

(19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. <i>A61K 35/12</i> (2006.01)	(45) 공고일자 2006년04월26일 (11) 등록번호 10-0573423 (24) 등록일자 2006년04월17일
--	--

(21) 출원번호	10-2000-7008003	(65) 공개번호	10-2001-0040384
(22) 출원일자	2000년07월21일	(43) 공개일자	2001년05월15일
번역문 제출일자	2000년07월21일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/001179	(87) 국제공개번호	WO 1999/37314
국제출원일자	1999년01월20일	국제공개일자	1999년07월29일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 인도, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 그라나다,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 09/010,123 1998년01월21일 미국(US)

(73) 특허권자 콜린 피터 도날드
 미국 메인 04683 썬셋 피.오.박스 172

(72) 발명자 콜린 피터 도날드
 미국 메인 04683 썬셋 피.오.박스 172

(74) 대리인 리앤목특허법인

심사관 : 최원철

(54) 해삼 카로티노이드 리피드 분획 생성물 및 그 사용법

요약

해삼 조직의 리피드 분획의 투여에 의한 염증성 자기면역 및 다른 질병들의 치료를 위한 방법 및 조성물이 기재되어 있다. 수산 및 인간 식품에 포함시키기에 유용한 조성물이 또한 개시된다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 리포옥시게나제(lipoxygenase) 경로의 활성화가 병리학적 상태의 원인이 되는 인간 및 가축 병리학의 일반적인 의약 분야에 관련된 어떤 질병 상태를 저해하기 위한 치료적 생성물 및 방법에 관한 것이다. 5-리포옥시게나제 또는 12-리포옥시게나제 경로를 저해하거나 조절하는 약품은 의약 분야에서 유용한 것으로 알려졌다. 전신성(systemic) 또는 피부학적 염증을 저해하면서 독성이 거의 또는 전혀 없는 약품이 치료 분야에서 유용하다. 본 발명은 또한 안료(pigmented) 성분이 동물의 살(flesh) 또는 그의 피부 또는 껍질(shell)에 색상 침착을 일으키기 위하여 수생(aquatic) 사료내에 포함되어야 하는 양식(aquaculture) 산업에 유용한 안료제에 관한 것이다.

더욱 상세하게는, 본 발명은 홀로두리데아(Holothuridea) 속, 또는 해삼, 특히 메인(Maine) 및 북대서양에서 발견되는 쿠컴아리아 프론도사(*Cucumaria frondosa*) 변종에서 유래된 어떤 신규 리피드에 관한 것이다. 어떤 종의 해삼 부분도 본 발명의 화합물을 추출하기 위한 원료를 충족할 것이다, 어떤 종으로부터의 해삼 오일도 리포옥시게나제 효소 활성 또는 류코트리엔(leukotriene) 반응의 산물이 병리학적 상태의 원인이 되는 질병의 치료 또는 개선뿐만 아니라, 사료 통합에 의한 수생 종의 착색을 위해 사용될 수 있다. 즉, 어떤 해삼의 속 또는 종으로부터도 유래된 신규 리피드는 리포옥시게나제 효소를 저해하고/하거나 류코트리엔 리셉터를 결합한다. 리포옥시게나제 효소는 아라키돈산 캐스케이드(cascade)에서 잘 알려져 있다. '레드 오일(RED OIL)' 및 '골드 오일(GOLD OIL)'로 명명된 이들 오일은 면역억제 목적으로 그대로(as-is) 사용될 수 있으며, 또한 낭창(lupus) 또는 류마티스성(rheumatoid) 관절염과 같은 질병에서 기관 이식(transplant) 또는 자기면역(autoimmune) 응답으로 인한 면역 응답을 개선하기에 적합한 면역억제제 성분이 유래되는 원료를 제공한다. 이들 오일 또는 분자 증류(distillation)로부터의 그 유도체는 '그대로' 적합하거나, 또는 당업계에 공지된 방법으로 더 분별(fractionate)될 수 있으며, 예컨대 면역억제를 요하는 인간 또는 동물에서 원치않는 면역 응답을 감소, 억제, 저해 또는 예방을 위해 사용될 수 있다. 그러한 상태의 예들은 당뇨병, 낭창 및 류마티스성 관절염과 같은 자기면역 질병의 치료 또는 예방을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 면역억제는 또한 기관 이식과 연관되어 자주 요구되어 진다. 면역억제제는 또한 인간 또는 동물이 면역 시스템의 과도자극(overstimulation)을 유도하는 것으로 알려진 슈퍼항원(superantigens) 또는 다른 인자들에 노출되었을 때 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 다른 추정상(putative) 면역억제제의 활성을 평가하는 표준으로서 유용하다. 본 발명은 또한 이들 화합물을 함유하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이들 오일이 병아리 융모요막 측정(chick chorioallantoic membrane assay)(Knighton et al., 1977)에서 보여진 바와 같이 혈관형성(angiogenesis)을 저해한다는 것을 보여준다. 본 발명의 목적상 RED OIL로 명명된 안료 오일은 많은 양의 카로티노이드(carotenoids), 칸타크산틴(canthaxanthin) 및 아스타크산틴(astaxanthin)을 함유한다고 보여지고, 착색이 필요한 특정 종의 살 또는 피부에 색상 침착을 가져오기 위하여 상업적 어류 사료에 첨가하기에 적합하다.

배경기술

본 발명은 신규한 화합물, 약학적 조성물 및 5- 및 12- 리포옥시게나제 활성이 병리학적 조건의 원인이 되는 질병의 치료를 위한 사용방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 면역 응답을 개선하고, 물고기 또는 새우의 살 또는 피부에 색상을 부여하기 위한 목적으로 수생(aquatic) 식품에 포함될 수 있는 해삼 조직의 리피드 분획에서 유래된 생성물에 관한 것이다. 비록 다양한 관절염 관련 질병의 치료에 특정 물고기로부터의 해양 리피드에 관한 보고가 실린 문헌들이 있었으나, 해삼 리피드는 어떤 논문에도 포함된 적이 없으며, 본 발명과 같이 포유동물 시스템에서 척추동물 물고기의 염증 저해 메카니즘이 알려진 어떤 증거도 없었다(DeLuca et al., 1995). 또한 어떤 해양 해면 및 해초류가 면역조절 또는 면역억제 활성을 가진다는 것이 알려졌으나, 해양 약학 분야에서 해삼 리피드가 의약 분야에 유용한 어떤 저해 활성을 가진다고 밝혀진 어떤 논문도 없었다(Konig 및 Wright, 1995).

더 구체적으로, 하기 화합물은 포유동물에서 5-리포옥시제나제 경로 및 12-리포옥시제나제 경로를 저해한다. 류코트리엔 B₄, C₄, D₄ 및 E₄, 5-히드록시에이코사테트라에노산(hydroxyeicosatetraenoic acid), 5-히드록시에이코사테트라에노산 및 12-히드록시에이코사테트라에노산과 같은 리포옥시제나제 경로 산물은 상기 질병들에 관련되어 있다. 본 발명에 따른 신규 리포옥시제나제-저해 화합물, 그 약학적 조성물 및 신규 사용방법의 용도에 관한 구체적인 질병은 알레르기; 천식; 관절염; 건선, 아토피성 피부염 및 여드름을 포함한 피부질환; 염증-포함 염증성 장질환 또는 통증; 전립선, 폐, 결장 및 피부를 포함한 다양한 암; 및 심근 허혈 및 경색, 협심증, 부정맥, 졸증, 편두통 및 아테롬성 경화증을 포함하는 심혈관 질환을 포함한다.

본 발명의 화합물은 어떤 종 또는 서브-문(phyla)의 해삼의 리피드 분획으로부터; 그러한 리피드 분획의 탈-안료 분획으로부터; 당업계에 알려진 분자 증류상(molecular distillation phases)으로부터; 또는 그것의 크로마토그래피 칼럼 분리로부터; 어떤 해삼의 호흡관, 생식선, 쿠베리단 세관 또는 폴리안 소포를 포함하는 표피, 진피, 복측, 배측 또는 장관 물질로부터 유래된다.

다양한 종의 해삼은 치료분야에 유용한 의학적 활성 분획을 제공한다. 특허 제5,519,010호는 탈-중합된(de-polymerized) 다당이 항-응집제로서 유용하다고 교시한다. Collin의 특허 제5,770,205호는 다양한 방법으로 추출된 해삼 조직이 인간 및 수의 의학 분야에 유용한 항-염증 활성을 가진다고 교시한다. 해삼 기관으로부터의 글리코시드는 항-암제를 함유한다고 밝혀졌다(Milyamoto et al., 1990). 상기 문헌중 어느 것도 어떤 리포옥시제나제 경로 또는 염증을 저해하는 해삼으로부터의 리피드를 기술하고 있지 않으며, 리포옥시제나제 생성물, 이성질체 또는 대사산물이 원인이 되는 약리학적인 질병 상태들을 저해하는 해삼-유래 약제의 어떤 유용성도 기술하고 있지 않다. 상기 발명들중 어떤 것도 포유동물에서 면역조절 활성을 제공하는 그러한 리피드에 관한 분야를 제공하지 않는다.

본 발명은 안료-리치(rich) 리피드 물질 및 탈-안료 리피드 물질의 둘다 그리고 안료 또는 탈-안료 해삼 리피드 물질의 분자 증류에서 회수된 라이트 상(Light Phases)이 인간 호중구에서 5-리포옥시제나제 효소 활성 및 인간 혈소판에서 12-리포옥시제나제 효소 활성을 저해할 수 있다는 것을 교시한다.

최근에 포유동물에서 류코트리엔 및 5-리포옥시제나제 및 12-리포옥시제나제 경로를 저해하기 위한 약제들을 개시하는 특허들이 있었다. 이들 화합물중 몇몇은 효과적이었고, 몇몇은 독성 부작용을 가졌거나 비용-효과적으로 생산할 수 없었다. 본 발명의 목적은 연고, 좌약내로 통합될 수 있고 경구 투여 또는 주사용 약제 또는 기타 방법에 의한 투여 약제에 포함될 수 있는 해삼 및 그 유도체의 생산이 포유동물에서 류코트리엔 경로를 조절함으로써 류코트리엔, LTB₄, 5-HETE 및 12-HETE 가 병리학적인 조건의 원인이 되는 암, 건선, 아토피성 피부염 등과 같은 질병의 치료에 기여할 수 있는 비용 효과적이고 쉽게 구할 수 있는 수단을 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적

신규 화합물 및 그를 함유하는 조성물의 치료 용도는 당업계에 현재 알려졌거나 장래 알려질 어떤 적당한 요법 및 기술에 의해서도 성취될 수 있다고 여겨진다. 또한 본 발명의 화합물은 더 강력한 활성을 나타내는 다른 유용한 화합물 및 조성물의 제조를 위한 출발물질 또는 중간물질로서의 용도를 가진다.

본 발명의 목적은 활성성분으로서 유효량의 하나이상의 하기 신규 화합물을 함유하는 약학적 조성물을 업계에 제공하는 것이다. 본 발명의 목적은 포유동물에서 그들의 리포옥시제나제 경로의 저해 활성을 통해 그리고 포유동물 면역 시스템에서 그들의 림프구 증식 경로의 저해 활성을 통해 면역조절제로서 유용한 신규 화합물뿐만 아니라, 해양 생물의 안료용 수생(aquatic) 식이요법에 유용한 성분을 업계에 제공하는 것이다. 해삼 조직에서 나온 추출된 해삼 오일의 숙청 라이트 상(Light PHASES)을 함유하는 분자 증류 또는 다른 분리기술 분획들은 리포옥시제나제 경로를 저해한다고 밝혀졌다. 또한 그들 동일 오일의 분자 증류로부터의 헤비 상(HEAVY PHASES)도 유사한 활성을 나타낸다. 이들 경로의 더욱 활성인 부분의 단리는 예컨대 칼럼 크로마토그래피 또는 리피드 생화학 업계에 알려진 다른 방법을 통해 생성될 수 있다. 따라서 본 발명의 목적은 만약 더욱 강력하거나 특정한 분획이 요구되는 경우 그러한 단리물을 위한 원료 및 활성 중간체를 제공하는 것이다.

본 발명의 화합물은 포유동물에서 5-리포옥시겐아제 및 12-리포옥시겐아제 활성을 저해하며, 그 저해 활성은 항-알레르기, 항-염증 및 항-과증식 활성과 관련된다. 따라서 본 발명의 화합물은 상기 알레르기 질병, 상피의 염증성 질병, 가슴앓이(heart-burn), 암 및 과증식성(hyperproliferative) 피부 질환의 치료에 유용하다. 그들은 또한 인간 혈액에서 림프구 증식을 저해한다고 밝혀졌다.

치료될 염증성 질병은 관절염, 활액낭염, 건염, 통풍 및 염증성 장 질환을 포함한다.

"과증식성 피부 질환"은 그 증상이 과도한 피부세포 증식, 박편(flaking), 비늘(scales) 또는 구진성(papular) 병변인 어떤 질환을 의미한다. 과증식성 피부 질환의 예들은 건선, 태선(lichenified) 습진, 비듬 등을 포함한다.

본 발명의 화합물은 어떤 종래의 투여 형태로도, 예컨대 국소적, 경구적, 비경구적, 직장내, 경피, 흡입법 등으로 투여될 수 있다. 경구적 또는 직장내 투여 형태는 캡슐, 정제, 환제, 산제, 카세제(cachets) 및 좌약을 포함한다. 액체 경구 투여형태는 용액 및 현탁액을 포함한다. 비경구적 제제는 멸균 용액 및 현탁액을 포함한다. 흡입 투여는 경비(nasal) 또는 경구 스프레이의 형태이거나 취입기(insufflation)에 의할 수 있다. 국소 투여 형태는 크림, 연고, 로션, 경피 장치(예컨대, 종래의 패치 또는 매트릭스 타입의) 등일 수 있으며, 과증식성 피부 질환의 치료에 바람직하다.

상기 투여 형태에 의해 고려될 수 있는 제제 및 약학적 조성물은 종래의 기술을 사용하여 종래의 약학적으로 허용가능한 부형제 및 첨가제와 함께 제조될 수 있다. 그러한 약학적으로 허용가능한 부형제 및 첨가제는 담체, 결합제, 조미료, 버퍼, 농후제, 유색제, 안정화제, 유화제, 분산제, 현탁제, 향료, 방부제, 윤활제 등을 포함한다고 의도된다.

적합한 약학적 허용 고형 담체는 마그네슘 카보네이트, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 설탕, 락토스, 펙틴, 텍스트린, 전분, 젤라틴, 트라가칸트(tragacanth), 메틸셀룰로스, 소디움 카르복시메틸셀룰로스, 저 융점 왁스, 코코아 버터 등이다. 캡슐은 활성 화합물이 담체로서의 약학적으로 허용가능한 캡슐내로 삽입되도록 제조될 수 있다. 본 발명의 활성 화합물은 약학적으로 허용가능한 부형제와 혼합될 수 있거나, 캡슐내로 충전용 부형제 없이 미세 분할 산제 형태로 사용될 수 있다. 유사하게 카세제는 당업계에 알려진대로 리포솜내로 포함된다.

액상형 제제는 용액, 현탁액 및 에멀션을 포함한다. 예로서, 비경구용 주사를 위한 물 또는 물-프로필렌 글리콜 용액이 언급될 수 있다. 액체 제제는 또한 물을 함유할 수 있는 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 프로필렌 글리콜의 용액으로 조제될 수 있다. 경구용으로 적합한 수용액은 물에 활성 성분을 첨가하고, 필요에 따라 적합한 색소, 조미료, 안정화제, 감미료, 용해제 및 농후제를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 경구용으로 적합한 현탁액은 유/수 에멀션의 당업계에 알려진 대로 TWEEN-80과 같은 유화제내에서 오일상의 활성 성분을 분산시킴으로써 제조될 수 있다.

예컨대, 과증식성 피부 질환의 치료용 국소 적용을 위한 제제는 상기 액체 형태뿐만 아니라, 본발명의 활성 성분을 국소용 제제에 일반적으로 사용되는 종래의 약학적 허용 희석제 및 담체와 결합하여 제조되는 크림, 에어로졸, 스프레이, 오일이 적당한 담체와 혼합된 더스트(dusts), 로션 및 연고를 포함할 수 있다. 연고 및 크림은 예컨대 적합한 농후제 및/또는 겔화제의 첨가로 수성 또는 유성 기재와 조제될 수 있다. 그러한 기재는 예컨대 물 및/또는 액체 파라핀 또는 밀랍(beeswax) 또는 피넛유 또는 피마자유와 같은 식물성 오일과 같은 오일을 포함한다. 기재의 성질에 따라 사용될 수 있는 농후제는 소프트 왁스, 알루미늄 스테아레이트, 세토스테아릴 알콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 울페트(woolfat), 수소화 라놀린 등을 포함한다.

