



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0018474
(43) 공개일자 2023년02월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/198 (2006.01) A61K 31/405 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/198 (2013.01)
A61K 31/405 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7046211
- (22) 출원일자(국제) 2021년05월28일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년12월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/034807
- (87) 국제공개번호 WO 2021/243183
국제공개일자 2021년12월02일
- (30) 우선권주장
63/032,185 2020년05월29일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
유니버시티 오브 플로리다 리서치 파운데이션, 인크.
미국 32611-5500 플로리다 가이네스빌 그린터 홀 223
엔트린지, 엘엘씨
미국 메사추세츠 02062 노우드 스위트 100 리버릿지 드라이브 500
- (72) 발명자
비드야사가르, 사다시만
미국 32611 플로리다 게인즈빌 그린터 홀 223 유니버시티 오브 플로리다 내
그로세, 아스트리드
미국 32611 플로리다 게인즈빌 그린터 홀 223 유니버시티 오브 플로리다 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 무한

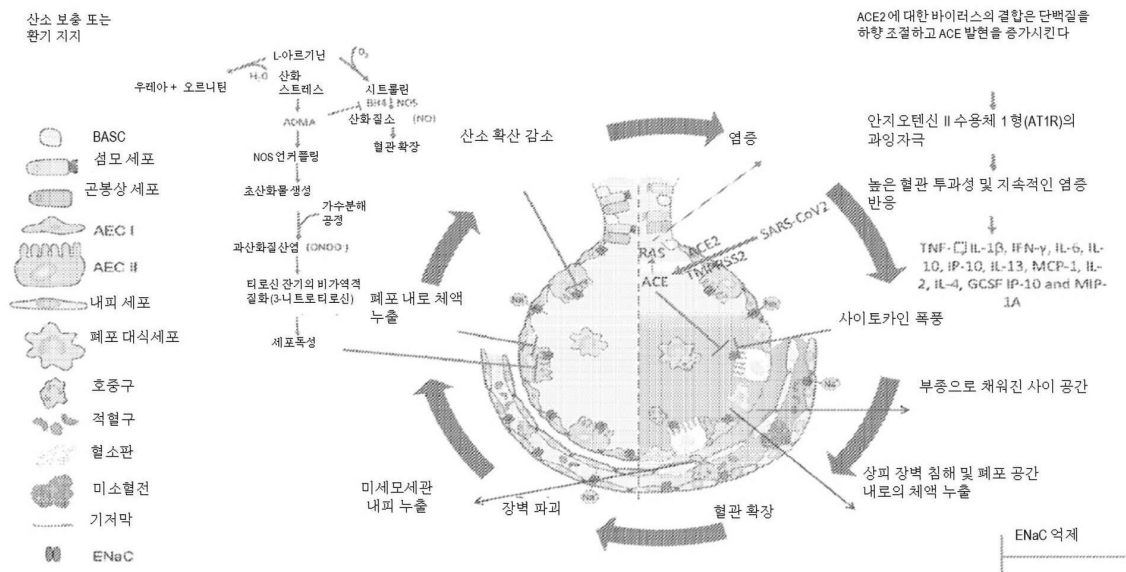
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 급성 호흡 곤란 증후군, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 제형 및 방법

(57) 요약

ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하는 데 유용한 유리 아미노산의 조합을 포함하는 제형이 본원에 기술된다. 이러한 아미노산 제형을 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 데 사용하는 것; ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하기 위한 방법에 이러한 아미노산 제형을 사용하는 것; 및/또는 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 위한 의약의 제조에 이러한 아미노산 제형을 사용하는 것이 본원에 포함된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 9/0043 (2013.01)
A61K 9/0073 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 11/06 (2018.01)
A61P 37/08 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

쉬, 시아오둥

미국 32611 플로리다 게인즈빌 그린터 홀 223 유니
버시티 오브 플로리다 내

양폴리, 다미아노

미국 02062 메사추세츠 노우드 스위트 206 리버 릿
지 드라이브 100 엔트린직, 인크. 내

가토, 스테펜, 제이.

미국 02062 메사추세츠 노우드 스위트 206 리버 릿
지 드라이브 100 엔트린직, 인크. 내

(30) 우선권주장

63/080,470 2020년09월18일 미국(US)
63/088,813 2020년10월07일 미국(US)
63/136,404 2021년01월12일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

급성 호흡곤란 증후군(ARDS), 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한 약학적 제형으로서, 상기 제형은 다음 유리 아미노산의 치료적 유효 조합 및 임의로 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체, 완충제, 전해질, 보조제, 부형제, 또는 물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고:

아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는 유리 아미노산; 및

글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량,

여기서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 ARDS 또는 천식을 치료하기 위해 폐에 전달되도록 제형화되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 대상체의 폐에서 체액 축적을 감소시키기에 충분하거나;

유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 알러지 비염을 치료하기 위해 비강 통로에 전달되도록 제형화되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 대상체의 비강에서 체액 축적을 감소시키기에 충분한, 약학적 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 유리 아미노산은 아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및

글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 유리 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및

글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 4

제2항에 있어서, 유리 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및

글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 또는 아스파라긴의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 아르기닌의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM인, 약학적 제형.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 티로신 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 아르기닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.1 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 8

제6항에 있어서, 아르기닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.8 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 9

제6항에 있어서, 아르기닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 리신은 8 mM의 농도로 존재하고, 트립토판은 8 mM의 농도로 존재하고, 티로신은 1.2 mM의 농도로 존재하고, 글루타민은 8 mM의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 11

제10항에 있어서, 아르기닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 12

제10항에 있어서, 아르기닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 13

제10항에 있어서, 아르기닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 리신은 8 mM의 농도로 존재하고, 트립토판은 8 mM의 농도로 존재하고, 글루타민은 8 mM의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 티로신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 15

제14항에 있어서, 아르기닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.1 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 16

제14항에 있어서, 아르기닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.8 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 17

제14항에 있어서, 아르기닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 리신은 8 mM의 농도로 존재하고, 티로신은 1.2 mM의 농도로 존재하고, 글루타민은 8 mM의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 18

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 글루타민, 시스테인, 및 아스파라긴의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제

형.

청구항 19

제18항에 있어서, 아르기닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 시스테인은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 아스파라긴은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 20

제18항에 있어서, 아르기닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 시스테인은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 아스파라긴은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 21

제18항에 있어서, 아르기닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 리신은 8 mM의 농도로 존재하고, 글루타민은 8 mM의 농도로 존재하고, 시스테인은 8 mM의 농도로 존재하고, 아스파라긴은 8 mM의 농도로 존재하는, 약학적 제형.

청구항 22

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 및 트립토판의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 23

제1항, 제3항, 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 트레오닌, 및 티로신의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 24

제1항, 제3항, 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 트레오닌, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 25

제1항, 제3항, 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 티로신, 글루타민, 및 트레오닌의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체, 완충액, 전해질, 보조제, 부형제, 또는 물, 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함하는 약학적 제형.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산 중 적어도 하나 또는 유리 아미노산의 각각은 L-아미노산을 포함하는, 약학적 제형.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 제형은 폐, 흡입, 또는 비강 경로에 의해 투여되도록 제형화되는, 약학적 제형.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 제형은 흡입에 의해 투여되거나 비강 투여되도록 제형화되는, 약학적 제형.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 포유동물인, 약학적 제형.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물은 인간, 고양이, 개, 돼지, 말, 소, 양, 또는 염소인, 약학적 제형.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물은 인간인, 약학적 제형.

청구항 33

제32항에 있어서, 인간은 유아(baby)인, 약학적 제형.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 코로나바이러스 감염증 2019(COVID-19) 환자인, 약학적 제형.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 폐에서 체액 축적을 감소시키면 ARDS 또는 천식과 연관된 적어도 하나의 증상이 감소되고, 비강에서 체액 축적을 감소시키면 알러지성 비염과 연관된 적어도 하나의 증상이 감소되는, 약학적 제형.

청구항 36

ARDS, 천식 또는 알러지성 비염의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 약학적 제형.

청구항 37

ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 의약의 제조를 위한, 제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 약학적 제형의 용도.

청구항 38

ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하기 위한 방법으로서, 상기 방법은:

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 약학적 제형을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되,

상기 투여하는 단계는 폐에서 체액 축적을 감소시켜, 대상체에서 ARDS 또는 천식과 연관된 적어도 하나의 증상을 감소시키거나,

상기 투여하는 단계는 대상체의 비강에서 체액 축적을 감소시켜, 대상체에서 알러지성 비염과 연관된 적어도 하나의 증상을 감소시키는, 방법.

청구항 39

약학적 제형 또는 의약은 폐, 흡입, 또는 비강내 경로 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합을 통해 투여될 수 있는, 제36항의 용도, 제37항의 의약, 또는 제38항의 방법.

청구항 40

약학적 제형 또는 의약은 흡입 또는 비강 투여를 통해 투여될 수 있는, 제36항의 용도, 제37항의 의약, 또는 제38항의 방법.

청구항 41

폐 투여 또는 비강 투여용으로 제형화되는 약학적 제형으로서, 상기 약학적 제형은 다음 아미노산의 치료적 유효 조합 및 임의로 적어도 하나의 담체, 완충제, 전해질, 보조제, 부형제, 또는 물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 약학적 제형:

아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는 유리 아미노산; 및

글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량.

청구항 42

제41항에 있어서, 유리 아미노산은 아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및

글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 43

제41항에 있어서, 유리 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및

글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 티로신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 45

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 아미노산의 조합은 아르기닌, 리신, 글루타민, 시스테인, 및 아스파라긴의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 46

제41항 내지 제43항에 있어서, 유리 아미노산의 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 47

제41항 내지 제43항에 있어서, 유리 아미노산의 조합은 아르기닌, 리신, 티로신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는, 약학적 제형.

청구항 48

제1항 내지 제35항 또는 제41항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 제형 또는 제37항의 의약을 포함하는 장치로서, 상기 장치는 약학적 제형 또는 의약을 이를 필요로 하는 대상체의 폐 또는 비강에 전달하도록 구성되는, 장치.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

[0001]

본 출원은 2020년 5월 29일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/032,185호, 2020년 9월 18일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/080,470호, 2020년 10월 7일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/088,813호, 및 2021년 1월 12일에

[0002]

출원된 미국 특허 가출원 제63/136,404호의 우선권을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본원에 기술된 아미노산 제형, 조성물, 의약, 및 방법은 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 데 유용하다. 이를 필요로 하는 대상체는 호흡 곤란의 징후를 나타낼 수 있으며, 그 징후는 과도한 폐포액과 연관된 증상을 포함한다. 아미노산 제형 및 조성물 및 이들의 의약은 상피 나트륨 채널(ENaC) 활성을 증가시켜, 이들 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시킨다. ARDS는 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19)를 포함하는 다양한 질환과 관련된 증후군이다. ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하기 위해 본원에 기술된 아미노산 제형을 사용하는 것 및 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 위한 의약을 제조하는 데 상기 아미노산 제형을 사용하는 것을 비롯하여 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 방법에 상기 아미노산 제형을 사용하는 것도 본원에 포함된다.

배경 기술

[0005] 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19)를 유발하는 SARS-CoV-2는 주로 기도 및 폐포 상피 세포, 혈관 내피 세포, 및 대식세포를 감염시킨다. SARS-CoV-2 감염증은 빈번하게 치명적인 염증 반응과 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 초래하는데, 이는 COVID-19 환자에서의 높은 사망률과 연관이 있다. ARDS는 COVID-19 폐렴을 나타내는 환자의 42%에서 발생하고, 이 중 61~81%는 중환자실(ICU)에 입원한다. COVID-19 환자의 약 20%에서, 질환은 중증이며 이러한 환자는 산소 요법 또는 기계적 환기를 필요로 한다. COVID-19 ARDS 환자가 산소호흡기를 이용하는 평균 기간의 중앙값은 증상 발현 후 8.5일이며, 일반적으로 이러한 환자는 이러한 보조 요법 후의 예후가 좋지 않다. ARDS는 폐에서 미만성 폐포 손상을 야기한다. 흥미롭게도, COVID-19 ARDS 환자는 다른 원인으로 인해 ARDS 환자보다 더 나쁜 결과를 갖는다. 치료 프로토콜의 발전에도 불구하고, ARDS 환자는 계속해서 높은 사망률을 경험한다.

발명의 내용

[0006] 대상 구현에는 본 발명의 내용이 아니라 청구범위에 의해 정의된다. 본 발명의 내용은 다양한 양태에 대한 높은 수준의 개요이며, 아래 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용의 섹션에서 추가로 기술되는 개념 중 일부를 소개한다. 본 발명의 내용은 청구된 주제의 주요 또는 필수 특징을 식별하도록 의도된 것이 아니며, 청구된 주제의 범주를 결정하기 위해 단독으로 사용되도록 의도된 것도 아니다. 주제는 전체 명세서의 해당 부분, 임의의 도면 또는 모든 도면, 및 각각의 청구범위를 참조하여 이해되어야 한다.

[0007] ENaC 및 장벽 기능은 폐포 체액 제거에 있어서 중요한 역할을 하며, COVID-19에서 나타난 것과 같이 이들이 파괴되면 ARDS가 발생할 수 있다. 선천 면역 메커니즘이 SARS-CoV-2를 잘 인식하지 못하면 Th1 및 Th2 반응의 조기 활성화와 Treg 세포 반응의 억제로 이어진다. 이러한 변경된 면역 반응은 고전적인 사이토카인 폭풍을 초래하고, 결국 ENaC 활성 및 장벽 기능의 파괴로 이어진다. 본 결과 이전에는, ENaC 활성 및 장벽 기능의 파괴에 관여하는 사이토카인의 타임라인 및 양에 대해 알려진 바가 거의 없었다. 이러한 이해의 부족은 ARDS를 해결하기 위한 다양한 치료 방법이 부족한 원인이 되어왔다.

[0008] 본원에 제시된 전기생리학적 기술과 면역형광 기술에 기초하여, 본 발명자들은 장벽 파괴보다 일찍 감소된 ENaC 활성 및 Th2 사이토카인(IL-4 및 IL-13)이 선천(IFN- γ), Th1(TNF- α), 및 Treg(TGF- β) 면역 반응의 사이토카인보다 이들 억제 효과에 더 유의하게 기여하였음을 입증한다.

[0009] 본원에 기술된 바와 같이, 일차 정상 인간 기관지 상피 세포(HBEC)를 대표적인 사이토카인 및 COVID-19 동안 방출되는 이들의 조합에 노출시켜 투여량 및 시간 의존적 평가를 실시하였다. ENaC 기능을 증가시키므로써 ARDS를 치료하는 데 적어도 부분적으로 아미노산 제형이 사용될 수 있는 가능성을 탐색하기 위해, 본 발명자들은 COVID-19 면역 반응의 선택된 사이토카인 특징에 노출된 일차 HBEC의 모델 시스템에서, 하나의 지정된 AA-EC01을 포함하여, 복수의 아미노산 제형을 이들이 ENaC 활성을 조절하는 능력에 대해 평가하였다. 본원에 기술된 바와 같이, AA-EC01은 최대 ENaC 억제를 나타내는 투여량 및 인큐베이션 시간에서 IL-13에 노출될 때, HBEC에서 ENaC 기능을 개선하고 MUC5AC 발현을 감소시킨 예시적인 아미노산 제형이다. AA-EC01은 또한 사이토카인 콕테일과 함께 인큐베이션한 HBEC의 섬모막 내에서 ENaC 발현을 증가시키고 IL-6 분비를 감소시켰다. 따라서, 본원에 제시된 결과는 ARDS 관련 염증 반응의 시험관 내 모델 시스템에서 ENaC 기능에 미치는 AA-EC01의 유익한

효과를 입증한다. ENaC 활성을 회복하는 능력 때문에, AA-EC01은 SARS-CoV-2 또는 다른 폐 바이러스 감염 후 ARDS에 걸린 환자의 결과를 개선하도록 설계된 제1 치료 제형이 될 가능성이 있다. AA-EC01은 독립형 치료제로서 사용될 수 있거나, ARDS 환자의 치료에 현재 사용되는 다른 치료제와의 병용 치료 접근법에 사용될 수 있다.

[0010] AA-EC01은 천식을 치료하기 위한 치료제로도 제공된다. 천식을 치료하기 위해, AA-EC01은 독립형 치료제로서 사용될 수 있거나, 천식 환자의 치료에 현재 사용되는 다른 치료제와의 병용 치료 접근법에 사용될 수 있다.

[0011] AA-EC01은 알러지성 비염을 치료하기 위한 치료제로도 제공된다. 알러지성 비염을 치료하기 위해, AA-EC01은 독립형 치료제로서 사용될 수 있거나, 알러지성 비염 환자의 치료에 현재 사용되는 다른 치료제와의 병용 치료 접근법에 사용될 수 있다.

[0012] 일부 구현예에서, ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한 약학적 제형이 제시되며, 상기 제형은 유리 아미노산의 치료적 유효 조합, 및 임의로 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체, 완충제, 전해질, 보조제, 부형제, 또는 물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하되, 유리 아미노산은 아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및 글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 ARDS 또는 천식의 치료를 위해 폐에 전달되도록 제형화되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 대상체의 폐에서 체액 축적을 감소시키기에 충분하거나; 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 알러지성 비염의 치료를 위해 비강에 전달되도록 제형화되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 대상체의 비강에서 체액 축적을 감소시키기에 충분하다.

[0013] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산은 아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및 글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 또는 아스파라긴의 유리 아미노산 중 적어도 하나 또는 이들의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다.

[0014] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다.

[0015] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및 트립토판, 티로신, 시스테인, 또는 아스파라긴의 유리 아미노산 중 적어도 하나, , 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다.

[0016] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 멸균 상태이다.

[0017] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는 0.1 mM 내지 30 mM 또는 0.5 mM 내지 30 mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 약학적 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는 0.1 mM 내지 15 mM 또는 0.5 mM 내지 15 mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 약학적 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는 0.1 mM 내지 10 mM 또는 0.5 mM 내지 10 mM의 범위이다.

[0018] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형의 pH는 2.5 내지 8.0, 3.0 내지 8.0, 3.5 내지 8.0, 4.0 내지 8.0, 4.5 내지 8.0, 4.5 내지 6.5, 5.5 내지 6.5, 5.0 내지 8.0, 5.5 내지 8.0, 6.0 내지 8.0, 6.5 내지 8.0, 7.0 내지 8.0, 또는 7.5 내지 8.0의 범위이다.

[0019] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM이고; 리신의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM이고; 글루타민의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM이고; 트립토판의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM이고; 티로신의 농도는 0.1 mM 내지 1.2 mM의 범위; 0.4 mM 내지 1.2 mM의 범위; 0.6 mM 내지 1.2 mM의 범위; 0.8 mM 내지 1.2 mM의 범위이거나; 1.2 mM이고; 시스테인의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM이고; 아스파라긴의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM이고; 트레오닌의 농도는 4 mM 내지 10 mM의 범위; 6 mM 내지 10 mM의 범위; 7 mM 내지 9 mM의 범위; 7.2 mM 내지 8.8 mM의 범위이거나; 8 mM이거나; 이들의 임의의 조합이다.

[0020] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 약학적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 티로신, 및

트립토판은 8 mM의 농도로 존재한다.

- [0025] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 약학적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 트레오닌, 및 티로신, 및 임의로 아스파라긴의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 트레오닌, 및 티로신의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트레오닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.1 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재한다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트레오닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.8 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재한다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 리신은 8 mM의 농도로 존재하고, 트립토판은 8 mM의 농도로 존재하고, 트레오닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 티로신은 1.2 mM의 농도로 존재한다.
- [0026] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 약학적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 트레오닌, 및 글루타민, 및 임의로 아스파라긴의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 트레오닌, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트레오닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재한다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트레오닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재한다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 리신은 8 mM의 농도로 존재하고, 트립토판은 8 mM의 농도로 존재하고, 트레오닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 글루타민은 8 mM의 농도로 존재한다.
- [0027] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 약학적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 티로신, 및 글루타민, 및 트레오닌, 및 임의로 아스파라긴의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 티로신, 글루타민, 및 트레오닌의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.1 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하고, 트레오닌은 6 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재한다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 리신은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트립토판은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 티로신은 0.8 mM 내지 1.2 mM 범위의 농도로 존재하고, 글루타민은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재하고, 트레오닌은 7.2 mM 내지 8.8 mM 범위의 농도로 존재한다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아르기닌은 8 mM의 농도로 존재하고, 리신은 8 mM의 농도로 존재하고, 트립토판은 8 mM의 농도로 존재하고, 티로신은 1.2 mM의 농도로 존재하고, 글루타민은 8 mM의 농도로 존재하고, 트레오닌은 8 mM의 농도로 존재한다.
- [0028] 일부 구현예에서, 약학적 제형은 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체, 완충액, 전해질, 보조제, 부형제, 또는 물, 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함한다.
- [0029] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산 중 적어도 하나 또는 유리 아미노산의 각각은 L-아미노산을 포함한다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 아미노산 모두는 L-아미노산이다.
- [0030] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 폐, 흡입, 또는 비강 경로에 의해 투여되도록 제형화된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 흡입에 의해 투여되거나 비강 투여되도록 제형화된다.
- [0031] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물이다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 포유동물은 인간, 고양이, 개, 돼지, 말, 소, 양, 또는 염소이다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 인간은 유아(baby)이다.

- [0032] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 대상체는 코로나바이러스 감염증 2019(COVID-19) 환자이다.
- [0033] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 ARDS 또는 천식에 걸린 대상체의 폐에서 과도한 체액 축적을 감소시켜, ARDS 또는 천식과 연관된 적어도 하나의 증상을 감소시킨다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 알리지성 비염에 걸린 대상체의 비강에서 과도한 체액 축적을 감소시켜, 알리지성 비염과 연관된 적어도 하나의 증상을 감소시킨다. 과도한 체액 축적의 감소는 부분적으로 ENaC 활성의 증가로 인한 것이다.
- [0034] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 ARDS, 천식, 또는 알리지성 비염의 치료에 사용하기 위한 것이다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 폐, 흡입, 또는 비강 경로 중 적어도 하나에 의해 투여된다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 흡입 또는 비강 경로에 의해 투여된다.
- [0035] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 ARDS, 천식, 또는 알리지성 비염을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 것이다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 의약은 폐, 흡입, 또는 비강 경로 중 적어도 하나에 의해 투여될 수 있다. 약학적 제형의 일부 구현예에서, 의약은 흡입 또는 비강 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0036] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 ARDS, 천식, 또는 알리지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하기 위한 방법에 사용되며, 상기 방법은 본원에 기술된 약학적 제형 중 적어도 하나를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 투여하는 단계는 폐에서 체액 축적을 감소시켜 대상체에서 ARDS 또는 천식과 연관된 적어도 하나의 증상을 감소시키거나, 상기 투여하는 단계는 대상체의 비강에서 체액 축적을 감소시켜 대상체에서 알리지성 비염과 연관된 적어도 하나의 증상을 감소시킨다.
- [0037] 상기 방법의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 폐, 흡입, 또는 비강 경로를 통해 투여된다. 상기 방법의 일부 구현예에서, 약학적 제형은 흡입 또는 비강 투여에 의해 투여된다.
- [0038] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 다음과 같은 유리 아미노산의 조합 및 임의로 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체, 완충제, 전해질, 보조제, 부형제, 또는 물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 약학적 제형이 제공된다: 아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및 글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는 유리 아미노산.
- [0039] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 다음과 같은 유리 아미노산의 치료적 유효 조합을 포함하는 약학적 제형이 제공된다: 아르기닌 및 리신의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및 글루타민, 트립토판, 티로신, 시스테인, 또는 아스파라긴의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는 유리 아미노산.
- [0040] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 다음과 같은 유리 아미노산의 조합을 포함하는 약학적 제형이 제공된다: 아르기닌, 리신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량; 및 트립토판, 티로신, 시스테인, 아스파라긴, 또는 트레오닌의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되는 유리 아미노산.
- [0041] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 티로신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다.
- [0042] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 글루타민, 시스테인, 및 아스파라긴의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다.
- [0043] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 트립토판, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다.
- [0044] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 티로신, 및 글루타민의 유리 아미노산의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다.
- [0045] 약학적 제형의 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약학적 제형 또는 본원에 기술된 약학적 제형을 포함하는 의약을 포함하는 장치가 제공되며, 상기 장치는 약학적 제형 또는 의약을 이를 필요로 하는 대상체의 폐 또는 비강 통로에 전달하도록 구성된다. 예시적인 이러한 장치는 흡입기, 네블라이저, 비강 분무 용기, 및 비강 점적 용기를 포함한다.
- [0046] 별도로 기술된 구현예의 모든 조합이 고려된다.

도면의 간단한 설명

[0047]

본 개시의 일부 구현에는 첨부된 도면을 참조하여 단지 예시로서 본원에 기술된다. 이제 도면을 구체적으로 참조하여, 도시된 구현에는 예시로서 그리고 본 개시의 구현예의 예시적인 논의를 위한 것임을 강조한다. 이와 관련하여, 도면과 함께 취해진 설명을 통해 본 개시의 구현예가 실시될 수 있는 방법이 당업자에게 자명해질 것이다.

도 1: 폐포 및 주변 미세모세관 상을 통해 SARS-CoV-2 감염증이 발병하여, 프로세스 중에 나트륨 채널 ENaC를 억제하는 것을 나타낸 개략도이다.

도 2: 상이한 농도의 IL-13이 존재할 때, 인간 기관지 상피 세포에서의 ENaC 전류. N = 6개 조직.

도 3: IL-12가 ENaC 전류를 최대로 감소시키는 데 걸리는 시간(N = 6개 조직).

도 4: IL-13이 ENaC 전류를 최대로 감소시키는 데 걸리는 시간. N = 6개 조직.

도 5a 및 5b: 투과성 삼입물 상에서 성장시키고 IL-13으로 4일 및 14일 동안 치료한 HBEC 세포. 도 5a. AAF01 (본원에서 AA-EC01로도 지칭됨)이 존재할 때, HBEC는 링거 용액에 비해 증가된 ENaC 전류를 나타냄. 도 5b. AAF01이 존재할 때, 부메타니드-민감성 음이온 전류는 링거 용액 중의 HBEC에 비해 감소하였다. N = 6개 조직.

도 6a 및 6b: AAF01은 IL-13으로 치료한 HBEC에서 염화물 분비를 감소시켰다. 도 6a. WT54 및 WT59의 기초 Jnet; 도 6b. 부메타니드 처리 후 WT54 및 WT59의 Jnet. AAF01은 IL-13 유도 Cl 분비를 정상으로 감소시킨다(0 일차).

도 7a~d: 20 ng의 IL-13으로 4일 및 14일 동안 치료한 완전히 분화된 일차 HBEC에서 벤자밀-민감성 전류(ENaC 활성화) 및 부메타나이드-민감성 전류(음이온 전류)에 선택 아미노산 제형이 미치는 효과. 평균 $\pm$ SEM; ANOVA (링거 대조군 대비 * $P < 0.05$ 임)(n = 3).

도 8a 및 8b: 20 ng의 IL-13으로 4일 및 14일 동안 치료했을 때 일차 HBEC에서 벤자밀-민감성 전류(ENaC 활성화) 및 부메타나이드-민감성 전류(음이온 전류)에 선택 아미노산 제형이 미치는 효과. 평균 $\pm$ SEM; ANOVA ($P < 0.05$)(n = 3).

도 9: 증가하는 농도의 TNF- α 에 7일 동안 노출시킨 후 인간 기관지 상피 세포에서의 ENaC 활성화. 인간 기관지 상피 세포(HBEC)를 상이한 농도(0.00005, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 또는 500ng/mL(배지))의 TNF- α 로 7일 동안 치료하였다.

도 10: 증가하는 농도의 IFN- γ 에 7일 동안 노출시킨 후 인간 기관지 상피 세포에서의 ENaC 활성화. HBEC를 IFN- γ (0.00005, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 또는 500 ng/mL(배지))로 7일 동안 치료하였다.

도 11: 증가하는 농도의 TGF- β 1에 7일 동안 노출시킨 후 인간 기관지 상피 세포에서의 ENaC 활성화. HBEC를 TGF- β 1(0.00005, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 또는 500 ng/mL(배지))로 7일 동안 치료하였다.

도 12: TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1에 7일 동안 노출시킨 후 인간 기관지 상피 세포에서의 ENaC 활성화에 선택 아미노산 제형이 미치는 효과. HBEC를 TNF- α (1.2 ng/mL(배지)), IFN- γ (0.875 ng/mL(배지)), 및 TGF- β 1 (2.6 ng/mL)로 7일 동안 치료하였다. 미처리 세포: 연령이 일치하는 정상적인 건강한 세포. 선택 "5AA 제형"(8 mM 아르기닌, 8 mM 리신, 8 mM 시스테인, 8 mM 아스파라긴, 8 mM 글루타민); NC(8 mM 아스파르트산, 8 mM 트레오닌, 8 mM 류신).

도 13a~13d: HBEC에서의 벤자밀-민감성 I_{sc} 및 TEER에 IFN- γ 가 미치는 투여량 의존적 및 시간 의존적 효과.

