

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019년 6월 27일 (27.06.2019) WIPO | PCT

WO 2019/124608 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 31/12 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/015373
- (22) 국제출원일: 2017년 12월 22일 (22.12.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 경상대학교병원 (GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 52727 경상남도 진주시 강남로 79 (칠암동), Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 이상일 (LEE, Sang-II); 54824 전라북도 진주시 덕진구 천마산로 100, 110동 403호, Jeollabuk-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

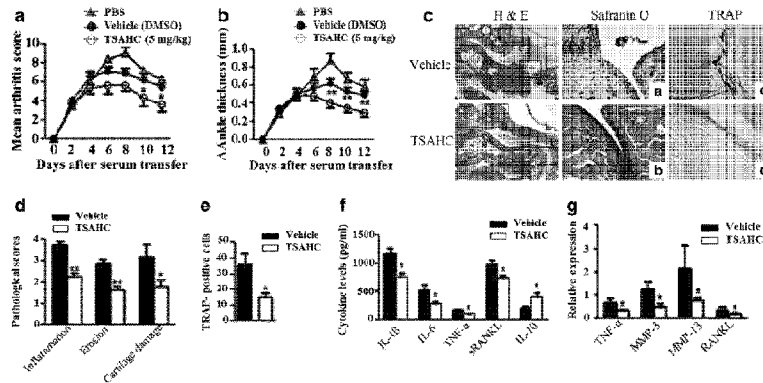
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING RHEUMATOID ARTHRITIS, CONTAINING 4'-(P-TOLUENESULFONYLAMIDO)-4-HYDROXYCHALCONE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 4'-(p-톨루엔설폰닐아미도)-4-하이드록시칼콘을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating rheumatoid arthritis, containing 4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone as an active ingredient. According to the present invention, in a K/BxN serum transfer arthritis model, 4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone (TSAHC) can reduce ankle inflammation, bone erosion, cartilage damage and osteoclast activity and can reduce the expression of inflammatory cytokines, MMPs and RANKL. In addition, TSAHC can inhibit, in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis, TNF- α -induced cell proliferation and can inhibit the translocation and transcriptional activity of NF- κ B. Therefore, the TSAHC of the present invention, having the above effects, can be effectively usable as a pharmaceutical composition for preventing or treating rheumatoid arthritis or a functional food composition for preventing or alleviating rheumatoid arthritis.



WO 2019/124608 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 4'-(p-톨루엔설포닐아미도)-4-하이드록시칼콘을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 4'-(p-톨루엔설포닐아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]은 K/BxN 혈청 전환 관절염 모델에서 발목의 염증, 뼈 침식, 연골 손상 및 파골세포의 활성을 감소시키고, 염증성 사이토카인, MMPs 및 RANKL의 발현을 감소시킬 수 있다. 또한, TSAHC는 류마티스 관절염의 섬유아세포 유사 활막세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 세포 증식을 억제하고, NF- κ B의 전위 및 전사 활성을 억제할 수 있다. 따라서, 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 TSAHC는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 류마티스 관절염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 4'-(p-톨루엔설폰닐아미도)-4-하이드록시칼콘을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 칼콘계 화합물, 더욱 상세하게는 4'-(p-톨루엔설폰닐아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone]을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis; RA)은 활막 과형성, 백혈구 침윤 및 비정상적인 면역 반응을 특징으로 하는 전신 자가면역질환이다. 류마티스 관절염의 대표적인 병리학적 특징은 활막 증식에 의한 침습성 판누스(pannus) 형성으로 발생하는 연골과 뼈의 파괴이다. 염증이 생긴 활막에서 섬유아세포 유사 활막세포(fibroblast-like synoviocytes; FLS)는 염증성 표현형과 비정상적인 증식, 세포사멸에 대한 내성, 이동 및 침습과 같은 종양 유사 특성을 나타낸다. 류마티스 관절염의 FLS의 부분 변형은 기질 금속단백질분해효소(matrix metalloproteinases; MMP)와 IL-6 및 IL-8을 포함하는 여러 사이토카인의 분비에 의해 염증 및 골 침식을 촉진한다.
- [3] TNF- α 는 세포 유형에 따라 세포 생존 및/또는 사멸을 조절하는 매우 광범위한 생물학적 활성을 가지며, 류마티스 관절염에서 염증을 일으키는 주요 사이토카인 중 하나로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면 TNF- α 는 활동성 류마티스 관절염 환자의 활액 및 활막 조직에서 다량으로 존재하는 것으로 보고된 바 있다. 류마티스 관절염 활막에서 TNF- α 의 농도가 높은 경우에는 자가분비(autocrine) 촉진제로서 뿐만 아니라 다양한 염증성 사이토카인(IL-1, IL-6 및 IL-8), MMPs 및 접착 분자의 강력한 촉진제(paracrine) 유도제로서 중요한 역할을 한다. 상기 상태는 백혈구 축적, 파골세포 및 연골세포 활성화, 활막 섬유아세포 활성화와 같은 세포 증식 및 분화 기능에 영향을 미친다. 특히, TNF- α 는 류마티스 관절염의 FLS에서 비정상적인 증식과 사이토카인 분비를 촉진하여 NF- κ B 경로를 매개로 하는 관절 파괴를 촉진시킨다.
- [4] NF- κ B는 염증성 사이토카인, MMPs 및 면역 성장 인자를 코딩하는 다양한 유전자를 발현하는데 핵심적인 역할을 한다. 휴면 세포에서, NF- κ B는 세포질에서 격리되고, I κ B- α 및 I κ B- β 를 포함하는 I κ B 패밀리의 구성원에 의해 억제된다. 일단 활성화되면, NF- κ B는 I κ B 키나아제의 복합체에 의해 인산화되고 유티퀴틴화되며 프로테아좀에 의해 빠르게 분해되어 I κ B 단백질로부터 방출된다. 결과적으로 NF- κ B는 핵으로 전위되어 다양한 특정 유전자 프로모터

