



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0034360
(43) 공개일자 2017년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/10 (2006.01) A61K 31/685 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/10 (2013.01)
A61K 31/685 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0032492(분할)
(22) 출원일자 2017년03월15일
심사청구일자 2017년03월15일
(62) 원출원 특허 10-2015-0025100
원출원일자 2015년02월23일
심사청구일자 2015년02월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
배중우
서울특별시 강남구 압구정로 201 현대아파트 87동 405호(압구정동, 현대아파트)
최용성
서울특별시 성북구 장월로1길 28 106동 801호(상월곡동, 동아에코빌아파트)
정성훈
서울특별시 강남구 압구정로39길 58 63동 601호(압구정동, 구현대아파트)
(74) 대리인
손민

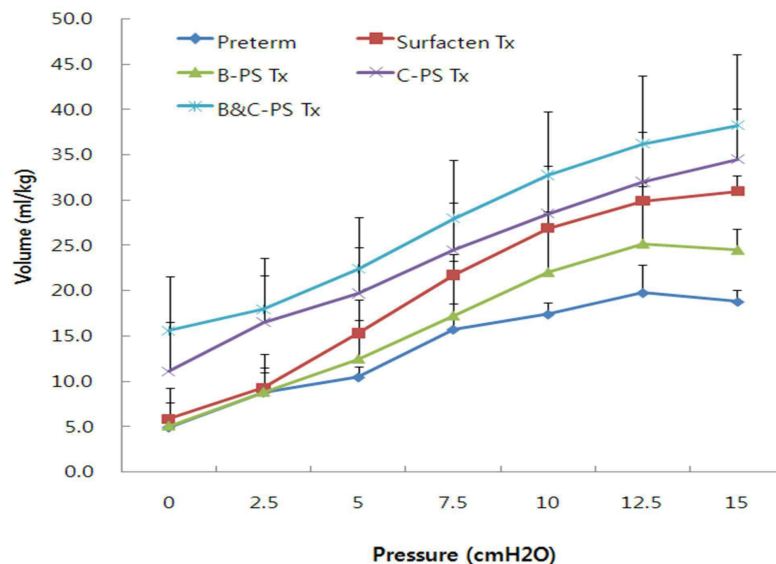
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 계면활성 단백질 B(SP-B) 및 계면활성 단백질 C(SP-C)의 유사체를 포함하는 합성 폐 계면활성제 조성물

(57) 요약

본 발명은 호흡곤란 증후군(respiratory distress syndrome; RDS)의 예방 또는 치료에 적합한 합성 폐 계면활성제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 폐 계면활성제 조성물은 기존의 동물 유래 폐 계면활성제보다 우수한 폐 계면활성능을 가질 뿐만 아니라 대규모 합성 시스템 구축에 의해 경제적으로 대량 생산이 가능하다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드, 서열번호 2로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드, 인지질(phospholipid) 및 지방산을 포함하는, 폐 계면활성제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC) 또는 포스파티딜글리세롤(PG)인 폐 계면활성제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 지방산은 팔미트산인 폐 계면활성제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 또는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드를 전체 폐 계면활성제 조성물 중 1 내지 5 중량%로 포함하는 것인 폐 계면활성제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드와 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드를 1 : 1 내지 1 : 10의 중량비로 포함하는 것인 폐 계면활성제 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폐 계면활성제 조성물을 유효성분으로 포함하는 호흡곤란 증후군(Respiratory distress syndrome)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 호흡곤란 증후군은 미숙아 또는 신생아에게 발생하는 것인 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항의 폐 계면활성제 조성물 및 이를 저장하기 위한 용기수단을 포함하는 키트.

청구항 9

(a) 서열번호 1로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드, 서열번호 2로 표시되

는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드, 인지질 및 지방산을 혼합하는 단계; 및
(b) 상기 혼합물을 용해시킨 후 증발시키는 단계를 포함하는, 제1항의 폐 계면활성제 조성물을 제조하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC) 또는 포스파티딜글리세롤(PG)인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 지방산은 팔미트산인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드와 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드를 1 : 1 내지 1 : 10의 중량비로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 호흡곤란 증후군(respiratory distress syndrome; RDS)의 예방 또는 치료에 적합한 합성 폐 계면활성제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 폐는 이른바 폐포라고 부르는 작고 수많은 공기 주머니로 이루어지고, 이 폐포에서 혈액과 폐의 공간 사이의 기체 교환이 일어난다. 건강한 개체에서 이러한 기체 교환은 날숨의 끝에 폐가 파괴되는 것을 예방하는 단백질 함유 계면활성제 복합체의 존재에 의하여 매개된다. 폐 계면활성 복합체는 주로 지질로 이루어지고, 소량의 다양한 단백질을 함유한다. 이러한 복합체가 적절한 수준을 유지하지 않는 경우에는 폐의 기능 부전이 초래되는데, 이 경우 발병할 수 있는 대표적인 질환이 바로 호흡곤란 증후군(respiratory distress syndrome, RDS)이다. 이는 폐 계면활성제(pulmonary surfactant, PS)의 생성 부족으로 호흡부전을 초래하는 질환으로, 신생아 특히 미숙아에게서 가장 흔한 질환이고 사망률도 높아 매우 중요한 질환 중의 하나이다. 신생아의 호흡곤란 증후군에 있어서 폐 계면활성제의 기관지 내 투여 치료법은 임상시험들을 통해 그 효과가 입증되어 현재 가장 확실하고 보편적인 치료법으로 확립되었다.

