



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0046698
(43) 공개일자 2021년04월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/10 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/10 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7007331
- (22) 출원일자(국제) 2019년08월15일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년03월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/046698
- (87) 국제공개번호 WO 2020/037146
 국제공개일자 2020년02월20일
- (30) 우선권주장
 62/719,217 2018년08월17일 미국(US)

- (71) 출원인
 더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아
 미국 펜실베이니아 필라델피아 (우편번호 19104) 윌
 넷 스트리트 3451 7플로어
- (72) 발명자
 피셔 아론 비.
 미국, 펜실베이니아 19103, 필라델피아, 130 에스.
 18 스트리트
 파인스타인 셸던 아이.
 미국, 펜실베이니아 19151, 필라델피아, 7661 브룩
 헤이븐 로드
- (74) 대리인
 특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **급성 폐 손상의 치료를 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

다양한 양상 및 실시형태에서 본 발명은 급성 폐 손상 (ALI)의 치료에 유용한 조성물 및 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0073 (2013.01)

A61K 9/127 (2013.01)

A61P 11/00 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C07K 7/06 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음으로 이루어진 폴리펩타이드를 포함하는 조성물:

서열번호 4 $X^1X^2X^3X^4X^5LX^6X^7X^8X^9$ HQIL

상기 식에서,

X^1 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;

X^2 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;

X^3 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;

X^4 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;

X^5 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 T 또는 E이고;

X^6 은 H 또는 Y이고;

X^7 은 D 또는 E이고;

X^8 은 F 또는 I이고;

X^9 는 R 또는 K이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩타이드는 서열번호 5 ELQTELYEIKHQIL, 서열번호 6 QTELYEIKHQIL 및 서열번호 7 ELYEIKHQIL로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHDFRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화(encapsulating)되는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사용으로 제형화되는, 조성물.

청구항 7

대상체에서 급성 폐 손상(acute lung injury)을 치료하는 방법으로서, 방법은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법:

서열번호 4 $X^1X^2X^3X^4X^5LX^6X^7X^8X^9$ HQIL

상기 식에서,

X^1 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;

X^2 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;

X^3 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;

X^4 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;

X^5 는 T 또는 E일 수 있고;

X^6 은 H 또는 Y이고;

X^7 은 D 또는 E이고;

X^8 은 F 또는 I이고;

X^9 는 R 또는 K이다.

청구항 8

제7항에 있어서, 폴리펩타이드는 서열번호 5 ELQTELYEIKHQIL, 서열번호 6 QTELYEIKHQIL 및 서열번호 7 ELYEIKHQIL로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHDFRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화되는, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 약제학적 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여되는, 방법.

청구항 12

대상체에서 패혈증(sepsis)을 치료하는 방법으로서, 방법은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법:

서열번호 4 $X^1X^2X^3X^4X^5X^6X^7X^8X^9$ HQIL

상기 식에서,

X^1 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;

X^2 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;

X^3 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;

X^4 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;

X^5 는 T 또는 E일 수 있고;

X^6 은 H 또는 Y이고;

X⁷은 D 또는 E이고;

X⁸은 F 또는 I이고;

X⁹는 R 또는 K이다.

청구항 13

제12항에 있어서, 폴리펩타이드는 서열번호 5 ELQTELYEIKHQIL, 서열번호 6 QTELYEIKHQIL 및 서열번호 7 ELYEIKHQIL로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHDFRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화되는, 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 약제학적 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2018년 8월 17일에 출원된 미국 가출원 제 62/719,217호에 대해 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권을 주장하며, 상기 문헌은 그 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0003] 미국 연방 정부 지원 연구 또는 개발에 관한 진술
- [0004] 본 발명은 미국 국립 심장, 폐 및 혈액 협회 (National Heart, Lung and Blood Institute)에서 부여하는 2R01 HL102016 하의 미국 정부의 지원을 받아 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 가지고 있다.
- [0005] 폐 염증은 다양한 병인으로 인해 발생하는 급성 폐 손상 (acute lung injury; ALI) 증후군의 발병 기전에서 중요한 요소이다. 활성 산소 종 (ROS)의 생성과 관련된 폐 염증은 ALI 증후군의 중요한 원인이다. 폐에서 ROS의 주요 공급원인 NADPH 산화효소, 유형 2 (NOX2)의 활성화에는 페록시레독신 (peroxiredoxin) 6 (Prdx6)의 포스포리파제 (phospholipase) A₂ (PLA₂) 활성이 필요하다.
- [0006] ALI의 현재 치료는 보조적(supportive)이며 현재 예방 또는 치료를 위해 특별히 승인된 약물이 없다. 따라서, ALI에 대해 보호하는 방법 및 조성물이 당 업계에 필요하다. 본 개시내용은 이러한 요구를 다룬다.

발명의 내용

- [0007] 일 양상에서, 본 발명은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 제공하고,
- [0008] 서열번호 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL
- [0009] 상기 식에서,
- [0010] X¹은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;

- [0011] X^2 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;
- [0012] X^3 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;
- [0013] X^4 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;
- [0014] X^5 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 T 또는 E이고;
- [0015] X^6 은 H 또는 Y이고;
- [0016] X^7 은 D 또는 E이고;
- [0017] X^8 은 F 또는 I이고;
- [0018] X^9 는 R 또는 K이다.
- [0019] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 5 ELQTELYEIKHQIL, 서열번호 6 QTELYEIKHQIL 및 서열번호 7 ELYEIKHQIL로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0020] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHDFRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0021] 다양한 실시형태에서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0022] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화(encapsulating)된다.
- [0023] 다양한 실시형태에서, 상기 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사용으로 제형화된다. 다양한 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여된다.
- [0024] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 급성 폐 손상을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고
- [0025] 서열번호 4 $X^1X^2X^3X^4X^5LX^6X^7X^8X^9$ HQIL
- [0026] 상기 식에서,
- [0027] X^1 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;
- [0028] X^2 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;
- [0029] X^3 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;
- [0030] X^4 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;
- [0031] X^5 는 T 또는 E일 수 있고;
- [0032] X^6 은 H 또는 Y이고;
- [0033] X^7 은 D 또는 E이고;
- [0034] X^8 은 F 또는 I이고;
- [0035] X^9 는 R 또는 K이다.
- [0036] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 5 ELQTELYEIKHQIL, 서열번호 6 QTELYEIKHQIL 및 서열번호 7 ELYEIKHQIL로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0037] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHDFRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3

LYDIRHQIL로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0038] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화된다.
- [0039] 다양한 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여된다.
- [0040] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 패혈증(sepsis)을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,
- [0041] 서열번호 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL
- [0042] 상기 식에서,
- [0043] X¹은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;
- [0044] X²는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;
- [0045] X³은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;
- [0046] X⁴는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;
- [0047] X⁵는 T 또는 E일 수 있고;
- [0048] X⁶은 H 또는 Y이고;
- [0049] X⁷은 D 또는 E이고;
- [0050] X⁸은 F 또는 I이고;
- [0051] X⁹는 R 또는 K이다.
- [0052] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 5 ELQTELYEIKHQIL, 서열번호 6 QTELYEIKHQIL 및 서열번호 7 ELYEIKHQIL로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0053] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHDFRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0054] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화된다.
- [0055] 다양한 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여된다. 다양한 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0056] 본 발명의 바람직한 실시형태에 대한 다음의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 설명하기 위해, 현재 바람직한 실시형태가 도면에 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 실시형태의 정확한 배열 및 수단에 제한되지 않음을 이해해야 한다.

도 1a 및 도 1b: 8 내지 10주령의 야생형 C57B1/6 마우스에게 기관내 카테터 (IT) 또는 정맥내 (IV)를 통해 2 ug/g 체중의 PIP-2를 주사하였다. 주사된 펩타이드를 식염수에 용해시키거나 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC), 난(egg) 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티딜글리세롤 (PG) 및 콜레스테롤 (지질 몰비, 50:25:10:15)로 구성된 단층(unilamellar) 리포솜에 혼입시켰다. 본 발명자들은 75% DPPC 또는 75% 난 PC (+ PG 및 콜레스테롤)를 포함하는 리포솜이 PIP-2의 세포내 전달에 대해 DPPC/PC/PG/콜레스테롤 리포솜과 동일하게 효과적이라는 것을 확인하였다. 마우스를 5분 후 희생시키고, 혈액이 제거될 때까지 폐를 관류한 다음, H₂O₂에 의한 Amplex red의 산화를 모니터링하기 위해 형광 지표 Amplex red + 양고추냉이 과산화효소 (HRP)의 존재 하에 온도 제어 (37°C) 조건에서 재순환 관류를 실시하였다. 관류액 분취물의 형광을 소정의 시간에 측정하고 임의의 형광단위 (AFU)로 표시하였다. 관류시간에 따른 형광 증가는 세포 NADPH 산화효소 (NOX2)의 활성화를 반영하는

H₂O₂의 생성을 나타낸다. 식염수 중 PIP-2의 투여는 H₂O₂ 생성 속도에 영향을 미치지 않지만 IT (도 1a) 또는 IV (도 1b) 주입된 리포솜 내 PIP-2는 H₂O₂ 생성을 현저하게 억제한다.

도 2a 내지 도 2f는 조직 산화 및 폐 염증의 다양한 마커에 따른 지질다당류 (LPS)의 기관내 주사 후 폐 손상의 시간 경과를 도시한다. 박테리아 (E. 콜라이 (E. coli)) 지질다당류 (LPS)를 5 ug/g 체중으로 기관내 (IT) 주사에 의해 야생형 C57B1/6 마우스에 투여하였다. 지시된 바와 같이 LPS 후 12, 16, 24, 또는 48시간째에 마우스를 희생시켰다. 폐를 제거하고 기관을 통해 식염수로 세척하여 BALf를 획득한 다음 폐를 균질화하였다. 폐 손상의 매개변수는 BALf의 핵 세포와 단백질, 및 폐 습중량 대 건조량 비율 (W/D)이었으며; W/D의 경우, 오븐에서 일정한 중량으로 건조 전 및 후에 폐의 좌측 상부 엽의 중량을 측정하였다. 조직 산화 스트레스의 지표 (하단 줄)는 폐 균질물에서 측정된 티오바르비투르산 반응성 물질 (TBARS), 8-이소프로스탄 및 단백질 카보닐이었다. 값은 n = 4에 대한 평균 ±이다. *P<0.05 대 다른 모든 값; § p<0.05 대 12시간, 16시간 및 24시간. 도 2a는 티오바르비투르산 반응성 물질 (TBARS)을 도시한다. 도 2b는 8-이소프로스탄을 도시한다. 도 2c는 폐 균질물 중 단백질 카보닐을 도시한다. 도 2d는 기관지 폐포 세척액 (BALF)의 세포 수를 도시한다. 도 2e는 BALF의 총 단백질을 도시한다. 도 2f는 폐의 습중량 대 건조량의 비율을 도시한다.

도 3a 내지 도 3f 급성 폐 손상 (ALI)을 기관내 LPS (5 mg/g 체중)로 생성하였다. 리포솜 내 PIP-2 (2 µg/g 체중)를 LPS (0시간)와 함께 IT 투여하거나 LPS 후 12시간 또는 16시간째에 정맥내 (IV)로 투여하였다. 기관내에 대한 두 번째 '공격(assault)'을 방지하기 위해 PIP-2를 IV 투여하였다. 마우스를 24시간째에 희생시키고 폐 손상 및 조직 산화 스트레스에 대해 폐를 평가하였다. 결과는 n = 4에 대한 평균 ± SE이다. *P<0.05 대 다른 모든 그룹. 도 3a는 BALF의 세포 수를 도시한다. 도 3b는 BALF의 총 단백질을 도시한다. 도 3c는 폐의 습중량 대 건조량의 비율을 도시한다. 도 3d는 TBARS를 도시한다. 도 3e는 8-이소프로스탄을 도시한다. 도 3f는 폐 균질물의 단백질 카보닐을 도시한다.

도 4a 및 도 4b: Prdx6의 포스포리파제 A₂ (aiPLA₂)를 Ca²⁺의 부재 하에 산성 조건 (pH 4) 하에 디팔미토일포스파티딜콜린으로부터 팔미트산의 유리에 의해 측정하였다. 도 4a: 재조합 인간 Prdx6의 aiPLA₂ 활성에 대한 PIP-2의 농도 증가 효과. 도 4b: 마우스 폐의 aiPLA₂ 활성에 대한 LPS 및 PIP-2 처리의 효과. 마우스 (각 조건에 대해 n = 3)를 리포솜 내 PIP-2 (2 µg/g 체중)의 부재 또는 존재 하에 기관내 LPS (2 µg/g 체중)로 처리하였다. LPS 제공 후 6, 12 또는 24시간째에 동물을 희생시켰다. 폐에서 혈액을 제거하고 균질화하였다. 대조군 폐는 LPS가 제공되지 않은 마우스의 것이다. *P<0.05 대 해당 대조군 및 대 LPS+PIP-2; § P<0.05 대 LPS 12시간 및 24시간.

도 5a 및 도 5b: 리포솜 내에 혼입된 PIP-2를 폐 분리 전에 기관내에 주입하였다. 도 5a: 분리된 폐를 인공 배지로 재순환 시스템에 관류하였다. NOX2 활성을 안지오텐신 (angiotensin) II (Ang II)의 첨가에 의해 자극하였다. 양고추냉이 과산화효소와 함께 Amplex red를 ROS 생성의 검출을 위해 관류액에 첨가하였다. 관류액의 분취물을 일정한 간격으로 분광광도법에 의해 분석하여 ROS 생성을 나타내는 amplex red의 산화를 결정하였다. 결과는 N = 3 내지 4에 대한 평균 ± SE이다. 도 5b: LPS 투여 (5 mg/g 체중) 후 6, 12 또는 24시간째에 마우스를 희생시키고 형광단 (디플루오로플루오레세인 디아세테이트, DFFDA)을 포함하는 염수 용액으로 15분 동안 현장에서 폐를 관류하였다. 그런 다음 폐를 균질화하고 폐 균질액의 형광을 ROS 생성 지표로 결정하였다. 도 5a 및 도 5b의 결과는 N = 4에 대한 평균 ± SE이다. *P<0.05 대 해당 LPS 및 LPS+PIP-2; § P<0.05 대 12시간 및 24시간 LPS; Δ P<0.05 대 해당 LPS.

도 6: 리포솜의 PIP-2를 0시간째에 기관내 (IT) 또는 정맥내 (IV)로 마우스에 투여하였다. PIP-2 투여 후 4 내지 72시간째에 일정한 간격으로 폐를 수확하고, 균질화하고, Prdx6-PLA₂ 활성에 대해 분석하였다. PIP-2는 IT 또는 IV 경로에서 효과적이었으며, 회복을 위해 계산된 ½ 시간은 약 50시간이었다. 결과는 N = 3 내지 4에 대한 평균 + SE이다.

도 7a 및 도 7b: 생존율에 대한 Kaplan-Meier 플롯(plot). LPS (15 mg/g 체중)를 도 7a: 기관내 (IT) 또는 도 7b: 복강내 (IP) 주사에 의해 모든 마우스에 제공하였다. 화살표로 표시된 바와 같이 총 5회 동안 리포솜 내 PIP-2 또는 위약 (리포솜 단독)을 LPS 12시간 후 (치료시간 0) 정맥내 (IV) 투여한 다음 12시간 또는 24시간 간격으로 투여하였다. 도 7a: 2 µg/g 체중의 PIP-2; 각 그룹에 대해 N = 14. 도 7b: 2 또는 20 µg/g 체중의 PIP-2; 위약 그룹, n = 8; PIP-2 2 mg 그룹, n = 7; PIP-2 20 mg 그룹, n = 10.

