(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137550
(43) 공개일자 2024년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/14 (2006.01) *A23J 1/20* (2006.01)
A23J 3/08 (2006.01) *A23L 33/19* (2016.01)
A61K 38/40 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *C07K 1/18* (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01) *C07K 14/79* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/14 (2013.01)
A23J 1/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7019854
(22) 출원일자(국제) 2022년11월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월14일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2022/051362
(87) 국제공개번호 WO 2023/087052
국제공개일자 2023년05월25일
(30) 우선권주장
2021903675 2021년11월16일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
노우미 리미티드
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
(72) 발명자
모세스, 팀
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
발디, 프랭크
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김민태

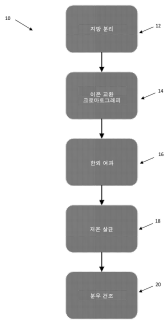
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **락토페린 분말 생산 방법 및 이의 용도**

(57) 요 약

락토페린 분말을 생산하는 공정이 본원에 개시된다. 상기 공정은 천연 락토페린 함유 물질로부터 락토페린을 추출하고, 상기 추출된 락토페린을 농축하여 추출된 락토페린이 개선된 안정성을 갖는 액체 농축물을 생산하는 단계를 포함한다. 그 다음, 액체 농축물을 저온살균하기에 유효한 온도로 그리고 시간 동안 가열하여 저온살균한 다음, 저온살균된 액체 농축물을 변성되지 않는 조건 하에서 건조시켜서 실질적으로 모든 락토페린이 천연 락토페린인 락토페린 분말을 생산한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A23J 3/08 (2013.01)
A23L 33/19 (2016.08)
A61K 38/40 (2013.01)
A61K 9/0043 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
C07K 1/18 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)
C07K 14/79 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
(72) 발명자
쿠쿨잔, 소냐
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
딕킨스, 톰
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
엔자푸리, 아슈완타
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
트라제라, 브루노
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
배닝, 크리스토퍼
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
바틀렛, 네이선
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80
에스노, 카밀 앤-제네비에브
오스트레일리아 2229 뉴사우스웨일즈 타렌 포인트 박스 로드 80

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토페린 분말의 생산 공정으로서, 공정은

천연 락토페린 함유 물질로부터 락토페린을 추출하고, 추출된 락토페린을 농축하여 추출된 락토페린이 개선된 안정성을 갖는 액체 농축물을 생산하는 단계;

액체 농축물을 저온살균하기에 유효한 온도로 그리고 시간 동안 액체 농축물을 가열하는 단계; 및

변성되지 않는 조건 하에서 저온살균된 액체 농축물을 건조시켜서, 실질적으로 모든 락토페린이 천연 락토페린인 락토페린 분말을 생산하는 단계를 포함하는, 공정.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출된 락토페린이, 락토페린을 불안정화시키는 종이 액체 농축물에 없음으로 해서 개선된 안정성을 갖는, 공정.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 추출된 락토페린이, 락토페린을 안정화시키는 종이 액체 농축물에 있음으로 해서 개선된 안정성을 갖는, 공정.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 농축물이 pH 조절제, 안정화 미네랄 및 용해된 기체 중 하나 이상을 포함하는, 공정.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 락토페린 함유 물질이 우유인, 공정.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 락토페린 함유 물질이 탈지유인, 공정.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 탈지유가 저온 보울 지방 분리 공정(cold bowl fat separation process)을 사용하여 생산되는, 공정.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 락토페린이 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 천연 락토페린 함유 물질로부터 추출되는, 공정.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출된 락토페린이 한외여과를 사용하여 농축되는, 공정.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출된 락토페린이 약 9 내지 12 wt%로 농축되는, 공정.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저온살균된 액체 농축물이 저온살균 직후에 냉각되는, 공정.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저온살균된 액체 농축물이 분무 건조에 의해 건조되는, 공정.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 분무 건조가 다단계 분무 건조를 포함하는, 공정.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 락토페린 분말 내 락토페린의 90% 초과가 천연 락토페린인, 공정.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 락토페린 분말이 필수적으로 락토페린으로 구성되는, 공정.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 락토페린 분말이 약 50 마이크론의 D50 입자 크기를 갖는, 공정.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 공정으로 생산된 락토페린 분말.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 식품.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 비강 스프레이.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 공정으로 생산된 락토페린 분말 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제 조성물.

청구항 21

환자에서 바이러스 감염을 예방하거나 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 제제 또는 제20항의 약제 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 투여가 환자의 기도를 통해 이루어지는, 방법.

청구항 23

환자에서 바이러스 감염을 예방하거나 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 제제 또는 제20항의 약제 조성물을 상기 환자에게 비강 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제가 바이러스 감염을 예방하기 위해 예방적으로 투여되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 락토페린 분말 생산 방법 및 그러한 분말의 용도가 본원에 설명된다.

배 경 기 술

[0002] 락토페린은 동물 우유를 포함한 많은 동물 분비액에서 발견되는 단백질이다. 락토페린은 많은 건강 효과 또는 이점을 갖는 것으로 생각되며, 이는 유아용 제제와 같은 많은 우유 대체 제제 내 성분이다.

[0003] 락토페린은 재조합 방식으로 생산될 수 있거나, 우유 또는 치즈 유청과 같은 기타 유제품에서 추출하여 생산될 수 있다. 우유 또는 치즈 유청에서 락토페린을 생산하는 전형적인 공정은 미생물 부하를 줄이기 위한 초기 저온살균 단계에 이어, 우유/유청 매트릭스에서 락토페린을 농축 및 추출하는 단계를 포함한다. 그 다음, 락토페린 농축물을 전형적으로 동결 건조시켜서, 주로 락토페린으로 구성되는 미립자 물질을 생산한다. 특정 입자 크기 및/또는 입자 크기 분포를 갖는 락토페린이 필요한 경우, 동결 건조된 입자를 분쇄할 수 있다.

[0004] 락토페린을 생산하기 위한 대체 방법을 제공하는 것이 유리할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 제1 측면에서, 본 발명은 락토페린 분말 생산 공정을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 공정은

[0007] 천연 락토페린 함유 물질로부터 락토페린을 추출하고, 추출된 락토페린을 농축하여 추출된 락토페린이 (즉, 락토페린 함유 물질에 있을 때와 비교하여) 개선된 안정성을 갖는 액체 농축물을 생산하는 단계;

[0008] 액체 농축물을 저온살균하기에 유효한 온도로 그리고 시간 동안 액체 농축물을 가열하는 단계; 및

[0009] 변성되지 않는 조건 하에서 저온살균된 액체 농축물을 건조시켜서, 실질적으로 모든 락토페린이 천연 락토페린인 락토페린 분말을 생산하는 단계를 포함한다.

[0010] 본 출원의 실체인 발명의 발명자들은, 우유 또는 치즈 유청으로부터 락토페린을 생산하는 전통적인 공정이 락토페린이 경험하는 조건으로 인해 그 단백질 구조가 어느 정도 분해/변성되는 단계를 포함한다는 것을 깨달았다. 이는, 제품 내 천연 락토페린의 비율 측면에서, 회수된 락토페린의 양 및/또는 락토페린 함유 제품의 품질을 결과적으로 감소시킨다. 이해되는 바와 같이, 변성 락토페린은 천연 락토페린에 비해 줄어든 기능성 및 생물학적 활성을 가질 가능성이 높을 것이다. 그러한 품질에서의 저하는, 락토페린 함유 제품을 특성화하는 데 사용된 기법이 락토페린의 천연 형태와 비천연 형태를 반드시 충분히 잘 구별하지 않았고, 제품이 어느 정도 수준의 기능성을 갖기에 충분한 천연 락토페린을 함유했기 때문에, 한동안 업계에서는 인식되지 않았다. 본 발명에서는, 많은 기존 공정의 경우보다 더 많은 락토페린이 회수될 수 있으며, 회수된 락토페린은 흔히 있는 경우보다 덜 변성된다. 실제로, 본 발명의 락토페린 분말 내 락토페린은, 가공처리되고 저온살균된 형태로 제공됨에도 불구하고, 생물학적 활성의 대부분을 유지한다.

[0011] 락토페린은 많은 단백질과 마찬가지로 열에 민감하며, 우유, 유청 등과 같은 액체를 가열할 때(특히 저온살균 온도 이상) 가끔 발생할 수 있는 것처럼 고온에서 pH 변화에 노출되는 경우 특히 분해되기 쉬운 것으로 밝혀졌다. 또한, 전형적으로 락토페린이 공급되는 액체의 다른 성분이 락토페린의 불안정화에 기여하여, 이것이 가열 시 분해되기 훨씬 더 쉽게 만드는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은, (특히, 공정의 다른 단계에서도 열이 적용될 수 있음을 인식하더라도) 저온살균 단계에 제공된 락토페린이, 저온살균하지 않은 우유 매트릭스로부터 그리고, 락토페린이 (즉, 우유와 같은 천연 락토페린 함유 물질에서의 안정성과 비교할 경우에) 개선된 안정성을 갖는 액체 농축물로 추출되었을 경우에, 락토페린의 (아래 정의된 바와 같은) 실질적으로 모두가 천연(즉, 변성되지 않은) 락토페린인 락토페린 함유 분말이 생산될 수 있음을 발견하였다.

[0012] 이러한 방식으로 락토페린은 저온살균 중에 우유와 같은 액체가 가열될 때 발생할 수 있는 그러한 불안정한 효과에 노출되지 않으며(이는 식품에 대한 많은 산업 표준의 규정을 준수하는 데 필수적임), 본 발명의 공정이 기존 공정의 경우와 마찬가지로 락토페린 단백질 구조에 대한 손상이 적은 것으로 밝혀졌다. 실제로, 본 발명자들

은 우유의 저온살균으로 인해 약 25%의 락토페린 회수 손실이 발생하고, 우유 매트릭스에서 저온살균될 때 락토페린에 대한 일부 다른 구조적 변화가 있을 수 있음을 관찰하였다. 더욱이, 본 발명에서는, 락토페린 함유 분말이 최소 수의 공정 단계에서 생산되며, 이는 증발 등과 같은, 락토페린 분말을 생산하기 위해 일상적으로 사용되는 단계를 포함하지 않는다. 본 발명자들은 모든 추가적인 공정 단계가 락토페린을 손상시키고/시키거나 전반적인 회수를 낮출 수 있음을 인식하고 있다.

[0013] 일부 실시양태에서, 추출된 락토페린은 락토페린을 불안정화시키는 종이 액체 농축물에 없기 때문에 개선된 안정성을 가질 수 있다. 예를 들어, 우유 매트릭스에서 전형적으로 발견되는 종은 카제인 및 유청 단백질과 같은 단백질, 지질다당류, 설탕, 칼슘 및 마그네슘 이온과 같은 이온 종을 포함하며, 이들 중 일부 또는 전부는 (예를 들어, pH 변화를 유발시킴으로써 직접적으로 또는 간접적으로) 우유 매트릭스에서 락토페린의 안정성에 유해하게 영향을 미칠 수 있다. 그러한 잠재적으로 유해한 종을 함유하지 않는 락토페린 함유 액체 농축물을 저온살균한다는 것은, 락토페린을 불안정하게 하는 효과를 가질 수 있는 종의 존재 하에서 락토페린이 가열되지 않음을 의미한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 추출된 락토페린은 락토페린을 안정화시키는 종이 액체 농축물에 존재하기 때문에 개선된 안정성을 가질 수 있다. 액체 농축물은 예를 들어, pH 조절제, 안정화 미네랄 및 용해된 기체 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 그러한 종의 구체적인 예, 및 이것들의 보호 메커니즘에 대한 발명자들의 이해가 아래에 설명될 것이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 천연 락토페린 함유 물질은 우유, 바람직하게는 탈지유일 수 있다. 저온 보울 지방 분리(cold bowl fat separation)는, 락토페린이 우유 매트릭스 내에 여전히 함유되어 있는 동안 락토페린이 약간 높은 온도에 놓이는 것을 포함하지 않기 때문에, 탈지유 생산에 유리한 것으로 밝혀졌다. 아래에서 더 자세히 설명되는 바와 같이, 락토페린은 이 초기 단계에서 쉽게 변성될 수 있다.

[0016] 일부 실시양태에서, 락토페린은 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 천연 락토페린 함유 물질로부터 추출될 수 있다. 락토페린은 물질(예를 들어, 우유 매트릭스)의 다른 성분과는 별도로 이온 교환 컬럼에서 용출될 수 있다.

[0017] 일부 실시양태에서, 추출된 락토페린은 한외여과를 사용하여 농축될 수 있으며, 락토페린은 액체 농축물에서의 후속적인 재구성을 위해 여과액에 함유될 것이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 저온살균된 액체 농축물은 저온살균 직후에 냉각될 수 있으며, 이로써 락토페린이 고온에서 소비되는 시간의 길이를 절대적으로 최소로 줄일 수 있다(이와 동시에 저온살균에 관한 규제 요건을 여전히 준수함).

[0019] 일부 실시양태에서, 저온살균된 액체 농축물은 변성되지 않는 조건 하에서 건조되어, 분무 건조에 의해 락토페린 함유 제품을 생산할 수 있다. 분무 건조(특히 다단계 분무 건조)는 최종 분말 형성 단계 중의 추가 열 적용 및/또는 가공처리 전에 잠재적으로 손상을 줄 수 있는 양의 열 적용을 필연적으로 수반하는, 증발과 같은 단계의 필요성을 감소시키는 것으로 발명자들에 의해 유리하게 발견되었다. 다단계 분무 건조를 사용하면 특별한 이점을 얻을 수 있는데, 이때 누적 적용 온도를 훨씬 더 낮추고 따라서 특정의 원하는 입자 크기 및/또는 입자 크기 분포와 같은 특정 특성을 갖는 실질적으로 천연의 락토페린 함유 분말을 생산하는 데 기여하기 위해 노즐 크기, 입구 및 출구 온도, 및 체류 시간과 같은 매개변수를 유리하게 사용한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 락토페린 분말은 필수적으로 락토페린으로 구성될 수 있다. 대안적인 실시양태에서, 최대 약 10% w/w(바람직하게는 약 5% w/w 미만)의 다른 물질이 락토페린 분말에 존재할 수 있으며, 이는 본 발명의 공정의 불가피한 부산물이다. 예를 들어, 수분 및 기타 비특이적인 단백질은, 이것들의 존재가 제품의 유용성에 유해하게 영향을 미치지 않는다면, 최종 제품에 함유될 수 있다.

[0021] 제2 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 제공한다.

[0022] 제3 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하거나 이것으로 필수적으로 구성되는 식품을 제공한다.

[0023] 본 발명자들은 또한, 본 발명의 제1 측면의 공정에 따라 생산된 락토페린 분말에 함유된 고 기능성 및 생물학적 활성의 락토페린이 락토페린 분말의 독특한 특성으로 인해 치료 활성 또는 향상된 치료 활성을 가질 수 있음을 발견하였다. 구체적으로, 본 발명자들에 의해 수행된 실험(아래 설명됨)은, 본 발명에 따라 생산된 락토페린 분말이 *시험관 내에서* 그리고 *생체 내에서* 바이러스 복제에 대한 억제 효과를 가짐을 입증하였다. 본 발명자들은,

이들의 예비 실험의 결과가 본원에 개시된 치료적 적용의 합리적인 예측으로 이어진다고 믿는다. 현재 진행 중이거나 계획된 둘 다의 추가 실험을 통해 발명자들의 예측이 확증될 것으로 예상된다.

[0024] 따라서, 제4 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 비강 스프레이를 제공한다.

[0025] 제5 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

[0026] 제6 측면에서, 본 발명은 환자에서 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 제제 또는 본 발명의 제5 측면에 따른 약제 조성물을 (예를 들어, 환자의 기도를 통해) 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0027] 제7 측면에서, 본 발명은 환자에서 바이러스 감염을 예방하거나 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 제제 또는 본 발명의 제5 측면의 약제 조성물을 환자에게 비강 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0028] 제8 측면에서, 본 발명은 약제로 사용하기 위한 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 제공한다.

[0029] 제9 측면에서, 본 발명은 환자에서 바이러스 감염을 예방하거나 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말을 제공한다.

[0030] 제10 측면에서, 본 발명은 환자에서 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말의 용도를 제공한다.

[0031] 본 발명자들은 또한 락토페린이 면역조절 및 항염증 활성을 나타냈음에 주목한다. 본 발명자들은, 본 발명의 제1 측면의 공정으로 생산된 락토페린 분말이, 그러한 활성과 관련된 병태의 치료 및 예방을 위한 개선된 락토페린 전달 형태를 제공할 수 있음에 주목한다.

[0032] 본 발명의 다른 측면, 특징 및 이점이 아래에서 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 본 발명의 실시양태는 다음 도면을 참고하여 아래에서 더 자세히 설명될 것이다:

도 1은 본 발명의 제1 측면의 실시양태의 블록 흐름도이다;

도 2는 n=1 천식 환자의 세포를 사용한 예비 BEC 연구에 대한 바이러스 부하를 보여주는 그래프이다. 100 ug/mL(LF100 ■) 또는 1000 ug/mL(LF1000 ▲)의 락토페린으로 처리한 후의 OC43 바이러스 부하가 있는 분화된 1차 인간 기관지 상피 세포;

도 3은 n=2 건강한 기증자(n=4 반복 각각 = 총 8), 처리되지 않은 (●) 그리고 1000 ug/mL(LF1000 ▲)를 사용한 또 다른 예비 연구에 대한 바이러스 부하를 보여주는 그래프이다;

도 4는 2x 건강한 기증자(n=4 반복 각각 = 총 8), 처리되지 않은(●), 100 ug/mL(LF100 ■) 및 1000 ug/mL(LF1000 ▲)에 대한 시간 경과에 따른 감염성 바이러스의 수를 보여주는 그래프이다;

도 5는 n=1 건강한 기증자(n=3 반복 각각 = 총 6, 락토페린은 48시간에 보충됨), 처리되지 않은(●) 그리고 100 ug/mL(LF1000 ■)에 대한 시간 경과에 따른 감염성 바이러스의 수를 보여주는 그래프이다;

도 6은 (a) *생체 내에서의* 연구 1&2 및 (b) *생체 내에서의* 연구 3에 대한 실험 계획을 도시한다;

도 7a는 48시간의 시간 과정에 걸쳐 1.5 ug의 락토페린을 비강 내로 처리한 마우스에 대한 처리되지 않은(비히클) 마우스에서 비갑개 내 OC43 바이러스 부하를 보여주는 그래프이다;

도 7b는 비강 세척액 샘플에서 TCID¬¬50 검정을 사용하여 MRC-5 세포에서 측정된 OC43 감염성 바이러스를 보여주는 그래프이다;

도 8a는 48시간의 시간 과정에 걸쳐 1.5 ug의 락토페린을 비강 내로 처리한 마우스에 대한 처리되지 않은(비히클) 마우스의 비갑개 내 OC43 바이러스 부하를 보여주는 그래프이다;

도 8b는 비강 세척액 샘플에서 TCID¬¬50 검정을 사용하여 MRC-5 세포에서 측정된 OC43 감염성 바이러스를 보

여주는 그래프이다;

도 9는 qPCR에 의해 평가된 바와 같이 비히클과 락토페린 처리 마우스 사이의 a) IFN-β 및 b) IFN-λ2/3 수준을 보여주는 그래프이다;

도 10은 감염 당시 그리고 그 후 매일 2회 150 ug의 락토페린으로 처리한 마우스에 대한 처리되지 않은(비히클) 마우스의 비갑개 및 BAL 내 (a) 대식세포, (b) 호중구 및 (c) 림프구를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 전술한 바와 같이, 본 발명은, 분말 조성물 내 락토페린이 저온살균되어 분말로 가공되었음에도 불구하고 생물학적 활성의 대부분을 유지한다는 점에서 독특한 특성을 갖는다고 발명자들이 믿고 있는 락토페린 분말의 생산 공정을 제공한다. 상기 공정은 천연 락토페린 함유 물질로부터 락토페린을 추출하고, 추출된 락토페린을 농축하여 추출된 락토페린이 락토페린 함유 물질에 있을 때와 비교하여 (아래에 설명된 이것의 생물학적 및 기능적 특성 뿐만 아니라 이것의 회수율%이 실질적으로 유지되는, 분말 내 락토페린에 의해 입증된 바와 같이) 개선된 안정성을 갖는 액체 농축물을 생산하는 단계를 포함한다. 그 다음, 액체 농축물을 저온살균하기에 유효한 온도로 그리고 시간 동안 가열하여 저온살균한 다음, 저온살균된 액체 농축물을 변성되지 않는 조건 하에 건조시켜서, 실질적으로 모든 락토페린이 천연 락토페린인 락토페린 분말을 생산한다.

