

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 12월 20일 (20.12.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/173392 A9

(51) 국제특허분류:

A61K 31/19 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004672

(22) 국제출원일: 2012년 6월 13일 (13.06.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0057139 2011년 6월 13일 (13.06.2011) KR

(71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국
생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE
OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)
[KR/KR]; 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Dae-
jeon (KR).

(72) 발명자: 곽

(75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 이우송 (LEE, Woo-
Song) [KR/KR]; 305-806 대전광역시 유성구 과학로
125, Daejeon (KR). 류영배 (RYU, Young-Bae) [KR/KR];
305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
김영민 (KIM, Young-Min) [KR/KR]; 305-806 대전광역시
유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박수진 (PARK,
Su-Jin) [KR/KR]; 305-806 대전광역시 유성구 과학로
125, Daejeon (KR). 노문철 (RHO, Mun-Chual)
[KR/KR]; 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Dae-
jeon (KR). 정형재 (JEONG, Hyung-Jae) [KR/KR]; 305-
806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권
형준 (KWON, Hyung-Jun) [KR/KR]; 305-806 대전광역시
유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 필엔온지 (PHIL & ONZI INT'L
PATENT & LAW FIRM); 137-872 서울시 서초구 반포
대로 63, 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, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, 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, 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, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에
관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일: 2013년 3월 14일

(48) 본 정정판 공개일: 2013년 5월 2일

(15) 정정사항에 관한 정보:
2013년 5월 2일 자 공지 참조

(54) Title: CURCUMINOID-BASED COMPOUND/STEVIOSIDE-CONTAINING COMPLEX FOR THE PREVENTION AND
TREATMENT OF AN INFLUENZA VIRUS INFECTION

(54) 발명의 명칭: 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 커큐미노이드계 화합물/스테비오사이드 함유 복합체

(57) Abstract: The present invention relates to a compound expressed by formula 1, to a plant extract comprising same, or to frac-
tions of the extract; and to a stevioside, to a plant extract comprising the stevioside, or to a complex comprising fractions of the plant
extract comprising the stevioside, to a pharmaceutical composition comprising the complex as an active ingredient for the prevention
or treatment of an influenza virus infection, to a food composition for the prevention or amelioration of an influenza virus infection,
to a virucidal quasi-drug composition, to a virucidal animal feed additive, and to an animal feed. According to the present invention,
since the compound expressed by formula 1, the plant extract comprising same, or the fractions of the plant extract; and the stevios-
ide, the plant extract comprising same, or a mixture of fractions of the plant extract, exhibit virucidal effects and cytopathic effect-in-
hibition effects as well as anti-viral efficacy using a specific pathogen-free (SPF) chicken, all may usefully be used for the prevention
and treatment of an influenza virus infection.

(57) 요약서: 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비
오사이드(stevioside), 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 포함하
는 복합체, 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 인플
루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 살바이러스용 의약품 조성물, 살바이러스용 사료첨가제, 및 사
료에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획
물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물의 혼합물은 인플루엔자 바이러스에 대해
살바이러스 및 세포면역억제효과 및 SPF 닭을 이용한 항바이러스 효능을 동시에 나타내므로 인플루엔자 바이러스 감염
의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2012/173392 A9

명세서

발명의 명칭: 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 커큐미노이드계 화합물/스테비오사이드 함유 복합체

기술분야

- [1] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드(stevioside), 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 포함하는 복합체, 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 살바이러스용 의약품 조성물, 살바이러스용 사료첨가제, 및 사료에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인플루엔자 바이러스는 급성 호흡기 질환을 일으키는 전염성이 매우 강한 바이러스로 온 세계에 집단감염이나 대유행을 야기하여 소아, 고령자, 심폐질환 환자에게 심각한 호흡기 증상을 유발하는 바이러스중 하나이다(Hien, T. T. et al. *N. Eng. J. Med.*, 350, 1179, 2004). 인플루엔자 바이러스는 분류학적으로 오르토믹소바이러스(*Orthomyxovirus*)에 속하며 A, B, C의 3가지 형이 있으며 특히 유행적으로 확산되는 형은 A, B형이다.
- [3] 바이러스의 표면항원들은 동일한 아형에서 변이를 일으키고, 매년 새로운 항원 변이주가 출현한다. 특히 인플루엔자 바이러스 중 최근까지 문제가 되고 있는 조류 인플루엔자 바이러스는 대변이가 일어나 닭, 칠면조, 오리 및 야생조류 등 여러 종류의 조류를 감염시키며 빠른 전파로 인해 닭이 감염되면 80% 이상이 폐사함으로 전 세계적으로 양계산업에 가장 큰 피해와 위협을 주는 바이러스 질환이며, 그 파급효과는 양계산업에만 한정되어 있지 않고 인체에 대한 감염으로 인하여 사람에게 질병을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Gubareva, L. V. et al. *Lancet.* 355, 2000).
- [4] 이러한 바이러스의 감염을 예방하고 치료하기 위한 방법으로 상피세포로의 흡착 저해, 세포로의 침입 저해, 유전자의 전사 및 복제의 저해, 단백질 합성의 저해, 세포로부터 방출의 억제 등을 생각할 수 있으며, 이들 각각은 항 바이러스의 표적이 되고 있다.
- [5] 종래부터 인플루엔자 바이러스에 의해 야기되는 질환을 치료하기 위해서 아만타딘(Amantadine), 리만타딘(Rimantadine), 자나미비(Zanamivir), 오셀타미비르(Oseltamivir) 등 4가지 물질이 미국식품의약품 안전청(FDA)으로부터 승인받아 사용되고 있다. 그러나 바이러스 증식에 필수적인 세포막 단백질인 M2 단백질의 이온채널을 차단하여 바이러스의 탈외피(uncoating)를 방해함으로써 항바이러스 작용을 하는 M2 억제제인

아만타딘(Amatadine), 리만타딘(Rimatadine)은 인플루엔자 바이러스 A형에만 효과가 있으며 40년 동안 사용되는 동안 내성을 가진 바이러스가 발생되고 신경계 및 위장에 심각한 부작용이 나타나는 것으로 보고되고 있다(Bantia, S. et al. *Antiviral Research* 69, 39, 2006). 1999년 이후에는 바이러스의 증식에 중요한 역할을 하고 내성 발생빈도가 적으며, A형 및 B형 인플루엔자 바이러스 모두에 안정적으로 존재하는 뉴라미니데이즈의 저해제인 자나미비르(Zanamivir), 오셀타미비르(Oseltamivir)와 같은 신약에 의한 바이러스 감염 치료에 대한 보고되고 있다(Zhang, J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3009, 2006).

- [6] 그러나 자나미비르의 경우에는 높은 항바이러스 효과를 가지고 있지만 낮은 생체이용율과 빠른 신장에서의 배출의 단점(Ryan, D. M. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 2583, 1995)을 가지고 있으며, 오셀타미르는 심각한 구토증세가 나타나는 부작용이 있다.
- [7] 현재까지 개발된 항바이러스들은 심한 부작용을 나타내고 있으며 그 응용에 대한 많은 주의가 필요하다. 또한 백신의 개발은 유행하는 바이러스의 형과 백신의 바이러스가 맞지 않으면 효과가 낮은 문제점이 있기 때문에 감염 억제 효과가 뛰어나고 안정성이 우수한 새로운 인플루엔자 바이러스제의 개발의 필요성이 증가하고 있다. 또한, 실질적으로 인플루엔자 바이러스가 감염된 동물을 치료하기 위해서 동물의 체내 전체에서 우수한 항바이러스 효과를 나타내는 물질의 개발이 필요하다.
- [8] 이에, 본 발명자들은 커큐미노이드계 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 커큐민을 포함하는 식물 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물의 복합체가 인플루엔자 바이러스에 대한 살바이러스 효과 및 세포 변성 억제 효과에 있어서 매우 우수하고, 적은양의 사용으로도 인플루엔자 바이러스에 감염된 개체를 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

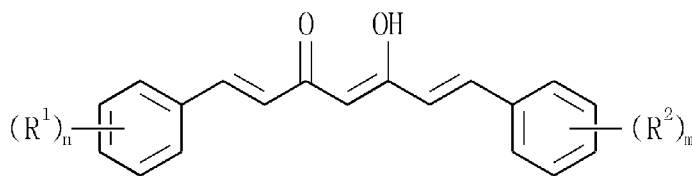
- [9] 본 발명의 목적은 화학식 1의 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드(stevioside), 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 추출물의 분획물을 포함하는, 복합체를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 적은양의 사용으로도 인플루엔자 바이러스가 감염된 개체의 몸 전체 부위에서 항바이러스 효과를 가지는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물 및 이를 개체에 투여하여 인플루엔자 바이러스 감염의 치료방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 적은양의 사용으로도 인플루엔자 바이러스가 감염된 개체의 몸 전체 부위에서 항바이러스 효과를 가지는, 인플루엔자 바이러스

감염의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물 및 살바이러스용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 적은양의 사용으로도 인플루엔자 바이러스가 감염된 개체의 몸 전체 부위에서 항바이러스 효과를 가지는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용, 또는 살바이러스용 사료첨가제 및 사료를 제공하는 것이다.