도 8: PLA₂ 억제 펩타이드 (PIP-2)는 분리되어 관류된 마우스 폐에서 안지오텐신 II (Ang II)에 의해 자극된

ROS 생성을 억제한다. IV 경로를 통해 온전한 야생형 (WT) 마우스에 PIP-2 (2 µg/g 체중)를 투여하였다. WT 기준, WT 대조군 및 NOX2 높 (nu11)에는 펩타이드를 제공하지 않았다. 30분 후, 마취된 마우스로부터 폐를 분리하고 Nox2 활성화제로 Ang II (50 µM)를 첨가하고 Amplex red 및 양고추냉이 과산화효소를 첨가한 재순환 시스템에서 관류하여, 관류액 ROS를 검출하였다. WT 기준 폐는 Ang II로 자극하지 않았다. 15분 평형 기간 (0시간으로 표시됨) 후 형광 분석을 위해 분취물을 15분 간격으로 취하였다. 표시된 각 점은 n = 3에 대한 평균 ± SE를 나타낸다. 선은 최소 평균 제곱법으로 그어졌다. 각 선의 기울기로부터 계산된 ROS 감소의 평균 비율은 괄호 안에 표시된다. *P<0.05 대 다른 3개의 기울기.

도 9a 및 도 9b: PIP-2는 LPS 투여 후 증가된 폐 aiPLA2 활성화 및 증가된 ROS 생성을 억제한다. LPS (5 µg/g 체중)를 리포솜 단독 (LPS로 표시) 또는 리포솜 내 PIP-2 (+PIP-2로 표시)와 함께 기관내 (IT) 주입에 의해 투여하였다. 대조군은 LPS가 부재하는 리포솜 단독이었다 (대조군으로 표시). LPS 후 6, 12 또는 24시간째에 마우스를 희생시키고 형광단 디플루오로플루오로세인 디아세테이트 (DFF-DA)를 포함하는 식염수 용액으로 폐를 15분 동안 현장에서 관류하였다. 그 후 폐를 균질화하고 도 9a: aiPLA2 활성화; 도 9b: ROS 생성의 지표로서 폐 균질물의 형광에 대해 분석하였다. 결과는 도 9a의 경우 N = 3 도 9b의 경우 N = 4에 대한 평균 ± SE이다. *P<0.05 대 대조군 및 동일한 시점의 +PIP-2; Δ P<0.05 대 6시간째의 해당 값.

도 10: IV 투여 후 폐로의 PIP-2 전달에 대한 리포솜 조성물의 효과. 도 5a 및 도 5b에서와 같은 정맥내 주입에 의한 PIP-2의 리포솜 매개 전달을 위한 동일한 프로토콜. * 총 지질의 %; 모든 리포솜은 또한 15% 콜레스테롤을 포함하였다. i 평균 ± SE (n = 3) 또는 범위 (n = 2). 리포솜 내의 PC 또는 DPPC는 PIP-2의 세포내 전달에 유사한 효과를 나타낸다. PG를 누락시키면 효능이 약 10% 감소한다.

도 11: IT LPS 후 24시간째에 평가된 폐 손상에 대한 PIP-2에 의한 "보호" (%). * LPS 후 0, 12 또는 16시간째의 투여에 의한 PIP-2 효과 값. 폐 손상에 대한 보호 (%)를 $[1 - (\text{PIP-2 손상} - \text{대조군}) / (\text{LPS 단독} - \text{대조군})]$ 으로 계산하였다. PIP-2에 의한 "보호"는 >75%이다.

도 12: 고투여량 LPS에서 생존하는 PIP-2 처리된 마우스의 폐 손상 지표. 마우스에 LPS (15 µg/g wt)를 B 선. 기관내 (IT); 또는 C 선. 복강내 (IP) 주사하였다. 리포솜 내 2 µg/g 또는 20 µg/g 체중의 PIP-2를 도 7에 표시된 시간에 주사하였다 (IV). 생존한 마우스 중 5 마리를 처리 개시 후 108시간 (LPS 투여 후 120시간)째에 희생시켰다. 결과를 과거 대조군 마우스 (무 LPS) (A 선)에 대한 값과 비교한다. BALf, 기관지 폐포 세척액; TBARS, 티오바르비투르산 반응성 물질. 값은 대조군의 경우 n = 4, LPS + PIP-2의 경우 n = 5에 대한 평균 ± SE이다. LPS + PIP-2의 평균값은 해당 대조군과 통계적으로 다르지 않다 (p > 0.05). LPS 후 5일 동안 생존한 PIP-2 처리 마우스는 정상 폐를 가졌다.

도 13: 인공호흡 유발 폐 손상 (VILI)에 대한 PIP-2의 효과. 마취된 마우스를 호흡 속도 120/min 및 2 cm H₂O 호기말 양압(positive end-expiratory pressure; PEEP)으로 일호흡량(tidal volume) 12 ml/Kg 체중으로 6시간 동안 기계적으로 인공호흡시켰다. 리포솜 내 PIP-2 (2 ug/g 체중)를 기계적 인공호흡 개시시 IT 주사로 투여하였고 6시간 후에 마우스를 희생시켰다. 대조군은 정상 (비 인공호흡) 폐의 값을 나타낸다. 보호 %는 표 1에서와 같이 계산되었다. 결과는 n = 4에 대한 평균 ± SE이다. * VILI + PIP 대 VILI에 대한 P<0.05. PIP-2는 기계적 인공호흡과 관련된 폐 손상으로부터 보호된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 정의
- [0058] 달리 규정되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 균등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 시험을 위한 실행에 사용될 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법이 본 명세서에 기재된다. 본 발명을 설명하고 청구함에 있어서 다음과 같은 용어가 사용된다.
- [0059] 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어는 특정 실시형태를 설명하기 위한 것이며 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.
- [0060] 단수형 관사 하나 ("a" 및 "an")는 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 예를 들어, "하나의 요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0061] 양, 시간적 지속시간 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭할 때 본 명세서에서 사용되는 "약"은 명시된 값으로부터 ± 20% 또는 ± 10%, 더욱 바람직하게는 ± 5%, 더욱더 바람직하게는 ± 1%, 더욱더 바람직하게는 ± 0.1%의 변

동을 포함하는 것을 의미하며, 이는 그러한 변동은 개시된 방법을 수행하기에 적절하기 때문이다.

- [0062] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "급성 폐 손상" 또는 "ALI"는 심부전과 관련이 없는 저산소혈증을 동반한 양측 폐 침윤의 급성 발병을 특징으로 하는 증후군을 지칭한다.
- [0063] 질병 또는 장애의 증상의 중증도, 환자가 그러한 증상을 경험하는 빈도 또는 둘 모두가 감소되는 경우, 질병 또는 장애는 "완화"된다.
- [0064] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "조성물" 또는 "약제학적 조성물"은 본 발명에서 유용한 적어도 하나의 화합물과 약제학적으로 허용 가능한 담체의 혼합물을 지칭한다. 약제학적 조성물은 환자 또는 대상체에게 화합물의 투여를 용이하게 한다. 다음에 제한되는 것은 아니나 정맥내, 경구, 에어로졸, 비경구, 안내, 폐 및 국소 투여를 포함하여 화합물을 투여하는 여러 기술이 당 업계에 존재한다.
- [0065] 화합물의 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 화합물이 투여되는 대상체에게 유리한 효과를 제공하기에 충분한 화합물의 양이다. 전달 비허량의 "유효량"은 화합물을 효과적으로 결합하거나 전달하기에 충분한 양이다.
- [0066] 용어 "환자", "대상체", "개체" 등은 본 명세서에서 상호 혼용되며, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 시험관내 또는 현장의 임의의 동물 또는 이의 세포를 지칭한다. 특정 비 제한적 실시형태에서, 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다.
- [0067] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 화합물의 생물학적 활성 또는 특성을 제거하지 않고 비교적 독성이 없는 담체 또는 희석제와 같은 물질을 지칭하며, 즉, 상기 물질은 부적절한 생물학적 효과를 일으키거나 그것이 포함된 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않고 개체에 투여될 수 있다.
- [0068] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 의도된 기능을 수행할 수 있도록 본 발명 내에서 유용한 화합물을 환자 내에서 또는 환자에게 전달 또는 운반하는데 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 안정화제, 분산제, 현탁제, 희석제, 부형제, 증점제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용 가능한 물질, 조성물 또는 담체를 의미한다. 일반적으로, 이러한 작제물은 하나의 기관 또는 신체 일부로부터 다른 기관 또는 신체 일부로 전달 또는 운반된다. 각 담체는 본 발명 내에서 유용한 화합물을 포함하는 제형의 다른 구성요소와 상용성이고, 환자에 유해하지 않다는 의미에서 "허용 가능"하다. 약제학적으로 허용 가능한 담체로서 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 락토스, 글루코스 및 수크로스와 같은 당; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 셀룰로스 및 그 유도체, 예컨대 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말형 트라가칸스 (tragacanth); 맥아; 젤라틴; 활석; 코코아 버터 및 좌약 왁스와 같은 부형제; 팜콩 유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; 한천; 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제; 표면 활성제; 알긴산; 무발열수; 등장 식염수; 링거액; 에틸 알코올; 인산염 완충액; 및 약제학적 제형에 사용되는 기타 무독성의 상용성 물질을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 또한 본 발명에서 유용한 화합물의 활성과 상용성이고 환자에게 생리학적으로 허용 가능한 임의의 및 모든 코팅, 항박테리아 및 항진균제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 보충 활성 화합물이 또한 본 조성물에 포함될 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 본 발명에서 유용한 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예에 사용되는 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 다른 추가 성분은 당 업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA)]에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0069] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "PIP-2"는 서열번호 1 LHDFRHQIL을 갖는 펩타이드를 의미한다.
- [0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "PIP-4"는 서열번호 2 LYEIKHQIL을 갖는 펩타이드를 의미한다.
- [0071] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "PIP-5"는 서열번호 3 LYDIRHQIL을 갖는 펩타이드를 의미한다.
- [0072] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "질병 또는 장애의 치료"는 환자가 질병 또는 장애의 증상을 경험하는 빈도를 감소시키는 것을 의미한다. 질병 및 장애는 본 명세서에서 상호 혼용된다.
- [0073] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "폐혈증"은 감염에 대한 신체의 반응으로 인해 잠재적으로 생명을 위협하는 병태이며 다발성 장기 부전을 유발할 수 있다.

[0074] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 예방 및/또는 요법을 포함한다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 치료 용도로 제한되지 않고 예방 용도로 사용될 수 있다. 따라서 상태, 장애 또는 병태를 "치료하는" 또는 그의 "치료"에는 (i) 상태, 장애 또는 병태가 발병하거나 그 소인이 있지만, 상태, 장애 또는 병태의 임상적 또는 아임상적 증상을 경험하지 않았거나 이러한 증상이 나타나지 않은 대상체에서 발생하는 상태, 장애 또는 병태의 임상 증상의 출현을 예방 또는 지연, (ii) 상태, 장애 또는 병태의 억제, 즉, 질병 또는 이의 적어도 하나의 임상적 또는 아임상적 증상 발생의 억제 또는 감소, 또는 (iii) 질병의 완화, 즉 상태, 장애 또는 병태 또는 이의 적어도 하나의 임상 또는 아임상 증상의 퇴행의 유발이 포함된다.

[0075] 범위: 본 개시내용 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 양상은 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의성과 간결성을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 불변적 제한으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 범위에 대한 설명은 가능한 모든 하위 범위와 해당 범위 내의 개별 수치 값을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 기재는 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6과 같은 하위 범위뿐만 아니라, 범위 내의 개별 수치, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0076] 설명

[0077] 조성물

[0078] 본 발명은 부분적으로 ALI를 치료하기 위해 사용될 수 있는 aiPLA₂의 특정 펩타이드 억제제의 조작용을 기반으로 한다. 본 발명의 다수의 펩타이드의 aiPLA₂ 억제 활성은 하기 표 1에 제시되어 있다.

표 1

[0079] 재조합 hPrdx6의 aiPLA₂ 활성화에 대한 펩타이드의 효과

서열	활성 nmol/min/mg prot.
서열번호 8 DEELQATLHDFRHQIL (16) 인간 PIP-1	45.0
서열번호 9 DEELQTELYEIKHQIL (16) 랫트, 마우스 PIP-3	32.0
서열번호 10 ELQTELYEIKHQIL (14)	33.2
서열번호 11 QTELYEIKHQIL (12)	31.5
서열번호 12 ELYEIKHQIL (10)	28.6
서열번호 13 YEIKHQIL (8)	94.4
서열번호 14 IKHQIL (6)	97.1
서열번호 15 DEELQTELYEIKHQ (14)	102
서열번호 16 DEELQTELYEIK (12)	95.7
서열번호 17 DEELQTELYEI (10)	94.9
서열번호 18 DEELQTEL (8)	93.6
hPrdx6 단독 (무 펩타이드)	93.4
서열번호 9 DEELQTELYEIKHQIL (16) r	20.1

표 2

[0080] 인간 재조합 단백질의 aiPLA₂ 활성화에 대한 효과에 의한 억제 펩타이드의 크기 최적화

서열	활성 nmol/min/mg prot.
서열번호 19 TLHDFRHQIL (10)	31.5
서열번호 1 LHDFRHQIL (9) PIP-2	29.9
서열번호 20 TLHDFRHQI (9)	89.6
서열번호 21 LHDFRHQI (8)	93.6
서열번호 2 LYEIKHQIL (9) PIP-4	32.3
서열번호 22 ELYEIKHQI (9)	93.5
서열번호 23 LYEIKHQI (8)	92.1
hPrdx6 단독	92.0
서열번호 9 DEELQTELYEIKHQIL (16) r	32.0

표 3

[0081]

PIP-2 내 치환: 인간 재조합 Prdx6의 aiPLA2 활성의 억제에 대한 효과

샘플	서열	활성 nmol/min/mg prot.
SN019	서열번호 24 LKIEYHQIL	97.67
SN020	서열번호 25 LRFDDHQIL	98.97
SN021	서열번호 3 LYDIRHQIL-PIP-5	29.74
SN022	서열번호 26 LHEFKHQIL	99.42
SN023	서열번호 27 LFKLEHQIL	97.95
SN024	서열번호 28 LHDFRDQIL	102.04
SN025	서열번호 29 LHDFRPQIL	101.34
SN026	서열번호 30 LHDFRHNIL	98.97
SN029	서열번호 31 LHDFRHIIL	97.30
SN028	서열번호 32 LHDFRHQLL	102.45
SN029	서열번호 33 LHDFRHQTL	100.35
무펩타이드	hPrdx6 단독	99.91
PIP-2* (PIP-4)* * 천연 발생	서열번호 1 LHDFRHQIL (서열번호 2 LYEIKHQIL)	26.18 시험하지 않음

[0082]

따라서, 일 양상에서, 본 발명은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드를 포함하는 조성물로서,

[0083]

서열번호 4 X¹X²X³X⁴X⁵LX⁶X⁷X⁸X⁹HQIL

[0084]

상기 식에서,

[0085]

X¹은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;

[0086]

X²는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;

[0087]

X³은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;

[0088]

X⁴는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;

[0089]

X⁵는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 T 또는 E이고;

[0090]

X⁶은 H 또는 Y이고;

[0091]

X⁷은 D 또는 E이고;

[0092]

X⁸은 F 또는 I이고;

[0093]

X⁹는 R 또는 K인

[0094]

조성물을 제공한다.

[0095]

다양한 실시형태에서, 상기 조성물은 서열번호 1 LHDFRHQIL (PIP-2), 서열번호 2 LYEIKHQIL (PIP-4) 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL (PIP-5)로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한다. 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로서 대상체에 제공될 수 있다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 폴리펩타이드는 리포솜 내에 효과적으로 투여될 수 있다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화된다. 다양한 실시형태에서, 상기 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사용으로 제형화된다. 적절한 약제학적으로 허용 가능한 담체뿐만 아니라, 흡입용 또는 주사용 제형은 본 명세서의 다른 부분에 기재되어 있다.