[0035] 그렇게 생산된 락토페린 분말은 천연 락토페린의 비율이 높기 때문에, 다른 많은 락토페린 함유 분말에 비해 개선된 생물학적 활성을 갖는다. 락토페린 분말의 기능적 특성(예를 들어, 이것의 용해도, 혼합성, 특정 입자 크기 속성 및 형태 등으로 인해)도 또한 유리하다. 본 발명의 공정은 또한, 저온살균 후에 락토페린 추출이 일어나는 공정과 비교할 때, 개선된 수율의 천연 락토페린을 가져올 수 있다.

[0036] 본 발명은 실질적으로 모든 락토페린이 천연 락토페린인 락토페린 분말을 생산하게 한다. 천연 락토페린은 변성되지 않거나 무시할 정도로만 변화되며, 이때 락토페린 단백질은 구조를 유지하므로 생물학적 활성 및 건강 효과를 유지한다. 인식될 바와 같이, 본 발명에 따라 가공처리되는 락토페린 모두가 완전히 비변성되지 않을 수 있다. 약간의 변성은 불가피할 수 있다. 락토페린 분말은 예를 들어, 90% 초과의 천연 락토페린, 95% 초과의 천연 락토페린 또는 98% 초과의 천연 락토페린을 함유할 수 있다. 락토페린 분말은 예를 들어, 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100%의 천연 락토페린을 함유할 수 있다.

[0037] 본 발명으로 생산된 락토페린 분말은 필수적으로 락토페린으로 구성될 수 있다(즉, 소량의 불가피한 불순물, 부산물, 분해 생성물 등을 제외하고, 제품의 실재는 락토페린이다). 그러나 그러한 높은 수준의 순도는 필요하지 않을 수 있으며, 일부 실시양태에서는(예를 들어, 더 저렴한 제품이 상업적으로 매력적인 경우) 락토페린 분말에 최대 약 10% w/w의 다른 성분이 존재하는 것으로 충분할 수 있다. 그러한 기타 성분은 본 발명의 공정의 불가피한 부산물을 포함할 수 있지만, 기능적 이유로 제공되는 첨가제(예를 들어, 고결 방지제(anti-caking agent), 방부제 등)도 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명으로 생산된 락토페린 분말은 임의의 적절한 입자 크기, 또는 입자 크기 범위를 가질 수 있으며, 이는 건조 단계의 맥락에서 아래에서 더 자세히 설명될 것이다. 예로서, 본 발명에 따라 생산되고 본 발명자들이 미세 분말인 것으로 특성화한 하나의 락토페린 함유 분말은 입자 크기 분포 D50 = 38.2 마이크론 및 D90 = 72.3 마이크론을 갖는다. 본 발명에 따라 생산되고 본 발명자들이 중간 분말인 것으로 특성화한 또 다른 락토페린 함유 분말은 입자 크기 분포 D50 = 46.2 마이크론 및 D90 = 98.7 마이크론을 갖는다. 본 발명에 따라 생산되고 본 발명자들이 굵은(coarse) 분말인 것으로 특성화한 더욱 또 다른 락토페린 함유 분말은 입자 크기 분포 D50 = 56 마이크론 및 D90 = 130 마이크론을 갖는다.

[0039] 임의의 주어진 락토페린 함유 분말 샘플 내 천연 락토페린의 비율은 공개된 기법과 함께, 아래에 설명된 바와 같이 결정될 수 있다. 일반적으로 말해, 천연 락토페린 단백질은 분자량이 약 80 kDa이고 철분 포화도가 약 10-20%이며 색상은 연어 핑크색이다. 천연 락토페린 분말은 또한 이것의 공급원과 비슷한 생체 활성을 가질 것이지만, 손상된 락토페린의 생물학적 활성은 손상될 것이다.

[0040] 본 발명자들이, 락토페린 분말 내 락토페린 순도(예를 들어, 샘플 내 다른 단백질에 대한 락토페린의 순도 백분율)를 결정하는 데는 사용했지만 정량화 또는 천연(즉, 변성되지 않은) 락토페린과 변성된 형태의 락토페린을 구별하는 데 적합하지 않다고 생각하는 검정법은 Chinese GB RP-HPLC(GB 1903.17 - 2016) 방법이다. 중국으로 수입된 소 락토페린 분말을 시험하기 위해 중국 표준 관리국에서 시행한 이 방법은, 컬럼 결합 용량의 상단(upper end)에 근접한 고농도의 단백질(50 μl의 10 mg/ml 샘플 (주입당 0.5 mg))을 주입하는 것을 수반한다.

이로 인해 소 락토페린의 결정에서 몇 가지 유의한 차이가 관찰되었다.

[0041] 완성된 분말에서 (백분율로서의) 락토페린 양을 결정하기 위해 발명자들이 사용한 검정법은 Callaghan Innovation RP-HPLC 방법이며, 여기서 천연 락토페린만이 HPLC 컬럼에 결합하기 때문에 천연 락토페린이 변성 락토페린과 구별될 수 있다. Callaghan Innovation 방법은 *J. Billakanti et. el., International Dairy Journal 99 (2019) 104546*에 설명되어 있고, 이는 Aeris™ 3.6 µm WIDEPORE XB-C8 200Å 분석 LC 컬럼(부품 - 00G-4481-E0, 250 [1] 4.6 mm), C8 Security Guard Ultra Holder(부품 -AJ0-9000) 및 Security Guard Ultra Catridge(부품 - AJ0-8771)를 사용하여 수행되며, 검출은 280 nm의 파장에서 실시된다. 이 방법은 다른 프로토콜에 사용된 v/v 기반 샘플 제조보다는 샘플의 w/w 제조를 사용하며, 이는 시간이 지남에 따라 재현 가능하고 신뢰할 수 있는 결과를 제공하므로 보다 정확한 분석이 이루어지게 한다.

[0042] 본 발명자들은 그러한 검정법의 조합으로 특정 락토페린 함유 분말의 락토페린 양(즉, 회수 백분율) 및 품질(즉, 변성되지 않은 락토페린의 비율) 둘 다를 결정할 수 있음을 발견하였다. 위에서 언급한 바와 같이, 본 출원의 주체인 발명은 적어도 부분적으로 천연-락토페린 함유 분말을 적절하게 특성화하기 위해 이들 검정법 둘 다가 필요하다는 인식에 관한 것이다.

[0043] 본 발명의 주요 특징 중 하나는, 락토페린을 천연 락토페린 함유 물질로부터 추출하고 농축한 후에만 저온살균을 실시한다는 점이다. 액체 농축물 내 락토페린은 이것이 천연 락토페린 함유 물질에 있을 때와 비교하여 개선된 안정성을 가져서, 제품을 저온살균하기 위해 적용해야 하는 온도로 인한 변성에는 덜 민감하다. 규제(및 안전) 요건을 충족하려면 저온살균 조건(최소 온도, 시간 등)을 충족해야 하지만, 본 발명에서는 적용된 열에 대한 락토페린의 안정성이, 락토페린이 천연 락토페린 함유 물질에 함유되어 있는 동안 저온살균을 실시했을 경우보다 더 높다. 이러한 방식으로, 액체 농축물 내 실질적으로 모든 락토페린은 천연 형태로 유지될 수 있다. 대조적으로, 예를 들어, 우유를 저온살균하면 우유에 함유된 천연 락토페린이 최대 25%까지 변성되어, 초기의 락토페린 회수율은 그에 상응하여 감소한다.

[0044] 본 발명의 맥락에서, "개선된 안정성을 갖는 락토페린" 등의 특징은 액체 농축물 내 락토페린의 안정성이 천연 락토페린 함유 물질 내 락토페린의 안정성보다 큼을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 일상적인 시험(아래에 설명된 시험을 포함함)을 사용하여 상이한 담체 내 락토페린의 상대적인 안정성을 평가할 수 있다.

[0045] 락토페린은, 본원에 설명된 방식으로 보호되지 않는 한, (예를 들어, pH 변화로 인해 변성이 발생하기 때문에) 열적 및 화학적 분해 중 하나 또는 둘 다를 겪을 수 있다. 액체 농축물 내 락토페린을 불안정화시키는 종이 없기 때문에 락토페린은 개선된 열 안정성을 가질 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 액체 농축물 내 락토페린을 안정화시키는 종이 존재하기 때문에 락토페린은 개선된 열 안정성을 가질 수 있다.

[0046] 전술한 바와 같이, 유청 및 우유와 같은 유제품에서 전형적으로 발견되는 종은 카제인 및 유청 단백질과 같은 단백질, 당(예를 들어, 유당), 지방(예를 들어, 지질다당류), 및 칼슘 및 마그네슘 이온과 같은 이온 종을 포함한다. 이들 종 중 어느 것 또는 전부는 직접적으로(예를 들어, 변성시키거나, 그렇지 않으면 가열 시 락토페린과 반응함으로써) 또는 간접적으로(예를 들어, 더 높은 온도에서 락토페린을 불안정화시키는 pH 변화를 야기함으로써) 락토페린의 상대적인 열 안정성 부족에 기여할 수 있다. 천연 락토페린 함유 물질의 매트릭스로부터 락토페린을 단리하면 임의의 그러한 유해한 상호 작용이 발생하는 것이 방지된다(또는 적어도 감소된다).

[0047] 락토페린 함유 액체 농축물은, 이것이 가열됨에 따라 락토페린을 안정화시키는 데 도움을 줄 수 있는 추가 종을 포함할 수 있다. 그러한 종은 락토페린 분말의 최종 용도에 적합해야 할 것이고(예를 들어, 식품 등과 적합한 GRAS임), 그렇지 않으면 본 발명의 성능에 유해하게 영향을 미치지 않아야 할 것이다. 이들 종은 액체 농축물에 첨가될 수 있거나, 농축물(예를 들어, 용출액)에 이미 존재할 수 있다.

[0048] 일부 실시양태에서, 액체 농축물은 예를 들어, pH 조절제, 안정화 미네랄 및 용해된 기체 중 하나 이상과 같은 가공 보조제를 포함할 수 있다. 그러한 종은 운반 액체/기체를 통해 액체 농축물에 첨가되거나, 이것들의 현재 형태의 사전 저온살균에 직접 첨가될 수 있다.

[0049] 액체 농축물의 전도도(이는 전류를 통과시키거나 운반하는 농축물의 능력의 척도임)는 예를 들어, 농축물 내 염화나트륨, 또는 도시 상수도에서 발견되는 것들과 같은 미네랄의 양을 조작하여 조정될 수 있다. 본 발명은 저온살균 전에 락토페린 농축물을 더 안정화시키기 위해 전도도를 제어함으로써 락토페린의 고유한 측면을 유지할 수 있다. 액체 농축물은 RO 물일 수 있지만, 미네랄 함량이 낮은 물(예를 들어, 도시 물)은 공정에 유해한 영향을 미치지 않을 수 있으며 공정의 전체 비용을 줄이는 데 도움이 될 수 있다. 실제로, 낮은 수준의 미네랄을 함유하는 물은 락토페린을 더 안정화시키는 역할을 할 수도 있다.

[0050] 액체 농축물의 pH는 원치 않는 오염 물질의 생성을 방지하는 방식으로 또는 수입국 요건이나 고객 사양을 충족시키기 위해 제어될 수 있다. 일반적으로 말해, 예를 들어, 규제 요건을 준수하기 위해서는 락토페린의 pH는 5.2 내지 7.2의 범위를 준수해야 한다. 액체 농축물의 pH 조정은 두 가지 경우에, 첫 번째는 저온살균을 위해 락토페린을 안정화시키기 위해, 또는 두 번째는 표준에 대한 최종 적합성을 보장하기 위해 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명자들은 아포(apo)-락토페린(비-철분 결합)이 훨씬 더 안정한 홀로(holo)-락토페린(철분 결합)보다 더 쉽게 손상된다는 점에 주목한다. 따라서, 홀로-락토페린의 형성을 지지하는 액체 농축물 내 조건이 락토페린의 내열성을 개선할 수 있다.

[0052] pH를 낮추기 위해 특정 산을 사용하는 것이 변성의 영향을 줄이는 데 도움이 될 수 있으므로 적절할 수 있다. 그러나, 그렇게 하면 오염 물질 수준이 증가하거나 농축물에서의 감각적 특성에 부정적인 영향을 미칠 수 있으며, 이는 바람직하지 않고 일부 시장에서의 락토페린 함유 제품에는 허용되지 않을 수 있다.

[0053] 중탄산나트륨(또는 기타 중탄산염)을 사용하면 또한 가능하게는 중탄산염 이온과 락토페린 분자의 C 및 N 로브(lobe)에 있는 철분 결합 부위 사이의 상호 작용 때문에 저온살균 중에 락토페린을 안정화시키는 것으로 나타났다. 이는 또한 식품/첨가물에 필요한 pH 5.2 내지 7.2(바람직하게는 5.7)에 있도록 최종 제품의 pH를 관리하는 데 도움이 될 수 있다.

[0054] 임의의 특정 종이 본 발명의 방법에 사용될 수 있는지 여부를 결정하는 것은 본원에 개시된 정보와 일상적인 시험 및 실험만을 사용하여 당업자의 능력 내에 있다.

[0055] 위에서 언급한 바와 같이, 규제 요건을 충족하기 위해 공정 중에 추가 성분을 첨가해야 할 수도 있다. 예를 들어, 식품은 5.2 초과의 pH를 가져야 하며, 일부 실시양태에서는 본 발명의 최종 제품이 규정을 준수하도록 저온살균 후 pH 조정제를 첨가하는 것이 필요할 수 있다. 본원에 포함된 교시 및 단지 일상적인 시험을 사용하여 그러한 추가 성분에 대한 필요성을 결정하고 선택하는 것은 당업자의 능력 내에 있다.

[0056] 본 발명자들은 또한 동일한 효과를 성취하기 위해 추가 성분을 첨가하는 대신 추가 가공처리 단계가 사용될 수 있음에 주목한다. 예를 들어, 음이온 교환이 샘플의 pH를 조정하는 데 사용될 수 있으며, 때로는 샘플의 pH를 조정하기 위해 추가 물질을 첨가하는 대신 음이온 교환을 수행하는 것이 유리할 수 있다.

[0057] 락토페린은 임의의 천연 락토페린 함유 물질로부터 추출될 수 있다. 전형적으로, 천연 락토페린 함유 물질은 우유이고, 이는 풍부하게 공급되며 임의의 가공 보조제(예를 들어, 치즈 제조 공정에서 추출한 유청의 경우일 것임)로 오염되지 않는다. 지방 함유 물질이 이온 교환 공정의 락토페린 결합 능력에 부정적인 영향을 미칠 수 있기 때문에, 탈지유가 선호된다. 지방 수준은 이상적으로 0.1% 미만으로 유지되어야 한다.

[0058] 천연 락토페린 함유 물질이 탈지유인 실시양태에서, 탈지유는 고온 보울 지방 분리(hot bowl fat separation)의 고온을 기피하는 공정인 저온 보울 지방 분리 공정을 사용하여 생산될 수 있다. 그러한 온도는 약 50℃(저온살균 온도보다 훨씬 더 낮음)에 불과하지만, 락토페린 단백질의 일부라도 손상되지 않도록 우유 매트릭스에 남아 있는 락토페린을 조금이라도 가열하는 것을 기피하는 것이 가장 좋을 수 있다. 또한, 저온에서 박테리아 성장이 더 낮아서, 이는 고온 보울에서의 분리에 비해 개선된 우유 품질을 제공한다.

[0059] 본 발명에서는 천연 락토페린 함유 물질로부터 락토페린을 추출한다. 본 발명의 결과와 양립할 수 있다면, 임의의 적합한 추출 기법이 이 단계에 사용될 수 있다. 하나의 적합한 기법은, 락토페린을 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 천연 락토페린 함유 물질로부터 추출하는 것이다.

[0060] 일반적으로 말해, 이온 교환 크로마토그래피는 천연 락토페린 함유 물질(예를 들어, 탈지유)을 컬럼에 통과시키는 것을 포함한다. 락토페린은 컬럼에 결합하여 컬럼에 보유되는 반면, 우유 매트릭스의 나머지 성분은 컬럼을 통과한다. 보유된 락토페린은 이후 염화나트륨 용출액과 같은 상이한 용매를 사용하여 용출될 수 있다. 특정 실시양태에서, 그러한 공정은 설포네이트(SP) 강 양이온 교환 기로 변형된 큰, 가교결합된 아가로스 비드(100-300 μm)로 구성된 SP Sepharose Big Bead 수지를 활용할 수 있다. 이 공정 동안, 양으로 하전된 락토페린이 음으로 하전된 수지에 결합한다.

[0061] 본 발명에서는, 추출된 락토페린을 농축하여, 락토페린이 개선된 열 안정성을 갖는 액체 농축물을 생산한다. 또한, 본 발명의 결과와 양립할 수 있다면, 임의의 적합한 기술이 이 단계에 사용될 수 있다. 락토페린을 농축하기에 적합한 하나의 기법은 한외여과이다.

[0062] 일반적으로 말해, 한외여과는 다른 오염 물질(예를 들어, 추출 단계로부터의 용출액)을 제거하는 동시에, 선택한 액체 담체(예를 들어, RO 물) 내 락토페린을 농축하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 특정 분자량(10-

50 kDa 초과)을 갖는 단백질을 보유하도록 설계된 한외여과 막 필터 매체를 사용하여 락토페린을 농축한다.

