



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138456
(43) 공개일자 2017년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
<i>C07K 16/28</i> (2006.01)	웰드 바이로테라퓨틱스, 임크
(52) CPC특허분류	미국 캘리포니아 93012 카마릴로 컨스티튜션 애비뉴 468
<i>C07K 16/2869</i> (2013.01)	(72) 발명자
<i>A61K 2039/505</i> (2013.01)	얀, 하이
(21) 출원번호 10-2017-7031693	미국 씨에이 91320, 198 비아 이네즈 싸우전드 오크스
(22) 출원일자(국제) 2016년03월31일	시, 짐
심사청구일자 없음	미국 씨에이 91362, 2746 코네요 캐년 씨티., 에이피티 #27 싸우전드 오크스
(85) 번역문제출일자 2017년11월01일	오, 정
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/025336	미국 씨에이 91320, 5002 비아 비스토사 뉴버리파크
(87) 국제공개번호 WO 2016/161154	(74) 대리인
국제공개일자 2016년10월06일	허용록
(30) 우선권주장	
62/142,257 2015년04월02일 미국(US)	

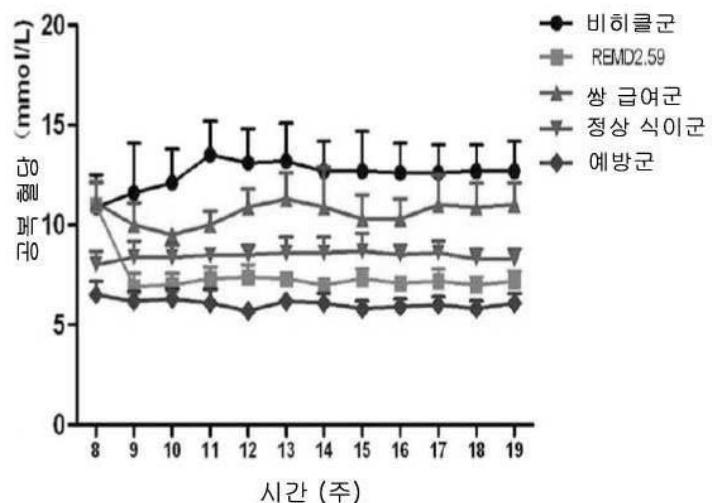
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 글루카곤 수용체 길항 항체를 이용한 비만 및 비알콜성 지방간 질환 또는 비알콜성 지방간염의 치료 방법

(57) 요 약

본 발명은 글루카곤 수용체 차단제를 이용한 비만 및/또는 비알콜성 지방간 질환 (NAFLDs) 및/또는 비알콜성 지방간염 (NASH)의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하고 인간 글루카곤 수용체의 기능을 길항하는, 항원 결합 및 길항 단백질인 완전 인간 항체를 이용한 NAFLD/NASH의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2319/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

비알콜성 지방간염(NASH)으로 진단된 피험자에게, 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 비알콜성 지방간염의 치료 방법.

청구항 2

비알콜성 지방간염(NASH)으로 진단된 피험자에게, (a) 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질; 및 (b) 항-비만제를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 비알콜성 지방간염의 치료 방법.

청구항 3

제 3항에 있어서, 항-비만제는 장-선택성 MTP 저해제, CCKa 작용제, 5HT2c 작용제, MCR4 작용제, 리파제 저해제, 오피오이드 길항제, 올레일-에스트론, 오비네피티드, 프람린티드 (SYMLIN®), 테소펜신, 렙틴, 브로모크립틴, 오르리스타트, AOD-9604 및 시부트라민으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

비알콜성 지방간 질환(NAFLD)으로 진단된 피험자에게, 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 비알콜성 지방간 질환의 치료 방법.

청구항 5

비알콜성 지방간 질환(NAFLD)로 진단된 피험자에게, (a) 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질; 및 (b) 항-비만제를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 비알콜성 지방간 질환의 치료 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 항-비만제는 장-선택성 MTP 저해제, CCKa 작용제, 5HT2c 작용제, MCR4 작용제, 리파제 저해제, 오피오이드 길항제, 올레일-에스트론, 오비네피티드, 프람린티드 (SYMLIN®), 테소펜신, 렙틴, 브로모크립틴, 오르리스타트, AOD-9604 및 시부트라민으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 비만으로 분류된 (체질량 지수 (BMI)가 30 kg/m^2 이상인) 피험자의 치료 방법.

청구항 8

(a) 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질; 및 (b) 항-비만제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 비만으로 분류된 피험자의 치료 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 항-비만제는 장-선택성 MTP 저해제, CCKa 작용제, 5HT2c 작용제, MCR4 작용제, 리파제 저해제, 오피오이드 길항제, 올레일-에스트론, 오비네피티드, 프람린티드 (SYMLIN®), 테소펜신, 렙틴, 브로모크립틴, 오르리스타트, AOD-9604 및 시부트라민으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 완전 인간 항체, 인간화 항체,

카메라 항체, 단일클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv, dAb, 나노체, 단일체, 이중체 및 반체로부터 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 길항 항체 또는 항체 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 분리된 길항 항체 또는 항체 단편은 적어도 1×10^{-7} M, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M의 해리 상수 (K_D)를 갖는 인간 글루카곤 수용체에 특이 적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 분리된 길항 항체는 완전 인간 항체인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 완전 인간 항체는 서열번호: 2의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 3의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 인간 항-GCGR 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 완전 인간 항체는 서열번호: 4의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 5의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 인간 항-GCGR 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 15

제 12항에 있어서, 완전 인간 항체는 서열번호: 6의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 7의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 인간 항-GCGR 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 16

제 12항에 있어서, 완전 인간 항체는 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 서열번호: 24, 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27 및 서열번호: 28로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 17

제 12항에 있어서, 완전 인간 항체는 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 서열번호: 46 및 서열번호: 47로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 18

제 12항에 있어서, 완전 인간 항체는 서열번호: 28의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 47의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 인간 항-GCGR 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 19

제 12항에 있어서, 완전 인간 항체는 서열번호: 51의 중쇄를 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 52의 경쇄를 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 인간 항-GCGR 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 20

제 10항에 있어서, 분리된 길항 항체는 서열번호: 8의 중쇄를 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 9의 경쇄를 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 키메라 항체인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량은 매주 0.001 내지 100 mg/kg, 0.001 내지 90 mg/kg, 0.001 내지 80 mg/kg, 0.001 내지 70 mg/kg, 0.001 내지 60 mg/kg, 0.001 내지 50 mg/kg, 0.001 내지 40 mg/kg, 0.001 내지 30 mg/kg, 0.001 내지 20 mg/kg, 0.001 내지 10 mg/kg, 0.001 내지 5 mg/kg, 0.001 내지 4 mg/kg, 0.001 내지 3 mg/kg, 0.001 내지 2 mg/kg, 0.001 내지 1 mg/kg, 0.010 내지 50 mg/kg, 0.010 내지 40 mg/kg, 0.010 내지 30 mg/kg, 0.010 내지 20 mg/kg, 0.010 내지 10 mg/kg, 0.010 내지 5 mg/kg, 0.010 내지 4 mg/kg, 0.010 내지 3 mg/kg, 0.010 내지 2 mg/kg, 0.010 내지 1 mg/kg, 0.1 내지 50 mg/kg, 0.1 내지 40 mg/kg, 0.1 내지 30 mg/kg, 0.1 내지 20 mg/kg, 0.1 내지 10 mg/kg, 0.1 내지 5 mg/kg, 0.1 내지 4 mg/kg, 0.1 내지 3 mg/kg, 0.1 내지 2 mg/kg, 0.1 내지 1 mg/kg, 0.5 내지 50 mg/kg, 0.5 내지 40 mg/kg, 0.5 내지 30 mg/kg, 0.5 내지 20 mg/kg, 0.5 내지 10 mg/kg, 0.5 내지 5 mg/kg, 0.5 내지 4 mg/kg, 0.5 내지 3 mg/kg, 0.5 내지 2 mg/kg, 0.5 내지 1 mg/kg, 1 내지 50 mg/kg, 1 내지 40 mg/kg, 1 내지 30 mg/kg, 1 내지 20 mg/kg, 1 내지 10 mg/kg, 1 내지 5 mg/kg, 1 내지 4 mg/kg, 1 내지 3 mg/kg, 1 내지 2 mg/kg, 및 0.1 내지 1 mg/kg 체중으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량은 매주 0.01 내지 10 mg/kg 체중인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량은 격주로 0.01 내지 10 mg/kg 체중인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 24

제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 환자에게 전신 투여하기 위한 약학 조성물을 형성하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 25

제 24항에 있어서, 전신 투여는 정맥내 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 복강내 주사, 경피 주사, 동맥내 주사, 흉골내(intrasternal) 주사, 척수강내 (intrathecal) 주사, 뇌실내(intraventricular) 주사, 요도내 (intraurethral) 주사, 두개내(intracranial) 주사, 활막내(intrasyновial) 주사 또는 주입을 통해 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 26

비알콜성 지방간염(NASH)의 치료, 예방 및/또는 방지를 필요로 하는 피험자에서 비알콜성 지방간염의 치료, 예방 및/또는 방지용 약제의 제조를 위해, 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도.

청구항 27

비알콜성 지방간 질환(NAFLD)의 치료, 예방 및/또는 방지를 필요로 하는 피험자에서 비알콜성 지방간 질환의 치료, 예방 및/또는 방지용 약제의 제조를 위해, 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도.

청구항 28

비만으로 분류된 (체질량 지수 (BMI)가 30 kg/m² 이상인) 피험자의 치료를 위한 약제의 제조를 위해 인간 글루

카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 특허 출원

본 출원은 2015년 4월 2일에 출원된 미국 가출원 번호 제 62/142,257호의 이익을 주장하고, 본 명세서에 전체 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 비만은 식욕 조절 및/또는 신진 대사의 복잡한 의학적 장애로 인해 지방 조직 덩어리가 과도하게 축적된다. 비만은 중요한 임상 문제이며, 서구 문화에서는 유행성 질환이 되어, 미국 성인 인구의 3분의 1 이상에 영향을 준다. 미국에서 약 9,700만 명의 성인이 과체중 또는 비만으로 추정된다. 비만은 조기 사망 및 뇌졸중, 심근경색, 울혈성 심부전, 관상 동맥 심장 질환 및 급사로 인한 사망률 (mortality) 및 이환율 (morbidity)의 현저한 증가와 더 관련된다. 또한, 비만은 독립적으로 및 다른 질병과 관련하여 많은 건강 문제를 악화시킨다. 비만 치료의 주요 목표는 과체중을 줄이고, 비만-관련 이환율과 사망률을 개선 또는 예방하고, 장기적인 체중 감량을 유지하는 것이다.

[0004] 또한, 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD)은 이의 더 공격적 형태인 비알콜성 지방간염 (NASH)을 포함하여, 비만 확산과 동시에 급속한 확산으로 증가하고 있다 (Sowers JR et al., *Cardiorenal Med*, 1:5-12, 2011). 비만과 NAFLD의 급격한 증가는, 지난 30년간 미국에서 과당(fructose) 소비가 2배 이상 증가하였기 때문에, 어느 정도는, 많은 양의 지방과 당 (예를 들어, 자당(sucrose) 또는 과당)을 함유한 서구식 식이 (WD)의 소비에 기인한 것으로 보인다 (Barrera et al, *Clin Liver Dis*, 18:91-112, 2014). NAFLD는 알콜을 거의 또는 전혀 소비하지 않는 개인에서 발생하는 간의 거대수포성 지방증 (macrovesicular steatosis)을 특징으로 한다. NAFLD의 조직학적 스펙트럼은 지방증 단독, 지방간 및 염증의 존재를 포함한다. NASH는 만성 염증을 유도하여 간경변증, 간세포암증 (hepatocellular carcinoma, HCC)으로 이어질 수 있고, 궁극적으로는 간부전 및 사망에 이를 수 있는 진행성 섬유증 (흉터)을 유발한다는, 여전히 불완전하게 이해되고 있는 이유 때문에, 간에서 과도한 지방 축적을 특징으로 하는 보다 심각한 만성 간 질환이다 (Brunt et al., *Am. J. Gastroenterol*. 94:2467-2474, 1999; Brunt, *Semin. Liver Dis*. 21:3-16, 2001; Takahashi Y et al., *World J Gastroenterol*, 18:2300-2308, 2012).

[0005] NASH가 점점 더 널리 퍼지게되어 미국인의 2%-5%와 세계 인구의 2%-3%에 영향을 미치고 있지만 (Neuschwander-Tetri BA, *Am J Med Sci*, 330:326-335, 2005), 그 근본 원인은 아직도 명확하지 않다. 중년 및 과체중 또는 비만인 사람에게서 가장 흔하게 발생한다. NASH를 가진 많은 피험자는 혈중 지질 (예를 들어, 콜레스테롤 및 중성지방)을 상승시키고, 고인슐린혈증, 인슐린 저항성을 가지며, 많은 사람들이 당뇨병 또는 당뇨병전증 (prediabetes)을 앓고 있다. 그러나 모든 비만인이나 또는 모든 당뇨병을 앓고 있는 피험자가 NASH를 가지고 있는 것은 아니다. 또한, NASH를 가진 일부 피험자는 비만하지 않으며, 당뇨병이 없고, 정상 혈중 콜레스테롤과 지질을 가지고 있다. NASH는 어떤 명백한 위험 요인 없이 발생할 수 있으며, 어린이에서도 발생할 수 있다. 따라서, NASH는 단순히 간에 영향을 미치는 비만이 아니다. 현재, NASH에 대한 특별한 치료법은 존재하지 않는다. 이 질환에 걸린 사람들에게 주어진 가장 중요한 권고 사항은 에어로빅 운동, 식이 요법 및 식습관 조절, 및 체중 감량 (비만 또는 과체중인 경우)이다.

[0006] 지속적인 발전이 있었지만, 비만과 이의 의학적 결과 및 이의 치료를 위한 새로운 방법의 근거가 되는 분자 메커니즘에 대해 더 많은 연구가 절실히 필요하다. 유사하게, 당뇨병 및 비-당뇨병 피험자에서 NAFLDs를 치료하거나 또는 예방하는 새로운 방법에 대한 필요성이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 항원 결합 및 길항 단백질이 당뇨병 및 비-당뇨병 피험자에서 식이 유도성 비만 (diet induced obesity, DIO)의 치료 및 NAFLD/NASH의 치료를 위한 개선되고 효과적인 치료법을 제공할 수 있다는 발명자의 독특한 통찰력에 부분적으로 기초한다. 본 발명자들은 (글루카곤

수용체의 차단을 통해) DIO 및/또는 NAFLD/NASH 피험자에서 포도당 생성을 조절함으로써 제공되는 유익한 치료 효과가, 인슐린 저항성의 감소; 고인슐린혈증의 감소 또는 예방; 간에서 지방 축적의 감소 또는 예방; 간에서 염증의 감소 또는 예방; 지질의 축적, 예를 들어, 간 트리아실글리세롤, 간 디아실글리세롤 및 세라미드의 감소 또는 예방; 및 간 손상의 예방을 포함할 수 있음을 제안한다.

[0008] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 NAFLD/NASH로 진단된 피험자 또는 NAFLD/NASH에 걸릴 위험이 있는 피험자에게 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 NAFLD/NASH의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 완전 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv, dAb, 나노체(nanobody), 단일체(unibody), 또는 이중체(diabody)로부터 선택된 항체를 포함한다. 다양한 실시예에서, 항체는 완전 인간 단일클론 항체이다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NAFLD의 치료 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NASH의 치료 방법을 포함한다.

[0009] 다른 측면에서, 본 발명은 NAFLD/NASH로 진단된 피험자 또는 NAFLD/NASH에 걸릴 위험이 있는 피험자에게, (a) 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질; 및 (b) 항-비만제를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 NAFLD/NASH의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 완전 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv, dAb, 나노체, 단일체, 또는 이중체로부터 선택된 항체를 포함한다. 다양한 실시예에서, 항체는 완전 인간 단일클론 항체이다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NAFLD의 치료 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NASH의 치료 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 항-비만제는 장-선택성 MTP 저해제, CCKa 작용제, 5HT2c 작용제, MCR4 작용제, 리파제 저해제, 오피오이드 길항제, 올레일-에스트론, 오비네피티드, 프람린티드 (SYMLIN®), 테소펜신, 렙틴, 브로모크립틴, 오르리스타트, AOD-9604 및 시부트라민으로부터 선택된다.

[0010] 다른 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 비만으로 분류된 (예를 들어, 체질량 지수 (BMI)가 30 kg/m² 이상인) 피험자의 치료 방법에 관한 것이다. 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 완전 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv, dAb, 나노체, 단일체, 또는 이중체로부터 선택된 항체를 포함한다. 다양한 실시예에서, 항체는 완전 인간 단일클론 항체이다.

[0011] 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질; 및 (b) 항-비만제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 비만으로 분류된 (예를 들어, 체질량 지수 (BMI)가 30 kg/m² 이상인) 피험자의 치료 방법에 관한 것이다. 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 완전 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv, dAb, 나노체, 단일체, 또는 이중체로부터 선택된 항체를 포함한다. 다양한 실시예에서, 항체는 완전 인간 단일클론 항체이다. 다양한 실시예에서, 항-비만제는 장-선택성 MTP 저해제, CCKa 작용제, 5HT2c 작용제, MCR4 작용제, 리파제 저해제, 오피오이드 길항제, 올레일-에스트론, 오비네피티드, 프람린티드 (SYMLIN®), 테소펜신, 렙틴, 브로모크립틴, 오르리스타트, AOD-9604 및 시부트라민으로부터 선택된다.

[0012] 다른 측면에서, 본 발명은 비알콜성 지방간염 (NASH)의 치료, 예방 및/또는 방지를 필요로 하는 피험자에서 비알콜성 지방간염 (NASH)의 치료, 예방 및/또는 방지용 약제의 제조를 위해 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

[0013] 다른 측면에서, 본 발명은 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD)의 치료, 예방 및/또는 방지를 필요로 하는 피험자에서 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD)의 치료, 예방 및/또는 방지용 약제의 제조를 위해 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

[0014] 다른 측면에서, 본 발명은 비만으로 분류된 (예를 들어, 체질량 지수 (BMI)가 30 kg/m² 이상인) 피험자의 치료를 위한 약제의 제조를 위해 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

- [0015] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 적어도 약 1×10^{-7} M, 적어도 약 1×10^{-8} M, 적어도 약 1×10^{-9} M, 적어도 약 1×10^{-10} M, 적어도 약 1×10^{-11} M, 또는 적어도 약 1×10^{-12} M의 해리 상수 (K_D)를 갖는 인간 글루카곤 수용체에 결합한다.
- [0016] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 서열번호: 2의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 3의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 완전 인간 항체이다.
- [0017] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 서열번호: 4의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 5의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 완전 인간 항체이다.
- [0018] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 서열번호: 6의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 7의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 완전 인간 항체이다.
- [0019] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 서열번호: 24, 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27 및 서열번호: 28로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 완전 인간 항체이다.
- [0020] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 서열번호: 46 및 서열번호: 47로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 완전 인간 항체이다.
- [0021] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 서열번호: 28의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 47의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 완전 인간 항체이다.
- [0022] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 결합 단백질은 서열번호: 51의 중쇄를 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 52의 경쇄를 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 완전 인간 항체이다.
- [0023] 다양한 실시예에서, 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질은 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합하여 정맥내 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 복강내 주사, 경피 주사, 동맥내 주사, 흉골내(intrasternal) 주사, 척수강내(intrathecal) 주사, 뇌실내(intraventricular) 주사, 요도내(intraurethral) 주사, 두개내(intracranial) 주사, 활막내(intrasyновial) 주사를 통해 또는 주입을 통해 피험자에게 전신 투여될 수 있는 약학 조성물을 형성할 것이다.
- 과제의 해결 수단**
- [0024] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥에 의해 별도로 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이고 복수 용어는 단수를 포함할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화의 기술과 관련하여 사용되는 명명법은 당해 기술분야에서 일반적으로 사용되고 잘 알려진 기술이다. 본 발명의 방법 및 기술은 별도의 표시가 없으면 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적이고 더 구체적인 문현들에 기재된 대로 일반적으로 당해 기술분야에서 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 수행된다. 참조, 예를 들어, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 참조로 본 명세서에 포함된다. 효소 반응 및 정제 기술은 당해 기술분야에서 통상적으로 달성되는 바와 같이 또는 본 명세서에 기재된 바와 같이, 제조업자의 설명서에 따라 수행된다. 본 명세서에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 제약 화학의 실험 과정 및 기술과 관련하여 사용되는 명명법은 당해 기술분야에서 일반적으로 사용되고 잘 알려진 기술이다. 표준 기술은 화학 합성, 화학 분석, 제약 제제, 제형, 및 전달, 및 피험자의 치료에 사용된다.
- 정의**
- [0026] 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질" 각각은 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2 이상의 아미노산 잔기를

포함하는 분자를 나타낸다. 이들 용어는 단백질 서열의 천연 및 인공 단백질, 단백질 단편 및 폴리펩티드 유사체 (예를 들어, 뮤테인, 변이체 및 융합 단백질) 및 번역-후, 또는 다른 공유적으로 또는 비-공유적으로, 변형된 단백질을 포함한다. 웨프티드, 폴리웨프티드, 또는 단백질은 단량체 또는 다량체일 수 있다. 특정 실시예에서, "웨프티드", "폴리웨프티드" 및 "단백질"은 알파 탄소가 웨프티드 결합을 통해 연결된 아미노산의 사슬이다. 따라서, 사슬의 한쪽 끝에 있는 말단 아미노산 (아미노 말단)은 유리 아미노기를 가지는 반면, 사슬의 다른쪽 끝에 있는 말단 아미노산 (카복시 말단)은 유리 카복실기를 가진다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "아미노 말단" (N-말단으로 약칭함)은 웨프티드의 아미노 말단에서 아미노산 위의 유리 α -아미노기 또는 웨프티드 내 다른 위치에 있는 아미노산의 α -아미노기 (웨프티드 결합에 참여할 때 이미노기)를 나타낸다. 유사하게, 용어 "카복시 말단"은 웨프티드의 카복시 말단 위의 유리 카복실기 또는 웨프티드 내 다른 위치에 있는 아미노산의 카복실기를 나타낸다. 또한, 웨프티드는 본질적으로 아미드 결합과는 반대로 에테르에 의해 연결된 아미노산과 같은 웨프티드 모방체를 포함하는 임의의 폴리아미노산을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0027] 폴리뉴클레오티드 및 폴리웨프티드 서열은 1-문자 또는 3-문자 약어를 사용하여 나타낸다. 별도의 표시가 없으면, 폴리웨프티드 서열은 왼쪽에 이들의 아미노 말단 및 오른쪽에 이들의 카복시 말단을 가지며, 단일-가닥 핵산 서열 및 이중-가닥 핵산 서열의 상부 가닥은 왼쪽에 이들의 5' 말단 및 오른쪽에 이들의 3' 말단을 가진다. 폴리웨프티드의 특정 부분은 아미노산 80 내지 119와 같은 아미노산 잔기 번호 또는 Ser80 내지 Ser119와 같은 그 위치의 실제 잔기에 의해 지정될 수 있다. 또한, 특정 폴리웨프티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 이것이 기준 서열과 어떻게 다른지 설명함으로써 기재될 수 있다.

[0028] 본 발명의 폴리웨프티드는 (1) 단백질 가수분해에 대한 민감성 감소, (2) 산화에 대한 민감성 감소, (3) 단백질 복합체의 형성에 대한 결합 친화도 변화, (4) 결합 친화도 변화, 및 (5) 기타 물리화학적 또는 기능적 특성 부여 또는 변형을 위해, 임의의 방식으로 그리고 임의의 이유로 변형된 폴리웨프티드를 포함한다. 예를 들어, 단일 또는 다수의 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 아미노산 치환)은 자연적으로 발생하는 서열 (예를 들어, 분자 간 접촉할 때 형성하는 도메인(들) 바깥쪽 폴리웨프티드 부분)에서 될 수도 있다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산의 폴리웨프티드에서 기능적으로 유사한 아미노산으로의 치환을 나타낸다. 하기의 6개 군은 각각 서로에게 보존적 치환인 아미노산을 함유한다:

[0029] 알라닌 (A), 세린 (S), 및 트레오닌 (T)

[0030] 아스파르트산 (D) 및 글루탐산 (E)

[0031] 아스파라긴 (N) 및 글루타민 (Q)

[0032] 아르기닌 (R) 및 리신 (K)

[0033] 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 및 발린 (V)

[0034] 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 및 트립토판 (W)

[0035] "비-보존적 아미노산 치환"은 이들 부류 중 하나의 일원을 다른 부류의 일원으로 치환하는 것을 나타낸다. 이러한 변화를 주는데 있어서, 특정 실시예에 따라, 아미노산의 수치요법 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각 아미노산은 이의 소수성과 전하 특성을 기준으로 하여 수치요법 지수를 부여하였다: 이들은 이소류신 (+4.5); 발린 (+4.2); 류신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 리신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5)이다.

[0036] 단백질 상에 상호작용하는 생물학적 기능을 부여하는데 있어서 아미노산의 수치요법 지수의 중요성은 당해 기술 분야에서 이해된다 (참조, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). 특정 아미노산이 유사한 수치요법 지수 또는 점수를 갖는 다른 아미노산으로 치환될 수 있고 여전히 유사한 생물학적 활성을 보유하는 것으로 알려져 있다. 수치요법 지수를 기준으로 변화를 주는데 있어서, 특정 실시예에서, 수치요법 지수가 \pm 2 이내인 아미노산의 치환이 포함된다. 특정 실시예에서, 수치요법 지수가 \pm 1 이내인 아미노산의 치환이 포함되고, 특정 실시예에서, 수치요법 지수가 \pm 0.5 이내인 아미노산의 치환이 포함된다.

[0037] 또한, 유사한 아미노산의 치환이, 특히 이렇게 함으로써 생성된 생물학적 기능성 단백질 또는 웨프티드가 본 명세서에 개시된 바와 같은 면역학적 실시예에서의 사용을 목적으로 하는 경우에, 친수성을 기준으로 하여 효과적으로 이루어질 수 있다는 것이 당해 기술분야에서 이해된다. 특정 실시예에서, 인접 아미노산의 친수성에 의해 지

배되는 단백질의 가장 큰 국소 평균 친수성은 그의 면역원성 및 항원성, 즉 단백질의 생물학적 특성과 상호 관련이 있다.

[0038] 하기의 친수성 값이 이들 아미노산 잔기에 부여되었다: 아르기닌 (+3.0); 리신 (+3.0); 아스파르테이트 (+3.0.+-.1); 글루타메이트 (+3.0.+-.1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5.+-.1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 류신 (-1.8); 이소류신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5) 및 트립토판 (-3.4). 유사한 친수성 값을 기준으로 변화를 주는데 있어서, 특정 실시예에서, 친수성 값이 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 포함되고, 특정 실시예에서, 친수성 값이 ± 1 이내인 아미노산의 치환이 포함되고, 특정 실시예에서, 친수성 값이 ± 0.5 이내인 아미노산의 치환이 포함된다.

[0039] 예시적인 아미노산 치환은 표 1에 제시된다.

표 1

아미노산 치환

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	
Asp	Glu	
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르류신(Norleucine)	Leu
Leu	노르류신, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-디아미노부티르산, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 노르류신	Leu

[0041] 당업자는 잘-알려진 기술을 이용하여 본 명세서에 제시된 바와 같은 폴리펩티드의 적당한 변이체를 결정할 수 있을 것이다. 특정 실시예에서, 당업자는 활성에 중요하지 않은 것으로 여겨지는 영역을 표적화시킴으로써 활성을 파괴하지 않으면서 변화시킬 수 있는 분자의 적당한 영역을 확인할 수 있다. 다른 실시예에서, 당업자는 유사한 폴리펩티드 중에서 보존되는 분자의 잔기 및 일부를 확인할 수 있다. 추가 실시예에서, 생물학적 활성 또는 구조에 대해 중요할 수 있는 영역조차도 생물학적 활성을 파괴시키지 않고 또는 폴리펩티드 구조에 악영향을 미치지 않고 보존적 아미노산 치환을 받을 수 있다.

[0042] 추가로, 당업자는 활성 또는 구조에 중요한 유사한 폴리펩티드의 잔기를 확인하는 구조-기능 연구를 검토할 수 있다. 이러한 비교를 고려하여, 당업자는 유사한 폴리펩티드의 활성 또는 구조에 중요한 아미노산 잔기에 상응하는 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기의 중요성을 예측할 수 있다. 당업자는 이러한 예측된 중요한 아미노산 잔기에 대해 화학적으로 유사한 아미노산 치환을 선택할 수 있다.

[0043] 당업자는 유사한 폴리펩티드의 이러한 구조와 관련하여 3-차원 구조 및 아미노산 서열을 분석할 수도 있다. 이러한 정보를 고려하여, 당업자는 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 3-차원 구조에 대한 정렬을 예측할 수 있다. 특정 실시예에서, 당업자는 폴리펩티드의 표면 상에 존재할 것으로 예측되는 아미노산 잔기에 대해 급진적인 변화

를 일으키지 않는 것을 선택할 수 있는데, 이는 이러한 잔기가 다른 분자와의 중요한 상호작용에 관여될 수 있기 때문이다. 또한, 당업자는 각각의 원하는 아미노산 잔기에서 단일 아미노산 치환을 함유하는 시험 변이체를 생성할 수 있다. 그 다음, 변이체는 당업자에게 알려진 활성 분석을 이용하여 스크리닝 될 수 있다. 이러한 변이체를 사용하여 적당한 변이체에 관한 정보를 수집할 수 있다. 예를 들어, 특정 아미노산 잔기로의 변화가 파괴되거나, 바람직하지 않게 감소되거나, 또는 부적당한 활성을 일으킨다는 것을 발견하면, 이러한 변화를 가진 변이체를 피할 수 있다. 즉, 이러한 통상적인 실험으로부터 수집된 정보에 기초하여, 당업자는 추가 치환이 단독으로 또는 다른 돌연변이와 조합하여 배제되어야 하는 아미노산을 용이하게 결정할 수 있다.

