	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0071272 (43) 공개일자 2014년06월11일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01) C07K 14/775 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7020637 (22) 출원일자(국제) 2012년01월19일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년08월05일 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/021802 (87) 국제공개번호 WO 2012/100010 국제공개일자 2012년07월26일 (30) 우선권주장 61/434,196 2011년01월19일 미국(US)		(71) 출원인 유니버시티 오브 신시내티 미국 오하이오 45221 신시내티 스위트 240 굿맨 드라이브 51 (72) 발명자 초, 패트릭 미국 오하이오 45221 신시내티 스위트 240 굿맨 드라이브 51 데이비슨, 셀 미국 오하이오 45221 신시내티 스위트 240 굿맨 드라이브 51 (뒷면에 계속) (74) 대리인 에스앤아이피특허법인

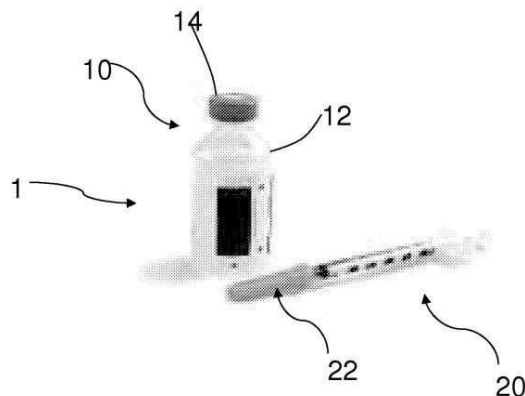
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 항 당뇨병 펩타이드로서의 아포리포프로테인 A I V

(57) 요약

처치가 필요한 대상에서 타입 2 진성 당뇨병의 치료 방법 및 타입 2 진성 당뇨병의 치료를 위한 약제학적 조성물이 개시된다. 상기 방법은 아포리포프로테인 A-IV의 유효 용량을 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 약제학적 조성물은 타입 2 진성 당뇨병의 치료를 위하여 대상에게 투여하기 위해 제제화된 아포리포프로테인 A-IV를 포함한다. 또한, 치료가 필요한 대상에서 글루코오스 내성을 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는 방법 및 처치가 필요한 대상에서 혈중 글루코오스 수준을 저하시키는 방법이 개시된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

우즈, 스티븐

미국 오하이오 45221 신시내티 스위트 240 굿맨 드
라이브 51

왕, 페이

미국 오하이오 45242 신시내티 폴싱톤 코트 10811

특허청구의 범위

청구항 1

아포리포프로테인 A-IV 또는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 90%의 동일성을 갖는 이의 생물학적 활성 유사체의 유효 용량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는 타입 II 진성 당뇨병의 치료 방법.

청구항 2

아포리포프로테인 A-IV 프로테인 또는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 90%의 동일성을 갖는 이의 생물학적 활성 유사체의 유효 용량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는 혈중 글루코오스 수준을 저하시키는 방법.

청구항 3

아포리포프로테인 A-IV 또는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 90%의 동일성을 갖는 이의 생물학적 활성 유사체의 유효 용량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는 글루코오스 내성을 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성 유사체는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 99%의 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상에게 아포리포프로테인 A-IV의 유효 용량이 투여되며, 여기서 상기 아포리포프로테인의 아미노산 서열은 아래와 같은 것을 특징으로 하는 방법:

X₁EVSDQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV
SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX₂LKAKIDQNVEELKGRTPYADEFKVKIDQTVEELRR
SLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQMKNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQME
QLRQKLGPAGDVEGHLSEFLKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX₃LSLPELEQQEQX₄QEQQEQVQMLAPLES

(서열 번호 4),

여기서, X₁ 은 G, A, V이거나 또는 없고;

X₂는 E 또는 K이고;

X₃ 는 T 또는 S이며; 그리고

X₄ 는 Q 또는 H임.

청구항 7

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV는 전장 인간 아포리포프로테인 A-IV인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV의 아미노산은

EVSDQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQ

KIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLA
 PYAQDTQEKLNHQLEGLTFQMKNAEELKARI SASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLR
 QKLGPAGDVEGHLSEFLKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQEQVQMLAPLES

(서열 번호 1) 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV의 아미노산 서열은:

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVS
 QKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSL
 APYAQDTQEKLNHQLEGLTFQMKNAEELKARI SASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQL
 RQKLGPAGDVEGHLSEFLKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQEQVQMLAPLES

(서열 번호 3) 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV는 글리코실화된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV 글리코실화되지 않은 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV는 전신적(systemically) 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체의 전신적 투여는 구강, 피하, 정맥 내, 근육 내 및 복강 내 투여로 구성되는 그룹에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 약 1 내지 약 10 μ g/g의 용량으로 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 약 0.25 내지 약 2 μ g/g의 용량으로 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 약 1 μ g/g의 용량으로 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 일일 1회 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 일일 약 2회 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

타입 II 진성 당뇨병 치료를 위하여 대상에 투여하기 위해 제제화된 제 1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 약제학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제를 더 포함함을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 21

제 19항 또는 제20항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 액체 제제임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 22

제19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 수성 제제임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 수성 제제는 발열성 물질이 없는 것임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제 19항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 조성물의 유효 용량을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는 타입 II 진성 당뇨병의 치료 방법.

명세서

기술 분야

[0001] [관련 출원들]

[0002] 본 출원은 2011년 1월 19일에 출원된 미국 가출원(U.S. Provisional Application) 제 61/434,196호의 이익을 주장하며, 상기 출원 전체의 교시 사항은 본원에 참조로서 편입된다.

[0003] [기술 분야]

[0004] 본원의 개시는 당뇨병의 치료 방법에 관련된다. 보다 구체적으로, 본원의 개시는 유효 용량의 아포리포프로테인 A-IV를 투여함으로써 타입 2 진성 당뇨병을 치료하는 방법에 관련된다.

배경 기술

[0005] 당뇨병의 발생은 광범위하며, 미국 인구의 대략 8%가 당뇨병으로 고통받고 있다. 당뇨병은 인체가 인슐린을 효과적으로 생산 및/또는 사용할 수 없게 됨에 기인하는 높은 혈당으로 특징지어지는 만성 질병이다. 당뇨병은 다양한 신체적 합병증에 이르게 할 수 있는데, 이에 제한되는 것은 아니나, 신부전(renal failure), 실명, 신경 손상, 심장 질환, 수면성 무호흡 및 소아지방변증(celiac disease)이 포함된다. 예를 들면, 미국에서, 당뇨병은 신부전, 실명, 절단수술(amputation), 뇌졸중(stroke) 및 심장 발작(heart attack)의 주된 원인이다. 또한, 미국에서 당뇨병은 6대 사망 원인이며 중년 성인의 기대 수명을 약 5 내지 10년 감소시키는 것으로 나타나고 있다.

[0006] 가장 흔한 형태의 당뇨병은 타입 2 진성 당뇨병 (이하에서 "T2DM"이라 함)이다. T2DM은 고혈당증(hyperglycemia), 인슐린 저항성(resistance), 베타(β)-세포 기능장애(dysfunction), 그리고 간에서의 포도당 신합성 장애(dysregulated hepatic gluconeogenesis)로 특징 지워 진다. T2DM으로 고통받는 사람들은 인슐린 분비의 제 1 단계(phase) 에서 베타(β)-세포들로부터 저장된 인슐린 과립들의 손상된 방출과 관련된 글루코오스-촉진된 인슐린 분비의 손실을 경험한다. 인슐린 분비의 제 2 단계에서, T2DM으로 고통받는 사람들은 글루코오스 자극에 반응하여 인슐린을 활발히 합성하는 능력의 점진적 손실을 경험한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] T2DM의 횡행은 증가하고 있으며 2002년에, T2DM은 \$130 조 이상의 의료 보험 비용을 초래하였다. 따라서, T2DM을 효과적으로 치료하는 새로운 치료 요법이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0008] [요약]

[0009] 본원의 개시는 아포리포프로테인 A-IV가 T2DM의 해결에 밀접하게 관련된 효과적인 항-당뇨병 펩타이드라는 놀라운 발견에 기초한 것이다. 아포리포프로테인 A-IV는 식후(post-prandial) 글루코오스 내성에 기여하는 주요 장 호르몬(gut hormone)이며 글루코오스 내성의 개선에서 이전에 알지 못했던 매개체로서 작용한다. 따라서, 일 실시예에서, 치료가 필요한 대상에서 T2DM를 치료하는 방법이 개시된다. 상기 방법은 대상에게 유효 용량의 아포리포프로테인 A-IV 또는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖는 이의 생물학적 활성 유사체를 투여하는 것을 포함한다.

[0010] 다른 실시예에서, 아포리포프로테인 A-IV를 포함하는 약제학적 조성물이 개시된다. 상기 약제학적 조성물은 T2DM의 치료를 위하여 대상에 투여하기 위해 제제화된 아포리포프로테인 A-IV 또는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖는 이의 생물학적 활성 유사체를 포함한다.

[0011] 또 다른 실시예에서, 처치가 필요한 대상에서 글루코오스 내성을 정상적 수준으로 실질적으로 회복시키는 방법이 개시된다. 상기 방법은 대상에게 유효 용량의 아포리포프로테인 A-IV 또는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖는 이의 생물학적 활성 유사체를 투여하는 것을 포함하는데, 예를 들면, 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체를 전신적 투여에 의하여 투여하는 것을 포함한다.

[0012] 또 다른 실시예에서, 처치가 필요한 대상에서 혈중 글루코오스 수준을 저하시키는 방법이 개시된다. 상기 방법은 처치가 필요한 대상에게 유효 용량의 아포리포프로테인 A-IV 또는 아포리포프로테인 A-IV와 적어도 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖는 이의 생물학적 활성 유사체를, 예를 들면 전신적 투여로, 투여하는 것을 포함한다. "유효 용량"은 이하에서 상세히 설명되며 apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체의 약 0.25 내지 2 μ g/g을 포함한다.

발명의 효과

[0013] 본원의 개시 사항에 따른 이들 그리고 이들의 다른 특징 및 이들의 장점들 및 다른 다양한 실시예들은 본원 명세서에서 제공되는 도면, 상세한 설명 및 청구항들에 비추어 더욱 명확할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 이하의 본원의 개시의 실시예들의 상세한 설명은 하기의 도면들과 결합하여 독해하면 더욱 잘 이해될 수 있으며, 여기서 유사한 구조들은 유사한 도면 부호로 지시된다. :

도 1은 본원의 개시의 실시예에 따른 약제학적 조성물의 저장소 및 주사기를 갖는 장치의 측면 사시도이다.

도 2는 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 위한 시간(분)에 대한 수컷 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 및 야생-타입 마우스들에서의 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 3은 16개월령의 아포리포프로테인 A-IV 야생-타입 그리고 녹아웃 동물들에서 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 위한 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 4는 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 위한 재조합 아포리포프로테인 A-IV (μ g/g) 또는 식염수의 복강 내의 투여에 따른 수컷 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 마우스들에서의 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 5는 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 위한 재조합 아포리포프로테인 A-I 또는 식염수의 복강 내의 투여에 따른 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 마우스들에서의 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 6은 재조합 아포리포프로테인 A-I 또는 식염수의 복강 내의 투여에 따른 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 마

우스들에서의 시간(분)에 대한 인슐린 분비 (ng/mL)의 그래프이다.

