



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0121138
(43) 공개일자 2013년11월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/00 (2006.01) *C08J 3/075* (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7016831
- (22) 출원일자(국제) 2011년11월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년06월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2011/052358
- (87) 국제공개번호 WO 2012/073019
국제공개일자 2012년06월07일
- (30) 우선권주장
1020191.1 2010년11월29일 영국(GB)
- (71) 출원인
바이오텍 파마콘 에이에스에이
노르웨이 트롬소 9294 포르스키닝스파르켄 스케후
스베이엔 23
- (72) 발명자
엔그스타드, 르프
노르웨이, 엔-9019 트롬세, 리드스크자브베겐 16
소렘, 스테인-토레
노르웨이, 엔-9017 트롬세, 말베겐 3
람소이, 다그-에이릭
노르웨이, 엔-9008 트롬세, 스토르가타 14씨
- (74) 대리인
특허법인이룸

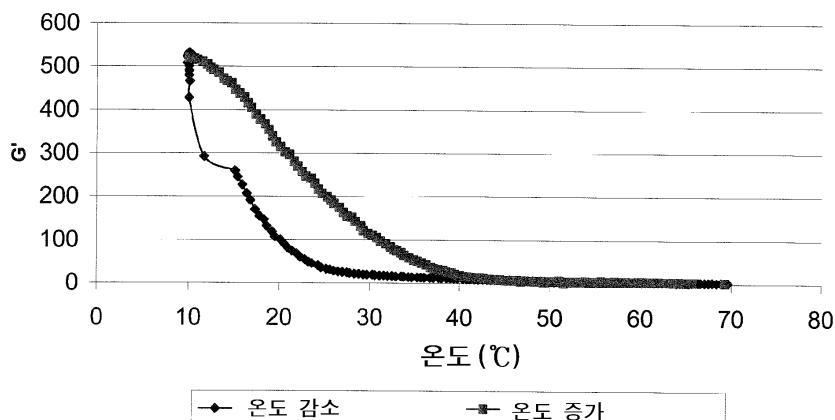
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 글루칸 겔

(57) 요 약

본 발명은 단일사슬 기준으로 중량평균분자량이 15,000 내지 50,000 g/mol 및 응집체 기준으로 수용액에서의 중량평균분자량이 4 내지 20 $\times 10^5$ g/mol이며, 25°C 및 중성 pH에서 $\geq 1\%$ 농도로 물에 용해될 때 겔 형태로 존재하며 2% 농도로 물에 용해될 때 융점(겔에서 졸)이 35 내지 60°C인 글루칸, 이의 제조방법, 이의 의학적 용도, 글루칸이 적용되거나 함침되는 물리적 지지체 및 피부세포집단 및 글루칸과의 접촉단계를 포함하는 시험관내 피부세포 증식방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

단일사슬 기준으로 중량평균분자량이 15,000 내지 50,000 g/mol 및 응집체 기준으로 수용액에서의 중량평균분자량이 4 내지 20×10^5 g/mol이며, 25°C 및 중성 pH에서 ≥ 1% 농도로 물에 용해될 때 겔 형태로 존재하며 2% 농도로 물에 용해될 때 융점 (겔에서 졸)이 35 내지 60°C인, 글루칸.

청구항 2

제1항에 있어서, 단일사슬 기준으로 중량평균분자량이 20,000 내지 40,000 g/mol인, 글루칸.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 글루칸 융점 (겔에서 졸)은 약 40°C인, 글루칸.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 글루칸은 수용액 중에 약 2% 농도인, 글루칸.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 효모 유래인, 글루칸.

청구항 6

제5항에 있어서, 사카로미케스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 유래인, 글루칸.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, β -(1,3)-결합 글루코실 잔기들의 골격 및 β -(1,6)-결합을 통하여 골격이 연결되는 2 이상의 β -(1,3)-결합 글루코실 잔기들로 이루어진 결사슬들로 구성되는 베타글루칸인, 글루칸.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 반복적 β -(1,6)-결합된 글루코실 잔기들이 실질적으로 부재하는, 글루칸.

청구항 9

농도 1 내지 6%의 수용액 상태의 글루칸을 포함하며, 상기 글루칸은 응집체 기준으로 중량평균분자량이 4 내지 20×10^5 g/mol이고 단일사슬기준으로 중량평균분자량이 15,000 내지 50,000 g/mol이며, 융점 (겔에서 졸)이 35 내지 60°C인, 겔 글루칸 생성물.

청구항 10

- 글루칸 분자들 수용액을 글루칸 수소결합 분해 조제로 처리하는 단계; 및
- 단계 a) 생성물과 글루칸 내 수소결합 재형성 가능 조제와 접촉하는 단계로 구성되는, 선행 항들 중 어느 하나에 의한 글루칸의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 글루칸 수소결합 분해 조제는 알칼리염, 수소화나트륨, 나트륨아미드, 요소 또는 포름아미드인, 글루칸의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 글루칸 수소결합 분해 조제는 수산화나트륨인, 글루칸의 제조방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 글루칸 수소결합 분해 조제는 50 mM 이상의 최종 농도로 적용되는, 글루칸의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 글루칸 수소결합 분해 조제는 약 150 mM의 최종 농도로 적용되는, 글루칸의 제조방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수소결합 재형성 가능 조제는 강산인, 글루칸의 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 산은 염산, 황산, 인산, 아세트산 또는 시트르산인, 글루칸의 제조방법.

청구항 17

제10항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 단계 b)는 10분 이내, 바람직하게는 4 분 이내에 겔을 형성하는, 글루칸의 제조방법.

청구항 18

제10항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, 단계 a) 및 b)의 조제들은 등몰량 첨가되는, 글루칸의 제조방법.

청구항 19

제10항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 입자성 글루칸 출발 물질을 포름산에 혼탁시켜 β -(1,6) 결합된 글루코실 결사슬들을 제거하고 입자성 글루칸을 용해시키기 위한 포름산분해 단계가 선행되는, 글루칸의 제조방법.

청구항 20

제10항 내지 제19항 중 어느 하나의 항에 의한 방법으로 수득되는 글루칸.

청구항 21

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항 또는 제 20항에 의한 글루칸 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체로 구성되는 약학적 조성물.

청구항 22

치료 용도인, 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항 또는 제 20항에 의한 글루칸.

청구항 23

상처 또는 궤양 치료 조력 용도의, 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항 또는 제 20항에 의한 글루칸.

청구항 24

제21항 또는 제22항에 있어서, 글루칸은 개체에 국소적으로 적용되는, 글루칸.

청구항 25

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항 또는 제 20항에 의한 글루칸을 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체를 대상으로 상처 또는 궤양 치료에 조력하거나 또는 구내점막염 또는 암을 치료하는 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 케양은 당뇨병 케양인, 글루칸 또는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항 또는 제20항에 있어서, 구내점막염 또는 암 치료 용도의, 글루칸.

청구항 28

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항 또는 제20항에 의한 글루칸을 적용하거나 내부에 함침시킨 물리적 지지체.

청구항 29

제28항에 있어서, 직물, 부직물, 편물, 발포재 및 접착 기재; 패치, 드레싱, 플라스터, 붕대, 필름 또는 거즈로 이루어진 군에서 선택되는, 물리적 지지체.

청구항 30

피부세포집단 및 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항 또는 제20항에 의한 글루칸파의 접촉단계를 포함하는, 시험관내 피부세포 증식방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 새로운 글루칸 생성물, 이의 제조방법 및 의학 기구에 조합되는 약품, 기능식품, 화장품 또는 기타 등의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 글루칸은 식물, 세균, 진균 및 원충의 세포벽에서 발견되는 글루코스 고분자의 이질적 그룹이다. 글루칸은 골격 사슬을 가지고 어떤 경우에는, 글루칸 유래에 따라, $\beta(1,3)$, $\beta(1,4)$ 및/또는 $\beta(1,6)$ -결합 글루코실 단위들로 이루어진 결사슬들을 가진다. 원천 및 분리방법에 따라, 베타-글루칸은 골격 및 결사슬들에서 다양한 분지도 및 결합 유형을 가진다. 결사슬들의 결합 빈도 및 유형은 분자들의 생물학적 활성과 높은 연관성이 있다. 또한 글루칸은 사슬 응집 성향뿐 아니라 분자량이 크게 다르며, 이를 두 특성들은 효능 프로필에 있어서 중요한 특징이다. 진균 및 효모 유래의 대부분 베타-글루칸은 자연 상태에서 수불용성이며, 산분해 또는 분자에 -인산염, -황산염, -아민, -카르복시메틸 등과 같은 외래기들 도입에 의한 유도화로 용해성으로 제조될 수 있다.

[0003] 유럽, 아시아 및 미국에서, 특히 베이커 이스트 유래 베타-글루칸은 동물용 사료 첨가물, 화장품, 인간의 식이 보충제, 예를 들면 상처치료에 있어서 면역조절제, 및 피부크림제제에서의 활성성분으로 오랫동안 사용되었다. 글루칸은 WO02/058711에서 보이는 바와 같이 암치료에 사용되고 있다. 베타-글루칸은, 이와 관련하여, 부분적으로는 암 부위에 국소적인 양호하게 조절되고 부위 특이적 염증반응을 유도하여 백혈구 활성을 증가시키는 면역 자극제로 고려되었다. 또한 염증성 장질환 치료에서의 용도는 WO 2009/063221에 기재되어 있다. 상처 치료에 대한 글루칸의 추가적 적용은 EP 815144 및 US 6875754에 기재되고, 천식 및 알레르기 치료에 대한 적용은 US 12/528,215에 기술되어 있다.

[0004] 곡물 글루칸은 일반적으로 $\beta(1,3)$ 및 상당한 정도의 $\beta(1,4)$ 결합들의 미분지 사슬들로 구성되고, 효모 글루칸은 $\beta(1,3)$ 및 $\beta(1,6)$ 결합된 글루코실 잔기들로 이루어진 결사슬들의 분지점으로 작용하는 $\beta(1,6)$ 결합들과 함께 주로 $\beta(1,3)$ 결합된 글루코실 잔기들로 이루어진다. 글루칸으로 분류되는 기타 분자들로는, 분자가 없고 $\beta(1,3)$ 결합 글루코실 잔기들로 이루어진 기본적으로 선형분자인 커들란을 포함한다. 렌티난은 $\beta(1,3)$ 결합 골격이지만 골격에 실질적으로 규칙적으로 연결되어 머리빗 구조를 제공하는 단일 $\beta(1,6)$ 결합 글루코실 잔기들이 포함되는 글루칸이다. 단일 $\beta(1,6)$ 결합 글루코실 잔기들은 골격에 연결되어 $\beta(1,3,6)$ 연결점과 동등하지만 이러한 연결점에 추가적인 분자들이 연결되지 않고 따라서 렌티난과 같은 글루칸은 결사슬들을 가지지 않는다. 이러한 글루칸 류의 다른 예시로는 스클레로글루칸, 라미나린 및 쉬조필란이 있다.

[0005] 결사슬들의 분지도 및 길이 및 구조의 다양성은 대조적인 2차 및 3차 구조 및 이에 따른 생물학적 활성으로 이어진다. 글루칸의 고차 구조들은 상당히 다르고 분자량, 용해도 및 입자크기 모두는 일반적으로 예측불가능한

방식으로 활성을 영향을 미친다. 일부 생성물들은 표적 세포들에서 매우 잠재적인 염증성 시토카인의 유도자들이지만, 다른 것들은 시토카인 방출을 완전히 억제하는 역효과를 보인다. 많은 전형적인 불용성 베타-글루칸 생성물들은 전 범위의 염증성 반응들을 유도하고, 예를 들면 불용성 베타-글루칸 제제 주입은 육아종 형성, 관절 염 유도 및 그람음성 패열증 감수성 증가와 연관된다. 한편, 용해성 베타-글루칸은 이러한 부작용으로 인한 유해성이 보고되지 않았지만, 면역자극제로서의 효능이 실질적으로 가변적이라고 알려져 있다.

- [0006] 예를 들면, 선택적으로 (1,6) 결합된 결사슬들을 제거하는 글루카나제 처리에 의해 변형된 효모 유래 글루칸 생성물은 천연의 (1,6) 결합된 결사슬들을 가지는 생성물보다 어류의 면역계를 더욱 자극할 수 있다는 것이 밝혀졌다 (WO 95/30022).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 글루칸은 치료제 및 보조제로서 상당한 잠재성을 가지고 있지만 광범위한 구조적 다양성, 이러한 거대하고 복잡한 분자들에 대한 분석상의 문제들 및 이러한 분자들의 작용기작 및 수용체들에 대한 이해 부족으로, 맞춤형 생물학적 활성을 가지는 개선된 글루칸 생성물 및 제어 가능하고 반복 재현 가능한 균질 생성물 제조방법에 대한 필요성은 여전히 존재한다.

- [0008] 베타-글루칸은 수많은 병원체 (미생물), 특히 진균 표면에서 발견되므로 소위 병원균 연관 분자 패턴으로 알려져 있다. 따라서 고차 생물체는 이러한 유형의 병원체에 속하는 침입자를 발견하고 파괴하기 위하여 이러한 유형의 구조를 인식하는 진화된 메커니즘을 가진다. 포유류에서 소위 선천성 면역세포들은 베타-글루칸을 인식하는 특이 수용체들을 발현하고, 가장 중요한 수용체들 중 하나는 텍틴-1이다. 다른 수용체들도 이러한 인식 또는 베타-글루칸에 의해 유도되는 신호전달에 관여하고 이들은 무엇보다도 CD11b/CD18 (CR3), 및 툴 수용체들 2 및 4 (TLR2 및 TLR4)이다. 베타-글루칸 인식에 관여하는 세포들 중 전형적인 것은 선천 면역계의 식세포들, 즉 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 및 과립구이지만, 자연살해세포뿐 아니라 수많은 내피세포 및 기타 조직 특이 세포들도 베타-글루칸 수용체들을 발현할 수 있다.

- [0009] 표적 세포에서 생물학적 반응을 유도하는 중요한 단계는 수용체와의 초기 결합 및 또한 아마도 세포로의 적당한 신호-전달에 충분한 수의 수용체들을 교차결합하는 베타-글루칸 제제 능력이다. 본 발명은 특이 유형의 생물학적 활성을 유도하도록 수용체들을 교차-결합하는 능력을 가지는 생성물 및 생성물 제조방법을 기술한다. 이는, 대량의 수용체들을 교차-결합하고 이차적으로 식균되어 다량의 반응들을 유도하고, 불용성 (또는 "결정 유사") 글루칸 성질로 인하여 세포의 리소좀이 파열되어 NLRP 염증조절결합체 활성을 유도하는 불용성 생성물과 대조된다. 또한 불용성 베타-글루칸은 염증조절결합체 활성을 촉발하여 바람직하지 않은 염증반응에 이르는 ROS (활성 산소)을 유도한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 여러 면역기작들을 활성시키지만, 다수의 (옹집된 불용성) 베타-글루칸 생성물에 전형적인 염증조절 결합체 활성을 촉발시키지 않는 베타-글루칸 생성물을 기술한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명은 최종 생성물에 약학적으로 유리한 초분자 (supramolecular) 구조를 형성시킴으로써 글루칸 효능을 증가시킨다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 이하 비-제한적 실시예들 및 도면들에서 본 발명을 더욱 상세하게 기술할 것이다.

도 1은 본 발명에 의한 글루칸 젤에 대하여 온도에 따른 저장탄성률, G' (Pa)을 도시한 것이다. 본 데이터는

Stresstech HR 유량계를 이용한 소형 변형을 진동 측정계로 다음과 같은 온도 스캔하여 얻어졌다: 1/3 °C/분 속도로 70에서 10 °C, 10 °C에서 2 h 유지, 이후 1/3 °C/분 속도로 10에서 70 °C. 본 젤의 융점 (겔에서 졸)은 온도 증가에 따른 곡선이 수평이 되는 ($G' \sim 0$ Pa) 값이고 대략 40 °C로 측정된다.

도 2 a) 내지 e) 는 다른 회분 및 농도의 SG (081-5, 252-7, 342-8, 421-4) 및 다른 농도의 SG-LS (신 421-4)로 자극된 인간 mDC의 시험관내 결과를 도시한 것이다. a) TNF α, b) G-CSF, c) IL-10, d) CXCL-10 및 e) IL-12p70 분비 농도는 y축에 표시된다.

도 3 a) 내지 e) 는 LPS 및 다른 회분 및 농도의 SG (081-5, 252-7, 342-8, 421-4) 및 다른 농도의 SG-LS (신 421-4)로 공동 자극된 인간 mDC의 시험관내 결과를 도시한 것이다. a) TNF α, b) G-CSF, c) IL-10, d) CXCL-10 및 e) IL-12p70 분비 농도는 y축에 표시된다.

