



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년05월19일
(11) 등록번호 10-1036058
(24) 등록일자 2011년05월13일

(51) Int. Cl.
A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2004-7017208
(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년04월25일
심사청구일자 2008년04월25일
(85) 번역문제출일자 2004년10월25일
(65) 공개번호 10-2005-0019073
(43) 공개일자 2005년02월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/012731
(87) 국제공개번호 WO 2003/090682
국제공개일자 2003년11월06일
(30) 우선권주장
60/375,968 2002년04월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Am. J. Crit. Care Med. Vol.159, p917-p923
(1999)*
US06013619 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 스크립스 리서치 인스티튜트
미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 노스 토리 파
인 로드 10550
(72) 발명자
코크레인, 찰스 지.
미국 92037 캘리포니아 라 줄라 루딩톤 플레이스
7782
(74) 대리인
장수길, 김영

전체 청구항 수 : 총 20 항

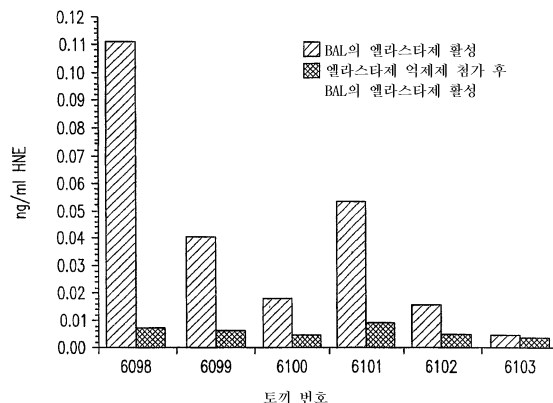
심사관 : 이수정

(54) 폐질환 증상의 치료 및 예방

(57) 요약

본원 발명은 폐 질환 증상의 치료용 및 폐 염증의 부정적 효과를 감소시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 조성물 및 방법은 프로테아제 억제제 및 폐 계면활성제 혼합물을 사용한다. 이 조성물 및 방법은 또한 리파아제 억제제(예를 들어 포스포리파아제 억제제) 및 항산화제를 포함할 수 있다.

대표도 - 도6A



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

폐 계면활성제 폴리펩타이드 및 프로테아제 억제제를 포함하며,
상기 폐 계면활성제 폴리펩타이드는

KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (서열 번호 :1),
KLLLLLLLLKLLLLLLLLKLL (서열 번호:2),
KKLLLLLLLLKKLLLLLLLLKKL (서열 번호 :3),
DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD (서열 번호 :4);
RLLLLRLLLLRLLLLRLLLLR (서열 번호 :5);
RLLLLLLLLRLLLLLLLLRLL (서열 번호 :6);
RRLLLLLLRRLLLLLLRRLL (서열 번호:7),
RLLLLCLLLRLLLLCLLLR (서열 번호 :8),
RLLLLCLLLRLLLLCLLLRLL (서열 번호 :9), 및
RLLLLCLLLRLLLLCLLLRLLLLCLLLR (서열 번호:10)

의 폐 계면활성제 폴리펩타이드로부터 선택된 것이고,
상기 프로테아제 억제제는 엘라핀인,

폐 고혈압, 신생아 폐 고혈압, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐질환, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 기종, 세기관지염, 기관지 확장증, 방사선 폐렴, 과민증, 폐실질염, 급성 염증성 천식, 급성 연기 흡입, 열에 의한 폐 손상, 알레르기성 천식, 의원성 천식, 낭포성 섬유증, 허파파리 단백질증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상, 특발성 호흡 곤란 증후군 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된 폐질환 증상의 치료 또는 예방을 위한,

액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

제 32 항에 있어서, 0.1 내지 10 건조중량%의 폐-계면활성제 폴리펩타이드를 포함하는, 액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 44

제 32 항에 있어서, 상기 폐 계면활성제 폴리펩타이드가 아미노산 서열 KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (서열 번호: 1)을 갖는 것인 액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

제 32 항에 있어서, 50 내지 95 건조중량%의 인지질을 추가로 포함하는 액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 49

제 48 항에 있어서, 상기 인지질이 디팔미토일 포스파티딜콜린 및 팔미토일, 올레일 포스파티딜 글리세롤을 4:1 내지 2:1의 몰비로 포함하는 것인 액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 50

제 32 항에 있어서, 추가로 산포제를 포함하는 액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

제 32 항에 있어서, 액체 조성물인 조성물.

청구항 61

제 32 항에 있어서, 건조 조성물인 조성물.

청구항 62

제 32 항에 있어서, 1 μm 내지 5 μm 의 질량 중위 공기역학적 직경(mass median aerodynamic diameter)을 갖는 에어로졸 입자를 포함하는 액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 63

제 32 항에 있어서, 천식 치료용으로 제제화된 액체 또는 에어로졸화 조성물.

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

폐 계면활성제 혼합물 및 프로테아제 억제제를 포함하며,
상기 폐 계면활성제 혼합물은

**KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (서열 번호 :1),
KLLLLLLLLLKLLLLLLLLLKLL (서열 번호:2),
KKLLLLLLLLKKLLLLLLLLKKL (서열 번호 :3),
DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD (서열 번호 :4);
RLLLLRLLLLRLLLLRLLLLR (서열 번호 :5);
RLLLLLLLLRLLLLLLLLRLL (서열 번호 :6);
RRLLLLLLRRLLLLLLRRL (서열 번호:7),
RLLLLCLLRLLLLCLLR (서열 번호 :8),
RLLLLCLLRLLLLCLLRLL (서열 번호 :9), 및
RLLLLCLLRLLLLCLLRLLLLCLLR (서열 번호:10)**

으로부터 선택된 폐 계면활성제 폴리펩타이드를 포함하고,

상기 프로테아제 억제제는 엘라핀인,

환자에게 프로테아제 억제제를 폐로 전달하는,

폐 고혈압, 신생아 폐 고혈압, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐질환, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 기종, 세기관지염, 기관지 확장증, 방사선 폐렴, 과민증, 폐실질염, 급성 염증성 천식, 급성 연기 흡입, 열에 의한 폐 손상, 알레르기성 천식, 의원성 천식, 낭포성 섬유증, 허파파리 단백질증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상, 특발성 호흡 곤란 증후군 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된 폐질환 증상의 치료 또는 예방을 위한 조성물.

청구항 95

제 94 항에 있어서, 상기 폐 계면활성제 혼합물이 인지질 50-95 건조중량%, 산포제 2-25 건조중량%, 및 폐 계면활성제 폴리펩타이드 0.1-10 건조중량%를 포함하는 조성물.

청구항 96

제 95 항에 있어서, 상기 인지질이 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC) 및 팔미토일-올레일 포스파티딜 글리세롤(POPG)의 혼합물을 4:1 내지 2:1의 몰비로 포함하는 조성물.

청구항 97

제 95 항에 있어서, 상기 산포제가 탄소 원자수 12 개 이상 20개 이하의 지방 아실 사슬 길이를 갖는 지방산 또는 지방 알콜인 조성물.

청구항 98

제 94 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 아미노산 서열 KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (서열 번호: 1)을 갖는 것인 조성물.

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

(a) (i) 인지질 50-95 건조중량%, (ii) 폐의 안 표면층으로 인지질의 혼입을 촉진시키는 데 유효한 산포제 2-25 건조중량%, 및 (iii)

**KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (서열 번호:1),
KLLLLLLLLKLLLLLLLLKLL (서열 번호:2),
KKLLLLLLLLKKLLLLLLLLKKL (서열 번호:3),
DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD (서열 번호:4);
RLLLLRLLLLRLLLLRLLLLR (서열 번호:5);
RLLLLLLLLRLLLLLLLLRLL (서열 번호:6);
RRLLLLLLLLRRLLLLLLLLRRL (서열 번호:7),
RLLLLCLLLRLLLLCLLLR (서열 번호:8),
RLLLLCLLLRLLLLCLLLRLL (서열 번호:9), 및
RLLLLCLLLRLLLLCLLLRLLLLCLLLR (서열 번호:10)**

으로부터 선택된 폐 계면활성제 폴리펩타이드

를 포함하는 계면활성제 혼합물, 및

(b) 계면활성제 제제의 1 내지 80 건조중량%의 양의 엘라핀

으로 구성된 계면활성제 제제의 에어로졸 입자를 포함하며,

상기 입자의 질량 중위 공기역학적 직경이 1-5 μ m 크기 범위인, 흡입을 통하여 환자에게 프로테아제 억제제를 전달하기 위한 용도의 에어로졸화된,

폐 고혈압, 신생아 폐 고혈압, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐질환, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 기종, 세기관지염, 기관지 확장증, 방사선 폐렴, 과민증, 폐실질염, 급성 염증성 천식, 급성 연기 흡입, 열에 의한 폐 손상, 알레르기성 천식, 의원성 천식, 낭포성 섬유증, 허파파리 단백증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상, 특발성 호흡 곤란 증후군 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된 폐질환 증상의 치료 또는 예방을 위한 조성물.

청구항 116

제 115 항에 있어서, 상기 폐 계면활성제 혼합물이 인지질 80-89.9 건조중량%, 산포제 10-15 건조중량%, 및 폐 계면활성제 폴리펩타이드 0.1-10 건조중량%을 포함하는 조성물.

청구항 117

제 116 항에 있어서, 상기 인지질이 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC) 및 팔미토일-올레일 포스파티딜 글리세롤(POPG)의 혼합물을 4:1 내지 2:1의 몰비로 포함하는 조성물.

청구항 118

제 116 항에 있어서, 상기 산포제가 탄소 원자수 12 개 이상 20개 이하의 지방 아실 사슬 길이를 갖는 지방산

또는 지방 알콜인 조성물.

청구항 119

제 115 항에 있어서, 상기 폐 계면활성제 폴리펩타이드가 아미노산 서열 KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (서열 번호: 1)을 갖는 것인 에어로졸화된 조성물.

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

명세서

기술분야

본원 발명은 폐의 염증 동안 또는 이전에 폐 조직의 파괴를 예방하는 제약 조성물 및 이러한 조성물의 형성 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 내생 분해 효소 예컨대 리파아제 및 단백질 가수분해 효소는 침입 유기체, 항원-항체 복합체 및 더 이상 유기 조직체에 필요하거나 유용하지 않는 일부 지질 및 단백질을 분해하는 작용을 한다. 정상적으로 기능하는 유기 조직체에서, 이러한 효소는 한정된 양으로 생성되고 억제제의 합성을 통하여 부분적으로 조절된다.
- [0003] 효소와 이들 억제제 간의 균형이 어지럽혀지면 효소가 매개된 조직 파괴가 생길 수 있다. 이러한 파괴는 염증, 기종, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 관절염, 사구체 신염, 치주염, 근 이영양증, 종양 침윤 및 기타 다른 병리적 상태를 포함하는 다수의 증상으로 이를 수 있다. 예를 들어 심각한 병리적 진행 예컨대 폐혈증 또는 급성 백혈병과 같은 특정 상황에서, 유리 단백질 가수분해 효소의 양은 분비 세포로부터 효소의 방출 때문에 증가한다. 이러한 이상한 증상이 존재하는 유기조직체 내에서, 분해 효소의 작용을 조절하는 조치를 취하지 않으면 유기조직체에 대한 중대한 손상이 일어날 수 있다.
- [0004] 인간의 폐는 신체의 6% 부피를 차지하고, 다수의 작은 가스낭인 허파파리로 구성되어 있다. 폐의 일차적 목적은 전신 순환계와 가스 상호교환을 촉진하는 것이다. 따라서, 폐 상피 및 내피 장벽을 가로질러 신선한 허파파리 가스와, 가스 교환을 위한 혼합 정맥혈을 가져오는 광대한 모세관 네트워크가 허파파리를 관류하고 있다. 허파파리 막은 100 m^2 의 총 표면적 및 $1\mu\text{m}$ 미만의 두께를 갖는다. 허파파리 막 장벽을 파괴를 야기하는 질환 및 증상은 허파파리로 액체 누설을 야기하여, 폐 기능의 손실을 초래할 수 있다.
- [0005] 예를 들어, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)은 심각한 가스 교환 장애 (특히 동맥 저산소혈증)와 관련있는 다른 병인의 다수의 급성, 확산 침윤성 폐 병변을 적용하는 기술적 표현이다. ARDS는 자주 "누설" 모세관 반응과 관련이 있다. 신생아 호흡곤란 증후군 (IRDS)과 공통된 다수의 임상 및 병리적 특성 때문에, 표현 "급성 호흡 곤란 증후군"이 사용된다. IRDS은 폐 계면활성제 결핍과 관련있는 반면, ARDS는 폐 계면활성제 기능장애와 관련 있다. 치사율이 50-60% (Schuster Chest 1995, 107 : 1721-26의 조사)이므로 ARDS 환자의 예후는 좋지 못하다.
- [0006] 폐질환을 예방 또는 치료하기 위하여, 기관지폐포 세정법에 의하여, 도관을 통한 액체 볼러스(bolus) 투여에 의하여 또는 에어로졸 약물 용액 (예컨대 분무기를 사용하여)에 의한 후 약물을 포함하는 에어로졸 액적을 흡입함으로써 약물을 환부 조직에 직접 전달할 수 있다. 그러나, 약물 용액을 폐로 직접 전달하여도, 약물 또는 그 투여가 얼마나 효능있는가에 대하여 상당한 불확실성이 존재한다. 예를 들어, 약물이 일부 지역에서는 고농도로 존재할 수 있는 반면, 다른 지역에서는 거의 없거나 없을 수 있고, 혈액계로 흡수 또는 파괴되기 때문에 폐 내의 약물의 반감기가 상대적으로 짧다. 또한, 약물의 에어로졸화의 효과의 문제도 있다. 약물은, 산화에 의해서 불활성화되거나 분무기의 분무 작용에 의하여 분해될 수 있다. 또한, 긴 시간 동안 폐에 대하여 또는 숙주 기관에 대하여 해로운 효과없이 유효량을 유지하는 능력에 관하여 불확실하다. 또한, 건조 분말 형태의 전달을 위해 제제화된 단백질이 생물 활성을 유지할지에 대해 예측불가능하다.
- [0007] 어떤 저분자량 약물을 함유하는 제약 조성물을 폐로 투여해 왔고, 가장 두드러지게 천식을 치료하기 위하여 베타-안드로젠 길항제를 폐로 투여했다. 코르티코스테로이드 및 크로몰린 소디움을 비롯한 다른 저분자량 비단백질성 화합물들이 폐 흡수를 경유하여 전신 투여되고 있다. 그러나, 반드시 모든 저분자량 약물이 폐를 통하여 효능있게 투여되지는 않는다. 예를 들어, 전신 작용을 하는 아미노글리코시드 항생제, 항바이러스성 약물 및 항암 약물의 폐로의 투여는 일부 성공을 가져왔다. 일부 경우, 약물은 자극적이고, 기관지를 수축시킨다는 것이 발견되어 있다. 따라서, 저분자량 물질조차도, 상기 화합물의 폐로의 전달이 효과적인 투여 수단일 것이라고 모두 예측할 수는 없다. 일반적으로는 문헌 [Peptide and Protein Drug Delivery, ed. V. Lee, Marcel Dekker, N. Y. , 1990, pp. 1-11]을 참조하시오. 약물 자체, 제약 조성물, 전달 장치 및 특히 폐 또는 이들 인자의 조합에 대한 본질적인 다양한 인자들에 의하여 폐로의 투여가 성공적인가가 영향받을 수 있다.
- [0008] 이와 같이, 폐질환 증상을 치료하기 위한 현재 사용되는 조성물 및 방법의 개선이 요구된다.

발명의 상세한 설명

- [0009] <발명의 요약>
- [0010] 본원 발명은 주로 폐질환 증상의 치료 조성물 및 방법에 관한 것이다. 이 조성물은 하나 이상의 폐 계면활성제 폴리펩타이드 및 염증 동안에 활성있는 조직 파괴 매개체의 하나 이상의 억제제를 포함한다. 염증 동안에 활성인 조직 파괴 매개체는 임의의 화합물, 효소, 또는 염증 반응의 일부로서 포유동물 신체에 의하여 생성되며 포유동물 조직을 해를 주거나 파괴할 수 있는 기타 인자를 포함한다. 이러한 조직 파괴 매개체의 예로서 프로테아제, 리파아제, 산화제 등을 포함한다. 이러한 매개체의 억제제로, 예를 들어, 프로테아제 억제제, 항산화제, 리파아제 억제제 또는 포스포리파아제 억제제를 포함한다.

- [0011] 한가지 태양으로, 본원 발명은 하나 이상의 프로테아제 억제제와 함께 폐 계면활성제 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 포함한다. 리파아제 억제제, 포스포리파아제 억제제 및(또는) 항산화제도 또한 조성물 내에 포함될 수 있다. 이 조성물을 기관지폐포 세정, 액체 볼러스 액적 (bolus liquid drip), 흡입 등을 경유하여 폐로 직접 투여할 수 있다.
- [0012] 다른 태양으로, 본원 발명은 흡입을 통해 환자에게 활성제를 전달하기 위한 에어로졸화된 조성물을 포함한다. 이 조성물은 하나 이상의 계면활성제 폴리펩타이드를 하나 이상의 프로테아제 억제제와 함께 포함하는 에어로졸 입자를 포함할 수 있다. 리파아제 억제제, 포스포리파아제 억제제 및(또는) 항산화제도 또한 이 조성물 내에 포함될 수 있다.
- [0013] 이 조성물에 사용된 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제, 포스포리파아제 억제제 및 항산화제 및 본원 발명 방법은 당업계에서 구입할 수 있는 어떠한 항산화제 또는 억제제일 수 있다.
- [0014] 어떤 태양으로서, 프로테아제 억제제는 쿠니츠(Kunitz) 억제제 또는 세린 프로테아제 억제제이다. 예를 들어, 프로테아제 억제제는 트립신, 키모트립신, 엘라스타제, 칼리크레인, 플라스민, 응고 인자 XIa, 응고 인자 IXa, 콜라게나제, 카텝신 G, 인간 백혈구 엘라스타제 또는 인간 분비 백혈구 프로테아제를 억제할 수 있다. 프로테아제 억제제는 예를 들어 인간 백혈구 엘라스타제 억제제, 알파 1-프로티나제 억제제, 인간 분비 백혈구 프로테아제 억제제, 콜라게나제 억제제, 카텝신 G 억제제, 알파-1-항트립신, 알파-1-항키모트립신, C-반응성 단백질, 엘라핀 또는 이들의 조합일 수 있다. 어떤 태양에서는, 프로테아제 억제제는 서열번호 : 14, 서열번호 : 15, 서열번호 : 16, 서열번호 : 17, 서열번호 : 18, 서열번호 : 19, 서열번호 : 20, 서열번호 : 21 또는 서열번호 : 22을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0015] 어떤 태양에서는, 리파아제 억제제는 포스포리파아제 A₂ 억제제이다. 리파아제 억제제는 또한 예를 들어, p-브로모펜아실 브로마이드, 티엘로신 A1 베타, 리포코르틴, 아넥신 I 또는 크로탈러스(Crotalus) 포스포리파아제 A₂ 억제제일 수 있다.
- [0016] 항산화제는 예를 들어, 카탈라아제, 글루타티온, N-아세틸시스테인, 프로시스테인, 또는 알파-토코페롤일 수 있다. 또한 예시적인 항산화제로 EUK134을 포함한다.
- [0017] 앞서 기술하였듯이, 폐로 투여하는 본 조성물은 폐 계면활성제 폴리펩타이드를 포함한다. 폐 계면활성제 폴리펩타이드는, 화학식 (Z_aU_b)_cZ_d로 표현되는 소수성 및 친수성 아미노산 잔기 영역이 교대하는 아미노산 서열의 약 10 내지 약 60 개의 아미노산을 가질 수 있다 (여기서, Z는 친수성 아미노산 잔기이고, U는 소수성 아미노산 잔기이고, "a"는 약 1 내지 약 5의 정수이고, "b"는 약 3 내지 약 20의 정수이고, "c"는 약 1 내지 약 10의 정수, "d"는 약 0 내지 약 3의 정수이다). 억제제(들) 및(또는) 항산화제는 제제 중 1 내지 80, 전형적으로 2-50 건 조중량%을 차지할 수 있다. 예시적인 폐-계면활성제 폴리펩타이드에서, Z는 히스티딘, 라이신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및(또는) 3-히드록시프롤린이고, U는 발린, 이소류신, 류신, 시스테인, 티로신, 페닐알라닌, 및(또는) α-아미노지방족 카르복시산, 예컨대 α-아미노부탄산, α-아미노펜탄산, α-아미노-2-메틸프로판산, 또는 α-아미노헥산산이다.
- [0018] 계면활성제 단백질의 한 부류로 하기의 서열을 갖는다:
- KLLLLKLLLLKLLLLK (서열 번호:1),**
KLLLLLLLLKLLLLLLLLKLL (서열 번호:2),
KKLLLLLLLLKKLLLLLLLLKKL (서열 번호:3),
DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD (서열 번호:4);
RLLLLRLLLLRLLLLRLLLLR (서열 번호:5);
RLLLLLLLLRLLLLLLLLRLL (서열 번호:6);
RRLLLLLLLLRRLLLLLLLLRRL (서열 번호:7),
RLLLCLLLRLLLCLLLR (서열 번호:8),
RLLLCLLLRLLLCLLLRLL (서열 번호:9), 또는
RLLLCLLLRLLLCLLLRLLLLCLLLR (서열 번호:10).
- [0019]

- [0020] 이러한 폐로 투여되는 조성물은 (i) 인지질 50-95 건조중량%, (ii) 인지질을 폐의 안쪽 표면 내로의 혼입 및 분포를 촉진하는 데에 유효한 산포제(spreading agent) 2-25 건조중량%, 및 (iii) 폐-계면활성제 폴리펩타이드 0.1 내지 10 건조중량%의 계면활성제 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0021] 구체적이고 예시적인 태양으로, 계면활성제 혼합물의 인지질은 4:1 내지 2:1의 물비로 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC) 및 팔미토일, 올레오일 포스파티딜글리세롤 (POPG)을 포함한다. 예시적인 산포제로 세틸 알콜 및 팔미트산과 같이 탄소원자수 10개 이상의 지방 아실 사슬 길이를 갖는 지방산 또는 지방 알콜이 있다.
- [0022] 에어로졸 입자가 액체 현탁액으로부터 형성되는 경우, 계면활성제는 수성 에어로졸 액적 내에 현탁될 수 있다. 입자가 건조 분말의 형태인 경우, 입자는 탈수되거나 실질적으로 탈수된다. 에어로졸 입자는 1-5 μm 크기 범위의 질량 중위 공기역학적 직경(Mass Mean Aerodynamic Diameter:MMAD)을 가질 수 있다.
- [0023] 또한 본원 발명은, 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 및 항산화제를 포함하는 조성물을 포유류에게 투여하는 것을 포함하는 포유류의 폐 염증의 치료 방법을 제공한다. 당업자가 이 조성물을 폐 조직으로 직접 투여하는 것(예를 들어, 기관지폐포 세정, 액체 볼러스 액적 또는 기관지내 투여)으로 결정할 수 있지만, 또한 이 조성물을 다른 경로, 예를 들어 장관외, 경구 또는 정맥내 투여 경로를 거쳐 투여할 수 있다. 폐로의 투여를 이용할 경우, 하나 이상의 폐 계면활성제 폴리펩타이드가 이 조성물 내에 포함된다.
- [0024] 본원 발명에 의해 치료되는 폐 염증은 예를 들어, 폐 고혈압, 신생아 폐 고혈압, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐질환, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 기종, 세기관지염, 기관지 확장증, 방사선 폐렴, 과민증, 폐실질염, 급성 염증성 천식, 급성 연기 흡입, 열에 의한 폐 손상, 알레르기성 천식, 의원성 천식, 낭포성 섬유증, 허파파리 단백질증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상, 특발성 호흡 곤란 증후군, 또는 특발성 폐 섬유증과 관련이 있다.
- [0025] 또 다른 측면으로, 본원 발명은, 환자에게 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제와 같은 활성제 투여 방법을 포함한다. 기관지폐포 세정, 볼러스 액체 투여 또는 흡입에 의하여 투여할 수 있다. 본 방법은 상기 약품을, (i) 인지질 50-95 건조중량% (ii) 지질을 폐의 안쪽 표면층 내로의 혼입 및 분포를 촉진시키는 데에 유효한 산포제 2-25 건조중량%, 및 (iii) 폐 계면활성제 폴리펩타이드 0.1 내지 10 건조중량%의 계면활성제 혼합물에 혼입하는 것을 포함한다. 계면활성제 혼합물은 10-60개의 아미노산 잔기를 포함하고, 화학식 $(Z_aU_b)_cZ_d$ 로 표현되는 친수성 및 소수성 아미노산 잔기 영역이 교대하는 아미노산 서열을 갖는다 (여기서, Z는 친수성 아미노산 잔기이고, U는 소수성 아미노산 잔기이고, "a"는 1- 5의 평균치이고, "b"는 3 - 20의 평균치이고, "c"는 1 내지 10, "d"는 0 내지 3이다). 얻어진 제제는 활성제 1-80 건조중량%, 또는 2-50 건조중량%를 함유한다.
- [0026] 제제는 입자의 질량 중위 공기역학적 직경이 1-5 μm 인 입자 조성물로 전환될 수 있다. 입자는 치료적 유효량으로 환자의 기도로 에어로졸 조성물의 형태로 투여된다.
- [0027] 한 태양으로, 제제는 폐로 기관지폐포 세정에 의하여 투여되거나 직접 볼러스 투여, 예를 들어 기관 튜브를 통하여 투여되는 수성 제제이다. 활성제 및 다른 제제 성분을 수성, 유기 또는 혼합 용매일 수 있는 용매에 용해하거나 현탁하여 제제를 제조한다. 필요한 1-5 μm MMAD 크기 범위를 갖는 건조 입자를 제조하는 데 효과적인 조건하에서 혼합물을 분무 건조하여 제제를 에어로졸 투여를 위한 입자 조성물로 전환할 수 있다. 다른 태양으로, 액체 조성물을 동결건조하여 건조시키고 건조 혼합물을 건조 혼합물로 세분시켜 원하는 크기 범위의 건조 입자를 형성하여, 제제를 에어로졸 투여를 위한 입자 조성물로 전환할 수 있다.
- [0028] 기관지폐포 세정 또는 볼러스 투여를 통하여, 액체(예를 들어 수성) 조성물을 폐로 직접 투여할 수 있다. 액체 또는 건조 입자는 에어로졸 형태의 흡입에 의하여 투여될 수 있다. 또한 제제는 수성 현탁액 형태, 예를 들어 리포솜 현탁액의 형태로 되어 그속에 현탁된 현탁 제제 입자를 갖는 액체 액적을 형성할 수 있다.
- [0029] 다음의 도면과 함께 다음의 발명의 상세한 설명을 통하여 파악함으로써 이들 및 본 발명의 다른 목적 및 특징이 더욱 명확해질 것이다.

실시예

[0377] 계면활성제 단백질/폴리펩타이드의 제조

[0378] 본 발명의 계면활성제 폴리펩타이드 (예: KL₄)의 합성은 다양한 공지 합성 방법에 따라서 수행될 수 있다. 하기

방법은 예를 들어 설명하는 것이다.

- [0379] 별법으로, 하기 방법은 또한 본원에 기술된 바와 같이 사용된다. 계면활성제 펩티드의 배치(예: KL₄ 펩티드의 배치)를 합성하는데 유용한 화학물질 및 시약으로는 다음을 들 수 있다:
- [0380] t-Doc-L-라이신(CI-Z) PAM-수지 (t-Bcc-L-Lys (CI-Z) (미국 캘리포니아주 포스터 시지 소재 어플라이드 바이오 시스템즈(Applied Biosystems));
- [0381] a-Boc-ε-(2-클로로-CBZ)-L-라이신 (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재 바켄(Bachem));
- [0382] N-Boc-L-류신-H₂O (N-Boc-L-Leu; 바켄);
- [0383] 디클로로메탄(DCM; 미국 뉴저지주 깁스타운 소재 EM 사이언스, 또는 미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재 피셔(Fisher));
- [0384] 트리플루오로아세트산 (TFA; 할로카본);
- [0385] 디이소프로필에틸아민 (DIEA; Aldrich, Aldrich, MI);
- [0386] N,N-디메틸포름아미드 (DMF; 미국 뉴저지주 깁스타운 소재 EM 사이언스);
- [0387] 디메틸설폭사이드 (DMSO; Aldrich);
- [0388] N-메틸피롤리돈 (NMP; 미국 미시간주 무스케곤 소재 부르딕 잭슨(Burdick Jackson));
- [0389] 1-히드록시벤조트리아졸 히드레이트 (HOBt; Aldrich);
- [0390] 1,3-디시클로헥실카르보다이미드 (DCC; Aldrich);
- [0391] 아세트산 무수물 (Ac₂O; 미국 미조리주 세인트 루이스 소재 밀링크로트(Mallinckrodt)); 및
- [0392] 히드로젠 플루오라이드 (HF; 미국 펜실베이니아주 알렌타운 소재 에어 프러덕츠(Air Products));
- [0393] KL₄ 펩티드를 합성하는 한 수단은 메리필드 방법(Merrifield method)를 이용하여 커플러 296 펩티드 합성기 (Vega Biotechnologies, Tucson, AZ) 상에서 수행된다. "통상적" 합성법은 다음과 같이 기술된다. 사슬 연장은 하기 표 2에 기술된 방법에 의해 100 g의 라이신 PAM 수지 상에서 수행되었다. 단계 7, 10 및 11을 제외한 모든 단계는 자동으로 수행하였다.

표 2

- [0394] HOBt 활성 에스테르 방법을 이용한 사이클용 프로그램

단계	시약	시간	부피
1	50% TFA/CH ₂ Cl ₂	1x2 분	1.8 리터
2	50% TFA/CH ₂ Cl ₂	1x20 분	1.5 리터
3	CH ₂ Cl ₂	5x20 초	1.7 리터
4	5% DIEA/CH ₂ Cl ₂	1x2 분	1.7 리터
5	5% DIEA/NMP	1x3 분	1.7 리터
6	DMF	5x30 초	1.7 리터
7	BOC AA-HOBt 활성 에스테르	1x39 분	1.0 리터
8	DIEA/DMSO (195 ml/285 ml)	1x21 분	0.5 리터
9	DMF	3x30 초	1.7 리터
10	10%; AC ₂ O; 5% DIEA/NMP	1x8 분	2.0 리터
11	CH ₂ Cl ₂	3x30 초	1.7 리터

- [0395] 펩티드-수지를 탈보호하면서 적절한 아미노산 유도체를 제조하였다. 적절한아미노산을 1 리터의 NMP에 용해하였다. 맑은 용액을 얻은 후, HOBt를 용액에첨가하였다. HOBt가 용해되었을 때, DCC를 용액에 첨가하였다. 이 용액을 1 시간 동안 실온에서 교반하였다. 이 1 시간의 교반 동안 형성된 부산물인 디시클로헥실우레아 (백색 침전물)가 형성되었다. 상기 부산물을 와즈만 #1 여과지를 이용하여 부흐너(buchner) 깔대기를 통하여 여과하였다. 이어서, 여액을 단계 7에서 베가(vega) 296 반응 용기의 내용물에 수동으로 첨가하였다.
- [0396] 이어서, 합성기를 단계 9 완료 후 종료하도록 프로그래밍하였다. 분취량의 펩티드 수지로 사린(Sarin) 등의 정량적 다프트린 시험을 수행하였다 (Applied Biosystems 431A user manual, Appendix A). 커플링 효율은 전체 합성 도중에 양호하였다. 미반응 펩티드 수지를 류신 12 (사이클 9) 후 및 류신 5 (사이클 5) 후에 아세틸화하였다. 각 아세틸화 후, 펩티드 수지를 디클로로메탄으로 세척하였다 (표 2, 단계 11 참조).
- [0397] 합성 종료시, 완성된 펩티드 수지를 프로그램의 단계 1 내지 3 (표 2 참조)를 수행하는 것에 의해 탈보호하였다 (Boc 기의 제거). 이어서, 탈보호된 펩티드 수지를 앰플 분량의 순수 에탄올로 세척하고, 진공 중에서 P₂O₅ 상에서 건조하였다. 건조된 탈보호 펩티드의 중량은 256.48 g이었다. 배치를 0.64 mmole/g의 치환에서 100 g의 t-Boc-라이신 (Cl-Z) OCH₂ PAM 수지로 시작하였으므로, 로딩은 64 mmole에 상응한다. 초기 100 g의 수지를 제외하면, 획득 중량은 156.48 g이었다. 초기 보호된 펩티드 (수지 내로 고착된 C-말단 라이신을 제외함)의 분자량은 3011.604 g/mole이었다.
- [0398] **HP 분해.** 256.48 g 분량의 펩티드 수지를 3개의 큰 분취량의 히드로젠 플루오라이드 (HF)로 처리하였다. 페닌슐라 레버러토리스(Peninsula laboratories, 미국 캘리포니아주 벨몬트 소재)의 타입 V HF-반응 기구를 히드로젠 플루오라이드를 이용한 펩티드 수지의 분해에 사용하였다. 아니솔을 사용전 증류하였다. HF는 아무런 처리 없이 사용하였다. 드라이 아이스, 이소프로판올 및 액상 질소가 냉각용으로 필요하다.
- [0399] 먼저 HF에 대하여, 약 88 g의 KL₄ 펩티드 수지를 자기 교반 막대를 갖는 1 리터의 반응 용기에 넣었다. 25 ml의 증류 아니솔을 펩티드 수지에 첨가하였다. 전체 시스템을 조립하고 누출 시험한후, HF를 전체 수준이 약 300 ml에 도달할 때까지 반응 용기로 응축하였다. 수지로부터의 펩티드 분해가 -4℃에서 1 시간 동안 진행되도록 하였다. HF의 부분 제거를 1 내지 2 시간 동안 수분 아스피레이터에 의해 수행하였다. 1-2 시간 후, 나머지 HF를 1-2 시간 동안 고 진공 (기계식 진공 펌프)에 의해 제거하였다. 반응 용기의 온도는 HF 제거 과정 동안 -4℃로 남아있었다.
- [0400] 이어서, HF 기구를 대기압으로 평형을 맞추고, 유성 슬러지가 반응 용기의 바닥에서 발견되었다. 냉각 무수 에테르 (700 ml, -20℃로 미리냉동함)를 반응 용기의 내용물에 첨가하였다. 수지 클럼프를 유리 막대를 이용하여 에테르로 트리튜레이션하였다. 수지가 안정된 후 에테르를 따라내었다. 수지가 자유 유동성이 될 때까지 세척하였다 (4-5 총 세척). 수지를 혼중 후드에 놓아서 밤새 건조하였다.
- [0401] 얻은 건조된 HF-처리 수지를 칭량하고 냉장고에 보관하였다. 1.021 g의 건조된 HF-처리 수지를 제거하고 50 ml의 50% 아세트산/물로 추출하고 30분 동안 교반하였다. 수지를 거친 소성 유리 깔때기를 통하여 여과하고, 여액을 동결건조 항아리에 수집하였다. 여액을 약 200 ml의 물로 희석하고, 냉동하고 동결건조기에 놓았다. 1 g의 추출한 HF-처리 수지로 569 mg의 조 펩티드를 얻었다. 하기 표 (표 3)은 나머지 KL₄ 펩티드 수지의 큰 스케일의 HF 처리를 요약한 것이다. 모든 HF-처리 수지는 냉장고에 보관하였다.

표 3

[0402]

HF#	수지의 중량	아니솔의 양	총 부피 (HF+아니솔+수지)
1	88.07 g	25 ml	300 ml
2	85.99 g	25 ml	300 ml
3	79.35 g	25 ml	300 ml

[0403]

정제. 펩티드를 도르-올리버 모델 B (Dorr-Oliver Model B) 예비 HPLC (Dorr-Oliver, Inc., Milford, CT)를 이용하여 정제하였다. 상기 유닛을 리니어 모델 204 분광분석기 및 키프 앤 조넨(Kipp and Zonen) 이중 채널 기록기에 연결하였다. 상기 예비 HPLC를 바이닥(Vydac) C₄ 지지체, 15-20 마이크론 및 300 Å 공극 크기로 충전된

방사 압축 10x60 cm 카트리지를 함유하는 워터스 KIL250 칼럼 모듈(Waters KIL250 Column Module)과 인터페이스하였다 (Waters Associates, Milford, MA). 용매 "A"는 수 중 0.1% HOAc로 이루어지고, 용매 "B"는 아세트 니트릴 중 0.1% HOAc로 이루어졌다. 유속을 400 ml/분으로 설정하고, 카트리지를 150-200 psi로 압축하였으며, 예비 HPLC 시스템 후방 압력은 550-600 psi였다.

[0404] 먼저 도르-올리버 수행에 대하여, HF#1으로부터의 20 g의 HF-처리 수지를 500 ml의 빙초산 중에서 5 분 동안 추출하였다. 물 500 ml을 수지/아세트산 혼합물에 첨가하였다. 상기 50% 아세트산/물 용액을 추가 25 분 동안 교반하였다. 수지를 거치 소성 유리 깔때기로 여과하였다. 펩티드 함유 여액을 저장하고 도르-올리버에 로딩 하였다. 사용한 HPLC 구배는 45 분간 1-40% "B"이고, 이어서 7 분 동안 이소크래틱 유지하였다. 이 지점에서, "B" 백분율을 최종 44%로 분 당 1% 증가시켰다 (나타내지 않음).

