



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월19일

(11) 등록번호 10-1780074

(24) 등록일자 2017년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/481 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7016274

(22) 출원일자(국제) 2009년12월15일

심사청구일자 2014년12월15일

(85) 번역문제출일자 2011년07월13일

(65) 공개번호 10-2011-0094343

(43) 공개일자 2011년08월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/068062

(87) 국제공개번호 WO 2010/077867

국제공개일자 2010년07월08일

(30) 우선권주장

61/122,586 2008년12월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2004502703 A

JP2006070217 A

(73) 특허권자

에코팜, 엘엘씨

미국, 캘리포니아 64065, 레드우드 시티, 슈트
600, 303 트윈 돌핀 드라이브

(72) 발명자

안, 진후아

미국, 캘리포니아 95054, 산타 클라라, 2381 블루
라운 드라이브

필들러, 존, 엠.

미국, 캘리포니아 94611, 오클랜드, 6399 길빈 드
라이브

무써, 존, 에이치.

미국, 캘리포니아 94070, 산 칼로스, 71 로마 로
드

(74) 대리인

허용록

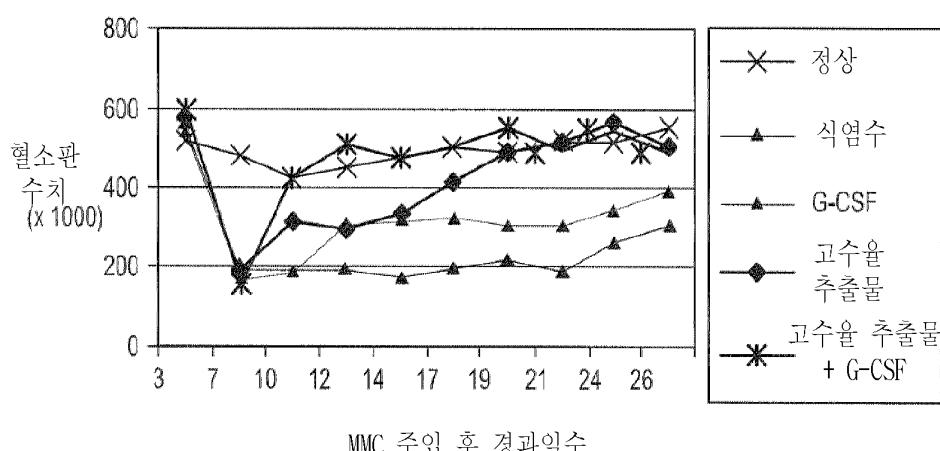
전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 황기 추출물을 포함하는 조성물을 이용한 특발성 혈소판감소증자반병의 치료

(57) 요 약

본 명세서에서 제공되는 설명은 황기 추출물을 포함하는 조성물의 제조 및 사용과 관련이 있다. 상기 추출물은 황기로부터 제조되고, 예를 들어 약 3.5:1 내지 약 5.0:1의 비율을 가지고, 약 5 % 내지 약 10 %의 람노오스, 약 15 % 내지 약 20 %의 갈락토오스 및 약 10 % 내지 약 15 %의 글루코오스를 가지는, 산으로 개질된 아라비노갈락탄 단백질 조성물을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 특발성 혈소판감소증자반병의 치료 및 이러한 치료를 위한 약제의 제제에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2

MMC 주입 후 경과일수

명세서

청구범위

청구항 1

황기(*Astragalus membranaceus*) 뿌리의 정제 추출물로서, 상기 추출물은:

아라비노오스:갈락토오스의 몰비가 4.0:1 내지 4.5:1 이며;

48 몰% 내지 63 몰%의 아라비노오스;

5 몰% 내지 10 몰%의 람노오스;

12 몰% 내지 14 몰%의 갈락토오스;

10 몰% 내지 20 몰%의 갈락투론산;

1 몲% 내지 8 몲%의 글루코오스; 그리고

2 중량% 이하의 단백질을 포함하며;

상기 단백질은 20,000 내지 60,000 Da의 중량 평균 분자량을 갖는 아라비노갈락탄 단백질의 당단백질(AGPs)이고,

상기 추출물은 황기에서 조질 추출물을 단리하는 단계 및 산으로 상기 조질 추출물을 온화하게 처리하는 단계를 포함하는 제 1 공정을 사용하여 제조되며, 상기 온화하게 처리하는 단계는 15 °C 내지 25 °C의 온도에서 1 시간 내지 24시간 동안에 0.05 M 내지 0.5 M 농도의 산을 상기 조질 추출물에 가하는 단계를 포함하며, 상기 산을 가하는 온도 및 시간은 상기 아라비노오스:갈락토오스의 몰비, 상기 갈락토오스 함량, 상기 글루코오스 함량, 및 고수율을 얻도록 선택되며; 그리고,

상기 제 1 공정에 의해 제조된 추출물은, 3.5:1 비율 미만의 아라비노오스:갈락토오스의 몰비, 45.5 몰% 내지 73.5 몰%의 아라비노오스; 2 몰% 내지 4 몰%의 람노오스; 13 몰% 내지 21 몰%의 갈락토오스; 4 몰% 내지 6 몰%의 갈락투론산; 및 5 몰% 내지 25 몰%의 글루코오스를 얻도록 선택된 온도 및 시간에서 상기 조질 추출물에 상기 산을 가하는 단계를 포함하는 제 2 공정을 사용하여 생산된 황기 추출물의 수율에 비해 높은 수율을 보이며,

상기 황기 뿌리는 몽고황기(*A. membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao); 막협황기(*A. membranaceus* (Fisch.) Bge); 또는 내부 몽골 또는 산시성 지방에서 재배된 황기로부터의 뿌리인 것을 특징으로 하는, 추출물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 적어도 100 kDa의 평균 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는, 추출물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 적어도 80 중량%의 탄수화물을 갖는 것을 특징으로 하는, 추출물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 수용액 중에 pH 4.5 내지 6.5를 갖는 것을 특징으로 하는, 추출물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 조혈을 촉진하는 물질인 과립구집락촉진인자(G-CSF)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 추출물.

청구항 6

제 1 항의 황기 뿌리의 정제 추출물의 치료적 유효량 및 수성 주사용 부형제를 포함하는 수성 주사용 제제.

청구항 7

제 1 항에 따른 황기 뿌리의 정제 추출물을 제조하는 방법에 있어서, 상기 방법은:

황기에서 조절 추출물을 단리하는 단계; 및

상기 조절 추출물을 산으로 온화하게 처리하는 단계

를 포함하며;

상기 온화하게 처리하는 단계는 15 °C 내지 25 °C 온도에서 1 시간 내지 24시간 동안에 0.05 M 내지 0.5 M 농도의 산을 상기 조절 추출물에 가하는 단계를 포함하며, 상기 산을 가해주는 온도 및 시간은 상기 아라비노오스: 갈락토오스의 몰비가 4.0:1 내지 4.5:1이며, 48 몰% 내지 63 몰%의 아라비노오스; 5 몰% 내지 10 몰%의 람노오스; 12 몰% 내지 14 몰%의 갈락토오스; 10 몰% 내지 20 몰%의 갈락투론산; 1 몰% 내지 8 몰%의 글루코오스; 그리고 2 중량% 이하의 단백질을 갖는 것을 연도록 선택되며,

상기 단백질은 20,000 내지 60,000 Da의 중량 평균 분자량을 갖는 아라비노갈락탄 단백질의 당단백질(AGPs)인 것을 특징으로 하는, 황기 뿌리의 정제 추출물을 제조하는 방법.

청구항 8

제 1항에 따른 황기 뿌리의 정제 추출물을 포함하는, 인간의 특발성 혈소판감소증자반병 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 추출물은 제2 활성 물질인 과립구집락촉진인자(G-CSF)와 함께 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 추출물은 적어도 100 kDa의 평균 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

제 8 항에 있어서,

상기 추출물은:

아라비노오스:갈락토오스의 몰비가 1.5:1 내지 2.2:1이며;

5.25 몰% 내지 15.4 몰%의 아라비노오스;

0.1 몰% 내지 1.5 몰%의 람노오스;

3.5 몰% 내지 7 몰%의 갈락토오스;

0.1 몰% 내지 4 몰%의 갈락투론산; 및

75 몰% 내지 90 몰%의 글루코오스를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 추출물은 20 kDa 내지 60 kDa의 평균 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 추출물은 제2 활성 물질인 과립구집락촉진인자(G-CSF)와 함께 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 14

제 8 항에 있어서,

상기 추출물은:

아라비노오스:갈락토오스의 몰비가 3.0:1 내지 3.5:1이며;

48 몰% 내지 70 몰%의 아라비노오스;

2 몰% 내지 4 몰%의 람노오스;

16 몰% 내지 20 몰%의 갈락토오스;

4 몰% 내지 6 몰%의 갈락투론산; 및

5 몰% 내지 25 몰%의 글루코오스를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 추출물은 100 kDa 내지 350 kDa의 평균 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

상기 추출물은 제2 활성 물질인 과립구집락촉진인자(G-CSF)와 함께 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 17

제 8 항에 있어서,

상기 추출물은:

아라비노오스:갈락토오스의 몰비가 4.0:1 내지 4.5:1 이며;

48 몰% 내지 63 몰%의 아라비노오스;

5 몰% 내지 10 몰%의 람노오스;

12 몰% 내지 14 몰%의 갈락토오스;

10 몰% 내지 20 몰%의 갈락투론산; 및,

1 몰% 내지 8 몰%의 글루코오스를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

제 17 항에 있어서,

상기 추출물은 100 kDa 내지 350 kDa의 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 20

제 17 항에 있어서,

상기 추출물은 제2 활성 물질인 과립구립락촉진인자(G-CSF)와 함께 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2008년 12월 15일에 출원된 미국 가출원 번호 제61/122,586호의 이익을 주장하며, 여기에 전체로써 참조로 포함된다.

[0002] 여기에 제공되는 설명은 황기 추출물을 포함하는 조성물의 제조 및 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 혈소판 또는 거핵구 수의 감소는 혈소판 감소증으로 알려진 질환, 많은 질병뿐만 아니라 골수 기능을 억제하거나, 조혈을 억제하거나, 혈소판 수치 또는 거핵구의 감소를 유발하는 치료에서 겪는 질환이다. 예를 들어, 종양 환자는 화학 치료 또는 방사선 치료로 종종 치료받고, 출혈 및 화학치료제의 투여량을 잠재적으로 제한하는 위험성을 증가시키는 혈소판감소증을 겪는다. 혈소판감소증을 일으키는 적어도 2 가지 메커니즘이 있다 - (1) 거핵구 또는 혈소판의 생성을 감소시키는 메커니즘; 및 (2) 순환중인 혈소판을 분해 또는 제거하도록 작용하는 메커니즘.

[0004] 두 번째 메커니즘을 사용하는 질병의 예로는 특발성 혈소판감소성자반병(ITP)이 있다. ITP는 자가면역성 혈액계 질병으로써, 면역계가 공격함으로써 혈액내의 혈소판을 파괴하며, 그 결과 비정상적인 낮은 혈소판 수치를 보이는 것으로 특징지어진다. 상기 혈소판 파괴는 항혈소판자가항체의 존재로 인한 것이며, 상기 항혈소판자가항체는 환자의 혈소판에 직접적으로 대항하는 항체이다. 이러한 낮은 혈소판 수치는 쉬운 타박상, 출혈성 치은을 야기할 수 있고, 흔치 않지만 극심한 내장 출혈을 야기할 수 있다. 또한, 코, 치은, 위장 또는 요로로부터의 출혈이 일어날 수 있고, 뇌 안에서의 출혈은 드물지만 무서운 합병증이다.

[0005] 현재, ITP는 미국인 약 200,000명에게서 발생하고, 치유되었다고 알려진 것이 없다. 모든 경우 중 약 절반은 원인을 알지 못하는 "특발성"으로서 분리된다. 상기 용어 "혈소판감소증"은 혈소판의 감소를 나타내고, 상기 용어 "자반병"은 혈소판의 감소로 인하여 출혈이 일어나는 입 안과 같은 피부 및 점막 영역이 자주벗을 때는 것을 나타낸다. 상기 용어 "면역성 혈소판감소성자반병"은, 질병의 면역성 성질로 명시되고 원인이 알려진 경우 뿐만 아니라 근본원인이 알려지지 않은 경우를 포함하여, 종종 질환을 설명하기 위해 사용된다.

[0006] ITP는 약물에 의해 촉발될 수 있거나, 감염, 임신 또는 전신 홍반성 난창과 같은 면역성 장애와 관련이 있을 수 있다. 급성 ITP는 유아에게서 대부분 일어난다. 소년 및 소녀에게 동등하게 발병되고, 증상은 종종 바이러스 감염이 따른다. 어린이의 약 85 %는 1년 내에 회복되고, 재발하지 않는다. ITP가 6개월 이상 지속되면 만성으로 고려되고, 만성 ITP의 개시는 임의의 나이에 발병할 수 있다. 성인 및 여성에서 ITP 피크는 남성에 비해

2 내지 3 배 더 종종 영향을 미친다. 불행히도, 생활방식의 변화는 종종 부상으로 인한 출혈을 막기 위해 요구된다.

[0007] 일부 실시예에서, 표준 ITP 치료는 높은 투여량의 코르티코스테로이드를 사용한다. 환자는 상기 높은 투여량의 코르티코스테로이드에 반응하지만, 상기 반응은 오래가지 않고, 상기 치료는 상당한 부작용을 용인하기에 좋지 않다. 그리고, 코르티코스테로이드에 대한 부전(failure) 또는 과민증은 비장 질체의 선택을 야기할 수 있으며, 비장이 혈소판 파괴의 주요 부위이기 때문에, 추가적인 합병증을 물론 야기한다. 일부 실시예에서, 치료는 프레드니손 및/또는 IV 면역 글룰불린의 투여를 포함할 수 있다. 다른 약물, 예를 들어, 빙그리스틴, 아자티오프린(IMURAN), DANAZOL, 시클로포스파이드 및 시클로스포린이 또한 사용될 수 있다.

[0008] 당해 기술자는 비정상적으로 낮은 혈소판 수치가 화학치료제 또는 방사선 치료에서 기인한 것으로 인식할 것이다. 이러한 치료는 골수 기능을 억제하며, 거핵구의 생성을 감소시키고, 차례로 혈소판 수치를 감소시킨다는 점에서, 상술한 제 1 메커니즘을 제공한다. 이와 대조적으로, 상기 ITP의 비정상적으로 낮은 혈소판 수치는, 혈소판에 결합하는 항체의 생성을 통하여 순환으로부터 혈소판을 제거하는 제 2 메커니즘에서 기인한다. 따라서, 당해 기술자는, 순환하는 거핵구 또는 혈소판을 만드는 손상된 생물학적 과정 때문이던지 또는 ITP의 항체-매개 메커니즘 때문이던지 상관없이 혈소판감소증을 치료할 수 있는 조성물로 인식할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 황기 추출물을 포함하는 조성물을 제조하고 이를 사용하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 명세서에 제공되는 상기 사상은 황기 추출물을 포함하는 조성물의 제조 및 사용과 일반적으로 관련이 있다. 황기의 고수율 추출물을 포함하는 조성물의 일부 실시예에 있어서, 상기 추출물은 아라비노오스:갈락토오스 비율이 약 3.5:1을 초과하며; 약 5 % 내지 약 10 %의 람노오스; 약 15 % 내지 약 20 %의 갈락토오스; 약 10 % 내지 약 20 %의 갈락투론산; 및 약 10 % 내지 약 15 %의 글루코오스를 포함한다. 이러한 실시예에서, 상기 고수율 추출물은 황기로부터 조질 추출물을 분리하는 단계 및 상기 조질 추출물을 산으로 온화하게 처리하는 단계를 포함하는 제 1 과정을 통해 제조되며, 이 때 상기 온화하게 처리하는 단계는, 약 0.05 M 내지 약 0.5 M의 산을 약 15 °C 내지 약 25 °C에서 약 1 시간 내지 약 24시간 동안에 상기 조질 추출물에 가하는 단계를 포함한다. 상기 산을 가하는 온도 및 시간은 상기 아라비노오스:갈락토오스 비율, 상기 갈락토오스 함량, 상기 글루코오스 함량 및 고수율을 얻도록 선택된다. 상기 고수율은, 아라비노오스:갈락토오스 비율이 3.5:1 미만이 되도록, 20 내지 35 %의 갈락토오스 및 약 10 % 미만의 글루코오스를 얻도록 선택되는 온도 및 시간에, 상기 산을 상기 조질 추출물에 가하는 것을 포함하는 제 2 과정을 통해 제조된 황기 추출물의 수율보다 실질적으로 높다. 일부 실시예에서, 상기 산 처리에 사용된 산은 트리클로로아세트산 또는 염산이다.