[0063] 저온살균 전 액체 농축물 내 락토페린의 양은 예를 들어, 약 9 내지 12 wt%(예를 들어, 약 11% 고형물)일 수 있다. 락토페린의 이 양은, 락토페린의 범위가 6 내지 8 wt%일 수 있는 기존 공정에 종종 존재하는 것보다 높다. 유리하게는, 본 발명의 공정에서 이것이 일어날 때 재농축하면 농축물 내 락토페린의 비율이 더 높아지며, 본 발명자들은 (예를 들어, 분무 건조에 의해) 농축물을 건조시켜서, 또 다른 추가적인 농축 공정을 첨가하지 않고도 더 나은 입자 크기 유연성을 갖는 분말을 생산할 수 있음을 발견하였다.

[0064] 본 발명에서, 액체 농축물은 저온살균하기에 유효한 온도까지 그리고 시간 동안 가열하여 저온살균된다. 저온살균은 잘 실행되는 기법이며, 주어진 샘플에 대한 적절한 저온살균 조건은 당업자에 의해 쉽게 확인될 수 있다. 유효한 저온살균은 락토페린 함유 액체 농축물을 최소 15초의 시간 동안 최소 온도 72℃로 가열하여 성취될 수 있다. 다른 형태의 저온살균이 당업계에 알려져 있고, 본 발명의 유리한 효과가 그러한 경우에도 적용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0065] 마지막으로, 변성되지 않는 조건 하에서 저온살균된 액체 농축물을 건조시켜서, 실질적으로 모든 락토페린이 천연 락토페린인 락토페린 분말을 생산한다. 기존 건조 기법은 동결 건조 및 분무 건조를 포함하는데, 이때 분무 건조가 일반적으로 비교적 균일한 입자 크기를 갖는 입자를 생산하는 데 더 좋으며, 때로는 동결 건조를 사용한 경우에서와 같이 제품을 분쇄할 필요가 보통은 없기 때문에, 본 발명에서는 분무 건조가 바람직하다. 동결 건조 분말은 때로는 기능성이 부족할 수도 있고, 예를 들어, 이것들은 입자 크기가 더 굵고 우유 분말에 쉽게 블렌딩되지 않을 수 있다.

[0066] 임의의 적합한 분무 건조 기법 및 장치가 사용될 수 있다. 전형적으로, 분무 건조 장치에서는 노즐 크기, 입구 및 출구 온도, 및 체류 시간을 포함한 매개변수를 조작할 수 있고, 상기 매개변수 모두는 원하는 물리적 특성을 갖는 분말을 생산하도록 조정될 수 있다. 본 발명자들은, 생성된 분말의 물리적 특성이 또한 이것의 수성 액체와의 혼합성 및 유동성과 같은 기능적 특성에 직접적으로 영향을 미침에 주목한다.

[0067] 다단계 분무 건조는, 다른 이점 중에서, 더 낮은 노즐 온도가 락토페린 분말의 분무 및 건조에 적용될 수 있게 하기 때문에, 본 발명에 유리하게 사용될 수 있다. 전술한 바와 같이, 락토페린이 비교적 더 높은 온도에 노출되는 시간이 짧을수록 좋다.

[0068] 예를 들어, 단일 단계 건조기를 사용하면 출구 온도가 출구 분말 온도를 결정한다. 그러나, 다단계 건조기에는 2차 가열/냉각을 사용하여 출구 분말 온도를 조작하는 능력이 있다(2차 온도 조작은 유동층을 통해 성취된다 - 유동층에는 자체 가열 및 냉각원이 있다). 2차 건조 시스템은, 이 2차 건조 시스템이 더 낮은 온도에서 건조를 보충하고 완료하여 락토페린의 구조를 보존할 수 있기 때문에, 출구에서 덜 공격적인 건조 온도를 허용한다. 본 발명자들은, 그러한 분무 건조가 분말 내 락토페린의 개선된 건강 효과/기능적 이점에도 기여할 수 있으며, 본 발명의 공정에서의 모든 단계의 누적 영향으로 개선된 기능적 락토페린을 갖는 분말이 얻어질 수 있음에 주목한다.

[0069] 락토페린을 변성시키지 않고 원하는 기능적 특성을 갖는 분말을 생산하기 위해 분무 건조기의 다양한 매개변수를 조정하는 것은 당업자의 능력 내에 있다. 이와 관련하여 본 발명자들에 의해 실시된 두 가지 시도의 구체적인 예가 아래에 설명될 것이다.

[0070] 노즐 크기 시험

[0071] 본 발명자들은 다양한 노즐 크기, 목표로 하는 노즐 압력 및 다단계 분무 건조기의 사용을 조합하면 특정의 그리고 독특한 입자 크기 분포를 갖는 락토페린 분말을 생산할 수 있음을 발견하였다.

[0072] 아래에 설명된 바와 같이, 두 가지의 예시적인 입자 크기 분포를 목표로 하였고, 이것의 각각은 완성된 제품에서 특정의 기능적 특성, 즉 혼합성(분말 및/또는 수성) 및 분말 유동성과 관련되어 있다. 분무 건조기 작동의 특정 요소는 하기를 포함하여 다양하였다: (1) 분무 노즐 소용돌이 챔버 및 오리피스 크기 조합; (2) 주 챔버의 입구 및 출구 온도; (3) 노즐 압력; (4) 공정에서 미세한 미립자가 재진입되는 지점에 따라 부분적으로 결정되는 응집도; 및 (5) 공급 스트림 내 고형물 농도.

[0073] 이들 노즐 크기 시험 중에, 분말 성능 시험은 실시간으로 수행되었고, 유리한 입자 크기 분포(즉, 아래에 설명된 대로 더 미세한 그리고 더 굵은 변형예(variant))를 성취하기 위해 매개변수가 실시간으로 조정되었다. 이를 통해 시험 중에 실행 조건을 수정할 수 있으므로, 공정이 즉시 확인된다.

[0074] 시험 결과 두 가지 주요 변형예, 즉 더 미세한 분말 및 더 굵은 변형예가 생산되었다. 더 미세한 분말은 대략

35 - 40 μm의 D_{50} 값 및 대략 50 - 55 μm의 d_{90} 값으로 특성화되는 반면, 더 굵은 변형예는 대략 50 - 60 μm의 D_{50} 값 및 125 - 130 μm의 D_{90} 값으로 특성화된다. 분말에 요구되는 목표로 하는 수성 혼합성 및 분말 유동성 특성이 성취되었다.

0.34 노즐 - 미세한 분말 0.58 노즐 - 굵은 분말	0.58 노즐 - 굵은 분말 0.34 노즐 - 미세한 분말
건조기 입구에서 공기 온도는 대략 180-190° C를 목표로 한다. 락토페린 농축물은 이러한 높은 온도에 도달하지 않지만, 대신 짧은 체류 시간(< 2분) 동안 건조에 노출되며, 이 경우 분말 온도는 전형적으로 65° C에서 유지되고 결코 75° C를 초과하지 않는다. 공정의 출구 온도는 40° C 미만이다. 분무 건조 중 노즐 압력은 대략 150~160bar로 더 미세한 입자 크기를 생성한다. 변형예는 일반적으로 0.34 THOU(1/1000 인치)의 더 작은 노즐 오리피스 크기를 사용한다.	건조기 입구에서 공기 온도는 대략 175-185° C를 목표로 한다. 락토페린 농축물은 이러한 높은 온도에 도달하지 않고 대신 짧은 체류 시간(< 2분) 동안 건조에 노출된다. 분말 온도는 전형적으로 65° C에서 유지되며 결코 75° C를 초과하지 않는다. 공정의 출구 온도는 40° C 미만이다. 분말 체류 시간은 일반적으로 농축물 공급 유량에서의 변화에 따라 유지된다. 분무 건조 중 노즐 압력은 대략 100~110bar로, 더 큰 입자 크기를 생성한다. 변형예는 더 큰 노즐 오리피스 크기, 일반적으로 0.55 THOU를 활용한다.

[0075]

[0076] 다단계 분무 건조기

[0077] 다단계 분무 건조기(MSD)를 사용하면 하기 3 단계를 통해 가열된 공기를 경유하여 물을 제거함으로써 락토페린 분말의 기본 구조를 보존하는 데 크게 도움이 될 수 있다; (1) 주 건조 챔버; (2) 정적 유동층 및 (3) 진동 유동층. 단일 단계 건조기와 달리, MSD는 1 단계 이후 2 단계 및 3 단계 공정을 통해 추가 수분이 제거될 수 있게 한다. 이들 공정을 통해 수분 활성도가 이미 감소한 더 낮은 온도에서 추가로 수분이 제거될 수 있고, 락토페린은 더 높은 온도에서 손상되기 쉽다. 정적 유동층(2 단계) 온도는 결코 75℃를 초과하지 않는다.

[0078] MSD와 달리, 단일 단계 건조기를 활용할 때는 건조 온도 프로파일을 매치할 수는 없다. 단일 단계 건조기는 유사한 결과를 얻기 위해 더 높은 건조 온도나 더 긴 머무름 시간을 활용해야 한다. 이로 인해 단일 단계 건조기를 활용할 때는 열에 대한 노출이 증가하고, 락토페린 분말의 기본 구조에 대한 손상이 증가한다.

[0079] 락토페린 농축물 시험에서 고형물 백분율

[0080] 분무 건조기로의, 더 낮은 고형물 농도를 갖는 공급 스트림을 또한 시험하였다. 상류 한외여과 플랜트에서 락토페린 농축물을 10-12% 고형물로 농축한 후, 저온살균하여 분무 건조기에 공급하였다.

[0081] 수정된 가열 프로파일 및 분무 패턴을 공급 스트림에 적용하여, 락토페린 정량화를 개선하면서 위에서 정의된 혼합성과 유동성, 및 입자 크기 분포를 유지할 수 있었다. 전형적으로, 공급 스트림의 고형물 백분율을 낮추면 분말의 입자 크기 분포에 영향을 주어, 평균 입자 크기가 감소하고 입자 크기 분포의 크기가 아래로 이동할 것이다. 분무 건조가 공급 스트림 고형물 백분율을 낮출 때 입자 크기 분포를 유지하기 위해, (1) 노즐 소용돌이 챔버; (2) 노즐 오리피스 크기; 및 (3) 노즐 압력을 포함한 기타 공정 매개변수를 조작하면 락토페린 회수율이 증가하는 것으로 나타났다.

[0082] 저온살균 및 분무 건조는 동일한 고형물 농도, 즉 10 - 12%에서 완료되었다. 대조적으로, 본 발명자들이 알고

있는 선행 기술의 공정은 전형적으로 더 낮은 고형물(7-8%)에서 저온살균하고, 증발 농축 기법을 적용한 다음, 더 높은 백분율의 고형물에서 분무 건조한다. 이는 공개된 문헌에서의 교시와 일치하여 더 높은 회수 백분율이 성취될 수 있게 하지만, 회수된 락토페린의 구조적 및 생물학적 기능성에 대해 전술한 불리한 결과도 얻어지게 한다. 따라서, 다른 공정이 더 낮은 고형물 농도에서 저온살균함으로써 본 발명의 공정보다 더 큰 락토페린 회수를 성취할 수 있는 반면, 본 발명은 농축물을 건조하기 전에 더 높은 백분율의 고형물을 사용함으로써 동일한 회수 백분율을 가능하게 할 수 있다.

[0083] 본 발명의 공정(10)의 특정 실시양태가 이제 도 1에 도시된 흐름도를 참고하여 상세히 설명될 것이다.

[0084] **1) 현장으로 - 우유 배달/취급**

[0085] 이중 스킨의 로드 탱커(double skinned road tanker)를 사용하여 농장에서 전유를 수집한다. 픽업 시점에 우유 온도가 규제 요건을 충족하는지 확인한다. 우유를 현장으로 배달하고, 하역하고, 냉장 사일로(silo)에서 < 섭씨 5도의 온도로 보관한다. 현장에 도착한 후 24-48시간 이내에 가공처리되도록 우유의 수명을 모니터링한다. 우유 온도를 모니터링하고, 배달되는 각 탱커 적재물에 대한 우유의 산도 수준을 시험하여 우유 품질을 관리한다.

[0086] **2) 지방 분리(저온 보울 스키밍) 12**

[0087] 우유 분리는 우유 처리 플랜트에서 중요한 공정이다. 이 단계에서, 전유를 추가 가공처리를 위해 크림 부분 및 탈지 부분으로 분리한다. 전통적인 분리는 분리 가공처리 중에 우유를 50℃까지 가열해야 하는 고온 보울 밀폐 분리기의 사용을 수반하며, 이는 박테리아 성장을 촉진한다. 그러나, 본 발명의 공정에서는 24-26℃의 온도에서 탈지 부분으로부터 크림을 효과적으로 분리할 수 있어서, 우유 품질이 유지되고 가공처리 중 박테리아 성장을 최소화할 수 있는 저온 보울 분리 기술을 선호한다.

[0088] **3) 탈지 전처리(정화/여과)**

[0089] 지방 함량이 < 0.1%인 탈지유를 락토페린 공정으로 옮기고, 여기서 정화 및 여과를 겪는다. 가공처리 중에 탈지유의 박테리아 부하를 줄이도록 설계된 공정인 GEA Bacterial Removal System(BRS)을 활용하여 정화를 수행한다. 우려되는 박테리아는, 최대 128℃의 내열성과 동시에 내한성이 있어서 상류 공정에 대한 우유의 유통기한에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 *바실러스 세레우스*(*Bacillus cereus*)와 같은 포자 형성균을 포함한다. 컬럼에서의 이온 교환(즉, 락토페린 제거) 공정 전에 과도한 지방 및 기타 불순물이 제거되도록 우유를 또한 여과한다.

[0090] **4) 이온 교환 공정 14**

[0091] 탈지유가 특정 SP Sepharose Big Bead 수지를 함유하는 컬럼(홀딩 용기(Holding Vessel))을 통과하는 이온 교환 공정을 통해 탈지유로부터 락토페린의 추출을 수행한다. 상기 수지는 설포네이트(SP) 강 양이온 교환 기를 사용하여 변형된 큰, 가교결합된 아가로스 비드(100-300 μm)로 구성된다. 이는 산업용으로 설계되고, 기본 매트릭스의 큰 입자 크기 및 물리적 안정성으로 인해 상기 수지가 대량의 상업적 추출 공정에 활용될 수 있다. 상기 수지의 이온 교환 능력은 용출 공정을 통한 수집을 위해 탈지유로부터의 락토페린에 결합한다. 이온 교환 공정은 로딩 효율이 93% 미만으로 떨어질 때까지 컬럼에 락토페린을 로딩해야 하는 배치(batch) 공정이다. 이 단계에서, 동시 용출 공정을 사용하여 락토페린을 추출한다.

[0092] **5) 용출액 수집 및 보관**

[0093] 컬럼 로딩 공정이 완료되면, 특별히 준비된 완충액을 사용하여 락토페린을 수지에서 씻어내며, 이는 2 단계 용출 공정이다. 용출 공정의 첫 번째 부분에서는 대부분 락토페록시다제로 구성되는 바람직하지 않은 단백질 불순물을 제거하도록 설계되는 더 낮은 완충액 농도를 사용하지만, 이 시점에서 유청 단백질 및 미네랄과 같은 기타 불순물도 제거될 것이다. 용출 공정의 2 단계에서는 더 높은 완충액 강도를 사용하여 세파로스 빅 비드에서 락토페린을 제거하고, 추가 가공처리를 위해 보관 용기에 수집한다. 불순물이 제거되도록 완충액 전도도 수준이 제어되며, 이는 락토페린 제품의 최종 효능 수준(즉, 함량 및 순도)에 영향을 미친다.

[0094] **6) 한외여과 16**

[0095] 다수 용출액의 축적이 한외여과 공정의 전제조건이다. 공정에서의 이 단계는 락토페린 용액에서 원하는 전도도 수준에 도달할 때까지 락토페린에서 완충액 시약을 제거하도록 특별히 설계된다. 이는 나트륨, 염화물, 질산염과 같은 불순물을 제거하도록 설계된다. 그 다음, 저온살균을 위한 제품의 최종 농도를 성취하기 위해 여과 공정을 계속할 것이다. 이 단계의 완료 시, 천연 락토페린 구조를 유지하기 위해 농축물의 총 고형물 및 pH를 세

심하게 관리한다. 공정 수(process water)를 사용하여 총 고형물 및 pH를 조정할 수 있고, 이 시점에서 농축물이 필요한 허용 수준 내에 있도록 하기 위해 다른 pH 조정용 첨가제를 사용할 수 있다.

[0096] **7) 저온살균 18**

[0097] 호주 규정(호주 및 뉴질랜드 식품 표준)에 따라 식품 안전 요건이 성취되도록 하기 위해 저온살균을 특별히 설계한다. 전술한 바와 같이, 저온살균 단계는 락토페린 단백질의 원래 상태를 유지하는 데 중요한 단계이며, 락토페린 농축물에 대한 온도 노출로 인한 손상 효과를 최소화하도록 설계된다. 농축물은 최소 15초 동안 72℃까지 가열되어야 하며, 상기 공정은 가열 매체와 제품 온도 간의 최소 온도 차이를 유지하면서 최소 규제 요건을 성취할 수 있도록 조작될 수 있다. 이 단계 직후에 락토페린 농축물을 냉각하면 락토페린의 생체 활성 수준을 유지하는 데 도움이 될 수 있다.

[0098] **8) 농축물 보관**

[0099] 저온살균 후, 유동층 분무 건조기를 통해 가공처리하기에 충분한 양을 축적하기 위해 농축물을 5℃ 미만에서 보관한다. 총 고형물 및 pH가, 천연 락토페린 생산을 최대화하는 데 필요한 엄격한 한계까지 유지되도록 하기 위해, 이 공정 중에 농축물에 대한 지속적인 모니터링이 일어난다.

[0100] **9) 분무건조 20**

[0101] 저온살균된 락토페린 농축물은, 기존의 분무 건조 공정보다 낮은 온도에서 락토페린을 부드럽게 건조시키는 다단계 분무 건조 공정을 통해 가공처리된다. 건조 공정의 첫 번째 단계는, 분말 입자를 형성하는 농축물에서 대부분의 수분을 줄이도록 설계된다. 건조 공정의 이 부분은 기류, 공기 온도 및 농축물 노즐 압력을 사용하여 특별히 제어되어, 고객 요구 및 사양을 충족하도록 특별히 설계된 분말 입자를 얻는다. 건조의 두 번째 단계는, 더 낮은 온도의 공기 및 공기 유량을 사용하여 락토페린 분말을 부드럽게 조절하고 단백질 매트릭스를 냉각시키는 동시에 수분 함량을 원하는 수준으로 부드럽게 조정하는 건조 유동층으로 구성된다. 그 다음, 제품은 진동체(vibrating sifter)를 통과하여, 포장하기 전에 더 큰 입자/이물질이 제거되게 한다.

[0102] **10) 포장**

[0103] 공정의 마지막 단계는 특별히 설계된 무거운 호일 파우치에 락토페린 분말을 분배하는 작업을 포함한다. 제품의 긴 유통기한 동안 락토페린 제품의 무결성의 유지를 보장할 수 있도록 우수한 차단 특성을 갖게 하기 위해 포장 재료를 신중히 선택하였다. 포장 형식은 전형적으로 5 kg이다. 그러나, 이는 고객의 요구사항에 따라 달라질 수 있다.