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드 단편" 및 "절단된 (truncated) 폴리펩티드"는 상응하는 전장 단백질에 비해 아미노-말단 및/또는 카복시-말단 결실을 가지는 폴리펩티드를 나타낸다. 특정 실시예에서, 단편은 길이가 적어도 5, 적어도 10, 적어도 25, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 150, 적어도 200, 적어도 250, 적어도 300, 적어도 350, 적어도 400, 적어도 450, 적어도 500, 적어도 600, 적어도 700, 적어도 800, 적어도 900 또는 적어도 1000인 아미노산일 수 있다. 특정 실시예에서, 단편은 길이가 1000 이하, 900 이하, 800 이하, 700 이하, 600 이하, 500 이하, 450 이하, 400 이하, 350 이하, 300 이하, 250 이하, 200 이하, 150 이하, 100 이하, 50 이하, 25 이하, 10 이하, 또는 5 이하인 아미노산일 수도 있다. 단편은 하나 이상의 추가 아미노산, 예를 들어, 상이한 자연적으로-발생하는 단백질 (예를 들어, Fc 또는 류신 지퍼 도메인)의 아미노산 서열 또는 인공 아미노산 서열 (예를 들어, 인공 링커 서열)의 말단 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 더 포함할 수 있다.

[0045] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드 변이체" 및 "폴리펩티드 돌연변이체"는 하나 이상의 아미노산 잔기를 다른 폴리펩티드 서열에 대해 아미노산 서열에 삽입, 결실 및/또는 치환되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 특정 실시예에서, 삽입, 결실, 또는 치환될 아미노산 잔기의 수는 길이가 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 25, 적어도 50, 적어도 75, 적어도 100, 적어도 125, 적어도 150, 적어도 175, 적어도 200, 적어도 225, 적어도 250, 적어도 275, 적어도 300, 적어도 350, 적어도 400, 적어도 450 또는 적어도 500인 아미노산일 수 있다. 본 발명의 변이체는 융합 단백질을 포함한다.

[0046] 폴리펩티드의 "유도체"는 화학적으로 변형된, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민), 인산화, 및 글리코실화와 같은 다른 화학적 부분(chemical moiety)에 결합된 폴리펩티드이다.

[0047] 용어 "% 서열 동일성(sequence identity)"은 용어 "% 동일성"으로 본 명세서에서 통용되고, 서열 정렬 프로그램을 이용하여 정렬할 때, 2 이상의 웨이트 서열간의 아미노산 서열 동일성의 수준 또는 2 이상의 뉴클레오티드 서열간의 뉴클레오티드 서열 동일성의 수준을 나타낸다. 예를 들어, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 80% 동일성은 정의된 알고리즘에 의해 결정된 80% 서열 동일성과 동일한 것을 의미하고, 주어진 서열이 다른 서열의 다른 길이와 적어도 80% 동일하다는 것을 의미한다. 특정 실시예에서, % 동일성은 주어진 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 또는 그 이상의 서열 동일성으로부터 선택된다. 특정 실시예에서, % 동일성은 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 85%, 약 85% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 95%, 또는 약 95% 내지 약 99%의 범위 내이다.

[0048] 용어 "% 서열 상동성(sequence homology)"은 용어 "% 상동성"으로 본 명세서에서 통용되고, 서열 정렬 프로그램을 이용하여 정렬할 때, 2 이상의 웨이트 서열간의 아미노산 서열 상동성의 수준 또는 2 이상의 뉴클레오티드 서열간의 뉴클레오티드 서열 상동성의 수준을 나타낸다. 예를 들어, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 80% 상동성은 정의된 알고리즘에 의해 결정된 80% 서열 상동성과 동일한 것을 의미하고, 이에 따라 주어진 서열의 동족체(homologue)는 주어진 서열의 길이에 대해 80% 이상의 서열 상동성을 가진다. 특정 실시예에서, % 상동성은 주어진 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 또는 그 이상의 서열 상동성으로부터 선택된다. 특정 실시예에서, % 상동성은 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 85%, 약 85% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 95%, 또는 약 95% 내지 약 99%의 범위 내이다.

[0049] 두 서열 사이의 동일성을 결정하는데 사용될 수 있는 예시적인 컴퓨터 프로그램은, BLAST 프로그램의 세트, 예를 들어, BLASTN, BLASTX, 및 TBLASTX, BLASTP 및 TBLASTN, NCBI 웹사이트에서 인터넷 상에서 공개적으로 이용 가능한 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 참조, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 (특히 공개된 기본 설정에 관하여, 즉, 매개변수 $w=4$, $t=17$) 및 Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. 서열 검색은 일반적으로 GenBank Protein Sequences 및 기타 공공 데이터베이스의 아미노산 서열과 관련하여 주어진 아미노산 서열을 평가할 때 BLASTP 프로그램을 이용하여 수행된다. BLASTX 프로그램은

GenBank Protein Sequences 및 기타 공공 데이터베이스의 아미노산 서열에 대해 모든 판독 프레임에서 번역된 핵산 서열을 검색하는데 선호된다. BLASTP 및 BLASTX는 11.0의 개방 캡 페널티(open gap penalty), 및 1.0의 확장 캡 페널티 (extended gap penalty)의 기본 매개변수를 이용하여 실행하고, BLOSUM-62 매트릭스를 이용한다. 참조 id.

[0050] 퍼센트 서열 동일성을 계산하는 것 이외에, BLAST 알고리즘은 두 서열 간의 유사성의 통계적 분석도 수행한다 (참조, 예를 들어, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787 (1993)). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 하나의 척도는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 일치가 우연히 일어 날 확률의 지표를 제공하는 가장 작은 합계 확률 ($P(N)$)이다. 예를 들어, 시험 핵산과 기준 핵산의 비교에서 가장 작은 합계 확률이 약 0.1 미만, 약 0.01 미만, 또는 약 0.001 미만인 경우, 핵산은 기준 서열과 유사하다고 간주된다.

[0051] 용어 "분리된 분자(isolated molecule)" (여기서 분자는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 또는 항체이다)는 이의 유래의 기원 또는 근원에 의하여 (1) 이의 원래 상태에서 동반되는 자연적으로 결합된 성분과 관련이 없고, (2) 동일한 종으로부터 다른 분자가 실질적으로 없으며, (3) 다른 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 자연에서 발생하지 않는 분자이다. 따라서, 화학적으로 합성되거나, 또는 자연적으로 유래한 세포와 다른 세포 시스템에서 발현되는 분자는, 이의 자연적으로 결합된 성분으로부터 "분리될" 것이다. 또한, 분자는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 정제 기술을 이용하여 분리함으로써 자연적으로 결합된 성분이 실질적으로 존재하지 않게 할 수 있다. 분자 순도 또는 균질성은 당해 기술분야에서 잘 알려진 많은 방법에 의해 분석될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 시료의 순도는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 겔의 염색을 이용하여 분석함으로써, 당해 기술분야에서 잘 알려진 기술을 이용하여 폴리펩티드를 시각화할 수 있다. 특정 목적을 위해, HPLC 또는 정제를 위한 당해 기술분야에서 잘 알려진 다른 방법을 이용하여 더 높은 해상도를 제공할 수 있다.

[0052] 시료의 적어도 약 60% 내지 75%가 단일 종의 폴리펩티드를 나타낼 때, 단백질 또는 폴리펩티드는 "실질적으로 순수한", "실질적으로 균질한", 또는 "실질적으로 정제된"이다. 실질적으로 순수한 폴리펩티드 또는 단백질은 일반적으로 단백질 시료의 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% W/W, 보다 일반적으로는 약 95%를 포함할 것이고, 예를 들어 99% 이상 순수할 것이다. 단백질 순도 또는 균질성은 당해 기술분야에서 잘 알려진 많은 방법, 예를 들어 단백질 시료의 폴리아크릴아미드 겔 전기영동한 다음, 당해 기술분야에서 잘 알려진 염색으로 겔을 염색하자마자 단일 폴리펩티드 밴드를 시각화하여 나타낼 수 있다. 특정 목적을 위해, HPLC 또는 정제를 위한 당해 기술분야에서 잘 알려진 다른 방법을 이용하여 더 높은 해상도를 제공할 수 있다.

[0053] "항원 결합 및 길항 단백질"은 항원에 결합하는 부분, 및 임의로, 항원 결합 부분이 항원에 분리된 길항 항원 결합 단백질의 결합을 촉진시키는 구조를 채택할 수 있는 지지체 또는 골격 부분을 포함하는 단백질이다. 항원 결합 및 길항 단백질의 예는 항체, 항체 단편 (예를 들어, 항체의 항원 결합 부분), 항체 유도체, 및 항체 유사체를 포함한다. 분리된 길항 항원 결합 단백질은 대안적인 단백질 지지체 또는 이식된(grafted) CDRs 또는 CDR 유도체를 갖는 인공 지지체를 포함할 수 있다. 이러한 지지체는 생체적 합성 고분자를 포함하는 전체 합성 지지체뿐만 아니라 분리된 길항 항원 결합 단백질의 3차원 구조를 안정화시키기 위해 도입된 돌연변이를 포함하는 항체-유래 지지체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 참조, 예를 들어, Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129 (2003); Roque et al., Biotechnol. Prog. 20:639-654 (2004). 또한, 지지체로서 피브로넥틴 성분을 이용하는 항체 모방체를 기반으로 한 지지체뿐만 아니라, 웨პ티드 항체 모방체 ("PAMs")도 사용될 수 있다.

[0054] 분리된 길항 항원 결합 단백질은 자연적으로 발생하는 면역글로불린의 구조를 가질 수 있다. "면역글로불린"은 사랑체 분자(tetrameric molecule)이다. 자연적으로 발생하는 면역글로불린에서, 각 사랑체는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되어 있으며, 각 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄" (약 50-70 kDa)를 가진다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카복시-말단 부분은 주로 작동자(effector) 기능을 담당하는 불변 영역을 정의한다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤(mu), 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로 분류되며, 항체의 동형(isotype)을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 결합되고, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 참조, 일반적으로, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (모든 목적을 위해 전체 참조로 포함됨). 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 온전한 면역글로불린이 2개의 결합 부위를 가지도록 항체 결합 부위를 형성한다.

[0055]

"항체"는 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자의 단편에 의해 실질적으로 또는 부분적으로 인코딩되고 종양 항원에 대한 특이성 또는 병리학적 상태로 과발현된 분자에 대한 특이성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 단백질을 나타낸다. 인식된 면역글로불린 유전자는 이들 유전자의 아형(subtypes)뿐만 아니라 카파, 람다, 알파, 감마, 엘타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자, 및 무수히 많은 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄 (LC)는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄 (HC)는 감마, 뮤, 알파, 엘타 또는 엡실론으로 분류되며, 차례로 각각 면역글로불린 종류인 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 정의한다. 일반적인 면역글로불린 (예를 들어, 항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각 사량체는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되어 있으며, 각 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄" (약 50-70 kDa)를 가진다. 각 사슬의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 정의한다.

[0056]

전장 항체에서, 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본 명세서에서 HCVR 또는 V_H 로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} (및 경우에 따라, C_{H4})로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본 명세서에서 LCVR 또는 V_L 로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인인 C_L 로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 골격 영역 (framework regions, FR)으로 지칭되는 보다 보존적인 영역이 배치된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되는 초가변 영역으로 더 세분될 수 있다. 각 V_H 및 V_L 는 FR_1 , CDR_1 , FR_2 , CDR_2 , FR_3 , CDR_3 , FR_4 순서로 아미노-말단으로부터 카복시-말단에 배열된, 3개의 CDRs 및 4개의 FRs로 구성된다. 골격 영역 및 CDRs의 범위가 정의되었다. 상이한 경쇄 또는 중쇄의 골격 영역의 서열은 인간과 같은 종 내에서 상대적으로 보존된다. 항체의 골격 영역, 즉 구성 경쇄 및 중쇄의 조합된 골격 영역은, 3차원 공간에서 CDRs을 위치시키고 정렬시키는 역할을 한다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 종류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위 종류일 수 있다.

[0057]

항체는 온전한 면역글로불린으로 또는 다수의 잘 특징지워진 단편으로 존재한다. 이러한 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, Fab₂, F(ab)₂ 단편, 단일쇄 Fv 단백질 ("scFv") 및 표적 항원에 결합하는 이황화 안정화된 Fv 단백질 ("dsFv")을 포함한다. scFv 단백질은 면역글로불린의 경쇄 가변 영역 및 면역글로불린의 중쇄 가변 영역이 링커에 의해 결합되는 융합 단백질이며, dsFvs에서는 사슬이 돌연변이되어 이황화 결합을 도입하여 사슬의 결합을 안정화시킨다. 다양한 항체 단편이 온전한 항체의 분해로 정의되지만, 당업자는 이러한 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 이용하여 새로 합성될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 항체는 단일클론 항체 (전장 단일클론 항체 포함), 다클론 항체, 적어도 2개의 온전한 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 인간 항체, 인간화 항체, 카멜화 항체(camelised antibodies), 키메라 항체, 단일-쇄 Fvs (scFv), 단일-쇄 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편, 이황화-결합 Fvs (sdFv), 세포내 항체(intrabodies), 및 에피토프-결합 단편 또는 상기 중 어느 것의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0058]

Fab 단편은 V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인을 갖는 1가 단편이다; F(ab')₂ 단편은 경첩 영역(hinge region)에서 이황화 다리에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 갖는 2가 단편이다; Fd 단편은 V_H 및 C_{H1} 도메인을 가진다; Fv 단편은 항체의 단일 팔의 V_L 및 V_H 도메인을 가진다; dAb 단편은 V_H 도메인, V_L 도메인, 또는 V_H 또는 V_L 도메인의 항원-결합 단편을 가진다 (미국특허 번호 제 6,846,634호, 제 6,696,245호, 미국 출원 공개 번호 제 05/0202512호, 제 04/0202995호, 제 04/0038291호, 제 04/0009507호, 제 03/0039958호, Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)).

[0059]

단일-쇄 항체 (scFv)는 V_L 및 V_H 영역이 링커 (예를 들어, 아미노산 잔기의 합성 서열)를 통해 결합되어, 연속적인 단백질 사슬을 형성하는 항체이며, 상기 링커는 단백질 사슬이 그 자체로 뒤로 접어 1가 항원 결합 부위를 형성할 수 있을 정도로 충분히 길다 (참조, 예를 들어, Bird et al., Science 242:423-26 (1988) and Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83 (1988)). 이중체는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 2가 항체이고, 각 폴리펩티드 사슬은 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커에 의해 결합된 V_H 및 V_L 도메인을 포함함으로써 각 도메인은 다른 폴리펩티드 사슬 상에서 상보적 도메인과 쌍을 이룰 수 있다 (참조, 예를 들어, Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993), and Poljak et al., Structure 2:1121-23 (1994)). 만일 이중체의 2개의 폴리펩티드 사슬이 동일하다면, 그 쌍으로부터 생성된 이중체는 2개의 동일한 항원 결합 부위를 가질 것이다. 상이한 서열을 갖는 폴리펩티드 사슬은 2개

의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 이중체를 만드는데 사용될 수 있다. 유사하게, 삼중체(tribodies) 및 사중체(tetraabodies)는 각각 3개 및 4개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고 각각 동일하거나 또는 상이할 수 있는 3개 및 4개의 항원 결합 부위를 형성하는 항체이다.

[0060] 분리된 길항 항원 결합 단백질은 하나 이상의 결합 부위를 가질 수 있다. 하나 이상의 결합 부위가 있는 경우, 결합 부위는 서로 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, 자연적으로 발생하는 인간 면역글로불린은 일반적으로 2개의 동일한 결합 부위를 가지며, "이중특이적(bispecific)" 또는 "이작용성 (bifunctional)" 항체는 2개의 상이한 결합 부위를 가진다.

[0061] 용어 "인간 항체"는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 영역 및 불변 영역을 가지는 모든 항체를 포함한다. 일 실시예에서, 가변 도메인 및 불변 도메인 모두는 인간 면역글로불린 서열 (완전 인간 항체)로부터 유래된다. 이들 항체는 하기에 기재된 예인, 인간 종체 및/또는 경쇄-인코딩 유전자로부터 유래된 항체를 발현하도록 유전자 변형된 마우스의 관심 항원으로 면역화하는 것을 포함하는 다양한 방법으로 제조될 수 있다.

[0062] "인간화 항체"는 인간화 항체가 인간 피험자에게 투여되는 경우, 비-인간 종 항체와 비교하여, 인간화 항체가 면역 반응을 유도할 가능성이 더 적고, 및/또는 덜 심각한 면역 반응을 유도하도록, 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 첨가에 의해 비-인간 종으로부터 유래된 항체의 서열과 다른 서열을 가진다. 일 실시예에서, 비-인간 종 항체의 종체 및/또는 경쇄의 골격 및 불변 도메인 내의 특정 아미노산은 들연변이되어 인간화 항체를 생성한다. 다른 실시예에서, 인간 항체의 불변 도메인(들)은 비-인간 종의 가변 도메인(들)에 융합된다. 다른 실시예에서, 비-인간 항체의 하나 이상의 CDR 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 이것이 인간 피험자에게 투여될 때 비-인간 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 변화되고, 상기 변화된 아미노산 잔기는 이의 항원에 대한 항체의 면역특이적 결합에 중요하지 않거나, 또는 제조된 아미노산 서열에 대한 변화가 보존적 변화이며, 따라서 항원에 대한 인간화 항체의 결합이 항원에 대한 비-인간 항체의 결합보다 현저히 악화되지 않는다. 인간화 항체의 제조 방법의 예는 미국특허 제 6,054,297호, 제 5,886,152호 및 제 5,877,293호에서 확인될 수 있다.

[0063] 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은, 10^{-7} 이하의 해리 상수 (Kd, 또는 하기에 정의된 바와 같은 상응하는 Kb) 값에 의해 결정된 바와 같은 높은 결합 친화도를 갖는 항원에 결합하는 경우, 인간 글루카곤 수용체와 같은 항원에 "특이적으로 결합하는" 항체를 포함한다. 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질은 다른 종으로부터의 글루카곤 수용체에도 동일하거나 또는 상이한 친화도로 결합할 수 있다.

[0064] "에피토프"는 분리된 길항 항원 결합 단백질에 의해 (예를 들어, 항체에 의해) 결합되는 분자의 부분이다. 에피토프는 분자의 불연속 부분을 포함할 수 있다 (예를 들어, 폴리펩티드에서, 폴리펩티드의 1차 서열에서 인접하지 않지만 폴리펩티드의 3차 및 4차 구조와 관련하여 아미노산 잔기는 항원 결합 및 길항 단백질에 의해 결합되도록 서로 충분히 가깝다).

[0065] 용어 "혈당 수준", 또는 "혈당의 수준"은 혈당 농도를 의미한다. 특정 실시예에서, 혈당 수준은 혈장 포도당 수준이다. 혈장 포도당은 [Etgen et al., Metabolism, 49(5): 684-688, 2000]에 따라 결정될 수 있거나, 또는 [D'Orazio et al., Clin. Chem. Lab. Med., 44(12):1486-1490, 2006]에 따라 전혈 포도당 농도의 전환으로부터 계산될 수 있다.

[0066] 용어 "정상 포도당 수준"은 인간에서 공복시 수준의 경우 약 100 mg/dL 미만, 식후 2시간 수준의 경우 약 145 mg/dL 미만 또는 랜덤 포도당 수준의 경우 약 125 mg/dL 미만의 평균 혈장 포도당 값을 의미하는 것으로 나타낸다. 용어 "상승된 혈당 수준", 또는 "상승된 혈당의 수준"은 임상적으로 부적당한 기저 및 식후 고혈당증을 나타내는 피험자에서 발견되는 것과 같은 상승된 혈당 수준 또는 경구 당부하 검사 (OGTT)에서 피험자에서 발견되는 것과 같은 상승된 혈당 수준을 의미하고, "상승된 혈당의 수준"은 공복 상태에서 시험하였을 때 약 100 mg/dL 이상이고 1시간 시험하였을 때 약 200 mg/dL 이상이다.

[0067] 용어 "글루카곤 저해제", "글루카곤 억제제" 및 "글루카곤 길항제"는 통용된다. 각각은 글루카곤 신호를 검출가능하게 저해하는 분자이다. 저해제에 의해 야기된 저해는, 글루카곤 신호 전달 저해의 결정적인 것으로 당해 기술분야에서 인식되고 이해되는 분석법을 이용하여 저해가 검출될 수 있는 한 완전할 필요는 없다.

[0068] "약학 조성물"은 동물 또는 인간에서의 약학 용도에 적합한 조성물을 나타낸다. 약학 조성물은 약리학적 및/또는 치료적 유효량의 활성체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. "약학적으로 허용가능한 담체"는 동물

또는 인간에게 투여될 때 해로운, 알러지 또는 다른 부작용(untoward reaction)을 일으키지 않는 조성물을 나타낸다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 표준 약학적 담체, 비히를, 완충액, 및 담체, 예를 들어 인산염 완충 식염수 용액, 5% 텍스트로오스 수용액, 및 에멀젼, 예를 들어 유/수 또는 수/유 에멀젼, 및 다양한 유형의 습윤제 및/또는 보조제를 나타낸다. 적당한 약학적 담체 및 제형은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. 2005, Mack Publishing Co, Easton에 기재되어 있다. "약학적으로 허용가능한 염"은 금속염 (나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등) 및 암모니아 또는 유기 아민의 염을 포함하여 약학 용도의 화합물로 제형화될 수 있는 염이다.

[0069] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 "치료적 유효량"은, 개시되고 청구된 방법에 따라 피험자에게 제공될 때, 하기의 생물학적 활성 중 하나를 야기하는 이러한 단백질의 양을 나타낸다: 비만을 치료한다; NAFLD를 치료한다; NASH를 치료한다; 또는 NASH의 하나 이상의 증상을 감소, 억제, 약화 또는 저해한다.

[0070] 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 유익한 또는 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 방법을 나타낸다. 또한, 본 명세서에서 "치료"는 치유적(curative), 완화적(palliative) 및 예방적(prophylactic) 치료를 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, 유익한 또는 바람직한 임상 결과는 하기 중 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 약 80-180 mg/dL 내, 또는 약 80-170 mg/dL 내, 또는 약 80-160 mg/dL 내, 또는 약 80-150 mg/dL 내, 또는 약 80-140 mg/dL 내로 혈당의 향상, 또는 고혈당증, 고글루카곤혈증(hyperglucagonemia) 및 고인슐린혈증을 포함하나 이에 한정되지 않는 상승된 혈당의 수준과 관련되거나 또는 이로부터 생기는 임의의 하나 이상의 질병, 질환 또는 증상의 개선.

[0071] 본 명세서 및 첨부된 청구항에 사용된 바와 같이, 문맥에 달리 명시되어 있지 않는 한, 단수형 "a," "or" 및 "the"는 복수를 포함할 것이다. 본 명세서에 기재된 개시 내용의 측면 및 변화는 측면 및 변화의 "이루어지는" 및/또는 "본질적으로 이루어지는"을 포함하는 것으로 이해된다.

[0072] 본 명세서에서 "약(about)"에 관한 값 또는 매개변수는 그 값 또는 매개변수 자체에 관한 변화를 포함하고 기재한다. 예를 들어, "약 X"를 나타내는 기재는 "X"의 기재를 포함한다.

비만

[0074] 비만은 과도한 체지방이 간을 포함하여 여러 조직에 축적되어 건강에 악영향을 끼칠 수 있을 정도의 질병이다. 일반적으로, $30\text{kg}/\text{m}^2$ 이상의 체질량 지수 (BMI) (사람의 체중을 사람의 키의 제곱으로 나눈 값)로 정의되는 비만의 유병률은 지난 10년 동안 미국 및 다른 많은 선진국에서 크게 증가하여 전 세계적으로 공중 보건 문제가 되었다.

[0075] 비만은 일부 경우 주로 유전자, 내분비 장애, 약물 또는 정신병에 의해 야기되지만, 과도한 식품 에너지 섭취, 신체 활동 부족 및 유전적 감수성의 조합에 의해 가장 흔하게 야기된다. 비만은 다양한 질환, 특히 심장병, 제2형 당뇨병, NAFLD/NASH, 폐쇄성 수면 무호흡증, 특정 유형의 암, 골관절염 및 천식의 가능성을 증가시킨다. 합병증은 비만에 의해 직접 야기되거나 또는 열악한 식이 또는 좌식 생활 방식과 같은 일반적인 원인을 공유하는 메커니즘을 통해 간접적으로 관련된다. 비만과 특정 질병 사이의 연관성은 다양하다. 가장 강력한 것 중 하나는 제2형 당뇨병과 관련 있다. 과다 체지방은 남성의 당뇨병 사례의 64%와 여성의 당뇨병 사례의 77%를 차지한다.

[0076] 현재의 치료 방법은 일반적으로 식이 요법과 운동 프로그램, 생활 방식 관리, 약물 요법(pharmacotherapy) 및 수술을 포함한다. 치료 결정은 비만의 중증도, 관련 질병의 심각성, 피험자 위험 상태 및 피험자 기대치에 근거하여 결정된다. 심혈관 위험 및 당뇨병 발생률의 현저한 개선이 체중의 5-10%의 체중 감량과 함께 관찰되었으며, 기준치에서 체중이 10% 감소하는 목표치를 권고하는 비만 치료의 임상 지침을 지지하고 있다. 불행하게도, 체중 감량을 촉진시키기 위해 이용할 수 있는 약리 요법은 부작용, 금기 또는 긍정적인 반응의 부족 때문에 많은 비만 피험자에게 충분한 이익을 제공하지 못한다 (National Heart, Lung and Blood Institute, Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report, NIH Publication No. 98-4083, September 1998).

[0077] 비만 수술(Bariatric surgery)은 $40\text{ kg}/\text{m}^2$ 의 BMI 또는 이를 초과하는 BMI를 갖는 피험자의 체중 감량 수술로 간주될 수 있다. $\sim 35\text{ kg}/\text{m}^2$ 의 BMI를 가지며 이와 관련된 심각한 질병을 갖는 피험자도 이 치료 방안의 후보자이다. 불행하게도, 수술 후 합병증은 일반적으로 출혈, 색전증 또는 혈전증, 상처 합병증, 심부 감염 (deep infections), 폐 합병증 및 위장관 폐쇄(gastrointestinal obstruction)를 포함하여 비만 수술 과정에 기인한

다; 수술 후 재수술은 때때로 이러한 합병증을 해결하는데 필요하다. 수술 후 재수술 또는 전환 수술의 비율은 비만 수술의 유형에 따라 다르며, 한 연구에서 17%에서 31%로 나타났다. 미량 영양소 결핍 및 단백질-칼로리 영양 실조와 같은 장 흡수성 이상도 일반적으로 우회 과정에서 나타나며, 평생 영양 보충을 필요로 한다. 비만 수술과 관련된 중대하고 심각한 불리한 결과는 일반적으로 수행되는 과정의 약 4%에서 관찰된다 (각각, 복강경 밴딩 (laparoscopic banding) 또는 우회 수술을 받는 모든 피험자의 0.3-2%의 사망을 포함).

[0078] 식이 유도성 비만 (DIO)을 포함하여 비만 치료의 개선된 방법 및/또는 새로운 방법에 대한 필요성이 절실히 요구되고 있다. 본 발명은 당뇨병 및 비-당뇨병 피험자에서 DIO의 개선되고 효과적인 치료법을 제공할 수 있는 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 항원 결합 및 길항 단백질을 제공한다.

비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) 및 비알콜성 지방간염 (NASH)

[0080] 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD)은 서구인에서 매우 널리 퍼져 있다. 최근 연구에 따르면 이 질환은 비만한 개인에서는 70%의 빈도 및 마른 개인에서는 35%의 빈도로 발생할 수 있음을 시사하고 있다 (Wanless IR, et al., Hepatology, 12:1106-1110, 1990). NAFLD는 알콜을 거의 또는 전혀 소비하지 않는 개인에서 발생하는 간의 거대수포성 지방증 (macrovesicular steatosis)을 특징으로 한다. NAFLD의 조직학적 스펙트럼은 단순 지방증 (simple steatosis) 단독 또는 비알콜성 지방간염 (NASH)으로 분류된다. 일부 역학 연구는 포화 지방이 높은 식이를 포함한다 (Musso G, et al., Hepatology, 37:909-916, 2003). 그러나, NAFLD는 과당, 특히 청량 음료의 섭취와도 밀접하게 연관되어 있다 (Ouyang X, et al., J Hepatol., 48:993-999, 2008). 고전적인 서구식 식이의 포화 지방과 당 모두가 높다.