요소에 결합하여 전사를 시작하게 된다. NF- κ B 활성화가 류마티스 관절염의 발병 이전에 관여함을 시사하는 많은 문헌들이 존재한다. 예를 들어, NF- κ B 활성화가 골관절염보다 류마티스 관절염 활막에서 유의하게 높고, FLS에서 염증 및 접착 분자, 및 항 세포사멸 인자의 발현을 촉진한다는 것이 증명되었다. 따라서, 이러한 결과는 NF- κ B가 류마티스 관절염에 대한 중요한 치료 표적이 될 수 있음을 시사한다.

- [5] 4'-(p-톨루엔설폰아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]은 화학적으로 변형된 화합물로, 여러 약용식물, 과일, 채소, 향신료, 견과류에서 발견되며, 플라보노이드의 천연 전구체인 천연 칼콘(1,3-디페닐-2-프로펜)으로부터 추출된다. 류마티스 관절염 치료에 있어서 TSAHC의 효과는 현재까지 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 류마티스 관절염의 예방, 개선 또는 치료를 위한 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 4'-(p-톨루엔설폰아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 류마티스 관절염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [8] 본 발명에 따르면, 4'-(p-톨루엔설폰아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]은 K/BxN 혈청 전환 관절염 모델에서 발목의 염증, 뼈 침식, 연골손상 및 파골세포의 활성을 감소시키고, 염증성 사이토카인, MMPs 및 RANKL의 발현을 감소시킬 수 있다. 또한, TSAHC는 류마티스 관절염의 섬유아세포 유사 활막세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 세포 증식을 억제하고, NF- κ B의 전위 및 전사 활성을 억제할 수 있다.
- [9] 따라서, 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 TSAHC는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 류마티스 관절염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 K/BxN 혈청 전환 관절염 모델에서 TSAHC의 예방 효과를 (a) 평균 임상 점수, (b) 발목 두께의 변화, (c) 헤마톡실린 & 에오신, 사프라닌 O 및 TRAP 염색, (d) 반 정량 점수 체계에 따른 활막 염증, 골 침식 및 연골 손상 평가, (e) TRAP 양성 세포의 총 수, (f) 혈청 내 사이토카인 발현 및 (g) 발목 조직에서의 TNF- α ,

MMP-3, MMP-13 및 RANKL 발현으로 확인한 것이다.

- [11] 도 2는 류마티스 관절염 섬유아세포 유사 활막세포(FLS)의 생존율 및 TNF- α 유도 FLS 증식에서 TSAHC의 억제 효과를 (a) 세포 생존율, (b) 세포 사멸 및 (c) 세포 증식 백분율로 확인한 것이다.
- [12] 도 3은 류마티스 관절염 FLS를 이용한 TNF- α 유도 사이토카인 발현에서 TSAHC의 억제 효과를 (a) IL-6, (b) MMP-1, (c) MMP-3 및 (d) MMP-13의 발현으로 확인한 것이다.
- [13] 도 4는 류마티스 관절염 FLS를 이용한 TNF- α 유도 NF- κ B 신호 전달 경로에서 TSAHC의 억제 효과를 (a) I κ B- α 인산화, (b) I κ B- α 분해, (c) NF- κ B(p65)의 전위, (d) NF- κ B 활성화 및 (e) K/BxN 혈청 전환 관절염 모델의 발목 조직에서 NF- κ B(p65) 발현(T, 경골; F, 대퇴골; S, 활막)으로 확인한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [14] 본 발명의 발명자들은 K/BxN 혈청 전환 관절염 모델 또는 류마티스 관절염의 섬유아세포 유사 활막세포에서 TSAHC가 염증 반응, 뼈 침식, 연골 손상 등을 억제하고, NF- κ B 경로를 통해 TNF- α 유도 세포 증식 및 사이토카인 발현을 억제하여 류마티스 관절염에 치료 효과를 나타냄을 확인하며 본 발명을 완성하였다.
- [15]
- [16] 본 발명은 4'-(p-톨루엔설폰닐아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [17] 상기 류마티스 관절염은 K/BxN 혈청으로 유도된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [18] 상기 TSAHC는 관절염의 발생률 및 중증도를 감소시키고, 발목의 염증, 뼈 침식, 연골 손상 또는 파골 세포 활성을 감소시킬 수 있다. 또한, 염증성 사이토카인, MMPs 또는 RANKL의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [19] 상기 TSAHC는 TNF- α 에 의해 유도되는 세포 증식을 감소시키고, 세포 사멸을 유도할 수 있다. 또한, 인산화된 I κ B- α 및 I κ B- α 의 발현을 조절하여 NF- κ B의 전위 및 전사 활성을 억제할 수 있다.