(13a) HBEC를 증가하는 농도의 IFN- γ (5×10^{-5} 내지 500 ng/mL)와 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 벤자밀-민감성 I_{sc} 에 IFN- γ 가 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자밀을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(Δ)을 계산하였다. (13b) HBEC를 증가하는 농도의 IFN- γ (5×10^{-5} 내지 500 ng/mL)와 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 IFN- γ 가 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. (13c) HBEC를 1 ng/mL IFN- γ 와 함께 16일 동안 인큐베이션한 후 벤자밀-민감성 I_{sc} 에 IFN- γ 가 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터를 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자밀을

첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (13d) HBEC를 1 ng/mL IFN- γ 와 함께 16일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 IFN- γ 가 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하고, 데이터를 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. 모든 값은 대조군에 대해 정규화한 것이고(0 ng/mL 사이토카인/0일차), 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다(군당 $n = 2$ 명의 공여자이고 $N = 2$ 개의 독립적인 실험임). 대조군과의 쌍 비교를 위해 만-휘트니 검정(Mann-Whitney test)으로 통계적 유의성을 검정하였다(* $P < 0.05$).

도 14a~14d: HBEC에서의 벤자민-민감성 I_{sc} 및 TEER에 TNF- α 가 미치는 투여량 의존적 및 시간 의존적 효과. (14a) HBEC를 증가하는 농도의 TNF- α (5×10^{-5} 내지 500 ng/mL)와 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 TNF- α 가 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (14b) HBEC를 증가하는 농도의 TNF- α (5×10^{-5} 내지 500 ng/mL)와 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 TNF- α 가 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. (14c) HBEC를 1 ng/mL TNF- α 와 함께 16일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 TNF- α 가 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터를 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (14d) HBEC를 1 ng/mL TNF- α 와 함께 16일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 TNF- α 가 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하고, 데이터를 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. 모든 값은 대조군에 대해 정규화한 것이고(0 ng/mL 사이토카인/0일차), 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다(군당 $n = 2$ 명의 공여자이고 $N = 2$ 개의 독립적인 실험임). 대조군과의 쌍 비교를 위해 만-휘트니 검정(Mann-Whitney test)으로 통계적 유의성을 검정하였다(* $P < 0.05$).

도 15a~15d: HBEC에서의 벤자민-민감성 I_{sc} 및 TEER에 IFN- γ 및 TNF- α 가 미치는 투여량 의존적 효과 및 IL-4가 미치는 시간 의존적 효과. (15a) HBEC를 각각 0.05, 0.5, 2.5, 5, 또는 10 ng/mL의 IFN- γ 및 TNF- α 와 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 IFN- γ 및 TNF- α 각테일이 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (15b) HBEC를 각각 0.05, 0.5, 2.5, 5, 또는 10 ng/mL의 IFN- γ 및 TNF- α 와 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 IFN- γ 및 TNF- α 각테일이 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. (15c) HBEC를 2 ng/mL IL-4와 함께 14일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 IL-4가 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터를 2, 4, 6, 8, 10, 12, 및 14일차에 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (15d) HBEC를 2 ng/mL IL-4와 함께 14일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 IL-4가 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터를 2, 4, 6, 8, 10, 12, 및 14일차에 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. 모든 값은 대조군에 대해 정규화한 것이고(0 ng/mL 사이토카인/0일차), 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다(군당 $n = 2$ 명의 공여자이고 $N = 2$ 개의 독립적인 실험임). 대조군과의 쌍 비교를 위해 만-휘트니 검정(Mann-Whitney test)으로 통계적 유의성을 검정하였다(* $P < 0.05$).

도 16a~16d: HBEC에서의 벤자민-민감성 I_{sc} 및 TEER에 IL-13이 미치는 투여량 의존적 및 시간 의존적 효과. (16a) HBEC를 증가하는 농도의 IL-13(0.1 내지 64 ng/mL)과 함께 14일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 IL-13이 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (16b) HBEC를 증가하는 농도의 IL-13(0.1 내지 64 ng/mL)과 함께 14일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 IL-13이 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. (16c) HBEC를 20 ng/mL IL-13과 함께 16일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 IL-13이 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터를 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (16d) HBEC를 20 ng/mL IL-13과 함께 16일

동안 인큐베이션한 후 TEER에 IL-13이 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터들 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. 모든 값은 대조군에 대해 정규화한 것이고(0 ng/mL 사이토카인/0일차), 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다(군 당 n = 2명의 공여자이고 N = 2개의 독립적인 실험임). 대조군과의 쌍 비교를 위해 만-휘트니 검정(Mann-Whitney test)으로 통계적 유의성을 검정하였다(* P < 0.05).

도 17a~17d: HBEC에서의 벤자민-민감성 I_{sc} 및 TEER에 TGF- β 1이 미치는 투여량 의존적 및 시간 의존적 효과.

(17a) HBEC를 증가하는 농도의 TGF- β 1(5×10^{-5} 내지 50 ng/mL)과 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 TGF- β 1이 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (17b) HBEC를 증가하는 농도의 TGF- β 1(5×10^{-5} 내지 50 ng/mL)과 함께 7일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 TGF- β 1이 미치는 투여량 의존적 효과를 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. (17c) HBEC를 1 ng/mL TGF- β 1과 함께 16일 동안 인큐베이션한 후 벤자민-민감성 I_{sc} 에 TGF- β 1이 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터들 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 및 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량(delta)을 계산하였다. (17d) HBEC를 1 ng/mL TGF- β 1과 함께 16일 동안 인큐베이션한 후 TEER에 TGF- β 1이 미치는 시간 의존적 효과를 분석하고, 데이터들 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16일차에 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액에 침지한 상태로 기록하였다. 모든 값은 대조군에 대해 정규화한 것이고(0 ng/mL 사이토카인/0일차), 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다(군 당 n = 2명의 공여자이고 N = 2개의 독립적인 실험임). 대조군과의 쌍 비교를 위해 만-휘트니 검정(Mann-Whitney test)으로 통계적 유의성을 검정하였다(* P < 0.05).

도 18a~18b: HBEC에서 벤자민 민감성 I_{sc} 및 TEER에 AA-EC01이 미치는 효과, 및 COVID-19-연관 ARDS에서 ENaC 및 면역 반응에 AA-EC01이 미치는 영향에 대한 개략도. (18a) HBEC를 20 ng/mL IL-13과 함께 14일 동안 인큐베이션한 후, 벤자민 민감성 I_{sc} 에 AA-EC01이 미치는 효과를 분석하였다. 유성 챔버에서 링거 용액, AA-EC01, 또는 AANC(음성 대조군)의 상단에 6 μ M의 벤자민을 첨가하기 전과 첨가한지 15분 후 사이의 I_{sc} 변량을 계산하였다. (18b) HBEC를 20 ng/mL IL-13과 함께 14일 동안 인큐베이션한 후, TEER에 AA-EC01이 미치는 효과를 분석하였다. TEER은 30분 후에 유성 챔버에서 링거 용액, AA-EC01, 및 AANC(음성 대조군)에 침지한 상태로 기록하였다. 모든 값은 대조군에 대해 정규화한 것이고(0 ng/mL IL-13), 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다(군 당 n = 2명의 공여자이고 N = 2개의 독립적인 실험임). 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 검정으로 군들 간의 유의성을 확인한 후, 쌍 비교를 위해 만-휘트니 검정을 사용하였다(* P < 0.05).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

개시된 이점 및 개선 사항 중에서, 본 개시의 다른 목적 및 이점은 첨부된 도면과 함께 취해진 다음의 설명으로부터 명백해질 것이다. 본 개시의 상세한 구현예가 본원에 개시되지만, 개시된 구현예는 다양한 형태로 구현될 수 있는 본 개시를 단지 예시하는 것임을 이해해야 한다. 또한, 본 개시의 다양한 구현예에 관해 주어진 각각의 실시예는 예시하고자 하는 것이며, 한정적이지 않다.

[0049]

ARDS는 COVID-19에서의 높은 사망률과 연관이 있다. ARDS는 폐포액 제거(ALC) 손상, 폐포-모세혈관 과투과성, 및 혈관 및 상피 누출을 동반하는 사이토카인 폭풍을 특징으로 하는데, 이는 단백질이 풍부한 체액을 폐 모세혈관으로부터 간질 및 폐포 공간으로 누출시켜 폐 부종을 야기한다. 정상적인 조건 하에서, 기도는 폐포 내강 및 폐포 격막 사이에 내장된 모세혈관 네트워크에 걸쳐 기체 교환을 용이하게 한다. ENaC는 전기발생 나트륨 흡수에 이어서 수동 수분 흡수를 매개하고, 점액 섬모 제거를 위해 최적의 수분 함량을 유지한다. 그러나, ENaC는 COVID-19 발병기전의 여러 단계에서 억제되고, 이로 인해 폐포에 체액이 축적된다. 산소 보충 및 인공호흡기 지지는 염증을 강화하고, 초과산화물과 과산화질산염의 형성을 유발하고, 산화 질소 생성효소(NOS) 언커플링(uncoupling)을 유발하며, ENaC를 포함하는 장벽과 수송 단백질을 손상시킨다.

[0050]

상기 이벤트의 캐스케이드는 도 1에 개략적으로 도시되어 있다. SARS-CoV-2에 의한 ENaC 활성의 억제는 다음 단계에서 발생한다: 1) 바이러스의 단백질분해 활성화에 필수적이고, 궁극적으로 COVID-19 확산 및 발병기전에 필수적인 숙주 세포 인자인 막관통 프로테아제 세린 S1 구성원 2(TMPS2), 2) 안지오텐신 전환 효소(ACE) 및 레닌 안지오텐신 시스템(RAS)을 상향 조절하는 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2); 3) ACE 및 RAS 활성화에 부차적이

고, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-10, IP-10, IL-13, MCP-1, IL-2, IL-4, GCSF IP-10, 및 MIP-1A의 수준을 증가시키는 사이토카인 폭풍; 4) 폐포 내로 체액을 누출시켜 기체 교환을 감소시키는 상피 및 내피 장벽의 파괴; 및 5) 염증에 부차적이고 폐포 내에서 국지적으로 산소를 증가시키는 NOS의 언커플링.

[0051] ARDS에 사용할 수 있는 유일한 치료법은 보충용 산소 장치 및 부중액으로 채워진 폐포 공간을 통해 더 많은 산소를 용해시키고 혈액-공기-장벽에서 이용 가능한 산소를 증가시키는 산소호흡기를 사용하는 것이다. 그러나, 보충용 산소 장치 및 산소호흡기 지지는 염증을 강화하고, eNOS 언커플링, 초과산화물 형성, 과산화질산염(ONOO-) 증가, 및 다양한 세포 단백질(ENaC와 같은, 상피 및 주변 혈관구조 내의 막 결합 단백질 포함)의 시스템인 잔기의 비가역적 질화를 촉진한다. 예를 들어 수송 및 세포내 및 세포간 구조적 무결성과 같은 필수 세포 기능에 기여하는 ENaC 및 기타 세포 단백질에 대한 손상은 폐 조직 무결성에 악영향을 미치는 추가의 손상을 생성한다.

[0052] 산소 보충 요법 및 기계식 환기로 치료를 받는 COVID-19 환자에서의 높은 사망률은 위에 개략한 손상의 캐스케이드와 연관이 있을 수 있다. 실제로, 이들 환자의 사망률은 65% 내지 94%의 범위이며, 이는 SARS-CoV-2 환자에 대한 산소호흡기 사용의 장점에 대한 논쟁을 촉발시켰다. 또한, COVID-19-매개 ARDS를 앓고 있는 대상체의 결과가 다른 원인으로 인해 ARDS에 걸린 대상체의 결과보다 훨씬 더 나쁘다는 점은 주목할 만하다.

[0053] 본 발명자들은 ARDS를 해결하기 위한 잠재적 치료 요법을 조사하기 위한 검정법을 개발하였고, ARDS, 특히 COVID-19 환자/대상체를 대상으로 한 ARDS 치료의 어려움을 해결하기 위한 모델 시스템을 개발하였다. 따라서, 본원에 기술된 모델 시스템은, COVID-19와 연관이 있는지 또는 COVID-19와 독립적인지 여부와 상관없이, ARDS와 연관된 유의한 임상 문제를 해결하고, 본원에 기술된 것들과 같은 아미노산 제형을 제공함으로써 이러한 임상 문제에 대한 해결책을 제시하도록 설계되었다. 먼저 이러한 임상 문제를 해결하기 위해 사용된 시험관 내 모델 시스템으로 돌아가서, 본 발명자들은 다양한 염증성 촉진제에 노출된 분화된 일차 인간 기관지 상피 세포(HBEC)를 사용하여 ARDS의 특징을 재현하였다.

[0054] 모델 시스템의 일부 구현예에서, 본 발명자들은 분화된 HBEC를 IL-13 노출시키는 것이 ENaC의 억제 및 장벽 기능의 손상을 초래한다는 것을 보여주었다. 따라서, 본 발명자들은 이러한 발견에 기초하여, ARDS의 이러한 특징이 ARDS에 걸린 대상체/환자의 폐에서 관찰된 것과 유사한 정도로 재현되는 실험 시스템을 개발하였다.

[0055] 본원에 기술된 IL-13에 노출된 분화된 HBEC를 포함하는 개발된 실험 시스템을, 다양한 아미노산 제형이 ENaC 활성을 증가시키고 장벽 기능을 개선하는 데 미치는 효과를 평가하기 위한 모델 시스템으로서 사용하였다. 이러한 모델 시스템을 사용하여 복수의 아미노산 제형을 식별하고, 이들이 (ENaC 전류를 증가시키는 이들의 능력에 의해 측정했을 때) ENaC 수송 단백질 활성을 증가시키고 장벽 기능을 개선하는 능력에 기초하여 특성화하였다. 아래 표 1 및 2 참조. 이러한 예시적인 제형은 5개의 아미노산 제형(AAF01)이다. 본원에 나타낸 바와 같이, AAF01은 14일 동안 IL-13으로 치료한 HBEC에서 ENaC 전류를 증가시키고, 음이온 전류를 감소시키고, 장벽 기능을 개선하였다. AAF01을 선택한 것은 염화물 분비를 감소시키고 장벽 기능을 개선하는 이의 능력에 적어도 부분적으로 기인한다.

[0056] 이러한 발견은 본원에 기술된 AAF01 및 다른 예시적인 아미노산 제형이 COVID-19에 걸린 대상체, 특히 ARDS의 적어도 하나의 증상을 나타내는 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다는 증거를 제공한다. 본원에 기술된 AAF01 및 다른 예시적인 아미노산 제형은 Th2 사이토카인(예를 들어 IL-4 및 IL-13)이 중요한 역할을 하는 병태인 천식 또는 알러지성 비염을 앓고 있는 대상체를 치료하는 데에도 사용될 수 있다. 본원에 제시된 결과에 기초하여, 본원에 기술된 AAF01 및 다른 예시적인 아미노산 제형은 ENaC 활성을 증가시키고 폐포액 제거를 개선하는 이들의 능력을 통해 적어도 부분적으로 작용할 수 있다.

[0057] 본원에 제시된 결과는 다음을 입증한다:

[0058] - AAF01이 아밀로라이드/벤자민-민감성 ENaC 전류를 증가시킴

[0059] - AAF01이 ENaC 단백질 수준을 증가시킴

[0060] - AAF01이 NHE3 단백질 수준을 증가시킴(ENaC 독립적 나트륨 흡수)

[0061] - AAF01이 밀착 접합부 단백질(tight junction protein) 수준 및 기능을 증가시킴

[0062] - AAF01은 COVID와 연관된 ARDS 및 다른 형태의 폐렴뿐만 아니라 천식 및 알러지성 비염의 치료에도 사용될 수 있음.

[0063] - AAF01은 네블라이저, 흡입기, 또는 비강 분무기에 의해 전달되는 것과 같은 에어로졸화된 형태를 포함하되 이에 한정되지 않는 다양한 수단을 통해 전달될 수 있음.

[0064] - AAF01은 SARS-CoV-2, 천식, 및/또는 알러지성 비염의 치료에 사용되는 다른 제제와 병용으로 사용됨.

[0065] 본원에 제시된 결과에 기초하여, AAF01, AAF03, 및 AAF07을 ARDS를 치료하기 위한 예시적인 제형으로서 선택하였는데, 그 이유는 적어도 부분적으로, 제형의 각각이 호흡곤란의 특징을 재현하는 본원에 기술된 모델 시스템에서 ENaC 활성을 증가시키기 때문이다. AAF01, AAF03, 및 AAF07의 각각은, 과도한 폐포액 축적을 포함하여 ARDS 또는 천식에서 관찰된 것과 같은 호흡곤란의 특징을 재현하는 본원에 기술된 모델 시스템에서 염화물 분비를 감소시키고/시키거나 장벽 투과성을 감소시키는 이들의 능력으로 인해 예시적인 제형으로서 선택되었다. 염화물 분비를 감소시키고/시키거나 장벽 투과성을 감소시키는 능력도 AAF01, AAF03, 및 AAF07 각각이, 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체의 비강에서 과도한 체액 축적을 감소시킴으로써, 알러지성 비염을 치료하기 위한 치료 제형으로서의 역할을 할 수 있게 하였다.

표 1

AAF07	AAF01*	AAF03
리신	리신	리신
아르기닌	트립토판	트립토판
티로신	아르기닌	아르기닌
글루타민	티로신	글루타민
	글루타민	

* AAF01(본원에서 AA-EC01 로도 지칭됨)

[0066]

표 2

AAF02	AAF04	AAF05	AAF06
리신	리신	리신	리신
트립토판	트립토판	트립토판	트립토판
아르기닌	아르기닌	아르기닌	아르기닌
	트레오닌	트레오닌	트레오닌
	티로신	글루타민	티로신
			글루타민

[0067]

[0068] 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형[예: AAF01, AAF03, AAF07, 및 선택 5AA 제형(아르기닌, 리신, 시스테인, 아스파라긴, 및 글루타민)]은 ARDS, 천식 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는데 유용하다. ARDS 또는 천식은 폐포액 축적과 연관이 있을 수 있으므로, 폐포액 제거를 개선함으로써 증상을 완화시킬 수 있다. 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형은 증가된 나트륨 및 체액 흡수에 의해 반영되는 것과 같이, 적어도 부분적으로 ENaC 기능을 상향조절하는 것에 의해 폐포액 제거를 개선한다. 따라서, 본원에 기술된 아미노산 제형은 폐포액 제거가 요구되는 ARDS 또는 천식을 치료하는 데 사용하도록 제시된다. ARDS 또는 천식을 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 기술된 아미노산 제형은 단독으로 사용되거나 이들 장애 각각을 치료하는 데 사용되는 적어도 하나의 다른 활성 약학적 성분(API)과 병용으로 사용될 수 있다. 폐포액 제거를 개선할 수 있는 특성은 ARDS 또는 천식을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형의 유용성을 강조하는데, 여기서 이러한 의약은 폐포액 제거를 개선함으로써, 이들 장애에 걸린 대상체에서 증상을 완화시킨다. 본원에 기술된 아미노산 제형은 의약 중 유일한 API일 수 있거나, ARDS 또는 천식을 치료하는 데

사용되는 적어도 하나의 다른 API와 조합하여 존재할 수 있다. 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형은, 폐포액 축적과 연관된 ARDS 또는 천식을 앓고 있고 이의 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에도 사용될 수 있다. ARDS 또는 천식을 치료하기 위한 방법은 본원에 기술된 아미노산 제형을 단독으로 투여하거나 ARDS 또는 천식을 치료하기 위해 사용되는 적어도 하나의 다른 API와 병용으로 투여하는 단계를 필요로 할 수 있다.

[0069] 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형(예: AAF01, AAF03, AAF07, 및 선택 5AA 제형)은 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 데 유용하다. 알러지성 비염은 비강 내 과도한 체액과 연관이 있으므로, 비강으로부터 체액 제거를 개선함으로써 증상을 완화시킬 수 있다. 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형은 증가된 나트륨 및 체액 흡수에 의해 반영되는 것과 같이, 적어도 부분적으로 ENaC 기능을 상향조절하는 것에 의해 부비강 및/또는 비강으로부터 체액 제거를 개선한다. 따라서, 본원에 기술된 아미노산 제형은 알러지성 비염의 치료에 사용하도록 제시된다. 알러지성 비염의 치료에 사용하기 위한 본원에 기술된 아미노산 제형은 단독으로 사용되거나 알러지성 비염을 치료하는 데 사용되는 적어도 하나의 다른 API와 병용으로 사용될 수 있다. 비강으로부터 체액 제거를 개선할 수 있는 특성은 과도한 비강 분비물을 감소시키는 것이 바람직한 알러지성 비염을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형의 유용성을 강조한다. 본원에 기술된 아미노산 제형은 의약 중 유일한 API일 수 있거나, 알러지성 비염을 치료하는 데 사용되는 적어도 하나의 다른 API와 조합하여 존재할 수 있다. 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형은 알러지성 비염을 앓고 있고 이의 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하기 위한 방법에도 사용될 수 있다. 알러지성 비염을 치료하기 위한 방법은 본원에 기술된 아미노산 제형을 단독으로 투여하거나 알러지성 비염을 치료하기 위해 사용되는 적어도 하나의 다른 API와 병용으로 투여하는 단계를 필요로 할 수 있다.

[0070] 일부 구현예에서, 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는 0.1 mM 내지 30 mM 또는 0.5 mM 내지 30 mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는 0.1 mM 내지 15 mM 또는 0.5 mM 내지 15 mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는 0.1 mM 내지 10 mM 또는 0.5 mM 내지 10 mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는, 0.1 내지 1.2 mM, 0.5 내지 1.2 mM, 0.6 내지 1.2 mM, 또는 0.8 내지 1.2 mM(예를 들어 약 1.2 mM)의 범위인 티로신을 제외하고는, 4 mM 내지 12 mM, 5 mM 내지 12 mM, 6 mM 내지 12 mM, 4 mM 내지 10 mM, 5 mM 내지 10 mM, 6 mM 내지 10 mM, 4 mM 내지 9 mM, 5 mM 내지 9 mM, 또는 6 mM 내지 9 mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 제형에 존재하는 유리 아미노산 각각의 농도는, 0.8 내지 1.2 mM(예를 들어 약 1.2 mM)의 범위인 티로신을 제외하고는, 7 mM 내지 9 mM(예를 들어 약 8 mM)의 범위이다. 일부 구현예에서, 제형은 다음과 같은 AAF01(본원에서 AA-EC01로도 지칭됨)이다: 8 mM 리신, 8 mM 트립토판, 8 mM 아르기닌, 8 mM 글루타민, 및 1.2 mM 티로신.

[0071] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제형의 pH는 2.5 내지 8.0, 3.0 내지 8.0, 3.5 내지 8.0, 4.0 내지 8.0, 4.5 내지 8.0, 4.5 내지 6.5, 5.5 내지 6.5, 5.0 내지 8.0, 5.5 내지 8.0, 6.0 내지 8.0, 6.5 내지 8.0, 7.0 내지 8.0, 또는 7.5 내지 8.0의 범위이다.

[0072] 제형이 네블라이저를 통해 전달되는 일부 구현예에서(흡입물 또는 현탁액), 제형의 pH는 4.5 내지 6.5의 pH 범위일 수 있으며, 이는 대상체가 투여에 반응하여 재채기를 하는 경향을 감소시킨다.

[0073] 제형이 비강 스프레이 또는 비강 분무기를 통해 전달되는 일부 구현예에서, 제형의 pH는 4.5 내지 6.5의 pH 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 제형의 pH는 5.5 내지 6.5의 pH 범위일 수 있다. 상업적으로 이용 가능한 비강 스프레이 제품은 일반적으로 3.5 내지 7.0 범위의 pH를 갖는다. 비강 상피의 pH는 일반적으로 5.5~6.5의 범위이다. 인간 비강의 평균 베이스라인 pH는 약 6.3이다.

[0074] 일부 구현예에서, 투여량/스프레이 퍼핑(좌측 및 우측 콧구멍): 효능 <5 mg/투여량; 부피 최대 100 μ l/스프레이 퍼핑: 용해도 >50 mg/ml; 용액 중 약물: pH 약 5.5, 오스몰농도 290~500 mosm/kg.

[0075] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제형은, 예를 들어 적절한 식염수 용액으로 비강 세척을 통해 전달된다. 적절한 식염수 용액은 상업적으로 이용 가능하거나 대안적으로 가정에서 만들 수 있다. 적절한 식염수 용액은 1/4 내지 1/2 티스푼의 요오드 미첨가 식염과 한 꼬집의 베이킹 소다를 녹인 1~2컵의 미온수(예를 들어 증류수, 멸균수, 또는 끓인 물)를 포함할 수 있다.

[0076] 도포 장치: 비강 투여용으로 의도된 제형(예를 들어 세척액, 점적, 분출 시스템, 스프레이)의 의도된 용도 및 약학적 형태는 사용될 수 있는 도포 장치를 필요로 한다. 투여량(보통 부피/퍼핑은 100 μ l에 불과함), 투여 옵션(한 번 또는 여러 번), 대상체(소비자, 의료 전문가, 환자, 아동, 노인 개체), 및 대상체의 건강 상태 또한 도포 장치의 선택에 영향을 미친다. 경점막 비강 전달 및 흡수는 위장 손상 및 간 초회 통과 대사(first-pass

metabolism)를 피할 수 있다는 점에서 유익하다.

- [0077] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제형은 병원균(예: SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응의 단계를 해결하도록 순차적으로 사용된다. 따라서, 질환이 초기에서 후기 단계로 진행함에 따라 초기 단계 질환을 치료하는 데 적합한 아미노산 제형은 후기 단계 질환을 치료하는 데 적합한 아미노산 제형으로 대체된다. 일부 구현예에서, 선천 면역(예: IFN- γ) 및/또는 Th1 세포 반응(예: TNF- α)의 특징인 사이토카인의 병리학적 결과에 대항하는 제형은 병원균 또는 (예를 들어 만성 또는 급성) 병에 대한 면역 반응의 초기 단계에서 투여된다. 선천 면역 및/또는 Th1 세포 반응의 특징인 사이토카인의 병리학적 결과에 대항하기 위한 예시적인 제형은 제1 제형을 포함하며, 이러한 제1 제형은 유리 아미노산의 치료적 유효 조합을 포함하고, 치료적 유효 조합은: 아르긴 및 리신의 치료적 유효량; 및 시스테인, 아스파라긴, 또는 글루타민의 유리 아미노산 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 이러한 면역 반응은 병원균, 예컨대 SARS-CoV-2에 자리잡은 것들에 의해 야기된 호흡기 질환에 대한 초기 면역 반응에서 관찰된다. 예를 들어 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응은 시간 경과에 따라 진행되므로, 사이토카인 발현 패턴은 Th2 세포 반응(예를 들어 IL-4 및 IL-13)의 해당 특성에 맞게 바뀔 수 있다. Th2 세포 반응에 대한 면역 반응이 진행된 후, 예시적인 아미노산 제형(예를 들어 AAF01, AAF03, 또는 AAF07)을 포함하는 제2 제형을 사용해 제1 제형을 대체할 수 있다. 본원에 제시된 증거는, 예를 들어 AAF01(본원에서 AA-EC01로도 지칭됨)이 적어도 부분적으로 ENaC 활성을 회복시킴으로써 Th2형 사이토카인의 병리학적 결과를 해결하기에 치료적으로 적합하다는 것을 입증한다.
- [0078] 본원에 제시된 결과에 기초하여, 치료 요법은 적어도 부분적으로 ENaC 활성을 회복함으로써 선천 면역 및/또는 Th1 세포의 특징인 사이토카인의 병리학적 효과에 대항하는 제1 아미노산 제형 및 이어서 적어도 부분적으로 ENaC 활성을 회복함으로써 Th2 세포의 특징인 사이토카인의 병리학적 효과에 대항하는 제2 아미노산 제형을 포함할 수 있다. 제1 및 제2 아미노산 제형은 순차적으로 및 별도로 투여하거나, 중첩 투여와 병행하여 순차적으로 투여할 수 있으며, 이 경우 제1 아미노산 제형의 양을 점진적으로 테이퍼링하고 제2 아미노산 제형만이 투여될 때까지 제2 아미노산 제형을 증가하는 양으로 첨가할 수 있다. 제1 및 제2 아미노산 제형의 투여 시기는 임상 징후 및 증상의 출현에 기초하여 담당의에 의해 결정될 수 있다.
- [0079] 일부 구현예에서, 대상체를 평가하여 대상체가 주된 면역 반응이 선천 면역 및/또는 Th1 세포의 특징인 사이토카인의 생성 또는 Th2 세포의 특징적인 사이토카인의 생성을 포함하는 면역 반응을 나타내는지; 또는 초기 면역 반응이 선천 면역 및/또는 Th1 세포의 특징인 사이토카인의 생성을 포함하고, Th2 세포의 특징적인 사이토카인의 생성을 포함하는 면역 반응이 이어지는 면역 반응을 나타내는지 여부를 결정할 수 있다. 이러한 평가는 아미노산 제형을 대상체의 유전자, 병태, 환경, 및 생활 방식에 맞게 맞춤화함으로써 정밀한 약물 치료를 용이하게 하는 데 사용될 수 있다.
- [0080] 전술한 바에 더하여, 본원에 제시된 실시예 및 도면에 상술된 바와 같이, ENaC 활성 및 장벽 기능에 사이토카인 유도성 염증이 미치는 영향을 분석하였다. 본원에 기술된 바와 같이, ENaC는 상피 체액층을 유지하는 데 있어서 중요하다. TNF- α , TGF- β , IFN- γ , 및 IL-6과 같은 일부 사이토카인은 고농도일 때 폐 손상 및 ARDS와 밀접한 연관성이 있으며, 본원에 나타난 바와 같이 ENaC 활성 및 기능을 감소시켜 COVID-19 환자의 기도로부터 체액이 제거되는 것을 방해한다. 질환의 병인과 진행에 이들 사이토카인이 미치는 영향을 분석하기 위해, 본 발명자들은 정상 인간 기관지 상피 세포를 3개 사이토카인(TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ)의 각테일에 7일 동안 노출시켜 이들이 ENaC 활성에 미치는 영향을 분석하고, 이어서 증가된 사이토카인 수준이 ENaC 기능에 미치는 부작용을 역전시키는 아미노산 제형을 선택하였다. 도 9 내지 도 12 참조. 예를 들어, 도 9는 TNF- α 의 농도가 증가함에 따라 ENaC 전류가 감소하였음을 보여준다. 도 10은, 예를 들어 더 낮은 농도의 IFN- γ (0.00005 내지 0.05 ng/mL (배지))로 세포를 치료했을 때 ENaC 전류가 증가하였음을 보여준다. ENaC 전류는 더 높은 수준의 IFN- γ 에 노출될 때 베이스라인 수준(미처리)으로 복귀하였지만, 더 높은 농도의 IFN- γ (>0.05 ng/mL 배지)로 세포를 치료했을 때 베이스라인 대비 감소하였다. 예를 들어, 도 11은 TGF- β 1의 농도가 증가함에 따라 ENaC 전류가 감소하였음을 보여준다.
- [0081] 예를 들어, 도 12는 HBEC를 TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1(사이토카인 각테일)에 7일 동안 노출시키는 것이 HBEC를 사이토카인 각테일에 노출시키지 않은 것(미처리)에 비해 ENaC 활성(비히클)을 상당히 감소시켰음을 보여준다. 도 12에 사용된 바와 같이, 용어 “비히클”은 AA를 도입하여 5AA 제형 및 NC 제형을 생성한 용액으로서, AA 제형에 대한 음성 대조군의 역할을 하는 용액을 지칭한다. 도 12에 도시된 바와 같이, 선택 5AA 제형(AA; 아르기닌, 리신, 시스테인, 아스파라긴, 및 글루타민)은, 미처리 세포와 비교했을 때, TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1에 노출된 HBEC에서 ENaC 활성을 유의하게 회복시켰다. 일부 구현예에서, 8 mM 아르기닌, 8 mM 리신, 8 mM 시스테인, 8 mM 아스파라긴, 및 8 mM 글루타민을 포함하는 선택 5AA 제형은, 미처리 세포와 비교했을 때, TNF- α ,

IFN- γ , 및 TGF- β 1에 노출시킨 HBEC에서 ENaC 활성을 유의하게 회복시켰다. NC 제형(아스파르트산, 트레오닌, 및 류신)은 ENaC 활성의 사이토카인-유도성 감소를 개선하지 않았다. 실제로, NC 제형은 사이토카인 콕테일과 비히클에 노출시킨 HBEC에 비해 사이토카인 콕테일에 노출시킨 HBEC에서 ENaC 활성을 추가로 감소시켰다.

