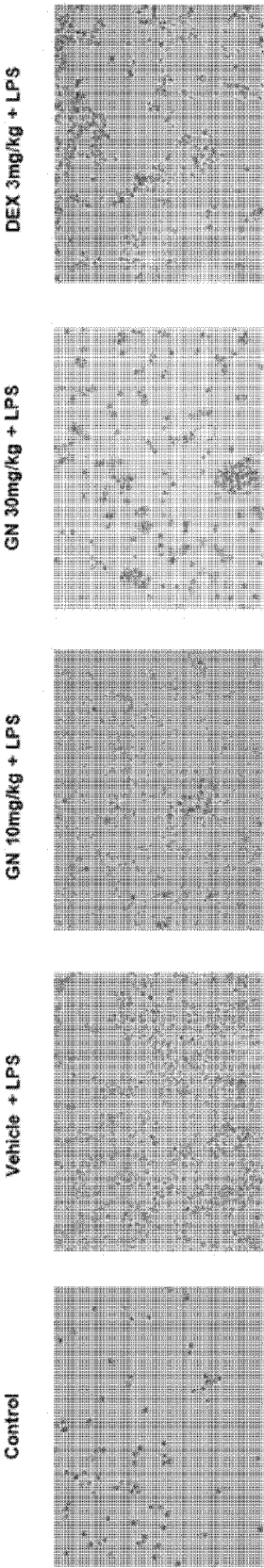
[도5c]



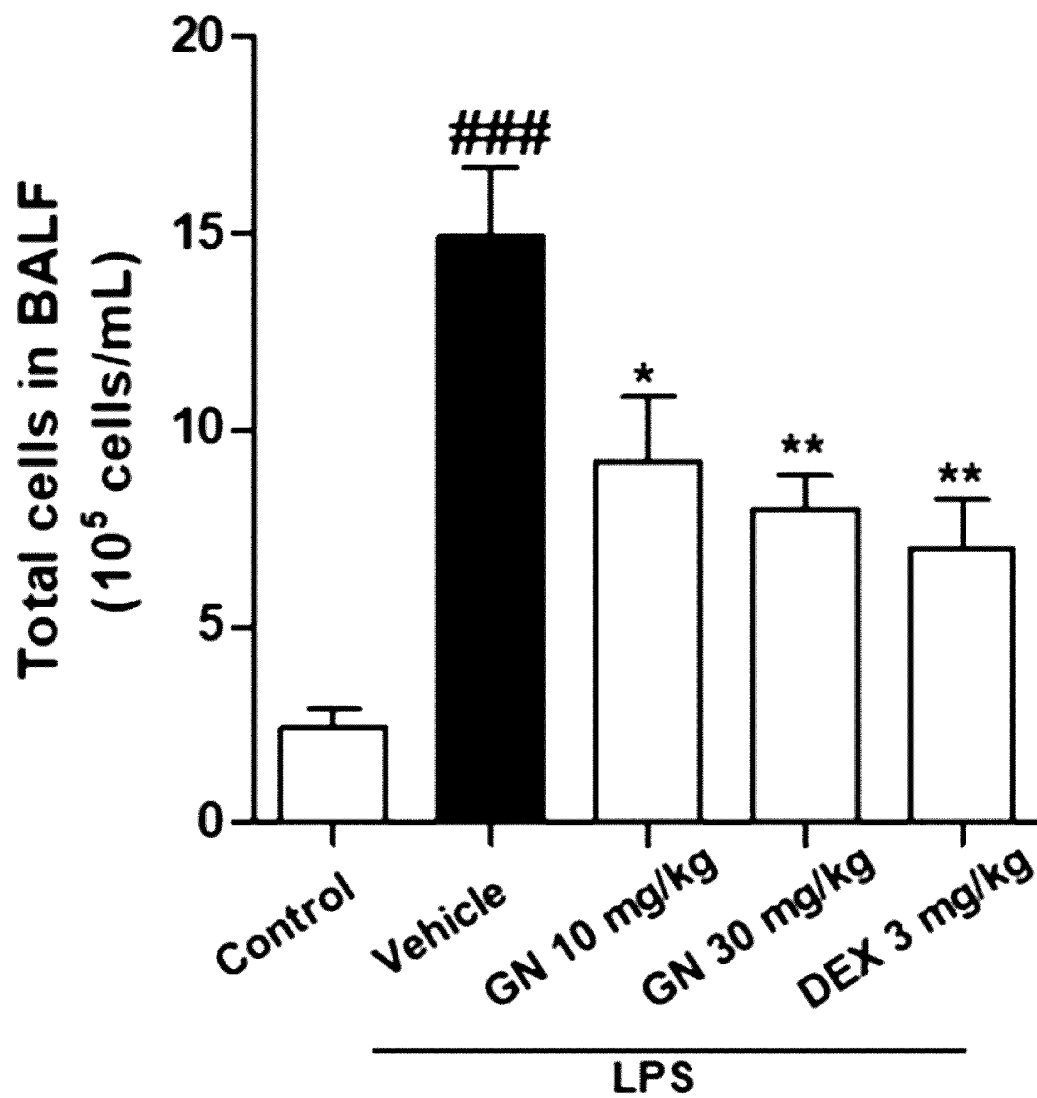
[도5d]