- [0096] **급성 폐 손상의 치료 방법**
- [0097] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 급성 폐 손상을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,
- [0098] 서열번호 4 $X^1X^2X^3X^4X^5LX^6X^7X^8X^9$ HQIL
- [0099] 상기 식에서,
- [0100] X^1 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;
- [0101] X^2 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;
- [0102] X^3 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;
- [0103] X^4 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;
- [0104] X^5 는 T 또는 E일 수 있고;
- [0105] X^6 은 H 또는 Y이고;
- [0106] X^7 은 D 또는 E이고;
- [0107] X^8 은 F 또는 I이고;
- [0108] X^9 는 R 또는 K이다.
- [0109] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHDFRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 대상체에 투여되는 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화된다. 다양한 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여된다.
- [0110] **폐혈증의 치료 방법**
- [0111] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 폐혈증을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음으로 이루어진 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,
- [0112] 서열번호 4 $X^1X^2X^3X^4X^5LX^6X^7X^8X^9$ HQIL
- [0113] 상기 식에서,
- [0114] X^1 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 E이고;
- [0115] X^2 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 L이고;
- [0116] X^3 은 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 Q이고;
- [0117] X^4 는 존재 또는 부재할 수 있고, 존재하는 경우 A 또는 T이고;
- [0118] X^5 는 T 또는 E일 수 있고;
- [0119] X^6 은 H 또는 Y이고;
- [0120] X^7 은 D 또는 E이고;
- [0121] X^8 은 F 또는 I이고;

- [0122] X^9 는 R 또는 K이다.
- [0123] 다양한 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 LHFDRHQIL, 서열번호 2 LYEIKHQIL 또는 서열번호 3 LYDIRHQIL로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 대상체에 투여되는 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 리포솜에 캡슐화된다. 다양한 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 에어로졸 흡입 또는 기관내 또는 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여된다. 다양한 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 정맥내 주사에 의해 대상체에 투여된다.
- [0124] **투여/투여량/제형**
- [0125] 투여 요법은 유효량 구성에 영향을 미칠 수 있다. 치료적 제형은 손상 개시 전 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 추가로, 다수의 분할된 투여량 및 일정한 간격의 투여량은 매일 또는 순차적으로 투여될 수 있거나, 투여량은 연속적으로 주입될 수 있거나, 볼루스 주사(bolus injection)일 수 있다. 또한, 치료적 제형의 투여량은 치료적 또는 예방적 상황의 긴급성에 의해 제시되는 바와 같이 비례적으로 증가 또는 감소될 수 있다.
- [0126] 본 발명의 조성물을 환자, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간에게 투여하는 것은 공지된 절차를 사용하여 환자의 폐 손상을 치료하기에 효과적인 투여량 및 기간 동안 수행될 수 있다. 치료 효과를 얻기 위해 필요한 치료 화합물의 유효량은 환자의 질병 또는 장애 상태; 환자의 연령, 성별 및 체중; 및 환자의 급성 폐 손상을 치료 또는 예방하는 치료 화합물의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 다수의 분할된 투여량이 매일 투여될 수 있거나 투여량은 치료 상황의 긴급성에 의해 제시되는 바와 같이 비례적으로 감소될 수 있다. 본 발명의 치료 화합물에 대한 유효 투여량 범위의 비 제한적인 예는 약 1 내지 5,000 mg/kg/체중/일이다. 당업자는 관련 요인을 연구하고 과도한 실험없이 치료 화합물의 유효량에 관한 결정을 내릴 수 있을 것이다.
- [0127] 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 유독하지 않고 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 적절한 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 구성요소의 양을 획득하기 위해 다양할 수 있다.
- [0128] 특히, 선택된 투여량 수준은 사용된 특정 화합물의 활성, 투여 시간, 화합물의 배출 또는 분해 속도, 치료 기간, 상기 화합물과 조합하여 사용되는 기타 약물, 화합물 또는 물질, 치료중인 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 상태 및 이전 병력 및 의료 분야에 잘 알려진 유사 요인을 포함하여 다양한 요인에 따라 달라진다.
- [0129] 당 업계의 숙련된 의사, 예를 들어 의사 또는 수의사는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 적절한 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것보다 낮은 수준에서 약제학적 조성물에 사용된 본 발명의 화합물의 투여량을 시작하고 적절한 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다.
- [0130] 특정 실시형태에서, 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 화합물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에 사용된 투여 단위 형태는 치료할 환자에 대한 단위 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미하며; 각각의 단위는 필요한 약제학적 비히클과 관련하여 적절한 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정의 양의 치료 화합물을 포함한다. 본 발명의 투여 단위 형태는 (a) 치료 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료 효과, 및 (b) 환자의 폐 손상 치료를 위한 이러한 치료 화합물을 배합/제형화하는 기술에 내재된 한계에 따라 지시되고 직접적으로 결정된다.
- [0131] 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물성 오일을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.
- [0132] 특정 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 1일 1 내지 5회 또는 그 이상 범위의 투여량으로 환자에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 다음에 제한되는 것은 아니나, 매일, 2일마다, 3일마다 1회 내지 1주에 1회 및 2주마다 1회를 포함하는 투여량 범위로 환자에게 투여된다. 본 발명의 다양한 조합 조성물의 투여 빈도는 다음에 제한되는 것은 아니나, 연령, 치료 질병 또는 장애, 성별, 전반적인 건강 및 기타 요인을 포함하는 많은 요인에 따라 개체마다 다르다는 것은 당업자에게 용이하게 명백하다. 따라서, 본 발명은 임의의 특정 투여 요법으로 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며, 임의의 환자에게 투여될 정확한 투여량 및 조성물은 환자에 대한 다른 모든 요인을 고려하여 주치의에 의해 결정된다.
- [0133] 투여를 위한 본 발명의 화합물은 약 1 μ g 내지 약 10,000 mg, 약 20 μ g 내지 약 9,500 mg, 약 40 μ g 내지

약 9,000 mg, 약 75 µg 내지 약 8,500 mg, 약 150 µg 내지 약 7,500 mg, 약 200 µg 내지 약 7,000 mg, 약 350 µg 내지 약 6,000 mg, 약 500 µg 내지 약 5,000 mg, 약 750 µg 내지 약 4,000 mg, 약 1 mg 내지 약 3,000 mg, 약 10 mg 내지 약 2,500 mg, 약 20 mg 내지 약 2,000 mg, 약 25 mg 내지 약 1,500 mg, 약 30 mg 내지 약 1,000 mg, 약 40 mg 내지 약 900 mg, 약 50 mg 내지 약 800 mg, 약 60 mg 내지 약 750 mg, 약 70 mg 내지 약 600 mg, 약 80 mg 내지 약 500 mg, 및 그 사이의 임의의 및 모든 전체 또는 일부 증분의 범위일 수 있다.

[0134] 일부 실시형태에서, 본 발명의 화합물의 투여량은 약 1 mg 내지 약 2,500 mg일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물에 사용되는 본 발명의 화합물의 투여량은 약 10,000 mg 미만 또는 약 8,000 mg 미만 또는 약 6,000 mg 미만 또는 약 5,000 mg 미만 또는 약 3,000 mg 미만 또는 약 2,000 mg 미만 또는 약 1,000 mg 미만 또는 약 500 mg 미만 또는 약 200 mg 미만 또는 약 50 mg 미만이다. 유사하게, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 제2 화합물의 투여량은 약 1,000 mg 미만 또는 약 800 mg 미만 또는 약 600 mg 미만 또는 약 500 mg 미만 또는 약 400 mg 미만 또는 약 300 mg 미만 또는 약 200 mg 미만 또는 약 100 mg 미만 또는 약 50 mg 미만 또는 약 40 mg 미만 또는 약 30 mg 미만 또는 약 25 mg 미만 또는 약 20 mg 미만 또는 약 15 mg 미만 또는 약 10 mg 미만 또는 약 5 mg 미만 또는 약 2 mg 미만 또는 약 1 mg 미만 또는 약 0.5 mg 미만, 및 그 사이의 임의의 및 모든 전체 또는 일부 증분이다.

[0135] 특정 실시형태에서, 본 발명은 단독으로 또는 제2 약제학적 제제와 조합한 본 발명의 화합물의 치료 유효량을 보유하는 용기; 및 환자에서 급성 폐 손상의 하나 이상의 증상을 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 화합물을 사용하기 위한 설명서를 포함하는 패키징된 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0136] 제형은 통상적인 부형제, 즉 경구, 비경구, 비강, 정맥내, 피하, 장내 또는 당 업계에 공지된 임의의 다른 적합한 투여 방식에 적합한 약제학적으로 허용 가능한 유기 또는 무기 담체 물질과의 혼합물로 사용될 수 있다. 약제학적 제조물은 멸균될 수 있고 적절한 경우 보조제, 예를 들어 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압 조정 염 완충제, 착색제, 향료 및/또는 방향족 물질 등과 혼합될 수 있다. 이는 또한 적절한 경우 다른 활성제, 예를 들어 다른 진통제와 조합될 수 있다.

[0137] 본 발명의 임의의 조성물의 투여 경로는 경구, 비강, 직장, 질내, 비경구, 협측, 설하 또는 국소를 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 화합물은 경구 또는 비경구, 예를 들어 경피, 경점막 (예를 들어, 설하, 설측, (경)구강, (경)요도, 질 (예를 들어, 경 및 질주위), (내)비강 및 (경)직장), 방광내, 폐내, 십이지장내, 위내, 척수강내, 피하, 근육내, 피내, 동맥내, 정맥내, 기관지내, 흡입 및 국소 투여와 같은 임의의 적합한 경로에 의한 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0138] 적합한 조성물 및 투여 형태는 예를 들어 정제, 캡슐, 캐플릿, 알약, 겔 캡, 트로키, 분산액, 현탁액, 용액, 시럽, 과립, 비드, 경피 패치, 젤, 분말, 펠렛, 마그마, 로젠지, 크림, 페이스트, 플라스틱, 로션, 디스크, 좌약, 비강 또는 경구 투여용 액체 스프레이, 흡입용 건조 분말 또는 에어로졸화 제형, 방광내 투여용 조성물 및 제형 등을 포함한다. 본 발명에 유용한 제형 및 조성물은 본 명세서에 기재된 특정 제형 및 조성물에 제한되지 않음을 이해해야 한다.

[0139] *경구 투여*

[0140] 경구 적용을 위해, 특히 적합한 것은 정제, 당의정, 액체, 액적, 좌약 또는 캡슐, 캐플릿 및 겔캡이다. 경구용으로 의도된 조성물은 당 업계에 공지된 임의의 방법에 따라 제조될 수 있으며, 이러한 조성물은 정제의 제조에 적합한 불활성의 무독성 약제학적 부형제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제제를 포함할 수 있다. 이러한 부형제는 예를 들어 락토스와 같은 불활성 희석제; 옥수수 전분과 같은 과립 및 붕해제; 전분과 같은 결합제; 및 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제를 포함한다. 정제는 정밀함을 위해 또는 활성 구성요소의 방출을 지연시키기 위해 공지된 기술에 의해 코팅되지 않거나 코팅될 수 있다. 경구 사용을 위한 제형은 또한 활성 구성요소가 불활성 희석제와 혼합된 경질 젤라틴 캡슐로 제공될 수 있다.

[0141] 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 화합물의 지연 방출을 제공하는 층, 및 특정 질병 또는 장애의 치료를 위한 약물의 즉시 방출을 제공하는 추가 층을 포함하는 다층 정제를 포함한다. 왁스/pH 감응성 중합체 혼합물을 사용하여 활성 구성요소가 포획되어 지연 방출을 보장하는 위 불용성 조성물을 획득할 수 있다.

[0142] *비경구 투여*

[0143] 비경구 투여를 위해, 본 발명의 화합물은 주사 또는 주입, 예를 들어 정맥내, 근육내 또는 피하 주사 또는 주입, 또는 볼루스 투여량 및/또는 연속 주입으로 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 선택적으로 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 다른 제형제를 포함하는 유성 또는 수성 비히클 내의 현탁액, 용액 또는 에멀전이 사

용될 수 있다.

- [0144] 추가 투여 형태
- [0145] 본 발명의 추가 투여 형태는 미국 특허 제 6,340,475호; 제 6,488,962호; 제 6,451,808호; 제 5,972,389호; 제 5,582,837호; 및 제 5,007,790호에 기재된 투여 형태를 포함한다. 본 발명의 추가 투여 형태는 또한 미국 특허 출원 제 20030147952호; 제 20030104062호; 제 20030104053호; 제 20030044466호; 제 20030039688호; 및 제 20020051820호에 기재된 투여 형태를 포함한다. 본 발명의 추가 투여 형태는 또한 PCT 출원 WO 03/35041; WO 03/35040; WO 03/35029; WO 03/35177; WO 03/35039; WO 02/96404; WO 02/32416; WO 01/97783; WO 01/56544; WO 01/32217; WO 98/55107; WO 98/11879; WO 97/47285; WO 93/18755; 및 WO 90/11757에 기재된 투여 형태를 포함한다.
- [0146] 제어 방출 제형 및 약물 전달 시스템
- [0147] 특정 실시형태에서, 본 발명의 제형은 다음에 제한되는 것은 아니나, 단기의 신속한 상쇄뿐만 아니라 제어, 예를 들어, 지속 방출, 지연 방출 및 일정한 간격의 방출 제형일 수 있다.
- [0148] 지속 방출이라는 용어는 장기간에 걸쳐 약물의 점진적 방출을 제공하고 반드시 그런 것은 아니지만 실질적으로 장기간 동안 약물의 일정한 혈중 농도를 유보할 수 있는 약물 제형을 지칭하기 위해 통상적인 의미로 사용된다. 기간은 1개월 이상이 될 수 있으며 같은 양의 약제를 볼루스 형태로 투여하는 것보다 더 긴 방출이어야 한다.
- [0149] 지속 방출을 위해, 화합물은 화합물에 지속 방출 특성을 제공하는 적합한 중합체 또는 소수성 물질로 제형화될 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 방법을 사용하기 위한 화합물은 미립자 형태, 예를 들어 주사에 의해 또는 이식에 의해 웨이퍼 또는 디스크 형태로 투여될 수 있다.
- [0150] 본 발명의 일 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 지속 방출 제형을 사용하여 단독으로 또는 다른 약제와 조합하여 환자에게 투여된다.
- [0151] 용어 지연 방출은 약물 투여 후 일정 기간의 지연 후에 약물의 초기 방출을 제공하고 반드시 그런 것은 아니지만 약 10분 내지 약 12시간의 지연을 포함할 수 있는 약물 제형을 지칭하기 위해 통상적인 의미로 사용된다.
- [0152] 용어 일정한 간격의 방출은 약물 투여 후 약물의 규칙적 혈장 특성을 생성하는 방식으로 약물의 방출을 제공하는 약물 제형을 지칭하기 위해 통상적인 의미로 본 명세서에서 사용된다.
- [0153] 용어 즉시 방출은 약물 투여 직후 약물 방출을 제공하는 약물 제형을 지칭하기 위해 통상적인 의미로 사용된다.
- [0154] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 단기는 약물 투여 후 약물 투여 후 최대 약 8시간, 약 7시간, 약 6시간, 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 약 40분, 약 20분, 또는 약 10분 및 이의 임의의 또는 모든 전체 또는 일부 증분을 포함하는 임의의 기간을 지칭한다.
- [0155] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 신속한 상쇄는 약물 투여 후 최대 약 8시간, 약 7시간, 약 6시간, 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 약 40분, 약 20분, 또는 약 10분, 및 그 사이의 임의의 및 모든 전체 또는 일부 증분을 포함하는 임의의 기간을 지칭한다.
- [0156] 투여
- [0157] 본 발명의 화합물의 치료적 유효량 또는 투여량은 환자의 연령, 성별 및 체중, 환자의 현재 의학적 상태 및 치료되는 환자의 급성 폐 손상의 진행에 따라 달라진다. 당업자는 이들 요인 및 기타 요인에 따라 적절한 투여량을 결정할 수 있다.
- [0158] 본 발명의 화합물의 적절한 투여량은 약 0.01 mg 내지 약 5,000 mg/일, 예컨대 약 0.1 mg 내지 약 1,000 mg, 예를 들어, 약 1 mg 내지 약 500 mg, 예컨대 약 5 mg 내지 약 250 mg/일의 범위일 수 있다. 투여량은 단일 투여량 또는 다회 투여량, 예를 들어 1일 1 내지 4회 이상 투여될 수 있다. 다회 투여량이 사용되는 경우, 각 투여량의 양은 동일하거나 다를 수 있다. 예를 들어, 1 mg/일의 투여량은 2회 0.5 mg 투여량으로 투여될 수 있으며, 투여는 약 12시간 간격으로 이루어진다.
- [0159] 1일 투여되는 화합물의 양은 비 제한적인 예에서 매일, 격일, 2일마다, 3일마다, 4일마다 또는 5일마다 투여될 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 격일 투여는 5 mg/일 투여량을 월요일에 개시하여, 후속 투여로 5 mg/일을 수요일에 투여하고, 2차 후속 투여로 5 mg/일을 금요일에 투여되는 등으로 이루어질 수 있다.
- [0160] 환자의 상태가 개선되는 경우, 의사의 재량에 따라 본 발명의 억제제의 투여가 선택적으로 지속하여 제공되고;

대안적으로, 투여되는 약물의 투여량이 일시적으로 감소되거나 특정 기간 동안 일시적으로 중단된다 (즉, "휴약기"). 휴약기의 기간은 선택적으로 예를 들어 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 12일, 15일, 20일, 28일, 35일, 50일, 70일, 100일, 120일, 150일, 180일, 200일, 250일, 280일, 300일, 320일, 350일, 또는 365일을 포함하여 2일 내지 1년으로 다양하다. 휴약기 동안의 투여량 감소에는 예를 들어 1%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%를 포함하여, 10% 내지 100%가 포함된다.