[0082] 본원에서 전술한 바와 같이, ARDS는 코로나바이러스 감염병-19(COVID-19) 및 기타 바이러스 폐 감염증의 흔한 호흡기 징후이다. ARDS는 폐 부종, 환기 부족, 및 산소 포화도 감소를 유발하는 폐포액 제거(AFC) 손상으로 인한 것이다. 정상적인 상황 하에서, 섬모액(약 7 μ m)과 점액의 박층으로 이루어진 기도 표면액(ASL)는 약 75 m² 표면적에 걸쳐 존재하는 600 mL의 유체에 기여하고, 기도에서 먼지와 다른 이물질을 제거하는 점액 섬모 기능을 용이하게 한다. 꼭지면 음이온 채널 활성화와 ENaC에 의한 재흡수의 복잡한 상호작용은 수동적 수분 이동을 위한 삼투 구배를 생성하고 AFC를 유지한다. 예를 들어 인플루엔자 바이러스 감염증에서 관찰된 바와 같이, ENaC 기능 감소는 활성 바이러스 복제를 넘어 지속되는 AFC 감소를 야기한다. 장벽 파괴는 폐 미세혈관 모세관으로부터 폐포로 단백질이 풍부한 체액의 삼출을 촉발하여, 비식상성 폐 부종을 유발하고 AFC를 심각하게 손상시키는 유리질 막을 형성한다.

[0083] ENaC 및 장벽 기능은 COVID-19 발병기전의 여러 단계에서 영향을 받는다. SARS-CoV-2가 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)에 결합하여 숙주 세포에 진입하는 능력에 기여하는 2형 막관통 세린 프로테아제(TMPS2), 디스인테그린 및 메탈로펩티다아제 도메인 17(ADAM17) 또한 ENaC 기능을 억제한다. 도 1 참조. ACE2에 대한 SARS-CoV-2의 결합은 ACE2 수준을 감소시켜, 안지오텐신 II(Ang II) 및 키닌이 상승으로 인한 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템(RAAS)과 조직 칼리크레인-키닌 시스템(KKS) 간의 불균형을 야기한다. Ang II 및 키닌은 ENaC 기능을 직접적으로 및 TNF- α 및 IL-6을 포함하는 전염증성 사이토카인의 방출을 통해 억제한다. SARS-CoV-2 감염증에서, 바이러스 연관 분자 패턴은 패턴 인식 수용체(PRR)에 의해 잘 인식되지 않아 I형 인터페론(IFN) 생산과 바이러스 제거가 감소된다. 대식세포 기능 및 IFN- γ 활성화에 대한 I형 IFN이 미치는 억제 효과는 감소되고, 이는 낮은 수준의 IFN- γ 의 초기 방출과 지속 방출로 이어진다. 이러한 변경된 IFN- γ 반응은 M1의 초기 분극화를 촉진하고, M2 활성화에 미치는 억제 효과를 무력화하여 Th1형 및 Th2형 면역 반응의 개선되고 지속적인 자극을 개시한다. 환자에서의 임상 합병증은, 시간 경과에 따라 COVID-19의 특징인 사이토카인 폭풍 유발을 증폭시키는 선천 면역 반응과 적응 면역 반응이 지속되는 것에 기인한다.

[0084] HBEC에서 벤자민 민감성 전류와 TEER의 높은 개별 변이. 유상 챔버 기반 실험 설계에서, 공기-액체 계면에 있는 스냅웰 상에서 28일 내지 35일 동안 성장시킨 2개의 폐 공여자 유래의 분화된 HBEC를 대상으로 기저 단락 전류(I_{sc})와 경피 전기 저항(TEER)을 기록하였다. 6 μ M 벤자민을 세포의 꼭지면에 첨가한 후 15분 후에 발생하는 I_{sc} 의 변화로부터 벤자민-민감성 I_{sc} 를 계산함으로써, 강력한 ENaC 차단제인 벤자민을 사용하여 ENaC 활성을 결정하였다. 연령이 일치하는 HBEC의 벤자민-민감성 I_{sc} ($38 \pm 2.6 \mu A \cdot cm^{-2}$, $25.7 \pm 2.2 \mu A \cdot cm^{-2}$; $P < 0.01$, $n = 10$) 및 기저 TEER($130.5 \pm 6.8 \text{ 오옴} \cdot cm^2$, $177.7 \pm 16 \text{ 오옴} \cdot cm^2$; $P < 0.03$, $n = 10$)은 두 공여자 간에 유의하게 상이하였다. 따라서, 도 13 내지 도 18과 관련된 통계적 분석을 위해 모든 후속 실험에 정규화된 데이터를 사용하였다.

[0085] IFN- γ 는 투여량 및 시간 의존적 방식으로 ENaC 활성 및 상피 장벽을 변경시켰다. IFN은 선천 면역 반응 동안 중심적인 역할을 하며, 바이러스 감염에 대한 1차 방어선이다. II형 IFN 계열의 구성원으로서, IFN- γ 는 강력한 항바이러스 활성을 가지며, ENaC 활성 및 장벽 기능에 미치는 효과를 알아내기 위해 이를 사용하였다. HBEC를 상이한 농도의 IFN- γ 와 함께 7일 동안 인큐베이션함으로써, 벤자민-민감성 I_{sc} 및 TEER에 IFN- γ 가 미치는 투여량 의존적 효과를 측정하였다. 흥미롭게도, IFN- γ 에 대한 노출은 매우 낮은 농도(5×10^{-4} ng/mL)에서 베이스라인 값의 $161.62 \pm 9.7\%$ ($P < 0.04$)까지 벤자민-민감성 I_{sc} 를 증가시켰지만, IFN- $\gamma > 20$ ng/mL는 벤자민-민감성 I_{sc} 에 부정적인 영향을 미쳤다(도 13a). IFN- γ 는 더 낮은 농도에서 TEER에 영향을 미치지 않았지만, ≥ 0.5 ng/mL의 농도에서는 상피 저항이 유의하게 증가하였다(도 13b). 이들 연구는 선천 면역 반응의 초기 단계 동안, ASL 및 점막 면역의 적절한 항상성을 유지하기 위한 ENaC 활성 및 장벽 기능이 IFN- γ 에 의해 촉진됨을 시사한다. 질병 상태 동안 관찰된 혈장 수준과 유사한 농도인 0.5 ng/mL에서 IFN- γ 가 TEER에 미치는 효과에 기초하여, 모든 후속 실험들은 적절한 IFN- γ 반응을 보장하기 위해 1 ng/mL에서 수행하였다.

[0086] ENaC 활성 및 장벽 기능에 IFN- γ 가 미치는 시간 의존적 효과를 1 ng/mL IFN- γ 에서 16일의 기간에 걸쳐 연구하였다. 벤자민-민감성 I_{sc} 는 노출의 첫 12일 이내에는 변하지 않았지만, 14일차에 감소하기 시작하였고, 가장 낮은 ENaC 활성이 16일차에 나타났다($43.7 \pm 7.0\%$, $P < 0.04$; 도 13c). 대조적으로, IFN- γ 는 상피 저항을 초기

에 개선하였고, 연구 기간 전체에 걸쳐 시간 경과에 따라 TEER을 점진적으로 증가시켰다(16일차: $142.5 \pm 12.3\%$, $P < 0.04$; 도 13d). 이들 결과는 IFN- γ 가 ARDS의 초기 단계에 ENaC 활성화와 상피 장벽을 보호하고 지지하지만, 시간 경과에 따라 유해해질 수 있음을 시사한다.

[0087] **저농도의 TNF- α 는 ENaC 기능을 파괴하였다.** TNF- α 는 COVID-19-연관 ARDS 중증도와 상관이 있는 SARS-CoV-2 감염 중에 방출되는 강력한 초기 전염증성 사이토카인 중 하나이다. 본원에 제시된 결과는 TNF- α 가 COVID-19 환자에서 나타나는 혈장 수준과 유사한 ≥ 0.05 ng/mL의 농도에서 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 감소시켰음을 보여준다(도 14a). 벤자밀-민감성 I_{sc} 의 감소는 약 10 ng/mL에서 평탄해졌다($17.4 \pm 3.6\%$, $P < 0.01$). TNF- α 농도를 증가에 따른 장벽 기능의 감소가 5×10^{-5} 내지 5×10^{-3} ng/mL의 TNF- α 에서 관찰되었다(도 14b). 놀랍게도, 10 내지 40 ng/mL에서 TNF- α 는 상피 저항을 유의하게 증가시켰다. >0.5 ng/mL 농도에서 벤자밀-민감성 I_{sc} 의 현저한 감소로 인해, 모든 후속 실험에서는 완전한 억제력을 보장하기 위해 TNF- α 를 1 ng/mL로 사용하였다. HBEC를 1 ng/mL TNF- α 와 함께 16일의 기간에 걸쳐 인큐베이션할 때, 벤자밀-민감성 I_{sc} 는 빠르게는 4일차($81.2 \pm 5.4\%$, $P < 0.04$)에 시작하여 시간 경과에 따라 점진적으로 감소하였고, 16일차에 최대 감소하였다($39.2 \pm 2.4\%$, $P < 0.04$; 도 14c). TNF- α 에 대한 노출의 첫 8일 이내에는 TEER의 유의한 변화가 관찰되지 않았지만, 상피 저항은 시간 경과에 따라 증가하였고, 16일차에 피크 변화가 측정되었다($132.6 \pm 9.0\%$, $P < 0.04$)(도 14d). 이들 연구는 TNF- α 가 질환 상태와 연관된 농도에서 ENaC 활성화 및 장벽 기능의 파괴에 상당히 기여한다는 것을 보여주는 데, 이는 ARDS의 발병기전에서 TNF- α 가 중요한 역할을 함을 시사한다.

[0088] **고농도의 IFN- γ 및 TNF- α 조합은 ENaC 및 장벽 기능을 감소시켰다.** SARS-CoV-2 감염의 초기 단계를 모방하도록 설계된 실험 조건에서, HBEC를 증가하는 농도의 조합에 7일 동안 노출시킨 결과, 각 사이토카인별로 10 ng/mL에서 벤자밀-민감성 I_{sc} 가 대조군 세포와 비교해 유의하게 감소하였다($48.0 \pm 3.7\%$, $P < 0.01$). TEER은 조합이 5 및 10 ng/mL로 존재할 때 감소하였다(도 15a, 도 15b). 이들 결과는 ENaC 기능에 TNF- α 가 미치는 억제 효과가 낮은 농도에서 IFN- γ 의 보호 특성에 의해 보상되었음을 시사한다. 그러나, IFN- γ 의 보상 효과는 더 높은 농도에서 잠재적으로 감소하여, ENaC를 증가시키고 및 장벽 기능에 장애를 야기하였는데, 이는 이어서 TNF- α 에 의해 주도되었다.

[0089] **IL-4 및 IL-13은 ENaC 및 장벽 기능을 강력하게 감소시켰다.** IL-4 및 IL-13은 기능적으로 관련된 사이토카인으로, Th1/Th17 반응을 억제하면서 Th2 면역 반응을 개시한다. 본원에 나타난 바와 같이, Th2 사이토카인은 손상된 ENaC 기능 및 AFC와 연관이 있었다. 2 ng/mL IL-4와 함께 14일 동안 인큐베이션한 HBEC는 빠르게는 4일차에 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 유의하게 감소시켰다($59.9 \pm 9.4\%$, $P < 0.04$). 벤자밀-민감성 I_{sc} 의 최대 감소는 10일차에 관찰되었고($8.6 \pm 5\%$, $P < 0.04$), 이는 나머지 연구 기간 동안 억제된 상태로 유지되었다(도 15c). 유사하게, 장벽 기능은 빠르게는 2일차에 감소하였고, 최대 억제는 10일차에 발생하였다($37.5 \pm 2\%$, $P < 0.04$)(도 15d). HBEC에서 ENaC 및 상피 장벽 기능에 미치는 초기의 큰 억제 효과를 통해서 IL-4가 ARDS의 병태생리학적 진화에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀냈다.

[0090] IL-4는 양의 피드백 메커니즘에 의해 조절되어 IL-4 및 다른 Th2 사이토카인(예를 들어 IL-13)의 추가 방출을 자극한다. 따라서, (이러한 특성이 없는) IL-13을 사용하여 질병 발생에 대한 이의 기여를 연구하였다. IL-13을 투여량 의존적 방식으로 배양 배지에 첨가할 때, 벤자밀-민감성 I_{sc} 는 0.1 ng/mL에서 시작하여($50.9 \pm 9.6\%$, $P < 0.03$) 점진적으로 감소하였고, 벤자밀-민감성 I_{sc} 는 8 ng/mL에서 완전히 제거하였다(도 16a). TEER은 2 ng/mL IL-13에서 $59.9 \pm 7.6\%$ ($P < 0.03$)로 감소하였고, 장벽 기능의 최대 감소는 4 ng/mL에서 관찰되었다($41.3 \pm 6.9\%$, $P < 0.03$; 도 16b). HBEC를 20 ng/mL의 IL-13과 함께 16일의 기간 동안 인큐베이션한 후, 2일차에 벤자밀-민감성 I_{sc} 가 베이스라인 값의 1/4까지 감소하였고($25.0 \pm 5\%$, $P < 0.03$), 8일차가 되자 벤자밀-민감성 I_{sc} 가 완전히 억제되었다(도 16c). 상피 저항은 시간 경과에 따라 점진적으로 감소하였으며, 10일차에 TEER의 최대 감소가 관찰되었다($48.7 \pm 3.6\%$, $P < 0.03$)(도 16d). 종합적으로, 이들 연구는 ENaC 및 장벽 기능에 Th2-형 사이토카인이 미치는 강력한 초기 억제 효과를 시사하는데, 이는 ASL 제거의 초기 및 점진적 조절장애의 원인일 수 있다. 두 사이토카인(IL-4 및 IL-13) 모두가 COVID-19-연관 ARDS 환자에서 고농도로 검출되었으므로, AFC의 점진적 손상은 폐 부종의 발병과 ARDS로 이어질 수 있다.

[0091] **TGF- β 1은 ENaC 활성을 감소시켰지만 장벽 기능은 보존하였다.** 일반적으로 성장, 증식, 및 분화에 관여하는 다기능 사이토카인인 TGF- β 1은 IFN- γ , TNF- α , 및 인터류킨과 같은 전염증성 사이토카인의 분비 및 활성화를 억제하는 항염증성 Treg 면역 반응의 일부이다. 이의 면역 억제 성질에도 불구하고, TGF- β 1은 화학유인제로서 작

용하여 염증을 개시할 수도 있다. 본원에 나타낸 바와 같이, TGF- β 1은 ENaC 수송의 조절 장애를 초래하여 COVID-19-연관 ARDS의 발병기전에 관여하는 전염증성 사이토카인과 동시에 작동하였다.

[0092] HBEC를 증가하는 농도의 TGF- β 1과 함께 7일 동안 인큐베이션한 결과, TGF- β 1은 0.5 ng/mL에서 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 $70.4 \pm 2.5\%$ 로 감소시켰고($P < 0.04$), 50 ng/mL에서 $1.5 \pm 0.3\%$ 로 감소시키는 것으로($P < 0.04$) 나타났다(도 17a). 대조적으로, TEER은 저농도의 TGF- β 1에 영향을 받지 않았으나, 5 ng/mL TGF- β 1에서 시작하여 점진적으로 증가하였다(도 17b). 벤자밀-민감성 I_{sc} 의 억제를 보장하기 위해, 후속 시간 의존적 실험에서는 최대 16일 동안 TGF- β 1을 1 ng/mL로 사용하였다. TGF- β 1은 4일차에서 시작하여 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 감소시켰고($64.4 \pm 8.3\%$, $P < 0.04$), 16일차가 되었을 때 벤자밀-민감성 I_{sc} 는 대조군 값의 $20.3 \pm 5.8\%$ 로 감소하였다(도 17c). TEER은 연구 기간 동안 영향을 받지 않았다(도 17d). 이들 결과는 TGF- β 1이 ENaC 활성화에 투여량 의존적 효과를 갖지만 상피 장벽 기능에는 영향을 미치지 않았음을 시사한다. 따라서, TGF- β 1을 AFC에 영향을 미쳐 ARDS로 진행시키는 사이토카인으로 식별하였다.

[0093] AA-EC01은 고농도의 IL-13에 의해 제거된 ENaC 활성을 개선시켰다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 증가시킨 5개의 아미노산(AA-EC01)을 포함하는 제형을 개발하고, ENaC 기능을 완전히 제거시키는 농도와 노출 기간인, 20 ng/mL의 IL-13과 함께 14일 동안 함께 인큐베이션한 HBEC에서 제형이 ENaC 발현 및 기능을 개선하는 능력을 시험하였다. 유성 챔버에서 IL-13을 접종한 HBEC를 AA-EC01에 노출시킨 결과, 벤자밀-민감성 I_{sc} 는, 링거 용액에 침지한 상태로 IL-13을 접종한 HBEC에서 $4.0 \pm 1.7\%$ 인 것에 비해 $33.9 \pm 3.6\%$ ($P < 0.02$)로 증가하였다(도 18a). IL-13을 접종한 세포를 벤자밀-민감성 I_{sc} 에 미치는 억제 효과에 기초하여 선택된 아미노산 세트(음성 대조군: AANC)에 노출했을 때, ENaC 활성은 낮게 유지되었다($3.4 \pm 2.5\%$, $P = NS$; 도 18a). ENaC 기능은 AA-EC01과 접촉시킨 후 30분 이내에 개선되었지만, 연구 기간 동안 완전히 회복되지는 않았다. 대조적으로, IL-13-유도성 장벽 파괴는 AA-EC01에 의해 변하지 않았다(도 18b).

[0094] AA-EC01은 IL-13이 존재하는 가운데 꼭지면 ENaC 발현을 회복시켰다. 본원에 제시된 결과는 Th2 사이토카인 IL-4 및 IL-13이 HBEC에서 ENaC 활성화의 조절장애에 관여하는 주요 사이토카인이었고, AA-EC01은 사이토카인 인큐베이션 후 ENaC 기능을 개선하였음을 입증하였다(도 18a). HBEC의 면역형광 영상은 섬모막 및 꼭지막을 따라 ENaC- α 서브유닛의 발현을 나타냈다. 14일 동안 IL-13에 노출시킨 HBEC의 경우, ENaC 단백질이 섬모 주위막 및 꼭지막에서 벗어나 섬모 및 무섬모 세포의 꼭지 아래 구획과 세포질로 완전히 전좌한 것으로 나타났다. 1시간 동안 AA-EC01로 치료한 결과, 꼭지막 및 섬모 주위막을 따라 ENaC- α 의 면역형광이 증가하였다. 이들 관찰은 AA-EC01이 적어도 꼭지막 및 섬모 주위막에서 ENaC의 발현을 복구함으로써 ENaC를 개선하였음을 나타낸다.

[0095] AA-EC01은 COVID-19 사이토카인 조합에 의해 유발된 IL-6 분비를 감소시켰다. IL-6은 감염 및 조직 손상에 반응하여 상피 세포, 조직 대식세포, 및 단핵구를 포함하는 다양한 세포 유형에 의해 생산되는 다면 발현 전염증성 사이토카인이다. 초기에, IL-6은 호중구 및 다른 염증 세포를 염증 부위에 유인하는 급성기 단백질의 주요 자극인자다. 나중에, IL-6은 Th2 세포 분화를 촉진하여 IL-4의 발현을 초래할 뿐만 아니라, 만성 염증 및 자가 면역에 대한 전체 조건인 Th17/Treg 균형을 파괴하면서 Th17형 반응도 활성화시킨다. SARS-CoV-2에 감염된 동안, IL-6은 상승된 Ang II에 반응하는 기관지 상피 세포에 의해 IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 다른 전염증성 사이토카인과 함께 생산된다. HBEC를 IFN- γ , TNF- α , 및 TGF- β 1로 이루어진 사이토카인 조합에 7일의 기간 동안 노출시킨 후, 본 발명자들은 HBEC의 섬모 주위막을 따라 IL-6 발현이 증가하였음을 면역형광 현미경을 사용하여 입증하였다. 사이토카인과 함께 인큐베이션한 세포를 1시간 동안 AA-EC01로 치료했을 때, IL-6-연관 면역형광 신호는 꼭지 막에서 유의하게 감소하였다. 이들 연구에 기초하면, AA-EC01의 유익한 효과는 ENaC 기능을 강화하는 데 한정되지 않고, 오히려 COVID-19 감염증의 진화에 중요한 역할을 하는 사이토카인에 대한 면역 조절 특성도 포함하였다.

[0096] AA-EC01은 IL-13에 의해 유도된 MUC5AC 분비를 감소시켰다. MUC5AC는 겔을 형성하는 점성 뮤신으로서, 일반적으로 상피 표면에서 배상 세포(goblet cells)에 의해 생산된다. 폐 손상과 염증이 있는 동안은 MUC5AC 발현이 실질적으로 증가하여, 진행성 기도 폐색, 점막 방어 손상, 및 폐 기능 저하를 초래한다. MUC5AC는 천식 및 만성 섬유증의 발병기전에 있어서 중요한 기여인자이며, 또한 염증과 연관된 내인성 인자 및 다수의 병원균에 의해 상향조절된다. 호흡기 바이러스에 감염된 동안, MUC5AC의 과발현은 특히 TNF- α 및 Th2형 사이토카인의 생산 증가에 의해 유발된다. 본 발명자들은 배상 IL-13과 함께 인큐베이션한 후 배상 세포가 과형성되고 MUC5AC의 발현 및 분비가 증가한다는 것을 면역형광 영상화를 사용해 밝혀냈다. 1시간 동안 AA-EC01로 치료한 결과 감염된 세포에서 세포내 및 세포외 MUC5AC가 감소하였는데, 이는 AA-EC01이 기관지 상피 세포에서 점액 생성을 조절할 능

력이 있음을 시사한다. 임상적으로 위독한 COVID-19 환자는 이들의 가래 중 MUC5AC의 높은 수치와 상관된 기도 폐색을 나타내므로, MUC5AC도 AA-EC01의 표적 역할을 할 수 있다.

[0097] 요약하자면, SARS-CoV-2-연관 분자 패턴이 PRR에 의해 인식되는 방식에 있어서의 극단적인 차이는 선천적 및 적응적 면역 반응의 예측불가능하고 매우 가변적인 활성화 및 관련 사이토카인(IFN, Th1, Th2, Th17, 및 Treg)의 방출을 야기한다. 면역 반응이 상승한 경우, 환자는 사이토카인 폭풍 증후군의 징후인 폐 부종 또는 ARDS를 나타낸다(도 1). 본원에 제시된 결과는 이들 사이토카인이 기도 상피에서 ENaC 및 장벽 기능을 손상시킨다는 것을 입증한다. ENaC 기능은 ASL의 조절에 매우 중요하며, 폐포 상피 표면에 있는 얇은 체액층의 정밀하게 유지하는 것은 효율적인 기체 교환에 중요하다. 장벽 결함은 폐포-모세혈관을 과투과화시키고 폐 모세혈관으로부터 간질 및 폐포 공간으로 단백질이 풍부한 체액을 누출시켜, 산소 포화도를 감소시킨다. 현재, ARDS의 치료는 대부분 지지 치료이며 산소 보충과 인공호흡기 지지로 이루어진다. 인공호흡기로 전달된 산소는 폐포 내의 과도한 체액이 산소화되는 과정에서 부분적으로 고갈되어, 혈액-공기 장벽을 통한 교환에 이용 가능한 산소를 감소시키고 내피 산화질소 합성효소(eNOS)를 언커플링시키는데, 이는 초과산화물과 및 과산화질산염의 형성과 연관이 있다. 과산화질산염은 ENaC 및 장벽 단백질을 포함하는 다양한 세포 단백질에서 티로신 잔기의 비가역적 질화를 야기하는데, 이는 병태가 진행됨에 따라 콜라겐 침착, 섬유증, 및 조직 리모델링으로 이어진다. 기계식 환기는 폐 실질을 추가로 손상시켜 인공호흡기-유발 폐 손상을 초래하는데, 이는 발병 환자의 높은 사망률(65-88%)을 설명할 수 있다. 또한, 기도삽관(intubation)에 의해 생존한 환자는 상당한 상흔과 함께 폐 기능 감소를 나타냈다. 따라서, 보조 요법은 폐 손상을 악화시키며, 환자의 환기 보조 이탈은 시간이 지날수록 점점 더 어려워진다. 폐 포액 축적은 SARS-CoV-2 감염증 및 기타 감염증과 연관된 ARDS에서 이환율 및 사망률의 주요 원인이지만, ENaC 및 장벽 기능을 효과적으로 표적화하는 치료제와 관련하여 이용 가능한 옵션은 거의 없다.

[0098] 본원에 나타난 바와 같이, AA-EC01은 HBEC에서 ENaC 기능을 강화하였고, 따라서 AA-EC01은 AFC를 개선하고 폐 부종 및 ARDS를 치료하기 위한 임상 개입에 사용하기 위한 유망한 치료 제형이다. AA-EC01은, ENaC 기능을 완전히 제거하기에 충분한 기간 동안 사이토카인 폭풍의 특징인, 병리학적으로 고농도의 사이토카인에 노출시킨 HBEC에서 ENaC 기능을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, AA-EC01은 IL-6 및 MUC5AC의 생성 및 분비를 감소시켰다.

[0099] TNF- α 는 다수의 항상성 및 병리학적 메커니즘을 통해 다면발현성 효과를 갖는 강력한 전염증성 사이토카인이며, 그 수준은 ARDS 동안 증가된다. TNF- α 는 폐포 상피 세포에서 α - β - 및 γ -ENaC mRNA, 단백질 수준, 및 아밀로라이드-민감성 I_{sc} 를 감소시켰다. TNF- α 는 폐포 투과성을 증가시키면서 밀착 연결 단백질의 발현을 하향조절한다. 본 연구에서, 더 낮은 농도의 TNF- α 는 벤자밀-민감성 I_{sc} 에 영향을 미치지 않은 반면, 더 높은 농도는 ENaC 활성의 상당히 감소시켰다. 대조적으로, TEER의 감소는 더 낮은 농도에서 관찰된 반면, 더 높은 농도는 상피 저항을 증가시켰다.

