



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0050460
 (43) 공개일자 2012년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 38/26 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
 A61P 37/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7004905
 (22) 출원일자(국제) 2010년08월19일
 심사청구일자 2012년02월24일
 (85) 번역문제출일자 2012년02월24일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2010/053754
 (87) 국제공개번호 WO 2011/024110
 국제공개일자 2011년03월03일
 (30) 우선권주장
 61/237,654 2009년08월27일 미국(US)

(71) 출원인
리나트 뉴로사이언스 코퍼레이션
 미국 캘리포니아 94080 사우스 샌프란시스코 이스
 트 그랜드 애비뉴 230
 (72) 발명자
초우, 조이스 칭 추
 미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코
 이스트 그랜드 애비뉴 230 리나트 뉴로사이언스
 코퍼레이션
린, 치아-양
 미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코
 이스트 그랜드 애비뉴 230 리나트 뉴로사이언스
 코퍼레이션
퉁, 후아
 미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코
 이스트 그랜드 애비뉴 230 리나트 뉴로사이언스
 코퍼레이션
 (74) 대리인
김영, 양영준

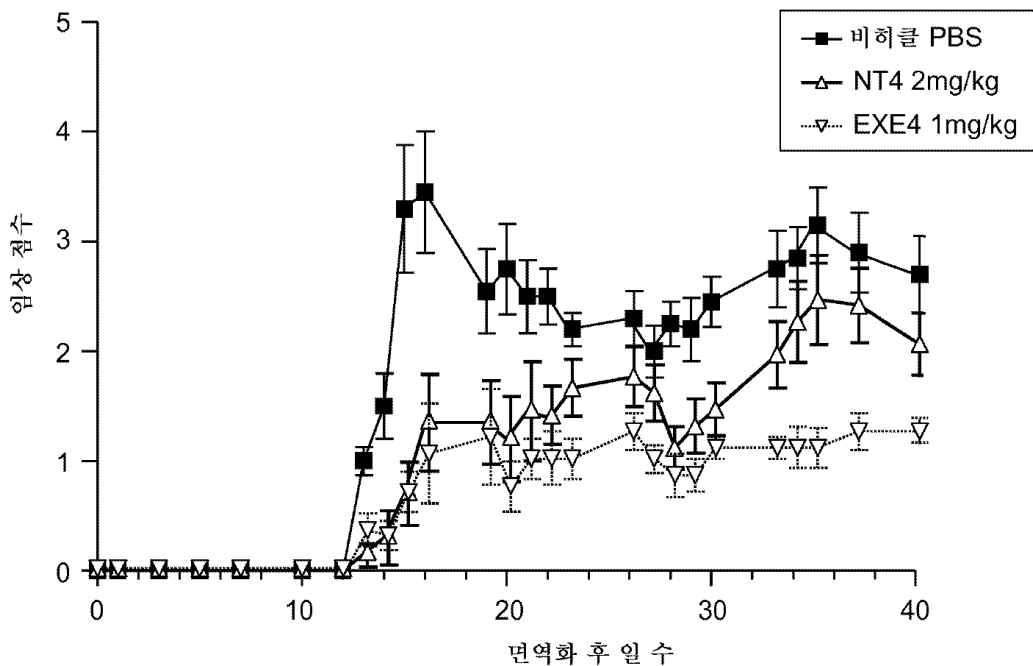
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 자가면역 장애를 치료하기 위한 글루카곤-유사 펩티드-1 수용체 (GLP-1R) 효능제

(57) 요약

글루카곤-유사 펩티드-1 수용체 (GLP-1R) 효능제가 다발성 경화증과 같은 자가면역 질환에서 중추 신경계의 백혈 구 침습을 감소시키기 위해 제공된다. GLP-1R 효능제에는, 예를 들어, 천연 발생 효능제, 예컨대 엑센딘-4, 뿐 만 아니라 항체에 연결된 GLP-1R 효능제 펩티드가 포함된다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

치료를 필요로 하는 포유동물에게 글루카곤-유사 펩티드-1 수용체 (GLP-1R)를 활성화시키는데 효과적인 양으로 GLP-1R 효능제를 포함하는 조성물을 투여함으로써 중추 신경계 조직의 백혈구 침습을 감소시키는 것을 포함하는, 중추 신경계 조직의 백혈구 침습을 감소시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 포유동물에 자가면역 장애가 있는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 자가면역 장애가 다발성 경화증인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 자가면역 장애가 면역 거부, 이식편-대-숙주 질환, 포도막염, 시신경병증, 시신경염, 횡단성 척수염, 염증성 장 질환, 류머티스성 관절염, 강직성 척추염, 전신 홍반성 루푸스, 중증 근무력증 또는 그레이브스병(Graves disease)과 관련되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, GLP-1R 효능제가 OAP-189인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, GLP-1R 효능제가 DPP-4 억제제인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, GLP-1R 효능제가 항-GLP-1R 효능제 항체인 방법.

청구항 9

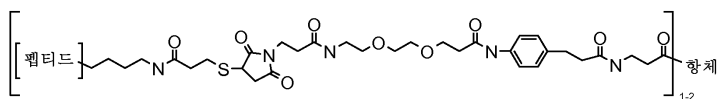
제1항에 있어서, GLP-1R 효능제가 엑센딘(exendin)-4의 단편 또는 유도체를 포함하고, 이때 이러한 엑센딘-4의 단편 또는 유도체가 GLP-1R에 결합하고 이를 활성화시키는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, GLP-효능제가 GLP-1R 효능제 펩티드 및 항체를 포함하는 GLP-1R 효능제-항체 접합체 (GAC)인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, GAC가 하기 구조를 갖는 것인 방법.



[상기 식에서, 펩티드의 화학식은

R^1 -[H¹X²E³G⁴T⁵F⁶T⁷S⁸D⁹X¹⁰S¹¹X¹²X¹³X¹⁴
E¹⁵X¹⁶X¹⁷A¹⁸X¹⁹X²⁰X²¹F²²X²³X²⁴X²⁵X²⁶X²⁷X²⁸X²⁹X³⁰X³¹X³²X³³X³⁴X³⁵X³⁶X³⁷
X³⁸X³⁹X⁴⁰ (서열 3)]-R²

이고,

R¹은 부재하거나, CH₃, C(O)CH₃, C(O)CH₂CH₃, C(O)CH₂CH₂CH₃ 또는 C(O)CH(CH₃)CH₃이고;

R²는 OH, NH₂, NH(CH₃), NHCH₂CH₃, NHCH₂CH₂CH₃, NHCH(CH₃)CH₃, NHCH₂CH₂CH₂CH₃, NHCH(CH₃)CH₂CH₃, NHC₆H₅, NHCH₂CH₂OCH₃, NHOCH₃, NHOCH₂CH₃, 카르복시 보호기, 지질 지방산 기 또는 탄수화물이고, X²는 Aib, A, S, T, V, L, I, D-Ala와 같은 차단기이고;

X¹⁰은 V, L, I 또는 A이고; X¹²는 S 또는 K이고;

X¹³은 Q 또는 Y이고;

X¹⁴는 G, C, F, Y, W, M 또는 L이고;

X¹⁶은 K, D, E 또는 G이고;

X¹⁷은 E 또는 Q이고;

X¹⁹는 L, I, V 또는 A이고;

X²⁰은 오르니틴 또는 K(SH) R과 같은 유도체화 리신 기, 또는 K이고;

X²¹은 L 또는 E이고;

X²³은 I 또는 L이고;

X²⁴는 A 또는 E이고;

X²⁵는 W 또는 F이고;

X²⁶은 L 또는 I이고;

X²⁷은 I, K 또는 V이고;

X²⁸은 R, 오르니틴, N 또는 K이고;

X²⁹는 Aib 또는 G이고;

X³⁰은 임의의 아미노산, 바람직하게는 G 또는 R이고;

X³¹은 P이거나 부재하고;

X³²는 S이거나 부재하고;

X³³은 S이거나 부재하고;

X³⁴는 G이거나 부재하고;

X³⁵는 A이거나 부재하고;

X³⁶은 P이거나 부재하고;

배경 기술

- [0006] 배경기술
- [0007] 다발성 경화증 (MS)은 염증, 말이집탈락 및 축삭 손상을 특징으로 하는 중추 신경계 (CNS)의 말이집탈락 자가면역 질환이다. 이러한 질환은 세계적으로 수백만명 넘게 영향을 미치고, 남성보다 여성에서 2배 더 우세하다. MS의 증상들은 일반적으로 20세 내지 40세에 나타난다.
- [0008] MS의 병인은 불명확하지만, 질환의 특색들이 연구되어 왔다. 이같은 특색에는 CNS 조직에 대한 손상, 미세아교세포의 활성화, 염증유발성(proinflammatory) 시토카인 생산, T 세포 이동 및 클론형 확장 of 정지, 변경된 대식세포 이펙터(effector) 기능, 생산, MHC의 상향조절, 및 침윤성 T 세포에 의한 직접적인 CNS 공격이 포함된다.
- [0009] 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE)이 MS에 대한 표준 모델로 간주된다. 이러한 무린(murine) 질환 모델이 MS의 병인을 연구하고 이의 치료를 위한 약물을 평가하는데 사용되어 왔다 (문헌 [Aharoni, R. et al., 2005, J. Neurosci. 25:8217-28]). EAE의 임상적인 특색에는 다수의 침윤성 백혈구 및 대식세포에 의한 CNS의 염증 및 말이집탈락이 포함된다. 말이집 염기성 단백질 (MBP), 단백질질 단백질 (PLP), 및 말이집 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG)이 포함되는 말이집의 여러 상이한 단백질 성분으로의 마우스의 활성 면역화는 자가면역 항체의 생산 및 상행 마비의 임상 증상을 유도한다. 이러한 질환은 마우스 계통 및 면역화에 사용된 말이집 단백질에 따라 급성 또는 만성일 수 있다. EAE는 MS의 병인을 연구하고 이의 치료를 위한 약물을 평가하는데 사용되어 왔다 (문헌 [Aharoni, R. et al.]).
- [0010] MS는 뉴런 조직에 풍부한 지질 및 여러 단백질이 포함되는 말이집에 대한 T 세포 응답에서 주로 초래된다. 말이집 항원에 대한 특이성이 있는 Th1 및 Th17 표현형의 T 세포에 의한 CNS 조직의 침습으로부터 말이집탈락 및 임상적인 마비가 초래된다. Th1 세포는 TNF- α 및 IFN- γ 가 포함되는 염증성 시토카인을 생산한다. IL-17 발현이 MS 환자, 뿐만 아니라 류머티스 관절염 및 과민성 장 질환 환자에서 증가된다 (문헌 Komiyama, Y. et al., 2006, J. Immunol. 177, 566-573); [Matusevicius, D. et al., 1999, Mult. Scler. 5, 101-104]). 이는 자가면역 질환에서의 Th17 세포에 대한 병원성 역할을 시사한다. 자가면역 항체의 생산 및 보체 활성화가 포함되는 기타 면역학적 응답에 의해 CNS에 대한 손상이 또한 야기될 것이다. B-세포가 MS 및 EAE의 초기 및 후기 단계에 수반되고, 이때 다양한 아이소타입(isotype)의 MBP-특이적 및 MOG-특이적 항체가 이러한 질환들의 과정 전반에 걸쳐 발견된다. 뇌 및 척수 조직으로부터 제조된 절편들은 백혈구 침습 (특히 림프구 및 대식세포), 및 신경계의 기저 조직의 파괴를 나타낸다.
- [0011] 글루카곤-유사 펩티드 (7-36) 아미드 (GLP-1)는 래트 및 인간 양쪽 모두에서의 글루코인크레틴이다 (문헌 [Dupre and Ebert and Creutzfeld, 1987, Diabetes Metab. Rev. 3]; [Mojsov et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:11880]). 인슐린 분비를 증가시키고 글루카곤 분비를 감소시키는 것에 더하여, 아미노산 30개의 GLP-1 펩티드는 프로-인슐린 유전자 전사를 자극하고, 위 배출 시간을 느리게 하며, 음식 섭취를 감소시킨다. GLP-1은 글루카곤-유사 펩티드 1 수용체 (GLP-1R)에 결합함으로써 자신의 생리학적 효과를 발휘한다. GLP-1R은 다수의 중요한 생리학적 및 병태생리학적 프로세스를 조절하는 G 단백질-커플링(coupled) 수용체 (GPCR) 수퍼패밀리의 클래스 B 수용체 서브클래스(sub-class)에 속한다. GLP-1R은 G-단백질 활성화, 증가된 cAMP 생산 및 PKA 활성화에 커플링된 7-막횡단 스패닝(spanning) 수용체이다. GLP-1R을 통해 개시되는 PKA-비의존적 응답이 또한 있다. GLP-1의 작용에 대한 기타 응답에는, 예를 들어, β -세포 세포자멸사의 감소가 동반되는 췌장 β -세포 증식 및 확장이 포함된다. 또한, GLP-1 활성화는 췌장 세포에서의 글루코스 전달체-2 (GLUT2) 및 글루코키나제 (glucokinase) 유전자의 증가된 발현을 초래할 수 있다.
- [0012] 또한 GLP-1은 고립로 핵 (NTS)의 꼬리쪽 영역에서 뉴런에 의해 합성되는 뉴로펩티드이다 (문헌 [Jin, S. L. et al., 1988, J Comp Neurol. 271:519-532]). GLP-1-면역반응성 섬유 및 GLP-1R이 뇌 전역에 걸쳐 광범위하게 발현되는 것으로 나타났다 (문헌 [Jin, S. L. et al., 1988]; [Larsen, P. J. et al., 1997, Neuroscience 77:257-270]; [Merchantaler, I. et al., 1999, J Comp Neurol 403:261-280]). GLP-1R-결핍 마우스는 카이네이트 투여 후 발작 중증도 및 뉴런 손상이 강화되었고, 이때 해마 체세포에서의 Gplr 유전자 전달 후 표현형이 수정되었다 (문헌 [During, M. J. et al., 2003, Nat Med. 9(9):1173-9]).

발명의 내용

- [0013] 개요
- [0014] 한 측면에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 포유동물에게 GLP-1R을 활성화시키는데 효과적인 양으로 GLP-1R 효

능제를 포함하는 조성물을 투여함으로써 중추 신경계 조직의 백혈구 침습을 감소시키는 것을 포함하는, 중추 신경계 조직의 백혈구 침습을 감소시키는 방법을 제공한다. 추가로 본 발명은 포유동물에서 중추 신경계 조직의 백혈구 침습을 감소시키는데 사용되는 의약의 제조에서의 GLP-1R 효능제의 용도를 제공한다. 추가로 본 발명은 포유동물에서 Th1 및 Th17 세포수를 감소시키는데 사용되는 의약의 제조에서의 GLP-1R 효능제의 용도를 제공한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 포유동물은 자가면역 장애에 걸려 있다. 한 실시양태에서, 자가면역 장애는 실험적 자가면역 뇌척수염이다. 또 다른 실시양태에서, 자가면역 장애는 다발성 경화증이다. 다른 실시양태에서, 자가면역 장애는 면역 거부, 이식편-대-숙주 질환, 포도막염, 시신경병증, 시신경염, 횡단성 척수염, 염증성 장 질환, 류머티스성 관절염, 강직성 척추염, 전신 홍반성 루푸스, 중증 근무력증 또는 그레이브스병(Graves disease)과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

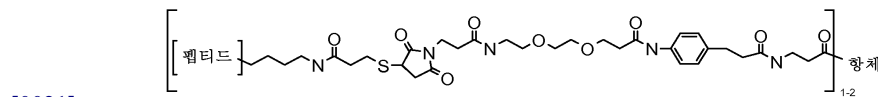
[0016] 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제를 포함하는 조성물의 투여는 포유동물의 림프절 내의 Th1 및/또는 Th17 세포의 개수를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제를 포함하는 조성물의 투여는 포유동물의 림프절 내의 Ter119+ 적혈구 세포를 감소시킨다.

[0017] 바람직한 실시양태에서, 침습 백혈구는 T 세포 및 대식세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 침습 백혈구는 CD3-발현 및 CD68-발현 백혈구를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 중추 신경계 조직은 뇌 조직 또는 척수 조직이다.

[0018] 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제는 OAP-189이다. 다른 실시양태에서, GLP-1R 효능제는 DPP-4 억제제이다. 다른 실시양태에서, GLP-1R 효능제는 항-GLP-1R 효능제 항체이다.

[0019] 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제는 천연-발생 GLP-1R 효능제이다. 일부 실시양태에서, 천연-발생 GLP-1R 효능제는 엑센딘(exendin)-4이다. 관련된 실시양태에서, 천연-발생 GLP-1R 효능제는 엑센딘-4의 단편 또는 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 엑센딘-4의 단편 또는 유도체는 GLP-1R에 결합하고 이를 활성화시킨다.

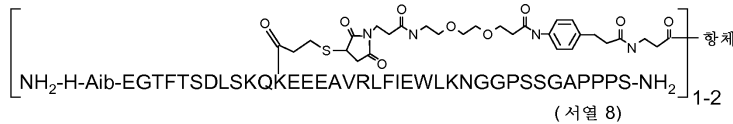
[0020] 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제는 GLP-1R 효능제 펩티드 및 항체를 포함하는 GLP-1R 효능제 항체 접합체("GAC": GLP-1R agonist Antibody Conjugate)이다. 관련된 실시양태에서, GAC의 구조는 하기와 같을 수 있다:



[0021]

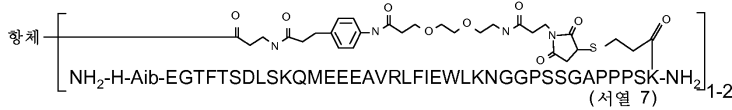
[0022] [상기 식에서, 펩티드의 화학식은 R¹-[H¹ X² E³ G⁴ T⁵ F⁶ T⁷ S⁸ D⁹ X¹⁰ S¹¹ X¹² X¹³ X¹⁴ E¹⁵ X¹⁶ X¹⁷ A¹⁸ X¹⁹ X²⁰ X²¹ F²² X²³ X²⁴ X²⁵ X²⁶ X²⁷ X²⁸ X²⁹ X³⁰ X³¹ X³² X³³ X³⁴ X³⁵ X³⁶ X³⁷ X³⁸ X³⁹ X⁴⁰ (서열 3)]-R²이고, R¹은 부재하거나, CH₃, C(O)CH₃, C(O)CH₂CH₃, C(O)CH₂CH₂CH₃ 또는 C(O)CH(CH₃)CH₃이고; R²은 OH, NH₂, NH(CH₃), NHCH₂CH₃, NHCH₂CH₂CH₃, NHCH(CH₃)CH₃, NHCH₂CH₂CH₂CH₃, NHCH(CH₃)CH₂CH₃, NHC₆H₅, NHCH₂CH₂OCH₃, NHOC₃H₇, NHOC₂H₅, 카르복시 보호기, 지질 지방산 기 또는 탄수화물이고, X²는 Aib, A, S, T, V, L, I, D-Ala와 같은 차단기이고; X¹⁰은 V, L, I 또는 A이고; X¹²는 S 또는 K이고; X¹³은 Q 또는 Y이고; X¹⁴는 G, C, F, Y, W, M 또는 L이고; X¹⁶은 K, D, E 또는 G이고; X¹⁷은 E 또는 Q이고; X¹⁹는 L, I, V 또는 A이고; X²⁰은 오르니틴 또는 K(SH) R과 같은 유도체화 리신 기, 또는 K이고; X²¹은 L 또는 E이고; X²³은 I 또는 L이고; X²⁴는 A 또는 E이고; X²⁵는 W 또는 F이고; X²⁶은 L 또는 I이고; X²⁷은 I, K 또는 V이고; X²⁸은 R, 오르니틴, N 또는 K이고; X²⁹는 Aib 또는 G이고; X³⁰은 임의의 아미노산, 바람직하게는 G 또는 R이고; X³¹은 P이거나 부재하고; X³²는 S이거나 부재하고; X³³은 S이거나 부재하고; X³⁴는 G이거나 부재하고; X³⁵는 A이거나 부재하고; X³⁶은 P이거나 부재하고; X³⁷은 P이거나 부재하고; X³⁸은 P이거나 부재하고; X³⁹는 S이거나 부재하며; X⁴⁰은 연결 잔기이거나 부재하고; X¹⁰, S¹¹, X¹², X¹³, X¹⁴, X¹⁶, X¹⁷, X¹⁹, X²⁰, X²¹, X²⁴, X²⁶, X²⁷, X²⁸, X³², X³³, X³⁴, X³⁵, X³⁶, X³⁷, X³⁸, X³⁹ 또는 X⁴⁰ 중 하나는 링커를 통해 항체의 조합 부위에 공유결합으로 연결된 친핵성 측쇄를 포함하는 연결 잔기로 치환되고, 연결 잔기는 K, R, Y, C, T, S, 리신의 동족체 (K(SH) 포함), 호모시스테인 및 호모세린으로 구성된 군으로부터 선택된다].

[0023] 일부 실시양태에서, GAC는 하기 구조를 포함할 수 있다:



[0024]

[0025] 일부 실시양태에서, GAC는 하기 구조를 포함할 수 있다:



[0026]

[0027] 일부 실시양태에서, 항체는 전장 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dsFv, scFv, VH, 디아바디(diabody) 및 미니 바디(minibody)로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 구성된 군으로부터 선택된 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 촉매 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 알돌라제(aldoase) 항체이다. 일부 실시양태에서, 알돌라제 항체는 서열 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 12에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 다른 실시양태에서, 본 발명은 GLP-1R을 활성화시키는데 효과적인 양의 GLP-1R 효능제 및 사용 설명서를 포함하는, 중추 신경계 조직의 백혈구 침습을 감소시키기 위한 부품 키트를 제공한다. 관련된 실시양태에서, 본 발명은 GLP-1R을 활성화시키는데 효과적인 양의 GLP-1R 효능제 및 사용 설명서를 포함하는, 중추 신경계에 영향을 미치는 자가면역 장애를 치료하기 위한 부품 키트를 제공한다.

[0029] 본 발명의 이러한 측면 및 기타 측면이 하기의 상세한 설명 및 실시예로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도면의 간단한 설명

도 1은 MOG 면역화 후 EAE 동물에서의 침윤성 세포체, T 세포, 단핵구 및 미세아교세포를 나타내는 조직화학을 도해한다. EAE 동물(상부 패널) 및 건강한 동물(하부 패널)로부터의 척수 절편을 침윤성 세포체를 염색하기 위한 크레실 바이올렛(Cresyl violet) (왼쪽), 침윤성 T 세포를 검출하기 위한 항-CD3 항체, 또는 단핵구 및 미세아교세포를 검출하기 위한 항-CD68 항체 (오른쪽)로 염색하였다.

도 2는 MOG 면역화 후 1 mg/kg GLP-1R 효능제로 처리된 동물에서의 EAE의 임상 중증도를 나타낸다 그래프를 도해한다. MOG 면역화 후 제0일부터 제9일까지 동물에게 1 mg/kg 엑센딘-4 (EXE4), 2 mg/kg 뉴로트로핀-4 (NT4) 또는 PBS (대조군)를 매일 제공하였다. 하기의 채점 시스템에 따라 EAE의 임상 징후에 대해 마우스들을 매일 평가하였다: 0 = 정상; 1 = 늘어난 꼬리; 2 = 중증도의 뒷다리 약화; 3 = 약간 중증의 뒷다리 약화 (여전히 동물이 어렵게 걸을 수 있음); 4 = 중증 뒷다리 약화 (동물이 자신의 뒷다리를 움직일 수 있지만 걷지는 못함); 5 = 완전한 뒷다리 마비; 및 6 = 사망.

도 3은 MOG 면역화 후 1 mg/kg GLP-1R 효능제로 처리된 EAE 동물에서의 이환율을 나타내는 그래프를 도해한다. MOG 면역화 후 제0일부터 제6일까지 동물들을 1 mg/kg 엑센딘-4 (EXE4) 또는 PBS로 매일, 또는 GLP-1R 효능제 GAC-1 (1 mg/kg)로 매주 처리하였다. 임상 점수를 매일 모니터링하고 상기 기술된 바와 같이 평가하였다.

도 4는 MOG 면역화 후 다양한 용량의 GLP-1R 효능제 (엑센딘-4 또는 GAC-1)로 처리된 EAE 동물에서의 이환율을 나타내는 그래프를 도해한다. 엑센딘-4 (EXE4) 처리 동물은 MOG 면역화 후 제0일부터 제2일까지 3 mg/kg 엑센딘-4로 매일, 제3일부터 제8일까지 1 mg/kg 엑센딘-4로 처리하였다. GAC-1 처리 동물은 제0일에 3 mg/kg GAC-1로 처리한 후, 면역화 후 제7일에 시작하여 1 mg/kg GAC-1로 매주 처리하였다. 대조군 동물은 대조군 PBS로 매일 처리하였다. 임상 점수를 매일 모니터링하였다. EAE의 임상 징후를 상기 기술된 바와 같이 평가하였다.

도 5A-C는 (A) PBS 대조군 처리 및 (B) 엑센딘-4 처리 및 (C) GAC-1 처리 EAE 동물로부터의 척수 절편의 조직화학적 염색 결과를 도해한다. 절편들을 말미집에 대해 룩솔 패스트 블루(Luxol Fast Blue)로 염색하였다. 흑색화살표는 감소된 룩솔 패스트 블루 염색을 나타내는 백색질에서의 말미집탈락을 가리킨다.

도 6A-F는 PBS 대조군 (A, D) 및 엑센딘-4 처리 (B, E) 및 GAC-1 처리 (C, F) EAE 동물로부터의 척수 절편의

면역조직화학적 염색 결과를 도해한다. 절편들을 CD3 (A-C) 또는 CD68 (D-F)에 대해 특이적인 항체로 염색하였다. 제시된 절편들은 척수 전각 단면이다.

도 7은 MHC 클래스 II에 대해 특이적인 항체로 염색된 뇌 및 척수로부터의 CD11b+CD45^{hi} 세포 (활성화된 미세아교세포 및 침윤성 대식세포) 및 CD11b+CD45^{lo} 세포 (휴지 중인 미세아교세포) 집단의 유동 세포측정법 분석으로부터의 데이터를 나타내는 그래프를 도해한다. 각각의 그래프에서, 엑센딘-4 (EXE4)로 처리된 EAE 동물로부터의 세포의 MHC 클래스 II 발현은 속이 빈 흑색 선으로 지시되고 (□), 대조군으로 처리된 EAE 동물로부터의 세포의 MHC 클래스 II 발현은 점선으로 지시된다 (□). 상부 패널: 질환 개시 시에 동물로부터 수집된 세포. 하부 패널: 질환 피크 시에 동물로부터 수집된 세포.

도 8은 EAE의 입양 전달에서의 비장세포의 병원성을 나타내는 그래프를 도해한다. 왼쪽 그래프: PLPp(139-151) 면역화 후 제0일부터 제4일까지 1 mg/kg 엑센딘-4 (EXE4) 또는 PBS (대조군)가 매일 제공된 동물. 면역화 후 제5일에 동물들을 희생시켰다. 오른쪽 그래프: 엑센딘-4로 처리된 공여자 (삼각형) 및 PBS로 처리된 공여자 (사각형)으로부터의 비장세포를 나이브(naive) SJL/J 동물로 전달하였다. 수용자 마우스를 매일 임상 점수 및 체중 변화에 대해 모니터링하였다. EAE의 임상 징후를 상기 기술된 바와 같이 평가하였다.

도 9A-C는 GLP-1R 효능제로의 처리 후 림프절 중량 및 비장 중량 및 크기를 도해한다. 동물들을 MOG 면역화 후 제0일부터 제5일까지 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (EAE-EXE4), PBS (EAE-비히클(vehicle)) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 대조군 (EAE-Dex)으로 처리하였다. 나이브 동물은 MOG로 면역화되지 않았다. (A) 서혜부 림프절 중량. (B) 비장 중량. (C) 나이브 동물, 비히클로 처리된 EAE 동물 및 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물로부터의 비장.

도 10A-F는 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 면역학적 변화를 나타내는 그래프를 도해한다. 동물들을 MOG 면역화 후 제0일부터 제6일까지 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (EXE4) 또는 PBS로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제6일에 희생시켰다. 림프구 (A-C) 및 단핵구 (D-F)를 비장 (A, D), 림프절 (B, E) 및 말초혈 (C, F)로부터 측정하였다. y축은 림프구 (A-C) 또는 단핵구 (D-F)인 세포의 백분율을 가리킨다.

도 11A-F는 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 면역학적 변화를 나타내는 그래프를 도해한다. 동물들을 MOG 면역화 후 제0일부터 제6일까지 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (EXE4) 또는 PBS로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제6일에 희생시켰다. CD4+ 세포 (A-C) 및 CD8+ 세포 (D-F)를 비장 (A, D), 림프절 (B, E) 및 말초혈 (C, F)로부터 측정하였다. 지시된 마커에 대해 양성으로 염색된 세포의 백분율이 y축에 제시된다.

도 12A-F는 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 면역학적 변화를 나타내는 그래프를 도해한다. 동물들을 MOG 면역화 후 제0일부터 제6일까지 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (EXE4) 또는 PBS로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제6일에 희생시켰다. CD19+ 세포 (A-C) 및 Ter119+ 세포 (D-F)를 비장 (A, D), 림프절 (B, E) 및 말초혈 (C, F)로부터 측정하였다. 지시된 마커에 대해 양성으로 염색된 세포의 백분율이 y축에 제시된다.

도 13은 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 Ter119+ 세포 집단 변화를 나타내는 그래프를 도해한다. 제0일부터 제5일까지 동물들을 매일 PBS (EAE-PBS), 1 mg/kg 엑센딘-4 (EAE-EXE4) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (EAE-dex)으로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제5일에 희생시켰다. 적혈구 계통 마커 Ter119에 대해 비장 세포를 표면 염색하였다. Ter119에 대해 양성으로 염색된 세포의 백분율이 y축에 지시된다.

도 14는 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 활성화된 T 세포 집단 변화를 나타내는 그래프를 도해한다. 제0일부터 제5일까지 동물들을 매일 PBS (EAE-PBS), 1 mg/kg 엑센딘-4 (EAE-EXE4) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (EAE-dex)으로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제5일에 희생시켰다. 림프절로부터의 활성화된 T 세포가 CD44 수준이 높은 CD4+ 세포 (CD44^{hi})로서 확인되었다. y축은 각각의 처리 군 및 나이브 군에서의 CD44 수준이 높은 CD4+ 세포의 백분율을 지시한다.

도 15는 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 증식성 세포 집단 변화를 나타내는 그래프를 도해한다. 제0일부터 제5일까지 동물들을 매일 PBS (EAE-PBS), 1 mg/kg 엑센딘-4 (EAE-EXE4) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (EAE-dex)으로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제5

일에 희생시켰다. 림프절 세포를 MOG로 자극하면서 배양하고, BrdU로 처리하여, 세포 증식을 측정하였다. y축은 각각의 처리 군 및 나이브 군에서 BrdU 양성인 CD4+의 백분율을 지시한다.

도 16은 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 IL-17+ 세포 집단 변화를 나타내는 그래프를 도해한다. 동물들을 매일 PBS (EAE-PBS), 1 mg/kg 엑센딘-4 (EAE-EXE4) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (EAE-dex)으로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제5일 (왼쪽 그래프) 또는 제7일 (오른쪽 그래프)에 희생시켰다. 서혜부 림프절 세포를 CD4, IL-17 및 IFN- γ 에 대해 염색하였다. IL-17에 대해 양성으로 염색된 CD4+ 세포의 백분율이 y축에서 지시된다.

도 17은 MOG 면역화에 이은 GLP-1R 효능제로의 처리 후 EAE 동물에서의 인터페론- γ (IFN- γ)⁺ 세포 집단을 나타내는 그래프를 도해한다. 제0일부터 제5일까지 동물들을 매일 PBS (EAE-PBS), 1 mg/kg 엑센딘-4 (EAE-EXE4) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (EAE-dex)으로 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 (나이브)와 함께, 동물들을 면역화 후 제5일에 희생시켰다. 서혜부 림프절 세포를 CD4, IL-17 및 IFN- γ 에 대해 염색하였다. IFN- γ 에 대해 양성으로 염색된 CD4+ 세포의 백분율이 y축에서 지시된다.

도 18은 MOG 면역화 후 GLP-1R 효능제 (엑센딘-4) 또는 DPP-4 억제제 (시타글립틴(sitagliptin))로 처리된 EAE 동물에서의 이환율을 나타내는 그래프를 도해한다. MOG로 면역화된 동물에게 1 mg/kg 시타글립틴, 10 mg/kg 시타글립틴, 엑센딘-4 또는 메틸셀룰로스를 투약하였다. 임상 점수를 매일 모니터링하였다. EAE의 임상 징후를 상기 기술된 바와 같이 평가하였다.

도 19는 GLP-1R 효능제 (엑센딘-4) 또는 비히클로 처리된 EAE 동물에서의 이환율을 나타내는 그래프를 도해한다. 면역화 후 제29일에 시작하여, PLP로 면역화된 SJL/J 마우스에 1 mg/kg 엑센딘-4 또는 비히클을 매일 투약하였다. 임상 점수를 매일 모니터링하였다. EAE의 임상 징후를 하기와 같이 평가하였다: 0, 마비 없음; 1, 꼬리 긴장(tone) 상실; 2, 뒷다리 약화; 3, 뒷다리 마비; 4, 뒷다리 및 앞다리 마비; 5, 빈사 또는 사망.

