



(51) 국제특허분류:

A61K 31/35 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004131

(22) 국제출원일: 2015년 4월 24일 (24.04.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0043623 2015년 3월 27일 (27.03.2015) KR

(71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 440-746 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교내, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이선미 (LEE, Sun Mee); 137-776 서울시 서초구 서초대로 385, 5-404호 (서초동, 진흥아파트), Seoul (KR). 김소진 (KIM, So-Jin); 158-774 서울시 양천구 목동로 130, 1419동 102호 (신정동, 신시가치 14단지 아파트), Seoul (KR). 김준성 (KIM, Joon-Sung); 448-130 경기도 용인시 수지구 광교마을로 62, 4207동 201호 (상현동, 광교상록자이아파트), Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 135-846 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 (대치동), 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

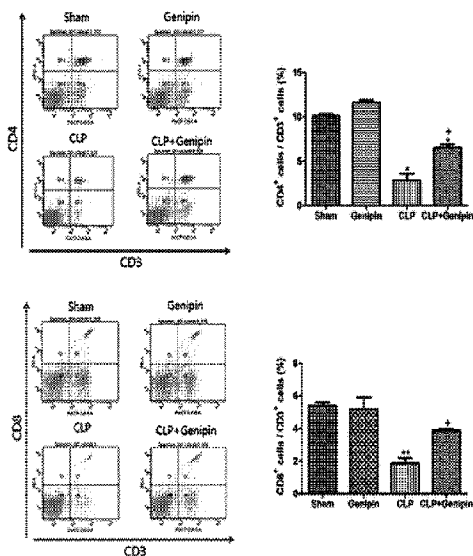
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR ENHANCEMENT OF IMMUNE ACTIVITY CONTAINING GENIPIN OR DERIVATIVE THEREOF AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 면역활성 증강용 조성물 및 이의 용도

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for enhancement of immune activity containing genipin or a derivative thereof and to a use thereof and, more specifically, provides a pharmaceutical composition or food composition for enhancement of immune activity containing genipin or a derivative thereof. The genipin or derivative thereof according to the present invention exhibits effects, such as increasing the number of CD4+ T cells and CD8+ T cells and decreasing the number of regulatory T cells (Treg). In addition, the genipin or derivative thereof is a natural material, and thus can also reduce side effects that frequently occur from chemical materials. Therefore, it is expected that the genipin or derivative thereof can be favorably used as an active ingredient of a pharmaceutical composition or food composition for enhancement of immune activity.

(57) 요약서: 본 발명은 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 면역활성 증진용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 면역활성 증진용 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 제니핀 또는 이의 유도체는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 수를 증가시키고, 조절 T 세포(Treg) 수를 감소시키는 등의 효과를 나타내는 특징이 있다. 또한 천연물 소재인바, 화학물질에서 빈번히 나타나는 부작용도 감소시킬 수 있다. 이에, 면역활성을 증강시키는 약학적 조성물 또는 식품 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 면역활성 증강용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 면역활성 증강용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 면역활성 증강용 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 제공한다.

배경기술

- [2] 면역반응이란 숙주 내에 존재하는 자기방어체계로서, 외부로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 자기자신과 구별해내어 제거하는 생물학적 현상이다. 이러한 자기방어를 위한 감시체계는 크게 두 가지 기작에 의해 이루어지는데 하나는 체액성 면역, 그리고 다른 하나는 세포성 면역이다. 면역 증강이란 이러한 숙주의 특이 또는 비특이, 세포성 및 체액성 면역반응을 상승시키는 모든 작용을 말하며, 최근에 감염이나 종양 등의 치료에 면역 증강이 이용되면서 많은 관심을 불러일으키고 있다.
- [3] 예컨대, 패혈증의 경우, 최근 패혈증의 면역반응에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있다. 즉, 몇몇 연구자들은 패혈증으로부터 유래되는 이병률과 사망률은 염증 반응을 동반하는 지속적인 면역 활성화의 결과라고 주장하는 반면, 다른 연구자들은 면역 억제의 결과라고 주장하기도 한다. 패혈증 환자를 대상으로 소염제를 이용한 수많은 임상실험에서 생존률을 향상시키는데 실패하였으며, 이러한 결과는 패혈증에서 주요한 사망의 원인으로써 과염증 반응에 대하여 재평가하게 만들었다. 최근 Hotchkiss 등(Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. The Lancet Infectious diseases 2013;13:260-8.)은 동물 실험과 임상환자 실험 모두에서 패혈증 시 주된 사망 원인은 면역억제와 관련된 면역세포의 손실이라고 보고하였다.
- [4] 상기와 같이, 면역억제 상태를 개선하고 면역활성을 증강시킴으로써 다양한 질환의 치료에 적용이 가능한데, 면역 증강에 이용되는 제제들은 특이성에 따라 일반 면역강화제와 특이 면역강화제로 구분되며, 또 기능에 따라 능동 면역강화제와 수동 면역강화제로 구분할 수 있다.
- [5] 하지만, 이러한 면역 증강물질은 그 자체의 독성, 면역반응의 차이 등 여러 가지 부작용으로 인해 현재 인간에게 사용할 수 있는 물질은 극히 제한된 실정이고 그 효능도 매우 미미한 것으로 알려져 면역 증강제 개발에 있어서 커다란 장벽이 되어왔다. 따라서, 부작용이 없으면서 유용한 면역 증강효과를 나타내는 천연물질의 개발은 대단히 중요한 의미를 가지는데, 이에 대한 연구가 이루어지고 있으나(국내 등록특허 10-0565442 등) 아직 미비한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 면역활성을 증강시키는 천연물 소재를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, 제니핀이 T 림프구의 사멸을 억제하여 면역억제 상태를 개선시키고, 면역활성을 증강시키는 효과를 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [7] 이에, 본 발명의 목적은 제니핀 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 조성물을 제공하는 것이다.
- [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] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제니핀 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 약학적 조성물을 제공한다.
- [10] 본 발명의 일 구현예로, 상기 조성물은 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포 수를 증가시킬 수 있다.
- [11] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 조성물은 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포의 세포사멸을 억제할 수 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 전세포사멸사 분자인 Bim, FADD, caspase-3 및 caspase-8 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 발현을 억제시킬 수 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 항세포사멸사 분자인 Bcl-2 단백질 발현을 증가시킬 수 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 조절 T 세포(Treg) 수를 감소시킬 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 전염증 사이토카인인 IL-2 및/또는 IFN- γ 생산을 증가시킬 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 항염증 사이토카인인 IL-10 및/또는 IL-4 생산을 감소시킬 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명은 제니핀 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물을 제공한다.
- [18] 더욱이, 본 발명은 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역활성 증강 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명에 따른 제니핀 또는 이의 유도체는 CD4⁺ T 세포 및/또는 CD8⁺ T 세포 수를 증가시키고, 조절 T 세포(Treg) 수를 감소시키는 등의 효과를 나타내는

특징이 있다. 또한 천연물 소재인바, 화학물질에서 빈번히 나타나는 부작용도 감소시킬 수 있다. 이에, 면역활성을 증강시키는 약학적 조성물 또는 식품 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 CLP 유도 패혈증 모델에서 제니핀 처치에 따른 생존율 변화를 확인한 결과이다.
- [21] 도 2는 제니핀 처치에 따른 비장세포 수 변화를 확인한 결과이다.
- [22] 도 3은 제니핀 처치에 따른 비장 내 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구 수 변화를 확인한 결과이다.
- [23] 도 4는 제니핀 처치에 따른 비장 내 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구 세포자멸사 변화를 확인한 결과이다.
- [24] 도 5는 제니핀 처치에 따른 비장 내 Bim, Bcl-2, FADD, caspase-3 및 caspase-8 단백질 발현 변화를 확인한 결과이다.
- [25] 도 6은 제니핀 처치에 따른 비장 내 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 및 CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ 조절 T 세포 비율 변화를 확인한 결과이다.
- [26] 도 7은 제니핀 처치에 따른 비장 내 사이토카인 분비 변화를 확인한 결과이다.