[20]

- [21] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물,

메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

- [22] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [23] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[24]

[25] 또한, 본 발명은

4'-(p-톨루엔설폰닐아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[26]

- [27] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 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 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

- [28] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며,

식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

- [29] 상기 식품첨가물공전에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [30] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [31] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[32]

[33] 실시예 1 : K/BxN 혈청 전환 관절염 모델 및 TSAHC 처리

- [34] KRN TCR-형질전환 마우스는 D. Mathis와 C. Benoit(Harvard Medical School, Boston, MA, USA)로부터 제공 받았다. NOD 마우스는 Jackson Laboratories에서 구입하였다. K/BxN 혈청은 KRN TCR-형질전환 및 NOD 마우스를 교차하여 획득하였다. 0일째와 2일째, 수컷 BALB/c 마우스(6-8 주령)에 K/BxN 혈청(100 μ l)을 복강 내 주사하여 관절염을 유도하였고, PBS, 비히클(DMSO) 또는 TSAHC(이틀에 한 번, 각 군 당 5 mg/kg, n=10)를 12일 동안 복강 내 주사하였다. TSAHC는 DMSO에 용해하여 50 mM 농도로 제조하였고, 이는 실온에서 8주 동안 안정적임을 확인하였다(> 98%). 마우스와 관련된 모든 실험은 경상대학교 동물실험윤리위원회(GNU-121018-M0043)의 승인을 받고 수행하였다.

[35]

[36] 실시예 2 : 관절염 점수 및 발목 두께 분석

- [37] 관절염의 임상적 중증도는 각 발에 0-4의 척도(0=팽창 없음, 1=약간의 팽창 및 홍반, 2=중간 팽창 및 홍반, 3=심한 팽창 및 홍반, 4= 최대 염증 및 관절 경직)를 사용하여 평가하였고, 가능한 총 점수는 16 점이다. 발목의 직경은 가장 넓은 지점의 발목 관절을 가로 지르는 부분을 디지털 마이크로캘리퍼(microcaliper)로 측정하였다. 모든 마우스를 12일째에 희생시키고, 조직학적 분석을 위해 발목을 수거하여 치료 효과를 평가하였다.

[38]

[39] 실시예 3 : 조직 병리학적 및 생화학적 분석

- [40] 마우스 발목 관절 조직은 10% 포르말린으로 밤새 고정시키고, 10% EDTA에서

3주 동안 탈회(decalcification)한 후 탈수시켰다. 그 후, 조직을 파라핀으로 포매하여 파라핀 블록을 제작하고, 마이크로톰을 사용하여 5 μ m 두께로 절단하여 조직 절편을 제작하였다. 발목 관절 조직 절편은 헤마톡실린 & 에오신(H & E) 또는 사프란인 O로 염색하였다. 염색된 발목 관절 부위는 활막 염증, 뼈 침식 및 연골 손상에 따라 반 정량 점수 체계(semi-quantitative scoring system)를 사용하여 평가하였다. 일부 조직 절편은 시판 염색 키트(Sigma-Aldrich, Hempstead, NY USA)를 사용하여 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 활성을 측정하였다. TRAP 양성 세포(≥ 3)는 현미경으로 계수하였다. NF- κ B p65 면역 반응성을 확인하기 위해, 발목 관절 조직 절편을 2% 정상 염소 혈청과 반응시킨 다음 rabbit anti-NF- κ B p65 antibody(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)로 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음 날, 조직 절편을 PBS로 3회 세척한 후, biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 아비딘-비오틴 복합체(ABC; Vector)로 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 PBS로 세척하고, DAB(Sigma)을 처리하였다. 관절염 마우스의 혈청에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , sRANKL 및 IL-10의 발현 수준, 조직에서 TNF- α , MMP-1, MMP-3 및 RANKL의 발현 수준은 ELISA 키트(R & D systems, Minneapolis, MN, USA) 및 PCR로 분석하였다.

[41]

[42] 실시예 4 : 활막 섬유아세포의 분리 및 배양

[43] 인공 슬관절 전 치환술을 받은 10명의 류마티스 관절염 환자에서 얻은 1차 활막 조직으로부터 FLS를 분리하였다. 조직을 다진 후, 2.5 mg/mL I형 콜라게나제(Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)가 포함된 DMEM 배지(Gibco, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후 해리된 세포를 1000xg에서 원심분리하고, 10% 우태아혈청(FBS) 및 2.5 μ g/ml 암포테리신 B(Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지에 재현탁한 후, 75 cm² 플라스크(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 하룻밤 배양하였다. 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착 세포를 10% FCS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하고, 3일 마다 배지를 교체하였다. 세포의 순도는 phycoerythrin-conjugated anti-CD14(PharMingen, San Diego, CA, USA), fluorescein isothiocyanate phycoerythrin-conjugated anti-CD3, anti-CD19, anti-CD14 또는 anti-Thy-1(CD90) monoclonal antibody(R&D Systems)를 사용하여 유세포 분석으로 확인하였다. 분석을 위해, FACS Calibur flow cytometer(488Ex / 620Em) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였다. 세포는 형태학적으로 균일하고 역 현미경 하에서 전형적인 양극(bipolar) 형태를 가지는 FLS의 외형을 나타내었다. 대부분의 세포(> 98%)는 섬유아세포(Thy-1)의 표면 마커를 발현하였으며, CD3, CD19 및 CD14의 발현에는 음성을 나타내었다. FLS는 3 ~ 8 세대 후 각 실험에 사용하였고, 모든 처리는 무혈청 배지에서 수행하였다. 모든 환자의 정보는 환자의 동의를 얻은 후 사용하였고, 연구 프로토콜은 경상대학교

병원 기관생명윤리위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받은 후 수행하였다.

