(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0011621
(43) 공개일자 2016년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/18 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7029167
(22) 출원일자(국제) 2014년03월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년10월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/030101
(87) 국제공개번호 WO 2014/145357
국제공개일자 2014년09월18일
(30) 우선권주장
13/843,289 2013년03월15일 미국(US)

(71) 출원인
세라브론 세라퓨틱스, 아이엔씨.
미국 메릴랜드 20850 록스빌 키 웨스트 애버뉴 9430 스위트 150
(72) 발명자
필론 에이프릴 엘.
미국 메릴랜드 20850 록빌 그레이트 세네카 하이웨이 9700 스위트 314
윈 멜리사 이.
미국 메릴랜드 20850 록빌 그레이트 세네카 하이웨이 9700 스위트 314
제머 존 케이.
미국 메릴랜드 20850 록빌 그레이트 세네카 하이웨이 9700 스위트 314
(74) 대리인
리앤목특허법인

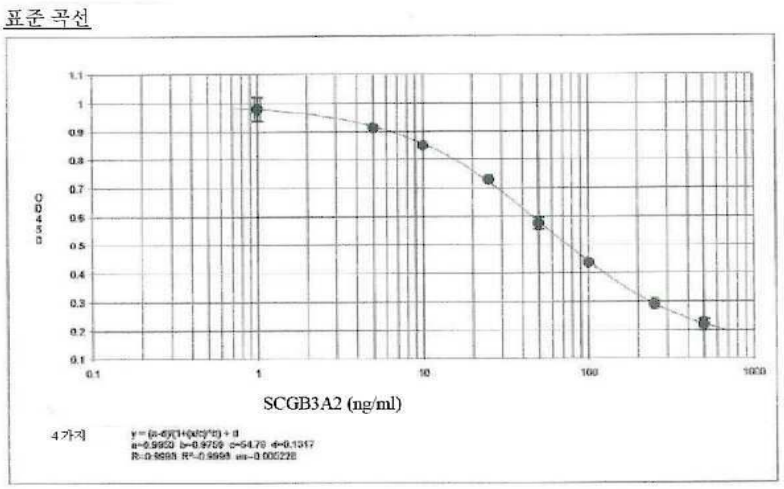
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 인간 분비글로빈에 대한 개선된 사용 방법**

(57) 요 약

분비글로빈 SCGB1A1, SCGB3A2, 및 SCGB3A1을 합성하고, 제제제하며 및 사용하는 방법이 제공된다. 장기 환자 결과에 영향을 주기 위해, 예컨대 입원 등의 의료적 개입을 필요로 하는 기저 질환의 중증 호흡기 악화를 예방하기 위해, 치료제로서 SCGB1A1, SCGB3A2, 및 SCGB3A1을 사용하는 방법이 제공된다. 급성 및 만성 호흡기 질환의 장기간 후유증을 예방하기 위한 재조합 인간 분비글로빈 생산 방법, 분석 방법, 약학적 조성물, 및 사용 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
C12Y 301/01004 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) rhCC10을 급성 폐 손상 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 급성 폐 손상 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하는 방법으로서,

상기 환자는 rhCC10 투여 후 10개월 이상 동안 재입원되지 않는 것인 방법.

청구항 2

(a) rhCC10을 빈번한 호흡기 악화를 갖는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 빈번한 호흡기 악화(frequent respiratory exacerbation)를 경험하는 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하는 방법으로서,

상기 환자는 rhCC10 투여 후 1개월 이상 동안 재입원되지 않는 것인 방법.

청구항 3

(a) rhCC10을 만성 호흡기 질환 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 만성 호흡기 질환 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하는 방법으로서,

상기 환자는 rhCC10 투여 후 1개월 이상 동안 재입원되지 않는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 중증 호흡기 악화는 COPD 또는 천식에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 5

청구항 2에 있어서, 상기 중증 호흡기 악화는 COPD 또는 천식에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 중증 호흡기 악화는 COPD 또는 천식에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 7

(a) rhSCGB3A2를 급성 폐 손상 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 급성 폐 손상 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하는 방법으로서,

상기 환자는 rhCC10 투여 후 10개월 이상 동안 재입원되지 않는 것인 방법.

청구항 8

(a) rhSCGB3A2를 빈번한 호흡기 악화를 갖는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 빈번한 호흡기 악화를 경험하는 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하는 방법으로서,

상기 환자는 rhSCGB3A2 투여 후 2개월 이상 동안 재입원되지 않는 것인 방법.

청구항 9

(a) rhSCGB3A2를 만성 호흡기 질환 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 만성 호흡기 질환 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하는 방법으로서,

상기 환자는 rhSCGB3A2 투여 후 1개월 이상 동안 재입원되지 않는 것인 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 중증 호흡기 악화는 폐 섬유증 또는 기관지 확장증에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 중증 호흡기 악화는 폐 섬유증 또는 기관지 확장증에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 중증 호흡기 악화는 폐 섬유증 또는 기관지 확장증에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 13

서열번호 1인, N-말단 ATA를 가진 재조합 인간 SCGB3A2 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 단백질은 PLA_2 효소를 억제하는 것인 단백질.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 단백질은 등전위 초점 겔에서 6.3-6.7 또는 그 사이의 등전점에 해당되게 이동하는 것인 단백질.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 단백질은 동종이량체를 더 포함하는 것인 단백질.

청구항 17

청구항 14에 있어서, 상기 단백질은 6.7의 pI을 갖는 동종이량체를 더 포함하는 것인 단백질.

청구항 18

UBL 융합 단백질과, 융합 파트너를 인식하고 융합 파트너와 SCGB3A2 사이를 절단하는 UBL 프로테아제를 사용하여, 서열번호 1에 따른 무손상(intact) SCGB3A2 단백질을 방출하는 단계를 포함하는, 재조합 인간 SCGB3A2를 합성하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 SCGB1A1 (CC10), SCGB3A1 및 SCGB3A2를 포함한, 분비글로빈(secretoglobin) 단백질에 대한 약학적 조성물, 생산 방법, 분석 방법 및 사용 방법에 관한 것이다. 이러한 분비글로빈의 신규한 생리학적 역할과 치료 용도가 확인되었다. 구체적으로, 본 발명은 치료 과정 후 최대 10 개월까지 중증 호흡기 악화(severe respiratory exacerbation)로 인한 입원을 예방하거나 지연하는 데에 있어서 rhCC10, rhSCGB3A2 및 rhSCGB3A1의 신규한 사용 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 안정적이고 항염증 특성을 보유하는 rhSCGB3A2의 신규한 생산 방법 및 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 또한, rhCC10을 투여하여 중증 호흡기 악화를 예방하는 방법을 더 제공한다. 본 발명은 rhSCGB3A2를 투여하여 기관지 확장증(bronchiectasis)을 치료하고 기관지 확장증의 악화를 예방하기 위한 방법을 제공한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 rhCC10, rhSCGB3A2 또는 rhSCGB3A1을 투여하여 만성 폐 질환에서 기도 개형(airway remodeling)을 역전시키고 급성 폐 손상에서 기도 개형을 예방하기 위한 방법을 제공한다. 보다 더 구체적으로, 이 분비글로빈들은 기도 상피에서, 정상적인 수의 클라라 세포(Clara cell) 및, 항-CGRP1 항체에 대한 면역활성에 의해 식별되는, 신경-상피체(neuroepithelial body)(일명 NEB) 또는 신경 내분비 세포 클러스터(neuroendocrine cell cluster)(일명 NEC)로 불리는, 그들의 관련 구조(associated structure)를 복원하여 간접적으로 기도 개형을 변형한다. 그 후, 클라라 세포 및 기타 CGRP1+ 세포는, 이들 분비글로빈 및 정상 점막 환경의 다른 구성 요소를 분비하여, 심각한 악화를 경험하지 않고 흡입된 시험감염(inhaled challenge)에 대해 더 저항성인 호흡기 점막 및 상피의 항상성과 정상적인 기능성에 기여한다.

배 경 기 술

[0002] 우테로글로빈(uteroglobin)으로도 알려진, 천연 인간 클라라 세포 10kDa 단백질 (CC10), 클라라 세포 16 kDa 단

백질 (CC16), 클라라 세포 분비 단백질 (CCSP), 블라스토키닌(blastokinin), 뇨 단백질-1(urine protein-1), 및 분비글로빈 1A1 (SCGB1A1)은 모든 척추 동물에 존재하는 것으로 여겨지는 분비글로빈(secretoglobin)으로 불리는 관련 단백질의 패밀리 중 하나이다. SCGB3A1 및 SCGB3A2(Porter, 2002)라고 불리는, 호흡기 관(respiratory tract)에서도 매우 높은 수준으로 발현되는 두 개의 추가적인 분비글로빈이 있다. 이 세 가지 단백질; SCGB1A1, SCGB3A1 및 SCGB3A2은 본원에서 "호흡기 분비글로빈(respiratory secretoglobin)"으로 지칭된다. 표 1은 각각의 호흡기 분비글로빈에 대한 유전자 은행 자리(Genebank locus)와 아미노산 서열을 보여준다.