도 20은 엑센딘-4 또는 PBS로 처리된 미주신경 절단 및 미주신경 비절단 EAE 동물에서의 이환율을 나타내는 그래프를 도해한다. 하기의 채점 시스템에 따라 EAE의 임상 징후에 대해 마우스들을 매일 평가하였다: 0 = 정상; 1 = 늘어난 꼬리; 2 = 중등도의 뒷다리 약화; 3 = 약간 중증의 뒷다리 약화 (여전히 동물이 어렵게 걸을 수 있음); 4 = 중증 뒷다리 약화 (동물이 자신의 뒷다리를 움직일 수 있지만 걷지는 못함); 5 = 완전한 뒷다리 마비; 및 6 = 사망.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 상세한 설명
- [0032] 본 발명은 다발성 경화증 및 기타 자가면역 장애의 치료를 위해 GLP-1R 효능제를 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0033] 일반적인 기술
- [0034] 본 발명은 분자 생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학 분야에서 사용되는 통상적인 기술들을 이용한다. 이같은 기술들이 참고문헌, 예컨대, 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press]; [Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984)]; [Methods in Molecular Biology, Humana Press]; [Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press]; [Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987)]; [Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press]; [Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons]; [Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)]; [Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.)]; [Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987)]; [Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al., eds., 1987)]; [PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds., 1994)]; [Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991)]; [Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)]; [Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997)]; [Antibodies (P. Finch, 1997)]; [Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; [Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; [Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; [The Antibodies

(M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]에 기술되어 있다.

[0035] 정의

[0036] 하기의 약어, 용어 및 구절이 하기에 정의된 바와 같이 본원에서 사용된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 기술된 발명에 관련되어 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 의미이다. 추가로, 문맥적으로 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수를 포함하고, 복수형 용어는 단수형을 포함한다.

아미노산	단문자 약어	3문자 약어
2-아미노이소부티르산	--	Aib2 또는 Aib
알라닌	A	Ala
아르기닌	R	Arg
아스파라긴	N	Asn
아스파르트산	D	Asp
시스테인	C	Cys
글루탐산	E	Glu
글루타민	Q	Gln
글리신	G	Gly
히스티딘	H	His
이소류신	I	Ile
류신	L	Leu
리신	K	Lys
메티오닌	M	Met
노르류신	--	Nle
오르니틴	--	Orn
페닐알라닌	F	Phe
프롤린	P	Pro
세린	S	Ser
트레오닌	T	Thr
트립토판	W	Trp
타이로신	Y	Tyr
발린	V	Val

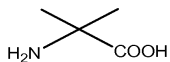
[0037]

[0038] 접두사 "D", 예를 들어, D-Ala 또는 N-Me-D-Ile로 달리 지시되지 않는 한, 본원에 기술된 펩티드 내의 아미노산 및 아미노아실 잔기의 알파-탄소의 입체화학은 천연 또는 "L" 형상이다. 칸-인골드-프렐로그(Cahn-Ingold-Prelog) "R" 및 "S" 명칭이 펩티드의 N-말단의 특정 아실 치환체 내의 키랄 중심의 입체화학을 특정하도록 사용된다. 명칭 "R,S"는 2가지 거울상이성질체 형태의 라세믹(racemic) 혼합물을 지시하도록 의도된다. 이러한 명명법은 문헌 [R. S. Cahn, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 5:385-415 (1966)]에 기술된 것을 따른다.

[0039] D-H는 D 히스티딘을 지칭한다.

[0040] 본원에서 사용되는 2-아미노이소부티르산의 구조는 하기와 같다:

[0041]



[0042] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기들의 중합체를 지칭하도록 상호교환가능하게 사용된다. 본원에서 사용되는 이러한 용어들은 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공적인 화학적 유사체인 아미노산 중합체에 적용될 수 있다. 이러한 용어들은 천연 발생 아미노산 중합체에 또한 적용된다. 아미노산은 펩티드의 결합 기능이 유지되는 한 L 또는 D 형태일 수 있다. 펩티드 내의 2개의 인접하지 않은 아미노산 사이의 분자내 결합, 예를 들어, 골격-골격, 측쇄-골격 및 측쇄-측쇄 고리화가 있어, 펩티드들이 고리형일 수 있다. 당업계에서 주지된 방법에 의해 고리형 펩티드가 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,013,625; 문헌 [S. Cheng et al., J Med. Chem. 37:1-8 (1994)] 참조.

[0043] 모든 펩티드 서열은 일반적으로 허용되는 관례에 따라 작성되어, 알파-N-말단 아미노산 잔기가 왼쪽에 있고, 알파-C-말단 아미노산 잔기가 오른쪽에 있다. 본원에서 사용된 용어 "N-말단"은 펩티드 내의 아미노산의 유리 알파-아미노기를 지칭하고, 용어 "C-말단"은 펩티드 내의 아미노산의 유리 카복실산 말단을 지칭한다. 한 기로 N-종결된 펩티드는 N-말단 아미노산 잔기의 알파-아미노 질소 상에 기를 보유하는 펩티드를 지칭한다. 한 기로 N-종결된 아미노산은 알파-아미노 질소 상에 기를 보유하는 아미노산을 지칭한다.

- [0044] "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내에 위치하는 하나 이상의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자이다. 본원에서 사용된 이러한 용어는 무손상 폴리클로날 또는 모노클로날 항체뿐만 아니라, 이의 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일쇄 (scFv) 및 도메인 항체 (예를 들어, 상어 및 낙타류(camelid) 항체 포함), 및 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 기타 변형 형상을 포함한다. 항체에는 임의의 클래스의 항체, 예컨대 IgG, IgA 또는 IgM (또는 이의 하위 클래스)가 포함되고, 항체는 임의의 특정 클래스의 것일 필요가 없다. 중쇄의 불변 도메인의 항체 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스에 할당될 수 있다. IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5가지 주요 면역글로불린 클래스가 있고, 이들 중 몇몇은 하위 클래스 (아이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 면역글로불린 클래스들에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 칭해진다. 상이한 면역글로불린 클래스들의 서브유닛 구조 및 3차원 형상이 주지되어 있다.
- [0045] 본원에서 사용된 "침습 백혈구"는 자가면역 질환, 바람직하게는 CNS에 영향을 미치는 자가면역 질환의 결과로서 뇌 및 척수가 포함되는 중추 신경계 (CNS)의 조직 내로 침습, 침윤 또는 이동하는 백혈구이다. 침습 백혈구는 주로 T 세포 및 단핵구이지만, 기타 백혈구가 존재할 수 있다.
- [0046] 본원에서 사용된 "백혈구 침습을 감소시키는 것"은 뇌 및 척수 조직이 포함되는 CNS 조직 내로의 백혈구의 이동 (즉, 침습 또는 침윤)을 감소시키는 것을 지칭한다. 백혈구 침습을 감소시키는 것은, 특히 CNS 조직의 기저 뉴런 세포 및/또는 기타 지지 세포와 관련하여, 백혈구 침습에 의해 매개되는 세포독성 영향을 감소시키는 것을 또한 지칭한다. 백혈구 침습에는 T 세포 및 단핵구에 의한 침습이 포함된다. 백혈구 침습을 감소시키는 것은 자가면역 공격으로부터 CNS 조직을 보호하는 것을 포함한다. 백혈구 침습에 의해 파괴되는 CNS의 세포에는 말이집을 발현하는 세포 및 말이집을 발현하지 않는 이웃 세포가 포함된다. 세포 파괴는 세포자멸사, 괴사 또는 이들의 조합에 의한 것일 수 있다. 감소된 백혈구 침습은 느려진 질환 진행, 지연된 발병 또는 이환율 중증도, 연장된 생존, 개선된 삶의 질, 감소 또는 안정화된 인지, 운동 또는 거동 증상과 같은 임상 징조를 특징으로 한다. 백혈구 침습을 감소시키는 것은 중추 신경계 (CNS)의 조직 내로의 백혈구 이동 위험을 예방하거나 감소시키는 것을 또한 포함한다. 백혈구 침습 감소는 부분적이거나 완전할 수 있으며, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이, 상대적 또는 실제 감소에서, 감소는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 심지어 약 95%일 수 있다.
- [0047] 본원에서 사용된 용어 "GLP-1R"은 GLP-1R의 활성의 적어도 일부분을 유지하는 임의 형태의 GLP-1R 및 이의 변이체를 지칭한다. 인간 GLP-1R에 대한 구체적인 언급과 같이 달리 지시되지 않는 한, GLP-1R은 천연 서열 GLP-1R의 모든 포유동물 중, 예를 들어, 인간, 개, 고양이, 말 및 소를 포함한다.
- [0048] 본원에서 사용된 "GLP-1 수용체 효능제" 또는 "GLP-1R 효능제"는 GLP-1R의 활성화 양을 증가시켜, 천연 발생 효능제인 GLP-1 및 엑센딘-4에 의해 생산되는 것과 유사한 효과를 일으키는 분자이다. GLP-1R 효능제는, 예를 들어, GLP-1R에 결합하고 이를 활성화시킴으로써, GLP-1R에서의 형상 변화를 야기함으로써, GLP-1R에 커플링된 G 단백질의 활성화를 야기함으로써, GLP-1R을 더 긴 기간 (무한적으로 포함) 동안 활성화된 상태 (예를 들어, 활성 형상)로 유지되도록 야기함으로써, 천연 발생 효능제의 결합을 모방함으로써, 천연 발생 효능제의 결합을 조정함으로써, GLP-1의 억제제를 차단함으로써, 또는 다른 방식으로 GLP-1R 활성화를 조정하거나 GLP-1R 활성화에 특징적인 세포내 이벤트들의 캐스케이드를 개시시킴으로써, GLP-1R의 활성화를 증가시킨다. GLP-1R 효능제의 바람직한 성질들이 본원에서 기술된다. 본 발명의 GLP-1R 효능제는 GLP-1R의 활성화를 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 또는 이를 초과하는 만큼 증가시킬 수 있다.
- [0049] 본원에서 사용된 "천연-발생 GLP-1R 효능제"는 천연에 존재하고 GLP-1R의 활성화제로서 기능하는 분자이다. GLP-1R의 공지된 천연-발생 효능제는 펩티드 호르몬인 GLP-1 및 엑센딘-4이다. 천연-발생 GLP-1R 효능제에는 천연-발생 변이체 분자, 예컨대 돌연변이된 *GLP-1R* 대립유전자가 있는 동물에서 발현된 폴리펩티드가 포함된다.
- [0050] "생물학적 활성"은, 본 발명의 GLP-1R 효능제와 관련되어 사용될 때, GLP-1R 및/또는 GLP-1R 신호전달 기능에 의해 매개되는 하류 경로에 결합하고 이를 활성화시키는 능력이 있는 것을 일반적으로 지칭한다. 본원에서 사용된 "생물학적 활성"은 GLP-1R-발현 세포 상에서 GLP-1R의 천연 리간드인 GLP-1의 작용에 의해 유도되는 것들과 공통적인 하나 이상의 이펙터 기능을 포함한다. 비-제한적으로, 생물학적 활성은 하기의 것들 중 임의의 하나 이상을 포함한다: GLP-1R에 결합하고 이를 활성화시키는 능력, GLP-1R에서 형상 변화를 야기하는 능력, GLP-1R에 커플링된 G 단백질의 활성화를 야기하는 능력, GLP-1R을 더 긴 기간 (무한적으로 포함) 동안 활성화된 상태 (예를 들어, 활성 형상)로 유지되도록 야기하는 능력, 세포내 cAMP를 증가시키는 능력, 인슐린 방출을 자극

하는 능력, 및 GLP-1R 활성화에 특징적인 세포내 이벤트들의 캐스케이드를 개시시키는 능력.

- [0051] 본원에서 사용된 "완전(full) 효능제"는 유효 농도에서 GLP-1R의 측정가능한 효과를 본질적으로 완전하게 유도하는 효능제이다. 예를 들어, GLP-1R의 측정가능한 효과는 증가된 cAMP 수준이다. 부분적 효능제는 측정가능한 효과를 부분적으로 유도할 수 있지만 최고 농도에서도 완전 효능제는 아닌 효능제를 의미한다. 본질적으로 완전하게는 측정가능한 효과의 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 가장 바람직하게는 약 98% 이상이 유도되는 것을 의미한다. 관련된 "측정가능한 효과"가 본원에서 기술된다.
- [0052] 본원에서 사용된 "단편" 폴리펩티드는 더 큰 폴리펩티드의 생물학적 성질, 예컨대 GLP-1R을 활성화시키는 능력의 적어도 일부를 유지하는 더 큰 폴리펩티드의 일부분이다. 바람직한 단편은 더 큰 폴리펩티드의 생물학적 성질을 초래하는 더 큰 폴리펩티드의 아미노산 잔기 및/또는 구조를 포함한다. 폴리펩티드 단편이 펩티드로 칭해질 수 있지만, 본원에서 폴리펩티드와 펩티드가 구별되지는 않는다. 예시적인 단편들이 본원에서 기술된다. 단편들은 본원에 기술된 바와 같이 유도체화될 수 있다.
- [0053] 본원에서 사용된 "유도체" 폴리펩티드에는 하나 이상의 공유결합 또는 비-공유결합 변형, 예컨대 관능기 또는 모이어티(moiety)의 부가 또는 제거가 있다. 유도체들의 예가 본원에서 제공된다.
- [0054] 본원에서 사용된, 특정 폴리펩티드 서열의 "변이체"는 클러스탈 V(Clustal V) 또는 BLAST, 예를 들어, "BLAST 2 시퀀스(Sequences)" 툴 버전 2.0.9 (1999년 5월 7일) (디폴트 파라미터로 설정됨)와 같은 알고리즘을 사용하여 폴리펩티드 서열들 중 하나의 특정 길이에 걸쳐 특정 폴리펩티드 서열에 대해 서열 동일성이 40% 이상인 폴리펩티드 서열로 정의된다. 이같은 한 쌍의 폴리펩티드는, 예를 들어, 폴리펩티드들 중 하나의 특정한 소정의 길이에 걸쳐 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상, 또는 이를 초과하는 서열 동일성을 나타낼 수 있다.
- [0055] 폴리펩티드 서열에 적용된, 본원에서 사용된 "서열 동일성"은 클러스탈 V, MEGALIGN, 또는 BLAST와 같은 표준화된 알고리즘을 사용하여 정렬된 2개 이상의 폴리펩티드 서열 간의 잔기 매치(match)의 백분율을 지칭한다. 폴리펩티드 서열 정렬 방법들이 주지되어 있다. 일부 정렬 방법은 보존적 아미노산 치환을 고려한다. 이같은 보존적 치환은 본원에 기술된 바와 같고, 일반적으로 치환 부위에서의 전하 및 소수성을 보존하여, 폴리펩티드의 구조 (및 이에 따른 기능)를 보존한다.
- [0056] 용어 "폴리펩티드", "올리고펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이, 바람직하게는 비교적 짧은 길이 (예를 들어, 아미노산 10-100개)의 아미노산들의 사슬을 지칭하도록 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 사슬은 선형 또는 분지형일 수 있고/있거나, 변형된 아미노산을 포함할 수 있고/있거나, 비-아미노산으로 중단될 수 있다. 이러한 용어들은 천연적으로 또는 개입에 의해 변형된 아미노산 사슬을 또한 포함한다; 예를 들어, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 기타 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분의 접합. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 유사체 (예를 들어, 비-천연 아미노산 등 포함), 뿐만 아니라 당업계에 공지된 기타 변형을 함유하는 폴리펩티드가 이러한 정의 내에 또한 포함된다. 폴리펩티드는 단일 사슬 또는 회합 사슬로서 발생할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0057] 당업계에 공지된 바와 같이, 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 뉴클레오티드들의 사슬을 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 디옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 사슬 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 이의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 사슬의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드들의 서열이 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 중합 후에, 예컨대 표지 성분의 접합에 의해, 폴리뉴클레오티드가 추가로 변형될 수 있다. 기타 유형의 변형에는, 예를 들어, "캡(cap)", 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 전하를 띠지 않는 연결 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 전하를 띠는 연결 (예를 들어, 포스포포티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)이 있는 것, 랜던트 모이어티, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제(nuclease), 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)를 함유하는 것, 인터칼레이터(intercalator) (예를 들어, 아크리딘, 소랄렌 등)가 있는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등)를 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 변형된 연결이 있는 것 (예를 들어, 알파 아노머형(anomeric) 핵산 등), 뿐만 아니라 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드(들)을 포함한다. 추가로, 당에 통상적으로 존재하는 히드록실 기 중 임의의 것이, 예를 들어, 포스포네이트 기, 포스페

이트 기로 교체될 수 있거나, 표준 보호기에 의해 보호될 수 있거나, 또는 추가적인 뉴클레오티드에의 추가적인 연결이 제조되도록 활성화될 수 있거나, 또는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH가 인산화되거나 탄소수 1 내지 20의 아민 또는 유기 캡핑(capping) 기 모이어티로 치환될 수 있다. 기타 히드록실기 표준 보호기로 또한 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 탄소환식 당 유사체, 알파- 또는 베타-아노머형 당, 에피머형(epimeric) 당 예컨대 아라비노스, 자일로스 또는 리코스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 비환식(非環式) 유사체 및 무염기성 뉴클레오시드 유사체 예컨대 메틸 리보시드가 예를 들어 포함되는, 당업계에 일반적으로 공지된 리보스 또는 디옥시리보스 당의 유사 형태를 또한 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결이 별법적인 연결 기로 교체될 수 있다. 이러한 별법적인 연결 기들에는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") [식 중 각각의 R 또는 R'은 독립적으로 H, 또는 에테르 (-O-) 연결을 임의로 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬이다]로 교체된 실시양태가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기의 기술은 RNA 및 DNA를 포함하여 본원에서 언급된 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

- [0058] 본원에서 사용된 "실질적으로 순수한"은 50% 이상 순수한 (즉, 오염물이 없음), 더욱 바람직하게는 90% 이상 순수한, 더욱 바람직하게는 95% 이상 순수한, 더욱 더 바람직하게는 98% 이상 순수한, 가장 바람직하게는 99% 이상 순수한 물질을 지칭한다.
- [0059] "숙주 세포"는 폴리펩티드 삽입물의 혼입을 위한 벡터(들)의 수용체일 수 있거나 이러한 수용체인 개별적인 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하고, 이러한 자손은 천연적인 돌연변이, 우발적인 돌연변이 또는 의도적인 돌연변이로 인해 원래의 어버이 세포와 반드시 완전히 동일할 필요가 없을 수 있다 (형태 또는 게놈 DNA 상보성 면에서). 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드(들)로 생체내 형질감염된 세포를 포함한다.
- [0060] 본원에서 사용된 "치료"는 이롭거나 바람직한 임상 결과를 수득하기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위해, 이롭거나 바람직한 임상 결과는 하기의 것들 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 이동성을 개선하는 것, 사지 약화를 감소시키는 것, CNS의 백혈구 침습을 감소시키는 것, 및 MS가 포함되는 자가면역 질환으로부터 초래되는 말이집탈락을 감소시키는 것.
- [0061] "발생물을 감소시키는 것"은 중증도를 감소시키는 것 (이러한 상태에 일반적으로 사용되는 기타 약물 및/또는 치료법에 대한 요구 및/또는 이의 양 (예를 들어, 이에 대한 노출)을 감소시키는 것을 포함할 수 있음) 중 임의의 것을 의미한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 치료에 대한 응답 면에서 개체들이 상이할 수 있고, 따라서, 예를 들어, "발생물을 감소시키는 방법"은 GLP-1R 효능제의 투여가 이러한 특정 개체에서 이같은 발생물 감소를 야기할 수 있을 것이라는 합리적인 예상을 기초로 GLP-1R 효능제를 투여하는 것을 반영한다.
- [0062] "완화"는 GLP-1R 효능제를 투여하지 않는 것과 비교하여 하나 이상의 증상의 감소 또는 개선을 의미한다. "완화"는 증상 기간의 단축 또는 감소를 또한 포함한다.
- [0063] 본원에서 사용된, GLP-1R 효능제와 관련된 "GLP-1R을 활성화시키는데 효과적인 양" 또는 유사한 표현은 GLP-1R 효능제의 투여 전의 기준선 활성화 수준과 비교하여 GLP-1R 활성화 (본원에서 정의되고 당업계에 공지된 바와 같음)를 증가시키는데 충분한 양을 지칭한다. 활성화 증가는 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 또는 그 초과일 수 있다. 이러한 양은 투여 경로, 신체 내에서의 GLP-1R 효능제의 반감기, GLP-1R 효능제의 용해도, 생체이용률, 소거율 및 기타 약동학적 특징, 동물 또는 환자의 체중 및 대사 등과 같은 고려사항들을 고려할 것이다.
- [0064] 본원에서 사용된, 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 "유효 투여량" 또는 "유효량"은 임의의 하나 이상의 이롭거나 바람직한 결과를 일으키는데 충분한 양이다. 예방적 용도를 위해, 이롭거나 바람직한 결과는 위험을 제거하거나 감소시키는 것, 중증도를 감소시키는 것, 또는 질환의 생화학적, 조직학적 및/또는 거동적 증상, 이의 합병증 및 질환 발달 동안 나타나는 중간의 병리학적 표현형을 포함하여, 질환의 발병을 지연시키는 것을 포함한다. 치료적 용도를 위해, 이롭거나 바람직한 결과는 예를 들어, CMT 질환의 하나 이상의 증상을 감소시키는 것, 질환을 치료하는데 필요한 다른 의약의 용량을 감소시키는 것, 또 다른 의약의 효과를 강화시키는 것, 및/또는 환자의 질환의 진행을 지연시키는 것과 같은 임상 결과를 포함한다. 유효 투여량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 유효 투여량은 직접적으로 또는 간접

적으로 예방적 또는 치료적 처치를 달성하는데 충분한 양이다. 임상 상황에서 이해되는 바와 같이, 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 유효 투여량은 또 다른 약물, 화합물 또는 제약 조성물과 함께 달성될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 따라서, "유효 투여량"이 하나 이상의 치료제를 투여하는 상황에서 고려될 수 있고, 하나 이상의 다른 작용제와 함께 바람직한 결과가 달성될 수 있거나 달성되는 경우 단일 작용제가 유효량으로 제공된 것으로 간주될 수 있다.

- [0065] 본원에서 사용된 "치료를 필요로 하는 동물" 또는 유사한 표현은 CNS를 수반하는 자가면역 질환에 걸렸거나 이러한 질환이 발달될 위험이 있는 동물, 바람직하게는 인간이 포함되는 포유동물을 의미한다. CNS에 영향을 미치는 자가면역 질환 (또는 장애, 구별 없음)의 예는 마우스에서의 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE), 인간에서의 다발성 경화증 (MS), 및 기타 포유동물에서 발견되는 유사한 자가면역 질환이다. CNS의 자가면역 공격이, 예를 들어, 면역 거부, 시신경병증, 염증성 장 질환 및 파킨슨병에서 또한 관찰된다.
- [0066] "개체" 또는 "대상"은 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간이다. 포유동물에는 가축, 경주용 동물, 애완동물, 영장류, 말, 개, 고양이, 마우스 및 래트가 또한 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0067] 본원에서 사용된 "백터"는 숙주 세포 내에 하나 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달할 수 있고, 바람직하게는 이를 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 백터의 예로는 바이러스 백터, 네이키드(naked) DNA 또는 RNA 발현 백터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 백터, 양이온성 축합제와 회합된 DNA 또는 RNA 발현 백터, 리포솜 내에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 백터, 및 특정 진핵생물 세포, 예컨대 생산자 세포가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0068] 본원에서 사용된 "발현 제어 서열"은 핵산의 전사를 지시하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 제어 서열은 프로모터, 예컨대 구성적 또는 유도성 프로모터, 또는 인핸서일 수 있다. 발현 제어 서열은 전사될 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다.
- [0069] 본원에서 사용된 "제약상 허용되는 담체" 또는 "제약상 허용되는 부형제"는 활성 성분과 조합되는 경우 이러한 성분이 생물학적 활성을 유지하도록 하고 대상의 면역계와 반응성이지 않은 임의의 물질을 포함한다. 예로는 임의의 표준 제약 담체 예컨대 포스페이트 완충 염수 용액, 물, 에멀션 예컨대 오일/물 에멀션, 및 다양한 유형의 습윤화제가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 에어로졸 또는 비경구 투여를 위한 바람직한 희석제는 포스페이트 완충 염수 (PBS) 또는 일반적인 (0.9%) 염수이다. 이같은 담체를 포함하는 조성물이 주지된 통상적인 방법에 의해 제형된다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990]; 및 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000] 참조).
- [0070] 본원에서 사용된 "말초 투여" 또는 "말초 투여됨"은 중추 신경계 (CNS) 또는 혈액 뇌 장벽 (BBB) 외부에서 대상 내로 작용제를 도입하는 것을 지칭한다. 말초 투여는 척추 또는 뇌로의 직접적인 투여 이외의 임의의 투여 경로를 포함한다. 말초 투여는 국소 투여 또는 전신 투여일 수 있다.
- [0071] *중추 신경계 (CNS)에 영향을 미치는 자가면역 장애의 치료를 위한 GLP-1R 효능제*
- [0072] 본 발명은 다발성 경화증 및 중추 신경계 (CNS)에 영향을 미치는 기타 자가면역 장애의 치료를 위해 GLP-1R 효능제를 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 특색에 따르면, GLP-1R 효능제는 CNS 조직 내로의 백혈구 침습을 감소시키고 CNS의 기저 뉴런 조직의 파괴를 감소시키는데 효과적이고, 따라서 이러한 질환의 임상 증상, 예컨대 사지 마비를 완화시키는데 효과적이다. 특히, 말미집 항원을 제시하고 이를 생산하는 세포 상에 세포독성 효과를 실행시키는데 활성인 단핵구 및 T 세포의 이동을 GLP-1R 효능제가 감소시킨다.
- [0073] MS에 대한 잘 인정된 동물 모델인 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE) 마우스를 사용하여, 본 발명에 이르는 관찰이 이루어졌다. EAE는 인간에서의 MS와 다수의 임상적 및 병리학적 특색을 공유하는 실험적인 질환 상태이다. FDA에 의해 승인된 다수의 MS 치료법들이 먼저 마우스 및 래트에서의 EAE 모델을 기초로 발견 및 개발되었다. (문헌 [Steinman and Zamvil, 2006]에 개관되어 있음). 말미집 염기성 단백질 (MBP), 단백질질 단백질 (PLP) 및 말미집 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG)이 포함되는 말미집의 여러 상이한 단백질 성분으로의 EAE 마우스의 활성 면역화는 자가면역 항체의 생산 및 상행 마비의 임상 증상을 유도한다. 예를 들어, EAE가 MOG 펩티드 아미노산 35-55 (문헌 [Aharoni, R., et al.]) 또는 PLP 펩티드 아미노산 139-151 (PLPp (139-151))로의 면역화 후에 C57BL/6 마우스에서 유도될 수 있다. MOG 또는 PLP로의 면역화는 말미집-특이적 자가면역 반응을 유도하고, 이는 MS와 유사한 말미집탈락 또는 이환율을 야기한다. EAE의 임상 특색에는 다수의 침윤성 림프구, 단핵구 및 대식세포에 의한 CNS의 염증 및 말미집탈락이 포함된다 (도 1).

- [0074] *GLP-1R 효능제를 사용하는 동물 실험*
- [0075] 본 발명을 지지하여 수행된 실험에서, GLP-1R 효능제의 직접적인 투여가 CNS-특이적 자가면역 질환에 걸린 동물에서 이환율 및 CNS 조직 손상을 감소시키는 것으로 나타났다 (도 2-4). 엑센딘-4 (EXE4)를 MOG 면역화 후 EAE 동물에게 투여하였다. 엑센딘-4로 처리된 동물은 대조군 동물과 비교하여 유의하게 감소된 이환율을 나타냈다. 이러한 결과는 GLP-1R 효능제의 투여가 만성 EAE의 진행을 느리게 하는데 효과적이었음을 실연하였다. 실험은 엑센딘-4에 의해 제공된 보호가 증상의 발병과 관련하여 적어도 *trkB* 효능제 NT-4 (PCT 출원 번호 WO 2008/078179 참조)에 의해 제공되는 보호만큼 양호하다는 것 (더 양호하지는 않더라도)과 처리가 효과적이기 위해 증상 발병 시점까지 엑센딘-4로의 처리가 계속되지 않아도 된다는 것을 가리켰다 (도 2).
- [0076] 동물 실험은 GLP-1R 효능제 화합물인 GAC-1의 매주 투여가 대조군과 비교하여 EAE 이환율에 대한 유의한 보호를 제공하였음을 나타냈다 (도 3 및 4). 주1회 기반으로 투여되었을 때 GAC-1이 효과적이었다. 실험은 GAC-1로의 매주 처리가 증상 발병 시점까지 적어도 매일 엑센딘-4 처리만큼 잘 보호하였음을 가리켰다.
- [0077] 조직학적 분석은 대조군 EAE 동물로부터의 절편과 비교하여 GLP-1R 효능제로 처리된 동물로부터 제조된 절편에서 감소된 말이집탈락 및 백혈구 침습을 나타냈다 (도 5A-C 및 6A-F). GLP-1R 효능제로 처리된 동물은 CNS CD3+ 세포 침습의 증거를 사실상 나타내지 않았다. CD3-발현 T 세포 및 CD68-발현 대식세포에 대해 염색함으로써 침습 세포의 확인을 수행하였다. GLP-1R 효능제로 처리된 동물로부터의 척수 조직이 대조군 동물과 비교했을 때 실질적으로 감소된 T 세포 및 단핵구 침습을 나타냈다 (도 6A-F). CNS 조직 절편의 조직화학적 염색 결과는 GLP-1R 효능제 처리가 CNS의 림프구 및 단핵구 침습을 감소시킨다는 것을 실연하였다.
- [0078] EAE 마우스의 미세아교세포 상에서의 활성화 마커 MHC 클래스 II 발현 분석은 엑센딘-4로의 처리가 뇌 및 척수 양쪽 모두에서 CD11b+CD45^{hi} (활성화된 미세아교세포 및 침윤성 대식세포) 및 CD11b+CD45^{lo} (휴지 중인 미세아교세포) 세포 집단 양쪽 모두 상에서의 MHC 클래스 II의 발현 수준을 감소시켰음을 가리켰다 (도 7). 엑센딘-4가 제공된 EAE 마우스로부터의 휴지 중인 미세아교세포, 활성화된 미세아교세포 및 침윤성 대식세포는 증상 발병 및 질환 피크 양쪽 모두의 시점에서 비히클로 처리된 대조군 동물로부터의 세포와 비교하여 감소된 MHC 클래스 II 발현을 나타냈다.
- [0079] 동물 실험은 엑센딘-4로 처리된 마우스로부터의 비장세포가 EAE의 입양 전달 모델에서 덜 병원성을 나타냈다 (도 8). 엑센딘-4로 처리된 PLP-유도 마우스로부터 단리된 비장세포가 제공된 마우스에서 대조군 (PBS-처리) PLP-유도 마우스로부터 단리된 비장세포가 제공된 마우스보다 실질적으로 덜 중증인 질환이 발달되었다.
- [0080] GLP-1R 효능제로 처리된 EAE 마우스의 서혜부 림프절이 비히클로 처리된 대조군 EAE 동물의 림프절보다 중량이 덜하였다 (도 9A). 대조군으로 처리된 EAE 동물의 림프절이 실질적으로 더 무거웠다. GLP-1R 효능제로 처리된 EAE 마우스의 비장은, 비히클로 처리된 대조군 EAE 동물의 비장 (실질적으로 더 무겁고 더 큼)와 대조적으로, 나이브 동물의 비장과 중량 및 크기가 유사하다 (도 9B-C).
- [0081] 동물 실험을 수행하여 EAE 동물의 GLP-1R 효능제 처리로부터 초래되는 면역학적 변화를 분석하였다 (도 10A-F, 11A-F 및 12A-F). GLP-1R 효능제 처리는 나이브 동물에서의 Ter119+ 세포수에 가깝게 MOG로 유도된 동물에서 Ter119+ 세포수의 큰 감소를 초래하였다 (도 12D-F 및 13). 대조적으로, PBS로 처리된 대조군 EAE 동물에서는 Ter119+ 세포수가 증가되었다. 또한, GLP-1R 효능제 처리는 나이브 동물과 비교했을 때 IL-17+ 및 IFN- γ + 세포수가 증가된 PBS로 처리된 대조군 EAE 동물과 비교하여 EAE 동물에서 IL-17+ 및 IFN- γ + 세포수를 감소시켰다 (도 16 및 17). 면역학적 분석 결과는 GLP-1R 효능제 처리가 EAE 동물에서 헬퍼 T 세포 수준을 감소시킨다는 것을 시사한다.
- [0082] 상기 기술된 결과들은 GLP-1R 효능제가 CNS의 말이집탈락 및 백혈구 침습을 감소시키는데, 그리고 MS의 널리 인정된 동물 모델인 EAE의 진행을 느리게 하는데 효과적이라는 것을 실연한다. 천연-발생 GLP-1R 효능제인 엑센딘-4 및 GLP-1R 효능제 GAC-1이 질환 진행을 느리게 하는데 있어서 모두 효과적이었다. 조직화학적 실험은 GLP-1R 효능제가 T 세포 및 단핵구에 의한 CNS 조직의 침습을 감소시킨다는 것을 나타냈다.
- [0083] *CNS 자가면역 장애를 위한 GLP-1R 효능제*
- [0084] 이론에 한정되지 않으면서, 백혈구의 이동을 조정하고/하거나 Th1 및 Th17 세포 수준을 감소시킴으로써 GLP-1R 효능제가 주로 기능하는 것으로 여겨진다. 본 발명의 방법은 현행 면역억제제 치료와 조합되어 추가적인 치료 효과를 일으킬 수 있다.
- [0085] 본 발명의 GLP-1R 효능제는 다수의 자가면역 또는 관련 질환에서 CNS 조직의 백혈구 침습을 감소시키는데 사용

될 수 있다. 본 발명의 GLP-1R 효능제는 다수의 자가면역 또는 관련 질환에서 Th1 및 Th17 세포 수준을 감소시키는데 또한 사용될 수 있다. MS에 대한 모델인 것에 더하여, EAE 마우스는 시신경염을 연구하는데 또한 사용된다. GLP-1R 효능제는 모든 이러한 질환 및 백혈구 침습 및/또는 Th1 및 Th17 세포에 의해 특히 매개되는 기타 자가면역 장애에서 CNS 면역 침습을 완화할 것으로 예상된다. 용어 질환 및 장애가 구별 없이 사용된다는 것을 주지한다.