[44]

[45] 실시예 5 : 세포 증식 및 세포 사멸 분석

[46] FLS는 24-웰 플레이트에 2×10^4 세포/웰 농도로 접종하였다. 다음날, 세포에 다양한 농도의 TSAHC(1, 10, 20 및 $50 \mu\text{M}$)를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 CCK-8 키트를 이용하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다. 또한, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 유세포 분석으로 세포 사멸을 분석하였다. 간략하게, 세포를 6-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰 농도로 접종하고, 24시간 배양한 후, 세포에 $50 \mu\text{M}$ 의 TSAHC를 처리하고 24시간 동안 배양한 다음 세포를 수집하고, FITC Annexin V 및 PI(propidium iodide)로 염색하였다. 세포 사멸을 분석하기 위해, 세포 용해물은 rabbit anti-caspase 3 및 anti-PARP antibody(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[47]

[48] 실시예 6 : TNF- α 유도 세포 증식 분석

[49] FLS는 96-웰 플레이트에 5×10^3 세포/웰 농도로 접종하였다. 다음날, 배지는 TSAHC(1, 10 및 $20 \mu\text{M}$) 및 TNF- α (50 ng/ml)가 포함된 0.1% FBS 함유 DMEM 배지로 교체하고 120시간 동안 배양하였다. 세포 증식은 CCK-8으로 측정하였고, 세포 증식 억제는 백분율로 계산하였다.

[50]

[51] 실시예 7 : 사이토카인 mRNA 발현 분석

[52] FLS는 6-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰 농도로 접종하였다. 다음날, 배지는 TSAHC($20 \mu\text{M}$) 및 TNF- α (50 ng/ml)를 포함하거나 포함하지 않는 1% FBS 함유 DMEM 배지로 교체하였다. QIAzol(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 총 RNA를 추출한 다음 $2 \mu\text{g}$ 의 RNA를 사용하여 iScript cDNA 합성 키트(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 cDNA를 합성하였다. IL-6, MMP-1, MMP-3 및 MMP13의 cDNA를 증폭하기 위해, TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), IL-6(FAM/MBG probe Hs00985639 m1) 및, MMP-1(FAM/MBG probe Hs00899658 m1), MMP-3(FAM/MBG probe Hs00968305 m1), MMP-13(FAM/MBG probe Hs00233992 m1) 및 GAPDH 내인성 대조군(FAM/MBG probe Hs0275899 m1) TaqMan assays를 사용하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다. 반응은 96-웰 플레이트를 이용하여 ViiA 7 Real-time PCR System ABI(Applied Biosystems)로 수행하였다. 증폭 조건은 50°C 에서 2분 및 95°C 에서 10분의 유지 단계에 이어서 95°C 에서 15초 및 55°C 에서 1분의 PCR 단계로 40사이클을 수행하였다. 데이터는 델타 델타 Ct 법을 사용하여 분석하였다.

[53]

[54] 실시예 8 : 웨스턴 블랏 분석

[55] FLS를 6-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰 농도로 접종하였다. 다음날, 세포에 TSAHC($20 \mu\text{M}$)를 24시간 동안 전처리한 다음 TNF- α (50 ng/ml)로 30분 동안 자극하였다. 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 5% BSA를 포함하는 TBST 완충액으로 블로킹한 후, rabbit anti-NF- κB p65 antibody(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), rabbit anti-I $\kappa\text{B}\alpha$ antibody(Cell Signaling Technology), rabbit anti-phospho-I $\kappa\text{B}\alpha$ antibody(Cell Signaling Technology), 및 mouse anti- β -actin antibody(Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany)와 반응시켰다. NF- κB 전위 분석을 위해, 핵 및 세포질 단백질은 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 분리하였다. 신호는 HRP가 접목된 2차 항체 및 SuperSignal West Pico Trial Kit(Thermo Scientific)를 사용하여 시각화 하였다. 밴드는 β -actin으로 정규화 하고, Image J 1.48 소프트웨어를 사용하여 정량하였다.

[56]

[57] 실시예 9 : 루시퍼라제 분석

[58] FLS는 24-웰 플레이트에 2×10^4 세포/웰 농도로 접종하였다. 다음날, 세포는 lipofectamine 3000 Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 분비형 루시퍼라제 분석(Clontech, Palo Alto, USA)을 사용하여 pNF- κB -MetLuc2 리포터 플라스미드로 형질 감염시켰다. 배지는 형질 감염 24시간 후 교체하였다. 그 다음, 세포에 TSAHC($20 \mu\text{M}$)를 24시간 동안 처리하고, TNF- α (50 ng/ml)로 30분 동안 자극하였다. 배지에서 분비된 루시퍼라제는 제조사에서 제공한 프로토콜을 따라 Ready-to-Glow Secreted Reporter System(Clontech)으로 분석하였다.

[59]

[60] 실험예 1 : K/BxN 혈청 전환 관절염 모델에서 TSAHC의 예방 효과

[61] TSAHC가 관절염 진행에 미치는 영향을 분석하기 위해 K/BxN 혈청 전환 관절염을 유도하고, 마우스에 TSAHC(5 mg/kg)를 이틀에 한 번 12일 동안 복강 내 투여하였다. 그 결과, 도 1a 및 도 1b를 참조하여 보면, 12일째에 비히클 처리군과 비교하였을 때, TSAHC 처리군에서 임상 점수(5.4 ± 0.39 대 3.9 ± 0.79), 발목 두께(0.49 ± 0.04 대 $0.29 \pm 0.04 \text{ mm}$)가 감소되어 관절염을 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 도 1c 및 도 1d를 참조하여 보면, 조직학적 분석 결과에서 TSAHC 처리군은 발 염증, 뼈 침식 및 연골 손상을 감소시켰고, 도 1c 및 도 1e를 참조하여 보면, 비히클 처리군에 비해 TSAHC 처리군에서 TRAP 양성 세포가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 1f를 참조하여 보면, 혈청 내의 다양한 사이토카인을 분석한 결과, TSAHC 처리군에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 sRANKL의 발현이 감소하고, 항 염증성 사이토카인인 IL-10이 증가하는 것을

확인하였다. 또한, 도 1g를 참조하여 보면, TSAHC 처리군은 TNF- α , MMP-1, MMP-3, RANKL의 mRNA 발현을 억제하였다.