[0081] 고-지방 식이 및 고-당 식이 (예를 들어, 포도당, 과당과 같은 단당(simple sugar))의 섭취로 인해 발생하는 (고혈당증 및/또는 고인슐린혈증을 야기할 수 있는) 간 인슐린 저항성은 NAFLD와 밀접하게 관련되어 있다. 축적된 증거는 간 인슐린 저항성이 세 가지 에너지 대사 경로의 기능 장애에 의해 야기됨을 암시한다 (Samuel et al, Cell, 148:852-871, 2012). 첫째, 과량의 탄수화물 플러스 (예를 들어, 포도당, 과당)는 간 포도당 생성에 대한 인슐린의 억제 효과에 대한 저항성 및 신규 지방합성(de novo lipogenesis)을 통한 탄소의 과량 처리 (Id)와 관련이 있다. 둘째, 지질 합성의 증가 (또는 지질 분비/배출의 감소)는 비활성인 간 트리아실글리세롤 (TAG)의 축적을 야기하지만 간 인슐린 저항성을 추정적으로 야기하는 생활성 지질 중간체인 디아실글리세롤 (DAG) 및 세라마이드의 수준의 증가와 함께 자주 추적한다 (Kumashiro N et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 108:16381-16385, 2011). 셋째, 인슐린 저항성과 관련된 간 지방증은 미토콘드리아 기능 장애 및 변경된 간 지방산 산화와 관련이 있다 (Rector RS et al., J Hepatol, 52:727-736, 2010).

[0082] 완전히 이해되지 않은 메커니즘에 의해, NAFLD는 더 공격적 형태인 비알콜성 지방간염 (NASH)으로 진행할 수 있거나, 또는 섬유증, 간경변증 및 간세포 암종 (HCC)으로 진행할 수 있다. NASH는 현재 미국인의 2%-5%에게 악영향을 미치고, 간경변증 및 영구적인 간부전으로 이어질 수 있는 진행성 대사성 간 질환으로 받아들여지고 있다 (Brunt et al., supra, 1999; Brunt, supra, 2001; Ludwig et al., J. Gastroenterol. Hepatol. 12:398-403, 1997). 건강한 간에서 NASH에 이르는 병인의 현재 모델은 두-히트(two-hit) 진행을 시사한다. 첫째, 인슐린 저항성은 간세포에서 지질 축적을 야기한다 (제 1 히트). 둘째, 산화성 스트레스, 지질 과산화, 직접적인 지질 독성, 미토콘드리아 기능 장애 및/또는 감염과 같은 세포 손상이 간염 (제 2 히트)을 야기하여 NASH를 일으킨다고 제안된다 (Brunt, supra, 2001).

[0083] 지질과 함께 간의 울혈(engorgement)은 간에서 심각한 인슐린 저항성과 비정상적인 포도당 생성을 야기한다 (Samuel et al., J. Biol. Chem. 279:32345-32353, 2004). 인슐린 저항성에 의해 야기된 지방증은 염증, 괴사 및 섬유증을 야기하는 대사성 손상으로 간을 민감하게 하는 것으로 여겨진다 (James et al., Lancet 353:1634-1636, 1999; Ludwig et al., Mayo Clin. Proc. 55:434-438, 1980; Day, Gut 50:585-588, 2002; Browning et al., J. Clin. Invest. 114:147-152, 2004). 따라서, 지방증은 NASH의 일정한 특징이지만, NASH는 간 생검에 의해서만 구별할 수 있다. NASH의 평가와 중증도는 간 지방증, 염증 및 손상의 패턴과 정도에 근거하여 조직학적으로 만들어지며, 정의에 따르면 상당한 알콜 소비가 없는 경우에만 발생한다 (Brunt, supra, 2001). 지방증은 동물 모델과 인간 모델 모두에서 볼 수 있지만, NASH는 인간 질병에서만 완전히 평가된다 (Browning et al., supra, 2004). 따라서, NASH에서 관찰된 임상적 변화를 이해하는 것이 이 질병에 대한 치료 전략의 개발에 중요하다.

[0084] 현재 NASH에 걸린 환자를 확인할 수 있는 좋은 임상 지표는 없다. 유사하게, NASH의 추가 질환 진행의 과정을 늦추거나 또는 변화시키는 치료법도 없다. 이러한 마커 및 NASH의 치료가 당해 기술분야에서 필요하다. NASH는 C형 간염과 알콜성 간 질환의 원인이 되어, 미국에서 간경변증의 주요 원인 중 하나라고 평가한다. 따라서, 당

해 기술분야에서 NASH의 치료 방법에 대한 필요성이 존재한다. 본 발명은 당뇨병 및 비-당뇨병 피험자에서 NASH의 예방 및 치료를 위한 개선되고 효과적인 치료법을 제공할 수 있는 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 항원 결합 및 길항 단백질을 제공한다.

[0085] 글루카곤 수용체 및 항원 결합 및 길항 단백질

글루카곤은 전구호르몬(prohormone) 및 전구신경펩티드(proneuroopeptides)의 세포내 성숙에 관여하는 신경내분비-특이적 프로테아제인 전구호르몬 전환효소 2 (PC2)의 세포 특이적 발현에 의해 체장 알파 세포에서 이의 전-전구-형태(pre-pro-form)로부터 처리된 29개의 아미노산 호르몬이다 (Furuta et al., J. Biol. Chem. 276: 27197-27202 (2001)). In vivo에서, 글루카곤은 인슐린 작용에 대해 주요 반대-조절 호르몬이다. 금식 중에, 글루카곤 분비는 포도당 수준의 감소에 따라 증가한다. 증가된 글루카곤 분비는 간 글리코겐 분해 및 포도당신합성을 촉진하여 포도당 생성을 촉진한다 (Dunning and Gerich, Endocrine Reviews, 28:253-283 (2007)). 따라서, 글루카곤은 동물에서 정상 포도당 수준을 유지하는데 있어서 인슐린의 영향을 상쇄한다.

[0087] 글루카곤의 생물학적 효과는 특정 세포 표면 수용체인 글루카곤 수용체의 결합 및 차후 활성화를 통해 매개된다. 글루카곤 수용체 (GCGR)는 G-단백질-결합 수용체의 세크레틴 아과 (B 과)의 일원이다. 인간 GCGR은 477개의 아미노산 서열 GPCR이고, GCGR의 아미노산 서열은 종 전체에 걸쳐 고도로 보존되어 있다 (Mayo et al., Pharmacological Rev., 55:167-194, (2003)). 글루카곤 수용체는 간의 포도당 생성을 조절하는 곳인 간, 신장, 및 포도당신합성에서의 이의 역할을 반영하는 체도 β -세포에서 주로 발현된다. 간에서 글루카곤 수용체의 활성화는 아데닐 시클라제 및 포스포이노시톨 전환의 활성을 자극하여 포스포에놀피루베이트 카복시키나제 (PEPCK), 프럭토오스-1,6-비스포스파타제 (FBPase-1), 및 글루코오스-6-포스파타제 (G-6-Pase)를 포함하는 포도당신합성 효소의 발현을 증가시킨다. 또한, 글루카곤 신호는 글리코겐 인산화효소(glycogen phosphorylase)를 활성화시키고, 글리코겐 합성효소(glycogen synthase)를 저해한다. 연구에 따르면 기저 글루카곤 수준이 높고 식후 글루카곤 분비 억제가 부족하면 인간의 당뇨병 질병에 영향을 미친다는 사실이 밝혀졌다 (Muller et al., N Eng J Med 283:109-115 (1970)). 이와 같이, GCGR 길항제를 이용하여 글루카곤 생성 또는 기능을 표적하여 혈당을 조절하고 저하시키는 방법이 탐구되었다.

[0088] 다양한 실시예에서, 본 발명의 항원 결합 및 길항 단백질은 세포 상에서 발현되는 막-결합된 글루카곤 수용체에 결합하고, 글루카곤 수용체를 통해 글루카곤 신호를 저해 또는 차단하는 것으로 선택될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 항원 결합 및 길항 단백질은 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합한다. 다양한 실시예에서, 인간 글루카곤 수용체에 결합하는 항원 결합 및 길항 단백질은 다른 종의 글루카곤 수용체에 결합할 수도 있다. 여러 종의 글루카곤 수용체에 대한 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열이 알려져 있다 (참조, 예를 들어, 미국특허 번호 제 7,947,809호, 인간, 랙트, 마우스 및 시노몰구스(cynomolgus) 글루카곤 수용체의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열의 특정 교시에 대해 전체 참조로 본 명세서에 포함됨). 본 발명의 다양한 실시예에서, 항원 결합 및 길항 단백질은 서열번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합한다:

[0089] 글루카곤 수용체 인간 (호모 사피엔스) 아미노산 서열

[0090] (등록번호 AAI04855)

MPPCQPQRPLLLLLLACQPQVPSAQVMDFLFEWKLYGDQCHHNLSLLPPPTELVCNRTFD
KYSWCWPDTPANTTANISCPWYLPWHHKVQHRFVFKRCGPDGQWVRGPRGQPWRDASQCQ
MDGEEIEVQKEVAKMYSSFQVMYTVGYSLSLGALLALAILGGLSKLHCTRNAIHANLFASFVVLK
ASSVLVIDGLLRTRYSQKIGDDLSVSTWLSDGAVAGCRVAAVFMQYGVANYCWLLVEGLYLYH
NLLGLATLPERSSFLYLGIGWGAPMLFVVWAVVKCLFENVQCWTSDNMGFWWILRFPVFL
AIIINFFIFVRIQVLLVAKLRARQMHHTDYKFLAKSTLTLIPLLGVHEVVFAFVTDEHAQGTLRSA
KLFFDQLLSSFQGLLVAVLYCFLNKEVQSELRRRWHRWRLGKVWLWEERNTSNHRASSSPGH
PPSKELQFGRGGGSQDSSAETPLAGGLPRLAESPF (서열번호 : 1)

[0092] 다양한 실시예에서, 인용문헌에 기재된 글루카곤 수용체에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성 (당해 기술분야에서 알려지고 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 계산됨)을 가지는 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항원 결합 및 길항 단백질도 본 발명에 포함된다.

[0093] 본 발명의 항원 결합 및 길항 단백질은 글루카곤과 그의 수용체 사이의 상호 작용을 차단함으로써 글루카곤의 포도당 상승 효과를 저해하는 작용을 한다. 이와 같이, 본 발명의 항원 결합 및 길항 단백질의 용도는 정상 포도당 수준을 달성함으로써, 고혈당증, 고글루카곤혈증 및 고인슐린혈증을 포함하나 이에 한정되지 않는 당뇨병

에 의해 야기되는 장기적 합병증의 하나 이상의 증상의 개선 또는 예방하는 효과적인 수단이다. 또한, 본 발명의 항원 결합 및 길항 단백질의 용도는 비-당뇨병 환자에서 정상 포도당 수준을 달성함으로써, 비만 또는 NAFLDs를 포함하거나 이에 한정되지 않는 장애를 갖는 피험자에서 고혈당증, 고글루카곤혈증 및 고인슐린혈증의 위험을 저하시키고, 이러한 비-당뇨병 장애를 치료하기 위한 효과적인 수단이다.

[0094] 인간 글루카곤 수용체와 같은 항원에 결합하는 항체의 제조 방법은 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 표적 항원 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체의 제조 방법은 검출가능한 면역 반응을 자극하는데 효과적인 표적 항원 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물의 양을 마우스에게 투여하는 단계, 마우스로부터 항체-생성 세포 (예를 들어, 비장으로부터의 세포)를 얻고 상기 항체-생성 세포와 골수종 세포를 융합시켜 항체-생성 하이브리도마를 얻는 단계, 및 항체-생성 하이브리도마를 시험하여 표적 항원 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 동정하는 단계를 포함할 수 있다. 일단 얻어지면, 하이브리도마는 임의로 하이브리도마-유래 세포가 표적 항원 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 배양 조건에서, 세포 배양물에서 증식될 수 있다. 단일클론 항체는 세포 배양물로부터 정제될 수 있다. 그 다음, 항원/항체 상호 작용을 시험하기 위해 다양한 상이한 기술을 이용하여 특히 바람직한 항체를 동정할 수 있다.

[0095] 예를 들어, 라이브러리로부터 재조합 항체를 선택하거나, 또는 인간 항체의 완전한 레퍼토리를 생성할 수 있는 형질전환 동물 (예를 들어, 마우스)의 면역화에 의존하는 방법을 포함하여, 필요한 특이성의 항체를 생성 또는 분리하는 다른 적당한 방법이 사용될 수 있다. 참조, 예를 들어, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 90: 2551-2555, 1993; Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258, 1993; Lonberg et al., 미국특허 번호 제 5,545,806호; 및 Surani et al., 미국특허 번호 제 5,545,807호.

[0096] 항체는 다양한 방법으로 조작될 수 있다. 이들은 단일-쇄 항체 (작은 모듈 면역약제(small modular immunopharmaceuticals) 또는 SMIPsTM 포함), Fab 및 F(ab')₂ 단편 등으로 제조될 수 있다. 항체는 인간화, 키메라, 탈면역화, 또는 완전 인간일 수 있다. 수많은 간행물은 많은 유형의 항체와 이러한 항체를 조작하는 방법을 제시한다. 예를 들어, 참조 미국특허 번호 제 6,355,245호; 제 6,180,370호; 제 5,693,762호; 제 6,407,213호; 제 6,548,640호; 제 5,565,332호; 제 5,225,539호; 제 6,103,889호; 및 제 5,260,203호.

[0097] 키메라 항체는 당해 기술분야에서 알려진 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 쥐과(murine) (또는 다른 종) 단일클론 항체 분자의 Fc 불변 영역을 인코딩하는 유전자를 제한 효소로 분해하여 쥐과 Fc를 인코딩하는 영역을 제거하고, 인간 Fc 불변 영역을 인코딩하는 유전자의 동등한 부분을 치환한다 (참조 Robinson et al., International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira, et al., European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., International Application WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. Pat. No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al., Science, 240:1041-1043, 1988; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 84:3439-3443, 1987; Liu et al., J. Immunol., 139:3521-3526, 1987; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 84:214-218, 1987; Nishimura et al., Canc. Res., 47:999-1005, 1987; Wood et al., Nature, 314:446-449, 1985; and Shaw et al., J. Natl Cancer Inst., 80:1553-1559, 1988).

[0098] 항체의 인간화 방법은 당해 기술분야에 기재되어 있다. 일 실시예에서, 인간화 항체는 비인간 CDRs 이외에, 비인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 치환함으로써, 원터와 동료들의 방법에 따라 수행될 수 있다 (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 온전한 인간 가변 영역보다 적은 것을 비인간 종의 상응하는 서열로 치환한 키메라 항체이다 (미국특허 번호 제 4,816,567호). 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 골격 영역 잔기를 설치류 항체의 유사한 부위의 잔기로 치환한 인간 항체이다.

[0099] 퀸 등의 미국특허 번호 제 5,693,761호는 원터 등의 인간화 항체에 대한 정제를 개시하고 있고, 입체 또는 다른 화학적 부적합성 때문에, 결합력 손실 (avidity loss)을 마우스 항체에서 발견된 결합 가능한 형태로 CDRs의 접힘을 간섭하는 인간화 골격에서의 구조적 모티프의 문제의 탓으로 돌리는 전제를 기준으로 한다. 이 문제를 해결하기 위해, 퀸은 선형 펩티드 서열에서 밀접하게 상동인 인간 골격 서열을 인간화될 마우스 항체의 골격 서열에 사용하는 것을 교시한다. 따라서, 퀸의 방법은 종간의 골격 서열을 비교하는데 초점을 맞추고 있다. 일반적으로, 모든 이용가능한 인간 가변 영역 서열을 특정 마우스 서열과 비교하고, 상응하는 골격 잔기들 사이의 퍼

센트 동일성을 계산한다. 가장 높은 퍼센트를 갖는 인간 가변 영역은 인간화 프로젝트를 위한 골격 서열을 제공하도록 선택된다. 또한, 퀸은 인간화 골격에서 결합 가능한 형태의 CDRs를 지지하는데 중요한 마우스 골격의 특정 아미노산 잔기를 유지하는 것이 중요하다고 교시한다. 잠재적인 중요성은 분자 모델로부터 평가된다. 잔류를 위한 후보 잔기는 일반적으로 CDR에 대해 선형 서열 내 또는 물리적으로 임의의 CDR 잔기의 6Å 이내에 인접한 잔기이다.

[0100] 다른 방법에서, 특정 골격 아미노산 잔기의 중요성은 단일 잔기의 마우스 서열로의 복귀 및 Riechmann et al., 1988에 기재된 바와 같은 항원 결합의 분석에 의해 낮은-결합력 인간화 구조체가 얻어지면 실험적으로 결정된다. 골격 서열에서 중요한 아미노산을 동정하기 위한 또 다른 예시적인 방법은 카터 등의 미국특허 번호 제 5,821,337호 및 아데르 등의 미국특허 번호 제 5,859,205호에 개시되어 있다. 이들 문헌은 골격 내 특정 Kabat 잔기 위치를 개시하는데, 인간화 항체에서 결합력을 보존하기 위해 상응하는 마우스 아미노산과의 치환이 필요할 수 있다.

[0101] "골격 뒤섞기(framework shuffling)"라고 하는 항체를 인간화하는 또 다른 방법은, 골격에서 융합된 비인간 CDR 가변 영역을 가진 조합 라이브러리를 개별 인간 생식계 골격의 풀에 생성하는 것에 의존한다 (Dall'Acqua et al., Methods, 36:43, 2005). 그 다음, 라이브러리를 스크리닝하여 양호한 결합을 유지하는 인간화 항체를 인코딩하는 클론을 동정한다.

[0102] 인간화 항체의 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘 다의 인간 가변 영역의 선택은, 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "최적 적합(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 영역의 서열은 알려진 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 설치류의 서열과 가장 가까운 인간 서열은 인간화 항체의 인간 골격 영역 (골격 영역)으로 용인된다 (Sims et al., J. Immunol., 151:2296, 1993; Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901, 1987). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위 군의 모든 인간 항체의 공통 서열(consensus sequence)로부터 유래된 특정 골격 영역을 사용한다. 동일한 골격은 여러 상이한 인간화 항체에 사용될 수 있다 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 89:4285, 1992; Presta et al., J. Immunol., 151:2623, 1993).

[0103] 인간 가변 영역으로 치환하기 위한 비인간 잔기의 선택은 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있다. 이러한 요인은 특정 위치에서 아미노산의 희귀도 (rarity), CDRs 또는 항원과의 상호 작용 확률, 및 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 계면 간의 계면에 참여 확률을 포함한다. (참조, 예를 들어, 미국특허 번호 제 5,693,761호, 제 6,632,927호, 및 제 6,639,055호). 이러한 요인을 분석하는 하나의 방법은 비인간 및 인간화 서열의 3-차원 모델을 사용하는 것이다. 3-차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 이용가능하고 당업자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 예상되는 3-차원 형태의 구조를 설명하고 표시하는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 이러한 디스플레이의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능, 예를 들어 후보 면역글로불린이 이의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석에서 잔기의 알맞은 역할의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, 비인간 잔기는 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은 원하는 항체 특성을 달성하기 위해, 인간 가변 영역 잔기에 대해 선택되고 치환될 수 있다.

[0104] 완전 인간 항체의 제조 방법은 당해 기술분야에 기재되어 있다. 예로서, 항-GCGR 항체 또는 이의 항원 결합 항체 단편의 제조 방법은, 파지 상에서 인간 항체의 라이브러리를 합성하는 단계, GCGR 또는 이의 항체 결합 부분으로 라이브러리를 스크리닝하는 단계, GCGR에 결합하는 파지를 분리하는 단계, 및 파지로부터 항체를 얻는 단계를 포함한다. 다른 예로서, 파지 디스플레이 기술에서 사용하기 위한 항체 라이브러리를 제조하는 하나의 방법은, 인간 면역 글로불린 좌(loci)를 포함하는 비-인간 동물을 GCGR 또는 이의 항원성 부분으로 면역화시켜 면역 반응을 생성하는 단계, 면역화 동물로부터 항체-생성 세포를 추출하는 단계; 추출된 세포로부터 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 RNA를 분리하는 단계, RNA를 역전사시켜 cDNA를 생성하는 단계, 프라이머를 이용하여 cDNA를 증폭시키는 단계, 및 파지 상에서 항체가 발현되도록 cDNA를 파지 디스플레이 백터에 삽입하는 단계를 포함한다. 본 발명의 재조합 항-GCGR 항체는 이러한 방법으로 얻어질 수 있다.

[0105] 다시, 예로서, 본 발명의 재조합 인간 항-GCGR 항체는 재조합 조합 항체 라이브러리를 스크리닝함으로써 분리될 수도 있다. 바람직하게는, 라이브러리는 B 세포로부터 분리된 mRNA로부터 제조된 인간 V_L 및 V_H cDNAs를 이용하여 생성된 scFv 파지 디스플레이 라이브러리이다. 이러한 라이브러리의 제조 방법 및 스크리닝 방법은 당해 기술분야에 알려져 있다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하기 위한 키트는 시판되고 있다 (예를 들어, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; 및 Stratagene SurfZAP™ phage display kit, catalog no. 240612). 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는데 사용될 수 있는 다

른 방법과 시약도 있다 (참조, 예를 들어, 미국특허 번호 제 5,223,409호; PCT 공개번호 WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., Bio/Technology, 9:1370-1372 (1991); Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas, 3:81-85, 1992; Huse et al., Science, 246:1275-1281, 1989; McCafferty et al., Nature, 348:552-554, 1990; Griffiths et al., EMBO J., 12:725-734, 1993; Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896, 1992; Clackson et al., Nature, 352:624-628, 1991; Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 89:3576-3580, 1992; Garrad et al., Bio/Technology, 9:1373-1377, 1991; Hoogenboom et al., Nuc. Acid Res., 19:4133-4137, 1991; and Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 88:7978-7982, 1991), 모두 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0106] 또한, 인간 항체는 이의 개놈 내에 인간 IgE 항원, 예를 들어, XenoMouseTM 동물 (Abgenix, Inc./Amgen, Inc.--Fremont, Calif.)과 함께 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 콰 중 일부 또는 모두를 포함하는 비-인간 형질전환 동물을 면역화합으로써 생성된다. XenoMouseTM 마우스는 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 콰의 큰 단편을 포함하고 마우스 항체 생성이 결핍된 조작된 마우스 균주이다. 참조, 예를 들어, Green et al., Nature Genetics, 7:13-21, 1994 및 미국특허 번호 제 5,916,771호, 제 5,939,598호, 제 5,985,615호, 제 5,998,209호, 제 6,075,181호, 제 6,091,001호, 제 6,114,598호, 제 6,130,364호, 제 6,162,963호 및 제 6,150,584호. XenoMouseTM 마우스는 완전 인간 항체의 성인-유사 인간 레퍼토리를 생성하고 항원-특이적 인간 항체를 생성한다. 일 실시예에서, XenoMouseTM 마우스는 효모 인공 염색체 (YAC)에서 인간 중쇄 콰와 카파 경쇄 콰의 메가염기(megabase) 크기의 생식계열 배열 단편(germline configuration fragments)을 도입하여 인간 항체 V 유전자 레퍼토리의 약 80%를 함유한다. 다른 실시예에서, XenoMouseTM 마우스는 대략 모든 인간 람다 경쇄 콰를 더 함유한다. 참조 Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-156, 1997; Green and Jakobovits, J. Exp. Med., 188:483-495, 1998; 및 WO 98/24893.

[0107] 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 항체 단편을 이용하고, 항체 또는 이의 항원 결합 항체 단편은 다클론 항체, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 재조합 항체, 이중체, 키메라화 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 완전 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편, CDR-이식 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 단일쇄 항체, Fv, Fd, Fab, Fab', 또는 F(ab')₂, 및 합성 또는 반-합성 항체이다.

[0108] 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 적어도 약 1×10^{-7} M, 적어도 약 1×10^{-8} M, 적어도 약 1×10^{-9} M, 적어도 약 1×10^{-10} M, 적어도 약 1×10^{-11} M, 또는 적어도 약 1×10^{-12} M의 해리 상수 (K_D)를 갖는, 글루카곤 수용체 항원에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 이용한다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 적어도 약 1×10^{-7} M 내지 적어도 약 1×10^{-8} M, 적어도 약 1×10^{-9} M 내지 적어도 약 1×10^{-10} M, 적어도 약 1×10^{-11} M, 또는 적어도 약 1×10^{-12} M 내지 적어도 약 1×10^{-13} M의 범위 내의 해리 상수 (K_D)를 갖는, 글루카곤 수용체 항원에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 이용한다.

[0109] 글루카곤 수용체에 대한 항체는 하기 문헌에 기재되어 있다: 미국특허 번호 제 5,770,445호; 제 7,947,809호; 제 7,968,686호; 제 8,545,847호; 제 8,771,696호; 제 9,102,732호; 제 9,248,189호; 유럽특허출원 EP2074149A2; EP 특허 EP0658200B1; 미국특허 공개 2009/0041784; 2009/0252727; 2013/0344538; 2014/0335091 및 20160075778 및 PCT 공개 WO2008/036341. 본 발명의 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 미국특허 번호 제 7,947,809호 및 제 8,158,759호에 제시된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열을 포함하는 항-GCGR ("길항") 항체 또는 항원-결합 단편이고, 다양한 항-GCGR 항체 또는 항원-결합 단편의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열의 특정 교시에 대해 각각 전체 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0110] 본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 2에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 2에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 2에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 항-GCGR 항체이다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 2에 제시된 중쇄 가변 영역 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는

3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 2에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 2에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

**QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV
MWYDGSNKDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRLRAEDTAVYYCAREKD
(서열번호 : 2)**

본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 3에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 3에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 3에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 항-GCGR 항체이다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 3에 제시된 경쇄 가변 영역 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는 3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 3에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 3에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISVQPEDFVTYYCLQHNSNPLTFGGGTKVEIK
(서열번호 : 3)**

다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 2 또는 3의 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 관찰된 상동성을 공유하는 아미노산 서열을 함유한다.

본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 4에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 4에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 4에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 항-GCGR 항체이다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 4에 제시된 중쇄 가변 영역 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는 3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 4에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 4에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

**QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV
AVMWYDGSNKDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRLRAEDTAVYYCARE
KDHYDILTGYNYYGLDVWQGQTTVTVSS (서열번호 : 4)**

본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 5에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 5에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 5에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 항-GCGR 항체이다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 5에 제시된 경쇄 가변 영역 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는 3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 5에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 5에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLQHNSNPLTFGGGTKVEIK
(서열번호 : 5)**

다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 4 또는 5의 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 관찰된 상동성을 공유하는 아미노산 서열을 함유한다.

본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 6에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 6에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양

한 실시예에서, 항체는 서열번호: 6에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 항-GCGR 항체이다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 6에 제시된 중쇄 가변 영역 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는 3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 6에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 6에 제시된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
VMWYDGSNKDYYDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRLRAEDTAVYYCAREK
DHYDILTGYNYYYGLDVWGQGTTVTVSS (서열번호 : 6)

[0121] [0122] 본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 7에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 7에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 7에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 항-GCGR 항체이다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 7에 제시된 경쇄 가변 영역 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는 3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 7에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 7에 제시된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGI[RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASS
LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDFVTYYCLQHNSNPLTFGGGTKVEIK
(서열번호 : 7)

[0123] [0124] 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 6 또는 7의 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 관찰된 상동성을 공유하는 아미노산 서열을 함유한다.

[0125] 본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 8에 제시된 중쇄 서열을 포함하는 키메라 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 8에 제시된 중쇄 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 8에 제시된 중쇄 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는 3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 8에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 8에 제시된 중쇄 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWV
RQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKDYYDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRLRAEDTAV
YYCAREKDHYDILTGYNYYYGLDVWGQGTTVTSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMSV
TLGCLVKGYFPEPVTVWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVT
CNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVV
DISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKC
RVNSAAFPAPIEKTKISKTGRPAPQVYTI PPPKEQMAKDVKSLTCMITDFFPEDITVEW
QWNGQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLEHGLHNHHT
EKSLSHSPGK (서열번호 : 8)

[0126] [0127] 본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 9에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 키메라 항체의 항원-결합 친화도와 동일하거나 또는 더 높은 것을 갖는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 9에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 9에 제시된 경쇄 서열의 적어도 하나 (예를 들어, 2 또는 3)의 CDRs을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 9에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 9에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다:

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGI[RNDLGWYQ
QKPGKAPKRLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDFVTYYCLQHNSNPLT
FGGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSRQN
GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT[KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
(서열번호 : 9)

[0129] 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 8 또는 9의 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 관찰된 상동성을 공유하는 아미노산 서열을 함유한다.

[0130] 본 발명의 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 서열번호: 24, 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 및 서열번호: 28로부터 선택된 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 서열번호: 46, 및 서열번호: 47로부터 선택된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-GCGR 항체일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항체는 서열번호: 10-28 또는 서열번호: 29-47의 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 관찰된 상동성을 공유하는 아미노산 서열을 함유한다.

항-GCGR 항체의 예

HCVR	LCVR
서열번호: 2	서열번호: 3
서열번호: 4	서열번호: 5
서열번호: 6	서열번호: 7
서열번호: 10	서열번호: 29
서열번호: 11	서열번호: 30
서열번호: 12	서열번호: 31
서열번호: 13	서열번호: 32
서열번호: 14	서열번호: 33
서열번호: 15	서열번호: 34
서열번호: 16	서열번호: 35
서열번호: 17	서열번호: 36
서열번호: 18	서열번호: 37
서열번호: 19	서열번호: 38
서열번호: 20	서열번호: 39
서열번호: 21	서열번호: 40
서열번호: 22	서열번호: 41
서열번호: 23	서열번호: 42
서열번호: 24	서열번호: 43
서열번호: 25	서열번호: 44
서열번호: 26	서열번호: 45
서열번호: 27	서열번호: 46
서열번호: 28	서열번호: 47

[0131]

[0132] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항체는 서열번호: 28의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열 및 서열번호: 47의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 완전 인간 항체이다.

