

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07D 493/22
A61K 31/35

(11) 공개번호 특1999-0077000
(43) 공개일자 1999년10월25일

(21) 출원번호	10-1998-0705130	(87) 국제공개번호	WO 1997/25333
(22) 출원일자	1998년07월03일	(87) 국제공개일자	1997년07월17일
번역문제출일자	1998년07월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1996/05867		
(86) 국제출원출원일자	1996년12월30일		
(81) 지정국	EA 유라시아특허 : 아제르바이잔 벨라루스 러시아 투르크메니스탄		
	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴		
	국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 일본 대한민국 리투아니아 라트비아 마케도니아 멕시코 뉴질랜드 폴란드 루마니아 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 터어키 우크라이나		
(30) 우선권주장	196 00 301.6	1996년01월05일	독일(DE)
(71) 출원인	도나투어 데알. 케렉 게엠베하		
	독일, 데-81375 원헨, 구아디니슈트라쎄 30		
(72) 발명자	케렉 프란츠		
	독일, 데-81375 원헨, 구아디니슈트라쎄 30		
(74) 대리인	나영환, 이상섭		

심사청구 : 없음

(54) 아산화물 단위로 제조된 대환식 화합물

요약

본 발명은 아산화탄소를 환형 올리고머화하여 형성한 대환식 구조 골격을 가진 생체 조절 활성 물질에 관한 것으로서, 이 물질은 다른 대환 구조를 가질 수 있다. 이들 활성 물질은 그 자체로서 및/또는 다른 공지된 물질과의 안정한 첨가 생성물로서 사용된다. 본 발명은, 이들 활성 물질, 이들의 유기 및 무기 유도체, 이들의 합성 방법, 분리 및 정제 방법에 관한 것이기도 하다. 본 발명은 또한, 상기 활성 물질의 효소 조절 용도 및 생체 조절 용도, 이들 활성 물질을 함유한 의약 조성물, 및 이들 활성 물질의 진단 및 치료 용도에 관한 것이기도 하다.

명세서

기술분야

본 발명은, 생체 조절 활성을 가진 대환식(macrocylic) 화합물 활성 물질, 이 활성 물질의 합성 방법, 및 각종 출발 원료로부터 이 활성 물질을 분리시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 이들 활성 물질을 그 자체로서, 또는 다른 활성 물질과 함께 효소 조절 및 생체 조절을 위해 사용하는 방법에 관한 것이기도 하다.

배경기술

생화학적 처리 과정의 적절한 진행 및 생물학적 면역 매카니즘의 적정 기능은 각종 생체 조절 활성 물질에 의해 지해된다[문헌 (롬프 렉시콘, 페이지 3826 'Regulation') 참고]. 화학적 관점에서 볼 때, 이제까지 알려진 생체 조절 활성 물질로는 펩티드, 탄수화물, 스테로이드 또는 지질이 있으며, 이들 성분들은 혼합 상태(예, 글리코펩티드, 지단백)로도 사용될 수 있다. 또한, 상기 조절 매카니즘 중 1개 이상의 기능 장애로 인해 유발되는 질환을 치료하기 위해, 생체 조절 활성 물질을 사용하는 방법은 이미 알려져 있다. 그러한 사용 예중 일부 예로는 스테로이드 호르몬, 코르티코스테로이드 및 강심성 글리코시드 뿐 아니라 성장 호르몬 또는 혈액 응고 인자의 치료적 사용예를 들 수 있다. 그러나, 이러한 류의 물질로 약물 치료를 실시할 경우에는 심각한 부작용이 보다 빈번히 발생하므로, 그 사용이 상당히 제한되고 있다. 이러한 점에 대해서는, 굿맨 및 길만의 문헌 ['The Pharmacological Basis of Therapeutics', 8판, 뉴욕, 1991]에 상세히 설명되어 있다. 예를 들어, 강심성 글리코시드를 사용할 경우에는, 치료적으로 유용한 근수축 작용 효과와 함께 부작용인 심장 독성이 수반된다. 따라서, 이 물질의 치료 용량은 강력히 제한되어야 한다. 또다른 예로는 코르티코스테로이드의 사용예를 들 수 있는데, 이 물질은 매우 심각한 부작용(예, 근증, 골다공증, 정신 분열증, 감염 감수성(感受性)의 증가)을 보이므로 매우 심각한 경우에 한해 제한된 회수로만 사용할 것을 권장하고 있다.

면역적으로 유발된 질환 증후군을 면역 조절 활성 물질로 치료하는 데에 상당한 노력을 기울이고 있음에도 불구하고, 종전의 임상 시험은 그다지 설득력이 없었다. 그러한 면역 치료 용도의 주 목적은, 현재까지도 그 치료 방법을 알지 못하는 자가 면역 질환(예, 특히 류마티스성 관절염, 다발성 동맥경화증)을 치료하고자 하는 것이다. 문헌 [Current Biology 6, 875~881(1995)]에 게재된 이. 서카즈 및 에스. 케이. 다타의 논문 '자가 면역성'에 따르면, 이러한 자가 면역 질환은 대부분 면역 조절의 장애로 인해 유발되는 것으로 기재되어 있다. 면역계의 심각한 약화에 그 원인적 특징이 있는 심각한 질환 증후군(예, 암증 또는 AIDS)을 치료하는 데 있어, 종전의 면역 조절 물질의 사용은 그다지 효과가 없었다.

몇 종의 생체 조절성 펩티드 및 단백질의 특징은, 엠. 제이. 클레멘스의 문헌[옥스포드, 1991]에 게재된 논문 '시토킨'에 보고된 바 있다. 시토킨(Cytokines)이 다른 종의 암종, 자가 면역 질환 및 바이러스성 감염(예, AIDS)에 중요한 작용을 한다는 점은 이미 몇 차례 보고된 바 있다. 이러한 점에도 불구하고, 시토킨 및 다른 생체 조절성 단백질과 펩티드는 여전히 그 양이 부족한 상태이다. 그 이유 중 하나는 제조 기술의 수행이 상당히 힘들다는 점으로서, 다시 말하면 사람 또는 동물의 조직액 중에는 생체 조절 활성 물질이 단지 극소량 존재하므로 조직액으로부터 이들 물질을 추출하여 정제하는 방법을 통해 그 치료 요구량을 제공한다는 것은 절대적으로 부적합하다는 것이다. 유전자 기술에 의해 제조된 생체 조절성 폴리펩티드 또는 당단백을 인체의 치료에 사용할 경우에는, 알레르기성 부작용 및/또는 아나필락시스(anaphylactic) 반응의 위험이, 발생 빈도는 낮으나 여전히 심각한 위험 인자로서 존재한다. 고도의 활성을 가진 폴리펩티드 인자 몇 종을 '시험관 내'에서 치료적으로 이용하는 방법의 기본적인 문제점은, 이들 물질이 '생체 내'에서는 완전히 다른 효과를 나타내며, 더욱이 대부분 생체 내에서 훨씬 약한 활성을 나타내는 것으로 입증되었다는 점이다. 한편, 각종 물리적 및 효소적 차단체는, 외부에서 투여한 펩티드 및 단백질이 병소(염증부, 암 궤양 등)에 도달하지 못하게 방해한다. 다른 한편으로, 이들 차단체는 내인성 효소 및 그 내부에 존재하는 활성 인자에 의해 급속히 중화되어 대사된다. 따라서, 펩티드, 글리코펩티드 및 글리코시드 물질 등의 활성 물질을 경구 투여할 경우, 이들 물질은 몇 개의 분해 과정에 의해 실제로 위장계에서는 이미 그 효과를 상실하게 된다.

한편, 펩티드계 또는 글리코펩티드계의 생체 조절 활성 물질을 '경구 투여'할 경우에는, 이들 물질이 비교적 빠르게 분해된다는 점을 고려해야 한다. 활성 물질을 치료적 효과 농도로써 병소 또는 증상부(예, 염증부 또는 암 궤양부)에 정확히 전달시키기 위해, 종래에는 활성 물질을, 예를 들어 제한적인 방식으로 전달시켰었다. 이와 유사한 방법, 즉 의도적으로 모노클론 항체에 독소를 결합시켜 사용하는 방법(약물 표적화 방법)이 알.콜리어 및 디.카플란의 문헌['Immunotoxine', 하이델베르크, 1988]에 기재되어 있다. 그러나, 이 방법은 매우 복잡하며, 특정 경우에 한해서만 제한적으로 이용될 수 있다. 조절 활성 물질의 경우, 생체내 이용율은 안정성 뿐 아니라 순수한 물리적 과정(예, 용해도 및 막 투과성)에 의해 좌우된다. 막 투과성은, 혈장 내 친수성 물질의 수용도(水溶度) 또는 친수성 활성 성분(Na^+ 또는 K^+ 이온)의 막 투과성과 관련된 것이다. 예를 들어, 미토콘드리아 막은 대개 칼륨 이온이 투과하지 못한다. 그런데, 대환식 항생 물질(예, 비 광화학 물질 또는 발리노마이신)은, 이 칼륨 이온을 이에 상응하는 이온으로 유기적 봉합시켜 칼륨 이온이 이 막을 투과할 수 있도록 한다.

'크라운 에테르'의 발견 년도인 1967년 이후로, 무기 이온 또는 소분자를 크라운 형태 또는 소낭(cryptate) 형태로 봉합시키는 미소 구조의 각종 신규 화합물이 제조되어 왔다. 그러나, 그러한 소낭 형성 대환식 화합물을 직접적인 치료 용도에 사용할 경우 요구되는 중요한 예비 필수 요건은, 독성이 낮고 생체 동화성이 양호해야 한다는 점인데, 이것은 합성 반응을 통해 제조된 소낭(cryptand) 시약을 사용할 경우 약간은 충족된다.

많은 기본적인 생체 조절 매카니즘은 소위 나트륨 펌프에 의해 조절된다. 이 효소는, 세포 내부의 나트륨 이온을 세포 외부로 펌핑하면서 동시에 칼륨 이온을 이와 반대 방향으로 운반하는 작용을 한다. 이때 필요한 에너지는, 아데노신 삼인산(ATP)이 가수 분해됨에 따라 조달된다. 이 펌프는, Na^+ , K^+ -ATP 효소(ATPase)로 칭해지는 효소와 동일하며 편재 분포한다. 이 Na^+ , K^+ -ATP 효소에 의하면, 몇 종의 중요한 세포 특성(예, 세포 용적, 열 발생, 자유 Ca^{2+} 이온의 세포 내 농도, 신경 전달, 근수축 또는 막 전위)이 조절된다.

각종 면역 조절 과정의 중요한 단계 역시 Na^+ , K^+ -ATP 효소에 의해 조절되므로, 나트륨 펌프는 면역 조절에 중요한 역할을 한다. 이러한 분포 및 중요성에도 불구하고, 이 효소의 조절 매카니즘은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 다만, 이 효소의 소위 '강심성 글리코시드의 수용체 부위'가 나트륨 펌프의 생체 조절용 작용 부위인 것으로 추측될 뿐이다. 몇몇 식물류에 존재하는 강심성 글리코시드는 이 부위에 높은 친화력으로 결합하여 강심 작용 뿐 아니라 심장독성 효과까지도 발휘한다. 이러한 독성은, 이들이 이 효소의 내인성 리간드와 맞지 않음을 말해준다. 문헌 [Progress in Drug Research, 41, 249~291(1993)] 중 더블유. 쇼너의 논문 '내인성 디지털 형 인자'에는, 이러한 많은 연구 노력에도 불구하고, 이러한 내인성 생체 조절 물질의 화학적 특성 및 구조가 아직 밝혀지지 않은 것으로 보고되어 있다. 현재까지는, 특징 분석 및 구조 결정을 가능한 정확히 실시하기에 충분한 양의 내인성 인자를 동물 조직 및 체액으로부터 분리해낼 수 없었다. 따라서, 이들 내인성 리간드와 구조가 동일하거나 유사한 인자를 사용함으로써, Na^+ , K^+ -ATP 효소의 활성 및 이 효소에 의한 몇종의 생체 조절 매카니즘을 효과적으로 조절할 수 있었다.

생체 조절 과정에 관여하는 몇 종의 간단한 무기 물질이 최근 발견되었다. 그러나, 이들 무기 물질은 모두 간단한 메신저 물질 또는 작동 물질(effector)로만 작용한다. 이들은 기본적으로, 생체 조절 작용을 발휘하는데 필요한 3차원 구조 및 이들과 연관된 구조 특이적 작용능이 결합되어 있다. 문헌 [Scientific American, 1992(5), 22~29]에 게재된 에스. 스나이더 및 디. 브레트의 논문 '무수 질산(nitric oxide)의 생물학적 기능'에는, 무수 질산 가스가 비 특이적 면역 반응을 조절하는 기능성 작용 물질인 것으로 보고되어 있다. 생물체에 있어 무수 질산은, 그 수명이 매우 짧아 대부분 국소적인 독성 효과만을 발휘하며, 항상 '현장에서' 바로 제조된다. 면역계의 식세포인 소위 마크로파지가 세균 독소 또는 시토킨에 의해 활성화될 경우, 이들은 수시간 내에 무수 질산을 비교적 다량 생성시킬 수 있으며, 생성된 무수 질산은 면역적 무기로서 사용된다. 간단한 기체 화합물 역시 생체 조절 과정에 관여할 것으로 추측된다. 예를

들어, 에틸렌은 식물 생물학의 중요한 인자로서 공지되어 있다. 에이. 베라의 문헌 [Science, 259, 381(1993)]에는, 일산화탄소가, 구아노신 일인산(GMP)의 순환에 대한 생리학적 조절에 관여하는 것으로 보고되어 있다.

일산화탄소의 또다른 생물학적 작용에 대해서는 이제까지 거의 보고된 바가 없으며, C_3O_2 에 대해서는 보고된 바가 더욱 없다. 단지, 이 화합물이 실온에서 기체 상태인 화합물(비점 $7^\circ C$)이라는 점과, 겨자유 및 아크롤레인의 냄새 및 점막에 의해 자극을 받는다는 점만이 알려져 있다. 아산화 탄소(C_3O_2)는, 헤모글로빈과 비가역적으로 결합하는 비교적 강한 혈액 독소로서, 쥐에 대한 허용 제한 농도는 건조 공기 중의 0.2% 내지 0.4%이다. C_3O_2 는 물과 반응하여 말론산을 형성한다. 그러나, 이러한 형성 반응은, 반드시 미량의 무기산이 존재하는 상태에서만 종전에 청구된 바와 같이 급속히 진행된다. 태고의 지구 대기 중에는 일산화 탄소 이외에도 C_3O_2 가 상당량 존재했을 것으로 추측되고 있으나, 최근에는, 더블유. 헛트레스 등의 문헌 [Nature, 352, 316~318(1991)]에 보고된 바와 같이, 항성간의 우주에 C_3O_2 가 존재한다는 증거가 발견되었다. 그러나, 이 C_3O_2 가 생물학적 유체 내에 존재할 것이라는 구체적 증거는 아직 밝혀진 바 없다. 단량체 가스 및 비정형 중합체가 물에 민감한 점을 고려하여, 종래에는 이들 물질의 생물학적 기능을 대부분 배제시켰었다. 그러나, 에이치. 야나가와 및 에프. 에가미의 문헌 [Precambrian Research, 14, 75(1981)]에 기재된 학설, 즉 수반응성의 비정형 중합체가 간단한 무기 화합물 합성 반응의 출발 물질이 된다는 학설은 기본적으로 가능한 것으로 간주되었다.

C_3O_2 가스는, 황색 내지 진한 적갈색을 띤 비정형 중합체를 다소 빠르게 형성시킨다. 이들 중합체의 구조에 대해서는 구체적으로 알려진 바가 거의 없다. 통상적으로, 이들 중합체는, 비균질한 비정형 물질(종전에는 '적색 탄소'로도 칭함)로 알려져 있다. 아산화 탄소 및 그 중합체의 화학적 특성에 대해서는, 문헌 [Agnew. Chem., 86, 529(1974)]에 게재된 티. 카페 및 이. 짜글러의 논문에서 다루고 있다. 상기 형성된 비정형 중합체 생성물은 물 또는 묽은 알칼리 물질에 부분적으로 용해되어, 진황색 내지 진갈색의 용액을 형성한다. 이들 비정형의 불규칙 중합체의 구조에 대해서는 몇 개의 학설이 제안된 바 있으나, 이들 모두 실험적으로 확인되지는 않은 것이다. 주변이 불포화되어 있어 불안정한 상태인 흑연과 유사한 육각형 격자 구조라는 학설이 가장 가능성이 있을 것으로 추측된다. 이 학설은, 문헌 [Inorganic Chemistry 2, 829(1963)]에 게재된 엔. 에스. 스미스 및 디.에이. 영의 논문에 상세히 설명되어 있다.