도 7은 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 위한 만성 고-지방 식이의 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 그리고 야생-타입 마우스들에서의 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/mL)의 그래프이다.

도 8은 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 위한 재조합 마우스 아포리포프로테인 A-IV (1 μ g/g) 또는 식염수의 복강 내의 투여에 따른 만성 고-지방 식이의 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 마우스들에서의 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/mL)의 그래프이다.

도 9는 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 위한 재조합 마우스 아포리포프로테인 A-IV (1 μ g/g)의 복강 내의 투여에 따른 당뇨병 마우스들에서의 시간(시간)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 10은 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 마우스들, 야생-타입 마우스들, 그리고 아포리포프로테인 A-I 녹아웃 마우스들에서 혈청 아밀로이드 A 단백질 성분의 수준에 대한 웨스턴 블랏(Western blot) 분석의 결과를 도시한다.

도 11은 복강 내의 글루코오스 내성 테스트 (IPGTT) 동안에 암컷 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 그리고 야생-타입 마우스들에서의 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 12는 복강 내의 글루코오스 내성 테스트 동안에 1.0 μ g/g 인간 아포리포프로테인 A-IV 또는 식염수의 복강 내 투여에 따른 야생 타입 마우스들에서의 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 13은 복강 내의 글루코오스 내성 테스트 동안의 1.0 μ g/g 재조합 마우스 아포리포프로테인 A-IV 또는 식염수의 복강 내의 투여에 따른 암컷 야생 타입 마우스들에서의 시간(분)에 대한 혈장 글루코오스 (mg/dL)의 그래프이다.

도 14는 3mM 또는 20mM 글루코오스의 존재 하에 30mM KCl 그리고 250 μ M 디아족사이드에 의하여 비극화된 (depolarized) 인간 섬(islets)에 대한 10 μ g/g 인간 apoA-IV의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 15는 전장 야생 타입 인간 아포리포프로테인 A-IV (서열 번호 1)의 아미노산 서열을 갖는 단백질이다.

도 16은 전장 야생 타입 마우스 아포리포프로테인 A-IV (서열 번호 2)의 아미노산 서열을 갖는 단백질이다.

도 17은 N-말단에 글라이신의 부가를 갖는 전장 야생 타입 인간 아포리포프로테인 A-IV의 아미노산 서열을 갖는 단백질이다. (서열 번호 3).

도 18은 다형(polymorphic) 치환들 T347S, Q360H, 및/또는 E165K 그리고 N-말단에 글라이신, 알라닌 또는 발린의 선택적 부가(addition)를 나타내는 인간 아포리포프로테인 A-IV의 아미노산 서열을 갖는 단백질이다. (서열 번호 4).

도 19는 전장 야생 타입 인간 아포리포프로테인 A-IV를 인코딩(encoding)하는 폴리뉴클레오타이드 (서열 번호 5) 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 통상의 기술자들은 도면의 요소들이 단순성과 명확성을 위하여 도시된 것이며 반드시 축적에 따라 도시된 것이 아님을 이해할 것이다. 본원의 개시 사항의 다양한 실시예들의 이해를 증진시키기는 것을 돕기 위하여, 예를 들면, 도면들에서 일부 요소들의 차원들은 다른 요소들에 비하여 과장될 수 있음은 물론, 전통적인 부분들은 생략될 수 있다.

[0016] [발명의 상세한 설명]

[0017] 다음의 용어들이 본원 명세서에서 사용된다:

[0018] 여기서 사용되는, "유효 용량"이라는 용어는 소망하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요한 또는 충분한 용량을 묘사한다. 여하한 특정 용도를 위한 유효 용량은 투여되는 특성의 조성물, 대상의 크기, 및/또는 질환의 중증도(severity) 및/또는 처치되는 상태를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 요소들에 따라 변화될 수 있을 것이다. 일 실시예에서, "유효 용량"은 약 0.25 내지 10 μ g/g의 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체의 복용량이다. 대안적으로, apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체의 "유효 용량"은 약 1 내지 10 μ g/g, 약 0.25 내지 2 μ g/g, 또는 약 1 μ g/g이다. apoA-IV 또는 생물학적 활성 유사체는 1일 1회 투여된다. 대안적으로, apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 1일당 약 2회 투여된다. 또 다른 대안에서, apoA-IV 또는 이

의 생물학적 활성 유사체는 하루에 2회 이상 투여되는데, 예를 들면, 1일에 3회이다. 또 다른 대안에서, apoA-IV는 2일에, 3일에, 4일에, 5일에 또는 6일에 1회, 또는 일주일에 1회 투여된다.

- [0019] 여기서 사용되는, "소망하는(desired) 생물학적 효과"라는 용어는 질병 또는 상태의 효과를 감소시키거나, 대항하거나, 및/또는 제거하는 것을 표현한다. 예를 들면, T2DM의 맥락에 있어서, 소망하는 생물학적 효과들에는, 이들에 제한되는 것은 아니나, 혈중 글루코오스 저하, 글루코오스 내성 개선, 글루코오스 내성을 정상 수준으로 실질적으로 회복, 인슐린 분비 개선, 및/또는 인슐린 분비를 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는 것이 포함된다.
- [0020] 여기서 사용되는, "정상 수준"이라는 용어는 치료를 필요로 하지 않는 대상에서의 수준과 실질적으로 동일한 수준을 나타낸다. 예를 들면, T2DM의 치료의 맥락에서, 혈중 글루코오스의 정상 수준은 식사 전에 약 70 mg/dL 내지 약 130 mg/dL이며 식사 후 약 1 내지 2 시간 후에 약 180 mg/dL 보다 낮은 것이거나, 또는 식사 전에 약 70 mg/dL 내지 약 100 mg/dL이며 식사 후 약 1 내지 2 시간 후에 약 140 mg/dL보다 낮은 것이다. 다른 실시예에서 T2DM의 치료 맥락에서, 글루코오스 내성의 정상 수준은 대상의 탄수화물 대사 능력을 나타내므로 혈중 글루코오스 수준이 식사 전에 약 70 mg/dL 내지 약 130 mg/dL이고 식사 후 약 1 내지 2 시간 후에 약 180 mg/dL보다 낮은 것이거나, 또는 식사 전에 약 70 mg/dL 내지 약 100 mg/dL이며 식사 후 약 1 내지 2 시간 후에 약 140 mg/dL보다 낮은 것이다. 또 다른 실시예에서 T2DM의 치료 맥락에서, 인슐린 분비의 정상 수준은 글루코오스 내성의 정상 수준을 유지하기 위하여 필요한 용량이며, 여기서 인슐린 분비의 수준은 식사 약 15시간 후에 약 1 ng/mL보다 높은 것이다.
- [0021] 혈중 글루코오스 수준의 맥락에서, "회복(restore)"이라는 용어는 대상의 혈중 글루코오스 수준을 정상 수준으로 변화시키는 것을 나타낸다. 유사하게, 글루코오스 내성의 맥락에서, "회복"이라는 용어는 대상의 글루코오스 내성을 정상 수준으로 변화시키는 것을 나타낸다. 또한, 인슐린 분비의 맥락에서, "회복"은 대상의 인슐린 분비를 정상 수준으로 변화시키는 것을 나타낸다.
- [0022] 아포리포프로테인 A-IV의 맥락에서, "생물학적 활성 단편(fragment)"이라는 용어는 T2DM을 갖는 대상에서 소망하는 생물학적 효과를 실현할 수 있는 아포리포프로테인 A-IV의 단편을 나타낸다. "생물학적 활성 유사체"라는 용어는 T2DM을 갖는 대상에서 소망하는 생물학적 효과를 실현할 수 있는 아포리포프로테인 A-IV의 유사체를 나타낸다. 일 실시예에서, 소망하는 생물학적 효과는 실시예 2에 개시된 바와 같이 apoA-IV 녹아웃 마우스들에서 글루코오스 내성을 회복시키는 것이다. 소망하는 생물학적 효과의 다른 실시예는, T2DM의 동물 모델, 이를테면 실시예 7에 개시된 마우스 모델에서, 비정상적 글루코오스 수준을 통계학적으로 현저하게 저하시키는 것을 일으키는 것이다.
- [0023] 여기서 사용되는, "비만(obese)"이라는 용어는 정상 체중을 충분히 넘는 대상의 상태를 나타낸다. 특정의 일 실시예에서, 비만이라는 용어는 대상이 그들의 이상적 체중을 약 20% 이상 초과하거나 및/또는 약 30 또는 약 30 보다 큰 체질량 지수(body mass index)를 갖는 상태에 있는 것을 나타낸다. 일 실시예에서, 처치되는 대상은 비만이며; 다른 실시예에서, 처치되는 대상은 비만이 아니고; 그리고 또 다른 실시예에서, 처치되는 대상은 정상 체중을 갖는다.
- [0024] 본원의 개시 사항의 실시예들은 처치가 필요한 대상에서 T2DM를 치료하는 방법 및 T2DM의 치료를 위한 약제학적 조성물에 관련된다. 일 실시예에서, 당뇨병을 치료하는 방법이 개시된다. 특정한 일 실시예에서, 처치가 필요한 대상에서 T2DM를 치료하는 방법이 개시되는데, 여기서 상기 방법은 유효 용량의 아포리포프로테인 A-IV (이하에서 "apoA-IV"라 함) 또는 이의 생물학적 활성 유사체를 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0025] 일 실시예에서, T2DM치료 방법은 대상의 혈중 글루코오스 수준을 저하시키는데 효과적이다. 특정한 일 실시예에서, 상기 방법은 대상의 혈중 글루코오스 수준을 약 20 내지 50% 저하시키는데 효과적이다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 대상의 혈중 글루코오스 수준을 약 40% 저하시키는데 효과적이다. 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 혈중 글루코오스 수준을 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는데 효과적이다.
- [0026] 다른 실시예에서, T2DM를 치료하는 방법은 대상의 글루코오스 내성을 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는데 효과적이다. 특정한 일 실시예에서, 상기 방법은 대상의 글루코오스 내성을 apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체의 복용량의 투여 후 약 2시간 이내에 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는데 효과적이다. 다른 실시예에서, 대상의 글루코오스 내성은 약 8 내지 12 시간 동안 정상 수준으로 실질적으로 회복된다.
- [0027] 또 다른 실시예에서, 상기 치료는 인슐린 분비를 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는데 효과적이다. 특정한 일 실시예에서, 상기 치료는 apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체의 복용량 투여 후 약 2시간 이내에 인슐

린 분비를 정상 수준으로 실질적으로 회복시키는데 효과적이다. 다른 실시예에서, 인슐린 분비는 약 8 내지 12 시간 동안 실질적으로 정상 수준으로 회복된다. 또 다른 실시예에서, 상기 치료는 C-반응성(reactive) 단백질의 수준을 저하시키는데 효과적이다.