[0011] 일부 실시예에서, 상기 추출물은 황기의 뿌리로부터 분리된다. 이러한 실시예에서, 상기 황기는 몽고황기 (*A.membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao) 또는 막협황기(*A. membranaceus* (Fisch.) Bge)일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 황기는 내몽골 또는 산시성 지방에서 중국인에 의해 재배되었다. 나아가, 일부 실시예에서, 상기 뿌리는 약 2 년간 황기 나무의 뿌리일 수 있다.

[0012] 상기 추출물의 조성물은 다를 수 있으며, 일부 실시예에서는, 상기 추출물은 적어도 100 kDa의 평균 분자량을 가지며, 80 중량% 이상의 탄수화물 및 2 중량% 이하의 단백질을 가지며, 아라비노오스:갈락토오스 비율이 약 4.0:1 내지 약 4.5:1이며, 수용액에서 pH가 약 4.5 내지 약 6.5의 범위를 가지며, 또는 상기의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0013] 상기 추출물을 포함하는 조성물은 조혈을 촉진하는 물질을 더 포함할 수 있거나 조혈을 촉진하는 물질과 함께 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 물질은 과립구립락촉진인자, 과립대식세포립락촉진인자, 에리스로포이에틴 및 적혈구조혈촉진단백질, 트롬보포이에틴, 인터류킨-3 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 조성물은, 조성물의 치료적 유효량(therapeutically effective amount) 및 수성 주사용 부형제를 포함하는 수성 주사용 제제일 수 있다.

[0014] 일부 실시예에서, 상기 추출물은 아라비노오스:갈락토오스 비율이 약 1.5:1 내지 약 3:1이며; 약 5 % 내지 약 15 %의 아라비노오스; 약 1.5 % 미만의 람노오스; 약 3 % 내지 약 7 %의 갈락토오스; 약 4 % 미만의

갈락투론산; 및 약 70 % 내지 약 90 %의 글루코오스를 포함한다. 이러한 실시예에서, 상기 추출물은 약 20 kDa 내지 약 60 kDa의 평균 분자량을 가지고, 수용액에서 pH가 약 4.5 내지 약 6.5의 범위를 가지며, 또는 상기의 조합을 가질 수 있다.

[0015] 또한, 본 명세서에서 제공된 상기 설명은 포유류의 조혈 시스템을 촉진하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 본 명세서에 설명된 상기 추출물을 포함하는 조성물의 유효량을 표유류에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 예에서, 상기 촉진하는 방법은 혈소판 수를 증가시키는 것, 백혈구 수를 증가시키는 것, 램프구 수를 증가시키는 것 또는 상기를 조합한 것을 포함한다.

[0016] 일부 실시예에서, 상기 방법은 제 2 활성 물질의 공동 투여를 더 포함한다. 이러한 실시예에서, 상기 제 2 활성 물질은 조혈 물질일 수 있다. 상기 제 2 활성 물질은 과립구집락촉진인자, 과립대식세포집락촉진인자, 에리스로포이에틴 및 적혈구조혈촉진단백질, 트롬보포이에틴, 인터류킨-3 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0017] 상기 포유류는 시험 목적이든 치료의 목적이든지 간에 상기 조성물이 투여되는 임의의 포유류일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 포유류는 인간이고, 일부 실시예에서는 골수부전을 앓고 있는 인간이다. 상기 골수부전은 화학 치료 또는 방사선 치료의 결과일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 사상은 상기 추출을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 황기로부터의 조질 추출물을 분리하는 단계 및 상기 조질 추출물을 산으로 온화하게 처리하는 단계를 포함한다. 상기 온화하게 처리하는 단계는 약 0.05 M 내지 약 0.5 M의 산을 약 15 °C 내지 약 25 °C에서 약 1 시간 내지 약 24시간 동안 상기 조질 추출물에 가하는 단계를 포함한다. 상기 산을 가하는 온도 및 시간은 아라비노오스:갈락토오스 비율이 약 3.5:1을 초과하며; 약 5 % 내지 약 10 %의 람노오스; 약 15 % 내지 약 20 %의 갈락토오스; 약 10 % 내지 약 20 %의 갈락투론산; 약 10 % 내지 약 15 %의 글루코오스; 및 고수율을 얻도록 선택된다. 상기 고수율은, 아라비노오스:갈락토오스 비율이 3.5:1 미만이 되도록, 20 내지 35 %의 갈락토오스 및 약 10 % 미만의 글루코오스를 얻도록 선택되는 온도 및 시간에, 상기 산을 상기 조질 추출물에 가하는 것을 포함하는 제 2 과정을 통해 제조된 황기 추출물의 수율보다 실질적으로 높다. 일부 실시예에서, 상기 아라비노오스:갈락토오스 비율은 약 4.0:1 내지 약 4.5:1, 약 3.75:1 내지 약 4.5:1, 약 3.8:1 내지 약 4.25:1의 범위 내로, 또는 상기 중 임의의 범위 내로 감소할 수 있다.

[0019] 또한, 상기 설명은 특발성 혈소판감소증반응을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에서 설명된 상기 추출물의 유효량을 특발성 혈소판감소증반응을 가진 대상에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 산으로 개질된 아라비노갈락탄 단백질 조성물은 제 2 활성 물질과 함께 투여된다. 일부 실시예에서, 상기 제 2 활성 물질은 과립구집락촉진인자, 과립대식세포집락촉진인자, 에리스로포이에틴 및 적혈구조혈촉진단백질, 트롬보포이에틴, 인터류킨-3 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 그리고, 일부 실시예에서, 상기 조성물은, 약제를 치료적 유효량 투여함으로써 포유류의 특발성 혈소판감소증반응을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다.

[0020] 상기 설명을 이해할 수 있는 능력을 가진 사람은 상기 개념이 청구항, 청구항에 의해 나열되는 본 발명, 그리고 청구항에 나열된 개념의 문헌적 이해를 훨씬 벗어나는 부가적인 실시예를 포괄할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 일부 실시예에 따른, 치사량에 가까운 방사선의 투여 후에 고수율 추출물에 대한 BALB/c 쥐의 혈소판 수준의 반응을 보여준다.

도 2는 일부 실시예에 따른, BALB/c 쥐에 미토마이신을 주입한 지 7 일경과 후에 유발된 혈소판 감소를 보여준다.

도 3은 일부 실시예에 따른, 상기 고수율 추출물의 투여 이후에 조사된 BALB/c 쥐에서 백혈구의 회복을 보여준다.

도 4는 일부 실시예에 따른, 상기 고수율 추출물 및 G-CSF가 공동으로 주입되는 경우, 조사된 BALB/c 쥐에서 혈소판 수의 회복률을 보여준다.

도 5는 일부 실시예에 따른, 상기 고수율 추출물 및 G-CSF가 공동으로 주입되는 경우, 조사된 BALB/c 쥐에서 백

혈구 수의 회복률을 보여준다.

도 6은 The American Society of Hematology(ASH) 지표에 따라 만성 특발성 혈소판감소증을 가지는 것으로 진단된 환자에 대하여, 타이완에서 실시된 임상실험의 흐름도를 도시한다.

발병을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022]

본 명세서에 제공되는 상기 설명은 황기의 추출물을 포함하는 조성물의 제조 및 사용과 일반적으로 관련이 있다. 일부 실시예에서, 상기 추출물은 골수억제증에 조혈을 촉진; IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, 또는 G-CSF의 생성을 촉진; 및 백혈구의 생성 또는 작용을 촉진; 호중구감소증, 백혈구감소증, 단핵구감소증, 빈혈 또는 혈소판감소증을 갖는 포유류의 면역 및/또는 조혈 시스템을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 상기 추출물은 가령 세포독성 물질 또는 방사선에 우연히 노출되던지 치료과정의 일부분으로 노출됨으로써 발생하는 질환을 치료하는데 사용될 수 있으며, 상기 질환은 골수부전 또는 면역반응의 결과로써 조혈 세포의 손상, 억제 또는 제거를 제한없이 포함한다. 증상은 여기에서 제공되는 치료를 통하여 개선될 수 있으며, 상기 증상은 예를 들어, 안액질, 구토, 및 마약의 금단 증상을 포함할 수 있다. 이러한 추출물의 예는 예를 들어, 미국특허 제6,991,817호 및 WO200100682에서 발견될 수 있고, 각각은 참조로 여기에 전체로서 포함된다.

[0023]

상기 추출물은 조혈 활동을 촉진하고, 이로 인하여 혈액 생성이 증가된다. 예를 들어, 상기 추출물은 혈소판 수를 증가시킬 수 있어 혈소판감소증의 치료에 효과적이며, 종양 치료중인 환자에게서 가장흔히 보이는 질환에 효과적이다. 혈소판감소증의 많은 다른 원인이 있지만, 가령 면역성 장애 및 바이러스성 장애가 있다. 면역성 장애의 예로는 ITP가 있고, 바이러스성 장애의 예로는 HIV 또는 만성 간염이 있다. 약물의 투여는 혈소판 수의 감소가 상기 약물에 대한 거부반응으로써 보여질 수 있는 혈소판감소증을 야기할 수도 있으며, 또는 골수 기능을 억제하는 약물의 결과를 야기할 수 있다. 항염증약, 심장약, 항생제는 혈소판감소증의 원인으로써 확인되었다. 비종과 같은 신체질환은 비종이 혈소판을 가두고 파괴하기 때문에 혈소판감소증을 야기할 수 있다. 낭창 및 류마티스성 질병과 같은 면역 시스템 병 역시 혈소판감소증을 야기할 수 있다.

[0024]

따라서, 상기 추출물은 예를 들어, 면역성 장애에 의해 발병했던지 골수부전에 의해 발병했던지 간에 혈소판 감소증을 치료하는데 사용될 수 있다. 상기 추출물은 백혈구의 생성을 촉진하도록 사용될 수도 있다. 본 명세서에 설명된 상기 조성물 및 방법은 조혈을 촉진하여 거핵구 및 다른 백혈구의 확산 또는 성숙을 유발한다. 본 명세서에 설명된 상기 조성물 및 방법은 혈소판, 거핵구 및 다른 백혈구의 생성, 확산 및 성숙을 촉진할 뿐만 아니라, 이들의 생성 억제된 이후 또는 질환이나 다른 치료에 의해 순환중에 파괴되거나 제거된 이후에, 이들의 회복을 촉진한다. 여기에 기술된 설명을 검토한 이후에, 당해 기술자는 청구항의 범위를 더 잘 이해할 수 있을 것이다.

[0025]

본 명세서에서 제공되는 상기 추출물은 감염 또는 면역 억제성 질환에서 면역 반응을 회복시키고, B형 간염에서 간세포를 보호하는 것을 도울 수 있다. 그리고, 상기 추출물은 더 성숙한 조혈 세포의 원시 조혈 전구체의 성장 또는 활동을 촉진할 것으로 상당히 기대될 수 있다. 나아가, 상기 추출물은 화학 치료와 같은 치료 과정 중의 효험을 향상시키는데 도움을 줄 수 있으며, 이는 환자 내에서 조혈을 촉진하거나, 치료를 자연케 하는 감염을 저해시키거나, 치료의 강도를 감소시킴으로써 감염에 대한 환자의 저항성을 강화시킴으로써 이루어진다.

[0026]

Ara:Gal의 비율이 약 1.5:1 내지 3:1이고, 약 20 내지 60 kDa의 평균분자량을 가지는 황기 추출물의 제조("정제된 추출물")

[0027]

본 설명은 황기로부터 어떻게 추출물이 분리되고 정제되는지를 설명한다. 일부 실시예에서, 상기 2년산 황기나무의 뿌리는 조성물의 좋은 공급원을 제공한다. 많은 실시예에서, 상기 뿌리는 예를 들어, 몽고황기; 막협황기; 또는 내부 몽골 또는 산시성 지방에서 중국인에 의해 재배된 황기로부터의 뿌리일 수 있다.

[0028]

황기로부터의 추출물은 살균 과정을 거친 얇게 썬 또는 절단된 말린 뿌리로부터 보통 유래된다. 상기 제조는 말린 뿌리를 다듬는 단계, 한외 여과된(UF) 물로 이를 스크럽(scrubbing)하는 단계, 그리고 70% 에탄올과 같은 살균 용액으로 이를 세척하는 단계를 포함한다. 상기 뿌리는 "드링크 칩(drink chip)"(본 명세서에서는 "클린 칩(clean chip)"으로도 사용됨)을 제조하도록, 얇은 슬라이스로 절단되고 살균 조건하에서 건조된다. 상기 추출물은 아라비노갈락탄 단백질 및 관련된 다당류로 구성되는데, 이 때 상기 관련된 다당류는 적어도 80 내지 100 °C의 온도를 가지는 수성 추출 용매를 가하는 단계를 포함하는 과정을 사용하여 드링크 칩으로부터 분리된다.

