



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2007-0109985

(43) 공개일자

2007년11월15일

(51) Int. Cl.

A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01) A61K 47/10 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2007-7013811

(22) 출원일자

2007년06월19일

심사청구일자

없음

번역문제출일자

2007년06월19일

(86) 국제출원번호

PCT/AU2005/001746

국제출원일자

2005년11월18일

(87) 국제공개번호

WO 2006/053383

국제공개일자

2006년05월26일

(30) 우선권주장

60/629,559 2004년11월22일 미국(US)

(71) 출원인

아나디스 리미티드

오스트레일리아 빅토리아 3061 캠프벨필드 캐피탈 링크 드라이브 4

(72) 발명자

롤린 그랜트 토마스

호주 빅토리아 3764 킬모어 이스트 오'그레디스 로드 43

리히티 고트프리트

호주 빅토리아 3040 옛센돈 쿠퍼 스트리트 49

로빈스-브라운 로이 마이클

호주 빅토리아 3106 템플스토헤 옥스포드 클로우스 5

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 생물활성 조성물

(57) 요약

본 발명은 (d) pH 민감성 생물활성제, (e) 식용 카르복시산 함유 모이어티 및

(f) 식용 알칼리성화(alkalising) 모이어티를 포함하는 생물활성 조성물(bioactive agent composition)로서, 상기 모이어티들과 활성제의 비율은 (i) 37 ± 3℃에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) 37 ± 3℃에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.5 미만의 값에 도달하도록 pH 조절을 제공하는 것인 생물활성 조성물에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

(a) pH 민감성 생물활성제

(b) 식용 카르복시산 함유 모이어티 및

(c) 식용 알칼리성화(alkalising) 모이어티를 포함하는 생물활성 조성물로서,

상기 모이어티들과 활성제의 비율은 (i) $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.5 미만의 값에 도달하도록 pH 조절을 제공하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, 상기 pH는 8.0 미만의 값에 도달하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 상기 생물활성제 및 상기 알칼리성화 모이어티 및 상기 카르복시산 함유 모이어티 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 pH 조절제를 포함하고, 상기 알칼리성화 모이어티 및 상기 카르복시산 함유 모이어티 중 나머지 하나는 하나 이상의 상기 생물활성제 및 상기 pH 조절제 성분에 존재하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 생물활성제, 및 상기 식용 카르복시산 함유 모이어티 및 상기 식용 알칼리성화 모이어티를 모두 포함하는 pH 조절제를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 생물활성제, 상기 알칼리성화 모이어티를 포함하는 알칼리성화제 및 상기 카르복시산 모이어티를 포함하는 작용제를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물활성제는 비타민, 영양 보충제, 성장 촉진제, 항종양제, 경구 백신, 흡입제, 살아있는 미생물, 펩티드, 폴리펩티드, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 뉴클레오시드, 단백질, 당단백질, 당 및 복합 탄수화물, 항감염제(anti-infectant), 항미생물제, 살균제, 방부제, 항우울제, 항정신성 작용제, 다른 생물활성 물질을 위한 벡터로 이용되는 유전적으로 변형된 개체 및 감염성 작용제(infectious agent), 예를 들면, 세균성 벡터(대장균, 살모넬라, 비브리오, 바실러스, 마이코박테리아, 쉬겔라 포함), 바이러스성 벡터(아데노바이러스, 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 헤르페스바이러스, 엔테로바이러스, 파라믹소바이러스 및 오르토믹소바이러스 포함), 식물 벡터(담배, 감자 및 바나나 포함), 효모 벡터, 면역글로불린, 질병 및 질병 유발원(예를 들면, 헬리코박터 파이로리, 대장균, 바실러스 중, 병원성 에르시니아 중, 및 알레르겐(allergen)), 그들의 단편, 유도체 및 복합체에 대한 항체를 포함한 친화성 정제된 면역글로불린을 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 생물활성 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물활성제는 성장 촉진제, 경구 백신, 프로바이오틱 미생물, 항미생물제, 세균 벡터, 면역글로불린, 항체 및 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 생물활성 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 카르복시산 함유 모이어티를 포함하는 pH 조절

제를 포함하고, 상기 카르복시산 함유 모이어티는 아세트산, 폴리산 모이어티, 아미노산, 또는 펩티드 사슬, 단백질, 또는 알긴산, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 아크릴산 및 메타크릴산 중 하나 또는 양자 모두의 공중합체 및 카르복시 함유 셀룰로오스 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 초유, 시트르산 및 타르타르산 중 하나 이상을 포함하는 카르복시산 함유 모이어티를 갖는 pH 조절제를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 카르복시산 모이어티를 포함하는 산성 작용제(acidic agent)는 소의 초유인 것인 생물활성 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 400 mg은 20 ml의 0.033 노르말 염산의 pH를 4 이상의 최종 pH, 보다 바람직하게는 5 이상의 최종 pH로 상승시키기에 충분한 식용 알칼리성화 모이어티를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 알칼리 인산염, 알칼리 탄산염, 알칼리 중탄산염, 히드록시염 및 그들 중 둘 이상의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 알칼리성화 모이어티를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 중탄산마그네슘, 실리케이 트 염, 및 질산염, 탄산염 또는 갈레이트 모이어티를 포함하는 염기성 염 중 하나 이상으로부터 선택된 알칼리 성화 모이어티를 포함하는 식용 알칼리성화 작용제(alkalising agent)를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알칼리성화 모이어티는 아민 함유 알칼리, 수산화칼륨, 수산화리튬, 수산화알루미늄, 산화칼슘 또는 수산화칼슘, 산화마그네슘, 또는 수산화마그네슘 및 산화 알루미늄 또는 수산화 알루미늄으로 구성된 군으로부터 선택된 알칼리와 반응된 약산 함유 모이어티를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물활성제는 고면역성 소의 초유(hyperimmune bovine colostrum) 또는 고면역성 조류 난황으로부터 유래된 항체로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 항체는 장내 세균, 장내 바이러스, 탄저병균, 흑사병균, 구강 세균, 호흡기 세균 및 식품매개 세균으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 항원에 대한 것인 생물활성 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물활성제는 장 질환 유발 그람 음성균으로부터의 0 그룹 혈청형의 특징적인 방식으로 반응하는 하나 이상의 세포벽 항원을 포함하는 백신으로 백신접종된 유우(dairy cow)로부터 채취된 초유의 고면역성 분획을 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물활성제는 락토펙틴 또는 락토펙라신을 포함하는 것인 생

물활성 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 생물활성제로서 장 질환 유발 그람 음성균으로부터의 0 그룹 혈청형의 특징적인 방식으로 반응하는 하나 이상의 세포벽 항원을 포함하는 백신으로 백신접종된 유우로부터 채취된 초유의 고면역성 분획 및 초유를 포함하는 pH 조절제를 포함하고, 정상 초유 대 고면역성 초유의 비는 1 대 1보다 큰 것인 생물활성 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 비는 3 대 1보다 큰 것인 생물활성 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 탄산칼슘 및 탄산마그네슘으로부터 선택된 식용 알칼리성화 모이어티를 포함하는 알칼리성화 작용제를 포함하는 것인 생물활성 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 조성물은 초유, 우유, 또는 그의 분획, 농축액 또는 가수분해물로 구성되는 군으로부터 선택된 카르복시산 모이어티를 포함하는 작용제를 포함하고, 상기 식용 알칼리성화 모이어티는 탄산칼슘 및 탄산마그네슘 중 하나 이상인 것인 생물활성 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 유제품 유래 단백질 대 탄산칼슘 또는 탄산마그네슘의 중량비는 2 대 1보다 큰 것인 생물활성 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 비는 4 대 1보다 큰 것인 생물활성 조성물.