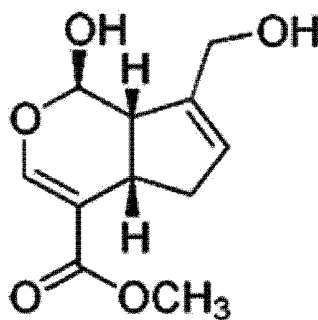
발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 본 발명은 제니핀 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
- [28] 본 발명에서의 용어 "제니핀(genipin)" 이란 이리도이드 배당체 계통의 천연 성분인 제니포사이드(geniposide)의 비당부분으로서 치자나무 과실(치자)의 주요 약리 효능을 나타내는 성분을 의미하며, 하기 화학식 1로 나타낼 수 있다. 제니핀은 위산의 분비를 촉진하고 항산화작용 및 산화질소(NO) 생성 저해작용 또는 간독성 모델에서 병리학적 조직 병변을 개선시킴이 보고된 바가 있으나, 본 발명에서 밝힌 T 림프구 사멸 억제에 의한 면역활성 증강 용도는 본 발명자에 의해 최초로 규명되었다.

[29] [화학식 1]

[30]

[31]



- [32] 본 발명에서의 용어 "제니핀(genipin)의 유도체"란 제니핀과 동일한 활성을 나타내며, 면역활성을 증강시키는 효과가 있는 화합물은 제한없이 포함되나, 그

예로 제니포사이드(geniposide), 제니피오다이식산(genipiodisic acid), 펜타-아세틸제니포사이드(penta-acetyl geniposide; Molecular Pharmacology, 70(3), 997-1004, 2006), 6a-하이드록시제니포사이드(6a-hydroxygeniposide), 6b-하이드록시제니포사이드(6b-dhydroxygeniposide), 6a-메토오시제니포사이드(6a-methoxygeniposide) 또는 6b-메토오시제니포사이드(6b-methoxygeniposide)이다(Journal of Health Science, 52(6), 743-747, 2006). 바람직하게는 제니포사이드 일 수 있다. 제니포사이드는 섭취시 체내 장내 세균에 의해서 제니핀으로 대사되므로, 제니핀과 동일한 효과가 있음을 당업자에게 자명할 것이다.

- [33] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 면역억제의 주요한 특징 중 하나인 면역세포의 감소를 억제시킴으로써 면역활성 증강 효과를 나타낼 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CLP로 유도된 패혈증 모델을 사용하여 제니핀 처치에 따른 비장 내 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포 수의 변화를 확인한 결과, 제니핀을 투여한 군의 경우, T 림프구의 감소가 현저히 억제됨을 확인하였다(도 3 참조).
- [35] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 면역세포의 세포사멸을 억제함으로써 면역활성 증강 효과를 나타낼 수 있다.
- [36] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 제니핀 처치에 따른 면역세포의 세포사멸 억제를 확인한 결과, 제니핀을 투여한 군의 경우, CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구의 세포사멸사 비율이 현저히 억제되고(도 4 참조), 전세포사멸사 분자인 Bim, FADD, caspase-3 및 caspase-8 단백질 발현이 억제되며, 항세포사멸사 분자인 Bcl-2 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 5 참조).
- [37] 더욱이, CD4⁺ T 세포는 후천적 면역 시스템에서 주요한 효과기 세포(effector cell)이고, 이들은 항-염증 반응에서 중요한 역할을 한다. 분화 및 표현형에 근거하여 도움 T 림프구는 Th1, Th2 및 조절 T 세포로 나뉘어질 수 있다. Th1 세포는 인터페론-감마(IFN- γ) 및 인터루킨-2(IL-2)를 생산하며, 이들은 세포 매개 면역 및 염증반응을 담당한다. Th2 세포는 인터루킨-4(IL-4) 및 인터루킨-10(IL-10)을 생산하며, 이들은 체액성 면역 시스템과 항염증 반응을 담당한다. 조절 T 세포는 T 림프구의 일종으로 억제성 T 세포라고 불리기도 한다. 조절 T 세포는 다른 염증 세포의 사이토카인 분비를 억제하거나 T 림프구의 분화 억제 또는 T 림프구의 세포사멸사를 유도함으로써 면역 시스템의 항상성을 유지하는 역할을 한다. 최근 보고에 따르면, 조절 T 세포의 과도한 증식이 면역억제를 유도하는 요인 중 하나로 밝혀졌다.
- [38] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 제니핀 처치에 따른 조절 T 세포 비율 변화 및 사이토카인 분비 변화를 확인한 결과, 제니핀을 투여한 군의 경우, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 및 CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ 조절 T 세포 비율이 현저히 억제되고, Th1 유래 사이토카인(IFN- γ 및 IL-2) 생산이 증가하며, Th2 유래 사이토카인(IL-4 및 IL-10) 생산이 감소됨을 확인하였다(도 6 및 도 7 참조).

- [39] 이에, 본 발명에 따른 조성물은 면역활성을 증강시킴으로서 면역결핍, 면역저하 또는 면역계 손상으로 인한 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- [40] 본 발명에 따른 조성물이 약학적 조성물의 형태인 경우, 약학적으로 유효한 양의 제니핀을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란 면역활성을 증가시키기에 충분한 양을 말한다. 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 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.
- [41] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 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 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [42] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체로는 식염수, 완충 식염수, 물, 글리세롤 및 에탄올 등이 있으나 이에 한정되지 않으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 모두 사용 가능하다.
- [43] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 포함하여 면역활성 증강을 필요로 하는 개체에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [44] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 면역활성을 증강시키는 건강기능 식품 조성물로도 사용할 수 있다.
- [45] 그러므로 본 발명에서, 제니핀은 면역활성 증강에 효과가 있는 건강기능식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료의 제조에 용이하게 활용할 수 있다.
- [46] 본 발명에서 상기 "건강기능식품"이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록

설계하여 가공한 식품을 의미하며, 이는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[47] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[48] 상기 제니핀의 양은 전체 건강기능식품 중량의 0.001 중량% 내지 90 중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 40 중량%로 포함할 수 있고, 장기간 섭취 용도일 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으나, 유효성분이 안전성 면에서 아무런 문제가 없어 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있기 때문에 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[49]

[50] 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.

[51]

[52] [실시예]

[53] 실시예 1. 실험준비 및 실험방법

[54] 1-1. 실험 물질

[55] 제니핀은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지, Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin 및 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco Life Technologies (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 유세포 분석 (FACS)을 위한 항체는 eBioscience (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다. 이 외의 세포 배양 물질들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 모든 실험 물질은 reagent grade를 사용하였다.