[0161] 환자의 상태가 개선되면, 필요한 경우 유지 투여량이 투여된다. 그 후, 투여량 또는 투여 빈도, 또는 둘 모두가 바이러스 부하의 함수로서 개선된 질병이 유지되는 수준으로 감소된다. 특정 실시형태에서, 환자는 증상 및/또는 감염의 임의의 재발에 따라 장기적으로 간헐적 치료가 필요하다.

[0162] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 화합물은 단위 투여 형태로 제형화될 수 있다. 용어 "단위 투여 형태"는 치료를 받는 환자에 대한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각 단위는 선택적으로 적합한 약제학적 담체와 함께 적절한 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정의 양의 활성 물질을 포함한다. 단위 투여 형태는 1일 1회 투여량 또는 1일 다회 투여량 중 하나 (예를 들어, 1일 약 1 내지 4회 이상)일 수 있다. 1일 다회 투여량이 사용되는 경우, 단위 투여 형태는 각 투여량에 대해 동일하거나 다를 수 있다.

[0163] 이러한 치료 요법의 독성 및 치료 효능은 다음에 제한되는 것은 아니나 LD₅₀ (집합의 50%에 치명적인 투여량) 및 ED₅₀ (집합의 50%에서 치료 효과가 있는 투여량)의 결정을 포함 하여 세포 배양 또는 실험 동물에서 선택적으로 결정된다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 투여량 비율은 LD₅₀과 ED₅₀ 사이의 비율로 표시되는 치료 지표이다. 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에게 사용하기 위한 범위의 제형화에 선택적으로 사용된다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 최소 독성으로 ED₅₀을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 선택적으로 변한다.

[0164] 당업자는 최대한 통상적인 실험, 본 명세서에 설명된 특정 절차, 실시형태, 청구범위 및 실시예에 대한 수많은 균등물을 사용하여 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주되고 본 명세서에 첨부된 청구범위에 포함된다. 예를 들어, 당 업계에서 인정된 대체물을 사용하고 통상적인 실험만 사용하여, 다음에 제한되는 것은 아니나, 반응 시간, 반응 크기/부피 및 실험 시약, 예컨대 용매, 촉매, 압력, 대기 조건, 예를 들어 질소 대기 및 환원/산화제를 포함하는 반응 조건의 변형이 산화제는 본 출원의 범위 내에 있음을 이해해야 한다.

[0165] 값 및 범위가 본 명세서에 제공되는 전체 부분에서, 이러한 값 및 범위에 포함되는 모든 값 및 범위는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것을 의미함을 이해해야 한다. 더욱이, 이들 범위에 속하는 모든 값은 물론, 값 범위의 상한 또는 하한이 또한 본 출원에 의해 고려된다.

[0166] 실험 실시예

[0167] 본 발명은 하기 실험 실시예를 참조하여 더욱 상세하게 설명된다. 이러한 실시예는 설명 목적으로만 제공되며 달리 명시하지 않는 한 제한하려는 의도가 없다. 따라서, 본 발명은 다음의 실시예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로 명백해지는 임의의 그리고 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0168] 추가 설명없이, 당업자는 진술한 설명 및 다음의 예시적인 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조하여 이용할 수 있고 청구된 방법을 실행할 수 있다고 고려된다. 따라서, 다음의 실시예는 본 발명의 바람직한 실시예를 구체적으로 지적하고, 어떠한 방식으로든 본 개시내용의 나머지 부분을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0169] **실시예 1: 생체내 PIP 펩타이드의 활성**

[0170] 마우스에 IT (도 1a) 또는 IV (도 1b)의 리포솜 내 PIP-2 (2 ug/g 체중)를 주사하였으며 (도 1 참조); 이 리포솜은 DPPC의 sn-2 팔미테이트의 9,10 위치에 추적자 [³H]를 포함하였다. 마우스로부터 폐를 제거하고 분리된 시스템에서 연구하였다. 선의 기울기는 산화제 (H₂O₂)의 생성을 나타낸다.

[0171] IV 또는 IT 주사된 리포솜 내의 PIP-2는 폐 균질물의 Prdx6 활성을 억제한다. 최대 억제는 PIP-2 투여 후 4시간 이내에 나타났다. 억제로부터의 회복은 약 36시간에 개시되었고 48시간에 완료되었다. PIP-1,2,4의 결과는 유사

하다 (PIP-3 및 -5는 시험되지 않음). 마우스 결과에 따라 Prdx6 활성 및 NOX2 활성화의 최대 억제를 유지하기 위해 PIP-2 또는 4를 24 내지 36시간마다 한 번씩 투여할 수 있다. 효과를 위해서는 펩타이드 전달을 위한 리포솜이 필요하다. IT 또는 IV 투여 후의 억제는 유사했다. 데이터는 아래 표 4 내지 표 6에 나와 있다.

표 4

전달을 위한 리포솜의 존재 및 부재 하의 PIP-4 IV 주사 24시간 후 마우스 폐의 aiPLA2 활성

	aiPLA ₂ 활성 nmol/hr/mg prot
대조군(리포솜 단독) n=3	8.81 ± 0.2 (n=3)
PIP-4 (리포솜 내)	1.55 ± 0.02 (n=3)
PIP-4 (단독, 무 리포솜)	8.43 ± 0.23 (n=3)

[0172]

[0173]

PIP-4 = 2 µg/g wt 마우스. 평균 +/- SE; n=3.

표 5

PIP-2의 IT 또는 IV 주사 후 증가된 시간의 마우스 폐 균질물의 aiPLA2 활성: 생체내 저항성

	기관내 (IT)	정맥내 (IV)
시간 (H), 주사 후	aiPLA ₂ 활성, nmol/hr/mg 단백질	
0	8.84 ± 0.35 (100)	8.85 ± 0.3 (100)
4	1.56 ± 0.03 (18)	1.45 ± 0.07 (16)
12	1.61 ± 0.04 (18)	1.58 ± 0.04 (18)
24	1.63 ± 0.14 (18)	1.77 ± 0.11 (20)
36	2.04 ± 0.04 (27)	2.14 ± 0.03 (24)
48	2.95 ± 0.10 (33)	3.03 ± 0.05 (34)
72	8.78 ± 0.18 (99)	8.49 ± 0.10 (96)

[0174]

표 6

PIP의 IT 또는 IV 주사 후 증가된 시간의 마우스 폐 균질물의 Prdx6-PLA2 활성

	기관내 (IT)* PIP-1	정맥내 (IV) PIP-1	IT* PIP-2	IV PIP-4
시간, 주사 후	Prdx6-PLA ₂ 활성 nmol/hr/mg 단백질			
0	9.0 ± 0.2	8.8 ± 0.3	8.1 ± 0.3	8.0 ± 0.7
4hr	1.6 ± 0.1	1.4	-	-
12hr	1.6 ± 0.1	1.5	-	-
24hr	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.2 ± 0.02	1.1 ± 0.02
48hr	2.9 ± 0.2	-	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.2

[0175]

72hr	-	-	8.3 ± 0.9	7.8 ± 1.2
96hr	-	-	-	8.1 ± 0.2

[0176] * 폐를 세척한 후 내재화되지 않은 SP-A 펩타이드의 가능한 효과를 방지하기 위해 분석하였다.

[0177] **실시예 2: IT LPS 후 손상의 시간 경과.**

[0178] 박테리아 (E. 콜라이) 지질다당류 (LPS)를 5 ug/g 체중으로 기관내 (IT) 주사에 의해 야생형 C57B1/6 마우스에 투여하였다. 지시된 바와 같이 LPS 후 12, 16, 24 또는 48시간째에 마우스를 희생시켰다. 폐를 제거하고 기관을 통해 식염수로 세척하여 BALF를 획득한 후; 폐를 균질화하였다. 측정된 매개변수는 BALF의 유핵 세포와 단백질, 티오바르비투르산 반응성 물질 (TBARS), 8-이소프로스탄 및 폐 균질물의 단백질 카보닐, 폐 습중량 대 건중량의 비율 (W/D)이다. 값은 n = 4에 대한 평균 ± 이다.

[0179] 도 2에 도시된 바와 같이, BALF의 증가된 세포는 염증을 반영하고, BALF의 단백질, 증가된 습중량/건중량 비율은 변경된 폐포 투과성을 반영하고, TBARS 및 8-이소프로스탄은 세포막 지질 과산화를 반영하며 단백질 카보닐은 조직 단백질 산화를 반영한다. 이러한 효과는 모두 ALI 증후군의 특징이다. 단일 투여량의 LPS 후 유의한 폐 손상이 존재하며, 이는 LPS 후 12 내지 24시간째에 본질적으로 변경되지 않았다. 48시간째에 일부 회복이 나타난다. LPS로 인한 폐 손상은 12 내지 24시간째에 비교적 안정적이며; 예상컨대 이는 진행중인 폐 손상과 회복 과정 사이의 균형을 반영한다. 데이터는 아래 표 7에 나와 있다.

표 7

IT LPS 후 손상의 시간 경과

조건	BALF의 세포 # (x10 ⁴ /g 체중)	BALF의 총 단백질 (μg/g 체중)	TBARS pmol/mg prot.	8-이소프로스탄 pmol/mg prot.	단백질 카보닐 nmol/mg prot.	폐의 습중량/건중량 비율
대조군	0.97 ± 0.06	77 ± 2	75 ± 2.3	0.33 ± 0.03	5.6 ± 0.2	5.61 ± 0.02
LPS, @12시간째에 희생시킴	7.94 ± 0.54	153 ± 4	374 ± 14	1.01 ± 0.11	15.9 ± 0.7	8.35 ± 0.15
LPS, @16시간째에 희생시킴	8.43 ± 0.15	156 ± 3	379 ± 2.2	1.05 ± 0.04	16.7 ± 0.4	8.32 ± 0.15
LPS, @24시간째에 희생시킴	8.57 ± 0.53	162 ± 2	368 ± 12	1.04 ± 0.13	16.4 ± 1.4	7.84 ± 0.34
LPS, @48시간째에 희생시킴	5.20 ± 0.2	107 ± 1	214 ± 9.4	0.75 ± 0.02	8.52 ± 0.3	6.39 ± 0.4

[0180]

[0181] LPS 5 μg/g

[0182] **실시예 3: PIP-2는 폐 손상으로 부터 보호한다**

[0183] 표 9에 나타난 바와 같은 급성 폐 손상 (ALI)의 IT 모델을 사용하여 PIP-2의 효과를 시험하였다. 리포솜 내 PIP-2 (2 ug/g 체중)를 LPS (0시간)와 함께 IT 투여하거나 LPS 후 12시간 또는 16시간째에 정맥내 (IV)로 투여하였다. 기관에 대한 두 번째 '공격'을 방지하기 위해 PIP-2의 IV 투여를 사용하였다. 마우스를 24시간째에 희생시키고 표 9에 설명된 바와 같이 손상에 대해 폐를 평가하였다. 폐 손상에 대한 보호 (%)를 [1 - (PIP-2 손상 - 대조군)/(LPS 단독 - 대조군)]로 계산하였다. 결과는 n = 4에 대한 평균 ± SE이다. * P<0.01 대 대조군. † P<0.01 대 무 PIP, 24시간.

[0184] 도 3에 도시된 바와 같이, LPS와 함께 PIP-2의 투여를 LPS 투여 후 24시간째에 평가했을 때 폐 손상을 완전히 방지하였다. LPS 후 12 또는 16시간째에 투여된 PIP-2는 LPS 후 24시간째에 평가된 폐 손상에 대해 약 85 내지 95% 보호를 제공하였다. PIP-2의 효과는 매우 극적이다. PIP-2 또는 PIP-4는 0시간에 투여한 경우 및 12 내지 16시간째에 투여한 경우 폐 손상을 방지하고, LPS 후 12 내지 16시간의 간격 동안 손상된 폐가 치유될 수 있다

록 추가 손상을 방지하며, 마우스를 @24시간 (h)째에 희생시켰다. 따라서 PIP-2와 PIP-4는 모두 폐 손상을 방지하고 치료할 수 있다. 다양한 폐 손상 마커에 대한 데이터가 표 8 내지 표 11에 나와 있다.

