

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.³
C12P 1/04

(45) 공고일자 1981년06월01일
(11) 공고번호 특허1981-0000552

(21) 출원번호	특 1977-0002155	(65) 공개번호
(22) 출원일자	1977년09월 13일	(43) 공개일자
(71) 출원인	도비시 야구현 고요교 가부시끼 가이사 지가 다게시 일본국 도오교도 쥬우오구 야에스 1-9-9	
(72) 발명자	도요시마 시게시 일본국 도오교도 세다가야구 후다바시 3-14-22 후지다 하루히사 일본국 가나가와켄 가마구라시 가지와라 1181-17 후구마 마리고 일본국 도오교도 무사시노시 세기마에 5-13-21 야마무라 쇼오스게 일본국 아이치켄 나고야시 미스호구 무라가미쵸 2-20 세토 요시고 일본국 지바켄 후나바시 나쓰미다이 1-2 오오크흠즈 3-406 이또 무네모도 일본국 도오교도 오오다구 덴엔쇼후 1-52-5 이또 미에 일본국 도오교도 오오다구 덴엔쇼후 1-52-5 후지와라 미기로오 일본국 도오교도 도시마구 다가마쓰 3-9	
(74) 대리인	장용식	

심사관 : 김혜원 (책자공보 제570호)

(54) 향약성 종양제의 제조방법

요약

내용 없음.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

향약성 종양제의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도-제4도는 실시예 2에 표시된 공정에 의하여 얻어진 분획의 U.V. 스펙트럼 및 I.R 스펙트럼을 나타낸다.

제1도는 분자량 5,000~10,000을 가진 활성성분의 U.V. 스펙트럼을 나타낸다(원배양액과 물의 희석비는 1 : 10).

제2도는 분자량 1,000~5,000을 가진 활성성분의 U.V. 스펙트럼을 나타낸다(원배양액).

제3도는 분자량 5,000~10,000을 가진 활성성분의 I.R. 스펙트럼을 표시하며.

제4도는 분자량 1,000~5,000을 가진 활성성분의 I.R. 스펙트럼을 표시한다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 신규한 항악성종양제의 제조방법에 관한 것이다. 좀더 상세히 설명하면 본 발명은 액체배지(液體培地)에 스타필로코쿠스 에피데르미디스 STE(staph ylococcus epidermidis STF)(微工研寄託 No. 3706; ATCC 31310)를 배양하여 얻어지는 신규한 활성물질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

상기물질은 백혈병 및 악성종양을 방지하는데 효과를 가지고 있다. 본 발명은 백혈병 환자에 있어 부스럼이 생겼을 때, 예상외로 백혈병세포의 수가 현저히 감소되고 마침내 환자의 백혈구수가 정상으로 된 것 발견하여 이루어진 발명의 것이다.

본 발명자들은 백혈병환자의 종기에서 미생물균주를 분리시키고 이것을 배양하여 백혈병을 감염시킨 동물에게 배양액의 여액(濾液)을 투여한 결과, 이 동물들의 백혈병 바이러스 양이 줄어들고 백혈병 세포의 수가 줄어들며, 백혈병이 걸린 기관의 회복, 수명의 연장 및 살아남은 동물의 수를 증가시킨 효과를 나타냈다.

연구를 계속하여, 본 발명자들은 상기 여액이 백혈병에 뿐만 아니라 일반적으로 다른 악성종양에 유효하다는 것도 발견하였다.

본 발명자들은, 배양액의 여액을 농축시키고, 활성물로 생각되는 수용성물질을 몇 개의 성분으로 분리시키며, 이 물질이 상기 항생활성을 가지고 있다는 것을 입증하기 위하여 단리하고 정제하였다.

다음에 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[1] 균주(菌株)의 식별

본 발명에 사용되는 미생물의 균주는 신규한 것이다. 이것은 미공연 기탁 번호 No. 3706 및 ATCC 31310로 미공연 및 "ATCC" 각각에 기탁되어 있다.

이 균주는 이들 연구소에서 누구나 자유로 사용할 수 있다.

이 균주는 다음과 같이 스타필로코쿠스 에피데르미디스의 일균으로 판명되었다.

제1차 감별				
(1) 운동성	37°C	(-)	(6) 포자형성	(-)
	24°C	(-)	(7) 공기중 생육	(+)
(2) 그람염색		(+)	(8) 산화효소활성	(-)
(3) 케탈라제 활성		(+)	(9) 글루코우스 이용성	(+)
(4) 형 상		구균	(10) 산화탈효 시험(Hugh-Leffson test)	(F)
(5) 황산성		(-)		

상기 시험결과로부터 병원균은 스타필로코쿠스 또는 에어로코커스에 속한다는 것이 판명되었다.

