(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[8]
A61K 36/899 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년01월24일
(11) 등록번호 10-0544376
(24) 등록일자 2006년01월11일

(21) 출원번호 10-2000-7001459
(22) 출원일자 2000년02월12일
번역문 제출일자 2000년02월12일
(86) 국제출원번호 PCT/HU1998/000077
국제출원일자 1998년08월11일

(65) 공개번호 10-2001-0022857
(43) 공개일자 2001년03월26일

(87) 국제공개번호 WO 1999/08694
국제공개일자 1999년02월25일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 가나, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 감비아, 인도네시아,

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

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

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

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

(30) 우선권주장
P9701392 1997년08월13일 헝가리(HU)
P9801797 1998년08월05일 헝가리(HU)

(73) 특허권자
히드베기, 마테
헝가리, 에이치-1133 부다페스트, 헤게두스 지와이. 유. 63

퇴뫼스쾨지네, 파르카스 리타
헝가리, 에이치-2030 에르드, 타르노키 우트 107

라피스, 카롤리
헝가리, 에이치-1093 부다페스트, 로냐이 유. 25

라소. 에르체베트
헝가리, 에이치-1173 부다페스트, 바닐리아 유. 60

스젠드, 벨라
헝가리, 에이치-1091 부다페스트, 윌뢰이 우트 55

(72) 발명자 히드베기, 마테
헝가리, 에이치-1133 부다페스트, 헤게두스 지와이. 유. 63

퇴뫼스쾨지네, 파르카스 리타
헝가리, 에이치-2030 에르드, 타르노키 우트 107

라피스, 카롤리
헝가리, 에이치-1093 부다페스트, 로냐이 유. 25

라소. 에르체베트
헝가리, 에이치-1173 부다페스트, 바닐리아 유. 60

스젠드, 벨라
헝가리, 에이치-1091 부다페스트, 윌뢰이 우트 55

(74) 대리인 한양특허법인

심사관 : 여호섭

(54) 면역증강성 및 전이억제성 발효된 식물성 추출물, 약제학적 조성물 및 이의 용도

요약

본 발명은 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 식물성 추출물, 이를 함유하는 약제학적 조성물, 상기 추출물의 제조방법, 및 면역증강성 및 전이억제성 약제학적 조성물 및 식이 보충물의 제조용으로서의 건조된 식물성 추출물의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 추출물은 사카로마이세스 세레비제의 존재하에 맥아를 수성 배지중에서 발효시켜서 발효액을 건조시킴으로써 얻어질 수 있다.

대표도

도 7

명세서

기술분야

본 발명은 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 식물성 추출물, 이를 함유하는 약제학적 조성물, 상기 추출물의 제조방법 및 면역증강, 특히 전이억제성 약제학적 조성물의 제조시에 사용되고 식이 보충물로서의 건조된 식물성 추출물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

종양 치료에 대한 주요 목적 중의 하나는 세포의 악성 성장으로 인한 일차 종양이 전이를 통해 인접 세포 및 기관으로 퍼지고, 말기에는 수술에 의해 제거될 수 없고 또한 화학요법에 대하여 내성을 가지게 되는 이차 종양을 일으키기 때문에 전이의 억제에 있다.

면역조절 물질의 개발에 더욱 더 노력이 집중되어 왔고, 자연 물질, 주로 식물성 물질의 기원에 대하여 집중적으로 연구조사를 행하였다.

퀴논구조를 갖는 화합물이 생물학적으로 중요한 역할을 한다는 사실이 공지되어 있다. 유비퀴논, 플라스토퀴논, 메나퀴논과 같은 여러가지 퀴논 유도체가 식물에서 발견되는데, 이는 광합성 및 척추동물문, 나아가 사람의 세포 호흡계통 및 혈액 응고시 등에 역할을 한다. 여러가지 벤조퀴논 유도체는 의약용으로도 사용된다. 아드리아마이신, 다우노루비신 및 마이토마이신 C는 세포증식억제 효과를 지닌 퀴논 유도체이고, 다른 벤조퀴논 및 하이드로퀴논은 항균 효과를 지니고 테트란 B, 메타사이클린 및 독시사이클린과 같은 세균성 감염 치료에 적합한 항생물질의 유효성분이다.

2,6-디메톡시-p-벤조퀴논(2,6-DMBQ) 및 2-메톡시-p-벤조퀴논(2-MBQ)은 살균 및 세균발육저지 효과를 지니며, 또한 악성 종양 세포에 대하여 세포 독성을 나타낸다[참조 문헌: Int.J.Quant. chem.: Quant. Biol. Symp.7., 217-222(1980), 9., 27-30(1982) and 12., 257-261(1985); Phytochemistry 27., 225(1971) and J. Agric. Food Chem. 39., 266(1991)]. 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논과 아스코르브산의 혼합물이 마우스에서 에를리히 복수증 종양 세포의 성장을 억제시키는 것으로 나타났다[참조 문헌: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81., 2088-2091(1984) and 82, 1439-1442(1985)]. 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논 및 2-메톡시-p-벤조퀴논은 각종 식물에서 발견되어 분리되어 왔다[참조 문헌: Magy. Kém. Folyóirat 102/7., 320-325(1996)]. 이들 두 화합물은 밀(트리시툼 불가리스), 더욱 정확하게는 맥아에서 글루코시드 형태로 가장 큰 양으로 발견될 수 있다. 화합물은 효모로 발효되어 맥아가 첨가된 빵의 품질 저하 검사를 위해 분류된 맥아에서 50 개로 분리된다[참조 문헌: Helv. Him. Acta 33., 433 (1950); J. Chem. Soc. London 1952, 4821-4823].

맥아에 관한 문헌에 따르면, 2-MBQ의 양은 약 0.05 중량%, 2,6-DMBQ의 양은 약 0.01 중량%(글루코시드)이다. 글루코시드로서의 퀴논의 존재는 퀴논, 특히 메톡시로 치환된 p-벤조퀴논이 반응성을 나타내는 반면에, 이들의 하이드로퀴논-글루코시드가 더욱 안정하고 불활성이다는 사실에 의해 설명된다.

본 발명자들은 맥아의 발효에 대하여 연구를 행한 결과, 빵효모(baker's yeast)(사카로마이세스 세레비제(Saccharomyces cerevisiae))로 맥아를 발효시키는 동안에 생성된 발효액으로부터 유도된 건조 추출물이 놀랄만한 면역증강 및 전이억제 효과를 지니며, 면역증강성 및 전이억제성 약제학적 조성물의 활성제로서 성공적으로 사용될 수 있음을 알아냈다.

