(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
A61K 35/16 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0127992
(43) 공개일자 2006년12월13일

(21) 출원번호 10-2006-7016937
(22) 출원일자 2006년08월23일
심사청구일자 없음
번역문 제출일자 2006년08월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/001238
국제출원일자 2005년01월14일
(87) 국제공개번호 WO 2005/072139
국제공개일자 2005년08월11일

(30) 우선권주장 11/034,590 2005년01월13일 미국(US)
60/538,678 2004년01월23일 미국(US)

(71) 출원인 지티씨바이오쎄라퓨틱스,인크.
미국 메사추세츠주 01701-9322 프래밍햄 크로싱 불바드 175

(72) 발명자 무라카미 가즈노리
미국 텍사스주 77551 갈베스톤 에이피티. 3512 존스 드라이브7400
엔크바아타르 페렌레이
미국 텍사스주 77551 갈베스톤 에이피티. 931 센트럴 시티불러바드
6424
콕스 로버트 에이
미국 텍사스주 77551 갈베스톤 자마이카 비치 9061
호킨스 할 에이
미국 텍사스주 77551 갈베스톤 샤퍼 드라이브 10301
트라버 릴리안 디
미국 텍사스주 77551 갈베스톤 벨루시 드라이브 2414
트라버 다니엘 엘
미국 텍사스주 77551 갈베스톤 벨루시 드라이브 2414

(74) 대리인 강승옥
김성기

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 급성 폐 손상을 치료하기 위한 에어로졸화 항트롬빈의 용도

(57) 요약

본 발명은 항트롬빈 Ⅲ를 폐 전달을 통해 투여함으로써 폐렴 및 폐 손상과 같은 폐 질환을 가진 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

흡입에 의해 치료학적 유효량의 항트롬빈 Ⅲ를 투여하여 폐 손상을 치료하는 단계를 포함하는, 환자의 급성 폐 손상을 치료하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 폐 손상은 패혈성 급성 폐 손상인 것인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 폐 손상은 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)인 것인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 폐 손상은 바이러스제에 대한 노출에 반응하여 일어나는 것인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 바이러스제는 슈도모나스 뉴모니아(*Pseudomonas pneumonia*)인 것인 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 폐 손상은 연기 및 석면 중 하나 이상에 반응하여 일어나는 것인 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서, 항트롬빈 Ⅲ를 초음파 분무기를 사용하여 투여하는 것인 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 항트롬빈 Ⅲ는 혈장에서 유래한 항트롬빈 Ⅲ인 것인 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 항트롬빈 Ⅲ는 재조합에 의해 생성된 항트롬빈 Ⅲ인 것인 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 재조합에 의해 생성된 항트롬빈 Ⅲ는 유전자 전환에 의해 생성된(transgenically produced) 항트롬빈 Ⅲ인 것인 방법.

청구항 11.

제1항에 있어서, 상기 환자에게 항트롬빈 Ⅲ를 1회 이상 투여하는 것인 방법.

청구항 12.

제1항에 있어서, 항트롬빈 Ⅲ를 체중 1 ㎏당 약 10~300 U의 용량으로 투여하는 것인 방법.

청구항 13.

제1항에 있어서, 항트롬빈 Ⅲ를 체중 1 ㎏당 약 25~125 U의 용량으로 투여하는 것인 방법.

청구항 14.

제1항에 있어서, 폐 손상을 ATⅢ와 아가트로반 둘 다로 치료하는 것인 방법.

청구항 15.

제1항에 있어서, 치료되는 폐 손상은 연기 흡입에 의해 발생한 것인 방법.

청구항 16.

제1항에 있어서, 치료되는 폐 손상은 폐에 대한 화상에 의해 발생한 것인 방법.

청구항 17.

단백질을 함유하는 물질의 조성물로 인간의 급성 폐 손상을 치료하는 방법으로서, 상기 단백질은 ATⅢ를 포함하는 전환 유전자(transgene) DNA 구성체에 의해 암호화되는 것인 방법.

청구항 18.

단백질을 함유하는 물질의 조성물로 인간의 급성 폐 손상을 치료하는 방법으로서, 상기 단백질은 ATⅢ를 포함하는 전환 유전자 DNA 구성체에 의해 암호화되는 것인 방법에 있어서, 유효량의 아가트로반과 함께 상기 단백질의 실질적으로 약학적으로 순수한 조성물로 환자를 치료하는 단계를 포함하는 것인 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 항트롬빈 Ⅲ를 폐 전달을 통해 투여함으로써 폐렴 및 폐 손상과 같은 폐 질환을 가진 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 출원은 2004년 1월 23일자로 출원된 미국출원번호 60/538,678에 대한 우선권주장 출원으로서, 상기 미국 출원의 내용을 본원에 참고로 인용한다.

배경기술

염증성 폐 질환에서는 피브린이 기도에서 발견된다. 폐포에서의 피브린의 형성은 급성 및/또는 만성 염증성 폐 질환의 특징으로 알려져 있다. 혈장 누출액(transudate)은 폐혈관 삼투성의 증가로 인해 염증 상태에서 기도로 들어간다. 삼출된 혈장의 피브리노겐은 활성화된 폐포 대식세포(1) 및 상피 세포(2)의 표면에서 발현되는 조직 인자에 의해 활성화되어 기도에서 응괴 형성을 초래한다. 기관지내의 피브린은 폐 병리학에서 몇 가지 역할을 한다. 첫째, 상기 피브린은 환기를 차단한다. 본 발명자들은 기관지 및 세기관지의 40% 이상이 양(ovine)의 연기 흡입 및 폐렴 이후에 피브린 함유 캐스트에 의해 폐쇄되었음을 나타냈다(3). 폐의 일부가 폐쇄되면, 환기/과부정합으로 인해 가스 교환이 감소한다. 환자를 기계적으로 환기시키면, 폐의 환기된 부분이 과다 신장되며, 이는 압력외상(barotrauma)의 원인이 될 수 있다. 둘째, 피브린은 계면활성제 활성을 저해한다(4). 헤파린 분무는 기도 폐쇄 및 후속적인 급성 폐 손상을 방지하는 데 효과적임이 알려져 있다(5). 그러나, 헤파린 분무는 연기 흡입에 의해 유도된 급성 폐 손상에는 효과적이지 않다는 보고가 있다(6). 본 발명자들은 이러한 불일치에 대한 이유가 헤파린의 항응고제로서의 능력이 항트롬빈 의존적이며 항트롬빈 활성이 다른 연구에서는 적절히 고려되지 않았기 때문이라고 생각한다.

피브린 캐스트에 의한 기도 폐쇄는 연기 흡입에 의해 유도된 급성 폐 손상(ALI)에서의 심각한 문제이다. 기도 캐스트의 방지가 임상적 성과에 중요할 수 있다. 본 발명자들은 헤파린 분무가 양의 연기 흡입 모델에서 기도 폐쇄를 방지하는 데 효과적임을 보고하였다. 그러나, 헤파린의 항응고성이 항트롬빈 의존적이기 때문에, 헤파린이 반드시 효과적인 것은 아니며, 치료적 성과는 본 발명의 방법을 사용하여 개선될 수 있다.

항트롬빈은 생리적 세린 프로테아제 저해제인데, 이것은 트롬빈뿐만 아니라 응고 인자 Xa, IXa, XIa 및 XIIa를 차단한다. 헤파린은 항트롬빈의 저해 반응을 수천배 촉진시킨다. 따라서, 기도에서 적당한 농도의 항트롬빈이 없으면, 에어로졸화 헤파린은 피브린 형성을 저해하지 않아서 연기 또는 화상에 의한 폐 손상의 치료에 있어 거의 개선을 나타내지 않는다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 항트롬빈 분무가 연기의 흡입에 의한 손상 및/또는 화상에 의해 유도된 손상을 치료하는 데 있어 더 효과적이며 신뢰성이 있음을 입증하여, 그러한 폐 손상을 보다 효과적으로 치료하는 방법을 권리 범위로서 청구한다.

발명의 개요

본 발명은 부분적으로는 에어로졸화 항트롬빈 Ⅲ(ATⅢ)이 폐 질환, 예컨대, 폐렴 및 폐 손상을 치료하는 데 효과적이라는 발견에 근거한다. 급성 패혈성 폐 손상을 치료하는 데 있어 에어로졸화 ATⅢ의 투여량이 더 적을수록 정맥내로 투여된 ATⅢ의 양이 더 많은 경우보다 더 효과적이라는 것이 발견되었다. 따라서, 흡입에 의한 ATⅢ의 투여는 정맥내 투여의 경우보다 폐 질환, 예컨대, 폐렴 및 폐 손상의 더 효과적인 치료를 제공한다.

본 발명의 바람직한 실시 형태에 따르면, 항트롬빈 및 구체적으로 에어로졸화 항트롬빈이 기도 폐쇄를 방지하는 데 있어 헤파린 또는 기타 작용제보다 더 효과적인 항응고제인 것으로 확인되었다. 이것은 또한 에어로졸화 항트롬빈이 양(sheep)에서의 연기 흡입에 의해 유도된 ALI 모델에서 특이적 합성 트롬빈 저해제인 아가트로반에 대해 시험할 경우에 사실인 것으로 확인되었다.

항트롬빈 및 아가트로반 분무는 모두 기도 폐쇄를 저해하고 가스 교환을 약화시켰다. 또한, 항트롬빈은 항염증 효과를 가져서 폐렴 및 후속적인 부종 형성의 약화를 초래하는 것으로 보인다.

따라서, 일 측면에서 본 발명은 폐 질환, 예컨대, 폐렴 및/또는 폐 손상을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 치료학적 유효량의 ATⅢ를 흡입에 의해 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 한다. 폐 질환은 급성 또는 만성 폐 질환일 수 있다. 일 실시 형태에서, 폐 질환은 급성 폐 손상, 예컨대, 패혈성 급성 폐 손상 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS) 또는 기도 차단이다. 폐 손상 및/또는 폐렴은 예컨대, 외래 작용제, 예를 들면 바이러스제(예, 슈도모나스 뉴모니아(*Pseudomonas pneumonia*)), 연기 또는 석면에의 노출에 반응하여 생길 수 있다. 다른 실시 형태에서, 폐 질환은 예컨대, 폐 또는 흉막의 신생물, 간질성 폐 질환 및/또는 기질화 흉막염(organizing pleuritis)일 수 있다.

일 실시 형태에서, ATⅢ는 제트 에어로졸 또는 초음파 분무 시스템을 사용하여 또는 건조 분말 흡입 시스템에 의해 투여한다. 에어로졸 투여용 시스템이 알려져 있다.

일 실시 형태에서, ATⅢ는 인간 ATⅢ이다. ATⅢ는 혈장에서 얻는 것과 같이 천연에서 유래하거나 재조합으로 제조할 수 있다. 혈장 유래 ATⅢ가 시판되고 있다. 바람직한 실시 형태에서, 항트롬빈 Ⅲ는 유전자 전환에 의해 생성되는데(transgenically produced), 예컨대, ATⅢ는 유전자 전환 가축, 예컨대, 소, 염소, 토끼 또는 마우스의 밀크로부터 얻는다. 유전자 전환 동물의 밀크에서 ATⅢ를 제조하는 방법은 본원에 참고로 인용한 미국 특허 제5,843,705호에 기재되어 있다.

바람직한 실시 형태에서, 환자에게 ATⅢ 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 에어로졸 조성물을 투여한다. 약학적으로 허용 가능한 담체의 예로는 물 및 식염수를 들 수 있다.

일 실시 형태에서는, ATⅢ를 주기적으로 흡입에 의해 환자에게 투여하는데, 예컨대, ATⅢ를 환자에게 정규 간격으로 투여한다. 예컨대, 폐렴 및/또는 폐 손상의 발병 시에 및 그 후에는 초기 투여후 설정된 간격으로 환자에게 에어로졸 Ⅲ를 투여할 수 있는데, 예컨대, 흡입에 의해 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간 마다, 1일 2회, 또는 1일 3회, 4회, 5회, 6회 ATⅢ를 투여할 수 있다. 투여 시간은 약 24, 48, 72, 96, 120, 144 또는 168시간 이상일 수 있다. 또 다른 실시 형태에서는, ATⅢ를 필요에 따라 흡입에 의해 환자에게 투여하는데, 예컨대, 폐렴 또는 폐 손상의 하나 이상의 지속 또는 재발 징후가 나타날 때 ATⅢ를 투여한다.

ATⅢ, 예컨대, 유전자 전환에 의해 생성된 ATⅢ의 효과적인 투여량은 체중 1 ㎏당의 단위로 약 10~300 U/㎏, 25~125 U/㎏, 50~100 U/㎏ 또는 60~75 U/㎏일 수 있다. 또 다른 측면에서, 효과적인 투여량은 약 1 ㎎/㎏, 5 ㎎/㎏, 10 ㎎/㎏보다 더 크지만, 약 150 ㎎/㎏, 100 ㎎/㎏, 70 ㎎/㎏보다는 더 적을 수 있다.

바람직한 실시 형태에서, 사용된 에어로졸 ATⅢ의 투여량은 동일한 질환을 치료하기 위해, 예컨대, 폐렴 또는 폐 손상의 하나 이상의 징후에 대해 동일한 효과를 가지도록 정맥 내로 투여된 ATⅢ 용량의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 미만이다.

본 발명에 따르면, 항트롬빈 및 아가트로반 분무는 모두 기도 폐쇄를 저해하고 가스 교환을 약화시켰다. 또한, 항트롬빈은 추가적이고 증가된 항염증 효과를 가져서 폐렴 및 후속적인 부종 형성의 개선된 약화를 초래하였다. 또한, 항트롬빈 및 아가트로반을 함께 사용하여 연기 흡입 및/또는 화상으로 인한 폐 손상을 치료할 경우에 상승 효과가 나타난다.

또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 폐 손상의 치료용 키트를 특징으로 한다. 상기 키트는 치료학적 유효량의 에어로졸형 ATⅢ 및 사용 지시문을 포함하는 것이 바람직하다. 상기 에어로졸은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 약학적으로 허용 가능한 담체의 예로는 물 및 식염수를 들 수 있다.