[0086] 본 발명의 특색은 GLP-1R 효능제를 자가면역 질환을 앓고 있는 동물에게 직접 투여하는 것이다. 본 발명의 바람직한 실시양태들이 폴리펩티드의 관점에서 기술되지만, 본 발명은 신체 내에서 코딩된 GLP-1R 효능제의 발현을 지시할, GLP-1R 효능제 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 투여를 포함한다. 직접적인 DNA 주입 및 유전자 요법 전달 방법이 당업계에 공지되어 있다. GLP-1R 효능제 폴리펩티드, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 약물의 투여에 의해 유도되는 것과 대조적으로, 동물에게 직접 투여된다. 본 발명은 천연-발생 GLP-1R 효능제 및/또는 효능제 항체와 일관된 방식으로 GLP-1R에 결합하고 이를 활성화시키는 펩티드모방(peptidomimetic) 분자를 또한 포함한다.

[0087] 본원에 기술된 방법에 따라 사용하기 위한 특정 GLP-1R 효능제가 하기에 더욱 상세하게 기술된다. 추가적인 GLP-1R 효능제들이 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 당업자에게 명백할 것이다.

[0088] 천연 발생 GLP-1R 효능제 및 이의 유도체

[0089] GLP-1R 효능제는 GLP-1, 엑센딘-4, 프로엑센딘(prooxendin) (예를 들어, 미국 특허 번호 6,723,530 참조), 엑센딘-3 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,424,286 참조), OAP-189 (예를 들어, 전문이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 번호 US 20090181885 참조) 및 옥신토모듈린(oxyntomodulin)을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 천연-발생 효능제 폴리펩티드, 이의 단편, 변이체 및 유도체를 포함한다. 본원에서 사용된 GLP-1 및/또는 엑센딘-4 폴리펩티드 서열은 상응하는 GLP-1R과 동일한 중 또는 상이한 중으로부터의 것일 수 있고, 단 생성된 폴리펩티드는 GLP-1R에 결합하고 효능제로서 기능한다.

[0090] GLP-1R 효능제는 천연-발생 및 변이체 GLP-1을 포함한다. 다수의 포유동물에서 GLP-1 폴리펩티드들이 확인되었다. HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (서열 1)은 위치 2 알라닌에서의 디펩티달 펩티다제(peptidase) IV (DPP-4)에 의한 GLP-1의 절단에 의해 생성된 아미노산 30개의 GLP-1 (7-36) 펩티드이다. 문헌 [D.J. Drucker (2001) Endocrinology 142:521-527]. GLP-1 (7-36)은 GLP-1R 효능제로서 기능하여, 증가된 글루코스-의존적 인슐린 분비를 초래한다. 그러나, GLP-1 (7-36)의 반감기는 몇 분에 불과하다. 프로테아제(protease) 절단 부위가 제거되어 GLP-1 폴리펩티드의 반감기를 연장시킬 수 있거나, 또는 부가되어 이의 활성 조절을 허용할 수 있다. GLP-1R 효능제가 반감기 확장 모이어티, 예컨대 PEG, IgG Fc 영역, 알부민, 또는 펩티드 또는 에피토프 예컨대 Myc, HA (적혈구응집소), His-6, 또는 FLAG에 접합 또는 융합될 수 있다. 기타 예시적인 GLP-1 폴리펩티드에는 GLP-1(7-37) HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (서열 42) 및 GLP-1(1-45) (예를 들어, 미국 특허 출원 번호 2003/0232754 참조)가 포함된다.

[0091] GLP-1R 효능제는 천연-발생 및 변이체 엑센딘-4를 추가로 포함한다. 미국 독도마뱀(Gila monster)의 타액에서 엑센딘-4가 확인되었다. 엑센딘-4는 GLP-1과 약 53% 상동성인 아미노산 39개의 펩티드이다. 미국 독도마뱀 엑센딘-4의 서열은 HGEFTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS (서열 2)이다. GLP-1 (7-36)과 유사하게, 엑센딘-4는 GLP-1R 효능제로서 기능하고, 글루코스-의존적 인슐린 분비를 자극한다. 그러나, GLP-1 (7-36)과 달리, 엑센딘-4는 DPP-4에 의한 절단에 대해 증가된 저항성을 나타낸다. GLP-1 (7-36) 및 엑센딘-4의 N-말단 영역은 거의 동일하고, 이때 주목할 만한 차이는 제2 아미노산 잔기이다. 이러한 잔기는 GLP-1 (7-36)에서는 알라닌이지만, 엑센딘-4에서는 글리신이다. N-말단 영역에서의 이러한 단일 아미노산이 DPP-4 소화에 대한 엑센딘-4의 증가된 저항성을 담당한다. 엑센딘-4와 DLP-1 (7-36) 간의 또 다른 주목할 만한 차이는 엑센딘-4의 C-말단에서의 9개의 추가적인 아미노산 잔기의 존재이고, 이는 Trp-우리(cage)를 형성한다.

[0092] 본 발명의 천연-발생 및 변이체 GLP-1 및 엑센딘-4 폴리펩티드는 이의 키메라, 변이체, 단편 (펩티드 포함), 및/또는 유도체를 포함한다. 바람직한 단편에는 천연-발생 폴리펩티드의 GLP-1R-결합 부분, 또는 등가의 키메라, 컨센서스(consensus) 또는 돌연변이 결합 부분이 포함된다. 단편에는 합성 펩티드가 포함된다. 변이체에는 보존적 및 비-보존적 아미노산 치환이 있는 천연-발생 아미노산 서열 변이체가 포함된다. 예시적인 변이체에는, 비-제한적으로, GLP-1-Tf (미국 특허 출원 공개 번호 20060205037), OAP-189, 엑센딘-4-Tf (WO2008012629), 및 미국 특허 출원 번호 20040242853에 개시된 GLP-1 및 엑센딘-4 펩티드 유사체가 포함된다. OAP-189의 서열은

- [0093] HAQGTFTSDYSKYLEQELVKYFIQWLKKNAGPSKNNIA (서열 43)이다.
- [0094] 보존적 치환은 유사한 크기, 전하 또는 소수성의 아미노산 잔기를 수반한다. 예를 들어, Ala은 Val, Leu 또는 Ile으로 치환될 수 있다. Arg은 Lys, Gln 또는 Asn으로 치환될 수 있다. Asn은 Gln, His, Lys 또는 Arg으로 치환될 수 있다. Asp은 Glu으로 치환될 수 있다. Cys은 Ser으로 치환될 수 있다. Gln은 Asn으로 치환될 수 있다. Glu은 Asp으로 치환될 수 있다. Gly은 Pro으로 치환될 수 있다. His은 Asn, Gln, Lys 또는 Arg으로 치환될 수 있다. Ile은 Leu, Val, Met, Ala, Phe 또는 노르류신으로 치환될 수 있다. Leu은 노르류신, Ile, Val, Met, Ala 또는 Phe으로 치환될 수 있다. Lys은 Arg, Gln 또는 Asn으로 치환될 수 있다. Met은 Leu, Phe 또는 Ile으로 치환될 수 있다. Phe은 Leu, Val, Ile 또는 Ala으로 치환될 수 있다. Pro은 Gly으로 치환될 수 있다. Ser은 Thr으로 치환될 수 있다. Thr은 Ser으로 치환될 수 있다. Trp은 Tyr으로 치환될 수 있다. Tyr은 Trp, Phe, Thr 또는 Ser으로 치환될 수 있다. Val은 Ile, Leu, Met, Phe, Ala 또는 노르류신으로 치환될 수 있다.
- [0095] 기능에서의 실질적인 변형이 (a) 치환 구역에서의 폴리펩티드 골격의 구조를, 예를 들어, 시트 또는 나선 형상으로 유지시키거나, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성을 유지시키거나, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지시키는데 있어서 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성될 수 있다. 천연 발생 잔기들은 공통적인 측쇄 성질을 기초로 하기의 군으로 분류될 수 있다 (이들 중 일부는 여러 기능 군에 속할 수 있다):
- [0096] (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu, Ile, 노르류신;
- [0097] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr;
- [0098] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0099] (4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- [0100] (5) 방향족: Trp, Tyr, Phe; 및
- [0101] (6) 구부러짐을 유도하는 잔기: Gly 및 Pro.
- [0102] 비-보존적 치환은 한 클래스의 구성원으로 다른 클래스의 구성원을 교환하거나, 또는 이전 단락에서 보존적인 것으로 확인되지 않은 치환을 수반한다.
- [0103] 효능제의 적합한 형상을 유지하는데 수반되지 않는 임의의 시스테인 잔기가, 일반적으로 세린으로, 또한 치환되어, 분자의 산화 안정성을 개선하고 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)이 효능제에 부가되어 이의 안정성을 개선할 수 있다.
- [0104] 아미노산 변형의 범위는 하나 이상의 아미노산을 변화 또는 변형시키는 것에서 가변 영역과 같은 영역의 완전한 재고안까지 이를 수 있다. 가변 영역에서의 변화는 결합 친화력 및/또는 특이성을 변경시킬 수 있다.
- [0105] 변이체는 천연-발생 아미노산 서열 변이체 및 조작 변이체를 포함하고, 단 생성된 폴리펩티드 또는 유도체가 GLP-1R에 결합하고, 효능제로서 기능한다. GLP-1R 활성화를 측정하는 분석법이 본원 및 인용된 참고문헌에서 기술된다.
- [0106] 유도체에는 공유결합 및 비-공유결합으로 변형된 펩티드 및 폴리펩티드 (예를 들어, 아실화, PEG화, 파르네실화, 글리코실화, 또는 인산화 폴리펩티드)가 포함된다. 폴리펩티드는 결합 및/또는 활성을 조정하거나, 신체 내에서의 영상화를 허용하거나, 반감기를 조정하거나, 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 전달을 조정하거나, 특정 세포 유형 또는 조직으로의 폴리펩티드의 표적화를 보조하기 위한 추가적인 관능기를 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 변형 (예를 들어, PEG화, 글리코실화 또는 기타 부위의 부가)을 용이하게 하는 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 단 이러한 치환은 GLP-1R에 대한 폴리펩티드의 결합 또는 효능제 활성화에 실질적으로 영향을 미치지 않는다.
- [0107] 통상적인 변형은 생물학적 활성을 최소로 손실시키면서 전신 소거를 감소시키는 PEG화이다. 폴리에틸렌 글리콜 중합체 (PEG)가 당업계에 공지된 방법을 사용하여 GLP-1 및 엑센딘-4 폴리펩티드 (뿐만 아니라 GLP-1R 효능제 항체)의 다양한 관능기에 연결될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Roberts et al. (2002), *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476]; [Sakane et al. (1997) *Pharm. Res.* 14:1085-91] 참조). PEG는, 예를 들어, 아미노기, 카르복실기, 변형 또는 천연 N-말단, 아민기, 및 티올기에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표면 아미노산 잔기가 PEG 분자로 변형된다. PEG 분자는 크기가 다양할 수 있다 (예를 들어, 약 2 내지 40 kDa

범위). GLP-1, 엑센딘-4 또는 기타 폴리펩티드에 연결된 PEG 분자는 분자량이 약 2000, 10,000, 15,000, 20,000, 25,000, 30,000, 35,000, 40,000 Da 중 임의의 것일 수 있다. PEG 분자는 단일쇄 또는 분지쇄일 수 있다. PEG를 GLP-1R 효능제 폴리펩티드에 연결하기 위해, 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 관능기가 있는 PEG의 유도체가 사용될 수 있다. 폴리펩티드 상의 이용가능한 반응성 기의 유형을 기초로 관능기가 선택될 수 있다. 유도체를 폴리펩티드에 연결하는 방법들이 당업계에 공지되어 있다. PEG에 대한 N-말단 특이적 부착의 한 예는 위치 1의 잔기를 세린 또는 트레오닌으로 돌연변이시켜 PEG화를 용이하게 하는 것이다.

[0108] 폴리펩티드 또는 이의 유도체를 다른 분자에 직접적으로 또는 합성 링커를 통해 연결할 수 있다. 바람직한 GLP-1R 효능제 폴리펩티드, 이의 단편 또는 유도체는 결합 친화력, 선택성 및 활성화 값이 보고되어 있는 천연-발생 GLP-1R 효능제와 비교하여 유사하거나 더욱 양호한 결합 친화력, 선택성 및 활성화를 나타낸다. 효능제 폴리펩티드의 소형 부분이 "펩티드"로 지칭될 수 있지만, 이러한 용어는 제한적인 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0109] 바람직한 GLP-1R 효능제는 EAE 동물 모델이 포함되는 본원에 기술된 다수의 실험 및 분석법에서 엑센딘-4 및 GAC-1과 비교하여 유사한 생물학적 성질을 나타낸다.

[0110] *GLP-1R 효능제-항체 접합체*

[0111] 유도체에는 반감기를 연장하고/하거나 효능을 강화하기 위한 항체에 대한 GLP-1R 효능제 펩티드의 공유결합 연결이 추가로 포함된다. 예를 들어, 항체의 조합 부위에 직접적으로 또는 개재 링커를 통해 연결된 GLP-1R 효능제 펩티드 작용제를 포함하는 GLP-1R 효능제 화합물이, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20090098130 및 PCT 출원 공개 번호 WO 2008/081418에 기술되어 있고, 이들은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 이같은 GLP-1R 효능제 화합물은 본원에서 "GLP-1R 효능제-항체 접합체" 또는 "GAC"로 지칭된다. GAC는 직접적으로 또는 링커를 통해 항체에 연결된 GLP-1R 효능제 펩티드, 예를 들어, GLP-1 또는 엑센딘-4 단편 또는 유도체를 포함한다. 링커가 사용된 일부 실시양태에서, 링커는 항체가 GLP-1R 효능제 펩티드와 GLP-1R 간의 결합을 제한하는 것을 방지하기 위해 GLP-1R 효능제 펩티드를 항체로부터 거리를 두게 하는 작용을 할 수 있다.

[0112] 본원에 개시된 GAC는 임의의 GLP-1R 효능제 펩티드, 즉, GLP-1R의 활성화 양을 증가시켜, 천연-발생 효능제인 GLP-1 및 엑센딘-4가 일으키는 것과 유사한 효과를 일으키는 펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, GLP-1R 펩티드의 측면에 하나 이상의 R 기가 있을 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, GAC의 GLP-1R 효능제 펩티드의 구조가 하기와 같을 수 있다:

[0113] R^1 -HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR (서열 1)- R^2 [식 중, R^1 은 부재하거나, CH_3 , $C(O)CH_3$, $C(O)CH_2CH_3$, $C(O)CH_2CH_2CH_3$ 또는 $C(O)CH(CH_3)CH_3$ 이고; R^2 는 OH, NH_2 , $NH(CH_3)$, $NHCH_2CH_3$, $NHCH_2CH_2CH_3$, $NHCH(CH_3)CH_3$, $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$, $NHCH(CH_3)CH_2CH_3$, NHC_6H_5 , $NHCH_2CH_2OCH_3$, $NHOCH_3$, $NHOCH_2CH_3$, 카르복시 보호기, 지질 지방산 기 또는 탄수화물이다]. 다른 실시양태에서, GLP-1R 효능제 펩티드의 구조가 하기와 같을 수 있다: R^1 -HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 2)- R^2 (서열 4) [식 중, R^1 은 부재하거나, CH_3 , $C(O)CH_3$, $C(O)CH_2CH_3$, $C(O)CH_2CH_2CH_3$ 또는 $C(O)CH(CH_3)CH_3$ 이고; R^2 는 OH, NH_2 , $NH(CH_3)$, $NHCH_2CH_3$, $NHCH_2CH_2CH_3$, $NHCH(CH_3)CH_3$, $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$, $NHCH(CH_3)CH_2CH_3$, NHC_6H_5 , $NHCH_2CH_2OCH_3$, $NHOCH_3$, $NHOCH_2CH_3$, 카르복시 보호기, 지질 지방산 기 또는 탄수화물이다]. GLP-1R 효능제 펩티드에는 서열 1 및 2의 유사체가 추가로 포함된다. 이같은 유사체들은 추가적인 유리한 특성, 예를 들어, 증가된 생체이용률, 증가된 안정성, 개선된 EAE 치료 프로파일, 개선된 Th17 세포수 감소 프로파일, 개선된 식욕 제어, 개선된 체중 제어, 및/또는 감소된 숙주 면역 인식을 지닐 수 있다. 본원에서 사용된, 서열 1 또는 서열 2의 펩티드의 유사체는 본질적으로 서열 1 또는 서열 2의 서열이지만 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실 또는 이의 조합이 있는 펩티드이다.

[0114] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 GLP-1R 효능제 펩티드는 서열 1 또는 서열 2를 포함한다. 적절한 예시적인 서열 1 및 서열 2 유사체들이, 예를 들어, 2008년 1월 4일 출원된 미국 특허 출원 번호 11/969,850 (미국 특허 출원 공개 번호 20090098130으로 공개됨)의 표 II에 기재되어 있고, 이는 전문이 본원에 참고로 포함된다.

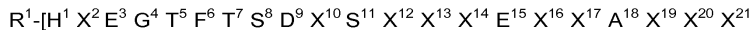
[0115] 당업계에 주지된 방법을 사용하여 GLP-1R 효능제 펩티드가 제조될 수 있다. 예를 들어, GLP-1R 효능제 항체 접합체 화합물의 제조 방법이 미국 특허 출원 공개 번호 20090098130에 기술되어 있다. 전형적으로, GLP-1R 효능제 펩티드의 합성이 제1 단계이고, 미국 특허 출원 공개 번호 20090098130에 기술된 바와 같이 수행된다. 그

후, GLP-1R 효능제 펩티드가 연결 성분 (링커)에의 연결을 위해 유도체화되고 나서, 링커가 항체와 조합된다. 당업자는 사용되는 특정 합성 단계들이 3가지 성분의 정확한 성질에 좌우된다는 것을 쉽게 이해할 것이다. 따라서, 본원에 기술된 GLP-1R 효능제 펩티드-링커 접합체 및 GAC가 쉽게 합성될 수 있다.

[0116] 본원에서 사용된 "항체"는 B 세포 및 이의 변이체의 생성물인 면역글로불린, 뿐만 아니라 T 세포 및 이의 변이체의 생성물인 T 세포 수용체 (TcR)를 포함한다. 조합 부위는 항원 결합에 참여하는 항체 분자의 부분을 지칭한다.

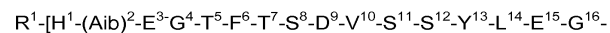
[0117] 본원에 기술된 GLP-1R 효능제 펩티드는 직접적으로 또는 링커를 통해 항체 내의 조합 부위에 공유결합으로 연결될 수 있다. 표적화제와 항체 사이의 충분한 거리를 제공하도록 적합한 링커가 선택될 수 있다. 기타 링커 고려사항에는 생성된 GAC 또는 GLP-1R 효능제 펩티드-링커의 물리적 또는 약동학적 성질, 용해도, 친지성, 친수성, 소수성, 안정성 (다소 안정적인 것, 뿐만 아니라 계획적인 분해), 강성, 유연성, 면역원성, 항체 결합의 조정, 마이셀(micelle) 또는 리포솜 내로 혼입되는 능력 등이 포함된다. 펩티드 조성, 링커 조성 및 연결 잔기 위치에 대한 미미한 변경도 생성된 분자의 상이한 특성들 (예를 들어, 안정성, 용해도, 반감기, 생체이용률, 표적 결합 능력, 효능제 또는 길항제 활성화, 약동학 등)에 대한 예측불가능한 놀라운 효과가 있을 수 있는 것으로 발견되었다.

[0118] 일부 실시양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 펩티드는 하기 화학식 I의 것일 수 있다:



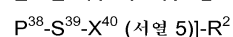
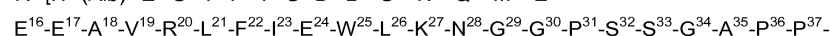
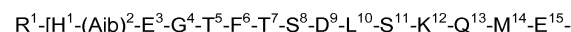
[0119] $F^{22} X^{23} X^{24} X^{25} X^{26} X^{27} X^{28} X^{29} X^{30} X^{31} X^{32} X^{33} X^{34} X^{35} X^{36} X^{37} X^{38} X^{39} X^{40}$ (서열 3)]-R² [식 중, X²는 Aib, A, S, T, V, L, I, D-Ala와 같은 차단기이고; X¹⁰은 V, L, I 또는 A이고; X¹²는 S 또는 K이고; X¹³은 Q 또는 Y이고; X¹⁴는 G, C, F, Y, W, M 또는 L이고; X¹⁶은 K, D, E 또는 G이고; X¹⁷은 E 또는 Q이고; X¹⁹는 L, I, V 또는 A이고; X²⁰은 오르니틴 또는 K(SH) R과 같은 유도체화 리신 기, 또는 K이고; X²¹은 L 또는 E이고; X²³은 I 또는 L이고; X²⁴는 A 또는 E이고; X²⁵는 W 또는 F이고; X²⁶은 L 또는 I이고; X²⁷은 I, K 또는 V이고; X²⁸은 R, 오르니틴, N 또는 K이고; X²⁹는 Aib 또는 G이고; X³⁰은 임의의 아미노산, 바람직하게는 G 또는 R이고; X³¹은 P이거나 부재하고; X³²는 S이거나 부재하고; X³³은 S이거나 부재하고; X³⁴는 G이거나 부재하고; X³⁵는 A이거나 부재하고; X³⁶은 P이거나 부재하고; X³⁷은 P이거나 부재하고; X³⁸은 P이거나 부재하고; X³⁹는 S이거나 부재하며; X⁴⁰은 연결 잔기이거나 부재하고; X¹⁰, S¹¹, X¹², X¹³, X¹⁴, X¹⁶, X¹⁷, X¹⁹, X²⁰, X²¹, X²⁴, X²⁶, X²⁷, X²⁸, X³², X³³, X³⁴, X³⁵, X³⁶, X³⁷, X³⁸, X³⁹ 또는 X⁴⁰ 중 하나는 직접적으로 또는 중간 링커를 통해 항체의 조합 부위에 공유결합으로 연결가능한 친핵성 측쇄를 포함하는 연결 잔기 (-[LR]-)로 치환되고, 연결 잔기는 K, R, Y, C, T, S, 리신의 동족체 (K(SH) 포함), 호모시스테인 및 호모세린으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다].

[0120] 일부 실시양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 펩티드는 하기 화학식 II의 서열을 포함할 수 있다:



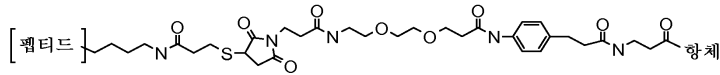
$Q^{17}-A^{18}-A^{19}-K^{20}-E^{21}-F^{22}-I^{23}-A^{24}-W^{25}-L^{26}-V^{27}-K^{28}-G^{29}-R^{30}$ (서열 4)]-R². 일부 실시양태에서, 잔기들 중 하나가 연결 잔기로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, G¹⁶ 또는 A²⁴ 중 하나가 직접적으로 또는 중간 링커를 통해 항체의 조합 부위에 공유결합으로 연결가능한 친핵성 측쇄를 포함하는 연결 잔기로 치환될 수 있고, 연결 잔기는 K, R, Y, C, T, S, 리신의 동족체 (K(SH) 포함), 호모시스테인 및 호모세린으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 다른 실시양태에서, 링커가 R³⁰ 기의 C-말단, 또는 위치 31의 추가적인 잔기의 C-말단에 공유결합으로 부착될 수 있다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 펩티드는 하기 화학식 III의 서열을 포함할 수 있다:



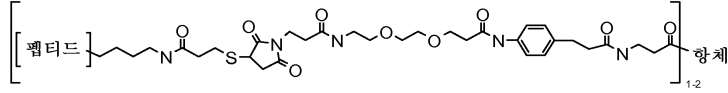
[0122] [식 중, X⁴⁰은 연결 잔기이거나 부재하고, L¹⁰, S¹¹, K¹², Q¹³, M¹⁴, E¹⁶, E¹⁷, A¹⁹, R²⁰, L²¹, E²⁴, L²⁶, K²⁷, N²⁸, G³², S³³, G³⁴, A³⁵, P³⁶, P³⁷, P³⁸, S³⁹ 또는 X⁴⁰ 중 하나는 직접적으로 또는 중간 링커를 통해 항체의 조합 부위에 공유결합으로 연결가능한 친핵성 측쇄를 포함하는 연결 잔기 (-[LR]-)로 치환되고, 연결 잔기는 K, R, Y, C, T, S, 리신의 동족체 (K(SH) 포함),

[0138] 일부 실시양태에서, 펩티드-링커 복합체가 항체에 공유결합으로 부착될 수 있다:



[0139]

[0140] 일부 실시양태에서, 펩티드-링커 복합체가 항체의 조합 부위 중 하나 이상에 부착된다:

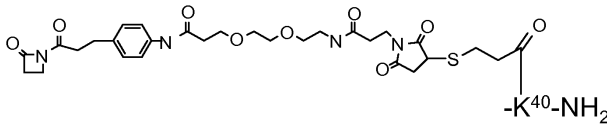


[0141]

[0142] 특정 실시양태에서, GLP-1R 효능제 펩티드가 하기의 서열을 포함할 수 있다:

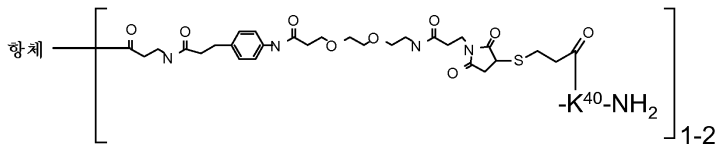
[0143] $H^1-(Aib)^2-E^3-G^4-T^5-F^6-T^7-S^8-D^9-L^{10}-S^{11}-K^{12}-Q^{13}-M^{14}-E^{15}-E^{16}-E^{17}-A^{18}-V^{19}-R^{20}-L^{21}-F^{22}-I^{23}-E^{24}-W^{25}-L^{26}-K^{27}-N^{28}-G^{29}-G^{30}-P^{31}-S^{32}-S^{33}-G^{34}-A^{35}-P^{36}-P^{37}-P^{38}-S^{39}-X^{40}$ (서열 6) [식 중, M^{14} 또는 X^{40} 중 하나가 연결 잔기로 치환된다]. 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제 펩티드-링커가 하기에 제시된 바와 같이 K^{40} (연결 잔기)을 통해 링커 A에 연결된 펩티드

[0144] $NH_2-[H-(Aib)-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-K$ (서열 7)]- NH_2 를 포함한다:



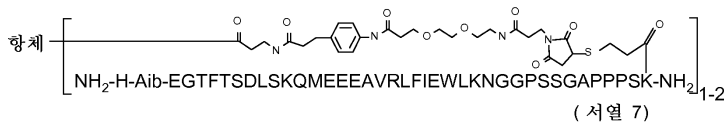
[0145]

[0146] 화합물 GAC-1에서, 펩티드 $NH_2-[H-(Aib)-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-K$ (서열 7)]- NH_2 가 하기 제시된 바와 같이 K^{40} (연결 잔기)를 통해 링커 A에 연결되고, 항체의 조합 부위에 결합된다:



[0147]

[0148] 따라서, GAC-1의 구조가 하기와 같다:

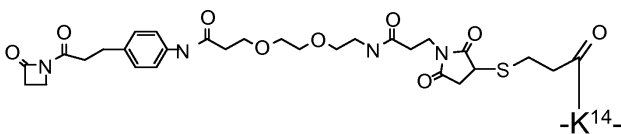


[0149]

GAC-1

[0150] 다른 실시양태에서, GLP-1R 효능제 펩티드-링커가 하기에 제시된 바와 같이 K^{14} (연결 잔기)을 통해 링커 A에 연결된 펩티드

[0151] $NH_2-[H-(Aib)-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-K-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S$ (서열 8)]- NH_2 를 포함한다:

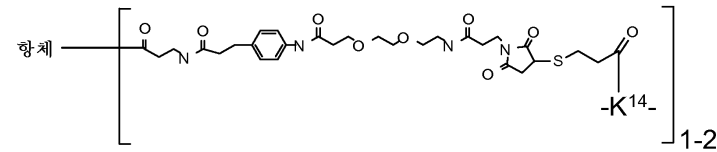


[0152]

[0153]

NH₂-[H-(Aib)-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-K-E-E-A-V-R-
 화합물 GAC-2에서, 펩티드 L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S (서열 8)-NH₂ 가 하기 제시된 바와 같이 K¹⁴ (연
 결 잔기)를 통해 링커 A에 연결되고, 항체의 조합 부위에 결합된다:

[0154]

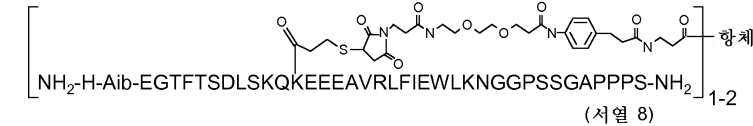


[0155]

따라서, GAC-2의 구조가 하기와 같다:

[0156]

[0157]



GAC-2

예시적인 GAC에는, 비제한적으로, 하기 표 1에서 제공되는 펩티드 서열 중 임의의 것의 GAC가 포함된다. 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제 화합물은 표 1로부터의 임의의 GAC이다. 표 1에 제시된 데이터는 미국 특허 출원 공개 번호 20090098130에 기술된 방법을 사용하여 획득되었다. 표 1에 제공된 EC₅₀ 값은 미국 특허 출원 공개 번호 20090098130의 실시예 30에 예를 들어 기술된 바와 같은 글루코스-자극 인슐린 분비 (GSIS) 분석법을 사용하여 결정되었다. 표 1에서, EC₅₀ 열 내의 (P)는 펩티드가 항체에 테더링(tethering)되었을 때의 EC₅₀을 가리킨다.