문헌[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80., 129(1983)]에 따르면, 2,6-DMBQ와 아스코르브산의 혼합물이 에를리히 복수증 종양 세포의 성장을 억제하지만, 이들은 종양 성장의 정량 분석 및 생화학적 기능 연구에 매우 적합하고, 미확인 성분 이외에도 2,6-DMBQ 및 2-MBQ를 함유하는 본 발명에 기재된 추출물이 이들 일차 종양 세포, 아스코르브산과 혼합하더라도 일반적으로 모든 일차 종양에 대하여 실질적으로 효과가 없는 것으로 판명되었고, 전이 치료에만 매우 효과적인 것으로 판명되었기 때문에, 상기 사실은 놀랄 만하다. 일차 종양 및 이로부터 발생되는 전이치료 측면은 기본적으로 다르므로, 일차 종양 치료에 효과적인 것으로 알려진 이의 화학조성에 관해 아직 완전히 확인되지 않은 화합물을 함유하는 식물 추출물이 면역증강 및 전이억제 효과를 지니는 것으로 자명되지 않았다[참조 문헌: Cancer, Principles and Practice of Oncology, Vol 1. 4th edition, J. B. Lippincott Company, Philadephia, 1993].

따라서, 본 발명의 목적은 수성 배지중에서 빵효모로 맥아를 발효시키고, 세포를 함유하지 않는 발효액을 여과시킨 후 건조시켜서 얻을 수 있는 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 식물성 추출물을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 면역증강성 및 전이억제성 약제학적 조성물을 제공하는데 있으며, 여기서 이의 활성제는 본 발명에 개시된 발효건조된 식물성 추출물을 함유한다.

본 발명의 또 하나의 목적은 면역증강성 및 전이억제성 약제학적 조성물의 제조용으로서의 상술한 발효건조된 식물성 추출물의 용도를 제공하는데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 개시된 약제학적 조성물을 사용하여 면역계통 증강 및 전이억제를 위한 포유동물의 치료방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 목적은 본 발명에 기재된 발효건조된 식물성 추출물 및 말토덱스트린(maltodextrin)을 함유하는 식이 보충물을 제공하는데 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명에 따르면, 발효건조된 식물성 추출물은 이의 2,6-DMBQ 함유량을 기준으로 하여 확인조사되었다. 본 발명자들은 이용가능한 방법으로는 추출물의 화학조성을 완전히 확인할 수 없기 때문에, 모든 데이터는 2,6-DMBQ 함유량을 기준으로 하고 있다는 점에 주목한다.

본 발명에 기재된 발효건조된 식물성 추출물의 제조를 위해, 원상태 또는 탈지된 상태로 분말상으로 분쇄된 제분의 부산물로서 다량으로 얻을 수 있는 맥아를 사용하는 것이 적합한 것으로 판명되었다. 탈지된 맥아의 사용은 특정한 이점을 갖고 있지 않다. 빵효모(사카로마이세스 세레비제)를 사용하여 발효를 행하였다. 이러한 종류의 효모는 시판되고 있다. 발효는 약 10~24 시간, 바람직하게는 15~20 시간 또는 약 18 시간 이었다. 발효 온도는 약 25~35℃, 바람직하게는 약 30℃이다. 맥아와 효모의 중량비는 4:1~2:1, 바람직하게는 약 3:1이고, 건조추출물과 물의 중량비는 1:6~1:12, 바람직하게는 약 1:9이다.

실험실에서의 발효는 예를 들면 유리 발효조에서 수중에서의 효모 현탁액을 분쇄된 생맥아에 첨가하여, 혼합물을 교반하거나 진탕시킴으로써 행해질 수 있다. 발효액은 기포 상태로 된다.

발효후에, 혼합물을 2000~4500/min, 바람직하게는 약 3000/min으로 5~15 분간 원심분리한다. 상청액을 비등시키고 냉각시켜서, 적절한 방법, 예를 들면 냉동 건조 또는 분무 건조에 의해 건조시킨다.

적색을 띤 갈색 분말인 생성물은 본 발명의 추출물이다. 추후 사용시까지 추출물을 냉각 상태로 유지하고, 흡습성으로 인해 밀폐 용기에 보존하는 것이 유리하다. 생성된 건조추출물 중의 2,6-DMBQ 함유량은 약 0.4㎎/g이다.

큰 규모의 발효(예: 4㎥)의 경우에는, 연속 에어레이션, 예를 들면 0.5ℓ 공기/ℓ발효액/min로 느린 교반하에 행하는 것이 적절하다. 발효 시간은 약 18 시간이다. 기포 발생을 억제하기 위해, 통상적인 첨가제를 가할 수 있는데, 해바라기유를 사용하는 것이 바람직하다. 발효 공정 말기시에, 에어레이션 및 교반이 중단되고, 발효액은 통상적인 방법, 예를 들면 스크루 디캔터, 이어서 세퍼레이터 및 필터 프레스로 맥아-효모 현탁액과 분리된다. 필요에 따라, 필터 보조물질을 첨가할 수 있다. 발효액의 입방 미터당 5~10㎏ 필터링 펄라이트를 사용하는 것이 적당하다. 발효액을 급속하게 여과하여, 현미경으로 필터링 품질을 검사한다. 여과된 발효액은 실제로 세포를 포함하고 있지 않는데, 이는 10회당 겨우 1개의 효모 세포가 발견된다는 것을 의미한다. 건조물질 약 1.5 중량%를 함유하는 얻어진 발효액을 진공 냉각기, 바람직하게는 약 40~50℃에서 증발시키고, 종료후에, 진공 상태를 약 15분간 대기압에서 비등시킨다. 그 결과, 유해한 효소 활성도가 감소된다. 이어서, 혼합물을 분무 건조, 예를 들면 회전식 분무 장치에서 건조시킨다. 상기 발효 공정이 이용되는 경우, 사용된 맥아의 벤조퀴논 함유량에 따라, 얻어진 발효건조된 식물성 추출물 중의 2,6-DMBQ 함유량은 건조추출물 1g 당 0.12~0.52㎎이고, 2-MBQ는 건조추출물 1g 당 0.05~0.28㎎이다.

최종 생성물이 흡습성을 지니기 때문에, 분무 건조 효율 및 최종 생성물의 용도를 개선시키기 위해, 통상적인 첨가제(예: 말토덱스트린, 아카시아 검, 구아르 검, 크산탄, 로커스트 빈(locust bean) 분말 등)를 분무 건조시에 사용할 수 있다. 말토덱스트린을 사용하는 것이 바람직하다. 적절한 공정은 진공 냉각기에서 증발되고 비등된 혼합물의 건조추출물 함유량을 측정하여, 건조할 혼합물의 건조추출물 함유량이 약 30 중량%이도록 다량의 말토덱스트린을 첨가하는 것이다. 온수에 말토덱스트린을 용해시켜 응축된 혼합물로 냉각될 때까지 첨가하는 것이 적절하다. 건조후에, 최종 생성물인 분말은 발효건조된 식물성 추출물 약 60 중량% 및 말토덱스트린 약 40 중량%를 함유한다.

얻어진 추출물의 안정성은 2,6-DMBQ 농도 변화를 검사함으로써 체크될 수 있다. 정량 분석은 HPLC에 의해 행해질 수 있다. 상술한 공정에 따라 제조된 분말은 실온에서 약 3년간 안정하게 보유된다. 본 발명의 발효건조된 식물성 추출물은 면역증강성 및 전이억제성 약제학적 조성물의 활성제로서 사용될 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 상기 활성제이외에도 아스코르브산 또는 다른 세포 증식 억제 물질을 함유할 수 있다.