- [0029] 상기 추출 용매는 물일 수 있고, 알칼리 금속염과 같은 공-추출용제를 선택적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 알칼리 금속염은 인산이수소칼륨 또는 인산이수소나트륨을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 공-추출용제는 0.5 M KH₂PO₄(pH는 약 4.5임)일 수 있다.
- [0030] 상기 추출 용매는 시간, 온도, 그리고 상기 뿌리로부터의 추출물을 분리하기 위해 필요한 만큼의 추출 사이클 동안 상기 드링크 칩에 가해진다. 일반적인 과정은 3번의 추출 사이클을 포함하며, 각각의 사이클은 약 3 시간 동안 계속되고, 약 100 °C의 추출 용매를 가하는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 드링크 칩은 pH 4.5 및 약 100 °C에서 약 30분 동안 0.5 M KH₂PO₄와 같은, 초기의 뜨거운 수성 염 세척제로 추출된다. 일부 실시예에서, 모든 단계 이후에 상기 드링크 칩의 제조는, 실균한 장비 및 시약의 사용을 포함하는 무균 조건 하에서 수행된다.
- [0031] 이후에, 상기 추출 용매는 1 kg의 드링크 칩당 약 1 L의 농도를 달성하도록 농축되고, 이러한 농축은 약 60 °C 내지 약 70 °C에서 진공 조건하에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 농도는 한외 여과, 예를 들어 100 kDa 분자량의 차단필터를 포함하는 한외 여과기를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0032] 이후에, 상기 추출물은 상기 농축된 추출 용매로부터 저급 알칸올을 사용하여 침전될 수 있다. 예를 들어, 상기 저급 알칸올은 에탄올일 수 있다. 일부 실시예에서는, 실온에서 침전물을 생성하기 위하여, 상기 에탄올이 약 70 %농도의 에탄올이 되도록 상기 용매에 첨가될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 침전물은 첫 번째 침전 단계에서 약 35 %농도 미만의 에탄올을 최초 사용하고, 그 다음에 두 번째 단계에서 약 70 %농도를 초과하는 에탄올을 사용함으로써 이루어진다. 상기 침전물에 사용된 저급 알칸올의 농도는, 예를 들어 20 % 내지 30 %, 30 % 내지 40 %, 40 % 내지 50 %, 50 % 내지 60 %, 60 % 내지 70 %, 70 % 내지 80 %, 80 % 내지 90 %, 또는 상기 범위 내에서의 임의의 조합일 수 있다.
- [0033] 상기 알칸올 세척제는 다음 정제를 위해 반복될 수 있다. 예를 들어, 상기 침전물은 오히려 저급 알칸올로 세척될 수 있으며, 일반적인 세척은 예를 들어, 95 % 에탄올로 3 번 세척하는 것을 포함할 수 있다. 이후에, 상기 침전물은 다음 과정에 적합한 농도, 예를 들어 약 18 % 내지 약 20 %(중량/부피)와 같은 농도로 물에 떠 있다. 상기 물에 저급 알칸올을 다시 첨가함에 따른 재침전은 추가적인 수불용성 물질을 제거하기 위해 사용될 수 있다. 상등액은 상기 고농도의 저급 알칸올로 침전시킬 수 있다. 상기 고농도의 저급 알칸올은 아라비노갈락탄 단백질 및 관련된 다당류를 함유하는 조질 추출물 침전물을 생성하기 위하여, 예를 들어 40 % 내지 80 % 에탄올 및 일부 실시예에서는 60 % 내지 70 % 에탄올일 수 있다.
- [0034] 상기 조질 추출물은 물에 재용해되고 건조된다. 적절한 건조 과정은 과도한 가열을 회피하는 기술 중 하나로 알려진 임의의 과정을 포함할 수 있고, 상기 건조 과정은 예를 들어, 분무 건조, 진공 건조, 동결 건조, 임계점 건조, 용매 교환 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 조질 추출물은 물 또는 수용액에 재용해될 수 있으며, 이 때 상기 조질 추출물은 한외 여과에 적절한 농도가 된다. 일부 실시예에서, 상기 한외 여과에 적절한 농도는 약 2 %이다. 이후에, 상기 조질 추출물은 저분자량 물질을 더 제거하고 용액의 부피를 더 감소시키도록 한외 여과될 수 있으며, 이 때 상기 한외 여과 시스템은 예를 들어, 5 kDa 분자량을 차단할 수 있다.
- [0035] 일부 실시예에서, 상기 조질 추출물은 백색 내지 오프 화이트(off-white) 분말 또는 밝은 황색 분말로써 보여질 수 있고, 적어도 약 100 mg/ml로 물에 녹는다. 일부 실시예에서, 상기 분말은 적어도 약 200 mg/ml로 물에 녹는다. 상기 분말은 건조함에 따라 약 15 % 미만의 중량 손실을 보이며, 약 0.5 EU/mg 미만의 내독소 함량을 가지고, 일부 실시예에서는 0.3 EU/mg 미만의 내독소 함량을 가진다.
- [0036] 상기 조질 추출물은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 더 정제될 수 있다. 상기 조성물은 수용액에 재용해되고, 한외 여과에 적절한 농도, 일반적으로 약 2 %농도가 된다. 이후에, 상기 재용해된 조성물은 저분자량 물질을 더 제거하고 용액의 부피를 더 감소시키도록 한외 여과된다. 상기 5 kDa 분자량을 차단하는 한외 여과 시스템이 사용될 수 있다. 상기 한외 여과의 농축물은 양이온 교환 컬럼, 예를 들어 20 mM NaOAc 완충제와 pH 5.20에서 평형을 이루는 SP Sepharose 양이온 컬럼을 통하여 용출된다. 상기 양이온 교환 컬럼으로부터의 용출액은 음이온 교환 컬럼, 예를 들어 상기 동일한 NaOAc 완충제와 평형을 이루는 음이온 교환 컬럼을 통하여 용출된다.
- [0037] 상기 음이온 교환 컬럼으로부터의 용출액은 (1) 본 명세서에서 개시된 추출물의 다른 형태의 제조; (2) 상기 정제된 추출물을 제조하는데 적합한 중간체로써 유지될 수 있는 상기 조질 추출물을 형성하도록 농축 및 건조; 또는 (3) 상기 정제된 추출물을 제조하는데에 직접적으로 사용될 수 있다.

- [0038] 상기 정제된 추출물의 제조에서, 용액을 탈염화하고 다시 이의 부피를 감소시키기 위하여, 상기 조질 추출물은 $0.1 \mu\text{m}$ 필터와 같은 적절한 정제균성 필터를 통과하여 마이크로 필터링되고 한외 여과된다. 일부 실시예에서 8 kDa 분자량을 차단하는 한외 여과기가 사용될 수 있다. 상기 한외 여과로부터의 농축물은 농축되고, 상기 농축 비율은 굴절계를 사용하여 결정될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 농축물은 50 °C 내지 60 °C에서 약 20 % 내지 약 26 %농도로 농축된다. 이후에, 상기 농축된 농축물을 저급 알칸올로 침전시킨다. 일부 실시예에서, 상기 저급 알칸올은 약 80 % 내지 약 90 %농도에 첨가되는 에탄올일 수 있다. 상기 침전물은 더 세척될 수 있으며, 일반적인 세척은 침전물을 무수의 에탄올로 3 번 세척하는 것을 포함할 수 있다. 이후에, 상기 침전물은 정제된 추출물을 제공하도록 건조된다. 일부 실시예에서, 상기 침전물의 건조는 예를 들어, 약 60 °C 내지 약 70 °C에서 진공 오븐을 사용하여 이루어질 수 있다.
- [0039] 과정으로부터 얻은 추출물에서 배치(batch)에서 배치로의 변화를 감소시키기 위하여, 상기 물질은 추출 과정 중의 하나 이상의 단계에서 혼합될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 과정은 원료를 혼합하는 단계, "드링크 칩"을 혼합하는 단계, 과정 중에 다른 중간체를 혼합하는 단계, 또는 상기의 조합을 포함한다.
- [0040] 상기 정제된 추출물의 조성물은 당해 기술자에게 알려진 표준 분석 기술을 사용하여 가메탄올분해된 조성물 추출물의 트리메틸실릴 유도체를 기체-액체 크로마토그래피로 확인할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 정제된 추출물은 약 5 % 내지 약 15 %, 약 5 % 내지 약 12 %, 약 5 % 내지 약 10 %, 약 10 % 내지 약 15 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 양의 Ara; 1 % 내지 1.5 % 미만의 Rha; 약 4 % 미만의 양의 GalA; 약 3 % 내지 약 7 %, 약 3 % 내지 약 5 %, 약 4 % 내지 약 6 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 양의 Gal; 약 70 % 내지 약 90 %, 약 70 % 내지 약 85 %, 약 75 % 내지 약 80%, 약 85 % 내지 약 90 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 양의 Glc를 함유한다. 모든 %는 몰%를 나타낸다.
- [0041] 상기 정제된 추출물에서 Ara:Gal 비율은 약 1.5:1 내지 약 3:1이다. 일부 실시예에서, 상기 Ara:Gal의 비율은 약 1.5:1 내지 약 1.75:1, 약 1.75:1 내지 약 3:1, 또는 상기 범위 중 임의의 범위이다.
- [0042] 상기 정제된 추출물은 약 20 kDa 내지 약 60 kDa의 평균 분자량을 가지며, 일부 실시예에서는 약 25 kDa 내지 약 40 kDa, 약 27 kDa 내지 약 35 kDa, 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 분자량을 가진다.
- [0043] 나아가, 상기 정제된 추출물은 약 2 중량% 미만의 희분, 약 10 ppm 중량 미만의 중금속함량 그리고 약 0.1 % 미만의 히드록시프롤린 함량을 가진다. 일부 실시예에서, 상기 히드록시프롤린 함량은 약 0.05 % 미만, 약 0.03 % 미만 또는 상기 범위 중 임의의 범위이다.
- [0044] 상기 정제된 추출물은 내독소를 실질적으로 갖지 않으며, 1.0 EU/mg 미만의 내독소 함량을 가진다(Endoscopy에 의해 결정됨[Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan]). 일부 실시예에서, 상기 내독소 함량은 0.5 EU/mg 미만, 0.3 EU/mg 미만, 또는 상기 범위 중 임의의 범위이다. 그리고, 상기 정제된 추출물은 적어도 20 mg/ml로 물에 녹고, 수용액에서 pH가 약 4.5 내지 약 6.5 범위를 갖는다.
- [0045] 일부 실시예에서, 상기 추출물은 아라비노오스:갈락토오스 비율이 약 1.5:1 내지 약 3:1이며; 약 5 % 내지 약 15 %의 아라비노오스; 약 1.5 % 미만의 람노오스; 약 3 % 내지 약 7 %의 갈락토오스; 약 4 % 미만의 갈락투론산; 및 약 70 % 내지 약 90 % 글루코오스를 포함한다. 이러한 실시예에서, 상기 추출물은 약 20 kDa 내지 약 60 kDa의 평균 분자량을 갖고, 수용액에서 pH가 약 4.5 내지 약 6.5 범위이며, 또는 상기의 조합을 가질 수 있다.
- [0046] Ara:Gal의 비율이 약 2:1 내지 약 4:1이고, 약 100 kDa보다 큰 평균분자량을 가지는 황기 추출물의 제조("고분자량 추출물")
- [0047] 일반적으로 말하면, 본 예의 추출물은 상기 정제된 추출물의 고분자량형이며, 이 때 상기 추출물은 적어도 100 kDa의 평균 분자량을 가진다. 다른 이점들 중에서 특히 이러한 추출물은 더 작은 부피를 가진다. 일반적으로, 이러한 고분자량 추출물은 상기 정제된 추출물을 제조하기 위한 절차를 사용하여 제조되며, 이 때 상기 음이온 교환 컬럼으로부터의 용출액, 상기 조질 추출물 또는 상기 정제된 추출물("정제된 추출물 또는 이의 중간체")은 직접적으로 사용될 수 있다.
- [0048] 100 K 분자량을 차단하는 한외 여과 시스템은 상기 정제된 추출물 또는 이의 중간체로부터 고분자량 추출물을 제조하기 위하여 사용된다. 예를 들어, 상기 음이온 교환 컬럼으로부터의 용출액은 상기 100 K 분자량을 차단하는 한외 여과 시스템에 직접적으로 가해질 수 있으며, 상기 농축물은 농축되며, 침전되고, 선택적으로 추가

세척되고, 건조되며, 그리고 각각의 단계는 상기 정제된 추출물의 제조에서 설명된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0049] 일부 실시예에서, 상기 고분자량 추출물은 약 45 % 내지 약 75 %, 약 50 % 내지 약 75 %, 약 50 % 내지 약 65 %, 약 55 % 내지 약 60 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Ara의 양; 약 2 % 내지 약 4 %, 약 2 % 내지 약 3%, 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Rha의 양; 약 4 % 내지 약 6 %, 약 4 % 내지 약 5 %, 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Ga1A의 양; 약 8 % 내지 약 25 %, 약 10 % 내지 약 20 %, 약 12 % 내지 약 18 %, 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Ga1의 양; 약 5 % 내지 약 25 %, 약 7 % 내지 약 20 %, 약 10 % 내지 약 15 %, 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Glc의 양을 함유한다. 모든 %는 몰%를 나타낸다.

[0050] 상기 고분자량 추출물에서 Ara:Gal 비율은 약 2:1 내지 약 4:1이다. 일부 실시예에서, 상기 Ara:Gal의 비율은 약 2:1 내지 약 3.75:1, 약 2.5:1 내지 약 3.5:1, 약 2.5:1 내지 약 3:1, 약 3:1 내지 약 4:1 또는 상기 범위 중 임의의 범위이다.

[0051] 상기 고분자량 추출물은 100 kDa을 초과하는 평균 분자량을 가진다. 일부 실시예에서, 상기 고분자량 추출물은 약 100 kDa 내지 약 350 kDa의 평균 분자량을 가지며, 일부 실시예에서는 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 125 kDa 내지 약 275 kDa, 약 150 kDa 내지 약 250 kDa, 약 200 kDa 내지 약 275 kDa 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 분자량을 가진다.

[0052] 나아가, 상기 고분자량 추출물은 약 2 중량% 미만의 회분, 약 20 ppm 중량 미만의 중금속함량 그리고 약 0.2 %를 초과하는 히드록시프롤린 함량을 가지며, 일부 실시예에서 상기 히드록시프롤린 함량은 약 0.2 % 내지 약 0.3 % 범위를 가진다.

[0053] 상기 고분자량 추출물은 내독소를 실질적으로 갖지 않으며, 1.0 EU/mg 미만의 내독소 함량을 가진다(Endospeicy에 의해 결정됨[Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan]). 일부 실시예에서, 상기 내독소 함량은 0.5 EU/mg 미만, 0.3 EU/mg 미만, 또는 상기 범위 중 임의의 범위이다. 그리고, 상기 정제된 추출물은 적어도 10 mg/ml로 물에 녹고, 수용액에서 pH가 약 4.5 내지 약 6.5 범위를 갖는다.

[0054] 일부 실시예에서, 상기 고분자량 추출물은 상기 아라비노갈락탄 단백질 코어(core)를 글리코실화하는 약 95 %의 탄수화물 및 약 5 %의 단백질을 함유하며, 이 때 히드록시프롤린은 상기 총 아미노산 함량의 약 20 %를 차지한다.

[0055] Ara:Gal의 비율이 약 3.5:1 내지 약 5.0:1이고, 약 100 kDa보다 큰 평균분자량을 가지는 황기 추출물의 제조("고수율 추출물")

[0056] 산으로 개질된 추출물은 미국특허 번호 제6,991,817호에서 설명된다. 일반적으로 말하면, 본 실시예의 상기 추출물은 적어도 그들이 실질적으로 고수율 형태의 활성 추출물을 제공한다는 이유만으로도 진척이 있다. 일부 실시예에서, 상기 고수율 추출물은 일반적으로 상기 고분자량 추출물을 제조하는 절차를 사용하여 제조될 수 있고, 상기 절차는 본 실시예에 의해 개시된 온화한 산 처리를 포함한다.

[0057] 상기 과정은 상기 조질 추출물을 분리하는 단계 및 상기 조질 추출물을 산으로 온화한 조건에서 처리하는 단계를 포함하며, 상기 온화한 조건에서 처리하는 단계는 상기 산을 약 0.05 M 내지 약 0.5 M, 약 0.01 M 내지 약 1.0 M, 약 0.05 M 내지 약 0.1 M 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 농도로 상기 조질 추출물에 가하는 단계를 포함한다. 상기 과정은 약 15 °C 내지 약 25 °C의 처리 온도 및 약 1 시간 내지 약 24 시간의 처리 시간을 사용한다. 일부 실시예에서, 처리는 24 시간을 초과하여 바람직한 가수분해 기술의 작용에 필요한 시간의 기간으로 증가 될 수 있다. 상기 산을 가하는 온도 및 시간은, 아라비노오스:갈락토오스 비율이 3.5:1을 초과하며, 약 15 % 내지 약 20 %의 갈락토오스 함량, 약 10 % 내지 약 15 %의 글루코오스 함량과 같은 다른 조성의 특징, 및 상기 고수율을 얻도록 선택된다.

[0058] 상기 수율은, 3.5:1 미만의 아라비노오스:갈락토오스 비율, 20 내지 35 %의 갈락토오스 및 10 % 미만의 글루코오스를 함유하도록 선택되는 온도 및 시간에 산을 상기 조질 추출물에 가하는 것을 포함하는, 상이한 과정을 사용하여 제조된 황기 추출물의 수율보다 실질적으로 크다. 상기 고수율 추출물의 수율은 3 % 내지 30 %, 5 % 내지 25 %, 10 % 내지 20 %, 10 % 내지 15 %, 15 % 내지 20 %, 20 % 내지 30 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위만큼 더 높을 수 있다. 상기 고수율 추출물은 아라비노오스:갈락토오스 비율이 약 3.5:1 내지 약 5.0:1이 되도록

제조되고, 본 명세서에 설명된 다른 추출물 제조 과정을 사용하여 얻어진 수율보다 큰 수율을 얻으며, 이 때 상기 제조 과정은 3.5:1 이하의 아라비노오스:갈락토오스 비율을 가지는 추출물을 제조하는 과정이다.

[0059] 예를 들어, 상기 온화한 산 처리는, 원하는 정제 및 고수율을 달성하기 위해 충분한 가수분해를 보장함과 동시에 다당류 쇄를 보존하도록 선택된다. 일부 실시예에서, 상기 산은 미네랄 산, 유기산, 또는 상기의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 산은 트리클로로아세트산, 염산 또는 상기의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 산은 봉산, 인산, 불산 또는 상기의 조합을 포함한다.