[0028] 일 실시예에서, apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 전신적으로(systemically) 투여된다. apoA-IV 또는 이의 유사체의 전신적 투여는 경구, 피하, 정맥 내, 근육 내, 그리고 복강 내의 투여로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0029] 다른 실시예에서, 약제학적 조성물이 개시된다. 특정한 일 실시예에서, 상기 약제학적 조성물은 apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 apoA-IV 또는 이의 유사체는 T2DM의 치료를 위하여 대상에 투여하기 위해 제제화된다. 이 특정의 실시예에서, 처치가 필요한 대상에서 T2DM를 치료하는 방법이 또한 제공되는데, 여기서 상기 방법은 대상에게 약제학적 조성물의 유효 용량을 투여하는 것을 포함한다.

[0030] "아포리포프로테인 A-IV"(여기서 또한 "apoA-IV" 라고도 지시됨)라는 용어는 포유류 apoA-IV를 지시하며 전장(full-length) apoA-IV 그리고 apoA-IV의 생물학적 활성 단편들을 포함한다. 전장 인간 apoA-IV는 376 아미노산 단백질(서열 번호 1)이며, 이의 아미노산 서열은 도 15에 도시되고; 전장 마우스 apoA-IV (서열 번호 2)의 아미노산 서열은 도 16에 도시된다. 또한, "아포리포프로테인 A-IV"이라는 용어에 의하여 포괄되는 것은 글라이신이 전장 인간 서열의 아포리포프로테인 A-IV의 N-말단에 부가된 공지된 유사체(서열 번호 3, 도 17에 도시됨), 그리고 N-말단 글라이신에 대한 보존적 치환들을 갖는(이를테면 알라닌 및 발린) 이의 유사체들이다. "아포리포프로테인 A-IV"은 또한 이의 다형체들(polymorphic forms)을 포함하는데, 서열 번호 1로 대표되는 인간 서열, 또는 서열 번호 3의 대응되는 위치들,에 대한 T347S, Q360H, 또는 E165K 치환들을 포함한다. 따라서, "아포리포프로테인 A-IV"는 서열 번호 4의 단백질, 도 18에 도시됨, 을 포함한다.

[0031] 아포리포프로테인 A-IV의 생물학적 활성 유사체는 아포리포프로테인 A-IV과적어도 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖는다. 위 단락에서 설명한 바와 같이, 아포리포프로테인 A-IV는 전장 포유류 아포리포프로테인 A-IV (예컨대, 인간 또는 포유류), 이의 다형체들, 서열 번호 3 및 4의 단백질 그리고 전술한 여하한 것의 생물학적 활성 단편들을 포함한다. 생물학적 활성 유사체들에서의 아미노산 변이들은 바람직하게는 야생 타입 서열들에 대하여 보존적 치환들을 갖는다. "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산의 동일한 네트(net) 전기적 하전 및 대략적으로 동일한 크기 및 형태를 갖는 다른 아미노산으로의 대체이다. 지방족 또는 치환된 지방족 아미노산 측쇄들을 갖는 아미노산 잔기들은 총 탄소 수 및 그들의 측쇄들의 헤테로원자가 약 4 이하로 상이한 경우 대략적으로 동일한 크기를 갖는다. 그들은 그들의 측쇄들 내의 분지 수가 1 이하로 상이한 경우 대략적으로 동일한 형태를 갖는다. 그들의 측쇄들에 페닐 또는 치환된 페닐 그룹들을 갖는 아미노산 잔기들은 대략 동일한 크기 및 형태를 갖는 것으로 간주된다. 이하에 아미노산들의 5 그룹들이 열거된다. 한 아미노산 잔기를 동일한 그룹으로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체하는 것은 보존적 치환을 초래한다:

[0032] 그룹 I: 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 그리고 C1-C4 지방족 또는 C1-C4 하이드록실 치환된 지방족 측쇄들(직쇄 또는 단일 분지됨)을 갖는 비-천연 발생(non-naturally occurring) 아미노산들.

[0033] 그룹 II: 글루탐릭 애시드, 아스팔릭 애시드 그리고 카르복실릭 애시드 치환된 C1-C4 지방족 측쇄들(비분지된 또는 하나의 분지점(branch point))을 갖는 비-천연 발생 아미노산들.

[0034] 그룹 III: 라이신, 오르니틴, 아르기닌 그리고 아민 또는 구아니디노 치환된 C1-C4 지방족 측쇄들(비분지된 또는 하나의 분지점)을 갖는 비-천연 발생 아미노산들

[0035] 그룹 IV: 글루타민, 아스파라긴 그리고 아마이드 치환된 C1-C4 지방족 측쇄들(비분지된 또는 하나의 분지점)을 갖는 비-천연 발생 아미노산들.

[0036] 그룹 V: 페닐알라닌, 페닐글라이신, 티로신 그리고 트립토판.

[0037] 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 글리코실화되거나 또는 글리코실화되지 않을 수 있다. 재조합 글리코실화되지 않은 인간 및 마우스 아포리포프로테인 A-IV의 제조는 실시예 11에서 상세히 설명된다. 전장 야생 타입 인간 아포리포프로테인(서열 번호 1)의 폴리뉴클레오타이드 서열은 도 18의 서열 번호 4에 도시된 바와 같다. 실시예들 1-10에 사용된 아포리포프로테인 A-IV은 글리코실화되지 않는다. apoA-IV는 분자 생물학 분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들면, apoA-IV는 전통적인 분자 클로닝 기술을 통하여 제조될 수 있다.

- [0038] 실시예들에서 사용된 아포리포프로테인 A-IV 녹아웃 마우스들은 J Lipid Res. 1997 Sep;38(9):1782-94에 개시된 절차에 따라 생성되었으며, 이 문헌의 전체의 교시는 본원에 참조로서 편입된다.
- [0039] 특정한 일 실시예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 수용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 약제학적으로 수용가능한 담체들은 광범위한 공지된 희석제들(즉, 용제들), 충전제들, 확장제들(extending agents), 바인더들, 현탁화제들, 봉해제들, 계면 활성제들, 윤활제들, 부형제들, 습윤제들 그리고 이 분야에서 통상적으로 사용되는 이와 유사한 것들을 포함한다. 약제학적 조성물은 바람직하게는 수성, 즉, 액체 제제이며, 그리고 바람직하게는 발열성 물질 없는 물을 포함한다. 이들 담체들은 단독으로 또는 약제학적 제조물의 형태에 따라 조합하여 사용될 수 있다. 도출되는 제조물은, 만약 필요하다면, 하나 또는 그 이상의 가용화제(solubilizing agent), 완충제들(buffers), 방부제들(preservatives), 착색제들(colorants), 향료들(perfumes), 향신료들(flavorings) 그리고 약제학적 제조 분야에서 널리 사용되는 이와 유사한 것들을 포함할 수 있다.
- [0040] 아포리포프로테인 A-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 정제들, 캡슐들, 과립들, 환제들, 주사제들, 액제들, 유제들, 현탁제들, 그리고 시럽제들로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 제형으로 제제화될 수 있다. 약제학적 조성물의 형태 및 투여 경로는 제한되지 않으며 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 정제들, 캡슐들, 과립들, 환제들, 시럽들, 액제들, 유제들, 그리고 현탁제들은 경구로 투여될 수 있다. 부가적으로, 주사제들(예컨대 피하, 정맥 내, 근육 내, 그리고 복강 내의)은 정맥 주사로 단독으로 또는 글루코오스, 아미노산 및/또는 이와 유사한 것들을 함유하는 전통적인 보충제(replenisher)와 조합하여 투여될 수 있거나, 또는 단독으로 근육 내로, 피내로(intracutaneously), 피하로(subcutaneously) 및/또는 복강 내로 투여될 수 있다.
- [0041] T2DM을 치료하기 위한 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 수용가능한 담체를 사용하여 이 종류의 약제학적 분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들면, 경구 제형들 이라면 정제들, 캡슐들, 과립들, 환제들 그리고 이와 유사한 것들은 부형제들 이라면 사카로오스, 락토오스, 글루코오스, 전분, 만니톨 그리고 이와 유사한 것들; 바인더들 이라면 시럽, 검 아라빅(gum arabic), 솔비톨, 트라가칸트(tragacanth), 메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 그리고 이와 유사한 것들; 봉해제들 이라면 전분, 카르복시메틸셀룰로오스 또는 이의 칼슘염, 미정질 셀룰로오스, 폴리에틸렌 글리콜 그리고 이와 유사한 것들; 윤활제들 이라면 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 실리카 그리고 이와 유사한 것들; 그리고 습윤제들 이라면 소듐 라우레이트, 글리세롤 그리고 이와 유사한 것들을 사용하여 공지된 방법에 따라 제조된다.
- [0042] 주사제들, 액제들, 유제들, 현탁제들, 시럽제들 그리고 이와 유사한 것들은 적절하게는 활성 성분을 녹이기 위한 용제들, 이라면 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 새서미 오일 그리고 이와 유사한 것들; 계면 활성제들 이라면 솔비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌솔비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르, 하이드로겐화된 캐스터 오일의 폴리옥시에틸렌, 레시틴 그리고 이와 유사한 것들; 현탁화제들 이라면 카르복시메틸셀룰로오스 소듐, 메틸셀룰로오스 그리고 이와 유사한 것들을 포함하는 셀룰로오스 유도체들, 트라가칸트, 검 아라빅(gum arabic) 그리고 이와 유사한 것들을 포함하는 천연 검들; 그리고 방부제들 이라면 파라하이드록시벤조익 애시드 에스테르들, 벤잘코늄 클로라이드, 소르빅 애시드 염들 및 이와 유사한 것들을 사용하여 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0043] 당뇨병 치료를 위한 본 발명의 약제학적 조성물에 함유되는 활성 성분의 비율은 광범위한 범위로부터 적절하게 선택될 수 있다.
- [0044] 특정한 일 실시예에서, T2DM의 치료를 요하는 대상은 포유동물이다. 포유동물은 인간들, 비-인간 영장류들, 개과 동물들, 고양이과 동물들, 쥐과 동물들, 소과 동물들, 말과 동물들, 돼지류들, 그리고 토끼목 동물들(lagomorphs)로 구성된 그룹에서 선택될 수 있다. 특정한 일 실시예에서, 포유 동물은 인간이다. 다른 실시예에서, apoA-IV 또는 이의 생물학적 활성 유사체는 T2DM의 치료를 위하여 대상에게 투여될 수 있으며, 여기서 상기 대상은 비만이다. 대안적으로, apoA-IV는 비만이 아닌 대상의 T2DM의 치료를 위하여 대상에게 투여될 수 있다.
- [0045] 도 1을 참조하여, 또한 다른 실시예에서, 장치 (1)이 개시된다. 일 실시예에서, 장치 (1)은 전술한 약제학적 조성물의 저장소 (10)를 포함한다. 다른 실시예에서, 저장소 (10)는 바이알(12)을 포함한다. 바이알(12)은 약제학적 조성물의 기능을 방해하지 않는 여하한 물질로 형성될 수 있다. 예를 들면, 바이알(12)은 유리 및/또는 플라스틱을 포함할 수 있다. 부가적으로, 바이알(12)은 구멍을 낼 수 있는 격막(pierceable septum) (14)을 포함할 수 있으며 이를 통하여 약제학적 조성물이 분리될 수 있다. 사용 시에, 바이알의 격막(14)은 주사기 (20)의 바늘(22)에 의하여 천공될 수 있으며, 약제학적 조성물이 바이알(12)로부터 주사기(20)에 의하여 분리되고, 약제학적 조성물은 주사를 통하여 필요한 대상에게 투여된다.