발효건조된 식물성 추출물은 통상적인 경구 또는 비경구 투여용 고체 또는 액체 약제학적 조성물로 가공처리될 수 있다. 약제학적 조성물의 제조시에, 발효건조된 식물성 추출물의 흡습성을 고려해야 한다. 적당한 형태는 활성제를 공기 습도로부터 보호하는 캡슐이다.

약제학적 조성물의 제조시에, 약제 관례상 통상적으로 사용되는 보조 물질이 사용될 수 있다. 이들 물질 및 이들의 가능 용도가 약제 문헌에 상세하게 기술되어 있기 때문에, 적절한 형태의 선택 및 제법은 일상적인 일이다. 유효 제제의 1 회 투약

량은 환자의 상태에 따라 광범위하게 변화할 수 있고, 적절한 유효 투여량의 선택은 항상 의사 책임이어야 한다. 일반적으로, 투약량이 체중 1 ㎏당 0.001～100g, 바람직하게는 0.01～50g, 더욱 바람직하게는 0.1～40g이면, 0.1～10, 1～25 또는 10～30g의 투약량으로 적당한 결과가 얻어질 수 있다.

본 발명의 발효건조된 식물성 추출물은 또한 아스코르브산(비타민 C)과 혼합될 수 있다. 본 발명자들의 실험에 의하면, 아스코르브산은 본 발명의 추출물의 전이억제 효과를 향상시킬 수 있다. 발효건조된 식물성 추출물 및 아스코르브산의 중량비는 10:1～1:1, 바람직하게는 6:1～2:1, 더욱 바람직하게는 3:1, 4:1 또는 5:1일 수 있다.

본 발명은 본 발명의 발효건조된 식물성 추출물에 의한 면역증강 및/또는 전이억제 치료에 관한 것이다. 치료 관점은 발효건조된 식물성 추출물의 유효 투약량을 환자에게 투여하는 것이다.

발효건조된 식물성 추출물은 또한 포유동물용 식이 보충물로서 사용될 수 있다. 이 경우에는 말토덱스트린 및 식품업계에서 사용되는 통상적인 보조 물질, 예를 들면 방향족 물질, 감미료, 착색제 등을 함유하는 혼합물을 가하는 것이 바람직하다. 식이 보충물은 예를 들면, 유동층상에 방향족 물질 및 감미료 외에 건조추출물 60 중량% 및 말토덱스트린 40 중량%를 함유하는 혼합물을 과립화하여, 인스턴트 입체를 예를 들면 백으로 패킹함으로써 제조될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 2,6-DMBQ의 HPLC 측정에 대한 보정 다이어그램.

도 2는 물질의 클로로포름 추출물에 대한 HPLC 크로마토그램.

도 3은 물질의 에탄올 추출물에 대한 HPLC 크로마토그램.

도 4는 정치후 60 분째 및 90 분째에 상이한 농도의 냉동건조물 (lyophilisate)의 존재하에 B16 종양 세포의 결합상태를 나타낸다(모든 값은 분광광도계 측정에 의한 평가로서 8개의 유사한 측정값의 평균값 ±SD를 나타낸다.).

도 5는 치료 개시된지 24 시간 및 48 시간 후의 증식에 대한 냉동건조물의 상이한 투약량 효과를 나타낸다(모든 값은 분광광도계 측정에 의한 평가로서 8개의 유사한 측정값의 평균값 ±SD를 나타낸다.).

도 6은 치료 개시한 지 24 시간 후에 냉동건조물의 상이한 투약량의 존재하에 A2058 사람 흑색종의 발육 현상을 나타내고, 배양균의 평가는 유사한 분광광도계 측정에 의해 프로테인(SRB) 및 탈수소 효소 활성(MTT)에 의거하여 행해졌다(모든 값은 8개의 유사한 측정값의 평균값 ±SD를 나타낸다.).

도 7은 상이한 냉동건조물 투약량으로 치료한 후의 시험관 내의 배양에서의 A2058 사람 흑색종의 아폽토틱(apoptotic) 세포(FACS 분석)의 정량을 나타낸다.

실시예

하기 실시예는 본 발명의 발효건조된 식물성 추출물, 이의 제조방법 및 약리학적 효능을 예시한다.

실시예 1:

실험실 규모의 맥아 발효:

효모(사카로마이세스 세레비제) 33.3g과 음료수 1000㎖의 현탁액을 분말(헝가리언 스탠더드 MSZ-081361-80에 의거)로 분쇄한 생맥아 100g에 가한다. 혼합물을 30℃에서 18 시간 동안 진탕기에서 진탕시킨다. 이 기간 동안에 발효액은 기포상을 이루어 원래 체적의 약 3배에 이른다. 발효후에 혼합물을 3000/min으로 15분간 원심분리한다. 비등 및 냉각후에 상청액을 냉동 건조에 의해 건조시켜 얻어진 냉동건조물을 추후 사용시까지 냉동기(-10℃)에 보관한다. 생성된 냉동건조물 중의 2,6-DMBQ는 건조추출물 1g 당 0.4㎎(0.04 중량%) 이었다.

실시예 2:

큰 규모의 맥아 발효

분말(헝가리언 스탠더드에 의거)로 분쇄한 맥아 300㎏과 효모 100㎏을 5 ㎥ 발효조에 주입하고, 체적이 4000ℓ가 될 때까지 음료수를 가한다. 발효 시간은 18 시간이고, 이 동안에 연속 에어레이션(0.5ℓ공기/ℓ발효액/min) 및 느린 교반(30 rev./min)을 행한다. 기포 발생을 억제하기 위해, 1ℓ/㎥ 해바리기유를 혼합물에 가한다. 발효후에 에어레이션 및 교반을 중단하고, 처음에 발효액을 스크루 디캔터, 이어서 분리기에서 분리한 다음, 최종적으로 섬유 필터를 갖춘 필터 프레스에서 분리한다. 보조 물질로서 10㎏ 필터링 펄라이트/㎥를 가한다. 발효액을 급속하게 여과하여 그 예리도를 현미경으로 검사한다. 여과된 발효액은 실제로 세포를 포함하고 있지 않는데, 이는 10 회당 겨우 1개의 효모 세포가 발견된다는 것을 의미한다. 건조추출물 약 1.5 중량%를 함유하는 얻어진 발효액을 진공 냉각기, 바람직하게는 약 40~50℃에서 증발시키고, 중단후에 진공 상태를 약 15분간 대기압에서 비등시킨다. 그 후에 용액의 건조추출물 함유량을 측정하고, 용액의 건조추출물 함유량이 약 30% 질량%가 되도록, 처음에 온수에 용해시킨 다음에 냉각시킨 다량의 말토덱스트린을 첨가한다. 이어서, 용액을 배출 공기의 온도가 90℃인 전단 노즐 회전식 분무 건조기 중에서 분무 건조시킨다다. 생성된 최종 생성물인 분말은 본 발명의 발효된 식물성 추출물 60 중량% 및 말토덱스트린 40 중량%를 함유한다. 하기 실시예에 기재된 방법에 따라 HPLC에 의해 측정된 2,6-DMBQ 함유량은 건조추출물 1g 당 0.4㎎이다.

