(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0027752
(43) 공개일자 2024년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) *A61K 47/12* (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 9/10* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0078 (2013.01)
A61K 38/164 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7003103
(22) 출원일자(국제) 2022년06월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년01월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/068149
(87) 국제공개번호 WO 2023/275292
국제공개일자 2023년01월05일
(30) 우선권주장
21182877.7 2021년06월30일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
인세름 (엥스띠뛰 나씨오날 드 라 쌍떼 에 드 라 흐쉐르슈 메디깔)
프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 뤼 드 똘비악 101
쌍트르 나시오날 드 라 르쉐르쉐 싸이엉띠피끄(쎄.엔.에르.에스.)
프랑스공화국, 75016 빠리, 뤼 미쉘-앙즈 3
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
외즈 부르츠, 나탈리
프랑스, 37032 뚜르 세렉스 1, 불르바르 또넬르 10 - 밧 47쎄, 위1100 - 파뀰때 드 메드씬느
메이오르, 알렉시
프랑스, 37032 뚜르 세렉스 1, 불르바르 또넬르, 10 - 밧 47쎄, 위1100 - 파뀰때 드 메드씬느
시라를, 쟝-끌로드
프랑스, 59019 릴 세덱스, 뤼 뒤 프로페써 깔멧뜨 1, 엥쓰띠뛰 빠스퇴르 드 릴, 인쎔 위1019 - 세엔에르에스 위엠에르8204
(74) 대리인
특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **플라겔린의 폐 전달을 위한 에어로졸 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 메쉬-분무화 동안에 플라겔린을 안정화시키기 위해 완충제, 계면활성제, 당 및 아미노산을 포함하는 최상의 부형제를 정의하기 위한 제제 연구로부터 비롯된다. 단백질을 안정화시키는 핵심 요소 중 하나는 적절한 용해도와 안정성을 제공하고 에어로졸화 공정 동안의 응집체 형성을 방지하기 위해 최적의 pH와 완충 시스템을 결정하는 것이다. 에어로졸화 공정 후 플라겔린의 활성을 유지하기 위해, 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 액체 제형의 완충제, 계면활성제 및 pH의 선택을 특히 고려하여 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 안정하고 가용성인 에어로졸 조성물을 얻기 위해 상이한 제형이 분석되었다. 따라서, 본 발명은 플라겔린 폴리펩티드, 완충제(아세테이트 및/또는 포스페이트) 및 계면활성제(폴리소르베이트)를 포함하는 액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 에어로졸 조성물은 폐 세균 감염의 치료에 적합하다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/10 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
(71) 출원인
위니베르시뜨 드 뚜르
프랑스 에프-37000 뚜르 뤼 뒤 쁠라 데땡 60
위니베르시떼 드 릴르
프랑스 59800 릴르 뤼 폴 두에즈 42
엥스티튀 파스퇴르 드 릴레
프랑스 릴레 에프-59000 뤼 뒤 프로페세르-칼메트 1
상뜨르 오스피딸리에 유니베르시떼르 드 릴
프랑스, 59037 릴 세덱스, 아브뉘 오스카 랑브레2

명 세 서

청구범위

청구항 1

액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물로서, 상기 액체 제형은:

(i) 플라겔린 폴리펩티드,

(ii) 아세테이트, 포스페이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제, 및

(iii) 폴리소르베이트로 구성된 계면활성제; 및

(iv) 수성 매질;을 포함하며,

상기 액체 제형은 약 8 이하의 pH를 갖는, 에어로졸 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 계면활성제는 폴리소르베이트 80인, 에어로졸 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 완충제는 아세테이트이고, 액체 제형은 약 5.8 미만 또는 약 5.5 미만의 pH를 가지는, 에어로졸 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 완충제는 포스페이트이고, 액체 제형은 약 6.8 미만 또는 약 6.5 미만의 pH를 가지는, 에어로졸 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 액체 제형에서 계면활성제의 농도는 약 0.1%(w/v) 이하 또는 약 0.02% (w/v) 이하 또는 약 0.005% (w/v) 이하인, 에어로졸 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 플라겔린 폴리펩티드는: a) 서열번호: 3의 위치 1에 위치한 아미노산 잔기로부터 시작하고 서열 번호:3의 위치 99 내지 173에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 N-말단 펩티드; 및 b) 서열 번호: 3의 401 내지 406번 위치에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 시작하고 서열 번호: 3의 위치 494에 위치한 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하고,

상기 N-말단 펩티드는 상기 C-말단 펩티드에 직접 연결되거나, 또는 상기 N-말단 펩티드와 상기 C-말단 펩타이드는 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결되는, 에어로졸 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 각각 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-173, 및 401-494으로 이루어지는, 에어로졸 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 N-말단 펩티드 및 C-말단 펩티드는 NH2-GIy-AIa-AIa-GIy-COOH (서열 번호: 4) 펩티드 서열로 이루어지는 중간 스페이서 사슬을 통해, 서로 간접적으로 연결되는, 에어로졸 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 플라겔린 폴리펩티드는 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드인, 에어로졸 조성물.

청구항 10

액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물을 제조하는 방법으로서:

(i) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 액체 제형을 제공하는 단계,

(ii) 분무기(nebulizer)를 사용하여 단계 (i)에서 제공된 액체 제형을 분무(nebulizing)하여 에어로졸을 제조하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

선택적으로, 단계 (i)과 단계 (ii) 사이에:

(ia) 단계 (i)에서 제공된 액상 제형을 동결건조시켜 동결건조된 분말을 제공하는 단계, 및

(ib) 단계 (ia)에서 제공된 동결건조된 분말에 적절한 양의 수성 매질을 첨가함으로써 단계 (i)에서 제공된 액체 제형을 재구성(reconstituting)하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

청구항 12

플라겔린 폴리펩티드를 대상체(subject)의 폐에 전달하는 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 에어로졸 조성물 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 액체 제형으로서, 상기 에어로졸 조성물은 흡입(inhalation)에 의해 대상체에게 투여되거나 또는 액체 제형은 분무기(nebulizer)를 통한 흡입에 의해 피험자에게 투여되는, 에어로졸 조성물 또는 액체 제형.

청구항 13

대상체의 폐 감염 질환을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, 선택적으로 적어도 하나의 항생제와 조합된, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 에어로졸 조성물 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 액체 제형으로서, 상기 에어로졸 조성물은 흡입에 의해 대상체에게 투여되거나 또는 액체 제형은 분무기를 통한 흡입에 의해 대상체에게 투여되는, 에어로졸 조성물 또는 액체 제형.

청구항 14

(i) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 액상 제형 또는 상기 액상 제형을 동결건조하여 얻을 수 있는 분말을 포함하는 용기, 및

(ii) 분무기(nebulizer)를 포함하는,

키트.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 액체 제형의, 분무기에 의한 분무에 의해 에어로졸 조성물을 제조하기 위한, 용도.

청구항 16

분무기에 의해 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 액체 제제의 분무 시 플라겔린 폴리펩티드의 안정성을 증가시키기 위한, 아세테이트, 포스페이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제, 및 폴리소르베이트로 이루어진 계면활성제의 용도로서, 상기 완충제는 분무 전에 액체 제형에 포함되는, 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 플라겔린 폴리펩티드(flagelin polypeptide), 완충제(아세테이트 또는 포스페이트(phosphate) 및 계면활성제(폴리소르베이트)를 포함하는 액체 제형을 포함하는 소적(droplet)을 포함하는 에어로졸 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 에어로졸 조성물은 폐 세균 감염의 치료에 적합하다.

배 경 기 술

[0002] 치료 단백질의 폐 전달은, 모체 전달에 대한 매력적이고, 비-침입성인 대안이 될 수 있다. 폐 투여 경로는 폐 질환, 특히 폐 세균 감염을 치료하기 위한 다양한 약물 및 생물약제의 국소 및 전신 전달에 효과적인 것으로 입증되었다.

[0003] 그러나, 폴리펩티드와 같은 단백질을 폐에 투여하는 것은 강한 분자간/입자간 상호작용 및 물리화학적 분해를 극복하기 위해 폴리펩티드의 적절한 제제의 필요성과 같은 많은 과제와 관련되어, 예를들어, 집합화되고 잠재적으로 생물학적/치료 활성 손실 및/또는 안전 문제가 발생할 수 있다. 예를 들어, 단백질은 에어로졸화-관련 전단 응력 및/또는 온도의 증가에 민감할 수 있거나 에어로졸 내 공기-액체 계면에서 감소된 안정성을 나타낼 수 있다.

[0004] 플라겔린은 폐렴에 대해 면역 조절제(immunomodulatory)로 사용되는 28kD의 생물학적 약물이다. 따라서, 플라겔린을 분무화(nebulization)하여 폐 투여하면 박테리아 감염 부위를 직접 표적화할 것 이다. 그러나, 플라겔린과 같은 치료용 단백질은 에어로졸화 과정에서 생성되는 스트레스에 특히 민감한 경우가 많다. 실제로, 식염수 포스페이트 완충액(PBS)에서 제형화된 플라겔린의 메쉬-분무화(mesh-nebulization)는 단백질의 높은 응집을 유도했다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 플라겔린의 폐 전달에 적합하고 에어로졸화/분무화 시 플라겔린 폴리펩티드의 안정성과 활성을 유지하는 데 도움이 되는 제형 시스템을 확인하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 플라겔린 폴리펩티드, 완충제(아세테이트 또는 포스페이트) 및 계면활성제(폴리소르베이트)를 포함하는 액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 청구범위에 의해 정의된다.

[0007] 제1 양태에서, 본 발명은 액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물에 관한 것이며, 여기서 액체 제형은,

[0008] (i) 플라겔린 폴리펩티드,

[0009] (ii) 아세테이트, 포스페이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제, 및

[0010] (iii) 폴리소르베이트로 구성된 계면활성제; 및

[0011] (iv) 수성 매질을 포함하며;

[0012] 여기서 액체 제형은 약 8 이하의 pH를 갖는다.

[0013] 제2 양태에서, 본 발명은 액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 다음 단계:

[0014] (i) 상기 정의된 바와 같은 액체 제형을 제공하는 단계,

[0015] (ii) 분무기를 사용하여 단계 (i)에서 제공된 액체 제형을 분무하여 에어로졸을 제조하는 단계를 포함한다.

[0016] 제3 양태에서, 본 발명은 플라겔린 폴리펩티드를 대상체(subject)의 폐에 전달하는 방법에 사용하기 위한, 상기 정의된 바와 같은 본 발명의 에어로졸 조성물 또는 액체 제형에 관한 것으로서, 여기서 에어로졸 조성물은 흡입에 의해 대상체에게 투여되거나 또는 액체 제형은 분무기를 통한 흡입에 의해 피험자에게 투여된다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 선택적으로 대상체의 폐 박테리아 감염을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 적어도 하나의 항생제와 조합된, 본 발명의 에어로졸 조성물 또는 상기 정의된 액체 제형에 관한 것이며, 여기서 에어로졸 조성물은 흡입에 의해 대상체에게 투여되거나 액체 제형은 분무기를 통한 흡입에 의해 대상체에게 투여된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 메쉬-분무화 동안에 플라겔린을 안정화시키기 위해 완충제, 계면활성제, 당 및 아미노산을 포함하는 최상의 부형제를 정의하기 위한 제제 연구로부터 비롯된다. 단백질을 안정화시키는 핵심 요소 중 하나는 적절한 용해도와 안정성을 제공하고 에어로졸화 공정 동안의 응집체 형성을 방지하기 위해 최적의 pH와 완충 시스템을 결정하는 것이다.

[0019] 여기서 제형의 다양한 성분은 무작위로 선택된 것이 아니라 식품에 첨가된 화학 물질 또는 물질이 의도된 사용 조건 하에서 전문가에 의해 안전한 것으로 간주된다는 미국 식품의약국(FDA) 지정인 일반적으로 안전한 것으로 인정되는 GRAS(Generally recognized a safe) 목록에 기초하여 선택되었다 (https://en.wikipedia.org/wiki/Generally_recognized_as_safe).

[0020] 실제로, 다양한 구성요소는 이미 상업용 흡입 가능한 산물(폐)에 사용되었거나 임상 2상에서 시험된 치료 단백질의 제형에 사용되었다(따라서 이미 허용 가능한 내성을 나타냄).

[0021] 따라서, 에어로졸화 공정 후 플라겔린의 활성을 유지하기 위해, 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 액체 제형의 완충제, 계면활성제 및 pH의 선택을 특히 고려하여 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 안정하고 가용성인 에어로졸 조성물을 얻기 위해 상이한 제형이 분석되었다. 따라서, TLR5 활성화에 대한 플라겔린 효능은 본 발명에 따른 에어로졸 제형에서 분무화 후에 유지되었다(실시예 부분 참조).

[0022] 제1 양태에서, 본 발명은 액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물에 관한 것으로, 상기 액체 제형은:

[0023] (i) 플라겔린 폴리펩티드,

[0024] (ii) 아세테이트, 포스페이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제, 및

[0025] (iii) 폴리소르베이트로 구성된 계면활성제; 및

[0026] (iv) 수성 매질;을 포함하며,

[0027] 여기서 액체 제형은 약 8 이하의 pH를 갖는다.

[0028] 본원에 사용된 용어 "플라겔린"은 당업계에서 일반적인 의미를 가지며, 다양한 그람 양성 또는 그람 음성 박테리아 종(species)에 함유된 플라겔린을 의미한다. 플라겔린의 비-제한적인 공급원에는 대장균(E. coli), 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클렙시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(예를 들면, Salmonella enterica serovar Typhimurium), 세라티아(예를 들면, Serratia marcescans) 및 시겔라(Shigella), 및 또는 B. subtilis 및 B. licheniformis와 같은 바실리(Bacilli), P. aeruginosa 및 Streptomyces와 같은 슈도모나스(Pseudomonas)가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 실례가 되는 것들이다. 플라겔린의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열은 NCBI Genbank에서 공개적으로 이용 가능하다. 예를 들어, 접근 번호 AAL20871, NP_310689, BAB58984, AAO85383, AAA27090, NP_461698, AAK58560, YP_001217666, YP_002151351, YP_001250079, AAA99807, CAL35450, AAN74969 및 BAC44986을 참조하면 된다. 이들 종 및 다른 종으로부터의 플라겔린 서열은 본원에서 사용된 용어 플라겔린에 포함되도록 의도된다. 따라서, 종간 서열의 차이도 이 용어의 의미에 포함된다.