[62]

[63] **실험예 2 : 세포 증식 및 TNF- α 유도 세포 증식에서 TSAHC의 억제 효과**

[64] 세포 생존율에 있어서 TSAHC의 효과를 분석하기 위해, FLS에 TSAHC를 다양한 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 결과, 도 2a를 참조하여 보면, 1 ~ 20 μ M 농도의 TSAHC는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았지만, 50 μ M 농도의 TSAHC에서는 비히클 처리군에 비하여 세포 사멸을 약 35% 촉진시켰다. 또한, 도 2b를 참조하여 보면, 유세포 분석 및 웨스턴 블랏 결과에서, 50 μ M 농도의 TSAHC는 카스파제-3 활성화를 통해 절단된 PARP에 의해 유도되는 세포 사멸을 증가시켰다.

[65] 반면, 무독성 농도(1 ~ 20 μ M의 TSAHC)에서 TNF- α 에 의해 유도되는 세포 증식에 TSAHC가 영향을 미치는지 여부를 분석하였다. 1 ~ 50 μ M 농도의 TSAHC를 TNF- α 자극 FLS에 5일 동안 첨가한 결과, 도 2c를 참조하여 보면, 10 및 20 μ M 농도의 TSAHC는 TNF- α 에 의해 유도되는 세포 증식을 유의하게 억제하였다. 따라서, TSAHC가 세포 사멸을 유도하고, TSAHC 농도 의존적으로 TNF- α 에 의해 유도되는 세포 증식을 억제하는 것을 확인하였다.

[66]

[67] **실험예 3 : TNF- α 유도 사이토카인 발현에서 TSAHC의 억제 효과**

[68] 도 2에 나타낸 바와 같이, 20 μ M 농도의 TSAHC는 FLS 세포 생존율에 유의한 억제 효과를 나타내지 않았다. 따라서, 무독성 농도에서 TSAHC(20 μ M)가 TNF- α 에 의해 유도되는 사이토카인의 발현을 조절하는지 여부를 분석하였다. 그 결과, 도 3을 참조하여 보면, 실시간 PCR 분석 결과, TSAHC는 FLS에서 TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13의 mRNA 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

[69]

[70] **실험예 4 : TNF- α 유도 NF- κ B 신호 전달 경로 및 K/BxN 혈청 전환 유도 NF- κ B 발현에서 TSAHC의 억제 효과**

[71] TNF- α 유도 세포 증식 및 사이토카인 발현의 메커니즘을 규명하기 위해, TSAHC(20 μ M)가 TNF- α 자극 하에서 I κ B- α 및 NF- κ B에 영향을 미치는지 여부를 분석하였다. 그 결과, 도 4a 및 도 4b를 참조하여 보면, TSAHC는 TNF- α 유도 FLS에서 TNF- α 단독 처리군에 비하여 인산화된 I κ B- α 발현 및 I κ B- α 분해를 억제하였다.

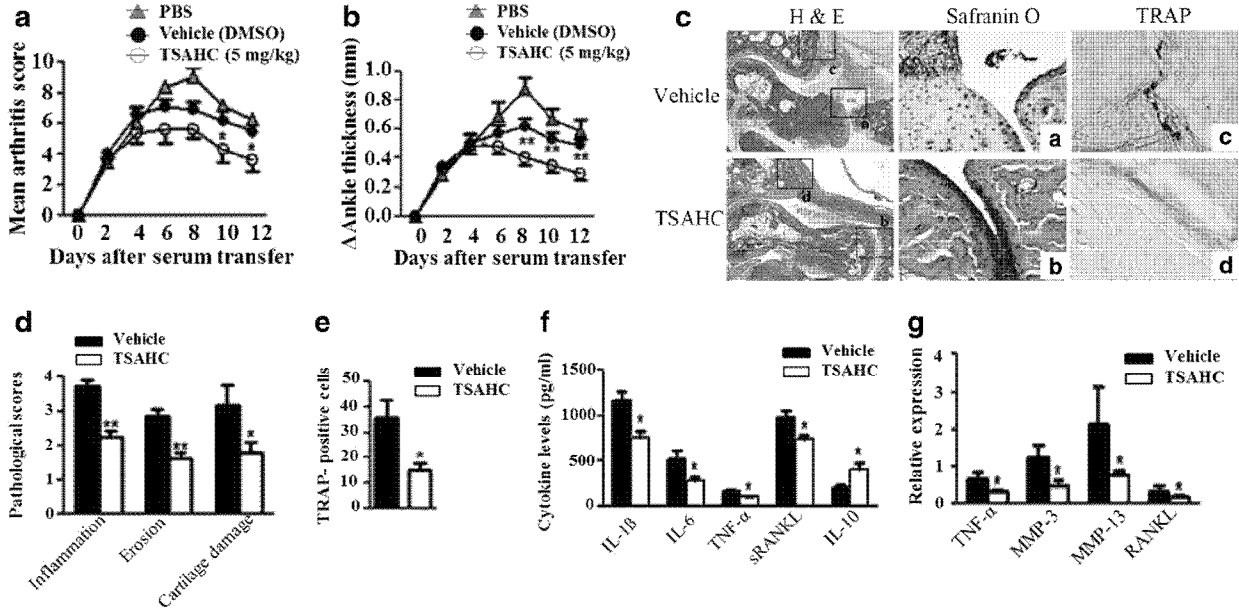
[72] TSAHC가 TNF- α 유도 FLS에서 p65의 전위 및 전사 활성을 조절하는지 여부를 분석한 결과, 도 4c 및 도 4d를 참조하여 보면, TSAHC가 p65의 전위 및 전사 활성을 유의하게 억제하고 NF- κ B 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 상기 결과는 TSAHC가 NF- κ B 경로를 통해 TNF- α 유도 세포 증식 및 사이토카인 발현을 억제할 수 있음을 시사한다.