표 8

LPS 후 염증 및 부종에 대한 PIP-2의 효과

조건	$\times 10^4$ /g wt 세포의 #	mg 단백질/g wt	폐 습중량/건중량 비율
대조군 무 LPS	0.95 ± 0.16	75 ± 1.3	5.59 ± 0.03
LPS (IT) @24시간째에 희생시킴	8.67 ± 0.53	164 ± 2	8.10 ± 0.22
LPS IT, PIP-2 IT @0 시간 24시간째에 희생시킴	0.92 ± 0.02	$71 \pm$	5.50 ± 0.04
LPS IT, PIP-2 IV @12시간 24시간째에 희생시킴	1.45 ± 0.03	84 ± 1.2	5.95 ± 0.02
LPS IT, PIP-2 IV @ 16시간 24시간째에 희생시킴	1.43 ± 0.2	82.0 ± 1.2	6.19 ± 0.06

[0185]

n= 4, PIP-2 농도 (2 μ g/g wt 마우스), LPS 5 μ g/g

표 9

LPS 후 폐 조직 산화에 대한 PIP-2의 효과

조건	TBARS pmol/mg prot.	8-이소프로스탄 pmol/mg prot	단백질 카보닐 nmol/mg prot
대조군 (무 LPS)	75 ± 1.3	34 ± 3	5.6 ± 0.2
리포솜 내 LPS(IT) @24시간째에 희생시킴	381 ± 4.5	101 ± 7	16.9 ± 0.4
LPS IT, PIP-2 IT @ 0시간 24 시간째에 희생시킴	70 ± 2.1	31 ± 2	5.4 ± 0.1
LPS IT, PIP-2 IV @12시간 24 시간째에 희생시킴	85 ± 5.2	38 ± 1	6.4 ± 0.2
LPS IT, PIP-2 IV @16시간 24 시간째에 희생시킴	89 ± 9.3	40 ± 1	6.4 ± 0.3

[0187]

n= 4, PIP 농도 (2 μ g/g wt 마우스), LPS 5 μ g/g

표 10

LPS 후 염증 및 부종에 대한 PIP-4의 효과

조건	$\times 10^4$ /g wt 세포 #	μ g 단백질/g wt	폐 습중량/건중량 비율
대조군 (리포솜 내 PIP)	0.96 ± 0.03	78 ± 2	5.59 ± 0.02
리포솜 내 LPS(IT) @24시간째에 희생시킴	8.5 ± 0.46	166 ± 3	7.40 ± 0.31
LPS IT, PIP-4 IT @ 0시간 24시간째에 희생시킴	0.95 ± 0.02	77 ± 3	6.1 ± 0.01
LPS IT, PIP-4 IV @12시간 24시간째에 희생시킴	1.46 ± 0.25	85 ± 2	5.94 ± 0.05
LPS IT, PIP-4 IV @ 16시간, 24 시간째에 희생시킴	1.44 ± 0.12	83 ± 1	6.12 ± 0.09

[0188]

[0189]

[0190] n= 4; PIP 농도, 2 µg/g wt 마우스, LPS 5 µg/g

표 11

[0191] LPS 후 폐 조직 산화에 대한 PIP-4의 효과

조건	TBARS pmol/mg prot.	8-이소프로스탄 pmol/mg prot	단백질 카보닐 nmol/mg prot
대조군 (리포솜 내 PIP) IT	76 ± 2	34 ± 1	5.8 ± 0.2
리포솜 내 LPS(IT) @24시간째에 희생시킴	374 ± 4	1.02 ± 3	16.9 ± 0.4
LPS IT, PIP-4 IT @ 0시간 24시간째에 희생시킴	78 ± 4	32 ± 2	5.9 ± 0.3
LPS IT, PIP-4 IV @12시간 24시간째에 희생시킴	84 ± 2	0.38 ± 1	6.4 ± 0.1
LPS IT, PIP-4 IV @16시간 24시간째에 희생시킴	85 ± 2	0.39 ± 1	6.4 ± 0.1

[0192] n=4, PIP 농도 (2 µg/g wt 마우스), LPS 5 µg/g

[0193] **실시예 4: PIP-2는 건조 분말로서 안정하다.**

[0194] 펩타이드가 aiPLA₂ 활성의 억제체로서의 효능을 얼마나 오래 유지할 수 있는지 결정하기 위해 aiPLA₂ 활성을 일정한 간격 하에 측정하였다. 펩타이드는 관찰 4개월 동안 안정하였다.

표 12

[0195] 실온에서 건조 분말로서 4개월 저장 동안 PIP-2의 활성. 안정성을 나타낸다.

샘플	aiPLA ₂ 활성 nmol/min/mg prot.
무 PIP-2	100 ± 4.0
PIP-2, 0일	29.7 ± 2.9
30 d	31.1 ± 1.3
45 d	31.8 ± 1.0
60 d	32.8 ± 0.9
90 d	29.9 ± 1.1
120 d	31.9 ± 2.4
무 PIP-2, 120 d	103 ± 4.7

[0196] **실시예 5:**

[0197] 이하의 실시예에서 사용된 재료 및 방법이 여기에 설명된다.

[0198] 동물

[0199] C57B1/6J 또는 NADPH 산화효소 (Nox2) 높 마우스는 Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME)로부터 획득하였으며, 이를 펜실베이니아 대학 실험 동물 지원 (ULAR)의 시설에서 12시간 명암 주기로 HEPA 여과된 공기 하에서 유지하였다.

[0200] 시약

[0201] 질량 분광법에 의해 평가된 추정 펩타이드의 순도는 89% 초과였다. 에세리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) O111:B4 세포막으로부터 유도되고 겔 여과 크로마토그래피로 정제된 지질다당류 (LPS)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA, cat # L3012)로부터 획득하였다. amplex red/양고추냉이 과산화효소 (HRP) 분석 키트 (cat. #A22188) 및 환원된 디플루오로플루오레세인 디아세테이트 (DFF-DA, cat. #13293)의 카복시 부가물은 Life

Technologies, Grand Island, NY, USA (Thermo-Fisher Scientific)로부터 구입하였다. 안지오텐신 II (Ang II) 는 Bachem, Torrance, CA, USA (cat. #4095850.0005)로부터 구입하였다. 통상적인 지질은 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA에서 구입했으며 폐 계면활성제의 조성을 반영하기 위해 이전에 설명한 바와 같이 증발 건조 후 식염수에서 재구성하여 리포솜을 제조하였고; 리포솜 조성은 몰 분율로 0.5 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 0.25 난 포스파티딜콜린 (PC), 0.10 포스파티딜글리세롤 (PG) 및 0.15 콜레스테롤이었다. 첨가된 PIP-2는 0.15 μg PIP-2/ μg 지질이었다.

[0202] LPS 및 PIP-2의 투여

[0203] 마취된 마우스에 20 μl 의 식염수 중 LPS (5 또는 15 $\mu\text{g/g}$ 체중)를 투여하고 기관 카리나 수준에 배치된 기관 내 카테터를 통해 폐에 주입하였다. 본 발명자들은 이전에 PIP-2가 단독으로 주입되면 효과가 없으며 리포솜에 캡슐화되면 약 50시간의 $\frac{1}{2}$ 시간으로 aiPLA₂ 활성을 억제한다는 것을 관찰하였다. 리포솜 내의 PIP-2를 IV 또는 IT 주사를 위해 20 μl 식염수에 현탁시켰다. 0시간에 PIP-2의 효과를 평가하기 위한 연구의 경우, LPS 투여 후 리포솜 \pm PIP-2를 IT 주입에 의해 제공하였다. LPS 후 나중에 투여된 PIP-2의 효과를 평가하기 위한 연구를 위해 리포솜 \pm PIP-2를 망막 동맥에 주사하여 제공하였다. 이 투여 경로의 변화를 사용하여 반복적인 기관 절개술로 발생할 수 있고, 폐에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있는 마우스 기관의 손상을 최소화하였다. 기관내 LPS 후 처리에 사용된 PIP-2의 투여량은 2 $\mu\text{g/g}$ 마우스 체중이었으며; 대조군 마우스에서 이 투여량의 PIP-2는 적어도 24시간 동안 폐 aiPLA₂ 활성을 최대로 억제하는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 최대 적용 범위를 확인하기 위해 12시간째에 두 번째 PIP-2 투여량을 제공한 다음 PIP-2 투여를 위해 24시간마다 갔다. 폐혈증 모델의 경우, 20 μl 식염수 중 LPS (15 $\mu\text{g/g}$ 체중)를 복강내로 주사하고 마우스를 2 또는 20 $\mu\text{g/g}$ 체중으로 IV PIP-2로 처리하였으며; 이 폐혈증 모델에 대한 PIP-2의 초기 투여량은 IT가 아니라 IV로 투여되었음에 주의한다. 본 발명자들은 폐혈증 모델에서 IT LPS 모델에 사용된 것과 동일한 시간의 PIP-2 투여를 사용하였다. 마취에서 회복된 후, 모든 마우스를 사료 및 물이 무제한 제공될 수 있는 사육장에서 유지하였다.

[0204] 폐 손상의 평가

[0205] IT LPS를 사용한 각 실험 종료시 (24 또는 120시간째), 생존 마우스를 마취하에 방혈하여 희생시켰다. 원 위치에서 폐를 폐동맥을 통한 관류에 의해 혈액을 제거한 후 식염수로 기관을 통해 세척하였다. 조직 분석을 위해 폐를 흉부로부터 제거하였다. 본 발명자들은 폐 조직 지질 및 단백질 성분의 산화를 결정하기 위해 폐 기관지 폐포 세척액 (BALf)의 유핵 세포 수와 단백질 함량, 폐의 좌측 상부 엽을 사용한 폐 습중량 대 건중량 비율, 폐 균질액의 티오바르비투르산 반응성 생성물 (TBARS), 8-이소프로스탄 및 단백질 카보닐을 측정하여 LPS가 폐 손상에 미치는 영향을 평가하였다. 마우스 치사율 연구를 위해 Kaplan-Meier 추정을 사용하여 생존율 플롯을 작제하였다.

[0206] 폐 ROS 생성 및 aiPLA₂ 활성 측정

[0207] 대조군 (비처리) 폐에서 ROS 생성에 대한 PIP의 효과를 분리된 관류 폐를 사용하여 시험관내에서 측정하였다. 리포솜 내의 PIP-2를 IV 경로를 통해 2 $\mu\text{g/g}$ 마우스 체중으로 투여하였다. 30분 후, 마우스를 마취하고 폐를 분리하고 혈액을 제거하고 Nox2 활성화제로서 Ang II (50 μM) 및 Amplex red + 양고추냉이 과산화효소를 포함하는 관류액으로 재순환 시스템에서 관류하여 ROS를 검출하였다. 야생형 마우스의 폐와 PIP-2로 처리되지 않은 NOX2 높 마우스의 폐를 대조군으로 사용하였다. ROS 생성의 기본 속도를 AngII 부재 하에 관류된 WT 폐로 평가하였다. 관류 프로토콜에는 15분의 평형화 기간 후 60분의 실험 기간이 포함되었다. 관류액의 분취물을 15분 간격으로 취하고 Amplex red 산화의 산물인 레조루핀 (resorufin) ($\lambda_{\text{여기}}$ 568 nm, $\lambda_{\text{방출}}$ 581 nm)에 대해 형광으로 분석하였다. Amplex red 산화 비율을 계산하고 마우스 체중에 대한 정규화를 사용하여 임의의 형광 단위 (AFU)로 표시하였다. 관류액에 HRP가 부재할 때 Amplex red 산화의 비율이 낮았는데 (AngII 자극 형광의 약 7%), 이는 형광단의 비 ROS 매개 산화를 나타내며; 기록 값을 획득하기 위해 이 값을 뺀다.

[0208] LPS 처리 후 폐 ROS 생성을 측정하기 위해, 무손상 마우스를 LPS (5 $\mu\text{g/g}$) \pm PIP-2 (2 $\mu\text{g/g}$)로 처리하였다. LPS로 처리한 후 6, 12 또는 24시간째에 마우스를 마취하고 현장에서 폐에서 혈액을 제거하고 세포내에서 DFF로 가수분해되는 형광단 DFF-DA를 포함하는 식염수 용액으로 10분 동안 관류하였다. 그런 다음 폐를 균질화하고 균질물의 형광을 Ex 495 nm, Em 525 nm에서 측정하였다. 폐 형광을 마우스 체중에 대해 정규화하여 관류의 분당 AFU로 표시하였다.

[0209] 통계 분석

- [0210] 데이터는 평균 \pm 표준 오차 (SE)로 표시된다. 선 플롯의 기울기는 최소 평균 제곱법으로 계산하였다. 통계적 유의도를 평가하기 위해 SigmaStat 소프트웨어 (Jandel Scientific, San Jose, CA)를 사용하였다. 그룹 차이에 대한 평균값을 1원 ANOVA에 이어 Bonferroni 사후 시험으로 평가하였다. 2개의 그룹의 비교를 위해 스튜던트 t 검정으로 평균을 비교하였다. 평균값 간의 차이는 $P < 0.05$ 에서 통계적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0211] 결과:
- [0212] *PIP에 의한 폐 ROS 생성의 억제.*
- [0213] NOX2 활성화에 대한 PIP 화합물의 억제 효과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 공지된 NOX2 활성화제인 Ang II의 존재 하에 분리된 관류 폐에 의해 ROS 생성을 연구하였다. Amplex red 산화를 ROS 생성의 지표로 사용하였다. 대조군 조건 하에서 관류된 폐에서 ROS 생성의 기준선 비율이 매우 낮았으며, 즉, NOX2 활성화의 추가 자극이 없었다 (도 8, WT 기준). 관류액에 Ang II를 첨가하여 NOX2를 활성화시킴으로써, ROS 생성이 현저하게 증가하였다 (도 8, WT 대조군). ROS 생성은 WT 폐와 비교하여 NOX2 늘에서 76% 감소했으며, 이는 NOX2가 Ang II 자극 후 관류액에 유입되는 ROS의 주요 공급원임을 나타낸다. 이전에 제시된 바와 같이, WT 폐에 PIP-2 (리포솜 내)를 첨가하면 NOX2 늘과 유사하게 ROS 생성이 억제되었다 (약 75%). 따라서 PIP-2는 본질적으로 NOX2 매개 ROS 생성을 완전히 억제하였다.
- [0214] 다음으로, 본 발명자들은 LPS 후 폐에서 aiPLA₂ 활성 및 ROS 생성에 대한 PIP-2 (리포솜 내)의 효과를 측정하였다. 이들 매개변수는 IT LPS 투여 후 6, 12 및 24시간째에 측정하였다. 폐 균질물에서 aiPLA₂ 활성은 대조군과 비교하여 LPS로 처리한 후 6시간째에 약 50% 증가하고 12시간 및 24시간째에 또 다시 50% 증가하였다 (도 9a). 본 발명자들은 폐 ROS 생성을 측정하기 위해 세포내 형광단 (DFP-DA)을 사용하였다. ROS-유도 형광은 LPS-비처리 대조군 폐에서 매우 낮았지만 LPS-처리 마우스 폐에서는 6시간째에 약 10배, 12시간 및 24시간째에 약 20배 증가하였다 (도 9b). LPS 후 폐 DFP 형광의 이러한 증가는 이러한 폐에서 부종의 존재로 인한 신호 희석에 의해 약간 과소 평가될 수 있다 (아래 참조). LPS 투여 전에 PIP-2로 마우스를 전처리한 결과 aiPLA₂ 활성 및 ROS 생성 형광이 3개 기간 모두에서 LPS 비처리 대조군과 유사한 값으로 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 LPS의 기관 투여가 폐에서 ROS 생성을 증가시키고, 이는 적어도 24시간 동안 유지되며, PIP-2로 폐를 전처리함으로써 거의 완전히 억제될 수 있음을 나타낸다.
- [0215] *LPS-매개 폐 손상의 시간 경과*
- [0216] LPS 매개 손상에 대한 감응성은 마우스 종에 따라 크게 다르다. 이 연구를 위해, 본 발명자들은 5 $\mu\text{g/g}$ 체중에서 IT LPS를 제공한 C57B1/6J 마우스의 폐 손상 경과를 측정하였다 (도 2a 내지 2f). 폐는 LPS 후 12시간째에 평가했을 때 BALf에서 유핵 세포 증가, BALf 단백질 증가, 폐 습중량 대 건중량 비율 증가 ($p < 0.05$)로 나타나는 상당한 손상을 보였다. 이 결과는 폐 염증 (BALf의 세포), 폐포-모세관 투과성 장벽 (BALf 단백질)의 변이, 및 폐액 축적 (폐 습중량/건중량)과 양립한다. 폐 조직 TBARS, 8-이소프로스탄 및 단백질 카보닐의 증가는 폐 조직 지질 및 단백질 성분의 산화의 산화 스트레스를 나타낸다. 이러한 폐 손상 지표는 LPS 후 12, 16 또는 24시간째에 유사한 값을 보여주었으며 (도 2a 내지 도 2f), 이는 폐 손상 정도가 비 치사 투여량의 LPS 후 12 내지 24시간째에 본질적으로 안정했음을 나타낸다. 폐 손상 지표에서 일부 회복 (약 50%, $p < 0.05$)은 대조군과 비교하여 여전히 상승했지만 이는 48시간째에서야 나타났다 ($p < 0.05$).
- [0217] *LPS 매개 폐 손상에 대한 PIP-2의 효과*
- [0218] 폐 손상에 대한 PIP-2 투여의 효과를 연구하기 위해, IT 제공된 LPS (5 $\mu\text{g/g}$ 체중)로 마우스를 처리하였다. 1 $\mu\text{g/g}$ 체중의 경우 상대적으로 낮은 수준의 폐 손상이 나타났고 5 $\mu\text{g/g}$ LPS/g 체중을 사용한 경우 치사율은 유의하지 않았으나 손상이 더 큰 것으로 나타난 동일한 LPS 배치를 사용한 이전 연구를 기반으로 LPS의 투여량을 선택하였다. PIP-2 (리포솜 내 2 $\mu\text{g/g}$ 체중)를 LPS 후 0, 12 또는 16시간째에 투여하였다. 본 발명자들은 이전에 이 투여량의 PIP-2가 적어도 24시간 동안 약 90%까지 폐 aiPLA₂ 활성을 억제할 수 있음을 관찰하였다. PIP-2를 기관의 과도한 손상을 방지하기 위해 0시간에 IT로, 12 또는 16시간째에 IV로 제공하였다. LPS 후 24시간째에 동물을 희생시키고 폐를 조사하였다. 폐 염증, 폐포 모세 혈관 장벽 기능 장애, 폐액 축적 및 조직 산화 스트레스를 반영하는 모든 폐 손상 지표는 대조군과 비교하여 LPS 처리 마우스에서 상승하였다 ($p < 0.05$). 0시간에 투여된 PIP-2는 LPS 후 24시간째에 평가했을 때 폐 손상을 완전히 방지하였다 (도 3a 내지 도 3f). 12시간 및 16시간째에 PIP-2로 처리된 마우스의 폐 조직 손상 지표도 LPS 단독과 비교하여 현저하게 감소했으며 값은 대조군 값과 크게 다르지 않았다 (도 3a 내지 도 3f). 폐 손상은 LPS 후 12시간 및 16시간째에 폐에 존재했기 때문에 12시간 또는 16시간째에 PIP-2를 제공한 LPS 처리 마우스의 폐에서 24시간째의 정상 값은 폐가 PIP-2 투여와 폐

검사 사이의 8 내지 12시간 간격 동안 손상으로부터 완전히 회복할 수 있었음을 의미할 수 있다.