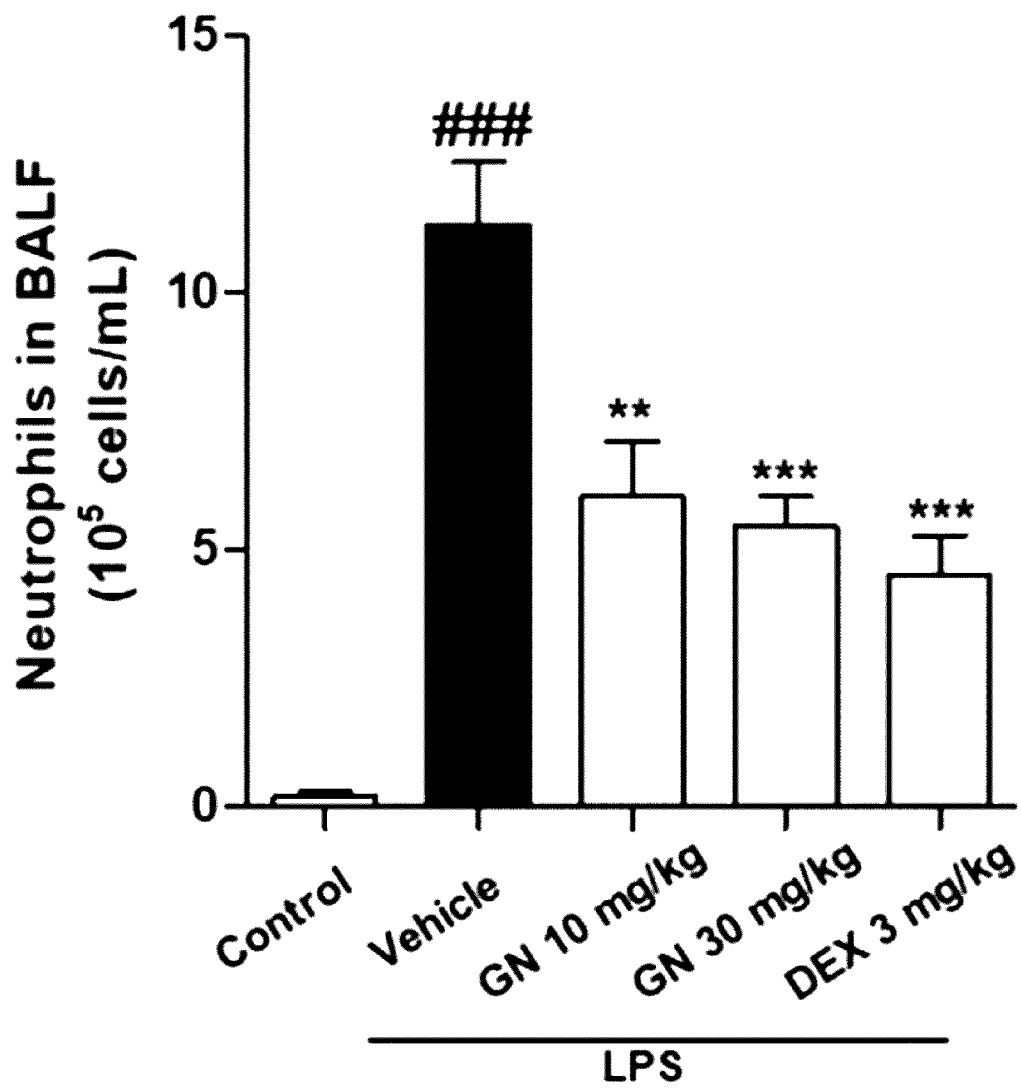
[도6a]