일 실시 형태에서, ATⅢ, 예컨대, 유전자 전환에 의해 생성된 ATⅢ의 효과적인 투여량은 체중 1 ㎏당의 단위로 약 10~300 U/㎏, 25~125 U/㎏, 50~100 U/㎏ 또는 60~75 U/㎏일 수 있다. 또 다른 측면에서, 효과적인 투여량은 약 1 ㎎/㎏, 5 ㎎/㎏, 10 ㎎/㎏보다 더 크지만, 약 150 ㎎/㎏, 100 ㎎/㎏, 70 ㎎/㎏보다는 더 적을 수 있다.

바람직한 실시 형태에서 상기 키트는 급성 또는 만성 폐 질환의 치료용 키트이다. 폐 질환은 급성 폐 손상, 예컨대, 패혈성 급성 폐 손상 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)이 바람직하다. 폐 손상 및/또는 폐렴은 예컨대, 외래 작용제, 예를 들면 바이러스제(예, 슈도모나스 뉴모니아), 연기 또는 석면에의 노출에 반응하여 생길 수 있다. 다른 실시 형태에서, 폐 질환은 예컨대, 폐 또는 흉막의 신생물, 간질성 폐 질환 및/또는 기질화 흉막염일 수 있다.

일 실시 형태에서, 상기 키트는 ATⅢ는 제트 에어로졸 또는 초음파 분무 시스템을 사용하여 또는 건조 분말 흡입 시스템 중에 ATⅢ를 포함한다.

일 실시 형태에서, 상기 키트는 에어로졸형의 인간 ATⅢ를 포함한다. ATⅢ는 혈장에서 얻는 것과 같이 천연에서 유래하거나 재조합으로 제조할 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 항트롬빈 Ⅲ는 유전자 전환에 의해 생성되는데, 예컨대, ATⅢ는 유전자 전환 가축, 예컨대, 소, 염소, 토끼 또는 마우스의 밀크로부터 얻는다.

본 발명의 하나 이상의 실시 형태의 상세한 사항은 첨부 도면 및 하기 상세한 설명에서 제시된다. 본 발명의 기타 특징, 목적 및 장점은 상세한 설명 및 도면과 특허청구범위로부터 명확해질 것이다.

발명의 상세한 설명

하기의 약어는 본 명세서에서 지정된 의미를 지닌다:

약어 설명:

체세포 핵전이 (SCNT)

핵전이 (NT)

합성 수란관핵 (SOF)

우태아 혈청 (FBS)

중합효소 연쇄반응 (PCR)

소혈청 알부민 (BSA)

용어 설명:

소의(bovine)- 다양한 종의 소(cow)의 또는 그와 관련된

생물학적 액체- 포유동물, 새, 양서류 또는 파충류와 같은 유기체가 생성시킨 수용액으로서, 그 수용액 중에 침지된 세포에 의해 분비되는 단백질을 함유하는 수용액. 그 예로는 밀크, 뇨, 타액, 정액, 질액, 활액, 림프액, 양수액, 혈액, 땀 및 눈물뿐만 아니라 식물에 의해 생성된 수용액, 예컨대, 삼출액 및 일액(guttation fluid), 물관부, 체관부, 수지 및 과즙이 있다.

생물학적 액체 생성 세포- 생물학적 액체 속에 침지되며 생물학적 액체 속으로 단백질을 분비하는 세포.

생약- 그 기원, 합성 또는 제조가 미생물, 재조합 동물(키메라 또는 유전자 전환 동물을 포함하나, 이에 국한하지 않음), 핵전이, 미세주입 또는 세포배양 기술의 사용을 포함하는 모든 의약, 치료제, 백신 또는 모든 의료용 조성물을 의미한다.

염소의(caprine)- 다양한 종의 염소(goat)의 또는 그와 관련된.

암호화(encoding)- 일반적으로 해독 가능한 형태로, 통상은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 채로 존재하는 서열 정보를 의미한다. 서열은 기능성 프로모터가 그 서열의 전사 또는 발현을 증강시킬 때 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 특히 센스 가닥의 발현을 촉진하는 서열에 연결될 때 동일한 정보량이 용이하게 접근 가능한 형태로 존재하기 때문에 안티센스 가닥 역시 상기 서열을 암호화하는 것으로 간주된다. 그 정보는 표준 또는 변형된 유전자 암호를 사용하여 전환 가능하다.

발현 벡터- 박테리오파지, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스바이러스 또는 인공 염색체로부터 유래한 유전자 조작된 플라스미드 또는 바이러스로서, 이를 사용하여 프로모터에 작동 가능하게 연결된 ATⅢ 단백질 암호 서열을 숙주 세포 내로 전이시켜 암호화된 재조합 ATⅢ 단백질이 숙주 세포 내에서 발현되게 한다.

기능성 단백질- 내생적으로 생성될 때 나타나는 것과 유사한 생물학적 또는 기타 활성이나 용도를 가진 단백질.

슬라이드- 고정된 거리만큼 이격되어 위치하는 평행 전극용 유리 슬라이드. 세포 커플릿을 활성화용 전류를 수용하도록 전극 사이에 배치한다.

상동성 서열- 비교시 유사성을 나타내는 유전자 서열을 의미한다. 핵산에서 상동성의 표준은 당해 분야에서 일반적으로 사용되는 상동성의 척도 또는 하이브리드화 조건이다. 핵산에서의 실질적인 상동성은 비교시에 약 60% 이상의 잔기, 통상 약 70% 이상, 더 통상적으로는 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상 및 더 바람직하게는 약 95 내지 98% 이상의 뉴클레오티드에서 적당한 뉴클레오티드 삽입 또는 결실과 함께 최적으로 정렬될 때 분절 또는 그 상보 가닥이 동일한 것을 의미한다. 한편, 실질적인 상동성은 상기 분절들이 선택적인 하이브리드화 조건 하에 하나의 가닥 또는 그 상보 가닥에 하이

브리드될 때 존재한다. 하이브리드화의 선택성은 하이브리드화가 일어날 때 존재하는 것이며, 특이성이 전체적으로 부재하는 것보다 더 선택적이다. 통상, 선택적 하이브리드화는 약 14개 이상의 뉴클레오티드 길이에 걸쳐 약 55% 이상의 상동성, 바람직하게는 약 65% 이상, 더 바람직하게는 약 75% 이상 및 가장 바람직하게는 약 90% 이상의 상동성이 존재할 때 일어난다.

리더 서열 또는 "신호 서열"- 단백질 분비 신호를 암호화하며, ATⅢ 단백질을 암호화하는 하류 핵산 분자에 작동 가능하게 연결될 때 ATⅢ 분비를 유도하는 핵산 서열. 리더 서열은 천연의 인간 ATⅢ 리더 또는 인공적으로 유도된 리더이거나 또는 ATⅢ 암호 서열의 전사를 유도하는 데 사용된 프로모터로서 동일 유전자로부터, 또는 세포로부터 정상 분비되는 또 다른 단백질로부터 얻을 수 있다.

밀크 생성 세포- 단백질을 밀크 속으로 분비하는 세포(예컨대, 유선 상피 세포).

밀크 특이적 프로모터- 단백질을 밀크 속으로 분비하는 세포(예컨대, 유선 상피 세포)에서 유전자의 발현을 천연적으로 유도하는 프로모터로서, 그 예로는 카제인 프로모터, 예컨대, 알파 카제인 프로모터(예; 알파 S-1 카제인 프로모터 및 알파 S2-카제인 프로모터), 베타 카제인 프로모터(예; 염소 베타 카제인 유전자 프로모터(DiTullio, BIOTECHNOLOGY 10:74-77, 1992)), 감마 카제인 프로모터 및 카파 카제인 프로모터; 유장 산성 단백질(WAP) 프로모터(Gorton 등, BIOTECHNOLOGY 5:1183-1187, 1987); 베타-락토글로불린 프로모터(Clark 등, BIOTECHNOLOGY 7:487-492, 1989); 및 알파-락토글로불린 프로모터(Soulier 등, FEBS LETTS. 297:13, 1992)가 있다. 유선 조직에서 특이적으로 활성화되는 프로모터도 포함되는데, 따라서, 이것은 본 발명에 따라 유용하며, 그 예로는 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV)의 장말단 반복(LTR) 프로모터가 있다.

핵전이- 핵이 제거된 난모세포 속으로 공여 세포의 핵이 이식되는 클로닝 방법을 의미한다.

작동 가능하게 연결된- 유전자 및 하나 이상의 조절 서열이 적당한 분자(예컨대, 전사 활성화 단백질)이 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 허용하는 방식으로 연결된다.

양의(ovine)- 양(sheep)의 또는 그와 관련되거나 유사한.

처녀 생식의(parthenogenic)- 정자의 침투 없이 난모세포로부터 배의 발육.

약학적으로 순수한- 명확한 생물학적 시험뿐만 아니라, 인간 환자의 치료를 수행하기에 적합한 투여에 적합한 단백질을 의미한다. 실질적으로 약학적으로 순수하다는 것은 순도가 약 90% 이상인 것을 의미한다.

돼지의(porcine)- 돼지(pig) 또는 집합적으로 돼지(swine)의 또는 그와 유사한.

프로모터- 전사를 유도하기에 충분한 최소 서열. 본 발명에는 프로모터 의존성 유전자 발현이 세포형 특이적, 조직 특이적, 측두 특이적으로 조절 가능하거나, 또는 외주 신호 또는 작용제에 의해 유도되기에 충분한 프로모터 요소 역시 포함된다; 그러한 요소는 천연 유전자의 5' 또는 3' 또는 인트론 서열에 위치할 수 있다.

단백질- 본원에서는 당단백질뿐만 아니라 기타 부가 부분을 보유한 단백질을 의미한다. 단백질은 또한 생리적 기능을 보유하는 단편성 또는 절두된 폴리펩티드를 포함한다.

치료학적 유효량- 환자에게 투여 시에 그 분자에 의해 매개되는 생물학적 활성을 저해하거나 자극하는 치료용 분자 또는 그 단편의 양.

형질전환, "트랜스펙션(transfection)" 또는 "형질도입"- 외래 분자를 세포 내로 도입시키는 모든 방법. 리포펙션, DEAE-덱스트란-매개의 트랜스펙션, 미세주입법, 핵전이(예컨대, Campbell 등, BIOL. REPROD. 49:933-942, 1993; Campbell 등, NATURE 385:810-813, 1996), 원형질 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 형질도입(예컨대, 박테리오파지, 아데노바이러스, 레트로바이러스 또는 기타 바이러스의 전달), 전기천공법(electroporation) 및 생탄도성 형질전환이 사용될 수 있는 당업자에게 알려진 단지 몇 가지의 방법이다.

형질전환된 세포 또는 트랜스펙션된 세포- ATⅢ를 암호화하는 핵산 분자가 재조합 DNA 기법에 의해 도입된 세포(또는 그 자손 세포). 핵산 분자는 숙주 염색체 내로 안정하게 도입되거나 또는 에피좀으로 유지될 수 있다.

전환 유전자(transgene)- 기술에 의해 세포 또는 그 조상 세포 내로 삽입되고, 그 세포로부터 발육되는 동물의 게놈의 일부가 되는 핵산 분자의 모든 단편. 그러한 전환 유전자는 유전자 전환 동물에 대해 부분적으로 또는 전적으로 외인성(즉, 외래의) 유전자를 포함하거나, 그 동물의 내생성 유전자와 동일성을 가진 유전자를 나타낸다.

유전자 전환의(transgenic)- 기술에 의해 세포 또는 그 조상 세포 내로 삽입되고, 그 세포로부터 발육되는 동물의 게놈의 일부가 되는 핵산 분자를 포함하는 임의의 세포.

유전자 전환 유기체(transgenic organism)- 또 다른 유기체로부터의 유전 물질이 실험적으로 전이되어 숙주가 그 유전적 상보체에 이미 존재하는 것 외에도 그 염색체 내에 존재하는 전이된 유전자의 유전 정보를 획득하는 유기체.

유제의(ungulate)- 양, 돼지, 염소, 소 및 말(이들에 국한되지 않음)을 비롯하여 발굽이 있고 통상 초식성인 네발 포유동물의 또는 그와 관련된.

벡터- 본원에 사용된 벡터는 (1) 숙주 세포에서 복제할 수 있고, (2) 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있으며, (3) 형질전환된 세포를 확인하기에 적합한 마커를 보유하는 플라스미드, 파지 DNA 또는 기타 DNA 서열을 의미한다.

본 발명에 따라, 에어로졸형의 ATⅢ를 사용하면 정맥내 투여된 ATⅢ보다 더 낮은 용량에서 급성 패혈성 폐 손상을 감소시킨다는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명은 ATⅢ를 포함하는 에어로졸 제제뿐만 아니라, 폐 질환, 예컨대, 폐 손상 또는 폐렴을 가진 환자를 치료하기 위해 그러한 에어로졸형 ATⅢ를 사용하는 방법을 특징으로 한다.

재조합 인간 항트롬빈("ATⅢ") 및 아가트로반 분무는 둘 다 기도 폐쇄를 방지하는 데뿐만 아니라, 연기 흡입 손상과 그에 후속하는 폐렴 이후에 가스 교환을 개선하는 데 효과적이었다. 또한, ATⅢ는 폐렴 및 후속의 부종 형성을 감소시켰다. ATⅢ의 양은 정맥내 투여에서 효과적인 것보다 더 적었다. 본원에 지시된 데이터 및 본 발명의 바람직한 실시 형태에 따르면, 출혈 경향을 비롯하여 부작용이 관찰되지 않았다. 그러므로, 에어로졸화 ATⅢ 분무법의 사용은 연기 흡입의 치료에 더 효과적인 치료 전략이다.

본원에서 사용되는 "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 폐 질환과 관련된 하나 이상의 징후(들)을 경감 또는 감소시키는 것을 의미한다. 예컨대, 폐 손상 및/또는 폐렴의 징후로는 1) 폐의 감소된 가스 교환; 2) 폐의 감소된 단락 분획; 3) 세포외 피브린 축적; 4) 증가된 혈관 투과성; 5) 감소된 지단백질 계면활성제 축적; 6) 조직 리모델링; 7) 응고; 및/또는 8) 증가된 폐포 장력이 있다. 본원에서 폐 질환을 치료하는 데 효과적인 에어로졸형 ATⅢ의 양, 즉 "치료학적 유효량"이란 본 명세서에 기재된 바와 같은 폐 질환을 가진 환자를 그러한 치료의 부재 시에 기대되는 것 이상으로 치료, 경감, 구제 또는 개선하는 데 있어서 단일 또는 다중 용량의 투여 시에 효과적인 ATⅢ 에어로졸의 양을 의미한다.