청구항 25

pH 민감성 생물활성제 및 식용 카르복시산 함유 모이어티 및 식용 알칼리성화 모이어티를 포함하는 단위 투여량 조성물(unit dosage composition)로서: (i) $37 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 온도에서 상기 단위 투여량이 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) $37 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 온도에서 상기 단위 투여량이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.5 미만의 값에 도달하는 것인 단위 투여량 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 조성물은 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따라 정의된 바와 같은 것인 단위 투여량 조성물.

청구항 27

pH 민감성 제제와 (a) 식용 카르복시산 함유 모이어티 및 (b) 식용 알칼리성화 모이어티의 혼합물을 형성하는 단계를 포함하는 경구 투여용 약제의 제조에서 pH 민감성 생물활성제의 용도로서, 상기 조성물은 (i) $37 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 온도에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) $37 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 온도에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.5 미만의 값에 도달하도록 반응하게 제제화되는 것인 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 생물활성 조성물에 관한 것이고, 구체적으로는 광범위한 개체들의 집단에 이득을 제공하기 위해 pH에 민감하고 위 환경(gastric environment)에서 작용하거나 또는 이를 통과해야 하는 생물활성 조성물에 관한 것이다

다.

배경 기술

- <2> 경구용 생물활성 조성물의 예들은 소의 초유(위장 질환의 증상을 경감시키기 위해 이용될 수 있음), 초유의 IgG 분획(colostrum IgG fraction), 고면역성 초유(hyperimmune colostrum), 고면역성 난황 물질(hyperimmune egg yolk material) 및 참조에 의해 본 명세서에 포함된 국제특허출원 PCT/AU03/00348(WO 03/080082로 공개됨)에 기재된 기타 물질을 포함한다.
- <3> pH 민감성 생물활성 조성물의 이용과 연관된 여러 문제들이 있다. 위 환경은 개체 간 및 동일한 개체에 있어서 하루 중 상이한 시기별로 크게 다르다. 예를 들면, 늦은 밤 또는 아침식사 전에 일어날 수 있는 공복의 위 환경(fasted gastric environment)은 1.5 내지 2의 범위에 있는 pH를 가질 수 있고, 반면에 식후 위 환경은 2 내지 5 또는 그보다 훨씬 높은 범위에 있는 pH를 가질 수 있다. 또한, 연령 또는 투약에 의해 초래된 정지성 위선 분비(arrested gastric secretion)를 갖는 개체들에서, 위의 pH는 6 내지 7의 범위에 있을 수 있다. 또한, 개체에서 위액의 휴지기 용량(resting volume of gastric fluid)은 5 내지 40 ml 또는 훨씬 더 광범위하게 변할 수 있다.
- <4> pH 민감성 생물활성 물질(bioactive)의 효능을 개선하기 위한 다수의 전략들이 제안되었다.
- <5> 하기의 문헌, 행위, 물질, 장치, 물품 등의 검토는 본 발명의 배경을 제공하기 위한 목적으로만 본 명세서에 포함된다. 이들 중 일부 또는 전부가 선행 기술 기반의 일부를 형성하거나 또는 본 출원의 각 청구항의 우선일 전에 본 발명이 관련된 분야에서 통상의 지식이었다는 것을 시사하지도 의미하지도 않는다.
- <6> 2001년에 출원된 미국특허 제6569453호(Linder 및 Dietrich)는 오메프라졸과 같은 양성자 펌프 억제제를 포함한 산 분해성(acid-labile) 활성 화합물에 대한 투여 제형을 기재한다. 상기 제제는 장용층(enteric layer)을 갖지 않으며 경구 투여에 적합하다- 그들은 폴리비닐 아세테이트 또는 PVP/비닐 아세테이트 공중합체와 같은 중합체와 조합된 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함할 수 있다. 상기 제제는 적합한 용매에 스테롤 및 중합체를 용해시키는 단계, 그 내부에 산 분해성 양성자 펌프 억제제를 현탁시키는 단계 및 상기 결과물인 현탁액을 분무 건조시키는 단계에 의해 제조될 수 있다.
- <7> 또 다른 전략은 산 분해성 활성 화합물에 위 통과 후 장의 알칼리 환경에서 신속하게 용해되는 장용 코팅을 제공하는 것이다. 그와 같은 전략이 유럽특허공개 EP-A-0 005 129, EP-A-0 166 287, EP-A-0 174 726 및 EP-A-0 268 956에서 채택되었다. 이 전략을 채택하는 경우, 활성 성분은 종종 그의 알칼리 염의 제형으로 또는 알칼리 물질과 함께 제공되어야 한다. 장용 코팅의 제조에서 유용한 물질은 통상적으로 유리 카르복시기를 가지는 물질이며, 투여 제형의 내부에 알칼리 모이어티의 존재 하에, 코팅의 용해는 내부로부터 외부로 일어날 수 있다. 유리 카르복시기는 활성 화합물의 분해를 촉진할 수 있다. 따라서, 코팅과 핵심 물질(core material) 사이에 격리성 중간층(insulating intermediate layer)을 제공하는 것이 필요할 수 있다. Linder 및 Dietrich는 강한 산성 조건에 대한 보호를 제공하기 위해 매트릭스 캡슐화(matrix encapsulation)를 수행하여 이 문제를 해결한다. 활성 화합물은 건조된 제형으로 제공되어야 하고 비-수성 용매와 접촉한다. 전술된 특징은 비용 및 용매 사용을 증가시키고 많은 생물활성 물질의 변성, 특히 펩티드 기반 물질의 삼차 구조의 변성을 초래할 수 있다.
- <8> 2000년에 출원된 미국특허 제6312712호(Whittle 등)는 일부 약학적 활성 모이어티의 생체이용률이 상기 모이어티를 사이클로덱스트린과 조합하여 투여하는 것에 의해 증가될 수 있다는 것을 교시한다. 이 방법의 이용은 사이클로덱스트린과 적합한 반응, 예를 들면, 포접 화합물(inclusion complex)을 형성하기 위한 반응을 수행하는 활성 모이어티로 한정된다.
- <9> 1996년에 출원된 미국특허 제5998216호(O'Donnell)는 체액 내에 존재하는 단백질의 본래 상태(integrity)를 보존하기 위한 안정화용 제제(stabilising formulation)를 기재한다. 상기 안정화용 제제에서 중요한 성분은 수용성, 고-효능 완충 화합물(high-potency buffering compound)이다. 완충 능력은 해당 완충액에 강산 또는 강 알칼리의 증분을 첨가하는 것에 의해 유발되는 pH 변화를 측정하는 것에 의해 결정될 수 있다. 고효능의 가용성 완충 화합물은 TRIS, 이염기성 인산염(di-basic phosphate)/일염기성 인산염(mono-basic phosphate), 탄산수소나트륨 및 트리에탄올아민을 포함한다. O'Donnell은 혈액, 타액, 흉수, 위액, 복수 및 활액을 포함한 일련의 체액을 언급한다.
- <10> O'Donnell에 의해 언급된 다수의 완충액은 심한 부작용 때문에 긴 치료 과정에 이용될 수 없다.
- <11> 1997년에 출원된 미국특허 제5851579호(Wu 등)는 알칼리 가용성 아크릴계 라텍스 중합체 및 셀룰로오스 중합체

의 암모늄 또는 알칼리 염의 수용액을 포함하는 수성 장용 코팅 조성물을 기재한다. 이와 같은 장용 코팅 전략은 다수의 펩티드 기반 생물활성 물질에서 문제가 되는 것으로 확인되었다.