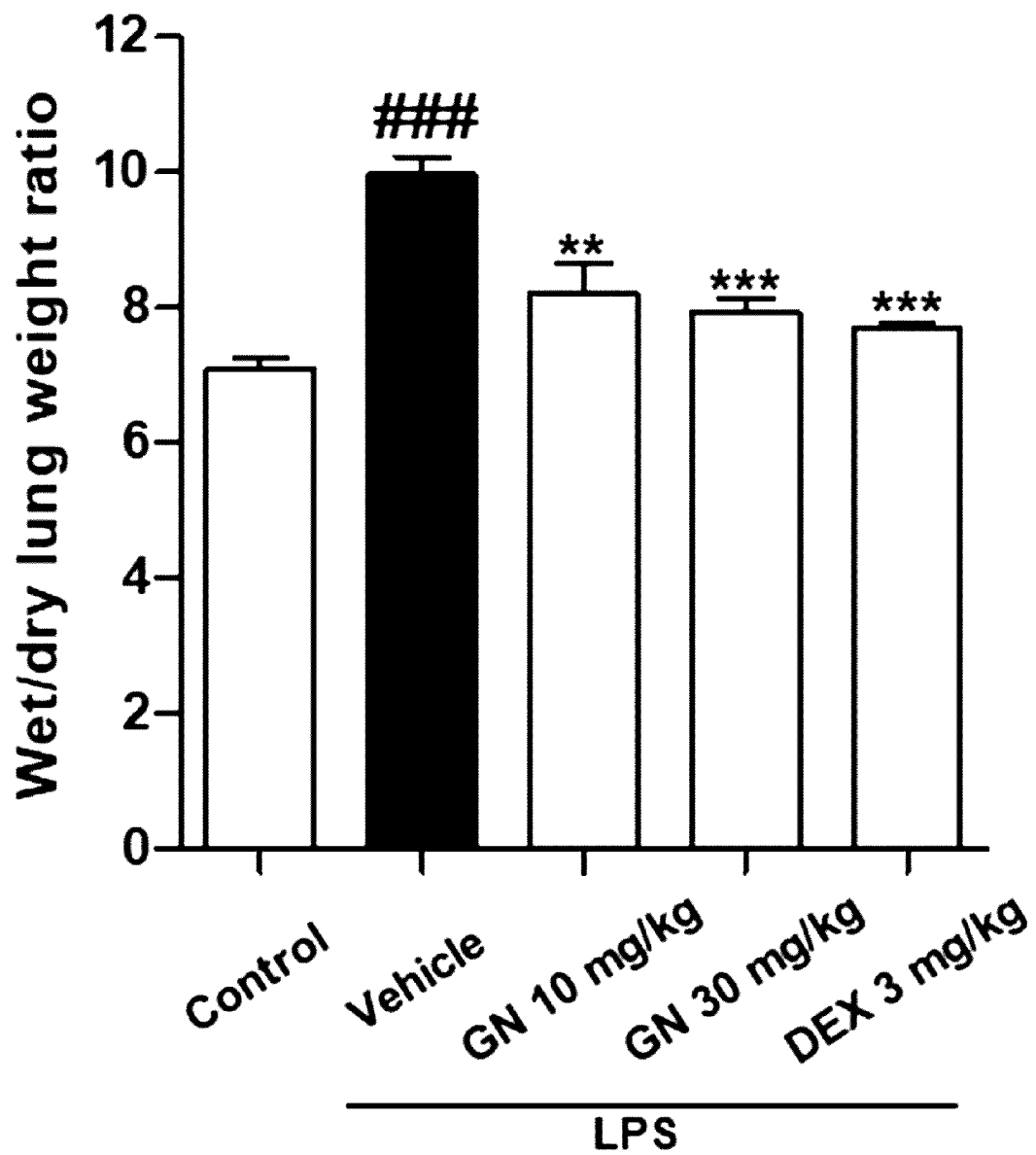
[도6b]