- [73] 동물 모델의 발목 관절 활막에서 K/BxN 혈청 전환에 의해 유도되는 NF- κ B 발현에 대한 TSAHC의 효과를 추가로 분석하기 위해, p65에 대한 특이 항체를 가지는 발목 조직에서 면역 염색을 수행하였다. 그 결과, 도 4e를 참조하여 보면, 비히클 처리군에 비해 TSAHC(5 mg/kg) 처리군에서 FLS 핵에서의 p65 면역 반응성이 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과는 *in vitro* FLS에서 TNF- α 에 의해 유도된 p65 전사 활성화에 대한 TSAHC의 억제 효과와 일치하였다.
- [74]
- [75] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [76] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [77]

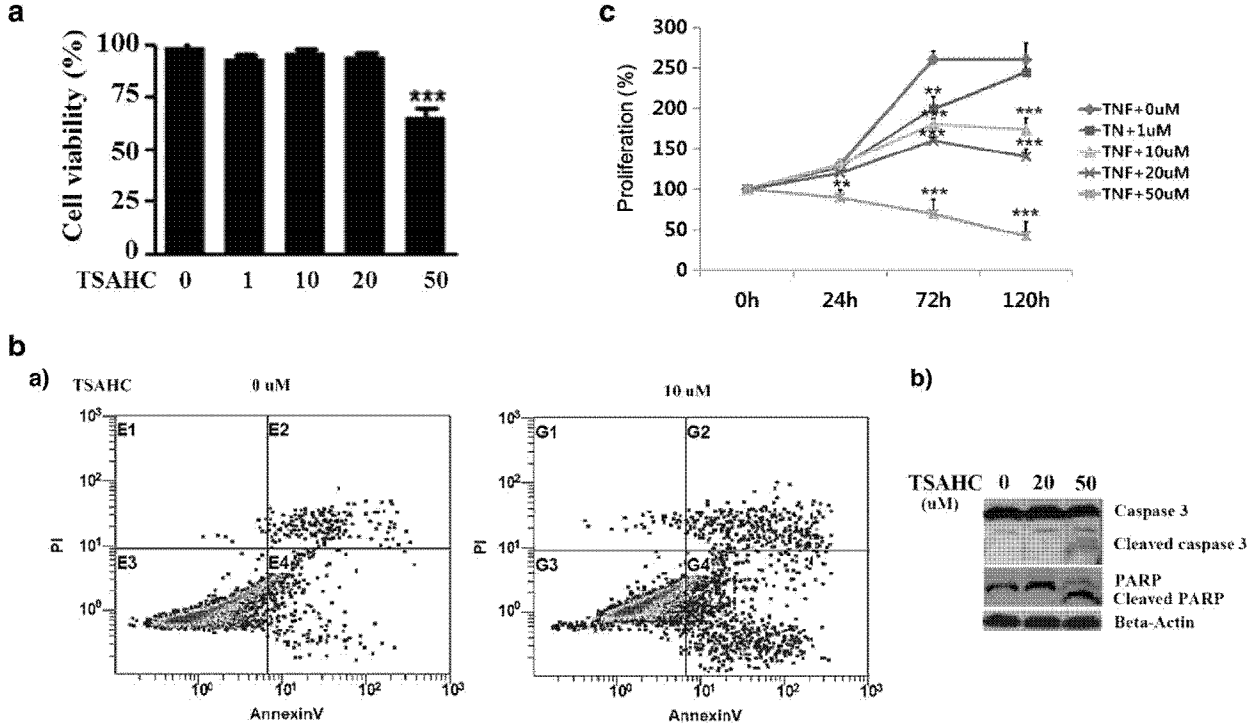
청구범위

- [청구항 1] 4'-(p-톨루엔설폰닐아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 류마티스 관절염은 K/BxN 혈청으로 유도된 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 TSAHC는 관절염의 발생률 및 중증도를 감소시키고, 발목의 염증, 뼈 침식, 연골손상 또는 파골세포 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 TSAHC는 염증성 사이토카인, MMPs 또는 RANKL의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 TSAHC는 TNF- α 에 의해 유도되는 세포 증식을 감소시키고, 세포 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 TSAHC는 인산화된 I κ B- α 및 I κ B- α 의 발현을 조절하여 NF- κ B의 전위 및 전사 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 4'-(p-톨루엔설폰닐아미도)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone; TSAHC]을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