- [0046] [실시예들]
- [0047] 이하의 비-제한적 실시예들은 본원의 개시 방법들을 상세하게 설명한다.
- [0048] **실시예 1: ApoA-IV 녹아웃 마우스들의 글루코오스 불내성(intolerance)**
- [0049] **실험 절차.** 수컷 apoA-IV 녹아웃 (이하에서 "KO"라 함) 마우스들이 입수되었다. 야생-타입 (이하에서 "WT"라 함) 마우스들은 대조군을 역할을 한다. ApoA-IV KO 그리고 WT 마우스들은 신시네티 대학(Cincinnati, OH)에 보관된 콜로니로부터 입수되었다. ApoA-IV KO 그리고 WT 마우스들은 차우 식이(chow diet)로 급식 되었다. 글루코오스 내성 테스트들을 수행하기 전에, ApoA-IV KO 마우스들 그리고 WT 마우스들은 5시간 동안 단식 되었다. 글루코오스 내성 테스트들에서, apoA-IV KO 마우스들 그리고 WT 마우스들은 복강 내로 복용량 약 2 mg/g 체중의 글루코오스가 주사되었으며 혈장 글루코오스가 글루코오스 주사 후 약 0, 15, 30, 60, 그리고 120분에 측정되었다. 글루코오스 내성 테스트들은 두 번, 3 개월령에 한번 그리고 16개월령에 다시, 수행되었다.
- [0050] **실험 결과들.** 도 2에 도시된 바와 같이, apoA-IV KO 마우스들은 WT 마우스들에 비하여 글루코오스 불내성이었다. 특히, 도 2는 글루코오스 복강 내 주사 후 2 시간 동안 WT 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들이 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들보다 낮았다는 것을 보여준다. 이론에 얽매이지 않고, 이들 연구의 의미는 apoA-IV가 정상 글루코오스 항상성(homeostasis)에 (적어도 수컷들에서) 필요하다는 것이다. 더욱이, 도 3에 도시된 바와 같이, apoA-IV KO 마우스들은 16개월령에 테스트 되었을 때 증가된 글루코오스 불내성을 입증하였다. 특히, 도 3은 16개월령에 테스트 된 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들은 3개월령에 테스트 된 apoA-IV KO에서의 혈장 글루코오스 수준들보다 높았다는 것을 보여준다. 이론에 얽매임이 없이, 이들 연구는 apoA-IV KO 마우스들의 글루코오스 내성이 연령에 따라 악화되었다는 것을 의미한다.
- [0051] **암컷 야생 타입 그리고 ApoA-IV 녹아웃 마우스들로의 실험**
- [0052] 암컷 ApoA-IV 야생 타입 그리고 녹아웃 마우스들이 전술한 실시예 1에 기재된 바와 같이, 수컷 apoA-IV KO 그리고 WT 마우스들에 사용된 것과 같은 동일한 복강 내의 글루코오스 불내성 테스트에 도입되었다. 결과들은 도 11에 도시된다. 암컷 apoA-IV^{-/-} 마우스들은, 복강 내로 글루코오스로 시험 되는 경우, 암컷 WT 동물들에 비하여 증가된 혈장 글루코오스 수준들을 가지나, 통계학적으로 현저한 차이는 없었다. 다른 한편, 수컷들은 WT 그리고 KO 동물들 사이에 현저한 차이를 갖는다.
- [0053] **실시예 2: ApoA-IV 녹아웃 마우스들에서 글루코오스 내성의 회복**
- [0054] **실험 절차.** apoA-IV KO 마우스들이 글루코오스 불내성임을 입증함에 따라, 일련의 광범위한 연구들이 apoA-IV의 apoA-IV KO 마우스들에서의 투여가 글루코오스 내성을 정상 수준으로 회복시키는지 여부를 결정하기 위하여 수행되었다. 특히, 일련의 연구들이 글루코오스 내성 테스트들 실행 전에 투여되는 apoA-IV의 용량뿐만 아니라 최적의 apoA-IV 투여 시간을 결정하기 위하여 수행되었다.
- [0055] ApoA-IV 수컷 KO 마우스들은 apoA-IV의 중량으로 약 0.25, 0.5, 1, 그리고 2 μ g/g의 복용량들로 복강 내로 주사 되었다. ApoA-IV KO 마우스들은 또한 대조군으로 사용하기 위하여 식염수가 복강 내로 주입되었다. 마우스 apoA-IV 또는 식염수로 주사 후에, 글루코오스 내성 테스트들이 전술한 바와 같이 3개월령에 수행되었다. 특히, 글루코오스 내성 테스트들이 apoA-IV 또는 식염수 주사 후 약 2시간에 수행되었다. 실험 결과들은 apoA-IV KO 마우스들에서 글루코오스 내성을 회복시키기 위한 최적의 시간은 글루코오스 내성 테스트들을 실행하기 약 2시간 전에 apoA-IV를 투여하는 것임을 지시한다.
- [0056] **실험 결과들.** 도 4에 도시된 바와 같이, apoA-IV를 apoA-IV KO 마우스들에 투여하는 것은 글루코오스 내성을 정상 수준으로 회복시켰다. 특히, 도 4는 apoA-IV가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들이 식염수가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들보다 낮았음을 나타낸다. 더욱이, 도 4에 도시된 바와 같이, apoA-IV가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들은 가장 높은 투약량의 apoA-IV가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서 가장 낮았고; 유사하게, apoA-IV가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들은 가장 낮은 투약량의 apoA-IV가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서 가장 높았다.
- [0057] 따라서, 글루코오스 내성의 개선도는 투여된 apoA-IV의 복용량에 따르며, 더욱 높은 복용량들이 개선된 글루코오스 내성을 유도한다는 것이 밝혀졌다.

- [0058] **실시예 3: ApoA-IV 녹아웃 마우스들에서의 글루코오스 내성 회복에 있어서 ApoA-IV의 특이성**
- [0059] **실험 절차.** apoA-IV의 특이성을 평가하기 위하여, 우리는 아포리포프로테인 AI (이하에서 "apoA-I"라 함)를 apoA-IV KO 마우스들에 투여하였다. ApoA-I는 apoA-IV 역시 생성하는 소장 상피 세포들(small intestinal epithelial cells)에 의하여 제조되는 단백질이다. ApoA-I는 apoA-IV의 많은 기능들을 공유한다. ApoA-IV KO 마우스들은 apoA-I의 중량으로 1 μ g/g의 복용량이 복강 내로 투여되었다. ApoA-IV KO 마우스들은 또한 대조군으로서 복강 내로 식염수가 주사되었다. apoA-I 또는 식염수로 주사 후, 글루코오스 내성 테스트들이 전술한 바와 같이 3개월령에 수행되었다. 특히, 글루코오스 내성 테스트들은 apoA-I 또는 식염수로 주사 후 약 2시간 후 실시되었다.
- [0060] **실험 결과들.** 도 5에 도시된 바와 같이, apoA-IV KO 마우스들에 apoA-I의 투여는 글루코오스 내성을 회복 또는 개선시키는데 실패하였다.
- [0061] **실시예 4: ApoA-IV 녹아웃 마우스들에서 글루코오스 내성의 회복 메커니즘**
- [0062] **실험 절차.** apoA-IV KO 마우스들에서 어떤 메커니즘으로 ApoA-IV가 글루코오스 내성을 개선하는지 평가하기 위하여, 우리는 apoA-IV KO 마우스들에서 글루코오스-유도된 인슐린 분비를 측정하였다. 보다 구체적으로, 우리는 전술한 바와 같이 3개월령에 글루코오스 내성 테스트들 동안에 글루코오스-유도된 인슐린 분비를 측정하였다. 이 연구에서 apoA-IV KO 마우스들은 글루코오스 내성 테스트들 실험 2시간 전에 마우스 apoA-IV의 중량으로 약 1 μ g/g의 복용량이 복강 내로 주사되었다. ApoA-IV KO 마우스들은 대조군으로 사용하기 위하여 글루코오스 내성 테스트들 실험 약 2시간 전에 식염수로 주사되었다.
- [0063] **실험 결과들.** 도 6에 도시된 바와 같이, 식염수가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서는 단계(phase) I 인슐린 분비가 없었다. 그러나 도 6에 도시된 바와 같이, 단계 I 인슐린 분비는 apoA-IV가 글루코오스 내성 테스트들 수행 2시간 전에 복강 내로 투여된 경우 apoA-IV KO 마우스들에서 회복되었다.
- [0064] **실시예 5: 고 지방 식이의 ApoA-IV 녹아웃 그리고 야생-타입 마우스들에서 ApoA-IV 효능**
- [0065] **실험 절차.** ApoA-IV KO 그리고 WT 마우스들은 10주 동안 Dyets사(社) (Bethlehem, PA)로부터 구입한 고-지방 반-정제된, 영양상으로 완전한 실험용 식이(AIN-93M)로 만성적으로 급식 되었다. 상기 고-지방 식이는 식이 100g당 약 20g의 지방 (즉 약 19g의 버터 지방 및 필수 지방산을 공급하기 위한 1g의 소이빈 오일)을 함유한다. apoA-IV KO 그리고 WT 마우스들은 온도- (약 22 \pm 1 $^{\circ}$ C) 그리고 빛- (약 12 h 광/12 암)으로 조절된 사육장에서 옥수수 속대의 베딩이 있는 개별 통 우리에 거주 되었다. 글루코오스 내성 테스트들이 전술한 바와 같이 3개월령에 수행되었다. 글루코오스 내성 테스트들 수행 전에, apoA-IV KO 마우스들 그리고 WT 마우스들은 5시간 동안 단식처리되었다. 글루코오스 내성 테스트들에서, apoA-IV KO 마우스들 그리고 WT 마우스들은 글루코오스 약 2 mg/g 체중의 복용량으로 복강 내로 주사되었다.
- [0066] **실험 결과들.** 도 7에 도시된 바와 같이, apoA-IV KO 마우스들은 WT 마우스들에 비하여 보다 큰 글루코오스 불내성을 나타내었다. 특히, 도 7은 글루코오스로 복강 내 주사 2시간 후 WT 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들이 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들보다 낮았음을 보여준다.
- [0067] **실시예 6: 고 지방 식이의 ApoA-IV 녹아웃 그리고 야생-타입 마우스들에서의 글루코오스 내성의 회복**
- [0068] **실험 절차.** 3개월령에 14주 동안 고-지방 식이 (중량으로 20%의 지방, 19%의 버터 지방 및 1%의 홍화 오일)를 한 apoA-IV KO 그리고 WT 마우스들에 apoA-IV를 투여하는 것과 관련된 일련의 연구들이 수행되었다. 특히, apoA-IV KO 그리고 WT 마우스들은 마우스 apoA-IV의 약 1 μ g/g 체중의 복용량으로 복강 내로 주사되었다. ApoA-IV KO 그리고 WT 마우스들은 또한 대조군으로 사용하기 위하여 식염수로 복강 내 주사되었다. apoA-IV 또는 식염수로 주사 후, 글루코오스 내성 테스트들이 실행되었다. 특히, 글루코오스 내성 테스트들은 apoA-IV 또는 식염수 주사 2시간 후에 실행되었다.
- [0069] **실험 결과들.** 도 8에 도시된 바와 같이, apoA-IV KO 마우스들에서 apoA-IV의 투여는 현저하게 글루코오스 내성을 개선하였다. 특히, 도 8은 apoA-IV가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서 혈장 글루코오스 수준들이 식염수가 주사된 apoA-IV KO 마우스들에서의 혈장 글루코오스 수준들보다 낮았음을 보여준다. [위의 문장은 반복되는데, 이는 다음 문장이 동일한 것을 설명하기 때문이다. 비록 데이터는 본원에 포함되지 않았지만, 만성적 고 지방 식이로 급식 된 WT 마우스들에서 apoA-IV의 투여 또한 현저하게 글루코오스 내성을 개선하였음 역시 발견되었다.