[0100] ENaC 기능의 조절 장애는 SARS-CoV-2를 절단하고 활성화시키는 TMPRSS2로 시작하는데, 이는 ENaC가 SARS-CoV-2 스파이크 단백질과 유사한 절단 부위를 갖기 때문이다. ENaC 기능은 상승된 Ang II 및 키닌에 의해 추가로 감소된다. SARS-CoV-2 감염증에 걸린 동안 방출되는 다양한 사이토카인에 의한 ENaC 및 장벽 기능의 억제가 ARDS의 주된 원인이며, 이는 바이러스가 복제를 중단한 후에도 오랫동안 지속된다. 본 연구에서, HBEC를 더 낮은 농도의 IFN- γ 와 함께 장기간 인큐베이션한 결과 ENaC 기능이 억제되었다. HBEC를 IFN- γ 와 함께 ≥ 14 일 동안 배양했을 때, HBEC에서 벤자밀-민감성 I_{sc} 의 점진적 감소는 SARS-CoV-2에서 관찰된 질병 진행을 설명하는 데 도움이 될 수 있다. 질환이 경미한 환자와 비교했을 때, 중증 COVID-19 환자에서 혈장 IFN- γ 및 IL-6 수치 상승이 보고되었다. IFN- γ 는 단독으로 작용하는 경우는 거의 없으며, TNF- α 와 함께는 대식세포에서 유도성 산화질소 합성효소(iNOS)를 상향조절하는 것으로 나타났다. 이는 특히 중요한데, eNOS 언커플링이 초과산화물과 과산화질산염 형성을 유발하고, 이는 단백질을 손상시켜 ENaC 및 장벽 기능을 감소시키기 때문이다. 이러한 효과는 초과산화물 형성이 증가하는 산소 보충 및 환기 보조에 의해 악화된다.

[0101] 본 발명자들은 HBEC를 이용해 IFN- γ 와 TNF- α 의 조합이 벤자밀-민감성 I_{sc} 및 TEER에 미치는 영향을 연구하였다. 본원에 제시된 결과는 10 ng/mL에서 두 사이토카인의 조합이 상승적으로 작용하였음을 입증한다. TNF- α 는 단독으로는 ENaC 활성을 감소시켰지만, IFN- γ 와 조합했을 때, TNF- α 와 IFN- γ 의 조합은 장벽 기능에도 영향을 미쳤다. 이들 연구는, 특히 IFN- γ 가 존재할 때, TNF- α 가 COVID-19의 초기 단계 동안 ENaC 및 장벽 기능에 유의한 손상을 야기하였음을 보여주었다.

[0102] Treg 세포는 TGF- β 및 IL-10의 방출을 활성화시키고, 염증 상태가 지속되는 동안 CD8⁺, CD4⁺ T 세포, 단핵구,

NK 세포, 및 B 세포를 억제함으로써 면역 항상성을 유지하며, 자가면역을 예방하는 데 중요한 역할을 한다. Treg 세포의 억제 효과는 COVID-19 동안 감소된다. TGF- β 1은 아밀로라이드-민감성 ENaC 활성, ENaC mRNA, 및 α -서브유닛의 단백질 발현을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 그러나, TGF- β 1은 다면발현 효과를 가지며, 이의 기능은 연관된 사이토카인 및 염증 상태에 따라 달라진다. COVID-19가 발병한 동안, 사이토카인의 복잡한 조합은 TGF- β 1이 ENaC 및 장벽 기능에 미치는 구체적인 효과를 결정하기 더 어렵게 한다. 본 연구에서, 다른 사이토카인과는 독립적으로 시험한 TGF- β 1은 빠르게는 4일차에 ≥ 0.5 ng/mL의 농도에서 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 감소시켰으며, TEER에 미치는 억제 효과가 없었다. 이러한 효과는 IFN- γ 및 TNF- α 에 반응하여 관찰된 것과 같았다.

[0103] SARS-CoV-2 감염증은 Th2 반응에 대한 억제 효과의 감소와 결합된 초기 Th1형 활성화를 특징으로 하는 선천성 면역 반응 손상을 초래할 수 있으며, 이는 Th2 반응이 우세한 Th1/Th2 불균형을 초래한다. IFN- γ 생성 감소로 인한 초기 Th2 활성화는 M2 대식세포를 활성화시키고, Th2 사이토카인을 방출시키며, 아르기나제 활성을 증가시킨다. 아르기나제 경로의 활성화는 NOS가 이용할 수 있는 아르기닌을 감소시킴으로써 NO-매개 세포독성을 감소시키고, 콜라겐 합성, 증식, 섬유증, 및 조직 리모델링을 강화한다. IL-4는 IL-4 반응, 및 다른 Th2 사이토카인 (IL-5 및 IL-13)의 반응을 추가로 증가시키는 양성 피드백 반응을 갖는 일차 Th2 사이토카인이다. IL-4는 알려진 반응의 일환으로서 호염기구로부터 IgE의 분비를 개시하고, IL-5는 비만 세포 및 호산구를 동원하고, IL-13은 MUC5AC를 활성화함으로써 상피 세포로부터의 점액 생성을 주로 증가시킨다. IL-4는 또한 ENaC β - 및 γ -서브유닛의 발현을 감소시키고, IL-4 및 IL-13은 아밀로라이드-민감성 I_{sc} 를 억제한다. 본원에 제시된 결과는, 시험된 모든 사이토카인 중 Th2 사이토카인이 COVID-19 감염증 진행의 초기 단계 동안 벤자밀-민감성 I_{sc} 및 TEER에 대해 특히 극도로 부의 효과를 나타낸 반면, IFN- γ 및 TNF- α 는 TEER에 영향을 미치지 않았음을 입증한다. 따라서, COVID-19가 발병한 동안, 일부 개체에서 Th2 면역 반응으로의 조기 전이가 ARDS를 포함하는 보다 심각한 폐 사건을 설명할 수 있다.

[0104] 본원에 제시된 결과는 IL-13이 ENaC 및 장벽 기능을 억제하였고, AA-EC01은 ENaC 활성 및 발현을 증가시켜 IL-13-매개 부작용에 대항하였음을 보여준다. 본 연구는, ENaC가 세포질로부터 (ENaC가 기능적으로 활성인) 꼭지막으로 전파하는 것을 AA-EC01이 촉진하였음을 추가로 입증하였다. 본원에 기술된 면역조직화학 연구는, AA-EC01이 ENaC 전사 및/또는 ENaC 단백질 합성 증가를 통해 ENaC 활성을 증가시킬 수도 있음을 보여주었다.

[0105] Th2형 사이토카인, 특히 IL-13의 활성화는 류신의 생성 및 분비 증가의 주요 유발인자이며, MUC5AC는 중증 COVID-19 환자에서 관찰된 것과 같은 폐색성 호흡기 증상의 발병에 중요한 역할을 한다. HBEC를 IL-13에 노출시킨 후, HBEC에서 MUC5AC의 세포내 발현 및 분비에 미치는 AA-EC01의 억제 효과는 AA-EC01가 점액 생성을 조절하는 효과가 있음을 시사한다.

[0106] IL-6은 폐 안의 상주 세포에 의해 분비되는 전염증성 사이토카인으로서, 사이토카인 폭풍 동안 중심 역할을 하며, COVID-19 환자에서의 대표적인 예후 지표이다. HBEC에서 사이토카인 유도 IL-6 분비를 감소시키는 AA-EC01의 능력은, 이러한 제형이 ENaC 활성을 증강시키는 것을 초과하는 더욱 더 광범위한 특성을 가졌음을 시사한다.

[0107] 과도한 폐포액 축적을 감소시킬 수 있는 승인된 약물이 없다는 것을 감안하면, AA-EC01은 충족되지 않은 긴급한 임상적 필요에 대한 해결책을 제공한다. 본원에 제시된 결과는 ARDS를 치료하고/하거나 ARDS와 연관된 폐 합병증의 가능성 및/또는 중증도를 감소시키기 위한 치료제로서 AA-EC01의 용도를 뒷받침한다. AA-EC01은 치료 특성을 갖는 아미노산의 기능적 조합으로 구성되기 때문에, 제형은 독립형 API로서 사용되거나 다른 치료 옵션과의 병용 사용을 위한 상보적 API로서 사용될 수 있다. 은 뛰어난 안전성 프로파일을 갖는데, 이는 AA-EC01에 포함된 아미노산 각각이 ‘일반적으로 안전한 물질로 인정된 화학적 물질’ (GRAS)이고, 임의의 부작용을 나타내거나 다른 API와 관련하여 사용이 금지될 것으로 예상되지 않기 때문이다. 따라서, AA-EC01은 표준 치료 API와 함께 표준 치료 요법의 효과를 최대화하여 산소 보충 및 환기 보조의 지속시간을 감소시키고, 장기적인 폐 합병증을 최소화하고, 발병 환자의 생존을 증가시킬 수 있다. ENaC 활성을 증가시킴으로써 과도한 폐포액 축적을 적어도 부분적으로 감소시키는 본원에 기술된 다른 관련 아미노산 제형[예컨대 AAF03, AAF07, 및 선택 5AA 제형(아르기닌, 리신, 시스테인, 아스파라긴, 및 글루타민)]에도 동일한 추론이 적용된다.

[0108] ARDS 치료에 사용되는 API는 다음을 포함한다: 폐 보호 환기(낮은 일회 호흡량: 6 ml/kg; ARDS 네트워크 지침에 따른 중간 정도의 호기말 양압; 30 cm 물 미만의 고평부 기도압; 엷드린 자세; 고주파 진동 환기; 보존적 체액 전략; ARDS의 초기 단계에서 저투여량 코르티코스테로이드; 체외막 산소화; 외인성 계면활성제(소아 모집단에서

특히 유익한 것으로 나타남; 4가지 유형: 비이온성, 음이온성, 양이온성, 양쪽성); 면역조절제(예: 인터류킨-1 수용체 길항제, 인터페론 감마 및 TNF-알파 억제제); 파비피라비르(Favipiravir)(광대역 RNA 중합효소 억제제); 로피나비르/리토나비르(lopinavir/ritonavir)(HIV 프로테아제 억제제); 우미페노비르(umifenovir)(아르비돌; ACE2를 통해 바이러스가 숙주 세포와 상호작용하고 이와 결합하는 것을 억제함); 클로로퀸/하이드록시클로로퀸(항말라리아제); 신경근 제제(NMA)는 중증 저산소증 환자에서 환자-인공호흡기 동기화를 개선하고 기계 환기를 보조하는 데 사용될 수 있음; 흡입된 산화 질소(NO; 내인성 혈관확장제); 프로스타시클린(폐 혈관 확장을 유발하는 아라키돈산 유도체)을 포함하는 프로스타노이드; 호중구 엘라스타아제 억제제(예: 데펠레스타트(Depelestat)); 항산화제(예: 글루타티온 및 그의 전구체인 N-아세틸시스테인); $\beta 2$ 작용제; 에어로졸화된 알부테롤(albuterol); 항응혈제(분무식 헤파린 또는 정맥내 헤파린); 간엽 간질 세포를 이용한 세포 기반 요법; 스타틴; 인슐린; 및 인터페론 β . 병용 치료 용도, 방법, 및 의약에서, 본원에 기술된 아미노산 제형은 ARDS로 고통받는 대상체를 치료하는 데 현재 사용되는 상기 열거된 치료적 개입 중 적어도 하나와 병용으로 사용될 수 있다.

[0109] 기관지 천식은 기관지 기도의 발작성 협착으로 인한 호흡곤란, 흉부 압박감, 및 쌽쌽거림의 발작성 공격(paroxysmal attack)이다. 천식은 기도의 염증, 폐색, 및 과민성을 특징으로 한다. 기관지 천식의 병리학적 특징은 기관지 수축 및 염증을 포함한다. 따라서, 천식을 치료하는 데 사용되는 API는 기관지 수축의 예방 또는 역전 및/또는 기도 염증의 감소를 표적으로 한다.

[0110] 천식을 치료하는 데 사용되는 API는 이하에서 상세히 설명된다. 기관지 수상구조의 평활근은 주로 $\beta 2$ 수용체를 함유하는데, 이를 자극하면 기관지가 확장된다. ($\beta 2$ 아드레날린 수용체의 자극의 원인인) 교감 신경성 API는 기관지 천식, 특히 $\beta 2$ 수용체에 주로 작용하는 것의 치료에 유용하다. 이러한 API는 에피네프린(epinephrine), 에페드린(ephedrine), 이소프로테레놀(isoproterenol), 알부테롤(albuterol), 레발부테롤(levsalbuterol), 비톨테롤(bitolterol), 메타프로테레놀(metaproterenol), 테르부탈린(terbutaline), 리토도린(ritodrine), 프로카테롤(procaterol), 이소에타린(isoetarine), 포르모테롤(formoterol), 피르부테롤(pirbuterol), 및 살메테롤(salmeterol)을 포함한다. 아드레날린은 주사 또는 흡입기를 통해 투여될 수 있다. 아드레날린(0.3 내지 0.5 mL의 1:1000 용액)은 천식을 위해 피하로 투여될 수 있는데, 투여는 15 내지 20분 후에 반복될 수 있다. 이는 노인 대상체와 허혈성 심장 질환, 심장 부정맥, 또는 고혈압을 앓고 있는 대상체에게는 금기시된다. 알부테롤은 경구로, 주사에 의해, 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 경구 투여 시, 이는 위장관에서 잘 흡수되어, 약 1시간 내에 기관지 확장이 발생하고 6 내지 8시간 동안 유지된다. 흡입에 의해 투여될 때는 약 15분 후에 작용하여 3 내지 4시간 동안 효과를 유지한다. 피하 주사에 의한 경우, 그 효과가 5분 후에 나타나 3~4시간 동안 지속된다. 메틸 크산틴 약물은 다음을 포함한다: 테오필린(theophylline), 아미노필린(aminophylline), 테오브로민(theobromine), 카페인(caffeine), 옥스트립릴린(oxtriphylline), 다이필린(dyphylline), 펜톡시필린(pentoxifylline), 및 아세필린(acefylline). 아미노필린은 복부 및 횡격막 이상 피로(paradoxical abdominal and diaphragmatic fatigue)가 발생하는 환자에게 처방된다. 아미노필린 주입은 횡격막 수축성을 개선하는 데 효과적이다. 비만 세포 안정화제는 다음을 포함한다: 크로몰린 나트륨, 네도크로밀 Na, 및 케토티펜. 이러한 항염증제는 염증 세포(특히 비만 세포), 호산구, 및 상피 세포의 활성화를 방지하지만, 직접적인 기관지 확장제로서의 활성을 갖지 않는다. 이들은 경증 지속성 천식에 효과적이며, 특히 운동이 촉발 인자일 때 효과적이다. 크로몰린 나트륨은 켈린이라고 불리는 이집트 식물로부터 유래된다. 이는 비만 세포로부터 화학물질이 방출되는 것을 억제하므로 천식 발작의 모든 단계를 예방한다. 이는 1일 3 내지 4회 투여될 수 있다. 분말 형태의 약물은 흡입될 수 있으며, 분무된 장치에 사용되고 현재 인텔 포켓 흡입기에서 이용 가능한 1% 인텔 용액으로 개발되었다. 코르티코스테로이드는 다음을 포함한다: 트리암시놀론, 프레드니손, 모메타손, 메틸프레드니솔론, 하이드로코티손, 플루티카손, 플루니솔리드, 텍사메타손, 부테소니드 및 베클로메타손. 코르티코스테로이드는 효과적인 항염증제이다. 코르티코스테로이드는 염증을 감소시켜 천식 증상을 조절하고 천식 악화를 예방한다. 코르티손 흡입기는 최소한의 부작용으로 천식을 국소적으로 완화시킨다. 코르티손은 천식과 지속적인 비정상적인 호흡에 효과적이다. 5-리폭시제나제 억제제(예: 질류톤(zileuton)) 및 류코트리엔 D₄(LTD₄)-수용체 길항제(예: 자피를루카스트(zafirlukast) 및 몬테루카스트(montelukast))도 천식 치료에 일상적으로 사용된다. 류코트리엔은 평활근 세포를 수축시키고, 염증 세포를 유인하고, 점액 분비와 혈관 투과성을 강화함으로써 천식 증상과 기도 폐색을 유도한다. 병용 치료 용도, 방법, 및 의약에서, 본원에 기술된 아미노산 제형은 천식으로 고통받는 대상체를 치료하는 데 현재 사용되는 상기 열거된 치료적 개입 중 적어도 하나와 병용으로 사용될 수 있다.

[0111] 알러지성 비염의 특징적인 증상은 다음을 포함한다: 비출혈, 비강 가려움, 콧물(코에서 점액의 과도한 방출), 및 재채기. 2세대 경구용 항히스타민제와 비강 코르티코스테로이드가 치료의 핵심이다. 일반적으로, 알러지성 비염에 대한 치료 옵션은 증상의 감소를 목표로 한다. 이러한 치료 옵션은 회피 조치(증상이 알러지 항원에 대

한 노출과 연관이 있는 경우, 알러지 항원의 회피; 경구 항히스타민제, 비강 코르티코스테로이드, 충혈 완화제, 류코트리엔 수용체 길항제, 및 비강 내 크롬과 같은 API; 및 알러지 항원 면역요법)를 포함한다. 일부 대상체에서 유용할 수 있는 다른 요법은 충혈 완화제 및 경구 코르티코스테로이드를 포함한다. 때때로 전신 코르티코스테로이드와 충혈 완화제(경구 및 국소)도 사용된다. 비처방 비강 식염수 분무제 또는 수제 염수 용액을 사용하여 비강으로부터 자극물을 세척하고 점액을 묽게 하고 비강 통로 막을 진정시킬 수도 있다. 병용 치료 용도, 방법, 및 의약에서, 본원에 기술된 아미노산 제형은 알러지성 비염으로 고통받는 대상체를 치료하는 데 현재 사용되는 상기 열거된 치료적 개입 중 적어도 하나와 병용으로 사용될 수 있다.

[0112] 점액 용해제는 점액을 묽게 하는 API로서, 점액을 신체에서 쉽게 제거할 수 있게 한다. 점액 용해제는 과도한 점액 또는 걸쭉한 점액을 특징으로 하는 호흡기 병태 또는 비강 병태를 치료하는 데 사용된다. 점액 용해제는 정제 또는 시럽 제형으로 경구 투여되거나 네블라이저를 통해 흡입될 수 있다. 보다 흔한 유형의 점액 용해제 중 일부는 다음을 포함한다: 뮤시넥스(구아이페네신), 카르보시스테인, 폴모자임(도르나제 알파), 에르도스테인, 메시스테인, 브롬헥신 고장성 식염수, 및 만니톨 분말. 병용 치료 용도, 방법, 및 의약에서, 본원에 기술된 아미노산 제형은 상기 열거된 것들과 같은 적어도 하나의 점액 용해제와 병용으로 사용될 수 있다.

[0113] 본원에서 사용되는 바와 같이, “ENaC 활성 증가”라는 문구는 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 또는 500%의 ENaC 활성 증가를 지칭하도록 사용될 수 있다.

[0114] 본원에서 사용되는 바와 같이, “ENaC 활성 증가”라는 문구는 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 또는 50배의 ENaC 활성 증가를 지칭하도록 사용될 수 있다.

[0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, “ENaC 활성 증가”라는 문구는, ENaC 활성이 정상 ENaC 활성의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%로 회복되도록, 특정 세포 또는 조직에서 ENaC 활성을 정상 수준으로 적어도 부분적으로 회복시키는 ENaC 활성의 증가를 지칭하는 데 사용될 수 있다.

[0116] 본원에 기술된 바와 같이, ENaC 활성의 증가 또는 감소는, 예를 들어 유성 챔버에서 벤자민/아밀로라이드 민감성 전류를 측정함으로써 결정될 수 있다. 본원에 제시된 결과에 기초하여, AAF01, AAF03, AAF07, 선택 5AA 제형(아르기닌, 리신, 시스테인, 아스파라긴, 및 글루타민)을 호흡곤란의 특징을 재현하는 본원에 기술된 모델 시스템에서(ENaC 활성에 대한 효과가 없는 것으로 확립된) 음성 대조군 용액에 비해 ENaC 활성을 증가시키는 예시적인 제형으로서 선택하였다.

[0117] 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐, 다음의 용어는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한, 본원에서 명시적으로 연관된 의미를 취한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 문구 “일 구현예에서(in one embodiment/in an embodiment)”는 동일한 구현예(들)를 지칭할 수는 있지만, 반드시 그런 것은 아니다. 또한 본원에서 사용된 바와 같이, 문구 “또 다른 구현예에서” 및 “일부 다른 구현예에서”는 다른 구현예(들)를 지칭할 수는 있지만, 반드시 그런 것은 아니다. 본 개시의 모든 구현예는 본 개시의 범주 또는 사상을 벗어나지 않고 조합될 수 있는 것으로 의도된다.

[0118] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “기초로 하는(based on)”은 독점적이지 않으며, 문맥상 달리 명확하게 언급하지 않는 한, 설명되지 않은 추가 요인에 기초로 하는 것을 허용한다. 또한, 명세서 전체에 걸쳐, 단수 표현(“a”, “an”, 및 “the”)의 의미는 복수의 지시 대상을 포함한다. “내(in)”의 의미는 “내(in)” 및 “상(on)”을 포함한다.

[0119] 제제(또는 이러한 제제를 함유하는 조성물)의 “유효량(effective amount)” 또는 “유효 투여량(effective dose)”은, 예를 들어 선택된 투여 형태, 경로, 및/또는 일정에 따라 세포 또는 유기체에 전달될 때, 원하는 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. “유효량” 및 “치료적 유효량”이라는 문구는 상호 교환적으로 사용된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 효과적인 특정 제제 또는 조성물의 절대량은, 원하는 생물학적 또는 약리학적 평가변수, 전달될 제제, 표적 조직 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 당업자는, 다양한 구현예에서, “유효량”이 세포와 접촉되거나, 단일 투여량으로 또는 다회 투여량의 사용을 통해 대상체에게 투여될 수 있음을 추가로 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 유효량은 적어도 하나의 세포에서 ENaC 활성을 증가시킴으로써, 과도한 체액 축적을 적어도 부분적으로 감소시키는 양이다. 일부 구현예에서, 유효량은 적어도 ENaC 활성의 증가를 필요로 하는 대상체에서 이를 증가시킴으로써, 과도한 체액 축적의 감소를 필요로 하는 대상체에서 이를 적어도 부분적으로 감소시키는 양이다. 이의 일부 구현예에서, 유효량은 과도한

체액 축적의 감소를 필요로 하는 대상체의 폐 또는 비강에서 이를 감소시키는 양이다. 일부 구현예에서, 유효량은 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 양이다.

[0120] 대상체 치료의 맥락에서 본원에서 사용되는 “치료(treat, treatment, treating)” 및 유사한 용어는 대상체의 내과적 및/또는 외과적 관리를 제공하는 것을 지칭한다. 치료는 대상체에게 제제 또는 제형(예: 약학적 제형)을 투여하는 것을 포함할 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 용어 “치료(treatment)” 또는 이의 문법적으로 변형된 표현(예: treat, treating, 및 treatment 등)은, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 질병 또는 질환의 증상을 경감시키는 것; 및/또는 질병 또는 질환의 진행, 중증도, 및/또는 범위를 감소시키거나, 억제하거나, 저해하거나, 저하시키거나, 그에 영향을 주는 것을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0121] 치료의 효과는 질환의 발생 또는 재발 가능성, 또는 질환의 적어도 하나의 증상 또는 징후를 감소시키는 것도 포함할 수 있다. 치료제 또는 이의 제형은, 질환을 앓고 있거나 일반 모집단 구성원에 비해 질환이 발생할 위험이 증가된 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료제 또는 이의 제형은 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키거나 제거하기 위한 유지 목적으로 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 치료제 또는 이의 제형은 질환을 앓은 적이 있지만 더 이상 질환의 증거를 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다. 제제 또는 이의 제형은, 예를 들어 질환의 재발 가능성을 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 치료제 또는 이의 제형은 예방적으로, 즉, 질환의 임의의 증상 또는 징후가 발생하기 전에 투여될 수 있다.

[0122] “예방적 치료”는 질환이 발생하지 않았거나 질환의 증거를 나타내지 않는 대상체에게, 예를 들어 질환이 발생할 가능성을 감소시키거나 질병이 발생할 경우 이의 중증도를 감소시키기 위해 내과적 및/또는 외과적 관리를 제공하는 것을 지칭한다. 대상체는 질환 발생의 위험이 있는 것으로 (예를 들어 일반 모집단에 비해 위험이 증가되었거나, 질환 발생 가능성을 증가시키는 위험 인자를 가진 것으로) 식별되었을 수 있다.

[0123] 용어 “완화(amelioration)” 또는 이의 문법적으로 변형된 표현(예를 들어 ameliorate, ameliorating, amelioration 등)은, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 질환 또는 병태의 중증도를 감소시키는 것, 또는 질환 또는 병태의 개시를 지연시키는 것을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 완화는 증상의 완전한 부재를 요구하는 것은 아니다.

[0124] 용어 “병태(condition, disease, 및 disorder)”는 상호 교환적으로 사용된다.

[0125] “대상체(subject)”는 다양한 구현예에서 임의의 척추동물 유기체일 수 있다. 대상체는, 예를 들어 실험, 진단, 및/또는 치료 목적으로 제제를 투여할 개체이거나, 샘플을 수득할 개체이거나, 수술을 수행할 개체일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물, 예를 들어 인간; 비인간 영장류(예를 들어, 유인원, 침팬지, 오랑우탄, 원숭이); 또는 가축 동물, 예컨대 개, 고양이, 토끼, 소, 황소, 말(예를 들어 망아지 포함), 돼지, 양, 염소, 라마, 마우스, 및 랫트이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다. 인간 또는 다른 포유동물은 남성(수컷)이거나 여성(암컷)일 수 있고 임의의 발달 단계에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 또는 다른 포유동물은 영유아(조산아 포함)이다. 일부 구현예에서, 대상체는 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염으로 진단받은 적이 있다.

[0126] 위에 추가하여, ENaC는 출산 중에 중요한 역할을 한다. 태아의 체액으로 채워진 폐포는 분만 시 ENaC 발현 및 기능의 급격한 증가로 인해 공기로 채워진 폐포로 전환된다. 따라서, 본원에 기술된 예시적인 제형은 조산아(예정일에 앞서 조산으로 태어난 영아) 또는 호흡기 계통의 발달 장애를 특징으로 하는 질환 또는 장애를 가지고 태어난 영아에게 즉각적인 이점을 갖는다. 조산 동물 및 호흡기 계통의 발달 장애를 특징으로 하는 질환 또는 장애를 가지고 태어난 영아 동물에게도 동일한 추론이 적용된다.

[0127] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “영아(infant)”는 출생 직후 내지 1세 이하 범위의 인간 소아를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “영유아(baby)”는 출생 직후 내지 4세 이하 범위의 인간 소아를 지칭하며, 따라서 신생아, 영아, 및 유아를 포함한다.

[0128] “무시할 만한 양”이란, 존재하는 아미노산이 폐 또는 비강에서 체액 축적을 감소시키지 않음을 의미한다. 또는, 일부 구현예에서, 아미노산은 비록 제형 중에 존재하더라도, 이를 필요로 하는 대상체에서 폐 또는 비강의 체액 축적에 영향을 미칠 수 있는 양으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은, 아미노산의 총 농도가 100 mg/l, 50 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l, 0.5 mg/l, 0.1 mg/l, 또는 0.01 mg/l 미만인 양이다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 100 mg/l 미만인 양이다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 50 mg/l 미만인 양이다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 10 mg/l 미만인 양이다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 5 mg/l 미만인 양이다.

일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 1 mg/l 미만인 양이다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 0.5 mg/l 미만인 양이다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 0.1 mg/l 미만인 양이다. 일부 구현예에서, 무시할 만한 양은 아미노산의 총 농도가 0.01 mg/l 미만인 양이다.

[0129] 용어 “아미노산”은 아민($-NH_2$) 작용기, 카르복실($-COOH$) 작용기, 및 각각의 아미노산에 특이적인 측쇄(“R”)기를 포함하는 알려진 모든 아미노산을 포괄한다. “아미노산”은 인간 계능(즉, 단백질생성 아미노산)에 의해 암호화된 21개의 아미노산, 박테리아 또는 단세포 유기체에 의해 암호화되거나 생산된 아미노산, 및 자연적으로 유도된 아미노산을 포괄한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산의 컨주게이트 산 형태(아르기닌, 리신, 및 히스티딘) 또는 산성 측쇄를 갖는 아미노산의 컨주게이트 염기 형태(아스파르트산 및 글루탐산)는, 달리 언급되지 않는 한, 본질적으로 동일하다. “아미노산”은 또한, 예를 들어 유성 챔버 검정에서 ENaC 활성 증가의 관점에서 실질적으로 동일한 활성을 보유하는 이의 유도체 및 유사체를 포함한다. 유도체 및 유사체는, 예를 들어 거울상 이성질체일 수 있고, 아미노산의 D- 및 L-형태 둘 다를 포함한다. 유도체 및 유사체는 “천연” 또는 “비-천연” 아미노산의 유도체(예: β -아미노산, 호모-아미노산, 프롤린 유도체, 피루브산 유도체, 3-치환된 알라닌 유도체, 글리신 유도체, 고리-치환된 시스테인 유도체, 고리-치환된 페닐알라닌 유도체, 선형 코어 아미노산, 및 N-메틸 아미노산), 예를 들어 셀레노시스테인, 피롤리신, 요오드시스테인, 노르류신, 또는 노르발린일 수 있다. 유도체 및 유사체는 보호기(α -아미노기, α -카르복시산기, 또는 적절한 R 기, 여기서 R은 NH_2 , OH, SH, COOH 또는 다른 반응성 작용기를 함유함)를 포함할 수 있다. 다른 아미노산 유도체는, 예를 들면 아실화, 메틸화, 당질화, 및/또는 아미노산의 할로겐화에 의해 합성되는 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이들은 예를 들어, β -메틸 아미노산, C-메틸 아미노산, 및 N-메틸 아미노산을 포함한다. 본원에 기재된 아미노산은 유리 아미노산으로서 존재할 수 있다. 용어 “유리 아미노산(free amino acid)”은 펩티드 또는 폴리펩티드의 일부가 아닌(예를 들어, 펩티드 결합을 통해 다른 아미노산에 연결되지 않는) 아미노산을 지칭한다. 유리 아미노산은(예를 들어 디펩티드 결합을 통해 적어도 하나의 다른 아미노산에 연결되는 것과 반대로) 용액에서 유리되지만, 용액 중 염 또는 다른 성분과 결합할 수 있다.