[56]

[57] 1-2. 실험동물

[58] 실험동물은 (주) 오리엔트바이오로부터 ICR계 웅성 생쥐 (27-29 g)를 공급받아 1주일 동안 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 온도 및 12시간 간격으로 명암이 조절되는 실험실에서 순화하였으며, 고형 사료 (오리엔트바이오) 및 물은 자유롭게 섭취시켰다. 모든 동물 실험은 성균관대학교 약학 대학 동물 실험 윤리위원회의 승인을 받았으며, National Institutes of Health의 가이드라인 (NIH publication No. 86-23, revised 1985)에 따라 실험하였다.

[59]

[60] 1-3. 맹장 결찰 및 천공법(cecal ligation and puncture; CLP)

[61] 생쥐에 케타민(ketamine; 100 mg/kg; Yuhan Corporation, Seoul, Korea) 및 자일라진(xylazine; 10 mg/kg; Bayer, Leverkusen, Germany)을 근육 주사하여 마취시킨 후, Chaudry 등 (Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. Surgery 1979;85:205-11.)의 방법에 따라 CLP를 통해 패혈증을 유발시켰다. 즉, 복강 정중부를 절개하여 맹장을 외부로 노출시킨 후, 장폐색이 일어나지 않도록 회맹부 밸브의 말단을 3.0 봉합사로 결찰하였다. 이 후, 20게이지 카테터를 이용하여 맹장에 두 개의 구멍을 만들어 일정량의 분변을 유출시켰으며, 이를 포함하여 맹장을 다시 복강 내에 넣고 2.0 봉합사로 봉합한 후 탈수가 일어나지 않도록 1 mL의 생리식염수를 피하 주사하였다.

[62]

[63] 1-4. 유세포 분석법

[64] 비장세포는 항-마우스 CD16/CD32 항체로 15분간 blocking 하였다. 이 후, flow cytometry buffer로 반응을 정지시킨 후 원심 분리하여 pellet을 취하였다. 분리한 비장세포는 항-CD3 (PerCP-Cy5.5), 항-CD4 (APC), 항-CD8 (PE), 항-CD25 (PE) 및 항-CTLA4 (APC) 항체와 반응시켰다. 세포 내 염색은 Foxp3/Transcription factor 염색 완충액을 사용하여 염색하였다. 유세포 분석법은 GuavaSoft™ software 및 Guava easyCyte8(Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 실시하였다.

[65]

[66] 1-5. 웨스턴 블롯(Western blot)

[67] 단백질 샘플을 7.5-18%의 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩한 뒤, SDS-PAGE를 사용하여 단백질 크기대로 분리하였다. 분리된 단백질은 Trans-Blot Cell을 사용하여 PVDF membrane으로 옮겼으며, 5% 탈지분유 (용매: TBST)로 실온에서 1시간 blocking하였다. 이 후, 1 차 항체를 하룻밤 동안 4°C에서 반응시켰으며, 다음 날 2차 항체를 실온에서 1 시간 반응시켰다. 단백질의 양은 화학발광검출시스템 (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 검출하였으며, Total Lab TL120 software (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, UK)를 이용하여 정량하였다. Bim, B-cell lymphoma (Bcl)-2, Fas-Associated protein with Death Domain (FADD), caspase-3 및 caspase-8 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 측정된 단백질 양은 β -actin (Sigma-Aldrich)의 단백질 양으로 나누어 표준화하였다.

[68]

[69] 1-6. 통계분석

[70] 생존율 평가 결과는 Kaplan-Meier curve 및 log-rank test로 분석하였다. 모든 결과는 평균 $\pm$ 평균의 표준오차로 나타내었으며, 결과의 유의성은 one-way analysis of variance로 분석하였다. 그룹 간의 차이는 Bonferronic correction을 통하여 $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성을 검증하였다.

[71]

[72] 실시예 2. CLP 유도 패혈증 모델에서 제니핀 처치에 따른 생존율 변화 확인

[73] 생존율 평가를 위하여, CLP 수술 직후 및 24시간 후 생쥐에게 제니핀 (1, 2.5 및 5 mg/kg) 또는 PBS (용매)를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 제니핀의 용량과 투여 경로는 기존 논문(Kim TH, Yoon SJ, Lee SM. Genipin attenuates sepsis by inhibiting Toll-like receptor signaling. Molecular medicine 2012;18:455-65)을 참조하였다. 생존율은 패혈증 유도 후 7일까지 관찰하였으며, 이 후 3 주 동안 추가적인 사망이 일어나지 않았음을 확인하였다 (군당 10마리).

[74] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, CLP군의 경우, CLP 후 1 일째 50%의 생존율을 보였으며 2 일째부터 7일째까지 20%의 생존율을 유지하였다. 반면, 제니핀을 투여한 군의 경우 CLP군에 비하여 생존율이 증가하였으며, 특히, 제니핀 2.5 mg/kg 용량을 투여한 군의 경우, CLP군에 비하여 생존율이 현저히 생존율을 증가됨을 확인할 수 있었다($p=0.0421$).

[75]

[76] 한편, 상기 생존율 평가 결과를 바탕으로, 이후의 실험에서는 제니핀 2.5 mg/kg 용량으로 실험을 실시하였다. 또한, 실험군은 생쥐를 임의적으로 4 개의 군으로 나누었다 (군당 6~8마리): (a) 용매 투여 sham 군 ('sham'), (b) 2.5 mg/kg 제니핀 투여 sham 군 ('genipin'), (c) 용매 투여 CLP 군 ('CLP') 및 (d) 2.5 mg/kg 제니핀 투여 CLP 군 ('CLP + genipin'). 이때, sham은 대조군으로 패혈증을 유도하지 않은 생쥐이다.

[77]

[78] 실시예 3. 제니핀 처치에 의한 면역활성 증강 효과 확인

[79] 3-1. 제니핀 처치에 따른 비장세포 수 변화 확인

[80] 면역세포의 감소는 면역억제 시에 나타나는 가장 중요한 특징 중 하나이다. 이에, 상기 실시예 2를 통해 분리한 4 개의 군에서 면역세포 수 변화를 측정하였다. 보다 구체적으로, 'CLP' 및 'CLP + genipin'군의 경우에는, 실시예 1-3의 방법에 의한 CLP 수술을 실시한 직후 및 24시간 후 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 한편, 'sham' 및 'genipin'군에도 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 각각 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 패혈증 유도 26 시간 후, 주사기 고무를 이용하여 비장을 균질화 시키고, 세포 파편 등을 제거하기 위해 70- μ m 나일론 mesh strainer를 이용하여 여과하였다. 여과된 세포 중 적혈구는 적혈구 분해 용매 (RBC lysis buffer)로 분해하였으며, 분리된 세포의 수는 hemocytometer를 이용하여 측정하였다.

[81] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 'CLP' 군의 경우, 패혈증 유도 26 시간 후, 총 비장 세포의 수는 sham 군에 비하여 52.6% 감소하였으나, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우, 총 비장 세포의 수 감소가 현저히 개선됨을 확인할 수 있었다(* $p<0.05$ compared to sham group. * $p<0.05$ compared to CLP group). 한편, 제니핀 단독 투여는 총 비장세포의 수에 영향을 미치지 않았다.

[82]

[83] 3-2. 제니핀 처치에 따른 비장 내 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구 수 변화 확인

[84] 'CLP' 및 'CLP + genipin'군의 경우에는, 실시예 1-3의 방법에 의한 CLP 수술을 실시한 직후 및 24시간 후 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 한편, 'sham' 및 'genipin'군에도 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 각각 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 패혈증 유도 26 시간 후, 비장세포를 분리한 뒤, 항-CD4, 항-CD8 및 항-CD3 항체를 부착하여 상기 실시예 1-4의 유세포 분석을 실시하였다. 이때, 결과는 평균 $\pm$ 평균의 표준오차로 나타내었으며 군당 마리수는 6~8 마리이다.