[0004] 폐 계면활성제의 주요 성분 구성은 인지질인 디팔미토일 포스파티딜 콜린 (DPPC), 포스파티딜 글리세롤(PG), 기타 인지질, 중성지질 등과, 폐 계면활성 단백질(surfactant protein, SP) SP-A, B, C, D 등으로 이루어져 있다. 또한 상업적으로 사용되는 인공 폐 계면활성제 제품군은 크게 두 가지로 구분될 수 있는데, (i) 첫째는 동물(소 혹은 돼지)의 폐에서 계면활성 단백질을 분리하여 나머지 인지질과 혼합한 폐 계면활성 제제로서 '자연 폐 계면활성제' 혹은 '동물 유래 폐 계면활성제'라고 하며, 대부분의 제품이 이에 속한다. (ii) 둘째는 계면활성 단백질의 일부를 인공적으로 합성하여 제조한 인공 '합성 폐 계면활성제'가 있다.

[0006] 현재 임상적으로 적용되고 있는 대부분의 동물 유래 폐 계면활성제에는 동물의 계면활성 단백질을 함유하고 있기 때문에 1) 동물의 항원성을 지니는 점, 2) 감염성 질환의 잠재적 위험이 존재하는 점, 3) 소나 돼지 등의 동물을 대량으로 도륙해야하는 윤리적 문제, 4) 제조 비용이 비싸다는 점 등의 문제점이 존재한다. 따라서 차세대 인공 합성 폐 계면활성 제제 개발의 필요성이 제기된다(Kim YD. new synthetic surfactants for neonates. J Korean Soc Neonatol. 2012;19:184-194., Robertson B, Johansson J, Curstedt T. Synthetic surfactants to

treat neonatal lung disease. Mol Med Today 2000;6:119-124.).

[0008] 과거 1990년대에 개발되었던 1세대 합성 폐 계면활성 제제 Exosurf[®]는 계면활성 단백질이 포함되어 있지 않고 인지질만으로 구성되어 있었는데, 그 임상적 유용성이 좋지 못해 생산이 중단되어 현재 임상에서는 사용하지 않는다. 이후로는 주로 효과가 우수한 동물 유래 폐 계면활성 제품이 전세계적으로 주를 이루고 있으며, 그 중에서도 계면활성 단백질이 함유되는 제제의 개발 연구가 지속되고 있다.

[0010] 계면활성 단백질은 SP-A, B, C, D로 구분될 수 있으며, 이 중에서 SP-A와 SP-D는 수용성이고 폐 계면활성제의 생산과 분비에 관여하기 때문에, 인공 폐 계면활성 제제의 개발에는 성분에 포함시키지 않고, 폐 계면활성제의 표면 물리적 특성에 주로 관여하는 SP-B 및/또는 SP-C를 포함시켜야 효과가 있다.

[0011] 그러나 사람의 SP-B 및 SP-C의 아미노산 구조를 정확하게 동일한 구조로 합성하는 것은 불가능하다. 왜냐하면 SP-B는 그 분자량이 크고 구조가 복잡하며, 특히 이중 황화물 결합으로 되어 있어 합성의 한계가 있고, SP-C는 단독 단백질로 합성시 안정성이 매우 떨어지기 때문이다(Kallberg Y, Gustafsson M, Persson B, Thyberg J, Johansson J. Prediction of amyloid fibril-forming proteins. J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2001 Apr 20;276(16):12945-50.).

[0013] 한편, 폐 계면활성제 조성물은 저체중 미숙아에게 투여하여야 하는 것이므로, 우수한 계면활성과는 별도로 수성 매질 중의 농축된 현탁액 제제를 허용하기 위하여 낮은 점도를 나타내어야 한다. 그러나 폴리펩티드와 인지질을 포함한 폐 계면활성제는 인지질 혼합물의 조성 뿐만 아니라, 특정한 인지질/폴리펩티드 조합에 따라 점도 등의 특성이 현저하게 바뀌는 복잡한 혼합물이다. 따라서 2 이상의 폴리펩티드가 포함될 경우 이들의 조합에 따라 조성물의 유동학적 특성에 영향을 미치게 되어 이들의 함량 또한 고려하여야 할 요소 중의 하나이다.

[0015] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 기존의 동물 유래 폐 계면활성제보다 우수한 계면활성능을 갖는 합성 폐 계면활성제를 만들고자 예의 노력한 결과, SP-B의 일부 서열 및/또는 SP-C의 유사 서열을 폐 계면활성제에 포함시켜 제조할 경우, 종래의 폐 계면활성제보다 우수한 효과를 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 및 서열번호 2로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드를 포함하는 폐 계면활성제 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 상기 폐 계면활성제 조성물을 유효성분으로 포함하는 호흡 곤란 증후군(Respiratory distress syndrome)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폐 계면활성제 조성물 및 이의 투여형을 함유하는 용기수단을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 및 서열번호 2로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드를 포함하는 폐 계면활성제 조성물을 제공한다.