ATⅢ는 단독으로, 예컨대, 건식 분말 제제로서, 또는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 투여할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체로는 멸균수, 식염수 및 알코올이 있다. 약제 ATⅢ 에어로졸 조성물은 기타 치료제(예컨대, 폐렴 또는 폐 손상을 경감 또는 감소시키는 기타 작용제) 또는 기타 약학적 보조제, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다. ATⅢ는 예컨대, 리포좀과의 복합체로서 또는 리포좀 내에 캡슐화하여 투여할 수 있다.

흡입에 의한 투여의 경우, 화합물들은 적합한 추진제, 예컨대, 이산화탄소와 같은 가스를 함유하는 가압 용기 또는 분배기, 또는 분무기로부터 에어로졸 형태로 전달될 수 있다. 본원에서 "에어로졸(aerosol)"이란 용어는 상대 공기 함유 안정성을 가지기에 충분히 미세한 입자 크기와 결과적인 낮은 정착 속도를 가지는, 고체 또는 액체 입자의 공기 중 분산액을 의미한다(Knight, V., VIRAL AND MYCOPLASMAL INFECTIONS OF THE RESPIRATORY TRACT. 1973, Lea 및 Febiger, 펜실배니아주 필라델피아, pp. 2 참조).

ATⅢ의 분무는 가스압 또는 초음파에 의해 달성될 수 있다. 일반적으로 말하면, 분무기는 에어로졸의 투여를 허용하는 장치이다. 분무기는 임의의 형태일 수 있으며, 그 구조는 당업자에게 공지되어 있고, 이들 장치는 시판되고 있다. 본 발명의 에어로졸은 다양한 공지의 분무 기법을 사용하여 ATⅢ 함유 용액을 분무함으로써 제조할 수 있다. 한 가지 분무 시스템은 액체 추진제 중에 활성 성분의 용액 또는 현탁액으로 구성되는 "2상(two-phase)" 시스템이다. 액체상 및 증기상이 가압 용기에 존재하며, 용기 상의 밸브를 개봉하면 용액 또는 현탁액을 함유하는 액체 추진제가 방출된다. 이것은 미세한 에어로졸 안개 또는 에어로졸 습식 분무를 초래할 수 있다.

소부피 분무기를 비롯하여 에어로졸을 생성시키는 데 이용할 수 있는 다양한 분무기가 있다. 압축기 구동 분무기는 제트 기술을 도입하며, 압축된 공기 또는 의료용 산소를 사용하여 에어로졸을 생성시킨다. 시판되는 장치는 헬스다인 테크놀로

지스 인크; 인바케어 인크; 마운틴 메디칼 이큅먼트 인크; 패리 레스피러토리 인크; 마다 메디아칼 인크; 퓨리탄-베넷; 슈코 인크; 오므론 헬스케어 인크; 드빌비스 헬스 케어 인크; 및 호스피택 인크로부터 시판된다. 초음파 분무기, 예컨대, 고주파수에서 진동하는 석영 결정을 가진 초음파형 분무기를 사용하여 ATⅢ를 전달할 수도 있다.

그러한 ATⅢ 에어로졸의 독성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제 절차에 의해, 예컨대, LD_{50}(군집의 50%가 치사에 이르게 하는 용량) 및 ED_{50}(군집의 50%에서 치료학적으로 효과가 있는 용량)을 측정할 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비가 치료 치수이며, 이것은 LD_{50}/ED_{50} 비로 표현할 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물들을 사용할 수 있지만, 비감염 세포에게 잠재적인 손상을 최소화하여 부작용을 감소시키기 위해 상기 화합물들이 감염된 조직 부위를 지향하는 전달 시스템을 고안하는 데 주의를 기울여야 한다.

세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에게 사용하기 위한 용량 범위를 공식화하는 데 사용할 수 있다. 그러한 화합물들의 용량은 독성이 거의 없거나 전혀 없이 ED_{50}을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있는 것이 바람직하다. 용량은 이용되는 투여형 및 이용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 변화할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 화합물의 경우, 치료학적 유효 용량은 초기에 세포 배양 분석으로부터 산정할 수 있다. 용량은 동물 모델에서 공식화하여 세포 배양물에서 측정되는 바와 같이 IC_{50}(즉, 징후의 최대치의 절반의 저해를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환성 혈장 농도 범위를 달성할 수 있다. 그러한 정보를 사용하여 인간에게 유용한 용량을 더 정확히 측정할 수 있다. 혈장 내의 레벨을 예컨대, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정할 수 있다.

ATⅢ의 용량을 측정하는 다른 방법으로는 ATⅢ로 치료전에 순환 ATⅢ 레벨을 측정하는 것이 있다. 순환성 ATⅢ 레벨에 기초하여, ATⅢ의 용량은 초기 순환 레벨보다 50%, 100%, 150%, 250%, 300% 더 높게 조정할 수 있다.

투여되는 에어로졸 제제의 양은 통상 체중 1 ㎏당의 단위로 약 10~250 U/㎏의 범위이고, 약 25~175 U/㎏의 범위가 바람직하다.

당업자는 특정 인자가 환자를 효과적으로 치료하는 데 요구되는 용량 및 시기에 영향을 끼칠 수 있는데, 그 인자의 예로는 질병 또는 질환의 심도, 기존의 치료, 환자의 일반적 건강 및/또는 나이 및 기타 존재하는 질병이 있으나, 이에 국한되지 않는다. 또한, 치료학적 유효량의 단백질, 폴리펩티드 또는 항체로 환자를 치료하는 방법은 단일 치료를 포함하거나, 일련의 치료를 포함할 수 있다.

실시예

실시예 1

재조합에 의해 생성된 ATⅢ를 식염수(42 ㎎/㎖)에 용해시켰다. 암양(n=24)을 사용하였다. 피. 에어루기노사(*P. aeruginosa*)($5x10^{11}$ CFU)를 두 폐에 주입하였다. 모든 동물에게 100% O_2(주기적 부피 15 ㎖/㎏, 30회 호흡/min, PEEP 5 ㎝H_2O)로 기계적으로 환기시켰다. 재조합 항트롬빈(n=6), 아가트로반(n=8)이나 동일 부피의 정상 식염수(n=10)를 손상 후 2, 4, 8, 12, 16 및 20시간에 초음파 분무기로 분무하였다. 연구 중에 죽은 동물은 없었다. PaO_2/FiO_2 비, 폐의 단락분획, 조직학적 기도 폐쇄 수치는 모두 항트롬빈 및 아가트로반에 의해 약화되었다. 그러나, 조직병리학적 변화 및 폐의 함수/건조 중량비는 아가트로반에 의해서가 아니라, 항트롬빈에 의해서만 약화되었다.

재료 및 방법

재료

인간 재조합 항트롬빈(ATⅢ)(7. 8)은 GTC 바이오세라퓨틱스(매사추세츠주 프래밍햄)로부터 기증받았다. 아가트로반은 다이이치 파마슈티컬 컴퍼니(일본 도쿄)로부터 구입하였다. 다른 모든 시약은 분석용 등급의 것이었다.

동물 준비

텍사스 대학교 의학 분과의 동물 보호 및 사용 위원회가 본 원고에 보고된 실험을 승인하였다. 모든 동물은 미국 생리학 협회 및 국립보건원에 의해 확립된 지침 내에서 취급되었다. 24 마리의 암양을 종래 개시되어 있는 바와 같이 (9) 할로탄 마취 하에 연구용으로 외과적으로 준비하였다. 기준선 심혈관 데이터의 측정 후에, 양들에게 종래 개시되어 있는 바와 같이 (3) 연기 흡입 및 박테리아 주입의 병합 손상을 입혔다. 이 동물 모델은 심각한 급성 폐 손상뿐만 아니라, 과역동 상태의 심혈관 반응을 나타내는데, 이는 인간의 패혈증 환자의 그것과 유사하다.

간략히 언급하면, 피. 에어루기노사(5×10^9/kg)를 면 연기 노출(12회 호흡의 4 세트, < 40℃) 후에 기관지 내로 주입하였다. 연기 흡입 및 박테리아 주입 후에, 동물들은 두 치료군, ATⅢ 분무군(n=6), 아가트로반-분무군(n=8) 및 식염수 분무 대조군(n=10)으로 무작위로 할당하였다. 모든 동물은 24시간 연구 전체에서 100% 산소(주기적 부피 12~15 ㎖/kg, 30회 호흡/min, PEEP 7.5 ㎝H_2O)로 기계적으로 환기시켰다. 주기적 부피는 $PaCO_2$를 정상으로 유지하도록 조정하였다. 링거 락테이트 용액은 헤마토크리트가 세척되는 것을 방지하기에 충분한 부피로 주사하였다. 초기에는 2 ㎖/kg/h의 링커의 락테이트를 주입하고, 헤마토크리트 레벨에 기초하여 최고 10 ㎖/kg/h의 속도로 조정하였다. 식염수 처리된 대조군, 항트롬빈 처리군 및 아가트로반 처리군의 체중(kg)은 각각 39.3±3.1, 37.2±2.6 및 36.2±1.4이었다(유의 수준으로 상이하지는 않음).

치료

재조합 인간 항트롬빈(rhAT)을 증류수(250 ㎎/30 ㎖)에 용해시켰다. 그 후, ATⅢ 용액을 60 ㎖의 식염수와 혼합하고, 41.7 ㎎의 ATⅢ을 함유하는 혼합 용액 15 ㎖을 4시간마다 분무하였다. 아가트로반을 식염수(10 ㎎/90 ㎖)와 혼합하고, 혼합 용액 15 ㎖(1.67 ㎎의 ATⅢ을 함유)을 4시간마다 분무하였다. 대조군에는 동일한 방식으로 15 ㎖ 의 염수 분무를 실시하였다. 이 용액들을 종래 제시된 바와 같이(10), 기관지 트리에 연결되어 있는 초음파 분무기(울트라-네브99, 드빌비스 컴퍼니, 펜실배니아주 서머셋)로 분무하였다. 분무기에 의해 얻어진 입자들의 크기는 4 미크론 미만으로 보고되었다. 분무는 손상 1시간 후에 개시하여 그 후 4시간마다 실시하였다.

혈장 NO_2/NO_3(NO_x)의 측정

혈장 내 NO_x(니트릭 옥사이드 대사물질의 총량)의 농도는 종래 개시되어 있는 바와 같이 (11) 화학 발광 NO 분석기(안텍, 모델 7020)로 측정하였다.

혈액 배양 및 응고 매개변수

동맥혈을 배양하여 균혈증을 시험하였다(셉티-체크, 벡턴 디킨슨, 매릴랜드주 스파크스). 헤파린 처리한 혈액 샘플을 기준선 및 3, 6, 12 및 24시간에 대퇴부 동맥 카테터로부터 주의 깊게 취했다.

활성화된 응고 시간은 헤모크론 모델 801(인터내셔널 테크니다인 컴퍼니, 뉴저지주 에디슨)을 사용하여 손상 후 기준선, 12 및 24시간에 점검하였다.

시트레이트화된 혈장을 항트롬빈 분석을 위해 손상 후 기준선, 6 및 24시간에 수거하였다. 항트롬빈의 활성은 발색성 기질(S-2765, 다이아그노스티카 스타고, 뉴저지주 파시파니)을 사용하여 측정하였다. 데이터는 정상 표준 혈장의 %로서 표현하였다.

폐 조직학 및 면역조직화학

우상하엽구에서 얻은 폐 슬라이스를 동물 분류(5)를 모르고 있는 병리학자에 의해 조직학적으로 수치를 평가하였다. 실질(parenchyma) 내의 변화를 울혈, 부종, 염증 및 출혈에 대해 0~4의 등급(0: 정상, 4: 심각)을 매겼다. 캐스트 형성에 의한 기도 폐쇄 역시 종래 개시된 바와 같이 (3) 평가하였다.

기도압

피크 및 평탄역 기도압을 환기장치(서보 벤틸레이터 900C, 시멘스-엘레나, 스웨덴)에 의해 점검하였다. 피크 기도압은 기도 내성 및 순응성의 합을 반영하고 평탄역 압력은 주로 기도 순응성을 반영하기 때문에, 본 발명자들은 피크압으로부터 평탄역 압력을 공제하였다(Δ기도압). 따라서, Δ기도압은 기도 내성의 지수이다.

통계 분석

통계 소프트웨어인 스탯뷰 5.0(SAS 인스티튜트, 노스 캐롤라이나주 캐리)를 사용하여 분석을 수행하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표현하였다. 분산의 반복 측정된 분석(아노바) 또는 터키(Tuckey)의 사후검증과 함께 아노바(ANOVA)를 사용하여 군들 사이의 데이터를 비교하였다. 적합한 경우에, 개개의 시점에서 군간 비교는 쌍을 이루지 않은 데이터에 대해 스튜던트 뉴먼-큘스 시험(Student Newman-Keuls test)을 사용하여 이루어졌다. 조직학적 연구에서는, 비매개변수의 만-휘트니 U 시험(Mann-Whitney U test)를 수행하였다. p 값이 <0.05인 것이 통계적으로 의미가 있는 것으로 간주되었다.

결과

식염수 처리군, ATⅢ 처리군 및 아가트로반 처리군에서 카르복시-헤모글로빈의 피크 레벨(%)은 각각 58.6±8.2, 65.7±7.2 및 57.5±6.1(유의 수준으로 상이하지는 않음)이었는데, 이것은 모든 군이 거의 동일한 양의 연기 흡입을 받았음을 시사하는 것이다. 24시간 연구 기간 중에 사망한 동물은 없었다.

혈액 배양

동맥 샘플을 방법 섹션에서 나타낸 바와 같이 연구 중의 여러 시점에서 박테리아 배양에 대해 주의 깊게 취했다. 피. 에어루기노사는 모든 기준 샘플에서 음성이었다. 24시간 연구 중에, 피. 에어루기노사는 식염수-대조군에서는 33%(3/10), 그러나 ATⅢ 및 아가트로반 군에서는 둘 다 0%로 검출되었다. 비율은 ATⅢ 및 아가트로반-처리된 군에서 더 낮았지만, 식염수-처리군과 통계적인 차이는 없었다.

