

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(51) . Int. Cl.<sup>6</sup>  
 C07K 14/47

(45) 공고일자 2005년08월17일  
 (11) 등록번호 10-0508764  
 (24) 등록일자 2005년08월09일

(21) 출원번호	10-1999-7002904	(65) 공개번호	10-2000-0048886
(22) 출원일자	1999년04월02일	(43) 공개일자	2000년07월25일
번역문 제출일자	1999년04월02일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1997/002721	(87) 국제공개번호	WO 1998/14473
국제출원일자	1997년10월03일	국제공개일자	1998년04월09일

## (81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 가나, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남,

AP ARIPO특허 : 가나, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 P.316416 1996년10월03일 폴란드(PL)

(73) 특허권자 루드빅 히르츠펠드 인스티튜트 오브 이무놀로지 앤드 엑스페리멘탈 세라피 폴리쉬 아카데미  
 오브 사이언스  
 폴란드, 브로클라바 피엘-53-114, 루돌파 바이글라 12

조지아데스 바이오테크 리미티드  
 영국, 토르톨라, 로드타운, 피.오.박스 30152, 팜 체임버 3

(72) 발명자 야누츠, 마린  
 폴란드, 브로클라바피엘-53-114, 루돌파바이글라12, 루드빅히르츠펠드  
 인스티튜트오브이무놀로지앤드엑스페리멘탈세라피폴리쉬아카데미오브  
 사이언스

리소브스키, 요제프

폴란드, 브로클라바피엘-53-114, 루돌파바이글라12, 루드빅히르츠펠드  
인스티튜트오브이무놀로지앤드엑스페리멘탈세라피풀리쉬아카데미오브  
사이언스

두보브스카-잉글로트, 안나

폴란드, 브로클라바피엘-53-114, 루돌파바이글라12, 루드빅히르츠펠드  
인스티튜트오브이무놀로지앤드엑스페리멘탈세라피풀리쉬아카데미오브  
사이언스

(74) 대리인

김태규  
김성규

심사관 : 박정웅

#### (54) 콜로스트리닌을 포함하는 의약품 및 약제학적 조성물

#### 요약

콜로스트리닌의 의약, 특히 중추신경계 및 면역계의 만성적 질환치료에 대한 의약으로서의 용도.

#### 명세서

##### 발명의 상세한 설명

본 발명은 콜로스트리닌 및 그의 의약으로서의 용도에 관한 것이다.

초유는 출산후 처음 며칠동안 포유동물 어미의 유방에 의해 생성되는 짙은 황색의 액체이다. 상기 초유는 출산후 약 4-5일에 성숙 모유로 대체된다. 성숙모유와 비교하여 초유는 당의 농도가 낮다. 한편, 초유는 지질, 단백질, 무기질염, 비타민 및 면역글로불린이 풍부하다. 또한, 초유는 과립성 세포 및 기질세포와 같은 다양한 부유세포, 호중구, 단핵구/대식세포 및 림프구를 포함하고, 성장인자, 호르몬 및 시토킨을 포함한다.

다양한 인자가 포유동물 초유로부터 분리 및 특정화되었다. 1974년, Janusz et al (*FEBS Lett*, 49, 276-279)은 양의 초유로부터 프롤린이 풍부한 폴리펩타이드 (PRP)를 분리하였다. 이후, 양 이외의 포유동물도 초유에 PRP의 유사체를 갖는다는 것이 발견되었다. PRP는 그 후 콜로스트리닌이라 명명되었고 이는 시토킨의 신규종으로서 동정되었다.

"프롤린-풍부 폴리펩타이드 (PRP)-양 초유로부터의 면역조절 펩타이드"(Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1993, 41, 275-279)에서 Janusz et al.은 양의 초유로부터 분리한 PRP가 마우스에서도 면역자극 활성을 나타냄을 언급하였다. 한편, 상기 문헌에는 PRP가 다른 동물에서도 치료효과를 나타낸다는 것은 개시하고 있지 않다. 어떤 조성물이 마우스에서 치료효과를 나타내는 사실이 다른 동물에서도 치료효과를 나타낸다는 것을 추측케하는 것은 아니다.

본 발명자들은 종래에 미지였던 콜로스트리닌의 다양한 치료효과를 발견하였다. 더욱 상세하게는, 본 발명자들은 콜로스트리닌이 면역자극 작용을 하고, 정신자극 작용을 함을 발견하였다.

본 발명의 목적은 의약으로 이용되는 콜로스트리닌을 제공하는 것이다. 콜로스트리닌은 비-설치류 포유동물용 의약으로서 이용될 수 있고; 특히, 콜로스트리닌은 사람의 치료에 이용되는 의약에 유용하다.

본 발명의 다른 목적은 면역계 및 중추신경계 질환의 치료에 이용되는 의약의 제조에 이용되는 것을 특징으로 하는 콜로스트리닌의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 콜로스트리닌은 중추신경계의 질환, 특히 중추신경계의 만성질환에 유용하다. 콜로스트리닌에 의해 치료될 수 있는 중추신경계 질환은 신경성 및 정신성 질환을 포함한다.

콜로스트리닌에 의해 치료될 수 있는 신경성 질환의 예는 치매 및 치매를 유발하는 질환, 예컨대 신경퇴화성 질환을 포함한다. 신경퇴화성 질환은 노인성 치매 및 운동신경 질병을 포함하며; 파킨슨씨병은 콜로스트리닌에 의해 치료될 수 있는 운동신경 질병의 예이다. 콜로스트리닌은 알즈하이머병으로 알려진 신경퇴화성 질환에 특히 유용하다.