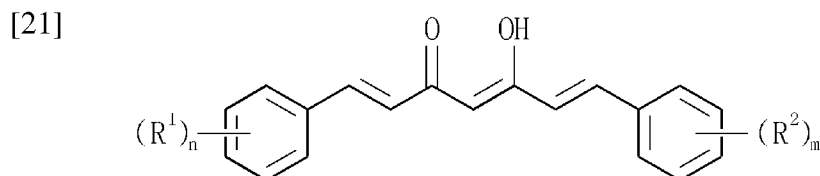
과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드(stevioside), 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 추출물의 분획물을 포함하는, 복합체를 제공한다.
- [14] 화학식 1



- [15] 상기 식에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알콕시기이고, $1 \leq n \leq 5$, $1 \leq m \leq 5$ 이다.
- [16] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물 및 살바이러스용 의약품 조성물을 제공한다.
- [18] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용, 또는 살바이러스용 사료첨가제 및 상기 사료첨가제를 함유하는 사료를 제공한다.
- [19] 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물의 혼합물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[20] [화학식 1]



- [22] 상기 식에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의

알콕시기이고, $1 \leq n \leq 5$, $1 \leq m \leq 5$ 이다.

[23]

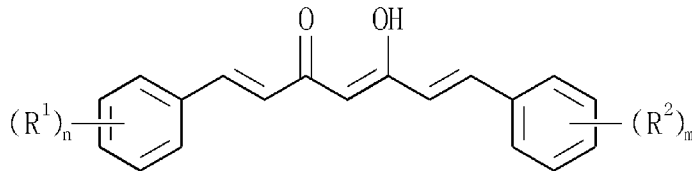
[24] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[25]

[26] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 포함하는, 복합체에 관한 것이다.

[27] [화학식 1]

[28]



[29] 상기 식에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알콕시기이고, $1 \leq n \leq 5$, $1 \leq m \leq 5$ 이다.

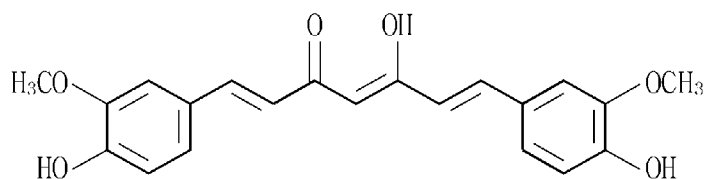
[30] 본 발명의 복합체는 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 용매에 혼합한 후, 작동중인 전자레인지에서 반응시켜 얻어진 제형인 것이 바람직하다.

[31] 상기 제형은 전자레인지에서 반응을 2회 이상 수행하고, 각 반응 사이에 혼합물을 식히는 단계를 추가하여 얻어질 수 있으며, 상기 제형은 전자레인지에 반응시키기 전에 초음파 처리하는 단계를 추가로 하여 얻어질 수 있다.

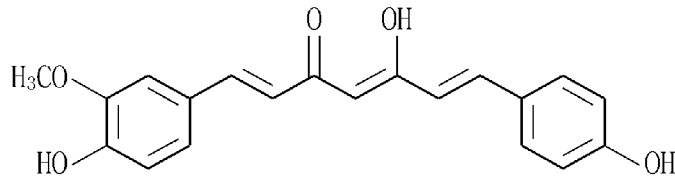
[32] 본 발명의 복합체에서, 상기 화학식 1의 R^1 는 R^2 와 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알콕시기일 수 있으며, R^2 는 R^1 과 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알콕시기일 수 있다. 또한, $n \geq 2$ 이 R^1 에서, R^1 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알콕시기일 수 있고, $n \geq 2$ 이 R^2 에서, R^2 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알콕시기일 수 있다.

[33] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 4 중 어느 하나로 표시되는 화합물 또는 이의 혼합물일 수 있다.

[34] 화학식 2

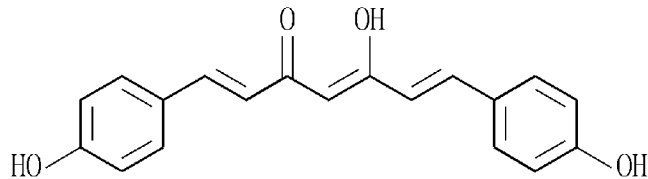


[35] 화학식 3



[36]

[37] 화학식 4



[38] 화학식 1로 표시되는 화합물은 커큐미노이드계 화합물로서, 화학식 2의 커큐민(curcumin), 화학식 3의 커큐데메톡시커큐민 (Demethoxycurcumin), 화학식 4의 비스데메톡시커큐민 (Bisdemethoxycurcumin)을 포함하며, 바람직하게는 화학식 2의 커큐민이다. 상기 화합물들은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 울금과 같은 식물로부터 추출 분리된 것을 사용할 수 있다.

[39] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트,

나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

- [40] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.
- [41] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염의 형태로 만들어 사용할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [42] 본 발명의 복합체에서, 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 식물 추출물은 그 종류가 제한되지 않으며, 바람직하게는 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물 추출물이고, 보다 바람직하게는 울금 추출물이다.
- [43] 일반적으로 울금이란 가을울금 (*Curcuma longa* Linne)의 덩이뿌리를 그대로 또는 주피를 제거하고 찌서 말린 뿌리를 의미 (대한약전 제9개정)하고, "덩이뿌리"란 덩이 모양으로 생긴 뿌리로서, 괴근(塊根)이라고도 한다.
- [44] 한편, 가을울금(*Curcuma longa* Linne)의 뿌리줄기 부분을 일반적으로 강황 (*Curcuma longa* Rhizoma)이라 하며 (대한약전 제9개정), "뿌리줄기"란 식물의 줄기가 뿌리처럼 땅속으로 뻗어서 자라나는 땅속줄기로서, 근경(根莖)이라고도 한다.
- [45] 본 발명에서 울금(Turmeric)이란 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물의 덩이뿌리 부분을 의미하는 것으로, 상기 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물에는 온울금(*Curcumawenyujin*, Y. H. Chen et C. Ling), 가을울금(황울금)(*Curcuma longa* Linne), 봄울금(*Curcuma longa* Salisb.), 보라색울금(*Curcuma zedoaria*), 광서아출(계울금)(*Curcumakwansiensis*, S. G. Lee et C. F. Liang), 아출(녹사울금) (*Curcuma aeruginosa*), 봉아출 [*Curcumaphaeocaulis* Val. (생강과 Zingiberaceae)] 또는 커큐마 도메스티카 (*Curcuma domestica*) 등이 있으며, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [46] 구체적으로, 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물 중 가을울금(*Curcuma longa* Linne)의 부위에 따른 커큐민 유도체의 함량을 측정한 결과, 덩이뿌리 에탄올 추출물에 커큐민은 17.0 g/kg이 함유되어 있었고, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민은 각각 5.3 및 3.4 g/kg이 함유되어 있었으며, 줄기 부위에는 상기 화합물들이 검출되지 않았고, 뿌리줄기 부위의 에탄올 추출물에는 커큐민, 데메톡시커큐민, 및 비스데메톡시커큐민이 각각 2.8, 0.4, 및 6.8 g/kg 함유되어 있었다(실시예 3).
- [47] 본 발명에서 울금 또는 강황은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

