



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0080519
(43) 공개일자 2010년07월08일

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7006933

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년08월29일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년03월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/074868

(87) 국제공개번호 WO 2009/029847

국제공개일자 2009년03월05일

(30) 우선권주장

60/969,019 2007년08월30일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

큐어디엠 인코포레이티드

미국 펜실베이니아 19096 알-215 웨인우드 랭카스터 애비뉴 100

(72) 발명자

레베탄 클라레사 에스.

미국 펜실베이니아주 19010 로즈몬트 히코리 레인 103

가르스키 빅터 엠.

미국 펜실베이니아주 19422 블루 벨 팔머 플레이스 752

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 12 항

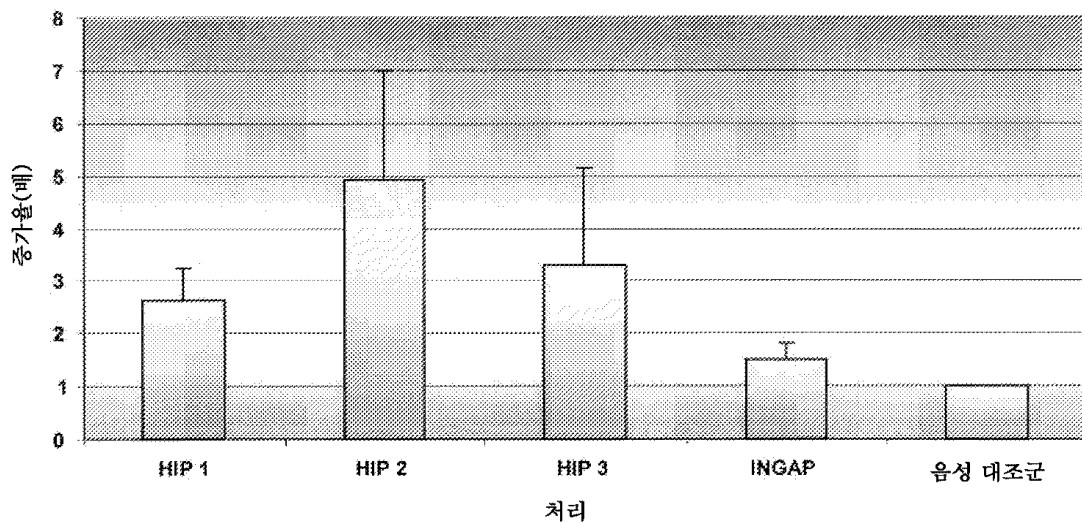
(54) 프로섬 펩타이드 및 이의 유사체의 조성물 및 이의 이용 방법

(57) 요약

본 발명은 안정성 및 효능이 증가된 프로섬 펩타이드, 바람직하게는 HIP, 및 제1형 및 제2형 당뇨병 및 이의 증상을 포함한 손상된 체장 기능과 연관된 병리를 치료하는데 상기 펩타이드를 이용하는 방법에 관한 것이다.

대표도

사람 프로섬 펩타이드로 1주 처리한 후 사람 인슐린 함량의 증가



(30) 우선권주장

60/979,526	2007년10월12일	미국(US)
60/991,964	2007년12월03일	미국(US)
61/031,479	2008년02월26일	미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

최적화된 프로섬 (proislet) 펩타이드.

청구항 2

약제학적 부형제 및 최적화된 프로섬 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 사람 섬 펩타이드 유사체가 치료학적 유효량으로 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 치료학적 유효량이 약 60 내지 약 180 mg/day인 약제학적 조성물.

청구항 5

최적화된 프로섬 펩타이드를 투여함을 포함하여, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리를 치료하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 최적화된 프로섬 펩타이드가 치료학적 유효량으로 투여되는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 치료학적 유효량이 약 1 내지 약 3 mg/day인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리가 제1형 당뇨병, 신근 발생 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 성인의 잠재적 자가면역 당뇨병, 당뇨병전단계, 손상된 공복 글루코즈, 손상된 글루코즈 내성, 인슐린 내성 증후군, 대사 증후군/대사이상 증후군, 과체중, 비만, 고지질혈증, 고트리글리세라이드혈증, 섭식 장애, 무배란성 주기 및 다낭성 난소 증후군으로부터 선택되는 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 췌장 섬 세포 재생제를 투여함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 췌장 섬 세포 재생제가 사람 프로섬 펩타이드, 사람 프로섬 펩타이드 유사체, 아밀린, 프람린티드, 엑센딘-4, GIP, GLP-1, GLP-1 수용체 작용제, GLP-1 유사체, 햄스터 INGAP 펩타이드, 리라글루티드, 및 디펩티딜 펩티다제 억제제 중에서 선택되는 방법.

청구항 11

제5항에 있어서, 췌장 내분비 세포를 표적화하는 자가면역 세포를 억제, 차단 또는 파괴하는 제제를 투여함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 췌장 섬 세포를 표적화하는 자가면역 세포를 억제, 차단 또는 파괴하는 제제가, hOKT3 γ 1(Ala-Ala) (텡리주마브)를 포함한 항 CD-3 항체; 면역 반응을 표적화하고 제1형 당뇨병에서 베타 세포 사멸을 일으키는 T-림프구를 특이적으로 차단하는 ChAglyCD3; 세포독성 T-림프구 항원 4, CLTA-4 Ig (아바타셉트); 시클리무스 (라파마이신) 단독 또는 타크로리무스 (FK506) 또는 IL-2 (라파무네)와 병용; 라파무네 단독 또는 프로로류킨 (알데스류킨)과 병용; 열-쇼크 단백질 60 (Diap277); 항-글루탐산 데카복실라제 65 (GAD65) 백신; 리

소필린, IBC-VSO, 백신, 인터페론-알파, $CD4^+CD25^+$ 항원-특이적 조절 T 세포 백신; 당뇨병-억제성 수지상 세포 백신, GSK189075, 디아족시드 및 스타틴 약물 (베타 세포 기능을 보존하기 위한 제제로서 사용되는 아토르바스 타틴 포함), 미코페놀레이트 모페틸 단독 또는 다클리주마브와 병용; 항-CD20 제제; 리톡시마브; 캄파쓰-1H (항-CD52 항체), 리소필린; 폴리클로날 항-T-림프구 글로불린 (ATG/티모글로불린), 과립구 콜로니-자극 인자, 놀라 스타 (페그필그라스탐), 비타민 D, 25 하이드록시 및 1,25 하이드록시비타민 D 보충물 모두; 췌장 베타-세포 파괴를 예방하도록 디자인된 인슐린의 합성된 대사적 불활성 형태인 IBC-VSO 백신; 인터페론-알파; $CD4^+CD25^+$ 항원-특이적 조절 T 세포를 사용하는 백신 또는 랑게르한스섬 내의 베타 세포에 대한 면역 공격을 억제하도록 디자인된 제제 또는 제제들, 프로키말 (사람 성인 줄기 세포), 소염성 아나킨라 및 소염제, 테옥시스페르구알린, 염증촉진성 사이토카인 생성을 차단하고 T-세포 및 B-세포를 억제하는 소염제 중의 하나 이상으로부터 선택되는 방법.

명세서

발명의 내용

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 미국 가출원 제60/969019호 (2007년 8월 30일 출원); 미국 가출원 제60/979526호 (2007년 10월 12일 출원); 미국 가출원 제60/991964호 (2007년 12월 3일 출원); 및 미국 가출원 제61/031479호 (2008년 2월 26일 출원)를 우선권으로 주장한다.

[0003] 발명의 요약

[0004] 본원에 기술된 양태는 용해도, 생물이용성 및 프로테아제 절단에 대한 혈청내 저항 (in-serum-resistance)이 증가되어 치료제로서의 효과가 개선되도록 디자인된 프로섬 펩타이드의 제제, 유도체 및 변형물, 및 이들의 이용 방법을 제공한다.

[0005] 하나의 양태에서, 프로섬 펩타이드 및 이의 유도체는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된다.

[0006] 하나의 양태에서, HIP 및 이의 유도체는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된다 (HIP3Blocked (서열번호 5), HIP1Blocked (서열번호 6) 및 HIP2Blocked (서열번호 7)). 이러한 변형은 통상적으로 유리 말단을 인식하는 프로테아제를 갖는 혈청 중의 프로테아제 절단에 대해 상기 펩타이드를 덜 민감하게 함으로써 펩타이드의 T_{max} 및 생물이용성을 효과적으로 증가시키는 것으로 보인다. 이러한 방식으로 변형되는 펩타이드는 증가된 효능을 보임으로써, 예를 들어 IV, IM, SubQ 또는 복강내 경로로 투여시, 감소된 용량을 필요로 한다.

[0007] 또 다른 양태에서, 프로섬 펩타이드 및 이의 유도체는 펩타이드의 N-말단에 시스테인 잔기를 첨가함으로써 변형된다.

[0008] 또 다른 양태에서, HIP 및 이의 유도체는 HIP의 C-말단에 시스테인 잔기를 첨가함으로써 변형됨으로써 (HIP3Cys (서열번호 8), HIP1Cys (서열번호 9) 및 HIP2Cys (서열번호 10)), 용액 중에서 이량체를 형성할 수 있는 화합물을 생성한다 (HIP3CysDimer (서열번호 11), HIP1CysDimer (서열번호 12) 및 HIP2CysDimer (서열번호 13)). 이러한 변형은 단량체 형태의 HIP 또는 HIPCys 변이체를 인식하는 프로테아제를 피함으로써 HIPCys 변이체의 안정성을 증가시키는 것으로 보인다.

[0009] 또 다른 양태에서, 시스테인 프로섬 펩타이드 변이체는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된다.

[0010] 또 다른 양태에서, HIPCys 변이체는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된다 (HIP3CysBlocked (서열번호 14), HIP1CysBlocked (서열번호 15) 및 HIP2CysBlocked (서열번호 16)). 이러한 변형은 통상적으로 유리 말단을 인식하는 프로테아제를 갖는 혈청 중의 프로테아제 절단에 대해 펩타이드를 덜 민감하게 하고 용액 중에서 이량체를 형성할 수 있는 화합물을 생성함으로써 (HIP3CysBlockedDimer (서열번호 17), HIP1CysBlockedDimer (서열번호 18) 및 HIP2CysBlockedDimer (서열번호 19)), 단량체 형태의 HIP 또는 HIPCysBlocked 변이체를 인식하는 프로테아제를 피하여 HIPCysBlocked 변이체의 안정성을 증가시키는 것으로 보인다.

[0011] 또 다른 양태에서, 시스테인 프로섬 펩타이드 변이체는 C-말단 시스테인 잔기에 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물을 공유적으로 결합시킴으로써 변형된다.

- [0012] 또 다른 양태에서, HIPCys 변이체는 C-말단 시스테인 잔기에 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물을 공유적으로 결합시킴으로써 변형된다 (HIP3CysPEG (서열번호 20), HIP1CysPEG (서열번호 21) 및 HIP2CysPEG (서열번호 22)). 이러한 변형은 혈청 중의 HIPCys의 안정성을 개선시킴으로써 생체내에서 섬 신생을 자극하고 당뇨병을 역전시키기 위한 치료 전략에서 HIPCys 변이체의 생물이용성 및 투약 효능을 증가시키는 것으로 보인다.
- [0013] 또 다른 양태에서, CysBlocked 프로섬 펩타이드 변이체는 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물을 공유적으로 결합시킴으로써 변형된다.
- [0014] 또 다른 양태에서, HIPCysBlocked 변이체는 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물을 공유적으로 결합시킴으로써 변형된다 (HIP3CysBlockedPEG (서열번호 23), HIP1CysBlockedPEG (서열번호 24) 및 HIP2CysBlockedPEG (서열번호 25)). 이러한 변형은 혈청 중에서 HIPCysBlocked 변이체의 안정성을 개선시켜 생체내에서 섬 신생을 자극하고 당뇨병을 역전시키기 위한 치료 전략에서 HIPCysBlocked 변이체의 생물이용성 및 투약 효능을 증가시키는 것으로 보인다.
- [0015] 추가의 양태는 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP (서열번호 5-25) 포함)을 단독으로 또는 췌장 섬 세포 재생을 자극하기 위한 다른 치료제와 병용하여 투여하는 방법을 제공한다. 다양한 양태에서, 본원에서 기술되는 방법은 치료학적 유효량의 최적화된 프로섬 펩타이드를 단독, 인슐린과 병용, 인슐린 및 또 다른 제제와 병용, 및 인슐린과 다른 하나 이상의 제제와 병용하여 투여함으로써 실시될 수 있다.
- [0016] 다른 양태는 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함)의 약제학적 제형 및 단위 용량 형태를 제공한다. 하나의 양태에서, 제공되는 약제학적 제형은 최적화된 HIP를 단독 또는 하나 이상의 다른 활성 약제학적 성분 (active pharmaceutical ingredient: API)와 병용하여 포함한다. 하나의 양태에서, API는 최적화된 HIP가 선택되는 제형에 따라 다양한 경로 (피하, 근육내, 정맥내 및 심지어 경구를 포함)로 투여되는 것을 가능하게 하는 가용성 리포솜 제제 중의 약제이다. 하나의 양태에서, 제형은 일반적인 전신 투여를 위한 것이나, 다른 양태에서 제형은 피험자 내의 특정 위치, 수용체, 세포, 조직, 기관 또는 기관계에 표적화된 투여를 위한 표적화제를 포함한다.
- [0017] 다른 양태에서, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리의 치료가 필요한 피험자에서 상기 병리를 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함)에 추가하여 췌장 섬 세포 재생을 자극하기 위한 하나 이상의 제제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 양태의 하나의 양상으로, 상기 제제는 최적화된 HIP 또는 HIP와 다른 HIP-관련 펩타이드, 아밀린/프람린티드 (SYMLINTM, 엑센딘-4 (EXENATIDETM), GIP, GLP-1, GLP-1 수용체 작용제 (agonist), GLP-1 유사체, 햄스터 INGAP 펩타이드 및 관련 펩타이드, 리라글루티드 (NN2211), 및 디펩티딜 펩티다제 억제제 (GLP-1의 분해를 차단) 중에서 선택된다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리의 치료가 필요한 피험자에서 상기 병리를 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 (1) 혈당 조절을 강화하는 단계; (2) 25-하이드록시비타민 수준을 40 ng/ml 이상으로 유지하기 위해 경구 비타민 D3 (콜레칼시페롤) 또는 비타민 D2 (에르고칼시페롤)를 투여하는 단계; (3) 면역억제제의 투여를 포함한, 새로운 섬 세포 형성을 보호하기 위한 하나 이상의 요법을 시행하는 단계; (4) 인슐린과 병용하나 시간이 경과함에 따라 인슐린의 투여를 감소시키면서 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함)을 투여하는 단계; 및 (5) 최적화된 HIP의 투여 단계에 추가하여, 선택된 면역 요법에 따라, 바람직하게는 3 내지 24개월 기준으로, 섬의 보호를 위한 요법을 반복적으로 시행하는 단계 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리의 치료가 필요한 피험자에서 상기 병리를 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 (1) 혈당 조절을 강화하는 단계; (2) 25-하이드록시비타민 수준을 40 ng/ml 이상으로 유지하기 위해 경구 비타민 D3 (콜레칼시페롤)를 투여하는 단계; (3) 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함) (이에 제한됨이 없이, 최적화된 HIP와 다른 HIP 및 HIP 유사체를 포함)에 추가하여, 췌장 섬 재생을 자극하기 위한 제제를 투여하는 단계; (4) 아밀린/프람린티드 (SYMLINTM), 엑센딘-4 (EXENATIDETM; BYETTATM), 가스트린, 표피 성장 인자 및 표피 성장 인자 유사체 GIP, GLP-1, GLP-1 수용체 작용제, GLP-1 유사체, INGAP, 리라글루티드 (NN2211), 및 디펩티딜 펩티다제 IV 억제제 (GLP-1의 분해를 차단)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 제제를 공동-투여하는 단계; 및 (5) 또 다른 당뇨 요법의 시행을 감소 또는 점감시키는 단계 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리의 치료가 필요한 피험자에서 상기 병리를 치료하는 방법이

제공된다. 이 방법은, 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함)을 투여하는 것에 추가하여, 췌장 섬을 표적화하는 자가면역 세포를 억제, 차단 또는 파괴하는 하나 이상의 제제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 요법은 "면역 요법"이라 불린다. 이러한 양태의 다양한 양상에서, 췌장 섬을 표적화하는 자가면역 세포를 억제, 차단 또는 파괴하는 제제는, 개별적으로 또는 다른 제제와 병용하여 투여되는, 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다: 항 CD-3 항체 (hOKT3 γ 1(Ala-Ala) (ટે리주마브) 포함); 면역 반응을 표적화하고 제1형 당뇨병에서 베타 세포 사멸을 일으키는 T-림프구를 특이하게 차단하는 ChAglyCD3; 세포독성 T-림프구 항원 4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4: CLTA-4 Ig) (아바타셉트); 시롤리무스 (라파마이신) 단독 또는 타크로리무스 (FK506) 또는 IL-2 (라파무네)와 병용; 라파무네 단독 또는 프로류킨 (알테스류킨)과 병용; 열-쇼크 단백질 60 (Diapep277); 항-글루탐산 데카복실라제 65 (GAD65) 백신; 당뇨병-억제성 수지상 세포 백신 GSK189075, 디아족시드 및 스타틴 약물 (베타 세포 기능을 보존하기 위한 제제로서 사용되는 아토르바스타틴 포함), 미코페놀레이트 모페틸 단독 또는 다클리주마브와 병용; 항-CD20 제제; 리툭시마브; 캄파쓰-1H (항-CD52 항체), 리소필린; 폴리클로날 항-T-림프구 글로불린 (ATG/티모글로불린), 과립구 콜로니-자극 인자, 놀라스타 (페그필그라스탐), 비타민 D, 25 하이드록시 및 1,25 하이드록시비타민 D 보충물 모두; IBC-VSO 백신 (췌장 베타-세포 파괴를 예방하도록 디자인된 인슐린의 합성된 대사적 불활성 형태); $CD4^+CD25^+$ 항원-특이적 조절 T 세포를 사용하는 백신 또는 랑게르한스 섬 내의 베타 세포에 대한 면역 공격을 억제하도록 디자인된 임의의 제제 또는 제제들, 프로키말 (사람 성인 줄기 세포), 소염성 아나킨라 및 소염제, 데옥시페페르구알린, 염증촉진성 사이토카인 생성을 차단하고 T-세포 및 B-세포를 억제하는 소염제. 이들 제제 또는 유사한 제제는 직접적으로 또는 인슐린-생성 세포의 파괴를 저지하는 면역요법제의 사용을 통해 조절 T 세포를 사용하는 병용 요법에 사용될 수 있다.

[0021] 또 다른 양태에서, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리의 하나 이상의 증상이 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함) 투여 결과 치료되거나 감소되는, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리의 치료가 필요한 피험자에서 상기 병리를 치료하는 방법이 제공된다. 이러한 양태의 하나의 양상에서, 상기 증상은, 궁극적으로 미세혈관 및 대혈관 합병증 (실명을 이끄는 시각 증상, 투석 및 신장 이식을 하게 하는 신부전을 이끌 수 있는 가속된 신장 손상, 및 발 궤양 및 절단을 이끄는 신경병증을 포함)을 이끄는 고혈당증과 함께, 낮은 수준의 인슐린, 인슐린 내성, 고혈당증, 6.0%를 초과하는 헤모글로빈 A1C 수준, 빈뇨, 과도 갈증, 극심한 허기, 이상 체중 손실 또는 증가, 과체중, 피로 증가, 과민, 흐린 시력, 생식기 가려움, 이상 아픔 및 통증 (odd ache 및 pain), 구내 건조, 건조하거나 가려운 피부, 발기부전, 질 효모 감염, 절단 및 문지름에 대한 불량 치유, 과다 또는 이상 감염, 혈당 조절의 상실 또는 악화, 혈중 글루코즈의 요동, 혈중 글루카곤의 요동, 및 혈중 트리글리세라이드의 요동 중에서 선택된다. 추가로, 최근의 연구는 개선된 혈당 조절을 받은 제1형 당뇨병 환자에서 미세혈관 및 대혈관/심혈관 위험 감소를 입증하였다.

[0022] 또 다른 양태에서, 손상된 췌장 기능과 연관된 병리의 치료가 필요한 피험자에서 상기 병리를 치료하는 방법이 제공된다. 손상된 췌장 기능과 연관된 병리는 제1형 당뇨병, 신규 발생 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 성인의 잠재적 자가면역 당뇨병, 당뇨병전단계, 손상된 공복 글루코즈, 손상된 글루코즈 내성, 인슐린 내성 증후군, 대사 증후군/대사이상 증후군, 과체중, 비만, 고지질혈증, 고트리글리세라이드혈증, 섭식 장애, 무배란성 주기 및 다낭성 난소 증후군 중의 하나이다.

[0023] 또한, 본원의 양태는 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함)에 선택적으로 결합하는 항체를 제공한다. 하나의 양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 또 다른 양태에서, 항체는 폴리클로날 항체이다. 이러한 항체는 포유동물의 혈청 또는 조직 중의 최적화된 HIP 수준을 검출하는 것을 포함하는 본원에 제공되는 진단 방법에 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 진단 방법은 치료학적 유효 수준이 이러한 요법을 받은 환자에서 달성되는 것을 확실하게 하기 위해 최적화된 HIP로의 처리를 모니터링하는데 사용된다.

[0024] 또한, 본원의 양태는 치료학적 유효량의 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함) 및, 임의로, 동일하거나 분리된 포장의 GLP-1 수용체를 자극하거나 GLP-1 수준을 증대, 베타 세포 재생을 촉진, 포만을 증가, 음식 섭취 및 체중 감소를 감소시키기 위한 하나 이상의 제제, 및 사용 설명서를 포함하는, 제1형 또는 제2형 당뇨병 또는 이상 인슐린 수준, 글루코즈 대사의 불안 또는 인슐린 내성을 포함하는 기타 상태의 환자를 치료하기 위한 키트를 제공한다. 추가의 양태는 최적화된 프로섬 펩타이드 항체 (최적화된 HIP-특이적 항체를 포함) 및, 임의로, 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 포함) 및, 임의로, 표지 수단을 포함하는, 샘플 중의 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물 (최적화된 HIP 수준을 포함)를 측정하기 위한 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 본원의 파일은 컬러로 작성된 하나 이상의 사진 또는 도면을 포함한다. 컬러 도면(들) 또는 사진(들)을 갖는

본원의 사본들은 요청 및 수수료의 납부시 특허상표청에 의해 제공될 것이다.

본 발명의 특성 및 이점을 보다 충분히 이해하기 위해서, 첨부된 도면과 관련된 하기의 상세한 설명을 참조한다.

도 1은 사람 췌장 관 조직을 갖는 배양물에서 HIP1, HIP2 및 HIP3와 함께 인큐베이션한 후의 인슐린 수준을 나타내는 그래프이다.

도 2는 HIP1, HIP2 및 HIP3으로 처리된 마우스에서 인슐린 요구를 나타내는 그래프이다.

도 3은 HIP1, HIP2 및 HIP3으로 처리된 마우스에서 기준선으로부터 글루코즈의 평균 감소를 나타내는 그래프이다.

도 4A는 HIP2 및 HIP3로 처리된 마우스에서 섬의 수를 나타내는 그래프이다. 도 4B는 위약 및 HIP-처리된 마우스에서 인슐린 면역염색의 전형적 이미지를 제공하며, 인슐린-염색된 섬은 자가-형광 혈구로부터 이들의 구조를 구분하기 위해 황색으로 경계가 그어진다. 눈금 막대 = 모든 이미지에서 50 μ m.

도 5는 HIP로 처리된 마우스 췌장 조직에서의 인슐린에 대한 면역형광 염색이다.

도 6은 래트에서 근육내 전달된 HIP의 반감기를 나타내는 그래프이다.

도 7은 래트에 피하 전달된 HIP의 반감기를 나타내는 그래프이다.

도 8은 시간 경과에 따른 혈장 중 HIP2 및 HIP2B의 시험관내 안정성을 나타내는 그래프이다.

도 9A는, 다양한 HIP 및 최적화된 HIP와의 인큐베이션에 반응한, 비환원 및 환원 조건 하에서의 PANC-1 세포로부터 사람 인슐린 발현을 입증하는 웨스턴 블롯 분석이다. 도 9B는, 다양한 HIP 및 최적화된 HIP와의 인큐베이션에 반응한, 비환원 및 환원 조건 하에서의 폰시우 염색 (Ponceau Stain)이다.

도 10A는 4일 동안 HIP2 및 최적화된 HIP 펩타이드로 처리된 PANC-1 세포를 나타내며, 도면은 7일에 취한 것으로 200배 확대한 것이다. 도 10B는 7일 동안의 PANC-1 세포 형태의 진행을 나타내며 (대조군, HIP2 및 HIP2B), 도면은 1, 2, 3, 5 및 7일에 취한 것으로 200배 확대한 것이다. 도 10C는 대조군 및 최적화된 HIP (HIP2 이량체 및 HIP2 PEG)로 처리된 PANC-1 세포의 형태 변화 진행을 나타낸다.

도 11은 HIP2B의 투여 후 사람 췌장 세포에서 핵 및 인슐린을 나타내기 위한 CK19 및 DAPI에 대한 염색이다.

도 12는 위약 및 리소필린 (LSF), HIP2 및 LSF, 및 HIP2B 및 LSF로의 처리 후 3마리의 NOD 마우스의 글루코즈 수준을 나타내는 그래프이다.

도 13은 150 μ M HIP 및 최적화된 HIP 펩타이드로 48시간 동안 처리한 후의 PANC-1 세포의 Cy3 이중 항체 면역조직화학 염색이며, 이는 HIP 및 최적화된 HIP로의 자극 시 HIP 수용체의 PANC-1 세포의 세포막으로부터 세포질로의 전위를 입증한다.

도 14는 HIP 및 최적화된 HIP2B 펩타이드를 사용한 SFM 및 TSFM에서의 노출 조절된 PANC-1 세포를 나타낸다.

도 15는 면역형광 분석을 이용한 PANC-1 세포에 대한 최적화된 HIP2 펩타이드의 영향에 대한 반복 평가를 나타내며, HIP2B는 HIP 수용체 (EXTL)과 상호작용하여 HIP로의 자극 시 HIP 수용체가 세포질막으로부터 세포질로 핵으로 삼켜진다는 것을 보인다.

도 16은 최적화된 HIP2B가 PANC-1 세포에서 HIP 수용체 (EXTL3)의 세포질막으로부터 핵으로의 전위 시간을 향상시키는 것을 보이는 웨스턴 블롯을 나타낸다.

도 17은 HIP2, HIP2B 및 위약 투여 후 STZ-당뇨병 마우스 모델에서 평균적인 1일 글루코즈 수준을 나타내는 그래프이다.

도 18은 HIP2B 처리 (녹색) 및 대조 (자색) 및 위약 그룹의 마우스에서 1일 글루코즈 수준을 나타내는 그래프이다.

도 19는 중재의 개시 및 말에 HIP2B (황색), HIP2 (녹색) 및 대조 (청색) 그룹 마우스에서의 글루코즈 수준을 나타내는 그래프이다.

도 20은 공복 글루코즈 수준을 비당뇨병 범위 및 STZ 처리 이전의 기준선 글루코즈 수준 이하의 수준으로 회복시키는 최적화된 HIP2B의 영향을 나타낸다.

도 21은 연구의 종결시 처리 그룹에서의 글루코즈 내성 시험의 결과를 나타내며 최적화된 HIP2B 처리 그룹에서 보다 낮은 글루코즈 수준을 갖는다.

도 22는 최대 효과를 갖는 최저 잠재 용량을 측정하기 위해 당뇨병 모델 마우스에 상이한 용량으로 전달되는 최적화된 HIP2B의 글루코즈 조절에 대한 영향을 비교하는, STZ-유도된 당뇨병 마우스에서의 최적화된 HIP2B의 용량 반응 분석을 나타낸다.

도 23은 당뇨병 약화에 대한 상이한 농도의 HIP2B의 영향을 나타낸다.

도 24는 스프라그 돌리 (Sprague Dawley) 래트에 4 mg/kg으로 피하 및 정맥내 투여된 HIP2B, HP2 및 INGAP의 약동학 분석을 나타낸다.

도 25는 피하 전달된 최적화된 HIP2B의 약동학 분석을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명의 조성물 및 방법을 기술하기에 앞서, 공정, 조성물 및 방법들이 다양할 수 있기 때문에, 본 발명은 본원에 기술되는 특정 공정, 조성물 및 방법에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 전문용어는 단지 특정 버전 및 양태를 기술하기 위한 것으로서 특허청구범위에 의해서만 제한될 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니라는 것을 이해해야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당해 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술되는 방법 및 재료와 유사하거나 동등한 모든 방법 및 재료가 본 발명의 양태를 실시하거나 시험하는데 사용될 수 있으나, 바람직한 방법, 디바이스 및 재료가 하기에 기술된다. 본원에서 언급되는 모든 공개문은 전부 참조로서 삽입된다. 본원에서의 어떠한 것도 본 발명이 이전 발명 때문에 이러한 기술보다 앞설 수 없다는 것을 인정하는 것으로 간주될 수 없다.
- [0027] 인슐린은 제1형 당뇨병 및 인슐린 결핍 또는 인슐린의 감소된 효능 또는 생성과 연관된 기타 상태의 치료를 위해 1922년 이래로 유일한 것은 아니지만 가장 중요한 요법이 되어왔다. 그러나, 인슐린은 사라진 비정상적인 췌장 기능의 단지 일부이기 때문에, 인슐린에 대해 당뇨병 환자는 정상적인 글루코즈 대사를 갖지 못한다.
- [0028] 오늘날, 제1형 또는 제2형 당뇨병에 대한 근본적인 질환 메커니즘을 치료하기 위해 성공적으로 사용되어온 단독 요법 또는 병용 요법이 없었다. 췌장 내의 인슐린-생성 세포의 재생을 자극하는 성공적인 치료의 개발이 당뇨병을 갖는 환자를 위한 중대한 치료 전환이 될 것이다. 일부 문헌은 용어 "섬 세포"를 단지 베타 세포 또는 전체 섬을 가리키는 것으로 잘못 사용한다. 그러나, 섬 이식 이외에는 내생적으로 전체 섬을 대체하기 위해 이용 가능한 어떠한 처리도 없는 반면, 몇몇 치료적 대안은 베타 세포의 수를 증가시키고자 하기 때문에, 베타 세포와 섬을 구분해야 하는 것이 중요하다.
- [0029] 수십년의 연구 및 1974년 췌장 섬 이식의 출현 및 섬 이식을 위한 에드몬톤 프로토콜 (Edmonton Protocol)로부터의 성공에 대한 보다 새로운 주장에도 불구하고, 이들 접근법들은 미국에서 매우 성공적이지 않았다. 예를 들어, 이식 후 4년에 섬 이식된 환자의 10% 미만이 인슐린 독립적이다. 추가로, 심각한 부작용 비율이 18%이다. 제1형 당뇨병 발병시, 환자는 이미 이들의 섬의 대부분을 상실했으며, 섬의 수가 꾸준히 감소한다는 것이 잘 확립되어 있다. 그러나, 보다 최근의 연구에서는 제2형 당뇨병의 진단시 환자는 섬 매쓰 및 수의 적어도 50%의 상실을 나타낸다는 것을 밝혔다. 제1형 당뇨병 환자와 같이, 섬의 수 및 매쓰는 계속 감소하는데, 이는 자가면역 공격 때문이 아니라 베타 세포가 사실상 못쓰게 되기 때문이다. 이러한 감소가 제1형 당뇨병 환자에서 보다 빠르게 일어나지만, 제2형 당뇨병 환자에서도 여전히 1년에 10 내지 20%의 감소가 있다.
- [0030] 정상적으로 작용하는 췌장에서, 소수의 섬이 매일 자연적으로 죽으며, 글루코즈 수준을 조절 하에 유지시키는데 필요한 만큼 대체된다. 평균적으로, 섬 신생이라 공지된 이러한 재생 과정은 섬을 1개월당 약 2%의 속도로 대체시킨다. 비당뇨병 환자에서, 존재하는 섬 중의 베타 세포 매쓰는 개체의 인슐린 필요에 따라 늘거나 줄 수 있다. "베타 세포 증식"이라 불리는 이러한 과정이 제1형 당뇨병 환자에서는 일어나지 않으며 제2형 당뇨병 환자에서는 제한적이다.
- [0031] 섬 신생의 연구가 새로운 것은 아니다. 1920년 폐쇄성 췌장 스톤이 췌장의 대부분을 위축시키나 섬은 증가시킨다고 보고되었다. 이때 췌장관의 결찰 (결합)이 당뇨병의 치료에 유용할 수 있는 물질의 확인을 이끌 수 있다고 가정되었다. 외과의사들은 새로운 섬을 형성하는 물질을 생성하는 것을 기대하여 당뇨병 소아의 췌장관을 결찰하였다. 이러한 절차의 긍정적 효과는 단기간이었으나, 이들은 사람 에서 섬 회복에 대한 잠재성을 입증하

였다.