[0133]

본 발명의 분리된 항-GCGR 항체, 항체 단편, 또는 항체 유도체는 당해 기술분야에서 알려진 임의의 불변 영역을 포함할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파- 또는 람다-유형 경쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 카파- 또는 람다-유형 경쇄 불변 영역일 수 있다. 중쇄 불변 영역은 알파-, 델타-, 웹실론-, 감마-, 또는 뮤-유형 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 알파-, 델타-, 웹실론-, 감마-, 또는 뮤-유형 중쇄 불변 영역일 수 있다. 다양한 실시예에서, 경쇄 또는 중쇄 불변 영역은 자연적으로 발생하는 불변 영역의 단편, 유도체, 변이체, 또는 뮤테인이다.

[0134]

관심 항체, 즉 하위종류 스위칭(subclass switching)으로부터 상이한 하위종류 또는 동형의 항체를 유도하는 기술이 알려져 있다. 따라서, IgG 항체는 IgM 항체로부터 유도될 수 있으며, 그 반대도 그렇다. 이러한 기술은 주어진 항체 (부모 항체)의 항원-결합 특성을 갖는 새로운 항체의 제조를 가능하게 하지만, 부모 항체의 것과 다른 항체 동형 또는 하위종류와 관련된 생물학적 특성도 나타낸다. 제조합 DNA 기술이 사용될 수 있다. 특정 항

체 폴리펩티드를 인코딩하는 복제된 DNA는 이러한 과정, 예를 들어, 원하는 동형의 항체의 불변 도메인을 인코딩하는 DNA에서 사용될 수 있다. 참조 Lanitto et al., Methods Mol. Biol. 178:303-16 (2002).

[0135] 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 항원 결합 단백질은 서열번호: 48에 제시된 불변 경쇄 카파 영역, 또는 이의 단편을 포함한다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 항원 결합 단백질은 서열번호: 49에 제시된 불변 경쇄 람다 영역, 또는 이의 단편을 포함한다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 항원 결합 단백질은 서열번호: 50에 제시된 IgG2 중쇄 불변 영역, 또는 이의 단편을 포함한다.

[0136] 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 서열번호: 51에 제시된 중쇄 서열 및 서열번호: 52에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 완전 인간 항-GCGR 항체이다.

[0137] 본 발명의 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질은 반체 (hemobody)이다. "반체"는 완전한 중쇄, 완전한 경쇄 및 완전한 중쇄의 Fc 영역과 쌍을 이루는 제 2 중쇄 Fc 영역을 포함하는 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 구조체이다. 링커는 중쇄 Fc 영역 및 제 2 중쇄 Fc 영역을 결합하기 위해 사용될 수 있으나, 사용하지 않아도 된다. 다양한 실시예에서, 반체는 (i) 온전한 경쇄, 및 (ii) Fc 영역에 융합된 중쇄 (예를 들어, IgG2 Fc 영역)를 포함하는 1가 항원 결합 단백질이다. 반체의 제조 방법은 미국특허출원 제 2012/0195879호에 기재되어 있으며, 이러한 반체의 제조를 교시할 목적으로 본 명세서에 전체 참조로 포함된다.

약학 조성물

[0139] 다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 분리된 길항 항원 결합 단백질과 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체(들)을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 명세서에 기재된 약학 조성물 및 이용 방법은 하기에 기재된 바와 같이 다른 활성제와의 조합 (공동-투여)의 실시예를 포함한다.

[0140] 일반적으로, 본 발명의 길항 항원 결합 단백질은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체(들)과 함께 제형으로서 투여하기에 적합하다. 용어 '담체'는 본 발명의 화합물(들) 이외의 임의의 성분을 설명하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 담체(들)의 선택은 특정 투여 방식, 담체가 용해도 및 안정성에 미치는 영향, 및 제형의 특성과 같은 요인에 크게 의존할 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"는 생리적으로 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체의 일 예는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로오스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합이다. 많은 경우에, 조성물은 등장화제, 예를 들면, 조성물 내에서 당, 만니톨과 같은 폴리알콜, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함할 것이다. 약학적으로 허용가능한 물질의 추가 예는 습윤제 또는 소량의 보조 물질, 예를 들어 항체의 유통기한 또는 유효성을 향상시키는 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충액이다. 본 발명의 약학 조성물 및 이의 제조 방법은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 이러한 조성물 및 이의 제조 방법은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995)에서 확인될 수 있다. 약학 조성물은 일반적으로 멸균, 실질적으로 등장성 및 미국 식품 의약국의 모든 GMP 규정을 완전히 준수하여 제형화된다.

[0141] 본 발명의 약학 조성물은 일반적으로 비경구 투여에 적합하다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 약학 조성물의 "비경구 투여"는 피험자의 조직의 물리적 과손 및 조직의 균열을 통한 약학 조성물의 투여를 특징으로 하는 임의의 투여 경로를 포함하여, 일반적으로 혈류로, 근육으로 또는 내부 장기(internal organ)로 직접 투여된다. 따라서, 비경구 투여는 조성물의 주사에 의한, 외과적 절개를 통한 조성물의 적용에 의한, 조직-관통 비-외과적 상처를 통한 조성물의 적용에 의한 약학 조성물의 투여 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특히, 비경구 투여는 피하 주사, 복강내 주사, 근육내 주사, 흉골내 주사, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 척수강내 주사, 뇌실내 주사, 요도내 주사, 두개내(intracranial) 주사, 활막내 주사 또는 주입; 또는 신장 투석 주입 기술을 포함하는 것으로 생각되나 이에 한정되지 않는다.

[0142] 본 발명의 약학 조성물은 표준 바늘 및 주사기로 피하 또는 정맥 내로 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달과 관련하여, 펜 전달 장치는 본 발명의 약학 조성물을 전달하는데 용이하게 적용될 수 있다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용할 수 있거나 또는 일회용일 수 있다. 재사용 가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약학 조성물을 함유하는 교체 가능한 카트리지를 사용한다. 카트리지 내의 모든 약학 조성물이 투여되고 카트리지가 비워지면, 빈 카트리지는 즉시 폐기되고 약학 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 대체될 수 있다. 그 다음, 펜 전달 장치는 재사용될 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에는 대체할 수 있는 카트리지가 없다. 오히려, 일회용 펜 전달 장치는 장치 내의 저장소에 보유된 약학 조성물로 미리 채워진다. 일단 저장소가 약학 조성물을 비우면, 전체 장치는 폐기된다. AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems,

Burghdorf, Switzerland), 및 HUMALOG MIX 75/25™, HUMALOG™ pen, HUMALIN 70/30™ pen (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind.)를 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 재사용 가능한 펜 및 자동주사기 전달 장치는 본 발명의 약학 조성물의 피하 전달에 적용된다.

[0143] 일반적으로 비경구 투여에 적합한 약학 조성물의 제형은 멸균수 또는 멸균 등장성 식염수와 같은 약학적으로 허용가능한 담체와 조합한 활성 성분을 포함한다. 이러한 제형은 일시 투여(bolus administration) 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 주사 제형은 보존제를 함유하는 앰플 또는 다중-용량 용기와 같은 단위 제형으로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 혼탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클 중의 에멀젼, 페이스트 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 제형은 혼탁제, 안정화제, 또는 분산제를 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가 성분을 더 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제형의 일 실시예에서, 활성 성분은 재구성된 조성물의 비경구 투여 전에 적당한 비히클(예를 들어, 멸균 주사용 증류수(sterile pyrogen-free water))로 재구성하기 위해 건조(즉, 분말 또는 과립) 형태로 제공된다. 또한, 비경구 제형은 염, 탄수화물 및 완충제(바람직하게는, pH 3 내지 9)와 같은 담체를 함유할 수 있는 수용액을 포함하나, 일부 적용의 경우, 이들은 멸균 비-수용액으로 또는 멸균 주사용 증류수와 같은 적당한 비히클과 함께 사용되는 건조된 형태로 더 적당하게 제형화될 수 있다. 예시적인 비경구 투여 형태는 멸균 수용액, 예를 들어, 프로필렌 글리콜 수용액 또는 텍스트로오스 수용액 내의 용액 또는 혼탁액을 포함한다. 이러한 제형은 원한다면 적절하게 완충될 수 있다. 유용한 다른 비경구적으로 투여 가능한 제형은 활성 성분을 미세결정형 내 또는 리포좀 제제 내에 포함하는 것을 포함한다. 비경구 투여용 제형은 즉시 방출 및/또는 변형 방출로 제형화 될 수 있다. 변형 방출 제형은 지연 방출, 서방출, 펄스 방출, 조절 방출, 표적 방출 및 예정된 방출(programmed release)을 포함한다.

[0144] 예를 들어, 일 측면에서, 멸균 주사 용액은 필요에 따라 적당한 용매에서 필요량의 분리된 길항 항원 결합 단백질을 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 혼입시킨 다음, 여과 멸균시켜 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들 중 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시켜 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 진공 건조 및 동결 건조와 같은 제조 방법은 활성 성분의 분말 + 이의 미리 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 바람직한 성분을 생성한다. 용액의 적당한 유동성은 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사 가능한 조성물의 장기 흡수는 조성물에서 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 야기될 수 있다. 다양한 실시예에서, 주사 가능한 조성물은 시판되는 일회용 주사 가능한 장치를 이용하여 투여될 것이다.

[0145] 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 일반적으로 적당한 추진제(propellant)를 사용하거나 또는 사용하지 않고, 가압 용기, 펌프, 스프레이, 분무기(atomiser)(바람직하게는, 미세한 안개를 생성하기 위해 전기유체역학을 이용하는 분무기), 또는 연무기(nebulizer)로부터 에어로졸 스프레이로서, 또는 비강 액적(nasal drops)으로서, 건조 분말 흡입기로부터 건조 분말(단독으로, 혼합물로서, 또는 혼합된 성분 입자, 예를 들어, 적당한 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합된 입자로서)의 형태로, 비강 내로 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다.

[0146] 가압 용기, 펌프, 스프레이, 분무기, 또는 연무기는 일반적으로 적당한 활성 물질의 분산, 가용화, 또는 방출을 연장하는데 적합한 물질인, 추진제(들)을 용매로서 포함하는 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용액 또는 혼탁액을 함유한다.

[0147] 건조 분말 또는 혼탁액 제형에 사용하기 전에, 의약품은 일반적으로 흡입에 의한 전달에 적합한 크기(일반적으로 5 마이크론 미만)로 미분화된다. 이는 나선형 제트 밀링, 유동층 제트 밀링, 나노 입자를 형성하기 위한 초임계 유체 처리, 고압 균질화, 또는 분무 건조와 같은 임의의 적당한 분쇄 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0148] 흡입기 또는 취입기(insufflator)에 사용하기 위한 캡슐, 블리스터 및 카트리지는 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질, 적당한 분말 기체 및 성능 개질제의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화 될 수 있다.

[0149] 멘톨 및 레보멘톨과 같은 적당한 향미제, 또는 사카린 또는 사카린 나트륨과 같은 감미제는 흡입/비강내 투여용으로 의도된 본 발명의 제형에 첨가될 수 있다.

[0150] 흡입/비강내 투여용 제형은 즉시 방출 및/또는 변형 방출로 제형화 될 수 있다. 변형 방출 제형은 지연 방출, 서방출, 펄스 방출, 조절 방출, 표적 방출 및 예정된 방출을 포함한다.

[0151] 건조 분말 흡입기 및 에어로졸의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하는 벨브에 의해 결정된다. 본 발명에 따른 단위는 일반적으로 본 발명의 항체의 정량(metered dose) 또는 "퍼프(puff)"를 투여하도록 배열된다. 총

일일 용량은 일반적으로 단일 용량으로 투여되거나, 또는 보다 일반적으로는 하루 종일 분할 용량으로 투여될 것이다.

[0152] 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 경구 투여용으로 제형화될 수도 있다. 경구 투여는 화합물이 위장관으로 들어가도록 삼키는 것을 포함할 수 있고, 및/또는 화합물이 입으로부터 직접 혈류로 들어가는 협측(buccal), 혀(lingual) 또는 혀밑(sublingual) 투여를 포함할 수 있다. 경구 투여에 적합한 제형은 고체, 반고체 및 액체계, 예를 들어 정제; 다중-미립자 또는 나노-미립자, 액체, 또는 분말을 함유하는 연질 캡슐 또는 경질 캡슐; 로렌지(lozenges) (액체-충전된 것 포함); 씹는 것; 겔; 빠른 분산 제형; 필름; 질좌체(ovules); 스프레이; 및 협측/점막 접착 폐치를 포함한다.

[0153] 경구용 약학 조성물은 약학 조성물의 제조를 위해 당해 기술분야에 알려진 임의의 방법에 따라 제조될 수 있으며, 이러한 조성물은 약학적으로 우아하고 맛이 좋은 제제를 제공하기 위해 감미제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 함유할 수 있다. 예를 들어, 경구 전달용 정제를 제조하기 위해, 분리된 길항 항원 결합 단백질을 적어도 하나의 약학적 담체와 혼합하고, 고체 제형을 압축하여 위장관으로 전달하기 위해 알려진 방법에 따라 정제를 형성한다. 정제 조성물은 일반적으로 첨가제, 예를 들어 당류(saccharide) 또는 셀룰로오스 담체, 전분풀 또는 메틸 셀룰로오스와 같은 결합제, 충전제, 봉해제, 또는 의료 제제의 제조에 통상적으로 사용되는 기타 첨가제와 함께 제형화된다. 경구 전달용 캡슐을 제조하기 위해, DHEA를 적어도 하나의 약학적 담체와 혼합하고, 고체 제형을 위장관으로 전달하기에 적합한 캡슐 용기에 넣는다. 분리된 길항 항원 결합 단백질을 포함하는 조성물은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042) at Chapter 89]에 일반적으로 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0154] 다양한 실시예에서, 약학 조성물은 정제의 제조에 적합한 비-독성 약학적으로 허용가능한 담체와의 혼합물에서 분리된 길항 항원 결합 단백질을 함유하는 경구 전달용 정제로 제형화된다. 이들 담체는 불활성 희석제, 예를 들어 탄산칼슘, 탄산나트륨, 락토오스, 인산칼슘 또는 인산나트륨; 과립화제 및 봉해제, 예를 들어, 옥수수 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 및 윤활제, 예를 들어, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산, 또는 탈크일 수 있다. 정제는 코팅되지 않을 수 있거나 또는 위장관에서의 봉해 및 흡수를 지연시켜 장기간에 걸쳐 지속 작용을 제공하는 알려진 기술로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 시간 지연 물질을 단독으로 또는 왁스와 함께 사용할 수 있다.

[0155] 다양한 실시예에서, 약학 조성물은 분리된 길항 항원 결합 단백질이 불활성 고체 희석제, 예를 들어, 탄산칼슘, 인산칼슘, 또는 카올린과 혼합한 경질 젤라틴 캡슐로, 또는 분리된 길항 항원 결합 단백질이 수성 또는 유성 매질, 예를 들어, 아라키스 오일(arachis oil), 낙화생유(peanut oil), 유동 파라핀(liquid paraffin) 또는 올리브유와 혼합한 연질 젤라틴 캡슐로 제형화된다.

[0156] 액체 제형은 혼탁액, 용액, 시럽 및 엘릭시르(elixirs)를 포함한다. 이러한 제형은 (젤라틴 또는 히드록시프로필메틸셀룰로오스로부터 제조된) 연질 캡슐 또는 경질 캡슐 내 충전제로서 사용될 수 있고, 일반적으로 담체, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 메틸셀룰로오스, 또는 적당한 오일, 및 하나 이상의 에멀젼화제 및/또는 혼탁제를 포함한다. 액체 제형은 향낭(sachet)으로부터의 고체의 재구성에 의해 제조될 수도 있다.

[0157] 당해 기술분야에서 용인된 펩티드, 단백질 또는 항체를 투여하기 위한 임의의 방법은 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질을 투여하기 위해 적당하게 사용될 수 있다.

치료 방법

[0159] 글루카곤 수용체와의 상호 작용으로 인해, 본 발명의 항원 결합 및 길항 단백질은 포도당신합성(gluconeogenesis) 및 글리코겐 분해(glycogenolysis)를 조절함으로써 혈당 수준을 저하시키고, 또한 글루카곤과 이의 수용체와의 상호 작용을 차단하는 광범위한 질병 및 장애의 치료에 유용한 동시에, 현재 치료법과 관련된 하나 이상의 원하지 않는 부작용을 감소 및/또는 제거에 유용하다.

[0160] 본 발명의 일 측면에서, 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 과도한 수준의 글루카곤 (고글루카곤혈증) 및/또는 혈당으로 특징지워진 장애 또는 질병으로 진단된 피험자를 치료하는 방법이 제공된다. 다양한 실시예에서, 항원 결합 및 길항 단백질은 완전 인간 단일클론 항체이고, 장애는 비만이다. 다양한 실시예에서, 항원 결합 및 길항 단백질은 완전 인간 단일클론 항체이고, 장애는 NAFLD이다. 다양한 실시예에서, 항원 결합 및 길항 단백질은 완전 인간 단일클론 항체이고, 장애는 NASH이다.

[0161]

본 발명에 따른 길항 항원 결합 단백질, 특히 인간 항체는 생존가능한 치료제를 구성하기 위해 질환의 모든 증상 또는 징후를 완전히 치유하거나, 또는 근절시킬 필요는 없다. 관련 분야에서 인식되는 바와 같이, 치료제로서 사용되는 약물은 주어진 질환 상태의 중증도를 감소시킬 수 있으나, 유용한 치료제로서 간주되는 것으로 질환의 모든 징후를 없앨 필요는 없다. 유사하게, 예방적으로 투여된 치료는 생존가능한 예방제를 구성하기 위해 질병의 발병을 예방하는데 완전히 효과적일 필요는 없다. 피험자에게서 (예를 들어, 질환의 증상의 수 또는 중증도를 감소시키거나, 또는 다른 치료의 유효성을 증가시키거나, 또는 다른 유익한 효과를 발생시킴으로써) 질환의 영향을 단순히 감소시키거나, 또는 질환이 발생하거나 또는 악화될 가능성을 감소시키는 것이면 충분하다. 본 발명의 일 실시예는 특정 장애의 중증도를 반영하는 지표의 기준치 이상으로 지속적인 개선을 유도하기에 충분한 양 및 시간으로 인간 항체와 같은 분리된 길항 항원 결합 단백질을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0162]

본 발명의 다양한 실시예에서, 비만은 30 kg/m^2 이상의 BMI로 정의된다 (National Institute of Health, Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults (1998)). 다양한 다른 실시예에서, 본 발명은 또한 25 kg/m^2 이상, 26 kg/m^2 이상, 27 kg/m^2 이상, 28 kg/m^2 이상, 29 kg/m^2 이상, 29.5 kg/m^2 이상, 또는 29.9 kg/m^2 이상의 체질량 지수 (BMI)로 특징지워진 질환, 장애 또는 질병을 포함하는 것이고, 이를 모두는 일반적으로 과체중이라고 한다.

[0163]

본 발명의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질, 특히, 완전 인간 항체는 일정 기간 동안 일정한 간격으로, 예를 들어, 1회 또는 1회 이상 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 완전 인간 항체는 적어도 1개월에 1회 이상, 예를 들어 1, 2 또는 3개월 동안, 또는 심지어 무기한으로 투여된다. 만성 질병을 치료하기 위해서는, 일반적으로 장기간 치료가 가장 효과적이다. 그러나, 급성 질병을 치료하기 위해서는, 보다 짧은 기간 동안, 예를 들어 1주에서 6주까지의 투여가 충분할 수 있다. 일반적으로, 완전 인간 항체는 피험자가 선택된 지표 또는 지표들에 대한 기준치 이상으로 의학적으로 관련된 개선 정도를 나타낼 때까지 투여된다.

[0164]

본 명세서에서 제공되는 치료 방법 중 하나의 예는 혈당 수준이 역할을 하는 질병을 치료하기 위해, 적당한 투여량으로, 1주에 1회 또는 2주에 1회씩, 분리된 길항 항원 결합 단백질의 피하 주사를 포함한다. 분리된 길항 항원 결합 단백질의 매주 또는 매달 투여는 원하는 결과가 달성될 때까지, 예를 들어, 피험자의 증상이 가라앉을 때까지 계속될 것이다. 필요에 따라 치료를 재개할 수 있거나, 또는 대안적으로 유지 용량을 투여할 수도 있다.

[0165]

피험자의 혈당 수준은, 만약 있다면, 이들의 수준에서의 변화를 검출하기 위해, 인간 항체와 같은 분리된 길항 항원 결합 단백질로 치료 전, 치료 중 및/또는 치료 후에 관찰될 수 있다. 일부 장애의 경우, 혈당 상승의 발병률은 질환의 단계와 같은 이러한 요인에 따라 달라질 수 있다. 혈당 수준을 측정하기 위해 알려진 기술이 사용될 수 있다. 글루카곤 수준은 알려진 기술, 예를 들어, ELISA를 이용하여 피험자의 혈액에서 측정될 수도 있다.

[0166]

치료적 유효량은 IC_{50} 를 측정하여 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정될 수 있다. 그 다음, 세포 배양에서 측정된 IC_{50} 를 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 용량을 명확하게 나타낼 수 있다. 이러한 정보를 사용하여 인간에서의 유용한 용량을 더 정확하게 결정할 수 있다. 혈장 내의 수준은 치료 약물에 특이적인 항-유전자형 항체(anti-idiotypic antibodies)를 이용하여 HPLC 또는 면역분석법에 의해 측정될 수 있다. 정확한 조성물, 투여 경로 및 투여량은 피험자의 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 선택될 수 있다.

[0167]

용량 요법은 최적의 원하는 반응 (예를 들어, 치료적 또는 예방적 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 큰 환약이 투여될 수 있고, 여러 번 분할 용량 (다중 또는 반복 또는 유지)이 시간이 지남에 따라 투여될 수 있으며, 용량은 치료 상황의 긴급 상황에 따라 비례하여 감소되거나 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 단위 제형으로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 바람직하다. 본 명세서에서 사용되는 단위 제형은 치료받을 포유류 피험자에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 나타내고; 각 단위는 요구되는 약학적 담체와 함께 원하는 치료 효과를 야기하도록 계산된 미리 정해진 양의 활성화합물을 함유한다. 본 발명의 단위 제형에 대한 명세서는 항체의 독특한 특성 및 달성될 특별한 치료적 또는 예방적 효과에 의해 주로 지시될 것이다.

[0168]

따라서, 당업자는 본 명세서에 제공된 발명을 기준으로 하여, 용량 및 투여 요법이 치료 분야에서 잘-알려진 방법에 따라 조정된다는 것을 이해할 것이다. 즉, 최대 허용 용량은 쉽게 확립될 수 있고, 피험자에게 검출가능한 치료 이익을 제공하는 유효량은 피험자에게 검출가능한 치료 이익을 제공하도록 각 약제를 투여하기 위한 일시

적인 요구 사항과 마찬가지로 결정될 수도 있다. 따라서, 특정 용량 및 투여 요법이 본 명세서에 예시되어 있지만, 이들 예들은 본 발명을 실시할 때 피험자에게 제공될 수 있는 용량 및 투여 요법을 결코 제한하지 않는다.

[0169] 용량 값은 완화될 질병의 유형 및 중증도에 따라 달라질 수 있으며, 단일 또는 다중 용량을 포함할 수 있음을 유의해야 한다. 임의의 특정 피험자에 대해, 특정 용량 요법은 조성물의 투여를 관리 또는 감독하는 사람의 개인적인 필요 및 전문적인 판단에 따라 시간이 지나면서 조정되어야 하며, 본 명세서에 제시된 용량 범위는 단지 예시적일 뿐 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하지 않는다는 것을 더 이해하여야 한다. 또한, 본 발명의 조성물과 함께 용량 요법은 질환의 유형, 피험자의 연령, 체중, 성별, 질병, 질병의 중증도, 투여 경로, 및 사용된 특정 항체를 포함하여, 다양한 요인에 기초할 수 있다. 따라서, 용량 요법은 광범위하게 다양할 수 있지만, 표준 방법을 이용하여 일상적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 용량은 독성 효과 및/또는 실험값과 같은 임상 효과를 포함할 수 있는 약동학적 또는 약력학적 매개변수를 기준으로 하여 조정될 수 있다. 따라서, 본 발명은 당업자에 의해 결정된 피험자내 용량 증가(intra-subject dose-escalation)를 포함한다. 적당한 용량 및 요법을 결정하는 것은 관련 기술분야에 잘-알려져 있으며, 본 명세서에 개시된 교시를 일단 제공받은 당업자에 의해 포함되는 것으로 이해될 것이다.

[0170] 인간 환자에게 투여하기 위해, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 총 매월 용량은, 당연히, 투여 방식에 따라 환자당 0.5-1200 mg, 환자당 0.5-1100 mg, 환자당 0.5-1000 mg, 환자당 0.5-900 mg, 환자당 0.5-800 mg, 환자당 0.5-700 mg, 환자당 0.5-600 mg, 환자당 0.5-500 mg, 환자당 0.5-400 mg, 환자당 0.5-300 mg, 환자당 0.5-200 mg, 환자당 0.5-100 mg, 환자당 0.5-50 mg, 환자당 1-1200 mg, 환자당 1-1100 mg, 환자당 1-1000 mg, 환자당 1-900 mg, 환자당 1-800 mg, 환자당 1-700 mg, 환자당 1-600 mg, 환자당 1-500 mg, 환자당 1-400 mg, 환자당 1-300 mg, 환자당 1-200 mg, 환자당 1-100 mg, 또는 환자당 1-50 mg의 범위 내일 수 있다. 예를 들어, 정맥내 매월 용량은 환자당 약 1-1000 mg이 필요할 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-500 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-400 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-300 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-200 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-150 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-100 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-50 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질은 환자당 약 1-50 mg의 정맥내 매월 용량으로 투여될 수 있다. 총 매월 용량은 단일 용량 또는 분할 용량으로 투여될 수 있으며, 의사의 재량에 따라 본 명세서에 명시된 범위를 벗어날 수 있다.

[0171] 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 또는 예방적 유효량의 예시적인, 비-제한적인 매주 또는 격주 투여 범위는 0.001 내지 100 mg/kg 체중, 0.001 내지 90 mg/kg, 0.001 내지 80 mg/kg, 0.001 내지 70 mg/kg, 0.001 내지 60 mg/kg, 0.001 내지 50 mg/kg, 0.001 내지 40 mg/kg, 0.001 내지 30 mg/kg, 0.001 내지 20 mg/kg, 0.001 내지 10 mg/kg, 0.001 내지 5 mg/kg, 0.001 내지 4 mg/kg, 0.001 내지 3 mg/kg, 0.001 내지 2 mg/kg, 0.001 내지 1 mg/kg, 0.010 내지 50 mg/kg, 0.010 내지 40 mg/kg, 0.010 내지 30 mg/kg, 0.010 내지 20 mg/kg, 0.010 내지 10 mg/kg, 0.010 내지 5 mg/kg, 0.010 내지 4 mg/kg, 0.010 내지 3 mg/kg, 0.010 내지 2 mg/kg, 0.010 내지 1 mg/kg, 0.1 내지 50 mg/kg, 0.1 내지 40 mg/kg, 0.1 내지 30 mg/kg, 0.1 내지 20 mg/kg, 0.1 내지 10 mg/kg, 0.1 내지 5 mg/kg, 0.1 내지 4 mg/kg, 0.1 내지 3 mg/kg, 0.1 내지 2 mg/kg, 0.1 내지 1 mg/kg, 1 내지 50 mg/kg, 1 내지 40 mg/kg, 1 내지 30 mg/kg, 1 내지 25 mg/kg, 1 내지 20 mg/kg, 1 내지 15 mg/kg, 1 내지 10 mg/kg, 1 내지 7.5 mg/kg, 1 내지 5 mg/kg, 1 내지 4 mg/kg, 1 내지 3 mg/kg, 1 내지 2 mg/kg, 또는 1 mg/kg 체중일 수 있다. 용량 값은 완화될 질병의 유형 및 중증도에 따라 달라질 수 있음을 유의해야 한다. 임의의 특정 환자에 대해, 특정 용량 요법은 조성물의 투여를 관리 또는 감독하는 사람의 개인적인 필요 및 전문적인 판단에 따라 시간이 지나면서 조정되어야 하며, 본 명세서에 제시된 용량 범위는 단지 예시적일 뿐 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하지 않는다는 것을 더 이해하여야 한다.

[0172] 다양한 실시예에서, 투여된 총 용량은 약 1 내지 1000 μ g/ml, 약 1 내지 750 μ g/ml, 약 1 내지 500 μ g/ml, 약 1 내지 250 μ g/ml, 약 10 내지 1000 μ g/ml, 약 10 내지 750 μ g/ml, 약 10 내지 500 μ g/ml, 약 10 내지 250 μ g/ml, 약 20 내지 1000 μ g/ml, 약 20 내지 750 μ g/ml, 약 20 내지 500 μ g/ml, 약 20 내지 250 μ g/ml, 약 30 내지 1000 μ g/ml, 약 30 내지 750 μ g/ml, 약 30 내지 500 μ g/ml, 약 30 내지 250 μ g/ml 범위의 혈장 항체 농도를 달성할 것이다.