- [48] 상기 울금 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법 및 환류추출법 등 당업계에서 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 세척 및 건조로 이물질이 제거된 울금의 뿌리를 분쇄하여 얻은 울금 건조물을 물, C₁~C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 C₁~C₄의 알코올로 추출한 추출물일 수 있고, 가장 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올로 추출한 추출물일 수 있다. 이때, 추출용매는 울금의 건조중량의 2 ~ 20 배로 하는 것이 바람직하다. 일례로 울금 건조물을 세절한 후 추출용기에 넣고 C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 넣고 일정기간 상온에서 방치한 다음, 여과하여 알코올 추출물을 얻을 수 있다. 이때, 추출은 상온에서 1주 동안 방치하는 것이 바람직하며, 이후에 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 거칠 수 있다.
- [49] 한편, 본 발명에서 화학식 1의 화합물을 포함하는 식물 추출물의 분획물은 상기 설명한 커큐미노이드계 화합물을 포함하는 식물 추출물로부터 분획하여 얻을 수 있다. 바람직하게는, 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물 추출물의 분획물이고, 보다 바람직하게는 울금 추출물의 분획물이다. 보다 구체적으로, 상기 울금 분획물은 울금 추출물을 물에 현탁시킨 후 헥산 및 에틸아세테이트로 각각 분획함으로써 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물로서 각각 얻을 수 있다.
- [50] 본 발명의 복합체에서, 상기 스테비오사이드는 설탕의 약 300배 당도를 가지는 천연 다당류 물질로서, 스테비오사이드 A1, A2, 스테비올 1,2,3, 돌코사이드, 르바우디오사이드 a,b,c,e,f 등 다양한 당으로 구성되어 있고, 혈당이나 비만 등에 영향을 주지 않으며, 또한 충치 군도 억제한다.
- [51] 본 발명에서 스테비오사이드는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 스테비아로부터 추출 분리된 것을 사용할 수 있다. 이때 스테비오사이드의 추출 분리 방법은 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [52] 본 발명에서 스테비오사이드는 바람직하게는 스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni)로부터 얻어지는 것이며, 보다 바람직하게는 스테비아의 잎 부위로부터 얻어지는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [53] 본 발명에서 스테비아는 그대로 사용하거나, 또는 이를 그대로 말린 건조된 형태로 사용하거나, 또는 이를 찌서 말린 건조된 형태로 사용할 수도 있으며, 건조된 스테비아는 분말화하여 분말 형태로 사용할 수도 있다.
- [54] 본 발명의 복합체에서, 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물은 그 종류가 제한되지 않으나, 바람직하게는 스테비아 추출물이다.
- [55] 스테비아는 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과 숙근(宿根) 다년초 여러해살이풀로서 남미 파라과이, 아르헨티나, 브라질 등의 국경산간지 하천, 습지대주변에 서식하며 허브차, 음료, 한약조제, 천연감미료, 당료, 다이어트, 건강보조식품 등에 사용한다.

- [56] 본 발명에서 스테비아는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.
- [57] 본 발명에서 스테비아는 잎 부위를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [58] 본 발명에서, 스테비아 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻을 수 있다. 구체적으로, 스테비아 중량의 약 2~10배, 바람직하게는 2~5배의 부피의 물, 에탄올, 메탄올과 같은 저급 알코올로, 바람직하게는 에탄올로 20~50°C, 바람직하게는 25~30°C에서 교반 추출, 초음파 추출, 100°C에서 열수 추출방법으로 2~3회 연속 추출하여 수득한 후, 여지로 여과하고 여과액을 회전식 감압 농축기로 제거한 후 잔사를 진공 동결건조, 열풍건조를 통하여 스테비아 추출물을 얻을 수 있다.
- [59] 또한, 본 발명의 상기 스테비아 추출물은 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물 및 이들 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [60] 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물은 상기 식물 추출물로부터 분획하여 얻을 수 있다.
- [61] 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 식물 추출물로서 울금 추출물을 사용할 경우, 울금 추출물과 스테비아 추출물의 혼합 비율은 임의로 선택할 수 있으며, 바람직하기로는 울금 추출물: 스테비아 추출물이 1:100 내지 100:1, 더욱 바람직하기로는 1:10 내지 10:1, 가장 바람직하기로는 1:2 내지 2:1의 비율로 혼합될 수 있다.
- [62] 본 발명에서, 울금 추출물과 스테비오사이드의 혼합물을 사용할 경우 이들의 혼합 비율은 임의로 선택할 수 있으며, 바람직하기로는 울금 추출물: 스테비오사이드가 1:1000 내지 1000:1, 더욱 바람직하기로는 1:100 내지 100:1, 가장 바람직하기로는 1:10 내지 10:1의 비율로 혼합될 수 있다.
- [63] 본 발명에서 화학식 1로 표시되는 화합물과 스테비아 추출물 또는 스테비오사이드의 혼합물을 사용할 경우, 이들의 혼합 비율은 임의로 선택할 수 있으며, 바람직하게는 1:10 내지 1:30의 비율로 혼합될 수 있다.
- [64] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [65] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [66] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [67] 상기 인플루엔자 바이러스는 바람직하게는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스는 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴을 일으킬 수 있으며, 특히 조류독감, 돼지독감 또는 염소독감을 야기시킬 수 있다.

- [68] 본 발명의 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은, 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 단독으로 사용하거나, 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 단독으로 사용한 경우보다 인플루엔자 바이러스의 활성 억제 효과 및 세포 변성 억제 효과가 보다 우수함을 특징으로 한다.
- [69] 본 발명의 일 실시예에서는 SPF(specific pathogens free) 닭에 인플루엔자 바이러스(H9N2)를 접종하고, 바이러스 공격접종 4시간 전부터 공격접종 후 5일까지 화학식 2의 화합물 및 스테비오사이드를 혼합한 혼합물을 경구투여한 결과, 화학식 2의 화합물만 경구투여한 군, 울금 에탄올 추출물만 경구투여한 군, 스테비오사이드만 경구투여한 군, 및 아무것도 처리하지 않은 군에 비하여 닭의 기관 및 맹장편도에서 바이러스 재분리율과 평균역가가 현저히 저하되었음을 확인하였다. 즉, 화학식 1의 화합물, 이를 포함하는 울금 추출물, 스테비아 추출물, 또는 스테비오사이드를 단독으로 처리한 경우보다 화학식 1의 화합물 또는 울금 추출물을 스테비아 추출물 또는 스테비오사이드와 혼합한 본 발명의 조성물을 처리한 경우, 인플루엔자 바이러스의 활성 억제 효과가 현저히 증가됨을 확인하였다.
- [70] 또한, 본 발명에 따라 스테비오사이드가 첨가되면 커큐민이 0.3mg/kg/day로 소량이 포함되어 있어도, 커큐민을 1mg/kg/day로 투여한 경우보다 바이러스 재분리율 및 평균 역가가 보다 낮았는 바, 적은양의 커큐민으로도 인플루엔자 바이러스의 감염을 치료할 수 있다.
- [71] 특히, 커큐민 또는 울금 에탄올 추출물만 경구투여한 군에서는 기관에서만 바이러스 재분리율 및 바이러스 평균 역가가 감소되는 경향을 보이고, 맹장편도에서는 바이러스 재분리율 및 바이러스 평균 역가가 공격접종 대조군에 비해 크게 저하되지 않았으나, 본 발명의 조성물을 경구투여한 군에서는 맹장편도에서 현저히 낮은 바이러스 재분리율과 평균 역가를 나타내었는 바, 본 발명의 조성물은 바이러스가 감염된 개체의 몸 전체에서 우수한 항바이러스 효과가 유지된다.
- [72] 또한 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크

등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[73] 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[74] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[75] 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 울금 추출물 또는 그 분획물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋으며, 화학식 1의 화합물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[76] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 약제학적 조성물을 닭에게 경구 투여시, 기관 뿐만 아니라 맹장편도에까지 살바이러스 및 항바이러스 효과가 유지되었는 바, 본 발명의 조성물은 경구투여하는 것이 바람직하다.