로션은 수성 또는 유성 기재와의 제제될 수 있으며, 또한 일반적으로 하나이상의 약학적으로 허용가능한 안정화제, 유화제, 분산제, 현탁제, 농후제, 유색제, 향료 등을 포함할 것이다.

국소용 약학적 조성물은 또한 하나 이상의 방부제 또는 세균발육저지제, 예컨대 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 클로로크레졸, 벤잘코니움 클로라이드 등을 포함할 수 있다.

국소용 약학적 조성물은 또한 본발명의 활성 화합물과 조합하여 향균제와 같은 다른 활성 성분들, 구체적으로 항생제, 마취제, 진통제 및 징크 피리디온과 같은 진양제를 함유할 수 있다.

본 발명의 화합물은 또한 전신 분포를 위하여 경피적으로 전달될 수 있다. 경피용 조성물은 크림, 로션 및/또는 에멀션의 형태를 취할 수 있으며, 당업계에 관례와 같이 매트릭스 또는 저장기 타입의 경피 패치에 포함될 수 있다.

본 발명의 화합물은 항-알레르기, 항-염증성 또는 항-과증식성 유효량의 본 발명의 화합물을 사용함으로써 종래의 어떤 투여 모드로도 투여될 수 있다. 투여량은 주치의 판단하에 환자의 필요도, 치료될 질병 정도 및 사용될 특정 화합물에 따라 변할 수 있다. 구체적인 조건에서의 적당한 투여량의 결정은 당업계의 기술 범위내에 있다. 치료는 화합물의 최적 투여량 보다 적은 투여량으로 개시될 수 있다. 그 후에, 투여량은 환경하의 최적 효과가 달성될 때까지 조금씩 증가되어야 한다. 편의상, 총 일일 투여량은 필요에 따라 부분적으로 나누어 투여될 수 있다.

따라서, 모드에 따라, 일당 약 0.1 내지 약 500 mg/kg 체중의 투여량이 투여될 수 있다. 예컨대, 경구 투여시 그들은 약 0.5 내지 약 200 mg/kg 체중, 바람직하게는 약 50 내지 약 100 mg/kg 체중의 투여량에서 항-알레르기 활성을 나타내며; 흡입법으로 투여시 화합물은 퍼프(puff)당 0.1 내지 5 mg 의 투여량에서 항-알레르기 활성을 나타내고, 1 내지 4 퍼프가 4시간마다 흡입될 수 있다.

본 발명의 화합물은 항-염증성 유효량의 본 발명의 화합물을 사용함으로써 항-염증 활성을 얻기 위하여 어떤 종래의 투여 모드로도 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 항-염증제로서 일당 약 0.1 내지 약 500 mg/kg 체중, 바람직하게는 약 5 내지 약 200 mg/kg 의 투여량으로 투여될 수 있다. 바람직하게는 총 투여량은 일당 2 내지 4 분할 투여량으로 투여된다. 예컨대, 일당 약 5 mg/kg 체중 내지 약 50 mg/kg 체중의 경구 투여량이 약 4시간 간격의 분할 투여량으로 사용될 수 있다.

과증식성 피부 질환의 치료용 투여시, 본 발명의 화합물은 국소적, 경구적, 직장내 또는 비경구적, 바람직하게는 국소적으로 투여될 수 있다. 국소적으로 투여시, 투여 화합물의 양은 처리될 피부의 양뿐만 아니라 적용될 활성 성분의 농도에 따라 넓게 변화한다. 바람직하게는 국소용 조성물은 약 0.10 내지 약 10 중량%의 활성 성분을 함유하며, 주치의의 판단에 따라 적용된다. 경구 투여시, RED OIL 및 GOLD OIL의 화합물은 약 0.1 mg/kg 내지 약 500 mg/kg 체중, 바람직하게는 약 5 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 범위의 일일 투여량에서 과증식성 피부 질환의 치료에 효과적이며, 이들은 분할 투여량으로 투여될 수도 있다. 직장내 투여시, 본 발명의 화합물은 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 범위의 일일 투여량으로 투여될 수 있다.

본 발명의 화합물의 투여 결과로서, 대부분의 경우에 건선 환자의 증상이 소실됨을 기대할 수 있다. 따라서, 건선증 환자는 비늘, 홍반, 플라크 크기, 가려움증 및 건선 관련 기타 증상의 감소를 기대할 수 있다. 각각의 개별 건선 환자를 성공적으로 치료하기 위해 필요한 의약 투여량 및 투여기간은 변할 수 있으나, 의약계의 기술자는 이들 변화를 인식할 수 있으며 따라서 치료 코스를 조정할 수 있을 것이다.

리포옥시젠아제 시스템

아라키돈산은 생리학적 활성 에이코사노이드의 패밀리의 생물학적 전구체로서 작용한다. 이들은 프로스타글란딘-E 및 -F 화합물, 트롬보옥산 및 프로스타시클린의 클래스와 같은 시클로옥시젠아제 활성에서 유래된 생성물 및 히드록시- 및 히드로퍼옥시에이코사테트라에노산 및 류코트리엔과 같은 리포옥시젠아제 효소의 작용에서 유래된 생성물을 포함한다.

이들 리포옥시젠아제 생성물은 다형핵 백혈구 이주 또는 화학주성, 리소솜 효소 방출 및 탈과립(degranulation)의 매우 강력한 입체특이성 유도인자라고 밝혀졌다. 더욱이, 이들 생성물은 맥관 및 폐 조직과 같은 평활근의 수축을 유도하며, 트롬보옥산 A₂ 및 프로스타시클린과 같은 추가의 염증원의 발생을 유도한다. 리포옥시젠아제 생성물은 또한 혈관확장제 프로스타노이드 및 기타 매개체와 상호작용하여 염증성 응답의 향상 또는 증폭을 유도한다.

류코트리엔 및 히드록시 및 히드로퍼옥시에이코사테트라에노산은 많은 질병 상태의 병인론에서 주요한 역할을 수행한다. 이들 화합물은 류마티스성 조인트의 활액에서, 건선 환자의 관련 피부에서, 염증성 유색 조직에서, 그리고 허혈성 심근 조직에서 고레벨로 발견되었다. 그들은 또한 알레르기 및 천식 질병의 매개인자이다.

다수의 서로 다른 유형의 종양의 성장을 자극하는데 있어 5-HETE의 역할은 최근 다수의 문헌에서 증명되고 있다. 예컨대, 배양된 인간 전립선 암 세포에 아라키돈산을 첨가하면 세포 성장의 상당한 증가 및 5-히드록시에이코사테트라에노산(5-HETE)의 증가된 생합성을 나타낸다(Ghosh 및 Myers, 1997). 이들 증가된 성장은 5-리포옥시젠아제(5-LO) 저해제 AA681 및 MK886에 의해 차단되나, 12-LO 저해제, 바이살레인 및 N-벤질-N-히드록시-5-페닐펜탄아미드(BHPP) 이나 시클로옥시젠아제(COX) 저해제에 의해서는 차단되지 않는다. 더욱이, 세포에 5-HETE를 첨가하면 세포 성장을 자극할 뿐만 아니라 MK886의 효과를 역전시키나, 류코트리엔 B₄과 같은 5-LO 경로의 다른 생성물은 그렇지 않다. 유사한 발견이 또한 시험관내(in vitro) 및 생체내(in vivo) 둘다에서 다른 유형의 암 세포에서 관찰되었다. 예컨대, 인간 유방암(HS578T) 세포주에서, LO 저해제 노르디히드로구아아아레탄산(NDGA) 및 에스쿨레틴은 세포 성장을 저해하나, COX 저

해제 피폭시킴은 효과를 가지지 않는다(Hofmanova et al., 1996). 쥐 아테노카시노마 세포주(MAX) 및 MAC 세포로 이식된 마우스에서, 5-LO 저해제 BWA4C(일반식 R-CONHOH을 갖는 아세토히드로옥삼산 유도제)는 종양세포 성장 및 5-HETE 생산을 저해하였다(Hussey 및 Tisdale, 1996). 더욱이, 우레탄에 의해 유도된 아테노마를 갖는 A/J 마우스에서의 생체내 연구에서 NDGA의 투여는 폐 아테노마 세포 숫자를 상당히 감소시켰으며(Moody et al., 1998), 마우스 아테노카시노마에서 BWA4C 및 BWB70C는 또한 5- 및 12-HETE 생산에 작용하여 MAC26 및 MAC16 세포 성장을 감소시키는 것으로 밝혀졌다(Hussey 및 Tisdale, 1996).

12-HETE

혈소판 및 종양세포에 의해 발생하는 12-HETE는 종양 전이를 촉진하는데 중요한 분자라는 많은 증거들이 제시되고 있다. 그것은 표면 인테그린의 증가된 발현에 의해 종양세포 유도된 혈소판 응집 및 종양세포의 서브내피 매트릭스에의 부착을 향상시키고, 내피 세포 수축을 유도하고, 종양세포 운동성을 증가시키며, 이들 모두는 종양세포 전이의 중요한 단계들이다(Honn et al., 1994). 시험관내 연구에서 12-LO 저해제 BHPP는 내인적 및 외인적으로 첨가된 12-HETE 둘다의 상기 효과를 파괴시킨다는 것을 보여주었다(Honn et al., 1992; Chen et al., 1994). 또한 12-HETE 생산이 종양세포 전이 잠재성의 좋은 지시계이라는 것도 증명되었다. 예컨대, 정상 세포와 비교하여 전립선 암 세포에서 12-HETE mRNA 레벨이 증가하였고, 이 mRNA 레벨의 증가는 암 세포의 진보된 단계 및 약한 분화와 관련되어 있다(Gao et al., 1995). 또 다른 연구에서, 래트 Walker 카시노마(W256) 및 마우스 펠라노마(B16a) 세포는 아라키돈산(AA)을 12-HETE 및 5-HETE로 물질대사시킨다는 것과, 실험적 전이에서 BHPP의 사용은 폐에서 콜로니 형성을 감소시킨다는 것이 밝혀졌다(Chen et al., 1994; Liu et al., 1994).

본 발명에 따른 화합물, 약학적 및 누트라세티컬(nutraceutical) 조성물은 리포옥시게나제 또는 류코트리엔의 생합성 또는 생화학 작용을 저해하며, 따라서 그 병인론이 5-HETE 및 12-HETE 및 류코트리엔 B₄(LTB₄)과 같은 류코트리엔 및 다른 리포옥시게나제-유래된 산물의 생성과 관련된 다수의 질병의 치료 또는 개선에 유용하다. 이들 리포옥시게나제 저해제는 백혈구의 침윤, 조직-소화성 리소좀 효소의 방출 및 평활근 조직이 투과성 및 수축상태의 변화로 인한 조직 손상 및 염증의 예방을 도와준다.

본 발명에 따른 리포옥시게나제-저해 또는 류코트리엔-길항 화합물 및 약학적 조성물이 유용한 구체적인 질병은 알레르기; 천식; 관절염; 건선 및 여드름을 포함하는 피부 질환; 염증; 염증성 장 질환, 통증 및 심근 허혈 및 경색, 협심증, 부정맥, 졸증, 편두통, 아테롬성 경화증을 포함하는 심혈관 질환 및 전립선, 폐, 피부 및 소화관의 암을 포함하는 다양한 병인학의 암을 포함한다.

본 발명의 RED OIL 및 GOLD OIL에 의한 혈관생성(angiogenesis) 저해

새로운 혈관의 저해가 신규 혈관 성장에 의존하는 신생물(neoplastic) 종양의 성장을 제한할 것이라는 견해에서 혈관생성의 새로운 저해제를 찾기 위한 조사는 과학자들의 흥미를 끌어들였다. 정상 세포가 고형 종양으로 발전함에 따라, 그것은 일련의 변화를 겪게된다. 생리학적 레벨에서, 성장은 향상되고, 면역성은 회피되고, 신혈관형성(neovascularization)이 유도된다. 신혈관형성 또는 혈관생성은 종양 성장의 필수조건이라고 보여진다. 실험적인 고형 종양은 혈액 공급없이 몇 밀리미터 두께 이상으로 성장할 수 없다. 대부분의 자연 고형 종양은 그들이 의존하는 새로운 혈관을 유인하는 혈관생성인자를 만들어 낸다. 따라서, 무엇이 만연하는 모세관 증식을 저지하는가 및 무엇이 정상조직의 모세관 내피 세포의 침묵(quiescent) 상태를 유지하는가에 대한 계속적인 연구 노력이 있어왔다.

본 발명의 또 다른 목적은 그러한 치료가 필요한 온혈 동물에서 혈관생성을 저해하는 물질의 조성물과 방법을 제공하는 것이며, 그 방법은 상기 온혈 동물에 하기하는 바와 같이 분자 종류 공정으로부터 단리된 RED OIL 또는 GOLD OIL, 또는 LIGHT 또는 HEAVY 상(Phases)을 함유하는 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

해삼 조직으로부터의 카로티노이드

해삼으로부터의 카로티노이드는 다양한 과학 잡지 논문에서 언급되었는데, 예컨대, Matsuno et al. (1995)는 해삼, *Holothuria leucospilota* 및 *Stichopus japonicus*의 생식선에서 주요 카로티노이드로서의 아스타산틴의 발생을 보고하였으며, 베타 카로틴, 에치네논, 칸탁산틴 및 제악산틴이 *H. leucospilota* 및 *S. japonicus*의 생식선으로부터 단리되었다. 한편, 아스타산틴 및 에스테르, 칸탁산틴, 포에니콕산틴 및 에치네논이 Bullock 및 Dawson(1970)에 의해 *Psolus fabrichii*의 적색 체벽으로부터 단리되었다. Tsushima et al. (1996)은 해삼 *Cucumaria japonica*로부터의 신규 해양 디-Z 카로티노이드, 커컴마리악산틴 A, B 및 C에 대해 보고하였다. Findlay et al., (1983a)은 *Cucumaria frondosa* 종으로부터의 칸

탁산틴에 대해 보고하였다. 이들 보고중 어느 것도 그러한 카로티노이드를 양식(aquaculture) 또는 의학 또는 건강식품 산업분야를 위해 사용하는 방법을 제공하지 않으며, 어떤 것도 그러한 안료 리피드 분획을 농축하는 방법을 제공하지 않는다.

Spinelli, Stout 및 Nilsson에 의한 U.S 특허 제4,692,280호는 초임계의 이산화탄소를 사용하여 정제된 물고기 오일(물고기 조직으로부터의 개시 추출후에)을 수득하는 방법을 제공하며, 이것은 본 명세서에서 상기 방법을 기술하기 위한 참고문헌으로 포함된다. 이 특허는 초임계 정제 방법을 통해 해삼 리피드 분획 정제물을 수득하는 방법을 제공하지는 않는다.

따라서, 리피드 분획의 효과적이고 대규모 제거에 대한 선행기술은 없으며, 어느 것도 해삼 조직의 사용가능한 카로티노이드 또는 비-카로티노이드 리피드 분획을 수득하는 것을 지향하지는 않는다.

본 발명의 목적은 해삼, 특히 *Cucumaria frondosa* 종으로부터 내장 물질 및/또는 체벽으로부터 사용가능한 안료 리피드 분획 및 안료-없는 리피드 분획을 회수하는 방법을 제공한다. 본 발명의 또 다른 목적은 그러한 회수 방법으로 인한 안료 리피드 분획 및 탈-안료 리피드 분획인 물질의 조성물을 개시하는 것이다. 쿡기를 추출분야에서 사용되듯이 Crown 2 Extractor (Crown Iron Works, Chicago, IL)과 같은 상업적 추출장비로 아세톤 또는 알콜 용매 추출법에 의해 수득된 결과의 안료 리피드 분획은 밀리온당 약 4,500 부의 칸탁산틴 및 아스타산틴이 풍부한 안료 물질을 제공하며, 사료 성분으로서 양식 산업에 유용하다. 리피드 추출후에, 건조, 탈-리피드 조직은 놀라운 레벨의 필수 아미노산을 갖는 고-단백질 음식 또는 가수분해물로서 사용될 수 있다.

발명의 요약

본 발명은 습기 또는 건조 원료 조건에서 해삼 내장 또는 체벽 조직으로부터 수득가능한 신규 안료 및 비-안료 리피드 화합물의 산업적 추출을 위한 방법 및 물질의 조성물을 개시한다. 본발명의 화합물은 수생(aquatic) 식이요법(diets)에서 안료 첨가제로서 또는 포유동물에서 의학적 치료제로서 사용될 수 있으며, 여기 기술된 분자 증류법, 산업적 규모의 용매 추출법, 칼럼 크로마토그래피법 및 제조용(preparative) 고압 액체 크로마토그래피법을 통해 제조된다.