[0173] 다양한 실시예에서, 단일 요법으로 또는 항-비만제와 병용하여, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.01 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된

길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.025 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.05 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.075 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.1 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.25 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.5 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 0.75 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 1 mg/kg 체중일 것이다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 1.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 2 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 2.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 3 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 3.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 4 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 4.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 5.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 6 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 6.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 7 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 7.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 8 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 8.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 9 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 9.5 mg/kg 체중일 것이다. 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질의 치료적 유효량에 대한 매주 또는 격주 용량은 10 mg/kg 체중일 것이다.

[0174] 본 발명의 약학 조성물의 독성 및 치료 지수는, LD₅₀ (개체군의 50%에 치사되는 용량) 및 ED₅₀ (개체군의 50%에서 치료적 유효량)를 결정하기 위해, 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약학 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료적 유효량 사이의 용량비는 치료 지수이며, 비율 LD₅₀/ED₅₀로 나타낼 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 조성물이 일반적으로 바람직하다.

[0175] 다양한 실시예에서, 약학 조성물의 단일 또는 다중 투여는 피험자에 의해 요구되고 허용되는 용량 및 빈도에 따라 투여된다. 아무튼, 조성물은 피험자를 효과적으로 치료하기 위해 충분한 양의 본 명세서에 개시된 분리된 길항 항원 결합 단백질 중 적어도 하나를 제공해야 한다. 용량은 1회 투여될 수 있으나, 치료 결과가 달성될 때까지 또는 부작용이 치료 중단을 보증할 때까지 주기적으로 적용될 수 있다.

[0176] 분리된 길항 항원 결합 단백질 약학 조성물의 투여의 투여 빈도는 치료의 특성 및 치료되는 특정 질환에 달려있다. 피험자는 원하는 치료 결과가 달성될 때까지 일정한 간격으로, 예를 들어 매주, 격주 또는 매월 치료될 수 있다. 예시적인 투여 빈도는 중단 없이 매주 한번; 매주, 격주로 한번; 2주에 한번; 3주에 한번; 2주 동안 중단 없이 약하게, 그 다음 매월; 3주 동안 중단 없이 약하게, 그 다음 매월; 매월; 2개월에 한번; 3개월에 한번; 4개월에 한번; 5개월에 한번; 또는 6개월에 한번; 또는 1년에 한번을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0177] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "공동-투여", "공동-투여된" 및 "병용하여"는, 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질 및 하나 이상의 다른 치료제(들)을 나타내는 것을 의미하는 것으로 의도되고, 하기의 것을 나타내고 포함한다: 이러한 성분들이 함께 실질적으로 동일한 시간에 피험자에게 상기 성분을 방출하는 단일 제형으로 제형화 될 때, 치료를 필요로 하는 피험자에게 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질 및 치료제(들)의 이러한 조합의 동시 투여; 이러한 성분들이 실질적으로 동시에 피험자에 의해 취해진 별도의 제형으로 서로 별도로 제형화하여 상기 성분이 상기 피험자에게 실질적으로 동시에 방출될 때, 치료를 필요로 하는 피험자에게 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질 및 치료제(들)의 이러한 조합의 실질적으로 동시에 투여; 이러한 성분들이

각 투여 사이의 상당한 시간 간격으로 피험자에 의해 연속하여 취해진 별도의 제형으로 서로 별도로 제형화하여 상기 성분이 상기 피험자에게 실질적으로 상이한 시간에 방출될 때, 치료를 필요로 하는 피험자에게 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질 및 치료제(들)의 이러한 조합의 순차적인 투여; 및 이러한 성분들이 함께 조절된 방식으로 상기 성분을 방출하는 단일 제형으로 제형화하여 이들이 상기 피험자에게 동일한 시간 및/또는 상이한 시간에 동시, 연속 및/또는 중첩하는 방식으로 방출되며, 여기서 각 부분이 동일하거나 또는 상이한 경로에 의해 투여될 때, 치료를 필요로 하는 피험자에게 본 발명의 분리된 길항 항원 결합 단백질 및 치료제(들)의 이러한 조합의 순차적인 투여.

[0178] 본 발명의 화합물과 병용될 수 있는 적당한 약학 물질은 항-비만제 (식욕 억제제 포함), 항-당뇨제, 항-고혈당제, 지질저하제 및 항-고혈압제를 포함한다.

[0179] 적당한 항-비만제 (일부는 항-당뇨제로도 작용할 수 있음)는 11β -히드록시 스테로이드 탈수소효소-1 (11β -HSD 제 1 형) 저해제, 스테아로일-CoA 불포화효소-1 (SCD-1) 저해제, MCR-4 작용제, 콜레시스토킨인 (cholecystokinin)-A (CCK-A) 작용제, 모노아민 재흡수 저해제(monoamine reuptake inhibitors) (예를 들어, 시부트라민), 교감신경흥분제(sympathomimetic agents), β_3 아드레날린성 작용제 (adrenergic agonists), 도파민 작용제 (예를 들어, 브로모크립틴 (bromocriptine)), 멜라닌세포-자극 호르몬 유사체(melanocyte-stimulating hormone analogs), 5HT2c 작용제, 멜라닌 농축 호르몬 길항제(melanin concentrating hormone antagonists), 렙틴 (OB 단백질), 렙틴 유사체, 렙틴 작용제, 갈라닌 길항제(galanin antagonists), 리파제 저해제 (예를 들어, 테트라히드로립스타틴(tetrahydrolipstatin), 즉, 오르리스타트(orlistat)), 식욕억제제 (anorectic agents) (예를 들어, 봄베신 작용제(bombesin agonist)), 신경펩티드-Y 길항제(neuropeptide-Y antagonists) (예를 들어, 벨네페리트(velneperit)와 같은 NPY Y5 길항제), PYY₃₋₃₆ (이의 유사체 포함), BRS3 조절제, 오피오이드 수용체 아형들의 혼합 길항제, 갑상선호르몬 모방제(thyromimetic agents), 데히드로에피안드로스테론(dehydroepiandrosterone) 또는 이의 유사체, 글루코코르티코이드 (glucocorticoid) 작용제 또는 길항제, 오렉신 길항제(orexin antagonists), 글루카곤-유사 펩티드-1 작용제, 섬모 신경친화성 인자(ciliary neurotrophic factors) (예를 들어, Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, N.Y. 및 Procter & Gamble Company, Cincinnati, Ohio로부터 구입가능한 AXOKINE™), 인간 AGRP (agouti-related protein) 저해제, 히스타민 3 길항제 또는 역작용제, 뉴로메딘 (neuromedin) U 작용제, MTP/ApoB 저해제 (예를 들어, 장-선택성 MTP 저해제, 예컨대 딜로타피드(dirlotapide), JTT130, 우시스타피드 (Usistapide), SLx4090), 오피오이드 길항제, GSK1521498를 포함하나 이에 한정되지 않는 뮤(mu) 오피오이드 수용체 조절제, ZGN-433을 포함하나 이에 한정되지 않는 MetAp2 저해제, 2 이상의 글루카곤의 혼합 조절 활성을 갖는 물질, GIP 및 GLP1 수용체, 예를 들어 MAR-701 또는 ZP2929; 노르에피네프린 전달체 저해제 (norepinephrine transporter inhibitors), 칸나비노이드-1-수용체 길항제/역작용제, 그렐린(ghrelin) 작용제/길항제, 옥신토모듈린(oxyntomodulin) 및 유사체, 테소펜신과 같으나 이에 한정되지 않는 모노아민 흡수 저해제, 오렉신(orexin) 길항제, 조합 물질 (예를 들어, 부프로피온(bupropion) + 조니사미드(zonisamide), 프람린티드(pramlintide) + 메트레렙틴(metreleptin), 부프로피온 + 날트렉손(naltrexone), 웬테르민(phentermine) + 토피라메이트(topiramate)) 등을 포함한다.

[0180] 다양한 실시예에서, 항-비만제는 장-선택성 MTP 저해제 (예를 들어, 딜로타피드, 미트라타피드(mitratapide) 및 임플리타피드(implitapide), R56918 (CAS No. 403987) 및 CAS No. 913541-47-6), CCKa 작용제 (예를 들어, N-벤질-2-[4-(1H-인돌-3-일메틸)-5-옥소-1-페닐-4,5-디히드로-2,3,6,10b-테트라아자-벤조[e]아줄렌-6-일]-N-이소프로필-아세트아미드 (PCT 공개 번호 WO 2005/116034 또는 US 공개 번호 제 2005-0267100호 A1에 기재됨), 5HT2c 작용제 (예를 들어, 로카세린 (lorcaserin)), MCR4 작용제 (예를 들어, U.S. 특허 번호 제 6,818,658호에 기재된 화합물), 리파제 저해제 (예를 들어, 세틸리스타트(Cetilistat)), PYY₃₋₃₆ (본 명세서에 사용된 바와 같이, "PYY₃₋₃₆"는 폐길화 PYY₃₋₃₆와 같은 유사체, 예를 들어, US 공개 번호 제 2006/0178501호에 기재된 유사체를 포함함), 오피오이드 길항제 (예를 들어, 날트렉손), 올레오일-에스트론 (CAS No. 180003-17-2), 오비네피티드 (TM30338), 프람린티드 (SYMLIN™), 테소펜신 (NS2330), 렙틴, 브로모크립틴, 오르리스타트, AOD-9604 (CAS No. 221231-10-3) 및 시부트라민으로부터 선택된다.

[0181] 다양한 실시예에서, 병용 요법은 동일한 약학 조성물 또는 별도의 약학 조성물 중 하나로, 분리된 길항 항원 결합 단백질 조성물 및 제 2 물질 조성물을 동시에 투여하는 단계를 포함한다. 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질 조성물 및 제 2 물질 조성물은 연속적으로 투여된다, 즉, 분리된 길항 항원 결합 단백질 조성물은 제 2 물질 조성물의 투여 전 또는 후에 투여된다.

[0182] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질 조성물 및 제 2 물질 조성물은 동시에 투여된다, 즉, 분리된

길항 항원 결합 단백질 조성물 및 제 2 물질 조성물의 투여 기간은 서로 중첩된다.

- [0183] 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질 조성물 및 제 2 물질 조성물의 투여는 비-동시적이다. 예를 들어, 다양한 실시예에서, 분리된 길항 항원 결합 단백질 조성물의 투여는 제 2 물질 조성물이 투여되기 전에 종료된다. 다양한 실시예에서, 제 2 물질 조성물의 투여는 분리된 길항 항원 결합 단백질 조성물이 투여되기 전에 종료된다.
- [0184] 다양한 실시예에서, 본 발명은 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 과체중 또는 비만 피험자의 치료 방법을 포함한다.
- [0185] 다양한 실시예에서, 본 발명은 (a) 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질; 및 (b) 항-비만제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 과체중 또는 비만 피험자의 치료 방법을 포함한다.
- [0186] 다양한 실시예에서, 본 발명은 NAFLD/NASH로 진단된 피험자 또는 NAFLD/NASH에 걸릴 위험이 있는 피험자에게, 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 NAFLD/NASH의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 항체는 완전 인간 단일클론 항체이다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NAFLD의 치료 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NASH의 치료 방법을 포함한다.
- [0187] 다양한 실시예에서, 본 발명은 NAFLD/NASH로 진단된 피험자 또는 NAFLD/NASH에 걸릴 위험이 있는 피험자에게, (a) 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질; 및 (b) 항-비만제를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 NAFLD/NASH의 치료 또는 예방 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 항체는 완전 인간 단일클론 항체이다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NAFLD의 치료 방법을 포함한다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 NASH의 치료 방법을 포함한다.
- [0188] 다른 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 분리된 길항 항원 결합 단백질을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, NASH에 걸릴 위험이 있는 피험자 (예를 들어, 과체중 또는 비만인 피험자, 또는 NAFLD에 걸린 피험자)의 치료 방법을 제공한다.
- [0189] 다른 측면에서, 본 발명은 비알콜성 지방간염 (NASH)의 치료, 예방 및/또는 방지를 필요로 하는 피험자에서 비알콜성 지방간염 (NASH)의 치료, 예방 및/또는 방지용 약제의 제조를 위해 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.
- [0190] 다른 측면에서, 본 발명은 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD)의 치료, 예방 및/또는 방지를 필요로 하는 피험자에서 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD)의 치료, 예방 및/또는 방지용 약제의 제조를 위해 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.
- [0191] 다른 측면에서, 본 발명은 비만으로 분류된 (예를 들어, 체질량 지수 (BMI)가 30 kg/m² 이상인) 피험자의 치료를 위한 약제의 제조를 위해 인간 글루카곤 수용체에 특이적으로 결합하는 비-자연적으로 발생하는 분리된 길항 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0192] 도 1은 20주 동안 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클군, REMD2.59 군, 쌍 급여군 (Pair feeding group), 정상 식이군 및 예방군의 체중 (g)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 선 플롯(line plot)이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.
- 도 2는 20주 동안 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클군, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 음식 소비 (kcal/g/day)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 선 플롯이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.
- 도 3은 19주 동안 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클군, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 혈당 (mmol/L)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 선 플롯이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 4는 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 혈당 (mmol/L)에 대한 REMD 2.59의 반복 투여의 *in vivo* 효과를 나타내는 선 플롯이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다. 연구 종료시 (즉, 20주) 모든 동물에 대해 경구 당부하 검사 (OGTT)를 수행하였다.

도 5는 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 AUC 수준 (mmol/L 분 혈당)을 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 6은 20주 동안 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 혈청 내 중성지방 (TG) 수준 (mmol/L)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 7은 20주 동안 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 혈청 내 총 콜레스테롤 (TCHO) 수준 (mmol/L)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 8은 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 수준 (U/L), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST) 수준 (U/L), 감마-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT) 수준 (U/L), 및 알칼리성 포스파타제 (ALP) 수준 (U/L)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 9는 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 간 내 중성지방 (TG) 수준 (mmol/L)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 10은 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 간 내 총 콜레스테롤 (TCHO) 수준 (mmol/L), 고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL-C) 수준 (mg/g) 및 저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDL-C) 수준 (mg/g)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 11은 20주 동안 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 인슐린 수준 (ng/mL)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다. 6시간의 금식 후 57일, 85일 및 113일에, 및 16시간 동안 금식 후 141일에 인슐린 수준을 시험하였다 (OGTT 연구는 그 날 수행하였다).

도 12는 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 렙틴 수준 (ng/mL)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다. 6시간의 금식 후 57일, 85일 및 113일에, 및 16시간 동안 금식 후 141일에 인슐린 수준을 시험하였다 (OGTT 연구는 그 날 수행하였다).

도 13은 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 활성 글루카곤-유사 웨티드-1 (GLP-1) 수준 (pM)에 대한 *in vivo* 효과를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 14는 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클균, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상

식이군 및 예방군의 백색 지방 조직 (WAT), 간, 근육 및 췌장에 대해 습중량 (g)을 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 15는 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클군, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 IHC 결과 (% 인슐린 영역/췌도 영역 및 % 글루카곤 영역/췌도 영역)를 나타내는 바 그래프이다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

도 16은 20주에 HFD DIO 마우스 연구에서 평가된, 본 명세서에 기재된 비히클군, REMD2.59 군, 쌍 급여군, 정상 식이군 및 예방군의 다양한 간 절편의 조직학적 H&E 염색 (20 X 10)의 결과를 나타낸다. 예방군을 제외하고 모든 군에 대해 57일 (즉, 9주 시작)에 치료를 시작하였다. 예방군의 경우, HFD 급여의 1일부터 시작하여 REMD2.59C 항체를 매주 투여하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0193]

기재된 본 발명인 하기의 실시예는 예시로서 제공되는 것이지 제한하는 것은 아니다.

[0194]

실시예 1

[0195]

본 실시예에서는, 다양한 DIO 젖과(murine) 모델에서 포도당 생성의 조절과 비만 발생 사이의 관계를 평가하였다. 특히, 야생형 C57BL/6 마우스를 이용하여 DIO 젖과 모델에서 서열번호: 8에 제시된 중쇄 서열 및 서열번호: 9에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 항-GCGR 항체 ("REMD2.59C")의 *in vivo* 활성을 20주 동안 평가하였다. 야생형 C57BL/6 마우스는 고지방식이 ("HFD")를 먹을 때 체지방량, 고혈당증 및 고인슐린혈증이 증가하기 때문에, 비만 연구에 일반적으로 사용된다 (REbuffe-Scrive, M et al., Metabolism, 42:1405-1409, 1993; Surwit, RS., Metabolism 44:645-651, 1995).

[0196]

본 연구에서, 야생형 C57BL/6J 마우스 (수컷, 4-6주령, 20-22g) 각 10마리씩 3개의 군은 8주 동안 고지방식이 (HFD)를 무제한으로 급여받았다 (이하, "비히클군" 또는 "REMD2.59 군" 또는 "쌍 급여군"). 10마리의 야생형 C57BL/6J 마우스 (수컷, 4-6주령, 20-22g)의 하나의 군은 8주 동안 정상 식이("음식물(chow)")를 무제한으로 급여하였다 (이하, "정상 식이군"). 8마리의 야생형 C57BL/6J 마우스 (수컷, 4-6주령, 20-22g)의 하나의 군은 (1일에 시작하여) 8주 동안 HFD를 급여하고 7.5 mg/kg의 REMD2.59 항체를 매주 투여하였다 (이하, "예방군"). 마우스는 각 우리에 1마리의 동물과 함께 일정한 온도와 습도의 층류실 (laminar flow rooms)에 수용되었다. 동물은 폴리카보네이트 우리 및 (22±2°C)의 온도와 40%-70%의 상대 습도로 유지되는 환기가 잘되고 환경적으로 관찰되는 방에 수용되었다. 하루에 약 12시간 동안 형광등 조명을 제공하였다. 깔개(bedding material)는 연재 (soft wood)이고, 일주일에 한번씩 바꿔주었다. 모든 절차는 실험실 동물의 관리와 사용을 위한 NIH (National Institutes of Health) 지침에 따라 수행되었다.

[0197]

HFD 식이의 시작 후 8주에, "비히클군" 및 "쌍 급여군"은 HFD를 유지시키고, "정상 식이군"은 음식물(chow)을 유지시키고, 비히클 (PBS)을 피하 주사를 통해 (57일에 시작하여 20주까지) 모두 매주 투여된다. HFD "REMD2.59 군"은 7.5 mg/kg (10 mL/kg) REMD2.59C 항체를 피하 주사를 통해 (57일에 시작하여 20주까지) 매주 투여된다. HFD "예방군"은 7.5 mg/kg (10 mL/kg) REMD2.59C 항체를 피하 주사를 통해 매주 20주까지 계속 투여된다. 연구 군 과제는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0198]

군	식이 (1-20 주)	매주 치료 용량 (mg/kg)	치료 시작일	치료 종료일
비히클 대조군 (N=10)	HFD	PBS	9주	20주
REMD2.59C 군 (N=10)	HFD	REMD2.59C, 7.5 mg/kg	9주	20주
쌍 급여군 (N=10)	HFD	PBS	9주	20주
예방군 (N=8)	HFD	REMD2.59C, 7.5 mg/kg	1주	20주

정상 식이군 (N=10)	정상 식이	PBS	9주	20주
------------------	-------	-----	----	-----

[0199] 체중은 연구 기간 내내 매주 측정된다. 음식 소비 (음식 섭취/음식 배출)는 연구 기간 내내 매주 기록된다. 음식 소비는 "REMD2.59 군"에 대해 치료 후 첫 주 동안 매일 관찰한 다음, 치료 후 7일의 양을 사용하여 10주 동안 "쌍 급여군"에 급여한다. 그 후 매주, "REMD2.59 군"의 음식 소비를 매주 관찰하고, 매주 말의 음식 소비량을 사용하여 그 다음 주에 "쌍 급여군"에 급여한다. 음식물(chow)을 급여한 "정상 식이군"은 20주 전체 연구 기간 동안 동일한 양의 음식물을 급여받는다.

[0200] 체중과 음식 소비 외에, 다양한 다른 매개변수가 20주 연구 기간 동안 측정된다. 예를 들어, i) 공복 혈당 측정은 Accu-Chek Aviva System®을 이용하여 매주 꼬리 정맥을 통해 측정되었다 (마우스는 공복 혈당 수준 검사 전 6시간 동안 금식시킴); ii) 경구 당부하 검사 (OGTT)는 REMD Ab2.59의 반복 투여 효과를 시험하기 위해 연구 종료시 모든 동물에 대해 수행되었다. 기준치 (시간 0) 포도당 수준은 16시간 공복 후 및 포도당 유발 전에 측정되었다. 2 g/kg 포도당의 경구 투여 후에, Accu-Chek Performa System을 이용하여 상이한 시점 (30, 60, 120 분)에서 혈당 수준을 측정하였다; iii) 혈청 및 혈액 생화학 매개변수 (ALT, AST, GGT, ALP, TG 및 TCHO)의 지질 프로파일을 연구 기간 동안 시험하였다. 혈액 시료를 8, 12, 16 및 20주에 얻고, 시료를 4°C, 4000g에서 15 분 동안 원심분리하여 즉시 처리한 다음, 이들을 새로운 시험관으로 옮겼다. 지질 프로파일 및 혈액 생화학 매개변수는 TOSHIBA TBA-40FR 자동 생화학 분석기를 이용하여 측정되었다; iv) 지질 프로파일 (TG, TCHO, HDL-C 및 LDL-C)을 프로토콜에 따라 동물의 간에서 추출한 다음, TOSHIBA TBA-40FR 자동 생화학 분석기를 이용하여 지질 프로파일을 측정하였다; v) 모든 연구 동물의 인슐린 수준은 8, 12, 16 및 20주에 측정되었다. GLP-1 및 렙틴은 연구 종료시 ELISA 방법으로 측정되었다. 혈청을 분석에 사용하였다; 및 vi) 종료일에, OGTT 연구가 끝난 후 검시를 수행하였다. 연구 종료시, 조직 또는 장기를 모으고, 췌장, 백색 지방 조직 (WAT), 근육 (비복근 (gastrocnemius muscle)) 및 간의 습중량을 측정하였다. 이 조직 시료의 절반을 고정시키고, H&E (간 및 WAT) 또는 IHC (췌장) 분석을 위해 파라핀 블록으로 가져왔다. 시상하부(Hypothalamus), 뇌, 심장 및 췌장, WAT, 근육, 간의 나머지 부분은 향후 분석을 위해 -80°C에 저장되었다. 상기 기재된 다양한 측정 및/또는 분석은 하기의 추가 물질 및 방법 부문에 기재된 대로 이루어진다. 모든 통계 검정을 수행하였으며, 유의 수준은 5% 또는 P<0.05로 설정하였다. 군의 평균 및 표준 편차는 연구 설계에 따라 모든 측정 매개변수에 대해 계산되었다. 일원분산분석 (ANOVA)은 소프트웨어 GraphPad Prism 5.0으로 군 사이에 사용되었다.

[0201] 결과

[0202] 체중 및 음식 소비

[0203] 도 1에 나타난 바와 같이, REMD2.59 군은 9주에서 20주까지 체중 증가를 효율적으로 감소시켰다. 9주에서 20주 까지 REMD2.59 군과 동일한 양의 일일 음식을 제공받은 쌍 급여군은, REMD2.59 군과 유사하나 약간 큰 체중 증가를 나타내었다. 이러한 관찰은 REMD2.59의 효과가 음식 섭취의 감소에 한정되지 않음을 시사한다. 1주에서 20 주까지 HFD와 함께 동시에 매주 REMD2.59 주사를 받은 예방군은, HFD 급여에도 불구하고, 모든 다른 군에 비해 가장 낮은 체중 증가를 나타내었다. 특히, 연구 종료시 (140일, 또는 20주 말), 예방군의 평균 체중 (35.3 ± 3.0 g)은 비히클군 (53.3 ± 2.4 g)보다 34% 낮았으며 (P<0.01), 정상 식이군 (38.6 ± 3.1 g) 보다도 9% 낮았다. 도 2에 나타난 바와 같이, 예방군은 정상 식이군과 동일한 양의 체중(g) 당 칼로리를 소비하였다. 반면, HFD 급여군 (비히클군, REMD2.59 군 및 쌍 급여군)은 모두 체중(g)에 의해 조절될 때 거의 동일한 양의 칼로리를 소비하였다. 그럼에도 불구하고, 체중 차이를 고려하면, 비히클군이 가장 높은 평균 체중을 가지고 있기 때문에, 비히클군이 여전히 REMD2.59 군 및 쌍 급여군보다, 동물 당 더 많은 양의 칼로리를 소비한다.

[0204] 공복 혈당

[0205] 도 3에 나타난 바와 같이, 9주부터 시작된 REMD2.59 치료 (즉, REMD2.59 군)는 비히클군보다 현저히 낮은 혈당을 야기하였다. 쌍 급여군이 REMD2.59 군보다 훨씬 적은 양의 혈당 저하를 달성하였기 때문에, 이 고혈당증의 조정은 감소된 에너지 소비만으로는 설명될 수 없다. 예방군은 공복 혈장 포도당 프로파일이 가장 낮았으며, 심지어 정상 식이군보다도 낮았다. 마지막으로, 식이-유도성 비만은 비히클군에 의해 나타난 바와 같이 명확하게 고혈당증과 관련되어 있다.

[0206] 경구 당부하 검사 (OGTT)에서 얻은 혈당 수준

[0207] 도 4에 나타난 바와 같이, 치료 (REMD2.59 군) 또는 예방 조치 (예방군)로 주어진 REMD 2.59는 경구 당부하 검

사 (OGTT) 동안 혈당 프로파일이 현저히 낮아졌다. 그러나, 미처리 (비히클군) 또는 음식-제한 (쌍 급여군)은 당뇨병 OGTT 포도당 프로파일을 나타내었으며, OGTT 동안 상승된 기준치 포도당 수준과 높은 포도당 이동 (glucose excursions)을 특징으로 하며, 높은 OGTT-후 포도당 프로파일로 끝난다. 도 5에 나타난 바와 같이, 곡선 아래 (AUC)의 OGTT 포도당 면적 값은 관찰을 확인하는 것으로 나타나고, 도 4에 나타난 관찰을 뒷받침한다.

[0208] 지질 프로파일 및 혈액 생화학 자료

도 6에 나타난 바와 같이, 중성지방 (TG) 수준은 HFD-급여 비히클군 및 정상 식이 대조군 간에 유의한 차이가 없었다. REMD2.59 치료는 TG 수준에 유의한 영향을 미치지 않았으며, 예방군은 16주에 TG 수준이 감소하였음에도 불구하고 연구가 끝날때까지 변화는 지속되지 않았다. 따라서, 전체 REMD2.59는 순환 TG 수준에서 중대한 변화를 야기하지 않았다. 도 7에 나타난 바와 같이, 총 콜레스테롤 (TCHO) 수준은 REMD2.59 치료 (비히클군 대 REMD2.59 군 비교)에 의해 영향을 받지 않았으나, 예방군에 의해 정상 식이군의 수준에 가까운 수준으로 (20주 까지 최대 47%) 유의하게 감소되었다.

[0210] 간 분석에서 지질 프로파일

도 9에 나타난 바와 같이, REMD2.59 치료는 통계적으로 유의하지는 않지만, 비히클군 마우스에 비해 간 조직에서 TG 함량을 적당히 감소시켰다 (102.0 ± 45.2 대 131.6 ± 46.5 mg/g 조직). 예방군은 비히클군에 비해 간 TG 함량을 84%까지 감소시켰다 (21.4 ± 14.5 대 131.6 ± 46.5 mg/g 조직). 도 10에 나타난 바와 같이, 총 콜레스테롤 (TCHO), 고밀도 및 저밀도 지단백 수준 (HDL-C 및 LDL-C)은 REMD2.59 치료 또는 예방에 의해 유의한 영향을 받지 않았다.

[0211] GLP-1, 인슐린 및 렙틴의 측정

도 11에 나타난 바와 같이, 치료 기간 동안 그리고 20주 연구가 끝날 때까지, 인슐린 수준이 정상 식이군에서 보인 수준으로 회복되거나 또는 그보다 낮아졌기 때문에, REMD2.59 군 및 예방군 모두 고인슐린혈증을 교정하는데 매우 강력한 효과를 나타내었다. 이것은 인간 비만, 제 2 형 당뇨병 및 NAFLD/NASH에서와 마찬가지로 REMD2.59에 대해 중요한 생물학적 작용을 나타내며, 이상지질혈증 (dyslipidemia)은 고인슐린혈증과 밀접하게 관련되어 있다. 도 12에 나타난 바와 같이, 렙틴은 비히클군에 비해 예방군에서 92% 정도까지 감소되었으며, 감소된 렙틴 수준은 정상 식이군의 수준보다 훨씬 낮았다. 이것은 순환계에서의 렙틴 수준이 비만 정도를 의미한다는 점에서 중요하다. REMD2.59 군은 통계적으로 유의하지는 않지만 렙틴 수준을 약간 감소시켰다. 도 13에 나타난 바와 같이, 예방군이 아닌 REMD2.59 군은 순환 활성 GLP-1 수준의 10배 증가와 관련이 있으며, 이는 REMD2.59를 이용하여 글루카곤 수용체를 차단함으로써 음식 섭취 및 기타 대사적 이익을 조절하는데 GLP-1이 기여한다는 것을 시사한다. 실제로, REMD2.59의 매주 치료는 순환 활성 GLP-1 수준이 거의 10배 증가하여, 추가적인 체중 감량 효과를 설명할 수 있다.

