



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0057803
(43) 공개일자 2007년06월07일

(21) 출원번호 10-2007-7003917

(22) 출원일자 2007년02월16일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년02월16일

(86) 국제출원번호 PCT/DK2005/000498

(87) 국제공개번호 WO 2006/007848

국제출원일자 2005년07월15일

국제공개일자 2006년01월26일

(30) 우선권주장	10/892,393	2004년07월16일	미국(US)
	60/690,477	2005년06월15일	미국(US)
	60/690,482	2005년06월15일	미국(US)
	60/690,496	2005년06월15일	미국(US)
	PA 2005 00880	2005년06월15일	덴마크(DK)
	PA 2005 00881	2005년06월15일	덴마크(DK)
	PA 2005 00882	2005년06월15일	덴마크(DK)

(71) 출원인 메디머쉬 에이/에스
덴마크 디케이-2970 호르솔름 아제른 알레 3

(72) 발명자 크리스티안센 브조에른
노르웨이 엔-1614 프레데릭스태드 글럽페베이엔 15

(74) 대리인 박장원

전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 진균류로부터의 면역 조절 화합물

(57) 요약

본 발명은 폴리펩타이드 및 폴리사카라이드를 포함하는 조성물에 대한 것이다. 그 조성물은 일반적으로 면역을 조절한다. 본 발명은 또한 액체 배지에서 배양된 사상균류를 이용하여 이들 조성물을 생산하는 방법을 개시하고 있다. 예를 들면, 그 조성물은 면역 저항 상태의 치료에 아주 유용하다.

특허청구의 범위

청구항 1.

하나 이상의 폴리펩타이드 및 폴리사카라이드 혼합물을 함유하는 조성물로서, 여기에서:

a) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 30,000Da의 분자량을 가지고 있고, 여기에서 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함하거나,

또는

b) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 100,000Da의 분자량을 가지고 있으며, 여기에서 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 0 내지 0.5:0.5 내지 10:0.5 내지 50의 비율로 포함하거나,

또는

c) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 1,000Da의 분자량을 가지고 있고, 여기에서 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:0 내지 25:1 내지 50을 포함하는 것인 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 그 조성물은 진균류에 의해 생산되는 것인 조성물.

청구항 3.

제1항에 있어서, 그 조성물은 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 생산되는 것인 조성물:

i) 액체 성장 배지에서 진균의 배양, 및

ii) 상기 액체 성장 배지로부터 그 조성물을 분리.

청구항 4.

제3항에 있어서, 그 조성물은 초원심분리, 한외여과, 정밀여과 또는 겔여과의 방법에 의해 액체 성장 배지로부터 분리되는 것인 조성물.

청구항 5.

제2항에 있어서, 상기 진균류는 진균 균사체인 것인 조성물.

청구항 6.

제2항에 있어서, 상기 진균은 렌티너스(*Lentinus*) 속에 속하는 것인 조성물.

청구항 7.

제2항에 있어서, 상기 진균류는 아가리쿠스 비스포러스(*Agaricus bisporus*), 코르디셉스 시넨시스(*Cordiceps sinensis*), 플람물리나 벨루티페스(*Flammulina velutipes*), 가노덜마 루시덤(*Ganoderma lucidum*), 그리폴라 프론도사(*Grifola frondosa*), 렌티너스 에도데스(*Lentinus edodes*), 플루로투스 오스트레아투스(*Pleurotus ostreatus*), 시조필룸 코루네(*Schizophyllum commune*), 스클레오티나 스텔레오티움(*Sclerotinia sclerotium*), 트라메테스 (코리오루스) 베르시칼라

(*Trametes (Coriolus) versicolor*), 트레멜라 푸시폴미스(*Tremella fuciformis*), 아가리쿠스 블라제이(*Agaricus blazei*), 아그로시베 에게리타(*Agrocybe aegerita*), 아그로시베 시린드라세아(*Agrocybe cylindracea*), 알바트렐루스 콘플루엔스(*Albatrellus confluens*), 아르밀라리엘라 멜레아(*Armillariella mellea*), 오리쿨라리아 오리쿨라-주다에(*Auricularia auricula-judae*), 오리쿨라리아 폴리트리차(*Auricularia polytricha*), 콜리비아 마라쿨라(*Collybia maracula*), 코르디셉스 밀리타리(*Cordiceps militari*), 덴드로폴리포러스 엄벨라투스(*Dendropolyporus umbellatus*), 포메스 포멘타리우스(*Fomes fomentarius*), 포메스 피니콜라(*Fomes pinicola*), 가나덜마 아플란아툼(*Ganoderma applanatum*), 가나덜마 슈가에(*Ganoderma tsugae*), 헤리시움 에리나세우스(*Hericium erinaceus*), 힙시지구스 말모레우스(*Hypsizyugus marmoreus*), 이노노투스 오블리쿠스(*Inonotus obliquus*), 래티포러스 설포로우스(*Laetiporus sulphureus*), 렌지테스 베틀리누스(*Lenzites betulinus*), 루코팍실루스 기간테우스(*Leucopaxillus giganteus*), 리오피룸 시네라센스(*Lyophyllum cinerascens*), 옴팔리나 에피사이슘(*Omphalina epichysium*), 오우데만시엘라 무시다(*Oudemansiella mucida*), 파넬루스 세로티누스(*Panellus serotinus*), 피토포로스 베틀리누스(*Piptoporus betulinus*), 펠리누스 린테우스(*Phellinus linteus*), 펠리누스 피니(*Phellinus pini*), 폴리오타 나메코(*Pholiota nameko*), 플루로투스 시트리노필레아투스(*Pleurotus citrinopileatus*), 플루로투스 풀모나리우스(*Pleurotus pulmonarius*), 사르세돈 아스파라투스(*Sarcedon asparatus*), 트라메테스 수아보렌스(*Trametes suavolens*), 볼바리엘라 볼바세아(*Volvariella volvacea*) 및 울피포리아 코코스(*Wolfiporia cocos*)로 구성되는 군에서 선택되는 것인 조성물.

청구항 8.

제2항에 있어서, 상기 진균류는 아가리쿠스 비스포러스(*Agaricus bisporus*), 코르디셉스 시넨시스(*Cordiceps sinensis*), 플람물리나 벨루티페스(*Flammulina velutipes*), 가나덜마 루시덤(*Ganoderma lucidum*), 그리폴라 프론도사(*Grifola frondosa*), 렌티너스 에도데스(*Lentinus edodes*), 플루로투스 오스트레아투스(*Pleurotus ostreatus*), 시조필룸 코루네(*Schizophyllum commune*), 스크레오티나 스텔레오티움(*Sclerotina sclerotium*), 트라메테스 (코리오루스) 베르시칼라(*Trametes (Coriolus) versicolor*) 및 트레멜라 푸시폴미스(*Tremella fuciformis*)로 구성된 군에서 선택되는 것인 조성물.

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 조성물은 면역력을 조절하는 것인 조성물.

청구항 10.

제1항에 있어서, 상기 조성물은 면역력을 자극하는 것인 조성물.

청구항 11.

제1항에 있어서, 상기 조성물은 *in-vitro* 분석에서 적어도 한 종류의 IL-1을 생산하는 세포로부터 IL-1 생산을 유도할 수 있는 것인 조성물.

청구항 12.

제1항에 있어서, 상기 조성물이 포유동물에 투여되었을 때, 그 포유동물에서 항체 생산을 증가시킬 수 있는 것인 조성물.

청구항 13.

제1항에 있어서, 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:5 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함하는 것인 조성물.

청구항 14.

제1항에 있어서, 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:13.4 ± 0.4:12.6 ± 1.3의 비율로 포함하는 것인 조성물.

청구항 15.

제1항에 있어서, 그 조성물의 모든 폴리사카라이드는 적어도 10,000Da 분자의 분자량을 갖는 것인 조성물.

청구항 16.

제1항에 있어서, 그 조성물의 모든 폴리사카라이드는 적어도 50,000Da 분자의 분자량을 갖는 것인 조성물.

청구항 17.

제1항에 있어서, 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:7 내지 11:2.5 내지 3.5의 비율로 포함하는 것인 조성물.

청구항 18.

제1항에 있어서, 50,000 내지 100,000Da 범위에서 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:4 내지 14:1 내지 5의 비율로 포함하는 것인 조성물.

청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 비율은 약 1:8.9:2.9인 것인 조성물.

청구항 20.

제1항에 있어서, 100,000 내지 300,000Da 범위에서 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:3 내지 13:1 내지 5의 비율로 포함하는 것인 조성물.

청구항 21.

제20항에 있어서, 상기 비율은 약 1:7.3:2.9인 것인 조성물.

청구항 22.

제1항에 있어서, 300,000 내지 1,000,000Da 범위에서 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:5 내지 15:1 내지 5의 비율로 포함하는 것인 조성물.

청구항 23.

제22항에 있어서, 상기 비율은 약 1:9.9:3.1인 것인 조성물.

청구항 24.

제1항에 있어서, 1,000,000Da 이상의 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:5 내지 15:1 내지 5의 비율로 포함하는 것인 조성물.

청구항 25.

제24항에 있어서, 상기 비율은 약 1:10.3:2.9인 것인 조성물.

청구항 26.

제1항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 10 $\mu\text{g}/\ell$ 용해성 폴리펩타이드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 27.

제1항에 있어서, 상기 조성물은 10 내지 1000 $\mu\text{g}/\ell$ 범위의 용해성 폴리펩타이드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 28.

전 항들 중 어느 한 항에 따른 조성물의 생산방법으로서, 상기 방법은 하기의 단계를 포함하는 것인 방법:

- i) 액체 성장 배지에서 진균류를 배양
- ii) 상기 액체 성장 배지로부터 상기 조성물을 정제.

청구항 29.

제28항에 있어서, 상기 정제는 적어도 10,000Da의 분자량을 갖는 폴리사카라이드를 다른 폴리사카라이드로부터 분리하는 것을 수반하는 것인 방법.

청구항 30.

제29항에 있어서, 상기 분리는 초원심분리, 한외여과, 정밀여과 또는 겔여과에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 31.

의약으로서 사용하기 위한, 제1항에 따른 조성물 및 약학적으로 허용가능한 담체(들)을 포함하는 약학 조성물.

청구항 32.

i) 면역 저항 상태로 진단; 및/또는

ii) 면역 저항 상태를 갖게 될 위험; 및/또는

iii) 수술 또는 병으로부터 회복되고 면역 저항 상태를 갖게 될 위험; 및/또는

iv) 후천성 면역 결핍증인 것으로 또는 이것에 걸릴 위험이 있는 것으로 진단된 개체의 치료방법으로서,

상기 방법은 상기 개체에 제1항의 조성물을 상기 면역 저항 상태 또는 상기 후천성 면역 결핍증을 치료 또는 예방학적으로 치료하는데 있어서, 또는 상기 개체의 면역계를 증진시키는데 있어서 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 33.

제32항에 있어서, 면역 저항 상태는 전염성 질병, 기생충 질병, 헤모필루스 수막염(haemophilus meningitis), 폐렴구균성 수막염(pneumococcal meningitis), 연쇄구균성 수막염(streptococcal meningitis), 포도구균성 뇌막염(staphylococcal meningitis), 다른 미생물로 인한 수막염, 뇌염(encephalitis), 바이러스 폐렴(viral pneumonia), 폐렴구균성 폐렴(pneumococcal pneumonia), 다른 세균성 폐렴, 세균을 제외한 다른 특정 미생물로 인한 폐렴, 기관지폐렴(bronchopneumonia), 기관 비특이적 폐렴, 인플루엔자, 비특이적 설사, 비특이적 간염, 간의 급성 및 아급성 괴사, 만성 간염 및 간의 종기(abscess)로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 34.

제32항에 있어서, 상기 면역 저항 상태는 콜레라, 살모넬라, 시겔라증 이질(shigellosis), 대장균(Escherichia coli), 다른 특정 세균에 의한 장자 감염, 클로스트리디움 디피실(Clostridium difficile), 바이러스성 위장염(viral gastroenteritis), 전염성 대장염(infectious colitis), 장염(enteritis) 및 위장자염(gastroenteritis), 전염 설사(infectious diarrhea), 결핵(tuberculosis), 리스테리아증(listeriosis), 파스테렐라 감염증(pasteurellosis), 결핵균(myco bacterium), 디프테리아, 백일해(pertussis), 수막구균(meningococcus), 스트렙토코커스 패혈증(streptococcus septicaemia), 폐렴구균 패혈증(pneumococcal septicaemia), 혐기성균에 의한 패혈증(septicaemia due to anaerobes), 다른 그램-음성균에 의한 패혈증, 방선균 감염증(actinomycotic infection), 가스 괴저(gas gangrene), 독소 충격 증후군(toxic shock syndrome), 괴사 근막염(necrotizing faciitis), 프리이들렌데 폐렴균(Friedlander's bacillus), 인플루엔자 간균, 슈도모나스, AIDS/HIV 감염, 급성 회색질척수염(acute poliomyelitis), 크로이펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease), 아급성 경화 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis), 진행성 다소성 백질뇌증(progressive multifocal leucoencephalopathy), 중추 신경계의 비특정 느린 바이러스 감염, 콕사키 바이러스(coxsackie virus), 비특정 바이러스성 수막염, 임파구성 맥락 수막염(lymphocytic choriomeningitis), 비특정 바이러스성 뇌염, 수두(chickenpox), 대상 포진(herpes zoster), 단순 포진(herpes simplex), 'A' 바이러스 간염, 'B' 바이러스 간염, 다른 특정 바이러스 간염, 만성 간염, 간의 농양/급성 괴사, 감염성 단핵구증(mononucleosis), 세포 거대 포함병(cytomegalic inclusion disease), 클라미디아(chlamydiae), 아데노바이러스, 바이러스 감염, 매독(syphilis), 칸디다증, 비특정 히스토플라스마증, 아스페르길루스증(aspergillosis), 크립토코쿠스증(cryptococcosis), 진균증(mycoses), 분선충증(strongyloidiasis), 창자 기생충증(intestinal parasitism), 톡소포자충증(toxoplasmosis), 사코이드증(sarcoidosis), 폐포자충(pneumocystis carinii), 소아마비 증후군(post polio syndrome), 헤모필루스 수막염(haemophilus meningitis), 폐렴구균 수막염(pneumococcal meningitis), 연쇄구균 수막염(streptococcal meningitis), 포도상구균 뇌막염(staphylococcal meningitis), 뇌염(encephalitis), 아데노바이러스로 인한 폐렴, 호흡기 세포 융합 바이러스로 인한 폐렴, 파라인플루엔자 바이러스로 인한 폐렴, 다른 바이러스로 인한 폐렴, 바이러스 폐렴, 폐렴구균 폐렴(pneumococcal pneumonia), 폐렴막대균(klebsiella pneumoniae)으로 인한 폐렴, 슈도모나스로 인한 폐렴, 헤모필루스 인플루엔자로 인한 폐렴, 연쇄구균으로 인한 폐렴, 포도상구균으로 인한 폐렴 및 세균성 폐렴으로부터 선택되거나 이들에 의해 유발되는 전염성 또는 기생충 질병인 것인 방법.

청구항 35.

제32항에 있어서, 그 개체는 인간을 포함하는 포유동물인 것인 방법.

명세서

기술분야

이 출원은 2004년 7월 16일자로 출원된 U.S. 출원번호 제10/892,393호, 2005년 6월 15일자에 출원된 U.S. 가출원번호 제60/690,482호, 2005년 6월 15일자에 출원된 U.S. 가출원번호 제60/690,496호, 2005년 6월 15일자에 출원된 U.S. 가출원번호 제60/690,477호의 우선권 주장 출원이며, 그들의 전부가 여기에 참고자료로 통합되어 있다. 이들 특허출원서 또는 본 출원서에 인용된 모든 특허 및 비특허 자료들은 여기에 전부 참고자료로 통합되어 있다.

본 발명은 진균류의 액체 배양액으로부터 분리한 폴리사카라이드를 함유하는 면역 조절 화합물에 관한 것이다.

배경기술

진균류 및 효모로부터의 글루칸은 건강-증진 효과에 기여하는 것으로 알려져 있다. "시이타케(Shiitake)" 진균류 (*Lentinus edodes*)는 면역자극, 항-바이러스, 항-조양, 등과 같은 많은 약용 목적으로 활용될 수 있는 효과를 가지고 있다고 여겨진다. 렌티난(lentinan)의 연구가 T 헬퍼 세포의 활성화, 인터루킨 1 및 인터루킨 2의 생산 증가, 암의 다양한 형태에 대한 항체 생산 증가, 및 혈액의 콜레스테롤 수치 저하와 같은 다양한 방식으로 숙주의 면역계를 자극한다는 것을 보여주었다(Herbs for Health, jan/feb, 1997; K. Jones, "Shiitake: Medicine in a mushroom", p.40-50, 54; Anticancer Res, Vol.17(4A), 1997; H. Matsouka, "Lentinan potentiates immunity and prolongs the survival time of some patients", p.2751-2755; Adv Appl Microbiol, Vol.39, 1993; S. C. Jong, "Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom", p.153-184, Int J Immunopharmacol, Vol.14, 1992; K. Irinoda, "Stimulation of microbiocidal host defence mechanism against aerosol influenza virus infection by lentinan, p.971-977., Jpn J Cancer Res, Vol.76(1), 1985; D. Herlyn, "Monoclonal antibody-dependent murine macrophage-mediated cytotoxicity against human tumors is stimulated by lentinan, p.37-42).

렌티너스 에도데스(*Lentinus edodes*)의 한 활성 성분은 렌티난(lentinan)으로 불리어지고, 이는 β -(1,6) 결사슬을 갖는 β -(1,3) 글루칸 골격으로 설명되는 화합물에 기초한 폴리사카라이드이다.