[0219] PIP-2 처리는 고투여량 LPS에 의한 마우스 치사를 방지한다.

[0220] 저투여량 LPS (5 µg/g 체중)로 처리된 마우스는 유의한 폐 손상을 알지만 일시적이며 본질적으로 모든 마우스는 공격으로부터 회복될 것이다 (도시되지 않음). 더 중증의 손상 모델로 PIP-2 처리의 효과를 시험하기 위해 마우스에게 더 고투여량의 LPS (15 µg/g 체중)를 투여하였다. 생존 데이터를 초기 PIP-2 처리를 0시간으로 하여 플롯팅하였으며; LPS를 PIP-2 12시간 전에 투여하였다 (도 7a 및 도 7b의 그래프에서 제외된 -12시간). 이 고투여량의 LPS에서, 위약 (리포솜 단독)으로 처리된 마우스는 LPS 후 24시간 동안 73%의 치사율을 나타냈으며 48시간째까지 100%의 치사율을 나타냈다. 치료 아암(arm)의 경우, LPS 후 12, 24, 48, 72 및 96시간째에 PIP-2를 마우스에 투여하고 120시간째에 마우스를 희생시켰고; PIP-2 처리된 마우스는 PIP-2 처리 개시 후 36시간째에 유일하게 17%의 치사율 (83% 생존율)을 나타냈으며 관찰 기간 동안 추가의 치사율은 나타나지 않았다. 치사율에 대한 영향 외에도 LPS 후 PIP-2가 제공된 마우스의 거동에서 현저한 차이가 관찰되었으며, 대부분의 마우스는 PIP-2가 제공된 후 12시간째까지 정상적인 신체 활동으로 복귀하였다. LPS 후 120시간째에 희생된 처리 마우스의 폐 손상 지표는 이상을 나타내지 않았다 (표 13).

표 13

[0221] 폐 손상은 고투여량 LPS에서 생존하는 마우스에서 복구된다.

	BALf 세포 X10 ⁴ /g 체중.	BALf 단백질 µg/g wt	습중량/건중량 비율	TBARS pmol/mg prot	8-이소프로스 탄 pmol/mg prot	단백질 카보닐 nmol/mg prot
대조군 (무 LPS)	0.95 ± 0.04	75 ± 1.3	5.59 ± 0.03	76 ± 6	34 ± 3	5.6 ± 0.2
LPS+PIP-2	0.96 ± 0.40	78 ± 2.2	5.34 ± 0.03	77 ± 1	34 ± 3	5.6 ± 0.2

[0222] 마우스에 LPS (15 µg/g wt)를 IT에 주입하고; 리포솜 내 PIP-2 (2 µg/g 체중)를 도 7a에 도시된 시간에 주사하였다 (IV). LPS 후 120시간째에 5마리의 생존 마우스를 희생시켰으며; 대조군 마우스에는 리포솜을 제공하고, LPS는 제공하지 않았다. BALf, 기관지 폐포 세척액; TBARS, 티오바르비투르산 반응성 물질. 값은 대조군의 경우 N = 4, LPS + PIP-2의 경우 N = 5에 대한 ± SE이다. LPS+PIP-2의 평균 값은 해당 대조군과 통계적으로 다르지 않다 (p>0.05).

[0223] 다음으로, 본 발명자들은 전신 패혈증과 관련된 ALI에 대한 모델로서 복강내 경로에 의해 LPS (15 µg LPS/g 체중)가 제공된 마우스에서 PIP-2의 효과를 평가하였다. 본 발명자들은 10 µg LPS/g 체중에 의해 60%의 치사율을 보인 본 발명자들의 이전 연구를 기반으로 LPS의 투여량을 선택하였으며; 본 발명자들의 목표는 고투여량 IT LPS 연구에서 관찰한 것과 유사한 위약 처리 마우스에서 100% 치사율을 유발하는 것이었다. 위약 처리된 마우스 (리포솜 단독)의 생존율은 LPS 후 24시간째에 40% 미만이었고 마우스의 100%는 48시간째에 치사되었다 (도 7b). 이와 달리, PIP-2 (2 µg/g 체중)로 마우스를 처리하면 LPS 후 36시간째에 생존이 86%로 증가했고 마우스의 43%가 완전히 회복되었다. 더 고투여량의 PIP-2 (20 µg/g 체중)의 경우, 장기 생존율은 70%에서 유의하게 더 컸다. 따라서, PIP-2는 전신 패혈증과 관련된 ALI 모델에서 마우스 생존율을 현저하게 증가시켰다.

[0224] ALI는 치사율이 약 40%인 심각한 질병 증후군이다. 염증은 일차적 공격과 관련된 폐 손상을 증폭시킬 수 있는 중요한 요인이다. 현재까지 증후군의 염증 성분에 대해 승인된 약리학적 치료법은 없다. 폐 염증 중 폐 손상의 메커니즘은 복잡적이지만 과도한 ROS 생성이 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 본 발명자들은 이전에 Prdx6의 aiPLA2 활성이 NOX2에 의한 ROS 생성 활성화에 필요하다는 것을 보여주었으며, aiPLA₂ 활성을 억제하여 폐 세포에서 NOX2의 활성화를 억제하는 폐 계면활성제 단백질 A (SP-A) 서열에서 유래된 다수의 노나펩타이드를 설명하였다. 본 연구는 PLA₂-억제 펩타이드로 지칭되는 이러한 펩타이드 (PIP-2, PIP-4, PIP-5)가 분리된 마우스 폐에서 AngII 활성화 NOX2에 의한 ROS 생성을 억제함을 확인시킨다. PIP-2는 다른 2개의 PIP 화합물보다 약간 더 활성인 것으로 나타났지만, 3개의 PIP 화합물은 모두 억제제로서 효과적이었으며, 이는 예상컨대 중 사이에서 Prdx6 아미노산 서열의 높은 정도의 보존을 부분적으로 반영한 것으로 보인다. 본 발명자들은 PIP의 16개 아미노산 전구체의 결합 부위가 Prdx6의 아미노산 195 내지 204를 포함하는 아미노산 서열에 존재함을 입증하였다.

인간 Prdx6의 이 절편에 대한 서열은 다음과 같고; 서열번호 34 195-EEEAKKLFPK-204; 해당 마우스 서열은 10개 아미노산 중 8개 아미노산에 대해 동일하며 위치 200에서 K가 아닌 Q이고, 위치 201에서 L이 아닌 C이다. 본 발명자들은 후속 조사를 위해 인간 SP-A의 관련 서열에서 유래된 PIP인 PIP-2를 선택하였다. PIP-2 아미노산 서열은 서열번호1 LHDFRHQIL이다.

[0225] 본 연구의 주요 목표는 LPS의 기관내 투여와 관련된 폐 손상에 대한 PIP-2의 효과를 평가하는 것이었다. 본 발명자들은 먼저 PIP-2가 AngII 매개 ROS 생성을 현저하게 억제한다는 것을 입증하였고; AngII는 NOX2의 공지된 활성화제이며 앞서 살펴본 것처럼 활성화에는 aiPLA₂ 활성이 필요하다. 본 발명자들은 LPS 처리가 폐의 aiPLA₂ 활성을 현저하게 증가시켰고 또한 NOX2의 활성화를 통해 ROS 생성을 현저하게 증가시켰으며; aiPLA₂ 활성의 LPS 매개 증가와 ROS 생성은 모두 PIP-2에 의해 억제되었음을 보여주었다.

[0226] 폐 손상 모델에서 PIP-2 효과에 대한 첫 번째 연구는 LPS와 PIP-2의 동시 투여였으며, 이는 후속 폐 손상에 대해 현저하게 보호되었다. LPS 후 급성 폐 손상을 평가하기 위한 측정에는 a) BALf의 유핵 세포 (염증); b) BALf의 단백질 (폐포-모세관 투과성); c) 폐 습증량 대 건증량 비율 (폐 부종); 및 d) 폐 TBARS, 8-이소프로스탄 및 단백질 카보닐 (조직 지질 및 단백질의 산화)이 포함되었다. 이러한 모든 손상 지표는 LPS 투여 후 12 내지 24 시간째에 평가된 폐에서 유의하게 상승하였다. 그러나 PIP-2가 LPS와 동시에 투여되었을 때 이러한 조직 손상 지표 중 어떤 것도 폐에서 변경되지 않았다. 따라서 PIP-2는 마우스에서 LPS 투여와 관련된 ALI를 방지할 수 있다.

[0227] 다음 연구에서는 치료 (예방이 아님) 방식으로 LPS를 투여한 후 12시간 또는 16시간째에 투여된 PIP-2의 효과를 조사하였다. 도 3a 내지 도 3f에 도시된 바와 같이, 비 치사 LPS와 관련된 조직 손상은 이 시점에서 최대이다. LPS 후 12 또는 16시간째에 PIP-2를 투여하면 LPS 후 24시간째에 검사했을 때 폐 손상의 매개변수가 본질적으로 정상 값으로 복구되었다. 이 연구에서 본 발명자들의 결론은 PIP-2가 LPS와 관련된 지속적인 폐 손상을 방지하고 PIP-2 투여와 동물 희생 사이의 8 내지 12시간 동안 폐가 스스로 복구될 수 있도록 하였다는 것이다.

[0228] 본 발명자들의 최종 연구는 치사 투여량의 LPS 투여 후 마우스 폐 기능 및 생존율에 대한 PIP-2의 효과를 평가하는 것이었다. LPS를 투여한 후 12 내지 24시간마다 PIP-2를 투여하면 마우스 거동이 극적으로 개선되고 마우스 치사율이 현저하게 감소했으며 폐 손상 지표가 정상 값으로 복구되었다. 따라서, Prdx6의 PLA₂ 활성화에 대한 노나펩타이드 억제제는 NOX2 활성화에 따른 ROS 생성을 방지하고 치사 투여량의 LPS 투여와 관련된 치사를 방지하였다. 이러한 결과는 PIP-2가 LPS 유도 ALI의 마우스 모델을 예방하고 치료할 수 있음을 모두 나타낸다.

[0229] PIP-2를 사용한 본 결과는 aiPLA₂ 활성 및 후속적인 NOX2 활성화를 억제하는 다수의 다른 수단을 사용하여 LPS-유도 ALI에서 보호를 나타낸 이전 연구와 유사한 결론을 제공한다. 여기에는 a) aiPLA₂ 활성의 지질 억제제인 MJ33의 투여; b) Prdx6 nul 마우스 사용 (Prdx6의 과산화효소 활성도 손실되기 때문에 완벽한 모델이 아님); 및 c) aiPLA₂ 활성 부위의 필수 성분인 Prdx6에서 아미노산 D140의 돌연변이를 갖는 마우스가 포함되었다. MJ33 억제 마우스, D140A 돌연변이 마우스 및 PIP-2 처리 마우스는 모두 Prdx6의 과산화 효소 활성을 유지하지만, 이 활성은 Prdx6 nul 마우스에서 제거된다. 이러한 이전 연구에서 a) 및 b)에서 직접 폐 손상 모델로 LPS를 IT 경로로 투여하고, c)에서는 비 감염성 폐혈증 모델로 복강내 경로로 투여하였다. 본 발명자들은 PIP-2에 의해 제공되는 보호 메커니즘이 Prdx6에 펩타이드의 결합으로 인한 알로스테릭 효과에 의해 Prdx6의 aiPLA₂ 활성을 억제하는 것이라고 제안하였다. PIP 펩타이드는 다른 단백질에 대한 잠재적 결합 부위의 비 유사성에 근거하여 예상된 바와 같이 실험적으로 입증된 다른 폐 PLA₂ 효소를 억제하지 않았다. aiPLA₂ 활성의 억제는 lysoPC 및 그 하류 생성물의 생성을 방지하여 Nox2 활성화에 필요한 보조 인자인 Rac의 활성화를 방지한다. 홍미류게도, 콜레스테롤 저하 약물인 심바스타틴 (simvastatin)은 또한 LPS 유도 ALI의 마우스 모델에서 Rac의 활성화를 억제하고, 내피 세포에 의한 ROS 생성을 억제하고 보호하는 것으로 나타났다. 아직 확실한 증거는 없지만, Rac 활성화의 억제는 NOX2 활성화에 대한 영향 외에도 ALI의 비 ROS 매개 발현에 유익한 영향을 미칠 가능성이 있다.

[0230] 현재 및 이전의 연구는 NOX2가 폐에서 ROS의 주요 공급원이며 상기 효소가 LPS의 존재하에 활성화된다는 것을 보여주었다. LPS 모델 외에도 NOX2에 의한 ROS 생성은 그람 음성 폐혈증, 내독소, 중증 외상, 출혈성 쇼크 및 올레산 주입을 포함하여 ALI의 다수의 다른 관련 및 이중 동물 모델에서 중심 역할을 하는 것으로 나타났다. 예상컨대, NOX2 활성화와 관련된 산화 스트레스의 주요 징후는 현재 연구에서 나타난 바와 같이 조직 거대 분자의 산화이다. 그러나 NOX2 유래 ROS와 관련된 또 다른 중요한 병태생리학적 역할은 ROS가 폐로의 호중구 집합 및 ALI의 특징인 결과적인 폐 염증으로 이어지는 신호에 관여한다는 증거에 근거한다. PIP-2로 처리한 후 BALf에서

유핵 세포의 현저한 감소는 ROS의 이 기능이 폐 손상으로부터 회복하는데 중요함을 시사한다. 그런 점에서, 미리스토일화된 알라닌이 풍부한 C 키나제 기질 (Marcks) 단백질의 펩타이드 억제제는 또한 마우스의 LPS로 인한 폐 손상으로부터 보호한다. 후자의 펩타이드가 NOX2 활성화를 억제하는 것으로 나타나지는 않았지만, 그 효과는 PMN이 폐로 유입되는 것을 방지하는 변경된 세포 운동성을 통해 매개될 수 있다. 따라서 PIP-2, 심바스타틴, Marcks 단백질 억제제 및 가능하게는 아포시닌 (apocynin)과 같은 NOX2 억제제는 모두 LPS 후 폐로 PMN 유입을 방지하여 염증 및 관련 폐 손상을 역전시킬 수 있다.