혈장 내에 존재하는 생물학적으로 상당히 효과적인 몇 종의 물질은 그 자체로서 보다는 결합체(conjugates)로서 존재하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 스테로이드 호르몬은 황산염과의 결합체 또는 글루쿠로네이트와의 결합체 형태로 혈장 내에 존재하며, 이 호르몬의 분해 산물 역시 그러한 결합체 형태로 제거된다. 이들 결합된 스테로이드는 순수한 활성 성분에 비해 훨씬 우수한 치료 특성을 갖는 것으로 여러 차례 입증된 바 있으며, 이는, 미국 특허 제2,565,115호 및 미국 특허 제2,720,483호에 따른 에스트로겐 스테로이드 결합체 또는 디히드로에피안드로스테론 설페이트(DHEAS)와 관련하여 기재되었다. 상기 언급된 결합체는 생체내 이용률 및 상기 스테로이드 활성 물질의 동화 작용을 조절하므로, 우수한 치료 특성을 갖는 것으로 볼 수 있다. 그러나, 폴리펩티드 활성 물질이 상응하는 결합체를 형성하므로써 그 생체내 이용률이 조절된다는 점에 대해서는 비교적 알려진 바가 없다. 문헌 [Trends Biochemical Sciences 15, 195(1990)]에 기재된 바와 같이, 유비쿼틴과 단백질의 효소 결합체 역시 조절 기능을 갖는다. 폴리펩티드 물질에 적합한 결합체의 발견은, 이 폴리펩티드 활성 물질의 치료 용도에 돌파구를 제시할 수 있다. 공지된 예로서, 지연 작용성(retard-acting) 인슐린에 대한 연구 결과를 언급하고자 한다. 인슐린의 치료 작용 시간은, 아연 염 또는 프로타민 황산염을 첨가할 경우 상당히 연장된다. 그러나, 이러한 첨가제는 다른 부작용을 유발시킬 수도 있다. 인슐린을 지속적으로 방출시키는데 적합한 결합체를 제조하고자 여러 발명자들이 시도하여 왔으나, 아직까지 실현되지 못하고 있다.

발명의 상세한 설명

<발명의 분야>

본 발명의 목적은, 전술한 단점을 갖지 않으면서 질환에 따른 생체 조절 매카니즘의 장애를 회복시키는 생체 조절 활성을 가진 신규의 대환식 화합물 활성 물질을 제공하는 것이다. 이 활성 물질은 또한 공지된 의학의 치료 효과 및 생체내 이용률을 명백히 개선시키는 작용을 한다.

상기 목적은, 본 발명의 청구 범위 제1항 내지 제39항에 청구된 39개의 특징에 의해 이루어진다.

도면의 간단한 설명

도 1은 수 중에서의 $com-(C_3O_2)_6$ 에 대한 전기 이온화 질량 스펙트럼 결과를 제시한 것이다.

도 2는 아민 착물인 $com-(C_3O_2)_6 \cdot (NH_3)_2$ 및 $com-(C_3O_2)_6 \cdot (NH_3)_6$ 의 전기 스프레이 질량 스펙트럼 결과를 제시한 것이다.

도 3은 $com-(C_3O_2)_n$ [식 중, n은 558임]의 다중 하전 단위에 대한 LC 결합된 전기 스프레이 질량 스펙트럼 결과를 제시한 것이다.

도 4는 $com-(C_3O_2H)_{60}$ 및 $com-(C_3O_2H)_{72}$ 의 MALDI 질량 스펙트럼 결과를 제시한 것이다.

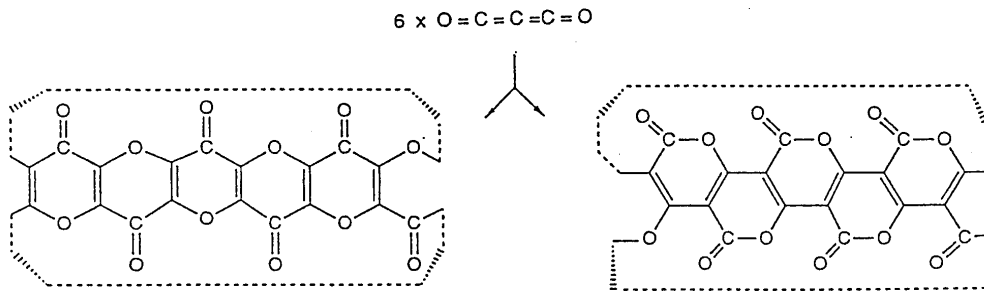
도 5는 KBr 펠릿 중에서의 $com-(C_3O_2)_{10}$ 에 대한 적외선 스펙트럼 결과를 제시한 것이다.

도 6은 수 중에서의 $com-(C_3O_2)_6$ 에 대한 UV-VIS 흡수 스펙트럼 결과를 제시한 것이다.

도 7은 칼럼의 분자량 표준 곡선과 활성 물질 혼합물의 HP 겔 투과 크로마토그램이다.

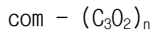
구조에 대한 설명

본 발명의 화합물은, 간단한 무기 아산화탄소(C_3O_2)의 고리형 올리고머화(cyclooligomerization) 반응을 통해 구조 골격(frame)이 형성되는 화합물이다. 아산화 탄소($O=C=C=O$) 자체 및 이것으로 제조된 비정형 중합체는 감수성(感水性) 반응 물질로 알려져 있음에도 불구하고, 놀랍게도 본 발명자들은 특정의 수안정성을 가진 아산화 탄소의 환형 올리고머 구조를 형성하기에 이르렀다. 이들 구조가 수 안정성을 보유하기 위한 기본적인 예비 필수 요건은, 아산화탄소 중에 존재하는 중첩된 $C=C$ 및 $C=O$ 의 반응성 이중 결합이 구조 중에 더 이상 존재하지 않아야 한다는 것이다. 이 요건은, 하기 식에 제시된 바와 같이, 몇 개(바람직하게는 4, 6, 8 또는 10개)의 아산화탄소 분자를 고리화시켜 축합된 4-피론 또는 2-피론 고리를 형성하고, 이들 구조를 다시 이중 변형된 대환(大環)으로 형성시키는 본 발명에 의하면 충족된다.



기본적으로, 아산화 탄소의 환형 올리고머로 이루어진 이들 골격은 유기 화합물이 아니며, 아산화탄소 자체와 마찬가지로 무기 화학 분야에 해당하는 것으로 간주할 수 있다.

아산화 탄소의 대환식 환형 올리고머 골격의 화학식은 다음과 같다:



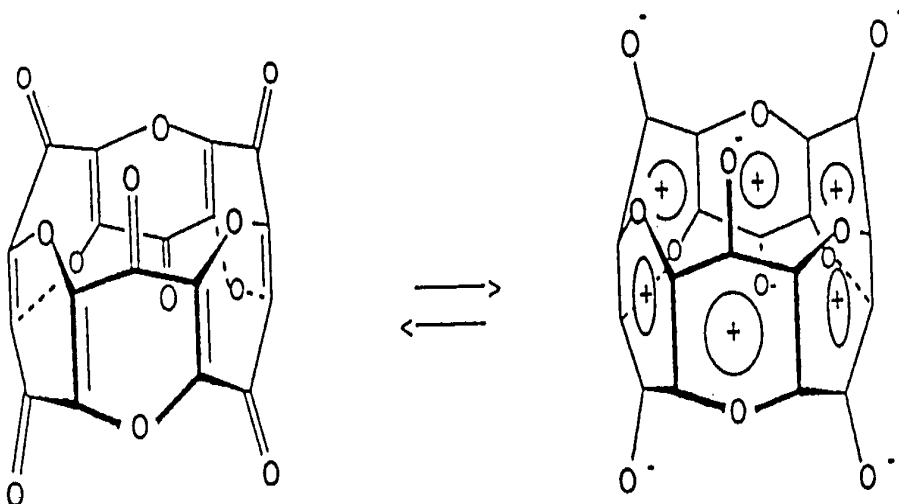
상기 식 중, n 은 C_3O_2 의 환형 올리고머화도이고, com은 이들 단위가 결합된 상기 명시된 대환식 환형 올리고머의 형태를 상징하는 것이다.

또한, 본 발명자들은 아산화 탄소의 대환식 환형 올리고머의 여러 구조 중에서, 특정의 n 값을 가진 몇 개 구조만이 특히 안정하다는 것을 밝혀냈다. 상기 식 중 n 이 4, 6 또는 10이거나 또는 이들의 배수인 대환식 환형 올리고머 골격이 바람직하다.

식 $\text{com}-(C_3O_2)_n$ 중 n 값이 보다 큰 본 발명의 활성 물질은 또한 n 값이 보다 작은 아산화 탄소 환형 올리고머 단위의 몇 배에 해당하는 것으로 볼 수도 있다. 그러한 일련의 아산화 탄소의 대환식 환형 올리고머 중 제1에는 다음과 같다.

아산화 탄소의 환형 육량체 $[\text{com}-(C_3O_2)_6]$

질량 분광분석법을 통해 실험적으로 측정된 몰량($M = 408.19$)은 식 $C_{18}O_{12}$ 에 상응하는 것이며, 동시에 아산화탄소 몰량(즉, 68.032)의 6배에 해당한다. 구조 면에서는, 예를 들어 축합된 2-피론 고리 또는 헤드-헤드 축합된 4-피론 고리를 가진 몇 종의 이성체, 또는 6개가 교번적으로 헤드-테일 축합된 4-피론 고리를 가진 하기 제시된 구조를 가상해볼 수 있는데, 이들 구조는 분광 및 다른 특성 면에서 볼 때 가장 가능성이 있는 것으로 볼 수 있다.



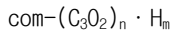
'피론'

'피릴륨'

실제의 전자 분포는, 피론(PYRON) 및 피릴륨(PYRILIUM)으로 칭해진 상기 도시된 구조로서 존재할 것으로 추측되나, 사용된 용매 및 매질에 따라 다른 구조, 즉 극성이 보다 높거나 또는 낮은 토모터 전자 구조를 가질 수도 있다.

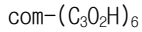
히드록시피란 및 피릴륨 염 유도체

식 $(C_3O_2)_6 \cdot H_{1-6}$ 을 가진 아산화 탄소 환형 육량체의 일부 환원된 유도체의 존재 여부는 질량 스펙트럼을 통해 확인할 수 있다(도 1). 수용액 중에서, 본 발명의 활성 물질은 또한 히드록시피란 유도체로서 존재할 수도 있다. 수소를 몇 배로 첨가한 경우 형성되는 환원 상태의 히드록시 피란 유도체의 화학식은 다음과 같다.

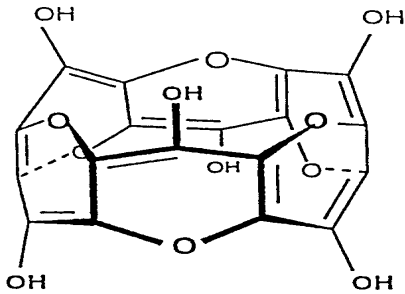


상기 식 중, 결합된 수소 원자의 개수(m)는 고리외 산소 원자의 개수(n)에 의해 제한되며, $m \leq n$ 의 관계에 있다.

완전 환원된 히드록시피란 유도체는, 환형 육량체인 경우 하기 화학식을 가지며, 그 몰량(M)은 414.24이고, 무기 및 유기 유도체의 형성과 관련하여 특별한 중요성을 가지며, $\text{com}-(C_3O_2)_6$ 과 함께, 자체 결합체 및 다른 유도체의 형성을 위한 환형 육량체 계열의 기본 단위를 이룬다.

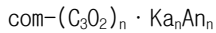


아산화 탄소의 환형 육량체, 즉 $\text{com}-(C_3O_2H)_6$ 의 4-히드록시피란 구조체는 다음의 구조를 갖는다.

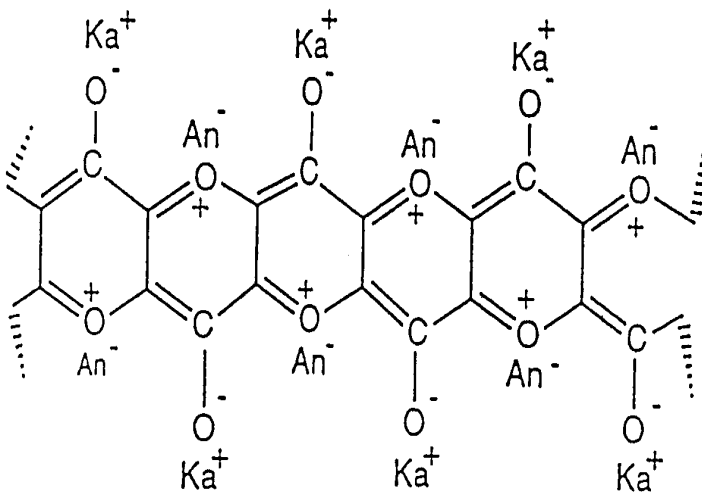


'히드록시피란'

피릴륨 염은, 강한 이온화제(예, 산, 염기 또는 용이하게 용해되는 몇 종의 염)의 존재 하에 음이온(An^-) 및 양이온(Ka^+)을 사용하여 형성시키는 것이 통상적이다. 본 발명의 활성 물질과, 산, 염기 또는 하기 $Ka^+ \cdot An^-$ 의 염 화합물로 제조된 피릴륨 염의 화학식은 다음과 같다.



상기 식 중, Ka^+ 및 An^- 은 피릴륨 골격의 양쪽 이온성 전하를 모두 중화시키는 양이온 반대 이온 및 음이온 반대 이온이다. 피릴륨 염 화합물의 구조는 다음의 식으로 도시할 수 있으며, 반대 이온이 수용액 중에 완전 편재되는 것은 아니다.



음이온(An^-) 및 양이온(Ka^+)의 반대 이온은,

개별적이면서 균질한 무기 또는 유기 양이온 및 음이온 형태, 예를 들어 Ka^+ 가 모두 Na^+ 이고 An^- 은 모두 Cl^- 인 형태로서,

상기 이온의 생리학적 농도에 상응하는 무기 또는 유기 양이온과 무기 또는 유기 음이온의 혼합물 형태로서, 또는

상기 반대 이온을 모두 함유한 양쪽 이온성 화합물 자체, 예를 들어 아미노산, 베타인, 이온 비누 형태로서 존재할 수 있다.

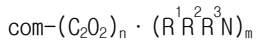
본 발명의 활성 물질의 피릴륨 염 유도체는 대부분 물에 잘 용해될 수 있다. 음이온을 함유한 피릴륨 염(예, 황산염의 염화물)이 아세톤 또는 에탄올 중에서의 용해도가 다소 낮다는 점은, 본 발명의 활성 물질을 본 발명에 따라 분리하는데 이용된다. 생리학적 유체 중에서, 활성 물질의 양쪽 이온성 전하는 이 유체 중에 존재하는 음이온 및 양이온에 의해 중성화된다. 따라서, 화학적으로 합성된 특정 이온 함유 염

화합물을 언급하기 보다는 반대 이온의 통계적 분포를 언급하는 것이 보다 적절할 것이다.

본 발명의 활성 물질의 분리 및 검출시에는, 금속 이온, 바람직하게는 전이 금속 이온[예, Fe(III), Sb(III), Cd(II), Pt(II), Au(III), Pd(IV)]을 사용할 수 있다. 무기 또는 유기 음이온[SCN⁻, BF₄⁻, Cr₂O₇²⁻, MnO₄⁻, 피크레이트, 라이베크이트] 착물로 형성된 화합물도 또한 분리 및 검출에 사용할 수 있다.