- [0032] 췌장염에 대한 햄스터 모델을 생성하는 것이 의도되었던 췌장관 결찰 연구로부터 많은 새로운 섬들을 형성하였다. 이러한 연구로 섬 신생 연관 펩타이드 (Islet Neogenesis Associated Peptide: INGAP)로 불리는 햄스터 펩타이드를 분리하였다. INGAP의 임상적 개발에서, 또한, 제1형 당뇨병이 발병한 지 수 십년 후에도 성인 췌장 전반에 걸쳐 남아있는 줄기-세포형 섬 전구세포로부터 새로운 사람 섬이 분화될 수 있다는 것이 입증되었다.
- [0033] 새로운 섬을 생성하기 위한 관 결찰을 이용하는 개념과는 별도로, 임신 동안 섬의 잠재적 재생에 대한 연구가 수행되었다. 후기 배형성에서 섬이 형성되는 것으로 보고되었으며, 섬 집단이 주변 관 조직으로부터 탈바꿈 과정을 통해 생후 계속해서 성장한다고 보고되었다.
- [0034] 제1형 또는 후기 제2형 당뇨병 환자가 이러한 질환을 다루는 주요 방법은 피하 주사를 통하거나 피하 펌프 주입을 이용하여 인슐린을 투여하는 것이다. 인슐린 요법은, 명백한 생활방식의 불편함뿐만 아니라, 신체의 정상적인 조절 메커니즘과도 부조화하여 글루코즈 변동을 완전히 조절하지 못한다. 인근 차트에서 보여지는 바와 같이, 가장 잘 조절된 제1형 당뇨병 환자도 정상적인 글루코즈 메커니즘과 유사한 것들을 조금도 갖지 않는다. 이는 인슐린 분비가 결손된 췌장 기능의 단지 일부이기 때문이다.
- [0035] 연구자들은 인슐린의 내생적 생성이 약물 처리로 자극될 수 있는지의 여부를 평가하였다. 예를 들어, 지난 수십 년에 걸쳐, 글루코즈 대사에 수반되는 펩타이드 또는 이러한 펩타이드의 유사체가 당뇨병 환자에게 투여되는 수개의 요법을 연구하였다. 이러한 요법은 글루카곤 유사 펩타이드-1 (Glucagon Like Peptide-1: GLP-1)의 아미노산 서열과 유사한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 투여를 포함하며, 이러한 펩타이드는 GLP-1 수용체 유사체, 엑센딘-4, 엑세나티드/BYETTA™ (길라 몬스터로부터 유도됨), Januvia™, 위 억제 펩타이드/글루코즈-의존적 인슐린항성 폴리펩타이드 (Glucose-Dependent Insulinotropic polypeptide: GIP), GLP-1와 동족인 화합물, 예를 들어 리라글루티드 (NN2211), 디펩티딜 펩티다제-4 억제제 (GLP-1의 파괴를 억제), 가스트린, 표피 성장 인자 및 표피 성장 인자 유사체, 및 햄스터 유도된 섬 신생 연관된 펩타이드 (INGAP)를 포함한다.
- [0036] 이러한 처리의 어떠한 것도 당뇨병의 근본적인 메커니즘을 역전시키는데 효과적이지 않았다. 새로운 섬의 생성은 인슐린-생성 베타 세포의 형성뿐만 아니라 글루코즈 대사에 수반되는 다른 세포들도 형성한다. 결과적으로, 충분한 새로운 섬이 생성되는 경우, 환자는 결국 혈당 조절을 회복할 수 있다. 따라서, 섬 신생은 당뇨병을 치료할 뿐만 아니라 실제로 이를 역전시킬 가능성을 나타낸다.
- [0037] 효과적인 섬 세포 신생제에 대해서, 췌장은 새로운 섬 세포를 생성할 이의 능력에 있어 "유통성 (elastic)"이 있어야 한다. 기존 섬에서 증식할 베타 세포의 적응성 (plasticity)은 잘 확립되어 있는 반면, 췌장 섬 사멸 또는 아포토시스에 반응하여 일생 동안 새로운 췌장 섬이 생성된다는 췌장의 유통성에 대한 입증은, 인슐린 생성 섬 구조물의 수가 출생시 고정되어 삶 동안 유지된다는 오랜 개념을 바꿨다. 췌장 섬 신생이 췌장의 내분비 및 외분비 부분 모두에서 발견되는 전구 세포의 분화를 통해 기존의 췌장 세포로부터 일어난다는 것이 널리 받아들여지고 있다. 자료들은 제1형 당뇨병이 발병한 지 수십 년 후에도 췌장 섬이 재생될 수 있다는 것을 입증한다.
- [0038] 예를 들어, 제1형 당뇨병 환자는 임신 동안 정상적인 수준의 C-펩타이드를 만들 수 있다. 수개의 팀은 모든 임신한 제1형 당뇨병 환자의 1/3에서 임신의 처음 3개월 동안 C-펩타이드 수준이 정상적 범위로 기이하게 증가하는 것을 밝혀내었다. C-펩타이드의 이러한 증가는 인슐린 요구의 상당한 감소를 동반하여 일부 환자는 임신의 처음 3개월 동안 일시적으로 인슐린을 중단하였다. 임신 전 측정가능한 C-펩타이드가 없음에도 불구하고, 환자에서 임신 10주 내에 발생하는 임신 동안의 C-펩타이드 증가는 작용하는 섬 구조물의 회복을 의미한다. 임신 동안 발생하는 섬 신생은 내인성 스테로이드 생성의 부수적 상승 및 태아에 대한 면역 공격을 예방하는 면역 시스템의 하향 조절로부터 생긴 것으로서 이는 또한 섬에 대한 림프구 공격을 억제하는데도 역할을 할 법하다고 가정된다. 면역 억제와 함께, 임신 시 모계의 글루코즈 세트포인트의 하락을 보상하기 위해 임신 동안 모계의 섬 성장 촉진 인자의 상향 조절이 있다고도 추측된다. 또한, 동물 모델은 섬 신생이 임신 동안 베타 세포 확장의 전개에 앞서 선행된다는 것을 입증하였으며, 사람 췌장 전구 세포가 섬으로 분화한다는 것이 입증되었다. 유사하게, 신장 이식을 위해 장기간 면역억제된 환자는 인슐린 생성 섬을 재생하는 것이 관측되었다.
- [0039] 지난 10년에 걸쳐, 췌장의 베타 세포 파괴를 저지시킬 수 있는 다수의 면역 조정자의 영향을 평가하는 임상 시험들이 수행되었다. 시롤리무스 (라파마이신), 타크로리무스 (FK506), 열-쇼크 단백질 60 (DIAPEP277™), 항-글루탐산 데카복실라제 65 (GAD65) 백신, 미코페놀레이트 포페틸 단독 또는 다클리주마브와 병용, 항-CD20 제제, 폴리클로날 항-T-림프구 글로불린 (ATG), 리소필린, 리툽시마브, 캄파쓰-1H (항-CD52 항체), 비타민 D,

IBC-VSO 백신 (췌장 베타-세포 파괴를 예방하도록 디자인된 인슐린의 합성된 대사적 불활성 형태), 및 인터페론- α 의 투여, $CD4^+CD25^+$ 항원-특이적 조절 T 세포를 사용하는 백신화를 수반하는 치료와 함께, 면역 반응을 표적화하고 제1형 당뇨병에서 베타 세포 사멸을 일으키는 T-림프구를 특이적으로 차단하는 항 CD-3 항체, 예를 들어 hOKT3 γ 1(A1a-A1a) 및 ChAglyCD3가 이러한 목적으로 이용되었다. 이러한 치료적 접근법은 직접적으로나 인슐린-생성 세포의 파괴를 저지시키기 위한 면역요법의 이용을 통해 조절 T 세포를 이용하고자 하는 것이다. 이러한 시도의 목적은 췌장의 섬의 베타 세포에 대한 추가의 면역 공격을 예방함으로써 섬 기능을 보존하기 위한 체제의 능력을 측정하는 것이다.

[0040] 또한, 최근의 연구에서는 비타민 D가 제1형 당뇨병의 예방에 중요한 면역 조절 역할을 할 수 있다는 것을 밝혀내었다. 위도와 무관하게 미국 인구의 54.7% 이하가 낮은 25 하이드록시비타민 D 수준을 갖는다. 비타민 D 결여는 제1형 당뇨병의 증가된 위험과 관련되고 제1형 진단의 개시에 나타날 뿐만 아니라 제1형 및 제2형 당뇨병 환자 모두에서 일반적으로 나타나는 것으로 입증되었다. 정상적 면역 기능을 지탱하는데 40 ng/ml 이상의 수준을 유지시키는 것이 권장된다. 10,000 IU/day 이하의 용량에서 어떠한 부작용도 나타나지 않았다.

[0041] 하기 정의는 이해를 돕기 위한 것이다. 달리 언급이 없는 한, 본원에 사용되는 기술, 표기 및 기타 과학적 또는 의학적 용어 또는 전문 용어는 화학 및 의학 기술분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어가 명확히 하기 위해 및/또는 신속한 참조를 위해 본원에서 정의되며, 본원에서의 이러한 정의의 삽입이 반드시 당해 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 용어의 정의 이상으로 실질적인 차이를 나타내고자 하는 것으로 간주되지 않아야 한다.

[0042] 또한, 본원 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태인 "하나"는, 문맥에서 달리 명시되지 않는 한, 복수를 것을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "섬유아세포"는 하나 이상의 섬유아세포 및 당해 기술 분야의 사람들에게 알려진 이의 등가물 등을 언급한다.

[0043] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 사용되는 숫자의 수치 값에 대한 + 또는 - 10%를 의미한다. 따라서, 약 50%는 45% 내지 55%의 범위를 의미한다.

[0044] 본원에서 사용되는 "프로섬 펩타이드"는 섬 세포 신생을 자극하는 단백질로부터 유도되는 단백질 또는 펩타이드를 언급하며, 이로 제한됨이 없이, 사람 REG3A (서열번호 1), 사람 REG3G (서열번호 28), 사람 REG1A, 사람 REG1B, 사람 REG4, 햄스터 INGAP (서열번호 27), 햄스터 REG2, 햄스터 REG3G, 래트 REG1, 래트 PAP/REG3B, 래트 PAP3, 래트 REG3G, 마우스 REG1, 마우스 REG2, 마우스 REG3A, 마우스 REG3B, 마우스 REG3G, 마우스 REG3S, 마우스 REG4, 소 PTP, 이러한 단백질의 침팬지, 소, 개, 양 (sheep) 유사체 및 동족체, 및 이러한 단백질 또는 이의 동족체로부터 유도되는 펩타이드 단편을 포함한다. 이러한 프로섬 펩타이드의 단백질 서열은 공개적으로 이용가능하다. 프로섬 펩타이드는, 추가로, HIP2의 활성인 14개 아미노산 서열 (또는 각각의 동족체에 대한 상응하는 서열) (하기 표 1 참조)를 포함하고 150개 미만의 아미노산, 125개 미만의 아미노산, 100개 미만의 아미노산, 75개 미만의 아미노산, 50개 미만의 아미노산 또는 25개 미만의 아미노산인 REG3A, INGAP 또는 상동 단백질의 단편인 펩타이드를 포함한다. 이러한 펩타이드 (활성인 14개 아미노산 서열을 제공)는, 이로 제한됨이 없이, 하기를 포함한다:

표 1

사람 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	서열번호 4
침팬지	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	서열번호 60
햄스터	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	서열번호 61
INGAP	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	서열번호 62
마우스	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	서열번호 63
REG3A	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	서열번호 64
노르웨이	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	서열번호 65
랫트 REG3	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	서열번호 66
소	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	서열번호 67
개	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	서열번호 68
양	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	서열번호 69
사람 REG1A	I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W	서열번호 70
사람 REG1B	I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W	서열번호 71
랫트 REG1	I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W	서열번호 72
마우스 REG1	T	G	L	H	D	P	K	R	N	R	R	W	H	W	서열번호 73
마우스 REG2	T	G	L	H	D	P	K	S	N	R	R	W	H	W	서열번호 74
햄스터 REG2	I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W	서열번호 75
랫트 REG3	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	서열번호 76
랫트	I	G	L	H	D	P	T	L	G	G	E	P	N	G	서열번호 77
PAP/REG3B	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R	서열번호 78
랫트 PAP3	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	서열번호 79
마우스	I	G	L	H	D	P	T	L	G	A	E	P	N	G	서열번호 80
REG3A	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Y	E	P	N	R	서열번호 81
마우스	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Y	E	P	N	R	서열번호 82
REG3B	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	G	서열번호 83
마우스	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R	서열번호 84
REG3G	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R	서열번호 85
랫트 REG3G	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	G	서열번호 86
햄스터	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	G	서열번호 87
REG3G	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	서열번호 88
사람 REG3G	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	서열번호 89
마우스	I	G	L	H	D	L	S	L	G	S	L	P	N	E	서열번호 90
REG3S	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	A	N	A	서열번호 91
소 PTP	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	A	N	A	서열번호 92
햄스터	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	서열번호 93
INGAP	I	G	L	H	D	P	Q	K	R	Q	Q	W	Q	W	서열번호 94
사람 REG4	I	G	L	H	D	P	Q	K	R	Q	Q	W	Q	W	서열번호 95

[0045]

마우스 REG4	I	G	L	H	D	P	Q	K	K	Q	L	W	Q	W	서열번호 86
침팬지	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	서열번호 87
소	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	서열번호 88
개	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	서열번호 89
양	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	서열번호 90

[0046]

[0047]

이러한 펩타이드 단편은, 이로 제한됨이 없이, 하기에서 확인되는, HIP1, HIP2, HIP3, INGAP 펩타이드 (서열번호 26), 및 이의 동족체를 포함한다. (Reg 유전자로 불리는) 랫트 유전자 (이에 기초하여 HIP가 사람에서 발견된 유전자)에 대해 사람에서 발견되는 유사한 사람 유전자가 있었으며, 사람 프로섬 펩타이드의 종과 다른 포유동물 중 사이에 고도의 상동성이 있다. 하기 중 상동성 차트는 HIP 관련된 서열이 진화를 통해 잘 보존된다는 것을 나타낸다. 이들 서열 각각이 사람에서 다소의 효능을 가질 것 같으나, 어느 것도 HIP의 사람 활성 서열과 정확히 일치하지는 않는다.

[0048] 중 상동성

사람 REG3A	W I G L H D P T	Q	G	T	E	P	N	G	E	서열번호 30
침팬지	W I G L H D P T	Q	G	S	E	P	D	G	G	서열번호 31
햄스터 INGAP	W I G L H D P S	H	G	T	L	P	N	G	S	서열번호 32
마우스 REG3A	W I G L H D P T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	서열번호 33
노르웨이 랫 REG3	W I W L H D P T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	서열번호 34
소	W I G L H D P T	E	G	S	E	P	D	A	G	서열번호 35
개	W M G L H D P T	E	G	Y	E	P	N	A	D	서열번호 36
양	W I G L H D P T	E	G	S	E	P	N	A	G	서열번호 37

[0049]

[0050] 상기 표는 14개의 아미노산 HIP2 서열을 포함하는 사람 펩타이드의 16개 아미노산 스트레치를 다른 종과 비교한다.

사람 REG3A	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	서열번호 3						
침팬지	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		서열번호 38					
햄스터 INGAP	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G			서열번호 39				
마우스 REG3A	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G				서열번호 40			
노르웨이 랫 REG3	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G					서열번호 41		
소	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A						서열번호 42	
개	W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A							서열번호 43
양	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A							
사람 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	서열번호 4							
침팬지	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		서열번호 45						
햄스터 INGAP	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G			서열번호 46					
마우스 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G				서열번호 47				
노르웨이 랫 REG3	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G					서열번호 48			
소	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A						서열번호 49		
개	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A							서열번호 50	
양	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A								서열번호 51
사람 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	E							
침팬지	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	G	서열번호 52						
햄스터 INGAP	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	S		서열번호 27					
마우스 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G			서열번호 53				
노르웨이 랫 REG3	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G				서열번호 54			
소	I	G	L	H	D	P	T	E		S	E	P	D	A	G					서열번호 55		
개	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	D						서열번호 56	
양	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	G							서열번호 57

[0051]

[0052] 본원에서 사용되는 용어 "최적화된 프로섬 펩타이드"는, 이로 제한됨이 없이 사람 REG3A, 사람 REG3G, 사람 REG1A, 사람 REG1B, 사람 REG4, 햄스터 INGAP, 햄스터 REG2, 햄스터 REG3G, 랫 REG1, 랫 PAP/REG3B, 랫 PAP3, 랫 REG3G, 마우스 REG1, 마우스 REG2, 마우스 REG3A, 마우스 REG3B, 마우스 REG3G, 마우스 REG3S, 마

우스 REG4, 소 PTP, 이러한 단백질의 침팬지, 소, 개, 양 유사체 및 동족체, 및 이러한 단백질 또는 이의 동족체로부터 유도되는 펩타이드 단편, HIP1, HIP2 및/또는 HIP3 또는 이러한 펩타이드의 동족체 (서열번호 31-90)를 포함한 프로섬 펩타이드의 변형들을 언급하며, 상기 펩타이드는 다양한 양태에서 기술되는 바와 같이 이러한 펩타이드의 안정성, 가용성 또는 생물이용성을 증가시키기 위해 변형되었다. 이러한 기술의 목적상, 안정성은 비-최적화된 프로섬 펩타이드, REG3A, REG3G, INGAP, REG3G 펩타이드, NGAP 펩타이드, HIP1, HIP2 및/또는 HIP3 또는 이러한 펩타이드의 동족체를 표적화하고 분해하는 혈청 내 프로테아제에 의한 분해에 대한 펩타이드 내성을 언급한다. 또한, 이러한 기술의 목적상, 생물이용성은 비-최적화된 프로섬 펩타이드인 사람 REG3A, 사람 REG3G, 사람 REG1A, 사람 REG1B, 사람 REG4, 햄스터 INGAP, 햄스터 REG2, 햄스터 REG3G, 래트 REG1, 래트 PAP/REG3B, 래트 PAP3, 래트 REG3G, 마우스 REG1, 마우스 REG2, 마우스 REG3A, 마우스 REG3B, 마우스 REG3G, 마우스 REG3S, 마우스 REG4, 소 PTP, 이러한 단백질의 침팬지, 소, 개, 양 유사체, HIP1, HIP2 및/또는 HIP3 또는 이러한 펩타이드의 동족체를 분해하는 프로테아제 및 다른 체계적 경로에 의한 분해를 피하기 위한 펩타이드의 능력에 기초하여 표적 세포, 경로 및/또는 체계적 메커니즘에 의한 생체내 치료적 이용에 이용가능한 펩타이드의 양을 언급한다. 바람직하게는, 최적화된 프로섬 펩타이드는 C-말단 아미드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹의 첨가, 페길화 (pegylated) 및 이의 조합에 의해 차단된 REG3G 펩타이드, INGAP 펩타이드, HIP3, HIP1 및/또는 HIP2 또는 동족체를 언급한다.

[0053] 본원에서 사용되는 "최적화된 HIP"는 HIP, HIP1 및/또는 HIP2의 변형들을 언급하며, 상기 펩타이드는 본원의 양태들에서 기술되는 바와 같이 HIP, HIP1 또는 HIP2의 안정성, 가용성 또는 생물이용성을 증가시키기 위해 변형되었다. 이러한 기술의 목적상, 안정성은 비-최적화된 HIP3, HIP1 및/또는 HIP2를 표적화하고 분해하는 혈청 내 프로테아제에 의한 분해에 대한 펩타이드 내성을 언급한다. 또한, 이러한 기술의 목적상, 생물이용성은 비-최적화된 HIP3, HIP1 및/또는 HIP2를 분해하는 프로테아제 및 다른 체계적 경로에 의한 분해를 피하기 위한 펩타이드의 능력에 기초하여 표적 세포, 경로 및/또는 체계적 메커니즘에 의한 생체내 치료적 이용에 이용가능한 펩타이드의 양을 언급한다. 바람직하게는, 최적화된 HIP는 C-말단 아미드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹의 첨가, 페길화 및 이의 조합에 의해 차단된 HIP3, HIP1 및/또는 HIP2를 언급한다.

[0054] 본원에서 사용되는 상태 또는 환자의 "치료"는 임상 결과를 포함한 유리하거나 목적하는 결과를 얻기 위한 단계들을 취하는 것을 언급한다. 이러한 기술의 목적상, 유리하거나 목적하는 임상 결과는, 이로 제한됨이 없이, 당뇨병의 하나 이상의 증상의 경감 또는 개선, 질환 면적의 감소, 질환 진행의 지연 또는 서행, 질환 상태의 개선, 완화 또는 안정화, 및 후술되는 기타 이로온 결과를 포함한다. 당뇨병의 증상은 낮거나 부적절한 수준의 인슐린 또는 인슐린 활성, 빈뇨, 과도 갈증, 극심한 허기, 이상 체중 손실, 피로 증가, 과민, 흐린 시력, 생식기 가려움, 이상 아픔 및 통증, 구내 건조, 건조하거나 가려운 피부, 발기부전, 질 효모 감염, 절단 및 문지름에 대한 불량 치유, 과다 또는 이상 감염, 고혈당증, 혈당 조절의 상실, 식후 혈중 글루코즈의 요동, 혈중 글루카곤의 요동, 혈중 트리글리세라이드의 요동을 포함한다. 당뇨병은 당해 기술의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법에 의해 진단될 수 있다. 예를 들어, 일반적으로, 당뇨병은 126 mg/dL 초과 글루코즈의 혈장중 글루코즈 결과를 갖는다. 본원에서 기술되는 조성물 및 방법으로 또한 처리될 수 있는 당뇨병전기 (prediabetes)는 일반적으로 100 내지 125 mg/mL 글루코즈의 혈중 글루코즈 수준을 갖는 환자로 진단된다. 또한, 다른 증상들도 당뇨병, 관련 질환 및 상태, 및 감소된 체장 기능에 의해 영향을 받는 질환 및 상태를 진단하는데 이용될 수 있다.

[0055] 본원에서 사용되는, 증상 또는 증상들의 "감소" (및 이러한 구의 문법적 동의어)는 증상(들)의 중증도 또는 빈도 감소, 또는 증상(들)의 제거를 의미한다.

[0056] 용어 "억제"는 증상의 개시를 예방, 증상을 경감, 또는 질환, 상태 또는 장애를 제거하기 위한 본원에 기술된 화합물의 투여를 포함한다.

[0057] 본원에서 사용되는, "손상된 체장 기능과 연관된 병리"는, 병리가 호르몬 및/또는 사이토카인을 생성 및/또는 분비하는 피험자의 체장에 대해 감소된 능력과 연관되는 것이다. 바람직하게는, 이러한 호르몬 또는 사이토카인은 인슐린이다. 손상된 체장 기능과 연관된 병리는 제1형 당뇨병, 신규 발생 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 성인의 잠재적 자가면역 당뇨병, 당뇨병단계, 손상된 공복 글루코즈, 손상된 글루코즈 내성, 인슐린 내성 증후군, 대사 증후군, 과체중, 비만, 고지질혈증, 고트리글리세라이드혈증, 섭식 장애 및 다낭성 난소 증후군을 포함한다.

[0058] 본원에서 사용되는, 피험자에 약물 또는 치료제의 "투여" (및 이러한 구의 문법적 동의어)는 치료제를 피험자에게 투여함으로써 치료제가 표적되는 조직에 긍정적 영향을 끼치게 하기 위한 표적 조직으로의 또는 표적 조직에

의 직접적 투여 (자가-투여를 포함), 및 간접적 투여 (약물을 처방하는 행위를 포함)를 포함한다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 바와 같이, 환자에게 자가-투여를 지시 및/또는 환자에게 약물에 대한 처방전을 제공하는 의사는 약물을 환자에게 투여하는 것이다.

- [0059] 본원에서 사용되는, "피험자 (subject)" 또는 "환자 (patient)"는 포유동물, 전형적으로 사람, 단 임의로 수의 학적으로 중요한 포유동물이며, 이로 제한됨이 없이 말, 캐틀 (cattle), 양, 개 및 고양이를 포함한다.
- [0060] 본원에서 사용되는, 질환에 대한 "소견 (manifestation)"은 질환을 갖는 환자의 증상, 징후, 해부학적 상태 (예: 섬 세포의 결여), 생리학적 상태 (예: 글루코즈 수준), 또는 리포트 (예: 트리글리세라이드 수준) 특성을 언급한다.
- [0061] 본원에서 사용되는, 약물 또는 제제의 "치료학적 유효량"은, 질환 또는 상태를 갖는 피험자에게 투여시, 의도된 치료 효과, 예를 들어 피험자에서 질환 또는 상태의 하나 이상의 소견에 대한 경감, 개선, 완화, 제거를 가질 약물 또는 제제의 양이다. 완전한 치료학적 효과는 반드시 한번의 용량을 투여하여 일어나는 것은 아니며, 일련의 용량을 투여한 후에만 발생할 수 있다. 따라서, 치료학적 유효량은 한번 이상 투여될 수 있다.
- [0062] 본원에서 사용되는, 약물의 "예방학적 유효량"은, 피험자에게 투여시, 의도된 예방 효과, 예를 들어 질환 또는 증상의 개시 (또는 재발)를 예방 또는 지연 또는 질환 또는 증상의 개시 (또는 재발) 가능성을 감소시킬 약물의 양이다. 완전한 예방학적 효과는 반드시 한번의 용량을 투여하여 일어나는 것은 아니며, 일련의 용량을 투여한 후에만 발생할 수 있다. 따라서, 예방학적 유효량은 한번 이상 투여될 수 있다.
- [0063] "약제학적으로 허용되는"은 담체, 희석제 또는 부형제가 제형의 다른 성분들과 조화되고 수령자에게 유해하지 않아야 한다는 것을 의미한다.
- [0064] 본원에서 사용되는, "TID", "QD" 및 "QHS"는 각각 "1일 3회", "1일 1회" 및 "취침전 1회"에 대한 통상적 의미를 갖는다.
- [0065] "병용하는" 제제의 투여는 병행 투여 (일정 시간에 걸쳐 환자에게 양 제제를 투여, 예를 들어 1개월 동안 격일로 모노클로날 항체 및 인크레틴 호르몬 또는 유사체와 같은 펩타이드 호르몬의 투여), 공동-투여 (제제를 거의 동시, 예를 들어 약 수분 내지 수시간 내에 투여), 및 공동-제형 (제제를 경구, 피하 또는 비경구 투여에 적합한 단일 용량 형태로 배합 또는 화합)을 포함한다.
- [0066] "DPP-4 억제제"는 디펩티딜 펩티다제-4 억제제이다.
- [0067] "햄스터 INGAP"는 서열 Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (서열번호 26)을 갖는 비-사람 섬 신생 연관된 펩타이드이다. 이 펩타이드는 서열 Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (서열번호 27)를 갖는 햄스터 INGAP의 단편이다.
- [0068] "GIP"는 글루코즈-의존적 인슐린항성 폴리펩타이드로도 공지된 위 억제성 펩타이드이다.
- [0069] "GLP-1"은 글루카곤-유사 펩타이드 1이다.
- [0070] "HIP3" (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu (서열번호 2))는 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다. HIP3는 약 1564.6의 분자량을 갖는다.
- [0071] "HIP1" (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly (서열번호 3))은 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0072] "HIP2" (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly (서열번호 4))는 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다. HIP2는 약 1435.5의 분자량을 갖는다.
- [0073] HIP3Blocked 또는 HIP3B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-NH₂) (서열번호 5))는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아마이드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다. HIPB는 약 1605.7의 분자량을 갖는다.
- [0074] HIP1Blocked (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH₂ (서열번호 6))는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아마이드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0075] HIP2Blocked 또는 HIP2B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH₂) (서열번호 7))는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아마이드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이

트이다. HIP2B는 약 1476.6의 분자량을 갖는다.

- [0076] INGAP PeptideBlocked 또는 INGAPB는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 INGAP 펩타이드이다.
- [0077] HIP3Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys) (서열번호 8))는 추가의 C-말단 시스테인 잔기를 갖는 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0078] HIP1Cys (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (서열번호 9))는 추가의 C-말단 시스테인 잔기를 갖는 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0079] HIP2Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (서열번호 10))는 추가의 C-말단 시스테인 잔기를 갖는 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0080] INGAP PeptideCys 또는 INGAPCys는 추가의 C-말단 시스테인 잔기를 갖는 정제, 합성 또는 제조합 형태의 INGAP 펩타이드이다.
- [0081] HIP3CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (서열번호 11))는 각각의 단량체가 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드 이량체이다. 이량체는 각각의 단량체의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합을 통해 형성된다.
- [0082] HIP1CysDimer (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys)₂ (서열번호 12))는 각각의 단량체가 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드 이량체이다. 이량체는 각각의 단량체의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합을 통해 형성된다.
- [0083] HIP2CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (서열번호 13))는 각각의 단량체가 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드 이량체이다. 이량체는 각각의 단량체의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합을 통해 형성된다. HIP2는 약 1435.5의 분자량을 갖는다.
- [0084] INGAPCysDimer는 각각의 단량체가 N-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 INGAP 펩타이드 이량체이다.
- [0085] HIP3CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂) (서열번호 14))는 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0086] HIP1CysBlocked (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (서열번호 15))는 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0087] HIP2CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (서열번호 16))는 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0088] INGAPCysBlocked는 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 INGAP 펩타이드이다.
- [0089] HIP3CysBlockedDimer (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂)₂ (서열번호 17))는 각각의 단량체가 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드 이량체이다. 이량체는 각각의 단량체의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합을 통해 형성된다.
- [0090] HIP1CysBlockedDimer (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂)₂ (서열번호 18))는 각각의 단량체가 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 제조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드 이량체이다. 이량체는 각각의 단량체의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합을 통해 형성된다.
- [0091] HIP2CysBlockedDimer 또는 HIP2B Cys Dimer (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-

Cys-NH₂)₂ (서열번호 19)는 각각의 단량체가 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드 이량체이다. 이량체는 각각의 단량체의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합을 통해 형성된다. HIP2B Cys Dimer는 약 3157.5의 분자량을 갖는다.