[0003] 표 1. 호흡기 분비글로빈 단백질

표 1

[0004]

단백질	유전자 은행 자리(Genebank locus)	아미노산 서열
SCGB1A1 (CC10)	BC004481	EICPSFQRVIETLLMDTPSSYEAAMELFSPDQDMREAGAQLKKLVDTLPQKPRESIIKLMEKIAQSSLCN
SCGB3A1	NP_443095	AAFLVGSAKPVAQPVAALESAAEAGAGTLANPLGTLNPLKLLLSSLGIPVNHLIEGSQKCVAELGPQAVG AVKALKALLGALTVFG
SCGB3A2	AAQ89338	ATAFLINKVPLPVDKLAPLPLDNILPFMDPLKLLLKTLGISVEHLVEGLRKCVNELGPEASEAVKKLLEA LSHLV

[0005] 포유 동물에서 호흡기 분비글로빈의 주요 소스(source)는 폐 및 기관 상피 세포, 특히 비-섬모 세기관지 기도 상피 세포 (주로 클라라 세포)이며, 그들은 성인 폐의 세포외 체액에서 매우 풍부한 국소 생산되는 단백질이다. 그들은 또한 비강 상피에서 분비된다. 따라서, 호흡기 분비글로빈은 상부 및 하부 호흡기 관 모두에서 고도로 발현된다; 상부 호흡기 관은 비강 및 부비동을 포함하고 하부 호흡기 관은 기관(trachea), 기관지(bronchi) 및 폐의 폐포를 포함한다. 호흡기 분비글로빈의 상당량은 또한 혈청 및 소변에 존재하며, 대부분 폐 소스로부터 유래된다. 또한 SCGB3A1은 위, 심장, 소장, 자궁 및 유선에서 발현되고, SCGB3A2은 갑상선 (Porter, 2002)에서 낮은 수준으로 발현된다. 또한 CC10은 생식 조직 (자궁, 정낭), 외분비샘 (전립선, 유선, 췌장), 내분비샘 (갑상선, 뇌하수체, 부신 및 난소) 및 흉선과 비장에 의해 생산된다(Mukherjee, 1999; Mukherjee, 2007). *생체 내* 인간 CC10의 주된 회수가능한 형태는 4.8의 등전점을 가진, 70개의 아미노산으로 이루어진 길이를 갖는, 2개의 동일한 단량체로 구성된 동종이량체(homodimer)이다. 그것은 SDS PAGE에서 약 10kDa의 겉보기 분자량으로 이동하지만, 분자량이 15.8 kDa이다. 단량체는 역평행 구조로 배열되고, 하나의 N-말단에 나머지 하나의 C-말단이 인접하며, 이량체의 완전 산화된 형태에서, 단량체는 2개의 이황화 결합에 의해 연결된다(Mukherjee, 1999). 그러나, 인간 시료에서 SCGB3A2의 *생체 내* 분자 형태 (단량체, 이량체, 또는 기타 복합체)는 아직 규명(characterize)되지 않았다. 인간 SCGB3A1과 SCGB3A2의 성공적인 합성과 이러한 단백질의 *시험관 내* 생화학적 특성규명을 설명하는 보고는 현재까지 없었다 하더라도, 3가지 호흡기 분비글로빈은 모두 합성 (Nicolas, 2005) 또는 재조합 방법 (Mantile, 1993)에 의해 제조될 수도 있다.

[0006] CC10은 다른 단백질, 수용체 및 세포 종류와의 다양한 상호 작용에 대해 규명된 항염증 및 면역조절 단백질이다 (Mukherjee, 2007, Mukherjee, 1999, 및 Pilon, 2000에서 검토됨). 낮은 수준의 CC10 단백질 또는 mRNA가 천식 (Lensmar, 2000; Shijubo 1999; Van Vyve, 1995), 폐렴 (Nomori 1995), 폐쇄성 세기관지염 (Nord, 2002), 사르코이드증(sarcoidosis)(Shijubo, 2000)을 비롯한, 어느 정도의 염증을 특징으로 하는 다수의 임상적 상태에 대한 다양한 조직 및 유체 시료, 및 재발성 부비동염과 비강 폴립증(nasal polyposis)(Liu, 2004)을 수반한 만성 비염을 앓고 있는 환자에서 발견되었다. 내인성 CC10에 대한 신체의 주요 소스인 폐 상피 세포는 종종 이러한 상태에 의해 악영향을 받거나, 고갈되거나 심지어 제거되기도 한다(Shijubo, 1999).

[0007] CC10 녹아웃(knockout; KO) 마우스는 폐 항상성, 생식 및 특정 유형의 신장 질환에서 CC10의 역할을 특징짓는 데에 중요했다. 각각 다른 유전자 녹아웃 구조체 및 다른 부모 마우스 종(parental mouse strain)을 갖는, CC10 KO 마우스의 두 종이 있다. 한 녹아웃 종은 전신 염증, 약한 생식 능력 (작은 산자수(litter size)), 및 인간 IgA 신장병을 닮은 치명적인 신장 표현형을 포함한, 여러 가지 극단적인 표현형을 나타낸다(Zhang, 1997; Zheng, 1999). 다른 녹아웃 종은 이 극단적 표현형들을 보유하고 있지 않으며, 보다 생존력이 높아, 상당히 많은 실험을 수행할 수 있게 한다(Stripp, 1997). CC10 KO 마우스의 종은 모두 천식, 폐 섬유증 및 발암(carcinogenesis)의 모델에서의 폐 시험감염(pulmonary challenge), 세균 및 바이러스 감염, 및 산소 및 오존 노출에 대한 훨씬 더 강한 민감도와 상당히 높아진 염증 반응을 공유한다(Plopper, 2006; Lee, 2006; Yang, 2004; Wang, 2003; Harrod, 2002; Chen, 2001; Wang, 2001; Hayashida, 2000; Harrod, 1998). 재조합 인간

CC10 (rhCC10)를 사용한, 이러한 녹아웃 마우스에서 CC10 기능의 복원은 최대 7일의 종료 지점을 가진 단기 유발검사(challenge) 모델에서 과장된 폐 염증 반응을 완화하는 것으로 나타났다 (Chen, 2001; Wang, 2003). 본 발명과 가장 관련성이 높은 것으로, 두 종 모두는 칼시토닌-유전자 관련 단백질 1 (CGRP1)에 의한 양성 염색에 의해 확인된 바와 같이, 상당히 감소된 수의 클라라 세포 및 이들과 연관된 구조, 소위 신경 상피체(NEB)(Castro, 2000) 또는 신경-내분비 세포 클러스터(NEC)(Hong, 2001; Reynolds, 2000)를 특징으로 하는 기도 상피 표현형을 공유한다. 기도 내 클라라 세포들과 연관된 구조에서 이러한 2-10배 결핍은 이들 KO 마우스 내에 어떤 타입의 손상도 없을 때 생긴다.

[0008] 호흡곤란 증후군(respiratory distress syndrome)(RDS)을 경험하는 조산아는 고유의(native) CC10이 부족하다. 임상 시험에서, rhCC10의 단일 투여량이 출생 당일에 투여되었고 폐에서 3-7일 동안 강한 단기 항염증 효과를 매개하였다. 약동학 분석에 의하면 단일 투여량을 투여한지 48 시간 이내에 잉여 CC10이 제거된 것으로 나타났다. 1) 생후 28일째 흉부 X 선 불투명도 또는 2) 월경후 연령(postmenstrual age)(PMA) 36주차 보충 산소 사용을 포함하는, 임상 파라미터에 의해 정의된 바와 같이, 항염증 효과에도 불구하고, rhCC10은 신생아 기관지폐형성 장애(bronchopulmonary dysplasia)(BPD) (Levine, 2005)의 진행을 예방하지 못했다. 또한 rhCC10은 기관 흡인액(tracheal aspirate fluid)(TAF)에서 관찰되는 폐 염증의 지표에서 유의한 감소에도 불구하고, 병원에서의 시간이나 인공호흡기 일 수를 단축하지 못했다. Levine 등에서 명시된 바와 같이, 12 개월 종료 지점(endpoint)에 위약, 저용량 및 고용량 치료 그룹 간에 차이가 없었다 (2005).

[0009] BPD를 가진 조산아는 빈번한 중증 호흡기 악화를 경험하기 쉽고 생후 1-2년에 재입원 비율이 높다. 중증 호흡기 악화는 호흡 부족, 호흡 곤란, 코와 가슴 울혈, 점액의 과잉생성, 및 때로는 호흡 장애(respiratory distress)를 특징으로 한다. 중증 호흡기 악화는 환자가 환경적 노출과, 먼지, 연기, 알레르기 유발물질, 오염물질, 화학물질, 세균, 곰팡이, 바이러스의 흡입을 통한 감염을 겪으면 발생한다.

[0010] 환경적 유발물질에 노출될 때 호흡기, 위장, 비뇨기의 만성 질환을 가진 환자의 많은 유형은, 심각한 악화에 민감하다. 유사하게, 환경적 유발물질에 노출될 때 자가면역 및 알레르기 질환을 비롯한 면역 질환을 가진 환자는 또한 심각한 악화에 민감하다. 그들이 환자에서 연간 3회 넘게 발생하면 중증 또는 급성 악화가 빈번한 것으로 간주된다. 심지어 만성 질환을 가지고 있지 않지만 급성 폐 손상(acute lung injury)(ALI)을 경험하는 환자는 손상 후에, 중증 호흡기 악화를 닮은, 빈번한 중증 급성 호흡기 에피소드에 민감하다. 악화를 유발하는 환경 자극원으로는, 먼지, 미립자, 연기, 알러지 유발물질, 공해물질(pollutant), 화학물질, 오염물질(contaminant), 세균, 곰팡이, 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 흡입되거나, 섭취되거나, 삼키거나, 피부를 통해 흡수되거나, 그렇지 않으면 환자의 신체의 젖은 점막 표면과 국소적으로 접촉하게 될 수도 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 전술은 본 발명에 의해 달성되는 목적들의 비-배타적인 목록을 제공한다:

[0012] 분비글로빈을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 최대 10개월 동안 기저(underlying) 또는 만성 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 일차 목적이다.