첨가 생성물 또는 결합체

무기 화합물 또는 유기 화합물로서 첨가 생성물 분자를 형성하는 과정은, 본 발명의 대환식 아산화탄소 환형 올리고머가 결합능이 높다는 점으로 인해 활성화된다. 유기 화합물을 함유한 화학량론적 또는 비화학량론적 첨가 생성물은 결합체(conjugates)로서 칭한다. 아산화탄소의 대환식 환형 올리고머는, 암모니아, 유기 아민, 아미노산, 펩티드 또는 아민 작용기를 가진 다른 종의 물질을 수 개[환형 육량체의 경우 2 내지 6개가 바람직함] 함유한 안정한 첨가 생성물을 형성할 수 있다. 천연 아미노산, 생물학적 아민, 및 아민 작용기를 가진 다른 유도체가 특히 본 발명의 영역 내에 포함되는 것들이다. 이들 아민 첨가 생성물의 화학식은 다음과 같다.

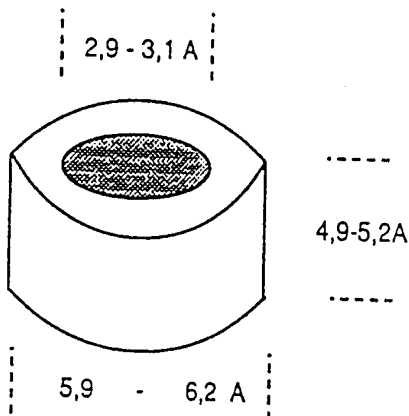


상기 식 중, R¹ 내지 R³은 각각 수소 원자 또는 유기 잔기이고, m은 1 내지 n (n은 전술된 바와 동일함)의 수이다.

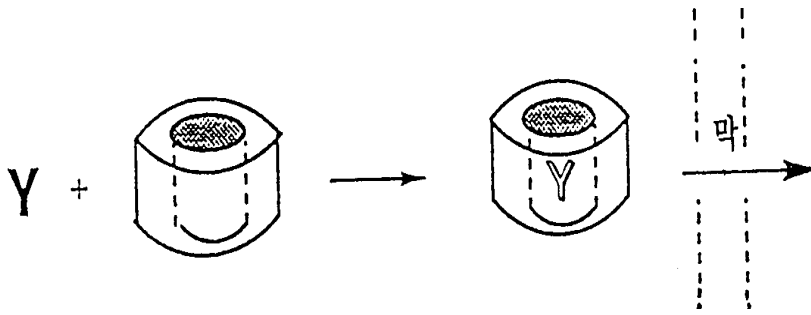
식 com-(C₃O₂)₆ · (NH₃)₂의 환형 육량체의 디아민 첨가 생성물은, ES 질량 분광 광도법을 통해 그 몰량(M)이 442.2인 것으로 밝혀졌으며, 식 com-(C₃O₂)₆ · (NH₃)₆의 헥사아민 첨가 생성물의 몰량(M)은 510.4인 것으로 밝혀졌다. 디아민 첨가 생성물의 경우에는, 2개의 암모니아 또는 아민 분자가 수소 결합에 의해 피론 고리의 카르보닐기에 결합되는 것으로 추측된다. 헥사아민 착물의 경우에는, 대환 구조의 내부 공동이 이미 형성되기 때문에, 호스트-게스트(host-guest) 착물로서 간주한다.

호스트-게스트 착물

본 발명의 활성 물질의 구조 면에서 특히 중요한 제2 특징은, 축합된 피론 또는 히드록시피란 고리가, 본 발명에 따른 대환(바람직하게는 원통형 대환) 형성 방식을 통해 이루어진다는 점이다. 이 고리 구조의 분자 크기는, 본 발명의 호스트-게스트 착물을 형성하는데 적합하다. 보다 작은 분자 또는 분자 단편인 '게스트'는, 원통형 공동 내에 입체적으로 들어맞는 것으로 간주되고, 또는 특정 결합력에 의해 공동의 주변에 결합된다. 아산화 탄소 환형 육량체의 원통형 대환 구조의 형태 및 크기는 아래 그림을 보면 알 수 있다.



양이온(예, 칼륨, 암모늄, 은 또는 루비듐) 또는 음이온(예, 불소, 염소, 포름산염 또는 로데네이트)은, 내부 직경이 2.9Å 내지 3.2Å이고 높이가 4.9Å 내지 5.2Å인 환형 육량체의 대환 내 내부 원통형 공동에 잘 들어맞는다. 본 발명에 따르면, 이온 또는 중성 원소 또는 분자는 com-(C₃O₂)₆ 단위의 원통형 대환 구조의 공동 내에 존재하며, 이 공동에 의해 봉입된다. 질량 분광 광도법을 통해 측정된 이 구조의 몰량은 각 구성 성분들의 합계에 상응하며, 이로써, 이들 호스트-게스트 착물은 별개의 화합물임이 입증되었다. 본 발명자들은 실험을 통해, 보다 작은 무기 또는 유기 화합물(통상적으로 Y로 칭함)(예, 암모니아, 히드록실아민, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 아세톤, 디글로로메탄, 클로로포름, 아세틸콜린, 포름산, 아세트산), 몇 종의 아미노산 및 탄수화물과 아산화 탄소 환형 육량체와의 호스트-게스트 착물을 밝혀낸 것이다. 본 발명에 따르면, 아래 그림에서 알 수 있듯이, 물질 Y가 본 발명의 활성 물질의 내부 공동 내에 '게스트'로서 존재한다.



이러한 '봉입(envelopment)'에 의하면, 물질 Y의 특정 특성이 '차단'되고, 본 발명에 따른 새로운 특성(예, 우수한 막 투과성 및 생체내 이용율)을 얻게된다.

다른 물량을 가진 활성 물질

$M \leq 2,000$ 달톤

이 저 물량의 활성 물질에는, 식 $com-(C_3O_2)_n$ [식 중, n은 4, 6, 10, 12 또는 18임]의 전술된 아산화탄소의 환형 육량체 자체, 또는 분자량이 전술된 한계치(즉, 2,000) 이하인, 식 $com-(C_3O_2H)_n$ 의 히드록시피란 형태, 이들의 모든 유도체, 첨가 생성물, 호스트-게스트 착물이 모두 포함된다. 2 내지 4개의 환형 육량체 단위로 형성된 자체 결합체 역시 저물량의 활성 물질로서 간주된다. 이로써, 본 발명자들에 의해 확인된 물량(M)이 816 달톤인 $com-(C_3O_2)_{12}$ 및 물량이 1,224 달톤인 $com-(C_3O_2)_{18}$ 도 역시 존재 여부를 확인할 수 있다.

$M > 2,000$

이 범주에 속하는 활성 물질은 각기 다른 분자량을 가진 화합물들의 혼합물이다. 그러나, 보다 정밀한 분석 결과, 이들 화합물은 그 수가 상당히 많음에도 불구하고, 특정 분자 크기의 극소수만을 얻을 수 있고 또한 확인될 수 있는 것으로 입증되었다.

아세트니트릴 수용액 중의 활성 물질에 대한 전기 스프레이 질량 스펙트럼(LC-MS)을 통해, 다중 하전된 일련의 이온(m/z)이 존재하는 것으로 입증되었다(도 3 참고). 가장 강력한 성분(A31)에 대해 측정된 값인 $m/z = 1,225.7$ 달톤은, 식 $com-(C_3O_2)_{18}$ 중의 양성자화 분자와 정확히 일치한다. 상응하는 중합체의 몰량 실험치는, 식 $M = n [m/z - 1]$ {제이. 알. 채프만의 문헌 [Practical Mass Spectrometry, 202 페이지, 존 윌리, 뉴욕, 1993] 참고}을 통해 $M = 31 \times 1,224.6 = 37,962.6$ 달톤으로 산출되었다.

확인된 화합물 중 일부의 물량은 하기 표를 통해 구할 수 있다.

물량 실측치		물량 이론치(달톤)		
HP-GP, PAGE*	MS**	n	$com-(C_3O_2)_n$	$com-(C_3O_2H)_n$
	408.2	6	408.2	
	414.2	6		414.2
	680.6	10	680.3	
	816.4	12	816.4	
	1,224.6	18	1,224.6	
~2,500		36	2,449.2	
~4,100	4,084.2	60	4,082.0	
~4,100	4,134.0	60		4,142.5
~5,000	4,900.8	72	4,898.4	
~5,000	4,976.6	72		4,970.9
~10,000	10,065.2	144		9,941.9
~12,500	12,656.8	186	12,654.2	
~15,000		216	14,912.0	
~30,000		432		29,825.7
~38,000	37,963.3	558	37,962.6	
~60,000		864		59,651.4
~120,000		1,728		119,302.7

* 공지된 기준과 비교 ** MALDI를 통해 구한 3개 실험 측정치의 평균치

상기 측정치는, MALDI 질량 분광광도법(MS), 겔 투과 크로마토그래피(GP) 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법(PAGE)을 통해 구한 것이다. MALDI 질량 스펙트럼(도 4)을 통해 확인된 바와 같이, n이 60인 화합물 및 특히 n이 72인 상응하는 화합물이 다른 모든 화합물에 비해 명백히 높은 농도로 존재한다. 이 방법을 통해 구한 물량은, 히드록시피란 올리고머의 식 $com-(C_3O_2H)_n$ 중 n이 60 및 n이 72인 경우에 정확히 상응하는 것이다. 이들 화합물은, n이 60이거나 또는 n이 72인 환형 올리고머로서, 또는 환형 육량체의 기본 단위인 $\{com-(C_3O_2H)_6\}_s$ 중 s가 10이거나 또는 12인 10개 또는 12개의 자체 결합체로서 간주할 수 있다.

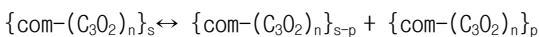
이들 화합물 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_{60}$ 및 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_{72}$ 의 생리 화학적 특성 및 분광 광도 특성에 의하면, 이들 화합물은 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_6$ 단위를 10개, 12개 또는 그 이상 함유한 구형 배열임을 알 수 있다. 오각형 또는 육각형의 대칭 구조를 가진 샌드위치 배열이라는 것은 또한 이 화합물 중의 양쪽 이온성 전하가 다수 중성화되었음을 말해준다.

폴리아크릴아미드 겔 전기영동법(PAGES)에 의한 실험 결과, M ~ 5 kD의 영역에는 강한 밴드가 나타나고 약 10 kD, 12.5 kD, 15 kD, 30 kD, 60 kD 및 120 kD의 몰량 값에서는 부가의 라인이 임의로 존재하는 것으로 나타났다. 이들은 올리고머화도가 $n = 72, 144, 180, 216, 432, 864$ 및 1,728인 경우에 정확히 상응하는 것이다. 놀랍게도 이들 수치는 모두 6 및 12의 특정 배수이다. 겔 중의 폴리아크릴아미드 농도가 16.5%인 경우에는, M ~ 5 kD의 범위에 가장 강한 밴드가 존재한다. 그러나, 다른 겔(예를 들어, 폴리아크릴아미드 함량이 낮은 겔)에 동일한 샘플을 적용시킨 경우에는, 2배 넓은 영역(~ 10 kD)에 주요 밴드가 나타날 수 있다. 이러한 차이는, 활성 물질의 특이적 결합-해리 평형 관계에 의해 설명된다.

결합 평형 및 막 투과

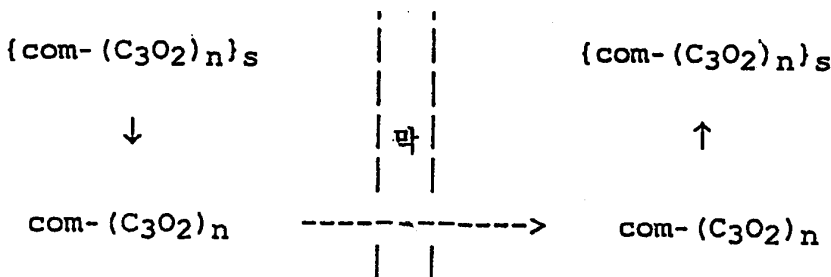
본 발명자들은 또한 고분자량 화합물의 투석 및 한외 여과 간의 구체적 차이를 측정하였다. 투석 시간이 특정 시간 경과한 후에는, 보다 큰(대개는 막 불투성) 활성 물질이 막의 양면 상에서 검출되었다. 하기 평형식에 따른 보다 큰 결합체는 막 투과성의 보다 작은 형태로 해리되고, 이들 보다 작은 형태는 외부 배출 투석물 중에서 보다 큰 자체 결합체로서 재형성된다. 보다 긴 투석 시간이 경과한 후에는, 하기 반응식 1의 평형 상태가 이루어진다.

반응식 1



상기 식 중, s 는 2,3,4,5,6,10 또는 12 및 이들 수의 배수이고, $p < s$ 의 관계에 있다.

보다 높은 몰량을 가진 간단한 환형 올리고머 및 이것이 다수개 결합된 유도체 간의 평형 상태는 여러 인자에 의해 좌우되거나 또는, 예를 들어 용매의 성질, pH 값, 알칼리 금속 및 다른 이온의 농도, 온도 및 용액 중에 존재하는 다른 물질과의 결합 여부에 의해 영향을 받을 수 있다. 상기 반응식에 의하면, 보다 큰 몰량을 가진 본 발명의 활성 물질은 대개 세포내 공간(이 공간은 대개 이 활성 물질의 접근에 의해 차단됨) 내로 투과할 수 있다. 막 외부 공간 내에는, 본 발명의 활성 물질이 보다 큰 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ 화합물로 존재할 수 있다. 상기 반응식 1에 따른 해리에 의하면, 이들 활성 물질은 막을 통과할 수 있으며, 이로써 막 내부 공간에 도달한 후 결합을 통해 보다 큰 화합물로 재형성된다.



보다 큰 자체 결합체는 안정하기 때문에, 생리학적 저장 및 활성 성분의 운반에 적합하며, 따라서 병소 지점에 도달할 수 있다. 이들 결합체는, 자체 형태로 또는 다른 활성 물질과 결합된 상태로 생체 조절성의 치료 효과를 나타내 보인다. 막 불투성 물질 Y의 '차단된' 막 투과는, 본 발명에 따라 물질 Y를 활성 물질의 원통형 내부 공동 내에 '은닉'시키는 방식으로 수행할 수 있다.

분광광도법에 의한 특징 분석

통상적으로, 본 발명의 활성 물질의 분자 스펙트럼은 밴드가 비교적 빈약한데, 이는 상응하는 구조가 상당히 대칭적이기 때문이다. KBr 펠릿 중에서 적은 적외선 스펙트럼(도 5)은, $3500 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$, $1680 \sim 1620 \text{ cm}^{-1}$, $1400 \sim 1385 \text{ cm}^{-1}$, 1210 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 및 $830 \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ 에서 몇 개의 특징적인 흡수 밴드를 갖는 것으로 나타났으며, 1660 cm^{-1} 에서의 강한 밴드는 4-피론 고리의 '고리 호흡 빈도수'로서 해석된다. 2-피론 고리는 1720 cm^{-1} 에 IR 흡수 밴드가 없기 때문에 부적합하다.

UV-VIS 스펙트럼의 최강 흡수도는 약 190 nm에 존재하며, 쇼울더(shoulder)는 약 220 nm 및 265 nm에 존재한다(도 6 참고). 확인 결과, 결합된 이중 결합의 강한 흡수도는 약 320 nm에 존재하며, 약한 비특이적 경사 흡수는 240 내지 400 nm에 존재한다. 그러나, 본 발명자들은 일부 첨가 생성물의 경우 310~340 nm에서 여기 방사선에 의해 400~450 nm에서 형광이 방출됨을 발견하였다. 이로써, 대칭 구조에서는 비허용적인 보다 강한 전이 상태가 존재함을 알 수 있다.

분석 반응

식 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ 의 활성 물질은, 박층 크로마토그래피에서 오염화 안티몬 또는 리베르만-부르하르트(Liebermann-Burchart) 시약을 사용한 양성 반응을 통해 확인할 수 있다. 분리시에는, 살리카겔 60 평판(머크사 제품) 및 1-프로판올, 에틸 아세테이트와 20% 아세트산의 용출 혼합물(60:10:30)을 사용한다. 스프레이 시약으로는, 사염화 탄소 중의 오염화안티몬 포화 용액 또는 무수 에탄올 20 ml 중의 아세트산 무수물 2 ml 과 진한 황산 2 ml 혼합물을 사용한다. 분사 후에는, 평판을 120°C 에서 약 10 분간 가열한 후 $\lambda = 365 \text{ nm}$ 의 자외선으로 검사한다. 형광 스폿을 통해, 본 발명의 활성 물질이 존재함을 알 수 있다.