[77] 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[78]

[79] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[80] 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기

스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 첨가될 수 있다. 상기 성분을 식품 첨가물로 사용할 경우, 추출물, 분획물 또는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[81] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[82] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[83] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 과육의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[84] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는, 살바이러스용 의약품 조성물에 관한 것이다.

[85] 즉, 본 발명의 조성물은 살바이러스를 목적으로 의약품 조성물에 첨가될 수 있다. 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물, 분획물 또는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

- [86] 바람직하게는, 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제의 제조에 사용될 수 있다.
- [87]
- [88] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스의 예방 또는 개선용, 또는 살바이러스용 사료첨가제에 관한 것이다.
- [89] 상기 사료첨가제는 살바이러스 및 항바이러스 효능을 가지므로 가금류, 가축 등에게 꾸준히 섭취하게 함으로써 바이러스성 질환을 예방할 수 있고, 이미 발생한 바이러스성 질환을 개선시킬 수 있다. 사료는 영양가, 주성분, 유통, 수분 함량 배합상태 및 가공형태 등에 따라 여러 가지로 분류할 수 있으며, 상기 사료는 조사료, 농후사료, 보충사료, 단백질사료, 녹말사료, 지방질사료 또는 섬유질사료가 사용가능하나, 이에 한정하지 않는다.
- [90] 또한 상기 사료첨가제는 추가적으로 가금류 및 가축 등에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서는 상기 사료첨가제를 그대로 또는 공지의 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제를 공급하는 경우는 가금류 및 가축 등에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.
- [91]
- [92] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 사료첨가제를 함유하는 사료에 관한 것이다.
- [93] 상기 설명한 사료첨가제를 다양한 동물의 사료나 음수의 원료 및 첨가제로 사용할 수 있으며, 상기 사료첨가제를 포함하는 사료 조성물로 사용할 수 있다.
- [94]
- [95] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [96] 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 포함하는 복합체를 인플루엔자 바이러스 감염의 발병 또는 발병가능성이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하여 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 치료할 수 있다.
- [97] 상기 인플루엔자는 바람직하게는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 감염 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴일 수 있으며, 특히 조류독감, 돼지독감 또는 염소독감일 수 있다.
- [98] 본 발명에서 용어, "개체"란 인플루엔자바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 본 발명의 복합체를 개체에

투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 다양한 인플루엔자바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자바이러스로 감염된 닭 또는 돼지를 치료할 수 있다. 본 발명의 복합체를 기존의 인플루엔자바이러스 감염 질환의 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.

- [99] 상기 혼합물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 혼합물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 혼합물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [100] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 억제학적 조성물을 닭에게 경구 투여시, 기관 뿐만 아니라 맹장편도에까지 살바이러스 및 항바이러스 효과가 유지되었는 바, 본 발명의 조성물은 경구투여하는 것이 바람직하다.
- [101] 본 발명의 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 단독으로 사용하거나, 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 단독으로 사용한 경우보다 인플루엔자 바이러스의 활성 억제 효과 및 세포 변성 억제 효과가 보다 우수함을 특징으로 한다.
- [102] 특히, 본 발명의 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물의 혼합물은 기관에서 뿐만 아니라, 맹장편도에서 공격접종 양성 대조군, 화학식 1로 표시되는 화합물의 투여군, 화학식 1의 화합물을 포함하는 식물 추출물, 및 스테비아 추출물 투여군에 비하여 바이러스 재분리율과 평균역가가 현저히 감소됨을 특징으로 한다(실험예 3). 즉, 상기 본 발명의 혼합물은 기관에 있는 바이러스 뿐만 아니라, 내장의 끝부분인 맹장편도에 있는 바이러스까지에도 항바이러스 효과가 나타나는 바, 상기 혼합물은 바이러스가 감염된 개체의 몸 전체 부위에서 항바이러스 활성이 유지되는 효과를 가진다.

발명의 효과

- [103] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료를 위한 억제학적 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물, 의약품

조성물 또는 사료 첨가제용 조성물로 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 화학식 1의 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물의 분획물이 혼합됨으로 인해서, 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 살바이러스 효과, 세포 변성 억제 효과 및 항바이러스 활성이 증가되어 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료에 유용히 사용할 수 있으며, 인플루엔자 바이러스가 감염된 개체의 몸 전체에서 우수한 항바이러스 활성이 유지되는 효과를 가진다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[105]

[106] 실시예 1: 울금 추출물의 제조

[107] 본 실시예에서 사용한 울금은 일반적으로 한약재상이나 시장에서 구입할 수 있는 것으로 가을울금(*Curcuma longa* Linne)의 덩이뿌리(Radix) 부위를 그대로 찢어서 말린 것을 구입한 후 본 발명의 추출물을 효율적으로 얻기 위하여 파우더 형태로 분쇄하여 사용하였다. 울금 1.6 kg에 100% 에탄올(EtOH) 7.5 ℓ를 가하여 실온에서 5일 방치하고 여과지로 여과하고 농축하여 울금 에탄올 추출물(170 g)을 얻었다.

[108]

[109] 실시예 2: 울금 추출물로부터 울금분획물 및 커큐미노이드계 화합물의 분리 및 정제

[110] 상기 실시예 1에서 수득한 울금의 에탄올추출물 170 g에 물 1ℓ를 넣어 현탁시켰다. 이를 분별 깔대기에 넣고, n-헥산 및 에틸아세테이트를 순서대로 이용하여 분별 추출하여 n-헥산 가용추출물 (23 g), 에틸아세테이트 가용추출물 (85 g) 및 물 가용추출물 (34 g)을 수득하였다.

[111] 상기에서 수득한 에틸아세테이트 가용추출물 85 g을 클로로포름, 메탄올 및 이들의 혼합용매 (80:1 ~ 1:1)를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[실리카겔 500 g, 70~230 메쉬(mesh)]를 수행하여 15개의 분획물(Fr.-1~15)로 분리하였다. 이중 여섯 번째 분획물(Fr.-6, 16 g)은 n-헥산 : 에틸아세테이트(20:1 ~ 1:1 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로 하여 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (30 g, 230 ~ 400 메쉬)를 수행하여 5개의 분획물(Fr.-6-1~5)을 얻었다.

[112] 그 중 Fr.-6-2~3 분획물(11 g)에 대해 클로로포름, 메탄올 및 이들의 혼합용매 (80:1 ~ 4:1)를 이동상으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 획득한 분획물을 대상으로 제조용 TLC(preparative TLC)법으로

전개[(n-헥산:에틸아세테이트=4:1 (v/v)]하여 순수한 화합물 1 (8 g)을
수득하였다. 또한, 여덟 번째 분획물 (Fr.-8, 14 g)은 n-헥산 : 에틸아세테이트(20:1
~ 1:1 (v/v)) 및 클로로포름 : 메탄올 (80:1 ~ 20:1 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로
하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (30 g, 230 ~ 400 메쉬)를 반복적으로
수행하여 화합물 2 (0.4 g)와 3 (0.2 g)을 수득하였다.

[113]

[114] 실시예 3: 커큐미노이드계 화합물의 구조 분석

[115] 상기 실시예 2에서 얻은 커큐미노이드계 화합물의 분자량 및 분자식을 VG
고분해능 GC/MS 분광기(VG high resolution GC/MS spectrometer, Election
Ionization MS, Autospec-Ultima)를 사용하여 결정하였다. 또한, 핵자기공명(NMR)
분석(Bruker AM 500)을 통하여 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 및 2D NMR 분광학 자료를
이용하여 분자구조를 결정하였다.

