

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 9월 29일 (29.09.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/153220 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/484 (2006.01) A61K 36/9066 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002732
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 17일 (17.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0039171 2015년 3월 20일 (20.03.2015) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이우송 (LEE, Woo Song); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 류영배 (RYU, Young Bae); 34141 대구시 유성구 과학로 125, Daegu (KR). 정형재 (JEONG, Hyung Jae); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 노문철 (RHO, Mun Chul); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박수진 (PARK, Su Jin); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권형준 (KWON, Hyung Jun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박지영 (PARK, Ji Young); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한일국제특허사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

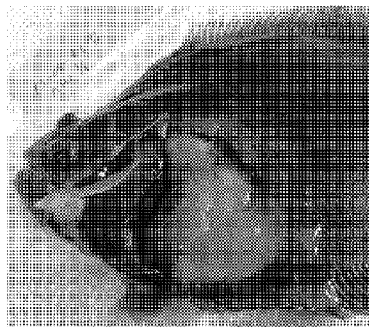
(54) Title: COMPOSITION FOR PROPHYLAXIS OR TREATMENT OF VIRAL HEMORRHAGIC SEPTICEMIA OF FISH

(54) 발명의 명칭: 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 조성물

(a)



(b)



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for prophylaxis and treatment of viral hemorrhagic septicemia of fish. The composition for the treatment of the present invention can be utilized effectively and widely in a method for prophylaxis and treatment of viral hemorrhagic septicemia of fish.

(57) 요약서: 본 발명은 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 조성물 (A composition for prophylaxis and treatment of viral hemorrhagic septicemia of fish)에 관한 것으로, 본 발명의 치료용 조성물을 이용하면, 어류 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료방법에 효과적으로 널리 활용될 수 있을 것이다.



WO 2016/153220 A2

명세서

발명의 명칭: 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 조성물(A composition for prophylaxis and treatment of viral hemorrhagic septicemia of fish)에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 감초 추출물을 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 약학 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료방법 및 바이러스 출혈성 패혈증의 예방 또는 개선용 사료 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(Viral hemorrhagic septicemia, VHSV)는 단일가닥의 RNA 바이러스로 Rhabdoviridae과(科) Novirhabdovirus속의 외막을 가진 바이러스이다. VHSV에 감염된 넙치를 육안으로 살펴보면, 체색흑화, 전신의 출혈, 복수 저류로 인한 복부팽만, 탈장, 아가미 퇴색, 무안축 체표에 붉은 반점모양의 출혈이 관찰된다. VHSV로 인한 발병은 수온이 낮은 10-13 °C의 겨울철에 발생하고 종묘 입식시기에 주로 발생하여 치어의 대량폐사를 일으킨다. 감염 표적 장기는 심장과 신장이며 이외에도 비장, 뇌, 근육, 아가미 등의 손상을 초래한다. VHSV는 무지개송어의 중요 바이러스성 질병으로 처음 보고가 되었는데 최근 다양한 어류, 송어, 무지개송어, 은연어, 강송어, 브라운송어, 스틸헤드 송어 (steelhead trout) 등의 연어과 어류뿐만 아니라 대구, 청어등과 같은 자연수계의 어류 및 넙치 등과 같은 해산양식어류에서도 널리 발생하며, 주로 유럽, 북미, 아시아 지역에서 널리 발생한다.
- [4] 바이러스성 출혈성 패혈증(Viral hemorrhagic septicemia, VHS)는 국내에서는 2001년 넙치에서 처음 보고되었으며 이후 각종 자연산 해산어에서도 보고되고 있으며 양식 넙치의 피해가 매우 심각한 치명적인 질병이다. 2011년 국내 넙치 양식장의 주요 폐사 원인체를 조사한 결과, VHSV에 의한 폐사가 전체 폐사 원인 중 약 12.5%를 차지하였으며, 이는 넙치의 바이러스 질병 중 가장 높은 비율을 차지하였다. 또한, 국내 넙치 생산량 중 절반 가량을 생산하는 제주도 지역의 경우 2007년부터 2010년까지 질병검사 의뢰 시료 중 바이러스성 출혈성 패혈증의 양성율이 30%로 가장 높게 나타났으며, 그 피해도 증가하고 있는 실정이다. 또한, VHSV는 국제수역사무국 (OIE)에서 'OIE 신고대상 질병 (OIE notifiable disease)'으로 규정되어 있어 수산물 유통시 검역 대상이 되는 질병으로 넙치를 포함한 양식 어류의 수출입에 있어서 무역장벽으로 작용하는 중요한

질병요인이기도 하다.