- [0092] INGAPCysBlocked Dimer는 각각의 단량체가 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드 이량체이다. 이량체는 각각의 단량체의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합을 통해 형성된다.
- [0093] HIP3CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys(PEG)) (서열번호 20)는 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0094] HIP1CysPEG (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)) (서열번호 21)는 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0095] HIP2CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)) (서열번호 22)는 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0096] INGAPCysPEG는 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 INGAP 펩타이드이다.
- [0097] HIP3CysBlockedPEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys(PEG)-NH₂) (서열번호 23)는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단되고 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0098] HIP1CysBlockedPEG (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH₂) (서열번호 24)는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단되고 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다.
- [0099] HIP2CysBlockedPEG 또는 HIP2B Cys-PEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH₂) (서열번호 25)는 N-말단 아세틸 그룹 및 C-말단 아미드 그룹으로 차단되고 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 사람 프로섬 펩타이드이다. HIP2B Cys(PEG)는 약 44,782의 분자량을 갖는다.
- [0100] INGAPCysBlocked PEG는 C-말단 아세틸 그룹 및 N-말단 아미드 그룹으로 차단되고 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물에 공유적으로 결합된 C-말단 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 정제, 합성 또는 재조합 형태의 INGAP 펩타이드이다.
- [0101] REG3G는 하기 서열을 갖는 사람 재생 섬-유도된 단백질 3 감마 전구체이다:
MLPPMALPSVSWMLLSCILLCQVQGEETQKELPSPRISCPKGSKAYGSPCYALFLSPKS
WMDADLACQKRPSGKLVSVLSGAEGSFVSSLVRSISNSYSYIWGLHDPTQGSEPDGDG
WEWSSTDVMNYFAWEKNPSTILNPGHCGSLSRSTGFLKWWDYNCDAKLPHYVCKFKD
(서열번호 28)
- [0102]
- [0103] REG3G 펩타이드는 서열 IGLHDPTQGSEPDG (서열번호 29)을 갖는 REG3G로부터 유도되는 사람 재생 섬-유도된 단백질 3 감마 전구체 펩타이드이다. 다른 REG3G 펩타이드는 WIGLHDPTQGSEPDG (서열번호 58) 및 IGLHDPTQGSEPDG (서열번호 59)이다.
- [0104] 본원 기술의 양태는 치료제로서의 개선된 사용을 위해 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)의 안정성 및 용해도를 최적화시키기 위한 상세한 전략을 제공한다. HIP는, 염색체 2, 위치 2p12 자리 79240075 (서열번호 1)에 위치한 췌장-연관된 단백질 전구체 (NP_002571)로도 알려진, 사람 단백질 재생 섬-유도된 3 알파 단백질 (REG3A) (NM_138937.1)의 펩타이드 단편이다. HIP3, HIP1 및 HIP2는 췌장에 내재하는 전구 세포로부터 섬 신생을 유도

또는 자극한다. 본원 기술의 방법에 따라 사용되는 이들 신생제는, 질환을 치료하기 위한 치료제로서 사용시, 증가된 생체내 안정성, 용해도 및 효능을 나타내는 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)의 최적화된 형태이다. 상기 질환은, 이로 제한됨이 없이, 진성 당뇨병 (제1형 당뇨병), 제2형 당뇨병 (비-인슐린 의존적 진성 당뇨병 및 인슐린 요구 성인 발병 당뇨병, 유년기 및 청년기의 당뇨병), 및 성인에서의 잠복성 자가면역 당뇨병 (Latent Autoimmune Diabetes in Adults: LADA)를 포함한다.

[0105] 또한, 본원 기술의 양태는 췌장 기능이상 (제1형 및 제2형 당뇨병 포함)을 치료하기 위한 약제학적 조성물 및 요법을 제공한다. 하나의 양태에서, 이러한 조성물은 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)을 포함한다. 또 다른 양태에서, 이러한 조성물은 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함) 및 글루코즈 대사에 영향을 끼치는 다른 제제를 포함한다. 췌장 섬 신생에 수반되는 제제 및 췌장 섬 세포를 표적화하는 자가면역 세포를 억제, 차단 또는 파괴하는 제제가 이러한 다른 제제에 포함된다. 하나의 양태에서, 본원에서 기술되는 요법은 치료학적 유효량의 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)를 치료가 필요한 포유동물에게 투여함으로써 실시된다. 또 다른 양태에서, 본원에서 기술되는 요법은 치료학적 유효량의 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)을 치료가 필요한 포유동물에게 글루코즈 대사에 영향을 끼치는 또 다른 제제 (예를 들어, 호르몬 또는 화합물) (이로 제한됨이 없이, 베타 세포 재생 및 위 배출에 수반되는 호르몬 또는 화합물 포함), 예를 들어 GLP-1, GIP, GLP-1 수용체 유사체, GLP-1 유사체, 및 디펩티딜 펩티다제-4 억제제 (GLP-1의 파괴를 예방), 및 췌장 세포를 표적화하는 자가면역 세포를 억제, 차단 또는 파괴하는 제제와 병용하여 투여함으로써 실시된다. 이러한 후자의 양태에서, 최적화된 HIP 및 다른 제제는 따로 투여되거나 배합 조성물을 제공하도록 혼합되어 동시에 투여될 수 있다.

[0106] NOD 마우스에서 유전자 발현의 마이크로어레이 분석은 특징적으로 섬 신생에서 Reg 유전자의 상향조절을 나타내었다. 또한, Reg 유전자는 발달하는 사람의 췌장을 차지해서 분만 후 그 자신의 글루코즈 대사를 유지하도록 후기 태아 발달시 상향조절되는 것으로 알려져 있다. 태아 조직과 비-내분비 췌장 상피 세포 (non-endocrine pancreatic epithelial cell: NEPEC)와의 공동-이식이 NEPEC 집단으로부터 새로운 섬 구조물을 자극하는 것으로 밝혀졌다. 공동-이식된 태아 물질에서 Reg의 상향조절이 이러한 효과를 위한 자극일 것 같다.

[0107] 생체내 연구는, HIP1, HIP2 및 HIP3가 당뇨병 마우스에게 도입되는 경우 췌장 내의 전구 세포의 새로운 섬 구조물로의 분화를 자극한다는 것을 보였다.

[0108] 섬 구조물의 신생에 효과적일지라도, 프로섬 펩타이드 (HIP 변이체 포함)를 치료제로서 투여하기 위해서는 용해도, 안정성 및 생물이용성이 개선되도록 최적화시킬 필요가 있다. 프로테아제 분해의 기회를 감소시킬 프로섬 펩타이드 (HIP 변이체 포함)에 대한 변형은 이들의 효능을 증가시킴으로써 긍정적 치료 효과에 필요한 용량을 감소시킬 것이다. 이러한 변형으로 "최적화된 프로섬 펩타이드" 또는 "최적화된 HIP"로 불리는 것들이 생성된다.

[0109] 하나의 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)은 정제, 합성 또는 재조합 형태로 본원 기술에 의해 제공되며, 췌장 섬 신생을 유도하도록 본원에서 기술되는 방법에 따라 투여된다.

[0110] 또한, 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)는 긴 기간 동안 안정하게 저장될 수 있다. 최적화된 HIP는 등장 염수에서 20 °C에서 저장시 수개월 동안 안정하다.

[0111] 특정 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)는 작용적으로 과활성이어서, REG3A, 다른 HIP 펩타이드 및 비-사람 HIP 동족체, 예를 들어 햄스터 INGAP와 연관된 하나 이상의 작용 활성화에 대한 보다 큰 활성을 나타낼 수 있다.

[0112] 뉴클레오타이드 암호화 서열의 축퇴 때문에, 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 암호화하는 다양한 DNA 서열을 재조합의 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 변이체 포함)를 생성하기 위한 발현 벡터의 제조를 위해 본원 기술의 실시예에 사용할 수 있다. 이들은, 이로 제한됨이 없이, 서열 내의 동일하거나 작용적으로 등가물인 아미노산 잔기를 암호화하여 침묵 변화를 생성하는 상이한 코돈의 치환에 의해 변형된 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함) 전체 또는 일부를 포함하는 핵산 서열을 포함한다. 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함) 및 이의 유도체는, 이로 제한됨이 없이, 1차 아미노산 서열로서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 변이체 포함)의 아미노산 서열 (작용적으로 등가인 아미노산 잔기가 서열 내의 잔기 대신 치환되어 침묵 변화를 생성하는 변형된 서열을 포함) 전체 또는 일부를 포함하는 것들을 포함한다. 예를 들어, 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 작용적 등가물로서 작용하여 침묵 변화를 초래하는 유사한 극성의 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 서열 내의 아미노산

에 대한 치환은 아미노산이 속하는 부류의 다른 구성원 중에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 비극성 (소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 유도체 포함)는 또한, 이로 제한됨이 없이, 1차 아미노산 서열로서, 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)의 아미노산 서열 (아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성을 갖는 잔기로 대체된 변형된 서열 포함) 전체 또는 일부를 포함하는 펩타이드를 포함한다. 구체적 양태에서, 최적화된 HIP의 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산이 치환되어 최적화된 HIP의 유사체 및/또는 유도체가 생성된다.

[0113] 특정 양태에서, 키메릭 또는 융합 단백질이 본원에서 기술되는 방법에 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는, "키메릭 단백질" 또는 "융합 단백질"은 비-프로섬 펩타이드 또는 HIP 폴리펩타이드 또는 이의 유사체 또는 유도체에 작동적으로 연결된 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체를 포함)를 포함한다. 융합 단백질에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 및 비-프로섬 또는 HIP 폴리펩타이드는 "작동적으로 연결"된다. 즉, 이들은 서로 인-프레임 (in-frame)으로 융합된다. 비-프로섬 또는 HIP 폴리펩타이드는 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 이의 N-말단에 이중의 시그널 서열을 포함하는 최적화된 HIP일 수 있다. 특정 숙주 세포 (예: 포유동물 숙주 세포)에서, 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체의 발현 및/또는 분비는 이중의 시그널 서열의 사용을 통해 증가될 수 있다. 또 다른 예에서, 융합 단백질은 최적화된 HIP 서열이 면역글로불린 단백질 패밀리의 구성원으로부터 유도되는 서열에 융합되는 최적화된 HIP-면역글로불린 융합 단백질이다. 최적화된 HIP-면역글로불린 융합 단백질은 본원 기술에 따라 면역학적 반응을 억제하기 위해 약제학적 조성물에 삽입되고 피험자에게 투여될 수 있다.

[0114] 본원에서 기술되는 방법에 사용하기 위한 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함), 또는 이의 유사체 또는 유도체, 또는 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함)-키메릭 또는 융합 단백질은 생물이용성을 개선시키고/시키거나 효율, 용해도 및 안정성을 증가시키기 위해 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 알부민, 트랜스페린 또는 추가의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 잔기에 공유적으로나 비공유적으로 연결될 수 있다.

[0115] 본원에서 기술되는 방법에 사용하기 위한 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함), 또는 이의 유사체 또는 유도체, 또는 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP-키메릭 또는 융합 단백질은 본원의 교시에 따라 표준 재조합 DNA 기술로 생성될 수 있으며 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 상이한 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 DNA 단편은 통상의 기술, 예를 들어 결합을 위한 평할-말단 또는 엇갈림-말단, 적합한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 분해, 필요한 경우 점착 말단의 충전, 바람직하지 않은 결합을 피하기 위한 알칼리 포스파타제 처리, 및 효소적 결합을 이용함으로써, 인-프레임으로 함께 결합될 수 있다. 또한, 2개의 연속 유전자 단편 사이융합 유전자는 자동화된 DNA 합성기를 포함하는 통상의 기술로 합성될 수 있다. 달리, 2개의 연속 유전자 단편 사이에 상보적 돌출물을 만들어 결국 어닐링되고 재증폭되어 키메릭 유전자 서열을 생성할 수 있는 앵커 프라이머를 사용하는 유전자 단편의 PCR 증폭이 이용될 수 있다. 또한, 이미 융합 잔기 (예: GST 폴리펩타이드)를 암호화하는 많은 발현 벡터들이 시판되고 있다. 최적화된 HIP-암호화 핵산은 융합 잔기가 최적화된 HIP에 인-프레임으로 연결되도록 이러한 발현 벡터에 클로닝될 수 있다. 융합 단백질은 재조합의 최적화된 HIP의 정제 및 검출을 돕거나 피험자에서 면역 반응을 마스킹하기 위해 Hig 태그 또는 에피토프 태그 (예: V5)에 융합된 최적화된 HIP일 수 있다. 최적화된 HIP 및 이의 유사체 및 유도체의 짧은 아미노산 서열은 이러한 유용한 펩타이드의 합성적 생산을 즉시 실시가능하게 하고, 펩타이드 합성을 위한 다양한 자동화된 기구가 시판되고 있으며, 자동화가 필요하지 않은 펩타이드 합성을 위한 합성법이 장기간 공지되어 왔으며 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체를 제조하기 위해 본원의 교시에 따라 이용될 수 있다.

[0116] 일부 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (최적화된 HIP 포함), 또는 이의 유사체 또는 유도체, 또는 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP-키메릭 또는 융합 단백질은 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 방법을 이용하여 생체 내에서 반감기가 연장되도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 사람 IgG의 Fc 단편 또는 고분자량 폴리에틸렌글리콜 (PEG)와 같은 불활성 중합체 분자가 단백질의 N- 또는 C-말단에 PEG의 부위-특이적 접합을 통하거나 리신 잔기에 존재하는 엡실론-아미노 그룹을 통해 다작용성 링커의 존재 또는 부재하에 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체에 결합될 수 있다. 최소한으로 생물학적 활성을 상실하는 선형 또는 분지형 중합체 유도체화가 이용될 것이다. 접합의 정도는 PEG 분자의 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체에의 적합한 접합을 확실하게 하기 위해 SDS-PAGE 및 질량 분광법에 의해 면밀히 모니터링할 수 있다. 반응되지 않은 PEG는 크기-배제

크로마토그래피 또는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 최적화된 HIP-PEG 접합체로부터 분리될 수 있다. PEG-유도체화된 접합체는 당해 기술의 기술자에게 공지된 방법을 이용하여 생체내 효능을 시험할 수 있다.

- [0117] 본원 기술의 양태는 당뇨병 및 손상된 췌장 기능을 수반하는 많은 다른 증상들의 치료에 있어 최적화된 프로섬 펩타이드 제형 (최적화된 HIP 제형 포함), 및 최적화된 프로섬 또는 HIP-기본 요법 및 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 변이체의 전달 방법을 제공한다.
- [0118] 하나의 양태에서, 프로섬 펩타이드는 C-말단 아미드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹의 첨가에 의해 최적화됨으로써 혈청에서 펩타이드의 자유 말단을 인식하고 분해하는 프로테아제에 의한 단백질 분해 활성을 효과적으로 차단하고 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물을 생성한다.
- [0119] 하나의 양태에서, HIP3, HIP1 및/또는 HIP2는 C-말단 아미드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹의 첨가에 의해 최적화됨으로써 혈청에서 펩타이드의 자유 말단을 인식하고 분해하는 프로테아제에 의한 단백질 분해 활성을 효과적으로 차단하고 최적화된 HIP 화합물인 HIP3Blocked (서열번호 5), HIP1Blocked (서열번호 6) 및 HIP2Blocked (서열번호 7)를 생성한다. 이들 차단 그룹들은 고체상 펩타이드 합성 (Solid Phase Peptide Synthesis: SPPS)에 의해 제조되어 첨가된다. 고체상 합성의 기본 전제는 펩타이드 쇠의 하나의 말단은 불용성 지지체에 고정시키고 아미노산을 임의의 목적하는 서열의 펩타이드로 조립할 수 있다는 것이다. 상술된 바와 같이, 실제의 SPPS에서, 펩타이드의 카복실 말단은 중합체에 연결된다. 아미노산의 목적하는 서열이 지지체에 함께 연결된 후, 시약을 적용시켜 지지체로부터 펩타이드 쇠를 절단시키고 조 펩타이드를 용액으로 방출할 수 있다. 합성에 수반되는 모든 반응을 가능하다면 완전히 수행하여 균질한 생성물을 수득할 수 있다.
- [0120] 펩타이드의 C-말단이 아미드인 경우, 유도체는 펩타이드 아미드이다. 많은 자연 발생 펩타이드 호르몬이 아미드로서 존재하므로, 펩타이드-아미드는 매우 중요한 유도체이다. 펩타이드 아미드를 합성하기 위해서, 절단시 직접적으로 펩타이드 아미드를 생성하는 고체상 수지가 개발되었다. N-말단이 아세틸 그룹인 경우, 펩타이드는 C-말단으로부터 N-말단으로 조립된다. 이어서, N-말단은 염기의 존재 하에서 아세트산 무수물을 사용하여 아세틸화된다.
- [0121] 또 다른 양태에서, 프로섬 펩타이드는 C-말단 시스테인 잔기의 첨가에 의해 변형되어 Cys 프로섬 펩타이드 화합물을 생성한다. 이러한 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물은 용액 중에서 이량체를 형성할 수 있으며 이때 디설파이드 결합이 각각의 단량체의 시스테인 사이에 형성되어 최적화된 프로섬 펩타이드 화합물인 프로섬 펩타이드 CysDimer이 생성된다.
- [0122] 또 다른 양태에서, HIP3, HIP1 및/또는 HIP2는 C-말단 시스테인 잔기의 첨가에 의해 변형되어 각각 최적화된 HIP 화합물 HIP3Cys (서열번호 8), HIP1Cys (서열번호 9) 및 HIP2Cys (서열번호 10)를 생성한다. 이러한 최적화된 HIP 화합물은 용액 중에서 이량체 (디설파이드 결합이 각각의 단량체의 시스테인 사이에 형성됨)를 형성하여 각각 최적화된 HIP 화합물 HIP3CysDimer (서열번호 11), HIP1CysDimer (서열번호 12) 및 HIP2CysDimer (서열번호 13)를 생성할 수 있다. 4 g의 조 펩타이드를 2 ml의 아세트산으로 적시고 약 500 ml의 DI 수로 희석하였으며, 이어서 20% NH₄OH 용액을 적가함으로써 pH를 약 8.2로 조절하고, 실온에서 밤새 교반시킴으로써 시스테인 잔기를 가하였다. 반응은 밤새 완결되지 않았으므로 영구적인 황녹색이 지속될 때까지 페리시안화칼륨 용액을 가하였다. 엘만 (Ellman) 시험 및 HPLC 분석으로 측정시 이 단계에서 반응이 완결되었다. 이어서, 산화 용액을 30분 동안 일 스파툴라 (spatula)의 AG-1 X2 (클로라이드 형태) 수지로 처리하고, P4 편셀에서 여과한 후, HPLC 정제 전에 마지막으로 pH를 약 5로 조절하였다.
- [0123] 또 다른 양태에서, Cys 프로섬 펩타이드는 C-말단 아미드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹을 가해 차단됨으로써 혈청 중에서 유리 말단을 인식하는 프로테아제에 의한 분해로부터 보호되며 최적화된 HIP 화합물 프로섬 펩타이드 CysBlocked가 생성된다. 또한, 이러한 화합물은 용액 중에서 이량체 (디설파이드 결합이 각각의 단량체의 시스테인 사이에 형성됨)를 형성하여 최적화된 프로섬 화합물 프로섬 펩타이드 CysBlockedDimer를 생성할 수 있다. 이러한 차단 그룹은 상술된 바와 같이 첨가된다.
- [0124] 또 다른 양태에서, HIP3Cys (서열번호 8), HIP1Cys (서열번호 9) 및/또는 HIP2Cys (서열번호 10)는 C-말단 아미드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹을 가해 차단됨으로써 혈청 중에서 유리 말단을 인식하는 프로테아제에 의한 분해로부터 보호되며 각각 최적화된 HIP 화합물 HIP3CysBlocked (서열번호 14), HIP1CysBlocked (서열번호 15) 및 HIP2CysBlocked (서열번호 16)가 생성된다. 또한, 이러한 화합물은 용액 중에서 이량체 (디설파이드 결합이 각각의 단량체의 시스테인 사이에 형성됨)를 형성하여 각각 최적화된 HIP 화합물 HIP3CysBlockedDimer (서열번호 17), HIP1CysBlockedDimer (서열번호 18) 및 HIP2CysBlockedDimer (서열번호 19)를 생성할 수 있다. 이러

한 차단 그룹은 상술된 바와 같이 첨가된다.

- [0125] 또 다른 양태에서, Cys 프로섬 펩타이드는 C-말단 시스테인 잔기에서 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물을 공유적으로 결합함으로써 최적화되어 최적화된 HIP 화합물 프로섬 펩타이드 CysPEG를 생성한다. PEG 제작물은 아세테이트 완충액 (pH=6.5)에 용해된 CS504 펩타이드 (1.1 당량)의 단량체성 정제 형태를 가짐으로써 C-말단 시스테인 잔기에 공유적으로 결합될 수 있다. PEG 말레이미드 (1 당량)의 용액은 DI 수 중에 제조되며 교반하면서 펩타이드 용액에 첨가될 수 있다. 생성 용액의 pH는 희석 NH_4OH 용액으로 약 6.5로 다시 조절되고, 30분 동안 실온에서 교반되며, 수개 방울의 아세트산으로 산성화되고, 마지막으로 RP-HPLC로 정제될 수 있다.
- [0126] 또 다른 양태에서, HIP3Cys (서열번호 8), HIP1Cys (서열번호 9) 및/또는 HIP2Cys (서열번호 10)는 C-말단 시스테인 잔기에서 이량체성 말레이미드 활성화된 40Kd PEG 제작물을 공유적으로 결합함으로써 최적화되어 각각 최적화된 HIP 화합물 HIP3CysPEG (서열번호 20), HIP1CysPEG (서열번호 21) 및 HIP2CysPEG (서열번호 22)를 생성한다. PEG 제작물은 아세테이트 완충액 (pH=6.5)에 용해된 CS504 펩타이드 (1.1 당량)의 단량체성 정제 형태를 가짐으로써 C-말단 시스테인 잔기에 공유적으로 결합된다. PEG 말레이미드 (1 당량)의 용액은 DI 수 중에 제조되며 교반하면서 펩타이드 용액에 첨가되었다. 생성 용액의 pH는 희석 NH_4OH 용액으로 약 6.5로 다시 조절되고, 30분 동안 실온에서 교반되며, 수개 방울의 아세트산으로 산성화되고, 마지막으로 RP-HPLC로 정제되었다.
- [0127] 또 다른 양태에서, 프로섬 펩타이드 CysPEG는 C-말단 아마이드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹을 가함으로써 최적화되어 혈청 중에서 유리 말단을 인식하는 프로테아제에 의한 분해로부터 보호되고 최적화된 HIP 화합물 프로섬 펩타이드 CysPEGBlock를 생성한다. 차단 그룹은 상술된 바와 같이 첨가된다.
- [0128] 또 다른 양태에서, HIP3CysPEG (서열번호 20), HIP1CysPEG (서열번호 21) 및 HIP2CysPEG (서열번호 22)는 C-말단 아마이드 그룹 및 N-말단 아세틸 그룹을 가함으로써 최적화되어 혈청 중에서 유리 말단을 인식하는 프로테아제에 의한 분해로부터 보호되고 각각 최적화된 HIP 화합물 HIP3CysPEGBlocked (서열번호 23), HIP1CysPEGBlocked (서열번호 24) 및 HIP2CysPEGBlocked (서열번호 25)를 생성한다. 차단 그룹은 상술된 바와 같이 첨가된다.
- [0129] 본원 기술의 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 유사체 또는 유도체 요법 또는 병용 요법은, 최적화된 HIP 화합물을 이용하는 전구 세포로부터 새로운 섬 구조물의 분화 및 치료 방법을 통해 상실되거나 감소된 베타 세포 기능 또는 피험자에게 제공될 수 있는 것보다 많은 인슐린 생성이 필요하여 인슐린에 대한 감소된 생산 또는 분비와 관련된 질환, 증상 또는 상태를 겪는 임의의 포유동물 (사람 포함)을 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 질환 및 상태는 제1형 진성 당뇨병, 제2형 당뇨병, 당뇨병전단계, 손상된 공복 글루코즈, 공복 고인슐린혈증을 포함하며, 이로 제한됨이 없이 제1a형 당뇨병을 갖는 환자 또는 항체 (항-GAD65 항체, 항-섬 항체 또는 항-인슐린 항체)를 나타낼 수 있는 성인의 잠재적 자가면역 당뇨병을 갖는 환자 또는 베타 세포에 대해 지시되는 자가면역 없이 인슐린 결핍을 갖는 제1형 당뇨병 (제1b형 당뇨병)을 갖는 환자를 포함한다. 또한, 본원 기술의 양태는 제1형 당뇨병을 갖는 것으로 새로이 진단된 환자, 제1형 당뇨병을 갖는 환자, 제1형 당뇨병을 갖는 환자의 동기간 및 1급 친척들, 및 제1형 당뇨병에 대한 편애를 나타내는 양성 항체 및 다른 자가면역 상태를 갖는 사람들에게 대해 치료적으로 유리하게 실시될 수 있다. 하나의 양태에서, 본원에 기술되는 방법은 제1형 당뇨병의 치료가 필요한 환자에서 제1형 당뇨병을 역전시키기 위해 실시된다.
- [0130] 또한, 병용 요법 및 관련된 방법 및 조성물은, 당뇨병을 갖는 환자, 및 불량하게 조절되는 당뇨병을 갖는 환자에서 글루코즈 동요, 저혈당 무인식, 및 제1형 당뇨병에서의 재발성 저혈당을 개선하기 위해 소아 및 성인에서 제1형 당뇨병의 인슐린 치료에 대한 보조 요법으로서 이용될 수 있다.
- [0131] 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체 요법 및 관련 방법 및 조성물은 새로운 진단된 제2형 당뇨병, 고혈당증을 갖는 소아 및 성인에서의 제2 당뇨병 (제2 당뇨병은 인슐린, 경구 당뇨 요법 또는 다른 피하 당뇨 요법으로 동시에 처리됨), 및 불량하게 조절된 제2형 당뇨병을 갖는 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 환자 (소아 및 성인 모두)에서, 본원에 기술된 방법 및 조성물은 제1형 및 제2형 당뇨병을 역전시킬 수 있다. 또한, 본원에서 기술되는 방법 및 조성물은 당뇨병의 비전형적 형태를 갖는 소아 및 성인 및 식후 고혈당의 상태를 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있다.
- [0132] 또한, 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 유사체 또는 유도체 요법 및 관련 방법 및 조성물은, 당뇨병을 갖는 환자 및 제1형 또는 제2형 당뇨병을 갖지 않는 환자에서, 이로 제한됨이 없이 체중 손실을 달성하거나 비만, 과체중을 치료하기 위해 체중 손실, 트리글리세라이드, LDL 콜레스테롤 감소가 필요한 소아 및 성인 환자를 치료하는데 이용될 수 있다. 하나의 양태에서, 본원에서 기술되는 방법 및 조성물은 병적 비만을 갖는 환자를 치료하는데 이용된다. 다른 양태에서, 본원에서 기술되는 방법 및 조성물은 병적 비만을 갖는 환자 또는 식욕

부진, 폭식증, 또는 기타 섭식 장애를 갖는 환자를 치료하는데 이용된다.

- [0133] 또한, 단일 제제 최적화된 요법 및 관련 방법 및 조성물은 대사이상 증후군 또는 대사 증후군을 갖는 소아 및 성인, 변화된 글루코즈 대사에 부수적인 신경병증 통증 증후군의 상태를 나타내는 환자, 및 당뇨병 존재 및 부재 하의 고트리글리세라이드혈증, 및 식후 고트리글리세라이드혈증을 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있다. 하나의 양태에서, 이러한 방법은 다낭성 난소 증후군의 치료가 필요한 환자에서 상기 증후군의 치료를 위해 실시된다.
- [0134] 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 유사체 또는 유도체 요법 및 관련 방법으로부터 유리할 수 있는 다른 환자는 공복 고혈당, 당뇨병전단계, 손상된 공복 글루코즈, 손상된 글루코즈 내성 및 일반적으로 고혈당 상태와 같은 상태를 갖는 것으로 진단된 소아 및 성인 환자를 포함한다.
- [0135] 또한, 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 유사체 또는 유도체 요법 및 관련 방법 및 조성물은 환자가 당뇨병으로 진단되는지의 여부와 무관하게 신경병증 통증 증후군 및 신경병증을 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있다.
- [0136] 또한, 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 유사체 또는 유도체 요법 및 관련 방법 및 조성물은 재발성 췌장염 또는 췌장암을 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있으며, 췌장의 전구세포로부터 유도되는 새로운 섬 구조물을 수립하는 목적하는 모든 방식에 이용될 수 있다.
- [0137] 하나의 양태에서, 췌장 전구세포로부터 인슐린 생성 섬 구조물로의 섬 분화를 자극하는 제제는 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체 중에서 선택된다. 또 다른 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)와 섬 세포 신생을 자극하기 위한 또 다른 제제의 배합물이 사용된다. 이러한 추가의 제제는, 예를 들어 아밀린 및/또는 유사체일 수 있으며, 이로 제한됨이 없이, 프람린티드 (SYMLINTM), GLP-1 수용체 유사체, 엑센딘-4 (EXENATIDETM), 리라글루티드 (NN2211), GLP-1, GLP-1 유사체 GIP, GLP-1, 햄스터 INGAP, 다른 인크레틴-모방 호르몬, 및/또는 유사하게 작용하는 화합물 및 제제, 및 상기 화합물 및 제제 중 임의의 것의 반감기를 연장시키거나 수준 또는 활성을 증가시키는 제제, 예를 들어 디펩티딜 펩티다제-4 억제제 (GLP-1의 분해를 지연)를 포함한다. GLP-1 수용체에 대한 직접적인 작용제 활성을 통해 또는 GLP-1의 분해를 억제하여 작용하는 많은 GLP-1 모방체가 있다. 이러한 제제는 본원 기술의 특정 양태에 유용하다. GLP-1 모방체는 제1형 당뇨병을 치료하기 위해 HIP 및/또는 표적화된 면역 요법과 병용하여 사용될 수 있으며, 이들은 혈당 조절을 개선하고, 안정성을 증가시키고, 창자 글루코즈 흡수를 지연시키고, 제1형 당뇨병을 유도하는 기본 메커니즘을 역전시키는데 사용될 수 있다. 이러한 제제 및 방법은 당뇨병에서 손상된 글루코즈 내성의 진행을 예방하고; 손상된 공복 글루코즈의 손상된 글루코즈 내성 및 당뇨병으로의 당뇨병전단계 진행을 예방하고; 새로이 진단된 제2형 당뇨병을 역전시키며; 제2형 당뇨병을 치료하며, 과체중, 비만, 다낭성 난소 증후군, 및 신경병증 통증 증후군을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0138] 성인 췌장의 전구세포로부터 췌장 섬 분화를 달성하기 위해 본원 기술의 실시예에 유용한 방법, 제제 및 약제학적 제형은 하기 참조문 (각각이 참조로 본원에 삽입됨)에서 다른 목적으로 기술된 것들을 포함한다 [참조: Rosenberg *et al.*, 1992, *Adv. Exp. Med. Biol.* 321: 95-104; Mar. 1996, *Diabetologia* 39(3):256-62; Jul. 1996, *Pancreas* 13(1):38-46; and Nov. 2004, *Ann. Surg.* 240(5):875-84; Vinik *et al.*, Jun. 1997, *Horm. Metab. Res.* 29(6):278-93]. 췌장 전구세포의 섬 재생 또는 분화의 성공적 자극은 피험자에서 인슐린의 증가된 생산 및/또는 분비를 통해 나타날 수 있다.
- [0139] 하나의 양태에서, 아밀린 또는 아밀린의 유사체, 예를 들어 SymlinTM 또는 프람린티드는 최적화된 HIP의 투여 전에 또는 투여와 수반하여 사용된다. 아밀린은 문헌 [참조: Young *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Endocrin. Diabetes* 4: 282-290, 본원에 참조로 삽입됨]의 교시에 따라 섬 재생 전에 투여되고 섬 재생 기간을 통해 계속될 수 있다. 하나의 양태에서, 아밀린 및/또는 유사체 (이로 제한됨이 없이, 프람린티드 포함)는 최적화된 HIP의 개시 전에 혈당 조절을 최적화하기 위해 피하로 투여되며, 단독으로 투여되거나 다른 섬 자극 펩타이드, 예를 들어 최적화된 HIP 또는 최적화된 HIP 유사체 또는 유도체와 병용하여 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 아밀린 또는 프람린티드는 환자 중량 kg 당 0.3 내지 0.8 μg 으로 투여된다. 하나의 양태에서, 이러한 용량은 식사 전에, 예를 들어 QHS 및 3 AM에 피하 투여된다. 하나의 양태에서, 치료학적 유효량은 피하로 또는 주입 디바이스/펌프 및/또는 경피, 비강, 협측, 마이크로니들 전달 시스템, 경구 캡슐화 방법을 통해 전달된다. 또 다른 양태에서, 치료학적 유효량은 주사 또는 다른 전달 방법에 의해 기껏해야 1주일에 1회, 2주일에 1회 또는 1개월에 1회의 투여를 필요로 하는 지연 방출 제형을 이용하여 투여된다. 상기에서 주목되는 바와 같이, 일부

양태에서, 아밀린 또는 프람린티드는 또 다른 섬 자극제와 함께 공동-투여된다.