- <12> 1994년에 출원된 미국특허 제6468959호(Wunderlich 등)는 인슐린과 같은 펩티드에 대한 투여(dosage) 제형을 기재한다. 상기 투여 제형은 그 내부에 펩티드 약물이 분포되어 있는 젤라틴 또는 젤라틴 유도체의 매트릭스를 포함한다. 젤라틴 유도체는 슈도-코아세르베이트(pseudo-coacervate)를 형성하기에 충분한 반대 순 전하를 갖는다. 이는 젤라틴과 코아세르베이트 또는 슈도-코아세르베이트를 형성하는 생물활성 물질로 한정되고, 이 기준은 저분자량 생물활성 물질을 배제하는 경향이 있다. 중요하게는, 코아세르베이트화된 물질은 위 pH 및 위의 효소들에 의한 불리한 효과로부터 생물활성 물질을 보호해야 한다-이는 상당한 최적화 및 테스트를 필요로 하며, 전혀 달성될 수 없을 수 있다.
- <13> 1995년에 출원된 미국특허 제5780434호(A. Fjellestad-Paulsen)는 소형 및 중형 펩티드, 특히, 바소프레신, 옥시토신 및 그들의 유사체의 경구 투여용 조성물로서, 상기 조성물은 펩티드, 단백질분해효소(protease) 억제제, 및 약 5의 pH에서 완충작용하는 완충제를 포함하는 담체를 포함하고, 상기 혼합물은 2 mm보다 작은 구체의 형태로 존재하고, 상기 구체는 분리될 수 있는 카르복시기를 갖는 중합체로 코팅(장용 코팅)된 것인 조성물을 기재한다. 전술된 바와 같은 장용 코팅과 관련하여 어려움이 발생한다. 상기 특허는 바람직한 위의 pH 최종값(end value), 또는 pH 최종값 범위에 관한 정보를 전혀 제공하지 않는다.
- <14> 미국특허 제5525634호는 매트릭스-약물 조합으로서, 상기 매트릭스는 사카라이드-함유 중합체를 포함하는 것인 매트릭스-약물 조합을 기재한다. 상기 중합체는 위에서 화학적 및 효소적(enzymatic) 분해에 저항하고, 결장에서 장내 세균(colonic bacteria)에 의한 효소적 분해에 민감하다. 이 특허는 위 환경에서의 pH 조절에 관한 교시를 제공하지 않는다.
- <15> 국제특허출원 PCT/AU03/00348(Rawlin 및 Lichti)의 공개공보 WO 03/080082는 불리한 환경에서 불안정한(labile) 생물활성 물질의 생존력(viability)을 개선하는 방법으로서, 생물활성 물질과 포유동물의 초유의 혼합물을 형성하는 단계를 포함하는 방법을 기재한다. 이 특허는 초유 이외의 물질의 보호 효과에 관한 교시를 전혀 제공하지 않는다.
- <16> 탈지유 및/또는 난황은 동결 및 해동과 같은 불리한 환경에서 정자의 생존력을 보존하는데 효과적인 것으로 알려져 있다(Squire et al (2004) in Theriogenology Sep 15; 62(6):1056-65).
- <17> 다양한 위 환경을 갖는 광범위한 개체들에게 양호한 생체이용률을 제공하는 pH 민감성 생물활성 물질용 조성물에 대한 요구가 있다.

발명의 상세한 설명

- <18> pH 민감성 물질의 생체이용률에 대한 연구를 통해, 본 발명자들은 그와 같은 조성물에 대한 요건의 이해를 수립하였다. 본 발명자들은 그와 같은 조성물에 대한 요건들 중 일부는 산성인 위액에 대해 양호한 알칼리성화(alkalising) 활성을 제공하는 것이나, 그 조성물이 중성인 위 환경이 pH 8.5를 초과, 바람직하게는 pH 8을 초과하여 알칼리성화되게 하지 않는다면 상당한 장점이 될 것이라는 것을 발견했다. 본 발명자들은 후자의 제약은 위의 알칼리성 급증(일시적인 급증일지라도)은 소화 효소인 펩신을 영구적으로 불활성화시킬 수 있기 때문에 발생한다고 생각한다(The Pharmacological Basis of Therapeutics - Goodman and Gillman, 5th edition, p 960). 전술된 제약 모두(낮은 pH에서 알칼리성화 효과, 중성 pH에서 비-알칼리성화 효과)를 충족시키는 요건은 제산제(antacid)의 제제에서는 일어나지 않으며, 이는 제산제는 산성(4 미만의 pH) 위액을 갖는 사람들에 의해서만 복용되기 때문이다.
- <19> 본 발명자들은 위 환경에 대한 pH에 불안정한(pH labile) 생물활성 물질의 최적의 제시는 위의 pH를 보다 높은 pH값(예를 들면, pH 7 또는 8)이 아닌, pH 4 내지 5로 유지하는 것을 포함할 수 있고- 이는 위산 공급(replenishment) 속도는 보다 높은 pH 수준에서 크게 증가하기 때문이다.
- <20> 본 발명자들은 카르복시산 함유 모이어티(moiety) 및 알칼리 함유 모이어티를 이용하고 각각의 양을 선택하는 것에 의해, 투여 시에 매우 산성인 위 환경을 갖는 개체에서 생물활성 물질을 보호하면서, 투여 시에 덜 산성이거나 또는 중성인 위 환경을 갖는 개체에서 위의 알칼리 급증을 피하는 것이 가능하다는 것을 발견했다. 이에 의해, 생물활성제를 손상시키거나 또는 펩신을 불활성화시키는 위험 없이 생물활성제의 생체이용률이 개선될 수 있다.