[0013] 호흡기 분비글로빈(respiratory secretoglobin)을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 최대 10개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0014] rhCC10을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 최대 10개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0015] rhSCGB3A2를 투여해서, 분비글로빈 투여 후 최대 10개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0016] rhSCGB3A1을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 최대 10개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0017] 분비글로빈을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 적어도 1개월 동안 기저 또는 만성 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0018] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 적어도 1개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한

악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0019] rhCC10을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 적어도 1개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0020] rhSCGB3A2를 투여해서, 분비글로빈 투여 후 적어도 1개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0021] rhSCGB3A1을 투여해서, 분비글로빈 투여 후 적어도 1개월 동안 기저 또는 만성 호흡기 질환의 심각한 악화로 인한 입원을 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0022] 분비글로빈을 투여해서, 일반적으로 만성 질환의 재발성 악화를 경험하는 환자에서 하나의 심각한 악화에서 다음 심각한 악화까지의 시간 간격을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0023] 만성 질환의 재발성 악화를 경험하는 환자에서 호흡기 분비글로빈 요법의 투여 또는 과정(course) 이후 최대 10개월 동안, 하나의 심각한 악화에서 다음 심각한 악화까지의 시간 간격을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0024] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 만성 호흡기 질환의 재발성 악화를 경험하는 환자에서 하나의 심한 호흡기 악화에서 다음까지의 시간 간격을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0025] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 급성 폐 손상을 경험했지만 손상 전에 만성 호흡기 질환으로 진단되지 않은 환자에서 악화를 닮은 중증 급성 호흡기 에피소드를 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0026] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 만성 호흡기 질환을 가진 감수성 환자에서, 악화를 유발할 수 있는 흡입 자극제에 노출된 후 심각한 악화를 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0027] 분비글로빈을 투여해서, 만성 자가면역 질환의 재발성 악화를 경험하는 환자에서, 하나의 중증 자가면역 악화에서 다음까지의 시간 간격을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0028] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 만성 호흡기 질환의 빈번한 악화를 경험하는 환자에서, 하나의 중증 호흡기 악화에서 다음까지의 시간 간격을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0029] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 만성 자가면역 질환의 빈번한 악화를 경험하는 환자에서, 하나의 중증 자가면역 악화에서 다음까지의 시간 간격을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0030] 다음 악화를 예방하기 위해 이전 악화 동안 또는 이후에 분비글로빈을 투여하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0031] 정맥 내 주사, 기관 내 점적주입(intratracheal instillation), 흡입, 비강 내 점적주입, 경구, 설하, 또는 항문 또는 질 크림, 겔, 또는 좌약에 의해 분비글로빈을 투여하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0032] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 비-섬모(non-ciliated) 분비 상피 세포의 수를 증가시킴으로써 점막 조직을 회복시키는 것이 본 발명의 이차 목적이다.

[0033] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 상부 및 하부 호흡기 관을 포함한 호흡기 관 내 비-섬모 분비 상피 세포의 수를 증가시킴으로써 호흡기 점막 조직 및 기도를 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0034] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 호흡기 관 내 클라라 세포의 수를 증가시킴으로써 호흡기 점막 조직 및 기도를 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0035] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 호흡기 관 내 NEB 및 NEC의 수를 증가시킴으로써 호흡기 점막 조직 및 기도를 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0036] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 혈액에 순환하는 하나 이상의 고유의 호흡기 분비글로빈의 양을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0037] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 비강, 기관지, 또는 폐의 호흡 기도 라이닝 유체(airway lining fluid)(ALF) 및/또는 객담 또는 유도 객담에서 발견되는 하나 이상의 고유의 호흡기 분비글로빈의 양을 증가시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0038] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 호흡기 관 내 분비글로빈-분비 세포의 수를 증가시킴으로써 호흡기 점막 조직

및 기도를 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0039] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 호흡기 관 내 CC10-분비 세포의 수를 증가시킴으로써 호흡기 점막 조직 및 기도를 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0040] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 호흡기 관 내 SCGB3A2-분비 세포의 수를 증가시킴으로써 호흡기 점막 조직 및 기도를 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0041] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 호흡기 관 내 SCGB3A1-분비 세포의 수를 증가시킴으로써 호흡기 점막 조직 및 기도를 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0042] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 여성 비뇨기 관 내 CC10-분비 상피 세포의 수를 증가시킴으로써 질 점막 조직을 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0043] 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 입, 목, 식도, 위, 췌장, 담관, 상부 및 하부 창자, 및 결장을 포함한 위장관 내 CC10-분비 상피 세포의 수를 증가시킴으로써 위장 점막 조직을 회복시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0044] ATA의 비-고유의 N-말단(non-native N-terminus of ATA)을 갖는 인간 SCGB3A2의 약학적 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0045] 6.7의 등전점을 갖는 인간 SCGB3A2의 약학적 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0046] 6.3의 등전점을 갖는 인간 SCGB3A2의 약학적 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0047] 6.3과 6.7의 등전점을 갖는 아형(isoform)의 조합을 가진 인간 SCGB3A2의 약학적 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0048] 다른 단백질과의 융합으로 합성된 재조합 인간 SCGB3A2의 약학적 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0049] 유비퀴틴 유사 단백질과의 융합으로 합성되는 재조합 인간 SCGB3A2의 약학적 조성물을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0050] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 기관지 확장증으로 진단받은 환자에서 기관지 확장증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0051] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 일종의 폐 섬유증으로 진단받은 환자에서 폐 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0052] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 일종의 낭포성 섬유증으로 진단받은 환자에서 낭포성 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0053] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, COPD로 진단받은 환자에서 COPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0054] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 만성 기관지염으로 진단받은 환자에서 만성 기관지염의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0055] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 폐기종으로 진단받은 환자에서 폐기종의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0056] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 천식으로 진단받은 환자에서 천식의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0057] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, BPD로 진단받은 환자에서 BPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0058] 인간 호흡기 분비글로빈을 투여해서, 태변 흡인 증후군(MAS)으로 진단받은 환자에서 MAS의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0059] 인간 CC10을 투여해서, 기관지 확장증으로 진단받은 환자에서 기관지 확장증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0060] 인간 CC10을 투여해서, 일종의 폐 섬유증으로 진단받은 환자에서 폐 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다. 인간 CC10을 투여해서, 일종의 낭포성 섬유증으로 진단받은 환자에서 낭포성 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0061] 인간 CC10을 투여해서, COPD로 진단받은 환자에서 COPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0062] 인간 CC10을 투여해서, 만성 기관지염으로 진단받은 환자에서 만성 기관지염의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0063] 인간 CC10을 투여해서, 폐기종으로 진단받은 환자에서 폐기종의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0064] 인간 CC10을 투여해서, 천식으로 진단받은 환자에서 천식의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0065] 인간 CC10을 투여해서, BPD로 진단받은 환자에서 BPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0066] 인간 CC10을 투여해서, 태변 흡인 증후군(MAS)으로 진단받은 환자에서 MAS의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0067] 인간 SCGB3A2를 투여해서, 기관지 확장증으로 진단받은 환자에서 기관지 확장증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0068] 인간 SCGB3A2를 투여해서, 일종의 폐 섬유증으로 진단받은 환자에서 폐 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0069] 인간 SCGB3A2를 투여해서, 일종의 낭포성 섬유증으로 진단받은 환자에서 낭포성 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0070] 인간 SCGB3A2를 투여해서, COPD로 진단받은 환자에서 COPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0071] 인간 SCGB3A2를 투여해서, 만성 기관지염으로 진단받은 환자에서 만성 기관지염의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0072] 인간 SCGB3A2를 투여해서, 폐기종으로 진단받은 환자에서 폐기종의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0073] 인간 SCGB3A2를 투여해서, 천식으로 진단받은 환자에서 천식의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0074] 인간 SCGB3A2를 투여해서, BPD로 진단받은 환자에서 BPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0075] 인간 SCGB3A2를 투여해서, 태변 흡인 증후군(MAS)으로 진단받은 환자에서 MAS의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0076] 인간 SCGB3A1을 투여해서, 기관지 확장증으로 진단받은 환자에서 기관지 확장증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0077] 인간 SCGB3A1을 투여해서, 일종의 폐 섬유증으로 진단받은 환자에서 폐 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0078] 인간 SCGB3A1을 투여해서, 일종의 낭포성 섬유증으로 진단받은 환자에서 낭포성 섬유증의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0079] 인간 SCGB3A1을 투여해서, COPD로 진단받은 환자에서 COPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0080] 인간 SCGB3A1을 투여해서, 만성 기관지염으로 진단받은 환자에서 만성 기관지염의 악화를 지연 또는 예방하는

것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0081] 인간 SCGB3A1을 투여해서, 폐기종으로 진단받은 환자에서 폐기종의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0082] 인간 SCGB3A1을 투여해서, 천식으로 진단받은 환자에서 천식의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0083] 인간 SCGB3A1을 투여해서, BPD로 진단받은 환자에서 BPD의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0084] 인간 SCGB3A1을 투여해서, 태변 흡인 증후군(MAS)으로 진단받은 환자에서 MAS의 악화를 지연 또는 예방하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

과제의 해결 수단

[0085] 호흡기 관에서 발현되는 분비글로빈(secretoglobin) 단백질은 기능성 호흡기 상피에 존재하는, 클라라 세포들(Clara cells)과 다른 호흡기 상피세포 및 면역 구조체(immune structure)의 발달을 촉진한다. SCGB1A1(일명 CC10, 우테로글로빈, CCSP, CC16 등), SCGB3A2(일명 UGRP1, HIN-2) 및 SCGB3A1(일명 UGRP2, HIN-1)를 비롯하여, 인간 호흡기 관에서 고도로 발현되는 세 가지 분비글로빈이 있다.

