



등록특허 10-2687778



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월23일
(11) 등록번호 10-2687778
(24) 등록일자 2024년07월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 38/22* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/1641 (2013.01)
A61K 38/2278 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7022385(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년10월20일
심사청구일자 2021년07월26일
- (85) 번역문제출일자 2021년07월15일
- (65) 공개번호 10-2021-0092335
- (43) 공개일자 2021년07월23일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7014421
원출원일자(국제) 2017년10월20일
심사청구일자 2020년02월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/057606
- (87) 국제공개번호 WO 2018/075901
국제공개일자 2018년04월26일
- (30) 우선권주장
62/410,748 2016년10월20일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
Journal of Endocrinology, 202, 2009,
pp.431-439*
KR100805208 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

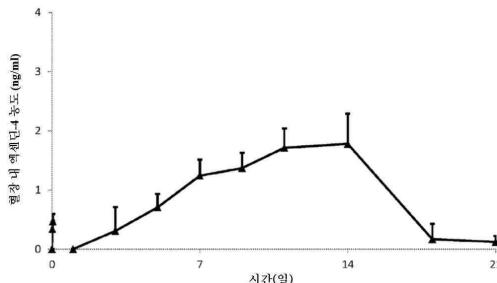
전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 신경 보호 폴리펩티드를 중추 신경계에 전달하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부에 전달하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체의 전신 혈액 순환에 신경보호 폴리펩티드의 치료 유효량을 방출 제어형 제제를 투여하거나, GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적(뒷면에 계속)

대 표 도

어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하는 신경보호 폴리펩티드를 서방형 방출시키는 디바이스에 의해 투여하는 단계를 포함하고; 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센틴-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며; 방출 제어형 신경보호 제제, 또는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출은, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 혈액 뇌 장벽(BBB)를 가로질러 CNS의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다. 또한, CNS 관련 질환을 치료하거나 CNS 관련 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 상기 질환을 치료하거나 상기 증상을 감소시키는 방법이 개시된다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/26 (2013.01)

A61K 9/0021 (2013.01)

A61K 9/1647 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 25/16 (2018.01)

C07K 14/57563 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

액센딘-4 및 생분해성 중합체를 갖는 코어를 포함하는 지속 방출형 마이크로 스피어를 포함하고,
상기 코어는 코어 전체 중량의 2 내지 4 중량%인 액센딘-4 및 96 내지 98 중량%인 생분해성 중합체를 포함하고,
상기 지속 방출형 마이크로스피어는 상기 코어를 코팅하는 코팅층을 더 포함하는 것이며,
상기 생분해성 중합체는 폴리락타이드(PLA), 폴리글리콜리드(PGA), 폴리(락타이드-코-글리콜리드)(PLGA), 폴리
오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리하이드록시부티르산, 폴리카프로락톤, 및 폴리알킬카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,
투여에 의해 상기 액센딘-4의 정태 혈장 농도는 50 내지 4500 pg/mL이 되고 혈액-뇌 장벽 통과 후 정태 뇌척수액(CSF) 농도는 10 내지 400 pg/mL이 되는,
파킨슨병(PD) 또는 외상성 뇌 손상(TBI)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 액센딘-4의 정태 혈장 농도 대비 정태 뇌척수액 농도의 비가 0.1% 내지 5%의 범위 내인, 파킨슨병(PD) 또는 외상성 뇌 손상(TBI)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 액센딘-4는 1 pM/kg/분 내지 30 pM/kg/분의 속도로 투여되는, 파킨슨병(PD) 또는 외상성 뇌 손상(TBI)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 또는 21일마다 1회씩 투여되는 투약 방법으로 사용되는, 파킨슨병(PD) 또는 외상성 뇌 손상(TBI)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2016년 10월 20일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/410,748호의 우선권을 주장하며, 그 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0003]

정부 자금 조달

[0004]

본 출원을 지원하는 연구는, 보건복지부 장관이 대표하는 미합중국 정부에 의해 주도되었다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

[0005]

참조에 의한 인용문헌의 통합

[0006]

Patent-In 3.5, and Checker 4.4.0을 사용해 2017년 9월 3일에 생성된, 24.4 KB의 크기의 파일명: 1568390_100W02_Sequence_Listing_ST25.txt는 37 C.F.R. § 1.52(e)(5)에 따라 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.

[0007]

기술분야

[0009] 본 발명은, 예를 들어, 글루카곤-유사 펫티드-1(GLP-1), 엑센딘-4, 및/또는 이들의 펫티드 유사체와 같은 신경보호 치료용 폴리펩티드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 개시는 신경퇴행성 병태의 치료를 위해 신경보호 치료용 폴리펩티드의 정태 혈장(steady-state plasma) 수준을 유지시켜, 신경보호 치료용 폴리펩티드가 혈액-뇌 장벽(BBB)를 가로질러 뇌에 전달되는 것을 용이하게 하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0010] 음식물에 반응하여 위장의 신경내분비 세포에 의해 정상적으로 분비되는 호르몬인 글루카곤-유사 펫티드-1(GLP-1)이 2형 당뇨병의 새로운 치료법으로서 제시되었다(Gutniak 외, 1992; Nauck 외, 1993 참조). 이는 심지어 오랫동안 2형 당뇨병을 앓아 온 대상체에서도 베타 세포에 의한 인슐린 방출을 증가시킨다(Nauck 외, 1993). GLP-1이 내인성 인슐린 분비를 자극하고 혈당 수치가 떨어지면 자극을 멈추기 때문에 이러한 측면에서 GLP-1 치료가 인슐린 치료에 비해 장점을 가지고 있다(Nauck 외, 1993; Elahi 외, 1994). GLP-1은, 인슐린 방출 및 합성을 증가시키고, 글루카곤(glucagon)의 방출을 억제함과 더불어, 위배출(gastric emptying)을 감소시켜 정상혈당이 유지되도록 한다(Nauck 외, 1993; Elahi 외, 1994; Wills 외, 1996; Nathan 외, 1992; De Ore 외, 1997). GLP-1은 프로글루카곤의 번역 후 변형의 산물이다. GLP-1의 서열 및 그의 활성 단편인 GLP-1(7-37) 및 GLP-1(7-36) 아미드는 해당 기술분야에서 잘알려져 있다(Fehmann 외, 1995). GLP-1이 당뇨병 치료에서의 치료제로서 제안되었지만, 이는 짧은 생물학적 반감기(De Ore 외, 1997)를 가지며, 환약으로 경피투여될 때 조차도(Ritzel 외 1995) 그러하다. GLP-1 분해(및 GLP-1(7-36) 아미드)는 아미노산 8과 9(알라닌과 글루탐산) 사이의 폴리펩티드를 절단하는 효소 디펩티딜 펫티다아제(DPP 4)에 부분적으로 기인한다.

[0011] 엑센딘-4는 독 도마뱀(Gila monster lizard)의 침샘에서 생산되는 폴리펩티드이다(Goke 외, 1993 참조). 엑센딘-4에 대한 아미노산 서열은 해당 기술분야에 공지되어 있다(Fehmann 외, 1995 참조). 비록 독특한 비-포유류 유전자 산물이고 침샘에서만 발현되는 것으로 보이지만(Chen 및 Drucker, 1997), 엑센딘-4는 GLP-1과 52%의 아미노산 서열 상동성을 공유하며, 포유류에서는 GLP-1 수용체와 상호작용한다(Goke 외, 1993; Thorens 외, 1993 참조). 시험관 내에서, 엑센딘-4는 인슐린 생산 세포에 의한 인슐린 분비를 촉진하는 것으로 나타났으며, 동량(equimolar quantities)으로 주어졌을 때에는, 인슐린 생산 세포로부터 인슐린 방출을 유도하는 데 있어 GLP-1보다 더 강력하다. 또한, 엑센딘-4는 인슐린 방출을 강력하게 자극하여 설치류와 인간 모두에서 혈장 포도당 수준을 감소시키며, GLP-1보다 더 장기 작용성이다. 그러나, 엑센딘-4는 포유류에서 자연적으로 발생하지 않기 때문에, GLP-1이 결여된 포유류에서는 특정한 잠재적 항원으로서의 성질을 갖는다.

[0012] 당뇨병에서 발생하는 인슐린 생산의 감소 외에도, 말초 신경증은 당뇨병과 혼하게 연관이 되어있다. 모든 당뇨병 대상체의 20~30%에서는 결과적으로 말초 신경증이 발생한다. 또한, 심장 질환을 동반하는 알츠하이머병, 뇌졸중, 고혈압 및 당뇨병의 위험 증가에 대한 보고서들이 있다(Moceri 외, 2000; Ott 외, 1999 참조). 따라서, 당뇨병은 신경퇴행성 질환과도 연관된 질환이다.

[0013] GLP-1 수용체는 설치류 뇌(Jin 외, 1988; Shughue 외, 1996; Jia 외, 2015 참조) 및 인간 뇌(Wei 및 Mojsov 1995; Satoh 외, 2000 참조) 모두에 존재한다. 분포의 화학 구조는 시상하부(hypothalamus), 시상(thalamus), 뇌간(brainstem), 측두엽(lateral septum), 뇌활밀기관(the subfornical organ) 및 일반적으로 대다수의 펫티드 수용체가 위치하고 있는 모든 뇌실주위 기관(circumventricular areas)인 맨아래구역(area postrema)에 주로 국한되어 있는 것으로 나타난다. 그러나, 비록 더 낮은 밀도이긴 하지만 GLP-1에 대한 특이적 결합 부위는 미상 피각(caudate-putamen), 대뇌 피질(cerebral cortex) 및 소뇌(cerebellum) 전반에 걸쳐검출이 되었다(Campos 외, 1994; Calvo 외, 1995; 및 Goke 외, 1995 참조). 예를 들어 Lu 외, 2014 문헌에서는, GLP-1 수용체가 페럿(Mustela putorius furo)의 편도체(amygdala), 소뇌, 전두 피질(frontal cortex), 해마, 시상하부, 중뇌, 수질(medulla), 뇌교(pons), 선조체(striatum), 시상(thalamus) 및 측두 피질(temporal cortex)에서 발현된다는 것을 입증하였다. 뇌에서의 GLP-1 수용체의 발현 수준은 노화에 영향을 받지 않는다.

[0014] 또한, GLP-1은 인지 및 행동과 관련이 있는 것으로 나타났다(During 외, 2003 참조). 실제로, 다수의 연구는 GLP-1 수용체 효능제를 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅تون병, 외상성 뇌 손상, 뇌졸중 및 말초 신경증을 포함하는 신경퇴행성 질환에 대한 새로운 치료제로써 제안하였다. 그러나, CNS 관련 질환의 치료에 실질적인 장애물은 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계(CNS)로 약물을 전달하는 것이다. 예를 들어, GLP-1은 1~2분의 짧은 반감기를 가지며, GLP-1의 불활성화에 내성을 부여하여 GLP-1의 반감기를 대략 2일까지 증가시키도록 생성된 GLP-1-트랜스페린 융합 단백질(GLP-1-Tf)은 BBB를 넘어갈 수 없다(김 외, 2010 및 Martin 외 2012 참조).

[0015] 또한, 엑센딘-4는 GLP-1-Tf와 비교해 로타로드 성능을 개선하는 것으로 나타났으며(Martin 외, 2012), 진입 속

도가 제한적이지만 혈액으로부터 뇌로 진입하는 것으로 알려져 있다(Kastin AJ 및 Akeerstrom V, International Journal of Obesity (2003) 27, 313-318). 또한, 엑세나타이드는, 치료 후 7일 동안 매일 제공된 경우에도, 파킨슨병에 대한 MPTP 마우스 모델에서 신경보호를 제공하는 데 효과적이지 않은 것으로 나타났다(Liu 외, 2015).

[0016] 이와 같이, 신경퇴행성 병태를 치료하기 위한 방법뿐만 아니라, 신경보호 GLP-1 수용체 작용제의 정태 혈장 수준을 유지시켜, BBB를 가로질러 중추 신경계에 약물 전달을 촉진하고 유도하는 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0017] 본 발명의 한 양태에서, 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부에 신경보호 폴리펩티드를 전달하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 대상체의 전신 혈액 순환에 신경보호 폴리펩티드의 치료 유효량을 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드를 서방형 디바이스에 의해 투여하는 단계를 포함하며, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제 또는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출은, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계 (CNS)의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

[0018] 본 개시의 또 다른 양태에서, 중추 신경계(CNS) 관련 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하거나 CNS 관련 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 이를 감소시키는 방법이 제공된다. 상기 방법은 대상체의 전신 혈액 순환에 신경보호 폴리펩티드의 치료 유효량을 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드를 서방형 디바이스에 의해 투여하는 단계를 포함하며, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제 또는 디바이스는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계 (CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.

[0019] 본 발명의 한 양태에서, 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부에 신경보호 폴리펩티드를 전달하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 대상체의 전신 혈액 순환에 방출 제어형 신경보호 제제을 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제는 GLP-1, 엑센딘 (예: 엑센딘-4), 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체 (예: 엑센딘-4 유사체)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘 (예: 엑센딘-4), 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계 (CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.

[0020] 특정 구현예에서, 방출 제어형 제제는 신경보호 폴리펩티드의 장기 작용성 제제이다.

[0021] 다른 구현예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방출을 위한 데포 제제를 포함한다.

[0022] 특정 구현예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 조성물을 포함한다.

[0023] 추가 구현예에서, 방출 제어형 제제는 특정 기간 동안 유효농도로 신경보호 폴리펩티드의 생체 이용률 및 지속적인 방출을 하도록 하는 특정 점도와 코팅 물질을 갖는 생분해성 중합체를 추가로 포함한다.

[0024] 특정 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제는 신경보호 폴리펩티드 및 생분해성 중합체를 갖는 코어를 포함하는 서방형 마이크로 스피어 및 코어를 코팅하는 코팅 층을 포함한다.

[0025] 일 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 병태의 적어도 하나의 증상을 완화시킨다.

[0026] 다른 구현예에서, CNS 관련 병태는 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 병태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون병, 만성 외상성 뇌병변(CTE), 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 루이소

체 치매(DLB), 혼합형 치매, 전측두엽 치매, 크로이츠펠트 야곱병, 정상 뇌압 수두증, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0027] 특정 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 조절 방출형 신경보호 제제를 주입하는 단계(injecting)를 포함한다.

[0028] 추가 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 주입하는 단계는 피하 주사하는 단계이다. 예를 들어, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 방출 제어형 신경보호 제제를 피하 주사하는 단계를 포함할 수 있다.

[0029] 또 다른 구현예에서, 방출 제어형 신경 보호 제제를 투여하는 단계는 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도(steady-state plasma concentration)가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위가 되게 한다.

[0030] 다른 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌 또는 이들 조합의 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.

[0031] 특정 구현예에서, CSF에서 신경보호 폴리펩티드 농도는 약 5 내지 약 400pg/mL(예를 들어, 약 10 내지 약 400pg/mL)의 범위 이내에 있다.

[0032] 추가 양태에서, CNS 관련 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하거나 CNS 관련 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 이를 감소시키는 방법이 제공된다. 상기 방법은 방출 제어형 신경보호 제제의 치료 유효량을 대상체의 전신 혈액 순환에 투여하는 단계를 포함한다. 방출 제어형 신경보호 제제는 GLP-1, 엑센딘(예컨대 엑센딘-4), 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘(예컨대 엑센딘-4) 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘(예: 엑센딘-4) 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 BBB를 가로질러 CNS의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.

[0033] 특정 구현예에서, 방출 제어형 제제는 신경보호 폴리펩티드의 장기 지속성 제제이다.

[0034] 다른 구현예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 데포 제제를 포함한다.

[0035] 추가 구현예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 조성물을 포함한다.

[0036] 추가 구현예에서, 방출 제어형 제제는 특정 기간 동안 생물학적 이용률 및 특정 기간 동안 유효 농도의 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 갖는 특정 점도와 코팅 물질을 갖는 생분해성 중합체를 추가로 포함한다.

[0037] 특정 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제는 신경보호 폴리펩티드 및 생분해성 중합체를 갖는 코어를 포함하는 방출 제어형 마이크로 스파이어 및 코어를 코팅하는 코팅 층을 포함한다.

[0038] 특정 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는, 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 병태의 적어도 하나의 증상을 경감시킨다.

[0039] 일 구현예에서, CNS 병태는 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 상태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون병, 만성 외상성 뇌병변, 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 루이소체 치매(DLB), 혼합형 치매, 전측두엽 치매, 크로이츠펠트 야곱병, 정상 뇌압 수두증, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0040] 다른 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 조절 방출형 신경보호 제제를 대상체에게 주입하는 단계를 포함한다.

[0041] 특정 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 대상체에 주입하는 단계는 피하 주사이다.

[0042] 추가 구현예에서, 방출 제어형 제제를 투여하는 단계는, 신경보호 폴리펩티드의 정태 플라즈마 농도가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다.

[0043] 일부 구현예에서, 방출 제어형 제제를 투여하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에서 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.

[0044] 추가 양태에서, 대상체의 중추신경계(CNS)의 적어도 일부분에 신경보호 폴리펩티드를 전달하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은: GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어

진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 전신 혈액 순환에 서방형 방출에 의해 전달하는 단계를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 웨티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액 뇌 장벽(BBB)를 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

[0045] 또 다른 양태에서, 중추신경계(CNS) 관련 질병을 앓고 있는 환자를 치료하거나, CNS 관련 질병의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 환자에서 이를 감소시키는 방법이 제공된다. 상기 방법은: GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 전신 혈액 순환에 지속 전달하는 단계를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액 뇌 장벽(BBB)를 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.

[0046] 일 구현예에서, 서방형 방출 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들을 제공하는 단계는 장치(예를 들어, 펌프, 미니 펌프, 삼투 펌프, 삼투 전달 장치, 주입 펌프, 정맥내 투여 장치, 연동 펌프, 또는 미니어쳐 주입 펌프 등)를 통해 폴리펩티드(들)을 투여하는 단계를 포함한다.

[0047] 소정의 구현예에서, 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들은 약 1 pM/kg/분 내지 약 30 pM/kg/분(예를 들어, 약 3 pM/kg/분 내지 약 17.5 pM/kg/분)의 속도로 투여된다.

[0048] 다른 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하거나, 신경보호 폴리펩티드를 지속 전달하는 것은 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 병태의 적어도 하나의 증상을 완화시킨다.

[0049] 특정 구현예에서, CNS 관련 병태는 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 상태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون 병, 만성 외상성 뇌병변, 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 루이소체 치매(DLB), 혼합형 치매, 전측두엽 치매, 크로이츠펠트 야콥병, 정상뇌압 수두증다기관 위축증, 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0050] 일 구현예에서, 방출 제어형 제제를 투여하거나 신경보호 폴리펩티드를 서방형 방출에 의해 제공하는 단계는, 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다.

[0051] 특정 구현예에서, 방출 제어형 제제를 투여하거나 또는 신경 보호 폴리펩티드를 서방형 방출에 의해 제공하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에서 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.

[0052] 또 다른 구현예에서, CSF의 신경보호 폴리펩티드 농도는 5 내지 약 400 pg/mL의 범위 내에 있다.

[0053] 일부 구현예에서, 혈장에 대한 CFS 내 정태 폴리펩티드 농도의 비는 약 0.1% 내지 약 5%의 범위이다.

[0054] 다른 구현예에서, 신경보호 폴리펩티드는 서열번호 1~55로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 신경보호 폴리펩티드는 서열번호 1~55로부터 선택된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0055] 다른 구현예에서, 엑센딘-4 유사체는 화학식 I 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 다음의 염으로서 표시된다:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 -Z₁, Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 -Z₁,

[0057] (화학식 I)

[0058] (여기서:

[0059] Xaa1은 His, Arg, Tyr, Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 4-օ-미다조프로파오닐 이고;

[0060] Xaa2는 Ser, Gly, Ala, 또는 Thr 이고;

[0061] Xaa3은 Ala, Asp, 또는 Glu 이고;

- [0062] Xaa4는 Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 Gly이고;
- [0063] Xaa5는 Ala 또는 Thr이고;
- [0064] Xaa6은 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0065] Xaa7은 Thr 또는 Ser이고;
- [0066] Xaa8은 Ala, Ser, 또는 Thr이고;
- [0067] Xaa9는 Ala, Norval, Val, Norleu, Asp, 또는 Glu이고;
- [0068] Xaa10은 Ala, Leu, Ile, Val, 펜틸글리신, 또는 Met이고;
- [0069] Xaa11은 Ala 또는 Ser이고;
- [0070] Xaa12는 Ala 또는 Lys이고;
- [0071] Xaa13은 Ala 또는 Gln이고;
- [0072] Xaa14는 Ala, Leu, Ile, 펜틸글리신, Val, 또는 Met이고;
- [0073] Xaa15는 Ala 또는 Glu이고;
- [0074] Xaa16은 Ala 또는 Glu이고;
- [0075] Xaa17은 Ala 또는 Glu이고;
- [0076] Xaa19는 Ala 또는 Val이고;
- [0077] Xaa20은 Ala, 또는 Arg이고;
- [0078] Xaa21은 Ala, Leu, 또는 Lys-NHe-R이고(여기서 R은 Lys, Arg, 또는 C1-C10 칙쇄 또는 분지형 알카노일임);
- [0079] Xaa22는 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0080] Xaa23은 Ile, Val, Leu, 펜틸글리신, tert-부틸글리신, 또는 Met이고;
- [0081] Xaa24는 Ala, Glu, 또는 Asp이고;
- [0082] Xaa25는 Ala, Trp, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0083] Xaa26은 Ala 또는 Leu이고;
- [0084] Xaa27은 Ala 또는 Lys이고;
- [0085] Xaa28은 Ala 또는 Asn이고;
- [0086] Z_1 은 $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, Gly- Z_2 , Gly- Z_2 , Gly Xaa31- Z_2 , Gly Xaa31 Ser- Z_2 , Gly Xaa31 Ser- Z_2 , Gly Xaa31 Ser Gly- Z_2 , Gly Xaa31 Ser Gly Ala- Z_2 , Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36- Z_2 , Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37- Z_2 , Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38- Z_2 , 또는 Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38 Xaa39- Z_2 이고,
- [0087] Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, 및 Xaa28 중 3개 이하가 Ala이고, Xaa10이 His, Arg 또는 Tyr이고, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나가 Ala인 경우, Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38은 Pro, 흐모프롤린, 3Hyp, 4Hyp, 티오프롤린, N-알킬글리신, N-알킬펜틸글리신, 또는 N-알킬알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, Xaa39는 Ser, 또는 Ty(예: Ser)이며,
- [0088] Z_2 는 $-\text{OH}$, 또는 $-\text{NH}_2$ 임.
- [0089] 단,
- [0090] Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, 및 Xaa28 중 3개 이하는 Ala이고;
- [0091] Xaa10이 His, Arg, 또는 Tyr일 때, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나는 Ala임).

- [0092] 다른 구현예에서, 엑센딘-4 유사체는 화학식 II 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 다음의 염으로 표시된다:
- [0093] Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 X₁-Z₁,
- [0094] (화학식 II)
- [0095] (여기서:
- [0096] Xaa1은 His, Arg, Tyr, Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 4-օ-미타조프로피오닐 이고;
- [0097] Xaa2는 Ser, Gly, Ala, 또는 Thr 이고;
- [0098] Xaa3은 Ala, Asp, 또는 Glu 이고;
- [0099] Xaa4는 Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 Gly 이고;
- [0100] Xaa5는 Ala 또는 Thr 이고;
- [0101] Xaa6은 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0102] Xaa7은 Thr 또는 Ser 이고;
- [0103] Xaa8은 Ala, Ser, 또는 Thr 이고;
- [0104] Xaa9는 Ala, Norval, Val, Norleu, Asp, 또는 Glu 이고;
- [0105] Xaa10은 Ala, Leu, Ile, Val, 웬틸글리신, 또는 Met 이고;
- [0106] Xaa11은 Ala 또는 Ser 이고;
- [0107] Xaa12는 Ala 또는 Lys 이고;
- [0108] Xaa13은 Ala 또는 Gln 이고;
- [0109] Xaa14는 Ala, Leu, Ile, 웬틸글리신, Val, 또는 Met 이고;
- [0110] Xaa15는 Ala 또는 Glu 이고;
- [0111] Xaa16은 Ala 또는 Glu 이고;
- [0112] Xaa17은 Ala 또는 Glu 이고;
- [0114] Xaa19는 Ala 또는 Val 이고;
- [0115] Xaa20은 Ala, 또는 Arg 이고;
- [0116] Xaa21은 Ala, Leu, 또는 Lys-NH₂-R 이고(여기서, R은 Lys, Arg, C1-C10 칙쇄 또는 분지형 알카노일, 또는 시클로알킬-알카노일임);
- [0117] Xaa22는 Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0118] Xaa23은 Ile, Val, Leu, 웬틸글리신, tert-부틸글리신, 또는 Met 이고;
- [0119] Xaa24는 Ala, Glu, 또는 Asp 이고;
- [0120] Xaa25는 Ala, Trp, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0121] Xaa26은 Ala 또는 Leu 이고;
- [0122] X₁은 Lys Asn, Asn Lys, Lys-NH₂-R Asn, Asn Lys-NH₂-R, Lys-NH₂-R Ala, Ala Lys-NH₂-R 이고(여기서 R은 Lys, Arg, C1-C10 칙쇄 또는 분지형 알카노일, 또는 시클로알카노일임);
- [0123] Z₁은 -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly-Z₂, Gly Xaa31-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38-Z₂, 또는 Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38 Xaa39-Z₂ 이며;

- [0124] Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38은 Pro, 호모프롤린, 3Hyp, 4Hyp, 티오프롤린, N-알킬글리신, N-알킬펜틸글리신 및 N-알킬알라닌이로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, Xaa39는 Ser 또는 Tyr이며;
- [0125] Z₂는 -OH, 또는 -NH₂임.
- [0126] 단,
- [0127] Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, and Xaa26 중 3개 이하는 Ala이며;
- [0128] Xaa1이 His, Arg, Tyr, 또는 4-이미다조프로피오닐일 때, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나는 Ala임).

도면의 간단한 설명

- [0129] 본 명세서에 포함되고 그 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 (하나의) 여러 구현예(들)를 도시하며, 상세한 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명하는 역할을 한다.
- 도 1a. 2 mg/kg의 서방형-엑세나타이드(PT302)를 1회 피하 투여한 성체(9주령) 수컷 스프래그-다울리 랫트의 시간 의존적 엑세나타이드(엑센딘-4) 혈장 수준을 나타내는 그래프임.
- 도 1b. 2.4 mg/kg, 4.8 mg/kg, 또는 9.6 mg/kg의 서방형-엑세나타이드(PT302)를 1회 피하 투여한 성체(9주령) 수컷 스프래그-다울리 랫트의 시간 의존적 엑세나타이드(엑센딘-4) 혈장 수준을 나타내는 그래프임.
- 도 2. 4.0 mg/kg의 양으로 서방형-엑세나타이드(PT304)를 1회 피하 주입한 성체(9주령) 수컷 스프래그-다울리 랫트의 시간 의존적 엑센딘-4 혈장 수준을 나타내는 그래프임.
- 도 3. 표시된 양 및 횟수로 PT302 또는 PT304를 투여한 수컷 스프래그 다울리 랫트에서 10주의 기간에 걸친 시간 의존적 엑센딘-4 혈장 수준을 나타내는 그래프임.
- 도 4a. 안쪽앞뇌다발(medial forebrain bundle)의 6-OHDA 일측성 병변이 생기기 전에 스프래그-다울리 랫트에게 PT302를 투여한 실시예 2에 대한 연구 설계의 개요임.
- 도 4b. PT302를 미리 투여한 6-OHDA 랫트의 메타암페타민 유도(메타 유도) 회전 거동을 보여주는 그래프임.
- 도 4c. PT302를 미리 투여한 6-OHDA 랫트에서 엑센딘-4의 플라즈마 수준을 보여주는 그래프임.
- 도 5a. 안쪽앞뇌다발의 6-OHDA 일측성 병변이 생긴 후 스프래그-다울리 랫트에게 PT302로 투여한 실시예 3에 대한 연구 설계의 개요임.
- 도 5b. 병변이후 PT302를 투여한 6-OHDA 랫트의 메타 유도 회전 거동을 보여주는 그래프임.
- 도 5c. 비히클(대조군; 랫트 #866, #883, 및 #886)과 PT302(랫트 #881, #875, #882)가 투여되는 안쪽앞뇌다발의 6-OHDA 일측성 병변을 가진 랫트에서 수행된 선조체(striatum)에 대한 타이로신 수산화효소(TH) 면역조직 화학의 대표적인 현미경 이미지임. 엑센딘-4 플라즈마 농도(ng/ml)는 각 동물에 대해 표시되어 있다.
- 도 5d. 도 5c에 도시되고 이와 연관된 면역조직 화학(immunohistochemistry)에서 관찰 된 정량화된 TH 면역반응성을 나타내는 그래프임.
- 도 5e. 비히클(대조군; 랫트 #866, #883, 및 #886) 및 PT302(랫트 #881, #875, 및 #882)가 투여되는 안쪽앞뇌다발의 6-OHDA 일측성 병변을 갖는 랫트에서 수행된 흑질(substantia nigra)에 대한 TH 면역조직 화학의 대표적인 현미경 이미지임. 엑센딘-4 플라즈마 농도(ng/ml)는 각 동물에 대해 표시되어 있다.
- 도 5f. 도 5e에 기술되고 이와 연관된 면역조직 화학에서 관찰된 정량화된 TH 면역반응성을 나타내는 그래프임.
- 도 5g 및 5h. 랫트의 병변이 없는 측부에서 관찰된 TH+ 뉴런의 대표적인 현미경 이미지임.
- 도 5i. 안쪽앞뇌다발의 6-OHDA 일측성 병변을 가진 랫트유래의 뇌의 병변측 흑질에 존재하는 TH+ 뉴런이 없는 것에 대한 대표적인 현미경 이미지임.
- 도 5j, 5k 및 5l. PT302로 치료한 6-OHDA 랫트의 뇌의 대표 이미지임.

도 5m. 선상체의 정규화된 TH 면역반응성과 엑센딘-4 혈장 수준 사이에서 관찰된 유의한 상관관계를 나타내는 그래프임.

도 5n. 흑질의 엑센딘-4 혈장농도와 TH 면역반응성 사이에서 관찰된 유의한 상관관계를 나타내는 그래프임.

도 6a. 실시예 4의 연구 설계 개요임.

도 6b. 엑센딘-4 및 PT302 처리는 안쪽앞뇌다발의 6-OHDA 일측성 병변을 갖는 랫트의 회전을 감소시킨다.

도 6c. 대조군(Sham) 랫트, 6-OHDA 랫트, 엑센딘-4로 처리한 6-OHDA 랫트 및 PT302로 처리한 6-OHDA 랫트 유래의 흑질에 대한 대표적인 현미경 이미지임.

도 6d. 도 6c의 정량화 데이터를 도시한 그래프.

도 7a. 실시예 5의 연구 설계의 개요임.

도 7b. PT302는 일측성 6-OHDA-병변을 가진 랫트에서 회전 거동을 유의하게 감소시킨 반면, 엑센딘-4는 일측성 6-OHDA-병변을 가진 랫트에서 회전 거동을 감소시키지 않았다.

도 8a. 실시예 6의 연구 설계의 개요임.

도 8b. PT302는 MPTP처리한 마우스에서 와이어로부터 추락하기까지의 시간을 유의하게 증가시키는 반면, 엑센딘-4는 와이어로부터 추락하기까지의 시간을 증가시키지 않았음을 나타내는 그래프임.

도 9a. 실시예 8의 연구 설계의 개요임.

도 9b. 서방형-엑세나타이드가 경미한 외상성 뇌손상(mTBI)를 당한 마우스에서 새로운 물체 인식을 유의하게 증가시켰음을 나타내는 그래프임.

도 10a. 엑센딘-4 혈장 수준이 PT302 투여 후 7일 동안 지속되고, 추가적으로 투여량 의존적임을 나타내는 그래프임.

도 10b. PT302 투여로부터 유래된 엑센딘-4 혈장 수준의 유의한 차이가 정상/대조군 마우스와 mTBI를 겪은 마우스 사이에서는 관찰되지 않았음을 나타내는 그래프임.

도 10c. 3가지 상이한 용량의 서방형-엑세나타이드(PT302: 0.024, 0.12 및 0.6 mg/kg)가 혈장에서 축적될 수 있었고 시간 의존적으로 유지될 수 있었음을 나타내는 그래프임.

도 11a. mTBI 유도이후 7일차에 새로운 물체 인식 기법에 의해 평가한 결과, 아무 처리를 하지 않은 mTBI유도 마우스가 시각 기억력 결핍으로 고통받으며 새로운 물체 근처에서 시간을 적게보낸 것과 비교해, 서방형-엑세나타이드(PT302: 0.024, 0.12 및 0.6 mg/kg)로 처리한 mTBI 유도 마우스가 새로운 물체에 대한 높은 선호도를 나타냈다는 것을 보여주는 그래프임.

도 11b. mTBI유도 이후 7일차에 Y-미로에 의해 평가한 결과, 서방형-엑세나타이드(PT302: 0.024, 0.12 및 0.6 mg/kg)가, 아무 처리를 하지않은 mTBI 유도 마우스에서 관찰된 mTBI에 의한 공간 기억력 결핍을 완화시켰음을 나타내는 그래프임.

도 11c. 도 11a 및 도 11b의 결과가 불안-유사 행동의 결과가 아니었음을 나타내는 그래프임.

도 12a. mTBI유도 이후 30일차에 새로운 물체 인식 기법에 의해 평가한 결과, 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스가 시각적 기억력 부족으로 고통받으며 신규 물체 근처에서 시간을 적게 보낸 것과 비교해, 서방형-엑세나타이드(PT302: 0.12 및 0.6 mg/kg)로 치료한 mTBI 유도 마우스가 신규 물체를 대한 높은 선호도를 나타냈다는 것을 보여주는 그래프임.

도 12b. mTBI유도 이후 30일차에 Y-미로에 의해 평가한 결과, 서방형-엑세나타이드(PT302: 0.12 및 0.6 mg/kg)가 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스에서 관찰된 mTBI 공간 기억력 결핍을 완화시켰음을 나타내는 그래프임.

도 12c. 도 12a 및 도 12b의 결과가 불안 유사 행동의 결과가 아니었음을 나타내는 그래프임.

도 13a. 서방형-엑세나타이드(PT302 0.6 mg/kg)가 mTBI 유도 마우스의 피질, CA3, 및 치아이랑에서 관찰된 뉴런의 감소를 방지할 수 있었음을 나타내는 이미지임.

도 13b. 도 13a에서의 대표적인 이미지와 연관된 대뇌 피질 데이터를 정량화한 그래프로서, 서방형-엑세나타이드(PT302 0.6 mg/kg)가 mTBI 유도 마우스의 대뇌 피질에서 관찰된 뉴런의 감소를 방지할 수 있음을 입증함.

도 13c. 도 13a에서의 대표적인 이미지와 연관된 CA3 데이터를 정량화한 그래프로서, 서방형-엑세나타이드(PT302 0.6 mg/kg)가 mTBI 유도 마우스의 해마의 CA3 영역에서 관찰된 뉴런의 감소를 방지할 수 있었음을 입증함.

도 13d. 도 13a에서의 대표적인 이미지와 연관된 치아이랑 데이터를 정량화한 그래프로서, 서방형 엑세나타이드가 mTBI 유도 마우스의 해마의 치아이랑 영역에서 관찰된 뉴런의 감소를 방지할 수 있었음을 입증함.