아민 첨가 생성물 형태의 활성 물질에서는 양성 니히드린 반응이 나타나며, 이 반응은 상기 활성 물질의 분석 검출 또는 분광광도적 분석에 사용할 수 있다. 이 반응은 또한 대부분의 아미노산 및 펩티드에서 나타나기 때문에, 분석 용도로 사용할 경우에는 크로마토그래피에 의한 분리 후에만 적합하다. 박층 크로마토그래피에 의한 분리시에는, 용출제로서, 실리카겔-60 평판(머크사 제품), 및 1-부탄올, 에탄올과 물의 혼합물(50:30:20 v/v)을 사용한다. 스프레이 시약으로는, 에탄올 중의 0.1% 니히드린 용액을 사용하는데, 이 용액은 2%(v/v)의 빙초산 및 0.5%(v/v) 대칭 콜리딘을 사용한다. Rf 영역 0.32 내지 0.45에 황색 스팟이 존재하는 것으로 볼 때, 본 발명의 활성 물질이 어느 정도 존재함을 알 수 있다.

본 발명의 활성 물질의 히드록시피란기는, 폴린-시오칼도(Folin-Ciocalteu) 시약과 약한 양성 페놀 반응을 하며, 이 반응은 확인 과정에 사용할 수 있다. 단백질 분석법으로 공지된 로우리법(Lowry method) 역시 이 방법에 준한 것이므로, 단백질 또는 페놀 물질로부터의 크로마토그래피적 분리를 먼저 수행해야 한다.

본 발명의 물질의 분자 크기에 따른 분석적 분리시에는, HP-GP 법(고성능의 겔 투과 크로마토그래피)을 사용한다. 분리 과정은, 용출제로서 50 mM의 보레이트 완충 용액(pH = 8.1)을 사용하는 TSK G-2000 SW (Toso-Haas) 칼럼(600 x 7.5 mm)에서 수행하는 것이 바람직하다. 혼합물 중 활성 물질 성분의 몰량은, 검정(檢定) 다이아그램(도 7A) 상에서 보유 용적 측정치(도 7)를 사용하여 구한다. 검정 곡선에는, 공지된 분자량을 가진 폴리에틸렌 글리콜을 기준으로 사용한다.

성분의 극성에 따른 크로마토그래피 분리시에는, 고품 상으로서 Nucleosil 5 C₁₈ 칼럼(마쉴리 나겔 제품)을 사용하고 용출제로는 10% 내지 90%의 구배적 아세토니트릴 수용액을 사용하는 역상 HPLC 법을 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 피릴륨 염 유도체는, 반대 이온의 공지된 분석 반응, 예를 들어 은 이온에 의한 할로겐화물 이온의 침전화 또는 바륨 이온에 의한 황산염 이온의 침전화 반응이 이루어지는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 활성 물질은, 강심성 스테로이드 글리코시드(예, 우아바인, 디곡신 등)의 항체와 고감도의 교차 반응이 이루어진다. 이들 유기 화합물은 그 자체로는 면역원성을 갖지 않기 때문에, 이들은 먼저 보다 큰 단백질 분자(예, BSA 또는 아비딘)와 화학적으로 결합한다. 이들 결합체를 토끼에게 수차례 투여하면, 항 우바인 또는 항 디곡신의 특이적 항체가 생성된다. 이들 항체와 본 발명의 활성 물질과의 교차 반응은, 효소형 면역측정 ELISA 법 또는 방사성 면역 측정법(RIA)을 통해 검사한다. 이 기술로는, 극소량의 활성 물질(pg 범위)도 고감도로 측정해낼 수 있다. 사람 체액 중에서는, 강심성 글리코시드(심장 질환에 대한 특이적 치료시에만 존재함)에 의해 그 측정이 방해받을 수 있다.

몰량이 큰(즉, M > 2.0 kD) 본 발명의 활성 물질은, 면역 글로블린과 상당히 특이한 반응을 나타내 보인다. 사람 또는 동물의 면역 글로블린과 상기 본 발명의 활성 물질 간의 면역 특이적 침전화 반응은, 분광광도 측정법 또는 아가로스 겔 중의 오탁터로니법 또는 면역 전기 영동법(로렐)을 통해 검사한다. 면역 글로블린과의 반응에 있어, 정상 혈청과 병리적 혈청은 상당한 차이를 보이므로, 각종 면역 병리학의 진단시 이들 반응을 이용할 수 있다.

0-알킬 및 0-아실 유도체

잔기(R)의 무기 또는 유기 분자가 기본 골격의 산소 원자에 결합함에 따라, 식 com-(C₃O₂)_n · R_m [식 중, R은 무기 또는 유기 분자 및/또는 유기 잔기, 바람직하게는 메틸, 에틸, 아세틸, 벤질이고, m ≤ 2n임]의 무기 및/또는 유기 유도체 또는 결합체가 형성된다.

제조 방법

본 발명에 따르면, 본 발명의 대환식 물질의 합성용 출발 물질로서 아산화탄소(공지된 방법을 통해 제조 가능함)를 사용할 수 있다.

본 발명에 있어서, 분별 증류에 의해 정제된 C₃O₂는 광화학적인 방식을 통해 또는 안정한 보조제의 사용을 통해 환형 올리고머 유도체로 전환된다. 아산화탄소의 합성 과정은, 오산화인의 작용 하에 및/또는 가열을 통해 저분자량의 디카르복실산(예, 말론산 또는 이것의 유도체)으로부터 2 배량의 수분을 제거하는 공지된 방법을 통해 수행한다. 그러나 이러한 방법은, 원치 않는 비정형의 아산화탄소 중합체가 형성된다는 단점이 있다. 본 발명자들은, 비양자성 용매 중에서 가열을 통해 산 또는 이것의 유도체로부터 수분을 제거하는 방법이 본 발명의 활성 물질의 제조에 훨씬 더 적합하다는 것을 밝혀내기에 이르렀다. 본 발명에서는, 산 또는 이것의 해당 유도체를 가열하거나 또는 교반하면서 비양자성 용매[바람직하게는 디메틸포름아미드 또는 아세트산 무수물] 중에 용해시킨다. 이 혼합물을 120°C 내지 150°C로 가열하면, 수분 후에 C₃O₂가 형성되기 시작한다. 이러한 방식으로 제조된 아산화탄소를 본 발명의 환형 올리고머 활성 물질로 전환시키기 위해서는, 본 발명에 따라 광화학적으로 활성화시키거나 안정한 보조제를 첨가한다. 그러한 보조제로는, 대환 구조 형성을 위한 일종의 주형으로 작용하는 물질이 효과적인 것으로 밝혀졌다. com-(C₃O₂)₆ 대환의 내부 공동(즉, 내부 직경 2.9 Å 내지 3.1 Å)에 상응하는 반경을 지닌 이온을 함유한 안정한 염 화합물이 바람직하다. 이때 바람직한 이온으로는 루비듐(2.94 Å), 칼륨(2.66 Å), 암모니아(2.86 Å) 및 불소(2.72 Å)가 있다.

본 발명자들은, 본 발명의 아산화탄소의 대환식 환형 올리고머를 합성하는데 있어, 몇 종의 효소, 바람직하게는 '폴리케타이드 합성 효소(PHSs)'의 부류에 속하는 효소를 사용할 수 있음을 밝혀냈다. 몇 종의 카르복실산 유도체, 바람직하게는 말론산 유도체, 보다 바람직하게는 말로닐 조효소 A를 사용하였다. 이 말로닐 조효소 A는 비오틴(biotin)의 존재 하에 아세틸 조효소 A와 CO₂로부터 용이하게 제조될 수 있다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 생체 조절 활성 물질 역시, 일산화탄소를 출발물질로 하는 일부 대량 생성물의 부산물로부터 분리해낼 수 있다. 본 발명자들은, 일산화탄소 또는 합성 가스를 출발 물질로 하는 공업적 제조 방법에 따른 몇 종의 공지된 유기 합성 생성물이 본 발명의 활성 물질을 소량이지만 하나 검출가능한 양 만큼 함유할 수 있다는 놀라운 사실을 밝혀냈다. 이러한 점은, 일산화탄소 및 합성 가스 중의 아

산화탄소 함량이 낮다는 점으로 설명될 수 있다. 이러한 대량 생성물 중에 극소 함량으로 존재하는 본 발명의 활성 물질의 함량을 높이기 위해 분별 증류법이 이용된다. 물 또는 완충 수용액 2 부 내지 60 부('부'는 특별한 언급이 없는 한 '중량부'를 칭하는 것임), 바람직하게는 20 부를 출발 물질, 바람직하게는 합성 가스로 제조된 공업용 메탄올 100부에 첨가한 후, 증류 컬럼을 이용하여 이 혼합물로부터 먼저 메탄올을 증류 배출시킨다. 이로써, 나머지 수상 중에는 본 발명의 활성 물질이 고농도로 함유된다. 새로운 메탄올 상을 첨가하여 여러 회 반복적으로 증류시키면, 본 발명의 활성 물질을 상당한 농도로 얻을 수 있다. 본 발명의 활성 물질은, 분별 증류법, 또는 고품상(바람직하게는 목탄(charcoal) 또는 역상 실리카)에서의 흡수법 및 용매 혼합물(바람직하게는 물과 메탄올의 혼합물)을 이용한 탈착법을 통해 상기 용액으로부터 분리할 수 있다.

본 발명에 있어서, 본 발명의 활성 물질은 식물 추출물, 식물 세포 배양액 또는 세균 배양액으로부터도 분리된다. 다수 종의 식물 중에 대해, 그 중에 함유된 본 발명의 활성 물질이 그 자체로서 존재하지 않고, 확인되지 않은 다른 성분(바람직하게는, 독성 식물 성분)과의 결합체로서 존재하는지의 여부를 검사하였다. 미정제 원료로는, 독성 성분(예, 알칼로이드 또는 심장독성 글리코시드)을 함유한 식물 종이 바람직하다. 비교적 고품상의 사포닌 또는 탄닌을 함유한 식물 종 역시 본 발명의 활성 물질을 분리하기에 적합한 출발 물질이다. 식물 원료로는, 뿌리, 근경, 줄기, 잎, 껍질, 종자, 또는 공지된 방법에 의해 유효 조직이 형성되는 해당 식물 세포 배양액이 적합하다.

저분자량의 아산화탄소 유도체, 바람직하게는 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ 을 제조하고자 하는 경우에는, 본 발명에 따라 하기 방법을 이용한다. 핵산으로 탈지시킨 건조된 식물 재료 1 중량부에 추출용제, 바람직하게는 30%의 알콜 수용액 10 중량부를 첨가한 후, 약하게 가열하면서 24 시간 동안 침연시킨다. 이 과정을 수 회(바람직하게는, 2 회 내지 3 회) 반복하여, 생성된 알콜 추출물을 혼합한 후, 이것을 농축시킨다. 농축된 덩크제에는, 산(바람직하게는, 아세트산 또는 염산)을 0.01 % 내지 5 % [바람직하게는 1 % (덩크제 기준)]의 양으로 첨가하여 끓인 후, 80°C 내지 100°C로 단시간(바람직하게는 10 분 내지 30 분) 유지시킨다. 냉각된 용액은 염기(바람직하게는 NH_4OH)로 중화시킨 후, 액체 100 중량부당 1 중량부 내지 20 중량부(바람직하게는 5 중량부 내지 10 중량부)의 목탄으로 처리한다. 여과된 목탄은 물로 다시 세척하여 여과한다. 진공 하에서 건조된 목탄을 끓고 있는 추출용제, 바람직하게는 에탄올과 물의 혼합물(1:1)로 처리한 후, 이 과정을 2 회 반복한다. 이와 같은 방식으로 얻은 본 발명의 활성 물질 용액은 안정하여 장 기간 보관에 적합하다. 또한, 이 용액은 농축 및 냉동 건조시킬 수도 있다. 반복적인 재결정(알콜과 에테르의 혼합물을 사용하는 것이 바람직함)을 통해 고품 잔류물을 정제시킨다. 이러한 방식으로 분리된 첨가 생성물은 안정하여 장기간의 보관에 적합하다.

고분자량의 환형 올리고머 아산화탄소 화합물을 제조하고자 할 경우에는, 본 발명에 따라 하기 방법을 이용한다. 페트롤륨 에테르로 탈지시킨 건조된 식물 원료 1 중량부에 메탄올 5 중량부 내지 20 중량부(바람직하게는 8 중량부)를 첨가하고, 약하게 가열하면서 1 시간 내지 36 시간(바람직하게는 16 시간) 동안 침연시킨다. 이 과정을 수 회(바람직하게는 2 회) 반복하여 생성된 추출물을 모아, 이들을 농축시킨다. 농축된 용액은, 수산화물의 유기 용매(바람직하게는 아세톤 또는 에탄올) 내에 1:20 내지 1:2 (바람직하게는 1:8)의 비율로 주입한다. 형성된 침점물은, 여과 또는 원심 분리를 통해 분리한 후, 최소량의 물 또는 완충 용액에 용해시킨다. 이 전체 과정을 1 회 내지 5 회(바람직하게는 2 회) 반복한다. 이러한 방식으로 얻은 미정제 생성물은, pH가 9 내지 10.5인 완충액으로 알칼리화된 최소량의 물에 용해시킨 후, 막(바람직하게는, 배제 한계가 3 kD인 막)을 사용하고 pH가 9 내지 10.5인 완충액으로 알칼리화시킨 증류수를 사용하여 투석한다. 막 외부의 수분을 몇 차례 교체해 주면서 장시간 동안(바람직하게는 3 일 내지 4 일 동안) 투석을 실시한 후, 막 내부 용액을 여과시킨 다음, 조심스럽게 농축하여 냉동 건조시킨다.

본 발명에 있어서, 상이한 물량을 가진 본 발명의 활성 물질을 분리하는 데에는, 이온 교환 기능을 가진 중성 흡착제 또는 이온 교환 상(예, 수지, 겔, 또는 변성된 다당류)을 사용한다. 본 발명의 활성 물질은 양쪽 이온성을 갖기 때문에, 음이온성, 양이온성, 또는 혼합 이온 상을 사용할 수 있다. 먼저, 식물 상 추출물 또는 다른 원료 추출물을 이온 교환 상으로 처리한다. 성분들을 고품 상에 결합시킨 후, 추출액 중에 통상의 성분(탄수화물, 아미노산)이 검출되지 않을 때까지, 컬럼을 과량의 중성 또는 약산성 용출액(바람직하게는 물 또는 완충액)으로 철저히 세척한다. 양이온성으로부터 활성 물질을 탈착시킬 경우에는, 묽은 무기산(바람직하게는 염산), 또는 유기산(바람직하게는 아세트산)을 사용한다. 음이온 상 또는 혼합 이온상에 결합된 본 발명의 활성 물질은, 묽은 알칼리(바람직하게는 0.1몰 내지 0.3 몰의 수산화 암모늄 용액 또는 수산화칼륨 용액)를 사용하여 탈착시킨다. 역상 실리카로부터 탈착시킬 경우에는, 용매(바람직하게는 메탄올 또는 수성 아세토니트릴)를 사용한다.

본 발명에 있어서, 중성상(예, 실리카 겔, 폴리amide 또는 각종 다당류)으로부터 활성 물질을 탈착시키는 경우에는, 0.2 % 내지 5 %, 바람직하게는 1.2 %의 나트륨 도데실설페이트(SDS) 용액 또는 1 몰 내지 12 몰, 바람직하게는 8 몰의 우레아 용액을 사용한다.