[0086] 본 발명은 일반적으로 환경 노출에 의해 유발되는 만성 질환, 특히 호흡기 질환의 심각한 악화를 지연 및 예방하기 위한 호흡기 분비글로빈의 용도에 관한 것이다. 조직 수준에서, 호흡기 분비글로빈은 호흡기 조직에서의 분비글로빈-분비 세포 및 관련 구조체의 수의 증가를 매개하고, 이는 체액에서의 그들의 분비글로빈 분비 생성물의 양의 증가를 통해 간접적으로 측정될 수 있다. 예를 들면, rhCC10 투여는 클라라 세포, NEB 및 NEC 수의 증가를 매개하여, 호흡 기도 상피를 회복시킨다. 현재, 이것이 CC10 KO 마우스의 기도 상피 표현형과 일치하고 중증 호흡기 악화로부터의 매우 강한 장기간의 보호에 해당하지만 일종의 폐 섬유증인 신생아 BPD의 예방에는 해당하지 않는 조산아 데이터를 설명하는 유일한 가설이다.

[0087] rhCC10이 신생아 BPD의 진행을 방지하지는 않았지만, 재입원을 필요로 하는 중증 호흡기 악화로부터 장기간 보호를 제공했다는 것이 유아가 40주 임신 후 6개월 월령이 되었을 시간인 6개월의 PMA에서 관찰되었다. 이 시험은 24-28주 사이의 PMA 유아를 대상으로 하기 때문에, 이 종료 지점은 rhCC10의 단일 투여 후 최대 10개월이다.

도면의 간단한 설명

[0088] 도 1: 인간 SCGB3A2 아미노산 서열, 예측되는 N-말단과 실제 N-말단의 비교와 함께 인간 SCGB3A2 아미노산 서열의 정렬

도 2: 정제된 rhSCGB3A2의 SDS-PAGE, 정제된 rhSCGB3A2의 SDS-PAGE. 각각 DTT 1mM의 존재 또는 부재 하에 5 ㎍을 함유하는 시료를 SDS 시료 완충액과 혼합하고, 5분간 끓이고, 10-20%의 트리신(tricine) 겔 상에 로딩하였다. 겔을 전개(run)시키고, Coomassie R250로 염색했다. 겔을 염색 제거하고 디지털 카메라로 촬영하였다.

도 3: rhCC10 및 UBL 및 Den-1 대비, 정제된 rhSCGB3A2의 등전위 초점(isoelectric focusing), 정제된 rhSCGB3A2의 등전위 초점. 5㎍을 함유하는 시료를 각각 Novex IEF 겔 상에 로딩하였다. 겔을 전개시키고, Coomassie R250로 염색했다. 겔을 염색 제거하고 디지털 카메라로 촬영하였다. 화살표는 ATA N-말단을 갖는 rhSCGB3A2의 주요 아형(major isoform) 및 소수 아형(minor isoform)을 나타낸다.

도 4: rhSCGB3A2에 의한 $sPLA_2$-1 B의 시험관 내 억제 패널 A: UNIBIPY 기질; PLA_2 없음; rhSCGB3A2 없음. 패널 B: UNIBIPY 기질 + PLA_2; rhSCGB3A2 없음. 패널 C: UNIBIPY 기질 + PLA_2 + rhSCGB3A2. 피크 #1은 UNIBIPY 인지질 기질이며, 피크 #2는 $sPLA_2$에 의해 절단 후 생성물이다.

도 5: 인간 TAF에서의 SCGB3A2의 웨스턴 블로팅. 항-rhSCGB3A2 토끼 폴리클로날 항체를 사용하여 정제된 rhSCGB3A2 대비, 인간 유아의 기관 흡인액의 웨스턴 블로팅. 각각 TAF 20 ㎕을 함유하는 시료를 Novex 10-20%의 트리신 겔 상에 로딩하였다; rhSCGB3A2는 래인 1 (5ng)과 래인 8 (1ng)에 있음. 겔을 염색 제거하고 디지털 카메라로 촬영하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 다음을 포함하는 증거 세 가지가 본 발명을 구상하는 데에 조합되었다; 1) 조산아에서 관찰되는 rhCC10의 단일 투여에 의한 중증 호흡기 악화 및 재입원의 장기간 방지, 2) CC10 KO 마우스의 기도 상피 표현형, 3) SCGB3A2의 "성장 인자" 속성 (Guha, 2012; Kurotani, 2008; Kurotani, 2008a; Inoue, 2008; Niimi, 2001). 수년간의 연구에도 불구하고, 항염증 효과를 매개한다는 것 이외에는, 호흡기 상피세포에서 CC10의 역할에 관한 대중적 합의가 없다. 알레르기성 비염의 코 알레르기 유발검사 모델에서 최근의 임상 시험 실패는 심지어 *생체 내* 항염증 효과조차도 모든 유형의 염증 질환에 대해 일관되지 않는다는 것을 보여주었다(Widegren, 2009). 그리고, 완전한 CC10 결핍에도 불구하고, 클라라 세포들은 여전히 CC10 KO 마우스의 두 종의 기도 모두에서 발견된다. CC10 및 SCGB3A2가 구조적으로 유사하며, 이에 따라 일부의 기능을 공유할 것으로 생각되지만, CC10에 의한 기도 상피 세포의 성장 또는 발달의 자극에 관한 보고가 없으며, rhCC10은 사실 기도 상피 세포주 A549 (Szabo, 1998)를 포함한 상피세포 기원의 종양 세포의 성장을 억제하는 것으로 주지되어 있다(Kundu, 1996; Leyton, 1994).

[0090] 그럼에도 불구하고 본 발명자들은 출생 일에 조산아에게 투여된 rhCC10가 CC10-분비 세포의 발달을 자극하였으며, 이어서, 이 세포들이 고유의 CC10을 생산하였으며, 보다 많은 CC10-분비 세포의 발달을 자극했다고 믿고 있다. 위약-처리된 유아와 비교할 때, 최종 결과는 모든 환경적 도전(먼지, 연기, 알레르기 유발물질, RSV 감염, 인플루엔자 감염, 등)에 대해 더 저항성이 있는 rhCC10-처리된 유아에서의 더욱 정상적인 탄성 호흡기 상피(normal and resilient respiratory epithelium)였다. 출생일에 rhCC10의 단일 투여는 위약-처리된 유아에서 관찰된 50%의 재입원 비율과 대조적으로, 중증 호흡기 악화로 인한 재입원으로부터 100% 보호를 부여했다.

[0091] 본 발명자들은 추가로 호흡기 상피에서 CC10-분비 세포의 발달을 촉진하기 위해 CC10를 사용하는 것이 또한 기도 개형이 클라라 세포의 상실을 초래한 만성 호흡기 질환을 가진 성인에서 작용할 것이라고 믿고 있다. rhCC10에 의한 치료 과정은 질환을 치료하지는 않을 수도 있지만, 어느 정도 클라라 세포와 관련 구조체를 복원시켜서, 후속 환경적 도전에 더욱 저항성이 강해진 더욱 정상적인 상피세포를 가져올 것이라고 우리는 믿고 있다. rhCC10 치료 과정의 임상적 결과는 이어서 다음의 중증 악화까지의 시간 간격의 증가일 것이다.

[0092] 본 발명자들은 또한, CC10 KO 마우스의 클라라 세포 결핍의 기도 상피 표현형에 의하면 CC10은 클라라 세포, 관련 구조체, 및 기도 상피세포의 다른 정상 세포 집단의 발달에 필요한 자가분비 및 측분비 인자임을 시사한다고 믿고 있다. 본 발명자들은 CC10가 위장 관과 비뇨생식기 관을 포함한, 호흡기 관 외부 CC10-분비 세포의 발달 및 유지에 필요한 자가분비 및 측분비 인자라고 믿고 있다. 분비글로빈은 구조적 유사성을 공유하기 때문에 그들이 또한 유사한 기능을 공유할 것이라는 많은 추측이 있지만, 그러나, *시험관 내* 또는 *생체 내* 임의의 두 분비글로빈 간에 어떠한 생물학적 활성도 공유되는 것으로 이전에 확인되지 않았다. 여기서, 우리는 rhSCGB3A2가 CC10와, *시험관 내* 돼지 췌장 포스포리파제 A_2를 억제하는 능력을 공유한다고 보고한다. 이것은 CC10 외에 다른 분비글로빈이, 실제로 임의의 포스포리파제 A2 효소를 억제하거나 또는 항염증 활성을 보유한다는 것의 최초의 보고이다. 이러한 결과를 바탕으로, 본 발명자들은 rhCC10과 구조적 유사성을 공유하는, 호흡기 분비글로빈을 비롯한 다른 분비글로빈들이, 이들을 분비해서, 후속 악화까지의 시간 증가, 후속 악화의 중증도 감소, 및 급성 손상 후 심각한 악화의 예방과 같은 장기적인 임상적 혜택(clinical benefit)을 가져오는 세포의 발달 및 유지를 촉진할 수 있다고 추론한다.