도 14a. 대조군(CTRL) 및 mTBI를 겪고 비히를 또는 서방형 엑세나타이드 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg(PT302)이 투여된 mTBI 유도 마우스에서, 뇌손상으로 인한 뉴런 손실의 마커인 플루오로-제이드® C 염색의 대표적인 이미지임.

도 14b. 도 14a의 대표적인 이미지와 연관된 해마 CA1 영역 데이터의 정량화 및 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 CA1에서 외상성 뇌손상으로 인한 뉴런 손실의 강한 증가를 나타내는 그래프로서, 뉴런 손실은 0.6 mg/kg의 서방형 엑세나타이드(PT302)의 투여로 유의하게 감소하였음.

도 14c. 도 14a의 대표 이미지와 연관된 해마 CA3 영역 데이터의 정량화 및 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 CA3에서의 외상성 뇌손상으로 인한 뉴런 손실의 강한 증가를 나타내는 그래프로서, 뉴런 손실은 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg의 서방형 엑세나타이드(PT302)의 투여로 유의하게 감소하였음.

도 14d. 도 14a의 대표 이미지와 연관된 치아이랑 데이터의 정량화 및 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 치아이랑에서 외상성 뇌손상으로 인한 뉴런 손실의 강한 증가를 나타내는 그래프로서, 뉴런 손실은 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg의 서방출형 엑세나타이드(PT302)의 투여로 유의하게 감소하였음.

도 14e. 도 14a의 대표 이미지와 연관된 대뇌 피질 데이터의 정량화 및 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 피질에서의 외상성 뇌 손상으로 인한 뉴런 손실의 강한 증가를 나타내는 그래프로서, 뉴런 손실은 0.6 mg/kg의 서방출형 엑세나타이드(PT302)의 투여로 유의하게 감소하였음.

도 15a. 대조군 및 비히를 또는 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg의 서방형 엑세나타이드(PT302)가 투여된 대조군 및 mTBI 유도 마우스에서, 외상성 뇌손상으로 인한 소교 세포 활성화(microglia activation) 및 신경염증의 마커인 이온화된 칼슘 결합 어댑터 분자 1(IBA1) 염색의 대표 이미지임.

도 15b. 도 15a의 대표 이미지와 연관된 CA1 데이터의 정량화 및 전염증성 사이토카인 TNF-α가 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 CA1에 있는 IBA1+ 세포에서 유의하게 증가하였음을 나타내는 그래프로서, 전염증성 사이토카인 TNF-α는 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg의 서방형 엑세나타이드(PT302)의 투여로 유의하게 감소하였음.

도 15c. 도 15a의 대표적인 이미지와 연관된 CA3 데이터의 정량화 및 전염증성 사이토카인 TNF-α가 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 CA3에 있는 IBA1+ 세포에서 유의하게 증가하였음을 나타내는 그래프로서 전염증성 사이토카인 TNF-α는 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg의 서방형 엑세나타이드(PT302)의 투여로 유의하게 감소하였음.

도 15d. 도 15a의 대표적인 이미지와 연관된 치아이랑의 데이터의 정량화 및 전염증성 사이토카인 TNF-α가 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 치아이랑의 IBA1+ 세포에서 유의하게 증가하였음을 나타내는 그래프로서, 전염증성 사이토카인 TNF-α는 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg의 서방형 엑세나타이드(PT302)의 투여로 유의하게 감소하였음.

도 15e. 도 15a의 대표적인 이미지와 연관된 대뇌 피질 데이터의 정량화 및 전염증성 사이토카인 TNF-α가 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스의 피질의 IBA1+ 세포에서 유의하게 증가하였음을 나타내는 그래프로서, 전염증성 사이토카인 TNF-α는 0.6 mg/kg 또는 0.12 mg/kg의 서방형 엑세나타이드의 투여로 유의하게 감소하였음.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0130] 본 발명은 본원에 기술된 활성 성분(예를 들어, GLP-1, 엑센딘 및 GLP-1과 엑센딘의 생물학적 활성 유사체 또는 유도체)의 전달이 놀랍고 예기치 못하게 향상되었음에 기초한다. 본 명세서는 본 개시의 바람직한 실시예에 대

한상세한 설명 및 그 안에 포함된 예들, 도면들 및 그 이전의 설명 및 이하의 상세한 설명을 참조하여 보다 용이하게 이해될 수 있다.

- [0131] 본 화합물, 조성물, 물품, 장치 및/또는 방법을 개시하고 기술하기 전에, 본 개시가 특정 합성 방법, 특정 처리 방법, 또는 특정 정제방법에 한정되지 않으며, 당연히 다양할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시예를 기술하는 목적이며, 제한하려는 것은 아니다.
- [0132] 본원에 언급된 모든 간행물, 예를 들어, 미국 특허 제8,853,160호, 미국 특허 제8,278,272호, 미국 특허 제7,576,050호, 미국 특허 제9,155,702호, 국제 특허 공개 WO/2003/011892, 및 Gu 외의 (Clinical Therapeutics. 36(1): 101-114 (2014))를 포함한특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고문헌으로 본원에 도입된다.
- [0133] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥상 달리 언급하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "폴리펩티드"에 대한 참조는 폴리펩티드들의 혼합물을 포함하고, "약제학적 담체"에 대한 언급은 둘 이상의 그러한 담체 등의 혼합물을 포함한다.
- [0134] 범위는 "약" 하나의 특정 값에서, 및/또는 "약" 또 다른 특정 값까지로서 본원에서 표현할 수 있다. 이러한 범위가 표현될 때, 또 다른 실시예는 하나의 특정 값에서 및/또는 다른 특정 값까지 포함한다. 유사하게, 전술한 "약"의 사용에 의해 값이 근사값으로 표현될 때, 특정 값은 다른 실시예를 형성하는 것으로 이해될 것이다. 각 범위의 종점이 다른 종점과 관련하여 유의할 뿐아니라 다른 종점과 독립적으로도 유의하다는 것이 더 이해될 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "약"은 주어진 값 ± 10%를 의미한다.
- [0135] 본 명세서 및 이어지는 청구범위에서, 다음의 의미를 갖는 것으로 정의되는 용어에 대해 언급 될 것이다:
- [0136] "선택적" 또는 "선택적으로"는 추후에 기술된 사건 상황이 발생할 수도 있고 발생하지 않을 수도 있음을 의미하며, 설명에는 사고 또는 상황이 발생하는 경우 및 사례가 없는 경우가 포함된다.
- [0137] 본 명세서에서 사용하는 바와 같이, "대상체"는 개체를 의미한다. 특정 구현예에서, 대상체는 영장류와 같은 포유동물이다. 특정 실시예에서, 대상체는 인간이다. 따라서, "대상체"는, 고양이, 개 등의 가축(예를 들어, 소, 말, 돼지, 양, 염소 등)과 같은 가축화된 동물 및 실험실 동물(예를 들어, 마우스, 토끼, 랙트, 기니피그 등)을 포함할 수 있다.
- [0138] 용어 "폴리펩티드"와 "펩티드"는 문맥상 달리 지시되지 않는 한 일반적으로 교환 가능하게 사용된다. 달리 지시되지 않는 한, "폴리펩티드" 및 "펩티드" 모두는 펩티드 결합에 의해 연결된 자연 발생 또는 비자연 발생 아미노산을 지칭할 수 있다.
- [0139] 용어 "정태(stable-state)"는 약물동태학 내에서 이의 일반적인 의미로 사용된다. 간략하게는, 예를 들어 혈장이나 뇌척수액(CSF)에서의 정태 농도는 투여되는 신경보호 폴리펩티드(들)의 속도가 대상체의 신체에 의해 신경보호 폴리펩티드(들)가 제거되는 속도와 동일할 때의 혈장 및 CSF에서의 농도이다. 본 개시의 신경보호 폴리펩티드(들)의 정태 농도를 결정하는 것은 당업자에게는 일상적인 것이다.
- [0140] "단리 된 폴리펩티드" 또는 "정제 된 폴리펩티드"란 폴리펩티드가 배양물에서 정상적으로 또는 관련되는 물질을 실질적으로 함유하지 않는 폴리펩티드를 의미한다. 본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들어 이용 가능한 경우 천연 공급원 (예를 들어, 포유동물 세포)으로부터의 추출, 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 핵산의 발현 (예를 들어, 세포내 또는 무세포 전사 시스템), 또는 폴리펩티드를 화학적으로 합성함으로써 제조 될 수 있다. 또한, 폴리펩티드는 전체 길이 폴리펩티드를 절단함으로써 수득 될 수 있다. 폴리펩타이드가 본질적으로 발생하는 폴리펩티드의 단편 인 경우, 단리 된 폴리펩타이드는 단편 인 전체 길이의 천연 발생 폴리펩타이드보다 짧고 배제된다.
- [0141] 본 발명은 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 방출 제어형 신경보호 제제를 대상체의 전신 혈액 순환에 투여하는 단계를 포함하되, 방출 제어형 신경보호 제제는 GLP-1, 엑센딘 (예: 엑센딘-4), 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체 (예: 엑센딘-4 유사체)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘 (예: 엑센딘-4), 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계 (CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.
- [0142] 도 1a, 도 1b, 도 2, 및 도 3에 도시된 바와 같이, 방출 제어형 신경보호 제제는 동물 모델에서 엑세나타이드의

혈장 농도를 더 오래 유지되도록 한다. 또한, 도 7b 및 도 8b는 엑세나타이드의 방출 제어형 제제가 단독으로 사용되는 엑세나타이드보다 더 효과적인 신경보호 제제/치료제이고 더 효과적인 신경복원 제제/치료제인 것을 입증한다.

[0143] 본 발명은 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은: 대상체의 전신 혈액 순환에 신경보호 폴리펩티드의 치료 유효량을 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드를 서방형 방출시키거나 전달하는 디바이스에 의해 투여하는 단계를 포함할 수 있으며, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 방출 제어형 신경보호 제제 또는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출은, 신경보호 웨პ티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

[0144] 또한, 본 발명은 중추 신경계(CNS) 관련 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하거나, CNS 관련 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 이를 감소시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 대상체의 전신 혈액 순환에 신경보호 폴리펩티드의 치료 유효량을 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드를 지속 방출하거나 전달하는 디바이스에 의해 투여하는 단계를 포함하며, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제 또는 장치는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.

[0145] 특정 실시예에서, 방출 제어형 제제는 신경보호 폴리펩티드의 장기 지속성 제제이다. 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 데포 제제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 조성물을 포함할 수 있다(이하에서 더욱 상세히 설명함). 추가 실시예에서, 방출 제어형 제제는 특정 기간 동안 신경보호 폴리펩티드를 생물학적으로 이용가능하게 하고 특정 농도로 서방형 방출되게 하는, 특정 점도와 코팅 물질을 갖는 생분해성 중합체를 추가로 포함한다. 추가 실시예에서, 방출 제어형 제제는, 활성 성분의 초기 방출 없이(예를 들어, 활성 성분의 초기 파열, 예컨대, 유해한 초기 방출 없이), 특정 기간 동안 신경보호 폴리펩티드를 생물학적으로 이용가능하게 하고 특정 농도로 서방형 방출되게 하는, 특정 점도와 코팅 물질을 갖는 생분해성 중합체를 추가로 포함한다. 특정 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제는: 신경보호 폴리펩티드 및 생분해성 중합체를 갖는 코어를 포함하는 방출 제어형 마이크로 스피어(microsphere) 및 코어를 코팅하는 코팅 층을 포함한다.

[0146] 일 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 상태의 적어도 하나의 증상을 완화시킨다. 예를 들어, CNS 관련 병태는 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 상태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون병, 만성 외상성 뇌병변, 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 루이소체 치매(DLB), 혼합형 치매, 전측두엽 치매, 크로이츠펠트 야곱병, 정상 뇌압 수두증, 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0147] 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 방출 제어형 신경보호 제제를 주입하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 방출 제어형 신경보호 제제는 피하 주입될 수 있다.

[0148] 또 다른 구현예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도(steady-state plasma concentration)가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다. 예를 들어, 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도는 약 50 내지 약 4500 pg/mL, 약 50 내지 약 4250 pg/mL, 약 50 내지 약 4000 pg/mL, 약 50 내지 약 3750 pg/mL, 약 50 내지 약 3500 pg/mL, 약 50 내지 약 3250 pg/mL, 약 50 내지 약 3000 pg/mL, 약 50 내지 약 2750 pg/mL, 약 50 내지 약 2500 pg/mL, 약 50 내지 약 2250 pg/mL, 약 50 내지 약 2000 pg/mL, 약 50 내지 약 1750 pg/mL, 약 50 내지 약 1500 pg/mL, 약 50 내지 약 1250 pg/mL, 약 50 내지 약 1000 pg/mL, 약 50 내지 약 750 pg/mL, 약 50 내지 약 500 pg/mL, 약 50 내지 약 250 pg/mL, 약 250 내지 약 4500 pg/mL, 약 250 내지 약 4250 pg/mL, 약 250 내지 약 4000 pg/mL, 약 250 내지 약 3750 pg/mL, 약 250 내지 약 3500 pg/mL, 약 250 내지 약 3250 pg/mL, 약 250 내지 약 3000 pg/mL, 약 250 내지 약 2750 pg/mL, 약 250 내지 약 2500 pg/mL, 약 250 내지 약 2250 pg/mL, 약 250 내지 약 2000 pg/mL, 약 250 내지 약 1750 pg/mL, 약 250 내지 약 1500 pg/mL, 약 250 내지 약 1250 pg/mL, 약 250 내지 약 1000 pg/mL, 약 250 내지 약 750 pg/mL,

전술한 바와 같이, 신경보호 폴리펩티드의 지속적인 정태 혈장 농도는 뇌척수액(CSF), 뇌 또는 이의 조합에서 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다. 예를 들어, CSF에서 신경보호 폴리펩티드 농도는 약 5 내지 약 400 pg/mL 또는 약 10 내지 약 400 pg/mL의 범위 이내에 있을 수 있다. 즉, CSF에서 신경보호 폴리펩티드의 농도는 약 10 내지 약 350 pg/mL, 약 10 내지 약 300 pg/mL, 약 10 내지 약 250 pg/mL, 약 10 내지 약 200 pg/mL, 약 10 내지 약 150 pg/mL, 약 10 내지 약 100 pg/mL, 약 10 내지 약 50 pg/mL, 약 50 내지 약 400 pg/mL, 약 50 내지 약 350 pg/mL, 약 50 내지 약 300 pg/mL, 약 50 내지 약 250 pg/mL, 약 50 내지 약 200 pg/mL, 약 50 내지 약 150 pg/mL, 약 50 내지 약 100 pg/mL, 약 100 내지 약 400 pg/mL, 약 100 내지 약 350 pg/mL, 약 100 내지 약 300 pg/mL, 약 100 내지 약 250 pg/mL, 약 100 내지 약 200 pg/mL, 약 100 내지 약 150 pg/mL, 약 150 내지 약 400 pg/mL, 약 150 내지 약 350 pg/mL, 약 150 내지 약 300 pg/mL, 약 150 내지 약 250 pg/mL, 약 150 내지 약 200 pg/mL, 약 200 내지 약 400 pg/mL, 약 200 내지 약 350 pg/mL, 약 200 내지 약 300 pg/mL, 약 200 내지 약 250 pg/mL, 약 250 내지 약 400 pg/mL, 약 250 내지 약 350 pg/mL, 약 250 내지 약 300 pg/mL, 약 300 내지 약 400 pg/mL, 약 300 내지 약 350 pg/mL, or 약 350 내지 약 400 pg/mL의 범위에 있을 수 있다.

본원에 기술된 실시예의 임의 양태에서, 혈장에 대한 CFS 내 정태 폴리펩티드 농도의 비는 약 0.1% 내지 약 5%

의 범위에 있을 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 혈장 내 정태 혈장 농도에 대한 CSF 내 정태 농도의 비는, 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서는 적어도 약 0.1%, 적어도 약 0.3%, 적어도 약 0.5%, 적어도 약 0.7%, 적어도 약 0.9%, 적어도 약 1%, 적어도 약 1.1%, 적어도 약 1.2%, 적어도 약 1.5%, 적어도 약 2.0%, 약 0.1% 내지 약 5%, 약 0.1% 내지 약 4%, 약 0.1% 내지 약 3%, 약 0.1% 내지 약 2%, 약 0.5% 내지 약 5%, 약 0.5% 내지 약 4%, 약 0.5% 내지 약 3%, 약 1% 내지 약 5%, 약 1% 내지 약 4%, 약 1% 내지 약 3%, 약 1% 내지 약 2%, 약 2% 내지 약 5%, 약 2% 내지 약 4%, 약 3% 내지 약 5%, 약 3% 내지 약 4%, 또는 약 4% 내지 약 5%일 수 있다.

[0151] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 혈장 내 신경보호 폴리펩티드 농도의 정태 수준에 있어서의 백분율 변화(즉, 정태가 달성되었을 때의 백분율 변화)는 약 30% 이하(예: 약 50% 이하)일 수 있다. 예를 들어, 정태 혈장 수준/농도 이후에 신경보호 폴리펩티드가 재투여되는 경우, 혈장 내 신경보호 폴리펩티드 농도의 백분율 변화는 약 80% 이하(예: 약 50% 이하)일 수 있다(제1 투여로부터 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 또는 약 6주 후에는 혈장 내 신경보호 폴리펩티드 농도가 정태에 있을 수 있음). 예를 들어, 정태가 달성된 후의 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도의 백분율 변화는, 예를 들어, 이전 신경보호 폴리펩티드 투여의 28일 이내에 (예: 약 7, 14, 약 21일 이내에) 신경보호 폴리펩티드가 재투여되는 경우(예를 들어, 이전 신경보호 폴리펩티드(들)의 투여 후 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 또는 약 28일차에 투여되는 경우) 약 80%, 약 79%, 약 78%, 약 77%, 약 76%, 약 75%, 약 74%, 약 73%, 약 72%, 약 71%, 약 70%, 약 69%, 약 68%, 약 67%, 약 66%, 약 65%, 약 64%, 약 63%, 약 62%, 약 61%, 약 60%, 약 59%, 약 58%, 약 57%, 약 56%, 약 55%, 약 54%, 약 53%, 약 52%, 약 51%, 약 50%, 약 49%, 약 48%, 약 47%, 약 46%, 약 45%, 약 44%, 약 43%, 약 42%, 약 41%, 약 40%, 약 39%, 약 38%, 약 37%, 약 36%, 약 34%, 약 33%, 약 32%, 약 31%, 약 30%, 약 29%, 약 28%, 약 27%, 약 26%, 약 25%, 약 24%, 약 23%, 약 22%, 약 21%, 약 20%, 약 19%, 약 18%, 약 17%, 약 16%, 약 15%, 약 14%, 약 13%, 약 12%, 약 11%, 약 10%, 약 9%, 약 8%, 약 7%, 약 6%, 또는 약 5%이하이다.

[0152] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 제제는 약 7 내지 약 28일(예를 들어, 약 7 내지 약 21일 또는 약 7일 내지 약 14일)마다 1회 투여된다. 예를 들어, 제제는 약 7 내지 약 28일 간격으로(예를 들어, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 또는 약 28일마다 1회씩) 복수의 횟수로 투여될 수 있다(예를 들어, 후속 투여는 이전 투여로부터 7일 내지 28일 이후임). 본원의 임의의 양태 또는 구현예에서, 제제는 복수의 횟수로 투여될 수 있으며, 제제는 약 7일 내지 약 28일의 간격(예를 들어, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 또는 약 28일의 간격으로, 즉, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 또는 약 28일마다 1회씩) 투여된다.

[0153] 추가 양태에서, 중추신경계(CNS) 관련 질환을 앓고 있는 환자를 치료하거나, CNS 관련 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 환자에서 이를 감소시키는 방법이 제공된다. 상기 방법은 방출 제어형 신경보호 제제의 치료 유효량을 대상체의 전신 혈액 순환에 투여하는 단계를 포함하되, 방출 제어형 신경보호 제제는 GLP-1, 엑센딘 (예: 엑센딘-4), 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘(예: 엑센딘-4) 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘 (예: 엑센딘-4), 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제는, 신경보호 폴리펩티드가 단독으로 투여되는 것에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계 (CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.

[0154] 특정 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 병태의 적어도 하나의 증상을 완화시킨다. 예를 들어, CNS 병태는 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 상태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون병, 만성 외상성 뇌병변, 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 루이소체 치매(DLB), 혼합형 치매, 전족두엽 치매, 크로이츠펠트 야곱병, 정상 뇌압 수두증, 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0155] 다른 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 방출 제어형 신경보호 제제를 대상체에게 주입하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 방출 제어형 신경보호 제제를

대상체에게 피하 주입하는 단계를 포함한다. 추가 실시예에서, 방출 제어형 제제는 특정 기간 동안 신경보호 폴리펩티드를 생물학적으로 이용가능하게 하고 특정 농도로 서방형 방출되게 하는, 특정 점도와 코팅 물질을 갖는 생분해성 중합체를 추가로 포함한다. 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제는 신경보호 폴리펩티드가 생물학적으로 이용가능하게 하고 활성 성분의 초기방출(예를 들어, 유해한 초기방출) 없이 특정 기간 동안 효과적인 농도로 서방형 방출되게 한다. 특정 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제는: 신경보호 폴리펩티드 및 생분해성 중합체를 갖는 코어를 포함하는 방출 제어형 마이크로스피어(microsphere) 및 코어를 코팅하는 코팅 층을 포함한다.

추가 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하는 단계는, 신경보호 폴리펩티드의 항정상태 플라즈마 농도가 전술한 범위, 예를 들어 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다.

일부 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에서 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.

추가 양태에서, 본 발명은 대상체의 중추신경계(CNS)의 적어도 일부분에 신경보호 폴리펩티드를 전달하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은: GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 전신 혈액 순환에 서방형 방출에 의해 전달하는 단계를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액 뇌 장벽(BBB)를 가로질러 CNS의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

또 다른 양태에서, 본 개시는 CNS 관련 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하거나, CNS 관련 질병의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 이를 감소시키는 방법을 제공된다. 상기 방법은: GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 전신 혈액 순환에 지속 전달하는 단계를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 BBB를 가로질러 CNS의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다. 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 서방형 방출 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들을 투여하는 단계는 디바이스(예를 들어, 펌프, 미니 펌프, 삼투펌프, 삼투 전달 장치, 주입 펌프, 연동 펌프, 또는 미니어쳐 주입 펌프 등)로 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들을 투여하는 단계를 포함한다.

약 30 pM/kg/분, 약 10 pM/kg/분 내지 약 27.5 pM/kg/분, 약 10 pM/kg/분 내지 약 25 pM/kg/분, 약 10 pM/kg/분 내지 약 22.5 pM/kg/분, 약 10 pM/kg/분 내지 약 20 pM/kg/분, 약 10 pM/kg/분 내지 약 17.5 pM/kg/분, 약 15 pM/kg/분 내지 약 35 pM/kg/분, 약 15 pM/kg/분 내지 약 35 pM/kg/분, 약 15 pM/kg/분 내지 약 32.5 pM/kg/분, 약 15 pM/kg/분 내지 약 30 pM/kg/분, 약 15 pM/kg/분 내지 약 27.5 pM/kg/분, 약 15 pM/kg/분 내지 약 25 pM/kg/분, 약 20 pM/kg/분 내지 약 35 pM/kg/분, 약 20 pM/kg/분 내지 약 35 pM/kg/분, 약 20 pM/kg/분 내지 약 32.5 pM/kg/분, 약 20 pM/kg/분 내지 약 30 pM/kg/분, 또는 약 25 pM/kg/분 내지 약 35 pM/kg/분의 속도로 투여될 수 있다.

[0161] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들은 디바이스를 통해 투여될 수 있다. 예를 들어, 장치는 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들을 담아 전달하는 이식형 디바이스일 수 있다. 디바이스는 펌프, 미니 펌프, 삼투 펌프, 삼투 전달 장치, 주입 펌프, 혈관 내 투여 장치, 연동 펌프, 또는 미니어쳐 주입 펌프 등일 수 있다. 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 디바이스는 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들을 일정하게 흘리거나, 그 흐름을 조절할 수 있거나, 그 흐름을 프로그래밍 할 수 있는 이식형 디바이스일 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제8,298,561 B2호 또는 미국 특허 제8,940,316 B2호에 기술된 것과 같은 삼투 전달 디바이스일 수 있으며, 상기 문헌 모두는 참조로서 본원에 통합된다.

[0162] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 “삼투 전달 디바이스(osmotic delivery device)”는 하나 이상의 유익제(예: 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제)를 대상체에게 전달하는 데 사용되는 디바이스를 지칭하되, 상기 디바이스는, 예를 들어, 혼탁 제제와 삼투 제제가 담기는 내강(lumen)을 갖는 (예를 들어, 티타늄 합금으로 만들어진) 저장소를 포함한다. 내강 내에 위치된 피스톤 조립체는 혼탁 제제를 삼투 제제로부터 격리시킨다. 삼투 제제와 인접한 저장소의 제1 원위 단부에는 반투과성 막이 위치하고, 혼탁 제제와 인접한 저장소의 제2 원위 단부에는 (혼탁 제제가 장치를 빠져 나가는 전달 오리피스(orifice)를 정의하는) 흐름 조절기(flow modulator)가 위치한다. 삼투 전달 디바이스 또는 삼투 펌프는 대상체 내부에, 예를 들어 피하 이식(예를 들어, 상완의 안 쪽, 바깥 쪽, 또는 뒷 쪽에 피하 이식되거나 복부 영역에 피하이식)될 수 있다.

[0163] 본원에 기술된 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제는 연속 기간 동안, 예컨대, 수주 또는 약 1년에 걸쳐 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제를 지속적으로 전달하는 디바이스를 통해 투여될 수 있다. 이식형 디바이스일 수 있는 이러한 디바이스는 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제를 원하는 기간에 걸쳐 원하는 유속으로 전달할 수 있다. 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제는 종래 기술에 의해 이식형 약물 전달 디바이스 내에 로딩될 수 있다.

[0164] 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들 또는 방출 제어형 제제는, 예를 들어, 삼투압 구동 디바이스, 기계식 구동 디바이스, 전기 기계식 구동 디바이스, 또는 화학식 구동 디바이스를 사용해 전달될 수 있다. 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제는 신경보호 폴리펩티드(들)에 의한 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료적으로 유효한 유속으로 전달된다.

[0165] 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제는 약 1주일 초과 내지 약 1년 이상인 범위의 기간(예를 들어, 약 1개월 내지 약 1년 이상, 또는 약 3개월 내지 약 1년 이상 동안)에 걸쳐 전달될 수 있다. 장치는, 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제가 전달되는 적어도 하나의 오리피스를 갖는 저장소를 포함할 수 있다. 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제는 저장소 내에 저장될 수 있다. 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 디바이스는 이식형 디바이스일 수 있는 삼투 전달 디바이스로서, 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제의 전달은 삼투압에 의해 이루어진다. DUROS® 전달 디바이스 또는 유사한 디바이스와 같은 일부 삼투 전달 디바이스 또는 삼투 펌프 및 이들의 구성 요소부가 기술되었다(예를 들어, 미국 특허 제5,609,885호; 제5,728,396호; 제5,985,305호; 제5,997,527호; 제6,113,938호; 제6,132,420호; 제6,156,331호; 제6,217,906호; 제6,261,584호; 제6,270,787호; 제6,287,295호; 제6,375,978호; 제6,395,292호; 제6,508,808호; 제6,544,252호; 제6,635,268호; 제6,682,522호; 제6,923,800호; 제6,939,556호; 제6,976,981호; 제6,997,922호; 제7,014,636호; 제7,207,982호; 제7,112,335호; 제7,163,688호; 미국 특허 출원 공개 제2005-0175701호, 제2007-0281024호, 및 제2008-0091176호를 참조하되, 이들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0166] DUROS® 전달 디바이스는 일반적으로, 삼투 엔진을 포함하는 원통형 저장소, 피스톤 및 약물 제제로 이루어진다. 저장소의 일 단부는 속도 조절식 투수성 막(controlled-rate water-permeable membrane)으로 캡이

씌워지고, 약물 저장소로부터 약물 제제가 방출되어 통과하는 확산 조절기(diffusion moderator)에 의해 타 단부에 캡이 씌워진다. 피스톤은 삼투 엔진으로부터 약물 제제를 분리하며, 삼투 엔진칸의 수분이 약물 저장소로 들어가는 것을 막기 위해 시일(seal)을 사용한다. 확산 조절기는 약물 제제(예: 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들, 또는 방출 제어형 제제)와 연계하여, 채액이 오리피스를 통해 약물 저장소에 들어가는 것을 방지하도록 설계된다.

[0167] DUROS® 장치는 삼투압 원리에 기초하여 소정의 속도로 치료제를 방출한다. 세포외액은 반투과 막을 통해 DUROS® 장치로 들어가서, 완만하고 일정한 속도로 피스톤을 구동하도록 팽창하는 염 엔진(salt engine) 내로 직접 들어간다. 피스톤의 운동은 약물 제제가 소정의 순전한 속도(sheer rate)로 오리피스 또는 출구 포트를 통해 방출되도록 한다. 본 발명의 임의의 양태 또는 실시예에서, DUROS® 장치의 저장소에는 신경보호 폴리펩티드(들) 또는 방출 제어형 제제가 로딩되며, 상기 디바이스는 대상체에게 신경보호 폴리펩티드(들) 또는 방출 제어형 제제를 연속 기간(예: 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 또는 약 12개월)에 걸쳐 치료적으로 유효한 소정의 전달 속도로 전달할 수 있다.

[0168] 임의의 이식형 디바이스가 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있으며, 이에는 화합물을 일정하게 흘리거나, 그 흐름을 조절할 수 있거나, 그 흐름을 프로그래밍할 수 있는 레귤레이터형의 이식형 펌프가 포함될 수 있다.

[0169] 본 발명의 전달 디바이스에 사용되는 신경보호 폴리펩티드(들) 또는 방출 제어형 제제의 양은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 치료 유효량의 제제를 전달하는 데 필요한 양이다. 실제로, 이는, 예를 들어, 특정 제제, 전달 부위, 병태의 중증도, 및 원하는 치료 효과와 같은 변수들에 따라 달라지게 된다. 일반적으로, 삼투 전달 디바이스의 경우, 신경보호 폴리펩티드(들) 또는 방출 제어형 제제를 포함하는 유익체 챔버(beneficial agent chamber)의 체적은 약 100 μ l 내지 약 1000 μ l(예를 들어, 약 120 μ l 내지 약 500 μ l, 또는 약 150 μ l 내지 약 200 μ l)이다.

[0170] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 삼투 전달 디바이스는 대상체 내에, 예를 들어, 피하 이식된다. 디바이스(들)는 양팔 중 어느 하나 또는 둘 모두에 (예를 들어, 상완의 안 쪽, 바깥 쪽, 또는 뒷 쪽에) 삽입되거나 복부 내에 삽입될 수 있다. 예를 들어, 디바이스는 갈비뼈 아래 및 허리선 위로 연장되는 영역에서의 복부 피하에 이식될 수 있다. 복부 내에 하나 이상의 삼투 전달 디바이스를 삽입하기 위한 다수의 위치를 제공하기 위해서, 복벽을 다음과 같이 4개의 4분면으로 분할할 수 있다: 오른쪽 갈비뼈 아래로 5~8 센티미터 및 중간 선 오른쪽으로 약 5~8 센티미터 연장되는 우상단 4분면; 허리선 위로 5~8 센티미터 및 중간 선 오른쪽으로 5~8 센티미터 연장되는 우하단 4분면; 왼쪽 갈비뼈 아래로 5~8 센티미터 및 중간 선 왼쪽으로 약 5~8 센티미터 연장되는 좌상단 4분면; 허리선 위로 5~8 센티미터 및 중간 선 왼쪽으로 5~8 센티미터 연장되는 좌하단 4분면. 이는 하나 이상의 디바이스를 한 번 이상의 경우에 이식할 수 있는 다수의 위치를 제공한다.

[0171] 다른 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하거나 신경보호 폴리펩티드를 지속 방출하는 단계는 대상체에서 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 병태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون병, 만성 외상성 뇌병변, 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 루이소체 치매(DB), 혼합형 치매, 전측두엽 치매, 크로이츠펠트 야곱병, 정상 뇌압 수두증, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 CNS 관련 병태의 적어도 하나의 증상을 완화시킨다.

[0172] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하거나 신경보호 폴리펩티드를 서방형 방출에 의해 제공하는 단계는, 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다.

[0173] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하거나, 신경 보호 폴리펩티드를 서방형 방출에 의해 제공하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에서 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.

신경보호 폴리펩티드

[0175] 신경보호 폴리펩티드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 가질 수 있다: 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열 번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열 번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열 번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열

번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 또는 서열번호 55. 신경보호 폴리펩티드는 서열번호 1~55로부터 선택된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 신경보호 폴리펩티드는 서열번호 1~55로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0176] "GLP-1 또는 엑센딘-4의 유사체"는 작용제 특성을 나타내는 (즉, GLP-1 또는 엑센딘-4의 하나 이상의 생물학적 활성을 나타내는) 변형된 GLP-1 및/또는 엑센딘 아미노산 서열을 의미한다. 이러한 변형은 GLP-1에 존재하는 하나 이상의 아미노산 잔기 및 엑센딘-4에 존재하는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 포함한다. 변형은 또한 GLP-1 또는 엑센딘-4 또는 키메라 폴리펩티드의 절단을 포함한다. 예를 들어, 절단된 키메라 폴리펩티드는 위치 36에서의 G가 GLP-1의 위치 36에서의 R로 대체된 엑센딘-4 7~36이다. 본 개시의 폴리펩티드는 GLP-1 또는 엑센딘-4와 비교하여, 하나 이상의 추가 아미노산(삽입 또는 추가), 아미노산의 결실, 또는 GLP-1 또는 엑센딘-4의 아미노산 서열에서의 치환을 기능성 활성의 주목할 만한 손실 없이 포함한다. 예를 들어, 결실은 현재 정의된 분화 활성에 대한 비필수 아미노산으로 이루어질 수 있고, 치환(들)은 보존적(즉, 동일하게 치환된 염기성, 친수성 또는 소수성 아미노산)이거나 비보존적일 수 있다. 보존적 치환은 치환된 아미노산이 기준 서열 내의 상응하는 아미노산과 유사한 구조적 또는 화학적 특성을 갖는 것이다. 예로서, 보존적 아미노산 치환은 지방족 또는 소수성 아미노산(예: 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신)과 또 다른 것과의 치환; 히드록실 함유 아미노산(예: 세린 및 쓰레오닌)과 또 다른 것과의 치환; 하나의 산 잔기(예: 글루타민산 또는 아스파르트산)와 또 다른 것과의 치환; 하나의 아미드 함유 잔기(예: 아스파라긴 및 글루타민)와 또 다른 것과의 대체; 하나의 방향족 잔기(예: 페닐알라닌 및 쓰레오닌)와 또 다른 것과의 대체; 하나의 염기성 잔기(예: 리신, 아르기민 및 히스티딘)와 또 다른 것과의 대체; 및 하나의 소아미노산(예: 알라니, 세린, 쓰레오닌, 메티오닌, 및 글리신)의 또 다른 것과의 대체를 포함한다. 따라서, 원하는 경우, GLP-1 및 엑센딘-4의 아미노산 서열에서 변형과 변경이 이루어질 수 있고, 유사한 특성을 갖는 단백질이 여전히 수득될 수 있는 것을 이해된다. GLP-1 또는 엑센딘-4 아미노산 서열(또는 기저 핵산 서열)에서의 다양한 변화가 생물학적 유용성이나 활성의 상당한 손실없이, 가능하게는 이러한 유용성이나 활성을 증가시키면서 이루어질 수 있다.

