

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 2월 5일 (05.02.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/016428 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/352 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/010087
- (22) 국제출원일: 2013년 11월 7일 (07.11.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0091366 2013년 8월 1일 (01.08.2013) KR
- (71) 출원인: 한국기초과학지원연구원 (KOREA BASIC SCIENCE INSTITUTE) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 169-148(어은동), Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 권요셉 (KWON, Joseph); 560-793 전라북도 전주시 완산구 서신동 동아한일아파트 109-505, Jeollabuk-do (KR). 이광식 (LEE, Kwang-Sik); 302-744 대전시 서구 둔산북로 215, 5-1206 (둔산동, 가람아파트), Daejeon (KR). 최중순 (CHOI, Jong-Soon); 305-335 대전시 유성구 농대로 55 E-1 호 (궁동, 대동빌리지), Daejeon (KR). 백근식 (BAIK, Keun Sik); 500-708 광주시 북구 임방울대로 1042 번길 14-1, 106 동 901 호 (신용동, 자이 1 단지 아파트), Gwangju (KR). 황금숙 (HWANG, Geum-Sook); 173-775 서울시 서초구 서초대로 65 길 13-10, 105 동 1102 호 (서초동, 서초래미안 아파트), Seoul (KR). 김두운 (KIM, Duwoon); 500-795 광주시 북구 우치로 537 번길 10 105-103 (일곡동, 동아아파트), Gwangju (KR). 이성훈 (LEE, Sunghoon); 305-729 대전시 유성구 엑스포로 501, 105 동 103 호 (전민동, 청구나래아파트), Daejeon (KR).

(74) 대리인: 김원준 (KIM, Wonjoon); 302-834 대전시 서구 둔산대로 117 번길 66, 골드벤처타워 205 호, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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 4.17 에 의한 선언서:

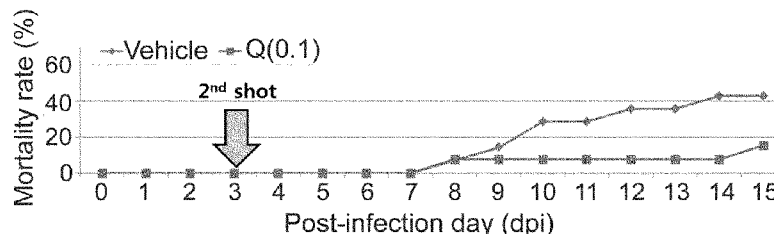
— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ANTIVIRAL COMPOSITION FOR FISH CONTAINING QUERCETIN AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 퀘르세틴을 유효성분으로 하는 어류의 항바이러스 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to an antiviral composition against viral hemorrhagic septicemia virus in fish, the composition containing quercetin as an active ingredient. The composition of the present invention, administered through peritoneal injection, oral administration, or water tank administration, makes possible the prevention or treatment of diseases caused by viral hemorrhagic septicemia virus in fish having a great effect on the mortality rate of cultured fish, thereby contributing greatly to the cost reduction in the fish aquaculture industry and an increase in the added value.

(57) 요약서: 본 발명은 퀘르세틴을 유효성분으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증(Viral Hemorrhagic Septicemia) 바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의한 조성물을 복강주사하거나 경구투여하거나 수조투여함으로써 양식어류의 폐사율에 큰 영향을 미치는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 의한 질환의 예방 또는 치료가 가능하게 되어 궁극적으로 어류 양식산업의 원가절감과 부가가치 증대에 크게 기여할 수 있게 될 것이다.

WO 2015/016428 A1

명세서

발명의 명칭: 퀘르세틴을 유효성분으로 하는 어류의 항바이러스 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 퀘르세틴을 유효성분으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증(Viral Hemorrhagic Septicemia) 바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 다양한 방법으로 적정량의 퀘르세틴을 어류에 투여함으로써 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증의 감염을 예방하거나 감염된 어류를 치료하는 조성물에 관한 것이다.

[2]