본 발명의 화합물은 국소 적용시 염증의 쥐 모델에서 귀(ear) 무게의 낮은 퍼센트 증가에 의해, 래트의 뒷발에서 보조제 유발 염증의 저해 결과에 의해, 뿐만 아니라 인간으로부터의 주관적 유익성의 일화적 보고로부터 항-염증 활성이 명백해진다.

본 발명의 화합물, RED OIL 및 GOLD OIL 및 그 분자 증류 분획은 포유동물(예컨대, 인간 또는 개)에서 알레르기를 치료하는데 사용되며, 바람직한 용도는 그러한 포유동물의 피부의 알레르기성 만성 염증을 치료하는 것이고, 적당한 경피 담체 화합물과 함께 본발명의 오일이 국소적인 리포옥시젠아제 활성 부위로 경피적으로 운반되는 관절염성 염증 상태의 저해제로서 사용되는 것이다. 추가적인 바람직한 용도는 알레르기성 만성 폐색성 폐 질환을 치료하는 것이다. 여기 사용된 만성 폐색성 폐 질환이란 천식, 알레르기성 또는 계절성 비염 및/또는 기관지염 등과 같은 폐 내외로 공기의 통과가 방해되거나 감소되는 질병을 의미한다. 건식, 여드름, 관절염 또는 암의 치료는 경구 투여뿐만 아니라 국소 화합물로서의 본발명의 화합물의 사용에 의해 성취될 수 있다.

따라서, 본 발명의 추가적 목적은 해삼 조직에서 단리된 RED OIL 및 GOLD OIL 및 이들 화합물의 다양한 유도체 및 유사체의 면역억제 용도에 관한 것이다. 이들 화합물은 원치않는 면역 응답을 감소, 억제, 저해 또는 예방하기위해 사용될 수 있다. 유리하게는, 이 면역억제는 세포독성없이 성취될 수 있다. 따라서, 이들 화합물은 면역억제를 요구하는 인간 또는 동물의 치료에 유용하다. 그러한 질병의 예들은 당뇨병, 낭창 및 류마티스성 관절염과 같은 자기면역 질환의 치료 또는 예방을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 면역억제는 기관 이식과 관련하여 자주 요구된다. 면역억제제는 또한 인간 또는 동물이 면역 시스템의 과도자극을 유발한다고 알려진 수퍼항원 또는 다른 인자들에 노출되었거나 노출될 수 있을 때 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 다른 추정상 면역억제제의 활성을 평가하는 표준으로서 유용하다. 본 발명은 또한 이들 화합물을 함유하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

안료 첨가제로서, 다양한 안료 오일이 오일의 카로티노이드 함량 또는 안료 다이어트가 공급될 특정 수생 종에서의 색상 강도의 요구 정도에 따라 다양한 함율로 물고기 또는 새우 사료에 첨가될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 대조군에 비해 LTB₄의 합성에 대한 GOLD OIL LIGHT PHASES의 효과를 보여주며,

- 도 2는 GOLD OIL의 회석에 의한 호중구 5-리포옥시겐아제 대사물질 합성의 저해를 보여주며,
- 도 3은 호중구 5-리포옥시겐아제 대사물질 합성에 대한 1:10,000 회석에서 RED OIL의 효과를 보여주며,
- 도 4는 메탄올 대조군에 비하여 12-HETE 합성에 대한 RED OIL 및 GOLD OIL의 효과를 보여주며,
- 도 5는 GOLD OIL의 가스 크로마토그래피를 보여주며,
- 도 6은 RED OIL의 흡수 스펙트럼을 보여주며,
- 도 7은 아세톤 대조군에 비해 크로톤 오일로 공격된 마우스 귀에 대한 5% GOLD OIL의 효과를 보여주며,
- 도 8은 메탄올 대조군에 비해 12-HETE 합성에 대한 GOLD OIL LIGHT PHASES의 효과를 보여준다.

실시예

발명의 상세한 설명

해삼의 유용한 분획을 제조하는 방법

다양한 해삼 분획들이 단리되고 치료학적으로 일부 수생 사료용으로 사용된다. 요약하면, 이들 분획을 제조하는 한가지 방법은 건조 해삼 내장 또는 체벽을 용매로 추출하여 RED OIL이라 불리우는 안료 오일을 생성하는 것이다. 안료는 RED OIL로부터 제거되어 GOLD OIL이라 불리우는 다소 안료 오일을 얻을 수 있으며 적색 안료 리피드 농축물인 제2분획을 얻을 수 있다. RED OIL 및 GOLD OIL은 각각 증류되어 LIGHT PHASES 및 HEAVY PHASES라고 불리우는 다양한 분획들을 수득할 수 있다. 다른 방법은 건조 조직대신에 습식 해삼 조직을 사용하는 것이다. 이것은 아세톤 또는 알콜로 수행하였을 때, 제1용매 추출이 RED GREASE로 명명된 생성물을 생성하였다. GOLD OIL을 만드는 제2방법이 또한 개시된다. 이 선택적 방법은 제1추출이 모든 또는 대부분의 적색 칼라를 제거한후 어떤 적합한 수단에 의해 건조된 해삼 조직의 제2용매 추출을 포함한다. 마지막으로, 해삼의 또 다른 추출은 탈리피드된 해삼 조직을 취하여 그것을 단백질-리치 가수분해물을 생성하도록 처리함으로써 수득된다. 이 가수분해물은 식품 보조물로서 유용하거나 다양한 식품 내용물내로 포함될 수 있다. 각각의 분획을 제조하고 이용하는 방법이 아래 개시되어 있다. 하기 방법은 RED OIL 및 GOLD OIL과 같은 본 발명의 각각의 다양한 생성물을 제조하는 하나 이상의 방법을 개시한다. 비록 약간 다른 방법이 개시되지만, 그 방법은 본질적으로 동등한 산물을 제조하며, 생성물의 이름은 본 명세서에 개시된 방법 또는 본질적으로 동등한 산물을 생성하는 다른 방법중 어느 것이 그 생성물을 제조하기 위해 사용되는가에 상관없이 생성물을 포함한다고 의도된다.

해삼의 유용한 분획의 제조방법

460 킬로그램의 해삼, *Cucumaria frondosa*으로부터의 내장 물질을 해삼 산업의 가공 폐기물로부터 수집하였다. 내장 물질(352 파운드)을 3일동안 스크린 래크상의 종래의 저온 해산물 건조기(Southwind, Nova Scotia, Canada)에서 건조하여 105파운드의 건조 물질을 얻었다. 이어서, 건조 내장 물질을 종래 방법(Crown Model 2 Extractor, Crown Iron Works, Chicago, IL)으로 콩기름 분야에서 알려진대로 헥산으로 추출하여 약 42파운드의 RED OIL이라고 불리우는 적색 리피드 물질을 생성하였다. 다음 리피드 물질을 오일에 1% 물을 첨가하여 '탈-검(de-gummed)'하고, 30분간 수화한 후, 150 °F에서 8000 rpm으로 원심분리하였다. 이어서, 적색 탈검 리피드 물질을 0.5% 실리카겔로 예비처리하고, 180 °F로 가열한 후, 6 마이크론 여과지를 이용하여 여과시켰다. 안료의 제거는 예비처리된 오일에 5% 표백 점토를 첨가하여 수행하였다. 오일을 28 인치 Hg의 진공에서 20분간 220 °F로 가열하였다. 결과의 오일(34 파운드)은 연황색이었으며, 대부분의 안료는 표백 점토에 흡착되었다. 안료가 없는 내장 리피드는 "GOLD OIL"이라고 명명되며, 리포옥시겐아제 활성의 저해 및 항-염증 활성에 대해 더 분석되는 리피드 분획중 하나이다.

결과의 점토를 다음 1:2 (w:w) 점토 대 용매 비율로 아세톤으로 추출하고 2회 세척하였다. 결과의 용액을 다음 90 °C 및 29 인치 Hg 진공에서 Luwa 증발기에서 탈용매(desolventize)시키고, 8 파운드의 적색 리피드 분획 농축물을 회수하였다.

GOLD OIL을 제조하는 선택적 방법은 클로로포름으로 평형된 실리카의 칼럼을 통해 RED OIL을 통과시키고 클로로포름으로 세척하는 것이다. GOLD OIL은 클로로포름 세척으로 용리된다. 다음 칼럼을 통해 클로로포름:메탄올(바람직하게는 60%:40%) 혼합물을 통과시켜 칼럼으로부터 농축된 RED OIL을 용리시킬 수 있다. 이로 인해 GOLD OIL로 회수된 칼럼상에 로딩된 원재료의 약 70% 및 농축 RED OIL로 회수된 30%가 얻어진다.

증발 분획을 분리시키기 위해 안료-없는 GOLD OIL 및 안료 RED OIL을 둘다 분자 증류시켰다. 3가지 패스가 200 °C 및 0.005 torr에서 분자 스틸(still)을 통해 만들어졌다. 3가지 분획을 각 패스에서 회수하였다. 라이트 상(LIGHT PHASE I)을 약 30 °C 온도의 응축기로 수집하고 유지하였다. 휘발성 분획을 알콜/드라이아이스 트랩에서 수집하여 폐기하였다. 헤비 상(HEAVY PHASE I)은 스틸의 바닥에서 용리되는 공정에 의해 증발되지 않는 부분이다. 이어서 HEAVY PHASE I을 분자 스틸에 재도입하여 LIGHT PHASE II 및 HEAVY PHASE II을 생성하였다. 스틸의 바닥에 용리된 HEAVY PHASE II을 다음 스틸에 재도입하여 LIGHT PHASE III 및 HEAVY PHASE III을 생성하였다. 전책적으로, 이 기술은 LIGHT PHASES I, II 및 III; HEAVY PHASES I, II 및 III; 및 폐기된 추가의 휘발성 물질을 제공하였다. 라이트 상은 이어서 리포옥시젠아제 경로를 저해는 그들의 활성에 대해 측정되었다. 도 1은 라이트 상의 5-리포옥시젠아제 활성의 저해를 도시한다. 도 2는 비증류된 GOLD OIL의 저해성 5-리포옥시젠아제 활성을 도시한다. 도 3은 탈-안료전에 RED OIL의 5-리포옥시젠아제 저해 활성을 도시한다. 도 4는 12-리포옥시젠아제 경로 및 12-HETE 발생의 활성에 대한 GOLD OIL 및 RED OIL의 효과를 도시한다. 도 9는 메탄올 대조군에 비해 12-HETE 합성에 대한 1:1000 희석에서의 GOLD OIL LIGHT PHASES의 효과를 도시한다.

유용한 분획을 제조하는 제2방법

물고기 또는 새우를 착색하기 위한 안료-제공 화합물로서 해삼 내장 또는 체벽 조직으로부터의 대상 오일 분획의 사용을 포함하는 본발명의 목적은 다음 단계들의 조합을 포함하는 공정을 사용함으로써 성취된다:

- a. 수작업이나 기계로 가공된 해삼으로부터 내장 물질을 분리하기. 수작업 분리는 칼로 동물을 절단한후 내장을 물리적으로 제거하는 것을 포함한다. 기계 절단은 자동화된 절단도구가 동물을 절개함으로써 내장이 제거될 수 있는 어떤 기계화 구체예를 포함한다.
- b. 단백질성 리피드 내장 물질을 동물로부터 분리후 충분한 산으로 예비처리하여 물질의 pH를 약 4 내지 약 5.5, 바람직하게는 약 4.3 내지 약 4.7의 범위까지 낮추어 미생물 분해를 억제하고, 물질을 탈미네랄화시키고, 용매 또는 용매 조합에 의한 후속 추출동안 전체 적색 카로티노이드 안료 회수를 개선한다.
- c. 공정의 한 방법에서, 단백질성 리피드 내장 물질을 아세톤, 알콜 또는 3:1 (v:v) 용매 대 물질 비율의 유사한 용매로 혼합한 후, 24 시간동안 또는 충분한 안료가 내장 물질로부터 용매로 방출될 때까지 교반한다.
- d. 아세톤 또는 다른 용매를 잔류 내장 물질로부터 따러내고, 내장 물질을 이어서 4회 이상 청정 용매로 세척하여 잔류 카로티노이드 리피드를 제거한다.
- e. 잔류 내장 물질을 원심분리하여 잔류 용매를 제거하거나, 밀폐 용기에서 가열하고 당업계에 알려진 탈용매기(desolventizer)를 사용한 방법에 의해 용매를 회수한다.
- f. 안료 함유 아세톤 또는 용매를 오일 화학 업계에 알려진 대로 '와이프드-필름(wiped-film)' 증발기로 펌핑하고, 안료를 방지하고 봉쇄한후 용매를 회수한다.
- g. 결과의 리피드 안료 분획은 칸탁산틴 및 아스타산틴을 함유하는 혼합된 카로티노이드-함유 리피드 물질이고, 여기서 "RED GREASE"라고 칭해진다. 주요 카로티노이드는 *Cucumaria frondosa*의 예에서 칸탁산틴이다.
- h. 결과의 안료 리피드 분획은 당업계에 알려진 대로 공지의 항-산화제에 의해 안정화될 수 있다.

I. 잔류 내장 물질을 다음 건조하고 핵산, 부탄, 초임계 이산화탄소 또는 유사 용매로 추출하여 안료가 본질적으로 없는 황금색 오일을 제거한다. 본질적으로 대부분의 카로티노이드가 없는 이 황금색 오일은 GOLD OIL이라고 칭해진다. 결과의 리피드가 없는 잔류 건조 단백질성 물질은 단백질 및 다당류가 풍부하여 필수 아미노산이 필요한 동물 또는 인간 식품 부형제대로 포함시키기에 적합하다. 단백질성 탈-안료 음식은 해양 물고기-음식 산업에서는 독특한데, 왜냐하면 그것은 상

기 방법에 의해 탈-안료되고, 탈-리피드되고, 수용성으로 만들 수 있고, 사용가능한 단백질 및 필수 아미노산이 풍부하며, 본질적으로 냄새나는 오염물질이 없기 때문이다. 그것은 가수분해물 업계에 알려진 방법에 의해 분말 또는 가수분해물로 쉽게 제조되며, 이는 여기에 기술된다.

본 발명의 다른 구체 공정에서, 분리된 해삼 내장은 상기 방법대로 산성화된 후 건조된다. 내장 물질은 또한 10분 내지 30 분사이의 다양한 시간동안 150 °F 내지 비점사이의 범위의 물에서 가열된 후, 본 발명의 일반 공정에 악영향을 주지 않게 산성화될 수 있다. 건조 공정은 표적 리피드 분획 또는 카로티노이드에 영향을 주지 않고 저열(60-80 °F) 또는 고열(150-200 °F)일 수 있다. 내장 또는 조직 물질의 건조를 포함하는 이 구체 공정은 다음 단계들의 조합을 포함하는 공정에 의해 더욱 성취된다:

- a. 약 10% 이하의 수분 함량을 갖는 건조 내장 물질을 당업계에 알려진 핵산 또는 다른 적합한 용매에 의한 표준 "오일-회수 절차"를 수행하며, 여기서 건조 내장 또는 조직 물질은 5분간 130 °F에서 1:1로 혼합된 후 배수된다. 추출 생성물은 다음 청정 용매에 의해 3회 세척된다. 카로티노이드를 함유하는 용매는 95 °C 및 28 인치 Hg 진공에서 와이프 필름 증발기(Luwa and Pope)에서 탈용매화된다.
- b. 그러한 용도로 디자인된 저장기내로 용매/리피드 상을 봉쇄하고, 표준 "스팀 스트리핑" 또는 "와이프 필름" 오일 기술에 의해 카로티노이드-오일/용매 상으로부터 상기 용매를 제거한다.
- c. 300 내지 600 부/밀리온의 6-에톡시-1,2-디히드로-2,2,4-트리메틸퀴놀린 (Ethoxyquin, Monsanto) 또는 약 1 퍼센트의 비타민 E와 같은 당업계에 알려진 항-산화제로 상기 오일 상을 처리한다.
- d. 그렇게 수득된 적색 안료 오일을 오일에 1% 물을 첨가하고 30분간 수화한후 150 °F의 8000 rpm에서 원심분리함으로써 탈검(degumming) 공정시킨다. 이 오일은 RED OIL이라 칭해진다.
- e. 다음 방법으로 농축된 안료를 회수한다: 탈검 오일을 우선 0.5% 실라카겔(Trysil 600, Grace Co.)로 예비처리하고, 180 °F로 가열한후, 6 마이크론 여과지를 사용하여 여과시킨다. 색상의 회수는 예비처리된 오일에 5 퍼센트 표백(활성화) 점토(Englehard 105)를 첨가함으로써 수행되고, 오일은 다음 28 인치 Hg 진공에서 20분간 220 °F로 가열한다. 결과의 오일은 밝은 황색이고 대부분의 안료는 표백 점토에 흡착된다. 이 오일은 GOLD OIL이라 칭해진다. 결과의 점토는 다음 1:2 (w:w) 점토 대 용매 비율의 아세톤으로 추출되고 2회 세척된다. 결과의 용매는 다음 90 °C 및 29 인치 Hg 진공의 증발기(Rotovap)에서 탈용매화된다.
- f. 당업계에 알려진 표준 HPLC 방법에 의해 추출 농축물의 카로티노이드 함량을 측정한다. 본 발명에 의해 추출된 농축 안료는 수생 다이어트에 포함시키기에 적합하고, 원료의 카로티노이드 함량에 따라 2,000 내지 5,000 부/밀리온의 카로티노이드 칸탁산틴을 함유한다.
- g. 1 내지 5 중량%로 당업계에 알려진 비타민 E 또는 다른 적합한 항산화제를 첨가함으로써 카로티노이드 추출공정(GOLD OIL)으로부터 탈-안료 리피드를 안정화한다.
- h. 해삼 내장 물질의 카로티노이드 함유 오일 추출 절차로부터 수득된 탈-안료 리피드 분획(GOLD OIL) 또는 안료 오일(RED OIL)을 500 내지 1000 밀리그램의 "소프트-겔" 캡슐에 캡슐화하거나, 포유동물에의 경구 및 국소 투여를 위해 적합한 저장기내로 포장한다. 국소 투여 생성물은 특정 또는 일반 조건에서 원하는 효과에 따라 연화제와 비-안료 리피드 분획의 어떤 조합에 의해서도 수득될 수 있다.
- i. 살 또는 피부내로의 카로티노이드 침착을 생성하기에 충분한 식품 퍼센트로 수생 다이어트내에 카로티노이드의 부/밀리온에 의존하여 상기 안료 리피드 분획을 통합시킨다.