- [5] VHSV의 구조와 항원단백질에 대한 연구, 및 이들 기초 연구를 바탕으로 불활화 백신, 단백질 재조합 백신, 약독화 백신, DNA 백신에 대한 연구가 수행되고 있다. 그러나 약독화 (attenuated) 바이러스 백신은 실험 조건에서는 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나 바이러스의 병원성 회복의 위험성과 자연계로의 확산 위험성 때문에 허가가 되지 않고 있다. 또한, 출혈성 패혈증 바이러스 G 혹은 N 유전자를 삽입한 플라스미드를 근육 주사한 DNA백신 실험에서는 강력한 면역반응이 유도되고 폐사율도 경감되었다는 보고가 무지개송어와 넙치에서 보고되고 있으나 DNA백신 유전자 조작에 대한 안전성의 문제 때문에 현재까지 허가된 DNA백신은 단 한 개뿐으로, 아직은 실용화 단계의 DNA백신은 없는 실정이며 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 백신은 상용화되어 있지 않다.
- [6] 국내에서는 넙치에서 분리된 바이러스 주에 대한 백신개발이 주로 진행되고 있으며 천연제제를 사용한 바이러스 활성 억제 연구는 거의 이루어지고 있지 않다. 한국 특허 공개 10-2014-0003826에서 바이러스성 출혈성 패혈증의 불활화 백신에 대하여 기재하고 있으나 천연물을 이용한 저독성 및 약제 효율성의 향상뿐만 아니라 항-VHSV에 관한 연구는 미비한 실정이다.
- [7] 또한 양식 어류는 천연 어류와 달리 고밀도로 사육되기 때문에 과대 밀식에 의한 질병에 항상 노출되어 있으며 지속적인 양식업으로 인한 양식 환경의 악화와 부적절한 사육으로 인한 증체율 저하 등 많은 문제들이 발생하고 있다. 최근 국내에서는 넙치 양식에 적합한 배합 사료가 개발 시판되고 있지만 여전히 생사료에 비하여 생산기간이 길어 효율적인 양식이 불가능한 실정이며, 일부 어업인은 외국에서 수입되고 있는 비싼 사료를 사용하므로 경제적인 면에서 부담이 되고 있다. 그리고 국내 통계자료에 따르면 내수면 양식 생산량 11,678톤에 비해 해수면 양식 29,297톤으로 해산어류의 생산량이 훨씬 많기 때문에 해산어류에 적용될 수 있는 증육율을 증대시키고 질병에 강한 고기능성 해산어류 양식사료 첨가제 개발 필요성이 제기되며, 이를 산업화 시킬 수 있는 연구개발이 필요하다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 바이러스성 출혈성 패혈증을 예방 또는 치료하기 위한 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 감초추출물을 포함한 약학 및 사료 조성물이 바이러스성 출혈성 패혈증에 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 하나의 목적은 감초 추출물을 포함하는 바이러스 출혈성 패혈증의

예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는, 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 감초 추출물을 포함하는 바이러스 출혈성 패혈증의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명의 감초 추출물을 포함하는 조성물은 어류에 감염된 VHSV에 대한 활성을 억제하는 효과를 나타내고 이를 이용하여 높은 안정성을 가진 어류의 VHS의 예방 또는 치료를 향상시키는 효과를 나타내므로, VHSV의 감염에 대한 어류의 생존율 향상 및 어업 생산성 향상으로 인한 어업 안정성 증대에 널리 활용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 넙치를 대상으로 생체 내 (in vivo)에서 항 VHSV 효과를 검증하기 위하여, 공격 시험하여 폐사어의 해부 및 주요장기를 나타내는 그림이다.