[0177] 실질적으로 이들에 상동인 아미노산 서열을 갖는 GLP-1 또는 엑센딘-4 또는 폴리펩티드와 관련하여 본원에서 사용된 바와 같은 "단편" 또는 "절단부"라는 용어는, 이들에 실질적으로 상동인 아미노산 서열을 갖는 GLP-1, 엑센딘-4 또는 폴리펩티드의 적어도 5개의 인접 아미노산의 폴리펩티드 서열을 의미하며, 여기서 폴리펩티드 서열은 인슐린분비 기능(insulinotropic)을 갖는다.

[0178] 다른 변형은, 아미노산 잔기의 적어도 하나의 자연 발생 L-구조가 아미노산 잔기의 D-구조로 대체되는 D-거울상 이성질체(D-enantiomers)를 포함한다.

[0179] 본 발명은 측면 스페이서와 같은 스페이서의 사용을 고려한다. 용어 "측방향 스페이서"는 화학 결합에 의해 아미노산 서열 내에 통합되는 화합물로서, 아미노산 서열의 위치 또는 그 근처에서 (예를 들어, DPP 1V에 의한) 아미노산 서열의 절단을 감소시키거나 제거하기 위해 2개 이상의 아미노산 잔기 사이의 거리를 증가시키는 것인 화합물로서 정의된다. 예를 들어, A와 B가 아미노산 잔기이고 X는 측방향 스페이서인 서열 A-X-B에서는, 측방향 스페이서가 없는 서열(A-B)과 비교할 때, 효소에 의한 서열의 절단이 감소되거나 제거된다. 예를 들어, 1 내지 4개의 화합물이 측방향 스페이서로서 아미노산 서열에 통합될 수 있다. 따라서, 1, 2, 3, 또는 4개의 화합물이 다양한 실시예에서 삽입된다.

[0180] 일반적으로, 측면 스페이서는 아미노산과 펩티드 결합을 형성할 수 있는 임의의 화합물이며, 적어도 하나의 아미노기 및 적어도 하나의 카르복실기(CO_2)를 함유한다(카르복실기는 카르복실산 또는 그의 에스테르 또는 염일 수 있음). 일 실시예에서, 측면 스페이서는 화학식 $\text{H}_2\text{N}-\text{R}^1-\text{CO}_2\text{H}$ (I)를 가지며, 여기서 R^1 은 치환되거나 미치환된 분지형 또는 직쇄 C_1 내지 C_{20} 알킬기, 알케닐기, 또는 알키닐기; 치환되거나 미치환된 C_3 내지 C_8 시클로알킬기; 치환되거나 미치환된 C_6 내지 C_{20} 아릴기; 또는 치환되거나 미치환된 C_4 내지 C_{20} 헤테로아릴기를 포함한다. 또 다른 실시예에서, R^1 은 화학식 $(\text{CH}_2)_n$ 으로 제시될 수 있으며, 여기서 n 은 1 내지 10이다. 일 실시예에서, R^1 은 $(\text{CH}_2)_3$ (3-아미노프로피온산) 또는 $(\text{CH}_2)_5$ (6-아미노헥사논산)이다.

[0182] 본 발명은 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하는 방출 제어형 제제를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 폴리펩티드는, GLP-1의 잔기 7 및 8 (Aha 스페이서가 있는 GLP-1의 경우, 예를 들어 "GLP-1

Aha⁸"로 지정됨) 또는 잔기 8 및 9 (Aha 스페이서가 있는 GLP-1의 경우, 예를 들어, "GLP-1Aha⁹"로 지정됨)에 필적하는 아미노산 잔기 사이의 스페이서를 갖는, 변형된 GLP-1 또는 엑센딘(예컨대 엑센딘-4) 서열, 또는 그의 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 측면 스페이서는, 일 실시예에서는 하나 이상의 아미노프로프리온산 (aminopropionic acid) 잔기이다. 일 실시예에서, 스페이서는 6-아미노헥사논산(6-aminohexanoic acid) 스페이서이며, 6-아미노헥사논산 스페이서는 4개 미만의 6-아미노헥사논산 잔기를 포함한다. 폴리펩티드는, 예를 들어, 잔기 7 및 8 사이에서 하나 이상의 6-아미노헥사논산 잔기를 갖는 GLP-1 7~36 (GLP-1 Aha⁸)을 포함하거나, 잔기 8 및 9 사이에서 하나 이상의 6-아미노헥사논산 잔기를 갖는 GLP-1 7~36을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는, 예를 들어, 잔기 7 및 8 사이에서 둘 이상의 6-아미노헥사논산 잔기를 갖는 GLP-1 7~36 (GLP-1 Aha⁸)을 포함하거나, 잔기 8 및 9 사이에서 둘 이상의 6-아미노헥사논산 잔기를 갖는 GLP-1 7~36을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는, 예를 들어, 잔기 7 및 8 사이에서 3개 이상의 6-아미노헥사논산 잔기를 갖는 GLP-1 7~36 (GLP-1 Aha⁸)을 포함하거나, 잔기 8 및 9 사이에서 3개 이상의 6-아미노헥사논산 잔기를 갖는 GLP-1 7~36을 포함할 수 있다.

[0183]

다른 실시예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 GLP-1의 등몰량의 효과에 필적하는 인슐린분비 효과(insulinotropic effect)를 갖거나, 일 실시예에서는, 엑센딘-4의 등몰량의 효과에 필적하는 인슐린분비 효과를 갖는다. "효과에 필적하는(comparable to the effect)"이란, GLP-1 또는 엑센딘-4의 효과의 약 10~15% 이내의 효과를 의미한다. 또 다른 실시예에서, 폴리펩티드는 GLP-1 또는 엑센딘-4의 인슐린분비 효과를 초과하는 인슐린분비 효과를 갖는다. GLP-1 또는 엑센딘-4의 "효과를 초과하는"이란, GLP-1 또는 엑센딘-4와 비교하여 인슐린분비 효과가 증가하는 것, 예컨대 GLP-1 또는 엑센딘-4의 효과의 약 10% 보다 더 크게 증가하는 것을 의미한다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 GLP-1 또는 엑센딘-4만큼 강력하며, 또 다른 실시예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 GLP-1보다 더 강력하며, 선택적으로, 엑센딘-4보다 더 강력하다. 다른 실시예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 GLP-1보다 더 장기 지속성이다. 다른 실시예에서, 폴리펩티드는 적어도 엑센딘-4만큼 장기 지속성이다. 다른 실시예에서, 폴리펩티드는 엑센딘-4보다 더 장기 지속성이다. "더 장기 지속성"이란, 폴리펩티드가 적어도 하나의 분해 효소에 대해 GLP-1이나 엑센딘-4보다 더 내성이 있음을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 효소 디펩티딜 펩티다아제-4(DPPIV)에 의한 분해에 대해 GLP-1보다 더 내성이 있으며, 선택적으로는, 엑센딘-4보다 더 내성이 있다. 하나 이상의 분해 효소에 대한 이러한 내성을 분해 산물의 양 (예를 들어, N-말단 분해 산물의 양) 또는 절단되지 않은 폴리펩티드의 양을 검출함으로써 직접 평가할 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 분해 효소에 대한 내성을 본 발명의 폴리펩티드를 투여한 후 시간에 따른 인슐린분비 효과의 감소를 평가함으로써 간접적으로 검출할 수 있다. 예를 들어, 분해 효소가 본 개시의 폴리펩티드를 절단함에 따라, 플라즈마 인슐린 수준은 1회 투여 후에는 반드시 감소한다. 추가 실시예에서, 이러한 감소는 GLP-1의 경우보다 느리고/느리거나 엑센딘-4보다 훨씬 더 느릴 수 있다.

[0184]

본 발명의 폴리펩티드는 용액 방법 및 고상 방법을 포함하여 당업자에게 잘 알려진 다수의 화학적 폴리펩티드 합성 기술 중 임의의 것을 사용하여 제조할 수 있다. 폴리펩티드 서열의 C-말단 아미노산이 불용성 지지체에 부착된 후 서열 중의 잔여 아미노산을 순차적으로 첨가하는 고상 합성은 폴리펩티드를 제조하기 위한 하나의 합성 방법이다. 고상 합성을 위한 기술은 Merrifield 등에 의해 *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156 (1963)에 기술되어 있다. 고상 펩티드 합성을 수행하기 위한 많은 자동화 시스템이 상업적으로 이용 가능하다.

[0185]

고상 합성은, 보호된 아미노산을 이의 카르복실기를 통해 적절한 고체 지지체에 결합시킴으로써, 폴리펩티드의 카르복시-말단 단부(C-말단)에서 시작된다. 사용된 고체 지지체가 펩티드 합성 절차에서 사용되는 시약에 대해 실질적으로 불활성인 상태를 유지하면서 카르복실기에 결합할 수 있다면, 고체 지지체는 중요한 특징부가 아니다. 예를 들어, 시작 물질은 아미노-보호 아미노산을 벤질 에스테르 연결을 통해 클로로메틸화 수지 또는 히드록시메틸 수지에 부착시키거나, 아미드 결합을 통해 벤즈하이드로알라민(BHA) 수지 또는 p-메틸벤즈하이드로알라민(MBHA) 수지에 부착하여 제조할 수 있다. 고체 지지부로서 사용하기에 적합한 물질은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 다음을 포함하되, 이에 한정되지 않는다: 할로메틸 수지, 예컨대 클로로메틸 수지 또는 브로모메틸 수지; 하이드록시메틸 수지; 폐놀 수지, 예컨대 4-(a-[2,4-디메톡시페닐]-Fmoc-아미노메틸)페녹시 수지; tert-알킬옥시카르보닐-수화 수지; 등. 이러한 수지는 상업적으로 이용할 수 있으며 그들의 제조 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0186]

펩티드의 산 형태는 고체 지지체로서 벤질 에스테르 수지를 사용하는 고상 펩티드 합성 절차에 의해 제조할 수 있다. 상응하는 아미드는 벤즈하이드릴아민 수지나 메틸벤즈하이드릴아민 수지를 고체 지지체로서 사용하여 제조할 수 있다. 당업자는 BHA 또는 MBHA 수지가 사용될 때, 고체 지지체로부터 펩티드를 절단하기 위한 무수 불

화수소산으로 처리하면 말단 아미드기를 갖는 펩티드가 생성된다는 것을 인식할 것이다.

[0187] 합성에 사용된 각 아미노산의 α -아미노기는 반응성 α -아미노 기능을 수반하는 측면 반응을 방지하기 위해 결합 반응 동안 보호되어야 한다. 특정 아미노산은 또한 반응성 측쇄 작용기(예: 셀프히드릴, 아미노, 카르복실, 하이드록실, 등)를 함유하는데, 이들도 펩티드 합성 동안 화학 반응이 이들 부위에서 발생하는 것을 방지하기 위해 적절한 보호기로 보호되어야 한다. 보호기는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3: Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis* (Gross and Meienhofer (eds.), Academic Press, N.Y. (1981))을 참조한다.

[0188] 적절하게 선택된 α -아미노 보호기는: 결합 반응 동안 α -아미노 기능을 불활화시킬 것이고; 측쇄 보호기가 제거되지 않는 조건 하에서 결합 후 쉽게 제거될 수 있을 것이고; 펩티드 단편의 구조를 변경시키지 않을 것이며; 결합 직전에 활성화될 때 라세미화를 방지할 것이다. 유사하게, 측쇄 보호기는, 합성 동안 측쇄 작용기를 불활화시키도록 선택되어야 하고; α -아미노 보호기를 제거하는 데 사용된 조건 하에서 안정해야 하며; 펩티드 합성을 완료한 후에는 펩티드의 구조를 변화시키지 않는 조건 하에서 제거 가능해야 한다.

[0189] 아미노산의 결합은 당업자에게 공지된 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 통상적인 접근법은: 카르복실기가 펩티드 단편의 유리 N-말단 아미노기와 더 잘 반응하도록, 아미노산을 유도체로 전환시키는 것; 또는 예를 들어 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC) 또는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 (DIPCDI)와 같은 적합한 결합제의 사용하는 것을 포함한다. 빈번하게, 히드록시벤조트리아졸(HOBt)이 이들 결합 반응에서 촉매로서 사용된다.

[0190] 일반적으로, 펩티드의 합성은 우선, 플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc)과 같은 보호기에 의해 N-아미노 위치에서 보호되는 C-말단 아미노산을 고체 지지체에 결합시킴으로써 시작된다. Fmoc-Asn의 결합에 앞서, Fmoc 잔기가 중합체로부터 제거되어야 한다. Fmoc-Asn은, 예를 들어, N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(DCC) 및 하이드록시벤조트리아졸(HOBt)을 사용하여 약 25°C에서 약 2시간 동안 교반함으로써 4-(α -[2,4-디메톡시페니1]-Fmoc-아미노-메틸)페녹시 수지에 결합시킬 수 있다. Fmoc 보호 아미노산을 수지 지지대에 결합시킨 후, DMF 중의 20% 피페리딘을 사용하여 α -아미노 보호기를 실온에서 제거한다.

[0191] α -아미노 보호기를 제거한 후, 잔여 Fmoc 보호 아미노산을 원하는 순서대로 단계적으로 결합시킨다. 적절하게 보호된 아미노산은 다수의 공급자로부터 상업적으로 이용할 수 있다(예: Novartis(스위스) 또는 바肯(캘리포니아주 토렌스)). 개별 아미노산을 단계적으로 첨가하는 것에 대한 대안으로서, 둘 이상의 아미노산으로 이루어진 적절하게 보호된 펩티드 단편을 "성장하는" 펩티드에 결합시킬 수 있다. 전술한 바와 같이, 적절한 결합제를 선택하는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0192] 보호된 각각의 아미노산 또는 아미노산 서열은 과량으로 고상 반응기 내로 도입되며, 결합은 디메틸포름아미드 (DMF), 메틸렌 염화물(CH_2Cl_2), 또는 이들의 혼합물로 이루어진 배지에서 수행된다. 결합이 불완전한 경우, N-아미노기의 탈보호 및 다음 아미노산의 첨가 전에 결합 반응이 반복될 수 있다. 결합 효율은 당업자에게 잘 알려진 다수의 수단에 의해 모니터링될 수 있다. 결합 효율을 모니터링하는 방법은 닌하이드린 반응에 의한 것일 수 있다. 펩티드 합성 반응은 Biosearch 9500TM 합성기(Biosearch, San Raphael, CA)와 같은 상업적으로 입수 가능한 펩티드 합성기를 사용해 자동으로 수행될 수 있다.

[0193] 선택된 보호기에 따라, 약 20분 내지 90분 동안, 또는 고체 상 합성에 사용된 반응 컬럼 내부에서 고체 지지체를 사용하여 약 30 내지 60분 동안 사용되는 반응 컬럼 내부에서 고체 지지체를 배양함으로써 펩티드를 절단할 수 있고, 보호기는, 약 20분 내지 90분 동안, 무수 담체 또는 고체 지지체를 무수, 불용성 담체 또는 고체 지지체를 교반함으로써 제거될 수 있다. 당업자에게 잘 알려진 다른 탈보호 방법이 또한 사용될 수 있다.

[0194] 펩티드는 당업자에게 공지된 펩티드 정제에 의해 반응 혼합물로부터 단리되고 정제될 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 역상 HPLC, 젤 투과율, 이온 교환, 크기 배제, 친화도, 구획부 또는 역상 분포와 같은 공지된 크로마토그래피 절차를 사용하여 정제될 수 있다.

[0195] 신경보호 폴리펩티드는 또한, 예를 들어 재조합 기술을 포함하는 다른 수단에 의해 제조될 수 있다. 적절한 클로닝 및 시퀀싱 기술, 그리고 많은 클로닝 연습을 통해 기술자를 지시하기에 충분한 지침은 Sambrook 외 (1989) *Molecular Cloning -A Laboratory Manual* (2판) Vol 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook)에서 찾을 수 있다.

[0196] 예를 들어, 방출 제어형 제제에 사용되는 엑센딘 유도체 또는 유도체들은 화학식 I, 또는 그의 약학적으로 허용

가능한 다음의 염으로 나타나는 화합물일 수 있다:

[0197] Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 -Z₁, Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 -Z₁,

(화학식 I)

[0199] (여기서:

[0200] Xaa1은 His, Arg, Tyr, Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 4-이미다조프로피오닐 이고;

[0201] Xaa2는 Ser, Gly, Ala, 또는 Thr이고;

[0202] Xaa3은 Ala, Asp, 또는 Glu이고;

[0203] Xaa4는 Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 Gly이고;

[0204] Xaa5는 Ala 또는 Thr이고;

[0205] Xaa6은 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;

[0206] Xaa7은 Thr 또는 Ser이고;

[0207] Xaa8은 Ala, Ser, 또는 Thr이고;

[0208] Xaa9는 Ala, Norval, Val, Norleu, Asp, 또는 Glu이고;

[0209] Xaa10은 Ala, Leu, Ile, Val, 펜틸글리신, 또는 Met이고;

[0210] Xaa11은 Ala 또는 Ser이고;

[0211] Xaa12는 Ala 또는 Lys이고;

[0212] Xaa13은 Ala 또는 Gln이고;

[0213] Xaa14는 Ala, Leu, Ile, 펜틸글리신, Val, 또는 Met이고;

[0214] Xaa15는 Ala 또는 Glu이고;

[0215] Xaa16은 Ala 또는 Glu이고;

[0216] Xaa17은 Ala 또는 Glu이고;

[0217] Xaa19는 Ala 또는 Val이고;

[0218] Xaa20은 Ala, 또는 Arg이고;

[0219] Xaa21은 Ala, Leu, 또는 Lys-NHe-R이고(여기서 R은 Lys, Arg, 또는 C1-C10 직쇄 또는 분지형 알카노일임);

[0220] Xaa22는 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;

[0221] Xaa23은 Ile, Val, Leu, 펜틸글리신, tert-부틸글리신, 또는 Met이고;

[0222] Xaa24는 Ala, Glu, 또는 Asp이고;

[0223] Xaa25는 Ala, Trp, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;

[0224] Xaa26은 Ala 또는 Leu이고;

[0225] Xaa27은 Ala 또는 Lys이고;

[0226] Xaa28은 Ala 또는 Asn이고;

[0227] Z₁은 -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly-Z₂, Gly Xaa31-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37-Z₂,

Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38-Z₂, 또는 Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38 Xaa39-Z₂이고,

[0228] Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38은 Pro, 호모프롤린(homoproline), 3Hyp, 4Hyp, 티오프롤린(thioproline), N-알킬글리신, N-알킬펜틸글리신, 또는 N-알킬알라닌으로 이루어진 군으로부터 독립하여 선택되고, Xaa39는 Ser, 또는 Tyr(예: Ser)이며,

[0229] Z₂는 -OH, 또는 -NH₂임.

[0230] 단,

[0231] Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, 및 Xaa28 중 3개 이하는 Ala이고;

[0232] Xaa1이 His, Arg, 또는 Tyr일 때, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나는 Ala임).

[0233] 일부 실시예에서, N-알킬글리신, N-알킬펜틸글리신, 및 N-알킬알라닌에 대한 N-알킬기는 더 낮은 알킬기, 예컨대, 1 내지 약 6개의 탄소 원자 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 화학식 I에 의해 대표되는 화합물은 실시예 1 내지 89에서 식별된 화합물(각각 화합물 1 내지 89), 및 "Novel Exendin Agonist Compounds"라는 명칭으로 1998년 11월 13일에 출원된 PCT 출원 일련번호 PCT/US98/24273에서의 실시예 104 및 105에서 식별된 상응하는 화합물을 포함할 수 있으며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0234] 특정 실시예에서, 화학식 I의 엑센딘 유도체는 화학식 I의 Xaa1이 His, Ala, Norval, 또는 4-이미다조프로피오닐인 것을 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 화학식 I의 Xaa1은 His, Ala, 또는 4-이미다조프로피오닐이다. 추가 실시예에서, 화학식 I의 Xaa1은 His 또는 4-이미다조프로피오닐이다.

[0235] 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa2가 Gly인 것일 수 있다.

[0236] 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa3이 Ala인 것일 수 있다.

[0237] 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa4가 Ala인 것일 수 있다.

[0238] 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa9가 Ala인 것일 수 있다.

[0239] 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa14가 Leu, 펜틸글리신, 또는 Met인 것들일 수 있다.

[0240] 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa21이 Lys-NH₂-R이고, R이 Lys, Arg, 또는 C₁-C₁₀ 직쇄 또는 분지형 알카놀인 것들일 수 있다.

[0241] 일 실시예에서, 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa25가 Trp 또는 Phe인 것들일 수 있다.

[0242] 또 다른 실시예에서, 화학식 I의 엑센딘 유도체는 Xaa6이 Ala, Phe, 또는 나프틸알라닌이고, Xaa22가 Phe 또는 나프틸알라닌이고, Xaa23은 Ile 또는 Val인 것들일 수 있다. 또한, 화학식 I의 엑센딘 유도체는: Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38이 Pro, 호모프롤린, 티오프롤린 및 N-알킬알라닌으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; Z₁이 -NH₂일 수 있고; 및 Z₂는 -NH₂일 수 있는 것들일 수 있다.

[0243] 다른 실시예에서, 화학식 I의 엑센딘 유도체는: Xaa1이 Ala, His, 또는 Tyr이고(예: Ala 또는 His); Xaa2가 Ala 또는 Gly이고; Xaa6이 Phe 또는 나프틸알라닌이고; Xaa14가 Ala, Leu, 펜틸글리신, 또는 Met이고; Xaa22가 Phe 또는 나프틸알라닌이고; Xaa23이 Ile 또는 Val이고; Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38이 Pro, 호모프롤린, 티오프롤린, 및 N-알킬알라닌으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; Xaa39이 Ser 또는 Tyr(예: Ser)이며; Z₁은 -NH₂일 수 있는 것들일 수 있다.

[0244] 일 실시예에 따르면, 화학식 I의 엑센딘 유도체는: Xaa1이 His 또는 Ala이고; Xaa2가 Gly 또는 Ala이고; Xaa3이 Ala, Asp 또는 Glu이고; Xaa4가 Ala 또는 Gly이고; Xaa5가 Ala 또는 Thr이고; Xaa6이 Phe 또는 나프틸알라닌이고; Xaa7이 Thr 또는 Ser이고; Xaa8이 Ala, Ser, 또는 Thr이고; Xaa9가 Ala, Asp, 또는 Glu이고; Xaa10이 Ala, Leu, 또는 펜틸글리신이고; Xaa11이 Ala 또는 Ser이고; Xaa12가 Ala 또는 Lys이고; Xaa13이 Ala 또는 Gln이고; Xaa14가 Ala, Leu, Met, 또는 펜틸글리신이고; Xaa15가 Ala 또는 Glu이고; Xaa16이 Ala 또는 Glu이고; Xaa17이 Ala 또는 Glu이고; Xaa19가 Ala 또는 Val이고; Xaa20이 Ala 또는 Arg이고; Xaa21이 Ala 또는 Leu이고; Xaa22가 Phe 또는 나프틸알라닌이고; Xaa23이 Ile, Val, 또는 tert-부틸글리신이고; Xaa24가 Ala, Glu, 또는 Asp이고;

Xaa25가 Ala, Trp, 또는 Phe이고; Xaa26이 Ala 또는 Leu이고; Xaa27이 Ala 또는 Lys이고; Xaa28이 Ala 또는 Asn이고; Z₁이 -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly Gly-Z₂, Gly Gly Xaa31-Z₂, Gly Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Gly Xaa31 Ser Ser-Z₂, Gly Gly Xaa31 Ser Ser Gly-Z₂, Gly Gly Xaa31 Ser Ser Gly Ala-Z₂, Gly Gly Xaa31 Ser Ser Gly Ala Xaa36-Z₂, Gly Gly Xaa31 Ser Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37-Z₂, Gly Gly Xaa31 Ser Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38-Z₂, 또는 Gly Gly Xaa31 Ser Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38 Xaa39-Z₂이고; Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38이 독립적으로 Pro, 호모프롤린, 티오프롤린, 또는 N-메틸알라닌이고; Xaa39가 Ser 또는 Tyr(예: Ser)이며; Z₂가 -OH 또는 -NH₂이며, 단, Xaa3, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, 및 Xaa28 중 적어도 3개 이하가 Ala이고, Xaa1이 His, Arg, 또는 Tyr일 때, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나가 Ala일 수 있는 것들일 수 있다.

[0245] 추가 실시예에서, 화학식 I의 화합물은 PCT 출원 일련번호 PCT/US98/25728에 제시된 서열번호 5 내지 93의 아미노산 서열을 갖는 것들, 또는 미국 출원 제60/066,029호에 제시된 것들을 포함할 수 있으며, 본 참고 문헌들은 참조로서 본원에 통합된다.

[0246] 일 실시예에 따르면, Xaa14가 Leu, Ile, Val, 또는 펜틸글리신(예를 들어, Leu 또는 펜틸글리신)이고; Xaa25는 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌(예를 들어, Phe 또는 나프틸알라닌)인 화합물이 제공된다. 이들 화합물은 시험관 내 및 생체 내 둘 다에서 뿐만 아니라 화합물의 합성 도중에 산화의 의한 분해에 덜 민감할 것이다.

[0247] 또 다른 양태에서, 엑센딘 유도체는 화학식 II로 표시되는 화합물, 또는 그들의 약학적으로 허용 가능한 다음의 염들을 포함할 수 있다:

[0248] Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 X₁-Z₁,

[0249] (화학식 II)

[0250] (여기서:

[0251] Xaa1은 His, Arg, Tyr, Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 4-아미다조프로피오닐이고;

[0252] Xaa2는 Ser, Gly, Ala, 또는 Thr이고;

[0253] Xaa3은 Ala, Asp, 또는 Glu이고;

[0254] Xaa4는 Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 Gly이고;

[0255] Xaa5는 Ala 또는 Thr이고;

[0256] Xaa6은 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;

[0257] Xaa7은 Thr 또는 Ser이고;

[0258] Xaa8은 Ala, Ser, 또는 Thr이고;

[0259] Xaa9는 Ala, Norval, Val, Norleu, Asp, 또는 Glu이고;

[0260] Xaa10은 Ala, Leu, Ile, Val, 펜틸글리신, 또는 Met이고;

[0261] Xaa11은 Ala 또는 Ser이고;

[0262] Xaa12는 Ala 또는 Lys이고;

[0263] Xaa13은 Ala 또는 Gln이고;

[0264] Xaa14는 Ala, Leu, Ile, 펜틸글리신, Val, 또는 Met이고;

[0265] Xaa15는 Ala 또는 Glu이고;

[0266] Xaa16은 Ala 또는 Glu이고;

[0267] Xaa17은 Ala 또는 Glu이고;

[0268] Xaa19는 Ala 또는 Val이고;

- [0269] Xaa20은 Ala, 또는 Arg이고;
- [0270] Xaa21은 Ala, Leu, 또는 Lys-NH_ε-R^ο이고(여기서, R은 Lys, Arg, C1-C10 직쇄 또는 분지형 알카노일, 또는 시클로알킬-알카노일임);
- [0271] Xaa22는 Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0272] Xaa23은 Ile, Val, Leu, 펜틸글리신, tert-부틸글리신, 또는 Met이고;
- [0273] Xaa24는 Ala, Glu, 또는 Asp이고;
- [0274] Xaa25는 Ala, Trp, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0275] Xaa26은 Ala 또는 Leu이고;
- [0276] X₁은 Lys Asn, Asn Lys, Lys-NH_ε-R Asn, Asn Lys-NH_ε-R, Lys-NH_ε-R Ala, Ala Lys-NH_ε-R^ο이고(여기서 R은 Lys, Arg, C1-C10 직쇄 또는 분지형 알카노일, 또는 시클로알카노일임);
- [0277] Z₁은 -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly-Xaa31-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38-Z₂, 또는 Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38 Xaa39-Z₂^ο이며;
- [0278] Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38은 Pro, 호모프롤린, 3Hyp, 4Hyp, 티오프롤린, N-알킬글리신, N-알킬펜틸글리신 및 N-알킬알라닌으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, Xaa39는 Ser 또는 Tyr이며;
- [0279] Z₂는 -OH, 또는 -NH₂임.
- [0280] 단,
- [0281] Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, and Xaa26 중 3개 이하는 Ala이며;
- [0282] Xaa1이 His, Arg, Tyr, 또는 4-이미다조프로피오닐일 때, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나는 Ala임).
- [0283] 특정 실시예에서, 화학식 II의 엑센딘 유도체는, Xaa1이 His, Ala, Norval, 또는 4-이미다조프로피오닐인 것들(예를 들어, Xaa1이 His, 4-이미다조프로피오닐, 또는 Ala를 포함하거나, Xaa1이 His, 또는 4-이미다조프로피오닐을 포함함)을 포함할 수 있다.
- [0284] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa2가 Gly인 것들일 수 있다.
- [0285] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa4가 Ala인 것들일 수 있다.
- [0286] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa9가 Ala인 것들일 수 있다.
- [0287] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa14가 Leu, 펜틸글리신, 또는 Met인 것들일 수 있다.
- [0288] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa25가 Trp 또는 Phe인 것들일 수 있다.
- [0289] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa6가 Ala, Phe, 또는 나프틸알라닌이고, Xaa22가 Phe 또는 나프틸알라닌이고, Xaa23은 Ile 또는 Val인 것들일 수 있다.
- [0290] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Z₁이 -NH₂인 것들일 수 있다.
- [0291] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38이 Pro, 호모프롤린, 티오프롤린 및 N-알킬알라닌으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것들일 수 있다.
- [0292] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa39가 Ser 또는 Tyr(예를 들어, Ser)인 것들일 수 있다. 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Z₂가 -NH₂인 것들일 수 있다.
- [0293] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Z₁이 -NH₂인 것들일 수 있다.
- [0294] 화학식 II의 엑센딘 유도체는 Xaa21이 Lys-NH_ε-R(R은 Lys, Arg, 또는 C1-C10 직쇄 또는 분지형 알카노일임)인

것들일 수 있다.

[0295] 화학식 II의 엑센딘 유도체는, X1이 Lys Asn, Lys-NH₂-R Asn, 또는 Lys-NH₂-R Ala(R은 Lys, Arg, 또는 C1-C10 칙쇄 또는 분지형 알카노일임)인 것들일 수 있다.

[0296] 추가 실시예에서, 화학식 II의 엑센딘 유도체는 WO99/025728에 기재된 서열번호 95~110으로서 식별된 아미노산 서열을 갖는 화합물을 포함할 수 있다. 화학식 II의 엑센딘 유도체는 "Novel Exendin Agonist Compounds"라는 명칭으로 1998년 11월 13일에 출원된 PCT 출원 PCT/US98/24210에 기술된 바와 같은, 서열번호 5~93으로서 식별된 아미노산 서열을 갖는 화합물을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 화학식 II의 엑센딘 유도체는 WO99/007404에 제시된 서열번호 37~40으로서 식별된 아미노산 서열을 갖는 화합물을 포함할 수 있다. 상기 문헌은 본원에 참조로서 통합된다.

[0297] 화학식 I 및 II에 사용된 약어는 다음을 나타낸다.

[0298] "ACN" 및 "CH₃CN"은 아세토니트릴을 지칭한다.

[0299] "Boc", "tBoc" 및 "Tboc"는 t-부톡시 카르보닐을 지칭한다.

[0300] "DCC"는 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드를 지칭한다.

[0301] "Fmoc"는 플루오레닐메톡시카르보닐을 지칭한다.

[0302] "HBTU"는 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3,-테트라메틸루로늄 헥사플루오로포스페이트를 지칭한다.

[0303] "HOBT"는 1-하이드록시벤조트리아졸 일수화물을 지칭한다.

[0304] "homoP" 및 "hPro"는 호모프롤린(homoproline)을 지칭한다.

[0305] "MeAla" 및 "Nme"은 N-메틸알라닌을 지칭한다.

[0306] "naph"는 나프틸알라닌을 지칭한다.

[0307] "pG" 및 "pGly"는 펜틸글리신을 지칭한다.

[0308] "tBug"는 삼차-부틸글리신을 지칭한다.

[0309] "ThioP" 및 "tPro"는 티오프롤린을 지칭한다.

[0310] "3Hyp"는 3-하이드록시프롤린을 지칭한다.

[0311] "4Hyp"는 4-하이드록시프롤린을 지칭한다.

[0312] "NAG"는 N-알킬글리신을 지칭한다.

[0313] "NAPG"는 N-알킬펜틸글리신을 지칭한다.

[0314] "Norval"은 노르발린을 지칭한다.

[0315] 일 실시예에서, 엑센딘 단편 또는 유도체는 아미드기와 치환되거나 미치환된 C-말단을 가질 수 있으며, 엑센딘-4(1-28)(서열번호 15), 엑센딘-4(1-28) 아미드, 엑센딘-4(1-30)(서열번호 7), 엑센딘-4(1-30) 아미드, 엑센딘-4(1-31)(서열번호: 54), 엑센딘-4(1-31) 아미드, ¹⁴Leu²⁵Phe 엑센딘-4(서열번호 55), ¹⁴Leu²⁵Phe 엑센딘-4 아미드, 및 그들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

방출 제어형 제제

[0317] 다른 실시예에 따르면, 방출 제어형 조성물 또는 마이크로 스피어는 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체를 활성 성분으로서 포함할 수 있으며, 그 양은 엑센딘(예: 엑센딘-4), GL-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체(예: 엑센딘-4 유사체), 생분해성 중합체 및 코팅 물질을 포함하는 조성물 또는 마이크로 스피어의 100 중량%를 기준으로 약 0.1 내지 약 10 중량%(예컨대, 약 0.8 내지 약 6 중량%)이다. 예를 들어, 방출 제어형 조성물 또는 마이크로 스피어는 엑센딘, GLP-1, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체, 생분해성 중합체 및 코팅 물질을 포함하는 조성물 또는 마이크로 스피어의 100 중량%를 기준으로, 약 0.1 내지 약 10 중량%, 약 0.1 내지 약 9 중량%, 약 0.1 내지 약 8 중량%, 약 0.1 내지 약 7 중량%, 약 0.1 내지 약 6 중량%, 약 0.1 내지 약 6 중량%, 약 0.1 내지 약 5 중량%, 약 0.1

내지 약 4 중량%, 약 0.1 내지 약 3 중량%, 약 0.5 내지 약 10 중량%, 약 0.5 내지 약 9 중량%, 약 0.5 내지 약 8 중량%, 약 0.5 내지 약 7 중량%, 약 0.5 내지 약 6 중량%, 약 0.5 내지 약 6 중량%, 약 0.5 내지 약 5 중량%, 약 0.5 내지 약 4 중량%, 약 0.5 내지 약 3 중량%, 약 1 내지 약 10 중량%, 약 1 내지 약 9 중량%, 약 1 내지 약 8 중량%, 약 1 내지 약 7 중량%, 약 1 내지 약 6 중량%, 약 1 내지 약 6 중량%, 약 1 내지 약 5 중량%, 약 1 내지 약 4 중량%, 약 1 내지 약 3 중량%, 약 2 내지 약 10 중량%, 약 2 내지 약 9 중량%, 약 2 내지 약 8 중량%, 약 2 내지 약 7 중량%, 약 2 내지 약 6 중량%, 약 2 내지 약 5 중량%, 약 2 내지 약 4 중량%, 약 3 내지 약 10 중량%, 약 3 내지 약 9 중량%, 약 3 내지 약 8 중량%, 약 3 내지 약 7 중량%, 약 3 내지 약 6 중량%, 약 4 내지 약 10 중량%, 약 4 내지 약 9 중량%, 약 4 내지 약 8 중량%, 약 4 내지 약 7 중량%, 약 5 내지 약 10 중량%, 약 5 내지 약 9 중량%, 약 5 내지 약 8 중량%, 약 6 내지 약 10 중량%, 약 6 내지 약 9 중량%, 또는 약 7 내지 약 10 중량%의 엑센딘 또는 치료적으로 유효한 그의 유사체 및/또는 GLP-1 또는 치료적으로 유효한 그의 유사체를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물 또는 마이크로 스피어에 함유된 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 양이 상기 범위보다 낮은 경우, 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 효율적인 효과를 얻을 수 없고; 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 양이 상기 범위보다 높은 경우, 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 초기 파괴가 증가하여, 초기 파괴로 인한 부작용이 나타나므로, 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 양이 상기 범위 이내인 것이 바람직하다.