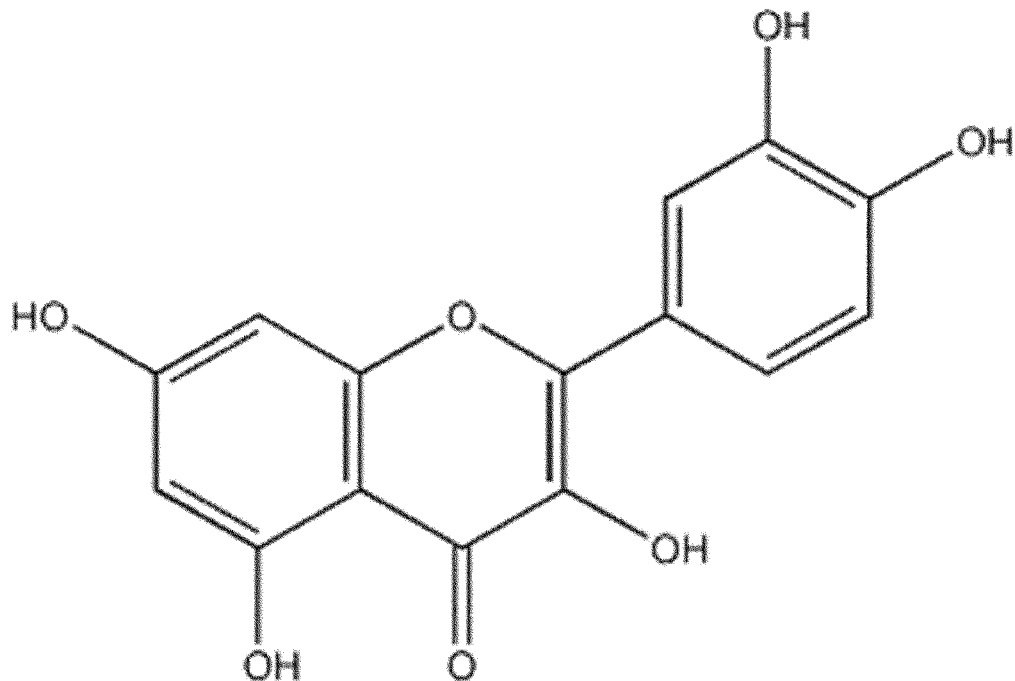
배경기술

- [3] 바이러스성 출혈성 패혈증(Viral Hemorrhagic Septicemia; VHS)은 주로 유럽 지역에서 분포되어 있었으나, 1988년 미국 서부 태평양 연안으로 회유하는 은연어와 왕연어에서 발견된 후, 다양한 해수 어종에서 분리되었다. 근래 일본과 우리나라 자연산 해수어종에서 바이러스성 출혈성 패혈증이 검출되었을 뿐만 아니라 저수온기 동안 양식 넙치에 치명적인 질병을 유발하는 것으로 보고되었다(Takano et al., 2001). 감염이 확인된 어종으로는 넙치, 무지개송어, 대서양 연어, 브라운송어, 은연어, 왕연어, 대구 등이 있다. 우리나라에서도 동해와 남해 수역에서 해수 양식어류 뿐만 아니라 자연산 어류에서도 검출되고 있다. 이러한 출혈성 패혈 바이러스는 유럽의 송어와 우리나라와 일본의 넙치의 중요한 병원체이다.
- [4] VHS 바이러스는 작은 어체뿐 아니라 출하시기의 큰 어체도 폐사를 일으켜 경제적인 손실을 야기하고 있다. 예를 들어, 넙치는 우리나라의 주요 양식어종으로서 생산량은 2008년 기준 약 4만 7,000톤이며 생산금액은 4,083억원으로 전체 양식생산액의 26.8%를 차지하는 중요한 양식품목이다. 그러나 바이러스, 세균 또는 기생충 등에 의한 각종 감염성 질병으로 약 40%가 폐사하여 심각한 경제적 손실을 초래하고 있다. 특히, VHS와 같은 바이러스성 질병은 치어뿐만 아니라 상품가치가 높은 성어에 있어서 대량폐사를 유발하는데, 양식수산물의 질병 및 폐사, 그에 따른 해양오염에 의한 경제적 손실이 연간 약 3,000억 원에 이른다고 보고된다.
- [5] VHS 바이러스는 자외선 처리에도 불활화 되며 chlorine, hypochlorite, iodophore 등과 같은 소독제에도 쉽게 불활화 되므로 양식장에서 기구와 수조를 소독해 주는 것이 효과적인 것으로 알려져 있다. 그러나 다른 바이러스성 질병과 마찬가지로 VHS를 치료하는 화학요법제는 아직까지 개발되어 있지 않다(국립수산과학원, http://fdcc.nfrdi.re.kr/02/01_click.jsp?DSS_CD=IV009).

[6]

- [7] 공개특허 10-2009-0077303는, 넙치의 양식을 위한 수온이 18~22°C로 유지되도록 조절함으로써 넙치의 VHS 바이러스에 의한 감염을 예방하는 방법 및 시스템을 제공하고 있다. 그러나 이 방법은 겨울에 수온유지를 위한 난방비가 과다하게 소요되는 문제가 있다.
- [8] 공개특허 10-2013-0058104는 커큐민(Curcumin)을 유효성분으로 하는 VHS 바이러스에 대한 항바이러스 조성물을 제공한다. 그러나 위 종래기술은 세포수준에서의 항바이러스 활성을 확인한 것이어서 실제 양식개체에서도 원하는 효과를 얻을 수 있을지 확인되지 않았으며, 또한 펠드에서 효과가 있다고 하더라도 커큐민을 대량 입수하기 어렵다는 단점이 있다.
- [9] 약독화(attenuated) 바이러스 백신은 바이러스의 병원성 회복의 위험성과 자연계로의 확산 위험성이 있다. 또한, 출혈성 패혈 바이러스 G 혹은 N 유전자를 삽입한 플라스미드를 근육주사한 DNA백신 실험에서는 강력한 면역반응이 유도되고 폐사율도 경감되었다는 보고가 무지개송어와 넙치에서 보고된 바(Byon et al., 2005) 있으나, 아직까지 실용화되지는 않았다.
- [10]
- [11] 퀘르세틴(Quercetin)은 플라보노이드(항산화작용) 중의 하나로서 적포도주나 양파, 키위, 녹차, 사과, 베리, 배추 속(양배추, 브로콜리, 콜리플라워, 순무 등)에 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다. 퀘르세틴은 중금속 제거, 혈중 콜레스테롤 감소, 고혈압 및 당뇨병 등의 성인병 예방 등 다양한 생리 활성 및 항산화 작용과 항바이러스 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있지만, 실제로는 관상동맥 질환, 뇌졸중, 고혈압, 암 등의 발병률 감소에 미치는 영향에 대한 논문이 몇 편 있을 뿐이다. 특히 VHS 바이러스에 대한 퀘르세틴의 항바이러스성 효과 및 연구에 대한 보고는 전무하다. 퀘르세틴의 화학구조는 다음과 같다.

[12]



- [13] 본 발명자들은 양식어류의 바이러스 감염성 질병에 대해 감염기작과 방어기작을 조사하여 항바이러스 조성물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 퀘르세틴(Quercetin)이 바이러스성 출혈성 패혈증에 대하여 뛰어난 항바이러스 효과를 보임을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명은 어류를 위한 항바이러스 조성물을 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 어류 감염성 바이러스에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [17] 본 발명의 다른 목적은 어류 감염성 바이러스에 의한 질환의 예방 또는 치료를 위한 어류 사료 첨가용 조성물 및 사료를 제공하는데 있다.
- [18] 본 발명의 다른 목적은 항바이러스 조성물을 어류에 급여하는 것을 특징으로 하는 어류에서 어류 감염성 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공하는데 있다.