- <21> 따라서, 본 발명자들은 본 발명의 제1양태에서,
- <22> (a) pH 민감성 생물활성제
- <23> (b) 식용 카르복시산 함유 모이어티 및
- <24> (c) 식용 알칼리성화(alkalising) 모이어티를 포함하는 생물활성제 조성물(bioactive agent composition)로서,
- <25> 상기 모이어티들과 활성제의 비율은 (i) 37 ± 3℃의 온도에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) 37 ± 3℃에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.5 미만의 값에 도달하도록 pH 조절을 제공하는 것인 생물활성제 조성물을 제공한다.
- <26> 또 다른 양태에서, 본 발명은 pH 민감성 생물활성제와 (a) 식용 카르복시산 함유 모이어티 및 (b) 식용 알칼리성화 모이어티의 혼합물을 형성하는 단계를 포함하는 경구 투여용 약제의 제조에서 pH 민감성 생물활성제의 용도로서, 상기 조성물은 (i) 37 ± 3℃의 온도에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) 37 ± 3℃에서 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.5 미만의 값에 도달하도록 반응하게 제제화되는 것인 용도를 제공한다.
- <27> 또 다른 양태에서, 본 발명은 pH 민감성 생물활성제 및 식용 카르복시산 함유 모이어티 및 식용 알칼리성화 모이어티를 포함하는 단위 투여량(unit dosage) 조성물로서: (i) 상기 단위 투여량이 37 ± 3℃의 온도에서 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) 상기 단위 투여량이 37 ± 3℃의 온도에서 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.5 미만의 값에 도달하는 것인 조성물을 제공한다.
- <28> 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명의 결과물인 조성물이 실제로, 개별적인 투여 전에는 알려질 수 없는 것인 광범위하게 다양한 위의 휴지기 용량(gastric resting volume) 및 위의 pH 값을 갖는 광범위한 개체들의 집단에게 안정한 pH 민감성 생물활성제의 조성물을 제공한다는 것을 발견했다.
- <29> 본 명세서에서 사용되는 모이어티(moiety)라는 용어는 분자의 화학적 작용기 또는 세그먼트 또는 전체 분자를 의미한다. 이 분자는 비교적 낮은 분자량의 분자 또는 단백질과 같은 거대분자(macromolecule)일 수 있는 분자일 수 있다.
- <30> 본 명세서에서 사용되는 용어 작용제(agent)는 분자 또는 물질과 같은 화학적 화합물(chemical entity)를 의미한다.
- <31> 본 명세서의 상세한 설명 및 청구항 전반에서, 단어 "포함한다(comprise)" 및 "포함하는(comprising)" 및 "포함하다(comprises)"와 같은 상기 단어의 변형은 다른 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하도록 의도되지 않는다.
- <32> 본 명세서 및 청구항에서 지칭되는 경우, 고형 조성물의 수성 물질에 대한 첨가에 관해 보고된 pH 값은 미세하게 분할된 제형의 상기 고형 물질을 수성 조성물에 (10% w/v 미만으로) 첨가하고, 37℃에서 30분간 교반하고 37℃로 조정된(calibrated) 유리 전극을 이용하여 pH를 측정하는 것에 의해 결정된다. (이는 "pH 프로토콜"이라는 표제의 실시예 섹션에서 보다 상세하게 설명된다.)
- <33> 상세한 설명
- <34> 본 발명의 바람직한 양태에서, 조성물은 pH 민감성 생물활성제를 포함하고 바람직하게는 (i) 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 0.033 노르말 염산에 첨가되는 경우, pH가 4 내지 8의 범위에 있는 값에 도달하고, (ii) 400 mg의 상기 조성물이 20 ml의 pH 7의 탈이온수에 첨가되는 경우, pH가 8.0 미만의 값에 도달하도록, 식용 카르복시산 함유 모이어티 및 식용 알칼리성화 모이어티를 더 포함할 수 있다.
- <35> 생물활성 조성물은 pH 민감성 생물활성제를 포함한다. 생물활성제는 100 mg의 상기 활성제가 20 ml의 0.033 노르말 염산과 30분간 지속적으로 혼합되는 경우 50% 이상의 활성(바람직하게는 75% 이상의 활성)을 잃는 경우, pH 민감성인 것으로 간주된다.
- <36> pH 민감성 생물활성제는 비타민, 영양 보충제, 성장 촉진제, 항종양제, 경구 백신, 흡입제, 살아있는 미생물(예를 들면, 락토바실러스 종과 같은 프로토바이오틱스(protobiotics)), 펩티드, 폴리펩티드, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 뉴클레오시드, 단백질, 당단백질(glycoprotein), 당(sugar) 및 복합 탄수화물(complex

carbohydrate), 항감염제(anti-infectant), 항미생물제(antimicrobial), 살균제, 방부제, 향우울제, 향정신성 작용제(psychoactive agent), 다른 생물활성 물질을 위한 벡터로 이용되는 유전적으로 변형된 개체 및 감염성 작용제(infectious agent), 예를 들면, 세균성 벡터(대장균, 살모넬라, 비브리오, 락토바실리(Lactobacilli), 바실러스, 마이코박테리아, 쉬겔라 포함), 바이러스성 벡터(아데노바이러스(Adenovirus), 폭스바이러스(Poxvirus), 바쿨로바이러스(Baculovirus), 헤르페스바이러스(Herpesvirus), 엔테로바이러스(Enterovirus), 파라믹소바이러스(Paramyxovirus) 및 오르토믹소바이러스(Orthomyxovirus) 포함), 식물 벡터(담배, 감자 및 바나나 포함), 효모 벡터, 면역글로불린, 질병 및 질병 유발원(예를 들면, 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori), 대장균, 바실러스 종, 병원성 예르시니아(Yersinia) 종, 및 알레르겐(allergen)), 그들의 단편, 유도체 및 복합체에 대한 항체를 포함한 친화성 정제된(affinity purified) 면역글로불린을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

<37> 식용 카르복시산 함유 모이어티는 아세트산; 아스코르브산; 시트르산 및 타르타르산과 같은 폴리산 모이어티; 아미노산; 펩티드 사슬 또는 단백질; 알긴산; 폴리아크릴산; 폴리메타크릴산; 및 아크릴산 메타크릴산의 군으로부터 선택된 하나 이상의 단량체의 공중합체; 및 카르복시산 함유 셀룰로오스 유도체로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 식용 카르복시산, 예를 들면, 액체 유제품(dairy fluid) 또는 야채 또는 식육으로부터 유래된 단백질 또는 단백질 단편은 영양적 가치를 가질 수 있다.

<38> 식용 알칼리성화 모이어티는 400 mg의 투여량으로 20 ml의 0.033 노르말 염산의 pH를 4 또는 그 이상의 최종 pH까지 상승시킬 수 있는 모이어티일 수 있다. 바람직하게는, 식용 알칼리성화 모이어티는 20 ml의 0.033 노르말 염산의 pH를 5 이상, 또는 심지어 6 이상의 최종 pH까지 상승시킬 수 있다. 이 모이어티는 알칼리성 인산염, 알칼리성 탄산염, 알칼리성 중탄산염, 히드록시염 및 그들 중 둘 이상의 혼합물로부터 선택된 바와 같은 알칼리성 작용제를 포함할 수 있다. 알칼리성 모이어티는 하나 이상의 탄산, 중탄산의 칼슘 및 마그네슘 염, 실리케이트 염 및 탄산마그네슘 공침체(co-precipitate)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 염을 포함할 수 있다. 알칼리성화 작용제(alkalising agent)는 질산염, 탄산염 또는 갈레이트(gallate) 모이어티를 포함하는 기타 염 기성 염의 형태일 수 있다. 알칼리성화 모이어티는 아민 함유 알칼리와 같은 알칼리 또는 하나 이상의 수산화칼륨, 수산화리튬, 수산화나트륨, 수산화알루미늄, 수산화칼슘, 수산화마그네슘, 및 산화 알루미늄과 같은 알칼리와 반응된 약산 함유 모이어티를 포함할 수 있다.

<39> 식용 카르복시산 함유 모이어티(양성자첨가(protonated) 또는 양성자제거(deprotonated)된 형태일 수 있음) 및 식용 알칼리성화 모이어티는 동일한 물질의 일부인 동일한 것일 수 있다. 예를 들면, 단백질 또는 폴리카르복시산의 산 기가 수산화나트륨 또는 아민-함유 염기와 부분적으로 예비-반응되면, 결과물인 생성물은 두 모이어티를 모두 포함할 수 있다.