"고체-상태" 반응기는 렌티너스 에도데스(*Lentinus edodes*)과 같은 진균류를 배양하기 위하여 일반적으로 이용된다. 이것은 퇴비(composting), 효소, 간장, 아세트산, 및 그와 유사한 것과 같은 생물학적 제품의 생산과 같은 목적으로 이용되는 기술이다. 렌티난의 생산을 위해, 렌티너스 에도데스를 종종 균사체의 성장 및 과실체의 발달을 도와주는 화학 물질을 첨가한 나무 줄기 또는 나무 토막과 같은 적절한 고체 매트릭스에서 재배할 수 있으며, 대부분의 렌티난은 국부적으로 위치한다. 과실체는 손으로 또는 기계적으로 수확되고, 그 후 건조되고 그대로 사용되거나 정제로 사용될 수 있도록 분말로 갈거나, 또는 렌티난의 추출과 같은 다른 공정을 위해 보내진다.

렌티너스 에도데로부터 제조한 폴리사카라이드 제품은 상업적으로 "주사를 위한 렌티난"으로서 이용가능하다(Eureka Bio-Chemicals Pty, Australia). 이 제품은 몇몇 면역자극 효과를 가지고 있다(하기 실시예들을 보라).

특허출원 WO03/020944는 진균류로부터 세포외의 면역자극 화합물을 정제하는 수많은 방법을 개시하고 있다. 일반적으로 이들 방법들은 침전 단계와 관련있다.

그런, 매우 높은 면역 자극 활성을 갖는 조성물들은 개시되어 있지 않다. 그러므로 본 발명의 목적은 신규한 조성물들, 바람직하게는 면역 자극 활성의 뛰어난 진균류로부터의 세포외 면역 자극제를 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명은 현저한 면역 자극 활성을 갖는 폴리사카라이드를 함유하는 조성물을 개시한다. 흥미롭게도, 본 발명은 폴리사카라이드 조성물의 특정 모노사카라이드 성분이 면역 자극 활성에 중요한 것임을 개시하고 있다.

그러므로, 본 발명의 목적 중의 하나는 하나 이상의 폴리펩타이드 및 폴리사카라이드의 혼합물을 함유하는 조성물을 제공하는 것으로서, 여기에서 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분, 바람직하게는 모든 폴리사카라이드는 적어도 10,000Da의 분자량을 가지고 있고, 여기에서 상기 폴리사카라이드의 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스가 (0-1.5) : (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (45-55)의 비율로, 바람직하게는 약 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로, 이를테면 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 구성된다.

다른 구체예에서 하나 이상의 폴리펩타이드 및 폴리사카라이드 혼합물을 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기에서:

- a) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 30,000Da의 분자량을 가지며, 여기에서 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 구성되어 있거나; 또는
- b) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 100,000Da의 분자량을 가지고 있고, 여기에서 상기 폴리사카라이드의 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스가 0 내지 0.5:0.5 내지 10:0.5 내지 50의 비율로 구성되어 있거나; 또는
- c) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 1,000Da의 분자량을 가지고 있고, 여기에서 상기 폴리사카라이드의 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스가 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 구성되어 있다.

본 발명의 두 번째 목적은 그 조성물의 생산방법을 제공하는 것으로서, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

- i) 액체 성장 배지에서 진균류 배양
- ii) 상기 액체 성장 배지로부터 상기 조성물을 정제

본 발명의 세 번째 목적은 약제로서의 용도로 상기 언급한 조성물 및 약학적으로 허용가능한 담체(들)을 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 개체의 치료방법을 제공하는 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 조성물을 효과적인 양으로 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

본 발명의 추가적인 목적은 그런 치료를 필요로 하는 개체의 상태에 부합하는 치료, 임의적으로 면역 예방 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명에 따른 그 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

정의

폴리사카라이드: 여기에서 사용되는 "폴리사카라이드"는 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 그와 유사한 것을 포함하고/포함하거나 거기에 공유적으로 연결된 것, 이를테면 프로테오폐리사카라이드 뿐만 아니라 폴리사카라이드를 의미한다.

모노사카라이드를 함유하는 폴리사카라이드: 폴리사카라이드는 모노사카라이드를 포함하는 것으로 언급되어 지는데, 여기에서 상기 모노사카라이드는 상기 폴리사카라이드를 형성하기 위하여 공유적으로 연결되어 있다. 폴리사카라이드의 가수분해는 유리 형태에 있어서 상기 폴리사카라이드를 형성하는 모노사카라이드를 초래할 것이다. 그러므로, 폴리사카라이드의 모노사카라이드의 성분은 폴리사카라이드를 가수분해하고 독립적인 모노사카라이드의 존재를 측정함으로써 측정될 수 있다. 폴리사카라이드의 혼합물의 모노사카라이드 성분은 전체 혼합물의 모노사카라이드 성분을 결정함으로써 결정된다.

비율: 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드 혼합물은 갈락토오스, 만노스 및 글루코스를 지정된 비율로 포함하는 것으로 언급되는데, 상기 폴리사카라이드 또는 상기 폴리사카라이드 혼합물의 가수분해는 갈락토오스, 만노스 및 글루코스의 지정된 비율로 생산하게 된다. 1:a 내지 b:c 내지 d의 비율에서 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스는 어느 갈락토오스 부분에 대해서나, 만노스가 a 내지 b 부분의 범위에서 존재하는 것을 의미하고, 글루코오스가 c 내지 d 부분의 범위에서 존재하는 것을 의미하는 것이며, 여기에서 a, b, c, 및 d는 수치를 지시한다. 그러므로, 예로써, 갈락토오스, 만노스 및 글루코스를 1:5 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함하는 폴리사카라이드 혼합물은 어느 갈락토오스 부분에 대해서나, 폴리사카라이드 혼합물은 만노스는 5 내지 25 부분의 범위에서, 글루코오스는 1 내지 50 부분의 범위에서 포함하는 것이다.

분자량: 조성물의 모든 폴리사카라이드는 상기 조성물이 지정된 수치의 분자량으로 초래하는 여과단계를 이용하여 정제될 때, 적어도 지정된 수치의 분자량을 갖는다. 유사하게, 조성물의 모든 폴리사카라이드는 상기 조성물이 그 범위의 더 낮은 수치인 더 낮은 분자량 및 그 범위의 더 높은 수치인 더 큰 분자량을 초래하는 하나 이상의 여과 단계들을 수행할 때, 지정된 범위 내의 분자량을 갖는다. 상기 여과 단계는 예를 들어 한외 여과(ultrafiltration), 정밀 여과(microfiltration), 초원심분리(ultracentrifugation) 또는 겔 여과가 된다. 그러나, 모든 사카라이드가 적어도 지정된 수치의 분자량을 갖거나, 모든 사카라이드가 지정된 범위 내의 분자량을 갖는 것인 조성물은 다른 방법에 의해 제조될 수 있다.

폴리펩타이드: 여기에서 사용되는 "폴리펩타이드"는 단백질, 펩타이드 및 폴리펩타이드를 의미하고, 여기에서 상기 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 후-번역 변형(Post-translational modification)이 되거나 그렇지 않은 것이다. 후-번역 변형은 예를 들어 인산화, 메틸화, 글루코실화가 있다.

발명의 상세한 설명

조성물

본 발명에 다른 조성물은 하나 이상의 폴리펩타이드 및 폴리사카라이드 혼합물을 포함한다. 상기 폴리펩타이드는 임의적으로 폴리사카라이드에 공유 결합될 수 있다. 그러나 상기 폴리펩타이드는 상기 폴리사카라이드에 결합되지 않거나 상기 폴리펩타이드는 상기 폴리사카라이드에 비-공유적으로 결합되는 것 또한 포함된다.

그러므로 그 조성물은 프로토폴리사카라이드이거나 그렇지 않은 폴리사카라이드를 포함하거나, 그 조성물은 상기 두 가지의 혼합물을 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 조성물은 분리되거나 정제된 조성물로서, 즉, 그들은 하나 이상의 정제단계들이 수행된다. 바람직한 구체예에서, 크기 분류를 포함하는 적어도 하나의 정제 단계를 이용하여 진균류 균사체의 액체 성장 배지로부터 정제되는 것이다. 정제 방법들은 하기에서 좀더 자세하게 설명된다.

바람직한 구체예에서, 조성물은 필수적으로 폴리사카라이드 및 임의적으로 폴리펩타이드로 구성되고, 더욱 바람직하게는 그 조성물은 필수적으로 폴리사카라이드 및 폴리펩타이드로 구성된다. 빈번하게, 그 조성물은 액체 조성물이고, 이때 그 조성물은 필수적으로 임의적으로 염 및 버퍼를 포함하는 수용액에서 용해된 폴리사카라이드 및 임의적으로 폴리펩타이드로 구성되는 것이 바람직하다.

본 발명의 조성물의 폴리사카라이드는 바람직하게 모노사카라이드 글루코오스, 만노스 및 갈락토오스를 포함한다. 본 발명의 조성물 내에 포함되어 있는 폴리사카라이드 및 폴리펩타이드의 예는 β -(1,3), β -(1,6)D-글루칸, 시조필란(schizophyllan), 그리폴란(grifolan), 코리올란(coriolan) 및 PSK와 PSP와 같은 코리올러스 버시칼라(*Coriolus versicolor*)의 글리코실화된 폴리펩타이드, 렌티너스 에도테스로부터 분리되는 KS-2, 가노덜마 루시덤(*Ganoderma lucidum*)로부터 분리되는 레이시(reishi)와 같은 α -만난에 결합된 폴리펩타이드; 글루쿠론옥실로만난; 만노글루칸; 글루코만난; 갈락토글루칸 및/또는 갈락토글루코만난이 있으며 이에 제한되지는 않는다.

진균류

본 발명의 바람직한 구체예에서, 여기에 개시된 조성물은 진균류에 의해 생산된다. 바람직하게, 그 조성물은 진균류의 세포의 환경으로부터 정제된다. 좀더 바람직하게, 진균류, 바람직하게 진균류의 균사체는 액체 성장 배지에서 배양되고, 상기 조성물은 상기 액체 성장 배지로부터 정제된다.

본 발명의 조성물은 하기 단계를 구성하는 방법에 의해 생산되는 것이 바람직하다:

- i) 진균류, 이를테면 진균류 균사체를 액체 성장 배지에서 배양, 및
- ii) 상기 액체 성장 배지로부터 조성물을 분리

어느 진균 바이오매스는 액중배양(submerged culture)에서 성장할 수 있는 진균 균사체에 의해 의도될 수 있다. 진균류 바이오매스는 단일 균사, 포자, 균사체의 응집체 및 부분적으로 분화된 균사체의 형태가 된다.

액체 성장 배지는 하기에서 개시한 액체 성장 배지 중 어느 하나이다.

진균류는 어느 진균류도 가능하며, 바람직하게는 균류의 균사체를 형성하는 진균류, 더욱 바람직하게 진균류는 사상균류(filamentous fungus)이다. 가장 바람직하게, 진균류는 아가리쿠스 비스포러스(*Agaricus bisporus*), 코르디셉스 시넨시스(*Cordiceps sinensis*), 플람물리나 벨루티페스(*Flammulina velutipes*), 가노덜마 루시덤(*Ganoderma lucidum*), 그리폴라 프론도사(*Grifola frondosa*), 렌티너스 에도데스(*Lentinus edodes*), 플루로투스 오스트레아투스(*Pleurotus ostreatus*), 시조필룸 코루네(*Schizophyllum commune*), 스크레오티나 스텔레오티움(*Sclerotina sclerotium*), 트라메테스(코리오루스) 베르시칼라(*Trametes (Coriolus) versicolor*), 트레멜라 푸시폴미스(*Tremella fuciformis*), 아가리쿠스 블라제이(*Agaricus blazei*), 아그로시베 아게리타(*Agrocybe aegerita*), 아그로시베 시린드라세아(*Agrocybe cylindracea*), 알바트렐루스 콘플루엔스(*Albatrellus confluens*), 아르밀라리엘라 멜레아(*Armillariella mellea*), 오리쿨라리아 오리쿨라-주다에(*Auricularia auricula-judae*), 오리쿨라리아 폴리트리차(*Auricularia polytricha*), 콜리비아 마라쿨라(*Collybia maracula*), 코르디셉스 밀리타리(*Cordiceps militari*), 덴드로폴리포러스 엄벨라투스(*Dendropolyporus umbellatus*), 포메스 포멘타리우스(*Fomes fomentarius*), 포메스 피니콜라(*Fomes pinicola*), 가나덜마 아플란아툼(*Ganoderma applanatum*), 가나덜마 슈가에(*Ganoderma tsugae*), 헤리시움 에리나세우스(*Hericium erinaceus*), 힙시지구스 말모레우스(*Hypsizygyus marmoreus*), 이노노투스 오블리쿠스(*Inonotus obliquus*), 래티포러스 설포로우스(*Laetiporus sulphurous*), 렌지테스 베틀리누스(*Lenzites betulinus*), 루코팍실루스 기간테우스(*Leucopaxillus giganteus*), 리오필룸 시네라센스(*Lyophyllum cinerascens*), 옴팔리나 에피사이썸(*Omphalina epichysium*), 오우테만 시엘라 무시다(*Oudemansiella mucida*), 파넬루스 세로티누스(*Panellus serotinus*), 피토포로스 베틀리누스(*Piptoporus betulinus*), 펠리누스 린테우스(*Phellinus linteus*), 펠리누스 피니(*Phellinus pini*), 폴리오타 나메코(*Pholiota nameko*), 플루로투스 시트리노필레아투스(*Pleurotus citrinopileatus*), 플루로투스 풀모나리우스(*Pleurotus pulmonarius*), 사르세돈 아스파라투스(*Sarcedon asparatus*), 트라메테스 수아보렌스(*Trametes suavolens*), 볼바리엘라 볼바세아(*Volvariella volvacea*) 및 울피포리아 코코스(*Wolfiporia cocos*)로 구성되는 균에서 선택된다.

좀더 바람직하게, 진균류는 아가리쿠스 비스포러스(*Agaricus bisporus*), 코르디셉스 시넨시스(*Cordiceps sinensis*), 플람물리나 벨루티페스(*Flammulina velutipes*), 가노덜마 루시덤(*Ganoderma lucidum*), 그리폴라 프론도사(*Grifola frondosa*), 렌티너스 에도데스(*Lentinus edodes*), 플루로투스 오스트레아투스(*Pleurotus ostreatus*), 시조필룸 코루네(*Schizophyllum commune*), 스크레오티나 스텔레오티움(*Sclerotina sclerotium*), 트라메테스(코리오루스) 베르시칼라(*Trametes (Coriolus) versicolor*) 및 트레멜라 푸시폴미스(*Tremella fuciformis*),로 구성된 균에서 선택된다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 진균류는 가노덜마(*Ganoderma*), 이를테면 가노덜마 루시덤(*Ganoderma lucidum*)이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 진균류는 아가리쿠스 진균류, 이를테면 A. 블라제이(*A. blazei*), A. 블라제이 무릴(*A. blazei Murill*), A. 비스포러스(*A. bisporus*), A. 호르텐시스(*A. hortensis*), A. 캄페스트리스(*A. campestris*)로 구성된 균에서 선택된다.

본 발명의 매우 바람직한 구체예에서, 진균류는 담자균류에 속하는 것으로서, 이를테면 렌티너스 속의 진균류로서, 렌티너스 에도데스이다.

BCCM(Belgian Coordinated Collections, 14 Rue J. Wytsman, B-1050 Bruxelles, Belgium)에 IHEM 18992로 기탁된 렌티너스 에도데스는 렌티너스 에도데스의 바람직한 균주 중의 하나를 대표한다. 게다가, 렌티너스 에도데스 균주는 ATCC(American Type Culture Collection, P.O.Box 1549, Manassas, VA 20108, USA), CBC(Centraalbureau voor Schimmelcultures, PO Box 85167, 3508 AD Utrecht, THE NETHERLANDS) 및 DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig GERMANY)와 같은 기탁기관으로부터 입수할 수 있다.