도 4 는 다른 농도의 SG 및 SG-LS로 자극된 db/db 생쥐 대식세포의 CXCL2 분비 결과를 보인다. LS는 SG-LS를 나타낸다. * $p<0.05$.

도 5 는 다른 농도의 SG 및 SG-LS로 자극된 db/db 생쥐 대식세포의 PGE2 분비 결과를 보인다. LS는 SG-LS를 나타낸다.

도 6 은 다른 농도의 SG 및 SG-LS로 자극된 db/db 생쥐 대식세포의 GM-CSF 분비 결과를 보인다. LS는 SG-LS를 나타낸다.

도 7 은 SG (421-4), SG-LS (421-4 LS)에 의해 자극된 텍틴-1 과발현 RAW 세포주에 의한 TNF α 분비 결과를 보인다. 인산염 완충식염수가 음성대조군이다.

도 8 은 비히클 (물) 및 양성대조군 (0.5% HPMC 중의 rh-PDGF-BB (10ug) + rh-TGF-α (1ug))에 대한 SG 131-92% 및 후보 (L/S) 131-92%를 보인다, 평균 ± s.e.m. * $p<0.05$. ** $p<0.01$.

도 9 는 본 발명에 의한 글루칸의 수용액 및 알칼리, 산 처리 전 출발 글루칸 수용액에서의 SEC-MALS-RI 크로마토그램을 보인다. 프로필은 비슷하지만, 본 처리에 의해 고분자량 응집체가 제거되었다는 것이 명백하다.

도 10 은 누드 마우스에 경피 이식된 이종 BT474 종양세포 성장도를 보인다. SG (09BP003), SG-LS (09BP003) 또는 물 (용매 대조군)을 7일부터 38일까지 격일로 경구 (p.o.) 투여하였다.

도 11 은 시험관내 분화된, 혈액 단핵구 유래 인간 골수 수지상세포 피드 DTAF-염색처리 SG (100 ug/ml) 및 SG-LS (20 ug/ml)의 2h 동안 형광을 보인다. DTAF는 FACS로 검출되었다. 텍틴-1 결합 항체 (길항체)로 예비 처리된 미성숙세포 (a), 또는 성숙mDC (b)에서 DTAF 수준을 조사하였다. PBS 만으로 예비처리된 글루칸-피드 미성숙세포의 DTAF 수준은 대조군이었다 (100%) (a, b). Y-축은 대조군 대비 형광 백분율을 나타낸다.

도 12 는 시험관내 분화된, 혈액 단핵구 유래 인간 골수 수지상세포 피드 DTAF-염색처리 SG (100 ug/ml), SG-LS (20 ug/ml), 텍스트란 및 루시페라제 엘로우 (LY)의 2h 동안 형광을 보인다. 텍스트란은 클라트린-의존성 리간드이고, LY는 유동-상 (대음세포작용) 마커이다. DTAF는 FACS로 검출되었다. 표시된 역제제들로 예비처리된 미성숙세포들에서 DTAF 수준을 조사하였다. PBS 만으로 예비처리된 글루칸-피드 미성숙세포의 DTAF 수준은 대조군이었다 (100%).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] β -글루칸에서의 고차 구조의 중요성 및 글루칸 생성물 전체 활성에 대한 개별 글루칸 결합 또는 사슬들 및 고차 구조 특성의 기여는 Sletmoen 등의 2008년 Biopolymers 89권, 4호, 310-321쪽에 기술된다. 고차 구조는 3중 나선구조와 같은 규칙 배열 또는 약간 풀린 응집체 (aggregation)를 포함한다.

[0014] 본 발명은 표적세포에 의해 접촉될 때 적당한 크기의 개체로 인지되지만, 식균될 때 리소좀 파열없이 글루칸이 용이하게 식포로 섭취되는 글루칸 제제를 제공한다. 따라서 본 발명은 양호한 젤화 특성을 가지고 고도의 잠재성이 있는 용해성 베타-글루칸의 새로운 구조를 기술한다. 이론에 구속됨이 없이 본 글루칸 분자들은 글루칸 골격 구조를 따라 빈번한-OH 기를 사이 상대적으로 약한 수소결합들에 의해 서로 유지되는 고도로 복잡하고 느슨한 "건초더미 (haystack)" 유형의 구조로 배열되는 것으로 보인다. "건초더미" 구조는 표적세포에서 특이적 글루칸 수용체들에 의해 인식될 수 있는 다수의 표면 부위를 제공할 수 있다. 그러나 "건초더미" 구조의 분자는 불용성 생성물의 경직성을 따르지 않고, 더욱 쉽게 "분해"되고 따라서 부위에서 또는 식균작용 이후 "고정"된다. 불용성 및 공지 용해성 생성물과 비교하여 이러한 거대 고차 구조는, 입자성 및 불용성 베타-글루칸에서 관찰되는 많은 효과들을 모방하는 면역조절반응을 제공하면서도 불용성 베타-글루칸과 연관되어 알려진

덜 조절되고 잠재적인 유해 작용을 유발하지 않으므로 유리하다.

- [0015] 일 양태에서 본 발명은 단일사슬 기준으로 중량평균분자량이 15,000 내지 50,000 g/mol 및 응집체 기준으로 수용액에서의 중량평균분자량이 4 내지 20×10^5 g/mol인 글루칸을 제공하며, 상기 글루칸은 25°C 및 중성 pH에서 ≥ 1 % 농도로 물에 용해될 때 젤 형태로 존재하며 글루칸이 2% 농도로 물에 용해될 때 응점(젤에서 졸)이 30°C 이상, 바람직하게는 35 내지 80°C, 더욱 바람직하게는 35 내지 60°C, 더더욱 바람직하게는 37 내지 60°C, 가장 바람직하기로는 약 40°C이다.
- [0016] 바람직하기로는 본 글루칸은 1.5 내지 6%, 더욱 바람직하기로는 1.5 내지 5%, 더더욱 바람직하기로는 2 내지 4%, 가장 바람직하기로는 약 2% 농도의 수용액 상태이다. "젤" 형태는 수용액 상태로 고려된다는 것을 이해하여야 한다.
- [0017] 바람직한 양태에서 본 글루칸은 베타 글루칸이고, 바람직하기로는 $\beta(1,3)$ 결합 글루코실 잔기들의 골격 및 $\beta(1,6)$ 결합으로 연결되는 $\beta(1,3)$ 결합 글루코실 잔기들의 결사슬들(예를 들면 최소한 2, 5, 10 또는 20 결합 글루코실 잔기들의 결사슬들)을 가진다.
- [0018] "중성 pH"는 pH 7을 의미한다.
- [0019] "단일사슬"이란 개별 글루칸 분자, 즉 글리코실 잔기들이 공유 결합된 하나의 분자를 의미한다. "응집체"는 수소결합으로 형성되며 초분자 또는 고차 구조체를 형성한다. 이러한 연결은 공유결합보다 덜 영구적이지만 본원에 기재된 방법에 의하면 인식가능한 패턴의 응집체가 제공되고, 이들의 평균분자량은 본원에 언급된 방법으로 분석될 수 있다. "수용액"은 전형적으로 pH 7이다.
- [0020] 달리 감안될 때, 본 발명은 농도 1 내지 6%의 수용액 상태의 글루칸을 포함하는 젤 글루칸 생성물을 제공하며, 본 글루칸은 응집체 기준으로 중량평균분자량이 4 내지 20×10^5 g/mol이고 단일사슬기준으로 중량평균분자량이 15,000 내지 50,000 g/mol이고, 본 젤 글루칸 생성물의 응점(젤에서 졸)은 30°C 이상, 바람직하게는 35 내지 80°C, 더욱 바람직하게는 35 내지 60°C, 더더욱 바람직하게는 37 내지 60°C, 가장 바람직하기로는 약 40°C이다.
- [0021] 글루칸 생성물은 통상 수용액 중에서 입자성 또는 어떤 경우에는 완전 용해성이다. 젤 형태는 매우 통상적이지 않지만, 본 젤 생성물은 특히 상처 치료에 있어서, 기타 글루칸 생성물들과 비교할 때 우수한 생물학적 활성을 제공한다는 것을 알았다. 상처 치료에 있어서 상처 보습을 확보하고 감염 방지를 위하여 생성물들이 상처 표면을 덮고 부착하고 의료 실무진에 의해 적절하게 판단되거나 또는 상처 유형에 따라 필요한 투여 프로필을 제공하도록 약학적 또는 의학적 기구를 적용하는 것이 극히 중요하다. 통상, 입자성, 반-용해성 또는 액상의 글루칸은, 효과적이지 않고 상처 치료 목적에 적용될 수 없는 상태이거나 또는 양자의 이유로 인하여, 이러한 기본 요건을 해결하지 못한다. 본 발명의 글루칸은 이러한 필요 특성을 조합하여 순수 글루칸 젤이 도포될 수 있는 모든 용도에 유용하다. 엄격한 국소 도포뿐 아니라, 기타 가능한 경구 및/또는 암치료뿐 아니라 위장관 또는 구강 질환 치료와 같은 점막투여가 가능하고, 이에 대하여 본 젤 생성물은 우수한 활성이 가지는 것으로 밝혀졌다. 본 발명에 의한 글루칸은 우수한 부착 특성으로 작용 부위에 있는 점막 내충을 덮을 수 있어 치료 과정을 촉진시킨다. 따라서 본 발명의 글루칸은 구내 점막염 및 기타 점막 영향 장후 치료에 특히 유용하다.
- [0022] 본 발명에 의하면 용해성 글루칸의 새로운 구조인 젤 구조는 용해성 글루칸의 적당한 농축용액을 글루칸 사슬들 간 및 내의 수소결합들을 분해할 수 있는 조제와 접촉시키고, 이어 사슬들-간 및 사슬들-내 수소결합 상호작용을 신속하게 회복시킬 수 있는 조제를 첨가하여 얻어질 수 있다. 이 경우, 글루칸 생성물 내부에서 전체로서 분자 사슬들의 초분자적 3차 또는 3D 구조 배열의 글루칸은 효능에 있어서 가장 중요한 것으로 보인다. 이론에 구속됨이 없이, 생물학적으로 유효한 분자 구조들만이 표적세포에서 다른 수용체들과 결합되는 것으로 보인다. 적합하게 복잡한 3D 구조가 아닌 단일사슬, 단사슬 또는 생성물들은 동일한 방식으로 신체의 면역계를 자극하지 못한다.
- [0023] 단일사슬들로 구성되는 젤의 3D (3차 또는 초분자 구조로 정의되는) 분자 구조를 특정하는 한정된 방법이 있다. 이러한 젤을 기술하는 일반적인 방법은 점도와 같은 물성뿐 아니라 평균분자량 및 단일사슬들의 분자량 분포에 의한다. 면역조절 생성물들의 경우, 젤들을 생물학적 효능 프로필에 의해 또는 달리 소위 "생물학적 지문(fingerprint)"을 측정함으로써 간접적으로 기술할 수 있다. 물성으로써 분자량을 적용할 때, 분석방법은 일반적으로 파괴적이고, 생물학적으로 유효한 3D 초분자 구조 제공에 필요한 단일 사슬들 간 분자 상호작용들에 대한 상세한 현상을 주기보다는 젤 생성물의 단일사슬 성분 또는 더욱 작은 응집 구조체 분석에 이른다는 것을 이

해할 수 있다. 그럼에도 불구하고 생물학적 효능 프로필과 결합된 점도를 포함한 글루칸의 여러 기타 물성들에 대한 상세한 분석으로 기술자들은 여러 상이한 글루칸들을 구분할 수 있다. 이러한 기준들 중 하나는 특정 분자량 범위이다. 글루칸 분자량은 여러 방법으로 결정될 수 있다. 용해성 글루칸 생성물의 경우 SEC-MALS-RI (다중-각 광산란 및 굴절률 검출 기능을 가지는 사이즈 배제 크로마토그래피) 분석으로 분자량을 간편하게 측정하고, 이러한 분석은 시료들에 대한 중량평균분자량 값 (M_w) 뿐 아니라 시료내 상이한 분자량들의 분포를 제공한다. 본 발명에서, 중량평균분자량 (M_w)은 다음과 같이 정의된다:

$$[0024] M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i}$$

[0025] 여기에서 n_i 는 분자량 M_i 을 가지는 분자들의 개수이다. 분자량 M_i 을 가지는 분자들의 중량농도 c_i 는 분자량 M_i 및 분자들 개수 n_i 에 비례한다.

$$[0026] c_i = M_i n_i \Rightarrow n_i = c_i / M_i$$

[0027] 크로마토그램의 각 분획물에 대한 중량농도는 RI-검출기로 결정되고, 크로마토그램에서 각각의 분획물에 대한 분자량은 RI-검출기와 조합된 MALS-검출기로 측정된다. 계산들은 광산란 이론에 기초한다.

[0028] 특히, 본 발명에 의한 (단일 사슬들에 대한) 평균분자량은 0.5% LiCl의 DMAc (0.5% 염화리튬의 디메틸아세트아미드)에서 본 용매에서 글루칸에 대한 dn/dc는 0.12라고 가정하고 SEC-MALS-RI로 측정된다. DMAc/LiCl 용매는 상기 글루칸을 단일사슬들로 충분히 용해시키고, 계속하여 용리액으로서 0.5% LiCl의 DMAc로 SEC-MALS-RI 분석하면 단일사슬 수준의 분자량분포를 측정할 수 있다. 간단하게, DMAc/LiCl 중에서 글루칸 분석은 건조 글루칸을 대략 3 mg/ml 농도로 용매에 용해시키고 실온에서 밤샘 교반하고 1시간 정도 100 °C 가열한 후 3 x PLgel Mixed-A LS 컬럼 및 용리액으로서 0.5% LiCl의 DMAc 을 이용하여 SEC-MALS-RI 분석한다. 본 방법에 의해 측정된 본 발명 글루칸의 중량평균분자량은 단일사슬 기준으로 15,000 내지 50,000 g/mol, 바람직하기로는 25,000 내지 45,000 g/mol, 및 더욱 바람직하기로는 30,000 내지 40,000 g/mol이다.

[0029] 수용액에서 존재하는 주요 고차 구조체 및 응집체의 중량평균분자량은 4-20 x 10⁵ g/mol, 바람직하기로는 5-15 x 10⁵ g/mol, 및 더욱 바람직하기로는 6-12 x 10⁵ g/mol이다. 이를 평균은 바람직하게는 매우 큰 응집체, 즉 1.0 x 10⁷ g/mol 이상의 분자량을 제외하고 계산된 것이다. 수용액 중의 글루칸 분석은 0.02 % NaN₃의 0.1 M NaNO₃에 대략 3 mg/ml로 겔 용액을 희석시키고, 30분 동안 밀봉 유리관에서 100 °C로 가열시키고, 실온 냉각시킨 후, 0.2 μm 실린지 필터로 여과시키고, TSKgel G5000 PWXL + TSKgel G4000 PWXL 컬럼 및 용리액으로서 0.02 % NaN₃의 0.1 M NaNO₃을 사용하여 SEC-MALS-RI 분석으로 이루어진다. 유사한 설정들 예를 들면 용매/ 용리액으로서 0.05 M Na₂SO₄ / 0.01 M EDTA로도 동등한 결과들을 얻는다. 단일사슬들 및 수용액 중 고차 구조들/ 응집체에 대한 분자량 값들의 조합으로 전체로서 겔의 분자적 및 초분자적 구조는 양호하게 표시되고 본 발명의 글루칸이 유용하게 정의된다.

[0030] 본 발명의 글루칸은 pH 3 내지 8의 25°C 수용액 중에서 겔 형태로 더욱 특징된다. 본 발명의 글루칸 겔은, 30 °C 이상 약 80 °C까지, 바람직하기로는 정상 신체 온도 이상, 더욱 바람직하기로는 37°C 내지 60°C, 가장 바람직하기로는 39°C 내지 60°C, 예를 들면 40-50°C의 겔 융점 (겔에서 졸)에서 예시되는 점도 프로필에 의해 더욱 특징된다. 상기 수치들은 수용액 중 2% 농도에서의 글루칸 겔에 관한 것이다.