- [0140] 하나의 양태에서, GLP-1 수용체 유사체 (엑센딘-4 또는 엑센딘 4의 유사체 포함)는 식사와 함께 5 내지 10 mcg의 용량으로 최적화된 HIP를 사용하는 방법에 사용된다. 엑센딘-4가 본원 기술의 목적상 하기 문헌의 교시에 따라 제형화되고 투여될 수 있다 [참조: Alcantara *et al.*, 1998, *Cell Biochem. Funct.* 16(1): 51-6; Dupre *et al.*, 2004, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 89(7): 3469-73; Edwards *et al.*, 1999, *Diabetes* 48: 86-93; and Xu *et al.*, 1999, *Diabetes* 48: 2270-76, 각각이 본원에 참조로 삽입됨]. 하나의 양태에서, 엑센딘-4는 식사 전에 5 내지 10 μ g의 범위로 투여된다. 하나의 양태에서, 엑센딘-4는 단독으로 또는 최적화된 HIP 및/또는 다른 섬 자극 펩타이드와 병용하여 피하 투여된다. 하나의 양태에서, 치료학적 유효량은 피하 투여된다. 또 다른 양태에서, 엑센딘-4의 전달은 경피, 혈측, 경구 캡슐화 방법, 비강 또는 마이크로니들 전달 시스템을 통한다. 또 다른 양태에서, 치료학적 유효량은 기껏해야 1주일에 1회, 2주일에 1회 또는 1개월에 1회의 투여를 필요로 하는 지연된 방출 제형에 포함된다. 하나의 양태에서, 엑센딘-4는 제1형 또는 제2형 당뇨병을 갖는 환자 또는 비만, 과체중, 인슐린 내성 증후군, 손상된 공복 글루코즈, 당뇨병단계, 다낭성 난소 증후군, 대사 증후군 또는 섭식 장애를 갖는 환자에 최적화된 HIP 또는 다른 섬 세포 신생 또는 전구세포 전환제와 함께 공동-투여된다.
- [0141] GIP 및 GLP-1은 인크레틴 부류의 성장 호르몬에 속하며 [참조: Creutzfeldt, 1979, *Diabetologia* 16: 75-85; Creutzfeldt and Ebert, 1985, *Diabetologia* 28: 565-573; Holst *et al.*, 2001, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 234: 75-85; and Vilsboll *et al.*, Jun. 2003, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88(6): 2706-13, 각각 본원에 참조로 삽입됨], 하나의 양태에서 인크레틴 호르몬 또는 유사체는 최적화된 HIP의 부수적 사용과 함께 또는 사용 없이 성인 체장에서 전구 세포로부터 섬의 분화를 자극하기 위한 방법에 사용된다.
- [0142] 다양한 양태에서, GIP 또는 GIP 유사체는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)과 함께 사용된다. GIP는 본원 기술의 목적상 하기 문헌의 교시에 따라 제형화되고 투여될 수 있다 [참조: Andersen *et al.*, 1978, *J. Clin. Invest.* 62: 152 161; Creutzfeldt *et al.*, Feb. 1980, *Diabetes* 29(2):140-5; Dupre *et al.*, 1973, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 37: 826-828; Ebert *et al.*, 1980, *Clinical Gastroenterology* 9(3): 679-98; Elahi *et al.*, 1979, *Am. J. Physiol.* 237: E185-E191, and 1994, *Regulatory Peptide* 51(1): 63-74; Krarup *et al.*, Jun. 1983, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 56(6):1306-12; Krarup *et al.*, 1987, *Metabolism* 36(7): 677-82; Krarup *et al.*, 1988, *Acta Med. Scand.* 223(5):437-41; Lynn *et al.*, 2003, *FASEB* 17:19-93; Meir *et al.*, 2002, *Regulatory Peptides* 107:1-3; 및 Nauk *et al.*, 1993, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 76(4): 912-7, 각각 본원에 참조로 삽입됨].
- [0143] 하나의 양태에서, GIP는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체와 병용하여 정맥 내 또는 피하 투여되며, 식사 3 내지 5분 전, 취침 전, 및 3AM에 개시하는 정맥내 또는 피하 전달 시간에 의한 30분 연속 주입을 제공하도록 환자 체중 kg 당 2 내지 10 ng으로 투여된다. 하나의 양태에서, GIP는 식사전, QHS 및 3AM에 피하로 투여된다. 하나의 양태에서, GIP는 경구로 또는 주입 디바이스 또는 경피, 혈측, 비강 또는 마이크로니들 전달 시스템을 사용하여 투여된다. 또 다른 양태에서, 기껏해야 1주에 1회, 2주에 1회 또는 1개월에 1회의 투여를 필요로 하는 지연 방출 제형이 사용된다. 본원에서 기술되는 방법에 따라 GIP를 투여하기 위한 적합한 조성물은 문헌 [참조: Jones *et al.*, 6 Nov. 1989, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 7(4):263-9]에서 다른 목적으로 기술되어 있다.
- [0144] 다양한 양태에서, GLP-1 또는 유사체, 또는 GLP-1 수용체 작용제 또는 디펩티딜 펩티다제-4 억제제는 전구세포로부터 섬 분화를 자극하기 위한 방법에 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함), 또는 이의 유사체 또는 유도체와 병용하여 사용된다. GLP-1, GLP-1 수용체 작용제, GLP-1 유사체 및 DPP-4 억제제는 본원 기술의 목적 상 하기 문헌의 교시에 따라 제형화되고 투여될 수 있다 [참조: Elahi *et al.*, 1994, *Regulatory Peptides* 51(1): 63-74; Gutniak *et al.*, 1994, *Diabetes Care* 17:1039-44; Kreymann *et al.*, 1987, *Lancet* 2: 1300-1304; Larsen *et al.*, 1996, *Diabetes* 45(Suppl. 2):233A (Abstract); Larsen *et al.*, 2001, *Diabetes Care* 24(8): 1416-21; List *et al.*, 2004, *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 286(6): E875-81; Lugari *et al.*, 2000, *Horm. Metab. Res.* 32: 424-428; Marquez *et al.*, Mar. 1998, *Cell. Biochem. Funct.* 16(1):51-6; Meier *et al.*, March 2004, *Critical Care Medicine* 32(3):848-851; Meneilly *et al.*, 2003, *Diabetes Care* 26: 2835-41; Nauk *et al.*, 1996, *Diabetologia* 39(12):1546-53; Thorens *et al.*, Dec. 1995, *Diabetes Metab.* 21(5):311-8; Vilsboll *et al.*, 2003, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88(6): 2706-13; Wang *et al.*, 1997, *J. Clin. Invest.* 99: 2883-2889; 및 Zander *et al.*, 2002, *Lancet* 359: 824-30, 각각 본원에 참조로 삽입됨].

- [0145] 다양한 양태에서, GLP-1, GLP-1 수용체 작용제, 또는 GLP-1 유사체는 피하 투여되거나, DPP-4 억제제는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함), 또는 이의 유사체 또는 유도체와 병용하여 경구 투여되며, 환자 체중 kg 당 8 내지 20 mg으로 1일 당 400 내지 800 mg의 범위로 투여된다. 하나의 양태에서, GLP-1은 식사 전, QHS에 경구 또는 피하로 투여된다. 하나의 양태에서, GLP-1은 식사 3 내지 5분 전, 취침전 및 3AM에 개시하는 정맥내 또는 피하 전달 시간에 의한 30분 연속 주입을 제공하도록 1 내지 30 ng/kg 체중/min 속도의 연속적 피하 주입 디바이스 또는 경피, 협측, 또는 마이크로니들 전달 시스템을 사용하여 투여된다. 또 다른 양태에서, 기껏해야 1주에 1회, 2주에 1회 또는 1개월에 1회의 주사 투여를 필요로 하는 지연 방출 제형이 사용된다.
- [0146] 하나의 양태에서, 리라글루티드 (NN2211)는 체중 kg 당 10 내지 40 μ g의 용량으로 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체와 병용하여 피하 투여된다. 또 다른 양태에서, 리라글루티드는 식사 전, QHS 및 3AM에 피하 투여된다. 또 다른 양태에서, 리라글루티드는 식사전, QHS에 경구 또는 피하로 투여된다. 하나의 양태에서, GLP-1은 식사 3 내지 5분 전, 취침전 및 3AM에 개시하는 정맥내 또는 피하 전달 시간에 의한 30분 연속 주입을 제공하도록 주입 디바이스 또는 경피, 협측, 또는 마이크로니들 전달 시스템을 사용하여 투여된다. 또 다른 양태에서, 기껏해야 1주에 1회, 2주에 1회 또는 1개월에 1회의 주사 투여를 필요로 하는 지연 방출 제형이 사용된다.
- [0147] 병용 요법에 대한 하나의 양태에서, 리라글루티드 또는 NN2211은 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)와 병용하여 매일 환자의 체중 kg 당 약 20 μ g의 용량으로 투여된다. 이러한 용량은 감소된 요동 및 감소된 식후 글루코즈, 글루카곤 및 트리글리세라이드와 함께 식사 전 볼루스 인슐린을 10 내지 20% 감소시키는 능력을 환자에게 제공할 것이다. 본원에서 기술되는 방법에 따른 리라글루티드의 투여는 제1형 당뇨병에서, 예를 들어 제한 없이 헤모글로빈 A1C로 측정시, 혈당 조절을 개선하고; 손상된 공복 글루코즈의 손상된 글루코즈 내성 및 당뇨병으로의 진행을 예방하며; 새로이 진단된 제2형 당뇨병을 역전시키고; 제2형 당뇨병을 치료하는데 이용될 수 있다.
- [0148] 병용 요법에 대한 하나의 양태에서, 리라글루티드 또는 NN2211은 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 요법 동안 3주에 걸쳐 아침에, 음식 섭취 약 4시간 전 및 취침시에 성인 환자에 환자 체중 kg 당 약 20 μ g의 용량으로 투여된다. 약 1.0 ng/mL 미만의 C-펩타이드 수준으로 치료를 개시하는 환자에 대해, C-펩타이드 수준이 모니터링되며, 약 0.5 ng/mL 이상으로 증가되는 경우, 항체 hOKT3g1 (ala-ala)가 12일 동안 투여된다.
- [0149] 병용 요법에서, 엑센딘-4 또는 합성 엑센딘-4 또는 또 다른 GLP-1 유사체, GLP-1 수용체 작용제, 또는 디펩티딜 펩티다제-4 억제제는 최적화된 HIP 요법의 개시 전 또는 동안 혈당 조절을 개선하기 위해 단독으로나 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 HIP 또는 또 다른 섬 분화제와 함께 식사 전에 투여된다. 이러한 제제는, 식사 전에 전달되는 경우, 적어도 20%의 인슐린 필요성을 감소시킬 수 있으며, 최적화된 HIP가 투여되는 동안, 인슐린 및 당뇨병 투약에 대한 적합한 점감이 수행될 것이다. 최적화된 HIP 및/또는 다른 제제가 제1형 및 제2형 환자 모두에게 전달되며, 새로운 섬 세포가 전구세포로부터 분화됨에 따라 저혈당을 막기 위해서 인슐린 및 다른 당뇨병 투약의 신중한 점감이 일어날 것이다. 결국, 췌장이 새로운 작용성 섬으로 다시 채워짐에 따라 인슐린 및 당뇨병 투약 (최적화된 HIP 포함)은 점감될 것이다. 약 1.0 ng/mL 미만의 C-펩타이드 수준으로 치료를 개시하는 환자에 대해, C-펩타이드 수준이 모니터링되며, 이들이 0.5 ng/mL 이상으로 증가되는 경우, 외인성 인슐린에 대한 신중한 모니터링 및 점감이 일어날 것이다.
- [0150] 제1형 당뇨병을 갖는 환자에서 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함), 및/또는 다른 펩타이드 화합물 (SYMLINTM, 햄스터 INGAP, GLP-1, GLP-1 수용체 작용제, GLP-1 유사체, DPP-4 억제제) 개시 전에, 새로이 형성되는 섬을 보호하기 위해 (전, 동안 또는 후에) 면역 요법이 시행될 것이다. 예를 들어, 항체 hOKT3g1 (ala-ala)가 처음 처리 후 24개월까지 입증된 효능으로 12일 동안 투여되며, 유사한 사람화된 모노클로날 항체, ChAglyCD3은 6일 동안 투여된 후 매년 반복될 수 있다. 디아미드의 GAD65 (Diamyd's GAD65) 화합물은 1개월 간격으로 2회의 피하 주사로 전달된다. 열 쇼크 단백질 60인 DIAPEP277TM은, 연구 시작, 1개월 및 6개월에 식물성 오일 중의 40 mg 만니톨과 함께 1 mg의 피하 주사를 이용하는 새로이 진단된 당뇨병 환자 사이에서 성공적이었다. 선택된 면역 조절제에 기초하여, 치료 주기가 결정될 것이다. 또 다른 양태에서, 열 쇼크 단백질 60인 DIAPEP277TM, 및 췌장 베타-세포 파괴를 예방하기 위해 디자인된 인슐린에 대한 합성된 대사적 불활성 형태인 IBC-VSO 백신, 인터페론-알파, 또는 CD4⁺CD25⁺ 항원-특이적 조절 T-세포 또는 유사한 제제를 사용하는 예방접종이 병용 요법에 이용된다. 또 다른 양태에서, 면역조절제 (이로 제한됨이 없이, 항-CD3 면역요법 및 폴리클로날 항-T-림프구 클로날린 포함)가 최적화된 HIP와의 병용에 사용된다. 이러한 제제는 또한 시클리무스 (라파마이신), 타크로리무

스 (FK506), 열-쇼크 단백질 60 (DIAPEP277TM), 항-글루탐산 데카복실라제 65 (anti-Glutamic Acid Decarboxylase65: GAD65) 백신, 미코페놀레이트 모페틸 단독 또는 다클리주마브, 항-CD20 제제 리툽시마브, 캄파쓰-1H (항-CD52 항체) 및/또는 비타민 D와의 병용을 포함한다.

[0151] 일부 자가면역 세포는 췌장 베타 세포를 표적화하므로 본원에서 기술되는 방법에 따라 치료가능한 질환 및 상태 중 일부에서 원인적 역할을 한다 [참조: Bach *et al.*, 2001, *Ann. Rev. Immun.* 19: 131-161; Lernmark *et al.*, *Endocrin. Metab. Clin. N.Am.* 20(3): 589-617; 및 Mathis *et al.*, Dec. 2001, *Nature* 414(6865): 792-798, 각각 본원에 참조로 삽입됨].

[0152] 제1형 당뇨병을 갖는 환자에 면역 제제의 도입을 수반하는 이전의 치료 방법은 면역 공격에 의해 파괴되었던 섬 세포만을 보호하며, 완전히 작용하는 베타 세포를 갖는 새로운 섬 구조물을 갖는 췌장을 다시 찾기 위한 필요에는 초점을 맞추지 않는다. 이러한 방법은 베타 세포의 파괴를 감소시키는데 목적을 둔 일반화된 특정 면역 조절과 성인 췌장 내의 전구세포로부터 새로운 섬 세포를 분화시키는 방법 연구를 조합한다.

[0153] 본원 기술의 방법은 인슐린, 아밀린 또는 글루카곤을 생성하는 췌장 베타 세포를 표적화하는 자가면역 세포의 활성을 특정하게 억제하거나 자가면역 세포를 차단 또는 파괴하는 제제를 사용할 수 있다. 이러한 제제는 췌장 섬 세포 파괴를 저지시키는 면역조절 펩타이드를 포함한다. 예를 들어, 이러한 제제는 섬 세포 상실의 진행을 늦추거나 제1형 당뇨병의 발병을 지연 또는 정지시킬 수 있는 모노클로날 항체이다. 항-CD3 항체가 본원에 기술된 방법에 유용한 일반적 부류의 제제를 구성한다. 예를 들어, 본원 기술의 목적 상 적합한 항-CD3 항체는 TolerRx에 의해 개발된 TRX4 (Ala-Ala 및 ChAglyCD3) 항체 및 문헌 [참조: Herold *et al.*, 30 May 2002, *NEJM* 346(22):1692-1698, 본원에 참조로 삽입됨]에 기술된 사람화된 항-CD3 항체를 포함한다. 하나의 양태에서, 사람화된 항-CD3 항체는 1일에 1 내지 1.42 $\mu\text{g/kg}$, 2일에 5.67 $\mu\text{g/kg}$, 3일에 11.3 $\mu\text{g/kg}$, 4일에 22.6 $\mu\text{g/kg}$, 5 내지 14일에 45.4 $\mu\text{g/kg}$ 의 용량으로 1년 당 14일 동안 정맥내로 전달된다. 이러한 요법은 최적화된 HIP의 3 내지 6개월 사용 후 매년 반복될 있으며, 인슐린은 새로운 섬 세포 형성이 일어남에 따라 점감한다. 최적화된 HIP 처리 시기 동안, 비타민 D 및 프람린트드/SymlinTM의 사용이 계속될 수 있다. 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 및 인슐린 요법의 중단 후, 항-CD3 항체에 대한 면역 조절을, 비록 최근의 연구는 가능한 한 길게 24개월 동안 효능이 지속된다는 것을 밝혔지만, 매년 반복할 수 있다.

[0154] 또 다른 양태에서, 면역-조절 화합물은 섬 세포 파괴를 정지 또는 지연시킬 수 있는 열 쇼크 단백질이다. 이러한 단백질은 Develogen AG에 의해 개발된 열 쇼크 단백질인 DIAPEP277TM을 포함한다. 하나의 양태에서, DIAPEP277TM은 기준에서 1개월에, 이어서 3개월 간격으로 2번 피하로 식물성 오일 중의 40 mg 만니톨 중 1 mg을 투여함으로써 피하로 전달되다. 병용 요법의 하나의 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 최적화된 HIP 유사체 또는 유도체는 하기와 같이 DIAPEP277TM와 함께 공동-투여된다. 먼저, DIAPEP277TM은 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 유사체 또는 유도체-기본 요법의 개시 약 30일 전에 약 1 mg의 용량으로 피하로 투여된다. 이어서, DIAPEP277TM의 2차 투여는 최적화된 HIP 또는 유사체 또는 유도체-기본 요법을 개시하는 시기 (제1 투여한지 90일 후)에 수행된다.

[0155] 또 다른 양태에서, 면역-조절 화합물은 폴리클로날 항-T-림프구 글로불린 (ATG)이다. ATG 용량의 4회 투여가 수행된다. ATG의 제1 투여는 체중 kg 당 9 mg이며, 이어서 3 mg/kg의 3번의 연속 용량이 4시간에 걸쳐 정맥내로 투여될 것이다. 제1 ATG 투여 1시간 전에, 피부 내성 시험 (최종 용액 0.2 ml)이 수행될 것이다. 병용 요법의 하나의 양태에서, ATG는 최적화된 HIP 또는 최적화된 HIP 유사체 또는 유도체의 사용 전에 전달된다. ATG의 마지막 투여는 최적화된 HIP 또는 유사체 또는 유도체-기본 요법을 개시하기 최소 14일 전에 전달된다. ATG의 제2 투여는, ATG를 사용한 치료 개시 24개월 후 자가면역 공격을 제시하는 항-GAD65 항체 및 다른 면역 마커의 3개월 마다 한 번의 측정에 기초하여, 요구될 수 있다. 췌장에 대해 지시되는 자가면역 항체에 유의한 증가가 있는 경우, 보다 조기의 치료가 필요할 수 있다.

[0156] 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체는, 상술된 바와 같이, 피하 주사를 통해, 간 표적 비히클 또는 다른 리포솜 제제에 의해 경구적으로, 또는 24시간 연속 피하 주입을 통해 치료학적 유효량으로 전달될 수 있다. 하나의 양태에서, 1일 용량은 약 5 내지 20 mg/환자의 체중 kg/24 hour이다. 하나의 양태에서, 1일 용량은 약 600 내지 800 mg이다. 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 동조체 또는 유도체-기본 요법은 3 내지 6개월의 기간 동안 계속되며, C-펩타이드 생성에 의해 면밀히 모니터링된다. 면역 요법은 선택된 면역 제제에 기초하여 주기적으로 전달될 것이다. 예를 들어, DIAPEP277TM은 총 6개월 동안 3개월 간격으로 투여

되며, 최적화된 HIP 또는 유사체 또는 유도체-기본 요법 3개월 전에 먼저 전달될 것이다.

[0157] 본원에서 기술되는 방법에 유용한 면역-조절제는 당해 기술 분야에서 공지되거나 본원에서 기술되는 바와 같이 제형화되고, 투여되며, 조제될 수 있다. 본원에서 기술되는 방법의 실시를 위한 약제학적 제형 및 추가 조제 및 투여 프로토콜이 후술된다.

[0158] 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 및 약제학적으로 허용되는 염 및이의 에스 테르의 조성물은 다양한 다른 화합물과 병용시 당뇨병 또는 유사한 장애를 치료하는데 있어 전구세포를 새로운 섬 세포로 분화시키는데 상승작용적으로나 부가적으로 효과적이다. 이들 화합물은 최적화된 펩타이드 (HIP 포함) 및 이의 유사체 또는 유도체, 아밀린 및/또는 유사체, 이로 제한됨이 없이, 심린/프람린티드, GLP-1, GLP-1 수용체 작용제, 예를 들어 엑센딘-4, 리라글루티드 (NN2211), GLP-1 유사체, 디펩티딜 펩티다제-4 억제제, GIP, 햄스터 INGAP, 및 다른 인크레틴-모방 호르몬, 및/또는 유사하게 작용하는 화합물 및 제제, 및 상기 화합물 및 제제의 반감기를 연장시키거나 수준 또는 활성을 증가시키는 제제, 예를 들어 GLP-1의 분해를 지연시키는 디펩 티딜 펩티다제 억제제, 및 베타 세포를 표적화하는 자가면역 세포를 억제, 차단 또는 파괴하는 제제, 이로 제한 됨이 없이, 항 CD-3 항체 (hOKT31 (Ala-Ala) 및 ChAglyCD3를 포함), ATG, 시롤리무스 (라파마이신), 타크로리 무스 (FK506), 열-쇼크 단백질 60 (DIAPEP277TM) 항-글루탐산 데카복실라제 65 (GAD65) 백신, 미코페놀레이트 모페틸 단독 또는 다클리주마브와 병용, 항-CD20 제제 리툭시마브, 캄파쓰-1H (항-CD52 항체), 리소필린, 및 비 타민 D, 췌장 베타-세포 파괴를 예방하기 위해 디자인된 인슐린에 대한 합성된 대사적 불활성 형태인 IBC-VSO 백신, 및 췌장 베타-세포 파괴를 예방하기 위해 디자인된 CD4⁺CD25⁺ 항원-특이적 조절 T 세포 또는 유사한 제제 를 사용하는 인터페론-예방접종을 포함한다. 이러한 마지막 양태에서, CD4⁺CD25⁺ 항원-특이적 조절 T 세포 또는 유사한 제제를 사용하는 인터페론-예방접종이 직접적으로 또는 항-CD3 면역요법의이용을 통해 조절 T 세포를 이 용하기 위한 병용 요법에 이용된다.

[0159] 또한, 화합물, 예를 들어 시롤리무스 (라파마이신), 타크로리무스 (FK506), TRX4 항체, 사람화된 항-CD3 항체, DYAMIDTM 항-GAD65 항체, 및 DIAPEP277TM은, 당뇨병 또는 유사한 장애를 치료하는데 있어 최적화된 HIP 또는 전 구세포를 새로운 섬 세포로 분화시키기 위한 제제의 사용을 추가하는 경우, 상승작용적으로나 부가적으로 유효 하다.

[0160] 약물 치료 요법의 개선은, 2개 이상의 제제의 상호작용으로 이들의 병용 효과가 공동-요법에 사용되는 제제 중 하나 또는 둘 모두의 유해사례 (AE) 발생을 감소시키는 경우, 치료 효과를 갖는 2개의 제제의 병용 투여에 의해 수득될 수 있다. 유해 효과의 발생에 있어 이러한 감소는, 예를 들어 공동-요법에 사용되는 제제 중 하나 또는 둘 모두의 보다 용량의 투여의 결과일 수 있다. 예를 들어, 약물 A 단독의 효과가 25%이고 표지된 용량으로 사 용되는 경우 45%의 유해사례 발생을 가지며; 약물 B 단독의 효과가 25%이고 표지된 용량으로 사용되는 경우 30% 의 유해사례 발생을 갖는 경우, 2개의 약물이 각각의 표지된 용량보다 낮은 양으로 배합되었을 때, 전체 효과가 35%이고 유해 발생률이 20%라면, 약물 치료 요법에 개선이 있다. 본원 기술에 의해 제공되는 병용 요법은 이러 한 개선을 나타내는 것을 포함한다.

[0161] 약제학적 조성물, 용량 및 투여

[0162] 바람직한 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)은 약 0.5 내지 약 5 mg/kg/day의 농도로, 보다 바람 직하게는 분할된 피하 주사로 사람에게 전달된다. 따라서, 60 kg의 개체는 잠정적으로 식사 후 전달되는 2 또 는 3회의 20 mg 용량으로 분할된 60 mg/day를 수령할 것이다. 다른 바람직한 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타 이드 (HIP 포함)은 또한 경구 캡슐화 방법을 통해 약 0.5 내지 약 5 mg/kg/day 범위의 용량으로, 바람직하게는 식사 후 분할 용량으로 경구 전달될 수 있다.

[0163] STZ-제공된 당뇨병 마우스에 IP 전달되는 1일 2회의 1000 µg 내지 1일당 0.1 µg의 용량 범위의 HIP2 및 최적 화된 HIP2B를 사용하는 용량 범위 연구 (실시예 13)에 기초하여, HIP2B, 햄스터-유도된 INGAP의 사람 시험에 사 용된 10 mg/kg (600 mg/day)과 비교하여 약 1 mg/kg의 HIP2 및 등가물의 약 10%의 용량으로 사용될 수 있었다 (도 23).

[0164] 예를 들어, 일부 양상에서, 다양한 양태는 상기 정의된 바와 같은 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물, 또는 상기 정의된 바와 같은 화합물을 포함하는 약제학적 조성물의 유효량

에 관한 것이다.

- [0165] 본원에서 기술되는 화합물은 이들이 활성인 모든 경로로 통상의 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 전신, 국소 또는 경구일 수 있다. 예를 들어, 투여는, 이로 제한됨이 없이, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 경피, 경구, 협측, 또는 눈 경로, 또는 질내, 흡입, 데포 (depot) 주사, 또는 이식 투여일 수 있다. 따라서, 본원 기술의 화합물에 대한 투여 방식 (단독 또는 다른 약제와의 병용 투여)은, 이로 제한됨이 없이, 설하, 주사 (피하 또는 근육내로 주사되는 단기 작용의 데포, 이식물 및 펠릿 형태를 포함), 또는 질 크림, 좌제, 페서리, 질 환, 항문 좌제, 자궁내 디바이스, 및 경피 형태, 예를 들어 패치 및 크림의 사용에 의한 것일 수 있다.
- [0166] 투여의 특정 방식은 지시에 따를 것이다. 특정 투여 경로 및 투여 요법의 선택은 최적의 임상 반응을 얻기 위해 임상의에게 알려진 방법에 따라 임상의에 의해 조절될 수 있다. 투여되는 화합물의 양은 치료학적으로 유효한 양이다. 투여 용량은 처리되는 피험자의 특성, 예를 들어 처리되는 특정 동물, 나이, 체중, 건강, 존재하는 경우 동시 처리의 유형, 및 처리 빈도에 따를 것이며, 당해 기술 분야의 기술자 (예: 임상의)에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- [0167] 본원 기술의 화합물 및 적합한 담체를 포함하는 약제학적 제형은, 이로 제한됨이 없이, 정제, 캡슐, 카세제, 펠릿, 환제, 산제 및 과립제를 포함하는 고체 용량 형태; 이로 제한됨이 없이, 용액제, 산제, 유체 에멀전, 유체 현탁제, 반고체, 연고제, 페이스트, 크림, 겔 및 젤리, 및 포움을 포함하는 국소 투여 형태; 및 이로 제한됨이 없이, 용액제, 현탁제, 에멀전, 및 무수 산제를 포함하는 비경구 용량 형태일 수 있으며; 본원 기술의 중합체 또는 공중합체의 유효량을 포함한다. 또한, 활성 성분은 약제학적으로 허용되는 희석제, 충전제, 붕해제, 결합제, 윤활제, 계면활성제, 소수성 비히클, 수용성 비히클, 유화제, 완충제, 보습제 (humectant, moisturizer), 가용화제, 보존제 등과 함께 이러한 제형에 포함될 수 있다는 것이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 투여를 수단 및 방법이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 당업자는 교시를 위한 다양한 약리학적 문헌을 인용할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [참조: *Modern Pharmaceuticals*, Banker & Rhodes, Marcel Dekker, Inc. (1979); 및 *Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 6th Edition, MacMillan Publishing Co., New York (1980)]이 참조될 수 있다.
- [0168] 본원 기술의 화합물은 주사, 예를 들어 볼루스 주사에 의하거나 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위해 제형화될 수 있다. 화합물은 약 15분 내지 약 24시간의 기간에 걸쳐 피하로 연속적 주입에 의해 투여될 수 있다. 주사를 위한 제형은 단위 용량 형태로, 예를 들어 앰플 또는 다수-용량 용기에 첨가된 보존제와 함께 제공될 수 있다. 조성물은 오일성 또는 수성 비히클 중의 현탁물, 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있으며, 제형화제, 예를 들어 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다.
- [0169] 경구 투여를 위해, 화합물은 이들 화합물을 당해 기술 분야에 널리 공지된 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 배합함으로써 용이하게 제형화될 수 있다. 이러한 담체는 본원에 기술되는 화합물이 처리될 환자에 의해 경구 섭취되도록 정제, 환제, 당제, 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제 등으로 제형화될 수 있게 한다. 경구 사용을 위한 약제학적 제제는 고체 부형제를 가하고, 임의로 생성된 혼합물을 분쇄하며, 정제 또는 당제 코어를 수득하기 위해 필요한 경우 적합한 보조제를 가한 후, 과립 혼합물을 가공함으로써 수득될 수 있다. 적합한 부형제는, 이로 제한됨이 없이, 충전제, 예를 들어 슈가, 이로 제한됨이 없이, 락토즈, 슈크로즈, 만니톨, 및 소르비톨; 셀룰로즈 제제, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 검 트라가칸트, 메틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈, 및 폴리비닐피롤리돈 (PVP)를 포함한다. 필요한 경우, 붕해제, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 한천, 또는 알긴산 또는 이의 염, 예를 들어 나트륨 알기네이트가 첨가될 수 있다.
- [0170] 당제 코어는 적합한 코팅으로 제공될 수 있다. 이러한 목적으로, 임의로 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜, 및/또는 이산화티탄, 래커 용액, 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 포함할 수 있는, 농축된 슈가 용액이 사용될 수 있다. 활성 화합물 용량의 상이한 배합을 확인하거나 특성을 나타내기 위해 정제 또는 당제 코팅물에 염료 또는 색소를 첨가할 수 있다.
- [0171] 경구로 사용될 수 있는 약제학적 제제는, 이로 제한됨이 없이, 젤라틴으로 제조된 푸시-피트 (push-fit) 캡슐, 및 젤라틴 및 가소제, 예를 들어 글리세롤 또는 소르비톨로 제조된 연질의 밀폐된 캡슐을 포함한다. 푸시-피트 캡슐은 충전제, 예를 들어 락토즈, 결합제, 예를 들어 전분, 및/또는 윤활제, 예를 들어 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트 및, 임의로, 안정화제와 혼합된 활성 성분을 포함할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 성분은 적합한 액체, 예를 들어 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리메틸렌 글리콜에 용해되거나 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수 있다. 경구 투여를 위한 모든 제형은 이러한 투여에 적합한 용량이어야 한다.