폐의 가스 교환

PaO_2/FiO_2(P/F) 비는 모든 군에서 손상 후에 상당히 감소하였다. 그러나, 그 감소는 rhAT-분무군 및 아가트로반-분무군에서는 상당히 더 적었다(도 1a). ATⅢ 및 아가트로반에 의한 가스 교환에서의 약화는 거의 동일한 정도였다(도 1a). 폐의 단락 분획은 손상 후에 상당히 증가하였으나, 그 증가는 ATⅢ 또는 아가트로반 분무군에서는 상당히 더 적었다.

기도압

피크 및 평탄역 기도압을 연구 중에 환기장치에 의해 점검하였다. Δ기도압(=[피크 기도압]-[평탄역 기도압])을 계산하여 기도 내성을 분석하였다. Δ기도압 은 식염수 처리 대조군에서는 점진적으로 증가하였다. ATⅢ 처리군 및 아가트로반 처리군은 Δ기도압에서 증가를 나타내지 않았지만, 이들 군 사에 통계적인 차이는 없었다(도 2).

폐의 조직병리학

연기 및 박테리아 투입 24시간 후에, 간질 및 공기 공간에서 세포 침윤물을 특징으로 하는 손상된 양의 폐에서는 현저한 염증 반응이 있었다. 침윤물은 주로 호중구로 구성되었다. 간질 부종, 혈관 울혈 및 출혈 역시 관찰되었다. 울혈, 부종, 염증 및 출혈의 심도 및 정도에 기초한 조직학 수치는 연기 및 박테리아에 노출 후에 상당히 더 높았다(도 3a). 본 발명자들의 역사적인 대조군 손상 대조군 처리된 동물(n=7)은 모든 개개의 조직병리학 수치에서 1 이하를 나타냈다. 울혈, 부종, 염증 및 출혈에서의 각 수치는 ATⅢ 군에서는 더 낮았으나, 통계적 차이에는 이르지 못했다.

아가트로반은 식염수 대조군과 거의 동일한 수치를 나타냈다. 흥미롭게도, 출혈 수치는 ATⅢ 처리군 및 아가트로반 처리군 모두에서는 더 높은 것이 아니라 더 낮았다. 조직학 총수치가 계산되었다(도 3b). 각각의 울혈, 부종, 염증 및 출혈은 0(정상)으로부터 4(강함)까지 계산되었기 때문에, 조직학 총수치의 최대치는 16이었다. 그것은 ATⅢ 처리군에서는 상당히 더 낮았다(도 3b). 대조적으로, 아가±트로반 분무는 조직학 총수치를 약화시키지 않았다. 그것은 역사적인 대조-손상군(n=7)에서 3.3 ± 0.7이었다.

기관지 및 세기관지는 호중구, 누출된 기관지 상피 세포, 점액 및 피브린의 침윤물에 의해 폐쇄되었다. 횡단면적의 30% 이상의 기도 폐쇄는 식염수 처리군에서 기관지 및 기관지 레벨 둘 다에서 확인되었다(도 4). ATⅢ 분무는 기관지 레벨에서 기도 폐쇄를 상당히 저해하였다. 아가트로반은 기관지 및 세기관지에서 폐쇄를 상당히 저해시켰다(도 4).

폐의 함수/건조 중량비

역사적인 대조군 손상 데이터(함수/건조 중량비 = 3.70±0.17, n=7)와 비교하여 폐의 함수/건조 중량비는 연기 흡입 및 이어서 박테리아의 기관지 주입 24시간 후에 상당히 증가하였다. 이러한 증가는 아가트로반에 의해서가 아니라 ATⅢ 분무에 의해서 상당히 약화되었다.

질산염/아질산염(NO_x) 레벨의 변화

혈장 NO_x 레벨은 손상 후에 기준 레벨의 2 내지 3배 증가하였다. ATⅢ 군은 초기 3시간 내에는 유사한 증가를 나타냈으나, 24시간이 될 때까지의 후기 단계에서는 상당히 더 적은 증가를 나타냈다(도 6). 아가트로반은 6 내지 15시간 동안 NO_x 레벨이 더 낮은 것 같았으나, 나중에는 식염수 처리군과 동일한 정도에 도달하였다. 아가트로반 처리군과 식염수 처리군 사이에는 통계적인 차이가 없었다(도 6).

혈액 계수 및 응고 매개변수

기준 백혈구 및 혈소판 수는 군들 사이에서 상이하지 않았다. 백혈구 수는 손상 24시간 후에 상당히 감소하였다(표 1). 백혈구 수의 감소는 ATⅢ 군에서는 심각하지 않았다(표 1). 아가트로반은 백혈구 수의 감소에 영향을 끼치지 않았다. 혈소판 계수 역시 손상 후에 현저하게 감소하였다. 그러한 감소는 ATⅢ에 의해 방지되지 않았다(표 1). 아가트로반은 혈소판 감소를 약간 방지하였다.

모든 군에서 손상 후 활성화된 응고 시간을 연장시키는 경향이 있었는데, 이것이 통계적으로 상이한 것은 아니었다(표 2). 어느 군들 사이에서도 통계적인 차이는 관찰되지 않았다(표 2).

토론

기도에서의 피브린의 형성은 급성/만성 폐 손상의 특질로 알려져 있다(12). 패혈성 질병에서, 혈관 투과성은 증가되며 피브리노겐 함유 혈장은 기도로 들어가는데, 여기서, 조직 인자는 사이토카인의 자극에 의해 발현된다(12). 따라서, 피브리노겐은 기도에서 응괴를 용이하게 만든다. 기도에서의 피브린의 형성은 2가지 수단에 의한 폐 손상의 원인이다. 첫째, 이것은 기도 부분을 차단하여 가스 교환을 저해한다. 둘째, 피브린은 계면활성제 활성을 저해하며 피브린은 무기폐의 원인이 된다. 환자 또는 동물이 기계적으로 환기될 때, 기도 폐쇄는 환기장치에 의해 유발된 폐 손상(ventilator induced lung injury)도 야기한다. 또한, 환기된 폐 부분의 과다 신장은 케모카인, 예컨대 인터류킨 8을 유도한다(13,14).

본 발명자들은 헤파린 분무가 기도 폐쇄의 예방 및 가스 교환의 개선에 효과적이라는 것을 밝혀내었다(5). 본 발명자들은 헤파린 분무가 피브린 응괴 형성을 예방하고 급성 폐 손상을 약화시킨다는 것을 결정하였다. 그러나, 헤파린의 혈액 응고 방지 특성은 항트롬빈 의존성이다. 본 발명에 따르면, 연기 흡입, 폐 손상 및 폐렴은, 동일한 손상 또는 질환의 인간에서의 발병에서 나타나는 것을 모방하도록 고안된 실험실 동물에서 창안되었다. 본 모델에 따라 혈장 항트롬빈 활성을 측정 및 비교하였다.

본 발명의 바람직한 실시 형태에 따르면, 혈장 항트롬빈 활성의 기준선 값은 손상 후 서서히 감소되며, 24시간에는 대략 50%에 도달하였다(15). 유사한 현상이 화상(16) 또는 패혈증(17) 환자에게서 보고되어 있다. 그러한 질병에서 헤파린의 효과는 보이지 않는다. 본원 특허청구범위에 따르면 본 발명자들은 ATⅢ의 주입이 폐 손상의 치료에 있어서 효과적이라는 것을 제공한다(15). 이러한 정맥내 연구에 기초하여, 기도 내로의, 직접적으로 분무기에 의한 보다 낮은 투여량 범위의 ATⅢ도 효과적이라는 것이 결정되었다. 이것이 본 발명자들이 본 연구를 고안하게 된 이유이다. 또한, 본 발명자들은 본 발명자들이 투여하고 대략적으로 동일한 항-혈전 잠재력의 아가트로반의 효과를 시험한 에어로졸화 ATⅢ의 양(몰)을 계산하였다.

항트롬빈은 주요 생리학적 항응고제 중 하나이다. 트롬빈, FXa, FXIa, FXIIa 및 FIXa과 같은 다양한 응고 인자의 저해 외에도, 항트롬빈은 몇몇 항염증 측면을 갖는 것으로 공지되어 있다(18). 다양한 동물 및 임상 연구에 의하면 정맥내 항트롬

빈은 패혈증(19), 내독소 쇼크(20), 신장 허혈-재관류 손상(21) 및 화상(22)에서 유익한 것으로 밝혀졌다. 2가지의 작용 기작이 현재 고려되고 있다. 첫째, 항트롬빈은 내피 세포로부터의 프로스타사이클린의 방출을 촉진한다(23). 프로스타사이클린은 사이토카인 생성, 유착 분자 발현 및 혈소판 응집을 저해하기 때문에, 항트롬빈은 프로스타사이클린을 통하여 간접적으로 염증 반응을 저해한다. 둘째, 신데칸(syndecan)-4로 불리우는 항트롬빈 수용체가 최근에 발견되었다(24). 일단 항트롬빈이 신데칸-4에 결합하면, 그는 핵 인자 카파 B 전위를 저해하며 백혈구 및 내피 세포에서 염증성 신호 전달을 저해한다(25, 26). 이와 같이, 항트롬빈은 NF-카파 B 활성화의 저해를 통하여 염증 과정을 직접적으로 변경시킨다.

아가트로반은 트롬빈 활성을 저해하도록 고안되었으며 그 특이성이 매우 높다(27). 아가트로반은 항트롬빈에 비하여 매우 작은 분자이며(분자량이 527 Da임) 트롬빈을 직접적으로 저해한다. 아가트로반의 항염증 효과를 보여주는 보고서는 거의 없다. 본 발명자들은 항트롬빈과 아가트로반 사이의 이러한 차이가 흡입 손상에 대하여 상이한 효과를 나타낼 수 있다고 생각하였다. 본 연구에서, ATⅢ 및 아가트로반 둘 모두는 폐렴 및 연기 흡입 후의 기도 폐쇄를 동일한 정도로 저해하였다. 그 결과, 폐 가스 교환은 ATⅢ 및 아가트로반 둘 모두에 의해 약화되었다. 함께 사용될 경우 이들은 상승 효과를 나타내었다. 기도 폐쇄에 관해서는, 아가트로반이 rhAT보다 캐스트 형성의 예방에 있어서 더 효과적이었다. 아가트로반은 ATⅢ보다 작고 비-단백질 물질이기 때문에, 아가트로반은 보다 우수하게 전달될 수 있다. 그러나, 본 발명에 의해 제공되는 개선사항에 따르면, 조직 병리학적 분석에 의해 ATⅢ가 조직학적 변화를 개선시키지만 아가트로반은 그러하지 못한다는 것이 밝혀졌다. 이 결과와 일관되게, 폐의 습윤/건조 중량의 비는 ATⅢ 분무에 의해서는 개선되었지만 아가트로반에 의해서는 개선되지 않았다. 이러한 관찰 결과로부터, ATⅢ 및 아가트로반 둘 모두의 항응고 잠재력이 기도 피브린 형성을 저해하고 가스 교환을 약화시킨다고 생각할 수 있다. 이것 외에도, ATⅢ는 항염증 특성을 가지며 이것은 폐 염증 및 그 후의 폐 부종 형성을 개선시켰다. 백혈구 세포 총수의 강하는 아가트로반 처리 군에 비하여 ATⅢ 처리 군에서 덜 심하였는데, 이는 ATⅢ가 염증 응답을 저해한다는 것을 또한 시사하는 것이다.

본 발명의 일부로서 ATⅢ 및 아가트로반 둘 모두는 패혈증 이환율도 감소시켰다. 기도가 폐쇄되는 경우, 박테리아 클리어런스(clearance)가 방해되며 밀폐된 비-환기 부위는 박테리아의 침소가 된다. 따라서, 본 발명자들은 기도 폐쇄의 저해가 가스 교환에 유익할 뿐만 아니라 전신성 박테리아 전위 및 패혈증의 예방에도 유익하다고 생각한다.

도 6에 도시되어 있는 바와 같이, 산화 질소(NO) 형성의 지표인 혈장중 NO_x의 증가는 에어로졸화 rhAT에 의해 유의하게 억제되었다. NO는 세 가지 종류의 이소폼의 산화질소 신타아제(NOS)로부터 합성된다. 내피 NOS(eNOS) 및 뉴런 NOS(nNOS)는 구성적(constitutive) NOS(cNOS)로서 공지되어 있으며 항상 발현된다. 제3 이소폼은 유도성 NOS(iNOS)로 불린다. iNOS는 염증성 사이토카인, 예컨대 조직 괴사 인자-알파에 의해 유도된다. 본 연구에서, ATⅢ는 NO 형성, 특히 실험 12시간 후에 NO 형성을 저해하지만 처음 12시간 내에는 저해하지 않았는데, 이는 ATⅢ가 iNOS 발현을 저해한다는 것을 시사한다. 본 발명자들은 iNOS가 폐포 대식세포에서뿐만 아니라 폐포 상피 세포에서도 발현된다는 것을 밝혀내었다(28). 항트롬빈은 NFkB 활성화를 저해한다고 보고되어 있기 때문에(18), 본 발명자들은 분무된 ATⅢ가 기도 상피 세포로부터의 iNOS 발현을 저해한다는 것을 측정하였다.

[표 1]

혈구 총수의 변화

시간	기준선	24시간
WBC (x $10^3/\mu\ell$)		
식염수	6.19±0.71	1.85±0.46*
rhAT	4.71±0.54	2.96±1.12
아가트로반	6.15±0.93	2.08±0.81*
혈소판 (x $10^3/\mu\ell$)		
식염수	447±93	276±65*
rhAT	456±52	246±41*
아가트로반	417±116	297±78
평균 ± SE. * 기준선에 대하여 $p < 0.05$		

[표 2]
활성화된 응고 시간의 변화

시간	기준선	24시간
식염수	151±8	168±7
rhAT	149±5	164±14
아가트로반	147±2	157±5
평균 ± SE(초). * 식염수에 대하여 p < 0.05		

비록 AⅢ의 총 용량이 정맥내 연구에서 이전에 행한 것의 절반일지라도(문헌 [Murakami(2001) AM. J. RESP. CRIT. CARE MED. 163: A553] 참조), 그 성과는 정맥내 투여에서보다 효과적이었다. 부작용은 전혀 관찰되지 않았다. 이와 같이, 에어로졸화 AⅢ는 양에서 폐렴 및 연기 흡입 후의 패혈성 급성 폐 손상에서 유익하였다.