[0318]

생분해성 중합체는 인간에게 유해하지 않은 모든 중합체를 지칭하는데, 이는 생분해성 중합체가 신체 내로 투여될 때, 이의 분해와 배출이 서서히 이뤄질 수 있기 때문이다. 생분해성 중합체는, 폴리락타이드(PLA), 폴리글리콜리드(PGA), 폴리(락타이드-코-글리콜리드)(PLGA), 폴리오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리하이드록시부티르산, 폴리카프로락톤 및 폴리알킬카보네이트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상(예: 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상) 및 하나 이상의 중합체와 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 이루어진 공중합체를 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 공중합체는 공중합체 또는 단순 혼합체의 형태일 수 있다.

[0319]

예를 들어, 생분해성 중합체는, 폴리락타이드(PLA), R202H (IV=0.16~0.24 dL/g) 및 R203H (IV=0.25~0.35 dL/g), 락타이드:글리콜리드의 비가 1:1인 RG502H (IV=0.16~0.24 dL/g), RG503H (IV=0.32~0.44 dL/g) 및 RG504H (IV=0.45~0.60 dL/g), 및 락타이드:글리콜리드의 비가 75:25인 RG752H (IV=0.14~0.22 dL/g)로 이루어지고, 독일 Evnik에 의해 제공되는 폴리(락타이드-코-글리콜리드)(PLGA); 락타이드:글리콜리드의 비가 1:1인 5050DL 2A (IV=0.15~0.25 dL/g), 5050DL 3A (IV=0.25~0.43 dL/g), 및 5050DL 4A (IV=0.38~0.48 dL/g)로 이루어지고, 미국 Evonik(Parsippany, NJ)에 의해 제공되는 공중합체인 폴리(락타이드-코-글리콜리드); 및 기타로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있지만, 동등한 중합체를 임의의 적절한 공급원으로부터 제공받거나 획득할 수 있다.

[0320]

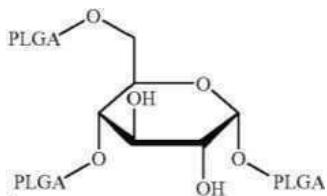
다른 실시예에서, 생분해성 중합체는 중합체-당 복합체일 수 있으며, 당류는 다음과 결합된다: (1) 폴리락타이드(PLA), 폴리글리콜리드(PGA), 폴리(락타이드-코-글리콜리드; PLGA), 폴리오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리히드록시부티르산, 폴리카프로락톤 및 폴리알킬카보네이트로 이루어진 군으로부터 선택된 중합체; (2) 적어도 2개의 중합체군으로 이루어진 공중합체; 또는 (3) 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 하나의 중합체군으로 이루어진 공중합체.

[0321]

본 발명의 다른 실시예에서, 중합체-당 복합체는 복합체를 지칭할 수 있으며, 여기서 중합체는 당의 수산기로 치환된다. 당은 단당류 및 1 내지 8개의 당류 단위를 포함하는 다당류를 포함할 수 있으며, 여기서 각 당류 단위는 3 내지 6개의 수산기; 및 3 내지 6개의 수산기를 포함하고 20,000 이하의 분자량을 갖는 직쇄 당-알코올을 포함한다. 당류-알코올은 만니톨, 펜타에리트리톨, 소르비톨, 리비톨 및 자일리톨을 포함할 수 있다. 중합체는 당에 존재하는 3개 이상의 수산기에서 당과 결합한다.

[0322]

위의 실시예에 따른 중합체-당 복합체는, 당과 결합된 중합체와 유사한 생체 내 특성을 가지고; 사용된 중합체의 종류에 따라 다양한 분해 속도를 가지며; 무해한 중합체와 당으로 분해되므로, 생분해성 중합체에 적합할 수 있다. 일 구현예에서, 중합체-당 복합체는 PLA-포도당 복합체, PGA-포도당 복합체, 또는 PLGA-포도당 복합체일 수 있으며, 여기서 PLGA-포도당 복합체는 다음의 구조를 갖는 것일 수 있다:



[0323]

본 발명에 따른 방출 제어형 마이크로 스피어에서, 마이크로 스피어의 표면에 형성된 코팅 층은 엑센딘이나 GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체나 엑센딘 유사체의 초기 방출(burst)이 효과적으로 조절되도록 하여, 과도한 초기 방출로 야기되는 부작용을 방지할 수 있다. 생분해성 중합체는 점도에 구애받지 않고 사용할 수 있다.

[0325]

본 발명에 따른 방출 제어형 조성물/제제에서, 생분해성 중합체는 활성 성분(엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체)을 보존하기 위한 매트릭스로서의 역할을 하되, 중합체의 점도가 불충분하게 낮으면 활성 성분을 효과적으로 보존하지 못하여 초기 방출을 증가시키고, 중합체의 점도가 과도하게 높으면 활성 성분의 총 방출량을 감소시켜 활성 성분의 생체이용률을 감소시킨다. 본 발명에서, 생분해성 중합체뿐만 아니라 조성물에 포함된 코팅 물질도 약물 방출을 제어하는 역할을 하므로, 비교적 낮은 점도를 갖는 생분해성 중합체가 사용될 수 있다. 따라서, 약물의 초기 방출을 효과적으로 조절하고 생체이용률을 개선하기 위해, 생분해성 중합체의 고유 점도(IV)는 약 0.1 내지 약 0.6 dL/g(예를 들어, 약 0.15 내지 약 0.31 dL/g 또는 약 0.16 내지 약 0.24 dL/g)일 수 있으며, 이는 1%(W/V)의 농도로 클로로포름에 용해된 생분해성 중합체에 대해 25°C±0.1°C에서 우베로드 점도계(Ubbelohde Viscometer)를 사용하여 측정된다.

[0326]

본 발명의 조성물, 제제 또는 마이크로 스피어에서, 생분해성 중합체는 활성 성분이 방출되는 동안 활성 성분을 보존하고 방출 속도를 조절하는 매트릭스로서의 역할을 하되, 조성물 또는 마이크로 스피어 내 생분해성 중합체의 함량은 활성 성분(엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체), 생분해성 중합체(들) 및 코팅 물질을 함유하는 조성물/제제 또는 마이크로 스피어의 100 중량%를 기준으로 약 85 내지 약 99.89 중량%(예: 약 91 내지 약 99 중량%)일 수 있다.

[0327]

코팅 물질은 과도한 초기 방출을 방지하고 활성 성분의 생체이용률을 증가시키는 데 사용되고, 본 발명의 마이크로 스피어에서는 코팅 층의 형태로 마이크로 스피어 표면 상에 존재할 수 있다. 코팅 물질은 염기성 아미노산, 폴리펩티드, 및 유기 질소 화합물로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 또는 3개)일 수 있다. 염기성 아미노산은 아르기닌, 리신, 히스티딘 및 이들의 유도체를 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2 또는 3개)을 포함하는, 2 내지 10개의 아미노산(예를 들어, 2 내지 5개의 아미노산)을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 산성 아미노산보다 염기성 아미노산을 더 포함할 수 있으므로, 염기성 특성을 나타낸다. 예를 들어, 폴리펩티드는 L-Ala-L-His-L-Lys, L-Arg-L-Phe, Gly-L-His, Gly-L-His-Gly, Gly-L-His-L-Lys, L-His-Gly, L-His-Leu, L-Lys-L-Tyr-L-Lys, L-His-L-Val, L-Lys-L-Lys, L-Lys-L-Lys-L-Lys, L-Lys-L-Thr-L-Thr-L-Lys-L-Ser, 등일 수 있다. 또한, 유기 질소 화합물은 크레아틴, 크레아티닌, 우레아 등일 수 있다.

[0328]

본 발명의 조성물에 함유되거나, 마이크로 스피어 상에 코팅된 코팅 물질의 함량은 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체, 생분해성 중합체(들), 및 코팅 물질(들)을 포함하는 조성물 또는 마이크로 스피어의 100 중량%를 기준으로 약 0.01 내지 약 5 중량%(예를 들어, 약 0.015 내지 약 3, 약 0.01 내지 약 4, 약 0.01 내지 약 3, 약 0.01 내지 약 2, 약 0.01 내지 약 4, 약 0.01 내지 약 2, 약 0.015 내지 약 5, 약 0.015 내지 약 4, 약 0.015 내지 약 2, 약 0.05 내지 약 5, 약 0.05 내지 약 4, 약 0.05 내지 약 3, 약 0.05 내지 약 2, 약 0.1 내지 약 5, 약 0.1 내지 약 4, 약 0.1 내지 약 3, 약 0.1 내지 약 2, 약 0.5 내지 약 5, 약 0.05 내지 약 4, 약 0.05 내지 약 3, 약 0.05 내지 약 2, 약 1 내지 약 5, 약 1.5 내지 약 4, 약 1.5 내지 약 3, 약 2 내지 약 5, 약 2 내지 약 4, 약 3 내지 약 5 약 3 내지 약 4, 또는 약 4 내지 약 5 중량%)일 수 있다. 코팅 물질의 함량이 위 범위보다 낮은 경우 약물 방출을 효과적으로 조절할 수 없는 반면, 코팅 물질의 함량이 위 범위보다 높게 증가하더라도 초기 방출을 조절하는 효과가 추가적으로 증가하지는 않는다.

[0329]

본 발명에 따른 각각의 조절 방출형 마이크로 스피어는 코팅 물질로 코팅된 매끄러운 표면을 가질 수 있고, 약 1 내지 약 50 m(예를 들어, 약 5 내지 약 30 m, 약 1 내지 약 40 m, 약 1 내지 약 30 m, 약 1 내지 약 20 m, 약 1 내지 약 10 m, 약 5 내지 약 50 m, 약 5 내지 약 40 m, 약 5 내지 약 30 m, 약 5 내지 약 20 m, 약 5 내지 약 10 m, 약 10 내지 약 50 m, 약 10 내지 약 40 m, 약 10 내지 약 30 m, 약 10 내지 약 20 m,

약 20 내지 약 50 m, 약 20 내지 약 40 m, 약 20 내지 약 30 m, 약 30 내지 약 50 m, 약 30 내지 약 40 m, 또는 약 40 내지 약 50 m)의 평균 크기를 가질 수 있다. 마이크로 스피어의 매끄러운 표면은 효과적인 초기 방출 조절과 우수한 생체이용률을 달성할 수 있게 한다.

[0330] 종래의 형태와 달리, 본 개시의 조성물/제제로부터 제조된 조절 방출 제어형 마이크로 스피어 또는 마이크로 스피어는 과도한/유해한 초기 방출을 방지하고 생체이용률을 증가시킬 수 있는 코팅 재료로 코팅되는데, 이는 마이크로 스피어를 함유하는 종래의 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체에서 는 얻을 수 없다. 특히, 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 과도한/유해한 초기 방출은 구토, 메스꺼움, 두통 등과 같은 다양한 부작용을 야기하므로, 초기 방출 양을 5% 이하로 낮추는 것이 매우 중요하다. 본 발명의 조성물(또는 제제)로부터 제조된 방출 제어형 마이크로 스피어 또는 마이크로 스피어는 초기 24시간 동안의 방출량을 5% 이하로 낮춘다. 방출 제어형 마이크로 스피어를 함유하는 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 투여로 인한 부작용을 감소시키기 위해서는, 초기 시간 동안의 초기 방출 양이 약 5% 이하(예컨대, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 또는 약 1% 이하)일 수 있다. 본 발명의 마이크로 스피어는 코팅 물질로 이루어진 코팅 층을 그 표면 상에 포함하여, 초기 방출의 효과적인 조절을 가능하게 하여 과도한/유해한 초기 방출로 인한 부작용을 제거하고, 약물을 지속적으로 충분히 방출시켜 우수한 생체이용률을 달성한다.

[0331] 본 발명의 일 실시예에서, 제제 또는 마이크로 스피어는 보호 콜로이드 및/또는 안정화제와 같은 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0332] 조성물 또는 마이크로 스피어는 폴리비닐 알코올, 알부민, 폴리비닐파릴리돈, 젤라틴 등으로부터 선택된 하나 이상의 보호 콜로이드를 추가로 포함할 수 있다. 보호 콜로이드는 마이크로 스피어에 포함된 활성 성분의 과도한/유해한 초기 방출을 방지하는 특별한 효과가 없지만, 마이크로 스피어 간의 응집을 방지하고 분산성을 향상시키는 역할을 한다. 이러한 역할을 고려하면, 보호 콜로이드의 함량은 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체, 생분해성 중합체(들), 및 코팅 물질을 함유하는 조성물, 제제, 또는 마이크로 스피어의 중량을 기준으로 약 0.02% (W/W) 내지 약 1.0% (W/W) (예를 들어, 약 0.02% 내지 약 0.8%, 약 0.02% 내지 약 0.6%, 약 0.02% 내지 약 0.4%, 약 0.05% 내지 약 1.0%, 약 0.04% 내지 약 0.8%, 약 0.05% 내지 약 0.5%, 약 0.05% 내지 약 0.4%, 약 0.05% 내지 약 0.3%, 약 0.05% 내지 약 0.2%, 약 0.1% 내지 약 1.0%, 약 0.1% 내지 약 0.8%, 약 0.1% 내지 약 0.6%, 약 0.1% 내지 약 0.4%, 약 0.1% 내지 약 0.3%, 약 0.1% 내지 약 0.2%, 약 0.2% 내지 약 1.0%, 약 0.2% 내지 약 0.8%, 약 0.2% 내지 약 0.6%, 약 0.2% 내지 약 0.4%, 약 0.4% 내지 약 1.0%, 약 0.4% 내지 약 0.8%, 약 0.4% 내지 약 0.6%, 약 0.6% 내지 약 1.0%, 약 0.6% 내지 약 0.8%, 또는 약 0.8% 내지 약 1.0%)일 수 있다.

[0333] 또한, 동결 건조시키는 동안 마이크로 스피어의 안정성을 개선하기 위해서, 본 발명의 조성물/제제 또는 마이크로 스피어는 만니톨, 트레할로오스, 수크로오스, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스 등으로부터 선택된 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 그 양은 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체, 생분해성 중합체(들), 및 코팅 물질을 포함하는 조성물, 또는 마이크로 스피어의 중량을 기준으로 약 5% (W/W) 내지 약 30% (W/W), 예를 들어, 약 10% (W/W) 내지 약 20% (W/W)이다.

[0334] 또한, 본 발명의 조성물, 제제 또는 마이크로 스피어는 약물의 제형에 통상적으로 사용되는 임의의 첨가제 및 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이들의 종류 및 함량은 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0335] 본 발명의 방법에 사용되는 방출 제어형 마이크로 스피어를 포함하는 엑센딘, GLP-1 또는 치료학적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체는 방출 제어형 마이크로 스피어를 제조하는 다양한 방법에 의해, 예를 들어, 마이크로 스피어를 제조하는 동안 또는 제조한 후에 코팅 물질 용액에 마이크로 스피어를 혼탁하여 마이크로 스피어의 표면을 코팅함으로써 제조될 수 있다. 마이크로 스피어를 제조하는 방법은 이중 유화법(W/O/W 방법), 단일 유화법(O/W 방법), 상 분리법, 분무 건조법 등에 의해 수행될 수 있다.

[0336] 구체적으로, 방출 제어형 마이크로 스피어를 함유하는 엑센딘, GLP-1 또는 치료학적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체의 제조 방법은: 활성제(들) 및 생분해성 중합체(들)을 혼합하여 W/O형 유화액 또는 균질 혼합물을 제조하는 단계; 및 유화액 또는 균질 혼합물을 코팅 물질의 수용액에 첨가하여 유화시킴으로써 코팅 층을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0337] 보다 구체적으로, 이중 유화법을 사용하는 경우, 상기 방법은: 활성 성분(들) 수용액과 유기 용매에 용해된 생분해성 중합체를 혼합함으로써 이들을 유화시켜 일차 유화액(W/O형)을 형성하는 단계; 유화액을 코팅 물질 수용

액 중에 혼탁시켜 W/O/W형 유화액을 형성하는 단계; W/O/W형 유화액을 가열하여 용매를 제거하고 수득된 마이크로 스피어를 경화시키는 단계; 및 마이크로 스피어를 동결 건조시키는 단계를 포함할 수 있다. 유기 용매는, 생분해성 중합체를 용해시킴으로써 유화액을 형성할 수 있고, 그런 다음 수용액과 혼합될 수 있는 임의의 유기 용매일 수 있으며, 예를 들어, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드 및 메틸에틸케톤(예: 메틸렌클로라이드)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 이 경우, 코팅 물질은 이차 수상(secondary aqueous phase)(W/O/W 유화액의 외부 수상)에 함유되어 유기 용매가 제거될 때 적어도 하나의 활성 성분(예를 들어, 엑센딘, GLP-1 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체, 또는 이들의 조합) 및 생분해성 중합체를 포함하는 마이크로 스피어의 외부에 코팅층을 형성한다.

[0338] 대안적으로, 단일 유화법이 사용되는 경우, 상기 방법은, 활성 성분(들)과 생분해성 중합체를 유기 용매에 용해시켜 균질 혼합물을 형성하는 단계; 코팅 물질이 포함된 수용액을 수득된 혼합물에 첨가하여 유화액을 형성하는 단계; 유화액을 가열하여 용매를 제거하고 수득된 마이크로 스피어를 경화시키는 단계; 경화된 마이크로 스피어를 수집하여 세척하는 단계; 및 마이크로 스피어를 동결 건조시키는 단계를 포함할 수 있다. 유기 용매는 활성 성분(들)과 생분해성 중합체(들)를 완전히 혼합시켜 균질 혼합물을 형성할 수 있고, 수용액과 혼합되어 유화액을 형성할 수 있는 임의의 유기 용매일 수 있다. 예를 들어, 유기 용매는, 1 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 알코올, 빙초산, 포름산, 디메틸 술폴시드, 및 n-메틸피롤리돈으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸에틸케톤 및 메틸렌 염화물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 혼합된 혼합 용매일 수 있고, 예를 들어, 메탄올 및 메틸렌 염화물이 혼합된 혼합 용매일 수 있다. 이 경우, 최종적으로 수득된 마이크로 스피어의 표면은, 생분해성 중합체와 활성 성분(들)의 균질 혼합물을 유화시키고, 유기 용매 제거를 위해 코팅 물질을 수용액에 첨가함으로써, 그 위에 코팅 층을 갖는다.

[0339] 방출 제어형 마이크로 스피어를 제조하는 방법은: 활성 성분(들)과 생분해성 중합체를 혼합하여 유화액 또는 균질 혼합물을 형성하는 단계; 수득된 유화액 또는 균질 혼합물을 고형화시켜 일차 마이크로 스피어를 제조하는 단계; 및 수득된 일차 마이크로 스피어를 코팅 물질 수용액 중에 혼탁시켜 각 마이크로 스피어상에 코팅 층을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0340] 고형화 방법은 제한이 없으며, 종래 기술에서 통상적으로 사용되는 임의의 고형화 방법, 예를 들어, 상 분리법 또는 분무 건조법 일 수 있다. 보다 구체적으로, 상 분리법이 고형화 단계에 사용되는 경우, 상기 방법은: 활성 성분(들)의 수용액과 유기 용매에 용해된 생분해성 중합체를 혼합하여 유화액을 만들거나, 활성 성분(들)과 생분해성 중합체를 혼합 용매로 혼합하여 균질화 혼합 용액을 형성하는 단계; 수득된 유화액 또는 용액에 실리콘 유와 같은 오일을 첨가하여 일차 마이크로 스피어를 제조하는 단계; 생분해성 중합체에 대한 비용매, 예컨대 1 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 알코올 및 1 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 알칸의 혼합 용매(예: 에탄올과 햄탄의 혼합 용매)를 첨가하여 마이크로 스피어로부터 유기 용매를 제거하고 마이크로 스피어를 경화시키는 단계; 수득된 마이크로 스피어를 코팅 물질의 수용액 중에 혼탁시켜 각 마이크로 스피어 상에 코팅 층을 형성하는 단계; 및 코팅 층이 형성된 마이크로 스피어를 수집하고, 세척하고, 동결 건조시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0341] 유기 용매는 클로로포름, 아세트산 에틸, 염화메틸렌 및 메틸에틸케톤으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 또는 4)(예를 들어, 염화메틸렌)일 수 있다. 혼합 용매는, 1 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 적어도 하나의 알코올, 빙초산, 포름산, 디메틸 술폴시드, 및 n-메틸피롤리돈으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상(예: 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상), 및 클로로포름, 아세트산 에틸, 메틸에틸케톤, 및 염화메틸렌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상(예: 1, 2, 3 또는 4개 이상)이 혼합된 것(예: 메탄올 및 염화메틸렌의 혼합 용매)일 수 있다.

[0342] 대안적으로, 분무 건조법이 사용되는 경우, 상기 방법은: 활성 성분(들)의 수용액과 유기 용매에 용해된 생분해성 중합체를 혼합하여 유화액을 형성하거나, 활성 성분(들)과 생분해성 중합체를 단일 용매 또는 혼합 용매로 혼합하여 균질 혼합물 용액을 형성하는 단계; 수득된 유화액 또는 용액을 분무 건조시켜 일차 마이크로 스피어를 제조하는 단계; 수득된 일차 마이크로 스피어를 코팅 재료의 수용액 중에 혼탁하여 각각의 마이크로 스피어 상에 코팅 층을 형성하는 단계; 및 코팅 층이 형성된 마이크로 스피어를 세척하고 동결 건조시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0343] 유기 용매는 클로로포름, 아세트산 에틸, 염화메틸렌 및 메틸에틸케톤으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 또는 4)(예: 염화메틸렌)일 수 있다. 단일 용매는 빙초산 및 포름산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상(예: 1, 2, 3, 4 또는 5개)일 수 있고, 혼합 용매는, 1 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 적어도 하나의 알코올, 빙초산, 포름산, 디메틸 술폴시드, 및 n-메틸피롤리돈으로 이루어진 군으로부터 선택된

하나 이상(예: 1, 2, 3 또는 4개 이상), 및 클로로포름, 아세트산 에틸, 메틸에틸케톤, 및 염화메틸렌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 혼합된 것(예: 메탄올 및 염화메틸렌의 혼합 용매)일 수 있다.

[0344] 상기 방법은 임의의 종래의 방법을 통해 보호 콜로이드 물질을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있는데, 예를 들어, 보호 콜로이드 물질은 마이크로 스피어를 코팅 재료로 코팅하는 단계가 진행되는 동안 첨가될 수 있다.

[0345] 수상(aqueous phase)으로 용해되었거나 수용액에 용해된 코팅 물질의 농도는 약 0.01 M 내지 약 1 M(예: 약 0.1 M 내지 약 0.5 M, 약 0.01 M 내지 약 0.8 M, 약 0.01 M 내지 약 0.6 M, 약 0.01 M 내지 약 0.4 M, 약 0.1 내지 약 1 M, 약 0.1 M 내지 약 0.8 M, 약, 약 0.1 M 내지 약 0.6 M, 약 0.1 M 내지 약 0.4 M, 약 0.2 내지 약 1 M, 약 0.2 M 내지 약 0.8 M, 약, 약 0.2 M 내지 약 0.6 M, 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 약 0.4 내지 약 1 M, 약 0.4 M 내지 약 0.8 M, 약, 약 0.4 M 내지 약 0.6 M, 약 0.6 내지 약 1 M, 약 0.6 M 내지 약 0.8 M 약, or 약 0.8 M 내지 약 1 M)일 수 있다. 코팅 물질의 농도가 상기 범위보다 낮으면 마이크로 스피어의 표면이 코팅 재료로 완전히 코팅되지 못하지만, 코팅 물질의 농도가 상기 범위보다 높으면 코팅 재료 용액이 과포화되어 초기 방출의 조절을 개선하는 효과가 나타날 수 없으며, 따라서 코팅 물질의 농도는 상기 범위 내에 있을 수 있다.

투여

[0347] 본 발명의 방출 제어형 조성물은 경구 또는 비경구 경로(예: 비경구 경로), 예컨대 정맥내 경로, 피하 경로, 근육내 경로, 복강내 경로 등을 통해 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에서, 방출 제어형 조성물 또는 제제는 분산액 형태의 주사 용액으로서 적용될 수 있다. 조성물의 유효량은 대상체의 연령, 질환의 종류와 심각성, 및 대상체의 상태에 따라 적절하게 조정될 수 있고, 조성물 내 활성 성분의 용량은 약 0.01 내지 약 100 g/kg/일(예컨대, 약 0.1 내지 약 10 g/kg/일)일 수 있으며, 이는 한 번에 투여되거나 여러 번 투여될 수 있다. 정확한 요구량은 대상체의 종, 연령, 및 전반적인 조건, 치료 중인 질환의 중증도, 사용된 특정 폴리펩티드, 이의 투여 방식 등에 따라 폴리펩티드마다 다르고 대상체마다 달라지게 된다. 따라서, 정확한 "인슐린분비량" 또는 신경 질환 또는 손상의 치료에 유용한 양을 명시하는 것은 가능하지 않다. 그러나, 적절한 양은 당업자가 일상적인 실험을 사용하는 것 만으로 결정할 수 있다.

[0348] 당업자는 치료 효과를 모니터링하는 방법 및 이에 따라 치료를 조정하는 방법을 인식하게 될 것이다. 예를 들어, 혈당 수준은 최적의 치료 효과인 정상혈당을 사용해 모니터링할 수 있다. 혈당 수준이 바람직한 수준보다 높은 경우, 투여되는 폴리펩티드의 양을 증가시켜야 하고, 혈당 수준이 바람직한 수준보다 낮은 경우, 투여되는 폴리펩티드의 양이 감소할 것이다.

[0349] 화합물은 경구 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 국부 투여, 경피 투여, 국소 투여, 전신 투여, 심실내 투여, 뇌내 투여, 경막하 투여, 또는 척수내 투여될 수 있다. 당업자는 인슐린분비 효과를 최적화하기 위해 투여 방식, 약리학적 담체, 또는 다른 파라미터들을 수정하는 방법을 알 것이다. 투여되는 활성 화합물의 양은 당연히 치료 대상체, 대상체의 체중, 투여 방식 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 것이다.

[0350] 의도된 투여 방식에 따라, 약제학적 조성물의 형태는 예를 들어 정제, 좌약, 환제, 캡슐, 분말, 액체, 혼탁액, 로션, 크림, 젤 등과 같은 고체, 반고체 또는 액체 투여 형태일 수 있고, 예를 들어, 정확한 투여량을 1회 투여하기에 적합한 단위 투여 형태일 수 있다. 조성물은, 위에서 언급한 바와 같이, 선택된 약물의 유효량을 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 포함하게 되며, 추가하여 다른 약제, 약제학적 제제, 담체, 보조제, 희석제 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 제제의 제조와 관련하여 사용될 수 있는 약제학적 조성물을 제조하는 종래 방법 및 일반적인 담체가 개시되어 있는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 최신판, E.W. Martin Mack Pub. Co., Easton, PA를 참조하며, 본 문현은 참조로서 본원에 통합된다. 고체 조성물의 경우, 종래의 무독성 고체 담체는, 예를 들어 제약용 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 스테리인 마그네슘, 사카린 나트륨, 탈크, 셀룰로오스, 포도당, 자당, 탄산 마그네슘 등을 포함한다. 약제학적으로 투여 가능한 액체 조성물은, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 활성 화합물 및 부형제 형태의 선택적 약제학적 보조제(예: 물, 염수 수성 텍스트로오스, 글리세롤, 에탄올 등)를 용해시키고, 분산시키는 등에 의해 용액 또는 혼탁액을 만드는 것에 의해 제조될 수 있다. 필요하다면, 투여될 약제학적 조성물은 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 등(예: 초산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 나트륨 아세테이트, 트리에탄올아민 올레아이트 등)과 같은 소량의 비독성 보조 물질을 함유할 수도 있다. 이러한 투여량 형태를 제조하는 실질적인 방법은 당업자에게 공지되어 있거나 이들에게 자명할 것이며; 예를 들어, 위에서 참조된 *Remington's Pharmaceutical Sciences*를 참조한다.

[0351] 경구 투여의 경우, 미세 분말 또는 과립은 희석제, 분산제 및/또는 표면 활성제를 함유할 수 있고, 물이나 시럽

으로 제공되거나, 건조 상태의 캡슐이나 주머니로 제공되거나, 비수성 용액 또는 혼탁액으로 제공되거나(혼탁제가 포함될 수 있음), 정제로 제공되거나(결합제 및 윤활제가 포함될 수 있음), 물이나 시럽 형태의 혼탁액으로 제공될 수 있다. 바람직하거나 필요한 경우, 향미제, 보존제, 혼탁제, 농조화제(thickening agents) 또는 유화제가 포함될 수 있다. 특정 실시예에서, 경구 투여 형태는 정제 또는 과립이고, 코팅될 수 있다. 비경구 투여가 사용되는 경우, 일반적으로는 주사(injecting)를 특징으로 한다.

[0352] 주사제는 통상적인 형태인 액체 용액이나 혼탁액으로서, 주사 전에 액체 형태의 용액이나 혼탁액으로 만들기에 적합한 고체 형태로서, 또는 유화액으로서 제조될 수 있다. 비경구 투여에 대한 보다 최근에 수정된 접근법은, 투여량이 일정한 수준으로 유지되도록 서방형 방출 시스템(slow release 또는 sustained release system)을 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 제3,710,795호를 참조한다.

[0353] 국부 투여의 경우, 활성 화합물이 피부의 표면에 전달될 수 있는 한, 액체, 혼탁액, 로션, 크림, 젤 등이 사용될 수 있다.

실시예

[0355] 다음 실시예는 본원에서 청구된 화합물, 조성물, 물품, 장치 및/또는 방법이 어떻게 만들어지고 평가되는지에 대한 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되고, 본 개시 내용과 관련하여 설명 된 것으로서, 발명자들이 그들의 개시로 간주하는 범위를 제한하려는 것은 아니다. 수치(예: 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하도록 노력하였지만, 일부 오차 및 편차는 고려되어야 한다.

[0356] **통계:** 값은 평균 \pm S.E.M.으로 표현된다. 콜모고르프-스미르노프 검정(Kolmogorov-Smirnov test)을 사용하여 분포의 정규도를 결정하였다. 결과에 표시된 바와 같이, 스튜던트 t 검정(Student's t test), 맨-惠트니 검정(Mann-Whitney test), 피셔의 정확성 검정(Fisher Exact test) 또는 일원 및 이원 분석해석(ANOVA)을 통계적 분석을 위해 사용하였다. 정규성 가정이 위배되었을 때 순위(ranks)에 대한 ANOVA를 사용하였다. 사후 뉴먼-쿨스 검정(Newman-Keuls test) 또는 Dunn 검정을 모든 쌍의 다중 비교에 사용하였다. 통계적으로 유의한 차이는 $p < 0.05$ 로서 정의하였다.

[0357] **실시예 1. 엑센딘-4의 약물 동력학 및 혈장 내 서방형 방출.** 엑센딘-4의 서방형 제제인 PT302는 중합체(98%)와 엑센딘-4(2%)의 혼합물을 함유한다. 엑센딘-4의 서방형 제제(PT302)를 주사한 후 엑세나타이드의 혈장 수준을 분석하였다. 특히, 6마리의 성체(9주령) 수컷 스프래그-다울리 랫트를 사용하여 PT302의 1회 용량의 약물 동력학을 조사하였다. PT302를 희석액에 새로 용해시키고, 2 mg/kg을 피하 투여하였다. 주사 후 0시간차, 0.5시간차 및 1시간차에 혈액을 채취하였을 뿐만 아니라 주사 후 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 18, 21 및 26일차에도 혈액을 채취하였다. 펩트론 엑세나타이드(Peptron Exenatide) EIA 키트(Peptron, 대한민국 대전)에 의해 엑센딘-4의 혈장 수준을 정량화하였다. 데이터는 도 1a에 도시되어 있으며, Cmax는 1.85 ng/ml, Tmax는 12.5일, 및 AUC는 18.55 ng*d/ml이다 (6마리 동물 모두의 개별 데이터로부터 계산된 값). 도 1a에서 알 수 있는 바와 같이, 서방형 제제인 PT302를 1 내지 2주간의 투여 치방에 무난한 양으로 1회 피하 주사하면 엑센딘-4 혈장 수준이 연장된다.

[0358] 군 당 6마리의 성체(9주령) 수컷 스프래그-다울리 랫트를 사용하여 다양한 용량(2.4 mg/kg, 4.8 mg/kg, 및 9.6 mg/kg)의 PT302의 1회 투여량에 대한 약물 동력학을 조사하였다. PT302를 희석액에 새로 용해시키고 표시된 바와 같이 피하 투여하였다. 주사 후 0시간차, 0.5시간차 및 1시간차에 혈액을 채취하였을 뿐만 아니라 주사 후 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 및 31일차에도 혈액을 채취하였다. 위에서 논의된 바와 같이 엑센딘-4의 혈장 수준을 정량화하였다. 데이터는 도 1b에 도시되어 있으며, 2.4 mg/kg 투여량의 경우 Cmax는 2.23 ng/ml, Tmax는 14.83 일, 및 AUC는 21.13 ng*d/ml이고; 4.8 mg/kg 투여량의 경우 Cmax는 5.21 ng/ml, Tmax는 16.17일, 및 AUC는 49.46 ng*d/ml이며; 9.6 mg/kg 투여량의 경우 Cmax는 9.42 ng/ml, Tmax는 17.17일, 및 AUC는 87.14 ng*d/ml이다. 도 1b는 서방형 제제인 PT302를 1회 피하 주사하여 연장시킨 엑센딘-4 혈장 수준이 투여된 PT302의 투여량 수준과 직접 관련되었음을 입증한다.

[0359] 엑센딘-4의 서방형 제제인 PT304는 중합체(96%)와 엑센딘-4(4%)의 혼합물을 함유한다. 엑센딘-4의 서방형 제제(PT304)를 6마리의 성체(9주령) 수컷 스프래그-다울리 랫트에 주사한 후 엑세나타이드의 혈장 수준을 분석하였다. PT304를 희석액에 새로 용해시키고, 4 mg/kg을 피하 투여하였다. 주사 후 1시간차 및 3시간차에 혈액을 채취하였을 뿐만 아니라 주사 후 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 및 42일차에도 혈액을 채취하였다. 펩트론 엑세나타이드 EIA 키트에 의해 엑센딘-4의 혈장 수준을 정량화하였다. 데이터는 도 2에 도시되어 있으며, Cmax는 3.82 ng/ml, Tmax는 14.17일, 및 AUC는 48.34 ng*d/ml이다 (값은 6마리 동물 모두의 개별 데이터)

터로부터 계산됨). 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 서방형 제제인 PT304를 2 내지 4주 투여 처방에 무난한 양으로 1회 펴하 주사로하면 엑센딘-4 혈장 수준이 연장된다.