[0405] 분획을 수동으로 수집하고, HPLC로 분석하였다. $\geq 95\%$ 의 순도를 만족시키는 모든 분획을 함께 풀링하고 큰 유리 용기에 보관하였다. 상기 재료를 후속하여 "BPS #1"으로 지칭하였다. 요망되는 성분을 가지나 95% 또는 그 이상의 순도를 충족시키지 않는 모든 분획을 수집하고 후에 재활용하였다. 적어도 10회의 추가 예비 HPLC를 도르-올리버 유닛 상에서 수행하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0406] 역 삼투, 동결건조. 총 부피의 BPS #1은 약 60 리터였다. 역 삼투를 사용하여 펩티드 용액을 2 리터의 최종 부피로 농축하였다. 펩티드를 유지하기 위하여 R74A 막을 갖는 밀리포어 모델 6015 역 삼투를 이용하였다. 얻은 2 l의 BPS #1을 2 장의 와츠만 #1 여과지를 이용하여 부호너 깔때기를 통하여 여과하고, 약 11 동결건조 항아리에 나누고, 동 부피의 물로 희석하였다. 동결건조 항아리를 냉동하고 동결건조하였다. 과정 마지막에 건조 KL₄ 펩티드의 총 중량은 40.25 g였다.

[0407] 재-동결건조. 상이한 동결건조 조건 (예를 들면, 펩티드 농도, 동결건조되는 용매의 조성, 동결건조 단계의 길이, 보관 온도 등)가 상이한 용해도 특성을 갖는 건조된 제제를 생성할 수 있음을 발견하였다. 건조 KL₄ 펩티드가 1 mg/ml에서 클로로포름:메탄올 (1:1) 용액에 가용성이고 10 mg/ml에서 $\geq 90\%$ 가용성인 것이 바람직하다. 이러한 기준이 상기 언급한 동결건조 단계 마지막에 충족되지 못하는 경우, 펩티드는 재-동결건조될 수 있다.

[0408] 통상적인 재-동결건조는 다음과 같이 기술된다. 약 5 g의 펩티드를 유리 플라스크 중 교반하는 2 l의 아세트 니트릴에 서서히 첨가한다. 약 1 분 후, 3 l의 밀리-Q 수를 첨가하고, 이어서 50 ml의 아세트산을 첨가한다 (아세트산의 최종 농도 = 1%). 이를 3일 동안 37°C에서 교반하고, 부호너 깔때기 중에서 와츠만 #1 여과지를 통하여 여과하고, 동결건조 항아리에 넣는다. 이어서, 드라이 아이스 및 이소프로필 알콜을 이용하여 급속 냉동하고, 동결건조기에 둔다. 동결건조 시간은 3 내지 7일로 변화될 수 있다. 최종 건조 생성물을 칭량하고, 패키징하고, 용해도 및 화학 분석을 위하여 분취량을 취한다.

[0409] 실시예 2

[0410] 모델 계면활성제 혼합물의 제조

[0411] 재료. 1,2-디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC), 1-팔미토일, 2-올레오일 포스파티딜글리세롤 (POPG) 및 팔미트산 (PA)는 아반티 폴리 리피드 인크 (Avanti Polar Lipids Inc., Birmingham, AL)로부터 얻었다. 아미노산 서열 KLLLLLLLLLLLLLLLLL (서열 번호 1)을 갖는 KL₄ 펩티드를 본원에 기술된 바와 같이 합성하거나, 디스커버리 레버레토리스 인크 (Discovery Laboratories, Inc., Doylestown, PA)로부터 얻었다. 사용한 모든 염, 완충액 및 유기용매는 입수가 가능한 최고 등급이었다.

[0412] 계면활성제 조성물의 원액을 40 mg/ml 총 인지질을 함유하도록 제제화하였고, 조성물은 하기 구성에 기초한다:

[0413] $PL_T = \text{총 인지질} = DPPC + POPG$

[0414] 3 DPPC: 1POPG

[0415] 1 PL_T: 0.15 PA: 0.027 KL₄ 펩티드

[0416] 상기 구성을 이용하여, ml 당 2.5 내지 30 mg의 총 인지질 중 다양한 양의 팔미트산 (PA) 및 KL₄ 펩티드를 함유하도록 계면활성제 조성물을 제조하였다 (표 4).

표 4

[0417]

성분	2.5 mg/ml	10 mg/ml	30 mg/ml
DPPC	1.875 mg	7.5 mg	22.5 mg
POPG	0.625 mg	2.5	7.5 mg
PA	0.375 mg	1.5	4.5 mg
KL ₄ 펩티드	0.067mg	0.267	0.801 mg

[0418]

모델 계면활성제 혼합물을 다음과 같이 제조하였다. KL₄ 펩티드 9 mg, DPPC 225 mg, POPG 75 mg 및 PA 45 mg을 45℃에서 2.5 ml의 95% 에탄올 중에 용해하였다. 이어서, 이 용액을 급속히 볼텍스하면서 45℃에서 7.5 ml의 증류 H₂O에 첨가하고, 2 ml의 500 mM NaCl, 250 mM 트리스-아세트레이트 pH 7.2를 첨가하였다. 얻은 유색 현탁액을 37℃에서 15 분 동안 교반하고, 존재하는 에탄올을 100 부피의 130 mM NaCl, 20 mM 트리스-아세트레이트 pH 7.2 완충액에 대하여 37℃에서 투석에 의해 제거하였다 (Spectrapor 2; 13,000 mol. 중량. 컷오프). 투석 용액을 2회 변화하면서 투석을 48 시간 동안 지속하였다.

[0419]

추가로, 조성물은 최종 생성물 ml 당 하기 조성을 갖는 완충액 시스템/현탁액을 더 포함할 수 있다 (표 5).

표 5

[0420]

성분	ml 당 양
트로메타민, USP	2.42 mg
빙초산, USP 또는 NaOH, NF	트로메타신 완충액을 pH 7.7로 조정하기 충분 한양
NaCl, USP	7.6 mg
주사용수, USP	1.0 ml로 하기 충분한 양

[0421]

상기 탬(Tham) 완충 시스템을 실질적으로 다음과 같이 제조하였다. 아세트산 (AR Select, ACS, Mallinckrodt, Paris, KY)를 이용하여 7.2±0.5의 pH로 조정한 pH를 갖는 0.37 ml의 탬 용액 (트로메타민 주사, NDC 0074-1593-04, Abbott Laboratories, North Chicago, IL)를 0.33 ml 식염수 (0.9% 염화나트륨 주사, USP, Abbott Laboratories) 및 0.30 ml 물 (무균 주사용수, USP, Abbott Laboratories)와 혼합하였다. 용액을 무균-여과 하였다.

[0422]

실시예 3

[0423]

인간 호중구 엘라스타제에 대한 비색계 검정

[0424]

MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (서열 번호 24)의 서열을 갖는 펩티드를 엘라스타제 기질로 사용하였다. 100 μ l의 서열 번호 24 펩티드 기질의 0.425 mM 용액을 일련의 마이크로타이터 플레이트 웰에 두었다. 다양한 양의 인간 호중구 엘라스타제 (human neutrophil elastase; HNE)를 마이크로타이터 플레이트 웰에 첨가하였다. 410 nm에서의 광학 밀도 (OD₄₁₀)을 사용하여 엘라스타제 활성을 측정하고, 관측된 광학 밀도를 첨가된 HNE 양에 대하여 플롯팅하여 표준 곡선을 생성하였다.

[0425]

실시예 4

[0426]

엘라스타제 억제제에 의한 인간 호중구 엘라스타제의 억제

[0427]

인간 호중구 엘라스타제 (HNE)를 억제하는 세린 엘라스타제 억제제의 능력을 시험하기 위하여, 표준량의 0.125 μ g HNE를 실시예 3에서 기술한 엘라스타제 기질의 첨가에 앞서 세린 엘라스타제 억제제 양을 증가시키면서 혼합 하였다. 도 5a에 플롯팅한 억제 곡선은 억제량의 로그값과 얻은 OD₄₁₀ 간의 선형 반응을 나타낸다.

[0428]

실시예 5

[0429]

ARDS 환자로부터의 BAL 유체 중 엘라스타제 활성

[0430]

기관폐포 세정 (bronchoalveolar lavage; BAL) 유체를 급성 호흡기 위축 증후군(acute respiratory distress syndrome; ARDS) 환자로부터 회수하였다. 엘라스타제 활성에 대한 비색계 검정을 상이한 양의 BAL 유체를 이용하여 수행하였다. 샘플에 첨가된 BAL의 양 및 OD₄₁₀ 간의 용량-반응 곡선을 도 5b에 플롯팅하였다.

[0431]

다른 ARDS 환자로부터의 세정 유체는 다양한 양의 엘라스타제 활성을 가졌다.

[0432]

실시예 6

[0433]

토끼 BAL 유체 중 엘라스타제 활성

[0434]

6 마리의 토끼를 3 mg의 항-BSA/kg (토끼 6098 및 6099)로 처리, 또는 5 mg 항-BSA/kg (토끼 6100-6103)을 기관내로 점적하였고, 10 mg의 BSA를 정맥내 투여하여 (6098-6101) 기관 위축을 유발하였다. 기관폐포 세정 (BAL) 유체를 처리 6 시간 후 이들 토끼의 폐로부터 취하고, 엘라스타제 활성의 비색계 검정을 이들 BAL 유체에 대하여 수행하였다. 엘라스타제 활성은 410 nm에서 상응하는 OD를 주는 HNE의 농도로 표현된다.

[0435]

추가로, 동일한 검정을 BAL 유체에 대하여 100 µg/ml의 세린 엘라스타제 억제제 첨가 후 수행하였다. 이 시험에서 사용된 세린 엘라스타제 억제제는 특이적으로 HNE를 억제한다. 도 6a는 이들 결과를 도시하여 보여준다. 모든 경우에, 엘라스타제 활성은 억제되었고, 이는 측정된 단백분해 활성이 HNE로 인한 것임을 확인하여 준다.

[0436]

실시예 7

[0437]

토끼 BAL 유체 중 엘라스타제 억제제의 증거

[0438]

6마리 토끼에 세균 리포폴리사카라이드 (LPS) 및 항-BSA-를 기관내 투여하고 호흡기 위축을 유발하였다. 동물 6317 및 6318은 추가로 3시간째에 10 mg/kg의 BSA를 투여하였다. BAL 유체를 첫번째 항-BSA 투여 후 3시간째에 토끼 6315 및 6316으로부터, 6 시간 째에 토끼 6313, 6314, 6317 및 6318로부터 취하였다. BAL 유체를 단독으로 (교차-기획) 또는 1 µg/ml의 HNE (고체) 투여 후 시험하였다. 결과를 도 6b에 도시하여 나타낸다. 유의한 유리 엘라스타제가 동물 6317에 존재하였고, 다른 것들은 모두 엘라스타제 억제제의 존재를 나타내었다.

[0439]

실시예 8

[0440]

모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제는 염증 도중 폐의 BAL 유체 중에 검출되는 단백질의 양을 감소시킨다

[0441]

재료:

[0442]

LPS: *Minn* (List Biological). 5 mg 바이알. 동물을 8 ml/kg 중 120 µg/kg의 정량적 세정 잔류로 시험하였다.

[0443]

PMA: (Sigma) 식염수 또는 모델 계면활성제 혼합물 중 5 µg/ml로 희석하였다. 세정용으로 20 ml/kg/토끼로 사용하고, 동물 중 투여량 20%가 남았다.

[0444]

모델 계면활성제 혼합물: (Discovery Labs) 10 mg/ml. 세정용으로 20 mg/kg/토끼로 사용하고, 동물 중 투여량 20%가 남았다.

[0445]

세린 엘라스타제 억제제: 엘라핀(Elafin) (Astra-Zeneca) 3 mg/mg 원액, 식염수에 대하여 투석하여 아지드를 제거함: 1.3 ml/kg 엘라핀을 1.5 시간에 정맥내 투여하고, 0.33 ml/kg를 3 시간에 기관내 (x 2 측면) 투여하였으며, 0.66 mg/kg를 4.5 시간에 정맥내 투여하였다.

[0446]

¹²⁵I-BSA: (NEN) 200 µg/ml BSA/식염수 중 20 µCi/ml로 희석하였다. 희생 30분 전에 0.4 ml/kg를 정맥내 사용하였다.

[0447]

토끼: 10 NZW 토끼, 수컷 또는암컷, 2.0-2.5 Kg.

[0448]

방법:

[0449]

20 마리의 NZW 토끼를 각 4 마리씩 5개의 처리 군으로 나누었다. 식염수 중 LPS로 2회 세정에 의해 폐 손상을

유발하였고, 3시간째 1회 PMA 처리를 세정에 의해 투여하였다. 세린 엘라스타제 억제제 및 모델 계면활성제 혼합물을 이들 인자들이 염증 증상을 감소시킬 수 있는 정도를 확인하기 위하여 개별적으로 및 같이 시험하였다. 상이한 군에 수행한 처리는 다음과 같다:

- [0450] 제1군: 동물을 식염수 중 LPS로 2회 세정하고, 3 시간째에 1회 PMA 처리를 세정에 의해 투여하였다. ¹²⁵I-BSA를 동물에 정맥내에 5.5시간에 투여하고, 동물을 6시간째에 희생하였다.
- [0451] 제2군: 동물을 식염수 중 LPS로 2회 세정하고, 3 시간째에 1회 PMA 및 모델 계면활성제 혼합물 처리에 의해 투여하였다. ¹²⁵I-BSA를 동물에 정맥내에 5.5시간에 투여하고, 동물을 6시간째에 희생하였다.
- [0452] 제3군: 동물을 식염수 중 LPS로 2회 세정하고, 3 시간째에 1회 PMA 처리를 세정에 의해 투여하였다. 세린 엘라스타제 억제제를 1.5, 3.0 및 4.5 시간에 3회 투여하고, ¹²⁵I-BSA를 동물에 정맥내에 5.5시간에 투여하고, 동물을 6시간째에 희생하였다.
- [0453] 제4군: 동물을 식염수 중 LPS로 2회 세정하고, 3 시간째에 1회 PMA 및 모델 계면활성제 혼합물 처리를 세정에 의해 투여하였다. 세린 엘라스타제 억제제를 1.5, 3.0 및 4.5 시간에 3회 투여하고, ¹²⁵I-BSA를 동물에 정맥내에 5.5시간에 투여하고, 동물을 6시간째에 희생하였다.
- [0454] 제5군: 정상 동물을 대조군으로 사용하였다. 동물을 ¹²⁵I-BSA를 1회 투여한 후 30분에 희생하였다.
- [0455] 모든 동물을 저 환기압에서 환기되는 방에서 유지하였다. 세정 후 즉시 동물이 약 80 보다 큰 SaO₂를 유지하기 위해 더 높은 압력 및(또는) 산소를 요하는 경우, 더 높은 양성 말단-호기 압력(positive end-expiratory pressure; PEEP) 및(또는) 산소 치료를 일정 시간 동안 행하였다.
- [0456] 동물을 희생한 후, 폐를 제거하고, 좌측 주 기관지를 묶었다. 우측 하부엽을 각각 10 ml의 식염수로 3회 세정하였다. 3회 세정 (마지막 세정)을 각 동물에 대하여 폴링하고, 5 μ l의 20 mM BHT를 각 폴링된 세정액에 첨가하여 산화를 예방하였다. 최종 세정 폴 중 세포를 1000 rpm에서 10 분 동안 원심분리에 의해 제거하였다. 계면활성제 펠렛 및 단백질이 풍부한 상층액을 40,000 g에서 15 분 동안 원심분리에 의해 제조하였다. 좌측 폐 영역을 포르말린 중에 보존하고, 다른 것은 냉동하였다. 최종 세정물 중의 단백질 함량 및 적혈구(red blood cells; RBC)를 분석하였다.
- [0457] 최종 세정물 중의 단백질 함량은 혈장 단백질이 폐포 공간으로 누출되도록 하는 기저 막 매트릭스에 대한 손상의 수준을 나타낸다. 최종 세정물 중 단백질의 양이 증가할수록 더 큰 손상이 폐에서 관찰되었다. 각 처리 군에 대한 최종 세정 유체 중에 발견되는 단백질의 양을 도 7a에 도시하여 나타낸다. 결과는 LPS 및 PMA 손상으로부터 인한 단백질의 양 (약 2.5 mg/ml)이 모델 계면활성제 혼합물을 투여한 군에서 감소하였고, 모델 계면활성제 혼합물 및 엘라스타제 억제제를 투여한 군에서 더 감소하였음을 보여준다. 단백질 수준의 감소를 보여주기 위한 엘라스타제 억제제 단독 투여한 제3군의 실패는 군 중 한마리 동물에 대하여 얻은 비정상적으로 높은 값으로 인한 듯 하였다 (도면의 설명 참조). 상기 동물을 배제한다면, 제3군에 대한 평균 값은 1.72 mg/ml이었고, 이는 모델 계면활성제 혼합물만으로 처리한 제2군에 대하여 얻은 값과 대략 동일하였다. 에러 막대는 SEM을 나타낸다.

[0458] **실시예 9**

[0459] **기저막 단백질 단편이 염증 도중 폐의 BAL 유체 중에 존재한다.**

- [0460] 단백질의 분비 및 이들의 단백질 분해 단편을 유발하기 위하여 실시예 8에서 토끼의 LPS 및 PMA 손상을 나타내었다. SDS 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동 분해 후 웨스턴 블롯 분석을 시험 토끼의 최종 세정유체 중에 존재하는 단백질에 대하여 수행하였다. 세정 유체 중의 기저 막 단백질의 존재를 가시화하고 확인하기 위하여 기저 막 매트릭스 단백질에 대하여 기니아 피그에서 생성된 항체를 이용하였다.
- [0461] 결과를 도 7b에 나타낸다. 폐 기저 막 매트릭스의 성분을 좌측 패널에 나타낸다. LPS 및 PMA 단독으로 처리한 토끼 (제1군), 또는 모델 계면활성제 혼합물을 첨가한 토끼 (제2군), 엘라스타제 억제제를 첨가한 토끼 (제3군), 또는 모델 계면활성제 혼합물 및 엘라스타제 억제제 모두를 첨가한 토끼 (제4군)의 예시의 BAL 유체 중의 단백질 및 단백질 단편을 제2-4군 패널에 나타낸다. 정상적인 비손상 토끼 세정물을 제5군 패널에 나타낸다. 완전 기저 막 매트릭스 및 제5군 패널에 존재하지 않는 낮은 MW 밴드 (,10,000 MW)는 기저 막의 단편을 나타낸다. 제1-4군 중 70,000 MW에 존재하는 큰 밴드는 알부민이고, 사용한 항혈청 중의 오염물로 존재하는 것이다.

90,000 MW 초과인 밴드는 기저 막에 특이적이고 정상 토끼 혈장에 존재하지 않는다 (데이타는 도시하지 않음).

[0462] 실시예 10

[0463] 폐의 염증이 BAL 유체 중 모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제에 의한 적혈구수 감소

[0464] 최종 세정액에 나타나는 출혈 또는 적혈구(RBC)의 양은 동물에서의 손상의 또다른 지표이다. 세정액 중 증가된 단백질의 존재는 전 혈구가 매트릭스에서 생성된 구멍들을 통과하는, 기저막 매트릭스에 대한 손상치를 표시할 수 있지만, RBC의 존재는 손상도를 훨씬 크게 표시할 수 있다.

[0465] 실시예 8에서 수득한 최종 세정액에서 RBC 수를 세고, 각 군 중 두 동물에 대해 얻은 결과의 평균을 도 7c에 플로팅하였다. 모델 계면활성제 혼합물이 존재하는 경우, 손상의 일부 개선을 제시하는 약간의 감소가 관찰되지만, 세린 엘라스타제 억제제가 존재하는 경우에는 손상이 크게 감소하였음이 관찰된다. 모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제의 첨가는 최종 세정액에 존재하는 RBC 수에서 측정된 바와 같이 손상의 상당한 감소를 제공하였다.

[0466] 실시예 11

[0467] 인간 호중구 엘라스타제의 억제

[0468] 0.02 μ g의 인간 호중구 엘라스타제 (HNE)를, 2 mg/ml의 모델 계면활성제 혼합물, 100 μ g/ml의 세린 엘라스타제 억제제, 또는 모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제 양쪽 모두와 함께 인큐베이션하였다. 앞서 기재한 측색 분석을 사용하여 잔여 HNE 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 8에 그래프로 나타낸다.

[0469] 모델 계면활성제 혼합물의 부가적인 존재 또는 부재 하에서 세린 엘라스타제 억제제가 첨가된 경우 상당한 억제 효과가 나타났다. 데이타는, 모델 계면활성제 혼합물이 세린 엘라스타제 억제제의 엘라스타제 억제능을 방해하지 않을 뿐만 아니라 그 자체가 직접 엘라스타제를 억제하지도 않는다는 점을 보여준다.

[0470] 실시예 12

[0471] BAL액 중 엘라스타제 억제제에 의한 HNE 억제

[0472] 상기 실시예 8 내지 10에서 제공된 데이타는 LPS 및 PMA를 사용한 손상 후 6 시간 후에 토끼 폐에서 발생하는 기저막 매트릭스 손상이 세린 엘라스타제 억제제 및(또는) 모델 계면활성제 혼합물에 의해 생체내 억제될 수 있다는 점을 제시하였다. 최종 세정액(실시예 8에 기재된 바에 따라 제조)에서의 엘라스타제 억제제(들)의 존재 (또는 잔여 활성)를 시험하였다.

[0473] 0.02 μ g의 인간 호중구 엘라스타제 (HNE)를, 각 실험군 (군 1-5)으로부터 한마리의 대표적인 토끼의 최종 세정액 50 μ l와 인큐베이션하였다. HNE 활성을 실시예 1에 기재된 바에 따라 측색 분석을 사용하여 평가하였다. 상기 분석 결과를 도 9에 그래프로 도시한다.

[0474] 군 2, 3 또는 4의 동물로부터, BAL액에 의하여 HNE 활성이 상당한 억제되었음을 관찰하였다. 공지된 엘라스타제 억제제를 정맥내 및 기관내 경로 양쪽 모두로 투여받은 군 3 및 4로부터의 세정액에서 보여지는 HNE 엘라스타제 억제는 상당히 높았다. 모델 계면활성제 혼합물 군 (군 2)에 대한 엘라스타제 억제는 토끼의 내인성 엘라스타제 억제제, 예를 들면 SLPI 또는 알파 1 프로테아제 억제제, 또는 이들의 일부 조합물에 의해 발생한 것일 수 있다. 이 실험에서, 정상 토끼(군 5) 및 LPS/PMA 양성 손상 동물(군 1)에는 최종 세정액 중에 엘라스타제 억제제가 존재하지 않았다. 그러나, 토끼 #5541 (군 1)은 최종 BAL액에서 유리 엘라스타제의 존재를 나타내었고, 정상 동물의 BAL (군 5)에서는 아무것도 검출되지 않았다.

[0475] 실시예 13

[0476] 세정액 중 포스포리파아제 A₂(PLA₂)의 검출

[0477] 물질 및 방법

[0478] BSA (항-BSA 항체)에 대해 유도된 부분 정제 항체를 기관내 투여함으로써 개시된 폐 손상을 경험한 토끼로부터 최종 세정액을 수집하였다. 세정액 중 PLA₂ 활성을 검출하기 위한 기질로서 팔미토일, 올레일 포스파티딜-글리세롤(POPG, 아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids))을 세정액에 첨가하였다. POPG 기질을 첨가하기 전에, 상기 혼합물을 최종 농도가 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl 및 25 mM Tris-Cl, pH 8.5가 되도록 조정하였다. 이 혼합물을 37 °C에서 인큐베이션하였다. 엘리콧을 오랫동안 제거하고 POPG 기질로부터 방출된 올레산의 양을 고성능

크로마토그래피 (HPLC)에 의해 측정하였다. 방출된 올레산의 양을, 207 nm에서의 흡광도에 의해 측정되는 C-18 HPLC 칼럼으로부터 4.59 분 용출 시간에서의 피크의 높이로부터 정량화하였다.

[0479] **결과**

[0480] 도 10은 토끼 6015로부터의 세정액에 의해 POPG로부터의 올레산 방출 속도를 도시한다. 도시된 바와 같이, 올레산은 사용된 조건 하에서 약 40 분 동안 신속하게 방출된다. POPG로부터의 이러한 올레산의 방출은 PLA₂가 세정액 샘플에 존재함을 보여주었다.

[0481] **실시예 14**

[0482] **세정액 포스포리파아제 A₂ (PLA₂) 활성과 기관내 항-BSA 투여 간의 상관성**

[0483] **물질 및 방법**

[0484] BSA를 6 마리의 토끼에게 정맥내 투여하였다. 상기 토끼를 16 ml/kg 식염수로 1 회 세척한 후, 다음과 같이 다양한 양의 항-BSA 항체를 기관내 적하하였다:

[0485] 토끼 6011 및 6012 - 2.5 mg/kg 항-BSA 항체

[0486] 토끼 6013 및 6014 - 5.0 mg/kg 항-BSA 항체

[0487] 토끼 6015 및 6016 - 12.5 mg/kg 항-BSA 항체.

[0488] 최종 세정액을 수집하고, 앞서 실시예들에 기재한 바와 같이 최종 세정액에서 생성된 올레산의 검출에 의해 PLA₂ 활성을 평가하였다.

[0489] 또한, 수집된 최종 세정액 중 유리 지방산 (올레산 외)의 내부 출현을 관찰함으로써 생체내 PLA₂ 활성을 검출하였다. 특히, 리놀렌산 및 리놀레산은 올레산과 용이하게 구별되고 HPLC에 의해 정량화되는 3 및 2 개의 탄소-탄소 이중 결합 세트를 갖는다.

[0490] **결과**

[0491] 도 11은 토끼 6011, 6012, 6013, 6014, 6015 및 6016로부터 얻어진 세정액을 사용하여 30 분 인큐베이션한 후에 POPG로부터 올레산이 방출된다는 점을 나타낸다. 도시된 바와 같이, 방출되는 올레산의 양, 및 이에 따른 PLA₂ 활성도는 동물에게 기관내 투여되는 항-BSA 항체 제제의 양에 정비례한다. 다시 말해, 2.5 mg/kg 항-BSA 항체만을 투여받은 토끼는 5.0 또는 12.5 mg/kg 항-BSA 항체를 투여받은 토끼보다 낮은 PLA₂ 활성을 가졌다. 따라서, PLA₂ 활성도는 폐 손상량이 증가함에 따라 증가한다.

[0492] 도 12는 손상된 폐 조직 내에서 인지질이 생체내 분해되는 것을 도시하고 있다. 특히, 도 12는 토끼 6011, 6012, 6013, 6014, 6015 및 6016으로부터 얻은 최종 세정액 내에서 관찰되는 바와 같이, 내인성 조직으로부터 리놀렌산 및 리놀레산이 방출되는 것을 도시하고 있다. 도시되는 바와 같이, 방출되는 리놀렌산 및 리놀레산의 양, 및 이에 따른 PLA₂ 활성도는 역시 동물에게 기관내 투여되는 항-BSA 항체 제제의 양에 정비례한다.

[0493] **실시예 15**

[0494] **세정액 중 포스포리파아제 A₂ (PLA₂) 활성의 억제**

[0495] **물질 및 방법**

[0496] BSA 및 항-BSA 항체를 토끼 6015에 투여하고, 이전 실시예에서 기재한 바와 같이 세정액을 토끼 6015로부터 수득하였다. 화합물 3-[3-(2-옥소에틸)-2-에틸-1-(페닐메틸)-1H-인돌-5-일]옥시]프로필 인산 (LY311727, 인디아나주 인디아나폴리스 소재의 일라이 릴리 코퍼레이션(Eli Lilly Co.))을 PLA₂ 억제제로서 사용하여 세정액 중 지방산의 출현이 PLA₂ 활성에 의한 것이며 폐 염증의 유효한 치료의 개발을 용이하게 한다는 점을 추가 확인하였다. 1.2 mM CaCl₂ 및 트리스 완충제, pH 8.5의 존재 하에 6015 토끼로부터의 일정한 양의 세정액에 대하여 억제제의 첨가량을 증가시킴으로써 PLA₂ 활성을 조절하는 LY311727 억제제의 능력을 시험하였다. POPG 기질을 첨가하기 전에 이 혼합물을 15 분 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 이전 실시예에 기재한 바와 같이, 용출된

올레산 HPLC 피크의 높이를 사용하여 PLA_2 활성을 측정하였다.

[0497] 결과

[0498] 도 13은, 토끼 6015로부터 수득한 세정액을 사용하여 30 분 인큐베이션한 후에 POPG로부터의 올레산 방출이 LY311727 억제제의 양에 간접 비례함을 도시하고 있다. 다시 말해, 첨가되는 억제제의 양이 증가함에 따라, PLA_2 활성량이 감소함이 관찰되었다.

[0499] 도 14는 억제제 농도의 로그 함수로 PLA_2 활성을 그래프로 도시하고 있다. 도시되는 바와 같이, PLA_2 활성은 억제제의 농도가 증가함에 따라 상당히 떨어진다.

[0500] 실시예 16

[0501] 염증시 항산화제의 폐 손상 억제

[0502] 물질 및 방법

[0503] 사용된 절차는 상기 실시예에서 사용된 것과 유사하였다. 20 ml/kg의 투여량에서 식염수 중 5 μ g/ml 세균 LPS를 사용하여 기관지폐포 세정액 (BAL)에 의해 토끼 (1.0-1.5 kg)에서 폐 손상을 유도한다. LPS 투여 후 2.5 시간에서, 기관지폐포 세정액에 의해 토끼에게 20 ml/kg 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA)를 투여하였다. 표 6 및 7에 나타낸 바와 같이, 토끼들을 각 군이 2 내지 6 마리의 동물을 갖는 4 개의 처리 군으로 나누었다. LPS 투여 후 2.5 시간에서, 군 1 중 동물들에게 항산화제 카탈라아제를 기관내 투여하였다. 군 2의 동물에는 카탈라아제를 기관내 및 정맥내 투여하였다. 군 3의 동물에는 카탈라아제를 기관내 및 정맥내 투여하고, 5 mg/ml 모델 계면활성제 혼합물 (KL_4)을 기관내 투여하였다. 군 4의 동물에는 어떠한 추가 처리도 하지 않았다 (대조군). 토끼들에게 PIP 1 PEEP 3 cm H_2O 압력에서 산소를 공급하였다. 상기 연구를 6 시간 후에 종료하였다. 표 6 및 7의 값들은 평균의 표준 오차(SEM) 평균이다.

[0504] 결과

[0505] 결과들을 표 6 및 7에 제공한다. 계면활성제와 카탈라아제를 투여받은 동물의 수가 명백한 결론을 얻기에는 너무 적지만, 몇몇 인자들에서 알 수 있는 바와 같이 카탈라아제의 투여는 폐 기능을 상당히 개선하였다.

표 6

처리	PaO_2 4.5 hr	PaO_2 6 hr	$PaCO_2$ 6hr	(12 cm H_2O / Kg 에서 ml)
카탈라제 IT	128 ± 15 (n=5)	119 ± 15 (n=5)	40 ± 3 (n=5)	10.1 ± 1.8 (n=5)
카탈라제 IT & IV	129 ± 19 (n=4)	124 ± 22 (n=4)	36 ± 5 (n=4)	8.4 ± 0.3 (n=4)
카탈라제 IT & IV + 계면 활성제	85 ± 6 (n=2)	85 ± 7 (n=2)	54 ± 9 (n=2)	8.8 ± 1.1 (n=2)
대조군	78 ± 10 (n=6)	83 ± 10 (n=5)	56 ± 4 (n=5)	5.6 ± 06 (n=5)

표 7

처리	BALF 중 알부민	습윤:건조 중량	BALF RBCs ($\times 10^3$)	육안* 병리학	조직* 병리학
카탈라제 IT	0.65 ± 0.16 (n=5)	7.4 ± 0.4 (n=5)	6.1 ± 3.6 (n=5)	1.6 ± 0.6 (n=4)	2.7 ± 0.6 (n=5)
카탈라제 IT & IV	0.50 ± 0.11 (n=4)	8.0 ± 0.6 (n=4)	2.3 ± 1.2 (n=4)	1.1 ± 0.4 (n=4)	2.9 ± 0.8 (n=4)
카탈라제 IT & IV + 계면 활성제	0.62 ± 0.29 (n=2)	7.6 ± 0.6 (n=2)	2.1 ± 1.5 (n=2)	1.0 ± 0.5 (n=2)	3.3 ± 0.3 (n=2)
대조구	1.05 ± 0.18 (n=5)	9.1 ± 0.6 (n=6)	18.1 ± 13.3 (n=5)	3.5 ± 0.2 (n=5)	3.8 ± 0.2 (n=5)

* 0-4의 척도로 함

[0507]

[0508]

표 6 및 7의 데이터에 의해 알 수 있는 바와 같이, 항산화 카탈라아제를 사용한 치료는 염증의 파괴 효과로부터 폐 조직을 보호한다. 특히, 카탈라아제의 투여는 일반적으로 혈액 기체를 개선시켰다(일반적으로, 처리된 동물이 비처리 동물에 비해 PaO_2 증가 및 $PaCO_2$ 감소). 또한, 최종 세정액 중 알부민 및 적혈구의 양 및 처리된 동물의 습윤 대 건조 폐 중량이 비처리 동물에서 관찰되는 것보다 적었다. 결국, 처리된 동물의 전체의 및 조직학적 병변이 비처리된 동물보다 일반적으로 우수하였다. 따라서, 폐 조직의 염증시 항산화제를 사용하는 것은 염증과 관련된 폐 조직의 손상을 제한하거나 또는 감소시킬 수 있다.

[0509] 참고 문헌

- Amaro, A., *Inhale Therapeutics Report*, 14, 2001.
- Cochrane, CG, *et al.*, *Am. J. Resp. and Crit. Care Med.*, Vol. 163:139, 731
2001.
- Enhorning, *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 151:554-556, 1995.
- Freide, M., *et al.*, *Anal. Biochem.*, 211(1):117-122, 1993.
- Glasser, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:10326, 1988.
- Ilowite, *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136:1445-1449, 1987.
- Janoff, A., In: INFLAMMATION: BASIC PRINCIPLES AND CLINICAL
CORRELATES, Gallin, J.I., *et al.*, eds, 803-814, Raven Press, New York,
1988.
- Jobe, *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 136:1032, 1987.
- Kharasch, V.S., *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144:909-913, 1991.
- King, *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 223:715-726, 1972.
- Laube, *et al.*, *Chest*, 95:822-830, 1989.
- Lee, C.T., *et al.*, *New England J. of Med.*, 304:192-196, 1981.
- Maa, Y.F., *Pharm. Dev. Technol.*, 2(3):213-223, 1997.
- Maa, Y.F., *et al.*, *Pharm. Res.*, 15(5):768-775, 1998.
- Master, K., SPRAY DRYING HANDBOOK, 5th edition, J. Wiley & Sons,
New York, 1991.
- Martin, F.J., In: SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS-
MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, P. Tyle, ed., Marcel
Dekker, New York, pp. 267-316, 1990.
- Mayer, L.D., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 857:123-126, 1986.
- Mayer, L.D., *et al.*, *Canc. Res.*, 49:5922-5930, 1989.
- Meienhofer, J., In: HORMONAL PROTEINS AND PEPTIDES, Vol. 2, p. 46,
Academic Press, New York, 1983.
- Niven, R.W., In: MODULATED DRUG THERAPY WITH INHALATION
AEROSOLS: REVISITED, A.J. Hickey, ed., Marcel Dekker, New York,
2002.
- Notter, *et al.*, *Clin. Perinatology*, 14:433-79, 1987.
- Olson, F., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 557:9-23, 1979.
- Puchell, E., *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 15:389-394, 1985.
- Revak, *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134:1258-1265, 1986.
- Robertson, *Lung*, 158:57-68, 1980.
- Sarboulouki, M.N., Toliat, T., *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 52(1):23-27,
1998.

[0510]

- Schroder, E., Kubke, K., In: THE PEPTIDES, Vol. 1, Academic Press, New
York, 1965.
- Steward, J.M., Young, J.D., In: SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS;
W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969.
- Szoka, F. Jr., *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467-508, 1980

[0511]

[0512]

모든 공보 및 특허들은 개별적으로 참고 문헌으로써 인용되었으나 모두 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다.

[0513]

구체적인 실시양태 및 실시예를 비롯한 상기 명세서는 본 발명을 설명하기 위한 것이며, 이에 발명을 제한하려는 것으로 이해되어서는 안된다. 본 발명의 진정한 기술사상 및 범위에서 벗어남이 없이 수많은 변화 및 변형이 이루어질 수 있다.

