(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2010 년 6 월 10 일 (10.06.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/064790 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/357 (2006.01) *A61P 31/18* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2009/006213

(22) 국제출원일: 2009 년 10 월 27 일 (27.10.2009)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2008-0120582 2008 년 12 월 1 일 (01.12.2008) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **부경대학교 산학협력단 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 부산 남구 용당동 산 100 번지 부경대학교내, 608-739 Busan (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김세권 (KIM, Se-Kwon)** [KR/KR]; 부산 동래구 사직 2 동 쌍용에가아파트 125-1402 호, 607-786 Busan (KR). **김문무 (KIM, Moon-Moo)** [KR/KR]; 부산 수영구 민락동 진로비취아파트 101-206 호, 613-769 Busan (KR).

(74) 대리인: **이덕록 (LEE, Duck-Rog)**; 서울 강남구 역삼 1 동 669-17 예일패트빌딩 예일국제특허법률사무소, 135-915 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

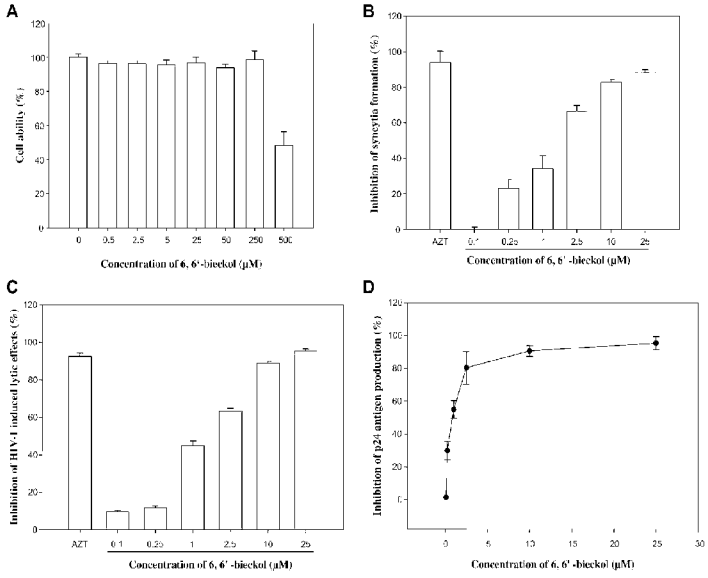
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,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

(54) **Title**: ECKLONIA CAVA-DERIVED PHLOROGLUCINOL DERIVATIVES HAVING INHIBITORY ACTIVITIES AGAINST HIV-1

(54) **발명의 명칭** : 항-HIV-1 저해 활성을 갖는 감태 유래 플로로글루시놀 유도체

[Fig. 1]



(57) **Abstract**: The present invention relates to Ecklonia cava-derived phloroglucinol derivatives having inhibitory activities against HIV-1, and to pharmaceutical compositions and to functional health foods having inhibitory activities against HIV-1 which contain said Ecklonia cava-derived phloroglucinol derivatives as active ingredients. According to the present invention, the Ecklonia cava extracts and 6,6'-bieckol, which is a phloroglucinol derivative derived from the Ecklonia cava extracts, exhibit no cytotoxicities as compared to other tannins, inhibit syncytia formation which might cause HIV-1, inhibit p24 antigen production, and inhibit activities of HIV-1 reverse transcriptase.

(57) **요약서**: 본 발명은 항-HIV-1 저해 활성을 갖는 감태 유래 플로로글루시놀 유도체 및 이를 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명에 따른 감태 추출물 및 그로부터 유래한 플로로글루시놀 유도체인 6,6'-비엑콜은 다른 탄닌에 비해 세포독성 효과를 나타내지 않으며, HIV-1 유발 세포융합체 형성을 저해하고, p24 항원 생산을 저해할 뿐만 아니라 HIV-1 역전사효소 활성을 저해하는 효과가 있다.

WO 2010/064790 A1

명세서

항-ＨＩＶ-1 저해 활성을 갖는 감태 유래 플로로글루시놀 유도체

기술분야

[1] 본 발명은 항-HIV-1 저해 활성을 갖는 감태 유래 플로로글루시놀 유도체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 감태 유래 플로로글루시놀 유도체인 6,6'-비엑콜을 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[2] 제1형 인간 면역결핍 바이러스(Human immunodeficiency virus type-1; HIV-1)은 지금까지 약 3천 3백만명 이상이 감염된 가장 중요한 질환 중 하나인 후천성면역결핍증(AIDS)의 감염인자이다. 2007년도에, 2백 10만명이 AIDS 관련 질환으로 사망하였으며, 2백 50만명의 새로운 HIV 감염자가 발생하였다. UNAIDS의 추정에 따르면, 매일 6800명이 새롭게 HIV에 감염되며, 5700명이 AIDS 및 관련 질환으로 사망한다. 그러나 바이러스가 면역 시스템을 파괴시키는 경로는 충분히 밝혀지지 않았다.

[3] 1980년대 초기에 AIDS가 알려진 이후로, 제1 세대 항-HIV 약물이 AIDS 환자 치료를 위한 유망한 제제로서 개발된 바 있다. 그러나 약물-내성 바이러스 균주의 발생으로 인해 HIV 감염 환자의 50% 이상이 항-AIDS 치료에 실패한 것으로 나타났다. 이러한 사실로부터 현재 항레트로바이러스 요법에 사용되는 약물에 내성이 있는 것들을 포함한 바이러스 HIV 균주에 대해 보다 높은 저해 활성을 나타내는 강력한 후보물질에 대한 요구가 증대되고 있다.

[4] 최근 들어 합리적인 약물 디자인에 있어 유의적인 진보가 있었으며, 고도로 활성인 화합물을 합성할 수 있었다. 그러나 천연 발생 산물이 생활성 선도 화합물뿐만 아니라 이들의 유도체에 대한 여전히 가장 풍부한 공급원으로 알려져 있다. 이에 따라, 천연 산물이 보다 효과적이면서도 보다 적은 부작용으로 신세대 항-HIV 약물 개발을 위한 주요 공급원이다.

[5] 지금까지, 천연 공급원으로부터 분리된 다양한 화합물이 유의적인 항-HIV 활성을 나타내는 것으로 밝혀진 바 있다. HIV에 의해 야기된 바이러스성 감염에 대한 항바이러스 약물 개발을 위한 중요한 전례로서 연구 및 발표뿐만 아니라 천연 산물-유래 물질의 조절된 임상연구로부터 유력한 증거들이 나타났다. HIV를 그의 생활사의 다양한 단계 동안 저해하는 식물 유래 다양한 화합물들, 예를 들어 알칼로이드, 쿠마린, 탄수화물, 플라보노이드, 리그난, 페놀화합물, 퀴닌, 인지질, 테르펜 및 탄닌들이 발견되었다. 전통 의약 공급원으로서 수백년 동안 사용되어진 것으로 알려진 지상 천연 산물과는 달리, 해양 천연 산물에 대한 중요한 연구가 지난 세기 중반부터 시작되었다.