[116]

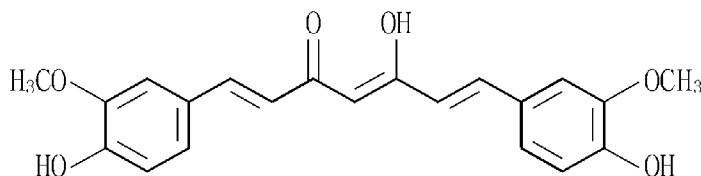
[117] 이상의 기기분석결과를 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, 하기 화학식 2
내지 화학식 4로 표시되는 커큐민, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민으로
확인하였다(Food Chem. 265-272, 2009; J. Nat. Prod. 1227-1231, 2002; J. Nat. Prod.
1531-1534, 1998; J. Agric. Food Chem. 3668-3672, 2002)). 구체적인 분석결과는
다음과 같다.

[118]

[119] 화합물 1: 커큐민 (Curcumin)

[120] [화학식 2]

[121]



[122] 1) 물성 : 밝은 주황색 분말 (m.p. 183 °C)

[123] 2) 분자량 : 368.3

[124] 3) 분자식 : $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$

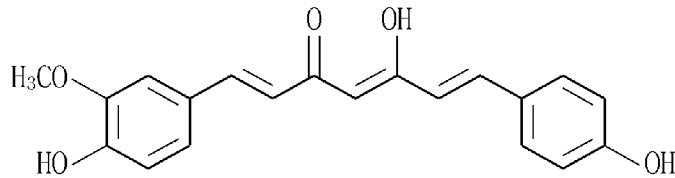
[125] 4) ^1H -NMR (acetone- d_6 , 500 MHz) δ 7.62 (2H, d, J = 15.80 Hz, H-4, H-4'), 7.35 (2H, d, J = 1.91 Hz, H-6, H-6'), 6.83 (2H, H-3, H-5), 7.20 (2H, dd, J = 8.3, 1.9 Hz, H-10, H-10'), 6.90 (2H, d, J = 8.15 Hz, H-9, H-6'), 5.99 (1H, s, H-1). ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 56.72, 102.01, 111.95, 116.64, 122.72, 124.25, 128.58, 141.81, 149.20, 150.44, 184.94.

[126]

[127] 화합물 2: 데메톡시커큐민 (Demethoxycurcumin)

[128] [화학식 3]

[129]



[130] 1) 물성 : 주황색 분말 (m.p. 220 °C)

[131] 2) 분자량 : 338

[132] 3) 분자식 : $C_{20}H_{18}O_5$

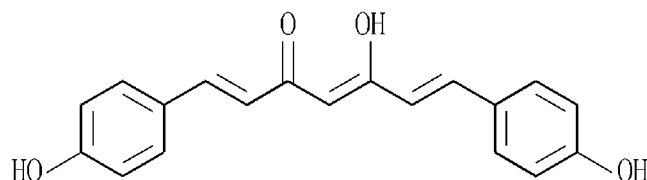
[133] 4) ^1H -NMR (acetone- d_6 , 500 MHz) δ 7.62-7.55 (4H), 7.34 (1H), 7.18 (1H), 6.89 (3H), 6.70 (2H), 5.97 (1H). ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 56.38, 101.79, 111.53, 116.30, 116.89, 122.12, 122.35, 123.98, 127.77, 128.24, 131.06, 141.13, 141.48, 148.87, 150.13, 160.64, 184.66.

[134]

[135] **화합물 3: 비스데메톡시커큐민 (Bisdemethoxycurcumin)**

[136] [화학식 4]

[137]



[138] 1) 물성 : 주황색 분말 (m.p. 224 °C)

[139] 2) 분자량 : 308

[140] 3) 분자식 : $C_{19}H_{16}O_4$

[141] 4) ^1H -NMR (acetone- d_6 , 500 MHz) δ 7.62-7.56 (6H), 6.91-6.87 (4H), 6.68-6.65 (2H), 5.98 (1H). ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 101.82, 116.87, 122.11, 127.79, 131.06, 141.12, 160.58, 184.62.

[142]

[143] **실험예 1: 울금 추출물, 분획물 및 커큐미노이드계 화합물의 뉴라미니데이즈 A/Bervig-Mission/1/18 (rvH1N1) 저해 활성 측정**

[144] 본 발명의 실시예 1 및 2의 울금 추출물, 울금 분획물 및 이로부터 분리한 커큐미노이드계 화합물의 뉴라미니데이즈에 대한 저해활성을 측정하기 위하여, 1918년 스페인 독감으로부터 분리된 바이러스(A/Bervig_Mission/1/18)의 재조합 뉴라미니데이즈인 rvH1N1 인플루엔자 A 바이러스의 뉴라미니데이즈(R&D SYSTEM, 4858-NM)를 사용하였다. 기질은 2'-(4-트리메틸움벨리페릴)- α -D-N-아세틸-뉴라미닌산 나트륨염 [2'-(4-trimethylumbelliferyl)- α -D-N-acetyl-neuraminic acid sodium salt]을 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

[145] 실시예 1 및 2의 울금 추출물 및 이의 분획물을 메탄올에 녹여 각각 20 μ L씩

첨가하고 기질로는 2'-(4-트리메틸옴벨리페릴)- α -D-N-아세틸-뉴라미닌산 나트륨염 (최종농도, 200 μ M)을 50 μ L 넣고, 5 mM CaCl₂와 200 mM NaCl이 첨가된 트리스 완충용액(pH 7.5) 80 μ L와 혼합하였으며, 효소원인 뉴라미니데이즈(효소 최종농도, 0.05 ng/ μ L) 50 μ L을 첨가하여 25 °C 상온에서 10분 동안 반응시키고 형광 분광기로 365 nm에서의 흡광과 445 nm에서의 발광을 측정함으로써 뉴라미니데이즈의 저해 활성을 측정하였다.

[146] 측정 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[147] 표 1

물질	뉴라미니데이즈 저해활성(IC ₅₀) ¹⁾
	A/Bervig-Mission/1/18 (rvH1N1)
울금 에탄올 추출물	3.1 μ g/mL
울금 헥산 분획물	262.0 μ g/mL
울금 에틸아세테이트 분획물	0.9 μ g/mL
울금 물분획물	61.5 μ g/mL
커큐민	3.0 μ M
테메톡시커큐민	3.0 μ M
비스테메톡시커큐민	6.0 μ M
[주] 1) : 두 번 실험의 평균값으로 결과를 나타내었다.	

[148]

[149] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 울금 추출물 및 분획물, 커큐미노이드계 화합물 각각의 뉴라미니데이즈에 대한 저해 활성을 측정한 결과, 울금 에탄올 추출물은 인플루엔자바이러스원의 뉴라미니데이즈에 대해 3.1 μ g/mL의 IC₅₀값을 보여주었고, 울금 헥산 분획물은 262.0 μ g/mL, 울금 에틸아세테이트 분획물은 0.9 μ g/mL, 그리고 울금 물 분획물은 61.5 μ g/mL의 IC₅₀값을 보여 주었다. 또한 커큐미노이드계 화합물인 커큐민 및 테메톡시커큐민은 3.0 μ M, 비스테메톡시커큐민은 6.0 μ M의 IC₅₀값을 보여 주었다. 따라서, 상기와 같은 결과를 통해 본 발명에 따른 울금 추출물, 이의 분획물 및 커큐미노이드계 화합물이 우수한 뉴라미니데이즈 저해 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[150]

[151] 실험예 2. 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물의 인플루엔자 바이러스에 대한 저해 효과 측정

[152] 먼저, 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물의 인플루엔자 바이러스 H1N1 (A/PR/8/34) 및 H9N2 (A/Chicken/Korea/MS96/96)]에 대한 살바이러스 효과를 측정하기 위하여, 개의 신장세포주인 MDCK (Madin-Darby canine kidney, ATCC: CCL-34)를 이용하여 다음과 같은 in vitro 실험을 수행하였다.