[0070] **실시예 7: T2DM을 갖는 마우스들에서 글루코오스 내성의 회복**

[0071] **실험 절차.** apoA-IV가 T2DM이 있는 동물들에서 글루코오스 내성을 증진시키는데 효과적임을 확인하기 위하여, 이형접합(heterozygous) KK Cg-A/J (이하에서 "Cg-A/J"라 함) 마우스들이 Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine)로부터 입수되었다. Cg-A/J 마우스들은 8주령까지 고혈당증, 고인슐린혈증, 비만, 그리고 글루코오스 불내성을 발생한다. 이들 마우스들에서 당뇨병의 주요 원인은, 펠라노코르틴-IV 수용체의 길항제 그리고 아구티(agouti) 관련 단백질을 암호화하는 A^y 돌연변이와의 다인자 유전자 상호작용들(polygenic interactions)에 의하여 생성된 인슐린 저항성이다. Cg-A/J 마우스들은 차우 식이로 급식 되었다. 부가적으로, 차우 급식 10 내지 14주로부터 혈중 글루코오스에 두드러진 증가가 있었다.

[0072] 14주령에, Cg-A/J 마우스들은 마우스 apoA-IV (약 $1\mu\text{g/g}$ 체중) 또는 식염수 (대조군으로서 사용하기 위하여) 어느 한쪽이 복강 내 주사로 투여되었다. 혈장 글루코오스가 이 후 약 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 그리고 24시간에 측정되었다.

[0073] **실험 결과들.** 도 9에 도시된 바와 같이, apoA-IV는 식염수 대조군에 비하여 Cg-A/J 마우스들의 혈당 수준을 두드러지게 저하시키는 효과를 갖는다. 식염수로 주사한 Cg-A/J 마우스들이 연구 24 시간 내내 안정된 혈장 글루코오스 수준을 유지한 반면, apoA-IV가 주사된 Cg-A/J 마우스들은 10시간 이상 동안 혈장 글루코오스 감소를 경험하였으며, 그리고 이 기간의 대부분 동안에, 혈장 글루코오스 수준은 우리가 연구해온 C57BL/6J 동물들에 상당하였다. 이 연구로부터 우리는 apoA-IV의 투여가 Cg-A/J 마우스들에서 혈장 글루코오스 저하에 효과적임을 결론지었다.

[0074] **실시예 8: ApoA-IV KO, ApoA-I KO, 그리고 WT 마우스들에서 혈청 아밀로이드 P 성분의 수준**

[0075] **실험 절차.** 동맥경화발생(atherogenic) 식이의 apoA-IV KO, apoA-I KO, 그리고 WT 마우스들에서 혈청 아밀로이드 A 단백질 성분 (이하에서 "SAP"라 함)의 수준을 측정하는 것과 관련된 일련의 연구들이 수행되었다. apoA-IV KO, apoA-I KO, 그리고 WT 마우스들은 신시내티 대학으로부터 입수하였다. SAP는, 아밀로이드라 불리는 생체 내 병리학적 축적(pathological deposits)의 오변형의 성분(pentagonal constituent)으로서 최초로 확인된 25 kDa 펜타머 (pentameric) 단백질인, 아밀로이드 P 성분 (이하에서 "AP"이라 함)의 혈청 형태이다. SAP는 인간에서 C-반응성 단백질처럼 거동한다. 특히, apoA-IV KO, apoA-I KO, 그리고 WT 마우스들에서 혈장 SAP의 수준이 동맥경화발생 식이 12주 후의 apoA-IV KO, apoA-I KO, 그리고 WT 마우스들에서 측정되었다. 혈장 SAP의 수준은 웨스턴 블랏 분석법을 통하여 측정되었다.

[0076] **실험 결과들.** 도 10에 도시된 바와 같이, apoA-IV KO 마우스들에서 (마우스 번호 1, 8, 그리고 10에 대응됨) SAP의 수준은 apoA-I KO 마우스들 (마우스 번호 28, 29, 그리고 30에 대응됨) 그리고 WT 마우스들 (마우스 번호 19, 20, 그리고 25에 대응됨)에서의 SAP의 수준에 비하여 증가되었다.

[0077] 본원의 개시 사항을 설명하고 정의하기 위한 목적에 있어서, "약" 그리고 "실질적으로"라는 용어들은 본원에서 여하한 양적 비교, 값, 치수, 또는 다른 표시에 대한 속성일 수 있는 고유의 불확실성의 정도를 표시하기 위하여 사용된다는 것에 유의하여야 한다. "약" 그리고 "실질적으로"라는 용어들은 또한 본원에서 이에 의하여 정량적 표시가 기술된 언급으로부터 문제가 된 대상물의 기본적 기능에 변화를 초래함이 없이 다양화될 수 있는 정도를 표현하기 위하여 사용된다.

[0078] 상기의 상세한 설명 및 도면들은 단지 본원의 개시 사항들의 특징들 및 장점들을 달성하는 예시적 실시예들의 상세한 설명을 위한 것으로 간주되어야 한다. 설명된 특징들 및 단계들의 변경 및 치환들이 본원 발명의 개시의 의도 및 범위로부터 벗어남이 없이 이루어질 수 있다. 따라서, 개시 사항이 전술한 설명 및 도면들에 의하여 제한되는 것으로 간주하여서는 안 되며, 다만 첨부된 청구항들의 범위에 의해서만 제한된다.

[0079] **실시예 8: 인간 ApoA-IV는 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 거치는 야생-타입 마우스들에서 혈중 글루코오스 수준들을 낮춘다.**

[0080] **실험 절차.** 야생 타입 마우스들에 인간 apoA-IV의 투여가 글루코오스 내성 테스트를 거치는 마우스들에서 혈중 글루코오스 수준들에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위한 연구들이 수행되었다.

[0081] 3개월령 야생 타입 마우스들이 인간 apoA-IV의 중량으로 약 $1\mu\text{g/g}$ 의 복용량들로 복강 내로 주사되었다. 대조군으로서, 다른 그룹의 야생 타입 마우스들이 식염수로 복강 내로 주사되었다. 인간 apoA-IV 또는 식염수 주사 후, 글루코오스 내성 테스트들이 실행되었다. 구체적으로, 글루코오스 내성 테스트들은 apoA-IV 또는 식염수 주사 약 2시간 후 그리고 단식 5시간 후 실행되었다. 꼬리 혈액이 수집되었으며 혈당측정기(glucometer)로 측

정되었다.

[0082] 실험 결과들. 도 12에 도시된 바와 같이, 인간 apoA-IV는 글루코오스 내성 테스트를 거치는 야생 타입 마우스들에서 혈중 글루코오스에 효과적이었다.

[0083] 실시예 9 복강 내의 글루코오스 내성 테스트를 거치는 야생-타입 암컷 마우스들에서의 마우스 ApoA-IV의 효과

[0084] 실험 절차. 글루코오스 내성 테스트를 거치는 마우스들에서 암컷 야생 타입 마우스들에 마우스 apoA-IV의 투여가 혈중 글루코오스 수준들에 효과를 미치는지 여부를 결정하기 위한 연구들이 수행되었다.

[0085] 3개월령 암컷 야생 타입 마우스들이 마우스 apoA-IV의 중량으로 약 1 μ g/g의 복용량들로 복강 내로 주사되었다. 대조군으로서, 다른 그룹의 암컷 야생 타입 마우스들이 복강 내로 식염수로 주사되었다. 인간 apoA-IV 또는 식염수로 주사 후, 글루코오스 내성 테스트들이 실행되었다. 특히, 글루코오스 내성 테스트들이 apoA-IV 또는 식염수 주사 약 2시간 후 그리고 단식 5시간 후에 실행되었다. 꼬리 혈액이 수집되었고 혈당 측정기로 측정되었다.

[0086] 실험 결과들. 도 13에 도시된 바와 같이, 마우스 apoA-IV는 글루코오스 내성 테스트를 거치는 야생 타입 암컷 마우스들에서 혈중 글루코오스를 저하시키는데 효과적이었다.

[0087] 실시예 10 인간 ApoA-IV는 인간 섬들(Islets)에서 인슐린 방출을 자극한다.

[0088] 고 순도 인간 섬들은 버지니아 대학, Axon Cells에서 제공받았었다. 섬들은 48시간 동안 95% 공기 및 5% CO₂의 습윤 대기에서 37°C에서 10% FBS 그리고 11mM 글루코오스를 함유하는 RPMI 1640에서 배양되었다. 네 그룹들의 50 IEQ 섬들이 이 후 3.0mM 글루코오스를 함유하는 정규(regular) KRB (129mM NaCl, 4.8mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 1.2mM KH₂PO₄, 5mM NaHCO₃, 10mM HEPES 그리고 0.2% BSA)에서 37°C에서 1시간 동안 예비 배양되었다. 첫 2 그룹들의 섬들은 이 후 10 μ g/ml 인간 A-IV의 존재 또는 부재 하에 한 시간 동안 3.0mM 글루코오스를 함유하는 정규 KRB에서 배양되었으며 그리고 10 μ g/ml 인간 A-IV의 존재 또는 부재 하에 부가적 한 시간 동안 20mM 글루코오스로 더욱 배양되었다. 마지막 2 그룹들의 섬들은 10 μ g/ml 인간 A-IV의 존재 또는 부재 하에 한 시간 동안 3.0mM 글루코오스를 함유하는 30mM KCl KRB (103.8mM NaCl, 30mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 1.2mM KH₂PO₄, 5mM NaHCO₃, 10mM HEPES 그리고 0.2% BSA) 플러스 250 μ mol/l 디아옥사이드에서 배양되었으며 그리고 10 μ g/ml 인간 A-IV의 존재 또는 부재 하에 부가적 한 시간 동안 20mM 글루코오스로 더욱 배양되었다. 배지들이 각각의 한-시간 배양 끝에 수집되었다. 인슐린 수준들이 ELISA 키트(Millipore)로 측정되었다.