- [0023] 본 발명은 합성 폐 계면활성제에 관한 것으로, SP-B 및 SP-C 각각의 전체 서열을 사용하지 않고, SP-B의 일부 서열 및/또는 SP-C의 유사 서열을 폐 계면활성제에 포함시켜 기존의 동물 유래 폐 계면활성제보다 우수한 폐 계면활성을 갖는 합성 폐 계면활성제를 제조한 것은 본 발명자들에 의해 처음 규명되었다.
- [0025] 본 발명에서 "계면활성"이란 표면장력을 낮출 수 있는 능력이다. 외생성 계면활성제의 시험관내(*in vitro*) 효능은 일반적으로 Wilhelmy Balance 및 Captive Bubble Surfactometer 등의 적절한 장치를 사용하여 표면장력을 낮출 수 있는 능력을 측정할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 "폐 계면활성제(pulmonary surfactant 또는 lung surfactant)"는 폐포의 내면을 코팅하여 정상적인 호흡이 가능하게 하는 단백질과 지질의 혼합물이다. 이것의 계면활성 특성때문에, 폐 계면활성제는 폐포의 공기-액체 계면에서의 표면장력을 상당히 감소시켜서, 폐포 확장에 필요한 압력을 감소시키고 호흡의 수고를 줄인다.
- [0027] 본 발명에서 "계면활성 단백질 SP-B 일부 폴리펩티드"는 계면활성 단백질의 일종으로서, 폐 계면활성제 내에서 지질과 관련된 필수 단백질인 SP-B의 일부 아미노산 서열을 의미한다. SP-B 폴리펩티드는 막 단백질과 같이 소수성이나, 세포막에는 존재하지 않는다. 상기 SP-B 폴리펩티드는 동물 또는 인간 유래의 천연 폴리펩티드일 수 있고, 인공적으로 합성한 폴리펩티드일 수도 있으나, 바람직하게는 인간 유래의 천연 SP-B 폴리펩티드의 C(탄소)-말단 일부의 아미노산 서열을 인공적으로 합성한 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로, RMLPQLVCRLVLRCSMD (서열번호 1)의 서열로 표시될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 "계면활성 단백질 SP-C 유사체 폴리펩티드" 역시 계면활성 단백질의 일종으로서, 폐 계면활성제 내에서 지질과 관련된 단백질인 SP-C의 아미노산 서열의 일부가 결손 및/또는 치환되거나, 다른 아미노산 서열이 부가된 폐 계면활성을 나타내는 폴리펩티드를 모두 포함한다. 상기 SP-C 폴리펩티드는 동물 또는 인간 유래의 천연 폴리펩티드일 수 있고, 인공적으로 합성한 폴리펩티드일 수도 있으나, 바람직하게는 인간 유래의 천연 SP-C의 유사체 폴리펩티드의 아미노산 서열을 인공적으로 합성한 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로, CPVHLKRLLLLLLLLLLLLLLLLL (서열번호 2)의 서열로 표시될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 일컫기 위하여 호환 사용될 수 있으며, 아미노산 서열은 왼쪽은 자유 아미노산기 (아미노 말단)이고, 오른쪽은 카르복실기 (카르복시 말단)인 순서로, 단문자로 나타낼 수 있다.
- [0031] 또한 상기 조성물은 상기 폴리펩티드 이외에 인지질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서, "인지질"은 1개의 지방산이 인산기(phosphate) 및 간단한 유기 분자에 의하여 치환된 지질이다. 계면활성 제제에서 발견될 수 있는 가장 일반적인 인지질의 예로는 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 포스파티딜글리세롤(PG), 포스파티딜이노시톨(PI), 포스파티딜세린(PS) 등이 있다. 인지질의 글리세롤 모이어티는 주로 장쇄 지방산으로 에스테르화되고, 이 장쇄 지방산은 다시 포화될 수 있거나(예컨대, 미리스트산, 팔미트산 및 스테아르산), 단일불포화될 수 있거나(예컨대, 올레산), 또는 다중불포화(리놀레산 및 아라키돈산)될 수 있다. 구체적인 예로 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디라우로일포스파티딜글리세롤(DLPG), 디미리스토일포스파티딜글리세롤(DMPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG), 팔마토일-올레오일-포스파티딜글리세롤(POPG) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 폐 계면활성제 조성물에 포함될 수 있는 인지질로는 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 포스파티딜글리세롤(PG) 및/또는 팔미트산(PA)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 상기 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 또는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드는 상기 폐 계면활성제 전체 조성물 중 1 내지 5 중량%로 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 폐 계면활성제 조성물은 인지질 및/또는 단백질의 혼합물에 해당하는 바, 이들의 함량비에 따라 제조되는 폐 계면활성제의 물성이 현저하게 달라질 수 있음은 당업계에 자명하다. 특히 국제공개특허 2008-044109호에서는 일반적으로 기재된 계면 활성제 조성물 중의 인지질 및 SP-B 및 SP-C 유사체의 상대적인 양에 의하여 점

도가 어떻게 영향을 받는지와, 아울러 합성 계면 활성제 중에서 상기 성분들이 어떻게 상호 영향을 끼치는지에 대하여 연구하고자 하였고, SP-B 유사체의 양은 계면 활성제 조성물의 점도에 유의한 영향을 미치고, SP-B 유사체의 함량은 치료효능에 영향을 미치지 않는 범위에서 되도록 낮게 유지되어야 한다고 기재하고 있다.

[0037] 따라서, 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 및/또는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드의 함량에 따라 특성이 상이할 수 있는바, 폐 계면활성제 조성물의 제조시 고려되어야 할 중요 요소이다.

[0039] 본 발명에서 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 또는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드는 각각 상기 폐 계면활성제 전체 조성물 중 1 내지 5 중량%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 약 2 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 사람의 자연 폐 계면 활성제에는 인지질 1mmol 당 10~11mg의 SP-B, 또는 22~34mg의 SP-C가 함유되어 있고, 시판 중인 동물 유래 폐 계면 활성제에는 제품에 따라 0~5.4mg의 SP-B 또는 1~11.6mg의 SP-C를 함유하고 있음을 고려할 때, 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 또는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드가 각각 상기 폐 계면활성제 전체 조성물 중 5 중량%보다 많은 함량으로 포함되거나 1 중량%보다 적은 함량으로 포함될 경우에는 계면활성 단백질의 기능이 저하되거나 상실된다는 문제점이 있다.

[0041] 또한, 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 또는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드는 각각 인지질 100 중량부 대비 1 내지 5 중량부로 포함될 수 있다. 본원발명의 실시예에서는 DPPC/PG/PA/SP-B/SP-C의 중량비를 75:25:10:2.24:2.24(w/w)로 하여 폐 계면활성제를 제조하였다.

[0042] 또한, 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 : 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드는 1 : 1 내지 1 : 10의 중량비로 포함될 수 있고, 바람직하게는 1 : 1의 중량비로 포함될 수 있다. 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드 대비 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드의 함량이 많을 경우 폐 계면활성제의 점도가 높아지는 문제가 있으므로, 상기 범위를 유지하는 것이 바람직하다.