[153] 먼저, 96 well microplate에 MDCK세포를 각 well 당 1 X 10⁵/well 이 되도록 넣고 배지 EMEM (penicillin 100 units, streptomycin 100 μ g, 10% FBS)로 배양하였다. MDCK 세포가 monolayer가 되면 항생제만 포함된 EMEM 배지로 2회 세척하였다. H1N1 및 H9N2주를 각각 100 TCID₅₀이 되도록 희석하여 EP 튜브에

담아 두었다. 여기에 DMSO (dimethylsulfoxide)로 희석한 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 농도별로 각 튜브에 넣은 후 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰다. 1시간 후 상기 반응액을 미리 세척한 MDCK 세포에 한 농도 당 3 well씩 각각 접종하여 35°C에서 1시간 동안 배양하였다(이하, 샘플 처리군이라 함). 한편, 비감염+비투여 대조군(Control, H1N1 또는 H9N2주를 감염시키지 않고, 커큐미노이드계 화합물을 투여하지 않은 세포군) 및 감염+비투여 대조군(Virus control, H1N1 또는 H9N2주를 감염시킨 후, 커큐민을 투여하지 않은 세포군)을 동일한 조건에서 MDCK 세포에 접종하여 35°C에서 1시간 동안 배양 하였다. 1시간 후 플레이트의 배지를 모두 제거하고 PBS로 1회 세척 후, 항생제와 10 μ g/mL 트립신이 첨가된 EMEM 배지를 각 well에 100 μ l씩 분한 후, 35°C에서 48-72시간 배양하였다. 감염+비투여 대조군에서 완전히 세포변성효과(Cytopathic effect, CPE)가 나올 때까지 48-72 시간 배양하였다. 도립현미경으로 매일 세포 상태를 관찰하였다. 배양 48-72 시간 후 세포 생존율을 알아보기 위하여 Cell Counting kit-8 (Dojin, Kumanoto, Japan, tetrazolium salt WST-8)을 각 well당 10 μ l 씩 넣은 후 35°C에서 2시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 비감염+비투여 대조군 및 감염+비투여 대조군과 본 발명의 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물이 나타내는 살바이러스 효과(저해도(%))를 하기 수학적 식 1에 의해 비교한 후, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[154] 수학적 식 1

$$\text{저해도}(\%) = \frac{\text{샘플 처리군 (O.D) 값} - \text{감염+ 비투여 대조군 (O.D) 값}}{\text{비감염+ 비투여 대조군 (O.D) 값} - \text{감염+ 비투여 대조군 (O.D) 값}} \times 100$$

[155] 상기 식에서, O.D 값은 450 nm에서 측정한 흡광도 값을 의미한다.

[156]

[157] 한편, 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물의 인플루엔자 바이러스 H1N1 (A/PR/8/34) 및 H9N2 (A/Chicken/Korea/MS96/96)]에 대한 세포변성억제효과를 알아보기 위해, 항생제만 포함된 EMEM 배지로 2회 세척한 MDCK 세포에 인플루엔자 바이러스 (H1N1 또는 H9N2주)를 접종하여 1시간 동안 35°C에서 배양하였다. 1시간 후 접종한 바이러스액을 모두 제거하고, 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물을 바이러스가 접종된 MDCK 세포에 넣어주었다. 이후, 위와 동일한 방법으로 본 발명의 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물이 나타내는 세포변성억제효과(저해도(%))를 상기 수학적 식 1에 의해 비교한 후, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[158] 표 2

물질	살바이러스 효과					
	H1N1(A/PR/8/34)			H9N2(A/Chicken/Korea/MS96/96)		
	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c
Tamiflu	>200	18.5	>10.8	>200	<1	>200
커큐민	94.1	7.1	13.3	94.1	18.6	5.1
데메톡시 커큐민	97.0	8.0	23.1	97.0	18.2	5.3
비스데메톡시 커큐민	>200	28.1	>7.1	>200	>200	<1
에틸아세테이트 분획물	82.1 μ g/mL	9.0 μ g/mL	9.1	82.1 μ g/mL	20.0 μ g/mL	4.1
에탄올 추출물	55.7 μ g/mL	8.7 μ g/mL	6.4	55.7 μ g/mL	30.4 μ g/mL	1.8
물질	세포변성억제 효과					
	H1N1(A/PR/8/34)			H9N2(A/Chicken/Korea/MS96/96)		
	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c
Tamiflu	>200	3.0	>66.7	>200	<1	>200
커큐민	94.1	40.7	2.3	94.1	10.9	8.6
데메톡시 커큐민	97.0	60.8	1.6	97.0	24.9	3.9
비스데메톡시 커큐민	>200	141.5	>1.4	>200	181.6	>1.1
에틸아세테이트 분획물	82.1 μ g/mL	23.5 μ g/mL	3.5	82.1 μ g/mL	11.6 μ g/mL	7.1
에탄올 추출물	55.7 μ g/mL	27.8 μ g/mL	2.0	55.7 μ g/mL	31.5 μ g/mL	1.8
[주] ^a CC ₅₀ , 세포독성 농도로부터의 평균(50%) 값						
^b EC ₅₀ , 억제효과 농도로부터의 평균(50%) 값						
^c SI, 선택지수, CC ₅₀ / EC ₅₀						

[159]

[160] a, 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물과 바이러스를 섞어 4°C에서 1시간 동안 반응 시키고 MDCK 세포에 감염시킨 1시간 후 PBS로 1회 세척 후 trypsin 10 mg/ml이 첨가된 EMEM 배지로 교환하여 35°C에서 48-72시간 배양함.

[161] b, 바이러스를 MDCK 세포에 감염시킨 1시간 후 바이러스를 포함하는 medium을 제거한 후 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 포함하는 medium을 넣고 48-72시간 배양함.

[162] c, 선택지수로서 CC₅₀ / EC₅₀의 값임.

[163]

[164] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 커큐미노이드계 화합물들은 H1N1주에서 살바이러스 효과를 보여주는 선택지수(selective index, SI)가 13.3, 23.1 및 7.1 이상으로 우수한 살바이러스 효과를 보여주었다. 또한, H9N2에서도 선택지수 5.1, 5.3 및 1.0 이하를 보여주어 다양한 바이러스 주에 대한 살바이러스 효과를 나타내었다. 울금 에틸아세테이트 분획물은 H1N1 균주에서 선택지수 9.1, 울금

에탄올 추출물은 6.4로 아주 우수한 살바이러스 효과를 보여주었다. 또한, 독립현미경 상에서 세포 형태를 관찰한 결과, 바이러스만을 접종한 군(H1N1, H9N2)은 MDCK세포가 거의 파괴되어 90-100% 세포 변성효과가 나왔으나, 바이러스와 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 처리한 샘플처리군은 MDCK 세포에 아무것도 처리하지 않은 비감염+비투여대조군과 유사한 것을 확인하였다.

[165] 뿐만 아니라 커큐미노이드계 화합물들은 H1N1과 H9N2 세포변성억제효과를 보여주었다. 특히, H9N2주에서 선택지수 8.6, 3.9 및 1.1 이상으로 아주 좋은 세포변성억제 효과를 보여주었으며, H1N1 군주에서도 선택지수 2.3, 1.6 및 1.4 이상으로 세포변성억제 효과를 나타내었다. 또한, 독립현미경 상에서 세포 형태를 관찰한 결과, 바이러스만을 접종한 군(H1N1, H9N2)은 MDCK세포가 거의 파괴되어 90-100% 세포 변성효과가 나왔으나, 바이러스와 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 처리한 군은 MDCK 세포에 아무것도 처리하지 않은 비감염+비투여대조군과 유사한 것을 확인하였다.

[166] 따라서, 본 발명의 조성물은 바이러스가 세포에 감염되기 전 바이러스에 직접 작용하여 살바이러스 효과를 나타내고, 또한 바이러스가 세포에 감염된 후 복제과정을 통하여 세포 외로 방출되지 못하게 함으로써 세포변성에도 우수한 억제효과를 나타내므로, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 감염 후 치료용으로도 유용하게 사용될 수 있다.