유용한 분획을 제조하는 다른 방법

본 발명의 또 다른 목적은 본질적으로 카로티노이드가 없는 해삼 내장 리피드 분획을 함유하는 물질의 조성물을 개시하는 것이다. 그것은 비교적 악취가 없으며; 상당한 양의 오메가-3 지방산, EPA(에이코사펜타노산)를 함유하며; 비타민 E를 함유한다.

가스 크로마토그래피/질량 분광측정기(mass spectrometry)를 탈-안료 리피드 분획상에 실시한다. 가스 크로마토그래피 데이터는 도 5에 나타난다. 도 5는 활성 점토 전달(transference)의 수단에 의해 카로티노이드 추출후에 탈-안료 리피드

분획의 스펙트럼으로서, Hewlett-Packard Model 5890 가스 크로마토그래피 및 5971 질량 선택 검출기(질량 분광측정기)로 수행하였다. 분석에 사용된 칼럼은 25 mm 길이의 HP Ultra-1 모세관 GC 칼럼이었다. 탈-안료 리피드 분획을 우선 리피드 분석 분야에서의 표준대로 소듐 메톡사이드를 사용하여 유리 지방산으로 비누화한후, 산성화하고, 메틸 에스테르로 전환시켰다. 그렇게 생성된 후속의 합성 메틸 에스테르를 공지 참조 도서관으로부터의 지방산의 표준 프로파일과 비교하였다. 표 1은 해삼 탈-안료 리피드 분획으로부터의 지방산 매치의 퍼센트를 공지된 지방산 프로파일과 비교한다.

【표 1】

피크	도서관으로부터의 화합물	% 매치
A	테트라데카노산, 메틸 에스테르	97
B	2-나프톨, 8-아미노	64
C	펜탄아미드	49
D	펜타데카노산, 메틸 에스테르	91
E	펜타데카노산, 메틸 에스테르	98
F	헥사데카노산, 메틸 에스테르	43
G	펜타데카노산, 4-메틸-, 메틸 에스테르	64
H	헥사데카노산, 메틸 에스테르	41
I	헥사데카노산, 메틸 에스테르	87
J	7-헥사데카노산, 메틸 에스테르	99
K	9-헥사데카노산, 메틸 에스테르	98
L	펜타데카노산, 14-메틸-, 메틸 에스테르	93
M	헥사데카노산, 14-메틸-, 메틸 에스테르	93
N	헥사데카노산, 15-메틸-, 메틸 에스테르	78
O	1,2,8-도데카트리엔, (E,E,E)-	94
P	10,13-옥타데카디에노산, 메틸 에스테르	98
Q	9-옥타데카노산 (Z)-, 메틸 에스테르	99
R	7-옥타데카노산, 메틸 에스테르	99
S	옥타데카노산, 메틸 에스테르	98
T	메틸 에이코사-5,8,11,14,17-펜타에노에이트	80
U	7-헥사데카노산, 메틸 에스테르 (Z)	91

본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법을 통해 탈-리피드된 해삼 내장 물질을 함유하는 물질의 조성물을 개시하는 것이다. 이 물질은 그것이 본질적으로 색상이 없고, 단백질이 풍부하며 사용가능한 분말로 쉽게 만들 수 있기 때문에 독특하다. 즉시 이어지는 두 개의 실시예는 서로 다른 기술 및 용매를 사용하여 만든 다수의 런(runs)으로부터 선택되는 전형적 런의 예시이다. 체벽 조직은 내장 물질보다 덜 리피드를 함유하며, 해삼의 내장에 대해 기술된 것과 동일한 방법으로 추출된다. 그러나 체벽 조직의 리피드 분획 함량은 내장보다 훨씬 작거나 체벽 조직의 총 건조중량의 약 1 내지 2%이다.

RED GREASE로 명명된 해삼의 안료 리피드 분획은 살 또는 피부내로 카로티노이드 침착을 생성하기에 충분한 그러한 식품의 퍼센트(카로티노이드이 부/밀리온에 의존)로 수생 다이어트내로 통합된다. 본 발명의 목적은 환경인자에 따라 다양한 퍼센트 및 부/밀리온의 아스타산틴 및 칸탁산틴을 함유하는 해삼 내장 또는 체조직으로부터 수득가능한 카로티노이드 리피드 분획을 함유하는 물질의 조성물을 개시하는 것이다. RED GREASE로 개시된 카로티노이드 리피드 분획의 하나는 분광측정기 분석에 의해 4,706.52 부/밀리온의 칸탁산틴을 함유한다고 결정되었다. 흡수 스펙트럼은 도 6에 첨부되었다. 도 6은 4,706.52 ppm의 측정된 카로티노이드 함량을 갖는 신선한 해삼 내장 물질의 아세톤 추출된 카로티노이드 리피드 분획의 Beckman DU-800 크로마토그래피로부터 얻어진 흡수 스펙트럼을 보여준다. 23 밀리그램의 아세톤 추출된 카로티노이드 리피드 분획을 10 mL의 페트로륨 에테르로 희석하고, 카로티노이드 물질은 E=2400의 흡광계수를 가지고 칸탁산틴에 대해 467 nm에서 관독하였다.

신선한 해삼 내장뿐만 아니라 체조직도 리피드 화합물의 원료(source) 물질이 될 수 있으며, Meyers and Chen (1982)의 방법에 따라 고온 식용 오일로 추출될 수 있다. 또한 Meyers and Chen의 특허 제4,505,963호(여기 참조문헌으로 포함)는 고온 오일을 사용하여 공정 폐기물로부터 왕새우 카로티노이드 안료를 추출하는 산업적 방법을 개시한다. 비록 이 산업

적 방법의 적용은 1차 원료로서 신선한 해삼 내장 물질을 사용하는 고온 오일 방법과 다르지만, 양 공정이 카로티노이드 함유 리피드의 고온 식용 오일로의 이동에 의존하기 때문에 공정은 본질적으로 동일하다. 신선한 *Cucumaria frondosa*의 내장 물질을 170 °F로 가열된 5 킬로그램 쿡기름의 용기에 넣고 20분간 방치한다. 조직을 200 메시 스테인레스 스틸 스크린 및 일반적인 '커피 필터' 종이를 통한 여과에 의해 제거하고, 과량의 오일을 쿡기름 용기내로 가볍게 짜서(expressed) 돌려보낸다. 후속의 1 킬로그램의 내장 물질을 용기에 넣고, 새로운 배치(batches)의 내장 물질로 절차를 반복하였다. 상기 방법으로 프로세스된 5개의 새로운 배치의 내장 물질후에, 쿡기름 용기내의 오일이 내장 리피드의 오일 혼합물로의 이동에 의해 암적색으로 바뀌었다. 본 방법의 한 실시예에서, 5 킬로그램의 출발부피의 쿡기름이 생성되며, 여기서 5 킬로그램의 습윤 내장 물질이 연속적으로 보유하고 약 20분후에 제거된다. 한가지 그렇게 공정된 잔류 오일의 샘플에서 총 카로티노이드 퍼센트는 표준방법에 의해 540 부/밀리온이라고 결정되었다.

탈-리피드 단백질-리치 가수분해물의 생성

300 그램의 해삼 내장 물질을 상기와 같이 수득하고, 건조하고, 쿡기름 업계에 알려진 대로 헥산 추출을 통해 탈-리피드시켰다. 결과의 해삼 가루(meal)를 가열 및 통풍(air-flow)에 의해 탈용매화하고, 결과의 가루를 수집하였다. 가루를 1 리터의 증류수로 더욱 집어넣는다. 농축 수산화나트륨을 사용하여, pH를 12로 올리고, 이 용액을 30분간 교반하였다. 30분의 마지막에 pH를 HCl을 사용하여 pH8.5로 낮추어 조정하였다. 이 pH가 얻어지자마자, 용액을 1분간 80 °C로 가열하였다. 이 용액을 25 °C로 냉각한후, 20분간 10,000 rpm으로 원심분리하고, 고형물을 빼기시키고, 상층액을 pH 3.0으로 조정하였다. 단백질을 원심분리와 따르기(decanting)에 의해 용액으로부터 침전시키고 제거하였다. 다음 단백질을 최소량의 물에 용해시키고, pH를 7.2로 조정한후, 동결 건조기를 이용하여 이것을 건조시켰다. 당업계에 알려진대로 액체 가수분해물은 종래의 스프레이-건조에 적합한 것으로 밝혀졌다. 예비 실험의 추출 효율은 출발물질로부터의 73% 효율을 가리켰다. 상기 프로토콜은 식품과학 및 단백질 가수분해물 산업에 일반적인 기계로 더 큰 용기에서 대량으로 생산하기에 적합하다고 밝혀졌다. 그렇게 수득된 건조 가수분해물은 수용성이라고 결정되었고, 이 물질의 아미노산 프로파일은 다음과 같다:

트립토판 0.82 %

아스파르트산 8.14

트레오닌 3.01

세린 2.62

글루탐산 8.67

프롤린 2.67

글리신 4.21

알라닌 4.39

시스테인 0.21

발린 4.31

메티오닌 1.00

이소루신 4.03

루신 3.38

페닐알라닌 4.39

라이신 5.31

히스티딘 1.88

아르기닌 5.93

상기 해삼 가수분해물은 액체 음료, 캡슐화된 식품 보조물, 샐러드 드레싱, 그레이비(gravies), 유아용 조유를 위한 우유 대체물, 단백질 바, 화장품, 소프트-드링크, 파스타(pasta), 빵, 및 단백질 영양부족이 영양실조의 원인이 되는 사람을 위한 장용 영양식에 단백질 또는 예비-소화된 아미노산 화합물로서 포함되기에 적합한 형태이다. 이들 유형의 제제는 식품과학 분야에 잘 알려져 있기 때문에, 어떻게 그러한 건조 또는 액체 아미노산-리치 분말이 포함되는지와 식품의 몇 퍼센트인지를 여기에 포함할 필요는 없다.

해삼 분획의 사용방법수생 다이어트에 안료 리피드 포함의 실시예

A) 100 파운드의 신선한 해삼 내장 물질을 약 55 갤런의 아세톤과 혼합하고, 300 갤런 밀폐 용기에서 3시간동안 실온에서 교반하였다. 아세톤을 혼합물로부터 저장용기내로 배수시키고, 안료 색상이 거의 얻어지지 않을 때까지 신선한 아세톤을 내장 물질상에서 세척하였다. 아세톤을 와이드 필름 증발기(Pope Still)를 통해 펌핑하고, 아세톤 혼합물에 포함된 물과 아세톤을 안료 리피드 분획으로부터 분리하고 회수하였다. 아세톤은 수집되고 수상은 폐기되었다.

결과의 리피드 분획(.63 파운드)은 높은 그리스 밀도(consistency)와 4,700 부/밀리온의 카로티노이드 칸탁산틴을 가졌다. 항산화제, 6-에톡시-1,2-디히드로-2,2,4-트리메틸퀴놀린(Ethoxyquin, Monsanto)을 리피드 상에 첨가하고, 1 중량%로 혼합하였다.

카로티노이드 물질을 함유하는 무거운 리피드 분획(RED GREASE)은 HPLC 분석에 의해 4,700 부/밀리온의 칸탁산틴을 함유한다고 결정되었으며, 그 제조에서 추출된 상업적 카로티노이드 물질을 갖는 표준 관상용(ornamental) 물고기 사료내로 통합되었다. 물고기 사료는 최종적으로 80 부/밀리온의 해삼 유래 칸탁산틴을 함유하도록 제조자에 의해 조제되었다. 왕새우에게 2개월간 이 사료의 실험적 다이어트를 공급하고, 5명의 폐닐에 의해 판단되어 8.5 평균 점수(1 내지 10의 점수, "10"은 매우 허용가능한 색상 침착)를 얻어, 그 피부에 침착된 허용가능한 색상을 가졌다.

(B) *Cucumaria frondosa* 종의 해삼(1000)을 손으로 내장을 적출하고, 내장 물질(352 파운드)을 해양식품 건조기(Southwind, Nova Scotia)에서 4일간 70 °F로 저온 수단에 의해 건조하였다. 건조전에, 프로피온산을 신선한 습윤 해삼 내장 물질에 7.2 중량%로 첨가하였다. 결과의 건조 물질(105 파운드)은 10% 수분과 41% 리피드를 함유하였다. 그 다음 건조 내장 물질을 공기름 업계에서 사용되는 본질적으로 동일한 방법으로 200 갤런 폐쇄 용기에서 산업 표준에 따라 리피드 분획의 핵산 추출시키고, 8.8% 에이코사펜타노 지방산의 칸탁산틴으로 판단하여 924.5 부/밀리온 카로티노이드를 함유하는 적색 리피드 분획(42 파운드)(여기서 RED OIL로 명명됨)이 생성되었다. 이 리피드 분획은 또한 100 그램당 35 IU d- α -토코페롤을 함유하였다. 그 다음 적색 리피드 분획(RED OIL)을 오일에 1% 물을 첨가하여 탈검시키고, 30분간 수화한후, 150 °F에서 8000 rpm으로 원심분리하였다. 탈검 물질은 또한 "RED OIL" 용어에 포함된다.

탈검 오일(해삼 내장 리피드 분획)을 우선 0.5% 실리카겔로 예비처리하고, 180 °F로 가열한후, 6 마이크론 여과지를 사용하여 여과시켰다. 색상의 회수는 예비처리된 오일에 5 퍼센트 표백 점토를 첨가함으로써 수행하였다. 오일을 28 인치 Hg 진공에서 20분간 220 °F로 가열하였다. 결과의 오일(34 파운드)은 밝은 황색이었고, 대부분의 안료는 표백 점토에 흡착되었다. 이 분획은 GOLD OIL이라 명명된다. 결과의 점토를 다음 1:2(w:w) 점토 대 용매 비율의 아세톤으로 추출하고 2회 세척하였다. 결과의 용액을 다음 90 °C 및 29 인치 Hg 진공에서 Luwa 증발기에서 탈용매시키고, 8 파운드의 적색 리피드 분획 농축물을 회수하였다.

공정의 결과 3가지 물질, 즉 황색/금색 오일(GOLD OIL); 농축된 적색 카로티노이드-함유 리피드 분획; 및 리피드없는 건조 단백질 분말을 생성하였다. 황색 리피드 분획(GOLD OIL)을 국소 화장품 및 실험용 "뉴트라세티칼(nutraceutical)" 해양 "오메가 3 리피드" 시제품내로 통합하였다. 적색 농축 리피드 분획을 한달동안 관상용 물고기 다이어트내로 통합하여 물고기에 적합한 색상을 생성하는데 있어 카로티노이드-함유 리피드의 효과를 결정하였다.