[0060] 일부 실시예에서, 상기 온화한 산 처리는 약 0.01 M 내지 약 0.5 M의 염산을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 염산은 과염소산, 요오드산, 브롬산, 황산, 질산 또는 이의 조합으로 대체될 수 있거나, 함께 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 산은 이염화아세트산, 말레산, 옥살산, 살리실산, 삼염화아세트산, 메탄설폰산, 삼불화아세트산, 벤젠황산 또는 상기의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 유기산을 포함한다. 당해 기술자는 적절한 농도 및 조건을 손쉽게 선택할 수 있다.

[0061] 일부 실시예에서, 상기 산 농도는 약 1.0 M 이하, 약 0.5 M 이하, 약 0.3 M 이하, 약 0.2 M 이하, 약 0.1 M 이하, 약 0.05 M 이하, 약 0.01 M 이하, 또는 상기 범위 중 임의의 범위일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 산 농도는 약 0.1 M 내지 약 0.5 M, 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 약 0.2 M 내지 약 0.3 M 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 농도일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 반응 시간은 약 0.5 시간 내지 약 10 시간, 약 1 시간 내지 약 8시간, 약 2 시간 내지 약 7 시간, 약 2 시간 내지 약 5 시간, 약 2 시간 내지 약 3 시간 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 시간일 수 있다.

[0062] 이후에, 상기 고수율 추출물은 상술한 한외 여과기 및 이온 교환 절차를 사용하여 더 정제될 수 있다. 상기 추가적인 정제는 더 많은 염 및 저분자량 물질을 제거할 뿐만 아니라, 용액의 부피도 감소시킨다.

[0063] 일부 실시예에서, 상기 고수율 추출물은 약 35 % 내지 약 65 %, 약 50 % 내지 약 65 %, 약 50 % 내지 약 60 %, 약 40 % 내지 약 60 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Ara의 양; 약 5 % 내지 약 10 %, 약 5 % 내지 약 8 %, 약 6 % 내지 약 9 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Rha의 양; 약 10 % 내지 약 20 %, 약 10 % 내지 약 18 %, 약 12 % 내지 약 16 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 GalA의 양; 약 15 % 내지 약 25 %, 약 15 % 내지 약 20 %, 약 18 % 내지 약 21 %, 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Gal의 양; 약 10 % 미만, 약 1 % 내지 약 8 %, 약 2 % 내지 약 6 % 또는 상기 범위 중 임의의 범위에 해당하는 Glc의 양을 함유한다. 모든 %는 몰%를 나타낸다.

[0064] 상기 고수율 추출물에서 Ara:Gal 비율은 약 3.5:1 보다 크다. 일부 실시예에서, 상기 Ara:Gal의 비율은 약 3.5:1 내지 약 4.5:1, 약 4.0:1 내지 약 4.5:1, 약 3.5:1 내지 약 4:1, 약 3.75:1 내지 약 4.5:1 또는 상기 범위 중 임의의 범위이다.

[0065] 상기 고수율 추출물은 100 kDa을 초과하는 평균 분자량을 가진다. 일부 실시예에서, 상기 고수율 추출물은 약 100 kDa 내지 약 350 kDa의 평균 분자량을 가지며, 일부 실시예에서는 약 kDa 100 내지 약 300 kDa, 약 125 kDa 내지 약 275 kDa, 약 150 kDa 내지 약 250 kDa, 약 200 kDa 내지 약 275 kDa 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 평균 분자량을 가진다.

[0066] 나아가, 상기 고수율 추출물은 약 2 중량% 미만의 회분, 약 20 ppm 중량 미만의 중금속함량 그리고 약 1.0 % 미만의 히드록시프롤린 함량을 가진다.

[0067] 상기 고수율 추출물은 내독소를 실질적으로 갖지 않으며, 1.0 EU/mg 미만의 내독소 함량을 가진다(Endospecey에 의해 결정됨[Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan]). 일부 실시예에서, 상기 내독소 함량은 0.5 EU/mg 미만, 0.3 EU/mg 미만, 또는 상기 범위 중 임의의 범위이다. 그리고, 상기 정제된 추출물은 적어도 10 mg/ml로 물에 녹고, 수용액에서 pH가 약 4.5 내지 약 6.5 범위를 갖는다.

[0068] 글리칸은 추출물의 약 80 %를 단백질로 포함하며, 나머지는 가능한 한 소량의 지방을 포함한다. 일부 실시예에서, 플루란 크기에 관하여, 약 350 kDa의 최대 분자량을 가지는 상기 추출물의 일부분은 고분자량을 나타내는 반면에, 약 75 kDa의 최대 분자량을 가지는 상기 추출물의 일부분은 저분자량을 나타낸다. 상기 고분자량을 가지는 부분의 평균 분자량은 약 260 kDa일 수 있고, 상기 저분자량을 가지는 부분은 약 120 kDa일 수 있다. 예를 들어, 상기 다분산도는 약 1 내지 약 5, 약 1.5 내지 약 3.5 또는 상기 범위 중의 임의의 범위일 수 있다.

[0069] 일부 실시예에서, 상기 추출물은 아라비노오스:갈락토오스 비율이 약 3.5:1을 초과하며; 약 5 % 내지 약 10 %의

람노오스; 약 15 % 내지 약 20 %의 갈락토오스; 약 10 % 내지 약 20 %의 갈락투론산; 및 약 10 % 내지 약 15 %의 글루코오스를 포함한다.

[0070] 당해 기술자는, 동일하거나 유사한 결과를 얻도록 상기 추출물의 제조에 제공되는 단계의 순서가 변경될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 실시예에서, 상기 이온 교환 크로마토그래피는 상기 동일하거나 유사한 이온 교환 수지를 사용하여 배치 방식으로 이루어질 수 있다. 상기 분리된 음이온 및 양이온 수지의 사용은 음이온 및 양이온 교환 기능을 둘 다 가지는 혼상식(mixed-bed) 수지의 사용으로 대체될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 이온 교환 정제는 온화한 산 치료 이전 또는 이후를 포함하는 과정 중의 다양한 지점에서 일어날 수 있으며, 그리고 한외 여과기 막에서 분자량을 차단하는 크기의 선택은 달라질 수 있다.

[0071] 본 명세서에서 설명하는 임의의 추출물을 포함하는 상기 조성물은 조혈을 촉진하는 물질을 포함하거나, 조혈을 촉진하는 물질과 함께 투여된다. 일부 실시예에서, 상기 물질은 과립구집락촉진인자, 과립대식세포집락촉진인자, 에리스로포이에틴 및 적혈구조혈촉진단백질, 트롬보포이에틴, 인터류킨-3 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 조성물은 조성물의 치료에 효과적인 양 및 수성 주사용 부형제를 포함하는 수성 주사용 제제일 수 있다.

투여의 용도 및 방법

[0072] 상기 조성물은 질병의 치료에서 치료적 및/또는 예방적 효과를 제공할 수 있거나, 피험자의 질병 중 하나 이상의 증상을 개선할 수 있다. 상기 용어 "피험자" 및 "환자"는 대체하여 사용되고, 예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 쥐, 생쥐와 같은 비영장류; 및 예를 들어, 원숭이 또는 인간과 같은 영장류를 포함하지만 이에 제한되지 않는 포유류와 같은 동물을 나타낸다.

[0073] 본 명세서에 제공되는 상기 조성물은 본 명세서에서 설명되는 다양한 치료를 위해 투여될 수 있으며, 상기 다양한 치료는 예를 들어, 조혈의 촉진; 거핵구의 확산 또는 성숙을 유도; IL-1- β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF 또는 G-CSF의 생성을 촉진; 백혈구, 중성구의 생성 또는 작용을 촉진; 및 호중구감소증, 백혈구감소증, 단핵구감소증, 빈혈증 또는 혈소판감소증을 치료하는 것을 포함한다. 또한, 상기 조성물은 세포 독성 물질 또는 방사선에 노출로부터의 회복을 가속하도록 도울 수 있으며, 상기 노출은 우연한 노출 또는 비치료적인 노출뿐만 아니라 치료적 노출을 포함한다.

[0074] 또한, 본 명세서에서 제공되는 설명은 포유류의 조혈 시스템을 촉진하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 본 명세서에서 설명된 상기 추출물을 포함하는 조성물의 유효량을 상기 포유류에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 촉진하는 방법은 혈소판 수치를 증가시키는 것, 백혈구 수치를 증가시키는 것, 림프구 수치를 증가시키는 것 또는 상기의 조합을 포함한다.

[0075] 일부 실시예에서, 상기 방법은 제 2 활성 물질의 공동 투여를 더 포함한다. 이러한 실시예에서, 상기 제 2 활성 물질은 조혈 물질일 수 있다. 상기 제 2 활성 물질은 과립구집락촉진인자, 과립대식세포집락촉진인자, 에리스로포이에틴 및 적혈구조혈촉진단백질, 트롬보포이에틴, 인터류킨-3 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0076] 많은 실시예에서, 상기 포유류는 시험의 목적이든지 치료상의 목적이든지 간에 상기 조성물이 투여되는 임의의 포유류일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 포유류는 인간이고, 일부 실시예에서는 골수부전을 앓는 인간이다. 상기 골수부전은 화학 치료 또는 방사선 치료의 결과일 수 있다.

[0077] 또한, 상기 설명은 특발성 혈소판감소성자반병을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 특발성 혈소판감소성자반병을 가지는 피험자에게 본 명세서에 설명된 상기 추출물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 산으로 개질된 아라비노갈락탄 단백질 조성물은 제 2 활성물질과 함께 투여된다. 일부 실시예에서, 제 2 활성물질은 과립구집락촉진인자, 과립대식세포집락촉진인자, 에리스로포이에틴 및 적혈구조혈촉진단백질, 트롬보포이에틴, 인터류킨-3 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0078] 또한, 상기 설명은 질병의 예방, 치료에 치료적 및/또는 예방적인 양, 및/또는 질병의 증상을 개선하는 양의 추출물을 포함하는 약학 조성물을 포함한다.

[0079] 상기 조성물에 사용되는 추출물의 양은 질병의 유형, 피험자의 나이, 성별 및 무게와 같은 인자에 따라 변화될 수 있다. 투여 요법은 치료 반응을 최적화하도록 조정될 수 있다. 일부 실시예에서, 치료적 상황의 긴박함 및 당해 기술자에게 알려진 인자로 나타낸 것에 따라, 단일의 일 회분이 투여되거나; 여러번으로 나눠진 투여량이

시간에 따라 투여되거나; 상기 투여량은 비례하여 감소 또는 증가되거나; 또는 상기의 임의의 조합으로 투여될 수 있다. 투여량 값은 완화시키기 위한 질환의 극심함에 따라 변할 수 있다고 잘 알려져 있다. 투여 요법은 개개의 필요 및 상기 조성물의 투여를 관리 또는 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간에 따라 조정될 수 있고, 본 명세서에서 제시되는 투여량 범위는 오직 예시적인 것으로, 개업 약사에 의해 선택될 수 있는 투여 범위를 제한하지 않는다.

[0081] 상기 용어 "투여" 또는 "투여하는 것"는 질병의 증상을 진단, 예방, 치료, 또는 개선하기 위해 생체내 시험 또는 생체 밖 시험 중 어느 하나의 방법으로 피험자의 세포 또는 조직에 조성물을 내포시키는 방법을 나타낸다. 일 예로, 상기 화합물은 생체내 시험으로 비경구적으로 피험자에게 투여될 수 있다. 또 다른 예로, 화합물은 조성물의 유용성 및 효험을 확인하기 위한 분석을 포함하지만 이에 제한되지 않는 목적을 위해 탈체한 피험자로부터의 세포 조직과 화합물을 혼합함으로써 피험자에게 투여될 수 있다. 상기 화합물이 하나 또는 활성 물질과 함께 피험자에 내포되는 경우, 상기 용어 "투여" 또는 "투여하는 것"은 상술한 임의의 물질과 같은 다른 물질과 상기 화합물의 순차적 또는 동시적인 내포를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 의도된 투여경로에 알맞도록 제형화된다. 투여경로의 예로는 비경구, 가령 예를 들어, 정맥 주사, 피내 주사, 근육 주사 그리고 피하 주사; 경구; 흡입; 비강; 경피; 경점막; 및 직장 투여를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0082] 본 발명의 조성물의 "유효량"은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량을 기술하는데 사용될 수 있다. 또한, 유효량은 질병의 증상을 개선하는 양일 수 있다. "치료적 유효량"은 원하는 치료효과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 기간에 효과적인 양을 나타내고, 또한, 원하는 효과에 이르게 하는 치료 계획의 일부분일 수 있고, 연구원, 수의사, 의사 또는 다른 임상의에 의해 추구되는, 조직 시스템 또는 피험자에게서 임의의 생물학적 또는 약효가 있는 반응을 이끌어내는 활성 화합물, 프로-드러그(pro-drug) 또는 약제의 양을 나타낼 수도 있다. 일부 실시예에서, 상기 치료적 유효량은, 장애 중 하나 이상의 증상의 개선, 장애의 발전의 예방, 또는 장애의 퇴행을 야기하기에 충분한 양이 투여되는 것이 요구될 수 있다. 일 예에서, 염증에 의해 특징지어진 염증성 장애 또는 자가 면역성 장애의 치료에서, 치료에 효과적인 양은 상기 조성물의 원하는 기작의 적어도 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % 또는 100 %의 측정가능한 반응을 제공하는 치료제의 양을 나타내는 것이 바람직하다. 상기 용어 "치료"는 본 명세서에 설명된 하나 이상의 치료제 또는 예방제를 투여하는 것을 나타낸다.

[0083] "예방적 유효량"은, 극심한 혈소판 또는 백혈구 수치의 감소를 방지하거나 억제하며, 또는 최악의 감소를 줄이는 것과 같이 원하는 예방의 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 기간에 효과적인 양을 나타낸다. 일반적으로, 예방적 유효량은, 질병의 개시 또는 질병의 증상을 방지하거나 억제하도록 질병의 개시 이전 또는 질병의 개시의 초기단계에 피험자에 사용된다. 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적거나 크거나 동등할 수 있다.

[0084] 일부 실시예에서, 상기 투여는 구강 투여일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 투여는 피하 주사일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 투여는 살균한 등장성 수성 완충제를 사용하는 정맥 주사일 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 투여는 가용화제 및 주입 부위에 불편함을 완화하는 리그노카인과 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 투여는 예를 들어, 투여의 용이함 및 일률성을 얻기 위해 비경구적일 수 있다.

[0085] 상기 화합물은 투여량 단위로 투여될 수 있다. 상기 용어 "투여량 단위"는 단일의 투여량으로써 피험자에게 투여될 수 있는 화합물의 별개의 기결정된 양을 나타낸다. 활성 화합물의 기결정된 양은 원하는 치료효과를 가져오도록 선택될 수 있고, 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여될 수 있다. 각각의 단위 투여량에서 상기 기결정된 양은 (a) 활성 화합물의 고유의 특징 및 달성하려고 하는 특정한 치료 효과, 및 (b) 이러한 투여량 단위를 생성하고 투여하는 기술에 내재하는 제한을 포함하지만 이에 제한되지 않는 인자에 의존할 수 있다.

[0086] "약학적으로 허용가능한 담체"는 상기 조성물과 함께 투여되는 희석제, 보강제, 첨가제 또는 부형제이다. 담체는 state 또는 federal regulatory agency에 의해 승인되거나 U.S Pharmacopeial convention 명단에 올라간 이후에 약학적으로 허용가능 하거나, 피험자에게 사용하기 위한 다른 일반적으로 알려진 공급원이다.

[0087] 상기 약학적 담체는 모든 생리학적으로 양립가능한 용매, 분산매, 코팅, 항박테리아제 및 항균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적 담체의 예는 물과 같은 살균액, 오일 및 인지질 및 당지질과 같은 지방을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 살균액은 석유, 동물, 식물 또는 땅콩 오일, 콩기름, 미네랄 오일, 참기름 등과 같은 합성 유래로부터 유래된 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 물은 정맥내 투여를 위한 담체로서 바람직할 수 있다. 또한, 식염수, 수성 텍스트로오스 및 글리세롤 용액은 액체 담체일 수 있고, 특히 주사액에서 그러하다.