<40> 카르복시산 함유 모이어티가 생물활성제에 존재할 수 있다. 예를 들면, 생물활성제는 산 및/또는 알칼리 모이어티를 갖는 단백질과 같은 거대분자를 포함할 수 있고 일부 경우에 요구되는 모이어티의 적합한 균형(balance)을 제공하기 위해 변형될 수 있다.

<41> 하나의 바람직한 구체예에서, 생물활성제는 소의 초유 또는 조류 난황(avian egg yolk)으로부터 유래된 고면역성 분획(hyperimmune fraction)을 포함한다. 고면역성 분획은 예를 들면, 장내 세균, 장내 바이러스, 탄저균, 흑사병(plague) 균, 구강 세균, 호흡기 세균(respiratory bacteria), 식품 매개 세균(food borne bacteria)에 대한 고면역성 물질일 수 있다.

<42> 또 다른 바람직한 구체예에서, 생물활성제는 장 질환(enteric bacteria) 유발 그람 음성균으로부터의 0 그룹 혈청형의 특징적인 방식으로 반응하는 하나 이상의 세포벽 항원을 포함하는 백신으로 백신접종된 유우(dairy cow)로부터 채취된 고면역성 초유를 포함한다. 이 초유 모이어티 및 관련된 백신은 보다 바람직한 구체예와 함께, 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 본 발명자들에 의해 출원되어 동시계류중인 국제특허출원 PCT/AU 2004/00277(WO 2004/078209로 공개됨)에 기재된다.

<43> 또 다른 바람직한 구체예에서, 생물활성제는 락토페린 또는 락토페라신을 포함한다.

<44> 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 제제는 정상의 초유 및 장 질환 유발 그람 음성균으로부터의 0 그룹 혈청형의 특징적인 방식으로 반응하는 하나 이상의 세포벽 항원을 포함하는 백신으로 백신접종된 유우로부터 채취된 고면역성 초유를 포함하고, 상기에서 정상 초유 대 고면역성 초유의 비는 1 대 1 보다 크고, 바람직하게는 2 대 1보다 크며, 보다 바람직하게는 3 대 1보다 크다.

<45> 특히 바람직한 구체예에서, 식용 알칼리성 모이어티는 탄산칼슘 또는 탄산마그네슘과 같은 비교적 불용성인 알

칼리이다.

- <46> 단위 투여량 조성물은 정제, 캡슐, 캐플릿(caplet), 시럽 또는 기타 적합한 제형일 수 있다. 바람직하게는 단위 투여량은 정제, 캡슐 또는 캐플릿의 제형이다. 통상적으로, 단위 투여량은 50 내지 700 mg 범위의 조성물을 포함하고, 보다 바람직하게는 100 내지 500 mg 범위의 조성물을 포함할 것이다.
- <47> 카르복시산 함유 모이어티는 바람직하게는 초유 또는 우유 또는 그의 분획 또는 농축액 또는 효소 또는 비-효소적 가수분해물과 같은 유제품 유래 단백질이고 식용 알칼리성화 모이어티는 탄산칼슘 또는 탄산마그네슘이다. 유제품 유래 단백질 및 탄산칼슘 또는 탄산마그네슘은 캡슐 또는 정제에 혼합된 분말 충전물(mixed powder fill)로서 동시-첨가될 수 있고, 또는 이 물질들은 수성 액체에 동시-현탁되고 뒤이어 건조되고 처리되어 분말을 형성할 수 있다.
- <48> 유제품 농축액(dairy concentrate)은 바람직하게는 80%보다 높은 비율의 단백질을 포함한다.
- <49> 바람직하게는, 유제품 유래 단백질 대 탄산칼슘 또는 탄산마그네슘의 중량비는 2 대 1보다 크고, 보다 바람직하게는 3 대 1보다 크며, 훨씬 더 바람직하게는 5 대 1보다 크다.
- <50> 이하에서 본 발명은 하기의 실시예를 참조하여 기재된다. 실시예들은 본 발명의 예시를 위해 제공되며 그들은 결코 본 발명의 범위를 한정하지 않는 것으로 이해된다.

실시예

- <51> pH 프로토콜
- <52> 본 명세서 및 청구항에서 지칭되는 경우, 고형 조성물의 수성 물질로의 첨가에 관해 보고된 pH 값은:
- <53> (a) 가상 위액(simulated gastric liquor)(달리 기재되지 않으면, 명목 pH 1.5의 0.033 N 염산 20 ml) 또는 증류수(달리 기재되지 않으면, 20 ml)를 50 ml 팔콘(Falcon) 튜브에 첨가하고, 37℃ 수조에서 10분간 방치하는 단계,
- <54> (b) 미세하게 분할되거나 또는 분쇄된 고체 물질(달리 기재되지 않으면, 400 mg)을 상기 팔콘 튜브에 첨가하고 5초간 볼텍싱(vortex)하는 단계,
- <55> (c) 상기 팔콘 튜브를 15도의 원호를 통해 진동하고 일 단부로부터 다른 단부까지 길이가 35 cm인 Ratek Rocking Platform 믹서(모델 ERPM4, Ratek Instruments, Boronia, Victoria, Australia 판매)의 일 단부(extremity)에, 상기 튜브의 장축도 15도의 원호를 통해 진동하도록 테이프에 의해 고정시키는 단계,
- <56> (d) 상기 진동 플랫폼(rocking platform)과 부착된 시료를 37℃ 인큐베이터의 내부에 배치하고 50 rpm으로 30분간 상기 시료를 진동시키는 단계,
- <57> (e) 진동 및 방치 후에 pH 측정기(pH meter)를 이용하여 상기 팔콘 튜브의 내용물의 pH를 측정하는 단계:에 의해 결정된다.
- <58> 실시예 1: 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)-시료 조성물
- <59> 하기의 표에 기재된 조성을 갖는 시료를 제조하였다-성분들을 미세하게 분할하고 함께 혼합하였다. 생물활성물질은 락토바실러스 플란타룸(동결건조된 분말, 실시예 5 참조)이었다.

<60>

표 1

시료 ID	생물활성 물질 중량부	카르복시 모이어티 중량부	알칼리성화 모이어티
Lp1	100	400 (초유)	-
Lp2	100	378 (초유)	22 (탄산칼슘)
Lp3	100	-	400 (탄산칼슘)
Lp4	100	-	400 (탄산칼슘)
Lp6	100	320 (초유)	80 (탄산칼슘)
Lp7	100	320 (초유)	80 (탄산칼슘)
Lp8	100	220 (시트르산)	180 (탄산칼슘)
Lp9	100	270 (시트르산)	130 (탄산칼슘)

<61>

<62>

실시예 2: 실시예 1에 기재된 시료의 성능

<63>

400 밀리그램의 시료를 20 ml의 0.033N HCl 및 20 ml의 증류수에 첨가하였다. 처리 후에 최종 pH(pH 프로토콜 섹션 참조) 및 20 ml 당 cfu로 표현된 L.플란타룸의 생존력을 측정하였다(실시예 6 참조). 결과는 하기의 표에 요약한다(EXP5는 100,000을 의미함):

<64>

표 2

시료 ID	PH (산 처리 후)	생존력 (산 처리 후)	PH (물 처리 후)	생존력 (물 처리 후)
Lp1	2.2	0	6.3	4.5EXP6
Lp2	3.7	1.6EXP5	6.9	5.2EXP6
Lp3	6.6	4.4EXP6	8.8	3.1EXP6
Lp4	9.3	2.2EXP6	9.6	2.1EXP6
Lp6	6.9	6.0EXP4	9.2	2.7EXP6
Lp7	5.9	3.6EXP6	6.9	5.9EXP6
Lp8	4.75	6.4EXP6	5.98	5.7EXP6
Lp9	2.15	0	2.27	0

<65>

<66>

검토:

<67>

시료 Lp1은 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 산 처리 후 pH(휴지기 위 pH의 대표)는 2.2(본 발명의 한계값인 4보다 훨씬 낮음)였고, L. 플란타룸은 생존가능하지 않았다.