표 1

GAC-	서열	연결 잔기	EC ₅₀ (μM)	T _{1/2} (IV) (마우스)	% 생체 이용률
	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIA WLVKGR (서열 1)	N/A (펩티드 단독)	0.051	ND (수행되지 않음)	ND
	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIE WLKNGGPSSGAPPPS (서열 2)	N/A (펩티드 단독)	0.029	ND	ND
1	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 7)	C-말단	0.078, 2.65 (P)	20.7	85
2	H(Aib)EGTFTSDLSKQKKEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 8)	K14	0.033 2.45 (P)	65.8	~100

[0158]

GAC-	서열	연결 잔기	EC ₅₀ (μ M)	T _{1/2} (IV) 마우스	% 생체 이용률
3	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVKGRK (서열 9)	C-말단	0.04, 2.66 (P)	12.8	ND
4	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVKGR (서열 10)	K26	0.041, 1.04 (P)	24.5	27
5	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVKGRK (서열 13)	C-말단	ND	11.2	ND
6	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVK(Aib)R (서열 14)	K26	ND	21.3	ND
7	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVK(Aib)RK (서열 15)	C-말단	ND	21.0	ND
8	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVK(Aib)R (서열 16)	K26	ND	21.2	ND
9	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVK(Aib)R (서열 17)	K26	0.094, 3.35 (P)	ND	ND
10	H(Aib)EGTFTSDKSSYLEEQAVKE FIAWLK(Aib)R (서열 18)	K16	ND	36.9	ND
11	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEEQAVKE FIAWLK(Aib)R (서열 19)	K24	ND	35.2	ND
12	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEEQAVKE FIAWLK(Aib)RPSSGAPPPSK (서열 20)	C-말단	ND	25.3	32
13	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEEQAVKE FIAWLK(Aib)RPSSGAPPPS (서열 21)	K26	ND	40.7	ND
14	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIE WLKNGGPSSGAPPPSK (서열 22)	C-말단	0.026	ND	ND
15	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPKS (서열 23)	K38	ND	29.2	39
16	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAKPPS (서열 24)	K36	ND	ND	ND
17	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSKAPPPS (서열 25)	K34	ND	ND	ND
18	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPKSGAPPPS (서열 26)	K32	ND	ND	ND
19	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKGGPSSGAPPPS (서열 27)	K28	ND	40.7	46
20	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 28)	K27	ND	35.2	72
21	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWKNGGPSSGAPPPS (서열 29)	K26	0.01	65.5	~100
22	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIKWLKNGGPSSGAPPPS (서열 30)	K24	0.14, 피팅 되지 않음	33.1	57
23	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FKEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 31)	K23	0.03	114.3	82

[0159]

GAC-	서열	연결 잔기	EC ₅₀ (μ M)	T _{1/2} (IV) 마우스	% 생체 이용률
24	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRK FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 32)	K21	0.010, 2.12(P)	66.2	72
25	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVKL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 33)	K20	0.047	50.9	78
26	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAKRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 34)	K19	피팅 되지 않음, 7.60(P)	82.5	~100
27	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEKAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 35)	K17	피팅 되지 않음	58.7	48
28	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEKEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 36)	K16	0.01	54.1	88
29	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 37)	K13	0.031, 2.67(P)	53.5	80
30	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 38)	K12	0.091, 1.76 (P)	30.8	94
31	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS (서열 39)	K11	0.08	52	~100
32	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRL FIEWLKNGGK (서열 40)	C-말단	ND	43.9	77
33	H(Aib)EGTFTSDLSKQMEEEAVRK FIEWLKNGGPS (서열 41)	K21	ND	46.2	98

[0160]

- [0161] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명에서 사용하기 위한 화합물이 항체에 공유결합으로 연결될 수 있다. 전문이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 번호 20090098130에 항체, 이의 유용한 단편 및 변이체 및 변형, 조합 부위 및 CDR, 항체 제조, 발현, 인간화, 아미노산 변형, 글리코실화, ADCC, CDC, 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 것, 발현 벡터, 포유류 숙주 시스템, 및 폴딩(folding), 및 항체 기술의 기타 요소들이 특허 기술되어 있다.
- [0162] 일부 실시양태에서, 본 발명의 화합물과 함께 사용될 수 있는 일부 항체는 항체 조합 부위 내에 반응성 측쇄가 있을 수 있다. 반응성 측쇄는 천연적으로 존재할 수 있거나, 또는 돌연변이에 의해 항체 내에 놓일 수 있다. 항체 조합 부위의 반응성 잔기는, 예컨대 이러한 잔기가 항체를 제조하는 것으로 최초로 확인된 림프계 세포 내에 존재하는 핵산에 의해 코딩되는 경우에, 항체와 회합될 수 있다. 별법적으로, 특정 잔기를 코딩하도록 DNA를 의도적으로 돌연변이시킴으로써 아미노산 잔기가 발생할 수 있다 (예를 들어, 미어스(Meares) 등의 WO 01/22922 참조). 반응성 잔기는 본원에 논의된 바와 같이 독특한 코돈, tRNA 및 아미노아실-tRNA를 사용하는 생합성 혼입에 의해 예를 들어 발생하는 비-천연 잔기일 수 있다. 또 다른 접근법에서, 아미노산 잔기 또는 이의 반응성 관능기 (예를 들어, 친핵성 아미노기 또는 술프히드릴기)가 항체 조합 부위 내의 아미노산 잔기에 부착될 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 "항체의 조합 부위 내의 아미노산 잔기를 통해" 일어나는 항체와의 공유결합 연결은 연결이 직접적으로 항체 조합 부위의 아미노산 잔기에 대한 것이거나 또는 항체 조합 부위의 아미노산 잔기의 측쇄에 연결된 화학 모이어티를 통한 것일 수 있음을 의미한다. 일부 실시양태에서, 아미노산은 시스테인이고, 측쇄의 반응성기는 술프히드릴기이다. 다른 실시양태에서, 아미노산 잔기는 리신이고, 측쇄의 반응성기는 ϵ -아미노기이다.
- [0163] 촉매 항체는 하나 이상의 반응성 아미노산 측쇄를 포함하는 적절한 조합 부위가 있는 항체의 한 공급원이다. 이같은 항체에는 알돌라제 항체, 베타 락타마제(lactamase) 항체, 에스테라제(esterase)항체, 아미다제(amidase) 항체 등이 포함된다.
- [0164] 한 실시양태는 마우스 모노클로날 항체 mAb 33F12 및 mAb 38C2, 뿐만 아니라 이같은 항체의 적절한 키메라 및 인간화 버전 (예를 들어, h38C2, 서열 11 및 12)과 같은 알돌라제 항체를 포함한다.
- [0165] h38C2 경쇄 서열 (아미노산 219개):
- ```

ELQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLHLYGSPYLNWYLQKPGQSP
KLLIYKVSNRFSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQGTSL
PYTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열 11)

```
- [0166]
- [0167] h38C2h 사슬 서열 (아미노산 448개):
- ```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPEKGLEW
VSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTGIYY
CKTYFYSFSYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT
QKLSLSLSPGK (서열 12)
    
```
- [0168]
- [0169] 마우스 mAb 38C2 (및 h38C2)는 HCDR3과 가깝지만 이의 외부에 있는 반응성 리신이 있고, 반응성 면역화에 의해 생성되고 천연 알돌라제 효소를 기계론적으로 모방하는 새로운 촉매 항체 클래스의 원형이다. 문헌 [C.F. Barbas 3rd et al., Science 278:2085-2092, 1997] 참조. 사용될 수 있는 기타 알돌라제 촉매 항체에는 ATCC 등록 번호가 PTA-1015인 하이브리도마 85A2; ATCC 등록 번호가 PTA-1014인 하이브리도마 85C7; ATCC 등록 번호가 PTA-1017인 하이브리도마 92F9; ATCC 등록 번호가 PTA-823인 하이브리도마 93F3; ATCC 등록 번호가 PTA-824인 하이브리도마 84G3; ATCC 등록 번호가 PTA-1018인 하이브리도마 84G11; ATCC 등록 번호가 PTA-1019인 하이브리도마 84H9; ATCC 등록 번호가 PTA-825인 하이브리도마 85H6; ATCC 등록 번호가 PTA-1016인 하이브리도마

90G8에 의해 생산된 항체가 포함된다. 반응성 리신을 통해, 이러한 항체들은 천연 알돌라제의 엔아민 메커니즘을 사용하여 알돌 및 레트로-알돌 반응을 촉매한다. 예를 들어, 문헌 [J. Wagner et al., Science 270:1797-1800, 1995]; [C.F. Barbas 3rd et al., Science 278:2085-2092, 1997]; [G. Zhong et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38:3738-3741, 1999]; [A. Karlstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97:3878-3883, 2000] 참조. 알돌라제 항체 및 알돌라제 항체를 생성시키는 방법이 미국 특허 번호 6,210,938, 6,368,839, 6,326,176, 6,589,766, 5,985,626 및 5,733,75에 개시되어 있고, 이들은 본원에 참고로 포함된다.

[0170] 본 발명의 화합물을 반응성 시스테인, 예컨대 티오에스테라제(thioesterase) 및 에스테라제 촉매 항체의 조합 부위에서 발견되는 것에 연결시킴으로써 본 발명의 화합물이 또한 형성될 수 있다. 적절한 티오에스테라제 촉매 항체가 문헌 [K.D. Janda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:2532-2536 (1994)]에 기술되어 있다. 적절한 에스테라제 항체가 문헌 [P. Wirsching et al., Science 270:1775-1782 (1995)]에 기술되어 있다. 반응성 아미노산을 코딩하도록 항체 조합 부위 잔기를 돌연변이시키는 것 또는 항체 조합 부위 내의 아미노산 측쇄를 반응성 기를 함유하는 링커로 화학적으로 유도체화시키는 것이 포함되는 당업계에 주지된 수단에 의해 반응성 아미노산을 함유하는 항체가 제조될 수 있다.

[0171] 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체일 수 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 β -락탐 기 또는 조합 부위에서 공유결합 연결을 형성할 수 있는 기타 화학 기에 대한 높은 연결 친화력을 유지한다. 다양한 형태의 인간화 무린 알돌라제 항체가 고려된다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 불변 도메인 C_k 및 $C_{\gamma 1}$ 이 있는 h38c2 IgG1 또는 h38c2 Fab와 같은 인간화 알돌라제 촉매 항체이다. 문헌 [C. Rader et al., 2003, J. Mol. Bio. 332:889-899]에 h38c2 Fab 및 h38c2 IgG1을 생산하는데 사용될 수 있는 유전자 서열 및 벡터가 개시되어 있다. 인간 생식계열 V_k 유전자 DPK-9 및 인간 J_k 유전자 JK4가 m38c2의 카파 경쇄 가변 도메인의 인간화를 위한 프레임워크로 사용되었고, 인간 생식계열 유전자 DP-47 및 인간 J_H 유전자 JH4가 m38c2의 중쇄 가변 도메인의 인간화를 위한 프레임워크로 사용되었다. G1m(f) 동종이형의 항체 h38c2 IgG1을 포함하는 본 발명의 화합물의 특정 실시양태에서, 링커의 β -락탐 기가 중쇄의 위치 99의 리신 잔기의 측쇄에 결합될 수 있다. 다른 실시양태에서, h38c2의 가변 도메인 (V_L 및 V_H) 및 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터의 불변 도메인을 포함하는 키메라 항체가 사용될 수 있다. 항체는 h38c2로부터의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는 전장 항체, Fab, Fab', $F(ab')_2$, F_v , dsF_v , scF_v , V_H , V_L , 디아바디 또는 미니바디일 수 있다. 또한 항체는 h38c2로부터의 V_H 및 V_L 도메인 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 구성된 군으로부터 선택된 불변 도메인을 포함하는 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 h38c2 IgG1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체로부터의 불변 영역을 포함하는 무린 알돌라제 항체의 인간화 버전일 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체는 무린 알돌라제 항체로부터의 가변 영역 및 인간 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체로부터의 불변 영역을 포함하는 키메라 항체일 수 있다. 추가적인 실시양태에서, 항체는 천부적 또는 천연 인간 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체로부터의 폴리펩티드 서열을 포함하는 무린 알돌라제 항체의 완전히 인간형인 버전일 수 있다.

[0172] 다양한 형태의 인간화 알돌라제 항체 단편이 또한 고려된다. 한 실시양태는 h38c2 $F(ab')_2$ 를 사용한다. h38c2 $F(ab')_2$ 는 h38c2 IgG1의 단백질분해성 소화에 의해 생산될 수 있다. 또 다른 실시양태는 개재 링커 $(Gly_4Ser)_3$ 에 의해 임의적으로 연결된 h38c2로부터의 V_L 및 V_H 도메인을 포함하는 h38c2 scF_v 를 사용한다. 인간화에 대한 별법으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다.

[0173] 기타 GLP-1R 효능제

[0174] GLP-1R 효능제에는, 예를 들어 비제한적으로, 항-GLP-1R 효능제 항체들인 엑세나티드(exenatide) (BYETTA[®]), 알비글루티드(albiglutide), R1583, 리라글루티드(liraglutide), AVE-0010, S4P 및 Boc5가 또한 포함된다 (문헌 [Chen et al. (2007) Proc Natl Acad Sci USA.104:943-948] 참조).

[0175] GLP-1R 효능제에는 DPP-4 억제제, 예를 들어 비제한적으로, 시타글립틴, 빌다글립틴(vildagliptin), 삭사글립틴(saxagliptin), 리나글립틴(linagliptin), 두토글립틴(dutogliptin), 제미글립틴(gemigliptin), 알로글립틴(alogliptin) 및 베르베린(berberine)이 또한 포함된다.

[0176] 일부 실시양태에서, GLP-1R 효능제는 모노클로날 항-GLP-1R 효능제 항체이다. 모노클로날 항-GLP-1R 항체는 당업자에 의해 쉽게 생산될 수 있다. 하이브리도마에 의해 모노클로날 항체를 제조하기 위한 일반적인 방법론이 현재 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [M. Schreier et al., Hybridoma Techniques (Cold Spring

Harbor Laboratory 1980)]; [Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (Elsevier Biomedical Press 1981)]; [Kennett et al., Monoclonal Antibodies (Plenum Press 1980)] 참조. 항체를 분비하는 불명 세포주가 융합 이외의 기술, 예컨대 종양발생 DNA 또는 EBV로의 B-림프구의 직접적인 형질전환에 의해 또한 생산될 수 있다. 추후에 불명 세포주로 전환되는 정상적인 B-림프구 집단을 챌린지(challenge)하기 위해, 원한다면, 여러 항원 공급원이 사용될 수 있다.

[0177] 폴리뉴클레오티드

[0178] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 폴리펩티드 중 임의의 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 당업계에서 공지된 절차에 의해 폴리뉴클레오티드가 제조 및 발현될 수 있다.

[0179] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 중 임의의 것을 포함하는 조성물 (예컨대 제약 조성물)을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 다른 실시양태에서, 조성물은 본원에 기술된 폴리펩티드 중 임의의 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 발현 벡터 및 폴리뉴클레오티드 조성물의 투여가 본원에서 추가로 기술된다.

[0180] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드 중 임의의 것을 제조하는 방법을 제공한다.

[0181] 임의의 이같은 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드가 본 발명에 또한 포함된다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 (코딩 또는 안티센스) 또는 이중-가닥일 수 있고, DNA (개놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다. RNA 분자에는 인트론을 함유하고 1-대-1 방식으로 DNA 분자에 상응하는 HnRNA 분자, 및 인트론을 함유하지 않는 mRNA 분자가 포함된다. 추가적인 코딩 또는 비-코딩 서열이 본 발명의 폴리뉴클레오티드 내에 존재할 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없고, 폴리뉴클레오티드가 다른 분자 및/또는 지지 물질에 연결될 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다.

[0182] 폴리뉴클레오티드는 천연 서열 (즉, 항체 또는 이의 일부분을 코딩하는 내인성 서열)을 포함할 수 있거나, 또는 이같은 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 코딩되는 폴리펩티드의 면역반응성이 천연 면역반응성 분자와 비교하여 감소되지 않도록 하나 이상의 치환, 부가, 결실 및/또는 삽입을 함유한다. 코딩되는 폴리펩티드의 면역반응성에 대한 효과는 일반적으로 본원에 기술된 바와 같이 평가될 수 있다. 변이체는 천연 항체 또는 이의 일부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 바람직하게는 약 70% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 약 90% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 동일성을 나타낸다.

[0183] 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 하기 기술되는 바와 같이 최대 상응하도록 정렬될 때 2개의 서열 내의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 동일한 경우에 "동일"한 것으로 일컬어진다. 2개의 서열 간의 비교는 서열들을 비교 창(window)에 걸쳐 비교하여 국소적인 서열 유사성 영역을 확인하고 비교함으로써 전형적으로 수행된다. 본원에서 사용된 "비교 창"은 약 20개 이상의 인접한 위치, 일반적으로는 30개 내지 약 75개, 또는 40개 내지 약 50개의 절편을 지칭하고, 여기에서 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후 하나의 서열이 인접한 위치의 개수가 동일한 기준 서열에 비교될 수 있다.

[0184] 비교를 위한 최적의 서열 정렬은, 디폴트 파라미터를 사용하여, 레이저진(Lasergene) 생물정보학 소프트웨어 묶음 (디엔에이스타 인코포레이티드(DNASTAR, Inc.), 위스콘신주 매디슨) 내의 메갈린(Megalign) 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 프로그램은 하기의 참고문헌에 기술된 여러 정렬 기법들을 구현한다: 문헌 [Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358]; [Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment 및 Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA]; [Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153]; [Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17]; [Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105]; [Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425]; [Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA]; [Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730].

[0185] 바람직하게는, "서열 동일성 백분율"은 2개의 최적으로 정렬된 서열을 위치 20개 이상의 비교 창에 걸쳐 비교함으로써 결정되고, 이때 비교 창 내의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부분은 2개의 서열의 최적의

정렬을 위해 기준 서열 (부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 20% 이하, 일반적으로는 5 내지 15% 또는 10 내지 12%의 부가 또는 결실 (즉, 갭(gap))을 포함할 수 있다. 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 양쪽 서열에 존재하는 위치의 개수를 결정하여 매칭되는 위치의 개수를 산출하고, 매칭되는 위치의 개수를 기준 서열 내의 위치의 전체 개수 (즉, 창 크기)로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 백분율이 계산된다.

- [0186] 또한 또는 별법적으로, 변이체는 천연 유전자, 또는 이의 일부분 또는 보체에 대해 실질적으로 상동성일 수 있다. 이같은 폴리뉴클레오티드 변이체는 중등도로 엄격한 조건 하에 천연 폴리펩티드를 코딩하는 천연 발생 DNA 서열 (또는 상보적인 서열)에 혼성화될 수 있다.
- [0187] 적절한 "중등도로 엄격한 조건"은 5× SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0)의 용액에서 예비세정하고, 50°C-65°C, 5× SSC에서 하룻밤 동안 혼성화시킨 후, 65°C에서 20분 동안 0.1% SDS를 함유하는 2×, 0.5× 및 0.2× SSC 각각으로 2회 세정하는 것을 포함한다.
- [0188] 본원에서 사용된 "고도로 엄격한 조건" 또는 "고-엄격성 조건"은 (1) 세정을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도를 사용하는 것, 예를 들어, 50°C에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산 나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트를 사용하는 것; (2) 혼성화 동안 변성제, 예컨대 포름아미드를 사용하는 것, 예를 들어, 42°C에서 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충제 (pH 6.5) + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨을 사용하는 것; 또는 (3) 42°C에서 50% 포름아미드, 5× SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5× 덴하르트(Denhardt) 용액, 초음파처리된 연어 정액 DNA (50 μg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용하고, 42°C에서 0.2× SSC (염화나트륨/시트르산나트륨), 55°C에서 50% 포름아미드로 세정한 후, 55°C에서 EDTA를 함유하는 0.1× SSC로 구성된 고-엄격성 세정이 이어지는 것이다. 프로브 길이 등과 같은 인자에 맞추기 위해 필요하다면, 당업자는 온도, 이온 강도 등을 조정하는 방법을 인지할 것이다.
- [0189] 당업자는, 유전자 코드 축중성(degeneracy)의 결과로서, 본원에 기술된 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 뉴클레오티드 서열이 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드 중 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대해 최소의 상동성을 지닌다. 그럼에도 불구하고, 코돈 용법에서의 차이로 인해 달라지는 폴리뉴클레오티드들이 본 발명에 명확하게 포함된다. 추가로, 본원에서 제공되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자가 본 발명의 범주 내에 속한다. 대립유전자는 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 뉴클레오티드의 결실, 부가 및/또는 치환 결과로서 변경된 내인성 유전자이다. 생성된 mRNA 및 단백질의 구조 또는 기능이 변경될 수 있지만, 반드시 그럴 필요는 없다. 표준 기술 (예컨대 혼성화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교)을 사용하여 대립유전자를 확인할 수 있다.
- [0190] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 화학적 합성, 재조합 방법 또는 PCR을 사용하여 획득할 수 있다. 화학적 폴리뉴클레오티드 합성 방법이 당업계에 주지되어 있고, 본원에 상세하게 기술될 필요가 없다. 당업자는 본원에서 제공된 서열 및 시판되는 DNA 합성기를 사용하여 원하는 DNA 서열을 생산할 수 있다.
- [0191] 재조합 방법을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위해, 본원에서 추가로 논의되는 바와 같이, 원하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 적절한 벡터 내로 삽입할 수 있고, 차례로 벡터를 복제 및 증폭을 위해 적절한 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 삽입할 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오티드를 직접적인 흡수, 세포내이입, 형질감염, F-메이팅(mating) 또는 전기천공에 의해 도입함으로써 세포가 형질전환된다. 일단 도입되면, 외인성 폴리뉴클레오티드는 비-통합 벡터 (예컨대 플라스미드)로서 세포 내에서 유지될 수 있거나, 또는 숙주 세포 게놈 내로 통합될 수 있다. 이렇게 증폭된 폴리뉴클레오티드를 당업계에 주지된 방법에 의해 숙주 세포로부터 단리할 수 있다. 예를 들어, [Sambrook et al., 1989, 상기 문헌] 참조.
- [0192] 별법적으로, PCR이 DNA 서열의 재생산을 허용한다. PCR 기술은 당업계에 주지되어 있고, 미국 특허 번호 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 및 4,683,202, 뿐만 아니라 문헌 [PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauser Press, Boston (1994)]에 기술되어 있다.
- [0193] 적합한 벡터 내의 단리된 DNA를 사용하고 이를 적절한 숙주 세포 내로 삽입함으로써 RNA를 획득할 수 있다. 세포가 복제되고 DNA가 RNA로 전사되면, [Sambrook et al., 1989, 상기 문헌]에 예를 들어 기재된 바와 같이, 당업자에게 주지된 방법을 사용하여 RNA를 단리할 수 있다.
- [0194] 적절한 클로닝 벡터가 표준 기술에 따라 구축될 수 있거나, 또는 당업계에서 이용가능한 다수의 클로닝 벡터로

부터 선택될 수 있다. 선택되는 클로닝 벡터는 사용하려는 숙주 세포에 따라 달라질 수 있지만, 유용한 클로닝 벡터는 일반적으로 자가 복제 능력이 있을 것이고/이거나, 특정 제한 엔도뉴클레아제(endonuclease)에 대한 단일 표적이 있을 수 있고/있거나, 벡터를 함유하는 클론을 선택하는데 사용될 수 있는 마커에 대한 유전자를 보유할 수 있다. 적절한 예로는 플라스미드 및 박테리아 바이러스, 예를 들어, pUC18, pUC19, 블루스크립트(Bluescript) (예를 들어, pBS SK+) 및 이의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 DNA, 및 서틀 벡터 예컨대 pSA3 및 pAT28이 포함된다. 이러한 클로닝 벡터 및 다수의 기타 클로닝 벡터가 바이오래드(BioRad), 스트라타진(Stratagene), 및 인비트로젠(Invitrogen)과 같은 시판원으로부터 입수가 가능하다.

[0195] 일반적으로 발현 벡터는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 함유하는 복제가능한 폴리뉴클레오티드 구축물이다. 발현 벡터가 숙주 세포 내에서 에피솜으로서 또는 염색체 DNA의 통합 부분으로서 복제가능하여야 한다는 것이 암시된다. 적절한 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터 (아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스 포함), 코스미드, 및 PCT 공개 번호 WO 87/04462에 예를 들어 개시된 바와 같은 발현 벡터 (들)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 벡터 성분은 하기의 것들 중 하나 이상을 일반적으로 포함할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 적절한 전사 제어 요소 (예컨대 프로모터, 인핸서 및 종결인자). 발현 (즉, 번역)을 위해, 하나 이상의 번역 제어 요소, 예컨대 리보솜 결합 부위, 번역 개시 부위 및 정지 코돈이 유용하다.

[0196] 관심 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터가 전기천공, 염화칼슘, 염화루비듐, 인산칼슘, DEAE-텍스트란 또는 기타 물질을 사용하는 형질감염, 미세발사체(microprojectile) 포격, 리포펙션(lipofection), 및 감염 (예를 들어, 벡터가 우두 바이러스와 같은 감염성 작용제인 경우)이 포함되는 다수의 적합한 수단 중 임의의 것에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법은 숙주 세포의 특성에 종종 좌우될 것이다.

[0197] 본 발명은 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포를 또한 제공한다. 이중성 DNA를 과발현할 수 있는 임의의 숙주 세포가 관심 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 유전자를 단리하기 위한 목적에 사용될 수 있다. 포유류 숙주 세포의 비-제한적인 예로는 COS, HeLa 및 CHO 세포가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. PCT 공개 번호 WO 87/04462를 또한 참조한다. 적절한 비-포유동물 숙주 세포에는 원핵생물 (예컨대 대장균 또는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*)) 및 효모 (예컨대 사카로마이세스 세레비시아에(*S. cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*S. pombe*); 또는 클루이베로마이세스 락티스(*K. lactis*))가 포함된다. 바람직하게는, 숙주 세포는 숙주 세포 내의 상응하는 내인성 항체 또는 관심 단백질 (존재하는 경우)의 수준보다 약 5배, 더욱 바람직하게는 10배, 더욱 더 바람직하게는 20배 더 높은 수준으로 cDNA를 발현한다. GLP-1R 또는 GLP-1R 도메인에 대한 특이적 결합에 대한 숙주 세포의 스크리닝이 면역분석법 또는 FACS에 의해 실행된다. 관심 단백질을 과발현하는 세포가 확인될 수 있다.

[0198] *GLP-1R* 효능제 조성물

[0199] GLP-1R 효능제가 중추 신경계에 영향을 미치는 자가면역 질환, 예컨대 다발성 경화증의 치료를 위한 의약의 제조에서 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, GLP-1R 효능제를 포함하는 조성물이, 본원에서 정의된 바와 같이, 포유동물 (인간 환자 포함)에서 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0200] 본 발명의 방법에서 사용되는 조성물은 유효량의 GLP-1R 효능제를 포함한다. 조성물이 1가지를 초과하는 GLP-1R 효능제를 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0201] GLP-1R 효능제 조성물은 적절한 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 적절한 담체, 희석제 및 부형제가 당업계에 주지되어 있고, 탄수화물, 왁스, 수용성 및/또는 수-팽윤성 중합체, 친수성 또는 소수성 물질, 젤라틴, 오일, 용매, 물 등과 같은 물질이 이에 포함된다. 사용되는 특정 담체, 희석제 또는 부형제는 본 발명의 화합물이 적용되는 수단 및 목적에 좌우될 것이다. 일반적으로, 안전한 용매는 비-독성 수성 용매 예컨대 물 및 물에서 가용성 또는 혼화성인 기타 비-독성 용매이다. 적절한 수성 용매에는 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, PEG400, PEG300) 등 및 이들의 혼합물이 포함된다. 제형은 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 습윤화제, 윤활제, 유화제, 현탁화제, 방부제, 항산화제, 불투명화제, 활제, 가공 보조제, 착색제, 감미제, 향료, 풍미제, 및 기타 공지된 첨가물을 또한 포함하여, 약물 (즉, 본 발명의 화합물 또는 이의 제약 조성물)의 격조 높은 제시를 제공하거나 제약 제품 (즉, 의약)의 제조에 도움이 될 수 있다. 일부 제형은 리포솜과 같은 담체를 포함할 수 있다. 리포솜 제제에는 사이토펙틴, 다층 소포 및 단층 소포가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 경구 및 비경구 약물 전달을 위한 부형제 및 제형이 문헌 [Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (2000)]에 기재되어 있다.

- [0202] 일반적으로, GLP-1R 효능제 조성물은 주사 (예를 들어, 복강내, 정맥내, 피하, 근육내 등)에 의한 투여를 위해 제형되지만, 기타 투여 형태가 사용될 수 있다. 원한다면 통상적인 첨가제 예컨대 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제 및 방부제와 함께, GLP-1R 효능제를 수성 또는 비-수성 용매, 예컨대 식물성 오일 또는 기타 유사 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르 또는 프로필렌 글리콜에 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 GLP-1R 효능제가 주사용 제제로 제형될 수 있다.
- [0203] 투여 및 투약
- [0204] 본원에 예시된 투여 일정 및 치료적 투여량은 동물 체중, 혈액에서의 GLP-1R 효능제의 반감기, 및 GLP-1R 효능제의 친화력과 같은 인자를 기초로 하였다. 바람직한 투여 일정 및 투여량은 투여들 사이에 신체 내에서 치료량의 GLP-1R 효능제를 유지시킨다. 엑센딘-4 및 GAC-1에 대한 유효 투여량 범위가 문헌 [Davies et al., 1993], 및 기타 참고 문헌에 예시되어 있다.
- [0205] 본 발명을 지지하여 수행된 실험에서 실연된 바와 같이, 질환 과정 중 초기의 엑센딘-4로의 "펄스(pulse) 치료"가 동물에서 이환율을 감소시키는데 충분한 것으로 보인다. GLP-1R 효능제의 연속 투여가 치료 효능에 요구되지 않을 수 있다. 다른 실시양태, 예컨대 GAC로의 치료에서, 매주 치료 또는 덜 빈번한 치료가 치료 효능에 충분할 수 있다.
- [0206] 특정한 투약 계획, 즉, 용량, 시기 및 반복은 치료될 인간 또는 동물의 연령, 상태 및 체중에 좌우될 것이다. 동물 실험으로부터 초기 투약 계획이 추론될 수 있다. GLP-1R 효능제 투여 시기/빈도는, 적용될 때, 특정 GLP-1R 효능제의 순환 반감기 (또는 뉴런 조직에서의 반감기), 혈액-뇌 장벽을 통과하는 효능제의 양, 세포 내에서의 효능제의 반감기, 독성, 및 부작용을 기초로 하여야 한다.
- [0207] 본 발명의 연구에서, GLP-1R 효능제의 투여는 복강내 (i.p.) 주사에 의해 수행되었다; 그러나, 기타 투여 경로가 효과적일 것으로 예상된다 (예를 들어, 정맥내, 피하, 근육내). 두개내 또는 척수강내/경막내 투여 (또는 CNS의 기타 조직으로의 투여)가 효과적일 것이다. 특정 GLP-1R 효능제, 이의 코팅, 접합, 또는 특정 생물학적 성질에 따라 기타 투여 경로가 적절할 수 있다 (예를 들어, 구강, 설하, 윤향강내, 점막, 경피, 관절내, 질, 항문, 요도내, 비강, 귀, 흡입, 통기, 카테터, 볼루스, 스텐트 또는 기타 이식성 장치, 색전 조성물, 정맥내 점적, 패치 또는 용해성 필름 등).
- [0208] 적절한 말초 경로를 통해 GLP-1R 효능제가 바람직하게 투여된다. 그럼에도 불구하고, 적은 비율의 효능제가 혈액-뇌 장벽을 가로지를 수 있고 중추 신경계의 세포에 전달될 수 있는 것으로 이해된다. 일부 경우에는, CNS에 진입한 말초 투여된 GLP-1R 효능제의 양이 적다 (심지어 1% 미만).
- [0209] 본 발명의 특색은 자가면역 질환을 앓고 있는 포유류 대상으로의 GLP-1R 효능제의 직접적인 투여이다. "직접적"은 GLP-1R 효능제 폴리펩티드, 또는 이같은 폴리펩티드의 발현을 지시할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 표준 접종 경로에 의해 동물에게 전달되는 것을 의미한다. GLP-1R 효능제가 면역억제제, 예컨대 글루코코르티코이드, 세포정지제 (예를 들어, 알킬화제, 항대사물질, 메토트렉세이트, 아자티오프린 및 메르캅토프린), 세포독성 항체 (예를 들어, T 세포 수용체 및 IL-2 수용체-특이적 항체), B 세포 고갈 요법 (예를 들어, 항-CD20 항체/리투산(RITUXAN)[®], 항-BLyS 항체), T 세포 이동에 영향을 미치는 약물 (예를 들어, 항-인테그린 알파 4/베타 1 항체/타이사브리(TYSABRI)[®]), 이뮤노필린(immunophilin)에 작용하는 약물 (예를 들어, 시클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스, 라파미신), 인터페론 (예를 들어, IFN-β), 글라티라머/코팍손(COPAXONE)[®], 아편유사제, TNF-결합 단백질 (예를 들어, 순환 수용체), 미코페놀레이트, 및 외래 항체 또는 치료 항원에 대한 동물의 면역 응답을 억제하는데 사용되는 기타 생물학적 작용제가 포함되는 다른 약리적 작용제와 조합되어 동물에게 투여될 수 있다.
- [0210] 자가면역 질환을 앓고 있는, 인간이 포함되는 포유동물 대상의 치료에서, 치료적 유효량의 GLP-1R 효능제 또는 제약상 허용되는 유도체가 투여된다. 예를 들어, GLP-1R 효능제가 약 0.1 mg/체중 1 kg 내지 약 15 mg/체중 1 kg으로 매일 정맥내 주입으로서 투여될 수 있다. 따라서, 한 실시양태는 약 0.5 mg/체중 1 kg의 용량을 제공한다. 또 다른 실시양태는 약 0.75 mg/체중 1 kg의 용량을 제공한다. 또 다른 실시양태는 약 1.0 mg/체중 1 kg의 용량을 제공한다. 또 다른 실시양태는 약 2.5 mg/체중 1 kg의 용량을 제공한다. 또 다른 실시양태는 약 5

mg/체중 1 kg의 용량을 제공한다. 또 다른 실시양태는 약 10.0 mg/체중 1 kg의 용량을 제공한다. 또 다른 실시양태는 약 15.0 mg/체중 1 kg의 용량을 제공한다. GLP-1R 효능제 또는 제약상 허용되는 유도체의 용량은 약 1회/일 내지 2회/주, 또는 별법적으로 약 1회/주 내지 1회/월의 간격으로 투여되어야 한다. 한 실시양태에서, 약 0.002 mg/ml 내지 30 mg/ml의 본 발명에 따른 GLP-1R 효능제 또는 이의 제약상 허용되는 유도체의 최고 혈장 농도를 달성하도록 용량이 투여된다. 이는 적합한 제형 (화학 분야의 당업자에게 공지된 임의의 적절한 제형 용액이 사용될 수 있다) 내의 투여되는 성분들의 용액의 무균 주사에 의해 달성될 수 있다. 인증된 분석 방법에 의해 측정되는 혈장 수준에 의해 확인되는 대로 본 발명에 따른 GLP-1R 효능제의 지속적인 주입에 의해 바람직한 혈액 수준이 유지될 수 있다.

[0211] GAC를 개체에 투여하는 한 방법은 GLP-1R 효능제 펩티드-링커 접합체를 투여하고, 이를 생체 내에서 적합한 항체의 조합 부위와 공유결합 화합물을 형성하게 하는 것을 포함한다. 생체 내에서 형성되는 GAC의 항체 부분은 GLP-1R 효능제 펩티드-링커 접합체의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여될 수 있다. GLP-1R 펩티드가 링커/반응성 모이어티를 포함할 수 있거나, 또는 항체 조합 부위가 적절하게 변형되어 표적화제에 공유결합으로 연결될 수 있다. 별법적으로 또는 추가적으로, 항체가 적합한 면역원으로의 면역화 후 개체의 순환계 내에 존재할 수 있다. 예를 들어, 담체 단백질에 접합된 기질의 반응성 중간체로 면역화시킴으로써 촉매 항체가 생성될 수 있다. 문헌 [R.A. Lerner and C.F. Barbas 3rd, 1996, Acta Chem. Scand. 50:672-678] 참조. 특히, 문헌 [P. Wirsching et al., 1995, Science 270:1775-1782] (문헌 [J. Wagner et al., 1995, Science 270:1797-1800]에 대해 논평)에 기술된 바와 같이 디케톤 모이어티에 연결된 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)을 투여함으로써 알돌라제 촉매 항체가 생성될 수 있다.