[0104] 본 발명은 또한 전술한 공정으로 생산된 락토페린 분말 뿐만 아니라, 상기 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 식품을 제공한다. 이들 제품의 적용은 하기를 포함한다:

[0105] · 영유아, 영유아 이후 및 유아 영양

[0106] · 등재, 평가 및 등록된 치료 제품 및 의약품(예를 들어, 캡슐, 정제, 비강 스프레이)

[0107] · 식이 보충제

[0108] · 성인 영양

[0109] · 스포츠 영양

[0110] · 유제품(음료, 요구르트 및 분말)

[0111] · 기능성 식품

[0112] · 영양제 및 기능식품

[0113] 전술한 공정으로 생산된 락토페린 분말의 물리적 특성은 하기를 포함한다:

[0114] · 더 작고 더 균일한 락토페린 입자를 통해 개선된 블렌딩 및 용해도 결과를 얻을 수 있다.

[0115] · 분무 건조된 락토페린은, 더 가볍고(lighter), 더 가벼운(fluffier) 입자 및 낮은 광산란 효과와 함께, 모양이 더 균일하다.

[0116] · 고객의 요구 및 원하는 크기에 따라 유동성이 달라질 수 있다.

[0117] · 중성/부드러운 맛 및 고결되지 않음

[0118] · 열에 민감함

[0119] · 분무 건조된 락토페린 색상(즉, 연한 핑크색)은, 이것의 색상이 기본 분말과 더 잘 "블렌딩"되기 때문에, 동결 건조 락토페린에 비해 건식 블렌딩에 더 적합하다.

[0120] 전술한 바와 같이, 본 발명자들은 전술한 높은 기능성 및 생물학적 활성의 락토페린 분말이 치료 활성을 가짐을 발견하였다. 아래에 설명된 실험은, 본 발명에 따라 생산된 락토페린 분말이 바이러스 복제에 대한 억제 효과를 가지며, *생체 내에서* 면역 반응을 자극할 수 있음을 입증하며, 본 발명자들은 이들 실험의 결과가 본원에 개시된 치료적 적용의 합리적인 예측을 가능하게 함을 믿는다. 실제로, 락토페린은 SARS-CoV-2 바이러스에 의해 유발되는 질환인 코로나19를 포함한 바이러스 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 잠재적인 치료제로 제시되어 왔으며, 본 발명자들은 전술한 유리한 생물학적 및 기능적 특성을 고려할 때, 본 발명에 따라 생산된 락토페린 분말을 사용하면 그러한 치료 효능이 향상될 것으로 예상한다. 실제로, 본 발명은 천연 락토페린의 생물학적 활성을 실질적으로 모두 보유하며 약제학적 적용에 제제화하기 위한 유익한 기능적 특성(예를 들어, 혼합 특성, 용해도 등)을 갖는 분말 형태의 락토페린을 제공한다.

[0121] 따라서, 본 발명은 환자에서 바이러스 감염을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다. 한 가지 방법에서, 전술한 바와 같이 생산된 락토페린 분말을 포함하는 제제가 (예를 들어, 환자의 기도를 통해) 환자에게 투여될 수 있다. 또 다른 방법에서는, 전술한 바와 같이 생산된 락토페린 분말을 포함하는 제제가 환자에게 비강 투여될 수 있다.

[0122] 다른 실시양태 및 측면에서, 전술한 바와 같이 생산된 락토페린 분말을 포함하는 제제는 환자에게 경구로(예를 들어, 캡슐로) 투여될 수 있다.

[0123] 또한, 전술한 공정으로 생산된 락토페린 분말을 포함하는 비강 스프레이 뿐만 아니라, 상기 공정으로 생산된 락토페린 분말 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제 조성물이 또한 제공된다.

[0124] 본 발명자들은, 락토페린 기반의 비강 스프레이가 바이러스 감염에 대한 예방 또는 노출 후 예방 조치로서 하루 최대 4회까지 사용될 수 있음을 구상한다. 락토페린은 점막 분비물에 일반적으로 존재하는 고도로 보존된 천연 단백질이라는 점을 고려할 때, 소 락토페린은 면역원성이 아닐 가능성이 높고 내약성이 우수해야 한다(유제품 알레르기가 있는 사람을 제외함). 이는, 락토페린을, 고도로 보존된 자연 발생 단백질을 기반으로 한 퍼스트인클래스(first in class) 비강 스프레이 전달 점막 범병원체 억제제로 고유하게 자리매김한다. 많은 합성 바이러스 차단 비강 스프레이가 개발되고 있지만, 이것들은 락토페린의 다발성 면역 강화 기능을 보유하지는 않는다.

[0125] 본 발명자들이 구상한 하나의 특정한 치료적 적용은, 코로나19 뿐만 아니라 감기(리노바이러스) 및 인플루엔자를 유발하는 것들과 같은 다른 바이러스 균주에 의해 발생하는 질환에 대한 잠재적인 예방 및 보조 치료제로서이다. 따라서 본 발명에 따라 생산된 락토페린이 인간 기관지 상피 세포 연구에서 그리고 인간 임상 연구에서 코로나19에 대한 반응을 개선하는지 여부를 조사함으로써 코로나19에 대한 치료제로서 유효할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 실험이 수행되었다. 이들 실험은 아래에서 설명될 것이다.

[0126] **실시예**

[0127] **실시예 1 - 락토페린 분말 생산**

[0128] 본 발명의 실시양태에 따른 락토페린 분말의 배치가 이하에서(실시예 2 참고) PnF20224 및 PnF21329로 지칭되는 방법이 이제 설명될 것이다.

[0129] 우유는 호주 빅토리아주의 Goulburn Valley에서 공급 받았다. 생우유를 분리하고, 탈지유를 가공처리를 위해 락토페린 공장으로 옮겼다. 탈지유는 보관 기간 내내 냉장 온도에서 유지한 후, 생 탈지유에서의 박테리아 부하를 줄이는 Bacterial Removal Separator(Clarifier)를 통해 가공처리한 후, 일련의 필터를 통해 임의의 남아 있는 이물질, 지방, 지용성 화합물 및 불용성 물질을 제거하였다. 이들 필터는 우유가 각 필터를 통해 가공처리됨에 따라 점점 더 미세해지며, 1 μm 필터에서 완결된다.

[0130] 탈지유가 특수화된 이온 교환 수지를 함유하는 방사상 흐름 컬럼을 통과하는 이온 교환 공정을 통해, 탈지유로부터 락토페린의 추출을 수행하였다. 상기 수지는 큰, 가교결합된 아가로스 비드(100-300 μm)로 구성되며, 산업용으로 맞춤 제작되고, 기본 매트릭스의 큰 입자 크기 및 물리적 안정성으로 인해 상기 수지가 대량의 상업적 추출 공정에 활용될 수 있게 된다. 수지의 이온 교환 능력은 용출 공정을 통한 수집을 위해 탈지유로부터의 락

토페린에 결합한다.

[0131] 결합된 락토페린은, 최고 농도가 대략 10% w/v인 점점 더 농축되는 일련의 염화나트륨 완충 용액을 사용하여 수지에서 용출된다. 락토페린 용출액은 추가 가공처리를 위해 수집되고 보관된다.

[0132] 락토페린 용출액의 한외여과 및 정용여과는 락토페린 용액에서 염화나트륨 이온을 제거하고, 용액 내 고형물을 증가시킨다.

[0133] 호주 규정(호주 및 뉴질랜드 식품 표준)에 따라 식품 안전 요건이 성취되게 하기 위해 저온살균을 특별히 설계한다. 저온살균 단계는 락토페린 농축물의 열 프로파일을 최소화하도록 설계된다. 규제 요건을 충족하기 위해, 농축물을 최소 15초 동안 72℃까지 가열해야 한다. 저온살균 직후에 락토페린 농축물을 냉각하면 락토페린의 생체 활성 수준을 유지하는 데 도움이 될 수 있다.

[0134] 그 다음, 락토페린 농축물을, 기존의 분무 건조 공정보다 낮은 온도에서 락토페린을 부드럽게 건조시키는 다단계 분무 건조 공정을 통해 가공처리하였다. 건조 공정의 첫 번째 단계는 분말 입자를 형성하는 농축물에서 대부분의 수분을 제거하도록 설계된다. 건조 공정의 이 부분은 기류, 공기 온도 및 농축물 노즐 압력을 사용하여 특별히 제어되어, 고객 요구 및 사양을 충족하도록 특별히 설계된 분말 입자를 얻는다. 건조의 두 번째 단계는, 더 낮은 온도의 공기 및 공기 유량을 사용하여 락토페린 분말을 부드럽게 조절하고 단백질 매트릭스를 냉각시키는 동시에 수분 함량을 원하는 수준으로 부드럽게 조정하는 건조 유동층으로 구성된다. 그 다음, 제품을 포장하기 전에 진동 체를 통과시킨다.

[0135] 공정의 마지막 단계는, 특별히 설계된 무거운 호일 파우치에 락토페린 분말을 분배하는 것을 포함한다. 락토페린 분말은 금속 탐지기를 통과하여 포장재에 들어가며, 이는 탁월한 차단 특성을 갖고 있어서 제품의 긴 유통기한 동안 PUREnFERRIN 제품의 무결성을 유지한다. 포장 형식은 전형적으로 5 kg이다; 그러나, 이는 고객 요구사항에 따라 달라질 수 있다.

[0136] 전술한 공정에 사용된 장비의 매개변수가 아래 표 1에 설명되어 있다.

[0137] *표 1 - 공정 매개변수*

우유 특성	측정 단위	PnF20224	PnF21329
대략. 탈지유 사용	L	5690000	925080
적정 산도	-	0.15	0.14
지방 함량	% m/v	0.08	0.07
단백질 함량	% m/v	3.80	3.60
총 고형물	% m/v	9.79	9.72
무지방 고형물(SNF)	% m/v	9.65	9.47
락토페린 컬럼	**측정 단위**	**PnF20224**	**PnF21329**
컬럼 수	-	3	3
컬럼 공급 속도	CV/min	1	1
컬럼 공급 온도	° C	50	50
출구 냉각기 온도	° C	6	6
첫 번째 완충액 전도도	mS/cm	42.5 - 43.5	42.0 - 43.0
첫 번째 완충액 부피	CV	7	7
첫 번째 완충액 유량	CV/min	0.25	0.25
첫 번째 완충액 전도도	mS/cm	≥ 102	≥ 102
두 번째 완충액 부피	CV	3	3
두 번째 완충액 유량	CV/min	0.25	0.25
한외여과(UF) 플랜트	**측정 단위**	**PnF20224**	**PnF21329**
저온살균 전 락토페린 농축물의 평균 브릭스	Bx	21.0	13.5
저온살균 전 락토페린 농축물의 평균 전도도	mS/cm	0.3	0.4
사용된 pH 조정 화학물질		수산화나트륨	해당사항 없음
pH 사전 저온살균	-	5.83 - 6.47	5.96
저온살균기	**측정 단위**	**PnF20224**	**PnF21329**
저온살균 온도	° C	73 - 75	73 - 75
저온살균 시간	초	17.5	17.5
온수 온도	° C	76 - 78	75 - 77
제품 유속	L/hr	80	80
건조기 공급 스트림 특성	**측정 단위**	**PnF20224**	**PnF21329**
브란 종 온도	° C	2.3	< 4.0
농축물의 부피	L	5451	607
농축 공급물 밀도	kg/m³	1041.9	1036.0
농축 공급물 유량	kg/hr	178.3	184.5
농축 공급물 온도	° C	49.9	49.8
고압 펌프 공급물 압력	bar	5	5
분무 건조기 작동 상태	**측정 단위**	**PnF20224**	**PnF21329**
분무 노즐 조합	소용돌이 크기/오리피스 크기	S4 / 0.34	S4 / 0.34

[0138]

주요 입구 공기 흐름	kg/hr	5146	5037
주요 입구 공기 온도	° C	175.6	189.6
출구 공기 온도	° C	91.4	98.4
노즐 압력	bar	170.8	190.6
챔버 유동층 기류	m³ /hr	240.2	252.5
챔버 유동 층 분말 온도	° C	64.9	70.7
챔버 유동 층 공기 온도	° C	68.3	79.9
유동 층 건조 기류	m³ /hr	180.0	186.0
유동 층 건조 공기 온도	° C	58.1	74.2
유동 층 냉각 기류	m³ /hr	140.0	177
유동 층 냉각 공기 온도	° C	41.9	44.1
유동 층 배출물 온도	° C	34.3	36.9
종결 목적지	-	체	체
유동층 위어(weir)	-	개방	개방

[0139]

[0140] **실시예 2 - 본 발명의 락토페린 분말과 상업적으로 입수 가능한 락토페린 분말의 비교**

[0141] 본 발명에 따라 생산된 분말 형태의 락토페린의 철분 포화 수준, 확인, 정량화 및 품질을 측정하고, 이것을 다른 상업적으로 입수 가능한 락토페린 분말과 비교하였다(표 2 참고). 양이온 교환 크로마토그래피, 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 및 질량 분석법(MS)을 사용한, 본 발명에 따라 그리고 상이한 제조업체로부터 생산된 상업용의 완성된 소 가공 락토페린 분말의 철분 포화 수준, 확인 및 정량화가 설명된다.

[0142] **1. 재료 및 방법**

[0143] **1.1. 화학물질**

[0144] 아세토니트릴(FSBA955-4), 물(FSBW6-4) Optima® LC-MS 등급, 순도 99%의 트리플루오로아세트산(FSBT/3258/PB05 -100 mL)을 포함한 HPLC 또는 분석 등급의 모든 시약 및 화학물질을 사용하였고, 트리스-염산염(#BP153-500)은 호주 Fisher Chemicals에서 구입하였다. 염화나트륨(#71380-5 kg)은 호주 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 수산화나트륨(#1.06469.1000)은 호주 Merck Millipore에서 구입하였다. 소 락토페린 표준(소 우유로부터의 락토페린 98.10%, 제품 번호: 127-04122, 로트 번호: CAG5602)은 호주 Novachem에서 구입하였다.

[0145] **1.2. 철분 및 철분 포화도 분석**

[0146] 이 방법을 사용하여 465 nm에서 흡광도 측정을 통해 락토페린의 철분 포화도 백분율을 결정한다. 100% 포화된, 10 mg/mL 락토페린 용액의 465 nm에서의 흡광도는 0.48이다. 이 사실을 토대로, 미지 용액의 Fe^{3+}, 포화도를 추정할 수 있다. A280 측정을 위해 상기 용액을 희석하여 1.00 내지 1.50의 값이 얻어지게 해야 한다. A465 및 A280에서 측정하기 전에 용액을 0.45 μm 셀룰로스 아세테이트 필터를 통해 여과해야 한다. GB 5009.268.2-2016(철) 및 LFST 01 06.03(철 포화도) 방법을 사용하여 호주 빅토리아주 노스 멜버른에 있는 Bureau Veritas Asure Quality(BVAQ) 연구소에서 분석을 수행하였다.

[0147] *표 2 - 분석된 소 락토페린 분말*

샘플 번호	샘플 설명	제조업체
1	소 락토페린 분말 - PnF20224*	호주 Noumi Limited
2	소 락토페린 분말 - PnF21329*	호주 Noumi Limited
3	소 락토페린 분말 -	미국 Leprino Nutrition
4	소 락토페린 분말	호주 Nepean River Dairy
5	소 락토페린 분말	호주 Tatura(A Bega Cheese Company)

[0148]

[0149] * = 본 발명에 따라 생산된 락토페린

[0150] **1.3. 샘플 제조**

[0151] **1.3.1. 락토페린 표준, 및 고속 성능 액체 크로마토그래피(FPLC) 및 초고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC)를 사용한 검량선의 구성**

[0152] 표준 설정을 위한 락토페린 참조 물질은 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation(일본 오사카)에서 제품 번호 # 127-04122 및 로트 번호 # CAG5602로 구입하였다. 10 mg/ml 농도를 얻기 위해 100 ml의 MQ와 함께 120 ml 용기에 1 g의 락토페린을 용해시켜서 원액(stock solution)을 제조하였다. 샘플을 Intelli 믹서(ELMI RM-2L)에서 실온에서 3.5시간 동안 부드럽게 용해시켰다. 작업용 표준 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 및 5 mg/ml을 얻기 위해 원액으로부터 작업용 락토페린 보정 표준을 제조하였다.

[0153] UHPLC 보정을 위해, 20 ml의 MQ에 200 mg의 락토페린을 용해시켜서 10 mg/ml의 농도로 원액을 제조하였다. 원액을 MQ에서 희석하여 작업용 표준을 제조하였다. 검량선에 사용된 농도는 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 및 2.5 mg/ml였다.

[0154] 각 목표에 대한 상대 반응을 사용하여 락토페린에 대한 검량선을 작성하였다.

[0155] **1.3.2. FPLC를 사용한 양이온 교환 크로마토그래피 분석을 위한 상업용 소 락토페린 분말 샘플 제조**

[0156] 50 mL Falcon 튜브에 200 mg의 분말을 정확하게 계량하여 락토페린 분말 원액(10 mg/ml)을 제조하였다. MQ 물을

최종 부피 20 mL 또는 20 g으로 상기 튜브에 첨가하였다. 각 분말은 3배로 제조하였다. 샘플을 Intelli 믹서(ELMI RM-2L)에서 실온에서 3.5시간 동안 부드럽게 용해시키고, 0.45 μm 필터를 통과시켰다. 양이온 교환 크로마토그래피(Capto HiRes 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼, Cytiva)를 사용하여 정량화하기 위해 스톡 샘플을 2 mg/ml로 희석하였다.

[0157] **1.3.3. MS 및 Callaghan Innovation RP-HPLC 분석을 위한 상업용 락토페린 분말 샘플 제조**

[0158] 50 mL Falcon 튜브에 100 mg의 분말을 정확하게 계량하여 락토페린 분말 원액(10 mg/ml)을 제조하였다. MQ 물을 최종 부피 10 mL 또는 10 g으로 상기 튜브에 첨가하였다. 각 분말을 3배로 제조하였다. 샘플을 Intelli 믹서(ELMI RM-2L)에서 실온에서 3.5시간 동안 부드럽게 용해시키고, 0.45 μm 필터를 통과시켰다.

[0159] 질량 분석법과 Callaghan Innovation RP-HPLC 분석 둘 다를 위해 스톡 샘플을 1.5 mg/ml로 희석하였다.

[0160] **1.4. 양이온 교환 크로마토그래피**

[0161] AKTA 순수 25 M2 FPLC 시스템(GE Healthcare, USA)을 사용하여 천연 락토페린 단백질의 고분해능 분리를 위해 분석용의 사전 충전된 Capto HiRes S 5/50 컬럼(#29275877, Cytiva Lifesciences)을 사용하여 실온에서 양이온 교환 크로마토그래피 실험을 수행하였다. 구배는 GE Healthcare에서 제공한 프로토콜을 따랐다. 매 실행 후에 제조업체의 지시에 따라 컬럼을 재생시켰다.