SEQUENCE LISTING

<110> The Scripps Research Institute
5 Cochrane, Charles G.
 Oades, Zenaida G.
 Revak, Susan D.
 Niven, Ralph

10<120> Treatment and Prevention of Pulmonary Conditions

<130> 1361.037W01

<150> US 60/375,968
15<151> 2002-04-25

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
20

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25

<220>
<223> A surfactant protein

<400> 1
30Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Lys
 20

35<210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40<220>
<223> A surfactant protein

[0514]

```

<400> 2
Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Leu
1           5           10           15
Leu Leu Lys Leu Leu
5           20

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
10<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A surfactant protein

15<400> 3
Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys Lys Leu Leu Leu Leu
1           5           10           15
Leu Leu Lys Lys Leu
20

20
<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25
<220>
<223> A surfactant protein

<400> 4
30Asp Leu Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Asp
1           5           10           15
Leu Leu Leu Leu Asp
20

35<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40<220>
<223> A surfactant protein

```

[0515]

```

<400> 5
Arg Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Arg
 1           5           10           15
Leu Leu Leu Leu Arg
5           20

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
10<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A surfactant protein

15<400> 6
Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu
 1           5           10           15
Leu Leu Arg Leu Leu
                20

20
<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25
<220>
<223> A surfactant protein

<400> 7
30Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Leu
 1           5           10           15
Leu Leu Arg Arg Leu
                20

35<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40<220>
<223> A surfactant protein

```

[0516]

```

<400> 8
Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
 1           5           10           15
Leu Leu Arg
5

<210> 9
<211> 21
<212> PRT
10<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A surfactant protein

15<400> 9
Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
 1           5           10           15
Leu Leu Arg Leu Leu
                20
20
<210> 10
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25
<220>
<223> A surfactant protein

<400> 10
30Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
 1           5           10           15
Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg
      20           25

35<210> 11

<400> 11
000

40

```

[0517]

```

<210> 12

<400> 12
000
5

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
10<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A surfactant protein

15<400> 13
His Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu His
1      5      10      15
Leu Leu Leu Leu His
20

20
<210> 14
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 14
Met Glu Gln Leu Ser Ser Ala Asn Thr Arg Phe Ala Leu Asp Leu Phe
1      5      10      15
Leu Ala Leu Ser Glu Asn Asn Pro Ala Gly Asn Ile Phe Ile Ser Pro
30      20      25      30
Phe Ser Ile Ser Ser Ala Met Ala Met Val Phe Leu Gly Thr Arg Gly
35      40      45
Asn Thr Ala Ala Gln Leu Ser Lys Thr Phe His Phe Asn Thr Val Glu
50      55      60
35Glu Val His Ser Arg Phe Gln Ser Leu Asn Ala Asp Ile Asn Lys Arg
65      70      75      80
Gly Ala Ser Tyr Ile Leu Lys Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Lys
85      90      95
Thr Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Phe Leu Val Ser Thr Gln Lys Thr Tyr
40      100      105      110
Gly Ala Asp Leu Ala Ser Val Asp Phe Gln His Ala Ser Glu Asp Ala
115      120      125

```

[0518]

```

Arg Lys Thr Ile Asn Gln Trp Val Lys Gly Gln Thr Glu Gly Lys Ile
130                      135                      140
Pro Glu Leu Leu Ala Ser Gly Met Val Asp Asn Met Thr Lys Leu Val
145                      150                      155                      160
5Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asn Trp Lys Asp Lys Phe Met
165                      170                      175
Lys Glu Ala Thr Thr Asn Ala Pro Phe Arg Leu Asn Lys Lys Asp Arg
180                      185                      190
Lys Thr Val Lys Met Met Tyr Gln Lys Lys Lys Phe Ala Tyr Gly Tyr
10      195                      200                      205
Ile Glu Asp Leu Lys Cys Arg Val Leu Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Glu
210                      215                      220
Glu Leu Ser Met Val Ile Leu Leu Pro Asp Asp Ile Glu Asp Glu Ser
225                      230                      235                      240
15Thr Gly Leu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Leu His
245                      250                      255
Glu Trp Thr Lys Pro Glu Asn Leu Asp Phe Ile Glu Val Asn Val Ser
260                      265                      270
Leu Pro Arg Phe Lys Leu Glu Glu Ser Tyr Thr Leu Asn Ser Asp Leu
20      275                      280                      285
Ala Arg Leu Gly Val Gln Asp Leu Phe Asn Ser Ser Lys Ala Asp Leu
290                      295                      300
Ser Gly Met Ser Gly Ala Arg Asp Ile Phe Ile Ser Lys Ile Val His
305                      310                      315                      320
25Lys Ser Phe Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
325                      330                      335
Thr Ala Gly Ile Ala Thr Phe Cys Met Leu Met Pro Glu Glu Asn Phe
340                      345                      350
Thr Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Ser Ser Gly
30      355                      360                      365
Ser Ile Leu Phe Leu Gly Arg Phe Ser Ser Pro
370                      375

<210> 15
35<211> 418
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
40Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
1      5      10      15

```

[0519]

```

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
      20              25              30
Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn
      35              40              45
5Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln
      50              55              60

Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser
65              70              75              80
10Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr
      85              90              95
His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro
      100             105             110
Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn
15      115             120             125
Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu
      130             135             140
Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys
145             150             155             160
20Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu
      165             170             175
Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys
      180             185             190
Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu
25      195             200             205
Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
      210             215             220
Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val
225             230             235             240
30Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys
      245             250             255
Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala
      260             265             270
Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu
35      275             280             285
Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
      290             295             300
Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
305             310             315             320
40Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
      325             330             335

```

[0520]

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
 340 345 350
 Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
 355 360 365
 5Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
 370 375 380
 Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
 385 390 395 400
 Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
 10 405 410 415
 Gln Lys

<210> 16
 15<211> 252
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 20Met Ala Gln Leu Cys Gly Leu Arg Arg Ser Arg Ala Phe Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Ser Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala Ala Asp Arg Glu Arg
 20 25 30
 Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg
 25 35 40 45
 Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln
 50 55 60
 Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr
 65 70 75 80
 30Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr
 85 90 95
 Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser
 100 105 110
 Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe Asn
 35 115 120 125
 Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala
 130 135 140
 Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn
 145 150 155 160
 40Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu
 165 170 175

[0521]

Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu
180 185 190
Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val
195 200 205
5Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala
210 215 220
Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Ser Gly Asp
225 230 235 240
Asp Lys Glu Gln Leu Val Lys Asn Thr Tyr Val Leu
10 245 250

<210> 17

<211> 57

<212> PRT

15<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Gln Glu Pro Val Lys Gly Pro Val Ser Thr Lys Pro Gly Ser Cys
1 5 10 15
20Pro Ile Ile Leu Ile Arg Cys Ala Met Leu Asn Pro Pro Asn Arg Cys
20 25 30
Leu Lys Asp Thr Asp Cys Pro Gly Ile Lys Lys Cys Cys Glu Gly Ser
35 40 45
Cys Gly Met Ala Cys Phe Val Pro Gln
25 50 55

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

30<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Arg Ala Ser Ser Phe Leu Ile Val Val Val Phe Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15
35Thr Leu Val Leu Glu Ala Ala Val Thr Gly Val Pro Val Lys Gly Gln
20 25 30
Asp Thr Val Lys Gly Arg Val Pro Phe Asn Gly Gln Asp Pro Val Lys
35 40 45
Gly Gln Val Ser Val Lys Gly Gln Asp Lys Val Lys Ala Gln Glu Pro
40 50 55 60
Val Lys Gly Pro Val Ser Thr Lys Pro Gly Ser Cys Pro Ile Ile Leu
65 70 75 80

[0522]

```

Ile Arg Cys Ala Met Leu Asn Pro Pro Asn Arg Cys Leu Lys Asp Thr
      85                      90                      95
Asp Cys Pro Gly Ile Lys Lys Cys Cys Glu Gly Ser Cys Gly Met Ala
      100                    105                    110
5Cys Phe Val Pro Gln
      115

<210> 19
<211> 134
10<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 19
Gln Glu Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val
15 1                      5                      10                      15
Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Asp Gln Asn
      20                    25                    30
Pro Val Arg Gly Gln Glu Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly
      35                    40                    45
20Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Glu Pro Val
      50                    55                    60
Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Arg Gln Gly
      65                    70                    75                    80
Arg Ile Gly Gly Pro Leu Leu Thr Lys Pro Gly Ser Cys Pro Arg Val
25                      85                      90                      95
Leu Ile Arg Cys Ala Met Met Asn Pro Pro Asn Arg Cys Leu Arg Asp
      100                    105                    110
Ala Gln Cys Pro Gly Val Lys Lys Cys Cys Glu Gly Ser Cys Gly Lys
      115                    120                    125
30Thr Cys Met Asp Pro Gln
      130

<210> 20
<211> 207
35<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu Trp
40 1                      5                      10                      15
Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro Gln
      20                    25                    30

```

[0523]

```

Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val Gly
  35              40              45
Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile Lys
  50              55              60
5Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala Asp
  65              70              75              80
Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr Phe
      85              90              95
His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Leu
10      100              105              110
Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro Trp
      115              120              125
Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr Thr
      130              135              140
15Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro Cys
  145              150              155              160
Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu Gln
      165              170              175
Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro Arg
20      180              185              190
Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala
      195              200              205

```

```

<210> 21
25<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 21
30Met Gly Ala Ala Ala Arg Thr Leu Arg Leu Ala Leu Gly Leu Leu Leu
  1              5              10              15
Leu Ala Thr Leu Leu Arg Pro Ala Asp Ala Cys Ser Cys Ser Pro Val
      20              25              30
His Pro Gln Gln Ala Phe Cys Asn Ala Asp Val Val Ile Arg Ala Lys
35      35              40              45
Ala Val Ser Glu Lys Glu Val Asp Ser Gly Asn Asp Ile Tyr Gly Asn
  50              55              60
Pro Ile Lys Arg Ile Gln Tyr Glu Ile Lys Gln Ile Lys Met Phe Lys
  65              70              75              80
40Gly Pro Glu Lys Asp Ile Glu Phe Ile Tyr Thr Ala Pro Ser Ser Ala
      85              90              95

```

[0524]

```

Val Cys Gly Val Ser Leu Asp Val Gly Gly Lys Lys Glu Tyr Leu Ile
      100              105              110
Ala Gly Lys Ala Glu Gly Asp Gly Lys Met His Ile Thr Leu Cys Asp
      115              120              125
5Phe Ile Val Pro Trp Asp Thr Leu Ser Thr Thr Gln Lys Lys Ser Leu
      130              135              140
Asn His Arg Tyr Gln Met Gly Cys Glu Cys Lys Ile Thr Arg Cys Pro
      145              150              155              160
Met Ile Pro Cys Tyr Ile Ser Ser Pro Asp Glu Cys Leu Trp Met Asp
10      165              170              175
Trp Val Thr Glu Lys Asn Ile Asn Gly His Gln Ala Lys Phe Phe Ala
      180              185              190
Cys Ile Lys Arg Ser Asp Gly Ser Cys Ala Trp Tyr Arg Gly Ala Ala
      195              200              205
15Pro Pro Lys Gln Glu Phe Leu Asp Ile Glu Asp Pro
      210              215              220

<210> 22
<211> 211
20<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Met Thr Pro Trp Leu Gly Leu Ile Val Leu Leu Gly Ser Trp Ser Leu
25 1      5      10      15
Gly Asp Trp Gly Ala Glu Ala Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln
      20      25      30
Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly
      35      40      45
30Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile
      50      55      60
Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln
      65      70      75      80
Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu
35      85      90      95
Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys
      100      105      110
Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr
      115      120      125
40Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn
      130      135      140

```

[0525]

```

Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys
145          150          155          160
Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly
          165          170          175
5Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys
          180          185          190
Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala
          195          200          205
Thr Asp Pro
10      210

```

<210> 23

<211> 132

<212> PRT

15<213> Homo sapiens

<400> 23

```

Met Lys Ser Ser Gly Leu Phe Pro Phe Leu Val Leu Leu Ala Leu Gly
1          5          10          15
20Thr Leu Ala Pro Trp Ala Val Glu Gly Ser Gly Lys Ser Phe Lys Ala
          20          25          30
Gly Val Cys Pro Pro Lys Lys Ser Ala Gln Cys Leu Arg Tyr Lys Lys
          35          40          45
Pro Glu Cys Gln Ser Asp Trp Gln Cys Pro Gly Lys Lys Arg Cys Cys
25      50          55          60
Pro Asp Thr Cys Gly Ile Lys Cys Leu Asp Pro Val Asp Thr Pro Asn
65          70          75          80
Pro Thr Arg Arg Lys Pro Gly Lys Cys Pro Val Thr Tyr Gly Gln Cys
          85          90          95
30Leu Met Leu Asn Pro Pro Asn Phe Cys Glu Met Asp Gly Gln Cys Lys
          100          105          110
Arg Asp Leu Lys Cys Cys Met Gly Met Cys Gly Lys Ser Cys Val Ser
          115          120          125
Pro Val Lys Ala
35      130

```

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

40<213> Artificial Sequence

[0526]

```

<220>
<223> A peptide used as an elastase substrate

<221> SITE
5<222> 1
<223> Xaa = MeO-Suc

<221> SITE
<222> 5
10<223> Xaa = Val-pNA

<400> 24
Xaa Ala Ala Pro Xaa
  1           5

15
<210> 25
<211> 248
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20
<400> 25
Met Trp Leu Cys Pro Leu Ala Leu Asn Leu Ile Leu Met Ala Ala Ser
  1           5           10           15
Gly Ala Val Cys Glu Val Lys Asp Val Cys Val Gly Ser Pro Gly Ile
25           20           25           30
Pro Gly Thr Pro Gly Ser His Gly Leu Pro Gly Arg His Gly Arg Asp
  35           40           45
Gly Leu Lys Gly Asp Leu Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly
  50           55           60
30Glu Met Pro Cys Pro Pro Gly Asn Asp Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly
  65           70           75           80
Ile Pro Gly Glu Cys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Glu Arg Gly Pro
  85           90           95
Pro Gly Leu Arg Ala His Leu Asp Glu Glu Leu Gln Ala Thr Leu His
35           100           105           110
Asp Phe Arg His Gln Ile Leu Gln Thr Arg Gly Ala Leu Ser Leu Gln
  115           120           125
Gly Ser Ile Met Thr Val Gly Glu Lys Val Phe Ser Ser Asn Gly Gln
  130           135           140
40Ser Ile Thr Phe Asp Ala Ile Gln Glu Ala Cys Ala Arg Ala Gly Gly
  145           150           155           160

```

[0527]

```

Arg Ile Ala Val Pro Arg Asn Pro Glu Glu Asn Glu Ala Ile Ala Ser
      165                      170                      175
Phe Val Lys Lys Tyr Asn Thr Tyr Ala Tyr Val Gly Leu Thr Glu Gly
      180                      185                      190
5Pro Ser Pro Gly Asp Phe Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Pro Val Asn Tyr
      195                      200                      205
Thr Asn Trp Tyr Arg Gly Glu Pro Ala Gly Arg Gly Lys Glu Gln Cys
      210                      215                      220
Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Gln Trp Asn Asp Arg Asn Cys Leu Tyr
10225                      230                      235                      240
Ser Arg Leu Thr Ile Cys Glu Phe
      245

```

```

<210> 26
15<211> 248
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 26
20Met Trp Leu Cys Pro Leu Ala Leu Asn Leu Ile Leu Met Ala Ala Ser
  1          5          10          15
Gly Ala Ala Cys Glu Val Lys Asp Val Cys Val Gly Ser Pro Gly Ile
      20          25          30
Pro Gly Thr Pro Gly Ser His Gly Leu Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp
25      35      40      45
Gly Val Lys Gly Asp Pro Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly
  50      55      60
Glu Thr Pro Cys Pro Pro Gly Asn Asn Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly
  65      70      75      80
30Val Pro Gly Glu Arg Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Glu Arg Gly Pro
      85      90      95
Pro Gly Leu Pro Ala His Leu Asp Glu Glu Leu Gln Ala Thr Leu His
      100     105     110
Asp Phe Arg His Gln Ile Leu Gln Thr Arg Gly Ala Leu Ser Leu Gln
35      115     120     125
Gly Ser Ile Met Thr Val Gly Glu Lys Val Phe Ser Ser Asn Gly Gln
      130     135     140
Ser Ile Thr Phe Asp Ala Ile Gln Glu Ala Cys Ala Arg Ala Gly Gly
      145     150     155     160
40Arg Ile Ala Val Pro Arg Asn Pro Glu Glu Asn Glu Ala Ile Ala Ser
      165     170     175

```

[0528]

Phe Val Lys Lys Tyr Asn Thr Tyr Ala Tyr Val Gly Leu Thr Glu Gly
180 185 190
Pro Ser Pro Gly Asp Phe Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Pro Val Asn Tyr
195 200 205
5Thr Asn Trp Tyr Arg Gly Glu Pro Ala Gly Arg Gly Lys Glu Gln Cys
210 215 220
Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Gln Trp Asn Asp Arg Asn Cys Leu Tyr
225 230 235 240
Ser Arg Leu Thr Ile Cys Asp Phe
10 245

<210> 27

<211> 381

<212> PRT

15<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
1 5 10 15
20Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
20 25 30
Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
35 40 45
Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly
25 50 55 60
Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn
65 70 75 80
Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu
85 90 95
30Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys
100 105 110
Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln
115 120 125
Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys
35 130 135 140
Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu
145 150 155 160
Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu
165 170 175
40Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His
180 185 190

[0529]

```

Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys
    195                      200                      205
Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys
    210                      215                      220
5Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu
    225                      230                      235                      240
Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile
    245                      250                      255
Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg
10    260                      265                      270
Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro
    275                      280                      285
Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser
    290                      295                      300
15Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala
    305                      310                      315                      320
Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys
    325                      330                      335
Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg
20    340                      345                      350
Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr
    355                      360                      365
Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
    370                      375                      380
25
<210> 28
<211> 197
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30
<400> 28
Met Asp Val Gly Ser Lys Glu Val Leu Met Glu Ser Pro Pro Asp Tyr
    1          5          10          15
Ser Ala Ala Pro Arg Gly Arg Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His
35          20          25          30
Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val
    35          40          45
Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu His Met Ser Gln Lys His
    50          55          60
40Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly Ala Pro Glu Ala Gln Gln
    65          70          75          80

```

[0530]

Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Leu Val Thr Thr Ala Thr Phe Ser Ile
85 90 95
Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr Gln Gln Leu Leu Ile Ala
100 105 110
5Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys Ile Ala Pro
115 120 125
Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Asn Arg Lys Val His Asn Phe
130 135 140
Gln Met Glu Cys Ser Leu Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys
10145 150 155 160
Leu Gly Gln Ala Glu Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Gly Gly
165 170 175
Asp Pro Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Asn Thr Leu Cys Gly Glu Val
180 185 190
15Pro Leu Tyr Tyr Ile
195

<210> 29

<211> 374

20<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Leu Pro Phe Leu Ser Met Leu Val Leu Leu Val Gln Pro Leu Gly
25 1 5 10 15
Asn Leu Gly Ala Glu Met Lys Ser Leu Ser Gln Arg Ser Val Pro Asn
20 25 30
Thr Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Pro Thr Glu Asn Gly Leu Pro Gly
35 40 45
30Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys Gly Asp
50 55 60
Pro Gly Leu Pro Gly Pro Met Gly Leu Ser Gly Leu Gln Gly Pro Thr
65 70 75 80
Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Glu Asn Gly Ser Ala Gly Glu Pro Gly
35 85 90 95
Pro Lys Gly Glu Arg Gly Leu Ser Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Ile
100 105 110
Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Pro Ser Gly Lys Gln Gly Asn Ile
115 120 125
40Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro Lys Gly
130 135 140

[0531]

```

Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Thr Gly Ala Lys Gly Ser
145          150          155          160
Thr Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Val Gln Gly Ala Pro
          165          170          175
5Gly Asn Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly
          180          185          190
Ala Pro Gly Ser Arg Gly Pro Pro Gly Leu Lys Gly Asp Arg Gly Val
          195          200          205
Pro Gly Asp Arg Gly Ile Lys Gly Glu Ser Gly Leu Pro Asp Ser Ala
10  210          215          220
Ala Leu Arg Gln Gln Met Glu Ala Leu Lys Gly Lys Leu Gln Arg Leu
225          230          235          240
Glu Val Ala Phe Ser His Tyr Gln Lys Ala Ala Leu Phe Pro Asp Gly
          245          250          255
15Arg Ser Val Gly Asp Lys Ile Phe Arg Thr Ala Asp Ser Glu Lys Pro
          260          265          270
Phe Glu Asp Ala Gln Glu Met Cys Lys Gln Ala Gly Gly Gln Leu Ala
          275          280          285
Ser Pro Arg Ser Ala Thr Glu Asn Ala Ala Ile Gln Gln Leu Ile Thr
20  290          295          300
Ala His Asn Lys Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Val Gly Thr Glu
305          310          315          320
Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Pro Leu Val Tyr Ser Asn Trp
          325          330          335
25Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asn Asn Gly Gly Ala Glu Asn Cys Val Glu
          340          345          350
Ile Phe Thr Asn Gly Gln Trp Asn Asp Lys Ala Cys Gly Glu Gln Arg
          355          360          365
Leu Val Ile Cys Glu Phe
30  370

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
35<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A WMAP-10 peptide.

40<221> SITE
<222> 1
<223> Xaa = succinyl-Leu

```

[0532]

```

<221> SITE
<222> 9
<223> Xaa = Lys-amide

```

```

5<400> 30
Xaa Leu Glu Lys Leu Leu Gln Trp Xaa
1          5

```

[0533]

도면의 간단한 설명

[0030]

도1은 본원 발명의 특정 측면을 실시하는 데 사용한 다양한 공정 단계 사이의 관계를 도시한 흐름도이다.

[0031]

도 2a 및 2b는 본원 발명에 실시될 수 있는 추가 가공 단계를 도시한다.

[0032]

도 3a 및 3b는 무정형(3a) 및 결정 (3b) 지질-부분의 현미경사진이다.

[0033]

도 4a 및 4b은 시간 0에서 계면활성제가 있는 상태(+), 계면활성제가 없는 상태로(-) 전달된 약물의 산포 및 부착을 (도 4a) 도시하고, 시간에 따른 폐에서 세포 흡수 및 침투를 향상하는 능력에 대한 산포 효과를 도시한다 (도 4b).

[0034]

도 4c는 본 발명의 다양한 약물 전달 이점이 어떻게 얻어지는가에 대하여 도시한다.

- [0035] 도 5a는 인간 호중구 엘라스타제(HNE)의 표준량($0.125\mu\text{g}$)에 첨가된 공지의 세린 엘라스타제 억제제 로그양을 상응하는 혼합물의 OD₄₁₀에 플롯한 억제 곡선이다.
- [0036] 도 5b는 엘라스타제 활성의 비색(colorimetric) 검정에서 ARDS 환자로부터 회수한 BAL 유체의 양과 OD₄₁₀ 사이의 복용-반응을 보여준다.
- [0037] 도 6a는 3mg 항-BSA/kg로 치료후(6098 및 6099 토끼), 또는 5mg 항-BSA/kg로 기관지내로 점적시키고(6100-6103 토끼), 추가로 정맥내로 10mg BSA(6098-6101)를 주어 치료한 후 6시간 후에 토끼의 폐로부터 취한 BAL 유체에서의 엘라스타제 활성을 보여준다 (대각선으로 된 막대). 비교를 위해, 공지의 세린 엘라스타제 억제제 $100\mu\text{g/mL}$ 의 투여 후에 이들 BAL 유체의 엘라스타제 활성도 나타내었다 (망상 표시된 막대). 엘라스타제 활성은 410nm에서 상응하는 OD를 제공하는 인간 호중구 엘라스타제(HNE)의 농도로 표현된다.
- [0038] 도 6b는 폐 손상을 겪은 토끼로부터의 기관지폐포 세정(BAL) 액에 의한 인간 호중구 엘라스타제(HNE) 활성의 억제를 보여준다. 박테리아 당지질(lipopolysaccharide; LPS) 및 항-BSA(모든 동물)를 기관지내로 주입된 후 3시간(토끼 6315 및 6316) 또는 6시간(토끼 6313, 6314, 6317 및 6318)에 토끼로부터 BAL 용액을 취하였다 (동물 6317 및 6318은 3시간에 추가로 10mg/kg의 BSA를 추가로 받았다). BAL 용액을 단독으로 (망상으로 된 막대) 또는 $1\mu\text{g/mL}$ HNE에 첨가후에(망상으로 된 막대) 시험하였다. 무너없는 막대는 BAL 액이 첨가되지 않은 HNE 활성을 보여준다. 유리 엘라스타제가 동물 6317 내에 현저히 존재하고, 다른 모든 것은 엘라스타제 억제제의 존재를 보여주었다.
- [0039] 도 7a는 정상 토끼 (그룹 5) 또는 박테리아 당지질(LPS)과 포르볼 미리스테이트(phorbol myristate; PMA)로 손상된 토끼(그룹 1) 및 또한 모델 계면활성제 혼합물로 치료한 토끼(그룹 3), 또는 모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제를 결합하여 치료한 토끼(그룹 4)에 대한 최종 세정액(손상 후 6시간)에서의 평균 단백질 수치를 보여준다. 사용량 및 치료 시간에 대해서는 실시예 8을 참조한다. 오차 막대는 SEM을 묘사한다. 그룹 3에서의 한 동물은, 오차 막대에서 반영되듯이, 드물게 높은 단백질 수치를 가져, 그렇지 않은 것보다 이 그룹에서 더 높은 단백질 수치로 왜곡하게 하였다. 벗어난 수치를 제거하면 그룹 3의 평균 값은 1.72로 될 것이다.
- [0040] 도 7b는 LPS/PMA-유도 폐 손상을 갖는 토끼로부터 얻은 BAL액의 웨스턴 블롯 분석의 다이어그램이다. 기저막 단백질에 대해 작용하는 항체를 사용하여 기저막 단백질이 이들 BAL 액내에 존재하는 것을 감지한다. 제1(가장 왼쪽) 줄은 대조구로서 약 80,000kDa 이상의 크기 범위인 기저막 단백질을 함유하였다. 더 고 분자량 기저막 단백질 뿐만 아니라 저분자량 (약 10,000) 기저막 단백질이 LPS 및 PMA 단독으로 치료한 토끼의 BAL 액에 존재하였다 (제2줄, 그룹1). LPS/PMA으로 손상된 토끼가 모델 계면활성제 혼합물(그룹 2), 세린 엘라스타제 억제제(그룹 4)로 치료될 경우, 다소 더 작은 양의 기저막 단백질이 존재하였다. 정상, 비손상 토끼 세정액에서는 저분자량 기저막 단백질이 없거나 거의 없었다(맨 오른쪽 패널, 그룹 5). 그룹 1-4에서의 존재하는 70,000MW의 가장 큰 띠는 알부민인데, 이는 사용된 항혈청에서 오염 물질로 존재한다. 90,000MW 초과인 띠는 기저막에 특이적이고, 정상 토끼 혈장에는 존재하지 않는다(데이터는 보이지 않음). 저분자량 띠(<10,000MW)는 기저막의 절편을 나타낸다.
- [0041] 도 7c는 LPS 및 PMA로 손상된, 그리고 다양한 방법으로 치료받은 동물의 최종 세정액 내(손상 후 6시간)의 적혈구(RBC)의 평균 개수를 보여준다. 아무런 치료를 받지 않은 정상 토끼 그룹(그룹 5)의 두 동물이 가장 많은 개수의 RBC를 가졌다. 모델 계면활성제 혼합물로 치료받은 LPS/PMA로 손상된 토끼(그룹 2)는 더 적은 수의 RBC를 가졌다. 엘라스타제 억제제로 치료받은 토끼들(그룹 3)이나 모델 계면활성제 혼합물 및 엘라스타제 억제제로 치료받은 토끼들(그룹 4)는 세정액에서 더 적은 RBC를 가졌다.
- [0042] 도 8은 모델 계면활성제 혼합물(2mg/mL 최종 농도), 공지의 세린 엘라스타제 억제제($100\mu\text{g/mL}$), 또는 모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제 함께에 의한 공지 양의 HNE($0.02\mu\text{g}$)의 억제를 보여준다.
- [0043] 도 9는 실시예 12에서 기술한 치료받은 그룹의 최종 세정액 내에서의 엘라스타제 억제제의 정도를 보여준다.
- [0044] 도 10은 포스포리파아제 A₂(PLA₂)가, 항-BSA 항체의 기관지내 투여에 의하여 유발된 폐 손상을 겪는 토끼로부터의 세정액 내에 존재함을 도시한다. 팔미토일, 올레일 포스파티딜글리세롤, PLA₂ 기질로부터 방출된 올레산의 양("피크 높이")이 시간의 함수로 도시되었다. 보여지는 바와 같이, 방출된 올레산의 양은 0에서 약 40분에서 급격히 증가되었다.

[0045] 도 11은 항-BSA항체 2.5mg/ml(동물 6011 및 6012), 5.0mg/kg 항-BSA 항체(동물 6013 및 6014) 또는 12.5mg/kg 항-BSA 항체(동물 6015 및 6016)을 받은 동물로부터 단리한 최종 세정액 내의 포스포리파제 A₂(PLA₂) 활성의 양을 도시적으로 기술한다. 도시한 바와 같이, 최종 세정액에서 포스포리파아제 A₂ (PLA₂) 활성은, 동물이 증가된 양의 항-BSA 항체를 받을 경우, 증가한다.

[0046] 도 12는, 항-BSA 항체를 2.5mg/mL(동물 6011 및 6012), 5.0mg/kg (동물 6013 및 6014) 또는 12.5mg/kg(동물 6015 및 6016)을 받은 동물로부터 단리한 최종 세정액 내에 존재하는 리놀렌산의 양(망상 막대) 및 리놀레산의 양(빗금친 막대)을 도시적으로 서술해준다. 유리 지방산(리놀렌산 및 리놀레산)의 존재는 포스포리파제 A₂(PLA₂)가 이들 동물의 손상된 폐 조직에서 활성이 있음은 가리켜준다. 또한 도시하였듯이, 유리 지방산의 양은 항 BSA 항체를 더 많은 양으로 받은 동물에서 증가한다.

[0047] 도 13은 PLA₂ 활성은, PLA₂ 억제제의 첨가에 의해 투여양에 의존하는 방식으로 감소됨을 그림으로 도시해 준다. 도에 나타나듯이, 세정액(토끼 6015로부터 얻음)으로 30분 인큐베이션 후 POPG 기질로부터의 올레산의 방출은 LY311727 억제제의 양에 역비례한다. 바꾸어 말하면, 억제제의 증가된 양이 첨가될수록, PLA₂ 활성의 정도의 감소가 관찰된다.

[0048] 도 14는 BAL 액으로부터의 PLA₂활성을 억제제 농도의 로그값의 함수로서 그림으로 도시해 준다. 나타나 있듯이, BAL 액 PLA₂ 활성은 억제제 농도가 증가함에 따라 현저히 떨어진다.

[0049] <발명의 상세한 설명>

[0050] 본 발명은 폐 계면활성제 폴리펩타이드 및 염증 동안에 일어날 수 있는 여러 유형의 조직 파괴에 대한 다양한 억제제의 조합을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 첨가될 수 있는 다른 요소, 예컨대 지질 및 산포제를 첨가하여 조성물의 폐내로의 전달 및 분산을 촉진시킬 수 있다.

[0051] <용어의 정의>

[0052] 아래의 용어는 다르게 지적하지 않으면 다음의 의미를 갖는다.

[0053] "아미노산"이란 단백질을 구성하는 아미노산 잔기를 칭한다. 아미노산은 보통 천연 L-형태이나, D-아미노산, 치환된 아미노산(예를 들어 개질된 결사슬기를 갖는 아미노산), 아미노산 대사물 및 이화 산물, "역전(retro)" 골격을 갖는 아미노산, 및 아미노산 유사체 또는 의태체도 본원 발명에 사용되어 포함되는 것으로 간주된다. 표준 폴리펩타이드 명명법(J. Biol. Chem., 243: 3557-59,1969)에 따라서, 더 흔한 아미노산 잔기에 대한 약칭을 하기 상응표에서 나타내었다.

[0054] <상응표>

기호		아미노산
한 문자	3 문자	
Y	Tyr	L-티로신
G	Gly	글리신
F	Phe	L-페닐알라닌
M	Met	L-메티오닌
A	Ala	L-알라닌
S	Ser	L-세린
I	Ile	L-이소류신
L	Leu	L-류신
T	Thr	L-트레오닌
V	Val	L-발린
P	Pro	L-프롤린
K	Lys	L-라이신
H	His	L-히스티딘
Q	Gln	L-글루타민
E	Glu	L-글루탐산
W	Trp	L-트립토판
R	Arg	L-아르기닌

D	Asp	L-아스파르트산
N	Asn	L-아스파라긴
C	Cys	L-시스테인
x	Xaa	알려지지않음/기타

- [0056] 다르게 나타내지 않으면, 화학식들로 본원에서 표현된 아미노산 잔기 서열은 아미노말단에서 카르복시 말단의 통상적인 방향으로 좌측에서 우측 배향을 가짐을 유의해야 할 것이다. 또한, "아미노산 잔기"란 구절은 상응표에서 열거한 아미노산 및 개질 및 특수한 아미노산 예컨대 37 C.F.R § 1.822(b)(4)에서 열거한 것들을 포함되도록 광범위하게 정의하며, 이들 모두 참고 문헌에 혼입되어 있는 것들이다. 구절 "아미노산 잔기"란 또한 D-아미노산, 치환된 아미노산(예를 들어 개질된 결사슬을 갖는 아미노산), 개질된 아미노산(예를 들어 아미노산 대사물, 이화 산물 및 "디자인된" 결사슬을 갖는 아미노산) 및 아미노산 의태체 또는 유사체를 포함하게끔 광범위하게 정의된다.
- [0057] 더구나, 아미노산 잔기 서열의 처음 또는 종결에서의 대치는 일반적으로 아미노- 및 카르복시 말단에 각각 H 및 OH(수소 및 히드록실)과 같은 라디칼과의 결합 또는 추가의 하나 이상의 아미노산 잔기의 서열과의 결합을 가리킴을 유의할 것이다. 게다가, 잔기 서열의 우측편 말단에 사선(/)은 서열이 다음 줄에 연속됨을 의미함을 유의해야 할 것이다.
- [0058] "제한적으로 허용가능한"이란 분자 개체 및 조성물이 인간에게 투여시에 반응에 알레르기성 또는 유사한 것을 일으키지 않음을 지칭하는 용어이다.
- [0059] "단백질" 또는 "폴리펩타이드" 또는 "펩타이드"란, 전형적으로, 펩타이드 서브유닛간 연결 또는 효소-기질 또는 수용체 결합 리간드 상호작용과 상응하는 기타 서브유닛간 연결에 의하여 연결된, 생물 단백질 내에서 발견되는 20개의 통상 L-아미노산의 일부 또는 전부인 아미노산 또는 아미노산 유사 서브유닛으로 이루어진, 생고분자이다. 단백질은 이의 서브유닛 서열에 의하여 표현되는 일차 구조를 갖고, 이차 나선(helix) 또는 판(pleat) 구조 뿐 아니라 전체 3차원 구조를 가질 수 있다. 단백질이 통상 상대적으로 큰 폴리펩타이드, 예컨대 30개 이상의 아미노산을 함유하는 것을 지칭하고, 펩타이드 또는 "폴리펩타이드"는 더 적은 폴리펩타이드를 지칭하지만, 본원에서는 서로 교환가능하게 사용된다. 즉, 용어 "단백질"은 더 큰 폴리펩타이드, 예를 들어 30 개 아미노산보다 더 큰 폴리펩타이드를 지칭할 수 있으나, 반드시 더 작은 폴리펩타이드를 배제하지는 않고, 용어 "폴리펩타이드"가 더 큰 단백질을 지칭할 수 있다.
- [0060] "계면활성"이란, 단독으로 또는 다른 유기 분자와 함께 지질과 결합시에 공기/물 계면에서 표면장력을 더 낮게 하는 어느 기질, 유기 분자, 단백질 또는 폴리펩타이드의 능력을 지칭한다. 윌헬미 저울(Wilhelmy Balance) 또는 체외 검정에서 진동 버블 계면활성계를 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들어 킹 등의 *Am. J. Physiol.* 223: 715-726 (1972)이나, 단백질 또는 폴리펩타이드를 인지질과 혼합할 시에 공기-물 계면의 표면장력의 측정을 이용한 본원에서 설명한 검정을 참조한다. 게다가, 폐 탄성 또는 폐로 들어가는 공기의 주어진 압력에서 공기흐름의 증가를 체내에서 측정하는 것은 로버트슨의 문헌 *Lung*, 158:57-68(1980)의 검정에서 용이하게 측정할 수 있다. 이 검정에서, 평가할 샘플을 기관내 튜브를 통하여, 제왕절개에 의하여 미숙하게 분만된 태아 토끼 또는 양에게 투여한다(이들 "조산아"들은 이들의 폐 계면활성제가 결핍되고, 통풍기(ventilator)에서 지탱된다). 폐 탄성, 혈액 가스 및 통풍기압력의 측정하여 활성의 지표를 제공한다. 진동 버블의 표면 장력을 낮추는 능력으로서 검정되는 계면활성제의 체외 검정, 그리고 본원에서 보고한 태아 토끼를 사용하는 체내 검정이 라박 등의 문헌[*Am. Rev. Respir. Dis.*, 134: 1258-1265 (1986)]에서 상세하게 기술되어 있다.
- [0061] "계면활성제 분자"란 계면활성을 갖는 유기 분자를 지칭하고, 제한적으로 허용가능한 지질과 혼합시에, 더낮은 ΔP 값으로 증명되듯이, 지질 단독의 경우보다 더 큰 계면활성을 갖는 계면활성제를 형성한다.
- [0062] "천연 폐 계면활성제"란 성숙 포유류 폐의 허파파리 상피를 덮고 있는 폐 계면활성제(PS)를 의미한다. 천연 또는 자연 PS는, 폐 공기-액체 계면에서 표면 장력을 감소시키기 위해 상호작용하는 인지질 및 아포단백질을 모두 함유하기 때문에 "지질 단백질 복합체"로 기술되어 왔다. 천연 계면활성제는, 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC)가 주성분인 여러 지질 종을 함유한다. SP-A, SP-B, SP-C 및 SP-D의 4개 이상의 단백질이 천연 폐 계면활성제 내에 전형적으로 존재한다. 이들 넷 중에서 SP-B 및 SP-C가, 예측상으로 지질이 벌크상의 라멜라 조직에서 공기-물 계면으로 전달을 촉진시키고 또한 배기 동안 지질 단일층을 안정화시킴으로써, 계면활성제 인지질 혼합물의 표면활성을 향상시키는 것으로 나타나지는, 구별되는 저분자량이고, 상대적으로 소수성 단백질이다. 대전 아미노산(주로 염기)은 이가 없었다면 소수성이었을 잔기의 스트레치 내의 상당히 일정한 간격으로 위치해

있다는 점에서 SP-B의 구조는 특이하다. 자연 SP-B 서열의 59-80 잔기로 이루어진 도메인에 대해서는, 이들 대전된 기가 생물적 활성화에 필요한 것으로 보여진다. 게다가, 이 소수성-친수성 도메인 상에 모델화한 천연 및 합성 펩타이드는 DPPC 및 PG와 합해졌을 때 양호한 계면활성을 나타낸다.