실시예 3:

본 발명의 추출물의 특성

본 발명의 추출물은 두가지 방법, 이의 2,6-DMBQ 함유량이나 소위 지문 크로마토그램에 의해 특징지울 수 있다. 두가지 경우에는 HPLC 크로마토그래피가 이용된다.

실시예 1에서 기술한 바와 같이 제조된 추출물 및 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 추출물에 대하여 분석을 행하였더니, 동일한 결과가 얻어졌다.

A. 벤조퀴논 유도체의 정량 및 정성 분석

샘플의 제조:

분석하기 전에, 냉동건조물의 벤조퀴논 농도를 증가시키는 것이 필요하다. 이를 달성하기 위해, 증류수를 사용하여 냉동건조물을 원래 농도로 희석한다((건조추출물 함유량 1 중량%) - (냉동건조물 0.5g, 증류수 50㎖)). 용액을 3 단계로 클로로포름 3 ×25㎖를 사용하여 추출한다. 클로로포름 상에 잔존하는 가능한 습기를 물을 함유하지 않는 황산나트륨으로 제거한다. 여과후에 클로로포름 상을 증발시키고, 클로로포름 잔여부에 총체적 5㎖로 첨가한다. 이 샘플을 HPLC 분석시에 주입한다.

벤조퀴논 유도체의 정성 및 정량 분석을 HPLC 법으로 행한다.

HPLC 법의 설명:

사용된 HPLC 장치는 베크만 모델 114 M 펌프, 레이버민(LaborMin) UV, 각각 머크(Merck)-히타치(Hitachi)-DAD 모드. 4500 다이오드 어레이 디텍터 및 워터즈(Waters) 740 타입 인터그레이터 유닛으로 구성되어 있다. 크롬실(Chromsil) C18(250 ×4㎜) 10μ컬럼을 측정에 사용한다. 주파수 290nm에서 UV 검출을 행하고, 유량은 2㎖/min이었다.

사용된 용리액의 조성은 다음과 같다. Na_2HPO_4 25mmol, NaH_2PO_4 25mmol, Na_2EDTA 25mmol, $NH_2OH \cdot HCl$ 20mmol, 메탄올 10 체적%, pH = 6.05.

상술한 방법으로 3개의 상이한 벤조퀴논 및 하이드로퀴논을 분석한다. 상기 화합물의 체류시간에는 작은 차이가 있다. 용리액, 유기상의 농도를 10%로 감소시킴으로써, 선택성을 크게 향상시킨다. 체류시간 데이터 분석에 따르면, p-벤조퀴논은 상응하는 하이드로퀴논 보다 체류시간이 길고, 메톡시 그룹의 수에 따라 체류시간이 길어짐을 알 수 있다. 모든 3개의 표준물질의 농도는 0.1㎎/㎖이다. 표 2는 표준물질의 체류시간(t_R) 및 용량인자(k') 데이터를 나타낸다. 측정 목적은 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논의 검출 및 정량 한정이므로, 하기에서 이러한 측정부분은 상세히 논의될 것이다. 정교한 방법이 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논의 정량분석에 적합한지의 여부를 조사한다. 사용된 보정 다이어그램은 도 1에 도시된다. 상관

계수 0.99를 이용하면, 결과는 직선이다. 또한 측정값이 재생되는지의 여부에 관하여 체크하고, 샘플마다 3개의 대응하는 측정을 행하여, 측정 산재도를 계산한다. 표 1은 6개월간 샘플에 행해진 대응 측정결과 및 이들의 산재도를 나타낸다. 이 결과에 따르면, 측정방법은 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논의 정확하고 재생가능한 측정에 적합하다는 것을 알 수 있다.

[표 1]

2,6-DMBQ의 정량분석 및 결과 산재도의 대응값

날짜	2,6-DMBQ 함유량 (㎎/샘플 50g)			(σ -%)
04.27.	3.45	3.54	3.66	0.08-2
04.28.	3.27	3.68	3.31	0.18-5
05.10.	1.56	1.49	1.48	0.03-1.9
05.10.	3.65	3.42		0.12-3
06.08.	3.00	2.98	2.86	0.06-2
06.09.	2.92	3.06	2.87	0.08-2.3
06.10.	3.34	3.23	3.36	0.05-1.5

[표 2]

조사된 물질의 체류시간(t_R) 및 용량인자(k')

표준물질	t_R	k'
2,6-DMBQ	13.4	5.0
2,6-DMHQ	5.1	1.2
2-MBQ	8.5	2.7

도 2는 상술한 바와 같이 제조된 클로로포름 샘플의 HPLC 크로마토그램을 도시한다. 크로마토그램은 2,6-DMBQ에 대한 피크 특성만을 나타낸다. 샘플 중의 2,6-DMBQ 함유량은 샘플을 기준으로 하여 측정한다.

B. 지문 크로마토그램

샘플의 제조:

96 체적% 에탄올 50㎖를 분무건조된 물질(실시예 2에 기재된 바와 같이 제조됨) 5g에 가한다. 혼합물을 50℃에서 200/min으로 30분간 진탕시킨다. 그 다음에, 혼합물을 여과하고, 증발시켜 건조시킨 후, 잔존하는 물질을 메탄올 10㎖에 용해시킨다. 여액을 컬럼으로 주입한다.

HPLC법:

상술한 HPLC 기기, 컬럼 및 조건을 이용하나, 용리액의 조성은 다음과 같다: Na_2HPO_4 1.25mmol, NaH_2PO_4 1.25mmol, Na_2EDTA 1.25mmol, $NH_2OH \cdot HCl$ 2.50mmol, 메탄올 5 체적%.

도 3은 얻어진 HPLC 크로마토그램을 나타낸다. 이들 조건하에서, 2개의 특징적인 피크가 나타나는데, 하나는 약 4.7 min(5), 또 하나는 약 5.8 min(6)에서 나타난다. 각각 7.3, 7.7 min의 체류시간에서, 2개의 피크(7,8)가 서로 곧 이어지므로, 완전히 분리될 수 없다. 9.8 min에서 작은 세기의 피크(9)가 나타나고, 이어서 약 13.1 min에서 특징적인 강한 피크(11)가 나타난다. 약 15 min에서는 작은 피크(12)가, 18 min에서는 또 하나의 강한 피크(14)가 나타난다. 21.8 min에서는 크로마토그램은 작은 피크(15)를, 약 31 min에서는 각종 물질을 함유하는 더욱 편평한 피크가 나타난다.