[0029] "플라겔린 폴리펩티드"라는 용어는 TLR5에 결합하고 이를 활성화하는 능력을 보유하는 플라겔린 또는 이의 단편을 의미한다. 본원에서 사용되는 용어 "톨-유사 수용체 5" 또는 "TLR5"는 당업계에서 그 일반적인 의미를 가지

며 임의의 종의 톨-유사 수용체 5를 의미하지만 바람직하게는 인간 톨-유사 수용체 5를 의미하도록 의도된다. 활성화되면, TLR5는 일련의 신호전달 분자를 통해 전파되는 세포 내 신호를 세포 표면에서 핵으로 전달함으로써 세포 반응을 유도한다. 일반적으로, TLR5의 세포내 도메인은 세린/트레오닌 키나제 IRAK(IRAK-1 및 IRAK-4)를 모집하는 어댑터 단백질인 MyD88을 모집한다. IRAK는 TRAF6과 복합체를 형성한 후, TLR 신호 전달에 참여하는 다양한 분자와 상호작용한다. 이들 분자 및 기타 TLR5 신호 전달 경로 구성요소는 fos, jun 및 NF-kB와 같은 전사 인자의 활성과 fos-, jun- 및 NF-kB 조절 유전자의 유전자 산물의 상응하는 유도를 자극, 예를 들어 IL-6, TNF-알파, CXCL1, CXCL2 및 CCL20이다. 전형적으로, 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드는 TLR5 신호전달에 관여하는 플라겔린의 도메인을 포함한다. "플라겔린의 도메인"이라는 용어는 자연적으로 발생하는 플라겔린의 도메인 및 이의 기능 보존적 변이체를 포함한다. "기능 보존 변이체"는 아미노산을 유사한 특성을 갖는 아미노산(예를 들어 극성, 수소 결합 전위, 산성, 염기성, 소수성, 방향족 등)으로 대체하는 것을 포함하지만 이에 국한되지 않는 폴리펩티드의 전체 형태 및 기능을 변경하지 않고 단백질 또는 효소의 주어진 아미노산 잔기가 변경된 것이다. 보존된 것으로 표시된 것 이외의 아미노산은 단백질에서 다를 수 있으므로 유사한 기능을 가진 임의의 두 단백질 사이의 단백질 또는 아미노산 서열 동일성 백분율은 다양할 수 있으며, 예를 들어 70% 내지 99%일 수 있다. 따라서 "기능 보존적 변이체"에는 플라겔린의 천연 서열 또는 이의 단편과 적어도 70%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩티드도 포함된다. 본 발명에 따르면, 제2 아미노산 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 제1 아미노산 서열은 제1 서열이 제2 아미노산 서열과 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 또는 99, 을 갖는다는 것을 의미하고; 또는 100%의 동일성을 갖는다는 것을 의미한다. 동일한 방식으로, 제2 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 제1 아미노산 서열은 제2 아미노산 서열과 90을 갖는다는 것을 의미하고; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 또는 99, 또는 100%의 동일성을 갖는다는 것을 의미한다. 아미노산 서열 동일성은 바람직하게는 적합한 서열 정렬 알고리즘 및 BLAST P(Karlin and Altschul, 1990)와 같은 디폴트 매개변수(default parameter)를 사용하여 결정된다. TLR5 신호전달에 관여하는 플라겔린의 도메인은 당해 분야에 잘 알려져 있는데, 예를 들어 문헌: Smith et al. (2003) Nat. Immunol. 4: 1247-1253 (예를 들어, S. typhimurium 플라겔린 또는 이의 동족체 또는 변형된 형태의 아미노산 78-129, 135-173 및 394-444)를 참조할 수 있다.

[0030] 플라겔린 폴리펩티드의 예는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,300,000호; 제6,585,980호; 제6,130,082호; 제5,888,810호; 제5,618,533호; 및 제4,886,748호; 미국 특허 공개 번호 US 2003/0044429 A1; 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2008097016 및 WO 2009156405에 에 기술된 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 이. 콜라이 0157:H7 플라겔린은 서열 번호: 1이다. 예시적인 S. 티피무리움 플라겔린은 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 3이다.

[0031] 폴리펩티드 번호매김은 최종 N-말단 메티오닌(서열 번호: 3에 표시되지 않음) 뒤의 첫 번째 아미노산에서 시작하며, 이는 일반적으로 아래에 언급된 바와 같이 박테리아 숙주 세포에서 메티오닌 아미노펩티다제에 의해 절단된다.

[0032] 일 구현예에서, 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3과 적어도 70%의 동일성을 갖는 아미노산 서열이 본 발명에 따른 플라겔린 폴리펩티드로 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열이 본 발명에 따른 플라겔린 폴리펩티드로 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 서열 번호: 3과 적어도 70%의 동일성을 갖는 아미노산 서열은 잔기 89-96(즉, TLR5 검출에 관여하는 잔기)이 돌연변이가 발생하지 않는다면(즉, 치환되지 않거나 결실되지 않음) 본 발명에 따른 플라겔린 폴리펩티드로 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열은 잔기 89-96(즉, TLR5 검출에 관여하는 잔기)이 돌연변이가 발생하지 않는다면(즉, 치환되지 않거나 결실되지 않음) 본 발명에 따른 플라겔린 폴리펩티드로 사용될 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 본 발명은 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2009156405 및 WO 2016/102536에 기술된 플라겔린 재조합 폴리펩티드의 용도를 포함한다.

[0034] 일 구현예에서, 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드는: a) 서열번호: 3의 위치 1에 위치한 아미노산 잔기로부터 시작하고 서열 번호:3의 위치 99 내지 173에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 N-말단 펩티드; 및 b) 서열 번호: 3의 401 내지 406번 위치에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 시작하고 서열 번호: 3의 위치 494에 위치한 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하고, 여기서: 상기 N-말단 펩티드는 상기 C-말단 펩티드에 직접 연결되거나, 상기 N-말단 펩티드와 상기 C-말단 펩타이드는 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된

다.

[0035] 일 구현예에서, 상기 N-말단 펩티드는 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-99, 1-137, 1-160 및 1-173으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0036] 일 구현예에서, 상기 C-말단 펩티드는 서열 번호: 3의 아미노산 서열 401-494, 및 406-494로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0037] 일 구현예에서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 각각 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-173, 및 401-494으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0038] 일 구현예에서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 각각 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-160, 및 406-494으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0039] 일 구현예에서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 각각 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-137, 및 406-494으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0040] 일 구현예에서, 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 NH2-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH(서열 번호: 4) 펩티드 서열로 구성된 중간 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된다.

[0041] 일 구현예에서, 서열 번호: 3의 위치 488에 위치한 아스파라긴 아미노산 잔기는 세린으로 대체된다.

[0042] 일 구현예에서, 상기 기술된 플라겔린 폴리펩티드는 N-말단(서열번호: 3의 플라겔린 폴리펩타이드에 관하여)에 추가적인 메티오닌 잔기를 포함한다.

[0043] 일 구현예에서, 상기 기술된 플라겔린 폴리펩티드는 N-말단(아미노산 잔기 ML)(서열번호 3의 플라겔린 폴리펩티드에 관하여)에 하나의 추가 메티오닌 잔기(M) 및 하나의 추가 리신 잔기(L)를 포함한다.

[0044] 따라서, 변형된 재조합 플라겔린(FLAMOD: 서열번호: 5 참조)에 상응하는 플라겔린 폴리펩티드의 예로서, 여기서 N-말단 및 C-말단 펩티드는 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-173 및 401-494로 구성되고, 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 NH2-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH(서열번호: 4) 펩티드 서열로 구성된 중간 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결되며, 여기서 상기 폴리펩티드는 N-말단에서 하나의 추가적인 메티오닌 잔기(M)와 하나의 추가적인 라이신 잔기(L)를 포함한다.

[0045] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 재조합 폴리펩티드이다.

[0046] 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드는 당업계에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 생산된다. 일 구현예에서, 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드는 전형적으로 그의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산으로 형질감염된 재조합 세포에 의해 재조합적으로 생산되고 형질감염된 세포 내에서 이의 효과적인 생산을 가능하게 한다. 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열은 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제 가능한 벡터에 삽입될 수 있다. 다양한 벡터들이 공개적으로 이용 가능하다. 벡터는 아마, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태일 수 있다. 다양한 절차에 의해 적절한 핵산 서열이 벡터에 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들)에 삽입된다. 벡터 성분은 일반적으로 서열이 분비될 경우 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 이러한 구성요소 중 하나 이상을 포함하는 적합한 벡터의 구성은 당업자에게 공지된 표준 결찰 기술을 사용한다. 발현 및 클로닝 벡터는 전형적으로 선택가능한 마커라고도 하는 선택 유전자를 포함할 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 기타 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복잡한 배지, 예를 들어,바실리에 대한 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자에서 이용할 수 없는 중요한 영양소를 공급하는, 단백질을 암호화한다. 포유동물 세포에 적합한 선택 마커의 예는 DHFR 또는 티미딘 키나제와 같은 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 흡수할 수 있는 세포의 식별을 가능하게 하는 것들이다. DHFR 활성이 결핍된 CHO 세포주는 야생형 DHFR을 사용할 때 적절한 숙주 세포이다. 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 mRNA 합성을 지시하기 위해 플라겔린 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 잘 알려져 있다. 원핵 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터에는 베타-락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 및 tac 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터가 포함된다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동 가능하게 연결된 Shine-Dalgarno(S.D.) 서열을 포함할 것이다. 숙주 세포는 플라겔린 폴리펩티드 생산을 위해 본원에 기술된 발현 또는

클로닝 벡터로 형질감염되거나 형질전환되고, 프로모터 유도, 형질전환체 선택, 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자 증폭에 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 배지, 온도, pH 등과 같은 배양 조건은, 과도한 실험 없이 숙련된 기술자에 의해 선택될 수 있다. 일반적으로, 세포 배양의 생산성을 최대화하기 위한 원리, 프로토콜, 및 실제 기술은 Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)에서 찾을 수 있다. 본원의 벡터에서 DNA를 클로닝하거나 발현하기에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 또는 고등 진핵생물 세포를 포함한다. 적합한 원핵생물에는 진균, 예를 들어 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 이. 콜라이와 같은 장내세균이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 이. 콜라이 K12 균주 MM294(ATCC 31,446); 이. 콜라이 X1776(ATCC 31,537); 이. 콜라이 균주 W3110(ATCC 27,325); 및 K5772(ATCC 53,635)와 같은 다양한 이. 콜라이 균주가 공개되어 있다. 다른 적합한 원핵생물 숙주 세포는 대장균, 예를 들어, 이. 콜라이, 엔테로박터, 에르위니아, 클렙시엘라, 프로테우스, 살모넬라, 예를 들어, 살모넬라 티피무륨, 세라티아, 예를 들어, 세라티아 마르세칸스 및 시겔라와 같은 에스케리키아(예를 들어, 1989년 4월 12일 DD266,710호에 개시된 B. licheniformis 41 P), 피. 아에루기노사(P. aeruginosa)와 같은 슈도모나스, 및 스트렙토미세스를 포함한다. 이들 예는 제한하기보다는 예시하기 위한 것이다. 살모넬라 티피무리움(fliC fljB)의 균주 SIN41은 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드의 생산에 특히 흥미로운데, 왜냐하면 이들 원핵 숙주 세포는 어떠한 플라겔린도 분비하지 않기 때문이다(Proc Natl Acad Sci USA. 2001 ;98:13722-7). 그러나, 플라겔린은 소위 "유형 III 분비 시스템"이라는 특수한 분비 시스템을 통해 분비된다. 흥미롭게도, SIN41 균주는 최적의 플라겔린 분비에 필요한 III형 분비 시스템의 모든 구성 요소를 생성한다. fliC 프로모터 하에서 새로운 플라겔린 펩티드를 코딩하는 클로닝 서열은 균주 SIN41에서 관심 있는 플라겔린 폴리펩티드의 다량 분비를 가능하게 한다. 균주 W3110은 재조합 DNA 제품 발효를 위한 일반적인 숙주 균주이기 때문에 또한 흥미롭다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비한다. 예를 들어, 균주 W3110은 숙주에 내인성인 단백질을 코딩하는 유전자에 유전적 돌연변이를 일으키도록 변형될 수 있으며, 이러한 숙주의 예로는 완전한 유전자형 tonA를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 1A2; 완전한 유전자형 tonA ptr3을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 9E4; 완전한 유전자형 tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kan.sup.r을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 27C7(ATCC 55,244); 완전한 유전자형 tona ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r을 갖는 이. 콜라이 W31 10 균주 37D6; 비-카나마이신 저항성 degP 결실 돌연변이를 갖는 균주 37D6인 이. 콜라이 W31 10 균주 40B4; 및 1990년 8월 7일에 허여된 미국특허 4,946,783호에 기재된 돌연변이 원형질막 주의 프로테아제를 갖는 이. 콜라이 균주가 있다. 이. 콜라이 균주 MG1655, MG1655 AfimA-H 또는 MKS12, fliD- 및 -f/m>A-/-/-결실 MG1655 균주는 또한 분비된 단백질(Nat Biotechnol. 2005; (4):475-81)로서 재조합 플라겔린의 생산을 위한 흥미로운 후보이다.

[0047] 대안적으로, PCR 또는 기타 핵산 중합효소 반응과 같은 시험관내 클로닝 방법이 적합하다. 본 발명의 플라겔린 폴리펩티드는 배양 배지 또는 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있다. 막에 결합된 경우, 적합한 세제 용액(예: TRITON-XTM. 100)을 사용 하여 또는 효소 절단을 통해 막에서 분리될 수 있다. 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는 Nempont 등에 개시된 바와 같이, 재조합 S. Typhimurium SIN41 (fliC fljB)의 상청액으로부터 정제된다(Nempont, C. C. C., D.; Rumbo, M.; Bompard, C.; Vileret, V.; Sirard, J. C. 2008. 플라겔린의 초가변 영역의 결손은 항체-매개 중화 및 TLR5-의존성 면역의 전신 활성화를 폐지한다. J Immunol 181:2036-2043). 특히, 살모넬라균은 37℃에서 6-18시간 동안 교반하면서 Luria-Bertani (LB) 배지에서 성장시켰다. 상청액을 여과하고 60% 황산암모늄(Sigma Aldrich, USA)으로 포화시켰다. 침전된 물질을 원심분리하여 회수하고, 20mM Tris/HCl pH7.5에 용해시킨 후 투석하였다. 단백질은 연속적인 수산화인회석, 음이온 교환, 및 크기 배제 크로마토그래피(Bio-Rad Laboratories, 미국; GE Healthcare, 스웨덴)를 통해 추가로 정제되었다. 마지막으로, 폴리믹신 B 컬럼(Pierce, USA)을 사용하여 단백질에서 지질다당류(LPS)를 고갈시켰다. 리물루스 분석(Associates of Cape Cod Inc., USA)을 사용하여, 잔류 LPS 농도는 μg 재조합 플라겔린당 30pg LPS 미만으로 결정되었다. 플라겔린을 코딩하는 구성물은 PCR에 의해 생성될 수 있고 발현 벡터 pET22b+에 클로닝될 수 있다. 플라스미드를 에스케리아 콜라이 BL21(DE3)에 도입하고 IPTG 1mM을 첨가하여 단백질 생산을 유도할 수 있다. 프렌치 프레스에서 분쇄한 후, Triton X-114 추출을 사용하여 가용성 분획에서 지질다당류(LPS)가 고갈되었다. 프렌치-프레스 후 불용성 분획에서 플라겔린이 발견되면, Urea 8M 존재 하에 봉입체를 변성시킨 후 투석하고 Triton X-114를 추출한다. 이후에, 단백질은 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과를 통해 정제될 수 있다. 마지막으로, 단백질은 폴리믹신 B 컬럼(Pierce, USA)을 사용하여 LPS가 다시 고갈될 수 있다.

[0048] · 완충제

[0049] 완충제라는 용어는 물질의 pH를 일정하게 유지하는 화학 물질을 의미한다. 완충 시스템은 액체 제제의 pH 변화

를 제한하는 산 염기 결합으로 구성된다.

[0050] 일 구현예에서, 완충제는 아세테이트이고, 액체 제형 중 아세테이트의 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM 범위, 예컨대 약 5 mM 내지 약 150 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM의 범위이다. 일 구현예에서, 액체 제형 중 아세테이트의 농도는 약 5 mM 내지 약 25 mM 범위, 예컨대 약 5 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 15 mM, 또는 약 7.5 mM 내지 약 12.5 mM의 범위이다. 일 구현예에서, 액체 제형 중 아세테이트의 농도는 약 10 mM이다.