[0093] 실시예 1: RDS를 가진 조산아에서의 rhCC10에 의한 장기적인 보호

[0094] rhCC10의 안전성, 약동학 및 항염증 속성을 호흡 곤란 증후군(RDS)을 가지며 932g의 평균 출생 체중과 26.9주의 평균 재태 기간(gestational age)을 가진 22명의 조산아에 대한 무작위, 위약 대조, 이중 맹검, 다기관 시험에서 평가하였으며, 이들은 계면 활성제 처리 후 위약(n=7), rhCC10 1.5mg/kg (n=8) 또는 5.0mg/kg (n = 7)의 기관 내(IT) 투여를 받았다(Levine, 2005). rhCC10-치료된 유아는 생후 최초 3일 동안, TAF 총 세포 수($P<0.001$), 호중구 수($P<0.001$), 및 총 단백질 농도($P<0.01$)의 현저한 감소를 보였고, IL-6($P<0.07$) 감소를 보였다. rhCC10은 안전하고 내약성이 있었다.

[0095] 현저하게, 작은 수에도 불구하고, 6개월 정정된 재태 기간(corrected gestational age)(CGA)에 17명의 유아의 추적조사에 의하면 표 2에 나타낸 바와 같이 rhCC10을 받은 0/11이 위약을 받은 3/6에 비해 호흡기 원인으로 병원에 다시 입원한 것으로 발견되었다 ($P<0.05$ 피셔의 정확한 검정(Fisher's Exact Test), 양측검정).

[0096] 표 2: 중증 호흡기 악화로 인한 재입원

표 2

[0097]

	6개월 CGA
위약 (7명 등록)	3/6
1.5mg/kg (8명 등록)	0/6
5mg/kg (7명 등록)	0/5

[0098] 이 결과는 본 문맥상 6 개월 CGA가 유아가 40주 임신된 후 6 개월에 해당하는 기간을 의미하며, 본 연구의 일부 유아가 출생시 24주 월경 후 연령(PMA)이어서, 6개월 CGA 추적조사 시기가 출생일에 투여한 rhCC10의 단일 투여 후 10개월에 일어났다는 것을 고려할 때, 훨씬 더 현저하다. 통계적 관점에서, 결과들은 위약 그룹에서의 적어도 57%의 재입원 발생율 대비, rhCC10 그룹에서의 적어도 27%를 보여준다. 이것은 매우 강력한 장기적인 효과이며 이들 데이터는 rhCC10의 투여를 위해 중요하고 전례없는 장기적인 혜택을 나타낸다.

[0099] 약동학 분석에 의하면 과잉 CC10은 9-11시간의 혈청 반감기를 가지면서, 투여 48 시간 이내에 제거된 것으로 나타났을 때 그렇게 심오한 장기적인 혜택을 발견하는 것은 훨씬 더 놀랍다(Levine, 2005). 상당한 양의 rhCC10이 거의 2일 동안 기관 흡인액에서 관찰되고, 혈청에 6시간까지 도달되었으나, 이후 신장에 의해 여과되고 12시간까지 소변으로 배출되었다. rhCC10은 폐에서 혈액에 이어서 뇨까지의 자연적인 생리적 분배 경로를 따라갔으며, 빠른 제거에도 불구하고, 장기적인 혜택을 보였다.

[0100] 실시예 2: rhSCGB3A2의 클로닝 및 발현

[0101] 도 2는 본 연구를 위해 제조된 rhSCGB3A2의 아미노산 서열을 도시하고 있다. 상기 서열은 유전자 은행 자리 AAQ89338에서 취했다. 유비퀴틴 유사(UBL) 융합 시스템을 이용하고 UBL-프로테아제를 사용하여 UBL에서 rhSCGB3A2 산물을 방출하는 재조합 산물 방법의 결과로서, N-말단은 포유류 분비된 단백질에 대한 컨센서스 단일 펩타이드(consensus single peptide) 절단 부위를 사용하여 고유의 단백질에 대해 예측된 N-말단과 상이하다. 또한, 인간의 유체 시료로부터 단리된 실제 펩타이드의 N-말단과도 상이하다. 이것은 히스티딘 정제 태그 없는 인간 SCGB3A2의 합성의 최초의 기술이며, 단백질의 안정성과 활성에 대한 N-말단의 효과는 예측될 수 없었다. rhSCGB3A2의 아미노산 서열은 표 1에 표시되고, 8147.82 달톤의 예측된 분자량과 6.1의 예측된 등전점을 가졌다.

[0102] rhSCGB3A2에 대한 합성 DNA 코딩 서열을 *E. coli* 박테리아 K12 균주에서의 발현에 최적화된 코돈 사용(codon usage)으로, jcat(www.jcat.de)을 사용하여 설계하였다. DNA 서열이 생성되면, 이미 UBL를 함유하고 있는 박테리아 발현 벡터, pTXB1 내로 유전자의 방향성 클로닝(directional cloning)을 용이하게 하기 위해 말단에 제한 효소 인식부위를 추가하였다. SCGB3A2를 UBL의 C-말단 연장으로 클로닝하였다. 방향성 클로닝을 위해서, AflII 부위를 5' 말단에 놓았으며 BamHI 부위를 3' 말단에 놓았다.

[0103] rhSCGB3A2에 대한 신규한 유전자를 PCR을 사용하여 중복된 올리고뉴클레오티드들로부터 합성하였다. rhSCGB3A2 유전자에 대한 DNA 서열은 다음과 같다:

[0104] CTTAAGAGGTGGTGCTACCGCTTTCCTGATCAACAAAGTTCCGCTGCCGGTTGACAAACTGGCTCCGCTGCCGCTGGACAACATCCTGCCGTTCATGGACCC
GCTGAAACTGCTGCTGAAAACCCTGGGTATCTCTGTTGAACACCTGGTTGAAGGTCTGCGTAAATGCGTTAACGAACTGGGTCCGGAAGCTTCTGAAGCTGT
TAAAAAACTGCTGGAAGCTCTGTCTCACCTGGTTTAGTAAGGATCC

[0105] UBL-rhSCGB3A2 융합체를 함유하는 pTXB1 플라스미드를, 융합 단백질의 유도가능한 발현을 가능하게 하는 T7 RNA 폴리머라제를 암호화하는 DE3 프로파지를 함유하고 있는, *E. coli* 균주 HMS174/DE3내로 형질전환시켰다. 융합 단백질의 발현을 위해 콜로니를 스크리닝하고, rhSCGB3A2 유전자를 고 발현자(high expresser)에서 DNA 서열결정에 의해 재확인하였다.

[0106] 암피실린을 포함하는 SuperBroth 배지를 함유하는 4L 발효 배양물에 최고 발현 클론의 120mL의 하룻밤 배양물을 접종하고 37℃에서 성장시켰다. 배양을 0.3mM의 IPTG를 이용하여 8.75의 OD_{600}에서 UBL-rhSCGB3A2 융합 단백질을 과발현하도록 유도한 다음, 또 다른 2 시간 동안 성장하게 하였다. 원심 분리하여 세포 페이스트를 채취하였고 젖은 세포 페이스트 수율은 67g이었다. 그런 다음 세포 페이스트를 rhSCGb3A2 정제에 사용하였다.

[0107] 실시예 3: rhSCGB3A2의 정제

[0108] 세포 페이스트를 20mM NaH_2PO_4, 0.5M NaCl, pH 7.2에 재현탁시킨 다음, 세포를 동결-융해(freeze-thaw)로 파열시켜서 조 용해물(crude lysate)을 생성하였다. 조 용해물을 4℃에서 20분간 19,800 x g에서 원심분리에 의해 정화시켰다. DNA, 내독소(endotoxin), 및 다른 세균 오염물질을 0.025%의 농도의 폴리에틸이민(PEI)를 이용하고 4℃에서 10분간 19,800 x g에서 이차 원심분리해서 정화된 용해물 상청액으로부터 침전시켰다. 이어서 PEI 상청액을 0.22㎛ 필터를 통해 여과시키고 10mM 이미다졸을 여과액에 첨가하였다. UBL과 UBL 프로테아제 모두 히스티딘 태그를 함유하고 있어서 그들은 고정된 금속 친화성 크로마토그래피(immobilized metal affinity chromatography) 컬럼에 결합된다. 이어서 UBL-rhSCGB3A2 융합 단백질을 함유하는 여과액을 20mM NaH_2PO_4, 0.5M NaCl, 10mM 이미다졸, pH 7.2에서 미리 평형화시킨 IMAC 컬럼(니켈 킬레이팅 세파로스 패스트 플로우(nickel chelating sepharose fast flow))에 통과시키고, 컬럼을 동일한 완충액으로 세척하고 나서, UBL-rhSCGB3A2 융합 단백질을 20mM NAH_2PO_4, 100mM NaCl, 300mM 이미다졸, pH 7.2로 용출시켰다. 그리고 나서 IMAC 용출액을 농축시키고, 15mM Tris, 15mM BisTris, 40mM NaCl, pH 7.0에서 5kDa NMWCO 필터로 접선 흐름 여과(tangential flow filtration)를 이용하여 완충액 교환했다. 오염물질을 결합시키고 UBL-rhSCGB3A2를 통과시키는, Macro Prep High Q 컬럼(BioRad)을 통해 UBL-rhSCGB3A2를 더 정제시켰다. 그리고 나서, 2시간 동안 37℃에서, HCl로 pH를 6.5로 조정하여, 5mM DTT에서 UBL 프로테아제 Den-1(1:100 몰비)로 소화시켜서 rhSCGB3A2를 UBL로부터 분리하였다. 그리고 나서, rhSCGB3A2를 양이온 교환 크로마토그래피(GE 세파로스 SP 고성능)를 이용하여 소화 혼합물로부터 정제하였다. SP 컬럼을 15mM 트리스, 15mM BisTris, 40mM NaCl, pH 6.5로 평형화시키고, 소화 혼합물을 로딩하고, rhSCGB3A2이 통과되는 동안 오염물질이 컬럼에 결합되었다. 그리고 나서, 3.5kDa MWCO 재생된 셀룰로오스 멤브레인을 사용하여 0.9% NaCl에 대해 SP 통과액을 광범위하게 투석하였다. 시료를 원심 농축기(3.5kDa MWCO)를 사용하여 농축시킨 다음, 0.22 ㎛ 필터를 통해 여과시켰다. 여과액은 정제된 rhSCGB3A2이었다. 도 2는 최종 정제된 단백질의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. SDS-PAGE의 밀도측정에 의해 >97% 순수하며, 및 대략 95% 이량체와 5% 단량체이다. rhCC10와 마찬가지로, 환원제로 이량체를 단량체로 완전히 환원시키기는 어렵다.