[0031] 글루칸 생성물의 겔 융점, 즉 겔 → 졸 전이온도는 Stresstech HR 유량계를 이용한 소형 변형을 진동 측정계로 또는 글루칸 용액 냉각 (70 → 10 °C) 및 가열 (10 → 70 °C) 과정에서 유사하게 점탄성 변화를 검사하여 간편하게 결정된다. 이러한 실험에서 온도에 대한 저장탄성률 (G')의 예시는 도 1에 도시된다. 이러한 시료들에 대한 융점은 온도 증가에 따른 저장탄성을 곡선이 수평이 될 때의 값이고 (약 0 Pa에서), 약 40 °C이다. 겔에 대한 대략적인 융점 결정을 위한 다른 방법은 점도가 실질적으로 사라지고 (gone) 겔이 용액으로 변환될 때까지 온도를 순차적으로 상승시키면서 겔 점도 (예를 들면 회전식 점도계 사용)를 측정하는 것이다. 겔 융점은 바람직하기로는 30 - 80°C, 바람직하기로는 국소 적용에 안정적인 글루칸 겔을 보장하기 위하여 체온 이상이다. 국소 투여를 위하여는 경구 투여 또는 감염 부위 투여보다 상당히 낮은 융점이 필요하다.

- [0032] 본 발명의 글루칸 젤은 수용성 젤이고 젤 형태는 육안관찰로 확인될 수 있고, 또한 글루칸 젤의 점도 및 유사가 소성 및 요변성을 예를 들면 회전식 점도계를 사용하여 점도를 측정하여 결정할 수 있다. 본 발명에 의한 2% 글루칸 젤의 점도는 소형 시료 어댑터 및 스픈들 SC4-31 (전단속도 $3,40 \text{ sec}^{-1}$)이 구비된 Brookfield DV-II+ Pro Programmable 점도계를 사용하여 25 °C 및 회전속도 10 rpm에서 측정할 때, 최소한 1000 cP, 바람직하기로는 최소한 1500 cP이다. 이러한 유사가 소성 및 요변성 젤의 점도를 측정하는 편리한 방법은 소위-하향 속도기울기 (up-down rate ramp)를 이용하는 것이고, 예를 들면 2 rpm에서 개시하여 2 rpm 증가분으로 10 rpm까지 상승시킨 후 다시 2 rpm씩 내리는 것이다. 이러한 실험 결과는 젤의 유사가 소성 (전단속도 증가에 따른 점도 감소) 및 요변성 (전단력이 적용되는 동안 점도 감소)을 보일뿐 아니라 예를 들면 10 rpm 점도 측정치를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 글루칸은 전형적으로 효모에서, 바람직하기로는 사카로미케스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 유래된다. 이들 글루칸의 기본 분자구조는, 전형적으로 β -1,3 결사슬들 (β -1,3 결합들에 의해 연결되는 최소한 두 개의 글루코스 분자들의 사슬을 의미) 및 결사슬들을 골격에 연결시키는 β -1,3,6-결합점을 가지는 β -1,3-골격 (β -1,3 결합들에 의해 연결되는 글루코스 분자들의 사슬을 의미)이다. 또한, 효모 유래 글루칸은 결사슬들에 연결되거나 골격에 직접 결합될 수 있는 β -1,6 결합들을 포함한다. 또 다른 유형의 결합들이 존재하지만 비교적 낮은 수준이다. 글루칸 공급원이 되는 다른 효모들로는 맥주 효모, 칸디다 속의 일종 (*Candida* sp.) 예를 들면 칸디다 알비кан스 (*Candida albicans*), 칸디다 클로아케 (*Candida cloacae*), 칸디다 크로피칼리스 (*Candida tropicalis*), 칸디다 우틸리스 (*Candida utilis*), 한세눌라 속의 일종 (*Hansenula* sp.) 예를 들면 한세눌라 원게이 (*Hansenula wingei*), 한세눌라 아르니 (*Hansenula arni*), 한세눌라 헨리키이 (*Hansenula henricii*) 및 한세눌라 아메리카나 (*Hansenula americana*), 히스토플라마 속의 일종 (*Histoplasma* sp.), 클로에케라 속의 일종 (*Kloeckera* sp.), 클루이베로미케스 속의 일종 (*Kluyveromyces* sp.) 예를 들면 클루이베로미케스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로미케스 프라길리스 (*Kluyveromyces fragilis*), 클루이베로미케스 폴리스포루스 (*Kluyveromyces polysporus*), 퍼키아 속의 일종 (*Pichia* sp.), 로도토풀라 속의 일종 (*Rhodotorula* sp.), 사카로미케스 속의 일종 (*Saccharomyces* sp.) 예를 들면 사카로미케스 델브루에키이 (*Saccharomyces delbruekii*), 사카로미케스 로세이 (*Saccharomyces rosei*), 사카로미케스 미크로엘립소데스 (*Saccharomyces microellipspores*), 사카로미케스 카를스벨렌시스 (*Saccharomyces carlsbergensis*) 또는 다른 사카로미케스 균주 (*Saccharomyces strains*) 예를 들면 사카로미케스 세레비시에 R4 (*Saccharomyces cerevisiae* R4) (NRRL Y-15903) 및 R4 Ad (ATCC No. 74181), 쉬조필룸 속의 일종 (*Schizophyllum* sp.), 쉬조사카로미케스 속의 일종 (*Schizosaccharomyces* sp.) 예를 들면 쉬조사카로미케스 품베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 토후라 속의 일종 (*Torula* sp.) 및 토후롭시스 속의 일종 (*Torulopsis* sp.)이 포함된다.
- [0034] 그러나, 본 발명인 젤 글루칸은, 세균, 진균 또는 곡물 글루칸과 같은 기타 적합한 공급원에서 유래될 수 있다. 다양한 글루칸의 치료적 활성을 본 분야에서 문서화되고, 본 발명의 방법은 포괄적으로, 특히 본 발명자들에 의한 글루칸 생성물의 물리적 형태 및 분자간 구조가 특히 중요하다고 보여지는 상처 치료에서 글루칸 활성을 증가시키기 위하여 사용된다. 이론에 구속되지 않고, 경험칙에 의하면 본 발명에 의한 글루칸 단일사슬 기준으로 중량평균분자량이 높을수록, 글루칸 젤의 효능이 높아진다는 것이다.
- [0035] 본 발명의 글루칸 젤의 결사슬들은 통상 2 이상의 β (1,3) 결합된 글루코실 단위들을 포함한다. 본 발명에 의하면, 주사슬에 연결되는 단일분자들은 "결사슬들"로 고려되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 글루칸은 바람직하기로는 β (1,3) 결합된 글루코실 단위들로 이루어지거나 실질적으로 이루어진 결사슬들을 가진다. β (1,3) 결합된 결사슬들 외에도, 글루칸은 하나 이상의 β (1,6) 결합된 결사슬들을 가질 수 있다. 구조의 사슬들을 변경시킴으로써 최종 생성물의 특성을 변경시킬 수 있다. 효소-처리, 포름산 또는 염산과 같은 산들 또는 다른 염기들뿐 아니라 기타 수단들의 사용을 포함하여 많은 방법들로 글루칸을 변경시킬 수 있다. 바람직한 글루칸은 산 (예를 들면 포름산) 또는 효소 또는 글루칸 내에서 반복적 (1,6)-결합 글루코스 분자들의 개수를 줄이거나 제거하는 기타 적당한 방법으로 처리된 것들이다. 이들 (1,6)-결합 글루코실 잔기들은 통상 효모 유래 베타-글루칸의 결사슬들에서 발견된다. 생성된 글루칸은 β (1,3) 주사슬들 및 제거 처리에 의해 끊어지지 않는 단일 β (1,6) 결합으로 이에 연결되는 β (1,3) 결사슬들을 가진다.
- [0037] 바람직한 글루칸은 반복적 β (1,6) 결합된 글루코실 잔기들이 실질적으로 존재하지 않는다. 분지점들 (β (1,3,6)-분지점들)에서 단일 (1,6) 결합들은 '반복적' β (1,6) 결합된 글루코실 단위들을 제공하지 않는다. '실질적으로 존재하지 않는'란 전체 글루코실 단위들 중 6% 미만, 바람직하기로는 4% 미만 및 가장 바람직하기로는 3% 미만이라는 의미이다.

[0038] 효소 처리와 같은 일부 처리에 따라 4개까지의 베타-1,6-결합된, 그러나 전형적으로 2개의 베타 1,6 결합된 글루코실 단위들이 결사슬들에서 끊어지지 않고 남겨진다. 이러한 분자들도 반복적 베타 1,6-결합 글루코실 단위들이 '설질적으로 존재하지 않는' 것이다.

[0039] 바람직한 본 발명의 글루칸 내에서 결합들 분포는 다음과 같이 나타난다:

결합된 글루코실 잔기 유형	%
$\beta(1,3)$	80-98
$\beta(1,6)$	0-6
$\beta(1,3,6)$	1-8
말단	0,01-6

[0040]

[0041] $\beta(1,3,6)$ 은 골격에 (1,3) 결합되고 (1,6) 연결로 결사슬을 제공하는 분지점 잔기들을 의미한다.

[0042] 본 발명의 글루칸은 단일, 추출된 분획물 또는 다른 평균분자량들을 가지는 2 이상의 다른 분획물의 형태일 수 있다.

[0043] 글루칸은 화학적 변형기들 관점에서 유도화되지 않는다.

[0044] 본 발명의 글루칸은 새로운 방법으로 제조된다. 본 발명자들은 용해성 글루칸의 적당한 농축용액을 글루칸 사슬들 간 수소결합들을 분해할 수 있는 조제로 처리하고, 이어 사슬들 간 상호작용을 회복시킬 수 있는 조제를 첨가함으로써 다른 유사한 글루칸 생성물들과 비교하여 개선된 활성을 가지는 새로운 젤 글루칸 생성물을 수득할 수 있다는 것을 알았다. 이러한 작업을 통하여 "열처리 (annealed)" 베타-글루칸 사슬들의 전형적인 3중 나선구조를 가지지 않는 고도의 무작위적 구조의 "건초더미" 젤을 제조할 수 있다. 놀랍게도 이러한 유형의 젤-구조는 3중 나선 구조 또는 다중 나선들인 종래 구조의 용해성 베타-글루칸보다 상당히 더욱 가능성 있는 면역조절자라는 것을 알았다.

[0045] 따라서 또 다른 양태에서 본 발명은 상기된 젤 글루칸 생성물 제조방법을 제공하며, 글루칸 분자들의 수용액을 글루칸 사슬들 간 수소결합들을 분해하도록 조제로 처리하고, 이어 글루칸 사슬들 간 수소결합을 재형성시킬 수 있는 조제로 처리한다.

[0046] 따라서, 본 발명은 상기 젤 글루칸 제조방법을 제공하며,

[0047] a) 글루칸 분자들 수용액을 수소결합 분해 가능성 조제로 처리하는 단계; 및

[0048] b) 수소결합을 신속하게 재형성할 수 있는 조제를 첨가하는 단계로 구성된다.

[0049] 달리 본 발명을 감안하면 본원에 기재된 젤 글루칸 생성물 제조방법을 제공하는 것이며,

[0050] a) 글루칸 분자들 수용액을 글루칸의 수소결합을 분해하는 조제로 처리하는 단계; 및

[0051] b) 단계 a)의 생성물을 글루칸 내에서 수소결합을 재형성할 수 있는 조제와 접촉시키는 단계로 구성된다.

[0052] 분해되고 재형성되는 수소결합들은 분자내, 즉 단일사슬 내 또는 사슬들 간 분자간 결합일 수 있고 이에 따라 응집체가 형성된다.

[0053] 바람직한 수소결합 분해 가능성 조제는 알칼리염이다. 바람직하게는 수소결합 분해 가능성 조제는 최종 농도 50mM 이상, 바람직하게는 약 150mM로 사용된다.

[0054] 단계 a)는 바람직하게는 10°C 내지 25°C, 더욱 바람직하게는 15°C 내지 20°C, 가장 바람직하게는 약 18°C에서 수행된다.

[0055] 수소결합 분해 가능성 조제는 바람직하게는 서서히, 바람직하게는 물 10 리터 중 NaOH 24몰 용해된 용액을 2% 글루칸 용액 200 리터에 분당 약 1 리터 속도로 또는 부피 및 농도가 다른 경우 등등 속도로 첨가된다.

[0056] 폴리글루칸 사슬에 있는 OH-기들 간 수소결합을 분해하는 이러한 조제 중 하나는, 사슬에 있는 다수의 OH-기들을 탈양성자화 하기에 충분한 농도의 수산화나트륨 (NaOH)이다. 이에 따라 고분자량인 글루칸에서 전형적인 모든 분자간 결합들이 완전히 분해되어 용액 중 사슬들의 무작위적 구조가 형성된다. 알칼리를 중화시키는 산을

첨가하여 용액을 중화시키면, OH-기들이 재형성되고 사슬들 간 새로운 수소결합들이 확립된다.

- [0057] 조제로서 NaOH는 전형적으로 최종 농도가 50 mM 이상, 또는 더욱 바람직하게는 약 150 mM이 되도록 예를 들면 2M NaOH 용액을 용해성 글루칸 농도 1-6%, 더욱 바람직하게는 1,5-4% 또는 가장 바람직하게는 2-4%의 수용액에 첨가하는 것이다.
- [0058] 수소결합 재형성 단계는 수소결합 분해 가능성 조제 첨가 후 용액을 중화시키는 것으로 이해될 수 있다.
- [0059] 수소결합 분해 가능성 조제는 바람직하게는 알칼리염이므로, 바람직하게는 수소결합을 신속하게 재형성할 수 있는 조제, 즉 단계 a)에서 생성된 용액 중화 조제는 산, 바람직하게는 강산이다. 바람직하게는 본 방법의 단계 a) 및 단계 b) 조제 (agent)는 등몰량 첨가된다. 예를 들면, 2M NaOH 용액이 단계 a)에서 첨가되면 용액을 중화시키기 위하여 등몰량, 예를 들면 2M 염산 (HCl)이 용액에 첨가될 수 있다. 바람직하게는 중화 단계는 충분한 중화가 보장되는 시간 동안 교반하면서 수행된다. 1000 ml의 경우, 본 단계는 1분, 예를 들면 30초 이내로 수행될 수 있을 것이다. 실시예들에서 보이는 바와 같이, 모든 산들이 첨가되고 혼합되기 위하여 용적이 크면 더 긴 시간이 필요할 것이다. 겔-구성이 확립되도록 용액을 방치한 후, 1000 ml의 경우 겔 형성 시간은 1 내지 10 분 소요될 것이고, 부피가 더 큰 경우 더욱 시간이 필요하다.
- [0060] 수소결합의 신속한 재형성은 겔 형성 속도로 평가될 수 있다. "신속" 이란 전형적으로 10 분 미만, 바람직하게는 8 또는 6 분 미만, 더욱 바람직하게는 4 분 또는 3 분 미만을 의미하지만, 조제 (재보존제로 고려될 수 있다)의 1회 첨가 후 15분 이내로 겔이 형성되면 수소결합이 신속하게 재형성된 것을 의미한다. 더욱 큰 용량의 경우 일반적으로 겔 형성/수소결합 재형성에 더 많은 시간이 필요하다는 것을 이해하여야 한다.
- [0061] 임의의 다른 수소결합 분해 가능성 조제들이 NaOH를 대체할 수 있고, "전초더미" 유형의 겔을 형성시킬 수 있는 임의의 다른 신속한 수소결합 재-형성 조제들이 HCl을 대체할 수 있다. 기술자들은 수소결합들을 파괴하고 다시 회복시키는 기타 조제들을 선택할 수 있고, 수소결합을 분해하는 조제의 영향을 중화시키기 위하여 염기 및 산은 서로 수지를 맞추기에 특히 편리하다. 기타 강산들 예를 들면 포름산 또는 황산이 적용될 수 있다. 또한 제한되지는 않지만, 수산화칼륨, 수산화리튬, 및 수산화칼슘을 포함한 기타 알칼리염뿐 아니라 소위 초염기 예를 들면 수소화나트륨 또는 나트륨아미드 역시, 탈양성자화 및 수소결합들 분해를 위한 잠재적 조제일 수 있다. 적당한 품질의 임의의 산이 수소결합들을 회복시키고 용액을 중화시키기 위하여 적용될 수 있고- 제한적이지 않지만, 인산, 아세트산, 및 시트르산을 포함한다. 또한 요소 또는 포름아미드 역시 수소결합들 봉괴에 일반적으로 사용되고 본 공정에서 잠재적으로 적용될 수 있다.
- [0062] 대형의 복잡한 유기분자들이 관여되는 시스템에서, 모든 수소결합들이 분해되고 수소결합 회복 조건이 적용된 후 모든 분자 사슬들이 상당한 수소결합에 참가하는 것을 보장하는 것은 불가능하고 필요하지 않다는 것을 이해 할 것이다.
- [0063] 그러나, 적용되는 조건들은 글루칸 용액 전체에서 수소결합의 구조 및 정도를 급속히 (radically) 변경시킬 수 있어야 한다. 기술자들은 예를 들면, 150 mM NaOH의 글루칸 용액에 대한 영향을 이해할 수 있고 이에 따라 기타 수소결합 분해제 농도를 선택할 수 있다. 수소결합들 재확립이 가능하도록 제공되는 조건들이 적용되는 제2 단계의 목적은, 수소결합 분해제 첨가로 유발된 분자간 정전기적 상호작용 효과를 효율적으로 신속하게 중화시키고 가역시키는 것이다. 따라서 제2 조제의 특성 및 농도는 수소결합 분해제의 선택에 따른다. 신속 중화 단계가 없다면 달리 에너지적으로 더욱 최적인 상태 그러나 생물학적 방식이 아닌 상태로 재-형성될 경향이 있는 에너지적으로 준-안정상태의 초분자 구조를 "고정"시키기 위하여 신속 중화 조건이 제공된다는 것을 이해하여야 한다. 본 발명에 의한 처리 결과 생성되는 최종 생성물의 안정성을 증가시키기 위한 추가적인 공정이 고려될 수 있다. 잠재적인 추가적인 방법은 안정제를 첨가하는 것 또는 생물학적 활성 프로필을 크게 손상시키지 않는 에너지적으로 더욱 최적인 분자구조를 확립하기 위한 임의의 방법일 수 있다.
- [0064] 산업적 공정에서 이를 단계는 생성물 전체를 유지하기에 충분한 대형 탱크에서 간편하게 구현된다.
- [0065] 상기된 바와 같은 수소결합 분해 및 회복 단계들은, 예를 들면 1회 이상 반복될 수 있다.
- [0066] 바람직하게는, 본 방법은 추가 단계 c)를 포함하고, 상기 단계 a 및 b에서 첨가된 이온들 (예를 들면 Na^+ 및 Cl^-)은 예를 들면 여과 과정을 통하여 제거될 수 있다. 여과 방법은 본 분야에서 잘 공지되어 있고, 예를 들면 필요한 부피의 정제수를 접선식 필터에 통과시켜 생성물을 정용여과할 수 있다.
- [0067] 수소결합 분해 단계 전 수용액 중 글루칸 농도는 바람직하기로는 1.5-6%, 더욱 바람직하기로는 2 내지 4%, 가장