콜로스트리닌에 의해 치료될 수 있는 정신성 질환은 정신병 및 신경증을 포함한다. 예를 들어, 콜로스트리닌은 정서교란, 특히 침체상태에 있는 정신치료환자의 정서교란을 치료하는데 이용될 수 있고, 콜로스트리닌의 이용은 환자가 평안한 감정을 갖게 하고 감정적 안정성을 갖게 한다. 콜로스트리닌은 약물중독자에게 있어서 무독화 기간후 보조적 철회 치료로서 이용될 수 있고, 자극에 의존적인 사람에게도 이용될 수 있다.

본 발명의 다른 바람직한 구현예에서, 콜로스트리닌은 면역계의 질환, 특히 면역계의 만성질환에 유용하다. 따라서, 본 발명자들은 면역-조절이 필요한 질병의 치료에 콜로스트리닌이 이용될 수 있음을 발견하였다. 특히, 사람을 포함한 비-설치류 동물에 있어서 상기 질환을 치료하는 데 유용하다. 콜로스트리닌은 면역 및 감염에 기초한 질병의 치료에 유용하다. 예를 들어, 콜로스트리닌은 박테리아 및 바이러스 원인 질병의 치료, 그리고 이미 발전된, 종양의 화학치료 또는 방사선치료 후 천성 면역 결핍의 치료에 이용될 수 있다. 본 발명은 특히, 비-특이성 면역자극 및 면역교정을 필요로 하는 만성 박테리아 및 바이러스 감염을 치료하는 데 유용하다.

일반적으로, 만성질환은 장기간, 보통 최소 1주, 더욱 일반적으로는 최소 1월, 가장 일반적으로는 최소 3월 또는 최소 6월 동안 지속되는 질환이다.

본 발명은 신생아 면역계의 발달을 개선하는 데 콜로스트리닌을 이용하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 다른 특징은 소아에서 면역결핍을 교정하는 데 있어서 콜로스트리닌을 이용하는 것이다. 상기 콜로스트리닌의 용도는 특히, 갓난아기 또는 초유로부터 분리된 소아에게 유용하다. 상기한 콜로스트리닌의 사용은 출생후 어미의 젖을 먹지 못하고 콜로스트리닌이 포함되지 않은 인공급유를 당한 갓난아기 및 소아에게 한다.

본 발명의 다른 목적은 식품보조제로서의 콜로스트리닌의 용도를 제공하는 것이다. 특히, 콜로스트리닌은 갓난 아기 및 면역계 발달의 결함을 교정하여야 하는 소아에게 유용하다. 상기한 바와 같이, 그러한 결함은 출생 후 젖을 먹지 못한 갓난 아기 및 소아에게 발생되는 것이다. 또한, 콜로스트리닌은 화학치료를 받고 있는 성인 및/또는 카헥시아, 또는 만성질병에 의한 체중감량으로 고생하고 있는 성인용 식품보조제로서 이용될 수 있다. 본 발명의 다른 목적은 구강 섭취성 콜로스트리닌 및 생리학적으로 적합한 담체를 포함하는 식품보조제를 제공하는 것이다. 상기 식품보조제는 액상 또는 고상의 형태로 제공될 수 있고, 정제의 형태로 제공될 수도 있다.

본 발명에 따르면, 콜로스트리닌은 중추신경계 및 면역계의 질환의 발전을 억제하기 위하여 예방적으로 투여될 수 있다.

본 발명에서 이용되는 콜로스트리닌은 양 또는 비-양의 콜로스트리닌이다. 비-양의 콜로스트리닌은 사람, 소, 말, 염소, 돼지, 야크, 라마 및 나귀에서 얻을 수 있다. 콜로스트리닌은 상기 동물의 출산 후 1-4일이 경과한 때에 젖에서 얻을 수 있다.

본원에서 사용되는 "콜로스트리닌"이라는 용어는 포유동물 초유로부터 수득되는 자연 형태의 폴리펩타이드를 나타낸다. 콜로스트리닌은 가끔 콜로스트리니네(colostrinine)로 알려져 있고 다음과 같은 특성을 갖는다:

(i) 16,000-26,000달톤의 분자량;

(ii) 다이머 또는 트라이머로서 각각의 서브-유니트는 5,000-10,000달톤, 바람직하게는 6,000달톤의 분자량을 갖으며;

(iii) 다른 아미노산보다 많은 양의 프롤린을 포함한다.

콜로스트리닌 및 그의 서브-유니트는 비극성의 특성을 갖는다.

분자량은 SDS의 존재하에서 전기영동(electrophoresis)으로 결정하며; 다이머 또는 트라이머의 존재도 상기 방법으로 결정된다. 환원상태 및 비-환원상태하에서의 전기영동을 통해 서브-유니트 사이의 결합이 비공유결합임을 알았다. 프롤린의 존재는 통상의 아미노산 분석방법으로 결정한다. 비극성은 비극성 조건하에서 크로마토그래피를 수행함으로써 확인된다.

본 발명에서 이용되는 콜로스트리닌은 양의 콜로스트리닌 또는 비-양의 콜로스트리닌이다. 양의 콜로스트리닌은 약 18,000달톤의 분자량을 갖으며, 분자량이 약 6,000달톤인 비공유결합된 세 개의 서브-유니트로 구성되어 있고, 약 22중량%의 프롤린을 포함한다. 아미노산 조성은 서브-유니트당 다음과 같은 잔기의 수로 구성된다: 라이신-2, 히스티딘-1, 알기닌-0, 아스파르트산-2, 트레오닌-4, 세린-3, 글루탐산-6, 프롤린-11, 글리신-2, 알라닌-0, 발린-5, 메티오닌-2, 이소루신-2, 루신-6, 타이로신-1, 페닐알라닌-3 및 시스테인-0.