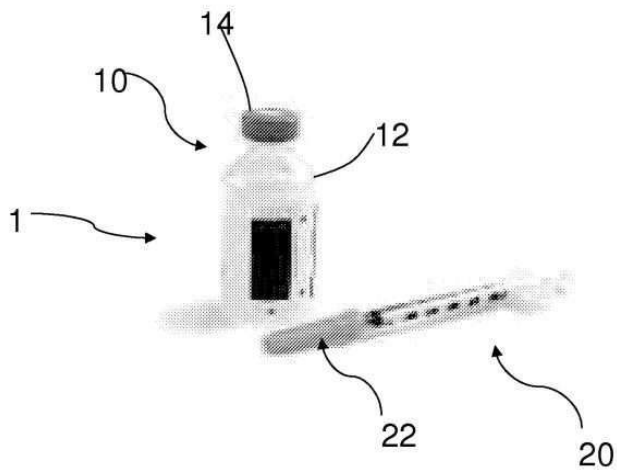
[0089] 도 14에서 볼 수 있는 바와 같이, 인간 섬들이 30mM KCl 플러스 250 μ M 디아옥사이드, 10 μ g/ml hA-IV에 의하여 최대한으로 비극화된 경우 인슐린 분비에 현저한 촉진 효과를 나타내었다.

[0090] 실시예 11 글리코실화되지 않은 ApoA-IV의 제조

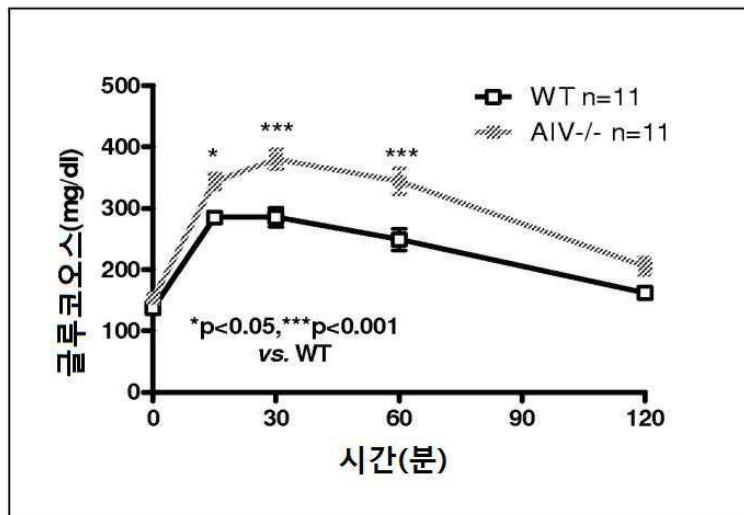
[0091] 인간 그리고 마우스 apoA-IV cDNA가 pSP65 유지 벡터(maintenance vector)에 수용되었으며, 그리고 *Afl* III 제한 부위가 성숙 apoA-IV 단백질을 위한 코딩 서열의 5'에서 조작되었다. 유전자가 유지 벡터로부터 절단되었으며 pET30 발현 벡터 내로 결합되었다. 이 구조체는 *E. Coli* BL-21 (DE3) 세포들로 형질감염되었으며 37°C에서 카나마이신 (30 μ g/ml)으로 보충된 Luria-Bertani 배양물에서 성장되었다. 세포들에서 apoA-IV 단백질 합성의 유도 후, 세포들이 수확되었으며 초음파분해되었다. 용해물로부터의 ApoA-IV 단백질이 His-결합 친화성 칼럼 크로마토그래피 그리고 투석으로 정제되었다. 결과물인 apoA-IV 단백질은 식염수 내의 최종 농도 1.0mg/ml로 희석되었다.