바람직하기로는 약 2%이다. 바람직하기로는, 글루칸 젤 중 글루칸 농도는 약 2%, 예를 들면 1.8% 내지 2.2%이다. 따라서, 바람직하기로는 수소결합 분해 단계 전 수용액 중 글루칸 농도 역시 약 2%이다. 상기 방법의 단계 a) 및 b)에서 조제들을 첨가하면 수용액의 부피를 증가시킬 수 있고 따라서 용액 중 글루칸 농도를 감소시킬 수 있다. 그러나 바람직하기로는 단계 a) 및 b)에서 첨가된 조제들의 부피는, 출발 및 최종 생성물에서의 글루칸 농도가 거의 동일하도록 용액 부피를 크게 변화시키지 않는다. 물론, 기술자들은, 필요하다면, 출발 생성물에서 더 높은 글루칸 농도를 적용하여 단계 a) 및 b)에서의 조제들을 첨가함으로써 최종 생성물에서 정확하고 원하는 글루칸 농도로 맞출 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 기술자들은 출발 생성물에서 적당한 글루칸 농도 및 젤 생성물에서 원하는 글루칸 농도를 달성하기 위하여 단계 a) 및 b)에서 첨가되는 조제들의 적당한 부피를 계산할 수 있다.

[0068] 상기 수소결합 분해 및 회복 단계는 임의의 글루칸 분자를 수용액에 구현될 수 있다; 변형 분자를 가지는 글루칸을 포함한 바람직한 글루칸이 상술되었고, 글루칸 용액은 바람직하기로는 효모 글루칸 용액이다. 출발 물질은 젤이고, 단계 a)에서 비-겔 용액이 생성되고 단계 b)에서 다시 젤 상태가 유도된다. 출발 용액에서 글루칸의 중량평균분자량 (M_w)은 바람직하기로는 높고, 바람직하기로는, 단일사슬 기준으로, 용액 중 글루칸의 중량평균분자량은 15,000 이상, 더욱 바람직하기로는 20,000 이상, 가장 바람직하기로는 25,000 g/mol 이상이다. 이러한 중량치를 구하는 적합한 방법들은 상술되었다.

[0069] 본 발명의 방법은, 1% 내지 4% 용해성 베타-글루칸 수용액이 출발 물질이고, 여기에 최종 농도가 약 150 mM이 되도록 약 2M의 NaOH를 첨가하고, 이후 완전히 용해되고 투명하게 될 때까지 교반하는 방법을 포함한다. 교반하면서 등몰량의 HCl을 첨가하여 젤을 다시 형성시키고, 이에 따라 생리적 오스몰 농도 및 pH 약 7의 젤이 생성된다. 젤은 임의의 부피로 제조될 수 있다.

[0070] 본 발명의 젤은, 시약들, 즉 출발물질 및 단계 a) 및 b)에서 사용되는 조제들이 키트로 제공되면, 일반인들도 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에서 키트가 제공되며, 글루칸 분자를 수용액이 담긴 밀봉 용기, 글루칸 수소결합 분해 가능 조제가 담긴 제2 밀봉용기 및 글루칸 내 수소결합 재형성 가능 조제가 담긴 제3 밀봉용기로 구성된다. 키트를 구성하는 글루칸 분자를 수용액, 및 두 조제들은 본원에서 기술된 바와 같다.

[0071] 이러한 키트의 하나는 2.2% 베타 글루칸 수용액 85 ml 병, 2M NaOH 7.5 ml 밀봉튜브 및 2M HCl 7.5 ml 밀봉튜브로 구성되며, 후자의 두 시약들은 2.2% 베타 글루칸 병에 연속적으로 첨가되어 등장성 2% 최종 젤을 생성한다. 또 다른 키트의 예시는 4% 베타 글루칸 수용액 70 ml 병, 1M NaOH 15 ml 밀봉튜브 및 1M HCl 15 ml 밀봉튜브로 구성되며, 후자의 두 시약들은 베타 글루칸 병에 연속적으로 첨가되어 약 3% (약간 아래의) 젤 100ml를 생성한다.

[0072] 일반적으로 글루칸은 공급재료 (예를 들면 진균, 효모 또는 곡물)에서 입자성 형태로 추출되지만 입자성 글루칸으로부터 용해성 형태를 제조하는 방법은 본 분야에 공지되어 있고 예를 들면 WO 95/30022에 기재된 포름산분해 (formolysis) 단계와 같은 산 또는 알칼리 처리를 포함하고 예를 들면 보리와 같은 곡물 유래의 다양한 유형의 글루칸 생성물은 Sigma Chemical에서 입수된다. 본 발명에 의하면, 예를 들면 WO 95/30022의 실시예 1에 따라 제조되는 입자성 출발 물질은 바람직하기로는 최소한 2시간 동안 포름산에서 가열하여 용해된다. 입자성 글루칸 출발 물질에 수행되는 포름산분해는 간단히 임의의 $\beta(1,6)$ 결합된 글루코실 결사슬들을 선택적으로 제거할 뿐 아니라 입자성 글루칸을 용해화시킨다.

[0073] 또한 본 발명의 방법은 선택적으로 가열 단계를 포함하며, 여기에서 포름산 처리된 생성물을 최소한 30 분 동안 끓인다 (>100°C). 생성물을 냉각시킨 후 본 분야에서 알려진 일반적인 방법 예를 들면 원심분리 또는 여과에 의해 입자성 물질들을 제거하도록 처리하는 것이 바람직하다.

[0074] 본 발명에 따른 공정을 위하여 용해성 형태를 수득하도록 처리되는 입자성 글루칸은 바람직하기로는 세포벽, 특히 단백질 성분들 및 기타 잔유물 예를 들면 세척하면 제거되는 만난 및 키틴을 포함하는 효모 세포벽에서 유래한다.

[0075] 예시적으로 적합한 입자성 효모 글루칸 생성물은 Biotec Pharmacon ASA에서 생산되며, 이는 뺏 효모 (사카로미케스 세레비시에)에서 유래하고 NBG Cos® 알려져 있다. 다른 예시적 입자성 글루칸 원재료들은 제품 표기 (Imprime) WGPTM와 같은 완전 (whole) 글루칸 입자들이다. 제품은 천연적인 미유도화된 (화학적 변형기들 관점에서) 입자성 $\beta(1,3)/(1,6)$ 글루칸이고, NMR 및 화학 분석에 의해 베타-1,3 및 베타-1,6-결합 D-글루코스의 결사슬들을 가지는 베타-1,3-결합 D-글루코스 고분자로 이루어진 것으로 특정된다.

- [0076] 본 발명의 바람직한 젤 생성물의 외관은 단단하고, 불투명하고 희끄무레하고 다른 표면에 대한 부착성이 크다.
- [0077] 또 다른 양태에서 본 발명은 임의의 상기 방법들로 수득된 또는 수득될 수 있는 글루칸 생성물을 제공한다.
- [0078] 본 발명의 글루칸은 잠재적 치료제이고 또 다른 양태에서 본 발명은 특히 개체의 전신적 또는 국부적 면역반응 증가가 요구되는 병태들, 예를 들면 조직 손상 또는 감염이 있는 경우 치료 용도를 위하여 본원에 기재된 글루칸을 제공하는 것이다. 글루칸은 특히 상처 또는 궤양 치료 및 구내점막염 및 암 치료 또는 종양 크기 감소화 조력에 유용하다.
- [0079] 또 다른 양태에서 본 발명은 따라서 개체의 상처 또는 궤양 치료 또는 구내점막염 치료에 조력하는 방법을 제공하고, 상기 개체에 본원에 기재된 본 발명의 글루칸을 투여하는 것을 포함한다.
- [0080] 일부 상처들 또는 궤양들은 자연 치유되고 다른 것들은 그렇지 않고 본 발명의 글루칸이 상처 및 궤양 치료를 촉진시키는 것으로 보이므로 상처 또는 궤양 치료에 "조력"하는 것으로 언급된다. 어떤 경우에는, 처리하지 않고 만족스러운 치료가 진행되지 않는다. 치료 처리가 필요한 이러한 상처의 예시로는 당뇨병성 족부궤양이다. 본 증상에서는 당뇨병이라는 근본 원인으로 환자들은 상처들이 생긴다. 때로 치료되지 않는 근본 원인 및 환자 족부에 상처들이 생긴다는 사실로 인하여, 이러한 궤양들은 자연 치유되지 않고 통상 족부 절단에 이르는 심각한 문제를 환자들에게 일으킨다.
- [0081] 또 다른 양태에서 본 발명은 개체의 암치료 또는 종량 크기 감소 방법을 제공하며, 상기 개체에 본원에 기재된 본 발명의 글루칸을 투여하는 것을 포함한다. 바람직하기로는 글루칸은 경구 투여된다. 바람직하기로는, 글루칸은 5 내지 200 mg/kg/일, 더욱 바람직하기로는 20 내지 100 mg/kg/일 함량 투여된다.
- [0082] 또 다른 양태에서 또한 본 발명은 상기 젤 형태의 글루칸 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체, 바람직하기로는 물 및 선택적으로 하나 이상의 생리적으로 허용되는 안정제 또는 추가 희석제 또는 담체로 구성되는 약학적 조성물을 제공한다. 본 조성물은 임의의 국소 투여 형태로 편리하게 제형될 수 있다. 국소 투여 형태는 젤, 페이스트, 크림, 스프레이, 로션, 용액, 연고, 필름, 기타 등이다.
- [0083] 일부 변형예들에서, 본원에 기술된 조성물 연고 형태이다. 연고기제는 유지성 기제, 유화성 기제, 에멀션 기제, 또는 수용성 기제일 수 있다. 다른 변형예들에서, 본 발명에 의한 조성물은 크림 형태이다. 크림은 유-중-수 또는 수-중-유의 점성 액체 또는 반고상 에멀션일 수 있다. 크림 기제는 수-세척성일 수 있고, 오일상, 유화제 및 수상을 가질 수 있다. 또 다른 변형예들에서, 본 발명에 의한 조성물은 로션 형태이다. 로션은 고체 혼탁액으로 조제되고 양호한 분산을 위하여 혼탁조제를 함유한다. 본 발명에 의한 조성물은 또한 페이스트로 조제된다. 페이스트는 반고상 투여 형태이고 활성제는 적합한 기제에 혼탁되어 있다. 기제 특성에 따라, 페이스트는 지방성 페이스트 또는 단일-상의 수상 젤로 제조된 페이스트로 구분된다.
- [0084] 일부 변형예들에서, 조성물 형태는 상처 표면에서의 필름일 수 있다. 본 필름은 분무 또는 기타 적당한 수단으로 적용될 수 있다. 필름 형성을 위하여, 필름 형성제 예를 들면, 제한적이지는 않지만, 아크릴산 및 이의 유도체, 폴리아크릴산 및 이의 유도체 예를 들면 폴리부틸메타크릴레이트 및 폴리메타크릴산, 폴리메타크릴레이트, 아스코빌 팔미테이트, 카보머, 카나우바 왁스, 셀룰로스 유도체 예를 들면 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 로스카 멜로스 소듐 (rosca melloose sodium), 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 관련 화합물들, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 히드로멜로스 프탈레이트, 세틸알코올 및 유도체, 미결정성 왁스, 폴록사며, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리우레탄, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 폴리비닐알코올, 실리콘 고무 및 유도체, 셀락, 트리글리세리드 유도체, 및 이들의 조합물들이 사용될 수 있다.
- [0085] 또한 조성물은 필름 형성제에 의해 형성된 고분자 필름을 연화시켜 균열 또는 박리되지 않고 신체 면적에서 이동될 수 있도록 충분히 유연하도록 최소한 하나의 필름 가소제를 포함할 수 있다.
- [0086] 일부 변형예들에서, 조성물을 상처에 적용하기 전에 필름으로 주조하거나 상처에 직접 도포하며 여기에서 동시에 중합된다. "도포식 (spread-on)" 필름은 피부에 적용될 때 중합되고 튜브에서 크림 또는 연고로서, 롤-온식, 스프레이, 및 기타 등으로 전달될 수 있다. 외부 상에 실리콘 고무를 결부시켜 필름이 제조될 수 있다. 내부 상과 혼합되면, 생성 에멀션은 경화되고 "도포식" 필름을 제공하며, 상처에 적용될 때 중합된다. 에멀션은 기재에 도포되어 원하는 두께를 달성할 수 있다.
- [0087] 다른 실시예들에서, 조성물은 레이어 (layer) 또는 패치로 구현될 수 있다. 패치는 두께가 다양할 수 있다. 또한 패치는 일반적으로 상처 모서리에 맞는 형상으로 절단될 수 있다.