- [0172] 협측 투여를 위해, 조성물은 통상의 방법으로 제형화되는, 예를 들어 정제 또는 로젠지 형태를 취할 수 있다.
- [0173] 흡입 투여를 위해, 본원 기술에 따른 화합물은 편리하게는 적합한 분사제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스를 사용하는 가압된 팩 또는 분무기로부터의 에어로졸 스프레이 프리젠테이션 형태로 전달된다. 가압된 에어로졸의 경우, 용량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 화합물과 적합한 분말 기재, 예를 들어 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 포함하는, 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한, 예를 들어 젤라틴의 캡슐 및 카트리지가 제형화될 수 있다.
- [0174] 또한, 본원 기술의 화합물은, 예를 들어 통상의 좌제 기재, 예를 들어 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드를 포함하는, 직장 조성물, 예를 들어 좌제 또는 정제 관장제로 제형화될 수 있다.
- [0175] 전술된 제형에 추가하여, 본원 기술의 화합물은 또한 데포 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 장기 작용성 제제는 이식 (예를 들어, 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0176] 데포 주사는 약 1 내지 약 6개월 또는 그 이상의 간격으로 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 화합물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질 (예를 들어, 허용되는 오일 중의 에멀전으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체, 예를 들어 난용성 염으로서 제형화될 수 있다.
- [0177] 경피 투여에서, 본원 기술의 화합물은, 예를 들어 플라스틱에 적용될 수 있거나, 결국에는 유기체에 적용되는 경피의 치료 시스템에 의해 적용될 수 있다.
- [0178] 또한, 화합물의 약제학적 조성물은 적합한 고체 또는 겔 상 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예는, 이로 제한됨이 없이, 탄산칼슘, 인산칼슘, 다양한 슈가, 전분, 셀룰로즈 유도체, 젤라틴, 및 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0179] 또한, 본원 기술의 화합물은, 병용 투여가 본원에서 기술되는 방법의 유리한 효과를 달성하는데 바람직하거나 유리한 것으로 보이는 경우, 다른 활성 성분, 예를 들어 애주번트, 프로테아제 억제제, 또는 다른 적합한 약물 또는 화합물과 병용하여 투여될 수 있다.

[0180] 최적화된 HIP 및 이의 유사체 또는 유도체의 제조 방법

- [0181] 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기술이 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체를 합성 및 정제하는데 이용될 수 있으며, 이로 제한됨이 없이, 드 노보 화학 합성 및 침전에 의한 정제, 흡착 (예: 칼럼 크로마토그래피, 막 흡착제, 방사상 유동 칼럼, 배치 흡착, 고성능 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 무기 흡착제, 소수성 흡착제, 고정된 금속 친화성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피), 또는 겔 여과, 전기 영동, 액체 상 분배, 계면활성제 분배, 유기 용매 추출, 및 한외여과를 포함한다. 정제 동안, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 생물학적 활성은 하나 이상의 시험관내 또는 생체내 검정에 의해 모니터링될 수 있다. 최적화된 프로섬 펩타이드 또는 이의 유사체 또는 유도체의 순도는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 겔 전기영동에 의해 검정될 수 있다 [참조: Scopes, 상기 참조]. 일부 양태에서, 본원 기술의 조성물에 사용되는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함), 또는 이의 유사체 또는 유도체는 총 mg 단백질의 80 내지 100%의 범위, 또는 총 mg 단백질의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%일 수 있다. 하나의 양태에서, 조성물에 사용되는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체는 총 단백질의 적어도 99%이다. 또 다른 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체는, 예를 들어 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 검정되는 바와 같이, 확실히 균질하게 정제된다. 하나의 양태에서, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)은 95% 초과 순도로 합성되고 HPLC에 의해 시험된다.
- [0182] 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 재조합적으로 생성할 수 있다. 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 암호화하는 핵산 서열은 숙주 세포에서 증식 및 발현을 위한 발현 벡터로 삽입될 수 있다.
- [0183] 본원에서 사용되는 발현 제작물은 적합한 숙주 세포에서 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체의 발현을 가능하게 하는 하나 이상의 조절 영역과 작동적으로 연결된 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 암호화하는 핵산 서열을 언급한다. "작동적으로 연결된"은 조절 서열 및 발현될 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체가 전사 및 결국에는 해독을 가능하게 하는 방식으로

연결 및 위치되는 연합을 언급한다.

- [0184] 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 전사에 필요한 조절 영역은 발현 벡터에 의해 제공될 수 있다. 또한, 해독 개시 코돈 (ATG)는, 코그네이트 (cognate) 인지 코돈이 결여된 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체가 발현되어야 하는 경우, 제공될 수 있다. 적합한 숙주-제작물 시스템에서, 세포성 전사 인자, 예를 들어 RNA 폴리머라제가 숙주 유기체에서 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 서열 포함)의 전사를 수행할 발현 제작물 상의 조절 영역에 결합할 것이다. 유전자 발현에 필요한 조절 영역의 정확한 특성은 숙주 세포마다 다양할 것이다. 일반적으로, RNA 폴리머라제를 결합하고 작동적으로 연결된 핵산 서열의 전사를 촉진시킬 수 있는 프로모터가 필요하다. 이러한 조절 영역은 전사 및 해독 개시에 수반되는 5' 비-암호화 서열, 예를 들어 TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열 등을 포함할 수 있다. 암호화 서열에 대해 3'의 비-암호화 영역은 전사 종결 조절 서열, 예를 들어 터미네이터 및 폴리아데닐화 부위를 포함할 수 있다.
- [0185] 조절 기능을 갖는 DNA 서열, 예를 들어 프로모터를 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 유전자 서열에 결합시키거나 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 서열을 벡터의 클로닝 부위에 삽입하기 위해서, 적합한 제한 부위를 제공하는 링커 또는 어댑터를 당해 기술 분야에서 널리 공지된 기술에 의해 cDNA의 말단에 결합될 수 있다. 제한 효소로의 절단물은 결합 전에 백 (back) 분해 또는 일본쇄 DNA 말단의 충진에 의해 평할 말단을 만들도록 변형될 수 있다. 달리, 목적하는 제한 효소 부위는 목적하는 제한 효소 부위를 포함하는 프라이머를 사용하는 PCR을 이용하여 DNA를 증폭시킴으로써 DNA 단편으로 도입될 수 있다.
- [0186] 조절 영역에 작동적으로 연결된 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 서열을 포함하는 발현 제작물은 추가의 클로닝 없이 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 발현 및 생성을 위해 적합한 숙주 세포로 직접적으로 도입될 수 있다. 또한, 발현 제작물은, 예를 들어 상동 재조합을 통해, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 서열이 숙주 세포의 게놈으로 삽입되는 것을 용이하게 하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이러한 경우, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 숙주 세포에서 증식 및 발현시키기에 적합한 복제 기원을 포함하는 발현 벡터를 사용할 필요는 없다.
- [0187] 사용될 수 있는 다양한 발현 벡터에는, 이로 제한됨이 없이, 플라스미드, 코스미드, 파아지, 파지미드 또는 변형된 바이러스가 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 암호화 서열이 생성된 후 정제될 수 있는 비히클을 나타내나, 또한 적합한 뉴클레오타이드 암호화 서열로 형질전환 또는 형질감염되는 경우, 동일계에서 (*in situ*) 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 발현할 수 있는 세포도 나타낸다. 이는, 이로 제한됨이 없이, 미생물 예를 들어 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 암호화 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균 (예: 이. 콜라이 (*E. coli*) 및 비. 서브틸리스 (*B. subtilis*)); 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 암호화 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된 효모 (예: 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 피키아 (*Pichia*)); 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 암호화 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터 (예: 배콜로바이러스)로 형질전환된 곤충 세포 시스템; 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 암호화 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예: 카울리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 토마코 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예: Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유도되는 프로모터 (예: 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유도되는 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 포함하는 재조합 발현 제작물을 갖는 포유동물 세포 시스템 (예: COS, CHO, BHK, 293, NS0, 및 3T3 세포)를 포함한다. 바람직하게는, 세균 세포, 예를 들어 에쉐리키아 콜라이 및 진핵세포 세포가 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 발현을 위해 사용된다. 예를 들어, 포유동물 세포, 예를 들어 햄스터 난소 세포 (CHO)가 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 서열의 효과적인 발현을 위해 사이토메갈로바이러스의 주요한 중간 초기 유전자로부터의 프로모터 성분을 갖는 벡터와 함께 사용될 수 있다.
- [0188] 세균 시스템에서, 발현되는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체에 대해 의도된 사용에 따라 다수의 발현 벡터가 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 약제학적 조성물의 생성을 위해 다량의 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함)

또는 이의 유사체 또는 유도체가 생성되어야 하는 경우, 용이하게 정제되는 융합 단백질 생성물의 높은 수준의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 벡터는, 이로 제한됨이 없이, 이. 콜라이 발현 벡터 pCR2.1 TOPO (Invitrogen); pIN 벡터 등을 포함한다. pFLAG (Sigma), pMAL (NEB), 및 pET (Novagen)과 같은 일련의 벡터도 FLAG 펩타이드, malE-, 또는 CBD-단백질과의 융합 단백질로서 외래 단백질을 발현하는데 사용될 수 있다. 이러한 재조합 단백질은 올바른 폴딩 및 성숙을 위해 원형질막주위공간으로 지시될 수 있다. 융합된 부분은 발현된 단백질의 친화성 정제에 사용될 수 있다. 엔테로키나제와 같은 특정 프로테아제를 위한 절단 부위의 존재는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 절단을 가능하게 한다. 또한, pGEX 벡터를 사용하여 글루타티온 5-트랜스퍼라제 (GST)와의 융합 단백질로서 외래 단백질을 발현할 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 매트릭스 글루타티온 아가로즈 비드에 흡착 및 결합시킨 후 유리 글루타티온의 존재 하에서 용출시킴으로써 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 잔기로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 디자인된다.

[0189] 곤충 시스템에서, 외래 유전자를 발현시키기 위한 많은 벡터가 사용될 수 있으며, 예를 들어 오토그라파 칼리포르니카 핵 폴리헤드로시스 바이러스 (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: AcNPV)가 외래 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 사용될 수 있다. 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포와 같은 세포에서 성장한다. 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 암호화 서열은 바이러스의 비-필수 영역 (예: 폴리헤드린 유전자)로 개별적으로 클로닝되고 AcNPV 프로모터 (예: 폴리헤드린 프로모터)의 조절 하에 놓일 수 있다.

[0190] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-기본 발현 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 목적하는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 암호화 서열은 아데노바이러스 전사/해독 조절 컴플렉스, 예를 들어 후기 프로모터 및 3부로 나누어진 리더 서열에 연결될 수 있다. 이어서, 이러한 키메라 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역 (예: 영역 E1 또는 E3)에 삽입함으로써 감염된 숙주에서 생존하며 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 발현할 수 있는 재조합 바이러스가 생성될 것이다. 또한, 삽입된 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체 암호화 서열의 효과적인 해독을 위해 특정 개시 시그널이 요구될 수 있다. 이러한 시그널은 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 또한, 개시 코돈은 전체 삽입물의 해독을 확실히 하기 위해 목적하는 암호화 서열의 판독 프레임과 동일한 상에 있어야 한다. 이러한 외인성 해독 조절 시그널 및 개시 코돈은 천연 및 합성 기원 모두의 다양한 기원의 것일 수 있다. 발현 효율은 적합한 전사 인핸서 요소, 전사 터미네이터 등의 삽입에 의해 증진될 수 있다.

[0191] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 목적하는 특정 양상으로 유전자 생성물을 변형 및 프로세싱하는 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형 (예: 글리코실화) 및 프로세싱 (예: 절단)은 단백질의 작용에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 해독 후 프로세싱 및 변형에 대해 특징적이고 구체적 메커니즘을 갖는다. 발현되는 외래 단백질의 올바른 변형 및 프로세싱을 확실히 하기 위해 적합한 세포주 및 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이를 위해, 일차 전사물의 적합한 프로세싱 및 유전자 생성물의 해독 후 변형, 예를 들어 유전자 생성물의 글리코실화 및 포스포릴화를 위한 세포성 기구를 갖는 진핵성 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는, 이로 제한됨이 없이, PC12, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0 (어떠한 면역글로불린 쇄도 내재적으로 생성하지 않는 쥐 골수종 세포주), CRL7030, 및 Hs578Bst를 포함한다. 해독 후 변형이 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체의 목적하는 활성화에 대해 비-필수적인 것으로 밝혀지는 경우, 세균 또는 효모 시스템에서의 발현이 이용될 수 있다.

[0192] 적합하게 프로세싱된 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 장기간의 고수율 생성을 위해, 세포에서의 안정한 발현이 바람직하다. 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 안정하게 발현하는 세포주는 선별 마커를 포함하는 벡터를 사용하여 조작될 수 있다. 제한이 없는 예시으로써, 발현 제작물의 도입 후, 조작된 세포를 농축 배지에서 1 내지 2일 동안 성장시킬 수 있으며, 이어서 선별 배지에 대해 스위칭된다. 발현 제작물 중의 선별 마커는 선별물에 대해 내성을 부여하고, 사용되는 벡터 제작물 및 숙주 세포에 따라, 세포가 발현 제작물을 이들의 염색체로의 안정하게 삽입시키고 배양물에서 성장하고 세포주로 확장되는 것을 허용할 수 있다. 이러한 세포는 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체가 연속적으로 발현되는 동안 오랜 기간 동안 배양될 수 있다.

[0193] 다수의 선별 시스템이 사용될 수 있으며, 이로 제한됨이 없이, 항생제 내성 (제네티신에 대한 내성을 부여하는

Neo, 또는 G-418; 제오신에 대한 내성을 부여하는 Zeo; 및 블라스티시딘에 대한 내성을 부여하는 Bsd와 같은 마커); 항대사물 내성 (메토포렉세이트에 대한 내성을 부여하는 Dhfr; 미코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt; 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygro를 포함한다. 또한, 돌연변이 세포주 (이로 제한됨이 없이, tk-, hgprrt- 또는 aprt- 세포 포함)가 티미딘 키나제, 하이포크산틴, 구아닌 또는 아데닌 포스포리보실-트랜스퍼라제에 대한 상응하는 유전자를 갖는 벡터와 병용하여 사용될 수 있다. 재조합 DNA 기술에 대한 당해 기술 분야의 일반적인 공지 방법이 목적하는 재조합 클론, 150:1을 선별하는데 관례대로 적용될 수 있다.

[0194] 재조합 세포는 온도, 인큐베이션 시간, 광학 밀도 및 배지 구성에 대한 표준 조건 하에서 배양될 수 있다. 그러나, 재조합 세포의 성장을 위한 조건은 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 발현을 위한 조건과 상이할 수 있다. 또한, 변형된 배양 조건 및 배지가 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 생성을 향상시키는데 이용될 수 있다. 당해 기술 분야에 공지된 모든 기술이 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 생성하기 위한 최적 조건을 확립하는데 적용될 수 있다.

[0195] 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 단편을 천연 공급원으로부터 재조합 기술 또는 정제에 의해 생성하는 것에 대한 대체법이 펩타이드 합성이다. 예를 들어, 전체의 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체, 또는 최적화된 HIP 또는 이의 유사체 또는 유도체의 일부에 상응하는 단백질을 펩타이드 합성기를 사용하여 합성할 수 있다. 당해 기술 분야에 널리 공지된 통상의 펩타이드 합성 또는 기타 합성 프로토콜을 이용할 수 있다.

[0196] 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 이의 일부는 고체상 펩타이드 합성에 의해 합성될 수 있다. 합성 동안, 보호된 측쇄를 갖는 N- α -보호된 아미노산을 C-말단에 의해 연결된 성장하는 폴리펩타이드 쇠 및 불용성 중합체 지지체, 즉 폴리스티렌 비드에 단계적으로 가한다. 단백질은 N- α -보호된 아미노산을 디사이클로헥실카보디이미드와 같은 시약과 반응시켜 활성화시킨 N- α -보호된 아미노산의 α -카복실 그룹에 N- α -탈보호된 아미노산의 아미노 그룹과 연결시킴으로써 합성된다. 유리 아미노 그룹을 활성화된 카복실에 연결시켜 펩타이드 결합을 형성한다. 가장 일반적으로 사용되는 N- α -보호 그룹은 산에 불안정한 Boc, 및 염기에 불안정한 Fmoc를 포함한다. 적합한 화학, 수지, 보호 그룹, 보호 아미노산 및 시약에 대한 상세한 기술은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있으므로, 본원에서 상세히 기술되지 않는다.

[0197] 생성된 최적화된 프로섬 펩타이드 (HIP 포함) 또는 이의 유사체 또는 유도체의 정제는 통상의 절차, 예를 들어 겔 투과를 이용하는 분취 HPLC, 분배 및/또는 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 달성된다. 적합한 매트릭스 및 완충제의 선택은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있으므로 본원에서는 상세히 기술되지 않는다.

[0198] 본 발명의 시약 및 방법에 대한 상기의 상세한 기술과 더불어, 하기 실시예가 본 발명의 다양한 양상을 설명하기 위해 제공된다.

[0199] 실시예 1

[0200] 시험관내 HIP 활성화. 시험관내 연구는 펜실베이니아 대학의 사람 섬 실험실 (Human Islet Laboratory)에서 수행하였다. 사람 췌장 섬 및 관 분획물을 10일에 걸쳐 배양한 후, 맹검 연구에서 처리하였다. 방사면역검정법을 이용하여 음성 대조군으로 사용되는 스크램블된 펩타이드, HIP3, HIP1, HIP2 및 양성 대조군으로 사용되는 햄스터-유도된 INGAP로 처리된 사람 췌장 배양물에서 인슐린 수준을 측정하였다. 펩타이드는 Bachem BioScience (95% 순도, 연구 등급)에 의해 합성되었다.

[0201] 이중 배양물을 10일 및 12일에 처리한 후, 처리 HIP 펩타이드, 대조군 및 INGAP 1주일 후 인슐린 함량을 검출하기 위해 분해하였다. 10일 배양 동안, 인슐린 생성은 감소되며, HIP 펩타이드로의 처리 후, 인슐린이 다시 생성된다.

[0202] 도 1에 나타난 바와 같은 관 분획물 그래프는, 사람 췌장 관 조직과의 배양물에서 인큐베이션 후, 방사면역검정으로 측정되는 y 축 상의 인슐린 수준을 나타낸다. 섬 분획물 그래프는 사람 췌장 섬 조직에서의 인큐베이션 후 인슐린 수준을 나타낸다. 기준선 인슐린 수준은 기준선의 관 분획물에서 보다 기준선의 섬 분획물에서 상당히 높다.

[0203] 관 및 섬 조직을 리코디 (Ricordi) 방법을 이용하여 분리하였다. 관 세포 및 섬 배양물은 자연적으로는 완전히

균질하지 않았다. 이 연구는 또한, HIP에 대한 표적물인 전구세포가 섬 및 관 배양물 모두에서 발견된다는 것을 제시한다. 이 연구는 하기 차트에서 보여지는 유사한 발견과 더불어 반복되었으며, HIP2와 함께 배양된 사람 관 조직에서 방사면역검정으로 측정시 인슐린 수준은 4배 증가하였다.

[0204] 반복 연구는 지배적으로 사람 관 세포 배양물 및 섬 배양물 모두에서 인슐린 증가를 확증하였으며, 기준선 인슐린 수준은 섬 배양물과 비교하여 기준선 관 배양물에서 일정하게 약 1/3 낮고, 음성 대조군과 비교하여 HIP와의 인큐베이션 후 인슐린 함량은 유사하게 증가하였다.

[0205] 실시예 2

[0206] 생체내 연구. HIP3, HIP1 및 HIP2가 마우스에서 생체내 연구의 대상이었다. 이들 HIP 변이체는, 당뇨병 마우스에 도입시, 췌장 내의 전구세포의 새로운 섬 구조물로의 분화를 자극하는 것으로 나타났다. 당뇨병 모델은 마우스에서 개발하였다 [참조: Rosenberg et. al., 2004]. 피험체의 수는 연구를 위해 충분한 수의 당뇨병 동물이 얻어지도록 선택되었으며, 동물들은 연구 그룹으로 무작위로 배정되었다. 모든 동물에 28일 동안 1일 2회 씩 (오전 및 오후) 복강내 주사로 투여하였다. 투여 시간은 투여 시기 동안 일정 (± 2 시간) 하였다. 마우스가 적어도 1주일 동안 당뇨병 (혈중 글루코즈가 16.7 mmol/L (300 mg/dL)를 초과)임을 확인한 후, 마우스에 투여하였다.

[0207] 마우스를 당뇨병이 되도록 하기 위해 5일 동안 시트레이트 완충액 (pH 4.5) 중 40 mg/kg의 스트렙토조신을 마우스에게 복강내 투여하였다. 마우스는 당뇨병으로 간주되는 적어도 1주일 동안 혈중 글루코즈가 16.7 mmol/L (300 mg/dL)를 초과하였다. 임의의 동물에서 혈중 글루코즈 수준이 400 mg/dL 이상으로 증가하는 경우, 동물은 인슐린으로 처리되었다. 3일마다 동일 시간에 꼬리에 자극을 내어 핏방울을 모았다. 글루코즈 계량기를 사용하여 글루코즈 측정을 하였다. 그룹 배정 및 용량 수준이 표 2에 나타나 있다.

표 2

그룹	처리	용량 수준	용량 용적	동물의 수
1	비히클	0	100 μ l	6
2	HIP3	250 μ g	100 μ l	6
3	HIP1	250 μ g	100 μ l	6
4	HIP2	250 μ g	100 μ l	6

[0208]

[0209] 연구의 종점은 하기를 포함하였다: 글루코즈의 변화, 인슐린 요구의 변화; 사후 췌장들 (pancreata)의 조직구조.

[0210] 인슐린 요구의 변화. 인슐린 요구 및 인슐린 요구의 감소 속도 모두에서의 유의한 감소가, 도 2에 나타난 바와 같이, HIP-처리된 마우스에서 나타났다. HIP2-처리된 마우스는 21일째까지는 인슐린에 대해 완전히 독립적이었다.

[0211] 글루코즈 수준의 변화. HIP-처리된 그룹 모두에서 대조군과 비교하여 기준선으로부터 글루코즈의 평균 감소가 있었으며, 이러한 감소는, 도 3에서 보여지는 바와 같이, 모든 HIP-처리된 그룹에서 유의하였다. HIP1과 대조군 사이에서는 14.7% 낮은 평균 글루코즈, HIP2와 대조군 사이에서는 29.4% 낮은 평균 글루코즈, 및 HIP3와 대조군 사이에서는 57.3% 낮은 평균 글루코즈를 나타내었다. 이 자료는 대조군 당뇨병 마우스와 비교하여 모든 HIP-처리된 마우스 그룹에서 인슐린 요구에 있어 상당히 빠른 감소율을 나타낸다. HIP 처리 후 상당히 큰 수의 섬이 마우스 췌장들 (연구된 각각의 마우스에서 절단되고 재검토됨)에서 관측되었다. 췌장들은 눈을 가린 조직 학자들에 의해 평가되었으며, 표 3에 자료가 나타나 있다.

표 3

	전체 섬 (증가율 %)	전체 섬 매쓰 (μm ²) (증가율 %)
위약	280	854364
HIP2	454 (62%)	2161782 (153%)
HIP3	410 (46%)	1703513 (99%)

[0212]

[0213]

HIP와 위약 사이의 섬 수의 차이가 통계학적으로 유의하였다 ($p=0.022$). HIP-처리된 마우스와 위약-처리된 그룹 사이에서 섬 면적에 보다 큰 증가가 있었다. 도 4A에 나타난 바와 같이, 위약-처리된 그룹에서의 142,394 μm^2 및 HIP3-처리된 그룹에서의 283,918 μm^2 와 비교하여, HIP2-처리된 그룹에서의 섬 면적은 360,297 μm^2 였다 ($p=0.05$). 도 4B는 HIP2B가 당뇨병 마우스에서 섬수를 증가시킨다는 것을 보인다. (a) 위약- 및 HIP-처리된 마우스에서 인슐린 면역염색에 대한 대표적 이미지. (b) 인슐린-염색된 섬은 자가-형광 혈구로부터 이들의 구조를 구분하기 위해 황색으로 경계가 그어진다.

[0214]

또한, 인슐린에 대한 면역형광 염색을 마우스 췌장들에 대해 수행하였으며, 도 5에 나타난 바와 같이, HIP-처리된 마우스에서 인슐린 염색의 정도가 보다 컸다. 이러한 마우스 췌장 조직을 수거하고, 4% PFA에 고정시키고, 차단시키며, 절단하였다. 10X-Objective, 1.6 optivar.

[0215]

실시예 3

[0216]

하기 실시예는 HIP 및 최적화된 HIP를 합성하고 정제하는 예시적 방법을 기술한다.

[0217]

HIP 펩타이드의 합성은 표준 Fmoc 보호 화학 [참조: Fields, G.B. and Noble, R.L. 1990, Int.J.Peptide Protein Res. 35, 161-214]을 이용하면서 일반적인 고체상 절차 [참조: Merrifield, R.B. 1963, J.Am.Chem.Soc. 85:2149-2154]로 수행하였다.

[0218]

수지 결합된 보호된 펩타이드를 절단시키고, 스캐빈저의 존재 하에서 트리플루오로아세트산 (TFA)로 처리하여 탈보호시켜 조 생성물을 수득하였다. 정제된 펩타이드 생성물을 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 수득하였다.

[0219]

펩타이드의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)로의 유도체화는 분자량 범위가 300 내지 43,000인 분리된 PEG 유니트의 도입으로 이루어질 수 있다.

[0220]

실시예 A: Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂ (HIP2B) (서열번호 7). 링크 (Rink) 아미드 수지, 4-[2',4'-디메톡시페닐-Fmoc-아미노메틸)-페녹시 수지로 시작하여, Fmoc 보호된 아미노산을 연속해서 도입하고, HOBT 및 DCC (N-하이드록시벤조트리아졸 및 디사이클로헥실카보디이미드)를 사용하여 커플링하였다. 출발 수지의 Fmoc 탈보호 및 각각의 아미노산의 Fmoc 보호 그룹은 디메틸포름아미드 중의 20% 피페리딘으로 수행하였다. N-말단 아미노산, Ile의 Fmoc 보호 그룹의 제거 후, 수지 결합된 보호된 펩타이드를 메틸렌 클로라이드 중의 20% 아세트산 무수물로 아세틸화하였다. 측쇄 그룹의 탈보호 및 수지로부터 펩타이드의 절단은 2.5% 물 및 2.5% 트리이소프로필실란과 함께 95% 트리플루오로아세트산으로 수행하였다. 1시간 처리 후, 펩타이드를 디에틸에테르를 사용하여 절단 용액으로부터 침전시키고, 여과시킨 후, 건조시켰다.

[0221]

정제. 조 생성물을 물 중의 0.1% TFA 및 아세트오니트릴 중의 0.1% TFA를 각각 완충액 A 및 B로 사용하면서 C-18 지지체 상에서 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제하였다. 증가하는 구배의 완충액 B를 사용하여 생성물을 용출시켰다. 잔류 TFA의 아세테이트로의 교환은 생성물 분획을 C-18 HPLC 칼럼에 재적용시키고, 수성 0.1M NH₄OAc로 세척한 후, 생성물을 이동상으로서 물 중의 1% 아세트산 및 아세트오니트릴의 구배로 용출시킴으로써 수행되었다. 순수 생성물 분획을 풀링하고, 동결건조시켰다. 펩타이드의 확인 및 균질성은 아미노산 조성 분석, 분석 HPLC 및 질량 분광 분석으로 확인하였다.

[0222]

실시예 B: IGLHDPTQGTEPNG (HIP2) (서열번호 4). Fmoc-Gly-Wang 수지로부터 시작하여, 펩타이드 서열을 실시예 A에서와 같이 어셈블링하였다. 차단되지 않은 유리 아미노 및 카복시 말단을 갖는 펩타이드를 제공하기 위해 아미노 말단을 아세틸화시키지 않았다. 정제된 생성물을 실시예 A에서와 같이 분리하였다.

- [0223] 실시예 C: (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (HIP2B CysDimer) (서열번호 19). 유리 티올 형태의 펩타이드는 실시예 A에서 기술된 바와 같이 합성하였다. 약 2 g의 펩타이드를 2 ml의 아세트산에 용해시키고 약 500 ml의 증류수로 희석시킴으로써 조 생성물을 이량체를 형성하도록 산화시키고, 20% NH₄OH 용액을 적가함으로써 pH를 약 8.2로 조절하였다. 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응은 밤새 완성되지 않았다. 반응을 완성시키기 위해, 페리시안화칼륨의 1% 용액을 영구적 황녹색이 지속될 때까지 가하였다. 엘만 (Ellman) 시험 및 HPLC 분석에 의해 측정시 반응은 완결된 것으로 확인되었다. 산화된 펩타이드의 용액을 30분 동안 3 내지 5 g의 AG-1 X2 이온교환 (클로라이드 형태) 수지와 함께 교반시키고, 여과시킨 후, HPLC 정제 전에 아세트산으로 pH를 약 5로 조절하였다.
- [0224] 실시예 D: (IGLHDPTQGTEPNGC)₂ (HIP2 Cys Dimer) (서열번호 13). Fmoc-Cys(Trt)-Wang 수지로 시작하여, 펩타이드 서열을 실시예 2에서와 같이 제조하였다. 조 생성물의 에테르 침전, 이량체로의 산화 및 HPLC 정제를 실시예 C에 기술된 바와 같이 수행하였다.
- [0225] 실시예 E: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂ (HIP2B Cys) (서열번호 16). 단량체성 일차 서열의 합성 및 정제는 실시예 A와 같이 수행한다.
- [0226] 하기 예는 차단된 HIP의 제조에 대한 예시적인 방법을 기술한다. HIP 차단된 펩타이드를 고체상 펩타이드 합성 (SPPS)에 의해 제조하였다. 고체상 합성의 기본 전제는, 쇠의 한측 말단을 불용성 지지체에 고정시키고, 아미노산을 임의의 목적하는 서열의 펩타이드로 어셈블링할 수 있다는 것이다. 상술된 바와 같이, 실제 SPPS에서 펩타이드의 카복실 말단은 중합체에 연결된다. 목적하는 서열의 아미노산을 지지체 상에 함께 연결시킨 후, 지지체로부터 펩타이드 쇠를 절단하고 조 펩타이드를 용액으로 방출하기 위해 시약을 적용시킬 수 있다. 합성에 수반되는 모든 반응은 균질한 생성물이 수득되도록 가능한 한 완결될 때까지 수행한다.
- [0227] 펩타이드의 C-말단이 아미드인 경우, 유도체는 펩타이드 아미드이다. 많은 천연 발생 펩타이드 호르몬이 아미드로서 존재하기 때문에, 펩타이드-아미드는 매우 중요한 유도체이다. 펩타이드 아미드를 합성하기 위해, 절단시 직접적으로 펩타이드 아미드를 생성하는 고체상 수지가 개발되었다. N-말단이 아세티 그룹인 경우, 펩타이드는 C-말단으로부터 N-말단으로 어셈블링된다. 이어서, N-말단을 염기의 존재 하에서 아세트산 무수물을 사용하여 아세틸화시킨다.
- [0228] Fmoc-아미노산 유도체를 사용하여 서열을 제조한다. 목적하는 서열의 아미노산을 지지체 상에 함께 연결시킨 후, 펩타이드를 아세틸화시키고, 여과시킨 후, 건조시켰다. 이어서, 아세틸화된 펩타이드-수지를 스캐빈저를 포함하는 트리플루오로아세트산 (TFA)으로 절단시켜, 지지체로부터 펩타이드 및 보호 그룹을 방출시켰다. 이어서, HPLC를 이용하여 조 물질을 정제하였다.
- [0229] 실시예 F: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH₂ (HIP2B Cys-PEG) (서열번호 25). 실시예 5로부터의 펩타이드의 단량체성 정제 형태 (1.1 당량)를 아세테이트 완충액 (0.1M, pH=6.5)에 용해시켰다. 말레이미드 유도체화된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG 말레이미드) 용액 (1 당량)을 증류수 중에 제조하고, 교반하면서 펩타이드 용액에 가하였다. 생성 용액의 pH를 희석 NH₄OH 용액으로 약 6.5로 조절하고, 30분 동안 실온에서 교반시킨 후, 몇몇 방울의 아세트산으로 산성화하고, HPLC로 정제하였다.
- [0230] 실시예 G: IGLHDPTQGTEPNGC(PEG) (HIP2 Cys-PEG) (서열번호 22). Fmoc-Cys(Trt)-Wang 수지로 시작하여, 일차 서열을 실시예 B에서와 같이 합성 및 정제하였다. 실시예 F에서와 같이 PEG 말레이미드로의 유도체화 후 HPLC 정제하였다.
- [0231] 실시예 H: (PEG)-IGLHDPTQGTEPNG (PEG -HIP2) (서열번호 91). 일차 수지 결합된 펩타이드 서열을 실시예 2에서와 같이 제조하였다. N-말단 Ile의 Fmoc 탈보호 후, 보호된 펩타이드 수지를 커플링제로서 HOBT 및 DCC를 사용하여 PEG-카복실산으로 유도체화하였다. 수지로부터 (PEG)-펩타이드의 절단 및 정제를 실시예 A에서와 같이 수행하였다.
- [0232] **실시예 4**
- [0233] 하기 실시예는 HIP2로 절단되는 HIP1의 근육내 및 피하 투여의 약동학을 설명한다.
- [0234] 20마리의 래트 (5마리 래트/투여 경로)로 HIP 전달의 약동학을 평가하였다. 햄스터-유도된 INGAP 발견과 유사

하계, 근육내 (IM) 경로가 물질에 대해 보다 우사한 혈액 농도를 제공하였으며, ELISA 측정에 의해 30분 이내에 반감기를 측정하였다 (도 6).