[0360] 군 당 10마리의 성체(9주령) 스프래그-다울리 랫트에서 10주 기간 동안의 PT302의 약동학을 조사하였다. 랫트에게 2 mg/kg의 PT302를 매주 펴하 주사하거나 4 mg/kg의 PT304를 격주로 펴하 주사하였다. PT302 및 PT304는 위에서 논의된 바와 같이 제조하였고, 첫 주사 후 1시간차 및 3시간차에 혈액을 채취하고, 첫 주사 후 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84일차 및 91일차에도 혈액을 채취하였다. 위에서 논의된 바와 같이 엑센딘-4의 혈청 수준을 정량화하였으며, 이는 도 3에 도시되어 있다. 매주 주사한 랫트의 경우 Cmax는 5.27 ng/ml, Tmax는 51.60일, 및 AUC는 236.42 ng*d/Ml이었지만, 격주로 주사한 랫트의 경우 Cmax는 5.08 ng/ml, Tmax는 47.89일, 및 AUC는 211.51 ng*d/Ml이었다.

실시예 2. PT302를 사용한 전치료는 파킨슨병의 6-OHDA 랫트 모델에서 Meth-매개 회전을 감소시킨다.

[0361] 동물을 도 4a에서 정의된 일차(즉, 안쪽앞뇌다발에 6-OHDA 일측 병변 발생 전 16일차와 2일차, 및 변병 발생 후 12일차, 26일차 및 40일차)에 비히클(랫트 9마리), PT302 0.4 mg/kg(저 투여량; 랫트 9마리), 또는 PT302 2 mg/kg (고 용량; 랫트 10마리)로 치료하였다. 도 4a 및 4b에 도시된 바와 같이, 병변 발생 후 20, 30 및 45일차에 랫트에 대해 meth-매개 회전 시험을 하고, 47일차에 안락사시켰다. 병변 생성을 위해, 랫트를 클로랄 수화물(400 mg/kg, 즉, 복강 내 투여)로 마취시키고 스테레오텍식 프레임(stereotaxic frame) 내에 두었다. 스테레오텍식 아암에 달린 해밀톤 미세주사기(Hamilton microsyringe)를 통해 6-OHDA (0.2 mg/ml의 아스코르브산을 함유하는 0.9% NaCl 중 2.76 μ g/ μ l x 5 μ l)를 4분 동안 안쪽앞뇌다발(브로그마에 대해 상대적으로 -4.4 mm AP, 1.2 mm 및 두개골 8.4 mm 아래) 내로 단축 주입하였다. 스테레오텍식 프레임에 부착된 미세조작기를 사용해 뇌 내의 원하는 표적 위치까지 미세주사기를 내렸다. 주사 속도(0.5 μ l/분)는 주사기 휨프(Micro 4, WPI, Sarasota, FL)로 제어하였다. 바늘은 주사 후 5분만에 제거하였다. 유체가 새어나오지 않도록 본와스(bone wax)로 천두공(burr hole)을 막았다. 상처는 봉합하거나 클리핑(clipped)하였다. 마취 기간 중에 서미스터 프로브로 체온을 모니터링하고 가열 패드를 사용해 37°C로 유지시켰다. 마취에서 깨어난 후, 3시간 동안 온도 조절식 인큐베이터를 사용해 체온을 37°C로 더 유지시켰다.

[0363] Meth-유도 회전 거동[Liu DM, Lin SZ, Wang SD, Wu MI, Wang Y. Xenografting human T2 sympathetic ganglion from hyperhidrotic patients partially restores catecholaminergic functions in hemi-Parkinsonian athymic rats. Cell Transplant 1999;8:563-91 ; and Luo Y, Hoffer BJ, Wang Y. Rotation, Drug-induced. In: Kompoliti K, Verhagen Metman L, editors. Encyclopedia of Movement Disorders. Oxford: Academic Press, 2010. p 49-51]을 8-채널 로토미터 시스템(RotoMax, AccUscan Instruments, Inc)을 사용해 평가하였다. 전술한 바와 같이 6-OHDA 병변을 생성한 후 6일차에 동물에게 메탐페타민(2.5 mg/kg)을 투여했다 [Yin LH, Shen H, Diaz-Ruiz O, Backman CM, Bae E, Yu SJ, Wang Y. Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. BMC Neurosci 2012;13:120 참조]. 메탐페타민은 뇌에서 도파민 방출을 유도하는 간접 작용제이다. 흑질 선상체 도파민작동 계통에 6-OHDA를 일측 주입한 랫트는 PD 모델로서 사용된다. 이를 동물은 간접 도파민 작용제(예: 메탐페타민)가 투여된 후에는 동측 회전 거동을 보이고, 직접 도파민 효능제(예: 아포모르핀)가 투여된 후에는 대측 회전 거동을 보인다. 이러한 거동은 선조체 도파민작동 마커의 발현이 일측으로 변화된 것과 관련이 있다.

[0364] 도 4b에 도시된 바와 같이, PT302를 사용한 치료는 비히클로 치료한 경우에 비해 PT302의 고 용량 및 저 용량 치료군 모두에서 회전을 상당히 감소시켰다($p = 0.018$, $F_2, 87=4.309$, 저 용량 치료군에서의 이원 ANOVA). 사후 뉴만-쿨스 검정은 고 용량의 PT302가 meth-매개 회전을 상당히 약화시켰음을 나타냈다($p=0.037$). 따라서, 엑센딘-4를 PT302 형태로 지속적으로 정태 투여한 결과, 랫트에서 안쪽앞뇌다발의 일측 6-OHDA 병변에 의해 유도된 거동 효과가 유의하게 완화되어 (PD의 동물 모델에서 잘 특성화됨) 신경보호 활성이 제공되었다.

[0365] 위에서 논의된 바와 같이 엑센딘-4의 혈장 수준을 정량화하였다. 도 4c에 도시된 바와 같이, 평균 엑센딘-4 혈장 수준은 고 투여량 랫트에서 30.845 pg/ml($n=10$)이었고 저 투여량 랫트에서는 8,990 pg/ml($n=9$)이었다. 그러나, 이상치 랫트/측정값(랫트 1, 10 및 12)을 빼면, 평균 엑센딘-4 혈장 수준은 고 투여량 랫트에서 5,596 pg/ml($n=8$)이었고 저 투여량 랫트에서는 574 pg/ml($n=8$)이었다.

[0366] 실시예 3. PT302를 사용한 전치료는 6-OHDA 병변 랫트에서 Meth-유도 회전 거동을 감소시켰다. 실시예 2에 기술된, PD의 설치류 모델에 대한 안쪽앞뇌다발 일측 6-OHDA 병변의 사용은 도 5a에서 도시된 바와 같이, 잠재적 약물을 사용하는 후치료와 조합될 수 있다. 이 시나리오에서, 설치류에게 일측 6-OHDA 병변(0일차)을 생성시키고,

그로부터 6일 후에 치료를 개시한다. 도파민작동성 세포 사멸이 이미 개시되었고 치료 전에도 진행 중이므로, 이는 치료가 더 어려운 PD 설치류 모델이다. 전술한 바와 같이 19마리의 랫트에 병변을 생성하였다. 위에 논의된 바와 같이 meth-유도 회전을 조사하였고, 치료를 개시하기 전에, 300회/시간을 초과하여 회전한 동물을 2개의 군으로 분리하여 비히클 치료군 또는 PT302 치료군에 대한 집단 회전 거동을 균등화시켰다. 도 5a에 요약된 바와 같이, meth-유도 회전은 병변 생성 후 6, 20, 30 및 45일차에 조사하였고, 동물(성체 수컷 스프래그-다울리 랫트; 도착 당시 2개월령)은 6-OHDA 병변 생성 후 6, 20 및 34일차에 비히클(피하 투여, n=11) 또는 PT302(2.0 mg/kg의 엑센딘-4를 함유한 100 mg/kg, 피하 투여, n=8)로 치료하였다. PT302는 전술한 바와 같이 제조하였다. 동물은 병변 생성 후 47일차에 안락사시켰다. 혈액과 뇌 샘플을 채취하고, 혈장을 분리 보관하였다 (-80°C). 채취한 혈장에서 엑센딘-4를 측정하였다.

[0367] 도 5b에 도시된 바와 같이, PT302는 일측에 6-OHDA 병변이 생성된 랫트($p=0.032$, 이원 ANOVA)에서 비히클 대조군과 비교해 meth-유도 회전 거동을 유의하게 감소시켰다.

[0368] 면역조직화학 검사에 의해 TH를 조사하였다. 구체적으로, 전체 뇌의 연속된 냉동 절편을 $25\text{ }\mu\text{m}$ 두께로 절단하였다. TH를 조사하기 위해 매 여섯 번째 절편에서부터 하나의 연속물을 염색하였다. 변색성을 제어하기 위해, 모든 실험군의 시편을 모든 배치에 포함시키고 동일한 조건 하에서 네트 웰 트레이(net well tray)에서 함께 반응시켰다. 0.1M 인산염 완충액(PB) 중에서 절편을 행구고, 0.1M PB 중의 4% 소 혈청 알부민(BSA) 및 0.3% Triton x-100로 블록화시켰다. 그런 다음 절편을 일차 항체(0.1M PB 중 4% BSA 및 0.3% Triton x-100에서 1:100의 농도로 회색된 마우스 단클론 항-TH, Chemicon, Temecula, CA) 중에 4°C에서 17~19시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 0.1M PB 중에서 행구고 이차 항체 중에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 아비딘-비오틴-서양고추냉이 페옥시다아제 복합체로 1시간 동안 인큐베이션한 후, 아비딘-비오틴-서양고추냉이 페옥시다아제 복합체와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 절편을 슬라이드에 장착하고 커버 슬립으로 덮었다. 대조군 절편은 일차 항체 없이 인큐베이션하였다.

[0369] 선조체에서의 TH 면역반응성을 ImageJ로 측정하고, 전교련(anterior commissure)이 보이도록 선택된 3개의 뇌 절편으로부터 평균화하였다. 흑질에서의 TH 면역반응성을 중뇌 전반에 걸쳐 $360\text{ }\mu\text{m}$ 마다 측정하였다(브레그마로부터 -4.2mm 내지 -6.0mm). 각 동물 유래의 총 5개의 뇌 절편을 사용하였다. 카발리에리 방법(Cavalieri's method)을 사용하여 흑질의 체적을 분석하였다.

[0370] PT302는 선조체에서 6-OHDA 매개 도파민작동성 신경퇴행을 감소시켰다. 비히클을 투여한 3마리의 랫트(#866, 883, 886) 및 PT302를 투여한 3마리의 랫트(881, 875, 882)로부터의 대표적인 선조체 TH 면역염색 수준 및 혈장 엑센딘-4 수준은 도 5c에 도시되어 있다 (이들 동일한 동물에서의 엑센딘-4의 혈장 농도를 정량화하였고, 이 또한 도 5c에 표시되어 있음). 도 5d에 도시된 바와 같이, 6-OHDA를 주사한 결과 비히클이 투여되는 동물에서 선조체 TH 면역반응성이 유의하게 감소된 반면, PT302는 병변화된 선조체에서 TH 면역반응성을 유의하게 증가시켰다($*p<0.001$, 이원 ANOVA). L=병변측; non-L=비병변측; veh=비히클이 투여되는 동물; PT=PT302.

[0371] 흑질에서의 TH 면역반응성을 ImageJ로 측정하고, 전교련(anterior commissure)이 보이도록 선택된 3개의 뇌 절편으로부터 평균화하였다. 비히클이 투여되는 동물(랫트 #866, #883, #886) 또는 PT302가 투여되는 동물(랫트 #881, #875, #882)의 대표적인 TH 면역염색은 도 5e에 도시되어 있다(동일한 동물에서 엑센딘-4의 혈장 수준도 도시됨). 흑질에서의 TH 면역반응성을 브레그마 -4.2 mm에서 -6mm까지 $360\text{ }\mu\text{m}$ 마다 정량화하였고, 이는 도 5f에 도시되어 있다. 6-OHDA를 주사한 결과 비히클이 투여되는 동물에서 흑질의 TH 면역반응이 유의하게 감소된 반면, PT302는 병변화된 흑질에서 TH 면역반응의 상실을 유의하게 완화시켰다 ($*p<0.001$, 이원 ANOVA). L=병변측; non-L=비병변측; 비히클=비히클이 투여되는 동물; PT=PT302.

[0372] PT302 후치료는 병변화된 흑질에서 TH+ 뉴런을 보호한다. 위에서 논의된 바와 같이, 뇌를 절편화하고 면역조직화학검사(immunohistochemistry)를 수행하였다. TH+ 뉴런은 뇌의 비병변측에서 나타났다(도 5g 및 5h). 뇌의 병변측 상의 흑질에서는 TH+ 뉴런 또는 섬유가 거의 발견되지 않았다(랫트 #886; 도 5i). PT302로 치료한 결과, TH+ 뉴런이 부분적으로 보호되었다(도 5j, 5k 및 5l).

[0373] TH 뉴런에서 엑센딘-4로 매개된 보호는 혈장 엑센딘 4 수준과 관련이 있다. 도 5m은 동일한 동물 내에서의 정규화된(normalized) 선조체 TH(즉, 병변측/비병변측) 면역반응성과 혈장 엑센딘 4 수준 간에 발견된 유의한 상관관계를 보여준다($p=0.002$, $R=0.663$). 도 5l은 병변측 흑질에서의 혈장 엑센딘 4 수준과 TH 면역반응성 간에 관찰된 유의한 상관관계를 보여준다($p<0.001$, $R=0.842$).

[0374] 실시예 4. PT302를 사용한 전치료는 PD의 6-OHDA 랫트 모델에서 Meth-매개 회전을 감소시킨다. 도 6a에 도시된

바와 같이, 6-OHDA 병변 생성 전 7일차 및 병변 생성 후 7일차에 전술한 바와 같이 Ex-4(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, BID) 또는 PT302(0.4 mg/kg)를 피하 투여하여 동물을 치료하였다. 본 연구에 사용된 엑센딘-4의 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BID 투여량은 인간에게 투여할 수 있는 것보다 높으며(아래 표 1 참조), 저 투여량에 해당하는 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BID가 인간에 대한 투여량 및 본 연구 내에서 사용된 PT302 투여량 둘 다와 동등하다. 엑센딘-4(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BID) 및 PT302(0.4 mg/kg) 치료 모두는 6-OHDA 병변화 랫트에서 회전을 유의하게 감소시켰다(엑센딘-4에서 $p=0.005$ 및 PT302군에서 0.002; 도 6b).

[0375] 엑센딘-4 또는 PT302로 전치료한 결과 흑질에서 6-OHDA 매개 도파민작동성 신경퇴행이 보호되었다. 비히를, 엑센딘-4(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, BID) 또는 PT302(0.4 mg/kg)를 투여하는 위동물 및 6-OHDA-병변화 동물의 대표적인 TH 면역 반응성은 도 6c에 도시되어 있다. 6-OHDA를 주사한 결과 병변이 있는 측의 TH 면역반응성이 유의하게 감소되었다(도 6c에서 동측(ipsi)으로 표시됨). 흑질에서의 대표적인 TH 면역반응성을 정량화하였고, 이는 도 6d에 도시되어 있다. PT302 및 엑센딘-4를 사용해 치료한 결과, 6-OHDA 병변측에서 TH 면역반응성 상실이 유의하게 감소하였다(TH 면역반응성을, 동일한 동물의 대조군 비병변측(대측)에 존재하는 면역반응성에 대한 병변측(동측)에 존재하는 면역반응성의 비율(%)로서 표현하여 평가함).

[0376] **실시예 5. PT302를 사용한 후치료는 파킨슨병의 6-OHDA 랫트 모델에서 Meth-매개 회전을 감소시킨다.** 6-OHDA로 병변을 생성한 후 엑센딘-4(1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2일차부터 BID) 또는 PT302(0.4 mg/kg , 2일차에는 1회)로 동물을 치료하였고, 9일차에 전술한 바와 같이 meth-매개 회전 거동을 조사하였다(도 7a). 도 7b에 도시된 바와 같이, PT302는 일측에 6-OHDA 병변이 생성된 랫트에서 회전 거동을 유의하게 감소시켰다($p=0.0075$). 대조적으로, 엑센딘-4는 일측에 6-OHDA 병변이 생성된 랫트에서 회전 거동을 감소시키지 않았다. 따라서, 인간 투여량과 동등하게 엑센딘-4를 사용하는 것(랫트에서 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BID)이 meth-유도 회전을 완화시키는 데 효과적이지 못한 것이 증명되었지만, 인간 투여량으로 사용할 수 있는 PT302의 투여량은 6-OHDA 랫트 PD 모델에서 효과적인 것으로 증명되었다. 인체에 투여할 수 있는 투여량(실시예 4에서와 같이, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BID)보다 높은 등가량으로 엑센딘-4 투여량을 높인 결과, 엑센딘-4는 6-OHDA 유도 장애를 경감시킬 수 있었다. 대조적으로, 임상적으로 투여할 수 있는 동등한 PT302의 투여량은 실시예 4 및 5 모두에서의 유리한 작용을 제공한다.

[0377] **실시예 6. PT302를 사용한 후치료는 PD의 MPTP-마우스 모델에서 독소-유도 거동 결합을 개선하였다.** 전술한 바와 같이, MPTP로 파킨슨증을 유도한 후에 엑센딘-4(16.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 6일차부터 BID) 또는 PT302(6, 20, 및 34일차에 0.6 mg/kg)로 치료하였다(도 8a). 구체적으로, 5일 동안 30 mg/kg 의 MPTP를 전신 투여하여 파킨슨증 (Parkinsonism)을 유도하였다. 예를 들어, Filichia E, Hoffer B, Qi X, Luo Y.의 Inhibition of Drp1 mitochondrial translocation provides neural protection in dopaminergic system in a Parkinson's disease model induced by MPTP Sci Rep. 2016; 6:32656을 참조한다. 엑센딘-4 또는 PT302를 사용한 치료는 첫 MPTP 투여 1일차에 시작되었고, 18일 동안 계속되었다. 18일의 치료 기간에 걸쳐, 엑센딘-4(16.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BID 피하투여) 및 PT302(0.4mg/kg 1회 피하투여)의 선택 투여량은 전달된 엑센딘-4 양과 관련해서는 동일하였고, 각각 601.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이 제공되었다. 18일차에, 와이어 악력 시험(wire grip test)을 사용해 모든 동물군의 이행 운동 조정력(locomotor coordination)을 평가하였다. 와이어 악력 시험(앞발 악력 지구력(PaGE) 시험법 및 악력 기록 시험으로도 알려짐)은 흔히 운동 강도의 척도로서 종종 사용된다. PaGE는 마우스의 악력 강도를 평가하도록 설계되는데, 이는 운동 기능의 감소를 나타낼 수 있으며, Jessica AL 외의 문헌에 기술된 바와 같이 본원에서 수행되었다. (Jessica A. L. Hutter-Saunders, Howard E. Gendelman, R. Lee Mosley의 Murine Motor and Behavior Functional Assessment for Acute 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) Intoxication. J Neuroimmune Pharmacol. 2012; 7(1): 279-288 참조). 간략하게, 각 마우스를 종래의 설치류 수용 케이지에서 꺼내 와이어 뚜껑 상에 두고; 뚜껑을 부드럽게 흔들어서 과지(gripping)를 유도한 다음 거꾸로 뒤집었다(180°). 마우스가 양 뒷다리를 놓을 때까지의 소요 시간을 초 단위로 측정하였다. 각 마우스를 3회, 최대 약 240초까지 시험하고, 추락하거나 양 뒷다리를 놓을 때까지의 가장 긴 소요시간을 기록하였다(Jessica, 외. 2012 참조).

[0378] 도 8b에 도시된 바와 같이, 도파민작동성 세포 독소인 MPTP를 투여한 결과, 악력 시험에서 소요 시간이 유의하게 감소하였다(MPTP: 94.5초 대 MPTP가 없는 통합 대조군: 148.3초; $p=0.02$). PT302는 MPTP-처리 마우스에서 와이어로부터 추락할 때 까지의 시간을 유의하게 증가시킨 반면(118.3초, 조합된 대조군의 값과 통계적으로 상이하지 않음), 엑센딘-4(인간용 바이에타(Byetta: 즉시 방출형 엑센딘-4)와 동일한 방식으로, 1일 2회 투여)는 MPTP-처리 마우스에서 독소 유도 행동 결합을 완화시키지 않았다(72.9초, 결합 대조군 값에 비해 $p>0.01$ 임) (도 8b: 모든 군에서, 마우스의 수는 7 대지 10마리였음).

[0379] **실시예 7. 서방형 엑센딘-4에 의해 중추 신경계에 엑센딘-4를 전달하는 것은 뇌척수액에서 엑센딘-4의 치료량을**

달성하는 데 효과적이다. 표 1에서 기술된 바와 같이, 엑센딘-4(주사 및 미니펌프) 및 엑센딘-4의 서방형 제제(PT302)를 본 연구에 사용된 성체 수컷 스프래그-다울리 랫트(9주령)에게 투여하였다. 엑센딘-4 수준의 측정을 위해, 엑센딘-4 주입 후 14일차에 혈액 및 뇌척수액(CSF)을 채취하였다. 전술한 바와 같이 엑센딘-4의 혈장 및 CSF 수준을 정량화하였다. 표 2에 도시된 바와 같이, 서방형 제제군과 미니펌프 투여 엑센딘-4군의 혈장 및 CSF에서 엑센딘-4가 검출된 반면, 1일 2회(BID, 즉시 방출형) 엑센딘-4 투여군의 CSF에서는 엑센딘-4가 검출 가능한 한계 미만이었다. 이는 본 엑센딘-4 군의 혈장에서 높은 수준의 엑센딘-4가 검출된 것과 대비된다. CSF/혈장 수준 비는 0.0081 (또는 0.81%) 내지 약 0.0412 (또는 4.12%)의 범위였고, 3.5~15 pM/kg/분 범위의 투여량으로 엑센딘-4가 펌프 투여된 군에서는 0.018(또는 1.8%)의 평균이 관찰되었다. 마찬가지로, 14일 동안 0.46~2.0 mg/kg을 투여한 동물에서의 CSF/혈장 수준 비는 0.0117 (또는 1.17%) 내지 약 0.016 (또는 1.6%) 범위였다. 본 데이터는 엑센딘-4의 서방형 방출이 CNS 내로 더 높은 수준의 엑센딘-4를 제공함을 입증한다.

[표 1] 실험 절차

엑센딘-4 BID (즉시 방출)	14 일간의 엑센 딘-4 미니 펌프	PT302	이론적 근거	동물
2.3 μ g/kg/일 (1.15 BID)	3.5 pM/kg/분	0.46 mg/kg/14 일	매일 투여량 변환	랫트 5 마리/ 군
4.6 μ g/kg/일 (2.3 BID)	7.0 pM/kg/분	0.92 mg/kg/14 일	매일 투여량 x 2	랫트 5 마리/ 군
10.0 μ g/kg/일 (5 BID)	15 pM/kg/분	2.0 mg/kg/14 일	혈장 수준 일치	랫트 5 마리/ 군

[0380]

[표 2] PT302, 엑센딘-4, 및 미니펌프를 통한 엑센딘-4로 치료한 랫트에서의 혈장 및 뇌척수액 수준

제제	투여량	혈장	CSF	CSF/플라즈마 비
펌프 (저)	3.5 pM/kg/분	394.8484	14.88721	0.041279
펌프 (중)	7.0 pM/kg/분	4293.409	35.0529	0.008159
펌프 (고)	15 pM/kg/분	7899.634	137.688	0.0185
PT302 (저)	0.46 mg/kg/14 일	1853.329	18.28185	0.01612
PT302 (중)	0.92 mg/kg/14 일	4438.496	54.37036	0.012756
PT302 (고)	2.0 mg/kg/14 일	2316.801	29.98072	0.011789
엑센딘-4 저	2.3 μ g/kg/일(1.15 BID)	93.479	LLOQ 미만	N/A
엑센딘-4 중	4.6 μ g/kg/일 (2.3 BID)	576.886	LLOQ 미만	N/A
엑센딘-4 고	10 μ g/kg/일 (5 BID)	5819.282	LLOQ 미만	N/A

[0381]

[0382]

실시예 8. 경미한 외상성 뇌손상(mTBI) 마우스에 대한 서방형 엑세나타이드 치료는 신규 개체 인식을 개선한다. 전술한 바와 같은 추 낙하 외상 장치를 사용해 두부를 손상시켰다(Tweedie 외, 2007). 상기 장치는 금속 튜브(길이가 90cm이고, 내경은 1.3cm임) 및 스폰지로 이루어지며, 스폰지는 마우스의 두부를 지지하도록 금속 튜브 아래에 있다. 마우스에게 이소플루란을 흡입시켜 가볍게 마취시키고 장치 아래에 두었다. 금속 추(30 그램)를 튜브 상단으로부터 낙하시켜 눈의 한 쪐과 귀 사이의 마우스 외두부를 타격하였다. 손상을 입은 즉시, 회복을 위해 마우스를 원래 케이지에 복귀시켰다. 이러한 두부 손상 절차는 마우스가 잘 견딜 수 있는 것으로, 손상된 측의 해마와 대뇌 피질에서 확산성 신경 손실을 초래하며, 시각적 및 공간적 기억력 테스트에 있어서 인식 장애를 수반한다(Deselms H, Maggio N, Rubovitch V, Chapman J, Schreiber S, Tweedie D, Kim DS, Greig NH,

Pick CG. Novel pharmaceutical treatments for minimal traumatic brain injury and evaluation of animal models and methodologies supporting their development. *J Neurosci Methods*. 2016; 272:69-76).

[0383] 전술한 바와 같은, 두부 손상 후 1시간 후에 서방형 PT302를 (0.6 mg/kg, 경피 투여) 투여하였다(도 9a). 부상 후 7일이 지난 후 신규 물체 인식 패러다임에 대해 마우스를 시험하였는데, 이는 설치류에서 인식 기억력을 평가하는 데 일상적으로 사용되는 것이다. 손상이 없는 설치류는 그들의 즉각적인 위치에서 신규 물체를 살펴보려는 고유의 경향을 나타낸다. 이러한 마우스 거동 특성은 시각 인식 기억 기능의 평가를 가능하게 한다. 더욱 중요하게는, 이는 이러한 고유한 활동에 대한 상이한 자극의 효과의 평가도 가능하게 한다. 상기 테스트는 2차례 시도된다. 제1 시도에서, 동물이 정의된 시간 동안 (5분) 2개의 물체를 탐색할 수 있도록 한다. 제2 시도는 제1 시도 후 24시간 후에 이루어지는데, 본 시도에서는 2개의 물체로 동물을 시험하게 되며, 그 중 하나는 첫 번째 시도에서의 것과 동일하고 다른 하나는 동물에게 생소한 것이다. 제2 시도에서도, 마우스가 5분 동안 물체를 탐색할 수 있도록 한다. 차별 선호도 지수를 계산하여 동물의 인식 기억력을 평가하는 데 사용한다. 상기 지수는 다음에 의해 산출된다: 동물이 신규 물체 근처에서 소모한 시간에서 익숙한 물체 근처에서 소모한 시간을 공제하고, 이를 신규 물체 및 익숙한 물체 근처에서의 시간들의 합으로 나눈다(Dix SL, Aggleton JP. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav. Brain Res.* 1999;99:191-200). 도 9b에 도시된 바와 같이, 엑세나타이드의 투여한 결과, 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스와 비교해 (n=7) mTBI 마우스에서 신규 물체 인식이 유의하게 증가하였는데 (n=5), 이에 의해 PT302 처리 마우스에서 mTBI에 의해 유도된 시각적 인식 장애가 완화되었음을 입증하였다.

[0384] **실시예 9. 정상 ICR 마우스에서 혈장 엑센딘-4 수준의 검사.** PT302(0.1, 0.3, 0.6, 1.0 및 2.0 mg/kg)를 피하 투여하고 7일 후 정상 ICR 마우스에서 엑센딘-4 플라즈마 농도를 측정하였다. 엑센딘-4의 혈장 수준을 전술한 바와 같이 정량하였다. 혈장 엑센딘-4 수준은 주입 후 7일이 될 때까지 지속적이며, 약 4000 pg/ml까지 용량의 준적으로 축적된다(도 10a).

[0385] **실시예 10. 정상 마우스 및 외상성 뇌 손상 마우스에서 혈장 엑센딘-4 수준의 검사.** PT302(0.6 mg/kg)을 피하 투여하고 7일 후 정상 마우스와 TBI 모델 마우스에서 엑센딘-4 혈장 수준을 측정하였다. 엑센딘-4의 혈장 수준을 전술한 바와 같이 정량하였다. 정상 마우스와 TBI 유도 마우스 사이에서 엑센딘-4 혈장 수준에는 차이가 관찰되지 않았다(도 10b).

[0386] **실시예 11. 서방출형 엑세나타이드는 연장된 기간 동안 엑센딘-4 혈장 수준을 유지시킨다.** 정상 ICR 마우스에게 PT302를 다음의 3가지 다른 용량으로 단일 피하 주입하였다: 0.024 mg/kg, 0.12 mg/kg, 및 0.6 mg/kg. 혈장 측정을 위해, 1차 주입 후 0시간차, 0.5시간차 및 1시간차에 혈액을 채취하였고, 1, 3, 7, 14, 및 21일차에 혈액을 채취하였다. 엑센딘-4의 혈장 농도를 전술한 바와 같이 정량화하였다. 도 10c에 도시된 바와 같이, PT302의 1회 투여량으로 20일 넘게 엑센딘-4 혈장 수준이 유지되었다.

[0387] **실시예 12. 서방형 엑세나타이드는 외상성 뇌 손상으로부터 7일 후 신규 물체 및 미로의 새로운 갈래에 대한 인식을 유의하게 증가시킨다.** 전술한 바와 같이 두부 손상을 수행하고, 회복을 위해 마우스를 원래 케이지에 즉시 집어 넣었다. TBI를 유도하고, 1시간 후에 PT302(0.024 mg/kg, 0.12 mg/kg, 및 0.6mg/kg)를 1회 주입량으로 마우스에게 피하 투여하였다. mTBI의 7일 후에 거동 평가(신규 개체 인식 및 Y-미로 테스트)를 수행하였다. Y-미로 패러다임은 새로운 환경 및 공간 작업 기억 기능에 대한 자발적 탐색 및 반응성을 평가하기 위해 흔히 사용된다(Deselms, 외(2016) 참조). 시험 장치는 동일한 검은색의 플렉시글라스 아암(8 X 30 X 15cm)으로 제작되는데, 아암은 중앙에서부터 120°의 각도로 중심점으로부터 연장된다. 각 아암 내부에는, 시각 기억 앵커(visual memory anchor)를 마우스에 주도록 설계된 상이한 공간 단서가 있다. 전형적으로, 몇 분 간격으로 수행되는 2회 시험이 있는데; 여기서는 5분 간격으로 시험을 수행하였다. 각각의 제1 시험의 경우, 시각 아암은 무작위로 선택된다. 각각의 동물을 Y 미로 환경의 중심점에 두고; 5분간의 제1 시험 동안에는 2개의 아암 중 하나가 무작위로 닫히며, 제2 시험 중 2분 동안 모든 3개의 아암이 탐색을 위해 개방된다. 제2 시험 동안 마우스가 각각의 아암에서 탐색한 총 시간을 기록한다. 임의의 가능한 혼란을 피하기 위해, 시험들 사이에 T 미로를 철저히 세정한다. 이전에 탐색한 익숙한 아암에 대해 이전에 탐색하지 않은 신규 아암에서 소비한 시간을 사용해 각각의 동물 치료군 간의 임의의 거동 차이를 평가한다. 즉, (신규 아암에서 소비한 시간 - 익숙한 아암에서 소비한 시간)/(새로운 아암에서 소비한 시간 + 익숙한 아암에서 소비된 시간).

[0388] 비히클로 치료한 mTBI 마우스는 시각적 기억 결함을 앓았고, 대조군 마우스와 비교해, 신규 물체 근처에서 더 적은 시간을 소비했다 (p<0.001) (도 11a). 아무 처리를 하지 않은 mTBI 유도 마우스와 비교해, mTBI를 유도하고

1시간 후에 0.12 mg/kg ($p<0.05$) 및 0.6 mg/kg ($p<0.01$)의 투여량으로 PT302를 1회 경피 투여하여 치료한 마우스에서 신규 물체에 대한 높은 선호도가 관찰되었다 (도 11a).

[0389] mTBI를 겪은 마우스는, 위(대조군) 동물과($p<0.001$) 비교해, 공간 기억에 있어서 유의한 장애를 보였고, Y 미로의 새로운 아암에서 더 적은 시간을 소비하였다. mTBI를 유도하고 1시간 후에 0.12 mg/kg 및 0.6 mg/kg의 용량으로 PT302를 1회 경피 투여한 결과, mTBI 공간 기억 결핍이, 아무 처리를 하지 않은 mTBI유도 마우스($p<0.01$)와 비교해 완화되었다 (도 11b). [F(4,50)= 4.83, $p= 0.002$, 사후 Fisher의 LSD].

[0390] 모든 군은 수준을 높인 + 미로의 개방된 아암에서 대략 동일한 시간을 소비하였고, 불안-유사 행동에 관해서는 서로 차별화할 수 없었는데(도 11c); 이는 중요하게는, 불안-유사 행동이 이전의 신규 물체 인식 패러다임과 Y 미로 패러다임($p>0.05$)에서는 혼란 인자가 아니었음을 나타낸다 [F(4,36)= 0.28, $p= 0.89$].

[0391] **실시예 13. 서방형 엑세나타이드는 외상성 뇌 손상으로부터 30일 후 신규 물체 및 미로의 새로운 갈래에 대한 인식을 유의하게 증가시킨다.** 전술한 바와 같이 두부 손상을 수행하고, 회복을 위해 마우스를 원래 케이지에 즉시 넣었다. TBI를 유도하고, 1시간 후에 PT302(0.6 mg/kg)를 1회 주입량으로 마우스에게 피하 투여하였다. mTBI의 30일 후에 거동 평가(신규 개체 인식 및 Y-미로 테스트)를 수행하였다.

[0392] 비히클로 치료한 mTBI 마우스는 시각적 기억 결함을 앓았고, 대조군 마우스와 비교해, 신규 물체 근처에서 더 적은 시간을 소비했다 (($p<0.001$; 도 12a). 아무 처리를 하지 않은 mTBI유도 마우스와 비교해, mTBI를 유도하고 1시간 후에 0.12 mg/kg 또는 0.6 mg/kg의 투여량으로 PT302를 1회 경피 투여하여 치료한 마우스에서 신규 물체에 대한 높은 선호도가 관찰되었다 (각각 $p<0.01$ 및 $p<0.001$; 도 12a).

[0393] mTBI를 겪은 마우스는, 위동물/대조군 동물과 비교해, 공간 기억에 있어서 유의한 장애를 보였고, 미로의 새로운 아암에서 더 적은 시간을 소비하였다 ($p<0.001$; 도 12b). mTBI를 유도하고 1시간 후에 0.6 mg/kg의 용량으로 PT302를 1회 경피 투여한 결과, mTBI 공간 기억 결핍이, mTBI만 겪은 마우스($p<0.01$)와 비교해 완화되었다 ($p<0.01$; 도 12b).

[0394] 모든 군은 미로의 개방된 아암에서 대략 동일한 시간을 소비하였고, 불안-유사 행동에 관해서는 서로 차별화할 수 없었는데(도 12c); 이는 불안-유사 행동이 이전의 신규 물체 인식 패러다임과 Y 미로 패러다임에서는 혼란 인자가 아니었음을 나타낸다($p>0.05$).