[19]

과제 해결 수단

- [20] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 퀘르세틴(Quercetin)을 유효성분으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증(Viral Hemorrhagic Septicemia) 바이러스에 대한 항바이러스 조성물인 것을 특징으로 한다.
- [21] '유효성분으로 하는'이란 퀘르세틴의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 하기 실시예에서 확인되었듯이, 퀘르세틴을 과량 투여하여도 동물세포에 독성이 나타나지 않으므로 본 발명의 조성물에 포함된 퀘르세틴의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택할 수 있다.
- [22] 본 발명에서 상기 퀘르세틴은 합성되거나(synthesized), 순수분리되거나(isolated) 식물체로부터 추출되거나(extracted) 또는 분획된(fractionalized) 것일 수 있는데, 가능하면 퀘르세틴(Quercetin)을 포함하는 천연 추출물, 바람직하게는 양파추출물 또는 양파 분획물을 포함한다.
- [23]
- [24] 본 발명의 조성물은 출혈성 패혈 바이러스의 숙주가 될 수 있는 모든 어종에 적용될 수 있다. 예를 들면, 자연산 또는 양식되는 넙치, 망어, 참돔, 자주복, 부시리, 송어, 갯망어, 전갱이, 능성어, 참다랑어, 잉어, 제브라피쉬, 메기, 틸라피아, 연어, 송사리 또는 새우 등을 대상으로 할 수 있을 것이다. 하기 실시예에서 실제 생체 테스트는 넙치를 대상으로 이루어졌지만, 퀘르세틴이 출혈성 패혈 바이러스의 복제를 저해하고 출혈성 패혈 바이러스에 감염된 세포의 생존률을 증가시키는 것을 확인한 다른 실시예를 함께 검토할 때, 본 발명의 조성물이 출혈성 패혈 바이러스의 숙주가 될 수 있는 모든 어종에 적용될 수 있음은 명백하다.

[25]

[26] 본 발명을 달리 표현하면, 케르세틴을 유효성분으로 하는 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.

[27]

본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 조제 시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다. 본 발명에 의한 약제학적 조성물은 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[28]

본 발명에 의한 항바이러스 조성물(또는 예방 또는 치료용 약제학적 조성물)은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다. 하기 실시예에서는 빠른 실험결과를 얻기 위하여 복강 주사방법을 적용하였으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[29]

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 동물의 수령, 체중, 성, 병적 상태, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예를 들면, 생체 1Kg당 본 발명의 조성물을 유효성분 함량 1 mg이 되도록 하여 1~3일에 1회씩 복강주사 또는 경구투여하는 것이 바람직하다.

[30]

[31]

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 케르세틴을 유효성분으로 하는 어류 감염성 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 질환의 예방 또는 개선용 어류 사료 또는 어류 사료 첨가용 조성물을 제공한다.

[32]

본 발명에 의한 어류 사료 또는 어류 사료 첨가용 조성물은, 통상적으로 이용되는 다양한 성분과 함께 제조될 수 있다. 예를 들어, 해양 단백질(예컨대, 어분 또는 크릴밀), 식물성 단백질(예컨대, 콩분말, 밀 글루텐, 옥수수 글루텐, 루핀 분말, 완두콩 분말 또는 해바라기씨 분말), 혈분 및 골분을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질원, 어류 기름(예컨대, 오징어간유) 또는 식물성 기름(예컨대, 평지씨 기름, 콩기름, 대두유)를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 에너지원, 비타민혼합물 및 무기질혼합물을 포함할 수

있다.

- [33] 사전 실험에 의하면, 퀘르세틴이 0.0025 % 함유된 통상의 양어용 사료 투여시
 넙치에서 탁월한 항바이러스 활성을 나타내었다. 따라서 양어용 사료에
 0.0005~0.005 %의 퀘르세틴을 함유하도록 하는 것이 바람직하다. 이보다 적은
 함량이면 예방 및 치료효과가 거의 나타나지 않고, 많은 함량인 경우 첨가량
 대비 효과성이 떨어진다.

[34]

- [35] 한편, 퀘르세틴은 수용액상에서 화학적 물리적으로 상당히 안정적이다. 따라서
 본 발명에 의한 항바이러스 조성물을 직접 양식장에 투여하는 방법으로
 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 질환의 예방 또는 치료 효과를 얻을 수 있을
 것이다. 구체적인 투여량이나 투여간격 등은 양식어종이나 양식밀도, 양식장의
 수온 등에 따라 다양하게 변경될 수 있을 것이지만, 다른 양식장용 첨가물을
 참조하여 1~3일마다 0.1 ~ 10ppm의 농도가 되도록 퀘르세틴 투여하는 것이
 바람직할 것이다.

[36]

발명의 효과

- [37] 이상과 같이 본 발명에 의한 조성물은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스의
 복제를 억제하는 효과가 있어 궁극적으로 바이러스성 출혈성 패혈증
 바이러스에 대한 숙주 어류의 생존율을 증가시킨다.
- [38] 따라서 본 발명에 의한 조성물을 복강주사하거나 경구투여하거나
 수조투여함으로써 양식어류의 폐사율에 큰 영향을 미치는 바이러스성 출혈성
 패혈증 바이러스에 의한 질환의 예방 또는 치료가 가능하게 된다.
- [39] 이에 의해 어류 양식산업의 원가절감과 부가가치 증대에 크게 기여할 수 있다.

[40]

도면의 간단한 설명

- [41] 도 1은 퀘르세틴 및 퀘르세틴 배당체의 바이러스 감염에 대한 항바이러스
 활성을 비교 확인한 결과를 보여주는 도표이다.
- [42] 도 2는 퀘르세틴을 농도 의존적으로 처리한 어류세포 (FHM 세포)에서
 세포독성을 확인한 결과를 보여주는 도표이다.
- [43] 도 3은 퀘르세틴을 농도 의존적으로 처리 후 VHSV 감염에 따른 어류세포
 (FHM 세포)의 세포 생존율을 확인한 결과를 보여주는 도표이다.
- [44] 도 4는 퀘르세틴 처리에 따라서 세포 배양액에서 VHSV 복제 저해능을 확인한
 결과를 보여주는 도표이다.
- [45] 도 5는 퀘르세틴 복강투여에 따른 넙치에서의 VHSV 감염에 대한 생존율을
 비교한 *in vivo* 실험 결과를 보여주는 도표이다.
- [46] 도 6은 퀘르세틴 구강투여에 따른 넙치에서의 VHSV 감염에 대한 생존율을
 비교한 *in vivo* 실험 결과를 보여주는 도표이다.