다수의 본 발명의 실시 형태가 설명되었다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 정신 및 범주를 벗어남이 없이 다양한 변형이 행해질 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 따라서, 기타 실시 형태는 하기의 특허청구범위 범주 이내이다.

본 발명의 방법에 따르면 유전자 전환 동물에 있어서 체세포 핵이식에 적합한(염소, 소, 양, 돼지 또는 임의의 기타 인간외 척추동물 기원의) 유전자 전환 일차 세포주는 목적하는 단백질 핵산 구성체(예컨대, 인간 알파-태아단백질-β-인터페론 단백질의 발현을 유선에 표적화하는 유선-특이성 전환 유전자)의 트랜스펙션에 의해 생성된다. 전환 유전자 구성체는 선발 마커(예컨대, 네오마이신, 카나마이신, 테트라사이클린, 퓨로마이신, 제오신, 하이그로마이신 또는 임의의 기타 선발가능한 마커)를 포함하거나 세포 배양물에서 선발 마커를 발현할 수 있는 카세트와 함께 공동-트랜스펙션될 수 있다.

본 발명은 본원에 기술되어 있는 핵산 서열을 포함하며, 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 결합되는 발현 벡터를 제공한다. 다수의 그러한 벡터는 구매가능하며, 기타 적합한 벡터는 숙련자에 의해 손쉽게 제조될 수 있다. "작동 가능하게 결합되는" 또는 "작동되도록 결합되는"은 핵산 서열이 숙주 유기체에 의해 발현되도록 하는 방식으로 핵산 서열이 조절 서열에 결합되는 것을 의미하려는 것이다. 조절 서열은 당업계에서 인지되는 것이며 암호화된 폴리펩티드 또는 단백질을 생성하도록 선택된다. 따라서, "조절 서열"이라는 용어는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소를 포함하며 이는 문헌 [Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, (Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 기술되어 있다. 예컨대, 천연 조절 서열 또는 형질전환된 숙주 세포에 천연적으로 있는 조절 서열이 이용될 수 있다.

발현 벡터의 고안은 형질전환시킬 숙주 세포의 선택 및/또는 발현시키기를 원하는 단백질의 유형과 같은 인자에 의존적일 수 있다는 것을 알아야 한다. 예컨대, 본 발명의 폴리펩티드는 클로닝된 유전자 또는 그의 일부를 원핵 세포, 진핵 세포 또는 이 둘 모두에서의 발현에 적합한 벡터 내로 라이게이션함으로써 생성될 수 있다. (ALABORATORY MANUAL, 2nd Ed., ed. Sambrook 등(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16 and 17)).

원하는 핵산 구성체의 재조합 콜로니의 선발 후, 세포를 단리 및 확장시키고, 당분야에 공지된 절차에 따라 장기간 보존을 위하여 분취물을 냉동시킨다. 선발된 유전자 전환 세포주는 표준 분자 생물학 방법(PCR, 서던 블로팅(Southern blotting), FISH)을 사용하여 특성화할 수 있다. 이어서 (동일한 기술이 다수의 통합 부위에서 사용될 수 있기는 하지만) 일반적으로 단일 통합 부위를 갖는, 적절한 카피수(copy number)의, 목적하는 2-기능성 단백질의 핵산 구성체를 지니는 세포주가 당업계에 공지된 체세포 핵이식 프로토콜에서 핵체(karyoplast) 공여체로서 사용될 수 있다. 핵이식, 및 수령 동물로의 배아 이식과, 임신 후, 살아있는 유전자 전환 자손이 수득된다. 전형적으로 이 유전자 전환 자손은 특정 염색체 상에 하나의 전환 유전자 통합부만을 지니며, 다른 상동 염색체는 동일 부위에서 통합부를 지니지 않는다. 따라서 유전자 전환 자손은 전환 유전자에 대하여 이형접합성이어서, 동형접합성 유전자 전환 동물을 생성하기 위한 2회 이상의 연속 번식 사이클에 대한 현재의 필요성이 유지된다.

생물학적 유체로부터의 ATⅢ-단백질의 정제

본 발명의 ATⅢ 단백질은 표준 단백질 정제 기술, 예컨대 친화 크로마토그래피(예컨대, 문헌 [Ausubel 등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998]을 참조; 또한, Lubon 등의 미국 특허 제5,831,141호 참조) 또는 단백질 정제 분야의 숙련자에게 공지된 기타 방법을 사용하여 유전자 전환 유기체의 생물

학적 유체로부터 정제될 수 있다. ATⅢ-단백질은, 일단 단리되면, 원할 경우 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; 예컨대, 문헌 [Fisher, LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, eds. Work and Burdon, Elsevier, 1980] 참조), 및/또는 접선 유동 여과(tangential flow filtration)에 의해 추가로 정제될 수 있다. 정제 후, ATⅢ 단백질의 순도는 적어도 80%, 바람직하게는 90%, 더 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 99%이다.

동물 프로모터

밀크 내로의 ATⅢ의 분비를 허용하는 임의의 프로모터가 사용될 수 있지만, 유선 조직에서의 ATⅢ의 발현에 유용한 프로모터는 유선-특이적 폴리펩티드, 예컨대 유단백의 발현을 천연적으로 구동시키는 프로모터를 포함한다. 이는 예컨대 유청 산성 단백질(whey acidic protein, WAP), 알파 S1-카제인, 알파 S2-카제인, 베타-카제인, 카파-카제인, 베타-락토글로불린, 알파-락트알부민(예컨대, Drohan 등의 미국 특허 제5,589,604호; Meade 등의 미국 특허 제4,873,316호; 및 Karatzas 등의 미국 특허 제5,780,009호 참조), 및 미국 특허 제5,750,172호에 개시되어 있는 기타의 것의 발현을 천연적으로 지시하는 프로모터를 포함한다. 설치류에서 주요 유청 단백질인 유청 산성 단백질(WAP; Genbank 등록 번호 X01153)은 임신 후기 및 젖 분비기 동안 유선에서 배타적으로 높은 수준으로 발현된다(Hobbs 등, J. BIOL. CHEM. 257: 3598-3605, 1982). 원하는 유선-특이성 프로모터에 대한 추가의 정보에 대해서는, 예컨대 문헌 [Richards 등, J. BIOL. CHEM. 256: 526-532, 1981](α-락트알부민 래트); 문헌 [Campbell 등, NUCLEIC ACIDS RES. 12: 8685-8697, 1984](래트 WAP); 문헌 [Jones 등, J. BIOL. CHEM. 260: 7042-7050, 1985](래트 β-카제인); 문헌 [Yu-Lee & Rosen, J. BIOL. CHEM. 258: 10794-10804, 1983](래트 γ-카제인); 문헌 [Hall, BIOCHEM. J. 242: 735-742, 1987](인간 α-락트알부민); 문헌 [Stewart, NUCLEIC ACIDS RES. 12: 3895-3907, 1984](소 α-sl 및 κ-카제인 cDNA); 문헌 [Gorodetsky 등, GENE 66: 87-96, 1988](소 β-카제인); 문헌 [Alexander 등, EUR. J. BIOCHEM. 178: 395-401, 1988](소 κ-카제인); 문헌 [Brignon etal., FEBS LETT. 188: 48-55, 1977](소 α-S2 카제인); 문헌 [Jamieson 등, GENE 61: 85-90, 1987], 문헌 [Ivanov 등, BIOL. CHEM. Hoppe-Seyler 369: 425-429, 1988], 및 문헌 [Alexander 등, NUCLEIC ACIDS RES. 17: 6739, 1989](소 β-락토글로불린)과; 문헌 [Vilotte 등, BIOCHIMIE 69: 609-620, 1987](소 α-락트알부민)을 참조한다. 다양한 유단백 유전자의 구조 및 기능은 문헌 [Mercier & Vilotte, J. DAIRYScl. 76: 3079-3098, 1993]에 개관되어 있다. 추가의 측면 서열이 발현의 최적화에 유용하다면, 그러한 서열은 기존의 서열을 프로브로 하여 클로닝할 수 있다. 상이한 유기체 유래의 유선 특이성 조절 서열은 공지된 동족 뉴클레오티드 서열, 또는 동족 단백질에 대한 항체를 프로브로 하여 그러한 유기체 유래의 라이브러리의 스크리닝으로 수득할 수 있다.

밀크 내로의 ATⅢ의 분비 및 발현에 유용한 신호 서열로는 밀크 특이성 신호 서열이 있다. 바람직하게는 이 신호 서열은 밀크 특이성 신호 서열, 즉, 밀크 내로 분비되는 생성물을 암호화하는 유전자로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 밀크 특이성 신호 서열은 상기에 기술된 밀크 특이성 프로모터에 관련된다. 신호 서열의 크기는 본 발명에서 결정적이지 않다. 필요한 모든 것은 예컨대 유선 조직에서 ATⅢ의 분비를 초래하는 데에 충분한 크기의 것이어야 한다는 것이다. 예컨대, 카제인, 예컨대, 알파, 베타, 감마 또는 카파 카제인, 베타 락토글로불린, 유청 산성 단백질 및 락트알부민을 암호화하는 유전자 유래의 신호 서열이 본 발명에서 유용하다. 기타 분비 단백질, 예컨대 간세포, 신장 세포, 또는 췌장 세포에 의해 분비되는 단백질로부터의 신호 서열도 사용될 수 있다.

소변 내로의 전환 유전자 산물의 분비를 허용하는 임의의 프로모터가 사용될 수 있지만, 비뇨기 조직에서의 재조합 폴리펩티드 전환 유전자의 발현에 유용한 프로모터는 유로플라킨 및 유로모듈린 프로모터이다(Kerr 등, NAT. BIOTECHNOL. 16: 75-79,1998; Zbikowska, 등, BIOCHEM. J. 365: 7-11, 2002; 및 Zbikowski 등, TRANSGENIC RES. 11: 425-435, 2002).

혈액 내로의 전환 유전자 산물의 분비를 허용하는 임의의 프로모터가 사용될 수 있지만, 혈액 생성 또는 혈청 생성 세포(예컨대, 간 상피 세포)에 의한 혈액 내로의 ATⅢ의 분비 및 발현에 유용한 프로모터는 알부민 프로모터이다(예컨대, 문헌 [Shen 등, DNA 8: 101-108, 1989]; 문헌 [Tan 등, DEV. BIOL. 146: 24-37, 1991]; 문헌 [McGrane 등, TIBS 17: 40-44, 1992]; 문헌 [Jones 등, J. BIOL. CHEM. 265: 14684-14690, 1990]; 및 문헌 [Shimada 등, FEBS LETTERS 279: 198-200, 1991] 참조).

정액에서의 ATⅢ의 발현에 유용한 프로모터가 미국 특허 제6,201,167호에 개시되어 있다. 유용한 조류-특이성 프로모터로는 오브알부민 프로모터 및 아포-B 프로모터가 있다. 기타 조류-특이성 프로모터가 당업계에 공지되어 있다. 오브알부민 프로모터를 사용하여 ATⅢ의 발현을 지시할 수 있으며 ATⅢ는 그 후 난의 난백에 침착된다. 아포-B 프로모터도 간에서의 재조합 폴리펩티드의 발현의 지시에 사용될 수 있는데, 여기서, 이 폴리펩티드는 결국 난황 내로 침착된다. 조류 난은 하기의 이유 때문에 다량의 재조합 폴리펩티드의 발현을 위한 최적의 비히클이다: (1) 다량의 단백질이 각각의 난 내로 패킹되고, (2) 난은 비-침습적으로 용이하게 수집되며 장기간 동안 보관될 수 있고, (3) 난은 살균되며, 밀크와는 달리 박테리아 오염균을 포함하지 않는다. 구체적으로는, 각각의 난에 있어서, 새는 난관에서 3그램의 알부민을 생성할 수 있으며,

그 중 50%보다 많은 것이 오브알부민이다. 다른 3그램은 간에서 생성되며(혈청 지단백질) 난황에 침착된다. 또한, 새는 전형적으로 포유류로부터의 진화 거리 때문에 면역학적으로 포유류 단백질을 인식하지 못하기 때문에, 새에서의 ATⅢ의 발현은 새의 생육성 및 건강에 해로운 영향을 미치는 것이 덜할 것 같다.

본 발명의 방법에서 유용한 기타 프로모터는 유도성 프로모터를 포함한다. 일반적으로, 재조합 단백질은 대부분의 진핵 발현 시스템에서 구성적인 방식으로 발현된다. 유도성 프로모터 또는 인핸서의 부가는 ATⅢ의 발현에 대하여 일시적 또는 공간적 제어를 제공하며, 대안적인 발현 기작을 제공한다. 유도성 프로모터는 열 충격 단백질, 메탈로티오니엔, 및 MMTV-LTR의 것을 포함하는 반면, 유도성 인핸서 요소는 엑디손, 뮤리스테론 A 및 테트라사이클린/독시사이클린의 것을 포함한다.

Tet-On 및 Tet-Off 유전자 발현 시스템(Clontech)은 본 발명의 방법에서 유용한 유도성 시스템의 일례이다. 이 시스템에서는 온(구성적으로 오프, 테트라사이클린(Tc)으로 유도됨) 또는 오프(구성적으로 온, Tc 또는 독시사이클린으로 억제됨) 모드로 ATⅢ 발현을 유지하기 위하여 테트라사이클린(Tc) 응답성 요소가 사용된다. 선발가능한 마커가 형질전환된 세포의 용이한 확인을 위하여 ATⅢ 전환 유전자 내로 또한 혼입될 수 있다. 선발가능한 마커는 일반적으로 하기의 2개의 카테고리: 열성 및 우성으로 분류된다. 열성 마커는 일반적으로 숙주 세포("마커" 산물 또는 기능이 결여된 세포)에서 생성되지 않는 생성물을 암호화하는 유전자이다. 티미딘 키나아제(TK), 디히드로폴레이트 리덕타아제(DHFR), 아데닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(APRT), 및 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(HGPRT)의 마커 유전자가 이 카테고리 내에 있다. 우성 마커는 성장 억제 화합물(항생제, 약물)에 대한 내성을 부여하고/하거나 대사 작용이 제한적인 환경에서 숙주 세포가 성장하게 하는 산물을 암호화하는 유전자를 포함한다. 일반적으로 사용되는 이 카테고리 내의 마커는 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 돌연변이 DHFR 유전자; 미코페놀산/잔틴 함유 배지에서 숙주 세포가 성장하게 하는 잔틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제의 gpt 유전자; 및 G418, 겐타마이신, 카나마이신 및 네오마이신에 대한 내성을 부여하는 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라아제의 neo 유전자를 포함한다.