[0212] 천연-발생 GLP-1R 효능제에 비한 GAC의 장점은 GAC가 순환 단백질-리간드와 비교하여 순환 반감기가 비교적 긴 경향이 있다는 것이다. 예를 들어, 천연-발생 효능제는 매일 투여를 필요로 할 수 있는 한편, GAC는 단지 주 1회 투여를 필요로 할 수 있다

[0213] GLP-1R 효능제로의 치료는 다발성 경화증 및 관련 장애에 대한 통상적인 치료와 조합될 수 있다. 다발성 경화증의 치료 및 관리를 위한 통상적인 약물에는 하기의 것들이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다: ABC (즉, 아보넥스-베타세론/베타페론-코팍손(Avonex-Betaseron/Betaferon-Copaxone)) 치료 (예를 들어, 인터페론 베타 1a (아보넥스(AVONEX))[®]

- , 레비프(REBIF)[®]
-), 인터페론 베타1b (베타세론(BETASERON))[®]
- , 베타페론(BETAFERON)[®]
-), 및 글라티라머 아세테이트 (코팍손COPAXONE)[®]
-); 화학요법제 (예를 들어, 미복산트론 (노반트론(NOVANTRONE))[®]
-), 아자티오프린 (이뮤란(IMURAN))[®]
-), 시클로포스파미드 (사이톡산(CYTOXAN))[®]
- , 네오사르(NEOSAR)[®]
-), 시클로스포린 (산드이문(SANDIMMUNE))[®]
-), 메토티렉세이트, 및 클라드리빈 (레우스타틴(LEUSTATIN))[®]
-); 코르티코스테로이드 및 부신피질자극 호르몬(ACTH) (예를 들어, 메틸프레드니솔론 (데포-메드롤(DEPO-MEDROL))[®]
- , 솔루-메드롤(SOLU-MEDROL)[®]
-), 프레드니손 (델타손(DELTAZONE))[®]

-) , 프레드니솔론 (델타-코르테프(DELTA-CORTEF)[®])
-) , 텍사메타손 (메드롤(MEDROL)[®])
- , 데카드론(DECADRON)[®]
-) , 부신피질자극 호르몬 (ACTH[®])
-) , 및 코르티코트로핀 (ACTHAR[®])
-) ; 통증 중재 (감각이상) (예를 들어, 카르바마제핀 (테그레톨(TEGRETOL)[®])
- , 에피톨(EPITOL)[®])
- , 아트레톨(ATRETOL)[®])
- , 카르바트롤(CARBATROL)[®])
-) , 가바펜틴 (뉴론틴(NEURONTIN)[®])
-) , 토피라메이트 (토파막스(TOPAMAX)[®])
-) , 조니사מיד (조네그란(ZONEGRAN)[®])
-) , 페니토인 (딜란틴(DILANTIN)[®])
-) , 데시프라민 (노르프라민(NORPRAMIN)[®])
-) , 아미트립틸린 (에라빌(ELAVIL)[®])
-) , 이미프라민 (토프라닐(TOFRANIL)[®])
- , 이마바테(IMAVATE)[®])
- , 자니민(JANIMINE)[®])
-) , 독세핀 (시네쿠안(SINEQUAN)[®])
- , 아다핀(ADAPIN)[®])
- , 트리아다핀(TRIADAPIN)[®])
- , 조날론(ZONALON)[®])
-) , 프로트립틸린 (비박틸(VIVACTIL)[®])
-) , 대마초 및 합성 카나비노이드 (마리놀(MARINOL)[®])
-) , 펜톡시필린 (트렌탈(TRENTAL)[®])
-) , 이부프로펜 (뉴로펜(NEUROFEN)[®])
-) , 아스피린, 아세트아미노펜, 및 히드록시진 (아타락스(ATARAX)[®])
-) ; 및 기타 치료 (예를 들어, 나탈리주맙 (안테그렌(ANTEGREN)[®])
-) , 알렘투주맙 (캠퍼스-1H(CAMPATH-1H)[®])

-), 4-아미노피리딘 (팜프리딘(FAMPRIDINE)®)
-), 3,4 디아미노피리딘, 엘리프로딜, IV 이류노글로빈 (감마가드(GAMMAGARD)®)
- , 감마르-IV(GAMMAR-IV)®
- , 감이문 N(GAMIMUNE N)®
- , 아이비감(IVEEGAM)®
- , 판글로불린(PANGLOBULIN)®
- , 산도글로불린(SANDOGLOBULIN)®
- , 베노글로불린(VENOGLOBULIN)®
-).

[0214] 키트

[0215] 본 발명은 본 발명의 방법을 실행하기 위한 부품 키트 (키트)를 또한 제공한다. 본 발명의 키트는 본원에 기술된 GLP-1R 효능제를 포함하는 하나 이상의 용기, 및 본원에 기술된 발명의 방법들 중 임의의 것에 따른 사용 설명서를 포함한다. 일반적으로, 이러한 설명서는 GLP-1R 효능제를 투여하는 방법의 설명을 포함한다. 키트는 치료를 필요로 하는 동물의 확인 및 치료 효과의 모니터링 또는 측정을 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 설명서는 투여량, 투약 일정 (투여 빈도), 및 투여 경로에 관한 정보를 일반적으로 포함한다. 키트 내에 공급된 설명서는 서면으로 작성될 수 있거나, 또는 데이터 파일 또는 스프레드 시트의 형태로 기계/컴퓨터에서 판독 가능할 수 있다. 용기는 단위 용량, 벌크 포장 (예를 들어, 다중 용량 포장), 또는 하위-단위 용량일 수 있다. 본 발명의 키트에서 제공되는 설명서는 전형적으로는 라벨 또는 포장 삽입물 (예를 들어, 키트 내에 포함된 종이 시트) 상의 서면 설명서이지만, 기계에서 판독가능한 설명서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크 상의 설명서)가 또한 허용가능하다.

[0216] 키트는 주사기, 바늘, 카테터, 흡입기, 펌프, 알콜 스왑(swab), 거즈, CNS 생검 기구, 조직학적 항체 및 염색 등이 포함되는, GLP-1R 효능제를 투여하기 위한 기구를 또한 포함할 수 있다. 필요하다면 키트의 성분이 멸균된다. 키트는 면역억제제, 예컨대 글라티라머 아세테이트 (GA) 및 텍사메타손을 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가적인 제약 작용제를 또한 제공할 수 있다. 키트는 소인, 조작 방지 포장, 및 무선 주파수 식별 (RFID) 태그(tag) 또는 기타 품목 관리 특색부를 포함할 수 있다.

[0217] 본 발명의 키트는 적절한 포장재 내에 존재한다. 적절한 포장재에는 바이알, 병, 단지, 가요성 포장재 (예를 들어, 밀봉된 마일라(Mylar) 또는 플라스틱 백) 등이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 특정 장치, 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치 (예를 들어, 분무기) 또는 주입 장치 예컨대 미니펌프와 조합하여 사용하기 위한 포장재가 또한 고려된다. 키트에 무균성 접근 포트(port)가 있을 수 있다 (예를 들어, 용기가 정맥내 용액 백 또는 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 바이알일 수 있다). 용기에 또한 무균성 접근 포트가 있을 수 있다 (예를 들어, 용기가 정맥내 용액 백 또는 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 하나 이상의 활성 작용제가 GLP-1R 효능제이다. 용기는 제2의 제약상 활성인 작용제를 추가로 포함할 수 있다.

[0218] 키트는 추가적인 성분 예컨대 완충제 및 설명 정보를 임의적으로 제공할 수 있다. 일반적으로, 키트는 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물(들)을 포함한다.

[0219] 실시예

[0220] 하기의 실시예는 설명의 목적을 위해서만 제공되고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 한정하도록 의도되지 않는다. 실제로, 본원에서 제시되고 설명된 것들에 더하여 본 발명의 다양한 변형이 상기의 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이고, 첨부된 청구항의 범주 내에 속할 것이다.

[0221] 실시예 1: GLP-1R 효능제의 확인

[0222] 하기의 방법들 중 하나 이상이 포함되는 당업계에 인정되어 있는 방법을 사용하여 GLP-1R 효능제를 확인할 수

있다. 예를 들어, 세포내 cAMP 농도의 증가를 검출하는 분석법을 사용할 수 있다. 이러한 분석법은, 예를 들어 cAMP 응답 요소의 제어 하에 있는 리포터 유전자의 발현을 측정하는 것에 의한, cAMP의 정성적 또는 정량적 측정, 뿐만 아니라 선택된 GPCR의 잠재적인 효능제 또는 길항제의 확인 및 특성화에 적절하다. 리포터 유전자가 리포터를 발현하도록 유도할 수 있는 화합물이 GLP-1R 효능제로서 확인된다. 한 이같은 방법은 GLP-1R 유전자의 발현 벡터 및 cAMP 응답 요소의 제어 하의 루시페라제(luciferase) 리포터 유전자의 발현 벡터로 안정적으로 형질감염된 인간 배아 신장 세포계를 사용하여, 후보 화합물에 대한 이의 응답을 검출한다 (문헌 [Thorens, 1992, Cell Biology 89: 8641-8645]; [Drucker et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol.84: 3434-3438]).

[0223] 분석법의 제1 단계는 GPCR, 본 경우에는 GLP-1R의 입체형상 변화를 수반하고, 이때 cAMP 응답 요소의 제어 하의 리포터 유전자를 함유하는 진핵생물 세포의 세포막 내에 수용체가 존재한다. 수용체는 내인성 수용체일 수 있거나, 또는 수용체 또는 수용체 구축물을 코딩하는 핵산이 세포 내로 형질전환될 수 있다. 전형적으로, 제1 고체 상 (예를 들어, 제1 분석법 플레이트의 웰)을 이같은 세포 (일반적으로는 포유류 세포주)의 실질적으로 균질한 집단으로 코팅하여, 세포들이 고체 상에 부착된다. 종종, 세포들이 부착성이어서, 제1 고체 상에 천연적으로 부착된다. 그 후, 분석물, 예컨대 후보 효능제를 부착성 세포가 있는 웰에 첨가하여, 수용체 (예를 들어 GLP-1R)를 분석물에 노출시킨다 (또는 이와 접촉시킨다). 이러한 분석법은 관심 GPCR (예를 들어 GLP-1R)에 대한 효능제 리간드의 확인을 가능하게 한다. 분석물에서의 노출 후, 부착되어 있는 세포를 적절한 조건 하에 미리 정해진 기간 동안 인큐베이션하여 리포터 유전자가 발현되도록 한다 (예를 들어, 약 6시간).

[0224] 그러면, 세포들은 분석법의 검출 단계에 적용될 준비가 되어 있다. 리포터 유전자의 발현을, 예를 들어, 루시페라제 활성의 검출에 의해 측정한다. 루시페라제 활성의 검출은 당업계에 공지되어 있는 다양한 적절한 방법 중 임의의 것에 의해 달성될 수 있다.

[0225] 초기의 확인 후, 후보 (예를 들어, 항-GLP-1R 모노클로날 항체)의 효능제 활성을 세포내 cAMP의 농도를 결정함으로써 추가로 확인 및 정련할 수 있다. 전형적으로, 제1 고체 상 (예를 들어, 제1 분석법 플레이트의 웰)을 이같은 세포 (일반적으로, 포유류 세포주, 예를 들어, HEK 293 세포)의 실질적으로 균질한 집단으로 코팅하여, 세포들이 고체 상에 부착된다. 후보를 세포를 함유하는 분석법 플레이트 내로 접촉하고, 적절한 조건 하에, 예를 들어 약 1시간 동안, 인큐베이션한다. 세포내 cAMP의 농도를 당업계에 공지된 다양한 적절한 방법 중 임의의 것에 의해 검출할 수 있다. 예를 들어, 세포내 cAMP의 농도를 cAMP-스크린 디렉트(Screen Direct)[®]

시스템 키트 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))의 설명서에 따라 검출할 수 있다. 시험관내-기반 경쟁적 면역분석법인 히트헌터(HitHunter)[™] cAMP XS + 어세이 (디스커브알엑스(DiscoverX))[®]

)와 같은 기타 cAMP 분석법 키트들이 시판된다. 간략하게, 세포 용해물로부터의 유리 cAMP가 항체 결합에 대해 β-갈락토시다제(galactosidase) (β-gal)의 소형 펩티드 단편인 표지된 ED-cAMP 접합체와 경쟁한다. 유리 cAMP의 부재 하에서는, ED-cAMP가 항체에 의해 포획되고, 보완(complementation)에 이용불가능하게 되어, 낮은 신호가 초래된다. 유리 cAMP의 존재 하에서는, 항체 부위가 차지되어, ED-cAMP 접합체가 자유롭게 EA를 보완하게 하여, 화학발광 신호를 생산하는 기질 가수분해를 위한 활성 β-gal EFC 효소를 형성시킨다. 항체에 결합된 유리 cAMP의 양에 직접적으로 비례하여 양성 신호가 생성된다.

[0226] 표적화된 생물학적 활성을 테스트하는 것으로 공지된 바이오어세이(bioassay)에 의해 후보 (예를 들어, 항-GLP-1R 모노클로날 항체)의 효능제 활성을 추가로 확인 및 정련할 수 있다. 예를 들어, GLP-1R을 작동시키는 후보의 능력을 인슐린 분비를 결정하는 분석법에서 테스트할 수 있다. 인슐린 분비를 자극하는 후보의 능력을 배양된 동물 세포, 예컨대 RIN-38 래트 인슐린종 세포주에 후보를 제공하고 배지 내로의 면역반응성 인슐린 (IRI)의 방출을 모니터링함으로써 결정할 수 있다. 별법적으로, 동물 내로 후보를 주사하고, 면역반응성 인슐린 (IRI)의 혈장 수준을 모니터링할 수 있다.

[0227] IRI의 존재를, 예를 들어, 인슐린을 특이적으로 검출할 수 있는 방사성면역분석법을 사용하여, 검출할 수 있다. IRI의 존재를 검출할 수 있는 임의의 방사성면역분석법을 사용할 수 있다; 한 이같은 분석법은 문헌 [Albano, J. D. M., et al., 1972, Acta Endocrinol., 70:487-509]의 방법의 변형이다. 이러한 변형에서, pH 7.4의 포스페이트/알부민 완충제가 사용된다. 10×75 mm 1회용 유리관 내에 750 μl의 총 부피를 제공하도록 500 μl의 포스페이트 완충제, 50 μl의 관류액 샘플 또는 관류액 내의 래트 인슐린 표준물, 100 μl의 항-인슐린 항혈청 (웰컴 래버러토리즈(Wellcome Laboratories); 1:40,000 희석물), 및 100 μl의 ¹²⁵I 인슐린을 연속적으로 첨가하여 인큐베이션을 준비한다. 2-3일 동안 4°C에서 인큐베이션한 후, 숯 분리에 의해 유리 인슐린을 항체에 결합

된 인슐린과 분리한다. 분석법 감도는 1-2 uU/ml이다. 조직 배양에서 성장된 세포의 세포 배양 배지 내로의 IRI의 방출을 측정하기 위해, 방사성 표지를 프로인슐린 내로 혼입시킬 수 있다. 폴리펩티드를 표지할 수 있는 임의의 방사성 표지가 사용될 수 있지만, 표지된 프로인슐린을 수득하기 위해 ³H 류신을 사용하는 것이 바람직하다.

[0228] 후보 GLP-1R 효능제가 인슐린분비자극(insulinotropic) 성질이 있는지 여부를 결정하는 것이 췌장 주입에 의해 또한 결정될 수 있다. 원위치 단리된 관류된 래트 췌장 분석법은 문헌 [Penhos, J. C., et al., 1969, Diabetes, 18:733-738]의 방법의 변형이다. 체중 350-600 g의 금식시킨 수컷 찰스 리버(Charles River) 계통 백색증 래트를 아미탈 소듐(Amytal Sodium) (일라이 릴리 앤 코(Eli Lilly and Co.): 160 ng/kg)의 복강내 주사로 마취시킨다. 신장, 부신, 위 및 하부 결장 혈관을 결찰시킨다. 약 4 cm의 십이지장 및 하행결장 및 직장을 제외한 전체 장을 절제한다. 따라서, 작은 일부 장만 관류되어, 글루카곤-유사 면역반응성이 있는 장 물질이 간섭할 가능성을 최소화한다. 관류액은 변형된 크랩스-링거(Krebs-Ringer) 바이카보네이트 완충제 + 4% 텍스트란 T70 및 0.2% 소 혈청 알부민 (분획 V)이고, 95% O₂ 및 5% CO₂로 버블링(bubbling)된다. 비-박동식 유동, 4-채널 롤러 베어링 펌프 (부클러 폴리스태틱(Buchler polystatic), 부클러 인스트루먼트즈 디비전(Buchler Instruments Division), 누클리어-시카고 코포레이션(Nuclear-Chicago Corp.))가 사용되고, 한 관류액에서 다른 관류액으로의 전환은 3방식 멈춤 꼭지를 전환함으로써 달성된다. 관류가 수행, 모니터링 및 분석되는 방식은 본원에 참고로 포함된 문헌 [Weir, G. C., et al., 1974, J. Olin. Invest. 54:1403-1412]의 방법을 따른다.

[0229] 실시예 2: 다수의 림프구 및 대식세포가 자가면역 질환 마우스의 CNS를 침윤한다

[0230] 본 실시예는 염증 세포로의 CNS의 침윤을 설명한다.

[0231] CFA (디프코(Difco)) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로쿨로시스(*M. tuberculosis*) (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. MOG 면역화 18일 후에 동물 (EAE 및 나이브)을 희생시켰다. 척수를 수확하고, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 20 µM로 냉동-절편화시켰다. CD3 (케미콘(Chemicon)) 및 CD68 (세로텍(Serotec))에 대한 1차 항체로 면역조직화학을 수행하였다. 알렉사(Alexa) 488 (인비트로젠)에 접합된 염소 항 래트 2차 항체가 검출에 사용되었다. 크레일 바이올렛 및 록슬 패스트 블루 염색이 침윤성 세포체 및 말이집을 염색하는데 사용되었다.

[0232] 도 1의 염색 결과는 건강한 마우스 (하부 패널)와 비교하여 EAE 마우스 (상부 패널)의 CNS에 다수의 침윤성 T 세포, 단핵구 및 미세아교세포가 있음을 나타낸다.

[0233] 실시예 3: GLP-1R 효능제의 직접적인 투여가 자가면역 질환에서 이환율을 감소시킨다

[0234] 본 발명을 지지하여 수행된 실험에서, GLP-1R 효능제의 직접적인 투여가 CNS-특이적 자가면역 질환에 걸린 동물에서 이환율 및 CNS 조직 손상을 감소시키는 것으로 나타났다 (도 2). CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로쿨로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다.

[0235] 마우스를 MOG 면역화 후 제0일부터 제9일까지 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=10), 2 mg/kg NT4 (양성 대조군, n=10) 또는 비히클 (PBS, 음성 대조군, n=10)로 처리하였다. 하기와 같이 이환율에 대해 동물들을 채점하였다: 0 = 정상; 1 = 늘어진 꼬리; 2 = 중등도의 뒷다리 약화; 3 = 약간 중증의 뒷다리 약화 (여전히 동물이 어렵게 걸을 수 있음); 4 = 중증 뒷다리 약화 (동물이 자신의 뒷다리를 움직일 수 있지만 걷지는 못함); 5 = 완전한 뒷다리 마비; 및 6 = 사망. 엑센딘-4로 처리된 동물이 대조군 동물과 비교하여 유의하게 감소된 이환율을 나타냈다 (도 2). 이러한 결과는 GLP-1R 효능제가 만성 EAE의 진행을 느리게 하는데 효과적이었음을 실연하였다.

[0236] 실시예 4: GLP-1R 효능제 화합물이 자가면역 질환에서 이환율을 감소시키는데 효과적이다

[0237] GLP-1R 효능제 항체 접합체 화합물인 GAC-1이 대조군 면역글로불린과 비교하여 EAE 이환율에 대해 유의한 보호를 제공하였음을 동물 실험이 나타냈다 (도 3 및 4).

[0238] CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로쿨로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 마우스를 MOG 면역화 후 제0일부터 제6일까지 매

일 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=10) 또는 비히클 (n=10)로 처리하였다. 또다른 마우스 군을 주1회 기반으로 1 mg/kg GAC-1 (n=10)로 처리하였다. 하기의 척도에 따라 EAE의 임상 징후에 대해 마우스를 매일 평가하였다: 0 = 정상; 1 = 늘어진 꼬리; 2 = 중등도의 뒷다리 약화; 3 = 약간 중증의 뒷다리 약화 (여전히 동물이 걸을 수 있음); 4 = 중증 뒷다리 약화 (동물이 자신의 뒷다리를 움직일 수 있지만 걷지는 못함); 5 = 완전한 뒷다리 마비; 및 6 = 사망. MOG 면역화 후 매주 투여되었을 때 GAC-1이 이환율을 감소시키는데 효과적이었다 (도 3).

[0239] 별도의 실험에서, 상기 기술된 바와 같이 EAE가 유도되었다. 제1 동물군은 MOG 면역화 후 제0일부터 제2일까지 3 mg/kg 엑센딘-4 (n=10)로, 제3일부터 제8일까지 1 mg/kg 엑센딘-4로 처리하였다. 제2 동물군은 MOG 면역화 후 제0일에 3 mg/kg GAC-1로 처리한 후, 면역화 후 제7일에 시작하여 1 mg/kg GAC-1로 매주 처리하였다. 제3 동물군은 PBS (대조군, n=10)로 매일 처리하였다. 상기 기술된 기준에 따라 임상 점수를 매일 모니터링하였다. 3 mg/kg의 초기 용량에 이어서 1 mg/kg의 주1회 용량으로 투여되었을 때 GAC-1이 이환율을 감소시키는데 있어서 더욱 더 효과적인 것으로 나타났다 (도 4). 결과는 3 mg/kg GAC-1의 초기 용량이 1 mg/kg 단독의 용량보다 이환율로부터의 더 많은 보호 (즉, 더 낮은 이환율)를 제공한다는 것을 실연하였다.

[0240] 실시예 5: GLP-1R 효능제가 자가면역 질환에서 CNS의 염증 세포 침습을 차단하고 말이집탈락을 감소시킨다

[0241] GLP-1R 효능제가 동물에서 보호를 매개하는 메커니즘을 더 잘 이해하기 위해 조직학적 분석을 수행하였다. 척수 절편을 대조군, 엑센딘-4-처리 및 GAC-1-처리 EAE-유도 동물로부터 제조한 후, 말이집을 염색하기 위해 록슬 패스트 블루로, 또는 침습 세포를 확인하기 위해 백혈구 마커에 대해 특이적인 항체로 염색하였다. 대조군 동물에서, 염색은 말이집-발현 뉴런 세포 배경에 대한 백혈구 침습 및 세포 파괴 영역을 나타냈다 (도 5A, 6A 및 6D). 감소된 백혈구 침습이 GLP-1R 효능제로 처리된 동물로부터 제조된 절편에서 관찰되었다 (도 6B, 6C, 6E 및 6F). 일부 GLP-1R 효능제-처리 동물은 CNS 백혈구 침습의 증거를 사실상 나타내지 않았다.

[0242] 척수 절편을 록슬 패스트 블루로 염색하여 말이집탈락을 측정하였다 (도 5A-C). CFA (디프코) 내에 유회되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 동물들을 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 또는 PBS 대조군으로, 또는 매주 1 mg/kg GAC-1로 처리하였다. MOG 면역화 18일 후에 동물들을 희생시켰다. 척수를 수확하고, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 20 µM로 냉동-절편화시켰다. 록슬 패스트 블루를 사용하여 말이집 염색을 수행하였다.

[0243] 도 5A-C는 PBS로 처리된 대조군 EAE 동물 (도 5A), 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물 (도 5B) 및 GAC-1로 처리된 EAE 동물 (도 5C)로부터의 척수의 대표적인 영상을 도해한다. 대조군 마우스의 뇌는 중증 말이집탈락의 영역 (즉, 도 5A에서 흑색 화살표로 지시되는 바와 같은, 록슬 패스트 블루 염색의 부재)을 나타냈다. 중증 말이집탈락 및/또는 뉴런 사망의 영역이 GLP-1R 효능제로 처리된 동물로부터의 절편에서 관찰되지 않았다 (도 5B 및 C). CNS 조직 절편의 조직화학적 염색 결과는 GLP-1R 효능제 처리가 CNS의 말이집탈락을 감소시킨다는 것을 실연하였다.

[0244] T 세포 상에 존재하는 CD3 및 대식세포 상에 존재하는 CD68인 2개의 백혈구 마커에 대해 특이적인 항체를 사용하여 침습 세포의 확인을 수행하였다. 상기 기술된 바와 같이 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 동물들을 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 또는 PBS 대조군으로, 또는 매주 1 mg/kg GAC-1로 처리하였다. MOG 면역화 12일 후에 동물들을 희생시켰다. 척수를 수확하고, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 20 µM로 냉동-절편화시켰다. CD3 (케미콘) 또는 CD68 (세로텍)에 대한 1차 항체로 면역조직화학을 수행하였다. 알렉사 488 (인비트로젠)에 접합된 염소 항-라트 2차 항체가 검출에 사용되었다.

[0245] 도 6A-C는 CD3 항체로의 염색 결과를 나타낸다. 다수의 밝게 염색된 점 영역이 말이집탈락 구역에 상응하여 대조군 동물의 척수에서 명백하다 (도 6A). 대조적으로, 엑센딘-4 또는 GAC-1로 처리된 마우스로부터 수득된 척수 절편은 CD3에 대한 염색을 사실상 나타내지 않았고 (각각 도 6B 및 6C), 이는 GLP-1R 효능제로 처리된 동물에서 T 세포 침습이 실질적으로 감소되었음을 가리킨다. 이같은 관찰은 GLP-1R 효능제로 처리된 동물로부터의 척수 조직이 대조군 동물과 비교했을 때 실질적으로 감소된 T 세포 침습을 나타낸다는 것을 가리킨다.

[0246] 도 6D-F는 CD68 항체로의 염색 결과를 나타낸다. 대조군 마우스로부터 제조된 절편 (도 6D)이 엑센딘-4 또는 GAC-1로 처리된 마우스로부터의 절편 (각각 도 6E 및 6F)보다 더 강하게 염색되었다. 이같은 관찰은 GLP-1R 효능제로 처리된 동물로부터의 척수 조직이 대조군 동물과 비교했을 때 실질적으로 감소된 단핵구 침습을 나타낸다는 것을 가리킨다. 총괄적으로, CNS 조직 절편의 면역조직화학적 염색은 GLP-1R 효능제 처리가 CNS의 림프구 및 단핵구 침습을 감소시킨다는 것을 실연하였다.

- [0247] 실시예 6: GLP-1R 효능제가 뇌 및 척수 내의 미세아교세포 및 침윤성 대식세포에서 활성화 마커를 감소시킨다
- [0248] 본 실시예는 질환 발병 (MOG 유도 후 제15일) 및 질환 피크 (MOG 유도 후 제28일) 양쪽 모두 시점의 뇌 및 척수 내의 미세아교세포 및 침윤성 대식세포에서의 활성화 마커인 MHC-II 발현의 GLP-1R 효능제-매개 감소를 설명한다.
- [0249] CNS 내의 항원 제시 세포 (APC)에 대한 액센딘-4의 효과를 평가하기 위해, 마우스에게 제0일에 MOG를 투여하였다. MOG-유도 동물에게 제0일부터 제9일까지 액센딘-4 (1 mg/kg) 또는 비히클 대조군을 매일 투여하였다 (각각의 처리군에서 n=9). 액센딘-4 처리 EAE 마우스 3마리 및 비히클-처리 EAE 대조군 마우스 3마리를 제15일 (질환 발병) 및 제28일 (질환 피크)에 희생시켰다. 희생된 동물로부터 미세아교세포를 분리하였다. 간략하게, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, 유출액이 투명하게 흐를 때까지 좌심실에 저온 무균성 PBS를 관류시켰다. 척수 및 뇌를 저온의 헵크 완충 염 용액 (HBSS) 내에 수집하였다. 척수 및 뇌를 HBSS와 함께 나일론 세포 여과기 (100 μ m)에 밀어 넣었다. 수집된 여과 물질을 원심분리에 의해 펠릿화하였다. 펠릿을 척수 또는 뇌 당 1 ml의 HBSS에 척수 당 300 U/ml의 제IV형 클로스트리디움(clostridium) 콜라게나제(collagenase)와 함께 재현탁시켰다. 60분 동안 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션한 후, 척수 또는 뇌 균질화물을 30% 퍼콜(Percol) 내에 넣고, 70% 퍼콜을 밑에 놓았다. 구배물을 원심분리하고, 단핵 세포를 30%/70% 퍼콜 계면으로부터 수집하였다. 세포를 350g에서 5분 동안 cDMEM에서 2회 계면으로부터 세정하여, 잔류 퍼콜을 제거하였다.
- [0250] 정제된 α -Fc γ R (2.4G2)로의 차단 후, 단일 세포 현탁액을 다색 유동 세포측정법을 위해 염색하였다. MHC 클래스 II (10-3.6), B220 (CD45R), CD45 및 CD11b에 대해 특이적인 모노클로날 항체를 BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences)에서 구입하였다. 죽은 세포를 제외하기 위해, 유동 세포측정법에 의한 분석 전에 샘플을 퀘스트(Hoescht) 33342 (HO, 칼바이오켄(Calbiochem))와 함께 5분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 세포 현탁액을 염색 직후에 분석하여 성숙 및/또는 고정 인공물을 방지하였다. 죽은 세포 (HO^{hi}) 및 B220^{hi} 세포가 분석 동안 제외되었다. 미세아교세포 및 CNS-대식세포 분석을 위해, 샘플을 LSRII로 분석하고, 플로우조(flowjo) 소프트웨어 (플로우조(FlowJo), 오리건주 애쉬랜드)로 분석하였다.
- [0251] 미세아교세포 서브세트(subset)를 CD45 및 CD11b의 발현을 기초로 상이한 서브세트로 나누었다. 2가지 상이한 세포 집단 서브세트인 CD11b+CD45^{hi} (활성화된 미세아교세포 및 침윤성 대식세포) 및 CD11b+CD45^{lo} (휴지 중인 미세아교세포)를 미세아교세포/단핵구 활성화 마커 MHC 클래스 II의 발현 프로파일에 대해 추가로 분석하였다.
- [0252] 유동 세포측정법 분석 결과는 액센딘-4로의 처리가, 증상 발병 (즉, 유도 15일 후) 및 질환 피크 (즉, 유도 28일 후) 양쪽 모두의 시점에, 뇌 및 척수 양쪽 모두에서 CD11b+CD45^{hi} 및 CD11b+CD45^{lo} 세포 집단 양쪽 모두 상에서의 MHC 클래스 II의 발현 수준을 감소시켰음을 가리킨다 (도 7). 도 7에 도해된 각각의 그래프는 지시된 형광 강도에서 염색된 모든 세포의 백분율을 나타낸다. 형광 강도는 세포 표면 상에서의 MHC 클래스 II 발현의 양을 나타낸다 (MHC 클래스 II 발현이 형광 강도와 양성으로 상관된다).
- [0253] 분석 결과는, 비히클로 처리된 대조군 EAE 동물로부터의 세포와 비교했을 때, GLP-1R 효능제 처리가 질환 발병 및 피크 양쪽 모두의 시점에서 뇌 및 척수 미세아교세포 및 침윤성 대식세포 상에서의 APC 활성화 마커 MHC 클래스 II의 발현을 억제하였음을 실연하였다.
- [0254] 실시예 7: 액센딘-4로 처리된 마우스로부터의 비장세포가 EAE의 입양 전달 모델에서 덜 병원성이다
- [0255] 본 실시예는 입양 전달 모델에서의 액센딘-4로 처리된 EAE 마우스로부터의 비장세포의 감소된 병원성을 설명한다.
- [0256] CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 PLPp (139-151) 500 μ g을 실험 제0일에 주사함으로써 8주령 내지 12주령 SJL/J 암컷 마우스 (더 잭슨 래버러토리(The Jackson Laboratory), 메인주 바 하버)에서 EAE가 유도되었다. 면역화된 동물을 매일 1 mg/kg 액센딘-4 (n=7) 또는 PBS (n=7)로 처리하였다. 처리된 동물을 면역화 후 제5일에 희생시키고, 비장 및 배출 림프절을 수집하였다. 세포를 시험관 내에서 20 μ g/ml PLPp (139-151)와 함께 배양하였다. 48시간 후, 배양된 세포를 수집하고, 꼬리 정맥 주사를 통해 나이브 SJL/J 동물 내로 주사하였다. 2000만개의 세포를 각각의 동물에 주사하였다. 액센딘-4로 처리된 공여자 (n=7) 또는 대조군 PBS로 처리된 공여자 (n=7)로부터의 세포가 동물에게 제공되었다.
- [0257] 수용자 마우스를 매일 임상 점수 및 체중 변화에 대해 모니터링하였다. EAE의 임상 징후를 하기의 척도에 따라 평가하였다: 0 = 정상; 1 = 늘어진 꼬리; 2 = 중등도의 뒷다리 약화; 3 = 약간 중증의 뒷다리 약화 (여전히 동

물이 걸을 수 있음); 4 = 중증 뒷다리 약화 (동물이 자신의 뒷다리를 움직일 수 있지만 걸지는 못함); 5 = 완전한 뒷다리 마비; 및 6 = 사망. 도 8에 제시된 바와 같이, 엑센딘-4로 처리된 동물로부터의 공여자 세포가 제공된 마우스에서 PBS로 처리된 대조군 동물로부터의 공여자 세포가 제공된 마우스보다 질환이 유의하게 덜 중증이였다. 이러한 결과는 GLP-1R 효능제 처리가 EAE의 입양 전달 모델에서 비장세포의 병원성을 감소시킨다는 것을 실연하였다.