[0212] 조직학 및 면역조직화학 결과

도 14에 나타난 바와 같이, 예방군은 백색 지방 조직 중량을 현저히 감소시켰으며, 이는 글루카곤 수용체의 차단이 낮은 비만도와 관련되어 있음을 시사한다. 또한, 예방군은 감소된 간 습중량을 나타내었고, 이는 감소된 지방 (TG) 및 글리코겐 함량과 관련될 수 있다. REMD2.59 군은 예방군과 유사하게 감소된 간 습중량을 나타내었으나, 췌장의 조직 습중량은 약간 증가하였으며, 이는 췌도 조직 덩어리의 반응성 증가에 기인한 것일 수 있다. 도 15에 나타난 바와 같이, 면역화학 (IHC) 염색된 췌장 부문에서, REMD 2.59 군은 예방군과 유사하게 감소된 인슐린 면적/췌도 면적을 나타내었으며, 이는 전체적으로 글루카곤 수용체 신호 전달의 차단이 췌도 베타-세포 및 인슐린 합성/분비에 대한 자극을 약화시켰음을 시사한다. 이러한 조직학적 결과는 REMD2.59 군 및 예방군이 순환에서 낮은 인슐린 수준을 나타내었다는 관찰 결과와 일치한다 (도 11, 위). 반면, REMD2.59 군 및 예방군 모두 글루카곤 면적/췌도 면적의 현저한 증가를 유도하였으며, 이는 췌도 알파-세포로부터의 글루카곤 합성/분비의 반응성 피드백 자극을 시사한다.

도 16에 나타난 바와 같이, 하기의 관찰이 도출될 수 있다: 1) 비히클군의 간 조직은 지방 액적(fat droplets)에 기인한 액포(vacuoles)가 풍부하여, 이를 마우스의 지방간 진단을 확인한다; 2) REMD2.59 군의 간 시료는 현저하게 감소된 지방 액적의 밀도와 크기를 나타내는 것으로 보인다, 즉, 명백한 지방 액적에 의해 점유된 면적은 비히클군의 점유된 면적보다 훨씬 작은 것처럼 보인다; 3) 쌍 급여군의 간 조직 시료는, 만일 있다면, 비히클군에서 관찰된 지방 액적의 밀도와 크기의 감소를 거의 나타내지 않는다; 4) 정상 식이군의 간 조직 시료는, 예방군의 시료와 비슷하게, 눈에 보이는 지방 액적이 거의 없는, 매우 깨끗한 간 절편을 나타낸다; 및 5) 예방군의 간 조직 시료는 정상 식이군의 시료와 비슷하게, 눈에 보이는 지방 액적이 거의 없는, 매우 깨끗한 간 절

편을 나타낸다. 상기 조직학적 증거는 식이-유도성 비만 마우스에서 지방간 변화를 교정하거나 또는 예방하는데 있어서 길항 글루카곤 수용체 항체의 강한 효과를 명확하게 나타낸다. 간 조직학에 의해 나타난 바와 같이, 지방간의 조직학적 개선은 고혈당증 및 고인슐린혈증의 교정, 및 포도당 및 지방 대사의 개선과 밀접하게 관련되어 있다.

[0217] 실시예 2

[0218] 실시예 1에 나타낸 REMD2.59C 처리의 유의한 효과를 고려하여, 다양한 젖과 모델에서 포도당 생성의 조절과 NAFLD/NASH의 발생 사이의 관계를 평가하였다. 본 실시예에서는, NASH-유래 HCC 젖과 모델 (STAM™ 모델, Fujii et al, Med Mol Morphol, 46:141-152, 2013)에서 REMD2.59C의 *in vivo* 활성을 평가하였다. STAM™ 모델에서, C57BL/6 마우스는 출생 후 2일에 200 µg의 STZ의 단일 피하 주사로 주사하고, 4주령 후에 HFD 또는 음식물을 먹었다. 수컷 마우스에서, 이 STZ-HFD 병용 치료는 HFD를 급여한 후 1주 후에 지방증과 당뇨병이 발병되었고, HFD를 계속 급여하면 수컷 마우스는 고혈당증 및 중등도 고지혈증과 함께 섬유증, 간경변증 및 간세포 암종 (HCC)을 일으켜, 인간 NASH와 매우 유사하다. STZ만으로 처리된 수컷 마우스와 STZ-HFD로 처리된 암컷 마우스는 당뇨병이 발병하나, HCC는 발병하지 않는다.

[0219] 본 연구에서, 야생형 C57BL/6J 마우스 (수컷, 4-6주령, 20-22g) 각 10마리씩 4개의 군은 출생 후 2일에 200 µg의 STZ의 단일 피하 주사로 주사하고, 4주령 후에 HFD를 먹었다 ("STZ-HFD 군"). 10마리의 야생형 C57BL/6J 마우스 (수컷, 4-6주령, 20-22g)의 하나의 군은 출생 후 2일에 200 µg의 STZ의 단일 피하 주사로 주사하고, 4주령 후에 정상 식이("음식물(chow)")를 급여받았다 ("STZ-Chow 군"). STZ-Chow 군은 24주의 연구 기간 동안 계속해서 음식물(chow)을 먹었고, STZ-HFD 군은 24주의 연구 기간 동안 계속해서 HFD를 먹었다.

[0220] 5주령에서, STZ-Chow 군은 24주령까지 비히클 (PBS)을 피하 주사를 통해 매주 투여받고, 하나의 STZ-HFD 군은 24주령까지 7.5 mg/kg REMD2.59 항체를 매주 투여받는다. 8주령에서, 하나의 STZ-HFD 군은 24주령까지 2.5 mg/kg REMD2.59 항체를 매주 투여받고, 하나의 STZ-HFD 군은 24주령까지 5.0 mg/kg REMD2.59 항체를 매주 투여받으며, 하나의 STZ-HFD 군은 24주령까지 7.5 mg/kg REMD2.59 항체를 매주 투여받는다.

[0221] i) 체중 (일주일에 한번); ii) 공복 혈당 측정 (마우스는 검사 전 6시간 동안 금식시키고 공복 혈당 수준은 Accu-Chek Aviva System®을 이용하여 매주 꼬리 정맥을 통해 측정됨); iii) 혈청 혼모글로빈-A1c (HbA1c) 측정; iv) 혈청 GLP-1 측정; v) 방사면역측정법(radioimmunoassay)(Linco, St. Charles, MO)을 통한 혈청 인슐린 및 렙틴 수준; vi) 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 측정; vii) 혈청 아디포네틴 측정; viii) 혈청 지질 (예를 들어, 총 콜레스테롤, LDL, HDL 및 중성지방 (TG)) 측정; 및 ix) 감마-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT) 측정을 포함하여, 다양한 매개변수가 24주 연구 기간 동안 측정된다. 항목 iii) - ix)의 경우, 혈액 시료를 투여-전과 연구 종료시에 모아 임의의 항응고제가 없는 튜브에 넣고, 즉시 원심 분리한 다음, 평가를 위해 혈청을 별도의 시료 튜브로 옮겼다. 상기 기재된 다양한 측정 및/또는 분석은 하기의 추가 물질 및 방법 부문에 기재된 대로 이루어진다.

[0222] 연구 종료시, 간을 빠르게 절개하고, 아주 차가운 식염수로 세척한 다음, 무게를 재었다. 간의 부분표본 (Aliquots)을 액체 질소에서 급속 동결시키고, 분석할 때까지 -80°C로 유지시켰다. 간의 적당한 조직학적 분석을 위해 각 간의 일부를 10% 포르말린에 고정시켰다. 간 중성지방 (TG) 함량, 디아실글리세라이드 (DG) 함량 및 세라마이드 함량 측정은 하기의 추가 물질 및 방법 부문에 기재된 대로 이루어진다. 염증, 중심 정맥 섬유증 및 문맥관 섬유증(portal tract fibrosis)은 하기의 추가 물질 및 방법 부문에 기재된 대로 평가될 것이다.

[0223] 실시예 1에 나타난 결과를 고려하여, 항-GCGR 항체를 이용한 야생형 마우스의 치료가 인슐린 저항성의 감소; 고인슐린혈증의 감소 또는 예방; 간에서 지방 축적의 감소 또는 예방; 간에서 염증의 감소 또는 예방; 지질의 축적, 예를 들어, 간 트리아실글리세롤, 간 디아실글리세롤 및 세라미드의 감소 또는 예방; 및 간 손상의 예방을 포함할 수 있는 유익한 치료 효과를 제공할 것이고, 이러한 마우스에서 NAFLD/NASH의 발병을 예방하거나 또는 치료함으로써 당뇨병 피험자의 HCC 발병 위험을 감소시킬 것으로 예상된다.

[0224] 실시예 3

[0225] 실시예 1에 나타낸 REMD2.59C 처리의 유의한 효과를 고려하여, db/db 마우스를 이용하여 NASH의 젖과 모델에서 REMD2.59C의 *in vivo* 활성을 평가하였다. 연구는 24주의 연구가 될 것이다. 추가로 48주의 연구가 수행될 수도 있다. C57BL/6 배경의 db/db 마우스는 잭슨 실험실 (Bar Harbor, ME)에서 구입하였다. db/db 마우스는 고렙틴 혈증(hyperleptinemic), 비만 및 당뇨병 마우스이다. 메티오닌과 콜린 결핍 (MCD) 식이를 급여한 db/db 마우스는 자연 발생적으로 간 지방증을 일으켜 NASH로 진행한다 (Wortham et al., Dig Dis Sci., 53(10): 2761-2774,

2008 October). 각각 6마리의 10-12주령의 db/db 마우스는 4주 동안 메티오닌과 콜린 결핍 (MCD) 식이 (MP Biomedicals Solon, OH, cat. no. 960439) 또는 메티오닌과 콜린으로 보충된 (MCDS) 식이와 동일한 식이 (MP Biomedicals cat. no. 960441), 또는 24주 동안 HFD + 과당 서구식 식이 (WD) (# 58Y1, TestDiet, St Louis, MO) 또는 음식물(chow) (대조 식이) (# 58Y2, TestDiet, St Louis, MO)를 무제한으로 급여받았다. 마우스는 12시간/12시간, 명/암 주기로 22°C에서 강철 미세분리 우리(steel microisolator cages)에 개별적으로 수용되었다. 모든 절차는 실험실 동물의 관리와 사용을 위한 NIH (National Institutes of Health) 지침에 따라 수행되었다. 마우스는 적절히 4주 또는 24주 동안 비히를 (10 mM 아세트산 나트륨, 5% 소르비톨 및 0.004% 폴리소르베이트 20), 2.5 mg/kg REMD2.59C 항체 ("저용량"), 또는 5 mg/kg REMD2.59C 항체 ("고용량")를 피하주사를 통해 매주 또는 격주로 투여받는다. 투여량은 1개월 당 10mg/kg을 초과하지 않을 것이다.

[0226] i) 체중 (일주일에 한번); ii) 공복 혈당 측정 (마우스는 검사 전 6시간 동안 금식시키고 공복 혈당 수준은 Accu-Chek Aviva System®을 이용하여 매주 꼬리 정맥을 통해 측정됨); iii) 혈청 혼모글로빈-A1c (HbA1c) 측정; iv) 혈청 GLP-1 측정; v) 방사면역측정법 (Linco, St. Charles, MO)을 통한 혈청 인슐린 및 렙틴 수준; vi) 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 측정; vii) 혈청 아디포넥틴 측정; viii) 혈청 지질 (예를 들어, 총 콜레스테롤, LDL, HDL 및 중성지방 (TG)) 측정; 및 ix) 감마-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT) 측정을 포함하여, 다양한 매개변수가 4주 또는 24주 연구 기간 동안 측정된다. 항목 iii) - ix)의 경우, 혈액 시료를 투여-전과 연구 종료시에 모아 임의의 항응고제가 없는 튜브에 넣고, 즉시 원심 분리한 다음, 평가를 위해 혈청을 별도의 시료 튜브로 옮겼다. 상기 기재된 다양한 측정 및/또는 분석은 하기의 추가 물질 및 방법 부문에 기재된 대로 이루어진다.

[0227] 연구 종료시, 간을 빠르게 절개하고, 아주 차가운 식염수로 세척한 다음, 무게를 재었다. 간의 부분표본을 액체 질소에서 급속 동결시키고, 분석할 때까지 -80°C로 유지시켰다. 간의 적당한 조직학적 분석을 위해 각 간의 일부를 10% 포르말린에 고정시켰다. 간 중성지방 (TG) 함량, 디아실글리세라이드 (DG) 함량 및 세라마이드 함량 측정은 하기의 추가 물질 및 방법 부문에 기재된 대로 이루어진다. 염증, 중심 정맥 섬유증 및 문맥관 섬유증은 하기의 추가 물질 및 방법 부문에 기재된 대로 평가될 것이다.

[0228] 실시예 1에 나타난 결과를 고려하여, 항-GCGR 항체를 이용한 db/db 마우스의 치료가 인슐린 저항성의 감소; 고 인슐린혈증의 감소 또는 예방; 간에서 지방 축적의 감소 또는 예방; 간에서 염증의 감소 또는 예방; 지질의 축적, 예를 들어, 간 트리아실글리세리를, 간 디아실글리세리를 및 세라마이드의 감소 또는 예방; 및 간 손상의 예방을 포함할 수 있는 유익한 치료 효과를 제공할 것이고, 이러한 마우스에서 NAFLD/NASH의 발병을 예방하거나 또는 치료시킬 것으로 예상된다.

실시예 4

[0230] 본 실시예는 NASH로 진단된 피험자에서 완전 인간 항-GRBGR 항체를 이용하여 매주 치료의 안전성, 약동학 및 약력학적 효과를 평가하기 위해 무작위, 이중-맹검, 위약-대조, 평행군, 다중 용량 연구를 기재한다. 치료는 치료 효능 및 안전성을 관찰하고 정량할 만큼 충분히 긴, 6개월 또는 12개월까지 지속될 수 있다.

[0231] 처리군은 위약군, 및 서열번호: 51에 제시된 중쇄 서열 및 서열번호: 52에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 완전 인간 항-GCGR 항체의 다양한 투여량으로 치료되는 치료군 ("REMD-477")을 포함한다. 비-위약 처리군의 예는, 주당 0.01 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 또는 10 mg/kg REMD-477의 주사를 맞은 피험자, 및 매주 0.01 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 또는 10 mg/kg REMD-477의 주사를 맞은 피험자를 포함할 것이다.

[0232] 일차 결과 측정은, 예를 들어, 연구가 끝날 때까지, 기준선, 4주 또는 8주 간격으로 MRI에 의한 간 지방 함량의 퍼센트 변화; 기준선 평가와 비교하여, 연구 종료시, 적어도 하나의 단계에 의해 간 섬유증의 개선을 달성하는 위약에 비해 REMD-477 처리된 환자의 비율의 변화; 및 연구가 끝날 때까지, 기준선, 4주 간격으로, 아스파르테이트 트랜스아미나제 (AST), 알라닌 트랜스아미나제 (ALT), 빌리루빈 및 알칼리성 포스파타제 (ALP)를 포함하여, 간 효소 및 대사성 마커의 변화를 포함할 것이다. 이차 결과 측정은, 예를 들어, 연구가 끝날 때까지, 전-처리 기준선 및 매주 간격으로 밤새 금식 후 매일 아침 평균 포도당인 공복 혈장 포도당 수준의 변화; 연구가 끝날 때까지, 전-처리 기준선, 및 4주 또는 8주 간격으로 혈장 인슐린 수준의 변화; 연구가 끝날 때까지, 전-처리 기준선, 및 4주 또는 8주 간격으로 혼모글로빈 A1c 수준의 변화 (만성 포도당 조절 지표); 연구가 끝날 때까지, 전-처리 기준선, 및 8주 간격으로, 경구 포도당 부하 후 0, 30, 60, 90 및 120분에서 측정된 경구 당부

하 검사 (OGTT) 시 포도당 프로파일의 변화; 기준선 및 연구 종료시, 간경변증, 모든 원인에 의한 사망률(all-cause mortality) 및 간-관련 임상 결과를 포함하여, 임의의 판결된 결과의 개시와 함께 환자의 수로 측정된 복합 장기 결과; 및 삶의 질 (36-Item Short-Form Health Survey [SF-36]) 설문지의 점수 변화를 포함할 것이다.

[0233] 추가 물질 및 방법

체중: 모든 동물의 체중은 다양한 연구 기간 동안 매주 측정된다.

음식 소비: 모든 동물의 음식 소비는 다양한 연구 기간 동안 매일 및/또는 매주 측정된다.

혈당: 마우스는 오전 9시부터 오후 3시까지 혈당 검사 전 6시간을 금식시키고, Accu-Chek Aviva System을 이용하여 매주 꼬리 정맥을 통해 공복 혈당 수준을 측정하였다.

경구 당부하 검사: REMD Ab2.59의 반복 투여 효과를 시험하기 위해, 연구 종료시 모든 동물에 대해 OGTT를 수행하였다. 기준치 (시간 0) 포도당 수준은 16시간 공복 후 및 포도당 유발 전에 측정되었다. 2 g/kg 포도당의 경구 투여 후에, Accu-Chek Performa System을 이용하여 상이한 시점 (30, 60, 120 분)에서 혈당 수준을 측정하였다.

혈액 생화학 분석: 2주마다 지질 프로파일과 말단 혈액 생화학 매개변수 (ALT, AST, GGT, ALP)를 시험하였다. 혈액 시료를 8, 12, 16 및 20주에 얻고, 시료를 4°C, 4000g에서 15분 동안 원심분리하여 즉시 처리한 다음, 이들을 새로운 시험관으로 옮겼다. 지질 프로파일 및 혈액 생화학 매개변수는 TOSHIBA TBA-40FR 자동 생화학 분석기를 이용하여 측정되었다.

[0239] 간에서 지질 프로파일의 측정: 지질 프로파일 (TG, TCHO, HDL-C 및 LDL-C)을 프로토콜에 따라 동물의 간에서 추출한 다음, TOSHIBA TBA-40FR 자동 생화학 분석기를 이용하여 지질 프로파일을 측정하였다.

[0240] ELISA 키트 분석: 모든 연구 동물의 인슐린 수준은 8, 12, 16 및 20주에 측정되었다. GLP-1 및 렙틴은 연구 종료시 ELISA 방법으로 측정되었다. 혈청을 분석에 사용하였다.

[0241] 간 중량: 연구 종료시, 간을 빠르게 절개하고, 아주 차가운 식염수로 세척한 다음, 무게를 재었다. 간의 부분표본을 액체 질소에서 급속 동결시키고, 분석할 때까지 -80°C로 유지시켰다. 조직학적 분석을 위해 각 간의 일부를 10% 포르말린에 고정시켰다.

[0242] 간 TG/DG/세라마이드 함량: 모든 동물의 간 중성지방 (TG), 디아실글리세라이드 (DG) 및 세라마이드 함량은 연구 종료시에 측정된다. 간 시료는 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 및 1 μM PMSF를 함유하는 50 mM Tris · HCl 완충액 (pH 7.4)에서 균질화시키고, 지질은 각 프로토콜에 대해 포함된 적절한 내부 표준과 함께 클로로포름으로 추출하여 분리시켰다. 추출된 지질을 재현탁시키고, Thermo Electron TSQ Quantum Ultra instrument (San Jose, CA)를 이용하여 전기분무 이온화-질량분석법(electrospray ionization-mass spectrometry)으로 분석하기 전에 메탄올/클로로포름 (4:1, 부피 기준)으로 희석시켰다. DG 분자종(molecular species)은 내부 표준 di-20:0 DG에 표준화된 각 종의 강도와 함께 이전에 기재된 바와 같이 선택된 반응 관찰을 이용하여 나트륨화된 부가물(sodiated adduct)로서 정량화되었다 (Demarco VG et al., Endocrinology, 154:159-171, 2013). TG 지방족 군은 TG 종으로부터의 각 지방산의 손실에 대한 중성 손실 스캐닝과 함께 TG 지문 감식법 (fingerprinting technique) 및 내부 표준 Tri-17:1 TG로부터 유래된 중성 손실 268의 결과에 의해 정량화되었다 (Han et al., Anal Biochem, 295:88-100, 2001). 개개의 세라마이드 분자종은 유형 I 및 유형 II ¹³C 동위원소 효과에 대한 교정 후 개개의 분자종의 이온 강도를 내부 표준의 이온 강도 (17:0 세라마이드)와 비교하여 중성 손실 256을 이용하여 음이온 모드로 정량화되었다.

[0243] 조직학적 및 면역조직화학: 포르말린-고정된 간 조직을 처리하고, 조직학적 분석을 위해 5 μm 두께의 파라핀 절편을 혼마록실린 및 에오신 (H&E), 및 마손 트리크롬(Masson's trichrome)으로 염색하였다. 염증은 H&E-염색 부문에서 평가되며, 하기와 같이 0에서 3까지의 점수를 부여받는다: 0, 염증 없음; 1, 경도(mild); 2, 중등도(moderate); 3, 심각한(severe). 섬유증의 정도는 디지털 형태 계측(digital morphometry)에 의해 평가된다. 각 마우스의 트리크롬-염색 부문의 5개의 별개의 영역을 무작위로 선택하고, 각 영역 내에서 디지털 사진을 찍을 문맥관 및 중심 정맥을 확인하였다. 중심 분야에서 관심 있는 문맥관 또는 중심 정맥이 있는 사진을 X20 대물렌즈로 얻음으로써, 각 마우스에 대해 관심 있는 5개의 문맥(portal)/문맥주위(periportal) 및 5개의 중심/중심주위(pericentral) 분야를 얻는다. 각각의 관심 분야에 대해, 이 분야에서 정상 간질 콜라겐(normal stromal collagen)을 신중하게 제외하고, 섬유증에 해당하는 광셀은 각 표본에서 명확한 섬유증의 염색에 해당하는 파란색 스펙트럼의 좁은 밴드를 기준으로 측정된다. 섬유증에 해당하는 광셀 수는 Image Processing Tool Kit, 버전

5.0을 이용하여 각 영상의 총 픽셀의 퍼센트로 측정된다 (Reindeer Graphics, Asheville, NC). 각 표본의 5개의 문맥/문맥주위 및 5개의 중심/중심주위 분야의 결과를 평균내고, 섬유증은 각 동물에 대해 총 단면적의 퍼센트로 표시된다.

[0244] 메티오닌파 콜린 결핍 (MCD) 식이: 본 명세서에서 논의된 식이 요법 중 MCD 식이는 가장 짧은 시간에 가장 심각한 NASH 표현형을 생성한다. MCD 식이는 자당과 지방이 높지만, 간 베타-산화와 VLDL (very low density lipoprotein) 생성에 필수적인 메티오닌파 콜린이 결핍되어 있다. 이것은 간내 지질 축적 및 VLDL 합성 감소를 야기한다 (Anstee et al., Int J Exp Pathol, 87(1):1-16, 2006). MCD 식이는 2-4주까지 설치류에서 빠르게 측정 가능한 간 지방증 (주로 거대수포성 지방증)을 유발할 것이며, 그 후 바로 염증과 섬유증으로 진행될 것이다. MCD 식이에서 지방 수준은 일반적으로 에너지로 약 20%의 지방을 함유하고 있지만 달라질 수 있다. 중요한 것은, NAFLD의 인간 또는 다른 식이-유도성 설치류 모델과는 달리, MCD 식이를 급여한 설치류는 (칼로리 섭취가 매우 낮기 때문에) 체중을 감량시키며, 인슐린 저항성을 갖지 않는다. NASH를 가진 대부분의 사람은 비만과 인슐린 저항성이 있기 때문에, 이것은 MCD 식이가 인간 NASH를 모델링하는 방식에서 중요한 차이를 나타낸다.

[0245] 고-지방 식이 (HFD): HFD는 설치류 모델에서 체중, 체지방을 증가시키고, 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. HFD는 말초 지방 축적의 유의한 증가가 일어나기 전에 간 지방 수준을 아주 빠르게 (며칠 내에) 증가시킬 수 있을뿐만 아니라 간 인슐린 저항성도 증가시킬 수 있다. 만성적으로, HFD-유도성 간 지방 축적은 선형 진행을 따르지 않을 수 있으며, 간 지방 수준은 실제로 감소한 다음 연장된 HFD 급여 동안 다시 증가할 수 있다. 동일한 시간 동안 급여할 경우, HFD 급여는 MCD 식이에 축적되는 것과 비교하여 간 지방 수준이 10배 감소한다. 일반적으로, HFD 급여는 MCD 식이에 비해 간 섬유증 및 경도 지방증만을 생성하지 않으므로, 이러한 식이 요법 사이의 중요한 차이점이 강조된다. 용어 'HFD'는 매우 다양한 처방 식이를 포함하며 상이한 조성의 식이는 다양한 방식으로 간 표현형을 변경시킬 것으로 예상될 수 있다는 것을 기억하는 것이 중요하다. 예시적인 HFD 식이는 36% 지방-유래 칼로리 (9% 옥수수유 및 27% 버터) 및 43.2% 당 없는 탄수화물-유래 칼로리로 이루어질 수 있다. 이들 연구에는 HFD (Research Diets, D12492, HFD)가 사용되었다.

[0246] HFD + 과당 식이 (서구식 식이 ("WD")): 예식적인 WD는 HFD와 동일하게 36% 지방-유래 칼로리 (9% 옥수수유 및 27% 버터) 및 43.2% 과당이 있는 탄수화물-유래 칼로리 (예를 들어, 30% 당-유래 칼로리)로 이루어질 수 있다.

[0247] NASH의 젖과 모델: 본 발명의 항-GCGR 항체는 다른 다양한 공개된 NASH의 젖과 모델 중 어느 하나에서 평가될 수 있다 (참조, Poekes et al., Archives of Public Health, 72(1): 07, 2014; Adorini et al., Drug Discovery Today, 17:988-997, 2012; Farrell et al., Liver Int., 34(7):1084-93, 2014; Aroor et al., Diabetes, <http://dx.doi.10.1016/j.drudis.2012.05.012>, Jan 20, 2015; Rooyen et al, Gastroenterology, 141(4):1393-1403, 2011; Ishimoto et al., Hepatology, 58(5):1632-1643, 2013; Farrell et al., Gut and Liver, 6(2):149-171, 2012; Sahai et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 287:G1035-G1043, 2004; Wortham et al., Dig Dis Sci, 53(10):2761-2774, 2008; Lieber et al, Am J Clin Nutr, 79:502-509, 2004).

[0248] 본 명세서에 개시되고 청구된 모든 논문 및 방법은 본 발명의 관점에서 과도한 실험 없이 제조되고 수행될 수 있다. 본 발명의 논문 및 방법이 바람직한 실시예에 의하여 기재되었지만, 본 발명의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않고 논문 및 방법에 변화를 적용할 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 모든 변화 및 균등물은, 현재 존재하든 또는 나중에 개발되든, 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 정신 및 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 명세서에 언급된 모든 특허, 특히 출원 및 간행물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자의 수준을 나타낸다. 모든 특허, 특히 출원 및 간행물은 모든 목적을 위해, 그리고 마치 각 개개의 간행물이 임의의 및 모든 목적을 위해 전체 참조로 포함되도록 구체적이고 개별적으로 나타낸 것과 동일한 정도로, 본 명세서에 전체 참조로 포함된다. 본 명세서에 예시적으로 기재된 발명은 본 명세서에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소(들)의 부재 시에 적절하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본 명세서의 각 예에서, "포함하는", "본질적으로 이루어진" 및 "이루어진"이라는 용어들 중 어느 하나는 두 개의 용어들 중 어느 하나로 대체될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 설명의 용어로서 사용되는 것이지 제한을 위한 것이 아니며, 나타내고 기재된 구성 또는 이의 일부의 임의의 등가물을 배제하는 이러한 용어 및 표현의 사용에 있어서 의도는 없지만, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능하다는 것이 인정된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 실시예들 및 선택적 특징들에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본 명세서에 개시된 개념들의 변형 및 변화가 당업자에 의해 재분류될 수 있고, 이러한 변형 및 변화는 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 발명의 범위 내

에 있는 것으로 간주된다는 것을 이해하여야 한다.

[0249] 서열목록

[0250] 수반되는 서열목록에 열거된 아미노산 서열은 37 C.F.R. 1.822에 정의된 바와 같이 아미노산에 대한 표준 3 문자 코드를 사용하여 나타낸다. 본 발명은 소프트웨어 프로그램 PatentIn을 사용하여 준비된 컴퓨터 판독 가능한 형식 (ST25 포맷 텍스트 파일)의 서열목록을 포함하며, 수반되는 서열목록과 동일하다.

[0251] 서열번호: 1은 인간 글루카곤 수용체 (GCGR) 분자의 아미노산 서열이다 (등록번호 AAI04855).