[47]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48]

이하 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[49]

[50]

실시예 1 : 퀘르세틴 및 퀘르세틴 배당체의 항바이러스 활성 비교

[51]

퀘르세틴 및 그와 유사한 화합물에서 퀘르세틴의 항바이러스 활성이 우수함을 확인하였다.

[52]

96well plate에 VHSV 감염에 가장 높은 감수성을 나타내는 잉어유래 어류세포주인 팻헤드 미노우 (Fathead Minnow; FHM) 세포 (ATCC CRL-2872, Manassa, VA) 를 각 well에 1.0×10^5 cells/100 μ L씩 24시간 배양하였다. 10% FBS를 함유한 Leibovitz's L-15 배지를 전액 제거한 후 퀘르세틴(Sigma, Q4951) 및 퀘르세틴 배당체 7종 (quercetin-3- β -D-glucoside, quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-glucuronide, rutin, quercetin-3-O- β -D-galactoside)을 어류세포에 각각 100 μ M씩 90분 처리하였다. 그 후 잔류액 제거하고 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(이하 'VHSV'라 함)를 0.2 MOI 수준으로 어류세포에 2시간 감염시켰다. 2시간 후 잔류액 제거하고 신선한 배지로 교환한 후 42시간동안 배양하였다. Cell Counting Kit-8 시약을 10 μ L씩 각 well에 처리하고 8시간 배양한 후 microplate reader를 이용하여 450nm 흡광도 값을 측정하여 세포생존율을 비교하였다. 그 결과, 퀘르세틴이 다른 퀘르세틴 배당체에 비해 VHSV에 대한 항바이러스 활성이 우수함을 확인하였다(도 1).

[53]

[54]

실시예 2 : 어류세포에 대한 퀘르세틴의 독성여부 확인

[55]

퀘르세틴의 어류세포에 대한 독성의 유무를 확인하였다.

[56]

96well plate에 어류세포를 각 well에 1.0×10^5 cells/100 μ L씩 24시간 배양하고 퀘르세틴을 25-400 μ M씩 24시간 처리하였다. 그 후 배지를 새로운 배지로 교환하여 Cell Counting Kit-8 시약을 10 μ L씩 각 well에 처리하고 8시간 배양한 후 microplate reader를 이용하여 450nm 흡광도 값을 측정하여 세포생존율을 비교하였다. 그 결과, 퀘르세틴을 처리하지 않은 음성대조구와 비교했을 때 퀘르세틴이 어류세포에 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(도 2).

[57]

[58]

실시예 3 : 퀘르세틴의 항바이러스 활성

[59]

퀘르세틴의 선처리시 VHSV 감염에 대한 세포생존율 증가를 확인하고자

하였다.

- [60] 96well plate에 어류세포를 각 well에 1.0×10^5 cells/100 μ L씩 24시간 배양하고 퀘르세틴을 25-400 μ M씩 24시간 처리하였다. 그 후 배지를 전액 제거한 후 VHSV를 0.2 MOI 농도로 2시간동안 감염시켰다. 그 후 새로운 배지로 교환하여 42시간 동안 배양하였다. Cell Counting Kit-8 시약을 10 μ L씩 각 well에 처리하여 8시간 배양한 후 microplate reader를 이용하여 450nm 흡광도 값을 측정하여 농도 증가에 따른 세포생존율을 비교하였다. 그 결과, 농도가 증가함에 따라 퀘르세틴을 처리하지 않은 대조구에 비해 세포생존율이 40% 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

[61]

[62] 실시예 4 : 퀘르세틴의 VHSV gene 복제 제어 확인

[63] 퀘르세틴의 선처리시 VHSV의 복제 제어 여부를 확인하였다.

[64] 60mm dish에 어류세포를 3.0×10^6 cells/3mL씩 24시간 배양하고 퀘르세틴을 100 μ M 90분 처리하였다. 그 후 배지를 전액 제거한 후 VHSV를 0.2 MOI 농도로 2시간동안 감염시켰다. 그 후 새로운 배지로 교환하여 42시간 동안 배양하였다.

[65] 퀘르세틴을 처리하지 않은 양성대조군과 100 μ M을 처리한 실험군의 상층액을 실시간 PCR을 통하여 분석하였다. 실시간 PCR에서 확인하고자 하는 VHSV gene은 NV-gene으로 NV_F (서열1, 5'-TTG TCC TTC GCG AGA TGA TCG-3')와 NV_R (서열2, 5'-TTT CTG ACC GAT CGA GGT CAC TG-3')프라이머를 사용하여 절대정량분석 하였다.

[66] 그 결과, 퀘르세틴을 처리한 실험구가 양성대조군에 비하여 약 42% 복제 감소율을 나타냄을 확인하였다(도 4). 이는 퀘르세틴이 VHSV 복제를 억제하여 양성대조군에 비해 세포생존율을 높이는 효과를 나타내는 것이며, VHSV에 대한 항바이러스제임을 입증하는 결과이다.

[67]

[68] 실시예 5 : 퀘르세틴 복강투여에 의한 넙치의 생존율 연장 효과 확인

[69] 퀘르세틴을 복강투여한 넙치의 VHSV에 대한 항바이러스 변화를 조사하였다.