[0235] 피하 (SQ) 경로의 투여는 약간 긴 반감기를 나타내었으나 (도 7), ELISA에 의해 검출된 수준은 IM 경로에 의한 것보다 낮았다. IM 경로가 SQ보다 약간 긴 혈중 반감기를 제공한다.

[0236] 실시예 5

[0237] 하기 실시예는 냉동-해동 연구에서의 HIP2B 펩타이드의 안정성을 나타낸다.

[0238] 실험 절차. 이 연구는 각 그룹 당 8개 샘플을 갖는 2 그룹으로 시작하였다. 2개월의 안정성 연구의 일부로서, 한 그룹은 4 내지 8 °C에서 유지시키고, 다른 그룹은 25 °C에서 유지시킨다. 각각의 샘플은 5 µl의 증류수중 4.57 mg의 HIP2B를 포함한다. 각각의 온도 그룹으로부터의 하나의 샘플을 꺼내고, 7일 마다 LC/MS 분석을 수행할 수 있을 때까지 저장을 위해 -20 °C 냉동기에 넣었다. 연구 시작시 제조되고 -20 °C에서 저장된 HIP2B의 대조 샘플에 대한 안정성 연구에서 1, 2 및 3주 후 일련의 샘플을 평가하였다. 상기된 온도 각각에서의 안정성 시험 3주 후, LC/MS로 측정시 모든 샘플은 변화되지 않았으며, 따라서 1, 2 및 3주에 안정한 것으로 판단되었다. 이러한 냉동-해동 안정성 연구는 디메틸 설펍사이드 (DMSO)에서 저장시 HIP 서열의 Pro-Asn의 연결부에서 탄소 이동 (shift)가 발생하며, -20 °C의 등장성 식염수에서 저장시 수개월 동안 안정하다는 것을 제시한다.

[0239] 실시예 6

[0240] 최적화된 HIP는 시간 (T) 경과에 따른 시험관내에서의 혈청 프로테아제에 대한 증가된 펩타이드 안정성을 입증한다.

[0241] 펩타이드를 37 °C에서 사람 혈장에서 인큐베이션하였다. 샘플 인큐베이션을 1시간에 걸쳐 수행하였다. 1, 5, 10, 30 및 60분의 개별 시점을 이용하여 반응을 추적하였다. 샘플을 1분 동안 100 °C에서 가열함으로써 각각의 시점에서의 혈장 프로테아제의 불활성화를 수행하였다. 처리 후, 혈장 처리된 샘플을, 대조 샘플과 대비하여, 질량 분광계와 함께 일련의 역상 크로마토그래피, HPLC/LC-MS에 의해 평가하였다.

[0242] HIP 및 최적화된 HIP 펩타이드로 처리된 혈장을 1, 5, 10, 30 및 60분에 걸쳐 평가하였다. 각각의 시점에 대해 0.70 ml의 혈장을 10 ml 시험관에 피펫팅하였다. 포스페이트 완충된 식염수 중에 제조된 HIP 또는 최적화된 HIP 펩타이드 (1.66 mg/ml)의 스톡 용액 0.30 ml를 각각에 가하였다. 혈장/펩타이드 샘플을 각각의 시점에 대해 37 °C에서 인큐베이션한 후, 100 °C에서 가열하여 혈장 프로테아제의 단백질분해 활성을 불활성화시켰다. 불활성화후, 샘플을 1 ml의 H₂O로 희석시키고, 원심분리시킨 후, 분석을 위해 상청액을 제거하였다.

[0243] 샘플을 완충액 A로서 H₂O 중의 0.07% TFA 및 완충액 B로서 아세트오니트릴 중의 0.07% TFA를 사용하여 C-18 역상 칼럼 (50 mm x 2.0 mm)에서 분석하였다. 10분에 걸쳐 98% A/2% B에서 30% A/70% B로의 선형 구배를 0.4 ml/min의 유동 속도로 사용하였다. 용출물을 220 nm 파장에서 UV 및 질량 분광법으로 모니터링하였다. 펩타이드 참조 샘플 및 혈장 대조군에 대한 혈장 처리된 펩타이드 (37 °C)의 크로마토그래피 프로파일의 대조를 이용하여 혈장 처리에 대한 펩타이드의 상대적 안정성을 결정하였다.

[0244] 조절:

[0245] T = 0: 혈장 (0.7 ml) + 펩타이드 스톡 용액 (0.3 ml), 가열 100 °C, 1분. 1 ml H₂O 첨가, 원심분리.

[0246] 혈장 배경 조절: 0.7 ml 혈장 + PBS (0.3 ml), 가열 100 °C, 1분, 1 ml H₂O 첨가, 원심분리.

[0247] 열처리된 펩타이드 참조물: 펩타이드 스톡 용액 (0.3 ml) + 0.7 ml PBS, 가열 100 °C, 1분, 1 ml H₂O 첨가.

[0248] 열처리 되지 않은 펩타이드 참조물: 펩타이드 스톡 용액 (0.3 ml)을 0.7 ml PBS + 1 ml H₂O에 첨가.

[0249] 결과

- [0250] HIP2 (IGLHDPTQGTEPNG) (서열번호 4) 새로운 성분 (약 5%)에 의한 단백질분해의 증거는 단지 1분의 HIP2 인큐베이션 후 명백하다. 새로운 성분은 시간 경과에 따라 계속 증가한다. 30분에 약 50%를 나타내고, 60분에 농도가 약 70%이다. 주요 대사물은 GLHDPTQGTEPNG (서열번호 92)로 확인되었으며, N-말단 이소류신의 주요 손실을 나타낸다. 또한, IGL의 손실로부터 생기는 소량의 HDPTQGTEPNG (서열번호 93)의 존재에 대한 증거가 있다.
- [0251] HIP2B (Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂) (서열번호 7) HIP2의 N-아세틸화된 C-아미드 형태는 37 °C에서 1시간의 인큐베이션 후 혈장 프로테아제에 완전히 안정한 것으로 보인다.
- [0252] HIP3 (IGLHDPTQGTEPNGE) (서열번호 3) HIP3의 단백질분해는 HIP2의 단백질분해에 비해 느리다. 60분 후, HIP3의 출발 농도는 약 50%이다. 주요한 확인된 대사물은 HDPTQGTEPNG (서열번호 93)이며 IG의 손실을 나타낸다.
- [0253] HIP3B (Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH₂) (서열번호 5) HIP3의 차단된 형태는 혈장 인큐베이션에 대해 1시간 이하까지 완전히 안정하다.
- [0254] HIP2B Cys-Dimer (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (서열번호 19) 이러한 화합물은 적어도 1시간 동안 혈장 프로테아제에 대해 안정한 것으로 보인다. 그러나, 인큐베이션된 샘플 및 T = 0 대조군의 100 °C 열처리는 출발 물질의 시스테인 부가물로의 전환을 나타내었다.
- [0255] Ac-IGHDPTQGTEPNGC(C)-NH₂. (서열번호 94) 샘플을 100 °C로 가열시 전환은 혈장으로부터 시스테인에 의한 대체에 의한 것으로 보인다.
- [0256] HIP2B Cys-PEG (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH₂) (서열번호 22) 이러한 고분자량 제작물은 1시간 이하 동안 혈장 프로테아제에 안정하다.
- [0257] **결과.** 혈장에서 HIP2 및 HIP2B 펩타이드의 단백질분해가 도 8에 나타나 있다. HIP2는 혈장에서의 단지 1분의 인큐베이션 후 새로운 성분 (약 5%)의 출현을 나타내었다. 이러한 새로운 성분은 시간이 경과함에 따라 계속 증가하였으며, 주요 대사물은 N-말단 이소류신의 주요한 손실 및 부수적으로 처음 3개 아미노산의 손실을 갖는 HIP2 서열로 확인된다. HIP2B는 37 °C에서 1시간의 인큐베이션 후 혈장 프로테아제에 완전히 안정한 것으로 나타났다. HIP2B 및 HIP3B로 언급되는 HIP2 및 HIP3의 차단된 형태는 차단되지 않은 구조물과 대비하여 1시간 이하 동안 혈장 프로테아제에 대해 확실히 더 안정하다. 또한, HIP2B의 이량체 및 PEG 유도체도 매우 안정하다.
- [0258] **실시예 7**
- [0259] PANC-1로 알려진 사람 췌장 상피양 세포로부터의 확립된 불멸화 사람 세포주를 성장시키는 기술을 이용하여, 시험관내에 HIP 및 최적화된 HIP의 인슐린 생성에 대한 영향을 평가하였다. 이러한 세포주는 적합한 시그널링시 다른 췌장 세포 유형으로 분화하는 능력을 입증한다. 따라서, PANC-1 세포는 췌장의 천연 발생 전구 세포에 대한 대용물로서 사용되었다.
- [0260] Panc-1 세포를 10% 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지의 T75 플라스크에 시딩하였다. 세포를 24시간 동안 37 °C 및 5% CO₂에서 인큐베이션한 후, 최종 농도 167 nM의 HIP로 처리하였다. 이러한 처리는 4일 동안 매일 1회씩 수행되었다. 5일째, 세포를 부수고 세포 용해물을 얻었다. 이러한 세포 추출물에서, 총 단백질 수준을 측정하고, 50 µg의 총 단백질을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 50 µg의 단백질을 포함하는 샘플을 환원제 베타-머캅토에탄올을 포함하거나 포함하지 않는 로딩 완충액에 희석시키고, 겔의 각각의 웰에 로딩하였다. 전기영동 및 단백질의 니트로셀룰로즈막으로의 전달 후, 인슐린의 존재를 제1 항체로서 폴리클로날 치킨 항 인슐린 항체 (ab1402, 1/2000 희석) 및 제2 항체로서 래빗 폴리클로날-HRP 접합된 항-치킨 (NIT 겔에 대해 1/1000 희석, PANC-1 겔에 대해 1/2000 희석)을 사용하여 검출하였다.
- [0261] 도 9는 HIP 최적화된 HIP와의 인큐베이션에 반응하는 PANC-1 세포로부터 사람 인슐린의 발현을 입증하는 웨스턴 블롯 분석이다. A 표시 아래의 패널은, 샘플이 비-환원 조건에서 로딩되는 경우, Panc-1 세포에서 인슐린에 대한 밴드를 나타낸다. 그 결과, HIP2, HIP2B, 및 이량체화된 HIP2는 폐기화된 HIP2 또는 대조군보다 많은 인슐린 생성을 자극한다는 것을 나타낸다. 환원 조건에서, 인슐린 내의 2개의 폴리펩타이드를 연결하는 디설파이드 결합이 환원되며, 따라서 췌가 분리되고, 이러한 상태에서, 인슐린 항체는 인슐린과 반응하지 않는다. 비-환원 조건과는 대조적으로, 인슐린 분자는 완전하며 항체에 의해 인식된다.

[0262] 도 9B는 도 9A에서와 동일한 막에 포함된 총 단백질을 나타낸다. 폰시우 (Ponceau) 염색을 통한 총 단백질의 수준 측정은 상이한 레인이 유사량의 단백질을 포함한다는 것을 입증한다. NIT-1 및 PANC-1 세포에서 총 단백질 수준이 측정되었으며, 50 μ g의 총 단백질을 웨스턴 블롯 분석을 수행하는데 사용하였다. 50 μ g의 단백질을 포함하는 샘플을 5% 환원제 베타-머캅토에탄올을 포함하거나 포함하지 않는 로딩 완충액에 희석시킨 후, 겔의 각각의 웰에 로딩하였다.

[0263] 폰시우 염색은 상이한 HIP 및 최적화된 HIP에 반응한 인슐린 발현의 차이가 웰에 로딩된 단백질 양과 관련되지 않는다는 것을 입증한다. 또한, 예를 들어 환원 조건 하의 막에서 인슐린에 대한 시그널의 결여는 단백질이 없기 때문이다.

[0264] 실시예 8

[0265] HIP 및 최적화된 HIP 펩타이드의 PANC-1 세포주의 세포 형태에 대한 효과. 세포를 4일 동안 HIP 및 최적화된 HIP 펩타이드로 처리하였다. 도 10A에서, 200X 확대로 7일에 취하는 경우, 대조군 조건과 HIP 및 최적화된 HIP로 처리된 세포 사이에 형태 차이를 볼 수 있으며, 특히 HIP2B-처리된 세포에서 조직학적으로 보다 분화된 세포를 갖는다. 도 10B는 7일 동안 세포 형태의 진행을 나타내며, 상단이 대조군, 중간이 HIP2, 바닥이 HIP2B-처리된 세포를 나타낸다. 사진은 1, 2, 3, 5, 및 7일에 200X 확대한 것이다. 대조군-처리 세포는 어떠한 변화도 겪지 않으나, HIP2 및 HIP2B로 처리된 세포는 이들의 초기 모습으로부터 상당히 벗어난다. 도 10C는 HIP2 Dimer 및 HIP2 PEG가 PANC-1 세포 배양물에 처리되는 경우의 형태 변화의 진행을 나타낸다. 전체적으로, 대조군-처리된 세포는 어떠한 가시적 변화도 겪지 않았으나, HIP2 및 HIP2B로 처리된 세포는 이들의 초기 모습으로부터 상당히 벗어난다.

[0266] 실시예 9

[0267] 사람 췌장 조직 배양물에서의 HIP2B 활성화. 펜실베이니아 대학의 사람 섬 연구실에서 사람 췌장 관 세포 배양물에서 HIP 및 최적화된 HIP 펩타이드의 영향을 나타내었다. 사람 췌장 세포의 관 분획물을 콜라겐 매트릭스에서 10일 동안 배양한 후, HIP2B로 격일로 처리하였다. 세포를 CK19 (관 조직에 대한 마커)에 대한 이중 항체 염색 및 DAPI 염색으로 표지하여 핵 및 인슐린을 나타내었다. 도 11에 나타난 바와 같이, 세포는 인슐린 음성 세포에서 인슐린 발현을 유도하는 형태 변화를 겪었다.

[0268] 실시예 10

[0269] 비-비만 당뇨병 모델에서 HIP 및 최적화된 HIP 펩타이드의 영향에 대한 예비 (Pilot) 자료

[0270] 증가된 섬 매쓰, 면적 및 수의 STZ-처리된 마우스 (상기)에서의 자료와 일치하게, 예비 NOD 마우스 모델은 최적화된 HIP의 잠재능에 대한 예비적 증거를 나타내어, 39일 동안 HIP 처리 후 마우스에서의 C-펩타이드 수준으로 측정된 섬 신생의 측면에서 보다 우수한 효능을 제공하였다.

[0271] 비-비만 당뇨병 (NOD) 모델은 제1형 자가면역 당뇨병에 대한 모델로서 사용된다. 이러한 형태의 당뇨병은 췌장에 대한 근본적인 손상 및 이의 인슐린 생성이 자가면역 공격 때문이므로 가장 도전할만하다. 따라서, 이러한 형태의 당뇨병에서 명확한 섬 신생을 나타내기 위해서, 면역 관용제가 HIP와 병용하여 사용되어야 한다. NOD 마우스 모델은, 많은 수의 마우스가 단지 일시적으로만 당뇨병되고 완화될 수 있으며, 다른 마우스는 심각한 당뇨병을 발병시키므로, 매우 어려운 모델이다. 이러한 유전자도입 마우스 모델에서의 시간 개입은 결정이 어렵다.

[0272] 개발 중인 면역관용제 리소필린 (LSF)를 사용하는 예비 연구에서, 3마리의 NOD 마우스가 당뇨병이 되었으며, 위약 + LSF, HIP2 + LSF 및 HIP2B + LSF로 임의 추출되었다. 도 12에 나타난 바와 같이, 적정한 시간에 LSF를 수령한 그룹 중에서, 연구 동안 글루코즈의 점진적 상승을 가진 LSF 단독으로 처리된 NOD 마우스와 비교하여, HIP로 처리된 2마리는 꾸준히 개선된 글루코즈 수준으로 반응하였다. 통계학적으로 유의한 연구는 아니지만, 이러한 자료는 제1형 당뇨병에 대한 면역 관용제 및 HIP의 병용을 추구하기 위한 매우 강력한 증거를 제공한다.

[0273] 실시예 11

[0274] HIP 수용체에 대한 HIP2B 및 HIP2의 영향. 하기 세트의 연구는 HIP2B가 HIP에 대한 세포질막 수용체과의 상호 작용 및 수용체로부터 핵으로의 트래피킹 (trafficking)에 있어 HIP2와 같이 효과적이라는 것을 입증한다. 사람 프로섬 펩타이드에 대한 수용체를 안정한 사람 췌장 세포주에서 이중 항체 방법으로 사용하여 표지하였다. 제1 항체는 래빗 폴리클로날 항체이고, 제2 항체는 Cy3 형광 염료로 표지된 염소-항-래빗 항체였다.

[0275] 이들 세포는 일반적으로 혈청 비함유 배지에서 성장하며, 트립신으로 처리되는 경우, 탈안정화되고 컴피턴트 (competent)하게 되어 발달 변화를 겪는다. 세포를 HIP의 존재 및 부재의 혈청 비함유 배지 (SFM), 및 트립신을 갖는 혈청 비함유 배지 (TSFM)에서 배양하였다. 이는 단순한 탈안정화가 발달 변화를 활성화시키지 않는다는 것을 보이기 위한 것이다.

[0276] 안정한 조건 하에서 HIP로 처리되는 경우, 어떠한 변화도 생기지 않는다. 발달상 컴피턴트 상태 하에서 HIP로 처리되는 경우, 표지된 수용체는, 세포질막에 의해 캡슐화되고 분화를 위한 시그널의 수령시 핵막으로 이동함으로써, HIP의 존재에 반응한다.

[0277] 도 13은 트립신으로 처리되고 혈청 비함유 배지에서 인큐베이션된 PANC-1 세포가 섬 세포 집합체로 분화한다는 것으로 나타낸다. HIP 수용체는 사람 췌장 세포의 분화 동안 상향조절되며, HIP2와 상호작용하는 것으로 보이며, HIP2B는 HIP 수용체와 상호작용한다. HIP2 및 최적화된 HIP2B는, 췌장 전구세포의 인슐린-생성 새로운 섬으로의 분화를 촉진하는, 세포질막 상의 HIP 수용체로부터 세포의 핵으로의 트래픽 (traffic)을 자극하였다.

[0278] 도 14는 48시간 동안 (A) TSFM 단독 및 (B) TSFM + 150 μ M (최적화된 HIP2B)에서 Cy3로 표지된 래비타 항-사람 HIP 수용체 항체를 나타낸다. HIP는 세포질막에 의해 삼켜지고 핵막으로 수송될 수용체 막 결합된 단백질을 자극한다.

[0279] 도 15는 최적화된 HIP2B의 HIP 수용체 (EXTL3)에 대한 영향에 대해 반복적 면역형광 분석한 것이다. 상부 패널은 EXTL3 (적색)의 Cy3 면역형광 염색에 의해 표시된다. 하부 패널의 이미지에서, EXTL3의 Cy3 면역염색은 핵의 DAPI (청색) 염색으로 찍어져 있다. 세포는 대조군으로서 표준 성장 배지에서 성장하였으며, HIP의 존재 또는 부재 하에서 혈청-비함유 배지 (SFM)에서 성장된 세포와 비교되었다. 황색 화살표는 표준 성장 배지에서 성장된 EXTL3의 표면 발현에 대한 예를 나타낸다. 세포 경계가 뚜렷하며, 이는 혈장막 상의 EXTL3의 표면 발현을 나타낸다. 황색 화살표는 세포 경계의 윤곽을 그리며, 핵은 청색으로 보여진다. 중간 이미지는 SFM에서 성장된 세포이다. EXTL3은 세포질 Cy3 염색에 의해 나타나는 바와 같이 세포질에 위치된다. 녹색 화살표는 핵의 위치에서 염색이 없음을 나타낸다. SFM에서 성장된 아래쪽 이미지의 세포에서 녹색 화살표는 핵에 대한 강한 청색 DAPI 염색을 나타내며, 이는 핵에 EXTL3가 없음을 나타낸다. SFM 및 HIP에서 성장된 위쪽 이미지의 세포에서, 청색 화살표로 지시되는 핵에서의 EXTL3 면역염색의 존재는 EXTL3의 핵으로의 전위를 제시한다. SFM 및 HIP에서 성장된 아래쪽 이미지의 세포에서, 청색 화살표는 핵의 위치를 나타낸다. 아래쪽 이미지에서, EXTL3-Cy3 염색 및 핵 DAPI 염색에 중복이 있으며, EXTL3의 핵 국소화를 입증한다 (청색 화살표). 눈금 막대 = 20 μ m (모든 이미지에서).

[0280] 도 16은 최적화된 HIP2B가 PANC-1 세포에서 세포질막으로부터 핵으로의 HIP 수용체 (EXTL3) 전위를 증진시킨다는 것을 나타낸다. 지시된 시점에 분리된 세포질 및 핵 분획에서 HIP (EXTL3) 수준의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 웨스턴 블롯 분석은, HIP 없이 SFM에서 배양한 지 6시간 후 HIP 수용체 (EXTL3)의 보다 높은 핵 수준이 관측되었음을 나타낸다. 배양 배지 중 HIP2 및 HIP2B의 첨가가 EXTL3 핵 전위를 증진시켰으며, 이는 30분에 이 단백질의 보다 높은 핵 수준으로 입증되었다. 이러한 비교는 HIP의 존재 하에서 세포질 구획으로부터 핵으로의 EXTL3의 전위 시간이 개선되며, EXTL3 핵 전위가 HIP의 존재에 의해 완료될 수 있다는 것을 입증한다. 웨스턴 블롯은 이러한 세포 및 시점을 사용하여 반복되었다.

[0281] 실시예 12

[0282] HIP2, HIP2B 대 위약의 무작위화된 위약-조절 연구에서, 80마리의 마우스를 STZ로 처리하여 당뇨병을 유발하였다. 마우스가 당뇨병 발병과 일치하는 고혈당 수준에 도달할 때까지 마우스를 모니터링하였다. 중재 마우스에 대한 기준선 글루코즈 수준은 평균 300 +/- 6 mg/dL이었으며, HIP 중재 그룹과 위약 그룹에서 글루코즈 수준에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다 (p=0.301).

[0283] 36일 후, 모든 HIP 처리된 마우스는 인슐린에서 벗어나고, 위약 그룹과 비교하여 글루코즈가 상당히 낮아졌다.

무작위로 선택된 마우스를 채장들에 대한 조직면역화학 연구 과정 동안 희생시켰다. 혈청에 대한 C-펩타이드 분석을 진행한다. 중재한 지 39일 후, 나머지 마우스를 다음 60일 동안 글루코즈 수준 및 전체 건강에 대해 매일 시험한다.

[0284] 예비 평가는, HIP 처리가 위약과 비교하여 38.7% 감소시킨다는 것을 입증한다 ($p < 0.05$). 또한, HIP2B를 조제하기 위한 HIP2의 안정화는 생체내에서 활성을 감소시키지 않았다.

[0285] 도 17에 나타난 바와 같이, HIP 처리는 위약보다 116 mg/dL 낮은 글루코즈 수준을 보였다 ($\downarrow 38.7\%$ $p < 0.05$). 모든 HIP 처리된 마우스는 인슐린으로부터 벗어났다. HIP-처리된 마우스의 56% (9/16)는 230 mg/dL 미만의 글루코즈 수준을 가졌다. 위약-처리된 마우스의 9% (1/11)는 230 mg/dL 미만의 글루코즈 수준을 가졌다. HIP2B는 시험관내에서 혈청 중에서 37°C에서 상당히 더 안정하다. 또한, HIP2B는 식염수 중에서 보다 긴 반감기를 갖는다. HIP2B를 형성하기 위한 HIP2에 대한 변형은 생체내에서 활성을 감소시키지 않는다.

[0286] HIP2B의 치료적 잠재능을 평가하기 위해서, STZ-유도된 당뇨병 마우스 모델을 사용하였다. 60마리의 C57BL/6J 마우스에 5일 동안 시트레이트 완충액 (pH 4.5) 중의 50 mg/kg의 STZ를 복강내 주사하여 당뇨병 마우스가 되게 하였다. 2일 동안 혈중 글루코즈가 200 mg/dl 이상이 될 때 마우스를 무작위화하였다. 꼬리 끝에 칼자국을 내어 수집한 혈액 방울을 사용하여 매일 혈중 글루코즈를 모니터링하였다. 글루코즈 측정은 글루코즈 계량기로 측정하였다. 임의의 동물에서 혈중 글루코즈 수준이 324 mg/dL 이상인 경우, 혈중 글루코즈가 324 mg/dL 미만으로 떨어질 때까지 인슐린 (1 Unit/day, 글라긴 인슐린, 근육내)으로 처리하였다. 인슐린 투여에 대해 기록하여 인슐린 요구를 비교하였다. 추가의 3마리의 동물을 STZ로 처리하지 않아 비-당뇨병 기준선값을 확립하는데 이용하였다.

[0287] 동물들을 표 4에 나타난 바와 같이 3개의 그룹으로 배정하였다. 당뇨병 동물에 39일 동안, 비히클 대조물, HIP2 (300 μ g) 또는 HIP2B (300 μ g)을 1일 2회씩 (오전 및 오후) 복강내 주사하였다. 각각의 처리 암 (그룹 1-3)으로부터의 마우스를 39일에 희생시켰다. 희생시키기 전 날 저녁에 모든 마우스를 절식시켰으며, 희생시키기 전에 공복 글루코즈 수준으로 간주되는 아침 글루코즈 수준을 측정하였다. 나머지 동물 그룹은 40 내지 60일에 어떠한 의학적 중재도 하지 않았다. 매일 아침 글루코즈 측정 및, 필요한 경우, 인슐린을 투여하였다. 연구의 중점은 1) 혈중 글루코즈의 변화 및 2) 인슐린 요구의 변화를 포함한다.

표 4

STZ-유도된 당뇨병 마우스의 무작위화

그룹	처리	용량	용량 수준	용량 용적	동물의 수
1	비히클	매일 2회의 IP 주사 X 39일	0	100 μ l	20
2	HIP2	매일 2회의 IP 주사 X 39일	300 μ g	100 μ l	20
3	HIP2B	매일 2회의 IP 주사 X 39일	300 μ g	100 μ l	20

[0288]

[0289] 연구 과정 동안, HIP2 및 HIP2B 그룹 모두 대조군으로부터 혈중 글루코즈 수준에 상당한 감소를 가졌다. 그러나, 2개의 HIP 그룹 간에는 혈중 글루코즈 수준에 차이가 없었다. 도 17은 36일까지는 HIP2B를 형성하기 위한 HIP2에 대한 변형이 생체내에서 감소된 활성을 갖지 않았다는 것을 나타낸다. HIP 처리는 위약보다 116 mg/dL 낮은 글루코즈 수준을 보였다 ($\downarrow 38.7\%$ $p < 0.05$). 모든 HIP 처리된 마우스는 인슐린으로부터 벗어났다. HIP-처리된 마우스의 56% (9/16)는 230 mg/dL 미만의 글루코즈 수준을 가졌다. 위약-처리된 마우스의 9% (1/11)는 230 mg/dL 미만의 글루코즈 수준을 가졌다.

[0290] 도 17은 HIP2, HIP2B 및 위약 투여 후 STZ-당뇨병 마우스 모델에서 평균적인 1일 글루코즈 수준을 나타내는 그래프이다. 평균 기준선 글루코즈 수준은 300 mg/dL \pm 2 mg/dL이었고, 위약과 HIP-처리된 그룹 간에는 유의한 차이가 없었다 ($p = 0.301$).

[0291] 도 18은 HIP2B 처리된 (녹색) 및 대조군 (자주색) 및 위약 그룹의 마우스에서 1일 글루코즈 수준을 나타내는 그래프이다. 각각의 그룹의 라인의 기울기 (도 18)는 글루코즈 수준의 변화율을 나타내며, "재생 속도"라 부른다. HIP2B 처리는, 1일부터 39일까지의 연구 기간에 걸쳐 +0.381의 글루코즈의 증가율을 갖는 위약-처리된

그룹에서의 글루코즈 증가율과 비교하여, -0.602의 글루코즈 수준의 감소율 (재생 속도)을 보였다.

[0292] 도 19는 연구 1일과 38일 사이의 글루코즈의 차이를 HIP2B, HIP2 및 위약에서 비교하여 나타낸다. 도 19는 중재의 시작과 끝에 최적화된 HIP2B 수령자 (황색), HIP2 (녹색) 및 대조군 (청색) 처리된 그룹의 마우스에서의 개선된 글루코즈 조절을 나타낸다. 대조군은 기준선으로부터 28.9 mg/dL 내지 334.6 mg/dL의 평균 증가를 갖는다. HIP2B 및 HIP2 그룹은 HIP2B 그룹에서 235.3 mg/dL ($p=0.024$, 대조군으로부터) 및 HIP2 그룹에서 231.6 mg/dL ($p=0.029$, 대조군으로부터)의 평균 비공복 글루코즈를 보여, 기준선으로부터 상당한 감소를 가졌다.

[0293] 도 20은 연구 말에 처리 그룹 사이의 공복 글루코즈 수준을 나타낸다. 최적화된 HIP2B 처리 그룹은 연구 말에 106.7 mg/dL \pm 0.58 mg/dL ($p=0.046$)의 공복 글루코즈를 가지며, 258.00 \pm 84.5 mg/dL의 평균 공복 글루코즈를 갖는 위약-처리된 대조군과 비교된다. 차단되지 않은 HIP2-처리된 마우스는 위약-처리된 그룹과 비교하여 115.3 mg/dL \pm 16.5 mg/dL ($p=0.050$)의 평균 공복 글루코즈를 가졌다.

[0294] 도 21은 처리 과정 후 및 희생 전에 동물에게 수행된 글루코즈 내성 시험 결과를 나타낸다. 최적화된 HIP2B는 시험관내에서 혈청 중에서 37°C에서 상당히 더 안정하다. 또한, 최적화된 HIP2B는 식염수 중에서 보다 긴 반감기를 갖는다. HIP2B를 형성하기 위한 HIP에 대한 변형은 생체내에서 감소된 활성을 갖지 않는다.

[0295] 실시예 13

[0296] 혈당 조절을 유의하게 개선시키는데 필요한 HIP2B의 치료학적으로 잠재적인 최저 유효 용량을 평가하기 위해서, STZ-유도된 당뇨병 마우스 모델을 사용하는 용량-반응 연구를 수행하였다.

[0297] 도 22는 최대 효능을 갖는 최저의 잠재적 용량을 측정하기 위해서 당뇨병 마우스 모델에 상이한 용량으로 전달되는 최적화된 HIP2B의 글루코즈 조절에 대한 효과를 평가 및 비교하기 위해 수행된 HIP2B의 용량 반응 분석 결과를 나타낸다. 이 연구는 STZ-처리된 마우스 모델에서 5개 농도의 HIP2B의 혈당 조절에 대한 영향 및 당뇨병 악화를 측정하기 위한 무작위 시험이었다. 처리 그룹은 100 μ l의 등장 식염수 중 최대 1000 μ g BID 내지 0.1 μ g BID의 최적화된 HIP2B로 처리된다. 6개의 연구 그룹은 하기와 같다.