[0044] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폐 계면활성제 조성물을 유효성분으로 포함하는 호흡곤란 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴리펩티드 및 서열번호 2로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드를 포함하는 폐 계면활성제는 종래 자연 폐 계면활성제(예를 들어, Surfacten[®])보다 우수한 폐 계면활성능(표면장력, 확산속도, 흡착속도 등)이 있음을 확인함으로써, 호흡곤란 증후군의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있음이 확인되었다.

[0047] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 호흡곤란 증후군의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함하며, "치료"는 본 발명의 조성물에 의해 호흡곤란 증후군에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 포함한다.

[0048] 본 발명에서, "호흡곤란 증후군"은 폐 계면활성제의 생성 부족으로 인해 호흡부전을 초래하는 질환으로, 신생아 특히 미숙아에게서 발병하는 가장 흔한 질환이다.

[0050] 본 발명의 폐 계면활성제 조성물을 포함하는 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 폐 계면활성제의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.01 중량% 내지 100 중량%로, 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량%를 포함할 수 있다.

[0051] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 주사제와 같이 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene

glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0053] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 호흡곤란 증후군의 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡곤란 증후군의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명에서 상기 호흡곤란 증후군의 의심 개체는 호흡곤란 증후군이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 포함하며, 본 발명의 약학적 조성물을 호흡곤란 증후군 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 호흡곤란 증후군에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0056] 본 발명에서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 호흡곤란 증후군 의심 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 주사와 같은 비경구 투여 방식으로 투여될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 폐 계면활성제를 포함하는 약학적 조성물은 통상적인 방법으로 연속 주입하거나, 연속적 또는 간헐적 양압 호흡(IPPV)하에 환자에게 기관지내로 주사함으로써 환자(예를 들어, 미숙아)에게 투여할 수 있다. 또한, 기관 안에 넣은 얇은 카테터, 마스크, 프롱(prongs) 등을 사용하거나, 지속적 양압술(nCPAP)에 따라 투여할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 예방 또는 치료 방법은 상기 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 예컨대, 만일 개체가 박테리아성 감염에 의하여 유발된 호흡기 질환 치료를 받고 있는 경우라면, 본 발명의 계면활성제는 항생제 등의 박테리아 감염을 치료하는 데 사용되는 다른 화합물과 함께 투여될 수 있고, 기관지폐형성이상 등의 합병증을 예방하기 위하여, 본 발명의 계면활성제는 부데소니드 및 베클로메타손 디프로피오네이트 등의 코르티코스테로이드와 함께 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다.
- [0062] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폐 계면활성제 조성물 및 이를 저장하기 위한 용기수단을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0064] 본 발명의 상기 키트는 그 종류가 특별히 제한되는 것은 아니며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 형태의 키트를 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 폐 계면활성제 조성물이 용기수단에 포함되어 있는 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 키트는 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 약학적으로 허용가능한 담체는 구체적으로 멸균된 생리식염수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 합성 폐 계면활성제 조성물과 약학적으로 허용가능한 담체는 각각 개별 용기에 담긴 형태, 또는 하나 이상의 구획으로 나누어진 한 개의 용기 내에 담긴 형태로 포장되어 있을 수 있다.
- [0066] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 서열번호 1로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-B의 일부 폴

리펩티드, 서열번호 2로 표시되는 서열로 이루어지는 계면활성 단백질 SP-C의 유사체 폴리펩티드, 인지질 및 지방산을 혼합하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물을 용해시킨 후 증발시키는 단계를 포함하는 상기 폐 계면활성제 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC) 및/또는 포스파티딜글리세롤(PG)일 수 있으며, 상기 지방산은 팔미트산일 수 있다.

발명의 효과

[0068] 본 발명의 폐 계면활성제 조성물은 기존의 동물 유래 폐 계면활성제보다 우수한 폐 계면활성능을 가질 뿐만 아니라 대규모 합성 시스템 구축에 의해 경제적으로 대량 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 Modified Wilhelmy balance에서 표면 확산속도를 나타낸 도이다.
 도 2는 Modified Wilhelmy balance에서 표면 흡착속도를 나타낸 도이다.
 도 3은 Modified Wilhelmy balance에서 표면장력 영역 도표를 나타낸 도이다.
 도 4는 만삭 대조군과 미숙 대조군 간의 압력에 따른 폐 용적 차이를 나타낸 도이다.
 도 5는 대조군 및 각 실험군 간의 압력에 따른 폐 용적 차이를 나타낸 도이다.
 도 6은 대조군 및 각 실험군의 폐조직의 병리소견을 H&E 염색을 통해 관찰한 사진이다.
 도 7은 대조군 및 각 실험군의 폐포 내에서 공기화된 면적(%)을 계산하여 비교한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 실시예: 인공 합성 폐 계면활성제 제제의 제조

[0075] 사람 SP-B의 탄소측 말단부의 일부 서열 (SP-B: RMLPQLVCRLVLRCSMD: 서열번호 1)과 사람 SP-C의 폴리펩티드 유사체 (SP-C: CPVHLKRLLLLLLLLLLLLLLLLL: 서열번호 2)를 애니젠㈜(전라남도, 한국)에 의뢰하여 합성하였다. 이를 바탕으로 디팔미토일-포스파티딜콜린(DPPC), 포스파티딜글리세롤(PG), 팔미트산(PA) 인지질에, (i) 서열번호 1의 SP-B 폴리펩티드, (ii) 서열번호 2의 SP-C 폴리펩티드 유사체 및, (iii) 서열번호 1의 SP-B 폴리펩티드 및 서열번호 2의 SP-C 폴리펩티드 유사체를 각각 혼합하였다. 이후 세 가지 합성 계면활성제 제제를 각각 Synsurf-1, Synsurf-2, 및 Synsurf-3으로 명명하였다(표 1).