본 발명에 있어서, 물량이 다른 본 발명의 활성 물질을 분리하여 정제하는 과정은 겔 여과법 또는 막 투석법 및 한외 여과법을 사용하여 실시한다. 본 발명의 활성 물질을 분자 크기에 따라 분리하는 경우에는, 겔 크로마토그래피법을 합성 고품 상(바람직하게는, 세파칼 200, 세파덱스 LH-20 또는 TSK HW-60)과 병용한다. 용출액으로는, 약염기 완충액, 바람직하게는 아세트산 암모늄 또는 중탄산 암모늄 또는 0.01 몰 내지 0.3 몰, 바람직하게는 0.15 몰의 NaCl 용액 또는 KCl 용액을 사용한다. 이러한 분리법을 사용하면, 먼저 고분자량의 화합물이 용출된 후, 이어서 저분자량의 화합물, 예를 들어 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2)_6$ 또는 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2)_{10}$ 이 컬럼으로부터 배출된다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 활성 물질과 식물 성분으로 형성된 여러 결합체들도 직접 분리해낼 수 있다. 이들 점착성의 황갈색 결합체는 대부분, 유기 용매(바람직하게는 아세톤 또는 디에틸 에테르)를 사용하여 농축된 메탄올계 식물 추출물로부터 침전시킬 수 있다. 이러한 방식으로 얻은 결합체들을 수 회(바람직하게는 3 회 내지 5 회) 반복적으로 침전화시키면 비교적 균일해진다. 본 발명에 따르면, 상기 제조된 결합체들을 절단하는 데 하기 염 석출법을 이용할 수 있다. 결합체를, 무기 염(바람직하게는 황산 암모늄)이 5 % 내지 50 % (w/w), 바람직하게는 15% (최종 용액 기준)의 양으로 용해되어 있는 물에 용해시킨다. 이 용액에 유기 용매(바람직하게는 n-부탄올 또는 2-프로판올)를 첨가한 후 강하게 교반한다. 상들

을 분리하고, 이 과정을 2 회 내지 5 회(바람직하게는 3회) 반복한 후, 산을 사용하여 수상의 pH를 1로 조절한다. 이 결합체를 본 발명에 따라 추가로 절단한 후 물에 용해시키고, 암모니아로 pH를 10으로 조절 한 뒤, 이 용액을 교반하면서 1:0.5 내지 1:6, 바람직하게는 1:2의 비율로 염소화 용매, 바람직하게는 디 클로로메탄 또는 클로로포름에 첨가한다. 이어서, 강하게 교반하여 형성한 매우 안정한 발포성 에멀전을 분리하고, 감압하에 유기 용매를 제거한다.

본 발명의 활성 물질은 박테리아 출발 물질로부터 분리할 수도 있다. 이러한 경우, 본 발명에 따르면 각 종 박테리아 배양액, 바람직하게는 BCG(바실러스 쿠알메테-구에린; *Bacillus Cualmette-Guerin*), 코리네 박테리움 파르부름(*Corynebacterium Parvum*) 또는 에스케리차 콜리(*Escherichia coli*)를 사용할 수 있다. 먼저, 물리적인 처리, 바람직하게는 초음파 처리를 실시한 후, 묽은 무기산, 바람직하게는 염산을 사용하여 가수 분해를 실시한다. 여과된 가수 분해 산물은 임의로 중화시키고, 고형 상, 바람직하게는 정상상 또는 역상 실리카겔에 통과시킨다. 아미노산, 탄수화물, 및 다른 간단한 가수 분해 산물이 용출액에서 전혀 검 출되지 않을 때까지, 고형상을 각종 중성 용출제로 처리한다. 본 발명의 활성 물질은 묽은 알칼리, 바람 직하게는 0.1 몰 내지 0.2 몰의 수산화암모늄을 사용함으로써, 또는 역상인 경우에는 메탄올 또는 수성 에탄올 또는 아세토니트릴을 사용함으로써 탈착시킨다.

동물의 조직과 조직액은, 본 발명의 활성 물질을 미확인 결합체로서 소량 함유할 수 있다. 본 발명에 따 라, 먼저 조심스럽게 냉동 건조시킨 유기 유체(바람직하게는, 오줌)의 조직을 유기적으로 추출한다. 선택 적 친화성 크로마토그래피법을 사용하여 본 발명의 활성 물질을 농축된 유기 추출물로부터 분리하여 정제 한다. 이러한 목적을 위해, 공지된 강심성 글리코시드, 바람직하게는 우아바인 또는 헬레브린을 친화성 고형 상(바람직하게는 세파로즈)에 공유 결합시킨다. 이러한 친화성 상은, 농축된 미정제 물질 용액 중의 본 발명의 활성 물질을 보유시키는 작용을 한다. 컬럼을 약산성 완충액 또는 중성 완충액으로 여러 번 세 척한 후, 알칼리 완충액을 사용하여 본 발명의 화합물을 방출시킨다.

생체 조절 용도

본 발명자들은, 본 발명의 활성 물질이 Na^+, K^+ -ATP 효소(이것은 나트륨 펌프로도 알려짐)의 활성을 효과 적으로 조절한다는 것을 밝혀냈다. 널리 분포하는 이러한 효소는, 소위 능동적 막 투과 작용을 통해 가장 중요한 알칼리 금속 이온의 세포외 농도 및 세포간 농도를 조절한다. 이때 필요한 에너지는 ATP의 가수 분해에 의해 조달되며, 따라서 ATP의 가수 분해는 이 효소의 활성과 직접 연관이 있다. 본 발명의 활성 물질은 상기 효소의 복합 활성을 조절할 수 있다. 이러한 조절의 방향과 강도는 본 발명의 활성 물질의 몰량 및 농도에 따라 좌우된다. 존재하는 알칼리 금속 이온 및 기타 무기 이온의 성질 및 농도는 실질적 으로 이러한 조절 효과에 영향을 미친다. 본 발명의 활성 물질을 적혈구 현탁액에 첨가하면, 세포외 Na^+, K^+ -ATP 효소의 증가, 즉 나트륨 펌프의 활성도가 이루어진다. 반대로 Na^+, K^+ -ATP 효소에 대한 억제 실험은, 시험 관 내에서 몰량이 보다 적은 본 발명의 활성 물질을 특정 농도로 사용하여 실시한다.

본 발명의 활성 물질을 우아바인 또는 다른 강심성 글리코시드와 함께 사용하면, 이들 글리코시드의 독성 부작용도 감소한다. 본 발명의 활성 물질을 글리코시드 1 몰당 0.02 몰 내지 2 몰, 바람직하게는 1 몰의 비로 첨가한 경우, 헬레브린의 LD_{50} 값이 상당히 높아졌는데, 이는 급성 독성이 저하되었음을 의미하는 것 이다. 또한 실험을 통해 입증된 바와 같이, 본 발명의 활성 물질은 다수의 기타 주요 효소(예, 콜리게나 아제, 히알루로니다아제, 포스포키나아제 및 다른 효소)의 활성을 조절할 수 있다. 이러한 점들에 의거할 때, 본 발명의 활성 물질은 Na^+, K^+ -ATP 효소의 내인성 리간드로서 사용될 수 있다.

면역 조절

본 발명자들은 본 발명의 활성 물질이 여러가지 면역 조절 작용을 가지고 있음을 밝혀 냈다. Na^+, K^+ -ATP 효소는 다수의 면역학적 과정에 실질적으로 관여하므로, 상기 조절 매카니즘은 Na^+, K^+ -ATP 효소의 조절에 의해 부분적으로 설명될 수 있다.

또한 본 발명의 활성 물질의 신규한 면역 조절 효과는, 이들 활성 물질이 Fc 수용체에 대해 특이적인 친 화성을 갖는다는 점으로 인해 달성된다. 이들 수용체는 각종 면역 세포에 결합하고, 이들 수용체의 결합 부 또는 비결합부는 그러한 면역세포의 활성을 조절하는 데 중요한 작용을 한다. 임상 시험 결과, 본 발 명의 활성 물질은, 항원 의존성 세포내 세포 독성(ADCC)에 있어 병리학적으로 활성화된 킬러 세포(K 세포)와 다른 림프구의 활성을 상당히 억제시킨다. 한편, 본 발명의 활성 물질은 자발적 세포내 세포 독 성(SCMC)에 있어 천연 킬러 세포(NK 세포)의 활성에 대해서는 이와는 다른 영향을 미친다. 류마티스 환자 인 경우에는, 병리학적으로 과잉 자극된 자발적인 세포 독성이 명백히 억제된다. 시험 대상이 건강한 사 람인 경우에는 자발적인 세포 독성에 거의 영향이 없다. 이러한 임상 데이터를 통해, 본 발명의 활성 물 질은 병리학적 자가공격성 과정을 억제시키므로 우발성 류마티스의 치료, 또는 조직 이식 거부 예방 또 는 기관 이식 거부 예방에 적합하다는 것이 입증되었다. 이러한 모든 효과는, 본 발명의 활성 물질을 상당히 소량($\mu\text{g}/\text{kg}$ 단위)만 사용하여도 얻어질 수 있음을 유의하는 것이 중요하다. 한편, 본 발명의 화합 물의 독성은 극히 낮다. 따라서, 본 발명의 사람 치료 용도에 있어 가장 중요한 점인 약물 독성학적 필수 요건들이 충족된다. 본 발명의 활성 물질은 류마티즘 치료시에도 명백히 유리하게 작용한다. 저분자량의 환형 올리고머 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ (n 은 6이 바람직함) 및 이것의 첨가 생성물은 상당히 강한 진통 효과 및 진경 효과를 나타내 보인다. 국소 투여 직후에 나타나는 진통 효과 및 진경 효과는 류마티스 치료 용도에 있어 서 중요한 이점으로 작용한다. 고통을 급속히 완화시키는 작용 및 진경 작용은, 정상적인 면역 조절 상태 가 재확보됨에 따라 장기간 동안 유지된다. 몰량이 보다 큰 본 발명의 활성 물질은, 면역 자극을 모방하 는 주목할만한 비특이적 효과를 발휘할 수 있다. 이러한 점은 세균 감염을 이용한 동물 실험을 통해 분명 히 확인된 점이다. 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)를 치사량 투여한 경우, 본 발명의 활 성 물질로 처리한 동물은 대조군의 동물에 비해 생존율이 훨씬 길다.

본 발명의 생체 조절 활성 물질은 순수한 물질로서 또는 혼합물로서 또는 약학 조성물 형태로 각각 투여 할 수 있는 데, 이중 약학 조성물은 본 발명의 활성 물질 이외에 약학적으로 허용 가능한 보조제 및/또는 담체를 1 종 및/또는 다수 종 함유한다. 그러한 물질들로는, 0.9% 염화나트륨 용액, 1% 내지 5% 글루코스

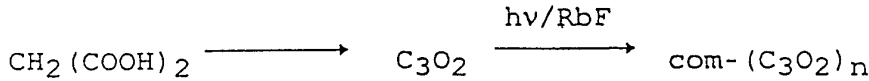
또는 프록토스 용액, 카르복실메틸셀룰로오스, 감자 전분, 젓당, 라놀린, 만니트, 스테아르산 마그네슘, 1,2-프로필렌글리콜, 글리세린, 세틸스테아릴 알콜, 니파긴, 나트륨 라우릴 설페이트 및 탈크를 들 수 있다. 이러한 방식으로 제조된 약학 조성물에는 부가의 치료적 활성 물질 또는 보조제를 임의로 첨가할 수도 있다. 이러한 생약 제제로는 비경구 투여, 근육 내 투여, 정맥 내 투여, 피하 투여, 관절 주변 투여 또는 관절내 투여에 적합한 모든 제제, 경구 용도(예, 정제, 캡슐 또는 드립제), 또는 외용에 적합한 형태(예, 연고, 크림, 겔 또는 좌약)가 있다.

본 발명은 하기 실시예를 통해 보다 상세히 설명하고자 한다.

실시예

실시예 1

아산화탄소로부터의 합성



환류 수 냉각기를 구비한 유리 반응기에서, 유조(80°C)를 사용하여 가열하고 교반하면서 말론산 15 중량부를 아세트산 무수물 80 중량부에 용해시켰다. 환류 냉각기의 외연부에 2개의 드라이 아이스 냉각 트랩을 연결시켜, 발생하는 휘발성 화합물을 수거하였다. 산을 모두 용해시킨 후, 불화 루비듐 0.2 중량부를 첨가하고, 250 W의 태양 램프를 사용하여 광화학적으로 조사하였다. 이로써, 유조의 온도가 최대 130°C 내지 150°C까지 상승하였으며, 반응 혼합물은 점점 진한 갈색을 변화였다. 강한 진공 하에서 휘발성을 띠는 아산화탄소 및 그 유도체를, 드라이아이스 및 아세톤으로 냉각시킨 트랩 내에서 응축시켰다. 이 응축물은 분별 진공 증류법에 의해 정제하였다. 이러한 방식을 얻은 활성 물질은 공지된 크로마토그래피법을 통해 정제한 후 분석하였다.

실시예 2

공업용 메탄올로부터의 분리

pH가 9인 0.1 몰 아세트산 암모늄 완충액 250 중량부를 합성 가스로 제조된 메탄올 1000 중량부에 첨가한 후, 증류 칼럼을 사용하여 이 혼합물로부터 메탄올을 증류 배출시켰다. 나머지 수상에 다시 메탄올 1000 중량부를 첨가한 후, 3회 내지 4회 반복하여 메탄올을 증류시켰다. 최종적으로 남은 수상을 조심스럽게 농축시킨 후 목탄으로 처리하였다. 목탄 50 중량부를 여과에 의해 분리하여, 공기 중에 건조시킨 다음, 80°C 내지 90°C에서 80%(v/v) 에탄올이 함유된 물 400 중량부로 처리하고, 30분 동안 침연시킨 후 가온 여과시켰다. 이 추출 과정을 2회 반복하였다. 수거한 에탄올 추출물을 혼합하여, 조심스럽게 농축한 후 냉동 건조시켰다.

실시예 3

헬레보루스(Helleborus) 종으로부터의 분리

헬레보루스 푸르푸라센스(Helleborus purpurascens)[라누쿨라세(Ranunculaceae)과]의 뿌리 또는 근경의 일부를 건조시켜 잘게 썬 후, 헥산 120 중량부로 탈지화시키고, 염화메틸렌 80 중량부로 예비 추출시켰다. 추출용제를 제거한 후, 건조된 잔류물은 30%(v/v) 에탄올을 함유한 물 200 중량부로 실온에서 24 시간 동안 침연시켰다. 추출 과정을 2회 반복한 후, 추출물들을 모아 여과하고 진공 하에 농축시켰다. 이러한 방식으로 얻은 추출물 250 중량부를 진한 염산 3 중량부에 첨가한 후, 95°C에서 20분 동안 가열하였다. 이 용액을 중화시킨 후, 소량의 목탄으로 처리하여 여과시켰다. 여액을 진공하에 농축시켜 8 배 부피의 아세톤에 쏟아 부은 후, 원심 분리된 침전물을 최소량의 물에 용해시키고, 아세톤으로 2 회 내지 3 회 반복하여 침전시켰다. 생성된 침전물은 최소량의 0.1 몰 염화나트륨 용액에 용해시키고, 이 용액을 TSK HW-60이 충전된 겔 컬럼 상에 통과시켰다. 용출 과정은 0.125 몰의 암모니아 수용액(이 용액은 10%(v/v)의 2-프로판올도 역시 함유함)을 사용하여 5 cm/시간의 유속으로 수행하였다. 230 nm에서 광학적 밀도를 측정하므로써 용출 여부를 검출하였다.

실시예 4

비티스 비니페라(Vitis vinifera)의 종자로부터 활성 물질의 분리

비티스 비니페라의 종자 25 부를 건조시켜 미분한 후, pH가 9.6인 0.5 몰 붕산염 완충액 150 중량부에 첨가하고, 가열한 다음, 90°C에서 30분 동안 침연시켰다. 여액을 농축시킨 후, 교반하면서 8 배 부피의 냉각된 에탄올에 부었다. 형성된 침전물을 원심 분리하고, 최소량의 물에 용해시킨 다음, 6 배 양의 냉각된 에탄올을 사용하여 각각 2 회 침전시켰다. pH가 약 알칼리성인 최소량의 아세트산 암모늄 완충액에 용해된 침전물을 한외여과법에 의해 분리하였는데, 이 때 사용된 막은 분자 배제 한계가 30 kD, 10 kD, 3 kD 및 1 kD인 것이었다. 이러한 방식으로 분리한 분류물은, pH를 약산성으로 재조절한 후 동결 건조시켰다.

실시예 5

피톨라카 아메리카나(Phytolacca americana)로부터 활성 물질의 분리

피톨라카 아메리카나의 뿌리 100 중량부를 건조시킨 후, 0.5 mm 내지 1.2 mm의 입자 크기로 잘게 부순 다음, 헥산 600 중량부로 24 시간 동안 계속 처리하여 탈지화시켰다. 먼저, 헥산을 가압하여 제거하고, 헥산 냄새가 더 이상 느껴지지 않을 때까지 식물 원료를 공기 건조시켰다. 건조된 식물 원료는 5%(v/v) 아세트산을 함유한 물 800 중량부로 실온에서 4 시간 동안 침연시켰으며, 이 과정을 2 회 반복하였다. 추출물들을 모아 여과한 후 진공하에 농축시켰다. 수용액 100 중량부에 황산암모늄 15 중량부 내지 50 중량부를 적가하여 용해시켰다. 염 석출 방식에 의해 침전된 단백질은 원심 분리 및 여과를 통해 제거하였다. 상등액 50 중량부에 1-부탄올 50 중량부를 첨가한 후 강력하게 교반하였다. 시간이 어느 정도 경과한 후,

유기 상을 분리하고, 부탄올을 사용하여 2회 반복적으로 추출하였다. 부탄 용액을 모아 합성한 후, 0.1% 암모니아를 함유한 물로 재 추출하였다. 수성상은 진공하에 농축시킨 후 겔 여과 방식으로 정제하였다.