[0051] 일 구현예에서, 완충제는 포스페이트(phosphate)이고, 액체 제형 중 포스페이트의 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM 범위, 예컨대 약 5 mM 내지 약 150 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM의 범위이다. 일 구현예에서, 액체 제형 중 포스페이트의 농도는 약 5 mM 내지 약 25 mM 범위, 예컨대 약 5 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 15 mM, 또는 약 7.5 mM 내지 약 12.5 mM의 범위이다. 일 구현예에서, 액체 제형 중 포스페이트의 농도는 약 10 mM이다. 일 구현예에서, 액체 제형 중 포스페이트의 농도는 약 20 mM이다.

[0052] 일 구현예에서, 완충제로서 작용하는 아세테이트는 예를 들어, 아세트산과 함께(즉, 아세테이트 완충제의 형태로) 나트륨 아세테이트 (또는 다른 적합한 아세테이트 염, 예를 들어, 칼륨 아세테이트)이다. 적합한 아세테이트 완충제를 제조하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0053] 의약품 등급 완충제 아세테이트의 예는 다음과 같다:

[0054] 나트륨 아세테이트 삼수화물 ($CH_3COONa+.3H_2O$)

[0055] 아세트산 (CH_3COOH)

[0056] 일 구현예에서, 완충제로서 작용하는 포스페이트는 예를 들어, 포스페이트 완충제의 형태의, 포스페이트 나트륨(phosphate sodium)(또는 다른 적절한 포스페이트 염(phosphate salt))이다. 적합한 포스페이트 완충제를 제조하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0057] 의약품 등급 완충제 포스페이트의 예는 다음과 같다:

[0058] 이염기성(Dibasic) 포스페이트, 무수물 Na_2HPO_4

[0059] 일염기성(Monobasic) 포스페이트, 무수물 NaH_2PO_4

[0060] 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 시트레이트 및 히스티딘을 포함하지 않는다.

[0061] 본원에 사용된, 용어 "수성 매질"(또는 "수성 용액")은, 물이 용매인 액체 매질 또는 용액을 지칭한다. 일 구현예에서, 수성 매질은 물, 특히 정제된 물 또는 주입용 물(WFI)로 구성된다. 일 구현예에서, 수성 매질은 멸균 상태이다. 일 구현예에서, 액체 제형은 멸균 상태이다.

[0062] 일 구현예에서, 액체 제형은 약 3.5 내지 약 8의 범위의 pH를 갖는다.

[0063] 일 구현예에서, 완충제는 아세테이트이고, 액체 제형은 약 5.8 미만 또는 약 5.5 미만인 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 아세테이트이고, 액체 제형은 약 3.5 내지 약 5.8 미만, 또는 약 4.0 내지 약 5.8, 또는 약 4.5 내지 약 5.8, 또는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 액체 제형은 약 5.5의 pH를 갖는다.

[0064] 일 구현예에서, 완충제는 10 mM 농도의 아세테이트이고, 액체 제형은 약 5.8 미만 또는 약 5.5 미만인 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 10 mM 농도의 아세테이트이고, 액체 제형은 약 3.5 내지 약 5.8 미만, 또는 약 4.0 내지 약 5.8, 또는 약 4.5 내지 약 5.8, 또는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 액체 제형은 약 5.5의 pH를 가지고, 완충제는 10 mM 농도의 아세테이트이다.

[0065] 일 구현예에서, 완충제는 포스페이트이고, 액체 제형은 약 8 이하 또는 약 6.5 이하인 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 포스페이트이고, 액체 제형은 약 7.5 미만 또는 약 7 미만인 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 포스페이트이고, 액체 제형은 약 8.0 내지 약 6.2, 또는 약 7.5 내지 약 6.2, 또는 약 7.3 내지 약 6.5, 또는 약 7.0 내지 약 6.3, 또는 약 6.8 내지 약 6.0의 범위의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 액체 제형은 약 6.5의 pH를 갖는다.

[0066] 일 구현예에서, 완충제는 10 mM 농도의 포스페이트이고, 액체 제형은 약 8 이하 또는 약 6.5 이하의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 10 mM 농도의 포스페이트이고, 약 7.5 미만 또는 약 7 미만의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 10 mM 농도의 포스페이트이고, 액체 제형은 약 8.0 내지 약 6.2, 또는 약 7.5 내지 약 6.2,

또는 약 7.3 내지 약 6.5, 또는 약 7.0 내지 약 6.3, 또는 약 6.8 내지 약 6.0의 범위의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 액체 제형은 약 6.5의 pH를 가지고, 완충제는 10 mM 농도의 포스페이트이다.

[0067] 액체 제형은 약제학적으로 허용 가능하고 흡입, 특히 분무기를 통한 흡입에 의한 액체 제형의 투여에 대한 적합성을 손상시키지 않는 한, 하나 이상의 다른 부형제를 포함할 수 있다. 적합한 부형제는 약전 또는 예를 들어, REMINGTON's PHARMACEUTICAL SCIENCES(18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), 및 그 후속 판에 나열되어 있다. 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용가능한"이라는 용어는, 일 구현예에서, 액체 제형의 활성제의 작용과 상호작용하지 않는 물질의 무독성을 지칭한다.

[0068] · 계면활성제

[0069] 본 발명에 따르면 액체 제형은 또한 폴리소르베이트로 구성된 계면활성제를 포함한다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "계면활성제"(또는 "표면 활성제")는 두 액체 사이, 기체와 액체 사이, 또는 액체와 고체 사이의 표면 장력(또는 계면 장력)을 낮추는 화합물을 의미한다. 화합물은 기체(예를 들어, 공기)와 액체 사이의 표면 장력(또는 계면 장력)을 낮춘다. 계면활성제는 비-이온성 계면활성제입니다. 보다 정확하게는, 계면활성제는 폴리소르베이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0071] 일 구현예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 80(PS80)이다.

[0072] 일 구현예에서, 액체 제형 중 폴리소르베이트의 농도는 약 0.1%(w/v) 이하, 또는 약 0.05% (w/v) 이하, 예를 들어 약 0.04% (w/v) 이하, 또는 약 0.03% (w/v) 이하, 또는 약 0.02% (w/v) 이하, 또는 약 0.01% (w/v) 이하, 또는 약 0.005% (w/v)이하이다. 일 구현예에서, 액체 제형 중 폴리소르베이트 계면활성제의 농도는 약 0.02% (w/v) 이하이다.

[0073] 일 구현예에서, 액체 제형 중 PS80의 농도는 약 0.1%(w/v) 이하, 또는 약 0.05% (w/v) 이하, 예를 들어 약 0.04% (w/v) 이하, 또는 약 0.03% (w/v) 이하, 또는 약 0.02% (w/v) 이하, 또는 약 0.01% (w/v) 이하, 또는 약 0.005% (w/v)이하이다. 일 구현예에서, 액체 제형 중 PS80의 농도는 약 0.02% (w/v) 이하이다.

[0074] 일 구현예에서, 액체 제형은 단지 하나의 계면활성제만 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 계면활성제는 PS80이다.

[0075] 일반적으로, 에어로졸은 미세한 고체 입자 또는 액체 소적을, 공기 또는 다른 기체에 현탁시킨 것이다. 본 발명에 따르면, 용어 "에어로졸" 또는 "에어로졸 조성물"은 기체, 예를 들어, 공기 중에 상기 정의된 액상 제형의 소적 현탁액을 지칭한다.

[0076] 일 구현예에서, 소적들은 5 μm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 소적들은 4.5 μm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 소적들은 4.0 μm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 소적들은 3.5 μm 미만의 평균 직경을 갖는다.

[0077] 일 구현예에서, 소적들은 약 0.5 μm 내지 약 5 μm의 범위의 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 소적들은 약 0.5 μm 내지 약 4.5 μm의 범위의 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 소적들은 약 0.5 μm 내지 약 4 μm의 범위의 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 소적들은 약 0.5 μm 내지 약 3.5 μm의 범위의 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 평균 직경은 용적 중앙 직경(VMD; Dv50 값으로도 지칭됨)이다. 일 구현예에서, VMD는 예를 들어, U.S. Pharmacopeia(USP)(429)에 기재된 바와 같이 레이저 회절에 의해 결정된다. 소적 크기는 간섭계 레이저 이미징 등을 통해 측정할 수도 있다. 결과는 사용된 측정 방법에 따라 달라질 수 있다.

[0078] 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 5.8, 또는 약 5.5 미만의 pH를 가지며, 평균 직경이 5.0μm 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 5.8, 또는 약 5.5 미만의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 μm 내지 약 5.0μm 의 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 3.5, 또는 약 5.8 미만의 pH를 가지며, 평균 직경이 5μm 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 3.5, 또는 약 5.8 미만의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 μm 내지 약 5.0μm 의 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 3.5 내지 약 5.8의 pH를 가지며, 평균 직경이 5μm 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 3.5 내지 약 5.8의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 μm 내지 약 5.0μm 의 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 4.0 내지 약

5.8의 pH를 가지며, 평균 직경이 5㎛ 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 4.0 내지 약 5.8의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 ㎛ 내지 약 5㎛ 의 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 4.5 내지 약 5.8의 pH를 가지며, 평균 직경이 5㎛ 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 아세테이트 완충제를 포함하고, 약 4.5 내지 약 5.8의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 ㎛ 내지 약 5㎛ 의 범위인 소적을 포함한다. 다른 구현예에서, 액체 제형은 단지 하나의 계면활성제만 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 계면활성제는 PS80이다.

[0079] 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 8.0 미만 또는 약 6.5 미만의 pH를 가지며, 평균 직경이 5 ㎛ 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 8.0 내지 약 6.2 범위의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 ㎛ 내지 약 5 ㎛ 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.5 미만 또는 약 7 미만의 pH를 가지며, 평균 직경이 5 ㎛ 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.5 내지 약 7 범위의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 ㎛ 내지 약 5 ㎛ 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.5 내지 약 6.2의 pH를 가지며, 평균 직경이 5 ㎛ 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.5 내지 약 6.2 범위의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 ㎛ 내지 약 5 ㎛ 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.3 내지 약 6.5의 pH를 가지며, 평균 직경이 5 ㎛ 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.3 내지 약 6.5 범위의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 ㎛ 내지 약 5 ㎛ 범위인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.0 내지 약 6.3의 pH를 가지며, 평균 직경이 5 ㎛ 미만인 소적을 포함한다. 일 구현예에서, 액체 제형은 완충제로서 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 7.0 내지 약 6.3 범위의 pH를 가지며, 평균 직경이 약 0.5 ㎛ 내지 약 5 ㎛ 범위인 소적을 포함한다. 다른 구현예에서, 액체 제형은 단지 하나의 계면활성제만 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 계면활성제는 PS80이다.

[0080] 본 발명에 따르면, 본원에 기술된 에어로졸 또는 액체 제형에 존재하는 플라겔린 폴리펩티드는 예를 들어, 시트레이트 또는 히스티딘을 포함하는 제형으로 제형화되는 동일한 플라겔린 폴리펩티드와 비교하여, 낮은 응집을 특징으로 한다.

[0081] 일 구현예에서, 본원에 기술된 에어로졸 또는 액체 제형에 존재하는 플라겔린 폴리펩티드는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는다:

[0082] - 본원에 기재된 에어로졸 또는 액체 제형에 존재하는 플라겔린 폴리펩티드의 다분산 지수(PDI)는 예를 들어, DLS에 의해 측정된 바와 같이(예를 들어, 본질적으로 실시예 부분에 기재된 바와 같음) 0.4 이하, 0.3 이하, 0.2 이하, 0.15 이하 또는 0.1 이하이다;

[0083] - 본원에 기재된 에어로졸 또는 액체 제형에 존재하는 플라겔린 폴리펩티드 단량체의 다분산도의 백분율은 예를 들어, DLS에 의해 측정된 바와 같이(예를 들어, 본질적으로 실시예 부분에 기재된 바와 같음) 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하 또는 15% 이하이다;

[0084] - 본원에 기재된 에어로졸 또는 액체 제형에 존재하는 플라겔린 폴리펩티드의 단량체의 질량 백분율은 예를 들어, DLS에 의해 측정된 바와 같이(예를 들어 본질적으로 실시예 부분에 기재된 바와 같음) 99.7% 이상, 또는 99.8% 이상, 또는 99.9% 이상이다;

[0085] - 총 입자 수는 mL당 50000개 미만, 또는 mL당 30000개 미만, 또는 mL당 10000개 미만, 또는 mL당 5000개 미만이며; 및

[0086] 2㎛ 초과의 입자 수는 mL당 4000개 미만, 또는 mL당 3000개 미만, 또는 mL당 2000개 미만, 또는 mL당 1000개 미만이며; 및

[0087] 10㎛ 초과의 입자 수는 mL당 250개 미만, 또는 mL당 150개 미만, 또는 mL당 100개 미만이며; 및

[0088] 25㎛ 초과의 입자 수는 mL당 100개 미만, 또는 mL당 50개 미만, 또는 mL당 40개 미만, 또는 mL당 30개 미만이며,

[0089] 예를 들어, FCM에 의해 측정된다(예를 들어, 본질적으로 실시예 부분에 기재된 바와 같음).

[0090] · 에어로졸 조성물의 제조 방법

[0091] 다른 양태에서, 본 발명은 액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 다음 단계:

[0092] (i) 상기 정의된 바와 같은 액체 제형을 제공하는 단계,

[0093] (ii) 분무기를 사용하여 단계 (i)에서 제공된 액체 제형을 분무하여 에어로졸을 제조하는 단계를 포함한다.

[0094] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0095] 분무기는 기체 내의 액체를 분산시켜 대상체의 호흡기로 흡입되는 에어로졸 내로 액체 제형을 에어로졸화하는 것을 가능하게 한다. 분무기의 예로는 연무 분무기, 메쉬 분무기(예를 들어, 진동 메쉬 분무기), 제트 분무기 및 초음파 분무기가 포함된다. 적합한 분무기 장치로는 Aerogen® Solo(Aerogen), ParieFlow®(Pari GmbH), Philips I-neb™(Philips), Pari LC Sprint(Pari GmbH), AERxRTM 폐 전달 시스템(Aradigm Corp.) 및 Pari LC Plus 재사용 가능 분무기(Pari GmbH)가 있다. 일 구현예에서, 분무기는 메시 분무기, 특히 진동 메시 분무기이다. 분무기는 전형적으로 약 1 mL 내지 약 200 mL, 보다 전형적으로 1 mL 내지 20 mL의 액체 제형을 포함한다.

[0096] 일 구현예에서, 방법은 단계 (i) 과 단계 (ii) 사이에 다음의 단계를 더 포함한다:

[0097] (ia) 단계 (i)에서 제공된 액상 제형을 동결건조시켜 동결건조된 분말을 제공하는 단계, 및

[0098] (ib) 단계 (ia)에서 제공된 동결건조된 분말에 적절한 양의 수성 매질을 첨가함으로써 단계 (i)에서 제공된 액체 제형을 재구성한다.

[0099] 또 다른 측면에서, 본 발명은 액체 제형을 포함하는 소적을 포함하는 에어로졸 조성물에 관한 것이며, 여기서 에어로졸은 상기 정의된 방법에 의해 얻을 수 있다. 일 구현예에서, 소적은 약 0.5㎛ 내지 약 5㎛ 또는 약 0.5㎛ 내지 약 3.5㎛ 범위의 평균 직경을 갖는다.

[0100] · 플라겔린 폴리펩티드를 전달하는 방법

[0101] 또 다른 측면에서, 본 발명은 플라겔린 폴리펩티드를 대상체의 폐로 전달하는 방법에 사용하기 위해 상기 정의된 바와 같은 액체 제형 또는 상기 정의된 에어로졸 조성물에 관한 것으로, 여기서 에어로졸은 흡입에 의해 대상체에게 투여되거나 액체 제형은 분무기를 통한 흡입에 의해 피험자에게 투여된다.