[6] 지구의 70% 이상을 해양이 차지하고 있기 때문에, 해양은 신규한 치료 제제의

발견을 위한 거대한 저장고의 표본이다. 이런 커다란 잠재력으로 인하여, 천연 산물 연구가 해양 천연 산물로 점진적으로 전환되고 있으며, 현재 이들 중 몇몇은 임상 또는 전임상 평가 상태에 있다. 해양 유기체는 항-HIV 천연 산물의 공급원들 중 선도적 위치를 차지하고 있다. 시아노박테리아 유래 11-kDa 단백질인 시아노비린-N(cyanovirin-N)이 연구된 바 있으며, 이들은 gp120에 대한 높은 친화력을 통해 HIV를 비가역적으로 불활성화시킨다는 사실이 밝혀졌다. 다양한 황산화 다당류는 바이러스 도입 단계에서 대부분이 높은 HIV 저해 활성을 가지며, 해양 조류로부터 분리되었다. 덱스트란 설페이트, 카라기난, 갈락탄 설페이트 및 자일로만난이 항-HIV 활성을 갖는 해양-기재 화합물들 중 선도적 위치를 차지하고 있다.

[7] 탄닌은 자연발생적인 수용성 폴리페놀 화합물로서, HIV-1 RT의 폴리메라아제 및 리보뉴클레아제 활성을 저해함으로써 HIV-1 저해 작용 방식을 나타내는 것으로 여겨지고 있다. 갈로탄닌, 제라늄 및 코릴라긴이 MT-1 세포에서 HIV-1 복제를 저해하였다. 제라닌인 바이러스 도입을 효과적으로 차단하였고, IC_{50} 1.9 μM에서 HIV-1의 RT 활성을 저해하였다. 탄틴 유도체인 1,3,4-트리-O-갈로일퀸산(1,3,4-tri-O-galloylquinic acid) 및 3,5-디-O-갈로일쉬킴산(3,5-di-O-galloylshikimic acid)이 비리온에 단단히 결합하여 이들을 불활성화시켜 바이러스-세포 상호작용을 저해하였고, 감염을 예방하였다. 플로로탄닌은 몇 가지 플로로글루시놀 단위가 다양한 방식으로 서로 결합되어 구성된 탄닌 유도체로서 대부분 홍조류 및 갈조류에서 분리된다. 플로로탄닌은 항산화, 항염증, 항균 및 항-MMP 활성을 갖는다고 보고되었다. 안 등(Ahn et al.)은 플로로글루시놀 유도체인 8,8'-비엑콜 및 8',4'''-디엑콜이 HIV-1의 재조합 RT 및 프로테아제를 in vitro에서 저해하였다고 주장하였다.

[8] 해양 조류 유래 생활성 천연 산물을 발견해내기 위한 본 발명자들의 계속된 연구의 일부분으로서, 해양 갈조류 감태(*Ecklonia cava*; EC) 유래의 일련의 플로로글루시놀 유도체를 수득하였고, 이들을 물리화학적 및 NMR 분광분석적 방법으로 특징화하였다. 이렇게 분리된 플로로탄닌들 중 몇몇은 HIV-1에 대하여 일반적인 저해 활성을 나타내었다.

[9] 본 발명에서는 플로로글루시놀 유도체인 6,6'-비엑콜의 항-HIV-1 활성을 최초로 보고하였다. 본 발명으로부터 얻어진 결과는 6,6'-비엑콜이 HIV-1 유발 융합체 형성, 세포용해 효과 및 바이러스성 p24 항원 생성을 포함하는 HIV-1의 세포변성 효과를 저해할 뿐만 아니라 이들의 다른 생물학적 특성에 부가하여 RT 효소 저해 및 HIV-1 도입 활성을 나타내었음을 지시하였다. 더욱이 대부분의 다른 탄닌들과 달리 6,6'-비엑콜은 HIV-1 복제를 거의 완전하게 저해하는 농도에서 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 따라서 본 발명의 목적은 감태 유래 플로로글루시놀 유도체의 신규한 항-HIV-1 저해 활성 용도를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 플로로글루시놀 유도체를 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

[12] 상기와 같은 본 발명의 목적은 감태(EC)로부터 플로로글루시놀 유도체의 추출 및 정제하고, 이를 이용하여 H9 및 H9/HIV-1IIIB 세포주를 처리하고, 이들의 세포융합체 형성의 저해와 HIV-1의 세포용리 효과 저해 효과를 확인함으로써 달성되었다.

[13]

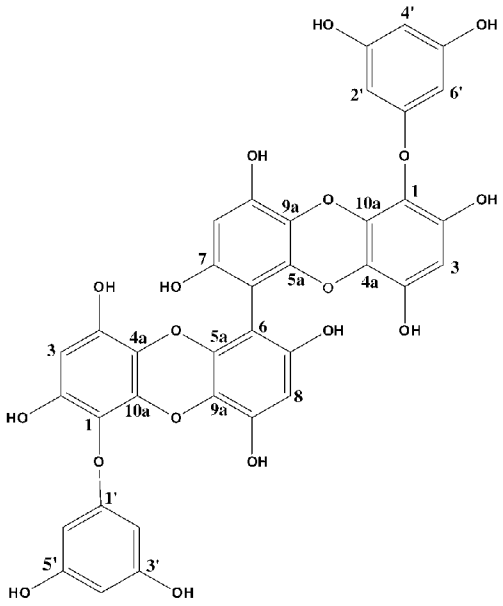
[14] 본 발명은 감태(*Ecklonia cava*; EC) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 약학 조성물을 제공한다.

[15] 본 발명에 따른 감태(EC) 추출물은 바람직하게는 EtOAc 추출물이다.

[16] 또한 본 발명은 감태 유래 플로로글루시놀 유도체를 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 약학 조성물을 제공한다.

[17] 본 발명에 따른 감태 유래 플로로글루시놀 유도체는 바람직하게는 6,6'-비엑콜이다.

[18] <화학식 1>

[19] 

[20]

[21] 본 발명에 있어서, "유효성분"이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[22] 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[23] 본 발명의 약학 조성물의 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[24] 또한, 감태(*Ecklonia cava*; EC) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 건강기능식품을 제공한다.

[25] 본 발명에 따른 감태(EC) 추출물은 바람직하게는 EtOAc 추출물이다.

[26] 또한 본 발명은 감태 유래 플로로글루시놀 유도체를 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 건강기능식품을 제공한다.