실시예 6

에스케리차 콜리로부터의 제조

트립톤 20 중량부, 효모 추출물 10 중량부, NaCl 20 중량부, 한천 30 중량부를 함유하고, 적당한 영양 첨가제가 강화되어 있는 오토클레브 내 배양 배지 2000 부피부에 에스케리차 콜리 균주 K-12(1:100의 희석액 상태)를 접종하였다. 포화 밀도가 2×10^9 세포/ml에 도달할 때까지 배양액을 37°C로 유지시켰다. 이 반응 혼합물을 초음파 처리하고, 1.0 N 아세트산을 사용하여 90°C에서 20분 동안 가열하고 냉각시킨 후, 여과한 뒤 진공 하에 농축시켰다. 농축된 용액 150 중량부를 컬럼 크로마토그래피(머크사 제품)의 역상 실리카(RP18) 상에 흡착시키고, 고행 상을 먼저 2%(v/v) 아세트산이 함유된 물로 세척한 후, n-프로판올:에틸 아세테이트: 20 ml 봉사/봉산염 완충액[600%(v/v):100%(v/v):300%(v/v)]으로 구성된 완충액 혼합물 1000 중량부로 세척한 다음, 최종적으로 물로 세척하였다. 용출액에서 아미노산, 탄수화물 및 기타 단순한 가수분해 산물이 전혀 검출되지 않을 때까지, 고행 상을 중성 용출제로 장기간 세척하였다. 본 발명의 활성 물질은 아세토니트릴을 사용하여 탈착시켰으며, 이 때 사용된 과량의 아세토니트릴은 진공 하에서의 농축 과정을 통해 제거하였다. 이러한 방식으로 얻은 본 발명의 활성 물질 용액은 농축시켰다.

실시예 7

동물 체액으로부터의 분리

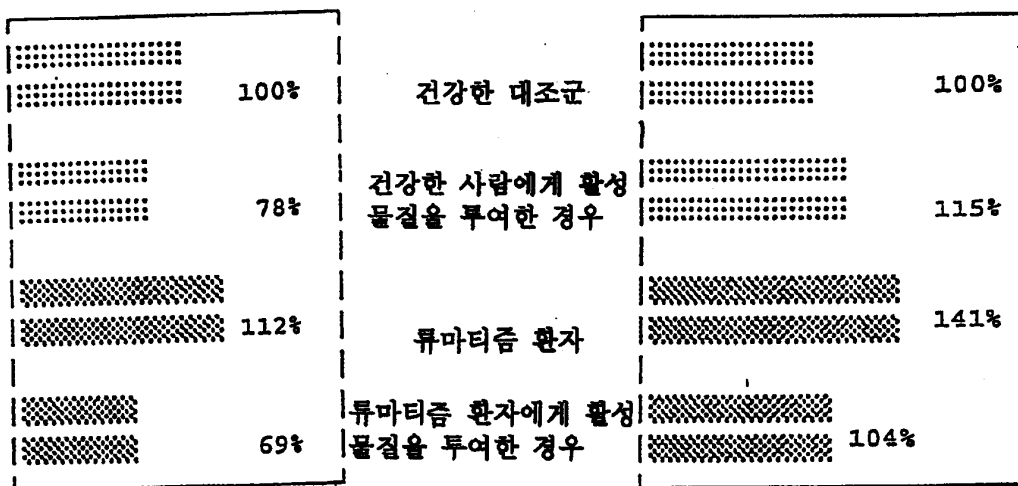
돼지의 소변 10,000 중량부를 냉동 건조시킨 후, 고행 잔류물을 메탄올 600 중량부로 3회 추출시켰다. 메탄올 추출물을 20 중량부로 농축하였다. 사용된 글리코시드 중 80%가 고행 상에 공유 결합할 때까지, 브롬화 시아노겐에 의해 활성화된 세파로즈 4B 100부를 적당히 활성화된 헬레브린 용액으로 90분 동안 처리하였다. 이러한 방식으로 제조한 농축된 메탄올 용액 10 중량부를 친화성 크로마토그래피 컬럼에 적용시킨 후, 용출액에서 화합물이 더이상 검출되지 않을 때까지 용출시켰다. 본 발명의 활성 물질은, 0.5 몰 내지 0.2 몰 포름산을 구배적으로 사용하여 칼럼으로부터 용출시킨 후, 냉동 건조시켰다. 이어서, 세파덱스 LH-20(파마시아 제품)로 충전된 컬럼 상에서 상기 활성 물질을 정제시켰다. 이어서, 활성 물질을 컬럼 상에 흡착시킨 후, 수 중의 아세톤을 20 (v/v) % 내지 60 (v/v) %의 구배로 사용하여 용출시켰다.

실시예 8

면역 조절 용도

NK 세포의 자발적 세포 매개 세포독성(SCMC)은, 작동 물질/표적의 비율을 100/1 내지 10/1로 하여 K₅₆₂ 표적 세포로부터 방출되는 ⁵¹Cr 동위 원소를 시험 분석하므로써 측정하였다. 8명 내지 10명의 건강한 피검자에 있어서, 본 발명의 활성 물질은 용해 활성을 평균 15% 정도 상승시켰다. 병리학적으로 평균 141%까지 증가된 16명의 류마티즘 환자의 병리학적 SCMC 활성은, 본 발명의 활성 물질을 투여한 경우 완전히 정상화되었다. 항원 의존성 세포내 세포 독성(ADCC)에서의 작동 물질은, 본 발명의 활성 물질에 의해 훨씬 더 균일한 방식으로 영향을 받는다. 하기 도표 1을 통해 명백히 알 수 있듯이, ADCC 활성은 건강한 사람뿐 아니라 류마티즘 환자에 있어서도 감소하였다.

도표 1. 활성 물질로 처리한 건강한 사람 및 류마티즘 환자의 세포 독성과 활성 물질로 처리하지 않은 건강한 사람 및 류마티즘 환자의 세포 독성



항체 의존성 세포 특성(ADCC)

자발적 세포 매개 세포 특성(SCMC)

이러한 활성의 정상화는, Fc 수용체에 대한 활성 물질의 특이적인 친화성으로 설명할 수 있다.

실시예 9

기관 이식을 위한 면역 억제 용도

본 발명의 활성 물질의 면역 억제 작용은, 기관 이식에 있어서 이식 거부증을 명백히 감소시켰다. 이것은, 마우스를 대상으로 실시한 일련의 심장 이식 실험을 통해 입증되었다.

코리, 알., 원, 에이치. 및 레셀, 피.의 문헌 [Transplantation 16, 343(1973)]에 기재되어 있는 심장 동종 이식법을, 병원균이 없는 생후 5 내지 6 주된 스프라그 돌리 DBA/2를 공급체로 하고, C57BL/6을 수용체로 하여 실시하였다.

공급체로 사용할 동물의 정맥에 헤파린을 주입하고 심장을 적출한 후, C57BL/6 수용 동물이 준비될 때까지 심장을 병냉된 링거 젯산염 용액에 유지시켰다. 현미경 수술을 통해, 공급체의 대동맥 및 허파동맥과 수용체의 복부 대동맥 및 대정맥을 접합시켰다.

혈액을 다시 흐르게 한 후, 심장 박동수와 심장 박동 강도를 관찰하여 0 에서 +4 등급으로 나누었다. 박동을 중단시켜 거부 반응을 유도한 후, 복개하여 그 거부 반응을 육안으로 확인하였다. 시험 군의 마우스에 대해, 하기 제시된 양의 활성 물질을 피하 투여하였다.

- 이식 3 일전 2.0 mg/kg 투여
- 수술 당일 3.0 mg/kg 투여
- 수술 후 3일째 2.5 mg/kg 투여
- 이후 3일 마다 1.5 mg/kg 투여

대조군의 동물에게는 위약으로서 주석산염 완충액만을 투여하였다.

이러한 이식 실험에서는 하기 표 1의 결과가 산출되었다.

[표 1]

동물 번호	처리 물질	생존 시간(일)
1	활성 물질	24
2	활성 물질	31
3	활성 물질	18
4	활성 물질	21
5	활성 물질	42
6	활성 물질	18
7	활성 물질	6
8	활성 물질	33
9	활성 물질	12
10	활성 물질	22
11	위약	8
12	위약	6
13	위약	10
14	위약	9

위약으로 처리한 동물의 평균 생존율은 8.2 일이었다. 활성 물질로 처리한 동물의 평균 생존 시간은 22.7 일로서, 위약 처리군에 비해 생존 기간의 거의 3 배에 달하였다. 이러한 효과는, 이식 반응을 유발시키는 T 림프구가 특이적으로 억제되었음을 말해준다.

실시에 10

마크로파지의 자극

10 마리의 정상 마우스로부터 비장 림프구를 채취한 후, HEPES에 의해 완충되고 10% 태아 송아지 혈청이 강화된 RPMI¹⁶⁴⁰ 배지에 현탁시켰다. 이 현탁액을 37°C에서 1 시간 동안 유지시켜 마크로파지를 접착시켰다. 시험군의 경우에는, 마우스를 활성 물질 5 mg/kg으로 복강내 처리한 후 24 시간 뒤 죽었다. 대조군의 동물에게는 어떠한 활성 물질도 투여하지 않았다. 이들 양 군으로부터 수거한 림프구는, 5×10^5 마리의 접착 마크로파지가 수용된 시험관 내에서 배양시켰다.

마크로파지의 자극 지수

	LPS	PHA
대조 군	288%	165%
활성 물질 군	402%	1,346%

이들을 통해 명백히 알 수 있듯이, 활성 물질로 처리한 동물에 있어, LPS(리포폴리사카라이드)와 PHA(피토헤마글루티닌)에 의해 산출된 자극 지수(SI)는 상당히 컸다.

실시에 11

확실한 면역 자극 용도

비특이적인 면역 자극은, 슈도모나스 에루지노사를 치사량 투여하여 감염시킨 동물의 생존율을 측정함으로써 검사하였다.

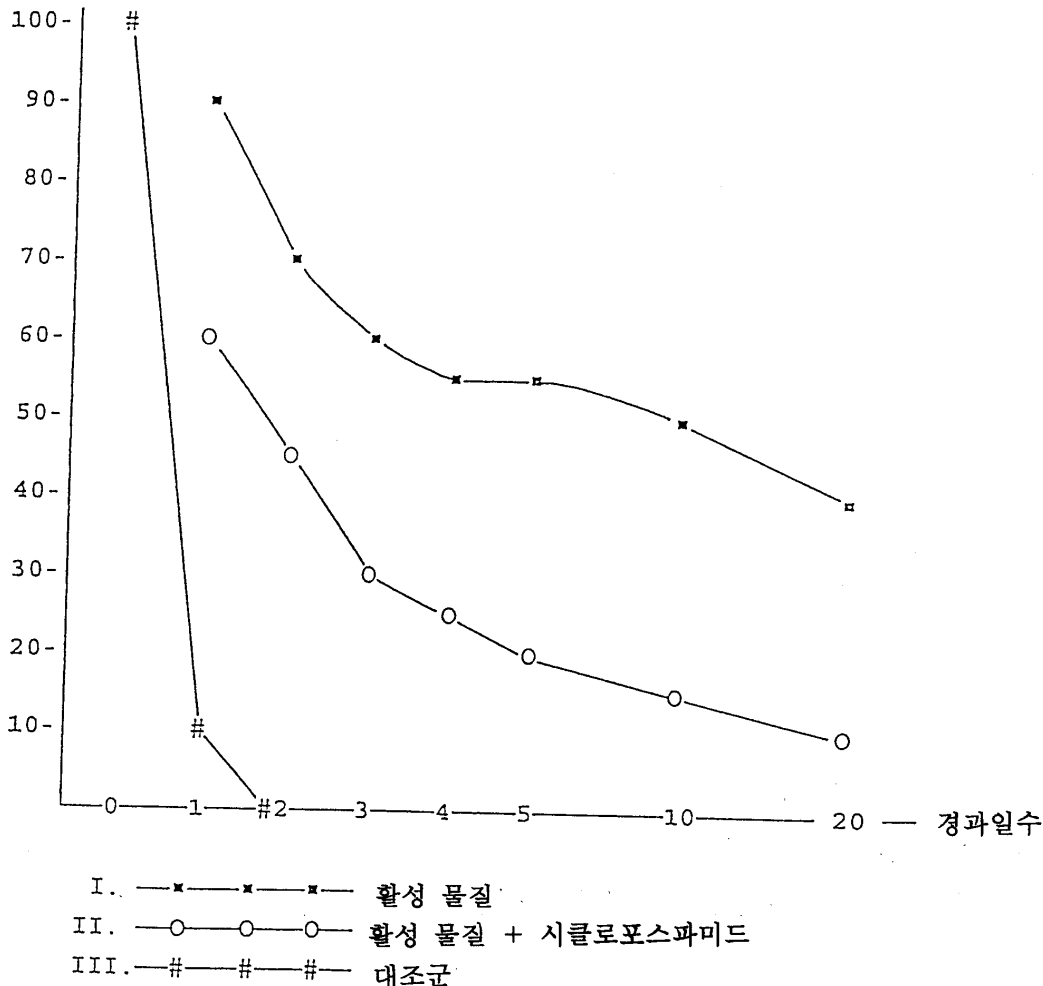
30 마리 내지 100 마리의 마우스로 각각 구성된 3 개의 시험군에 있어서, 각 마우스에게 슈도모나스 에루 지노사를 치사량 투여하였다.

I. 제1군에는, 치사량의 슈도모나스를 투여하기 7 일전, 14 일전 및 28 일전에 활성 물질 $2\mu\text{g}$ 을 투여하였다. 그리고, 21 일째 생리학적인 NaCl 용액 0.25 ml를 투여하였다.

II. 제2군에는, 상기 1군에서와 동일한 양의 활성 물질을 투여한 한편, 21 일째 시클로포스파미드 0.06 mg을 투여하였다.

III. 대조군에게는 활성 물질을 전혀 투여하지 않았다.

도표 2. 치사량의 슈도모나스를 투여한 후의 생존율(%)



본 발명의 활성 물질은 생존율을 명백히 증가시켰다. 시클로포스파미드를 투여한 경우 이것의 공지된 면역 억제 효과에 의해 생존율이 저하되긴 했으나, 대조군의 생존율보다는 여전히 높은 상태로 유지되었다. 이로써, 본 발명의 활성 물질의 확실한 비특이적 면역 자극 특성을 알 수 있으며, 또한 이제까지 알려지지 않은 신규 면역 매카니즘까지도 상상할 수 있다. 최근에는, 치사량의 슈도모나스를 투여한 직후 시토 킨이 폭발적으로 방출되는 것으로 입증되었다. 이로 인해 야기되는 시토 킨 쇼크 증상은 급사의 직접적인 원인이 되는 것으로 추측된다. 본 발명의 면역억제 효과는 이러한 시토 킨 쇼크를 예방할 수 있고, 실질적인 면역 자극 없이도 생존율을 상당한 정도로 향상시킬 수 있다.

실시예 12

비교 ELISA 방법에 의한 활성 물질의 분석

분석을 위해, 본 발명의 활성 물질과 항 우아바인(a-OU) 항혈청을 교차 반응시켰다. 해리스 등의 문헌 [Hypertension 17, 930(1991)]에 기재된 방법을 사용하여 예비 분석용 우아바인(시그마 제품)과 아비딘(플루카 제품)으로부터 우아바인-아비딘 결합체(OU-con)를 합성하였다. 해당하는 항 우아바인 혈청의 제조시에는, 디바르틀로 등의 문헌 [Life Sciences, 57, 1417(1995)]에 기재되어 있는 방법을 사용하였다.

ELISA 미량 역가판에 먼저 OU-con 결합체 용액 $0.1\ \mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ 을 4°C 에서 밤새 동안 배양시켰다. 비결합된 결합체는 인산염 완충액(PBS, pH=7.4)으로 세척하고, 비점유된 결합 부위는 1% 젤라틴 용액으로 차단시켰다.