[0130] 본원에 사용된 용어 “염”은 임의의 및 모든 염을 지칭하고, 약학적으로 허용 가능한 염을 포괄한다.

[0131] 용어 “담체”는 본원에 기술된 조성물과 함께 투여되는 임의의 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비히클을 지칭할 수 있다. 적합한 약학적 담체의 예는 Felton(ed.)의 문헌[*Remington's Essentials of Pharmaceuticals*, 21st ed. 2012]에 기술되어 있으며, 이는 참조로서 본원에 통합된다.

[0132] 본원에 기술된 제형에 포함시키기 위한 예시적인 염은 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 칼슘, 염화 마그네슘, 구연산 삼나트륨, 중탄산 나트륨, 글루콘산 나트륨, 또는 제일 인산나트륨, 제이 인산나트륨, 또는 제삼 인산나트륨을 사용하는 인산염 완충액, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0133] 예시적인 희석제는 탄산 칼슘, 탄산 나트륨, 인산 칼슘, 인산 이칼슘, 황산 칼슘, 인산수소 칼슘, 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 카올린, 염화 나트륨, 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0134] 본원에 기술된 약학적 제형의 제조에 사용되는 약학적으로 허용 가능한 부형제는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 봉해제, 결합제, 방부제, 완충제, 윤활제, 및/또는 오일을 포함한다. 코코아 버터 및 좌제 왁스와 같은 부형제, 착색제, 코팅제, 및 방향제 또한 조성물에 존재할 수 있다.

[0135] 유효량을 달성하는 데 필요한 아미노산 제형 또는 조성물의 정확한 양은, 예를 들어 대상체의 종, 연령, 및 일반적인 병태, 투여 방식 등에 따라, 대상체 마다 달라질 것이다. 유효량은 단일 투여량(예: 단일 경구 투여량) 또는 다회 투여량(예: 다회 경구 투여량)으로 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 다회 투여량이 대상체에게 투여되거나 조직 또는 세포에 도포되는 경우, 다회 투여량 중 임의의 2회 투여량은 본원에 기술된 아미노산 조성물의 상이한 양 또는 실질적으로 동일한 양을 포함한다. 일부 구현예에서, 다회 투여량이 대상체에게 투여되거나 조직 또는 세포에 도포되는 경우, 다회 투여량을 대상체에게 투여하거나 다회 투여량을 조직 또는 세포에 도포하는 빈도는 필요에 따라 1일 3회 투여량, 1일 2회 투여량, 1일 1회 투여량, 2일마다 1회 투여량, 3일마다 1회 투여량, 매주 1회 투여량, 2주마다 1회 투여량, 3주마다 1회 투여량, 또는 4주마다 1회 투여량이다. 일부 구현예에서, 다회 투여량을 대상체에게 투여하거나 다회 투여량을 조직 또는 세포에 도포하는 빈도는 1일 1회 투여량이다. 일부 구현예에서, 다회 투여량을 대상체에게 투여하거나 다회 투여량을 조직 또는 세포에 도포하는 빈도는 1일 2회 투여량이다. 일부 구현예에서, 다회 투여량을 대상체에게 투여하거나 다회 투여량을 조직 또는

세포에 도포하는 빈도는 1일 3회 투여량이다. 일부 구현예에서, 다회 투여량이 대상체에게 투여되거나 조직 또는 세포에 도포되는 경우, 다회 투여량의 첫번째 투여량과 마지막 투여량 사이의 기간은 1/3일, 1/2일, 1일, 2일, 4일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 7년, 10년, 15년, 20년, 또는 대상체, 조직, 또는 세포의 수명이다. 일부 구현예에서, 다회 투여량의 첫번째 투여량과 마지막 투여량 사이의 기간은 3개월, 6개월, 또는 1년이다. 일부 구현예에서, 다회 투여량의 첫번째 투여량과 마지막 투여량 사이의 기간은 대상체, 조직, 또는 세포의 수명이다.

[0136] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 투여량(예: 단일 투여량 또는 다회 투여량 중 임의의 투여량)은 0.1 μ g 내지 1 μ g, 0.001 mg 내지 0.01 mg, 0.01 mg 내지 0.1 mg, 0.1 mg 내지 1 mg, 1 mg 내지 3 mg, 3 mg 내지 10 mg, 10 mg 내지 30 mg, 30 mg 내지 100 mg, 100 mg 내지 300 mg, 300 mg 내지 1,000 mg, 1 g 내지 10 g, 1 g 내지 15 g, 또는 1 g 내지 20 g(시작 값과 끝 값 포함)의 본원에 기술된 아미노산 제형을 독립적으로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 투여량은 1 mg 내지 3 mg(시작 값과 끝 값 포함)의 본원에 기술된 아미노산 제형을 독립적으로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 투여량은 3 mg 내지 10 mg(시작 값과 끝 값 포함)의 본원에 기술된 아미노산 제형을 독립적으로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 투여량은 10 mg 내지 30 mg(시작 값과 끝 값 포함)의 본원에 기술된 아미노산 제형을 독립적으로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 투여량은 30 mg 내지 100 mg(시작 값과 끝 값 포함)의 본원에 기술된 아미노산 제형을 독립적으로 포함한다.

[0137] 본원에 기술된 것과 같은 투여량 범위는 본원에 기술된 약학적 제형 또는 조성물을 성인에게 투여하기 위한 지침을 제공한다. 예를 들어 유아, 아동, 또는 청소년에게 투여될 양은 의사 또는 당업자에 의해 결정될 수 있고 성인에게 투여되는 양보다 적거나 같을 수 있다.

[0138] 본원에서 참조된 모든 종래 특허, 간행물, 및 시험 방법은 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0139] 일부 구현예의 상세한 설명

[0140] 본원에 기술된 아미노산 제형(예: 약학적 제형)의 각각은 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하는 방법에 사용되거나, ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료에 사용되고/되거나, ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 의약을 제조하는 데 사용될 수 있다. ARDS는 폐의 기능을 방해하는 과도한 폐포액 축적을 특징으로 한다. 천식 또한 폐의 기능을 방해하는 과도한 체액 축적의 특징을 나타낼 수 있다. 알러지성 비염은 비강 내 과도한 체액 축적을 특징으로 한다. 본원에 기술된 아미노산 제형 각각은 이들 병태에서 체액 축적을 감소시키는 데 사용될 수 있으며, 이러한 능력은 폐 또는 비강에서 ENaC 활성을 증가시키는 능력에 의해 적어도 부분적으로 부여된다.

[0141] 이의 일부 구현예에서, 본원에 기술된 아미노산 제형(예: 약학적 제형)의 각각과 관련해, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인의 유리 아미노산을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산을 포함하지 않는다.

[0142] 일부 구현예에서, 제형은 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되며, 여기서 유리 아미노산은 리신(K) 및 아르기닌(R), 및 글루타민(Q), 트립토판(W), 티로신(Y), 시스테인(C), 또는 아스파라긴(N) 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 이의 예시적인 유리 아미노산 제형은 AAF01[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)], AAF07[K, R, Q, Y], AAF03[K, R, Q, W], AAF02[K, R, W], 및 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]을 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 이러한 유리 아미노산 제형은 AAF01[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)], AAF07[K, R, Q, Y], AAF03[K, R, Q, W], 및 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]을 포함한다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인의 유리 아미노산을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산을 포함하지 않는다.

[0143] 일부 구현예에서, 제형은 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되며, 여기서 유리 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R), 및 글루타민(Q), 및 트립토판(W), 티로신(Y), 시스테인(C), 또는 아스파라긴(N) 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 이의 예시적인 유리 아미노산 제형은 AAF01[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)], AAF07[K, R, Q, Y], AAF03[K, R, Q, W], AAF02[K, R, W], 및 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]을 포함한다. 일부

구현예에서, 이의 이러한 유리 아미노산 제형은 AAF01[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)], AAF07[K, R, Q, Y], AAF03[K, R, Q, W], 및 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]을 포함한다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인의 유리 아미노산을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산을 포함하지 않는다.

[0144] 일부 구현예에서, 제형은 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되며, 여기서 유리 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R), 및 글루타민(Q), 및 트립토판(W) 또는 티로신(Y) 중 적어도 하나, 또는 이들의 조합의 유리아미노산; 또는 시스테인(C) 또는 아스파라긴(N) 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 이의 예시적인 유리 아미노산 제형은 AAF01[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)], AAF07[K, R, Q, Y], AAF03[K, R, Q, W], AAF02[K, R, W], 및 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]을 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 이러한 유리 아미노산 제형은 AAF01[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)], AAF07[K, R, Q, Y], AAF03[K, R, Q, W], 및 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]을 포함한다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인의 유리 아미노산을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산을 포함하지 않는다.

[0145] 일부 구현예에서, 제형은 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되며, 여기서 유리 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R), 및 글루타민(Q), 및 트립토판(W) 또는 티로신(Y) 중 적어도 하나 또는 이들의 조합의 유리 아미노산으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성된다. 이의 예시적인 유리 아미노산 제형은 AAF01[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)], 및 AAF03[K, R, Q, W]을 포함한다. 이의 일부 구현예에서, 아미노 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 또는 세린(S)의 유리 아미노산을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 세린(S) 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인의 유리 아미노산을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산을 포함하지 않는다.

[0146] 일부 구현예에서, 제형은 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되며, 여기서 유리 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R), 및 글루타민(Q), 및 시스테인(C) 또는 아스파라긴(N) 중 적어도 하나 또는 이들의 조합의 유리 아미노산으로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 이의 예시적인 유리 아미노산 제형은 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]을 포함한다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인의 유리 아미노산을 포함하지 않는다. 이의 일부 구현예에서, 아미노산 제형은 페닐알라닌(F), 글리신(G), 세린(S), 또는 N-아세틸 시스테인 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합의 유리 아미노산을 포함하지 않는다.

[0147] AAF01은 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형이다. 이에 의해 포함되는 상이한 조합의 수를 결정하기 위한 식은 $2^n - 1$ 이며, 식 중 n 은 아미노산의 선택 목록(예를 들어 5개 아미노산)에서 상이한 아미노산의 수와 같다. 따라서, 리신, 트립토판, 아르기닌, 티로신 및 글루타민(AAF01의 유리 아미노산)의 상이한 조합의 총 수는 31개의 상이한 조합($2^5 - 1$)이다. 간략화를 위해, 선택 아미노산 각각은 다음과 같이 아미노산에 대한 표준 단일 대문자로 지칭된다: 리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q). 상이한 조합은 다음과 같이 목록 2에 제시되어 있다: 5 AA 세트: K, W, R, Y, Q (AAF01). 4 AA 서브세트: K, W, R, Y; K, W, R, Q (AAF03); K, W, Y, Q; K, R, Y, Q (AAF07); 및 W, R, Y, Q. 3 AA 서브세트: K, W, R (AAF02); K, W, Y; K, W, Q; K, R, Y; K, R, Q; K, Y, Q; W, R, Y; W, R, Q; W, Y, Q; 및 R, Y, Q. 2 AA 서브세트: K, W; K, R; K, Y; K, Q; W, R; W, Y; W, Q; R, Y; R, Q; 및 Y, Q.

[0148] 식은 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 데 사용하고/하거나 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 의약을 제조하는데 사용하기 위한 AAF01 중 선택 5 아미노산(K W R Y Q) 및 이의 서브세트(선택 5 아미노산의 2, 3, 또는 4개 아미노산의 서브세트 포함)를 포함하는 제형(예: 약학적 제형) 및 이의 용도에도 적용된다.

[0149] 상기 식 및 추론은, 본원에 기술된 선택 5 아미노산(K W R Y Q)의 2개, 3개, 또는 4개 아미노산의 서브세트의

임의의 조합에도 동일하게 적용된다.

- [0150] 일부 구현예에서, 제형은 리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)의 임의의 2개의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. AAF01의 5 아미노산 제형[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)]의 예시적인 2개의 유리 아미노산 서브세트는 다음과 같다: K, W; K, R; K, Y; K, Q; W, R; W, Y; W, Q; R, Y; R, Q; 및 Y, Q. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 W를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 R을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 Y를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 W 및 R을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 W 및 Y를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 W 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 R 및 Y를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 R 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 Y 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.
- [0151] 일부 구현예에서, 제형은 리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)의 임의의 3개의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. AAF01의 5 아미노산 제형[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)]의 예시적인 3개의 유리 아미노산 서브세트는 다음과 같다: K, W, R; K, W, Y; K, W, Q; K, R, Y; K, R, Q; K, Y, Q; W, R, Y; W, R, Q; W, Y, Q; 및 R, Y, Q. 일부 구현예에서, 제형은 K, W, 및 R를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, W, 및 Y를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, W, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, R, 및 Y를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, R, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, Y, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 W, R, 및 Y를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 W, R, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 W, Y, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 R, Y, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.
- [0152] 일부 구현예에서, 제형은 리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)의 임의의 4개의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. AAF01의 5 아미노산 제형[리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)]의 예시적인 4개 유리 아미노산의 서브세트는 다음과 같다: K, W, R, Y; K, W, R, Q; K, W, Y, Q; K, R, Y, Q; 및 W, R, Y, Q. 일부 구현예에서, 제형은 K, W, R, 및 Y를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, W, R, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, W, Y, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, R, Y, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 W, R, Y, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.
- [0153] 일부 구현예에서, 조성물은 리신(K), 트립토판(W), 아르기닌(R), 티로신(Y), 및 글루타민(Q)의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.
- [0154] 선택 5AA 제형[K, R, Q, C, N]은 본원에 기술된 예시적인 아미노산 제형이다. 이에 의해 포함되는 상이한 조합의 수를 결정하기 위한 식은 $2^n - 1$ 이며, 식 중 n은 아미노산의 선택 목록(예를 들어 5개 아미노산)에서 상이한 아미노산의 수와 같다. 따라서, 리신, 아스파라긴, 아르기닌, 시스테인, 및 글루타민의 상이한 조합의 총 수는 31개의 상이한 조합($2^5 - 1$)이다. 간략화를 위해, 선택 아미노산 각각은 다음과 같이 아미노산에 대한 표준 단일 대문자로 지칭된다: 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q). 상이한 조합은 다음과 같이 목록 1에 제시되어 있다: 5 AA 세트: K, N, R, C, Q. 이의 일부 구현예에서, 트레오닌(T)은 K, N, R, C, Q의 5 AA 세트에 임의로 첨가될 수 있다. 이의 일부 구현예에서, 아르기닌(R)은 K, N, R, C, Q의 5 AA 세트에서 시트룰린 또는 아르기닌과 시트룰린의 조합으로 치환될 수 있다. 4개의 AA 서브세트: K, N, R, C; K, N, R, Q; K, N, C, Q; K, R, C, Q; 및 N, R, C, Q. 이의 일부 구현예에서, 트레오닌(T)은 4개의 AA 서브세트에 임의로 첨가될 수 있다. 이의 일부 구현예에서, 아르기닌(R)이 존재할 때, 이는 4개의 AA 서브 세트 중 어느 하나

에서 시트룰린 또는 아르기닌과 시트룰린의 조합으로 치환될 수 있다.

[0155] 3개 AA의 서브세트: K, N, R; K, N, C; K, N, Q; K, R, C; K, R, Q; K, C, Q; N, R, C; N, R, Q; N, C, Q; 및 R, C, Q. 일부 구현예에서, 트레오닌(T)은 3개의 AA 서브세트 중 어느 하나에 임의로 첨가될 수 있다. 이의 일부 구현예에서, 아르기닌(R)이 존재할 때, 이는 3개의 AA 서브 세트 중 어느 하나에서 시트룰린 또는 아르기닌과 시트룰린의 조합으로 치환될 수 있다. 2개 AA의 서브세트: C, N; K, R; K, C; K, Q; N, R; N, C; N, Q; R, Q; 및 C, Q. 일부 구현예에서, 트레오닌(T)은 2개의 AA 서브세트 중 어느 하나에 임의로 첨가될 수 있다. 이의 일부 구현예에서, 아르기닌(R)이 존재할 때, 이는 2개의 AA 서브 세트 중 어느 하나에서 시트룰린 또는 아르기닌과 시트룰린의 조합으로 치환될 수 있다.

[0156] 식은 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하는 데 사용하고 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 의약을 제조하는데 사용하기 위한 선택 5 아미노산(K W R Y Q) 및 이의 서브세트(선택 아미노산의 2, 3, 또는 4개 아미노산의 서브세트 포함)를 포함하는 제형(예: 약학적 제형) 및 이의 용도에도 적용된다. 선택 5 아미노산(K N R C Q) 및 이의 서브세트(선택 5 아미노산의 2, 3, 또는 4개 아미노산의 서브세트 포함)를 포함하는 이러한 제형(예: 약학적 제형)은, 아르기닌(R)이 존재하는 경우, 아르기닌이 시트룰린 또는 아르기닌과 시트룰린의 조합으로 대체될 수 있는 구현예를 포함한다.

[0157] 상기 식 및 추론은, 본원에 기술된 선택 5 아미노산(K N R C Q)의 2개, 3개, 또는 4개 아미노산의 서브세트 중 어느 하나에도 동일하게 적용된다.

[0158] 일부 구현예에서, 제형은 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q)의 임의의 2개의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q)의 5 아미노산 제형의 예시적인 2개의 유리 아미노산 서브세트는 다음을 포함한다: K, N; K, R; K, C; K, Q; N, R; N, C; N, Q; R, Q; 및 C, Q. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 N을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 R을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 C를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 N 및 R을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 N 및 C를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 N 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 R 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 C 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.

[0159] 일부 구현예에서, 제형은 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q)의 임의의 3개의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q)의 5 아미노산 제형의 예시적인 3개의 유리 아미노산 서브세트는 다음과 같다: K, N, R; K, N, C; K, N, Q; K, R, C; K, R, Q; K, C, Q; N, R, C; N, R, Q; N, C, Q; 및 R, C, Q. 일부 구현예에서, 제형은 K, N, 및 R을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, N, 및 C를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, N, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, R, 및 C를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, R, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, C, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 N, R, 및 C를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 N, R, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 N, C, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 R, C, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.

[0160] 일부 구현예에서, 제형은 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q)의 임의의 4개의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q)의 5 아미노산 제형의 예시적인 4개의 유리 아미노산 서브세트는 다음과 같다: K, N, R, C; K, N, R, Q; K, N, C, Q; K, R, C, Q; 및 N, R, C, Q. 일부 구현예에서, 제형은 K, N, R, 및 C를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, N, R, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, N, C, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 K, R, C, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.

되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제형은 N, R, C, 및 Q를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.

- [0161] 일부 구현예에서, 제형은 리신(K), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 시스테인(C), 및 글루타민(Q)의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.
- [0162] 일부 구현예에서, 제형은 아르기닌(R) 및 리신(K)의 유리 아미노산 및 트립토판(W), 티로신(Y), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 또는 아스파라긴(N) 중 적어도 하나의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 본 구현예의 상이한 조합은 다음과 같이 목록 3에 제시되어 있다: 7 AA 세트: R, K, W, Y, Q, T, N. 이의 구현예에서, 제형은 R, K, W, Y, Q, T, 및 N의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 6개 AA의 서브세트: R, K, W, Y, Q, T [AAF06]; R, K, W, Y, Q, N; R, K, W, Y, T, N; R, K, W, Q, T, N; 및 R, K, Y, Q, T, N. 이의 구현예에서, 제형은 R, K, W, Y, Q, 및 T [AAF06]; R, K, W, Y, Q, 및 N; R, K, W, Y, T, 및 N; R, K, W, Q, T, 및 N; 또는 R, K, Y, Q, T, 및 N의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 5개 AA의 서브세트: R, K, W, Y, Q; R, K, W, Y, T [AAF04]; R, K, W, Y, N; R, K, W, Q, T [AAF05]; R, K, W, Q, N; R, K, W, T, N; R, K, Y, Q, T; R, K, Y, Q, N; R, K, Y, T, N; 및 R, K, Q, T, N. 일부 구현예에서, 제형은 R, K, W, Y, 및 Q; R, K, W, Y, 및 T [AAF04]; R, K, W, Y, 및 N; R, K, W, Q, 및 T [AAF05]; R, K, W, Q, 및 N; R, K, W, T, 및 N; R, K, Y, Q, 및 T; R, K, Y, Q, 및 N; R, K, Y, T, 및 N; 또는 R, K, Q, T, 및 N의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다. 4개 AA의 서브세트: R, K, W, Y; R, K, W, Q [AAF03]; R, K, W, T; R, K, W, N; R, K, Y, Q [AAF07]; R, K, Y, T; R, K, Y, N; R, K, Q, T; R, K, Q, N; 및 R, K, T, N. 이의 구현예에서, 제형은 R, K, W, 및 Y; R, K, W, 및 Q [AAF03]; R, K, W, 및 T; R, K, W, 및 N; R, K, Y, 및 Q [AAF07]; R, K, Y, 및 T; R, K, Y, 및 N; R, K, Q, 및 T; R, K, Q, 및 N; 또는 R, K, T, 및 N. 3개 AA의 서브세트: R, K, W [AAF02]; R, K, Y; R, K, Q; R, K, T; 및 R, K, N. 이의 구현예에서, 제형은 R, K, 및 W [AAF02]; R, K, 및 Y; R, K, 및 Q; R, K, 및 T; 또는 R, K, 및 N의 유리 아미노산을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된다.
- [0163] 따라서, ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 데 사용하고 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 의약을 제조하는데 사용하기 위한 선택 7 아미노산(R, K, W, Y, Q, T, N) 및 이의 서브세트(선택 7 아미노산의 2(R, K), 3, 4, 5, 및 6개 아미노산의 서브세트 포함)를 포함하는 제형(예: 약학적 제형) 및 이의 용도가 본원에 포함된다. 상기 추론은, 본원에 기술된 선택 7 아미노산(R, K, W, Y, Q, T, N)의 2개(R, K), 3개, 4개, 5개, 또는 6개 아미노산의 서브세트의 임의의 조합에도 동일하게 적용된다.
- [0164] 일부 구현예에서, ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하기 위한 제형이 제시되며, 상기 제형은 유리 아미노산의 치료적 유효 조합 및 임의로 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌 및 리신의 치료적 유효량; 및 시스테인, 아스파라긴, 또는 글루타민의 유리 아미노산 중 적어도 하나 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 대상체에서 ARDS 또는 천식과 연관된 폐에서의 체액 축적을 감소시키거나 알러지 비염과 관련된 비강에서의 체액 축적을 감소시키기에 충분하다.
- [0165] 일부 구현예에서, ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하기 위한 제형이 제시되며, 상기 제형은 유리 아미노산의 치료적 유효 조합 및 임의로 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 아르기닌, 리신, 및 글루타민의 치료적 유효량; 및 시스테인 또는 아스파라긴의 유리 아미노산 중 적어도 하나 또는 이들의 임의의 조합의 치료적 유효량으로 구성되거나 본질적으로 이로 구성되고, 유리 아미노산의 치료적 유효 조합은 ARDS 또는 천식과 연관된 폐에서의 체액 축적을 감소시키거나 알러지 비염과 관련된 비강에서의 체액 축적을 감소시키기에 충분하다.
- [0166] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제형은 임의로 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으며, 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합의 총 농도는 90 mM 이하이다. 이의 구현예에서, 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 85 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 80 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 75 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 70 mM 이하

이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 65 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 60 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 55 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 50 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 45 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 40 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 35 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 30 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 25 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 20 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 15 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 10 mM 이하이거나; 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 5 mM 이하이다.

[0167] 이의 구현예에서, 단당류 포도당, 적어도 하나의 포도당 함유 이당류, 또는 이들의 임의의 조합은 10~90 mM의 범위; 10~85 mM의 범위; 10~80 mM의 범위; 10~75 mM의 범위; 10~70 mM의 범위; 10~65 mM의 범위; 10~60 mM의 범위; 10~55 mM의 범위; 10~50 mM의 범위; 10~45 mM의 범위; 10~40 mM의 범위; 10~35 mM의 범위; 10~30 mM의 범위; 10~25 mM의 범위; 10~20 mM의 범위; 5~90 mM의 범위; 5~85 mM의 범위; 5~80 mM의 범위; 5~75 mM의 범위; 5~70 mM의 범위; 5~65 mM의 범위; 5~60 mM의 범위; 5~55 mM의 범위; 5~50 mM의 범위; 5~45 mM의 범위; 5~40 mM의 범위; 5~35 mM의 범위; 5~30 mM의 범위; 5~25 mM의 범위; 5~20 mM의 범위; 1~90 mM의 범위; 1~85 mM의 범위; 1~80 mM의 범위; 1~75 mM의 범위; 1~70 mM의 범위; 1~65 mM의 범위; 1~60 mM의 범위; 1~55 mM의 범위; 1~50 mM의 범위; 1~45 mM의 범위; 1~40 mM의 범위; 1~35 mM의 범위; 1~30 mM의 범위; 1~25 mM의 범위; 또는 1~20 mM의 범위이다.

[0168] 일부 구현예에서, 치료 조성물은 임의의 단당류, 이당류, 올리고당류, 다당류, 및 탄수화물을 포함하여 임의의 당류를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 치료 조성물은 포도당 및/또는 포도당으로 가수분해될 수 있는 임의의 이당류, 올리고당류, 다당류, 및 탄수화물을 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 조성물은 락토오스를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 치료 조성물은 과당 및/또는 갈락토오스 및/또는 과당 또는 갈락토오스로 가수분해될 수 있는 임의의 이당류, 올리고당류, 다당류, 및 탄수화물을 함유하지 않는다.

[0169] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 “본질적으로 구성되는”은 성분 또는 단계의 범주를 명시된 물질 또는 단계, 및 본 발명의 기본적인고 신규한 특성(들)에 중대한 영향을 미치지 않는 것들, 예를 들어 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료를 위한 제형 및 이의 용도, 및 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염을 치료하기 위한 방법으로 한정한다. 예를 들어, “본질적으로 구성된” 것을 사용할 때, 치료 제형은 청구범위에서 명시적으로 인용되지 않은 어떠한 성분도 함유하지 않으며, 이는 유리 아미노산, 이당류, 올리고당류, 또는 폴리펩티드 또는 단백질; 및 ARDS, 천식, 또는 알러지성 비염의 치료에 치료 효과를 갖는 단당류, 이당류, 올리고당류, 다당류, 및 탄수화물이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. “본질적으로 구성되는”의 맥락 내에서, 치료적 유효량은 유성 챔버 검정에서 조사한 분화된 HBEC에서, 벤자민 민감성 전류를 측정함으로써 평가된 ENaC 활성의 변화에 기초하여 결정될 수 있으며, 여기서 최대 1%, 2%, 3%, 4%, 또는 5%의 증가 또는 감소를 부여하는 성분은 “본질적으로 구성되는”의 용어 내에 속할 수 있다.

[0170] 본원에 기술된 제형은 약리학 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 본원에 기술된 제형의 화합물(즉, 유리 아미노산)을 담체 또는 부형제, 및/또는 하나 이상의 다른 부속 성분과 결합시킨 다음, 필요한 경우 및/또는 원하는 경우, 생성물을 원하는 단일 투여 단위 또는 다중 투여 단위로 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0171] 본원에 기술된 약학적 제형 중 활성 성분(들), 약학적으로 허용 가능한 부형제, 및/또는 임의의 추가 성분의 상대량은 치료되는 대상체의 동일성, 신장, 및/또는 병태에 따라 달라질 것이고, 추가로, 제형이 투여될 경로에 따라 달라질 것이다. 제형은 0.1% 내지 100%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0172] 경구 투여용 고형 투여 형태는 캡슐, 정제, 알약, 분말, 및 과립을 포함한다. 이러한 고형 투여 형태에서, 활성 성분은 구연산나트륨 또는 인산이칼슘과 같은 적어도 하나의 불활성 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체 및/또는 전분, 락토오스, 수크로오스, 포도당, 만니톨, 및 규산과 같은 필러 또는 증량제; 예를 들어 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로오스, 및 아카시아와 같은 결합제; 글리세롤과 같은 습윤제; 한천, 탄산 칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 및 탄산나트륨과 같은 붕해제;

파라핀과 같은 용해 지연제; 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제; 예를 들어 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 보습제; 카올린 및 벤토나이트 클레이와 같은 흡수제; 및 탈크, 스테아린산 칼슘, 스테아린산 마그네슘, 고휘 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 황산나트륨과 같은 윤활제, 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제, 및 알약의 경우, 투여 형태는 완충제를 포함할 수 있다.