부가적으로 렌티너스 에도데스뿐만 아니라 적절한 렌티너스 속은 다음의 렌티너스 속을 포함한다: 렌티너스 알보벨루티누스 G. Stev.(*Lentinus alboveletinus* G. Stev., 1964) = 로도사이베 알보벨루티나(G. Stev.) E. Horak (1971); 렌티너스 안토세팔루스(Lev.) 페글러(*Lentinus anthocephalus* (Lev.) Pegler); 렌티너스 바디우스 브레스.(*Lentinus badius* Bres.); 렌티너스 카스토레우스 Fr.(*Lentinus castoreus* Fr., 1838) = 렌티넬루스 울시누스(Fr.) 쿠흐너(*Lentinellus ursinus* (Fr.) Kuhner, 1926); 렌티너스 크리소페프루스 버크. & M.A. 커티스(*Lentinus chrysopeplus* Berk. & M.A. Curtis, 1869) = 십토타라마 아스프라타(버크.) 레드헤드&긴스(*Cyptotrama asprata* (Berk.) Redhead & Ginns, 1980); 렌티너스 코켈아투스 Fr.(*Lentinus cochleatus* Fr.); 렌티너스 콘신누스 Pat.(*Lentinus concinnus* Pat.); 렌티너스 델리카투스 G. Stev.(*Lentinus delicatus* G. Stev., 1964) = 마라스미우스 델리카투스(G. Stev.) E. 호락(*Marasmius delicatus* (G. Stev.) E. Horak, 1971); 렌티너스 파스시아투스 버크(*Lentinus fasciatus* Berk.); 렌티너스 헤파토타리쿠

스 버크(Lentinus hepatotrichus Berk., 1859) = 렌티넬루스 울시누스 (Fr.) 쿠흐너(Lentinellus ursinus (Fr.) Kuhner, 1926); 렌티누스 하이락시누스 칼츠버(Lentinus hyracinus Kalchbr., 1880) = 렌티넬루스 울시누스 (Fr.) 쿠흐너 (Lentinellus ursinus (Fr.) Kuhner, 1926); 렌티누스 레피데우스 센수 콜렌소(Lentinus lepideus sensu Colenso, 1891) ; 렌티누스 레피데우스 (Fr.) Fr.(Lentinus lepideus (Fr.) Fr., 1825) = 렌티너스 서프루네스센스 (브롯.) Fr.(Lentinus suffrutescens (Brot.) Fr., 1825); 렌티너스 노베젤랜드에 노베젤랜드에 버크.(Lentinus novaezelandiae Berk., 1855) = 렌티넬루스 울시누스 (Fr.) 쿠흐너(Lentinellus ursinus (Fr.) Kuhner, 1926); 렌티너스 풀비눌러스 버크.(Lentinus pulvinulus Berk., 1859) = 렌티넬루스 풀비눌러스 (버크) 페글러(Lentinellus pulvinulus (Berk.) Pegler, 1965); 렌티누스 펀타티셉스 버크 & 브루메(Lentinus punctaticeps Berk. & Broome, 1883); 렌티너스 펀타티셉스 cf. 센수 피터센, 니콜 & 허그스(Lentinus punctaticeps cf. sensu Petersen, Nicholl & Hughes, 1997); 렌티너스 파이그마우스 콜렌소 (Lentinus pygmaeus Colenso, 1887) = 렌티너스 젤랜드쿠스 삭.&쿱(Lentinus zelandicus Sacc. & Cub., 1887); 렌티너스 사조르-카주 (Fr.) Fr.(Lentinus sajor-caju (Fr.) Fr.); 렌티너스 스쿠아룰로루스 몬트.(Lentinus squarulosus Mont.); 렌티너스 스트리고서스(Schewin.) Fr.(Lentinus strigosus (Schwein.) Fr., 1825); 렌티너스 서프루테센스 (Brot.) Fr.(Lentinus suffrutescens (Brot.) Fr., 1825); 및 렌티너스 튜버-레지움 Fr.(Lentinus tuber-regium Fr.); 렌티너스 젤랜드쿠스 삭. & 쿱.(Lentinus zelandicus Sacc. & Cub., 1887) (참조: <http://nzfungi.landcareresearch.co.nz>).

면역계의 조절

본 발명에 따른 조성물은 바람직하게 면역계를 조절, 바람직하게는 그 조성물은 면역계를 자극한다. 면역계의 자극은 예를 들어 증가된 항체 생산에 의해, 헬퍼 T-세포의 활성화에 의해 또는 인터루킨 1 및 인터루킨 2와 같은 인터루킨의 생산 증가에 의해 입증될 수 있다.

조성물이 면역계를 조절하는지 여부를 테스트하는데 적절한, 당업자에게 알려진 어느 분석은 본 발명의 조성물이 면역계를 조절하는지 여부를 테스트하는데 차용될 수 있다. 그런 분석은 *in vitro* 또는 *in vivo* 분석이 될 것이다.

바람직한 한 분석은 조성물이 IL1- α 및/또는 IL1- β 생산과 같은 IL-1 생산을 유도할 수 있는지 여부를 테스트하기 위함이다. 그러므로, 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 조성물은 *in-vitro* 분석에서 IL-1 생산 세포의 적어도 한 종류로부터 IL-1 생산을 유도할 수 있다. 그 세포들은 P388 마우스 대식세포와 같은 IL-1 생산 세포이다. 바람직하게, 상기 세포는 IL-1 β 생산 세포이다. IL-1 생산은 어느 적절한 분석을 이용하여 결정된다. 일반적으로, 특정 IL1- α 및/또는 IL1- β 항체들과 같이 특정 IL-1 항체들의 이용에 관련된 분석이 유용하다. 그런 분석은 예를 들어 웨스턴 블랏팅 (Western blotting), 엘리사(ELISA) 또는 그와 유사한 분석일 것이다. 그 분석이 실시예 4에서 기재된 것처럼 수행된다.

IL1 분석을 조정하는 것이 어렵기 때문에, 그 분석은 참고자료에서처럼 특정 조성물을 이용하여 수행되는 것이 바람직하다. 그러므로, 본 발명의 바람직한 구체예 중의 하나는, 그 조성물은 비교예로 수행된 참조 실험에서 주사를 위한 상업적으로 입수가능한 렌티난(Eureka Bio-Chemicals Pty, Little Collins Street, Melbourne 3000, Australia)을 이용하여 유도된 IL1- α 의 양보다 적어도 1.5배, 바람직하게는 2배, 이를테면 적어도 4배, 예를 들어 적어도 6배, 이를 테면 적어도 8배, 예를 들어 적어도 10배, 이를테면 적어도 15배, 예를 들어 적어도 20배, 이를테면 적어도 30배, 예를 들어 적어도 40배의 IL1- α 의 생산을 유도할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 그 조성물은 비교예로 수행된 참조 실험에서 주사를 위한 렌티난(Eureka Biochemicals Pty.)을 이용하여 유도된 IL1- β 의 양보다 적어도 1.5배, 바람직하게는 적어도 2배, 이를테면 적어도 4배, 예를 들어 적어도 6배, 이를테면 적어도 8배, 예를 들어 적어도 10배, 이를테면 적어도 15배, 예를 들어 적어도 20배 이상의 IL1- β 의 생산을 유도할 수 있다. 바람직하게, 상기 언급된 분석들은 실시예 4에서 기재된 것과 같이 수행된다. 상기 언급된 IL1 α 와 IL1 β 모두의 생산을 유도하는 조성물이 가장 바람직하다.

본 발명의 다른 구체예에서, 그 조성물은 포유동물에 투여되었을 때, 그 포유동물에서 항체 생산을 강화시킬 수 있다. 예를 들어, 그 포유동물은 생쥐, 쥐, 토끼, 또는 인간이 된다. 바람직하게, 그런 분석은 그 조성물을 임의적으로 어쥬번트의 존재 하에서 항원의 투여 전 및 항원의 투여와 동시에 상기 포유동물에 투여함으로써 수행된다. 바람직하게, 그 조성물은 항원을 투여하기 전에 1 내지 30일의 범위에서 투여되고, 바람직하게는 1 내지 10일 동안, 더욱 바람직하게는 1 내지 3일 동안 투여된다. 그 후, 포유동물에서 항체 생산을 측정한다. 그 조성물은 바람직하게는 그 조성물의 투여없이 생산된 항체의 양과 비교하여 적어도 1.5배, 더욱 바람직하게는 적어도 2배, 더더욱 바람직하게는 적어도 2.5배, 이를테면 적어도 3배, 예를 들어 적어도 4배, 이를 테면 적어도 6배 이상의 항체 생산을 유도할 수 있다. 그런 분석의 예는 실시예 6에서 약술되어 있다.

그 조성물은 상기 여기에서 기재된 분석 시스템들의 조합과 같이, 하나의 분석 시스템 이상에서 면역계를 조절하는 것이 바람직하다.

바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 TNF- α 생산을 증시키고, 이는 실시예 9에서 기재된 분석에 의해 측정될 수 있다.

모노사카라이드 성분

본 발명에 따른 조성물은 바람직하게 폴리사카라이드를 포함하고, 여기에서 폴리사카라이드의 대부분, 바람직하게는 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 적어도 70%, 더더욱 바람직하게는 적어도 80%, 좀더 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 좀더 바람직하게는 필수적으로 모든 폴리사카라이드, 가장 바람직하게는 어느 폴리사카라이드든 10,000Da 이상의 분자량, 바람직하게는 30,000Da 이상, 더욱 바람직하게는 40,000Da 이상, 좀더 바람직하게는 50,000Da 이상, 예를 들어 적어도 100,000Da, 이를테면 적어도 300,000Da, 예를 들어 적어도 1,000,000Da의 분자량을 갖는다. 본 발명의 한 구체예에서, 폴리사카라이드의 대부분은, 바람직하게는 그 조성물의 어느 폴리사카라이드나 10,000 내지 3,000,000 Da 범위 내의 분자량을 가지고, 예를 들어 30,000 내지 3,000,000의 범위에서, 이를 테면 40,000 내지 3,000,000의 범위에서, 예를 들어 50,000 내지 3,000,000의 범위에서, 이를테면 50,000 내지 100,000의 범위에서, 예를 들어 100,000 내지 300,000의 범위에서, 이를테면 300,000 내지 1,000,000의 범위에서, 예를 들어 1,000,000 내지 3,000,000의 범위에서의 분자량을 갖는다.

바람직하게, 그 조성물은 적어도 하나의 크기 분류 단계와 관련된 방법에 의해 정제된다. 그러므로, 그 조성물이 적어도 하나의 크기 분류 단계를 이용하여 정제되는 것이 바람직하고, 여기에서 분자들, 이를테면 지정된 기준 이상의 명목상의 분자량을 갖는 폴리사카라이드가 상기 기준 이하의 명목상의 분자량을 갖는 폴리사카라이드와 같은 분자들로부터 분리된다.

예로써, 만약 크기 분류가 한외 여과 또는 정밀 여과라면, 상기 분자량 기준을 갖는 막이 사용된다. 만약 크기 분류가 겔 여과라면, 상기 분자량 기준을 갖는 겔이 선택되거나 특정 용리 분획이 사용된다. 본 발명의 한 구체예에서, 좀더 큰 분자량 분획이 사용되고, 여기에서 기준은 바람직하게는 10,000Da, 더욱 바람직하게는 30,000Da, 더더욱 바람직하게는 40,000Da, 더더욱 바람직하게는 50,000Da이 된다.

본 발명의 다른 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 크기 분류 단계와 관련된 방법에 의해 정제되고, 여기에서 그 결과 분획은 지정된 기준 이하 및 기준 이상의 명목상의 분자량을 갖는 폴리사카라이드를 포함한다. 예로써, 만약 크기 분류가 한외 여과 또는 정밀 여과라면, 더 낮은 분자량 기준을 갖는 막을 이용한 첫 번째 분류 단계가 수행된다. 더 큰 분자량 분획이 수집되고, 더 큰 분자량 기준을 갖는 막을 이용한 두 번째 한외 여과 또는 정밀 여과가 수행된다. 두 번째 분류 단계 후에, 더 낮은 분자량 분획이 수집된다. 만약 겔 여과가 이용된다면, 특정 용리 분획이 사용된다. 만약 초원심분리가 이용된다면, 더 낮은 분자량 기준을 갖는 막 및 더 큰 분자량 기준을 갖는 막이 이용된다.

본 발명에 따른 조성물은 폴리사카라이드 혼합물을 포함하고, 여기에서 상기 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코스가 1:5 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함된다. 그러므로, 그 비율은 폴리사카라이드 전체 혼합물 내의 비율을 반영하게 된다. 그러므로 그 혼합물 내의 각 개별 폴리사카라이드는 서로 다른 비율의 모노사카라이드를 포함하게 되는 것이 가능하다.

일반적으로 그 비율은 폴리사카라이드의 전체 혼합물을 모노사카라이드로 분해하고, 그 후 상기 모노사카라이드 각각의 농도를 결정함으로써 결정된다. 폴리사카라이드는 가수분해, 예를 들어 HCl과 같은 강산에서의 분해에 의해 그들의 구성 성분인 모노사카라이드로 분해된다. 가수분해물은 당업자가 일반적으로 이용할 수 있는 방법, 예를 들어 HPLC, 질량 분석 또는 NMR에 의해 분석된다.

본 발명의 한 구체예에 있어서, 폴리사카라이드는 모노사카라이드 글루코오스 및 만노스를 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 폴리사카라이드는 모노사카라이드 글루코오스 및 갈락토오스를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 그 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 포함한다.

폴리사카라이드 혼합물은 어느 갈락토오스 부분에 대해서나 5 내지 25의 범위에서, 바람직하게는 5 내지 20의 범위에서, 더욱 바람직하게는 5 내지 17의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 6 내지 15의 범위에서, 좀더 바람직하게는 7 내지 14의 범위에서, 이를테면 10 내지 17의 범위에서, 예를 들어 11 내지 16의 범위에서, 이를테면 12 내지 15의 범위에서, 예를 들어 13 내지 14의 범위에서, 이를테면 약 13.4 ± 0.4 , 예를 들어 약 13.4 ± 0.4 의 만노스 부분을 포함하는 것이 바람직하다.

폴리사카라이드 혼합물은 어느 갈락토오스 부분에 대해서나, 1 내지 50의 범위에서, 바람직하게는 1 내지 40의 범위에서, 더욱 바람직하게는 1 내지 30의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 1 내지 25의 범위에서, 좀더 바람직하게는 1 내지 20의 범위에서, 좀 더욱 바람직하게는 2 내지 15의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 2 내지 14의 범위에서, 이를테면 8 내지 17의 범위에서, 예를 들면 9 내지 16의 범위에서, 이를테면 10 내지 15의 범위에서, 예를 들면 11 내지 14의 범위에서, 이를테면 약 12.6 ± 1.3 , 예를 들어 약 12.6 ± 1.3 의 글루코오스 부분을 포함하는 것이 바람직하다.

그 혼합물이 갈락토오스에 대한 만노스의 비율이 상기에서 지시된 것처럼 함유하고, 글루코오스의 갈락토오스의 비율이 상기에서 지시된 것처럼 함유하는 것이 바람직하다.

본 발명의 구체예에서, 여기에서 폴리사카라이드가 만노스 및 글루코오스를 포함하고, 그들은 어느 만노스 부부에 대해서나, 0.1 내지 30의 범위에서, 이를테면 0.1 내지 0.25의 범위에서, 예를 들면 0.25 내지 0.5의 범위에서, 이를테면 0.5 내지 0.75의 범위에서, 예를 들면 0.75 내지 1의 범위에서, 이를테면 1 내지 5의 범위에서, 예를 들면 5 내지 10의 범위에서, 이를테면 10 내지 20의 범위에서, 예를 들면 20 내지 30의 범위에서의 글루코오스 부분을 포함하는 것이 바람직하다. 바람직하게, 폴리사카라이드는 어느 만노스 부분에 대해서나, 0.5 내지 2의 범위에서의 글루코오스 부분을 포함하고, 더욱 바람직하게는 13.4 ± 0.4 만노스 부분과 12.6 ± 1.3 글루코오스 부분을 포함한다.

본 발명의 매우 바람직한 구체예에서, 그 조성물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스가 1:5 내지 25:1 내지 50의 비율로, 더욱 바람직하게는 1:13.4 \pm 0.4:12.6 \pm 1.3의 비율로 포함되는 폴리사카라이드의 혼합물을 포함하는 것이다.

본 발명의 다른 구체예에서, 그 조성물은 폴리사카라이드의 혼합물을 포함하고, 50,000 내지 100,000 범위 내의 분자량을 갖는 상기 혼합물 내의 폴리사카라이드는 모든 갈락토오스 부분에 대하여, 3 내지 15의 범위에서, 바람직하게는 4 내지 14의 범위내에서, 더욱 바람직하게는 5 내지 13의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 6 내지 12의 범위내에서, 좀더 바람직하게는 7 내지 11의 범위에서, 좀 더욱 바람직하게는 7.9 내지 9.9의 범위내에서, 예를 들어 약 8.9 만노스 부분을 포함한다.

이 구체예에서, 50,000 내지 100,000 범위의 분자량을 갖는 폴리사카라이드는 모든 갈락토오스 부분에 대하여 1 내지 5 범위에서, 바람직하게는 2 내지 4의 범위에서, 더욱 바람직하게는 2.5 내지 3.5의 범위에서, 이를테면 약 2.9 글루코오스 부분을 포함한다. 50,000 내지 100,000Da의 범위에서 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:4 내지 14:1 내지 5, 바람직하게는 약 1:8.9:2.9의 비율로 포함한다.

본 발명의 다른 구체예에서, 그 조성물은 폴리사카라이드 혼합물을 포함하고, 여기에서 100,000 내지 300,000 범위의 분자량을 갖는 상기 혼합물 내의 그 폴리사카라이드는 어느 갈락토오스 부분에 대해서나 3 내지 15의 범위에서, 바람직하게는 3 내지 14의 범위에서, 더욱 바람직하게는 3 내지 13의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 3 내지 12의 범위에서, 좀더 바람직하게는 4 내지 11의 범위에서, 좀 더욱 바람직하게는 5 내지 10의 범위에서, 좀 더더욱 바람직하게는 6.3 내지 8.3의 범위에서, 예를 들어 약 7.3의 만노스 부분을 포함한다. 이 구체예에서, 100,000 내지 300,000 범위의 분자량을 갖는 폴리사카라이드는 어느 갈락토오스 부분에 대해서나 1 내지 5의 범위에서, 바람직하게는 2 내지 4의 범위에서, 더욱 바람직하게는 2.5 내지 3.5 범위에서, 이를테면 약 2.9의 글루코오스 부분을 포함한다. 50,000 내지 100,000 Da 범위의 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:3 내지 13:1 내지 5의 비율로, 바람직하게는 약 1:7.3:2.9의 비율로 포함한다.

본 발명의 다른 구체예에서, 그 조성물은 폴리사카라이드 혼합물을 포함하고, 300,000 내지 1,000,000 범위의 분자량을 갖는 상기 혼합물 내의 폴리사카라이드는 어느 갈락토오스 부분에 대해서나 3 내지 16의 범위에서, 바람직하게는 5 내지 15의 범위에서, 더욱 바람직하게는 5 내지 14의 범위에서, 좀더 바람직하게는 6 내지 13의 범위에서, 좀 더욱 바람직하게는 7 내지 12의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 8.9 내지 10.9의 범위에서, 예를 들어 약 9.9의 만노스 부분을 포함한다. 이 구체예에서, 300,000 내지 1,000,000 범위의 분자량을 갖는 폴리사카라이드는 어느 갈락토오스 부분에 대해서나 1 내지 5의 범위에서, 바람직하게는 2 내지 4의 범위에서, 더욱 바람직하게는 2.5 내지 3.5의 범위에서, 이를테면 약 3.1의 글루코오스 부분을 포함한다. 300,000 내지 1,000,000 범위의 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1: 5 내지 15:1 내지 5의 비율로, 바람직하게는 약 1:9.9:3.1의 비율로 포함한다.