[0395] **실시예 14. 마우스 측두 피질 영역 및 해마 영역에서의 외상성 뇌 손상 이후 PT302 투여는 NeuN 면역 반응성의 감소를 예방하였다.** NeuN은 성숙한 뉴런 마커이며, 외상성 뇌 손상으로 인한 뉴런 손실을 평가하는 데 사용될 수 있다. 정의된 뇌 영역에서의 NeuN 세포를 평가하기 위해, 과량의 케타민 + 자일라진을 투여하여 마우스를 마취시키고, 생리학적 완충 식염수에 이어 0.1 M 인산 완충액 중의 4% 파라포름알데히드((PFA), pH 7.4)로 즉시 경심(transcardially) 관류시켰다. 그들의 뇌를 제거하고, 밤새 고정하고(0.1M 인산염 완충액 중 4% PFA, pH 7.4), 그런 다음 30% 수크로오스에 48시간 동안 두었다. 관상 섹션(30 μ m)을 냉각기 상에서 절단하고, 동결보호제에 넣고, 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 그 후, 5개 섹션의 피질과 5개 섹션의 해마를 인산 완충 식염수(PBST) 중의 0.1% Triton X-100 및 정상 말 혈청과 함께 25°C에서 1시간 동안 인큐베이션하여 불록화하였다. 그런 다음, 일차 항체인 마우스 항신경 핵(NeuN; 1:50, Millipore, Danvers, MA, 미국, Cat#MAB3377)을 PBST 및 2% 정상 말 혈청에 용해시키고, 상기 섹션과 함께 4°C에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. PBST 중에서 행군 뒤, 섹션을 DyLight™ 405 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG 및 DyLight™ 488-conjugated AffinityPure DonkeyAnti-mouse IgG (1:300; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, 미국)와 함께 25°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBST에서 행군 후, 젤라틴-코팅된 견조 슬라이드 상에 섹션을 장착하고, X 20 및 X 63 렌즈(Carl Zeiss, 독일 Jena)가 구비된 Zeiss LSM 510 공초점 현미경으로 형광에 대해 평가하였다. 각각의 뇌에 대해, 3 내지 5개의 섹션을 취하고, 140² 또는 440² μ m의 정의된 필드 내에서 해마와 측두 피질 내 세포의 평균 개수를 계산하였다. 면역형광에 대한 면역조직화학 슬라이드의 평가는 맹검 방식으로 수행하였으며, 일차 항체의 누락은 음성 대조군 섹션이 생성되는 중에 일상적으로 수행하였다. 섹션 정량화를 위한 Imaris 프로그램(Bitplane AG, Zurich, 스위스)으로 분석을 수행하였다.

[0396] 도 13a는 mTBI 후 30일차에 대조군 마우스, 아무 처리를 하지 않은 mTBI유도 마우스, 및 PT302로 치료한 (mTBI 후 1시간 차에 0.6 mg/kg으로 치료함) mTBI 마우스의 피질, CA3 및 치아이랑에서의 NeuN(색상으로 평가되는 경우, 적색) 양성 뉴런의 대표 이미지를 도시한다. 도 13b, 13c 및 13d의 막대 그래프는 위동물 대조군, mTBI군 및 mTBI + PT302 0.6 mg/kg 치료군에서 항NeuN으로 양성 염색된 뉴런의 수에 의해 측정한 바와 같이, 각각 피질, CA3 및 치아이랑에서의 정량화된 뉴런 생존을 도시한다. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). 값은 평균 \pm SEM

이다. PT302의 형태로 서방출형 엑센딘-4를 투여한 결과, 외상성 뇌 손상으로 인해 관찰된 뉴런 소실이 예방되었다.

[0397] 실시예 15. PT302 투여는 mTBI 마우스에서 퇴행성 뉴런의 수를 감소시켰다. 플루오로-제이드® C는 손상된 퇴행성 뇌 뉴런을 표지하는 형광 염색으로, 외상성 뇌 손상으로 인한 뉴런 소실을 평가하는 데 활용될 수 있다. 이 온화된 칼슘 결합 어댑터 분자 1(iba1)은 소교 세포에서 특이적으로 발현되어 활성화된 소교 세포에서 상향 조절되며, 신경염증의 마커로서 사용될 수 있다. 마우스를 안락사시키고, 전술한 바와 같이 면역조직화학 분석을 위해 뇌를 준비하였다. 해마 및 두정 피질로부터의 관상 섹션(40 μ m)을 냉각기 상에서 절단하여 동결보호제 용액에 수집하였다. 두정 피질에 추가하여, 해마로부터의 CA1, CA3, 및 치아이랑을 분석하였다.

[0398] 플루오로제이드 C 염색의 경우, 뇌 섹션을 먼저 80% 에탄올 중에 1% NaOH를 함유하는 용액에 5분 동안 침지시켰다. 이들을 70% 에탄올 중에서 2분 동안 헹구고, 중류수에서 세척한 다음, 0.06% 과망간산 칼륨 용액 중에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 물 세척에 이어서, 슬라이드를 FJC 염색 용액(FJC 0.01% 스톡 용액이 함유된 중류수 4ml을 0.1% 아세트산 96ml에 첨가하여 수득함)에서 인큐베이션하고 10분 동안 염색하였다. 슬라이드를 중류수로 3회 세척한 후, 슬라이드 워머(slide warmer) 상에서 충분히 공기 건조시키고, 크실렌 중에서 청결화하여 DPX로 덜었다. 양 반구 내 각각의 영역에 대해 플루오로제이드 C 양성 세포를 FV 1000MPE 올림푸스 공초점 현미경으로 계수하였다.

[0399] IBA1/TNF- α 이중 표지를 위해, 섹션을 IBA1 항체(다클론 염소 항IBA1 1:200, Abcam, 미국) 및 TNF- α 항체(TNF- α 다클론 토끼 항TNF- α 1:800, Abbiotec, 미국)와 함께 48시간 동안 인큐베이션하였다. PBS 세척 후, IBA1에 대한 이차 항체와 함께 섹션을 인큐베이션하였고, 3단계 검출을 사용해 비오틴-접합된 IgG (IgG (H+L) 비오틴-염소 항토끼 1:500, Invitrogen, 미국) 및 스트렙트아비딘-플루오레세인 (1:200, Vector, 영국)에 의한 TNF- α 의 신호를 증가시켰다.

[0400] IBA1 및 TNF α 에 대한 정질 및 정량 분석은 FV 1000MPE, Olympus 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 사용하여 수행하였다. Z-시리즈 이미지들은 ImageJ 1.47v로 처리하였고, 공배치된 요소의 체적은 다음과 같이 Imaris 7.4.2로 측정하였다: 각 데이터세트에 대해, 공배치 채널은 소프트웨어에 의해 자동적으로 구성되었다. 최종 스택에서, 각 동물의 반구 당 각각의 뇌 영역(CA1, CA3, DG 및 피질)에 대한 관심 영역을 선택하였고, 관심 요소의 부피를 계산하고 이를 합산하여 부피/ μ m³으로 표현하였다.

[0401] 도 14a에 도시된 바와 같이, mTBI 손상 이후, 대조군과 비교해 조사된 모든 영역에서 (측두 피질, 및 해마의 경우는 CA1, CA3, DG) 플루오로-제이드 C 양성 뉴런의 수가 크게 증가하였음이 관찰되었다(CA1의 경우 $p<0.05$; CA3, DG 및 CTX의 경우 $p<0.001$; 각각 도 14a, 및 도 14b, 14c 및 14d, 및 14e). 0.6 mg/kg 용량의 PT302로 치료한 결과, 조사된 모든 영역에서 mTBI-유도 신경퇴행이 억제되었고(CA3 및 DG에서 $p<0.01$, 도 14c 및 14d; CTX 및 CA1에서 $p<0.05$, 도 14e 및 14b), PT302의 용량 0.12 mg/kg은 CA3 영역에서 유의한 효과를 나타냈다($p<0.05$).

[0402] 도 15a에서 도시된 바와 같이, mTBI 손상 이후, 분석된 영역 모두에서 IBA1 연역반응성이 비히를 대조군과 비교해 증가하였다(CA1의 경우 $p<0.05$; CA3, DG 및 CTX의 경우 $p<0.001$). 대조군에서, 소교 세포는 길고 얇은 프로세스인 작은 체세포로 휴면 형태를 나타냈다(도 15a). mTBI 손상 후, 소교 세포는 더 짧고 두꺼운 프로세스를 갖는 더 큰 몸체를 특징으로 하는 활성화된 형태를 나타냈다(도 15a). 두 투여량 모두에서 PT302는 소교 세포 활성화를 억제하였다: PT302 0.6mg/kg은 모든 뇌 영역에서 효과적인 것으로 나타났다(CTX에서 $p<0.001$; CA1 및 CA3에서 $p<0.001$; DG에서 $p<0.05$).

[0403] 전염증성 사이토카인 TNF- α 에 대한 면역반응성은 모든 분석된 영역에서의 mTBI 병변군 내 IBA1+ 세포에서 증가하였다(DG에서 $p<0.05$; CA1에서 $p<0.01$; CA3 및 피질에서 $p<0.001$; 각각 도 15d, 15b, 15c, 및 15e). PT302를 0.6 mg/kg 및 0.12 mg/kg의 투여량으로 투여한 결과, 해마 및 피질 모두에서 IBA1/TNF- α IR 공배치 체적의 수준이 감소되었다.

[0404] 특정 실시예

[0405] 본 발명의 일 양태는 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은, 대상체의 전신 혈액 순환에 신경보호 폴리펩티드의 치료 유효량을 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드를 서방형 방출 시키거나 전달하는 디바이스에 의해 투여하는 단계를 포함하며, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또

는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제, 또는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출은, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계 (CNS)의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

[0406] 본 발명의 또 다른 양태는, 중추 신경계(CNS) 관련 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하거나 CNS 관련 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 이를 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체의 전신 혈액 순환에 신경보호 폴리펩티드의 치료 유효량을 방출 제어형 제제 또는 신경보호 폴리펩티드를 서방형 방출시키거나 전달하는 장치에 의해 투여하는 단계를 포함하며, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하고, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키며, 방출 제어형 신경보호 폴리펩티드 제제 또는 장치는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계 (CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.

[0407] 본 발명의 일 양태는 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 신경보호 폴리펩티드를 제공하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은, GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하는 방출 제어형 제제를 대상체의 전신 혈액 순환에 투여하는 단계를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액 뇌 장벽(BBB)을 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

[0408] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제는 신경보호 폴리펩티드의 장기 지속성 제제이다.

[0409] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 생물학적 이용 가능성 및 신경보호 폴리펩티드의 유효량의 지속 방출이 (예를 들어, 활성 성분의 초기 방출, 예컨대, 유해한 초기 방출 없이) 특정 기간 동안 효과를 갖도록, 특정 점도 및 코팅 물질을 갖는 생분해성 중합체를 추가로 포함한다.

[0410] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 폴리펩티드 및 생분해성 중합체를 갖는 코어를 포함하는 방출 제어형 마이크로 스피어; 및 코어를 코팅하는 코팅 층을 포함한다.

[0411] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방향 방출을 위한 데포 제제를 포함한다.

[0412] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 조성물을 포함한다.

[0413] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 상태의 적어도 하나의 증상을 완화시킨다.

[0414] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, CNS 관련 병태는 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 병태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون병, 만성 외상성 뇌병변, 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 류이소체 치매(DLB), 혼합형 치매, 전측두엽 치매, 크로이츠펠트 야곱병, 정상 뇌압 수두증, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0415] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 방출 제어형 신경보호 제제를 주입하는 단계(injecting)를 포함한다.

[0416] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 주입하는 단계는 피하 주입하는 단계이다.

[0417] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경 보호 제제를 투여하는 단계는 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도(steady-state plasma concentration)가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다.

- [0418] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌 또는 이들의 조합의 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.
- [0419] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, CSF 내 신경보호 폴리펩티드 농도는 5 내지 약 400 pg/mL의 범위 내에 있다.
- [0420] 본 발명의 추가 양태는 중추신경계(CNS) 관련 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하거나, CNS 관련 질병의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 이를 감소시키는 방법을 제공된다. 상기 방법은, GLP-1, 액센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 액센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 포함하는 방출 제어형 제제의 치료 유효량을 대상체의 전신 혈액 순환에 투여하는 단계를 포함하여, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 액센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 웨პ티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액 뇌 장벽(BBB)를 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되는 것을 향상시킨다.
- [0421] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제는 신경보호 폴리펩티드의 장기 지속성 제제이다.
- [0422] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제는, 특정 기간 동안 신경보호 폴리펩티드가 생물학적으로 이용 가능하게 하고 신경보호 폴리펩티드가 유효한 농도로 (예를 들어, 활성 성분의 초기 방출, 예컨대, 유해한 초기 방출 없이) 서방형 방출이 되게 하는, 특정 점도와 코팅 물질을 갖는 생분해성 중합체를 추가로 포함한다.
- [0423] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제는: 신경보호 폴리펩티드 및 생분해성 중합체를 갖는 코어를 포함하는 방출 제어형 마이크로 스피어 및 코어를 코팅하는 코팅 층을 포함한다.
- [0424] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 데포 제제를 포함한다.
- [0425] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 장기 지속성 제제는 신경보호 폴리펩티드의 서방형 방출을 위한 조성물을 포함한다.
- [0426] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 병태의 적어도 하나의 증상을 경감시킨다.
- [0427] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, CNS 관련 병태는 파킨슨병(PD), 외상성 뇌 손상(TBI), 다발성 경화증, 약물 중독, 알코올 중독, 신경퇴행성 병태, 뇌 염증, 알츠하이머병(AD), 다기관 위축증, 헌팅تون병, 만성 외상성 뇌병변, 운동 뉴런증(예: 근위축성 측색 경화증, 척수 손상, 척수소뇌실조증(SCA), 척수근위축증(SMA)), 혈관성 치매, 루이소체 치매(DLB), 혼합형 치매, 전증두엽 치매, 크로이즈웰트 야곱병, 정상 뇌압 수두증, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0428] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하는 단계는 방출 제어형 신경보호 제제를 대상체에게 주입하는 단계(injecting)를 포함한다.
- [0429] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 주입하는 단계는 대상체에게 피하 주입하는 단계이다.
- [0430] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하는 단계는 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도(steady-state plasma concentration)가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다.
- [0431] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에서 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.
- [0432] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 제제는 7~21일마다 1회 (예를 들어, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일마다 1회) 투여된다.
- [0433] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 제제는 이전 투여 후 약 7 내지 약 21일의 제2 시간에 (예를 들어, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일,

약 18일, 약 19일, 약 20일, 또는 약 21일마다 1회씩) 투여된다.

[0434] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 혈장 내 신경보호 폴리펩티드 농도의 변화는 이전 제제 투여로부터 약 28일 이내에 (예를 들어, 약 21일 또는 약 14일 이내에) 재투여되는 경우 약 30% 이하이다.

[0435] 본 발명의 추가 양태는 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은: GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 전신 혈액 순환에 서방형 방출에 의해 전달하는 단계를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액 뇌 장벽(BBB)를 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

[0436] 본 발명의 추가 양태는 중추신경계(CNS) 관련 질병을 앓고 있는 대상체를 치료하거나, CNS 관련 질병의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것이 필요한 대상체에서 이를 감소시키는 방법을 제공된다. 상기 방법은: GLP-1, 엑센딘-4, 또는 치료적으로 유효한 GLP-1 유사체 또는 엑센딘-4 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 신경보호 폴리펩티드를 대상체의 전신 혈액 순환에 지속 전달하는 단계를 포함하되, 신경보호 폴리펩티드는 GLP-1, 엑센딘-4 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 결합하는 수용체에 결합하여 이를 활성화시키고, 방출 제어형 신경보호 제제는, 신경보호 폴리펩티드의 신속 방출형 제제에 비해, 신경보호 폴리펩티드가 대상체의 혈액 뇌 장벽(BBB)를 가로질러 중추 신경계(CNS)의 적어도 일부분에 전달되고/되거나 흡수되는 것을 향상시킨다.

[0437] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 서방형 방출 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들을 제공하는 단계는 디바이스(예를 들어, 펌프, 미니 펌프, 삼투 펌프, 삼투 전달 장치, 주입 장치, 정맥내 투여 장치, 연동 펌프, 또는 미니어쳐 펌프 등)를 통해 투여하는 단계를 포함한다.

[0438] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 상기 제제가 투여되는 경우(예를 들어, 7 내지 28일마다 한 번씩 투여되거나, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28일마다 한 번씩 투여되는 경우), 정태가 달성된 후의 혈장 내 정태 신경보호 폴리펩티드 농도의 백분율 변화는 약 80% 이하(예: 약 50% 이하 또는 약 40% 이하)이다.

[0439] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들은 디바이스(예를 들어, 펌프, 미니 펌프, 삼투 펌프, 삼투 전달 장치, 주입 펌프, 정맥내 투여 장치, 연동 펌프, 또는 미니어쳐 주입 펌프 등)를 통해 투여된다.

[0440] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 신경보호 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들은 약 1 pM/kg/분 내지 약 30 pM/kg/분(예를 들어, 약 3 pM/kg/분 내지 약 17.5 pM/kg/분)의 속도로 투여된다.

[0441] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 신경보호 제제를 투여하거나, 신경보호 폴리펩티드를 지속 전달하는 것은 대상체에서 적어도 하나의 CNS 관련 병태의 적어도 하나의 증상을 완화시킨다.

[0442] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하거나 신경보호 폴리펩티드를 서방출에 의해 제공하는 단계는, 신경보호 폴리펩티드의 정태 혈장 농도가 약 50 내지 약 4500 pg/mL의 범위에 있게 한다.

[0443] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 방출 제어형 제제를 투여하거나, 신경 보호 폴리펩티드를 서방형 방출에 의해 제공하는 단계는 뇌척수액(CSF), 뇌, 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에서 신경보호 폴리펩티드 농도의 누적 증가를 초래한다.

[0444] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, CSF 내 신경보호 폴리펩티드 농도는 10 내지 약 400 pg/mL의 범위 내에 있다.

[0445] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 혈장에 대한 CFS 내 정태 폴리펩티드 농도의 비는 약 0.1% 내지 약 5%의 범위에 있다.

[0446] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 엑센딘-4 유사체는 화학식 I 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 다음의 염으로 표시된다:

[0447] Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19

Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 -Z₁, Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 -Z₁,

[0448] (화학식 I)

[0449] (여기서:

[0450] Xaa1은 His, Arg, Tyr, Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 4-օ]미다조프로파오닐 이고;

[0451] Xaa2는 Ser, Gly, Ala, 또는 Thr이 고;

[0452] Xaa3은 Ala, Asp, 또는 Glu이 고;

[0453] Xaa4는 Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 Gly이 고;

[0454] Xaa5는 Ala 또는 Thr이 고;

[0455] Xaa6은 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이 고;

[0456] Xaa7은 Thr 또는 Ser이 고;

[0457] Xaa8은 Ala, Ser, 또는 Thr이 고;

[0458] Xaa9는 Ala, Norval, Val, Norleu, Asp, 또는 Glu이 고;

[0459] Xaa10은 Ala, Leu, Ile, Val, 펜틸글리신, 또는 Met이 고;

[0460] Xaa11은 Ala 또는 Ser이 고;

[0461] Xaa12는 Ala 또는 Lys이 고;

[0462] Xaa13은 Ala 또는 Gln이 고;

[0463] Xaa14는 Ala, Leu, Ile, 펜틸글리신, Val, 또는 Met이 고;

[0464] Xaa15는 Ala 또는 Glu이 고;

[0465] Xaa16은 Ala 또는 Glu이 고;

[0466] Xaa17은 Ala 또는 Glu이 고;

[0467] Xaa19는 Ala 또는 Val이 고;

[0468] Xaa20은 Ala, 또는 Arg이 고;

[0469] Xaa21은 Ala, Leu, 또는 Lys-NHe-R이 고(여기서 R은 Lys, Arg, 또는 C1-C10 칙체 또는 분지형 알카노일임);

[0470] Xaa22는 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이 고;

[0471] Xaa23은 Ile, Val, Leu, 펜틸글리신, tert-부틸글리신, 또는 Met이 고;

[0472] Xaa24는 Ala, Glu, 또는 Asp이 고;

[0473] Xaa25는 Ala, Trp, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이 고;

[0474] Xaa26은 Ala 또는 Leu이 고;

[0475] Xaa27은 Ala 또는 Lys이 고;

[0476] Xaa28은 Ala 또는 Asn이 고;

[0477] Z₁은 -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly-Z₂, Gly Xaa31-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38-Z₂, 또는 Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38 Xaa39-Z₂이 고,

[0478] Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38은 Pro, 호모프롤린(homoproline), 3Hyp, 4Hyp, 티오프롤린(thioproline), N-알킬글리신, N-알킬펜틸글리신, 또는 N-알킬알라닌으로 이루어진 군으로부터 독립하여 선택되고, Xaa39는 Ser, 또

는 Tyr(예: Ser)이며,

[0479] Z_2 는 $-OH$, 또는 $-NH_2$ 임.

[0480] 단,

[0481] Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, 및 Xaa28 중 3개 이하는 Ala이고;

[0482] Xaa1이 His, Arg, 또는 Tyr일 때, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나는 Ala임).

[0483] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 엑센딘-4 유사체는 화학식 II 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 다음의 염으로 표시된다:

[0484] Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Ala Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 X_1-Z_1 ,

[0485] (화학식 II)

[0486] (여기서:

[0487] Xaa1은 His, Arg, Tyr, Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 4-օ미다조프로파오닐이고;

[0488] Xaa2는 Ser, Gly, Ala, 또는 Thr이고;

[0489] Xaa3은 Ala, Asp, 또는 Glu이고;

[0490] Xaa4는 Ala, Norval, Val, Norleu, 또는 Gly이고;

[0491] Xaa5는 Ala 또는 Thr이고;

[0492] Xaa6은 Ala, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;

[0493] Xaa7은 Thr 또는 Ser이고;

[0494] Xaa8은 Ala, Ser, 또는 Thr이고;

[0495] Xaa9는 Ala, Norval, Val, Norleu, Asp, 또는 Glu이고;

[0496] Xaa10은 Ala, Leu, Ile, Val, 펜틸글리신, 또는 Met이고;

[0497] Xaa11은 Ala 또는 Ser이고;

[0498] Xaa12는 Ala 또는 Lys이고;

[0499] Xaa13은 Ala 또는 Gln이고;

[0500] Xaa14는 Ala, Leu, Ile, 펜틸글리신, Val, 또는 Met이고;

[0501] Xaa15는 Ala 또는 Glu이고;

[0502] Xaa16은 Ala 또는 Glu이고;

[0503] Xaa17은 Ala 또는 Glu이고;

[0504] Xaa19는 Ala 또는 Val이고;

[0505] Xaa20은 Ala, 또는 Arg이고;

[0506] Xaa21은 Ala, Leu, 또는 Lys-NHe-R(여기서 R은 Lys, Arg, C1-C10 칙쇄 또는 분지형 알카노일, 또는 시클로알킬-알카노일임)이고;

[0507] Xaa22는 Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;

[0508] Xaa23은 Ile, Val, Leu, 펜틸글리신, tert-부틸글리신, 또는 Met이고;

[0509] Xaa24는 Ala, Glu, 또는 Asp이고;

- [0510] Xaa25는 Ala, Trp, Phe, Tyr, 또는 나프틸알라닌이고;
- [0511] Xaa26은 Ala 또는 Leu이고;
- [0512] X₁은 Lys Asn, Asn Lys, Lys-NH_ε-R Asn, Asn Lys-NH_ε-R, Lys-NH_ε-R Ala, Ala Lys-NH_ε-R이고(여기서 R은 Lys, Arg, C1-C10 직쇄 또는 분지형 알카노일, 또는 시클로알카노일임);
- [0513] Z₁은 -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly-Z₂, Gly Xaa31-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37-Z₂, Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38-Z₂, 또는 Gly Xaa31 Ser Gly Ala Xaa36 Xaa37 Xaa38 Xaa39-Z₂이며;
- [0514] Xaa31, Xaa36, Xaa37, 및 Xaa38은 Pro, 호모프롤린, 3Hyp, 4Hyp, 티오프롤린, N-알킬글리신, N-알킬펜틸글리신 및 N-알킬알라닌이로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, Xaa39는 Ser 또는 Tyr이며;
- [0515] Z₂는 -OH 또는 -NH₂임.
- [0516] 단,
- [0517] Xaa3, Xaa4, Xaa5, Xaa6, Xaa8, Xaa9, Xaa10, Xaa11, Xaa12, Xaa13, Xaa14, Xaa15, Xaa16, Xaa17, Xaa19, Xaa20, Xaa21, Xaa24, Xaa25, and Xaa26 중 3개 이하는 Ala이며;
- [0518] Xaa1이 His, Arg, Tyr, 또는 4-이미다조프로피오닐일 때, Xaa3, Xaa4, 및 Xaa9 중 적어도 하나는 Ala임).
- [0519] 본원에 기술된 임의의 양태 또는 실시예에서, 신경보호 폴리펩티드는 서열번호 1~55로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0520] 본원에서 언급되는 각각의 문헌은 참조로서 본원에 통합된다. 실시예에서 또는 달리 명시적으로 표시된 경우를 제외하고는, 본 명세서에서 물질의 양 등을 명시하는 모든 수량(numerical quantities)은 "약(about)"이라는 단어로 변형된 것으로 이해해야 한다. 본원에서 제시된 상한액 및 하한액, 범위, 및 비율에 대한 제한은 독립적으로 조합될 수 있음을 이해해야 한다. 유사하게, 본 발명의 각 요소에 대한 범위 및 양은 임의의 다른 요소들에 대한 범위 또는 양과 함께 사용될 수 있다.
- [0521] 당업자는, 통상적인 실험보다 더 많이 사용하지 않고도 본원에서 기술된 특정 실시예 및 방법에 대한 많은 등가물을 인식하게 되거나, 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음의 청구범위의 범주에 포함되도록 의도된다.
- [0522] 본원에 기술된 상세한 실시예들 및 구현예들은 예시적인 목적을 위한 단지 예시로서 주어지며, 본 발명에 한정되는 것으로 간주되지 않음을 이해해야 한다. 이를 고려한 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이며, 이는 본원의 사상 및 정도 내에 포함되고, 첨부된 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 간주된다. 예를 들어, 성분의 상대적인 양은 원하는 효과를 최적화하기 위해 변화될 수 있고, 추가 성분이 첨가될 수 있고/있거나 유사한 성분들은 기술된 성분 중 하나 이상에 대해 치환될 수 있다. 본 발명의 시스템, 방법 및 단계와 관련된 추가적인 유리한 특징 및 기능은 첨부된 청구범위로부터 명백해질 것이다. 또한, 당업자는, 통상적인 실험을 더 많이 사용하지 않고도 본원에서 기술된 특정 실시예 및 개시에 대한 많은 등가물을 인식하게 되거나, 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음의 청구범위에 포함되도록 의도된다.
- [0523] 참조
- [0524] Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239-247.
- [0525] Bressler Ω. "Pharmacological regulation of blood glucose levels in non-insulin dependent diabetes," *Arch. Int. Med.* 157:836-848 (1997)
- [0526] Calvo Ω. "Structural characterization by affinity cross-linking of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide receptor in rat brain," *J. Neurochem.* 64(1):299-306 (1995)
- [0527] Campos Ω. "Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse," *Endocrinology* 134:2156-2164 (1994)
- [0528] Chen Ω. "Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode pro-glucagon-derived peptides or

exendin-4 in the lizard," *J. Biol. Chem.* 272: 4108-4115 (1997)

[0529] De Ore *et al.* "The effect of GLP-1 on insulin release in young and old rats in the fasting state and during an intravenous glucose tolerance test," *J. Gerontol.* 52:B245-249 (1997)

[0530] Drucker *et al.* "Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3434-3438 (1987)

[0531] During MJ, *et al.* "Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection," *Nature Medicine* 9: 1173-1179 (2003).

[0532] Elahi *et al.* "The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-36) in normal and diabetic subjects," *Regul. Pep.* 51:63-74 (1994)

[0533] Fehmann *et al.* "Cell and Molecular Biology of the Incretin Hormones Glucagon-Like Peptide-I and Glucose-Dependent Insulin Releasing Polypeptide," *Endocrine Rev.* 16:390-410 (1995)

[0534] Fehmann *et al.* "Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma BTC-1 cells", *Endocrinology* 130: 159-166 (1992)

[0535] Geula *et al.* Mesulam "Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study," *Neuroscience*. 33:469-81 (1989)

[0536] Ghazzi *et al.* "Cardiac and glycemic benefits of troglitazone treatment in NIDDM," *Diabetes Care*. 15: 270-276 (1997)

[0537] Goke *et al.* "Cardiac and Glycemic Benefits of Troglitazone Treatment in NIDDM," *Diabetes* 46:433-439 (1993)

[0538] Goke *et al.* "Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites, *Eur. J. Neurosci* 7:2294-2300 (1995)

[0539] Goke *et al.* "Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-4 (9-39)-amide in an antagonist at the GLP-1 (7-36)-amide receptor of insulin-secreting -cells," *J. Biol. Chem.* 268:19650-19655 (1993)

[0540] Greig N *et al.* "Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations." *Diabetologia* 42:45-50, (1999).

[0541] Gross *et al.* Meienhofer (eds.) "The Peptides: Analysis, Synthesis," Biology 3: Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis, Academic Press, N.Y. (1981)

[0542] Gutniak *et al.* "Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus," *N. Engl. J. Med.* 326:1316-1322 (1992)

[0543] Jia Y *et al.* 2015 Peptidic exenatide and herbal catapol mediate neuroprotection via the hippocampal GLP-1 receptor/β-endorphin pathway," *Pharmacological Research* 102:276-85.

[0544] Jin *et al.* "Distribution of glucagonlike peptide I (GLP-I), glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study," *J. Comp. Neurol.* 271:519-32. (1988)

[0545] Kastin AJ *et al.* Akerstrom V, *International Journal of Obesity* (2003) 27, 313-31

[0546] Kim BJ, *et al.* "Transferrin fusion technology: a novel approach to prolonging biological half-life of insulinotropic peptides," *J Pharmacol Exp. Ther.* 2010 Sep 1; 334(3):682-92.

[0547] Kim S, *et al.* "Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease," *J Endocrinol* 202(3):431-9 (2009)

[0548] Lahiri DK, Farlow MR, Hintz N, Utsuki T *et al.* Greig NH. 2000 Cholinesterase inhibitors, beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptides in Alzheimer's disease *Acta Neurol Scand Suppl* 176:60-67.