표 1

제제명	SP 제제(조성물 전체에 대한 중량%)	혼합비율(구성비)
Synsurf-1	SP-B(2중량%)	DPPC:PG:PA:SP-B = 75:25:10:2.24 (w/w)
Synsurf-2	SP-C(2중량%)	DPPC:PG:PA:SP-C = 75:25:10:2.24 (w/w)
Synsurf-3	SP-B/SP-C(각 2중량%)	DPPC:PG:PA:SP-B:SP-C = 75:25:10:2.24:2.24 (w/w)

[0077] 합성 폐 계면활성제는 보다 구체적으로 다음과 같이 제조하였다. 위에서 각각 기술한 구성비율로 계면활성 단백질을 준비하여 소량의 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)에 용해시킨 뒤, DPPC/PG/PA를 질량비로서 75:25:10의 비율로 혼합한 것과 함께 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, v/v) 용액에 함께 녹인 후, 보다 혼합이 잘 되게 하기 위해 10% 에탄올 용액에 용해시킨 뒤 40-45℃의 온도에 15분간 방치시켜 증발시켰다. 최종적으로 동결 건조하여 흰색 계열의 분말인 Synsurf-1, 2, 3을 수득하였다.

[0079] **실험예 1: 인공 합성 폐 계면활성제의 표면 물리적 특성의 검사**

[0081] 상기 실시예에서 합성한 Synsurf-1, 2, 3에 대해서 기존 상용화되어 사용 중인 폐 계면활성제 중에서 표면 물리적 특성이 가장 우수한 제제인 Surfacten[®] (Mitsubishi Tanabe, Japan)과 표면 물리적 특성에서 동등성을 가지는지 여부를 비교하였다.

[0082] 구체적으로, Modified Wilhelmy balance 검사를 통해 비교하였으며, Fujiwara 등이 제시한 이상적인 인공 폐 계면활성제 제제의 표면적 특성의 기준은 하기 표 2와 같다(Modified from Fujiwara T, Robertson B. Pharmacology of exogenous surfactant. In: Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, editors. Pulmonary surfactant. 2 ed., Amsterdam: Elsevier, 1992:561-92.).

표 2

[0083]	1. Pulsating bubble surfactometer	
	1) 최소 표면장력이 10 mN/m 미만	
	2) 최대 표면장력이 약 30 mN/m	
	2. Modified Wilhelmy balance	
	1) 빠른 확산: 24-27 mN/m의 평형 표면장력에 도달하기까지의 시간이 10초 미만	
	2) 빠른 흡착: 27-30mN/m의 표면장력(표면압력 42-45 mN/m)에 도달하기까지의 시간이 1분 미만	
	3) 20-30%의 표면 압축시 10mN/m 미만의 최소 표면장력	
	4) 재현성있는 표면장력-영역 다이어그램 상의 27-30 mN/m의 최대 표면장력	
	5) 10 mN/m의 표면장력에서 매우 낮은 표면 압축률(0.03 m/Mm 미만)	

[0084] **실험예 1-1: 최대 및 최소 표면장력 측정**

[0085] PBS(Pulsating bubble surfactometer) 기계(GENERAL TRANSCO, INC, USA) 내에서 마이크로버블(microbubble)을 만들어서 진동시킬 때, 마이크로버블의 최소 및 최대 표면장력(surface tension, ST) (min-ST, max-ST)을 측정하였다. 이상적인 인공 폐 계면활성제 제제로서의 표면장력의 기준은 Min-ST가 10 mN/m 이하이고 Max-ST가 30 mN/m 정도이다.

[0086] 그 결과, 하기 표 3에서와 같이, Synsurf-1을 제외하고 Surfacten[®], Synsurf-2 및 Synsurf-3의 최소 표면장력이 10 nM/m 이하이고, 최대 표면장력도 30 nM/m 정도의 표면 활성의 효과를 가지는 제제의 결과를 보여 적절한 표면장력을 가짐을 확인하였다.

표 3

[0087]	최소 표면장력(mN/m)		최대 표면장력(mN/m)	
	1 분	5 분	1 분	5 분
Surfacten [®]	6.2±0.9	5.5±0.4	33.8±1.5	32.8±1.6
Synsurf-1	16.2±0.9	16.7±0.6	27.6±1.8	28.7±1.5
Synsurf-2	8.1±1.1	7.9±1.0	33.0±1.7	33.1±1.6
Synsurf-3	8.0 ±0.9	7.1±0.8	34.6±0.8	34.5±1.0

[0088] **실험예 1-2: Modified Wilhelmy balance test**

[0089] Modified Wilhelmy balance (Acoma, Japan) 기계를 사용하여 표면장력 영역 도표(ST-area diagram, hysteresis curve), 표면 확산 검사(surface spreading test), 표면 흡착력 검사(surface adsorption test)를 수행하였다.

[0090] 그 결과, (i) 표면 확산 검사에서 Synsurf-2, 3 및 Surfacten[®]은 유사한 수준으로 빠른 확산속도를 보였음을 확인하였고(도 1), (ii) 표면 흡착력 검사에서는 Synsurf-3이 가장 빠른 흡착속도를 보였고, 이후 Surfacten[®], Synsurf-2, Synsurf-1의 순으로 빠른 속도를 보였으며(도 2), (iii) 표면장력 영역 도표에서 4가지 모두 이력곡

선(hysteresis curve)을 나타내었다(도 3). 다만, 최소 표면장력(min-ST)은 Surfacten[®]이 가장 작았고, 이후 Synsurf-2와 Synsurf-3이 비슷한 수준을 보였다.

[0091] 결론적으로, 본 발명의 Synsurf-2 및 Synsurf-3가 시판 중인 동물 유래 폐 계면활성제인 Surfacten[®]와 유사하거나 보다 우수한 표면 활성의 효과를 가짐을 확인하였다.