본 발명의 다른 구체예에서, 조성물은 폴리사카라이드 혼합물을 포함하고, 여기에서 적어도 1,000,000의 분자량을 갖는 상기 혼합물 내의 폴리사카라이드는 어느 갈락토오스 부분에 대해서나 3 내지 17의 범위에서, 바람직하게는 4 내지 16의 범위에서, 더 바람직하게는 5 내지 15의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 6 내지 14의 범위에서, 좀더 바람직하게는 7 내지

13의 범위에서, 좀 더욱 바람직하게는 8 내지 12의 범위에서, 좀 더더욱 바람직하게는 9.3 내지 11.3의 범위에서, 예를 들어 약 10.3의 만노스 부분을 포함한다. 이 구체예에서, 적어도 1,000,000의 분자량을 갖는 폴리사카라이드는 어느 갈락토오스 부분에 대해서나 1 내지 5의 범위에서, 바람직하게는 2 내지 4의 범위에서, 더욱 바람직하게는 2.5 내지 3.5의 범위에서, 이를 테면 약 2.9의 글루코스 부분을 포함한다. 적어도 1,000,000Da의 범위에서 분자량을 갖는 상기 조성물의 폴리사카라이드는 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:4 내지 1:5 내지 15:1 내지 5, 바람직하게는 약 1:10.3:2.9의 비율로 포함한다.

하나의 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 갈락토오스:만노스:글루코오스를 1 : 10 내지 20 : 30 내지 50의 몰랄 비율로, 이를 테면 1 : 12 내지 18 : 35 내지 45; 예를 들어 1 : 14 내지 16 : 38 to 42, 이를테면 1 : 약 15 : 약 40, 예를 들어 1 : 15 : 40의 몰랄 비율을 갖는다.

따라서, 하나의 구체예에서, 조성물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1 : 0 내지 25 : 1 내지 50(갈락토오스:만노스:글루코오스)의 비율로, 이를 테면 1 : 10 내지 20 : 30 내지 50, 이를테면 1 : 12 내지 18 : 35 내지 45; 예를 들어 1 : 14 내지 16 : 38 내지 42, 이를테면 1 : 약 15 : 약 40, 예를 들어 1 : 15 : 40의 비율로 포함한다.

다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 갈락토오스:만노스:글루코오스를 1 : 0.5 내지 5 : 6 내지 12, 이를테면 1 : 1 내지 4 : 7 내지 11; 예를 들어 1 : 1.5 내지 3.5 : 7.5 내지 10, 이를테면 1 : 2.0 내지 3.0 : 7.5 내지 9.5, 예를 들어 1 : 2.2 내지 2.8 : 8.0 내지 9.0, 이를테면 1 : 약 2.5 : 8.0 내지 9.0, 예를 들어 1 : 2.5 : 8.0 내지 9.0, 이를테면 1 : 2.5 : 8.6의 몰랄 비율을 갖는다.

본 발명의 조성물을 두 가지 바람직한 구체예는 갈락토오스:만노스:글루코오스의 1:12:40와 1:3:5의 몰랄 비율을 갖는다.

본 발명의 하나의 바람직한 구체예에서, 당 조성물은 아가리쿠스 블라제이(Agaricus blazei)로부터 수득할 수 있고, 10-20 만노스 부분, 30-50 글루코오스 부분 및 0-2 갈락토오스 부분, 이를 테면 예를 들어 11-17 만노스 부분, 35-45 글루코오스 부분 및 0-1 갈락토오스 부분을 포함한다. 더욱 바람직하게 당 조성물은 아가리쿠스 블라제이로부터 수득할 수 있으며, 약 15 만노스 부분, 약 40 글루코오스 부분 및 약 1 갈락토오스 부분을 포함하고, 여기에서, "약"은 지정된 수치로부터 20% 차이내를 지시하고, 이를 테면 지정된 구치에서 10% 차이내, 이를테면 지정된 수치에서 5% 차이 이내를 의미한다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 당 조성물은 가노덜마(Ganoderma)로부터 수득될 수 있고, 0.5-5 만노스 부분, 4-15 글루코오스 부분 및 0-2 갈락토오스 부분, 이를테면 예를 들어 2-3 만노스 부분, 7-9.5 글루코오스 부분 및 0.5-1.5 갈락토오스 부분을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 그 당 조성물은 가노덜마로부터 수득할 수 있고, 약 2.5 만노스 부분, 약 8.6 글루코오스 부분 및 약 1 갈락토오스 부분을 포함하고, 여기에서 "약"은 지정된 수치로부터 20% 차이내를 지시하고, 이를 테면 지정된 구치에서 10% 차이내, 이를테면 지정된 수치에서 5% 차이 이내를 의미한다.

지정된 범위내의 분자량을 가지는 폴리사카라이드의 모노사카라이드 성분의 결정은 크기에 따른 조성물 분류에 의해 결정되는데, 그 예로 한외여과, 정밀여과, 초원심분리 또는 겔여과가 있다. 예를 들면, 실시예 2에서 기재한 것처럼 수행된다.

폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 (0-1.5) : (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (45-55)의 비율로 포함하고, 이를테면 예를 들어 다음 중 어느 하나의 비율로 포함한다:

(0-1.5) : (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (45-55),

(0.8-1.2) : (0-0.5) 내지 (20-30) : (0.5-1.5) 내지 (45-55),

(0-1.5) : (0-0.1) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (45-55),

(0.8-1.2): (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (45-55),

(0-1.5) : (0-0.5) 내지 (20-30): (0.5-1.5) 내지 (48-52),

(0.8-1.2): (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (48-52),

(0-1.5) : (0-0.1) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (48-52),

(0.8-1.2): (0-0.1) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (48-52),
 (0-1.5) : (0-0.5) 내지 (20-30): (0.5-1.5) 내지 (49-51),
 (0.8-1.2): (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (49-51),
 (0-1.5) : (0-0.1) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (49-51),
 (0.8-1.2): (0-0.1) 내지 (20-30): (0.5-1.5) 내지 (49-51),
 (0-1.5) : (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (45-55),
 (0.8-1.2): (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (45-55),
 (0-1.5) : (0-0.5) 내지 (20-30): (0.5-1.5) 내지 (48-52),
 (0.8-1.2): (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (48-52),
 (0-1.5) : (0-0.5) 내지 (15-35) : (0.5-1.5) 내지 (49-51),
 (0.8-1.2): (0-0.5) 내지 (20-30) : (0.5-1.5) 내지 (49-51).

본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물의 당 조성물은 1-25 만노스 부분, 5-45 글루코오스 부분 및 0-1.5 갈락토오스 부분을 포함하고; (여기에서 "부분"이라는 것은 상대적인 몰랄 비율을 의미하고, 예를 들어 어느 1-25몰의 만노스에 대해서나, 5-45 몰의 글루코오스 및 0-1.5 몰의 갈락토오스가 존재한다), 그러므로 당 조성물은 하기와 같은 A), B) 및 C)를 포함한다:

A) 하기로 구성되는 군에서 선택되는 만노스의 어느 하나의 양:

1-25 부분

1-20 부분

1-15 부분

1-10 부분

1-4 부분

1-3 부분

1.5-2.5 부분

4-6 부분

7-15 부분

7-23 부분

9-19 부분

12-20 부분

10-25 부분

12-17 부분

14-16 부분

및

B) 하기로 구성되는 군에서 선택되는 글루코오스의 어느 하나의 양:

5-45 부분

5-13 부분

7-13 부분

7-15 부분

8-15 부분

8-12 부분

8-10 부분

8-9 부분

8.4-8.7 부분

8.6 부분

10-20 부분

20-30 부분

30-40 부분

30-45 부분

35-45 부분

35-42 부분

37-45 부분

39-41 부분

40 부분

및

C) 하기로 구성된 군에서 선택되는 갈락토오스 어느 하나의 양:

0-1.5 부분

0.2-1.2 부분

0.7-1.5 부분

0-0.2 부분

0-1 부분

0 부분

1 부분

1-1.5 부분

본 발명의 바람직한 구체예

본 발명의 구체예에서, 하나 이상의 폴리펩타이드 및 폴리사카라이드 혼합물을 포함하는 조성물을 제공하고, 여기에서:

- a) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 30,000Da의 분자량을 가지고 있고, 여기에서 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함하거나,
- b) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 100,000da의 분자량을 가지고, 여기에서 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 0 내지 0.5:0.5 내지 10:0.5 내지 50의 비율로 포함하거나,
- c) 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 1,000Da의 분자량을 가지고, 여기에서 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함한다.

그러므로, 본 발명의 구체예에서, 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 10,000Da의 분자량을, 바람직하게는 적어도 30,000Da 분자량을 가지고, 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함하고, 이를 테면 다음의 비율 중 어느 하나를 포함한다:

1:0 내지 15:1 내지 25,

1:15 내지 25:1 내지 25,

1:0 내지 25:25 내지 50,

1:15 내지 25:25 내지 50,

1:0 내지 7:1 내지 50,

1:0 내지 7:1 내지 25,

1:7 내지 15:1 내지 50,

1:7 내지 15:40 내지 50,

1:0 내지 25:1 내지 40,

1:0 내지 25:25 내지 40,

1:0 내지 10:1 내지 50,

본 발명의 다른 구체예에서, 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 1,000Da, 이를테면 적어도 5,000Da, 예를 들어 적어도 10,000Da, 이를 테면 적어도 20,000Da, 예를 들어 적어도 40,000Da, 이를테면 적어도 50,000Da, 예를 들어 적어도 60,000Da, 적어도 75,000Da, 예를 들어 적어도 85,000Da, 가장 바람직하게는 적어도 100,000Da의 분자량을 가지고, 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 0 내지 0.5:0.5 내지 10:0.5 내지 50의 비율로 포함하고, 이를테면 다음 비율들 중 어느 하나를 포함한다:

- 0 내지 0.5:0.5 내지 7:0.5 내지 50
- 0 내지 0.5:0.5 내지 4:0.5 내지 50
- 0 내지 0.5:0.5 내지 2:0.5 내지 50
- 0 내지 0.5:3 내지 10:0.5 내지 50
- 0 내지 0.5:5 내지 10:0.5 내지 50
- 0 내지 0.5:3 내지 7:0.5 내지 50
- 0 내지 0.1:0.5 내지 7:0.5 내지 50
- 0 내지 0.1:0.5 내지 4:0.5 내지 50
- 0 내지 0.1:0.5 내지 2:0.5 내지 50
- 0 내지 0.1:3 내지 10:0.5 내지 50
- 0 내지 0.1:5 내지 10:0.5 내지 50
- 0 내지 0.1:3 내지 7:0.5 내지 50
- 0 내지 0.5:0.5 내지 7:0.5 내지 25
- 0 내지 0.5:0.5 내지 4:0.5 내지 12
- 0 내지 0.5:0.5 내지 2:10 내지 50
- 0 내지 0.5:3 내지 10:0.5 내지 5
- 0 내지 0.5:5 내지 10:15 내지 40
- 0 내지 0.5:3 내지 7:25 내지 50
- 0 내지 0.1:0.5 내지 7:45 내지 50
- 0 내지 0.1:0.5 내지 4:40 내지 50
- 0 내지 0.1:0.5 내지 2:35 내지 50
- 0 내지 0.1:3 내지 10:20 내지 30
- 0 내지 0.1:5 내지 10:15 내지 45
- 0 내지 0.1:3 내지 7:25 내지 30

0 내지 0.1:0.5 내지 1.5:15 내지 20

0 내지 0.1:0.5 내지 1.5:0.5 내지 1.5

바람직하게, 상기 비율은 약 0:1:18 또는 약 0:1:1이다.

본 발명의 다른 구체예에서, 그 조성물의 폴리사카라이드의 대부분은 적어도 500Da, 이를 테면 적어도 800Da, 이를테면 적어도 1,000Da, 예를 들어 적어도 5,000Da, 예를 들어 적어도 10,000Da, 이를테면 적어도 20,000Da, 예를 들어 적어도 40,000Da, 이를테면 적어도 50,000Da, 예를 들어 적어도 60,000Da, 적어도 75,000Da, 예를 들어 적어도 85,000Da, 이를테면 적어도 100,000Da, 가장 바람직하게는 적어도 1,000Da의 분자량을 가지고, 상기 폴리사카라이드 혼합물은 모노사카라이드 갈락토오스, 만노스 및 글루코오스를 1:0 내지 25:1 내지 50의 비율로 포함하고, 이를테면 다음 비율들 중 어느 하나를 포함한다:

1:0 내지 25:1 내지 50

1:0 내지 20:1 내지 50

1:0 내지 15:1 내지 50

1:0 내지 10:1 내지 50

1:0 내지 5:1 내지 50

1:10 내지 25:1 내지 50

1:10 내지 15:1 내지 50

1:15 내지 25:1 내지 50

1:17 내지 25:1 내지 50

1:10 내지 18:1 내지 50

1:0 내지 25:1 내지 45

1:0 내지 25:1 내지 40

1:0 내지 25:1 내지 35

1:0 내지 25:1 내지 30

1:0 내지 25:1 내지 20

1:0 내지 25:1 내지 15

1:0 내지 25:1 내지 5

1:0 내지 25:10 내지 20

1:0 내지 25:10 내지 30

1:0 내지 25:10 내지 40

- 1:0 내지 25:20 내지 50
- 1:0 내지 25:20 내지 30
- 1:0 내지 25:20 내지 40
- 1:0 내지 25:30 내지 50
- 1:0 내지 25:30 내지 40
- 1:0 내지 25:30 내지 35
- 1:0 내지 25:35 내지 40
- 1:0 내지 25:1 내지 45
- 1:0 내지 20:1 내지 40
- 1:0 내지 15:1 내지 35
- 1:0 내지 10:1 내지 30
- 1:0 내지 5:1 내지 20
- 1:10 내지 25:1 내지 15
- 1:10 내지 15:10 내지 50
- 1:15 내지 25:10 내지 40
- 1:17 내지 25:1 내지 50
- 1:10 내지 18:1 내지 50
- 1:8 내지 15:30 내지 50
- 1:11 내지 13:35 내지 45
- 1:11 내지 13:38 내지 42
- 1:1 내지 5:3 내지 9
- 1: 2 내지 4: 4 내지 6

바람직하게, 상기 비율은 약 1:12:40 또는 약 1:3:5이다.

폴리펩타이드

본 발명에 따른 조성물은 폴리펩타이드를 포함하는 것이 바람직하다. 여기에서 사용되는 폴리펩타이드란 용어는 단백질, 펩타이드 및 폴리펩타이드를 모두 포함하는 개념이다. 상기 폴리펩타이드는 유리 형태로 존재하고, 폴리사카라이드에 공유적으로 결합될 수도 있고, 또는 폴리사카라이드나 상기 언급한 혼합물에 비-공유적으로 결합될 수도 있다.

그 조성물은 조성물의 경구 투여가 가능하도록 하기 위한 충분한 폴리펩타이드를 포함하는 것이 바람직하다. 만약 그 조성물이 너무 적은 폴리펩타이드를 포함한다면, 그 조성물을 개체에 경구 투여한 후에 그 개체에 있어서 면역 조절이 전혀 수득될 수 없거나 또는 거의 수득될 수 없다. 그러므로 본 발명의 조성물은 적어도 $10\mu\text{g}/\ell$, 더 바람직하게는 적어도 $20\mu\text{g}/\ell$, 더더욱 바람직하게는 적어도 $25\mu\text{g}/\ell$, 예를 들어 10 내지 $1000\mu\text{g}/\ell$ 의 범위에서, 이를테면 20 내지 $1000\mu\text{g}/\ell$ 의 범위에서, 예를 들어 25 내지 $1000\mu\text{g}/\ell$ 의 범위에서, 이를테면 25 내지 $100\mu\text{g}/\ell$ 의 범위에서, 예를 들어 25 내지 $35\mu\text{g}/\ell$ 의 범위의 폴리펩타이드를 함유하고, 바람직하게는 용해성 폴리펩타이드이다. 상기 언급한 폴리펩타이드 농도를 함유하는 조성물은 0.1 내지 2 범위에서, 더 바람직하게는 0.5 내지 1.5 범위에서, 더욱 바람직하게는 약 $1\text{mg}/\text{ml}$ 폴리사카라이드를 포함한다. 만약 그 조성물이 너무 많은 또는 너무 적은 폴리사카라이드를 포함한다면, 폴리펩타이드의 양은 비율적으로 감소되거나 증가되는 것이 바람직하다.

조성물의 제조방법

바람직하게, 본 발명의 조성물은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다:

i) 액체 성장 배지에서 진균류의 배양

ii) 상기 액체 성장 배지로부터 상기 조성물을 정제

액체 성장 배지에서 진균류를 배양하는 일반적으로 물에 상기 진균류의 성장을 위해 필요한 영양 성분을 용해하고, 그 용액을 바이오리액터로 옮기고, 그 바이오리액터에 진균류의 세포 또는 포자, 이를테면 진균류의 균사체 또는 그들의 분획을 배양하기 위해 접종하는 것을 수반한다. 이는 그 진균류에 적절한 화학적 및 물리적인 환경을 부여하기 위하여 멸균 상태 및 환경의 조절하에서 이루어진다. 액체 성장 배지에서 진균류를 배양하는 것은 또한 "액체 상태" 배양이라고 불리어진다.

"액체-상태" 배양 동안, 진균의 바이오매스를 갖는 배지는 기율기의 발생을 감소시키기 위하여, 그리고 액중 세포들에 산소 이용가능성을 확보하기 위하여 교반되는 것이 바람직하다. 진균류가 바이오리액터에서 성장될 때, 산소가 그 액체 배지에 공급되는 것이 바람직하고, 용해된 산소의 정도는 알려진 방법에 의해 조절된다.