[0102] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는: a) 서열번호: 3의 위치 1에 위치한 아미노산 잔기로부터 시작하고 서열번호:3의 위치 99 내지 173에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 N-말단 펩티드; 및 b) 서열 번호: 3의 401 내지 406번 위치에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 시작하고 서열 번호: 3의 위치 494에 위치한 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하고, 여기서: 상기 N-말단 펩티드는 상기 C-말단 펩티드에 직접 연결되거나, 상기 N-말단 펩티드와 상기 C-말단 펩타이드는 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된다.

[0103] 일부 구현예에서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 각각 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-173, 및 401-494으로 이루어진다.

[0104] 일부 구현예에서, 상기 N-말단 펩티드 및 C-말단 펩티드는 NH2-GIy-AIa-AIa-GIy-COOH (서열 번호: 4) 펩티드 서열로 이루어지는 중간 스페이서 사슬을 통해, 서로 간접적으로 연결된다.

[0105] 일부 구현예에서, 상기된 바와 같은 플라겔린 폴리펩티드는 N-말단(아미노산 잔기 ML)(서열번호 3의 플라겔린 폴리펩티드에 관하여)에 하나의 추가 메티오닌 잔기(M) 및 하나의 추가 리신 잔기(L)를 포함한다.

[0106] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 재조합 폴리펩티드이다.

[0107] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0108] 본 발명에 따라 용어 "대상체"는 인간, 인간이 아닌 영장류 또는 다른 동물, 특히 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼 또는 마우스, 랫트(rat), 기니 피그 및 햄스터 같은 설치류와 같은 포유동물을 포함하는 치료 대상체, 특히 질병에 걸린 대상체("환자"라고도 함)을 의미한다. 일 구현예에서, 대상체/환자는 인간이다.

[0109] 다른 양태에서, 본 발명은, 선택적으로 대상체에서 폐 질환을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 적어도 하나의 항생제와 조합된, 본 발명의 에어로졸 조성물 또는 상기 정의된 액체 제형에 관한 것이며, 여기서 에

어로졸은 흡입에 의해 대상체에게 투여되거나 또는 액체 제형은 분무기를 통한 흡입에 의해 대상체에게 투여된다.

[0110] 일 구현예에서, 폐 질환은 폐 감염성 질환(즉, 폐 세균 감염)이다.

[0111] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0112] "폐 감염성 질환"(본원에서 "폐 감염성 질환"이라고도 함)이라는 용어는 개체에서 개체로 또는 유기체에서 유기체로 전염될 수 있는 모든 질병을 의미하며, 이는 다음과 같은 대상체의 폐에 영향을 미치는 미생물 작용제(예: 일반적인 감기)에 의해 발생한다. 감염성 질환의 예로는 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 및 중증급성호흡기증후군(SARS)과 같은 바이러스성 감염성 질환, 레지오넬라(Legionnite's disease), 결핵과 같은 세균성 감염성 질환, 대장균, 포도상구균, 살모넬라 또는 연쇄상구균(Streptococci)에 의한 감염, 아스페르길루스증과 같은 기생충 감염성 질환, 또는 진균 감염, 예를 들어, 아스페르길루스증에 의한 감염성 질환 등이 있다.

[0113] 폐 감염성 질환은 폐렴일 수도 있다.

[0114] 용어 "폐렴"(본원에서는 "하기도 감염(LRTI)"이라고도 함)은 폐 농양 및 급성 기관지염을 비롯한 다른 유형의 감염에도 적용될 수 있다. 증상으로는 호흡곤란, 허약, 발열, 기침, 피로 등이 있다. 하기도 감염 증상이 있는 사람들에게 정기적인 흉부 X-레이 촬영이 항상 필요한 것은 아니다. 인플루엔자는 상부 및 하부 호흡기 모두에 영향을 미친다. 항생제는 폐렴의 1차 치료법이다; 그러나, 기생충 또는 바이러스 감염에는 효과적이지 않으며 표시되지도 않는다. 급성 기관지염은 일반적으로 시간이 지나면 저절로 해결된다.

[0115] 폐렴의 가장 흔한 원인은 폐렴구균이며, 폐렴구균은 균혈증 폐렴의 2/3를 차지한다. 이는 사망률이 약 25%인 위험한 유형의 폐 감염이다. 폐렴 환자를 최적으로 관리하려면 폐렴 중증도(예를 들어, 집, 병원 또는 중환자실 포함), 원인 유기체 식별, 흉통 진통, 보충 산소, 물리 치료, 수화, 기관지 확장기 및 폐기종 또는 폐 농양의 합병증 가능성을 평가해야 한다.

[0116] 폐렴의 주요 원인은 전형적인 세균 감염(헤모필루스 인플루엔자, 황색포도상구균, 폐렴간균)과 비정형 세균감염(레지오넬라 뉴모필라, 마이코플라스마 폐렴, 클라미도필라 뉴모니아, 클라미디아 시타치(psittaci)), 기생충 감염(호흡기 크립토스포리디움증) 및 바이러스 감염(아데노바이러스, 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스, 인간 파라인플루엔자 바이러스, 인간 호흡기 세포융합 바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2))에 기인한다.

[0117] 또 다른 측면에서, 본 발명은 흡입에 의해 상기 정의된 에어로졸의 유효량을 대상체에게 투여하거나 대상체에게 유효량의 다음을 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 폐에 분무기를 통한 흡입에 의한 상기 정의된 액체 제형 플라겔린 폴리펩티드를 전달하는 방법에 관한 것이다.

[0118] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는: a) 서열번호: 3의 위치 1에 위치한 아미노산 잔기로부터 시작하고 서열번호:3의 위치 99 내지 173에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 N-말단 펩티드; 및 b) 서열 번호: 3의 401 내지 406번 위치에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 시작하고 서열 번호: 3의 위치 494에 위치한 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하고, 여기서: 상기 N-말단 펩티드는 상기 C-말단 펩티드에 직접 연결되거나, 상기 N-말단 펩티드와 상기 C-말단 펩타이드는 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된다.

[0119] 일부 구현예에서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 각각 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-173, 및 401-494으로 이루어진다.

[0120] 일부 구현예에서, 상기 N-말단 펩티드 및 C-말단 펩티드는 NH2-GIy-AIa-AIa-GIy-COOH (서열 번호: 4) 펩티드 서열로 이루어지는 중간 스페이서 사슬을 통해, 서로 간접적으로 연결된다.

[0121] 일부 구현예에서, 상기된 바와 같은 플라겔린 폴리펩티드는 N-말단(아미노산 잔기 ML)(서열번호 3의 플라겔린 폴리펩티드에 관하여)에 하나의 추가 메티오닌 잔기(M) 및 하나의 추가 리신 잔기(L)를 포함한다.

[0122] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 재조합 폴리펩티드이다.

[0123] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0124] 본원에서 사용되는 용어 "유효량"은 특히 "치료적으로 유효한 양"을 지칭하는데, 이는 특히 허용될 수 없는 부작용을 야기하지 않으면서 단독으로 또는 추가의 투여량과 함께 원하는 치료 반응 또는 원하는 치료 효과를 달성하는 양이다. 특정 질병의 치료 또는 특정 상태의 치료의 경우에, 원하는 반응은 특히 질병 경과의 억제와 관련된다. 이는 질병의 진행을 늦추는 것 및, 특히 질병의 진행을 방해하거나 역전시키는 것을 포함한다. 질병 또는 상태의 치료에서 원하는 반응은 또한 발병의 지연 또는 해당 질병 또는 상태의 발병의 예방일 수 있다. 본원에 기재된 에어로졸 또는 액체 제형의 유효량, 및, 따라서, 이에 포함된 플라겔린 폴리펩티드의 유효량은 치료될 조건, 질병의 중증도, 연령, 생리학적 상태, 크기 및 체중, 치료 기간, 동반된 요법의 유형(존재하는 경우), 투여의 특정 경로 및 유사한 인자를 포함하는 대상의 개별 파라미터에 의존한다. 따라서, 본원에 기술된 에어로졸 또는 액체 제형의 투여 용량은 이러한 여러 매개변수에 따라 달라질 수 있다. 초기 용량으로 대상의 반응이 불충분한 경우에는 더 높은 용량을 사용할 수 있다.

[0125] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체의 폐 감염성 질환을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 흡입에 의해 상기 정의된 바와 같은 에어로졸의 유효량을 대상체에게 투여하거나 분무기를 통한 흡입에 의해 상기 정의된 적어도 하나의 항생제와 선택적으로 조합하여 상기 정의된 바와 같은 액체 제형의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0126] 일 구현예에서, 폐 감염성 질환은 폐 박테리아 감염이다.

[0127] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0128] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 액체 제형을 포함하는 분무기에 관한 것이다.

[0129] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0130] · 키트(kit)

[0131] 또 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 키트에 관한 것이다:

[0132] (i) 상기 정의된 액상 제형 또는 액상 제형을 동결건조하여 얻을 수 있는 분말을 포함하는 용기, 및

[0133] (ii) 분무기.

[0134] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0135] 본 명세서에 사용된 용어 "부품 키트(간략히: 키트)"는 하나 이상의 용기, 분무기(예를 들어, 메쉬 분무기), 및, 선택적으로, 데이터 캐리어(data carrier)를 포함하는 제조품을 의미한다. 상기 하나 이상의 용기는 상기 정의된 바와 같은 액체 제형 및/또는 상기 액체 제형의 동결건조에 의해 얻을 수 있는 분말로 충전된다. 예를 들어, 희석제(예를 들어, 수성 매질), 완충제 및 본원에 정의된 추가 시약을 함유하는 추가 용기가 키트에 포함될 수 있다. 상기 데이터 매체는 비전자 데이터 매체, 예를 들어, 정보 전단지, 정보 시트, 바코드 또는 액세스 코드와 같은 그래픽 데이터 매체, 또는 컴팩트 디스크(CD), DVD(Digital Versatile Disk), 마이크로칩 또는 기타 반도체 기반 전자 데이터 매체와 같은 전자 데이터 매체일 수 있다. 액세스 코드는 데이터베이스, 예를 들어, 인터넷 데이터베이스, 중앙 집중식, 또는 분산형 데이터베이스에 대한 액세스를 허용할 수 있다. 상기 데이터 매체는 본원에 기술된 방법 및 용도에서 키트의 사용에 대한 설명서를 포함할 수 있다.

[0136] · 액체 제형의 용도

[0137] 또 다른 측면에서, 본 발명은 분무기에 의한 분무에 의한 에어로졸 제조를 위해 상기 정의된 바와 같은 액체 제형의 사용에 관한 것이다.

[0138] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0139] 또 다른 측면에서, 본 발명은 분무기에 의해 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 액체 제제의 분무 시 플라겔린 폴리펩티드의 안정성을 증가시키기 위해 아세테이트, 포스페이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제, 및 폴리소르베이트로 이루어진 계면활성제의 용도에 관한 것이며, 여기서 완충제는 분무 전에 액체 제형에 포함된다.

[0140] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는: a) 서열번호: 3의 위치 1에 위치한 아미노산 잔기로부터 시작하고 서열번호:3의 위치 99 내지 173에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 N-말단 펩티드; 및 b) 서열 번호: 3의 401 내지 406번 위치에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 시

작하고 서열 번호: 3의 위치 494에 위치한 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열과 적어도 90%의 아미노산 동일성을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하고, 여기서: 상기 N-말단 펩티드는 상기 C-말단 펩티드에 직접 연결되거나, 상기 N-말단 펩티드와 상기 C-말단 펩타이드는 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된다.

[0141] 일부 구현예에서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 각각 서열 번호: 3의 아미노산 서열 1-173, 및 401-494으로 이루어진다.

[0142] 일부 구현예에서, 상기 N-말단 펩티드 및 C-말단 펩티드는 NH2-GIy-AIa-AIa-GIy-COOH (서열 번호: 4) 펩티드 서열로 이루어지는 중간 스페이서 사슬을 통해, 서로 간접적으로 연결된다.

[0143] 일부 구현예에서, 상기된 바와 같은 플라겔린 폴리펩티드는 N-말단(아미노산 잔기 ML)(서열번호 3의 플라겔린 폴리펩티드에 관하여)에 하나의 추가 메티오닌 잔기(M) 및 하나의 추가 리신 잔기(L)를 포함한다.

[0144] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드는 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 재조합 폴리펩티드이다.

[0145] 일 구현예에서, 분무기는 메쉬 분무기이다.

[0146] 일 구현예에서, "안정성을 증가시키는"이라는 용어는 플라겔린 폴리펩티드의 응집 정도를 예방하거나 감소시키는 것을 의미한다.

[0147] 일 구현예에서, 플라겔린 농도에 의해 보장되는 생물학적 및/또는 물리화학적 안정성은 10㎍/mL 내지 2.5mg/mL이다.

[0148] 일 구현예에서, 액체 제형은 약 8 이하의 pH를 갖는다.

[0149] 일 구현예에서, 액체 제형은 시트레이트 또는 히스티딘을 포함하지 않는다.

[0150] 일 구현예에서, 액체 제형은 약 3.5 내지 약 8의 범위의 pH를 갖는다.

[0151] 일 구현예에서, 완충제는 아세테이트이고, 액체 제형은 약 5.8 미만 또는 약 5.5 미만인 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 아세테이트이고, 액체 제형은 약 3.5 내지 약 5.8 미만, 또는 약 4.0 내지 약 5.8, 또는 약 4.5 내지 약 5.8, 또는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 액체 제형은 약 5.5의 pH를 갖는다.

[0152] 액체 제형은 폴리소르베이트로 구성된 계면활성제를 추가로 포함한다.

[0153] 일 구현예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다.

[0154] 일 구현예에서, 액체 제형 중 계면활성제의 농도는 약 0.1%(w/v) 이하, 또는 약 0.02% (w/v) 이하, 또는 약 0.005% (w/v)이하이다.

[0155] Beasley 연구에 따르면(Beasley R, Rafferty P, Holgate ST(1988)) 분무기 용액의 비-약물 성분에 대한 부작용이 일어난다. Br J Clin Pharmacol 25:283-287) 흡입용 제제는 삼투압 농도가 150~549mOsmol/Kg이어야 하며 이소-삼투압몰농도(iso-osmolality) (280~300mOsmol/Kg)에 가까운 것이 좋다. NaCl은 일반적으로 제형의 삼투압몰 농도를 조정하는 데 사용된다.

[0156] 일 구현예에서, 액체 제형은 NaCl을 포함한다.

[0157] 일 구현예에서, 액체 제형은 비-완충 염(non-buffering salt)을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "비-완충 염"은 산 또는 염기 첨가 시 액체 제형의 pH를 유지하는 데 실질적으로 기여하지 않거나 실질적으로 기여하지 않는 염을 의미한다. 일 구현예에서, 비-완충 염은 할로겐 염(예를 들어, Cl- 또는 Br- 포함)이다. 일 구현예에서, 비-완충 염은 나트륨(Na+), 칼륨(K+), 칼슘(Ca2+) 또는 마그네슘(Mg2+)의 하나 이상의 양이온을 포함하는 할로겐 염이다. 일 구현예에서, 비-완충 염은 나트륨(Na+) 또는 칼륨(K+)의 하나 이상의 양이온을 포함하는 할로겐 염이다. 또 다른 구현예에서, 비-완충 염은 NaCl, KCl, CaCl2 및 MgCl2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0158] **· 치료 방법**

[0159] 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 에어로졸 조성물 또는 상기 정의된 바와 같은 액체 제형을 임의로 적어도 하나의 항생제와 조합하여 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 폐 박테리아 감염을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0160] 대상체는 인간 또는 폐 박테리아 감염에 민감한(예를 들어, 고양이 및 개와 같은 가축, 말, 소, 돼지, 닭 등과 같은 가축 및 농장 동물) 임의의 다른 동물(예를 들어, 새 및 포유류)일 수 있다. 전형적으로 상기 대상은 비

영장류(예를 들어, 낙타, 당나귀, 얼룩말, 소, 돼지, 말, 염소, 양, 고양이, 개, 쥐 및 쥐)와 영장류(예를 들어, 원숭이, 침팬지, 및 인간)를 포함하는 포유동물이다. 일 구현예에서, 대상은 인간이다.