[0173] 소정의 구현예에서, 본원에 기술된 아미노산을 포함하는 제형은 분말 형태로 제공되어 대상체에게 투여하기 위해 재구성될 수 있다. 본원에 기술된 약학적 제형은 구강을 통한 폐 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장, 및/또는 판매될 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분이 포함된 건조 입자를 포함할 수 있고, 건조 입자의 직경은 약 0.5 내지 약 7 나노미터 또는 약 1 내지 약 6 나노미터 범위일 수 있다. 이러한 제형은, 분사제의 스트림이 유도되어 분말을 분산시킬 수 있는 건조 분말 저장조가 포함된 장치를 사용하여/하거나 저-비등점 추진제에 용해 및/또는 현탁된 활성 성분을 밀봉된 용기 내에 포함하는 장치와 같은 자가-추진 용매/분말 분배 용기를 사용하여 투여하기 편리하도록 건조 분말의 형태를 취한다. 이러한 분말은 입자를 포함하는데, 중량 기준으로 입자의 적어도 98%는 0.5 나노미터 초과와 직경을 갖고, 입자 수를 기준으로 입자의 적어도 95%는 7 나노미터 미만의 직경을 갖는다. 대안적으로, 중량 기준으로 입자의 적어도 95%는 1 나노미터 초과와 직경을 갖고, 입자 수를 기준으로 입자의 적어도 90%는 6 나노미터 미만의 직경을 갖는다. 건조 분말 제형은 설탕과 같은 고휘 미세 분말 희석제를 포함할 수 있고, 단위 투여량 형태로 편리하게 제공된다.

[0174] 경구 및 비경구 투여용 액상 투여 형태는 약학적으로 허용 가능한 유화액, 마이크로유화액, 용액, 현탁액, 시럽, 및 엘릭서를 포함한다. 활성 성분 이외에, 액상 투여 형태는, 예를 들어 물 또는 다른 용매와 같이 당업계에서 널리 사용되는 불활성 희석제; 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 아세트산에틸, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(예: 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 검, 올리브유, 피마자유, 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 및 소르비탄의 지방산 에스테르와 같은 가용화제 및 유화제, 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 제형은 습윤제, 유화 및 현탁제, 감미제, 향미제, 및 방향제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 비경구 투여에 대한 소정의 구현예에서, 본원에 기술된 접합체는 CREMOPHOR®, 알코올, 오일, 개질된 오일, 글리콜, 폴리소르베이트, 시클로텍스트린, 중합체, 및 이들의 혼합물과 같은 가용화제와 혼합된다.

[0175] 폐 전달용으로 제형화된 본원에 기술된 약학적 제형은 용액 및/또는 현탁액의 액적 형태로 활성 성분을 제공할 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하는 수용액 및/또는 희석식 알코올 용액 및/또는 현탁액으로서 제조, 포장, 및/또는 판매될 수 있고, 임의로 멸균될 수 있으며, 임의의 네블라이저 및/또는 분무 장치를 사용하여 편리하게 투여될 수 있다. 이러한 제형은 다음을 포함하되 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다: 사카린 나트륨과 같은 향미제, 휘발성 오일, 완충제, 표면 활성제, 및/또는 메틸하이드록시벤조에이트와 같은 보존제. 이러한 투여 경로에 의해 제공되는 액적은 약 0.1 내지 약 200 나노미터 범위의 평균 직경을 가질 수 있다. 흡입에 흔히 이용할 수 있는 장치는 다음을 포함한다: 가압식 정량 흡입기(pMDI), 네블라이저(예를 들어, 압축 공기/제트 및 초음파 네블라이저), 및 건조 분말 흡입기(DPI). 제트 네블라이저는 더 작은 입자 크기를 전달하며 초음파 네블라이저에 비해 긴 치료 시간을 필요로 한다. 흡입을 통해 투여되는 의약은 대상체가 기도 내로 흡입하는 에어로졸 분무, 미스트, 또는 분말을 통해 분산된다.

[0176] 폐 전달에 유용한 것으로 본원에 기술된 제형은 본원에 기술된 약학적 제형의 비강내 전달에도 사용될 수 있다. 비강내 투여에 적합한 또 다른 제형은 활성 성분을 포함하는 거친 분말로서, 평균 입자 크기는 약 0.2 내지 500 마이크로미터이다. 이러한 제형은 콧구멍에 가깝게 유지된 분말 용기로부터 비강을 통한 신속한 흡입에 의해 투여된다.

[0177] 비강 투여용 제형은, 예를 들어 적게는 약 0.1%(w/w) 내지 많게는 100%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있고, 본원에 기술된 하나 이상의 추가 성분을 포함할 수 있다. 이러한 제형은, 예를 들어 종래의 방법을 사용하여 만들어진 정제 및/또는 캔디(lozenge)의 형태일 수 있고, 예를 들어 0.1 내지 20%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있고, 나머지는 경구 용해성 및/또는 분해성 조성물을 포함할 수 있으며, 본원에 기술된 추가 성분 중 하나 이상을 임의로 포함할 수 있다. 대안적으로, 구강 투여용 제형은 활성 성분이 포함된 분말 및/또는 에어로졸화된 용액 및/또는 분무화된 용액 및/또는 현탁액을 포함할 수 있다. 이러한 분말화된, 에어로졸화된, 및/또는 에어로졸화된 제형은, 분산될 때, 약 0.1 내지 약 200 나노미터 범위의 평균 입자 및/또는 액적 크기를 가질 수 있고, 본원에 기술된 추가 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0178] 전술한 본 개시의 구현예에 대한 변화, 변형, 및 변경은 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 모든 변화, 변형, 변경 등은 본 개시의 사상 및 범주 내에 속하도록 의도되며, 첨부된 청구범위에 의해서만 한정된다.

- [0179] 본 개시의 몇몇 구현예가 기술되었지만, 이들 구현예는 단지 예시적인 것이고 제한적인 것이 아니며, 많은 변형이 당업자에게 명백해질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 본원에서 논의된 모든 치수는 예시로서만 제공되며, 예시적이되 한정하지 않는 것으로 의도된다.
- [0180] 본 설명에서 긍정적으로 식별된 임의의 특징부 또는 요소는 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 구현예의 특징부 또는 요소로서 구체적으로 배제될 수도 있다.
- [0181] 본원에 기술된 개시는, 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소(들), 제한(들)이 없는 가운데 실시될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 한정이 아닌 설명의 용어로서 사용되며, 도시되고 기술된 특징 또는 이의 일부분의 임의의 등가물을 배제하기 위해 이러한 용어 및 표현의 사용하려는 의도는 없지만, 본 개시의 범주 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다.
- [0182] **실시예**
- [0183] **실시예 1: ARDS:IL-13 매개 폐 조직 염증을 재현하는 폐 병리학의 모델 시스템**
- [0184] **물질 및 방법**
- [0185] IL-13: abcam (#ab9577); 모액: 10 μ g/mL(물); 20 ng = 2 μ L 모액/mL(배지)
- [0186] 배지는 IL-13과 함께 격일로 변경함
- [0187] 실험 설계: 4일 및 14일 동안 20 ng/mL(배지)로 IL-13을 치료함. 염기성 링거에서 유성 챔버 실험(기저측에 5 mM 포도당).
- [0188] 일부 구현예에서, 실험 연구는 다음을 결정하기 위한 것이었다:
- [0189] - 베이스라인 값(30분)
- [0190] - 6 μ M 벤자밀의 존재 또는 부재(꼭지측)(15분)
- [0191] - 20 μ M CFTRinh 172의 존재 또는 부재(꼭지측 및 기저측)(15분)
- [0192] - 10 μ M CaCCinh A01의 존재 또는 부재(꼭지측 및 기저측)(10분)
- [0193] - 20 μ M 부메타니드의 존재 또는 부재(기저측)(15분)
- [0194] 0일차 분석의 경우:
- [0195] - IL-13 치료: 0 ng/mL(배지) · 염기성 링거 또는 아미노산(AA) 제형을 대상으로 한 유성 챔버 실험.
- [0196] - 추가로, S 측에 5mM 포도당을 첨가함.
- [0197] 4일 또는 14일 동안의 치료 분석:
- [0198] - IL-13 치료: 20 ng/mL(배지)
- [0199] - 염기성 링거 또는 AA 제형을 대상으로 한 유성 챔버 실험.
- [0200] - 추가로, S 측에 5mM 포도당을 첨가함.
- [0201] 일부 구현예에서, 4일차 및 14일차 실험 연구는 다음을 결정하기 위한 것이었다:
- [0202] - 베이스라인 값(30분)
- [0203] - 6 μ M 벤자밀의 존재 또는 부재(점막측)(15분)
- [0204] - 20 μ M 부메타니드의 존재 또는 부재(장막측)(15분)
- [0205] - 20 μ M CFTRinh 172의 존재 또는 부재(점막 및 장막측)(15분)
- [0206] **결과**
- [0207] 염증이 있는 동안 ENaC의 중요성을 조사하고 ARDS가 진화하는 동안 그 활성이 어떻게 조절되는지 탐색하기 위해, 본 발명자들은 정상 인간의 폐로부터 수확한 인간 기관지 상피 세포(HBEC)의 일차 배양물을 사용하였는데, 상기 세포는 30일 동안 공기-배지 계면(꼭지측에 공기 및 기저측에 배지)을 시험관에서 분화시킨 것이다. 분화된 HBEC를 전기생리학 실험에 사용하여 IL-13이 이들 세포에 미치는 효과를 평가하였다. 이들 실험

의 결과는 ENaC 전류의 IL-13 투여량 의존적 감소를 보여주었다(도 2). 결과는 또한 IL-13 노출의 8일차에 ENaC 전류의 최대 감소가 발생하였음을 보여주었다(도 3). 유사하게, IL-13(20 ng/mL)은 노출 8일차에 장벽 기능의 최대 감소를 야기하였다. 이들 연구는 IL-13 노출이 분화된 HBEC에서 ENaC 활성화 및 장벽 기능을 감소시켰음을 입증하였다. 상기 내용은, IL-13에 노출된 HBEC는 호흡곤란의 병태 하의 폐 조직의 특징적인 특성을 나타냈고, 따라서 ARDS 및 천식을 치료하기 위한 제형의 효능을 평가하기 위한 시험관 내 모델 시스템을 제공하였다.

[0208] **실시예 2: IL-13-매개 폐 조직 염증의 맥락에서 ARDS를 재현하는 폐 병리학 모델 시스템을 사용하여 아미노산 제형 시험하기**

[0209] 아미노산의 선택 조합을 포함하는 다양한 제형을 스크리닝하고, 4일 또는 14일 동안 IL-13(20 ng/mL)에 노출시킨 분화된 HBEC에서 장벽 기능을 개선하고, ENaC를 통해 전기발생 나트륨 흡수를 증가시키고(도 4), 양성 섬유증 막관통 전도 조절제(CFTR) 및 아놀타민 1(ANO1) 채널을 통해 음이온 분비를 감소시키는 능력에 기초하여 이들의 순위를 매겼다. 예시적인 5 아미노산 제형(AAF01)은 이러한 정량적 분석에 기초하여 식별한다. AAF01에 의해 부여된 순 나트륨 흡수 기능은 나트륨 동위원소(^{22}Na) 플럭스 연구를 사용하여 검증한다. AAF01은 또한 나트륨-수소 교환기 이소형 3(NHE3)을 통해 전기적 중성인 나트륨 흡수를 증가시켰다. 웨스턴 블롯 분석은, 대조군 용액의 존재 하에 인큐베이션한 분화된 HBEC와 비교했을 때, 분화된 HBEC에서, AAF01이 존재할 때, ENaC 및 NHE3의 단백질 수준이 증가하고, CFTR이 감소하고, ANO1(칼슘-활성화 염화물 채널)이 감소하고, 밀착 연결 단백질 클라우딘1 및 E-카드헤린의 수준이 증가하였음을 보여주었다.

[0210] 4일 또는 14일 동안 IL-13에 노출시킨 분화된 HBEC에 AAF01이 미치는 효과(도 5a 및 도 5b)를 링거 용액(음성 대조군 제형/용액)의 효과와 비교하였다. HBEC는 4일차 또는 14일차에 링거 용액과 비교했을 때 AAF01 제형의 존재 시에 증가된 ENaC 전류를 나타냈다. 도 5a 참조. ENaC 전류의 AAF01-매개 증가는 IL-13 노출의 14일차에 더 두드러졌는데, 신호전달 경로가 관여하는 조직 및/또는 세포의 생화학적 무결성, 및 구조 단백질과 세포 표면 수송 및 채널 단백질의 상태를 포함하는 발병과 관련하여, 모델 시스템의 후기 상태는 ARDS의 후기 단계와 상관되었다.

[0211] 추가의 실험을 수행하여, NKCC1의 강력한 억제제인 부메타니드가 존재할 때, 염화물이 꼭지극을 통해 배출되기 전에 세포 내로 진입하는 것을 방지하는 AAF01의 효과를 평가하였다.

[0212] 도 6a는 ^{36}Cl 을 사용한 동위원소 플럭스 연구의 결과를 제시한 것으로서, 표시된 인큐베이션 일차에 (IL-13이 없는) 링거 용액, (IL-13이 포함된) 링거 용액, 또는 AAF01이 (IL-13과 함께) 존재할 때, 순 염화물 분비를 보여준다. AAF01은 IL-13이 존재할 때에도 염화물 분비를 감소시켰다. 도 6b는 ^{36}Cl 을 사용한 동위원소 플럭스 연구의 결과를 제시한 것으로서, 부메타니드 첨가 후 순 염화물 분비를 보여준다. IL-13은 순 염화물 분비를 증가시켰다. 부메타니드-민감성 음이온 전류는 AAF01이 존재할 때 감소된다. 이러한 감소는 링거 용액이 존재할 때는 관찰되지 않는다. 따라서, AAF01은 이들 연구에 사용된 음성 대조군 제형/용액에 비해 염화물 분비를 감소시킨다. 부메타니드의 첨가는 순 염화물 분비를 완전히 역전시키지는 않았다. 그러나, AAF01의 존재는 순 염화물 흡수를 초래한다. 이들 연구는 AAF01이 강화된 ENaC 활성화 및 염화물 분비 감소를 통해 체액 흡수를 증가시키는데 효과가 있음을 입증하였는데, 이 효과는 ARDS 또는 천식에서 관찰된 것과 같은 폐포액을 제거하는 데 도움을 주고, 알러지성 비염에서 관찰된 과도한 비강 분비물을 제거하는 데 도움을 준다.

[0213] 링거 용액의 존재 하에 인큐베이션한 분화된 HBEC와 비교했을 때, AAF01이 존재할 때 분화된 HBEC에서 밀착 연결 단백질 클라우딘1 및 E-카드헤린의 수준이 증가하였음을 보여주는 결과를 통해 AAF01이 장벽 기능도 개선하였음을 알 수 있다.

[0214] 도 7a~7d는, IL-13-유도성 ENaC 활성화 감소가 표시된 아미노산 제형이 존재할 때 유의하게 개선되었음을 보여주는 결과를 제시하는데, 최대값은 IL-13 치료 후 4일차에 AAF03에 노출된 세포 및 14일차에 AAF01에 노출된 세포에서 나타났다. IL-13-유도 음이온 전류 증가는 표시된 예시적인 아미노산 제형이 존재할 때 유의하게 감소하였으며, 최저 값은 IL-13 치료 후 4일차에 AAF04에 침지한 세포, 및 14일차에 AAF03에 침지한 세포에서 관찰되었다.

[0215] 도 8a 및 8b는 IL-13-유도 ENaC 활성화 감소가 IL-13 치료 후 4일차에 AAF01 또는 AAF07이 존재할 때, 및 IL-13 치료 후 14일 차에 AAF01, AAF03, 또는 AAF07이 존재할 때 유의하게 개선됨을 보여주는 결과를 제시한다. IL-13-유도 음이온 전류 증가는 표시된 예시적인 아미노산 제형에 노출시킨 HBEC에서 유의하게 감소하였으며, 최저 값은 IL-13 치료 후 4일차 및 14일차에 AAF07에 침지한 세포에서 관찰되었다.

- [0216] 실시예 3: ARDS를 재현하는 폐 병리학의 모델 시스템: 인간 기관지 상피 모델 시스템을 사용한 TNF- α -매개 폐 조직 염증
- [0217] 접근법: TNF- α 는 사이토카인 폭풍에 연루된 주요 전염증성 매개인자 중 하나로 식별되었으므로, 본 발명자들은 분화된 HBEC 모델 시스템을 사용하여, ARDS 폐 병리학의 특징을 재현하는 염증 상태의 유도인자인 TNF- α 에 대한 노출의 맥락에서 아미노산 제형의 효과를 탐구하였다. 위 실시예 1 내지 2에 기술된 바와 같이, 다양한 농도의 TNF- α 가 존재하는 가운데 상이한 기간 동안 인큐베이션한 분화된 HBEC를 대상으로, 아미노산 제형이 ENaC 활성화, 음이온 채널 활성화, 및 장벽 기능에 미치는 효과에 대해 이들 아미노산 제형을 평가할 수 있다.
- [0218] 방법 및 물질
- [0219] 유성 챔버 연구를 사용해 다음을 결정할 수 있다:
- [0220] - 벤자밀-민감성 전류(ENaC에 의해 매개된 전기발생 나트륨 전류)
- [0221] - 순 Na 흡수를 결정하기 위해 ^{22}Na 를 사용하는 유성 플럭스 연구
- [0222] - 장벽 투과성의 척도로서의 TEER(오姆)
- [0223] - FITC 텍스트란을 사용한 투과성 검정
- [0224] - qRT-PCR에 의한 ENaC(α , β , 및 γ)의 mRNA 발현, 클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘 및 E-카데린, 산 감지 이온 채널(ASIC1a), 및 아쿠아포린 1 및 5
- [0225] ENaC(α , β , 및 γ), 밀착 연결 단백질(클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘, 및 E-카데린), 산 감지 이온 채널(ASIC1a), 및 아쿠아포린 1 및 5의 단백질 수준 및 발현을 결정하기 위한 웨스턴 블롯 분석 및 면역조직화학
- [0226] - ELISA를 사용하여 배양 배지에서 사이토카인 발현을 결정하여 IL-6, IL-1 β , 및/또는 IL13 검출하기.
- [0227] ENaC 활성화 및 장벽 기능의 최대 감소에 필요한 TNF- α 의 최소량은 상이한 농도, 예를 들어 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 또는 40 ng/L의 TNF- α 를 배양 배지에 첨가하여 결정하였다.
- [0228] 예를 들어 0, 1, 3, 7, 또는 14일차에 TNF- α 를 첨가한 후, TNF- α 가 ENaC 활성화 및 장벽 기능을 감소시키는 데 필요한 시간을 평가하고, 이를 매일 결정하였다.
- [0229] 일부 구현예에서, HBEC는 0.00005 ng/mL 내지 500 ng/mL TNF- α 범위의 상이한 농도의 TNF- α (예: 배지 중 0.00005, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 또는 500 ng/mL TNF- α)로 7일 동안 치료하였다. TNF- α 의 농도가 증가함에 따라 ENaC 전류가 감소하였음을 보여주는 도 9를 참조한다.
- [0230] ENaC 활성화 및 장벽 기능의 최대 증가를 유도하는 데 필요한 AAF01 투여량 및 시간을 평가하고 결정하였다. AAF01은 TNF- α 치료 전, 치료와 함께, 및 치료 후에 사용하였다. AAF01 투여와 투여 시점은 본원에 기술된 TNF- α 매개 폐 조직 염증 모델 시스템과 관련하여 위에서 결정된 TNF- α 의 양 및 TNF- α 노출의 지속기간과 함께 평가하였다.
- [0231] 목표: TNF- α 로 치료한 분화된 HBEC에서 AAF01이 ENaC 활성화 및 장벽 기능의 최대 증가를 유도하는 데 필요한 최소 농도 및 노출 시간을 정의하기 위함. 이를 달성하기 위해, 0.4 μm 크기의 기공을 갖는 Costar의 투과성 스냅 웰 인서트 상에서 HBEC를 성장시키고, 공기-배지 계면에서 30일 동안 분화시켰다. ENaC의 활성화 감소, CFTR 및 ANO1 활성화의 증가, 및 장벽 기능 감소에 TNF- α 가 미치는 효과는 아래에 개략된 것과 같이 평가할 수 있다.
- [0232] ENaC 활성화의 감소, CFTR 및 ANO1 활성화의 증가, 및 장벽 기능의 감소에 의해 입증되는 것과 같이, 염증 효과를 유도하는 데 필요한 TNF- α 의 최소량을 결정한다. 이를 달성하기 위해, 상이한 농도, 예를 들어 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 또는 40 ng/L의 TNF- α 를 배양 배지에 첨가할 수 있다. ENaC 전류의 최대 감소를 초래하는 TNF- α 의 농도를 후속 연구에 사용하였다. 이들 실험은 상기 실시예 1 및 2와 관련하여 기술된 것과 같이 수행하였다.
- [0233] TNF- α 가 ENaC 활성화의 감소, CFTR 및 ANO1 활성화의 증가, 및 장벽 기능의 감소에 의해 입증된 것과 같은 효과를 발휘하는 데 필요한 시간을 결정한다. 이를 달성하기 위해, TNF- α 를 배지에 첨가하고, 첨가 후 0, 1, 3, 7, 또는 14일차에 연구하였다. 이들 연구는 TNF- α 에 대한 조기 및 후기 반응을 식별하고, SARS-CoV-2 감염 및 ARDS 발생 후 폐 조직에 대한 생리학적 변화의 진행을 더 잘 정의하는 데 도움이 된다.
- [0234] 본원에 기술된 것과 같은 아미노산을 포함하는 상이한 제형(예: AAF01)을 평가하여, 현저한 치료 활성을 갖는

것들을 특성화한다. TNF- α 가 최대 효과를 발휘하는 데 필요한 투여량 및 시간을 전술한 것과 같이 결정하였다. ARDS의 진행에서 관찰된 상이한 단계의 폐 병리학과 상관되는 상이한 TNF 매개 염증 상태 하에, 상이한 제형을 병렬로 평가하였다.

[0235] 인터페론-감마(IFN- γ) 하나만 존재하는 가운데 배양하거나 다양한 농도의 TNF- α 및 IFN- γ 의 조합이 존재하는 가운데 상이한 기간 동안 배양한 분화된 HBEC에서, 아미노산 제형이 ENaC 활성, 음이온 채널 활성, 및 장벽 기능에 미치는 영향에 대해 평가하였다. 도 10은, 예를 들어 더 낮은 농도의 IFN- γ (0.00005 내지 0.05 ng/mL(배지))로 세포를 치료했을 때 ENaC 전류가 증가하였음을 보여준다. ENaC 전류는 더 높은 수준의 IFN- γ 에 노출될 때 베이스라인 수준(미치료)으로 복귀하였지만, 더 높은 농도의 IFN- γ (>0.05 ng/mL 배지)로 세포를 치료했을 때 베이스라인 대비 감소하였다. 이들 연구는 TNF- α 단독, IFN- γ 단독, 또는 TNF- α 및 IFN- γ 의 조합에 대한 조기 및 후기 반응을 식별하고, SARS-CoV-2 감염 및 ARDS 발생 후 폐 조직에 대한 생리학적 변화의 진행을 더 잘 정의하는 데 도움이 된다. ARDS의 진행에서 관찰된 상이한 단계의 폐 병리학과 상관되는 상이한 TNF- α -매개 염증 상태, IFN- γ -매개 염증 상태, 및 TNF- α /IFN- γ -매개 염증 상태 하에, 상이한 제형을 병렬로 평가할 수 있다.

[0236] 분화된 HBEC에서 ENaC 활성에 TGF- β 가 미치는 효과 또한 본원에서 조사하였다. 예를 들어, 도 11은 TGF- β 1의 농도가 증가함에 따라 ENaC 전류가 감소하였음을 보여준다.

[0237] 요약하면, 본원에 제시된 결과에 기초하면, TNF- α 의 농도를 증가시키면 ENaC 활성이 농도-의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 도 9 참조. IFN- γ 의 농도를 증가시키는 경우, 더 낮은 농도의 IFN- γ 에서 활성의 증가하고, 더 높은 농도(> 5 ng)에서 ENaC 활성이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 도 10 참조. TGF- β 1 농도를 증가시키는 경우, ENaC 활성이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 도 11 참조.

[0238] 본 발명자들은 또한 TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1의 사이토카인 콕테일이 존재하는 가운데 7일 동안 인큐베이션한 분화된 HBEC에서 ENaC 활성을 평가하였다. 도 12 참조. ENaC 전류는, 사이토카인 콕테일이 없는 배지(미처리)에서 인큐베이션한 미치료 HBEC에 비해 사이토카인 콕테일(비히클)에 7일 동안 노출시킨 HBEC에서 유의하게 감소하였다. 도 12에 사용된 바와 같이, 용어 "비히클"은 AA를 도입하여 5AA 제형 및 NC 제형을 생성한 용액으로서, AA 제형에 대한 음성 대조군의 역할을 하는 용액을 지칭한다. 선택 5AA 제형(AA; 아르기닌, 리신, 시스테인, 아스파라긴, 및 글루타민)은 미처리 HBEC와 비교했을 때 TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1에 노출시킨 HBEC에서 ENaC 활성을 유의하게 회복시켰다. 대조적으로, NC 제형(아스파르트산, 트레오닌, 및 류신)은 사이토카인-유도성 ENaC 활성 감소를 개선하지 않았다. 실제로, NC 제형은 사이토카인 콕테일과 비히클에 노출시킨 HBEC에 비해 사이토카인 콕테일에 노출시킨 HBEC에서 ENaC 활성을 추가로 감소시켰다. 따라서, 일부 구현예에서, TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1을 포함하는 사이토카인 콕테일이 존재하는 가운데 7일 동안 인큐베이션한 분화된 HBEC에서 관찰된 것과 같은 손상된 ENaC 활성의 맥락에서, 아미노산 제형이 ENaC 활성을 개선하는 능력에 대해 평가하였다. 도 12에 제시된 결과는 본원에 기술된 예시적인 제형인 "5AA 제형"의 치료 특성을 입증한다.

[0239] 추가 물질 및 방법

[0240] 대표적인 사이토카인에 노출된 HBEC에서 AA-EC01과 함께 인큐베이션한 후, ENaC, IL-6, 및 MUC5AC의 발현 패턴을 면역형광에 의해 시각화하였다. 미처리 대조군 및 20 ng/mL IL-13에 14일 동안 노출시키고 링거 용액 또는 AA-EC01로 1시간 동안 치료한 연령-일치 HBEC에서 ENaC 발현을 평가하였다. 미처리 대조군 및 IFN- γ , TNF- α , 및 TGF- β 1(각각 1 ng/mL)의 사이토카인 콕테일에 7일 동안 노출시키고 링거 용액 또는 AA-EC01로 1시간 동안 치료한 연령-일치 HBEC에서 IL-6 발현을 평가하였다. 미처리 대조군 및 20 ng/mL IL-13에 14일 동안 노출시키고 링거 용액 또는 AA-EC01로 1시간 동안 치료한 연령-일치 HBEC에서 MUC5AC 발현을 평가하였다. 모든 실험은 n = 2(공여자)를 대상으로 N = 2(상이한 절편)를 이용해 수행하였다. 본원에서 상세히 기술된 바와 같이, AA-EC01은 IL-13이 존재할 때 꼭지측 ENaC 발현을 회복시키고, COVID-19 사이토카인 조합(IFN- γ , TNF- α , 및 TGF- β 1)에 의해 유발된 IL-6 분비를 감소시켰으며, IL-13에 의해 유도된 MUC5AC 분비를 감소시켰다.

[0241] **실시예 4: ARDS를 재현하는 폐 병리학의 모델 시스템: 인간 폐포 내피 세포 모델 시스템을 사용한 TNF 매개 폐 조직 염증**

[0242] **접근법:** 인간 폐포 내피 세포에 대한 TNF- α 의 효과를 탐색하기 위해, 본 발명자들은 또한 인간 폐포 내피 세포 모델 시스템을 사용하여, ARDS 폐 병리학의 특징을 재현하는 염증 상태의 유도인자로서 TNF- α 에 대한 노출의 맥락에서, 아미노산 제형의 효과를 탐색하게 된다. 위 실시예 1 내지 3에 기술된 바와 같이, 다양한 농도의

TNF- α 가 존재하는 가운데 상이한 기간 동안 인큐베이션한 분화된 인간 폐포 내피 세포를 대상으로, 아미노산 제형이 ENaC 활성, 음이온 채널 활성, 및 장벽 기능에 미치는 효과에 대해 이들 아미노산 제형을 평가할 수 있다.