[167]

[168] **실험예 3: 본 발명 복합체의 SPF 닭 동물모델을 이용한 항바이러스 활성 검증**

[169] 상기 실험예를 통해 항바이러스 효과를 확인한 화학식 1의 화합물, 이를 포함하는 울금 추출물 및 이의 분획물 뿐만 아니라, 이에 스테비오사이드를 혼합한 본 발명의 복합체에 대한 항바이러스 활성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[170] 먼저, 커큐민과 스테비오사이드를 혼합한 복합체를 제조하였다, 10 g/L의 커큐민과 1 내지 100 g/L의 스테비오사이드를 잘 섞은 후 70°C에서 30분간 울트라 소니케이션을 실시한 후, 700W의 전자레인지에서 15분간 반응시키고 (돌리고), 식힌후, 다시 15분간 돌리기를 3번 반복하였다.

[171] 그 결과 100g/L의 스테비오사이드 용액에서 최대 3.5 g/L의 커큐민을 얻을 수 있었고, 이 녹인 용액을 용도에 따라 희석하거나 직접 사용하였으며, 상기 방법으로 제조한 복합체에는 커큐민을 0.3mg/kg/day의 양으로 포함하고 있었다.

[172] 상기 복합체의 항바이러스 및 살바이러스 활성을 알아보기 위해 특정 병원체 부재(SPF, specific pathogens free) 계태아 난 3주령 병아리 60 수를 그룹 당 10수씩 총 6개의 그룹 (커큐민, 울금 추출물, 커큐민 및 스테비아가 혼합된 조성물의 경구투여 시험군 3개, 스테비오사이드 10%의 경구투여 시험군 1개, 공격접종 양성대조군 1개 및 음성대조군 1개)으로 나누었다(표 3).

[173] 표 3

Group	공시 시료
1	커큐민 (1mg/kg/day)
2	울금 에탄올 추출물 (커큐민 10% 함유)
3	커큐민(1%)+스테비오사이드(10%) 조성물 (300 μ l/dose)
4	스테비오사이드(10%) (300 μ l/dose)
5	공격접종 양성 대조군
6	음성 대조군

[174] 시험 바이러스는 influenza virus type A (H9N2)로 10^{6.0}/100 μ l/dose로 공격접종 4시간 전부터 공격접종 후 5일까지 공시 시료를 경구 투여하였다.

[175] 그룹 별 인플루엔자 바이러스 공격접종 5일 후 기관 및 맹장에서의 바이러스 증식억제 효능을 산정한 결과, 하기 표 4와 같았다.

[176] 표 4

그룹	접종 두수	Virus re-isolation ^A		Mean virus titer(log ₁₀ EID ₅₀ /g)	
		Trachea	Cecal Tonsil	Trachea	Cecal Tonsil
G1	10	4/10	6/10	1.7 $\pm$ 2.5	4.2 $\pm$ 3.6
G2	10	9/10	6/10	4.8 $\pm$ 1.56	4.20 $\pm$ 3.61
G3	10	8/10	2/10	4.0 $\pm$ 2.17	1.40 $\pm$ 2.95*
G4	10	10/10	8/10	5.80 $\pm$ 1.3	5.30 $\pm$ 3.5
G5	10	10/10	8/10	5.70 $\pm$ 1.9	5.40 $\pm$ 2.88
G6	10	0/10	0/10	0.00 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.0

[177]

[178] ^ANumber of virus-positive chicken/Number of inoculated chickens, **P*<0.05 by one-tailed t-test

[179]

[180] 상기 표 4에 나타낸 것과 같이 본 발명의 공시시료를 공격접종 4시간 전부터 공격접종 후 5일까지 치료 투여하여 장기별 인플루엔자 바이러스 증식 억제 효과를 산정한 결과, 커큐민 투여군, 울금 추출물 투여군, 및 커큐민 및 스테비오사이드가 포함된 조성물을 투여한 군에서 공격접종 대조군에 비하여 기관(Trachea) 및 맹장편도(Cecal Tonsil)에서 바이러스 재분리율과 평균역가가 저하됨을 확인할 수 있었다.

[181] 구체적으로, 커큐민을 투여한 군에서는 기관에서 바이러스 재분리율과

평균역가는 저하되었으나, 맹장편도에서의 바이러스 재분리율 및 평균역가는 공격접종 양성 대조군에 비해 크게 저하되지 않은 결과를 나타내었다. 또한, 커큐민이 10% 함유된 울금 에탄올 추출물을 투여한 군에서는 기관 및 맹장편도에서 바이러스 재분리율과 평균역가는 공격접종 양성 대조군에 비해 크게 저하되지 않은 결과를 나타내었다. 반면, 커큐민 및 스테비오사이드를 혼합한 조성물에서는 기관에서 뿐만 아니라, 맹장편도에서 공격접종 양성 대조군, 커큐민 투여군, 및 울금 추출물 투여군에 비하여 바이러스 재분리율과 평균역가가 현저히 감소되었다.

[182] 상기 결과를 통해서, 커큐민 및 스테비오사이드를 혼합한 조성물을 동물모델에 경구투여했을 때, 기관에 있는 바이러스 뿐만 아니라, 내장의 끝부분인 맹장편도에 있는 바이러스까지에도 항바이러스 효과가 나타나는 바, 상기 조성물은 바이러스가 감염된 개체의 몸 전체 부위에서 항바이러스 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[183]

[184] **실험예 4: 커큐미노이드계 화합물의 급성독성 실험**

[185] 본 발명의 조성물의 일 유효성분인 커큐미노이드계 화합물에 대한 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[186] 6주령의 특정 병원체 부재(SPF, specific pathogens free) C57BL/6J 마우스를 암수 각각 12 마리씩 4군(암수 각각 3마리/실험군)으로 나누어, 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 조명 12L/12D의 동물실내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정도 순화시켰다. 실험동물용 사료(마우스 및 랫트용, (주)제일제당, 서울, 대한민국) 및 음수는 멸균한 후 공급하였으며 자유 섭취시켰다.

[187] 상기 실시예 2에서 제조한 상기 화학식 2 내지 화학식 4로 표시되는 화합물들을 각각 0.5% 트윈 80(tween 80)에 50 mg/mL 농도로 조제한 후, 마우스 체중 20 g 당 0.04 mL(100 mg/kg), 0.2 mL(500 mg/kg) 및 0.4 mL(1,000 mg/kg)씩 경구 투여하였다. 시료는 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 7일 동안 다음과 같이 부작용 또는 치사 여부를 관찰하였다. 즉, 투여당일은 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 뒤에, 그리고 투여 익일부터 7일째까지는 매일 오전, 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

[188] 상기와 같은 급성 독성실험 결과, 시료를 투여한 모든 마우스에서 특기할 만한 임상증상이 나타나지 않았고 폐사된 마우스도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

[189] 따라서, 본 발명의 커큐미노이드계 화합물은 모든 마우스에서 1,000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD₅₀)이 1,000 mg/kg 이상인 안전한 물질임을 확인할 수 있었으며, 스테비오사이드 또한 실제 감미료로 사용하고 있는 안전한 물질인 바, 본 발명의 커큐미노이드계 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물

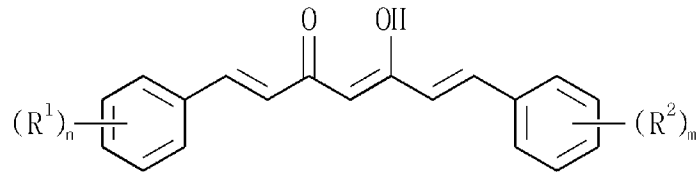
추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염 치료에 안전하게 사용할 수 있다.

청구범위

[청구항 1]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드(stevioside), 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 포함하는, 복합체.

[화학식 1]



상기 식에서, R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 C₁~C₁₀의 알콕시기이고, 1 ≤ n ≤ 5, 1 ≤ m ≤ 5이다.

[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 복합체는 화학식 1로 표시되는 화합물, 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물; 및 스테비오사이드(stevioside), 이를 포함하는 식물 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 용매에 혼합한 후, 작동중인 전자레인지에서 반응시켜 얻어진 제형인 것이 특징인 복합체.

[청구항 3]

제2항에 있어서, 상기 제형은 전자레인지에서 반응을 2회 이상 수행하고, 반응 사이에 식히는 단계를 추가하여 얻어진 것이 특징인 복합체.