[0063] 천연 계면활성제 단백질은 폐 상피 세포에서 라멜라체(lamellar body)의 형태로 보관되고, 밖으로 나온 다음에 구조적 변이를 거쳐 튜브형 미엘린을 형성한 후 공기-물 계면에서 단일층으로 된다. 계면활성제 단백질 SP-A, SP-B 및 SP-C가 이들 구조의 변이를 촉진시키고, 폐포의 팽창 및 수축 동안에 지질 단일층을 안정화하는 것으로 제안되어 왔다. 그러나, 분자 규모에서 지질-단백질 상호작용이 현재로서는 완전히 이해되지 못하고 있다.

[0064] "폐포의 투여"란 제약적으로 활성 물질을 폐의 임의의 표면에 전달하는 투여 모드를 지칭한다. 전달 모드는 이에 한정되지는 않지만, 기관지내 투여에 적합한 것들을, 예를 들어 일반적으로 액체 현탁 점적제로서, 건조 분말 "더스트"로 또는 흡입가루(insufflate) 또는 에어로졸로서 포함한다. 제약적으로 활성 물질의 국소 및 전신 전달을 위해 폐로 투여할 수 있다.

[0065] "폐 표면을 통한 운반"이란 침투 또는 투과하는 임의의 모드의 통로를 의미한다. 이는, 폐포 표면(가스 교환이 일어남), 기관지내 표면 및 이들 표면의 어느 곳 사이의 통로를 포함한 임의의 폐 표면을 통한 통로를 포함한다. 국소 작용을 위하여 폐 조직으로 직접 또는 폐 조직을 경유하여 전신 작용을 위한 순환계로 통과할 수 있다.

[0066] "인지질"은 비극성 소수성 꼬리, 글리세롤 또는 스펡고신 잔기, 및 극성 머리로 구성된 양친매성 지질을 의미한다. 비극성 소수성 꼬리는 대개 포화 또는 불포화 지방산 기이다. 극성 머리는 질소 함유 염기가 종종 부착된 포스페이트 기를 갖는다.

[0067] "산포제"란 인지질(들)을 폐의 안 표면층 내로 분포 및 혼입을 촉진하는, 다시 말해 폐의 표면 안층에서 공기/액체 계면에서 인지질의 산포를 촉진시키는 화합물을 의미한다.

[0068] "활성제"란 원하는 치료 또는 진단 결과 및 목적을 얻기 위해 투여되는 치료적 또는 진단 화합물을 의미한다. 치료적 활성제는, 의학 또는 수의 질환 또는 외상의 치료에, 의학 또는 치료 질환의 예방에, 또는 인간 또는 동물의 생리를 조절하는 데에 유용한 생물적 활성의 합성 또는 천연 물질인 시약을 의미한다. 활성 화합물의 범위는 아래에서 고려될 것이다.

[0069] "공기역학적 직경"이란, 특정 입자와 동일한 침강속도를 갖는, 단위 밀도의 상응한 구형 입자의 직경으로 정의된다. 즉, 입자의 크기 또는 모양에 관계없이, 입자는 단위 밀도의 구로 변형된 것으로 상상한다. 이러한 구의 직경이 공기역학적 직경이다. 따라서, 1-5 미크론 크기의 공기역학적 직경을 갖는 입자는 1-5미크론 크기 범위의 직경을 갖는 단위 밀도의 구형 입자와 동일한 성질을 갖는다. 입자의 공기역학적 성질은 단계별 충돌기(cascade impaction), 분리기 또는 침강 셀을 사용하여 실험적으로 측정된다. 종종, 사용되는 측정 기술이 에어로졸이 사용되는 상황과 매우 닮은 것이다.

[0070] 수집된 입자의 "질량 중위 공기역학적 직경"이란 입자의 질량의 중간 공기 역학적 직경이다. 즉 입자의 질량의 중간이 MMAD이거나 그 아래에 있고, 반은 위쪽에 있다. 에어로졸 입자의 분산상이도(heterodispersity)는 기하 표준 편차(GSD)에 의하여 정의할 수 있다. 입자의 모두가 동일 크기 및 모양이라면, GSD는 1이다. GSD가 3.5 라면, 수집된 입자의 분산상이도는 매우 높음을 나타낸다. 본원 발명의 에어로졸 입자는 GSD가 1 내지 2.5, 바람직하게는 1-2를 주는 조건 하에서 형성되는 것이 바람직하다.

[0071] "모델 계면활성제 혼합물" 또는 "서파신(Surfaxin)[®]"이란 실시예 1 및 2에서 나타난 계면활성제-혼합물 성분을 사용한, 본원 발명에 따라 제조한 계면활성제 혼합물을 의미한다.

[0072] 활성제

[0073] 본원 발명의 계면활성제 담체를 사용하여 폐 질환 증상을 치료 또는 예방하기 위한 다양한 범위의 활성제를 투여할 수 있다. 이러한 증상으로 폐 고혈압, 신생아 폐 고혈압, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 및 만성 기관지염, 기종, 세기관지염, 기관지 확장증, 방사선 폐렴, 과민증, 폐실질염, 급성 염증성 천식, 급성 연기 흡입, 열에 의한 폐 손상, 알레르기성 천식, 의원성 천식, 낭포성 섬유증, 및 허파파리 단백질증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상, 의원성호흡 곤란 증후군, 및 특발성 폐 섬유증을 포함한다. 이 활성제는 폐 조직에 또는 폐 조직 내의 병원성 유기체에 직접 작용할 수 있다.

- [0074] 폐 염증성 장애를 치료하는 데에 사용되는 치료제로 프로테아제 억제제, 항산화제, 포스포리파아제 억제제, 리파아제 억제제 및 이들의 조합을 포함한다. 이들 시약은 단백질, 펩타이드, 핵산, 다당류, 탄수화물, 지질, 글리코단백질 및 유기 및 무기 화합물의 형태일 수 있다.
- [0075] 본원 발명에 따르면, 프로테아제는 염증 동안에 폐 조직 손상을 악화할 수 있다. 이러한 프로테아제 활성화는 폐 염증의 환자 또는 동물 모델로부터 얻은 세정액에서 또는 폐 조직에서 검출될 수 있다. 급성 호흡 곤란 증후군을 겪는 환자 및 폐 손상을 겪는 동물 모델의 세정액에서 기저막 단백질의 상승된 양을 검출할 수 있다. 염증이 있는 폐 조직에서 활성화된 프로테아제의 유형은 당업계에서 사용가능한 방법에 의하여 확인할 수 있고, 이 방법은 프로테아제-특이 항체를 사용한 항원 프로테아제의 검출, 특이 프로테아제 활성화의 검출, 프로테아제 활성화가 있는 생성물의 검출 등을 포함한다.
- [0076] 억제제에 의하여 프로테아제의 활성을 조절 및 제어할 수 있다. 프로테아제 억제제는, 프로테아제의 활성 위치를 차지하고 이로써 정상 기질의 점유를 방해함으로써 표적 프로테아제의 단백질 분해 활성을 조절할 수 있다. 프로테아제 억제제가 여러 비관련 구조 부류에 해당되지만, 많은 태양에서 이 억제제는 노출 루프("억제제 루프", "활성 코어", "반응 위치" 또는 "결합 루프"로 다양하게 불림)를 포함할 수 있는데, 이는 이 루프 옆에 있는 잔기와 단백질 코어 사이의 분자내 상호작용에 의해 안정화된(보드 및 후버의 문헌 *Eur. J. Biochem.* 204: 433 (1992)). 억제제와 효소간의 상호작용은 안정된 복합체를 생성하며, 이는 매우 친천히 분리되어, 결합 루프의 잘리기쉬운 결합에서 잘려진 개질된 억제제 또는 잘려지지 않는 억제제 중의 하나를 방출한다.
- [0077] 본 발명은 본원 발명의 방법 및 조성물에서의 임의의 사용가능한 프로테아제 억제제를 사용하는 것을 의도한다. 프로테아제 억제제의 한 부류, 쿠니츠 억제제는 트립신, 키모트립신, 엘라스타제, 칼리크레인, 플라스민, 응고인자 XIa 및 IXa, 및 카텝신 G를 포함한다. 당업자들은 세린 프로테아제를 다른 프로테아제의 부류로서 인식한다. 세린 프로테아제는 이러한 효소, 예컨대 엘라스타제(예를 들어 인간 백혈구 엘라스타제), 카텝신 G, 플라스민, C-1 에스테라제, C-3 컨버타제, 우로키나아제, 플라스미노겐 활성화제, 아크로신, 키모트립신, 트립신, 트롬빈, 인자 Xa 및 칼리크레인을 포함한다. 억제제의 다른 부류는 메탈로프로티나제 예컨대 메탈로프로티나제 1-13 중의 임의의 것을 포함한다.
- [0078] 조성물에 사용될 수 있고 본원 발명에 사용될 수 있는 프로테아제 억제제는 예를 들어 쿠니츠 억제제, 매트릭스 메탈로프로티나제 억제제, 및 세린 프로테아제 억제제를 포함한다.
- [0079] 하나 이상의 쿠니츠 도메인을 포함하는 프로테아제 억제제는 조직인자 경로 억제제(TFPI), 조직 인자 경로 억제제 2(TFPI-2), 아밀로이드 β -단백질 전구체(A β PP), 아프로티닌, 및 태반 비쿠닌을 포함한다. TFPI, 외래 경로 억제제 및 천연 항응고제는 세계의 직렬로(tandemly) 연결된 쿠니츠 억제제 도메인을 함유한다. 아미노-말단 쿠니츠 도메인은 인자 VIIa, 플라스민 및 카텝신 G를 억제하고, 제2 도메인은 인자 Xa, 트립신 및 키모트립신을 억제하고, 제3 도메인은 알려진 활성이 없다(페터슨 등 *Eur. J. Biochem.* 125: 310 (1996)). TFPI-2는 인간 인자 VIIa-조직 인자 복합체, 인자 XIa, 혈장 칼리크레인 및 플라스민의 아미드 분해 활성 및 단백질 분해 활성에 대한 억제제로 알려져 있다(스프레처 등(Sprecher et al.), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91: 3353 (1994); 페터슨 등(Petersen et al.), *Biochem.* 35: 266 (1996)).
- [0080] 아프로티닌(소 췌장 트립신 억제제)는 단계적 응고의 활성화를 예방하는 것으로 보여지는 넓은 범위의 쿠니츠 유형 세린 프로티나제 억제제이다(Davis and Whittington, *Drug* 49: 954 (1995); Dietrich et al., *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 37: 92 (1989); Westaby, *Ann. Thorac. Surg.* 55: 1033 (1993); Wachtfogel et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 106: 1 (1993)) 참조. 아프로티닌은 혈장 칼리크레인 또는 플라스민을 억제할 수 있다(Dennis et al., *J. Biol. Chem.* 270: 25411 (1995)). 태반 비쿠닌은 2개의 쿠니츠 도메인을 함유하는 세린 프로티나제 억제제이다(Delaria et al., *J. Biol. Chem.* 272: 12209 (1997)). 비쿠닌의 개개의 쿠니츠 도메인이 발현되어, 트립신, 키모트립신, 플라스민, 인자 XIa, 및 조직 및 혈장 칼리크레인의 강력한 억제제로 알려져 있다(Delaria et al., *J. Biol. Chem.* 272: 12209 (1997)).
- [0081] 본원 발명에 사용할 수 있는 엘라스타제 억제제의 특정 예로서, 예를 들어 인간 백혈구 엘라스타제 억제제, 엘라핀 및 알파 1-프로티나제 억제제를 포함한다. 다른 적합한 프로테아제 억제제는 인간 분비 백혈구 프로테아제 억제제, 알파 1-항트립신, 알파 1-항키모트립신, C-반응성 단백질 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0082] 이들 프로테아제 억제제의 핵산 및 아미노산 서열은 당업계에서, 예를 들어 NCBI 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 웹 사이트 ncbi.nlm.nih.gov을 참조한다. 이 서열은 아래와 같이 제공되어 있다(서열번호: 14)

1 MEQLSSANTR FALDLFLALS ENNPAGNIFI SPFSSSAMA
41 MVFLGTRGNT AAQLSKTFHF NTVEEVHSRF QSLNADINKR
81 GASYILKLAN RLYGEKTYNF LPEFLVSTQK TYGADLASVD
121 FQHASEDARK TINCWVGQT EGKIPELLAS GMVDNMTKLV
161 LVNAIFYKGN WKDKFMKEAT TNAPFRLNKK DRKTVKMMYQ
201 KKKFAYGYIE DLKCRVLELP YQGEELSMVI LLPDDIEDES
241 TGLKKIEEQL TLEKLHEWTK PENLDFIEVN VSLPRFKLEE
281 SYTLNSDLAR LGVQDLFNSS KADLSGMSGAR DIFISKIVH
321 KSFVEVNEEG TAAAAATAGI ATFCMLMPEE NFTADHPFLF
361 FIRHNSSGSI LFLGRFSSP

[0083]

인간 알파-1-항트립신에 대한 아미노산 서열을 NCBI 데이터베이스에서 수탁번호 P01009 (gi: 1703025)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov를 참조하십시오. 이 서열은 다음과 같이 제공된다 (서열번호 :15)

1 MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTSHH
41 DQDHPTFNKI TPNLAFAFS LYRQLAHQSN STNIFSPVS
81 IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLT IPEAQIHEGF
121 QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK
161 LYHSEAFVTN FGDTEEAKKQ INDYVEKGIQ GKIVDLVKEI
201 DRDTVFALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV
241 KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD
281 EGKLQHLENE LTHDIITKFL ENEDRRSASL HLPKLSITGT
321 YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA
361 VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE
401 QNTKSPLFMG KVVNPTQK

[0085]

인간 비쿠닌에 대한 아미노산 서열을 NCBI 데이터베이스에서 수탁번호 NP 066925 (gi: 10863909)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov를 참조하십시오. 이 서열은 다음과 같이 제공된다 (서열번호 :16)

1 MAQLCGLRRS RAFLALLGSL LLSGVLAADR ERSIHDFCLV
41 SKVVGRCRAS MPRWWYNVTD GSCQLFVYGG CDGNSNNYLT
81 KEECLKKCAT VTENATGDLA TSRNAADSSV PSAPRRQDSE
121 DHSSDMFNIE EYCTANAVTG PCRASFPWY FDVERNSCNN
161 FIYGGCRGNK NSYRSEEACM LRCFRQENP PLPLGSKVVV
201 LAGLFVMVLI LFLGASMVYL IRVARRNQER ALRTVWSSGD
241 DKEQLVKNTY VL

[0087]

인간 엘라핀에 대한 아미노산 서열을 NCBI 데이터베이스에서 수탁번호 1FLEI (gi: 1942680)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov를 참조하십시오. 이 서열은 다음과 같이 제공된다 (서열번호 :17)

1 AQEPVKGPPV TKPGSCPIIL IRCAMLNPPN RCLKDTDCPG
41 IKKCEGSCG MACFVPQ

[0089]

이러한 인간 엘라핀에 관련된 많은 아미노산 서열을 NCBI 데이터베이스에서 발견할 수 있다. 예를 들어, 인간 프로테아제 억제제 3(피부에서 도출)은 엘라핀과 관련이 있고, 수탁번호 NP 002629 (gi: 4505787)이다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov를 참조하십시오. 이 서열은 다음과 같이 제공된다 (서열번호 :18)

1 MRASSFLIVV VFLIAGTLVL EAAVTGVPVK GQDTVKGVPV
41 FNGQDPVKGQ VSVKGQDKVK AQEPVKGPPV TKPGSCPIIL
81 IRCAMLNPPN RCLKDTDCPG IKKCEGSCG MACFVPQ

[0091]

인간 엘라핀과 유사한 서열을 갖는 억제제의 다른 예는 수탁번호가 CAA11184(gi:2764786)인 소 비트라핀-2(bovine bTrappin-2)이다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov를 참조하십시오. 소 비트라핀-2 서열은 다음과 같이 제공된다 (서열번호 :19).

1 QEPVKGQDPV KGQDPVKGQD PVKGQDPVKD QNPVRGQEPV
41 KGQDPVKGQD PVKGQDPVKG QEPVKGQDPV KGQDPVKRQG
81 RIGGPLLTKP GSCPRVLRC AMMNPPNRCL RDAQCPGVKK
121 CCEGSCGKTC MDPQ

[0093]

본원 발명은 또한 조성물 및 방법에 메탈로프로티나제의 억제제의 사용을 예상한다. 많은 인간 메탈로프로티나제가 존재한다. 본원 발명은 인간 메탈로프로티나제의 임의의 억제제의 사용을 예상한다. 예를 들어, 메탈로

[0094]

프로티나제의 조직 억제제 (TIMPs) 같은 억제제가 본원 발명에서 이용될 수 있다. 인간 TIMP-1에 대한 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 P01033 (gi: 135850)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 TIMP-1에 대한 이 서열은 이하에 제공된다 (서열번호 : 20).

```
1 MAPFEPLASG ILLLLWLIAP SRACTCVPPH PQTAFCONS DL
41 VIRAKFVGTP EVNQTTLYQR YEIKMTKMYK GFQALGDAAD
81 IRFVYTPAME SVCGYFHRSH NRSEEFLLAG KLQDGLLHIT
121 TCSFVAPWNS LSLAQRRGFT KTYTVGCEEC TVFPCLSIPC
161 KLQSGTHCLW TDQLLQGSEK GFQSRHLACL PREPGLCTWQ
201 SLRSQIA
```

[0095]

인간 TIMP-2에 대한 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 NP 003246 (gi: 4507511)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 TIMP-2에 대한 이 서열은 이하에 제공된다 (서열번호 : 21).

```
1 MGAAARTLRL ALGLLLLATL LRPADACSCS PVHPQQAFCN
41 ADVVIRAKAV SEKEVDSGND IYGNPIKRIQ YEIKQIKMFK
81 GPEKDIEFTY TAPSSAVCGV SLDVGGKKEY LIAGKAEGDG
121 KMHTLCDFI VPWDTLSTTQ KKSLSNHR YQM GCECKITRCP
161 MIPCYISSPD ECLWMDWVTE KNINGHQAKF FACIKRSDGS
201 CAWYRGAAPP KQEFLDIEDP
```

[0097]

인간 TIMP 3에 대한 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 NP 000353 (gi: 4507513)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 TIMP 3에 대한 이 서열은 이하에 제공된다 (서열번호 : 22).

```
1 MTPWLGLIVL LGSWSLGDWG AEACTCSPSH PQDAFCNSDI
41 VIRAKVVGKK LVKEGPFGLT VYTIKQMKMY RGFTKMPHVQ
81 YHTEASESL CGLKLEVNKY QYLLTGRVYD GKMYTGLCNF
121 VERWDQLTSL QKGLNRYRYH LGCNCKIKSC YYLPCFVTSK
161 NECLWTDMLS NFGYPGYQSK HYACIRQKGG YCSWYRGWAP
201 PDKSIINATD P
```

[0099]

기타 인간 TIMPs 에 대한 서열 역시 공개적으로 입수할 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조.

[0100]

인간 분비 백혈구 프로테아제 억제제에 대한 아미노산 서열 역시 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 NP003055 (gi: 4507065)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 이 서열은 이하에 다음과 같이 제공된다 (서열번호 : 23).

```
1 MKSSGLFPFL VLLALGTLAP WAVEGSGKSF KAGVCPPKKS
41 AQCLRYKKPE CQSDWQCPGK KRCCPDTCGI KCLDPVDTPN
81 PTRRKPGKCP VTYGQCLMLN PPNFCEMDGQ CKRDLKCCMG
121 MCGKSCVSPV KA
```

[0102]

그러므로, 본원 발명은 본원 발명의 조성물 및 방법에서 이용할 수 있는 다양한 프로테아제 억제제를 제공한다.

[0103]

포스포리파아제 효소는 포스포글리세리드로부터 지방산 잔기(residue)의 제거를 촉진한다. 구체적으로, 포스포리파아제 A2 (PLA2)는 막 인지질의 글리세롤 부분(moiety)의 2 위치에서 에스테르 결합을 절단시켜 동 물의 아라키돈산 및 라이소인지질을 만든다. 비록 PLA2가 인지질로부터 아라키돈산을 선호적으로 절단하지만, 아라키돈산은 S1, 포스포리파아제 C- 및 포스포리파아제 D- 활성화된 경로의 중간체들로부터 2차적으로 생성된다. PLA2 억제제는 p-브로모펜아실 브로마이드같은 화학 분자를 포함한다. 다른 PLA2 억제제는 생물학적 분자, 예를 들면 크로탈러스(Crotalus) 포스포리파아제 A2 억제제 (CNF) (NCBI 수납 번호 gi: 501050; Fortes-Dias C L et al. 1994; J Biol Chem 269: 15646-51), 또는 리포코르틴 또는 아넥신 I (NCBI 수납 번호 gi: 71756; Wallner et al. , Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity, Nature 320 (6057), 77-81 (1986)), 또는 진균류에 의해 생성되는 티엘로신 A1 베타(Tanaka et al. (1995) Eur J Pharmacol 279: 143-8)를 포함한다. 비특이적 PLA2 억제제, 예를 들면 글루코코르티코이드 역시 이용될 수 있다. 본원 발명의 용도에 적절한 포스포리파아제 A₂ 억제제는 또한 LY311727 (Eli Lilly)를 포함한다.

[0105]

포르테-디아스(Fortes-Dias C L)등은 (1994; J Biol Chem 269: 15646-51) 남미 래틀스네이크(Crotalus durissus terrificus)의 혈장으로부터 PLA2 억제제를 분리하고 특성분석을 했다. CNF (Crotalus neutralizing

factor)로 명명된 이 20-24 kDa 단백질은 6-8 올리고머성 집합체(aggregate)로서 자기 회합성(self-associate)인 것으로 보인다. CNF가 중성화시키는 크로톡신 분자는 오직 이량체로서 활성을 가지며, PLA2의 염기성 이성체(isoform) (CB1 및 CB2) 중 하나와 회합된(associated) 산성 분자(CA)로 구성되어 있다. CNF는 CA를 실질적으로 대체하여 CB 분자 중 하나와 안정된 회합을 형성한다. 이러한 대체는 크로톡신의 신경독성(neurotoxic), 카르디오톡식(cardiotoxic), 미오톡식(myotoxic), 항응고(anticoagulant) 및 혈소판-활성화 활성을 불활성화시킨다.

[0106] CNF의 총길이 840 bp cDNA는 크로탈러스(Crotalus) 간 조직으로부터 클로닝된다. 뉴클레오티드 서열은 N157에서 가능한 글리코실화 위치 및 5.45의 pI, 16 시스테인으로 181 잔기 성숙 단백질 및 19 잔기 시그널 펩타이드를 인코딩한다. 포르테스-디아스는 비-코딩 서열을 함유하고, 추정(putative) 폴리아데닐화 위치가 부족한 cDNA를 언급했다. 억제성 분석에서, 산성 CNF 분자는 또한 벌독(bee venom)의 활성 및 췌장(pancreatic) PLA2를 혈장중 100배로 억제한다.

[0107] 프로테아제 억제제 및 리파아제 억제제에 더하여, 본원 발명의 조성물 및 방법은 항산화제를 이용할 수 있다. 염증은 많은 양의 수퍼옥사이드($O_2^{\bullet-}$) 및 과산화수소(H_2O_2)를 생성하는 다형핵(polymorphonuclear) 백혈구 및 대식세포(macrophage)를 자극할 수 있다 (Babior, B. M. et al. [1973] J Clin Invest 52: 741-744; Halliwell, B. et al. [1999] Free radicals in Biology and Medicine, Oxford N. Y.: Clarendon Press, Oxford University Press). 이러한 라디칼들의 해로운 효과는 철 존재 및 기타 반응성 중간체, 예를 들면 수산화 라디칼(OH^{\bullet})의 뒤이은 형성시 증폭될 수 있다.

[0108] 막-회합된 전자 이송 사슬 단백질인 NADPH 옥시다제는 염증 중 활성화되고, O_2 를 $O_2^{\bullet-}$ 로 직접 환원시킨다. 수퍼옥사이드는 이어서 수퍼옥사이드 불균등화효소(superoxide dismutase)에 의해 H_2O_2 로 불균등화될 수 있다. 수퍼옥사이드는 전이금속, 예를 들면 제2철(Fe^{3+})을 제1철(Fe^{2+})로 환원시킬 수 있다. 환원된 금속 이온은 이어서 H_2O_2 와 반응하여 매우 산화성인 OH^{\bullet} 라디칼을 생성할 수 있다. 히드록실 라디칼은 생체 중 몇몇 생분자(biomolecule)들에 심각한 손상을 야기하는 것으로 널리 주장되고 있다.

[0109] 그러한 산화성 물질에 의해 손상될 수 있는 생분자들에는 DNA, 단백질 및 막 지질을 포함한다. 산화된 DNA는 조각(fragment)날 수 있다. 산화된 단백질 및 막 지질은 기능이 감소되거나 변화될 수 있고, 파괴의 표적이 될 수 있다. 폐 조직에 대한 산화의 효과 및 산화된 생성물의 존재는 폐 조직을 수집하거나 또는 세정액(lavage)을 조사하여 감지할 수 있다. 예를 들어, 대조군 및 LPS-손상된 모델 동물의 폐 조직을 수집하여, 그런 산화된 생성물에 대해 시험할 수 있다. 본원에서 기술된 것처럼, 모델 동물(예를 들어, 토끼)에 박테리아성 당지질(LPS)를 기관내로 투여하여 폐염증을 일으키고, 시뮬레이션 할 수 있다.

[0110] 수집된 그러한 LPS-처리된 모델 동물들의 폐조직 및 세정액은 다양한 방법으로 분석할 수 있다. 예를 들어, DNA 손상은 DNA 분리물 또는 조직 시료 중 DNA 분자의 말단을 라벨링하여 평가할 수 있다. 조각난 DNA는 이어서 중요한 라벨이 조직 섹션의 세포핵에 존재하는지 여부 및 라벨된 저분자량 밴드가 폐 조직으로부터 분리된 라벨된 DNA의 전기 영동 후 감지되는 지 여부를 감지하여 관찰된다. 그러한 저분자량 DNA 밴드의 존재는 DNA가 조각난 것을 나타낸다. 밴드의 크기는 기지의 분자량의 DNA 마커(marker)와 비교하여 평가한다.

[0111] 모니터링 수 있는, 산화의 다른 생물학적 마커는 예를 들어 유리 철(free iron), 총 항산화제 상태(total antioxidant status), 8-이소프로스탄 (8-Iso-PGF₂α), 수퍼옥사이드 불균등화제 (SOD), 글루타티온 퍼옥시다제 (GPX), 글루타티온 수준, 락테이트 데하이드로게나제 (LDH), C-반응성 단백질, 지질 히드로퍼옥시다제 (LOOH), 미엘로퍼옥시다제, 인터루킨-6 (IL-6), 크레아틴 키나제 (CK), 디티로신 및 8-히드록시구아닌 또는 그들의 조합을 포함한다. 폐 막 중 불포화 인지질은 H_2O_2 에 노출시 과산화 변화(peroxidative change)를 겪을 수 있고, 이는 공액이중결합의 생성에 의해, 및 티오바르비투르산(TBA)-결합 물질의 전개에 의해, 역상 HPLC 중 아실 측쇄의 지방산 절단 조각, 라이소인지질의 출현에 의해 결정된다. 따라서, 세정액 중 라이소인지질, 티오바르비투르산-결합 물질, 공액이중결합 및 기타의 존재는 산화된 지질의 지시자로서 이용될 수 있다.

[0112] 폐 조직에의 산화의 효과를 감소시키기 위해, 본원발명의 조성물 및 방법에 항산화제를 도입할 수 있다. 적절한 항산화제는 카탈라아제, 글루타티온, N-아세틸시스테인, 프로시스테인, 로즈마리 잎 추출물, 알파-토코페롤, 2,4-디아미노피롤로-[2,3-d]피리미딘, 아스코르브산 및 카로테노이드 화합물, 예를 들면 류테인, 제아크산틴, 크립토크산틴, 비올라크산틴, 카로텐 디올, 히드록시카로텐, 히드록시리코펜, 알로크산틴 및 데히드로크립토크

산틴 및 그의 유도체를 포함한다. 예를 들어, 아스코르브산의 에스테르 유도체 및 카르테노이드 화합물의 에스테르 유도체, 예를 들면 루테인, 제아크산틴, 크립토크산틴, 비올라크산틴, 카로텐 디올, 히드록시카로텐, 히드록시리코펜, 알로크산틴 및 데히드로크립토크산틴이 본원 발명에서 이용될 수 있다.

[0113] 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 및 항산화제는 장관외, 폐, 정맥, 피내(intradermal), 피하(subcutaneous), 경구, 흡입, 경피(transdermal)(국소), 경점막(transmucosal), 진피하(subdermal), 피하, 경피, 또는 직장 경로를 비롯한 임의의 가능한 경로로 투여될 수 있다. 어떤 태양에서는, 본원 발명의 활성제는 폐전달에 의해 투여될 수 있지만, 그러나, 활성제의 폐전달과 커플링된 정맥 전달은 본 조성물의 유익한 효과를 증대시킬 수 있다.

[0114] 폐질환 증상의 치료에 적절하거나 또는 용화될 수 있는 것을 비롯한 기타 화합물이 본원발명의 이 조성물에 포함될 수 있다. 함께 투여될 수 있는 시약은 항알레르기제, 소염제, 항바이러스제, 항균제 및 항바이러스제를 비롯한 항미생물제, 항생제, 면역조절제, 조혈제(hematopoietic), 크산틴, 교감신경흥분제(sympathomimetic amines), 점액용해제(mucolytic), 코르티코스테로이드, 항히스타민제, 및 비타민을 포함한다. 다른 예로는 기관지확장제(bronchodilator), 예를 들면 알부테롤, 크소페넥스, 테부탈린, 살메테롤, 포르모테롤 및 그의 제약학적으로 허용가능한 염, 항콜린제(anticholinergic), 예를 들면 이프라트로피움 브로마이드, 소위 "비만 세포 안정화제(mast cell stabilizer)", 예를 들면 크로몰린 소듐 및 네도크로밀, 코르티코스테로이드, 예를 들면 플루티카손, 플루티카손, 베클로메타손, 부데소니드, 트리암시놀론 및 그의 염, 인터페론, 예를 들면 INF-알파, 베타 및 감마, 점액용해제, 예를 들면 N-아세틸시스테인 및 구아이페네신, 류코트리엔 길항제, 예를 들면 자피르루카스트 및 몬테루카스트, 포스포디에스테라제 IV 억제제, 항생제, 예를 들면 아미카신, 겐타마이신, 콜리스틴, 프로테그린, 데펜신 및 토브라마이신, 항바이러스제, 예를 들면 리바비린, RSV 모노클로날 항체, VP14637, 항결핵제(antitubercular agent), 예를 들면 이소니아지드, 리팜핀 및 에탐부톨 및 항균제, 예를 들면 암포테레신 B를 포함한다.

[0115] 폐 계면활성제 폴리펩타이드

[0116] 계면활성제 폴리펩타이드는 교호로 대전된(charge) 및 대전되지 않은(uncharged) 아미노산 잔기 영역을 갖는 아미노산 잔기 서열을 포함하는 폴리펩타이드다. 교호로 소수성 및 친수성 아미노산 잔기 영역을 갖는 아미노산 잔기 서열을 포함하는 폴리펩타이드 역시 본원 발명에 바람직하다. 이러한 그룹 중 특히 바람직한 계면활성제 폴리펩타이드는 약 4개 이상, 더욱 바람직하게는 약 8개 이상, 더더욱 바람직하게는 약 10개 이상의 아미노산 잔기를 갖는 것에 더욱 특징이 있고, 비록 더 길고 심지어 완전한 길이의 천연 폐 계면활성제 단백질 역시 예상되지만, 일반적으로 길이로 약 60개 미만의 아미노산 잔기이다.

[0117] 바람직하게, 본원 발명의 계면활성제 폴리펩타이드는 하기 식에 의해 표시되는 것처럼 대전된 아미노산 잔기 및 대전되지 않은 아미노산 잔기의 교호 그룹으로 구성된다: [(대전된 것)_a(대전되지 않은 것)_b]_c(대전된 것)_d, 여기서, "a"는 약 1 내지 약 5의 평균값을 가지며; "b"는 약 3 내지 약 20의 평균값을 가지며; "c"는 1 내지 10이고; "d"는 0 내지 3이다. 유기 계면활성제 분자는 아미노산 잔기만을 포함하지 않고, 바람직하게는 대전된 및 대전되지 않은 (또는 친수성/소수성) 구성 분자의 교호 그룹으로 이루어진 유사한 구조를 바람직하게 갖는다.

[0118] 당업자에게 알려진 것처럼, 아미노산은 아미노산 측쇄의 화학적 및 물리적 성질에 주로 의존하여 다른 분류로 나뉠 수 있다. 예를 들어, 일부 아미노산은 일반적으로 대전된, 친수성 또는 극성 아미노산으로 간주되고, 나머지 대전되지 않은 소수성 또는 비극성 아미노산으로 간주된다. 극성 아미노산은 산성, 염기성 또는 친수성 측쇄를 갖는 아미노산을 포함하며, 비극성 아미노산은 방향족 또는 소수성 측쇄를 갖는 아미노산을 포함한다. 비극성 아미노산은 다른 것 중 지방족 아미노산을 포함하는 것으로 더 세분될 수 있다. 본원에서 사용되는 아미노산의 분류의 정의는 이하와 같다:

[0119] "비극성 아미노산"은 생리학적 pH에서 대전되지 않은 측쇄를 갖는 아미노산으로, 비극성이고, 일반적으로 수용액에 의해 배척된다. 유전학적으로 인코딩된 소수성 아미노산의 예는 알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 티로신 및 발린을 포함한다. 어떤 태양에서는, 시스테인이 비극성 아미노산이다. 비-유전학적으로 인코딩된 비극성 아미노산의 예는 t-BuA, Cha, 노르류신, 및(또는) α-아미노지방족 카르복실산, 예를 들면 아미노부탄산, α-아미노펜탄산, α-아미노-2-메틸프로판산 또는 α-아미노헥산산을 포함한다.

[0120] "방향족 아미노산"은 공액 π-전자계를 갖는 적어도 한개의 고리(방향족기)를 함유하는 측쇄를 갖는 비극성 아미노산을 말한다. 방향족기는 치환기 예를 들면, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 히드록실, 술폰닐, 니트로 및 아미노

기 및 기타로 더 치환될 수 있다. 유전학적으로 인코딩된 방향족 아미노산의 예는 페닐알라민, 티로신 및 트립토판을 포함한다. 통상적으로 접하는 비-유전학적으로 인코딩된 방향족 아미노산은 페닐글리신, 2-나프틸알라닌, β -2-티에닐알라닌, 1,2,3,4-테트리히드로이소퀴놀린-3-카르복실산, 4-클로로페닐알라닌, 2-플루오로페닐알라닌, 3-플루오로페닐알라닌 및 4-플루오로페닐알라닌을 포함한다.

[0121] "지방족 아미노산"은 포화 또는 불포화의 직쇄, 분지 또는 환형 탄화수소 측쇄를 갖는 비극성의, 대전되지 않은 아미노산을 말한다. 유전적으로 인코딩된 지방족 아미노산의 예는 Ala, Leu, Val 및 Ile를 포함한다. 비-코딩된 지방족 아미노산의 예는 Nle를 포함한다.

[0122] "극성 아미노산"은 생리학적 pH에서 대전된 또는 대전되지 않은 측쇄를 갖는 친수성 아미노산을 말하며, 전자쌍이 두 원자에 의해 공통으로 공유되는 결합이 전자 중 하나에 의해 더욱 가깝게 유지되는 결합을 갖는다. 극성 아미노산은 일반적으로 친수성이며, 수용액에 의해 이끌리는 측쇄를 갖는 아미노산을 갖는다는 것을 의미한다. 유전적으로 인코딩된 극성 아미노산의 예는 아스파라긴, 글루타민, 라이신 및 세린을 포함한다. 어떤 태양에서는, 시스테인은 극성 아미노산이다. 비-유전적으로 인코딩된 극성 아미노산의 예는 시트룰린, 호모시스테인, N-아세틸 라이신 및 메티오닌 술폭시드를 포함한다.

[0123] "산성 아미노산"은 7 보다 작은 측쇄 pK 값을 갖는 친수성 아미노산을 말한다. 산성 아미노산은 전형적으로 수소 이온의 손실때문에, 생리학적 pH에서 음으로 대전된 측쇄를 갖는다. 유전적으로 인코딩된 산성 아미노산의 예는 아스파르트산 (아스파르테이트) 및 글루탐산 (글루타메이트)를 포함한다.

[0124] "염기성 아미노산"은 7 보다 큰 측쇄 pK값을 갖는 친수성 아미노산을 말한다. 염기성 아미노산은 전형적으로 히드로늄 이온과의 회합때문에, 생리학적 pH에서 양으로 대전된 측쇄를 갖는다. 유전적으로 인코딩된 염기성 아미노산의 예는 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 비유전적으로 인코딩된 염기성 아미노산의 예는 비환형 아미노산 오르니틴, 2,3-디아미노프로피온산, 2,4-디아미노부티르산 및 호모아르기닌을 포함한다.