액체 성장 배지는 영양 성분을 함유하고 있는 수용액, 바람직하게는 멸균수이다. 그 액체 배지는 진균의 성장을 지지하고, 바람직하게는 세포의 화학물, 이를테면 면역 자극제의 생산을 자극한다. 액체 성장 배지는 미생물이 성장하는데 필요한 하나 이상의 전형적인 성분들, 이를테면 맥아 추출물, 효모 추출물, 펩톤, 글루코오스, 수크로오스, 인산염을 제공하는 염들, 마그네슘 및 칼륨, 콘 스틱 리퀴르(corn-steep liquor) 및 티아민과 같은 비타민을 포함한다. 더 바람직하게, 그 배지는 균사체 성장 및 폴리사카라이드의 성장을 위해 수크로오스, 콘 스틱 리퀴르, 인산염 및 마그네슘을 포함한다.

성장 배지의 접종을 위해, 맥아 추출물, 효모 추출물, 펩톤 및 글루코스를 함유한 아가 플레이트로부터의 진균 균사체, 이를테면 렌티너스 에도데스 균사체가 사용될 수 있다. 진균은 초기에 진균의 성장을 지속시킬 수 있는 상기 영양 성분을 함유한 아가 플레이트에서 배양될 수 있다. 그 플레이트는 균사체로 접종되고 적어도 가시적인 성장이 플레이트 상에서 나타날 때까지 배양된다. 진균에 따라, 약 7일 내지 24일, 또는 약 10 내지 30일, 전형적으로 14일 또는 최고 20일동안, 18 내지 32°C 의 범위에서, 바람직하게는 22 내지 30°C 에서, 이를테면 약 23 내지 30°C 의 온도에서, 이를테면 23 내지 27°C 의 온도에서, 이를테면 약 25°C 에서 보통 배양될 수 있다.

아가 플레이트로부터의 진균으로의 접종에 부가적으로, 성장 배지의 접종이 세포 성장을 지속시킬 수 있는 영양 성분을 함유한 교반 플라스크 배지(shake flask medium)에서의 발효 배양액으로부터의 균사체를 사용함으로써 수행될 수 있다. 진균 균사체 배양을 위한 교반 플라스크는 처음부터 아가 플레이트상에서 배양된 균사체로 접종될 수 있다. 그 균사체는 플레이트로부터 채취되어 진균 균사체의 성장을 지속시키는 용해된 영양 성분 및 영양 염들을 함유하는 멸균수를 함유하는 교반 플라스크로 무균적으로 옮겨진다. 전형적인 성장 배지는 수크로오스, 콘 스틱 리퀴르, 인산염 및 마그네슘을 포함한다. 세포의 렌티난의 최대의 생산을 가져다 주는 접종 물질의 양은 다음의 초기 실험으로부터 선택될 수 있다.

교반 플라스크의 접종을 위한 시간은 특정 진균에 의존한다. 전형적으로, 교반 플라스크는 6 내지 21일, 바람직하게는 7 내지 18일, 더욱 바람직하게는 8 내지 14일 동안, 18 내지 32°C 범위의 온도에서, 바람직하게는 22 내지 30°C 의 온도에서, 이를테면 약 23°C 의 온도, 예를 들어 24°C 의 온도, 이를테면 29°C , 예를 들어 30°C 의 온도에서 교반에 의해 배양될 수 있다. 교반 플라스크는 또한 8-25일 동안, 더 바람직하게는 10-20일, 더욱 바람직하게는 12-18일 동안 배양된다. 온도 또한 18 내지 37°C , 바람직하게는 23 내지 32°C , 이를테면 약 25°C 이다.

교반 플라스크의 성분은 바이오리액터를 배양하기 위해 사용될 수 있다. 그 경우에, 리액터는 담자균의 진균 균사체 또는 그들의 부분, 이를테면 렌티너스 진균 균사체, 이를테면 렌티너스 에도데스의 단일-배양균의 배양을 위한 물에 있어서 영양 성분 및 영양 염들의 멸균 용액을 포함한다.

바이오리액터 발효 기간은 전형적으로 50 시간 내지 300 시간의 범위, 바람직하게는 80시간 내지 270시간의 범위이고, 그 온도는 18 내지 32°C의 범위에서, 바람직하게는 22 내지 31°C, 이를테면 약 23°C의 온도, 예를 들어 24°C, 이를테면 25°C, 예를 들어 26°C, 이를테면 27°C, 예를 들면 28°C, 이를테면 29°C, 예를 들어 30°C의 온도에서 일정하게 유지된다. 그 온도는 또한 18 내지 37°C, 바람직하게는 23 내지 32°C, 이를테면 약 25°C이다.

그 리액터는 발효 배양액으로 공기를 공급하기 위하여 입구(inlet)이 설치되어 있고, 발효 배양액은 바람직하게는 공기 첨가의 결과로서, 또는 리액터의 성분을 잘 혼합하기 위해 적절한 혼합 기구에 의해 지속적인 교반 상태로 유지된다.

성장 배지의 pH는 성장 배지가 진균 균사체 또는 그들의 부분, 이를테면 L. 에도데스 균사체로 접종되기 전에 약 3 내지 약 7사이, 이를테면 약 4.5 내지 약 6.5의 pH, 예를 들면 약 pH 6으로 조정되는 것이 바람직하다. 초기 조정 후에, pH는 발효 과정 동안 자연스럽게 떨어지거나, 적절한 pH-조절제, 이를테면 산 및 염기를 첨가하여 pH 3 내지 7의 범위에서 특정 수치로 조절된다. 성장 배지의 온도는 바람직하게는 18 내지 32°C의 범위에서, 바람직하게는 22 내지 31°C, 이를테면 약 23°C의 온도, 예를 들어 24°C, 이를테면 25°C, 예를 들어 26°C, 이를테면 27°C, 예를 들어 28°C, 이를테면 29°C, 예를 들어 30°C이다. 그 온도는 또한 18 내지 37°C사이, 바람직하게는 23 내지 32°C, 이를테면 약 25°C이다.

샘플들은 그 바이오리액터로부터 수득하여 바이오매스, 물질대사산물 및 영양 성분을 위해 분석될 수 있고, 그 결정들에 의해 발효 공정의 운영에 있어서 바이오리액터의 작동기를 보조할 수 있다.

보통 수행되는 전형적인 분석은 바이오매스, 잔여물의 당 농도 및 세포 외 폴리사카라이드 농도의 결정이다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 사람은 이에 적용될 수 있는 분석 방법을 알고 있다.

바람직하게, 본 발명에 따른 조성물의 제조방법은 진균 균사체로부터 액체 배지의 세포의 부분을 정제하는 단계를 수반한다. 액체 발효 배지의 세포의 부분은 또한 상청액이라고 불리워지고, 이 분획은 원심분리 또는 여과, 또는 거기에 존재하는 어떤 진균 균사체없이 필수적으로 액체 분획을 획득할 수 있도록 하는 다른 수단에 의해 진균 균사체로부터 분리될 수 있다. "거기에 존재하는 어떤 진균 균사체없이 필수적으로"란 용어는 여전히 진균 균사체 및 그것의 부분의 농도가 적어도 10^3 인자, 이를테면 적어도 10^4 , 예를 들어 적어도 10^5 , 이를테면 적어도 10^6 인자에 의해 감소된다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 정제는 적어도 하나의 크기 분류 단계를 포함한다. 바람직하게, 이 크기 분류 단계는 세포의 분획에 대해 수행된다. 이 크기 분류 단계는 그 조성물의 어느 폴리사카라이드나 적어도 지정된 수치(상기에서 보여짐)의 분자량을 갖는 것을 보증한다. 그 크기 분류 단계는 숙련된 사람에게 알려진 어느 크기 분류라도 가능하며, 예를 들어 초원심분리, 한외여과, 정밀여과 또는 겔여과가 있다. 그러므로, 본 발명의 바람직한 구체예에서, 그 조성물은 초원심분리, 한외여과, 정밀여과 및 겔여과로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 정제 단계를 갖는 방법에 의해 액체 성장 배지로부터 정제된다. 바람직하게, 그 정제 단계(들)은 한외여과, 정밀여과 및 초원심분리로 구성된 군에서 선택되고, 더욱 바람직하게는 한외여과 및 정밀여과로 구성된 군에서 선택된다.

한외여과는 막이 크기에 따라 액체 성분을 분류하는 막 공정이다. 그 막 구성은 보통 크로스-플로우(cross-flow)이며, 여기에서 그 적절한 성분을 함유한 액체는 막을 가로질러 흘러간다. 그 막의 기공 크기보다 더 작은 성분을 함유하는 몇몇 액체는 막을 통과하여 퍼질 것이다. 기공 크기보다 큰 분자들은 보유될 것이다. 희망 산물은 보유상태 또는 여과상태에 있을 것이다. 만약 한외여과가 조성물을 제조하기 위해 수행된다면, 상기 조성물 내의 어느 폴리사카라이드든 지정된 수치보다 높은 분자량을 갖게 될 것이고, 희망 산물은 보유상태에 있게 된다. 만약 일련의 분류가 수행되면, 그 산물은 보유상태 또는 여과상태에 있을 것이다.

정밀여과(microfiltration)는 한외여과에 유사한 막 분리 과정으로서, 그러나 큰 분자들을 통과시키도록 더 큰 막 기공 크기를 가지고 있다.

겔 여과(gel filtration)는 입자들이 크기에 따라 분리되는 크로마토그래피 기술이다. 그 여과 배지는 전형적으로 비즈 기공을 관통할 수 있는 분자를 머무르게 할 수 있는 작은 겔 비즈가 있다. 더 큰 분자들은 비즈에 머무르지 않고 컬럼을 통과할 것이다.

겔-여과, 한외여과 또는 정밀여과는 예를 들어 R. 하티-카울 및 B. 마티아손(R Hatti-Kaul and B Mattiasson, Downstream Processing in Biotechnology, in Basic Biotechnology, eds C Ratledge and B Kristiansen, Cambridge University Press, pp 189, 2001)에 기재된 것처럼 수행될 수 있다.

본 발명에 따른 조성물의 제조방법은 실시예 1, 7 및 8에 기재된 것에 제한되지 않는다.

알콜 침전과 관련된 액체 성장 배지로부터 세포의 작용제를 정제하는 방법이 기재되어 있다. 그러나, 알콜 침전은 면역 조절 효고를 감소시키므로, 알콜 침전을 이용하여 정제된 조성물은 덜 바람직하다. 그러므로, 본 발명의 한 구체예에서, 그 방법은 알콜 침전 단계를 수반하지 않고, 더 바람직하게는 그 방법은 침전 단계를 수반하지 않는다.

본 발명의 다른 구체예에서는 면역 자극이 필요한 개체의 면역계를 자극하기 위한 방법에 있어서 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다. 그 조성물은 그 개체의 면역계를 자극할 수 있는 약학적으로 효과적인 양으로 그 개체에게 경구적으로 또는 피하(subcutaneously)로 투여된다. 면역계의 자극은 증가된 항체 생산, 헬퍼 T-세포의 활성화 또는 인터루킨 1 및 인터루킨 2와 같은 인터루킨의 증가된 생산에 의해 증명될 수 있다.

본 발명의 또 다른 구체예에서는 치료가 필요한 면역 저항 상태에 있는 개체를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다. 개체의 면역 저항 상태는 면역계 인자들, 이를테면 불충분한 항체의 양 또는 항체 생산 감소에 의해, 불충분한 헬퍼 T-세포들의 양 또는 헬퍼 T-세포의 생산 감소에 의해, 불충분한 B-세포의 양 또는 B-세포들의 생산 감소에 의해, 불충분한 자연살해세포의 양에 의해, 또는 NK 세포의 생산 감소에 의해 또는 불충분한 인터루킨 1 및 인터루킨 2와 같은 인터루킨의 양 또는 인터루킨 1 및 인터루킨 2와 같은 인터루킨의 생산 감소에 의해 증명될 수 있다. 면역 저항 상태는 하기에 개시된 것들 중의 어느 하나이다. 치료는 예방, 완화 또는 치유이다.

상기에서 사용된 "불충분한 양" 및 "생산 감소"는 건강한 개체과 보통 연결된, 하기 미리 결정된 수준 또는 값으로서 의료 전문가가 고려하는 그런 양 및 생산을 표시한다. 그 양 및/또는 생산은 일반적으로 나이, 일반적 신체적 상태 및 그와 유사한 것과 같은 요소들에 의존할 것이다. 이런 이유로, 미리 결정된 수준 또는 값은 의료 전문가에 의해 개체에 기초하여 결정되어야 할 것이다. 개체에 있어 면역 저항 상태의 한 징후는 몇일, 몇주 또는 몇년과 같은 시간 동안 측정된 단위 (혈액) 샘플 부피당 점차적으로 항체의 수가 감소하고, 점차적으로 CD4 (양성) 세포들의 수가 감소하거나 점차적으로 T-헬퍼 세포들의 수가 감소하는 것이다.

한 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물 및 약학적으로 허용가능한 담체(들)를 함유하는 약학 조성물에 대한 것이다. 그 약학 조성물은 전통적인 기술들, 예를 들어 레밍턴(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa.)에서 기술한 것에 의해 준비될 수 있다. 그 조성물은 전통적인 형태들, 예를 들어 캡슐, 정제, 로젠제스(lozenges), 분말, 시럽, 용액 또는 현탁액이 될 것이다.

한 측면에서, 본 발명은 면역 저항 상태로 진단된 개체의 치료 방법에 대한 것으로서, 상기 방법은 상기 개체에게 본 발명에 따른 조성물 또는 본 발명에 따른 약학 조성물을 상기 면역 저항 상태를 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함한다.

투여된 양은 상기 면역 저항 상태를 예방적으로 치료하는데 효과적인 양이 된다.

또한 수술 또는 병에서 회복되고 면역 저항 상태에 걸릴 위험이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명에 따른 조성물 또는 본 발명에 따른 약학 조성물을 상기 개체의 면역계를 증진시키는데 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함한다.

게다가, 후천성 면역 결핍증으로 또는 위험이 있는 것으로 진단받은 개체의 치료방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 약학 조성물을 상기 후천성 면역 결핍증을 치료 또는 예방적으로 치료하는데 효과적인 양으로 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

면역 저항 상태는 전염성 질병, 기생충 질병, 헤모필루스 수막염(haemophilus meningitis), 폐렴구균성 수막염(pneumococcal meningitis), 연쇄구균성 수막염(streptococcal meningitis), 포도구균성 뇌막염(staphylococcal meningitis), 다른 미생물로 인한 수막염, 뇌염(encephalitis), 바이러스 폐렴(viral pneumonia), 폐렴구균성 폐렴

(pneumococcal pneumonia), 다른 세균성 폐렴, 세균을 제외한 다른 특정 미생물로 인한 폐렴, 기관지폐렴 (bronchopneumonia), 기관 비특이적 폐렴, 인플루엔자, 비특이적 설사, 비특이적 간염, 간의 급성 및 아급성 괴사, 만성 간염 및 간의 종기(abscess)로 구성된 군에서 선택된다.

게다가, 면역 저항 상태는 콜레라, 살모넬라, 시겔라증 이질(shigellosis), 대장균(*Escherichia coli*), 다른 특정 세균에 의한 장자 감염, 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*), 바이러스성 위장염(viral gastroenteritis), 전염성 대장염(infectious colitis), 장염(enteritis) 및 위창자염(gastroenteritis), 전염 설사(infectious diarrhea), 결핵(tuberculosis), 리스테리아증(listeriosis), 파스테렐라 감염증(pasteurellosis), 결핵균(myco bacterium), 디프테리아, 백일해(pertussis), 수막구균(meningococcus), 스트렙토코커스 패혈증(streptococcus septic aemia), 폐렴구균 패혈증(pneumococcal septic aemia), 혐기성균에 의한 패혈증(septic aemia due to anaerobes), 다른 그람-음성균에 의한 패혈증, 방선균 감염증(actinomycotic infection), 가스 괴저(gas gangrene), 독소 충격 증후군(toxic shock syndrome), 괴사 근막염(necrotizing faciitis), 프리이들렌데 폐렴균(Friedlander's bacillus), 인플루엔자 간균, 슈도모나스, AIDS/HIV 감염, 급성 회색질척수염(acute poliomyelitis), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease), 아급성 경화 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis), 진행성 다소성 백질뇌증(progressive multifocal leucoencephalopathy), 중추신경계의 비특정 느린 바이러스 감염, 콕사키 바이러스(coxsackie virus), 비특정 바이러스성 수막염, 임파구성 맥락 수막염(lymphocytic choriomeningitis), 비특정 바이러스성 뇌염, 수두(chickenpox), 대상 포진(herpes zoster), 단순 포진(herpes simplex), 'A' 바이러스 감염, 'B' 바이러스 감염, 다른 특정 바이러스 감염, 만성 간염, 간의 농양/급성 괴사, 감염성 단핵구증(mononucleosis), 세포 거대 포함병(cytomegalic inclusion disease), 클라미디아(chlamydiae), 아데노바이러스, 바이러스 감염, 매독(syphilis), 칸디다증, 비특정 히스토플라스마증, 아스페르길루스증(aspergillosis), 크립토코쿠스증(cryptococcosis), 진균증(mycoses), 분선충증(strongyloidiasis), 창자 기생충증(intestinal parasitism), 톡소포자충증(toxoplasmosis), 사코이드증(sarcoidosis), 폐포자충(pneumocystis carinii), 소아마비 증후군(post polio syndrome), 헤모필루스 수막염(haemophilus meningitis), 폐렴구균 수막염(pneumococcal meningitis), 연쇄구균 수막염(streptococcal meningitis), 포도상구균 뇌막염(staphylococcal meningitis), 뇌염(encephalitis), 아데노바이러스로 인한 폐렴, 호흡기 세포 융합 바이러스로 인한 폐렴, 파라인플루엔자 바이러스로 인한 폐렴, 다른 바이러스로 인한 폐렴, 바이러스 폐렴, 폐렴구균 폐렴(pneumococcal pneumonia), 폐렴막대균(*klebsiella pneumoniae*)으로 인한 폐렴, 슈도모나스로 인한 폐렴, 헤모필루스 인플루엔자로 인한 폐렴, 연쇄구균으로 인한 폐렴, 포도상구균으로 인한 폐렴 및 세균성 폐렴으로부터 선택되는 전염성 또는 기생충 질병이다.