[85] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 'Sham' 군의 경우 비장 내 총 CD3⁺ 세포에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구의 비율은 각각 $10.1 \pm 0.2\%$ 및 $5.4 \pm 0.2\%$ 이었다. 한편, 패혈증 유도 26 시간 후, 'CLP'군의 비장 내 총 CD3⁺ 세포에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구의 비율은 각각 sham군의 28.7% 및 35.2%로 감소하였으나, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우 이러한 감소가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared to sham group. + $p < 0.05$ compared to CLP group.).

[86]

[87] 3-3. 제니핀 처치에 따른 비장 내 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구 세포자멸사 변화 확인

[88] 'CLP' 및 'CLP + genipin'군의 경우에는, 실시예 1-3의 방법에 의한 CLP 수술을 실시한 직후 및 24시간 후 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 한편, 'sham' 및 'genipin'군에도 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 각각 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 패혈증 유도 26 시간 후, 비장세포를 분리한 뒤, 항-CD4, 항-CD8, Annexin V 및 PI 항체를 부착하여 상기 실시예 1-4의 유세포 분석을 실시하였다. 이때, 결과는 평균 $\pm$ 평균의 표준오차로 나타내었으며 군당 마리수는 6~8 마리이다.

[89] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 'sham'군의 경우 비장 내 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구의 세포자멸사 비율은 각각 $5.2 \pm 0.4\%$ 및 $4.8 \pm 0.0\%$ 이었다. 한편, 패혈증 유도 26시간 후, 'CLP'군의 비장 내 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구의 세포자멸사 비율은 각각 sham 군에 비하여 1.8 및 2.2 배 증가하였으나, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin' 군)의 경우 이러한 증가가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다. (** $p < 0.01$ compared to sham group. + $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared to CLP group.).

[90]

[91] 3-4. 제니핀 처치에 따른 비장 내 Bim, Bcl-2, FADD, caspase-3 및 caspase-8 단백질 발현 변화 확인

[92] 'CLP' 및 'CLP + genipin'군의 경우에는, 실시예 1-3의 방법에 의한 CLP 수술을 실시한 직후 및 24시간 후 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 한편, 'sham' 및 'genipin'군에도 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 각각 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 패혈증 유도 26 시간 후, 비장 내 Bim, Bcl-2, FADD(Fas-Associated protein with Death Domain), caspase-3 및 caspase-8의 단백질

발현량을 상기 실시예 1-3의 웨스턴 블롯(Western blot)법으로 측정하였다. 이때, 결과는 평균 $\pm$ 평균의 표준오차로 나타내었으며 군당 마리수는 6~8 마리이다.

[93] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 패혈증 유도 26 시간 후, 'CLP'군의 비장 내 전세포사멸사(pro-apoptotic) 분자인 Bim 및 항세포사멸사(anti-apoptotic) 분자인 Bcl-2 단백질 발현량이 sham 군에 비하여 각각 3.3 및 3.6 배 증가하였다. 그러나 이와는 달리 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우 Bim 단백질 발현량이 현저히 억제되었으며, 증가된 Bcl-2 단백질 발현량은 더욱 증가됨을 확인할 수 있었다.

[94] 또한, 패혈증 유도 26 시간 후, 'CLP'군의 비장 내 FADD, caspase-3 및 caspase-8 단백질 발현량은 sham 군에 비하여 각각 1.8, 2.1 및 4.0 배 증가하였으나, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우 이러한 증가들이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared to sham group. + $p < 0.05$ ++ $p < 0.01$ compared to CLP group.).

[95]

[96] 3-5. 제니핀 처치에 따른 비장 내 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 및 CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ 조절 T 세포 비율 변화 확인

[97] 'CLP' 및 'CLP + genipin'군의 경우에는, 실시예 1-3의 방법에 의한 CLP 수술을 실시한 직후 및 24시간 후 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 한편, 'sham' 및 'genipin'군에도 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 각각 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 패혈증 유도 26 시간 후, 비장세포를 분리한 뒤, 항-CD4, 항-CD25, 항-Foxp3 및 항-CTLA4 항체를 부착하여 상기 실시예 1-4의 유세포 분석을 실시하였다. CD25⁺Foxp3⁺ 및 CD25⁺CTLA4⁺ 림프구의 비율은 전체 CD4⁺ 림프구 수에 대한 비율로 계산하였다. 결과는 평균 $\pm$ 평균의 표준오차로 나타내었으며 군당 마리수는 6~8 마리이다.

[98] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 'Sham' 군의 비장 내 CD4⁺ 림프구에 대한 CD25⁺Foxp3⁺ 림프구의 비율은 $3.6 \pm 0.2\%$ 이었다. 패혈증 유도 26시간 후, 'CLP'군의 비장 내 CD4⁺ 림프구에 대한 CD25⁺Foxp3⁺ 림프구의 비율은 sham 군에 비하여 1.5배 증가하였으나, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우 이러한 증가가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다.

[99] 또한, 'Sham' 군의 비장 내 CD4⁺ 림프구에 대한 CD25⁺CTLA4⁺ 림프구의 비율은 $0.34 \pm 0.04\%$ 이었다. 패혈증 유도 26시간 후, 'CLP'군의 비장 내 CD4⁺ 림프구에 대한 CD25⁺CTLA4⁺ 림프구의 비율은 'sham'군에 비하여 3.6배 증가하였지만, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우 이러한 증가가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(** $p < 0.01$ compared to sham group. + $p < 0.05$ compared to CLP group.).

[100]

[101] 3-6. 제니핀 처치에 따른 비장 내 사이토카인 분비 변화 확인

[102] 'CLP' 및 'CLP + genipin'군의 경우에는, 실시예 1-3의 방법에 의한 CLP 수술을

실시한 직후 및 24시간 후 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 한편, 'sham' 및 'genipin'군에도 PBS (용매) 또는 제니핀 2.5 mg/kg를 각각 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 패혈증 유도 26 시간 후 분리한 비장세포(1×10^6 /mL)를 항-CD3e (5 ug/mL; eBioscience) 및 항-CD28 (3 ug/mL; eBioscience) 항체로 24 시간 자극시켰다. 그리고 나서, 효소면역분석법 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)을 이용하여 비장 세포 배양 배지 내 인터루킨-2(IL-2), 인터페론-감마(IFN- γ), 인터루킨-10(IL-10) 및 인터루킨-4(IL-4) 분비량을 측정하였다. 이때, 결과는 평균 $\pm$ 평균의 표준오차로 나타내었으며 군당 마리수는 6~8 마리이다.

- [103] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 'Sham' 군의 비장세포 IL-2 및 IFN- γ 분비량은 각각 212.5 ± 9.2 및 1876.6 ± 226.2 pg/mL이었다. 패혈증 유도 26 시간 후, 'CLP'군의 비장세포의 IL-2 및 IFN- γ 분비량은 각각의 sham군에 비하여 57% 및 37% 감소하였으나, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우 이러한 감소가 현저히 회복됨을 확인할 수 있었다.
- [104] 또한, 'Sham'군의 경우, 비장세포의 IL-10 및 IL-4 분비량은 각각 71.2 ± 5.6 및 15.8 ± 2.5 pg/mL이었다. 패혈증 유도 26 시간 후, 'CLP'군의 비장세포의 IL-10 및 IL-4 분비량은 sham군에 비해 각각 1.6 및 2.5배 증가하였으나, 제니핀을 투여한 군('CLP + genipin'군)의 경우 이러한 증가가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to sham group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared to CLP group.).