활성 성분의 함량을 모르는 샘플 용액 $50\ \mu\text{l}$ 을 폴리프로필렌 튜브 내에서 일정량의 항 우아바인 혈청($0.5\ \mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$)과 혼합한 후 2 시간 동안 실온에서 유지시켰다. 이어서, 각 활성 물질의 항 혈청 샘플 $50\ \mu\text{l}$ 을 배양판에 도포한 후, 3 시간 동안 더 배양시켰다. 비결합된 항혈청은 PBS로 세척한 후, 배양판을 단백질 A 알칼리성 포스파타아제(시그마 제품)의 1:500 용액으로 실온에서 2 시간 동안 처리하였다. 비결합된

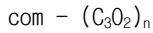
효소를 제거한 후, 배양판을 p-니트로페닐 포스페이트 용액(1mg/ml) 50 μ l로 처리하고, 30 분동안 배양한 후 405 nm에서의 흡착값(A)이 자동적으로 판독되었다.

검정 곡선을 작성하기 위해, 5 ng/ml 내지 0.1 mg/ml의 범위 내에 있는 소정량의 활성 물질을 일정한 양의 혈청(전술된 방법에 따라 처리한 것)과 혼합하고, 활성 물질의 흡착 측정치를 이에 상응하는 농도와 함수 관계로 하여 그래프로써 도시하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

무기 아산화탄소(C₃O₂)를 환형 올리고머화 하여 축합된 4-피론 또는 2-피론 고리를 형성한 후, 이들 고리를, 아산화탄소 중의 중첩된 C=O 및 C=C 이중 결합이 더 이상 존재하지 않는 대환식 구조로 결합시킴에 따라 형성되는 하기 화학식의 구조적 골격을 갖는 것이 특징인 대환식 물질.



상기 식 중, com은 C₃O₂ 단위의 대환식 환형 올리고머 결합을 상징하는 것이며, n은 아산화탄소의 환형 올리고머화도이다.

청구항 2

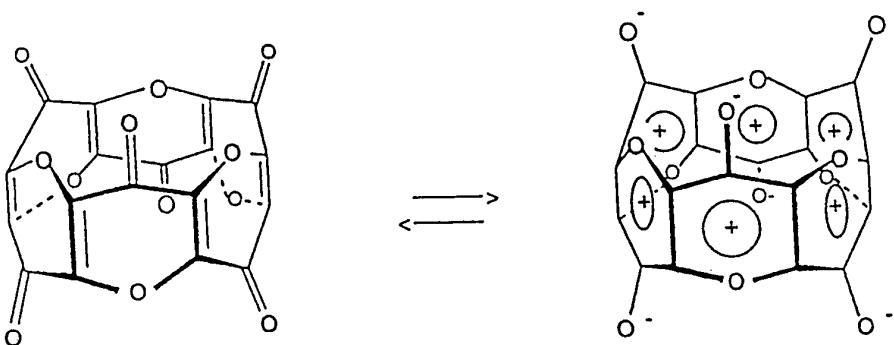
제1항에 있어서, 아산화탄소의 환형 올리고머 구조 골격의 화학식 중 n이 4, 6 또는 10이거나, 또는 이들의 배수인 것이 특징인 대환식 물질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 피론, 피릴륨 또는 다른 토도머 구조로 표시되는 매질 의존성 전자 분포를 가지며, 이들 구조는 용액 중에서 서로 평형 상태로 존재할 수 있는 것이 특징인 대환식 물질.

청구항 4

제3항에 있어서, 6개의 아산화탄소가 교번적으로 헤드-테일 축합된 4-피론 고리로 이루어진 아산화탄소 환형 육량체 [com-(C₃O₂)₆]인 피론 및 피릴륨이 용액 중에서 평형 상태로 존재하는 것이 특징인 대환식 물질.

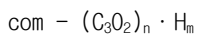


'피론'

'피릴륨'

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 골격 중의 고리 외 산소 원자에 수소가 첨가되어 형성된 하기 화학식의 히드록시피란 유도체로서 존재하는 것이 특징인 대환식 물질.



상기 식 중, m은 결합된 수소 원자의 개수이고, m≤n의 관계에 있고, H는 수소 원자이며, com 및 n은 전술된 바와 같다.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 식 com-(C₃O₂)_n [식 중, com 및 n은 전술된 바와 같음]의 아산화탄소 환형 올리고머 또는 식 com-(C₃O₂H)_n [식 중, com 및 n은 전술된 바와 같음]의 상기 올리고머의 히드록시피란 유도체가 첨가 생성물, 피릴륨 염, 호스트-게스트 착물, 자체 결합체 및 무기 또는 유기 유도체의 형성을 위한 기본 단위인 것이 특징인 대환식 물질.

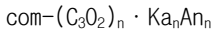
청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 환형 올리고머 기본 단위가 내부 공동을 가진 원통형 대환 구조로 제공되는 것이 특징인 대환식 물질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 하기 화학식의 피릴륨 염으로 존재하는 것이 특징인 대환

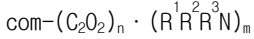
식 물질.



상기 식 중, Ka 및 An 은 각각 양이온 반대 이온 및 음이온 반대 이온으로서, 이들은 함께 피릴륨 골격의 양쪽 이온성 전하를 중화시킨다.

청구항 9

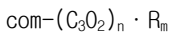
제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 하기 식의 아민 첨가 생성물 형태로 존재하고, 아산화탄소 환형 올리고머 골격과, 암모니아, 유기 아민, 아미노산, 펩티드 또는 아민 작용기를 가진 다른 물질 1 내지 n 개로 구성되는 것이 특징인 대환식 물질.



상기 식 중, R^1 내지 R^3 은 각각 수소 원자 또는 유기 잔기이고, m 은 1 내지 n (n 은 전술된 바와 동일함)의 수이다.

청구항 10

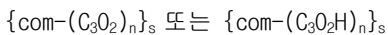
제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 무기 분자 또는 유기 분자, 또는 유기 잔기(R)가 기본 골격의 산소 원자에 결합됨에 따라 하기 화학식의 무기 유도체 및/또는 유기 유도체 또는 결합체로 형성되는 것이 특징인 대환식 물질.



상기 식 중, R은 무기 분자 또는 유기 분자 및/또는 유기 잔기이고, $m \leq 2n$ 이다.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 기본 단위 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ 또는 $\text{com}-(\text{C}_3\text{O}_2\text{H})_n$ 가 하기 화학식의 안정한 자체 결합체 형태로 존재하는 것이 특징인 대환식 물질.



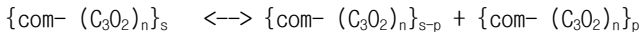
상기 식 중, s 는 2, 3, 4, 5, 6, 10 또는 12 및 이들의 배수이다.

청구항 12

제11항에 있어서, s 가 12이고 n 이 6이며 몰량이 4,898 또는 4,970인 화합물은 높은 구조적 대칭을 이루는 골격을 가지는 것이 특징인 대환식 물질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 용액 중에서는 하기 평형식에 따라 저분자량의 화합물과 고분자량의 화합물 사이에 동적 평형이 이루어지는 형태로 존재하는 것이 특징인 대환식 물질.



상기 식 중, s 는 제11항에 정의된 바와 같으며, $p < s$ 이다.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 단독으로 또는 혼합물 상태로서 생체 조절 활성을 발휘하는 것이 특징인 대환식 물질.

청구항 15

대환 공동 내에 맞춰지는 반경을 가진 이온을 함유한 염 형태의 보조제를 사용하여 아산화탄소를 광화학적으로 활성화 및/또는 환형 올리고머화시키므로써 대환식 구조로 형성시키는 것이 특징인, 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 생체 조절 활성을 가진 대환식 물질의 제조 방법.

청구항 16

말로닐 조효소 A와 같은 지방산 유도체를 폴리케타이드 합성 효소(PKS) 류의 효소로 처리하는 것이 특징인, 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 생체 조절 활성을 가진 대환식 물질의 제조 방법.

청구항 17

합성 가스로부터 생성되거나 또는 옥소 합성 반응을 통해 생성된 대량의 유기 생성물을 사용하고,

상기 유기 생성물 중에 함유된 생체 조절 활성 물질은 분별 증류를 통해 농축시키고,

이들 활성 물질은 저온 하에 진공 증류법 및 응축법을 통해 분리하며,

분리된 활성 물질은 고형 상에 흡착시킨 후 각 증 용매로 탈착시켜 정제시키는 것이 특징인, 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 생체 조절 활성을 가진 대환식 물질의 분리 방법.

청구항 18

독성 글리코시드, 알칼로이드 또는 탄닌을 함유한 식물 또는 식물 세포 배양물을 미정제 물질로서 사용하

고,

이 미정제 물질 중에 함유된 화학적으로 미확인된 결합체를 수용액으로 추출하고,

추출된 결합체는 가수 분해를 통해 절단 및/또는 아세톤, 알콜 또는 다른 용매로 침전시키고,

여기서 얻어진 혼합물은 이온 교환 물질 또는 중성 흡착제에 결합시키고, 기타 성분은 세척하여 제거하고,

활성 물질은 염기성 완충액 또는 선택적 작용 용매 혼합물을 사용하여 탈착시킨 후, 투석, 막 여과, 겔 크로마토그래피 또는 다른 방법을 통해 정제하고, 임의로 분자체를 통해 분리하는 것이 특징인, 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 생체 조절 활성을 가진 대환식 물질의 분리 방법.

청구항 19

배양 브로스(broth)를 초음파로 처리 및/또는 산성 pH 하에서 가수 분해시키고,

활성 물질은 액체-액체 추출 방식을 통해 분리하여, 목탄 또는 다른 흡착제에 결합시킨 후, 따뜻한 알콜 수용액 또는 다른 용매 혼합물을 사용하여 용액으로 형성시킨 뒤, 크로마토그래피 또는 다른 분리법을 통해 정제시키는 것으로 이루어지며, 상기 활성 물질은 박테리아 배양물에서 얻는 것이 특징인, 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 생체 조절 활성을 가진 대환식 물질의 분리 방법.

청구항 20

수성 추출물을 농축 및/또는 냉동 건조시키고, 액체-액체 추출 방식 및 액체-고체 추출 방식을 통해 예비 정제한 후, 공유 결합된 특이적 글리코시드 또는 단백질과 함께 친화성 고형 상에 결합시키고, 이어서 용매 혼합물을 사용하여 상기 수성 추출물을 선택적으로 방출시키는 것으로 이루어지며, 활성 물질은 동물의 조직, 조직액 또는 조직 배양물로부터 추출하는 것이 특징인, 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 생체 조절 활성을 가진 대환식 물질의 분리 방법.

청구항 21

Na^+, K^+ -ATP 효소 및 다른 효소의 생체내 조절용, 또는 자가 면역 질환에 있어 유해한 자가 공격성의 억제용, 또는 Fc 수용체에 대한 결합에 의한 면역 조절용, 또는 신경 수용체에 대한 결합에 의한 통증 치료용, 또는 근육 또는 혈관 경련 완화용 치료제의 제조시 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 대환식 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 22

Na^+, K^+ -ATP 효소 및 다른 효소의 조절용, 또는 면역 체계 자극용, 또는 식작용(phagocytosis)의 제어용 치료제로서 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 환형 올리고머의 첨가 생성물, 피릴륨 염, 호스트-게스트 착물의 유도체를 사용하는 것이 특징인 사용 방법.

청구항 24

강심성 글리코시드, 알칼로이드 또는 다른 의약품의 급성 및/또는 만성 독성을 완화시키거나, 스테로이드 물질, 펩티드 물질 또는 다른 활성 물질의 생체내 이용율을 향상시키기 위한, 공지된 약리학적 활성 물질과 상기 대환식 활성 물질의 결합체 또는 첨가 생성물인 약제를 제조하는 데 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 대환식 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 25

막 투과성 이온 또는 이보다 작은 물질과 함께 호스트-게스트 착물을 형성하고 이 착물 형태로 세포 막을 투과할 수 있는 약제의 제조시 제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 기재된 대환식 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 26

염증, 류마티즘 및 자가 면역 질환의 치료시 제1항 내지 제25항 중 어느 하나의 항의 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 27

류마티스성 관절염, 다발성 동맥경화증, 전신 홍반성 루푸스, 근무력증 및 다른 자가 면역 질환의 치료시 제1항 내지 제26항 중 어느 하나의 항의 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 28

기관 또는 조직 이식의 접합 거부 반응을 억제하는 데 제1항 내지 제27항 중 어느 하나의 항의 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 29

급성 또는 만성적인 면역 보호 기능 약화 또는 시토킨에 의한 쇼크 증상에 의해 야기되는 질환의 치료시 제1항 내지 제28항 중 어느 하나의 항의 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 30

Na^+, K^+ -ATP 효소계의 생체 조절 부전으로 인해 야기되는 심장 혈관 질환의 치료시 제1항 내지 제29항 중 어느 하나의 항의 활성 물질을 사용하는 방법.

청구항 31

제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항의 생체 조절 활성 물질 및 생리학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 것이 특징인 약제.

청구항 32

제31항에 있어서, 경구 투여 방식, 국소 투여 방식, 정맥내 투여 방식 또는 동맥내 투여 방식을 통해 투여되는 것이 특징인 약제.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 정제, 캡슐, 연고, 겔 또는 주사제로서 투여되는 것이 특징인 약제.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, 다른 보조제를 함유하는 것이 특징인 약제.

청구항 35

제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항의 활성 물질이 혈액 또는 조직 샘플의 검사를 위해 그 자체로 사용되거나 또는 표지된 형태로 사용되는 것이 특징인 자가 면역 병상(病狀)을 가진 질환용 진단제.

청구항 36

제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항의 활성 물질이 그 자체로 또는 표지된 형태로 사용되고 또는 겔 크로마토그래피, ELISA 또는 방사능 면역 분석법을 통해 분석되는 것이 특징인 심장 혈관 병상을 가진 질환용 진단제.

청구항 37

제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항의 활성 물질의 특이적 침전 반응물이 면역 글로블린 또는 이것의 단편과 함께 사용되는 것이 특징인 면역학적으로 야기된 질환용 진단제.

청구항 38

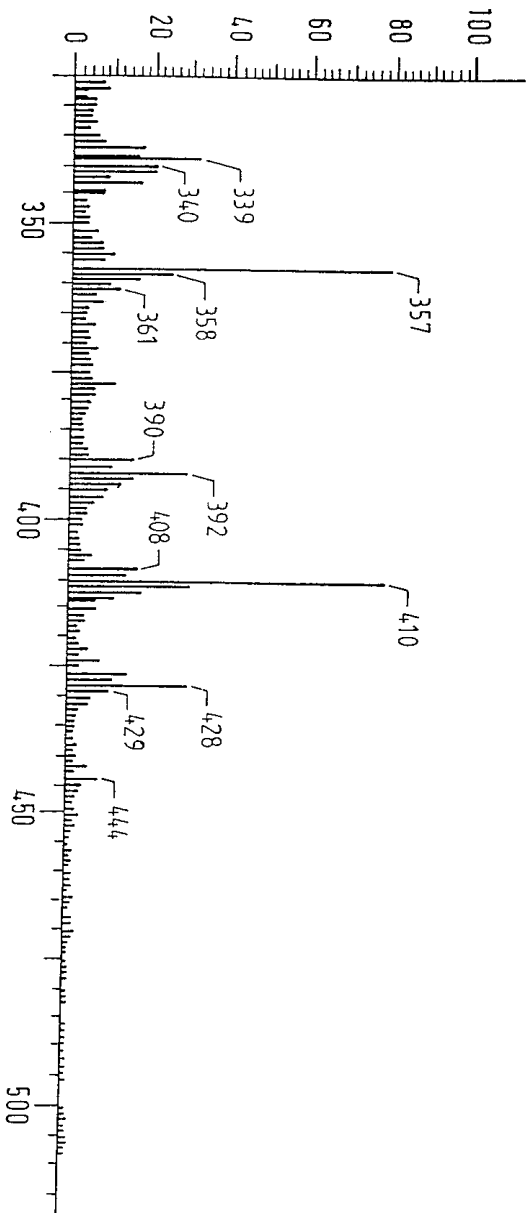
제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항의 활성 물질을 혈액 또는 조직 프로브를 검사하는 데 그 자체로 또는 표지된 형태로 사용하는 것이 특징인 자가 면역 병상을 가진 질환의 진단 방법.

