

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 국제특허출원의 출원공개공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 31/715
C08B 37/00

(11) 공개번호 특1995-0702834
(43) 공개일자 1995년08월23일

(21) 출원번호	특1995-0700667		
(22) 출원일자	1995년02월21일		
번역문제출일자	1995년02월21일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 93/007904	(87) 국제공개번호	WO 94/004163
(86) 국제출원출원일자	1993년08월20일	(87) 국제공개일자	1994년03월03일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨지움 스위스(리히텐슈타인) 독일 덴마크 스페인 프랑스 그리스 영국 아일랜드 이태리 룩셈부르크 모나코 네 델란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 베냉 브르키나파소 카메룬 중앙아프리카 공화국 차드 코트디부아르 콩고 가봉 기니아 말리 모리타니아 니제르 세네갈 토 고 국내특허 : 오스트리아 호주 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐 나다 스위스(리히텐슈타인) 체코 독일 덴마크 핀란드 영국 헝가리 일본 북한 대한민국 카자흐스탄 스리랑카 룩셈부르크 마다가스카르 몽고 말라위 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아연 방 수단 스웨덴 슬로바키아 우크라이나 미국 베트남		
(30) 우선권주장	07/934015 1992년08월21일 미국(US)		
(71) 출원인	알파-베타 테크놀로지, 인코포레이티드(ALPHA-BETA TECHNOLOGY, INC.) 로 버트 에스. 두프레슨, 주니어		
(72) 발명자	미합중국 01605 메사추세츠 워체스터 원 이노베이션 드라이브 스피로스 자마스 미합중국 02108 메사추세츠 보스턴 마운트 베르논 스트리트 67 디. 데이빗슨 이슨 주니어 미합중국 01545 메사추세츠 쉬르즈베리 올드 콜로니 드라이브 47 게리 알. 오스트로프 미합중국 01604 메사추세츠 워체스터 브리들 패스 301		
(74) 대리인	남상선		

심사청구 : 없음

(54) 글루칸 제제(NOVEL GLUCAN PREPARATION)

요약

본 발명은 특정한 사이토킨의 생성을 자극하지 않으면서 강력하고 특이한 면역 반응을 나타내는 중성의 수용성 β-글루칸, 이 신규한 β-글루칸을 함유하는 제제, 및 그것의 신규한 제조방법에 관한 것이다. 중성의 수용성 β-글루칸 제제는 사람 단세포의 β-글루칸 수용체에 대하여 높은 친화력을 가지며, 두가지의 기본적인 또는 면역학적 활성, 즉, (1) 식세포의 살미생물 활성의 증강 및 (2) 단세포, 호중구 및 혈소판 조혈 활성을 보유한다. 선행 기술에서 설명되는 가용성 글루칸과는 달리, 본 발명의 중성의 수용성 β-글루칸은 시험관내 및 생체내에서 IL-1β 및 TNF α 생성을 유도하지도 않으며 프라임하지도 않는다. 본 발명의 중성의 수용성 β-글루칸의 안전하고 효과적인 제제는 열 및 염증과 같은 해로운 부작용을 유발할 수 있는 특성의 생화학적 조절제(예컨대 IL-1β, TNF α)의 생성을 자극하지 않으면서 사람 및 동물의 면역 반응을 증강시키기 위하여 사람 및 동물의 치료 및/또는 예방 치료에 사용될 수 있다.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

글루칸 제제(NOVEL GLUCAN PREPARATION)

[도면의 간단한 설명]

제1도는 단일한 β(1-6)-결합된 글루코스 부분을 경유하여 주기적으로 분기되어 있는 선형의 β(1-3)-결

합된 중합체로서의 중성의 가용성 글루칸의 일반 구조를 도시한다.

제2도는 알칼리 분해 및 재-아닐링에 의해 정제되지 않은 가용성 글루칸의 겔투과 크로마토그램(pH7)을 도시한다. 크로마토그램은 본원에서 각기 고분자량 응집체(Ag), 피크 A 및 피크 B(단일 나선 글루칸)로서 언급되는 3개의 조각을 나타낸다.