[105]

- [106] 전술한 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.

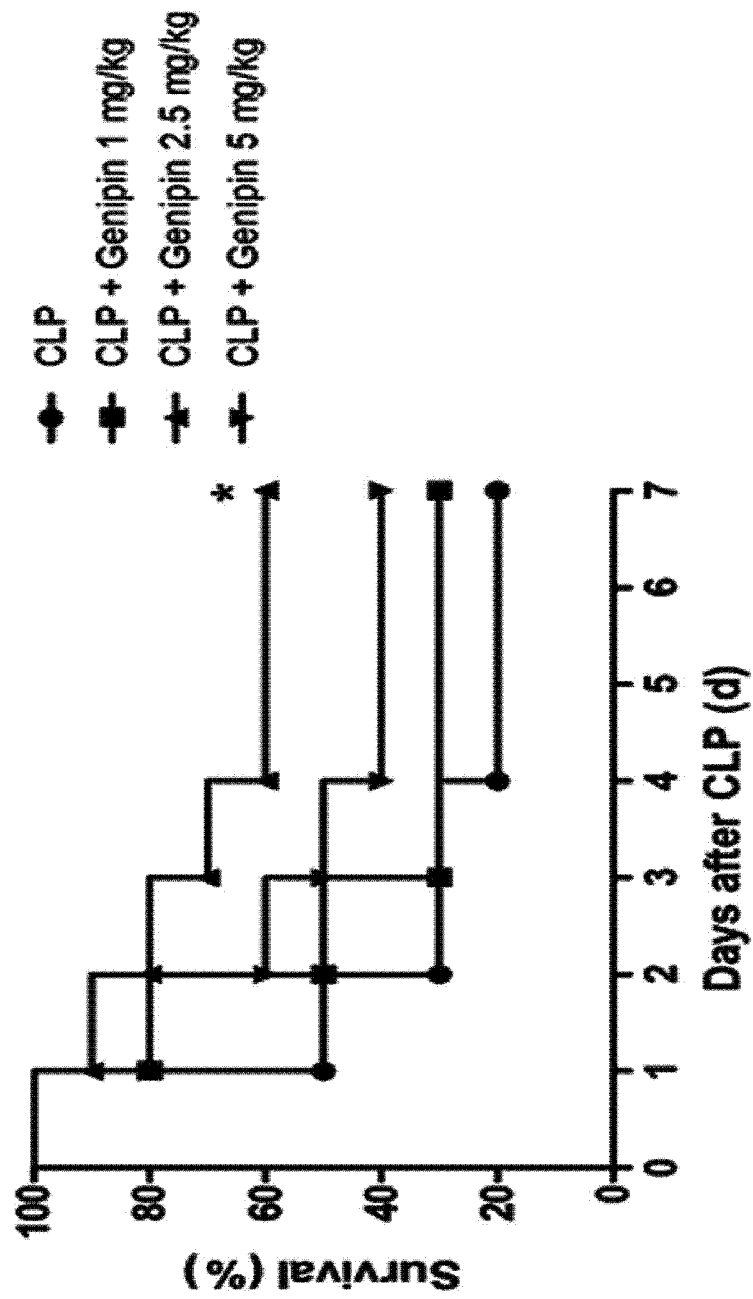
산업상 이용가능성

- [107] 본 발명에 따른 제니핀 또는 이의 유도체는 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포 수를 증가시키고, 조절 T 세포(Treg) 수를 감소시키며 면역이 저하된 상태에서 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키는 등의 효과를 나타내는 특징이 있다. 또한 천연물 소재인바, 화학물질에서 빈번히 나타나는 부작용도 감소시킬 수 있다. 이에, 면역활성을 증강시키는 약학적 조성물 또는 식품 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용될 수 있다.

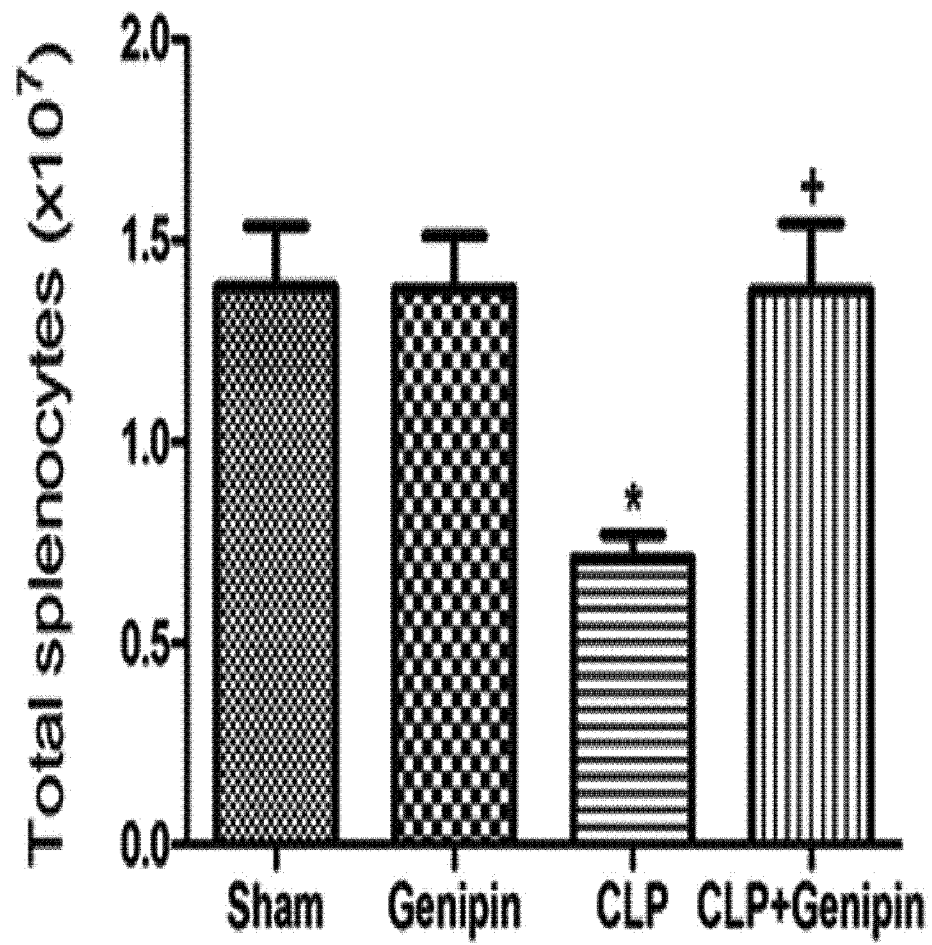
청구범위

- [청구항 1] 제니핀 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 수를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포의 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 Bim, FADD, caspase-3 및 caspase-8 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 Bcl-2 단백질 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 조절 T 세포(Treg) 수를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 IL-2 또는 IFN- γ 생산을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 IL-10 또는 IL-4 생산을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 9] 제니핀 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물.
- [청구항 10] 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역활성 증강방법.
- [청구항 11] 제니핀 또는 이의 유도체를 포함하는 조성물의 면역활성 증강 용도.