RED OIL에 의한 병아리 배(embryos)에서의 혈관생성 저해

1 μ g의 RED OIL을 마이크로피펫으로 1/4 인치 직경의 각각의 6 메틸셀룰로즈 디스크(disks)에 놓고, 건조시켰다. 디스크를 6개의 10일된 병아리 배 용모요막상에 놓고, Knighton et al. (1997)에 기술된바와 같이 히드로코르티손/헤파인 함침된 디스크를 또한 다른 6개의 계란의 대조 막상에 놓았다. RED OIL 처리된 막은 거의 완전한 혈관 성장의 저해를 보였

고, 해파린 및 히드로코르티손을 사용한 "포지티브 대조"보다 신혈관형성(neovascularization)을 저해하는데 있어 더욱 효과적이었다. 이 측정은 시험관내(in vivo) 측정으로서, 종양의 혈액 공급 저해를 통해 종양 성장을 저해하도록 고안된 화합물의 임상적 유용성의 지시계라고 생각된다(Knighton et al., 1977).

RED OIL에 의한 래트에서 보조제(adjuvant) 유도된 관절염 측정

상기와 같이 건조 물질로부터의 핵산 추출에 의해 *Cucumaria frondosa* 해삼 내장 및 체벽 조직으로부터 생성된 RED OIL, 히드로코르티손 및 페닐부타존을 래트의 보조제 관절염 모델에 사용하여 그들의 항-염증 효과를 연구하였다(Winter and Nuss, 1966; Glenn, 1966; Langford et al., 1972).

래트를 이용하여 개발된 보조제 관절염 모델은 사람의 류마티스성 관절염의 치료에 유용할 수 있는 화합물을 스크린하는데 유용하다고 밝혀졌다. 보조제 유도 관절염은 스테로이드 및 비-스테로이드 둘다에 응답한다. 염증의 정도는 발 중량 및/또는 발 부피의 증가를 측정함으로써 평가될 수 있다.

방법

160-180 g 사이의 무게의 래트를 B&K Universal, Inc., Kent, WA 98032로부터 구입하였다. 그들은 수컷이었다: Sprague-Dawley. 동물을 물과 사료에 자유롭게 접근하도록 하여 스테인레스강 우리에 개별적으로 방치하였다. 광주기는 12시간 명 및 12시간 암으로 조절하였다. 온도는 22 ± 3 °C로 유지하고 상대습도를 40 내지 70%로 유지하였다. 사료는 Harlan Teklan Rodent Diet 였다.

시험제품

시험 물질을 하기 투여량(dose)으로 탈이온수에 현탁하였다. 모든 위관영양(gavage) 부피는 2 mL이었다.

시험 물질 Lot# 투여량, mg/kg 체중

탈이온수 12/4/98 2 mL

히드로코르티손 스펙트럼, Lot# HH325 10

페닐부타존 시그마, Lot# 15H0063 10

RED OIL 코스트사이드 리서치 10

실험 디자인

수컷 Sprague-Dawley 래트 (160-180g)를 Freund 완전 보조제(0.5% 현탁의 사멸 마이코박테리움 투버쿨로시스 (H37RA, Difco in 미네랄 오일))를 주사하여 감작(sensitize)시켰다. 0.05 mL를 각 래트의 오른쪽 뒷다리상의 발바닥 부위에 경피적으로 투여하였다.

시험 물질을 0.5% 메틸셀룰로스로 경구(위관영양)로 7일간 1일1회 주었다. 복용은 감작 다음날로부터 시작하였다.

각 시험 런에서 각 군의 발 무게를 평균하였다. 활성은 다음과 같이 계산하였다: ((대조군의 평균 발 무게 - 시험군의 평균 발 무게)/(시험군의 평균 발 무게)) \times 100 = % 항-염증 응답.

결과 및 토론

항-염증 응답 결과는 표 2에 나타낸다. 항-염증 응답은 비처리된 발에 비해 Freund 보조제로 처리된 래트 발의 평균 발 무게의 차이이다. 이 연구에서, 히드로코르티손 대조는 56.0%의 항-염증 응답을 주었고, 페닐부타존은 155.3%의 응답을 주었다. 이들 두가지 화합물은 포지티브 대조군이다. RED OIL은 이 측정에서 158.6%의 항-염증 응답을 주었다.

[표 2]

평균 발 부피 감소에 기초한 % 항-염증 응답

그룹	랫트 수	처리	평균 발무게, gm	% 항-염증 응답
I	6	대조, 물	0.97	0
II	6	히드로코르티손, 10 mg/kg	0.61	59.0
III	6	페닐부타존, 10 mg/kg	0.38	155.3
IV	6	RED OIL, 10 mg/kg	0.375	158.6

이어서, 마우스 귀 부종(edema)에서 오일의 염증 저해 활성을 결정하기 위해 GOLD OIL을 측정하였다.

마우스-귀 부종 모델

다양한 포르볼 에스테르를 함유하는 크로톤(Croton)-오일 및 아라키돈산(AA)은 국소 적용시 마우스 귀에서 염증의 표준 유발인자이다. 마우스 귀에 아라키돈산을 다중으로 국소 적용하면 염증성 및 증식성 변화를 유도한다(Doherty et al., 1988). 포르볼 에스테르, 특히 포르볼 미리스틸 아세테이트(PMA)는 하나이상의 편재(ubiquitous) 막단백질, 단백질 카이 나제 C(PKC)를 활성화하고, 그것은 다시 염증을 이끄는 여러 대사 캐스케이드를 개시시킨다(Castagna et al., 1982). AA 는 이들 캐스케이드중 하나의 기질이며, 염증성인 프로스타글란딘 및 류코트리엔 생성을 이끈다. 추정상 생활성 약제에 의 한 그러한 염증의 저해는 잠재적인 약학적 활성의 일반화된 지시계라고 생각된다. Weanling, 수컷 Balb/C 마우스를 B&K Univeral, Kent, WA로부터 구입하고, 실험에 들어가기전에 하루동안 실험실에서 방치하였다. t=0에서, 각 마우스의 두 귀의 복(ventral)측을 10 μ L의 아세톤중 10% 크로톤 오일(n=12 귀) 또는 아세톤중 5% GOLD OIL(n=8 귀)로 국소적으로 공격(challenge)하였다. t=24 hrs에 동물을 경부 전위에 의해 희생시킨후 귀를 제거하고, 8 mm 펀치로 각 귀로부터 생검 (biopsy)을 취하였다. 생검을 즉시 4-플레이스 발란스상에서 측정하였다. 결과는 도 7에 보여진다. GOLD OIL은 아세톤 만으로 처리된 귀에 비해 팽윤에서 52% 감소 (p < 0.05, Wilcoxin Rank Sum test) 그리고 비처리된 귀에 비해 50% 감소를 만들었다.

RED OIL을 측정하여 상기 실시예대로 크로톤 오일 개시된 마우스에서 오일의 염증 저해 활성을 결정하였다. 동일 국소 투 여량에서, RED OIL은 아세톤만으로 처리된 귀에 비해 팽윤에서 85% 저해를 생성하였다. 그 결과는 도 8에 보여진다.

5-리포옥시게나제 측정

5-리포옥시게나제(5-LO)는 광범위한 종류의 세포에서 아라키돈산(AA)에서 류코트리엔 B₄ (LTB₄) 및 히드록시에이코사 테트라에노산(5-HETE)으로의 대사에 있어 중요한 효소이며, 이들 세포는 다형핵(PMN) 백혈구(Henderson, 1994)을 포함하고 최근 전립선 및 다른 암과도 연결되어있다(Ghosh and Myers, 1997). LTB₄ 는 혈류로부터 조직 상해 부위로의 PMN의 이동과 관련된 화학주성 시그널 약제이며, 이것은 염증 응답의 특징이다. 정상 지원자로부터 표준 절차에 의해 단 리된 인간 PMN을 37 °C로 예열하고, t=0에서 초음파 처리(sonication)에 의해 메탄올중에 현탁된 10 μ L의 시험 화합물 또는 메탄올 단독을 1 mL의 PMN 현탁액에 첨가하였다. t=10분에 5 mL의 2 mM AA를 5-LO 기질로서 각 현탁액에 첨가 하였다. t=14분에 칼슘 이오노포어 A23187 (5 mL, 1mM)을 효소 활성화를 위해 첨가하였다. t=19분에 100 μ L의 100 mN 시트르산에 의해 반응을 종료하고, 3.0의 pH를 유지하였다. 프로스타글란딘 B₂ 및 15-HETE를 LTB₄ 및 5-HETE 각 각의 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 정량을 위해 내부 표준으로 첨가하였다. 대사물질 및 표준을 클로로포름/메탄올 (7:3)로 현탁액으로부터 추출하였다. 클로로포름 상을 증발시키고 HPLC 용출의 이동상에서 재구성하였다. 대사물질을 자 외광으로 검출하고 표준 곡선에 대해 정량화하였다.

통계학적으로 중요한 GOLD OIL 투여량-의존성 LTB₄, 그 2가지 이성질체, 및 5-HETE의 PMN 생성의 감소가 도 2에 제 시된 데이터에서 명백하다. 세포를 10분간 1:100 및 1:1000 GOLD OIL 희석액에 노출시키면 각각 85% 및 94% 세포 생존율(viability)을 나타낸다는 사실의 관찰을 통해 이들 결과가 세포 독성이외의 인자로 인한 것이라는 것이 제시된다. 생존율은 당업계에 잘 알려진 트리판 블루 축출(trypsin blue exclusion) 방법에 의해 결정되었다.

RED OIL의 HPLC 분획

RED OIL을 분석용 고압 액체 크로마토그래피에 의해 100% 헥산 내지 30% 이소프로판올의 30분에 걸친 선형 구배를 갖는 E.Merck Si 60 칼럼, 5 μ m, 250×4.6 mm에서 18 분리 분획으로 분별하였다. 유속은 2.0 mL/분이었다. 처음 2분간 아무런 분획도 수집되지 않았다. 그후 분획을 2분 간격으로 수집하였다. 봉쇄된 모든 분획을 상기한 바와 같이 인간 호중구에서 5-리포옥시게나제 경로에서의 저해 활성을 검출하기 위해 측정하였다. 14 내지 18 분의 피크를 포함하는 분획 7 및 8이 류코트리엔 B₄, 6-trans-류코트리엔 B₄ 및 6-trans-12-epi-류코트리엔 B₄ 및 5-HETE (5(S)-히드록시-(E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-에이코사테트라에노산)를 저해하는데 활성인 것으로 밝혀졌다.

12-HETE 측정

RED OIL 및 GOLD OIL을 인간 혈소판을 사용하여 5-리포옥시게나제 측정과 유사한 방법으로 측정하였다. 다형핵 백혈구를 혼합하고, A23187로 공격하고, 12-HETE 생성을 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 측정하였다. 반응에 1:10,000 희석의 RED OIL을 첨가하여 메탄올 대조군의 65%인 12-HETE 레벨을 얻은 반면, 1:1000 희석의 GOLD OIL은 대조군의 46%인 레벨을 얻었다.

유선(mast)-세포 탈과립화

Weanling 수컷 Balb/c 마우스를 공격전 24 hrs, 12 hrs 및 5 min뿐만 아니라 공격후 5 min 및 20 min에 헥산중에 용해된 GOLD OIL로 처리하였다. 귀를 귓바퀴의 양면에 적용된 아세톤중 10% 크로톤 오일 20 μ L로 공격하였다. 공격후 6시간에 각 귀로부터 8 밀리미터 펀치 생검을 취하고, 칭량하고, 조직학 분석용 포르말린에 보관하였다. 3개의 5 마이크론 슬라이스를 파라핀-포접 생검을 통해 1/3 간격으로 제거하고, 히스타민-함유 과립에 특이한 톨루이딘 블루로 염색하였다. 탈과립화를 보이는 것들뿐만 아니라 중간 섹션도 계수하였다. 결과는 표 3에 제공된다.

[표 3]

크로톤 오일에 의한 국소 공격으로부터 마우스-귀 유선 세포의 탈과립화

처리	% 탈과립
담체 (헥산)	72.4 (2.2)
10% GOLD OIL	20.4 (3.5)
10% 파라핀 오일	66.4 (3.0)

귀를 24 시간동안 질병예방학적으로 처리하고, 상기와 같이 두 개의 후속 공격 처리를 하였다. 데이터는 탈과립된 유선세포의 평균(+/- 평균의 표준 에러; n= 4 귀) 퍼센트로서 주어진다.

림프구 증식 측정

림프구 증식에 대한 GOLD OIL 및 RED OIL의 효과를 3중수소 (³H)-티미딘 흡수 측정법에 의해 평가하였다. 인간 지원자 또는 양(sheep)으로부터 정맥천자(venipuncture)에 의해 말초혈을 수득하고, 말초혈 단핵 세포(PBMNC)를 Ficall 밀도 구배 원심분리에 의해 적혈구 및 과립구로부터 분리하였다. 원심분리후에 PBMNC를 흡출(aspirate)하고, PMS에서 세척하고, 배지(10% 태아 소 혈청(FCS) 및 2 mM 글루타민을 함유하는 RPMI)에 재현탁하였다. PBMNC를 2 × 10⁶/mL의 밀도로 조정하고, 100 μ L 분액(aliquots)(2×10⁵ 세포)을 96-웰 둥근-바닥 플레이트의 웰내로 피펫팅하였다. 각 실험군은 5 웰의 복제본으로 구성되었다. 세포를 희석의 범위에서 GOLD OIL 또는 RED OIL의 존재하에 24 시간동안 배양하였다. 오일의 희석은 다음과 같이 만들었다: 5%(v/v)의 농도로 완전 에탄올에 오일의 미셀(micelle) 현탁을 만들었다. 이 5%의 오일 용액을 10% FCS를 함유하는 RPMI 배지에서 더욱 희석하여 희석 범위(0.0062, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 % v/v)를 얻었다. 각 희석 단계는 격렬하게 혼합되어 현탁중 오일을 유지하였다.

대조 웰에서, 세포는 어떤 오일도 없이 배양하였다. 24시간의 배양후에, 1 μ Curie의 ^3H -티미딘을 림프구를 함유하는 각 웰에 첨가하고, 18시간 더 배양하여 ^3H -티미딘을 림프구의 복제 DNA내로 통합시켰다. 세포를 96-웰 플레이트로부터 방사성 표지된 DNA를 포획(entrap)하는 유리-섬유 필터상에 수확하였다. 수확된 세포를 함유하는 필터를 다음 당업계에 알려진 표준 절차에 따라 섬광(scintillation) 계수기를 사용하여 ^3H 에 대해 계수하였다.

또한, 미토겐(mitogen) Concanavalin A(Con A)를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 림프구에 첨가하였다. 미토겐 자극에 대한 오일의 효과를 오일과 Con A의 공동-배양에 의해 평가하였다. Concanavalin A는 알파-D-만노실 및 알파-D-글루코실 잔기에 친화성을 갖는 *Canavalia ensiformis* (Jack Bean)으로부터 수득된 렉틴이다. Con A는 응집체를 형성하는 분자의 능력에 의존하는 미토겐 활성을 나타내며, 칼슘 및/또는 망간 이온을 요구한다.

결과 및 토론

비처리된 PBMNC 제제는 ^3H -티미딘의 낮은 기준(baseline) 통합을 보여주었다. 그러나, PBMNC가 Con A로 자극되었을 때, 이들 세포는 그들의 기준 값에 비해 증가된 ^3H 티미딘 흡수에 의해 가려져지는 바와 같이 증가된 증식을 나타내었다. 더욱이, GOLD OIL 또는 RED OIL 이 Con A와 공동-배양되었을 때, PBMNC에 의한 ^3H -티미딘 통합의 감소에 의해 보여지듯이 증식의 투여량 응답 저해가 관찰되었다. Con A-자극된 인간 PBMNC 증식은 GOLD OIL의 0.1% 내지 0.025% 희석범위에서 71% 내지 12%사이에서 저해되었고, 양 PBMNC는 동일 희석범위에서 100% 내지 57%로 저해되었다. RED OIL의 저해 효과는 GOLD OIL에서 관찰된 것과 유사한 경향을 보여주었다. RED OIL은 인간 PBMNC에서 0.1% 희석에서 85%의 저해를 생성하였고, 양 PBMNC에서 0.1%에서 95%의 저해 및 0.05%에서 56%의 저해를 보여주었다.