[0258] 실시예 8: 엑센딘-4가 EAE-유도 마우스에서 2차 림프 기관의 크기를 감소시켰다

[0259] 본 실시예는 EAE 마우스에서의 2차 림프 기관의 크기에 대한 엑센딘-4의 효과를 설명한다.

[0260] CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥 내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. MOG-유도 동물을 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=7), PBS (n=7) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (n=3) 대조군으로 처리하였다. 일군의 나이브 동물 (n=3)이 또한 포함되었다. 질환 유도 후 제5일에, 동물을 안락사시켰다. 비장 및 서혜부 림프절을 절개하고 칭량하였다. 림프절 중량 및 비장 중량 및 크기가 PBS로 처리된 EAE 동물에서 현저하게 증가되었다 (도 9A-9C). 그러나, 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물의 림프절 (도 9A) 및 비장 (도 9B)는 대조군 동물의 것에 비해 유의하게 중량이 덜하였다. 유사하게, 면역억제제인 텍사메타손이 EAE 동물에서 림프절 및 비장 중량을 또한 감소시켰다. 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물의 비장은 크기 면에서 나이브 동물의 비장과 유사하였다 (도 9C). 대조적으로, 대조군 EAE 동물의 비장은 유의하게 더 커졌다 (도 9C). 이러한 결과는 GLP-1R 효능제 처리가 EAE에서 2차 림프 기관의 크기를 감소시키는데 효과적이었음을 실연하였다.

[0261] 실시예 9: 자가면역 질환에서의 엑센딘-4 요법 후의 면역학적 변화

[0262] 본 실시예는 엑센딘-4 처리 후의 EAE 마우스에서의 면역학적 변화를 설명한다.

[0263] MS의 치료를 위한 현재의 약물 (코르티코스테로이드 및 CD20 항체 리툭산™ 포함)은 면역조절제이고, 이는 면역억제 효과, T 세포 고갈 효과, B 세포 고갈 효과 및/또는 면역 응답과 관련된 기타 효과를 나타낸다. GLP-1R 효능제가 EAE에서 T 세포 및 B-세포 집단에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, EAE 동물에서의 면역학적 변화를 엑센딘-4 처리 후에 평가하였다. 비교를 위해, 동물들을 음성 대조군으로서 PBS로 처리하였다.

[0264] CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥 내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 동물들을 면역화 후 제0일부터 제6일까지 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=3) 또는 PBS (n=3)로 처리하였다. 면역화되지 않은 나이브 마우스 (n=3)와 함께, 처리된 동물들을 면역화 후 제6일에 희생시켰다. 비장, 림프절 및 말초혈을 수집하였다. 세포 해리 및 적혈구의 용해 후, 세포를 형광단위 집합된 CD4, CD8, CD19 (B 세포 마커) 및 Ter119 항체 (BD 바이오사이언시즈)로 염색하였다. FACS Aria™ 세포 분류기 (BD 바이오사이언시즈) 상에서 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하여 세포를 분석하였다.

[0265] 비장, 림프절 및 혈액에서의 림프구 수준이 PBS로 처리된 EAE 동물과 비교하여 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물에서 불변하는 것으로 나타났다 (도 10A-C). 비장에서의 단핵구 수준이 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물의 비장에서 약간 감소되었지만 (도 10D), 림프절 또는 혈액에서는 유의하게 변하지 않았다 (도 10E 및 10F). 엑센딘-4 처리는 CD4+ 또는 CD8+ 세포 집단을 유의하게 변화시키지 않았다 (도 11A-F). 엑센딘-4 처리 마커로부터의 CD19+ 집단에서의 변화는 간신히 통계학적 유의성에 도달하였다 (도 12A-C). 이러한 관찰들은 CD4+, CD8+ 및 CD19+ 세포를 직접적으로 사망시키는 코르티코스테로이드 및 리툭산™과 같은 면역억제제의 작용 메커니즘이 GLP-1R 효능제와 상이하다는 것을 시사한다.

[0266] 비장에서의 나이브 수준으로 돌아가는 Ter119+ 세포 집단의 큰 감소가 EAE 동물의 엑센딘-4 처리로 관찰되었다 (도 12D). Ter119+ 세포는 림프절 내에 존재하지 않고 (도 12E), 혈액에서는 통계적으로 유의하게 변하지 않는다 (도 12F). 이러한 결과는 엑센딘-4 처리가 EAE 마우스의 비장에서 Ter119+ 세포 집단을 감소시키는데 고도로 효과적이었음을 실연하였다.

[0267] 별도의 실험에서, 상기 기술된 바와 같이 암컷 마우스에서 EAE가 유도되었다. 동물들을 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=7), PBS (n=7) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (n=3) 대조군으로 처리하였다. 일군의 나이브 동물 (n=3)이 실험에 또한 포함되었다. 질환 유도 후 제5일에, 동물을 안락사시켰다. 비장 및 서혜부 림프절을 절개하고하고, 세포를 해리시키고, 적혈구 계통 마커 Ter119, 뿐만 아니라 CD4에 대해 표면 염색하고, FACS에 의해 분석하였다.

Ter119+ 세포의 백분율을 결정하였다 (도 13). 질환에 걸린 동물이 나이브 동물과 비교하여 Ter119+ 세포의 백분율이 더 높았던 한편, 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물은 PBS로 처리된 EAE 동물과 비교하여 Ter119+ 세포의 백분율이 감소되었다. 면역억제제인 텍사메타손으로의 처리 또한 EAE 동물에서 Ter119+ 세포의 20-25% 감소를 초래하였지만, 엑센딘-4 처리 (50-55%)만큼 많이는 아니었다. 이러한 결과는 엑센딘-4로의 처리가 MOG 면역화 동물의 비장에서 Ter119+ 세포의 백분율을 감소시키는데 효과적이었음을 실연하였다.

[0268] 실시예 10: GLP-1R 효능제 처리가 자가면역 질환에서 T 세포 활성화를 감소시켰다

[0269] 본 실시예는 EAE 마우스의 엑센딘-4 처리 후의 T 세포 활성화 수준에서의 변화를 설명한다.

[0270] 상기 기술된 바와 같이 MOG (35-55)로 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 면역화된 동물을 PBS 비히클 (n=7), 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=7) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (n=3)으로 매일 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 3마리의 나이브 군과 함께, 동물들을 면역화 후 제5일에 희생시켰다. 림프절을 수집하였다. 세포 해리 및 적혈구의 용해 후, 세포를 형광단이 접합된 CD4 및 CD44 항체 (BD 바이오사이언시즈)로 염색하였다. FACS Aria™ 세포 분류기 (BD 바이오사이언시즈)를 사용하여 세포를 분석하였다. 분석을 위해, FACS 영상을 CD4+ 세포에서 게이팅(gating)하였다. CD44 수준이 높고 (CD44^{hi}), CD4에 대해 양성으로 염색된 세포가 활성화된 CD4 세포로서 확인되었다. CD4+CD44^{hi} 세포의 백분율을 각각의 처리 군에 대해 분석하였다.

[0271] 도 14에 도해된 바와 같이, CD4 세포의 약 35%가 나이브 동물에서 활성화되었다 (CD4+CD44^{hi}). EAE 동물로부터의 CD4 세포의 약 60%가 활성화되었다 (도 14). 엑센딘-4 및 텍사메타손으로의 처리 양쪽 모두가 활성화된 T 세포의 백분율을 나이브 수준으로 감소시켰다 (도 14). 쌍대 비교를 위한 던넛(Dunnett) 사후 테스트가 이어지는 일원 ANOVA에 의해 데이터를 분석하였다. 2개의 별표 (**)는 PBS로 처리된 EAE 군과 엑센딘-4로 처리된 EAE 군 간의 쌍대 비교에 대해 P 값이 0.01 미만이라는 것을 가리킨다.

[0272] 이러한 결과는 엑센딘-4로의 처리가 EAE 유도 후 T 세포 활성화를 억제하는데 효과적이었음을 실연하였다.

[0273] 실시예 11: GLP-1R 효능제 처리가 자가면역 질환에서 CD4 T 세포 증식을 억제하였다

[0274] 본 실시예는 EAE 마우스의 엑센딘-4 처리 후의 T 세포 증식에서의 변화를 설명한다.

[0275] 상기 기술된 바와 같이 MOG (35-55)로 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 면역화된 동물을 PBS 비히클 (n=7), 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=7) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (n=3)으로 매일 처리하였다. 면역화되지 않은 마우스 3마리의 나이브 군과 함께, 동물들을 면역화 후 제5일에 희생시켰다. 림프절 세포를 수집하고, 48시간 동안 MOG로 자극하면서 배양한 후, BrdU로 처리하여 증식성 세포를 확인하였다. BrdU를 첨가하고 나서 18시간 후, 세포를 수확하였다. 세포 증식을 측정하기 위해, BrdU 염색 키트 (BD 바이오사이언시즈)를 퍼시픽 블루 (Pacific Blue)가 접합된 CD4 항체와 함께 사용하였다. FACS Aria™ 세포 분류기 (BD 바이오사이언시즈)를 사용하여 세포를 분석하였다. CD4+BrdU+ 세포가 증식성 CD4 T 세포로서 확인되었다.

[0276] 도 15에 도해된 바와 같이, 나이브 동물로부터의 CD4 세포는 MOG 자극에 응답하여 거의 증식하지 않았다; 나이브 동물로부터의 CD4 T 세포의 단지 약 3%만이 BrdU에 대해 양성이었다. 대조적으로, EAE 동물로부터의 세포는 MOG 자극에 응답하여 나이브 동물로부터의 세포보다 매우 큰 정도로 증식하였다 (도 15). 엑센딘-4 및 텍사메타손으로의 처리가 CD4 세포 증식을 유의하게 억제하였다 (도 15). 쌍대 비교를 위한 던넛 사후 테스트가 이어지는 일원 ANOVA에 의해 데이터를 분석하였다. 3개의 별표 (***)는 PBS로 처리된 EAE 군과 엑센딘-4로 처리된 EAE 군 간의 쌍대 비교에 대해 P 값이 0.001 미만이라는 것을 가리킨다.

[0277] 이러한 결과는 엑센딘-4로의 처리가 EAE 유도 후 CD4+ 세포의 증식을 감소시키는데 효과적이었음을 실연하였다.

[0278] 실시예 12: GLP-1R 효능제 처리가 자가면역 질환에서 비장세포 시토카인 수준을 변경시켰다

[0279] 본 실시예는 EAE 마우스의 엑센딘-4 처리 후의 비장세포 시토카인 수준에서의 변화를 설명한다.

[0280] GLP-1R 효능제가 EAE에서 시토카인 수준에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, EAE 동물에서의 비장세포 시토카인 수준의 변화를 엑센딘-4 처리 후 평가하였다. CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 유도된 동물을 매일 대조군 비히클 (PBS) 또는 엑센딘-4 (1 mg/kg/일)로 처리하였다. 테스트된 동물로부터 EAE 유도 후 제7일에, 그리고 또한 나이브 동물 (n=7)로부터 비장세포 (표 2의 제1열에서 "SPL) 및

림프절 (표 2의 제1열에서 "LN") 세포를 단리하였다. 세포를 20 µg/ml MOG를 함유하는 자극 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 배지 내의 시토카인 수준을 프로카르타®

시토카인 어세이 키트((Procarta®

Cytokine Assay Kit) (파노믹스(Panomics)®

)를 사용하여 측정하였다. 사용된 키트는 32가지의 상이한 종류의 시토카인 및 케모카인의 측정을 위한 비드-접합 항체를 포함하였다.

[0281] PBS로 처리된 군 (대조군, 표 2의 제3열)과 엑센딘-4로 처리된 군 (표 2의 제4열) 사이에서 유의한 수준 변화를 나타낸 시토카인이 표 2에 열거된다. 쌍대 비교를 위한 던넷 사후 테스트가 이어지는 일원 ANOVA에 의해 데이터를 분석하였다. 1개의 별표 (*)는 PBS로 처리된 EAE 군과 엑센딘-4로 처리된 EAE 군 간의 쌍대 비교에 대해 P 값이 0.05 미만이라는 것을, 2개의 별표 (**)는 P 값이 0.01 미만이라는 것을 가리킨다.

표 2

시토카인	나이브 동물에서의 수준 (pg/ml)	EAE 동물에서의 수준 (pg/ml)	EXE4로 처리된 EAE 동물에서의 수준 (pg/ml)	유의성
LN IL-17	1.8±0.7	3046±576	636.9±270.4	**
LN IFN-γ	2.4±2.7	1297±353.2	245.3±130.4	*
LN TNF-α	4.0±1.9	125.6±23.8	27.9±8.0	**
LN IL-3	1.3±0.8	102.7±27.4	24.9±9.7	*
LN SRANKL	-7.5±3.1	63.6±9.8	22.7±4.9	**
LN mip1α	5±1.3	1070±265.6	111.7±46	**
LN GM-CSF	1.4±0.7	155±45.8	17.7±7.8	*
SPL IL-23	28.6±5.4	24.7±5.5	49.1±4.0	**
LN IL-23	14.2±4.5	21.1±2.2	91.4±29.8	*
SPL IL-12 p40	153.3±53.3	259.6±13.9	412.2±57.5	*
SPL IL-1α	39.5±6.9	27.1±3.6	50.5±2.6	**
LN BTC	31.7±3.8	56.8±4.1	191.4±54.8	*
LN 아디포백틴	139.4±5.7	194.3±13.2	459.3±99.6	*

[0282]

[0283] 결과는 엑센딘-4 처리가 IL-17, IFN-γ, TNF-α와 같은 염증성 시토카인의 수준을 감소시켜, 감쇠된 질환 진행에 도달하였음을 가리켰다. 표 2의 데이터는 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물로부터의 세포에서의 시토카인 발현의 FACS 분석 (예를 들어, 실시예 13 참조)과 일관적이다.

[0284] 실시예 13: 엑센딘-4 처리가 EAE 유도 후 림프절에서 IL-17+ 및 IFN-γ 세포를 감소시켰다

[0285] 본 실시예는 EAE 마우스의 엑센딘-4 처리 후의 IL-17+ 및 IFN-γ 세포 집단에서의 변화를 설명한다.

[0286] GLP-1R 효능제가 EAE에서 Th17 및 Th1 세포 집단에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, EAE 동물에서의 IL-17+ 및 IFN-γ 세포 집단의 변화를 엑센딘-4 처리 후 평가하였다. IL-17은 Th17 세포 상에 존재하고, IFN-γ는 Th1 세포 상에 존재한다. 비교를 위해, 동물들을 음성 대조군으로서의 PBS 및 양성 대조군으로서의 텍사메타손으로 처리하였다. CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 µg을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스에서 EAE가 유도되었다. 동물들을 매일 1 mg/kg 엑센딘-4 (n=7), PBS (n=7) 또는 4 mg/kg 텍사메타손 (n=3) 대조군으로 처리하였다. 일군의 나이브 동물 (n=3)이 또한 포함되었다. 질환 유도 후 제5일 또는 제7일에, 동물들을 안락사시켰다. 서혜부 림프절을 절개하고, 세포를 해리시키고, FACS로 분석하였다. 세포를 CD4에 대해 표면 염색하였고, IL-17 및 IFN-γ에 대해 세포내 염색시켰다. CD4 및 IL-17 또는 CD4 및 IFN-γ에 대해 이중 양성인 세포를 FACS로 분석하였다.

[0287] MOG 면역화 5일 후 및 7일 후 양쪽 모두에, 질환에 걸린 동물이 나이브 동물과 비교하여 IL-17+ 세포의 백분율이 더 높았던 한편, 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물은 PBS로 처리된 EAE 동물과 비교하여 IL-17+ 세포의 백분율이 감소되었다 (도 16). 면역억제제인 텍사메타손으로의 처리 또한 EAE 동물에서 IL-17+ 세포의 50% 감소를 초래하였지만, 엑센딘-4 처리 (80-90%)만큼 많이는 아니었다. 이러한 결과는 엑센딘-4로의 처리가 림프절에서

Ter119+ 세포의 백분율을 감소시키는데 효과적이었음을 실연하였다.

- [0288] 림프절에서의 IFN- γ + 세포 집단의 큰 감소가 EAE 동물의 엑센딘-4 처리로 관찰되었다 (도 17). 예상대로, 면역억제제인 텍사메타손 또한 EAE 동물에서 IFN- γ + 세포의 감소를 초래하였다. 이러한 결과는 엑센딘-4 처리가 EAE 마우스의 림프절에서 IFN- γ + 세포 집단을 감소시키는데 효과적이었음을 실연하였다. 이러한 결과들은 MOG로 면역화된 동물에서 Th17 및 Th1 세포 양쪽 모두를 감소시키는 것에서의 GLP-1R 효능제의 역할을 지지한다.
- [0289] 천연-발생 GLP-1R 효능제 및 GLP-1R 효능제 CovX 바디(body) 양쪽 모두가 EAE 진행을 느리게 하는데 효과적이다. 천연-발생 효능제인 엑센딘-4 및 GAC-1이 질환 진행을 느리게 하는데 양쪽 모두 효과적이었다. 엑센딘-4는 EAE 증상의 발병 전에 투여되었을 때 효과적이었다. GAC-1은 EAE 증상의 발병 전 및 후에 주1회 기반으로 투여되었을 때 효과적이었다. GLP-1R 효능제의 초기 용량 증가가 이환율 감소와 관련되었고, 이는 투여량-의존적임을 가리킨다. 조직화학적 실험은 GLP-1R 효능제가 T-세포 및 단핵구에 의한 CNS 조직의 침습을 감소시켰음을 나타냈다. 말미집에 대한 염색은 GLP-1R 효능제로 처리된 동물에서 신경 세포에 대한 손상 감소를 나타냈다. GLP-1R 효능제 처리는 EAE의 발병 및 피크 양쪽 모두의 시점에 뇌 및 척수 미세아교세포 및 침윤성 대식세포 상에서의 APC 활성화 마커인 MHC 클래스 II의 발현을 억제하였다.
- [0290] 엑센딘-4를 사용하여 GLP-1R 효능제가 EAE 진행에 영향을 미치는 메커니즘을 추가로 조사하였다. CD4+, CD8+ 및 CD19+ 세포를 직접적으로 사망시키는 코르티코스테로이드 및 리톡산™과 같은 면역억제제와 GLP-1R 효능제의 작용 메커니즘이 상이한 것으로 보인다. 이는 GLP-1R 효능제가 EAE-유도 동물에서 CD4+ 또는 CD8+ 세포 집단을 유의하게 변화시키지 않았다는 관찰에서 증명되었다. 그러나, GLP-1R 효능제는 MOG-면역화 동물의 림프절에서 IL-17+ 및 IFN- γ + 세포 집단 양쪽 모두를 감소시킨다. 이러한 결과들은 GLP-1R 효능제 처리가 림프절에서 Th17 및 Th1 집단을 감소시킨다는 것을 실연하였다.
- [0291] 실시예 14: 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP-4) 억제제가 자가면역 질환에서 이환율을 감소시키는데 효과적이다
- [0292] 본 실시예는 DPP-4 억제제로의 처리에 의해 GLP-1 수준을 상승시키는 것이 EAE 진행을 감쇠시킬 수 있다는 것을 설명한다. DPP-4 억제제인 시타글립틴이 메틸셀룰로스 음성 대조군과 비교하여 EAE 이환율에 대해 유의한 보호를 제공하였음을 동물 실험이 나타냈다 (도 18).
- [0293] GLP-1은 생체 내에서 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP-4)에 의해 분해된다. DPP-4 억제제에는, 예를 들어 비-제한적으로, 시타글립틴, 빌다글립틴, 삭사글립틴, 리나글립틴, 두토글립틴, 제미글립틴, 알로글립틴 및 베르베린이 포함된다. DPP-4 억제제인 시타글립틴이 글루코스 수준 증가를 방지할 수 있는지 및 GLP-1 수준을 상승시켰는지 여부를 테스트하기 위해, 4개의 12월령 수컷 C57B1/6 마우스 군 (n=4-5)을 하룻밤 동안 금식시키고, 다음날 아침 경구 글루코스 내성 테스트에 적용하였다. 경구 글루코스 챌린지 1시간 전에, 테스트 동물에게 1 mg/kg 또는 10 mg/kg 시타글립틴을 경구 투약하였다. 음성 대조군 동물에게는 메틸셀룰로스를, 양성 대조군에게는 엑센딘-4 (1 mg/kg IP)를 투약하였다. 경구 글루코스 챌린지 후, 글루코스 수준을 20분, 40분, 60분 및 120분에 테스트하였다. 글루코스 챌린지 20분 후에 혈액 샘플을 또한 채취하여 글루코스 및 GLP-1 수준을 점검하였다. 엑센딘-4 처리는 글루코스 상승을 거의 완전히 차단하였다. 양쪽 농도의 시타글립틴으로의 처리는 메틸셀룰로스 대조군과 비교하여 더 낮은 글루코스 수준을 향하는 경향을 나타냈지만, 어느 쪽도 이원 ANOVA에 의한 통계적 유의성에 도달하지 않았다. 양쪽 용량의 시타글립틴이 메틸셀룰로스 대조군과 비교하여 경구 글루코스 챌린지 20분 후 혈액 GLP-1 수준을 유의하게 증가시켰다.
- [0294] 자가면역 질환에서의 DPP-4 억제제의 효과를 테스트하기 위해, CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 μ g을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 암컷 C57BL/6 마우스 (8주령)에서 EAE가 유도되었다. 마우스에게 면역화 후 제0일부터 제28일까지 하루에 1번 1 mg/kg 엑센딘-4, 10 mg/kg 시타글립틴, 1 mg/kg 시타글립틴 또는 메틸셀룰로스 (음성 대조군)를 투약하였다. 면역화 후 제5일에, GLP1 수준 측정을 위해 혈액 샘플을 취하였다. 10 mg/kg 시타글립틴으로 처리된 동물이 메틸셀룰로스로 처리된 동물과 비교하여 GLP-1 수준이 유의하게 더 높았다. 질환 진행을 모니터링하기 위해, 동물들을 하기와 같이 이환율에 대해 매일 채점하였다: 0 = 정상; 1 = 늘어난 꼬리; 2 = 중등도의 뒷다리 약화; 3 = 약간 중증의 뒷다리 약화 (여전히 동물이 어렵게 걸을 수 있음); 4 = 중증 뒷다리 약화 (동물이 자신의 뒷다리를 움직일 수 있지만 걷지는 못함); 5 = 완전한 뒷다리 마비; 및 6 = 사망. 엑센딘-4 또는 시타글립틴으로 처리된 동물은 대조군 동물과 비교하여 유의하게 감소된 이환율을 나타냈다 (도 18). 도 18의 그래프에 제시된 바와 같이, 엑센딘-4로의 처리는 제25일까지 EAE 진행을 크게 감쇠시켰고, 1 mg/kg 또는 10 mg/kg 시타글립틴으로의 처리는 질환 증상을 감쇠시키는 경향을 나타냈다. 10 mg/kg 시타글립틴으로 처리된 군의 질환 점수가 메틸셀룰로스로 처리된 동물과 비

교하여 제18일에서 제20일까지 유의하게 더 낮았다 (도 18). 이러한 결과는 엑센딘-4 및 시타글립틴 양쪽 모두가 만성 EAE의 진행을 느리게 하는데 효과적이었음을 실연하였다.

- [0295] 실시예 15: 말초 면역 세포는 엑센딘-4의 표적이 아니다
- [0296] 본 실시예는 말초 면역 세포가 엑센딘-4의 표적이 아니라는 것을 설명한다.
- [0297] GLP-1R 효능제-항체 접합체 GAC-2 (상기 기술됨)가 엑센딘-4/GLP-1 수용체의 발현을 점검하기 위한 염색 시약으로서 사용되었다. GAC-2를 형광단 알렉사488로 표지시켰다. 본 실시예에서, GLP-1R을 발현하는 CHO 세포가 양성 대조군으로서 사용되었다. GLP-1R을 발현하는 CHO 세포 또는 나이브 CHO 세포를 1% FBS로 차단한 후, GAC-2-알렉사488로 염색하고, 형광 활성화 세포 분류 (FACS)로 분석하였다. 나이브 CHO 세포에서의 모든 세포는 GAC-2에 대해 음성인 한편, GLP-1R을 발현하는 CHO 세포의 34%가 GAC-2에 대해 양성이었고, 이는 GAC-2-알렉사 488이 살아 있는 세포 상에서의 GLP-1R 발현을 인식할 수 있다는 것을 가리킨다.
- [0298] 나이브 동물 및 EAE 동물로부터의 비장, 림프절 및 혈액으로부터의 백혈구를 GLP-1R 또는 기타 가능한 엑센딘-4 수용체의 발현에 대해 시험하였다. 림프구 및 단핵구 대식세포 구획 양쪽 모두를 엑센딘-4/GLP-1 수용체 발현에 대해 GAC-2를 사용하여 분석하였다. 어떠한 구획에서도 양성 신호가 검출되지 않았고, 이는 엑센딘-4/GLP-1 수용체가 말초 림프 기관에서 발현되지 않거나 또는 이의 발현 수준이 매우 낮고 검출 역치 미만이라는 것을 가리킨다.
- [0299] 엑센딘-4가 말초 면역 세포 상에 직접 작용하는지 여부를 테스트하기 위해, 림프계 세포를 시험관 내에서 엑센딘-4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 비히클 (음성 대조군)의 존재 하에 MOG로 처리하였다. MOG를 대신하여 PBS가 활성화에 대한 음성 대조군으로서 사용되었다. MOG로 처리된 림프계 세포의 활성화를 CD44 발현 (T-세포 활성화) 및 MHCII 발현 (APC 활성화)을 분석함으로써 측정하였다. MOG로 처리된 세포에 엑센딘-4가 제공되었을 때 활성화 억제자 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 말초 면역 세포가 엑센딘-4의 표적이 아니라는 것을 가리킨다.
- [0300] 실시예 16: EAE가 진행 중인 마우스에서 이환율을 감소시키는 엑센딘-4 처리
- [0301] 본 실시예는 마우스에서의 진행 중인 EAE의 치료에서의 엑센딘-4의 효능을 설명한다.
- [0302] 본 발명을 지지하여 수행된 실험에서, GLP-1R 효능제의 직접적인 투여가 EAE가 진행 중인 마우스에서 이환율을 감소시키는 것으로 나타났다 (도 19). 4 mg/ml 의 가열-살균 마이코박테리움 투베로콜로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra (디프코 래버러토리즈(Difco Laboratories))를 함유하는 완전 프로인트 애주번트 (CFA) 내에 용해된 PLPp (139-151) 200 μg 으로 면역화시킴으로써 SJL/J 마우스 (8주령 내지 12주령, 더 잭슨 래버러토리)에서 EAE가 유도되었다 (문헌 [Youssef et al., Nature (2002) 420:78-84] 참조). 면역화된 마우스를 체중 측정 및 EAE의 임상 징후에 대해 매일 검사하고, 채점하였다. 실제 EAE가 SJL/J 마우스에서 확립된 후, 마우스들을 임상 점수 및 체중을 기초로 2개의 군으로 무작위화하였다 (n=28).
- [0303] 재발이 시작했을 때 엑센딘-4 처리를 시작하였다 (면역화 후 제29일). 엑센딘-4 (1 mg/kg) 또는 비히클 (PBS; 대조용)을 하루에 1번 투여하였다 (복강내). 마우스를 무작위화 후 제29일부터 제63일까지 매일 처리하였다. 동물들을 하기와 같이 이환율에 대해 채점하였다: 0, 마비 없음; 1, 꼬리 긴장 상실; 2, 뒷다리 약화; 3, 뒷다리 마비; 4, 뒷다리 및 앞다리 마비; 5, 빈사 또는 사망. 엑센딘-4로 처리된 동물은 대조군 동물과 비교하여 유의하게 감소된 이환율을 나타냈다 (도 19). 이러한 결과는 GLP-1R 효능제가 EAE가 진행 중인 마우스에서 이환율을 감소시키는데 효과적이었음을 실연한다.
- [0304] 실시예 17: 생체 내에서의 세포의 엑센딘-4 처리가 항원-특이적 CD4+T 세포 증식을 차단한다
- [0305] 본 실시예는 엑센딘-4로의 생체 내 처리 후의 항원-특이적 CD4+T 세포 증식 억제를 설명한다.
- [0306] 본 발명을 지지하여 수행된 실험에서, 생체 내에서 세포를 GLP-1R 효능제로 처리하는 것이 항원-특이적 CD4+T 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다 (도 19). SJL/J EAE 동물 및 C57BL/6 EAE 동물 양쪽 모두로부터의 항원-특이적 CD4+T 세포의 증식이 차단되었다. SJL/J 암컷 마우스 (8주령 내지 12주령, 더 잭슨 래버러토리)에서, 4 mg/ml 의 가열-살균 마이코박테리움 투베로콜로시스 H37Ra (디프코 래버러토리즈)를 함유하는 완전 프로인트 애주번트 (CFA) 내에 용해된 PLPp (139-151) 200 μg 으로 면역화시킴으로써 EAE가 유도되었다 (문헌 [Youssef et al., Nature (2002) 420:78-84] 참조). 암컷 C57BL/6 마우스에서, CFA (디프코) 내에 유화되고 4 mg/ml 의 마이코박테리움 투베로콜로시스 (디프코)가 보충된 뇌염유발 펩티드 MOG (35-55) 200 μg 을 실험 제0일에 피하 주사하고, 직후에, 그리고 48시간 후에 다시 400 ng의 백일해 독소를 정맥내 주사함으로써 EAE가 유도되었다.

마우스들을 매일 엑센딘-4 (1 mg/kg) 또는 비히클 단독 (PBS; 대조용)으로 처리하였다.

[0307] 면역화 후 제5일에, 처리된 동물들로부터 배출 림프절 및 비장을 단리하였다. 림프절 및 비장으로부터의 세포를 미리 가온된 PBS/0.1% BSA에서 세정하고 1×10^6 개의 세포/ml의 최종 농도로 재현탁시켰다. 세포 증식을 모니터링하기 위해, 세포를 CFSE로 표지한 후, PLP 또는 MOG 펩티드의 존재 하에 성장시켰다. CFSE 용액 (인비트로젠, 카탈로그 #C34554)을 1 μ M의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 염료와 함께 37°C에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 5배 부피의 빙냉 배양 배지를 첨가하고 얼음 상에서 5분 동안 인큐베이션하여 켄칭(quenching)시켰다. 총 3회의 세정을 위해, 세포를 원심분리에 의해 펠릿화시키고 신선한 배지에서 세정하였다. 세포를 계수하고, 0, 10 및 50 μ g/ml의 PLPp139-151 (SJL/J 마우스로부터의 세포) 또는 MOGp35-55 (C57BL/6 마우스로부터의 세포) 펩티드와 함께 72시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 유동 세포측정법으로 분석하였다. CFSA 염색이 없는 세포가 증식성 T 세포로서 확인되었다. 데이터가 표 3에서 요약된다.

표 3

처리	72h 펩티드 인큐베이션 (MOG/PLP)	SJL/J EAE 동물		C57BL/6 EAE 동물	
		림프절 CD4+T 세포	비장 CD4+T 세포	림프절 CD4+T 세포	비장 CD4+T 세포
비히클 단독	50 μ g/ml	89.01% 증식성	95.3% 증식성	93.3% 증식성	91.03% 증식성
비히클 단독	10 μ g/ml	87.8% 증식성	90.01% 증식성	93.9% 증식성	91.6% 증식성
엑센딘-4	50 μ g/ml	31.9% 증식성	37.2% 증식성	39.7% 증식성	35.24% 증식성
엑센딘-4	10 μ g/ml	12.8% 증식성	15.45% 증식성	5.05% 증식성	9.7% 증식성

[0308] 표 3의 데이터는 SJL/J-EAE 및 C57BL/6 EAE 마우스의 엑센딘-4 처리가 대조군 동물과 비교하여 증식성 항원-특이적 CD4+T 세포의 감소를 초래하였음을 나타낸다. 이러한 결과는 세포가 생체 내에서 GLP-1R 효능제로 처리되는 경우 EAE 동물로부터의 항원-특이적 CD4+T 세포의 증식이 차단되는 것을 실연하였다.

[0310] 상기 기술된 생체내 엑센딘-4 처리로부터의 결과와 대조적으로, 시험관 내에서 비장세포에 투여되었을 때 엑센딘-4는 CD4+T 세포 증식에 영향을 미치지 않았다. 간략하게, CD4+T 세포를 나이브 C57BL/6J 비장세포로부터 단리하였다. 세포 증식을 모니터링하기 위해, 세포를 상기 기술된 바와 같이 CFSE로 표지시키고, 이어서 플레이트에 결합된 항-CD3 (1 μ g/ml) 및 항-CD28 (0.5 μ g/ml)로 활성화시켰다. 엑센딘-4 (0 ng/ml, 10 ng/ml, 300 ng/ml 및 10 μ g/ml) 또는 비히클 (PBS)을 세포 배양물에 첨가하고, 세포를 72시간 동안 처리하였다. 처리된 세포를 유동 세포측정법으로 분석하였다. CFSA 염색이 없는 세포가 증식성 T 세포로서 확인되었다. 시험관 내에서 엑센딘-4로 처리된 CD4+T 세포가 대조군 세포에 필적하게 증식하였다. 이러한 결과는 세포가 생체 외에서 GLP-1R 효능제로 처리되는 경우 항원-특이적 CD4+T 세포의 증식이 영향을 받지 않는다는 것을 실연하였다.