[18] 도 2는 넙치를 대상으로 생체 내 (in vivo)에서 항 VHSV 효과를 검증하기 위하여, 공격 시험 VHSV 투여 농도를 결정하는 그래프이다.

[19] 도 3는 넙치를 대상으로 본 발명의 추출물을 포함한 조성물의 VHS 예방효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

[20] 도 4는 넙치를 대상으로 본 발명의 추출물을 포함한 조성물의 증육율을 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

[21]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[22] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 감초 추출물을 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[23] 상기 감초란, 콩과에 속하는 다년생 초본식물로, 중국 북부, 시베리아, 이태리 남부, 만주, 몽고 등지에 자생 또는 재배된다. 감초는 뿌리와 줄기 밑 부분을 감미제와 위궤양·십이지장궤양의 치료제로 사용한다. 다른 약의 작용을 순하게 하므로, 한방에서 다양한 용도로 쓴다. 하지만 감초 추출물의 VHS 바이러스 효과에 대해서는 알려지지 않았다.

[24] 본 발명에서 감초는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 이를 자연에서 채배 또는 채취한 것을 사용할 수 있다.

[25]

[26] 상기 추출물이란, 생약을 적절한 추출용매로 추출하여 얻은 추출액을 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의

희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물 또는 정제물일 수 있다.

- [27] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 추출용매로 추출하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획함으로써 제조할 수 있다.
- [28] 상기 추출용매는 이에 제한되지는 않으나, 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 구체적으로 각 건조물, 가공물, 또는 분쇄물을 건조 중량의 약 5 내지 30배, 보다 구체적으로 약 10 내지 20배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 등과 같은 탄소수 1(C1) 내지 4(C4)의 저급 알코올과 같은 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로 용출한 것일 수 있다. 일 예로, 각 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 제조한 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 용매로서 에탄올을 이용하여 추출물을 제조하였다.
- [29] 상기 용매를 이용하여 추출하는 방법은 당업계에서 공지된 방법에 따라 수행할 수 있고, 구체적으로 약 1시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 여과 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출한 것일 수 있다.
- [30] 추출 온도는 이에 제한되지는 않으나, 20 °C 내지 100 °C, 구체적으로 60 °C 내지 100 °C에서 추출한 것일 수 있다.
- [31] 일 예로 상기 감초 추출물은 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 구체적으로 1 내지 80 중량%, 보다 구체적으로 0.01 내지 50 중량%로 포함될 수 있다.
- [32]
- [33] 상기 약학 조성물이란, 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각의 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [34] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [35] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한

고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 상업 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [36] 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있는 것일 수 있다.
- [37] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체 (non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.
- [38] 상기 예방이란, 본 발명에 따른 감초 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 VHS의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [39] 상기 치료란, 본 발명에 따른 감초 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질병의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.
- [40] 본 발명의 실시예에서는 감초추출물을 포함하는 조성물의 투여로 바이러스성 출혈성 패혈증에 효과가 있음을 확인하였다(도 3).
- [41]
- [42] 일 예로 본 발명의 상기 조성물은 울금 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [43] 상기 울금이란, 생강과 커큐마 속에 속하며, 꽃의 색깔 등에서 강황과 차이가 나는 다년생 초본식물이다. 울금은 기를 소통시키고 혈액순환을 도와 생리통, 생리불순, 옆구리통증, 토혈, 코피, 피오줌, 담즙분비 촉진과 담낭결석을 치료한다.
- [44] 본 발명에서 울금은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 이를 자연에서 채배 또는 채취한 것을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [45] 일 예로 울금 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 및