RED OIL에 의한 혼합 림프구 반응

혼합 림프구 반응(MLR)은 두 개의 관련되지 않은 개체로부터의 림프구 알로반응성(alloreactivity)에 의해 매개되는 림프구 증식의 실험실내(in vitro) 측정법이다. 이 증식 응답은 3중 수소 티미딘의 흡수에 의해 측정된다. 필연적으로, MLR에서 한 개체로부터의 항원 제시 세포(APC)는 두 번째 개체의 T 세포상의 T 세포 리셉터에 MHC 분자를 통해 알로(allo)-펩티드를 제공한다. 이 반응은 시그널 1이라 불리운다. 시그널 1에 이어서, T 세포 및 APC(예컨대, CD28-B7)사이의 세포 부착 분자의 상호작용에 의해 공동-자극이 매개되며(시그널 2), 이것은 T 세포 활성화 및 증식을 유도한다. 따라서, MLR은 숙주 대 이식 질병(골수 이식 거부) 및 이식 대 숙주 질병(기관 이식 거부) 둘다를 일으키는 알로반응성의 실험실내 제시이다. 이 측정법은 알로반응성을 예측하기 위해 임상적으로, 또한 잠재적 면역억제제를 스크린하기 위해 실험적으로 널리 사용되어왔다. RED OIL을 현재 면역억제제로서 전 세계적으로 사용되고 있는 Cyclosporin A와 비교하였다.

RED OIL에 의한 MLR의 절차

두 개의 관련없는 공여자(donors)로부터의 세포를 사용한 MLR은 두 개의 세포 집단이 서로에 대해 동반(concurrently) 응답한다는 사실에 기초하여 연구될 수 있다(즉, 투-웨이 MLR).

말초혈을 두명의 관련없는 인간 지원자로부터 정맥천자에 의해 수득하고, 말초혈 단핵 세포(PBMNC)를 Ficoll 밀도 구배 원심분리에 의해 적혈구 및 과립구로부터 분리하였다. 원심분리후에, PBMNC를 흡출하고, PBS에서 세척하고, 10% 인간 AB 혈청 및 2 mM 글루타민을 함유하는 RPMI에서 재현탁하였다. 3개의 MLR을 3쌍의 관련없는 개체로부터 유래된 PBMNC로 수행하였고, 서로 통계적으로 유사하다고 밝혀졌다.

전형적 실험에서, 두 명의 관련없는 개체로부터의 PBMNC를 2×10^6 세포/mL의 밀도로 조정하고, 각각으로부터의 50 μL 분액(즉, 1×10^5 세포)을 96-웰 둥근 바닥 플레이트의 웰내로 혼합하였다. 각 실험군은 5웰의 복제본으로 구성되었다. 세포를 희석범위에서 Cyclosporin A 또는 RED OIL의 존재하에 배양하였다. 희석은 다음과 같이 제조되었다: RED OIL의 미셀 현탁이 5%(v/v)의 농도로 완전 에탄올에서 만들어졌다. 이 5% 오일 용액을 10% 인간 AB 혈청을 함유하는 RPMI 배지에서 더욱 희석하여 희석범위(0.0062, 0.0125, 0.025, 0.05 및 0.01% v/v)를 얻었다. 각 희석 단계를 격렬하게 혼합하여 현탁중의 오일을 유지하였다. Cyclosporin A를 조직 배양 배지에서 희석하여 최종 농도 100 mg/mL 및 500 mg/mL를 만들었다.

대조 웰(비처리된)에서, 세포를 어떤 약제도 없이 배양하였다. 96시간의 배양후에, 1 μ Curie의 ^3H -티미딘을 혼합 림프구를 함유하는 각 웰에 첨가하고, 18시간 더 배양하여 ^3H -티미딘이 림프구의 복제 DNA내로 통합되게 하였다. 세포를 96-웰 플레이트로부터 방사성 표지된 DNA를 포획하는 유리-섬유 필터상에 수확하였다. 수확된 세포를 함유하는 필터를 다 음 섬광 계수기를 사용하여 ^3H 에 대해 계수하였다.

RED OIL에 의한 MLR의 결과

비처리된 MLR 제제는 ^3H -티미딘의 높은 기준 통합을 보여주었고, 이는 두 개의 관련없는 림프구 집단사이에 알로반응성을 가르킨다.

100 ng/mL 및 500 mg/mL 둘다의 Cyclosporin A의 존재하에, 감소된 ^3H -티미딘 흡수에 의해 보여지듯이 감소된 증식이 관찰되었다. 저해는 비처리된 MLR의 퍼센트로서 표현되었다. MLR의 Cyclosporin A 저해는 100 ng/mL에서 37-75% 및 500 ng/mL에서 81-90%의 범위에 있었다. 이것은 Cyclosporin A의 알려진 면역억제 성질과 일치한다. Cyclosporin A는 이뮤노필린(immunophilins)과 상호작용하여 인터루킨-2(IL-2, T-세포 성장인자)의 전위에 중요한 전사인자 NF-AT의 핵내 전위를 방지한다.

RED OIL은 또한 ^3H -티미딘 통합의 감소에서 보여지듯이 MLR의 투여량-의존성 저해를 보여주었다. 0.025%의 희석에서 MLR의 저해는 수행된 3개의 측정에서 40-52%의 범위에 있었고, 0.05%의 희석에서 저해는 82-98%의 범위이었다. 당업계에 알려진 바와 같은 트리판 블루 축출(trypan blue exclusion)에 의해 결정된 세포 생존율은 0.025% 내지 0.05% 범위의 희석이 70-99% 사이의 생존율을 가진다는 것을 보여주었으며, 이들 희석에서 RED OIL의 잠재적 독성 결여를 가리킨다. 0.1%의 RED OIL의 희석은 감소된 세포 생존율을 보여주었다.

이들 측정에서 보여지듯이 면역억제를 나타내는 화합물은 유용한 치료학적 성질을 가지는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 목적은 RED OIL 및 GOLD OIL이 면역조절 활성을 가지는 약학적 화합물에 통합되는 것이다. 면역조절인자 화합물은 어떤 질병 및 질환에 면역성을 세우거나 치료를 개시하기 위한 면역자극제일 수 있다. 반대로, 면역조절인자는 외부 물질에 대한 원치않는 인체의 면역반응을 방지하거나, 자기면역 반응 또는 질병을 방지하거나 개선하기 위한 면역저해제 또는 면역억제제일 수도 있다.

면역조절인자는 낭창 홍반 및 당뇨병과 같은 전신성 자기면역질환뿐만 아니라 면역결핍질환을 치료하는데도 유용한 것으로 밝혀졌다. 또한, 면역조절인자는 암의 면역요법을 위하거나 예컨대 신장, 폐, 심장 또는 골수의 이식에서 외부 기간 또는 다른 조직에 대한 거부를 방지하는데 유용할 수 있다(Grover et al., 1997).

FK506, 무라밀산 디펩티드 유도체, 레바미솔, 니리다졸, 옥시수란, 플라길, 및 인터페론, 인터루킨, 류코트리엔, 코르티코스테로이드 및 시클로스포린의 그룹의 다른 것들을 포함하는 다양한 면역조절인자 화합물이 발견되었다. 그러나 이들중 다수는 원치않은 부작용 및/또는 높은 독성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 최소한의 원치않는 부작용을 갖는 특정 지역에 대한 광범위한 면역조절기능을 제공하기 위한 새로운 면역조절인자 화합물이 필요하다(Ishida et al., 1997).

따라서, 면역조절은 인간에게 제일 중요하며, 상당한 연구가 면역조절방법에 투자되었다. 추가적인 방법 및 조성물이 필요하다.

본 발명은 원료 물질로서의 해삼 오일 및 가능하다면 합성법에 의해 보충된 오일의 이용이라는 목적을 가진다. 본 발명은 신규 발견에 의한 면역조절 화합물의 병기고에 어떤 종의 해양 해삼의 추출물로부터도 단리될 수 있는 화합물을 포함하는 유용한 면역조절인자를 첨가하였다.

따라서, 본 발명의 추가적 목적은 해삼 조직에서 단리된 RED OIL 및 GOLD OIL, 및 이들 화합물의 다양한 유도체 및 유사체의 면역억제 용도에 관한 것이다. 이들 화합물은 원치않는 면역 응답을 감소, 억제, 저해 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 유리하게는 이 면역억제는 세포독성없이 성취될 수 있다. 따라서, 이들 화합물은 면역억제가 필요한 인간 또는 동물의 치료에 유용하다. 그러한 상황의 예들은 당뇨병, 낭창 및 류마티스성 관절염과 같은 자기면역 질병의 치료 또는 예방을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 면역억제는 또한 기관 이식과 관련하여 자주 요구된다. 면역억제제는 또한 인간 또는 동

물이 면역 시스템의 과도자극을 유발하는 것으로 알려진 수퍼항원 또는 다른 인자에 노출되었거나 노출될 수 있을 때 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 다른 추정상 면역억제제의 활성을 평가하기 위한 표준으로서도 유용하다. 본 발명은 또한 이들 화합물을 함유하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

의도하는 용도는 T 세포 활성을 통한 조절을 요구하는 면역 반응(in vivo/in vitro)을 위한 것이다. 본 발명의 한 태양은 인간에서 예컨대, 이식 및 자기면역과 같은 T 세포 반응의 생체내(in vivo) 억제에 관한 것이다. 시클로스포린이 현재 건선의 억제를 위한 의료분야에서 사용되고 있기 때문에, 본 발명의 목적은 건선 환자의 피부에 면역 응답의 조절을 위해 여기 기술된 연고 및 국소적용내로 RED OIL 또는 GOLD OIL을 통합하는 것이다. 본 발명의 다른 섹션에서 기술된 바와 같이, 건선 환자에게서 본 발명에 의해 얻어지는 유익한 응답은 환자내 T 세포 및/또는 B 세포의 국소 피부 면역억제의 결과일 것이다.

투여량은 원하는 면역조절 응답; 관련된 숙주의 유형; 그 나이, 건강, 중량, 병행치료의 종류; 치료의 빈도; 치료율 등과 같은 고려사항에 의존할 것이다. 유리하게는, 투여되는 활성 성분의 일일 투여 레벨은 예컨대, 경피 - 1 내지 약 500 mg/kg; 경구 - 0.01 내지 약 200 mg/kg; 비강내 - 0.01 내지 약 100 mg/kg; 및 에어로졸 - 0.01 내지 약 50 mg/kg 동물 체중일 수 있다.

농도로 표현하면, 본 발명의 활성 성분은 경피, 비강내, 기관지내, 근육내, 질내, 혈관내 또는 경구용의 신규 조성물에서 조성물의 약 0.01 내지 약 50 %w/w, 특히 약 0.01 내지 약 30 %w/w의 농도로 존재할 수 있다.

본 발명에 따른 유용한 화합물은 여기 기술된 다양한 방법으로 단리될 수 있다. 실시예들이 예컨대 화학공급회사와 같은 공지의 공급원에서 구입할 수 있는 재료 및 시약의 사용을 포함하고 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 일의 다양한 캡슐, 연고, 로션, 비누 및 샴푸내로의 통합을 의한 상세는 여기 제시된 것이외에는 생략하였다.

변이에 대한 의견

본 발명의 범위는 당업자에게 본 명세서에서 제공한 일반적 정보로부터 그러한 범위내의 변형이 가능하기 때문에, 특정 실시예 및 제시된 방법에 의해 제한되지는 않는다.

이하의 조제는 본 발명의 조성물의 투여량 형태의 몇몇을 예시한다. 각각에 있어, '활성 화합물'이라는 용어는 정제되거나 되지않은; 분획화되거나 되지않은 어떤 종의 해삼 조직으로부터 유래된 리피드 화합물을 의미한다.

경구 투여

여기 기술된 RED OIL 및 GOLD OIL은 뉴트라세티칼 산업에 잘 알려진 바와 같이 원형 '소프트-젤' 캡슐내로 캡슐화되었다. 본 발명의 오일은 당업계에 알려진 혼합 토크페롤에 의해 안정화된다. *Cucumaria frondosa*로부터의 건조되고 안정화된 해삼 내장 물질의 헥산 추출물에 의해 생성된 RED OIL을 당업자에 알려진 방법에 의해 탈-검하고, 1% 혼합 토크페롤 (Henkel Corporation, PA의 COVI-OX-T70)의 첨가로 안정화하여 산화를 방지하였다. 본 발명의 RED OIL의 500 밀리그램의 1,000 조각의 양으로 원형 소프트-젤을 제조하였다. 여기 기술된 RED OIL에서 유래된 GOLD OIL을 또한 실험용도로 원형 소프트-젤 캡슐내로 통합하였다.

또한 오렌지 주스의 수상과 리피드의 용해성을 향상시키기 위해 레시틴을 첨가함으로써 GOLD OIL 및 RED OIL을 1:5 (v/v)로 오렌지 주스내로 통합하였다.

국소 투여

본 발명의 RED OIL 및 GOLD OIL은 항-건선제에 사용될 수 있는 몇몇 형태를 예시하는 하기 형태로 조제된다.

실시예 A (연고)

성분 mg

활성 화합물 1-20

벤질 알콜, NF 20.0

알몬드 오일 또는 다른 오일 30.0

백색 바셀린, USP 총 1.0g의 잔부

제조 방법: 교반하면서 오일 성분을 알콜 성분에서 서서히 조합한다.

실시예 B (크림)

성분 mg

활성 화합물 1.0-20.0

스테아르산, USP 60.0

글리세릴 모노스테아레이트 100.0

프로필렌 글리콜, USP 50.0

폴리에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트 50.0

소르비톨 용액, USP 30.0

벤질 알콜, NF 10.0

정제수 총 1.0g의 잔부

제조 방법: 스테아르산, 글리세릴, 모노스테아레이트 및 폴리에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트를 70 °C로 가열한다. 별개 용기에서, 소르비톨 용액, 벤질 알콜, 물 및 반량의 프로필렌 글리콜을 용해시키고 70 °C로 가열한다. 고속 교반으로 오일 상에 수상을 첨가한다. 잔량의 프로필렌 글리콜에 활성 화합물을 용해시키고, 에멀션의 온도가 37-40 °C일 때 상기 에멀션에 첨가한다. 교반으로 균일하게 혼합하고 실온으로 냉각한다.

실시예 C (비강 흡입제)

경구 또는 비강(nasal) 흡입제로서의 투여를 위해, 프로필렌 글리콜과 같은 불활성 액체를 담체로 사용할 수 있다. 또한 당 업계에 잘 알려진 분산제의 임의 존재와 함께 트리클로로플로로메탄 및 디클로로디플로로메탄과 같은 공지의 추진제(propellants)에서 가압 취입기로부터 투여될 수 있다.

실시예 D (젤)

성분 mg

활성 화합물 1.0-20.0

프로필렌 글리콜, USP 300.0

부틸화 히드록시톨루엔 5.0

카르보머 940 5.0

수산화나트륨(프로필렌글리콜에 1% w/w 용액으로 첨가) 0.7

폴리에틸렌 글리콜 400, USP 총 1.0g의 잔부

제조 방법: 프로필렌 글리콜중 수산화나트륨의 1% 용액을 준비한다. 약 1/2 잔류 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 400을 적합한 용기에 넣고 혼합한다. 이 혼합물에 부틸화 히드록시톨루엔을 용해시킨다. 격렬한 교반으로 상기 혼합물에 카르보머 940을 분산시킨다. 고속 교반과 함께 수산화나트륨 용액을 첨가하여 pH를 7까지 높이고, 진한 겔 형태가 될 때까지 혼합한다. 잔류 프로필렌 글리콜에 활성 화합물을 용해시키고, 겔을 계속 혼합하면서 겔에 서서히 첨가한다.

실시예 E (로션)

성분 mg

활성 화합물 1.0-20.0

카르보머 940 3.0

수산화나트륨(4% w/w 수용액으로 첨가) 0.05

이소프로필 알콜 40.0

정제수 총 1.0g의 잔부

제조 방법: 수산화나트륨 4% 수용액을 준비한다. 정제수를 60 °C로 가열한다. 카르보머 940을 첨가하고, 분산될 때까지 고속으로 혼합한다. 상기 혼합물을 실온으로 냉각하고, 균질해질 때까지 수산화나트륨 용액을 서서히 첨가한다. 혼합과 함께 상기에 80%의 이소프로필 알콜을 첨가한다. 잔류 이소프로필 알콜에 활성 화합물을 용해시킨다. 교반과 함께 이것을 혼합물에 첨가한다. 필요하면 수산화나트륨으로 pH를 5.0 내지 5.5로 조정한다.