[0161] 본원에 사용된 용어 "폐 세균 감염"은 당업계에서 일반적인 의미를 가지며 대상에서 발생하는 세균 감염(예를 들어 세균성 폐렴)을 의미한다. 본 발명의 방법은 하기도 감염(예를 들어, 폐렴), 중이 감염(예를 들어, 중이염) 및 세균성 부비동염과 같은 세균성 감염의 치료에 특히 적합하다. 세균 감염은 수많은 세균성 병원체에 의해 발생할 수 있다. 예를 들어, 이는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 유기체: *폐렴구균; 황색포도상구균; 헤모필루스 인플루엔자, 마이오플라스마 종 및 모락셀라 카타랄리스*에 의해 매개될 수 있다.

[0162] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "**치료**" 또는 "**치료하다**"는 질환에 걸릴 위험이 있거나 질환에 걸린 것으로 의심되는 환자뿐만 아니라 아프거나 질환 또는 의학적 상태를 앓고 있는 것으로 진단된 환자의 치료를 포함하는, 예방적 또는 방지적 치료뿐만 아니라 치유적 또는 질환 변형 치료(disease modifying treatment) 둘 다를 지칭하고, 임상적 재발의 억제를 포함한다. 치료는 장애 또는 재발성 장애의 하나 이상의 증상의 발생을 방지, 치유, 지연하거나, 이의 중증도를 감소시키거나 또는 이를 개선하기 위해, 또는 이러한 치료의 부재하에서 예측되는 것 이상으로 대상체의 생존을 연장시키기 위해, 의학적 장애를 가지거나 궁극적으로 장애를 획득할 수 있는 대상체에게 투여될 수 있다. "치료 요법"은 질병의 치료 패턴, 예컨대, 치료요법 동안 사용된 투여 패턴을 의미한다. 치료 요법은 유도 요법(induction regimen) 및 유지 요법(maintenance regimen)을 포함할 수 있다. 어구, "유도 요법" 또는 "유도 기간"은 질병의 초기 치료에 사용되는 치료 요법(또는 치료 요법의 일부)을 지칭한다. 유도 요법의 일반적인 목표는 치료 요법의 초기 기간 동안 환자에게 높은 수준의 약물을 제공하는 것이다. 유도 요법은 (부분적으로 또는 전체적으로) "로딩 요법(loading regimen)"을 사용할 수 있는데, 이는 유지 요법 동안 의사가 사용할 수 있는 것보다 더 많은 양의 약물을 투여하는 것, 유지 요법 동안 의사가 약물을 투여할 수 있는 것보다 더 자주 약물을 투여하는 것, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 어구, "유지 요법" 또는 "유지 기간"은 질병의 치료 동안 환자의 유지를 위해, 예컨대, 긴 기간(수개월 또는 수년) 동안 환자가 차도(remission)를 유지하기 위해 사용된 치료 요법(또는 치료 요법의 일부)를 지칭한다. 유지 요법은 연속적인 치료요법(예컨대, 약물을 일정 간격, 예컨대, 매주, 매월, 매년 등마다 투여하는 것) 또는 간헐적인 치료요법(예컨대, 중단 치료(interrupted treatment), 간헐적 치료(intermittent treatment), 재발 시 치료, 또는 특수한 예정된 기준(예컨대, 질환 발현 등) 달성 시 치료)을 사용할 수 있다.

[0163] 본 발명의 방법은 50세 이상의 대상체, 만성 치료 시설에 거주하는 대상, 만성 폐질환이 있는 대상을 포함하여 박테리아 감염이 발생할 위험이 높은 것으로 확인된 대상 또는 심혈관계, 만성 대사 질환(당뇨병 포함), 신장 기능 장애, 혈색소증 또는 면역 억제(약물 또는 인간 면역결핍(HIV) 바이러스로 인한 면역 억제 포함)으로 인해 전년도에 정기적인 의학적 후속 조치 또는 입원이 필요했던 대상체); 14세 미만의 어린이, 장기간 아스피린 치료를 받고 있는 6개월에서 18세 사이의 환자, 인플루엔자 계절 동안 임신 2기 또는 3기의 여성에게 특히 적합하다. 보다 구체적으로, 본 발명의 방법은 1세 이상 14세 미만의 대상(즉, 어린이); 50세 이상 65세 미만의 대상, 및 65세 이상의 성인에서의 인플루엔자 후 박테리아 중복감염의 치료에 적합한 것으로 고려된다.

[0164] 일 구현예에서, 항생제는 아미노글리코사이드, 베타 락탐, 퀴놀론 또는 플루오로퀴놀론, 마크로라이드, 설폰아미드, 설파메톡소졸, 테트라사이클린, 스트렙토그라민, 옥사졸리디논(리네졸리드 등), 리파마이신, 글리코펩티드, 폴리믹신, 리포펩티드 항생제로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0165] 테트라사이클린은 4개의 융합된 6원(육환식) 고리로 구성된 4원 고리 구조를 공유하는 부류에 속한다. 테트라사이클린은 감수성 박테리아에서 아미노아실 tRNA가 30S 리보솜 하위 단위에 결합하는 것을 억제함으로써 활성을 나타낸다. 본 발명에서 사용하기 위한 테트라사이클린은 클로르테트라사이클린, 디메클로사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 메타사이클린, 메코사이클린, 티게사이클린, 라임사이클린 및 테트라사이클린을 포함한다. 테트라사이클린은 α-용혈성 연쇄상구균, 비용혈성 연쇄상구균, 그람 음성 간균, 리케차, 스피로헤타, 마이코플라즈마 및 클라미디아를 포함한 많은 알려져 있는 유기체에 효과적이다.

[0166] 아미노글리코사이드는 스트렙토미세스 또는 미코모나스포라균의 종에서 유래한 화합물로 주로 그람-음성균에 의한 감염을 치료하는 데 사용된다. 이 부류에 속하는 약물은 모두 동일한 기본 화학 구조, 즉, 둘 이상의 아미노당이 글리코시드 결합에 의해 부착된 중앙 육탄당 또는 디아미노 육탄당 분자를 갖는다. 아미노글리코사이드는 30S 리보솜에 결합하여 세균성 단백질 합성을 억제하는 살균 항생제이다. 이들은 주로 호기성 그람음성균과 포도상구균에 대해 활성을 보인다. 본 발명에 사용되는 아미노글리코사이드계 항생제는 아미카신(Amikin®), 겐타마이신(Garamycin®), 카나마이신(Kantrex®), 네오마이신(Mycifradin®), 네틸미신(Netromycin®), 파로마이

신(Humatin®), 스트렙토마이신(Streptomycin) 및 토브라마이신(TOBI Solution®, TobraDex®)을 포함한다.

[0167] 마크로라이드는 일반적으로 클라디노스 및 데소사민과 같은 하나 이상의 데옥시당이 부착된 마크로라이드 고리(대형 14-, 15-, 또는 16-원 락톤 고리)의 존재에서 비롯되는 활성을 갖는 폴리케티드 항생제 약물 그룹이다. 마크로라이드는 주로 정균 작용 및 리보솜의 50S 소단위에 결합하여 박테리아 합성을 억제한다. 마크로라이드는 호기성 및 혐기성 그람 양성 구균(장구균 제외)과 그람-음성 혐기성 미생물에 대해 활성을 나타낸다. 본 발명에 사용되는 마크로라이드는 아지트로마이신(Zithromycin, Zithromax®), 클라리트로마이신(Biaxin®), 디리트로마이신(Dirithromycin, Dynabac®), 에리트로마이신, 클린다마이신, 조사마이신, 록시트로마이신 및 린코마이신을 포함한다.

[0168] 케톨리드는 에리스로마이신 마크로락톤 고리 구조와 위치 5에 부착된 D-데소사민 당이 유지되는 반합성 14원 고리 마크로라이드 클래스에 속하지만, 위치 3의 L-클라디노스5 부분과 하이드록실 그룹은 a3-케토 작용기로 대체된다. 케톨라이드는 23S rRNA에 결합하며, 그 작용기전은 마크로라이드와 유사하다(Zanel, G.G., et al., Drugs, 2001; 61(4):443-98). 케톨리드는 그람 양성 에어로빅 및 일부 그람 음성 에어로빅에 대해 우수한 활성을 나타내며, mefA 및 ermB를 생성하는 스트렙토코커스 폐렴 및 헤모필루스 인플루엔자를 포함한 스트렙토코커스 spp.에 대해 우수한 활성을 갖는다. 본 발명에 사용하기 위한 대표적인 케톨리드는 텔리스로마이신(이전에는 HMR-3647로 알려짐), HMR 3004, HMR 3647, 세트로마이신, EDP-420 및 ABT-773을 포함한다.

[0169] 구조적으로, 퀴놀론은 위치 3에 필수 카르복실기를 갖는 1,4 디하이드로-4-옥소-퀴놀리닐 부분을 갖는다. 기능적으로, 퀴놀론은 세균 염색체와의 직접적인 결합을 통해 원핵생물 II형 토포이소머라제, 즉 DNA 자이라제 억제 및, 몇몇 경우에는 토포이소머라제 IV를 억제한다. 본 발명에 사용하기 위한 퀴놀론은 플루오로퀴놀론을 포함하는 1세대, 2세대, 3세대 및 4세대 퀴놀론에 걸쳐 있다. 이러한 화합물은 날리딕산, 시녹사신, 옥솔린산, 플루메퀸, 피페미드산, 로옥사신, 로옥사신, 노르플록사신, 로메플록사신, 오플록사신, 엔로플록사신, 시프로플록사신, 에녹사신, 아미플록사신, 플로록사신, 가티플록사신, 제미플록사신, 제미플록사신, 클리나플록사신, 시타플록사신, 페플록사신, 루플록사신, 스파르플록사신, 테마플록사신, 토수플록사신, 그레파플록사신, 레보플록사신, 목시플록사신 및 트로바플록사신을 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 추가의 퀴놀론은 문헌: Hooper, D., and Rubinstein, E., "Quinolone Antibiotic Agents, Vd Edition", American Society of Microbiology Press, Washington D.C. (2004)에 기재된 것을 포함한다.

[0170] 설폰아미드 부류에 속하는 약물은 모두 설폰아미드 부분(moiety), -SO2NH2, 또는 치환된 설폰아미드 부분을 보유하며, 여기서 질소의 수소 중 15개는 유기 치환체로 대체된다. 예시적인 N-치환체에는 치환되거나 치환되지 않은 티아졸, 피리미딘, 이속사졸 및 기타 작용기가 포함된다. 술폰아미드 항생제는 모두 공통적인 구조적 특징을 공유하는데, 즉, 모두 벤젠 술폰아미드이며, 이는 술폰아미드 기능이 벤젠 고리에 직접 부착되어 있다는 것을 의미한다. 설폰아미드 항생제의 구조는 테트라하이드로-25 엽산의 합성을 위한 효소인 디히드로프테로에이트 합성효소의 기질로서 박테리아에서 필요한 화합물인 p-아미노벤조산(PABA)과 유사하다. 설폰아미드는 PABA가 필요한 박테리아의 대사 과정을 방해하여, 박테리아의 성장과 활동을 억제함으로써 항생제로 기능한다. 본 발명에 사용하기 위한 설폰아미드 항생제에는 다음이 포함된다: 마페니드, 프탈릴설파티아졸, 숙시닐설파티아졸, 설파세트아미드, 설파디아진, 설파독신, 설파마존, 설파메타진, 설파메톡사졸, 설파메토피라진, 설파메톡시피리다진, 설파메트롤, 설파모노메톡신, 설파밀론, 설파닐아미드, 설파 퀴녹살린, 설파살라진, 설파티아졸, 설피속사졸, 설피속사졸 디올아민, 및 설파구아니딘.

[0171] 베타-락탐의 모든 구성원은 베타-락탐 고리와 카르복실기를 가지고 있으며, 이들의 약동학 및 작용 메커니즘 모두에서 55개의 유사성을 생성한다. 임상적으로 유용한 베타-락탐의 대부분은 페니실린 그룹 또는 세팔로스포린 그룹에 속하며, 여기에는 세파마이신 및 옥사켐이 포함된다. 베타-락탐에는 또한 카바페넴과 모노박탐도 포함된다. 일반적으로 말해서, 베타-락탐은 박테리아 세포벽 합성을 억제한다. 보다 구체적으로, 이러한 항생제는 세포벽의 펩티도글리칸 그물에 '닉(nicks) '을 유발하여 박테리아 원형질이 보호망에서 주변 저장성 배지로 흘러갈 수 있도록 한다. 이후 65개의 원형질체(벽이 없는 세포)에 유체가 축적되고, 결국 폭발하여 유기체가 죽게 된다. 기계적으로, 베타-락탄은 효소 표적 부위의 수산기에 부착된 열린 락탐 고리의 카르복실기와 안정한 에스테르를 형성함으로써 D-알라닐-D-알라닌 트랜스펩티다제 활성을 억제함으로써 작용한다. 베타-락탐은 매우 효과적이며 전형적으로 독성이 낮다. 이들 약물은 하나의 집단으로서 많은 그람-양성, 그람-음성 및 혐기성 유기체에 대해 활성을 나타낸다. 이 범주에 속하는 약물에는 2-(3-알라닐)클라밤, 2-하이드록시메틸클라밤, 7-메톡시세팔로스포린, 에피티에나마이신, 아세틸티에나마이신, 아목시실린, 아팔실린, 아폭시실린, 아지도실린, 아즈로실린, 아즈트레오남, 바캄피실린, 블라페넴, 카르베니실린, 카르페실린 , 카린다실린, 카펫티마이신 A 및 B, 세파세트릴, 세파클러, 세파드록실, 세팔렉신, 세팔로글리신, 세팔로리딘, 세팔로틴, 세파만돌, 세파피린, 세파트

리진, 세파제돈, 세파졸린, 세프부페라존, 세프카펨, 세프디니르, 세프디토렌, 세페핌, 세페타메트, 세픽심, 세피네녹심, 세피네타졸, 세프미녹스, 세프몰렉신, 세포디짐, 세포니시드, 세포페라존, 세포라미드, 세포셀리스, 세포탁심, 세포테탄, 세포티암, 세포시틴, 세포조프란, 세프피라미드, 세프피롬, 세프포독심, 세프프로질, 세프퀴놈, 세프라딘, 세프록사딘, 세프술로딘, 세프타지딤, c 에프테람, 세프테졸, 세프티부텐, 세프티족심, 세프트리악손, 세푸록심, 세팔로스포린 C, 세파마이신 A, 세파마이신 C, 세팔로틴, 키티노보린 A, 키티노보린 B, 키티노보린 C, 시클라실린, 클로메토실린, 클록사실린, 사이클로세린, 데옥시 플루라시도마이신 B 및 C, 디클록사실린, 디하이드로 플루라시도마이신 C, 에피실린, 에피티에나마이신 D , 전자 및 F, 에르타페넴, 파로페넴, 플로목세프, 플루클록사실린, 헤타실린, 이미페넴, 레남피실린, 로라카르베프, 메실리남, 메로페넴, 메탐피실린, 메티실린(메티실린이라고도 함), 메즈로실린, 목살락탐, 나프실린, 노디에나마이신, 옥사실린, 파니페넴, 페나메실린, 펜 이실린 G, N, 및 V, 페네티실린, 피페라실린, 포밤피실린, 피브세팔렉신, 포브메실린남, 피브메실리남, 플루라시도마이신 B, C, 및 D, 프로피실린, 사르목시실린, 설박탐, 술타미실린, 탈람피실린, 테모실린, 테르코나졸, 티에나마이신, 안드티카르실린이 포함된다.