상기한 바와 같이, 자연상태의 콜로스트리닌은 포유동물 초유로부터 수득된것이다. 콜로스트리닌은 초유로부터 지질 및 대부분의 단백질을 제거함으로써 얻어질 수 있다. 폭넓게는 콜로스트리닌은 칼럼 크로마토그래피 및 다른 생화학적 기술, 또는 유전공학적 기술을 이용하여 초유, 예컨대 큰 농장 동물의 초유로부터 수득될 수 있다.

보다 상세하게는, 콜로스트리닌은 다음과 같은 단계를 이용하여 포유동물의 초유로부터 분리된다:

(i) 예를 들어, 원심분리에 의한 지질의 제거;

(ii) 예를 들어, pH 저하에 의한 카제인과 같은 단백질의 제거;

(iii) 예를 들어, 다음과 같은 단계에 의한 면역글로불린에 결합된 콜로스트리닌의 분리:

(a) 지질 및 단백질의 제거후 형성된 부분의 이온교환크로마토그래피 단계; 및

(b) 인산완충식염수로 용출한 다음, 면역글로불린, 예컨대 IgG2에 결합된 콜로스트리닌을 포함하는 부분의 수집;

(iv) 예를 들어, 시빙 크로마토그래피에 의한 면역글로부린으로부터 콜로스트리닌의 분리; 그리고

(v) 바람직하게는, 다음과 같은 과정에 의한 콜로스트리닌의 세정제:

(a) 30,000 달톤 이하 부분의 탈염; 및

(b) 면역글로부린에 대한 항체의 도입에 의한 최종물의 수득.

상기 정의 규정에서는 자연적으로 발생한 포유동물의 초유만을 언급하고 있으나, 본원에서 사용하는 콜로스트리닌 용어는 동등한 생물학적 활성을 갖는 유사체 및 단편을 포함하고, 재조합 DNA 기술에 의해 제조되는 포유동물 콜로스트리닌, 이의 유사체 및 단편을 포함한다. 또한, 본원에서 이용되는 콜로스트리닌은 자연 콜로스트리닌과 실질적으로 동등한 조성을 갖는 생물학적 활성 폴리펩타이드를 포함하며, 이는 폴리펩타이드 합성에 의해 제조된 것이다.

본 발명은 콜로스트리닌을 이용한 중추신경계 및/또는 면역계 질환의 치료방법을 제공한다. 이 방법에 따라 치료될 수 있는 질환은 상술한 바와 같다. 본 발명의 바람직한 구현예에서 콜로스트리닌은 첫 번째 기간동안 매일 약 1-2 치료 유니트씩 투여되고, 이어 콜로스트리닌의 투여가 없는 두 번째 기간이 연속된다. 상기 첫 번째 기간은 바람직하게는 약 2-4주이고 보다 바람직하게는 약 3주이며; 두 번째 기간은 바람직하게는 약 2-5주이고 보다 바람직하게는 약 4주이다. 이 사이클은 최소 1회 이상 반복되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 1회 이상 반복하는 것이다.

본 발명에 있어서 1 치료 유니트는 바람직하게는 25-2000 $\mu$ g의 콜로스트리닌이고, 보다 바람직하게는 50-100 $\mu$ g이다.

콜로스트리닌은 투여를 위해 적합한 형태로 제형화 된다. 예를 들어, 구강, 직장, 비경구 투여에 적합하게 제형화된다. 보다 상세하게는, 콜로스트리닌은 주입투여에 적합한 형태로 제형화될 수 있고, 또는 바람직하게는 구강/비인두강의 점막을 통한 흡수에 적합한 형태, 소화관내 또는 점막 표면 흡수에 적합한 형태로 제형화된다. 구강제는 삼키기에 적합한 형태; 또는 바람직하게는 침해 용해되는 제형은 구강/비인두강의 점막으로 흡수된다. 구강제는 정제, 로젠지(즉, 구강에서 보유 및

빨아들이는 데 적합한 형태의 사탕과 같은 정제), 검으로 문지르는데 적합한 접착겔 형태로 제조될 수 있다. 콜로스트리닌은 검에 이용될 수 있는 접착성 플라스터 또는 패취 형태로 제형화될 수 있다. 콜로스트리닌은 생식-비뇨기관의 점막에 이용될 수 있는 제형으로 제조될 수 있다.

콜로스트리닌은 초유의 형태로 투여될 수도 있지만, 악취 및 보관의 곤란성 때문에 바람직하지 않다.

본 발명에서 이용되는 콜로스트리닌은 사람 또는 소, 말, 염소, 돼지, 야크, 양, 라마 또는 나귀, 카멜과 같은 동물을 포함하는 포유동물로부터 얻을 수 있다.

콜로스트리닌에 대한 시험은 양 또는 사람의 콜로스트리닌을 이용하여 수행하였다. 양의 콜로스트리닌은 Colostrinin™이라는 상표로 판매되고 있다.

실험 동물에 대한 시험중 콜로스트리닌은 생체내 및 시험관내의 면역자극 작용을 통해 특정화하였고, 이는 흉선세포의 활성 T-세포 전환에 대한 조절, 분화의 발달 및 성숙, 및 면역반응의 자극 및 방해, 그리고 흉선세포 표면의 다양한 표지의 발현에 기초한다. 마우스에서의 복강내 투여에 있어서, 콜로스트리닌은 NZB 라인 마우스의 용혈증의 발전을 억제하고, 마우스에서 육종 180 세포의 성장을 억제하며, 감마-선에 노출된 마우스에서 방사선 고통으로부터 동물을 보호한다.