핵산 벡터

소정 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기술된 핵산 분자 중 임의의 분자를 포함하는 벡터 또는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 본원에서 벡터는 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA의 증폭 및/또는 SSTR-단백질을 암호화하는 DNA의 발현을 위하여 사용된다. 벡터는 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피좀, 바이러스 입자 또는 바이러스, 및 통합성 DNA 단편(즉, 상동 재조합에 의해 숙주 게놈 내로 통합가능한 단편)을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 바이러스 입자는 아데노바이러스, 바큘로바이러스, 파르보바이러스, 헤르페스바이러스, 폭스바이러스, 아데노-관련 바이러스, 셈리키 포리스트(Semliki Forest) 바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 미립자(microparticles) 및 네이키드(naked) DNA를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 다양한 실시 형태에서, 발현은 표적화 리간드에 의해 특정 세포 유형 또는 세포 집단으로 표적화될 수 있다. 발현 벡터는 pcDNA3(Invitrogen) 및 pSVL(Pharmacia Biotech)를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 기타 발현 벡터는 pSPORT^{TM} 벡터, pGEM^{TM} 벡터(Promega), pPROEX^{TM} 벡터(LTI, Bethesda, Md.), Bluescript^{TM} 벡터(Stratagene), pQE.^{TM} 벡터(Qiagen), pSE420^{TM}(Invitrogen), 및 pYES2^{TM}(Invitrogen)을 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 발현용 구성체는 내인성 또는 외인성 발현 제어 DNA 서열 및 전사 종결자에 작동되도록 결합되는 단백질 암호화 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 많은 벡터에서 핵산 삽입을 위한 공간의 한정 때문에, 보다 작은 리포터 또는 리포터 구성체를 삽입하는 것이 바람직할 수 있다. 예컨대, 소마토스타틴 수용체 카르복시 말단의 모두 또는 일부의 결실을 이용할 수 있다. 발현 제어 DNA 서열은 프로모터, 인핸서, 오퍼레이터, 및 조절 요소 결합 부위를 일반적으로 포함하며, 전형적으로 발현 구성체가 이용될 발현 시스템에 기초하여 선택된다.

프로모터 및 인핸서 서열은 일반적으로 유전자 발현을 증가시키는 능력에 대해 선택되는 반면, 오퍼레이터 서열은 일반적으로 유전자 발현을 조절하는 능력에 대해 선택된다. 본 발명의 발현 구성체는 또한 상기 구성체를 보유한 숙주 세포의 확인을 허용하는 하나 이상의 선발가능한 마커를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 발현 구성체는 또한 숙주 세포에서 상동 재조합을 용이하게 하는 서열을 포함할 수 있다. 다양한 실시 형태에서, 구성체는 또한 숙주 세포에서의 복제에 필요한 서열을 포함할 수 있다.

다양한 예시적인 조직-특이적 프로모터가 본원에 열거되어 있다(Pearse and Takor, 1979; Nylen and Becker, 1995). 완전한 목록은 아니지만, 이들 프로모터는 본 발명의 소정 실시 형태에서 이용될 수 있는 프로모터와 인핸서의 유형을 예시하는 것이다. 본 발명에 유용한 추가의 프로모터는 당업계의 숙련자에게 손쉽게 공지될 것이다.

유도성 프로모터는 MT II, MMTV(마우스 유선 종양 바이러스), c-jun, 콜라게나아제, 스트로멜리신, 뮤린 MX 유전자, GRP78 유전자, α-2-마크로글로불린, 비멘틴, MHC 클래스 I 유전자 H-2 kB, HSP70, 프로리페린, 종양 괴사 인자 및 갑

상선 자극 호르몬-α를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 세포 또는 조직 특이성 발현은 세포-특이성 인핸서 및/또는 프로모터를 이용하여 이룰 수 있다. (일반적으로, 문헌 [Huber 등, ADV. DRUG DELIVERY REVIEWS 17: 279-292,1995] 참조).

발현 구성체는 암호화된 단백질의 생산을 위해 이용될 수 있으나, 또한 SSTR-단백질 암호화 폴리뉴클레오티드 서열을 단순히 증폭시키기 위해 이용될 수 있다. 몇몇 실시 형태에서, 벡터는 폴리뉴클레오티드가 발현 조절 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 작동되도록 결합된 발현 벡터이다. 소정 실시 형태에서, 플라스미드 및 바이러스 DNA 벡터와 같은 자가 복제성 재조합 발현 구성체는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 발현 벡터는 SSTR-단백질이 적절한 숙주에서 SSTR-단백질의 발현을 초래할 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 결합 또는 연결된 복제성 DNA 구성체일 수 있다. DNA 영역은 그들이 서로 기능적으로 관련될 때 작동 가능하게 결합되거나 연결된다. 예컨대, 프로모터는 암호화 서열의 전사를 조절하면 암호화 서열에 작동 가능하게 결합되거나 연결된다. 증폭 벡터는 발현 조절 도메인을 필요로 하지 않으며, 오히려 대개 복제 원점에 의해 부여되는, 숙주에서 복제하는 능력 및 형질전환체의 확인을 용이하게 하는 선발 유전자만을 필요로 한다. 발현 벡터에서 제어 서열에 대한 필요성은 선택된 숙주 및 선택된 형질전환 방법에 따라 다를 것이다. 일반적으로, 제어 서열은 전사 프로모터, 전사를 제어하기 위한 선택적인 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합을 암호화하는 서열 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함한다.

다양한 실시 형태에서, 벡터는 숙주 유기체에 의해 인식되는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터 서열은 원핵성, 진핵성, 합성 또는 바이러스성일 수 있다. 적합한 원핵성 서열의 예는 박테리오파지 람다의 프로모터(THE BACTERIOPHAGE LAMBDA, Hershey, A. D., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1973); LAMBDA II, Hendrix, R. W., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1980); 및, Benoist 등, The trp, recA, heat shock, and lacZ promoters of E. coli and the SV40 early promote, NATURE, 290: 304-310, (1981))를 포함한다. 추가의 프로모터는 마우스 유선 종양 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스의 긴 말단 반복체, 말로니 바이러스, 사이토메갈로바이러스 최전(immediate early) 프로모터, 엡스타인 바 바이러스, 라우스 육종 바이러스, 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 및 인간 메탈로티오네인을 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

추가의 조절 서열 또한 벡터에 포함될 수 있다. 적합한 조절 서열의 예는 파지 MS-2의 레플리카아제 유전자 및 박테리오파지 람다의 유전자 cII의 샤인-달가노(Shine-Dalgarno)에 의해 대표된다. 샤인-달가노 서열은 SSTR-단백질을 암호화하는 DNA가 바로 이어질 수 있으며 성숙한 SSTR-단백질의 발현을 야기한다.

더욱이, 적합한 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 스크리닝을 가능하게 하는 적합한 마커를 포함할 수 있다. 선택된 숙주의 형질전환은 당업계에 공지되고 상기한 Sambrook 등에 개시된 다양한 기술 중 어느 하나를 사용하여 실시한다.

복제 원점은 또한 외인성 기원을 포함하도록 벡터를 구성하여 제공되거나 또는 숙주 세포 염색체 복제 기작에 의해 제공될 수 있다. 만일 벡터가 숙주 세포 염색체 내로 통합되면, 후자가 충분할 수 있다. 대안적으로는, 바이러스의 복제 원점을 포함하는 벡터를 사용하기보다는, 당업계의 숙련자라면 선발가능한 마커와 SSTR-단백질 암호화 DNA를 이용한 동시형질전환 방법에 의해 포유류 세포를 형질전환할 수 있다. 적합한 마커의 예로는 디하이드로폴레이트 리덕타아제 또는 티미딘 키나제가 있다(미국 특허 제4,399,216호 참조).

SSTR2-단백질과 같은 리포터 단백질 융합체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 라이게이션을 위한 블런트-종결 말단 또는 스태거드-종결 말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 분해, 적절할 경우 코헤시브 말단의 충전, 바람직하지 못한 결합의 회피를 위한 알카라인 포스파타아제 처리, 및 적절한 리가아제를 이용한 라이게이션을 비롯한 통상적인 기술에 따라 벡터 DNA와 재조합될 수 있다. 그러한 조작을 위한 기술은 상기한 Sambrook 등에 개시되며 공지되어 있다. 포유류 발현 벡터의 제작을 위한 방법은 예컨대, Okayama 등, MOL. CELL.BIOL., 3: 280, (1983); Cosman 등, MOL. IMMUNOL., 23: 935, (1986); 및, Cosman 등, NATURE, 312: 768, (1984)에 개시된다.

전환 유전자 구성체는 바람직하게는 프로모터로부터 하류에 리더 서열을 포함한다. 리더 서열은 단백질 분비 신호를 암호화하는 핵산 서열이며, 본 발명의 ATⅢ-단백질을 암호화하는 핵산의 하류에 작동 가능하게 결합될 때, ATⅢ-분비를 지시한다. 리더 서열은 ATⅢ를 암호화하는 핵산 분자의 전사를 지시하기 위해 이용되는 프로모터와 동일한 유전자로부터 얻을 수 있다(예컨대, 밀크-특이성 단백질을 암호화하는 유전자). 대안적으로는, 천연 인간 ATⅢ 단백질 분비 신호를 암호화하는 리더 서열(Genebank 등록 번호 V01514의 아미노산 1-19)을 이용할 수 있다.

치료적 용도

본원에서 이러한 조직 배양물의 처리에서 시험관 내 용도로 조합물이 이용되는 것이 바람직하다. 그러나 조합물은 생체 내 용도에도 효과적이다. 생체 내에서 의도하는 투여 모드에 따라, 이용되는 조성물은 고체, 반고체 또는 액체의 투여 형태일 수 있으며, 예컨대, 정제, 알약, 분말, 캡슐, 젤, 연고, 액체, 현탁액 등일 수 있다. 바람직하게는 조성물은 정확한 투여량의 단일 투여에 적합한 단위 투여 형태으로 투여된다. 조성물은 또한 원하는 제형에 따라, 동물 또는 인간 투여를 위해 약학 조성물을 조제하기 위해 흔히 이용되는 수성계 비히클로 정의되는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 희석제는 인간 알파-태아 단백질의 생물 활성에 영향을 주지 않도록 선택된다. 그러한 희석제의 예는 증류수, 생리학적 식염수, 링거용액, 덱스트로스 용액, 및 행크 용액이다. 동결된 인간 알파-태아 단백질을 재구성하기 위해 동일한 희석제를 이용할 수 있다. 또한, 약학 조성물은 또한 다른 의학 제형, 약학 제형, 담체, 보조제, 비독성, 비치료성, 비면역원성 안정화제 등을 포함할 수 있다. 그러한 희석제 또는 담체의 유효량은 성분의 용해도, 생물 활성 등의 면에서 약학적으로 허용가능한 제형을 얻는 데 효과적인 양일 것이다.

본 명세서에서 조성물은 에어로졸화된, 분사된, 폐의, 비경구의 또는 경구 투여 및 연기 흡입 및/또는 화상 상해로부터 야기된 급성 폐 손상을 위한 전신성 형태를 통해 인간 환자에게 투여될 수 있다.

박테리아 발현

박테리아 용도를 위한 유용한 발현 벡터는 적합한 번역 개시 및 종결 신호와 함께 원하는 단백질을 암호화하는 구조적 DNA 서열을 기능성 프로모터에서 작동 가능한 판독 상으로 삽입시킴으로써 제작된다. 벡터는 하나 이상의 표현형의 선발 가능한 마커 및 벡터의 유지를 보장하며 바람직할 경우 숙주 내에서 증폭을 제공하는 복제 원점을 포함할 것이다. 선택상의 문제로서 다른 것 또한 이용될 수 있지만, 형질전환을 위한 적합한 원핵성 숙주는 이. 콜라이(*E. coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 및 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속 내의 다양한 종을 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 원핵 숙주는 이.콜라이이다.

박테리아 벡터는 예컨대, 박테리오파지-, 플라스미드- 또는 코스미드-계이다. 이들 벡터는 선발가능한 마커와 공지의 클로닝 벡터 pBR322(ATCC 37017)의 요소를 함유하는 시판되는 플라스미드에서 유래된 박테리아 복제 원점을 포함할 수 있다. 그러한 시판 벡터는 예컨대, GEM 1(Promega Biotec, Madison, Wis., USA), pBs, 파지스크립트, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a(Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pKK232-8, pDR540, 및 pRIT5(Pharmacia)를 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 벡터는 THE Pt7I 발현 벡터이다.

이들 "백본" 부분은 적절한 프로모터 및 발현될 구조 서열과 결합된다. 박테리아 프로모터는 lac, T3, T7, 람다 PR 또는 PL, trp, 및 ara를 포함한다. T7은 바람직한 박테리아 프로모터이다.

적합한 숙주 주의 형질전환 및 적절한 세포 밀도로의 숙주 주의 성장 후, 선택된 프로모터는 적절한 수단에 의해 활성화/유도되며, 세포는 추가 기간 동안 배양된다. 세포는 대개 원심분리에 의해 수집되고, 물리적 또는 화학적 수단에 의해 파괴되며, 얻어진 조 추출물은 추가 정제를 위해 보유된다.