[0252] 서열번호: 2는 완전 인간 항-GCGR 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다. 서열번호: 3은 완전 인간 항-GCGR 항체의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0253] 서열번호: 4는 완전 인간 항-GCGR 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다. 서열번호: 5는 완전 인간 항-GCGR 항체의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0254] 서열번호: 6은 완전 인간 항-GCGR 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다. 서열번호: 7은 완전 인간 항-GCGR 항체의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0255] 서열번호: 8은 키메라 항-GCGR 항체의 중쇄를 인코딩하는 아미노산 서열이다. 서열번호: 9는 키메라 항-GCGR 항체의 경쇄를 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0256] 서열번호: 10-28은 다양한 완전 인간 항-GCGR 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0257] 서열번호: 29-47은 다양한 완전 인간 항-GCGR 항체의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0258] 서열번호: 48은 카파 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다. 서열번호: 49는 람다 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0259] 서열번호: 50은 IgG2 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0260] 서열번호: 51은 인간 항-GCGR 항체의 중쇄를 인코딩하는 아미노산 서열이다. 서열번호: 52는 인간 항-GCGR 항체의 경쇄를 인코딩하는 아미노산 서열이다.

[0261] 서열목록

[0262] 서열번호: 1 - 인간 글루카곤 수용체 (GCGR) 분자의 아미노산 서열

[0263] MPPCQPQRPLLLLLLACQPQVPSAQVMDFLFKEWKLYGDQCHHNLSSLPPPTELVCNRRTFDKYSWCWPDTPTANTANISCPWYLPWHHKVQHRFVFKRCGP
DGQWVRGPRGQPWRDASQCQMDGEEIEVQKEVAKMYSSFQVMYTVGYSLSLGALLALAILGGLSKLHCTRNAIHANLFASFVLKASSVLVIDGLLRTRYSQ
KIGDDLSVSTWLSDGAVAGCRVAVFQYGI VANYCWLLVEGLYLNLLGLATLPERSFFSLYLGIGWGAPMLFVVPWAVVKCLFENVQCWTSNDNMGFWWI
LRFPVFLAILINFFIFVRIVQLLVAKLRARQMHHHTDYKFRLAKSTLTIPLLGVHEVVFAFVTDEHAQGTLRSAKLFDFLSSFQGLLAVLYCFLNKEVQ
SELRRRWHRWRLGKVWEERNTSNHRASSSPGHGPPSKELQFGRGGSQDSSAETPLAGGLPRLAESPF

[0264] 서열번호: 2 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열

[0265] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWWAVMWYDGSNKDYDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRRAEDTAVYYCAREKDH
YDILTGYNYYGLDWGQGTTVTVSS

[0266] 서열번호: 3 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열

[0267] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDFVTYYCLQHNSNPLTFGGGT
KVEIK

[0268] 서열번호: 4 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열

[0269] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWWAVMWYDGSNKDYDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREKDH
YDILTGYNYYGLDWGQGTTVTVSS

[0270] 서열번호: 5 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열

[0271] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFVTYYCLQHNSNPLTFGGGT
KVEIK

- [0272] 서열번호: 6 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0273] QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREKDH
YDILTGYNYYGLDWGQGTTVTVSS
- [0274] 서열번호: 7 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0275] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDFTYYCLQHNSNPLTFGGGT
KVEIK
- [0276] 서열번호: 8 - GCGR을 결합하는 키메라 항체의 중쇄의 아미노산 서열
- [0277] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKDYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NRLRAEDTAVYYCAREKDHDLTGYNYYGLDWGQGTTVTVSSAKTTPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVL
QSDLYTLSSSVTPSSWPSSETVCNVAHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPCICTPEVSSVFIPPKPKDVLTI TLTPKVTCCVVDISKDDPEVQFSWFVDDV
EVHTAQTPREEQFNSTFRSVEELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMIDFFPEDITVEWQWN
GQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK
- [0278] 서열번호: 9 - GCGR을 결합하는 키메라 항체의 경쇄의 아미노산 서열
- [0279] MDMRVPAAQLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQ
EDFVTYYCLQHNSNPLTFGGGTVKEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLSWTDQDSKDSTYSMSSTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFRNREC
- [0280] 서열번호: 10 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0281] QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILSDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDYE
ILTGYGYYGMDVWGQGTTVTVSS
- [0282] 서열번호: 11 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0283] QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILNDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDYE
ILTGYGYYGMDVWGQGTTVTVSS
- [0284] 서열번호: 12 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0285] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNGAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWWYDYAGSVKSRININPDTSKNQFSLQVNSVTPEDTAVYYCTRD
RSSGWNEGYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
- [0286] 서열번호: 13 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0287] QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAVLSSDGNNKYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYCAREEVY
YDILTGYYDYYGMDVWGQGTTVTVSS
- [0288] 서열번호: 14 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0289] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTYFWTWIRQFPGKGLEWIGYIFYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGYD
ILTGEDYSYGMDDVWGQGTTVTVSS
- [0290] 서열번호: 15 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0291] QVQLQQSGPGLVKPSQILSLTCAISGDRVSSNGAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWWYDYAGSVKSRININPDTSKNQFSLQVNSVTPEDTAVYYCARD
RSSGWNEGYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
- [0292] 서열번호: 16 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0293] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTYFWTWIRQFPGEGLEWIGYIFYSGNTNYPNPSLTSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGYD
ILTGEDYSYGMDDVWGQGTTVTVSS
- [0294] 서열번호: 17 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0295] QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFIFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISNDGSNKYYADFKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYD
ILTGNNGVYGMDDVWGQGTTVTVSS

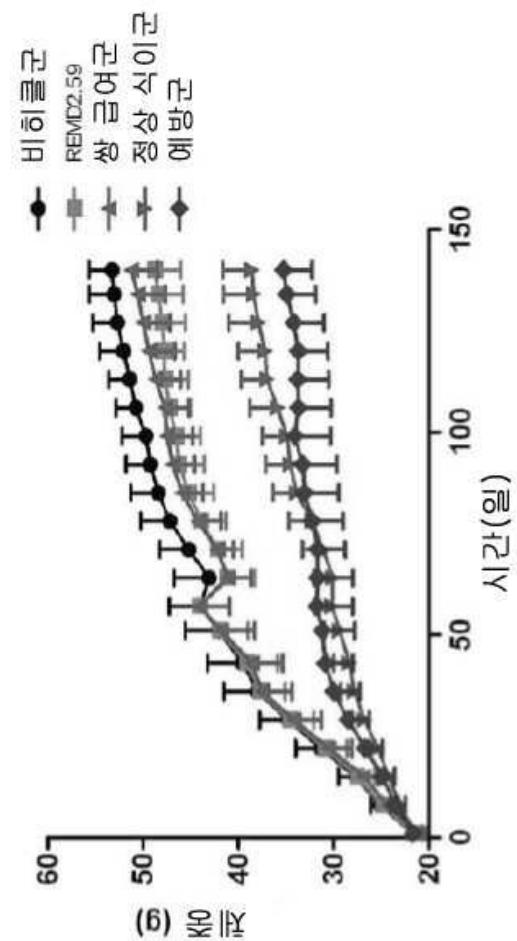
- [0296] 서열번호: 18 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0297] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWRQAPGKGLEWVSYISGSSLIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLHMNSLRDEDTAVYYCARARYN
WNDYYGMDVWGQGTTVSS
- [0298] 서열번호: 19 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0299] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFSSYGIHWVRQAPGKGLEWVAGIWYDGSNKYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLFDA
FDIWGQGTMVTVSS
- [0300] 서열번호: 20 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0301] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYTMNWRQAPGKGLEWVSYISSSSLIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSDDY
GSGSYYKGNYYGMDVWGQGTTVSS
- [0302] 서열번호: 21 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0303] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVTIWSDGINKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNQMNLSRAEDTAVYYCARERGL
YDILTGYDYYGIDVWGQGTTVSS
- [0304] 서열번호: 22 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0305] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVTIWSDGINKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNQMNLSRAEDTAVYYCARERGL
YDILTGYDYYGIDVWGQGTTVSS
- [0306] 서열번호: 23 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0307] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGIFTFRSYSMNWRQAPGKGLEWVSAISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYG
MDVWGQGTTVSS
- [0308] 서열번호: 24 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0309] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGSTFRSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYGDSVKGRLTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQYD
ILTGYSSDAFDIWGQGTMVTVSS
- [0310] 서열번호: 25 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0311] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSHKYYEDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTGVYYCARVGYG
SGWYEYYYHYGMDVWGQGTTVSS
- [0312] 서열번호: 26 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0313] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKDYDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRRAEDTAVYYCAREKDH
YDILTGYNYYGLDVWGQGTTVSS
- [0314] 서열번호: 27 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0315] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKDYDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRRAEDTAVYYCAREKDH
YDILTGYNYYGLDVWGQGTTVSS
- [0316] 서열번호: 28 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HCVR의 아미노산 서열
- [0317] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGITFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVASIWYDGSNKYYDSVKGRFTIFRDNSKKTLYLQMNRRAEDTAVYYCARLGGG
FDIWGQGTLVTVSS
- [0318] 서열번호: 29 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0319] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQDI SNYLAWFQKKPGKAPKSLIYVSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTINNLQPEDFATYYCQQYNHYPLTFGGGT
RVEIKR
- [0320] 서열번호: 30 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0321] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQDI SNYLAWFQQRPGKAPKSLIYVSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISNLQPEDFATYFCQQYNHYPLTFGGGT
KVEIKR

- [0322] 서열번호: 31 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0323] DIQMTQFPSSLSASIGDRVТИTCQASQDI SNFLNWFQQKPGKAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGAGTDFFTISSLQPEDIATYFCQQYDDLPLTFGGGT
RVDIKR
- [0324] 서열번호: 32 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0325] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSNPLTFGGGT
KVEIKR
- [0326] 서열번호: 33 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0327] QNVLTQSPGTLSSLPGERVTLCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIFGVSSRATGIPDRFSGSGSGTDFSLTISRLEPEDFAVYYCQQYGNSPFTFGPG
TKVDIKR
- [0328] 서열번호: 34 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0329] DIQMTQFPSSLSASIGDRVТИTCQASQDI SNFLNWFQQKPGKAPKLLIYDASDLETGVPSRFSGAGTDFFTISSLQPEDVATYFCQQYDNLPLTFGGGT
KVDIKR
- [0330] 서열번호: 35 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0331] ENVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQSVTSSYLA
WYQQKPGQAPRLLIFGVSSRATGIPDRFSGSGSGTDFSLTISRLEPEDFAVYYCQQYGNSPFTFGPG
TKVDIKR
- [0332] 서열번호: 36 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0333] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIDMYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFSGSGFGTDFLT
ISSLQPEDFATYYCQQYNIFPFTFGPGT
KVDVKR
- [0334] 서열번호: 37 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0335] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSPWTFGQGT
KVEIKR
- [0336] 서열번호: 38 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0337] KIVMTQTPLALPVIPGEPA
SICRSSLQVDSDDGDTYLDWYLQKPGQSPQLI
HRLSYRASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
IYYCMHRIEF
PTFGGGTKVEIKR
- [0338] 서열번호: 39 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0339] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQRPGKAPKRLIYAASSLQ
TGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSPWTFGQGT
KVEIKR
- [0340] 서열번호: 40 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0341] GIVLTQSPLSLPVTPGEPA
SICRSSLQVDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLI
YLG
SNRASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYC
MEALQTMCS
FGQG
TKLEIKR
- [0342] 서열번호: 41 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0343] GIVLTQSPLSLPVTPGEPA
SICRSSLQVDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLI
YLG
SNRASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYC
MEALQTMSS
FGQG
TKLEIKR
- [0344] 서열번호: 42 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0345] DIVMTQTPLFLPVTPGEPA
SICRSSLQVDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLI
YTL
SYRASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
IYYCMQHIEF
PS
TFGQG
TRLEIKR
- [0346] 서열번호: 43 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0347] SYELTQPPSVSPGQTASITCSGD
KLGDKYASWYQQKPGQSPV
LVIYQSTK
RPSGIPERF
SGNSGNT
ATLT
ISGTQAM
DEADYYC
QAW
DSST
VFGGGT
K
LTVLG

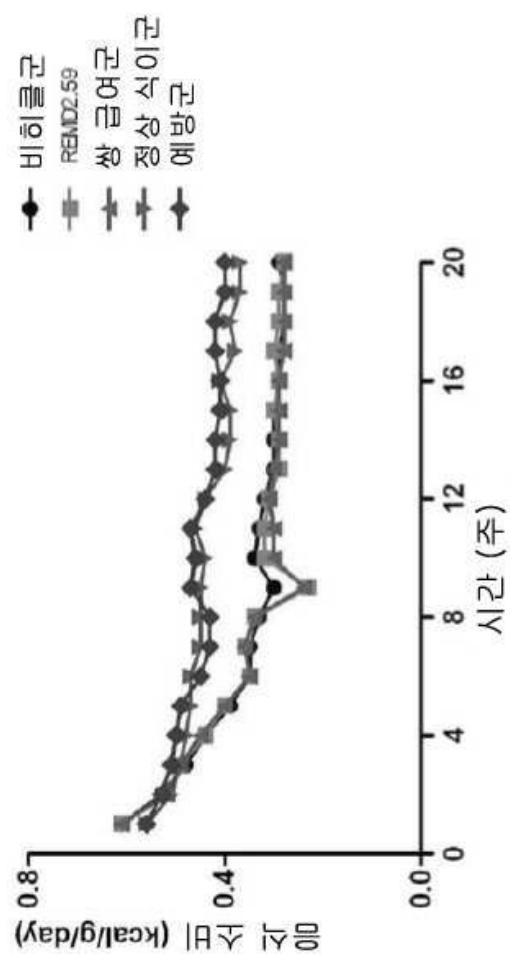
- [0348] 서열번호: 44 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0349] NIVMTQPLSLVTPGPASISCKSSQSLHSDGKNYLFWYLQKPGQSPQLIYEVSYRFSGVPDRFSGSGTDFSLKISRVEAEDVGVYYCMQNIQPPLT
FGQGTRLEIKR
- [0350] 서열번호: 45 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0351] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDFVYYCLQHNSNPLTFGGGT
KVEIKR
- [0352] 서열번호: 46 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0353] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDFVYYCLQHNSNPLTFGGGT
KVEIKR
- [0354] 서열번호: 47 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LCVR의 아미노산 서열
- [0355] DIVLTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLDRGDTYLDWYLQKPGQSPQLIYTLSYRASGVPDFSGSGTDFSLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFPF
TFGPGTKVDIKR
- [0356] 서열번호: 48 - 불변 경쇄 카파 영역의 아미노산 서열
- [0357] RTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC
- [0358] 서열번호: 49 - 불변 경쇄 람다 영역의 아미노산 서열
- [0359] GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAP
TECS
- [0360] 서열번호: 50 - IgG2 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열
- [0361] ASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTI SKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0362] 서열번호: 51 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 HC의 아미노산 서열
- [0363] QVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWDGSNKDYDSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNRLRAEDTAVYCCAREKDH
YDILTGYNYYGLDWGQGTTVTSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFT
GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
FRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0364] 서열번호: 52 - GCGR을 결합하는 인간 항체의 LC의 아미노산 서열
- [0365] DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDFVYYCLQHNSNPLTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