마우스에 대한 독소학적 연구에서는 구강 및 비경구투여후 매우 낮은 독성, 즉 LD50이 1.25g/kg(체중) 이상이다. 또한, 콜로스트리닌은 사람 및 실험동물에 있어서 면역학적 활성세포의 성장, 성숙 및 분화를 자극하는 능력을 갖는다. 사람의 말초혈액의 림프세포의 배양에 있어서(코드 혈액으로부터 분리한 림프세포의 배양) 콜로스트리닌은 시토킨, 특히 감마 인터페론 (INF- $\gamma$ ), 종양괴사인자 (TNF- $\alpha$ ), 인터루킨 (예: IL-6 및 IL-10) 및 다양한 성장인자의 생성을 자극한다. 생성된 시토킨은 공지된 방법에 의해 정량적으로 결정된다.

자연 조건하에서 원래의 생화학적 특성을 갖는 양의 콜로스트리닌 유사체는 사람의 초유 그리고 모든 포유동물의 초유, 특히 소, 말, 염소, 돼지, 야크, 양, 라마 또는 나귀, 카멜 등과 같은 큰 농장동물에서 출산후 1-4일 동안 존재한다. 콜로스트리닌은 어미의 젖을 빨고 삼키는 과정에서 태아의 체내로 들어간다. 작은 분자량 때문에 구강/비인두강의 점막에 작용하여 세포 수용체를 통해 들어갈 수 있고, 심지어는 일반적인 확산을 통해 들어갈 수도 있다. 소화관 상부의 점막 및 상피는 면역조절제 대한 수용체를 갖고 있기 때문에, 콜로스트리닌은 빨기에 적합한 정제 및 설하의 정제, 삼키기에 적합한 정제 및 캡슐의 형태, 접착성 젤의 형태, 검으로 되는 접착성 플라스터의 형태로 투여될 수 있다. 콜로스트리닌은 생식-비뇨 기관의 점막에 이용될 수 있다.

콜로스트리닌에 유도되는 생화학적 활성을 밝히기 위한 연구에서 출산후 1-7일된 여자로부터 채취한 사람의 초유를 이용한 경우, 거의 동일한 생물학적 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 사람의 콜로스트리닌을 분리하는 방법은 농장동물의 초유, 특히 양의 초유로부터 분리하는 방법과 유사하다. 출산후 1-7일된 여자의 유방선에 의해 분비되는 초유는 폴리펩타이드 콜로스트리닌을 포함하였고, 그 양은 수유에 따라 결정되며 2-3일째 최적인 상태가 되고, 초유 1ℓ당 약 300mg정도 검출되었다. 사람 콜로스트리닌의 양은 양의 초유에서 확인되는 범위내이다. 사람의 콜로스트리닌은 생물학적으로 양과 같은 동물과 유사한 특성을 나타내었다. 사람의 초유로부터 유래된 콜로스트리닌은 초유에 있는 림프구, 및 코드혈액의 림프구를 자극함으로써 주로 인터페론 (INF- $\gamma$ ), 종양괴사인자 TNF- $\alpha$ , 인터루킨 (IL-6 및 IL-10) 및 다른 시토킨을 분비케 한다. 상기 시토킨은 체액성 및 세포성 면역반응에 참여한다.

사람 및 동물 콜로스트리닌의 생물학적 활성은 폴란드 특허(PL 170592 B1) 및 유럽특허 EP-B-0609225에 개시된 방법에 따라 결정된다, pt: 면역학 시험.

사람의 연구에 있어서, 최소 1일 1회 콜로스트리닌 최소 25 $\mu$ g을 포함하는 빨기에 적합한 정제를 약 3주 동안 투여한 경우, 부반응이 관찰되지 않았고; 인터페론 INF- $\gamma$  및 종양괴사인자 TNF- $\alpha$ 에 대한 유도에 대해 저반응성을 나타내었다. 콜로스트리닌의 투여를 정지한 후에는 저반응성 상태가 정상으로 회귀하였다. 관찰된 반응은 Th1 및 Th2 림프구 및 헬퍼세포에서 생성되는 시토킨에 의한 것이다.

임상학적 연구에서는 콜로스트리닌이 면역조절 효과를 나타내며, 종추신경계에 영향을 미침을 알 수 있었고, 이는 예방학적 및 치료학적으로 다음과 같은 질병에 이용될 수 있다: 알즈하이머병의 발생 및 발전의 억제 그리고 경감, 다른 기원의 노인성 치매 그리고 면역성 및 감염성 만성질환.

콜로스트리닌 대신에 다음과 같은 조성 및 아미노산 서열을 갖는 노나펩타이드 (NP)를 이용하는 것도 가능하다: Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro. NP는 콜로스트리닌을 키모트립신으로 처리하고 컬럼크로마토그래피로 분리하거나 화학적 합성을 통해 얻을 수 있다. NP는 유용한 콜로스트리닌 단편의 예이다. NP는 콜로스트리닌과 유사한 생물학적 효과를 갖으며, 특히 만성 면역 및 중추신경계 질환, 특히 알즈하이머병의 치료에 유용하다. NP는 상기한 어떠한 질환에도 이용될 수 있다. NP는 식품보조제로서도 이용될 수 있고, 콜로스트리닌과 같은 방법으로 제형화할 수 있으며, 포유동물 특히 사람의 치료에 유용하다.