<68>

시료 Lp2는 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 산 처리 후 pH는 3.7(본 발명의 한계값 4보다 약간 낮음)이다. L.플란타룸 생존력은 물 처리시보다 40배 낮았다.

<69>

시료 Lp3은 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 산 처리 후 pH는 4보다 높으나, 물 처리 후 pH가 8.5보다 높다. L.플란타룸은 생존가능하나, 최종 pH는 8.5보다 높고, 이 제제의 특히, 장기적인 반복 섭취는 비교적 중성인 위 환경을 갖는 사람들에서 위산 분비 또는 원치않는 위 알칼리도(alkalinity)를 촉진할 것으로 예상되었다.

<70>

시료 Lp4는 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 산 및 물 처리 후 최종 pH는 8.5보다 높고 이 제제의 특히, 장기적인 반복 섭취는 비교적 중성인 위 환경을 갖는 사람들에서 위산 분비 또는 원치않는 위 알칼리도를 촉진할 것으로 예상되었다.

<71>

시료 Lp6는 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 산 및 물 처리 후 최종 pH는 8.5보다 높고 이 제제의 특히, 장기

적인 반복 섭취는 비교적 중성인 위 환경을 갖는 사람들에서 원치않는 위 알칼리도를 촉진할 것으로 예상되었다.

<72> 시료 Lp7은 본 발명에 따른 조성물이다- 산 처리 후 최종 pH는 4를 초과하고, 물 처리 후 최종 pH는 8.5 미만이며, L. 플란타룸은 생존가능했다.

<73> 시료 Lp8는 본 발명에 따른 조성물이다- 산 처리 후 최종 pH는 4를 초과하고, 물 처리 후 최종 pH는 8.5 미만이며, L. 플란타룸은 생존가능했다.

<74> 시료 Lp9은 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 산 처리 후 최종 pH는 4 미만이고 L. 플란타룸은 생존가능하지 않았다.

<75> 실시예 3: 에리트로마이신, 우레아제 시료 조성물

<76> 이 실시예에서 생물활성 물질은 에리트로마이신 및 우레아제였다(실시예 7 참조).

<77> 표 3

시료 ID	생물활성 물질 중량부	성분 1 중량부	성분 2 중량부
Er1	1.0 (erythro)	320 (초유, 카르복실 모이어티)	80 (탄산칼슘, 알칼리성화 모이어티)
Er2	1.0 (erythro)	400 (수크로오스, 블랭크 모이어티)	-
Ur1	168 (우레아제)	320 (초유, 카르복실 모이어티)	80 (탄산칼슘, 알칼리성화 모이어티)
Ur2	168 (우레아제)	400 (수크로오스, 블랭크 모이어티)	-

<78>

<79> 실시예 4: 실시예 3에 기재된 시료의 성능

<80> 표 4

시료 ID	PH (산 처리 후)	상대적 활성 (산 처리 후)	PH (물 처리 후)	상대적 활성 (물 처리 후)
Er1	5.8	65%	7.0	95%
Er2	1.7	<5%	6.8	100%
Ur1	6.0	75%	76.9	105%
Ur2	1.8	<5%	6.9	100%

<81>

<82> 검토:

<83> 시료 Er1은 본 발명에 따른 조성물이다- 산 처리 후 최종 pH는 4를 초과하고, 물 처리 후 최종 pH는 8.5 미만이었다. 에리트로마이신의 상대적 활성은 두 처리 후에 상당했다.

<84> 시료 Er2는 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 카르복시 성분 및 알칼리성화 성분을 포함하지 않으며, 산 처리 후 생물활성제의 상대적 활성이 낮았다. 물 처리 후 이 시료에서 생물활성제의 활성을 100% 수준을 설정하기 위해 이용하였다.

<85> 시료 Ur1은 본 발명에 따른 조성물이다- 산 처리 후 최종 pH는 4를 초과하고, 물 처리 후 최종 pH는 8.5 미만이었다. 우레아제의 상대적 활성은 두 처리 후에 상당했다.

<86> 시료 Ur2는 본 발명에 따른 조성물이 아니다- 카르복시 성분 및 알칼리성화 성분을 포함하지 않으며, 산 처리 후 생물활성제의 상대적 존재도(abundance)가 낮았다. 물 처리 후 이 시료에서 생물활성제의 활성을 100% 수준을 설정하기 위해 이용하였다.

<87> 실시예 5: L.플란타룸 동결건조 분말의 제조

<88> 동결건조 배지(FDM)를 하기와 같이 제조하였다(Conrad PB et al. (2000) in Stabilisation and preservation

of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41, 17-24로부터 유래된 방법): 트레할로오스 이수화물(Sigma) 및 소듐 테트라보레이트 데카하이드레이트(Sigma)를 멸균된 0.6mM 인산칼륨 pH 7.2에 각각 40%w/v 및 5.7%w/v으로 용해시켰다. 고형 시트르산(Sigma)으로 pH를 6.5로 조절하고 다시 수산화암모늄(Sigma 29.5% 용액)으로 8.5까지 조절하였다.

<89> 본 연구에서 사용된 *L. 플란타룸*은 Microbial Research Unit Royal Childrens Hospital, Parkville, Victoria, Australia의 균주 은행(culture collection)으로부터 수득하여 16S 서열분석(리보솜 서브유닛으로부터의 DNA 서열분석)에 의해 타입핑하였다. 균주는 5% CO₂:공기 믹스를 갖는 인큐베이터에서 37℃에서 48시간 동안 MRS 아가 상에 평판 배양(lawn culture)(20개의 플레이트)으로 배양하였다. 배양물을 20개의 플레이트로부터 떼어내고 20 ml의 0.85% 염수에서 합쳤다. 상기 염수를 실온에서 15분간 원심분리하고, 펠렛을 5 ml의 염수에 재현탁시켰다. 이 5 ml 분량(aliquot)에 볼텍싱하면서 5 ml의 FDM을 첨가하고 상기 합쳐진 액체를 Dynavac "Mini Ultra Cold" 동결건조기에서 동결건조시켰다. 펌프의 최대 진공 = 0.1mbar; 동결건조 챔버의 진공(정상 상태: steady state) = 0.38mbar; 작업 온도 = -100℃; 용량(컨테이너 용량) = 1.7 L. 동결건조 공정은 진공이 0.38 mbar에 접근할 때까지 밤새(18 시간) 진행하였다. 동결건조된 물질을 미세 분말로 분쇄하고 다른 시료 성분들에 첨가하였다.

<90> 실시예 6: *L. 플란타룸* 생존력의 결정.