도면

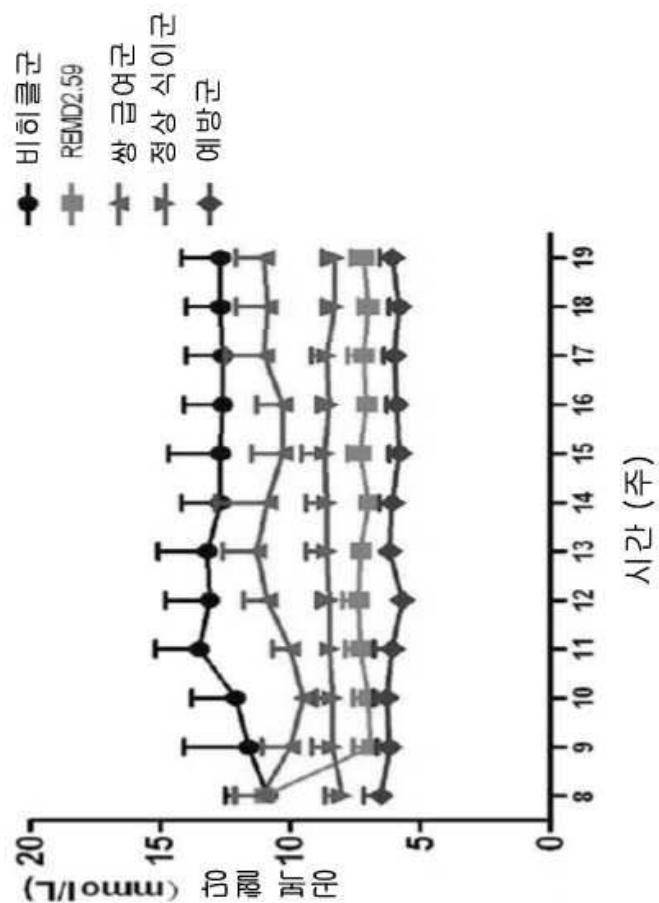
도면1



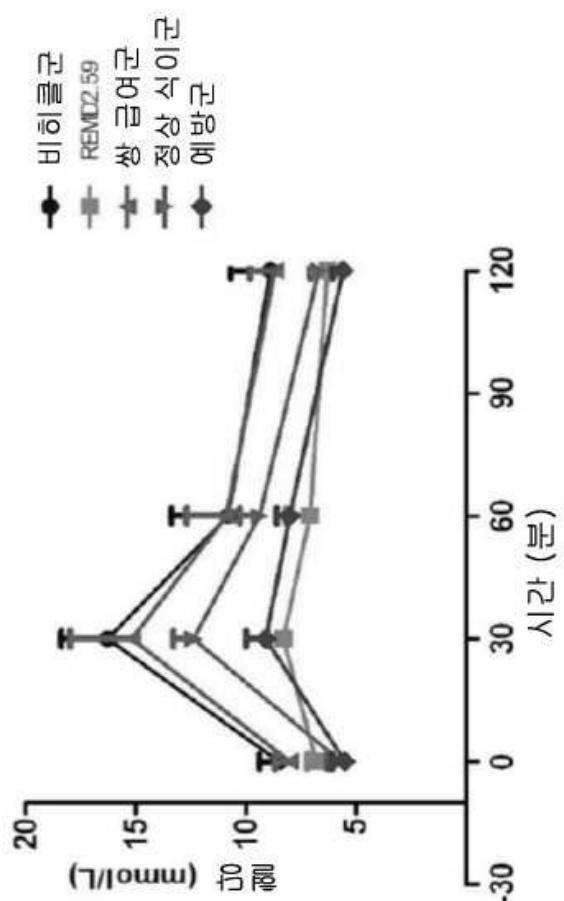
도면2



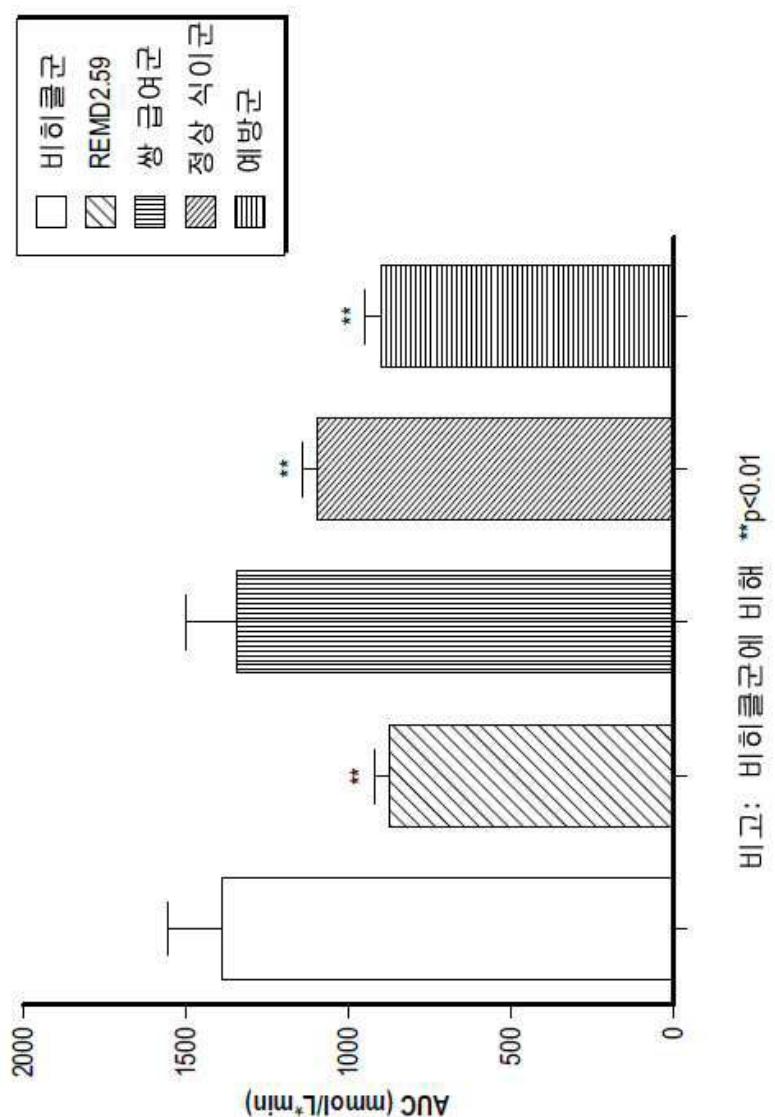
도면3



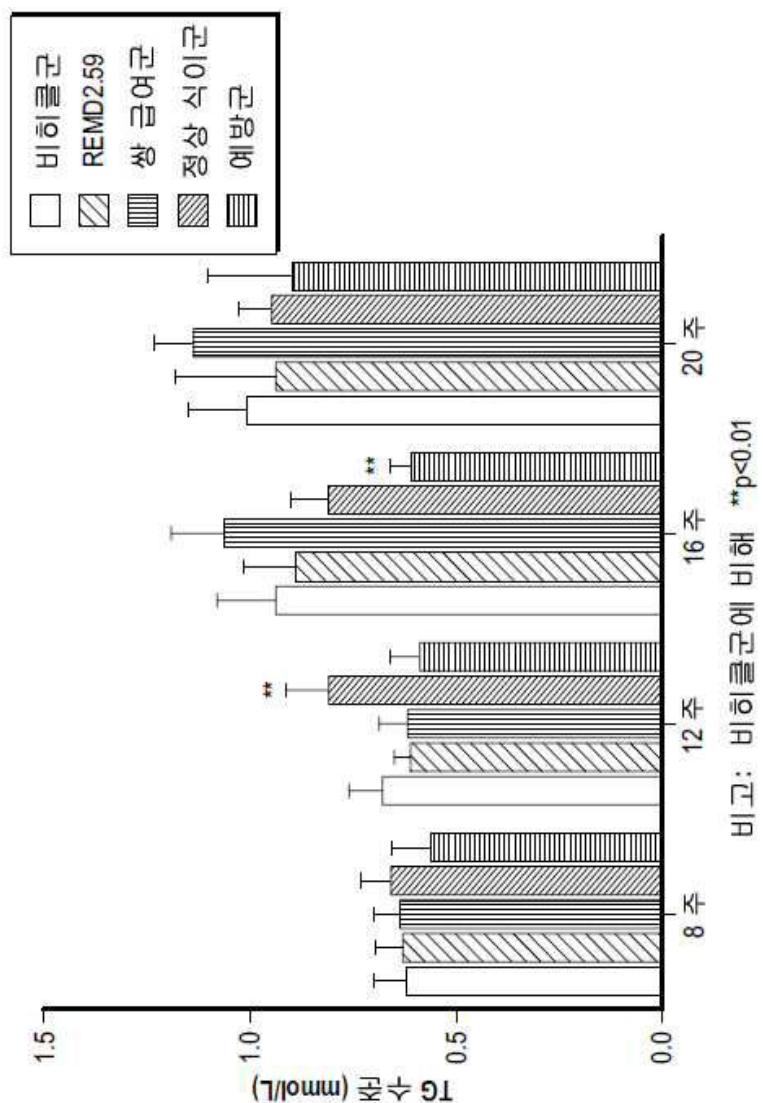
도면4



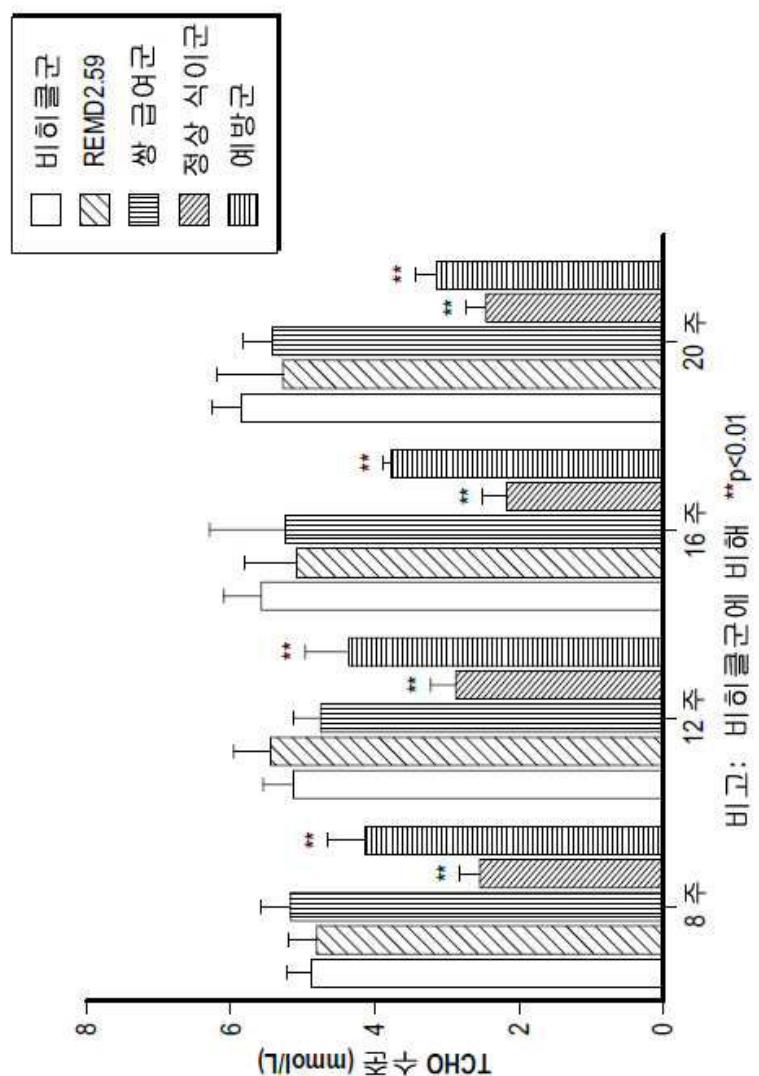
도면5



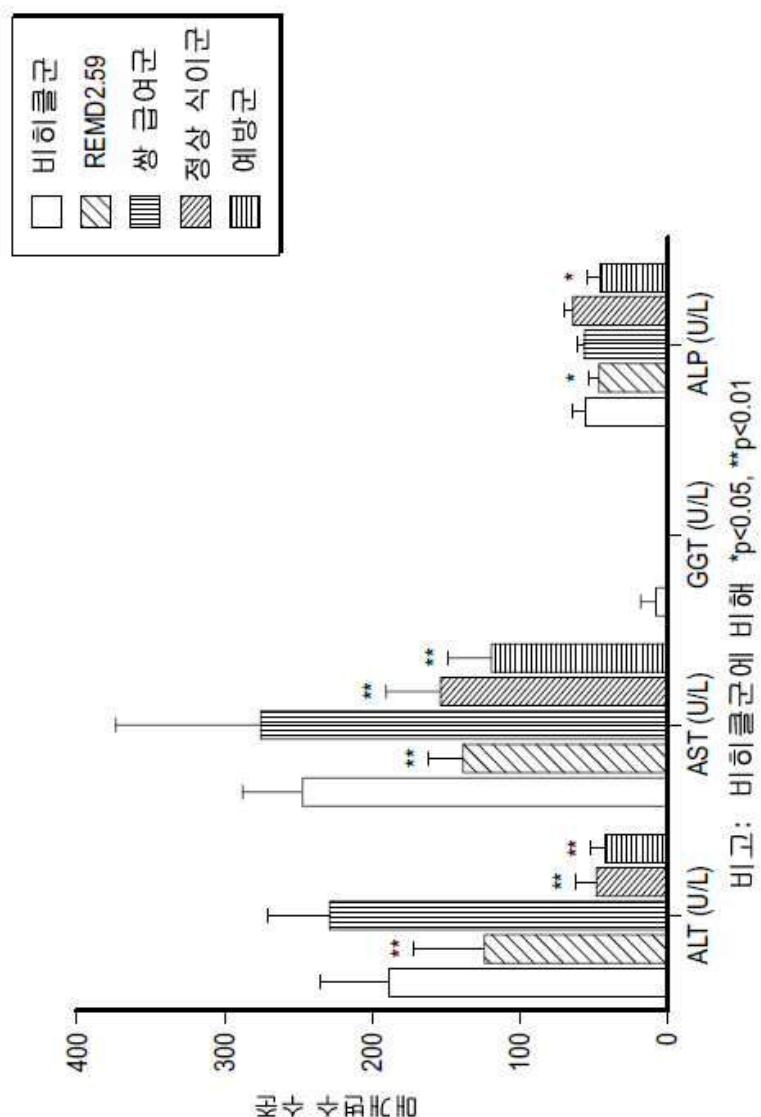
도면6



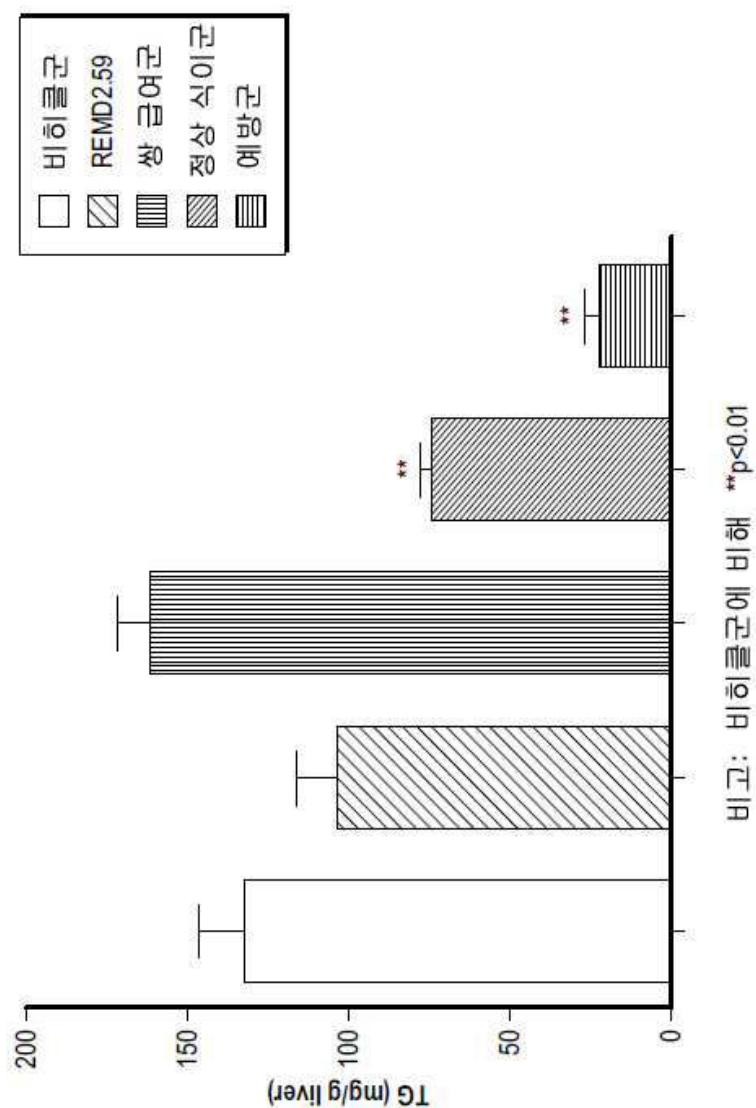
도면7



도면8

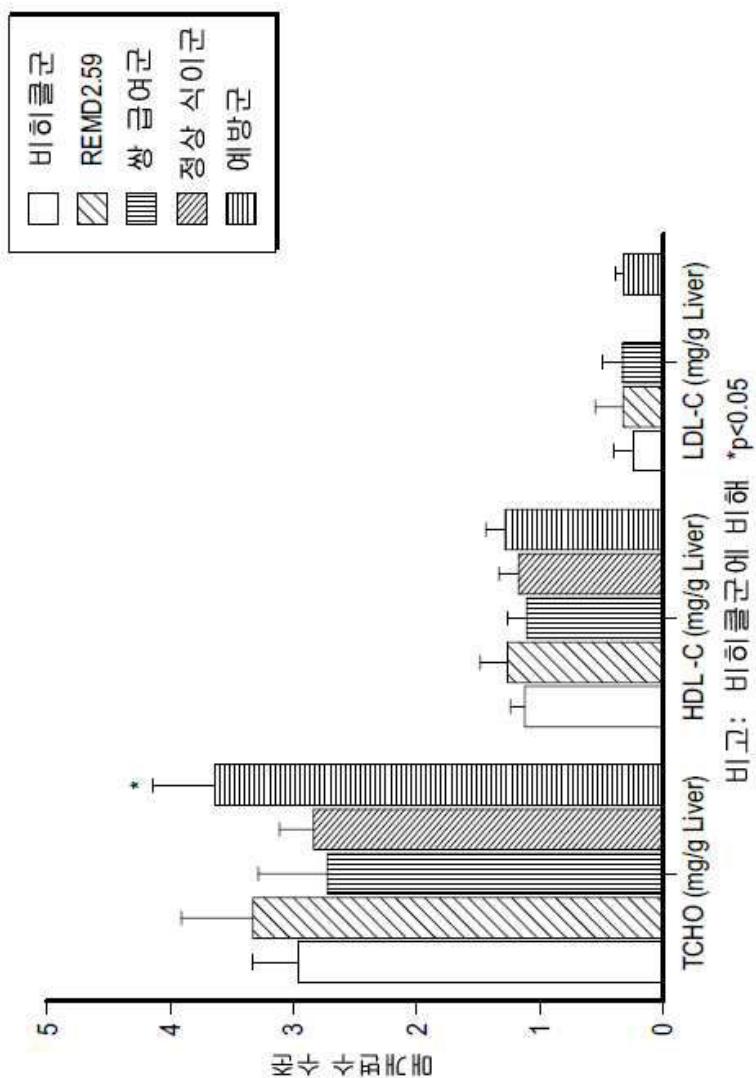


도면9

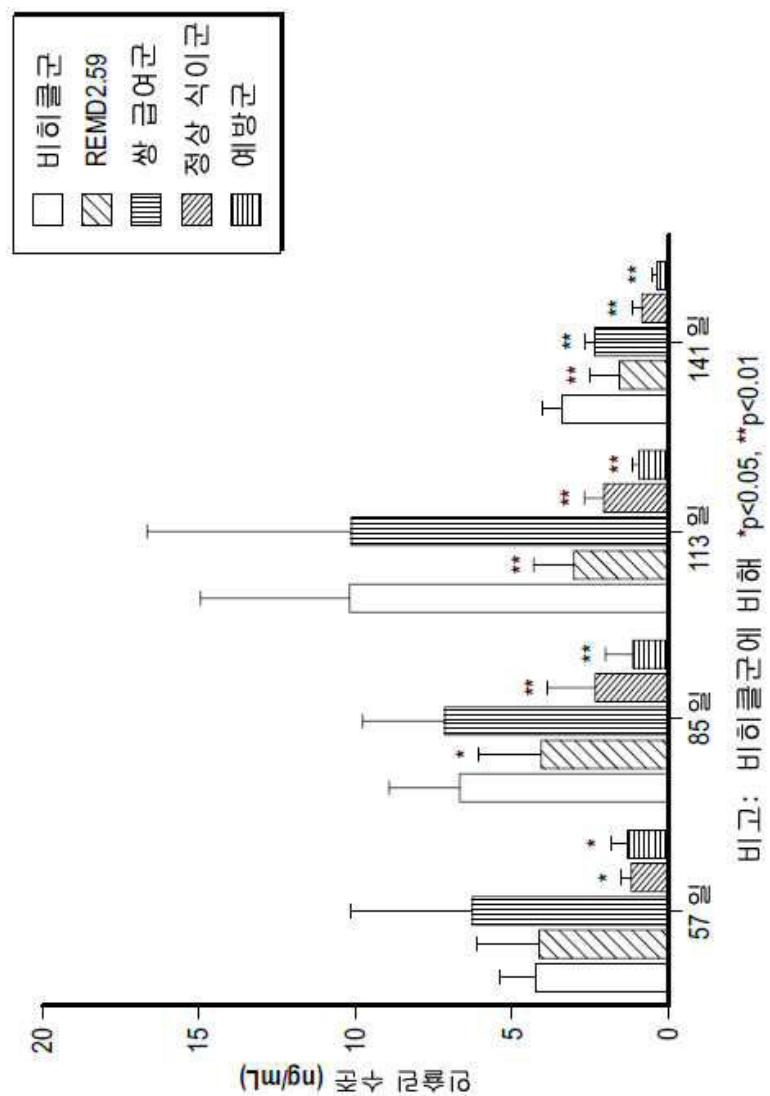


비고: 비하클군에 비해 **p<0.01

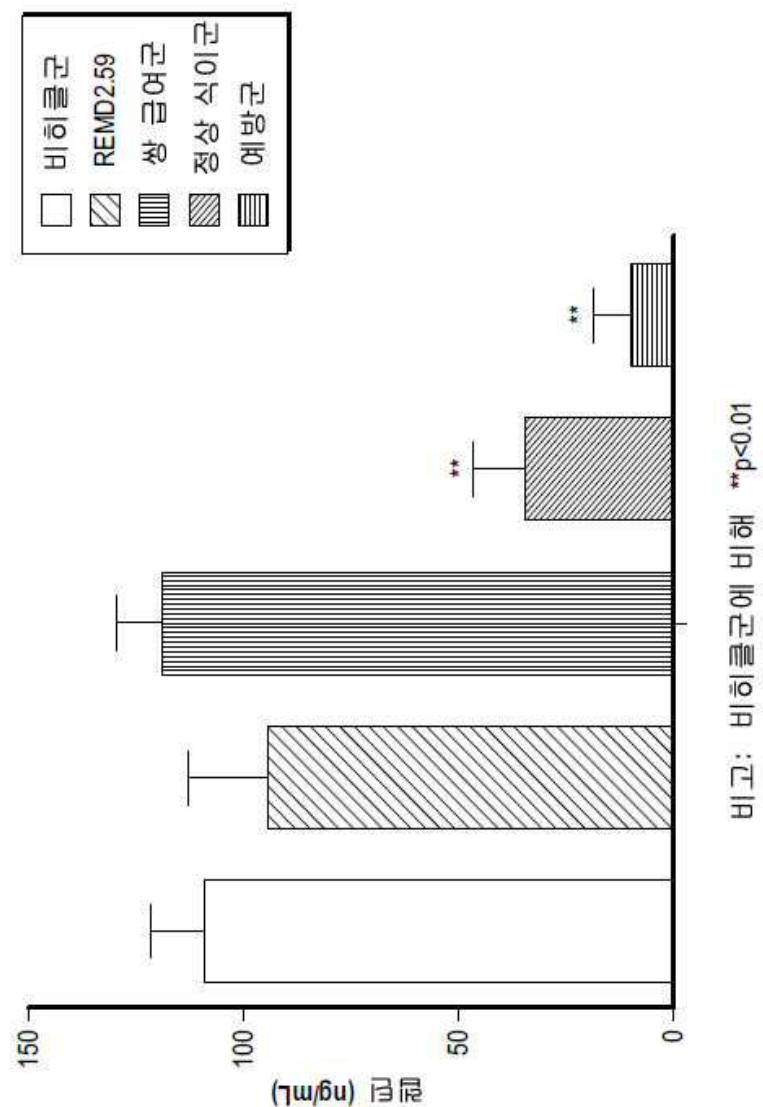
도면10



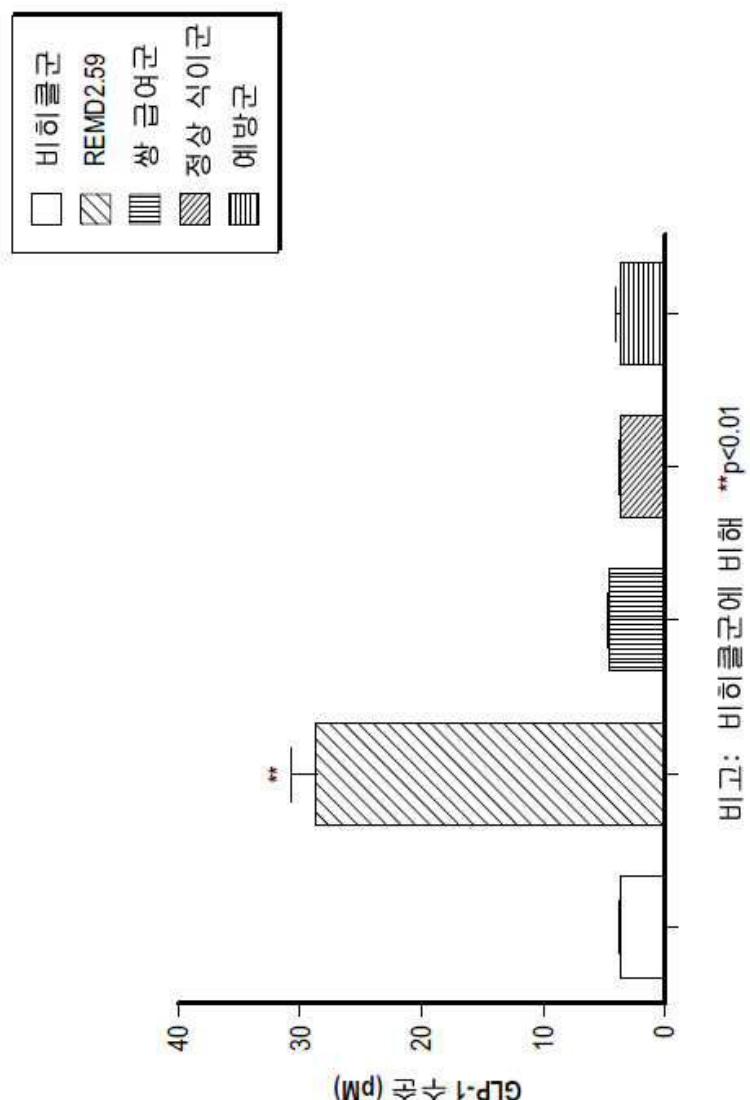
도면11



도면12

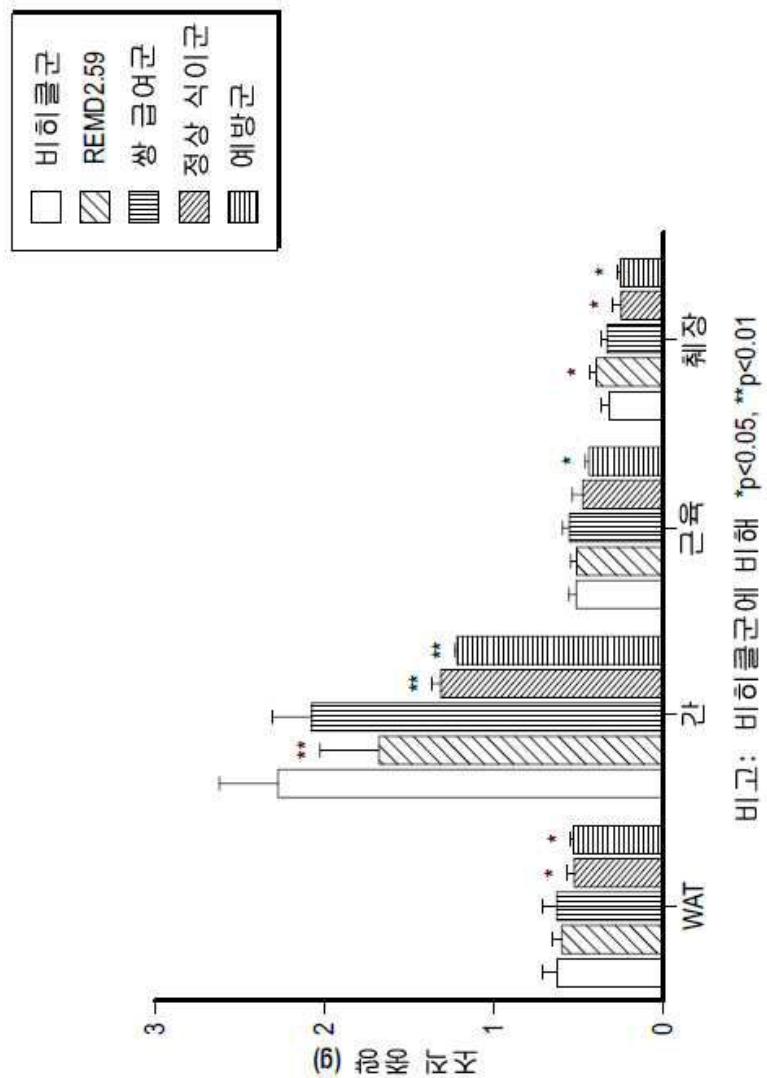


도면13

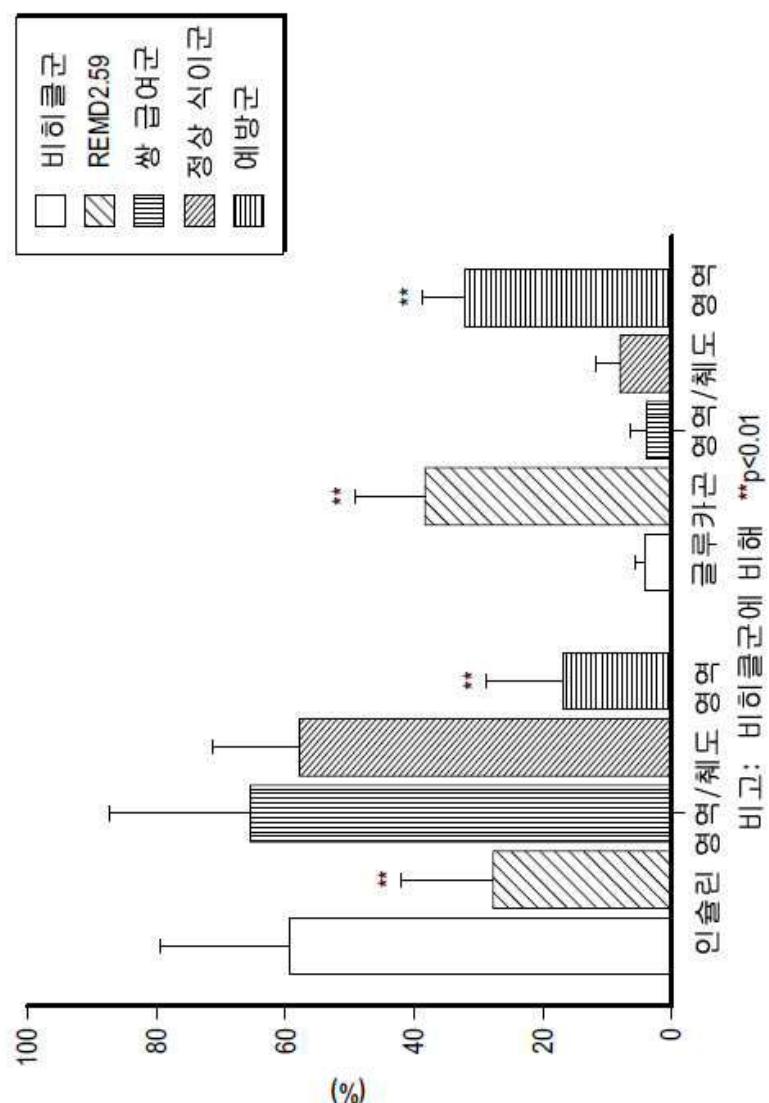


비고: 비호흡군에 비해 **p<0.01

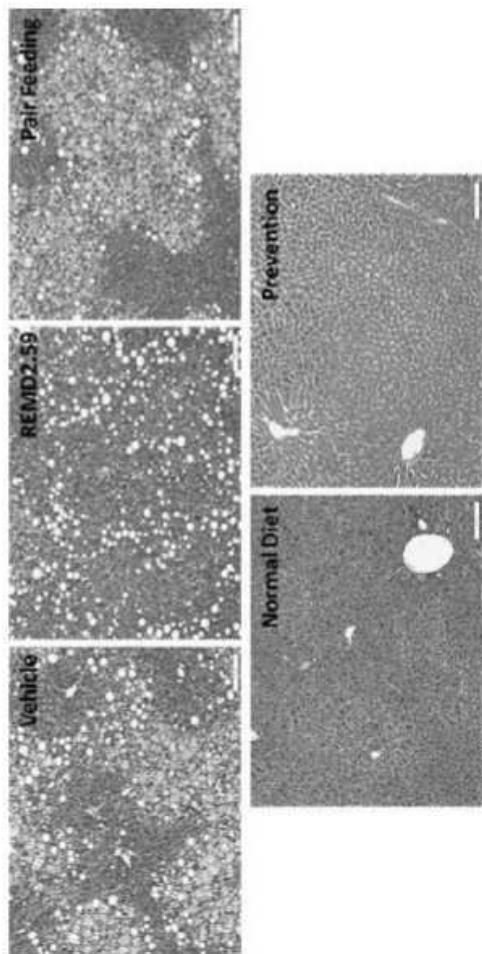
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록

- <110> REMD BIOTHERAPEUTICS, INC.
- <120> METHODS FOR TREATING OBESITY AND NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE
OR NONALCOHOLIC STEATHEPATITIS USING GLUCAGON RECEPTOR
ANTAGONISTIC ANTIBODIES
- <130> CACRE1.0004WO
- <160> 52
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 477
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Pro Pro Cys Gln Pro Gln Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1

5

10

15

Leu Ala Cys Gln Pro Gln Val Pro Ser Ala Gln Val Met Asp Phe Leu

20 25 30

Phe Glu Lys Trp Lys Leu Tyr Gly Asp Gln Cys His His Asn Leu Ser

35 40 45

Leu Leu Pro Pro Pro Thr Glu Leu Val Cys Asn Arg Thr Phe Asp Lys

50 55 60

Tyr Ser Cys Trp Pro Asp Thr Pro Ala Asn Thr Thr Ala Asn Ile Ser

65 70 75 80

Cys Pro Trp Tyr Leu Pro Trp His His Lys Val Gln His Arg Phe Val

85 90 95

Phe Lys Arg Cys Gly Pro Asp Gly Gln Trp Val Arg Gly Pro Arg Gly

100 105 110

Gln Pro Trp Arg Asp Ala Ser Gln Cys Gln Met Asp Gly Glu Glu Ile

115 120 125

Glu Val Gln Lys Glu Val Ala Lys Met Tyr Ser Ser Phe Gln Val Met

130 135 140

Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu

145 150 155 160

Ala Ile Leu Gly Gly Leu Ser Lys Leu His Cys Thr Arg Asn Ala Ile

165 170 175

His Ala Asn Leu Phe Ala Ser Phe Val Leu Lys Ala Ser Ser Val Leu

180 185 190

Val Ile Asp Gly Leu Leu Arg Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Ile Gly Asp

195 200 205

Asp Leu Ser Val Ser Thr Trp Leu Ser Asp Gly Ala Val Ala Gly Cys

210 215 220

Arg Val Ala Ala Val Phe Met Gln Tyr Gly Ile Val Ala Asn Tyr Cys

225 230 235 240

Trp Leu Leu Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Asn Leu Leu Gly Leu Ala

245 250 255

Thr Leu Pro Glu Arg Ser Phe Phe Ser Leu Tyr Leu Gly Ile Gly Trp

260	265	270
Gly Ala Pro Met Leu Phe Val Val Pro Trp Ala Val Val Lys Cys Leu		
275	280	285
Phe Glu Asn Val Gln Cys Trp Thr Ser Asn Asp Asn Met Gly Phe Trp		
290	295	300
Trp Ile Leu Arg Phe Pro Val Phe Leu Ala Ile Leu Ile Asn Phe Phe		
305	310	315
Ile Phe Val Arg Ile Val Gln Leu Leu Val Ala Lys Leu Arg Ala Arg		
325	330	335
Gln Met His His Thr Asp Tyr Lys Phe Arg Leu Ala Lys Ser Thr Leu		
340	345	350
Thr Leu Ile Pro Leu Leu Gly Val His Glu Val Val Phe Ala Phe Val		
355	360	365
Thr Asp Glu His Ala Gln Gly Thr Leu Arg Ser Ala Lys Leu Phe Phe		
370	375	380
Asp Leu Phe Leu Ser Ser Phe Gln Gly Leu Leu Val Ala Val Leu Tyr		
385	390	395
Cys Phe Leu Asn Lys Glu Val Gln Ser Glu Leu Arg Arg Arg Trp His		
405	410	415
Arg Trp Arg Leu Gly Lys Val Leu Trp Glu Glu Arg Asn Thr Ser Asn		
420	425	430
His Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly His Gly Pro Pro Ser Lys Glu Leu		
435	440	445
Gln Phe Gly Arg Gly Gly Ser Gln Asp Ser Ser Ala Glu Thr Pro		
450	455	460
Leu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Leu Ala Glu Ser Pro Phe		
465	470	475
<210>	2	
<211>	128	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Met Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Lys Asp His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Asn Tyr Tyr

100 105 110

Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Leu

85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 4		
<211> 128		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 4		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Val Met Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Val Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Lys Asp His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Asn Tyr Tyr		
100	105	110
Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	125
<210> 5		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 5		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp		

20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 6
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Met Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Lys Asp His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Asn Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain of a chimeric antibody that binds GCGR
 <400> 8

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50	55	60
Glu Trp Val Ala Val Met Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Val		
65	70	75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Lys Asp His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr		
115	120	125
Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
130	135	140
Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro		
145	150	155
160		
Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val		
165	170	175
Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser		
180	185	190
Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu		
195	200	205
Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser		
210	215	220
Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val		
225	230	235
240		
Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys		
245	250	255
Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
260	265	270
Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val		
275	280	285
Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp		
290	295	300

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe

305 310 315 320

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp

325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe

340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys

355 360 365

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys

370 375 380

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp

385 390 395 400

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys

405 410 415

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser

420 425 430

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr

435 440 445

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser

450 455 460

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 9

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain of a chimeric antibody that binds GCGR

<400> 9

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20	25	30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser		
35	40	45
Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys		
50	55	60
Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val		
65	70	75
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr		
85	90	95
Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln		
100	105	110
His Asn Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile		
115	120	125
Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser		
130	135	140
Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu		
165	170	175
Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr		
195	200	205
Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr		
210	215	220
Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
225	230	235
<210> 10		
<211> 125		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Asp Tyr Glu Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 11

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Asp Tyr Glu Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 12

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Gly Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Lys Ser Arg Ile Asn Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Val Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Ser Ser Gly Trp Asn Glu Gly Tyr Tyr
 100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 13

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Leu Ser Ser Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Cys Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Glu Val Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asp Tyr

100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Tyr

20 25 30

Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 15

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala

50 55 60

Gly Ser Val Lys Ser Arg Ile Asn Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Val Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Ser Gly Trp Asn Glu Gly Tyr Tyr

100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 16

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Tyr

20 25 30

Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Thr

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 17

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Phe Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Gly Val Tyr Gly Met

100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 18
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Gly Ser Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Arg Tyr Asn Trp Asn Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 19
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 20

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Gly Asn Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 21
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Thr Ile Ile Trp Ser Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Gly Leu Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asp Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 22
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Arg Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
Ala Arg Gly Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 24			
<211> 125			
<212> PRT			

<213> Homo sapiens			
<400> 24			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1 5 10 15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ser Tyr			
20 25 30			
Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35 40 45			
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val			
50 55 60			

Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65 70 75 80			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
Ala Arg Asp Gln Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Ser Asp Ala Phe			
100 105 110			
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser			
115 120 125			
<210> 25			
<211> 127			

<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 25			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr			
20	25	30	
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Glu Asp Ser Val			
50	55	60	

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Val Gly Tyr Gly Ser Gly Trp Tyr Glu Tyr Tyr His Tyr			
100	105	110	
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
115	120	125	
<210>	26		

<211>	128		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	26		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Val Met Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Val Asp Ser Val			
50	55	60	

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	

Ala Arg Glu Lys Asp His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Asn Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 27

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Met Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Lys Asp His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Asn Tyr Tyr
 100 105 110

Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 28

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Val Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn His Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg

100	105	
<210> 30		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 30		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
20	25	30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
35	40	45
Tyr Val Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro		
65	70	75
80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn His Tyr Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		

100	105	
<210> 31		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 31		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe		
20	25	30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		

50	55	60
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Leu Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Arg Val Asp Ile Lys Arg		
	100	105

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp			
20	25	30	
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	

65	70	75	80
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			

85	90	95
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Leu		
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
100	105	

<210> 33
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33

Gln Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Phe Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg

100 105

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg

100 105

<210> 35

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Phe Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg

100 105

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Met Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Val Lys Arg

100 105
 <210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105
 <210> 38
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Lys Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ala Leu Pro Val Ile Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Ser

20	25	30
Asp Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
35	40	45
Ser Pro Gln Val Leu Ile His Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
65	70	75
80		

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met His		
85	90	95
Arg Ile Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile		
100	105	110
Lys Arg		

<210> 39		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 39		

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
15		

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

20	25	30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp		
85	90	95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
100	105	

<210> 40
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Glu Ala

85 90 95

Leu Gln Thr Met Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<

210> 41
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 41

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Glu Ala

85 90 95

Leu Gln Thr Met Ser Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 42

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Phe Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

His Ile Glu Phe Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Ser Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 44

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Asn Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Asn Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Lys Ile

65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Asn			
85	90	95	
Ile Gln Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

Arg

<210>	45
<211>	108
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp			
20	25	30	
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			

50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Leu			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105		

<210>	46
<211>	108
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp			
20	25	30	
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Leu			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100		105	
<210>	47		
<211>	114		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	47		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Arg			
20	25	30	
Asp Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val			
50	55	60	
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Lys			
65	70	75	80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln			
85	90	95	
Arg Ile Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile			
100	105	110	

Lys Arg

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

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

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 49

<211> 106

<212> PRT

<

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 50

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180	185	190
-----	-----	-----

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195	200	205
-----	-----	-----

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210	215	220
-----	-----	-----

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245	250	255
-----	-----	-----

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260	265	270
-----	-----	-----

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275	280	285
-----	-----	-----

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

290	295	300
-----	-----	-----

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 51

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Val Met Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Val Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Lys Asp His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Asn Tyr Tyr		
100	105	110
Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	125
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
130	135	140
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
145	150	155
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
165	170	175
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
180	185	190
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr		
195	200	205
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
210	215	220
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
225	230	235
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

290 295 300

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

385 390 395 400

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 52

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20	25	30	
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Leu			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			