본 발명을 보다 명확히 설명하기 위하여, 다음과 같은 실시예를 듣다.

#### 실시예 I

18,000달톤 분자량을 갖는 양의 콜로스트리닌, 6,000달톤 분자량을 갖는 3개의 비공유결합 서브유니트로 구성되고, 각 서브유니트는 다음과 같은 아미노산 조성을 갖는다:

트레오닌-4, 세린-3, 글루탐산-6, 프롤린-11, 글리신-2, 알라닌-0, 발린-5, 메티오닌-2, 이소루신-2, 루신-6, 타이로신-1, 페닐알라닌-3 및 시스테인-0.

아미노산	서브유니트당 잔기의 수
라이신	2
히스티딘	1
알기닌	0
아스파르트산	2
트레오닌	4
세린	3
글루탐산	6
프롤린	11
글리신	2
알라닌	0
발린	5
메티오닌	2
이소루신	2
루신	6
타이로신	1
페닐알라닌	3
시스테인	0

콜로스트리닌은 출산한 다음 수유 개시후 24시간에서 양의 초유로부터 수득하였다. 상기 초유를 35,000 x g에서 원심분리하여 지방 및 카제인 성분을 제거하였다. Ig 부분을 DEAE-셀룰로스 컬럼에 적용하여 폴리펩타이드 콜로스트리닌과 복합체를 형성한 면역글로불린 IgG2를 분리하였으며, 세파넥스 G-100 컬럼크로마토그래피하고 용출함으로써 콜로스트리닌을 IgG2로부터 분리하였으며, 이어 다시 세파넥스 G-75 크로마토그래피를 수행하였다. 웨بت아이드 부분을 양 IgG2 대항체가 접합된 세파로스 컬럼에 적용하여 IgG2 오염물질을 제거하였다. 이어, 세파넥스 G-25로 탈염하고 냉동건조하였으며, 4°C 또는 -20°C에서 보관하였다.

수득한 콜로스트리닌은 Colostrinin<sup>TM</sup>이라는 상표를 부여하였다.

SDS-PAGE에서 강한 띠가 관찰되었고, 이는 분자량 5,800달톤에 해당하는 것이며, 두 개의 약한 띠, 12,400달톤 및 18,200달톤에 해당하는 것이다.

#### 실시예 II

Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro 조성 및 아미노산 서열을 갖는 노나펩타이드 NP를 상기 실시예 I에서 얻은 콜로스트리닌으로부터 수득하였다.

콜로스트리닌 50mg을 키모트립신 10 활성단위로 20시간동안 30°C에서 처리하였다. 이어, 세파넥스 G-10을 이용한 컬럼크로마토그래피를 최소 1 사이클을 수행하여 상기 분해물을 분리하였다. 그런 다음, 수득물을 냉동건조하고, 4°C 또는 -20°C에서 보관하였다. 분리된 노나펩타이드는 N-말단 아미노산의 결정에 의해 분리하였다.

## 실시 예 III

다음과 같은 조성을 갖는 빨기에 적합한 정제 형태의 투여량 단위:

활성성분: 실시 예 I에 따라 수득한

Colostrinin<sup>TM</sup> 폴리펩타이드 0.0001g

안정화제: I.P.S와 같은 불순물이 없는

알부민 0.000135g

윤활제/바이더: 스테아르산 마그네슘 0.003g

담체: 만니톨 0.15g(0.1497g)

상기 성분들을 0.0001M 염화나트륨에 혼탁하였다. 빨기에 적합한 정제는 알즈하이머병을 포함하는 비특이성 면역자극 및 면역교정을 요구하는 치매의 초기 및 후기단계, 노인성 치매의 여러 단계, 만성 박테리아 및 바이러스 감염 그리고 여러 원인에 의한 후천성 면역결핍의 치료에 주로 이용된다. 또한, 이는 정서교란, 특히 침체상태에 있는 정신치료 환자의 정서 교란을 치료하는데 이용될 수 있고, 환자가 평안한 감정을 갖게 하고 감정적 안정성을 갖게 하는데 이용될 수도 있으며, 약물중독자에게 있어서 무독화 기간 후 보조적 철회 치료로서 이용될 수 있고, 자극에 의존적인 사람에게도 이용될 수 있다.

Colostrinin<sup>TM</sup>은 또한 신생아 및 인공수유에 따른 영양결핍의 교정을 하여야 하는 소아에게 이용될 수 있다.

## 실시 예 IV

다음과 같은 조성을 갖는 점막에 적용되는 겔 제형:

활성성분: 실시 예 I에 따라 수득한

Colostrinin<sup>TM</sup> 폴리펩타이드

안정화제: 알부민

겔 담체: 웨틴, 겔라틴, 카복시메틸셀룰로스의 나트륨염 및 탄수화물 겔을 포함하는 Orabase-Plain<sup>TM</sup>

Colostrinin<sup>TM</sup> 폴리펩타이드 0.0003g 및 알부민 0.0015g을 겔 담체 1㎖에 대하여 사용하였다. 이렇게 제형된 것은 주로 구강 및 호흡기 상부의 박테리아 및 바이러스 감염의 사이를 치료에 이용된다.