[70] 100g 전후의 넙치 14마리를 유수식 수조에 나누어 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험을 진행하는 동안 수온은 12°C로 유지하였다. 퀘르세틴은 0.1mg/fish 농도(즉, 생체 1Kg당 1 mg)로 0.1mL 근육주사 할 수 있도록 만든 후 퀘르세틴을 근육 주사하는 실험구와 투여하지 않은 양성 대조구를 구분하였다. 퀘르세틴 근육주사 24시간 후 VHSV $10^{6.8}$ TCID₅₀/mL를 실험구와 양성 대조구에 근육주사 하였다. VHSV 감염 후 3일 후 퀘르세틴을 한 번씩 추가로 근육주사하여 실험을 진행하였다.

[71] 사료 급이를 중단하였으며 폐사율을 조사하였다. 2주 후 퀘르세틴 무처리구인 양성대조구와 비교했을 때, 퀘르세틴 0.1mg/fish 처리한 후에 3일 후 한 번 더 퀘르세틴을 처리한 실험구에서 넙치의 생존율 연장 효과가 보였다(도 5).

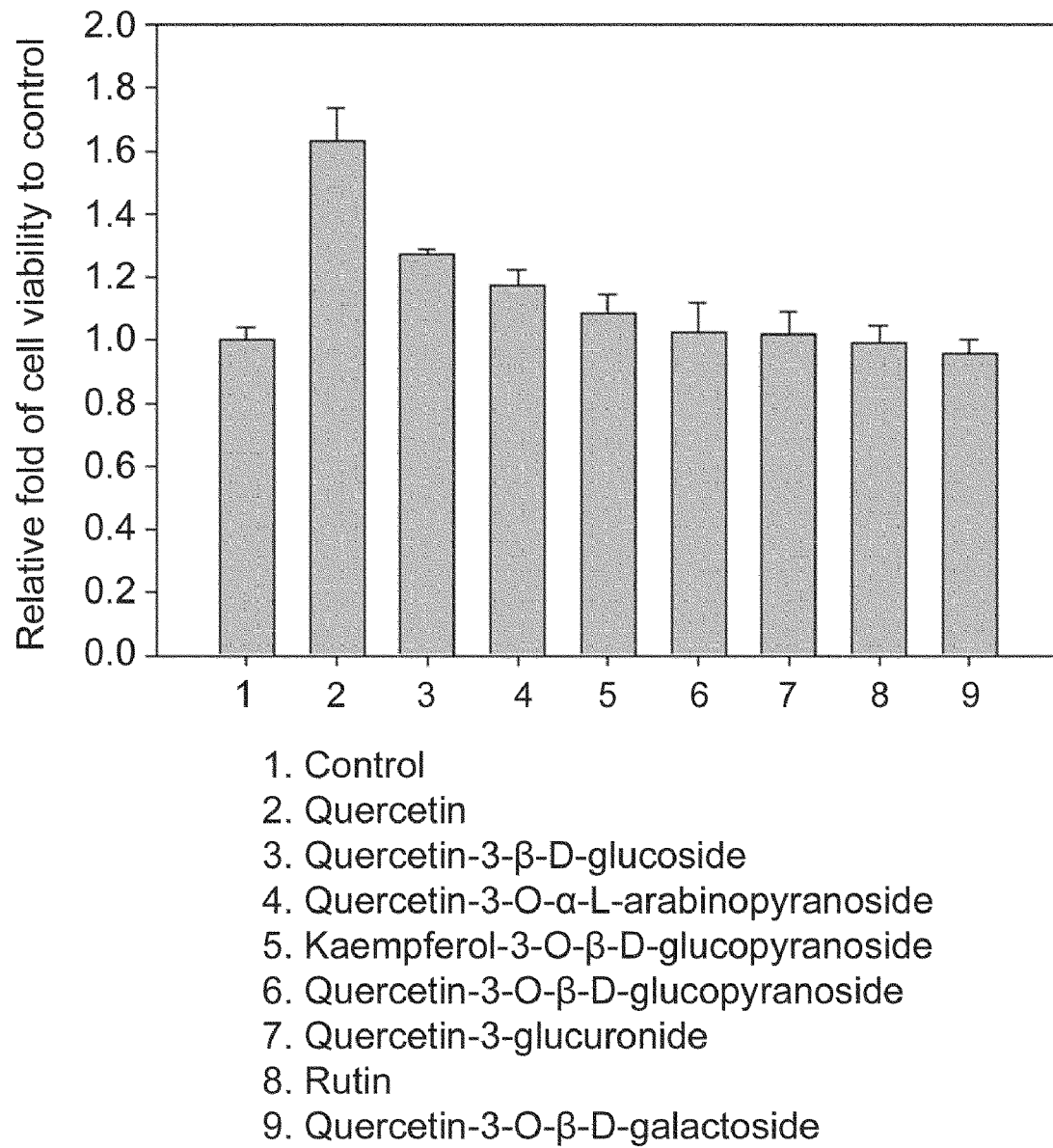
[72]

- [73] 실시예 6 : 퀘르세틴 구강투여에 의한 넙치의 생존율 연장 효과 확인
- [74] 퀘르세틴을 구강투여한 넙치의 VHSV에 대한 항바이러스 변화를 조사하였다.
- [75] 100g 전후의 넙치 어류를 10마리 1개의 실험구와 대조구로 설정하여 2일간 순환여과 시스템에서 사육하였다. 사료급이는 실험개시일부터 중단하였으며, 실험구는 퀘르세틴을 10mg/0.1mL 농도로 만든 후 경구용 зонд(Sonde)를 이용하여 0.1mL씩 투여하였다. 대조구는 퀘르세틴 대신 전달체(1% polyoxyethylene sorbitan monorate (tween-20)과 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 포함된 PBS)만을 경구 투여 하였다.
- [76] 퀘르세틴 구강투여 12시간 후 VHSV $10^{6.8}$ TCID₅₀/mL를 실험구와 양성 대조구에 0.1mL씩 근육주사 하였다. VHSV 감염 후 하루 간격으로 1차례씩 6일 동안 퀘르세틴을 추가로 구강 투여하여 실험을 진행하였다. 실험을 진행하는 동안 수온은 12°C로 유지하였으며 폐사율을 조사하였다. 8일 후 퀘르세틴 구강 투여에 따른 폐사율 저해 효과를 비교한 결과, 무처리구인 양성대조구와 퀘르세틴 10mg/fish 처리한 실험구에서 넙치의 생존율 차이가 나타나지 않았다. 이처럼 복강투여와 구강투여에서 폐사율 저해효과가 다르게 나타나는 이유는, 환경조건에 따라 민감하게 반응하는 넙치가 인위적인 구강투여로 인해서 상당한 스트레스를 받았기 때문이라 사료된다 (도 6).