- [0243] **방법 및 물질**
- [0244] 유성 챔버 연구를 사용해 다음을 결정하게 된다:
- [0245] - 벤자밀-민감성 전류(ENaC에 의해 매개된 전기발생 나트륨 전류)
- [0246] - 순 Na 흡수를 결정하기 위해 ^{22}Na 를 사용하는 유성 플럭스 연구
- [0247] - 장벽 투과성의 척도로서의 TEER(오옴)
- [0248] - FITC 텍스트란을 사용한 투과성 검정
- [0249] - qRT-PCR에 의한 ENaC(α , β , 및 γ)의 mRNA 발현, 클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘 및 E-카데린, 산 감지 이온 채널(ASIC1a), 및 아쿠아포린 1 및 5
- [0250] - ENaC(α , β 및 γ), 밀착 연결 단백질(클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘, 및 E-카데린), 산 감지 이온 채널(ASIC1a), 및 아쿠아포린 1 및 5의 단백질 수준 및 발현을 결정하기 위한 웨스턴 블롯 분석 및 면역조직화학
- [0251] - ELISA를 사용하여 배양 배지에서 사이토카인 발현을 결정하여, 예를 들어 IL-6, IL-1 β , 및/또는 IL13 검출하기.
- [0252] ENaC 활성 및 장벽 기능의 최대 감소에 필요한 TNF- α 의 최소량이 결정될 것이다. 상이한 농도(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 또는 40 ng/L)의 TNF- α 를 배양 배지에 첨가한다. TNF- α 가 ENaC 활성 및 장벽 기능을 감소시키는 데 필요한 시간을 평가하고 결정할 것이다. 예를 들어 0, 1, 3, 7, 또는 14일차에 TNF- α 를 첨가한 후, TNF- α 의 효과를 매일 연구할 것이다.
- [0253] ENaC 활성 및 장벽 기능의 최대 증가를 유도하는 데 필요한 AAF01 투여량 및 시간을 평가하고 결정할 것이다. AAF01은 TNF- α 치료 전, 치료와 함께, 및 치료 후에 사용할 것이다. AAF01 투여와 시점은 본원에 기술된 TNF- α 매개 폐 조직 염증 모델 시스템과 관련하여 위에서 결정된 TNF- α 의 양 및 TNF- α 노출의 지속시간과 함께 평가하게 된다.
- [0254] **목표:** TNF- α 로 치료한 인간 폐포 내피 세포에서 AAF01이 ENaC 활성 및 장벽 기능의 최대 증가를 유도하는 데 필요한 최소 농도 및 노출 시간을 정의하기 위함. 이를 달성하기 위해, 0.4 μm 크기의 기공을 갖는 Costar의 투과성 스냅 웰 인서트 상에서 인간 폐 미세혈관 내피(HPMVE) 세포를 성장시키고, 배지(꼭지측 및 기저측 모두를 이용한 배지)에서 7일 동안 분화시킬 수 있다. ENaC의 활성 감소, CFTR 및 ANO1 활성의 증가, 및 장벽 기능 감소에 TNF- α 가 미치는 효과는 아래에 개략된 것과 같이 평가할 수 있다.
- [0255] ENaC 활성의 감소, CFTR 및 ANO1 활성의 증가, 및 장벽 기능의 감소에 의해 입증되는 것과 같이, 염증 효과를 유도하는 데 필요한 TNF- α 의 최소량을 결정한다. 이를 달성하기 위해, 상이한 농도, 예를 들어 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 또는 40 ng/L의 TNF- α 를 배양 배지에 첨가하게 된다. ENaC 전류의 최대 감소를 초래하는 TNF- α 의 농도를 후속 연구에 사용하게 된다. 이들 실험은 상기 실시예 1 및 2와 관련하여 기술된 것과 같이 수행하게 된다.
- [0256] TNF- α 가 ENaC 활성의 감소, CFTR 및 ANO1 활성의 증가, 및 장벽 기능의 감소에 의해 입증된 것과 같은 효과를 발휘하는 데 필요한 시간을 결정한다. 이를 달성하기 위해, TNF- α 를 배지에 첨가하고, 첨가 후 0, 1, 3, 7, 또는 14일차에 연구하게 된다. 이들 연구는 TNF- α 에 대한 조기 및 후기 반응을 식별하고, SARS-CoV-2 감염 및 ARDS 발생 후 폐 조직에 대한 생리학적 변화의 진행을 더 잘 정의하는 데 도움이 될 것이다.
- [0257] 본원에 기술된 것과 같은 아미노산을 포함하는 상이한 제형(예: AAF01)을 평가하여, 현저한 치료 활성을 갖는 것들을 특성화한다. TNF- α 가 최대 효과를 발휘하는 데 필요한 투여량 및 시간을 전술한 것과 같이 결정하게 된다. ARDS의 진행에서 관찰된 상이한 단계의 폐 병리학과 상관되는 상이한 TNF 매개 염증 상태 하에, 상이한 제형을 병렬로 평가할 수 있다.
- [0258] 인터페론-감마(IFN- γ) 하나만 존재하는 가운데 배양하거나 다양한 농도의 TNF- α 및 IFN- γ 의 조합이 존재하는 가운데 상이한 기간 동안 배양한 인간 폐포 내피 세포에서, 아미노산 제형이 ENaC 활성, 음이온 채널 활성, 및

장벽 기능에 미치는 영향에 대해 평가하게 된다. 이들 연구는 TNF- α 단독, IFN- γ 단독, 또는 TNF- α 및 IFN- γ 의 조합에 대한 조기 및 후기 반응을 식별하고, SARS-CoV-2 감염 및 ARDS 발생 후 폐 조직에 대한 생리학적 변화의 진행을 더 잘 정의하는 데 도움이 될 것이다. ARDS의 진행에서 관찰된 상이한 단계의 폐 병리학과 상관되는 상이한 TNF- α -매개 염증 상태, IFN- γ -매개 염증 상태, 및 TNF- α /IFN- γ -매개 염증 상태 하에, 상이한 제형을 병렬로 평가할 수 있다.

[0259] 인간 폐포 내피 세포는 또한, 예를 들어 실시예 1 및 2에 따라, IL-13이 ENaC 활성화에 미치는 효과를 평가하기 위해 시험될 것이다. 예시적인 아미노산 제형은 HBEC에 대해 위에서 나타난 것과 같이, 인간 폐포 내피 세포에 대한 치료 활성화에 대해서도 평가될 것이다.

[0260] **실시예 5: 실시예 1~4에 사용된 예시적인 방법:**

[0261] 전기생리학 기술: a) 유성 챔버에서 벤자민-민감성 전류(ENaC에 의해 매개되는 전기발생 나트륨 전류), 부메타니드-민감성 전류, 및 경상피 저항의 측정; b) ^{22}Na 를 사용하여 순 Na 흡수를 결정하고 ^{36}Cl 을 사용해 염화물 분비를 결정하는 유성 챔버 플럭스 연구; 및 c) 챔버에 직접 첨가된 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-텍스트란(4 KD)을 사용한 투과성 검정.

[0262] 유성 챔버 - 나트륨 플럭스 (일반)

[0263] 등장성 링거 용액이 담긴 유성 챔버에 8주령 수컷 Swiss 마우스의 소장 점막 조직(회장 및 공장)을 장착하고, 이를 95% O_2 및 5% CO_2 로 버블링한 다음 실험 전체에 걸쳐 37°C를 유지하였다. 조직을 안정화시킨 후, 전도도(G ; mS/cm^2 로 표현됨)를 기록하고, 유사한 전도도에 기초하여 장 조직들 간에 쌍을 형성하였다. 각 조직 쌍의 기저측 또는 꼭지측에 나트륨 방사성 동위원소(^{22}Na)를 첨가하였다(핫). 링거 샘플을 반대쪽으로부터 15분마다 채취하였다(콜드). 감마 계수기를 사용해 샘플 ^{22}Na 활성을 분석하고, 단방향 순 나트륨 플럭스(J_{net} ; $\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)를 계산하였다.

[0264] $J_{\text{net}} = \frac{(\text{콜드 CPM2} - \text{블랭크}) - [(\text{콜드 CPM1} - \text{블랭크}) \times 9/10]}{5 \times 4 \times 140}$

[0265] (핫 CPM - 블랭크) $\times 10 \times 0.3$

[0266] [CPM = 분당 계수, CPM1 = 이전 샘플, CPM2 = 다음 샘플; Blank = ^{22}Na 첨가 없음; 9/10 = 각 샘플에 대한 희석 인자(0.5 mL 내지 5mL); 5 = 챔버 부피(5 mL); 4 = 시간 인자(15분 내지 60분); 140 = 나트륨 농도; 핫 CPM = "핫" 샘플 활성; 콜드 CPM = "콜드" 샘플 활성; 10 = 핫 샘플에 대한 부피 인자(0.1 mL 내지 1 mL); 0.3 = 소장 표면적 (cm^2)]

[0267] 분자 생물학 기술: qRT-PCR에 의한 ENaC(α , β , 및 γ) mRNA 발현, 클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘 및 E-카데린, 산 감지 이온 채널(ASIC1a), 및 아쿠아포린 1 및 5

[0268] 웨스턴 블롯 분석 및 면역조직화학: ENaC(α , β 및 γ), 밀착 연결 단백질(클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘, 및 E-카데린), 산 감지 이온 채널(ASIC1a), 및 아쿠아포린 1 및 5의 단백질 수준 및 발현을 결정하기 위한 웨스턴 블롯 분석 및/또는 면역조직화학

[0269] **실시예 6: 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)의 마우스 모델에서 AAF01을 사용한 폐 기능 개선 및 방사선 제거**

[0270] 본원에 기술된 상이한 농도의 예시적인 제형(예: AAF01)을, 예를 들어 분무화에 의해 전달하고 치료 효과에 대해 평가할 수 있다.

[0271] **ARDS-유도 ARDS 모델**

[0272] TNF- α 가 ENaC 활성화 및 장벽을 감소시키는 데 필요한 시간 결정하기.

[0273] - TNF- α 의 효과는 첨가 후 0, 1, 3, 7, 또는 14일차에 연구될 수 있다.

[0274] **ARDS-유도 폐렴구균 ARDS 모델**

[0275] ARDS의 동물 모델은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 Aeffner 등의 문헌(Toxicologic Pathology, 43: 1074-1092, 2015); Gotts 등의 문헌(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 317: L717-L736, 2019); 및 Hong 등의 문헌[Signal Transduction and Targeted Therapy (2021) 6:1]에 기술되어 있으며, 이들 각각의 내용은 그 전체가

본원에 통합된다. ENaC 활성 및 장벽 기능의 최대 증가를 유도하는 데 필요한 AAF01 투여량 및 시간 결정하기. AAF01은 TNF- α 치료 전, 치료와 함께, 및 치료 후에 사용할 것이다. 전술한 내독소 장벽 기능 검정 및 ARDS 유도 ARDS 모델에서 얻은 정보를 기반으로 TNF- α 의 최적 투여량 및 시간을 식별하였다.

[0276] **방법**

[0277] - 물리적 측정

[0278] 체중, 일상 활동, 호흡수, 산소 포화도, 폐 습윤/건조 중량 비율

[0279] - 생리학적 측정

[0280] 폐 기능 시험, FITC 텍스트란을 사용한 투과성 분석(4 KD 및 10 KD FITC 텍스트란 투과 연구)

[0281] - 분자 생물학

[0282] - qRT-PCR에 의한 ENaC(α , β , 및 γ)의 mRNA 발현, 클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘 및 E-카데린, 산 감지 이온 채널(ASIC 1a), 및 아쿠아포린 1 및 5

[0283] - ENaC(α , β 및 γ), 밀착 연결 단백질(클라우딘 1, 2, 5, 7, 및 8, 오클루딘, 및 E-카데린), 산 감지 이온 채널(ASIC1a), 및 아쿠아포린 1 및 5의 단백질 수준 및 발현을 결정하기 위한 웨스턴 블롯 분석 및 면역조직화학 분석

[0284] - ELISA로 예를 들어 IL-6, IL-1 β , 및/또는 IL13의 사이토카인 수준 결정하기.

[0285] **실시예 7: 도 13 내지 도 18과 관련하여 사용된 예시적인 방법**

[0286] **물질 및 방법**

[0287] **연구 설계.** 상이한 단계의 COVID-19 면역 반응(선천, Th1, Th2, 및 Treg)에 기인하는 개별 사이토카인 및 이들의 조합이 HBEC에서 ENaC 및 장벽 기능에 미치는 효과를, AFC에서 이들 각각의 역할을 결정하기 위한 노력의 일환으로 분석하였다. COVID-19 동안에 나타난 것과 같이, AFC 감소가 폐 부종 또는 ARDS의 주요 유발인자라는 가설을 세웠다. 2명의 별도 폐 공여자 유래의 정상 일차 HBEC(P2)를 사용하였고, 모든 실험은 헬싱키 선언 및 인간 연구 윤리에 관한 Huriert-Serusclat 및 Jardeet 법률에 기술된 지침과 규정에 따라 수행하였고, HBEC를 획득, 배양, 보관, 및 연구하기 위한 프로토콜은 플로리다 대학의 임상시험심사위원회의 승인을 받았다. 개별 사이토카인 및 사이토카인 조합을 이용한 투여량 의존적 및 시간 의존적 인큐베이션 실험을 위해 연령이 일치하는 분화된 HBEC를 여러 군으로 무작위 배정하고, 연구는 2회 또는 3회 반복하였다. 세포를 AA-EC01로 치료할 때 유사한 무작위 배정을 사용하였다. 통계적 분석을 위해 모든 샘플을 모았다. 데이터 이상치는 제외하지 않았다.

[0288] **HBEC 배양물.** HBEC는 MTA를 통해 엘라배마 대학교 및 마이애미 대학교로부터 입수하였다. 전술한 바와 같이 공여자 폐로부터 세포를 분리하였다(M. L. Fulcher, S. H. Randell, in Epithelial Cell Culture Protocols: Second Edition, S. H. Randell, M. L. Fulcher, Eds. (Humana Press, Totowa, NJ, 2013), pp. 109-121). 세포(P0 및 P1)를 랫트 꼬리 콜라겐 I로 코팅된 10 cm의 세포 배양 접시(ThermoFisher) 상에 1×10^6 세포의 농도로 도말하고, 전술한 것과 같이(7I), 100 U/mL 페니실린/스트렙토마이신 및 0.25ug/mL 암포테리신 B(ThermoFisher)가 포함된 37°C의 PneumaCult Ex Plus 배지(StemCell)에서 5% CO₂/95% O₂ 하에 4~8일 동안 증식시켰다. 배양 배지는 세포가 80~90% 융합될 때까지 2일마다 변경하였다.

[0289] 계대 배양을 위해, 배양 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 세척하고, TrypLE 선택 효소(ThermoFisher)로 트립신화하고, 추가 증식을 위해 콜라겐 I로 코팅된 세포 배양 접시에 도말하거나(P1), 콜라겐 IV로 코팅된(Sigma) 투과성 스냅웰 인서트(0.4 μ M 기공 폴리카보네이트막, Corning) 상에 80,000 세포/cm²(P2)의 농도로 도말하였다. 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 PneumaCult Ex Plus 중 스냅웰 배지에서 90% 융합될 때까지 증식시킨 후(세포를 배양 배지에 침지함), 공기-액체 계면에서 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 PneumaCult ALI 배지(StemCell)에서 세포를 분화시켰다. 세포가 완전히 분화될 때까지(14~21일) 2일마다 ALI 배지를 변경하였다. 분화된 HBEC는 섬모 운동성을 특징으로 한다.

[0290] 빠르게는 분화 후 14일차에, ALI 배지에서 회식시킨 사이토카인[IL-13(Abcam), IL-4(PeproTech), TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1(R&D Systems)]으로 기저 치료를 시작하였다. 개별 사이토카인 또는 사이토카인 콕테일을 원하는 농도로 배양 배지에 첨가하고, 세포를 사이토카인과 함께 최대 16일 동안 인큐베이션하였다. 사이토카인을 함유

하는 ALI 배지를 2일마다 변경하였다. 연령 일치 HBEC를 다음 치료군에 배정하였다:

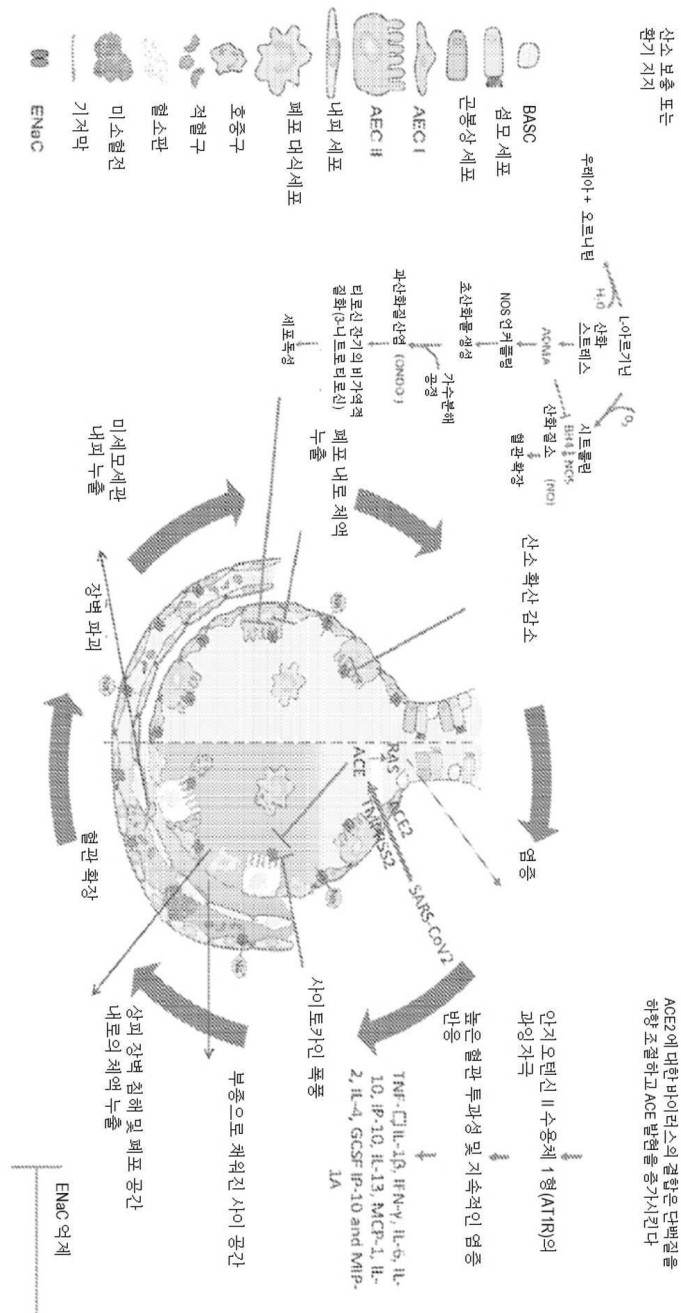
- [0291] **I 투여량 의존적 연구:** 7일 치료의 경우, IFN- γ 또는 TNF- α 를 5×10^{-5} , 5×10^{-4} , 5×10^{-3} , 5×10^{-2} , 0.5, 5, 10, 20, 40, 50, 및 500 ng/mL로 사용하고, TGF- β 1은 5×10^{-5} , 5×10^{-4} , 5×10^{-3} , 0.5, 5, 및 50 ng/mL로 사용하였다. 14일 치료의 경우, IL-13을 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 20, 64 ng/mL로 사용하였다.
- [0292] **II 시간 의존적 연구:** 이들 연구는 벤자밀-민감성 I_{sc} 및 TEER의 최대 억제를 보장하는 농도를 사용하여 수행하였다. HBEC를 각각의 사이토카인으로 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 또는 16일 동안 치료하였다. IFN- γ , TNF- α , 또는 TGF- β 1은 1 ng/mL로 사용하고, IL-13은 20 ng/mL로 사용하고, IL-4는 2 ng/mL로 사용하였다.
- [0293] **III 사이토카인 콕테일:** IFN- γ 및 TNF- α 를 0.05, 0.5, 2.5, 5, 및 10 ng/mL로 사용해 사이토카인 콕테일을 제조하고, 사이토카인 각각에 대해서는 TNF- α , IFN- γ , 및 TGF- β 1을 7일 동안 배양 배지에 첨가하였다.
- [0294] **IV 면역형광을 위한 아미노산 치료:** 이전에, 20 ng/mL IL-13 또는 1 ng/mL IFN- γ , TNF- α , 및 TGF- β 1과 함께 각각 14일 또는 7일 동안 인큐베이션한 세포 배양물(200 μ L)의 꼭지측에 AA-EC01, AANC(음성 대조군), 또는 링거의 등장성 용액을 첨가하였다. 37°C에서 5% CO₂/95% O₂ 하에, 세포 배양물을 아미노산 또는 링거 용액으로 1시간 동안 치료한 후, 면역형광 영상화를 위해 가공하였다.
- [0295] **유성 챔버 사용:** 사이토카인과 함께 인큐베이션한 분화된 HBEC 또는 사이토카인에 노출시키지 않은 연령 일치 HBEC가 포함된 스냅웰을 유성 챔버(Physiologic Instruments)에 장착하고, 113.8 mM Na⁺, 93.6 mM Cl⁻, 25 mM HCO₃⁻, 5.2 mM K⁺, 2.4 mM HPO₄⁻, 0.4 mM H₂PO₄⁻, 1.2 mM Mg²⁺, 1.2 mM Ca²⁺, 및 75 mM 만니톨을 함유하는 등장성 링거 용액, 또는 AA-EC01에 세포를 침지시켰다. 포도당(5 mM)을 기저측에 첨가하고, 챔버를 37°C에서 95% O₂ 및 5% CO₂로 버블링하였다. AA-EC01은 8 mM 리신, 8 mM 트립토판, 8 mM 아르기닌, 8 mM 글루타민, 및 1.2 mM 티로신을 함유하였고, AANC는 8mM 류신, 8 mM 시스테인, 8 mM 이소류신, 8 mM 아스파르트산, 및 8 mM 글루탐산염(Ajinomoto)을 함유하였는데, 이들 모두를 113.8 mM Na⁺, 93.6 mM Cl⁻, 25 mM HCO₃⁻, 5.2 mM K⁺, 2.4 mM HPO₄⁻, 0.4 mM H₂PO₄⁻, 1.2 mM Mg²⁺, 1.2 mM Ca²⁺, 및 40 mM 만니톨을 함유하는 pH 7.4 및 300 mOsm의 전해질 용액에서 희석하였다. 세포 배양물을 0 mV에 연속적으로 전압을 클램핑하면서 30분 동안 유성 챔버에서 평형화시켰다. 기저 단락 전류(I_{sc}) 및 정상피 전기 저항(TEER)을 30초 간격으로 기록하고, 30분 후에 기록한 기저 I_{sc} 와 6 μ M의 벤자밀(ThermoFisher)을 꼭지측에 첨가한 후 15분에 측정된 I_{sc} 의 차이로부터 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 계산하였다.
- [0296] **면역형광 영상화:** AA-EC01 또는 링거 용액으로 치료한 후, 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 파라핀에 포매하였다. 표준 프로토콜에 따라, 실란-코팅된 유리 슬라이드(FisherScientific) 상에 절단한 절편(4 μ m)을 장착하고, 파라핀을 제거하고, 재수화하고, pH 6.0의 희수 완충액(Biocare Medical)에서 가열 전처리하였다. 1% BSA 및 10% 정상 염소 혈청으로 차단한 후, 차단 완충액(1:100)에 희석한 마우스 항-인간 IL-6 단클론 항체(Abcam), 토끼 항-인간 ENaC- α 다클론 항체(Abcepta), 또는 마우스 항-인간 MUC5AC 단클론 항체(Abcam)와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. AlexaFluor488(ThermoFisher)과 접합된 염소-항-마우스 슈퍼클로날 재조합 이차 항체를 사용해 IL-6 및 MUC5AC를 검출/시각화하고, 1시간 동안 인큐베이션한 1 μ g/mL 농도의 염소 항-토끼 슈퍼클로날 재조합 이차 항체를 AlexaFluor647(ThermoFisher)과 접합해 사용하여 ENaC- α 를 검출/시각화하였다. 핵을 10분 동안 DAPI로 염색하고, 세포를 수성 장착 배지(Abcam)에 장착한 후 분석하였다. 레이저 스캐닝 Olympus Fluoview FV1000 공초점 현미경을 사용하여 400X 배율로 신호를 분석하였다.
- [0297] **통계적 분석:** 결과는 평균 $\pm$ 평균 표준 오차(SEM)로서 제시된다. 분석은 OriginPro 2018 소프트웨어 패키지로 수행하였다. 각 치료군에 대해, 값은 샤피로-윌크 정규성 검정을 사용하여 정상 분포에 대해 시험하였다. 공여자 폐를 이용하는 데 제약이 있어 작은 샘플 크기만 얻을 수 있었고, 공여자들 간에 변동이 크기 때문에 데이터는 정상적으로 분포되지 않았고, 통계 분석은 비모수적 검정을 사용하여 정규화된 값을 이용해 수행하였다. 값을 군 내의 대조군에 대해 정규화하고, 군 간의 비교를 위해 데이터를 모았다. 크루스칼-윌리스 검정을 사용하여 링거, AA-EC01, 및 AANC가 벤자밀-민감성 I_{sc} 및 TEER에 미치는 전체 효과를 비교하고, 만-휘트니 U 검정을 사용하여 군 내 쌍별 비교를 수행하였으며, 0 ng/mL 또는 0일차에 각 사이토카인에 대한 기저값들을 연구한 각각의 농도 및 기간과 비교하였다. $P < 0.05$ 는 유의한 것으로 간주하였고, NS는 유의하지 않음을 나타낸다.

[0298] 도 13~18과 관련된 결과

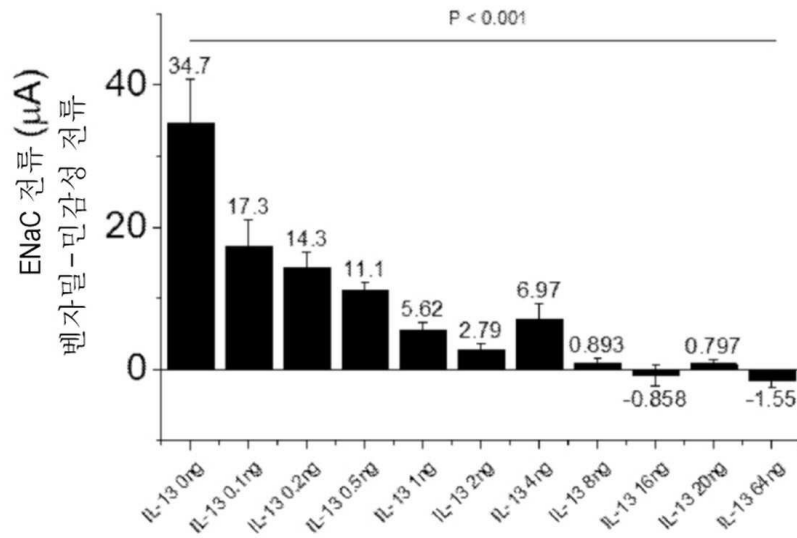
- [0299] 도 13은 더 낮은 농도의 IFN- γ 와 함께 HBEC를 장기간 인큐베이션한 결과 ENaC 기능이 억제되었음을 보여준다. ENaC 억제는, HBEC를 IFN- γ 와 함께 ≥ 4 일 동안 인큐베이션했을 때 HBEC에서의 벤자밀-민감성 I_{sc} 의 점진적 감소에도 반영되었다.
- [0300] 도 14는 TNF- α 가 ENaC 활성을 억제하였지만, TEER에 의해 반영된 것과 같이 장벽 기능을 손상시키지 않았음을 보여준다. 대조적으로, 도 17a 및 17b는 IFN- γ 및 TNF- α 의 조합(각각 10 ng/mL)이 상승적으로 작용하여 HBEC의 ENaC 활성 및 장벽 기능 손상을 감소시켰음을 보여준다.
- [0301] 도 15c 및 15d는 2 ng/mL IL-4와 함께 14일 동안 인큐베이션한 HBEC는 빠르게는 4일차에 벤자밀-민감성 I_{sc} 를 유의하게 감소시켰음을 나타낸다. 벤자밀-민감성 I_{sc} 의 최대 감소는 10일차에 관찰되었고, 벤자밀-민감성 I_{sc} 는 나머지 연구 기간 동안 억제된 상태로 유지되었다(도 15c). 유사하게, 장벽 기능은 빠르게는 2일차에 감소하였고, 최대 억제는 10일차에 발생하였다(도 15d).
- [0302] 도 16은 배양 배지에 IL-13을 첨가한 결과 벤자밀-민감성 I_{sc} 가 투여량 의존적 방식으로 감소하였음을 보여준다. 벤자밀-민감성 I_{sc} 는 0.1 ng/mL IL-13에서 시작하여 점진적으로 감소하였고, 8 ng/mL에서 완전히 제거되었다(도 16a). TEER은 2 ng/mL IL-13에서 극적으로 감소하였으며, 4 ng/mL에서 장벽 기능의 최대 감소가 관찰되었다(도 16b). HBEC를 20 ng/mL의 IL-13과 함께 16일의 기간 동안 인큐베이션한 결과, 2일차에 벤자밀-민감성 I_{sc} 가 베이스라인 값의 1/4까지 감소하였고, 8일차가 되자 벤자밀-민감성 I_{sc} 가 완전히 억제되었다(도 16c). 상피 저항은 시간 경과에 따라 점진적으로 감소하였으며, 10일차에 TEER의 최대 감소가 관찰되었다(도 16d).
- [0303] 도 17에 도시된 바와 같이, TGF- $\beta 1$ 을 다른 사이토카인과 독립적으로 시험된 결과, 0.5 ng/mL 이상의 농도에서 빠르게는 4일차에 벤자밀-민감성 I_{sc} 가 감소하였고, TEER에 대한 억제 효과는 없었다.
- [0304] 도 18은 IL-13이 ENaC 및 장벽 기능을 억제한 반면, AA-EC01은 ENaC 활성 및 발현을 증가시켜, 폐포액 축적과 같은 IL-13-매개 부작용에 대항하였음을 보여준다. 본 연구는, ENaC가 세포질로부터 (ENaC가 기능적으로 활성인) 꼭지막으로 전좌하는 것을 AA-EC01이 촉진하였음을 또한 입증하였다. 본원에 기술된 면역조직화학 연구는, AA-EC01이 ENaC 전사 및/또는 ENaC 단백질 합성 증가를 통해 ENaC 활성을 증가시킬 수도 있음을 보여주었다.
- [0305] 면역조직화학 연구에 의해 나타난 바와 같이, AA-EC01은 또한, HBEC를 IL-13에 노출시킨 후 HBEC에서 세포내 MUC5AC 발현 및 분비를 상당한 정도로 감소시켰는데, 이는 AA-EC01이 점액 생성을 감소시키는 데 사용될 수 있음을 시사한다. (IFN- γ , TNF- α , 및 TGF- $\beta 1$ 로 구성된 사이토카인 조합에 대한 노출로 인해) HBEC에서 사이토카인-유도 IL-6 분비를 감소시키는 AA-EC01의 능력은, AA-EC01이 ARDS와 연관된 폐 합병증을 해결하는 다수의 치료 특성을 갖는다는 것을 더욱 강조한다. AA-EC01은 IL-13 노출 후 HBEC에서 ENaC 활성을 증가시켰고, IL-13 노출 후 HBEC에서 MUC5AC 발현 및 분비를 유의하게 감소시켰으며, 사이토카인과 함께 배양한 세포의 꼭지막에서 IL-6-연관 면역형광 신호를 유의하게 감소시켰다.
- [0306] 폐포액 축적을 감소시킬 수 있는 승인된 약물이 없다는 것을 감안하면, AA-EC01은 충족되지 않은 긴급한 임상적 필요에 대한 해결책을 제공한다. 본원에 제시된 결과는 ARDS를 치료하고/하거나 ARDS와 연관된 폐 합병증의 가능성 및/또는 중증도를 감소시키기 위한 치료제로서 AA-EC01의 용도를 뒷받침한다. AA-EC01은 치료 특성을 갖는 기능성 아미노산으로 구성되기 때문에, 제형은 독립형 API로서 또는 다른 치료 옵션과 병용으로 사용하기 위한 상보적 API로서 사용될 수 있다. AA-EC01은 우수한 안전성 프로파일을 갖는데, 이는 그 안에 포함된 각각의 아미노산이 '일반적으로 안전한 물질로 인정'(GRAS)되고, 다른 API와 임의의 부작용을 나타낼 것으로 예상되지 않기 때문이다. 따라서, AA-EC01은 표준 치료 API와 함께 표준 치료 요법의 효과를 최대화하여 산소 보충 및 환기 보조의 지속시간을 감소시키고, 장기적인 폐 합병증을 최소화하고, 발병 환자의 생존을 증가시킬 수 있다.