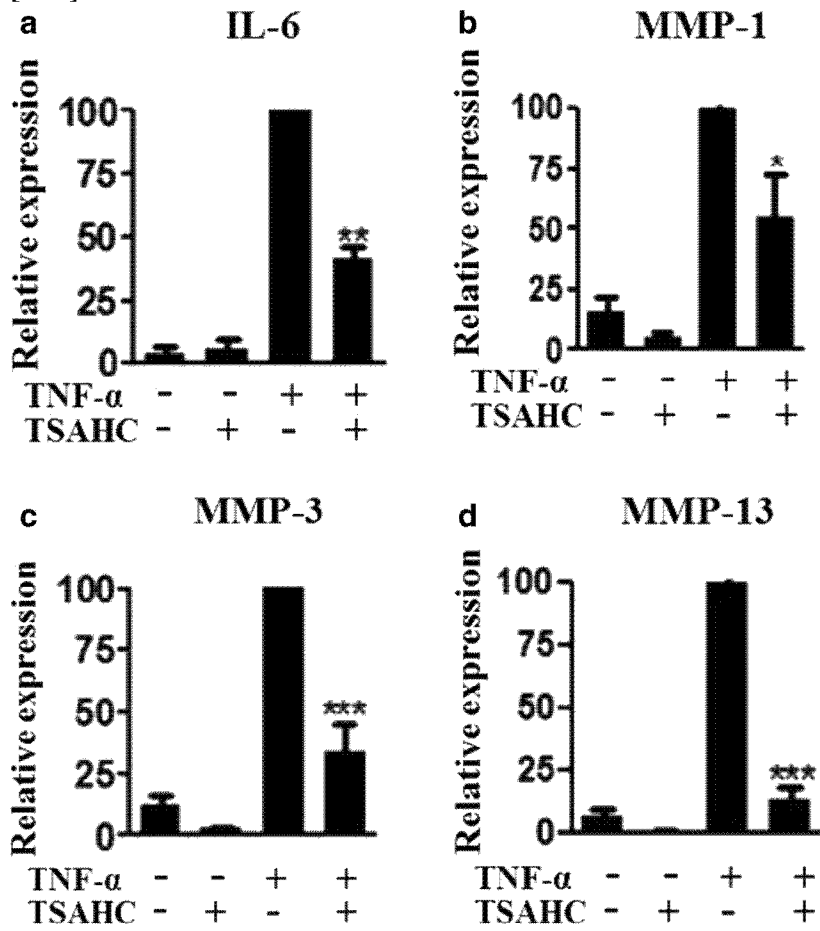
[도 1]



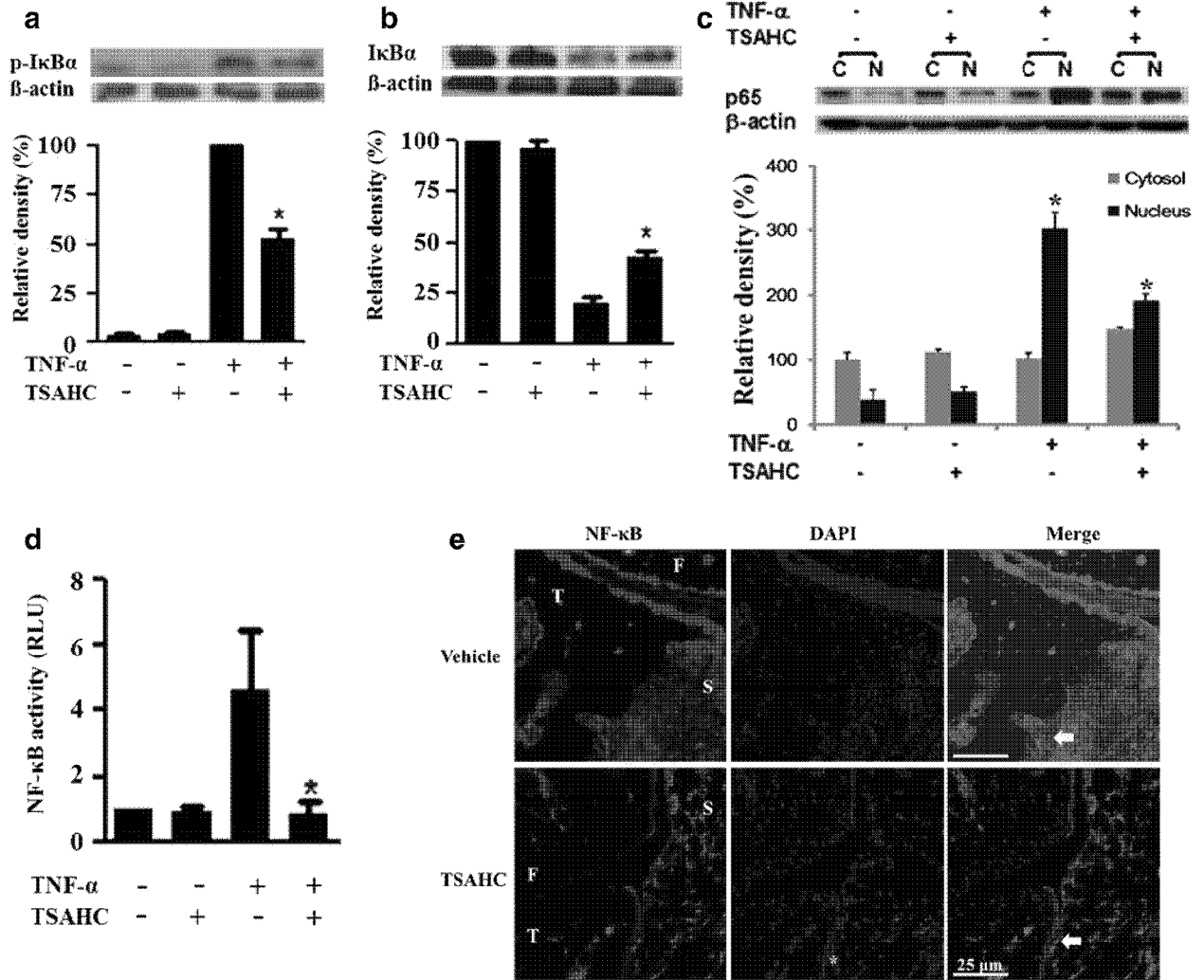
[도 2]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/015373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/12(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)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 31/12; C07C 225/16; A61K 31/122; A61K 31/4184; A61K 31/454; A61P 17/00; G01N 33/53; G01N 33/68; C07C 225/18; A23L 33/10