- [0088] 일부 변형예들에서, 패치는 상처 또는 피부에 패치를 부착시키는 약학적으로 허용되는 접착제를 포함할 수 있다. 패치 지지층이 포함될 수도 있다.
- [0089] 조성물은 직접 상처에 직접 배치되거나, 상처에 적용되는 기재에 배치된다. 임의의 기재 (운반체)는 본원에 기재된 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예를 들면, 직물, 부직물, 편물, 발포재 및 접착 기재들이 사용될 수 있다. 또한 흡수성 또는 비-흡수성 기재가 사용될 수 있다. 일부 변형예들에서, 조성물은 기재 상에 산포 또는 도포된다. 다른 변형예들에서, 조성물은 기재 내부로 함침된다.
- [0090] 상처 드레싱은 임의의 적합한 시간 주기 동안 적용된다. 예를 들면, 하루, 수일, 수주, 또는 수개월 이상의 주기로 진행될 수 있다. 일반적으로, 상처가 치유도리 때까지 반복적으로 상처를 치료한다. 본원에 기재된 드레싱으로 상처를 치료하는 기간은 상처 유형, 상처 부위, 상처 삼출액 및 적용되는 조성물 형태와 같은 변수에 따라 다르다. 사용되는 조성물 형태에 따라, 조성물은 물로 세척되거나, 상처 부위에서 닦기거나 벗겨질 수 있다.
- [0091] 본원에 기재된 조성물들은 임의의 병인으로 인한 상처들을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 상처들은 화상, 감염, 허혈, 림프부종, 종양, 신경병, 방사선 손상, 외과적 처치, 정맥부전증, 및 외상으로 인한 상처일 수 있다. 본 발명에 의한 조성물은 특히 상처 또는 궤양 치료 조력에 유용하다.
- [0092] 또한 본 발명은 물리적 지지체 (physical support), 예를 들면 본원에 기재된 본 발명인 글루칸을 포화하는 것을 포함한 글루칸에 적용되는 의학적 용도의 임의의 의학적 기구 또는 재료를 제공한다.
- [0093] 이러한 베타 글루칸의 중요한 하나의 특성은 겔 치료를 촉진시킬 수 있는 비-중성 pH 조건 또는 양이온들 부재에서도 보수력 및 겔 형성 특성이다. 일부 베타-글루칸은 1% 정도의 낮은 농도, 그러나 더욱 전형적으로는 2-4% 농도 범위에서도 겔을 형성할 수 있다. 본원에 기재된 효모 유래 용해성 베타-글루칸은 수용액에서 1-6% 농도 및 pH 3-7로 용해될 때, 양이온 존재와는 무관하게 요변성 및 유사가소성 겔을 형성한다.
- [0094] 본 발명의 조성물은 수용액에서 1.5-6%, 바람직하기로는 1.5-5% 베타 글루칸을 포함하며, 바람직하기로는 본 조성물은 수용액에서 약 2-3% 글루칸을 포함한다. 목적 및 투여 방식에 따라 다른 농도들이 적용된다. 포괄적으로, 수용액에서 농도 6% 이상이고 기타 안정화 물질이 부재하는 상기된 효모 글루칸은 고형 겔 특성들로 인하여 제조하기 어려운 최종 겔 생성물에 이를 것이다.
- [0095] 용어들 '상처' 및 '궤양'란 외상, 수술 상처, 화상, 개방골절, 다리 궤양, 아프타성 궤양, 당뇨병성 궤양 및 육창 궤양을 포함한다. 상처들은 부상, 수술 또는 질환으로 인한 것일 수 있지만 이들 모두가 진피 일체성의 손실로 특징되고, 피부는 찢기거나, 끊어지거나 찢린 상태이고 개구부 (opening)를 밀봉시킬 필요가 있다. 본 발명의 글루칸은 상처 봉합 (closure)을 촉진시키는 것을 밝혀졌다. 실시예들에서 보이는 바와 같이, 열린 상처 크기를 측정함으로써 용이하게 효능을 입증할 수 있다.
- [0096] 조성물들은 바람직하게는, 예를 들면 겔, 경피성 패치, 로션, 연고, 크림 등으로서 국소적으로 적용된다. 조성물은 매일, 다소 빈번히, 예를 들면 하루 2회 또는 이를 간격 및 의사 또는 어떤 경우에는 환자 또는 기타 건강 관리사 결정에 따른 기간 동안 적용된다. 일반적으로 호전 상태가 육안 검사로 쉽게 결정되고 치료 기간은 상처 또는 궤양의 성질 및 심각도에 따라 다르다.
- [0097] 국소 투여는 구강투여를 포함하고 구내점막 전달용으로 적합한 겔, 페이스트, 스프레이, 함당정제 등을 본 분야에서 공지되어 있다.
- [0098] 글루칸 및 이를 함유한 조성물은 의약 및 수의약에 유용하다. 본원에서 사용되는, 용어 '의학적'란 수의학적 적용 및 상황들을 포함하는 것이다. 사람이 바람직한 치료 개체이지만 유익하게 치료될 수 있는 개체로서의 기타 동물들은 가축 및 반려 동물을 포함한다.
- [0099] 본 발명인 글루칸 및 이를 함유한 조성물은, 상처 또는 궤양 부위에 적용되는 물리적/고상 지지체 예를 들면 패치, 드레싱, 플라스터, 봉대, 필름, 거즈 등에 도포 또는 결합될 수 있고, 이러한 제품은 본 발명의 또 다른 양태를 구성한다.
- [0100] 또한 본 발명인 글루칸은 예를 들면 피부 이식에 사용하기 위한 피부 세포주 시험관내 배양에 유용하다. 따라서 또 다른 양태에서 본 발명은 시험관내 피부세포 증식방법을 제공하고, 피부세포집단 및 본원에 기재된 본 발명인 글루칸과의 접촉단계를 포함한다.
- [0101] 본 발명의 바람직한 하나의 양태 또는 실시예는, 약간 변형된다면, 모든 양태들 및 실시예들에 적용될 수 있다는 것을 이해할 수 있다.

[0102] 실시예들에서 보이는 바와 같이, 본 발명의 글루칸은 상처 치료제 및 항암제로서 우수한 생체내 효능을 가진다. 또한 실시예들은 다양한 치료 상황들과 관련되는 시토카인의 생성을 자극하는 본 발명의 글루칸 성능을 보인다. 본 실시예들은 시토카인 생성 유도에 의해 입증되는 바와 같이, 역시 효모에서 얻어지고 용해성이며 선택적으로 (1,6) 결합 결사슬들을 감소시키지만 (1,3) 결합 결사슬들을 유지시키도록 처리된 피상적으로는 유사한 글루칸 생성물과 비교하여, 본 발명의 글루칸은 상이한 생물학적 활성을 가진다는 것을 보인다. 특히, 본 발명의 글루칸은, 인간 골수 수지상 세포를 염증 표현형으로 분화 유도하여, 본 세포에 의한 TNF-알파 분비를 크게 자극하고 G-CSF 및 IL-10 발현을 유도하지만, CXCL-10 분비는 기본적으로 기본 수준이어서, 본원에 기재된 처리에 따라 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 본 발명에 의한 바람직한 글루칸은 특정 세트 또는 조합의 시토카인의 분비를 자극한다는 것이 중요하고 이러한 사실을 보인다. 또한 본 발명의 글루칸은 당뇨병 생쥐 (db/db)의 대식세포를 자극하여 상처 치유에 있어서 현저한 역할을 수행하는 CXCL2, PGE2 및 GM-CSF을 분비시킨다. 또한, 본 발명인 젤 글루칸은 인간 보체를 활성시킨다. TNF α 방출에 대한 바람직한 베타 글루칸 효과는 용량-의존적이고 베타 글루칸 수용체 텍틴-1 과발현 RAW 세포주 변이체에서 소정의 역치 예를 들면 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 글루칸 농도에서는 감소하는 것으로 보인다. TNF α 분비를 최대로 유발시키는 농도 및 반응 세기 모두는, 본원에 기재된 처리를 수행하지 않은 용해성 베타 글루칸을 이용한 것보다 더욱 높다.

[0103] 실시예 1

[0104] 본 발명인 젤 글루칸 생성물 제조 (SG-LS)

[0105] 효모 글루칸 분자들 2% 수용액을 다음과 같이 제조하였다. 입자성 글루칸 제제를 포름산 분해하여 선택적으로 β -1,6 결사슬들을 제거하고 연속하여 입자성 물질 및 저분자 성분들 제거를 위하여 포름산분해액을 정제 및 정용여과하여 본 수용액을 제조하였다. 적합한 포름산분해 단계는 EP 0759089 B1의 실시예 3에 기재된다. 입자성 글루칸 자체는 빵 효모 (*S. 세레비시厄*) 세포벽을 알칼리, 에탄올 및 물로 별도 추출한 후 적절하게 건조하여 (분무건조 및 진공건조) 제조하였다.

[0106] a. 수산화나트륨 첨가에 의한 수소결합 분해 (disruption):

[0107] 대략 200 리터가 되도록 글루칸 용액 농도를 조절한 후 탱크 주위 자켓으로 스텀 또는 물을 도입시켜 가열, 냉각되고 밀폐된 800 리터 교반 탱크에서 수산화나트륨을 첨가하였다.

[0108] 생성물 온도를 18 °C로 조정하고, 정제수 약 10리터에 용해된 24몰의 NaOH를 탱크 창구를 통하여 서서히 (분 당 1리터) 부었다.

[0109] b. 염산 첨가에 의한 수소결합 회복:

[0110] 탱크에 NaOH를 모두 투입한 후 즉시 회복 공정을 개시하였다.

[0111] 24 몰이 약간 안되는 HCl, 정제수 중 2.4M 용액 약 9리터를 비교적 신속하게 (약 2분) 탱크에 붓고, 생성물 pH를 측정하고, pH 4에 이를 때까지 산을 소량 더욱 첨가하였다.

[0112] c. 염 제거

[0113] 단계 a 및 b에서 첨가된 이온들 (Na^+ 및 Cl^-)을 제거하기 위하여, 필요한 부피의 정제수를 접선식 필터에 통과시켜 생성물을 정용여과할 수 있다.

[0114] 실시예 2

[0115] 인간 수지상세포 성숙 자극

[0116] 단핵구 유도 미성숙 수지상세포 (iDC)를 성숙 수지상세포 (mDC)로 분화시키는 용해성 베타-글루칸 제제의 효능은 상이하다. 활성 수준은 선택된 DC 세포 표면 마커들의 발현을 측정하여 가시화할 수 있다.

[0117] 림포프렙 구배법 (lymphoprep gradient)에 이어 항-CD14 마이크로비드로 자성 이용 세포 분류기 (MACS)를 이용하여 정제한 인간 단핵구를 미성숙 수지상세포로의 분화를 촉진시키기 위하여 IL-4 및 재조합 인간 GM-CSF와 함께 5일 동안 배양하였다. 단핵구 유도 미성숙 수지상세포 (iDC)를 생리적 산소 (physO_2) 수준에서 배양하였다. 5일에서 6일에, iDC를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용해성 베타-글루칸 (SG), 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 비-용해성 베타 글루칸 (NG)으로 자극하였다.

[0118] 표면 분자들 HLA-DR, CD83 및 CD86의 발현을 이용하여 성숙 DC로의 iDC분화를 조사하고, 형광 이용 세포 분류기

FACS로 분석하였다. 또한 C-유형 렉턴 수용체 DC-SIGN 발현을 분석하였다.

[0119] 음성대조군 (PBS) 대비하여, 포름산분해-후, 실시예 1의 NaOH 처리-전 글루칸으로 수용액 중 2%로 존재하는 용해성 글루칸 (SG)은, CD83, CD86, MHC 클래스 II (HLA DR) 및 DC-SIGN 발현을 약간 하향 조절한다. 하향 조절은 단백질 발현 세포들의 낮은 세포 개수로 인한 것이고, 또한 CD86 단백질 발현은 세포 당 약간 하향 조절된다. 반대로, 본 발명에 의한, 실시예 1에 따라 제조된 글루칸 SG-LS은, iDC을 활성시키는 강력한 자극제이고 CD83, CD86, 및 HLA-DR을 상향 조절한다. 또한 SG와는 달리 SG-LS에 의해 DC-SIGN 발현은 효과적으로 하향 조절된다. *사카로미케스 세레비시에* (*Saccharomyces cerevisiae*) 유래 비-용해성 베타 글루칸은 SG-LS와 유사하게 CD83, CD86, HLA-DR 및 DC-SIGN 단백질 발현 패턴을 활성시키지만, 더욱 강력하다. CD83, CD86 및 MHC 클래스 II 상향조절과 함께 DC-SIGN의 하향조절은 수지상세포 활성화 특징으로 인정된다. 따라서, SG-LS는 시험관내에서 수지상 세포를 활성시키지만, SG는 그렇지 못하고, 이러한 기능들과 관련하여 SG-LS 특성은 *S. 세레비시에* 유래 비-용해성 베타 글루칸 입자들과 비슷하다.

[0120] 실시예 3

[0121] 인간 수지상 세포 (DC)에 의한 시토카인 분비 자극

[0122] 시험관내 인간 DC에 의한 시토카인 프로필을 결정하기 위하여, 표준방법으로 말초혈액 단핵구를 분리하고 mDC로 분화시켰다. 연속하여 mDC를 다른 농도의 용해성 베타-글루칸 단독 또는 세균성 지질다당체(LPS) (1 ng ml^{-1})와 조합하여 자극하였다. 루미네스 시스템을 이용한 다중분석으로 시토카인 프로필을 결정하였다. 도 2는, SG 자극으로 TNF α 분비가 약하게 유도되지만, G-CSF, IL-10, CXCL-10 및 IL-12는 영향을 받지 않는다는 것을 보인다. 반대로, SG-LS (도 2에서 "신 421-4")는 TNF α 분비를 강하게 및 G-CSF 및 IL-10의 분비는 낮은 수준으로 자극한다.

[0123] SG는 본 발명에 의한 글루칸이 아니지만, 실시예 1에 의해 제조되는 본 발명에 의한 겔 글루칸 생성물인 SG-LS으로 설명되는 바와 같이 제시된 프로토콜에 따라 보강될 수 있다.

[0124] CXCL-10 분비는, SG에 있어서도, SG-LS 자극에 의해 영향을 받지 않지만, IL-12 생성은 SG-LS에 의해 약하게 억제된다.

[0125] 인간 mDC를 SG 또는 SG-LS 및 LPS와 공동 자극하면 SG-LS는 TNF α , CXCL-10, IL-10, 및 G-CSF 분비에 대하여 상승적 또는 상가적 효과를 보이나, IL-12 분비는 LPS 단독의 경우와 비교하면 확실히 하향 조절되는 것으로 밝혀졌다 (도 3). SG 및 LPS의 공동 자극은 임의의 테스트 시토카인들에서 어떠한 명확한 변화를 유도하지 않았다 (도 3).

[0126] 종합하면, SG 및 SG-LS는 시험관내 자극된 인간 mDC에서 차별된 생물학적 기능을 유도한다.

[0127] 실시예는 본 발명에 따른 용해성 글루칸이 본원에 기재된 방법에 따르지 않는 용해성 글루칸과 비교하여 다른 병원균 연관 분자 패턴을 조절하는 더욱 강력한 능력을 가지는 것을 보인다.

[0128] 실시예 4

[0129] 생쥐 대식세포에 의한 시토카인 분비 자극

[0130] EDTA 보충 PBS를 이용한 복강내 관류로 당뇨병 (db/db) 생쥐 (*BKS.Cg-m Dock7tm +/- Lepr^{db}/J*) 유래 대식세포를 수확하였다. 마이크로플레이트에 세포를 접종하고, SG 또는 SG-LS로 12h 동안 37°C에서, 단독 또는 LPS와 조합하여 자극하였다. 상처 치료 및 감염에 관여하는 일련의 신호분자들에 대하여 ELISA로 상등액을 분석하였다.

[0131] SG 및 SG-LS 모두 db/db 생쥐 대식세포를 자극하여 CXCL2를 분비하였다 (도 4, SG 자극된 세포의 상등액에서 분비된 케모카인의 농도는 인산염 완충식염수 단독으로 제공된 세포들에서 측정된 것과 크게 다르지 않았다. 반대로, SG-LS로 자극된 세포는 대조 세포들보다 상당히 많은 CXCL2를 분비하였다.

[0132] SG-LS에 의해 자극되는 db/db 생쥐의 대식세포는 PGE2 (도 5) 및 GM-CSF (도 6)를 분비한다. 높은 검정 변동성으로 인하여 상등액들에서 두 신호분자의 어떤 것의 농도들은 인산염 완충식염수에서 배양된 세포 상등액들에서의 농도들보다 크게 다르지 않았다. 한편, SG는 PGE2 또는 GM-CSF의 분비를 자극하지 않았다 (각각 도 5 및 6).

[0133] 실시예 5

[0134] RAW/렉턴-1 세포주에 의한 TNF α 분비자극

[0135] RAW/렉틴-1 세포주는 베타-글루칸 수용체인 렉틴-1 과발현 RAW264.7 생쥐 백혈병 단핵구 대식세포 세포주의 안정한 형질전환체이다. 세포주는 인비보젠의 RAW blue™ 세포주이다. 본 세포주는 상이한 용해성 베타 글루칸 제제들 차이를 결정하기에 적합하고, 본 세포주에 의한 베타 글루칸 반응은 렉틴-1 수용체와의 상호작용 지표이다.

[0136] ELISA 검정으로 측정된 바와 같이 37 °C에서 자극 후 SG 및 SG-LS 모두 TNF α 분비를 유도한다 (도 7). 두 제제 모두 전형적인 용량-반응을 유도한다. SG의 최대 효과는 1-2 ug/ml일 때이고, 더 낮거나 더 높은 농도에서는 감소한다. 대조적으로 SG-LS 최대 효과는 100 ug/ml에서 보이고 세포 배양액에서 TNF α 농도는 5배 더 높다.

[0137] 따라서, SG 및 SG-LS 모두 렉틴-1 과발현 생쥐 세포주를 자극하여 TNF α를 분비하지만, 반응은 특이적이고 쉽게 차별될 수 있다. SG에 대한 반응은 4 ug/ml 이상에서 감소하지만, SG-LS에 대한 반응은 100 ug/ml까지 더 강해진다. 이는, SG 및 SG-LS는 주요 베타 글루칸 수용체, 렉틴-1과 상이하게 작용한다는 것을 제안한다.