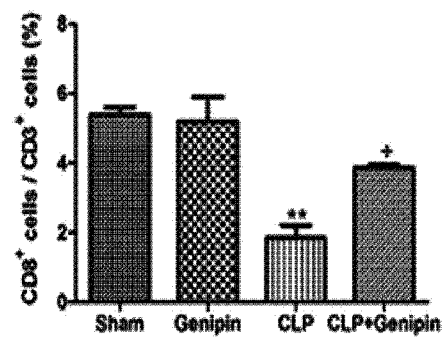
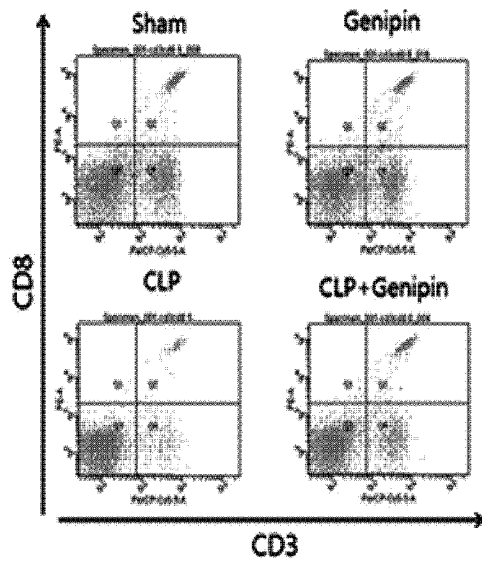
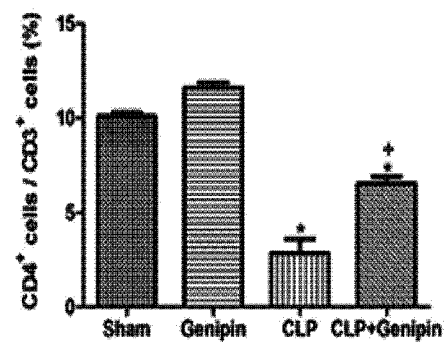
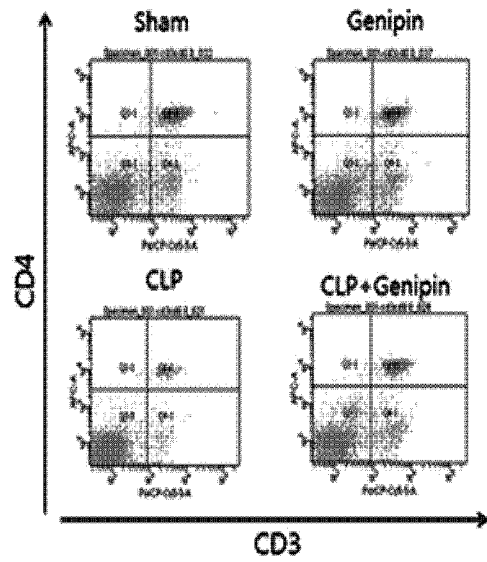
[도1]



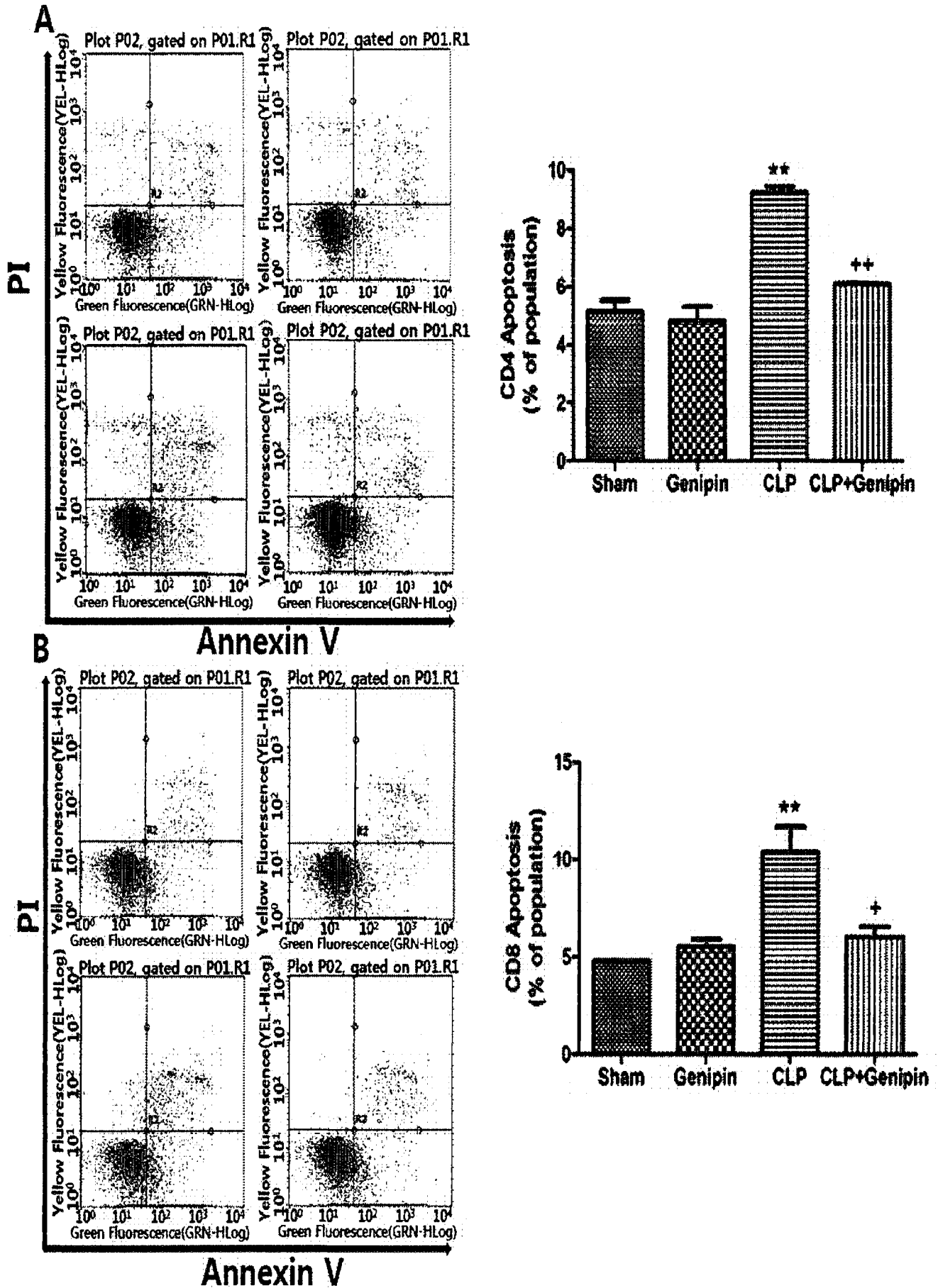
[도2]