[0125] "이온화가능한 아미노산" 또는 "대전된 아미노산"은 생리학적 pH에서 대전될 수 있는 아미노산을 말한다. 그러한 이온화가능한 또는 대전된 아미노산은 산성 및 염기성 아미노산, 예를 들어, D-아스파르트산, D- 글루탐산, D-히스티딘, D-아르기닌, D-라이신, D-히드록시라이신, D-오르니틴, D- 3-히드록시프롤린, L-아스파르트산, L-글루탐산, L-히스티딘, L-아르기닌, L- 라이신, L-히드록시라이신, L-오르니틴 또는 L-3-히드록시프롤린을 포함한다.

[0126] 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 상기 분류는 절대적인 것이 아니다. 몇몇 아미노산은 하나 이상의 특징적 성질을 보이고, 따라서 하나 이상의 카테고리에 포함될 수 있다. 예를 들어, 티로신은 비극성 방향족 고리 및 극성 히드록실기 모두를 갖는다. 따라서, 티로신은 비극성, 방향족 및 극성으로 기술될 수 있는 몇몇 특징을 갖는다. 그러나, 비극성 고리가 지배적이므로, 티로신은 일반적으로 비극성으로 생각된다. 유사하게, 시스테인은 디설피드 결합을 형성할 수 있는 능력과 함께 비극성 특징을 가졌다. 따라서, 소수성 또는 비극성 아미노산으로 엄격히 분류되지 않지만, 많은 경우에 시스테인은 펩타이드에 소수성 또는 비극성을 주는 것으로 이용될 수 있다.

[0127] 상기 기술한 유전학적으로 인코딩 및 비-코딩된 아미노의 분류는 단지 예시적 목적일 뿐, 본원에서 기술한 펩테면활성제 폴리펩타이드를 포함할 수 있는 아미노산 잔기의 철저한 리스트를 위한 목적이 아니다. 본원에서 기술한 펩테면활성제 폴리펩타이드를 만드는 데 유용한 다른 아미노산 잔기는 예를 들어 문헌[Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Inc.] 및 거기에서 인용한 문헌들에서 찾을 수 있다. 아미노산 잔기의 다른 공급원은 RSP Amino Acids Analogues, Inc의 웹사이트(www.amino-acids.com)에서 제공될 수 있다. 본원에서 구체적으로 언급되지 않은 아미노산은 구체적으로 확인된 아미노산과 비교하여, 그들의 거동 및 그들의 특징적인 화학적 및(또는) 물리적 성질에 기초하여 상기 기술된 카테고리로 알맞게 분류될 수 있다.

[0128] 어떤 태양에서는, 계면활성제 폴리펩타이드는 이하의 식으로 표현되는 아미노산 잔기의 교호 그룹을 갖는 서열을 포함한다: $(Z_a U_b)_c Z_d$, 여기서 Z 는 대전된 아미노산이며, U 는 비대전된 아미노산이며; "a"는 약 1 내지 약 5의 평균값을 갖고; "b"는 약 3 내지 약 20의 평균값을 갖고; "c"는 1 내지 10이며; "d"는 0 내지 3이다. 어떤 태양에서는, Z 는 히스티딘, 라이신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및(또는) 3-히드록시프롤린이고, U 는 발린, 이소류신, 류신, 시스테인, 티로신, 페닐알라닌, 및(또는) α -아미노지방족 카르복실산, 예를 들면 α -아미노부탄산, α -아미노펜탄산, α -아미노-2-메틸프로판산 또는 α -아미노헥산산이다.

- [0129] 다른 실시태양에서, 본원 발명의 바람직한 폴리펩타이드는 이하의 식으로 표현되는 아미노산 잔기의 교호 그룹을 갖는다: $(B_a U_b)_c B_d$, 여기서 B는 H, 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및 3-히드록시프롤린으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 아미노산 잔기이며; U는 V, I, L, C, Y, 및 F로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 아미노산 잔기이다. 한 바람직한 변형에서, B는 콜라겐으로부터 유도된 아미노산이고, 바람직하게 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및 3-히드록시프롤린으로 이루어진 군으로부터 선택되며; "a"는 약 1 내지 약 5의 평균값을 가지고; "b"는 약 3 내지 약 20의 평균값을 가지고; "c"는 1 내지 10이고; "d"는 0 내지 3이다.
- [0130] 또 다른 실시태양에서, 본원 발명의 계면활성제 폴리펩타이드는 이하의 식으로 표현되는 아미노산 잔기의 교호 그룹을 갖는 서열을 포함한다: $(B_a J_b)_c B_d$, 여기서 B는 히스티딘, 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및 3-히드록시프롤린으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 아미노산 잔기이며; J는 α -아미노지방족 카르복실산이며; "a"는 약 1 내지 약 5의 평균값을 가지고; "b"는 약 3 내지 약 20의 평균값을 가지고; "c"는 1 내지 10이고; "d"는 0 내지 3이다.
- [0131] 관련된 식에 "J"를 갖는 다양한 실시태양에서, J는 4 내지 6개의 탄소 (4개 및 6개를 포함함)를 갖는 α -아미노지방족카르복실산이다. 다른 바람직한 변형에서 J는 α -아미노부탄산, α -아미노펜탄산, α -아미노-2-메틸프로판산 및 α -아미노헥산산으로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택된다..
- [0132] 다른 실시태양은 이하의 식으로 표현되는 아미노산 잔기의 교호 그룹을 갖는 서열을 포함하는 계면활성제 폴리펩타이드를 포함한다: $(Z_a U_b)_c Z_d$, 여기서 Z는 R, D, E, 및 K로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 아미노산 잔기이며; U는 V, I, L, C, Y 및 F로 이루어진 군으로부터, V, I, L, C 및 F로 이루어진 군으로부터, 또는 L 및 C로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 아미노산 잔기이며; "a"는 약 1 내지 약 5의 평균값을 가지고; "b"는 약 3 내지 약 20의 평균값을 가지고; "c"는 1 내지 10이고; "d"는 0 내지 3이다.
- [0133] 상기 식에서, Z 및 U, Z 및 J, D 및 U, 및 B 및 J는 각 경우에서 독립적으로 선택되는 아미노산 잔기이다. 게다가, 상기 언급한 식 각각에서, "a"는 일반적으로 약 1 내지 약 5의 평균값을 가지고; "b"는 일반적으로 약 3 내지 약 20의 평균값을 가지고; "c"는 1 내지 10이고; "d"는 0 내지 3이다.
- [0134] 상기 실시태양의 한 변형에서, Z 및 B는 대전된 아미노산 잔기이다. 다른 바람직한 실시태양에서, Z 및 B는 친수성 또는 양으로 대전된 아미노산 잔기이다. 한 변형에서, Z는 R, D, E 및 K로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택된다. 관련된 실시태양에서, Z는 R 및 K로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택된다. 또 다른 바람직한 실시태양에서, B는 H, 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및 3-히드록시프롤린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 바람직한 실시태양에서, B는 H이다. 다른 바람직한 실시태양에서, B는 콜라겐 구성성분 아미노산 잔기이고, 5-히드록시라이신, (δ -히드록시라이신), 4-히드록시프롤린, 및 3-히드록시프롤린으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0135] 다양하게 개시된 실시태양에서, U 및 J는 바람직하게 비대전된 아미노산 잔기이다. 다른 바람직한 실시태양에서, U 및 J는 소수성 아미노산 잔기이다. 한 실시태양에서, U는 V, I, L, C, Y, 및 F로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택된다. 다른 바람직한 실시태양에서, U는 V, I, L, C, 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 바람직한 실시태양에서, U는 L 및 C로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 바람직한 실시태양에서, U는 L이다.
- [0136] 유사하게, 다양한 실시태양에서, B는 H, 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및 3-히드록시프롤린으로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택된 아미노산이다. 선택적으로, B는 5-히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, 및 3-히드록시프롤린을 포함하는 콜라겐-유도된 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0137] 본원 발명의 다른 실시태양에서, 대전된 및 비대전된 아미노산은 개질된 아미노산의 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 한 바람직한 실시태양에서, 대전된 아미노산은 시트룰린, 호모아르기닌, 또는 오르니틴으로 이루어진 군으로부터 선택되어 일부 실시예에서 지명된다. 유사하게, 다양한 바람직한 실시태양에서, 비대전된 아미노산은 α -아미노부탄산, α -아미노펜탄산, α -아미노-2-메틸프로판산 및 α -아미노헥산산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0138] 본원 발명의 바람직한 실시태양에서, 표식 "a", "b", "c" 및 "d"는 대전된 또는 비대전된 잔기 (또는 친수성 또는 소수성 잔기)의 수를 나타낸다. 다양한 실시태양에서, "a"는 약 1 내지 약 5, 바람직하게는 약 1 내지 약 3, 더욱 바람직하게는 약 1 내지 약 2, 더더욱 바람직하게는 1의 평균값을 갖는다.

- [0139] 다양한 실시태양에서, "b"는 약 3 내지 약 20, 바람직하게는 약 3 내지 약 12, 더욱 바람직하게는 약 3 내지 약 10, 더더욱 바람직하게는 약 4-8 범위의 평균값을 갖는다. 한 바람직한 실시태양에서 "b"는 약 4이다.
- [0140] 다양한 실시태양에서, "c"는 1 내지 10, 바람직하게는 2 내지 10, 더욱 바람직하게는 3-8 또는 4-8의 범위, 더더욱 바람직하게는 3 내지 6이다. 한 바람직한 실시태양에서, "c"는 약 4이다.
- [0141] 다양한 실시태양에서, "d"는 0 내지 3 또는 1 내지 3이다. 한 바람직한 실시태양에서, "d"는 0 내지 2 또는 1 내지 2이며; 다른 바람직한 실시태양에서, "d"는 1이다.
- [0142] 아미노산 잔기-- 예를 들어, Z 또는 U로 표현되는 잔기--가 독립적으로 선택된다고 하는 것은, 각 경우에, 특정된 군으로부터 잔기가 선택된다는 것을 의미하는 것이다. 즉, "a"가 2일 때, 예를 들면, Z로 표현되는 친수성 잔기 각각은 독립적으로 선택될 것이고, 따라서, RR, RD, RE, RK, DR, DD, DE, DK, 등등을 포함할 수 있다. "a" 및 "b"가 평균값을 갖는다고 하는 것은 비록 반복 서열(예를 들면, Z_aU_b) 중 잔기의 수가 펩타이드 서열 중 약간 변화할 수가 있지만, "a" 및 "b"의 평균값은 각각 약 1 내지 약 5, 및 약 3 내지 약 20임을 의미하는 것이다.
- [0143] 예를 들어, 이하의 표 1의 "KL8"로 지적된 펩타이드에 대한 식 $(Z_aU_b)_cZ_d$ 을 사용하면, 식이 $K_1L_8K_1L_8K_1L_2$ 로 다시 쓰여질 수 있다(여기서, "b"의 평균값은 6이고 [즉, $(8+8+2)/3 = 6$], "c"는 3이고, "d"는 0이다). 상기 식의 예시적인 바람직한 폴리펩타이드를 하기 표 1에 보였다:

표 1

표기 ¹	서열 번호	아미노산 잔기 서열
KL4	1	KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK
KL8	2	KLLLLLLLLKLLLLLLLLKLL
KL7	3	KKLLLLLLLLKKLLLLLLLLKKL
DL4	4	DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD
RL4	5	RLLLLRLLLLRLLLLRLLLLR
RL8	6	RLLLLLLLLRLLLLLLLLLRLL
RL7	7	RLLLLLLLLRRLLLLLLLLRRL
RCL1	8	RLLLCLLLRLLLLCLLL
RCL2	9	RLLLCLLLRLLLLCLLLRL
RCL3	10	RLLLCLLLRLLLLCLLLRLLLLCLL
		R
HL4	13	HLLLLHLLLLHLLLLHLLLLH

¹ 본 표기는 지시된 아미노산 잔기 서열에 대한 약칭임

- [0144]
- [0145] 허파파리와외의 상호작용을 최대화하는 배열(configuration)을 갖는 약 4 내지 60 아미노산 잔기의 복합체(composite) 폴리펩타이드 역시 적절하다. 복합체 폴리펩타이드는 본질적으로 아미노 말단 서열 및 카르복시 말단 서열로 이루어진다. 아미노 말단 서열은 상기 식에서 정의된 것같은, 본 발명의 소수성 펩타이드 또는 소수성 영역 폴리펩타이드의 아미노산 서열을, 바람직하게는 소수성 폴리펩타이드를 갖는다. 카르복시 말단 서열은 대상 카르복시 말단 펩타이드의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0146] 천연 계면활성제 단백질(SP)의 그것과 유사한 특징을 갖거나, 그로부터 유도된 단백질 및 폴리펩타이드는 본 발명에 유용하다. 언급한 바와 같이, 비록 소(bovine), 돼지(porcine) 및 인간 계면활성제가 특히 바람직하지만, 임의의 포유류 종으로부터 분리된 SP가 이용될 수 있다.
- [0147] 천연 계면활성제 단백질은 SP-A, SP-B, SP-C 또는 SP-D, 또는 그들의 조각을 단독 또는 지질과 복합으로 포함한다. 바람직한 조각은 SP-B의 아미노-말단 잔기 1-25이다.
- [0148] 그러한 천연 계면활성제 단백질과 연관된 많은 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 인간 폐 계면활성제 회합 단백질 A1의 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 NP_005402 (gi: 13346504)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 SP-A1의 이 서열은 이하에 제공된다 (서열번호 : 25).

1 MWLCPLALNL ILMAASGAVC EVKDVCVGSP GIPGTPGSHG
41 LPGRHGRDGL KGDLP GPPGPM GPPGEMPCPP GNDGLPGAPG
81 IPGECGEKGE PGERGPPGLR AHLDEELQAT LHD FRHQLQ
121 TRGALSLQGS IMTVGEKVFS SNGQSITFDA IQEACARAGG
161 RIAVPRNP EE NEAIA SFVKK YNTYAYVGLT EGPSPGDFRY
201 SDGTPVNYTN WYRGEPAGRG KEQCVEMYTD GQW NDRNCLY
241 SRLTICEF

[0149]

[0150]

인간 페 계면활성제 회합 단백질 A2의 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 NP 008857 (gi: 13346506)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 SP-A2의 이 서열은 이하에 제공된다(서열번호 : 26).

1 MWLCPLALNL ILMAASGAAC EVKDV CVGSP GIPGTPGSHG
41 LPGRDGRDGV KGD P GPPGPM GPPGETPCPP GNGLPGAPG
81 VPGERGEKGE AGERGPPGLP AHLDEELQAT LHD FRHQLQ
121 TRGALSLQGS IMTVGEKVFS SNGQSITFDA IQEACARAGG
161 RIAVPRNP EE NEAIA SFVKK YNTYAYVGLT EGPSPGDFRY
201 SDGTPVNYTN WYRGEPAGRG KEQCVEMYTD GQW NDRNCLY
241 SRLTICDF

[0151]

[0152]

인간 페 계면활성제 회합 단백질 B의 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 NP 000533 (gi: 4506905)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 SP-B의 이 서열은 이하에 제공된다 (서열번호 : 27).

1 MAESHLQWL LLLLPTLCGP GTAAWTSSL ACAQGPEFWC
41 QSLEQALQCR ALGHCLQEVW GHVGADDLCQ ECEDIVHILN
81 KMAKEAIFQD TMRKFLEQEC NVLPLKLLMP QCNQVLD D YF
121 PLVIDYFQNQ IDSNGICMHL GLCKSRQPEP EQEPGMSDPL
161 PKPLRDPLPD PLLDKLVLPV LPGALQARPG PHTQDLSEQQ
201 FPIPLPYCWL CRALIKRIQA MIPKGALRVA VAQVCRV VPL
241 VAGGICQCLA ERYSVLLDT LLGRMLPQLV CRLVLRCSMD
281 DSAGPRSP TG EWLPRDSECH LCMSVTTQAG NSSEQAIPQA
321 MLQACVGSWL DREKCKQFVE QHTPQLTLV PRGWD AHTTC
361 QALGVC GTMS SPLQCIHSPD L

[0153]

[0154]

또한, 인간 SP18 (SP-B) 계면활성제 단백질은 본원에서 기술된 것처럼 이용될 수 있다. 예를 들면 미국특허 제5,407,914호, 제5,260,273호 및 제5,164,369호 참조하며, 그의 개시내용을 본원에서 인용문헌으로 포함한다.

[0155]

인간 페 계면활성제 회합 단백질 C의 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 P11686 (gi: 131425)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 SP-C의 이 서열은 이하에 제공된다(서열번호 : 28).

1 MDVGSKEVLM ESPPDYSAAP RGRFGIPCCP VHLKRLLIVV
41 VVVVLLIVVVI VGALLMGLHM SQKHEMVLE MSIGAPEAQQ
81 RLALSEHLVT TATFSIGSTG LVVYDYQQL IAYKPAPGTC
121 CYIMKIAPES IPSLEALNRK VHNFM E C S L QAKPAVPTSK
161 LGQAEGRDAG SAPSGDPAF LGMAVNTLCG EVPLYYI

[0156]

[0157]

인간 페 계면활성제 회합 단백질 D의 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수납 번호 P50404 (gi: 1709879)로 찾을 수 있다. 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov 참조. 인간 SP-D의 이 서열은 이하에 제공된다(서열번호 : 29).

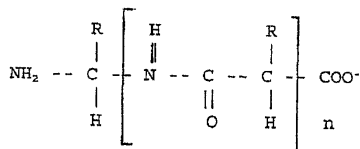
1 MLPFLSMLVL LVQPLGNLGA EMKSLSQRSV PNTCTLVMCS
41 PTENGLPGRD GRDGREGPRG EKGDPLPGP MGLSGLQGPT
81 GPVGPKGENG SAGEPGPKGE RGLSGPPGLP GIPGPAGKEG
121 PSGKQGNIGP QGKPGPKGEA GPKGEVGAPG MQGSTGAKGS
161 TGPKGERGAP GVQGAPGNAG AAGPAGPAGP QGAPGSRGPP
201 GLKGDRGVPG DRGIKGESGL PDSAALRQQM EALKGKLQRL
241 EVAFSHYQKA ALFPDGRSVG DKIFRTADSE KPFEDAQEMC
281 KQAGGQLASP RSATENAAIQ QLITAHNKA A FLSMTDVGTE
321 GKFTYPTGEP LVYSNWAPGE PNNNGGAENC VEIFTNGQWN
361 DKACGEQRLV ICEF

[0158]

- [0159] 연관된 펩타이드는 서열, 숙시닐-Leu-Leu-Glu-Lys-Leu-Leu-Gln-Trp-Lys-아미드 (서열번호 : 30)을 갖는 WMAP-10 펩타이드 (Marion Merrell Dow Research Institute)이다. 별법의 펩타이드는 본원에서 기술한 인지질의 혼합물 중 계면 장력의 강하를 유도하는 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘의 중합체이다.
- [0160] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 0 보다 작은, 바람직하게는 -1 이하의, 더욱 바람직하게는 -2 이하의 복합체 소수성(hydrophobicity)을 갖는 아미노산 잔기 서열이다. 펩타이드에 대한 복합체 소수성 값의 결정은 당 분야에 알려져 있다. 미국특허 제6,013,619호 참조하며, 이의 개시내용을 본원에서 인용문헌으로 포함한다. 이러한 소수성 폴리펩타이드는 SP18의 소수성 영역의 기능을 한다. 따라서, 한 바람직한 실시태양에서, 아미노산 서열은 SP18의 대전된 및 비대전된, 또는 소수성 또는 친수성 잔기의 패턴을 흉내낸다.
- [0161] 그러나, 본 발명의 폴리펩타이드 및 다른 계면활성제 분자들이 천연 SP-B (SP 18)의 그것과 유사한 서열을 갖는 분자로 한정되는 것이 아니다. 반대로, 본원 발명의 가장 바람직한 계면활성제 분자의 일부는 그들이 유사한 계면활성제 활성 및 교호하는 대전된/비대전된 (또는 소수성/친수성) 잔기 서열을 갖는다는 점을 제외하면, 구체적인 아미노산 잔기 서열에 있어 SP18과 거의 닮지 않았다.
- [0162] 본 발명의 한 개시된 실시태양은 염기성 극성 라이신(K)잔기에 의해 바운드된, 4개의 소수성 류신(L) 잔기의 반복단위로 이루어진 인간 SP-B와 유사한 21-잔기 펩타이드, 펩타이드-함유 조제(preparation)를 포함한다. 본원에서 "KL₄"로 약칭되는 이 예시적 펩타이드는 이하의 아미노산 잔기 서열을 갖는다:
- [0163] KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (서열번호 1).
- [0164] 한 바람직한 실시태양에서, KL₄는 인지질 디팔미토일 포르파티딜콜린 및 팔미토일-올레오일포르파티딜 글리세롤 (3:1) 및 팔미트산과 복합되며, 인지질-펩타이드 수 분산액은 "KL₄-계면활성제"로 명명되고, 일반적으로 그런 방법으로 본원발명에서 언급된다. KL₄-계면활성제는 Model surfactant mixture이라는 이름으로 시판 중이다. 다양한 실험 및 임상 연구에서 KL₄-계면활성제의 효능은 이미 보고되었다. 예를 들면 문헌[Cochrane et al., *Science*, 254: 566-568 (1991); Vincent et al., *Biochemistry*, 30: 8395-8401 (1991); Cochrane et al., *Am J Resp & Crit Care Med*, 152: 404-410 (1996); 및 Revak et al., *Ped. Res.*, 39: 715-724 (1996)] 참조.
- [0165] 본 발명의 다양한 실시태양에서, 폴리펩타이드: 인지질 중량비는 약 1:5 내지 약 1:10,000, 바람직하게 약 1:7 내지 약 1:5,000, 더욱 바람직하게 약 1:10 내지 약 1:1,000, 및 가장 바람직하게 약 1:15 내지 약 1:100의 범위이다. 특히 바람직한 실시태양에서, 폴리펩타이드: 인지질 중량비는 약 1:37이다.
- [0166] 본원 발명에 따른 담체 계면활성제 조성물의 제조에 적절한 합성 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 분야의 당업자에게 알려진 기술에 의해 아미노산으로부터 합성될 수 있다. 가용한 많은 기술의 뛰어난 요약은 문헌[J. M. Steward and J. D. Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1969]에서, 고체상 펩타이드 합성에 대해서는 문헌[J. Meienhofer, HORMONAL PROTEINS AND PEPTIDES, Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983], 전통 액상 합성에 대해서는 문헌[E. Schroder and K. Kubke, THE PEPTIDES, Vol. 1, Academic Press (New York), 1965]에서 찾을 수 있다.
- [0167] 일반적으로, 이러한 방법은 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 적절히 보호된 아미노산 잔기를 연이어 첨가하여 펩타이드 사슬을 키우는 것을 포함한다. 보통, 제1 아미노산 잔기의 아미노 또는 카르복실기는 적절히, 선택적으로 제거가능한 보호기로 보호된다. 그리고, 선택적으로 제거가능한 보호기는 반응성 측기를 함유하는 아미노산(예를 들면, 라이신)을 위해 이용된다.
- [0168] 실시예 1은 계면활성제 펩타이드의 고체상 합성을 설명한다. 간단하게, 보호되거나 유도된 아미노산을 비보호된 카르복실 또는 아미노기를 통해 불활성 고체 지지체에 부착시킨다. 아미노 또는 카르복실기의 보호기는 이어서 선택적으로 제거되고, 적절하게 보호된 상보성(complementary) (아미노 또는 카르복실)기를 갖는 서열로 다음 아미노산과 혼합하고, 고체 지지체에 이미 부착된 잔기와 아미드 결합을 형성하기에 적절한 조건하에서 반응시킨다. 이어서, 새로 추가된 아미노산 잔기로부터 아미노 또는 카르복실기의 보호기를 제거하고, 다음 아미노산 (적절히 보호된)을 첨가하고, 이어서 이와 같이 계속한다. 모든 원하는 아미노산이 적절한 서열로 연결된 후, 임의의 남은 말단 및 측기 보호기 (및 고체 지지체를) 연이어서 또는 동시에 제거하여, 최종 폴리펩타이드를 얻는다. 이어서 폴리펩타이드를 저급 지방 알코올에 녹여 세정하고 건조시킨다. 건조된 계면활성제 폴리펩타이드를 필요하면 기지의 기술을 이용하여 더 정제할 수 있다.

[0169] 본 발명의 계면활성제 단백질 및 폴리펩타이드는 또한 제조할 DNA 기술에 따라 제조할 수도 있다. 식물 또는 동물 숙주로부터 단백질 분자를 유도하는 과정은 이 분야에 일반적으로 알려져 있다. 문헌[Jobe et al., Am. Rev. Resp. Dis., 136: 1032 (1987); Glasser et al., J. Biol. Chem., 263: 10326, (1988)] 참조. 일반적으로, 적절한 프로모터 및(또는) 시그널 펩타이드 조절하에서 단백질 또는 폴리펩타이드를 인코딩하는 유전자 서열을 숙주 세포의 트랜스팩트를 위해 벡터 또는 플라스미드 내에 삽입한다. 발현된 단백질/폴리펩타이드는 세포 배지로부터 분리시킬 수 있다.

[0170] 비록 본원에 개시된 많은 유용한 폴리펩타이드, 예를 들면, KL₄ 폴리펩타이드 (서열번호 : 1)가 펩타이드 결합을 통해 연결된 "L"형태의 천연적으로 발생하는 아미노산을 포함하는 것을 이해할 수 있지만, 아미노산 측쇄 유사체, 비-아미드 연결(예를 들면, 백본을 다르게 한 것)을 비롯한 분자들 역시 충분한 계면활성제 활성을 보일 수 있고, 또한, 다른 장점을 가질 수 있음을 또한 이해해야 한다. 예를 들면, 만약 쉽게 분해되지 않는 분자(예를 들면 계면활성제 조성물에 사용하기 위해)를 구성하는 것을 원하면, 일련의 D-아미노산을 포함하는 폴리펩타이드 분자를 합성하기를 바랄 수 있다. "역전" 골격을 통해 연결된 일련의 아미노산을 포함하는 분자, 즉, 카르복실 말단에서 아미노 말단으로의 역방향으로 구성된 내부 아미드 결합을 갖는 분자, 역시 분해되기 더욱 힘들고, 따라서, 본원에서 기술한 바와 같이 다양한 응용분야에서 유용할 수 있다. 예를 들어, 이하의 설명은 골격 중 "역전" 결합을 갖는 예시적 분자를 설명한다:



[0171] 다른 변형에서, 일부는 더욱 "강직한(rigid)" 배좌(conformation)를 받아들이는 분자를 구성하기를 바랄 수도 있다; 이것을 달성하는 한 수단은 아미노산의 탄소원자에 메틸 또는 기타 기를 추가하는 것일 것이다.

[0173] 상기에서 언급한 것처럼, CH₃기 이외의 다른 기들이 탄소 원자에 추가될 수 있다. 즉, 본원 발명의 계면활성제 분자는 α탄소에만 CH₃를 도입하는 것에 한정되지 않는다. 예를 들어, 상기 기술된 분자 및 측쇄의 임의의 것이 α탄소 요소의 표시된 CH₃로 치환될 수 있다.

[0174] 본원에서 사용된, 폴리펩타이드 및 아미노산 잔기의 "유사체" 및 "유도체"라는 용어는 "천연적으로 발생한" L-형 아미노산으로 불리우는 것 중 보통 발견되는 것과 다른 연결, 골격, 측쇄 또는 측기를 포함하는 분자 뿐만 아니라 아미노산의 대사 산물 및 이화 생성물을 포함하는 것을 의도한다("유사체" 및 "유도체"는 또한 본원에서 편의상 서로 교환가능하게 사용된다). 따라서, D-아미노산, "디자인된" 측쇄를 갖는 아미노산 및 유사한 아미노산 분자들 (즉, 계면활성제 활성을 갖는 분자 중 하나 이상의 아미노산에 대해 치환될 수 있는 것) 역시 본원에서 "유사체" 및 "유도체"라는 용어에 의해 포함된다.

[0175] 하나 이상 연장되거나 또는 치환된 R 또는 R'기를 갖는 아미노산을 포함하는, 유용한 계면활성제 분자들의 넓은 구분 또한 본원 발명에 의해 예상된다. 또한, 당업자들은 개별적 아미노산, 연결 및(또는) 사슬 자체에 다양한 변화를 할 수 있다는 개시로부터, 얻은 분자가 본원에서 기술한 계면활성제 활성을 갖는 한, 그러한 변화가 본원 발명의 범위 내에 포함되는 분자들을 만들 것임을 이해할 것이다.

[0176] 본 조성물은 다른 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원 발명의 계면활성제 혼합물은 (i) 인지질 50-95 건조 중량%, (ii) 폐의 표면 안쪽 층(lining layer)로의 인지질의 도입을 증진시키기에 효과적인 산포제 2-25 건조 중량%, 및 (iii) 폐-계면활성제 폴리펩타이드 0.1 내지 10 건조 중량%를 포함할 수 있다. 상기에서 나타낸 바와 같이, 성분들은 건식, 용액 또는 입자-현탁 형태로 혼합될 수 있고, 치료제의 첨가 이전에 미리 제제화될 수 있으며, 또는 치료제와 함께 제제화될 수 있다.

[0177] 본원발명의 이 조성물에 유용한 인지질은 천연 및(또는) 합성 인지질을 포함한다. 사용될 수 있는 인지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티드산, 및 포스파티딜에탄올아민을 포함한다. 예시적인 인지질 포스파티딜콜린, 예를 들면 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC), 디라우릴 포스파티딜콜린 (DLPC) C12:0, 디미리스토일 포스파티딜콜린 (DMPC) C14:0, 디스테아로일 포스파티딜콜린 (DSPC), 디피타노일 포스파티딜콜린, 노나데카노일 포스파티딜콜린, 아라키도일 포스파티딜콜린, 디올레일 포스파티딜콜린 (DOPC) (C18:1), 디팔미트올레일 포스파티딜콜린 (C16:1), 리놀레오일 포스파티딜콜린 (C18:2), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민, 디올레오일 포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 디올레오일 포스파티딜글리세

롤 (DOPG), 팔미토일올레오일 포스파티딜글리세롤 (POPG), 디스테아로일포스파티딜세린 (DSPS) 대두(soybean) 레치틴, 난황(egg yolk) 레치틴, 스펙고미에린, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜 이노시톨, 디포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜에탄올아민, 및 포스파티드산.

[0178] 특히, 디아실기가 대칭적, 비대칭적일 수 있고, 사슬 길이로 3 내지 28개의 탄소 범위의 다양한 유형의 포화 또는 불포화 지방산을 함유할 수 있으며, 6개 까지의 불포화 결합을 갖는, 1,2-디아실-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디아실-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디아실-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민.

[0179] 한 바람직한 인지질은 DPPC이다. DPPC는 최근까지 조사된 모든 포유류종의 주요 인지질이다. DPPC는 기실(airspace)의 상피 세포(기도의 아직 미확인된 세포 및 허파파리의 제2형 폐포세포)에 의해 합성된다. DPPC는 세포 안쪽 층으로 분비되고, 퍼져, 허파파리에 단세포 필름을 형성한다. 기세포(air cellular) 안쪽 계면의 DPPC 필름은 그의 정상 기능을 설명하는 특성의 독특한 성질을 갖는다: (1) 필름은, 퍼져 모든 표면을 덮고, 압착시, 예를 들면 숨을 내쉬는 동안 극도로 낮은 표면 장력을 달성하여 공기층으로의 액체 움직임이 쉽도록 하는 알짜 힘(net force)을 감소시키며; (2) 기도 또는 허파파리 크기가 줄어들면, 표면 장력이 비례하여 줄어들고, 그리하여 구조간 압력 평형을 만들어 허탈(虛脫; collapse)을 예방하며; (3) 그의 양성적 구조때문에, 필름은 소수성 및 친수성 잔기 모두와 느슨한 화학적 회합을 형성할 수 있고, 그의 높은 압착성때문에, 이러한 회합은 필름 압착시 절단될 수 있어서, 계면으로부터 부분(moieity)을 유리시키며; (4) 이러한 느슨한 화학적 회합은 필름에 전하 분포를 변화시킬 수 있는 계면활성제 시스템 (PG, 예를 들어) 중 발견된 기타 화합물의 첨가에 의해 개질될 수 있어서, 그리하여 그 부분(상기 (3)에서 언급된)이 필름으로부터 방출되는 속도를 바꾼다.

[0180] 본원 발명의 다양한 실시태양에서, 지질 성분은 약 50 내지 약 90 중량%의 계면활성제 담체 조성물을 포함하는 DPPC이다. 본원 발명의 다른 실시태양에서, DPPC는 불포화 포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤 (PG), 트리아실글리세롤, 팔미트산, 스펙고미엘린 또는 그의 혼합물을 포함하는 잔여물과 약 50 내지 75 중량%의 계면활성제 조성물을 포함한다. 본원 발명 또 다른 실시태양에서, 지질 성분은 약 4:1 내지 2:1 중량비의 DPPC 및 POPG의 혼합물이다. 하나의 바람직한 실시태양에서, 지질 성분은 약 3:1 중량비의 DPPC 및 팔미토일-올레오일 포스파티딜글리세롤 (POPG)의 혼합물이다.

[0181] DPPC 및 상기 지질과 인지질은 상용으로 입수될 수 있거나, 당 분야에 통상적으로 알려진 공개된 방법에 따라 제조될 수 있다. 혼합물의 인지질 성분은 하나 이상의 인지질, 예를 들어 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티딜 에탄올아민 (PE), 포스파티딜이노시톨 (PI), 포스파티딜 글리세롤 (PG), 포스파티딜산 (PA), 포스파티딜 세린 (PS) 및 스펙고미엘린 (SM)을 포함한다. 인지질의 지방 아실 사슬은 바람직하게는 약 7 탄소 원자 길이 이상, 통상적으로는 12-20 탄소 원자 길이이며, 완전히 포화되거나 부분적으로 불포화될 수 있다.

[0182] 인지질(들)은 계면활성제 혼합물의 50-95 건조중량%를 차지하고, 바람직하게는 혼합물의 80-90 건조중량%를 차지한다.

[0183] 인지질, 예를 들어 DPPC는 단독으로 투여되었을 때 상대적으로 천천히 함기 세포 내막 계면으로 흡수되고, 일단 흡수되면 천천히 산포되는 것으로 알려져 있다.

[0184] 산포제는 계면활성제-혼합물 지질이 입자 형태에서 단층 형태로 전이되는 것을 촉진하여, 폐 표면 상에서 산포되고 폐 표면 내 및 표면에 따라 분포되도록 하는 것을 목적으로 한다. 따라서, 예를 들어 계면활성제 제제가 리포솜 형태로 폐에 전달될 경우, 산포제는 폐 표면에서 리포솜 인지질이 리포솜 이중층에서 평면 단층 형태로 전이되는 것을 촉진하는데 효과적이다. 이와 마찬가지로, 만일 계면활성제 제제가 비결정질 또는 결정질 지질 입자로서 폐에 전달된다면, 산포제는 폐 표면에서 계면활성제-혼합물 인지질이 평면 단층 형태로 전이되는 것을 촉진하는데 효과적이다.

[0185] 예시적인 산포제는 지질 이중층 또는 지질 단층의 형성과 양립할 수 있지만 단독으로는 지질-이중층을 형성시킬 수 없는 비인지질을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, 산포제는 리소인지질; 지방산, 지방 에스테르 및 지방 알코올, 및 기타 단일-장쇄 지방 아실 화합물을 포함한다. 바람직한 산포제는 약 12 탄소 원자 이상의 알킬 사슬 길이, 바람직하게는 15-20 탄소 원자의 사슬 길이를 갖는 지방산 및 지방 알코올을 포함한다. 하나의 바람직한 산포제는 팔미트산이고, 다른 것은 세틸 알코올이다. 산포제는 계면활성제 혼합물의 2-25 건조중량%, 바람직하게는 혼합물의 10-15 건조중량%를 차지한다. 84.5 건조중량%에서 DPPC:DOPG (3:1)도 포함하는 하나의 예시적인 혼합물은, 12.75 건조중량%의 팔미트산을 포함한다.

[0186] 본원 발명에 사용되는 산포제는 상업적 공급자로부터 구입할 수 있다. 예를 들어, 팔미트산 (PA)은 아반티 폴

라 리피드 인코포레이티드 (Avanti Polar Lipids, Inc., 알라배마주 버밍엄)로부터 입수할 수 있다. 또한, 산포제는 당 분야에 통상적으로 알려진 공개된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0187] 일부 실시태양에서, 조성물은 산포제로서 틸록사폴 (Tyloxapol)을 포함할 수 있고, 이는 스티링-윈트로프 (Sterling-Winthrop) 및 롬 앤 하스 (Rohm and Haas)와 같은 다양한 회사로부터 여러 가지의 상품명으로 구입할 수 있다. 틸록사폴은 4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)페놀의 포름알데히드 및 옥시란과의 중합체이다. 틸록사폴은 30년에 걸쳐 인간의 약리학적 제제에 사용되어 왔다 (Tainter ML et al. New England Journal of Medicine (1955) 253:764-767). 틸록사폴은 상대적으로 비독성이고, 다른 제제는 용혈성인 수천배의 농도에서도 적혈구를 용혈시키지 않는다 (Glassman HN. Science (1950) 111:688-689).