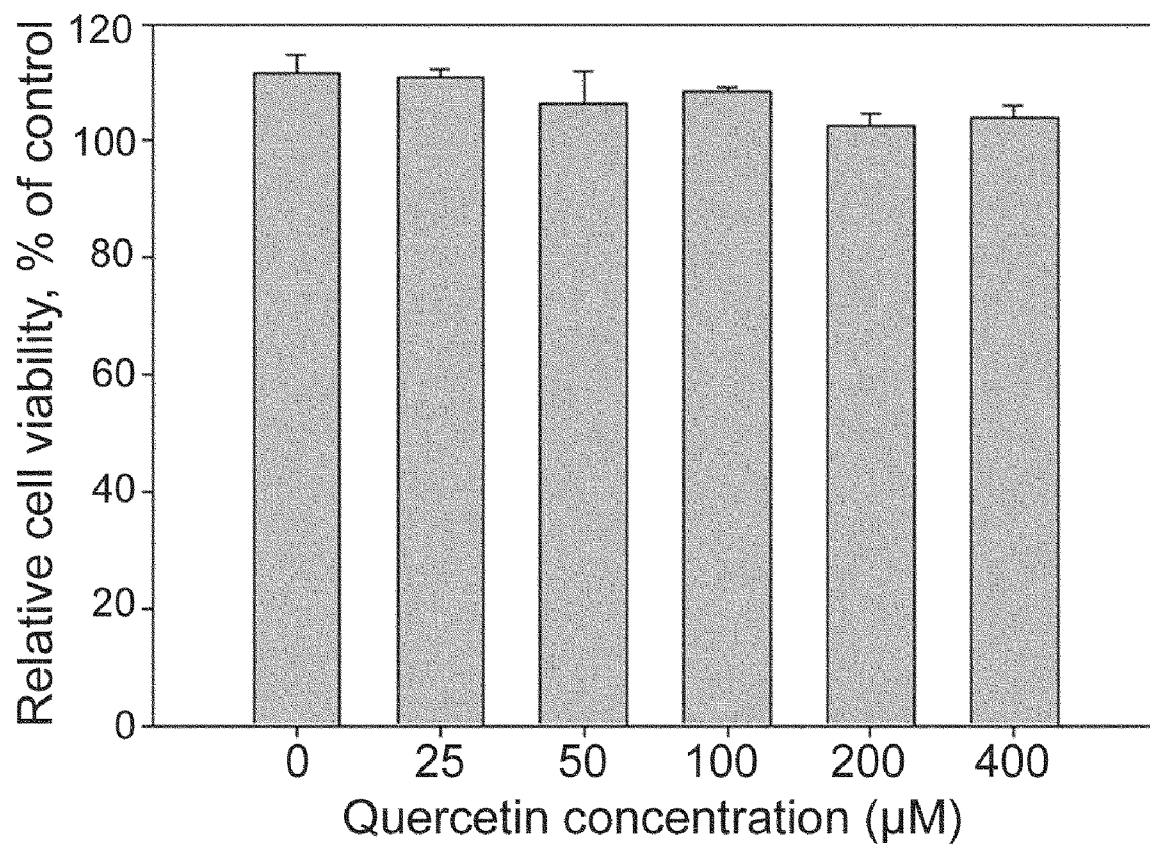
청구범위

- [청구항 1] 퀘르세틴(Quercetin)을 유효성분으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증(Viral Hemorrhagic Septicemia) 바이러스에 대한 항바이러스 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 퀘르세틴은 합성되거나, 순수분리되거나 식물체로부터 추출되거나 또는 분획된 것을 특징으로 하는 항바이러스 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
상기 어류는,
넙치, 방어, 참돔, 자주복, 부시리, 송어, 잭방어, 전갱이, 능성어, 참다랑어, 잉어, 제브라피쉬, 메기, 틸라피아, 연어, 송사리 또는 새우인 것을 특징으로 하는 항바이러스 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
경구 또는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여에 의해 비경구로 투여되는 것을 특징으로 하는 항바이러스 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
상기 조성물은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 의한 질환의 예방 또는 치료용 어류 사료 첨가용 조성물인 것을 특징으로 하는 항바이러스 조성물.
- [청구항 6] 퀘르세틴을 0.0005~0.005 % 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 어류 양식 사료.
- [청구항 7] 퀘르세틴을 어류 양식 사육수조에 1~3일마다 0.1~10ppm의 농도가 되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증 감염예방 및 치료방법.