[27] 본 발명에 따른 감태 유래 플로로글루시놀 유도체는 바람직하게는 상기 화학식 1의 6,6‘-비엑콜이다.

[28] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[29] 본 발명의 항-HIV-1 저해 활성 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.

[30] 또한, 항-HIV-1 저해 활성을 위한 목적으로 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

[31] 본 발명에 따른 감태 추출물의 제조에 있어서, 감태 분말로 메탄올 추출물을 제조하고, 이를 물에 현탁시켜, n-헥산, CH_2Cl_2, EtOAc 및 n-BuOH으로 차례로 분획하였다. EtOAc 분획이 H9 및 H9/HIV-1IIIB 인간 세포에 대해 가장 강력한 항-HIV 활성을 나타내었다. 상기 EtOAc 분획을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 처리하여 10 개의 분획(F110)을 수득하고, 이들 중 최고의 항-HIV 활성을 갖는 F5 분획을 정제하여 플로로글루시놀 유도체인 화학식 1 화합물(102.85 mg)을 수득하였다. 화학식 1 화합물의 분자식은 $C_{36}H_{22}O_{18}$이다. 상기 화합물의 물리화학적 데이터를 종래 문헌의 수치들과 비교하여 6,6‘-비엑콜로 정해하였다.

[32] 본 발명에 따른 감태 유래 플로로글루시놀 유도체인 6,6‘-비엑콜에 대한 항-HIV-1 활성을 분석한 결과, 용량의존적 방식으로 HIV-1 유발 융합체 형성을 저해하였고, 바이러스의 세포용해 효과로부터 세포를 보호하였으며, 세포 배양액 상청액 유래 HIV-1 RT 효소를 강력하게 저해하였고, HIV-1의 도입을 저해하였다. 세포바이러스(도 1B 참조) 및 세포-세포 융합(도 3A 참조)을 저해하였다.

[33] 또한 본 발명에 따른 6,6'-비엑콜은 CEM-SS 및 C8166 세포에 대해 HIV-1의 세포변성 효과를 저해할 뿐만 아니라 HIV-1 역전사효소 활성을 in vitro에서 저해하였고, HIV-1 유발 세포융합체 형성을 저해하였으며, p24 항원 생산을 저해하였다

[34] 또한 본 발명에 따른 6,6'-비엑콜은 역전사효소의 활성을 저해함으로써 배양액

상청액 및 세포에서 용량-의존적 방식으로 p24 항원 생산을 저해하였다(도 2A 및 B 참조).

[35] 결론적으로, 6,6'-비엑콜은 유의적인 HIV-1 복제 및 역전사효소 해 활성을 갖는 신규하고 안전한 천연 유래 화합물이다. 본 발명에서는 6,6'-비엑콜이 특정한 구조를 갖는 신규한 HIV-1 RT 저해제의 디자인을 위한 유망한 후보군일 수 있다고 제안한다.

[36]

유리한 효과

[37] 상기한 바와 같이 본 발명에 따른 감태 추출물 및 그로부터 유래한 플로로글루시놀 유도체인 6,6'-비엑콜은 다른 탄닌에 비해 세포독성 효과를 나타내지 않으며, HIV-1 유발 세포융합체 형성을 저해하고, p24 항원 생산을 저해할 뿐만 아니라 HIV-1 역전사효소 활성을 저해하는 효과가 있다.

[38]

도면의 간단한 설명

[39] 도 1은 본 발명에 따른 6,6'-비엑콜의 세포독성 및 HIV-1 저해 활성을 나타낸 그래프이다.

[40] 도 2는 HIV-1 감염 세포에서 바이러스성 p24 단백질 생산에 대한 6,6'-비엑콜의 효과를 나타낸 도이다.

[41] 도 3은 HIV-1 도입 및 HIV-1 RT 활성의 저해에 대한 6,6'-비엑콜의 효과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

[42] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[43]

[44] 실시예

[45] ^{1}H NMR (400 MHz) 및 ^{13}C NMR (100 MHz) 스펙트럼은 내부 참조 표준으로서 DMSO-d6 용매 피크(^{1}H NMR에서 d 2.50 ppm 및 ^{13}C NMR에서 d 39.5 ppm)를 이용하는 JEOL JNM-ECP 400 NMR 분광계(JEOL, Japan)에 기록하였다. 몇몇 신호에 대해서는 소수점 셋째 자리까지 나타내었다. 이는 매우 근사한 값의 신호들을 서로 구분하기 위한 것이나, 그럼에도 불구하고 스펙트럼의 시각적 관찰에 의해서도 명확히 구분할 수 있을 것이다. MS 스펙트럼은 JEOL JMS-700 분관계(JEOL, Japan)로 얻었다. EC의 추출은 추출 유닛(Extraction Unit; Dongwon Scientific Co., Korea)을 이용하여 수행하였다. 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔 60 (230-400 mesh, Merck, Germany), Sephadex LH-20 (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 수행하였다. TLC은 예비코팅된 머크 키젤겔(precoated Merck Kieselgel) 60 F254 플레이트(0.25 mm) 상에서 구동하였고, TLC 플레이트 상의 스팟을 전개 용매 시스템으로 $CHCl_3$/MeOH/H_2O/아세트산 (65:25:4:3, v/v)을

이용하는 UV 램프 (254 and 365 nm) 하에서 검출하고, 바닐린-V H_2SO_4를 페놀 화합물 검출제로서 이용하였다. 컬럼 크로마토그레피용 모든 용매는 상업적으로 입수한 시약 등급의 것들을 이용하였다.

[46] AZT, 덱스트란 설페이트 및 폴리에틸렌 글리콜(Mw 8000 Da)은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 웨스턴 블롯용 제1 및 제2 항체는 산타크루즈 바이오테크놀로지(SantaCruz Biotechnology; CA, USA)에서 구입하였다. HIV-1 p24 항원 캡춰 ELISA 키트는 퍼킨-엘머 라이프 사이언스(Perkin-ElMer Life Sciences; Boston, MA, USA)에서 입수하였다. 역전사효소 활성 분석 키트는 인비트로젠(InvitroGen; CA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양 배지(RPMI 1640), 페니실린/스트렙토마이신, 우태아혈청(FBS), 및 다른 세포 배양용 재료들은 깁코 BRL 라티프 테크놀로지(Gibco BRL, Life Technology; NY, USA) 및 시그마 케미칼사로부터 입수하였다.