진핵성 발현

다양한 포유류 세포 배양 시스템을 또한 재조합 단백질을 발현시키기 위해 이용할 수 있다. 포유류 발현 시스템의 예는 티미딘 키나아제-음성(TK) 및 아데닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제-음성(APRT) 세포와 같은 선택된 마우스 L 세포를 포함한다. 다른 예는 Gluzman, Cell 23: 175(1981)에 의해 개시된 원숭이 신장 섬유모세포의 COS-7 세포주, 및 융화성 벡터를 발현할 수 있는 다른 세포주, 예컨대, C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주를 포함한다. 특히, 효모와 관련해서는, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 슈와니오마이세스(*Schwanniomyces*), 또는 한세눌라(*Hansenula*) 속의 효모를 언급할 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 진균류 중에는, 보다 구체적으로 아스퍼질러스(*Aspergillus*) ssp, 또는 트리코더마(*Trichoderma*) ssp를 언급할 수 있다.

포유류 발현 벡터는 복제 원점, 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 또한 임의의 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여 부위 및 수용 부위, 전사 종결 서열, 및 5' 측면 비-전사 서열을 포함할 것이다. SV40 바이러스 게놈에서 유래된 DNA 서열, 예컨대, SV40 원점, 초기 프로모터, 인핸서, 스플라이스, 및 폴리아데닐화 부위를 이용하여 필요한 비-전사 유전자 요소를 제공할 수 있다.

포유류 프로모터는 베타-카제인, 베타-락토글로불린, 산유청 프로모터를 포함하며, 기타의 것은 HSV 티미딘 키나아제, 초기 및 말기 SV40, 레트로바이러스 유래의 LTR, 및 마우스 메탈로티오네인-1을 포함한다. 예시적 포유류 벡터는 pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, 및 pSVL(Pharmacia)을 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 포유류 발현 벡터는 pUCIG-MET이다. 선발가능한 마커는 CAT(클로람페니콜 트랜스퍼라아제)를 포함한다.

본 발명의 골격 내에서 사용될 수 있는 뉴클레오티드 서열은 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 일반적으로 이들은 판독 상으로 어셈블링되는 것에 의해 수득되며, 이 서열은 폴리펩티드의 기능성 부분 각각을 암호화한다. 후자는 당업계의 숙련자의 기술에 의해, 그리고 예컨대 세포 메신저 RNA(mRNA)로부터 직접 단리될 수 있거나, 상보성 DNA(cDNA)로부터의 재클로닝에 의해 단리될 수 있거나, 대안적으로는 이들은 완전 합성 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 또한, 뉴클레오티드 서열은 예컨대 유전 공학 기술에 의해 그 후에 또한 변형되어 상기 서열의 유도체 또는 변이체를 수득할 수 있다는 것이 이해된다.

치료 조성물

본 발명의 단백질은 본 발명의 분자, 또는 그의 기능성 유도체를 약학적으로 허용가능한 담체 비히클과의 혼합물로 조합함으로써 공지된 방법에 따라 제형화하여 약학적으로 유용한 조성물을 제조할 수 있다. 예컨대, 효과적인 투여에 적합한 약학적으로 허용가능한 조성물의 형성을 위하여, 적합한 비히클 및 다른 인간 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민을 포함하는 제형이 설명되어 있으며, 그러한 조성물은 유효량의 본 발명의 하나 이상의 단백질을 적당량의 담체 비히클과 함께 함유할 것이다.

본 발명에 따라 사용하기 위한 약학 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방식으로 제형화할 수 있다. 따라서, 2-기능성 분자 및 그의 생리학적으로 허용가능한 염과 용매화물이 흡입 또는 취입(구강 또는 비강을 통하여) 또는 경구, 협측, 비경구 또는 직장 투여에 의해 투여하기 위한 것으로 제형화될 수 있다.

경구 투여에 있어서, 약학 조성물은 예컨대 통상적인 방법에 의해 제조되는, 약학적으로 허용가능한 부형제, 예컨대 결합제(예컨대 예비젤라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필 메틸셀룰로오스); 충전제(예컨대 락토스, 미정질 셀룰로오스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예컨대 스테아르산마그네슘, 활석 또는 실리카); 붕해제(예컨대 감자 전분 또는 소듐 스타치 글리콜레이트); 또는 습윤제(예컨대 소듐 라우릴 설페이트)를 포함하는 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 당업계에 잘 알려진 방법으로 코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 예컨대 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있거나, 이들은 사용 전에 물 또는 기타 적합한 비히클을 이용하여 구성하기 위한 건조 생성물로서 제시될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 첨가제, 예컨대 현탁제(예컨대 소르비톨 시럽, 셀룰로오스 유도체 또는 수소화 식용 지방); 유화제(예컨대 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예컨대 아몬드유, 유성 에스테르, 에틸 알코올 또는 분획화 식물유); 및 방부제(예컨대 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)을 함유하는 그러한 액체 제제는 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 이 제제는 또한 적절할 경우 완충제 염, 착향제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다.

경구 투여용 제제는 활성 화합물의 방출이 제어되도록 제형화하는 것이 적합할 수 있다. 협측 투여에 있어서는, 조성물은 통상적인 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.

흡입에 의한 투여에 있어서는, 본 발명에 따라 사용하기 위한 2-기능성 분자는 적합한 분사제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스를 사용하여, 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 제시체의 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브의 제공에 의해 결정될 수 있다. 예컨대 화합물의 분말 믹스 및 적합한 분말 베이스, 예컨대 락토스 또는 전분을 함유하는, 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 젤라틴의 카트리지 또는 캡슐이 제형화될 수 있다.

본 발명의 2-기능성 단백질은 주사에 의한, 예컨대 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 방부제가 첨가된 단위 투여 형태, 예컨대 앰플 또는 다중 용량 용기의 형태로 제시될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀젼의 형태를 취할 수 있으며, 제형화제, 예컨대 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로는, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클, 예컨대 무발열원 살균수를 이용하여 구성하기 위한 분말 형태로 존재할 수 있다.

화합물은 또한 예컨대 통상적인 좌약 베이스, 예컨대 코코아 버터 또는 기타 글리세리드를 함유하는 좌약 또는 정체 관장제와 같은 직장 조성물로 제형화될 수 있다.

전술한 제형 외에도, 2-기능성 분자는 저장형 제제로서도 제형화될 수 있다. 그러한 장기간 작용형 제형은 이식에 의해(예컨대 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예컨대 화합물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예컨대 허용가능한 오일 중의 에멀젼으로서) 또는 이온 교환 수지를 이용하여, 또는 조금 용해될 수 있는 유도체로서, 예컨대 조금 용해될 수 있는 염으로서 제형화될 수 있다.

본 조성물은, 원할 경우 팩 또는 분배기 장치로 제시될 수 있으며 이 팩 또는 분배기 장치는 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 포함할 수 있다. 블리스터 팩과 같이, 팩은 예컨대 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 분배기 장치는 투여에 대한 설명서가 동반될 수 있다.

참조 문헌

1. Sitrin, R. G., P. G. Brubaker, J. E. Shellito, and H. B. Kaltreider. 1986. The distribution of procoagulant and plasminogen activator activities among density fractions of normal rabbit alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 133(3):468-72.

2. Gross, T. J., R. H. Simon, and R. G. Sitrin. 1992. Tissue factor procoagulant expression by rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6(4):397-403.

3. Murakami, K., L. J. Bjertnaes, F. C. Schmalstieg, R. McGuire, R. A. Cox, H. K. Hawkins, D. N. Herndon, L. D. Traber, and D. L. Traber. 2002. A novel animal model of sepsis after acute lung injury in sheep. *Crit Care Med* 30(9):2083-90.

4. Seeger, W., C. Grube, and A. Gunther. 1993. Proteolytic cleavage of fibrinogen: amplification of its surfactant inhibitory capacity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9(3):239-47.

5. Murakami, K., R. McGuire, R. A. Cox, J. M. Jodoin, L. J. Bjertnaes, J. Katahira, L. D. Traber, F. C. Schmalstieg, H. K. Hawkins, D. N. Herndon, and D. L. Traber. 2002. Heparin nebulization attenuates acute lung injury in sepsis following smoke inhalation in sheep. *Shock* 18(3):236-41.

6. Tasaki, O., D. W. Mozingo, M. A. Dubick, C. W. Goodwin, L. D. Yantis, and B. A. Pruitt, Jr. 2002. Effects of heparin and lisofylline on pulmonary function after smoke inhalation injury in an ovine model. *Crit Care Med* 30(3):637-43.

7. Minnema, M. C., A. C. Chang, P. M. Jansen, Y. T. Lubbers, B. M. Pratt, B. G. Whittaker, F. B. Taylor, C. E. Hack, and B. Friedman. 2000. Recombinant human antithrombin III improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with Escherichia coli. *Blood* 95(4):1117-23.

8. Edmunds, T., S. M. Van Patten, J. Pollock, E. Hanson, R. Bernasconi, E. Higgins, P. Manavalan, C. Ziomek, H. Meade, J. M. McPherson, and E. S. Cole. 1998. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood* 91(12):4561-71.

9. Herndon, D. N., D. L. Traber, G. D. Niehaus, H. A. Linares, and L. D. Traber. 1984. The pathophysiology of smoke inhalation injury in a sheep model. *J Trauma* 24(12):1044-51.

10. Kimura, R., L. D. Traber, D. N. Herndon, G. D. Neuhaus, and D. L. Traber. 1988. Treatment of smoke-induced pulmonary injury with nebulized dimethylsulfoxide. *Circ Shock* 25(4):333-41.

11. Soejima, K., L. D. Traber, F. C. Schmalstieg, H. Hawkins, J. M. Jodoin, C. Szabo, E. Szabo, L. Varig, A. Salzman, and D. L. Traber. 2001. Role of nitric oxide in vascular permeability after combined burns and smoke inhalation injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163(3 Pt 1):745-52.

12. Idell, S., A. P. Mazar, P. Bitterman, S. Mohla, and A. L. Harabin. 2001. Fibrin turnover in lung inflammation and neoplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163(2):578-84.

13. von Bethmann, A. N., F. Brasch, R. Nusing, K. Vogt, H. D. Volk, K. M. Muller, A. Wendel, and S. Uhlig. 1998. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 157(1):263-72.

14. Schmalstieg, F. C., J. Chow, C. Savage, H. E. Rudloff, K. H. Palkowetz, and J. B. Zwischenberger. 2001. Interleukin-8, aquaporin-1, and inducible nitric oxide synthase in smoke and burn injured sheep treated with percutaneous carbon dioxide removal. *Asaio J* 47(4):365-71.

15. Murakami, K., R. McGuire, R. A. Cox, J. M. Jodoin, F. C. Schmalstieg, L. D. Traber, H. K. Hawkins, D. N. Herndon, and D. L. Traber. 2003. Recombinant antithrombin attenuates pulmonary inflammation following smoke inhalation and pneumonia in sheep. *Crit Care Med* 31(2):577-83.

16. Kowal-Vern, A., R. L. Gamelli, J. M. Walenga, D. Hoppensteadt, M. Sharp-Pucci, and H. R. Schumacher. 1992. The effect of burn wound size on hemostasis: a correlation of the hemostatic changes to the clinical state. *J Trauma* 33(1):50-6; discussion 56-7.

17. Vervloet, M. G., L. G. Thijs, and C. E. Hack. 1998. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost* 24(1):33-44.

18. Wiedermann Ch, J., and J. Romisch. 2002. The anti-inflammatory actions of antithrombin--a review. *Acta Med Austriaca* 29(3):89-92.

19. Opal, S. M. 2000. Therapeutic rationale for antithrombin III in sepsis. *Crit Care Med* 28(9 Suppl):S34-7.

20. Isobe, H., K. Okajima, M. Uchiba, N. Harada, and H. Okabe. 2002. Antithrombin prevents endotoxin-induced hypotension by inhibiting the induction of nitric oxide synthase in rats. *Blood* 99(5):1638-45.

21. Mizutani, A., K. Okajima, M. Uchiba, H. Isobe, N. Harada, S. Mizutani, and T. Noguchi. 2003. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production. *Blood* 101(8):3029-36.

22. Kowal-Vern, A., V. McGill, J. M. Walenga, and R. L. Gamelli. 2000. Antithrombin(H) concentrate infusions are safe and effective in patients with thermal injuries. *J Burn Care Rehabil* 21(2):115-27.

23. Uchiba, M., K. Okajima, K. Murakami, H. Okabe, and K. Takatsuki. 1995. Effects of antithrombin III (AT III) and Trp49-modified AT III on plasma level of 6-keto-PGF1 alpha in rats. *Thromb Res* 80(3):201-8.

24. Kaneider, N. C., P. Egger, S. Dunzendorfer, and C. J. Wiedermann. 2001. Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 287(1):42-6.

25. Kaneider, N. C., C. M. Reinisch, S. Dunzendorfer, J. Romisch, C. J. Wiedermann, and C. J. Wiederman. 2002. Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Cell Sci* 115(Pt 1):227-36.

26. Oelschlager, C., J. Romisch, A. Staubitz, H. Stauss, B. Leithauser, H. Tillmanns, and H. Holschermann. 2002. Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood* 99(11):4015-20.

27. McKeage, K., and G. L. Plosker. 2001. Argatroban. *Drugs* 61(4):515-22; discussion 523-4.

28. Soejima, K., L. D. Traber, F. C. Schmalstieg, H. Hawkins, J. M. Jodoin, C. Szabo, E. Szabo, L. Virag, A. Salzman, D. L. Traber, and L. Varig. 2001. Role of nitric oxide in vascular permeability after combined burns and smoke inhalation injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163(3 Pt 1):745-52.

도면의 간단한 설명

도 1은 혈액 가스 및 폐 기능을 나타낸 것이다. PaO_2/FiO_2 비(A)의 변화 및 폐 단락 분획이 도시되어 있다. 빈 사각형은 손상이 있고 식염수 처리된 군(n=6)을 나타내며, 빈 다이아몬드는 손상이 있고 ATⅢ-처리된 대조군(n=6)을 나타내고, 채워진 원은 손상이 있고 아가트로반 처리된 군(n=6)을 나타낸다. 데이터는 평균 ± SE로 표현한 것이다. *는 식염수 처리된 군에 대한 차이($p<0.05$)를 나타낸다.