도면

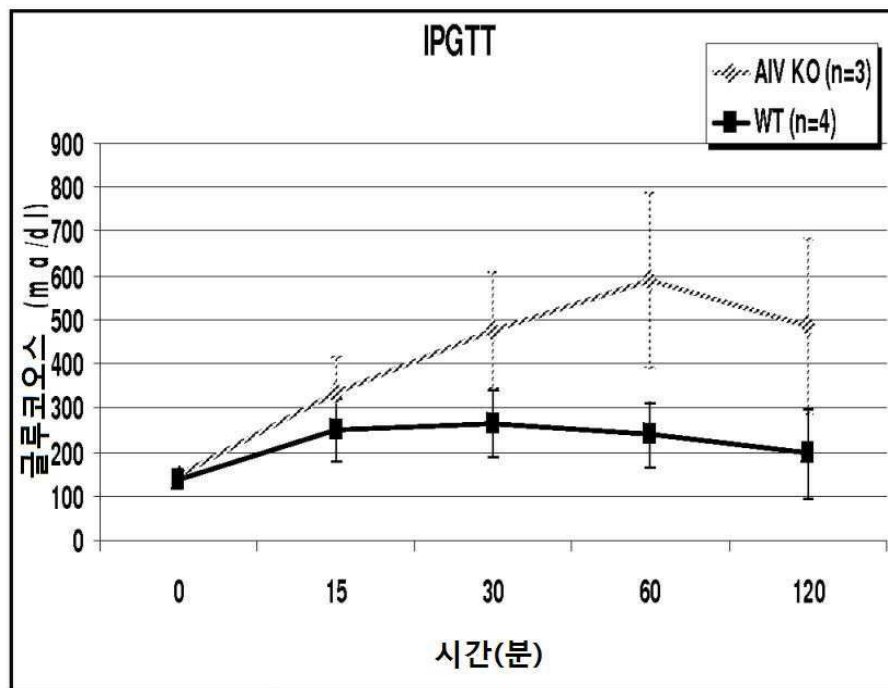
도면1



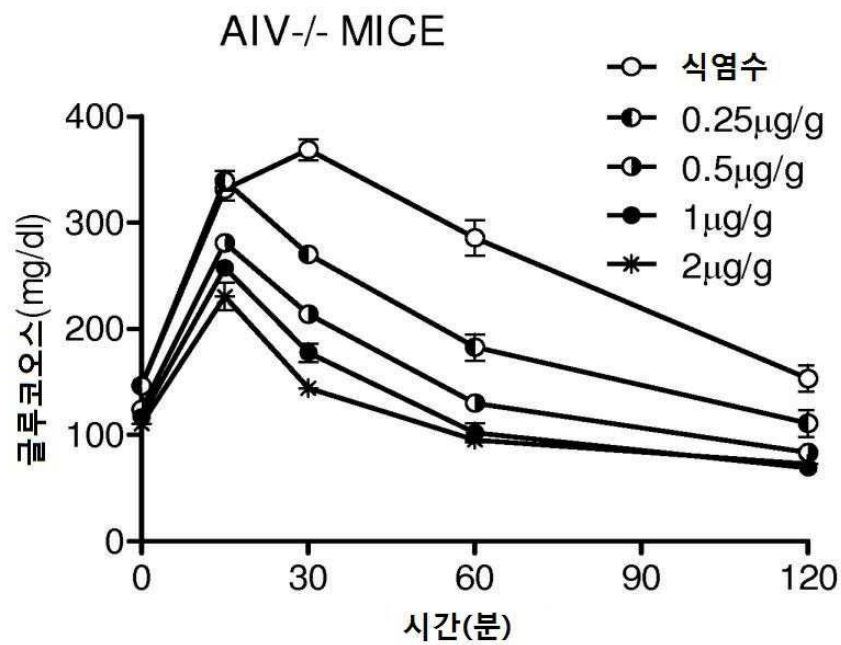
도면2



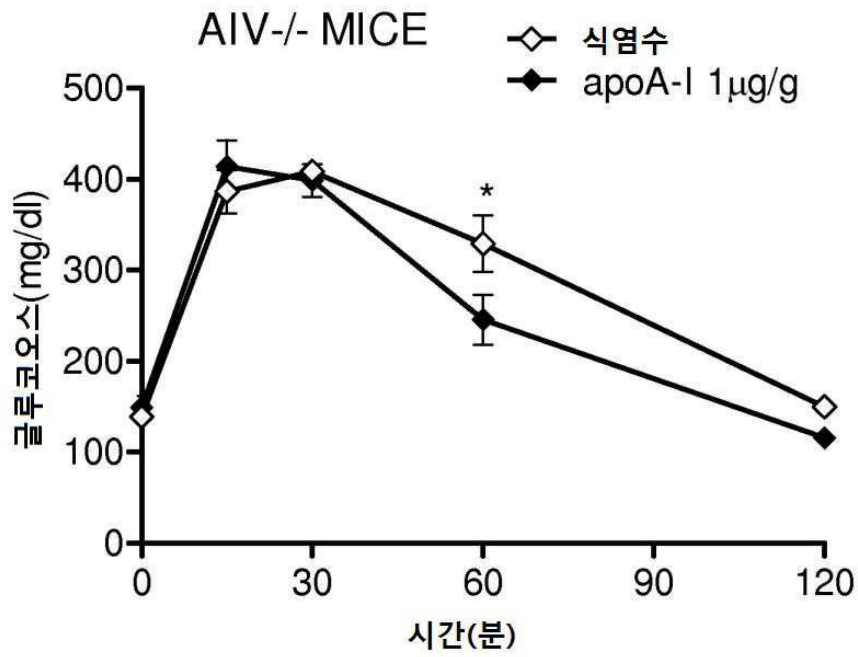
도면3



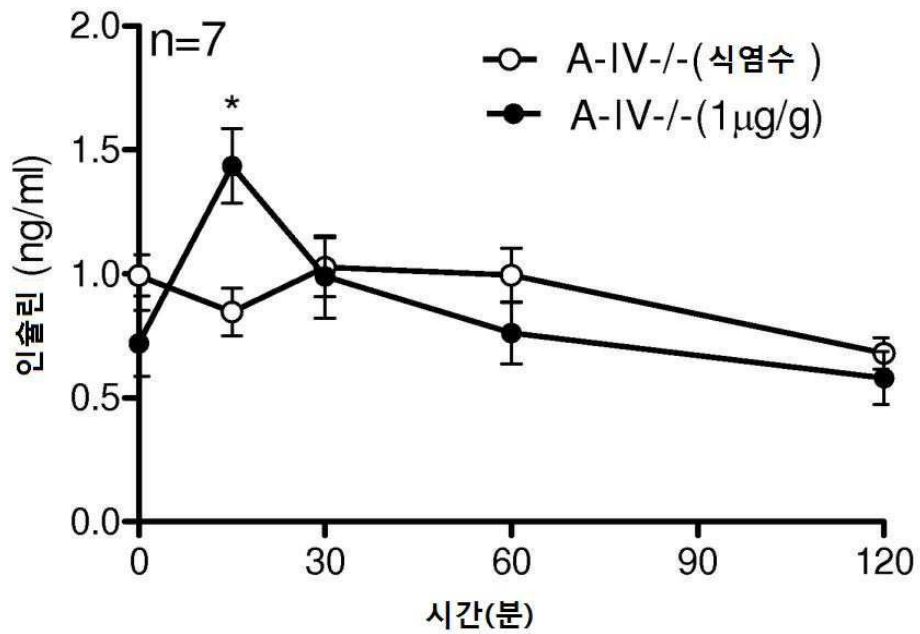
도면4



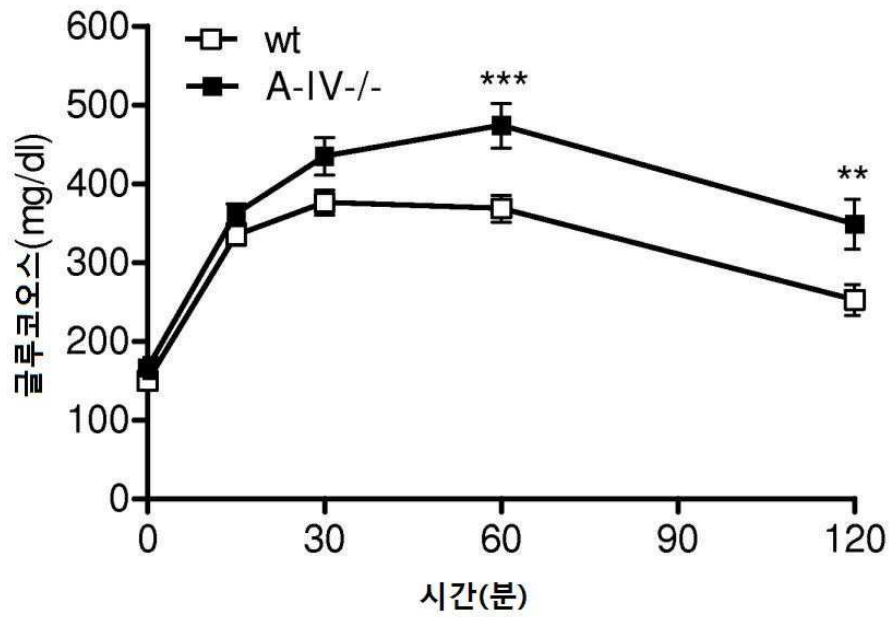
도면5



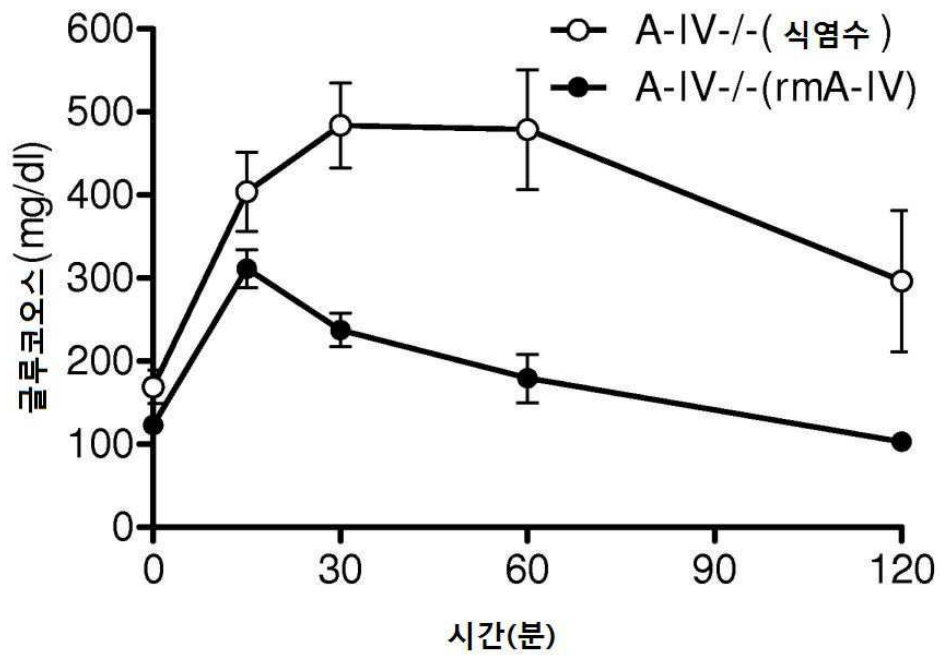
도면6



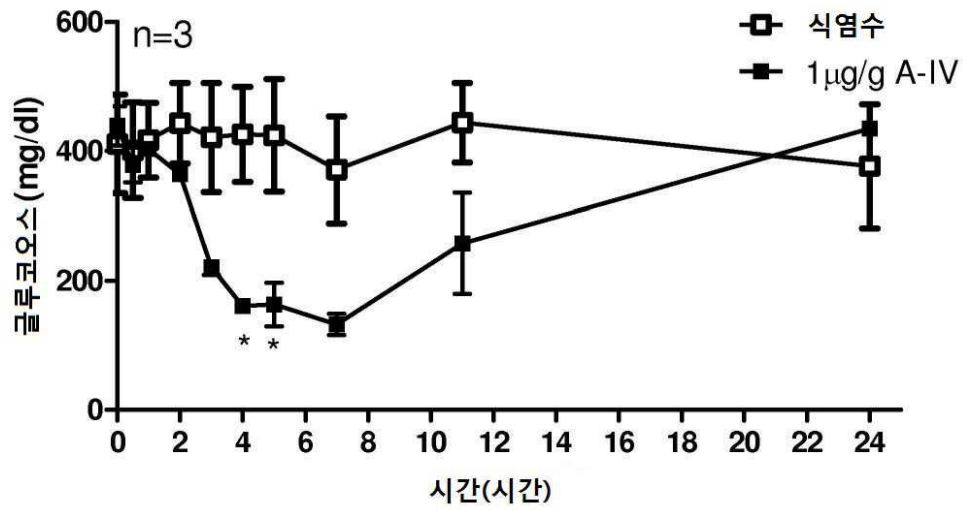
도면7



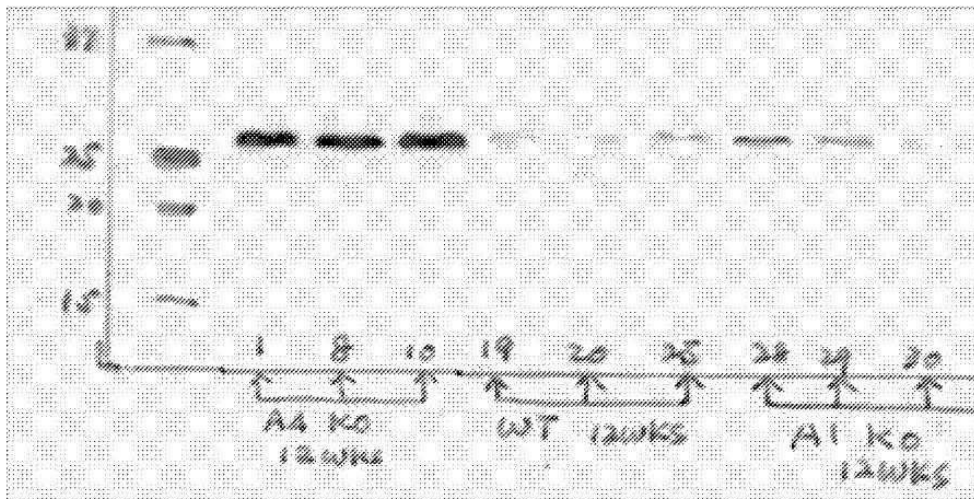
도면8



도면9

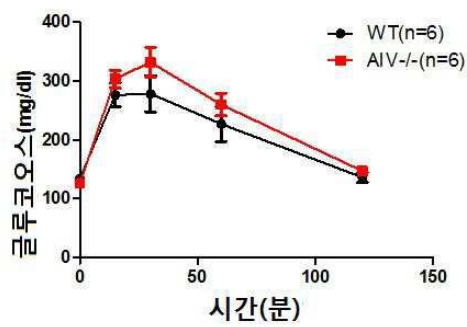


도면10

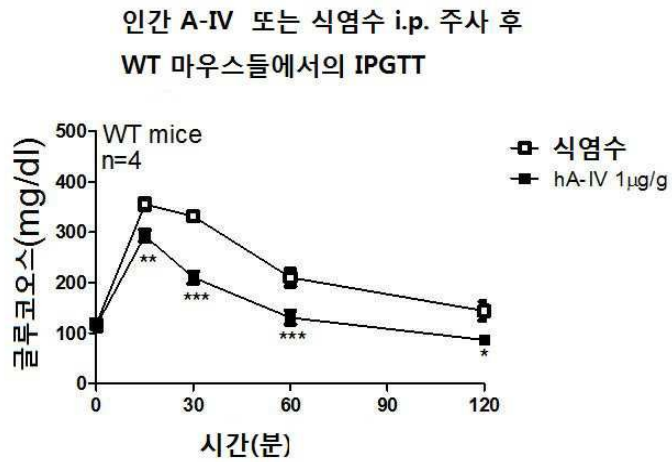


도면11

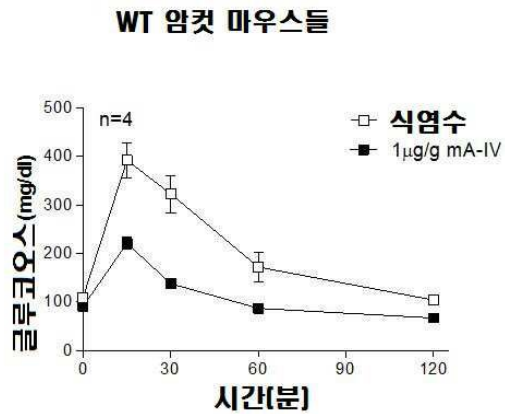
암컷 WT 그리고 AIV-KO 마우스들에서의 IPGTT



도면12

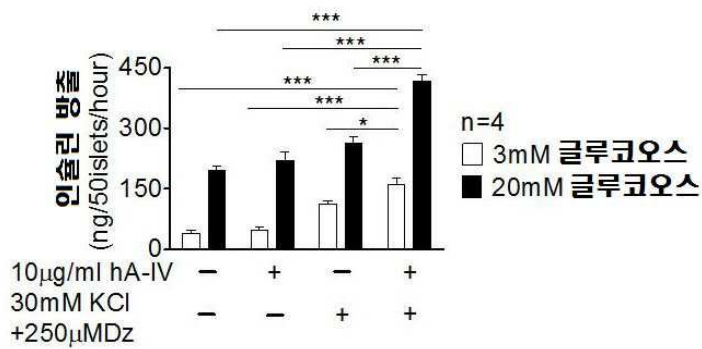


도면13



도면14

인간 A-IV로 처리된 인간 섬(islets)



인간 섬이 30mM KCl 플러스 250 µM Dz에 의하여 비극화된 경우,
10µg/ml hA-IV 는 인슐린 분비에 현저한 자극 효과를 나타내었다.