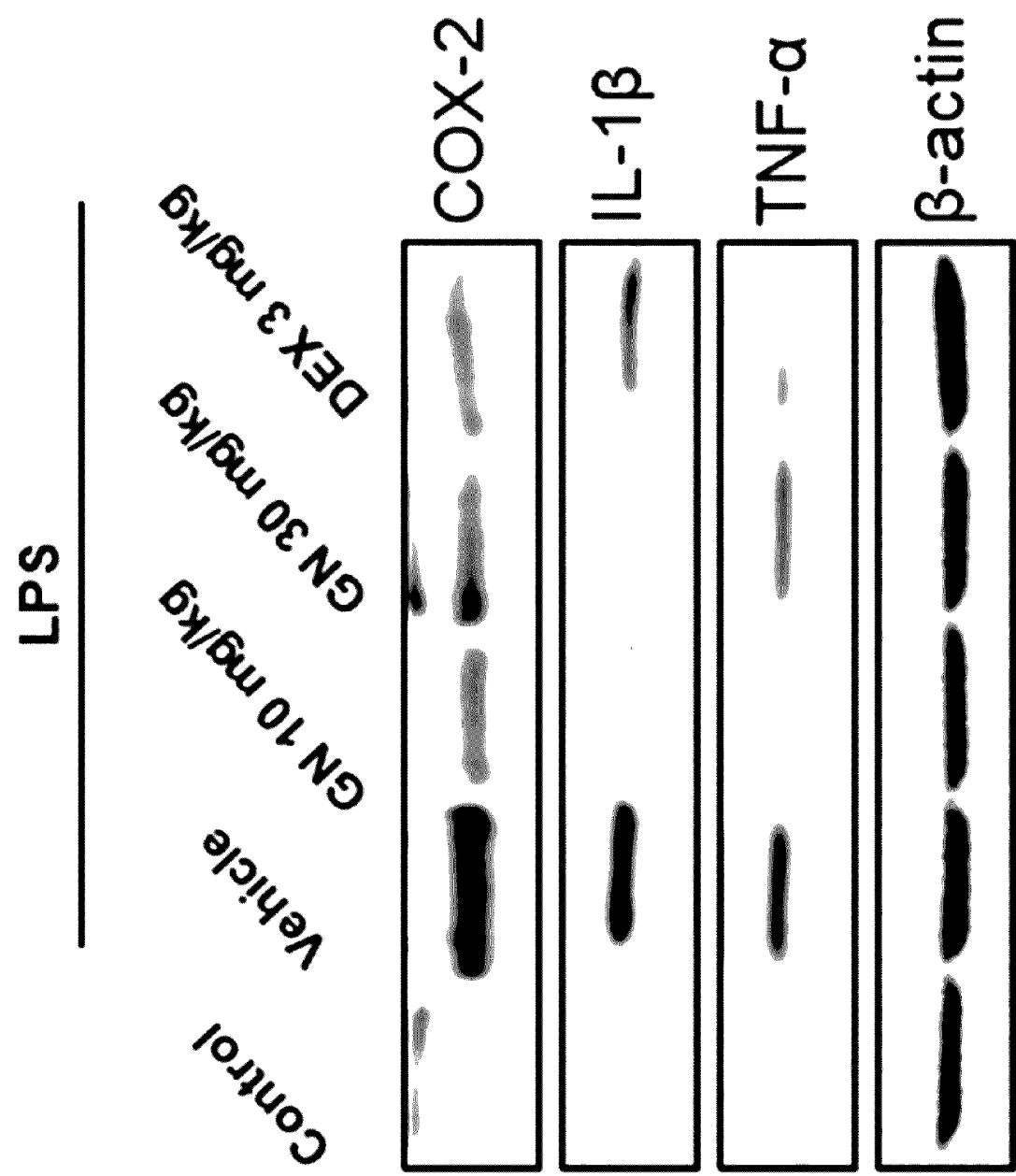
[도6c]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/010367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/352(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61K 36/484(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 31/352(2006.01); A23L 33/105(2016.01); A61K 31/201(2006.01); A61K 31/37(2006.01); A61K 8/34(2006.01);
A61P 29/00(2006.01); A61Q 19/00(2006.01)