[47] 모든 실험은 3 회 이상 실시하였고, 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

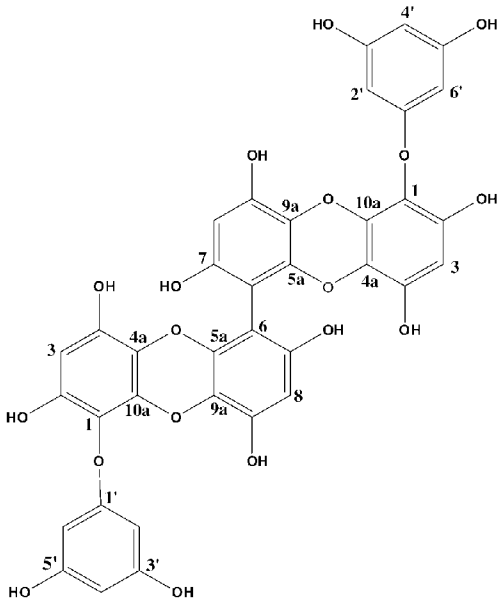
[48]

[49] **실시예 1 : 감태(EC)로부터 플로로글루시놀 유도체의 추출 및 정제**

[50] 해양 식용 갈조류인 EC를 대한민국 제주도 해안에서 2004년 10월부터 2005년 5월까지 수집하였다. 신선한 EC를 물로 3회 세척하여 염분을 제거하였다. 동결건조된 EC를 분말로 분쇄한 후 추출에 사용하였다. 건조된 EC 분말(10 kg)을 MeOH (35 L)을 이용하는 교반 추출 유니트로 10일 동안 추출하였다. 수득한 메탄올 추출물(273 g)을 물에 현탁시키고, n-헥산(35.92 g), CH_2Cl_2 (20.49 g), EtOAc (24.87 g) 및 n-BuOH(106 g)으로 차례로 분획하였다. EtOAc 분획(24.87 g)이 H9 및 H9/HIV-1IIIB 인간 세포에 대해 가장 강력한 항-HIV 활성을 나타내었고, 이를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 처리하고, 헥산/EtOAc/MeOH의 용매 구배 시스템으로 용리시켜 10 개의 분획(F110)을 수득하였다. 최고의 항-HIV 활성을 갖는 F5 분획(378.39 mg)을 MeOH 만을 사용하는 세파덱스 LH-20으로 추가 정제하여 플로로글루시놀 유도체인 화학식 1 화합물(102.85 mg)을 수득하였다.

[51] <화학식 1>

[52]



[53] 화학식 1 화합물의 분자식은 LREIMS, ^{1}H, ^{13}C, and ^{13}C DEPT 스펙트럼 데이터로부터 $C_{36}H_{22}O_{18}$로 측정되었다.

[54] 화학식 1 화합물의 ^{1}H NMR 스펙트럼은 5.75 (2H, J = 2.2 Hz), 및 5.80 (1H, J = 2.2 Hz)에서 두 개의 AB_2 시스템 및 d6.05 (2H, s) and 6.09 (2H, s)에서 두 개의 단일선 신호 뿐만 아니라 각각 d 9.29 (2H, s), 9.16 (4H,s), 9.15 (2H, s), 9.09 (2H, s), and 8.65 (2H,s)에서 12개의 페놀 OH 양성자를 나타내었다.

[55] ^{13}C NMR 스펙트럼은 10개의 비치환 및 24개의 O-보유 방향족 탄소 뿐만 아니라 두 개의 4급 방향족 탄소 신호를 나타내었다. 화학식 1 화합물의 분자량은 직접 결합에 기인한 두 개의 양성자 손실을 제외하고 단지 두 개의 플로로글루시놀 단위 차이로 인하여 비엑콜 보다 2 배 이상이었다.(742 vs 372). 상기에 기술한 이러한 데이터는 화학식 1 화합물이 여섯 개의 플로로글루시놀 단위로 구성되었음을 명확히 지시하는 것이다. 상기의 데이터 및 종래 문헌의 수치들과의 정확한 비교를 통하여, 화학식 1 화합물은 6,6‘-비엑콜로 정해졌다. 6,6’-비엑콜과 8,8‘-비엑콜 사이의 C-8에서 ^{13}C 화학 이동 값의 차이 6.4 ppm이 각각의 유사한 플로로탄닌을 명확히 구분시켜 준다.

[56] 화학식 1 화합물 : 엷은 갈색 분말(동결건조) ; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.29 (1H, s, OH-9), 9.16 (2H, s, OH-3‘, 5’), 9.15 (1H, s, OH-2), 9.09 (1H, s, OH-4), 8.65 (1H, s, OH-7), 6.09 (1H, s, H-3), 6.05 (1H, s, H-8), 5.80 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-4‘), 5.75 (2H, d, J = 2.2 Hz, H-2’, 6‘); ^{13}C NMR (DMSO-d6, 100 MHz) δ 123.5 (s, C-1)), 145.4 (s, C-2), 97.7(d, C-3), 141.4(s, C-4) 121.9(s, C-4a), 141.3(s, C-5a), 99.7 (d, C-6), 151.3 (s, C-7), 97.8 (d, C-8), 144.5 (s, C-9), 122.7 (s, C-9a), 137.2 (s, C-10a), 160.4 (s, C-1’), 93.7 (d, C-2‘), 158.8 (s, C-3’), 96.1 (d, C-4‘), 158.8 (s, C-5’), 93.7 (d, C-6‘); LREIMS m/z 742.10 [M]+.

[57]

[58] **실시예 2 : 세포 생존력 분석**

[59] H9 및 H9/HIV-1IIIB 세포주를 ATCC(American Type of Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. Dr. P. Nara 유래 CEM-SS 세포주와 Dr. G. Farrar 유래 C8166 세포주는 EU Programme EVA Centre for AIDS Reagents, NIBSC, UK에서 제공받았다. CEM-SS, C8166, H9 및 H9/HIV-1IIIB 세포주를 10% FBS, 100 μg/mL의 스트렙토마이신 및 100 U/mL의 페니실린이 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. HIV-1IIIB 바이러스 스톡을 만성 감염 H9/HIV-1IIIB 세로의 배양액 상청액에서 수득하였다. 무세포 바이러스를 원심분리 및 0.22 μM 필터를 통한 여과에 의해 상청액으로부터 배양하였다. 바이러스 스톡을 80℃로 사용 전까지 소량 분취액으로 저장하였다.

[60] 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT)의 감소율을 기준으로 하는 방법인 MTT 분석법으로 6,6'-비엑콜의 세포독성 농도를 측정하였다. CEM-SS 또는 H9 세포를 함유한 배지 400 μL를 48-웰 플레이트에서 10^5 cells/mL 밀도로 배양하였다. 플레이트를 밤새 배양하고, 6,6'-디엑콜이 존재/부재하는 RPMI 1640 배지 100μL로 처리하였다. 72 시간 배양한 후, 500 μg/mL MTT 100 μL를 각 웰에 가하고, 플레이트를 37℃에서 추가로 4 시간 동안 배양하였다. 블루 포르마잔을 50% DMSO 및 4% Triton X-100을 함유한 산성화된 프로판올에 용해시켰다. 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 비처리 세포에 의해 형성된 프로마단의 광학 밀도를 생존력 100%로서 취하였다.