- [0088] 적합한 약학적 부형제는 녹말, 당, 비활성 폴리머, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 엿기름, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 조성물은 소량의 습윤제, 유화제, pH 완충제 또는 상기의 조합을 함유한다. 상기 조성물은 용액, 혼탁액, 에멀션, 정제, 환약, 캡슐, 분말, 서방성 제제 등의 형태를 가질 수 있다. 구강 제제는 약학 등급의 만니톨, 락토오스, 녹말, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 스테아레이트, 셀룰로오스, 탄산마그네슘 등과 같은 표준형 담체를 포함할 수 있다 (Martin, E.W. Remington's Pharmaceutical Sciences 참조). 또한, 보조 활성 화합물은 상기 조성물에 포함될 수 있다.
- [0089] 일부 실시예에서, 상기 담체는 비경구 투여에 적합하다. 다른 실시예에서, 상기 담체는 정맥내의, 복강내의, 근육내의, 혀밀의 또는 구강 투여에 적합할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다.
- [0090] 비경구 투여용 약학 제제는 리포솜을 포함할 수 있다. 리포솜 및 에멀션은 소수성 약물에 특히 유용한 전달용 부형제 또는 담체이다. 치료용 시약의 생물학적 안정도에 따라서, 단백질 안정화를 위한 추가적인 계획이 사용된다. 뿐만 아니라, 예를 들어, 목표 특이형체로 코팅된 리포솜과 같이 목표가 된 약물 전달 시스템에 약물을 투여할 수 있다. 상기 리포솜은 목표 단백질에 결합 될 것이고, 세포 발현에 의해 선별적으로 목표 단백질을 차지할 것이다.
- [0091] 치료용 조성물은 살균되어야 하고 제조 및 저장 조건하에서 안정해야만 한다. 상기 조성물은 용액, 마이크로 에멀션, 리포솜으로 제형화되거나 고농도의 약물에 적합한 다른 정돈된 구조로 제형화 될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 담체는 물; 에탄올; 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 폴리올; 및 상기의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 분산에 요구되는 입자의 크기를 유지하는 레시틴으로 코팅하는 방식 그리고 계면 활성제를 사용하는 방식과 같은 다양한 방식으로 유지될 수 있다.
- [0092] 일부 실시예에서, 등장화제로, 가령 예를 들어, 당; 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 및 상기의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 폴리알콜; 및 염화 나트륨이 사용될 수 있다. 지속된 흡수 특징은, 모노스테아레이트 염, 젤라틴 및 지효성 폴리머와 같은 흡수를 지연하는 물질을 포함시킴으로써 조성물에 도입될 수 있다. 담체는 속효성에 대하여 활성 화합물을 보호하기 위해 사용될 수 있고, 이러한 담체는 이식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템에 방출 제어형 제제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 생분해성 및 생체적합성 폴리머로, 가령 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산, 폴리카프로락톤, 폴리글리콜릭 공-폴리머(PLG) 등과 같은 것이 사용될 수 있다. 이러한 제제는 일반적으로 당해 기술자에게 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0093] 상기 화합물은 혼탁액, 가령 예를 들어, 주입용 유성(oily) 혼탁액으로써 투여될 수 있다. 친유성(lipophilic) 용매 또는 부형제는 지방오일, 가령 예를 들어, 참기름; 에틸 올레산 또는 트리글리세라이드와 같은 합성 지방산 에스테르; 및 리포솜을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 주입에 사용될 수 있는 혼탁액은 혼탁액의 점도를 증가시키는 물질, 가령 예를 들어, 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은 물질을 함유할 수 있다. 선택적으로, 혼탁액은 안정화제 또는 화합물의 용해도를 증가시키는 물질을 함유하여서 고농도 용액을 제조할 수 있게 한다.
- [0094] 일 실시예에서, 살균한 주사용 용액(sterile and injectable solution)은 요구되는 상술한 추가성분 중 하나 또는 임의의 조합을 포함하는 용매에 활성 화합물의 유효량을 포함시키고, 이를 여과한 후에 용액을 멸균함으로써 제조될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 분산제는 활성 화합물을 분산 매질 및 요구되는 상술한 추가성분 중 하나 또는 임의의 조합을 함유하는 살균한 부형제에 포함시킴으로써 제조될 수 있다. 살균한 분말은 활성 성분 및 임의의 요구되는 추가성분으로 구성될 수 있는 분말을 산출하도록, 진공 건조, 동결 건조 또는 이의 조합에 의해 살균한 주사용 용액에 사용하기 위해 제조될 수 있다. 나아가, 상기 추가성분은 별도로 제조된 살균한 여과된 용액으로부터의 추가성분일 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 추출물은 상기 추출물의 용해도를 향상시키는 하나 이상의 추가 화합물과 함께 제조될 수 있다.
- [0095] 일부 실시예에서, 상기 화합물은 적절한 분사제, 가령 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로 메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 상기의 조합을 포함할 수도 있는 연무제 또는 분무기를 통하여 흡입함으로써 투여될 수 있다. 일 예에서, 가압 연무제에 대한 투여량 단위는 미터링 밸브를 통하여 전달될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 예를 들어, 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 흡입기에 사용될 수 있고, 적절한 분

말 재료 예를 들어, 녹말 또는 락토오스를 포함하는 화합물의 분말화 된 혼합 가루를 함유하도록 제형화 될 수 있다.

- [0096] 일부 실시예에서, 화합물의 치료적 또는 예방적 유효량은 약 0.001 nM 내지 약 0.10 M; 약 0.001 nM 내지 약 0.5 M; 약 0.01 nM 내지 약 150 μ M; 약 0.01 nM 내지 약 500 μ M; 약 0.01 nM 내지 약 1000 μ M, 또는 상기 범위 중 임의의 범위일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 조성물은 약 0.001 mg/kg 내지 약 500 mg/kg; 약 0.005 mg/kg 내지 약 400 mg/kg; 약 0.01 mg/kg 내지 약 300 mg/kg; 약 0.01 mg/kg 내지 약 250 mg/kg; 약 0.1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg; 약 0.2 mg/kg 내지 약 150 mg/kg; 약 0.4 mg/kg 내지 약 120 mg/kg; 약 0.15 mg/kg 내지 약 100 mg/kg; 약 0.15 mg/kg 내지 약 50 mg/kg; 약 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 양이 투여될 수 있으며, 이 때 인간 피험자는 평균 약 70 kg으로 추정된다.
- [0097] 본 발명은 하나 이상의 물질을 투여하기 위한 서방성 제제를 아우른다. 일부 실시예에서, 상기 서방성 제제는 피험자에게 투여하는 물질의 투여량 및/또는 횟수를 줄일 수 있다.
- [0098] 일부 실시예에서, 평균 체중을 갖는 인간에게 본 발명의 추출물의 유효량의 범위는 약 10 mg/day 내지 약 1000 mg/day, 약 50 mg/day 내지 약 500 mg/day, 약 100 mg/day 내지 약 250 mg/day, 또는 상기 범위 중 임의의 범위일 수 있다. 약액질, 구토 또는 약물 금단 증상의 치료, 또는 생물학적 반응의 변형 또는 B 형 간염에서 간세포의 보호를 위해, 비슷한 양이 치료적으로 효과적이다. 당해 기술 및 이 공개문헌을 통하여, 주어진 질병에 대하여 당해 기술자는 과도한 실험 없이 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 결정할 수 있을 것이다.
- [0099] 상기 조성물은 약학 제제로써 주사에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 제제는 수성 주사용 부형제와 함께 추출물을 포함할 수 있다. 적합한 수성 주사용 부형제의 예 및 제제를 제형화하는 방법은 당해 기술자에게 잘 알려져 있고, 상기 방법은 일반적인 참조문헌[Alfonso AR, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton Pa., 1985]에서 알 수 있다. 적합한 수성 주사용 부형제로는 물, 수성 식염수, 수성 텍스트로오스 용액 등이 있고, 산으로 개질된 아라비노갈락坦 단백질 조성을 위한 용해 개선제(예를 들어, 3~10 % 만니톨 또는 다른 당, 3~10 % 글리신 또는 다른 아미노산)를 선택적으로 함유할 수 있다.
- [0100] 일반적으로, 조혈제로써 투여되는 경우, 상기 추출물은 피하주사, 근육주사, 복강주사 또는 정맥주사로 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 정맥 투여가 사용되고, 약 15분과 같은 짧은 시간 내지 긴 시간 동안 지속적인 정맥 주입이 가능할 수 있다. 상기 투여량은 제제의 유형, 단위 투여량의 크기, 부형제의 종류, 및 당해 기술자에게 잘 알려진 다른 인자에 따라 폭넓게 변할 수 있다. 예를 들어, 상기 제제는 약 0.001 %(w/w) 내지 약 10 %(w/w), 약 0.01 %(w/w) 내지 약 1 %(w/w), 약 0.1 %(w/w) 내지 약 0.8 %(w/w), 또는 상기 범위 중 임의의 범위를 포함할 수 있으며, 부형제 또는 부형제들을 잔류물로 함께 포함한다.
- [0101] 일부 실시예에서, 상기 추출물은 질병 상태를 치료하기 위한 다른 치료제 중 적어도 하나, 특히 조혈을 촉진할 수 있는 또 다른 치료제, 예를 들어 에리스로포이에틴, 트롬보포이에틴, 과립구집락촉진인자(G-CSF), IL-3 등과 함께 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 추출물의 치료적 또는 예방적 유효량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 500 mg/kg; 약 0.005 mg/kg 내지 약 400 mg/kg; 약 0.01 mg/kg 내지 약 300 mg/kg; 약 0.01 mg/kg 내지 약 250 mg/kg; 약 0.1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg; 약 0.2 mg/kg 내지 약 150 mg/kg; 약 0.4 mg/kg 내지 약 120 mg/kg; 약 0.15 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.25 mg/kg 내지 약 75 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 50 mg/kg 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 양이 투여될 수 있으며, 상기 인간 피험자는 평균 약 70 kg으로 추정된다.
- [0102] 상기 추출물은 서로 함께 또는 다른 물질과 함께 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 물질은 약 15 분, 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간, 48 시간 또는 1 주마다 변화되는 시점에 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 물질 중 적어도 하나는 조혈 시스템을 촉진하는 물질이다. 일부 실시예에서, 상기 물질은 항증식성 물질, 항종양성 물질, 세포분열저지 물질, 항염증 물질, 항혈소판 물질(antiplatelets), 항응혈제, 항피브린 물질(antifibrins), 항트롬빈 물질, 항생물질, 항알레르기 물질, 항산화 물질, 및 임의의 프로-드러그, 공용약물(codrugs), 대사물질, 유사체, 동족체, 동종체, 유도체, 염 및 상기의 조합을 포함할 수 있다.
- [0103] 본 명세서에서 설명한 상기 추출물은, 예를 들어 치료적 유효량이 투여되는 조혈제와 함께 투여될 수 있다. 조혈제는 조혈을 촉진하는 분자이다. 조혈제의 예는 과립구집락촉진인자(G-CSF), 과립대식세포집락촉진인자(GM-CSF), 에리스로포이에틴 및 적혈구조혈촉진단백질, 트롬보포이에틴, 인터류킨-3 및 이의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. G-CSF의 예는 필그라스팀(filgrastim)(NEUPOGEN), PEGFILGRASTIM과 같은 필그라스팀의

유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. GM-CSF의 예는 사그라모스팀(sagramostim)(LEUKINE)을 포함한다. 에리스로포이에틴의 예로는 에포에틴알파(epoetin alfa)(EPREX)가 있다. 적혈구조혈촉진단백질의 예로는 다베포에틴알파(darbepoetin alfa)(NESP, ARANESP)가 있다.

[0104] 상기 조혈제는 본 명세서에서 설명된 상기 추출물과 함께 투여될 수 있고, 예를 들어, 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 12 시간, 18 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일, 10 일, 2 주, 3 주, 4 주, 6 주, 3 달, 6 달, 1 년, 상기의 임의의 조합, 또는 당해 기술자에 의해 필요하다고 여겨지는 임의의 시간 동안 투여될 수 있다. 상기 물질은 피험자에게 부수적으로, 순차적으로 또는 주기적으로 투여될 수 있다. 순환 치료는 기결정된 기간 동안 첫 번째 물질을 투여하는 단계, 두 번째로 기결정된 기간 동안 두 번째 물질을 투여하는 단계, 그리고 모든 목적, 가령 예를 들어, 치료의 효험을 향상시키기 위해 상기 순환을 반복하는 단계를 포함한다. 또한, 상기 물질은 동시에 투여될 수 있다. 상기 용어 "동시에"는 정확히 같은 시점에 약물을 투여하는 것에 제한되지 않고, 상기 물질이 추가적인 이점을 제공하도록 함께 작용할 수 있도록, 오히려 상기 물질이 시퀀스 및 시간 간격을 두고 투여될 수 있는 것을 의미한다. 각각의 물질은 상기 물질 또는 물질들을 투여하는 임의의 적절한 방식을 사용하여 임의의 적당한 형태로 각각 또는 함께 투여될 수 있다.

[0105] 일부 실시예에서, G-CSF는 당해 기술자에 의해 효과적이라고 알려진 투여의 임의의 양, 시간 및 방법을 사용하여 본 명세서에서 설명된 추출물과 함께 투여된다. 상기 G-CSF는 NEUPOGEN일 수 있으며, 예를 들어, 약 0.1 μg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 0.5 μg/kg내지 약 500 μg/kg, 약 1 μg/kg내지 약 250 μg/kg, 약 1 μg/kg내지 약 100 μg/kg, 약 1 μg/kg내지 약 50 μg/kg, 또는 상기 범위 중 임의의 범위의 양이 투여될 수 있다.

제조품

[0106] 본 발명은 완성된, 포장된 그리고 라벨을 붙인 의약품을 아우르는 제조품으로 제공된다. 상기 제조품은 적합한 단위 제형을 적합한 그릇 또는 용기, 가령 예를 들어, 관병 또는 용봉한 다른 용기에 포함한다. 비경구 투여에 적합한 제형의 경우, 상기 활성 성분, 예를 들어 본 명세서에서 설명된 추출물을 포함하는 하나 이상의 물질은 살균하여 미립자가 없는 용액으로써 투여하기에 적합하다. 다시 말하면, 본 발명은 비경구 용액 및 냉동 건조된 분말을 모두 아우르며, 각각은 살균되고, 상기 냉동 건조된 분말은 주입 전에 복원하기에 적합하다. 대안적으로, 상기 단위 제형은 구강, 경피 또는 점막 전달에 적합한 고체일 수 있다.

[0107] 일부 실시예에서, 상기 단위 제형은 정맥 내로, 근육 내로, 국부적으로 또는 피하로 전달하기에 적합하다. 따라서, 본 발명은 살균하는 것이 바람직하고, 각각의 전달 경로에 적합한 용액을 아우른다. 상기 물질 및 전달된 양의 농도는 본 명세서에서 개시된 것을 포함한다.

[0108] 임의의 의약품에 관하여, 상기 포장되는 물질 및 용기는 저장 및 수송 과정에 의약품의 안정성을 지키도록 설계된다. 부가적으로, 상기 제조품은 사용자, 가령 예를 들어, 의사, 기술자 또는 환자에게 관련 질병의 예방, 치료학적 또는 개선 치료를 위한 조성물의 올바른 투여에 관한 사용설명 또는 다른 정보 자료를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 설명서는 실제 투여량 및 모니터링 절차를 포함하지만 이에 제한되지 않는 투여량 요법을 명시하거나 제안한다.

[0109] 다른 실시예에서, 상기 설명서는 상기 조성물의 투여가 예를 들어, 아나필락시스(anaphylaxis)와 같은 알레르기 반응에 제한되지 않고 포함하는 거부 반응을 초래할 수 있다는 것을 명시하는 정보 자료를 포함할 수 있다. 상기 정보 자료는 알레르기 반응이 가벼운 소양성의 발진으로만 보이거나 극심한 소양성 발진으로 보일 수 있고, 홍피증, 맥관염, 아나필락시스, 스티븐스존슨증후군 등을 포함할 수 있다. 상기 정보 자료는 아나필락시스가 치명적일 수 있고 임의의 외부 단백질이 신체 내부로 주입될 때 일어날 수 있다는 것을 명시한다. 상기 정보 자료는 이러한 알레르기 반응이 두드러기 또는 홍진으로 나타날 수 있고, 치명적인 침투성 반응으로 발전 될 수 있고, 노출 이후에 곧 바로 예를 들어, 10 분 내에 일어날 수 있다고 명시한다. 상기 정보 자료는, 알레르기 반응이 피험자가 이상감각, 저혈압, 성대 부종, 정신 상태의 변화(mental status change), 안면 또는 인두 혈관 부종, 기도폐쇄, 기관지 경련, 두드러기 및 소양증, 혈청병, 관절염, 알레르기성 신장염, 사구체 신염, 측두 관절염, 호산 백혈구 증가증 또는 상기의 조합에 시달리게 하는 원인일 수 있다는 것을 더 명시할 수 있다.