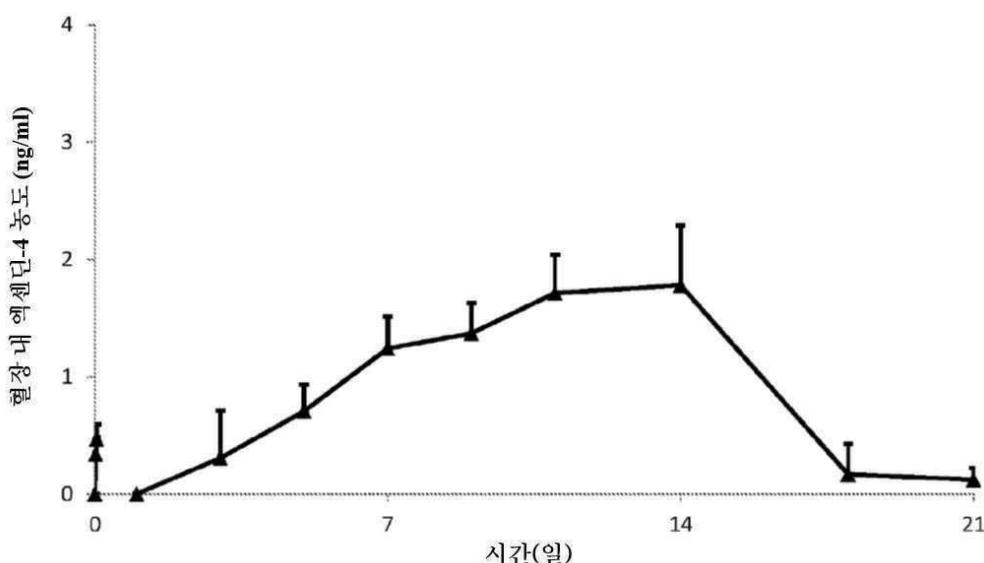
[0549] Li Y *et al.* "GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular

- and rodent models of stroke and Parkinsonism," *Proc Natl Acad Sci USA* 106(4):1285-90 (2009)
- [0550] Liu W, 외 "Neuroprotective effects of lixisenatide and liraglutide in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease," *Neuroscience* 202:42-50 (2015)
- [0551] Lu Z, et al., 2014 "Differential hypoglycaemic, anorectic, autonomic and emetic effects of the glucagon-like peptide receptor agonist, exendin-4, in the conscious telemetered ferret," *J. Transl Med.* 12: 327.
- [0552] Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K 및 Mattson MP. 1997 Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation *J Neurosci* 17:1046-1054.
- [0553] Martin B 외 2012 "Euglycemic agent-mediated hypothalamic transcriptomic manipulation in the N171-82Q model of Huntington disease is related to their physiological efficacy," *J Biol Chem* 287(38):31766-82.
- [0554] Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K 외, (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 65(4):1740-1751.
- [0555] Moceri 외 "Early-life risk factors and the development of Alzheimer's disease," *Neurology* 54:415-420 (2000)
- [0556] Montrose-Rafizadeh C, Wang Y, Janczewski AM 외, (1997a) Overexpression of glucagon-like peptide-1 receptor in an insulin-secreting cell line enhances glucose responsiveness. *Mol Cell Endocrinol* 130(1-2):109-117.
- [0557] Montrose-Rafizadeh 외 "High potency antagonists of the pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor," *J. Biol. Chem.* 272:21201-21206 (1997b)
- [0558] Montrose-Rafizadeh 외 "Incretin hormones regulate glucose dependent insulin secretion in RIN 1046-38 cells: mechanisms of action," *Endocrinology* 135:589-594 (1994)
- [0559] Nathan 외 "Insulinotropic action of glucagonlike peptide-I-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects," *Diabetes Care* 15:270-276 (1992)
- [0560] Nauck 외 "Preserved incretin activity of Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with Type-2 diabetes mellitus," *J. Clin. Invest.* 91: 301-307 (1993)
- [0561] Nauck 외 "Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in type II (non-insulin dependent) diabetic patients," *Diabetologia* 36:741-744 (1993)
- [0562] Naya 외 "Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice," *Genes Dev.* 11:2323-2334 (1997) Orskov "Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis," *Diabetologia* 35: 701-711 (1992)
- [0563] Ott 외 "Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study," *Neurology* 53:1937-42 (1999)
- [0564] Paxinos 및 Watson. "The rat brain in stereotaxic coordinates", Academic Press, NSW Australia (1998).
- [0565] Perry 외 "Behavioural, histological and immunocytochemical consequences following 192 IgG-saporin immunolesions of the basal forebrain cholinergic system," *Brain Res. Bull.* 54:29-48 (2001) Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E. W. (ed.) 총판 Mack Publishing Co., Easton, PA)
- [0566] Ritzel 외 "Pharmacokinetic, insulinotropic, and glucagonostatic properties of GLP-1 [7-36 amide] after subcutaneous injection in healthy volunteers. Dose-response-relationships," *Diabetologia*. 38:720-725 (1995)

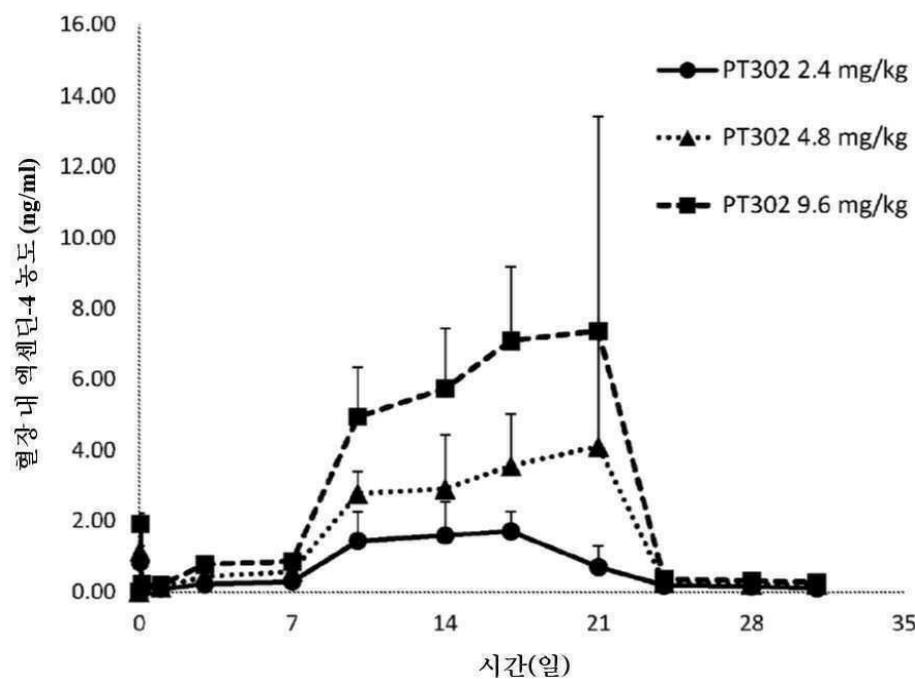
- [0567] Sambrook 외, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, (2판) Vol. 1-3 Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989)
- [0568] Satoh 외 "Characterization of human and rat glucagon-like peptide-1 receptors in the neurointermediate lobe: lack of coupling to either stimulation or inhibition of adenylyl cyclase," *Endocrinology* 141:1301-9 (2000)
- [0569] Shughrue 외 "Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus," *Endocrin.* 137(11):5159-62 (1996)
- [0570] Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr, Eckman C, Golde TE 및 Younkin SG. 1994 An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants *Science* 264:1336-1340.
- [0571] Thorens 외 "Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin(9-39) an antagonist of the receptor," *Diabetes* 42:1678-1682 (1993)
- [0572] Thorens 외 "Glucagon-like peptide-1 and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM," *Diabetes* 42:1219-1225 (1993)
- [0573] 미국 특허 제3,710,795호 "Drug-Delivery device with Stretched, Rate-Controlling Membrane," Higuchi 외 (1973년 1월 16일)
- [0574] Wang 외 "GIP regulates glucose transporters, hexokinases, and glucose-induced insulin secretion in RIN 1046-38 cells," *Mol. Cell. Endo.* 116:81-87 (1996)
- [0575] Wang 외 "Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-38 cells," *Endocrinology* 136:4910-4917 (1995)
- [0576] Wei 외 "Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences," *FEBS Lett* 358(3):219-224 (Jan. 30, 1995)
- [0577] Wilms 외 "Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in Type II (non-insulin-dependent) diabetic patients," *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:327-332 (1996)

도면

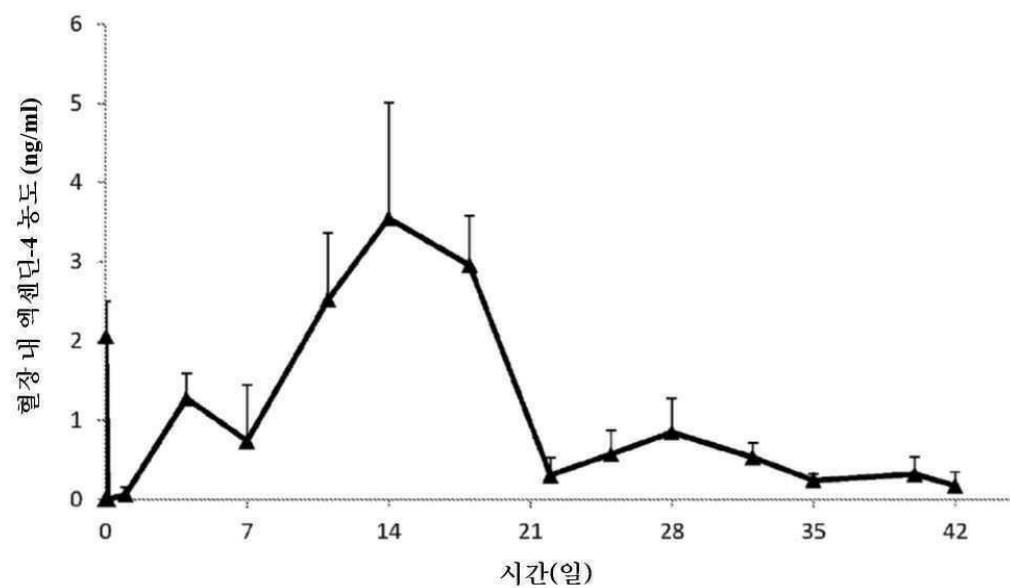
도면1a



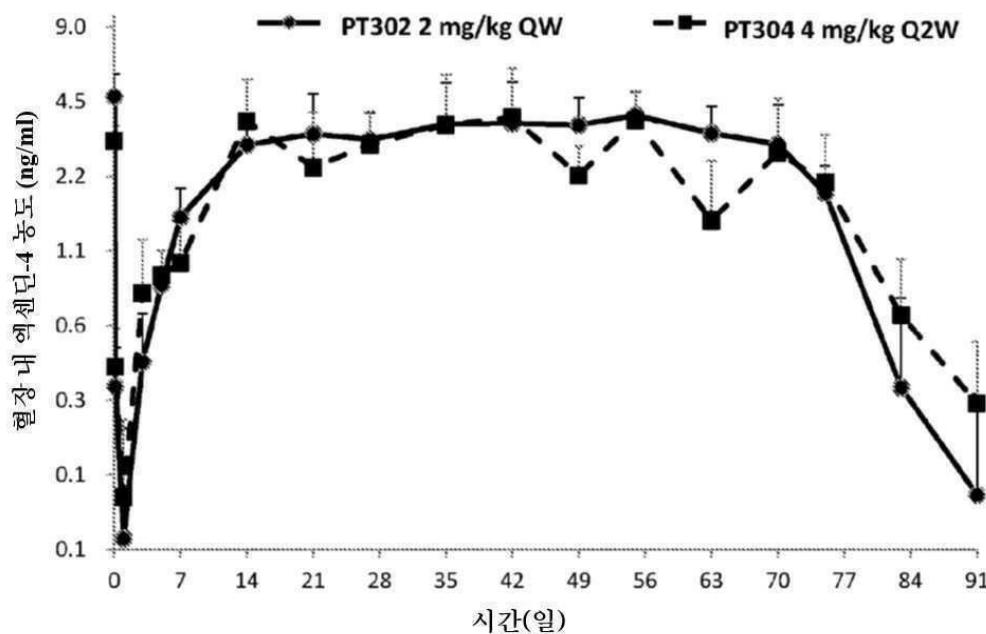
도면1b



도면2



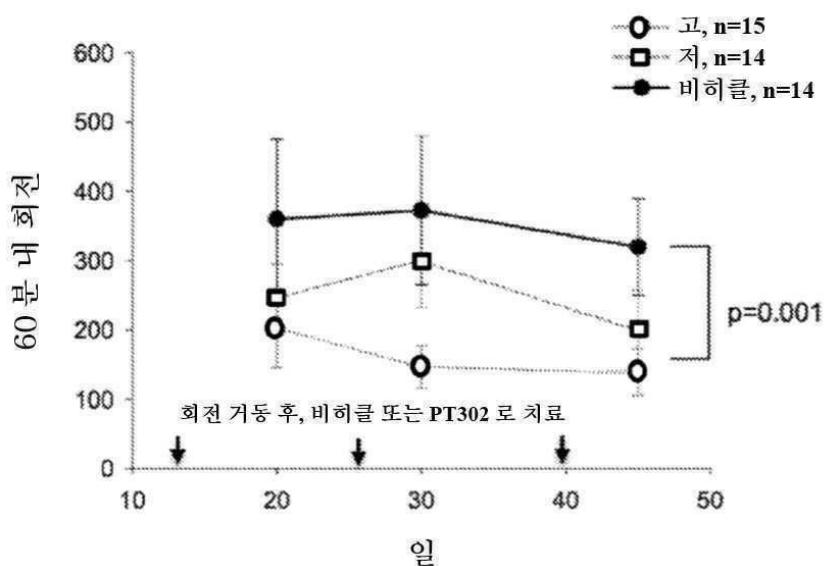
도면3



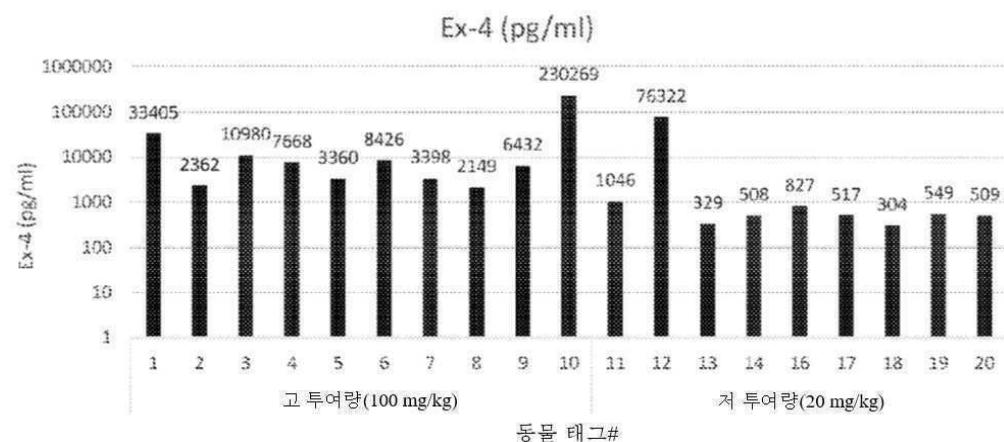
도면4a



도면4b



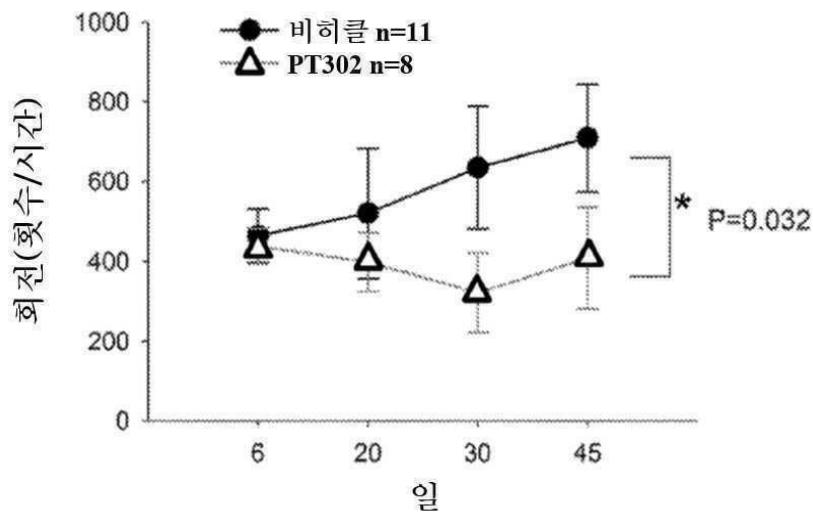
도면4c



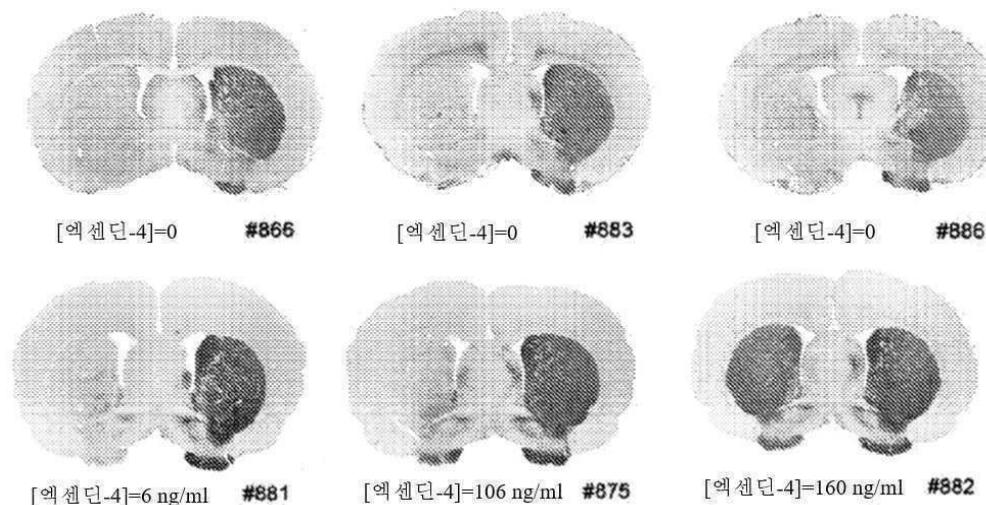
도면5a



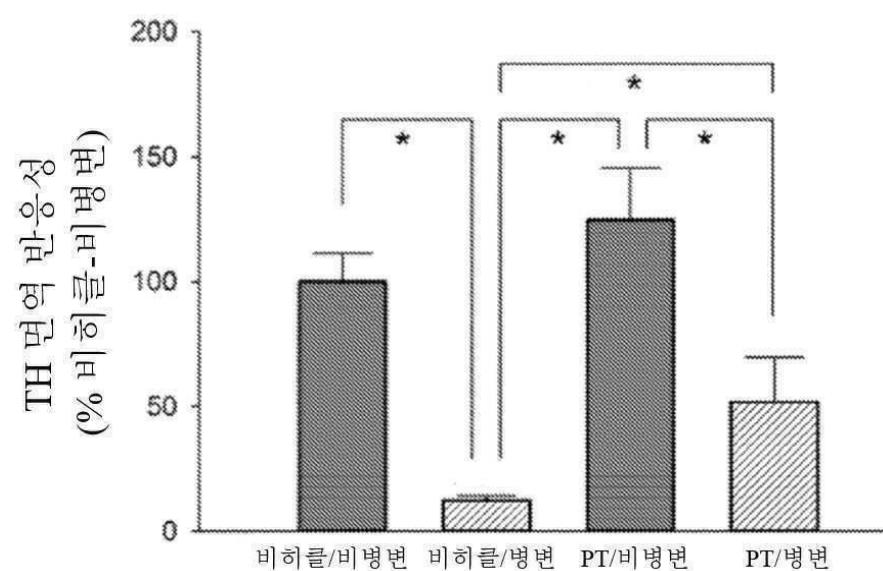
도면5b



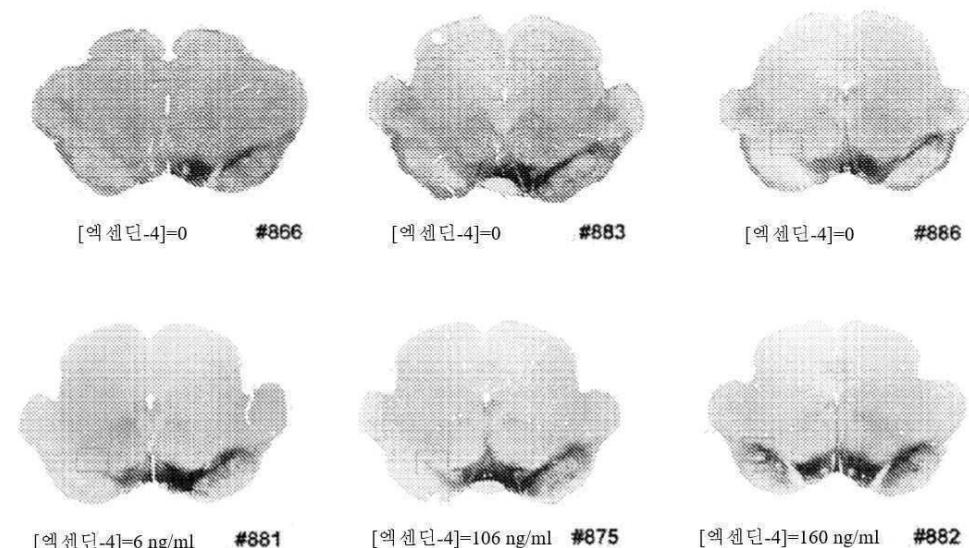
도면5c



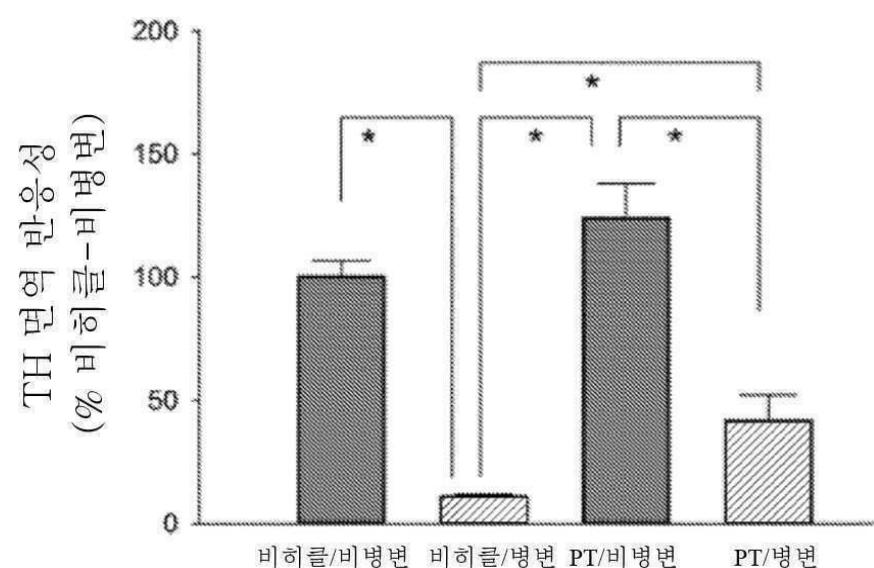
도면5d



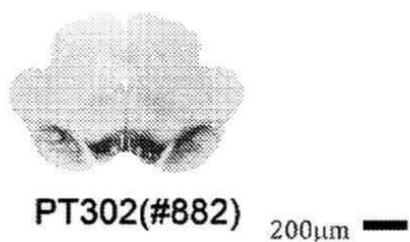
도면5e



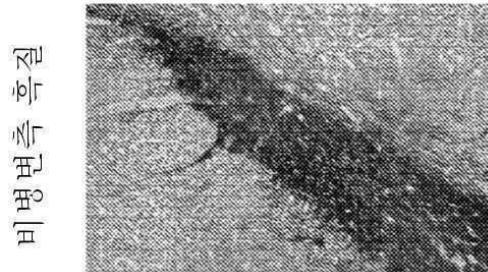
도면5f



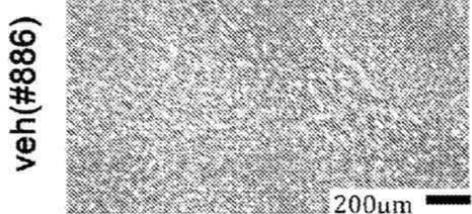
도면5g



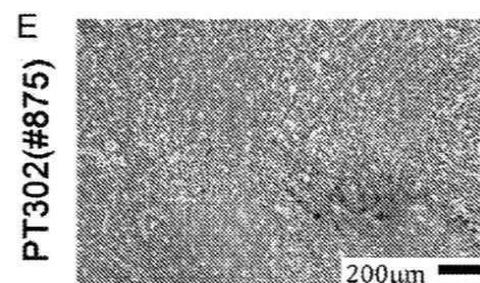
도면5h



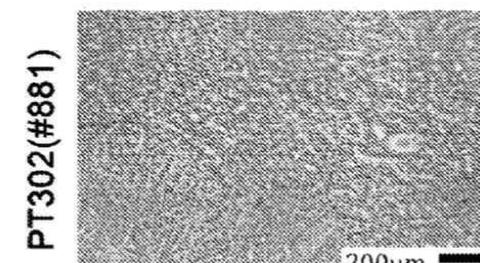
도면5i



도면5j

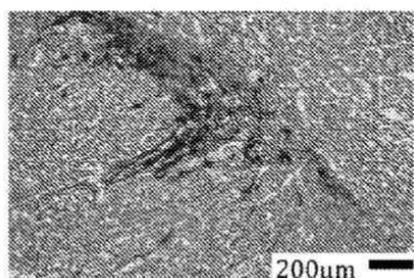


도면5k

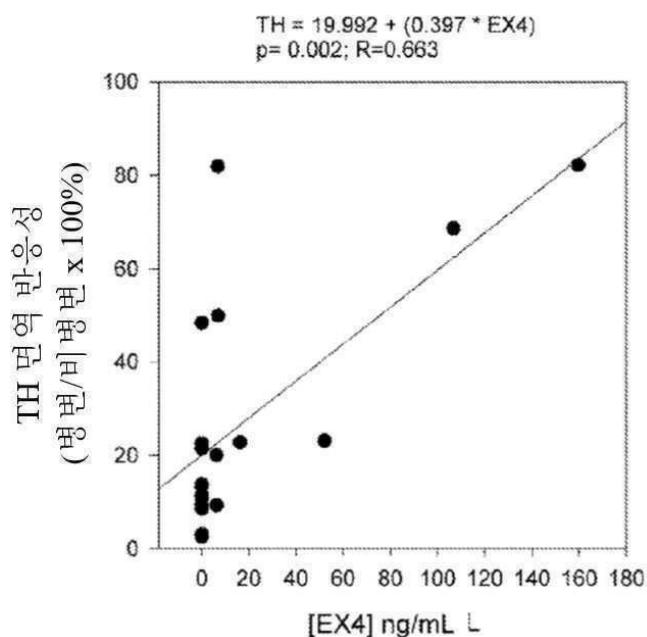


도면51

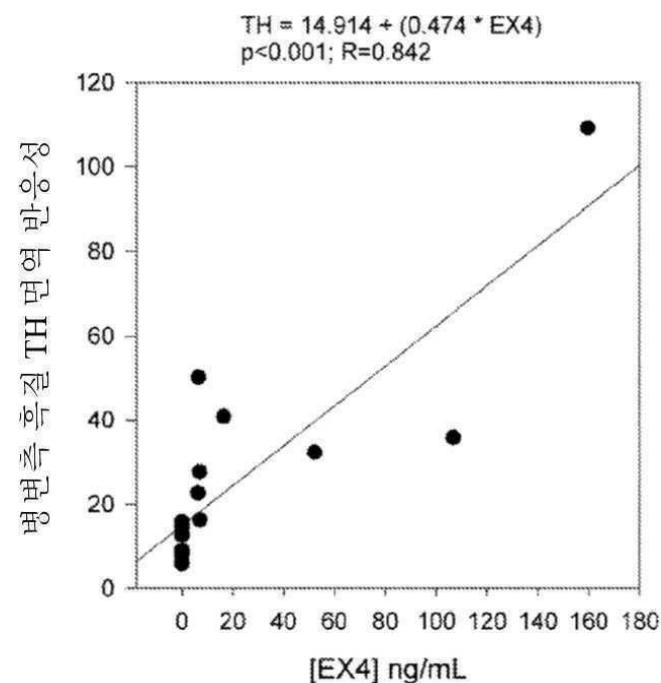
PT302(#882)



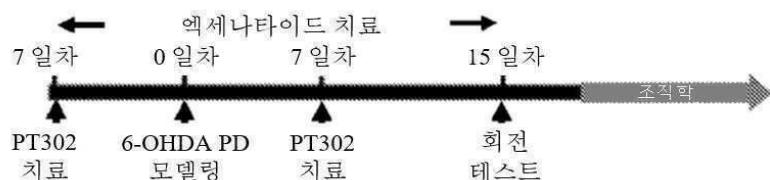
도면5m



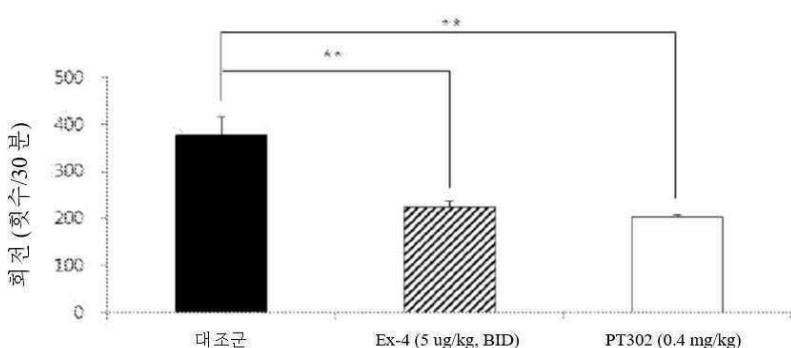
도면5a



도면6a

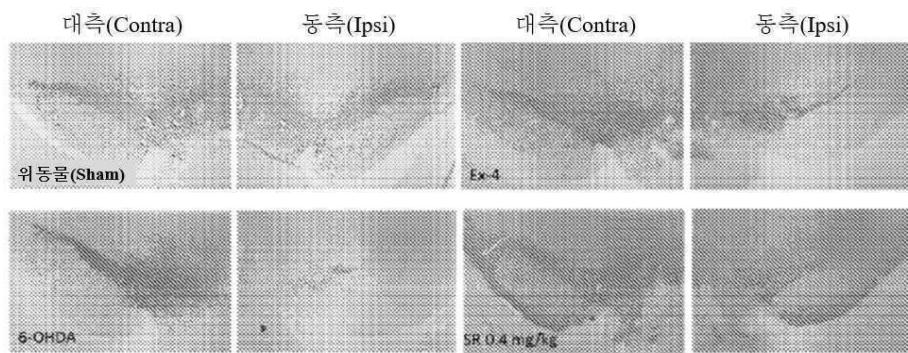


도면6b

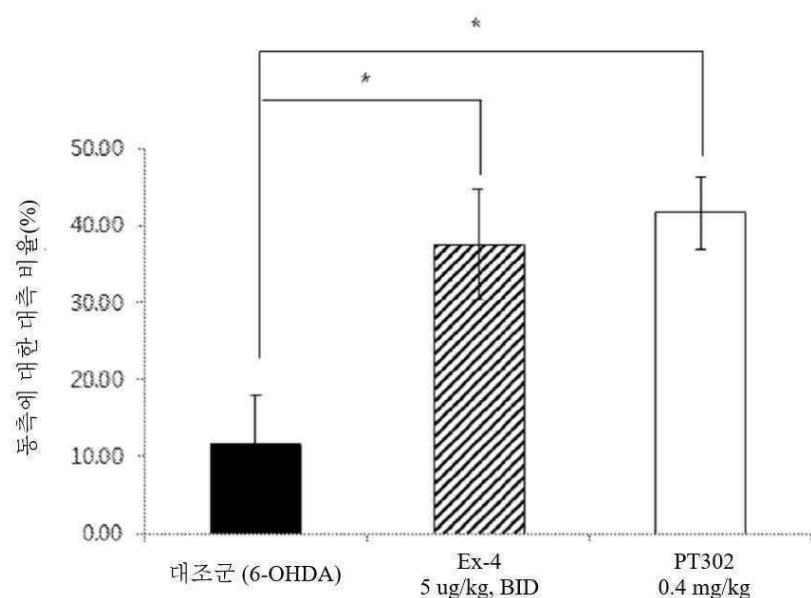


더넷 다중 비교 검정	평균 차이	차이의 95.00% CI	유의한가?	요약	조정된 P 값
대조군 대 Ex-4	152	54.96~249	예	**	0.005
대조군 대 PT302 0.4mg/kg	173	75.96~270	예	**	0.0022

도면6c

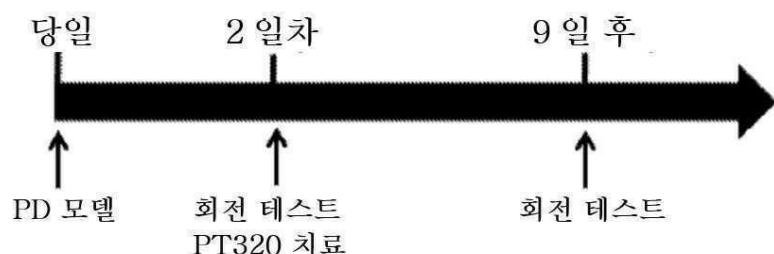


도면6d

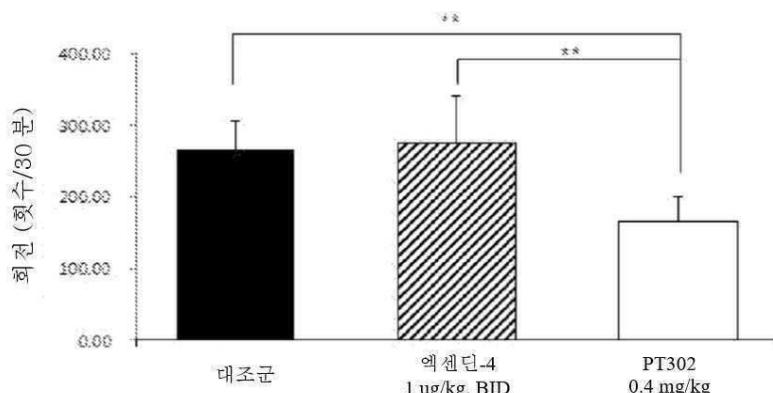


도면7a

연구 설계

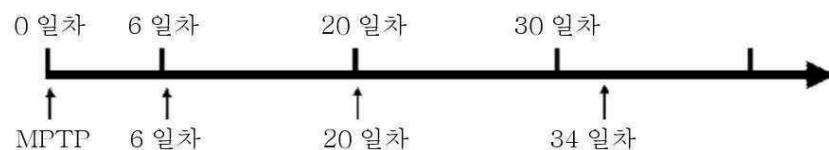


도면7b



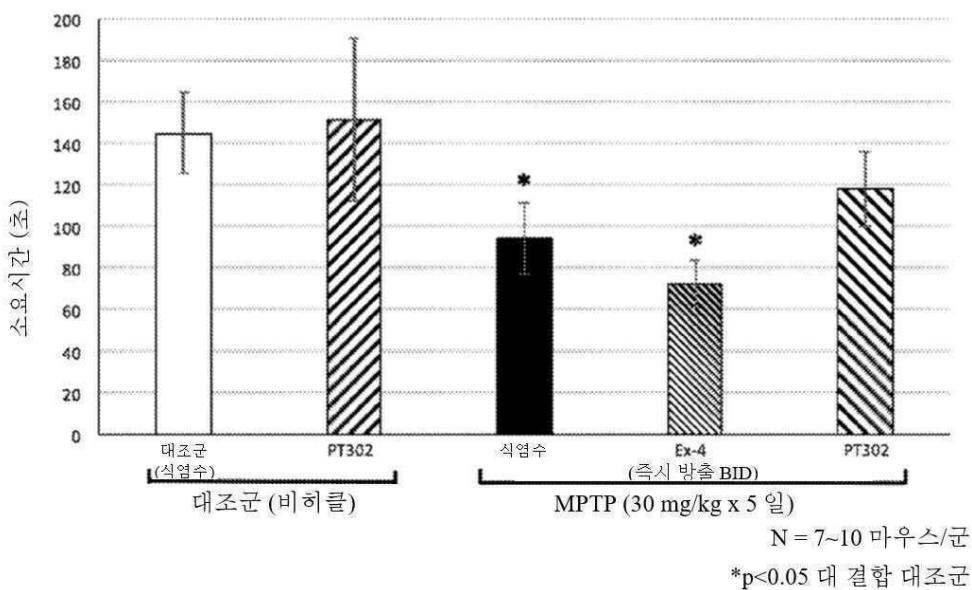
던넷 다중 비교 검정	평균 차이	차이의 95.00% CI	유의한가?	요약	조정된 P 값
대조군 대 Ex-4 1 ug BID	-8.8	-86.23~68.63	아니요	ns	0.9518
대조군 대 PT302 0.4mg/kg	102.9	28.8~177.1	예	**	0.0075
Ex-4 1ug BID 대 PT302 0.4 mg/kg	111.7	37.6~185.9	예	**	0.0042

도면8a



도면8b

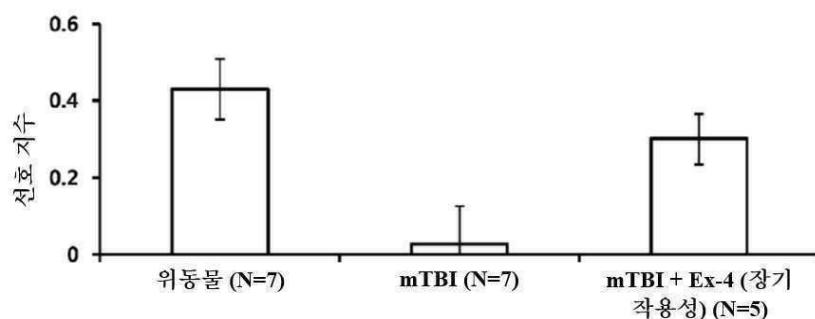
MPTP 유도 파킨슨병을 앓고 있는 마우스에 대한 PT302 치료는 악력 시험에 의해
평가된 바와 같이 행동 결손을 완화시키는 반면, 즉시 방출형 액센딘-4 의 투여는
그렇지 않음