도면15

EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVFPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGD
NLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQAS
LRPHADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQE
KLNHQLEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGL
QKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDV
EGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQEQV
QMLAPLES.

서열 번호. 1.

도면16

EVTSDQVANVWVDYFTQLSNNAKEAVEQFQKTDVQQLST
LFASTYADGVHNKLVPFVQVLSGHLAQETERVKEEIKKEL
EDLRDRKTQTFGENMQKLQEHLKPYAVDLQDQINTQTQE
MKLQLTPYIQRMQTTIKENVNLTSMPLATNLKDKFN
RNMEELKGHLTPRANELKATIDQNLEDLRRSLAPLTVGVQ
EKLNHQMEGLAFQMKKNAEELQTKVSAKIDQLQKNLAPL
VEDVQSKVKGNTEGLQKSLEDLNRQLEQQVEEFRRRTVEP
MGEMFNKALVQQLEQFRQQLGPNSGEVESHLFLEKSLRE
KVNSFMSTLEKKGSPDQPQALPLPEQAQEQQAQEQVQ
PKPLES.

서열번호 2.

도면17

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTTQQLNALFQDKL
GEVNTYAGDLQKKLVFPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV
SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENA
DSLQASLRPHADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPY
AQDTQEKLNHQLEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLR
GNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGP
HAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQE
QQQEQQVQMLAPLES.

서열 번호 3.

도면18

X₁EV SADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKL
GEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV
SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENA
DSLQASLRPHADX₂LKAKIDQNVEELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAP
YAQDTQEKLNHQLEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNL
RGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKL
GPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX₃LSLPELEQQQE QX₃
QEQQQEQVQMLAPLES.

X₁ 는 G, A, V 또는 없음.

X₂ 는 E 또는 K.

X₃ 는 T 또는 S.

X₄ 는 Q 또는 H.

서열 번호 4.

도면19

GTCAGTGCTGACCAGGTGGCCACAGTGATGTGGGACTACTTCAGCC
AGCTGAGCAACAATGCCAAGGAGGCCGTGGAACATCTCCAGAAATCTGAA
CTCACCCAGCAACTCAATGCCCTCTTCCAGGACAACTTGGAGAAGTGAAC
ACTTACGCAGGTGACCTGCAGAAGAAGCTGGTGCCCTTTGCCACCGAGCT
GCATGAACGCCTGGCCAAGGACTCGGAGAACTGAAGGAGGAGATTGGGA
AGGAGCTGGAGGAGCTGAGGGCCCGGCTGCTGCCCATGCCAATGAGGT
GAGCCAGAAGATCGGGGACAACCTGCGAGAGCTTCAGCAGCGCCTGGAG
CCCTACGCGGACCAGCTGCGCACCCAGGTCAACACGCAGGCCGAGCAGC
TGCGGCGCCAGCTGACCCCTACGCACAGCGCATGGAGAGAGTGCTGCG
GGAGAACGCCGACAGCCTGCAGGCCTCGCTGAGGCCCCACGCCGACGAG
CTCAAGGCCAAGATCGACCAGAACGTGGAGGAGCTCAAGGGACGCCTTAC
GCCCTACGCTGACGAATTCAAAGTCAAGATTGACCAGACCGTGGAGGAGC
TGCGCCGCAGCCTGGCTCCCTATGCTCAGGACACGCAGGAGAAGCTCAAC
CACCAGCTTGAGGGCCTGACCTTCCAGATGAAGAAGAACGCCGAGGAGCT
CAAGGCCAGGATCTCGGCCAGTGCCGAGGAGCTGCGGCAGAGGCTGGCG
CCCTTGGCCGAGGACGTGCGTGGAACCTGAGGGGCAACACCGAGGGGC
TGCAGAAGTCACTGGCAGAGCTGGGTGGGCACCTGGACCAGCAGGTGGA
GGAGTTCCGACGCCGGGTGGAGCCCTACGGGGAAACTTCAACAAAGCCC
TGGTGACGAGATGGAACAGCTCAGGCAGAACTGGGCCCCCATGCGGG
GGACGTGGAAGGCCACCTGAGCTTCTGGAGAAGGACCTGAGGGACAAG
GTCAACTCCTTCTTCAGCACCTTCAAGGAGAAAGAGAGCCAGGACAAGACT
CTCTCCCTCCCTGAGCTCGAGCAACAGCAGGAACAGCAGCAGGAGCAGCA
GCAGGAGCAGGTGCAGATGCTGGCCCCTTTGGAGAGC.

서열 번호 5.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF CINCINNATI

TSO, Patrick

DAVIDSON, Sean

WOODS, Stephen

Wang , Fei

<120> APOLIPOPROTEIN AIV AS AN ANTIDIABETIC PEPTIDE

<130> 120946-00120

<140> PCT/US2012/021802

<141> 2012-01-19

<150> 61/434196

<151> 2011-01-19

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 376

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe Ser

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

65	70	75	80												
Glu	Ile	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Pro	His
	85	90	95												
Ala	Asn	Glu	Val	Ser	Gln	Lys	Ile	Gly	Asp	Asn	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln
	100	105	110												

Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn Thr
115 120 125
Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg Met
130 135 140
Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu Arg
145 150 155 160
Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu Glu
165 170 175
Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys Ile
180 185 190
Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala Gln
195 200 205
Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe Gln
210 215 220
Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ala
225 230 235 240
Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg Gly
245 250 255
Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Ala Glu Leu
260 265 270
Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val Glu
275 280 285
Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu Gln
290 295 300
Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His Leu
305 310 315 320
Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn Ser Phe Phe Ser
325 330 335
Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu Ser Leu Pro Glu
340 345 350
Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Val

355 360 365
 Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser
 370 375
 <210> 2
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Glu Val Thr Ser Asp Gln Val Ala Asn Val Val Trp Asp Tyr Phe Thr

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

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

 130 135 140
 Met Met Pro Leu Ala Thr Asn Leu Lys Asp Lys Phe Asn Arg Asn Met
 145 150 155 160
 Glu Glu Leu Lys Gly His Leu Thr Pro Arg Ala Asn Glu Leu Lys Ala
 165 170 175
 Thr Ile Asp Gln Asn Leu Glu Asp Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Leu
 180 185 190

Thr Val Gly Val Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Met Glu Gly Leu Ala

195 200 205

Phe Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Gln Thr Lys Val Ser Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Leu Asn Arg Gln Leu Glu Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Thr

260 265 270

Val Glu Pro Met Gly Glu Met Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Leu

275 280 285

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

290 295 300

His Leu Ser Phe Leu Glu Lys Ser Leu Arg Glu Lys Val Asn Ser Phe

305 310 315 320

Met Ser Thr Leu Glu Lys Lys Gly Ser Pro Asp Gln Pro Gln Ala Leu

325 330 335

Pro Leu Pro Glu Gln Ala Gln Glu Gln Ala Gln Glu Gln Ala Gln Glu

340 345 350

Gln Val Gln Pro Lys Pro Leu Glu Ser

355 360

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 3

Gly Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe

1 5 10 15

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His Leu Gln Lys

20	25	30
Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp Lys Leu Gly		
35	40	45
Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu Val Pro Phe		
50	55	60
Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu Lys Leu Lys		
65	70	75
		80
Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Leu Pro		
85	90	95
His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu Arg Glu Leu		
100	105	110
Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn		
115	120	125
Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg		
130	135	140
Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu		
145	150	155
Arg Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu		
165	170	175
Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys		
180	185	190
Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala		
195	200	205
Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe		
210	215	220
Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser		
225	230	235
Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg		
245	250	255
Gly Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Ala Glu		
260	265	270

Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val
 275 280 285
 Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu
 290 295 300
 Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His
 305 310 315 320
 Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn Ser Phe Phe
 325 330 335

 Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu Ser Leu Pro
 340 345 350
 Glu Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Glu Gln
 355 360 365
 Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser
 370 375

 <210> 4
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> X is G, A, V or absent
 <220><221> VARIANT
 <222> (166)..(166)

 <223> X is E or K
 <220><221> VARIANT
 <222> (348)..(348)
 <223> X is T or S
 <220><221> VARIANT
 <222> (361)..(361)
 <223> X is Q or H
 <400> 4
 Xaa Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe
 1 5 10 15

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His Leu Gln Lys
20 25 30

Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp Lys Leu Gly
35 40 45

Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu Val Pro Phe
50 55 60

Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu Lys Leu Lys
65 70 75 80

Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Leu Pro
85 90 95

His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu Arg Glu Leu
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn
115 120 125

Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg
130 135 140

Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu
145 150 155 160

Arg Pro His Ala Asp Xaa Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu
165 170 175

Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys
180 185 190

Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala
195 200 205

Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe
210 215 220

Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser
225 230 235 240

Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg
245 250 255

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

260 265 270
 Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val
 275 280 285
 Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu
 290 295 300

Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His
 305 310 315 320
 Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn Ser Phe Phe
 325 330 335
 Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Xaa Leu Ser Leu Pro
 340 345 350
 Glu Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Xaa Gln Glu Gln Gln Glu Gln
 355 360 365

Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser
 370 375

<210> 5

<211> 1125

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gtcagtgtg accaggtggc cacagtgtg tgggactact tcagccagct gagcaacaat	60
gccaaaggagg ccgtggaaca tctccagaaa tctgaactca cccagcaact caatgccctc	120
ttccaggaca aacttgaga agtgaacact tacgcaggtg acctgcagaa gaagctggtg	180
ccctttgcc cagagctgca tgaacgcctg gccaaaggact cggagaaaact gaaggaggag	240
attgggaagg agctggagga gctgagggcc cggtgtgtgc cccatgcaa tgaggtgagc	300
cagaagatcg gggacaacct gcgagagctt cagcagcgcc tggagcccta cgcggaccag	360
ctgcgcaccc aggtcaaac gcagcccgag cagctgcggc gccagctgac cccctacgca	420
cagcgcatgg agagagtgt gctgggagaac gccgacagcc tgcaggcctc gctgaggccc	480
cacgccgacg agctcaaggc caagatcgac cagaacgtgg aggagctcaa gggacgcctt	540
acgcctacg ctgacgaatt caaagtcaag attgaccaga ccgtggagga gctgcgccgc	600
agcctggctc cctatgtca ggacacgcag gagaagctca accaccagct tgagggcctg	660

accttccaga tgaagaagaa cgccgaggag ctcaaggcca ggatctcggc cagtgccgag	720
gagctgcggc agaggctggc gcccttggcc gaggacgtgc gtggcaacct gaggggcaac	780
accgaggggc tgcagaagtc actggcagag ctgggtgggc acctggacca gcaggtggag	840
gagttccgac gccgggtgga gccctacggg gaaaacttca acaaagccct ggtgcagcag	900
atggaacagc tcaggcagaa actgggcccc catgcggggg acgtggaagg ccacctgagc	960
ttcctggaga aggacctgag ggacaaggtc aactccttct tcagcacctt caaggagaaa	1020
gagagccagg acaagactct ctccctccct gagctcgagc aacagcagga acagcagcag	1080
gagcagcagc aggagcaggt gcagatgctg gcccttttgg agagc	1125