[0110] 일부 실시예에서, 상기 제조품은 하나 이상의 포장재, 예를 들어 박스, 병, 판, 유리병, 용기, 분무기, 취분기(insufflator), 수액백(intravenous bag), 비닐봉투 등을 포함할 수 있고; 포장재 안에 본 명세서에서 설명된 추출물을 포함하는 물질의 적어도 하나의 단위 제형을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 제조품은 관련 질병에 대한 예방, 치료학적, 또는 개선 치료로써 상기 조성물의 사용에 대한 설명을 포함할 수도 있다.

- [0112] 다른 실시예에서, 상기 제조품은 하나 이상의 포장재, 가령 예를 들어, 박스, 병, 판, 유리병, 용기, 분무기, 취분기, 수액백, 비닐봉투 등을 포함할 수 있고; 상기 포장재 안에 본 명세서에서 설명된 추출물을 포함하는 물질의 적어도 하나의 단위 제형을 포함하는 제 1 조성물과 함께 제 2 물질을 포함하는 제 2 조성물을 포함할 수 있으며, 이 때 상기 제 2 물질은 예를 들어, 글리코사미노글리칸, 인지질, 폴리(알킬렌글리콜) 및 본 명세서에서 설명된 다른 생리활성 물질, 또는 임의의 프로-드러그, 공용약물, 대사물질, 유사체, 동족체, 동종체, 유도체, 염 및 상기의 조합이다. 다른 실시예에서, 상기 제조품은 관련 질병에 대한 진단, 예방, 치료학적, 또는 개선 치료로써 상기 조성물의 사용에 대한 설명을 포함할 수 있다.
- [0113] 작용의 어떤 이론이나 메커니즘으로 제한시킬 의도 없이, 하기 실시예는 본 발명에 제시된 사상을 더 분명히 보여주기 위해 제공된다. 당해 기술 분야에서 예상되는 다양한 변형이 인정될 것이고, 실시예로 하기 청구항을 제한하려는 의도는 아니다.
- [0114] 실시예 1. Ara:Gal의 비가 약 1.5:1 내지 약 3:1이고, 평균 분자량이 약 20 kDa 내지 약 60 kDa인 황기 추출물의 제조("정제된 추출물" 또는 EP011)
- [0115] 상기 정제된 추출물은 20 kDa 내지 60 kDa 분자량을 갖고, 70 % 내지 90 %의 글루코오스 조성물을 가진다.
- [0116] 상기 정제된 추출물은 내몽골로부터 얻은 황기 뿌리 조각으로부터 제조했다. 상기 건조된 뿌리(300 kg)를 탈염수로 세척하고 한의 여과하여 조각으로 가공했다. 오염된 표면의 일부분을 제거했고, 상기 뿌리를 2 mm 내지 5 mm 두께의 조각으로 절단했다. 이후에, 상기 조각을 살균하고 건조했다.
- [0117] 상기 조각(200 kg)을 3 톤 수성 추출기, 100 °C에서 3시간 동안 3번에 걸쳐 추출했다. 상기로 얻은 수성 추출물을 혼합한 이후에, 감압 하에서 60 내지 70 °C 조건에서 30 내지 40 번 농축시킨다. 상기로 얻은 물 추출물을 70 % 에탄올로 2 번 침전시키고, 35 % 에탄올로 한번 침전시킨다. 폴리사카라이드 중간체를 생성하도록 상기 에탄올 침전물을 물에 용해시키고 분무 건조시켰다.
- [0118] 상기 폴리사카라이드 중간체(3.0 kg)를 물에 용해시키고, 마이크로필터로 여과시키고, 한의 여과한 이후에, 첫 번째로 양이온 교환 컬럼에서, 다음으로 음이온 교환 컬럼에서 순차적으로 정제시켰다. 상기 원하는 용리액을 마지막 농축 이전에 미세필터시켰고 한의 여과시켰다. 융합(blending) 이후에 상기 정제된 추출물을 제조하기 위하여, 마지막으로 상기 농축물을 통째로 냉동 건조하였다.
- [0119] 상기 정제된 추출물은 글루칸의 폴리사카라이드, 람노갈락토로난(rhamnogalacturonans)(RGs), 아라비노갈락탄(AGs) 및 20,000 내지 60,000 Da중량의 평균 분자량을 갖는 아라비노갈락탄 단백질의 당단백질(AGPs)로 구성된다. 상기 약물 물질은 무취의 거의 백색의 비결정 분말이다. 이것은 pH 4.5 내지 6.5를 갖는 물 및 식염수에 쉽게 녹을 수 있고, 저농도의 에탄올에 약간 녹을 수 있고, 아세톤과 같은 유기 용매에 녹지 않는다.
- [0120] 상기 정제된 추출물에 존재하는 폴리사카라이드 및 당단백질의 구조는 TMS-GLC에 의한 글리코실-잔기 조합, GLC-MS의 메틸레이션, ¹H-NMR 분광기에 의한 글리코실-결합(linkage), AA 분석기에 의한 아미노산, 및 크기배제 HPLC에 의한 MW 분배에 의해 특징지어지고 설명된다. 당 조성물 분석에 의해 확인된, 지배적인 글리코실 잔기는 글리코실(60 내지 85 몰%), 아라비노실(5 내지 20 몰%), 및 글락토실(5 내지 15 몰%) 잔기이다. 또한, 소량(2 내지 5 몰%)의 글락투론산 및 람노오스가 이 생성물에 존재한다. 글리코실-결합 분석은, 글리코실 잔기에 대한 주요한 글리코실 결합이 말단, 4-, 6-, 및 4,6-결합이며; 아라비노실 잔기는 말단, 5-, 3-, 및 3,5-결합; 글락토실 잔기는 말단, 3-, 6-, 및 3,6-결합; 글락투론산은 4-결합; 및 람노실 잔기는 2-결합이라는 것을 보여준다. 아미노산 조성물 분석은, 생성물에 존재하는 당단백질에 Hyp, Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, 및 Lys 잔기가 풍부하다는 것을 보여줬다.
- [0121] **상기 정제된 추출물의 분석**
- [0122] 상기 글리코실-잔기 조성물 분석은 표 1에서 보여진다. 상기 정제된 추출물 중의 폴리사카라이드는 글리코실, 아라비노실 및 갈락토실 잔기를 주로 함유한다. 극소량의 람노오스 및 갈락투론산이 상기 정제된 추출물에 존재한다. 상기 정제된 추출물의 글리코실-잔기 조성물을 GLC로 per-O-트리메틸실릴화된 메틸글리코시드를 분석하여 확인하였다. 상기 유도체를 HP-5890 기체크로마토그래피를 사용하여 J&W Scientific DB-1 컬럼(0.25 mm x 30 m)에서 분리하였다.

표 1

상기 정제된 추출물 중의 글리코실-잔기 조성물					
글리코실-잔기	Ara	Rha	GalA	Gal	Glc
상기 정제된 추출물 중의 물%	8.1	0.6	2.0	5.4	83.9

[0124] 표 2에 제공된 상기 글리코실-결합 조성물 및 $^1\text{H-NMR}$ 분광기에 근거하면, 상기 생성물 중의 지배적인 폴리사카라이드는 골격 잔기의 6 번 위치에서 약간의 분지도를 갖는 1,4-연결된 글루칸이다. 상기 정제된 추출물에 존재하는 다른 폴리사카라이드는 상호 간에 가교 결합한 아라비노갈락탄 및 람노갈락투로난이다. 글리코실-결합은 메틸레이션 분석에 의해 확인되었다. Me_2SO 중의 상기 시료를 부틸리튬 및 아이오도메탄으로 메틸화하였다. 상기 메틸화된 시료를 SepPak C18 카트리지를 사용하여 정제하였고, 우라노실 잔기의 상기 카복시메틸기를 리튬트리에틸보로류테라이드(lithium triethylborodeuteride)로 환원하였다. 이후에, 부분적으로 메틸화된 알도톨을 제조하였고, HP 597 MSD-5890 GLC(GLC-MS 결합됨)로 분석했다.

표 2

상기 정제된 추출물 중의 글리코실-결합 조성물			
글리코실-결합	몰%	글리코실-결합	몰%
말단 Araf	6.2	6-결합된 glcp	0.9
5-결합된 araf	2.8	4,6-결합된 glcp	4.5
3-결합된 araf	0.3	말단 galp	1.5
3,5-결합된 araf	0.5	3-결합된 galp	0.4
2-결합된 araf	0.6	6-결합된 galp	0.6
말단 glcp	12.0	3,6-결합된 galp	0.3
4-결합된 glcp	68.2	4-결합된 galA	0.9

[0126] 하기 표 3에서 보여지는 상기 아미노산 조성물 분석은, Hyp, Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, 및 Lys가 상기 정제된 추출물 중의 단백질의 주요한 아미노산 잔기인 것을 보여준다. 상기 정제된 추출물의 아미노산 조성물을 콜라겐 가수분해 분석방법을 사용하여 Beckman 6300 아미노산 분석기로 분석했다. 상기 시료를 110 °C에서 24시간 동안 6 N HCl로 가수분해하였고, 희석한 후에 HPLC 시스템 안에 주입하였다.

표 3

상기 정제된 추출물 중의 아미노산 조성물			
아미노산 잔기	몰%	아미노산 잔기	몰%
Hyp	9.7	Val	4.5
Asp	14.4	Met	0.4
Thr	8.9	Ile	2.1
Ser	8.9	Leu	3.1
Glu	11.0	Tyr	1.0
Pro	4.2	Phe	1.0
Gly	9.7	His	2.1
Ala	9.0	Lys	8.1
Cys	0.3	Arg	2.0

[0128] 생성물에 대한 투여 경로가 주사에 의하기 때문에, 내독소 제거는 상기 정제된 추출물의 제조에 매우 중요하다. 생성물 중의 일부 폴리사카라이드는 내독소 LPS와 구조적으로 관련이 있다. 따라서, 제조 시작시부터 내독소가 없도록 유지하는 것이 제조 도중에 내독소를 제거하는 것보다 더 중요하다.

[0129] 실시예 2.Ara:Gal의 비가 약 3.5:1 내지 약 5.0:1이고, 평균 분자량이 약 100 kDa을 초과하는 황기 추출물의 제

조("고수율 추출물" 또는 EP011AM)

- [0130] 온화한 산 조건을 사용하는 것은 3.5보다 큰 Ara:Gal 비율의 결과를 낳고, 정제된 추출물 또는 본 명세서에서 설명된 고분자량 추출물보다 더 높은 수율의 추출물을 낸다. 일부 실시예에서, 상기 Ara:Gal 비율은 고 수율에서 5 미만으로 유지된다.
- [0131] 상기 고수율 추출물을 내몽골로부터 얻은 황기 뿌리 조각으로부터 제조했다. 상기 뿌리를 탈염수로 세척하고 한외 여과하여 조각으로 가공했다. 오염된 표면의 일부분을 제거했고, 상기 뿌리를 2 내지 5 mm 두께의 조각으로 절단했다. 이후에, 상기 조각을 살균하고 건조했다.
- [0132] 상기 조각을 먼저 0.5 M KH₂PO₄로 100 °C에서 3 시간 동안 추출했고, 이후에 물로 100 °C에서 3 시간 동안 추출했고, 이후에 반복하였다. 상기 추출된 추출물을 원심 분리하고, 한외 여과기로 여과하였다. 상기로 얻은 수용액을 농축했고, 먼저 35 % 에탄올로 침전시켰고, 이후에 80 % 에탄올로 침전시켰다. 조절 추출물을 얻기 위하여, 상기 80 % 에탄올 침전물을 물에 녹이고 분무 건조시켰다.
- [0133] 상기 조절 추출물을 SP 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 통과시키고, 다음으로 Q 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 통과시켰다. 상기 용출액을 한외 여과시켰다.
- [0134] 농축 이후에, 상기로부터 얻은 용출액을 염산(0.3 M)으로 22 °C에서 3 시간 동안 가수 분해시켰다. 중성화 이후에, 상기 고수율 추출물의 한외 여과 및 냉동 건조는 조절 추출물에 대하여 3.3 %의 수율로 얻어진다.

상기 고수율 추출물의 분석

- [0135] 상기 글리코실 잔기 조성물은 TMS-메티글리코사이드 유도체를 GLC하여 확인되었다. Ara, Gal, GalA, 및 Glc는 상기 약물 물질 중의 주요한 당 잔기이다. 상기 글리코실 잔기 조성물 결과는 하기 표 4에서 보여진다.

표 4

고수율 추출물 중의 글리코실 잔기 조성물	
글리코실 잔기	물%
Ara	57.0
Rha	8.2
Xyl	2.7
GalA	13.8
Gal	13.1
Glc	4.7
4-O-Me-GlcA	0.4

- [0136] 상기 Ara:Gal의 비율은 4.35이다. 상기 단백질 함량을 BCA 단백질 미량정량법을 사용하여 확인했다. 상기 고수율 추출물의 단백질 함량은 하기 표 5에서 보여진다.

표 5

고수율 추출물 중의 단백질 함량	
시료	단백질 함량(%)
AGP-P-05	0.67

- [0140] 상기 고수율 추출물의 히드록시프롤린 함량을 비색분석법을 사용하여 확인했고, 하기 표 6에 제공된다.

표 6

고수율 추출물 중의 히드록시프롤린 함량	
시료	Hyp(%)
AGP-P-05	0.34

[0142] 실시예 3. 온화한 산 조건으로 추출함에 따른 수율의 증가

[0143] 본 실시예는 유용한 추출물의 수율이 온화한 산 조건을 사용함으로써 증가 될 수 있다는 것을 보여준다. 첫 번째 추출물은 0.5 M HCl 조건을 사용하여, 22 °C에서 6 시간 동안 가수분해하여 제조되고; 상기 첫 번째 추출물의 수율은, 0.3 M HCl의 온화한 산 조건을 사용하여, 22 °C에서 3 시간 동안 가수분해하여 제조된 두 번째 추출물 및 세 번째 추출물과 비교된다. 표 7은 온화한 조건을 사용할 때 수율의 순차적인 증가를 보여준다.

표 7

온화한 조건을 사용하여 얻은 추출물의 수율 증가			
	첫 번째 추출물 0.5 M HCl, 6시간, 22 °C	두 번째 추출물 0.3 M HCl, 3시간, 22 °C	세 번째 추출물 0.5 M HCl, 6시간, 22 °C
Ara:Gal	2.9:1	4.3:1	4.0:1
단백질 함량 (BCA, %)	1.01%	0.67%	0.64%
내독소 함량 (Endospecey, EU/mg)	0.52	0.43	0.27
hyP 함량	0.42	0.34	0.35
수율 (조절 추출물의 %)	2.4	3.3 (32 % 증가)	3.1 (24 % 증가)

[0145] 실시예 4. 준치사량의 방사선을 받은 포유류에 상기 정제된 추출물을 투여함에 따른 혈소판 수준의 증가

[0146] 본 실시예는 상기 정제된 추출물이 준치사량의 x-ray를 받은 포유류 내의 혈소판 수준을 측정하는 것을 보여준다. BALB/c 쥐가 본 실험에 사용되었고, 상기 쥐의 일부는 0 일에 준치사량의 x-ray, 500 cGy를 받아서, 혈소판 수준의 감소 및 혈소판 감소증을 유발한다. 혈소판 수준을 (a) 방사선 또는 상기 정제된 추출물의 투여 중 어느 것도 겪지 않은, 정상적인 쥐; (b) x-ray가 조사되고, 복강 내에 식염수만을 처리한 대조군 쥐; (c) x-ray가 조사되고, 실험 0 일째에 방사선 조사가 있고, 14 일째까지 실험이 계속되는 동안 식염수 중의 상기 정제된 추출물을 250 mg/kg으로 주당 5 회 주입비율로 10 번 주입한 실험 쥐; 및 (d) x-ray가 조사되고, 실험 0 일째에 방사선 조사가 있고, 25 일째까지 실험이 계속되는 동안 정제된 추출물을 100 mg/kg/day으로 주입한 실험 쥐에서 측정했다.