## 실시 예 V

다음과 같은 조성을 갖는 근육내, 피하 또는 정맥투여에 적용되는 제형:

활성성분: 실시 예 I에 따라 수득한

Colostrinin<sup>TM</sup> 폴리펩타이드

안정화제: 불순물이 제거된 사람 알부민

담체: 무균, 비발열성 물

앰풀 1㎖당 Colostrinin<sup>TM</sup> 폴리펩타이드 0.0003g, 알부민 0.0015g 및 항박테리아제로서 메르티올레이트 0.001%, 즉 에틸머큐리티오살리사이클산의 나트륨염을 사용하였다. 이렇게 제형된 것은 주로 박테리아 및 바이러스 감염의 사이를 치료에 이용된다.

## 실시 예 VI

다음과 같은 조성을 갖는 근육내, 피하 또는 정맥투여에 적용되는 제형:

활성성분: 실시 예 II에 따라 수득한 NP

안정화제: 불순물이 제거된 사람 알부민

담체: 무균, 비발열성 물

앰풀 1㎖당 NP 0.003g, 알부민 0.0015g 및 항박테리아제로서 메르티올레이트 0.001%, 즉 에틸머큐리티오살리사이클산의 나트륨염을 사용하였다. 이렇게 제형된 것은 주로 박테리아 및 바이러스 감염의 사이를 치료에 이용된다.

## 실시 예 VII

상기 실시 예 III에서 얻은 제형으로 사이클 사이를 치료를 받는 건강한 그리고 환자지원자로부터 채취한 혈액 및 폴리펩타이드 Colostrinin<sup>TM</sup>으로 시험관내에서 시토킨 유도를 다음과 같이 수행하였다:

보존제가 없는 해파린 1㎖당 10유니트를 포함하는 혈액을 1:10 비율로 RPMI 1640 배양액으로 희석하였다. 유도자가 없는 동일 배양액(음성 대조군), 폴리펩타이드 Colostrinin<sup>TM</sup> 1-100 $\mu$ g/ml의 존재하 또는 파이토헤마글루티닌 (PHA) 2 $\mu$ g/ml(혈액) 및 리포폴리사칼라이드(LPS) 2 $\mu$ g/ml(혈액)의 존재하에서 37°C 및 5% 이산화탄소 대기하에서 20시간동안 항온 처리하였다. PHA 및 LPS의 혼합물을 갖는 시료는 양성 대조군으로서 시토킨의 최대양을 자극한다. 시험결과는 다음 표 1 및 2에 나타내었다. 결과에 따르면, 1-100 $\mu$ g/ml의 Colostrinin<sup>TM</sup>은 투여량에 따라 시토킨의 생성을 자극한다. 유도자가 없는 음성 대조군과 비교하면, 상기 결과는 통계학적으로 유의하다 ( $p<0.0001$ ). 알즈하이머 환자는 IFN 생성능이 저하되고 또한 TNF도 저하된다.

### [표 1]

건강한 그리고 알즈하이머 환자 지원자의 혈액에 있는 림프구의 배양을 통한 양의 Colostrinin<sup>TM</sup> (시리즈 A 1993)에 의한 시토킨의 유도

혈액 제공자	유도자	투여량( $\mu$ g/ml)	시토킨(유니트/ml $\pm$ SD)	
			IFN	TNF
건강 지원자	Colostrinin <sup>TM</sup>	100	344 $\pm$ 254	670 $\pm$ 560
	Colostrinin <sup>TM</sup>	10	50 $\pm$ 59	316 $\pm$ 371
	PHA+LPS	2 $\pm$ 2	171 $\pm$ 162	521 $\pm$ 447
	대조군	-	9 $\pm$ 21	19 $\pm$ 26
알즈하이머 환자	Colostrinin <sup>TM</sup>	100	21 $\pm$ 14	249 $\pm$ 187
	Colostrinin <sup>TM</sup>	10	15 $\pm$ 9	182 $\pm$ 158
	PHA+LPS	2 $\pm$ 2	117 $\pm$ 76	397 $\pm$ 252
	대조군	-	2 $\pm$ 3	18 $\pm$ 26

건강 지원자 (22명)군은 이형적이다 (20-64세). 알즈하이머 환자 (50명) 군 역시 이형적이다 (63 $\pm$ 7.5세). 큰 표준편차 ( $\pm$ SD)에도 불구하고, 유도자가 없는 대조군 및 Colostrinin<sup>TM</sup> 간의 차이는 통계학적으로 유의하다 ( $p<0.001$ ).

### [표 2]

건강한 그리고 알즈하이머 환자 지원자의 혈액을 이용하여 양의 Colostrinin (시리즈 A 1993)에 의한 인터페론 (IFN) 생성의 유도

혈액 제공자 (진단)	유도자	투여량 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	IFN의 양	
			항바이러스 생시험(유니트/ $\text{ml}$ )	ELISA IFN- $\gamma$ (pg/ $\text{ml}$ )
Z.B. 건강한 젊은 군인	Colostrinin™	100	300	2920
	Colostrinin™	10	300	3402
	Colostrinin™	1	100	1413
	PHA+LPS	2+2	200	3308
	대조군	-	<3	24
C.D. 건강한 젊은 군인	Colostrinin™	100	600	3941
	Colostrinin™	10	200	3778
	Colostrinin™	1	100	2690
	PHA+LPS	2+2	600	4631
	대조군	-	5	55
M.J. 알즈하이머 환자	Colostrinin™	100	40	400
	Colostrinin™	10	20	427
	PHA+LPS	2+2	300	3757
	대조군	-	3	46
S.E. 시조프레니아 환자	Colostrinin™	100	6	29
	Colostrinin™	10	6	29
	PHA+LPS	2+2	30	243
	대조군	-	3	19
F.W. 유방암 환자	Colostrinin™	100	70	523
	Colostrinin™	10	50	307
	PHA+LPS	2+2	600	2833
	대조군	-	40	150

주: IFN의 존재에 대한 생시험은 인터페론의 다양한 종류를 측정하는 것이고, ELISA는 면역활성 IFN- $\gamma$ 의 농도만을 측정하는 것이다.