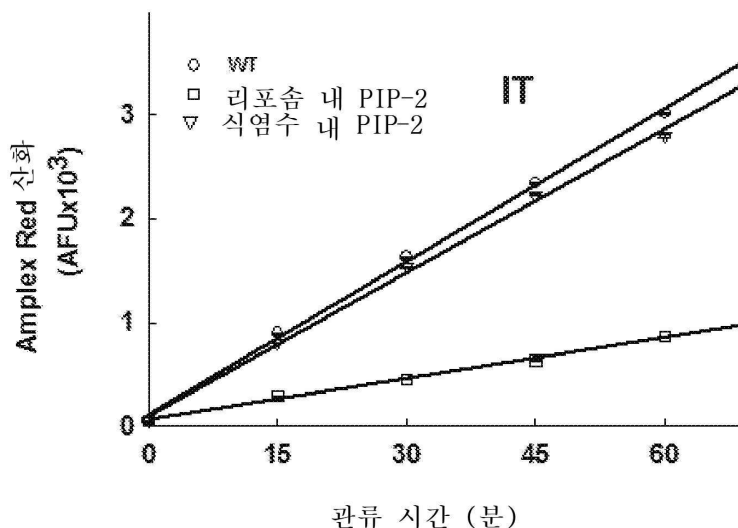
[0231] 본 결과에 근거하여, NOX2 활성화의 펩타이드 억제제는 ALI 위험이 있는 환자를 위한 예방제로서뿐만 아니라, 확립된 ALI 환자의 치료에도 효과적일 수 있다. 이러한 작은 펩타이드의 독성은 SP-A 단백질의 성분으로서 폐에서 정상적인 발현을 기반으로 예상되지 않지만 여전히 조사되어야 한다. 이론적으로 펩타이드의 항원 가능성은 낮지만 인간에서 확인되어야 한다. 상기 펩타이드의 다른 가능한 부작용은 ROS의 신호전달 및 조절 기능의 손실뿐만 아니라, Rac 활성화의 억제와 관련된 부작용을 포함한다. 참고로, 널리 사용되는 약물인 심비스타틴의 Rac 억제와 관련될 수 있는 주요 효과는 아직 보고되지 않았다. PIP 처리의 잠재적으로 더 중요한 "부작용"은 박테리아를 사멸시키기 위해 NOX2의 활성을 통해 생성된 초산화물 음이온을 사용하는 염증 세포 (PMN 및 AM)의 살균 활성에 대한 ROS 생성 억제 효과일 수 있다. 또한, 일부 항생제는 최대 효능을 위해 ROS가 필요한 것으로 나타났다. 감염에 대한 변화된 반응의 이론적 가능성에도 불구하고, NOX2 활성화 억제제는 ALI의 LPS 모델에서 PMN의 살균 활성을 감소시키지 않았다. 이는 NOX2 유래 ROS의 손실을 보상하는 비-NOX2 경로의 능력을 반영할 수 있다. 이는 NOX2 억제제로 처리된 환자의 항생제 적용범위에 대한 중요한 역할을 강조하지만, 항생제 단독 사용은 이 질병으로 인한 치사율을 40% 미만으로 현저히 낮추는데 효과적이지 않았다는 점에 유의하는 것이 중요하다.

[0232] 본 명세서에 인용된 각각의 모든 특허, 특허 출원 및 공보물의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

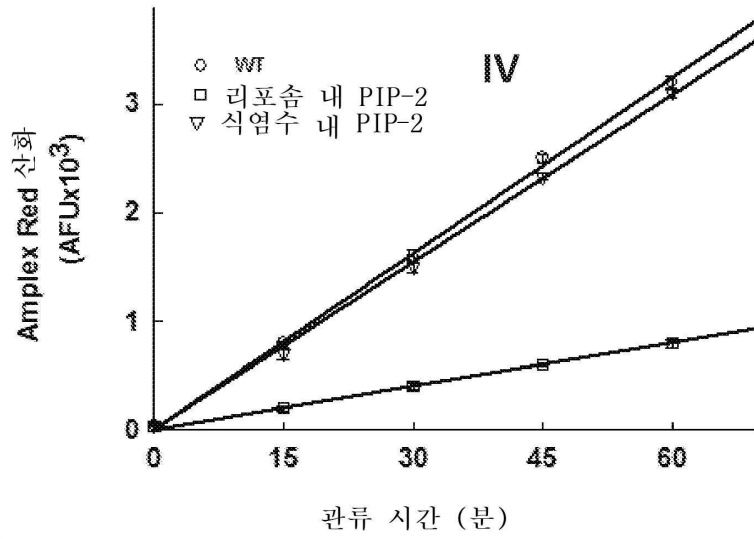
[0233] 본 발명이 특정 실시형태를 참조하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 실시형태 및 변형이 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어나지 않고 당업자에 의해 고안될 수 있음이 명백하다. 첨부된 청구범위는 이러한 모든 실시형태 및 균등한 변형을 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