[61]

[62] **실시예 3 : 항-HIV 활성의 측정**

[63] **실시예 3-1 : 세포융합체 형성의 저해**

[64] 300μL의 분취액 중 1 X 10^5 C8166 세포를 완전 배지 중 화합물의 연속 희석액 100 μL를 함유한 48-웰 플레이트에 3배 식재하였다. 배양 2 시간 후, 세포를 완전 배지에서 200 $CCID_{50}$로 희석된 HIV-1IIIB의 스톡 상청액 100μL로 감염시켰다. 플레이트들을 37℃에서 72 시간 동안 배양하고, 세포융합체의 수를 현미경으로 측정하였다.

[65]

[66] **실시예 3-2 : HIV-1의 세포용리 효과 저해**

[67] 급성 감염 CEM-SS 세포에 대한 6,6'-비엑콜의 항-HIV-1 활성을 측정하기 위해, MTT-포르마잔-기준 분석법을 이용하였다. 대수-생장(log-growth) 상태의 세포를 세척하고 완전 배지에 재현탁하고, 1 X 10^5 세포 함유 분취액 300 μL를 100 μL 부피의 배지중의 화합물 희석액을 함유한 48-웰 플레이트의 웰에 세 번에 걸쳐 가하였다. HIV-1IIIB의 스톡 상청액을 완전 배지에 희석하여 충분한 세포변성(7일 동안 90%의 세포가 사멸함)을 얻고, 분취액 100 μL를 웰에 가하였다. 플레이트를 37℃에서 7일 동안 배양하고, 7일째에 하기에 기술한 MTT 방법으로 세포 생존력을 측정하였다.

[68]

[69] **실시예 4 : 웨스턴 블롯 분석**

[70] 1 X 10^6 cells/mL H9 세포를 세포 배양 플레이트에서 배양하였다. 플레이트를 시료로 처리한 후, 2 시간 동안 배양하고 200 $CCID_{50}$에서 HIV-1_{IIIB}로 감염시켰다. 37℃에서 96 시간 동아 배양한 후, 세포를 10 분동안 1,000 rpm에서 펠릿화시키고, 상청액을 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척하고, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 mM 페닐메틸술포닐 플루오라이드, 80 μg/mL 류펩틴, 3 mM NaF, 및 1 mM DTT를 함유한 용리 완충액 500μL로 용리시켰다. 총 단백질 100 μg을 면역점적 분석에 이용하였다.

[71] 바이러스를 함유한 배양액 상청액을 0.22 μM 필터를 통해 여과하고, 0.4 M NaCl을 함유한 30% 폴리에틸렌 글리콜(PEG) (50% v/v)과 혼합하고, 바이러스 입자를 15,000 rpm에서 45 분 동안 펠릿화시켰다. 바이러스 펠릿을 용리시키고, SDS 시료 완충액에 재현탁시키고, 동비의 바이러스 용리액(20 μL)을 SDS 겔에 적재하였다. 단백질을 25 mM Tris, 192 mM 글리신, 4% 스택킹된 0.1% SDS 및10% 분리겔 중의 SDS-AGE로 변성시켰다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인 상으로 이송하고, 0.1% (v/v) Tween 20 (TBS-T) 및 5% 탈지유 분말을 함유한 트리스 완충 함수에 블록킹시켰다. 멤브레인은 마우스 항-p24 모노클로날 항체(1:500, SantaCruz) 및 양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)-공액화 항-마우스 IgE 2차 항체(1:5000, SantaCruz)를 주입하였다. 단백질을 화학발광기(chemiluminescence; FujifiμM Life Science, Tokyo, Japan)로 시각화하였다.

[72]

[73] **실시예 5 : 역전사효소 활성 분석**

[74] 바이러스 용리액 중의 HIV-1 역전사효소의 활성을 형광 RT 분석 키트(InvitroGen)를 이용하여 평가하였다. 간략하게, 템플릿/프라이머 하이브리드, 폴리(A)/d(T)16, 및 트리포스페이트 기질로서 dTTP를 함유한 반응 혼합물 20 μL을 미세적정 플레이트에 가하고, 다양한 농도의 6,6'-비엑콜을 함유한 바이러스 용리액 5 μL와 혼합하였다. 37℃에서 1 시간 동안 배양한 후, 각 반응에 200 mM EDTA 2 μL를 가하여 반응을 중단시켰다. 단일-가닥 핵산 또는 자유 뉴클레오타이드 위로 dsDNA 또는 DNA-RNA 헤테로듀플렉스(heteroduplexes)와 선택적으로 결합하는 형광 피코그린(PicoGreen)(상표명) 시약 173 μL를 가한 후 제니오스마이크로플레이트 리더기(GENiosmicroplate reader; Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 480 nm(여기) 및 520 nm(방출)에서 형광 강도를 측정하였다.

[75]

[76] **실시예 6 : p24 ELISA**

[77] H9 세포(3 X 10^6 cells/mL)를 37℃에서 1 시간 동안 HIV-1_{IIIB}의 존재 또는 부재 하에 배양하였다. 세포를 세척하여 미결합 바이러스를 제거하고, 배양 배지 중에

3 X 10^5 cells/mL로 재현탁시켰다. 분취액 1 mL를 6,6'-비엑콜 포함 또는 포함하지 않은 동비의 배지를 함유한 24-웰 배양 플레이트에 적재하였다. 양성 대조군으로 AZT를 처리하였다. 배지로부터 방출된 바이러스의 양을 측정하기 위하여, HIV-1 p24 항원 캡춰 ELISA를 상업용 키트(Perkin-EμMer Life Sciences, Boston, MA)로 수행하였다.

[78]

[79] **실시예 7 : 공동배양 분석**

[80] 3 X 10^4 C8166 세포를 다양한 농도의 6,6'-비엑콜로 2 시간 동안 전처리하고, 5% CO_2의 습윤 환경에서 37℃로 HIV-1_{IIIB}로 만성적 감염된 3 X 10^3 H9와 공동배양하였다. 배양 72 시간 후, 형성된 세포융합체를 현미경을 이용하여 계수하였다.