[0147] 실험 0 일째에 방사선 조사가 있고, 14 일째까지 실험이 계속되는 동안 식염수 중의 상기 정제된 추출물을 250 mg/kg으로 주당 5 회 주입비율로 10 번 피하에 주입한 실험 쥐에서, 준치사량의 x-ray는 10 일째에 최초 측정된 혈소판 수준에 감소를 초래했다. 실험 0 일째에 방사선 조사가 있고, 25 일째까지 실험이 계속되는 동안 상기 정제된 추출물을 100 mg/kg/day으로 주입한, x-ray가 조사된 실험 쥐와 상기 대조군 쥐를 비교하면, 상기 정제된 추출물은 14 일째에 혈액 중의 혈소판 수준에 증가를 보였고, 대조군과 비교하였을 때 EP011로 치료된 쥐의 혈액에서 발견된 낮은 수준의 혈소판의 차이가 14 일째 이후로 증가 되었고, 이러한 차이는 25 일째까지 분명하게 남아있었다. 따라서, 상기 정제된 추출물은 준치사량으로 조사된 쥐의 혈액 중의 혈소판 수준을 증가시켰고, 방사선 치료로부터 혈소판 수준의 회복을 향상시켰다.

[0148] 실시예 5. 준치사량의 조사를 받은 포유류에게 고수율 추출물만 투여함에 따른 혈소판 수준의 증가 및 조혈제만 투여했을 때와의 비교

[0149] 본 실시예는 고수율 추출물이 준치사량, 500 cGy의 x-ray를 받은 포유류 내의 혈소판 수준을 측정하는 것을 보여준다. BALB/c 쥐가 본 실험에 사용되었고, 상기 쥐의 일부는 0 일에 준치사량의 x-ray, 500cGy를 받았다. 혈소판 수준을 (a) 방사선 또는 상기 고수율 추출물의 투여 중 어느 것도 겪지 않은, 정상적인 쥐; (b) 복강 내에 식염수만 주입된, x-ray가 조사된 대조군 쥐; (c) 식염수 중의 상기 고수율 추출물을 250 mg/kg/day으로 주입한, x-ray가 조사된 실험 쥐; (d) 상기 고수율 추출물을 100 mg/kg/day으로 주입한, x-ray가 조사된 실험 쥐; (e) 상기 고수율 추출물을 50 mg/kg/day으로 주입한, x-ray가 조사된 실험 쥐; 및 (f) GCSF치료를 받은, x-ray가 조사된 실험 쥐에서 측정했다. 상기 고수율 추출물을 0 내지 4일째까지는 매일 피하에 투여했고, 그 다음 3 주 동안에는 주당 3 회 피하에 투여했으며, 7 내지 9일째, 14 내지 16일째 그리고 21 내지 23일째에는 상기 고

수율 추출물을 투여하였다.

[0150] 도 1은 일부 실시예에 따른, 방사선의 준치사량을 투여한 이후에 고수율 추출물에 대한 BALB/c 쥐의 혈소판 수준 반응을 보여준다. 도 1에서 볼 수 있듯이, 상기 x-ray는 혈소판 수준의 감소를 초래했고, 혈소판 수준의 감소를 초래하여 조사 후 약 10 일째에는 혈소판 감소증을 초래한다. 고수율 추출물을 사용한 치료는 0 일째부터 시작하여 주당 5 회 주입하여, 10 번 주입하는 동안 식염수 중의 250 mg/kg으로 주어졌다. 상기 고수율 추출물은 상기 식염수 대조군에 비해 약 3 내지 5 일 정도 일찍 정상 혈소판 수치의 50 %를 회복시키는데에 효과적이었고, 따라서, 상기 치료는 준치사량으로 조사된 쥐의 혈액 중의 혈소판의 양을 증가시켰다. 상기 G-CSF(NEUPOGEN)의 효과는 비교의 목적으로 도 1에 도시되었다.

실시예 6. 화학 치료를 받은 포유류에게 고수율 추출물만 투여함에 따른 혈소판 수준의 증가 및 조혈제와 함께 투여했을 때의 비교

[0151] 본 실시예는 상기 고수율 추출물의 투여가 혈소판 수준을 촉진함으로써 화학 치료로부터의 회복을 가속시키고, 따라서 상기 화학 치료에 의해 초래된 혈소판 감소증을 치료하는 것을 보여준다.

[0152] 혈소판 수준을 (a) 화학 치료 또는 상기 고수율 추출물의 투여 중 어느 것도 겪지 않은, 정상적인 쥐; (b) 복강 내에 식염수만 주입하는 정맥 내 화학치료를 받는 대조군 쥐; (c) 식염수 중의 상기 고수율 추출물을 200 mg/kg/day으로 피하에 주입하는 화학치료를 받는 실험 쥐; (d) 식염수 중의 상기 고수율 추출물을 250 mg/kg/day으로 피하에 주입하는 화학치료를 받는 실험 쥐; (e) 식염수 중의 상기 고수율 추출물을 400 mg/kg/day으로 피하에 주입하는 화학치료를 받는 실험 쥐; (f) 200 µg G-CSF가 포함된 식염수를 주입하는 화학 치료를 받는 실험 쥐; 및 (g) 식염수 중의 상기 고수율 추출물을 250 mg/kg/day으로 피하에 그리고 200 µg G-CSF가 포함된 식염수를 주입하는 화학치료를 받는 실험 쥐에서 측정했다.

[0153] 상기 사용된 쥐는 BALB/c 쥐였고, 정맥 내로 4 mg/kg의 미토마이신 C(MMC)을 실험 시작 전날("-1")에 한번 그리고 실험 시작하는 날("0")에 한번 총 2 번 주입했다. 또한, 상기 쥐는 0 일째부터 6 일째까지 상기 고수율 추출물을 250 mg/kg/day으로 피하에 7 일간 매일 주입받았다.

[0154] 일부 실시예에 따른 도 2는, 미토마이신이 BALB/c 쥐에 주입된 후 7 일째에 혈소판 감소증이 유발됐다는 것을 보여준다. 상기 대조군 쥐는 실험의 거의 끝인 26 일째에 정상 혈소판 수치의 60 %만 또는 약 $300 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 을 회복시키는 식염수로 치료했지만, 반면에 실험 쥐는 약 10 일째에 정상 혈소판 수치의 60 %에 도달시키고 약 19 일째에 정상 혈소판 수치의 100%에 도달시키는 상기 고수율 추출물로 치료했으며, 이 때 정상 혈소판 수치는 약 $500 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 이었다. 따라서, 상기 고수율 추출물은 화학치료로 유발된 혈소판 감소에서 혈소판 회복을 유도했다.

[0155] 상기 고수율 추출물은 화학치료에 노출된 이후에 혈소판 또는 거핵구의 회복을 가속한다. 도 2가 상술한 화학 치료 및 추출물의 양을 사용하여 결과가 유사함을 강조함에도 불구하고, 미도시 데이터는 MMC 치료가 일반적으로 혈소판 수치를 3일째에 감소시키고, 약 10일째에 최악의 기저 혈소판 수치 수준의 25 %에 도달한다고 제시했다. 식염수로 치료된 대조군 쥐는 24 일째에 기저 혈소판 수치 수준의 약 50 %만을 회복했으며, 반면에 상기 고수율 추출물이 200 내지 400 mg/kg/day로 치료된 실험 쥐는 10 일째에 기저 혈소판 수치 수준의 약 40 내지 50 %로 회복되었고, 이후에 혈소판 수치의 회복이 지속되었다. 상기 고수율 추출물이 400 mg/kg/day로 치료된 쥐에서, 상기 혈소판 수치는 21 일째에 기저 혈소판 수치 수준의 100 %를 달성했지만, 반면에 식염수만 주입된 상기 대조군 쥜은 여전히 기저 혈소판 수치 수준의 약 50 %에 있었다. 상기 고수율 추출물은, 식염수만 주입된 상기 대조군 쥜에서 혈소판 감소증의 지속시간이 6 일인 것을, 고수율 추출물이 주입된 실험 쥜의 경우에서 0 일로 혈소판 감소증의 지속시간을 감소시켰다.

[0156] 도 2에서, G-CSF(NEUPOGEN)가 주입된 쥜은 0 일째에 200 µg NEUPOGEN를 포함하는 식염수를 7 회 주입하거나, 또는 0 일째에 식염수 중의 고수율 추출물 200 µg 및 NEUPOGEN을 피하에 250 mg/kg으로 7회 주입하여 받아들였다. 상기 고수율 추출물과 NEUPOGEN의 조합은 이들을 각각 주입하여 받아들인 쥜과 비교할 때 혈소판의 회복을 가속하고, 조합한 치료는 10 일째에 빠르게 정상 대조군 혈소판 수치를 얻었다고 결과에서 보여준다. 특히 흥미로운 점은 상기 고수율 추출물 및 상기 조합한 치료 모두, 26 일 경과 후에 실험이 끝날 때까지 정상 혈소판 수준에 도달하지 못한 G-CSF 단독 투여보다 나은 결과를 내었다. 반면에, 상기 G-CSF와 상기 고수율 추출물의 조합은, 상기 고수율 추출물을 단독으로 투여한 경우보다 약 9일을 앞당겨 정상 혈소판 수치를 얻었다.

[0158] 따라서, 화학치료로 인한 혈소판감소증을 앓는 포유류에 상기 고수율 추출물의 투여는 적어도 (1) 혈소판 수치가 $200 \times 10^9 / L$ 미만인 극심한 혈소판 감소증을 제거하며; (2) 일반적으로, 혈소판 감소증 질환에 있어서 최악의 혈소판의 극심함을 감소시키며; (3) 혈소판 감소증 질환의 지속기간을 단축시키며; (4) 투여량-의존 방식으로 혈소판 회복을 가속시키며; 그리고 (5) G-CSF의 공동투여를 통한 상당히 향상된 혈소판 회복을 제공한다.

실시예 7. 준치사량의 조사를 받은 포유류에 고수율 추출물을 투여함으로써 백혈구 생성을 촉진

[0160] 본 실시예는 상기 고수율 추출물이 골수 기능 또는 조혈을 억제하는 방사선에 노출된 포유류에게서 백혈구의 회복을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 추출물은 백혈구의 감소 된 수준에 도움을 줄 수 있는데, 그렇지 않으면 염증에 취약한 포유류를 그대로 둘 수 있기 때문이다.

[0161] 본 실시예는 상기 고수율 추출물이 준치사량의 x-ray를 받은 포유류에서 백혈구의 회복을 촉진하는 것을 보여준다. BALB/c 쥐가 본 실험에 사용되었고, 상기 쥐의 일부는 치사량의 x-ray, 500 cGy를 0 일에 조사됐다. 세포 수치를 (a) 방사선 또는 상기 고수율 추출물의 투여 중 어느 것도 겪지 않은, 정상적인 쥐; (b) x-ray가 조사되고, 복강 내에 식염수만을 주입한 대조군 쥐; (c) 실험 0 일째에 방사선 조사가 있고, 14 일까지 실험이 계속되는 동안 식염수 중의 상기 정제된 추출물을 250 mg/kg으로 주당 5 회의 비율로 10 회 주입하는, x-ray가 조사된 실험 쥐; 및 (d) 실험 0 일째에 방사선 조사가 있고, 26 일째까지 실험이 계속되는 동안 200 µg G-CSF를 포함하는 식염수를 주입하는 x-ray가 조사된 실험쥐에서 측정했다.

[0162] 일부 실시예에 따른 도 3은, 조사된 BALB/c 쥐에서 상기 고수율 추출물의 투여 이후에 백혈구의 회복을 보여준다. 극심한 백혈구 감소증은 방사선 조사 후 7 내지 10 일째에 보였으며, 이 때 상기 쥐는 약 600 내지 100/µl의 백혈구 수치를 보였다. 상기 고수율 추출물은 약 21 내지 25 일째에 백혈구의 회복을 유도했고, 식염수로만 치료된 대조군 쥐에서 백혈구 수치는 실험이 끝날 때까지 회복되지 않았다. 수치의 차이는 상기 고수율 추출물이 림프구의 회복을 또한 유도했다는 것을 나타냈다.

[0163] 따라서, 도 3을 도 2와 비교하면, 준치사량의 x-ray를 받는 BALB/c 쥐에서 고수율 추출물이 백혈구의 회복을 가속하며, 백혈구 감소의 지속시간을 감소시킬 뿐만 아니라 혈소판 수치를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

실시예 8. 혈소판감소증을 앓는 포유류에 조혈을 촉진하는 물질과 고수율 추출물을 공동투여함으로써 방사선유도 혈소판 회복의 향상

[0165] 본 실시예는, 고수율 추출물과 G-CSF의 공동투여가 치사량으로 조사된 BALB/c 쥐에서 혈소판 생성을 촉진할 수 있다는 것을 보여준다.

[0166] BALB/c 쥐는 본 실험에서 사용되었다. 상기 쥐의 일부는 치사량의 x-ray, 500 cGy를 0 일째에 받았다. 혈소판 수준을 (a) 방사선 조사 또는 상기 고수율 추출물의 투여 중 어느 것도 겪지 않은, 정상적인 쥐; (b) x-ray가 조사된, 복강 내에 식염수가 주입된 대조군 쥐; (c) 0 일째 방사선 조사가 있고, 식염수 중의 상기 고수율 추출물을 피하에 250 mg/kg/day으로 매일 7 회 주입하는, x-ray가 조사된 실험 쥐; (d) 0 일째 방사선 조사가 있고, 250 mg/kg/day의 상기 고수율 추출물 및 1 µg/kg G-CSF를 포함하는 식염수를 피하에 공동투여로 매일 7 회 주입하는, x-ray가 조사된 실험 쥐; (e) 0 일째 방사선 조사가 있고, 250 mg/kg/day의 상기 고수율 추출물 및 100 µg/kg G-CSF를 포함하는 식염수를 피하에 공동투여로 매일 7 회 주입하는, x-ray가 조사된 실험 쥐에서 측정했다.

[0167] 일부 실시예에 따른 도 4는, 상기 고수율 추출물 및 G-CSF가 공동주입되는 경우에, 조사된 BALB/c 쥐에서 혈소판 수치의 회복속도를 보여준다. 상기 회복속도는, 쥐에 고수율 추출물과 1 µg/kg G-CSF 또는 100 µg/kg G-CSF 중 하나를 공동주입하는 경우에 거의 동일했다. 두 개를 공동 주입하는 경우, 쥐는 15 일째에 정상 혈소판 수치의 약 50 %로 회복됐지만, 반면에 상기 고수율 추출물만을 주입한 경우에는 18 일째에 정상 혈소판 수치의 약 50 %로 회복되었다. 이와 다르게, 대조군 쥐의 경우에는 정상 혈소판 수치의 약 50 %에 도달하기 위해서는 약 22 일이 걸렸다.