C. 안정성 시험

본 발명의 추출물의 분해는 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논의 농도 변화를 통해 체크한다. 본 발명자들은 세가지 상이한 온도(실온 20℃, 40℃ 및 60℃)에서 보관실험을 행하였다. 냉동건조물 약 1g을 기밀하게 밀폐된 시험관에 보관한다. 실험기간은 8 주간이었고, 상이한 온도로 유지된 모든 세가지 계열로부터 취한 샘플에 대하여 매주 3개의 유사한 측정을 행하였다. 벤조퀴논 유도체의 정량분석은 HPLC에 의해 행한다.

시험으로부터, 본 발명의 건조추출물은 실온에서 3년간 보관후에도 안정하게 보유되며, 즉 2,6-DMBQ 함유량은 실제로 변화되지 않는 것을 알 수 있다. 동시에 추출물은 40℃에서는 안정하지 않고, 2,6-DMBQ가 수 주내에 분해하며, 60℃에서는 2,6-DMBQ 함유량이 수일내에 빠르게 감소한다.

2-메톡시-p-벤조퀴논의 분해는 두 계열의 측정에서도 연구되었다. 이 화합물은 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논보다 더 불안정하므로, 그 결과, 40℃나 60℃에서 유지된 샘플 중에는 보관 1 주후에 그 존재가 확인되지 않았다. 실온에서는 이 화합물의 농도가 변화하지 않고 남아있었다.

실시예 4:

유효성 시험:

실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 냉동건조물 및 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 분무건조된 추출물을 유효성에 대하여 시험한다. 표준화된 건조물질은 2,6-DMBQ 함유량 0.4㎎/건조물질 g 및 도 2에 도시된 HPLC 곡선과 함께 사용되었다. 두가지 물질은 동일한 결과를 주므로, 본 발명의 물질은 간단히 냉동건조물이라 불리울 것이다. 면역 재구성, 및 종양 성장 및 전이억제 효과에 대하여 특별히 강조하여, 상기 냉동건조물에 관한 생물학적 및 독물학적 시험 결과가 하기에서 논의될 것이다.

1. 종양 성장 및 전이억제 효과(생체내 시험)

시험을 위해, 마우스 또는 래트에서 성장하는 주사가능한 하기 종양 종류를 사용한다: 루이스 폐암(마우스 폐암)의 고 전이형성 변종(3LL-HH), B16 마우스 흑색종 및 HCR-25 사람 결장암 이종이식.

3LL-HH(LLT-HH) 및 B16 종양을 C57B1/6 근친 교배 마우스에서 양육한다. HCR-25 이종이식을 미리 흉선절제술 및 완전한 몸체 조사에 의해 면역억제된 CBA/CA 마우스에 주사한다. 3LL-HH 및 HCR-25 종양의 경우에는 종양 세포를 비장에 이식하고, B16 흑색종의 경우에는 좌측 하지 근육에 이식한다. HCR-25 종양으로 주사된 동물의 대조군에 대하여 또한 종양 이식후 21일후에 비장 절제술을 실시하였다.

본 발명의 냉동건조물을 사용한 치료는 종양 주사후 24시간 후에 개시되었다. 1일 투약량 3g/체중㎏을 위 소식자를 사용하여 0.6g/㎖ 수성 현탁액 형태로 경구투여한다.

마취하에 동물을 출혈시켜 죽임으로써 3LL-HH 종양의 경우에는 이식후 14일 후에, B16 종양의 경우에는 이식후 21일 후에, HCR-25 종양의 경우에는 이식후 51일 후에 시험이 종료되었다.

표 3, 4 및 5는 시험결과를 요약한 것이다.

[표 3]

비장으로 주사된 3LL-HH 마우스 폐암의 경우에는 간 전이수에 대한 본 발명의 냉동건조물을 사용한 치료 효과

치료	주사된 세포수	간 전이수
대조군	3×10^5	104.0 ± 28.2
냉동건조물	3×10^5	29.8 ± 16.4*

*p <0.01

모든 시험군은 10마리의 동물을 포함함.

[표 4]

HCR-25 사람 결장암을 면역억제된 CBA/CA 마우스의 비장에 주사한 후 51일 후에 간 전이수에 대한 본 발명의 냉동건조물을 사용한 치료효과

치료	종양을 가진 비장의 중량(g)	간 전이 수
대조군. 비장절제되지 않음.	1.02 ± 0.59	42.0 ± 25.8
냉동건조물. 비장절제되지 않음.	0.62 ± 0.47	19.5 ± 19.0
대조군. 비장절제됨	0.10 ± 0.02	19.1 ± 13.5
냉동건조물. 비장절제됨	0.08 ± 0.02	10.6 ± 11.6

*비장절제술은 종양이 비장으로 주사된 후 21일후에 실시됨
모든 시험군은 12 마리의 동물을 포함함.

[표 5]

종양이 주사된 후 21일 후에 사지 근육에 주사된 B16 흑색종의 경우에 폐 전이수 및 종양이 주사된 사지의 중량에 대한 본 발명의 냉동건조물을 사용한 치료 효과

치료	종양이 주사된 사지의 중량 (평균)	폐 전이수 (평균)
대조군	7.6 ± 0.43	42.4 ± 10.2
냉동건조물	7.2 ± 0.38	6.2 ± 3.7*

*$p<0.01$
모든 시험은 10 마리의 동물을 포함함.

상기 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 기재된 냉동건조물로 치료하면, 3LL-HH 종양이 비장에 주사된 경우의 폐 전이수를 71%로 상당히 감소시킨다(표 3).

HCR-25 사람 결장암의 경우에는 50일간 치료하면, 종양이 주사된 비장의 중량 및 폐 전이수를 감소시킨다. 대조군과 비교하여, 전이수는 비장 절제된 그룹 및 비장 절제되지 않은 그룹에서 약 50% 이었다(표 4).

근육으로 주사된 B16 흑색종의 경우에는 근육에서 성장하는 종양 중량이 치료 효과로서 변화하지 않았으나, 폐 전이수는 대조군과 비교하여 매우 상당히 85% 정도로 감소되었다(표 5).

Ⅱ. 시험관 내 시험

본 발명에 개시된 냉동건조물이 악성 종양의 전이를 상당히 감소시킬 수 있음을 상기 시험으로부터 명백히 알 수 있기 때문에, 상이한 전이형성상에 대한 생성물의 효과도 조사되었다. 전이 형성은 여러가지 상으로 이루어지며, 일차 종양 세포의 증식 및 아폽토틱 활성 이외에도 종양 세포의 유착 퍼텐셜 및 종양 세포에 대한 생체의 보호 메카니즘이 역할을 한다. 시험관 내 시험에서는 세포 증식 및 아폽토시스(apoptosis)에 대한 냉동건조물의 효과 및 유착에 대하여 조사하였다.

생체내 시험의 대부분이 B16 마우스 흑색종 세포에 대하여 행해지기 때문에, 제 1 단계에서 이 종양은 냉동건조물을 시험하는데 사용된다.