[81]

[82] 상기와 같은 실시예 2 내지 7을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

[83] 6,6'-비엑콜은 500 μM 이하에서 세포독성을 나타내지 않았고, CC_{50} 값은 484 μM로 계산되었다(도 1A 참조). 각각 C8166 및 CEM-SS 세포에 대한 바이러스의 세포융합 및 세포용해 효과를 정량화하여 HIV-1 유발 세포변성 효과를 측정하였다. 6,6'-비엑콜은 용량의존적 방식으로 HIV-1 유발 융합체 형성을 저해하였고, 바이러스의 세포용해 효과로부터 세포를 보호하였다. HIV-1 유발 융합체 형성을 저해에 대한 6,6'-비엑콜의 EC_{50}은 1.72 μM이었다(도 1B 참조). 최고 농도(25 μM)의 6,6'-비엑콜을 사용함으로써, 88%의 세포응집체 형성을 저해하였다. 6,6'-비엑콜이 in vitro에서 HIV-1 유발 세포용해 효과로부터 세포를 보호하였다. 최고 농도(25 μM)의 6,6'-비엑콜에서 감염된 세포의 보호율은 96% 이상이었다(도 1C 참조). 6,6'-비엑콜의 치료 지수(therapeutic index; TI)는 약 393이었다. HIV-1 유발 세포변성 효과의 저해는 p24 항원의 생산과 관련이 있다. HIV-1 p24 항원 생산 저해에 대한 6,6'-비엑콜의 EC_{50}은 1.26 μM이었다 (도 1D 참조).

[84] HIV-1 p24 항원 생산에 대한 6,6'-비엑콜의 저해 효과를 세포 및 배양액 상청액을 웨스턴 블롯 분석하여 추가로 측정하였다(도 2A 참조). 세포 배양액 상청액 유래 HIV-1 RT 효소가 비교적 낮은 농도의 6,6'-비엑콜에 의해 강력하게 저해되었다(1 μM에서 50.46% 저해율). HIV-1 RT 효소 활성의 96.33%가 6,6'-비엑콜 10 μM에 의해 저해되었다(도 1C 참조). 바이러스 또는 HIV 감염 세포와 미감염 타깃 세포의 융합이 HIV 감염의 임계 단계이다. C8166과 HIV-1IIIB로 임상적 감염된 H9 세포를 공동배양하여 얻은 데이터에 따르면, 6,6'-비엑콜이 HIV-1의 도입을 저해하였다. 6,6'-비엑콜은 세포 바이러스(도 1B 참조) 및 세포-세포 융합(도 3A 참조)을 저해하였다. 공동배양 분석의 결과, 최고 농도의 6,6'-비엑콜 처리 시에, 세포융합체 형성의 저해율은 약 80%였다.

[85] 본 발명에서는 6,6'-비엑콜의 항-HIV 활성을 조사하였다. 6,6'-비엑콜은 CEM-SS 및 C8166 세포에 대해 HIV-1의 세포변성 효과를 저해할 뿐만 아니라 HIV-1

역전사효소 활성을 in vitro에서 저해하였다. 플로로글루시놀 유도체들은 대부분 RT와 RNA 템플릿 사이의 상호작용을 차단함으로써 HIV-1 저해 활성을 나타낸다. 이러한 유형의 저해는 몇몇 플라보노이드에서와 유사하다. 킬쿠스키 등(Kilkuskie et al.)은 그들이 시험한 탄닌들 중 대부분이 유효 농도에서 세포독성을 나타냈고, 이는 화합물의 치료지수가 약 1이라는 것을 의미한다고 보고하였다. 이들은 탄닌의 HIV 저해 활성과 RT 저해 활성 사이의 상관관계를 조사하기 위해 갈로탄닌, 엘라기탄닌, 응축 및 복합 탄닌을 포함한 다양한 탄닌의 HIV 복제 및 역전사효소 저해 효과를 평가하였다. 상기 결과는 역전사효소 저해는 HIV 복제 저해와는 관계가 없음을 지시하였다. 도 1B 및 3B에 나타낸 바와 같이, HIV-1 유발 세포변성 효과 및 RT 활성 연구로부터 얻은 데이터는 HIV-1 복제 저해가 역전사효소의 저해와 상관관계가 있음을 지시하였다. 6,6'-비엑콜이 각각 HIV-1 유발 세포변성 효과와 HIV-1 RT 활성을 거의 완전하게 저해하였다. 이러한 데이터는 다른 탄닌들과는 다르게 6,6'-비엑콜이 HIV-1 복제 및 역전사효소 활성을 효과적으로 저해하는 농도에서 비세포독성임을 나타낸다.

[86] HIV-1의 도입 단계는 신세대 약물 후보군을 위한 매력적인 타깃이다. 따라서, HIV-1 도입에 대한 6,6'-비엑콜의 저해 효과를 조사하였다. 노나카 등(Nonaka et al.)은 다양한 탄닌이 아마도 HIV-세포 상호작용을 방해함으로써 HIV의 복제를 저해한다고 주장하였다. C8166 세포와 H9/HIV-1IIIB 세포의 공동배양으로부터 얻어진 데이터의 결과에서와 같이 6,6'-비엑콜은 HIV-1 유발 세포융합체 형성을 저해하였다. 탄닌은 gp41 6-나선 번들 형성을 저해함으로써 HIV-1에 대한 저해 활성을 나타낸다. 그러나 6,6'-비엑콜의 도입 저해 프로파일을 세포변성 효과의 저해와 비교할 때, HIV-1 유발 세포변성 효과가 도입의 억제에 의해 감소될 뿐만 아니라 이어지는 HIV-1 역전사효소 활성의 저해에 의해서도 감소된다고 결론지을 수 있다. p24 항원 생산을 p24 항원 캡춰 ELISA 및 웨스턴 블롯 분석으로 측정하였다. ELISA로부터 얻어진 데이터로 지지되는 10 μM에서 6,6'-비엑콜이 p24 항원 생산을 90% 이상 저해하였다(도 1D 참조). 도 2에 나타낸 바와 같이, 25 μM 농도 6,6‘-비엑콜에서 p24 항원 생산의 저해는 AZT (5 μM)에 필적한다. 6,6'-비엑콜과 구조적으로 유사한 8,8’-비엑콜은 HIV-1 재조합 RT 및 프로테아제 활성을 각각 0.51 μM 및 81.5 μM의 IC_{50}으로 저해하였다. 6,6'-비엑콜의 역전사효소 저해 활성은 8,8'-비엑콜과 일치하였다. 웨스턴 블롯 분석에 따르면, 6,6'-비엑콜이 프로테아제를 저해하지 못함을 지시하는 p24를 제외하고, p55 gag 관련 단백질(p55, p41 및 p24)의 위치에서 무 또는 약한 밴드가 탐지되었다. 그러나 6,6'-비엑콜은 역전사효소의 활성을 저해함으로써 배양액 상청액 및 세포에서 용량-의존적 방식으로 p24 항원 생산을 저해하였다(도 2A 및 B 참조). 일반적으로, 구조적-활성 관계는 디벤조디옥신 결합을 갖는 독특한 골격, 플로로글루시놀의 결합 위치 및 6,6‘-비엑콜에 존재하는 페놀성기에 의존할 것이다.