시험물	사람(60kg)에서의 동등 용량	마우스 용량/day = mg/kg/day (마우스 중량 = 약 20g)
1	100 mg/kg/day 6000 mg/day	1000 mcg/100 μ l BID=2 mg/day = 100mg/kg/day
2	10 mg/kg/day 600 mg/day	100 mcg/100 μ l BID=0.2 mg/day=10mg/kg/day
3	1 mg/kg/day 60 mg/day	10 mcg/100 μ l BID=0.02 mg/day=1 mg/kg/day
4	0.1 mg/kg/day 6 mg/day	1 mcg/100 μ l BID=0.002 mg/day=0.1 mg/kg/day
5	0.01 mg/kg/day 0.6 mg/day	0.1 mcg/100 μ l BID=0.0002 mg/day=0.01 mg/kg/day
6	식염수 위약	식염수 위약 100 μ l BID

[0298]

[0299] 글루코즈 수준은 마우스에서 급식 패턴과 무관하게 약 9시 내지 11시에 매일 점검하였다. 1일 글루코즈 측정 시 잠재적인 글루코즈 변화 때문에, 각각의 처리 그룹에서 5일 이동 평균 글루코즈 값을 매일 계산하였다. HIP2B 농도의 영향을 1) 평균 글루코즈 수준 및 2) 상이한 농도의 HIP2B가 대조군과 비교하여 중재 그룹에서 혈당 이동에 의해 측정되는 글루코즈 독성 전개를 약화시키는 정도에 의해 평가되었다.

[0300] 도 22는 STZ-처리된 마우스에서 수행된 용량 반응 연구를 나타내며, 10, 100 및 1000 μ g BID로 처리된 당뇨병 마우스에서의 효능이 동등하다는 것을 입증한다. 1 mg/kg 미만에서, 마우스에서의 감소된 효능 시그널이 있었으며, 0.1 및 0.01 mg/kg 용량 수준에 상응한다.

[0301] 최적화된 HIP2B는 당뇨병 치료를 위한 인슐린과 같은 고전적 치료와는 많은 측면에서 다르다. HIP2B는 섬 신생을 이끄는 시그널링 캐스케이드를 시작한다. 반응의 효능이 주로 이의 즉각적인 글루코즈-저하능에 의해 측정되는 인슐린과는 대조적으로, 임의의 섬 신생의 약력학 반응은 수일 및 수주에 걸쳐 측정된다. 따라서, HIP2B 및 INGAP와 같은 섬 신생체의 효능은 반복적인 매일 투여 후 혈당 조절의 장기간 회복 및 고혈당의 약화, 및/또는 정상혈당이 달성되는 비율에 의해 평가될 수 있다. 모든 HIP 처리 그룹은 정상혈당에 접근하였다.

[0302] 용량 감소 반응은 평균 글루코즈의 변화로서 계산되며, 가장 큰 도달가능한 반응은 당뇨병이 약화되는 최대 정

도와 같다. 이러한 평가에서, 본 발명자는 대조군 그룹의 혈당 이동과 비교하여 연구를 통해 각각의 처리 그룹에서의 최대 혈당 이동의 차이에 의해 계산되는 바와 같은 단위 용량당 반응의 변화를 보고한다. 대조군은 어떠한 질환 약화도 없었으며, 100% 질환 유도를 달성하였다. HIP2B 용량이 이러한 효과를 약화시키는 정도는 위약 그룹과 비교하여 각각의 처리 그룹에서의 질환 약화를 (%)로서 기술된다.

[0303] 도 23은 상이한 농도의 HIP2B의 당뇨병 약화에 대한 영향을 나타낸다. 3개의 최고의 처리 수준 각각은 동일한 정도로 당뇨병의 중증도를 약화시켰다. HIP의 2개의 최저 처리 용량 (BID 전달된 0.1 및 1 µg/day)은 3개의 고용량에서와 같은 최적 반응을 나타내지 않았다.

[0304] 0.1 및 1 µg BID 용량 수준에서, HIP2B 반응은 위약의 반응을 증가하는 질환 약화를 나타내었다. HIP2B 농도를 10 µg BID로 증가시켰을 때, 당뇨병에 대해 가장 큰 효능 및 약화가 나타났다. 1000, 100, 및 10 µg BID의 용량 수준에서, 당뇨병은 위약 그룹에서 보여지는 최대 질환 상태에 대해 60 내지 70%의 약화가 있었다. 이러한 결과로부터, 본 발명자는 최적 효능을 제공할 최저 용량 수준의 HIP2B가 마우스에서는 1 내지 10 µg BID 또는 사람에서는 0.5 내지 1.0 mg/kg의 사람 용량 상당량 (30 내지 60 mg BID)의 범위라고 결론 내린다. 이러한 용량은 Phase2B INGAP 시험 (600 mg/day)에서 사용된 용량의 약 1/10이다.

[0305] 실시예 14

[0306] 최적화된 HIP2B 구조물로 달성되는 생물이용성의 개선을 확인하기 위해 약력학 연구를 수행하였다. 절대적 생물이용성 및 약력학 연구는 HIP2 (도 24), 최적화된 HIP2B 및 INGAP의 정맥내 및 피하 용량 투여 후 스프라그 돌리 (Sprague Dawley) 래트에서 수행하였다. 이를 위해 2개의 상이한 경로의 투여 후 수컷 래트에서의 HIP2, 최적화된 HIP2B 및 INGAP의 흡수, 절대적 생물이용성 및 혈장 수준을 측정하였다.

[0307] 6개 그룹의 5마리 수컷 스프라그 돌리 래트에 하기 표에서와 같이 정맥내 및 피하 경로에 의해 HIP2, HIP2B 또는 INGAP를 투여하였다.

그룹	투여 경로	시험물	Nom 농도 (mg/ml)	용량 용적 (ml/kg)	Nom 투여 수준 (mg/kg)
1	피하	HIP2	2	2	4
2	정맥내	HIP2	2	2	4
3	피하	HIP2B	2	2	4
4	정맥내	HIP2B	2	2	4
5	피하	INGAP	2	2	4
6	정맥내	INGAP	2	2	4

[0308]

[0309] 10개의 일련의 혈장 샘플 (각각 0.03 ml)를 투여 후 5, 10, 15, 30분, 45분, 이어서 1, 2, 3, 8, 및 24시간에 5마리/그룹으로부터 목정맥 카테터를 통해 수집하였다. 혈장을 EDTA 함유 튜브에 수집하였다. 수집 후, 샘플을 냉각 팩에서 냉각시키고, 원심분리시킨 후, -70 °C 또는 그 이하에서의 저장을 위해 미리-표지된 마이크로퓨지 튜브로 옮겼다.

[0310] 래트 혈장 샘플 200 µl 각각을 1 ml의 아세토니트릴 (0.07% 트리플루오로아세트산, TFA)를 포함하는 원심분리 튜브에 가하고, 1분 동안 볼텍스 혼합기로 교반한 후, 원심분리시켜 혈장 단백질을 침전시켰다. 상청액을 제거하고 Speed Vac를 사용하여 증발시켜 건조시켰다. 건조 펠릿을 포함하는 마이크로 원심분리 튜브에 200 µl의 20:80 아세토니트릴: 물 (0.07% TFA 포함)을 가하였다. 샘플을 원심분리시켜 임의의 불용성 물질을 제거하고, 상청액을 LC/MS MS 분석을 위해 분석 바이알로 옮겼다. HIP2B (M=286.0), HIP2 (M=287.1) 및 INGAP (M=212.2, 356.1, 373.9)의 참조 샘플 각각에 대해 관측되는 가장 풍부한 딸 (daughter) 이온/이온들을 검출하도록 질량 분광계를 조정하였다. 최적화된 HIP2B, HIP2 및 INGAP 혈장은 완충액 A로서 H₂O 중의 0.07% TFA 및 완충액 B로서 아세토니트릴 중의 0.07% TFA를 사용하여 C-18 역상 칼럼 (50 mm x 2.0 mm, Varian Pursuit XRS3)에서 분석하였다. 9분에 걸쳐 100% B로 진행되는 98% A/2% B의 선형 구배를 0.4 ml/min의 유동 속도로 이용하였다.

[0311] 하기 혈장 대조군을 상술한 바와 처리하고 표준 농도 곡선을 확립하는데 사용하였다:

[0312] 1. 배경 대조군으로서의 블랭크 혈장

[0313] 2. 6.7×10^4 , 6.7×10^3 , 6.7×10^2 , 67 및 6.7 ng/ml의 HIP2B, HIP2 및 INGAP를 포함하는 5개의 표준 혈장 샘플.

- [0314] 또한, 최적화된 HIP2B, HIP2 및 INGAP 의 잔류 용량 샘플을 주사시 각각의 농도를 측정하기 위해 LC/MSMS로 분석하였다. 분석 결과, 실험 오차 내의 농도는 2 mg/ml인 것으로 확인되었다. 모든 동물은 투여 후 모든 시간 및 각각의 경로의 투여 후 정상적인 것으로 보였다. HIP2 및 INGAP: HIP2의 정맥내 또는 피하 투여 후, 매우 낮은 수준의 HIP2가 투여 후 단지 5분에 관측되었으며, 모든 후속한 샘플은 정량 한계 이하였다. INGAP를 정맥내 또는 피하 투여한 후, 관측된 모든 혈장 샘플은 낮은 정량 한계 이하였다. 그 결과, 정맥내 및 피하 용량 투여 후 HIP2 및 INGAP에 대한 혈장 약동학 변수는 계산될 수 없었다.
- [0315] HIP2B, HIP2B의 정맥내 투여 후, 혈장 농도는 단상 방식으로 감소하였으며, 평균 최종 상 혈장 반감기는 0.19 시간 (11분)이었다. 평균 C_{max} 는 8237 ng/ml 이었으며, 5분의 제1 샘플링 시점에 발생하였다. 평균 C_0 는 18805 ng/ml인 것으로 평가되었다. 평균 $AUC_{0-\infty}$ 은 2231 ng*hr/ml였다. 겔보기 평균 혈장 제거율은 1.9 l/hr/kg이었으며, 겔보기 평균 용적 분포는 0.48 l/kg이었다.
- [0316] 최적화된 HIP2B의 피하 투여 후, 흡수된 HIP2B는 단상 방식으로 감소하였으며, 평균 최종 상 혈장 반감기는 0.34 시간 (20분)이었다. 평균 $AUC_{0-\infty}$ 는 1932 ng*hr/ml이었다. 겔보기 평균 Cl/F 는 2.1 l/hr/kg이었으며, 겔보기 평균 V_d/F 는 1 l/kg이었다. HIP2B의 절대적 피하 생물이용성은 87%였다. 도 25는 최적화된 HIP2B의 피하 투여에 대한 약동학을 나타내며, 최적화된 HIP2B 혈장 수준은 2시간 이하에서 검출가능하였으며, $t_{1/2,e}$ 은 약 20 분이었다.
- [0317] INGAP 혈장 농도는 모든 시점에서 검출가능하지 않았으며, 이는 INGAP가 신속히 제거되고/되거나 대사된다는 것을 나타낸다. 최적화된 HIP2B 혈장 수준은 피하 용량 투여 후 HIP2 또는 INGAP에 비해 상당히 높다. 관측된 멀티-피크 LC/MS 크로마토그래피 혈장 프로필에 기초할 때, HIP2 및 INGAP에 비해 최적화된 HIP2B는 거의 생체 내에서 신속히 대사될 것 같지 않다. HIP2B의 생물이용성은 87%이다.
- [0318] 도 24는 PK 분석의 일부로서 래트 혈장으로부터 유도되는 최적화된 HIP2B, HIP2 및 INGAP 샘플의 LC/MS MS 분석을 나타내며, 이때 HIP2B, HIP2 및 INGAP는 4mg/kg으로 피하 또는 정맥내 주사에 의해 용량 투여되었다.
- [0319] 피하 투여 후, HIP2B 수준은 1.5 시간까지 검출가능하였다. $T_{1/2}$ 는 약 0.5시간이다. HIP2의 매우 낮은 수준이 5분에 검출되었으며, 5분 후 어떠한 후속 검출도 없었다. 최적화된 HIP2B에 대해 관측된 멀티-피크 LC/MS 크로마토그래피 프로필에 기초할 때, HIP2B는 HIP2에 비해 생체내에서 덜 신속하게 대사된다.
- [0320] INGAP의 농도는 모든 시점에서 검출가능하지 않았으며, 이는 INGAP가 신속히 제거되고/되거나 대사된다는 것을 나타낸다. 하기 표는 이러한 자료를 요약한다.

비교 PK 분석

펩타이드	경로	용량 (mg/kg)	C_0 (ng/ml)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (h)	C_{1h} (ng/ml)	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng*h/ml)	$T_{1/2}$ (h)	F
HIP2B	SQ	4	na	2739	0.167	611.5	1932	0.34	0.87
	IV	4	18805	8237	0.083	114	1614.3	0.19	na
HIP2	SQ	4	na	32	0.083	0	2.7	0.02	0.01
	IV	4	18805	29	0.083	0	441.9	0.02	na
INGAP	SQ	4	na	0	na	0	0.0	<0.025	0.00
	IV	4	18805	0	na	0	439.5*	<0.025	na

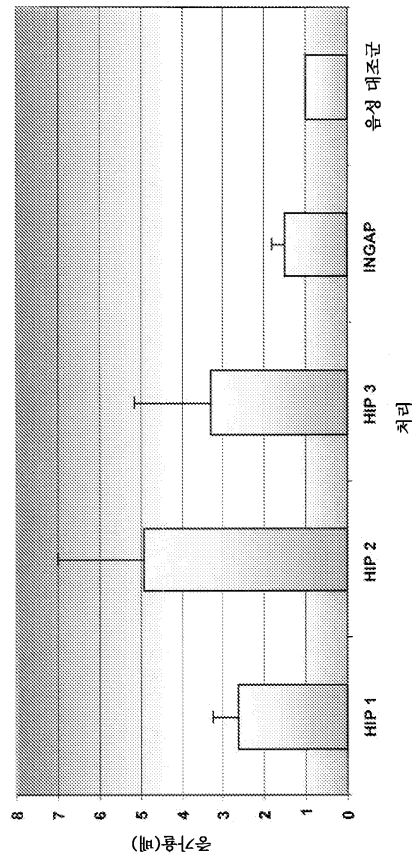
n=5; na, 적용가능하지 않음
*의삽됨

- [0321]
- [0322] 본 발명자는 피하 투여 후 최적화된 HIP2B의 혈장 수준이 HIP2 또는 INGAP와 비교하여 상당히 높다는 결론을 내린다. IV 투여 후 HIP2B 혈장 수준은 HIP 또는 INGAP에 비해 상당히 높다. 정맥내 투여 후, 최적화된 HIP2B는 시간 의존적 감소를 나타내며, 45분에는 농도가 검출가능하지 않다. $T_{1/2}$ 는 약 9분이다. HIP2는 단지 5분 시점에서만 관측되었으며, INGAP는 어떠한 시점에서든 검출가능하지 않았으며, 이는 둘다 신속히 제거되고/되거나 대사된다는 것을 나타낸다.
- [0323] 특정한 바람직한 양태를 참조로 하여 본 발명을 상당히 상세히 기술하였으나, 다른 버전이 가능하다. 따라서, 첨부된 청구범위의 취지 및 범위는 본원에 포함된 기술 및 바람직한 버전에 제한되지 않는다.

도면

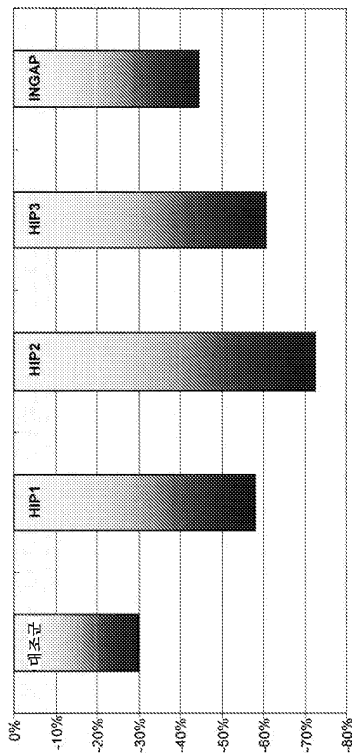
도면1

사람 프로섬 펩타이드로 1주 처리한 후 사람 인슐린 함량의 증가

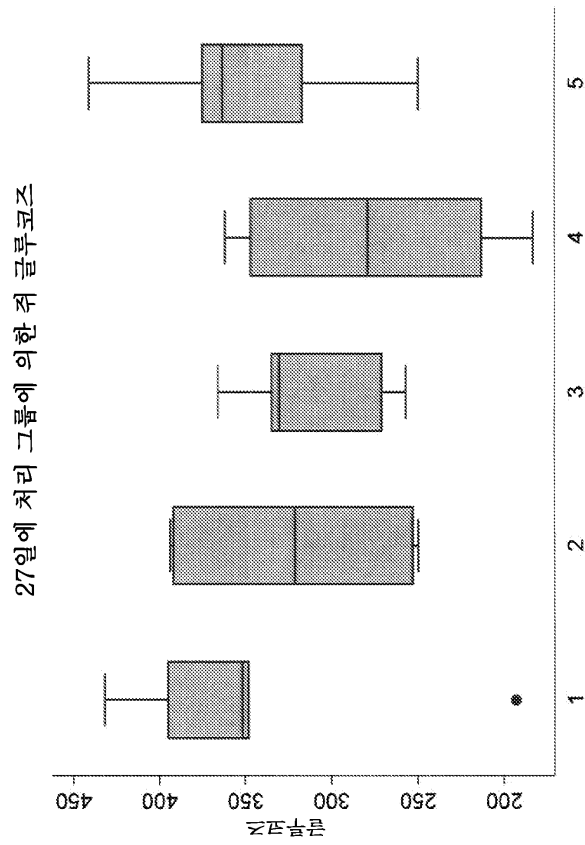


도면2

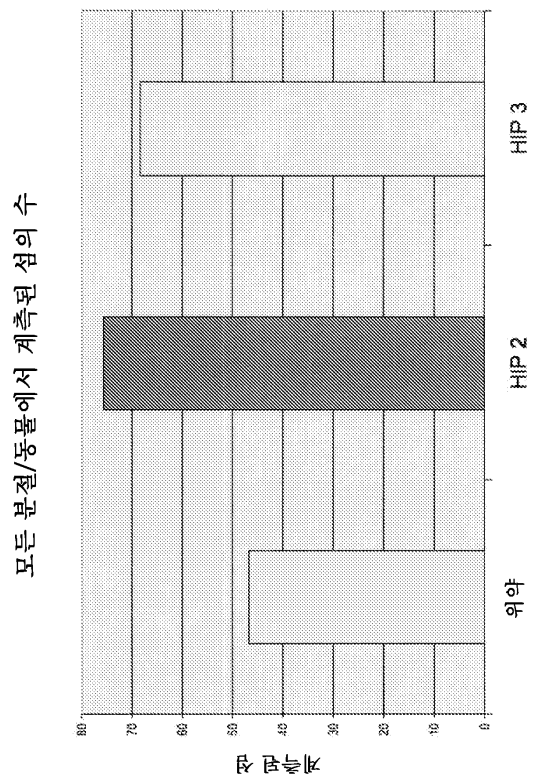
9일부터 28일까지 처리 그룹에서 인슐린 요구량의 변화 (%)