- 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예로 상기 알코올은 에탄올인 것일 수 있다.
- [46] 일 예로 상기 울금 추출물은 전체 조성물의 0.01 내지 50 중량%로 포함하는 것일 수 있다.
- [47] 본 발명의 실시예에서는 감초 추출물과 울금 추출물을 포함하는 각테일제제가 바이러스 출혈성 패혈증에 효과가 있음을 확인하였다(도 3).
- [48]
- [49] 일 예로 본 발명의 상기 조성물은 스테비아를 추가로 포함할 수 있다.
- [50]
- [51] 상기 스테비아란, 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과 숙근(宿根) 다년초 여러해살이풀로서 남미 파라과이, 아르헨티나, 브라질 등의 국경산간지 하천, 습지대 주변에 서식하며 허브차, 음료, 한약조제, 천연감미료, 당료, 다이어트, 건강보조식품 등에 사용한다.
- [52] 본 발명에서 스테비아는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 재배 또는 채취한 것을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [53] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [54] 상기 어류는 바이러스성 출혈성 패혈증이 발병할 수 있는 모든 어류를 제한없이 통칭할 수 있다. 구체적으로 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 방어 (*Seriola quinqueradiata*), 참돔 (*Pagrus major*), 자주복 (*Takifugu rubripes*), 부시리 (*Seriola aureovittata*), 송어 (*Oncorhynchus masou*), 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*), 잭방어 (*Seriola dumerili*), 전갱이 (*Trachurus japonicus*), 흑점줄전갱이(*Pseudocaranx dentex*), 능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*), 참다랑어 (*Thunnus thynnus*), 잉어 (*Cyprinus carpio*), 제브라피쉬 (*Danio rerio*), 메기 (*Silurus asotus*), 클라리아스 가리에피누스 (*Clarias gariepinus*), 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*), 연어 (*Oncorhynchus keta*), 대서양 연어 (*Salmo salar*) 및 송사리 (*Oryzias latipes*)를 포함할 수 있다. 또한, 구체적으로 양식어류일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예에서는 대표적으로 넙치를 사용하여 실험을 수행하였다.
- [55] 상기 투여란, 어떠한 적절한 방법으로 어류에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [56] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 감초 추출물을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 구체적으로 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어

투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[57] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[58] 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[59]

[60] 다른 양태로서, 본 발명은 감초 추출물을 포함하는 바이러스 출혈성 패혈증의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[61] 본 발명에서 사용되는 용어, "사료"는 어류가 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.

[62] 상기 사료는 사료 첨가제 또는 보조사료를 포함할 수 있다.

[63] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[64] 본 발명의 항바이러스 출혈성 패혈증 바이러스용 조성물이 적용될 수 있는 어류는 구체적으로, 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 망어 (*Seriola quinqueradiata*), 참돔 (*Pagrus major*), 자주복 (*Takifugu rubripes*), 부시리 (*Seriola aureovittata*), 송어 (*Oncorhynchus masou*), 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*), 잭망어 (*Seriola dumerili*), 전갱이 (*Trachurus japonicus*), 흑점줄전갱이 (*Pseudocaranx dentex*), 능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*), 참다랑어 (*Thunnus thynnus*), 잉어 (*Cyprinus carpio*), 제브라피쉬 (*Danio rerio*), 메기 (*Silurus asotus*), 클라리아스 가리에피누스 (*Clarias gariepinus*), 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*), 연어 (*Oncorhynchus keta*), 대서양 연어 (*Salmo salar*) 및 송사리 (*Oryzias latipes*)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 어류이고 이에 한정하지 않는다. 가장 구체적으로 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)일 수 있다.

[65]

발명의 실시를 위한 형태

[66]

이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[67]

[68]

실시예 1. 감초 추출물의 제조

[69]

[70]

본 발명에서 사용한 감초는 일반적으로 자연에서 쉽게 채집할 수 있는 것으로 추출물을 효율적으로 얻기 위하여 세절 형태로 분쇄하여 사용하였다.