실시예 F (식물성 향-건선 크림 조합)

성분 mg

활성 화합물 1-20

녹차 농축물 1-5

Boswellia serrata 추출물 1-10

실리마린 1-10

푸코실화 콘드로이틴 술페이트 1-20

밀랍 1-40

터머릭 오일 1-10

occimum sanctum 오일 1-10

생강 알콜 추출물 1-10

물 1-30

DMSO 1-5

에무(Emu) 오일 1-30

차나무 오일 1-5

제조 방법: 본 발명의 목적은 건선 질병을 개선하기 위해 유익한 약제들이 상승적으로 조합된 제제의 기초를 제공하는 것이다. 건선 질병이 다수의 염증성 매개인자에 의해 매개된다는 것은 잘 알려져 있다. 혈관생성은 12, 15- 및 5-리포옥시젠아제 경로이기 때문에 이 질병의 한 성분이다. 보체(complement) 활성화도 또한 이 질병의 매개인자이다. 왁스 담체 및 다른 식물성(herbal) 제제중 리포옥시젠아제 저해제로서 RED OIL 또는 GOLD OIL, 혈관생성 및 보체 저해제로서 푸코실화 콘드로이틴 술페이트, 보체 저해제로서 *Boswellia serrata* 추출물 및 피부 항-산화제 및 오르니틴 디카르복실라제 저해제로서 녹차 추출물을 조합한 연고가 건선증의 유효한 국소 치료능력을 제공한다는 것이 발명자에 의해 밝혀졌다. 생강 추출물은 건선 염증의 공동-매개인자인 오르니틴 디카르복실라제의 저해제라고 밝혀졌다. 이들 약제의 다양한 퍼센트가 유화제 및 국소 적용을 적합하게 하는 다른 약제와 조합될 수 있다. 활성 약제의 퍼센트는 환자 상태 및 다양한 매개인자로 인한 다양한 증상의 레벨에 따라 변할 수 있다. 즉, 풍부한 혈관생성 신혈관형성을 갖는 환자는 리포옥시젠아제 경로의 증가된 활성화를 나타내는 건선 플라크를 갖는 환자보다 더 많은 푸코실화 콘드로이틴 술페이트를 필요할 수 있다. 건선 플라크에 관련된 다양한 경로의 결정에 정통한 임상가는 실시예 E에 열거된 약제의 적합한 조합을 조제할 수 있을 것이다. 예컨대, 건선 환자의 혈청이 국소 농포(pustular) 병소에서 리포옥시젠아제 경로의 활성화에 대해 측정될 수 있으며, 농포 병변에서 C5a 및 C3a의 보체 캐스케이드 활성이 당업자에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 따라서, 당업계의 임상가의 및 조제자에 의해 건선 증상의 메카니즘-기초 표적이 성취될 수 있다. 담체, 연화제 등에 대한 더 이상의 상세는 언급할 필요가 없다.

산업상 이용 가능성

실시예 G

다양한 형태의 질병 및 다양한 '발작(flare)' 상태를 갖는 34 내지 67 살의 6명의 건선 환자에게 실시예 F의 국소용 연고를 주고 한달간 스스로 투여하도록 말하고, 연고의 치료 효과에 대한 주관적인 평가를 임상가에게 보고하도록 하였다. 6명의 환자중 5명이 그들의 건선 증상의 '매우 개선' 또는 '완전 소실'을 보고하였다.

아토피성 피부염 및 몸통 및 꼬리-뒷면 영역의 '핫-스팟(hot-spots)'을 앓고 있는 혈통을 모르는 3마리 개에게 6주간 임의의 '비조절된' 방식으로 그들의 주인에 의해 실시예 F의 국소 적용을 주었다. 모든 3마리 개의 주인은 그들의 동물에서 증상의 완전 소실과, 치료 부위를 긁거나 무는 것이 중지되었음을 보고하였다.

임상가에게 스스로 보고하도록 한, 류마티스성 관절염을 앓고 있는 46 내지 81살의 10명의 남자 및 여자에게 3달동안 한 사람당 약 2,000 mg/일로 RED OIL의 경구 보충물을 주었다. 이들중 8명이 그들의 질병 증상의 '현저한 경감' 및 그들의 수족의 증가된 운동범위를 보고하였다. 81세의 한 여성은 그녀의 어깨 및 손목의 완전한 통증 해소를 보고하였다.

50 내지 56살의 3명의 남자에게 9.5 중량%의 RED OIL, 멘솔, 디메틸술폭사이드(DMSO), 에무 오일, 윈터그린 오일, 알콜 및 올리브 오일을 함유하는 국소용 화합물로 스스로 치료하도록 하여 국소용 '문질러 바르는(rub-on)' 통증 조절 제제로서의 RED OIL의 통증-완화 능력을 시험하였다. 통증이 있는 어깨, 손가락 또는 무릎에 적용한지 4일후에, 2명의 참가자가 현저한 개선을 주장하였고, 한명은 온화한 개선을 주장하였다.

스스로 보고하도록 한, 골관절염을 갖는 4명의 여성에게 두달간 1일 2회 오렌지 주스 및 유화제의 용액중 GOLD OIL의 1,500 밀리그램을 주었다. 모든 4명이 화합물로 인한 '증가된 개선'을 보고하였고, 3명이 전체적인 통증 평가에서 현저한 감소 및 증가된 운동 범위를 보고하였다.

오른쪽 앞 다리에 관절염 관련 절뚝거림(limp)을 앓고 있는 혈통을 모르는 19살의 한 마리 말에게 상기 실시예 D와 유사한 20% RED OIL을 함유하는 겔로 무릎을 치료하였다. 겔을 감싸고 2주간 매일 갈아 주었다. 2주의 마지막에, 말 주인은 증가된 운동 범위와 절뚝거림 감소를 주장하였다.

수의사-진단 개 낭창을 갖는 한 마리 개에게 6개월간 매일 1,000 밀리그램의 RED OIL을 사료에 섞어서 주었다. 치료 경과후에, 질병 증상이 완화되었고, 주인은 동물의 프레드니손 약품의 투여량을 예전의 1/10 레벨까지 크게 줄일 수 있었다.

일반적인 가슴앓이(에소파거스의 염증)를 앓는 두 사람에게 일당 2,000 밀리그램의 GOLD OIL의 양으로 레시틴으로 유화된 GOLD OIL, 주스 및 설탕을 주스에 넣어 경구적으로 주었다. 그들은 증상이 2분내에 완화되었다.

천식을 앓고 있는 한명의 22살난 여성에게 2달반동안 다른 식품 부형제와 혼합된 1,000 밀리그램의 RED OIL을 식품 보충물로서 매일 섭취시켰다. 이 동안 그녀는 종래의 흡입 약제의 감소된 필요성 및 주관적 개선의 표시를 보고하였다.

안면에 다양한 여드름 통상(vulgaris) 병변을 갖는 3명의 청소년에게 한달간 오렌지 주스 및 레시틴에 혼합된 1,000 밀리그램의 RED OIL을 매일 복용시켰다. 그들은 모두 그들의 상태의 감소된 발진에 의해 증명되듯이 RED OIL로 인한 주관적 개선을 보고하였다.

항-암 측정

RED OIL 및 GOLD OIL 및 다양한 박층 크로마토그래피 분획을 실험실내에서(in vitro) 인간 암 세포주에 대해 시험하였다. 물질을 우선 디메틸설폭시드에 용해시킨후 조직 배양 배지에 희석하였다. 그 다음 23 $\mu\text{g/mL}$ 의 분액을 PC3(인간 전립선), MCF7(인간 유방 아테노카시노마), HT29(인간 결장 아테노카시노마) 또는 BRO(인간 멜라노마) 세포주에 적용하였다. 이들 분획은 당업계에서 일반적으로 사용되는 MTT 생존 염색법(viable dye method)에 의해 72시간후에 측정했을 때 비처리된 대조 세포에 비해 세포 성장의 저해를 매개하였다. 모든 세포주에서, RED OIL 및 다양한 분획들이 농도의존방식으로 세포 성장을 저해할 수 있었다. Findlay et al. (1983b)의 방법에 의해 해삼 리피드 상으로부터 분리된 한 분획, 플라스토크로마놀-8은 20-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 값이 IC_{50} 값(세포 성장을 50% 저해하는 농도)으로서 결정된 점에서 유망하다고 고려되었다. 플라스토크로마놀-8은 또한 상기 5-리포옥시제나제 측정법에서 측정되어 5-리포옥시제나제, LTB_4 및 여러 효소 이성질체의 현저한 저해제라고 밝혀졌다. 플라스토크로마놀-8은 또한 인간 혈소판에서 12-리포옥시제나제 경로의 저해성인 것이 밝혀졌다.

플라스토크로마놀-8 데이터

Betts (1997)의 방법에 의해 인간 호중구에서 메탄올 대조의 퍼센트로서 표현되는 류코트리엔에 대한 플라스토크로마놀-8의 효과를 보여주는 류코트리엔 활성화 측정에서, 플라스토크로마놀-8은 약 60 %로 5-HETE, 약 40 %로 LTB_4 , 및 75%로 LTB_4 의 두 개의 6-trans 이성질체(6-trans-류코트리엔 B_4 및 6-trans-12-에피류코트리엔 B_4)의 활성화를 저해하였다. 10^6 PMN 당 류코트리엔 합성으로 표현된 류코트리엔 합성에 대한 플라스토크로마놀-8의 효과의 관련 측정에서, 플라스토크로마놀-8은 약 75 %로 5-HETE, 50 %로 LTB_4 , 및 약 80 %로 LTB_4 의 두 개의 trans-6 이성질체의 생성을 저해하였다. 인간 혈소판에 대한 유사한 측정에서, 플라스토크로마놀-8은 약 80 %로 12-HETE 합성을 저해하였다.

본 발명은 본 발명의 바람직한 구체예를 참고로 본 명세서에서 개시되었지만, 그 개시는 단지 예시일 뿐 의미를 한정하는 것으로 의도되어서는 않된다. 따라서, 본 발명의 사상과 첨부된 청구범위의 범위내에서, 당업자가 용이하게 변형시킬 수 있다고 고려된다.

참조문헌 리스트

- Betts H (1997). *Inflammopharmacology* 5: 237-246
- Bullock E and Dawson CJ (1970). *Comp.Biochem. Physiol.* 34: 799
- Castagna M, et al. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.
- Chen YQ, et al. (1994). *Cancer Res.* 54: 1574-1579.
- DeLuca P, et al. (1995). *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 21: 759-777.
- Doherty NS, et al. (1988). *J. Invest. Dermatol.* 91: 298-302.
- Findlay JA, et al. (1983a). *Marine Chemistry* 12: 228.
- Findlay J. et al. (1983b). *J. Nat. Prod.* 47: 334-340.
- Gao X, et al. (1995). *Urology* 46: 227-237.
- Ghosh J and Myers CE (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 418-423.

- Glenn EM (1966). *Am. J. Vet. Res.* 27: 339-352.
- Grover FL, et al. (1997). *Am. J. Surg.* 173: 523-533.
- Henderson WR (1994). *Ann. Intern. Med.* 121: 648-697.
- Hofmanova J, et al. (1996). *Gen. Physiol. Biophys.* 15: 317-331.
- Honn KV, et al. (1994). *Cancer Metastasis Rev.* 13: 365-96.
- Honn KV, et al. (1992). *Prostaglandins* 44: 413-429.
- Hussey HJ and Tisdale MJ (1996). *Br. J. Cancer* 74: 683-687.
- Ishida H, et al. (1997). *Toxicology* 123: 167-175.
- Knighton D, et al. (1977). *J. Cancer* 35: 347-355.
- Konig GM and Wright AD (1995). *Planta Medica* 62: 193-211.
- Langford FD, et al. (1972). *J. Pharm. Sci.* 61: 75-78.
- Liu B, et al. (1994). *Lab. Invest.* 70: 314-323.
- Matsuno T, et al. (1995). *Comp. Biochem. Physiol. B* 11B: 597-605.
- Meyers S and Chen N (1982). *Journal of Food Science* 47: 345-348.
- Miyamoto T, et al. (1990). *Liebigs Ann. Chem.* 33: 453-460.
- Moody TW, et al. (1998). *Exp. Lung Res.* 24: 617-28.
- Tsushima M, et al. (1996). *J. Nat. Prod.* 59: 30-34.
- Winter CA and Nuss GW (1996). *Arthritis & Rheumatism* 9: 394-404.
- U.S Patent No. 4,495,207
- U.S Patent No. 4,505,963
- U.S Patent No. 4,692,280
- U.S Patent No. 5,519,010
- U.S Patent No. 5,770,205

(57) 청구의 범위

청구항 1.

건조된 해삼 조직으로부터 분리되는, 알레르기; 천식; 관절염; 건선, 아토피성 피부염 및 여드름을 비롯한 피부질환; 염증성 장질환 및 통증을 비롯한 염증성 질환; 심근 허혈 및 경색, 협심증, 부정맥, 졸증, 편두통 및 아테롬성 경화증을 비롯한 심혈관 질환; 및 전립선암, 폐암, 결장암 및 피부암을 비롯한 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한, 카로티노이드-함유 리피드를 포함하는 생성물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 건조된 해삼 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되는 생성물.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 조직은 내장 조직인 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 생성물:

- (a) 해삼으로부터 내장 조직을 분리하는 단계;
- (b) 상기 내장 조직의 pH 를 약 4 내지 약 5.5의 범위로 조정하는 단계;
- (c) pH 를 약 4 내지 약 5.5의 범위로 조정 후 상기 내장 조직을 건조하는 단계;
- (d) 상기 내장 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하는 단계;
- (e) 상기 내장 조직으로부터 상기 용매를 분리하는 단계; 및
- (f) 상기 용매를 증발시키는 단계; 그리고 임의로
- (g) 탈검(degumming)하는 단계;
- (h) 실리카겔로 처리하는 단계;
- (i) 가열하는 단계; 및
- (j) 여과하는 단계.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 항산화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 생성물:

- (a) 건조된 해삼 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 추출물을 생성하는 단계;

(b) 상기 추출물의 안료에 결합하는, 활성화된 점토, 비활성화된 점토, 실리산으로 구성된 군으로부터 선택되는 흡착제와 혼합하는 단계; 및

(c) 상기 흡착제를 제거하는 단계;

여기서 상기 생성물은 상기 흡착제의 제거후의 잔류물로 구성됨.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 상기 흡착제는 클로로포름으로 평형된 칼럼중의 실리산이고, 상기 생성물은 상기 칼럼을 통해 클로로포름을 통과시켜 상기 흡착제로부터 제거되는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 8.

삭제

청구항 9.

제 6 항에 있어서, 항산화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 단리되는 것을 특징으로 하는 생성물:

(a) 건조된 해삼 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 추출물을 생성하는 단계;

(b) 상기 추출물의 안료에 결합하는, 활성화된 점토, 비활성화된 점토 및 실리산으로 구성된 군으로부터 선택되는 흡착제를 첨가하는 단계;

(c) 상기 흡착제를 제거하는 단계;

(d) 상기 흡착제를 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하는 단계;

(e) 상기 흡착제로부터 상기 용매를 분리하는 단계; 및

(f) 상기 용매를 제거하여 상기 생성물을 잔류하게 하는 단계.

청구항 11.

삭제

청구항 12.

제 1 항에 있어서, 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 단리되는 것을 특징으로 하는 생성물:

(a) 건조된 해삼 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 추출물을 생성하는 단계;

(b) 상기 추출물을 증류하는 단계; 및

(c) 약 25-35℃의 응축기에서 증류 분획을 수집하는 단계.

청구항 13.

제 12 항에 있어서, 항산화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 14.

제 1 항에 있어서, 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 생성물:

- (a) 건조된 해삼 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 추출물을 생성하는 단계;
- (b) 상기 추출물의 안료에 결합하는, 활성화된 점토, 비활성화된 점토 및 실리카산으로 구성된 군으로부터 선택되는 흡착제를 혼합하는 단계;
- (c) 상기 흡착제를 제거하여 골드 오일(gold oil)을 생성하는 단계;
- (d) 상기 골드 오일을 증류하는 단계; 및
- (e) 약 25-35℃의 응축기에서 증류 분획을 수집하는 단계.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 항산화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 16.

알레르기; 천식; 관절염; 건선, 아토피성 피부염 및 여드름을 비롯한 피부질환; 염증성 장질환 또는 통증을 비롯한 염증성 질환; 심근 허혈 및 경색, 협심증, 부정맥, 졸증, 편두통 및 아테롬성 경화증을 비롯한 심혈관 질환; 및 전립선암, 폐암, 결장암 및 피부암을 비롯한 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한, 하기 단계들을 포함하는 방법에 의해 분리되는, 신선한 해삼 조직으로부터 정제된 생성물:

- (a) 해삼으로부터 내장 조직을 분리하는 단계;
- (b) 상기 내장 조직의 pH를 약 4 내지 5.5의 범위로 조정하는 단계;
- (c) 상기 내장 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하는 단계;
- (e) 상기 내장 조직으로부터 상기 용매를 분리하는 단계; 및
- (f) 상기 용매를 제거하는 단계;

여기서, 상기 생성물은 상기 용매의 제거후에 잔류하는 카로티노이드-함유 리피드 물질임.