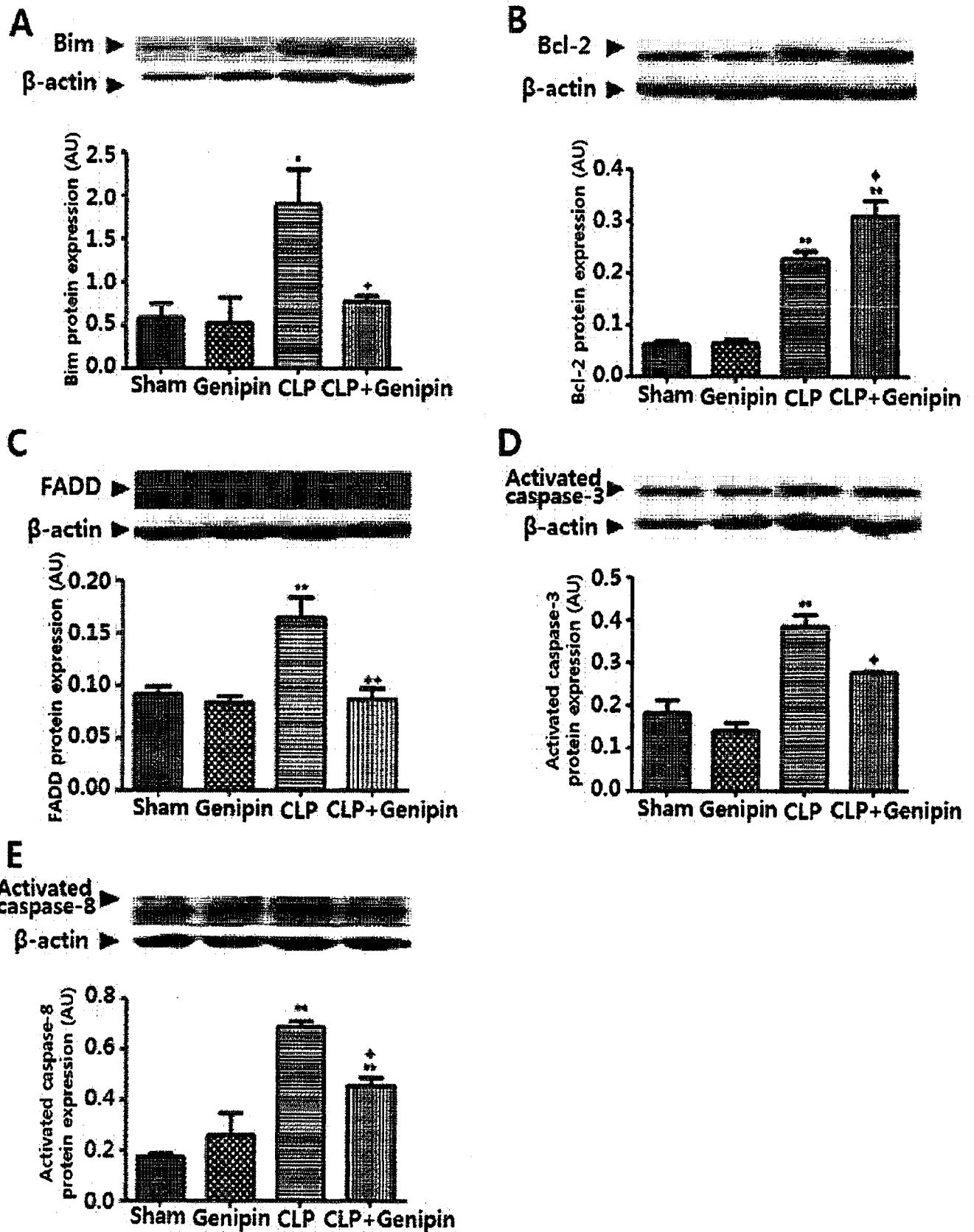
[도3]



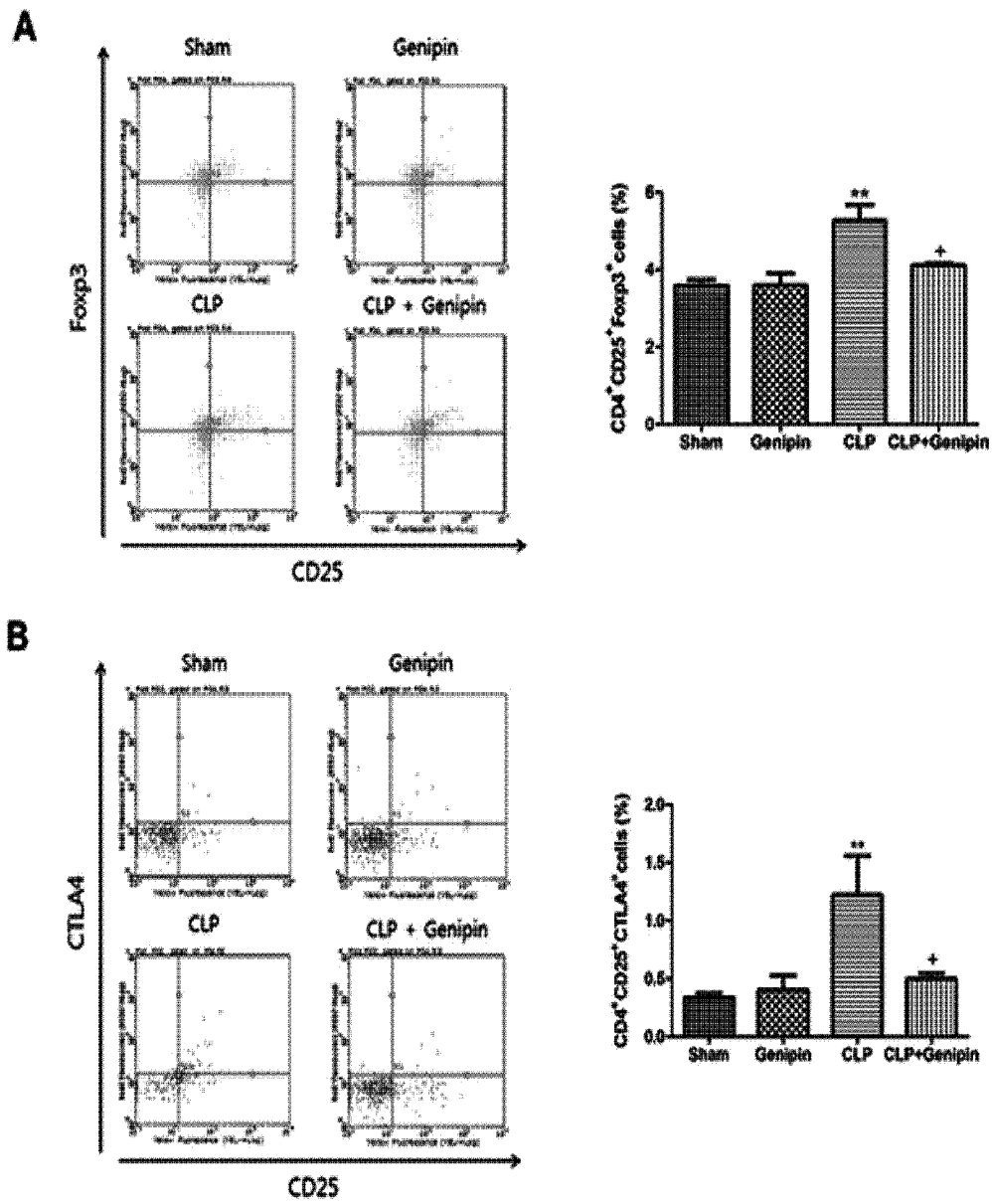
[도 4]