[0311] 실시예 18: 표면 GLP-1R이 말초 면역 세포 상에서 검출되지 않는다

[0312] 본 실시예는 말초 면역 세포에서의 엑센딘-4 염색의 부재를 설명한다.

[0313] GLP-1R을 발현하는 CHO 세포 및 어버이 CHO 세포를 고정하거나 투과가능하게 하지 않으면서 FITC-표지 GAC-2와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 1차 항체 (총 50 μ l 내의 10 μ g/ml)와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 유동 세포측정법을 사용하여 분석하였다. FITC 신호가 GLP-1R을 발현하는 CHO 세포 상에서 검출되었지만, 어버이 CHO 세포 상에서는 그렇지 않았다. 따라서, GAC-2가 세포 표면 상에서 GLP-1R을 검출할 수 있다.

[0314] 비장, 림프절 및 혈액으로부터의 말초 면역 세포를 MOGp35-55로의 면역화 5일 후에 나이브 동물 및 EAE 동물로부터 단리하였다. 단리된 세포를 FITC-표지 GAC-2로 염색하고, 유동 세포측정법으로 분석하여, 림프구, 뿐만 아니라 단핵구를 게이팅하였다. GLP-1R 염색이 이러한 세포 집단들 중 어느 것에서도 검출되지 않았다. 이러한 결과는 이러한 말초 림프 기관 세포가 세포 표면에 GLP-1R을 발현하지 않거나 또는 표면 GLP-1R 발현이 검출 수준 미만이라는 것을 시사한다.

[0315] 실시예 19: 엑센딘-4가 2D2 마우스 모델에서 시험관 내에서 면역 세포의 MOG 활성화에 영향을 미치지 않는다

- [0316] 본 실시예는 엑센딘-4가 면역 세포의 시험관내 MOG 활성화를 차단하지 않는다는 것을 설명한다.
- [0317] 비장 및 림프절 세포를 7주령 2D2 마우스로부터 분리하고, 48시간 동안 MOG로 자극하면서 또는 MOG 자극 없이 배양하였다. 엑센딘-4 (10 ug/ml) 또는 비히클 (PBS)을 MOG-자극 2D2 세포 배양물의 용액에 첨가하였다. 배양 물에서의 48시간의 MOG 자극 후, 세포를 수집하고, 항-CD44 항체 및 항-MHC 클래스 II 항체로 염색하고, 유동 세포측정법으로 분석하였다. 항-CD44 항체가 T 세포 활성화에 대한 마커로 사용되었다. 항-MHC 클래스 II 항체가 APC 활성화에 대한 마커로 사용되었다.
- [0318] MOG로 자극된 비장세포 및 림프절 세포가 활성화된 T 세포의 존재에 대해 양성으로 염색되었다. 엑센딘-4 처리가 T 세포 활성화를 차단하지 않았다. MOG 자극의 부재 하에 배양된 세포는 활성화된 T 세포에 대한 유의한 염색이 없었다. 이러한 결과는 2D2 비장세포 및 림프절 T 세포가 생체 외에서 MOG 자극에 의해 활성화될 수 있다는 것과 엑센딘-4 처리가 생체 외에서 직접적으로 이러한 활성화를 차단하지 않는다는 것을 가리킨다.
- [0319] MOG로 자극된 비장세포 및 림프절 세포가 활성화된 APC 세포의 존재에 대해 양성으로 염색되었다. 엑센딘-4 처리가 APC 세포 활성화를 차단하지 않았다. MOG 자극의 부재 하에 배양된 세포는 활성화된 APC 세포에 대한 유의한 염색이 없었다. 이러한 결과는 2D2 비장세포 및 림프절 항원 제시 세포가 생체 외에서 MOG 자극에 의해 활성화될 수 있지만 엑센딘-4 처리가 생체 외에서 직접적으로 이러한 활성화를 차단하지 않는다는 것을 가리킨다.
- [0320] 실시예 20: 엑센딘-4 처리의 효과가 염증유발성 시토카인 생산을 억제한다
- [0321] 본 실시예는 염증유발성 시토카인 생산에 대한 GLP-1R 효능제의 효과를 설명한다.
- [0322] SJL/J EAE 마우스 모델을 사용하여 염증유발성 시토카인 생산에 대한 생체내 엑센딘-4 처리의 효과를 연구하였다. PLP(p139-151) 면역화에 의해 8주령 SJL/J 동물에서 재발-경감(relapse-remitting) EAE가 유도되었다. 한 동물군은 1 mg/kg 엑센딘-4로 매일 처리하였고, 제2 동물군은 PBS (대조군)으로 처리하였다. 면역화 후 제5일에, 비장세포를 양쪽 동물군으로부터 분리하고, 시험관 내에서 MOG로 자극하면서 배양하였다. 48시간 동안 MOG로 자극하면서 배양한 후, 배양 배지를 수집하고, IFN-감마 및 IL-17에 대한 루미넥스(LUMINEX)[®] 시토카인 분석법을 사용하여 시토카인 생산 수준에 대해 분석하였다.
- [0323] 엑센딘-4로 처리된 EAE 동물로부터의 비장세포가 대조군 EAE 동물로부터의 비장세포와 비교하여 유의하게 더 낮은 양의 IFN-감마 및 IL-17를 생산하였다. 이는 엑센딘-4가 PLP(p139-151) 면역화 후 Th1 및 Th17 세포를 정상화하는데 효과가 있다는 것을 가리킨다.
- [0324] 2D2 비장세포 배양물을 사용하여 생체의 시스템에서의 염증유발성 시토카인 생산에 대한 엑센딘-4의 효과를 분석하였다. 7주령 2D2 동물로부터의 비장세포를 분리하고, MOG로 자극하면서 또는 MOG 자극 없이 배양하였다. MOG로 자극된 비장세포 배양물에서, 다양한 농도의 엑센딘-4 (10 ng/ml, 300 ng/ml 및 10 ug/ml)를 첨가하여, 엑센딘-4가 생체외에서 Th1 또는 Th17 세포를 감소시키는지 여부를 테스트하였다. PBS가 음성 대조군으로 사용되었다. 엑센딘-4 또는 PBS를 첨가하고 나서 48시간 후에, 배양 배지를 수집하고, 시토카인 수준을 측정하였다. MOG로 자극된 세포로부터의 배지에서 IFN-감마 및 IL-17의 수준이 높았다. 대조적으로, MOG로 자극되지 않은 세포로부터의 배지는 최소 수준의 IFN-감마 및 IL-17을 함유하였다. 배양물 내의 엑센딘-4의 존재가 IFN-감마의 생산에 대한 효과가 없는 것으로 나타났다. 또한, 10 ug/ml 엑센딘-4로 처리된 세포에 의해 생산된 IL-17의 수준이 엑센딘-4로 처리되지 않은 세포에 의해 생산된 수준과 다르지 않았다. 그러나, 10 ng/ml 또는 300 ng/ml 엑센딘-4로 처리된 세포로부터의 배지는 IL-17 수준이 약간 감소된 것으로 보였지만, 차이가 통계학적으로 유의하지는 않았다.
- [0325] 이러한 결과들은 엑센딘-4가 생체내 EAE 마우스 모델에서 염증유발성 시토카인 생산을 감소시킨다는 것을 실연하였다. 그러나, 대조적으로, 엑센딘-4는 2D2 생체의 모델에서 염증유발성 시토카인 생산을 감소시키지 않았다. 이러한 결과들은 엑센딘-4가 비장 또는 림프절을 직접적으로 표적화하는 것으로 보이지 않는다는 것을 실연한다.
- [0326] 실시예 21: 엑센딘-4 처리가 EAE 동물의 흉선에서 CD4, CD8 이중 양성 세포를 고갈시켰다
- [0327] 본 실시예는 EAE 동물의 흉선에서의 CD4, CD8 이중-양성 세포의 고갈을 설명한다.
- [0328] EAE를 유도하기 위해, 8주령 C57Bl/6 마우스를 피하 주사로 MOG/CFA로 면역화시키고, 면역화 직후 및 48시간 후에 백일해 독소를 복강내 주사하였다. 한 동물군을 매일 엑센딘 4 (1 mg/kg; n=3)로 처리하였고, 또 다른 동물

군을 대조군 PBS (n=4)로 처리하였다. 면역화 후 제4일에, 액센딘-4로 처리된 동물 및 대조군 동물의 흉선을 수확하였다. 4마리의 나이브 동물의 흉선을 동시에 수확하였다. 흉선을 측정하고, 흉선세포를 단리하고, 계수하고, 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 데이터가 하기 표 4에서 요약된다.

표 4

마우스	흉선 중량 (g)	전체 흉선 세포수	% CD4,CD8 이중 양성 세포
나이브	0.0475 ± 0.0044	104.6 ± 20.8 백만개	84.6 ± 0.3%
대조군 EAE	0.0285 ± 0.0019	14.8 ± 6.5 백만개	30.3 ± 11.9%
액센딘-4로 처리된 EAE	0.0147 ± 0.0003	3.8 ± 0.8 백만개	2.3 ± 0.3%

[0329]

[0330]

표 4에 제시된 바와 같이, 대조군 EAE 동물의 흉선이 나이브 동물의 흉선과 비교하여 유의하게 더 작았다 (p = 0.007). 액센딘-4로 처리된 EAE 동물의 흉선은 심지어 대조군 EAE 동물의 흉선보다 더 작았다 (p = 0.002). 대조군 EAE 동물, 액센딘-4로 처리된 EAE 동물 및 나이브 동물의 흉선으로부터의 흉선세포를 단리하였다. 상기 기술된 흉선 측정치와 일관적으로, 대조군 EAE 동물로부터의 전체 흉선 세포수가 나이브 동물의 것보다 유의하게 더 적었다. 액센딘-4로 처리된 EAE 동물로부터의 전체 흉선 세포수가 대조군 EAE 동물의 것보다 유의하게 더 적었다.

[0331]

흉선세포를 항-CD4 및 항-CD8 항체로 염색하고, 유동 세포측정법으로 분석하였다. 나이브 동물로부터의 전체 흉선세포 집단의 84.6±0.3%가 CD4, CD8 이중 양성이었다. 대조군 EAE 동물로부터의 전체 흉선세포 집단의 30.3±11.9%가 CD4, CD8 이중 양성이었다. 이러한 데이터는 MOG 자극에 응답한 흉선 내에서의 이중 양성 T 세포의 분화 및 성숙을 반영한다. 액센딘-4로 처리된 EAE 동물에서, CD4, CD8 이중 양성 T 세포 집단이 거의 완전히 없어졌다 - 액센딘-4로 처리된 EAE 동물로부터의 전체 흉선세포 집단의 2.3±0.3%만이 CD4, CD8 이중 양성이었다. 추가적인 연구에서, 액센딘-4로 처리된 동물에서 비장 및 림프절 세포수에서의 증가가 없다는 것이 실연되었다. 이러한 결과들은 액센딘-4가 세포 사망에 의해 CD4, CD8 이중 양성 세포의 고갈을 야기할 수 있음을 시사한다.

[0332]

별도의 연구에서, 나이브 동물, 뿐만 아니라 EAE 동물에서의 T 세포 성숙에 대한 액센딘-4의 효과를 조사하였다. 8주령 C57B1/6 마우스에서 MOG/CFA의 피하 주사에 이은 백일해 독소의 복강내 주사에 의해 EAE가 유도되었다. 나이브 및 EAE 동물을 3개의 군 (n=3)으로 나누고, 각각 PBS (대조군), 액센딘-4 (1 mg/kg) 또는 텍사메타손 (4mg/kg)으로 처리하였다. 텍사메타손은 T 세포 사망을 야기하는 것으로 공지되어 있다. 면역화 후 제6일에, 흉선을 수확하였다. 흉선세포를 단리하고, 항-CD4 및 항-CD8 항체로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 데이터가 표 5에서 요약된다.

표 5

마우스	처리	% CD4,CD8 이중 양성 세포
나이브	PBS	86.3 ± 1.1%
	액센딘-4	81.5 ± 2.0%
	텍사메타손	12.4 ± 3.3%
EAE	PBS	21.7 ± 6.3%
	액센딘-4	5.6 ± 2.6%
	텍사메타손	1.5 ± 0.5%

[0333]

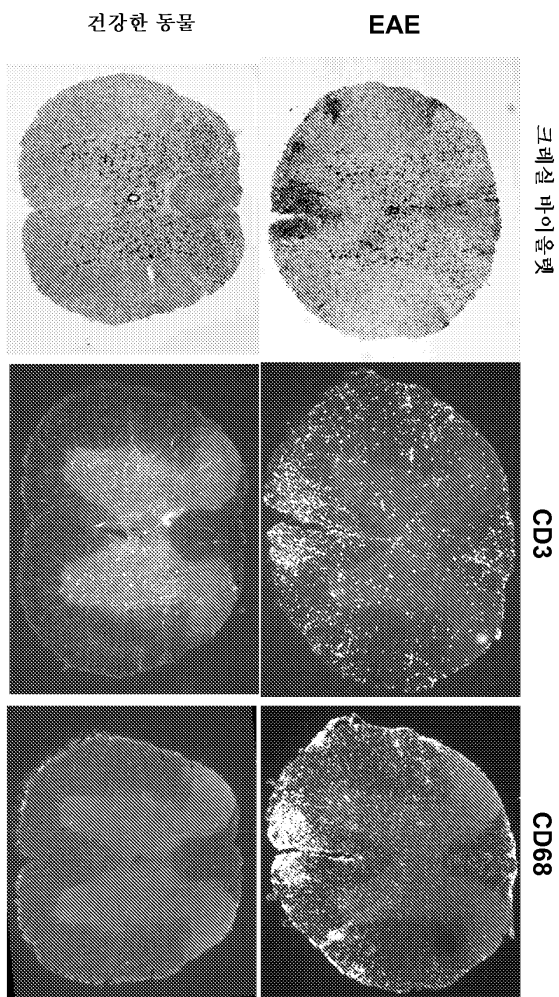
[0334]

EAE 대조군 동물의 흉선세포에서, CD4, CD8 이중 양성 세포 집단 (21.7±6.3%)이 나이브 대조군 동물 (86.3 ± 1.1%)과 비교하여 감소되었다. 액센딘-4 처리 및 텍사메타손 처리 양쪽 모두 EAE 동물에서 CD4, CD8 이중 양성 집단을 강하게 감소시켰다 (각각 5.6±2.6% 및 1.5±0.5%).

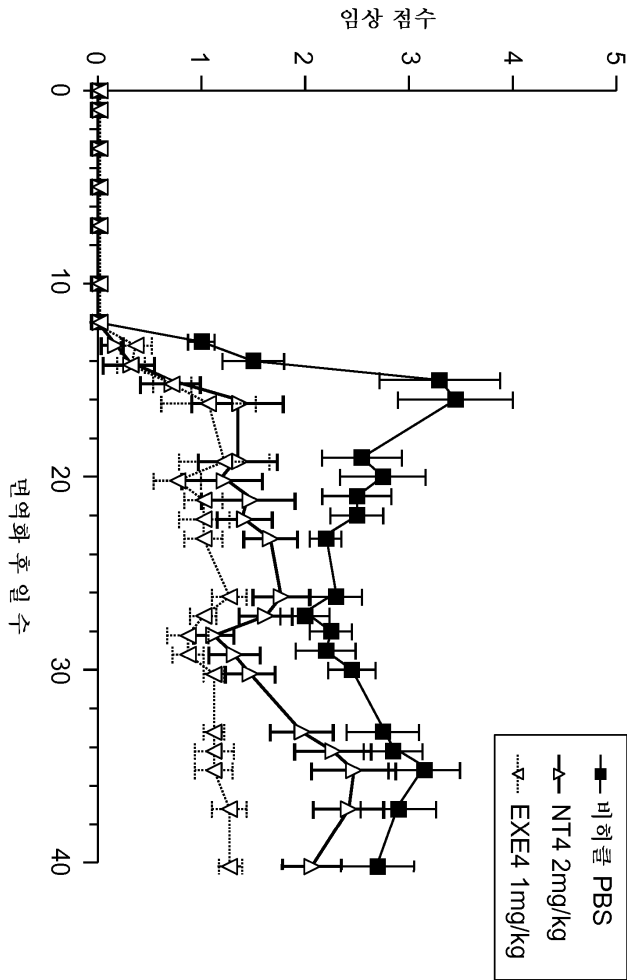
- [0335] 나이브 동물로부터의 전체 흉선세포 집단의 $86.3 \pm 1.1\%$ 가 CD4, CD8 이중 양성이었다. 텍사메타손 처리가 CD4, CD8 이중 양성 집단의 유의한 감소를 야기하였다 - 텍사메타손으로 처리된 나이브 동물로부터의 전체 흉선세포 집단의 $12.4 \pm 3.3\%$ 가 CD4, CD8 이중 양성이었다. 그러나, 엑센딘-4 처리는 나이브 동물의 흉선에서 CD4, CD8 이중 양성 세포 집단에 영향을 미치지 않았다. 엑센딘-4로 처리된 나이브 동물로부터의 전체 흉선세포 집단의 $81.5 \pm 2.0\%$ 가 CD4, CD8 이중 양성이었다.
- [0336] 이러한 결과들은 엑센딘-4 처리가 EAE 동물의 흉선에서 CD4, CD8 이중 양성 세포의 고갈을 초래하지만 나이브 동물에서는 그렇지 않다는 것을 실연한다.
- [0337] 실시예 22: 미주신경 절단이 체중 감소에 대한 엑센딘-4의 효과를 없애지만, EAE 진행에 대한 엑센딘-4의 효과에는 영향을 미치지 않는다
- [0338] 본 실시예는 엑센딘-4 처리에 대한 미주신경 절단의 효과를 설명한다.
- [0339] EAE 진행에 대한 엑센딘-4의 효과가 미주신경을 통해 매개되는지 여부를 조사하기 위해, 미주신경이 절단된 8주령 C57B1/6 동물 (더 잭슨 래버러토리)에서 EAE가 유도되었다. MOG/CFA 피하 면역화에 이어서, 면역화 직후 및 48시간 후에 백일해 독소를 복강내 주사함으로써, 미주신경 절단 및 비절단 마우스에서 EAE가 유도되었다. 면역화된 동물을 2개의 군으로 나눴다 ($n = 7-8$). 한 군은 매일 엑센딘-4 (1 mg/kg)로 처리하였고, 다른 군은 PBS (대조군)로 처리하였다. 체중 및 EAE 임상 점수를 매일 모니터링하였다. 제20일의 실험 말기에, 동물을 안락사시켰다. 미주신경 절단 동물의 미주신경이 올바르게 절단되었음이 위 측정으로 확인되었다.
- [0340] MOG 면역화로부터 처음 4일 이내에, 엑센딘-4로 처리된 미주신경 비절단 EAE 마우스가 미주신경 비절단 대조군 EAE 마우스와 비교하여 체중의 10%가 감소되었다. 미주신경 절단 마우스에서는, 엑센딘-4로 처리된 EAE 마우스와 대조군 EAE 마우스 간에 체중 차이가 관찰되지 않았다. 따라서, 미주신경 절단이 체중 감소에 대한 엑센딘-4의 효과를 없앴다. 이러한 결과는 체중 변화에 대한 엑센딘-4의 효과가 손상되지 않은 미주신경에 좌우된다는 것을 시사한다.
- [0341] EAE 질환 진행은 미주신경 절단에 영향을 받지 않았다. 미주신경 절단 마우스 및 비절단 마우스 양쪽 모두에서, 엑센딘-4 처리가 PBS로 처리된 동물과 비교하여 EAE 진행을 유의하게 지연시켰다 (도 20). 따라서, 미주신경 절단이 엑센딘-4가 매개하는 EAE 질환 진행 지연에 영향을 미치지 않는다. 이러한 결과는 EAE에 대한 엑센딘-4의 효과가 미주신경에 의해 매개되지 않는다는 것을 가리킨다.
- [0342] 개시된 교시내용이 다양한 용도, 방법, 키트 및 조성물과 관련하여 기술되었지만, 본원의 교시내용 및 하기의 청구된 발명을 벗어나지 않으면서 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 상기의 예들은 개시된 교시내용을 더 잘 설명하기 위해 제공되고, 본원에 제시된 교시내용의 범주를 제한하도록 의도되지 않는다. 본 발명의 교시내용이 이러한 예시적인 실시양태들의 관점에서 기술되었지만, 이러한 예시적인 실시양태들의 수많은 변경 및 변형이 과도한 실험 없이 가능하다는 것을 당업자는 쉽게 이해할 것이다. 모든 이같은 변경 및 변형이 현재의 교시내용의 범주 내에 속한다.
- [0343] 본원에서 사용된 섹션 제목은 조직적인 목적만을 위한 것이고, 기술된 내용을 어떠한 방식으로도 한정하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 약간의 실질적이지 않은 편차가 본원에서의 교시내용의 범주 내에 있도록, 본 발명의 교시내용에서 온도, 농도, 시간 등 앞에 암시적인 "약"이 있다는 것이 이해될 것이다. 본 출원에서, 단수형의 사용은 구체적으로 달리 언급되지 않는 한 복수형을 포함한다. 또한, "포함하다(comprise, comprises)", "포함하는(comprising)", "함유하다(contain, contains)", "함유하는(Containing)", "포함되다(include, includes), 및 "포함되는(including)"은 한정적인 것으로 의도되지 않는다. 상기의 일반적인 설명 및 하기의 상세한 설명 양쪽 모두가 단지 예시적 및 설명적이며 본 발명을 제한하지 않는다는 것을 이해하여야 한다.
- [0344] 특허, 특허 출원, 논문, 교재 등이 포함되는 본원에서 인용된 모든 참고문헌 및 이에 인용된 참고문헌은, 이들이 이미 포함되어 있지 않다는 점에서, 참고로 전문이 본원에 포함된다. 정의된 용어, 용어 용법, 기술된 기술 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 포함된 문헌 및 유사한 자료들 중 하나 이상이 본 출원과 다르거나 모순되는 경우, 본 출원이 우선한다.
- [0345] 상기의 설명 및 실시예는 본 발명의 특정한 구체적인 실시양태를 상술하고, 본 발명가들에 의해 구현된 최적의 양식을 기술한다. 그러나, 상기의 것들이 문서에서 아무리 상세하게 나타날 수 있을지라도, 본 발명이 다수의 방식으로 실행될 수 있고, 첨부된 청구항 및 이의 임의의 등가물에 따라 본 발명이 해석되어야 함이 이해될 것이다.

도면

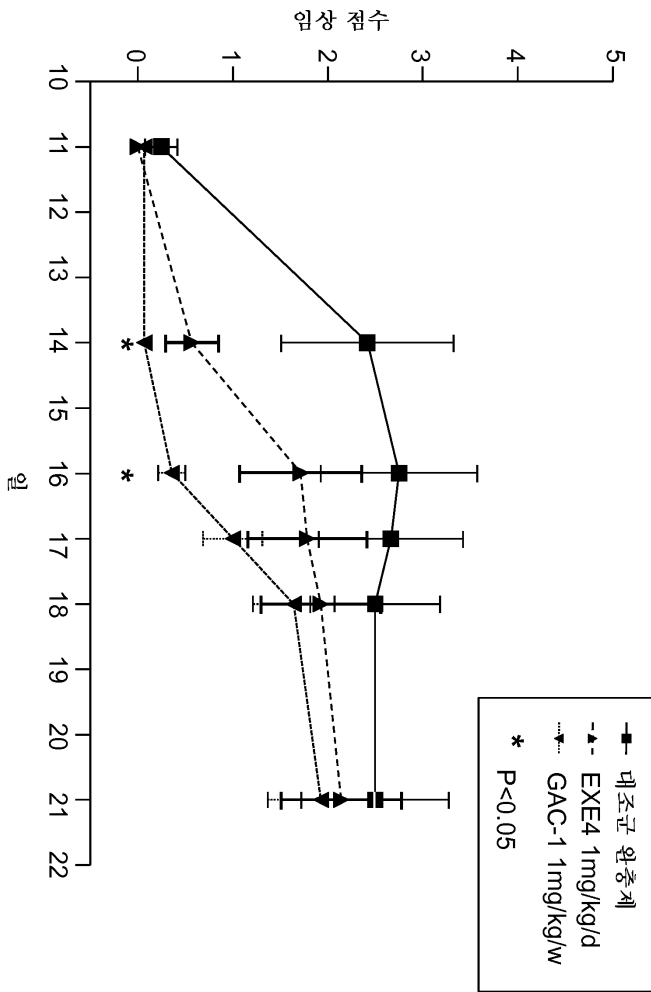
도면1



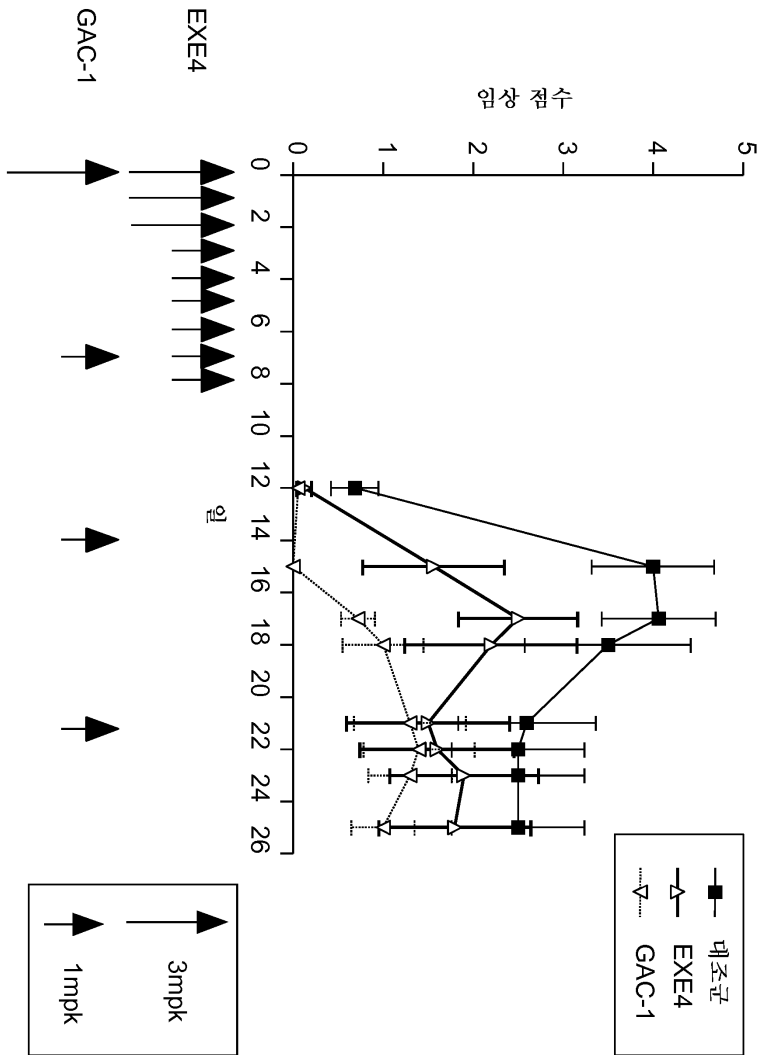
도면2



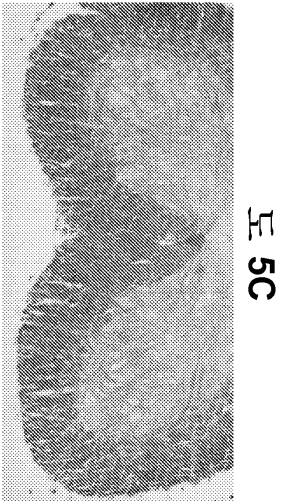
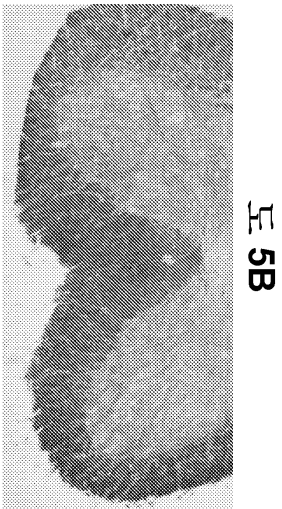
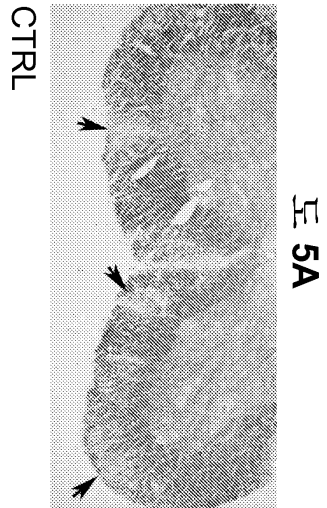
도면3