[87] 결론적으로, 6,6'-비엑콜은 유의적인 HIV-1 복제 및 역전사효소 저해 활성을 갖는 신규하고 안전한 천연 유래 화합물이다. 본 발명에서는 6,6'-비엑콜이 특정한 구조를 갖는 신규한 HIV-1 RT 저해제의 디자인을 위한 유망한 후보군일 수 있다고 제안한다.

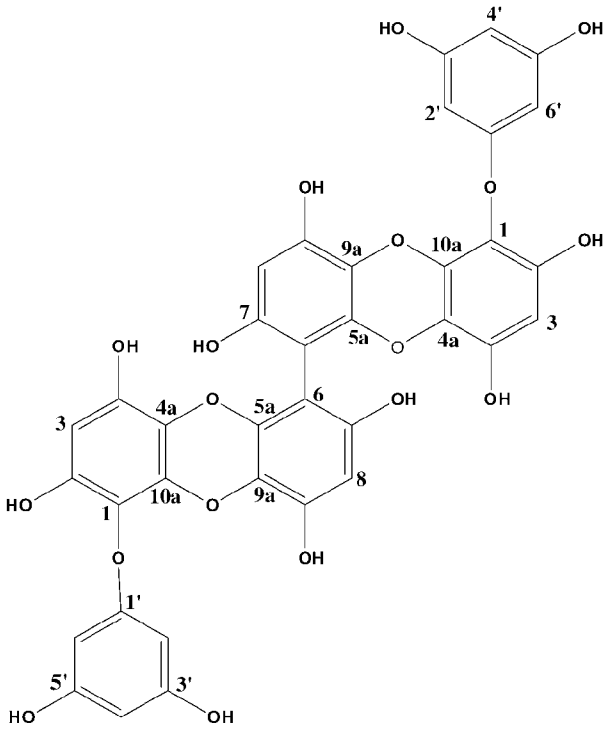
[88]

청구범위

[1] 감태 유래 플로로글루시놀 유도체를 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 약학 조성물.

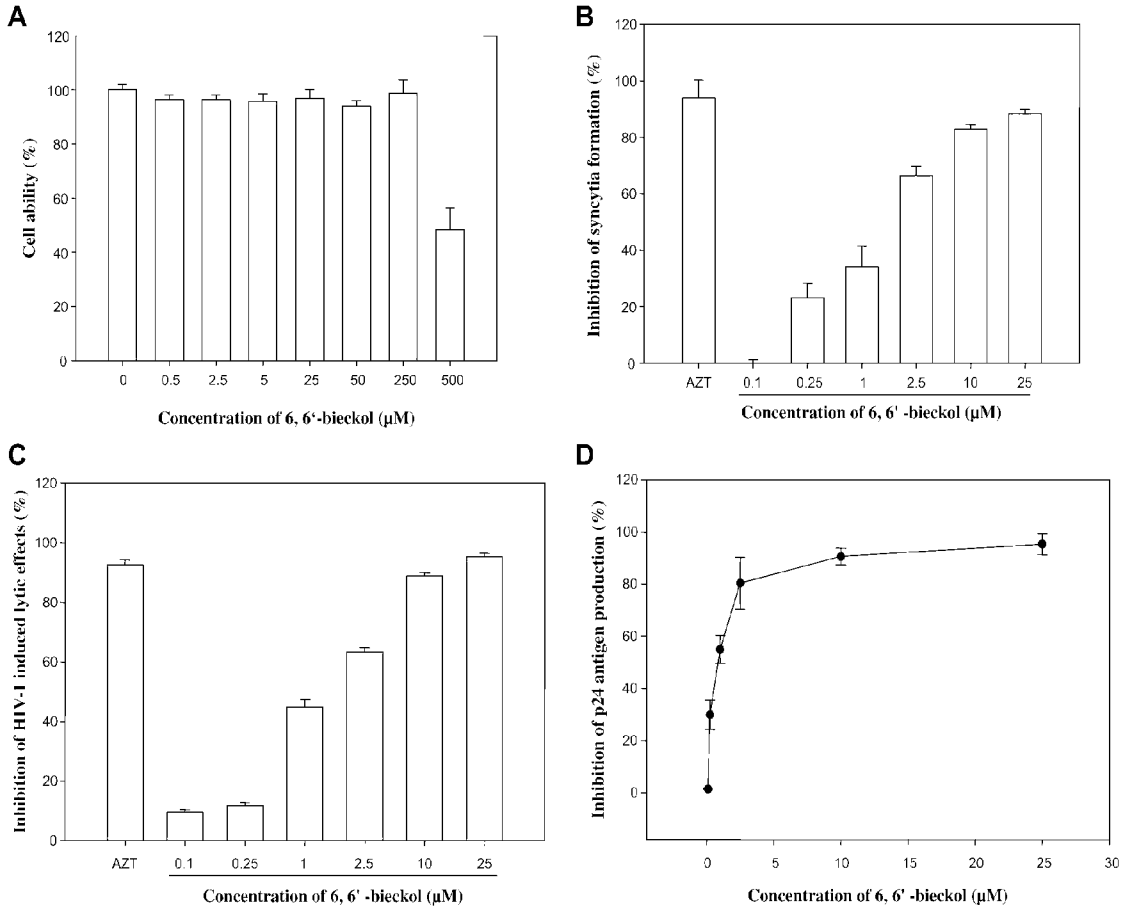
[2] 제1항에 있어서, 상기 플로로글루시놀 유도체가 하기 화학식 1의 6,6'-비엑콜인 것을 특징으로 하는 조성물.

<화학식 1>

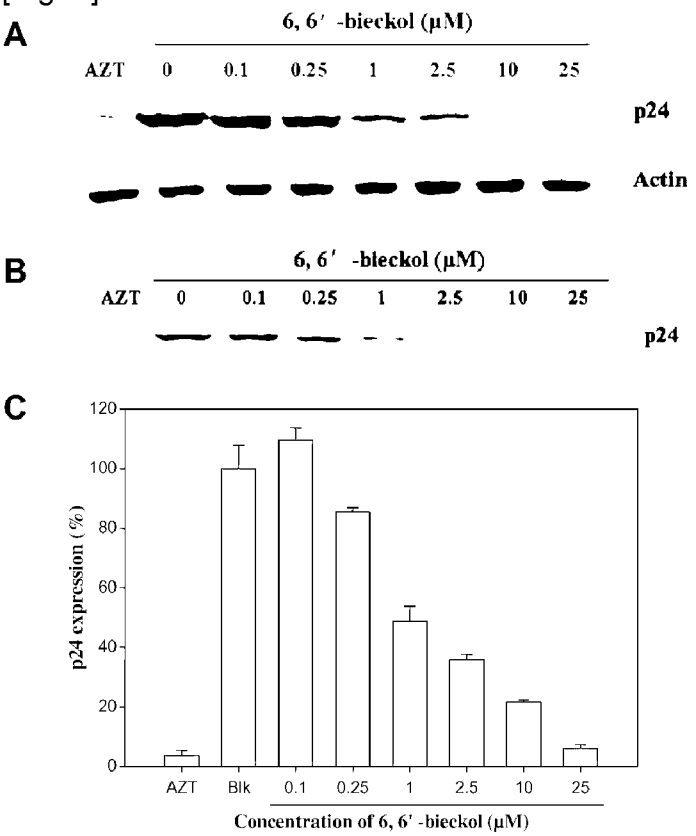


[3] 감태 유래 플로로글루시놀 유도체를 유효성분으로 함유하는 항-HIV-1 저해 활성 건강기능식품.