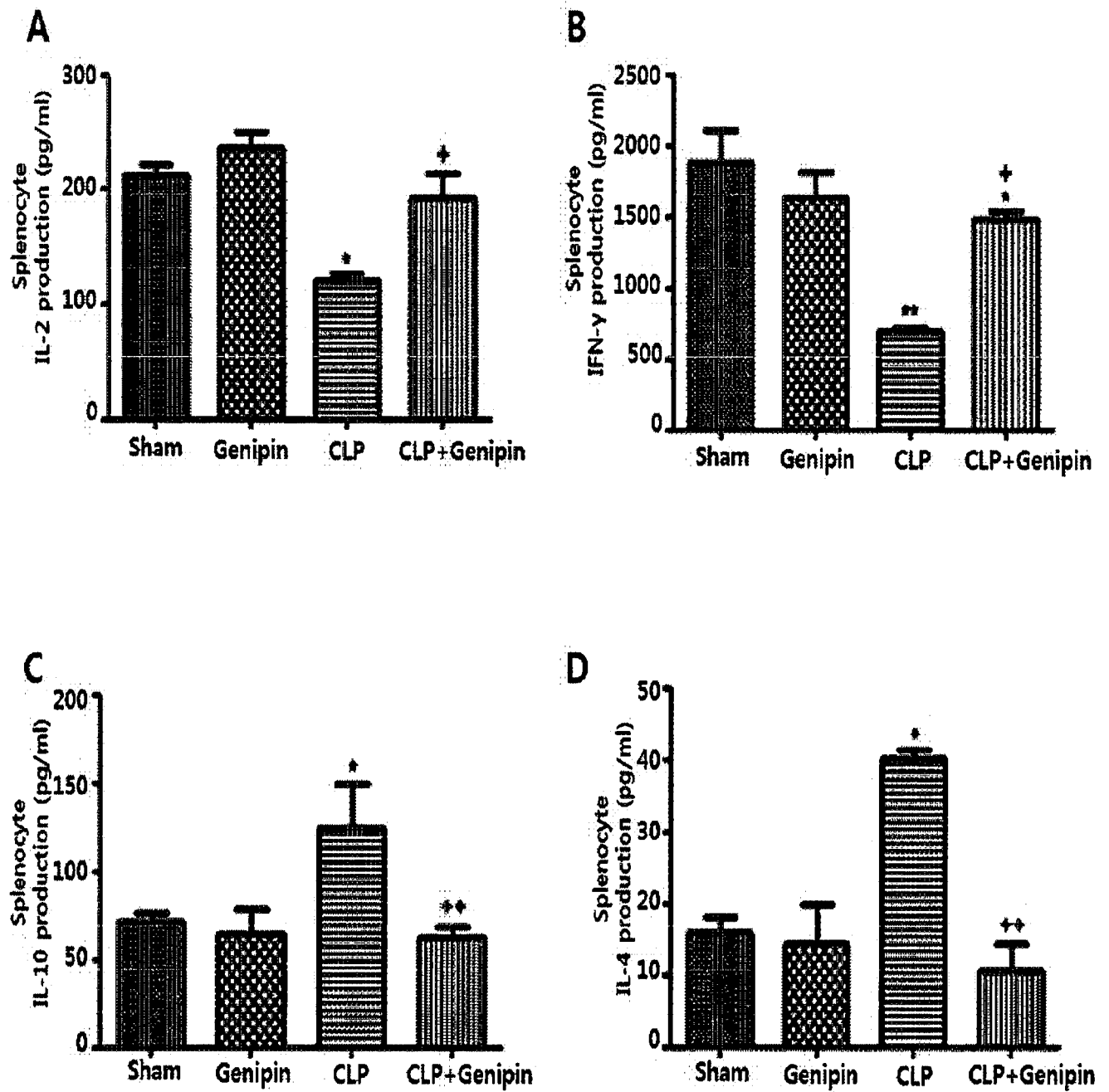
[도 5]



[도6]



[도 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/35(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/20(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 31/35; A23L 1/30; A61K 9/16; A61K 9/20

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: genipin, immunomodulatory activities reinforcing, regulatory T cell, sepsis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAM, K. N. et al., Genipin Inhibits the Inflammatory Response of Rat Brain Microglial Cells, International Immunopharmacology, 2010, vol. 10, pages 493-499 See abstract and pages 493, 496.	1-9,11
A	KIM, T.-H. et al., Genipin Attenuates Sepsis by Inhibiting Toll-like Receptor Signaling, Molecular Medicine, 2012, vol. 18, pages 455-465 See the entire document.	1-9,11
A	KOO, H. -J. et al., Antiinflammatory Effects of Genipin, an Active Principle of Gardenia, European Journal of Pharmacology, 2004, vol. 495, pages 201-208 See the entire document.	1-9,11
A	SHINDO, S. et al., Genipin Inhibits IL-1 β -induced CCL20 and IL-6 Production from Human Periodontal Ligament Cells, Cellular Physiology and Biochemistry, 2014, vol. 33, pages 357-364 See the entire document.	1-9,11
A	ZHANG, C. -Y. et al., Genipin Inhibits UCP2-Mediated Proton Leak and Acutely Reverses Obesity- and High Glucose-Induced β Cell Dysfunction in Isolated Pancreatic Islets, Cell Metabolism, 2006, vol. 3, pages 417-427 See the entire document.	1-9,11



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

21 DECEMBER 2015 (21.12.2015)

Date of mailing of the international search report

22 DECEMBER 2015 (22.12.2015)

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/KR2015/004131

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHOI, H. -S. et al., Genipin Attenuates Immunosuppression through Inhibition of Regulatory T Cell Expansion and Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4 Expression in Late Phase of Sepsis, The Korean Society of Applied Pharmacology, 2014 Proceeding of Autumn Conference, 31 October 2014, Number of Abstract pPBC-52 See the entire document of pPBC-52 ※ The above document is a document declaring non-prejudicial lack of novelty by the applicant.	1-9,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004131

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body, 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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004131

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/35(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/35; A23L 1/30; A61K 9/16; A61K 9/20

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: 제니핀, 면역활성 증강, 조절 T 세포, 패혈증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NAM, K. N. 등, Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells, International Immunopharmacology, 2010년, 10권, 페이지 493-499 초록 및 페이지 493, 496 참조.	1-9, 11
A	KIM, T.-H. 등, Genipin attenuates sepsis by inhibiting toll-like receptor signaling, Molecular Medicine, 2012년, 18권, 페이지 455-465 전체 문헌 참조.	1-9, 11
A	KOO, H.-J. 등, Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia, European Journal of Pharmacology, 2004년, 495권, 페이지 201-208 전체 문헌 참조.	1-9, 11
A	SHINDO, S. 등, Genipin inhibits IL-1 β -induced CCL20 and IL-6 production from human periodontal ligament cells, Cellular Physiology and Biochemistry, 2014년, 33권, 페이지 357-364 전체 문헌 참조.	1-9, 11
A	ZHANG, C.-Y. 등, Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity-and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets, Cell Metabolism, 2006년, 3권, 페이지 417-427 전체 문헌 참조.	1-9, 11

☒ 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

2015년 12월 21일 (21.12.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 12월 22일 (22.12.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

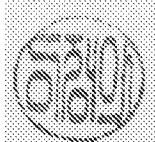
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이정아

전화번호 +82-42-481-8740



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CHOI, H.-S. 등, Genipin attenuates immunosuppression through inhibition of regulatory T cell expansion and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 expression in late phase of sepsis, 한국응용약물학회, 2014 추계학술대회 초록집, 2014년 10월 31일, 초록 번호 pPBC-52 pPBC-52 전체 문헌 참조 ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-9, 11

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제10항은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 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

없음