청구항 39

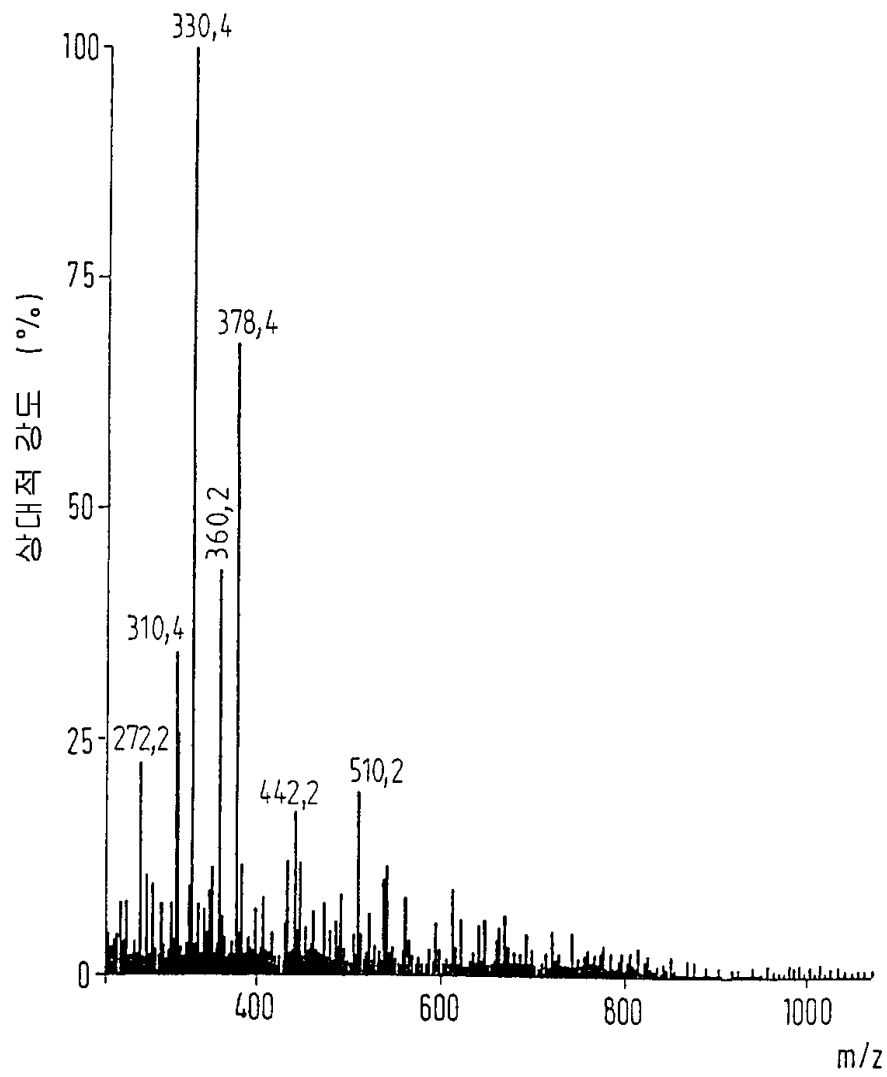
제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항의 활성 물질을 그 자체로 또는 표지된 형태로 사용 및/또는 겔 크로마토그래피, ELISA 또는 방사능 면역 분석법을 통해 분석하는 것이 특징인 심장 혈관 병상을 가진 질환의 진단 방법.

도면

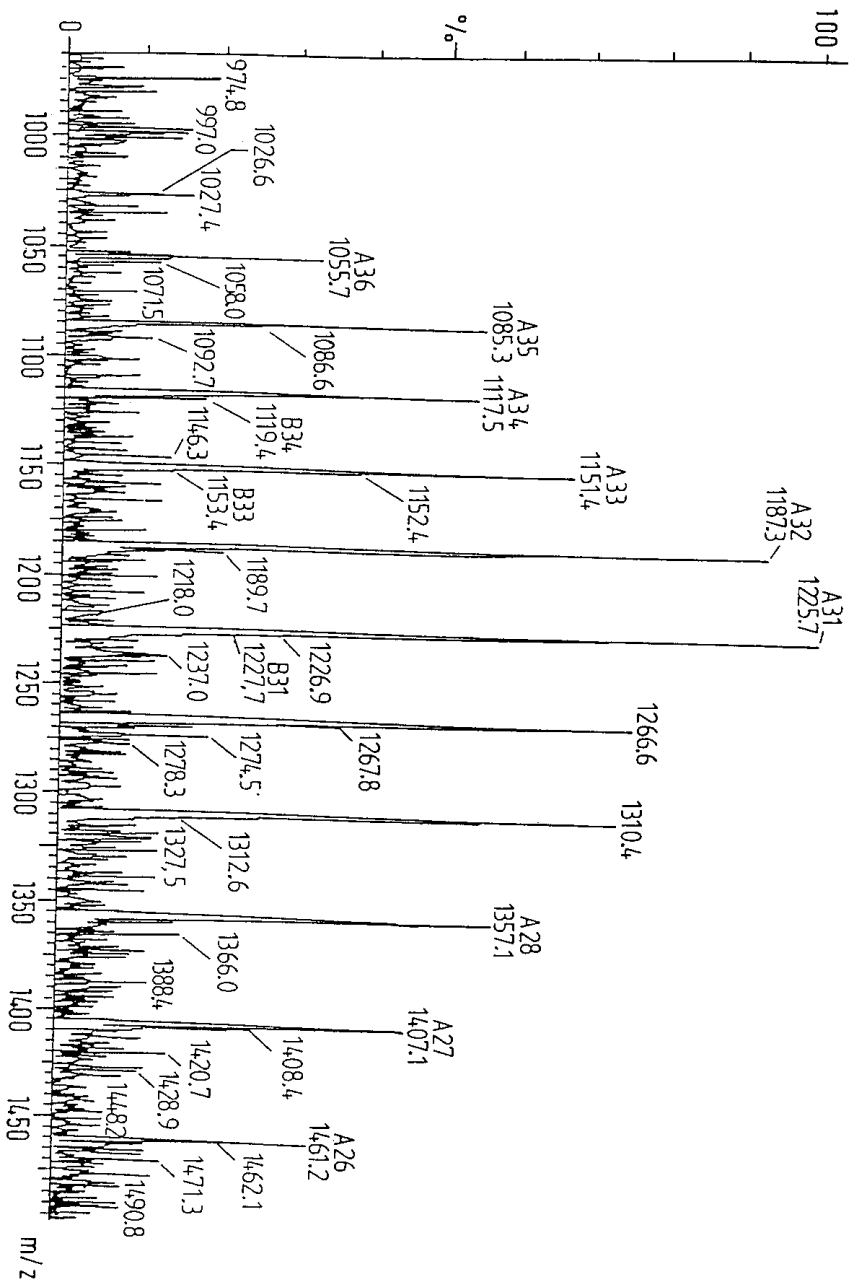
도면 1



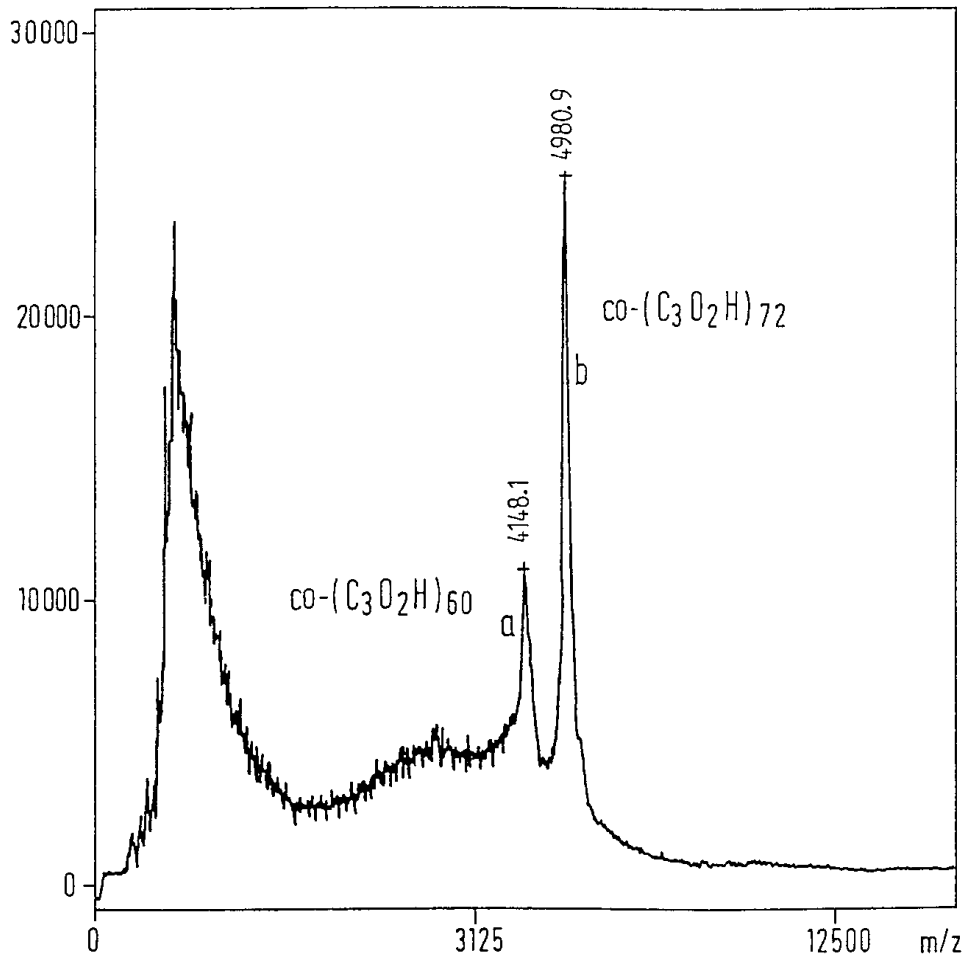
도면2



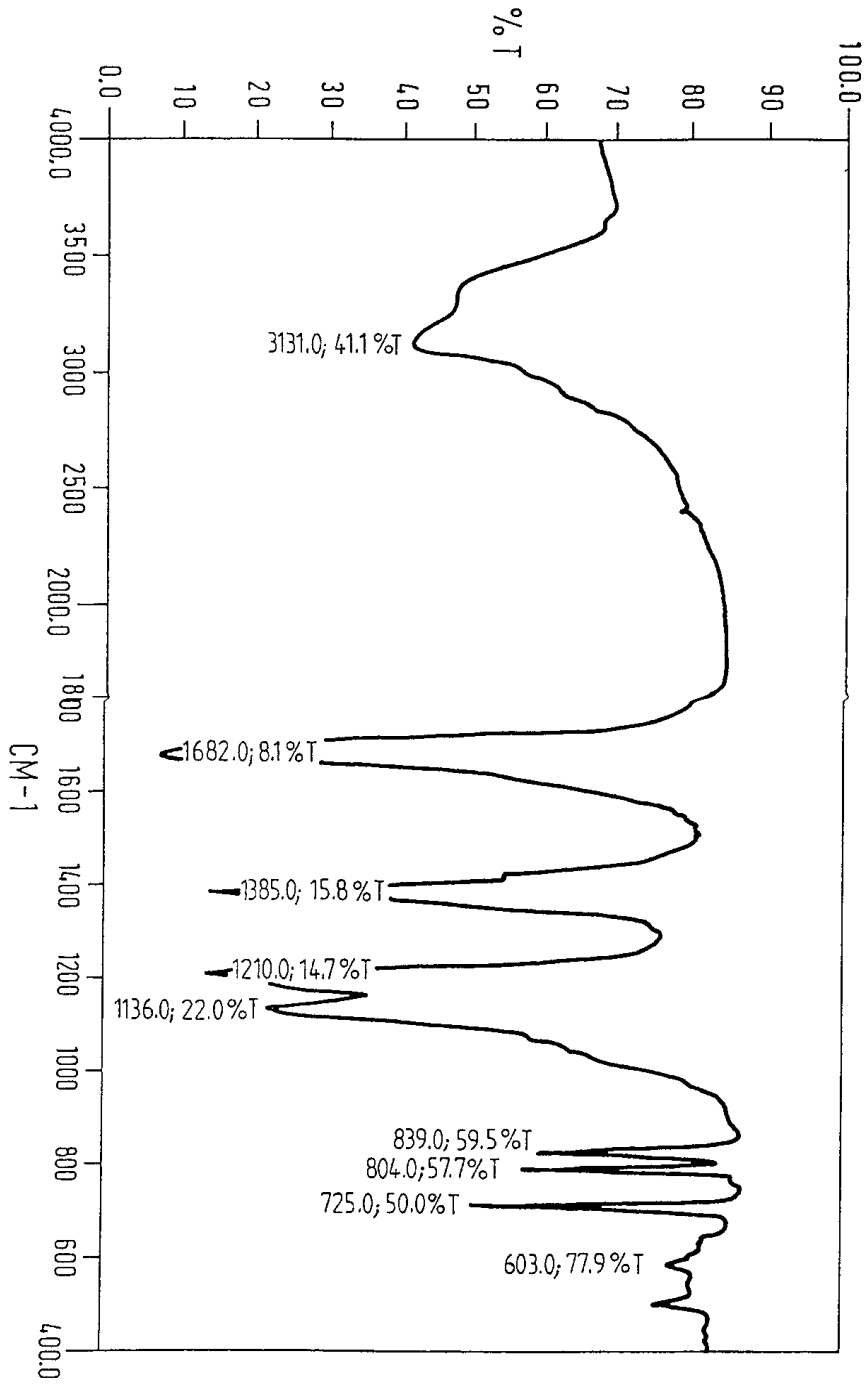
도면3



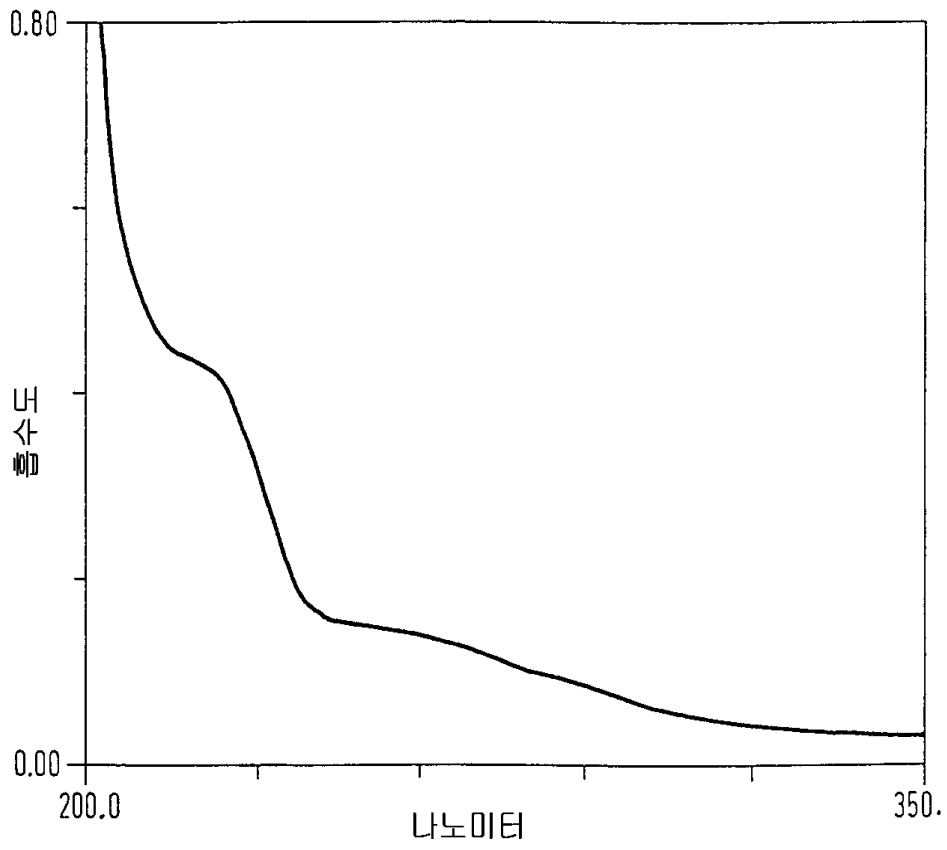
도면4



도면5



도면6



도면7