제3도는 겔 투과 크로마토그래피에 의해 중성의 가용성 글루칸에 대해 얻어진 크로마토그램이다. 실선은 pH 7에서의 중성의 가용성 글루칸을 나타내고 점선은 pH 13에서의 중성의 가용성 글루칸을 나타낸다.

제4도는 겔 투과 크로마토그래피에 의해 단일 나선 β -글루칸(피크 B)에 대해 얻어진 크로마토그램이다. 실선은 pH 7에서의 피크 B를 나타내고 점선은 pH 13에서의 피크 B를 나타낸다.

제5도는 플라세보(점선) 또는 중성의 가용성 글루칸(실선)과 함께 정맥내로 주입된 환자로부터 취한, 시간에 따른 혈청 IL-1 수준의 변화를 도시한다.

본 내용은 요구공개 건이므로 전문 내용을 수록하지 않았음

(57) 청구의 범위

청구항 1

감염에 대하여 숙주의 방어 메커니즘을 증강시키고 염증 반응을 유도하지 않는 중성의 수용성 β -글루칸 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 숙주가 사람인 것을 특징으로 하는 중성의 수용성 β -글루칸 제제.

청구항 3

제1항에 있어서, 약 5×10^6 세포/ml의 사람 말초혈 단핵 세포 배양물과 함께 약 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, β -글루칸 성분이 없는 완충액과의 다른 부분에서는 동일한 인큐베이션 후에 얻어진 수준보다 인터류킨-1 β 및 종양괴사 인자- α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는 것을 특징으로 하는 중성의 수용성 β -글루칸 제제.

청구항 4

제1항에 있어서, 약 5×10^6 세포/ml의 내독소-자극된 사람 말초혈 단핵 세포 배양물과 함께 약 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, 내독소 자극만으로 얻어진 수준보다 인터류킨-1 β 및 종양괴사 인자- α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는 것을 특징으로 하는 중성의 수용성 β -글루칸 제제.

청구항 5

제4항에 있어서, 사람 말초혈 단핵 세포가 약 $1\text{ng}/\text{ml}$ 의 농도의 대장균 리포다당 내독소로 자극되는 것을 특징으로 하는 중성의 수용성 β -글루칸 제제.

청구항 6

겔 투과 크로마토그래피에 의하여 분석되는 경우 단일 피크로서 이동하며, 삼중 나선 형태인 것을 특징으로 하는 분자 종으로 본질적으로 이루어지는 중성의 수용성 β -글루칸 제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 분자 종이 사람 단세포의 β -글루칸 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 중성의 수용성 β -글루칸 제제.

청구항 8

$1\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 아닐린 블루와 혼합되는 때 25mM NaOH 중에서 형광 복합체를 형성하고 150mM의 NaOH중에서 그것의 25mM NaOH 형광의 50%를 잃어버리는, 삼중 나선 형태를 갖는 중성의 수용성 β -글루칸.