[0109] 실시예 4:rhSCGB3A2의 등전점

[0110] 단백질의 등전점(pI)은 그 단백질의 전체 표면 전하의 척도이다. pI은 표준 등전위 초점(isoelectric focusing; IEF) 방법을 사용하여 측정한다. 도 3에 도시한 바와 같이 rhSCGB3A2의 pI을 결정하기 위해, rhSCGB3A2, rhCC10, UBL 및 Den-1 약 5㎍을 IEF 겔 (Novex) 상에 로딩하였다. 단백질이 SDS-PAGE 상에서 단일 밴드로 이동하고 다수 밴드가 IEF 겔에서 관찰되는 경우, 단백질의 다른 아형들이 존재할 가능성이 있다. pI 4.8에서 하나의 밴드를 보여주는 rhCC10와는 대조적으로, rhSCGB3A2는 pI 6.7과 6.3에서 두 개의 밴드를 보여준다. 우리의 rhSCGB3A2 서열의 예측된 pI은 6.1이지만(www.expasy.edu; Protein tool "Compute MW/pI"), 여전히 대부분의 단백질은 6.7의 pI에 대응하는 위치에 이동한다. 6.3에서의 작은(minor) 밴드조차도 6.1의 예측된 pI에 대응하지 않는다. 두 가지의 rhSCGB3A2 IEF 밴드가 있다는 것은 비-환원성 SDS-PAGE에서 가시화된 것처럼, 대안적으로 폴딩된(alternatively folded) 아형들 중 하나가 있거나 또는 그들이 단량체 및 이량체를 나타내는 것을 의미한다.

[0111] 이 pI들은 또한 이 제제가 고유한 rhSCGB3A2의 미지의 예상치 못한 아형임을 추가로 보여준다. 재조합 단백질의 고유한 폴딩 패턴은 종종 합성 방법에 의해 결정되며, 이 경우에는, N-말단의 선택, 유비퀴틴-유사 단백질과의 C-말단 융합으로서 단백질의 발현, 융합 단백질의 IMAC 정제, UBL로부터의 SCGB3A2의 절단, 및 UBL과 UBL-프로테아제로부터의 SCGB3A2의 분리에 의해 결정된다. 따라서, 이 제제의 고유성은 합성 방법, 비-고유의 N-말단, 또는 이들 또는 다른 미지의 요인들의 조합에 기인할 수도 있다.

[0112] 실시예 5: rhSCGB3A2에 의한 PLA_2의 억제

[0113] 다양한 배치(batch)의 rhCC10의 효능을 평가하기 위해 개발된 돼지 췌장 분비 PLA_2 효소 ($sPLA_2$) 의 억제를 평가하는 형광 정량 HPLC 분석에서 rhSCGB3A2의 생물학적 활성을 평가하였다. PLA_2 효소의 억제는 CC10에 대한 작용의 주요한 항염증 메커니즘인 것으로 생각된다. 많은 이들은 다른 분비글로빈이 그들의 CC10과의 구조적 유사

성으로 인해, PLA_2 효소를 억제할 수도 있다고 추측했다. rhSCGB3A2 (5.5㎍)을 100ng 돼지 $sPLA_2$ 1B (0.1㎍)과 혼합하고 37℃에서 인큐베이션하였다. 반응은 형광 인지질 유사체 2-데카노일-1-(O-(11-(4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-다이아자-s-인다센-3 프로피오닐)아미노)운데실)-sn-글리세로-3-포스포콜린(일명 UNIBIPY; 47.6ng)의 첨가를 통해 개시하였다. 15 분 후 반응을 2-프로판올 / n-헥산을 첨가하여 종결시켰다. 절단 산물을 Waters Spherisorb 실리카 HPLC 컬럼 상의 기질로부터 분리하였다. 분리 후에 G1321A 형광 검출기를 적용하였다.

[0114] 분석의 결과가 도 4에 도시된다. 패널 A는 $sPLA_2$ 또는 rhSCGB3A2 없는 UNIBIPY 기질을 보여주고; 패널 B는 UNIBIPY 기질 + $sPLA_2$를 보여주고, 패널 C는 UNIBIPY 기질 + $sPLA_2$ + rhSCGB3A2를 보여준다. $sPLA_2$는 기질을 절단해서(피크 #1), 생성물을 생성시킨다(피크 #2). rhSCGB3A2의 존재 시에 생성물 피크는 현저하게 감소된다. 각각의 반응 세트는 중복 실행하였다. rhSCGB3A2는 분석에서 $sPLA_2$-1B 활성의 83% 억제를 보여주었으며, 이는 rhCC10 단백질에 필적할 만하다 (데이터는 도시되지 않음).

[0115] 억제율을 다음과 같이 계산한다:

[0116] 억제율(%)= {1-(rhSCGB3A2 포함 절단된 영역의 평균 / (rhSCGB3A2 미포함 절단된 영역의 평균)} × 100

[0117] rhSCGB3A2는 돼지 췌장 $sPLA_2$를 억제한다는 것과 활성의 수준은 rhCC10에 필적할 만하다는 것으로 결론지어졌다.

[0118] 실시예 6: 인간 체액에서 rhSCGB3A2와 고유의 SCGB3A2의 비교

[0119] 표준 면역화 프로토콜을 이용하여, 두 마리의 뉴질랜드 흰 토끼를 면역화하는데 정제된 rhSCGB3A2를 사용하였다. 단백질을 KLH에 접합시키고, 프로인트 보조제와 혼합하고, 동물에 주입하였다. 두 마리의 동물 모두 매우 높은 역가로 우수한 항체 반응을 일으켰다. Pierce Protein A IgG 정제 키트를 사용하여 동물 혈청의 각 세트로부터 IgG를 정제하고, 정제된 IgG를 PBS, pH 7.2로 투석하고, 분취하고 -80℃에서 보관하였다.

[0120] 조산아 인간 유아에서 얻은 기관 흡인 액(TAF)을 사용하여 웨스턴 블로팅으로 항체를 확인(qualify)했다. 6명 유아로부터의 20㎕ TAF를 함유하는 시료를 비-환원성 SDS-PAGE에서 전개시키고 rhSCGB3A2(5ng)에 비교하였다. 겔을 PVDF 멤브레인에 전기-블로팅(electroblot)하고, 4% 무-지방 우유로 차단하고, 그리고 나서 최고 역가 토끼 항-rhSCGB3A2 IgG(1:5000 희석)을 블롯과 함께 인큐베이션하고, 뒤이어 염소 항-토끼-HRP 접합체와 인큐베이션시켰다(1:20,000 희석). 강화된 화학 발광을 이용하여 블로팅을 전개시켰다(41PBA-ECL-100mM Tris/HCl pH 8.8, 1.25mM 루미놀, 5.3mM 과산화수소, 2mM 41PBA). 면역활성 밴드가 TAF 시료의 5/6에서 나타났다. 시료들 중 두 개는 (3 래인, 6 래인) rhSCGB3A2 동종이량체와 동일한 크기로 이동하는 밴드를 포함하여, rhSCGB3A2 조제가 일부 환자에서 고유의 인간 SCGB3A2를 닮았음을 나타냈다. 동물이나 인간의 연구에 사용하기 위한, 재조합 단백질, 특히 소수성 단백질의 이종 발현은 종종 잘못 폴딩된(misfolded), 비활성, 면역원성, 또는 그렇지 않으면 사용불가한 제제를 초래한다. 고유의 SCGB3A2의 실제 N-말단이 공지되지 않았다는 점과 rhSCGB3A2의 pI가 예측된 것과 같지 않았다는 것을 감안한다면, 적어도 일부 인간 시료가 유사한 단백질을 포함한다는 관찰에 의해 우리의 합성 방법 및 rhSCGB3A2 제조를 검증하였다. 5개의 반응성 시료는 모두 200kDa 수준의, 고 분자량 종을 함유하고 있었으며 전부 8-13kDa 크기 범위에서 여러 개의 개별 밴드를 포함하고 있었으며, 이들 중 일부는 단량체, 이량체, 및 다른 아형에 해당할 수도 있다. 또한 두 시료 (3, 7 래인)는 3.5kDa 미만에서 면역반응성 흔적들(smear)을 포함했으며, 이들은 SCGB3A2 분해 산물을 나타내는 것으로 보인다. 최초로, 고유의 SCGB3A2가 웨스턴 블로팅에 의해 가시화된 것이다. 그 후, 웨스턴 블로팅에 사용된 항-rhSCGB3A2 항체를 인간 SCGB3A2 대한 ELISA를 전개하는 데에 사용하였다.