[0162] **1.5. LC/Q-TOF**

[0163] 다이오드 어레이 검출기(DAD) 및 Advanced Bio 6545XT LC/Q-TOF 기기가 장착된 Agilent Technologies UHPLC 1290 Infinity Quaternary LC 시스템을 사용하여 MS 및 MS/MS 분석을 수행하였다. Phenomenex의 Aeris™ 3.6 mm WIDEPORE XB-C8 200Å 분석 LC 컬럼(부품 - 00G-4481-E0, 250 x 4.6 mm), C8 Security Guard Ultra Holdder(부품 -AJ0-9000) 및 Security Guard Ultra Cartridges(부품 - AJ0-8771)에서 Callaghan RP-HPLC 분석을 수행하였다. Billakanti et al. 2019 (14)에 따라 두 가지 용매의 혼합물을 사용하여 구배 용출을 실시하였다. 용매 A는 물 중의 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)으로 구성되었고, 용매 B는 아세토니트릴 중의 0.1% TFA였다. 280 nm의 파장에서 검출을 실시하였다. 주입량은 20 μl로 구성되었다. 각 샘플에 대해 최소 3회의 독립적인 분석을 수행하였고, 대표적인 결과가 표시된다. 데이터 분석을 위해 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis Software 10을 사용하였다.

[0164] 샘플로부터 온전한 락토페린 단백질을 찾고 확인하기 위해 양성 전기분무 이온화 모드에서 Dual AJS ESI를 갖춘 Agilent Technologies 6545XT Advanced Bio LC/Q-TOF 기기에 20 μl를 주입하여 MS 분석을 수행하였다. 이온화 공급원 조건은 다음과 같이 설정되었다: 모세관 전압, 4.5 kV; 공급원 온도, 건조 기체 온도 250℃, 건조 기체 흐름 8 l/분, 분무 기체 압력 2 bar. 충돌 기체는 고순도 질소였다. 모든 LC-MS 측정은 3중으로 수행하였다. Agilent MassHunter BioConfirm 10 소프트웨어 및 Sequence Manager 소프트웨어를 데이터 분석에 사용하였다.

[0165] **2. 결과 및 논의**

[0166] **2.1. 철분 함량 및 철분 포화 수준**

[0167] 결과는 락토페린 분말에서 총 철분 농도 및 철분 포화 수준이 다양하였음을 보여준다(표 3). 락토페린 분말 내 철분 함량은 다음과 같았다: 105 mg/kg(Leprino Nutrition), 109 mg/kg(PnF20224), 129 mg/kg(PnF21329), 129 mg/kg(Tatura), 147 mg/kg(Nepean River Dairy), 및 180 mg/kg(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), Nepean River Dairy의 철분 함량이 가장 높은 것으로 평가되었다.

[0168] 6개의 상이한 락토페린 분말의 철분 포화도 백분율은 BVAQ 실험실에 따라 UV-Vis Spectroscopy로 측정하여 465 nm 및 280 nm에서의 광 흡수 비율을 기준으로 계산하였다. 철 포화 수준은 16% 내지 23% 범위였다(표 3). 전형적으로, 천연 형태의 락토페린은 15 내지 20%의 철분 포화도로 특성화되며, 연어 핑크색을 띤다. Noumi 및 Leprino 락토페린 분말은 모두 16%를 함유하는 한편, Tatura는 14%이고, Nepean River Dairy는 23%이고(분석된 모든 것 중 가장 높았음), FUJIFILM Wako Corporation의 락토페린 참조 물질의 철분 포화도는 19%였다.

[0169] 철 포화 수준은 완성된 락토페린 분말의 물리화학적 특성에 영향을 미치며, 이는 락토페린 기능이 이것의 정확한 3차원 구조에 달려 있기 때문에 락토페린의 기능 및 효능에 영향을 미친다. 철분 결합은 락토페린의 3차 구조에서의 변화를 촉진하고 이것의 열 안정성을 증가시키며, 천연 락토페린은 다른 형태보다 약간 더 높은 열 안정성을 나타낸다. Noumi 락토페린 분말은 천연 락토페린이라 할 수 있는 철분 포화도 16%의 연어 핑크색의 기준을 만족하기 때문에, 조금 더 높은 열안정성을 나타낼 것으로 예상될 수 있다.

[0170] 표 3 - *상업용 소 락토페린 분말의 철분 및 철분 포화 수준*

샘플 번호	샘플 설명	제조업체	국가	철분 (mg/kg)	철분 포화도 (%)
1	소 락토페린 분말 PnF20224*	Noumi Limited	호주	109	16
2	소 락토페린 분말 PnF21329*	Noumi Limited	호주	129	16
3	소 락토페린 분말	Leprino Nutrition	미국	105	16
4	소 락토페린 분말	Nepean River Dairy	호주	147	23
5	소 락토페린 분말	Tatura(A Bega Cheese Company)	호주	129	14
6	소 우유로부터의 락토페린 분말	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	일본	180	19

[0171]

[0172] * = 본 발명에 따라 생산된 락토페린

[0173] **2.2. 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 락토페린 분말 내 락토페린 정량화**

[0174] 뛰어난 피크 분해능을 제공하는 락토페린을 정량화하기 위해 고분해능의 사전 충전된 Capto HiRes S 5/50 컬럼을 선택하였다. 결과는 정확한 정량화를 위해 락토페린이 잘 분리되고 용출되었음을 보여준다. 크로마토그램을 280 nm에서 기록하였다.

[0175] 락토페린 농도를 결정하기 위해, 방법 부분에 설명된 대로 검량선을 생성하였다. 참조 락토페린은, 0.9997의 R2 값으로, 선택된 농도 범위(0.25 - 5 mg/ml)에 대해 우수한 선형 검량선을 생성하였다. 그 후, Capto HiRes S 5/50 컬럼에서 GE Healthcare에 의한 최적화된 검정 조건을 사용하여 4개의 상이한 제조업체로부터의 소 락토페린 분말을 락토페린 함량 및 순도의 정량화를 위해 분석하였다(표 4).

[0176] 통합 크로마토그램의 주요 락토페린 피크 백분율을 기반으로 단백질 순도를 결정하였다. 락토페린 분말 샘플에서 상이한 락토페린 순도 및 정량화 수준이 발견되었다(표 3). 단백질 순도는 PnF20224 및 PnF21329의 경우 각각 98.76% 및 98.58%로 계산되었고, 락토페린(Nepean River Dairy)의 경우 98.36% 그리고 락토페린(Tatura)의 경우 94.84%로 계산되었다. 락토페린 회수 백분율은 PnF20224와 PnF21329의 경우 각각 82% 및 81%였고, Nepean River Dairy의 경우 62%, 그리고 Tatura의 경우 74%였다. 락토페린 회수율에서의 차이는 다양한 락토페린 상업용 제조업체에서 사용하는 다양한 정제 공정에 기인할 수 있다.

[0177] 표 4 - *상업용 소 락토페린 분말에서 락토페린 회수 백분율*

샘플 번호	샘플 설명	제조업체	회수된 LF (%)
1	소 락토페린 분말 PnF20224	Noumi Limited	82
2	소 락토페린 분말 PnF21329	Noumi Limited	81
3	소 락토페린 분말	Leprino Nutrition	79
4	소 락토페린 분말	Nepean River Dairy	62
5	소 락토페린 분말	Tatura(A Bega Cheese Company)	74

[0178]

[0179] **2.3. 상업용 락토페린 분말 내 락토페린의 분자 질량**

[0180] 상업용 락토페린 분말에 존재하는 락토페린의 분자 질량을 확인하기 위해 Q-TOF 질량 분석기를 사용하였다. PnF20224, PnF21329, Nepean River Dairy 및 Tatura에 대한 온전한 락토페린의 분자 질량을 측정하였다. 결과는 이들 모두가 락토페린의 이론적 분자 질량과 일치하였음을 보여주었다: PnF20224는 83,194 Da였고, PnF21329는 82,853 Da였으며, Nepean River Dairy는 83,373 Da였고, Tatura는 83,984 Da였다. 질량 분석법 결과가 표 5에 나타나 있다.

[0181] 이전 연구는, 락토페린이 소의 초유와 성숙유에서 다양한 분자 질량 형태로 단리되었고, 이는 락토페린-a(분자 질량 ~84,000) 및 락토페린-b(분자 질량 ~80,000)로 지정되었음을 보여주었다. 이들 다양한 질량 형태는 다양한 우유 샘플에 자연적으로 존재하며, 상이한 형태는 적어도 부분적으로 글리코실화 정도에서의 차이로 인해 발생한다. Noumi의 락토페린 샘플(즉, 본 발명의 것들)은 둘 다 83,000 Da의 범위에 있으며, 이는 Noumi의 락토페린이 이것의 샘플 내 분자 질량 형태에 대해서 균일함을 나타낸다. Nepean River Dairy(NRD) 락토페린과 Tatura 락토페린 둘 다는 하나 초과의 분자 질량 락토페린 형태(NRD: 83,373 Da - 85,595 Da 및 Tatura: 83,984 Da - 88009 Da)를 함유하고 있으며, 이는 락토페린의 더 낮은 품질을 나타낸다.

[0182] 표 5 - *상업용 소 락토페린 분말 내 락토페린의 분자 질량*

샘플 번호	샘플 설명	제조업체	LF 분자 질량 (Da)
1	소 락토페린 분말 PnF20224	Noumi Limited	83194
2	소 락토페린 분말 PnF21329	Noumi Limited	82853
3	소 락토페린 분말	Nepean River Dairy	83373
4	소 락토페린 분말	Tatura(A Bega Cheese Company)	83984

[0183]

[0184] **2.4. Callaghan Innovation RP-HPLC 분석을 사용한 락토페린 정량화**

[0185] Callaghan Innovation RP-HPLC 분석 방법은 상업용 락토페린 제품에서 락토페린 순도 및 양을 동시에 결정하기 위해 개발되었다. 현재 실험의 경우, 검량선은 상관 계수(R^2) 값을 1로 하여 0.05 - 2.5 mg/ml의 범위에 걸쳐 선형이었다. 시험된 락토페린 분말 내 락토페린 함량을 결정하고, 표 6에 요약하였다. PnF20224의 경우 락토페린 회수율은 81.20%, PnF21329의 경우 83.00%, Nepean River Dairy의 경우 71.37%, 그리고 Tatura의 경우 81.79%였다. 락토페린 분말 내 오염된 단백질에 대한 조사는 현재 연구의 범위를 벗어나지만, Tatura 락토페린 분말은 2020년에 Lonnerdal 등에 의해 조사되었고, 그는 ~80,000 Da 주요 LF 단백질과 함께 ~25,000 Da의 작은 락토페린 단편이 확인되었음을 발견하였는데, 이는 락토페린이 생산 공정 중에 단편화되었음을 나타낸다.

[0186] 표 6 - *Callaghan RP-HPLC 분석을 사용한 상업용 소 락토페린 분말에서 락토페린 회수 백분율*

샘플 번호	샘플 설명	제조업체	회수된 LF (%)
1	소 락토페린 분말 PnF20224	Noumi Limited	81.20
2	소 락토페린 분말 PnF21329	Noumi Limited	83.00
5	소 락토페린 분말	Nepean River Dairy	71.37
6	소 락토페린 분말	Tatura(A Bega Cheese Company)	81.79

[0187]

[0188] 현재 연구에서는 Noumi Limited와 다른 두 호주 락토페린 제조업체(Nepean River Dairy 및 Tatura)의 락토페린 분말에 대해 철분 함량, 철분 포화 수준, 단백질 순도 및 정량화(양이온 교환 및 RP-HPLC)를 평가하였다. 모든 락토페린은 철 포화도, 순도 및 정량화에서 현격한 차이를 보였다. 양이온 교환 크로마토그래피 및 RP-HPLC 분석 락토페린 정량화 둘 다는, 두 가지 분석 기법 모두 락토페린 정량화를 확인하기 위해 상이한 물리화학적 특성을 연구하는 데 개별적인 이점이 있음을 보여준다. FPLC, 양이온 교환 크로마토그래피 및 RP-HPLC 결과는 락토페린 회수율에서의 차이를 보여주며, 여기서 Noumi 락토페린(즉, 본 발명에 따른)이 높은 회수율을 갖는다. 양이온 교환과 RP-HPLC 기법을 조합시키는 경우 소 락토페린으로부터 단리된 분말에 대한 더 나은 이해를 제공한다: 양이온 교환 분석은 기본 완충액 조건 하에서 락토페린의 열 유발 변화에 대한 통찰력을 제공하는 반면, RP-HPLC는 그러한 정보를 제공하지 않을 것이다(14, 21). 두 크로마토그래피 정량 분석에서는 Noumi 락토페린 분말(PnF20224 및 PnF21329)이 높은 회수율을 가지며 락토페린 단백질이 제조 조건 중에 안정하여서, 생물학적 활성 손실을 최소화하고 임상 연구, 식이 보충제 및 영양제 제조에 적합하다는 사실이 입증되었다.

[0189] **실시예 3 - 항바이러스 활성의 *시험관 내에서의* 조사**

[0190] 인간 폐 세포 연구를 수행하는 다각적인 연구 접근 방식, 후속하는 *생체 내에서의* 설치류 연구 및 인간 임상 연구는 본원에 설명된 치료 효과의 증거를 제공하는 것을 목표로 할 것이다. 달리 명시하지 않는 한, 실시예 3 및 4에서 "락토페린"에 대한 언급은 본 발명의 방법에 따라 생산된 락토페린 함유 분말 형태의 락토페린을 지칭한다.

[0191] 윤리 선언문, 기증자 모집, 및 pBEC 수집.

[0192] 1차 기관지 상피 세포(pBEC)는 서면 동의를 받아 기관지경 검사 중에 건강한 비흡연 기증자로부터 얻어서 P.A.B. Wark(The University of Newcastle)에서 제공되었다. 모든 대상체는 표준 지침에 따라 광섬유 기관지경 검사를 받았다. pBEC는 직접 관찰 하에 적용된 단일 외장 나일론 세포학 브러쉬를 사용하여 얻었다. 2세대에서 3세대 기관지까지 대략 4-8회의 브러싱이 행해졌다.

[0193] pBEC 및 조건부로 재프로그래밍된 pBEC의 공기-액체 계면 배양

[0194] 전술한 방법(Loo SL, Wark PAB, Esneau C, Nichol KS, Hsu AC, Bartlett NW. Human coronaviruses 229E and OC43 replicate and induce distinct antiviral responses in differentiated primary human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2020; 319: L926-L931)에 따라 공기-액체 계면에서의 배양 및 분화를 수행하였다. 공기-액체 계면에서 배양하기 전에, 1명의 천식 기증자로부터 얻은 pBEC를 성장시키고 합류될 때까지 분화시켰다. 건강한 환자로부터 얻은 pBEC의 경우, 이전에 공개된 프로토콜(Martinovich KM, Iosifidis T, Buckley AG, Looi K, Ling KM, Sutanto EN, Kicic-Starcevich E, Garratt LW, Shaw NC, Montgomery S, Lannigan FJ, Knight DA, Kicic A, Stick SM. Conditionally reprogrammed primary airway epithelial cells maintain morphology, lineage and disease specific functional characteristics. *Sci Rep* 2017; 7: 17971)에 따라 조사된 섬유아세포와 공동 배양하여 세포를 조건부로 재프로그래밍하였다. 분화하고 25-30일 후에, 가성중층 구조, 섬모 상피 및 점액/점액 생성 세포의 존재로 배양이 준비된 것으로 확인하였다.

[0195] 바이러스 스톡(stock) 및 증식

[0196] OC43 바이러스 스톡은 ATCC(VR-1558)로부터 입수하였다. American Type Culture Collection(ATCC)은 OC43이

HCT-8 세포에서 다수의 계대를 알 수 없는 상태로 증식되었음을 보여준다. ATCC에서 공급한 OC43 역가는 밀리리터당 2.8 × 105 정중 조직 배양 감염량(TCID50/mL)였고, ATCC 스톡을 받은 후 바이러스를 MRC-5 세포에서 3회 계대하여 작업용 스톡을 생성하였다: OC43 역가는 2 × 108 TCID50/mL였으며, 이것을 WHO 지침에 따라 연구에 사용하였다. Spearman-Karber 방법을 사용하여 MRC-5에서 TCID50 검정으로 바이러스 역가를 측정하였다.

[0197] 락토페린 처리 및 감염

[0198] 소 락토페린(LF) 분말(Noumi Limited, 호주)을 PBS 중의 10 mg/mL의 스톡 농도로 희석하였다. 일단 완전히 분화되면, BEBM 최소 배지(MM)에서 희석한 50 uL의 100 μg/mL(LF100) 및 1000 μg/mL(LF1000)를 첨가하여 LF를 사용한 근단 처리(apical treatment)를 수행하였다. 분화된 pBEC를 0.1의 moi에서 OC43으로 감염시켰다. 결합 중에 LF로의 노출을 유지하기 위해 바이러스 접종물을 200 uL MM에서 상응하는 농도의 LF를 사용하여 희석하였다.

[0199] 감염 전에, 세포를 PBS로 1회 세척하고, 근단 표면에서만 해당 농도의 50 μL의 LF(또는 MM 대조군)로 3시간 동안 전처리하였다. 3시간 후, LF 처리물을 제거하지 않고 바이러스 접종물을 웰에 직접 첨가하였다(총 감염량 250 uL). 35℃에서 2시간 동안 인큐베이션한 후에, 접종물을 제거하였다. 세포를 500 ul PBS로 세척하여 결합되지 않은 바이러스를 제거하였다. 마지막으로, 시간 과정의 시작에 맞춰서 50 uL의 LF 처리물을 근단부에 첨가하였다. 시간 과정이 지속되는 동안 처리를 유지하였고, 감염 후 0, 24, 48 및 96시간에 pBEC를 수확하였다. 적용 가능한 경우(도 5), 처리물을 새로 공급하기 위해 감염 후 48시간에 50 uL의 LF 처리물(또는 MM 대조군)을 근단 표면에 첨가하였다.

[0200] ALI 배양물로부터 샘플 수집 및 분석

[0201] 수확하자 마자, 감염성 바이러스의 방출을 측정하기 위해 5분 동안 PBS를 450 uL 첨가하여(또는 감염 후 48시간에 LF 처리물을 새로 공급할 때 400 uL를 첨가하여) 근단 세척액을 수집하였다. 분자 분석을 위해서는 1% 2-머캅토에탄올(2ME)을 함유한 RLT 완충액(Qiagen)에서 그리고 단백질 분석을 위해서는 프로테아제 억제제 칵테일(Roche)을 함유한 RIPA 완충액에서 반막(half-membrane)을 수집하였다. 모든 샘플을 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0202] TCID50에 의한 방출된 감염성 바이러스의 측정

[0203] OC43 작업용 스톡 역가 및 근단 세척액 내 방출된 감염성 바이러스를 TCID 종말점 희석 방법을 사용하여 측정하였다. MRC-5s를 평평한 바닥 96웰 플레이트의 10% FCS EMEM 배지(Hyclone)에 1.105개 세포/웰의 농도로 씨딩하였다. 다음 날, 세포가 40% 합류에 도달했을 때, 세포를 샘플로 감염시켰고, 이를 1% EMEM 배지에서 연속적으로 희석하였다. 한 행은 대조군으로 유지하였다. 플레이트를 35℃에서 5일 동안 인큐베이션하고, 현미경을 사용하여 검사하여 각 컬럼 내 CPE의 존재 여부를 결정하였다. 이들 결과를 사용하여, Spearman-Karber 방법을 사용하여 감염성 바이러스 단위를 결정하였다.