제2차 감별 :				
(1) 응고효소	(-)	(4) 포스파타아제	(+)	
(2) V-P 반응	(+)	(5) 질산염환원	(+)	
(3) 경크반응	(-)			

이리하여, 병원균은 마침내 스타필로코쿠스 에피데르미디스로 판단하였다. 본원 발명자들은 본 균주를 "STF" 라고 명명하였다.

[2] 활성성분의 제법 :

병원균은 일반배지, 예컨대 탄소, 질소, 무기영양을 포함하는 영양배지에 잘 증식된다.

세균에 의하여 만들어지는 유용한 활성성분을 이용하기 위하여 정치상태 또는 진탕상태하의 액체배지에 있어서의 호기배양이 바람직하다. 배지의 적당한 예는 다음과 같다.

(1) 펩톤	17g	NaCl	5g
부우용(Louillon) 역기스	3g	K ₂ HPO ₄	2.5g
글루코우스	2.5g	중류수	1ℓ(pH7.3)

위에는 액체배지만을 예시하였지만, 일반고체배지도 사용할 수 있다. 균류는 24시간-120시간동안 배양온도 -20°C~+40°C에서 상기 배지에 배양된다. 최적온도는 약 37°C였다. 집락표면(colony surface)은 희고 원형을 이루고 있었다.

얻어진 배양액은 원심분리되고 고체물질은 분리되고 용액을 얻었다(이후는 "배양액" 이라고 한다). 이 배양액에 여러 가지 실험을 가하였다.

[3] 활성성분의 효용

얻어진 배양액은 다음의 결과를 얻기 위하여 여러 가지의 질병을 감염시킨 동물들에게 투여하였다 :

(1) 백혈병 바이러스의 접종에 의하여 발생된 악성종양의 억제 : ICR 생쥐 303마리를 3군으로 나누었다.

그중 2개군에 대하여 프랜드(Friend)의 백혈병 바이러스를 접종한 후 1개군에 배양액을 0.1ml/10g/day의 비율로 8일간 복강내에 투여하여 다음과 같은 비장 이상 비대 억제효과를 보았다.

	비장의 무게(g)	억제율(%)
비감염군 대조	0.124±0.022	
감염군 대조	0.724±0.239	
8일간을 계속하여 배양액을 투여한 감염군	0.219±0.039	84.9

(2) 백혈병 세포의 접종에 의하여 발생된 악성종양 억제 :

유발된 백혈병 상태를 발생시키기 위하여 BDF₁ 생쥐들에게 생쥐백혈병세포 L-1210이 접종되었다. 생쥐들은 제한된 시간이 지나면 죽는다. 1개군 생쥐가 6마리로 이루어진 2개군의 생쥐들에게 L-1210 세포가 접종되고, 그후 상기 배양액이 아래의 결과를 얻기 위하여 5일간 계속해서 상기 1개군에 투약되었다. 주어진 배양액의 투여량은 (1)에 있어서와 동일 하였다.

사망시간(접종후 일수)	
비 투여군	7, 7, 7, 7, 7, 7
투여군	7, 7, 7, 8, 8, 10 이상

시험군/대조군(수명연장비)는 112% 이상으로 높았다.

(3) 에어리히(Ehrlich) 암세포의 억제효과 :

1개군이 10마리의 생쥐로 이루어진 2개군에 에어리히 복수 종양세포를 접종 하였다. 5일간을 계속하여 1개군의 생쥐의 복부내에 배양액이 투여되었다. 그리하여 아래와 같이 10일째에 억제효과가 종양세포수에 의하여 판명되었다. 배양액의 투여량은 (1)에 있어서와 동일하였다.

	종양세포수	억제율(%)
비 투여군	7.7×10^8	
투여군	4.7×10^7	93.7

(4) 사르코마(Sarcoma) 180세포의 억제효과 :

상기한 바와 같은 방법으로 1개군이 10마리의 생쥐로 이루어지는 ICR생쥐 2개군에 대하여 복부내에 사르코마 180세포를 접종하였다. 배양액은 5일간 계속하여 1개군에 투여되었다. 10일째의 세포수를 조사하여 다음결과를 얻었다. 배양액의 투여량은 (1)에 있어서와 동일하였다.