<91> 50 ml 팔콘 튜브(20 ml의 액체 부피)에서 산 또는 물의 처리 후, 250 마이크로리터의 액체를 (2개씩) 취하고 상기 액체를 62 마이크로리터의 냉각된 200mM Tris-HCl pH 8.0의 첨가에 의해 퀀칭시켰다. *L. 플란타룸*의 생존은 생존 플레이트 계수법(viable plate count technique)을 이용하여 분석하였다. 퀀칭 직후 MRS 배양액(broth)으로 인큐베이션 혼합물의 10배 희석액을 준비하였다. 100 마이크로리터의 각 희석액을 2개의 플레이트에 스프레딩시켰다. 플레이트를 48시간 동안 인큐베이션하고 플레이트 당 콜로니의 수를 측정하였다. 그 후, 인큐베이션 혼합물에서 콜로니 형성 유닛(cfu)의 수는 희석된 현탁액의 콜로니 형성 유닛의 수에 희석비 곱하여 계산하였다.

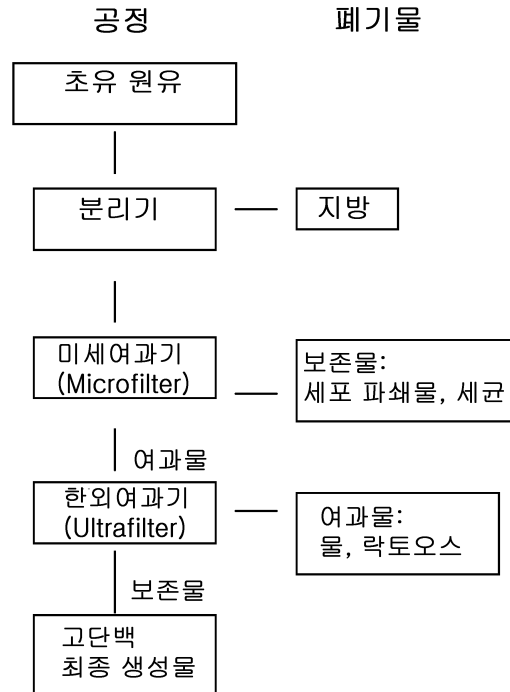
<92> 실시예 7: 다른 성분들의 제조/입수

<93> 우레아제는 Sigma Jack Bean Urease Type III(Cat No U-1500)이었다. 이 동결건조된 분말은 mg 당 16 유닛의 표시 활성(quoted activity)을 가졌다(1 유닛은 25℃ 및 pH 7.0에서 분당 우레아로부터 1.0 마이크로몰의 암모니아를 방출시킴).

<94> 에리트로마이신 분말은 Boehringer Mannheim의 제품이었다.

<95> 초유

<96> 하기의 도표는 초유를 수득하고 이를 처리된 제형으로 전환시키기 위해 이용된 원리를 도시한다.



<97>

<98> 초유 원유(raw colostrum)를 유우로부터 가장 바람직하게는 출산(calving) 후 최초 착유(milking) 시 채취하였다. 초유를 농장에서 4℃에 보관하고 -20℃에서의 보다 장기간 보관을 위해 수송시키거나 또는 직접 습식 제조(wet manufacturing)로 보냈다.

<99> 초유 원유를 약 37℃까지 가온하고 그 후 지방을 제거하기 위해 회전식 우유 분리기(rotary milk separator)에서 피막을 걷어냈다(skim). 결과물인 액체를 저온살균(pasturise)시키거나 또는 (세균 및 파쇄물을 제거하기 위해) 7-10 마이크론 세라믹 필터 시스템으로 미세여과시켰다(microfilter). 그 후, 대부분의 물, 락토오스 및 전해질을 제거하고 고단백 농축액(high protein concentrate)을 수득하기 위해 액체를 한외여과(ultrafilter)시켰다(예를 들면, Abcor 10m² Ultrafiltration 플랜트). 결과물인 고단백 농축액을 바람직하게는 동결건조(냉동-건조) 또는 분무-건조에 의해 더 처리하였다.

<100> 전술된 방법은 하기와 같은 규격을 갖는 처리된 소의 초유 분말을 생성했다. 하기에 정의된 바와 같은 이 제품은 호주의 Therapeutic Goods Authority에 의해 치료용 제품에 함유시키기에 적합한 물질로 열거된다.

<101> 정의: 소의 초유 분말(Bovine colostrum powder)은 농축 및 동결건조 후에 호주 또는 뉴질랜드* 소(Bos taurus)의 최초 착유로부터 유래된다.

<102> 외형: 자유-유동형(free-flowing), 연한 황색 분말.

<103> 특성: 수용성. 수분과 접촉되면 옅은 우유 향이 남.

<104> 수분: 2 내지 5 % m/m의 범위 AS 2300.1.1 (1988)

<105> 지방: 1 내지 4 % m/m의 범위 AS 2300.1.3 (1988)

<106> 회분(Ash) (@550℃) 8 % m/m 이하 AS 2300.1.5 (1988)

<107> 총 질소량(Total Nitrogen) (TN) 정보로 제공됨** AS 2300.1.2 (1991)

<108> 비-단백질 질소(NPN) 정보로 제공됨** AS 2300.1.2.2 (1988)

<109> 순수 단백질(True protein) 60 % m/m 이상 (TN-N PN)% x 6.38

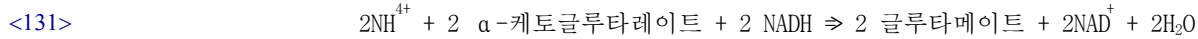
<110> 단백질 60 % m/m 이상 AS 2300.1.2 (1991)