[0121] 실시예 7: rhSCGB3A2에 대한 ELISA 전개

[0122] 표준 방법을 사용하여 경쟁 ELISA를 전개시켰다. 경쟁 분석 포맷에서, 표적을 포착하는 항체를 마이크로타이터(microtiter) 플레이트의 웰 상에 코팅한 후, 효소-접합 표적 분자(표지된 표적)를 사용해서 웰 내에서 가능한 위치들에 결합하기 위한 시료 내의 비접합 표적과 경쟁시켰다. 시료 중 표적의 농도가 증가하면서, 웰에 결합하는 표지된 표적의 양이 감소한다. 토끼 항-rhSCGB3A2 항체를 96 웰 Maxisorb 플레이트(200ng/웰) 상에 코팅한 후, 웰들을 PBS 중 5% 수크로스, 2.5% BSA로 차단시키고 나서, 플레이트를 건조시키고, 4℃에서 보관했다.

HRP(horse radish peroxidase)와 rhSCGB3A2의 접합체를 제조하고(Pierce kit-EZ-Link Maleimide Activated HRP kit, Cat# 31494) 분석에서 1:130,000 희석으로 사용했다. rhSCGB3A2를 사용하여 교정물(calibrator)(1-500ng)를 제조하고, 도 6에 나타낸 바와 같이 표준 곡선을 생성하였다. 그리고 나서 고유의 SCGB3A2를 표 3에 나타낸 바와 같이 인간 TAF 시료에서 정량하였다.

[0123] 표 3: 인간 TAF의 고유의 SCGB3A2

표 3

[0124]

레인	시료	[SCGB3A2] (ng/ml)*
1	Rh-SCGB3A2 (5ng)	
2	유아 TAF; Pt. 6	774
3	유아 TAF; Pt. 7	804
4	유아 TAF; Pt. 12	검출되지 않음
5	유아 TAF; Pt. 15	540
6	유아 TAF; Pt. 17	468
7	유아 TAF; Pt. 19	395
8	Rh-SCGB3A2 (1ng)	

[0125] SCGB3A2도 3명의 성인 인간 혈청 시료에서 측정하였다; 반환 값(returning value) 0, 29, 및 32ng/ml. SCGB3A2는 미농축된 인간 소변, 또는 10배 농축 소변에서 검출할 수 없었다. 분석의 검출 한계는 5ng/ml이었다.

[0126] 실시예 8:

[0127] a) 투여 후 최대 10개월 동안 급성 폐 손상 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하기 위한 rhCC10의 사용 방법.

[0128] b) 투여 후 적어도 1개월 동안 빈번한 악화를 경험하는 환자에서 중증 호흡기 악화를 예방하기 위한 rhCC10의 사용 방법.

[0129] c) 투여 후 적어도 1개월 동안 만성 호흡기 질환 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하기 위한 rhCC10의 사용 방법.

[0130] d) 만성 호흡기 질환이 COPD인 경우의 상기 a-c의 방법.

[0131] e) 만성 호흡기 질환이 천식인 경우의 상기 a-c의 방법.

[0132] f) 투여 후 최대 10개월 동안 급성 폐 손상 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하기 위한 rhSCGB3A2의 사용 방법.

[0133] g) 투여 후 적어도 2개월 동안 빈번한 악화를 경험하는 환자에서 중증 호흡기 악화를 예방하기 위한 rhSCGB3A2의 사용 방법.

[0134] h) 투여 후 적어도 1개월 동안 만성 호흡기 질환 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하기 위한 rhSCGB3A2의 사용 방법.

[0135] i) 투여 후 적어도 2개월 동안 만성 호흡기 질환 환자에서 중증 호흡기 악화로 인한 입원을 예방하기 위한 rhSCGB3A2의 사용 방법.

[0136] j) 만성 호흡기 질환이 폐 섬유증인 경우의 상기 g-i의 방법.

[0137] k) 만성 호흡기 질환이 기관지 확장증인 경우의 상기 g-i의 방법. SCGB3A2.

[0138] l) 서열번호 1을 포함하는, N-말단 ATA를 가진 재조합 인간 SCGB3A2 단백질에 대한 물질의 조성물(composition of matter).

[0139] m) UBL 융합 단백질과, 융합 파트너를 인식하고 상기 융합 파트너와 SCGB3A2 사이를 절단하는 UBL 프로테아제를 사용하여, 서열번호 1에 따른 무손상(intact) SCGB3A2 단백질을 방출하는 단계를 포함하는, 재조합 인간

SCGB3A2를 합성는 방법.

[0140] n) PLA_2 효소를 억제하는 rhSCGB3A2의 약학적 조성물.

[0141] o) 6.3-6.7 또는 그 사이의 등전점에 대응하게, 등전위 초점 겔에서 이동하는 rhSCGB3A2의 약학적 조성물.

[0142] p) 동종이량체를 포함하는 rhSCGB3A2의 약학적 조성물.

[0143] q) PLA_2 효소를 억제하는, 6.7의 pI를 갖는 동종이량체를 포함하는 rhSCGB3A2의 약학적 조성물.

[0144] 현재 가장 실용적이고 바람직한 구체예들로 간주되는 것과 연계해서 본 발명을 설명하였지만, 본 발명은 개시된 구체예들에 한정되어서는 안되나, 대조적으로, 첨부된 특허청구범위들의 사상 및 범위 내에 포함된 각종 변형 및 균등 구조들을 포포괄도록 의도되는 것으로 이해되어야 한다.

[0145] 약어 및 정의

[0146] CC10: 클라라 세포 10kDa 단백질 (Clara cell 10 kDa protein)

[0147] CCSP: 클라라 세포 분비 단백질 (Clara cell secretory protein)

[0148] CC16: 클라라 세포 16kDa 단백질

[0149] SCGB1A1: CC10, CCSP, CC16, 우테로글로빈과 동일하게, SCGB1A1 유전자에 의해 코딩되는 단백질

[0150] SCGB3A1: HIN-1 및 UGRP2와 동일하게, SCGB3A1 유전자에 의해 코딩되는 단백질

[0151] SCGB3A2: HIN-2 및 UGRP1과 동일하게, SCGB3A2 유전자에 의해 코딩되는 단백질

[0152] HIN-1: 하이-인-노멀 단백질 1 (high-in-normal protein 1)

[0153] HIN-2: 하이-인-노멀 단백질 2 (high-in-normal protein 2)

[0154] UGRP1: 우테로글로빈 유전자 관련 단백질 1(uterglobin gene related protein 1)

[0155] UGRP2: 우테로글로빈 유전자 관련 단백질 2

[0156] 분비글로빈(Secretoglobin): 이황화 결합에 의해 연결된 네 개의 나선형 다발 단량체를 특징으로 하는 구조적으로 관련된 단백질의 패밀리 유래 단백질

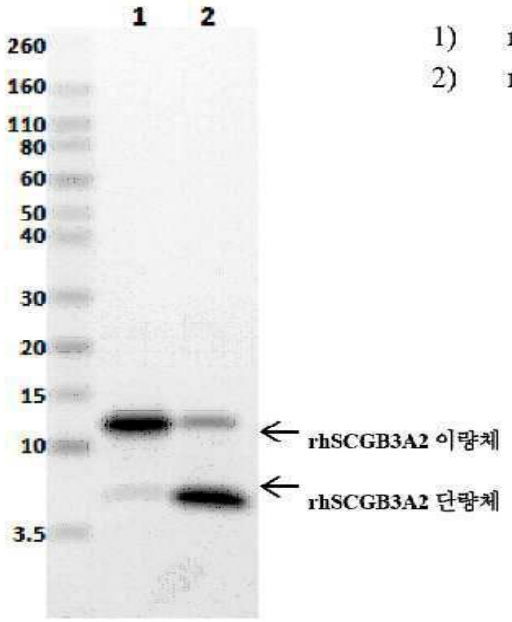
[0157] 호흡기 분비글로빈: SCGB1A1, SCGB3A1 및 SCGB3A2를 비롯하여, 호흡기 관에서 고도로 발현되고 풍부한 분비글로빈

도면

도면1

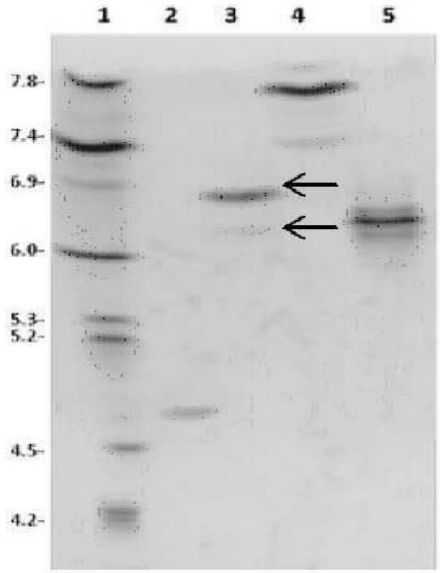
서열번호 2:
10 20 30 40 50 60 70 80 90
소스
MKLVTIFLLV TISLCSYSAT AFLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
유전자은행 AAQ89338
서열번호 3:
AT AFLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
클라라성스 버전
rbSCGB3A2
기타 공개 서열
서열번호 4:
9 19 29 39 49
FLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
US20050054822 (렌셀시스)
서열번호 5:
AFLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
N-말단 예측 도구
(www.expasy.org)
서열번호 6:
MKLVTIFLLV TISLCSYSAT AFLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
CA 2,331,934 (2001)
서열번호 7:
T AFLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
sig peptide 1-18 예측됨
서열번호 8:
FLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
sig peptide 1-21 예측됨
서열번호 9:
PLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
실제 단리된 펩타이드
서열번호 10:
AFLINKVPLP VDKLAPLPLD NILPFSMDPLK LLLKTLGISV EHLVEGLRKC VNELGPEASE AVKKLLEALS HLV
실제 단리된 펩타이드