[0188] 치료 방법

[0189] 다수의 호흡기 증상 및 질환들은 폐 계면활성제의 성능 저하 및 염증을 유발한다. 본원에 사용된 "호흡기 증상 및 질환(들)"이란 용어는 허파파리, 및 허파파리로의 호흡 기도와 관련된 증상 및 질환을 포함한다. 이러한 증상 및 질환은 폐 고혈압, 신생아 폐 고혈압, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 급성 및 만성 기관지염, 기종, 세기관지염, 기관지 확장증, 방사선 폐렴, 과민증, 폐실질염 (pneumonitis), 급성 염증성 천식, 급성 연기 흡입, 열성 폐손상, 알레르기성 천식, 의인성 천식, 낭포성 섬유증, 허파파리 단백증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 폐렴 (pneumonia), 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐손상, 특발성 호흡 곤란 증후군 및 특발성 폐 섬유증을 포함한다. 활성제는 폐조직 상에, 또는 폐조직 내의 병원균에 직접적으로 작용할 수 있다.

[0190] 일반적으로 폐 계면활성제의 결핍이 미숙아 및 유아의 호흡 곤란 증후군 (RDS)의 원인인 것으로 인식되어 있다. 이러한 결핍이 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS) 발생의 주요 요인은 아니지만, 이 질환의 병태 생리학에 현저하게 기여할 수 있다. RDS는 미숙아의 사망 및 장애의 주된 원인이다. 또한, 매년 약 150,000건의 ARDS가 60-80%의 치사율로 보고되고 있다. ARDS를 촉발하는 메커니즘은 부분적으로만 알려져 있다. 그러나, 산소독성으로 인해 발생하는 다수의 경우에 이 증후군은 다량의 산소-유래 유리 라디칼 및 친핵체, 예를 들어 퍼옥사이드, 슈퍼옥사이드, 히드록실, 일중항 산소 및 기타의 것에 의해 초래된다. 유리 라디칼로 야기된 폐 실질 손상은 염증 및 "누출" 모세혈관 반응을 초래한다. 이러한 반응은 폐 탄성 (compliance)의 감소, 저산소증 및 단백을 특징으로 하는 ARDS를 진행시킬 수 있다.

[0191] 염증은 호흡기 질환을 수반하는 침투성 증상으로 국소 외상, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 알레르기성 및 면역원성 반응 등에 반응하여 발생한다. 기도의 염증 부위에 모이는 염증성 세포, 특히 백혈구는 폐 계면활성제 성분의 분비를 유발하거나 억제할 수 있고 또한, 폐 내막 상피 세포를 파괴하여 세포질 성분을 방출시킬 수 있는 매개체를 방출한다. 후자의 군에 속하는 매개체에는 세린 프로테아제, 특히 백혈구 엘라스타제, 포스포리파아제 A₂, 및 반응성 산소 종, 예를 들어 슈퍼옥사이드 및 히드록실 라디칼이 포함된다. 낭포성 섬유증에서 기도 감염은 예를 들어, 질병의 심도의 원인이 될 수 있는 기도 분비의 비정상적인 운반 특성과 관련된다 (E. Puchell, et al., Eur. J. Clin. Invest., 15:389-394, 1985).

[0192] 본원 발명의 치료 방법은, 본원 발명의 제제에서 활성제(들)로서 계면활성제 혼합물을 프로테아제 억제제, 포스포리파아제 억제제 또는 항산화제, 또는 이들 중 둘 이상의 혼합물과 함께 사용한다. 제제는 예를 들어, 기관지허파파리 세정, 경구, 혈관내, 볼러스 또는 기타 투여에 유용한 액체 제제일 수 있다. 또한, 제제는 환자에게 투여하기 위해 에어로졸화될 수도 있다. 투여되는 제제의 양은 통상적으로 약 1-100 mg/용량, 5-20 mg/용량, 예를 들어 10 mg/용량이고, 용량에서 활성제의 양은 치료적 유효량, 예를 들어 약 0.01 mg 내지 50 mg의 약물 또는 약 0.01 mg 내지 5 mg의 약물이다. 실제 약물 용량은 제제가 폐에서 단층으로 산포되었을 때 소정의 약제 농도를 먼저 계산하고, 적절한 양의 계면활성제 제제에 이 용량을 투여하여 결정될 수 있다. 치료 효과를 최적화하고 부작용을 최소화하기 위한 용량의 조정은, 폐 염증 동물 모델 및(또는) 폐 염증성 증상이 있는 인간 환자에 대한 임상 연구를 포함할 수 있는 공지된 과정에 따라 이루어질 수 있다.

[0193] 하나의 실시태양에서, 본원 발명은 포유류에게 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 포유류의 폐 염증을 치료하는 방법을 의도한다.

[0194] 일부 실시태양에서, 본 방법은 본원 발명의 조성물을 폐 세정 (pulmonary lavage)으로 투여하는 것을 포함한다. 폐 세정을 수행하는 방법은 당 분야에서 입수할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고자료로 삽입되는 미국 특허 제6,013,619호를 참조한다. 예를 들어, 폐 세정은 다음과 같이 수행될 수 있다:

[0195] a) 호기말 양압 (positive end-expiratory pressure, PEEP) 기체를 조절된 압력, 바람직하게는 약 4 내지 20

cm 물의 압력으로 포유류의 폐 구역에 인공 호흡기로 가하고;

- [0196] b) 제약학상 허용되는 수성 매질 중의 묽은 계면활성제를 포함하는 세정 조성물을 하나 이상의 폐엽 또는 폐 구역에 점적 주입하고;
- [0197] c) 바람직하게는 약 20 내지 100 mm 수은의 음압을 사용하여 결과 폐액을 짧은 간격의 기관-기관지 흡입으로 폐로부터 제거한다.
- [0198] 통상적으로, PEEP는 점적 주입 단계 (b) 전에 사전 선택된 시간 주기, 바람직하게는 약 30분 이하 동안 적용되고, 또한 PEEP는 통상적으로 단계 (b) 및 (c) 동안, 그리고 제거 단계 (c) 후 사전 선택된 시간 주기, 바람직하게는 약 6시간 이하 동안 지속적으로 적용된다. 폐의 각기 다른 구역은 독립적으로 처리될 수 있다.
- [0199] 기타 실시태양에서, 조성물은 액체 볼러스 투여 (bolus administration)로 투여될 수 있다. 예를 들어, 기관 튜브를 위치시켜 조성물 액적을 폐조직에 전달할 수 있다. 일부 실시태양에서, 볼러스 투여는 폐의 일부에 이루어질 수 있거나 (다른 부분에는 이루어지지 않음), 폐의 각기 다른 부분을 각기 다른 시간에 볼러스 점적을 투여하여 처리할 수 있다.
- [0200] 또 다른 실시태양에서, 조성물은 흡입으로 투여될 수 있다. 추가의 실시태양에서, 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 및(또는) 항산화제는 경구로 또는 장관외로 투여될 수 있다. 경구 또는 장관외 (비-폐) 전달이 고려되는 경우, 조성물은 계면활성제 혼합물을 포함할 필요가 없다. 그러나, 본원 발명에 따르면 계면활성제 혼합물 및 억제제를 조합하면 폐 질환을 치료하는데 놀라울 정도로 효과적이다. 나아가, 계면활성제-억제제 조합은 폐 질환을 유익하게 치료하는데 상승적으로 작용할 수 있다.
- [0201] 또한, 본원 발명은 계면활성제 담체에 의해 운반되는 프로테아제 억제제를 포함하는, 폐 염증을 치료하기 위한 제약 조성물을 제공한다.
- [0202] 하나의 예시적 실시태양에서, 본 조성물은 인간 백혈구 엘라스타제의 억제제를 포함한다. 인간 백혈구 엘라스타제 (HLE)는 호중구의 호염기성 과립에 존재하는 단백분해 효소이다. 염증 부위에 방출된 후, 이 프로테아제는 중요한 결합 조직 성분, 예를 들어 엘라스틴 및 콜라겐을 가수분해할 수 있다. 이 효소는 피사 조직 및 미생물의 식작용 기능에 필수적이다. 그와 동시에, 이 효소는 비조절 상태로 방출되면 건강한 조직 및 순환 단백질들을 파괴할 수 있기 때문에, 신체를 심각한 공격에 노출시킨다. 그 결과로 발생한 조직 손상은 성인 호흡 곤란 증후군 (Lee, C. T., *et al.*, *New England J. of Med.*, 304:192-196, 1981) 및 기종 (Janoff, A., In: *INFLAMMATION: BASIC PRINCIPLES AND CLINICAL CORRELATES*, Gallin, J. I., *et al.*, eds, 803-814, Raven Press, New York, 1988)의 병인에 기여하는 것으로 제안되었다.
- [0203] 본원 발명에 따르면, 프로테아제 및 리파아제의 억제 및(또는) 폐조직 내에서의 산화 감소가 혈관 기저막에 대한 손상을 감소시키고 단백질 누출 및 출혈을 줄인다. 이와 비슷한 연구에서, 외인성 계면활성제에 의한 기관지허파파리 세정도 기저막에 대한 손상을 감소시키고 단백질 누출 및 출혈을 줄였다. 그러나, 계면활성제 혼합물만을 단독으로 처리했을 때에는 프로테아제 또는 리파아제 활성을 현저하게 억제하지 않았고, 현저한 항산화 활성을 나타내지도 않았다. 본원 발명에 따르면, 폐 염증성 증상을 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 및(또는) 항산화제를 포함하는 본원 발명의 계면활성제 제제로 치료하면 기저막 손상, 단백질 누출 및 폐혈관 출혈을 억제하는데 효과적이다. 혈관 단백질 누출 및 출혈을 최적으로 감소시키는 치료는 또한 고유 계면활성제의 불활성화, 및 폐기능의 심각한 소실, 다중 장기 기능부전을 일으키며 30-40%의 환자의 사망을 야기하는 폐 염증성 삼출액의 발생을 예방할 수 있다.
- [0204] 프로테아제 억제제는 엘라스타제 억제제, 예를 들어 인간 백혈구 엘라스타제 억제제, 인간 분비 백혈구 프로테아제 억제제 (SLPI), 알파 1- 프로티나제 억제제 (또는 알파 1 항트립신) 및 기타 쿠니츠 (Kunitz) 또는 세린 프로테아제 억제제를 포함한다. 또한, 본원 발명에 사용하기에 적합한 프로테아제 억제제는 상기 기술한 바와 같다.
- [0205] 항산화제는 예를 들어, EUK134, 카탈라아제, 글루타티온, N-아세틸시스테인, 프로시스테인, 알파-토코페롤, 아스코르브산, 부틸화 히드록시 아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 천연 플라비딘 (예를 들어, 2,7-디히드록시 9,10-디히드로펜안트로-4,5 bcd-피란, 예를 들어 미국 특허 제6,503,552호 참조) 및 이 화합물들의 유도체를 포함한다. 예시적인 포스포리파아제 A₂ 억제제는 LY11-727 (일라이 릴리(Eli Lilly))이다.
- [0206] 프로테아제 활성을 억제하는데 있어서 제약 조성물의 치료적 효과를 입증하기 위한 실험을 수행했다. 먼저 토끼 및(또는) 인간 기관지허파파리 세정액 (BAL)에서 엘라스타제 활성을 측정하기 위한 검정법을 확립했다 (실

시에 3). 그 결과로 생긴 인간 호중구 엘라스타제 (HNE) 활성을 갖는 표본에서의 비색 신호는, 410 nm에서의 광학적 밀도 (OD₄₁₀)와 선형적으로 상호 관련된다. 그리고, 엘라스타제 억제제가 HNE를 억제하는 능력을 조사했다 (실시에 4). 혼합물의 OD₄₁₀과 첨가된 억제제량의 로그의 상호 관계는 선형이어서 (도 5a), HNE 활성이 세린 엘라스타제 억제제에 의해 시험관내에서 억제됨을 입증하고 있다.

[0207] 그리고, ARDS (급성 호흡 곤란 증후군)를 앓는 인간 및 실험적으로 호흡 곤란을 유도한 토끼로부터 수득한 BAL 액에서, 엘라스타제 활성을 확립된 비색 검정법으로 측정했다. 도 5b는 BAL의 양과 OD₄₁₀ 간의 선형 대응을 보여주고 있는데, 이는 엘라스타제 활성이 비색 검정법으로 측정될 수 있고 엘라스타제가 ARDS를 앓는 인간의 BAL 액에 존재함을 입증하는 것이다.

[0208] 이와 유사하게, 폐손상을 유도한 토끼로부터 취한 기관지허파파리 (BAL) 액에서 비색 검정법을 수행했다 (실시에 6). 또한, 100 µg/ml의 세린 엘라스타제 억제제를 첨가한 후 각각의 BAL 액에 대해 비색 검정법을 수행했다. 도 6a는 단독의 BAL 액, 또한 세린 엘라스타제 억제제를 첨가한 BAL 액에서 엘라스타제 활성을 보여준다. 엘라스타제 활성은 상응하는 OD₄₁₀을 제공하는 HNE의 농도로서 표현된다. 모든 토끼 BAL 액에서 엘라스타제 활성이 관찰되었으며, 6개의 BAL 액 중 5개에서 세린 엘라스타제 억제제를 첨가하여 활성이 억제되었다. 첨가된 세린 엘라스타제 억제제는 공지된 HNE 억제제이므로 (실시에 4), 측정된 엘라스타제 활성은 HNE로 인한 것 같다.

[0209] 세정액이 내생 엘라스타제 억제제를 함유할 수 있음을 주의해야 한다. 이는 α₁-프로테아제 억제제, α₂-마크로글로불린, SLPI 또는 다른 엘라스타제 억제제일 수 있다. 이런 억제제(들)의 존재는, 폐손상을 유도한 토끼로부터의 기관지허파파리 (BAL) 액을 시험관내 분석하여 증명할 수 있다 (실시에 6). 도 6a에서, 토끼에게 박테리아 당지질 (LPS) 및 항-BSA를 기관내로 투여 (모든 동물)한 지 3시간 (토끼 6315 및 6316) 또는 6시간 (6313, 6314, 6317 및 6318) 후에 토끼로부터 BAL 액을 수득하고 (동물 6317 및 6318에게는 3시간에서 10 mg/kg의 BSA를 추가로 투여), 추출한 BAL 액을 단독으로 (격자 표시) 또는 1 µg/ml의 HNE와 혼합한 후 (진한 입방형 막대) 시험했다. 동물 6317의 BAL 액에서 현저한 양의 유리 엘라스타제가 존재했고; 다른 모든 동물의 액체에 엘라스타제 억제제, 특히 HNE 억제제가 존재하는 것으로 나타났다. 따라서, 토끼 BAL 액에서 유리 엘라스타제 활성의 부재는 표본에 엘라스타제가 존재하지 않음을 나타내는 것이 아니라, 존재할 수 있지만 억제되는 것이다. 구별하기 위해 면역학적 검정법을 수행할 수 있다.

[0210] 폐 염증에 대한 모델 계면활성제 혼합물, 세린 엘라스타제 억제제 및 이 두 가지의 조합의 효과를 ARDS 토끼 모델에서 평가했다. 이 실험들은 실시에 8 내지 12에서 상세하게 기술한다. 이 연구를 위해 토끼 20마리를 5 그룹으로 나누었다. 그룹 1-4의 토끼를 박테리아 당지질 (LPS)로, 그리고 3시간 후에는 포볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA)로 세정, 자극하여 폐 염증을 유도했다. 또한 치료로서, 그룹 2 토끼에게 모델 계면활성제 혼합물을, 그룹 3 토끼에게는 세린 엘라스타제 억제제를, 그리고 그룹 4 동물에게는 모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제를 모두 투여했다. 그룹 5 토끼는 정상 토끼이었으며 대조군으로 사용했다. 6시간 후 동물을 희생시키고, 각 동물에 대해 우하엽을 3회 세정하여 세정액을 모았다 (최종 세정). 손상의 정도 및 치료의 효과를 최종 세정액에서 발견된 기저막 단백질 단편 및 적혈구의 양으로 측정했다.

[0211] 도 7a는 폐손상을 입은 동물로부터 수득한 최종 세정액에 존재하는 단백질의 양이 증가했음을 보여준다. 발견된 단백질의 양은 혈장 단백질이 허파파리 공간으로 누출되도록 하는 기저막 기질 손상의 정도를 나타내고, 단백질의 양이 많을수록 폐의 손상이 많음을 나타낸다. 실험 결과, LPS 및 PMA 손상으로 인한 단백질의 양 (약 2.5 mg/ml)은 모델 계면활성제 혼합물을 단독으로 투여받은 그룹 2에서 감소했고, 모델 계면활성제 혼합물 및 엘라스타제 억제제를 모두 투여받은 그룹 4에서는 더욱 감소했다. 엘라스타제 억제제를 단독으로 투여받은 그룹 3이 단백질 수준의 감소를 나타내지 못한 것은, 그룹 내의 동물 한 마리에 대해 비정상적으로 높은 값을 얻었기 때문일 가능성이 가장 높다. 만일 이 동물을 배제한다면, 그룹 3의 평균값은 모델 계면활성제 혼합물만으로 치료한 그룹 2에서 얻은 수치와 거의 동일할 것이다.

[0212] 도 7b는 최종 세정액에서 발견된 단백질의 SDS-겔 분석 상에서 수행된, 기니 피그에서 기저막 기질 단백질에 대해 생산된 항체를 사용한 웨스턴-블롯 (Western-blot) 분석을 보여준다. 토끼 폐 기저막의 단백질 성분은 좌측 패널에 나타났다. LPS 및 PMA만으로, 모델 계면활성제 혼합물을 첨가하여, 세린 엘라스타제 억제제를 첨가하여, 그리고 모델 계면활성제 혼합물 및 엘라스타제 억제제를 모두 첨가하여 치료한 토끼 BAL 액의 단백질 성분은 그룹 1 내지 그룹 4 패널에 각각 나타났다. 정상으로 손상으로 입히지 않은 토끼 BAL 액의 단백질 성분은 그룹 5 패널에 나타났다. 이 패널에서 90,000 MW 위의 밴드는 기저막에 특이적인 것으로 정상 토끼 혈장

에는 존재하지 않았다 (데이터는 도시하지 않음). 그룹 1-4에서 70,000 MW의 큰 밴드는 알부민으로, 사용된 항혈청의 오염 물질이다. 아래의 MW 밴드 (< 10,000 MW)는 기저막의 단편을 나타낸다. 모델 계면활성제 혼합물, 엘라스타제 억제제, 또는 이들의 조합으로 치료한 동물에서 기저막 손상의 개선이 관찰되고, 이를 정량할 수 있다.

- [0213] 동물에서 손상의 수준을 측정하는 다른 방법은, 최종 세정액에 나타나는 출혈 또는 적혈구 (RBC)의 양이다. RBC가 존재한다는 것은, 단백질의 존재에 비해 기질에 생성된 구멍을 통해 전체 혈구 세포가 통과할 수 있을 정도의 더 심한 손상이 있음을 나타낸다. 도 7c는 최종 세정액에서 RBC 카운트를 보여준다. 모델 계면활성제 혼합물을 첨가했을 때 손상의 일부 개선을 암시하는 RBC 수의 약간의 감소가 나타났고, 엘라스타제 억제제를 첨가했을 때 보다 큰 손상의 감소가 나타났다. 또한, 모델 계면활성제 혼합물 및 엘라스타제 억제제를 모두 첨가하면 손상이 현저하게 감소되었다.
- [0214] 이전에, 머스타드 질소로 처리하여 순환하는 호중구가 결핍된 토끼는 LPS 및 PMA에 노출된 경우에도 현저한 손상을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이는 최종 세정액에 단백질, RBC 및 엘라스타제가 없다는 것으로 증명된다. (Cochrane, CG, *et al.*, *Am. J. Resp. and Crit. Care Med.*, Vol. 163:139, 2001). 이는 생체내 엘라스타제의 근원이 호중구라는 것을 강력하게 시사한다. 모델 계면활성제 혼합물만의, 세린 엘라스타제 억제제만의, 그리고 이 두 가지의 조합의 인간 호중구 엘라스타제 활성 억제 능력을 평가했다. 도 8은 추가적으로 모델 계면활성제 혼합물이 존재하거나 존재하지 않는 경우, 엘라스타제 억제제에 의한 HNE 활성의 현저한 억제를 보여주고 있다. 모델 계면활성제 혼합물은 엘라스타제 억제제가 엘라스타제를 억제하는 능력을 방해하지는 않고, 그 자체가 엘라스타제를 직접적으로 억제하지도 않는다.
- [0215] 최종 BAL 액에서 엘라스타제 억제제의 잔류 활성은, BAL 액을 공지된 양의 HNE와 인큐베이션시킴으로써 평가했다 (실시예 12). 결과는 도 9에 나타났다. OD₄₁₀으로 측정했을 때, 그룹 2-4에서 HNE 활성의 현저한 감소가 나타났다. HNE 활성의 감소는 하나 이상의 엘라스타제 억제제가 존재함을 나타낸다. 그룹 3 및 4로부터의 세정액에 나타나는 엘라스타제의 억제는 현저했는데, 이 그룹의 동물들은 정맥내와 기관내 경로 모두로 공지된 엘라스타제 억제제를 투여받았다. 그러나, 모델 계면활성제 혼합물 그룹 (그룹 2)에서 나타난 엘라스타제 억제는 또한, 토끼 내의 내생 엘라스타제 억제제, 예를 들어 SLPI 또는 알파-1 프로테아제 억제제, 또는 이들의 일부 조합에 의한 것일 수도 있다. 정상 토끼 (그룹 5) 및 LPS/PMA 양성 손상 동물 (그룹 1)은, 이 실험에서 최종 세정액에 엘라스타제 억제제가 존재하는 것으로 나타나지 않았다. 그러나, 토끼 #5541 (그룹 1)은 최종 BAL 액에 유리 엘라스타제가 존재하는 것으로 나타났고, 정상 동물의 BAL (그룹 5)에서는 아무것도 검출되지 않았다.
- [0216] 상기 기술한 연구는 백혈구로부터 방출된 엘라스타제가 폐 염증을 유도한 토끼의 폐에서 관찰된 단백분해 손상의 원인일 것이라는 점을 보여준다. 급성 폐손상은 폐 혈관 기저막의 분해, 및 혈장 단백질과 적혈구의 허파 파리 공간으로의 방출을 야기한다. 동물을 모델 계면활성제 혼합물 또는 세린 엘라스타제 억제제, 또는 이 두 가지의 조합으로 치료하면 손상의 정도를 감소시킨다. 따라서, 모델 계면활성제 혼합물 및 세린 엘라스타제 억제제를 포함하는 제약 조성물이 폐의 염증 손상을 예방하고 치료하는데 성공적일 것으로 생각된다.
- [0217] 상기 언급한 바와 같이, 본원 발명은 염증성 성분이 관련되지 않은 것을 포함하여 다양한 폐 증상을 치료하는데 바람직하다. 천식 및 관련 기관지-수축 증상은 기관지 확장제, 예를 들어 알부테롤, 테르부타린, 살메테롤, 포르모테롤, 및 그의 제약학상 허용되는 염을 포함하는 계면활성제 제제를 투여함으로써 바람직하게 치료될 수 있다.
- [0218] 폐의 박테리아 감염, 예를 들어 기관지염 및 결핵은 활성제로서 항생제를 포함하는 계면활성제로 바람직하게 치료될 수 있다.
- [0219] 낭포성 섬유증은 DNase의 전달을 위해 제조된 본원 발명의 계면활성제 제제를 투여함으로써 바람직하게 치료될 수 있다.
- [0220] 나아가, 본원 발명의 조성물은 다른 유용한 약제도 포함할 수 있다. 예를 들어 기관지 확장제, 항생제, DNase, 통증 약제 또는 폴리펩타이드, 예를 들어 사이토카인, 및 펩타이드 호르몬과 같은 약제가 포함될 수 있다.
- [0221] **개선된 분포 및 흡수**
- [0222] 본 절에서는 폐에서의 개선된 약물 분포 및 흡수에 기여하는, 상기 계면활성제 제제에 의해 제공되는 인자를

기술한다. 개선된 약물 분포는 (i) 사실상 약물이 폐 내부로, 그리고 폐를 통과할 수 있는 유효 표면적을 증가시키는, 폐 표면에서 약물의 개선된 산포 및 살포, 및 (ii) 폐 표면에서 지질 단층을 안정화시켜 폐 표면에서 유리한 약물-통과 계면을 유지시키는 것을 포함하는 인자들의 조합 때문인 것 같다.

[0223] 도 4a 및 4b는 지질을 산포한 경우와 하지 않은 경우, 폐로 전달된 지질-입자 중의 활성제의 침착 및 산포를 도시하고 있다. 도 4a는 산포한 경우 (+, 빈 원)와 산포하지 않은 경우 (-, 부분적으로 칠한 원) 모두에, 침착 직후 지질 입자의 크기를 도식적으로 보여주고 있다. 시간이 증가함에 따라 (도 4b) 산포 입자가 지속적으로 팽창, 융합하여 침착 영역에서 넓은 면적을 덮게 되기 때문에, 덮는 면적의 차이가 보다 현저하게 된다. 산포하지 않은 경우, 입자는 그 함유물을 작고 국소적인 영역에만 분비하면서 분리 및 국한된 상태로 유지된다.

[0224] 소정 크기의 소정량의 지질 입자가 덮을 수 있는 총 면적은, 입자 지질로 나타내어지는 총 단층 면적으로 환산하여 용이하게 계산될 수 있다. 예를 들어, 1 μm 크기의 계면활성제 제제 입자 10 mg의 계산된 표면적은 60 cm^2 또는 폐의 총 표면적의 약 0.00125%이다. 입자의 인지질이 산포에 의해 단층 형태로 분산된 경우, 제제가 덮을 수 있는 총 표면 (지질에 분산된 활성제를 포함할 것임)은 폐 표면의 34%로 계산된다. 따라서, 산포는 약물이 폐 내부로 또는 폐를 통과하는데 이용할 수 있는 총 폐 표면을 약 4배 이상 증가시킨다.

[0225] 약물 전달을 위한 폐 표면적을 현저하게 증가시키는 것 이외에, 본 발명의 계면활성제 제제는 압력하에서의 붕괴에 대해 단층을 안정화시키고 단층을 불안정화시키지 않으면서 지질이 단층 폐 표면으로 혼입되도록 함으로써, 보다 효과적인 흡수를 촉진시킨다.

[0226] 도 4c는 이러한 특징들이 환자의 폐 영역에 전달된 활성제의 세포 흡수 및 침투를 증강시키는데 기여함을 보여주고 있다. 도면의 좌측은 입자 자체의 작은 표면적만을 효과적으로 덮는 폐 표면 상에 침착된 국소성 지질 입자를 보여주고 있다. 이 입자로부터의 약물 전달은 입자로부터 약물의 확산 속도, 및(또는) 입자의 용해 속도에 의해 제한될 것이다.

[0227] 도면의 우측에서는, 본원 발명의 계면활성제 제제를 갖는 입자에서 지질 산포의 효과를 보여주고 있다. 도면은 입자 지질 및 관련 약물이 폐 표면의 단층/공기 계면에서 넓은 표면적 상에 산포됨을 입증하기 위한 것이다. 약물은 이제 넓은 폐 표면적 상에서의 즉시 흡수를 위해, 소포성, 세포주위 또는 세포형단 침투를 포함하는 메커니즘에 의한 흡수를 위해 분포된다. 소포성 운반은 세포 표면에서 일어나는 다수의 복잡한 메커니즘의 다소 부정확한 기재이다. 허파파리 내의 세포막은 약물을 함유하는 소포를 형성하고, 약물 입자와 세포막 간의 그러한 융합은 자발적으로 일어날 수 있다. 약물, 특히 고분자는 이러한 경로에 의해 세포막을 지나 운반될 수 있다. 세포주위 흡수에서, 활성제는 순환계로의 흡수를 위해 상피 세포 간의 세포주위 공간을 통해 확산된다. 세포형단 흡수 및 침투는 폐 상피 내로, 상피를 통한, 그리고 상피 밖으로 나와 순환계로 직접 흡수되는 것을 포함한다.

[0228] 도 3C는 또한, 약물 전달에서 산포 및 단층 안정화가 어떻게 폐의 병원체, 이 경우에는 폐 표면 상의 박테리아의 치료를 향상시킬 수 있는지를 보여주고 있다. 산포하지 않은 경우, 지질 입자는 병원체 입자와 접촉할 수 있거나 하지 않을 수 있다. 산포하지 않은 경우, 약물 전달은 약물이 접촉한 지점에서만, 또는 확산에 의해서만 일어난다. 반면, 지질을 산포하면 병원체를 섭취할 수 있기 때문에, 그의 외부 표면 전체를 통한 병원체에 의한 약물 흡수가 가능하게 된다.

[0229] 방금 기술한 이러한 특징들은 특히 화합물, 예를 들어 프로테아제 또는 포스포리파아제 억제제, 및 폐 염증 증상의 치료에 사용하기 위한 항산화제의 투여에 유용하며, 여기서 활성 폴리펩타이드제는 폐조직 상에 넓게 분포될 필요가 있다. 또한 투여된 약물은 넓은 폐 표면적 상에서 신속하게 이용될 수 있기 때문에, 이러한 특징들은 폐의 넓은 부분에 영향을 미치는 폐 증상들을 치료하는데 유용하다. 또한, 이러한 특징들은 스스로 확산될 수 없는 폴리펩타이드 및 펩타이드를 투여하는데 유용하다. 폐 내의 감염 부위로 침투할 필요가 있는 펩타이드 항생제를 포함하는 항생제는 효과적으로 투여되며, 폐 표면 상의 박테리아를 공격하기 위한 투여 후 용이하게 이용될 수 있다.

[0230] 조성물

[0231] 본원 발명의 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제, 항산화제 및 계면활성제 혼합물은 다양한 허용되는 조성물로 제제화될 수 있다. 이러한 제약 조성물은 선택된 투여 경로, 즉, 세정, 경구 또는 장관외, 정맥내, 근육내, 폐 또는 흡입 경로에 적응된 다양한 형태로, 포유류 숙주, 예를 들어 인간 환자에게 투여될 수 있다.

- [0232] 화합물, 예를 들어 항산화제 및 폴리펩타이드 억제제 또는 기타 화합물이 안정한 비독성 산 또는 염기 염을 형성하기에 충분한 염기성 또는 산성인 경우, 염으로서 상기 화합물의 투여가 적절할 수 있다. 제약학상 허용되는 염은 예를 들어, 생리학상 허용되는 음이온, 예를 들어 토실레이트, 메탄술포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트, α-케토글루타레이트 및 α-글리세로포스페이트를 형성하는 산과 형성된 유기산 부가염이다. 히드로클로라이드, 술페이트, 니트레이트, 바이카르보네이트 및 카르보네이트 염을 포함하는 적절한 무기염도 형성될 수 있다. 제약학상 허용되는 염은 당 분야에 공지된 표준 방법, 예를 들어 아민과 같이 충분히 염기성인 화합물을 생리학상 허용되는 음이온을 제공하는 적절한 산과 반응시킴으로써 취득된다. 카르복실산의 알칼리 금속 (예를 들어 나트륨, 칼륨 또는 리튬) 또는 알칼리 토금속 (예를 들어, 칼슘) 염도 제조된다.
- [0233] 폴리펩타이드의 제약학상 허용되는 염은 예를 들어, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산과 형성된 산 부가염 (폴리펩타이드의 유리 아미노기와 형성된)을 포함한다. 유리 카르복실기와 형성된 염은 또한, 예를 들어 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화철과 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다.
- [0234] 따라서, 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제를 포함하는 본원 발명의 조성물은 전신적으로, 예를 들어 경구로 제약학상 허용되는 비히클, 예를 들어 불활성 희석제 또는 흡수성 식용 담체와 함께 투여될 수 있다. 이는 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡슐에 둘러싸일 수 있고, 정제로 압축될 수 있거나, 환자 규정식의 음식에 직접 포함될 수 있다. 치료적 경구 투여를 위해, 조성물은 하나 이상의 부형제와 조합되어 섭취가능한 정제, 볼 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 이러한 조성물 및 제제는 0.1% 이상의 활성 화합물을 포함해야 한다. 조성물 및 제제의 백분율은 물론 변화될 수 있고, 통상적으로 약 2 내지 약 60 중량%의 소정의 단위 투여 형태일 수 있다. 상기 치료적으로 유용한 조성물에서 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제의 양은, 유효한 용량 수준을 얻을 수 있는 양이다.
- [0235] 정제, 트로키제, 환제, 캡슐 등은 또한 결합제, 예를 들어 검 트라가칸트, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어 인산이칼슘; 붕해제, 예를 들어 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등; 윤활제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트; 및 감미제, 예를 들어 수크로스, 프룩토스, 락토스 또는 아스파탐을 포함할 수 있거나, 향미제, 예를 들어 페퍼민트, 노루발폴 유 또는 체리향을 첨가할 수 있다. 단위 투여 형태가 캡슐인 경우, 이는 상기 형태의 물질 이외에 액체 담체, 예를 들어 식물유 또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함할 수 있다. 코팅으로서 또는 그렇지 않으면 고체 단위 투여 형태의 물리적 형태를 변화시키기 위해, 다양한 기타 물질들이 존재할 수 있다. 예를 들어 정제, 환제 또는 캡슐은 젤라틴, 왁스, 셀락 또는 당 등으로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 활성 화합물, 감미제로서 수크로스 또는 프룩토스, 보존제로서 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 향미제, 예를 들어 체리 또는 오렌지향을 포함할 수 있다. 물론, 임의의 단위 투여 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 제약학상 허용되는 것이어야 하며, 사용되는 양에서 실질적으로 비독성이어야 한다. 또한, 활성 화합물은 지속-방출 제제 및 장치에 혼입될 수 있다.
- [0236] 활성 화합물은 또한, 주입 또는 주사에 의해 정맥내 또는 복강내로 투여될 수 있다. 활성제의 용액은 임의로 비독성 계면활성제와 혼합되어 물 중에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 트리아세틴 및 그의 혼합물 중에서, 그리고 오일 중에서 제조될 수 있다. 통상적인 보관 및 사용 조건하에서, 이러한 제제들은 미생물의 성장을 예방하기 위해 보존제를 포함한다.
- [0237] 주사 또는 주입에 적합한 제약학상 제형은 무균 수용액 또는 분산액, 또는 무균 주사액, 주입액 또는 분산액을 증식 조제도로 구성되고 임의로 리포솜에 캡슐화된 활성 성분을 포함하는 무균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에 있어서, 궁극적으로 제형은 제조 및 보관 조건하에서 무균의 액체이며 안정해야 한다. 액체 담체 또는 비히클은 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에틸렌 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물유, 비독성 글리세릴 에스테르, 및 그의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 액체 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 리포솜의 형성, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지, 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용은 다양한 항생제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등으로 예방할 수 있다. 다수의 경우에 등장제, 예를 들어 당, 완충액 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사제 조성물은 조성물에 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 지속적으로 흡수될 수 있다.
- [0238] 무균 주사 용액은 필요한 양의 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제를 필요하다면 상기 언급한

다양한 기타 성분들과 함께 적절한 용매에 혼입시킨 다음, 필터 멸균시켜 제조된다. 무균 주사 용액을 제조하기 위한 무균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이며, 이 방법으로 종전에는 무균-여과된 용액 중에 존재하던 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제에 임의의 추가적인 목적 성분을 더한 분말을 얻는다.

- [0239] 본원 발명의 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제의 유용한 용량은, 그의 시험관내 활성과 동물 모델에서의 생체내 활성을 비교하여 결정할 수 있다. 마우스 및 기타 동물, 인간에 대한 유효량을 외삽하는 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 제4,938,949호를 참조한다.
- [0240] 통상적으로, 액체 조성물 중의 본원 발명의 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제의 농도는 약 0.01-25 wt-%, 또는 약 0.1-10 wt-%일 것이다.
- [0241] 치료에 사용하기 위해 필요한 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제, 또는 그의 활성 염 또는 유도체의 양은 선택된 특정 염 뿐만 아니라 투여 경로, 치료되는 증상의 성질 및 환자의 연령과 증상에 따라 변화할 것이고, 궁극적으로는 내과 의사 또는 임상치의 재량 사항이다.
- [0242] 그러나, 통상적으로 적절한 용량은 약 0.1 내지 약 100 mg/kg, 예를 들어 약 1.0 내지 약 75 mg/체중 kg/일, 예를 들어 하루에 수증자의 체중 1 kg 당 1 내지 약 50 mg의 범위이거나, 3 내지 90 mg/kg/일의 범위 또는 5 내지 60 mg/kg/일의 범위일 것이다.
- [0243] 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제는, 예를 들어 단위 투여 형태 당 5 내지 1000 mg, 통상적으로는 10 내지 750 mg, 가장 통상적으로는 50 내지 500 mg의 활성 성분을 포함하는 단위 투여 형태로 통상적으로 투여된다.
- [0244] 이상적으로는, 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제는 폐 증상에 대한 최적의 치료를 달성하기 위해 투여되어야 한다. 경구로, 정맥내로 또는 장관외로 투여했을 때 활성제의 피크 혈장 농도는 약 0.5 내지 약 75 μ M, 또는 약 1 내지 50 μ M, 또는 약 2 내지 약 30 μ M로 달성될 수 있다. 이는 또한 예를 들어, 임의로 식염수 중의 0.05 내지 5% 용액의 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제를 정맥내 주사하거나, 약 1-100 mg의 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제를 포함하는 볼러스로서 경구 투여하여 달성될 수 있다. 바람직한 혈액 수준은 약 0.01-5.0 mg/kg/hr을 제공하는 지속적인 주입에 의해, 또는 약 0.4-15 mg/kg의 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제를 포함하는 간헐적인 주입에 의해 유지될 수 있다.
- [0245] 바람직한 용량은 통상적으로 단일 용량, 또는 적절한 간격으로 투여되는 분할 용량, 예를 들어 하루에 2, 3, 4 또는 그 이상의 하위-용량으로 나타내어질 수 있다. 하위-용량 자체는 예를 들어, 대충 간격을 둔 다수의 분리된 투여; 취입기로부터 여러 번 흡입하거나 눈에 다수의 점적을 가하는 것과 같이 더 분할될 수 있다.
- [0246] 일부 실시태양에서는, 항산화제가 세포로 들어가 활성 산소 종과 반응하여 세포 내의 활성 산소 종의 농도를 감소시킨다. 대체된 실시태양에서는, 항산화제가 세포로 들어가거나 주위의 세포의 환경에 존재하면서 활성 산소 종으로부터 생성된 산화제와 반응한다.
- [0247] 본원 발명에 사용하기 위해 고려되는 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제는, 목적 부위 (폐)에 직접적으로 전달되어 폐 염증 증상을 즉시 완화시킬 수 있다. 이러한 전달은 기관지허파파리 세정, 기관내 투여, 흡입 또는 볼러스 투여로 이루어질 수 있다. 이러한 경우에, 계면활성제 혼합물이 포함된다.
- [0248] 폐 세정을 수행하는 방법은 당 분야에서 입수할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고자료로 삽입되는 미국 특허 제6,013,619호를 참조한다. 예를 들어, 폐 세정은 다음과 같이 수행될 수 있다:
- [0249] a) 호기말 양압 (PEEP) 기체를 조절된 압력, 바람직하게는 약 4 내지 20 cm 물의 압력으로 포유류의 폐 구역에 인공 호흡기로 가하고;
- [0250] b) 제약학상 허용되는 수성 매질 중의 묽은 계면활성제를 포함하는 세정 조성물을 하나 이상의 폐엽 또는 폐 구역에 점적 주입하고;
- [0251] c) 결과 폐액을 바람직하게는 약 20 내지 100 mm 수은의 음압을 사용하여 짧은 간격의 기관-기관지 흡입으로 폐로부터 제거한다.
- [0252] 통상적으로, PEEP는 점적 주입 단계 (b) 전에 사전 선택된 시간 주기, 바람직하게는 약 30분 이하 동안 적용되고, 또한 PEEP는 통상적으로 단계 (b) 및 (c) 동안, 그리고 제거 단계 (c) 후 사전 선택된 시간 주기, 바람직

하계는 약 6시간 이하 동안 지속적으로 적용된다.