1. 유착 시험

96개의 구멍이 있는 미세공 플레이트 상에서 종양 세포의 유착 시험을 행한다. 냉동건조물의 투약량은 300, 3000 및 30000㎍/㎖이다. 혈청 부재하에 10% FCS 존재하에 RPM1 배지를 사용한다. 통상적인 환경에서 배양한 후 10, 30, 60, 90 및 120분후에 유착 시험을 행한다. SBR 분석을 기초로 하여 비색법으로 평가를 행한다(참조 문헌: Mossmann, T.: J. Immunol. Neth. 65, 55-63/1983/). 배양의 전체 프로테인 함유량의 술포르호다민(sulforhodamine) B-컬러링에 의거하여 시험을 행하고, 분광광도계로 570㎚에서 흡수도를 읽는다. 도 4는 다만 두 시기를 나타내는데, 냉동건조물의 효과를 충분히 나타낸다. 냉동건조물의 투약량이 3000㎍/㎖이거나 또는 이의 10배 이상이면, 혈청의 부재 및 존재하에 종양 세포의 유착을 현저하게 감소시킴을 알 수 있다. 투약량이 300㎍/㎖인 경우에는 이러한 효과는 관찰될 수 없다.

2. 증식 시험

이 시험에서, 96개의 구멍이 있는 미세공 플레이트 상에서 처리하기 전에 종양 세포를 24시간 정치시킨다. 냉동건조물의 적정 투약량으로 처리한 후에, 세포의 증식 활성을 처리후 24, 48 및 72 시간후에 SRB 분석으로 시험한다. 반복시험 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 900~15000 ㎍/㎖ 범위의 처리 효과로서 종양 세포가 단일층 표면에 나타나고, 트리판(trypan)-블루 염료 배제법(exclusion method)에 의해 나타난 바와 같이, 사멸된다(Kaltenbach, J.P. et al.: Exp. Cell Res. 15, 112-117/1985/)(도 5).

사람 멜라닌 결핍 흑색종에 대한 본 발명자들의 시험(A2058 종양 세포-Todaro, G. J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5258-5262/1980/)에 의하면, 마우스 멜라닌 결핍 흑색종에 대한 결과와 유사한 결과를 가져온다(도 6). 이 종양의 경우에는 SRB 분석과 유사한 세포의 대사 활성을 나타내는 MTT 분석도 행한다(Cole, S. P. C.: Cancer Chemother. Pharmacol. 17, 259-263/1986/). 대사 활성 세포가 테트라솔륨염을 주로 이의 탈수소 효소 활성에 의해 착색된 포르마잔 생성물로 전환시키는 현상에 기초를 두고 있다. 활성과 비례하는 착색 반응은 570㎚에서 분광광도계로 알 수 있다. MTT 분석에 의하면, 투약량이 300㎍/㎖인 경우에도 종양 세포의 작용 활성이 감소됨을 명백히 알 수 있다(도 4). 표면에 나타나는 세포의 경우에서와 같이, 아폽토시스의 원인은 알려져 있지 않고, 완전한 세포군의 아폽토틱 활성은 유동 세포 분석법(FACS)으로 시험된다(도 7). 도 7은 종양 세포가 투약량에 따라 대단히 높게 아폽토시스 상태에 놓임을 보여준다.

Ⅲ. 면역반응에 대한 효과 시험

본 발명에 기재된 냉동건조물의 효과는 두가지 상이한 모델로 조사되었다. 한 시험에 있어서는 냉동건조물로 처리된 동물의 비장에서 구한 단핵 세포의 아세포 변형 가능성을 연구조사하고, 다른 시험에서는 이인자형 이식 피부 이식 모델에서 마우스의 등 부위에 이식된 피부의 전체 결합을 조사한다.

1. T 임파구의 아세포 변형에 대한 시험

본 발명에 기재된 냉동건조물로 처리하면, 면역반응에서 중요한 역할을 하는 T 임파구의 아세포 변형을 증가시킨다. 이는 하기 실험에 의해 보여진다.

본 발명에 기재된 냉동건조물을 3g/㎏ 투약량(0.6g/㎖ 현탁액) 사용하여 위 소식자로 주당 5회 6주간 $C_{57}Bl_{16}$ 마우스에게 경구투여처리한다. 치리 완료후에, 동물 비장으로부터 관류에 의해 얻은 임파구를 1㎍/㎖ Con A로 처리된 세포 배지에 옮긴다. 48 시간후에 DNS 합성을 수행하는 세포가 0.4 μCi ^{3}H 티미딘에 의해 마크된다. 마크 정도는 액체 신틸레이션 계수기로 나타낸다(베크만). 표 6은 Con A로 처리하면, 대조군과 비교하여, ^{3}H-TdR의 혼입, 즉 아세포 변형을 상당히 증가시킴을 보여준다.

[표 6]

대조군 및 냉동건조물로 처리된 마우스의 비장 임파구로 ^{3}H-티미딘 혼입

처리	1㎍/㎖ ConA	
	평균 (cpm)	SEM
대조군	3760.6	583.3
냉동건조물	8041.8	957.1

2. 이인자형 이식 피부 이식 모델의 면역증강 효과 시험

불충분한 면역반응 복구의 실례에 관한 최선 모델은 흉선절제술(흉선의 수술 제거)에 의해 면역이 부분적으로 불충분하게 이루어진 마우스의 이인자형 이식 피부 이식 시험이다. $C_{57}Bl_{10}$ 및 $B_{10}LP$ 마우스 주는 H-3 위치만이 다르므로, 한 주의 개체에서 다른 주의 개체로 이식된 피부는 7일 이내에 거부반응을 나타내지 않으나, 약 3 주후에만 거부반응을 나타낸다. 수용체가 흉선절제되면, 평균 50 일후에 거부반응을 나타낸다. 흉선의 호르몬과 같은 수질의 임파구의 성숙 및 분화를 촉진시키는 모든 물질은 이식된 피부의 거부에 필요한 시간을 감소시킨다(J. Immunpharmacology 7, 67-78/1985/). 본 발명에 기재된 냉동건조물로 처리한 결과, 동일한 효과가 본 발명자들의 시험에 의해 관찰되었다.

$C_{57}Bl_{10}$ 마우스는 수용체로서 사용되고, $B_{10}LP$ 마우스는 공여체로서 사용된다. 수용체 마우스는 흉선절제된 다음, 7 주후에 피부이식되었다. 흉선절제술후 1 주후에 주당 5회 냉동건조물 30㎎/㎏로 경구투여처리를 개시하였다. 피부 이식후 70일후에 처리를 완료하였다. 우발적인 거부반응이 매일 관찰되었다. 표 7은 흉선절제되지 않은 마우스의 거부반응시간은 수컷인 경우에는 21일, 암컷인 경우에는 28.7일임을 보여준다. 흉선절제된 마우스에서는 거부반응시간이 각각 52.4일, 41.6일로 길어졌다. 본 발명의 냉동건조물로 처리하면, 흉선절제되어 처리된 마우스에서 피부 이식(조직이식)의 생존을 상당히 단축시킨다. 이는 흉선절제로 인한 면역결핍이 처리 결과로서 상당히 감소됨을 보여주는데, 이는 냉동건조물이 면역증강효과를 갖는다는 것을 말해준다.