[0204] qPCR에 의한 바이러스 부하의 측정

[0205] miRNAeasy mini kit(Qiagen)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 정제된 RNA를 분광광도법(Nanodrop)으로 정량하였다. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. OC43 뉴클레오캡시드 유전자 PCR 검출을 위해 플라스미드를 사용하여 qPCR에 대한 표준을 생성하였다. OC43 N 유전자(Geneworks)를 표적으로 하는 taqman 검정을 사용하여 ABI 7500 Real Time PCR 시스템을 사용하여 바이러스 부하 qPCR 분석을 수행하였다. 모든 표적은 18S(Applied Biosystems, Thermofisher Scientific)를 사용하여 정규화하였다. 표 7은 이들 두 검정에 대한 프라이머 및 프로브를 보여준다.

[0206] 표 7 - *qPCR 프라이머 및 프로브*

표적 유전자	역방향 프라이머	정방향 프라이머	프로브
N-OC43	5′ - CGATGAGGCTATTC CGACTAGGT	5′ - CCTTCCTGAGCCTTCAATATA GTAACC	5′ -FAM- TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT -TAMRA
18S	5′ - CGCCGCTAGAGGTG AAATTCT	5′ - CATTCTTGGCAAATGCTTTCG	5′ -FAM- ACCGGCGCAAGACGGACCAGA- TAMRA

[0207]

[0208] 통계 분석

[0209] GraphPad Prism 버전 8.2.1 소프트웨어를 사용하여 모든 데이터를 분석하였다. qPCR 데이터(도 3)를 Šidák 다중 비교 시험을 사용한 이원 ANOVA로 비교하였다. TCID50으로 측정한 로그 변환 감염성 바이러스 데이터(도 4 및 5)를 Šidák 다중 비교 시험을 사용한 이원 ANOVA로 비교하였다. P값 < 0.05은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0210] **결과**

[0211] *인간 분화된 1차 인간 기관지 상피 세포 연구*

[0212] 도 2에서 볼 수 있듯이, 락토페린을 사용한 근단 처리는 공기 액체 계면에서 분화된 천식이 있는 1명의 기증자로부터 얻은 pBEC에서 96시간의 시간 과정에 걸쳐 OC43 바이러스 부하의 감소를 보여 주었다. 최소 배지(MM)에서 희석한 락토페린 처리물(LF100: 100 ug/mL; LF1000: 1000 ug/mL)의 존재 또는 부재 하에 세포를 0.1의 moi에서 OC43으로 감염시켰다. N 유전자를 표적으로 하는 OC43 특이적 검정을 사용하여 OC43 바이러스 부하를 측정하였다. 데이터를 18s 특이적 검정을 사용하여 18s 하우스키퍼 유전자로 정규화하였다. N = 1

[0213] 도 2에 나타난 바와 같이, 분화된 1차 인간 기관지 상피 세포를 1000 ug/mL 락토페린(본 발명에 따라 생산됨)으로 단일 처리하면 감염 후 최대 4일까지 100% 억제되었다. 10배 낮은 100 ug/mL 용량도 유효하였어서, 이는 2일 후 바이러스 복제를 100% 차단했고, 감염 후 4일에는 대략 90% 감소를 보여 주었다.

[0214] 도 3에서 볼 수 있듯이, 1000 ug/mL 락토페린을 사용한 근단 처리도 감염 후 96시간에 OC43 바이러스 부하의 유의한 감소를 보여주었다. 2명의 건강한 기증자로부터 얻은 pBEC는 공기 액체 계면에서 분화되었다. 최소 배지(MM)에서 희석한 락토페린 처리물의 존재 또는 부재 하에 세포를 0.1의 moi에서 OC43으로 감염시켰다. N 유전자를 표적으로 하는 OC43 특이적 검정을 사용하여 OC43 바이러스 부하를 측정하였다. 데이터를 18s 특이적 검정을 사용하여 18s 하우스키퍼 유전자로 정규화하였다. 통계 분석은 Šidák 다중 비교 시험과 함께 이원 ANOVA를 사용하여 수행하였고, 오류 막대는 평균 +/- SD; N=8; $p<0.05$(그래프의 *)를 의미한다.

[0215] 후속 실험은 기도 상피 배양물의 근단 표면에서 감염성 바이러스가 배출됨을 보여주었다(도 4 및 5). 도 4에서 볼 수 있듯이, 1000 ug/mL 락토페린을 사용한 근단 처리는 감염 후 48시간에 OC43 방출 감염성 바이러스의 유의한 감소를 보여주었다. 2명의 건강한 기증자로부터 얻은 pBEC는 공기 액체 계면에서 분화되었다. 방출된 감염성 바이러스는 Spearman-Karber 계산을 사용하여 TCID50 검정으로 측정하였고, 데이터의 로그 변환은 Šidák 다중 비교 시험을 사용한 이원 ANOVA로 분석하였다. 최소 배지(MM)에서 희석한 락토페린 처리물의 존재 또는 부재 하에 세포를 0.1의 moi에서 OC43으로 감염시켰다.

[0216] 도 5에서 볼 수 있듯이, 1000 ug/mL 락토페린을 사용한 근단 치료는 감염 후 48시간에 OC43 방출 감염성 바이러스의 유의한 감소를 보여주었다. 1명의 건강한 기증자로부터 얻은 pBEC는 공기 액체 계면에서 분화되었다. 최소 배지(MM)에서 희석한 락토페린 처리물의 존재 또는 부재 하에 세포를 0.1의 moi에서 OC43으로 감염시켰다. 방출된 감염성 바이러스는 Spearman-Karber 계산을 사용하여 TCID50 검정으로 측정하였고, 데이터의 로그 변환은 Šidák 다중 비교 시험을 사용한 이원 ANOVA로 분석하였다. 오차 막대는 평균 +/- SD; N=3; $p<0.05$(그래프의 *)를 나타낸다. 이들 데이터는 LF1000이 96시간에 처리되지 않은 것보다 통계적으로 더 낮았음을 보여 주었다(락토페린은 48시간에 보충되었다).

[0217] 감염 당시의 락토페린 처리는 48시간에 감염성 바이러스의 생산을 2 로그 넘게 유의하게 억제하였다. 바이러스는 96시간까지 처리된 세포에서 따라잡기 시작했지만(도 4), 락토페린이 48시간에 보충되었을 때, 이것은 처리되지 않은 세포에서보다 통계적으로 여전히 낮았고(LF1000)(도 5), 면역계 도움은 없었다. *생체 내에서*, 락토페린은 감염 첫 날에 걸쳐 보호 창을 제공할 것인 동시에, 면역력을 자극하여 지속적인 항바이러스 지원을 제공할 것으로 예상된다. *생체 내에서의* 마우스 연구(아래에 설명됨)가 이를 설명할 것으로 예상된다.

[0218] 따라서, 본 발명에 따라 생산된 락토페린은 분화된 1차 인간 기관지 상피 세포를 사용한 *시험관 내* 모델에서 인간 코로나바이러스(CoV) OC43에 의한 감염을 감소시킨다(데이터는 기밀이지만, 요청 시 논의를 위해 이용 가능함). 이들 긍정적인 결과는 매우 인상적이어서, (예를 들어, 코로나19에 대한) 항바이러스제 및 비처방 일반 의약품으로 적용하기 위해 신규한 처리 방식(동물의 비강에 국소적으로 적용되는 락토페린)으로 바이러스 억제를 유발하는 코로나19의 효과를 조사하기 위해 *시험관 내에서* 그리고 *생체 내에서의*(즉, 설치류 모델) 연구가 계획되고 있다.

[0219] **실시예 4 - 설치류에서 항바이러스 활성의 *생체 내에서의* 조사**

[0220] 많은 바이러스(OC43 및 SARS-CoV-2와 같은 베타 코로나바이러스를 포함함)는 프로테오글리칸을 공동 수용체로 사용하여 세포로의 결합을 촉진하고 감염을 촉진한다. 이들 세포 표면 프로테오글리칸에 결합함으로써, 천연 락토페린은 바이러스 감염을 방해하는 것으로 나타났다. *시험관 내에서*(세포주에서)의 연구는, SARS-CoV-2를 포함한 다양한 호흡기 바이러스에 대한 락토페린의 항바이러스 활성을 보고하였다. 본 발명에 따라 제조된 락토페린 분말 내 락토페린이 천연 락토페린의 생물학적 활성을 유지하는지 여부를 결정하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[0221] 전술한 대로, 락토페린의 항바이러스 특성은 풍토병 인간 코로나바이러스(예를 들어, OC43 및 229E)로 감염된 분화된 1차 인간 기관지 상피 세포에서 입증하였다. 인간 기도 상피의 이 생리학적으로 유익한 *시험관 내* 모델에서 SARS-CoV2에 대한 효능의 초기 개념 증명을 얻기 위해 후속 실험을 수행하였다.

[0222] 당업계에서의 표준이며 당업자에게 잘 알려진 절차를 사용하여 하기 실험을 수행하였다.

[0223] ***마우스에서 OC43 감염에 대한 비강 내 처리 효능***

[0224] **이론적 해석**

[0225] 항바이러스제는 코로나19의 억제에서 뿐만 아니라, 현재와 미래의 많은 호흡기 바이러스 질환에 대한 치료에서 중요한 역할을 할 가능성이 높다. 감염 중에 세포 결합을 위해 많은 바이러스에 의해 사용되는 세포 표면의 당 구조(예를 들어, 헤파란, 시알산 기반 분자)에 결합하여 매개되는 것으로 제안된, 천연 락토페린의 항미생물/항바이러스 활성이 인지되었다. 예를 들어, 코로나바이러스와 같은 인간 호흡기 바이러스는 세포 결합을 위해 당 기반의 분자 구조를 활용한다: SARS-CoV-2는 헤파란 황산염에 결합한다. 관련 인간 베타코로나바이러스 OC43은 글리칸 기반의 수용체 9-O-아세틸화 시알산을 활용한다.

[0226] 이들 실험은, 항호흡기 바이러스 비강 스프레이로서의 락토페린 제제의 개발을 뒷받침하는 개념 증명의 증거를 제공하기 위해, 자체 개발된 고유한 마우스 코로나바이러스(OC43) 감염 모델을 사용하여 OC43 감염을 차단하는데 대한, (예를 들어, 실시예 1에 설명된 바와 같이) 본 발명에 따라 생산된 비강 내로 전달된 락토페린 분말의 효능을 시험하는데 중점을 둘 것이다. 이전에 언급한 바와 같이, 달리 명시하지 않는 한, 이 실시예에서 "락토페린"에 대한 언급은 본 발명의 방법에 따라 생산된 락토페린 함유 분말 형태의 락토페린에 대한 것이다.

[0227] **목표**

[0228] 1. 비강 내 락토페린 처리가 마우스에서 인간 코로나바이러스(CoV) OC43에 의한 감염을 감소시키는 지를 결정하는 것.

[0229] 2. 락토페린 및 면역 전사체 바이오마커의 항바이러스 효과를 분석하는 것

[0230] **연구 설계**

[0231] 항호흡기 바이러스 비강 스프레이로서의 락토페린 제제의 개발을 뒷받침하는 개념 증명의 증거를 제공하기 위해 3개의 별도의 *생체 내에서의* 실험을 수행하였다. 각 연구에 대한 실험 설계의 요약은 표 8 및 도 6에서 이용 가능하다.

[0232] **연구 1: 락토페린에 대한 개념 증명**

[0233] 노출 후 예방을 모델화하기 위해 마우스(군당 8마리)를 감염 시점 및 감염 후 매일 락토페린(100 ug/mL*15 uL 비강 내, 시험관 내에서의 연구에 기반하여 마우스당 총 용량 1.5 ug에 해당함)으로 비강 내 처리하였다. 초기의 락토페린 처리 후, 마우스를 확립된 프로토콜에 따라 OC43 상부 호흡 기관 감염 과정을 모델화하기 위해 $1x10^6$ TCID50/mL OC43(또는 UV 불활성화 바이러스 대조군 - UV-OC43)으로 감염시켰다. 감염 후 2시간 및 48시간에 실험 종말점을 평가하였다. qPCR에 의한 OC43 바이러스 부하 및 바이러스 정중 조직 배양 감염량(TCID50)에 의한 감염성을 각각 평가하기 위해 비갑개 및 비강 세척액을 수집하였다.

[0234] **연구 2: 반복 실험**

[0235] 노출 후 예방을 모델화하기 위해 마우스(군당 8마리)를 감염 당시 및 감염 후 매일 락토페린(100 ug/mL*15 uL 비강 내, 마우스당 총 용량 1.5 ug에 해당함)으로 비강 내 처리하였다. 이 반복 실험에서, 락토페린 처리물은 시간 과정의 매일 새로 만들었다. 초기의 락토페린 처리 후에, 확립된 프로토콜에 따라 OC43 상부 호흡 기관 감

염 과정을 모델화하기 위해 마우스를 $1x10^6$ TCID50 OC43/mL(또는 UV 불활성화 바이러스 대조군 - UV-OC43)으로 감염시켰다. 감염 후 2시간 및 48시간에 실험 종말점을 평가하였다. qPCR에 의한 OC43 바이러스 부하 및 선천적 항바이러스 면역 반응(인터페론 IFN-β 및 IFN-λ2/3)을 평가하기 위해 비갑개를 수집하였다. 바이러스 정중 조직 배양 감염량(TCID50)에 의한 감염성을 평가하기 위해 각각 비강 세척액을 수집하였다.

[0236] **연구 3: 면역 전사체 바이오마커**

[0237] 노출 후 예방을 모델화하기 위해 마우스(군당 8마리)를 감염 당시 및 감염 후 하루 2회 락토페린(10 mg/mL*15 uL 비강 내, 마우스당 총 용량 150 ug에 해당함)으로 비강 내 처리하였다. 초기의 락토페린 처리 후에, 마우스를 확립된 프로토콜에 따라 OC43 상부 호흡 기관 감염 과정을 모델화하기 위해 $1x10^6$ TCID50/mL OC43(또는 UV 불활성화 바이러스 대조군 - UV-OC43)으로 감염시켰다. 감염 후 2시간 및 48시간에 실험 종말점을 평가하였다. qPCR에 의한 OC43 바이러스 부하를 평가하기 위해 비갑개를 수집하였다. 백혈구 계수를 위해 기관지 폐포 세척액을 수집하였다. 또한 n > 500 일반 마우스 면역학 관련 유전자의 발현을 평가하는, Nanostring(Nanostring, 시애틀, WA)으로부터의 nCounter 마우스 Immunology v2 Expression 패널을 사용하여 Nanostring에 의해 비강 조직 내 면역 전사체 바이오마커 단위를 분석하였다.

[0238] *표 8 - 각 PUREnFERRIN® 생체 내에서의 연구에 대한 연구 설계 및 처리의 요약.*

	8 마리 마우스/군	실험 군	투여 프로토콜	수확 (감염 후 시간)	종말점
연구 1/2	2 개 군 16 마리 마우스/수확 2 수확	1. 비히클/ OC43 2. 1.5 μg 락토페린/ OC43	LF 또는 비히클 0 일 차 + 그후 매일	2, 48	PCR에 의한 바이러스 역가 및 비강 조직에서 인터페론 유전자 발현(연구 2 만)의 분석. $TCID_{50}$ 검정에 의한 비강 세척액 내 살아있는 감염성 바이러스 단위의 분석.
	총계: 32				
	8 마리 마우스/군	실험 군	투여 프로토콜	수확 (감염 후 시간)	종말점
연구 3	4 개 군 32 마리 마우스/수확 2 수확	1. 비히클/ OC43 2. 1.5 μg 락토페린/ OC43 2. 150 μg 락토페린/ PBS 2. 모의 처리됨/ 감염됨	LF 또는 비히클 0 일 차 + 그후 매일	2, 48	PCR에 의한 비강 조직에서 바이러스 역가의 분석. 기관지 폐포 세척액의 백혈구 계수 Nanostring에 의한 비강 조직 내 면역 전사체 바이오마커 단위의 분석
	총계: 64				

[0239]

[0240] **결과**

[0241] **연구 1: 락토페린 비강 내 처리는 OC43 바이러스 부하 및 감염성 바이러스에서 감소 경향을 보였다.**

[0242] 도 7a는 48시간의 시간 과정에 걸쳐 1.5 ug의 락토페린을 비강 내로 처리한 마우스에 대한 처리하지 않은(비히클) 마우스에서 비갑개 내 OC43 바이러스 부하를 보여준다. 바이러스 접종 후 2시간에, OC43 바이러스 부하는 비히클과 락토페린 처리한 마우스 사이에서 비슷하였다. 감염 후 48시간까지, OC43 바이러스 부하에서 2-로그 증가가 관찰되었는데, 이는 상부 호흡 기관에서의 바이러스 복제를 시사한다. 락토페린 처리한 마우스의 경우,

이원 ANOVA 통계 시험 및 Sidak 다중 비교 시험(p=0.3368)을 사용하여 분석했을 때 감염 후 48시간에 바이러스 부하가 감소하는 경향이 있었다.

[0243] 도 7b는 비강 세척액 샘플에서 TCID50 검정을 사용하여 MRC-5 세포에서 측정한 OC43 감염성 바이러스를 보여준다. 바이러스 접종 후 2시간에, 처리하지 않은 샘플(비히클)과 LF 처리한 샘플 사이에서 감염성 바이러스 용량에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았지만, 락토페린 처리 군에서는 감염성 바이러스가 감소하는 경향이 있었다(p=0.6727). 감염성 바이러스 TCID50 검정의 경우, 감염 후 48시간에 OC43 살아있는 감염성 바이러스는 TCID50 검정의 검출 한계(LOD) 미만으로 떨어졌다.

[0244] 도 7에서 볼 수 있듯이, OC43 바이러스 부하 및 감염성 바이러스는 락토페린 비강 내 처리 후에 감소하는 경향을 보였다. 마우스를 감염 당시 및 그 후 매일 1.5 ug의 락토페린으로 비강 내 처리하였다. a) 바이러스 부하; 및 b) 비히클과 락토페린 처리한 마우스 사이의 감염성 OC43 수준을 각각 qPCR 및 TCID50 검정으로 평가하였다. 결과를 Sidak 다중 비교 시험을 사용하여 이원 ANOVA로 분석하였다. N=8; LOD= 검출 한계(63.2 TCID50/mL).

[0245] **연구 2: 락토페린 비강 내 처리는 감염 후 48시간에 OC43 바이러스 부하에서 감소하는 경향을 보였고, 이는 IFN mRNA에서의 감소와 관련이 있었다.**

[0246] 초기 예비연구에서 OC43 바이러스 RNA 및 감염성 바이러스가 감소하는 경향을 보였으므로, 실험을 반복하였다. 이전에 냉동된 스톡 락토페린 농도의 분취량으로부터 락토페린 처리물이 만들어졌던 초기 실험과 대조적으로, Noumi Limited에서 제공한 락토페린 분말을 처리 동안 매일 새로 희석하였다.

[0247] OC43 바이러스 부하 및 감염성 바이러스는 락토페린 비강 내 처리 후에 감소하는 경향을 보였다. 마우스를 감염 당시 및 그 후 매일 1.5 ug의 락토페린으로 비강 내 처리하였다. a) 바이러스 부하; 및 b) 비히클과 락토페린 처리한 마우스 사이의 감염성 OC43 수준을 각각 qPCR 및 TCID50 검정으로 평가하였다. 결과를 a) Sidak 다중 비교 시험을 사용한 이원 ANOVA 및 b) 짝이 없는(Unpaired) T 시험, n=8로 분석하였다.