### 실시예 VIII

코드혈액을 Warclaw에 있는 Specialist District Hospital의 Gynaecological-Obsteric Department에서 얻었다. 출산 후 4-6시간 경과한 코드혈액내에서 Colostrinin™으로 시험관내에서 시토킨 유도를 다음과 같이 수행하였다:

림프구는 100ml당 5.7g의 피콜 400 및 9.0g의 디아트리조에이트 소듐을 포함하는 Ficoll-Paque™ 구배를 이용하여 분리하였다. 분리된 림프구를 배양액 1ml당  $2 \times 10^6$  림프구세포의 밀도로 RPMI-1640 배양액에 혼탁하였다. 1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 Colostrinin™ 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 피토해마글루티닌을 림프구 혼탁액에 첨가하였다. 배양액을 37°C에서 20시간 동안 항온처리하였다. 배양액내 시토킨의 농도는 생물학적 방법으로 결정하였다. 전형적인 예는 다음 표 3에 나타내었다. 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 Colostrinin™에서는 전형적인 IFN- $\gamma$  유도자-피토해마글루티닌에 의해서 나타나는 것과 유사한 시토킨 (IFN 및 TNF)의 자극능을 보인다.

### [표 3]

코드혈액으로부터 분리한 림프구 (CBL)의 배양에서 Colostrinin™ (시리즈 A 1993)에 의한 시토킨의 유도

N	유도자	투여량 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	시토킨(유니트/ $\text{ml} \pm \text{SD}$ )	
			IFN	TNF
32	Colostrinin™	20	89 $\pm$ 79	59 $\pm$ 41
39	Colostrinin™	10	78 $\pm$ 80	37 $\pm$ 35
17	Colostrinin™	1	38 $\pm$ 66	16 $\pm$ 17
50	PHA	10	75 $\pm$ 66	83 $\pm$ 69
50	대조군	-	3 $\pm$ 3	3 $\pm$ 4

### N- 조사된 CBL 시료수

스튜던트 시험에서 Colostrinin™ 편차의 유의성 (p)

- 없음을 나타냄, "IFN 및 TNF에 대하여  $p < 0.0001$

코드혈액은 미성숙 스템세포가 풍부하고, 이는 혈모포이에틱 세포 및 다양한 면역-활성 세포의 재생을 야기하며, 이 결과 Colostrinin™이 스템세포의 성숙을 크게 촉진하게 된다. 상기 결과에 의하여 Colostrinin™이 다종의 면역결핍 그리고 예컨대 상처, 감염, 화학치료 및 방사선치료후 혈모포이에틱 시스템을 자극하는데 이용될 수 있음을 알 수 있다. 생의학적 연구를 통해, 상기 작용과 유사한 작용을 갖는 자연 유래의 물질은 거의 발견하기가 어려움을 알 수 있다.

#### 실시예 IX

중추신경계 질환의 치료방법은 알즈하이머병의 초기 및 중간 단계에 있는 환자 지원자군에 대하여 실시하였다. 투여단위는 상기 실시예 I 및 II에서 얻은 Colostrinin™ 0.00015g을 포함하는 빨기에 적합한 정제의 형태로 식사시간 사이에 투여하였다. 우선, 1개의 정제를 3주 동안 매일 투여하였고, 이어 치료를 2-4주동안 중단하였으며, 이어 치료를 개시하여 3주 동안 매일 2개의 정제를 투여하였다. Colostrinin™ 치료는 저반응성 상태 또는 내성을 유발함을 알 수 있었다. 이는 IFN 및 종양괴사인자 TNF- $\alpha$  합성의 무능에 따른 것이다. 상기 현상은 활성제 작용의 정량적 측정을 가능케 한다.

상기 의약의 투여를 중단한 후, 내성상태는 자동적으로 역류한다. Colostrinin™에 대한 일시적 내성상태는 Th1 및 Th2 림프구 및 단핵구, 대식세포, 수상돌기 세포, 상피세포와 같은 헬퍼세포에서 생성되는 시토킨 그리고 이들의 생성물에 의한 것이다. 결과적으로, 접촉 및 감정의 상승의 개선을 알즈하이머 환자에게서 관찰할 수 있었다.

도 1은 3주 동안 하루 걸러 100 $\mu$ g Colostrinin™이 포함된 정제를 투여한 알즈하이머 여자 환자 (J.M.)에서 감마-인터페론 (IFN- $\gamma$ )의 유도에 대한 저반응성 (부분적 내성)의 출현 및 자동적 소멸을 나타낸 것이다. 이어, 상기 처리를 3주동안 중단하였다 (중단동안 유도자에 대한 내성은 정상상태로 회귀한다). Colostrinin™ 및 대조군 유도자 (PHA-10 $\mu$ g/ml)에 의한 IFN- $\gamma$ 의 자극에 대한 연구를 위한 혈액치료는 매일 취하였다. 시토킨의 유도 및 이의 정량적 시험은 상술한 바와 같다.