- [0253] 흡입에 의한 전달은 본원에 추가로 기술한다. 대체된 전달 수단은 정맥내, 경구, 흡입, 캐놀러, 강 내, 근육 내, 경피 및 피하로의 투여를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0254] 본원 발명의 치료 조성물은, 활성 성분으로서 조성물에 용해되거나 분산된 본원에 기술된 바와 같은 계면활성제 혼합물, 프로테아제 억제제, 리파아제 억제제 또는 항산화제와 함께, 생리학상 허용되는 담체를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 치료 조성물은 포유류 또는 인간 환자에게 치료 목적으로 투여했을 때 면역원성이 아니다.
- [0255] 조성물에 용해 또는 분산된 활성 성분을 포함하는 제약 조성물의 제조는 당 분야에 공지되어 있고, 제제에 따라 제한될 필요는 없다. 통상적으로, 그러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사제로 제조되지만, 사용하기 전에는 액체 중의 용액 또는 현탁액으로 적합한 고체 형태로도 제조될 수 있다. 제제는 또한, 유화될 수 있다.
- [0256] 활성 성분은 제약학상 허용되고 활성 성분과 혼화될 수 있는 부형제와, 본원 발명에 기술된 치료 방법에 사용하기에 적합한 양으로 혼합될 수 있다. 적절한 부형제는 예를 들어, 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등, 및 그의 조합이다. 또한 필요에 따라, 조성물은 활성 성분의 효과를 증강시키는 소량의 보조 성분, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 등을 포함할 수 있다.
- [0257] 예시적인 액체 담체는 활성 성분과 물 이외에 다른 물질을 포함하지 않거나, 생리학적 pH 값에서 인산나트륨과 같은 완충액, 생리 식염수, 또는 인산-완충 식염수와 같이 이들 모두를 포함하는 멸균 수용액이다. 또한 나아가, 수성 담체는 하나 이상의 완충액 염, 및 염화나트륨 및 염화칼륨과 같은 염, 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜 및 기타 용질을 포함할 수 있다.
- [0258] 일부 실시태양에서 액체 담체는 탐 (Tham) 완충제인데, 이는 본질적으로 다음과 같이 제조될 수 있다. 아세트산 (AR 셀렉트, ACS, 말링크로트, 파리, KY)으로 pH를 7.2 ± 0.5 로 조정한 0.37 ml의 탐 용액 (트로메타민 주사, NDC 0074-1593-04, 애보트 래보라토리즈 (Abbott Laboratories, 노쓰 시카고, 일리노이주))을, 0.33 ml의 식염수 (0.9%의 염화나트륨 주사, USP, 애보트 래보라토리즈) 및 0.30 ml의 물 (주사를 위한 멸균수, USP, 애보트 래보라토리즈)과 혼합했다. 용액은 무균-여과로 멸균시킬 수 있다.
- [0259] **폐 전달을 위한 에어로졸 제제의 제조**
- [0260] 본 절에서는 계면활성제 제제를 피검체의 폐 표면에 투여하기 위한, 건조-분말 또는 액체-액적 에어로졸을 제조하는 방법 및 장치에 대해 기술한다.
- [0261] 도 1은 본원 발명에 따른 처리 단계 및 제제에 대한 개관을 나타낸다. "계면활성제 혼합물"이라 표기된 박스 10은 인지질, 산포제 및 폐-계면활성제 단백질의 혼합물을 지칭한다. 계면활성제 혼합물은 지질체 제제, 예를 들어 리포솜 현탁액으로 처리될 수 있다. "계면활성제 제제 성분"이라 표기된 박스 12는 계면활성제 혼합물의 기타 성분을 지칭한다. 활성제는 제제에 혼입된다.
- [0262] 삭제
- [0263] 삭제
- [0264] 삭제
- [0265] 삭제
- [0266] 삭제

[0267]	삭제
[0268]	삭제
[0269]	삭제
[0270]	삭제
[0271]	삭제
[0272]	삭제
[0273]	삭제
[0274]	삭제
[0275]	삭제
[0276]	삭제
[0277]	삭제
[0278]	삭제
[0279]	삭제
[0280]	삭제
[0281]	삭제
[0282]	삭제
[0283]	삭제
[0284]	삭제

[0285]	삭제
[0286]	삭제
[0287]	삭제
[0288]	삭제
[0289]	삭제
[0290]	삭제
[0291]	삭제
[0292]	삭제
[0293]	삭제
[0294]	삭제
[0295]	삭제
[0296]	삭제
[0297]	삭제
[0298]	삭제
[0299]	삭제
[0300]	삭제
[0301]	삭제
[0302]	삭제

[0303]	삭제
[0304]	삭제
[0305]	삭제
[0306]	삭제
[0307]	삭제
[0308]	삭제
[0309]	삭제
[0310]	삭제
[0311]	삭제
[0312]	삭제
[0313]	삭제
[0314]	삭제
[0315]	삭제
[0316]	삭제
[0317]	삭제
[0318]	삭제
[0319]	삭제
[0320]	삭제

- [0321] 삭제
- [0322] 삭제
- [0323] 삭제
- [0324] 삭제
- [0325] 삭제
- [0326] 삭제
- [0327] 삭제
- [0328] 삭제
- [0329] 삭제
- [0330] 삭제
- [0331] 삭제
- [0332] 삭제
- [0333] 삭제
- [0334] 삭제
- [0335] 삭제
- [0336] 삭제
- [0337] 삭제
- [0338] 삭제

- [0339] 삭제
- [0340] 삭제
- [0341] 삭제
- [0342] 삭제
- [0343] 삭제
- [0344] 도 1에 나타난 바와 같이, 활성제는 미리 형성된 계면활성제 혼합물, 예를 들어 미리 형성된 리포솜에 첨가되어 계면활성제 제제를 형성할 수 있거나, 12에서와 같이 계면활성제 혼합물 성분에 직접적으로 첨가되어 박스 14에 지시된 바와 같이 직접적으로 계면활성제 제제를 생성할 수 있다. 계면활성제 제제는 잘 규정되어 있는 지질체, 예를 들어 활성제, 계면활성제 혼합물 및 활성제 성분 모두를 포함하는 지질-결정 또는 비결정질 지질체를 포함하는 리포솜, 유기 용매 또는 유기/수성 공용매 중의 성분의 용액, 또는 일부는 지질체 형태이고 기타 성분은 용질 형태인 현탁액일 수 있다. 이하에서 알 수 있는 바와 같이, 계면활성제 제제에 조성 및 구조적으로 필요한 것은 단지, 제제가 상기 모든 지질 및 약물 성분을 포함하는 안정적인 에어로졸-입자 형태로 전환되거나 처리될 수 있다는 것이다.
- [0345] 이제 본 발명이 의도하는 다양한 처리 단계를 고려할 때, "동결건조 입자"로 라벨링된 박스 16은 바람직하게는 지질체의 수성 현탁액인 계면활성제 제제가 동결건조되어 건조 질량을 형성하고 이어서 미분되어 (예를 들면, 분쇄에 의해) 1 내지 5 μm 크기 범위의 질량 중위 공기역학적 직경을 갖는 건조 분말 입자를 함유하는 조성물을 형성한다. 박스 16에 표시된 건조 분말 입자는 저장되고 적당한 에어로솔화 장치에 이용되어 흡입 치료용 (박스 26) 또는 적당한 용매 중 현탁용, 입자 현탁액으로 에어로솔화 (박스 24)용으로 적당한 건조 입자 에어로솔을 생성한다.
- [0346] 다른 실시태양에서, 본 발명은 박스 20에 나타난 액상 계면활성제 제제를 사용자 조절형 네블라이저 또는 에어로솔화기를 이용하여 처리하여 지질체 형태 중 계면활성제 제제를 함유하는 수성 액적 에어로솔을 생성하는 것을 의도한다. 본 실시태양의 계면활성제 제제 성분은 에어로솔 액적 중 현탁된 정돈된 결정성 또는 무정형 지질 입자로 존재할 수 있다.
- [0347] 또 다른 실시태양에서, 계면활성제 제제는 분무 건조에 의해 처리되어 박스 18에 나타난 바와 같이 1 내지 5 μm 입자의 요망되는 질량 중위 공기역학적 직경을 갖는 분무 건조된 입자를 생성한다. 분무 건조된 입자는 이어서 저장되고 사용자에게 의해 흡입 치료를 위하여 상기와 같이 에어로솔화 장치에 이용된다. 나타난 바와 같이, 분말화된 입자는 건조 분말 에어로솔로 송달되거나 또는 입자는 수성 액적 형태로 에어로솔화 수성 매질 중에 현탁될 수 있다. 별법으로, 박스 14 및 26의 직접 연결에 의해 나타난 바와 같이, 액상 형태의 적당한 계면활성제 제제 (예: 휘발성 이적합성 유체 중 함유된 제제 용액 또는 현탁액)은 형성된 입자가 즉시 활성 성분의 치료적 송달을 위하여 흡입되는 에어로솔화 방법으로 형성될 수 있다.
- [0348] 본 발명의 계면활성제 제제의 에어로솔 투여에 의한 약물 송달, 및 이들 잇점을 달성하기에 적합한 에어로솔 형성 방법의 기본은 하기 더 설명된다. 본 발명의 다양한 치료 또는 진단 방법에서 폐 관으로의 활성 성분을 송달하는 것에서의 적용 또한 하기 고려된다.
- [0349] 상기한 바와 같이, 본 발명의 제제는 용액 제제로서 또는 미립자 제제로서 제조될 수 있다. 지질 성분 또는 치료 성분 또는 이들 모두는 또한 수성, 유기 또는 혼합 용매 중에 현탁된 리포솜성, 결정성 또는 무정형 지질체 중에 혼입될 수 있다.
- [0350] 리포솜 (지질 비히클)의 현탁액은 다양한 기술, 예를 들면 문헌[Szoka, F. Jr., et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467-508, 1980]에 설명된 것에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 리포솜 계면활성제 조성물은 일반적으로 무균 리포솜 현탁액이다. 이들 리포솜은 다중 구획 또는 다중층 소포, 단일 구획 소포 및 대형소포

(macrovesicle)일 수 있다. 다중층 소포가 일반적으로 가장 흔하다. 다중층 소포 (multilamellar vesicles; MLVs)는 바람직하게는 무균 조건하에서 단순 지질-필름 수화 기술에 의해 형성될 수 있다.

- [0351] 리포솜성 계면활성제 조성물을 제조하는 한 방법은 계면활성제 폴리펩티드를 유기 용매 중에 선택된 포스포리피드와 함께 용해하고, 이어서 얻은 용액을 수성 완충액 용액과 합치는 것을 포함한다. 얻은 현탁액은 투석하여 유기 용매를 제거한다. 별법으로, 유기 용매는 증발 및 (또는) 진공에의 노출에 의해 제거될 수 있다. 얻어진 지질/폴리펩티드 혼합물은 수성 완충액 시스템 중에서 재수화되어 리포솜을 생성한다 (Olson, F., et al., Biochim. Biophys. Acta, 557:9-23, 1979).
- [0352] 적합한 완충액은 트리스(Tris) 완충액, 탬(Tham) 완충액 시스템 등을 포함한다. 탬은 트리스, 트로메타민 및 트리스(히드록시메틸)아미노메탄으로 또한 알려진 완충 성분이다. 다양한 바람직한 실시태양에서, 조성물은 약 6.5 내지 8.0의 pH를 갖는다.
- [0353] 리포솜은 리포솜의 수성 현탁액을 선택된 균일한 공극 크기를 갖는 일련의 폴리카르보네이트 막을 통하여 압출함으로써 어떤 크기로 만들 수 있다. 막의 공극 크기는 특히 제제가 동일 크기 막을 통하여 2회 이상 압출되는 경우 막을 통한 압출에 의해 제조된 리포솜의 최대 크기에 대략 상응한다. 제조된 리포솜은 0.03 내지 5 미크론의 범위일 수 있다. 균질화 및 초음파법 또한 리포솜을 100 nm 이하의 평균 크기로 작게만드는 것에 유용하다 (Martin, F.J., In: SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS-MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, P. Tyle, ed., Marcel Dekker, New York, pp. 267-316, 1990).
- [0354] 리포솜 형성 전 치료 성분을 리포솜으로 혼입하는 것이 요망되는 경우, 이는 표준 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 리포솜이 지질 수화에 의해 형성되는 경우, 소수성 약물이 수화되는 지질 혼합물 중에 포함되고 친수성 약물은 수화 용액 내로 혼입될 수 있다. 친수성 화합물 (예: 단백질)의 고 캡슐화 효율은 약물 함유 수성 매질이 부분 증발된 지질 구조로 첨가되는 역상 증발 방법을 이용하여 달성될 수 있다.
- [0355] 친수성 약물에 대하여 고 캡슐화 효율을 달성하기 위한 다른 방법은 휘발성 유기 용매 (예: 에테르) 중의 지질 용액을 약물의 수성 용액으로 주입하는 용매 주입법에 의한 것이다. 액상 용액의 고농도 지질에의 연속 주입으로 매우 높은 캡슐화율 (예: 50% 이상)이 달성될 수 있다.
- [0356] 용매 주입 방법은 도 2a에 더욱 일반적으로 예시되어 있고, 도 2a는 친수성 약물의 수성 용액 또는 소수성 약물의 유기 용액의 지질의 공용매 분산액 (계면활성제 혼합물 성분을 함유)에 첨가하고 유기 용매의 수성 희석 및 증발을 함께 또는 후속하여 수행하여 약물을 혼입 또는 캡슐화한 지질 입자 (예: 리포솜)의 벌크 제제를 형성을 나타낸다.
- [0357] 별법으로, 활성제는 미리형성된 리포솜에 첨가될 수 있다. 이 경우, 계면활성제 폴리펩티드-지질 혼합물은 미리형성된 리포솜을 포함한다. 화합물이 소수성 화합물인 경우, 화합물은 수상 매질의 분획에 의해 이중층 막으로 섭취(uptake) 되도록 단순히 리포솜과 접촉할 수 있다. 이온화가능한 친수성 및 양친화성 화합물에 대하여, 미리형성된 리포솜으로의 높은 내부 캡슐화는 이용가능한 방법에 따라서 pH 또는 다른 이온 구배 (예: 암모늄 구배)에 대하여 약물을 로딩하는 것에 달성될 수 있다.
- [0358] 리포솜 제제는 도 1 중 (20)으로 나타낸 바와 같은 수성 액적 형태로 에어로솔화를 위해 지질 현탁액으로 저장될 수 있거나, 또는 리포솜 제제는 도 1에서 (16), (22)로 나타낸 바와 같이 동결건조, 분말화되고 건조 분말 에어로솔로 투여될 수 있다. 별법으로, 리포솜 현탁액은 분말화된 에어로솔로서 투여되기 위하여 분말 형태로 건조된 지질 입자를 형성하는, (18)에서와 같이, 분무 건조될 수 있다.
- [0359] 냉동 건조 (동결건조)는 용액 또는 현탁액으로부터 건조 분말을 제조하기 위한 한 표준 방법이다. 예를 들면, 문헌[Freide, M., et al., Anal. Biochem., 211(1):117-122, 1993; Sarbolouki, M.N. and T. Toliat, PDA J. Pharm. Sci. Technol., 52(1):23-27, 1998] 참조. 동결건조에 이어서, 건조된 계면활성제 제제는 예를 들면 분쇄 또는 다른 통상적인 수단에 의해 미분되어 요망되는 입자 크기를 형성한다.
- [0360] 근래, 액상 기체의 초임계 성질을 이용한 기술이 치료용 단백질을 함유하는 마이크로입자 및 분말의 생성에 이용되어 오고 있다 (Niven, R.W., In: MODULATED DRUG THERAPY WITH INHALATION AEROSOLS: REVISITED, A.J. Hickey, ed., Marcel Dekker, New York). 흡입 목적에 적당한 바람직한 결정 성질 및 특성을 갖는 입자는 상기 방법들에 의해 제조될 수 있다. 초임계 유체 처리 기술의 예로는 초임계 유체의 급속 팽창(rapid expansion of supercritical fluids; RESS), 입자를 제조하기 위하여 기체-항용매(gas-antisolvent; GAS) 침전물을 사용하는 것, 및 초임계 유체의 용액 강화 분산 (solution-enhanced dispersion of supercritical fluids; SEDS)를 들 수 있다 (미국 특허 제5,301,644호, 제5,707,634호, 제5,770,559호, 제5,981,474호, 제5,833,891호, 제

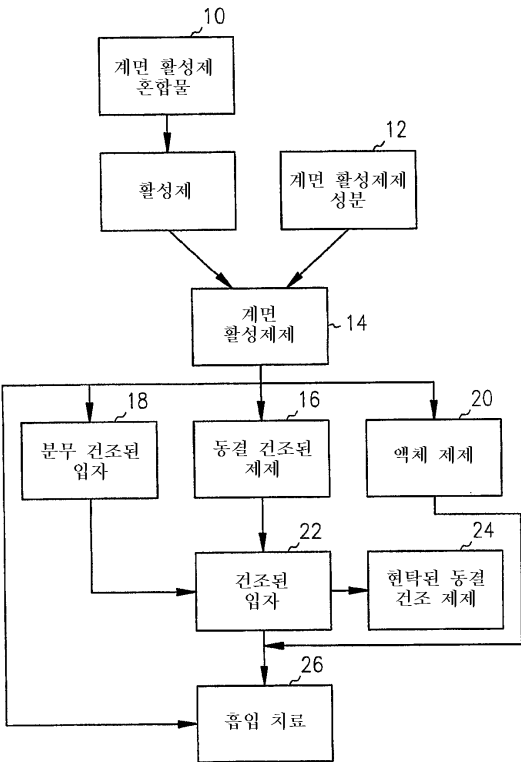
5,874,029호 및 제6,063,138호 참조).

- [0361] 분무 건조가 또한 요망되는 입자의 건조된 지질 입자를 제조하기 위하여 유리하게 사용될 수 있다 (문헌 [Master, K., SPRAY DRYING HANDBOOK, 5th edition, J. Wiley & Sons, New York, 1991; Maa, Y.F. et al., Pharm. Res., 15(5):768-775, 1998; Maa, Y.F., Pharm. Dev. Technol., 2(3):213-223, 1997] 참조). 다양한 분무 건조 방법이 특허 문헌에 기술되어 있고, 예를 들면 미국 특허 제6,174,496호, 제5,976,574호, 제5,985,284호, 제6,001,336호, 제6,015,256호, 제5,993,805호, 제6,223,455호, 제6,284,282호 및 제6,051,257호를 참조하라.
- [0362] 사용될 수 있는 한 분무-건조 장치는 건조 탱크를 갖는 사이클론(cyclone) 건조기이다. 액체 혼합물은 건조 탱크에 공급되고, 가온 기체 (예: 공기 또는 질소) 또는 다른 불활성 기체가 탱크의 상부에 가해진다. 공급 기체는 탱크에 들어가면서 부서지고, 탱크 하부쪽으로 및 거기서부터 수집 단위로 운반되면서 가온 기체에 의해 건조된다. 공기 공정 파라미터에 따라서, 용매, 주입 속도 및 가온 기체 흐름 속도를 조정하여 요망되는 크기의 건조된 입자를 제조할 수 있다. 이 경우, 평균 수력학 직경 (예: 1 내지 5 μm)를 갖는 입자가 사용될 수 있다. 이 과정에서, 건조 온도는 약 37°C 이상이고, 바람직하게는 40°C 보다 높으며, 100°C를 넘을 수도 있다. 수집 챔버 내의 온도는 실질적으로 가열된 공기의 온도보다 낮다. 상기 일반적인 방법은 도 2b에 예시되어 있고, 도 2b는 또한 계면활성제-혼합물 성분을 함유하는 적합한 공용매 용액에 첨가된 소수성 또는 친수성 약물을 나타낸다. 얻은 혼합물은 분무 건조되어 벌크 분말 제제로 요망되는 크기의 건조 입자를 생성한다. 이어서, 이들 입자는 포장되고 건조 입자를 폐로 투여하도록 에어로솔기에 사용될 때까지 바람직하게는 건조 분위기하에서 저장될 수 있다.
- [0363] 도 3a 및 3b는 상기 방법에 의해 제조될 수 있는 유형의 건조된 지질 입자의 광현미경사진이다. 도 3a는 (비록 모두 좁은 입자 범위에 있지만) 다양한 형태를 갖는 무정형 입자를 나타낸다. 도 3b에 나타난 입자는 잘 규정된 결정성 형태를 갖는 결정성 분말 입자이다. 두 가지 유형의 입자는 모두 본 발명에 적당하다, 일단 형성되면 입자가 초기 상태를 유지하는 것이 바람직하고, 이는 2 상태 간의 전이가 활성 제약 성분의 화학적 및 물리적 안정성에 영향을 줄 수 있고 흡입 장치로부터 분산 및 탈응집되는 분말의 능력에 직접적으로 영향을 줄 수 있기 때문이다. 이들 변화는 또한 입자의 약물동력학적 성질에 영향을 줄 수 있다. 일반적으로, 무정형 분말이 결정형으로 전이되는 경향에 영향을 주는 인자는 습도, 친수성 성분의 존재, 불순물, 온도 및 시간을 포함한다. 무정형 입자가 결정 상태로 전이되는 경향을 감소시킬 수 있는 인자는 단백질 및 폴리머의 존재, 및 소수성 물질이다. 전이에 영향을 주는 이들 여러 인자 중, 가장 중요한 것은 온도 및 습도이고, 이는 입자가 에어로솔화되기에 앞서 중간 저장 온도하의 건조 상태로 저장될 필요성을 강조하는 것이다.
- [0364] 현탁 또는 건조된 입자를 형성하는 방법에 무관하게, 입자는 1 내지 5 미크론 범위의 요망되는 MMAD를 부여하는 조건하에서 형성된다. 입자가 활성제를 폐 깊숙이 운반하는 것으로 의도되는 경우(예를 들면, 폐 깊은 조직에 영향을 미치는 폐 증상(예: 폐기종)의 치료), 입자는 바람직하게는 1 내지 3 또는 1 내지 2 미크론 MMAD 입자 범위가 우세하다. 약물 송달이 기도를 표적으로 하는 경우, 더 큰 입자 크기, 예를 들면 3 내지 5 MMAD 크기 범위가 더욱 적합할 수 있다.
- [0365] 제제가 리포솜 또는 다른 지질 입자의 수성 현탁액인 경우, 다양한 시판되는 네블라이저가 요망되는 에어로솔 입자를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 통상적으로, 네블라이징 조작은 약 10 내지 50 psig의 압력에서 수행되고, 형성되는 수성 입자는 통상적으로 약 2 내지 6 미크론의 범위이다. 장치는 공지의 조작 변수에 따라서 정량의 에어로솔화된 리포솜 또는 지질 기재 입자를 생성하도록 조절될 수 있다.
- [0366] 리포솜의 수성 현탁액, 바람직하게는 약 25% 내지 30% 미만의 캡슐화된 수성 부피를 함유하는 상대적으로 묽은 현탁액을 에어로솔화하는 적당한 다른 장치는 담체 유체를 수성 입자의 미세 미스트(mist)로 부수는 초음파 에너지를 사용하는 것이다. 초음파 네블라이저 장치는 그 입자 크기가 압축 공기 네블라이저에 의해 형성된 것과 대략 동일 (즉, 약 2 내지 6 미크론)한 리포솜 에어로솔 미스트를 형성함이 밝혀져 있다.
- [0367] 수-가용성, 리포솜-투과성 약물의 송달에 사용되는 유형의 농축된 리포솜 분산액의 에어로솔화를 위해서, 분산액은 먼저 담체 용매와 혼합되어 에어로솔화될 수 있는 묽은 분산액을 형성한다. 담체 용매는 예를 들면 공기 또는 초음파 네블라이저에 의해 분무에 적당한 형태로 분산액이 희석 또는 적응되는, 수성 매질일 수 있다. 첨가된 첨가제의 양은 분산액이 분무에 적당하게 하는데 충분한 양이고, 예를 들면 약 30% 미만의 총 캡슐화 부피를 함유한다. 분산액이 총 분산액 부피의 70 내지 75%의 초기 캡슐화 부피를 갖는다고 가정할 때, 주어진 부피의 분산액은 희석제 1 내지 2 부피 이상으로 희석되어야만 함을 이해할 수 있다.

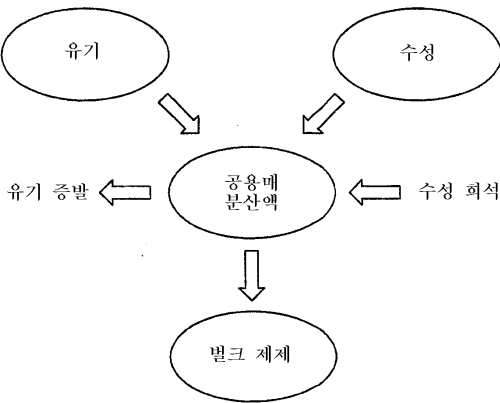
- [0368] 별법으로, 계면활성제 성분은 하기 주어진 것과 같은 적당한 휘발성 이적합성 용매에 용해 또는 분산되고, (i) 분무 건조된 입자의 초기 형성 및 (ii) 급방 형성된 입자의 폐로의 흡입을 유도하는 조건하에서 적당한 에어로솔화 장치로부터 분무될 수 있다.
- [0369] 본 부분은 건조된 지질 입자의 기공(airborne) 현탁액을 생성하도록 디자인된 다양한 자체 함유 송달 장치를 기술한다. 본원에서 "자체 함유(self-contained)"는 입자 에어로솔이 압축된 플루오로클로로카본 추진제의 방출에 의해서 또는 사용자에 의해 장치를 통해서 유도되거나 장치 중 생성된 공기의 기류에 의해서 생성된 차동적 압력에 의해 추진된 자체 함유 장치 중에서 생성되는 것을 의미한다. 건조 분말을 위한 통상적인 분말화 에어로솔기가 또한 적합함을 이해할 수 있다.
- [0370] 지질 입자/추진제 현탁액. 본 기구 또는 시스템은 추진제 중에 현탁된 정량의 건조된 지질 입자를 송달하기 위한 통상적인 압축 추진제 분무 장치를 사용한다. 시스템이 적당한 추진제 중의 지질 입자 (예: 리포솜)의 장치 간의 현탁액을 요하기 때문에, 현탁액의 지질 입자 및 추진제 성분은 저장에 안정하도록 선택되어야만 한다.
- [0371] 여러 플루오로클로로카본 추진제 용매가 자체 함유 흡입 장치에 사용 또는 제안되어 왔다. 대표적인 용매로는 "프레온(Freon) 11" (CCl_3F), "프레온 12" (CCl_2F_2), "프레온 22" (CHClF_2), "프레온 113" ($\text{CCl}_2\text{FCClF}_2$) 및 다른 것들을 들 수 있다. 지질 입자/추진제 현탁액을 형성하기 위하여, 건조된 지질 입자는 약 1 내지 30, 바람직하게는 약 10 내지 25 중량% (총 추진제 중량 기준)의 최종 지질 입자 농도로 선택된 추진제 또는 추진제 혼합물에 첨가된다. 약물이 추진제 현탁액의 건조된 지질 입자 중에 캡슐화된 채 잔류하는 수-가용성 화합물인 경우, 추진제 중의 지질 입자의 최종 농도는 주어진 에어로솔 현탁액 부피 중 약물의 선택된 정량 투여량을 얻도록 조정된다. 따라서, 예를 들면 리포솜이 건조된 리포솜 제제 당 0.05 mg 약물을 함유하도록 제제화되고 투여될 약물의 선택된 투여량이 1 mg이라면, 현탁액은 에어로솔 투여량 당 20 mg의 건조된 리포솜을 함유하도록 제제화된다.
- [0372] 지질-가용성 약물, 즉 추진제 용매 중 용이하게 용해되는 것에 대해서는, 2가지 제제 접근법이 가능하다. 먼저, 약물을 처음에 건조된 지질 입자를 형성하는데 사용되는 지질 중에 함유되고, 이어서 이들은 상기와 같이 선택된 농도의 약물/추진제 부피를 얻는 양으로 추진제에 첨가된다. 별법으로, 약물은 처음에 선택된 약물 농도로 용매로 첨가될 수 있다. 이러한 제제 중 지질 입자는 에어로솔 형성 및 용매 증발 도중에 약물에 대한 지질 저장소로도 작용할 수 있는 "빈" 건조 입자이다. 빈 지질 입자의 최종 농도는 정량의 약물을 유지하기에 적당한 알맞은 총 지질 용량을 얻도록 조정된다.
- [0373] 추진제 중 지질-입자 유입(entrainment). 이 기구 또는 시스템에서, 정량의 약물 용량을 함유하는 건조된 지질 입자는 송달 패킷 중 탈수된 형태로 미리패킷징된다. 패킷은 추진제 분무 장치를 사용하여 리포솜 입자의 기공 현탁액 중의 패킷의 리포솜 내용물을 방출한다.
- [0374] 공기 중 지질-입자 유입. 제3 유형의 송달 기구 또는 시스템은 건조된 지질 입자를 유입하고 이를 사용자의 호흡관으로 끌어들이기 위하여 사용자 흡입에 의해 생성되는 공기 기류를 이용한다. 조작시, 패킷은 노즐 상에, 바람직하게는 상기와같이 패킷의 "내부" 말단의 봉합이 파열되고 패킷의 다른 말단은 개봉되어 있는 방식으로 위치한다. 사용자는 이제 입술을 마우스피스에 위치시키고 힘차게 흡입하여 공기를 신속하게 흡입기 파이프 및 파이프를 통하여 끌어당긴다. 파이프를 끌어당겨진 공기는 노즐에 집중되어 지질 입자를 패킷을 빠져나가 대류 영역으로 운반하는 고속 공기 기류를 일으킨다. 공기 기류 및 유입된 리포솜은 패킷에 충돌하여 이것이 회전하고 대류 흐름을 만든다. 지질 입자는 따라서 흡입에 의해 사용자의 호흡기로 끌어당겨지기 직전에 더욱 균등하고 더 넓은 횡단면에 걸쳐서 분포된다.
- [0375] 별법으로, 지질 입자는 환자의 흡입하는 호흡과 독립적으로 분말을 분산 및 에어로솔화하는데 필요한 힘을 제공하는 장치 내에서 유지될 수 있다. 흡입 기동 내 투여 타이밍은 또한 송달 시스템 내에 혼입된 센서에 의해 조절될 수 있다.
- [0376] 하기 실시예는 본 발명을 예를 들어 설명하나, 제한하지는 않는 것을 의도한다.