[71]

감초 3 kg에 95 %의 에탄올 (ethanol) 20 ℓ를 가하여 실온에서 7일 동안 방치하여 추출하고, 이를 여과지로 여과하여 액상성분을 수득한 후, 이를 농축 및 건조시켜서 감초의 에탄올 추출물 (210 g)을 제조하였다

[72]

[73]

실시예 2. 울금 추출물의 제조

[74]

[75]

본 발명에서 사용한 울금은 일반적으로 자연에서 쉽게 채집할 수 있는 것으로 추출물을 효율적으로 얻기 위하여 분말 (powder) 형태로 분쇄하여 사용하였다.

[76]

울금 2 kg에 95 %의 에탄올 (ethanol) 20 ℓ를 가하여 실온에서 7일 동안 방치하여 추출하고, 이를 여과지로 여과하여 액상성분을 수득한 후, 이를 농축 및 건조시켜서 울금의 에탄올 추출물 (210 g)을 제조하였다.

[77]

[78]

실시예 3. 칵테일 제제의 제조

[79]

[80]

본 발명의 실시예 1, 실시예 2에서 제조된 감초 추출물에 울금:스테비아를 1:100으로 혼합하여 제조한 뒤 물 1.0 ℓ에 제조된 혼합물을 101g을 첨가하여 제조하였다.

[81]

[82]

실험예 1. VHSV 공격실험의 VHSV 투여농도 결정

[83]

[84]

먼저, 상기 실시예1 내지 3의 추출물을 포함하는 조성물에 대해 생체 내에서 항VHSV 효과를 검증하기 위하여, 넙치를 대상어종으로 VHSV 공격실험의 VHSV 투여농도를 결정하였다.

[85]

바이러스성 병원체인 VHSV가 세포에 감염할 수 있는 용량을 TCID₅₀으로 보았을 때 (바이러스 적정시), 10^{5.1}, 10^{6.1}, 10^{7.1} TCID₅₀/ fish 의 농도로 VHSV 공격실험을 수행한 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다. 도 1의 (a)는 대조군, (b)는 VHSV를 감염시킨 실험군이다. 도 1 및 도 2에서 보듯이, 10^{7.1} TCID₅₀ / fish의

농도에서 2일째부터 폐사가 시작되어 11일째에 최대 80%의 폐사율을 보였다. 따라서 VHSV 공격실험의 VHSV의 적정 투여 농도는 $10^{7.1}$ TCID₅₀/fish 로 결정하였다.

[86]

[87] 실험예 2. 감초 추출물을 포함하는 조성물의 VHSV 저해효과

[88]

[89] 사료에 실시예 1 내지 3의 추출물을 포함하는 조성물을 각각 0.3 중량%의 함량으로 첨가하여 4주간 동물에게 섭식시킨 후 각 실험구별로 각각 15 마리씩 무작위로 선발하여 인위감염을 통한 공격실험을 수행하였다. 인위감염 공격실험은 모든 개체에 $10^{7.1}$ TCID₅₀/fish 의 농도로 VHSV 100 μ l를 복강 주사한 후, 약 1톤 규모의 원형 수조에서 함께 사육하여 진행하였다. 환수는 1일 2회 실시하였으며, 냉각기를 사용하여 수온을 약 14 °C정도로 유지하였고, 사육기간 동안에는 절식하였다. 이어, 4주 후의 폐사율을 비롯하여 상대생존율 (Relative Percent Survival, RPS = (1-실험군 폐사율/대조군 폐사율)× 100)을 계산하였고 (수학식 1), 감초 추출물, 울금 추출물 및 각테일 제제의 VHSV에 대한 항바이러스 효과를 분석하였다.

[90]

[91] [수식1]

$$\text{상대생존율 (RPS)} = \left[1 - \left(\frac{\text{실험군폐사율}}{\text{대조군폐사율}} \right) \right] \times 100$$

[92]

[93] 도 3에서 보듯이, 감초 추출물의 경우 9일째부터, 울금 추출물의 경우 7일째부터, 각테일 제제의 경우 6일째부터 폐사가 시작되어 2주 ~ 3주 사이에 대부분의 폐사가 진행되었다. 실험 28일까지 누적 폐사율은 대조군이 53 %, 감초 추출물은 40 %, 울금 추출물은 27 %, 각테일제제는 20 %로 나타났다. 상대 생존율을 분석한 결과, 감초 추출물의 경우, 대조군과 비교하여 약 13 % 생존율이 향상된 것을 보여주었고 각테일제제의 경우, 가장 높은 생존율을 보여주었고 약 33 %의 생존율이 향상된 것을 보여주었다.