그 개체는 포유동물이며, 이를테면 인간이다.

본 발명의 조성물은 어떤 적절한 투여 형태로 투여된다: 그러나 일반적으로 투여는 경구 또는 비경구가 될 것이다. 그 조성물을 함유하는 시럽 및/또는 그 조성물을 함유하는 시럽을 포함하는 캡슐의 형태로 또는 그 조성물의 분말 형태로 경구 투여하는 것이 바람직하다.

1회 투여 필요량은 사용되는 특정 조성물, 투여 경로 및 치료받는 특정 개체에 따라 다양해 질 것이다. 이상적으로, 본 발명의 방법에 의해 치료받는 개체는 최대 허용 1회 용량에서 그 조성물의 약학적으로 효과적인 양을 받을 것이다.

일반적으로 하루의 경구 투여 요법은 전체 몸무게의 약 0.001 내지 약 100mg/kg, 바람직하게는 0.01 내지 50mg/kg의 범위에서, 더 바람직하게는 0.1 내지 10mg/kg의 범위에서, 더더욱 바람직하게는 1 내지 2mg/kg의 범위가 된다. 그 조성물의 최적 양 및 개별 1회 투여량은 선천, 치료받는 상태의 정도, 형태, 경로, 투여 자리, 및 치료받는 특이한 환자에 의해 결정되는 것이 당업계의 기술자에 의해 인식되고, 그런 최적 조건은 전통적인 기술에 의해 결정될 수 있음이 당업계의 기술자에 의해 인식될 것이다. 치료의 최적 과정, 예를 들어 지정된 일수 동안에 하루에 주어진 조성물의 1회 투여량은 치료 결정 테스트에 일반적인 과정을 이용하여 당업계의 기술자들에 의해 확인받을 수 있음은 당업계의 기술자에 의해 인지될 수 있을 것이다.

본 발명에 따른 조성물 및 약학 조성물은 상기 조성물 및 투여 양과 시간에 대한 가이드라인을 알려주는 투여 요법 지시를 포함하는 키트의 요소를 형성한다.

기능성 식품

본 발명의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 기능성 식품의 제조에 이용되고, 그러므로 본 발명의 구체예에서, 여기에서 설명된 조성물의 어느 하나는 바람직하게는 인간에게 적절한 기능성 식품 또는 영양 보충제에 포함된다. 상기 기능성 식품은 바람직하게는 생존력 강화, 수명 연장, 건강 증진 및/또는 미생물밀도의 조절자이다. 더욱 바람직하게, 상기 기능성 식품은

건강 증진 및/또는 미생물밀도의 조절자이다. 기능성 식품은 적어도 주간격으로 경구 섭취, 이를 테면 매일 경구 섭취하는 것이 적절하다. 보조로, 상기 기능성 식품 제품은 비경구적(parenteral) 또는 장내(enteral) 영양 섭취가 적절하며, 바람직하게는 당업계의 기술자에게 알려진 다른 영양 성분을 포함하는 제형과 조합하여 섭취하는 것이 적절하다.

본 발명에 따른 제품들은 인간의 건강 촉진을 위해 이용되고, 예를 들어 뼈 또는 심장혈관계 건강을 유지, 강화 또는 촉진 시키는데 이용된다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 기능성 식품은 골다공증(osteoporosis)의 예방 또는 감소를 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 기능성 식품의 보통 이용량은 예를 들어 하루에 한번, 하루에 두 번 또는 하루에 세번으로, 감기, 기침과 같은 질환의 위험을 감소시키거나 늘어짐(tiredness) 및 피로를 줄인다.

투여 또는 이용 방법은 다양한 반면, 기능성 식품은 사람들의 일상적 식이의 성분으로서 인간에 의해 섭취되는 것이 바람직하다. 여기에서 기재된 조성물들 중의 어느 것은 액체 베히클, 이를 테면 물, 우유, 식물성 오일, 주스 및 그와 유사한 것과 조합될 수 있거나 섭취될 수 있는 고체 또는 반고체 식료품과 조합될 수 있다. 예를 들어, 그것들은 밀크 셰이크, 밀크 셰이크 믹스, 아침 음료, 주스, 향미 음료, 향미 음료 믹스, 요거트, 푸딩, 아이스크림, 아이스 밀크, 프로스팅(frostings), 냉동 요거트, 치즈케이크 필링, 캔디바, 그라놀라 및 과일 바와 같은 "건강 바"를 포함하고, 껌, 눈깔사탕, 마요네즈, 과일 또는 크림 필링과 같은 패스트리 필링, 씨리얼, 빵, 스테핑(stuffings), 드레싱 및 인스턴트 감자 믹스와 같은 식품에 혼합된다. 그러므로 본 발명은 여기에 기재된 조성물의 어느 것(예를 들어, 렌티너스 진균으로부터 수득된 것)과 식료품을 혼합하는 것을 포함하는 기능성 식품 조성물의 생산방법에 대한 것이다.

예를 들어, 상기 기능성 식품 제품은 식사 대용품, 식이 보충제, 아이스크림, 소스, 드레싱, 스프레드, 바, 사탕, 스넥, 씨리얼 및 음료로 구성된 군에서 선택되는 것이다.

다른 구체예에서, 상기 기능성 식품은 식이 보충제, 바람직하게는 필, 캡슐, 정제 또는 액체 형태에 삽입되는 것이 적절하다.

하나의 구체예에서, 본 발명에 따른 제품은 여기에서 기재된 조성물의 어느 하나(이를 테면 렌티너스로부터의 것)가 식료품에 첨가되고, 그 조성물은 제품 100g당 5 내지 5000mg으로 포함되는 것에 의해 제조된다.

유제품(Dairy product)

본 발명의 바람직한 구체예에서, 기능성 식품은 유제품이다. 그러므로, 상기 기능성 식품은 예를 들어 다음으로부터 선택된다:

배양된 유제품, 요거트, 코티지 치즈(cottage cheese), 크림 치즈, 우유 덩스(dairy dips), 사워크림(sour cream), 밀크셰이크, 버터, 마가린, 저-지방 스프레드, 치즈, 코티지 치즈, 치즈 스프레드, 어린이용 치즈 "스티링". 치즈 슬라이스, 요거트, 요거트-기본 탄산 음료, 마시는 요거트, 저-지방 요거트, 냉장된 덩스, 사워크림, 아이스크림, 크림, 저-지방 크림-대체물, 커파이어(kefir)와 같은 발효된 우유.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 유제품은 치즈-기초 제품, 이를테면 저-지방 치즈, 하드 치즈(hard cheese), 소프트 치즈, 코티지 치즈, 치즈 스프레드, 어린이용 치즈 "스티링" 또는 샌드위치용 치즈 슬라이스에서 선택된다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 유제품은 요거트-기초 제품, 이를테면 세트 요거트(set yoghurt), 러니(runny) 또는 파우러블(pourable) 요거트, 요거트-기초 탄산음료, 마시는 또는 마실 수 있는 요거트, 저-지방 요거트 중에서 선택된다. 상기 요거트-기초 제품은 예를 들면 락토바실러스 불가리쿠스 및/또는 스트렙토코커스 쉴로필러스로 발효된 것이다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 유제품은 배양된 유제품으로, 이를 테면, 배양된 유동체(예를 들어 마실수 있는 요거트/요거트 스무디, 커파이어, probiotic shots); 마실수 없는 요거트 (예를 들어 컵 또는 튜브에 들어있는 것); 및/또는 다른 non-pourable 배양된 유제품(예를 들어 코티지 치즈, 크림 치즈, 우유 덩스 및 사우어 크림)이다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 유제품은 유제품의 다른 타입으로서, 이를테면 냉장 덩스 및 사우어 크림, 아이스크림, 크림, 저-지방 크림-대체물, 커파이어와 같은 발효된 우유, 마실수 있는 요거트 및 커파이어와 같은 발효 음료로 구성된 군에서 선택된다.

건강 음료

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 기능성 식품은 건강 음료이다. 상기 건강 음료는 "스퀴시"처럼 농축된, 음용하기 위하여는 희석시켜야 하는 과일 주스-기초한 것이다. 상기 과일 주스 또는 스퀴시는 바람직하게 농축된 과일 주스를 함유한다. 바람직한 과일 주스는 오렌지, 그레이프프루트, 레몬 또는 라임, 또는 그들의 조합과 같은 시트러스 과일 주스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 과일 주스 또는 스퀴시는 (바람직하게는 농축된) 나무딸기, 딸기, 검은 딸기, 로건베리, 크랜베리(cranberries), 레드커런트(redcurrants), 블랙커런트, 블루베리 또는 그들의 혼합 및/또는 시트러스 과일 주스와의 혼합과 같은 베리 주스를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 과일 주스 또는 스퀴시는 파인애플, 패션 프루트, 망고, 사과, 배, 살구, 석류, 구아바, 토마토 중 어느 하나 이상의 주스 및/또는 다른 종류의 과일 주스와 혼합된 것을 포함한다.

바람직한 주스 베이스는 다음 군으로부터 선택된다:

- 사과
- 살구
- 바나나
- 블랙베리
- 블루베리
- 카람볼라(Carambola)
- 체리
- 대추야자열매(Dates)
- 무화과(Figs)
- 과일 칵테일
- 포도
- 그레이프프루트
- 키위프루트
- 레몬
- 만다린 오렌지(Mandarin Orange)
- 망고
- 멜론
- 승도 복숭아(Nectarines)
- 오렌지
- 파파야
- 복숭아

- 배
- 파인애플
- 플랜타인(Plantain)
- 자두
- 나무딸기
- 딸기
- 탕헤르 오렌지(Tangerines)
- 수박

또는 그들의 조합.

또한, 바람직한 주스 베이스는 다음 군에서 선택된다:

- 사과
- 당근
- 크랜베리
- 포도
- 그레이프프루트(핑크 또는 흰색)
- 레몬
- 라임
- 오렌지
- 파인애플
- 파인애플
- 마른 자두(Prune)
- 탕헤르 오렌지
- 토마토

또는 그들의 조합.

상기 건강 음료는 물에 기초하거나, 이를테면 미네랄 물-기초 제품, 이를테면 향미가 가해진 미네랄 물-기초 제품이다. 상기 향미는 과일 주스 및/또는 다른 천연제품으로부터의 것이 바람직하다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 건강 음료는 설탕 및 다른 에너지-제공 제품을 포함하는 에너지 샷(an energy shot)으로, 이를테면 25 내지 30 cl 병에 포함된다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 건강 음료는 알콜 음료, 이를테면 유제품-기초한 알콜 음료이다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 건강 음료는 식사 대용 음료이다.

본 발명의 건강 음료는 마지막 단계에서, 바람직하게는 소비자에 의해 음료로수로 만들기 위한 준비로서, 농축음료 또는 혼합음료로서 제조된다.

고형 기능성 식품

본 발명의 바람직한 구체예에서, 기능성 식품은 고형 기능성 식품으로서, 이를테면 비스킷/크래커, 아침용 씨리얼, 수프, 뮤즐리, 슈빙검, 사탕(boiled sweets와 같은 것), 갓 구운 베이커리 제품 (갓 구운 빵, 케이크, 머핀, 와플 등), 건조 베이커리 제품(크리스브레드, 비스킷, 크래커, 등), 씨리얼 제품(아침용 씨리얼, 섬유질 및 스테롤 풍부한 밀가루, 뮤즐리, 씨리얼 기본 및 뮤즐리 바, 이를테면 초콜렛, 파스타 제품, 스넥 등을 함유한 바들, 밀기울 제품(과립된/되거나 구운 밀기울 제품들, 풍미 및/또는 스테롤 코팅된 밀기울 제품들 및 밀기울-밀기울 믹스 등)으로 구성된 군에서 선택된다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 고형 기능성 식품은 식품을 준비 또는 제조하는데 사용되기 위하여 제빵(예. 빵, 케이크, 머핀, 와플, 피자, 팬케이크) 또는 쿠키(예. 수프, 소스, 디저스, 푸딩)을 위해 미리 혼합된 것(바람직하게는 분말 형태)이다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 고형 기능성 식품은 육제품(소세지, 미트볼, 콜드컷 등)이다.

본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 고형 기능성 식품은 빵 또는 모닝 제품/베이커리 스낵이다. 그러므로, 상기 빵은 흰 빵, 갈색 빵 또는 통밀빵이다. 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 빵은 다음 빵 종류들에서 선택된다: 맥아 밀가루, 밀크 브레드, 밀기울-풍부하고 혼합된 곡물 브레드. 그 브레드는 어떤 형태로도 가능하며, 이를 테면 둥근빵(cob), 코버그(coburg), 코티지(cottage), 콜라(cholla), 블루머(bloomer), 배럴(barrel), 배치(batch), 샌드위치, 턴(tin), 비엔나(vienna) 또는 팜하우스(farmhouse)이다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 브레드는 다음 브레드 타입 중 어느 하나로 부터 선택된다:

통밀빵(wholemal bread)

흑빵(brown bread)

맥아빵(wheatgerm bread, 적어도 10%의 가공된 맥아가 첨가된 빵)

소프트그레인 빵 (softgrain bread, 전통적인 밀 빵과 비교하여 섬유질 성분을 증가시키기 위해(바람직하게는 30%) 부드러운 호밀과 밀의 부가 곡물과 흰 밀가루로 만들어진 것)

그레이너리빵(Granary breads)

맥아빵(Malt breads)

본 발명의 바람직한 또 다른 구체예에서, 상기 빵은 다음 빵 종류의 어느 하나로 부터 선택된다:

치아바타(Ciabatta)

피타(pitta)

난(naan)

콜라(cholla)

포카치아(Focaccia)

소다빵 또는 흑소다빵(Soda Bread or brown soda bread, 통밀가루를 이용하여 만듦)

호밀빵(rye breads)

바게트 또는 프렌치 스틱

크루아상(croissants)

베이글(bagel)

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 빵은 플랫빵(flat bread)이며, 이를테면 다음 빵 종류로부터 선택되는 어느 하나이다: 차파티스(Chapattis), 파라타스(Paratas) 및 로티(Roti), 멕시코 토르티아, 플랫 "랩" 또는 밀가루 토르티아, 팬케이크.

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 기능성 식품은 모닝 스넥 또는 빵 제품이다. 상기 빵 제품은 달콤하거나 짭짤한 것이며, 예를 들어 짭짤한 것이다.

바람직한 베이커리 제품은 다음을 포함하며 이에 제한되지는 않는다: 롤 및 뱍스, 머핀, 크림렛 및 파이클릿과 같은 구운 제품들, 스콘, 티케이크, 번 및 다른 과일이 든 제품들, 팬케이크나 그리들 스콘과 같은 핫 플레이트 제품들, 와플 및 감자 케이크, 핫 크로스 번, 크로와상, 브리오시(brioche), 초콜렛빵(pain-au-chocolat), 베이글, 미국의 스위트 머핀 및 다른 세미-스위트 빵 제품들.

식물성 오일-기초 제품

본 발명의 바람직한 구체예에서, 기능성 식품은 식물성 오일-기초 제품(스프레드, 샐러드 오일, 마요네즈 등)이다.

냉동 과자류 제품들

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 기능성 식품은 냉동 과자류 제품이다. 본 발명의 목적을 위해, 냉동 과자류 제품은 아이스크림, 냉동 요거트, 셔벳(sherbet), 셔벳(sorbet), 아이스 밀크 및 냉동 커스터드, 워터-아이스, 그라니타스(granitas) 및 냉동 과일 푸레를 포함한다.

바람직하게, 냉동 과자에서의 고형의 수준(예. 설탕, 지방, 향미 등)은 3wt% 이상, 바람직하게는 10 내지 70wt% 이상, 예를 들어 40 내지 70wt% 이상이다.

아이스크림은 전형적으로 2 내지 20wt%의 지방, 0 내지 20wt%의 스위트너, 2 내지 20wt%의 비-지방 우유 성분 및 임의적인 성분으로서, 유화제, 안정화제, 방부제, 향미 성분, 비타민, 미네랄 등, 발란스 워터를 포함한다. 전형적으로 아이스크림은 20 내지 40%, 좀더 일반적으로는 40 내지 200%로 부풀리기 위하여 탄산가스가 들어가고, -2 내지 -200°C, 좀더 일반적으로 -10 내지 -30°C의 온도에서 냉동된다. 아이스크림은 보통 약 0.1wt%의 칼슘을 포함한다.

냉동 과자류의 전형적으로 제공되는 평균량은 66g이다.

본 발명에 따른 조성물은 그 제품에서 물질의 용해화와 안정화를 확보하기 위하여 유화제, 세제 또는 다른 제제들로 캡슐에 싸여지거나 결합되어 진다.

식사 대용품

본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 기능성 식품은 식사 대용품이다. 식사 대용 음료는 전형적으로 검(gums) 또는 섬유질에 의해 걸쭉해진 액체 베이스에 기초하고, 거기에 미네랄 및 비타민 카테일이 첨가되기도 한다. 음료는 이상적인 맛, 예를 들어 과일 또는 초코 향미로 풍미를 낼 수 있다. 전형적으로 제공되는 사이즈는 330ml 또는 330g이다.

본 발명에 따른 조성물은 음료에서 물질의 용해성 및 안정성을 확보하기 위하여 유화제, 세제 또는 다른 제제들에 캡슐로 싸이거나 결합된다.