[0172] 400개 이상의 천연 항균 펩티드가 분리되고 특성화되었다. 화학 구조에 따라 이러한 펩타이드는, 선형 및 고리형의 두 가지 주요 그룹으로 분류될 수 있다(R.E. Hancock et al, Adv. Microb. Physiol., 1995, 37: 135-137; H. Kleinkauf et al., Criti. Rev. Biotechnol., 198, 8: 1-32; D. Perlman and M. Bodansky, Annu. Rev. Biochem., 1971, 40: 449-464). 대부분의 이들 펩티드(선형 및 고리형 모두)에 대한 작용 방식은 막 파괴를 포함하여 세포 누출을 일으키는 것으로 여겨진다(A. Mor, Drug Develop. Res., 2000, 50: 440-447). 마가이닌 및 멜리팅과 같은 선형 펩티드는 주로 α-나선형 양친매성 구조(분리된 소수성 및 친수성 부분 포함), 또는 그라미시딘 A(GA)에서 발견되는 β-나선으로 존재한다. 고리형 펩티드, 주로 양친성 β 시트 구조를 채택하는 펩티드는 두 개의 하위 그룹: 타키플레신과 같이 이황화 결합을 포함하는 그룹, 및 그렇지 않은, 그라미시딘 S로 더 나눌 수 있다(D. Audreu and L. Rivas, Biopolymers, 1998, 47: 415-433). 펩티드 항생제는 또한 그라미신, 폴리믹신, 바시트라신, 글리코펩티드 등과 같은 비리보솜 합성 펩티드와 리보솜 합성(천연) 펩티드의 두 가지 종류로 분류된다. 전자는 종종 급격하게 변형되어 박테리아에 의해 주로 생성되는 반면, 후자는 이러한 종의 천연 숙주 방어 분자의 주요 구성 요소로서 모든 생물 종(박테리아 포함)에 의해 생성된다. 특정 구현예에서, 펩티드 항생제는 콜리스틴, 답토마이신, 서팩틴, 프리울리미신, 아쿨레신 A, 이투린 A 및 쓰시마이신과 같은 리포펩티드 항생제이다. [00162] 콜리스틴(Colistin, 콜리마이신이라고도 함)은 50여 년 전에 발견된 폴리믹신계 항생제이다. 2가 이온을 킬레이트화하여 자가-유도 메커니즘으로 그람 음성균의 세포벽을 침투하는 고리형 리포펩티드 항생제이다. 콜리스틴은 벽을 불안정하게 만들어 벽 안으로 침투할 수 있다. 콜리스틴은 기본적으로 세포벽에 구멍을 뚫어 이 구조를 왜곡시키고, 세포내 구성성분을 방출시킨다. 그람 음성 박테리아, 특히 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 아시네토박터 바우마니(Acinetobacter baumannii) 및 폐렴간균(Klebsiella pneumoniae)의 다제 내성 증가는 심각한 문제를 나타낸다. 제한된 치료 옵션으로 인해 전염병 임상의와 미생물학자는 콜리스틴의 임상 적용을 재평가해야 했다. 콜리스틴은 신경독성 및 신장독성과 관련이 있다. 투여량 요법과 새로운 제형은 독성 문제를 해결하기 위한 해답이 될 수 있다.

[0173] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 에어로졸 조성물 또는 액체 제형은 아목시실린과 조합되어 사용된다.

[0174] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩티드를 포함하는 에어로졸 조성물 또는 액체 제형은 설파메톡사졸 및 트리메토프라임 둘 모두를 함유하는 박트림®과 조합되어 사용된다.

[0175] 일 구현예에서, 플라겔린 폴리펩타이드 및 항생제는 동시에 또는 주어진 시간 내에 순차적으로 사용되어야 한다. 항생제는 임의의 순서로 적용될 수 있는데, 예를 들어, 항생제를 먼저 적용한 후 플라겔린 폴리펩티드를 적용하거나 그 반대의 경우도 적용할 수 있다. 항생제와 플라겔린 폴리펩타이드를 모두 포함하는 조성물을 사용하는 경우 두 성분 모두 동일한 경로 또는 다른 투여 경로로 동시에 적용된다는 것은 명백하다. 예를 들어, 항생제는 경구 경로를 통해 대상체에게 투여될 수 있고, 플라겔린 폴리펩티드는 정맥내 경로 또는 비강내 경로를 통해 대상체에게 투여된다.

[0176] "치료 유효량"은 임의의 의학적 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이익/위험 비율로 인플루엔자 후 박테리아 중복감염을 치료하기 위한 플라겔린 폴리펩티드 및/또는 항생제의 충분한 양을 의미한다. 본 발명의 화합물 및 조성물의 총 1일 투여량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 것임이 이해될 것이다. 임의의 특수한 대상체에 대한 구체적인 치료학적 유효 용량 수준은 대상체의 연령, 체중, 전반적인 건강 상태, 성별 및 식이요법; 사용된 구체적인 화합물의 투여 시간, 투여 경로 및 배설 속도; 치료 기간; 사용된 특정 폴리펩타이드와 함께 또는 동시에 사용된 약물; 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 요인을 포함하는 다양한 요인에 의존

할 것이다. 예를 들어, 목적한 치료학적 효과를 달성하는 데 필요한 것보다 낮은 수준에서 화합물의 용량을 시작하고 목적한 효과가 달성될 때까지 용량을 점진적으로 증가시키는 것이 당업계에 잘 알려져 있다. 그러나 생성물의 1일 투여량은 성인 1인당 하루 0.01mg 내지 1,000mg까지, 특히 0.01mg 내지 0.5mg까지 광범위하게 다양할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 치료될 대상체에 대한 투여량의 증상 조절을 위해 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 및 500 mg의 활성 성분을 포함한다. 의약은 전형적으로 약 0.01 mg 내지 약 500 mg의 활성 성분을 포함하고, 바람직하게는 1 mg 내지 약 100 mg의 활성 성분을 포함한다. 약물의 유효량은 통상적으로 1일 당, 0.0002 mg/kg의 체중 내지 약 20 mg/kg의 체중, 특히 1일 당 약 0.001 mg/kg의 체중 내지 약 7 mg/kg의 체중의 투여량 수준으로 공급된다.

[0177] 전형적으로 본 발명의 활성 성분(즉, 플라겔린 폴리펩티드 및/또는 항생제)은 약제학적으로 허용가능한 부형제, 및 선택적으로 서방출 매트릭스와 조합되어 약제학적 조성물을 형성한다. "약제학적으로" 또는 "약제학적으로 허용되는"이라는 용어는 포유동물, 특히 인간에게 적절하게 투여될 때 유해한, 알레르기 또는 기타 부작용을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 의미한다.

[0178] 미생물 작용의 방지는 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등과 같은 다양한 항세균 및 항진균제에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에, 등장성 제제, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장기간 흡수는 흡수 지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 사용함으로써 이루어질 수 있다.

[0179] 일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 국소적으로(즉, 대상체의 호흡기관에) 투여된다. 따라서, 조성물은 스프레이, 에어로졸, 용액, 에멀젼, 또는 당업자에게 잘 알려진 다른 형태의 형태로 제형화될 수 있다. 본 발명의 방법이 조성물의 비강내 투여를 포함하는 경우, 조성물은 에어로졸 형태, 스프레이, 미스트 또는 드롭 형태로 제형화될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용하기 위한 활성 성분은 적합한 추진제(예를 들어, 디클로로디플루오로메탄,트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적절한 가스))를 사용하여 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기용 캡슐 및 카트리지(예를 들어, 젤라틴으로 구성됨)는 화합물의 분말 혼합물과 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 베이스를 함유하도록 제형화될 수 있다.

[0180] 본 발명은 다음의 도면 및 예시에 의해 더 상세히 설명될 것이다. 그러나, 이러한 예시들과 도면들은 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안될 것이다.

[0181] **실시예:**

[0182] **재료 및 방법**

[0183] **플라겔린**

[0184] 플라겔린은 pH 7.4의 PBS 완충액에 1.2g/L 또는 2.5g/L로 공급되었다. 연구의 다양한 제형의 경우, 완충액을 변경하기 위해 투석을 통해 플라겔린을 재구성한 다음 농도를 조정하고 필요할 경우 부형제를 추가했다. 모든 제형은 이소-삼투압몰농도를 유지하기 위해 145mM의 NaCl을 함유했다.

[0185] **응집력을 평가하기 위한 분석방법**

[0186] · 동적 광 산란(DLS)

[0187] 동적 광 산란(DLS)을 사용하여 초미세 범위의 입자 크기 분포를 결정했다. 측정은 663nm 레이저 파장을 사용하는 DynaPro NanoStar(Wyatt Technology) 장비로 수행되었다. 각 샘플 100μL를 일회용 큐벳 Uvette(Eppendorf)에 넣고 7초 동안 10회 획득하여 측정하였다. 데이터는 Dynamics 7.9.0.5 소프트웨어(Wyatt Technology)를 사용하여 분석되었다.

[0188] 결과는 다분산 지수(PDI), Z-평균, 단량체 반경(nm), 단량체 pic의 다분산도 백분율(%pd), 단량체 질량 백분율로 표시된다.

[0189] · 유동 세포 현미경 검사

[0190] 유동 세포 현미경 검사(FCM)를 사용하여 눈에 보이지 않는 입자를 분석했다. 측정은 Flowcell FC200-IPAC(Occhio) 장비를 사용하여 수행되었다. 각 샘플 250μL를 일회용 콘에 넣고 200μL에서 분석을 수행했다. 데이터는 Callisto 3D 소프트웨어(Occhio)를 사용하여 분석되었다.

[0191] 결과는 총 입자의 농도(입자/mL), 입자 >2㎛, >10㎛ 및>25㎛로 표시된다. 각 제형에 대해, 분무 전과 후의 값이 표시된다. 분무 후 값은 플라겔린의 분무 후 생성된 입자의 농도에서 부형제(w/o 플라겔린)로 해당 완충액의 분무 후 생성된 입자의 농도를 뺀 값이었다. 음수 값의 경우 채택된 값은 0이었다.

[0192] **에어로졸 특성화**

[0193] 에어로졸은 수직 흡입 셀이 장착된 스프레이텍 기기(Malvern)를 사용하여 레이저 회절로 특성화되었다. 에어로졸은 약 30 L/min의 유속으로 진공 펌프를 사용하여 흡입 셀로 흡입되었다. 1mL의 샘플이 채워진 분무기를 흡입 셀 상단에 배치했다. 측정 시간은 최소 1분이었다.

[0194] 결과는 부피 중앙 직경(VMD)과 직경이 5㎛ 미만, 0.5 내지 3.0㎛인 소적의 백분율로 표시된다.

[0195] **활동 분석**

[0196] 플라겔린의 생물학적 활성은 플라겔린 표적인, TLR5 수용체를 특이적으로 발현하는 HEK-Dual™ hTLR5(NF/IL8) 리포터 세포를 사용하여 평가되었다. TLR5의 자극은 IL-8 경로의 활성화 및 더 정확하게는 인터루킨 8(IL-8) 의 존적 루시퍼라제의 검출에 의해 측정된다. 이를 위해, 5 x 104 HEK-Dual™ hTLR5(NF/IL8) 세포를 96-웰 플레이트에서 2 x 10-6에서 2 x 10-13g/L 범위의 8가지 농도로 분무 전후에 플라겔린과 함께 배양했다. 37℃/5% CO2에서 18시간 동안 배양한 후, 10 μL의 상청액을 새로운 96-웰 플레이트에 첨가하고 50 μL QuantiLUC 시약과 혼합했다. 루시퍼라제 반응은 루미노미터 센트로 XS3 LB960(Berthold)을 사용하여, 즉시 측정되었다. 플라겔린 농도의 함수에 있는 상대 광 단위의 용량-반응 곡선을 사용하여 플라겔린의 EC50을 결정했다.

[0197] 결과는 EC50(㎍/mL)으로 표시된다.

[0198] **결과:**

[0199] **실시예 1**

[0200] **단계 1: 메쉬 분무 동안의 플라겔린 안정성에 대한 완충액의 영향 결정**

[0201] 이와 관련하여, 계면활성제가 있거나 없는 다양한 완충액으로 제형화된 플라겔린에 분무 스트레스를 적용했다.

[0202] 플라겔린은 0.5 g/L의 농도로 제조하였다. 히스티딘 pH 5.5, 시트레이트 pH 5.5, 아세테이트 pH 5.5 및 포스페이트 pH 6.5 완충액을 사용하였다. 첫번째로, 완충제는 계면활성제 없이 시험되었다. 두 번째 단계에서는 계면활성제인 폴리소르베이트 80(PS80)을 0.1% 농도로 사용하여 완충제를 시험했다.

[0203] 다른 완충액으로 제형화된, 1 mL의 플라겔린을, 진동 메쉬 분무기인, 솔로(Aerogen)로 분무하였다.

[0204] 응집 정도는 Flow Cell Microscopy (FCM) 및 DLS (Dynamic Light Scattering)를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 하기 표에 정리하였다.

[0205] **계면활성제 비함유**

표 1

[0206]

		총입자/mL	입자 > 2㎛/mL	입자 > 10㎛/mL	입자 >25㎛/mL
히스티딘 w/o PS80	분무 전 플라겔린	14987 ± 490	2533 ± 373	5 ± 5	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	44344957 ± 18057304	2614758 ± 2834573	139 ± 148	0 ± 0
시트레이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	2821 ± 89	465 ± 75	37 ± 32	3 ± 5
	분무 후 플라겔린	35419022 ± 14859436	2876853 ± 3366831	749 ± 1281	0 ± 4
아세테이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	4023 ± 172	715 ± 55	22 ± 23	5 ± 5
	분무 후 플라겔린	38430491 ± 14817201	4150700 ± 3883187	1628 ± 3528	0 ± 0
포스페이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	3544 ± 2353	1361 ± 1074	40 ± 28	5 ± 5

분무 후 플라겔린	8297880 ± 4067956	492779 ± 776329	425 ± 634	19 ± 25

[0207] 분무 전에는, 특히 시트레이트과 아세테이트의 경우 가시 가능한 입자의 수가 적다. 분무 후, FCM은 총 입자의 수가 모든 완충액에서 500만개 이상이었고 덜 현저한 응집을 나타내는 포스페이트 완충액을 제외하고는 2 μm/mL 이상의 입자가 100만개 이상 관찰되었기 때문에 높은 응집이 관찰되었다. DLS 분석을 통해 이러한 관찰이 확인되었다. 분무화 전, PDI는 모든 완충액에 대해 다중 모드이지만 단량체의 질량 비율이 높아 응집이 낮았다. DLS 결과는 또한 더 이상 플라겔린 단량체가 없고 Z-평균이 크게 증가했기 때문에 모든 완충액에서 분무 후 높은 응집(미세 입자)을 보여주었다.