표 4

[0092]

	Surfacten [®]	Synsurf-1	Synsurf-2	Synsurf-3
표면확산성 (10초 미만 시간에서의 도달한 평형 표면장력)(mN/m)	27*	43	27*	27*
표면흡착성(1분 미만의 시간에서 도달한 표면장력)(mN/m)	28*	35	29*	27*
20-30%의 표면 압축시 최소 표면장력(mN/m)	8*	12	9*	9*
재현성 있는 표면장력-영역 다이어그램 상의 최대 표면장력 (mN/m)	28*	47	36	36
10 mN/m의 표면장력에서의 표면 압축률(mN/m)	0.03*	0.05	0.03*	0.03*
*는 이상적인 인공 폐 계면활성제에 대하여 적합한 특성을 가짐을 의미한다.				

[0094] **실험예 2: 동물(*in vivo*) 투여 실험**

[0096] 동물실험을 위해 임신토끼에 제왕절개술을 시행하여 만삭(term)의 토끼태자(재태기간 31일) 및 미숙(preterm) 토끼태자(재태기간 27일)를 추출하였고, 상기 태자토끼에 기관절개술(tracheostomy)을 시행하여 0.3-0.5cc의 공기를 30회 강제 호흡을 시켰다.

[0097] 상기 태자토끼를 하기와 같이 대조군 및 시험군으로 구분하였다. 구체적으로, 1) 미숙 태자토끼에서 기관절개 튜브를 통해 아무것도 투여하지 않은 미숙아 대조군(미숙 대조군, Preterm), 2) 만삭 태자토끼에서 기관절개 튜브를 통해 아무것도 투여하지 않은 만삭아 대조군(만삭 대조군, Term), 3) 미숙 태자 토끼에서 기관절개 튜브를 통해 Surfacten[®]을 투여한 군(Surfacten[®] 투여군), 4) 미숙 태자토끼에서 Synsurf-1을 투여한 군(Synsurf-1 투여군), 5) 미숙 태자토끼에서 Synsurf-2를 투여한 군(Synsurf-2 투여군), 6) 미숙 태자토끼에서 Synsurf-3을 투여한 군(Synsurf-3 투여군)으로 구분하였다.

[0098] Surfacten[®] 투여군, Synsurf-1 투여군, Synsurf-2 투여군, Synsurf-3 투여군에서 각각의 제제인 Surfacten[®], Synsurf-1, Synsurf-2, Synsurf-3를 100mg/kg의 전체 용량을 30초 간격으로 5회 분할하여 기도를 통해 폐로 주입하였다. 주입 후 폐의 고른 분포를 위하여 30회 인공호흡을 실시하였다.

[0100] **실시예 2-1: 폐의 압력-용적 곡선(pressure-volume curve)에서 호기 시 용적 측정**

[0101] 상기의 각 군의 폐에 일정속도로 압력을 주었을 때, 압력의 증가에 따른 폐의 용적증가의 변화를 관찰하였고, 이를 압력-용적 곡선(pressure-volume curve)으로 표현하였다. 이 중에서 각각의 호기 압력일 때의 호기 용적(ml/kg)을 측정하여 비교하였다.

[0102] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, 만삭 대조군과 미숙 대조군 사이에서 폐용적의 차이를 보임을 확인하였다. 또한 도 5에 나타낸 바와 같이, 미숙 대조군을 기준으로 Surfacten[®] 투여군, Synsurf-1 투여군, Synsurf-2 투여군, Synsurf-3 투여군을 비교하였을 때, 미숙 대조군과 Synsurf-1 투여군 사이에는 유의한 차이가 없었으나(p=0.4811), Synsurf-2 투여군, Synsurf-3 투여군, Surfacten[®] 투여군과는 유의한 차이를 보였다(각각 p=0.0068, 0.0031, <0.0001). 각 투여군의 용적의 크기를 비교하였을 때 Synsurf-3 투여군이 가장 우수하였고, 그 다음으로 Synsurf-2 투여군, Surfacten[®] 투여군 순으로 측정되어 Synsurf-3의 폐 계면활성이 가장 우수함을

확인하였다.

[0104] 실시예 2-2: 병리조직학적 폐포 내에서 공기화된 면적 분석

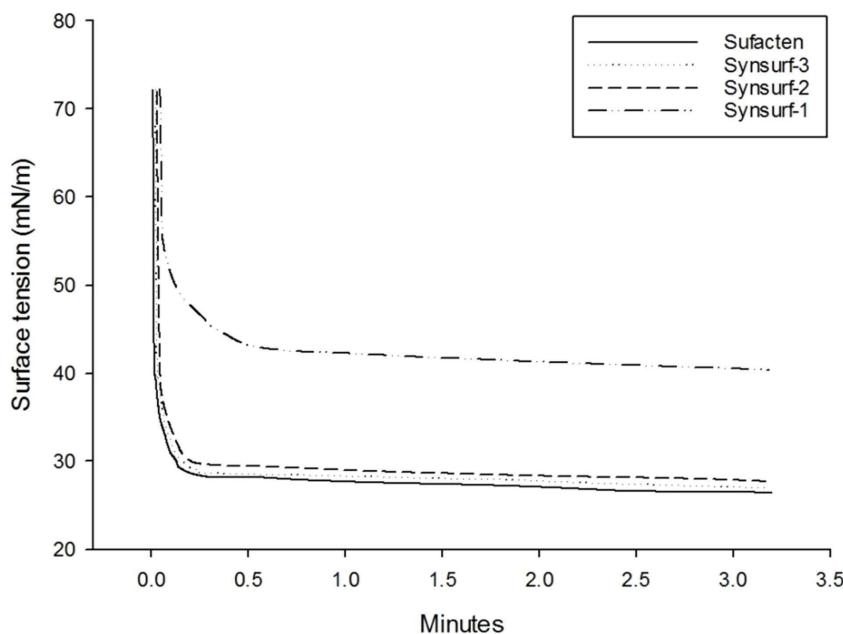
[0105] 압력-용적 곡선을 측정한 이후에는 10cmH₂O의 일정 압력을 가해주고 기관절개술 끝을 막은 후에 포르말린 고정액에 고정하였다. 좌우 폐 조직의 표본을 H&E(hematoxylin and eosin) 염색을 하여 병리 표본을 완성하였다. 병리 표본의 ×100배 사진을 촬영한 후 컴퓨터 상에서 ImageJ 소프트웨어 프로그램 (V 1.48 for Windows, NIH, USA)을 이용하여, ×100배 시야 전체 폐포 면적 중에서 공기화된 면적의(aerated area) 비율(%)을 측정하였다. 태자토끼 개체 한 마리 당 좌우 양측 폐 각각 한개 씩, 총 두개의 조직에서 시행하였으며, 각 군 간의 측정값을 비교하였다.