식사 대응 스넥 또는 바는 종종 식용가능한 물질의 매트릭스를 포함하는데, 여기에 본 발명에 따른 조성물이 포함된다. 예를 들어, 그 매트릭스는 지방을 기초로 하거나(예. 커버춰 또는 초콜렛) 또는 빵 제품을 기초로 하거나(빵, 도넛, 쿠키 등) 또는 덩어리로 된 입자들(쌀, 곡류, 너트, 건포도, 과일 조각)에 기초한 것이다. 스넥 또는 바 대응품의 일반적인 크기는 20-200g, 일반적으로 40-100g이 될 수 있다. 게다가, 그 제품이 향미 물질, 비타민, 미네랄 등의 성분이 첨가된다.

조합(Combinations)

본 발명의 한 측면에서, 기능성 식품은 본 발명에 따른 조성물이 다른 생존 강화제, 수명 연장제, 건강 증진제 및/또는 미생물 밀도 조절자들과 조합하여 포함된다.

예를 들어, 상기 기능성 식품의 한 바람직한 구체예는 하나 이상의 본 발명에 따른 조성물 및 프로바이오틱 "샷(shot)"과 같은 프로바이오틱(probiotic)을 함유하는 식품이다. 기능성 식품의 다른 바람직한 구체예는 본 발명에 따른 화합물 및 프로바이오틱 "샷(shot)"과 같은 프로바이오틱(probiotic)을 함유하는 식품이다. 기능성 식품의 다른 바람직한 구체예는 본 발명에 따른 조성물과 심바이오틱 "샷(shot)"과 같은 심바이오틱(symbiotic)을 포함하는 식품이다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 언급된 샷(shot)에서 이용되는 바람직한 박테리아는 다음 중의 어느 하나이다: 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*), 이를테면, L.애시도필러스(*L. acidophilus*), L.카세이(*L. casei*), L.펠멘툼(*L. fermentum*), L.존소니(*L. johnsonii*), L.락티스(*L. lactis*), L.플란타룸(*L. plantarum*), L.루테리(*L. reuteri*), L.람노서스(*L. rhamnosus*) 및/또는 L.살리바리우스(*L. salivarius*)이다. 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 언급된 샷(shot)에서 이용하기 위한 바람직한 박테리아는 다음의 어느 하나이다: 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium sp.*), 이를테면 B. 비피디움(*B. bifidum*), B. 브레베(*B. breve*), B.락티스(*B. lactis*), 및/또는 B.롱검(*B. longum*)이다. 상기 언급된 shots에서 이용을 위한 박테리아는 다음의 어느 하나이다: 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 대장균(*Escherichia coli*), 사카로마이세스 보울라디(*Saccharomyces boulardii*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및/또는 스트렙토코커스 쉴모필러스(*Streptococcus thermophilus*)이다.

본 발명에 따른 조성물은 식이 보충제, 이를테면 보타니컬 보충제에서 다른 성분과 결합되고/결합되거나 비타민 E 캡슐에서, 또는 셀레니움 필에서 다른 성분과 결합된다. 게다가, 상기 식이 보충제에서 바람직한 결합은 다음의 하나 이상과 이다: 항산화제(들), 비타민 C, 비타민 E, β-카로틴.

발명의 기능성 식품은 또한 비타민 A, B, C, D, E와 같은 다른 건강 성분들, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 철, 구리, 아연, 셀레늄과 같은 미네랄, 토코페롤, 폴리페놀과 같은 항산화제를 포함한다. 예를 들어, 기능성 식품은 비타민 C, 와 함께 본 발명에 따른 조성물(이를테면 렌티난)을 포함하고, 그 결합은 상기 기능성 식품을 섭취한 개체에서 감기 및 독감을 완화시킬 수 있다.

바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 골다공증(osteoporosis)을 완화 또는 예방하는 것으로 믿어지는 성분을 더 포함한다. 그런 성분들의 예로는 칼슘, 비타민 D, 마그네슘 등이 있다.

본 발명의 적절한 기능성 식품의 바람직한 구체예는 하기에서 기재된다:

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 0.1-5%, 바람직하게는 0.5-1%의 양으로 포함하는 음료.

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 0.9-16%, 바람직하게는 2.4-10%, 더욱 바람직하게는 3-5%의 양으로 포함하는 갓 구운 빵 제품.

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 1.0-20%, 바람직하게는 3.2-15%, 더욱 바람직하게는 4.4-10%의 양으로 포함하는 드라이 빵 제품.

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 0.5-20%, 바람직하게는 1.6-16%, 더욱 바람직하게는 2-10%의 양으로 포함하는 씨리얼 제품.

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 4-25%, 바람직하게는 6-20%의 양으로 포함하는 밀기울 제품(Bran product).

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 0.1-20%, 바람직하게는 0.8-8%의 양으로 포함하는 유제품 또는 비-유제품(예. 발효된 씨리얼 제품).

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 0.6-16%, 바람직하게는 2.6-10%, 더욱 바람직하게는 2.6-5%의 양으로 포함하는 식물성 오일에 기초한 제품.

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 0.1-16%, 바람직하게는 0.2-5%의 양으로 포함하는 육제품.

여기에 기재된 조성물 중 어느 하나를 0.1-16%, 바람직하게는 0.2-5%의 양으로 포함하는 유제품.

그러므로, 하나의 구체예에서, 본 발명은 기능성 식품, 이를테면 여기에 기재된 기능성 식품 중 어느 하나의 제조에 있어서 여기에 기재된 조성물들 중 어느 하나의 용도와 관련이 있다.

실시예

하기의 실시예들은 본 발명의 상세한 구체예들을 묘사하는 것이며, 본 발명은 여기에 제한받지 않는다.

실시예 1

탄수화물 조성물

렌티너스 에도데스는 15g/l 글루코스, 3g/l 맥아 추출물, 3g/l 효모 추출물 및 5g/l 펩톤이 함유된 배지로 25°C에서 교반 플라스크에서 액체배양으로 배양하였다. 배양후, 그 바이오매스는 여과에 의해 발효 배양액의 잔여로부터 분리하였다. 상청액은 50,000Da의 작은 기공 크기를 갖는 막을 이용하여 한외여과하였다. 그 보유액(retentate, 여기에서 "메디머쉬 제품"으로 지정됨)이 모노사카라이드 성분의 분석을 위해 사용되었다.

비교를 위해, 상업적으로 입수가 가능한, 주입을 위한 렌티난(Eureka Bio-Chemicals Pty, Little Collins Street, Melbourne 3000, Australia)이 참고실험예에서 사용되었다(여기에서부터 이 제품은 "유레카"로 지정됨).

샘플들은 100°C에서, 1N HCl로 그들의 구성성분 모노사카라이드로 가수분해되었다. 그 가수분해물은 디오넥스 MA-1 컬럼을 이용하여 이동상으로서 600mM NaOH로 HPLC에 의해 분석되었다: 검출은 펄스형 전류법(pulsed amperometry)에 의하였다.

메디머쉬 제품의 주요 모노사카라이드는 만노스 및 글루코스, 몇몇 갈락토오스였다. 표 A는 메디머쉬제품과 유레카의 상대적인 모노사카라이드 성분을 보여준다.

[표 A]

샘플	만노스	글루코오스	갈락토오스
메디머쉬	13.4±0.4	12.6±1.3	1
유레카	2.8	90.1	1

실시예 2

분자량 분류

그들의 생물학적 활성의 분자량 특징 묘사를 위해, 메디머쉬 제품은 마이크로셉(Microsep, Pall Life Sciences) 초원심분리기로 6°C, 7,500xg에서 원심분리하였다. MWCO 수치가 50,000-1,000,000를 갖는 필터를 이용하였다. 분석 결과(하기 표 2)는 산성 가수분해에 의한 만노스, 글루코오스 및 갈락토오스는 사용된 모든 네 개의 MWCO 막을 통과하였다:

[표 2]

MWCO	만노스	글루코오스	갈락토오스
1,000,000	10.3	2.9	1
300,000	9.9	3.1	1
100,000	7.3	2.9	1
50,000	8.9	2.9	1

실시예 3

용해성 단백질

샘플에 있어서 용해성 단백질은 쿠마씨에 염색-결합 분석(Mousdale, D.M, Campbell, M.S., Coggins, J.R. “Purification and characterisation of bifunctional dehydroquinase-shikimate:NADP dehydrogenase from pea seedlings”. Phytochemistry 367, 217-222, 1987)의 미세규모 버전으로 측정하였다. 두 가지 제품에서의 용해성 단백질의 양은 하기 표에서 보여지는 바와 같다:

샘플	용해성 단백질($\mu\text{g}/\ell$)
메디머쉬 샘플	31.5 \pm 3.43
유레카 제품	4.5(\pm 0.6, n=3)

실시예 4

면역 자극

조직 배양

P388 세포는 마우스 대식 세포와 유사한 것으로서, 자극되면 많은 양의 인터루킨-1(IL-1)을 분비한다(그 세포에 대한 상세한 정보는 ECACC로부터 입수가 가능하다). 분비된 IL-1의 양은 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoabSorbant Assay)를 이용하여 정량가능하고, 그 세포들이 어떻게 자극되었는지를 측정함으로써 이용될 수 있다. 그러한 분석을 조정할 절대적인 수치는 존재하지 않고, 그러므로 참고샘플은 병행하여 분석되고, IL-1 생산은 참고예에 의해 유도된 IL-1 생산과 비교하여 평가됨을 주의하여야 한다. IL-1의 두 가지 형태는 IL1- α 와 IL- β 가 존재한다. P388 세포들은 12웰 걸쳐 플레이트에 씨앗하여 하룻밤 동안 성장시킨다. 다양한 자극제들이 다양한 농도로 첨가되고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양된다.

ELISA

각 웰로부터 자극된 배양 배지의 50 $\mu\ell$ 은 코팅 버퍼와 혼합되고, 96 웰 엘리사 플레이트로 분배하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 이 단계는 엘리사 플레이트의 표면에 항원(IL-1)이 결합하도록 한다. 그 IL-1은 두 개의 다른 형태의 IL-1에 대한, 염소에서 발생하는 두 개의 항체(첫 번째 항체들)를 이용하여 측정된다. 그 다음 단계는 다른 항체를 이용하는데, 이는 염소 항체를 측정한다(두 번째 항체). 그 항체는 기질이 첨가될 때 컬러 반응을 보여주는 홀스-래디쉬 페록시다아제(horse-radish peroxidase)에 결합되어 있다. 분광광도계(spectrophotometer, 엘리사 리더)에 의해 측정된 컬러의 양은 현존하는 IL-1의 양과 상호관련되어 있어, 조직 배양 세포가 어떻게 자극되는지를 정량화할 수 있다.

결과

전체 샘플 분석

두 개의 제품들은 어느 범위의 농도에서 테스트되었고, 최적 수치는 IL1 α 에 대해서 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, IL1 β 에 대해서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 발견되었다. 결과들은 표 3에서 보여진다.

[표 3]

샘플	메디머쉬 제품	유레카 제품
IL1 α	0.173 \pm 0.033	0.003
IL1 β	0.168 \pm 0.053	0.016

메디머쉬 제품은 현저하게 면역자극적이다. 유레카 제품은 동일한 면역자극을 보여주고 있으나 메디머쉬 제품에 비하여는 현저하게 약하다. 메디머쉬 제품이 유레카에 비하여 IL1 α 의 생산은 58배, IL1 β 의 생산은 20배 많이 유도하였다.

분획의 분석

여과액을 필터 기준보다 더 큰 분자들이 이 분석에서 존재하지 않는지를 테스트하였다. 그 결과는 흡수로 나타나고, 오직 상대적인 면역 조절적 징후를 보여준다. 그런 분석을 조절할 수 있는 절대적인 수치는 존재하지 않는다.

[표 4]

Nominal Mwt	하기 보다 적은 Mwt을 여과	IL1 α 자극	IL1 β 자극
1,000,000	3,000,000	0.082	0.073
300,000	900,000-1,800,000	0.086	0.040
100,000	300,000-900,000	0.07	0.071
50,000	150,000-300,000	0.086	0.066

모든 여과 물질은 현저한 면역 자극을 보여주는 것이었다.

실시예 5

두 개의 다른 생산 방법을 비교하기 위하여, 실시예 1에서 기재한 것처럼 제조된 메디머쉬 제품의 면역 자극 활성을 크기 분류를 수행하지 않은 폴리사카라이드 조성물의 면역 자극 활성과 비교하였다.

이 제품은 렌티너스 에도데스를 실시예 1에서 기재한 것처럼 액체배양하여 제조하였다. 수득된 상청액에 순수한 에탄올 약 2 부피를 그 제품을 침전시키기 위하여 첨가하였다. 침전물을 제거하고, 순수한 에탄올로 세척하여 증류수에 재현탁시켰다.

면역 자극 분석은 실시예 4에서 기재한 것처럼 수행하였다. 메디머쉬 제품을 사용한 결과는 표 5에서, 침전된 제품을 이용한 결과는 표 6에서 보여지고 있다.

[표 5]

샘플	메디머쉬 제품	유레카 제품
IL1 α	0.173 \pm 0.033	0.003
IL1 β	0.168 \pm 0.053	0.016

[표 6]

샘플	침전된 제품	유레카 제품
IL1 α	0.166	0.023 10
IL1 β	0.159	0.078

그 분석은 병행하여 수행되지 않아서 수득된 수치들은 비교될 수 없다. 그러나, 유레카는 양 실험에서 참조예로서 이용되었고, 그 결과는 유레카에 비교하여 강화된 것처럼 비교되었다. 이들 수치들은 하기 표 7에서 보여지고 있다. 보여지는 것처럼, 양 조성물은 유레카에 비하여 현저하게 더 면역을 자극한다. 그러나 메디머쉬 제품은 그 침전된 제품보다 더욱 면역을 자극한다.

[표 7]

샘플	메디머쉬:유레카	침전된 제품:유레카
IL1 α	57.67	7.22
IL1 β	19.69	2.04 25

실시예 6

면역 자극 특성의 결정을 위하여, 다음의 방법이 이용되었다: 12주된 올드 스프라그 다우리 쥐에 본 발명에 따른 조성물 1mg을 0.5ml 0.09 생리 식염수에서 (i.p.)로 면역화전 2일 동안 투여하였다. 대조 동물로는 1mg의 카세인을 투여하였다. 그 동물들은 0.25 "프로인트 완전 어쥬번트(Freunds Complete Adjuvant)"에 BSA(0.5mg)으로 면역화시켰고, 그 혈액 샘플을 항체 반응의 측정을 위하여 11일 후에 수득하였다. 특정 항-BSA 항체 농도는 "샌드위치" 엘리사의 방법에 의해 항체 BSA의 절대적인 표준에 대하여 측정되었다.

실시예 7a

아가리쿠스 속의 배양을 위한 프로토콜

배양 조건:

온도: 25°C±1°C

pH: 중성 pH

물: 수돗물

배지: 글루코스 30g/l;

마이콜로지컬 펩톤 10g/l;

효모 추출물 6g/l;

맥아 추출물 6g/l

아가리쿠스 속의 발효기(3 리터) 배양

발효기 내에 배지 1.7리터를 놓아두고 121°C에서 20분 동안 살균하라. 발효 조건을 셋팅하라: 25°C, 200-300rpm 및 0.2-0.5vvm 공기. 좋은 성장을 촉진할 것인 발효 배지 또는 유사 배지를 함유하는 6-8일 올드 교반 플라스크를 이용하여 발효기를 접종하라. 필요할 때(보통은 운영을 통하여)는 적절한 항거품제를 첨가하라. 6-8일 후에 수확하라.

아가리쿠스 속의 수확

바이오매스: 여과 배지로서 기공 크기 45를 갖는 나일론 천을 이용하여 배양액으로부터 바이오매스를 제거하라. 물로 전체적으로 그 바이오매스를 세척하고 전자레인지에서 건조하라 (보통 샘플 사이즈는 약 15분이 필요하다). 건조기에서 차가워지고 무게가 있을 때까지 저장하라.

발효 리퀴르: 발효 리퀴르에서 면역자극제의 농도는 순수 에탄올로 ppt에 의해 측정된다. 살균된 증류수는 희망 수준으로 농도를 조정하기 위하여 필요하다면 첨가된다. 그 결과 리퀴르는 살균되고 저장된다.

의료 등급: 300kD와 같은 mwt 기준을 갖는 UF 필터를 통해 바이오매스-유리 발효 리퀴르를 통과시켜라. 그 리퀴르의 70-80%가 제거될 때, 그 용액을 세척하기 위하여 그 보유액에 물을 첨가하라. 그 용액이 그것의 색상을 거의 잃고 깨끗해질 때까지 반복하라.

실시예 7b

아라기쿠스 블라제이는 실시예 7a에서 기재된 것처럼 액체 배양되었다. 배양 후에, 그 바이오매스는 여과에 의해 발효 배양액의 잔여물로부터 분리되었다. 상청액은 다른 mwt 기준을 갖는 필터를 이용하여 원심분리 여과를 수행하였다. 첫번째 제품(메디머쉬 제품 II로 지정됨)은 메디머쉬 II 제품을 함유하는 잔여 액체로 100kD 이하의 모든 성분들을 제거하여 위하여 수득하였다. 두번째 제품(메디머쉬 제품 III 지정됨)은 "메디머쉬 제품 III"를 함유하는 잔여 액체로 1kD 이하의 mwt를 갖는 상청액으로부터 모든 성분들을 제거하기 위하여 수득하였다.

샘플들은 1N HCl로 100°C에서 그들의 구성성분인 모노사카라이드로 가수분해되었다. 그 가수분해물은 이동상으로서 600mM NaOH로 다이오넥스 MA-1 컬럼을 이용한 HPLC에 의해 분석되었다: 측정은 펄스형 전류법에 의하였다.

메디머쉬 제품 II 및 III의 주요 모노사카라이드는 만노스, 글루코오스 및 몇몇 갈락토오스였다. 표 B는 메디머쉬 제품들 II 및 III의 상대적인 모노사카라이드 성분을 보여준다.