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: 4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone, rheumatoid arthritis, prevention/treatment/improvement, pharmaceutical composition, health food composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEON, Yun-Hong et al., "Toluenesulfonylamido-chalcone, 4-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone (TSAHC) Suppresses Inflammatory Response and Joint Destruction in an Experimental Arthritic Mice and Fibroblast-like Synoviocytes", 2014 ACR/ARHP Annual Meeting, abstract No. 2356, pages 1-2 See "Background/Objective" section; "Results" section; and "Conclusion" section.	1-7
A	KR 10-0751899 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 23 August 2007 See abstract; claim 4; and experimental example 3.	1-7
A	WO 2012-015200 A2 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 02 February 2012 See the entire document.	1-7
A	KR 10-2007-0099189 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 09 October 2007 See the entire document.	1-7
A	US 2011-0263566 A1 (MATSUO, Yo et al.) 27 October 2011 See the entire document.	1-7



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

20 SEPTEMBER 2018 (20.09.2018)

Date of mailing of the international search report

20 SEPTEMBER 2018 (20.09.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/015373

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>JEON, Min-Gyu et al., "Suppressive Effects of TSAHC in an Experimental Mouse Model and Fibroblast-like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis", <i>Inflammation</i>, 17 August 2017 (online), vol. 40, no. 6, pages 1825-1835 See abstract, and "Materials and Methods" section.</p> <p>※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/015373

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0751899 B1	23/08/2007	NONE	
WO 2012-015200 A2	02/02/2012	KR 10-1368871 B1 KR 10-2012-0022504 A US 2013-0178533 A1 US 9057725 B2 WO 2012-015200 A3	28/02/2014 12/03/2012 11/07/2013 16/06/2015 27/09/2012
KR 10-2007-0099189 A	09/10/2007	KR 10-0843688 B1	04/07/2008
US 2011-0263566 A1	27/10/2011	CA 2741988 A1 CN 102271514 A EP 2364087 A1 EP 2364087 A4 JP 2012-507525 A KR 10-2011-0079847 A MX 2011004414 A RU 2011-121665 A WO 2010-051085 A1	06/05/2010 07/12/2011 14/09/2011 30/05/2012 29/03/2012 08/07/2011 21/06/2011 10/12/2012 06/05/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 31/12(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 31/12; C07C 225/16; A61K 31/122; A61K 31/4184; A61K 31/454; A61P 17/00; G01N 33/53; G01N 33/68; C07C 225/18; A23L 33/10

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: 4'-(p-톨루엔설포닐아미도)-4-하이드록시칼콘, 류마티스 관절염, 예방/치료/개선, 약학 조성물, 건강식품 조성물

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CHEON, YUN-HONG 등, "Toluenesulfonylamido-chalcone, 4-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone (TSAHC) suppresses inflammatory response and joint destruction in an experimental arthritic mice and fibroblast-like synoviocytes", 2014 ACR/ARHP Annual Meeting, 초록 No. 2356, 페이지 1-2 "배경/목적" 섹션; "결과" 섹션; 및 "결론" 섹션 참조.	1-7
A	KR 10-0751899 B1 (경상대학교산학협력단) 2007.08.23 요약; 청구항 4; 및 실험예 3 참조.	1-7
A	WO 2012-015200 A2 (서울대학교 산학협력단) 2012.02.02 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-2007-0099189 A (경상대학교산학협력단) 2007.10.09 전체 문헌 참조.	1-7
A	US 2011-0263566 A1 (MATSUO, YO 등) 2011.10.27 전체 문헌 참조.	1-7

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 "O" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2018년 09월 20일 (20.09.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 09월 20일 (20.09.2018)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이기철 전화번호 +82-42-481-3353
---	------------------------------------



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	<p>JEON, MIN-GYU 등, “Suppressive effects of TSAHC in an experimental mouse model and fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis”, <i>Inflammation</i>, 2017.08.17(online), 40권, 6호, 페이지 1825-1835 요약; 및 “재료 및 방법” 섹션 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.</p>	1-7

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0751899 B1	2007/08/23	없음	
WO 2012-015200 A2	2012/02/02	KR 10-1368871 B1 KR 10-2012-0022504 A US 2013-0178533 A1 US 9057725 B2 WO 2012-015200 A3	2014/02/28 2012/03/12 2013/07/11 2015/06/16 2012/09/27
KR 10-2007-0099189 A	2007/10/09	KR 10-0843688 B1	2008/07/04
US 2011-0263566 A1	2011/10/27	CA 2741988 A1 CN 102271514 A EP 2364087 A1 EP 2364087 A4 JP 2012-507525 A KR 10-2011-0079847 A MX 2011004414 A RU 2011-121665 A WO 2010-051085 A1	2010/05/06 2011/12/07 2011/09/14 2012/05/30 2012/03/29 2011/07/08 2011/06/21 2012/12/10 2010/05/06