[0106] 그 결과, 도 6 및 도 7에서 나타낸 것과 같이, 미숙 대조군에 비해서 Surfacten[®] 투여군, Synsurf-1 투여군, Synsurf-2 투여군, Synsurf-3 투여군은 각각 모두 유의하게 큰 결과를 보였고(p<0.0001), Surfacten[®] 투여군에 비해서 Synsurf-1 투여군 및 Synsurf-2 투여군은 유의한 차이가 없었으나(각각 p=0.7289, 0.7224), Synsurf-3 투여군의 값은 유의하게 높았다(p=0.0202). 이는 Synsurf-3가 폐 계면활성제로서 가장 우수한 효과가 있음을 시사하는 것이다.

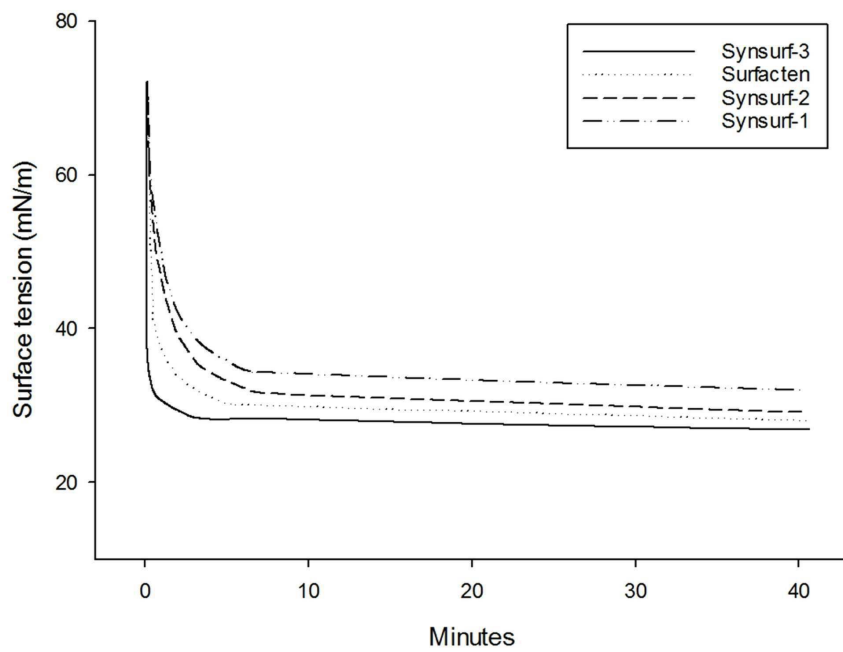
[0108] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