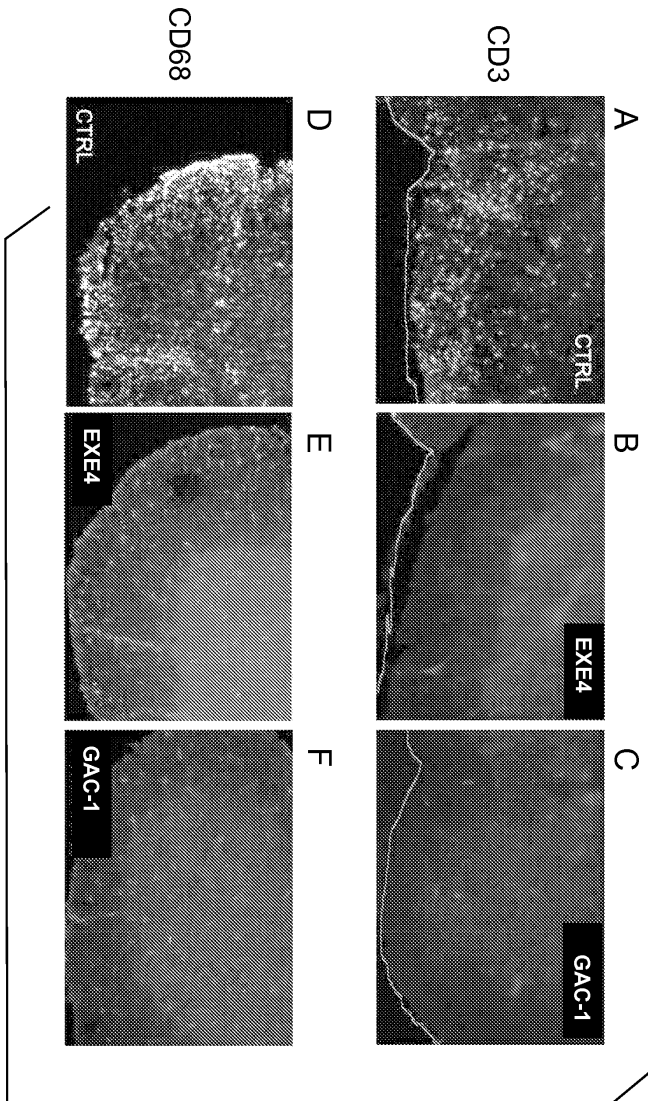
도면4



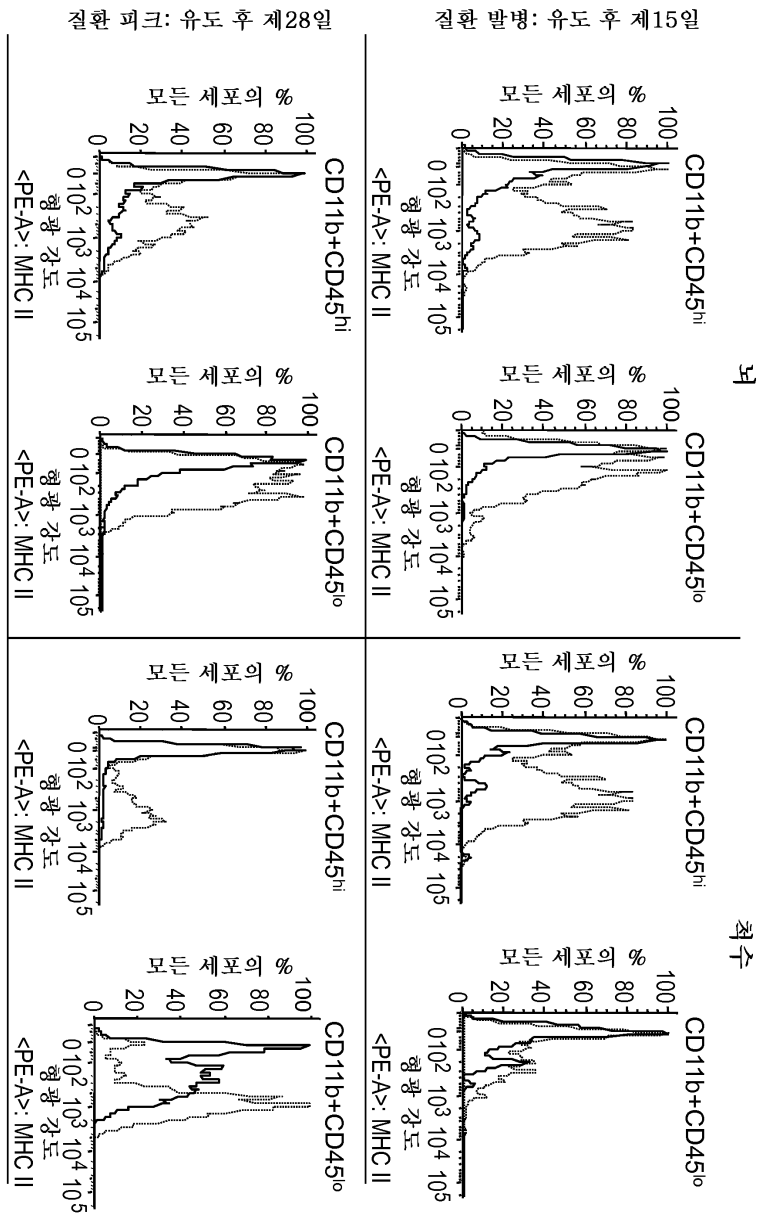
도면5



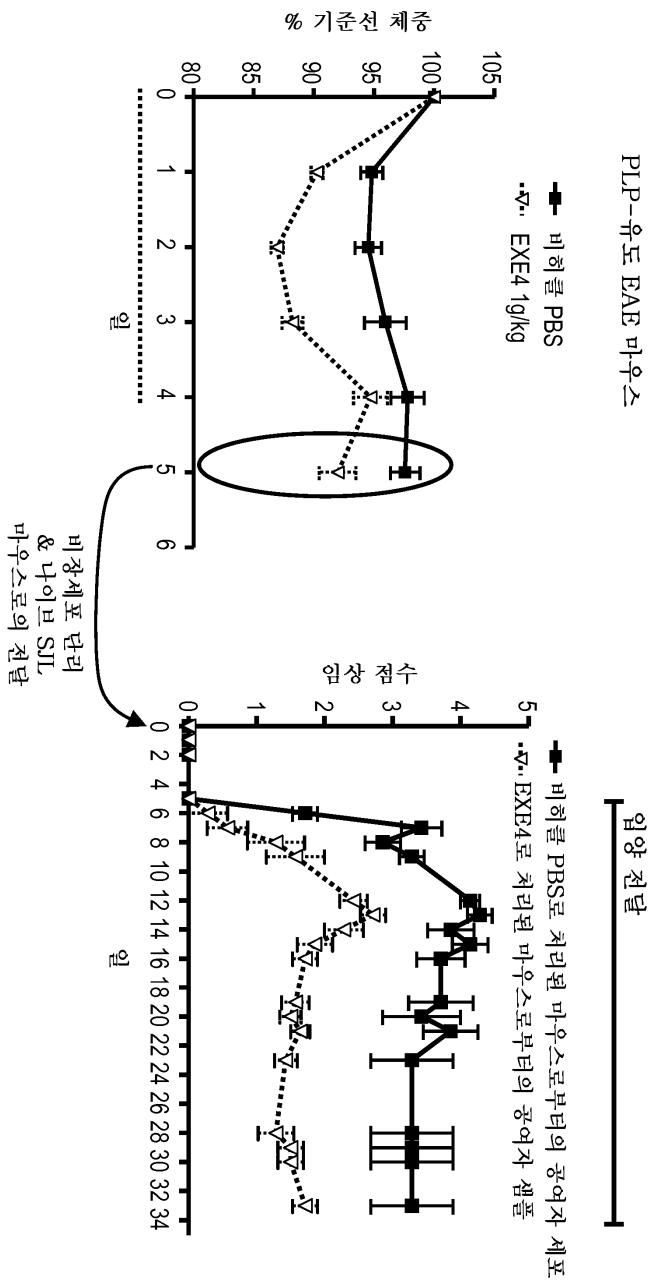
도면6



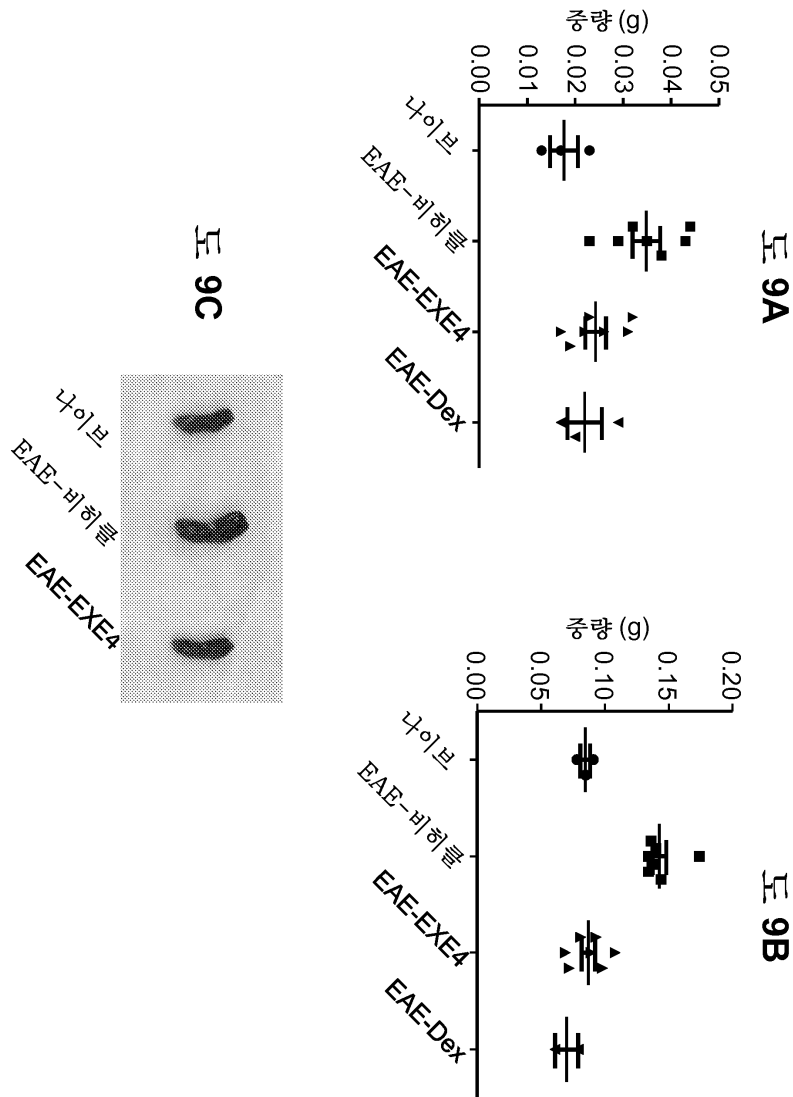
도면7



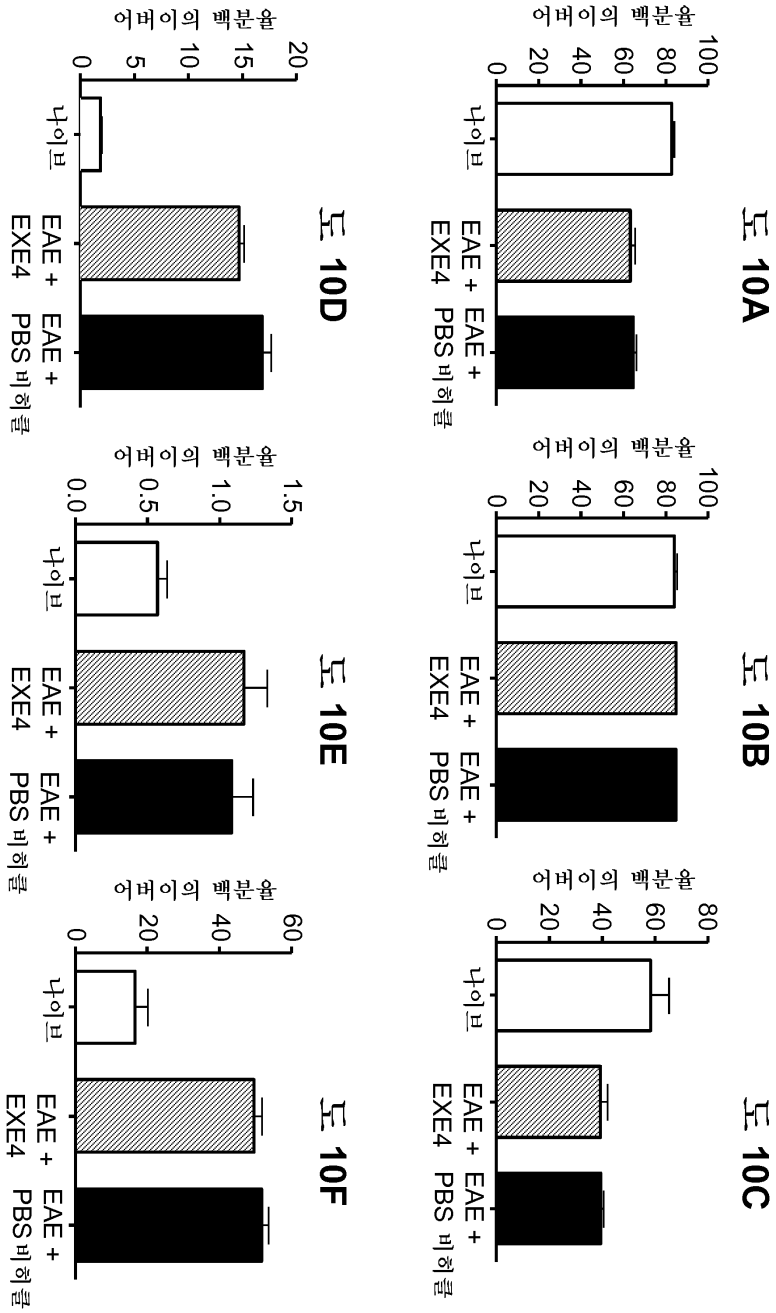
도면8



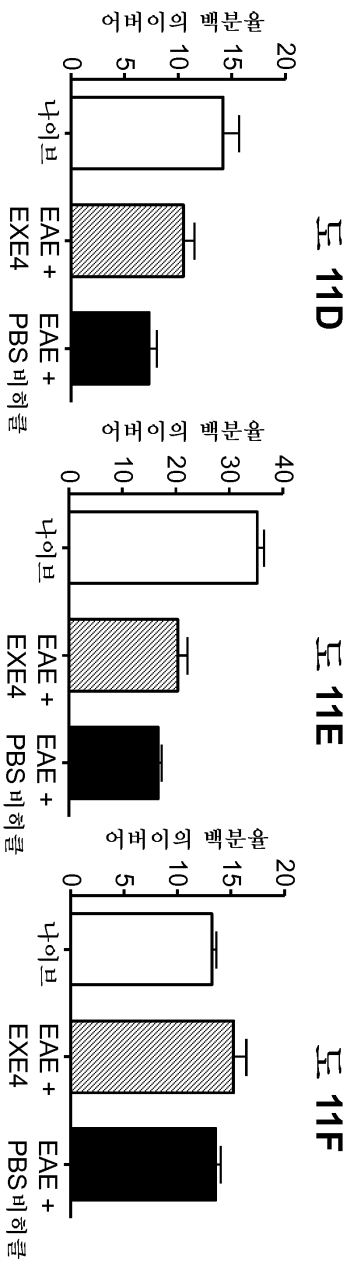
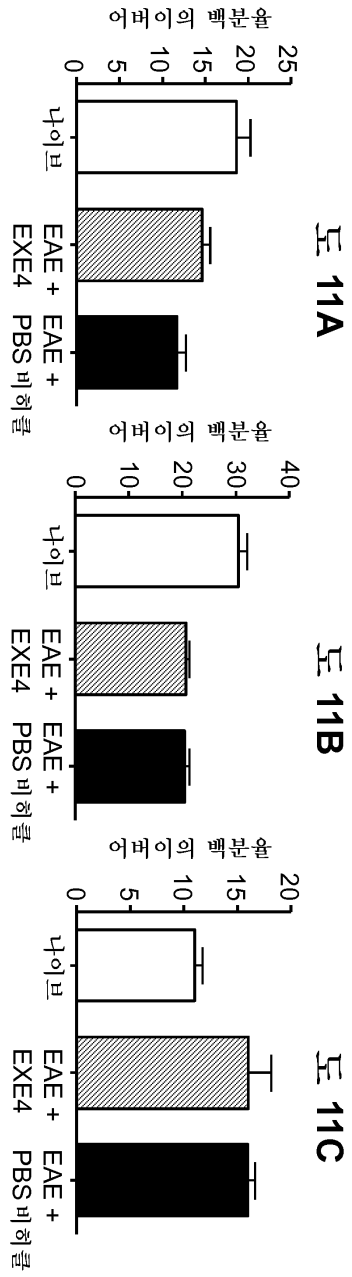
도면9



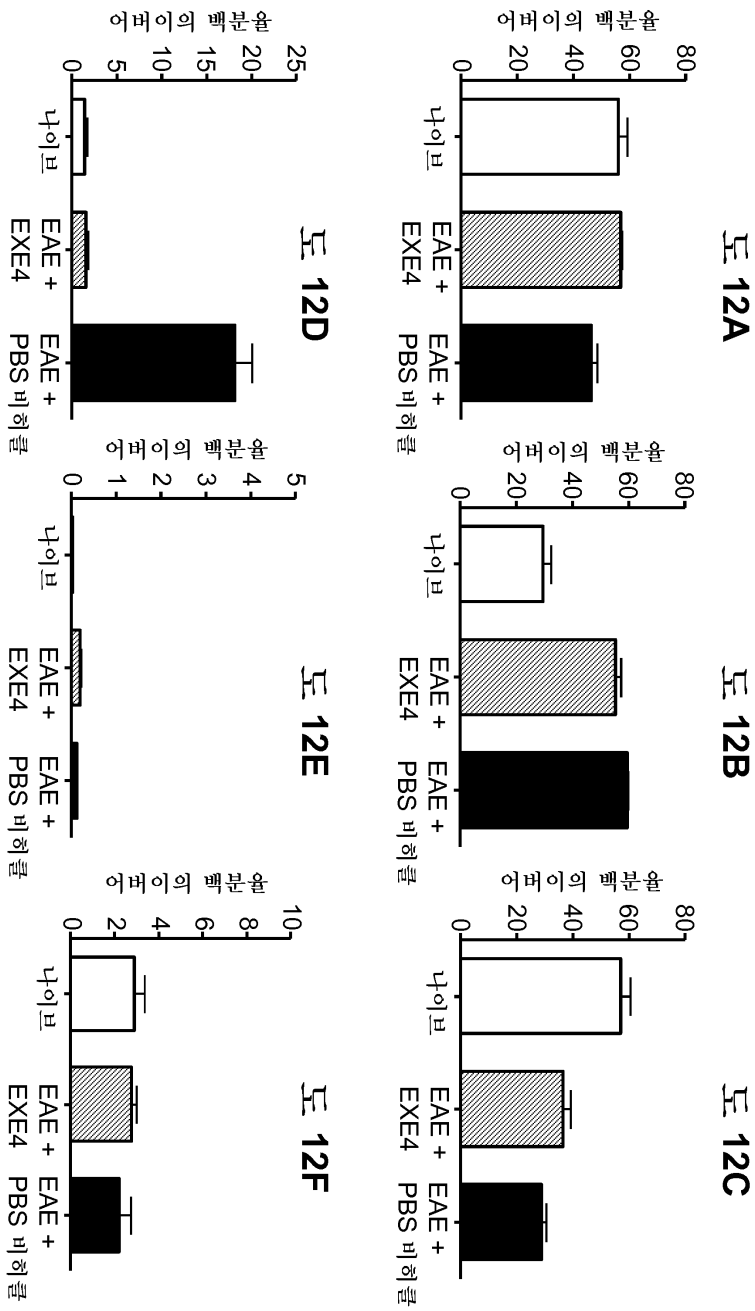
도면10



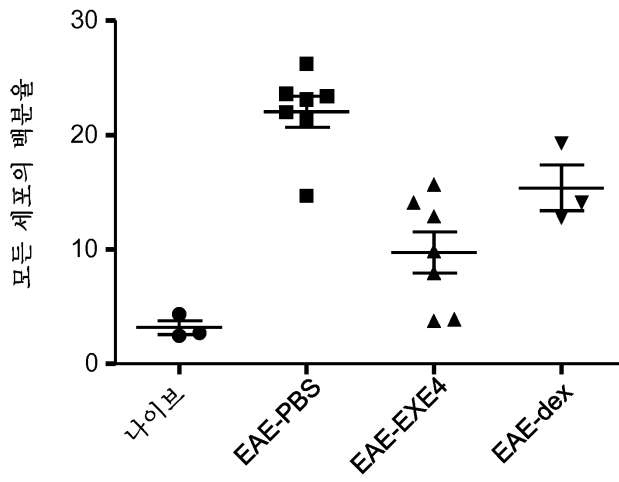
도면11



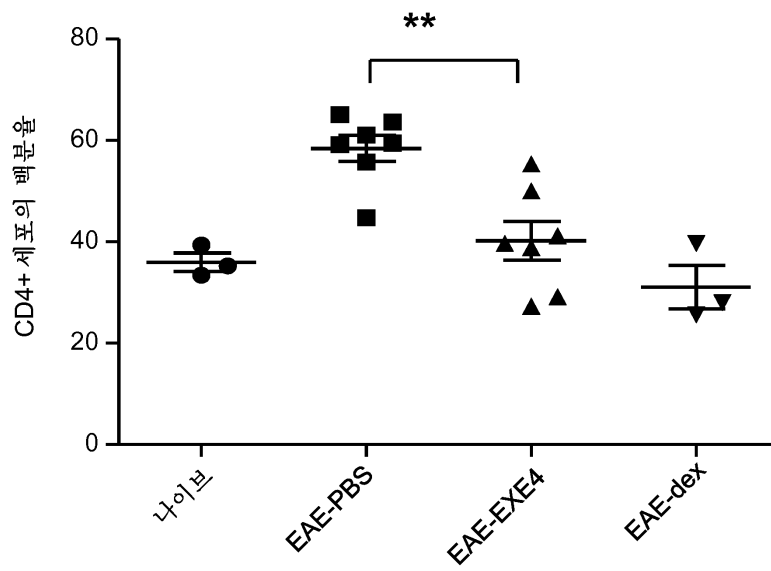
도면12



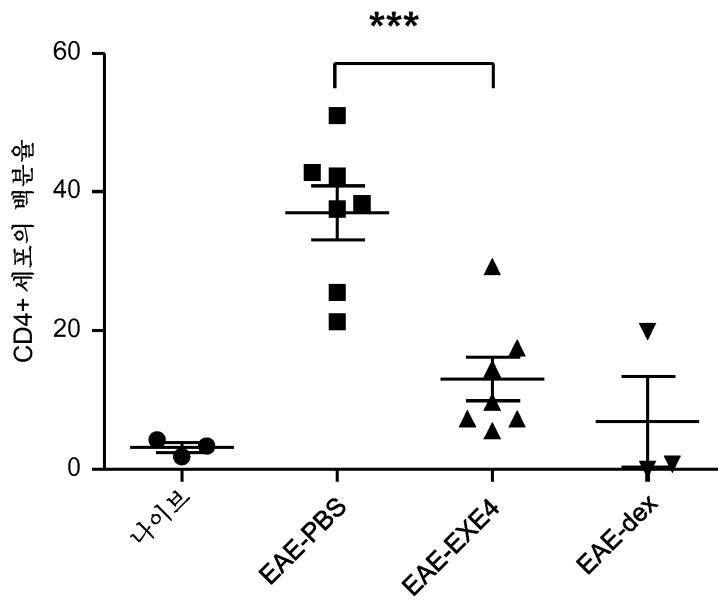
도면13



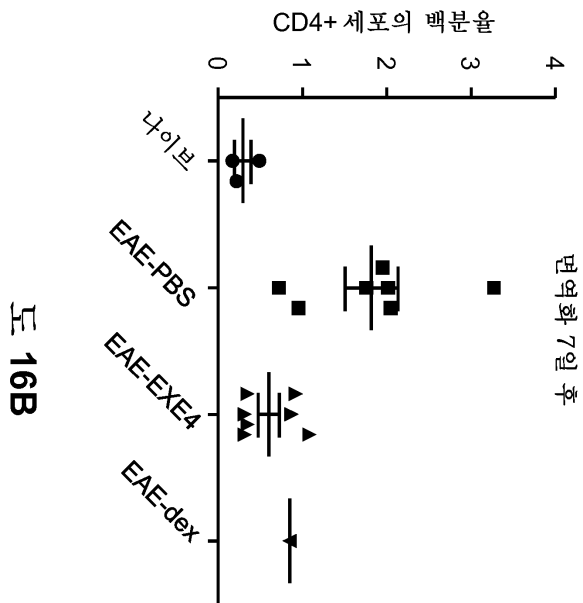
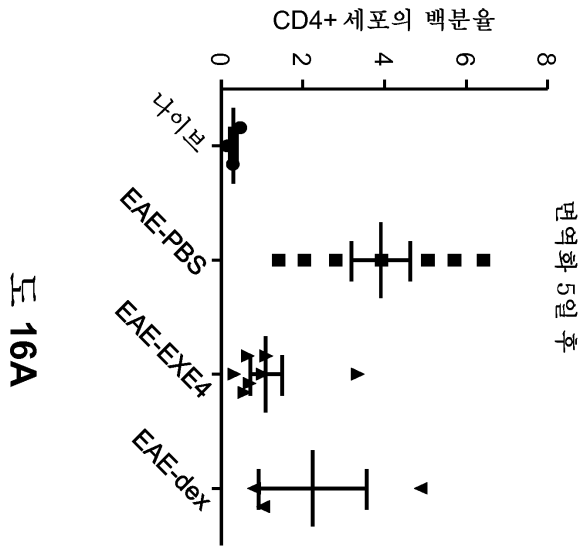
도면14



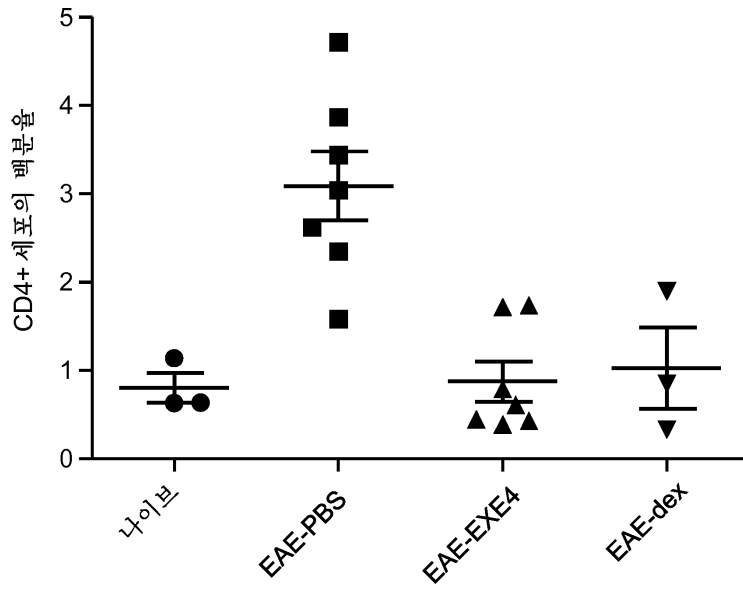
도면15



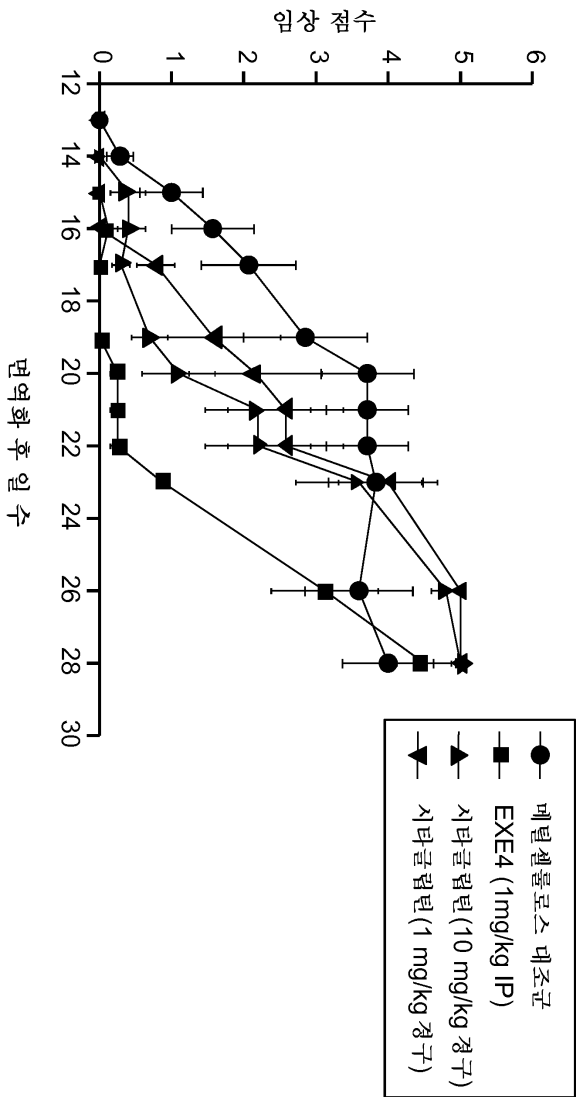
도면16



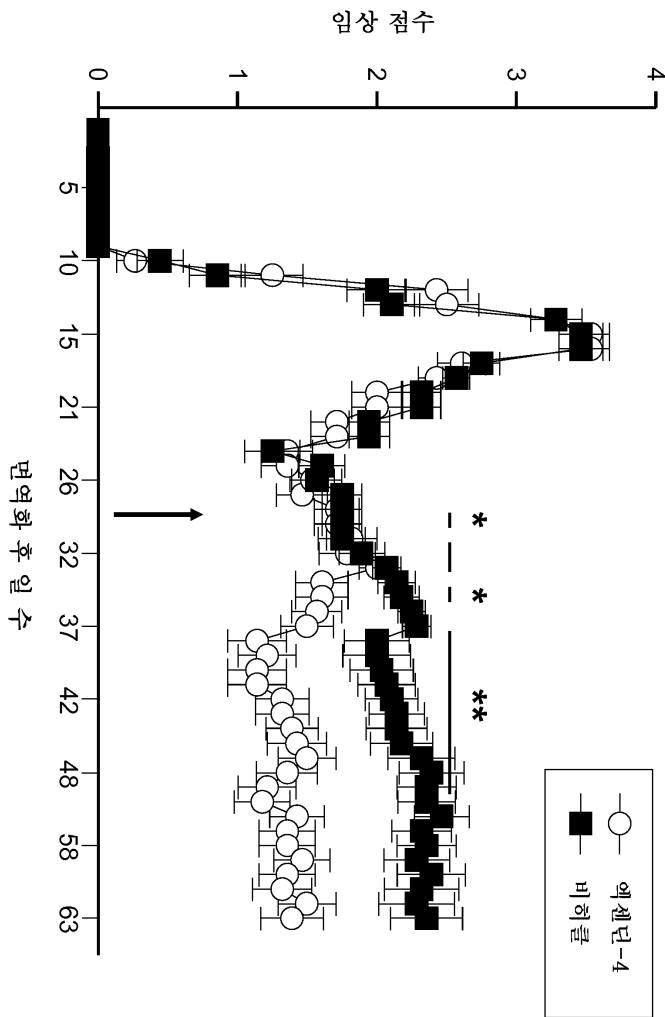
도면17



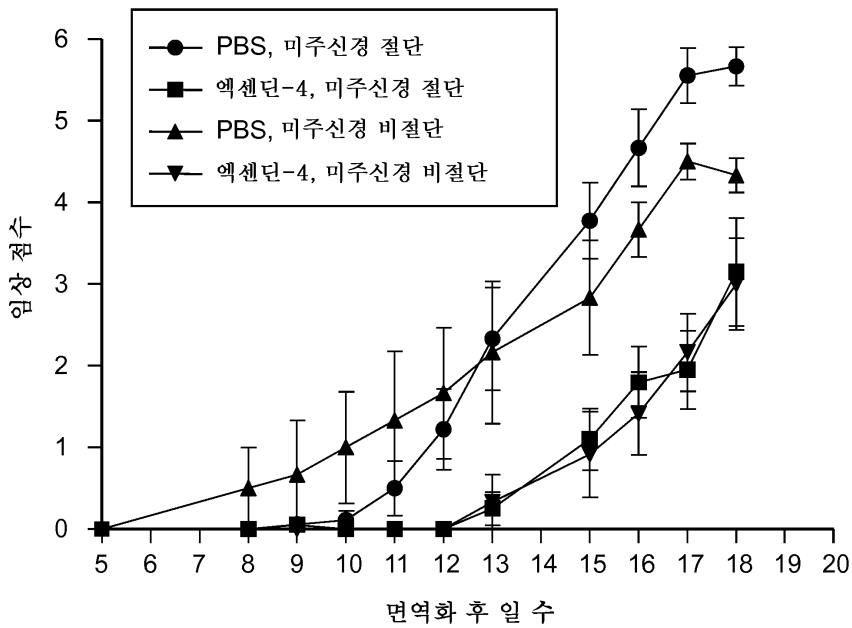
도면18



도면19



도면20



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> RINAT NEUROSCIENCE CORP.

<120> GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 RECEPTOR (GLP-1R) AGONISTS FOR TREATING
AUTOIMMUNE DISORDERS

<130> PC33892A

<150> US 61/237,654

<151> 2009-08-27

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1 variant

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 may be substituted with Aib, A, S, T, V, L, I or D-Ala, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa at position 10 may be substituted with V, L, I, or A, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa at position 12 may be substituted with S or K, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 may be substituted with Q or Y, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Xaa at position 14 may be substituted with G, C, F, Y, W, M, or L, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 may be substituted with K, D, E, or G, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa at position 17 may be substituted with E or Q, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa at position 19 may be substituted with L, I, V, or A, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa at position 20 may be substituted with ornithine or a derivatized lysine group such as K(SH) R, or K, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Xaa at position 21 may be substituted with L or E, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> Xaa at position 23 may be substituted with I or L, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Xaa at position 24 may be substituted with A or E, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> Xaa at position 25 may be substituted with W or F, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> Xaa at position 26 may be substituted with L or I, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa at position 27 may be substituted with I, K, or V, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Xaa at position 28 may be substituted with R, ornithine, N, or K,
in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 may be substituted with Aib or G, in no
particular order

<220><221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa at position 30 may be substituted with any amino acid,

preferably G or R, in no particular order

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa at position 31 may be substituted with P or absent, in no
particular order

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa at position 32 may be substituted with S or absent, in no
particular order

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> Xaa at position 33 may be substituted with S or absent, in no
particular order

<220><221> misc_feature

<222

> (34)..(34)

<223> Xaa at position 34 may be substituted with G or absent, in no
particular order

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa at position 35 may be substituted with A or absent, in no
particular order

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> Xaa at position 36 may be substituted with P or absent, in no

particular order

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> Xaa at position 37 may be substituted with P or absent, in no

particular order

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> Xaa at position 38 may be substituted with P or absent, in no

particular order

<220><221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> Xaa at position 39 may be substituted with S or absent, in no

particular order

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> Xaa at position 40 may be substituted with K, R, Y, C, T, S a
homolog of lysine (including K(SH)), homocysteine, homoserine, or
absent, in no particular order

<400> 3

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

1 5 10 15

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

35 40

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Aib

<400> 4

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa at position 40 is absent or substituted with K, R, Y, C, T,

S, a homolog of lysine (including K(SH)), homocysteine, or
homoserine, in no particular order.

<400> 5

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

 35 40

<210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Aib

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa at position 40 is absent or K, R, Y, C, T, S a homolog of lysine (including K(SH)), homocysteine, or homoserine, in no particular order.

<400> 6

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa

 35 40

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Aib

<400> 7

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

 35 40

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is Aib
 <400> 8
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Lys Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 9
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is Aib
 <400> 9
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Lys
 20 25 30

<210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is Aib
 <400> 10

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30
 <210> 11
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 Glu Leu 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 Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
 20 25 30
 Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

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

 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 12

<211> 448

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220><221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Aib

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220><221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Aib

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220><221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Aib

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)

<223> Aib
 <220><221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)

<223> Aib
 <400> 17

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Xaa Arg
 20 25 30

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220><221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)

<223> Aib
 <400> 18

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Val Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Ile Lys Xaa Arg
 20 25 30

<210> 19

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220><221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Aib
 <400> 19

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

1 5 10 15
 Gln Lys Val Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Ile Lys Xaa Arg
 20 25 30

<210> 20
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220><221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Aib
 <400> 20

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

1 5 10 15
 Gln Ala Val Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Ile Lys Xaa Arg Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40

<210> 21
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220><221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Aib
 <400> 21

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

 35

<210> 22

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

 35 40

<210> 23

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 23

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Lys Ser

35

<210> 24

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 24

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Lys Pro Pro Ser

35

<210> 25

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 25

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

 35

<210> 26

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 26

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

 35

<210> 27

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 27

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Lys Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 28

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 28

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 29

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 29

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 30

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 31

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 32
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <400> 32
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 33
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <400> 33
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 34
 <211> 39
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 34

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

 35

<210> 35

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 35

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

 35

<210> 36

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <400> 36
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Lys
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 37
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Synthetic
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> MOD_RES
 <400> 37
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Lys Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 38
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221>
 > MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <400> 38

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 39

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 39

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Lys Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 40

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 42

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 43

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OAP-189

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asn Asn Ile Ala

35