[0248] 첫 번째 연구에서와 마찬가지로 OC43 바이러스 부하에 대해 유사한 결과가 관찰되었다. 도 8a는 48시간의 시간 과정에 걸쳐 1.5 ug의 락토페린을 비강 내로 처리한 마우스에 대한 처리하지 않은(비히클) 마우스의 비갑개 내 OC43 바이러스 부하를 보여준다. 바이러스 접종 후 2시간에, 비히클과 LF 처리한 마우스 사이에서 OC43 바이러스 부하는 비슷하였다. 바이러스 접종 후 48시간에 OC43 바이러스 부하에서 2-로그 증가가 관찰되었는데, 이는 상부 호흡 기관에서의 바이러스 복제를 시사한다. LF 처리한 마우스에서는 감염 후 48시간에 바이러스 부하가 감소하는 경향이 있었다; 이원 ANOVA 통계 시험 및 Sidak 다중 비교 시험(p=0.2929).

[0249] 연구 1로부터의 결과에 기반하여, OC43 역가는 48시간까지 TCID50 검정의 검출 한계보다 낮았으므로, 살아있는 바이러스는 감염 후 2시간에만 측정되었다. 도 8b는 바이러스 접종 후 2시간에 비강 세척액 샘플에서 TCID50 검정을 사용하여 MRC-5 세포에서 측정한 OC43 감염성 바이러스를 보여준다. LF 처리 군에서는 감염성 바이러스가 감소하는 경향이 관찰되었다(p=0.3748).

[0250] 그 다음, 자체 IFN-β 및 IFN-λ2/3 qPCR 검정을 사용하여 비강 조직에서의 선천적 항바이러스 면역 반응을 조사하였다. 결과는 각각 IFN-β 및 IFN-λ2/3에 대하여 도 9a 및 9b에 제시되어 있다. 도 9에서, OC43 감염 후 선천적 면역 유전자 발현의 크기는 바이러스 부하에 따랐다. 마우스를 감염 당시 및 그 후 매일 1.5 ug의 락토페린으로 비강 내 처리하였다. 비히클과 락토페린 처리한 마우스 사이의 a) IFN-β 및 b) IFN-λ2/3 수준을 qPCR로 평가하였다. 결과를 Sidak 다중 비교 시험을 사용한 이원 ANOVA로 분석하였다. N = 8

[0251] 둘 다의 IFN 분자의 경우, 감염 후 48시간에 mRNA 수준이 감소하는 경향이 있었고, 이는 48시간에 관찰된 바이러스 부하에서의 감소로 이어졌다(**에러! 참조 출저가 발견되지 않음.**A); 이원 ANOVA 통계 시험 및 Sidak 다중 비교 시험을 사용하여 분석하였다(IFN-β 및 IFN-λ2/3의 경우, 각각 p=0.25139 및 0.5183).

[0252] **연구 3: 락토페린 비강 내 처리**

[0253] 마지막 연구에서는, 100배 더 높은 투여량에서 그리고 더 빈번한 투여로 락토페린을 비강 내 처리한 경우의 항바이러스 효능을 조사하였다. 이 실험에서는, 마우스를 150 ug의 락토페린으로 비강 내 처리하였고, 감염 후 48시간의 시점까지 총 5회의 비강 내 투여를 받았다. 두 개의 추가 대조군이 실험 설계에 추가되었다: UV-OC43/처리하지 않음(모의 비히클) 및 UV-OC43/LF 처리함(모의+LF).

[0254] 바이러스 RNA는 UV-OC43으로 감염시킨 군의 비갑개에서 검출 한계 미만이었는데, 이는 비강 조직 내 바이러스 RNA 수준이 초기 접종원의 지속적인 검출로 인한 것보다는 살아있는 바이러스로 인한 것이었음을 나타낸다. OC43 감염 군에서, 본 발명자들은 감염 2시간에서 48시간 사이에 비히클 처리 군과 락토페린 처리 군 둘 다에서

OC43 바이러스 부하가 1 로그 증가함을 관찰하였다. 마지막으로, 2시간 및 48시간의 시점 둘 다에서 비히클과 LF 처리 군 사이의 바이러스 부하에서는 차이가 없었다.

[0255] 이 연구에서 락토페린 용량은 더 높은 수준의 내성 및 효능을 확립하기 위해 이전 연구의 용량보다 100배 더 높았다. 그러나, 이는 너무 높은 것으로 보이며, 바이러스 부하에 대한 효과는 관찰되지 않았다. 예를 들어, 본 발명자들은 비강 스프레이의 증가된 양이 단순히 마우스의 비강 밖으로 떨어졌을 수도 있음에 주목한다. 향후 실험은 단지 두 배 정도(또는 그 쯤) 높을 것이다.

[0256] 그 다음, 기관지 폐포 세척액(BAL)에서 백혈구 모집을 조사하여, 상부 호흡 기관 락토페린 처리가 하부 호흡 기관에서 보호 면역 세포 모집을 생성하는 능력을 평가하였다. 도 10에서 볼 수 있듯이, OC43 감염과 락토페린 비강 내 처리. 마우스를 감염 당시 및 그 후 매일 2회 150 ug의 락토페린으로 비강 내 처리하였고, BAL (a) 대식세포, (b) 호중구 및 (c) 림프구를 비히클과 락토페린 처리 군 사이에서 그리고 모의 감염 군과 감염 군 사이에서 계수하였다. 결과는 Tukey의 다중 비교 시험을 사용하여 '혼합 효과' 통계 시험으로 분석하였다. 각 군에 대해 n은 8이다.

[0257] 도 10a는 하부 호흡 기관에서의 대식세포를 보여준다. 감염 후 2시간에, 군 사이에서 유의한 차이가 관찰되었다. UV 불활성화 OC43을 접종한 둘 다의 군은 OC43 감염 군에 비해 대식세포 수가 유의하게 더 높았다 ($p<0.01$). 또한, OC43 락토페린 처리 군은 처리하지 않은 군보다 대식세포 수가 더 적은 경향이 있었다; Tukey의 다중 비교를 사용한 혼합 효과 통계 시험($p=0.1337$). 감염하고 48시간까지, 모든 군 내에서의 대식세포 수에는 차이가 없었다. 도 10b는 OC43 접종 후 2시간 및 48시간에 BAL 호중구 수를 보여준다. 둘 다의 시점에 대해 호중구 수에서는 유의한 차이가 없었다. 도 10c는 하부 호흡 기관에서 림프구 수를 보여준다. 2시간 후에, 모의 감염시킨 처리하지 않은 군에서 림프구 수는 OC43 감염시킨 비히클 군보다 유의하게 더 낮았다($p<0.05$). 모의 감염, 비히클 처리 군과 비교하여 락토페린 처리 군의 경우 림프구가 증가하는 경향이 있었다(각각 OC43 비히클 및 OC43 락토페린 처리 군의 경우 $p=0.2006$ 및 $p=2101$). 감염 후 48시간까지, 림프구 수에서는 차이가 없었다.

[0258] 이들 데이터는 락토페린의 더욱 정기적인 투여가 필요할 수 있음을 시사한다. 인간에서, 바이러스 감염 예방 효과를 위해서는 하루 4회의 비강 스프레이가 필요하다. 향후 실험에서는, 전형적인 인간 처리 요법에서 나타나는 것과 마찬가지로 마우스를 더욱 자주 처리할 것이다.

[0259] **<u>연구 3 계속됨: 락토페린 면역 전사체 바이오마커</u>**

[0260] 락토페린 면역조절 활성을 조사하기 위해, n>500 일반 마우스 면역학 관련 유전자의 발현을 평가하는 Nanostring 마우스 Immunology v2 Expression 패널(Nanostring, 시애틀, WA)을 사용하여 비강 조직 면역 전사체 바이오마커 단위를 분석하였다. 감염시키지 않은 군 및 처리하지 않은 군을 감염시키지 않은 락토페린 군과 비교하고, 이 분석을 위해 2개의 이상치(outlier)(비히클 처리 군에서 하나 그리고 락토페린 처리 군에서 하나)를 제거하였다.

[0261] Nanostring은 T 세포 신호 전달 및 항원 제시, 림프구 모집(IL20 CXLC13 및 세포사멸(카스파제 8)), 대식세포 및 T 세포(CD2, CD22, ITG B2)로부터의 면역계 경로, 백혈구 이동 경로(ITGB2, ICAM 2 ITGA4. CD2, SELL) 및 JAK-STAT 신호 전달 경로(SHP1, STAT) 및 조혈 세포 계통(CD127, HLA-DR, CD19, CD22, CD20)에 관련된 바이오마커의 상향조절을 밝혔다.

[0262] 락토페린 처리에 의한 경로 강화에 대한 데이터를 추가로 분석하였다. 락토페린은 항원 제시 및 신호 변환 경로(TLR/NFkB/IFN/TNF 신호 전달)와 함께 림프구 모집, 결합, 성숙을 둘러싼 여러 경로의 강화를 촉진하였다.

[0263] 마지막으로, 이 분석은 비강 내 락토페린 처리가 비강 면역 세포 모집을 촉진함을 밝혔다. 비히클 처리 군과 비교하여 LF 처리 군에서는 CD45(백혈구 마커), B 세포 뿐만 아니라, 낮은 수준의 호중구 및 T 세포가 강화되었다. 한 가지 예외는 세포독성 t 세포였다.

[0264] **<u>결론</u>**

[0265] 이 보고서에서는, 항호흡기 바이러스 비강 스프레이로서의 락토페린 제제의 개발을 뒷받침하는 개념 증명 증거를 제공하기 위해 개발된 마우스 코로나바이러스(OC43) 감염 모델을 사용하여 OC43 감염에 대한 비강 내 전달된 락토페린의 효능을 조사하였다.

[0266] 이는, 비강 내 락토페린 처리가 마우스에서 인간 코로나바이러스(CoV) OC43에 의한 감염을 줄였는지 여부를 결정하고 락토페린 면역 전사체 바이오마커의 분석을 수행하기 위해, 3개의 *생체 내에서의* 연구에 걸쳐 수행하였

다.

[0267] 연구 1 및 2에서는 비히클과 락토페린 1.5 ug으로 처리한 마우스 사이에서 바이러스 부하 및 감염성 바이러스를 조사함으로써 락토페린 처리의 항바이러스 효과에 중점을 두었다. 중요하게는, 둘 다의 연구에서 감염 후 48시간에 바이러스 부하가 감소하는 경향이 강하였다.

[0268] 세 번째 연구에서는, 락토페린 투여량을 100배로(1.5 ug에서 150 ug로) 증가시켰을 때, 비히클 처리 군과 OC43 처리 군 사이에서 바이러스 부하가 유사하였는데, 이는 1.5 ug에서 150 ug로의 락토페린 투여량의 증가가 아마도 너무 높았었고 감염을 유효하게 예방할 수 없었음을 나타낸다. 예를 들어, 15 ug(즉, 단지 10배 더 높음)과 같은 추가 처리 용량을 시험하는 것은, 비강 내 락토페린 처리에 의한 OC43 바이러스 부하를 예방하기 위한 최적 용량을 결정하는 다음 단계이다.

[0269] 비강 세척액 샘플에서 감염성 OC43을 살펴보면(연구 1 및 2), 접종 후 2시간에 OC43 결합은 비히클 처리 군과 비교하여 락토페린 처리 군에서 감소하는 경향을 보였다. 증가한 마우스 수를 사용한 추가 연구는, 통계적 유의성에 도달하는 데 필요한 통계적 검정력을 제공하는 데 도움이 될 것이다(인간에서의 처리 모델과 같이, 락토페린으로 더 일찍 그리고 더 자주 처리하는 것 외에). 감염 후 48시간에, 감염성 바이러스 단위는 검정의 검출 한계 아래로 떨어졌다. qPCR에 의해 관찰된 바이러스 RNA에서의 증가와 대조되는, 감염 후 48시간까지 감염성 OC43의 부족은 추가로 최적화되어야 하는 실험 모델의 인위결과(artefact)일 가능성이 높다.

[0270] 연구 3에서는 더욱 고 용량(처리당 150 ug)에서 그리고 더욱 빈번한 투여량(하루 2회)으로 락토페린을 처리한 후 면역 바이오마커의 평가에 더 중점을 두었다; 그러나, 하루 2회는 인간의 비강 스프레이 적용에서와 같이 너무 적은 처리일 가능성이 여전히 높고, 적용 빈도의 측면에서는 하루 4회가 대표적이다. 연구 3의 목적은, 상부 호흡 기관에서의 락토페린 처리가, 기관지 폐포 세척액 내 백혈구 수를 계수함으로써 하부 호흡 기관에서 보호 면역 세포 모집을 생성할 수 있는지를 최초로 결정하는 것이었다. 상부 호흡 기관에서 OC43에 의한 감염 후 2시간에 유의한 림프구 모집은 유도되었지만, 대식세포 또는 호중구 모집은 유도되지 않았다($p<0.05$). 바이러스 접종(challenge) 후 48시간에, UV-OC43 대조군과 비교하여 OC43 비히클 처리 군과 OC43 락토페린 처리 군에서는 백혈구 수에서 변화가 없었고, 이는 백혈구 수에서의 변화가 일시적인 교란(perturbation)에만 연관될 수 있거나, 그러한 효과가 초기 면역계 '프라이밍'과 관련있을 수 있음을 나타낼 수 있었다.

[0271] 마지막으로, 비히클 처리 군과 LF 처리 군 사이에서 Nanostring 마우스 Immunology v2 Expression 패널(Nanostring, 시애틀, WA)을 사용하여 비강 조직 면역 전사체 바이오마커 단위를 분석하였다. 락토페린 처리는 MHC-II 발현, T 세포 및 B 세포 마커 뿐만 아니라, B 및 T 세포 귀소(homing)에 중요한 역할을 하는 사이토카인인 CXCL13 생산을 촉진하였다. 이 결과는, 이들이 비강 브러싱에 적합한 바이오마커일 수 있음을 시사한다. 경로 강화 분석은 락토페린 비강 내 처리가 항원 제시 및 신호 변환 경로(TLR/NFkB/IFN/TNF 신호 전달)와 함께 림프구 모집, 결합, 성숙을 둘러싼 여러 경로의 강화를 촉진함을 밝혔다. 이는 B 및 T 세포, 호중구 및 강화된 CD45(백혈구 마커)와 같은 면역 세포 집단을 위한 강화 코어에 의해 추가로 보완되었다.

[0272] **방법**

[0273] **OC43 증식, 정제, 및 정량화**

[0274] 원래 OC43(ATCC 번호 VR-1558) 계대 이력은 알려져 있지 않으며, 이것을 HCT-8 세포에서 증식하였다. ATCC로부터의 초기 스톡은 2.8x105 TCID50/ml의 농도로 얻었고, MRC-5 세포에서 3회 계대하여 전술한 바와 같이 작업용 스톡을 생성하였다(7). MRC-5 세포주를 Spearman-Karber 방법을 사용한 TCID50 검정에 사용하여 바이러스 부하를 정량화하였다.

[0275] **바이러스 접종 및 치료제 투여**

[0276] 6-8주령의 암컷 BALB/c 마우스를 Australian Bioresources(Moss Vale, 시드니, NSW)에서 입수하였다. 이소플루란을 사용한 가벼운 마취 하에 치료제 투여 및 바이러스 접종을 수행하였다. 상부 호흡 기관 감염을 모델화하기 위해 마우스에게 15 μL(연구 1 및 2) 또는 10 uL PBS 중의 1.15x106 TCID50 농도로 OC43을 비강 내 접종하였다. 연구 3에 사용된 UV-OC43은 호흡기 바이러스에 대해 전술한 바와 같이 불활성화하였다.

[0277] **비강 세척액, 기관지폐포 세척액, 및 세포 분석**

[0278] 마우스 기관(trachea)에 캐뉼러를 삽입하고, 콧구멍에서 비강 세척액을 수집하는 HBSS(HyClone, GE Life Sciences)를 사용하여 상부 호흡 기관을 세척하였다. 비강 세척액은 -80℃에서 보관하였다. 백혈구 및 사이토카

인의 계수를 위해 기관지폐포 세척액을 전술한 바와 같이 가공처리하였다.

[0279] **RNA 추출 및 역전사**

[0280] 비갑개를 절제하고, 1% 베타머캅토에탄올을 함유한 RLT에서 30초 동안 와류시켰다. 비갑개 잔해를 제거하고, 용해물은 -80℃에서 보관하였다. 공급업체의 프로토콜에 따라 miRNAeasy 키트(Qiagen)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA는 분광광도법(Nanodrop)으로 측정하고, 제조업체의 권장사항에 따라 High-Capacity cDNA 역전사 키트(ABI)와 함께 500 ng의 RNA를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다.

[0281] **정량적 PCR**

[0282] 정량적 PCR(qPCR)은 설명된 대로 TaqMan Gene Expression Master Mix(Thermo Fisher Scientific) 및 프라이머-프로브 조합(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 QuantStudio 6에서 수행하였다(표 9). 관심 유전자의 절대 정량화를 위해 알려진 농도의 표준을 사용하였다. 18s는 관심 유전자의 복제 수를 정규화하기 위한 참조 유전자로 사용하였다.

[0283] 표 9: *qPCR 프라이머/프로브 서열의 표. 프라이머 및 프로브는 모두 5μM의 최종 농도에서 사용하였다. TaqMan 프로브에는 모두 5'FAM 리포터 및 3'TAMRA 소광체(quencher)가 함유되어 있었다.*

유전자	프라이머	서열
OC43	정방향	5'CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT
	역방향	5'CCTTCCTGAGCCTTAATATAGTAACC
	프로브	5'FAM-TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT-TAMRA
IFN-β	정방향	5'CGCCGCATTGACCATCTA
	역방향	5'TTAGCCAGGAGGTTCTCAACAATAGTCTCA
	프로브	5'FAM-TCAGACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGA-TAMRA
IFN-λ 2/3	정방향	5'AAAGGATTGCCACATTGTCTC
	역방향	5'TCAAGCAGCCTCTTCTCGAT
	프로브	5'FAM-TCCCCAAAAGAGCTGCAGGC-TAMRA
18s	정방향	5'CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT
	역방향	5'CATTCTTGGCAAATGCTTTCG
	프로브	5'FAM-ACCGGCGCAAGACGGACCAGA-TAMRA

[0284] .

[0285] **바이러스 정중 조직 배양 감염량(TCID50) 바이러스 감염성 검정**

[0286] C43 코로나바이러스에 대한 TCID50 검정은 10% FCS EMEM 성장 배지 및 1% FCS EMEM 검정 배지를 사용하여 MRC-5 세포에서 실시하였다. MRC-5 세포를 성장 배지에 재현탁시키고, 96웰 플레이트에 씨딩하였다(웰당 100 μL당 1x105개 세포). 30-40% 합류에서(보통 하룻밤 인큐베이션한 후), 세포를 2배 희석에서 시작하는 비강 세척 샘플로 감염시킨 다음, 1% FCS를 함유한 EMEM에서 10배 희석 시리즈로 감염시켰다. 33℃/5% CO2에서 5일 동안 인큐베이션 한 후에, 플레이트를 세포병리학적 효과에 대해 광학 현미경으로 검사하였다. 그 다음 Spearman-Karber 방법을 사용하여 각 샘플에 대한 바이러스 역가를 결정하였다.