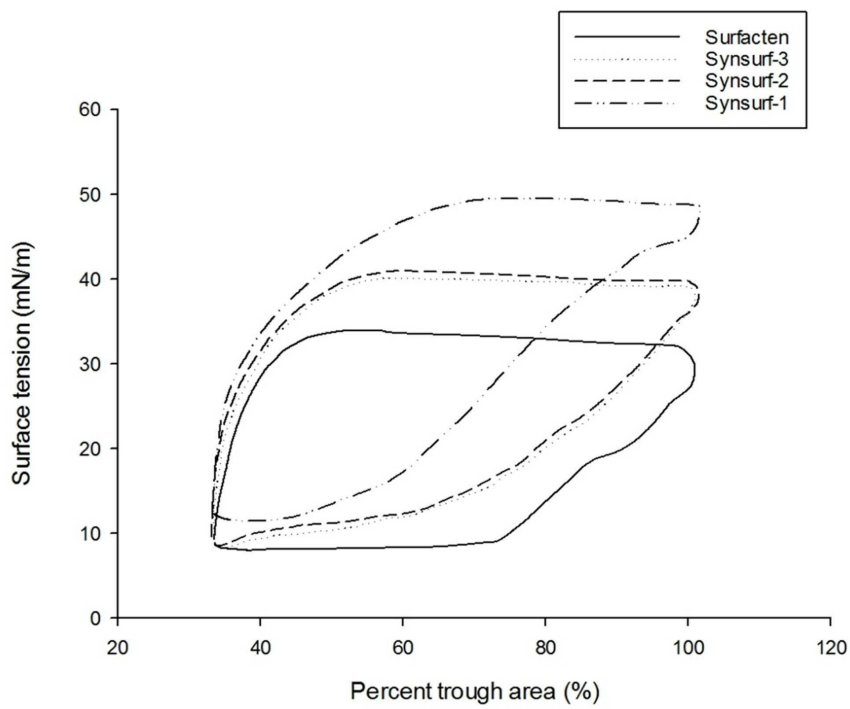
도면1



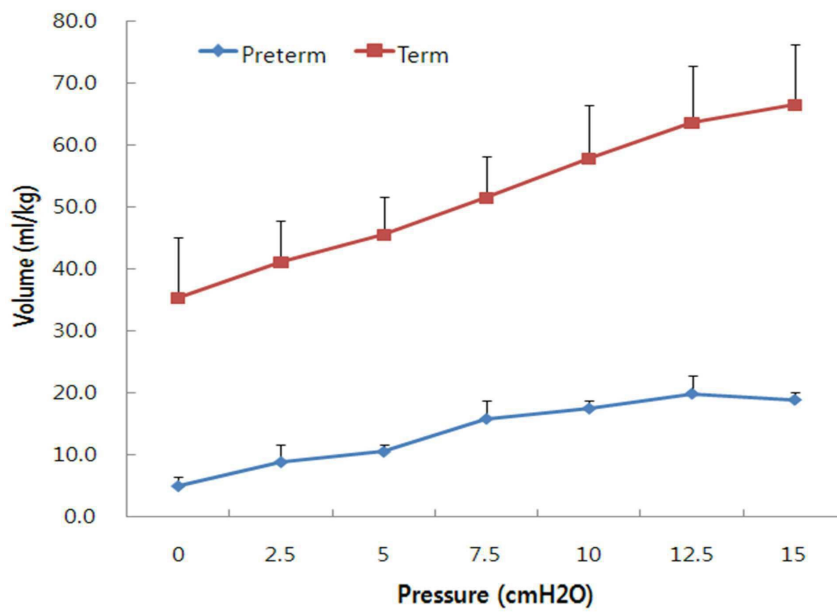
도면2



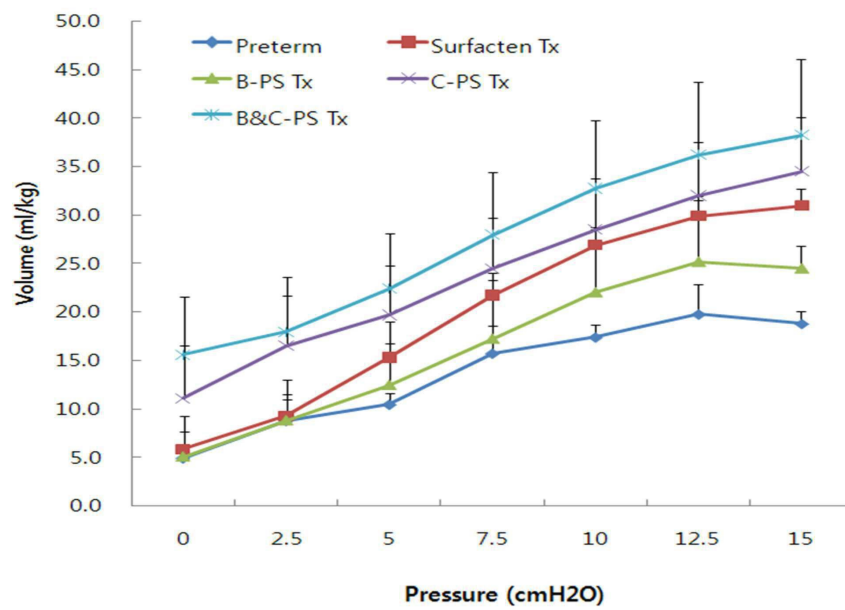
도면3



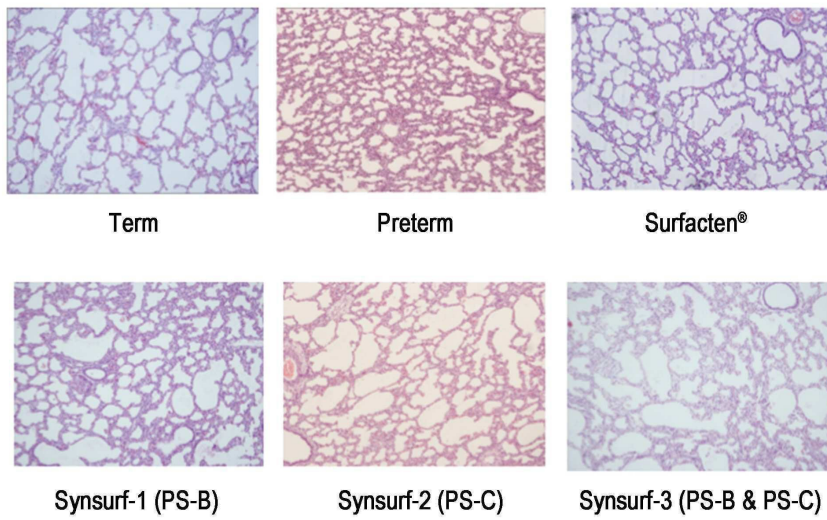
도면4



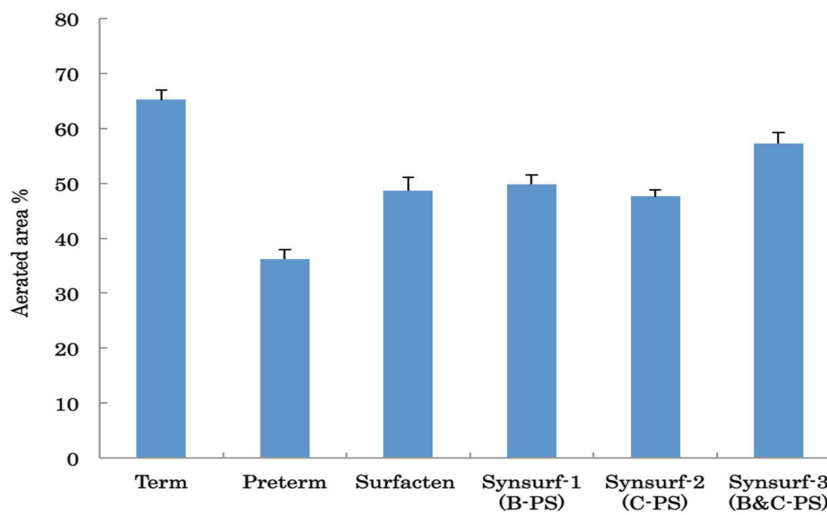
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Synthetic Pulmonary Surfactant Composition Comprising Analogues of Surfactant Protein B and Surfactant Protein C
- <130> KPA150012-KR-D1
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SP-B polypeptide

<400> 1

Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser Met

1 5 10 15

Asp

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SP-C polypeptide analogue

<400> 2

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

20