	종양세포의 수	억제율(%)
비 투여군	2.3×10^8	
투여군	5.3×10^6	76.9

비교를 위하여 동일한 배양법에 의하여 얻어진 다른 공지의 미생물의 배양액의 효과가 조사되었다. 아래의 공지와 미생물의 배양액은 프랜드 백혈병 바이러스로 접종된 생쥐들에게 투여되었다. 각 경우에 있어서 아무런 효과가 관찰되지 않았다 :

슈우도모나스(Pseudomonas)

클렙시엘라(Klebsiella)

스타필로코커스 아우레우스(staphylococcus aureus)

(4) 활성성분의 분리 및 정제 :

스타필로코커스 에피데르미디스의 배양액에 함유된 활성성분은 예를 들면, 다음 방법으로 분리되고 정제될 수가 있다 :

(1) 배양액을 30분~10분간, 3,000~12,000rpm에서 원심분리시켜 용액과 침전물로 분리시켰다. 다음에 침전물은 증류수로 세척하고 다시 원심 분리시켰다. 세척액은 상기 용액과 병합시켰다. 이 방법을 1~5회(통상 3회) 반복했다.

(2) 이렇게 해서 수집된 용액은 1~6시간 5~30mmHg의 감압하에 온도 10~30℃에서 증발에 의하여 농축되었으며, 이리하여 침전된 고체물질은 증류수로 세척한 후 용해시켰다. 이 용액은 증발에 의하여 다시 농축시켰다. 이 공정은 백색, 황색 또는 갈색을 띤, 물에 용해가능한 백색 결정체 분말을 얻기 위하여 1회~5회(통상 3회) 반복하였다.

(3) 이 결정체분말은 예컨대 세파덱스(Sphadex)(스웨덴, 바이오케미칼사에 의하여 제조된 흡착여과 겔) G-25와 같은 물레클라사이브 조작에 의하여 분류한다.

각 분획에 대한 활성을 조사하여 활성분획을 반복하여 선택하였다. 이러한 공정에 의하여 단일활성 피크를 가진 물질이 얻어졌다.

이 활성물은 다시 물에 용해시켜서 이온교환 크로마토그래피 또는 투석(透析)과 같은 정제 방법에 의하여 정제하였다.

(4) 이렇게 해서 정제된 활성성분은 수용액에 여러 가지의 유기 용제를 가하고 산성 영역에서 알칼리영역으로 pH를 변화시키고 염석후 재침전 및 여과 또는 증발에 의한 농축으로 분리시킬 수가 있다.

본 물질은 다음과 같은 특성을 갖는다.

열안정도	인정(물질은 15분간 100°C로 처리된 후에도 그 활성을 상실하지 않는다)
나이트리틴반응	(-)
에트리히 반응	(-)
사가주저 반응	(-)

이렇게해서 유리되고 정제된 활성성분의 항종양성 활성은 L-1210세포의 배양액에 이의 희석된 수용액을

가하고 48시간 35℃에서 이것을 배양하여 세포증식 억제율을 결정함으로써 다음과 같이 확인되었다.

희석도(율)	억제율(%)		희석도(율)	억제율(%)	
	로트 A	로트 B		로트 A	로트 B
50	100	100	800	69.0	61.4
100	100	95.3	1600	59.1	56.4
200	83.0	83.5	3200	49.9	—
400	72.7	78.5			

이리하여 스타필로코쿠스 에피데르미디스에 의해 생산되는 물질은 액상암 및 고체상암과 같은 여러 가지의 약성증양을 제어하는 효과를 가지고 있다. 본 물질을 급성독성을 나타내지 않는다.

(5) 활성성분의 투여 :

투약량은 투약경로에 따라서 다르지만 약 3-300mg/kg이다. 고체물질이 제거된 배양액은 직접사용할 수가 있다. 그러나, 물론 투약량을 정확히 조절하기 위하여 분리되고 정제된 활성성분을 사용하는 것은 더 좋다. 정맥주사, 피하주사, 근육주사, 경구투약, 좌약, 정제 및 유제와 같은 여러 가지의 투약방법이 가능하다. 따라서 제제의 형태는 적당히 선택할 수 있고 예컨대 분말, 정제(단충정제, 중충정제, 장용제등) 캡슐, 앰플, 또는 바이알에든 주사약, 설하정, 트로치제, 좌약 또는 지방유제등을 들 수 있다.