표 2

[0208]

		전체		단량체		
		PDI	Z-평균 (nm)	반경 (nm)	Pd%	질량%
히스티딘 w/o PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	13.6 ± 0.2	4.3 ± 0.2	32.2 ± 6.7	98.3 ± 0.2
	분무 후 플라겔린	0.237 ± 0.068	367.6 ± 43.5			
시트레이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	6.3 ± 0.4	16.4 ± 10.9	138.9 ± 81.6	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	다중모드	402.3 ± 109.9			
아세테이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	5.6 ± 0.1	10.6 ± 3.9	97.4 ± 36.7	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	0.327 ± 0.167	518.3 ± 147			
포스페이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	29.5 ± 0.9	5.1 ± 0.5	39.5 ± 8.3	98.6 ± 0.4
	분무 후 플라겔린	0.208 ± 0.07	324.2 ± 19.3			

[0209] · **계면활성제 함유**

표 3

[0210]

		총입자	입자 > 2 μm/mL	입자 > 10 μm/mL	입자 >25 μm/mL
히스티딘 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	4316 ± 427	145 ± 29	16 ± 21	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	59366 ± 67689	316 ± 360	11 ± 18	0 ± 0
시트레이트 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	352 ± 136	148 ± 71	16 ± 21	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	30325 ± 15264	2700 ± 2446	151 ± 206	11 ± 25
아세테이트 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	4195 ± 794	976 ± 379	36 ± 63	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	3607 ± 4849	507 ± 701	52 ± 61	12 ± 14
포스페이트 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	2630 ± 2393	729 ± 851	96 ± 125	27 ± 46
	분무 후 플라겔린	1156 ± 1595	858 ± 1192	188 ± 260	26 ± 37

[0211] 분무 전, 특히 시트레이트의 경우 눈에 보이지 않는 입자 수가 적다. 분무 후, FCM으로 관찰된 눈에 보이지 않는 입자의 양은 PS80이 없는 완충액에 비해, PS80으로 제형화된 플라겔린에서 더 낮았다. 아세테이트와 포스페이트는 전체 입자 농도가 가장 낮았으며 2μm 초과의 입자 수는 시트레이트 완충액을 제외한 모든 완충액에서 낮았다. 아세테이트 및 포스페이트 완충액은 메쉬 분무 중에 플라겔린의 안정성을 유지하는 데 가장 적합한 것으로 나타났다. 이러한 완충액은 제형을 더욱 최적화하기 위해 선택되었다.

표 4

[0212]

		전체		단량체		
		PDI	Z-평균 (nm)	반경 (nm)	Pd%	질량%
히스티딘 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	NA				
	분무 후 플라겔린	다중모드	33.4 ± 6.2	5.2 ± 0.6	25 ± 7.1	95.4 ± 3.7
시트레이트 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	0.195 ± 0.012	5.4 ± 0.1	5.6 ± 0.4	30.4 ± 9.6	100 ± 0
	분무 후 플라겔린	다중모드	6.9 ± 1.6	5.5 ± 0.2	27.7 ± 4.2	99.8 ± 0.1
아세테이트 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	0.119 ± 0.022	5.1 ± 0.1	5.3 ± 0.1	23.7 ± 1.1	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	0.314 ± 0.084	5.6 ± 0.3	5.3 ± 0.1	23.9 ± 2.6	99.9 ± 0.1
포스페이트 0.1% PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	11.6 ± 0.8	5.3 ± 0.2	22.8 ± 3.3	99.4 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	다중모드	15.6 ± 4.2	5.6 ± 0.4	29.9 ± 7.6	98.4 ± 1.4

[0213] DLS 분석은 특히 PS80을 사용하는 아세테이트에서 낮은 응집(미세 입자)을 나타냈으며, 이에 대한 PDI는 다중모드가 아니고 강도와 질량에서 단량체의 백분율이 높았다. 분무 전 PS80을 사용한 히스티딘의 결과는 아마도 샘플에 다수의 초미세 입자가 있기 때문에 분석할 수 없었다. 히스티딘에서 플라겔린을 분무한 후, 단량체의 질량 및 강도 백분율이 가장 낮았다.

[0214] 결과는 계면활성제가 없는 모든 완충액에서 메쉬 분무화 후 플라겔린의 응집이 높다는 것을 보여주었다. PS80의 첨가는 모든 버퍼에서 플라겔린 응집을 감소시킨다.

[0215] **단계 2: 메쉬 분무 중에 플라겔린을 안정화하기 위한 최적의 계면활성제와 최소 농도 결정**

[0216] 이와 관련하여, 다양한 유형의 계면활성제와 다양한 농도의 계면활성제가 함유한 완충액에 제형화된 플라겔린에 분무 응력을 적용했다.

[0217] 플라겔린은 0.5g/L의 농도로 제조하였다. 아세테이트 pH 5.5 및 포스페이트 pH 6.5 완충액을 사용하였다. 첫째로, 완충액을 0.02%, 0.05%, 0.1% 농도의 폴리소르베이트 80(PS80)으로 시험했다. 포스페이트 완충액의 경우, 새로운 배치의 플라겔린을 사용하여 0.01% 및 0.05%를 포함한 더 낮은 농도의 PS80도 시험했다. 아세테이트 완충액의 경우 폴리소르베이트 80(PS80), 폴리소르베이트 20(PS20) 및 폴록사머188을 포함한 다양한 계면활성제를 시험했다.

[0218] 다양한 제형의 플라겔린 1mL에 Solo(Aerogen) 진동 메쉬 분무기를 사용하여 분무 응력을 가했다.

[0219] 응집 정도는 FCM(Flow Cell Microscopy) 및 DLS(Dynamic Light Scattering)를 사용하여 측정했다. 결과는 아래 표에 요약되어 있다

[0220] · **계면활성제의 농도**

[0221] FCM으로 분석한 결과, 아세테이트 완충액에서는 분무 후 전체 입자 농도가 가장 작았기 때문에 0.1%의 PS80의 농도가 플라겔린을 안정화하는 데 더 적합했다. 그러나, PS80이 존재하는 모든 제형에서 2μm보다 큰 입자 수는

낮았다. 0.1%의 PS80으로 제형화된 플라겔린의 경우, PDI는 분무 전에는 낮았으며 분무 후에 약간 증가했다. 더 낮은 농도의 PS80의 경우, PDI는 다중 모드였지만 질량 비율은 높게 유지되었으며 분무 전후에 큰 차이가 없었다.

표 5

[0222]

		총입자	입자 > 2 μm/mL	입자 > 10 μm/mL	입자 >25 μm/mL
아세테이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	4023 ± 172	715 ± 55	22 ± 23	5 ± 5
	분무 후 플라겔린	38430491 ± 14817201	4150700 ± 3883187	1628 ± 3528	0 ± 0
아세테이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	1643 ± 217	99 ± 33	5 ± 5	3 ± 5
	분무 후 플라겔린	16804 ± 11000	440 ± 339	38 ± 57	5 ± 5
아세테이트 PS80 0.05%	분무 전 플라겔린	3436 ± 72	348 ± 137	13 ± 12	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	55649 ± 62542	465 ± 406	54 ± 52	0 ± 8
아세테이트 PS80 0.1%	분무 전 플라겔린	4195 ± 794	976 ± 379	36 ± 63	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	3607 ± 4849	507 ± 701	52 ± 61	12 ± 14

표 6

[0223]

		전체		단량체		
		PDI	Z-평균 (nm)	반경 (nm)	Pd%	질량%
아세테이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	5.6 ± 0.1	10.6 ± 3.9	97.4 ± 36.7	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	0.327 ± 0.167	518.3 ± 147			
아세테이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	34.8 ± 7	5.3 ± 1	33.9 ± 13.1	96.6 ± 1.6
	분무 후 플라겔린	다중모드	47.7 ± 6.7	6.8 ± 1.9	48.1 ± 18.5	96.8 ± 1.9
아세테이트 PS80 0.05%	분무 전 플라겔린	다중모드	25.2 ± 1	6.2 ± 1.4	40.4 ± 17.7	98.4 ± 0.6
	분무 후 플라겔린	다중모드	22 ± 5.2	6.1 ± 0.8	37.7 ± 8.8	98.6 ± 0.6
아세테이트 PS80 0.1%	분무 전 플라겔린	0.119 ± 0.022	5.1 ± 0.1	5.3 ± 0.1	23.7 ± 1.1	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	0.314 ± 0.084	5.6 ± 0.3	5.3 ± 0.2	23.9 ± 2.6	100 ± 0.1

[0224] FCM에 의해 관찰된 바와 같이, 포스페이트 완충액에서는 0.1%의 PS80 농도가 플라겔린을 안정화하는 데 더 적합했다. 낮은 농도의 PS80의 경우 분무 전 총 입자 수가 15 000개보다 컸다는 것이 눈에 띈다. 그러나, 분무 전후 PS80의 경우 0.02%에서 총 입자의 유의한 증가는 나타나지 않았다. 2 μm 초과의 입자 수는 모든 PS80 농도에 대해 분무 전후에 유사했다. 모든 PS80 농도에 대해 플라겔린 샘플은 다중 모드(DLS)였다. 단량체의 질량 백분율은 0.1%에서 PS80에 대해 더 높았다. 모든 농도에 대해, 본 발명자들은 분무화 후 질량의 단량체 백분율의 약간의 감소뿐만 아니라 PS80의 0.1%를 사용한 제형을 제외하고 Z-평균의 증가를 관찰했다. 따라서 PS80의 농도가 0.1% 미만으로 감소할 때 중간 정도의 응집이 관찰되었다.

표 7

[0225]

		총입자	입자 > 2㎛/mL	입자 > 10㎛/mL	입자 >25㎛/mL
포스페이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	3544 ± 2353	1361 ± 1074	40 ± 28	5 ± 5
	분무 후 플라겔린	8297880 ± 4067956	492779 ± 776329	425 ± 634	19 ± 25
포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	17435 ± 792	1691 ± 215	0 ± 12	11 ± 9
	분무 후 플라겔린	20531 ± 4710	1634 ± 1023	132 ± 138	11 ± 19
포스페이트 PS80 0.05%	분무 전 플라겔린	18258 ± 1208	1775 ± 171	102 ± 37	8 ± 8
	분무 후 플라겔린	46667 ± 38047	2478 ± 1424	188 ± 191	11 ± 25
포스페이트 PS80 0.1%	분무 전 플라겔린	2630 ± 2393	729 ± 851	96 ± 125	27 ± 46
	분무 후 플라겔린	1156 ± 1595	858 ± 1192	188 ± 260	26 ± 37

표 8

[0226]

		전체		단량체		
		PDI	Z-평균 (nm)	반경 (nm)	Pd%	질량%
포스페이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	29.5 ± 0.9	5.1 ± 0.5	39.5 ± 8.3	98.6 ± 0.4
	분무 후 플라겔린	0.208 ± 0.07	324.2 ± 19.3			
포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	41.4 ± 1.7	7.0 ± 3.9	39.4 ± 17.9	94.5 ± 3.5
	분무 후 플라겔린	다중모드	59.2 ± 20.1	4.3 ± 0.5	19.3 ± 8.7	91.6 ± 1.3
포스페이트 PS80 0.05%	분무 전 플라겔린	다중모드	24.2 ± 1.6	5.8 ± 0.5	37.4 ± 5.8	97.4 ± 1.5
	분무 후 플라겔린	다중모드	57.9 ± 12.4	6.5 ± 1.5	40.1 ± 21.6	95.9 ± 1.2
포스페이트 PS80 0.1%	분무 전 플라겔린	다중모드	11.6 ± 0.8	5.3 ± 0.2	22.8 ± 3.3	99.4 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	다중모드	15.6 ± 4.2	5.6 ± 0.4	29.9 ± 7.6	98.4 ± 1.4

[0227] · **포스페이트 제형에서 PS80 농도의 감소**

[0228] 이러한 새로운 배치를 사용하면 분무 후 PS80이 없는 포스페이트에서 플라겔린의 높은 응집이 FCM 및 DLS 분석을 통해 확인되었다. 실제로, FCM에서는 수백만 개의 비가시적 입자가 발견되었으며 DLS에서는 더 이상 플라겔린 단량체를 검출할 수 없었다. 또한 PS80을 0.02% 첨가하면 분무 후 입자의 증가나 분무 후 단량체의 비율 감소가 없어 응집이 크게 감소하는 것을 확인했다. 흥미롭게도, 이러한 새로운 배치에서 플라겔린은 이 제제의 이전 실험에서보다 0.02% PS80을 함유한 포스페이트에서 덜 응집된 것으로 나타났다.

[0229] PS80 농도를 감소시킴으로써, 본 발명자들은 매우 낮은 농도의 PS80(0.01 또는 0.005%)에서 FCM으로 분석한 입자가 분무 후 일정하게 유지되었으며 0.02%의 PS80을 포함하는 제형에서와 비슷한 농도로 유지되는 것을 관찰했다. DLS 결과는 또한 단량체 손실이 없었고 분무 후 Z-평균이 분무 전 Z-평균에 가깝게 유지되었기 때문에 낮은 응집을 나타냈다. 모든 PDI는 다중 모드 또는 높음이었다.

표 9

[0230]

		총입자	입자 > 2㎛/mL	입자 > 10㎛/mL	입자 >25㎛/mL
포스페이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	4426 ± 1578	688 ± 522	30 ± 25	13 ± 12
	분무 후 플라겔린 (n=1)	65173705	2784824	54	0
포스페이트 PS80 0.005%	분무 전 플라겔린	7132 ± 7788	550 ± 620	3 ± 5	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	4174 ± 1437	430 ± 75	27 ± 17	0 ± 0
포스페이트 PS80 0.01%	분무 전 플라겔린	5325 ± 1937	588 ± 58	13 ± 9	3 ± 5
	분무 후 플라겔린	4111 ± 2312	583 ± 324	30 ± 25	0 ± 0
포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	5039 ± 2359	703 ± 430	22 ± 17	3 ± 5
	분무 후 플라겔린	4083 ± 2307	430 ± 202	32 ± 21	11 ± 12

표 10

[0231]

		전체		단량체		
		PDI	Z-평균 (nm)	반경 (nm)	Pd%	질량%
포스페이트 w/o PS80	분무 전 플라겔린	다중모드	7.8 ± 0.1	4.5 ± 0.0	36.4 ± 7.6	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	0.219	340.9			
포스페이트 PS80 0.005%	분무 전 플라겔린	다중모드	5.9 ± 0.3	5.2 ± 0.1	44.2 ± 1.8	100 ± 0.0
	분무 후 플라겔린	0.483 ± 0.088	4.9 ± 0.4	5.6 ± 0.3	51.4 ± 3.6	99.8 ± 0.3
포스페이트 PS80 0.01%	분무 전 플라겔린	다중모드	5.5 0.4	5.0 ± 0.3	33.9 ± 12.8	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	0.409 ± 0.123	5.1 ± 0.2	5.3 ± 0.6	38.4 ± 10.9	99.9 ± 0.1
포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	0.474 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.1 ± 0.2	29.7 ± 4.1	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	다중모드	5.5 ± 0.1	5.1 ± 0.2	31.6 ± 4.2	100 ± 0.0

[0232] · **계면활성제의 종류**

[0233] FCM 분석과 관련하여, 분무 후 총 입자(가시적) 수는 PS80보다 PS20 및 폴록사머에서 더 높았다. 2㎛보다 큰 입자의 경우, 폴록사머에서도 높은 응집이 관찰되었다.

[0234] 분무 후 플라겔린의 DLS 분석은 폴록사머에서는 사용할 수 없었고 PS20(n=1/3)으로 제한되었는데, 이는 아마도 너무 많은 초미세 입자가 존재하기 때문일 것이다.