[표 B]

샘플	만노스	글루코오스	갈락토오스
메디머쉬 II	1	18	0
메디머쉬 III	12	40	1

실시예 8

가노덜마 루시덤은 실시예 7a에서 기재된 아가리쿠스 진균과 유사한 방법으로 액체 배양하였다. 배양 후, 바이오매스는 여과에 의해 발효 배양액의 잔여물로부터 분리하였다. 상청액은 실시예 7a에서 기재한 것과 같이 원심분리 여과를 수행하였다. 첫번째 제품(메디머쉬 제품 IV로 지정됨)은 메디머쉬 제품 IV를 함유하는 잔여 액체로 100kD 이하의 모든 성분을 제거함으로써 수득하였다. 두번째 제품(메디머쉬 제품 V로 지정됨)은 "메디머쉬 제품 V"을 함유하는 잔여 액체로 1kD 이하의 mwt를 갖는 상청액으로부터 모든 성분을 제거함으로써 수득하였다.

샘플들은 1N HCl, 100°C에서 그들의 구성성분인 모노사카라이드로 가수분해되었다. 그 가수분해물은 이동상으로서 600mM NaOH로 다이오넥스 MA-1 컬럼을 이용하여 HPLC에 의해 분석하였다: 펄스형 전류법에 의해 측정되었다.

메디머쉬 제품 IV 및 V의 주요 모노사카라이드는 만노스, 글루코오스 및 몇몇 갈락토오스였다. 표 C가 메디머쉬 제품 IV 및 V의 상대적인 모노사카라이드 성분을 보여준다.

[표 C]

샘플	만노스	글루코오스	갈락토오스
메디머쉬 IV	1	1	0
메디머쉬 V	3	5	1

실시에 9

쥐의 복강삼출세포(peritoneal exudates cells, PEC) 및 비장 림프구(splenocytes)에 의한 염증 전 단계의 사이토카인에 대한 메디머쉬 제품의 경구 및 복막내 치료의 효과.

물질 및 방법:

쥐: 이 실험에서 25마리, 5주된 수컷 쥐들을 이용하였다. Division of Laboratory Animal Medicine(Louisiana State University)으로부터 구입하였다. 모든 실험은 LSU IACUC 프로토콜 04-120에 기재된 규정들에 부합되도록 수행하였다.

메디머쉬 제품 치료: 쥐는 네 개의 그룹으로 나누었다. 그룹 1은 복막내로 (i.p.) 0.15M NaCl에서 2mg/kg 렌티난을 투여하였고, 그룹 2는 복막내로 동일 부피의 생리 식염수를 투여하였고, 그룹 3은 위관 영양법(경구)에 의해 물에서 10mg/kg 메디머쉬 제품을 투여하였고, 그룹 4는 경구적으로 동일부피의 물을 투여하였다. 모든 마우스들은 5일 동안 하루에 한번씩 처리받았다. 마지막 처리 후 24시간 동안, 쥐들은 출혈시켜 세포 분리를 위해 안락사시켰다.

복강삼출세포(PEC)의 분리 및 자극: PEC는 (1)에서 기재한대로 복막 세척에 의하여 수집하였다. 세포들은 2mM L-글루타민, 100 유닛/ml 페니실린 및 100µg/ml 스트렙토마이신 (배지)로 보충된 RPMI 1640에서 1×10⁶/ml로 농축시켜 1ml/웰로 24 웰 조직 배양 플레이트로 도달하였다. 플레이트는 10분 동안 1200×g로 원심분리하였고, 37°C에서, 5% CO₂ 하에서 2시간 동안 놓아 두었다. 배지를 제거하고 웰들은 따뜻한 배지로 한번세척하고 10% 소태아 혈청으로 보충된 1.5ml 따뜻한 배지로 대체하였다(Hyclone, Inc. Logan, UT) (완전 배지). 각 그룹의 웰 절반은 E.coli 리포폴리사카라이드 (LPS:Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 10 ng/ml로 처리하여, 37°C에서, 5% CO₂ 하에서 12 내지 24시간 동안 놓아 두었다. 세포들의 표현형은 피코에리트린으로 표지된 CD3 및 CD14에 대한 항체들(eBioscience, San Diego, CA) 및 형광체로 표지된 항-마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch, Avondale, PA)를 이용한 플로우 사이토미터에 의해 측정되었다.

비장 림프구(splenocytes)의 분리 및 자극: 비장을 각 마우스로부터 채취하였다. 그 일부분을 mRNA 분석을 위해 긁어내어 냉동시켰다. 잔여 비장은 그룹으로 모아서, 70µm 나일론 스크린(Becton Dickenson Labware, Franklin Lakes, NJ)을 통해 문개었다. 비장 림프구를 한 번 세척하고 그 펠릿을 완충된 염화암모늄에서 재현탁하여 얼음에서 5분 동안 놓아 두었다. 세포들을 두번 세척하고 1.5ml/웰에서 24 웰 조직 배양 플레이트로 분배된 완전 배지에서 4×10⁷/ml에서 재현탁하였다. 대표 웰들을 10ng/ml의 E. coli LPS 또는 5µg/ml의 컨카나빌린 A(Concanavilin A, ConA; Sigma Chemical Co.)로 5% CO₂에서 12 내지 24시간 동안 자극시켰다.

사이토카인을 위한 엘리사: TNFα, IL-1β, IL-6 및 IL-12를 위한 사이토카인 엘리사를 혈청에서 수행하고 제조사 (eBioscience)의 프로토콜에 따라 정확하게 상청액을 배양하였다. 희석되지 않은 상청액은 3회 반복 실험을 수행하였다. 혈청은 테스트를 위해 1:10으로 희석되었다.

결과 및 논의

메디머쉬 제품은 수득 무게로 측정된 것처럼 그들의 성장에 어떤 통계학적으로 중요한 효과를 가지고 있지 않았다(표 1). 그러나, 복막내로 삽입된 메디머쉬 제품은 복막의 세척으로부터 분리된 세포의 수 및 표현형에는 영향을 미쳤다. 경구적으로 노출된 마우스 및 복막내로 생리 식염수를 투여받은 마우스들은 상대적으로 유사하였다; 그러나, 복막내로의 삽입에 의한 메디머쉬 제품으로 처치를 받은 마우스들의 복막으로부터 분리한 세포의 총 수에 있어서는 증가하였다(데이터 없음).

세포 수의 증가는 주로 뉴트로필의 밀도의 증가에 기인한 것이었다 (표 2). 대식세포와 비교하여 PMN에 의해 관찰된 결과에 대한 상대적인 기여는 이번에는 제한될 수 없었으나, 복막내 그룹에서 관찰된 차이점에는 영향을 미쳤다. 반대로, 경구 그룹의 수 및 표현형은 매우 유사하고 그들의 비교는 통계적으로 유의하다.

복막내로의 메디머쉬 제품 처리는 복강삼출세포(PEC)에 의한 12시간 후에 TNF α 의 생산에 있어서 4 배의 증가를 유발하였고(표 3), 비장 림프구에 의해 3배의 증가(표 4)를 보였으며, PEC (30% 증가) 및 비장 림프구 (2배)에 의한 *in vitro* LPS 처리에 대응하여 생산된 TNF α 의 양도 증가되었다. 경구적 메디머쉬 제품의 처리는 PEC 또는 비장림프구에 의한 TNF α 의 생산에 어떠한 현저한 영향을 미치지 않았다. 흥미롭게도, PEC 후에 *in vitro* LPS 자극에 의하여 TNF α 생산이 현저하게 감소(20%)하였다. 이런 결과들은 TNF α 에 대한 효과는 국소적 수준에서 개시되고/되거나 메디머쉬 제품에 직접적으로 노출이 필요함을 보여준다.

경구적 및 복막내 모두로의 메디머쉬 제품 처리는 PEC에 의한 IL-1 β 생산을 현저하게 증가시켰다(각각 18배, 6배; 표 4). 게다가, *in vitro* LPS에 대한 IL-1 β 는 복막내로 처리된 마우스에 있어서 3배 이상이 증가하였고, 경구적 메디머쉬 제품에 노출된 마우스로부터 PEC에 의한 TNF, IL-1 β 생산처럼 *in vitro* LPS에서 자극된 경우는 감소하였다(2배).

처리 및 비처리 마우스로부터의 비장림프구는 배양의 첫 12시간에는 아주 적은 양의 IL-1 β 를 생산하였다. 마우스가 경구적 또는 복막내로 메디머쉬 제품에 노출되었을 때, 그 마우스로부터 비장림프구는 LPS 또는 ConA(T 세포 미토겐) 어느 하나의 처리에 의해 IL-1 β 를 생산하기 위해 자극되었다.

일반적으로, 비록 이것이 LPS 처리하지 않은 세포에 있어서는 통계적으로 현저할지라도, 메디머쉬 제품의 처리는 PEC에 의해 IL-6 생산에 영향을 미친다(표 7). 반대로, IL-6 생산은 경구적 및 복막내로의 노출 모두에 있어서 대부분 비자극된 비장림프구에 의해 증가되고, 대부분 LPS 또는 ConA 자극된 비장림프구에 의해 감소된다. IL-6 수준은 배양의 12시간 이후에 지속적으로 증가하였다(표 9 및 10).

12시간에서의 인터루킨 12 생산은 ConA 자극된 비장림프구 배양을 제외하고 그 분석의 측정에 제한이 되었다(표 12). 복막내 메디머쉬 제품의 노출에 있어서, 마우스들은 LPS에 대해 현저한 양의 IL-12를 생산한다.

메디머쉬 제품의 경구적 노출은 일반적으로 PEC에 의한 염증 전단계 사이토카인의 생산을 감소시켰고, 비장림프구에 의한 염증 전단계 사이토카인의 생산은 증가시켜, 이는 메디머쉬 제품(경구적)에 대한 전신성 반응은 이전의 연구들(nasal, i.p., i.v.)에서 측정된 국소적 반응과는 다르다는 것을 보여준다.

복막내 및 경구적으로 투여된 메디머쉬 제품은 직접적으로 비교될 수 없다. 왜냐하면 메디머쉬 제품의 투여량이 동일하지 않기 때문이다.

참고자료

1. Coligan, JE, Kruisbeek, AM, Margulies, DH, Shevach, EM, Strober, W (eds.). 1994. "In vitro assays for mouse lymphocytes" in Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., Indianapolis, IN, p 3.15.4

표 1. 체중에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	체중에 증가%		
	대조군 ^a	메디머쉬 제품	p=
복막내	10.5±3.9	10.0±11	0.8425
경구	11.3±5.6	12.1±4.0	0.3717

a. 0.15M 생리 식염수가 복막내 주사에 대한 대조군으로 사용되었고 증류수가 경구 노출에 대한 대조군으로 사용되었다.

**은 처리가 대조구과 현저하게 상이한 것을 의미한다.

표 2. 배양에서의 세포들의 표현형

경로	<i>in vitro</i> 처리	임파구%		PMN ^c	모노사이트/ 대식세포 ^d
		T 세포 ^a	B 세포 ^b		
복막내	대조군 ^e	14	17	46	18
복막내	메디머쉬 제품	4	3	84	6
경구	대조군 ^e	14	16	48	15
경구	메디머쉬 제품	20	25	37	18

- a. CD3 염색에 의해 측정됨
- b. 표면 면역글로블린 염색에 의해 측정됨
- c. 플로우 사이토메트리 사이드 스캐터에 기초함
- d. CD14로의 염색으로 인한 밝기에 기초함
- e. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

표 3. 복강삼출세포(PEC)로 12시간 배양한 후의 TNF α 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 TNF α 생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	108 \pm 4	428 \pm 30**	0.0036
복막내	LPS	407 \pm 40	537 \pm 50**	0.0314
경구	무	320 \pm 5	353 \pm 20	0.1565
경구	LPS	469 \pm 38	380 \pm 23**	0.0147

- a. 측정 8 pg/ml의 제한
- b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.
- c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 4. 비장림프구로 12시간 배양한 후의 TNF α 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 TNF α 생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	40 \pm 9	119 \pm 4**	0.0084
복막내	LPS	174 \pm 10	347 \pm 8**	0.0006
복막내	ConA	296 \pm 10	390 \pm 10**	0.0191
경구	무	34 \pm 6	35 \pm 0	0.7734
경구	LPS	114 \pm 4	160 \pm 5**	0.0026
경구	ConA	349 \pm 15	351 \pm 6	0.7337

- a. 측정 8pg/ml의 제한
- b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 5. 복강삼출세포(PEC)로 12시간 배양한 후의 IL-1β 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-1β 생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	25±8	146±7**	0.0006
복막내	LPS	225±16	751±152**	0.0323
경구	무	5±2	93±7**	0.0015
경구	LPS	487±15	227±1.1**	0.0017

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 6. 비장립프구로 12시간 배양한 후의 IL-1β 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-1β 생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	1±1	5±1**	0.0084
복막내	LPS	2±0	49±9**	0.0015
복막내	ConA	4±2	13±3	0.0717
경구	무	3±1	3±0	0.7811
경구	LPS	3±0	11±1**	0.0213
경구	ConA	3±1	11±2	0.0969

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 7. 복강삼출세포(PEC)로 12시간 배양한 후의 IL-6 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-6생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	567±25	320±33**	0.0194
복막내	LPS	265±15	286±54	0.5657
경구	무	288±30	247±30**	0.0027

경구	LPS	258±31	209±17	0.8763
----	-----	--------	--------	--------

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 8. 비장립프구로 12시간 배양한 후의 IL-6 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-6생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	132±2	344±30**	0.0089
복막내	LPS	299±10	367±31	0.0853
복막내	ConA	393±19	233±24**	0.0029
경구	무	114±2	199±7	0.0014
경구	LPS	367±31	329±11**	0.0124
경구	ConA	233±24	248±25**	0.0284

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 9. 복강삼출세포(PEC)로 12시간 배양한 후의 IL-6 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-6생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	101±2	272±5**	0.0009
복막내	LPS	624±15	932±17	0.0011
경구	무	764±10	852±43	0.0833
경구	LPS	835±29	760±77	0.3680

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 10. 비장립프구로 12시간 배양한 후의 IL-6 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-6생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	105±6	638±18**	0.0004
복막내	LPS	218±16	524±33**	0.0042
복막내	ConA	567±7	835±39**	0.0029
경구	무	117±5	190±3**	0.0007
경구	LPS	174±5	266±3**	0.0065
경구	ConA	326±6	510±11*	0.0039

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 9. 복강삼출세포(PEC)로 12시간 배양한 후의 IL-12 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-12생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	3±1	6±1	0.0509
복막내	LPS	2±2	14±7	0.0734
경구	무	6±3	3±2**	0.02512
경구	LPS	1±1	2±2	0.5627

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Sudio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

표 10. 비장림프구로 12시간 배양한 후의 IL-12 생산에 대한 메디머쉬 제품 처리의 효과

경로	<i>in vitro</i> 처리	처리에 의한 IL-12생산(pg/ml) ^a		p= ^c
		대조군 ^b	메디머쉬 제품	
복막내	무	1±1	11±5	0.1017
복막내	LPS	13±9	2±1	0.2611
복막내	ConA	96±11	86±8	0.4155
경구	무	2±2	0±0	0.3855
경구	LPS	4±4	1±1	0.4405
경구	ConA	71±11	80±7	0.2293

a. 측정 8pg/ml의 제한

b. 0.15 M 생리식염수는 복막내 주사에 대한 대조군으로서 이용하였고, 증류수는 경구 노출에 대한 대조군으로서 사용되었다.

c. StatXact v 6.0(Cytel Studio, 2004)를 이용한 t 테스트와 병행함.

** p<0.005에서 통계학적으로 유의함

기능성 식품 제품의 실시예

본 발명은 지금부터 본 발명에서의 이용을 위한 바람직한 기능성 식품 제품들의 적절한 구체예를 더 기재할 것이다. 본 발명의 다른 제품을 제조하기 위하여 거기에 제공된 교시를 이용하는 것은 당업자는 가능할 것이다.

실시예 10 - 바(Bar)

다크 초콜렛 75g을 70℃에서 녹이고 그 후 메디머쉬 제품 600mg과 혼합하였다. 그 혼합물은 바 형상 몰드에 문혀 하룻밤 동안 차게하였다.

실시예 11 - 밀크쉐이크

바닐라 향미 아이스크림 100ml를 찬 우유 100ml, 딸기 시럽 10ml 및 1ml 버섯 배양으로부터 세포의 액체와 혼합하였다. 그 혼합물은 믹서기에 넣어 즉시 제공되었다.

실시예 12 - 누가 바(Nougat Bar)

성분 함량 (g)

물 70

하이포아마(Hyfoama, 유화제) 3.5

젤라틴 2.0

설탕 515

글루코오스 시럽 60DE 250

글루코오스 시럽 35DE 250

탈지 분유 분말 115

지방 50

1 g 버섯 배양으로부터 세포의 액체

제조방법: 하이포아마 및 젤라틴을 물에서 용해시키고, 150g 설탕을 첨가하고 거품을 위해 휘저었고, 남아 있는 설탕에 130℃로 가열하고 거품을 위해 천천히 첨가하라. 지방, 글루코오스 시럽, 밀크파우더 및 1g 버섯 배양으로부터의 세포의 액체를 첨가하라. 차갑게 유지하고 50g의 바로 나누어라.

실시예 13 - 과일 음료

11 성분들 200g, 과일 주스 농축액(바나나, 파인애플, 오렌지, 포도, 살구, 레몬, 패션 과일, 구아바, 망고) 5g, 프락토오스 1g, 이눌린 10g, 0.1g의 메디머쉬 제품 IV, 0.9g 식물 스테롤 지방산 에스테르(=0.54g 스테롤 등가물), 5g 레시틴, 1.5g 칼슘 락테이트, 755g의 물.