아래 실시예는 본 발명을 예시한다. 아래 실시예에는 결코 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

[실시예 1]

스타필로코쿠스 에피데르미디스 STF는 아래배합의 배지에서 48시간 37℃에서 배양되었다 :

코른스티어브 리커(Corn steep liquor)	6g	엑스트라크투스	10g
NH ₄ H ₂ PO ₄	3g	CaCO ₃	2.5g
이이스트 액거스	2.5g	증류수	1리터(pH4.5)

상징액과 침전물로 나누기 위하여 30분간 10,000rpm에서 배양액을 원심 분리시켰다.

이 침전물은 1리터의 증류수로 재분산시켰으며 이 분산은 18시간 37℃에서 방치시키고 10,000rpm으로 다시 원심 분리시켜 상징액과 침전물로 나누었다. 이 공정은 5회에 걸쳐 반복되었다. 얻어진 상징액은 모아져 약 2시간 상온에서 10mmHg의 감압하에 증발에 의하여 농축되었다. 약 1/30 농축이 달성된 후, 액체는 세파덱스 D-25층을 통과하고 00(광학밀도) 265의 인디케이터를 사용하여 U.V. 분광분석을 하였다.

분획의 분리에는 몰리쉬(Molisch) 반응과 같은 다당류 검출법이 사용된다. L-1210 세포 증식 억제활성의 크로마토그램을 조사하여 활성분획을 분리하였다. 이 공정은 최고 활성분획을 얻기 위하여 3회 반복되었다. 이 활성분획의 수용액은 백색분말을 얻기 위하여 증발에 의하여 농축되었다.

이 분말은 물로 세척하고 다시 용해되어 증발에 의하여 농축되었다. 이 공정은 백색결정 분말을 얻기 위하여 5회 반복되었다. 배양액 1리터로부터의 산출량은 0.3g이었다.

[실시예 2]

실시예 1에 있어서와 마찬가지로 구성된 25리터의 액체배지가 만들어졌다. 배양은 2일간 37℃로 실시되었다. 배양액은 세균을 제거하기 위하여 원심분리(6,000rpm 20분간)시켰다. 얻어진 상징액(약 23리터)은 감압하에 40℃에서 약 500c.c. 용적으로 농축되었다.

이렇게 해서 형성된 침전물은 3회에 걸쳐 100c.c.의 증류수로 세척되었다. 이 세척물은 농축물과 결합되어, 이 전부가 감압하에 40℃에서 용적 500c.c.로 농축되었다.

농축물은 아미콘 파아 이이스트 다이아플론 #10,000(Amicon Far East Diaf Ion #10,000) 몰레클라 시이브막으로 2개분획(그중 1개분획 성분은 분자량이 10,000 이상이고 다른 것은 분자량 10,000 이하를 가지고 있다)으로 나누었다.

10,000 이하의 분자량을 가진 용액은 산성물질, 중성물질 및 염기물질로 나누기 위하여 디메틸 아미노에틸 셀룰로오스탐(OH-형)을 통과시켰다.

그후, 이 중성물질과 염기물질은 다이아플론 #5,000으로 다시 2개분획으로(그 하나는 분자량 5,000~10,000(원용액)을 가진 것으로, 또 다른 것은 분자량이 5,000 이하를 가진 것으로) 나누었다. 분자량이 5,000 이하의 것은 다시 다이아플론 #1,000으로 2개 분획으로(분자량 1,000~5,000을 가진 것과 분자량 1,000 이하를 가진 것으로) 나누었다. 이리하여 농축물은 각개 분획으로 나눌 수가 있었다.

상기 각 분획의 U.V. 스펙트럼 및 IR 스펙트럼이 결정되었다(제1~4도 참조).

다음에 상기 각개분획을 여러 가지의 유발된 질환에 감염된 동물들에게 투약하여 다음의 결과를 얻었다.