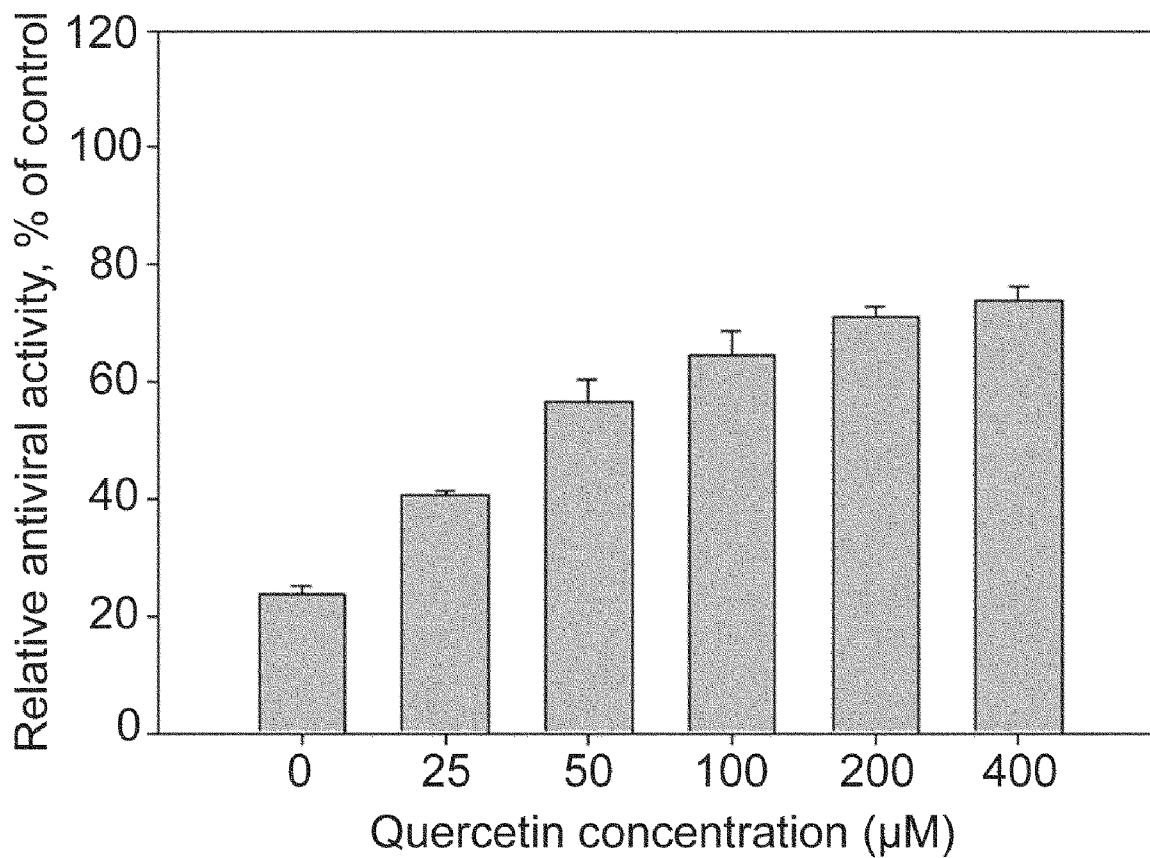
[Fig. 1]



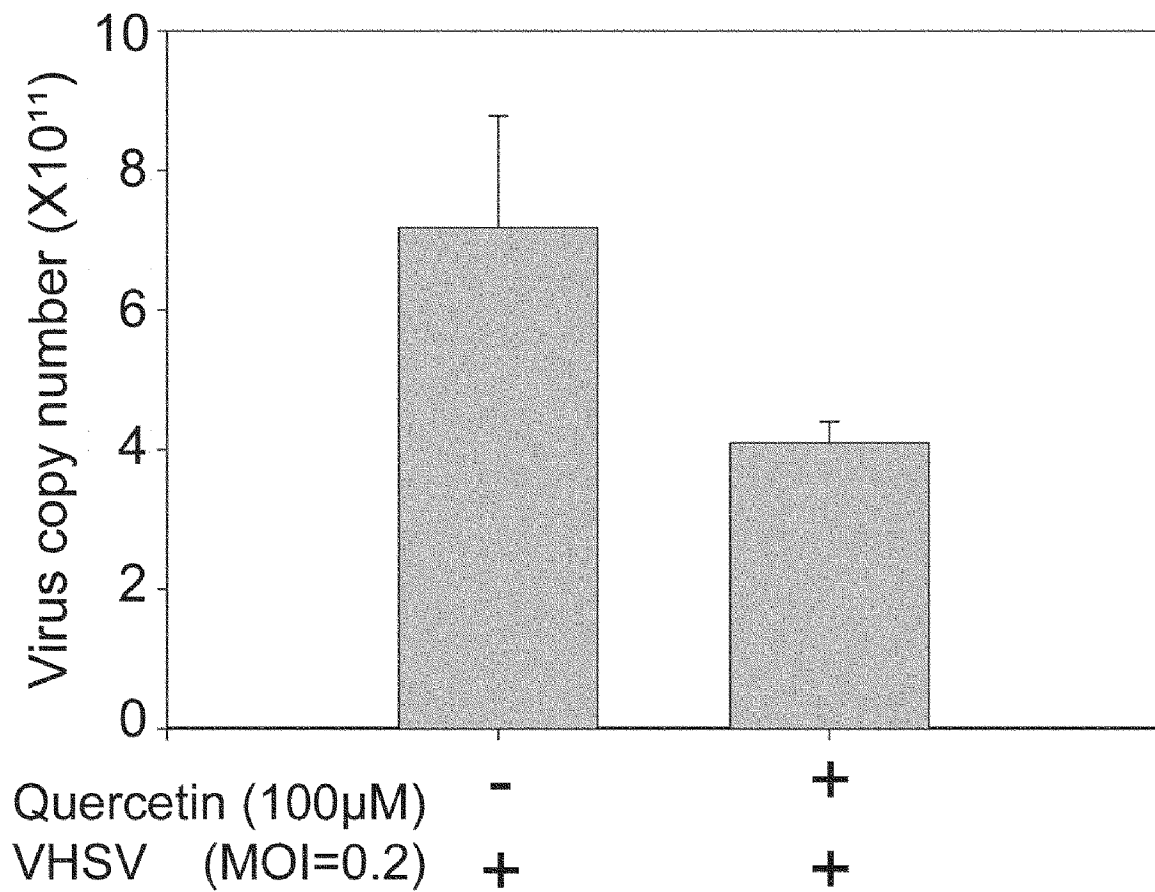
[Fig. 2]