[0287] **면역 전사체 발현 분석**

[0288] 비갑개 RNA를 nCounter 마우스 면역학 패널(NanoString)에 혼성화하고, 제조업체의 지침에 따라 고감도 결합 설정을 사용하여 Nanostring Prep-station에서 가공처리하였다. nCounter Digital Analyzer에서는 555개의 시야가 계수되었다. 원시 데이터는 품질 관리(QC) 검사를 거쳐, 양성/음성 대조군 뿐만 아니라, 함량 정규화 QC를 위한 nSolver Analysis 소프트웨어 4.0에서 하우스키퍼 유전자 발현으로 정규화되었다. GENorm 소프트웨어 및 경로/세포 강화 분석을 사용한 자동 정규화를 위해 원시 개수(raw count)를 nSolver Advanced Analysis 소프트웨어(v2.0.134)로 가져왔다. 고급 분석 플랫폼에서는 선형 회귀 모델을 사용하여 DEG를 확인하였다. DEG는 GraphPad Prism 9.1.2에서 화산(volcano)으로 표시되었다. Heatmapper 소프트웨어를 사용하여 샘플 및 유전자 발현 패턴의 평균 유클리드 클러스터링 뿐만 아니라, Nanostring 고급 분석 출력을 기반으로 하는 경로 강화 z-점수 및 세포 강화 프로파일의 시각적 표현을 생성하였다.

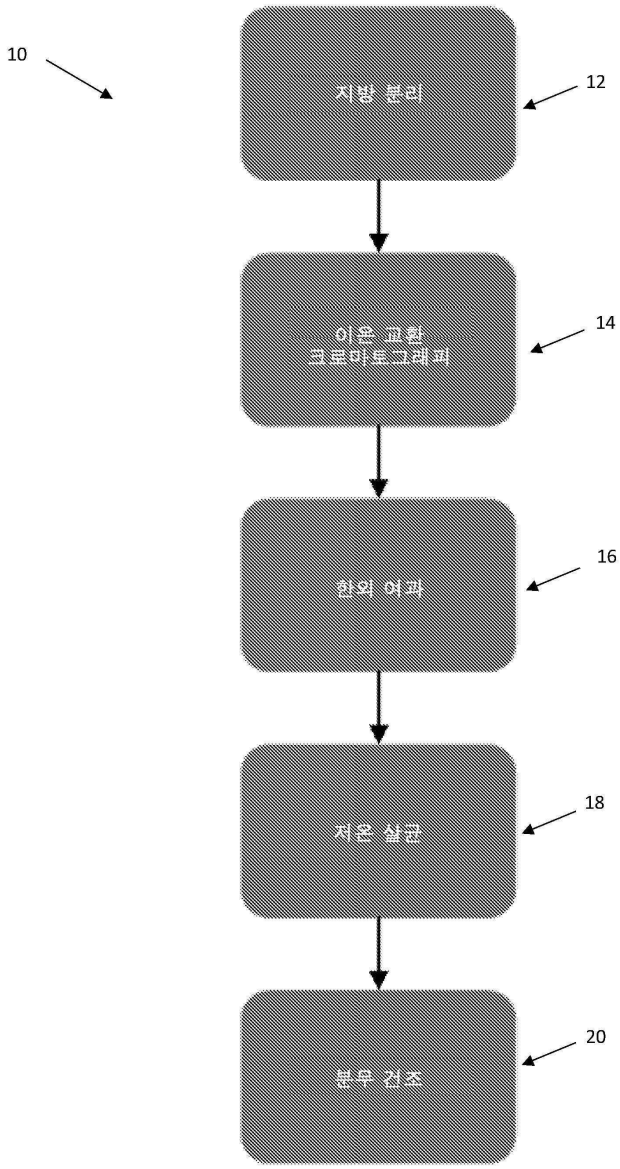
[0289] 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 이해될 것이다.

[0290] 뒤따르는 청구범위에서 그리고 앞선 본 발명의 설명에서, 표현적 언어 또는 필요한 암시로 인해 문맥상 달리 요구되는 경우를 제외하고, 단어 "포함하다(comprise)" 또는 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 포괄적인 의미로, 즉, 언급된 특징의 존재를 나타내지만, 본 발명의 다양한 실시

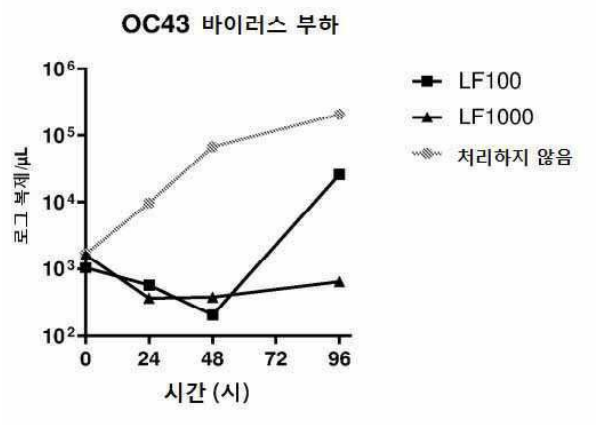
양태에서 추가 특징의 존재 또는 추가를 배제하지 않도록 사용된다.

도면

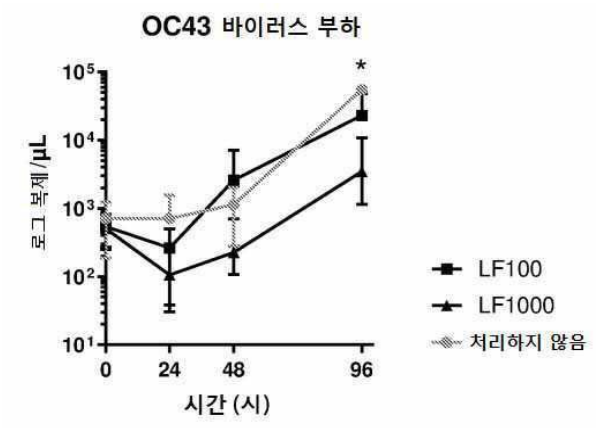
도면1



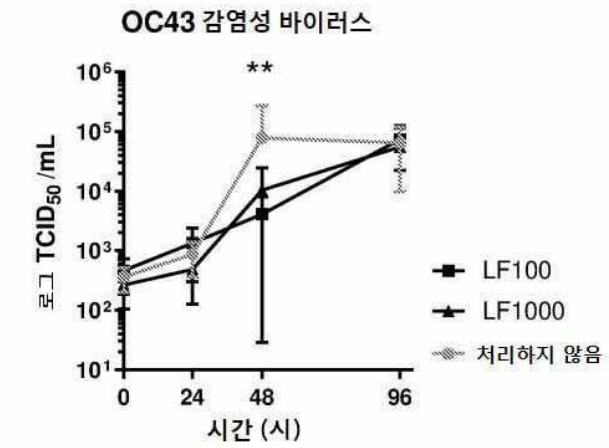
도면2


OC43 바이러스 부하
로그 복제/μL
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
24
48
72
96
시간 (시)
LF100
LF1000
처리하지 않음

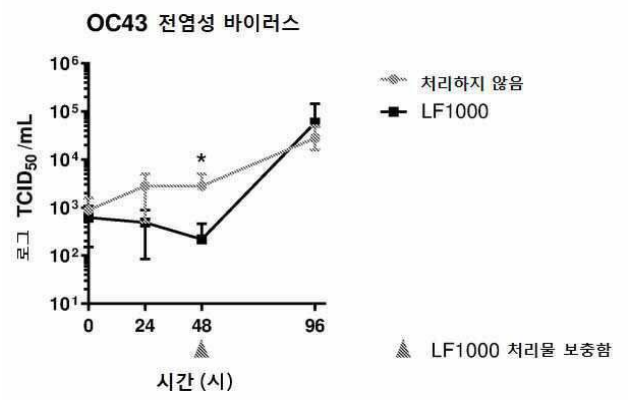
도면3


OC43 바이러스 부하
로그 복제 /μL
*
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
24
48
96
시간 (시)
LF100
LF1000
처리하지 않음

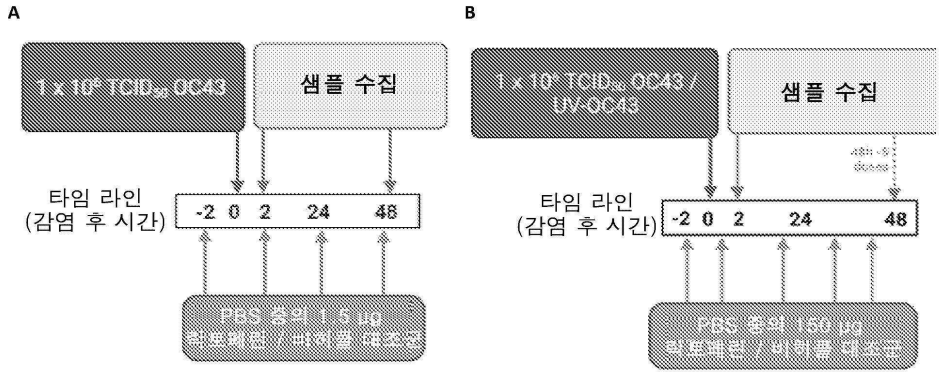
도면4


OC43 감염성 바이러스
로그 $TCID_{50}$ /mL
**
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
24
48
96
시간 (시)
LF100
LF1000
처리하지 않음

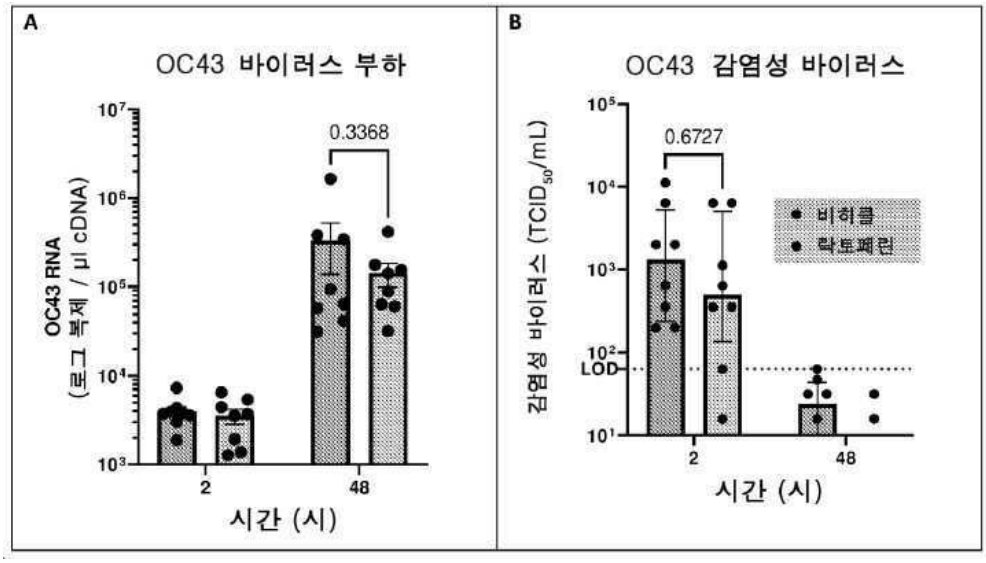
도면5


OC43 전염성 바이러스
로그 TCID50/mL
처리하지 않음
LF1000
LF1000 처리물 보충함
시간 (시)

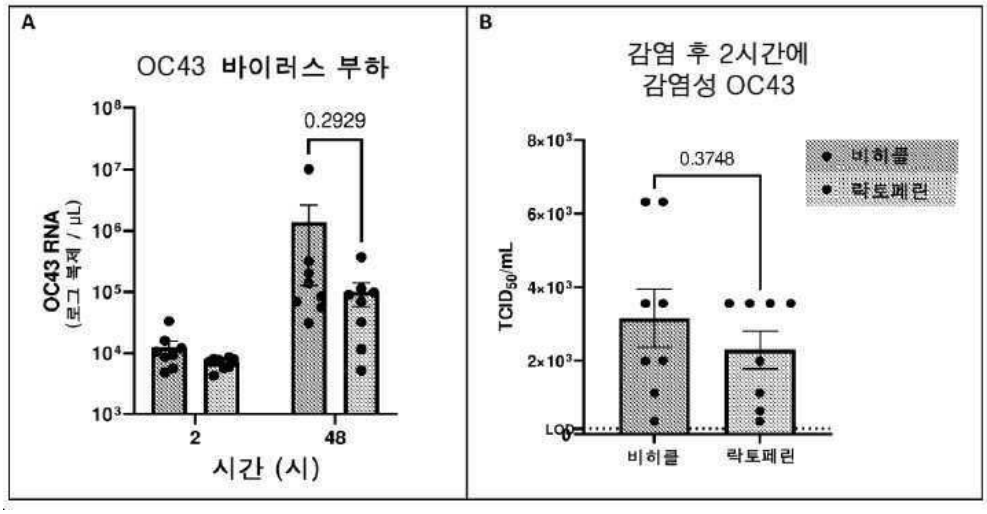
도면6


A
1 x 10⁶ TCID50 OC43
샘플 수집
타임 라인
(감염 후 시간)
-2 0 2 24 48
B
1 x 10⁶ TCID50 OC43 /
UV-OC43
샘플 수집
타임 라인
(감염 후 시간)
-2 0 2 24 48

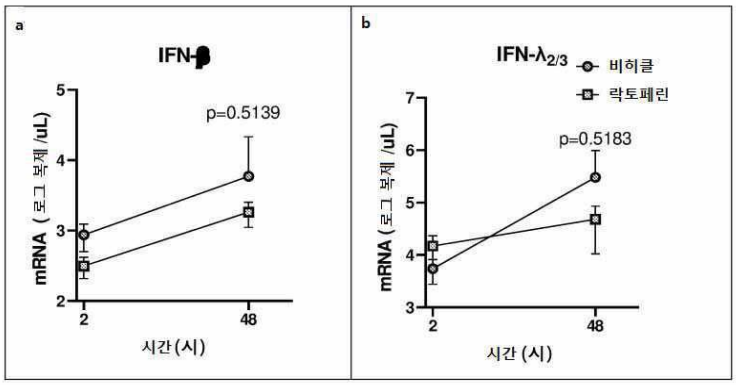
도면7


A
OC43 바이러스 부하
OC43 RNA
(로그 복제 / µl cDNA)
0.3368
시간 (시)
B
OC43 감염성 바이러스
감염성 바이러스 (TCID50/mL)
0.6727
LOD
비히클
락토페린
시간 (시)

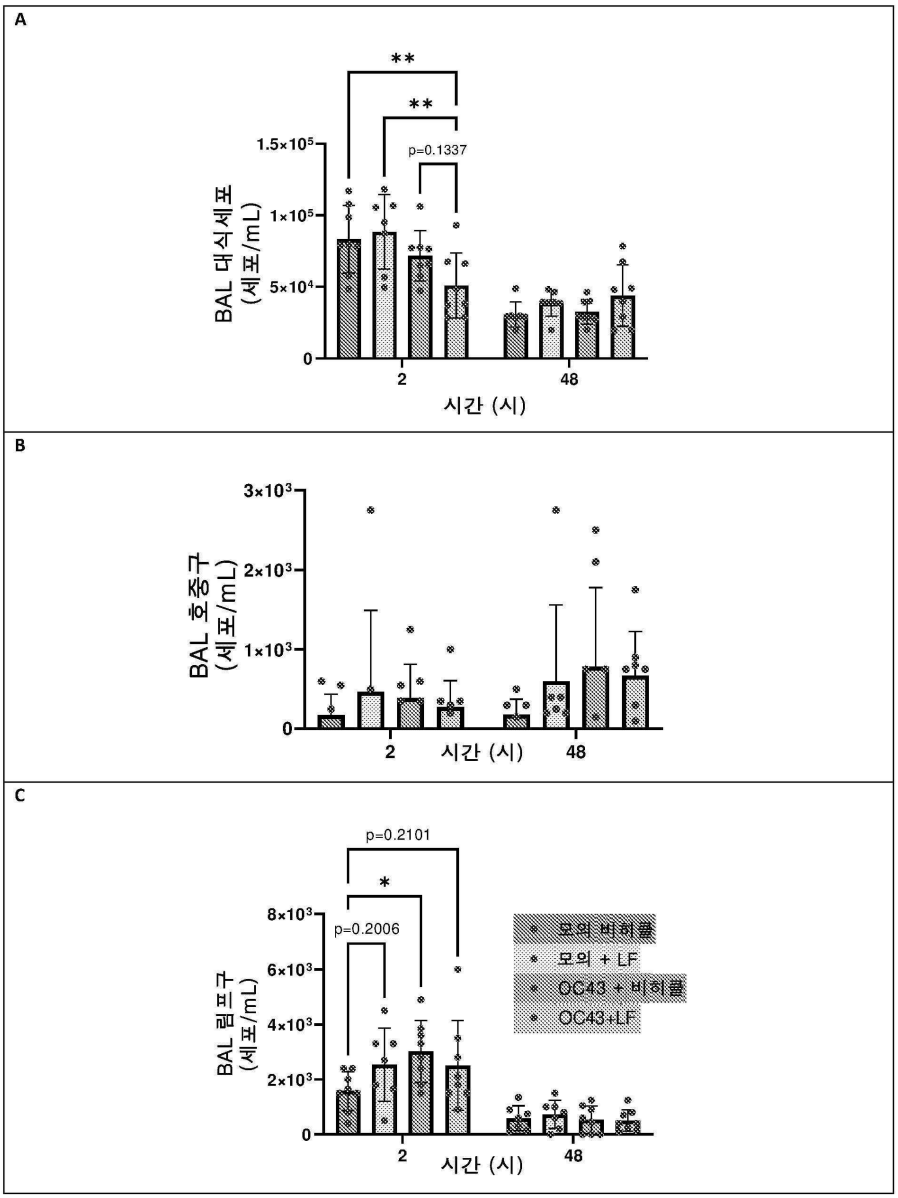
도면8


A
OC43 바이러스 부하
OC43 RNA (로그 복제 / μL)
0.2929
시간 (시)
B
감염 후 2시간에 감염성 OC43
TCID50/mL
0.3748
비히클
락토페린

도면9


a
IFN-β
mRNA (로그 복제 /uL)
p=0.5139
시간 (시)
b
IFN-λ2/3
비히클
락토페린
mRNA (로그 복제 /uL)
p=0.5183
시간 (시)

도면10


A
**
**
p=0.1337
1.5×10⁵
1×10⁵
5×10⁴
0
BAL 대식세포 (세포/mL)
2
48
시간 (시)
B
3×10³
2×10³
1×10³
0
BAL 호중구 (세포/mL)
2
시간 (시)
48
C
p=0.2101
*
p=0.2006
8×10³
6×10³
4×10³
2×10³
0
BAL 림프구 (세포/mL)
2
시간 (시)
48
모의 버허클
모의 + LF
OC43 + 버허클
OC43+LF