도면

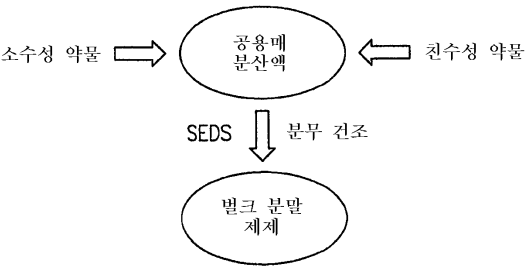
도면1



도면2A



도면2B



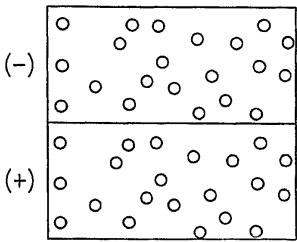
도면3A



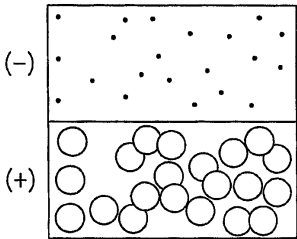
도면3B



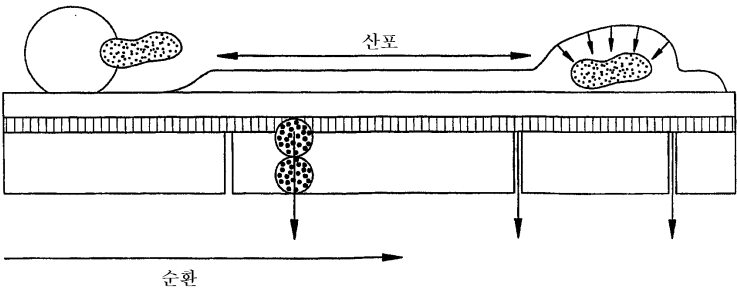
도면4A



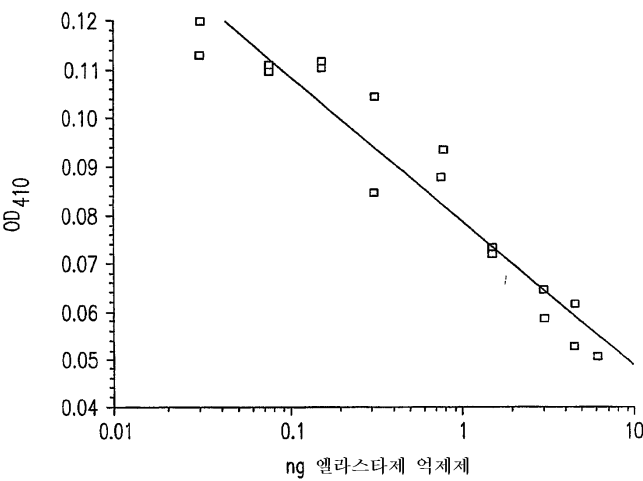
도면4B



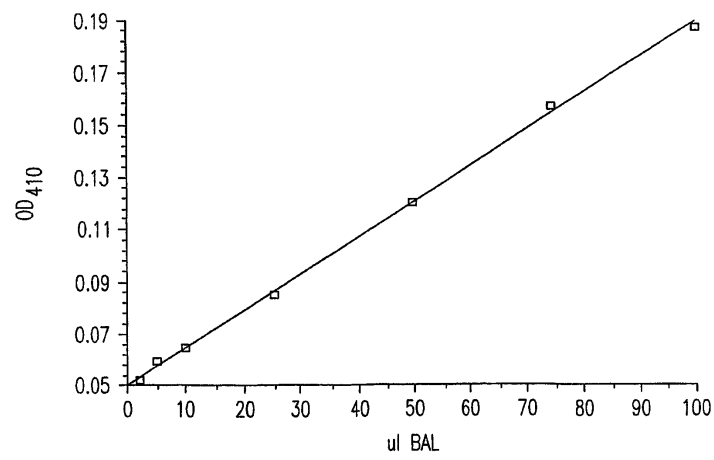
도면4C



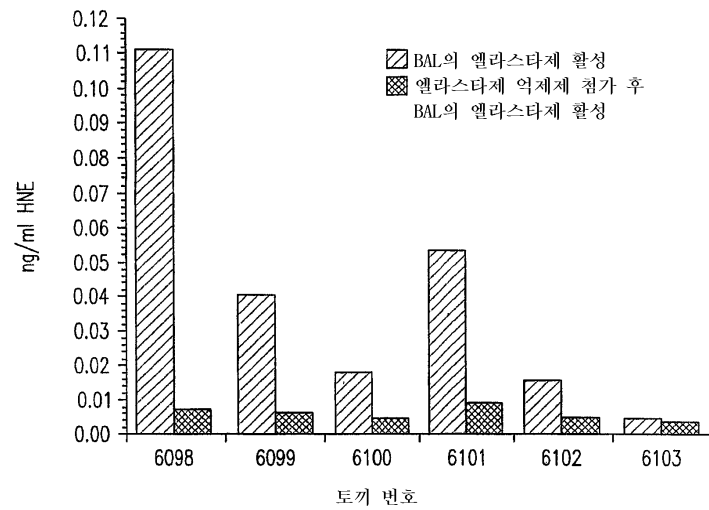
도면5A



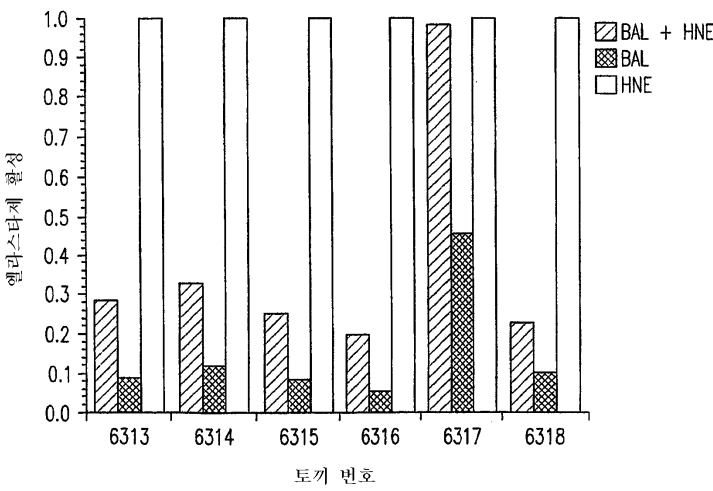
도면5B



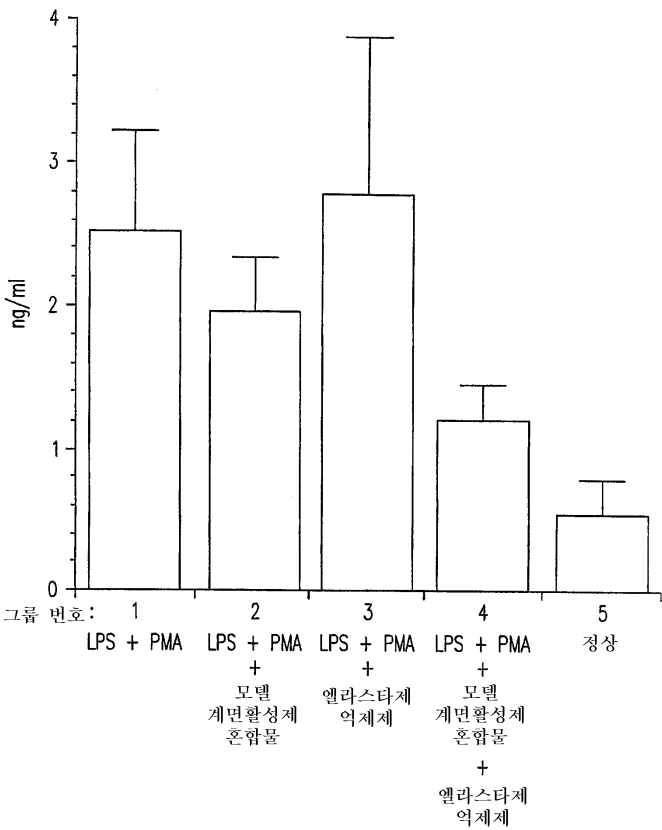
도면6A



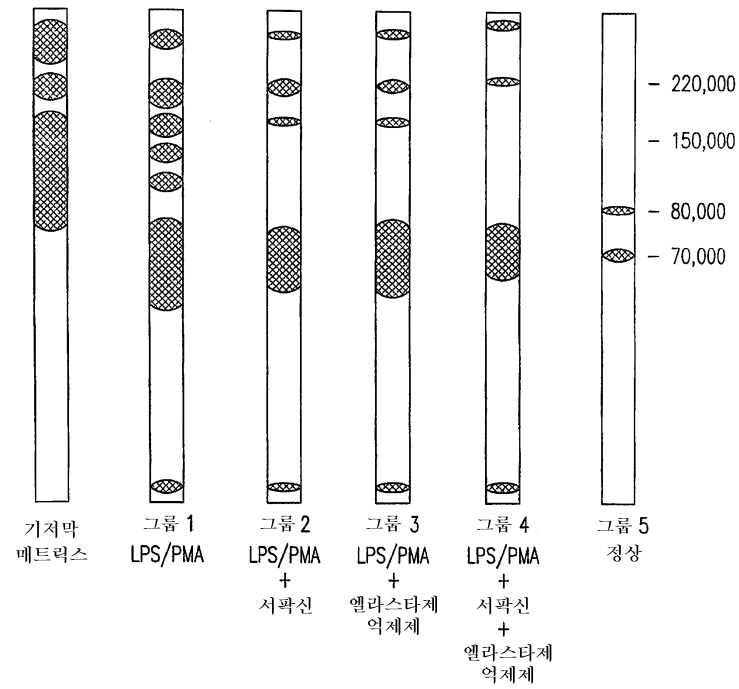
도면6B



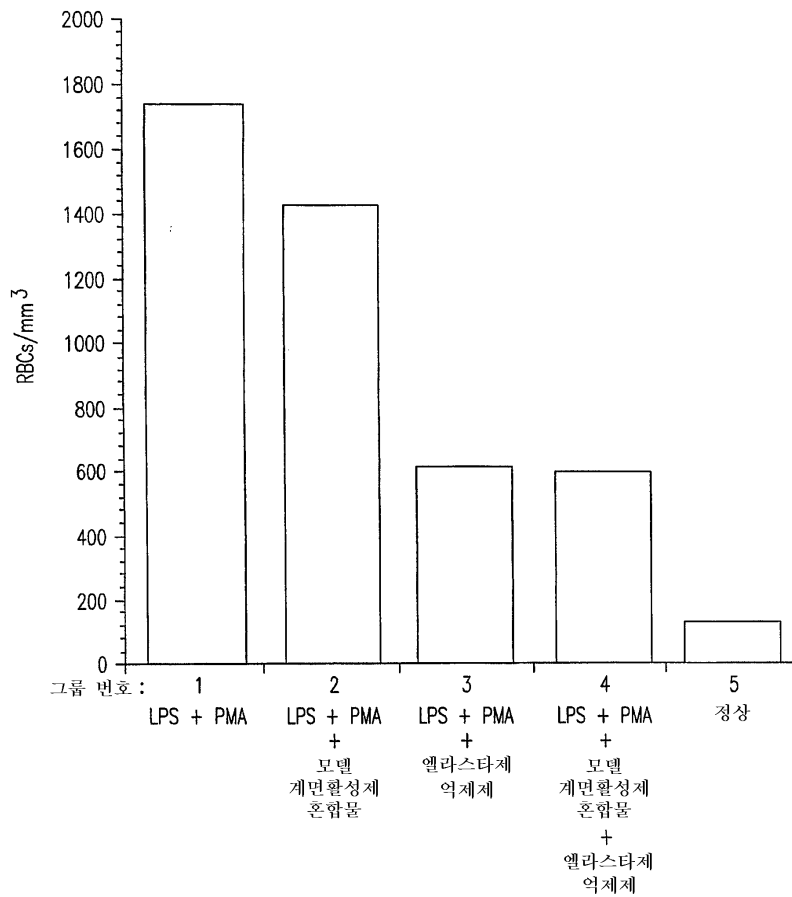
도면7A



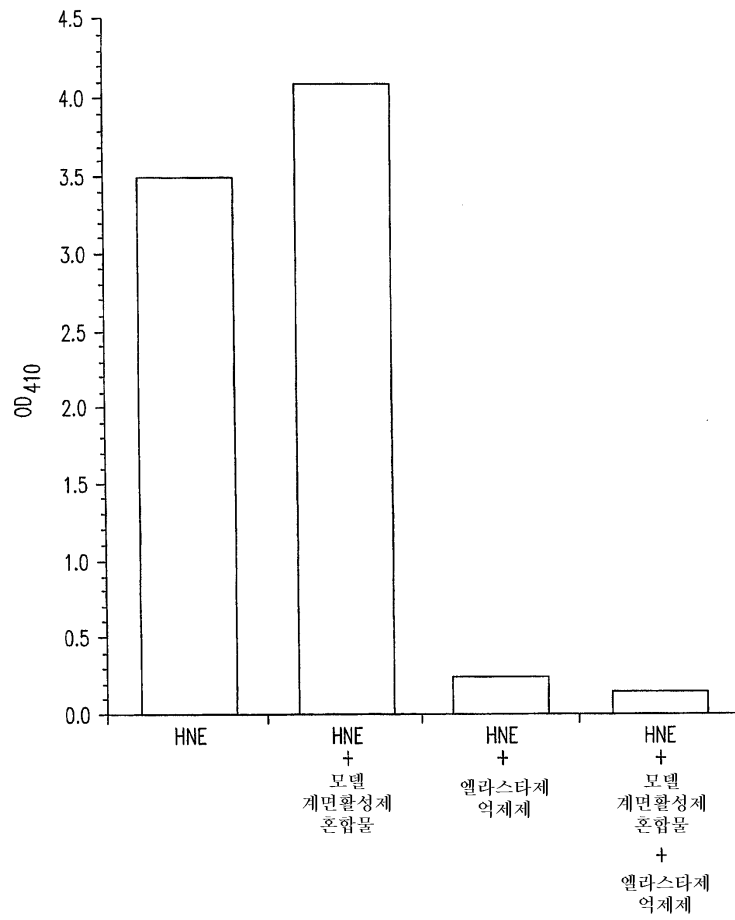
도면7B



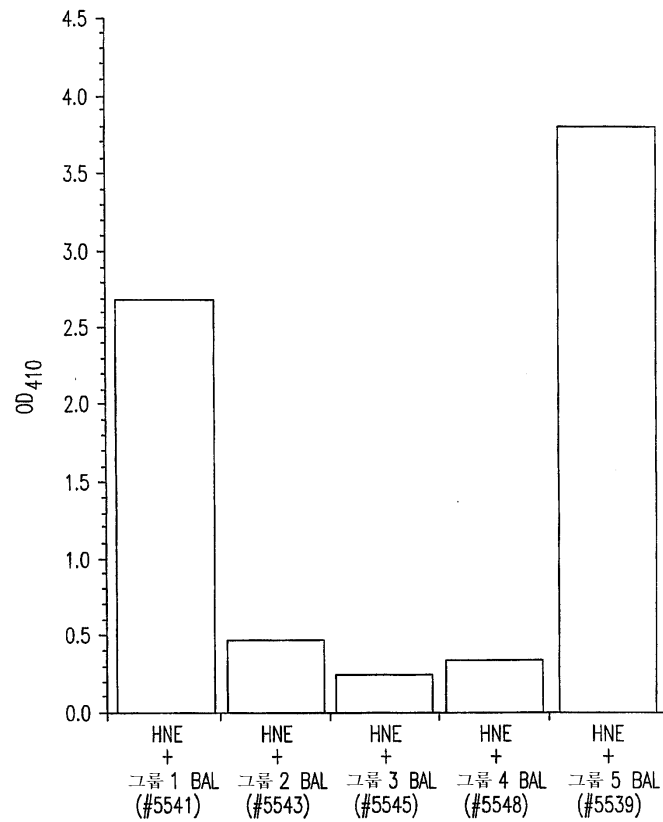
도면7C



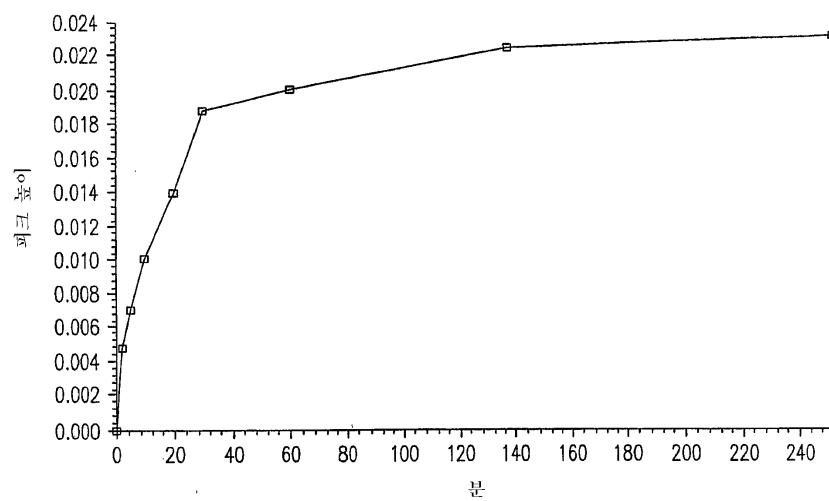
도면8



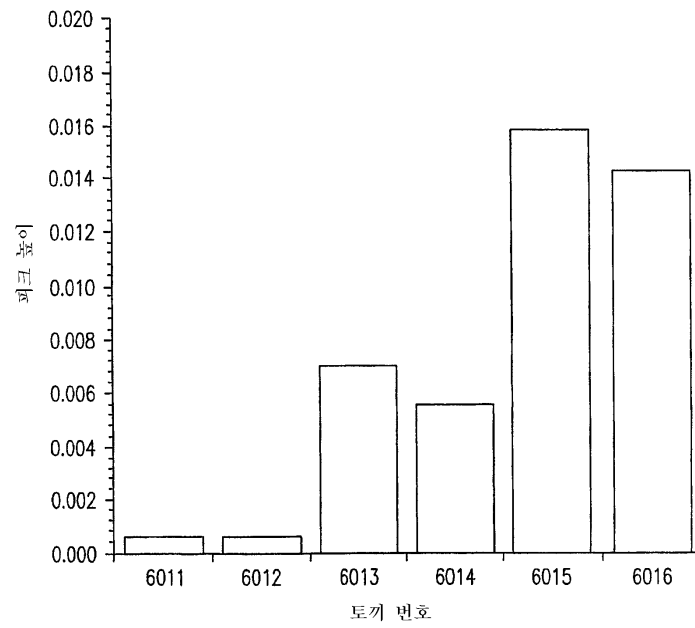
도면9



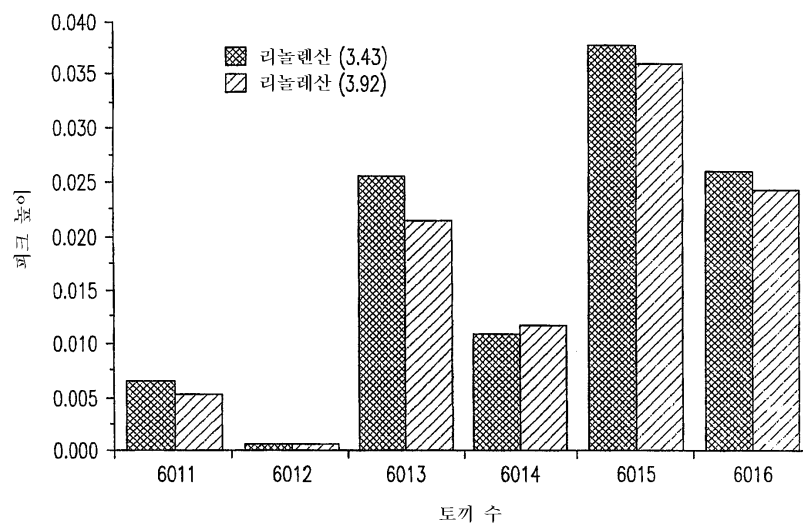
도면10



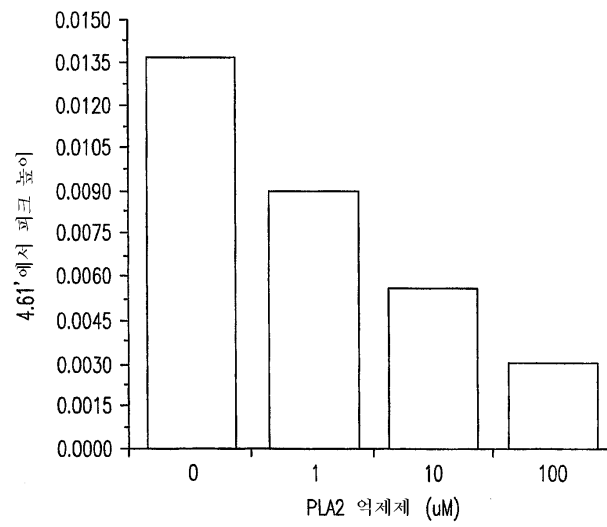
도면11



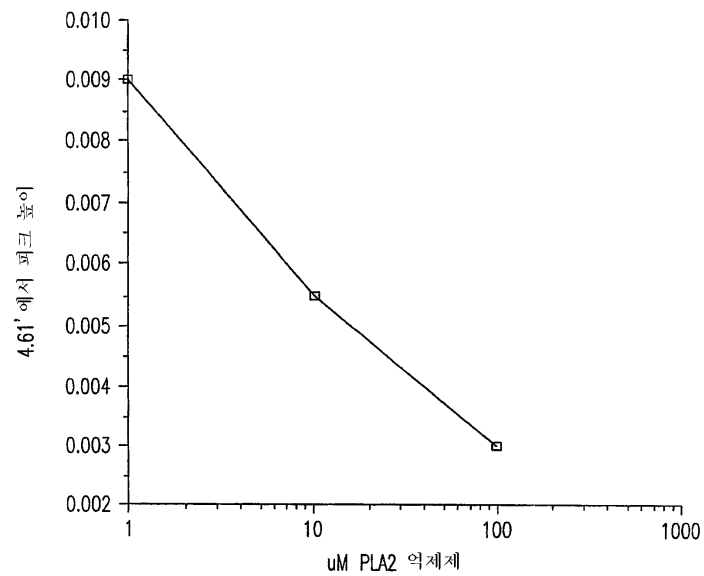
도면12



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Scripps Research Institute
 Cochrane, Charles G.
 Oades, Zenaida G.
 Revak, Susan D.
 Niven, Ralph

<120> Treatment and Prevention of Pulmonary Conditions

<130> 1361.037W01

<150> US 60/375,968
<151> 2002-04-25

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> A surfactant protein

<400> 1
Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Lys
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Lys
20

<210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 2
Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Lys Leu Leu
20

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 3
Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu Lys Lys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Lys Lys Leu
20

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 4

Asp Leu Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Leu Asp

1	5	10	15
Leu Leu Leu Leu Asp			
	20		

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 5

Arg Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Arg

1	5	10	15
Leu Leu Leu Leu Arg			
	20		

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> A surfactant protein

<400> 6

Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1	5	10	15
Leu Leu Arg Leu Leu			
	20		

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 7

Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu

1	5	10	15
Leu Leu Arg Arg Leu			
	20		

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 8

Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Cys Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Arg

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 9

Arg Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu Leu
 20

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 10

Arg Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Cys Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Arg Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg
 20 25

<210> 11

<400> 11

000

<210> 12

<400> 12

000

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A surfactant protein

<400> 13

His Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu His
 20

<210> 14

<211> 379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Glu Gln Leu Ser Ser Ala Asn Thr Arg Phe Ala Leu Asp Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Glu Asn Asn Pro Ala Gly Asn Ile Phe Ile Ser Pro
 20 25 30
 Phe Ser Ile Ser Ser Ala Met Ala Met Val Phe Leu Gly Thr Arg Gly
 35 40 45
 Asn Thr Ala Ala Gln Leu Ser Lys Thr Phe His Phe Asn Thr Val Glu
 50 55 60
 Glu Val His Ser Arg Phe Gln Ser Leu Asn Ala Asp Ile Asn Lys Arg
 65 70 75 80
 Gly Ala Ser Tyr Ile Leu Lys Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Lys

85 90 95
 Thr Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Phe Leu Val Ser Thr Gln Lys Thr Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Asp Leu Ala Ser Val Asp Phe Gln His Ala Ser Glu Asp Ala
 115 120 125
 Arg Lys Thr Ile Asn Gln Trp Val Lys Gly Gln Thr Glu Gly Lys Ile
 130 135 140
 Pro Glu Leu Leu Ala Ser Gly Met Val Asp Asn Met Thr Lys Leu Val
 145 150 155 160

Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asn Trp Lys Asp Lys Phe Met
 165 170 175
 Lys Glu Ala Thr Thr Asn Ala Pro Phe Arg Leu Asn Lys Lys Asp Arg
 180 185 190
 Lys Thr Val Lys Met Met Tyr Gln Lys Lys Lys Phe Ala Tyr Gly Tyr
 195 200 205
 Ile Glu Asp Leu Lys Cys Arg Val Leu Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Glu
 210 215 220
 Glu Leu Ser Met Val Ile Leu Leu Pro Asp Asp Ile Glu Asp Glu Ser

225 230 235 240
 Thr Gly Leu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Leu His
 245 250 255
 Glu Trp Thr Lys Pro Glu Asn Leu Asp Phe Ile Glu Val Asn Val Ser
 260 265 270
 Leu Pro Arg Phe Lys Leu Glu Glu Ser Tyr Thr Leu Asn Ser Asp Leu
 275 280 285

Ala Arg Leu Gly Val Gln Asp Leu Phe Asn Ser Ser Lys Ala Asp Leu

290 295 300
 Ser Gly Met Ser Gly Ala Arg Asp Ile Phe Ile Ser Lys Ile Val His
 305 310 315 320
 Lys Ser Phe Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
 325 330 335
 Thr Ala Gly Ile Ala Thr Phe Cys Met Leu Met Pro Glu Glu Asn Phe
 340 345 350
 Thr Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Ser Ser Gly

355 360 365
 Ser Ile Leu Phe Leu Gly Arg Phe Ser Ser Pro
 370 375

<210> 15
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
 1 5 10 15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
 20 25 30
 Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn

35 40 45
 Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln
 50 55 60
 Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser
 65 70 75 80
 Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr
 85 90 95
 His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro

100 105 110
 Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn
 115 120 125
 Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu
 130 135 140
 Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys
 145 150 155 160
 Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu
 165 170 175

Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys
 180 185 190
 Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu
 195 200 205
 Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
 210 215 220
 Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val
 225 230 235 240
 Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys

245 250 255
 Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala
 260 265 270
 Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu
 275 280 285
 Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
 290 295 300
 Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
 305 310 315 320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
 325 330 335
 Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
 340 345 350
 Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
 355 360 365
 Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
 370 375 380
 Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu

385 390 395 400
 Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
 405 410 415
 Gln Lys

<210> 16
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Ala Gln Leu Cys Gly Leu Arg Arg Ser Arg Ala Phe Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Ser Leu Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala Ala Asp Arg Glu Arg
 20 25 30

Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln
 50 55 60
 Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr
 65 70 75 80
 Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val Thr Glu Asn Ala Thr
 85 90 95
 Gly Asp Leu Ala Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp Ser Ser Val Pro Ser

100 105 110
 Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser Ser Asp Met Phe Asn
 115 120 125
 Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala
 130 135 140
 Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu
 165 170 175

Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln Glu Asn Pro Pro Leu
180 185 190

Pro Leu Gly Ser Lys Val Val Val Leu Ala Gly Leu Phe Val Met Val
195 200 205

Leu Ile Leu Phe Leu Gly Ala Ser Met Val Tyr Leu Ile Arg Val Ala
210 215 220

Arg Arg Asn Gln Glu Arg Ala Leu Arg Thr Val Trp Ser Ser Gly Asp
225 230 235 240

Asp Lys Glu Gln Leu Val Lys Asn Thr Tyr Val Leu
245 250

<210> 17

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Gln Glu Pro Val Lys Gly Pro Val Ser Thr Lys Pro Gly Ser Cys
1 5 10 15

Pro Ile Ile Leu Ile Arg Cys Ala Met Leu Asn Pro Pro Asn Arg Cys
20 25 30

Leu Lys Asp Thr Asp Cys Pro Gly Ile Lys Lys Cys Cys Glu Gly Ser
35 40 45

Cys Gly Met Ala Cys Phe Val Pro Gln
50 55

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Arg Ala Ser Ser Phe Leu Ile Val Val Val Phe Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15

Thr Leu Val Leu Glu Ala Ala Val Thr Gly Val Pro Val Lys Gly Gln
20 25 30

Asp Thr Val Lys Gly Arg Val Pro Phe Asn Gly Gln Asp Pro Val Lys
35 40 45

Gly Gln Val Ser Val Lys Gly Gln Asp Lys Val Lys Ala Gln Glu Pro
50 55 60

Val Lys Gly Pro Val Ser Thr Lys Pro Gly Ser Cys Pro Ile Ile Leu
65 70 75 80

Ile Arg Cys Ala Met Leu Asn Pro Pro Asn Arg Cys Leu Lys Asp Thr
85 90 95

Asp Cys Pro Gly Ile Lys Lys Cys Cys Glu Gly Ser Cys Gly Met Ala
100 105 110

Cys Phe Val Pro Gln
115

<210> 19

<211> 134

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 19

```

Gln Glu Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val
 1           5           10           15
Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Asp Gln Asn
           20           25           30
Pro Val Arg Gly Gln Glu Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly
          35           40           45
Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Glu Pro Val

          50           55           60
Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Gly Gln Asp Pro Val Lys Arg Gln Gly
65           70           75           80
Arg Ile Gly Gly Pro Leu Leu Thr Lys Pro Gly Ser Cys Pro Arg Val
          85           90           95
Leu Ile Arg Cys Ala Met Met Asn Pro Pro Asn Arg Cys Leu Arg Asp
          100          105          110
Ala Gln Cys Pro Gly Val Lys Lys Cys Cys Glu Gly Ser Cys Gly Lys

          115          120          125
Thr Cys Met Asp Pro Gln
          130

```

<210> 20

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

```

Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu Trp
 1           5           10           15
Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro Gln
          20           25           30
Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val Gly
          35           40           45

Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile Lys
          50           55           60
Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala Asp
65           70           75           80
Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr Phe
          85           90           95
His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Leu
          100          105          110

Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro Trp
          115          120          125
Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr Thr
          130          135          140
Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro Cys
145          150          155          160
Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu Gln
          165          170          175
Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro Arg

          180          185          190
Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala

```

	195						200						205					
<210>	21																	
<211>	220																	
<212>	PRT																	
<213>	Homo sapiens																	
<400>	21																	
Met	Gly	Ala	Ala	Ala	Arg	Thr	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	
1				5					10					15				
Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Ala	Asp	Ala	Cys	Ser	Cys	Ser	Pro	Val			
			20					25					30					
His	Pro	Gln	Gln	Ala	Phe	Cys	Asn	Ala	Asp	Val	Val	Ile	Arg	Ala	Lys			
		35					40					45						
Ala	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	Asn	Asp	Ile	Tyr	Gly	Asn			
	50					55				60								
Pro	Ile	Lys	Arg	Ile	Gln	Tyr	Glu	Ile	Lys	Gln	Ile	Lys	Met	Phe	Lys			
65					70					75					80			
Gly	Pro	Glu	Lys	Asp	Ile	Glu	Phe	Ile	Tyr	Thr	Ala	Pro	Ser	Ser	Ala			
				85					90					95				
Val	Cys	Gly	Val	Ser	Leu	Asp	Val	Gly	Gly	Lys	Lys	Glu	Tyr	Leu	Ile			
			100					105					110					
Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Gly	Asp	Gly	Lys	Met	His	Ile	Thr	Leu	Cys	Asp			
		115					120					125						
Phe	Ile	Val	Pro	Trp	Asp	Thr	Leu	Ser	Thr	Thr	Gln	Lys	Lys	Ser	Leu			
	130					135					140							
Asn	His	Arg	Tyr	Gln	Met	Gly	Cys	Glu	Cys	Lys	Ile	Thr	Arg	Cys	Pro			
145					150					155					160			
Met	Ile	Pro	Cys	Tyr	Ile	Ser	Ser	Pro	Asp	Glu	Cys	Leu	Trp	Met	Asp			
				165					170					175				
Trp	Val	Thr	Glu	Lys	Asn	Ile	Asn	Gly	His	Gln	Ala	Lys	Phe	Phe	Ala			
			180					185					190					
Cys	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Gly	Ser	Cys	Ala	Trp	Tyr	Arg	Gly	Ala	Ala			
		195					200					205						
Pro	Pro	Lys	Gln	Glu	Phe	Leu	Asp	Ile	Glu	Asp	Pro							
	210					215					220							
<210>	22																	
<211>	211																	
<212>	PRT																	
<213>	Homo sapiens																	
<400>	22																	
Met	Thr	Pro	Trp	Leu	Gly	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Trp	Ser	Leu			
1				5					10					15				
Gly	Asp	Trp	Gly	Ala	Glu	Ala	Cys	Thr	Cys	Ser	Pro	Ser	His	Pro	Gln			
			20					25					30					
Asp	Ala	Phe	Cys	Asn	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Arg	Ala	Lys	Val	Val	Gly			
		35					40					45						
Lys	Lys	Leu	Val	Lys	Glu	Gly	Pro	Phe	Gly	Thr	Leu	Val	Tyr	Thr	Ile			
	50					55					60							
Lys	Gln	Met	Lys	Met	Tyr	Arg	Gly	Phe	Thr	Lys	Met	Pro	His	Val	Gln			
65																		

Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu

				85					90					95				
Val	Asn	Lys	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Asp	Gly	Lys			
				100					105					110				
Met	Tyr	Thr	Gly	Leu	Cys	Asn	Phe	Val	Glu	Arg	Trp	Asp	Gln	Leu	Thr			
				115				120					125					
Leu	Ser	Gln	Arg	Lys	Gly	Leu	Asn	Tyr	Arg	Tyr	His	Leu	Gly	Cys	Asn			
				130				135				140						
Cys	Lys	Ile	Lys	Ser	Cys	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Cys	Phe	Val	Thr	Ser	Lys			
						145		150			155				160			

[illegible]

<210> 23

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Lys Ser Ser Gly Leu Phe Pro Phe Leu Val Leu Leu Ala Leu Gly

1					5					10					15				
Thr	Leu	Ala	Pro	Trp	Ala	Val	Glu	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Ala				
				20					25					30					
Gly	Val	Cys	Pro	Pro	Lys	Lys	Ser	Ala	Gln	Cys	Leu	Arg	Tyr	Lys	Lys				
				35					40					45					
Pro	Glu	Cys	Gln	Ser	Asp	Trp	Gln	Cys	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	Cys	Cys				
				50					55					60					
Pro	Asp	Thr	Cys	Gly	Ile	Lys	Cys	Leu	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Pro	Asn				
				65					70					75					
								70					75						

[illegible]

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$ \angle

223> A peptide used as an elastase substrate

<221> SITE

<222> 1

<223> Xaa = MeO-Suc

<221> SITE

<222> 5

<223> Xaa = Val-pNA

<400> 24

Xaa Ala Ala Pro Xaa

1 5

<210> 25

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Trp Leu Cys Pro Leu Ala Leu Asn Leu Ile Leu Met Ala Ala Ser

1 5 10 15

Gly Ala Val Cys Glu Val Lys Asp Val Cys Val Gly Ser Pro Gly Ile

20

25

30

Pro Gly Thr Pro Gly Ser His Gly Leu Pro Gly Arg His Gly Arg Asp

35

40

45

Gly Leu Lys Gly Asp Leu Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly

50

55

60

Glu Met Pro Cys Pro Pro Gly Asn Asp Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly

65

70

75

80

Ile Pro Gly Glu Cys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Glu Arg Gly Pro

85

90

95

Pro Gly Leu Arg Ala His Leu Asp Glu Glu Leu Gln Ala Thr Leu His

100

105

110

Asp Phe Arg His Gln Ile Leu Gln Thr Arg Gly Ala Leu Ser Leu Gln

115

120

125

Gly Ser Ile Met Thr Val Gly Glu Lys Val Phe Ser Ser Asn Gly Gln

130

135

140

Ser Ile Thr Phe Asp Ala Ile Gln Glu Ala Cys Ala Arg Ala Gly Gly

145

150

155

160

Arg Ile Ala Val Pro Arg Asn Pro Glu Glu Asn Glu Ala Ile Ala Ser

165

170

175

Phe Val Lys Lys Tyr Asn Thr Tyr Ala Tyr Val Gly Leu Thr Glu Gly

180

185

190

Pro Ser Pro Gly Asp Phe Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Pro Val Asn Tyr

195

200

205

Thr Asn Trp Tyr Arg Gly Glu Pro Ala Gly Arg Gly Lys Glu Gln Cys

210

215

220

Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Gln Trp Asn Asp Arg Asn Cys Leu Tyr

225

230

235

240

Ser Arg Leu Thr Ile Cys Glu Phe

245

<210> 26
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Met Trp Leu Cys Pro Leu Ala Leu Asn Leu Ile Leu Met Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Cys Glu Val Lys Asp Val Cys Val Gly Ser Pro Gly Ile
 20 25 30
 Pro Gly Thr Pro Gly Ser His Gly Leu Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp
 35 40 45

Gly Val Lys Gly Asp Pro Gly Pro Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly
 50 55 60
 Glu Thr Pro Cys Pro Pro Gly Asn Asn Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly
 65 70 75 80
 Val Pro Gly Glu Arg Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Glu Arg Gly Pro
 85 90 95
 Pro Gly Leu Pro Ala His Leu Asp Glu Glu Leu Gln Ala Thr Leu His
 100 105 110

Asp Phe Arg His Gln Ile Leu Gln Thr Arg Gly Ala Leu Ser Leu Gln
 115 120 125
 Gly Ser Ile Met Thr Val Gly Glu Lys Val Phe Ser Ser Asn Gly Gln
 130 135 140
 Ser Ile Thr Phe Asp Ala Ile Gln Glu Ala Cys Ala Arg Ala Gly Gly
 145 150 155 160
 Arg Ile Ala Val Pro Arg Asn Pro Glu Glu Asn Glu Ala Ile Ala Ser
 165 170 175
 Phe Val Lys Lys Tyr Asn Thr Tyr Ala Tyr Val Gly Leu Thr Glu Gly
 180 185 190

Pro Ser Pro Gly Asp Phe Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Pro Val Asn Tyr
 195 200 205
 Thr Asn Trp Tyr Arg Gly Glu Pro Ala Gly Arg Gly Lys Glu Gln Cys
 210 215 220
 Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Gln Trp Asn Asp Arg Asn Cys Leu Tyr
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Thr Ile Cys Asp Phe
 245

<
 210> 27
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45

Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly

50 55 60
Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn
65 70 75 80
Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu
85 90 95
Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys
100 105 110
Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln

115 120 125
Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys
130 135 140
Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu
145 150 155 160
Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu
165 170 175
Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His
180 185 190

Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys
195 200 205

Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys
210 215 220
Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu
225 230 235 240
Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile
245 250 255

Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg
260 265 270
Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro
275 280 285
Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser
290 295 300
Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala
305 310 315 320
Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys

325 330 335
Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg
340 345 350
Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr
355 360 365
Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
370 375 380

<210> 28

<211> 197

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Asp Val Gly Ser Lys Glu Val Leu Met Glu Ser Pro Pro Asp Tyr

1 5 10 15
 Ser Ala Ala Pro Arg Gly Arg Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His
 20 25 30
 Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val
 35 40 45
 Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu His Met Ser Gln Lys His
 50 55 60
 Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly Ala Pro Glu Ala Gln Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Leu Val Thr Thr Ala Thr Phe Ser Ile
 85 90 95

Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr Gln Gln Leu Leu Ile Ala
 100 105 110
 Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys Ile Ala Pro
 115 120 125
 Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Asn Arg Lys Val His Asn Phe
 130 135 140
 Gln Met Glu Cys Ser Leu Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys

145 150 155 160
 Leu Gly Gln Ala Glu Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Gly Gly
 165 170 175
 Asp Pro Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Asn Thr Leu Cys Gly Glu Val
 180 185 190
 Pro Leu Tyr Tyr Ile
 195

<210> 29

<211> 374

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Leu Pro Phe Leu Ser Met Leu Val Leu Leu Val Gln Pro Leu Gly

1 5 10 15
 Asn Leu Gly Ala Glu Met Lys Ser Leu Ser Gln Arg Ser Val Pro Asn
 20 25 30
 Thr Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Pro Thr Glu Asn Gly Leu Pro Gly
 35 40 45
 Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys Gly Asp
 50 55 60
 Pro Gly Leu Pro Gly Pro Met Gly Leu Ser Gly Leu Gln Gly Pro Thr
 65 70 75 80

Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Glu Asn Gly Ser Ala Gly Glu Pro Gly
 85 90 95
 Pro Lys Gly Glu Arg Gly Leu Ser Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Ile
 100 105 110
 Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Pro Ser Gly Lys Gln Gly Asn Ile
 115 120 125
 Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro Lys Gly
 130 135 140
 Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Thr Gly Ala Lys Gly Ser

145 150 155 160
 Thr Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Val Gln Gly Ala Pro
 165 170 175
 Gly Asn Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly
 180 185 190
 Ala Pro Gly Ser Arg Gly Pro Pro Gly Leu Lys Gly Asp Arg Gly Val
 195 200 205
 Pro Gly Asp Arg Gly Ile Lys Gly Glu Ser Gly Leu Pro Asp Ser Ala

 210 215 220
 Ala Leu Arg Gln Gln Met Glu Ala Leu Lys Gly Lys Leu Gln Arg Leu
 225 230 235 240
 Glu Val Ala Phe Ser His Tyr Gln Lys Ala Ala Leu Phe Pro Asp Gly
 245 250 255
 Arg Ser Val Gly Asp Lys Ile Phe Arg Thr Ala Asp Ser Glu Lys Pro
 260 265 270
 Phe Glu Asp Ala Gln Glu Met Cys Lys Gln Ala Gly Gly Gln Leu Ala

 275 280 285
 Ser Pro Arg Ser Ala Thr Glu Asn Ala Ala Ile Gln Gln Leu Ile Thr
 290 295 300
 Ala His Asn Lys Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Val Gly Thr Glu
 305 310 315 320
 Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Pro Leu Val Tyr Ser Asn Trp
 325 330 335
 Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asn Asn Gly Gly Ala Glu Asn Cys Val Glu
 340 345 350

 Ile Phe Thr Asn Gly Gln Trp Asn Asp Lys Ala Cys Gly Glu Gln Arg
 355 360 365
 Leu Val Ile Cys Glu Phe
 370

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A WMAP-10 peptide.

<221> SITE

<222> 1

<223> Xaa = succinyl-Leu

<221> SITE

<222> 9

<223> Xaa = Lys-amide

<400> 30

Xaa Leu Glu Lys Leu Leu Gln Trp Xaa

1

5