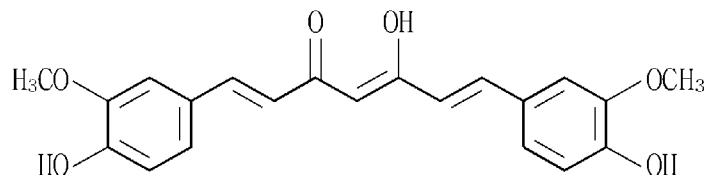
[청구항 4]

제2항에 있어서, 상기 제형은 전자레인지에 반응시키기 전에 초음파 처리하는 단계를 추가하여 얻어진 것이 특징인 복합체.

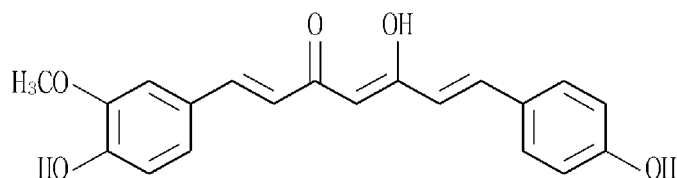
[청구항 5]

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 4 중 어느 하나로 표시되는 화합물 또는 이의 혼합물인 복합체.

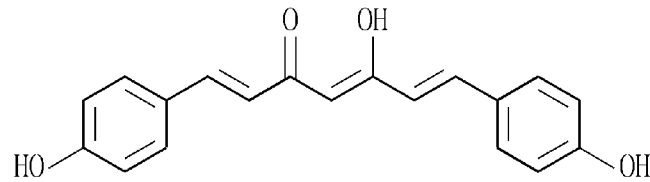
[화학식 2]



[화학식 3]

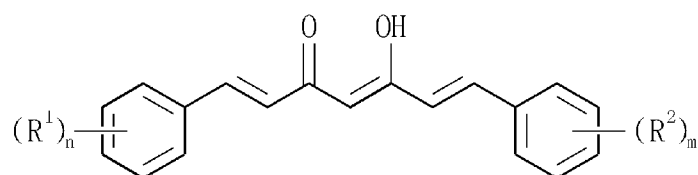


[화학식 4]



- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 스테비오사이드는 스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni)로부터 얻어지는 것이 특징인 복합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 식물 추출물은 울금 추출물인 복합체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 스테비오사이드를 포함하는 식물 추출물은 스테비아 추출물인 복합체.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스인 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 조성물은 경구투여용인 것이 특징인 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 13] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 복합체를 유효성분으로 포함하는, 살바이러스용 의약품 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 복합체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용, 또는 살바이러스용 사료첨가제.
- [청구항 15] 제14항에 기재된 사료첨가제를 함유하는 사료.
- [청구항 16] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는 방법.

[화학식 1]



상기 식에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 수소, 히드록시기, 또는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알콕시기이고, $1 \leq n \leq 5$, $1 \leq m \leq 5$ 이다.

- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 투여는 경구투여인 것이 특징인 방법.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/004672**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/19(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61P 31/16(2006.01)i, A61P 31/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/19; A61K 36/18; A61P 31/16; A61K 36/28; A61K 36/9066; A61P 1/02

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: Curcuma aromatica Salisb., curcumin, stevioside, steviarebaudiana Bertoni, influenza

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y Y	KR 10-2011-0004763 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 14 January 2011 See abstract, claims 1, 11-19 etc.	1,5-8 2-4,9-15
Y Y	JP 2006-008594 A (SATO NAOHIKO) 12 January 2006 See abstract, claims 1, 2 etc.	1,5-8 2-4,9-15
Y	WAKTE, P. S. et al. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa. Separation and Purification Technology. 19 May 2011. Vol. 79, No. 1, pp. 50-55 See abstract, figure 1, table 1 etc.	2-4,9-15
A	JP 2008-280333 (MATSUI YOSHINARI et al.) 20 November 2008 See the entire document.	1-15
A	MANDAL, V. et al. Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. Vol. 46, No. 2, pp. 322-327 See the entire document.	1-15



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

28 DECEMBER 2012 (28.12.2012)

Date of mailing of the international search report

02 JANUARY 2013 (02.01.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/004672

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.: **16,17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 16 and 17 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, or to a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

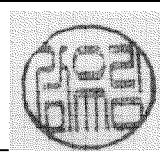
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/004672

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0004763 A	14.01.2011	CN 102573870 A KR 10-2011-0093975 A US 2012-0107429 A1 WO 2011-005043 A2 WO 2011-005043 A3	11.07.2012 19.08.2011 03.05.2012 13.01.2011 13.01.2011
JP 2006-008594 A	12.01.2006	NONE	
JP 2008-280333 A	20.11.2008	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/19(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61P 31/16(2006.01)i, A61P 31/00(2006.01)i																										
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/19; A61K 36/18; A61P 31/16; A61K 36/28; A61K 36/9066; A61P 1/02 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: 울금, 커큐민, 스테비오사이드, 스테비아, 인플루엔자																										
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2011-0004763 A (한국생명공학연구원) 2011. 1. 14.</td> <td>1,5-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>요약, 청구항 1, 11-19 등 참조.</td> <td>2-4,9-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2006-008594 A (SATO NAHIKO) 2006. 1. 12.</td> <td>1,5-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>요약, 청구항 1, 2 등 참조.</td> <td>2-4,9-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WAKTE, P. S. 등. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa. Separation and Purification Technology. 19 May 2011. Vol. 79, No. 1, pp. 50-55 초록, Fig. 1, Table 1 등 참조.</td> <td>2-4,9-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2008-280333 (MATSUI YOSHINARI 등) 2008. 11. 20. 전문 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MANDAL, V. 등. Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. Vol. 46, No. 2, pp. 322-327 전문 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	KR 10-2011-0004763 A (한국생명공학연구원) 2011. 1. 14.	1,5-8	Y	요약, 청구항 1, 11-19 등 참조.	2-4,9-15	Y	JP 2006-008594 A (SATO NAHIKO) 2006. 1. 12.	1,5-8	Y	요약, 청구항 1, 2 등 참조.	2-4,9-15	Y	WAKTE, P. S. 등. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa. Separation and Purification Technology. 19 May 2011. Vol. 79, No. 1, pp. 50-55 초록, Fig. 1, Table 1 등 참조.	2-4,9-15	A	JP 2008-280333 (MATSUI YOSHINARI 등) 2008. 11. 20. 전문 참조.	1-15	A	MANDAL, V. 등. Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. Vol. 46, No. 2, pp. 322-327 전문 참조.	1-15
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																								
Y	KR 10-2011-0004763 A (한국생명공학연구원) 2011. 1. 14.	1,5-8																								
Y	요약, 청구항 1, 11-19 등 참조.	2-4,9-15																								
Y	JP 2006-008594 A (SATO NAHIKO) 2006. 1. 12.	1,5-8																								
Y	요약, 청구항 1, 2 등 참조.	2-4,9-15																								
Y	WAKTE, P. S. 등. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa. Separation and Purification Technology. 19 May 2011. Vol. 79, No. 1, pp. 50-55 초록, Fig. 1, Table 1 등 참조.	2-4,9-15																								
A	JP 2008-280333 (MATSUI YOSHINARI 등) 2008. 11. 20. 전문 참조.	1-15																								
A	MANDAL, V. 등. Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. Vol. 46, No. 2, pp. 322-327 전문 참조.	1-15																								
☐ 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 “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 2012년 12월 28일 (28.12.2012)		국제조사보고서 발송일 2013년 01월 02일 (02.01.2013)																								
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 감유림 전화번호 82-42-481-8741 																								

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: 16,17
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제16항, 제17항은 수술 또는 치료에 의한 인체의 치료 및 진단방법에 관한 것이므로 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당하는 것으로 인정됩니다[PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)].
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0004763 A	2011.01.14	CN 102573870 A KR 10-2011-0093975 A US 2012-0107429 A1 WO 2011-005043 A2 WO 2011-005043 A3	2012.07.11 2011.08.19 2012.05.03 2011.01.13 2011.01.13
JP 2006-008594 A	2006.01.12	없음	
JP 2008-280333 A	2008.11.20	없음	