청구항 9

a) 불용성 β -글루칸의 현탁액을, 이것의 유기산-가용성 부분을 용해시키기에 충분한 조건하에서 유기산으로 처리하는 단계; b) 가용성 β -글루칸의 천연 형태를 변성시키기에 충분한 조건하에서 유기산-가용성 β -글루칸을 알칼리로 처리하는 단계; c) 변성된 가용성 β -글루칸을 가용성 β -글루칸을 재-아닐링하기에 충분한 조건하에서 중성화시키는 단계; 그리고 d) 약 5×10^6 세포/ml의 내독소-자극된 사람 말초혈 단핵 세포 배양물로 함께 약 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, 내독소 자극만으로 얻어진 수준보다 인터류킨-1 β 및 종양괴사 인자- α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는, 삼중 나선 형태를 갖는 중성의 수용성 β -글루칸을 얻기 위하여 재-아닐링된 가용성 β -글루칸을 정제하는 단계로 이루어지는, 중성의 수용성 β -글루칸 제제의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 불용성 β -글루칸이 전 글루칸 입자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 단계 a)가 약 1내지 5의 pH 및 약 20내지 약 100℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 유기산이 아세트산 또는 포름산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 단계 b)가 약 7내지 14의 pH 및 약 40내지 약 121℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 단계 c) 전에 불용성 β-글루칸 및 응집된 가용성 β-글루칸을 제거하기 위하여 변성된 β-글루칸을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 정제 단계가 1,000 내지 100,000 달톤의 공칭 분자량 컷-오프 울트라필터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 단계 c)가 약 3.5내지 11.0의 pH 및 약 50내지 70℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제9항에 있어서, 단계 d)가 30,000 내지 70,000의 공칭 분자량 컷-오프 울트라필터 및 100,000 내지 500,000의 공칭 분자량 컷-오프 울트라필터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제9항의 방법에 의하여 제조된 중성의 수용성 β-글루칸.

청구항 19

약 5×10^6 세포/ml의 사람 말초혈 단핵 세포 배양물과 함께 약 1μg/ml의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, β-글루칸 성분이 없는 완충액과의 다른 부분에서는 동일한 인큐베이션후에 얻어진 수준보다 인터류킨-1β 및 종양 괴사 인자-α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는 중성의 수용성 β-글루칸을 포유동물에게 비경구적으로 투여하는 것으로 이루어지는, 감염 위험이 높은 포유동물의 감염의 방지 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 포유동물이 침입성 수술 과정의 결과로서 감염 위험이 높은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

약 5×10^6 세포/ml의 사람 말초혈 단핵 세포 배양물과 함께 약 1μg/ml의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, β-글루칸 성분이 없는 완충액과의 다른 부분에서는 동일한 인큐베이션후에 얻어진 수준보다 인터류킨-1β 및 종양 괴사 인자-α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는 중성의 수용성 β-글루칸의 유효량을 상처 부위에 투여하는 것으로 이루어지는 포유동물의 상처 부위의 회복 및 치유를 자극하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, β-글루칸이 상처 부위에 국소적으로 투여되거나 또는 상처 부위에 주입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

a) 불용성 β-글루칸의 현탁액을, 이것의 유기산-가용성 부분을 용해시키기에 충분한 조건하에서 유기산으로 처리하는 단계; b) 가용성 β-글루칸의 천연 형태를 변성시키기에 충분한 조건하에서 유기산-가용성 β-글루칸을 알칼리로 처리하는 단계; c) 변성된 가용성 β-글루칸을 가용성 β-글루칸을 재-아닐링하기에 충분한 조건하에서 중성화시키는 단계; 그리고 d) 약 5×10^6 세포/ml의 내독소-자극된 사람 말초혈 단핵 세포 배양물과 함께 약 1μg/ml의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, 내독소 자극만으로 얻어진 수준보다 인터류킨-1β 및 종양 괴사 인자-α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는, 삼중 나선 형태를 갖는 중성의 수용성 β-글루칸을 얻기 위하여 재-아닐링된 가용성 β-글루칸을 정제하는 단계로 의해 제조되는 중성의 수용성 β-글루칸을 약리학적으로 허용되는 비히클내에 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것으로 이루어지는, 혈소판 증식의 자극 방법.

청구항 24

감염에 대해 숙주의 방어 메커니즘을 증강시키고 염증 반응을 유도하지 않는, 약제학적으로 허용되는 담체내에 용해되는 중성의 수용성 β-글루칸 제제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 약 5×10^6 세포/ml의 사람 말초혈 단핵 세포 배양물과 함께 약 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, β -글루칸 성분이 없는 완충액과의 다른 부분에서는 동일한 인큐베이션후에 얻어진 수준보다 인터류킨- 1β 및 종양 괴사 인자- α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 26