(A) 시험관내에 배양된 백혈병세포 L-1210에 대한 5,000 < 분자량 < 10,000 및 1,000 < 분자량 < 5,000을 가

진 분획의 항악성종양효과 :

분	획	농도(mg/ml)	평균세포수±표준편차($\times 10^4$ /ml)	억 제 율(%)	50%세포증식 억제농도 IC ₅₀ (mg/ml)
종양세포 대조군		0	14.1±0.49	—	—
1,000<분자량<5,000		0.25	9.9±0.97	29.8	
		0.50	8.5±0.19	39.7	
		1.0	4.9±0.13	65.2	
		2.0	3.7±0.33	73.8	0.70
		5,000<분자량<10,000	2.6±0.93	81.6	
		0.50	1.8±0.15	87.2	
		1.0	0.8±0.001	94.3	<0.25

(B) 시험관내에 배양된 종양세포에 대한 5,000<분자량<10,000 및 1,000<분자량<5,000을 가진 분획의 항악성종양효과 :

분	획	농도(mg/ml)	평균세포수±표준편차($\times 10^4$ /ml)	억 제 율(%)	50%세포증식 억제농도 IC ₅₀ (mg/ml)
종양세포 대조군			80.4±9.3	—	—
1,000<분자량<5,000		0.25	58.8±3.7	39.9	
		0.50	56.6±3.1	43.8	
		1.00	49.7±2.9	56.4	0.72
		2.00	46.1±2.3	63.1	
5,000<분자량<10,000		0.25	63.2±1.5	31.6	
		0.50	52.4±2.5	51.5	0.48
		1.00	39.4±2.5	75.4	
		2.00	37.7±1.8	79.5	

(C) 시험관내에 배양된 복수간장종양세포 AH41C에 대한 5,000<분자량<10,000 및 10,000<분자량<5,000을 가진 스티엔(styene) 분획의 항악성종양효과 :

분	획	농도(mg/ml)	평균세포수±표준편차($\times 10^4$ /ml)	억 제 율(%)	50%세포증식 억제농도 IC ₅₀ (mg/ml)
종양세포 대조군		0	115.9±1.52	—	—
1,000<분자량<5,000		0.1	93.4±1.85	19.8	
		0.5	93.5±6.60	19.0	
		1.00	90.3±2.74	22.4	>2.00
		2.00	87.7±7.94	24.1	
		5,000<분자량<10,000	118.9±2.59	0	
		0.5	62.9±3.35	45.7	
		1.00	27.3±2.61	76.7	0.60
		2.00	23.4±1.95	80.2	

(D) 에어리히 복수 종양세포를 접종시킨 생쥐에 대한 5,000<분자량<10,000 및 10,000<분자량<5,000을 가진 스티엔 분획의 항악성종양효과(세포 접종후 제11일에 총 종양 세포수에 미치는 영향).

분	획	투 여 량(mg/kg)	평균종양세포수±표준편차($\times 10^4$)	세포증식의 억제율(%)
대 조 군		0	115.4±12.6	—
1,000<분자량<5,000		200	28.4±6.4	75.3
		400	31.2±12.5	72.9
		600	29.0±3.3	74.5
		200	47.1±20.4	59.1
5,000<분자량<10,000			55.1±17.1	52.2
			42.2±5.1	63.2

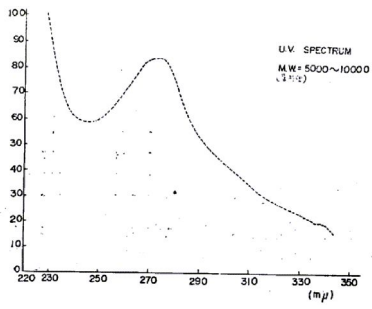
(57) 청구의 범위

청구항 1

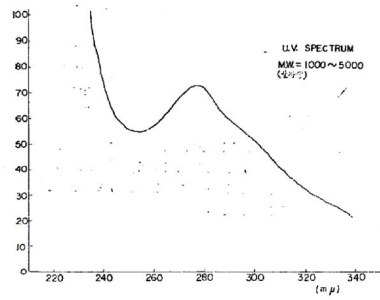
탄소원, 질소원 및 무기염을 함유하는 액체배양 배지에 스타필로코쿠스 에피데르미디스 STF(미공연 기탁 NO.3706, ATCC 31310)를 배양하고, 배양액으로부터 고체물질을 제거하고 잔류액을 농축하여 생성된 침전을 수세후, 이 침전을 재용해하여, 몇 개의 분획으로 분리한 후, 항종양 활성분획을 농축하고 정제 분리를 특징으로 하는 항악성종양제의 제조방법.

도면

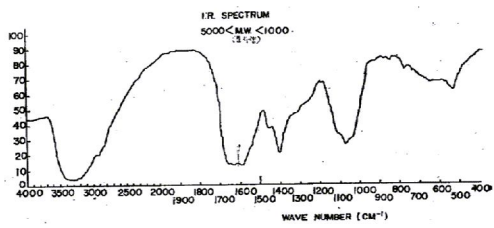
도면1



도면2



도면3



도면4