[94]

[95] 실험예 3. 감초 추출물을 포함하는 조성물의 생육증진 효과

[96]

[97] 먼저, 상기 실시예 1 내지 3의 추출물을 포함하는 조성물에 대해 넙치의 생육증진 효과를 알아보기 위하여, (i) 감초 추출물, 울금 추출물 및 각테일제제가 포함된 조성물을 0.3 중량%를 첨가하여 제조한 사료를 8주 동안 급이하여 양식한 실험구와, (ii) 일반 사료를 8주간 급이하여 양식한 넙치의 미당 증체량, 미당 증체율, 사료 요구율, 사료효율 등을 측정하였다.

[98] 구체적으로, 넙치 양식을 위한 수조는 자동온도($14.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) 조절, 산소공급이

가능한 온실에 3,000 ℓ 크기의 양식수조를 사용하였으며, 대조군은 평균 개시체중 25.64 g의 어류 100미를, 실험군은 평균 개시체중 23.57 g의 어류를 100미를 공시하였다.

[99] 먹이는 각 양식에 1일 3회 만복 급이를 하였다. 실험식이를 투여한 8주간의 각 양식수조에서의 넙치의 사육 결과를 도 4에 나타내었다.

[100] 그 결과, 평균 증체율은 대조군이 87 %, 감초추출물이 112 %, 울금 추출물이 87 %, 각테일제제는 94 %로 나타났다. 상대적인 평균 증체율을 분석한 결과, 감초추출물의 경우, 대조군과 비교하여 약 25 % 증가하였고 이는 가장 높은 평균 증체율을 보여 주었다. 각테일제제의 경우, 대조군과 비교하여 약 7 % 증가하였으며, 울금 추출물의 경우, 변화가 없었다.

[101]

[102] 이러한 결과는, 본 발명의 감초 추출물을 포함하는 조성물이 VHSV 저해하는 효과와 어류의 생육 증진을 촉진하는 효과가 우수함을 시사하는 것이다.

[103]

[104] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[105]

[106]

[107]

[108]

[109]

[110]

[111]

[112]

[113]

[114]

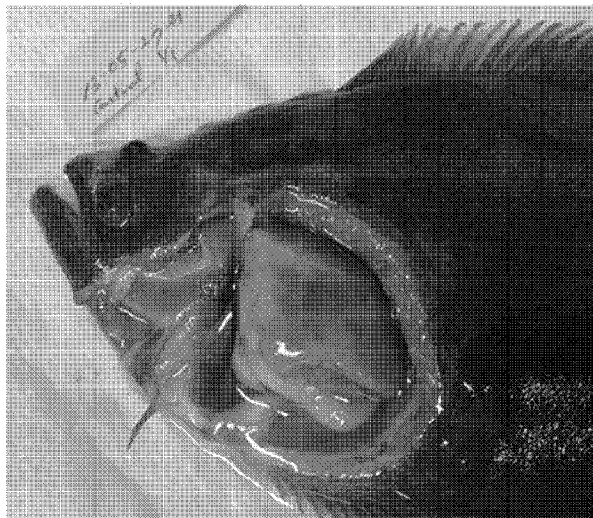
[115]