도면2



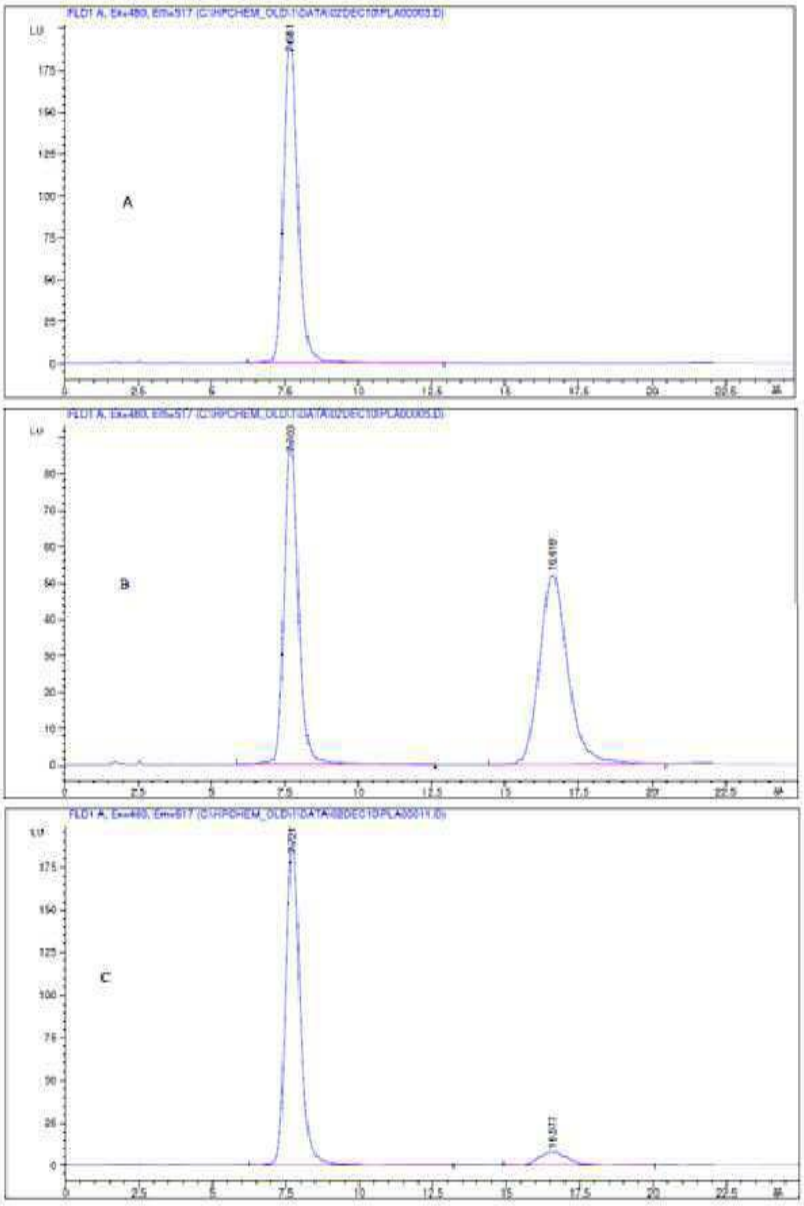
1) rhSCGB3A2, 미환원됨
2) rhSCGB3A2, 환원됨 (1mM DTT)

도면3

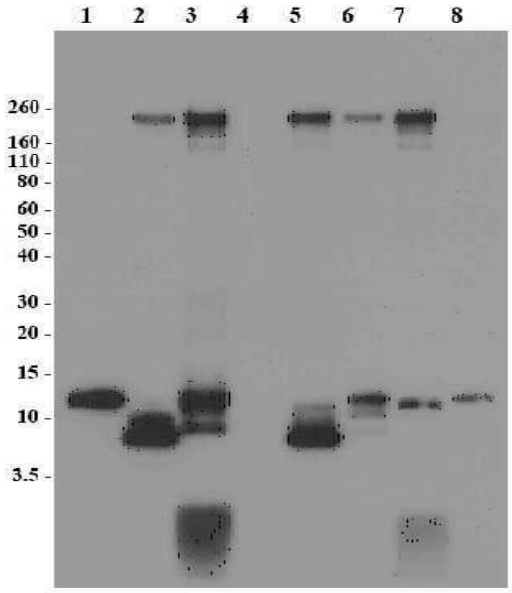


1) Serva IEF 마커 3-10
2) rhCC10 (4.8)
3) rhSCGB3A2 (6.3, 6.7)
4) UBL (7.3, 7.9)
5) Den1 (6.4)

도면4

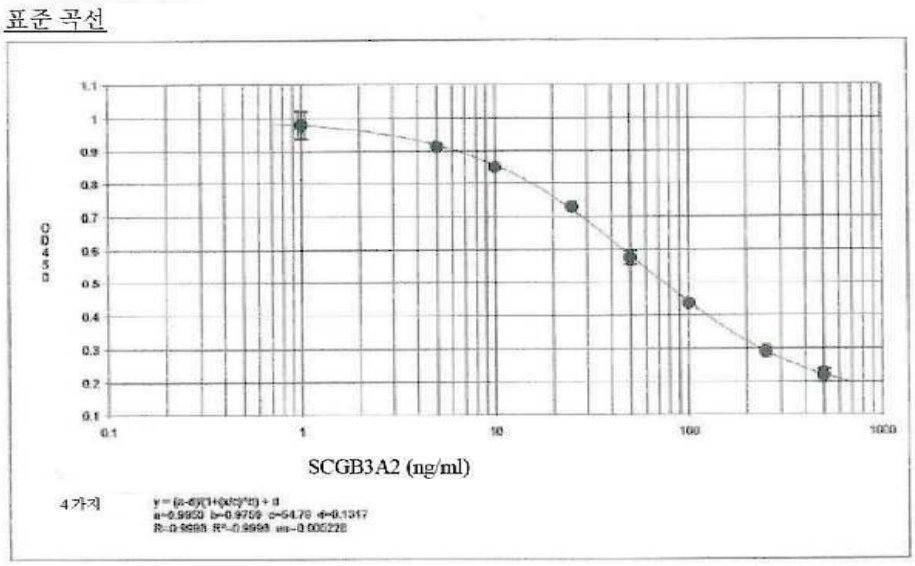


도면5



(1) rhSCGB3A2, 5ng
(2) 인간 TAF Pt. 6
(3) Pt. 7
(4) Pt. 12
(5) Pt. 15
(6) Pt. 17
(7) Pt. 19
(8) rhSCGB3A2, 1ng

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Clarassance, Inc.

<120> Improved Methods of Use for Recombinant Human Secretoglobins

<130> 116142/00500

<140> 13/843,289

<141> 2013-03-15

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 250

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cttaagaggt ggtgctaccg ctttcctgat caacaaagtt ccgctgccgg ttgacaaact 60

ggctccgctg ccgctggaca acatcctgcc gttcatggac ccgctgaaac tgctgctgaa 120

aaccctgggt atctctgttg aacacctggt tgaaggtctg cgtaaatgcg ttaacgaact 180

gggtccggaa gcttctgaag ctgttaaaaa actgctggaa gctctgtctc acctggttta 240

gtaaggatcc 250

<210> 2

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Leu Val Thr Ile Phe Leu Leu Val Thr Ile Ser Leu Cys Ser

1 5 10 15

Tyr Ser Ala Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp

20 25 30

Lys Leu Ala Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro

35 40 45

Leu Lys Leu Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val

50 55 60

Glu Gly Leu Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu

65 70 75 80

Ala Val Lys Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

85 90

<210> 3

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu

1 5 10 15

Ala Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys

20 25 30

Leu Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly

35 40 45

Leu Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val

50 55 60

Lys Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

65 70 75

<210> 4

<211> 72

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro Leu

1 5 10 15

Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu Leu

20 25 30

Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg Lys

35 40 45

Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys Leu

50 55 60

Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

65 70

<210> 5

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro
1 5 10 15

Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu
20 25 30

Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg

35 40 45

Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys
50 55 60

Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
65 70

<210> 6

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys Leu Val Thr Ile Phe Leu Leu Val Thr Ile Ser Leu Cys Ser
1 5 10 15

Tyr Ser Ala Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp

20 25 30

Lys Leu Ala Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro
35 40 45

Leu Lys Leu Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val
50 55 60

Glu Gly Leu Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu
65 70 75 80

Ala Val Lys Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

85 90

<210> 7

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu
20 25 30

Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu
35 40 45

Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys
50 55 60

Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
65 70

<210> 8

<211> 72

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro Leu
1 5 10 15

Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu Leu
20 25 30

Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg Lys
35 40 45

Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys Leu
50 55 60

Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
65 70

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu

1 5 10 15

Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu
20 25 30
Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys
35 40 45
Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
50 55

<210> 10
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro
1 5 10 15

Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu
20 25 30
Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg
35 40 45
Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys
50 55 60
Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
65 70