표 11

[0235]

		총입자	입자 > 2㎛/mL	입자 > 10㎛/mL	입자 >25㎛/mL
아세테이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	1643 ± 217	99 ± 33	5 ± 5	3 ± 5
	분무 후 플라겔린 - 완충제	16804 ± 11000	440 ± 339	38 ± 57	5 ± 5
아세테이트 PS20 0.02%	분무 전 플라겔린	14748 ± 1022	752 ± 66	51 ± 12	17 ± 19
	분무 후 플라겔린	42933 ± 52660	194 ± 171	5 ± 33	3 ± 16
아세테이트 폴록사머 0.02%	분무 전 플라겔린	3938 ± 214	246 ± 28	0 ± 0	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	1448465 ± 2364676	11913 ± 18815	94 ± 76	3 ± 7

표 12

[0236]

		전체		단량체		
		PDI	Z-평균 (nm)	반경 (nm)	Pd%	질량%
아세테이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	34.8 ± 7	5.3 ± 1	33.9 ± 13.1	96.6 ± 1.6
	분무 후 플라겔린	다중모드	47.7 ± 6.7	6.8 ± 1.9	48.1 ± 18.5	96.8 ± 1.9
아세테이트 PS20 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	18.9 ± 1.5	5.6 ± 0.9	41.1 ± 11.4	99.4 ± 0.1
	분무 후 플라겔린 (n=1/3)	다중모드	51.3	4.7	24.6	98.3
아세테이트 폴록사머 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	23.3 ± 3.6	4.7 ± 0.2	35.4 ± 6.1	98.8 ± 0.2
	분무 후 플라겔린	NA				

[0237] 결과는 0.1%의 PS80 농도가 플라겔린의 응집을 제한하는 데 더 적합할 수 있음을 보여주었다. 그러나, 포스페이트와 아세테이트 둘 모두에 대해 PS80의 0.02%는 계면활성제가 없는 완충액에 비해 눈에 보이지 않는 초미세 입자의 수를 크게 줄였다. 매우 낮은 농도의 PS80(0.05%)은 메쉬 분무 중에 포스페이트에서 플라겔린을 안정화하기에 충분한 것으로 나타났다. 계면활성제의 비교에서는 PS80이 PS20 및 폴록사머보다 메쉬 분무 중에 플라겔린을 안정화시키는 데 더 나은 것으로 나타났다.

[0238] **단계 3: 메쉬 분무 동안의 플라겔린의 안정성에 대한 플라겔린 농도의 영향**

[0239] 이와 관련하여, 4가지 상이한 농도로 제제화된 플라겔린에 분무 응력를 적용하였다.

[0240] 플라겔린은 0.1g/L, 0.5g/L, 1g/L 및 3g/L 농도의 0.02% PS80을 포함하는 포스페이트 pH 6.5 완충액에서 제조되었다.

[0241] 상이한 제형의 플라겔린 1mL에 Solo(Aerogen) 진동 메쉬 분무기를 사용하여 분무 응력을 가하였다.

[0242] 응집 정도는 FCM(Flow Cell Microscopy) 및 DLS(Dynamic Light Scattering)를 사용하여 측정했다. 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

표 13

[0243]

		총 입자	입자 > 2㎛/mL	입자 > 10㎛/mL	입자 >25㎛/mL
플라겔린 0.1g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	1966 ± 149	121 ± 28	3 ± 5	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	437 ± 606	8 ± 18	3 ± 4	3 ± 4
플라겔린 0.5g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	3070 ± 176	389 ± 94	19 ± 12	3 ± 5
	분무 후 플라겔린	10292 ± 19967	333 ± 558	19 ± 52	8 ± 18
플라겔린 1g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	1649 ± 860	261 ± 184	19 ± 17	0 ± 0
	분무 후 플라겔린	5188 ± 8056	1097 ± 2077	68 ± 91	0 ± 0
플라겔린 3g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	1487 ± 101	202 ± 69	5 ± 5	3 ± 5
	분무 후 플라겔린	2738 ± 4046	297 ± 501	0 ± 0	0 ± 0

[0244] 전반적으로, FCM 분석에서는 플라겔린을 다양한 농도로 제형화했을 때 응집(가시적 입자) 정도가 낮은 것으로 나타났다. mL당 총 입자수는 0.1g/L 및 3g/L에 비해 0.5g/L 및 1g/L에서 약간 더 높았다. 2㎛/mL 이상의 입자에 대해서는, 분무 후 증가가 1g/L 농도에서만 관찰되었다.

[0245] DLS로 분석한 모든 샘플의 경우, PDI는 다중 모드였다. 플라겔린 단량체의 질량%는 감소하지 않았다.

표 14

[0246]

		전체		단량체		
		PDI	Z-평균 (nm)	반경 (nm)	Pd%	질량%
플라겔린 0.1g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	6.8 ± 0.1	6 ± 0.4	38.3 ± 4.9	99.9 ± 0.1
	분무 후 플라겔린	다중모드	15.3 ± 8.2	5.4 ± 0.3	38.5 ± 5.5	99.3 ± 0.5
플라겔린 0.5g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	50.7 ± 3.8	4.7 ± 0.3	19.9 ± 8.4	96.0 ± 0.5
	분무 후 플라겔린	다중모드	17.3 ± 5.6	5.8 ± 0.5	39.3 ± 8	98.9 ± 1.1
플라겔린 1g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	25.3 ± 0.9	5 ± 0.6	26.3 ± 13.3	98.0 ± 0.5
	분무 후 플라겔린	다중모드	15.3 ± 16.1	5.4 ± 1.1	38.5 ± 18.9	99.3 ± 1.7
플라겔린 3g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	다중모드	43.3 ± 1.2	5.5 ± 1.7	39 ± 14.4	96.2 ± 2.5
	분무 후 플라겔린	다중모드	15.3 ± 1.8	5.4 ± 0.2	38.5 ± 5	99.3 ± 0.3

[0247] 결과는 플라겔린의 농도가 메쉬 분무 동안 플라겔린의 안정성에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다.

[0248] **선택된 제형에 대한 보완 분석**

[0249] 제형 연구를 기반으로, 메쉬-분무화 동안 플라겔린의 안정성을 유지하는 능력과 폐 환경에 대한 적합성을 위해 아세테이트 pH 5.5와 PS80 0.02% 포스페이트 pH 6.5의 두 가지 제형이 선택되었다.

[0250] 이들 제형의 경우, 플라겔린의 에어로졸 특성 및 활성에 대한 제제의 효과를 분석하기 위한 추가 분석

[0251] 에어로졸은 NaCl 0.9% 단독과 비교하여 아세테이트 또는 포스페이트에 분무된 플라겔린의 소적 크기 분포를 얻기 위해 레이저 회절을 통해 특성화되었다.

[0252] 플라겔린의 활성은 분무 전후의 다양한 제형에서 플라겔린의 EC50을 계산하여 평가되었다.

[0253] 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

[0254] · 에어로졸 특성

표 15

[0255]

	VMD (μm)	<5μm (%)	0.5-3 μm (%)
NaCl	4.0	60.0	33.0
플라겔린 0.5g/L 아세테이트 PS80 0.02%	4.2	61.4	31.3
플라겔린 0.5g/L 포스페이트 PS80 0.02%	4.3	59.7	29.7

[0256] 제형은 폐 전달과 호환되는 에어로졸 특성에 영향을 미치지 않았다. 미세 입자 비율(입자 < 5μm)은 약 60%로 에어로졸의 높은 비율이 폐에 도달함을 의미한다.

[0257] · 활성

표 16

[0258]

		EC_{50} (μg/mL)
플라겔린 0.5g/L 아세테이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	0.00211
	분무 후 플라겔린	0.00278
플라겔린 0.5g/L 포스페이트 PS80 0.02%	분무 전 플라겔린	0.00534
	분무 후 플라겔린	0.00247

[0259] 플라겔린의 분무 후 EC50 에는 유의미한 변화가 없었으며 EC50은 아세테이트 완충제와 포스페이트 완충제 간에 유사했다. 따라서, TLR5 활성화에 대한 플라겔린 효능은 두 제형 모두에서 분무 후에 유지되었다.

[0260] **실시예 2:**

[0261] 실시예 1에 대한 보완, 단계 3: 메쉬 분무 중 플라겔린의 안정성에 대한 플라겔린 농도의 영향

[0262] **메쉬 분무 후 최적 제제의 다양한 농도에서 플라겔린 생물학적 활성을 특성화:**

[0263] - 인간 적용에 적합하도록 하기 위해, 활성 성분은 폐에서 0.01 내지 0.5mg으로 구성된다.

[0264] - 선택한 완충제에 희석한 후 분무하는 동안 FLAMOD의 안정성

[0265] 생물학적 활성

[0266] - 포스페이트 10mM pH6.5 + NaCl 145mM + PS80 0.02%에서 10μg/mL ~ 500μg/mL의 플라겔린 생물학적 활성 평가

[0267] ○ (농도당 10회 분무, 3회 분석)

[0268] ○ 세포 리포터 분석(HEK-Dual™ hTLR5) 사용

[0269] 결과:

[0270] 10 μg/mL 내지 500 μg/mL의 플라겔린 생물학적 활성 평가(농도당 10회 분무, 3회 분석).

표 17

[0271]

		분무안함	500 μg/mL	250 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL	10 μg/mL
EC50 (ng/mL)	평균	0.304	0.412	0.280	0.464	0.395	0.334	0.363
	SD	0.293	0.363	0.245	0.186	0.121	0.111	0.131

[0272] 플라겔린의 활성은 최적 제형 내 플라겔린의 농도에 관계없이 분무 후 크게 변형되지 않았다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
UNIVERSITE DE TOURS
UNIVERSITE DE LILLE
INSTITUT PASTEUR DE LILLE
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE LILLE

<120> AEROSOL COMPOSITION FOR PULMONARY DELIVERY OF FLAGELLIN

<130> IP20234395FR

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Ile Thr Gln Asn

1 5 10 15

Asn Ile Asn Lys Asn Gln Ser Ala Leu Ser Ser Ser Ile Glu Arg Leu

20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln

35 40 45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ser Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala

50 55 60

Ala Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Val Ala Gln Thr Thr Glu Gly

65 70 75 80

Ala Leu Ser Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Thr

85 90 95

Val Gln Ala Thr Thr Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Asp Ser Ile

100 105 110

Gln Asp Glu Ile Lys Ser Arg Leu Asp Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly

115 120 125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Asn Val Leu Ala Lys Asp Gly Ser Met

130 135 140

Lys Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu

145 150 155 160

Lys Lys Ile Asp Ser Asp Thr Leu Gly Leu Asn Gly Phe Asn Val Asn

165 170 175

Gly Lys Gly Thr Ile Thr Asn Lys Ala Ala Thr Val Ser Asp Leu Thr

180 185 190

Ser Ala Gly Ala Lys Leu Asn Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Asp Leu Lys

195 200 205

Thr Glu Asn Thr Leu Leu Thr Thr Asp Ala Ala Phe Asp Lys Leu Gly

210 215 220

Asn Gly Asp Lys Val Thr Val Gly Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Asn Ala

225 230 235 240

Lys Ser Gly Asp Phe Thr Thr Thr Lys Ser Thr Ala Gly Thr Gly Val

245 250 255

Asp Ala Ala Ala Gln Ala Ala Asp Ser Ala Ser Lys Arg Asp Ala Leu

260 265 270

Ala Ala Thr Leu His Ala Asp Val Gly Lys Ser Val Asn Gly Ser Tyr

275 280 285

Thr Thr Lys Asp Gly Thr Val Ser Phe Glu Thr Asp Ser Ala Gly Asn

290 295 300

Ile Thr Ile Gly Gly Ser Gln Ala Tyr Val Asp Asp Ala Gly Asn Leu

305 310 315 320

Thr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala Ala Lys Ala Asp Met Lys Ala Leu

325 330 335

Leu Lys Ala Ala Ser Glu Gly Ser Asp Gly Ala Ser Leu Thr Phe Asn

340 345 350

Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Ala Lys Ala Thr Pro Ala Thr Thr Thr Pro

355 360 365

Val Ala Pro Leu Ile Pro Gly Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Thr Val Ser

370 375 380

Lys Asp Val Val Leu Ser Glu Thr Lys Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser

385 390 395 400

Ile Thr Phe Asn Ser Gly Val Leu Ser Lys Thr Ile Gly Phe Thr Ala

405 410 415

Gly Glu Ser Ser Asp Ala Ala Lys Ser Tyr Val Asp Asp Lys Gly Gly

420 425 430

Ile Thr Asn Val Ala Asp Tyr Thr Val Ser Tyr Ser Val Asn Lys Asp

435 440 445

Asn Gly Ser Val Thr Val Ala Gly Tyr Ala Ser Ala Thr Asp Thr Asn

450 455 460

Lys Asp Tyr Ala Pro Ala Ile Gly Thr Ala Val Asn Val Asn Ser Ala

465 470 475 480

Gly Lys Ile Thr Thr Glu Thr Thr Ser Ala Gly Ser Ala Thr Thr Asn

485 490 495

Pro Leu Ala Ala Leu Asp Asp Ala Ile Ser Ser Ile Asp Lys Phe Arg

500 505 510

Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Leu Asp Ser Ala Val Thr Asn

515 520 525

Leu Asn Asn Thr Thr Thr Asn Leu Ser Glu Ala Gln Ser Arg Ile Gln

530 535 540

Asp Ala Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Lys Ala Gln Ile

545 550 555 560

Ile Gln Gln Ala Gly Asn Ser Val Leu Ala Lys Ala Asn Gln Val Pro

565 570 575

Gln Gln Val Leu Ser Leu Leu Gln Gly

580 585

<210> 2

<211> 495

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium

<400> 2

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn

1 5 10 15

Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu

20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln

35 40 45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala

50 55 60

Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly

65 70 75 80

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala

85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile

100 105 110

Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly

115 120 125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu

130 135 140

Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu

145 150 155 160

Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln

165 170 175

Gln Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala

180 185 190

Asp Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr

195 200 205

Gly Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp

210 215 220

Asp Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr

225 230 235 240

Gly Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu

245 250 255

Val Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro

260 265 270

Ala Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp

275 280 285

Leu Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr

290 295 300

Ala Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile

305 310 315 320

Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr

325 330 335

Gln Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala

340 345 350

Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp

355 360 365

Gly Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser

370 375 380

Lys Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala

385 390 395 400

Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu

405 410 415

Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg

420 425 430

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr

435 440 445

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser
450 455 460

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu
465 470 475 480

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
485 490 495

<210> 3

<211> 494

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium

<400> 3

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
145 150 155 160
Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln Gln
165 170 175
Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp
180 185 190

Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr Gly
195 200 205
Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp Asp
210 215 220
Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly
225 230 235 240
Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu Val
245 250 255

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

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

Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala Ala

385 390 395 400

Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala

405 410 415

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

420 425 430

Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser

435 440 445

Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn

450 455 460

Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala

465 470 475 480

Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg

485 490

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 4

Gly Ala Ala Gly

1

<210> 5

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FLAMOD

<400> 5

Met Lys Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln

1 5 10 15

Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg

20 25 30

Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly

35 40 45

Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln

50 55 60

Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu

65 70 75 80

Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu

85 90 95

Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser

100 105 110

Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser

115 120 125

Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr

130 135 140

Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp

145 150 155 160

Leu Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Gly

165 170 175

Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala

180 185 190

Ala Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln

195 200 205

Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn

210 215 220

Leu Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu

225 230 235 240

Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser

245 250 255

Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu

260 265 270

Arg