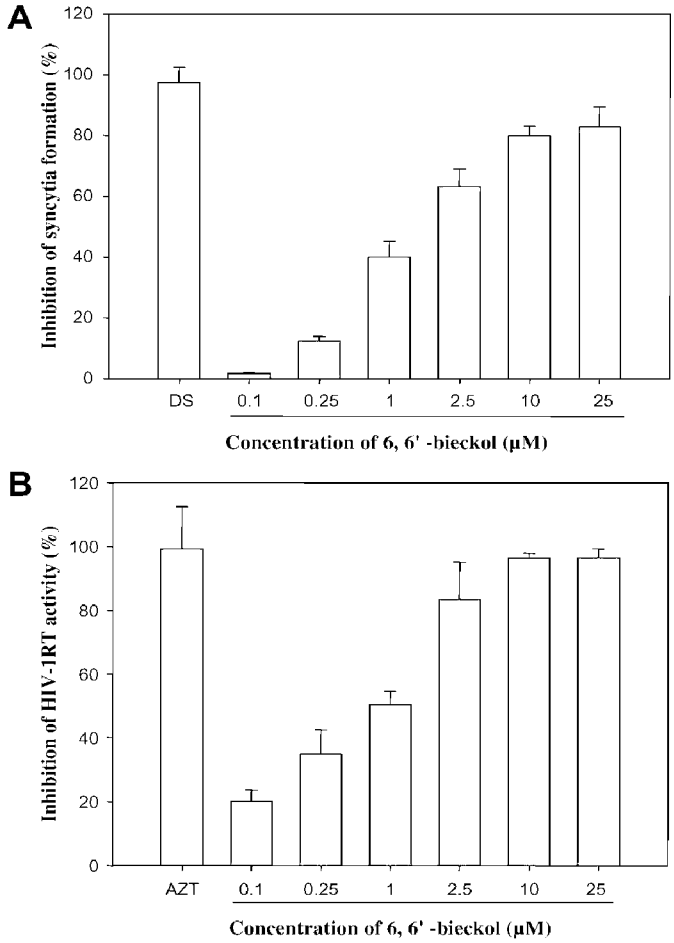
[Fig. 1]


A
Cell ability (%)
Concentration of 6, 6'-bieckol (μM)
B
Inhibition of syncytia formation (%)
AZT
Concentration of 6, 6' -bieckol (μM)
C
Inhibition of HIV-1 induced lytic effects (%)
AZT
Concentration of 6, 6' -bieckol (μM)
D
Inhibition of p24 antigen production (%)
Concentration of 6, 6' -bieckol (μM)

[Fig. 2]


A
6, 6′ -bieckol (μM)
AZT 0 0.1 0.25 1 2.5 10 25
p24
Actin
B
6, 6′ -bieckol (μM)
AZT 0 0.1 0.25 1 2.5 10 25
p24
C
p24 expression (%)
AZT Blk 0.1 0.25 1 2.5 10 25
Concentration of 6, 6' -bieckol (μM)

[Fig. 3]


A
Inhibition of syncytia formation (%)
120
100
80
60
40
20
0
DS
0.1
0.25
1
2.5
10
25
Concentration of 6, 6' -bieckol (μM)
B
Inhibition of HIV-1RT activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
AZT
0.1
0.25
1
2.5
10
25
Concentration of 6, 6' -bieckol (μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2009/006213

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/357(2006.01)i, A61P 31/18(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)

IPC 8 A61K 31/357, A61P 31/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), CAS (online), PUBMED, Google ; phloroglucinol, 6,6 '-bieckol,6,6' -bieckol, anti-HIV

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Murat Artan et al., Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6,60-bieckol, from Ecklonia cava, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, Vol. 16, Issue 17, pages 7921-7926 (noticed online since 2008.07.29) See the entire document	1-3
A	KR 10-2008-0004758 A (COSMAX, CO., LTD.) 10 January 2008 See the entire document	1-3
A	KR 10-2008-0005711 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 15 January 2008 See the entire document	1-3
A	WO 2000-071110 A1 (PROMINDUS) 30 November 2000 See the entire document	1-3

☐ 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	Date of mailing of the international search report
22 JANUARY 2010 (22.01.2010)	**25 JANUARY 2010 (25.01.2010)**
Name and mailing address of the ISA/ 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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2009/006213

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-2008-0004758 A	10.01.2008	NONE	
KR 10-2008-0005711 A	15.01.2008	NONE	
WO 2000-071110 A1	30.11.2000	AU 2000-49294 A1	19.05.2000
		EP 1178787 A1	13.02.2002
		US 06716884 B1	06.04.2004

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2009/006213

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/357(2006.01)i, A61P 31/18(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
IPC 8 A61K 31/357, A61P 31/18

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(KIPO internal), CAS(online), PUBMED, Google ; 플로로글루시놀, phloroglucinol, 6,6‘-비엑콜, 6,6’-bieckol, 항 HIV, anti-HIV

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Murat Artan 외, Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6,60 -bieckol, from Ecklonia cava, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, Vol.16, Issue 17, 7921-7926쪽 (2008.07.29부터 온라인 공지) 전체 문서 참조	1-3
A	KR 10-2008-0004758 A (코스맥스 주식회사) 2008.01.10. 전체 문서 참조	1-3
A	KR 10-2008-0005711 A (부경대학교 산학협력단) 2008.01.15. 전체 문서 참조	1-3
A	WO 2000-071110 A1 (PROMINDUS) 2000.11.30. 전체 문서 참조	1-3

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2010년 01월 22일 (22.01.2010)	**2010년 01월 25일 (25.01.2010)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
김성길
전화번호 82-42-481-5602

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2009/006213

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0004758 A	10.01.2008	없음	
KR 10-2008-0005711 A	15.01.2008	없음	
WO 2000-071110 A1	30.11.2000	AU 2000-49294 A1	19.05.2000
		EP 1178787 A1	13.02.2002
		US 06716884 B1	06.04.2004