[0138] 실시예 6

[0139] 시험관내 상처 치료

[0140] 당뇨병 (db/db) 생쥐 모델 (즉 BKS.Cg-m Dock7tm +/+ Lep^{db} /J 생쥐)의 전총 절제 피부상처들 회복을 분석하여 SG 및 SG-LS 각각이 상처 치료에 미치는 영향을 조사하였다. 적응시 (교란없이 5-7 일) 홈 오피스 규정들 및 당뇨병 동물들에 대한 특정 요건들에 따라 생쥐들을 5마리씩 그룹으로 수용하였다. 실험적 상처 유발 후, 생쥐들을 각각의 케이지 (케이지에는 주당 2회 교체되는 텁밥이 깔리고 치수는 35 x 15 x 15 cm)에 수용하고, 주변 온도 23°C 및 12-시간 명/암 주기의 환경을 유지하였다. 생쥐들에게 사료 (Standard Rodent Diet) 및 물을 임의량 공급하였다. 모든 마취 절차후에는, 생쥐들을 가온 환경에 방치하고 마취에서 완전히 회복될 때까지 감시하였다. 수술 후 모든 생쥐들에게 적당한 진통제 (부프레놀핀) 및 필요한 경우 추가 진통제를 제공하였다. 모든 동물실험들은 홈 오피스 라이센스에 따라 홈 오피스 허가 기관에서 진행하였다 (PCD: 50/2505; PPL: 40/3300; PIL: 50/3482; PIL: 70/4934). 연구 과정에서 매일 생쥐 건강 상태가 관찰되었다.

[0141] 0일에, 생쥐들을 마취시키고 (이소플루오란 & 에어) 등부를 면도하고 식염수에 젓인 거즈로 닦았다. 각 생쥐의 등쪽 좌측 옆구리에 단면의 표준화 전총 상처 (10.0mm x 10.0mm)를 만들었다. 모든 처리 그룹에서 상처들을 투명 필름 드레싱 Biocclusive™ (Systagenix Wound Management, UK)의 원주형 밴드로 상처를 치료하였다; 이후 29-케이지 주사 바늘로 Biocclusive 필름을 통과시켜 SG 또는 SG-LS를 정제수 중 2% 용액 50 uL으로 주사하였다. 적절한 소프트웨어를 이용하여 치료법 중 하나로 당뇨병 생쥐들을 무작위 선별하였다. SG 또는 SG-LS 치료를 받은 실험 그룹들에 대하여는 상처-유발 후 2, 4 및 6일 다시 처방하였다. 이를 동물의 상처 부위들에 대하여 처리 조제들이 과도하게 축적되는지 및 상처 부위 수화가 과도한지를 면밀하게 관찰하였다; 과도한 조제 누적/수화가 명백한 경우, 이전에 처방된 물질을 흡입 제거하고 다시 처방하였다. 양성대조군에 대하여는 상처-유발 후 6 일까지 매일 다시 처방하였다- 본 그룹의 상처들에 대하여는 총 7 가지의 성장인자 병용 치료들이 적용되었다. 상처-유발 후 4, 8 및 12일, 모든 생쥐들을 다시 마취시키고, 필름 드레싱 및 떨어진 모든 파편들을 제거하고, 상처들을 식염수를 젓인 거즈로 소독하였다. 4 및 8일째 사진 촬영 후, 상처들을 Biocclusive 필름 드레싱으로 상기와 같이 다시 상처 치료하였다.

[0142] 각 평가시점에 각 상처에 대한 상처 눈금 사진으로 상처 봉합 데이터를 결정하였다. 소정 시점에서의 상처 면적은 상처 유발 (즉 0일) 직후 상처 면적에 대한 백분율로 표시하였다. 각 그룹에 대하여 잔류 상처 면적의 평균 백분율 (& 평균의 표준오차)을 계산하고 도식하였다 (도 8). 각 글루칸 제제의 효과를 i). 비히클 (물); 및 ii) PDGF-BB + TGF-α (양성대조군)이 적용된 상처의 경우와 비교하였다.

[0143] 모든 평가시점에서 SG 131-9 LS 2% 적용된 상처는 SG 131-9 2% 적용된 상처와 비교하여 상처 봉합이 개선되었다 (도 8). 이러한 차이는 4일 및 8일에 통계적으로 유의하였다 (각각 p=0.015 & 0.001). 초기 시점에는 (4일 및 8일) SG 131-9 LS 처방 상처의 봉합 프로필은 양성대조군 처방 상처의 경우와 동등하였다.

[0144] 실시예 7

[0145] 용점 결정

[0146] 상세한 설명에 기재된 바에 따라 본 발명에 의해 제조된 글루칸 젤의 용점을 측정하고 결과를 도 1에 나타낸다. 일반적으로 알칼리-산 처리로 글루칸 젤의 용점 (젤에서 졸)은 증가한다.

[0147] 실시예 8

[0148] 매트리겔에서 배양된 10^7 BT474 세포를 피내이식한 NMRI nu/nu 생쥐를 이용하여 항-암 활성에 대한 SG 및 SG-LS 효과를 조사하였다. 종양 성장 후, 감지될 때까지 (80 mm^3) 7 일, SG 및 SG-LS를 매일 강제 경구 투여하였다. 31일 동안 격일로 종양 직경을 측정하고, 용적을 결정하였다. 분석에 의하면 (도 10) SG 및 SG-LS 모두는 비히클 (물) 대비 종양 성장을 지연시켰다. 또한 SG와 비교하여 SG-LS는 더욱 효과적으로 성장속도를 억제하였음이 명백하고, 이는 SG 항-암 특성은 본원 기재 제조방법에 의해 보강될 수 있다는 것을 제안한다.

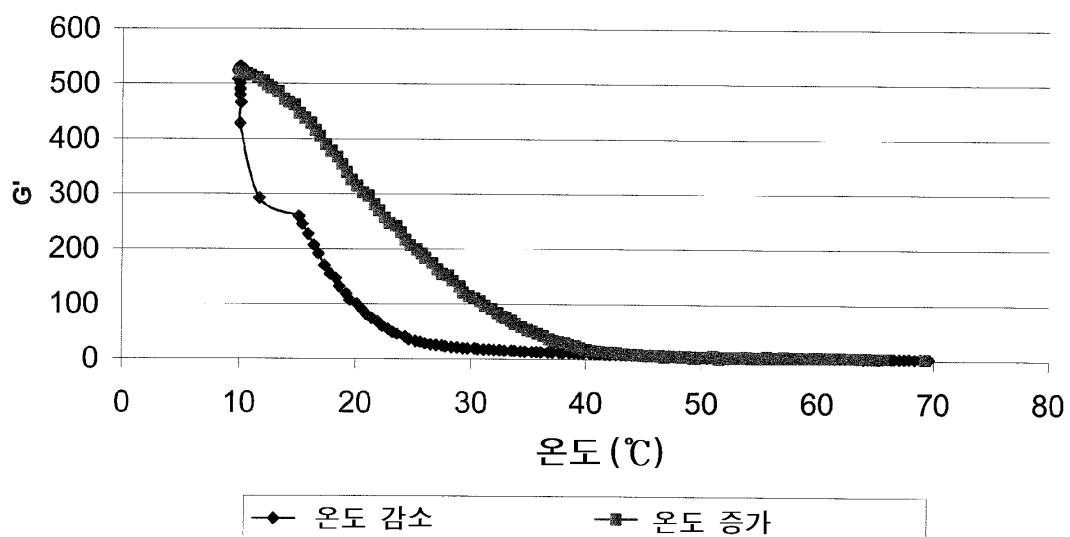
[0149] 실시예 9

[0150] 세포 작용기작을 분석하여 SG 및 SG-LS 간 효능 차이를 조사하고 결과를 도 11 및 12에 나타낸다. 혈액 단핵구 (mDC) 유래 시험관내 분화된 인간 골수 수지상세포에서 LS 종들 섭취는 텍틴-1 길항체에 의해 저해된다 (항-텍틴-1 항체, 도 11 a). SG 종들 섭취는 항체에 의해 약간 저해되고 이는 SG는 주로 텍틴-1과 무관한 기작을 통하여 세포로 들어간다는 것을 보인다. 이러한 발견은 성숙 mDC 및 미성숙 mDC에서의 형광-표지 글루칸 섭취를 조사하여 더욱 입증되었다. 텍틴-1 표면 발현은 미성숙 mDC에 비해 성숙 mDC에서 더욱 낮다는 것은 잘 알려져 있고, 따라서 미성숙 mDC (100 %, 미도시)에 비하여 성숙 mDC에서 SG-LS 섭취는 줄어든다 (~30%, 도 11b)). SG 섭취는 성숙 및 미성숙 mDC 모두에서 비슷하고, 이는 텍틴-1-길항체 데이터를 지지하는 것이고, SG-LS 및 SG는 세포와 다른 방식으로 작용한다는 것을 제안한다.

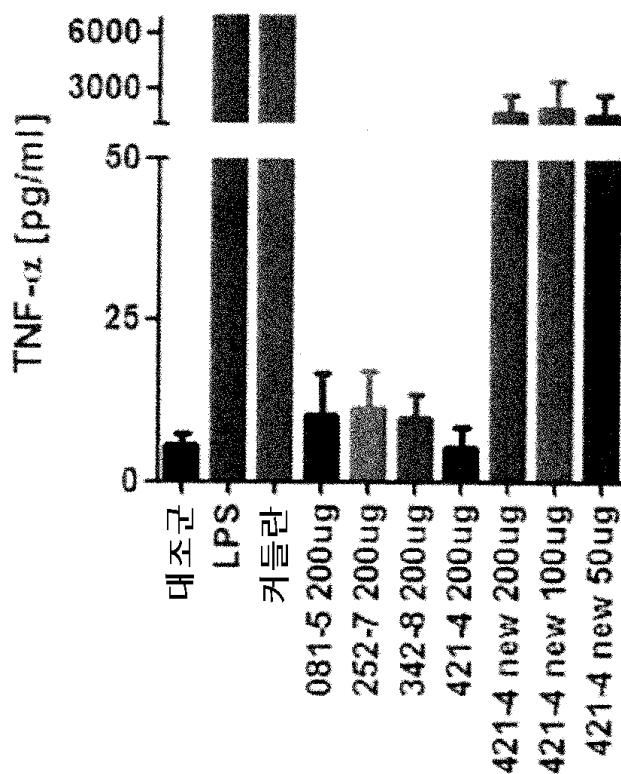
[0151] 특히 억제제를 이용하여 정확한 기작들을 결정하였다 (도 12). SG 섭취는 클로르프로마진에 의해 영향을 받지 않았지만, SG-LS의 세포내 섭취는 이러한 화합물에 의해 저해되었다. 이는, SG-LS는 클라트린-매개 내포작용에 의해 섭취되지만, SG는 그렇지 않다는 것을 제안한다. 한편, SG 섭취는 대음세포작용을 방해하는 로틀레린에 의해 저해된다. SG-LS의 세포내 축적은 로틀레닌에 의해 영향을 받지 않는다. 시토칼라신 D는 부분적으로 양 리간드들의 섭취를 저해하며, 이는, 세포로 들어가기 위하여 세포골격 재배열, 즉 식세포작용이 필요하다는 것을 제안한다. 종합하면 이러한 결과들은 SG 및 SG-LS는 식세포작용은 공통일지라도 서로 다른 기작들에 의해 섭취된다는 것을 보인다.