유도된 IFN- $\gamma$  농도에 대한 결과는 Colostrinin™ (100 $\mu$ g/정제 하루 걸러)의 투여후 첫 주 초기에 저반응성이 나타나고 처리 3주 째에 최대치를 보인다. IFN- $\gamma$ 의 유도에 대한 내성상태의 회귀는 처리를 중단한 3주의 시기에 자동적으로 발생하였다(즉, 치료 개시후 6주째). 더욱이, 상기 차트는 양의 Colostrinin™ (OvCal)에 대해 특이적인 저반응성이 6주째에도 여전히 지속되나 PHA에 대한 저반응성은 완전히 소멸된다는 것은 보인다.

#### 실시예 X

중추신경계 질환의 치료방법은 알즈하이머병의 초기단계에 있는 환자 지원자군에 대하여 실시하였다. 투여단위는 상기 실시예 II에서 얻은 NP 0.00015g을 포함하는 빨기에 적합한 정제의 형태로 식사시간 사이에 투여하였다. 우선, 1개의 정제를 3주 동안 매일 투여하였고, 이어 치료를 3주동안 중단하였으며, 이어 치료를 개시하여 3주 동안 매일 2개의 정제를 투여하였다. NP 치료는 저반응성 상태 또는 내성을 유발함을 알 수 있었다. 이는 IFN 및 종양괴사인자 TNF- $\alpha$  합성의 무능에 따른 것이다. 상기 현상은 활성제 작용의 정량적 측정을 가능케 한다.

상기 의약의 투여를 중단한 후, 내성상태는 자동적으로 회귀한다. Colostrinin™에 대한 일시적 내성상태는 Th1 및 Th2 림프구 및 단핵구, 대식세포, 수상돌기 세포, 상피세포와 같은 헬퍼세포에서 생성되는 시토킨 그리고 이들의 생성물에 의한 것이다. 결과적으로, 접촉 및 감정의 상승의 개선을 알즈하이머 환자에게서 관찰할 수 있었다

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

중추신경계의 만성질환의 치료를 위한, 콜로스트리닌을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 의약품.

##### 청구항 2.

신경질환 및 정신질환의 치료를 위한, 콜로스트리닌을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 3.

치매 및 신경퇴화성 질환의 치료를 위한, 콜로스트리닌을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 4.

알츠하이머의 치료를 위한, 콜로스트리닌을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 5.

운동신경 질병의 치료를 위한, 콜로스트리닌을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 6.

정신병 및 신경증의 치료를 위한, 콜로스트리닌을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 7.

알츠하이머병의 발전을 억제 또는 방해하기 위한, 콜로스트리닌을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 인간용 예방의약품.

### 청구항 8.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 콜로스트리닌은 비-양 콜로스트리닌인 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 9.

제8항에 있어서, 상기 의약품은 만니톨, 펩틴, 젤라틴, 카복시메틸셀룰로스의 나트륨염 및 탄수화물 젤, 무균 비발열성 물과 같은 담체와 조합하여 경구투약 형태로서 제공되는 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 콜로스트리닌은 격리된 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 의약품.

### 청구항 11.

만니톨, 펩틴, 젤라틴, 카복시메틸셀룰로스의 나트륨염 및 탄수화물 젤, 무균 비발열성 물과 같은 담체와 조합하여 미리 선택된 양의 콜로스트리닌을 포함하고,

증추신경계의 만성질환, 신경질환 및 정신질환, 치매 및 신경퇴화성 질환, 알츠하이머, 운동신경 질병, 정신병 및 신경증의 치료 및 알츠하이머병의 발전을 억제 또는 방해하기 위한 것임을 특징으로 하는 경구투약 형태의 약제학적 조성물.

## 청구항 12.

제11항에 있어서, 상기 콜로스트리닌은 비-양 콜로스트리닌인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

## 청구항 13.

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 구강/비인두강의 점막을 통한 흡수에 적합한 형태 및 소화관내 흡수에 적합한 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

## 청구항 14.

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 정제, 로젠지, 젤, 패취 또는 플라스터 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

## 청구항 15.

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 25 – 1000 $\mu$ g의 콜로스트리닌을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

## 청구항 16.

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 50 – 100 $\mu$ g의 콜로스트리닌을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

## 청구항 17.

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 콜로스트리닌은 격리된 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

## 청구항 18.

중추 신경계의 만성질환 치료를 위한, Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro 아미노산 서열 및 조성을 갖는 나노펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 의약품.

## 청구항 19.

알츠하이머병의 치료를 위한, Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro 아미노산 서열 및 조성을 갖는 나노펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 의약품.

## 청구항 20.

만니톨, 펩틴, 젤라틴, 카복시메틸셀룰로스의 나이트륨염 및 탄수화물 젤, 무균 비발열성 물과 같은 담체와 조합하여 Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro 아미노산 서열 및 조성을 갖는 나노펩타이드를 포함하고,

중추신경계의 만성질환, 신경질환 및 정신질환, 치매 및 신경퇴화성 질환, 알츠하이머, 운동신경 질병, 정신병 및 신경증의 치료 및 알츠하이머병의 발전을 억제 또는 방해하기 위한 것임을 특징으로 하는 경구 투약 형태의 약제학적 조성물.

청구항 21.

삭제

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

삭제

청구항 32.

삭제

청구항 33.

삭제

청구항 34.

삭제

청구항 35.

삭제

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

삭제

청구항 41.

삭제

청구항 42.

삭제

청구항 43.

삭제

청구항 44.

삭제

청구항 45.

삭제

청구항 46.

삭제

청구항 47.

삭제

청구항 48.

삭제

청구항 49.

삭제

청구항 50.

삭제

청구항 51.

삭제

청구항 52.

삭제

청구항 53.  
삭제

청구항 54.  
삭제

청구항 55.  
삭제

도면

도면1