도면

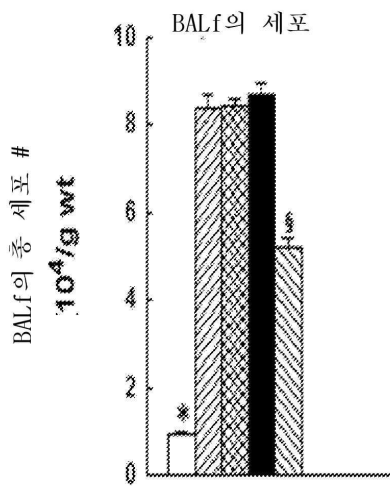
도면 1a



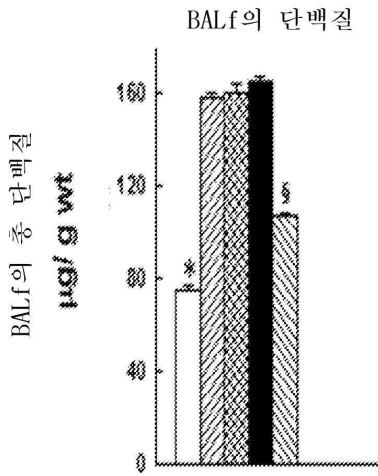
도면1b



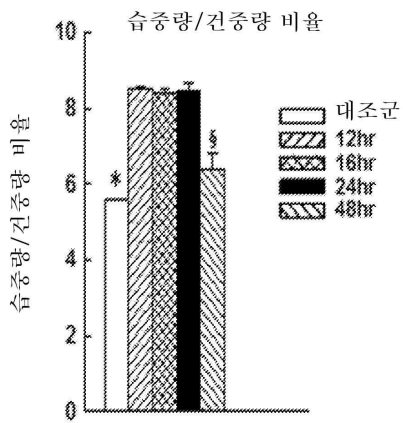
도면2a



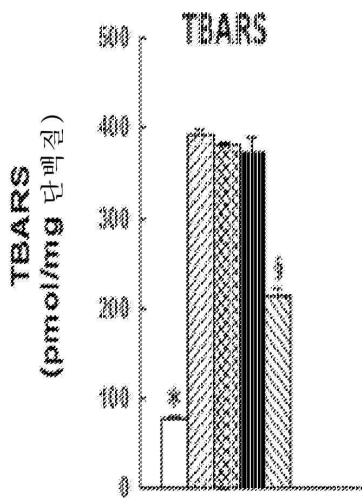
도면2b



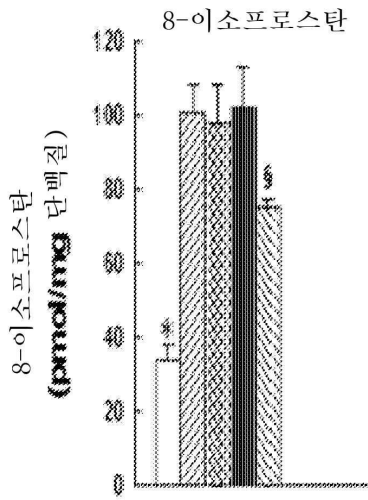
도면2c



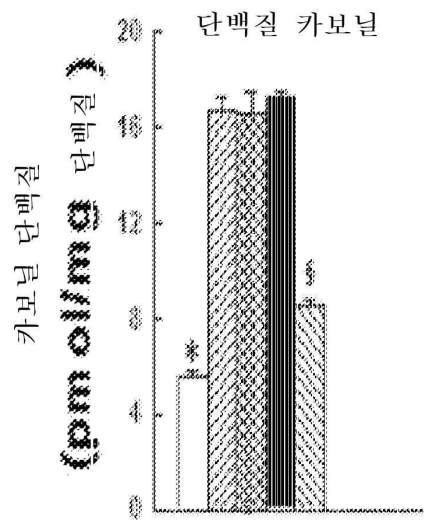
도면2d



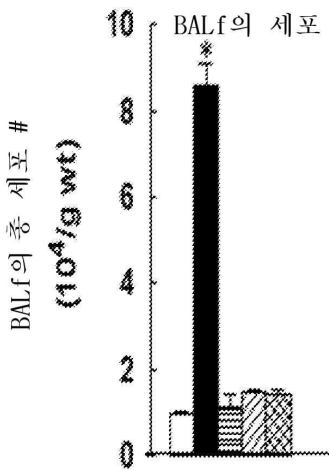
도면2e



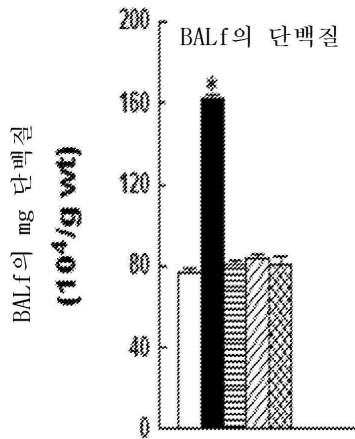
도면2f



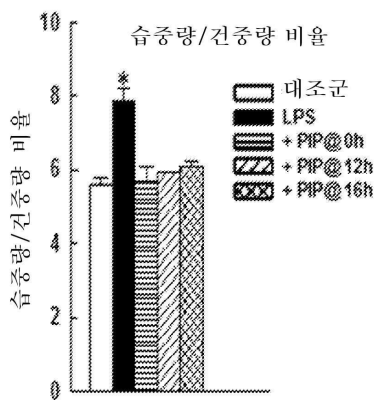
도면3a



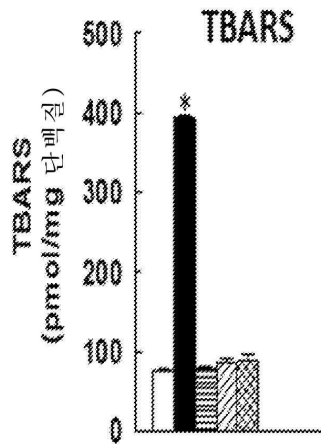
도면3b



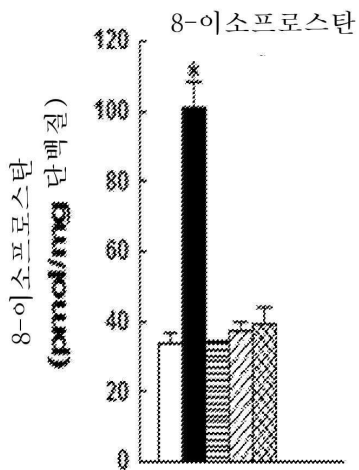
도면3c



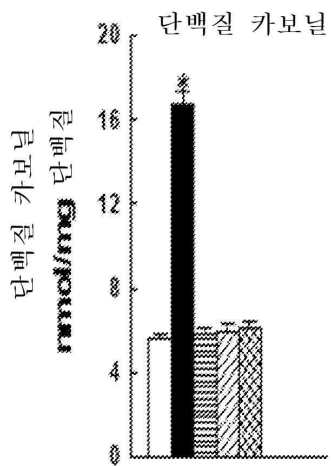
도면3d



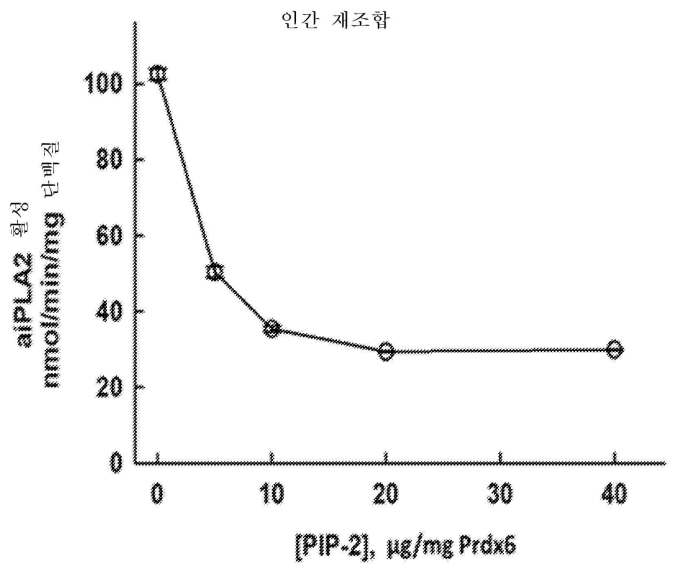
도면3e



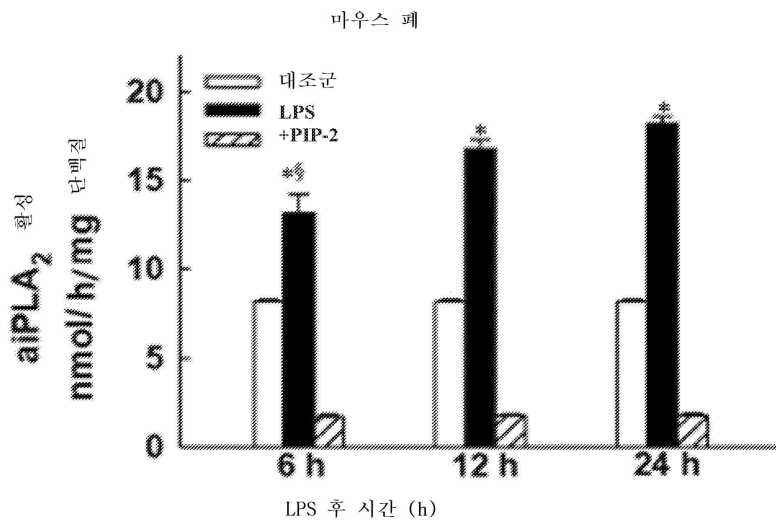
도면3f



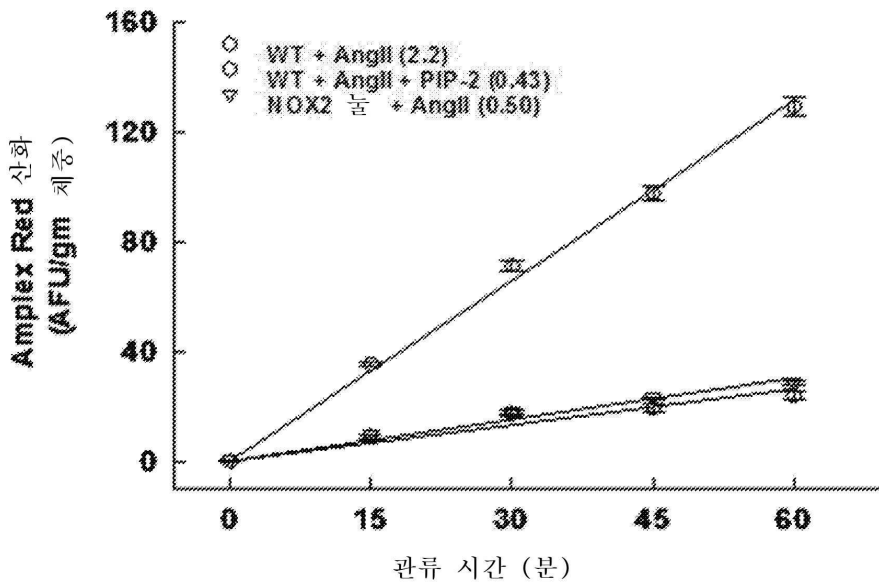
도면4a



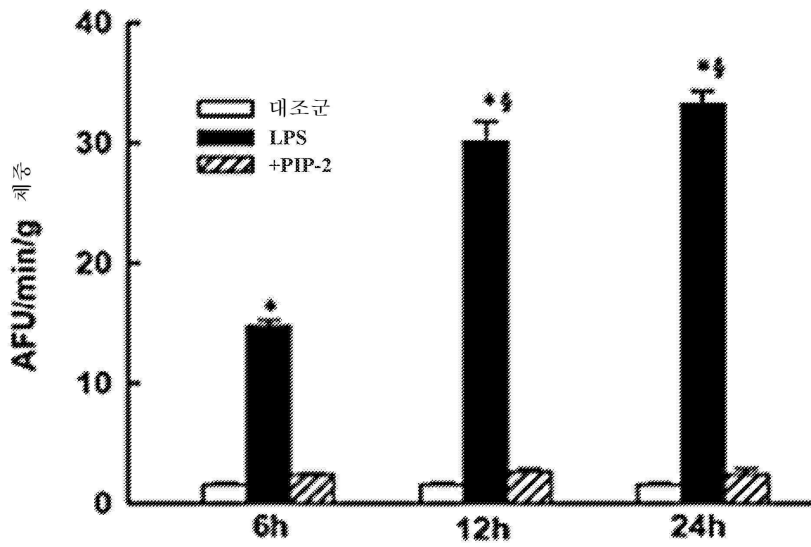
도면4b



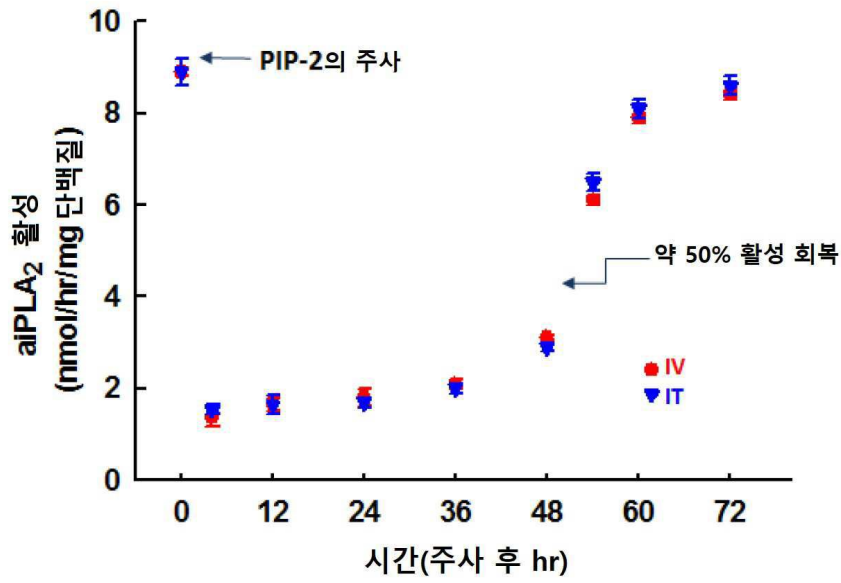
도면5a



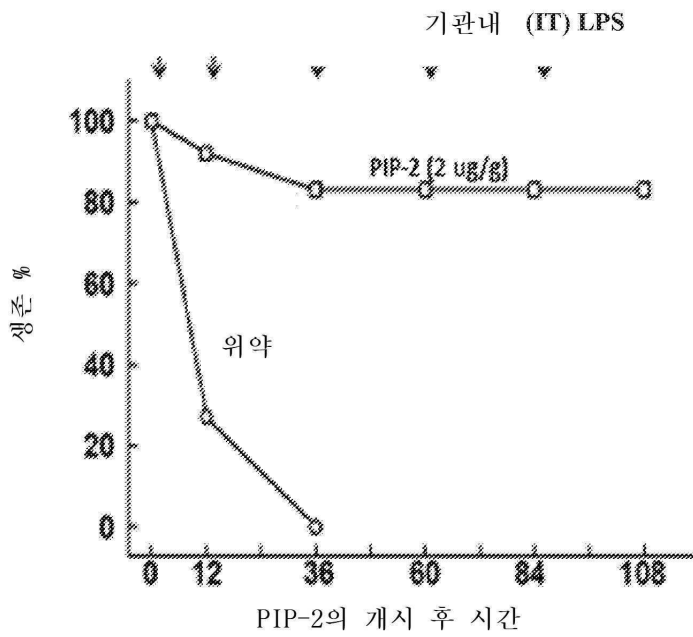
도면5b



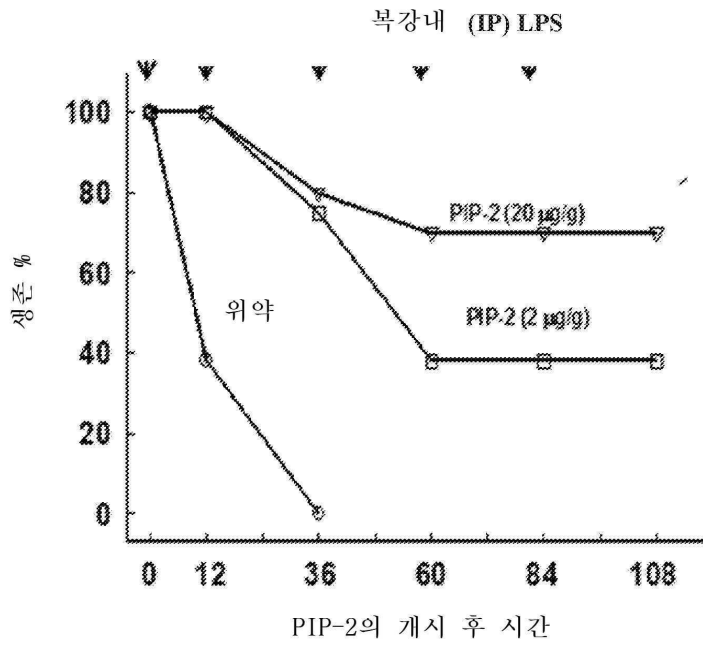
도면6



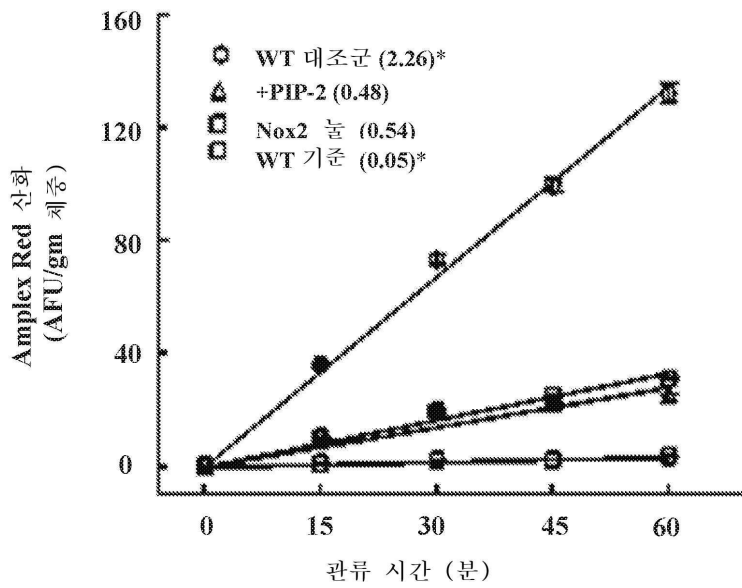
도면7a



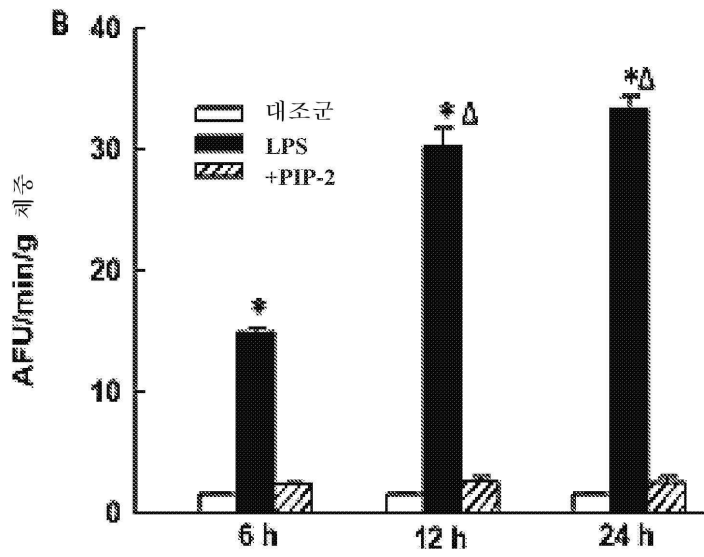
도면7b



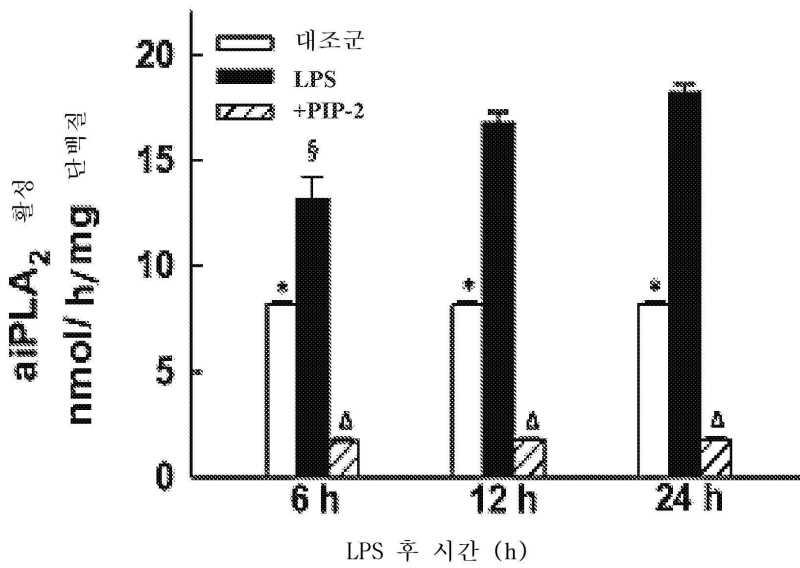
도면8



도면9a



도면9b



도면10

조성물 * % DPPC/PC/PG	PIP-2	n	활성 ↑ nmol/mg prot/h	억제 %	최대 억제 %
50/25/10	무	2	8.83 ± 0.1	----	----
50/25/10	유	3	1.64 ± 0.04	81.4	100
0/75/10	유	3	1.72 ± 0.06	80.5	99
75/0/10	유	2	1.84 ± 0.02	79.2	97
55/30/0	유	2	2.50 ± 0.12	71.7	88

도면11

조건	BALf의 세포 # (x10 ⁴ /g 체중)	BALf의 총 단백질 (μg/g 체중)	폐의 습중량/건중량 비율	TBARS pmol/mg prot.	8-이소프로스탄 pmol/mg prot	단백질 카보닐 nmol/mg prot
PIP-2에 의한 보호% @ 0/12/16 h*	100/ 94/ 94*	100/ 99/ 93*	100/ 86/ 76*	100/ 67/ 96*	100/ 94/ 91*	100/ 93/ 93*

도면12

	BALf 세포 ×10 ⁴ /g 체중	BALf 단백질 μg/g wt.	습중량/건중량 비율	TBARS pmol/mg prot	8-이소프로스탄 pmol/mg prot	단백질 카보닐 nmol/mg prot
A. 대조군 (무 LPS)	0.95 ± 0.04	75 ± 1.3	5.59 ± 0.03	76 ± 5	34 ± 3	5.60 ± 0.20
B. LPS (IT) + PIP-2 (2 μg/g 체중)	0.96 ± 0.04	78 ± 2.2	5.34 ± 0.03	77 ± 1	34 ± 3	5.60 ± 0.20
C. LPS (IP) + PIP-2 (20 μg/g 체중)	0.95 ± 0.05	79 ± 2.0		77 ± 2	35 ± 1	5.52 ± 0.14

도면13

	BALf의 세포 # (x10 ⁴ /g 체중)	BALf의 총 단백질 (ug/g 체중)	폐의 습중량/건중량 비율	TBARS pmol/mg prot.	β -이소프로스탄 pmol/mg prot	단백질 카보닐 nmol/mg prot
대조군	0.97 ± 0.06	77 ± 2.0	5.61 ± 0.02	74.6 ± 2.3	33.1 ± 3.0	5.6 ± 0.2
VILI	19.6 ± 1.4	235 ± 10	10.82 ± 0.21	530 ± 7	174 ± 5	22.8 ± 0.8
VILI + PIP-2	8.4 ± 0.3*	107 ± 8*	7.42 ± 0.11*	210 ± 4*	77.4 ± 1.0*	8.6 ± 0.4*
보호 %	60	81	65	70	69	83

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

Fisher, Aron B.

Feinstein, Sheldon I.

<120> Compositions and Methods for Treatment of Acute Lung Injury

<130> IPA210208-CN

<150> US 62/719,217

<151> 2018-08-17

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 1

Leu His Asp Phe Arg His Gln Ile Leu

1 5

<210> 2

<

211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 2

Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 3

Leu Tyr Asp Ile Arg His Gln Ile Leu

1 5

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 5

Glu Leu Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 6

Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 7

Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 8

Asp Glu Glu Leu Gln Ala Thr Leu His Asp Phe Arg His Gln Ile Leu

1 5 10 15

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 9

Asp Glu Glu Leu Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5 10 15

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 10

Glu Leu Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 11

Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 12

Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400>

> 13

Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 14

Asp Glu Glu Leu Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln

1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 15

Asp Glu Glu Leu Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 16

Asp Glu Glu Leu Gln Thr Glu Leu Tyr Glu Ile

1 5 10

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 17

Asp Glu Glu Leu Gln Thr Glu Leu

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 18

Thr Leu His Asp Phe Arg His Gln Ile Leu

1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 19

Thr Leu His Asp Phe Arg His Gln Ile

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 20

Leu His Asp Phe Arg His Gln Ile

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400>

> 21

Glu Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 22

Leu Tyr Glu Ile Lys His Gln Ile

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 23

Leu Lys Ile Glu Tyr His Gln Ile Leu

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 24

Leu Arg Phe Asp His His Gln Ile Leu

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 25

Leu His Glu Phe Lys His Gln Ile Leu

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 26

Leu Phe Lys Leu Glu His Gln Ile Leu

1 5
<210> 27
<211
> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Inhibitory peptide.
<400> 27
Leu His Asp Phe Arg Asp Gln Ile Leu

1 5
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Inhibitory peptide.
<400> 28
Leu His Asp Phe Arg Pro Gln Ile Leu

1 5
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Inhibitory peptide.
<400> 29
Leu His Asp Phe Arg His Asn Ile Leu

1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Inhibitory peptide.
<400> 30
Leu His Asp Phe Arg His Ile Ile Leu

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 31

Leu His Asp Phe Arg His Gln Leu Leu

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 32

Leu His Asp Phe Arg His Gln Thr Leu

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys

1 5 10

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory peptide.

<400> 34

Ile Lys His Gln Ile Leu

1 5