도면

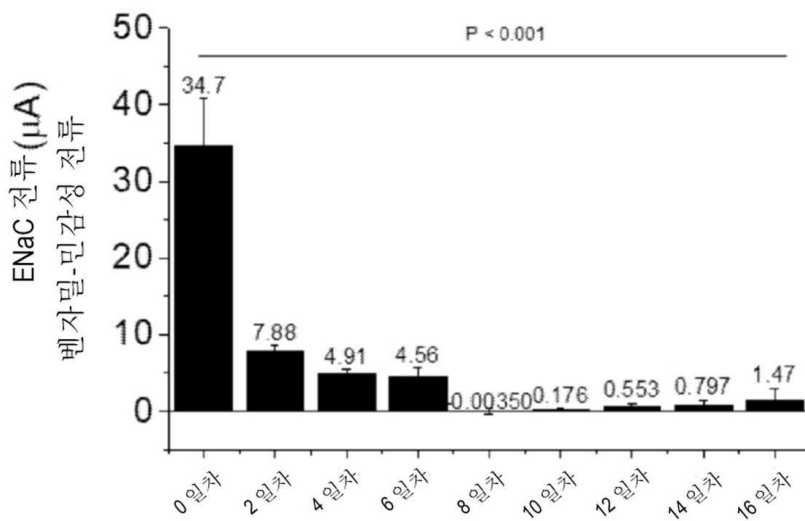
도면1



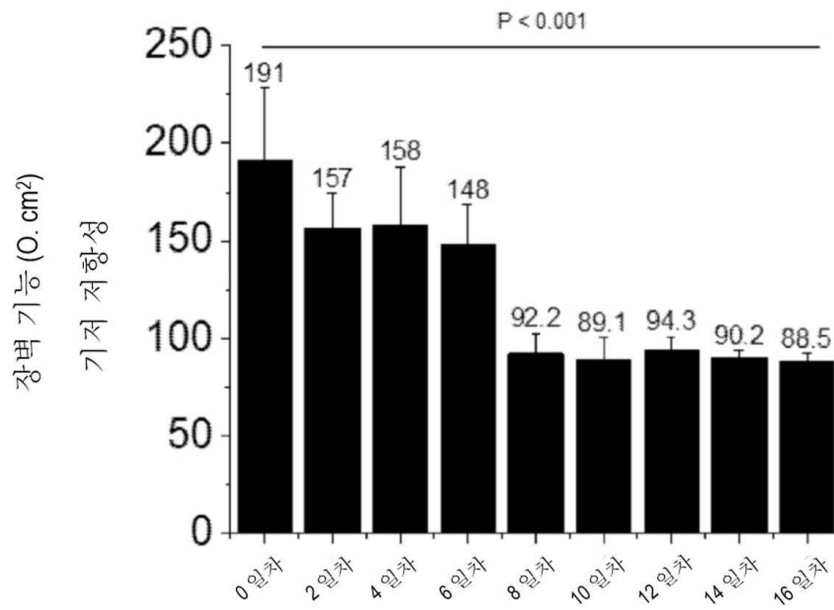
도면2



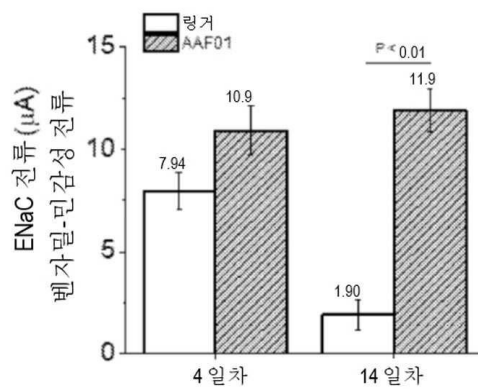
도면3



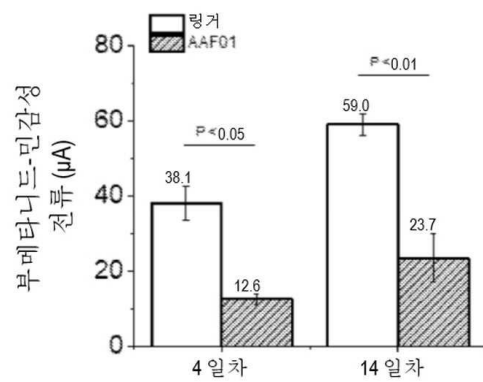
도면4



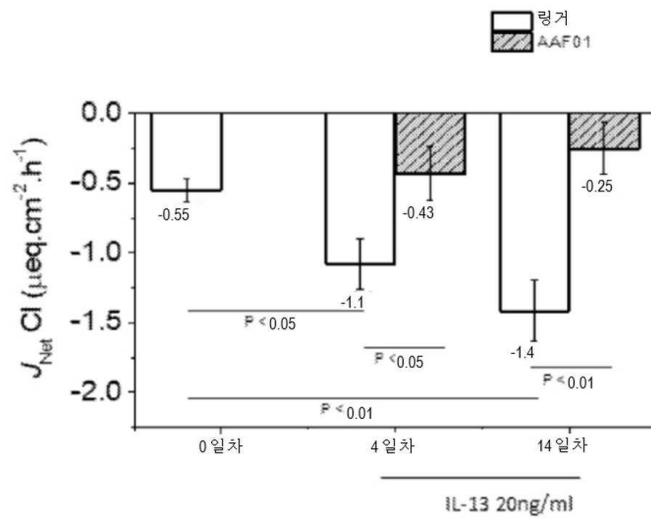
도면5a



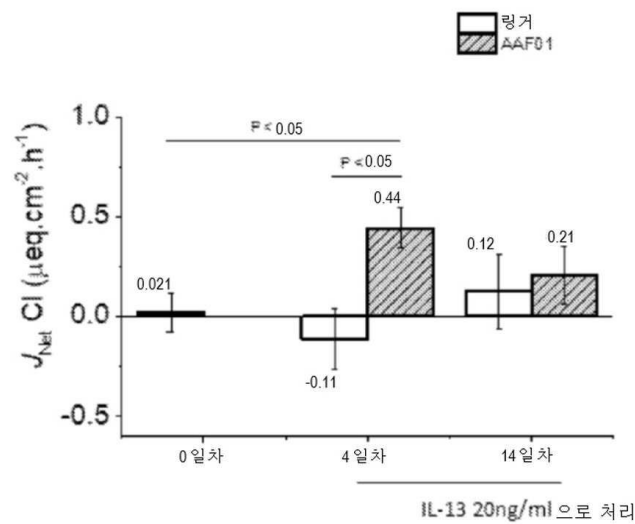
도면5b



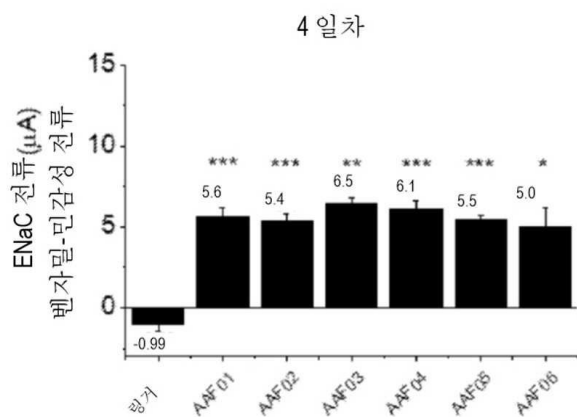
도면6a



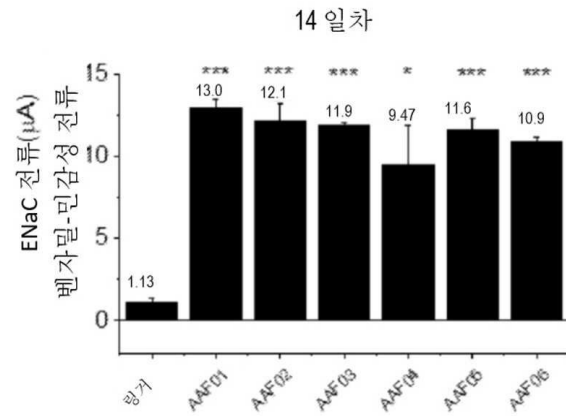
도면6b



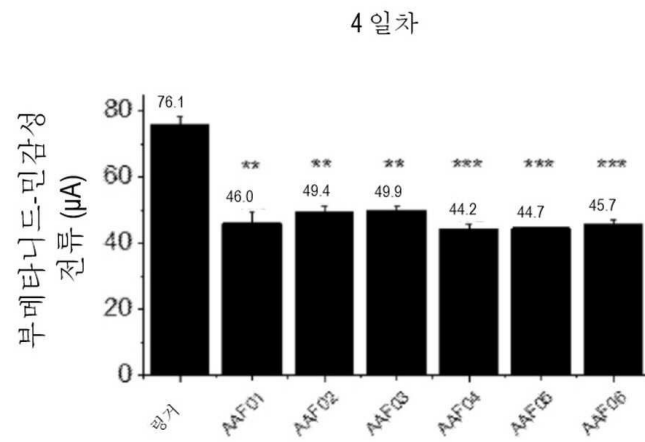
도면7a



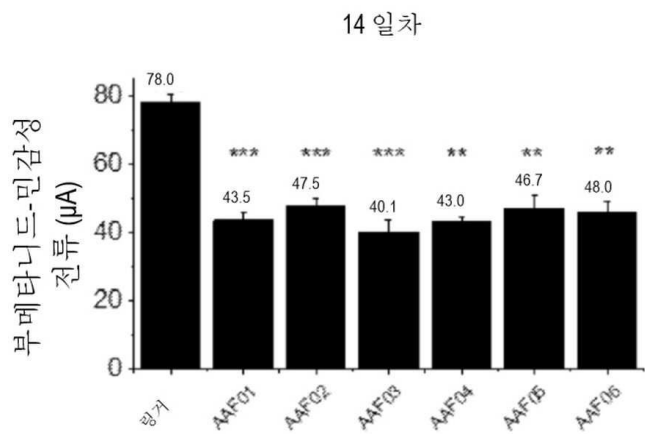
도면7b



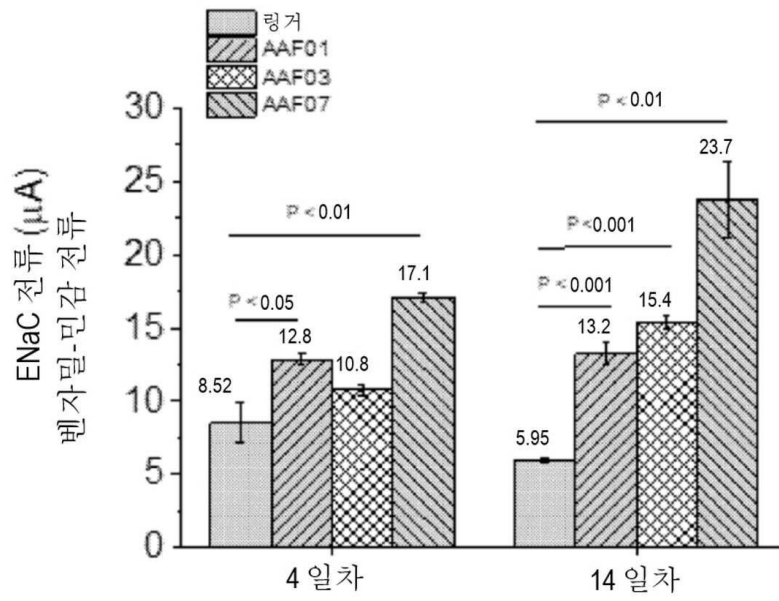
도면7c



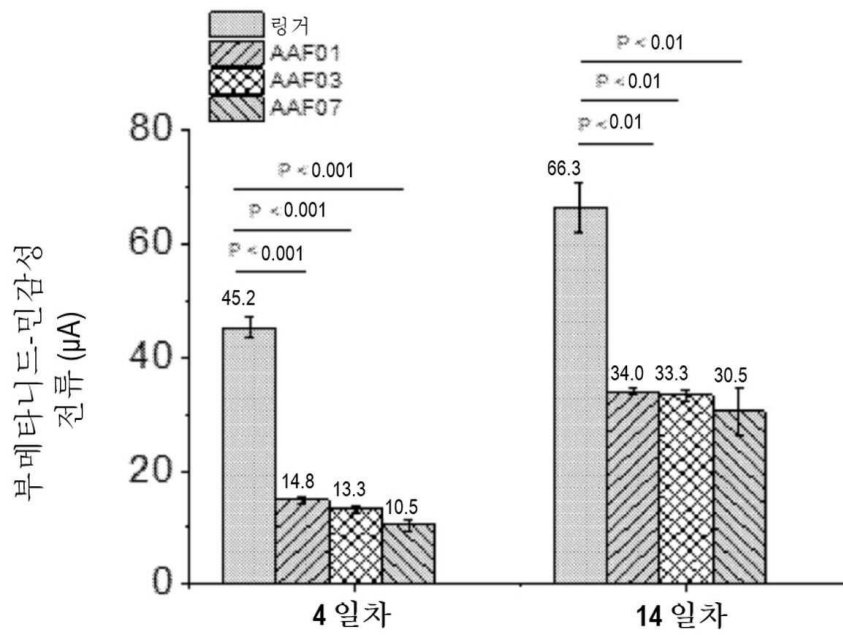
도면7d



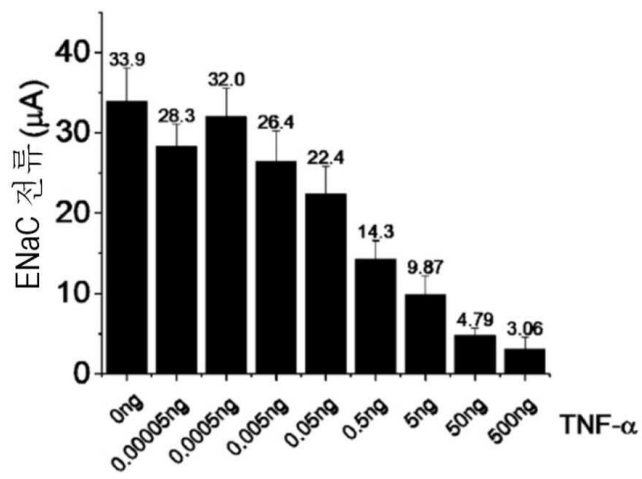
도면8a



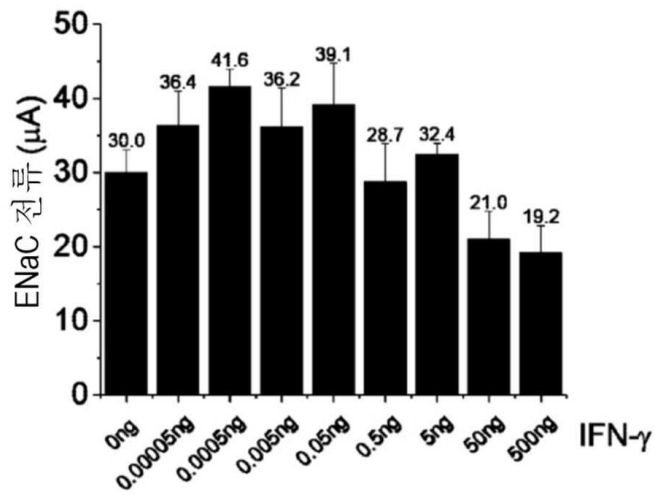
도면8b



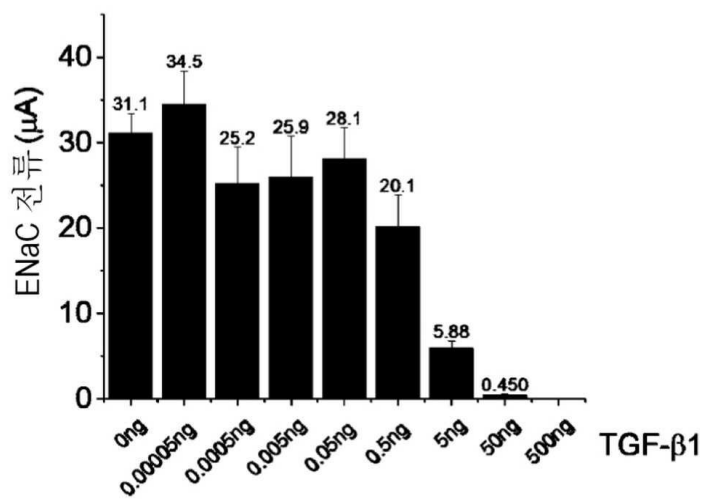
도면9



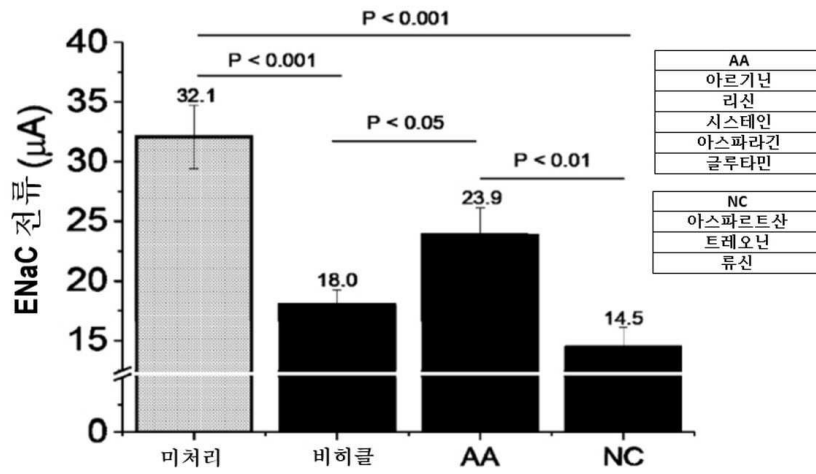
도면10



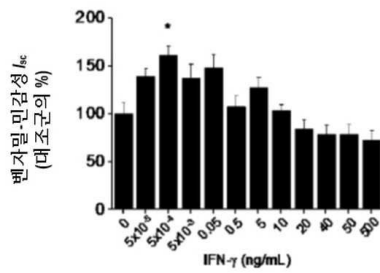
도면11



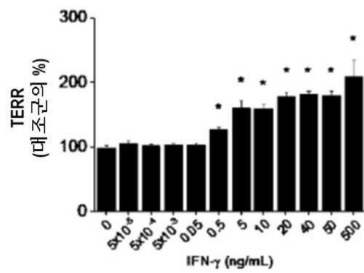
도면12



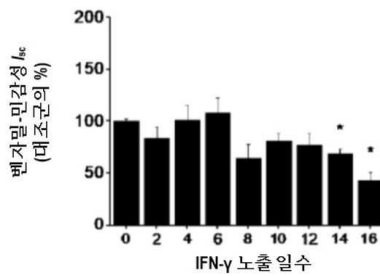
도면13a



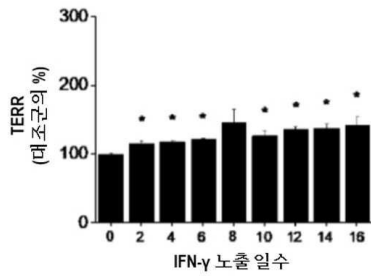
도면13b



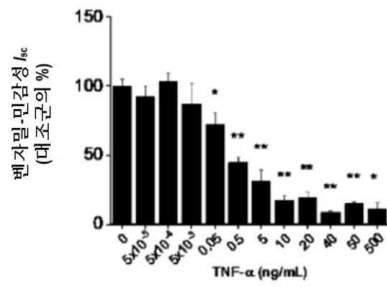
도면13c



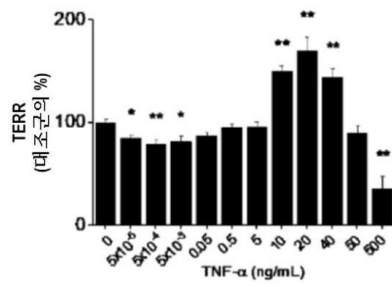
도면13d



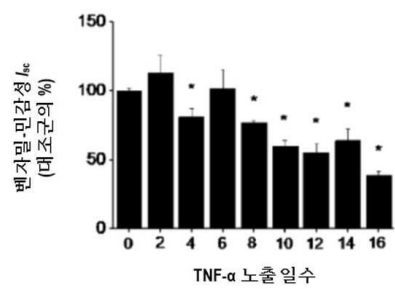
도면14a



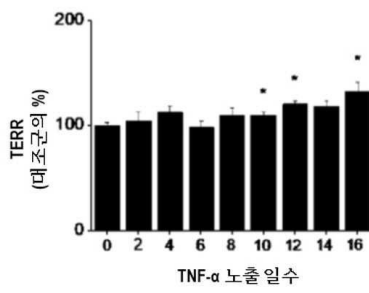
도면14b



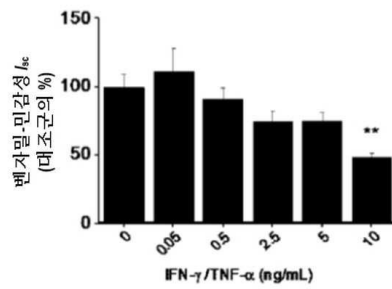
도면14c



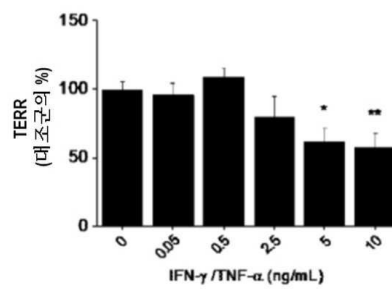
도면14d



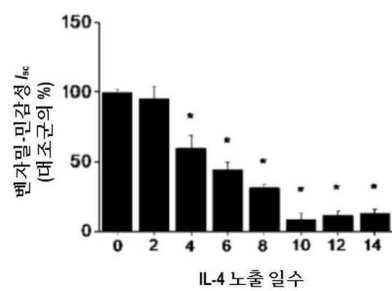
도면15a



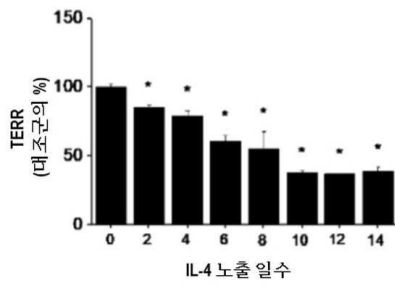
도면15b



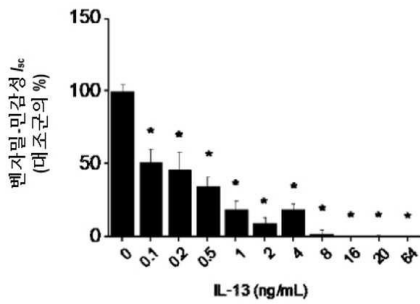
도면15c



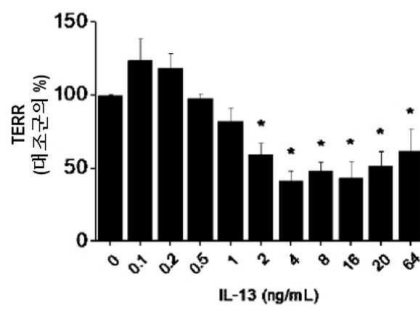
도면15d



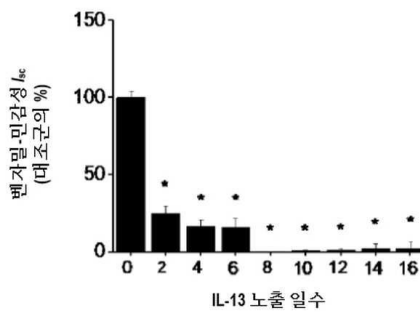
도면16a



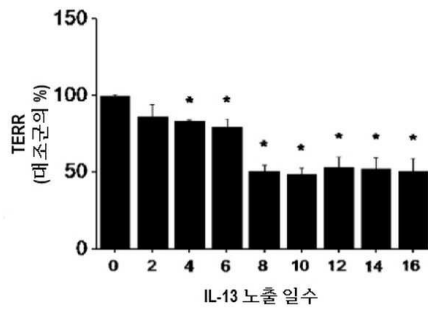
도면16b



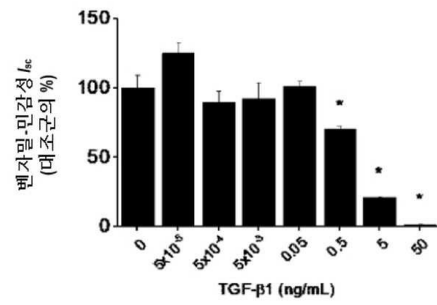
도면16c



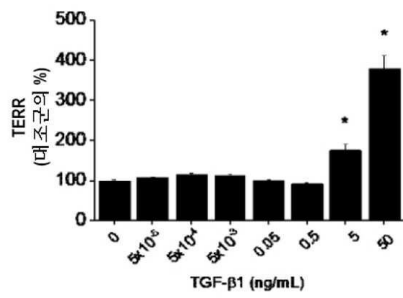
도면16d



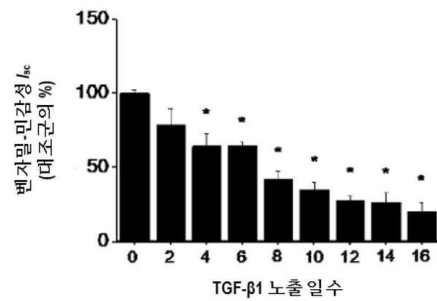
도면17a



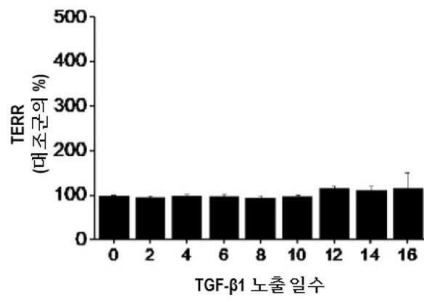
도면17b



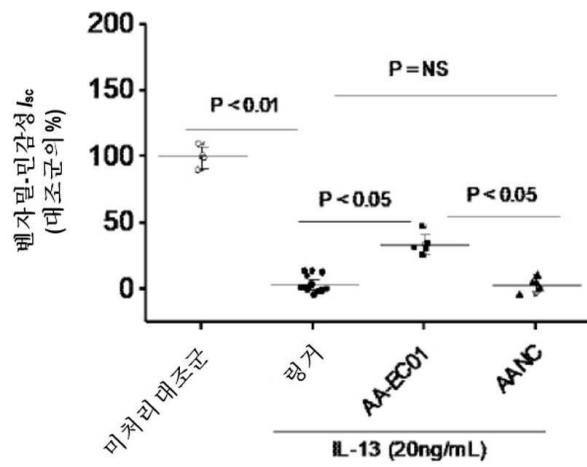
도면17c



도면17d



도면18a



도면18b