청구항 17.

삭제

청구항 18.

알레르기; 천식; 관절염; 건선, 아토피성 피부염 및 여드름을 비롯한 피부질환; 염증성 장질환 또는 통증을 비롯한 염증성 질환; 심근 허혈 및 경색, 협심증, 부정맥, 졸증, 편두통 및 아테롬성 경화증을 비롯한 심혈관 질환; 및 전립선암, 폐암, 결장암 및 피부암을 비롯한 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한, 하기 단계에 의해 제조되는, 리피드를 포함하는 생성물:

(a) 제 16 항의 단계 (e)의 상기 내장 조직을 건조하여 건조된 조직을 제조하는 단계;

(b) 상기 건조된 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 리피드를 용매상으로 추출하는 단계;

(c) 조직으로부터 상기 용매상을 분리하는 단계; 및

(d) 상기 용매를 제거하는 단계;

여기서 상기 생성물은 상기 용매상으로부터 용매 제거후에 잔류하는 리피드 물질임.

청구항 19.

삭제

청구항 20.

제 18 항에 있어서, 항산화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 21.

알레르기; 천식; 관절염; 건선, 아토피성 피부염 및 여드름을 비롯한 피부질환; 염증성 장질환 또는 통증을 비롯한 염증성 질환; 심근 허혈 및 경색, 협심증, 부정맥, 졸증, 편두통 및 아테롬성 경화증을 비롯한 심혈관 질환; 및 전립선암, 폐암, 결장암 및 피부암을 비롯한 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한, 하기 단계들에 의해 제조되는, 본질적으로 리피드가 없는 단백질성 물질을 포함하는 생성물:

(a) 제 16 항의 단계 (e) 또는 제 4 항의 단계 (e)의 상기 내장 조직을 건조하여 건조된 조직을 제조하는 단계;

(b) 상기 건조된 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 리피드를 용매상으로 추출하는 단계; 및

(c) 조직으로부터 상기 용매상을 분리하는 단계;

여기서 상기 생성물은 단계(c)의 조직임.

청구항 22.

신선한 해삼 내장 물질을 고온 식용 오일에 넣은 후 상기 오일로부터 내장 물질을 분리함으로써 제조되고, 상기 오일로 내장 물질로부터 추출된 리피드 및 상기 오일을 포함하는, 알레르기; 천식; 관절염; 건선, 아토피성 피부염 및 여드름을 비롯한 피부질환; 염증성 장질환 또는 통증을 비롯한 염증성 질환; 심근 허혈 및 경색, 협심증, 부정맥, 졸증, 편두통 및 아테롬성 경화증을 비롯한 심혈관 질환; 및 전립선암, 폐암, 결장암 및 피부암을 비롯한 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한, 카로티노이드-함유 리피드를 포함하는 생성물.

청구항 23.

제 1 항의 생성물, 제 6 항의 생성물, 제 12 항의 생성물, 제 14 항의 생성물, 제 18 항의 생성물 및 제 22 항의 생성물로 구성된 군으로부터 선택되는 생성물의 유효량을 포함하는, 건선, 관절염, 아토피성 피부염, 알레르기, 천식, 피부질환, 여드름, 염증성 장 질환, 심혈관 질환, 협심증, 졸증, 전립성암, 폐암, 피부암 또는 소화관암을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 24.

제 1 항의 생성물, 제 6 항의 생성물, 제 12 항의 생성물, 제 14 항의 생성물, 제 18 항의 생성물 및 제 22 항의 생성물로 구성된 군으로부터 선택되는 생성물의 유효량을 포함하는, 이식 거부의 위험을 감소시키거나 당뇨병, 류마티스성 관절염, 골관절염, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 편두통, 여드름, 가슴앓이, 낭창, 암 또는 여드름 통상(vulgaris)을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

어떤 공급원에서 유래되거나 합성 생성된 플라스토크로마놀-8(plastochromanol-8)의 유효 투여량을 포함하는, 암을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 31.

삭제

청구항 32.

제 1 항의 생성물, 제 6 항의 생성물, 제 12 항의 생성물, 제 14 항의 생성물, 제 18 항의 생성물 및 제 22 항의 생성물로 구성된 군에서 선택된 생성물을 포함하고, 추가적 보체(complement) 저해제로서 푸코실화된 콘드로이틴 술페이트(fucosylated chondroitin sulfate), 항-산화제 녹차 추출물, 생강 알콜 추출물 및 *Boswellia* 추출물을 추가적으로 포함하는, 건선, 태선(lichenified) 습진 또는 비듬을 치료하기 위한 조성물(여기서 상기 조성물은 동물 및 인간에게 적합한 적당한 부형제를 더 포함하는 국소용 연고임).

청구항 33.

제 10 항의 생성물을 함유하는 수생(aquatic) 다이어트(diet).

청구항 34.

제 16 항의 생성물을 함유하는 수생(aquatic) 다이어트(diet).

청구항 35.

하기 단계를 포함하는, 해삼 조직으로부터 리피드 분획을 대규모로 추출하는 방법:

- (a) 수작업 또는 기계에 의해 해삼의 조직을 추출하는 단계;
- (b) 해삼 조직 물질의 pH가 4 내지 5.5가 되도록 상기 조직을 산성화하는 단계;
- (c) 단계(b)의 상기 조직을 건조하는 단계; 및
- (d) 헥산, 액화 프로판, 초임계 이산화탄소, 아세톤, 알콜 또는 상기 용매들의 조합에서 선택된 용매로 단계 (c)의 상기 조직으로부터 리피드 분획을 추출하는 단계.

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

하기 단계들을 포함하는, 건조되고 리피드 분획이 없는 본질적으로 냄새없고 맛이없는 단백질성 해삼 조직 가루(meal)를 수득하는 방법:

- (a) 해삼 조직을 헥산, 알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 리피드를 제거함으로써 잔류물을 생성하는 단계; 및
- (b) 상기 잔류물을 10 % 이하의 습도로 건조시키는 단계.

청구항 40.

제 1 항의 생성물, 제 6 항의 생성물, 제 12 항의 생성물, 제 14 항의 생성물, 제 18 항의 생성물 또는 제 22 항의 생성물의 유효량을 포함하는, 병리학적 질환의 원인이 되는 혈관형성을 저해하기 위한 약학 조성물.

청구항 41.

제 40 항에 있어서, 혈관형성의 영역에 국소적으로 접촉함으로써 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 42.

류코트리엔 B₄, 6-*trans*-류코트리엔 B₄ 및 6-*trans*-12-*epi*-류코트리엔 B₄ 및 5-HETE (5(S)-히드록시-(E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-에이코사테트라에노산)를 저해하는 활성이 있는, 제 1 항 또는 제 6 항의 생성물의 분획.

청구항 43.

제 42 항에 있어서, 상기 분획은 제 1 항 또는 제 6 항의 생성물에 제조용 HPLC를 수행함으로써 수득되는 분획.

청구항 44.

제 42 항의 분획의 유효량을 포함하는, 염증을 저해하기 위한 약학 조성물.

청구항 45.

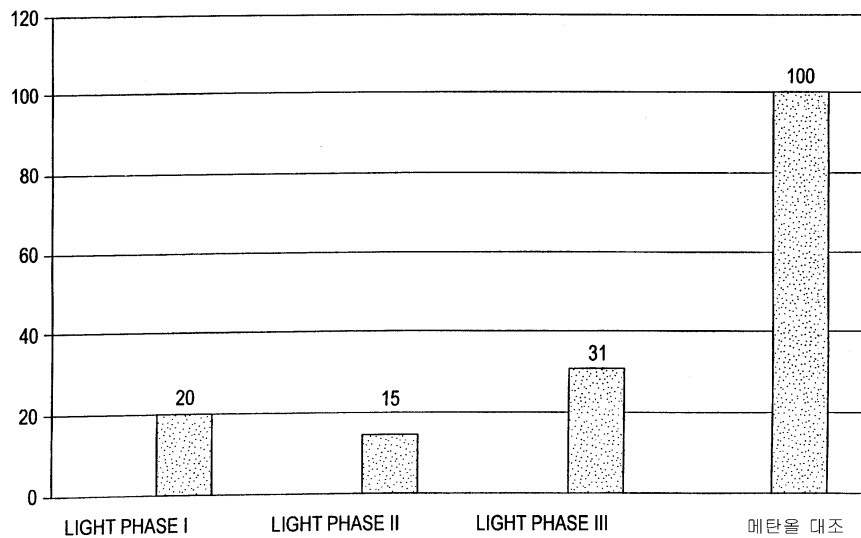
제 44 항에 있어서, 상기 염증은 5-리포옥시게나제 활성에 기인하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 46.

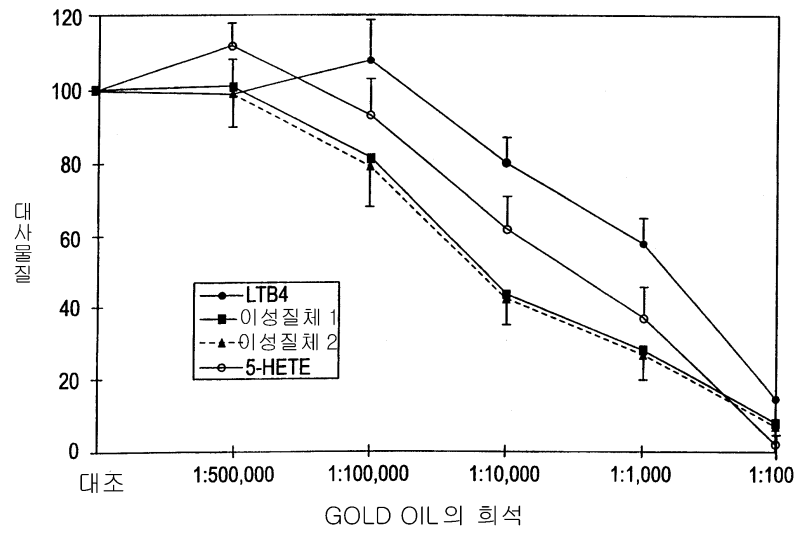
삭제

도면

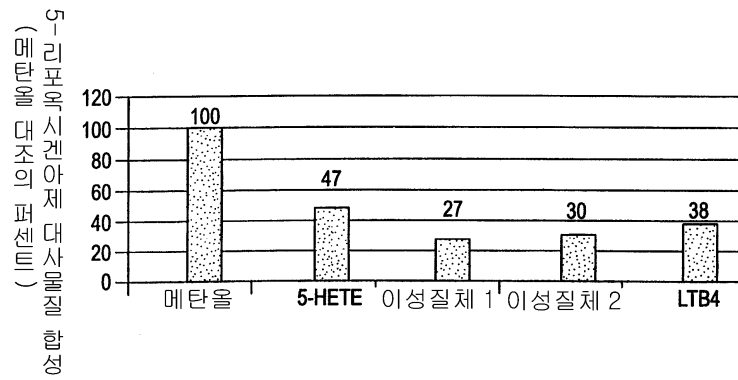
도면1



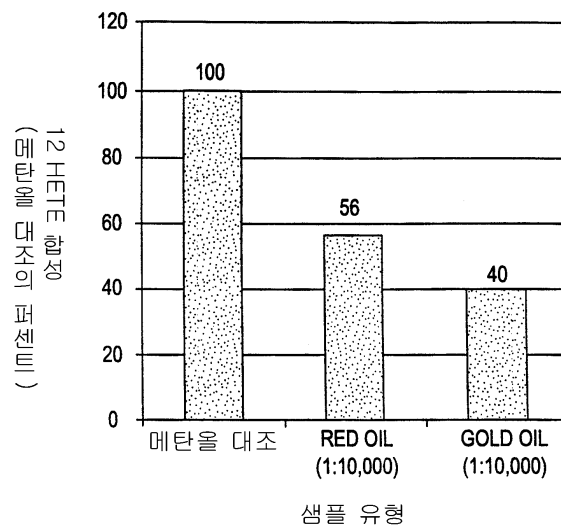
도면2



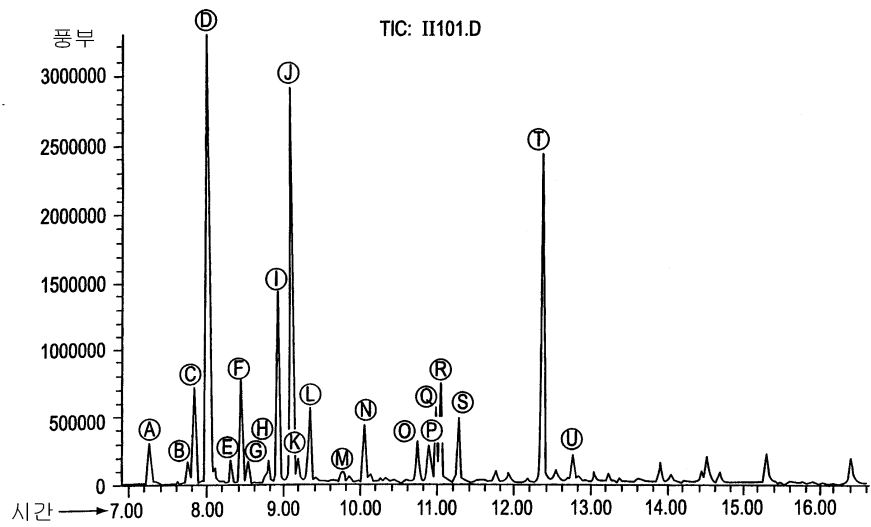
도면3



도면4



도면5

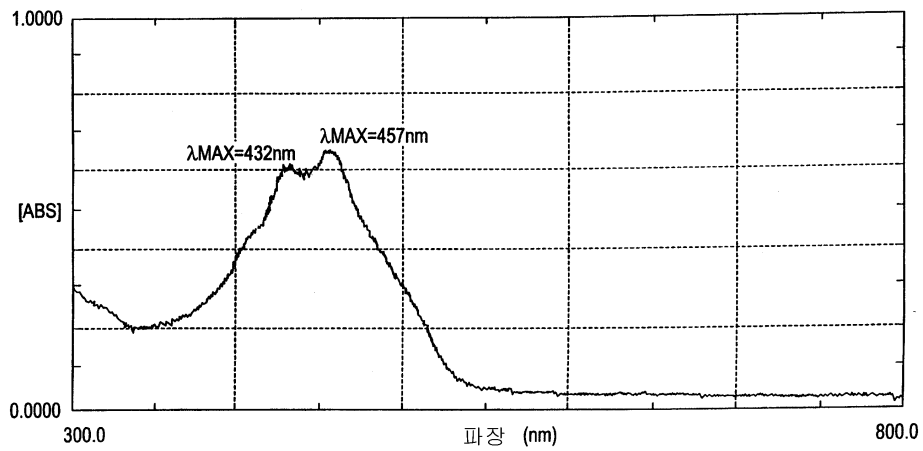


도면6

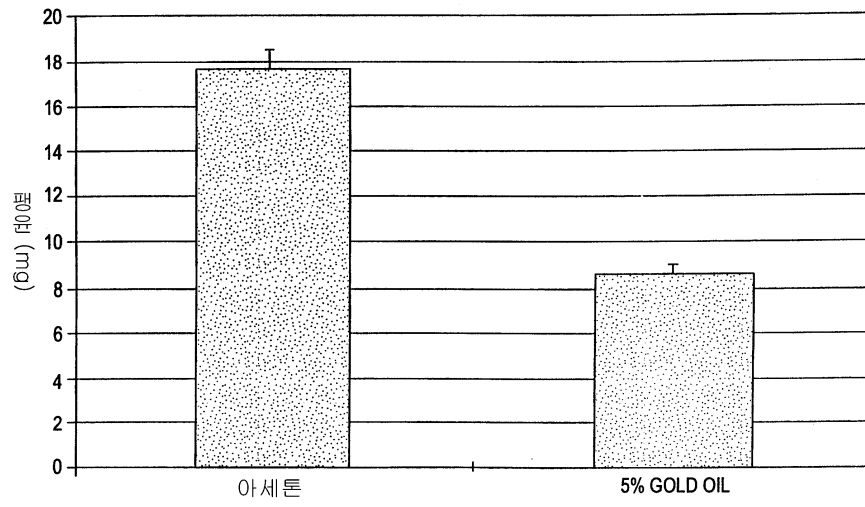
주음 주음아웃 트레이스 기능 자동누금 주석 프린트

기능 : 스캔

스무싱 : 없음



도면7



도면8