- <111> 락토오스(일수화물) 15 % m/m 이하
- <112> 효소에 의한 가수분해 및 산화 후 UV 분석
- <113> (Boehhnger Mannheim)
- <114> 총 면역글로불린 20 % m/m 이상
- <115> 방사 면역확산 분석법(Radial immunodiffusion assay)
- <116> 미생물 한도(Microbial limit) TGA 가이드라인 준수
- <117> 잔류물: 중금속, 농약 및 수의약품 화합물(Heavy metals Agricultural and Veterinary chemicals)
- <118> 유제품에 관한 ANZFA 식품 표준법(ANZFA Food Standards Code for dairy products) 적용. 적용가능한 식품 표준이 없는 경우, 중금속에 대한 BP 테스트를 적용하고(납을 기준으로 2 ppm으로 계산됨) 살충제 잔류물에 대한 BP 요건을 적용한다.
- <119> * 이 국가들은 광우병-안전(BSE-free) 국가이다. 다른 국가들로부터의 초유는 TGA로부터 사전-통관(pre-clearance)을 받아야할 것이다.
- <120> ** 순수 단백질에 대한 값을 계산하기 위해 이용됨.
- <121> 'AS'는 '호주 표준(Australian Standard)'의 호주 표준 기구(Australian Standards Organisation) 시리즈 문서를 의미한다- 이 경우, 유제품의 품질 및 성분 테스트의 표준화된 방법을 의미한다.
- <122> 실시예 8: 에리트로마이신에 대한 활성 측정
- <123> 바실러스 서브틸리스 디스크 확산 감수성 테스트(Bacillus subtilis disc diffusion susceptibility test)를 이용하여 에리트로마이신 활성을 분석하였다(Barry AL and Thornsberry C ,1991 , Susceptibility tests: diffusion test procedures. In Balos A, Hauser WJ, Herman KL, Isenberg HD, and Shadomy HJ, Manual of Clinical Microbiology 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington ppl 1 17-1 125). HBA(Horse Blood Agar) 상에서 밤새 자란 배양물로부터 2개 이상의 콜로니를 취하고 0.5 McFarlane 표준에 동등한 혼탁도에 도달하도록 2 ml의 염수에 접종하여 바실러스 서브틸리스(ATCC 6633)의 접종원을 준비하였다. 그 후, 균일한 접종원을 수득하기 위해 플레이트의 전체 표면 상에 세 방향으로 고르게, 표준화된 용액에 담긴 멸균된 면봉(swab)을 도말(streaking)하여 분석용 HBA 플레이트에 접종하였다. 그 후, 디스크를 적용하기 전에 플레이트를 3 내지 5분간 건조시켰다.
- <124> 에리트로마이신 액체(산 또는 물 처리 후)의 분량(aliquot)을 MilliQ 수로 1:2로 연속적으로 희석하여 각각에 대해 6개의 희석액을 준비하였다. 그 후, 20 마이크로리터의 각 희석액을 한 쌍의(duplicate) 블랭크 감수성 디스크(blank susceptibility disc)(Oxoid, Hampshire, England)에 적재하였다. 이 디스크들을 한 쌍의 플레이트 상에 배치하기 전에 30분 이상 건조시켰다. 각 플레이트는 단일 처리의 6개의 희석에 대응되는 6개의 균일하게 배치된 디스크를 포함했다. 표준 곡선(standard curve)을 얻기 위해 시료 Er2(pH 프로토콜에 따라 물과 반응됨)를 대조구로 이용하였다. 플레이트들을 37℃에서 16-18 시간 동안 인큐베이션시켰다.
- <125> 16-18 시간의 인큐베이션 후에, 디스크 주변에 나타난 억제 영역(zone of inhibition)의 직경을 측정하여 바실러스 서브틸리스의 에리트로마이신에 대한 감수성을 결정하였다. 이 영역들은 디스크로부터 주변 아가(agar)로의 상기 항생제의 확산에 의해 형성된 것이었다. 연속적으로 희석된 에리트로마이신 대조구로부터 얻은 영역의 직경을 이용하여 표준 곡선을 작성하였다. 그 후, 테스트 시료로부터 얻은 직경을 이용하여 무처리 대조구 대비 잔류된 에리트로마이신의 백분율을 계산했다.
- <126> 실시예 9: 우레아제에 대한 활성의 측정
- <127> 시료 처리 후 250 마이크로리터의 분량을 취하고 0.25 부피부(volume)의 냉각된 160mM Na₂CO₃의 첨가에 의해 원 침시켰다. 그 후, 분량을 20,000g로 3분간 원심분리 한 후, 얼음 상에 보관하였다. 상층액을 이용하여 우레아제 활성을 분석하였다.
- <128> 증가된 민감도를 위해 결합된 효소 분석법(coupled enzyme assay)을 이용하여 우레아제 활성을 분석하였다(Kaltwasser and Schlegel, 1966, NADH-dependent coupled enzyme assay for urease and other ammonia-producing systems. Analytical Biochem, 16:132-138에 기재된 방법의 변형). 이 반응에서, 우레아제 효소는

우레아의 가수분해를 촉매한다:



<130> 상기 반응은 암모니아 생성을 글루탐산 디히드로게나아제(glutamic dehydrogenase) 반응에 결합(coupling)시키는 것에 의해 측정하였다:



<132> 상기 반응은 NADH의 NAD로의 산화로 이어진다.

<133> 1 ml의 최종 분석 용량은 50mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 담긴 최종 농도 1.6 mM α-케토글루타레이트(Boehringer Mannheim Cat No.127 205), 1.5mM NADH (Sigma β-NADH Cat No. N-8129), 15 유닛/ml의 L-글루탐산 디히드로게나아제(Sigma Cat No. G-4387), 10 mM 우레아(Boehringer Mannheim Cat No. 100 164) 및 1 mM 소듐 술피드(Sigma Cat No S-4766)를 포함했다. 이 시약들을 1 cm 경로 길이의 폴리스티렌 큐벳(Sarstedt Cat No 67.742)에서 혼합하고 Beckman DU70 기록 분광광도계에서 실온에서 수분간 평형시켰다. 시료의 첨가 전에 전술된 혼합액을 이용하여 분광광도계를 0점을 조절하였다.

<134> 분석을 개시하기 위해 각 인큐베이션 혼합물의 상층액의 10 마이크로리터의 시료를 상기 분석 혼합액에 첨가하였다. 실온에서 최대 4분간 340 nm에서 10초마다 반응 속도를 기록하였다. 곡선의 선형 부분(일반적으로 최초 1-2분 후)으로부터 반응속도를 계산하고 그 후, 우레아제 활성을 단백질 mg 당 분당 가수분해된 우레아의 μ 몰(μmole of urea hydrolyzed per min per mg of protein)로 표시하였다. 시료 Ur2를 대조구로 이용하였다.

<135> 실시예 10 - 생물활성 에리트로마이신, 락토페린: 시료 조성

<136> 표 5

시료 ID	생물활성 물질 중량부	카르복실 모이어티 중량부	알칼리성화 모이어티 중량부
S1	1(Ery)	320 (초유)	62 (NaOH)
S2	1 (Ery)	320 (초유)	31 (NaOH)
S3	1 (Ery)	320 (초유)	15.5 (NaOH)
S4	1 (Ery)	320 (초유)	7.8 (NaOH)
S5	1 (Ery)	320 (초유)	111 (Na ₂ HPO ₄) 이수화물
S6	1 (Ery)	320 (초유)	55.5 (Na ₂ HPO ₄) 이수화물
S7	1 (Ery)	320 (초유)	27.5 (Na ₂ HPO ₄) 이수화물
S8	40 (락토페린)	320 (초유)	40 (CaCO ₃)
S9	20 (락토페린)	320 (초유)	60 (CaCO ₃)
S10	10 (락토페린)	320 (초유)	70 (CaCO ₃)
S11	10 (락토페린)	320 (초유)	80 (CaCO ₃)
S12	10 (락토페린)	320 (초유)	90 (CaCO ₃)
S13	10 (락토페린)	320 (초유)	100 (CaCO ₃)
S14	1 (Ery)	8 시트르산 이수화물	390 (Na ₂ HPO ₄) 이수화물
S15	1 (Ery)	250 시트르산 이수화물	150 (NaOH dry)

<137>

<138> 실시예 11 - 실시예 10에 기재된 시료의 성능

<139>

표 6

시료 ID	pH(산 처리 후)	pH (물 처리 후)
S1	11.5	11.7
S2	8.4	11.7
S3	3.3	11.4
S4	2.5	10.5
S5	5.5	7.6
S6	3.2	7.8
S7	2.5	7.0
S8	3.8	6.9
S9	4.2	7.0
S10	4.6	7.0
S11	4.9	7.0
S12	5.2	7.1
S13	5.4	7.1
S14	6.6	8.2
S15	5.6	6.7

<140>

<141>

전술된 실시예에서, S5, S9, S10, S11, S12, S13, S14 및 S15는 본 발명에 따른 조성물이다.