[표 7]

피부조직이식의 거부반응에 대한 본 발명의 냉동건조물 처리의 효과(수용체 $C_{57}Bl_{10}$ 마우스, 공여체 $B_{10}LP$ 마우스)

처리	거부반응시간			
		수컷		암컷
	평균(일)	SEM	평균(일)	SEM
대조군 (흉선절제되지 않음)	21.0	3.1	28.7	4.5
대조군 (흉선절제됨)	52.4	5.0	41.6	5.5
냉동건조물 (30㎎/㎏)	28.8*	8.6	32.6**	4.5

*0.001<p<0.01 대 흉선절제된 대조군

**0.01<p<0.05 대 흉선절제된 대조군

본 발명의 냉동건조물을 사용한 생체내 및 시험관내 시험에서, 이 생성물은 각종 동물 시험 모델에서 상당한 항전이효과를 갖는다는 것을 보여준다. 이 효과는 아마도 생체내 및 시험관내에서 관찰된 면역증강효과와 관계가 있으나, 전이수의 감소는 항증식성, 아폽토시스 유발 효과, 유착에 대한 추출물의 효과 및 자유 라디칼 발생 유발 효과에 의해 영향을 받을 수도 있다.

Ⅳ. 라디칼 결합 활성 시험

벤조퀴논이 공지의 자유 라디칼 형성 효과를 갖고 있기 때문에, 본 발명에 기재된 냉동건조물의 라디칼 결합 활성도 시험되었다. 전자 스핀 공명법을 이용하여 초산화물(SSA) 및 히드록시 라디칼 결합(OH-SA)을 측정한다. 냉동건조물은 상당한 SSA를 가지며, 1㎎의 클리인(clean) 라디칼 결합 활성은 5.64㎍ 초산화물 디스뮤타아제(SOD)의 활성에 상당한다. 냉동건조물은 OH-SA 활성을 갖지 않고, 과산화수소/Fe 히드록시 라디칼 형성계를 분열시키므로, 소위 비킬레이터 활성을 갖는 것을 추정할 수 있다.

Ⅴ. 독물학상 시험(아급성)

F344 래트 및 $C_{57}Bl_{16}$ 마우스에 대하여 77일간 독물학상 시험을 인더스트리얼 톡시콜로지 애니멀-데이터 리지스트리(RITA)의 권고에 따라 행하였다(Exp. Toxic. Pathol. 47, 247-266/1995/). 투약량 3g/㎏(0.6g/㎖ 수성 현탁액)으로 동

물을 매일 처리하였다. 처리시에, 동물 체중 변화, 우발적인 병리상 신체 변화 및 동물의 자연 사망이 관찰되었다. 시험 종결시에, 심장, 폐, 흉선, 비장, 간, 신장 및 고환의 중량을 측정하고, RITA에 의해 규정된 34개의 기관에 대하여 병리적으로 조사한다, 자연 사망이 관찰되지 않았고, 동물의 체중이 대조군과 마찬가지로 변화되었다. 시험 종료시에, 대조군과 비교하여 상이한 기관의 중량이 변화되지 않았다. 처리된 동물의 병리적 처리시에 아무런 변화가 관찰되지 않았는데, 이는 냉동건조물로 인한 것이다.

산업상 이용 가능성

상기 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 발효된 식물성 추출물은 독성이 없고, 이의 면역증강효과로 인해 면역계통이 손상되는 모든 상태로 나타내어진다. 상술한 생물학적 특성 때문에, 악성 종양의 의약 치료, 주로 전이억제시에 상보적인 용도를 가질 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

수성 배지 중에서 사카로마이세스 세레비제(Saccharomyces cerevisiae)로 맥아(wheat germ)를 발효시켜서 얻을 수 있는 발효액으로부터 유도된 것을 특징으로 하는 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 추출물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 추출물의 메탄올 용액을 크롬실(Chromsil) C18, 10μ컬럼에서 용리액으로 Na_2HP_4 1.25mmol, NaH_2PO_4 1.25mmol, Na_2EDTA 1.25mmol, $NH_2OH{\cdot}HCl$ 2.50mmol 그리고 메탄올 5 체적% 를 사용하여 용리하고 290 nm의 UV에 의해 검출한 결과, 도 3에 도시된 것과 상응하는 HPLC 크로마토그램을 가지는 것을 특징으로 하는 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 추출물.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, HPLC에 의해 측정된 것으로서, 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논 함유량은 건조추출물 1g 당 0.12~0.52㎎이고, 2-메톡시-p-벤조퀴논 함유량은 건조추출물 1g 당 0.05~0.28㎎인 것을 특징으로 하는 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 추출물.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 2,6-디메톡시-p-벤조퀴논 함유량은 건조추출물 1g 당 0.4㎎인 것을 특징으로 하는 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 추출물.

청구항 5.

분쇄된 맥아를 사카로마이세스 세레비제의 존재하에 수성 배지중에서 발효시키고, 발효액을 분리하고, 급속하게 여과시키고, 증발시키고, 비등시키고, 그 자체로 또는 보조 건조물질의 존재하에 건조시키는 것을 특징으로 하는 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 추출물의 제조방법.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 발효는 연속 에어레이션 및 교반하에 약 30℃에서 약 18시간 행하는 것을 특징으로 하는 면역증강성 및 전이억제성 발효건조된 추출물의 제조방법.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 상기 건조는 말토덱스트린(maltodextrin)의 존재하에 행해지는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8.

사카로마이세스 세레비제의 존재하에 수성 배지중에서 맥아의 발효에 의해 얻어진 발효액으로부터 유도된 건조추출물을 활성제로서 함유하는 것을 특징으로 하는 면역증강성 및 전이억제성 약제학적 조성물.

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

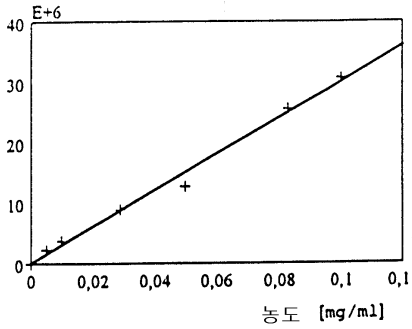
삭제

청구항 12.