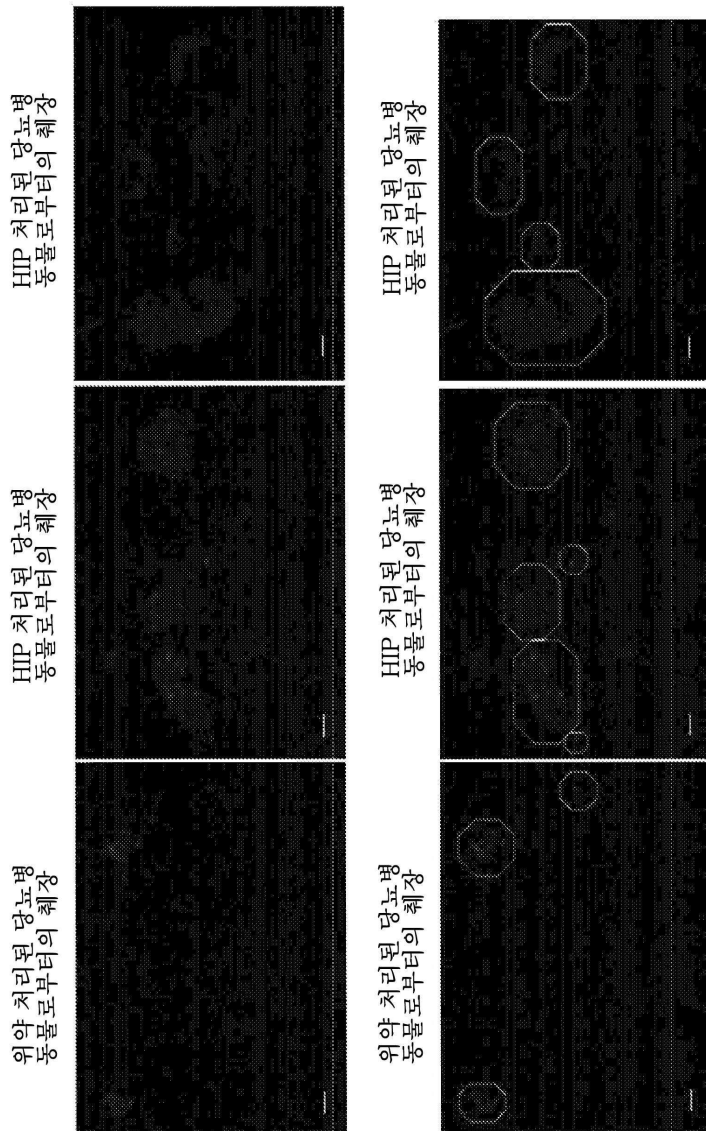
도면3



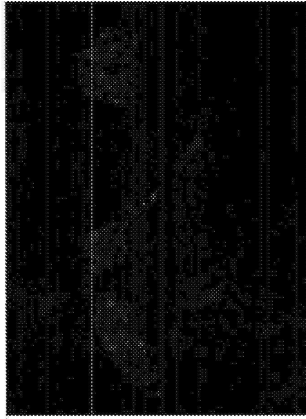
도면4a



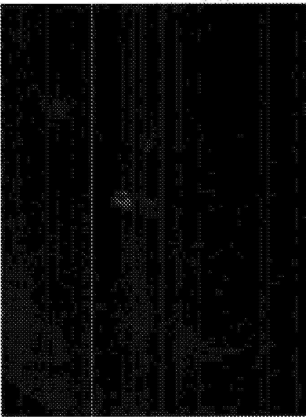
도면4b



도면5

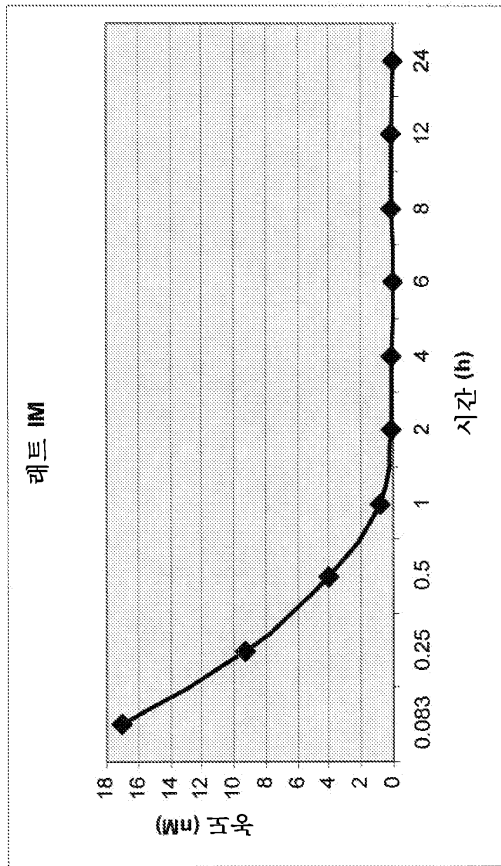


HIP-
처리군

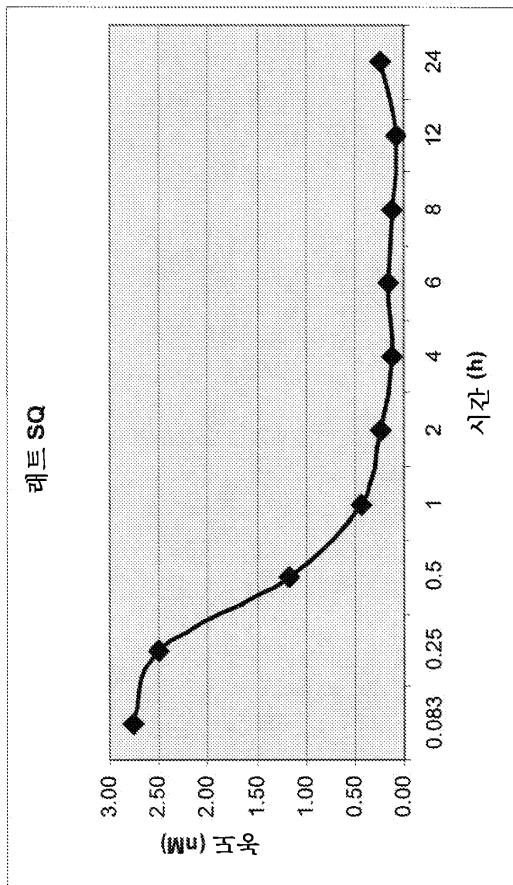


대조군

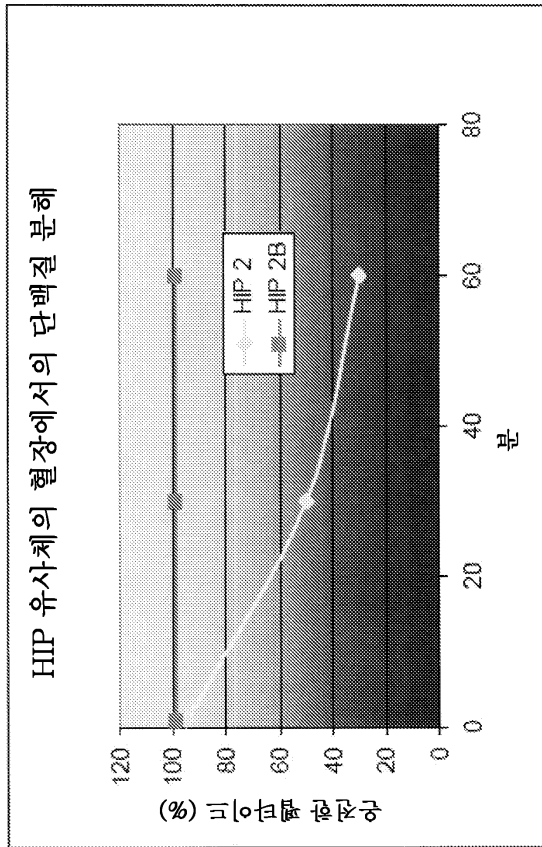
도면6



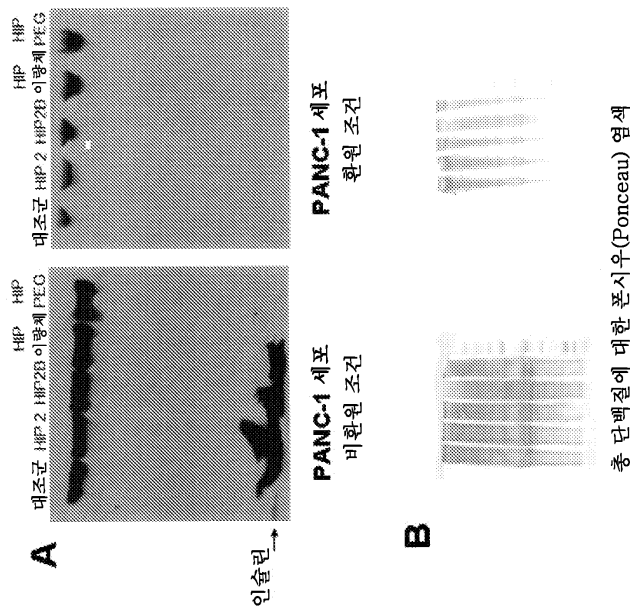
도면7



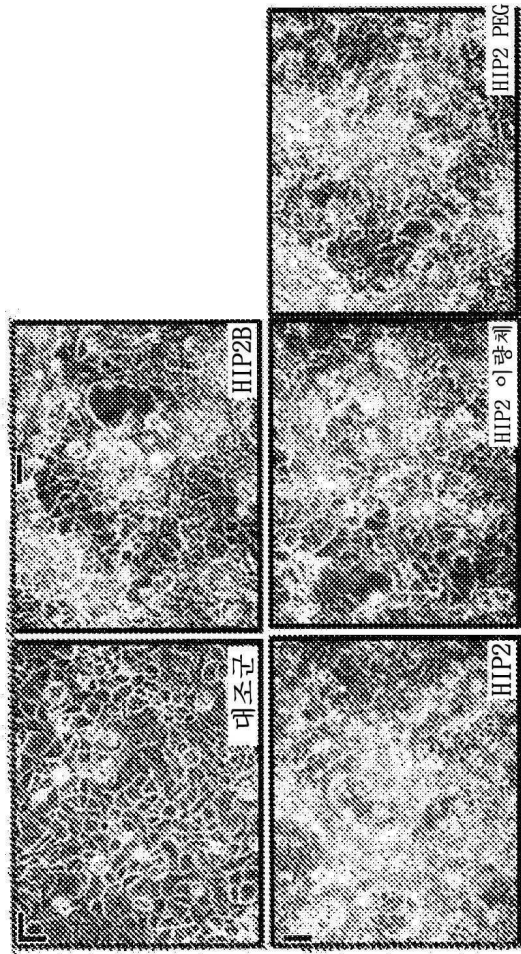
도면8



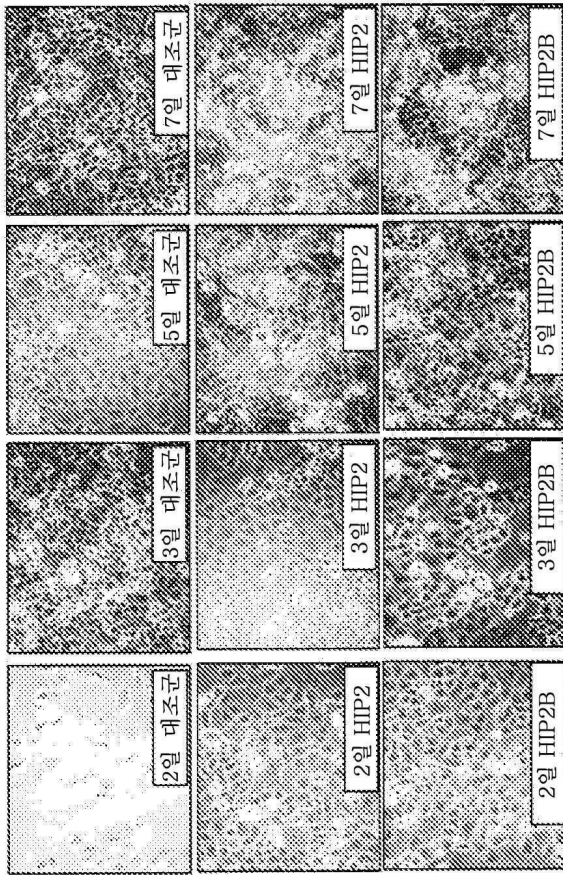
도면9



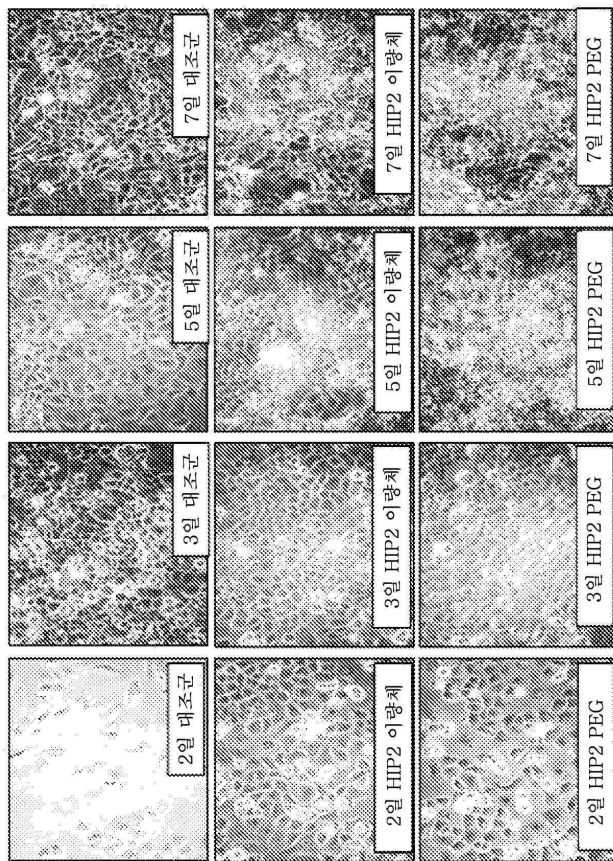
도면10a



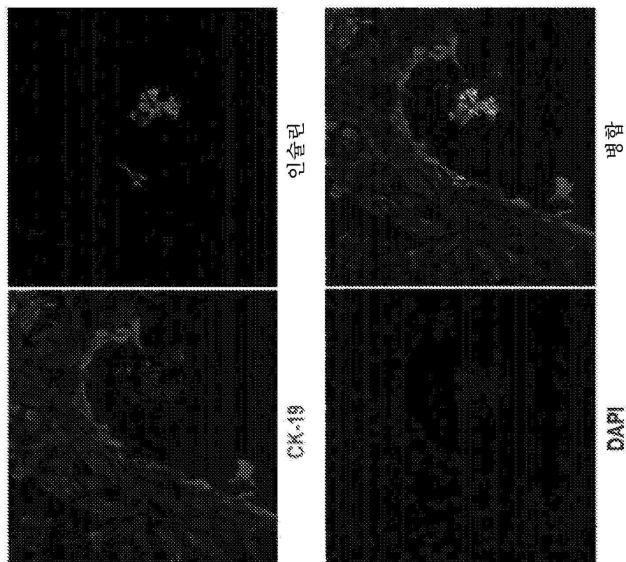
도면10b



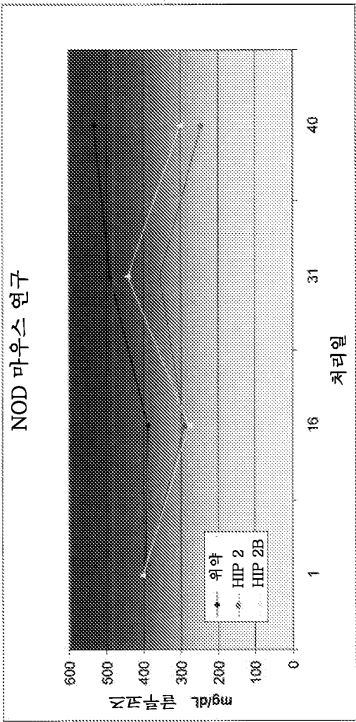
도면10c



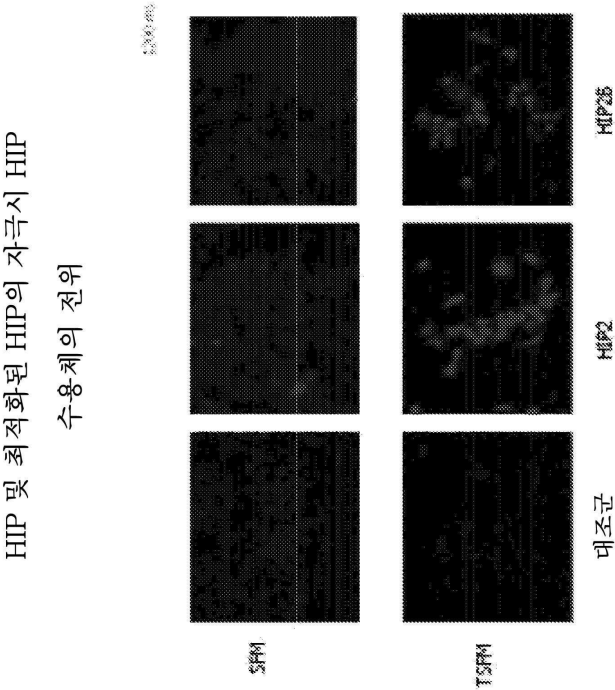
도면11



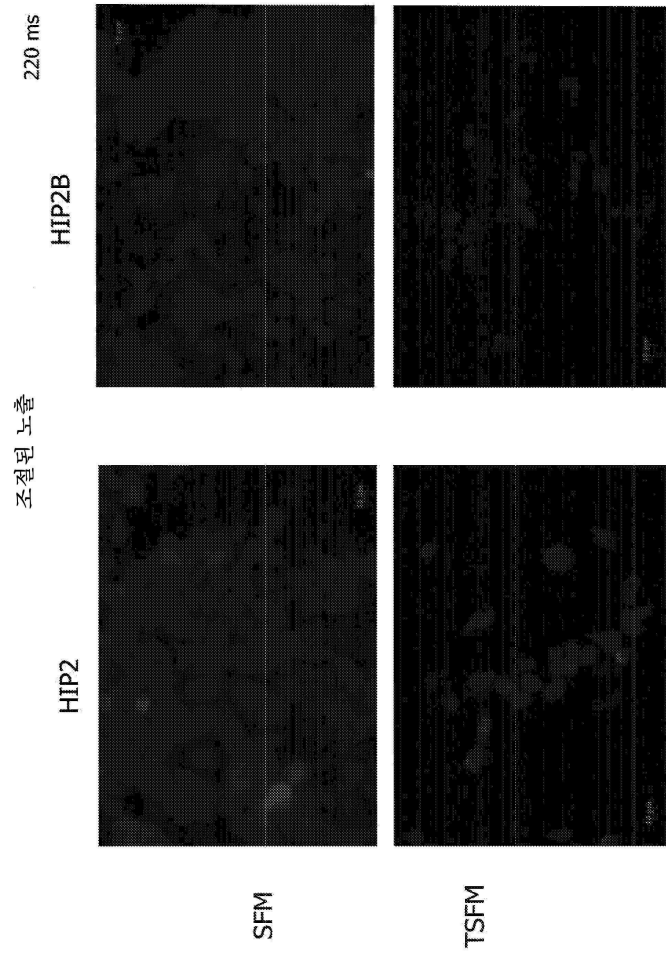
도면12



도면13

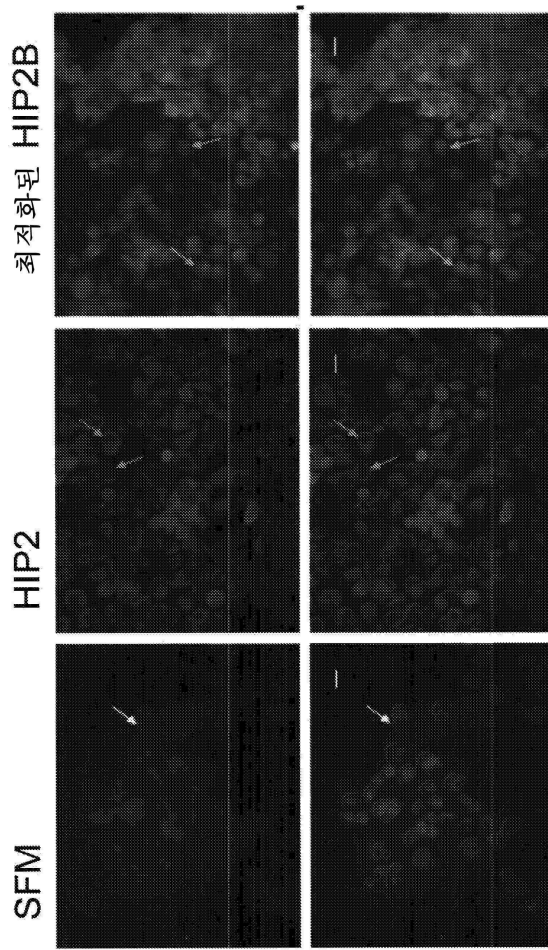


도면14



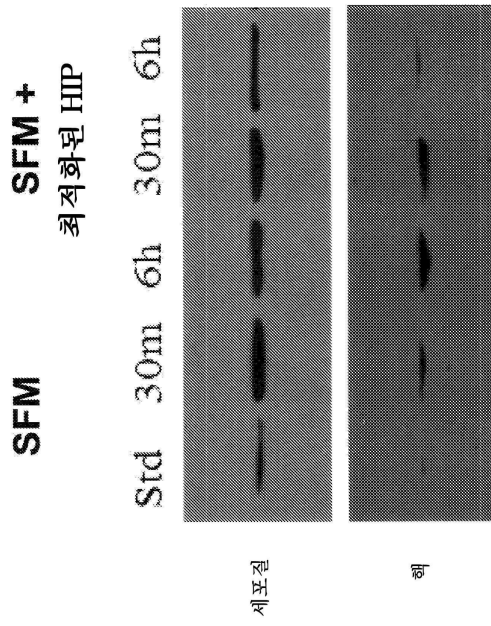
도면15

최적화된 HIP2 펩타이드로의 자극시 HIP 수용체의
세포질막으로부터 핵으로의 전위



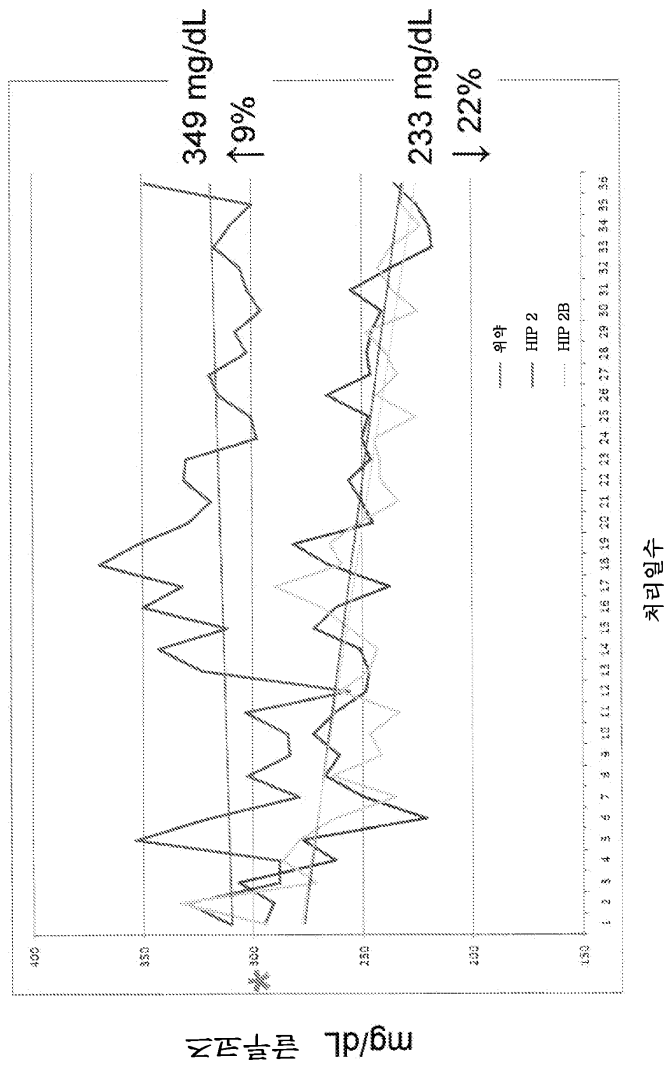
도면16

최적화된 HIP2B가 세포질로부터 핵으로의 전위 시간에 미치는 영향



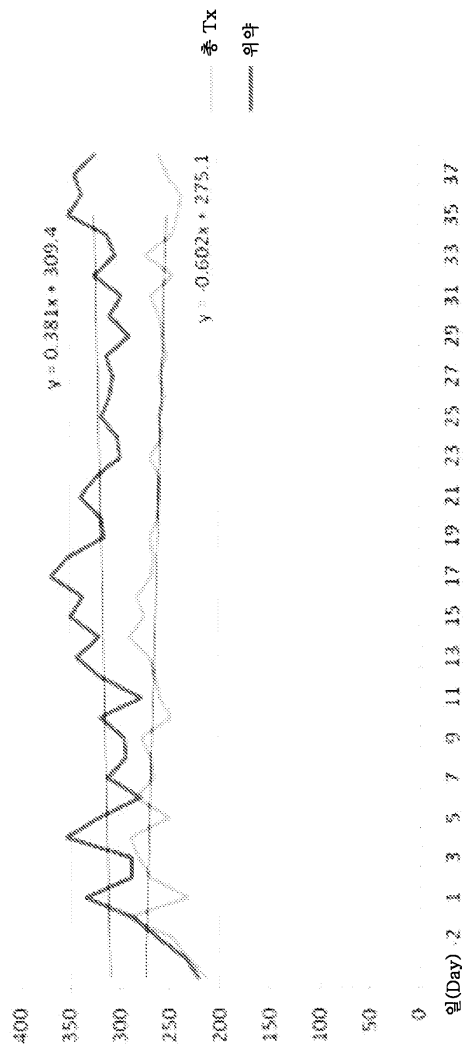
도면17

STZ-당뇨병 마우스 모델
HIP 2 및 HIP 2B 대 위약
평균적인 1일 글루코스 수준

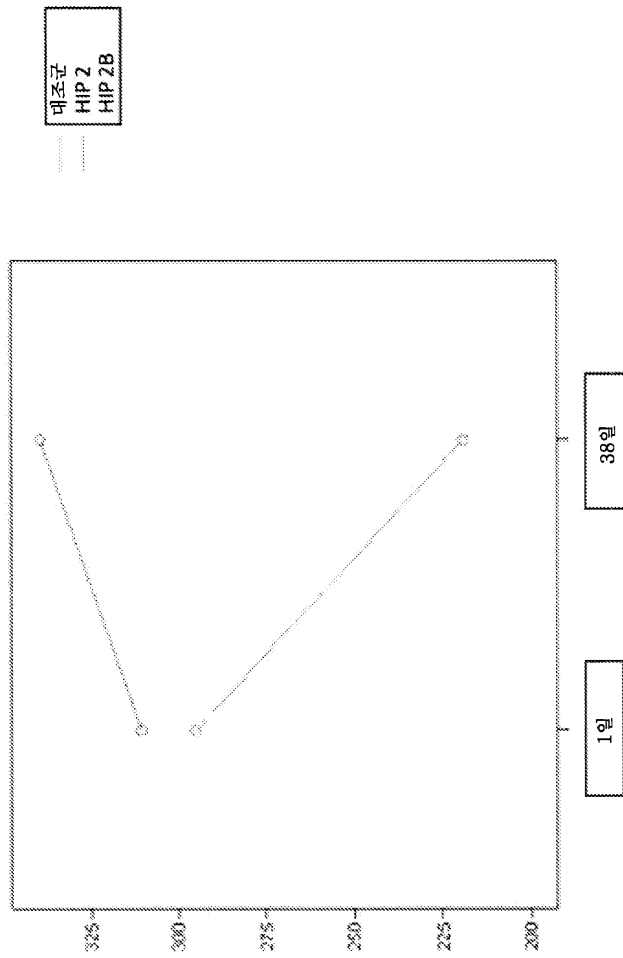


* 평균 기준선 글루코스 300+/-2% mg/dL, 그룹들간에 유의한 차이가 없음(p=0.301)

도면18

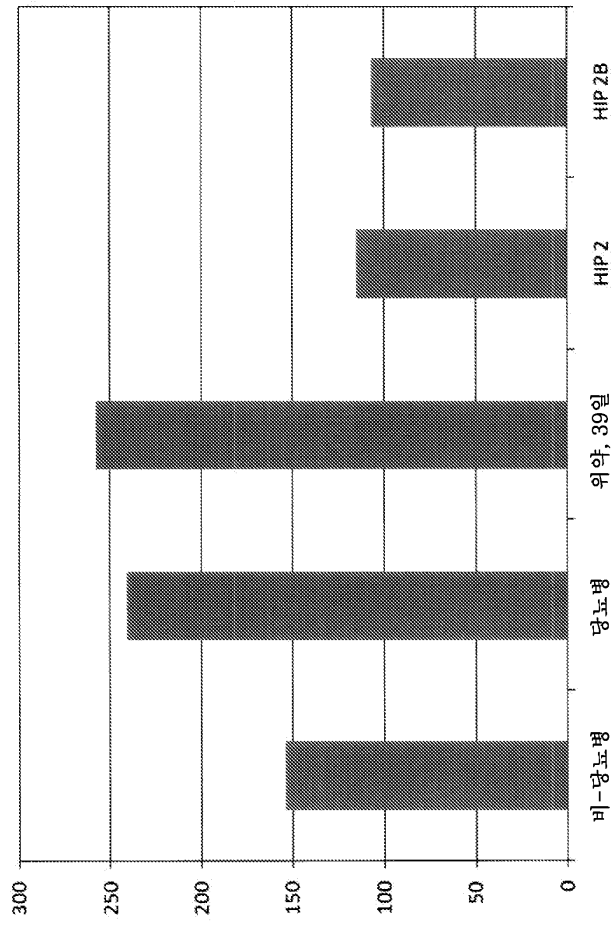


도면19



도면20

최적화된 HIP2B로 처리한 후의 공복 혈당(mg/dL) 수준

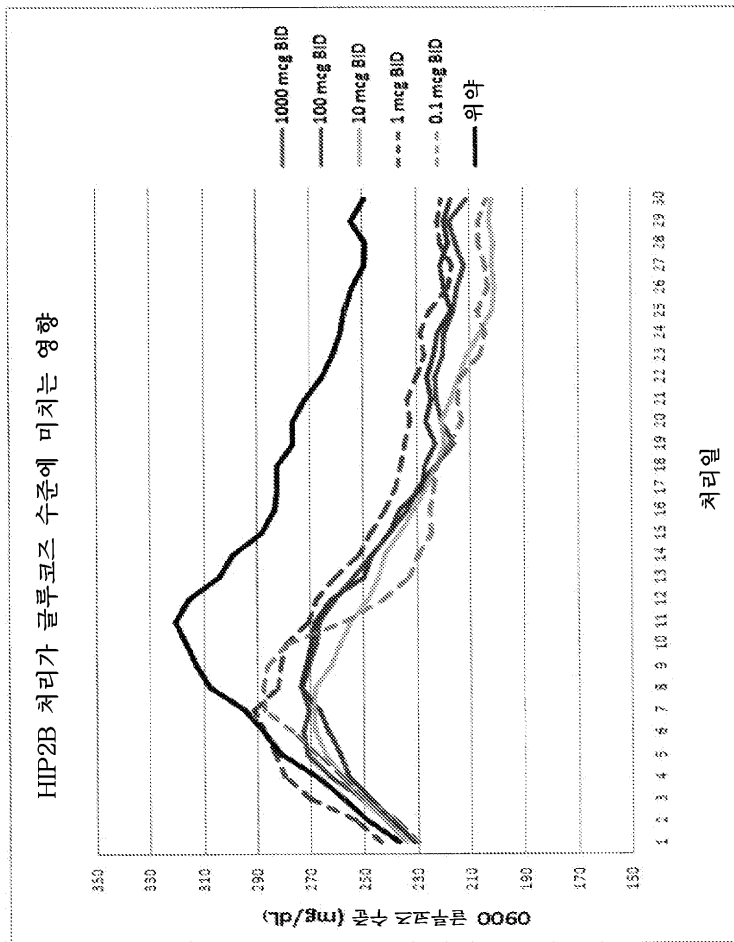


도면21

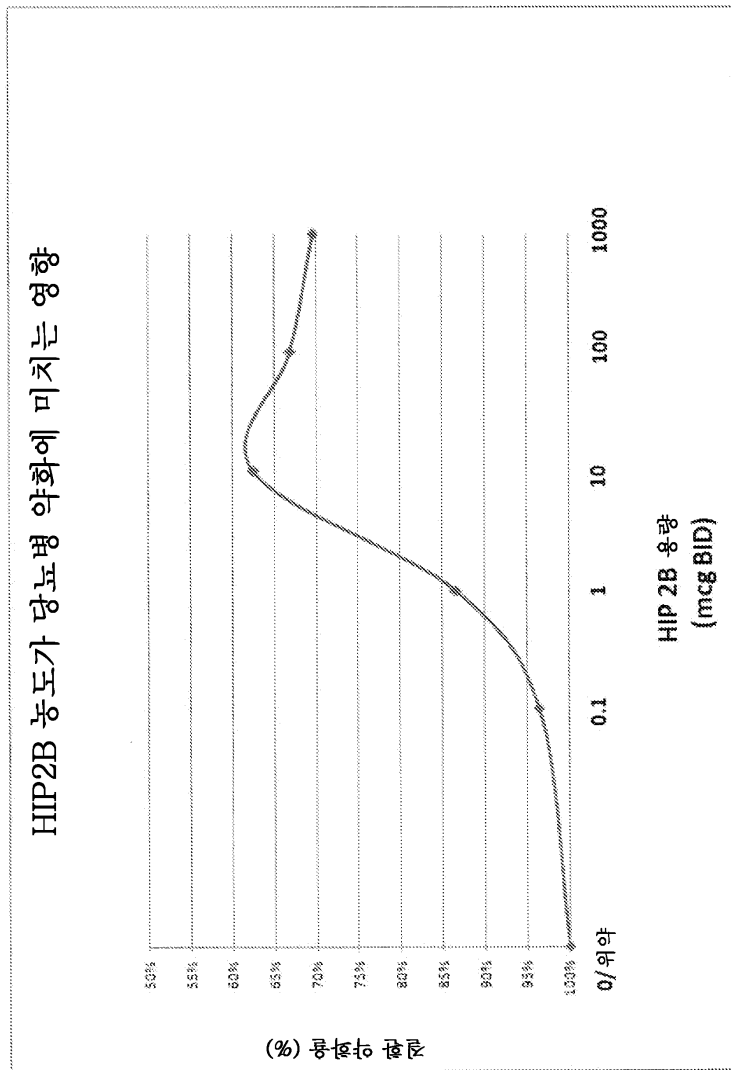
최적화된 HIP2B의 투여 후 글루코즈 내성 시험 결과



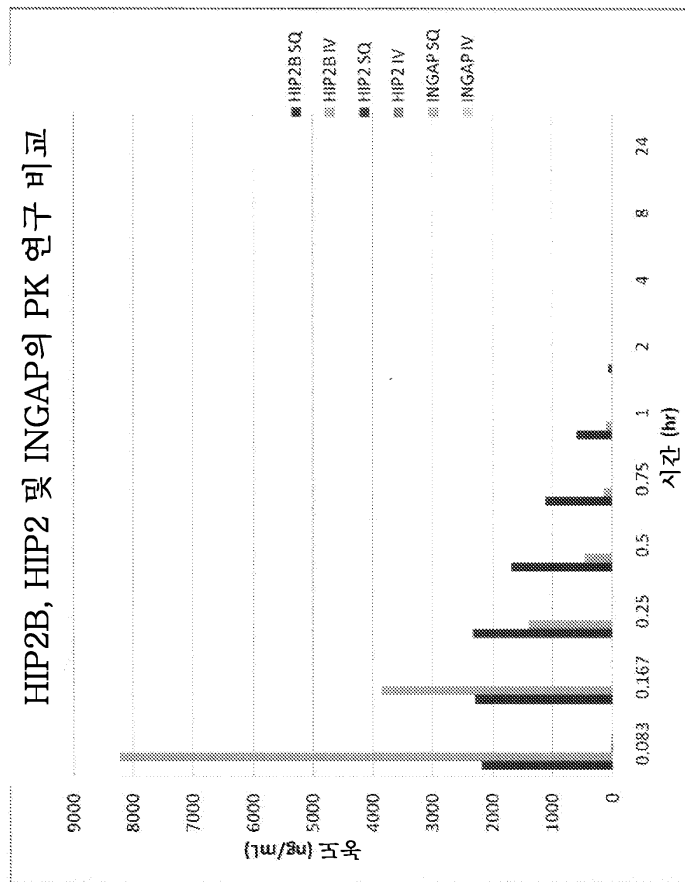
도면22



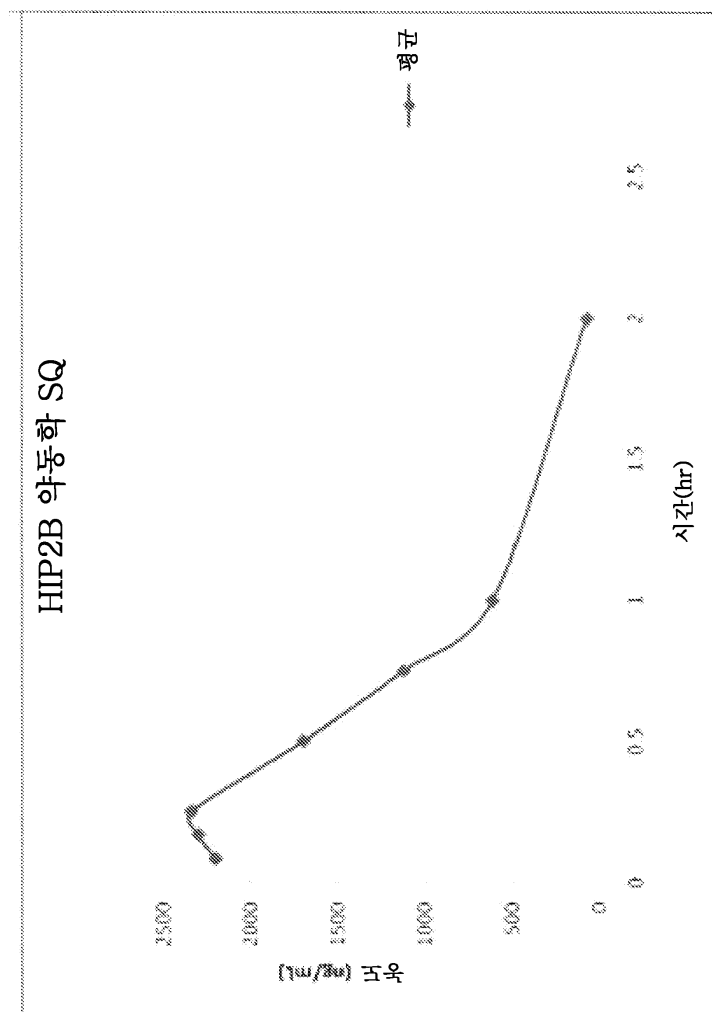
도면23



도면24



도면25



서열 목록

<110> CureDM, Inc.

<120> Compositions and methods of using proislet peptides and analogs thereof

<130> 132163.00502

<150> US 60/969,019

<151> 2007-08-30

<150> US 60/979,526

<151> 2007-10-12

<150> US 60/991,964

<151> 2007-12-03

<150> US 61/031,479

<151> 2008-02-26

<160> 94

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 528

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgctgcctc ccatggcctt gccagtgta tcttgatgc tgccttcctg cctcatgctg 60

ctgtctcagg ttcaagggtga agaaccacag aggggaactgc cctctgcacg gatccgctgt 120

cccaaaggct ccaaggccta tggctccac tgctatgcct tgtttttgtc accaaaatcc 180

tggacagatg cagatctggc ctgccagaag cggccctctg gaaacctggt gtctgtgctc 240

agtggggctg agggatcctt cgtgtcctcc ctggtgaaga gcatttgtaa cagctactca 300

tacgtctgga ttgggtccca tgacccaca cagggcaccg agcccaatgg agaaggttgg 360

gagtggagta gcagtgatgt gatgaattac ttgcatggg agagaaatcc ctccaccatc 420

tcaagccccg gccactgtgc gagcctgtcg agaagcacag catttctgag gtggaaagat 480

tataactgta atgtgaggtt accctatgtc tgcaagtcca ctgactag 528

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1 5 10 15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (15)..(15)

<400> 5

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (15)..(15)

<400>

> 6

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1 5 10 15

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (14)..(14)

<400> 7

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1 5 10 15

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> DISULFID

<222> (15)..(15)

<400> 11

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> DISULFID

<222> (17)..(17)

<400> 12

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu

1 5 10 15

Cys

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> DISULFID

<222> (15)..(15)

<400> 13

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (16)..(16)

<400> 14

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (16)..(16)

<400> 15

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (15)..(15)

<400> 16

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> DISULFID

<222> (16)..(16)

<220><221> AMIDATION

<222> (16)..(16)

<400> 17

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> DISULFID

<222> (16)..(16)

<220><221>

> AMIDATION

<222> (16)..(16)

<400> 18

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> DISULFID

<222> (15)..(15)

<220><221> AMIDATION

<222> (15)..(15)

<400> 19

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (16)..(16)

<223> PEGYLATION

<400> 20

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1 5 10 15

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (16)..(16)

<223> PEGYLATION

<400> 21

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (15)..(15)

<223> PEGYLATION

<400> 22

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> SITE

<222> (16)..(16)

<223> PEGYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (16)..(16)

<400> 23

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1 5 10 15

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> SITE

<222> (16)..(16)

<223> PEGYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (16)..(16)

<400> 24

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222>

(1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> SITE

<222> (15)..(15)

<223> PEGYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (15)..(15)

<400> 25

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 26

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser

1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 27

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser

1 5 10 15

<210> 28

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu Ser

1 5 10 15

Cys Leu Ile Leu Leu Cys Gln Val Gln Gly Glu Glu Thr Gln Lys Glu

20 25 30

Leu Pro Ser Pro Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly

35 40 45

Ser Pro Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Met Asp Ala

50 55 60

Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val Leu

65 70 75 80

Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Arg Ser Ile Ser

85 90 95

Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly

100 105 110

Ser Glu Pro Asp Gly Asp Gly Trp Glu Trp Ser Ser Thr Asp Val Met

115 120 125

Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Lys Asn Pro Ser Thr Ile Leu Asn Pro Gly

130 135 140

His Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Thr Gly Phe Leu Lys Trp Lys Asp

145 150 155 160

Tyr Asn Cys Asp Ala Lys Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Lys Asp

165 170 175

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu

1 5 10 15

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 31

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly

1 5 10 15

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 32

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser

1 5 10 15

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly

1 5 10 15

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 34

Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly

1 5 10 15

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 35

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala Gly

1 5 10 15

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 36

Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp

1 5 10 15

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 37

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly

1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 38

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 39

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly

1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 41

Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 42

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala

1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 43

Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala

1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 44

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala

1 5 10 15

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 45

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 46

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400>

> 47

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 48

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 49

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 50

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala

1 5 10

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 51

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala

1 5 10

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 52

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly

1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly

1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 54

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly

1 5 10 15

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 55

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Ser Glu Pro Asp Ala Gly

1 5 10

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 56

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp

1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 57

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly

1 5 10 15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 58

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Asp

1 5 10 15

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 60

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 61

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 63

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 64

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala

1 5 10

<210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 65

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala

1 5 10

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 66

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala

1 5 10

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 69

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210> 70

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 70

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Arg Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 71

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Ser Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 72

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 73

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 74

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 75

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg

1 5 10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Ala Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Tyr Glu Pro Asn Arg

1 5 10

<210> 79

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 79

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg

1 5 10

<210> 80

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 80

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10

<210> 82

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Ile Gly Leu His Asp Leu Ser Leu Gly Ser Leu Pro Asn Glu

1 5 10

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 83

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Ala Asn Ala

1 5 10

<210> 84

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 84

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 85

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp

1 5 10

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 86

Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Lys Gln Leu Trp Gln Trp

1 5 10

<210> 87

<211> 14

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 87

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10

<210> 88
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 88
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
 1 5 10
 <210> 89
 <211> 14

 <212> PRT
 <213> Canis familiaris
 <400> 89
 Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
 1 5 10
 <210> 90
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ovis aries
 <400> 90
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
 1 5 10
 <210> 91
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> SITE
 <222> (1)..(1)
 <223> PEGYLATION
 <400> 91
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

 1 5 10
 <210> 92
 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> ACYLATION

<220><221> AMIDATION

<222> (15)..(15)

<220><221> SITE

<222> (15)..(15)

<223> CYSTEINE ADDUCT

<400> 94

Ile Gly His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys Cys

1 5 10 15