청구범위

- [청구항 1] 감초 추출물을 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 울금 추출물을 추가로 포함하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 조성물은 스테비아를 추가로 포함하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 감초 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출한 것인 약학 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 알코올은 에탄올인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 울금 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출한 것인 약학 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 알코올은 에탄올인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 감초 추출물은 전체 조성물의 0.01 내지 50 중량%로 포함되는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 9] 제2항에 있어서, 상기 울금 추출물은 전체 조성물의 0.01 내지 50 중량%로 포함되는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는, 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 11] 감초 추출물을 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증의 예방 또는 개선용 사료 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 조성물은 울금 추출물을 추가로 포함하는 것인, 사료 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 조성물은 어류용인 것인, 사료 조성물.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 어류는 넙치, 망어, 참돔, 자주복, 부시리, 송어, 무지개 송어, 잭방어, 전갱이, 흑점줄전갱이, 능성어, 참다랑어, 잉어, 제브라피쉬, 메기, 클라리아스 가리오피누스, 틸라피아, 연어, 대서양 연어, 및 송사리를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, 사료 조성물.

[도1]

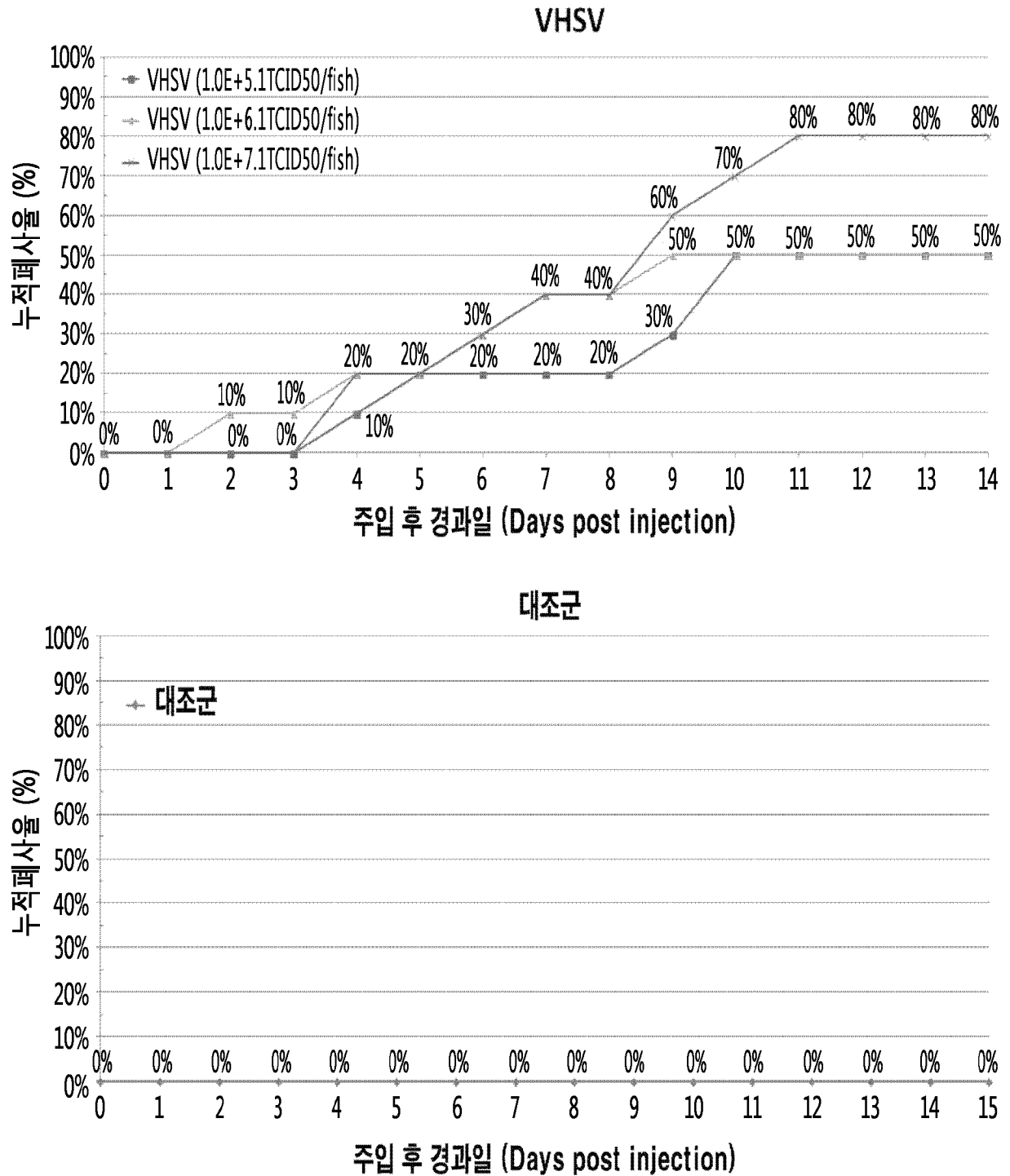
(a)