도 2는 기도 내성을 나타낸 것이다. 기도 내성은 Δ기도압(ΔAP)을 계산하여 평가하였다. ΔAP는 다음과 같이 계산하였다; ΔAP=[피크 AP]-[평탄역 AP]. 빈 사각형은 손상이 있고 식염수 처리된 군(n=6)을 나타내며, 빈 다이아몬드는 손상이 있고 ATⅢ-처리된 대조군(n=6)을 나타내고, 채워진 원은 손상이 있고 아가트로반 처리된 군(n=6)을 나타낸다. 데이터는 평균 ± SE로 표현한 것이다.

도 3은 폐의 조직학 수치를 나타낸 것이다. 울혈, 부종, 염증 및 출혈에서의 조직학적 변화는 연기 및 박테리아 노출 24시간 후에 평가하였다. 각 수치의 합을 조직학 총수치(A)로 계산하였다. 대조(sham) 손상군의 데이터는 본 발명자들의 조직학 데이터(n=6)로부터 제시된다. 울혈(Con), 부종(Ed), 염증(Inf) 및 출혈(Hem)과 같은 각각의 조직학적 변수에 미치는 ATⅢ의 효과가 B에 제시되어 있다. 흰색 막대는 손상이 있고 식염수 처리된 군(n=6)을 나타내며, 흑색 막대는 손상이 있고 ATⅢ-처리된 대조군(n=6)을 나타낸다. 데이터는 평균 ± SE로 표현한 것이다. *는 대조 손상 군에 대한 차이($p<0.05$)를 나타낸다.

도 4는 기도 폐쇄의 현미경 평가를 나타낸 것이다. 기도 폐쇄 비율을 산정하였다. 데이터는 기관지 및 세기관지 수준에서 분석하여 평균 ± SE로 표현하였다. *는 식염수 처리된 군에 대한 차이($p<0.05$)를 나타낸다.

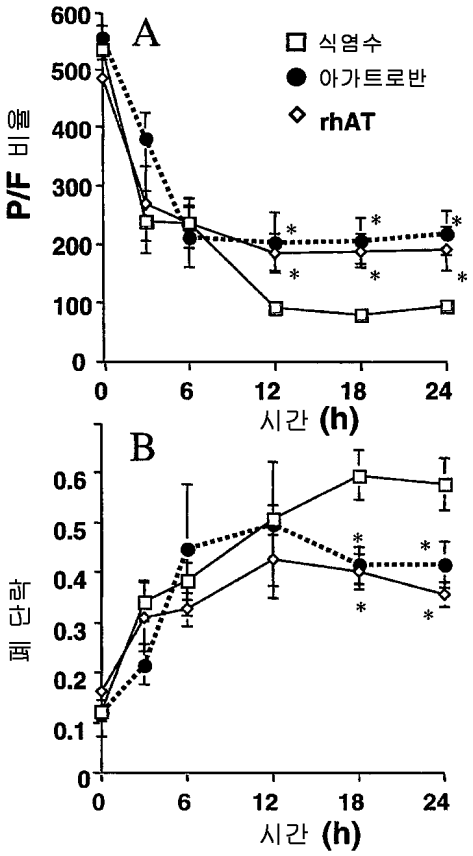
도 5는 폐의 함수/건조 중량비를 나타낸 것이다. 무혈성 폐의 함수/건조 중량비는 폐 부종 또는 폐수 함량의 지수로서 계산하였다. 데이터는 평균 ± SE로 표현한 것이다. *는 식염수 처리된 군에 대한 차이($p<0.05$)를 나타낸다.

도 6은 혈장 질산염 및 아질산염(NO_x) 농도의 변화를 나타낸 것이다. 빈 사각형은 식염수 처리된 군(n=6)을 나타내며, 빈 다이아몬드는 ATⅢ 군(n=6)을 나타내고, 채워진 원은 아가트로반(n=6)을 나타낸다. *는 식염수 처리된 군에 대한 유의 수준의 차이($p<0.05$)를 나타낸다.

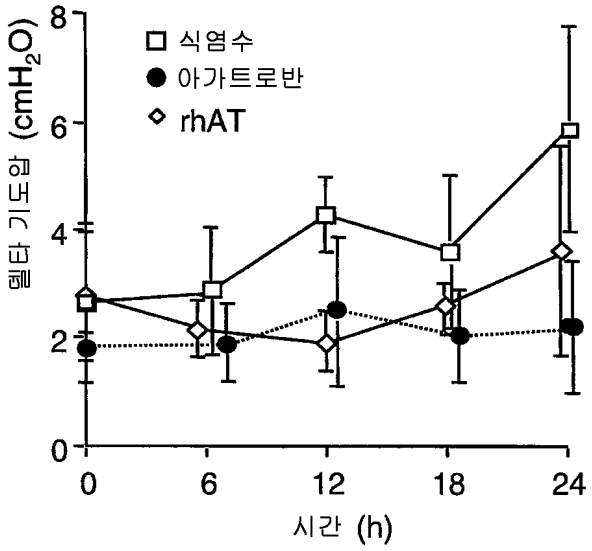
도 7은 핵 전이를 통해 클로닝된 동물을 생성시키는 방법의 일반화된 다이아그램을 나타낸 것이다.

도면

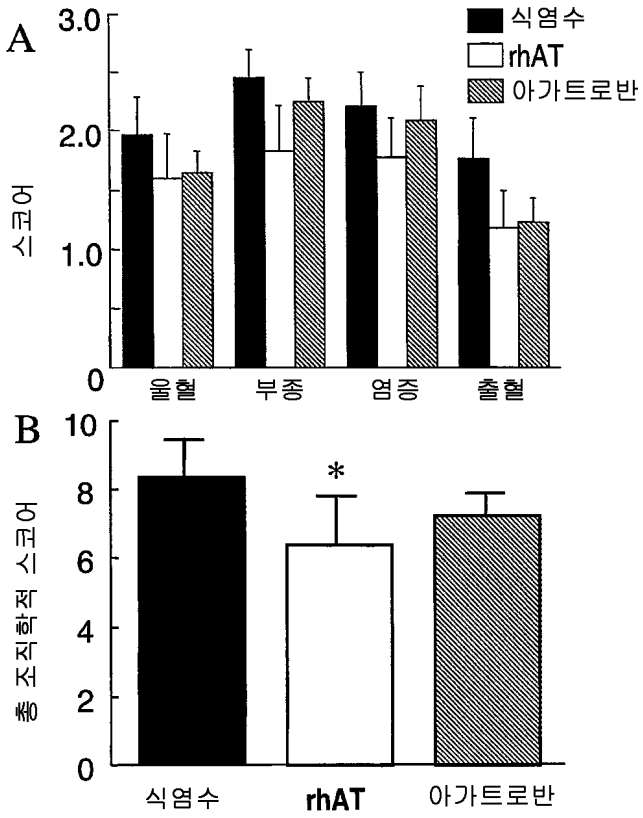
도면1



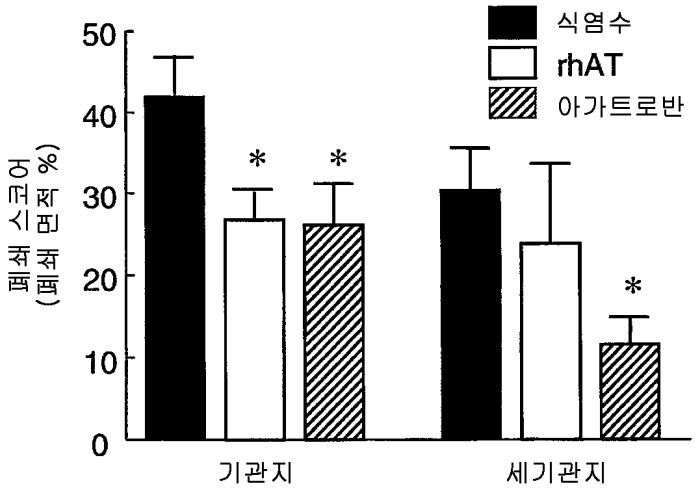
도면2


델타 기도압 (cmH_2O)
8
6
4
2
0
0
6
12
18
24
시간 (h)
식염수
아가트로반
rhAT

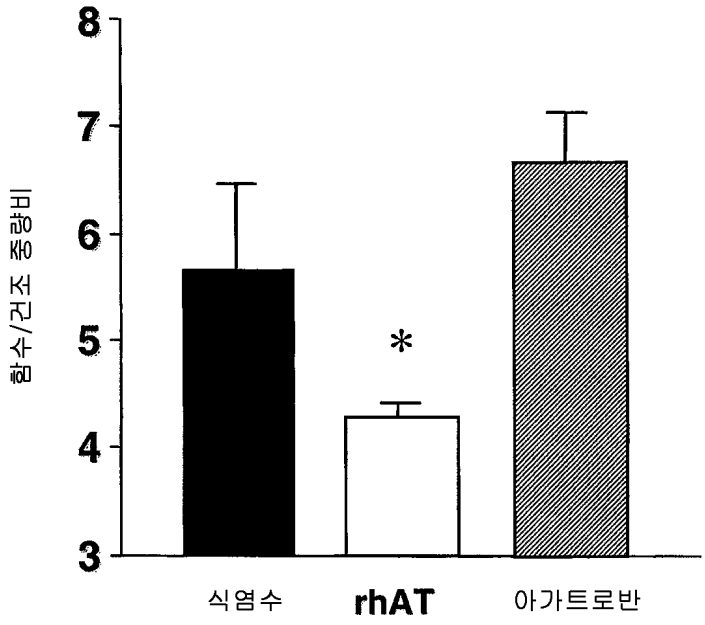
도면3


A
스코어
3.0
2.0
1.0
0
울혈
부종
염증
출혈
식염수
rhAT
아가트로반
B
총 조직학적 스코어
10
8
6
4
2
0
*
식염수
rhAT
아가트로반

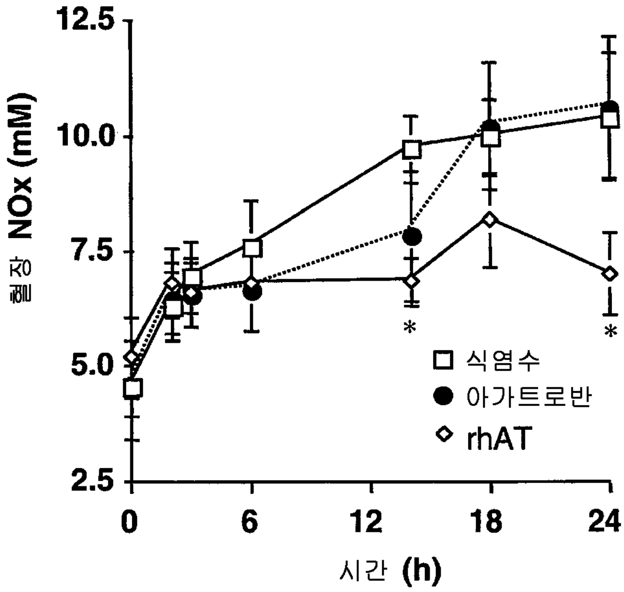
도면4


식염수
rhAT
아가트로반
폐쇄 스코어
(폐쇄 면적 %)
50
40
30
20
10
0
*
*
*
기관지
세기관지

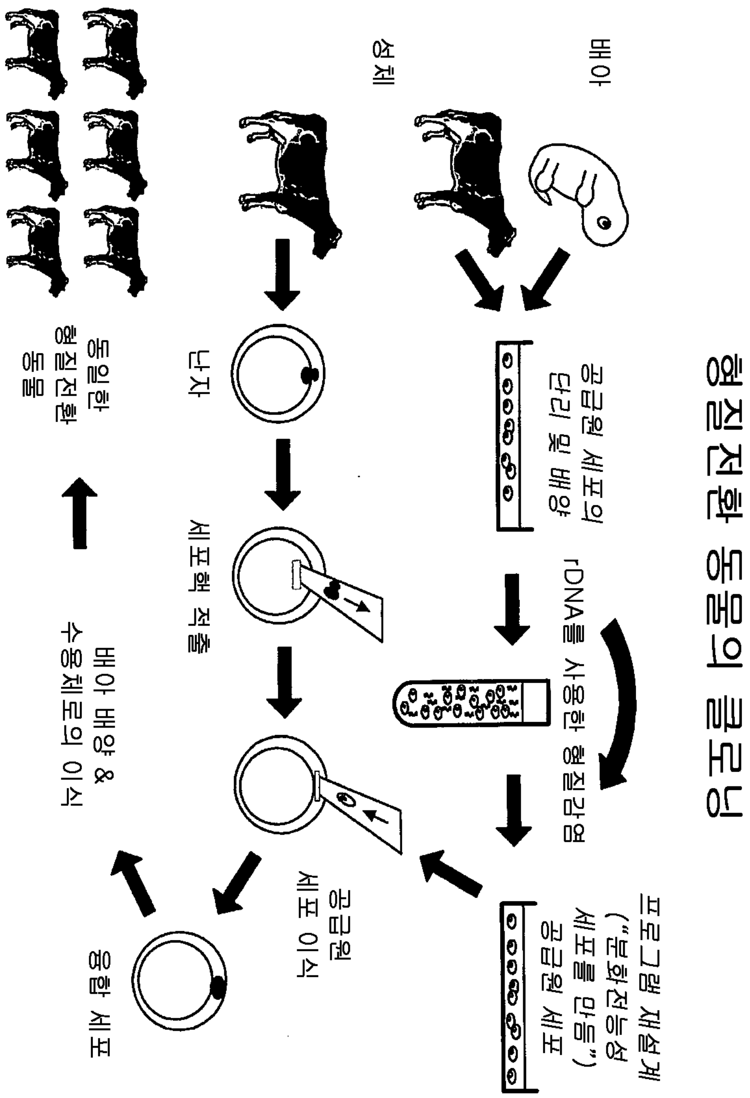
도면5


함수/건조 중량비
8
7
6
5
4
3
*
식염수
rhAT
아가트로반

도면6


12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
혈장 NOx (mM)
0
6
12
18
24
시간 (h)
식염수
아가트로반
rhAT
*
*

도면7


형질전환 동물의 클로닝
배아
성체
공급원 세포의 단리 및 배양
rDNA를 사용한 형질감염
프로그램 재설계 ("분화전능성 세포를 만듬") 공급원 세포
난자
세포핵 적출
공급원 세포 이식
융합 세포
배아 배양 & 수용체로의 이식
동일한 형질전환 동물