실시예 9. 준치사량의 x-ray에 의해 조사된 포유류에 조혈을 촉진하는 물질과 고수율 추출물을 공동투여함으로써 혈소판 회복의 향상

- [0169] 본 실시예는 상기 고수율 추출물과 G-CSF의 공동투여가 준치사량으로 조사된 BALB/c 쥐에서 백혈구의 생성을 촉진할 수 있다는 것을 보여준다.
- [0170] BALB/c 쥐는 본 실험에 사용되었다. 상기 쥐의 일부는 치사량의 x-ray, 500 cGy를 0 일째에 받았다. 혈소판 수준을 (a) 방사선 조사 또는 상기 고수율 추출물의 투여 중 어느 것도 겪지 않은, 정상적인 쥐; (b) x-ray가 조사된, 복강 내에 식염수만을 주입한, 대조군 쥐; (c) 0 일째에 방사선 조사가 있고, 14 일째까지 실험이 계속되는 동안 식염수 중의 상기 고수율 추출물을 250 mg/kg/day으로 피하에 주당 5 회의 주입비율로 10 회 주입하는, x-ray가 조사된 실험 쥐; (d) 0 일째에 방사선 조사가 있고, 14 일째까지 실험이 계속되는 동안 250 mg/kg/day의 상기 고수율 추출물 및 100 µg/kg G-CSF를 포함하는 식염수를 피하에 공동투여로 주당 5 회의 주입비율로 10 회 주입하는, x-ray가 조사된 실험 쥐; (e) 0 일째에 방사선 조사가 있고, 14 일째까지 실험이 계속되는 동안 250 mg/kg/day의 상기 고수율 추출물 및 1 µg/kg G-CSF를 포함하는 식염수를 피하에 공동투여로 주당 5 회의 주입비율로 10 회 주입하는, x-ray가 조사된 실험 쥐에서 측정했다.
- [0171] 일부 실시예에서 도 5는, 상기 고수율 추출물 및 G-CSF가 공동주입되는 경우, 조사된 BALB/c 쥐에서 백혈구 수치의 회복속도를 보여준다. 상기 방사선 조사는 백혈구에 뚜렷한 감소를 만들어냈다. 상기 고수율 추출물만의 주입은 백혈구 회복의 느린 속도를 유도했다. 그리고, 도 5에 미도시 되었지만, 상기 회복속도는 쥐에 고수율 추출물과 1 µg/kg G-CSF 또는 100 µg/kg G-CSF 중 하나를 공동주입하는 경우에 거의 동일했다. 상기 공동주입은 15 일째에 정상 백혈구 수치에 일시적인 급증을 가져오지만, 반면에 상기 고수율 추출물만 주입한 경우에는 정상 수치의 50 %로 회복을 유도했다. 18 일째부터 실험이 끝날 때까지, 공동주입과 고수율 추출물만의 투여 사이에 약간의 차이가 있었다. 둘 다 사용하여 치료한 경우 정상 수치의 60 %를 보였고, 29 일째에 정상 수치로 완전히 회복했다. 오직 식염수만 주입한 상기 대조군 쥐는 29 일째에 정상 백혈구 수치의 40 %를 보였다.
- [0172] 실시예 10. 타이완에서 ITP환자의 치료
- [0173] 본 명세서에서 설명된 정제된 추출물을 인간을 치료하기 위해 두 개의 유사한 연구 군에 대해 계속 진행 중인 시험, 개방 표지(open-label) 시험, 다기관(multi-center) 시험 및 투약량 찾는 시험(dose-finding trial)에서 사용되었다. 상기 추출물을 사용하는 치료의 안전성 및 효험은 만성 특발성 혈소판감소증을 앓는 피험자에게서 평가됐다. 상기 시험은 타이완에 소재한 두 개의 선도 의료센터에서 진행되었다.
- [0174] 도 6은 타이완에서의 임상실험의 흐름도를 도시하며, 상기 임상실험에서의 환자는 The American Society of Hematology(ASH) 지표에 따른 만성 특발성 혈소판감소증을 앓는 것으로 진단되었다. 도 6에 도시된 것처럼, ASH 지표는 포함 및 배제 기준을 사용하여 적어도 6 개월 동안 검사(605)하는 것을 포함한다. 그리고, 6 주의 연구 기간 동안, 모든 환자는 코르티코스테로이드를 복용하거나 상기 연구 이전에 밝혀진 다른 치료를 받도록 했다. 상기 연구는 무작위로 환자를 4 개의 연구군 중에 하나에 배치(610)하는 것을 더 포함한다.
- [0175] 상기 연구는 2 개의 식이요법 중 하나에 의한 상기 정제된 추출물을 최초 2 주 동안 투여하는 단계(615)를 더 포함했다: (식이요법 1) 상기 추출물 500 mg을 약 3 시간 동안(2.5 내지 3.5 시간) 주 5 일로 정맥 내 주입; 또는, (식이요법 2) 상기 추출물 500 mg을 약 3 시간 동안(2.5 내지 3.5 시간) 주 3 일로 정맥 내 주입. 다음 단계는 반응을 평가하는 단계(620)를 포함했다: (1) 만일 상기 환자의 혈소판 수치가 15 일째에 $75 \times 10^9/L$ 이상 $450 \times 10^9/L$ 미만으로 향상된다면, 상기 치료는 다음 2 주간 상기 추출물의 투여를 중단하는 것을 포함하며; 그리고 (2) 만일 상기 환자의 혈소판 수치가 15 일째에 $75 \times 10^9/L$ 이상 $450 \times 10^9/L$ 미만으로 향상되지 않았다면, 상기 치료는 다음 2 주간 상기 추출물의 투여를 계속 진행하는 것을 포함했다.
- [0176] 연구의 5 주차 및 6 주차 동안, 상기 환자는 추출물의 투여가 없이(625) 추가 연구됐다. 연구 도중에 어느 시점에든지, 만일 혈소판 수치가 $450 \times 10^9/L$ 이상으로 상승 되면, 상기 환자는 더 이상의 추출물을 받는 것을 멈췄고 상기 연구가 끝날 때까지(630) 모니터링 되었다. 극심한 출혈의 경우 구조요법은 IVIG, 스테로이드 또는 혈소판 수혈을 포함하도록 설계되었으며, 상기의 경우에 사용되었고, 기록되었다. 비-ITP(non-ITP) 관련 의료 조건에 필요하다고 여겨지는 다른 치료는 허용되었다.
- [0177] 본 연구의 결과에 기초하면, 상기 추출물은 ITP 환자들 중에서 혈소판 수치를 상승시키는데에 안전하고 효과적이라고 보여진다.

[0178] 실시예 11. 중국에서 ITP 환자의 치료

[0179] 상기 정제된 추출물은 중국에서 만성 난치성 ITP 사례 연구에 사용되었다. 상기 환자는 몇 년간 ITP로 진단되었고, 비장절제술을 포함하는 치료밖에는 효과적인 치료가 없었다. 상기 환자는 혈소판 수치를 유지하기 위해 몇 년간 프레드니솔론 또는 트리암시놀론으로 치료됐고, 몇몇의 출혈이 기록되었다. 치료기간의 말미에, 상기 환자를 상기 추출물(250 mg/day)과 혼합된 트리암시놀론으로 2 주 동안 매일 치료했다. 2 주의 치료 후에, 표 8에서 보여주듯이, 상기 환자의 혈소판 수치는 $44 \times 10^9/L$ 에서 $110 \times 10^9/L$ 로 회복되었다.

표 8

년수	1년차	2년차	3년차	4년차
치료	프레드니솔론 2.5mg	프레드니솔론 1.25mg	프레드니솔론 5mg	트리암시놀론 4mg
혈소판 수치	$29 \times 10^9/L$	$24 \times 10^9/L$	$26 \times 10^9/L$	$44 \times 10^9/L$

년주	5년차, 2월	
	1주차	2주차
치료	트리암시놀론 4mg + PG2	트리암시놀론 4mg + PG2
혈소판 수치	$79 \times 10^9/L$	$110 \times 10^9/L$

년주	5년차, 2월	
	1주차	2주차
치료	트리암시놀론 4mg + PG2	트리암시놀론 4mg + PG2
혈소판 수치	$71 \times 10^9/L$	$81 \times 10^9/L$

년주	5년차, 3월		
	PG2 치료전	1주차	2주차
치료	프레드니솔론 5mg + PG2	프레드니솔론 5mg + PG2	프레드니솔론 5mg + PG2
혈소판 수치	$108 \times 10^9/L$	$118 \times 10^9/L$	데이터가 나타나지 않음

[0180]

[0181] 이러한 결과는 스테로이드의 종래 치료법의 사용하는 것보다 훨씬 넘어선 회복을 제공했고, 상기 추출물의 투여 이후 3 달의 지속효과를 또한 보여주었다. 상기 혈소판 수치가 정상에 도달하는 경우, 추가적인 추출물의 투여가 2 주 더 지속되었다. 다음 3 달 동안에는, 상기 추출물이 상기 혈소판 수치의 초과량을 조절하는 것처럼 자가-피드백 메커니즘을 일으키는 것으로 생각되기 때문에 상기 혈소판 수치의 초과량이 없었으며, 이는 중요하다.

[0182] 실시예 11. ITP 환자의 치료 - 개인에 대한 연구

[0183] 본 연구의 목적은 만성 특발성 혈소판감소증(ITP)을 앓는 개개의 환자에 대한 상기 정제된 추출물의 효험과 안정성을 평가하기 위함이며, 상기 환자는 지속적인 ITP 치료를 6 개월 이상 받고 있는 조건의 환자를 포함했다. 상기 연구는 개방 표지된, 무작위의 2 개의 연구 집단에서 이루어졌다. 상기 최초 종점은 혈소판 수치 반응이었다.

[0184] 여성 환자(R01001)는 10 년 이상 ITP로 진단받았고, 프레드니솔론(10 mg QD)을 사용하여 치료받아왔다. 상기 환자에게 4 주간 매주 5일 상기 정제된 추출물을 주입했고, 이에 따른 결과는 표 9에 도시된다.

표 9

[0185]	날짜	연구 스케줄	혈소판 수치($10^3/\mu\text{l}$)
	2008-11-24	검사	8,000
	2008-12-01	1 일째	10,000(기준선)
	2008-12-08	8 일째	8,000
	2008-12-15	15 일째	12,000
	2008-12-22	22 일째	8,000
	2008-12-29	29 일째	12,000
	2009-01-12	43 일째	23,000

[0186] 상기 정제된 추출물로 치료한 이후에 치료에 대한 반응으로써 상기 혈소판 수치가 기준선의 2 배가 되어 23,000으로 회복되었다는 것을 인식해야 할 것이다. 부작용은 발생하지 않았다.

[0187] 46 세의 여성 환자(R02001)는 5 년 이상 ITP로 진단받았고, 프레드니솔론(20 mg QD)을 사용하여 치료받아왔다. 상기 환자에게 3 주간 매주 5일 상기 정제된 추출물을 주입하였고, 이에 따른 결과는 표 10에 도시된다.

표 10

[0188]	날짜	연구 스케줄	혈소판 수치($10^3/\mu\text{l}$)
	2008-12-30	1 일째	3,000(기준선)
	2009-01-05	8 일째	7,000
	2009-01-12	15 일째	4,000
	2009-01-19	22 일째	5,000
	2009-02-02	29 일째	11,000
	2009-02-17	43 일째	6,000

[0189] 상기 정제된 추출물로 치료한 이후에 상기 혈소판 수치가 11,000으로 회복되었다는 것을 인식해야 할 것이다. 부작용은 발생하지 않았다.

[0190] 61 세의 남성 환자(R01002)는 10 년 이상 ITP로 진단받았고, 프레드니솔론(10 mg QD)을 사용하여 치료받아왔다. 상기 환자에게 2 주간 매주 3일 상기 정제된 추출물을 주입하였고, 이에 따른 결과는 표 11에 도시된다.

표 11

[0191]	날짜	연구 스케줄	혈소판 수치($10^3/\mu\text{l}$)
	2009-05-18	1 일째	37,000(기준선)
	2009-05-25	8 일째	11,000
	2009-06-01	15 일째	84,000
	2009-06-03	17 일째	58,000
	2009-06-08	22 일째	55,000
	2009-06-15	29 일째	31,000
	2009-06-29	43 일째	14,000

[0192] 상기 정제된 추출물로 치료한 이후에, 치료에 대한 반응으로써 상기 혈소판 수치가 37,000에서 84,000으로 회복되었다는 것을 인식해야 할 것이다. 부작용은 발생하지 않았다.

[0193] 마지막으로 60 세의 여성 환자(R02002)는 약 4 년 전에 ITP로 진단받았고, 프레드니솔론(15 mg QD)을 사용하여 치료받아왔다. 상기 환자에게 3 주간(치료 계속중) 매주 3일 상기 정제된 추출물을 주입하였고, 이에 따른 결과는 표 12에 도시된다.

표 12

[0194]

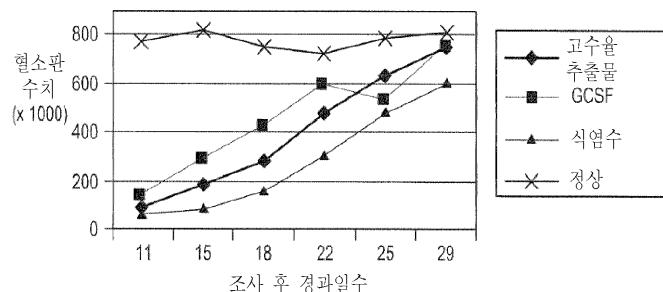
날짜	연구 스케줄	혈소판 수치(103/u1)
2009-07-06	1 일째	8,000(기준선)
2009-07-13	8 일째	6,000
2009-07-20	15 일째	54,000
		거부 반응
2009-07-06	1 일째	알레르기 반응
2009-07-08	3 일째	피부 발진

[0195]

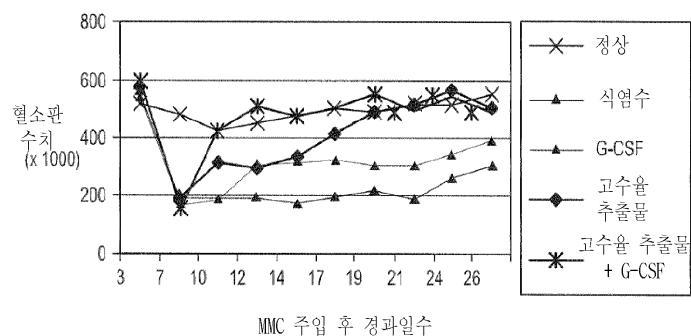
상기 정제된 추출물로 치료한 이후에, 치료에 대한 반응으로써 상기 혈소판 수치가 8,000에서 54,000으로 회복되었다는 것을 인식해야 할 것이다.

도면

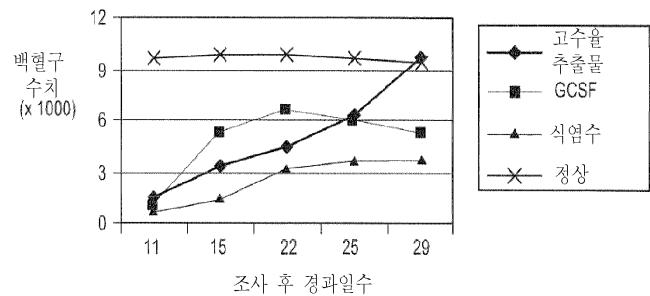
도면1



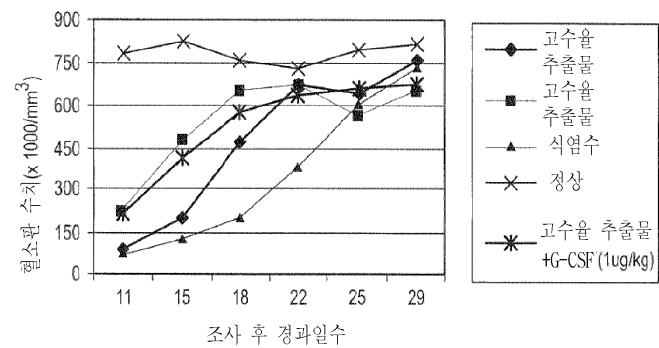
도면2



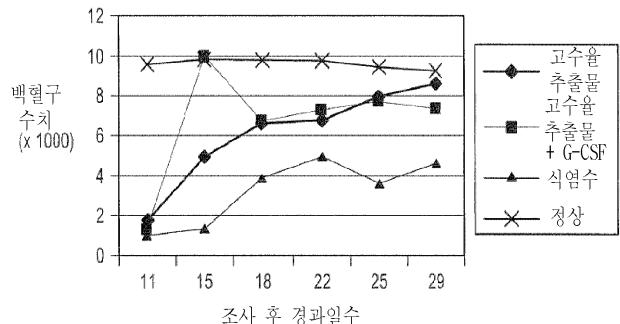
도면3



도면4



도면5



도면6