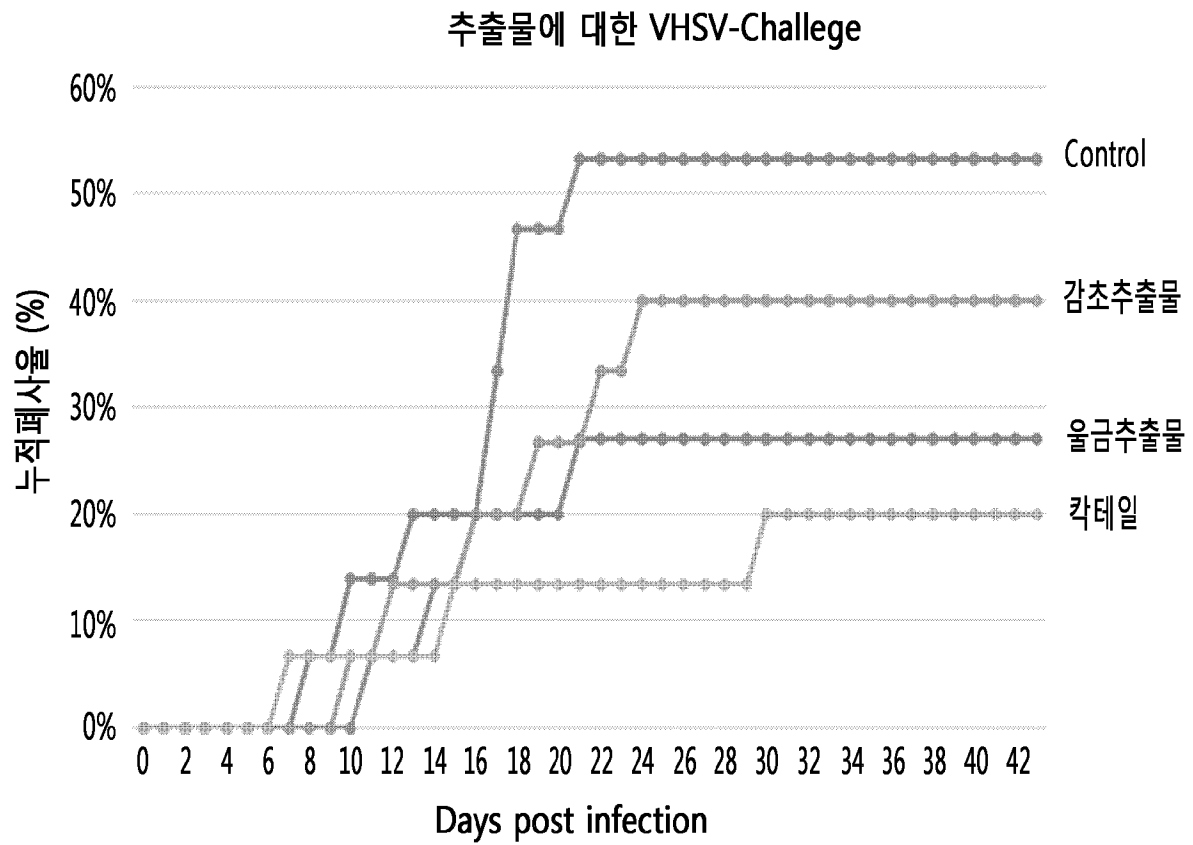
(b)



[도2]



[도3]



[도4]