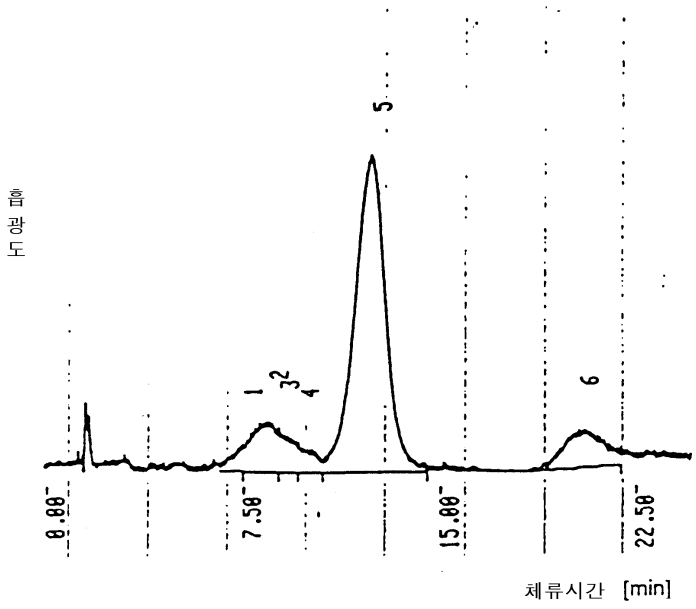
삭제

도면

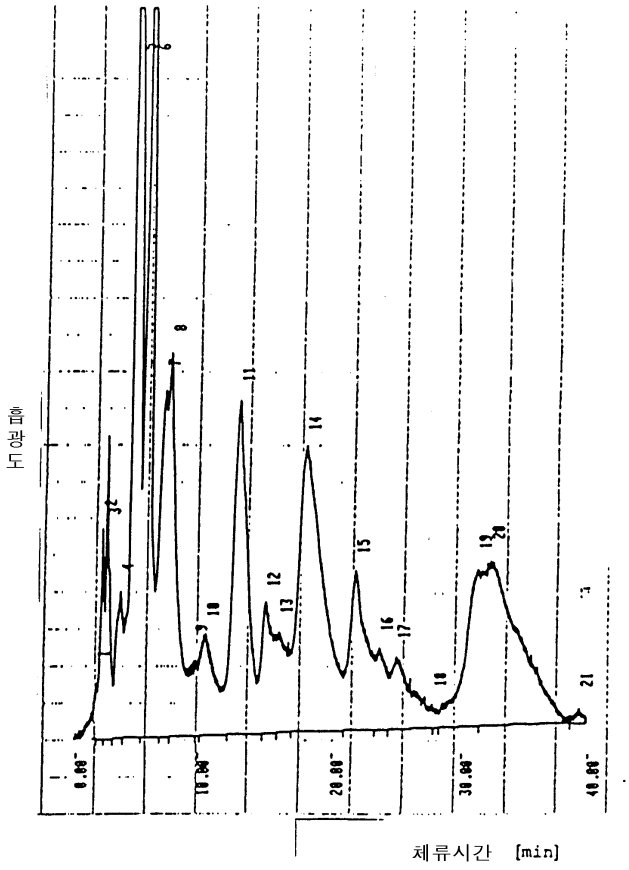
도면1



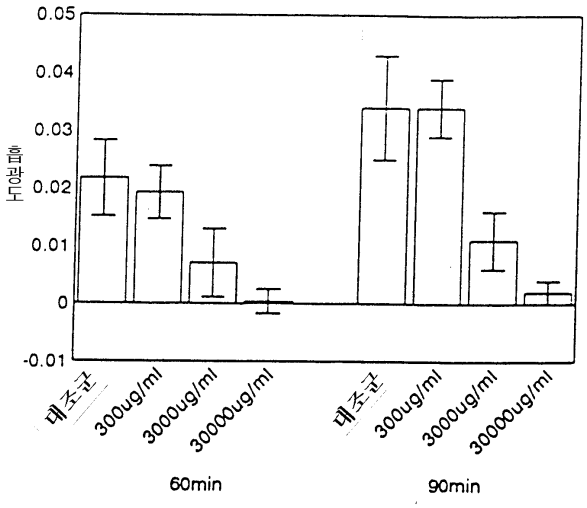
도면2


흡광도
0.00
7.50
15.00
22.50
체류시간 [min]

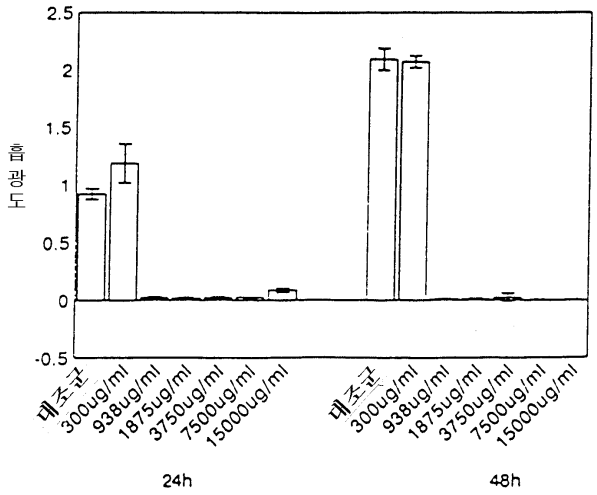
도면3


흡광도
0.00
10.00
20.00
30.00
40.00
체류시간 [min]

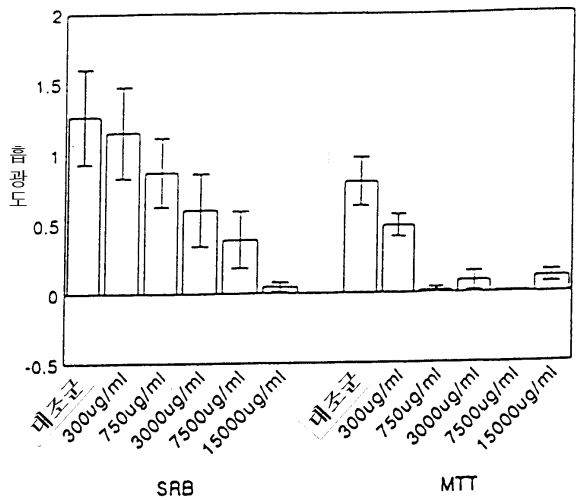
도면4


0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
-0.01
흡광도
대조군
300ug/ml
3000ug/ml
30000ug/ml
60min
90min

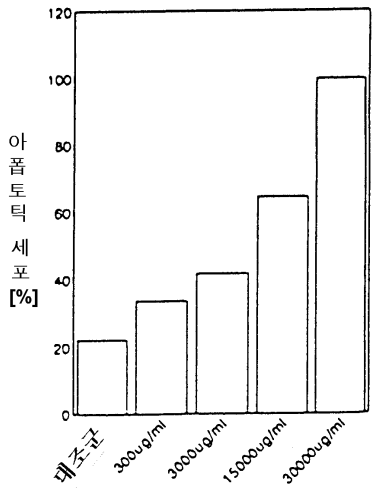
도면5


2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
흡광도
대조군
300ug/ml
938ug/ml
1875ug/ml
3750ug/ml
7500ug/ml
15000ug/ml
24h
48h

도면6


2
1.5
1
0.5
0
-0.5
흡광도
대조군
300ug/ml
750ug/ml
3000ug/ml
7500ug/ml
15000ug/ml
SRB
MTT

도면7


120
100
80
60
40
20
0
아폽토틱 세포 [%]
대조군
300ug/ml
3000ug/ml
15000ug/ml
30000ug/ml