도면

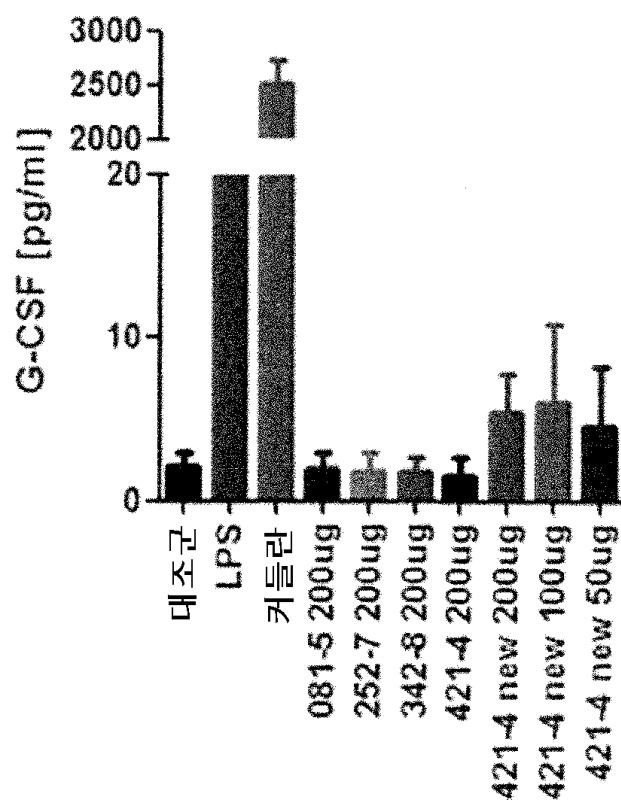
도면1



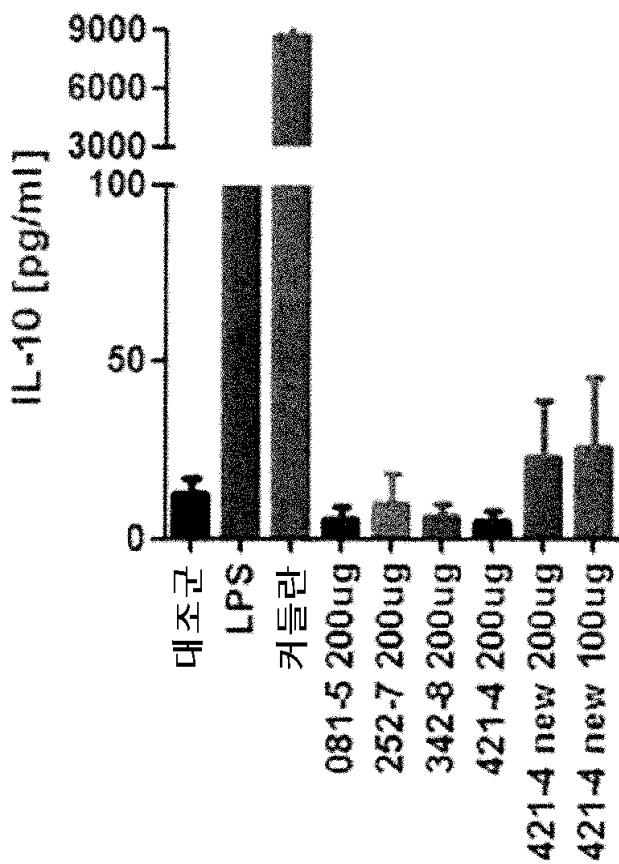
도면2a



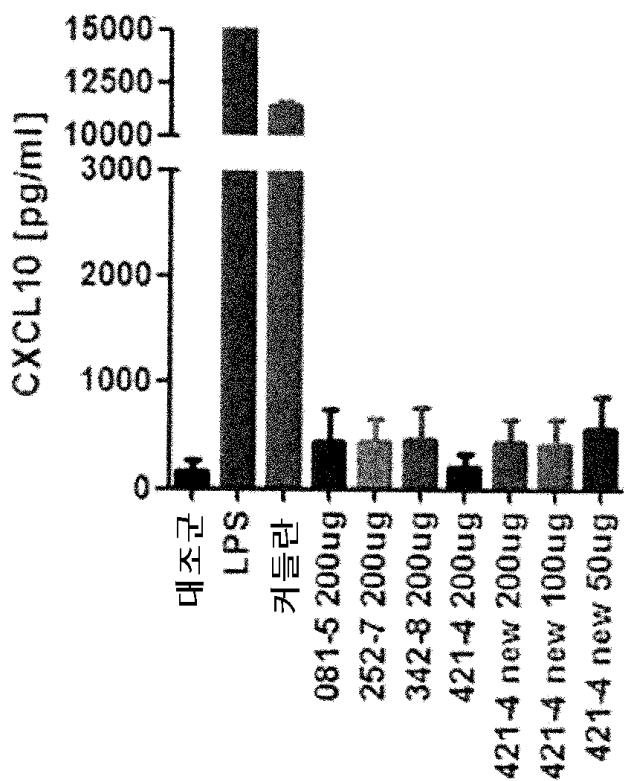
도면2b



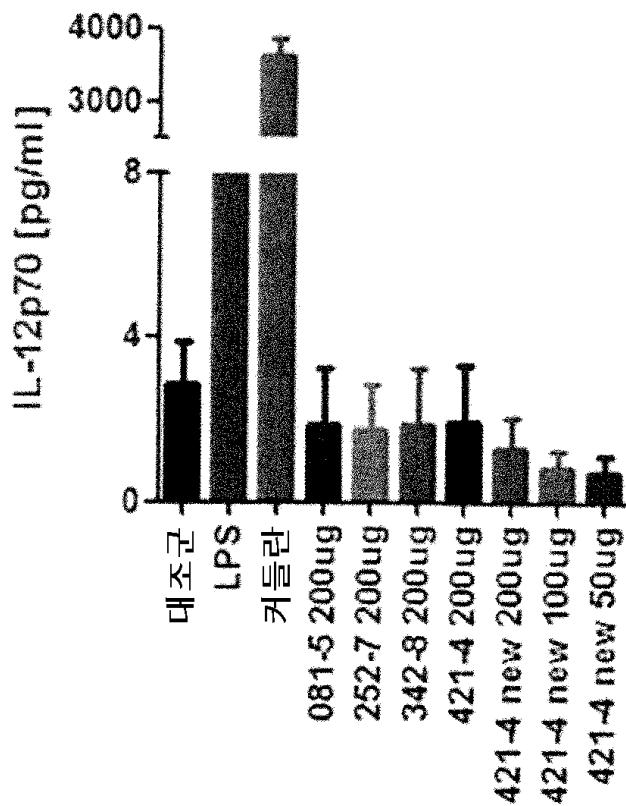
도면2c



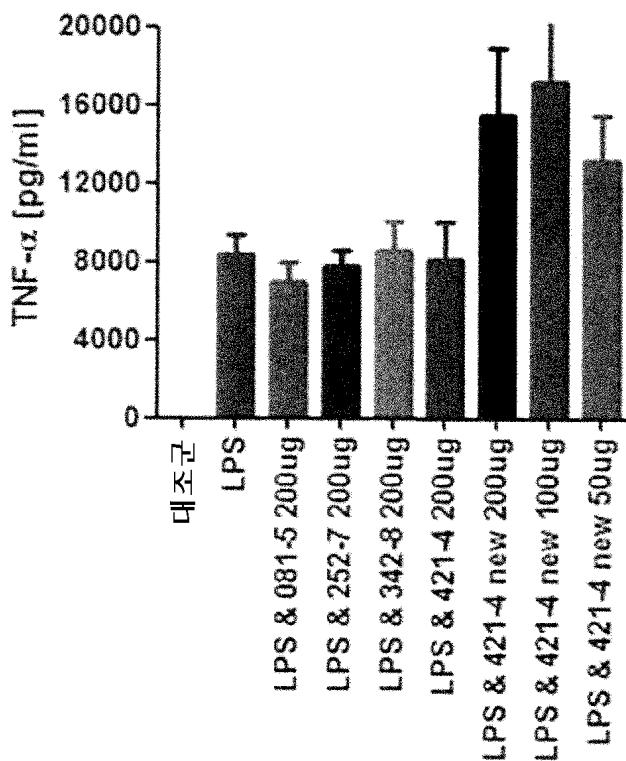
도면2d



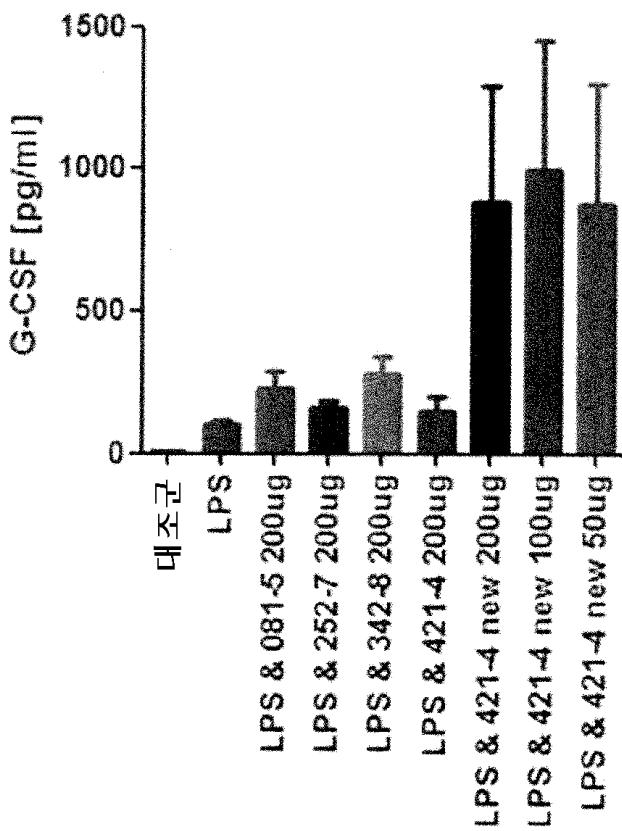
도면2e



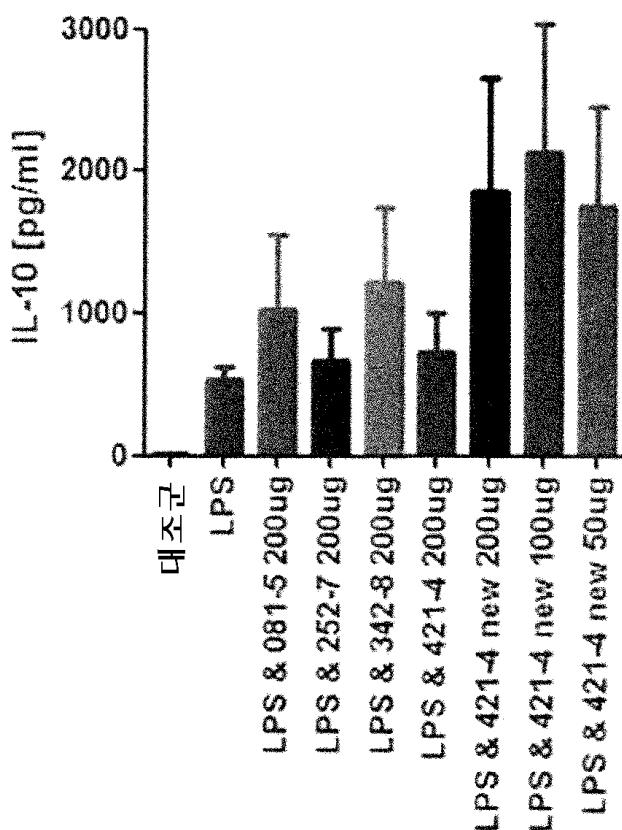
도면3a



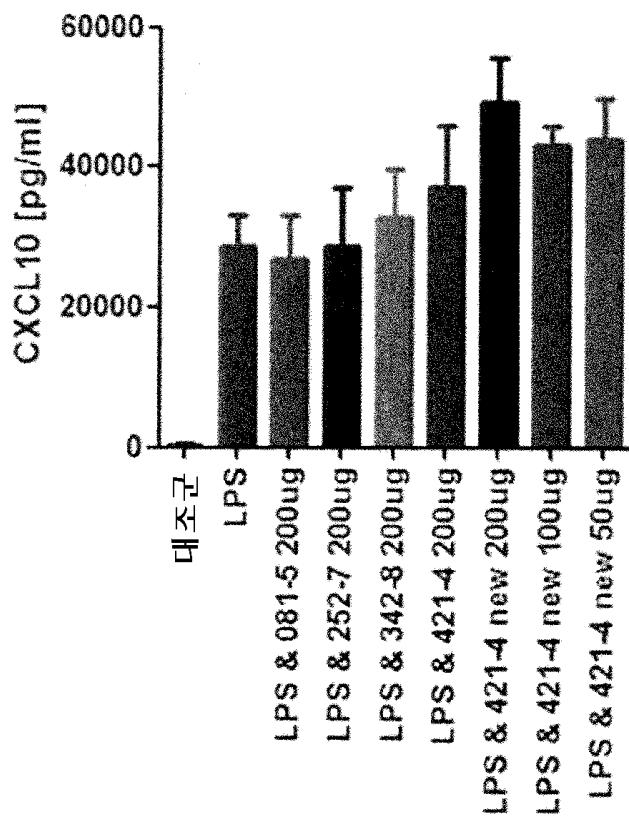
도면3b



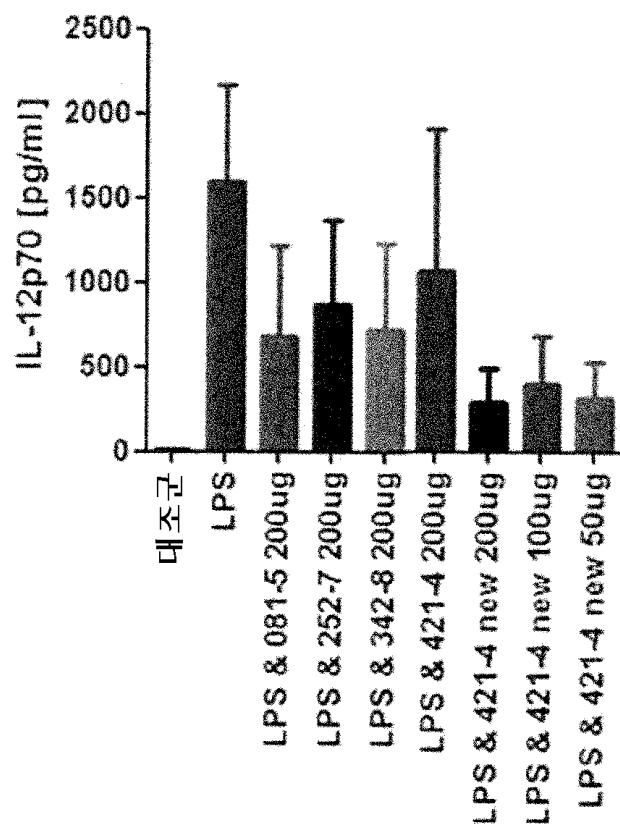
도면3c



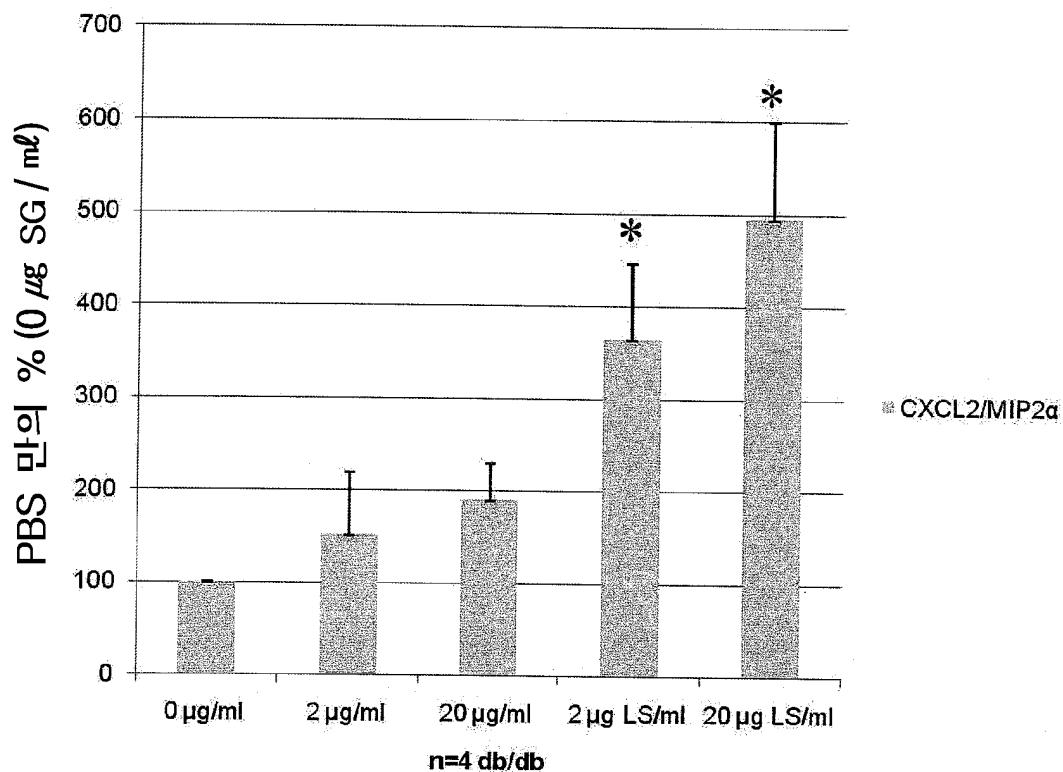
도면3d