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: 간카오닌 N(gancaonin N), 항염(anti-inflammatory), 염증질환(inflammatory diseases), 면역질환(immune disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	LIU, Yan-Ping et al. Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated isoflavone derivatives from the fruits of Ficus carica. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2019, vol. 67, pp. 4817-4823. See abstract; page 4821, right column; and table 3.	1-2,8-9,13 3-7,10-11
Y	KR 10-2009-0036676 A (KANG, Ok Hwa et al.) 15 April 2009 (2009-04-15) See paragraphs [0011]-[0012] and [0056]; and claims 2-3.	3-7,10-11
A	KR 10-2005-0035142 A (KANEKA CORPORATION) 15 April 2005 (2005-04-15) See entire document.	1-11,13
A	JP 2015-093848 A (MARUZEN PHARMACEUT CO., LTD. et al.) 18 May 2015 (2015-05-18) See entire document.	1-11,13
A	KR 10-2019-0118919 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 21 October 2019 (2019-10-21) See entire document.	1-11,13



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

17 December 2021

Date of mailing of the international search report

17 December 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/010367

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.: **12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/010367

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2009-0036676	A	15 April 2009	None			
KR	10-2005-0035142	A	15 April 2005	CN	1599602	A	23 March 2005
				EP	1440688	A1	28 July 2004
				EP	1440688	A4	30 November 2005
				US	2005-0014819	A1	20 January 2005
				US	2009-0036519	A1	05 February 2009
				US	7524975	B2	28 April 2009
				US	7888388	B2	15 February 2011
				WO	03-037316	A1	08 May 2003
JP	2015-093848	A	18 May 2015	None			
KR	10-2019-0118919	A	21 October 2019	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/352(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61K 36/484(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/352(2006.01); A23L 33/105(2016.01); A61K 31/201(2006.01); A61K 31/37(2006.01); A61K 8/34(2006.01); A61P 29/00(2006.01); A61Q 19/00(2006.01) 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: 간카오닌 N(gancaonin N), 항염(anti-inflammatory), 염증질환(inflammatory diseases), 면역질환(immune disease)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	LIU, YAN-PING 등, "Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated isoflavone derivatives from the fruits of Ficus carica." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67권, 페이지 4817-4823 요약; 페이지 4821, 우측 컬럼; 및 표 3 참조.	1-2,8-9,13 3-7,10-11
Y	KR 10-2009-0036676 A (강옥화 등) 2009.04.15 단락 [0011]-[0012], [0056]; 및 청구항 2-3 참조.	3-7,10-11
A	KR 10-2005-0035142 A (카네카 코포레이션) 2005.04.15 전체 문헌 참조.	1-11,13
A	JP 2015-093848 A (MARUZEN PHARMACEUT CO., LTD. 등) 2015.05.18 전체 문헌 참조.	1-11,13
A	KR 10-2019-0118919 A (경북대학교 산학협력단) 2019.10.21 전체 문헌 참조.	1-11,13
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2021년12월17일(17.12.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년12월17일(17.12.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 한인호 전화번호 +82-42-481-5373

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: **12**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0036676 A	2009/04/15	없음	
KR 10-2005-0035142 A	2005/04/15	CN 1599602 A	2005/03/23
		EP 1440688 A1	2004/07/28
		EP 1440688 A4	2005/11/30
		US 2005-0014819 A1	2005/01/20
		US 2009-0036519 A1	2009/02/05
		US 7524975 B2	2009/04/28
		US 7888388 B2	2011/02/15
		WO 03-037316 A1	2003/05/08
JP 2015-093848 A	2015/05/18	없음	
KR 10-2019-0118919 A	2019/10/21	없음	