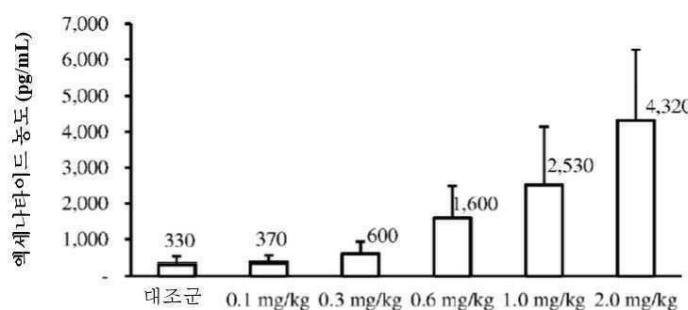
도면9a



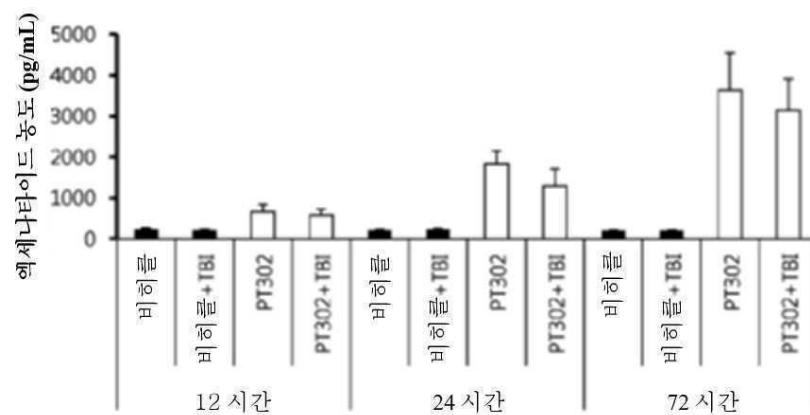
도면9b



도면10a

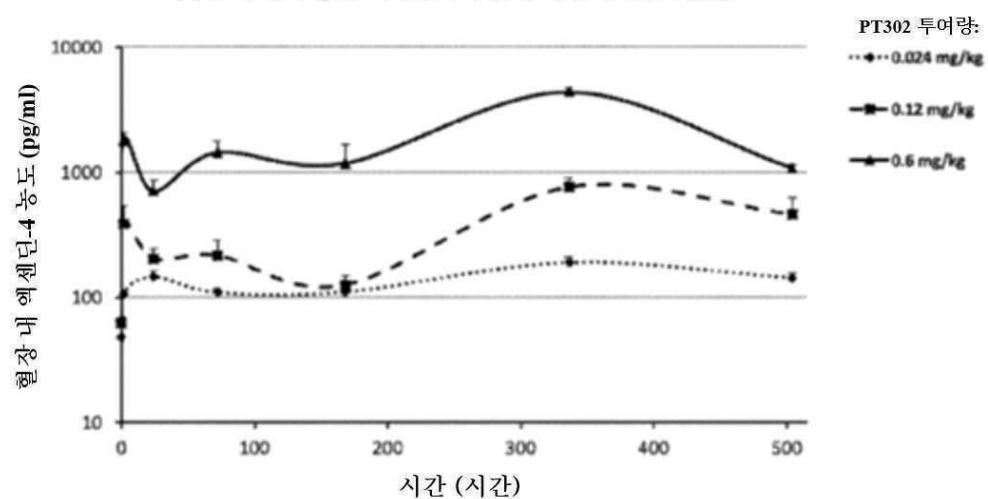


도면10b



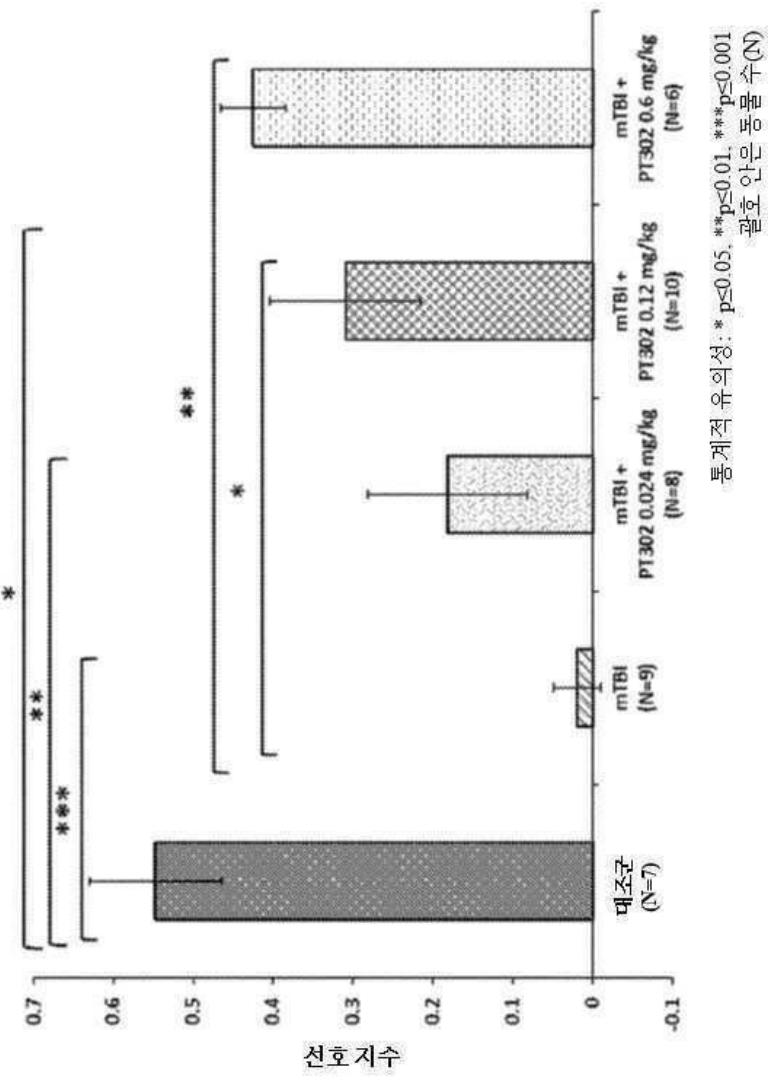
도면 10c

PT302 를 1 회 피하 주사(0.024 mg/kg, 0.12 mg/kg, 0.6 mg/kg)한 후 수컷 ICR
마우스에서의 혈장 엑센딘-4 수준에 대한 반-로그 플롯



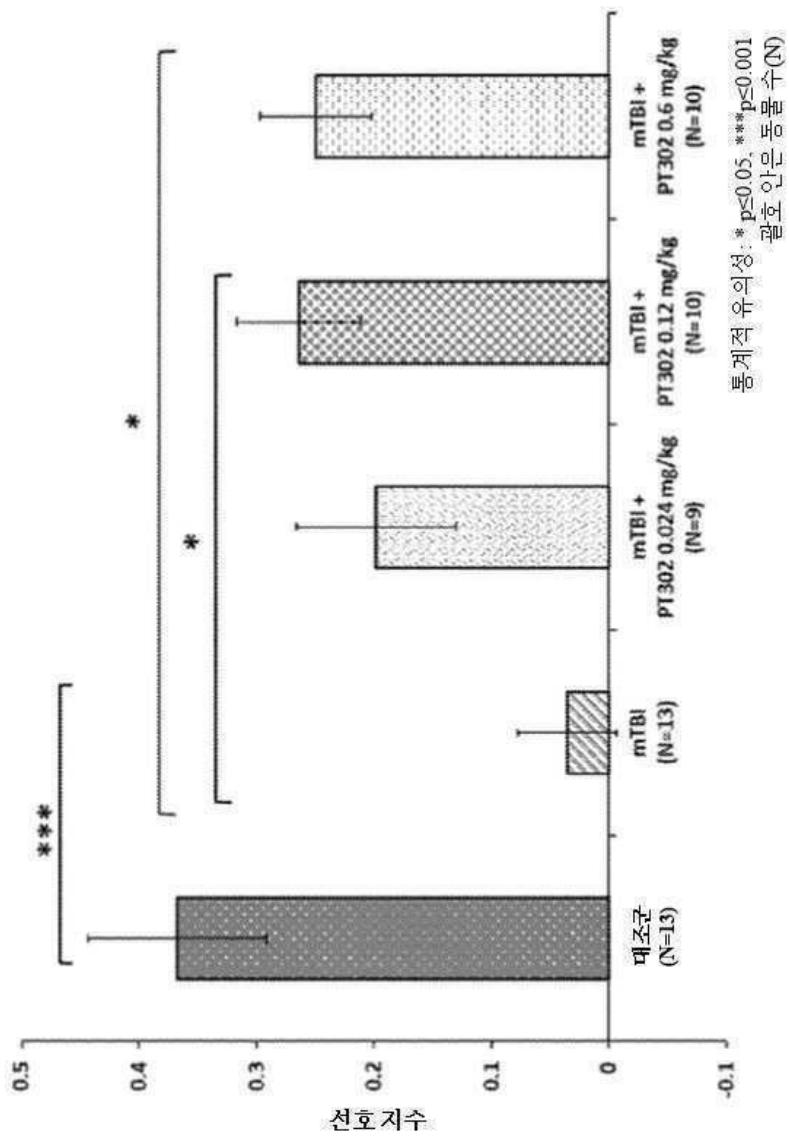
도면 11a

경미한 외상성 뇌 손상(mTBI) 후 7 일차의 신규 물체 인식
마우스에게 30 g 의 추를 낙하시키고, mTBI 가 나타난 후에 PT302 로 치료하였다(0, 0.024, 0.12
또는 0.6 mg/kg 경피투여). 대조군 동물은 유사하게 취급하였으나 mTBI 를 유도하지 않았음



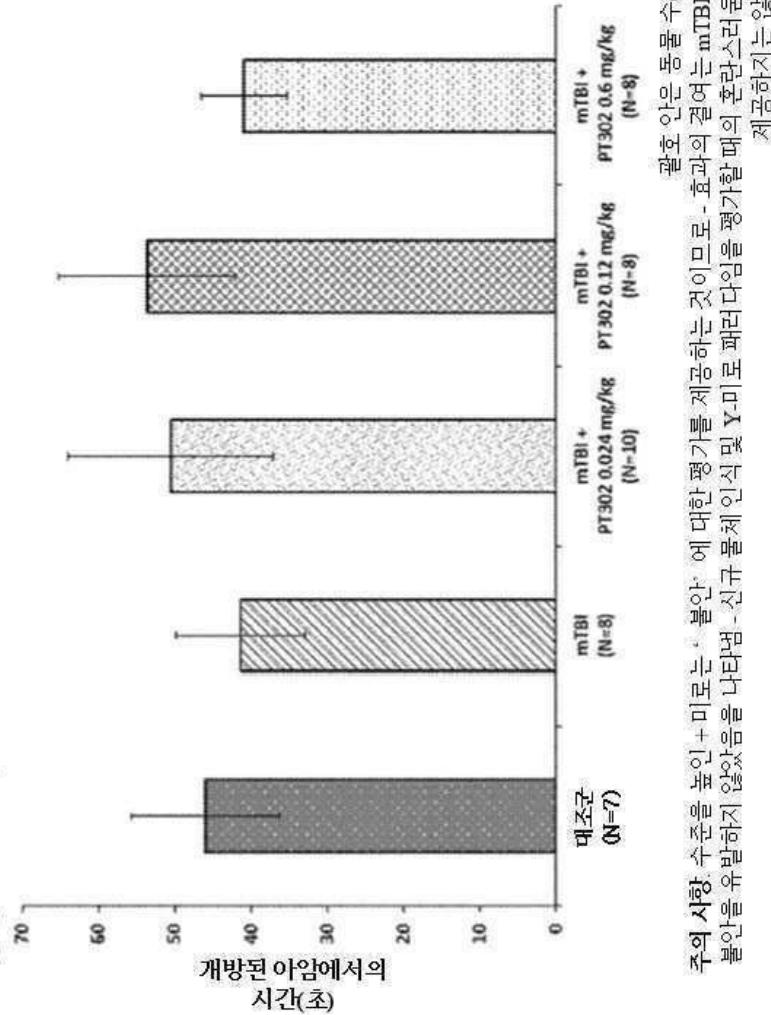
도면 11b

경미한 외상성 뇌 손상(mTBI) 후 7 일차의 Y-미로 평가
마우스에게 30 g의 추를 낙하시키고, mTBI가 나타난 후에 PT302로 치료하였다(0, 0.024, 0.12
또는 0.6 mg/kg 경피투여). 대조군 동물은 유사하게 취급하였으나 mTBI를 유도하지 않았음



도면 11c

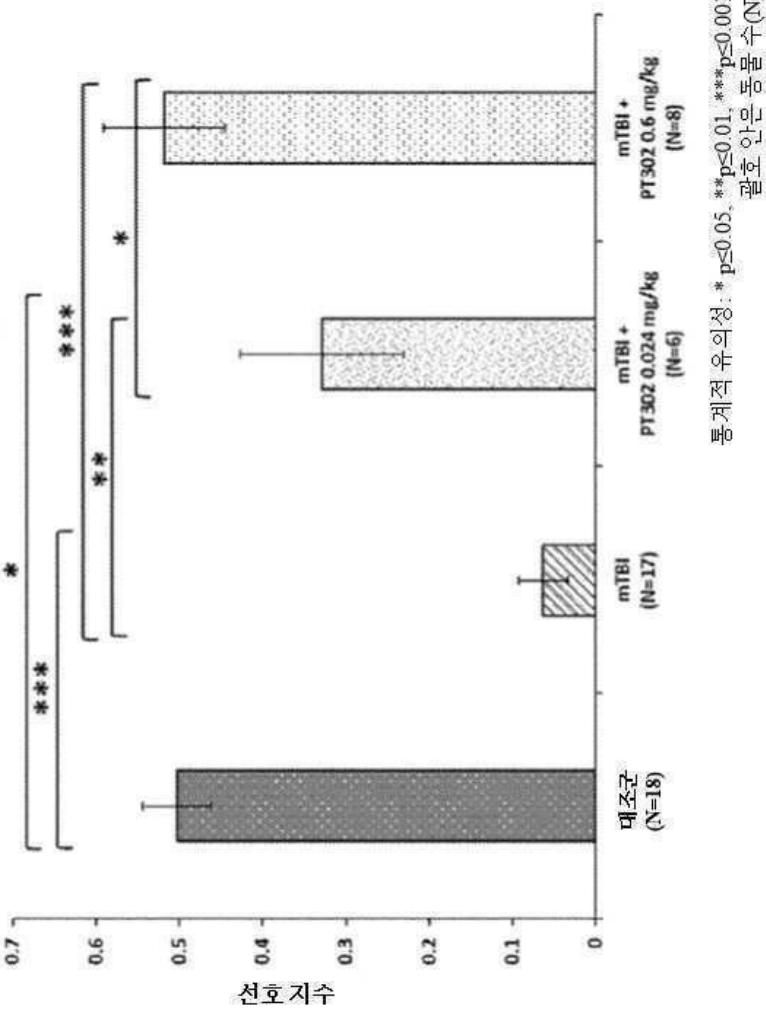
경미한 외상성 뇌 손상(mTBI) 후 7 일자의, 수준을 높인 + 미로 평가
마우스에게 30 g의 추를 낚하시키고, mTBI가 나타난 후에 PT302로 치료하였거나, 0.024, 0.12 또는 0.6
mg/kg 경피투여). 대조군 동물은 유사하게 취급하였으나 mTBI를 유도하지 않았음



주의 사항- 수준을 높인 + 미로는 ‘불안’에 대처한 평가를 제공하는 것이므로 - 효과의 결여는 mTBI가 불안을 유발하지 않았음을 나타냄 - 신규 물체 인식 및 Y-미로 패러다임을 평가할 때의 혼란스러움을 제공하지는 않음

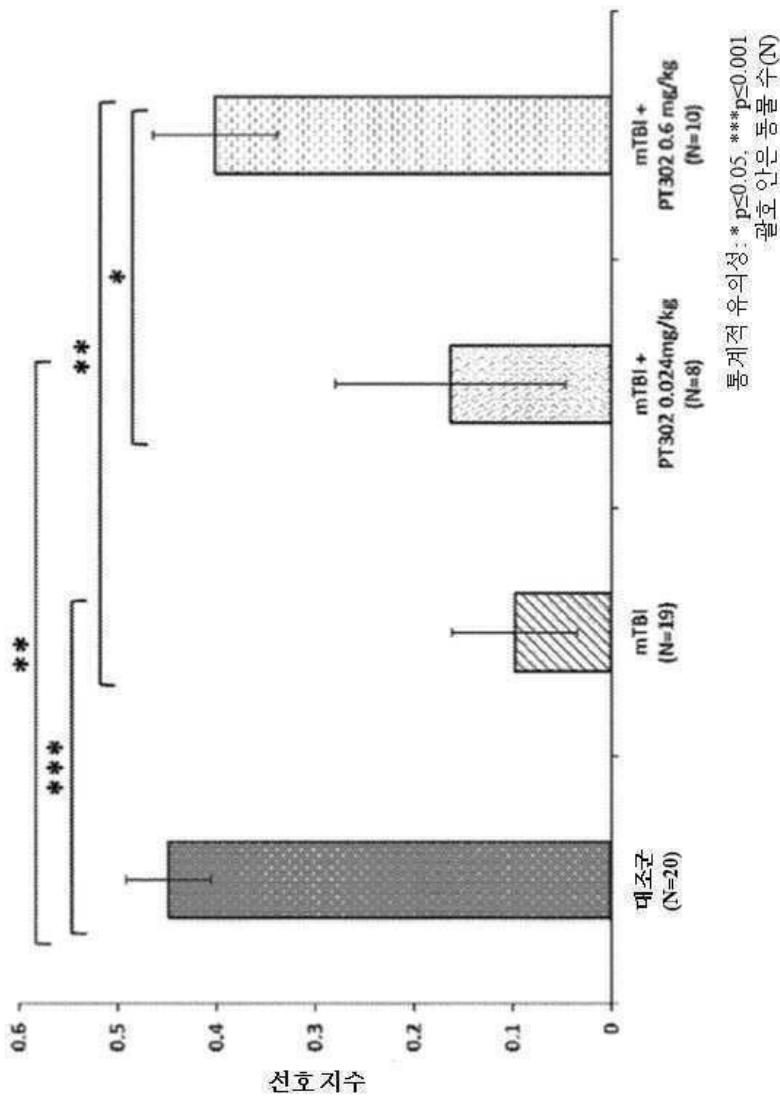
도면 12a

경미한 외상성 뇌 손상(mTBI) 후 30 일차의 신규 물체 인식
마우스에게 30 g 의 추를 낙하시키고, mTBI 가 나타난 후에 PT302 로 치료하였다(0, 0.024, 0.12
또는 0.6 mg/kg 경피투여). 대조군 동물은 유사하게 취급 하였으나 mTBI 를 유도하지 않았음



도면 12b

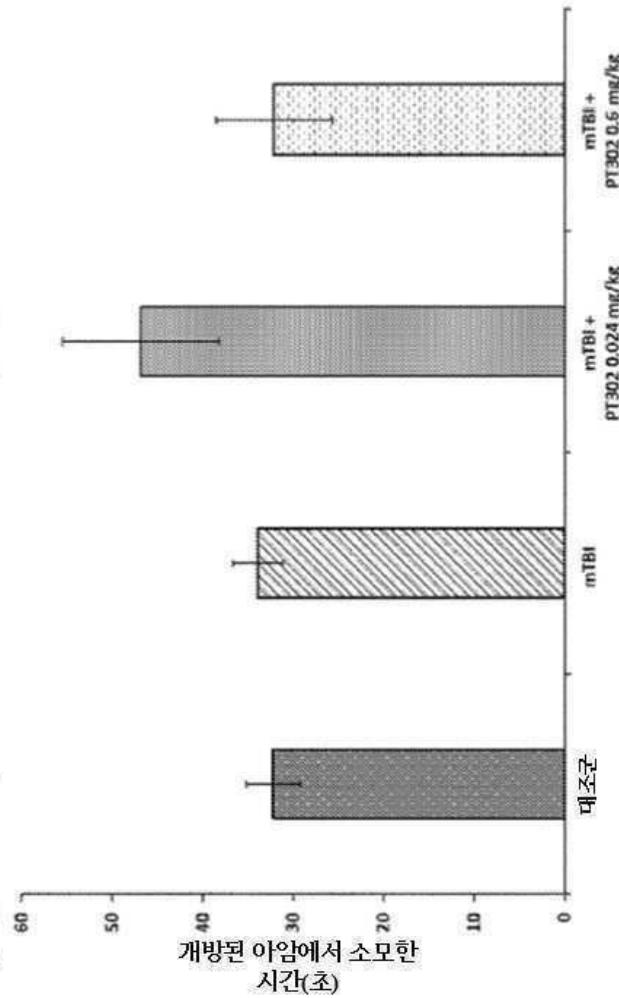
경미 한 외상성 뇌 손상(mTBI) 후 30 일차의 Y-미로 평가
마우스에게 30 g 의 추를 낙하시키고, mTBI 가 나타난 후에 PT302 로 치료하였다(0, 0.024, 0.12
또는 0.6 mg/kg 경피투여). 대조군 동물은 유사하게 취급하였으나 mTBI 를 유도하지 않았음



통계적 유의성: * p≤0.05, ** p≤0.001
괄호 안은 동물 수(N)

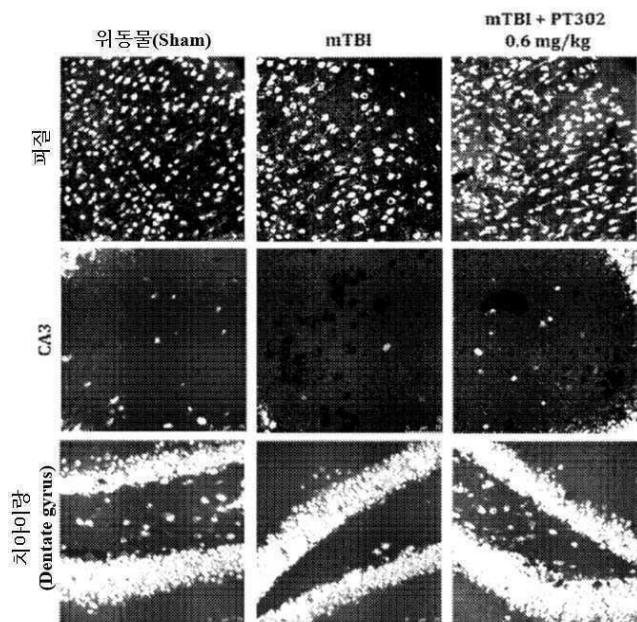
도면 12c

경미한 외상성 뇌 손상(mTBI) 후 30 일자의, 수준을 높인 + 미로 평가
마우스에게 30 g 의 추를 낙하시키고, mTBI 가 나타난 후에 PT302 로 치료하였다(0, 0.024, 0.12 또는 0.6
mg/kg 경피투여). 대조군 동물은 유사하게 취급하였으나 mTBI 를 유도하지 않았음



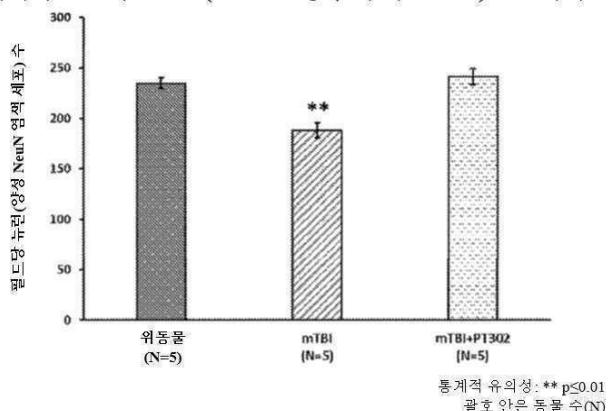
주의 사항: 수준을 높인 + 미로는 '불안'에 대한 평가를 제공하는 것므로 - 효과의 결여는 mTBI 가
불안을 유발하지 않았음을 나타낸다. mTBI+는 mTBI 를 평가할 때의 혼란스러움을
동물 수(그룹 당 N = 8-9 마우스)
제공하지는 않음.

도면 13a



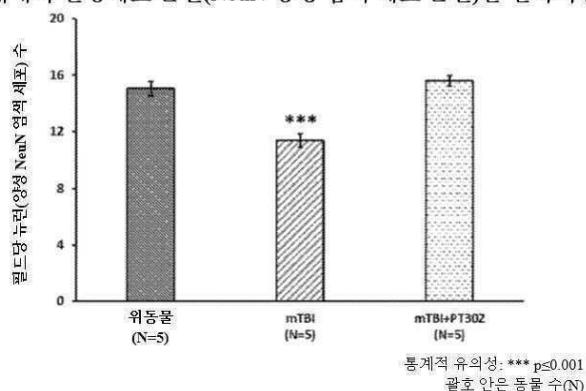
도면 13b

30 일차에 평가한 결과, PT302 는 mTBI 를 겪은 마우스의 대뇌 폐질 내에서 신경세포 손실(NeuN 양성 염색 세포 손실)을 완화시킨다.



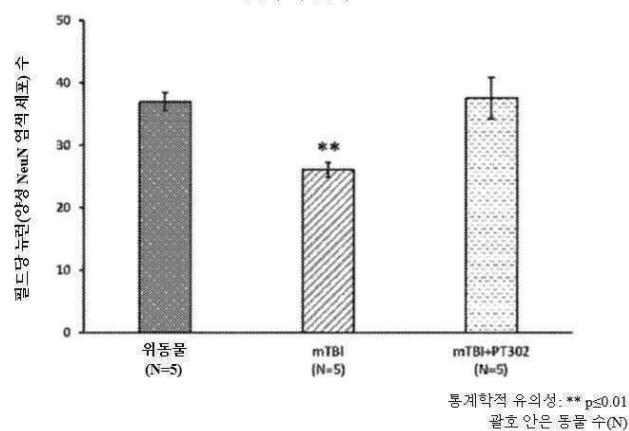
도면 13c

30 일차에 평가한 결과, PT302 는 mTBI 를 겪은 마우스의 CA3 해마 영역 내에서 신경세포 손실(NeuN 양성 염색 세포 손실)을 완화시킨다.

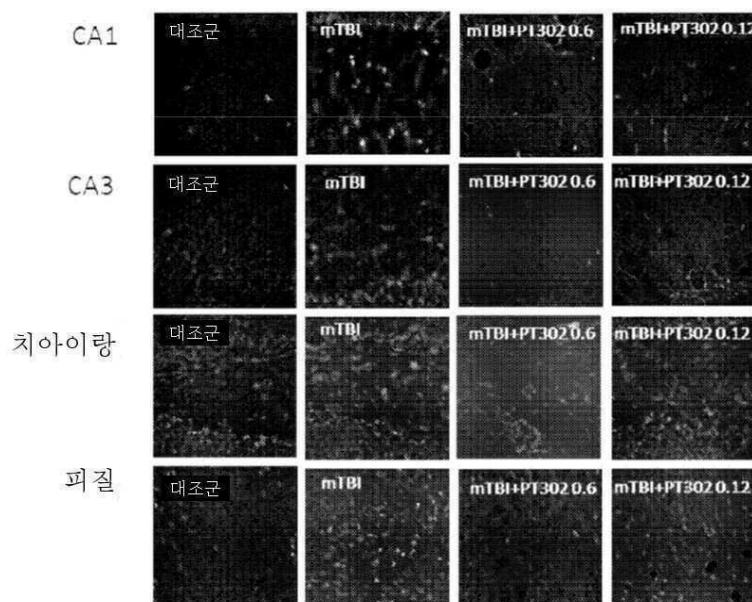


도면 13d

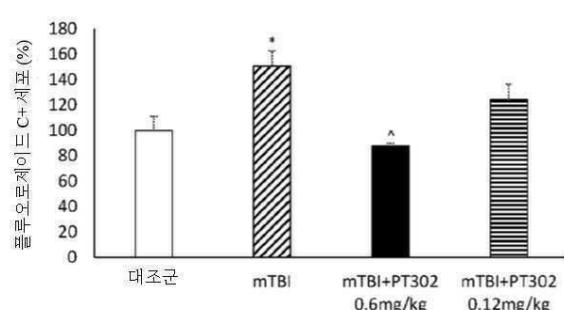
30 일차에 평가한 결과, PT302는 mTBI를 겪은 마우스의 CA3 해마 영역 내에서 신경세포 손실(NeuN 양성 염색 세포 손실)을 완화시킨다.



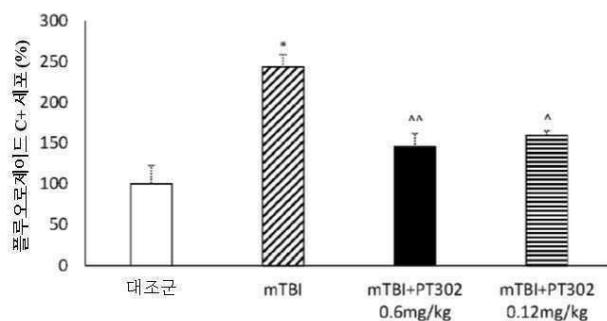
도면 14a



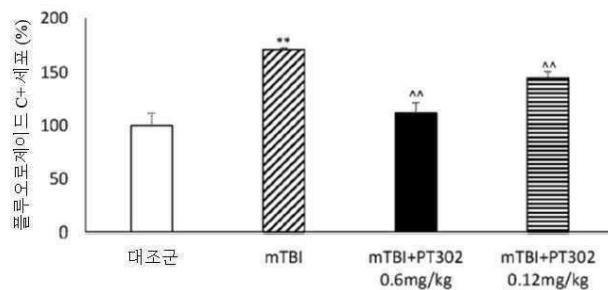
도면 14b



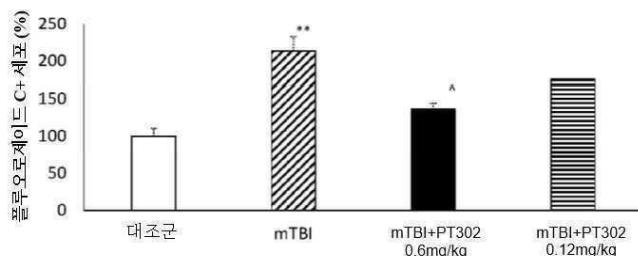
도면 14c



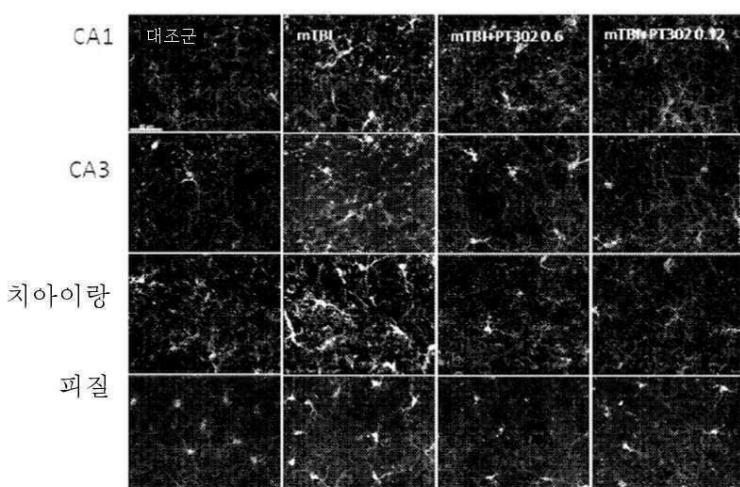
도면 14d



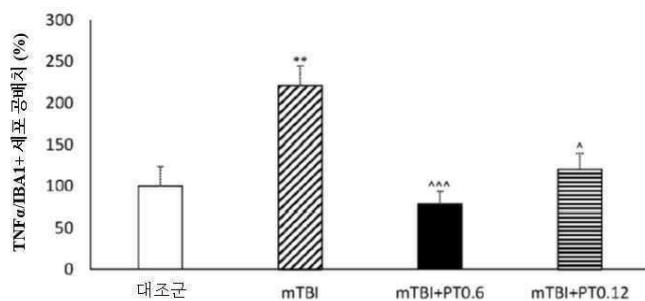
도면 14e



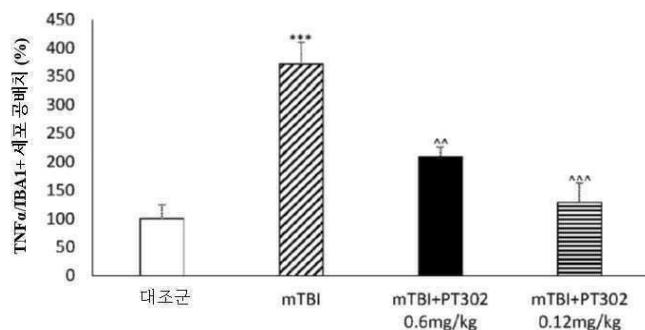
도면 15a



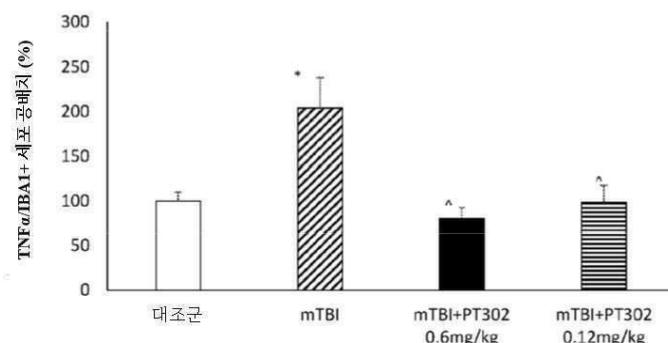
도면 15b



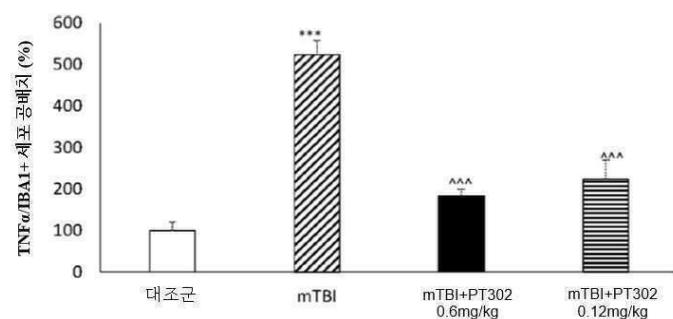
도면 15c



도면 15d



도면 15e



서 열 목록

<110> PEPTRON CO., LTD

<120> METHODS OF DELIVERING A NEUROPROTECTIVE POLYPEPTIDE TO THE

CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND METHODS OF TREATING A CENTRAL NERVOUS
SYSTEM DISEASE

<130> 1568390.100US0
<140> TBD
<141> 2017-10-20
<150> 62/410,748
<151> 2016-10-20
<160> 55
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 4

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 5

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 6

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 7

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly

20 25 30

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 8

His Xaa Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (30)

<223> Xaa=any amino acid

<400> 9

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Xaa Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 10

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 11

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly

20 25 30

<210> 12

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 12

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro

35

<210> 13

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 13

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala

35

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 14

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser

<210> 15

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 15

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn

20 25

<210> 16

<211> 26

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 16

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu

20 25

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 17

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile

20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 18

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg

20

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 19

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 20

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 21

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser

1 5 10

<210> 22

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(4)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 22

His Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser

1 5 10 15

Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys

20 25 30

Gly Arg

<210> 23

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(4)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 23

His Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser

1 5 10 15

Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala

20 25 30

Trp Leu Val Lys Gly Arg

35

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 24

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Glu

1

5

10

15

Gln Ala Val Arg Leu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 25

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Glu

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 26

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Val Arg Leu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 27

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 28

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 29

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Gly

20 25 30

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 30

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg

20	25	30
----	----	----

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 31

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Arg

20	25	30
----	----	----

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 32

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Ala Trp Leu Lys Asn Gly Arg

20	25	30
----	----	----

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 33

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Lys Asn Gly Arg

20 25 30

<210> 34

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 34

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 35

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 35

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 36

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 37

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 37

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Arg

20 25 30

<210> 38

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 38

Tyr Gly Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys

1 5 10 15

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys

20 25 30

Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln

35 40

<210> 39

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 39

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 40

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro

35 40

<210> 41

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 41

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro Pro Ser Ser

35 40 45

<210> 42

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 42

His Xaa Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro

20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35 40

<210> 43

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 43

His Xaa Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro

20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro

35 40

<210> 44

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 44

His Xaa Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro

20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser Gly Ala Pro Pro Ser Ser

35 40 45

<210> 45

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 45

His Ala Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro

20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser

35 40

<210> 46

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 46

His Ala Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro

20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro

35 40

<210> 47

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 47

His Ala Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro

20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro Pro Ser Ser

35 40 45

<210> 48

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa= aminohexanoic acid

<400> 48

Tyr Xaa Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp

1 5 10 15

Lys Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly

20 25 30

Lys Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln

35 40

<210> 49

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400

> 49

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro

35

<210> 50

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 50

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 51

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 51

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro

35

<210> 52

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Note = Synthetic Construct

<400> 52

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser

<210> 53

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of Exendin-3

<400> 53

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20	25	30
----	----	----

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 54
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid sequence of Exendin-4 variant
 <400> 54
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro
 20 25 30
 <210> 55
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid sequence of 14Leu25Phe Exendin-4 variant
 <400> 55
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35