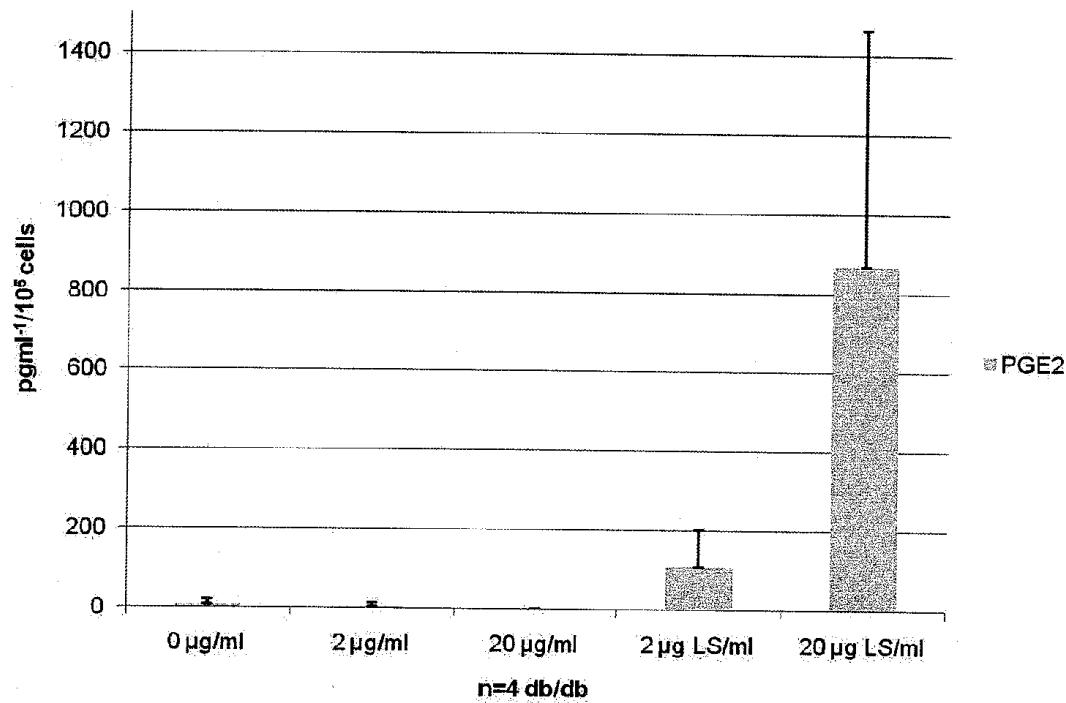
도면3e



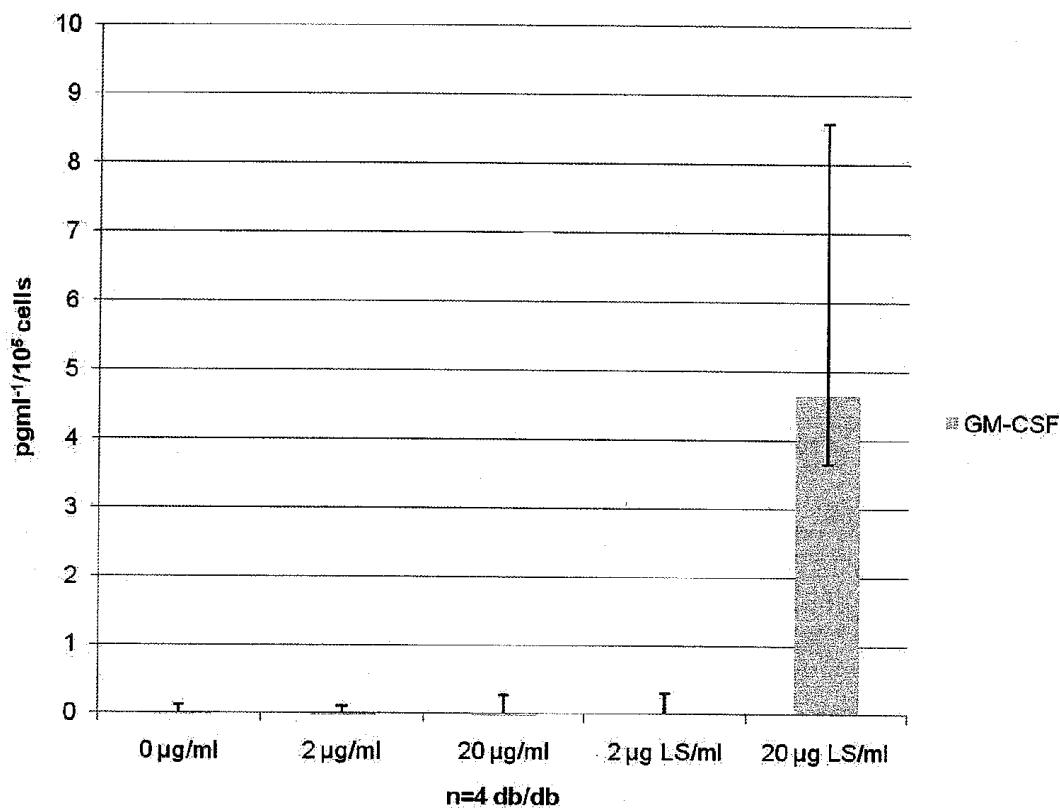
도면4



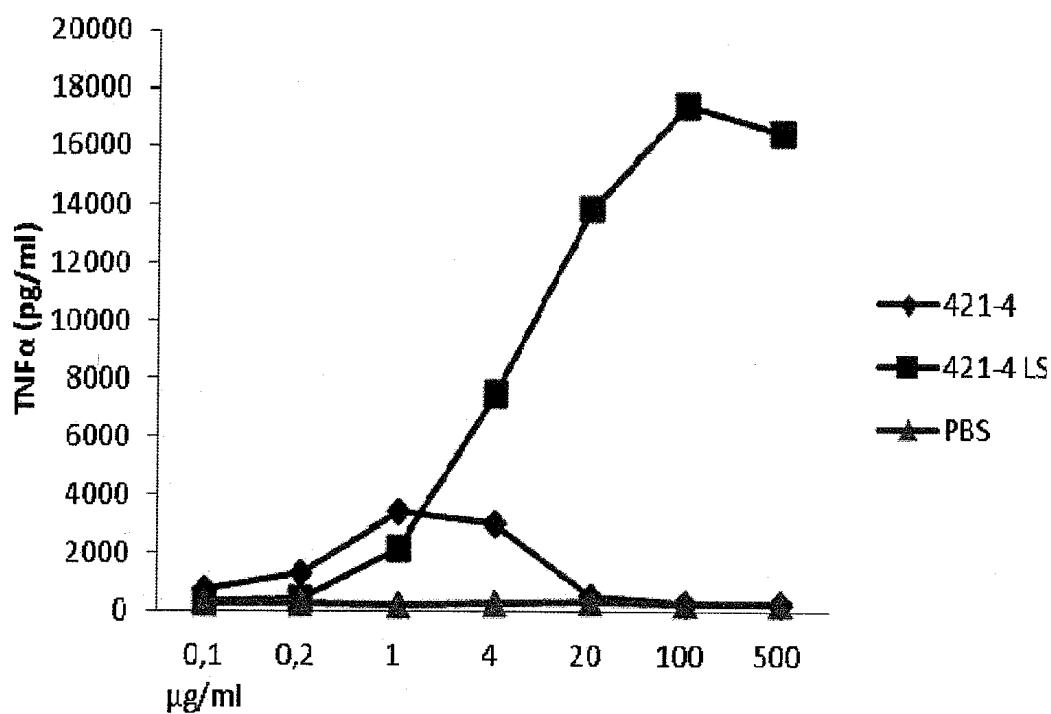
도면5



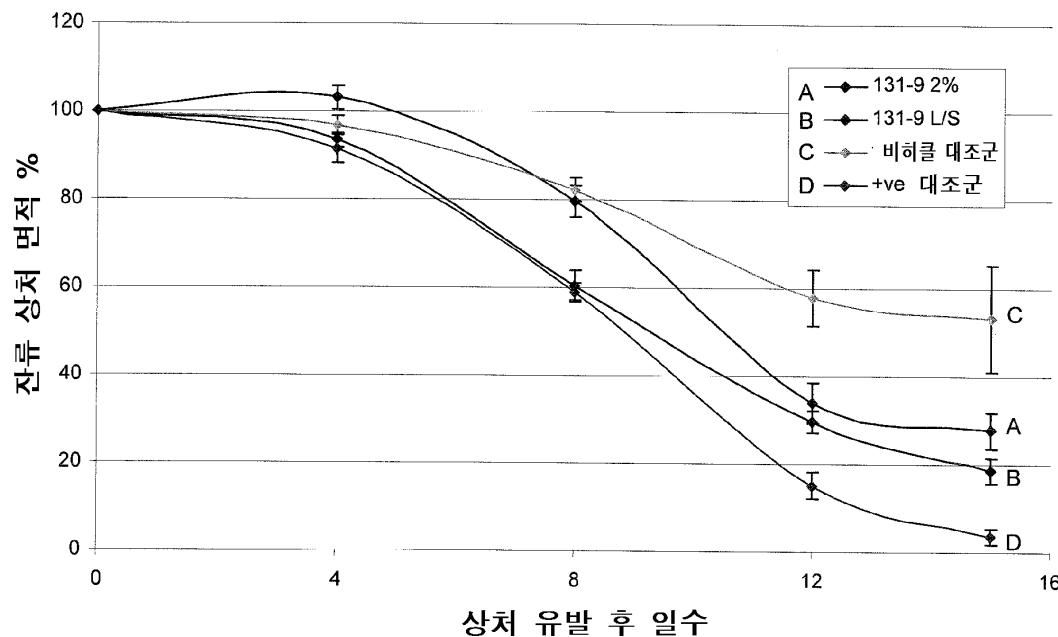
도면6



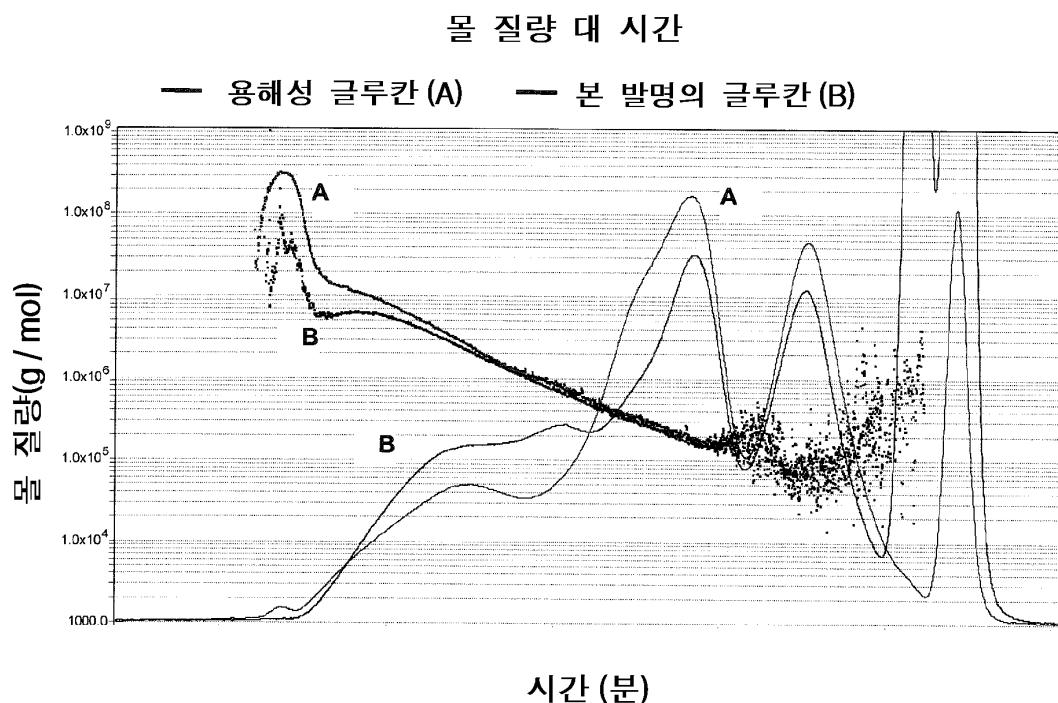
도면7



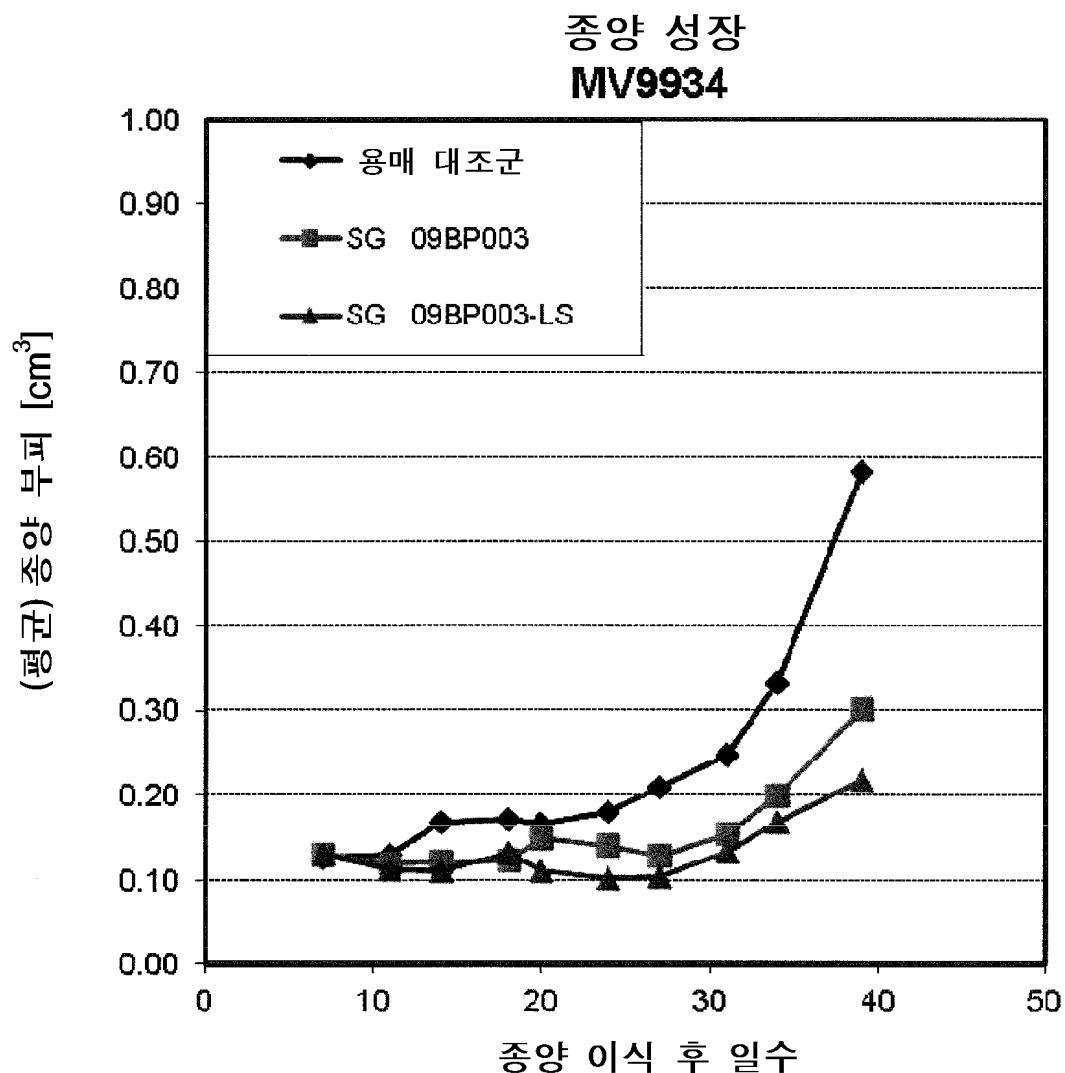
도면8



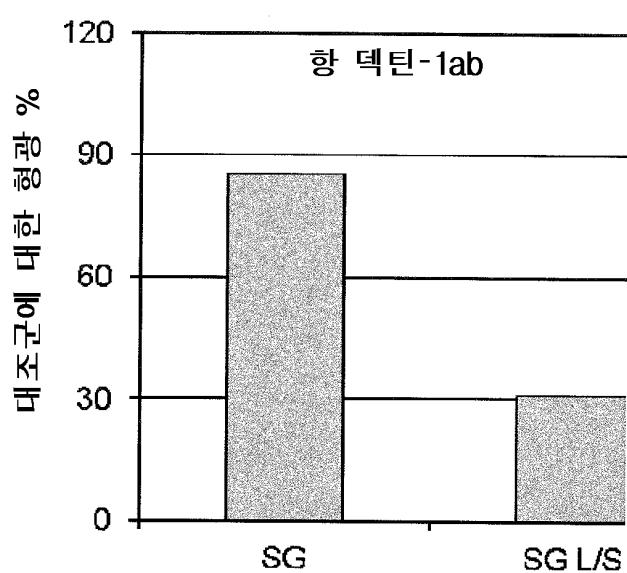
도면9



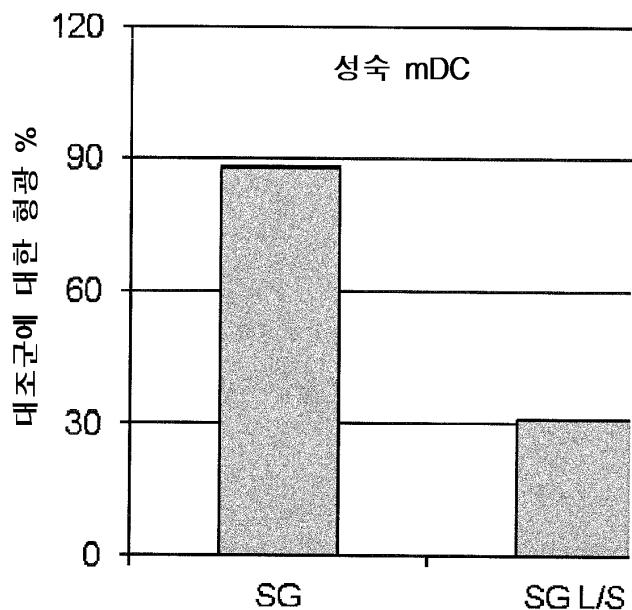
도면10



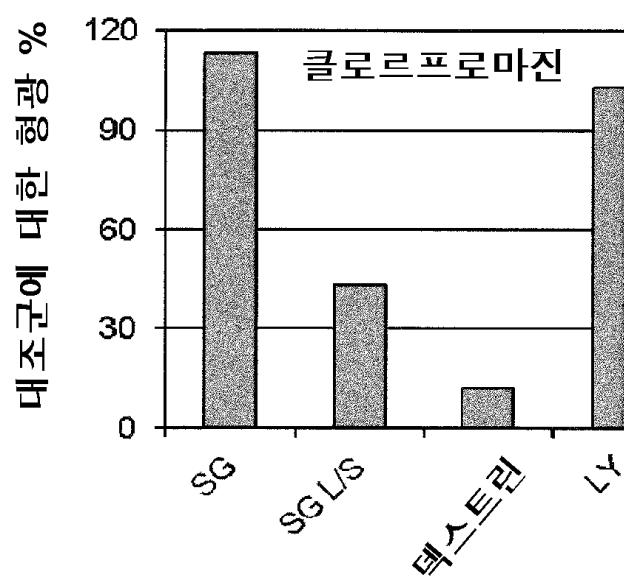
도면11a



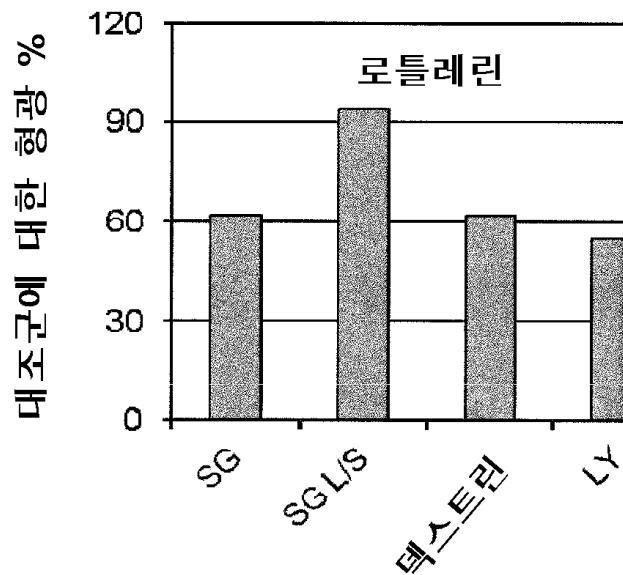
도면11b



도면12a



도면12b



도면12c