약 5×10^6 세포/ml의 사람 말초혈 단핵 세포 배양물과 함께 약 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 3시간 이상 인큐베이션될 때, β -글루칸 성분이 없는 완충액과의 다른 부분에서는 동일한 인큐베이션후에 얻어진 수준보다 인터류킨- 1β 및 종양 괴사 인자- α 합성에서 2배 이하의 증가를 유발하는 중성의 수용성 β -글루칸을 포유동물에게 비경구적으로 투여하는 것으로 이루어지는, 감염 위험이 높은 포유동물의 감염을 치료하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 포유동물이 침입성 수술 과정의 결과로서 감염 위험이 높은 것을 특징으로 하는 방법.

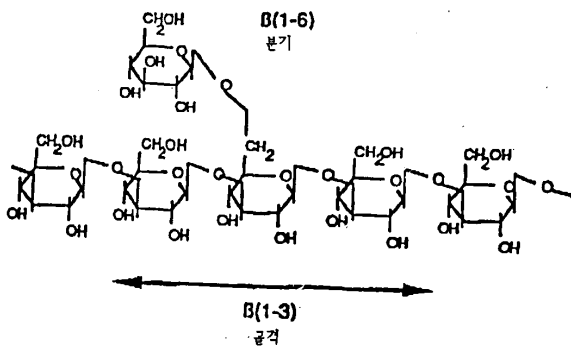
청구항 28

제16항에 있어서, 단계 c)가 약 6.0 내지 8.0의 pH에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

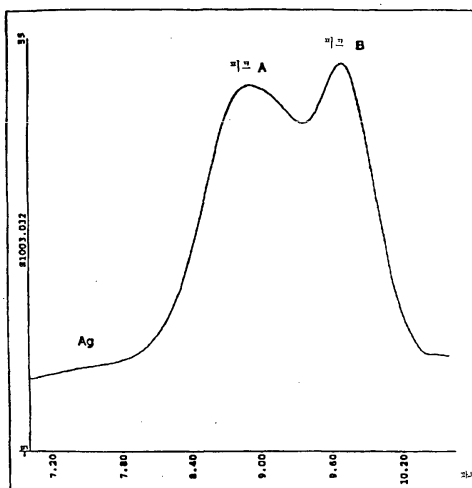
※ 참고사항 : 최초출원 내용에 의하여 공개하는 것임.

도면

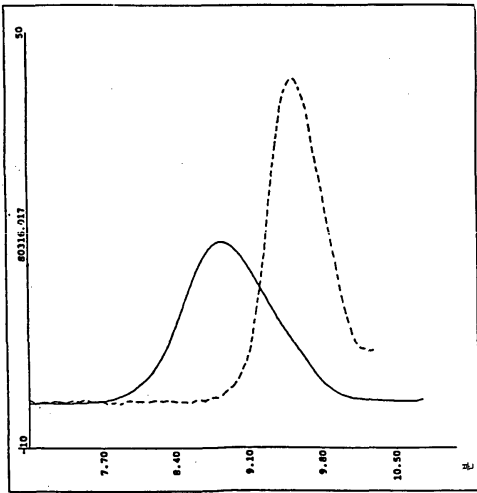
도면1



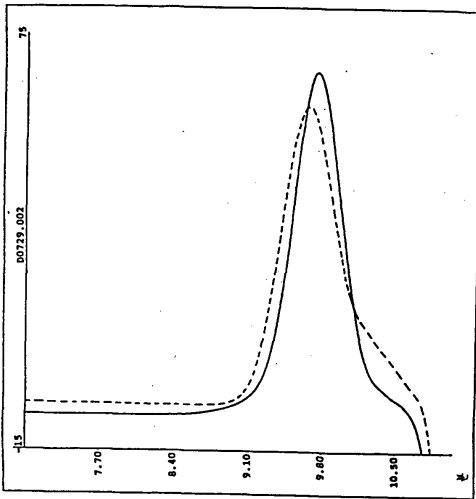
도면2



도면3



도면4



도면5