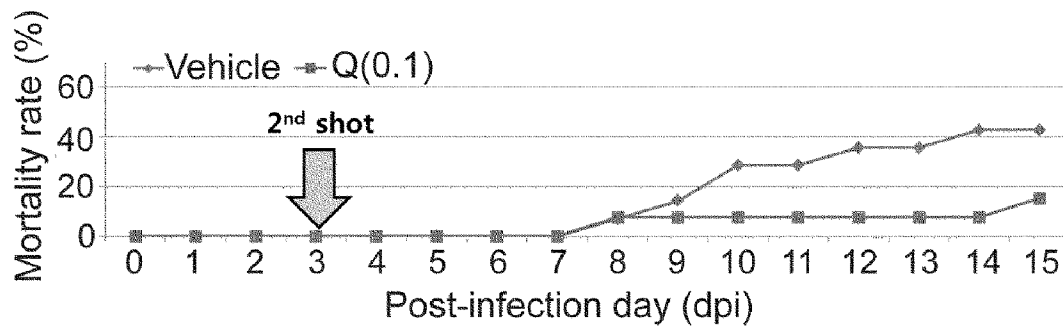
[Fig. 3]



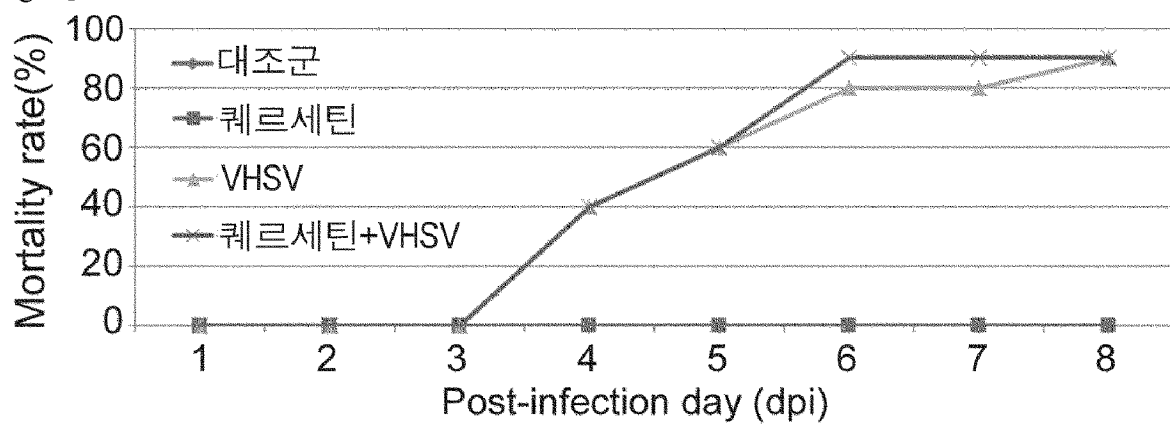
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/010087**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/35(2006.01)i, A61P 31/12(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/352; C12N 7/04; A61K 9/20; A61K 35/12; A61K 31/01; A61P 31/12

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: quercetin(quercetin), VHS (viral hemorrhagic septicemia), septicemia, fishes

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUNTAR, I. P. et al., "Assessment of anti-inflammatory and antinociceptive activities of <i>Olea europaea</i> L.", Journal of Medicinal Food, 2010, vol. 13, no. 2, pp. 352-356 See abstract, page 352.	1-7
A	US 2003-0092145 A1 (JIRA, V. et al.) 15 May 2003 See abstract and paragraphs [0035], [0116].	1-7
A	KR 10-1169196 B1 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 26 July 2012 See abstract.	1-7
A	MICOL, V. et al., "The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus (VHSV)", Antiviral Research, 2005, vol. 66, pp. 129-136 See abstract.	1-7
A	SKERGET, M. et al., "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities", Food Chemistry, 2005, vol. 89, pp. 191-198 See abstract.	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

02 MAY 2014 (02.05.2014)

Date of mailing of the international search report

02 MAY 2014 (02.05.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/010087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2003-0092145 A1	15/05/2003	AU 2001-34616 A1 CN 102441162 A US 2002-0164343 A1 US 2009-0226489 A1 US 2011-0081382 A1 US 7384637 B2 US 7838006 B2 WO 01-54717 A1	07/08/2001 09/05/2012 07/11/2002 10/09/2009 07/04/2011 10/06/2008 23/11/2010 02/08/2001
KR 10-1169196 B1	26/07/2012	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/35(2006.01)i, A61P 31/12(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/352; C12N 7/04; A61K 9/20; A61K 35/12; A61K 31/01; A61P 31/12 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: 퀘르세틴 (quercetin), VHS (viral hemorrhagic septicemia), 패혈증, 어류		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SUNTAR, I. P. 외, 'Assessment of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Olea europaea L.', Journal of Medicinal Food, 2010, 13권, 2호, 페이지 352-356 요약, 페이지 352 참조.	1-7
A	US 2003-0092145 A1 (JIRA, V. 외) 2003.05.15 요약 및 단락 [0035], [0116] 참조.	1-7
A	KR 10-1169196 B1 (전남대학교 산학협력단) 2012.07.26 요약 참조.	1-7
A	MICOL, V. 외, 'The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV)', Antiviral Research, 2005, 66권, 페이지 129-136 요약 참조.	1-7
A	SKERGET, M. 외, 'Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities', Food Chemistry, 2005, 89권, 페이지 191-198 요약 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 "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 2014년 05월 02일 (02.05.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 05월 02일 (02.05.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 최승희 전화번호 +82-42-481-8740 

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/010087

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2003-0092145 A1	2003/05/15	AU 2001-34616 A1 CN 102441162 A US 2002-0164343 A1 US 2009-0226489 A1 US 2011-0081382 A1 US 7384637 B2 US 7838006 B2 WO 01-54717 A1	2001/08/07 2012/05/09 2002/11/07 2009/09/10 2011/04/07 2008/06/10 2010/11/23 2001/08/02
KR 10-1169196 B1	2012/07/26	없음	